

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-170323

(P2004-170323A)

(43) 公開日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/519	A 6 1 K 31/519	4 C O 5 O
A 6 1 K 31/55	A 6 1 K 31/55	4 C O 8 6
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 17/04	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 Z	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-338738 (P2002-338738)	(71) 出願人	000183370 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(22) 出願日	平成14年11月22日 (2002.11.22)	(74) 代理人	100121588 弁理士 五十部 穰
		(72) 発明者	井上 忠弘 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内
		(72) 発明者	中川 麻恵 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
		Fターム(参考)	2G045 AA29 AA40 BB20 CB09 CB17 DB07 FB01 FB08 4C050 AA01 BB05 CC08 EE03 FF05 GG01 HH04
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 痒み症状を伴う皮膚疾患治療剤をスクリーニングする方法、及び該疾患治療剤を提供する。

【解決手段】 以下の工程(1)及び(2)：

(1) 被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程、

(2) (1)の結果に基づいて、PAR2阻害活性を有する被験物質を皮膚疾患治療剤の有効成分として選別する工程、

を含む、痒み症状を伴う皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、及びPAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、痒みを伴う皮膚疾患治療剤。

【選択図】 なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程 (1) 及び (2) :

- (1) 被験物質の P A R 2 阻害活性を評価する工程、
 (2) (1) の結果に基づいて、P A R 2 阻害活性を有する被験物質を皮膚疾患治療剤の有効成分として選別する工程、
 を含む、皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 2】

- (1) の工程が、下記の工程 (a) ~ (d) :
 (a) 被験物質と P A R 2 を発現可能な細胞とを接触させる工程、
 (b) (a) における P A R 2 の発現量を測定する工程、
 (c) (b) の値を、被験物質を接触させない対照における P A R 2 の発現量と比較する工程、
 (d) (c) の結果に基づいて、被験物質の P A R 2 阻害活性を評価する工程
 を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 3】

- (1) の工程が、下記の工程 (a) ~ (d) :
 (a) 被験物質と、P A R 2 及び P A R 2 活性化因子を含む細胞、または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、
 (b) (a) における P A R 2 由来の機能を測定する工程、
 (c) (b) の値を、被験物質を接触させない対照における P A R 2 由来の機能と比較する工程、
 (d) (c) の結果に基づいて、被験物質の P A R 2 阻害活性を評価する工程、
 を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 4】

皮膚疾患が、痒みを伴う疾患であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

皮膚疾患治療剤が、痒み症状を改善することを特徴とする治療剤である、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載のスクリーニング方法。

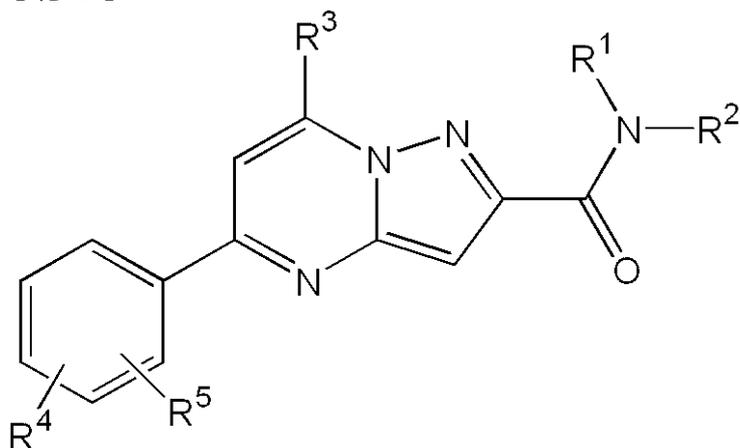
【請求項 6】

P A R 2 阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、皮膚疾患治療剤。

【請求項 7】

P A R 2 阻害活性を有する化合物が、一般式 (1) :

【化 1】



(式中、 R^1 および R^2 は、独立して、水素原子、又はアルキル基 (該アルキル基は、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよい。) を表すか、あるいは、 R^1 と R^2)

² は隣接する窒素原子とともに結合して、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基で置換されていてもよい1～2個の窒素原子、0～1個の酸素原子、および0～1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、

R³ は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、または置換もしくは無置換のアリール基を表し、

R⁴ および R⁵ は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、メチレンジオキシ基、またはハロアルキル基を表す。))

で表される化合物、又はその薬学上許容される塩である、請求項6記載の治療剤。

10

【請求項8】

皮膚疾患が、痒みを伴う疾患であることを特徴とする、請求項6又は7記載の治療剤。

【請求項9】

皮膚疾患治療剤が、痒み症状を改善することを特徴とする治療剤である、請求項6～8のいずれか記載の治療剤。

【請求項10】

PAR2またはPAR2活性化因子を有効成分として含有する、痒み症状を改善する薬剤を評価するための動物モデルにおける痒み惹起用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、詳しくは、痒みを抑制する皮膚疾患治療剤及びそのスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

プロテアーゼ受容体PAR (proteinase-activated receptor) はGタンパク共役7回膜貫通型受容体の一種であり、現在までに4つのPAR; PAR1, PAR2, PAR3, PAR4 がクローニングされている。

PAR2はトリプシン、トリプターゼ、または、血液凝固第VIIa因子もしくは第Xa因子によって、N末端の部分ペプチドが切断され、新しいN末端が生成することによって活性化される。例えば、ヒトPAR2の場合、N末端36残基が切断されて、新たにSLIGKVの配列ではじまるN末端を有するポリペプチドとなって活性化される。また、活性化されて生成するN末端のペプチドの配列に基づく、5～6個のアミノ酸から成る合成ペプチド(アゴニストペプチド)によっても、活性化されることが知られている(非特許文献1および非特許文献2)。該アゴニストペプチドとしては、SLIGKVの配列及びSLIGRLの配列で表される部分ペプチドやその改変ペプチドtrans-cinnamoyl-LIGRLO等が挙げられる(非特許文献3)。

30

【0003】

PAR2は、消化液の分泌、神経性炎症、疼痛、アレルギー反応(非特許文献4及び非特許文献5)などの種々の生理活性に関与している。

40

一方、痒みは皮膚固有の感覚である痒みをひきおこす生理活性物質としては、疾患により異なるが、例えば、ヒスタミン、セロトニン、ロイコトリエンB4、サブスタンスP、VIP、トリプシン(非特許文献6)等が報告されている。痒みを知覚するメカニズムについては不明な点も多いが、痒み刺激に対してヒスタミン等の生理活性物質が肥満細胞等から分泌され、知覚神経の一種であるC繊維を通して脳へと伝達されると考えられている。上記に関連して、PAR2は、C繊維(非特許文献7)及び肥満細胞に発現していること、並びに、PAR2の作用により脱顆粒が生じること(非特許文献8)等が報告されているが、PAR2と皮膚の痒み症状との関係は不明であった。

【非特許文献1】

Dery, Oら、「American Journal of Physiology」

50

」1998 第274巻, p. C1429 - 52

【非特許文献2】

Macfarlane, S. R. 5、 「Pharmacological Reviews」2001 第53巻, p 245 - 282

【非特許文献3】

Al-Ani, B. 5、 「Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics」1999 第290巻, p 753 - 760

【非特許文献4】

Sun, G. 5、 「Journal of Immunology」2001 第167巻, p1014 - 1021 10

【非特許文献5】

Mike, S. 5、 「Journal of Immunology」2001 第167巻, p6615 - 6622

【非特許文献6】

Hagermark, O. 5、 「Seminars in Dermatology」1995 第14巻, p271 - 276

【非特許文献7】

Steinhoff, M. 5、 「Nature Medicine」2000 第6巻, p151 - 158 20

【非特許文献8】

Grant, R. S. 5、 「Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics」2002 第302巻, p466 - 474

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規な作用機序に基づく、痒み症状を改善する皮膚疾患治療剤、およびそのスクリーニング方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 30

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、PAR2アゴニストペプチドが、マウスにおいて痒み症状を誘発することを見出した。本発明は以上の知見に基づき、完成するに至ったものである。

【0006】

すなわち、本発明は、

[1] 以下の工程(1)及び(2)：

(1)被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程、

(2)(1)の結果に基づいて、PAR2阻害活性を有する被験物質を皮膚疾患治療剤の有効成分として選別する工程、

を含む、皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、 40

[2] (1)の工程が、下記の工程(a)～(d)：

(a)被験物質とPAR2を発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b)(a)におけるPAR2の発現量を測定する工程、

(c)(b)の値を、被験物質を接触させない対照におけるPAR2の発現量と比較する工程、

(d)(c)の結果に基づいて、被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程

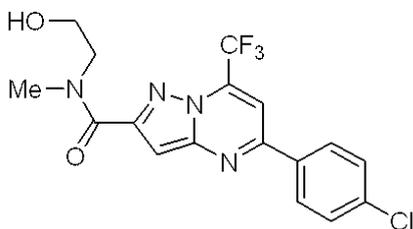
を含むことを特徴とする、[1]記載の皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、

[3] (1)の工程が、下記の工程(a)～(d)：

(a)被験物質と、PAR2及びPAR2活性化因子を含む細胞、または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、

- (b) (a) における P A R 2 由来の機能を測定する工程、
 (c) (b) の値を、被験物質を接触させない対照における P A R 2 由来の機能と比較する工程、
 (d) (c) の結果に基づいて、被験物質の P A R 2 阻害活性を評価する工程、
 を含むことを特徴とする、[1] 記載の皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、
 [4] (d) の工程が、以下の工程：
 (d - 1) 被験物質の P A R 2 阻害活性と、式：

【化 2】



10

- で表される化合物の P A R 2 阻害活性を比較する工程、
 (d - 2) 前記化合物と同等以上の P A R 2 阻害活性を示す被験物質を、皮膚疾患治療剤候補化合物として選択する工程、
 を含むことを特徴とする、[3] 記載のスクリーニング方法。

