

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-525706

(P2022-525706A)

(43)公表日 令和4年5月18日(2022.5.18)

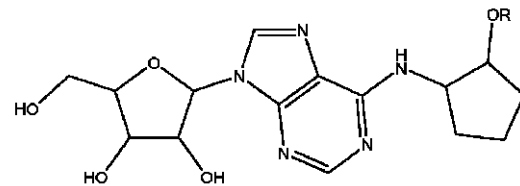
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 H	19/167 (2006.01)	C 0 7 H	19/167	C S P	4 C 0 5 7
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	25/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/04		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	25/20 (2006.01)	A 6 1 P	25/20		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-504738(P2022-504738)	(71)出願人	521435318
(86)(22)出願日	令和2年3月19日(2020.3.19)		サ・ユニバーシティ・オブ・ウォーリック
(85)翻訳文提出日	令和3年11月16日(2021.11.16)		The University of W
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/050734		arwick
(87)国際公開番号	WO2020/188288		英国シーブイ4・8ユーダブリュー、コ
(87)国際公開日	令和2年9月24日(2020.9.24)		ベントリー、カービー・コーナー・ロー
(31)優先権主張番号	1903900.7		ード、ユニバーシティ・ハウス
(32)優先日	平成31年3月21日(2019.3.21)	(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		弁理士 山尾 憲人
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100150500
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 森本 靖
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100176474
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 秋山 信彦
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100136696
	最終頁に続く		最終頁に続く

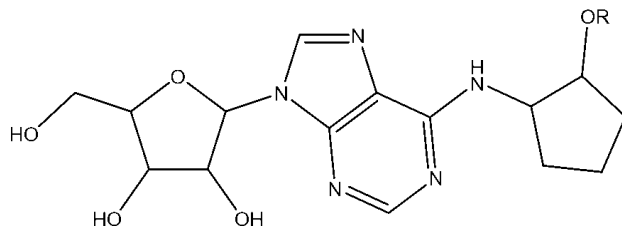
(54)【発明の名称】 アデノシン受容体アゴニスト

(57)【要約】

本発明は、神経系障害および疼痛の治療に使用するための、式(I)〔式中、Rは本明細書において定義される〕で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩または異性体、に関する。化合物は、神経系で優先的に作用し、心臓血管系と呼吸器系への影響を回避する、選択的A₁アデノシン受容体アゴニストである。本発明はまた、該化合物を含む医薬組成物に関する。



(I)



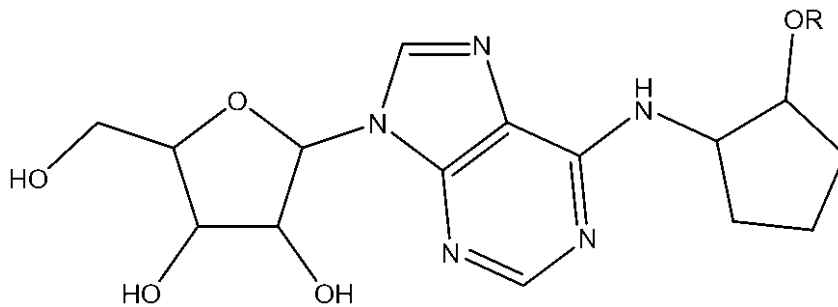
(I)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経系障害または疼痛の治療に使用するための、式 (I) :

【化 1】



10

(I)

【式中、

R は、独立して、水素、または、 $R^1 R^2 R^3$ であり；

R^1 は、独立して、 C_{1-10} アルキルであり；

R^2 は、独立して、アリールであり；および、

R^3 は、独立して、水素、OH、 $C(O)NH_2$ 、直鎖または分岐の C_{1-10} アルキル、または C_3-C_8 シクロアルキルである。]

20

で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩または異性体。

【請求項 2】

(i) R^1 が、 CH_2 であり；および／または、

(ii) R^2 が、フェニルであり；および／または、

(iii) R^3 が、水素、OH、 $C(O)NH_2$ 、直鎖または分岐の C_{4-10} アルキル、または C_3-C_8 シクロアルキルである、

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

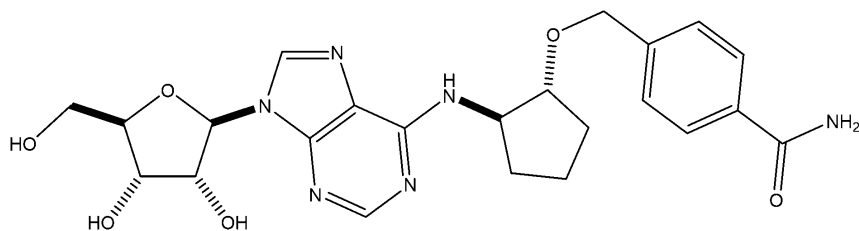
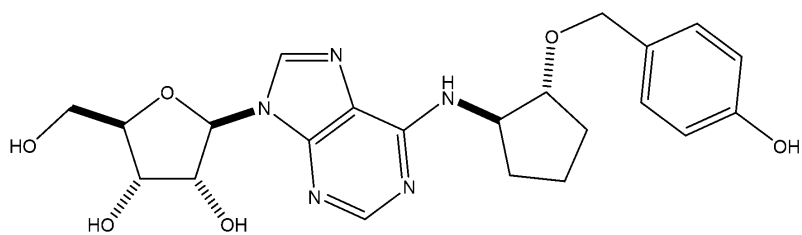
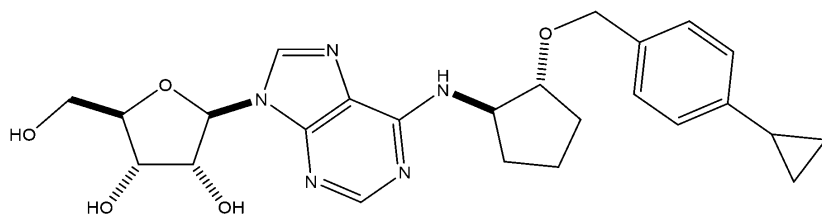
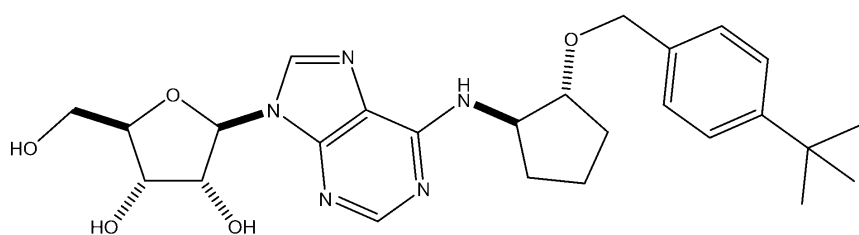
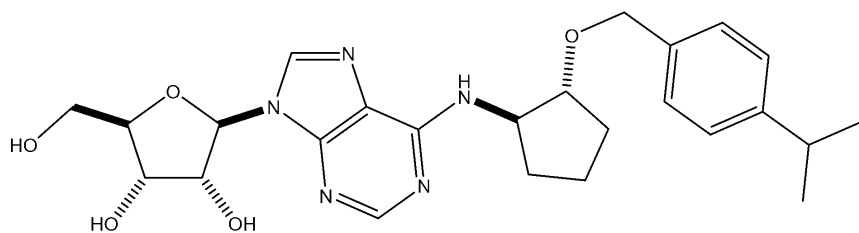
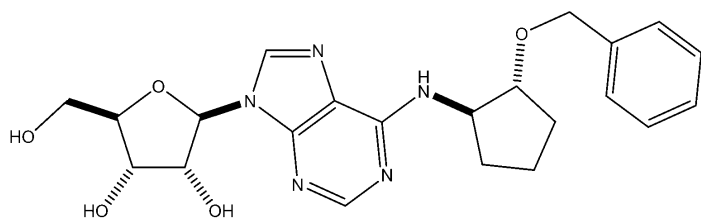
下記：

30

40

50

【化 2】



からなる群から選択される化合物である、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 4】

神経系障害が、てんかん、虚血、脳卒中、外傷性脳損傷（TBI）、低酸素症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、脳性麻痺、脳炎、髄膜炎、副腎白質ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、フェニルケトン尿症、脊髄損傷、認知症、統合失調症、および、不眠症を含めた睡眠障害、からなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5】

10

20

30

40

50

該化合物が、 $G\alpha$ タンパク質サブユニット $G\alpha b$ を活性化しない、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 6】

該化合物が、シナプス後 $A_1 R$ のアンタゴニストとして作用する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7】

該化合物が、膜過分極を誘発することができない、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

前記使用が、徐脈、低血圧、及び呼吸困難のうちの少なくとも 1 つを引き起こさない、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 9】

前記使用が、心臓血管または呼吸器の疾患に罹患しているか、そのリスクがあるか、またはその治療を必要としている対象に、化合物を投与することを含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 10】

疼痛が、神経障害性、侵害受容性、末梢性急性および慢性、体細胞性、内臓、神経腫、糖尿病性神経障害、外科的疼痛、化学療法誘発性疼痛、骨痛、炎症性、幻肢、筋肉痛、および多発性硬化症関連疼痛、からなる群から選択され；場合により、骨痛が、骨折痛または癌疼痛であってよい、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 11】

式 (I)

〔式中、

(i) R^1 は、 CH_2 であり；

(ii) R^2 は、アリールであり；および、

(iii) R^3 は、独立して、水素、 OH 、 $C(O)NH_2$ 、直鎖または分岐の $C_1 - C_{10}$ アルキル、または $C_3 - C_8$ シクロアルキルである。〕