20

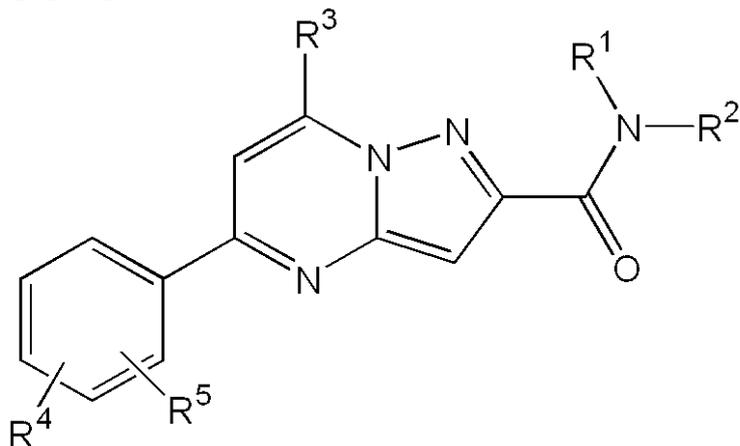
- [5] (1) の工程が、下記の工程 (a) ~ (d) :
 (a) 被験物質と、P A R 2、及び P A R 2 リガンドを含む水溶液、細胞、または該細胞から調製した細胞膜画分とを接触させる工程、
 (b) (a) における P A R 2 に結合した P A R 2 リガンド量を測定する工程、
 (c) (b) の値を、被験物質を接触させない対照における、P A R 2 に結合した P A R 2 アゴニスト量と比較する工程、
 (d) (c) の結果に基づいて、被験物質の P A R 2 阻害活性を評価する工程、
 を含むことを特徴とする、[1] 記載の皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法、
 [6] 皮膚疾患が、痒みを伴う疾患であることを特徴とする、[1] ~ [5] のいずれか記載のスクリーニング方法、
 [7] 皮膚疾患治療剤が、痒み症状を改善することを特徴とする治療剤である、[1] ~ [6] のいずれか記載のスクリーニング方法、

30

【0007】

- [8] P A R 2 阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、皮膚疾患治療剤、
 [9] P A R 2 阻害活性を有する化合物が、一般式 (1) :

【化 3】



40

- (式中、R¹ および R² は、独立して、水素原子、又はアルキル基 (該アルキル基は、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてもよい。)) を表すか、あるいは、R¹ と R

50

² は隣接する窒素原子とともに結合して、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基で置換されていてもよい1～2個の窒素原子、0～1個の酸素原子、および0～1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、

R³ は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、または置換もしくは無置換のアリール基を表し、

R⁴ および R⁵ は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、アルコキシ基、メチレンジオキシ基、またはハロアルキル基を表す。))

で表される化合物、又はその薬学上許容される塩である、[8] 記載の治療剤、

10

[10] R³ がハロアルキル基で表されることを特徴とする、[9] 記載の治療剤、

[11] ハロアルキル基がトリフルオロメチル基であることを特徴とする、[9] 記載の治療剤、

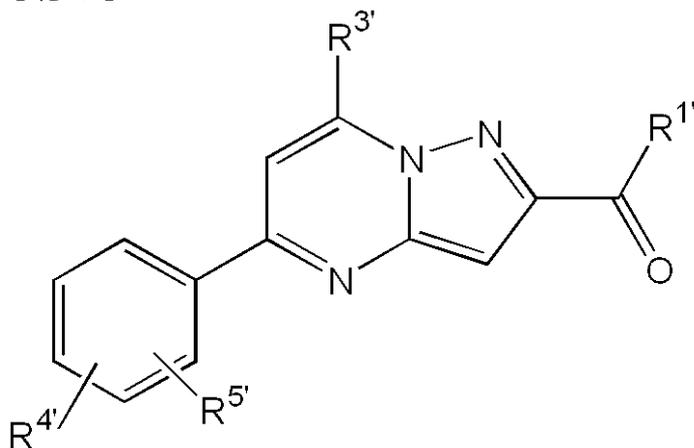
[12] R¹ と R² が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルコキシカルボニル基、フェニル基、またはベンジル基で置換されていてもよい、ピペリジン、パーヒドロアゼピン、モルホリン、チオモルホリン、またはピペラジンを形成していることを特徴とする、[8] ~ [10] のいずれか記載の治療剤、

[13] R¹ と R² が隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、または、アルコキシカルボニル基で置換されていてもよい、ピペリジン、またはパーヒドロアゼピンを形成していることを特徴とする、[11] 記載の治療剤、

20

[14] 一般式 (2) :

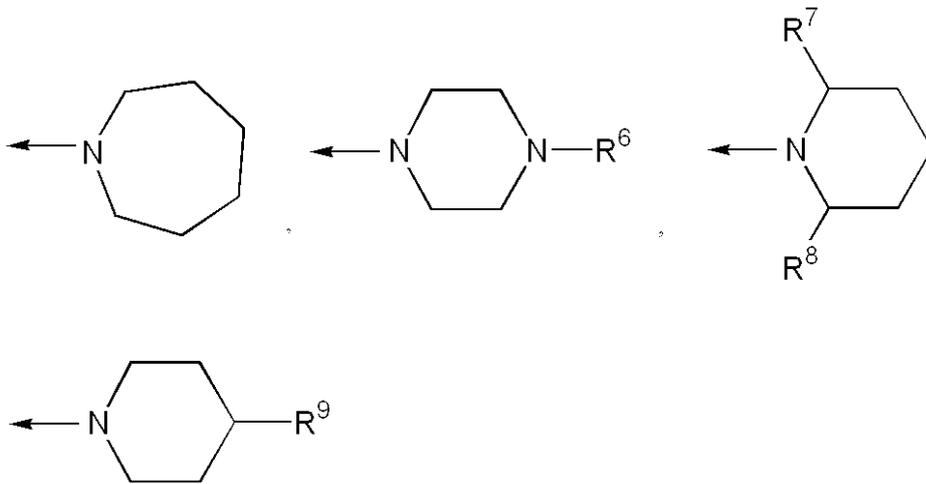
【化 4】



30

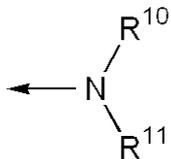
[式中、R¹ は、以下の群 :

【化 5】



10

または、
【化6】



20

(式中、 R^6 は水素原子、アリアルカルボニル基、またはアルキルカルボニル基を表し、 R^7 は、水素原子、またはアルキル基をあらわし、 R^8 および R^9 は、水素原子、アルキル基、またはアルコキシカルボニル基を表し、 R^{10} はアルキル基を表し、 R^{11} は水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリアル基、または置換もしくは無置換のヘテロアリアル基で置換されていてもよいアルキル基を表す。)

から選択される基を表し、 R^3 は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、またはフェニル基を表し、

R^4 および R^5 は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、またはハロアルキル基を表す。]

30

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有する皮膚疾患治療剤、

【0008】

[15] 皮膚疾患が、痒みを伴う疾患であることを特徴とする、[8] ~ [14] のいずれか記載の治療剤、

[16] 皮膚疾患治療剤が、痒み症状を改善することを特徴とする治療剤である、[8] ~ [14] のいずれか記載の治療剤、

[17] PAR2 又は PAR2 活性化因子を有効成分として含有する、痒み症状を改善する薬剤を評価するための動物モデルにおける痒み惹起用試薬、

に関するものである。

40

【0009】

【本発明の実施の形態】

本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

【0010】

本明細書において、「PAR2」とは、Gタンパク共役7回膜貫通型受容体に属するトリ

50

プシンやトリプターゼ等のプロテアーゼによって活性化される受容体 (p r o t e i n a s e - a c t i v a t e d r e c e p t o r) 蛋白質を表し、そのアミノ酸配列は、ヒトについては、Bohm, S. K. et al. Biochem. J., 314, 1009-16, 1996 (Genbank Ac. No. U34038) に記載されており、他の動物種のコモログについては、マウス: Nystedt S. et al., J. Biol. Chem., 270, 5950-55, 1995 (Genbank Ac. No. Z48043)、及びラット: Saifeddine M. et al., Br. J. Pharmacol., 118, 521-30, 1996 (Genbank Ac. No. U61373) についてそれぞれ公知である。

10

【0011】

本明細書において「PAR2」には、上記のアミノ酸配列を有するものだけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体 (コモログやスプライズバリエーション)、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などが包含される。ここで上記以外の動物種のコモログは、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または (ポリ) ペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97% 相同なものを挙げるができる。またアミノ酸修飾体には、天然に存在するアミノ酸修飾体、天然に存在しないアミノ酸修飾体が包含され、具体的にはアミノ酸のリン酸化体が挙げられる。

20

【0012】

本明細書において、「PAR2 遺伝子」とは、前記PAR2をコードする遺伝子を表し、その塩基配列は、ヒトについてはBohm, S. K. et al. Biochem. J., 314, 1009-16, 1996 (Genbank Ac. No. U34038) に記載されており、他の動物種のコモログについては、マウス: Nystedt S. et al., J. Biol. Chem., 270, 5950-55, 1995 (Genbank Ac. No. Z48043)、ラット: Saifeddine M. et al., Br. J. Pharmacol., 118, 521-30, 1996 (Genbank Ac. No. U61373) 等についてそれぞれ公知である。

30

また、本明細書において「PAR2 遺伝子」には、上記の塩基配列を有するものだけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体 (コモログやスプライズバリエーション)、変異体等が包含される。

ここで上記以外の動物種のコモログは、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変された塩基配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないポリヌクレオチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97% 相同なものを挙げるができる。

40

【0013】

「生物学的機能が同等である」とは、具体的には、既知のPAR2アゴニストとの結合活性を保持しているか、又は以下に述べるPAR2の機能を保持してことを表す。

【0014】

本明細書において、「PAR2 活性化因子」とは、1 PAR2のN末端の部分ペプチドを加水分解させることによってPAR2を活性化する酵素蛋白質、及び2 1の酵素蛋白質非存在下にPAR2を活性化することができるアゴニスト化合物を表し、PA

50

R2活性化とは 1 2 により生ずる作用を共に含む概念である。

すなわち、PAR2の天然における活性化機構は、PAR2活性化因子によりN末端のペプチド(ヒトPAR2の場合N末端36残基に相当する。)が加水分解されて新たに生成するN末端部分ペプチド(以下、活性型N末端部分ペプチドと称する場合がある。)が、リガンドとしてPAR2に結合し、これによりPAR2由来の生理活性が生じるものであり、具体的な前記 1 のPAR2活性化因子(酵素蛋白質)としては、トリプシン、トリプタゼ、血液凝固第Xa因子、又は血液凝固第VIIa因子等を例示することができる。

一方、前記 2 のPAR活性化因子(アゴニスト)としては、活性化されたPAR2のN末端部分ペプチド配列に基づくペプチド化合物及びその誘導体が挙げられる。具体的には、SLIGKV(配列番号:1)及びSLIGRL(配列番号:2)で表される部分ペプチドやその改変ペプチドtrans-cinnamoyl-LIGRLO(配列番号:3)等が挙げられる。また、膜結合型セリンプロテアーゼ 1 (Takeuchi, T. et al., J. Biol. Chem., 275, 26333-26342 (2000))、及び膜結合型セリンプロテアーゼ 3 (Wallrapp, C. et al., Cancer Res., 60, 2602-2606 (2000))等もアゴニストとして例示することができる。

【0015】

本明細書において、「PAR2阻害活性を有する化合物」とは、PAR2の機能を阻害する方向へ作用する化合物であれば何ら限定されるものではなく、PAR2の発現量を減少させる活性を有する化合物、PAR2アンタゴニスト活性を有する化合物、PAR2の機能を抑制する化合物等を含む概念である。