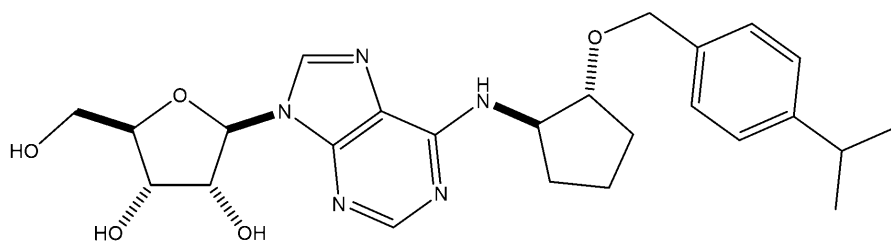
で示される、化合物。

【請求項 12】

該化合物が、下記：

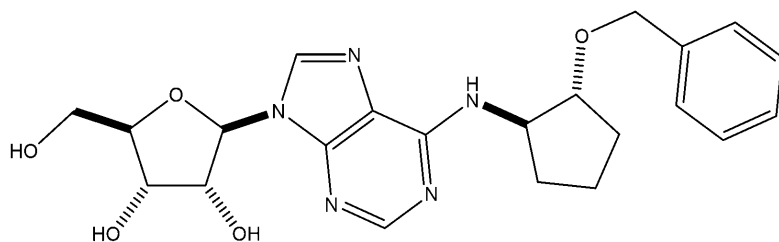
30

【化 3】



と

40



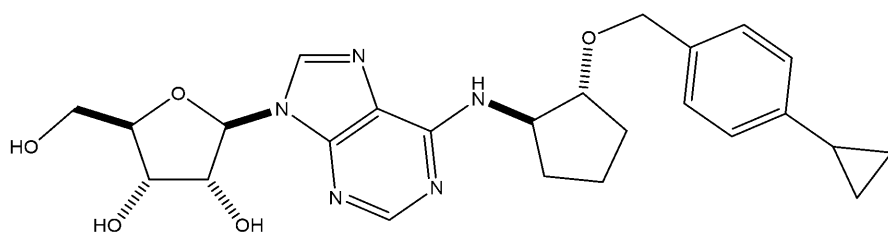
で示されるものでない、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

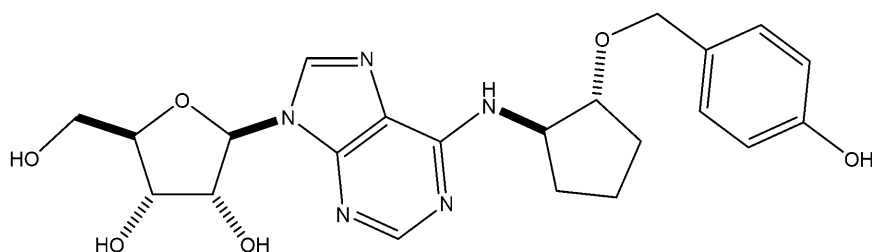
50

下記：

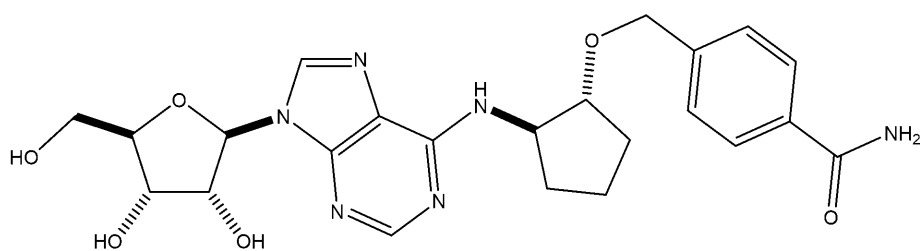
【化 4】



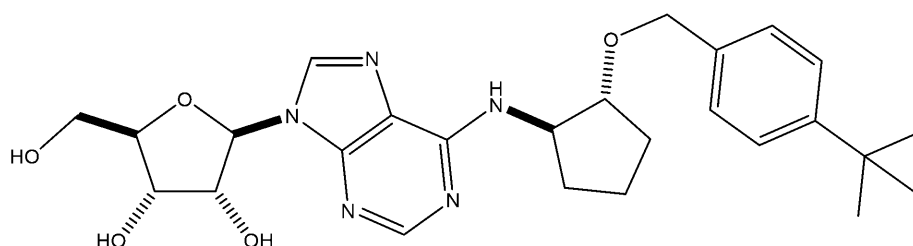
10



20



30



からなる群から選択される化合物である、請求項 1 1 または請求項 1 2 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩または異性体。

【請求項 1 4】

医薬として使用するための、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の式 (I) の化合物、および薬学的または治療的に許容される賦形剤または担体を含む、医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、アデノシン受容体アゴニスト、その製造方法、例えば医薬としてのその使用、および神経系障害および疼痛の治療における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プリンヌクレオシドアデノシンは、痛み、てんかんおよび脳卒中（脳虚血）を含む多くの生理学的プロセスおよび神経系の病状に関与する強力な神経調節物質である（例えば、J.

50

Sawynok, Neuroscience, 2016, 338, 1-18; D. Boison, Neuropharmacology, 2016, 104, 131-139; Borea et al., Trends Pharmacol. Sci., 2016, 37, 419-434; N. Dale et al., Curr. Neuropharmacol., 2009, 7, 160-179、参照)。アデノシンは、A₁、A_{2A}、A_{2B}、およびA₃と称される、細胞表面Gタンパク質共役受容体(GPCR)の複数のサブタイプを介して作用し、A₁受容体(A₁R)は脳内で最も広い分布を示す(例えば、B. B. Fredholm et al., N-S Arch. Pharmacol., 2000, 362, 364-374、参照)。

【0003】

てんかん発作が活発な間に、アデノシンが放出されてニューロン上のA₁Rを活性化し、これが負のフィードバック機構として作用して、現在の活性バーストを終結させ、次の活性バーストの発生を遅らせる(例えば、M. J. During et al., Ann. Neurol., 1992, 32, 618-624; N. Dale et al., 2009; D. Boison, 2016; M. J. Wall et al., J. Neurophysiol., 2015, 113, 871-882、参照)。海馬(一般にてんかんで影響を受ける)では、シナプス前A₁Rの活性化は、錐体細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を抑制し、一方、シナプス後A₁Rの活性化は、特定のK⁺チャネルの活性化を通じて錐体細胞の膜電位を過分極化する(例えば、G. R. Siggins et al., Neurosci. Lett., 1981, 23, 55-60; W. R. Proctor et al., Brain Res., 1987, 426, 187-190; T. V. Dunwiddie et al., J. Pharmac. Exp. Ther., 1989, 249, 31-37; S. M. Thompson et al., J. Physiol., 1992, 451, 347-363、参照)。現在、A₁R活性化のこれら2つの作用を薬理的に分けて分析することはできないため、発作の抑制に対するこれら2つのプロセスの相対的な寄与は不明なままである。シナプス前およびシナプス後のA₁受容体は、異なるセカンドメッセンジャーおよびGタンパク質を介してその作用を生じさせる可能性があるが、これは現在不明なままである。

10

20

【0004】

アデノシンの少数のN⁶-二環式およびN⁶-(2-ヒドロキシ)-シクロペンチル誘導体は、組換えA₁Rに対して高い効力および選択性を有することが報告されている(例えば、A. Knight et al., J. Med. Chem., 2016, 59, 947-964、参照)。そのようなリガンドがA₁Rでシグナル伝達バイアスを示すかどうかを決めることは有利であろう(すなわち、例えば、脳における、シナプス前またはシナプス後の受容体の優先的活性化)。これらは、無傷の組織の天然受容体でのアデノシンのシナプス前およびシナプス後の作用の重要性を確立するための、および神経系障害および疼痛におけるそれらの治療の可能性のための重要なツールとなるためである。

30

【0005】

アデノシンA₁受容体は、神経系で高密度に発現されるだけでなく、心臓血管系(CVS)、特に心拍数を低下させるように作用(徐脈)する心臓組織でも高い発現を示す。したがって、現在利用可能なアゴニストによる広く分布しているA₁受容体(A₁R)の活性化は、シナプス伝達や神経過分極の抑制などの神経系と、心臓の減速(徐脈)による心肺系の両方で、複数の作用を誘発し、血圧を低下させ(低血圧)、呼吸に影響を与える(呼吸困難)。これらの複数の作用は、痛み、てんかん、脳虚血などの幅広い臨床症状において可能性があるにもかかわらず、生命を変える薬としてのA₁Rアゴニストの見込みを厳しく制限している。したがって、神経系の選択性があり、CVSと呼吸器の副作用を回避する、リガンドを提供することが有利である。

40

【0006】

無差別のGタンパク質共役受容体カップリングの治療上の限界は、バイアス型アゴニストの開発を通じて克服され得る。バイアス型アゴニストは、ある細胞内シグナル伝達カスケードを別のカスケードよりも選択的に動員する化合物である。しかしながら、これまでのところ、無傷の生理学的システムでGαバイアス型アゴニズムを誘発できるA₁R特異的アゴニストは報告されていない。

【発明の概要】

【0007】

50

本発明の目的は、神経系障害および疼痛の治療に使用することができる、C V Sおよび／または呼吸影響を回避しながら、神経系における明らかな優先的作用でシグナル伝達バイアスを示す、アデノシンA₁受容体アゴニストを提供することである。

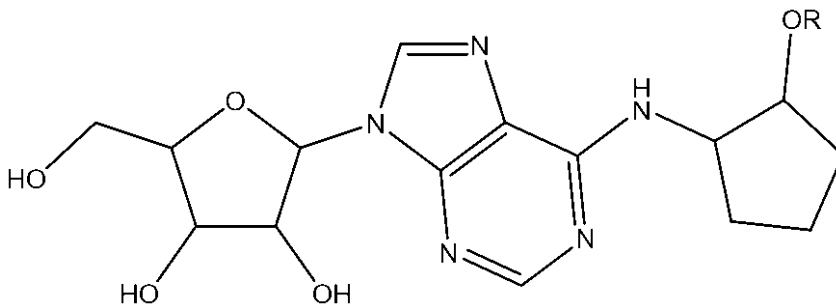
【0008】

WO 2011 / 119919は、ベンジルオキシシクロペンチルアデノシン（BCPA）化合物、およびそれらの選択的A₁アデノシン受容体アゴニストとしての使用について記載している。

【0009】

したがって、本発明の第1の態様は、神経系障害または疼痛の治療に使用するための、下記の一般式（I）により表される化合物、またはその薬学的に許容される塩または異性体、例えば、アデノシン受容体アゴニスト、を提供するものであり、式（I）は、

【化1】



（I）

で示され、

【0010】

上記式中、Rは、独立して、水素、または、R¹R²R³であり；

i . R¹は、独立して、C₁ - 10アルキルであり；

ii . R²は、独立して、アリールであり；および、

iii . R³は、独立して、水素、OH、C(O)NH₂、直鎖または分岐のC₁ - C₁₀アルキル、またはC₃ - C₈シクロアルキルである。

【0011】

いくつかの実施形態において、Rは、水素である。

【0012】

いくつかの実施形態において、Rは、R¹R²R³である。

【0013】

いくつかの実施形態において、上記で特定された一般式におけるR¹は、アルキル基を表す。R¹で表される1～10個の炭素原子を有するアルキル基は、1～5個の炭素原子を有する直鎖または分岐のアルキル基であり得る。1～10個の炭素原子を有するアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基などが挙げられる。アルキル基は、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、またはn-ペンチル基であり得る。

【0014】

いくつかの実施形態において、R¹は、CH₂である。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記で特定された一般式におけるR²は、アリール基を表す。6～30個の炭素原子を有するアリール基は、6～30個の炭素原子を有する、芳香族単環式基、芳香族多環式基、または芳香族縮合環式基であり得、好ましくは、6～15個の炭素原子を有する、芳香族単環式基、芳香族多環式基、または芳香族縮合環式基であり、例えば、6～12個の炭素原子を有する芳香族単環式基である。6～30個の炭素原

子を有するアリール基の具体例としては、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、インデニル基などが挙げられる。

【0016】

いくつかの実施形態において、 R^2 は、フェニル基である。

【0017】

いくつかの実施形態において、上記で特定された一般式における R^3 は、アルキル基を表し得る。 R^3 で表される 1～10 個の炭素原子を有するアルキル基は、好ましくは、1～5 個の炭素原子を有する直鎖または分枝のアルキル基である。1～10 個の炭素原子を有するアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 s -ブチル基、 t -ブチル基、 n -ペンチル基、 n -ヘキシル基、 n -ヘプチル基、 n -オクチル基、 n -ノニル基、 n -デシル基などが挙げられる。アルキル基は、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 s -ブチル基、 t -ブチル基、または n -ペンチル基であり得る。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、分岐の C_{1-C10} アルキルである。

【0019】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、分岐の C_{3-C4} アルキルである。

【0020】

いくつかの実施形態において、上記で特定された一般式における R^3 は、シクロアルキル基を表し得る。 R^3 で表される 3～8 個の炭素原子を有するシクロアルキル基は、5～8 個の炭素原子を有する、単環式、多環式、または架橋式のシクロアルキル基であり得る。

20

【0021】

いくつかの実施形態において、シクロアルキル基は、3～8 個の炭素原子を有する単環式シクロアルキル基である。3～8 個の炭素原子を有するシクロアルキル基の具体例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基などが挙げられる。

【0022】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、 C_{3-C8} シクロアルキルである。

【0023】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、シクロプロピルである。

30

【0024】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、OH である。

【0025】

いくつかの実施形態において、 R^3 は、 $C(O)NH_2$ である。

【0026】

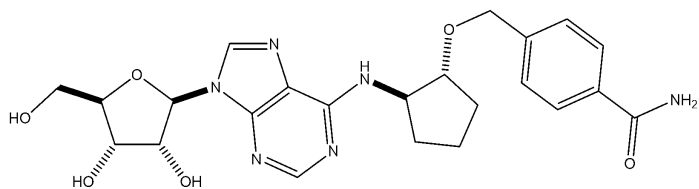
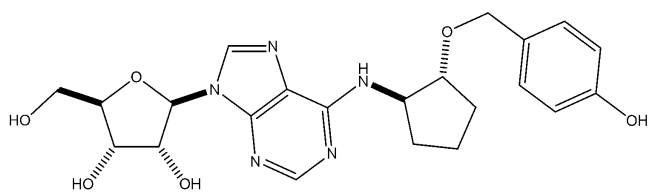
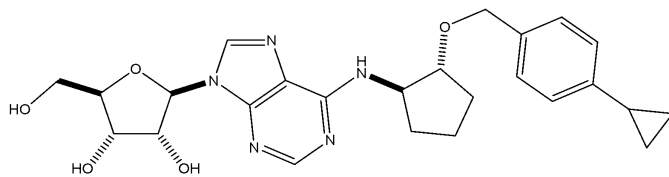
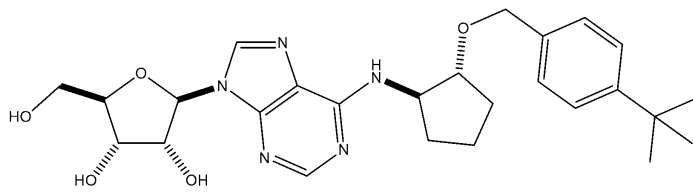
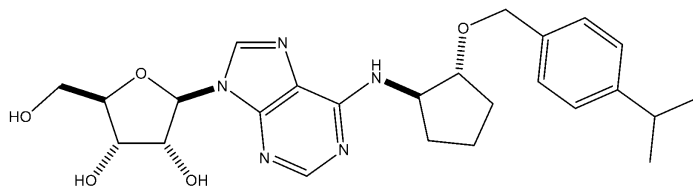
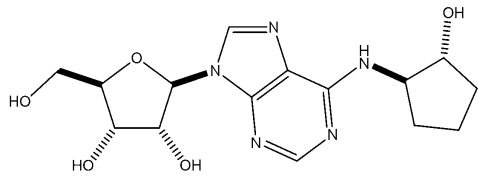
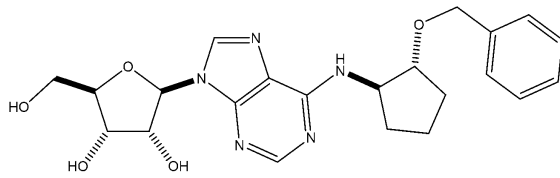
いくつかの実施形態において、 R^3 は、 t -ブチルである。

【0027】

式 (I) の範囲内の化合物としては、例えば、下記のもの：

40

【化 2】



またはその薬学的に許容される塩、が挙げられる。

【0028】

実施形態において、式（I）の化合物は、下記：

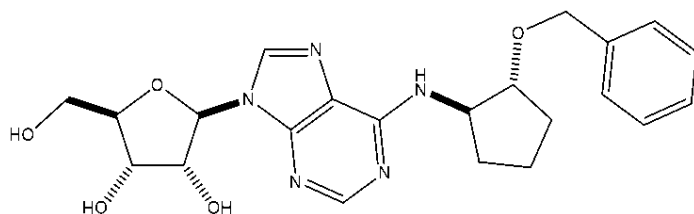
10

20

30

40

【化 3】



で示される化合物ではない。

【0029】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書に記載の式（I）の化合物、および薬学的または治療的に許容される賦形剤または担体を含む、医薬組成物が提供される。

【0030】

本発明の化合物は、アデノシン受容体アゴニストである。いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、A₁受容体（A₁R）のアゴニストである。既知のA₁Rアゴニストと同様に、式（I）の化合物はシナプス伝達を阻害し得る。

【0031】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、神経系障害の治療に使用するためのものである。

【0032】

神経系障害は、てんかん、虚血（例えば、脳卒中）、外傷性脳損傷（TBI）、低酸素症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、脳性麻痺（および、脳炎、髄膜炎、副腎白質ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、フェニルケトン尿症などの、痙攣を引き起こし得るその他の障害）、脊髄損傷、認知症、統合失調症、および、不眠症を含む睡眠障害、からなる群から選択され得る。

【0033】

いくつかの実施形態において、神経系障害は、てんかん、虚血、またはTBIである。

【0034】

本発明はまた、治療有効量の本明細書で定義される化合物または医薬組成物を、それを必要とする患者に投与するステップを含む、神経系障害または疼痛を治療する方法、を包含する。

【0035】

驚くべきことに、式（I）の化合物であるBnOCPAは、シナプス前A₁Rの活性化を介してシナプス伝達を阻害するが、シナプス後A₁Rを活性化せず、膜過分極を誘導しないことが、本発明者らによって見出された。代わりに、この化合物は、シナプス後A₁Rにおいて受容体アンタゴニストと同様に機能することが観察された。本発明者らはさらに驚くべきことに、この化合物は、選択性が高く、既知のA₁Rアゴニストとは異なり、G_αサブユニットG_{ob}を活性化できるが、G_{oa}を活性化できないことを確かめた（表1）。理論に拘束されるものではないが、G_{ob}に対するこの選択性は、化合物が、主にサブユニットG_{oa}のA₁R活性化によって起こると考えられる膜電位過分極を引き起こさない理由を説明すると考えられる。したがって、BnOCPAは、個々のG_αサブユニット間で強いバイアスを示す。当業者は、A₁RのG_α共役がそれらの局在化よりも重要であり、細胞、組織および器官に対するA₁Rの作用が、それらの構造内に存在し、A₁Rに関連した、G_αサブユニットに依存するが、それらの構造内のA₁Rの場所には依存しないことを理解するであろう。

【0036】

表1：A₁RアゴニストによるG_α活性化の要約

着色ボックスは活性化があることを示し、着色のないボックスは、活性化がないことを示す。CHO-K1細胞におけるcAMP産生の阻害の指標となるIC₅₀値が示されている。