ここで「PAR2の発現量を減少させる」とは、PAR2をコードするmRNAの発現量を減少させること、またはPAR2の蛋白質量を減少させることを表す。

「PAR2のアンタゴニスト活性」とは、N末端が切断されて活性化されたPAR2の活性型N末端部分ペプチドとPAR2の結合や、アゴニストとPAR2の結合を阻害する活性を言う。

また、「PAR2の機能」としては、細胞内カルシウムの濃度上昇や細胞内イノシトール3リン酸の産生増加等のGPCRに特有の機能、プロテインキナーゼCもしくはMAPキナーゼによる細胞内タンパク質のリン酸化増加、又は細胞からのプロスタグランジンE2(PGE2)放出促進、又は、哺乳動物における唾液分泌促進等の機能が挙げられる。

【0016】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

本発明の第1の態様は、以下の工程(1)被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程、及び(2)(1)の結果に基づいて、PAR2阻害活性を有する被験物質を皮膚疾患治療剤の有効成分として選別する工程を含む、皮膚疾患治療剤のスクリーニング方法である。上記(1)において、PAR2阻害活性を評価する方法としては、I.PAR2の発現量を測定する方法、II.PAR2の機能を測定する方法、III.PAR2結合阻害活性を測定する方法等が挙げられる。以下それぞれについて、具体的に述べる。

【0017】

I.PAR2の発現量を測定する方法

PAR2の発現量に基づき、PAR阻害活性を評価する方法は、以下の(a)~(d)の工程:

(a)被験物質とPAR2を発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b)(a)におけるPAR2の発現量を測定する工程、

(c)(b)の値を、被験物質を接触させない対照におけるPAR2の発現量と比較する工程、

(d)(c)の結果に基づいて、被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程を含む。

【0018】

10

20

30

40

50

ここで、P A R 2 を発現可能な細胞としては、内在性および外来性を問わず、P A R 2 を発現する培養細胞全般を挙げるができる。培養細胞においてこれら本発明遺伝子が発現しているか否かは、公知のノーザンブロット法やR T - P C R法にてこれらの遺伝子発現を検出することにより、容易に確認することができる。

当該スクリーニングに用いられる細胞の具体例としては、例えば以下の(1)~(3)：

- (1) P A R 2 を発現している哺乳動物由来細胞
- (2) 上記P A R 2 活性化因子で処理した細胞
- (3) P A R 2 をコードする遺伝子を導入した細胞、等を挙げるができる。

ここで、前記(1)の細胞としては、膵臓組織由来細胞、ケラチノサイト由来細胞、肥満細胞、血管内皮細胞、Tリンパ球、血小板、骨芽細胞、肝細胞、又は各種の株化された細胞が挙げられる。具体的には、M I A P a C a - 2細胞(ヒト膵臓癌由来細胞株)、H E K 2 9 3 (ヒト胎児腎臓由来細胞株)、A 5 4 9 (ヒト肺ガン由来細胞株)、H F L 1 (ヒト胎児肺由来細胞株)、S W 9 8 2 (ヒト滑膜様細胞株)、又はS W 1 3 5 3 (ヒト軟骨様細胞株)を例示することができる。

前記(2)において、P A R 2 活性化因子としては、前記と同じものが挙げられる。処理する細胞としては、前記(1)に記載された細胞が挙げられる。

【0019】

前記(3)の遺伝子を導入した細胞としては、前記(1)及び(2)に挙げた細胞の他、通常遺伝子導入に用いられる宿主細胞、すなわちC O P、L、C 1 2 7、S p 2 / 0、N S - 1、N I H 3 T 3、S T 2等のマウス由来細胞、ラット由来細胞、B H K、C H O等のハムスター由来細胞、C O S 1、C O S 3、C O S 7、C V 1、V e r o等のサル由来細胞、H e L a、2 9 3等のヒト由来細胞、およびS f 9、S f 2 1、H i g h F i v e等の昆虫由来細胞などが例示される。

【0020】

さらに、本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞には、細胞の集合体である組織なども含まれる。

また本発明スクリーニングに際して、被験物質と細胞とを接触させる条件は、特に制限されないが、該細胞が死滅せず且つ本発明遺伝子を発現できる培養条件(温度、p H、培地組成など)を選択するのが好ましい。

【0021】

P A R 2 の発現量を測定する方法としては、試料として工程(a)の細胞から調製されるR N Aを用いるノーザンブロット法、R T - P C R法、D N Aチップ解析法、もしくはi n s i t uハイブリダイゼーション解析法、又は、試料として工程(a)の細胞から調製される蛋白質を用いるウェスタンブロッティング法などの公知の方法が挙げられる。測定試料は、通常細胞を破碎、希釈、又は遠心分離する等の必要な処理を行い、R N Aもしくは蛋白質を含む画分として調製する。

【0022】

ノーザンブロット法を利用する場合は、P A R 2 遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び/又はその相補的なポリヌクレオチドをプローブとして用いることによって、R N A中のP A R 2 の発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、前記プローブを放射性同位元素(³²P、³³Pなど：R I)や蛍光物質などで標識し、これを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした、工程(a)の細胞由来R N Aとハイブリダイズさせた後、形成されたプローブ(D N A)とR N Aとの二重鎖を、疾患マーカーの標識物(R I若しくは蛍光物質)に由来するシグナルを放射線検出器(B A S - 1 8 0 0 I I、富士フィルム社製)または蛍光検出器で検出、測定する方法を例示することができる。また、A l k P h o s D i r e c t L a b e l l i n g a n d D e t e c t i o n S y s t e m (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h社製)を用いて、該プロトコールに従ってプローブD N Aを標識し、前記R N Aとハイブリダイズさせた後、前記プロ

ープの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860 (Ame r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h社製)で検出、測定する方法を使用することもできる。

【0023】

RT-PCR法を利用する場合は、本発明の上記プローブと同様の塩基配列をプライマーとして用いることによって、RNA中のPAR2の発現の有無や発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、工程(a)の細胞由来RNAから常法に従ってcDNAを調製して、これを鋳型として標的のPAR2の遺伝子の領域が増幅できるように、前記プライマー(上記cDNA(-鎖)に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖)をこれとハイブリダイズさせて、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する 10
方法を例示することができる。なお、増幅された二本鎖DNAの検出は、上記PCRを予めRIや蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法に従ってナイロンメンブレン等に転写させて、標識されたプライマーとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖DNA産物はアジレント2100バイオアナライザ(横河アナリティカルシステムズ社製)などで測定することができる。また、SYBR Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems 社製)で該プロトコールに従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社製)で反応させて、該反応物を検出する 20

DNAチップ解析を利用する場合は、上記ノーザンハイブリダイゼーション法でプローブとして用いたDNAプローブ(1本鎖または2本鎖)を樹脂上のチップに結合させたものを用意し、これに工程(a)の細胞由来RNAから常法によって調製されたcRNAをハイブリダイズさせて、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、前記プライマーから調製される標識プライマーと結合させて検出する方法を挙げることができる。

【0024】

また、PAR2を認識する抗体を用いて、ウエスタンブロット法などの公知方法で、PAR2を検出、定量する方法を挙げることができる。

ウエスタンブロット法は、一次抗体を試料と反応後、二次抗体として¹²⁵Iなどの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシターゼ(HRP)などの酵素等で標識した標識抗体(一次抗体に結合する抗体)を用い、得られる標識化合物の放射性同位元素、蛍光物質などに由来するシグナルを放射線測定器(BAS-1800II:富士フィルム社製など)、蛍光検出器などで検出し、測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860 (アマシャム ファルマシアバイオテク社製)で測定することもできる。 30

【0025】

ここで前記抗体は、ポリクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよく、その製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13(2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したPAR2を用いて、あるいは常法に従ってこれら本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したPAR2、またはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる(Cur 40 50

ent protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

【0026】

抗体の作製に免疫抗原として使用されるPAR2は、前記公知文献に記載された配列情報に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985))などに準じて行うことができる。

10

【0027】

上記のように測定した被験物質存在下におけるPAR2発現量(工程(b)の測定値)を、被験物質を接触させない対照におけるPAR2の発現量と比較することによって、被験物質のPAR2阻害活性を評価することができる。

具体的には、被験物質を添加した上記(1)~(3)のいずれかの細胞におけるPAR2の発現レベルが、被験物質を添加しない細胞(対照)のそのレベルに比して低くなることをもって、行うことができる。また、PAR2の発現に発現誘導物質を必要とする細胞を用いる場合は、発現誘導物質としてPAR2活性化因子を用いることによって誘導される発現が被験物質の存在によって制御されること、すなわち発現誘導物質の存在下で被験物質を接触させた細胞の遺伝子発現が、発現誘導物質存在下で被験物質を接触させなかった対照細胞(正のコントロール)に比して低くなることを指標として、当該被験物質をPAR2阻害活性を有する化合物として評価することができる。

20

【0028】

上記のように評価した被験物質のPAR2阻害活性を指標として、皮膚疾患治療剤の候補物質を選別することができる。例えば、被験物質存在下におけるPAR2の発現量が、被験物質を接触させない対照細胞における発現量と比較して、10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少する被験物質を候補物質として選別することができる。

【0029】

またPAR2の発現レベルの検出及び定量は、これを制御する遺伝子領域(発現制御領域)に、例えばルシフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入した細胞株を用いて、マーカー遺伝子由来のタンパク質の活性を測定することによっても実施できる。従って、PAR2の発現制御物質のスクリーニング方法には、かかるマーカー遺伝子の発現量を指標として標的物質を探索する方法も包含されるものであり、この意味において、PAR2の発現制御領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子を用いたスクリーニングも本発明の範疇である。

30

【0030】

なお、上記マーカー遺伝子としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましい。具体的には、上記のルシフェラーゼ遺伝子のほか、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺伝子、ガラクトシダーゼ遺伝子、及びエクオリン遺伝子などのレポーター遺伝子が例示できる。

40

また、ここで前記本発明遺伝子の発現制御領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1kb、好ましくは約2kbを用いることができる。

【0031】

本発明遺伝子の発現制御領域は、例えば(i)5'-RACE法(例えば、5'full Race Core Kit(宝酒造社製)等を用いて実施される)、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により、5'末端を決定するステップ;(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ;を

50

含む手法等により同定することができる。また融合遺伝子の作成、およびマーカ-遺伝子由来の活性測定は公知の方法で行うことができる。

【0032】

II. PAR2の機能を測定する方法

PAR2の機能に基づき、PAR阻害活性を評価する方法は、以下の(a)~(d)の工程：

(a)被験物質と、PAR2及びPAR2活性化因子を含む細胞、または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、