10

20

30

40

50

【表 1】

アゴニスト	IC ₅₀ (nM)	Gα サブユニット					
		Gi1	Gi2	Gi3	Goa	Gob	Gz
アデノシン	3.5						
COA	0.5						
NECA	0.2						
BnOCPA	0.7						
HOCPA	0.8						

10

【0037】

神経系障害および疼痛などの病気の治療におけるA₁Rアゴニストの使用に対する主要な障害は、CVSにおける副作用、例えば、心拍数および血圧の低下、および呼吸の変化であるため、BnOCPAのサブユニット選択性は特に重要である。これらの副作用は、心臓で高レベルに発現しているGoaを介して影響を受ける可能性がある。しかしながら、既知のA₁Rアゴニストとは異なり、BnOCPAは心臓のA₁Rを活性化しないことが見出され、心拍数、血圧、呼吸に影響を与えなかった。

20

【0038】

こうして、驚くべきことに、本発明による化合物は、CVSまたは呼吸器系に望ましくない副作用を引き起こすことなく、神経系障害および疼痛の治療に有用であることが見出された。これらの観察により、本発明の化合物は、神経系障害または疼痛を患っていることに加えて、心血管疾患または呼吸器疾患に罹患しているか、またはそのリスクがある患者の治療に使用するのに、特に適している。

30

【0039】

したがって、いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、Goaを活性化しない。例えば、化合物は、Gobを活性化するが、Goaを活性化しない可能性がある。当業者は、共通の一般的な知識、または本明細書に記載の方法を用いて、与えられたGタンパク質サブユニットを活性化する化合物の能力を決定することができる。

【0040】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、Gi1、Gi2、Gi3、Goa、またはGzのいずれも活性化しない。

【0041】

いくつかの実施形態において、式(I)の化合物は、Gobのみを活性化する。

40

【0042】

当業者に知られているように、「Goa」および「Gob」との用語は、Gタンパク質サブユニットGαの異なるアイソフォームを意味する。当業者はさらに、本発明の化合物および他のA₁Rアゴニストが、Gタンパク質サブユニットを直接活性化しないが、A₁受容体に結合することによってそれらの効果を間接的に発揮することを理解するものである。その後、A₁Rアゴニスト複合体は、Gタンパク質サブユニットを活性化する。

【0043】

式(I)の化合物は、シナプス伝達を阻害することができる可能性がある。シナプス伝達を阻害する化合物の能力は、本明細書に記載の方法を用いて当業者が決定することができ

50

る。

【0044】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、シナプス前 A₁R を活性化することができるが、シナプス後 A₁R を活性化することができない。式（I）の化合物は、シナプス後 A₁R のアンタゴニストであり得るか、またはそれと類似の方法で機能し得る。A₁R の活性化は、本明細書に記載の方法を用いて決定することができる。

【0045】

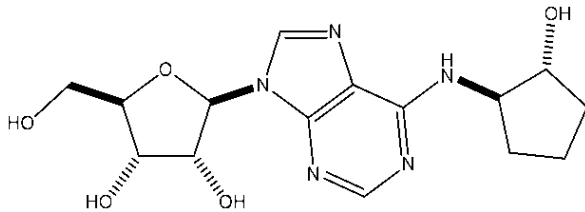
いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、膜過分極を誘発することができない。膜過分極を誘発する化合物の能力は、本明細書に記載の方法を用いて評価することができる。

10

【0046】

いくつかの実施形態において、化合物は、下記：

【化4】



20

で示されるものではない。

【0047】

いくつかの実施形態において、本発明は、神経系障害または疼痛の治療に使用するための、下記の一般式（I）によって表される化合物であって、前記使用は、以下の副作用：徐脈、低血圧および呼吸困難、の少なくとも1つを引き起こさない化合物、を提供する。

【0048】

さらに、神経系障害または疼痛の治療に使用するための、本明細書で定義される化合物であって、治療される患者がまた、心臓血管または呼吸器の疾患に罹患しているか、そのリスクがあるか、またはその治療を必要としている、化合物、が提供される。

【0049】

心血管疾患は、急性冠状動脈症候群、狭心症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、頸動脈アテローム性硬化症、脳血管疾患、脳梗塞、うっ血性心不全、先天性心疾患、冠状動脈性心臓病、冠状動脈疾患、冠状動脈プラーク安定化、脂質異常症、異常リポタンパク血症、内皮機能障害、家族性高コレステロール血症、家族性複合型高脂血症、低アルファリポタンパク血症、高トリグリセリド血症、高ベータリポタンパク血症、高コレステロール血症、高血圧、高脂血症、間欠性跛行、虚血、虚血再灌流傷害、虚血性心疾患、心臓虚血、メタボリックシンドローム、多発梗塞性認知症、心筋梗塞、肥満、末梢血管疾患、再灌流障害、再狭窄、腎動脈アテローム性硬化症、リウマチ性心疾患、脳卒中、血栓性障害、および一過性脳虚血発作、からなる群から選択され得る。

30

【0050】

「呼吸器疾患」との用語は、任意の肺疾患または肺機能の障害を意味すると解釈されるものである。そのような疾患は、拘束性疾患と閉塞性疾患に大きく分けることができる。呼吸器疾患は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺気腫、慢性気管支炎、気管支拡張症、細気管支炎、嚢胞性線維症、または喘息などの、閉塞性疾患であり得る。呼吸器疾患は、間質性肺疾患（特発性肺線維症など）、サルコイドーシス、脊柱側弯症、神経筋疾患（筋ジストロフィー、または筋萎縮性側索硬化症（ALS）など）、または結核などの、拘束性疾患であり得る。

40

【0051】

いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、疼痛の治療に使用するためのものである。

50

【0052】

疼痛は、神経障害性、侵害受容性、末梢性急性と慢性、体細胞性、内臓、神経腫、糖尿病性神経障害、外科的疼痛、化学療法誘発性疼痛、骨痛（例えば、骨折または癌）、炎症性、幻肢、筋肉痛、および多発性硬化症関連疼痛からなる群から選択され得る。

【0053】

いくつかの実施形態において、疼痛は、侵害受容性疼痛または神経障害性疼痛、例えば、慢性神経障害性疼痛、である。

【0054】

治療有効量は、例えば、式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩について、本明細書に記載の用量範囲から開始して、当業者によって決定され得る。

10

【0055】

本発明の化合物は、 $2 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $4 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、または $5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与され得る。いくつかの実施形態において、本発明の化合物は、 $5 \sim 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、または $8 \sim 15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、例えば、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、の用量で投与される。1日1回、2回、3回またはそれ以上の用量で投与され得る。当業者によって決定されるように、用量は、治療を提供するのに十分な期間、2日以上連続して投与され得る。

【0056】

本発明の第3の態様は、本明細書に記載の式（I）の化合物を提供する。

20

【0057】

本発明の第4の態様は、医薬として使用するための、本明細書に記載の式（I）の化合物を提供する。

【0058】

本発明の第3または第4の態様のいくつかの実施形態において、Rは、 $R^1 R^2 R^3$ であり、ここで、

i. R^1 は、 C_{1-10} アルキルであり；

ii. R^2 は、アリールであり；および、

iii. R^3 は、独立して、水素、OH、 $C(O)NH_2$ 、直鎖または分岐の C_{1-10} アルキル、または C_3-C_8 シクロアルキルである。

30

【0059】

本発明の第3または第4の態様のいくつかの実施形態において、Rは、 $R^1 R^2 R^3$ であり、ここで、

i. R^1 は、 CH_2 であり；

ii. R^2 は、フェニルであり；および、

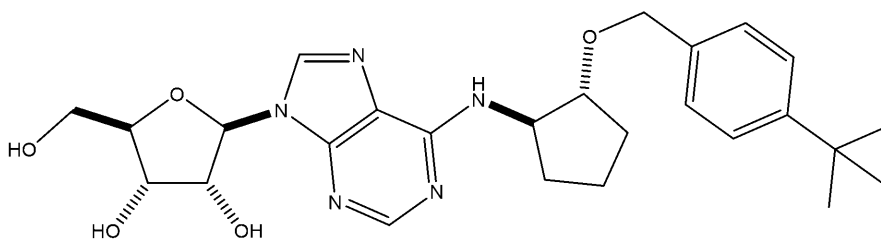
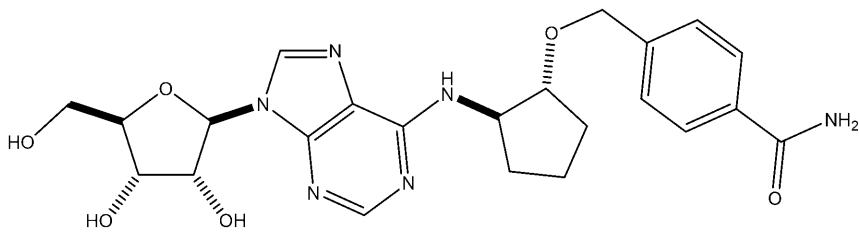
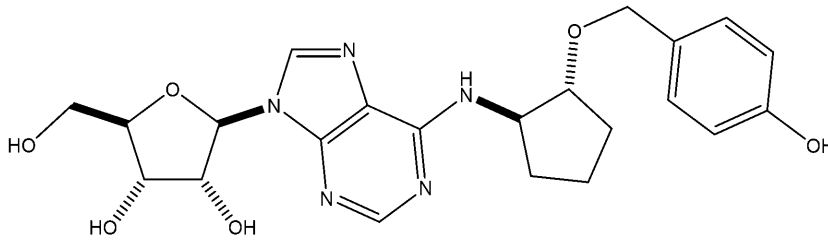
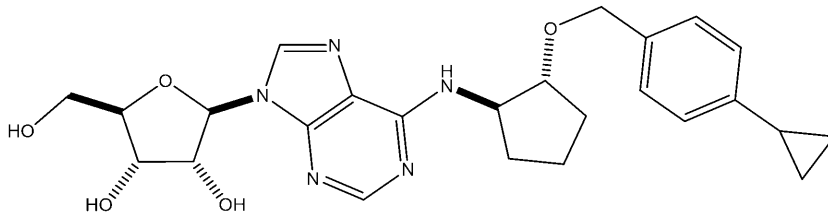
iii. R^3 は、独立して、水素、OH、 $C(O)NH_2$ 、直鎖または分岐の C_{1-10} アルキル（例えば、 t -ブチルなどの分岐の C_4-C_{10} アルキル）、または C_3-C_8 シクロアルキル（例えば、シクロプロピル）である。

【0060】

本発明の第3または第4の態様のいくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、下記：

40

【化 5】

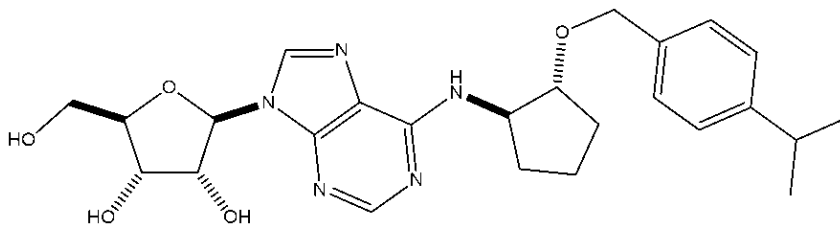


からなる群から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩または異性体、である。

【 0 0 6 1】

本発明の第 3 または第 4 の態様のいくつかの実施形態において、化合物は、下記：

【化 6】



のものでない。

【 0 0 6 2】

さらに、疾患または病気の治療のための医薬の製造における、本明細書で定義される式 (I) の化合物の使用、が提供される。

【 0 0 6 3】

本発明はまた、本明細書で定義される治療有効量の化合物または医薬組成物を、それを必要とする患者に投与するステップを含む、疾患または病気を治療する方法、を包含する。

【 0 0 6 4】

本発明の関連する態様による治療に適した疾患および病気は、神経系障害および疼痛であ

10

20

30

40

50

る。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】海馬におけるシナプス伝達に対する典型的なアデノシン受容体アゴニストの作用を示す。

【図2】海馬におけるシナプス伝達に対する非典型的なA₁受容体アゴニスト化合物BnOCPAの作用を示す。

【図3】発作活性に対するアデノシン受容体アゴニストの異なる作用を示す。

【図4-1】錐体細胞の膜電位に対する、典型的および非典型的なアデノシン受容体アゴニストBnOCPAの異なる作用を示す。

【図4-2】錐体細胞の膜電位に対する、典型的および非典型的なアデノシン受容体アゴニストBnOCPAの異なる作用を示し、図4-1の続きである。

【図5】典型的なA₁Rアゴニストと比較した、BnOCPAの異なるGタンパク質活性化プロファイルを示す。

【図6】TM7の末端部分上の不活性なN7・49PXXY7・53モチーフを参照として考慮した、平均二乗偏差(RMSD)分布を示す。

【図7】A₁RクライオEM構造6D9Hで報告される、GαCT(アルファ炭素原子)の最後の15残基のRMSDの頻度分布のプロットを示す。

【図8】心拍数および平均動脈圧に対する典型的なアデノシン受容体アゴニストと比較した、BnOCPAの異なる効果を示す。

【図9】BnOCPAが呼吸抑制を引き起こさない強力な鎮痛剤であることを示す。

【図10】脊髄の脊髄侵害受容性(疼痛感知性)求心性神経におけるシナプス伝達に対するBnOCPAおよびCPAの効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

以下の定義は、明細書および添付の特許請求の範囲の全体に適用されるものとする。

本明細書において、「含む」との用語は、含むこと、および、からなること、の両方を意味すると解釈されるものである。したがって、本発明が「化合物を含む組成物」に関する場合、この用語は、他の有効成分が存在し得る組成物と、定義された1つの有効成分のみからなる組成物の両方を包含することを意図する。特に断りのない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の通常の専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。同様に、本明細書で参照される、すべての発行物、特許出願、すべての特許、および他のすべての参考文献は、(法的に許容される場合)参照により組み込まれる。

【0067】

特に断りや指示のない限り、「アルキル」との用語は、非置換であるかまたは置換されてもよい、C₁-8、C₁-6またはC₁-4などの、一価の飽和の、直鎖または分枝の炭素鎖を意味する。この基は、ハロゲン(F、Cl、BrまたはI)、ヒドロキシ、ニトロ、およびアミノのうちの1つ以上から独立して選択される置換基で、部分的または完全に、置換されていてもよい。アルキル基としては、限定されるものではないが、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどが挙げられる。アルキル基は、好ましくは、1~6個の炭素原子、例えば、1~4個の炭素原子、を含む。

【0068】

特に断りや指示のない限り、「シクロアルキル」との用語は、一価の飽和環状炭素系を意味する。特に断りのない限り、シクロアルキル基は、1つ以上の位置で適切な置換基で置換されていてもよい。複数の置換基が存在する場合、それらは同じであっても異なってもよい。適切な置換基としては、ハロゲン(F、Cl、BrまたはI)、ヒドロキシ、ニトロ、およびアミノが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0069】

特に断りや指示のない限り、「アリール」との用語は、芳香族環系を包含することを意図している。そのような環系は、単環式または多環式（例えば、二環式）であり得、少なくとも1つの不飽和芳香族環を含む。これらが多環式環を含む場合、縮合していてもよい。好ましくは、そのような系は、6～20個の炭素原子、例えば、6または10個の炭素原子、を含む。そのような基としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、およびインデニルが挙げられる。好ましいアリール基は、フェニルである。

【0070】

「治療有効量」との用語は、疾患の治療において治療的利益を提供する剤または化合物の量を意味し、ここで、疾患は、神経系障害または疼痛からなる群から選択される。

10

【0071】

「薬学的に許容される」との用語は、一般に、安全で、毒性がなく、および生物学的または他の方途で望ましくないものでない、化合物または医薬組成物を製造するのに有用であることを意味し、動物医薬用途ならびにヒト医薬用途に有用であることを含む。

【0072】

「薬学的に許容される塩」との用語は、これに限定されるものではないが、アレルギー反応または毒性などの過度の望ましくない作用がなく、疾患の治療に適した、式(I)の化合物の可溶性または分散可能な形態を含む。代表的な薬学的に許容される塩としては、これに限定されるものではないが、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、またはリン酸塩などの、酸付加塩、および、リチウム、ナトリウム、カリウム、またはアルミニウムなどの、塩基付加塩が挙げられる。

20

【0073】

「薬学的または治療的に許容される賦形剤または担体」との用語は、有効成分の有効性または生物学的活性を妨害せず、それが投与されるヒトまたは動物のいずれかであり得るホストに対して毒性がない、固体または液体の、充填剤、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。特定の投与経路に応じて、当技術分野で周知のものなどの様々な薬学的に許容される担体を使用することができる。例えば、これに限定されるものではないが、糖、デンプン、セルロースおよびその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸緩衝液、乳化剤、等張食塩水、およびパイロジェンフリー水が挙げられる。

30

【0074】

本発明によれば、すべての適切な投与方法が企図される。例えば、薬剤の投与は、経口、皮下、直接静脈内、低速静脈内注入、連続静脈内注入、静脈内または自己調節硬膜外鎮痛法（PCAおよびPCEA）、筋肉内、髄腔内、硬膜外、嚢内、腹腔内、経皮、局所、経粘膜、口腔内、舌下、吸入、関節内、鼻腔内、直腸、または眼の経路を介してのものであり得る。薬剤は、個別の投与単位で製剤化することができ、調剤の分野でよく知られている方法のいずれかによって製造することができる。すべての適切な医薬剤形が企図される。薬剤の投与は、例えば、経口溶液および懸濁液、錠剤、カプセル、ロゼンジ、発泡錠、経粘膜フィルム、坐剤、口腔内製品、経口粘膜保持性製品、局所クリーム、軟膏、ゲル、フィルムおよびパッチ、経皮パッチ、乱用抑止および乱用耐性製剤、滅菌溶液と懸濁液、および非経口使用のためのデポ剤などの形態であり得、即時放出、持続放出、遅延放出、制御放出、徐放性放出などとして投与される。

40

【0075】

本明細書において、「異性体」との用語は、構造的および空間的異性体のすべての形態を意味する。特に、「異性体」との用語は、立体異性体を包含することを意図している。立体異性体に関して、本明細書に記載の多くの化合物は、1つ以上の不斉炭素原子を有する可能性があり、ラセミ体、ラセミ混合物として、および個々のエナンチオマーまたはジアステレオマーとして、存在し得る。そのような異性体形態はすべて、それらの混合物を含めて、本発明に含まれる。さらに、ジアステレオマーおよびエナンチオマー生成物は、クロマトグラフィー、分別結晶、または当業者に知られている他の方法によって、分離する

50

ことができる。

【0076】

そのような化合物の毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって、例えば、LD₅₀（集団の50%の致死用量）およびED₅₀（集団の50%の治療上有効な用量）を決めるために、決定することができる。毒性と治療効果の用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を使用することもできるが、病気になっていない細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それによって副作用を減らすために、影響を受ける組織の部位にそのような化合物を標的化する送達システムを設計することを考慮すべきである。

10

【0077】

医薬組成物は、投与説明書とともに、容器、パック、またはディスペンサーに含まれ得る。この態様によれば、本発明は、本発明による少なくとも1つの化合物または本発明の医薬組成物を含み、これは場合により本明細書で定義される1つ以上のさらなる活性剤に加えられ、好ましくは、ヒトまたは動物の体の治療処置、例えば前述したような神経系障害および／または疼痛の治療における、その投与のための説明書を含む、キットを提供する。