(b)(a)におけるPAR2由来の機能を測定する工程、

(c)(b)の値を、被験物質を接触させない対照におけるPAR2由来の機能と比較する工程、 10

(d)(c)の結果に基づいて、被験物質のPAR2阻害活性を評価する工程、を含む。

【0033】

ここで、PAR2の公知の機能に基づく如何なる機能測定方法をも利用することができる。すなわち、PAR2の公知の機能・活性測定系に被験物質を添加し、当該PAR2の公知の機能を抑制する被験物質を、PAR2阻害活性を有する化合物として評価することができる。

【0034】

本発明のスクリーニングは、PAR2を含む細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させることにより行うことができる。 20

【0035】

また、本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞としては、内在性及び外来性を問わず、PAR2を発現し得る細胞を挙げることができる。該細胞としては、具体的には、前記Iにおいて(1)~(3)に記載した細胞などを用いることができる。

また本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞画分とは、上記細胞に由来する各種の画分を意味し、これには、例えば細胞膜画分などが含まれる。

【0036】

前記スクリーニングにおいて用いられるPAR2は、公知のタンパク質であり、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換細胞の培養、および必要に応じて培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNACloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985))などに準じて行うことができる。 30

【0037】

PAR2の機能を測定する方法としては、具体的には、細胞内カルシウム濃度の上昇活性、アラキドン酸遊離(Kong, W. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 94, 8884-8889 (1997); McHowat, J., et al., J. Urology, 165, 2063-2067 (2001))、細胞内イノシトール3リン酸の産生促進、細胞膜電位変動、c-fos活性化(Hoogerwerf, W. A., et al., J. Neurosci., 21, 9036-9042 (2001); Coelho, A. M., et al., Gastroenterology, 122, 1035-1047 (2002))、又はプロテインキナーゼCもしくはMAPキナーゼによる細胞内蛋白質のリン酸化促進活性等のGPCR特有の機能を測定する方法、または細胞からのプロスタグランジンE2(PGE2)放出促進活性、哺乳動物における唾液分泌促進活性等が挙げられる。 40

該生理活性は、公知の方法、または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

すなわち、PAR2を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。新鮮な培地、 50

あるいは細胞毒性を示さない適当なバッファーに交換し、被験化合物、および/またはリガンド等を添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出、あるいは上清液を回収して生成した産物をそれぞれ該当する方法に従って定量する。生理活性の指標とする物質（例えばアラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって測定不能な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を併用することもできる。具体的な測定方法を以下に例示する。

【0038】

1 Fluorescent imaging plate reader (FLIPR) 法

細胞内カルシウム濃度上昇活性の測定方法としては、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK 293 細胞、ヒト肺ガン由来細胞株 A 549、またはヒト胎児肺由来細胞株 HFL 1 等の PAR 2 を発現し得る培養細胞株に、Fluo-3 AM (Molecular Probe 社) 等のカルシウム結合性蛍光プローブ、及び probenecid (色素を細胞内に保持するために、multiple drug-resistance pump の阻害剤として用いる。) を含む培地で培養し、PAR 2 アゴニスト (NH₂-SLIGRL-CONH₂ 等の合成ペプチド) もしくはトリプシン等の PAR 2 活性化因子を添加して、更に一定時間 (例えば 30 分 ~ 2 時間) 培養した後、PAR 2 を活性化することによって変動する細胞内カルシウム濃度を、蛍光シグナルの変化として FLIPR (Molecular Devices 社) にて検出する。検出は、488 nm のアルゴンレーザーで細胞を励起し、カルシウムイオンが結合した Fluo-3 の蛍光を 500 - 560 nm の波長でとらえることによって行う。例えば、リガンド添加直後から 60 秒後までの蛍光強度から、添加前の値をバックグラウンドとして差し引いた値を活性とすることができる。被験物質を添加する場合は PAR 2 活性化因子を添加する前に添加することが好ましい。被験物質の PAR 2 機能阻害活性は、被験物質存在下におけるカルシウムイオン量が、被験物質非存在下におけるカルシウムイオン量に比して減少するか否かを指標にして評価することができる。

尚、上記において、PAR 2 の発現ベクターと、Gq 蛋白、もしくは Gq s 5 蛋白 (Gq s 5 とは、C 末端に、Gs 蛋白の C 末端アミノ酸 5 残基を置換した Gq 蛋白を意味する。)、もしくは Gq i 5 蛋白 (Gq i 5 とは、C 末端に、Gi 蛋白の C 末端アミノ酸 5 残基を置換した Gq 蛋白を意味する。) の発現ベクターを作製し、CHO - K 1 細胞等に遺伝子導入試薬 Lipofectamine (Invitrogen 社) 等を用いて共導入し、形質転換細胞を調製して用いることもできる。

【0039】

2 イノシトール 3 リン酸の産生量を測定する方法

ヒト膵臓癌由来細胞株 MIA PaCa - 2 細胞等の培養細胞株に、PAR 2 アゴニスト (NH₂-SLIGRL-CONH₂ 等の合成ペプチド) もしくはトリプシン等の PAR 2 活性化因子を添加して、PAR 2 を活性化する。一定時間後にトリクロロ酢酸等の酸を加えて反応を停止させた後、細胞を回収し、ジエチルエーテル等の有機溶媒を含む水溶液等を用いて細胞内のイノシトール 3 リン酸を抽出し、イノシトール 3 リン酸の量を定量することができる。

定量方法としては、[³H] アッセイシステム (Amersham、TRK 1000; IP 3 抗体及び [³H] IP 3 を用いて生体内 IP 3 量を測定するシステム) で定量する方法が挙げられる。

【0040】

3 プロテインキナーゼ C 活性化測定方法

ヒト膵臓癌由来細胞株、MIA PaCa - 2 細胞等の培養細胞株に、[³²P] ATP 存在下で、PAR 2 アゴニスト (H-SLIGRL-NH₂ 等の合成ペプチド) もしくはトリプシン等の PAR 2 活性化因子を添加して、PAR 2 を活性化する。一定時間後に 0 に冷却することによって反応を停止させた後、細胞をホモゲナイズし、バッファー (例えば、0.25 mM sucrose、20 mM triethanolamine、2

10

20

30

40

50

mM EDTA、0.5 mM EGTA、1 mM DTE、10 µg/ml Leupeptin、1 mM PMSF 溶液) を加えて超音波処理後に遠心分離を行い、上清 1 と沈渣を共に回収する。沈渣を更にバッファー(例えば、Triton X-100 含有バッファー) 中でホモゲナイズし、遠心分離を行って上清 2 を回収する。前記上清 1 及び 2 を DEAE イオン交換カラムなどを用いて PKC 画分を分離精製し、PKC の基質である [³²P] ATP 由来の [³²P] リン酸量を測定することにより、PKC の量を定量することができる。

【0041】

4 PGE₂ 量の測定

ヒト滑膜様細胞株 SW982 細胞を被験物質存在下に、炭酸ガス培養装置内で一定時間培養した後、アゴニストペプチドを添加し、更に一定時間(例えば24時間)培養する。培養上清中のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の量を、プロスタグランジン E₂ EIA (Cayman chemical 514010) を用いて測定することができる。候補物質の選択は、被験物質の存在下における PGE₂ の量が、被験物質非存在下における PGE₂ に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

10

【0042】

上記のように測定した被験物質存在下における PAR₂ の機能(工程(b)の測定値)を、被験物質を接触させない対照における PAR₂ の機能と比較することによって、被験物質の PAR₂ 阻害活性を評価することができる。

具体的には、被験物質を添加した上記(1)~(3)のいずれかの細胞における PAR₂ の機能レベルが、被験物質を添加しない細胞(対照)のそのレベルに比して低くなることをもって、行うことができる。

20

【0043】

上記のように評価した被験物質の PAR₂ 阻害活性を指標として、皮膚疾患治療剤の候補物質を選別することができる。例えば、被験物質存在下における PAR₂ の機能レベルが、被験物質を接触させない対照細胞における機能レベルと比較して、10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上低下する被験物質を候補物質として選別することができる。

【0044】

III. PAR₂ 結合阻害活性を測定する方法

PAR₂ は受容体であるので、受容体結合阻害活性に基づき、PAR₂ 阻害活性を評価する方法は、以下の工程(a)~(d)：

(a) 被験物質と、PAR₂、及び PAR₂ リガンドを含む水溶液、細胞、または該細胞から調製した細胞膜画分とを接触させる工程、

(b) (a) における PAR₂ に結合した PAR₂ アゴニスト量を測定する工程、

(c) (b) の値を、被験物質を接触させない対照における、PAR₂ に結合した PAR₂ アゴニスト量と比較する工程、

(d) (c) の結果に基づいて、被験物質の PAR₂ 阻害活性を評価する工程、を含む。

ここで、PAR₂ のリガンド(受容体結合物質)としては、PAR₂ アゴニスト、PAR₂ アンタゴニスト、及びそれらを標識化した標識リガンドが挙げられる。また、公知アゴニスト化合物の誘導体をペプチド合成等により調製したものをを用いることもできる。

30

40

【0045】

具体的には、被験物質存在下における PAR₂ に対するリガンド(アゴニスト化合物等)の結合量を測定し、当該結合量を被験物質非存在下での PAR₂ に対するリガンド(アゴニスト化合物等)の結合量(対照結合量)と比較する。

【0046】

この場合、前記 PAR₂ とリガンドとの結合阻害は、1 受容体に結合することによって、リガンドの PAR₂ への結合を阻害する態様のものでもよいし、2 リガンドに結合することによって、リガンドの PAR₂ への結合を阻害する態様のものでもあって

50

もよい。但し、とりわけ 1 の態様の場合は、PAR2 に結合してもリガンドと同じ作用を発揮しない被験物質を選択することが必要である。

このため、上記のスクリーニング方法で選別された被験物質は更に、選択された被験物質の中から、更にリガンドと同じ作用を有する被験物質、又はリガンドの作用を拮抗する被験物質を選択する工程に供することが好ましい。具体的には、上記 I I . に記載された方法を挙げることができる。

【0047】

ここで、PAR2 は、精製物（単離物）又はその水溶液であっても良いし、当該 PAR2 を含有する細胞またはその細胞画分の形態であっても良い。ここで PAR2 を含む水溶液としては、例えば PAR2 を含む水溶液の他、これらのタンパク質を含む細胞溶解液、細胞破碎液、核抽出液あるいは細胞の培養上清などを例示することができる。

10

本発明スクリーニングで用いる PAR2 を含有する細胞は、当該受容体を天然に発現している細胞を用いても良いし、また PAR2 をコードする遺伝子を細胞に導入して作製した形質転換細胞を用いても良い。

【0048】

前記形質転換細胞は、Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等の基本書に従い、当業者にとって公知の方法で調製することができる。例えば、前記受容体の cDNA を pCAGGS (Gene 108, 193-199 (1991))、pcDNA1.1、pcDNA3.1 誘導体（インビトロジェン社）などの公知の発現ベクターに挿入する。その後、適当な宿主に導入し、培養することにより、導入した受容体の DNA に対応するタンパク質を発現させた形質転換細胞を作製することができる。宿主としては、一般的に広く普及している、CHO 細胞、C127 細胞、BHK21 細胞、COS 細胞などを用いることができるが、これに限定されることなく、酵母、細菌、昆虫細胞などを用いることもできる。