【0078】

「治療」または「治療する」との用語は、対象における疾患の任意の治療を意味し、下記：

20

(i) 病気を予防すること、すなわち、病気の臨床症状を発症させないこと；

(ii) 病気を抑制すること、すなわち、臨床症状の発症を阻止すること；および／または、

(iii) 病気を軽減すること、すなわち、臨床症状を退行させること、が含まれる。

【0079】

本明細書において、「治療有効量」との用語は、対象に治療を提供するのに有効である、本明細書の実施形態のいずれかに記載される化合物または組成物の量を意味する。神経系障害の場合、治療有効量は、対象において観察可能または測定可能な以下の変化のいずれかを引き起こすものであり得る：発作の数、期間または強度の減少、または発作の除去；認知機能または記憶の改善；運動機能の改善、または運動機能喪失率の減少；睡眠時間の増加；神経細胞死の予防または減少；罹患率および死亡率の減少；生活の質の向上；または、それらの効果の組み合わせ。疼痛の場合、治療有効量は、痛みの、頻度、期間、および／または強度の減少を引き起こすか、または痛みを完全に排除くものであり得る。当業者によって認識されるように、有効量は、投与経路、賦形剤の使用、および他の薬剤との併用に依りて変化し得る。

30

【0080】

「対象」との用語は、本明細書で提供される化合物または医薬組成物の投与によって治療することが可能な病気を患っているか、またはその病気になりやすい、生物体を意味する。限定されるものではないが、例えば、ヒト、他の哺乳動物、および他の非哺乳動物が挙げられる。

40

【0081】

「約」または「おおよそ」との用語は、通常、与えられた値または範囲の、20%以内、より好ましくは10%以内、および最も好ましくは5%以内、を意味する。あるいは、特に生物学的系において、「約」との用語は、おおよそ対数（すなわち、一桁）以内、好ましくは、与えられた値の2倍以内、を意味する。

【0082】

本出願の範囲内で、先行する段落、特許請求の範囲、および／または以下の説明および図面において、特にその個々の特徴において設定されている、様々な態様、実施形態、例、および代替手段は、独立して、または任意に組み合わせて、採用することができることが

50

、明確に意図されている。すなわち、すべての実施形態および／または任意の実施形態の特徴は、そのような特徴に適合性がない場合を除いて、任意の方法および／または組み合わせで、組み合わせることができる。誤解を避けるために、「あり得る」、「および／または」、「例として」、「例えば」との用語、および本明細書で使用される類似の用語は、そのように説明される特徴の必要性が存在しないように、非制限的に解釈されるべきである。実際、任意の特徴の組み合わせは、これらが明示的に特許請求されているかどうかにかかわらず、本発明の範囲から逸脱することなく、明確に想定されている。出願人は、最初に提出した請求範囲を変更する権利、またはそれに応じて新しい請求範囲を提出する権利を保有し、これには、その方法で最初に特許請求されたものでないが、最初に提出された請求範囲を補正して、他の請求範囲の特徴に依存および／または組み込む権利が含まれる。

10

【実施例】

【0083】

以下、本発明の特定の実施例を、以下の図面を参照して説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0084】

図1は、海馬におけるシナプス伝達に対する典型的なアデノシン受容体アゴニストの作用を示している。図1Aは、単一記録の時間に対してプロットした正規化fEPSP勾配を示す。アデノシンの濃度を増加させて適用すると、fEPSPの勾配が減少し、効果はA₁受容体アンタゴニスト8-CPT (2 μM) によって反転した。対照およびアデノシン濃度増加における重ね合わせたfEPSP平均を挿入している。図1Bは、アデノシン (IC₅₀ = 20 ± 4.3 μM、n = 11の切片)、および2 μMの8-CPTを伴うアデノシン (IC₅₀、n = 5の切片) の濃度応答曲線である。図1Cは、単一記録の時間に対してプロットした正規化fEPSP勾配を示す。非加水分解性A₁受容体アゴニストNECA (CPA) の濃度を増加させて適用すると、fEPSP勾配が減少し、効果はA₁受容体アンタゴニスト8-CPT (2 μM) によって反転した。対照およびCPA濃度増加における重ね合わせたfEPSP平均を挿入している。図1Dは、CPAの濃度応答曲線 (IC₅₀ = 11.8 ± 2.7 nM、n = 11の切片) である。図1Eは、単一記録の時間に対してプロットした正規化fEPSP勾配を示す。アデノシン受容体アゴニストNECAの濃度を増加させて適用すると、fEPSP勾配が減少し、効果はA₁受容体アンタゴニスト8-CPT (2 μM) によって反転した。対照およびNECA濃度増加における重ね合わせたfEPSP平均を挿入している。図1Fは、NECAの濃度応答曲線 (IC₅₀ = 8.3 ± 3 nM、n = 11の切片) である。

20

30

【0085】

図2は、海馬におけるシナプス伝達に対する非典型的なA₁受容体アゴニスト化合物BnOCPAの作用を示している。図2Aは、時間に対してプロットした正規化fEPSP勾配を示す、単一の実験からのデータ例である。化合物BnOCPAの濃度を増加させて適用すると、fEPSPの勾配が減少し、効果はA₁受容体アンタゴニスト8-CPT (4 μM) によって反転した。対照および化合物BnOCPA濃度増加における重ね合わせたfEPSP平均を挿入している。図2Bは、化合物BnOCPAの濃度応答曲線 (IC₅₀ = 65 ± 0.3 nM、n = 11の切片) である。図2Cは、対照 (黒い線) および化合物BnOCPA (灰色の線) における、重ね合わせペアパルスfEPSP波形 (パルス間の間隔50 ms) の平均 (5トレース) の例を示す。fEPSPトレースは、対照における最初のfEPSPの振幅に正規化されている。50 msのペアパルス間隔では、ペアパルス比は、対照の1.88 ± 0.08から、BnOCPAの2.41 ± 0.08に、有意に増加した (n = 6の切片、P = 0.005)。ペアパルス促進の程度の増加は、シナプス前受容体での作用と一致している。

40

【0086】

図3は、発作活性に対するアデノシン受容体アゴニストの異なる作用を示している。図3Aは、アデノシン (100 μM) が発作活性を可逆的に抑制することを示す、発作活性の

50

記録例である。図3Bは、NECA (300 nM) が可逆的に発作活性を抑制することを示す、発作活性の記録例である。図3Cは、化合物 BnOCPA (300 nM ~ 1 μM) が発作活性にほとんどまたは全く影響を及ぼさないことを示す、2つの異なる海馬切片からの発作活性の記録例である。したがって、BnOCPAは、典型的なアデノシン A₁R アゴニストと比較して、神経活性に対して異なる作用を示す。

【0087】

図4 (図4-1および図4-2) は、錐体細胞の膜電位に対する、典型的および非典型的なアデノシン受容体アゴニスト BnOCPA の異なる作用を示している。図4Aは、ラット海馬切片の領域 CA1 の錐体細胞から記録された膜電位のトレース例を示す。予想通り、CPA は膜電位を過分極させたが、対照的に、化合物 BnOCPA は効果を示さなかった。化合物 BnOCPA (300 nM) を適用すると、CPA (300 nM) に対する応答が低下し、アデノシン (100 μM) の効果を反転させた。スケールバーは、上のトレース (CPA) では20秒、下の2つのトレース (化合物 BnOCPA、および CPA + 化合物 BnOCPA) では40秒である。図4Bは、CPA (300 nM)、化合物 BnOCPA (300 nM)、および、化合物 BnOCPA (300 nM) の存在下の CPA (300 nM) によって生成される、平均膜電位過分極 (mV) をまとめた棒グラフである。図4Cは、単一の実験の時間に対する fEPSP 勾配をプロットしたグラフである。

(A) で使用した化合物 BnOCPA と同様の溶液は、姉妹切片でのシナプス伝達を無効にし (阻害の開始は、単一の指数関数 $\tau = 2.2$ 分に適合する)、化合物 BnOCPA がこれらの試験中、活性であったことを確認した。図4Dでは、BnOCPA (300 nM) の存在下でのバクロフェン (10 mM) の適用は、膜電位を過分極させた (-67 mV から -74 mV)。スケールバーは、5 mV、および 50 s (CPA)、200 s (アデノシン)、または 100 s (バクロフェン) で測定している。図4Eは、バクロフェン / BnOCPA 実験のデータ概要である。BnOCPA の存在下でバクロフェンによって生成された平均過分極は、対照条件でバクロフェンによって生成されたものと有意に異ならなかった (対応のない t 検定) (6.5 ± 0.43 mV、対して、 6.3 ± 0.76 mV、 $P = 0.774$ 、条件ごとに $n = 5 \sim 6$ の細胞)。棒グラフは、個々のデータポイントと平均 $\pm$ SEM を示している。図4Fは、ベースラインからの頻繁な自発的スパイクとして表される発作活性のインビトロモデルにおいて、CPA (300 nM) は活性を可逆的に抑制したが、BnOCPA (300 nM) はほとんど効果を示さなかった。スケールバーは、0.5 mV および 200 s で測定している。図4Gは、CPA または BnOCPA の前、その間、後の自発的スパイクの頻度で表される発作活性の概要データである。CPA は発作活性を消失させたが ($n = 4$)、BnOCPA は発作頻度を有意に減少させなかった ($n = 6$)。データは平均 $\pm$ SEM として表した。二元配置反復測定分散分析 (BnOCPA 対 CPA、切片) : $F(1, 3) = 188.11$ 、 $P = 8.52 \times 10^{-4}$ 、以下のボンフェローニ事後比較 : BnOCPA 対対照 ; $P = 1$; CPA 対対照 ; $P = 0.010$; BnOCPA 対 CPA ; $P = 0.027$ 。平均化されたデータは、平均 $\pm$ SEM として表される。ns, 有意差なし ; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.02$; ****, $P < 0.0001$ 。

【0088】

図5は、典型的な A₁R アゴニストと比較した、BnOCPA の異なる G タンパク質活性化プロファイルを示している。図5Aでは、アデノシン、CPA および BnOCPA のヒト (h) A₁R への結合が、CHO-K1-hA₁R 細胞から調製された膜から、A₁R の選択的アンタゴニストである [³H] DPCPX を置換するそれらの能力を介して測定された。データは、CPA および BnOCPA が、A₁R に等しい親和性で結合するのに対し、アデノシンは親和性が低下していることを示している ($n = 5 \sim 19$ の個別の繰り返し)。図5Bでは、cAMP レベルが、1 μM のフォルスコリンおよび各化合物 (1 pM ~ 1 μM) で30分間共刺激した後、CHO-K1-hA₁R 細胞で測定された。これにより、すべてが完全なアゴニストであることが確認された。アデノシンは、CPA および BnOCPA と比較して、10分の1の効力低下を示している ($n = 4$ の個別の繰り返し)。

し)。図5Cでは、cAMP蓄積が、1 μ Mのフォルスコリンおよび各化合物(1 pM ~ 1 μ M)で30分間共刺激した後、PTX非感受性Goaを発現するPTX前処理(200 ng/ml) CHO-K1-hA1R細胞で測定された(n=6の個別の繰り返し)。データは、BnOCPAが、Goaを活性化しないことを示している。図5Dは、(C)と同様であるが、細胞がPTX非感受性Gobに置き換えられている。アデノシン、CPA、およびBnOCPAはすべて、Gobへの結合(カップリング)を通じてcAMPの蓄積を阻害している(n=6の個別の繰り返し)。図5Eは、図5CおよびDのデータから得られたGoa(左)またはGob(右)のいずれかを発現するCHO-K1-hA1R細胞における、アデノシン、CPAおよびBnOCPAによる、cAMPの最大A1R刺激阻害の概要である。図5Fでは、Goaの活性化を介したcAMP蓄積を阻害するアデノシンの能力は、BnOCPAによって濃度依存的に阻害され、Kdは113 nMであった(n=4の個別の繰り返し)。図5Gは、対照条件下、細胞内Goa干渉ペプチド(100 μ M)、スクランブルGoaペプチド(SCR; 100 μ M)、およびGob干渉ペプチド(100 μ M)の存在下、アデノシン(10 μ M)によって生成された電流トレースの例である。スケールバーは、50 pAおよび100 sで測定される。図5Hは、外向き電流実験の概要データである。アデノシン(43.9 $\pm$ 3.1 pA、n=8細胞)によって誘発される外向き電流の平均振幅は、100 μ MのGoa干渉ペプチドにおいて、20.9 $\pm$ 3.6 pAに有意に減少した(一元配置分散分析; F(3, 27) = 13.31、P = 1.60 $\times$ 10⁻⁵) (n=10細胞、P = 5.35 $\times$ 10⁻⁵)。スクランブルペプチド(43.4 $\pm$ 2.4 pA、n=7細胞、P = 1)、およびGob干渉ペプチド(37.4 $\pm$ 2.2 pA、n=6細胞、P = 1)はいずれも、アデノシン誘発性外向き電流の振幅を有意に減少させなかった。平均化されたデータは、平均 $\pm$ SEMとして表されている。****, P < 0.0001。

10

20

30

40

50

【0089】

図6は、TM7の末端部分上の不活性なN7.49 PXXY7.53モチーフを参照として考慮した、平均二乗偏差(RMSD)分布を示している。図6Aでは、HOCPA(点線)、BnOCPAモードA(黒の実線)、BnOCPAモードC(灰色の実線)、およびアポ受容体(破線)は、A1R(黒の縦の破線)の活性確認を中心に共通の分布を有している。図6Bでは、PSB36(黒の破線)、BnOCPAモードB(黒の実線)、およびBnOCPAモードD(灰色の実線)のRMSD値は、不活性なN7.49 PXXY7.53ジオメトリに近づく傾向がある(x=0での灰色の破線に向かって曲線が左側にシフト)。

【0090】

図7は、A1RクライオEM構造6D9H(その分解能、3.6 Åは、縦の灰色の破線で示される)で報告される、Gi2 G α CTコンフォメーションに対するG α CT(アルファ炭素原子)の最後の15残基のRMSDの頻度分布のプロットを示している。図7Aは、BnOCPA-A1R(黒の線)およびHOCPA-A1R(灰色の線)の複合体で実施された、Gob G α CT(最後の27残基)の動的結合を示す。最も可能性の高い2つのRMSD範囲、すなわち、標準状態CS1および準安定状態MS1を、観察することができる。図7Bは、BnOCPA-A1R複合体で実施された、Goa(黒の線)およびGi2(灰色の線) G α CT(最後の27残基)の動的結合を示す。最も可能性の高い2つのRMSD範囲は、MS2およびMS3としてラベル付けされる。

【0091】

図8は、心拍数および平均動脈圧に対する典型的なアデノシン受容体アゴニストと比較した、BnOCPAの異なる効果を示している。図8Aは、アデノシン(30 μ M)、BnOCPA(300 nM)、および、化合物BnOCPAの適用後のアデノシン(30 μ M)の、単離されたカエルの心拍数への作用をまとめた棒グラフである。4つの調製物で、アデノシンは心拍数を可逆的に低下させた。その後の化合物BnOCPAの適用は、心拍数に有意な影響を与えなかったが、BnOCPAの存在下でそれを再度適用した場合、アデノシンの作用は低下した。典型的なA1R合成アゴニストであるCPAは、アデノシン

と同様に単離されたカエルの心拍数を低下させた。C V Sに対するB n O C P Aの影響を完全に調査するために、ウレタン麻酔をかけた自発呼吸の成体ラットの心拍数（H R）と平均動脈血圧（M A P）に対する作用を測定した（図5 B、C）。図8 Bは、単一の麻酔ラット調製物の心拍数（H R）の例であり、図8 Cは、同じく血圧（B P）トレースの例であり、アデノシン、B n O C P A、およびC P Aの作用が示される。B n O C P Aは、アデノシンおよびC P Aとは対照的に、H RまたはB Pに影響を与えなかった。静脈内カニューレを（*）で洗い流して、管内の化合物を除去した。アデノシン適用後のH Rのオーバーシュートは、圧反射の結果である可能性がある。ボックス化領域からのアデノシン（H RおよびB Pの低下を示す）およびB n O C P A（H RまたはB Pの低下を示さない）への拡張したH RおよびB P応答が挿入されている。図8 Dは、4つの麻酔ラット調製物の概要データである。各ラットからのデータは、異なる記号で示されている。データは平均±S E Mとして表される。C P AおよびB n O C P Aは、それぞれ、シナプス伝達への作用から測定されたI C 5 0の約3 0 0倍および約5 0 0倍の最終用量でボーラスとして投与された。

10

20

30

40

50

【0092】

図9は、B n O C P Aが呼吸抑制を引き起こさない強力な鎮痛剤であることを示している。図9 Aは、単一のウレタン麻酔、自発呼吸ラットからの、気管気流、呼吸頻度（f）、一回換気量（V_T）、および分時換気量（V_E）が、C P Aによって引き起こされる呼吸および呼吸抑制に対して、B n O C P Aの影響の欠如を示す例である。B n O C P AおよびC P Aは、縦の破線で示された時間に、350 μL・kg⁻¹のI Vボーラスとして投与された（B n O C P A、8.3 μg/kg；C P A、6.3 μg・kg⁻¹）。灰色の菱形は、自発的な吐息を示す。スケールバー測定：180 s、および：気流，0.5 mL；f，毎分50回の呼吸（B r P M）；V_T，0.25 mL；V_E，50 mL/min。図9 B、C、Dは、8匹の麻酔ラットの概要データである。各ラットのデータは、f、V_T、およびV_Eのそれぞれのすべての動物の平均値（実線）とともに、B n O C P A（青色の正方形と破線）およびC P A（赤色の丸と破線）の注射の前および後で、示されている。一元配置分散分析：図9 Bは、f、Greenhouse-Geisser補正F（1.20，8.38）=30.4、P=3.48×10⁻⁴であり；図9 Cは、V_T、F（3，21）=15.9、P=1.25×10⁻⁵であり、および、図9 Dは、V_E、Greenhouse-Geisser補正、F（1.19，8.34）=15.77、P=0.003であり、以下のボンフェローニ事後比較が行われ：続くB n O C P Aは、f（149±12 B r P M）、V_T（1.0±0.1 mL）、およびV_E（152±26 mL/min）は、安静時の値f（149±12 B P M）、V_T（1.0±0.1 mL）、およびV_E（152±26）と比較して変化しなかった（P=1）。これはC P Aとは対照的であり、C P Aは、安静時の値f（143±11 B r P M；p=4.05×10⁻⁶）、V_T（1.1±0.1 mL；P=2.58×10⁻⁵）、およびV_E（155±28；P=5.52×10⁻⁵）と比較して、f（108±10 B r P M）、V_T（0.8±0.1 mL）、およびV_E（99±19 mL/min）に減少させた。一方、B n O C P AとC P Aの投与前の対照の安静時の値は互いに異ならなかった（P=1）。C P Aの作用は、f（P=4.48×10⁻⁷）、V_T（P=1.15×10⁻⁴）、およびV_E（P=1.16×10⁻⁴）でB n O C P Aよりも有意に大きかった。データの上の横方向の有意性指標は、安静時の値と、B n O C P A（青の線）またはC P A（赤の線）のいずれかのI V投与後の違いを示している。縦方向の有意性指標は、B n O C P AとC P Aの効果の違いを示している。図9 E、Fでは、B n O C P Aが、静脈内（I V；E図）または髄腔内（I T；F図）経路で投与された場合に、神経障害性疼痛の脊髄神経結紮（Chung）モデルにおける機械的な異痛症を軽減している。外科処置前（術前）の動物は、Von Freyの毛髪刺激によって評価されるように、接触刺激に対して同様の感受性を示した。脊髄神経結紮は、その後、外科処置後1週間での足逃避（足逃避の閾値；PWT）を誘発するのに必要な接触圧の低下によって証明されるように、接触に対する過敏症（機械的異痛症）を引き起こした。PWTは、ビヒクルまたはB n O C P A注入