20

【0049】

PAR2 の cDNA を有する発現ベクターの宿主細胞への導入方法としては、公知の発現ベクターの宿主細胞への導入方法であれば、どのような方法でもよく、例えばリン酸カルシウム法 (J. Virol., 52, 456-467 (1973))、LT-1 (Panvera 社製) を用いる方法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL 社製) を用いる方法などが挙げられる。前記 PAR2 を天然に発現する細胞、および前記 PAR2 を発現する形質転換細胞は、そのままスクリーニングに用いることができるが、細胞膜をスクリーニングに用いる場合は、例えば以下のようにして細胞膜画分を得ることができる。すなわちまず細胞に低張バッファーを添加し、細胞を低張破壊した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより細胞膜画分の沈殿物を得る。そしてこの沈殿物をバッファーに懸濁することにより、PAR2 を含有する細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分は、抗体を結合させたカラム等により常法で精製することもできる。

30

【0050】

リガンドとしては、アゴニスト化合物をそのまま用いても良いし、任意の標識物質で標識された標識化アゴニスト化合物を用いることもできる。ここで標識物質としては、放射性同位体 (3H、14C、35S、125I 等)、蛍光物質 (Molecular Probes 社 Alexa Protein Labeling Kits 等)、化学発光物質 (Assay Designs 社 Chemiluminescence Labeling Kit 等)などを例示することができる。

40

【0051】

受容体結合阻害活性の測定は、具体的には、以下の方法が例示される。すなわち、受容体 (PAR2) を含有する水溶液（通常緩衝液が用いられる）、前記細胞若しくは細胞膜画分に、 10^{-3} ~ 10^{-10} M の適当な濃度に調製した被験化合物溶液（通常溶媒には水もしくは緩衝液が用いられるが、溶解度に応じてエタノールや DMSO を添加することも

50

できる)を加えた後、リガンドを加え、一定時間(通常、10分~2時間)反応させる。その後遠心分離等により上清を分離してリガンド量を計測する。あるいは、形質転換細胞もしくは細胞膜画分を含む沈殿物を界面活性剤、塩基を含む溶液に溶解した後溶液に含まれるリガンド量を計測することもできる。ここでリガンドが放射性同位元素で標識された標識化アゴニスト化合物であれば、放射活性を測定すればよい。また、リガンド量は、HPLCなどで試料を精製して計測してもよい。例えば、標識化されていないリガンドを用いる場合は、HPLCを用いてリガンドを含む画分を分離してUV(例えば220nmや254nm)で検出することもできる。

【0052】

上記の数値を、被験化合物の代わりに溶媒をブランクとして用いて実施した場合の値(対照結存量)と比較することにより、被験化合物が、受容体と標識リガンドの結合を阻害するか否かを評価することができる。すなわち候補物質のスクリーニングは、被験物質存在下での結存量が、被験物質非存在下での結存量に比して、減少するか否かを指標に行うことができる。

10

具体的な阻害率(%)については、以下の式:

$$\{1 - (\text{被験物質を添加した場合にPAR2と結合した標識アゴニストリガンド量}) / (\text{被験物質非添加時におけるPAR2と結合した標識アゴニストリガンド量})\} \times 100$$

で算出することによって求めることができる。

【0053】

上記のように測定した被験物質の阻害率に基づき、被験物質のPAR2阻害活性を評価することができる。例えば、阻害率が、10%以上、好ましくは30%以上、特に好ましくは50%以上である被験物質を候補物質として選別することができる。

20

【0054】

本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸(本発明遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む)、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記細胞および/または組織と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、被験物質を含む細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

30

【0055】

本発明の第2の態様は、PAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、皮膚疾患治療剤に関する。PAR2阻害活性を有する化合物、又はその薬学上許容される塩は、皮膚の痒み症状を抑える効果を有し、皮膚疾患治療剤、詳しくは痒み症状を伴う皮膚疾患治療剤として有効である。

ここで、PAR2阻害活性を有する化合物は、上記スクリーニング方法で述べたPAR2の発現や機能を抑制する化合物であれば、特に限定は無く、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物、蛋白質、核酸、糖化合物等が挙げられる。好ましくは、分子量200~2000、更に好ましくは分子量300~1000の化合物であり、例えば、実施例18に記載された方法において、10 μ g/mlにおいて30%以上のPAR2阻害活性を示す化合物である。

40

【0056】

PAR2阻害活性を有する化合物として、具体的には、前記式(1)で表される化合物又はその薬学上許容される塩が挙げられる。

式(1)において、アルキル基とは炭素数1~10のアルキル基を表し、好ましくは炭素数1~6のアルキル基を、更に好ましくは炭素数1~4のアルキル基を表す。具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、1-メチルエチル基、またはブチル基等が挙げられる。

式(1)において、アルコキシ基とは炭素数1~10のアルコキシ基を表し、好ましくは炭素数1~6のアルコキシ基を、更に好ましくは炭素数1~4のアルコキシ基を表す。具

50

体的にはメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-メチルエトキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

式(1)において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子を表し、好ましくは、フッ素原子または塩素原子を表す。

本明細書において、ハロアルキル基とは、同一または異なる、1~3個のハロゲン原子を含む炭素数1~2のハロアルキル基を表し、具体的には、トリフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、1,1,1-トリフルオロエチル基、または2,2-ジフルオロエチル基等が挙げられる。好ましくは、トリフルオロメチル基が挙げられる。

式(1)において、ヘテロシクロアルカンとしては、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、チオモルホリンオキシド、チオモルホリンジオキシド、パーヒドロアゼピン、または、パーヒドロジアゼピン等が挙げられる。好ましくは、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、または、パーヒドロアゼピンが挙げられる。

前記ヘテロシクロアルカンが置換されている場合の置換基としては、アルキル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、アルコキシカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基が挙げられる。

好ましくは、炭素原子上で置換されている場合の置換基としては、炭素数1~4のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基が挙げられる。

また、前記ヘテロシクロアルカンが窒素原子上で置換されている場合の置換基としては、炭素数1~4のアルキル基、炭素数2~4のアルコキシカルボニル基、炭素数1~4のアルキルカルボニル基、置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基が挙げられる。

前記置換もしくは無置換のアリールカルボニル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のアリールアルキル基におけるアリールとしては、フェニル、1-ナフチル、または2-ナフチルが挙げられ、特に好ましくはフェニルが挙げられる。

また、前記置換アリールカルボニル基、置換アリール基、または置換アリールアルキル基における置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~4のアルコキシ基、またはメチレンジオキシ基等が挙げられる。

【0057】

一般式(1)で表される化合物において、 R^1 および R^2 は好ましくは、隣接する炭素原子とともに結合して、アルキル基、アリールカルボニル基、アルキルカルボニル基、またはアルコキシカルボニル基で置換されていてよい1~2個の窒素原子、0~1個の酸素原子、および0~1個の硫黄原子を含むヘテロシクロアルカンを形成しており、該ヘテロシクロアルカンは、好ましくは、ピペリジン、ピペラジン、またはパーヒドロアゼピンである。

あるいは、一般式(1)で表される化合物において、 R^1 が炭素数1~4のアルキル基を表し、 R^2 が、水酸基、アルコキシ基、ニトリル基、置換もしくは無置換のアリール基、または置換もしくは無置換のヘテロアリール基で置換されていてよいアルキル基を表すのもまた、好ましい態様の一つである。前記アリール基としてはフェニル基が挙げられる。また、前記ヘテロアリール基としては、ピリジル基が挙げられる。 R^2 におけるアルキル基の置換基が置換アリール基もしくは置換ヘテロアリール基を表す場合の、アリール基もしくはヘテロアリール基の置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~4のハロアルキル基、または炭素数1~4のアルコキシ基が挙げられる。

一般式(1)で表される化合物において、 R^3 におけるアリール基としては、フェニル基が挙げられ、該アリール基が置換されている場合の置換基としては、ハロゲン原子、炭素数1~4のアルキル基、炭素数1~2のハロアルキル基、または炭素数1~4のアルコキシ基が挙げられる。 R^3 は好ましくは炭素数1~3のアルキル基、フェニル基、または炭素数1~2のハロアルキル基を表す。特に好ましい例として、トリフルオロメチル基が挙げられる。

一般式(1)で表される化合物において、 R^4 および R^5 は、好ましくは、同一または異

10

20

30

40

50

なって、水素原子、または、ハロゲン原子を表す。

【0058】

一般式(2)において、 R^6 は、好ましくは、水素原子、炭素数2~4のアルキルカルボニル基、またはベンゾイル基を表す。

一般式(2)において、 R^7 は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メチル基、を表す。

一般式(2)において、 R^8 は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メチル基、メトキシカルボニル基、またはエトキシカルボニル基を表す。ここで R^8 がアルコキシカルボニル基を表す場合、 R^7 は好ましくは水素原子を表す。

10

一般式(2)において、 R^9 は、好ましくは、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、または炭素数2~4のアルコキシカルボニル基を表し、更に好ましくは、水素原子、メトキシカルボニル基、またはエトキシカルボニル基を表す。

一般式(2)において、 R^{10} は、好ましくは、メチル基もしくはエチル基を表し、 R^{11} は、好ましくは水酸基、もしくはピリジル基で置換されていてもよいエチル基、もしくはプロピル基を表す。

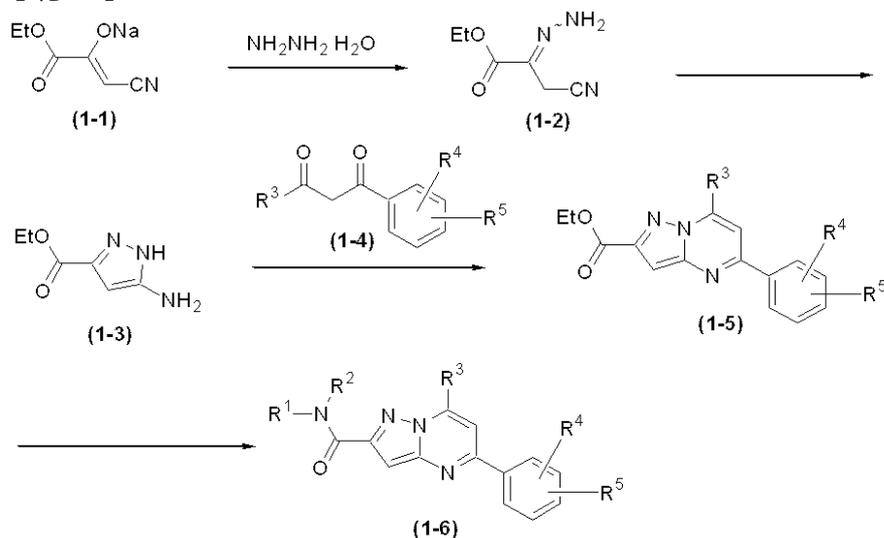
【0059】

式(1)で表される化合物は、その多くが公知であり、市販品として得ることができる。また、以下の方法で製造することもできる。

製造法：

20

【化7】



30

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 は前記と同義である。]

式(1-2)のヒドラゾンは、公知化合物である式(1-1)の化合物とヒドラジン1水和物を、酸性条件下、0~100で反応させることで製造できる。溶媒としては、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン系溶媒、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、アセトン、アセトニトリル、ジオキサンやテトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒、水またはこれらの混合溶媒等が用いられる。メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒がより好ましい。酸としては、酢酸、塩酸、硫酸、トリフルオロ酢酸などを用いることができる。この反応では、クロロホルム中、酸として硫酸を用いる等の方法により、式(1-2)の化合物を単離することなく、式(1-3)の化合物を製造することができる。

40

式(1-2)の化合物を、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒中、塩基を加えて加熱することにより、式(1-3)の化合物を得ることができる。塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、もしくは炭酸水素ナトリウムなどの無機塩基や、トリエチルアミン、もしくはピリジンなどの有機塩基が用い

50

られる。好ましくは、炭酸カリウム、または炭酸ナトリウムを用いることができる。

式(1-5)の化合物は、式(1-3)の化合物と式(1-4)で表される1,3-ジケトンを、塩基もしくは酸の存在、または非存在下に、室温から100で反応させることにより製造できる。溶媒としては、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン系溶媒、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソランやテトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒、水、またはこれらの混合溶媒等が用いられる。このうち、メタノール、エタノールなどのアルコール系溶媒がより好ましい。酸としては、酢酸、塩酸、または、塩化亜鉛などのルイス酸などを用いることができる。塩基として、ピロリジン、またはピペリジンなどの有機塩基を用いることができる。

10

式(1-4)の化合物は、公知化合物を用いるか、あるいは本明細書実施例に記載された方法で製造することができる。また、式(1-5)の化合物は、式(1-2)の化合物から、式(1-3)の化合物を単離することなく製造することもできる。

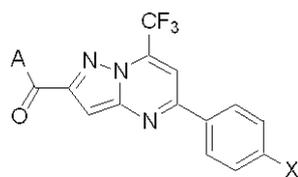
式(1-6)の化合物は、式(1-5)の化合物を加水分解してカルボン酸とした後、公知の方法に従い市販のアミン化合物と縮合させることにより製造できる。縮合方法としては、本明細書記載の水溶性カルボジイミド(WSCI)を用いる方法、混合酸無水物法、または、酸ハライドを用いる方法等が挙げられる。該縮合方法については「Comprehensive Organic Transformation(Larock, R.C., VCH Publishers, Inc. 1989)」等に記載されている。

20

【0060】

一般式(1)で表される化合物の特に好ましいものとして、以下の式51~64の化合物が例示される。

【化8】



式	A	X	式	A	X
51		H	59		H
52		Cl	60		Cl
53		H	61		H
54		Cl	62		Cl
55		H	63		H
56		Cl	64		Cl
57		H			
58		Cl			

10

20

30

【0061】

薬学上許容される塩としては、酸付加塩及び塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩等の有機塩基塩等が挙げられ、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの塩基性あるいは酸性アミノ酸といったアミノ酸塩が挙げられる。また、本発明のPAR阻害活性を有する化合物は、水和物、又はエタノール和物等の溶媒和物であってもよい。

40

【0062】

50

一般式(1)で表される化合物、またはその薬学上許容される塩は、皮膚疾患治療剤、詳しくは、痒み症状を伴う皮膚疾患治療剤として有効である。

【0063】

痒み症状を伴う皮膚疾患としては、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、湿疹、蕁麻疹、乾皮症、虫刺され、しもやけ、あせも、疥癬等が挙げられる。好ましくは、乾癬、アトピー性皮膚炎が挙げられる

【0064】

以下、本発明のPAR2阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する、上記疾患の治療剤を医薬品として用いる場合の投与量および投与形態などにつき記述する。

本発明の化合物又はその薬学上許容される塩は、経口または非経口投与、好ましくは経口投与することができ、薬剤としてそれぞれ経口または非経口投与に適した種々の剤型で、ヒトおよびヒト以外の動物に使用される。例えば、経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態、例えば錠剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液などで投与することができる。非経口的に投与する場合、溶液、乳剤、懸濁液などの液剤を注射剤として投与すること、坐剤の型で直腸投与すること、軟膏、ローション剤、クリーム剤等の塗布剤の型で経皮投与すること、スプレー剤、エアゾル剤等を噴霧剤の型で吸入により投与すること、点滴液(点眼薬など)として投与すること等ができる。このような投与剤型は、通常の担体、賦型剤、結合剤、安定化剤などの助剤と有効成分を配合することにより一般的方法に従って製造することができる。注射剤型で用いる場合は、緩衝剤、溶解補助剤、等張剤などを添加することもできる。投与量、投与回数は、対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重等、および投与形態などによって異なるが、経口投与する場合、有効成分は通常は成人に対し1日あたり約1~1000mgの範囲、好ましくは、約10~500mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。注射剤として投与する場合、有効成分は約0.1~約500mgの範囲、好ましくは約3~約100mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。

【0065】

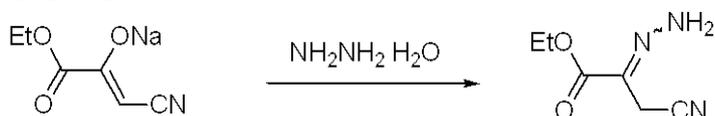
【実施例】

以下に実施例及び参考例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はもとよりこれに限定されるものではない。

実施例1

(2E)-3-シアノ-2-ヒドラゾノプロパン酸エチル

【化9】



エチルシアノピルベートナトリウムエノラート(ethyl cyanopyruvate sodium-enolate)(7.8g)を酢酸(40ml)とエタノール(40ml)に溶かし、0℃でヒドラジン1水和物を加えた。30分後室温にし、一晚攪拌した。反応液を濃縮後、水、クロロホルムを加え、分液、抽出した。有機層を乾燥、濃縮し、目的物(5.0g)を得た。

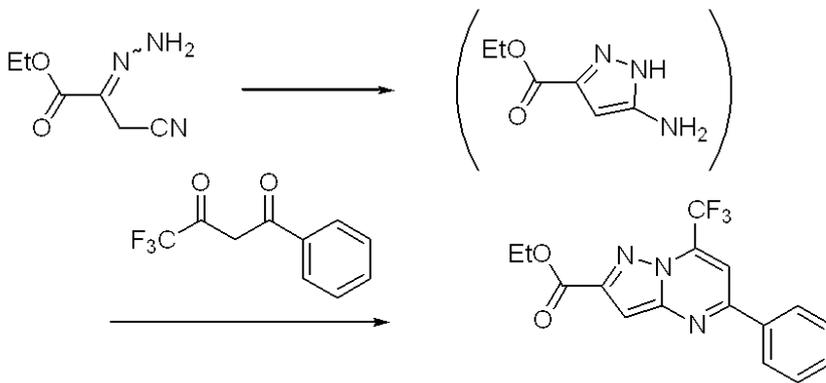
¹H-NMR(400MHz, CDCl₃)ppm: 1.34-1.41(m, 3H), 3.46(s), 3.63(s), 4.26-4.38(m, 2H), 6.52(brs), 8.50(br)

【0066】

実施例2

エチル5-フェニル-7-(トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-2-カルボキシレート

【化10】



10

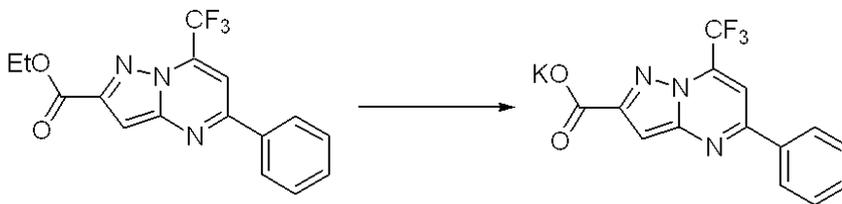
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) ppm : 1.37 (t, 3 H, $J = 7.1$ Hz), 4.42 (q, 2 H, $J = 7.1$ Hz), 7.44 (s, 1 H), 7.57 - 7.65 (m, 3 H), 8.31 - 8.38 (m, 3 H)

【0067】

実施例 3

5 - フェニル - 7 - (トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン - 2 - カルボン酸カリウム

【化11】



20

実施例 2 の化合物 (4.6 g)、エタノール (50 ml)、1 N 水酸化カリウム水溶液 (15 ml) を混ぜ、加熱還流した。30 分後、室温に冷却した。生じた結晶をろ過、乾燥し、目的物 (4.2 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) ppm : 6.87 (s, 1 H), 7.53 - 7.59 (m, 3 H), 8.02 (s, 1 H), 8.24 - 8.31 (m, 2 H)

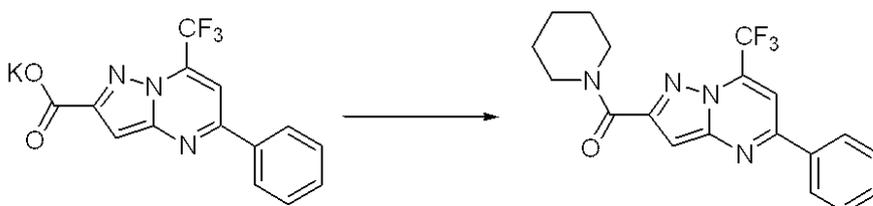
30

【0068】

実施例 4

5 - フェニル - 2 - (ピペリジン - 1 - イルカルボニル) - 7 - (トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

【化12】



40

実施例 3 で得た化合物 (3.0 g) を DMF に溶かし、N - ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.35 g)、ピペリジン (0.95 ml)、1 - エチル - 3 - (3' - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1.84 g) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液に、水、酢酸エチルを加え、分液、抽出した。有機層を、飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮した。残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄、ろ過、乾燥し、目的物 (2.8 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl $_3$) ppm : 1.62 - 1.78 (m 50

実施例 3 で得た化合物と 1 - ベンゾイルピペラジン塩酸塩から、実施例 4 と同様の方法により目的物 (1 . 6 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) ppm : 3 . 50 - 4 . 25 (m , 8 H) , 7 . 28 (s , 1 H) , 7 . 55 - 7 . 60 (m , 3 H) , 7 . 72 (br s , 1 H) , 8 . 10 - 8 . 15 (m , 2 H)

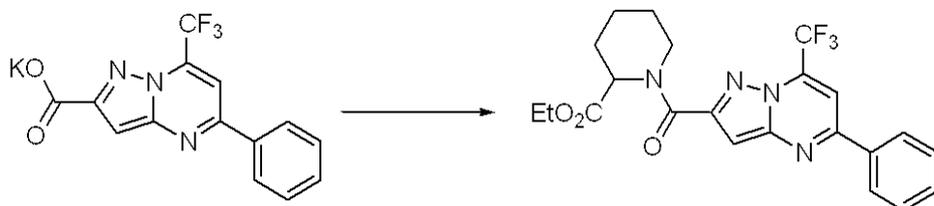
【 0072 】

実施例 8

エチル 1 - { [5 - フェニル - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 2 - イル] カルボニル } ピペリジン - 2 - カルボキシレート

【 化 16 】

10



実施例 3 で得た化合物とピペコリン酸エチル塩酸塩から、実施例 4 と同様の方法により目的物 (0 . 1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) ppm : 1 . 26 - 1 . 35 (m , 3 H) , 1 . 40 - 1 . 90 (m , 5 H) , 2 . 28 - 2 . 43 (m , 1 H) , 3 . 00 - 3 . 40 (m , 1 H) , 4 . 20 - 4 . 32 (m , 2 H) , 4 . 45 - 4 . 80 (m , 1 H) , 5 . 45 - 5 . 60 (m , 1 H) , 7 . 21 - 7 . 28 (m , 1 H) , 7 . 53 - 7 . 60 (m , 3 H) , 7 . 67 - 7 . 71 (m , 1 H) , 8 . 10 - 8 . 06 (m , 2 H)

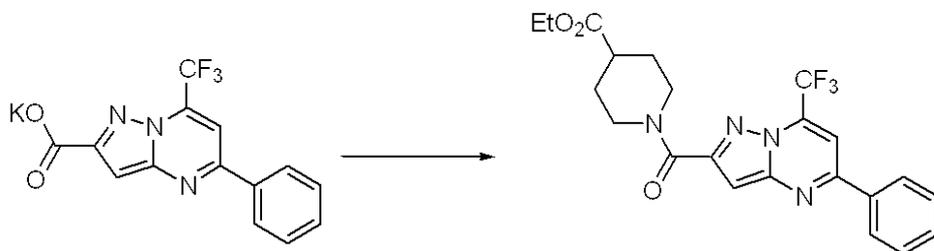
【 0073 】

実施例 9

エチル 1 - { [5 - フェニル - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 2 - イル] カルボニル } ピペリジン - 4 - カルボキシレート

【 化 17 】

30



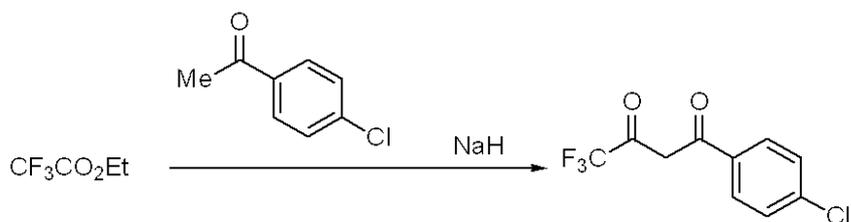
実施例 3 で得た化合物とイソニペコチン酸エチルから、実施例 4 と同様の方法により目的物 (0 . 2 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CDCl_3) ppm : 1 . 28 (t , 3 H , $J = 7 . 1 \text{ Hz}$) , 1 . 80 - 2 . 12 (m , 4 H) , 2 . 64 (m , 1 H) , 3 . 13 (m , 1 H) , 3 . 37 (m , 1 H) , 4 . 18 (q , 1 H , $J = 7 . 1 \text{ Hz}$) , 4 . 46 - 4 . 62 (m , 2 H) , 7 . 21 (s , 1 H) , 7 . 54 - 7 . 60 (m , 3 H) , 7 . 69 (s , 1 H) , 8 . 10 - 8 . 16 (m , 2 H)

実施例 10

1 - (4 - クロロフェニル) - 4 , 4 , 4 - トリフルオロブタン - 1 , 3 - ジオン

【 化 18 】



4 - クロロアセトフェノン (4 . 6 m l) をテトラヒドロフラン (5 0 m l) に溶かし、
0 に冷却後、水素化ナトリウム (1 . 5 5 g ; 6 0 %) を加えた。1 5 分後室温にし
、3 0 分攪拌した。反応液を 0 に冷却し、トリフルオロ酢酸エチルを加えた。2 時間後
、室温にあげ、さらに 1 . 5 時間攪拌した。1 N 塩酸を反応液に加え、酢酸エチルで抽出
した。有機層を水洗、乾燥、濃縮し、目的物 (1 0 . 6 g) を得た。

10

$^1\text{H-NMR}$ (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) p p m : 7 . 0 2 (s ,
1 H) , 7 . 6 6 (d , 2 H , J = 8 . 7 H z) , 8 . 1 4 (d , 2 H , J
= 8 . 7 H z)

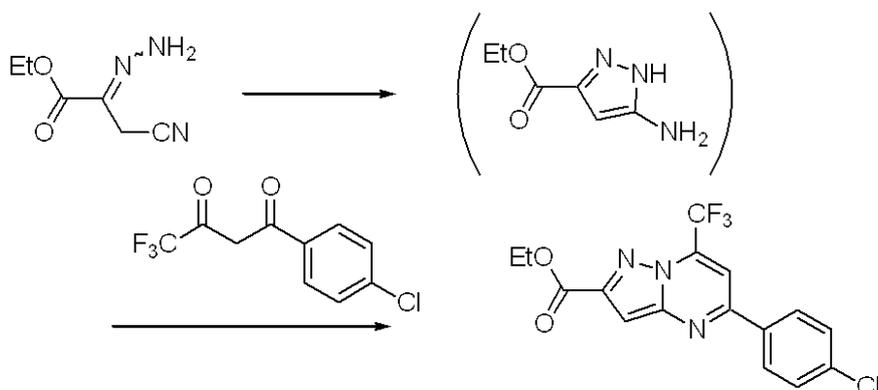
【 0 0 7 4 】

実施例 1 1

エチル 5 - (4 - クロロフェニル) - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 -
a] ピリミジン - 2 - カルボキシレート

【 化 1 9 】

20



30

実施例 1 で得た化合物と実施例 1 0 で得た化合物を用いて、実施例 2 と同様の方法で目的
物 (4 . 3 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (4 0 0 M H z , C D C l ₃) p p m : 1 . 4 7 (t , 3
H , J = 7 . 1 H z) , 4 . 5 1 (q , 2 H , J = 7 . 1 H z) , 7 . 3 8 (s ,
1 H) , 7 . 5 2 - 7 . 5 7 (m , 2 H) , 7 . 7 1 (s , 1 H) , 8
. 0 7 - 8 . 1 2 (m , 2 H)

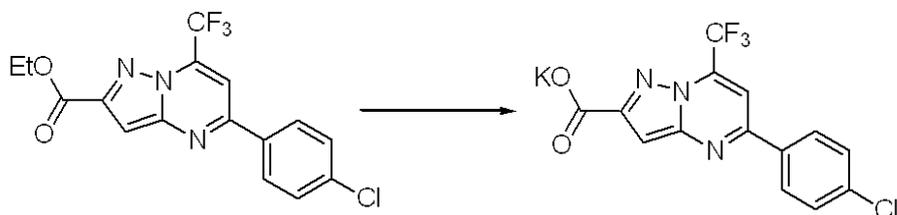
【 0 0 7 5 】

実施例 1 2

5 - (4 - クロロフェニル) - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリ
ミジン - 2 - カルボン酸カリウム

40

【 化 2 0 】



実施例 1 1 で得た化合物から、実施例 3 と同様の方法で目的物 (3 . 5 g) を得た。

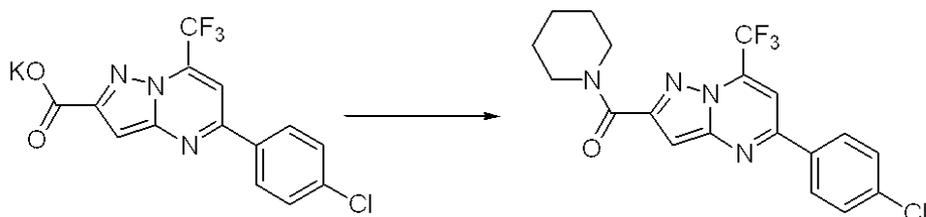
【 0 0 7 6 】

50

実施例 13

5 - (4 - クロロフェニル) - 2 - (ピペリジン - 1 - イルカルボニル) - 7 - (トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

【化 2 1】



10

実施例 12 で得た化合物とピペリジンから、実施例 4 と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm : 1.61 - 1.77 (m, 6H), 3.76 - 3.83 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.51 - 7.56 (m, 2H), 7.63 (s, 1H), 8.06 - 8.11 (m, 2H)

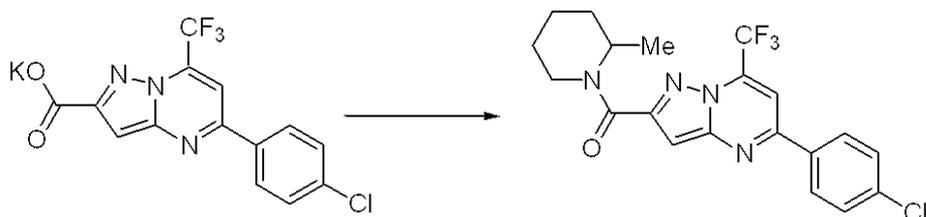
【0077】

実施例 14

5 - (4 - クロロフェニル) - 2 - [(2 - メチルピペリジン - 1 - イル)カルボニル] - 7 - (トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

20

【化 2 2】



実施例 12 で得た化合物と 2 - メチルピペリジンから、実施例 4 と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

30

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm : 1.31 - 1.40 (m, 3H), 1.50 - 1.90 (m, 6H), 2.90 - 3.30 (m, 1H), 4.20 - 4.73 (m, 1H), 4.53 - 5.15 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.51 - 7.56 (m, 2H), 7.63 (s, 1H), 8.06 - 8.11 (m, 2H)

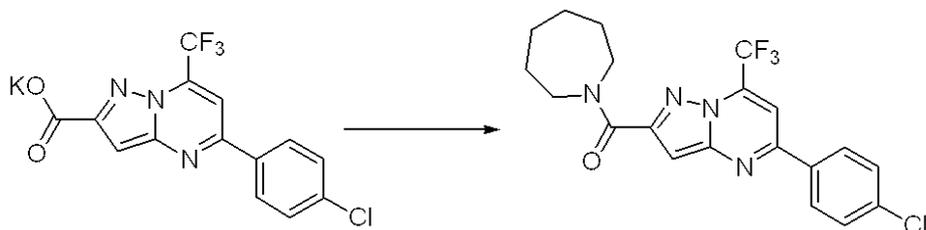
【0078】

実施例 15

2 - (アゼパン - 1 - イルカルボニル) - 5 - (4 - クロロフェニル) - 7 - (トリフルオロメチル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

40

【化 2 3】



実施例 12 で得た化合物とヘキサメチレンイミンから、実施例 4 と同様の方法により目的物 (0.1 g) を得た。

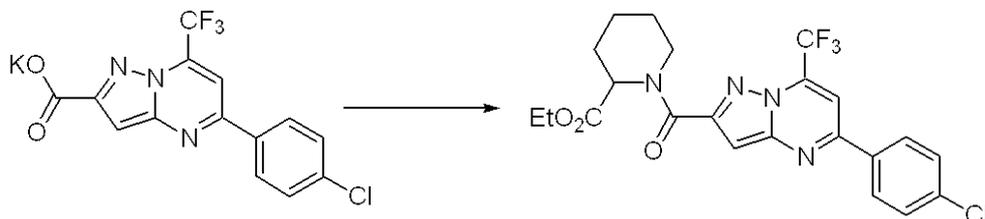
50

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm : 1.60 - 1.71 (m, 4H), 1.80 - 1.92 (m, 4H), 3.73 - 3.84 (m, 4H), 7.23 (s, 1H), 7.51 - 7.56 (m, 2H), 7.63 (s, 1H), 8.06 - 8.11 (m, 2H)

【0079】

実施例 16

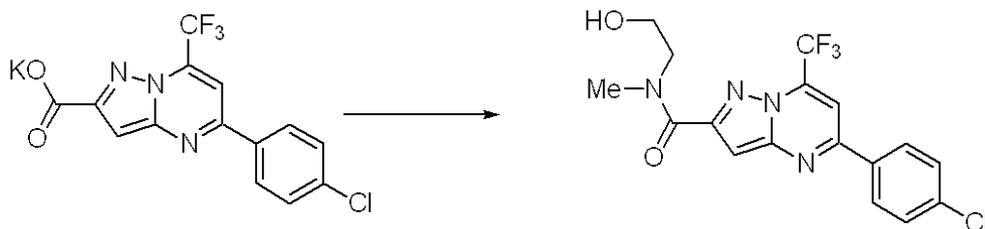
エチル 1 - { [5 - (4 - クロロフェニル) - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 2 - イル] カルボニル } ピペリジン - 2 - カルボキシレート
【化 24】



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm : 1.26 - 1.35 (m, 3H), 1.36 - 1.90 (m, 5H), 2.27 - 2.42 (m, 1H), 3.00 - 3.40 (m, 1H), 4.20 - 4.33 (m, 2H), 4.50 - 4.80 (m, 1H), 5.50 - 5.58 (m, 1H), 7.22 - 7.26 (m, 1H), 7.50 - 7.56 (m, 2H), 7.62 - 7.66 (m, 1H), 8.06 - 8.12 (m, 2H)

実施例 17

5 - (4 - クロロフェニル) - N - (2 - ヒドロキシエチル) - N - メチル - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 2 - カルボキサミド
【化 25】



実施例 12 で得た化合物と 2 - (メチルアミノ) エタノールから、実施例 4 と同様の方法により目的物 (1.8 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm : 3.05 - 3.24 (m, 1H), 3.24 - 3.47 (m, 3H), 3.78 - 4.00 (m, 4H), 7.27 - 7.33 (m, 1H), 7.51 - 7.58 (m, 2H), 7.65 - 7.70 (m, 1H), 8.06 - 8.12 (m, 2H)。

【0080】

実施例 18 : Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) を用いた細胞内カルシウム濃度測定

[材料と方法]

牛胎児血清 10% (10% FBS) 添加 DMEM 培養液 (インビトロジェン社) を用いて培養したヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞を 2.5×10^5 cells/ml に調製し、ポリドリジンでコートした 96 穴黒色プレート (透明底) (ファルコン社) に $80 \mu\text{l}/\text{well}$ 播いて、炭酸ガス培養装置で一晩培養した。Hanks - 20 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) で調製した FLIPR Calcium Assay Kit (Molecular Devices 社) を細胞に $80 \mu\text{l}/\text{well}$ 添加して、1 時間炭酸ガス培養装置にて培養した。Hanks - 20 mM Hepes 緩衝液 (

10

20

30

40

50

pH 7.4)で、PAR2活性化因子として0.0005%に調製したtrypsin (SIGMA社 T8642)を、96穴V底ポリプロピレンプレート(ヌンク社)に添加して試薬プレートとした。FLIPR (Molecular Devices社)で測定する直前に、Hanks-20mM Hepes緩衝液(pH 7.4)で調製した被験物質を、細胞に40 µl/well添加し、プレートシェーカーで攪拌した。被験物質を添加した細胞プレートと試薬プレートをFLIPRにセットし、細胞内カルシウム濃度の変化をCCDカメラにて検出した。測定は室温で70秒間行い、試薬プレートから細胞プレートへの試薬の添加(50 µl/well)は、FLIPR本体内蔵の96well自動分注機で行った。

被験物質の細胞内カルシウム上昇抑制率は、以下の式：

(被験物質存在下における細胞内カルシウム濃度の変化 - Trypsin非存在下における細胞内カルシウム濃度の変化) / (被験物質非存在下における細胞内カルシウム濃度の変化 - 被験物質及びTrypsin非存在下における細胞内カルシウム濃度の変化) で求めることができる。

[結果] 被験物質の細胞内カルシウム上昇抑制率(%)を、表1に示した。

【表1】

化合物	化合物濃度	抑制率 (%)
実施例 4の化合物	10 µg/ml	90.5
実施例 5の化合物	10 µg/ml	52.1
実施例 6の化合物	10 µg/ml	52.8
実施例 7の化合物	10 µg/ml	51.4
実施例 8の化合物	10 µg/ml	79.6
実施例 13の化合物	10 µg/ml	63.7
実施例 14の化合物	10 µg/ml	47.6
実施例 15の化合物	10 µg/ml	67.5
実施例 17の化合物	10 µg/ml	40.5

上記のように、化合物のFLIPRによるアッセイで細胞内カルシウム濃度上昇抑制活性を測定することにより、PAR2阻害活性を有する化合物として選別できる。

【0081】

実施例19： PGE2量の測定を利用したPAR2阻害活性の評価

SW982細胞を 2.5×10^5 細胞/mlになるように各培地で希釈し、96穴プレートに100 µl/wellの細胞を播きこんだ。炭酸ガス培養装置内で一晩前培養した後、培地を除去し、5 µg/ml 化合物入り培地を80 µl/well添加した(コントロール群、コントロールペプチド群、アゴニストペプチド単独群、IL-1群には0.1% DMSO含有培地を添加した)。化合物を入れたウェルには500 uM アゴニストペプチド入り培地を20 µl/well添加した(終濃度は4 µg/ml 化合物・100 uM アゴニストペプチド)。コントロール群のウェルには各培地を20 µl/well、コントロールペプチド群のウェルには500 µM コントロールペプチド入り培地を20 µl/well(終濃度100 µM)、アゴニストペプチド単独群のウェルには500 uM アゴニストペプチド入り培地を20 µl/well(終濃度100 µM)、IL-1群のウェルには50 ng/ml IL-1入り培地を20 µl/well(終濃度10 ng/ml)の割合で添加した。24時間後

(N = 3) に各上清を回収し - 8 0 で測定時まで保管した。各上清中の P G E 2 量の測定は、プロスタグランジン E 2 E I A (C a y m a n c h e m i c a l 5 1 4 0 1 0) を用いて行った。コントロールペプチドの P G E 2 量の値を 阻害率 1 0 0 % の値、アゴニストペプチドの P G E 2 量を阻害率 0 % の値として、実施例の化合物の P G E 2 産生阻害率を計算した。すなわち、被験物質の P A R 2 阻害率は以下の式：

(被験物質におけるアゴニスト存在下での P G E 2 量 - 被験物質におけるコントロールペプチド存在下での P G E 2 量) / (対照におけるアゴニスト存在下での P G E 2 量 - 対照におけるコントロールペプチド存在下での P G E 2 量)

で求めた。実施例の化合物の P G E 2 産生抑制率を表 2 に示した。

【表 2】

	0.25 μ g/ml	1 μ g/ml
実施例 4 の化合物	84	119
実施例 6 の化合物	58	115
実施例 17 の化合物	71	111
実施例 13 の化合物	97	75
実施例 8 の化合物	21	135
実施例 14 の化合物	56	192
実施例 15 の化合物	91	119
実施例 9 の化合物	55	91
実施例 16 の化合物	98	131

10

20

上記のように、化合物の P G E 2 産生抑制活性を測定することにより、P A R 2 阻害活性を有する化合物として選別できる。

30

【0082】

実施例 20 : P A R 2 の痒み惹起活性

7 週齢の雄 I C R マウスの肩背部皮内にアゴニストペプチドまたはコントロールペプチドを 5 0 p m o l / 2 0 u l 投与した。投与後 1 0 分間、後肢で投与部付近を引っかく行動を計測した (後肢が地面から離れて、再度戻るまでを 1 回と計測した) 。結果を表 3 に示した。この結果から、アゴニストペプチド (配列番号 : 2) を投与した群は、コントロールペプチド (配列番号 : 4) を投与した群と比較して、著しく投与部位付近を引っかく回数が多いことがわかった。

更に、実施例 17 の化合物 (2 0 0 m g / k g) を経口で投与した後、投与化合物の血中濃度を考慮して 3 0 分後にアゴニストペプチドを投与した。上記と同様にアゴニストペプチド投与後 1 0 分間、後肢で投与部付近を引っかく行動を計測した。結果を表 4 に示した。この結果から、実施例 1 の化合物により、アゴニストペプチドにより惹起された引っかき行動が抑制されることがわかった。

40

【表 3】

投与液	引っかき回数
生理食塩水 (ペプチド溶解溶媒)	2 回
S L I G R L (アゴニストペプチド)	2 5 回
L S I G R L (コントロールペプチド)	7 回

50

【表 4】

投与液	引っかき回数
-----	-----
実施例 17 の化合物 + S L I G R L	1 2 回
S L I G R L	2 4 回
-----	-----

【 0 0 8 3 】

【 発明の効果 】

本発明により、痒みを伴う皮膚疾患治療剤をスクリーニングする方法を提供することが可能になった。また、P A R 2 阻害活性を有する化合物を有効成分として含有する痒みを伴う皮膚疾患治療剤を提供することが可能になった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

// C 0 7 D 487/04

F I

C 0 7 D 487/04 1 4 2

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 CB06 MA01 MA04 NA14 ZA89