の前（投与前）に、すべての群で同様の最下点に達する。B n O C P Aの投与は、用量依存的に（一元配置分散分析（投与前、1、2、および4時間））、損傷部位と同側の四肢のPWTを有意に増加させた： $I V \quad B n O C P A : F(3, 80) = 37.3$ 、 $P = 3.44 \times 10^{-15}$ ； $I T \quad B n O C P A(3, 76) = 47.0$ 、 $P = 0$ 。フィッシャーLSD事後比較では、1、2、4時間でのIVにおいて $3 \mu g / kg$ で、それぞれ $P = 0.044$ 、 0.008 、 0.019 であり、1、2、4時間での $10 \mu g / kg$ で、それぞれ $P = 1.37 \times 10^{-8}$ 、 6.81×10^{-14} 、 3.23×10^{-4} で、有意差が示され；ITにおいて、1および2時間での $1 nmol$ で、それぞれ $P = 0.001$ および 4.16×10^{-5} であり、および、1、2および4時間での $10 nmol$ で、それぞれ $P = 9.52 \times 10^{-11}$ 、 1.42×10^{-11} および 1.41×10^{-8} である、有意差が示された。平均データ（処置あたり $n = 6$ 、ただし $1 nmol$ のB n O C P Aの $n = 5$ を除く）は、平均±SEMとして表される。 ns ，有意差なし；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.02$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ 。

10

20

30

40

50

【0093】

図10は、ラット（A、B）および非ヒト霊長類（マカク（Macaque）：C、D）の脊髄の脊髄侵害受容性（疼痛感知性）求心性神経におけるシナプス伝達に対するB n O C P AおよびC P Aの効果を示している。2つのニューロン（左（A）と右（B））からの連続記録のサンプルは、成体ラットから調製した腰髄切片の後角において記録された。図10Aにおいて、1は、 $0.1 Hz$ で後根の電気刺激によって誘発された重ね合わせた興奮性シナプス後電位（EPSP）である。図10Aにおいて、2では、EPSPを示す同じニューロンは、化合物B n O C P Aの存在下で減少した。10Aにおいて、3は、対照および化合物B n O C P Aの存在下で誘発されたEPSPの重ね合わせた平均である。図10Aにおいて、4は、後根求心性誘発EPSPに対する化合物B n O C P Aの効果を示す経時的プロットである。化合物B n O C P AのEPSPの振幅が有意に減少していることに注意されたい。図10Bにおいて、1は、 $0.1 Hz$ で後根の電気刺激によって誘発された重ね合わせた興奮性シナプス後電位（EPSP）である。図10Bにおいて、2では、EPSPを示す同じニューロンは、典型的なA₁RアゴニストC P Aの存在下で減少した。図10Bにおいて、3は、対照およびC P Aの存在下で誘発されたEPSPの重ね合わせた平均である。図10Bにおいて、4は、後根求心性誘発EPSPに対するC P Aの効果を示す経時的プロットである。B n O C P Aの振幅に匹敵して、C P AのEPSPの振幅が有意に減少していることに注意されたい。図10C、Dは、マカクの腰髄の第I / II層後角のニューロンから作成された同様の記録である。電流クランプで記録された2つの別々のニューロン（CおよびD）からの連続記録のサンプルは、B n O C P A（ $3 \mu M$ ）の存在下（灰色）および非存在下（対照）で重ね合わせたEPSPを示している。それぞれの下のパネルは、各セルの1と2の記録の重ね合わせた平均を示している。

【0094】

実験

実験は、欧州委員会指令2010/63/EU（実験および他の科学的目的に使用される脊椎動物の保護に関する欧州条約）および英国内務省（科学的手順）法（1986）に従って、施設内動物福祉および倫理審査機関（A W E R B）のプロジェクト承認を得て、実施した。

【0095】

海馬切片の調製

海馬の矢状切片（ $300 \sim 400 \mu m$ ）を、生後12～20日目に雄のSprague Dawleyラットから調製した。ラットを12時間の明暗サイクルに保ち、明サイクルに入った後90分で切片を作製した。英国動物（科学的手順）法（1986）に従い、雄ラットを頸椎脱臼と断頭により殺した。脳を取り出し、正中線を切り落とし、脳の両側を金属製のベースプレートに貼り付けた。切片は、正中線の周りで切断し、その際、構成（mM）： 127 のNaCl、 1.9 のKCl、 8 のMgCl₂、 0.5 のCaCl₂、 1.2 のKH₂PO₄、 26 のNaHCO₃、 10 のD-グルコース（95%のO₂およ

び5%のCO₂、300mOSMでバブリングしたときにpH7.4)である、低温(2~4℃)の高Mg²⁺、低Ca²⁺ aCSFで、Microm HM 650Vマイクロスライサーを使用した。切片は、使用前にaCSF(1mMのMgCl₂、2mMのCaCl₂)で、34℃で1~6時間保存した。

【0096】

細胞外記録

切片を記録チャンバーに移し、aCSFに沈め、4~6mL/分(32℃)で灌流した。切片は、組織の上下の灌流を可能にするグリッド上に配置され、すべてのチューブは気密にされた(酸素の損失を防ぐため)。細胞外記録のために、aCSFで満たされた微小電極をCA1の放射状層の表面に配置した。細胞外記録は、差動増幅器モデル3000(AM systems、WA、USA)または差動増幅器DP-301(Warner Instruments、Hampden、CT、USA)のいずれかを使用して行い、フィールド興奮性シナプス後電位(fEPSP)は、単離パルス刺激モデル2100(AM Systems、WA)またはISO-Flex(AMPI、エルサレム、イスラエル)のいずれかで誘発した。fEPSPについて、最大応答の40~50%を与える刺激強度で10~20分のベースラインが記録された。シグナルは、3kHzでフィルタリングされ、Spikeソフトウェア(Vs6.1、Cambridge Electronic Design、Cambridge、UK)またはWinLTP(W. W. Anderson et al., J. Neurosci Methods, 2007, 162, 346-356)によって制御されるMicro CED(Mark2)インターフェイスを使用して、オンライン(10kHz)でデジタル化された。fEPSP勾配について、線維斉射(fiber volley)後の1msの線形領域が測定された。細胞外記録は、2つの電気生理学装置(rig)で独立して行われた。各装置から得られたデータは比較可能であったため、両方のデータセットがプールされた。

【0097】

発作モデル

発作活性を、追加のMg²⁺を含まず、KClで総K⁺濃度が6mMに増加したaCSFを使用して、海馬切片において誘導した。細胞外Mg²⁺の除去は、NMDA受容体の活性化を促進して、長期的なEPSPsを生成し、これは、合わさって強壮性の活性化を生成する。K⁺の細胞外濃度を上げると、ニューロンが脱分極し、発火とグルタミン酸放出が起こり、活性が維持される。海馬切片で自発的な活性を生み出すには、K⁺濃度の増加とMg²⁺の除去の両方が必要である。自発的活性は、CA1の放射状層内に配置されたaCSFで満たされた微小電極で測定した。

【0098】

海馬錐体細胞からの全細胞パッチクランプ記録

切片を記録チャンバーに移し、32±0.5℃のaCSFで3mL/分で灌流した。切片は、オリンパスBX151W顕微鏡(Scientifica)とCCDカメラ(Hitachi)を備えたIR-DIC光学系装置を使用して、視覚化された。全細胞電流クランプ記録は、厚壁ガラス(Harvard Apparatus、Edenbridge、UK)で製造されたパッチピペット(5~10MΩ)を使用して、(mM)で：グルコン酸カリウムを135、NaClを7、HEPESを10、EGTAを0.5、ホスホクレアチンを10、MgATPを2、NaGTPを0.3、およびビオシチンを1mg/mL(290mOSM、pH7.2)を含めて、海馬の領域CA1の錐体細胞から調製した。電圧および電流の記録は、Axon Multiclamp 700B増幅器(Molecular Devices、USA)を使用して取得し、20kHzでデジタル化した。データの取得と分析は、Pclamp10(Molecular Devices)を使用して実施した。電位固定実験では、CA1錐体細胞を-60mVに保持した。Gタンパク質シグナル伝達を妨害するペプチドを、パッチピペットを介して、記録の細胞に導入した。細胞を少なくとも10分間保持した後、アデノシン(10μM)を添加して外向き電流を誘導した。

10

20

30

40

50

【0099】

カエル心臓の調製

アフリカツメガエル (*Xenopus leavis*) (若い成体のオス) は、ポーツマス・ゼノパス・リソースセンターから供給された。カエルは、MS222 (pH7で0.2%) で安楽死させ、断頭し、脊髄穿刺を行った。動物を解剖して心臓を表に出し、心膜を注意深く取り除いた。心臓の収縮は、力変換器 (AD instruments) で測定した。心拍数は、LabChart 7 (AD instruments) によって制御された PowerLab 26T (AD instruments) を介して取得した。心臓は定期的にリンガー液で洗浄され、薬物を心臓に直接適用した。

【0100】

心肺記録のためのインビボ麻酔ラットの調製

イソフルラン (2~4%; Piramal Healthcare) を用いて成体の雄の Sprague Dawley ラット (230~330g) に、麻酔を注入した。大腿静脈に薬物送達のためにカテーテルを挿入した。麻酔を、大腿カテーテルを介して送達される滅菌生理食塩水中のウレタン (1.2~1.7g/kg; Sigma) で維持した。大腿動脈にカテーテルを挿入し、圧カトランスデューサー (Digitimer) に接続して、動脈血圧を記録した。体温は、熱電対加熱パッド (TCAT 2-LV; Physitemp) によって、36.7°C に維持した。次いで、実験を開始する前に、ラットを安定化させた。血圧シグナルは、1401インターフェースに接続された NeuroLog システム (Digitimer) を使用して増幅され、Spike2ソフトウェア (Cambridge Electronic Design) を使用してコンピューターに取得した。動脈血圧の記録を用いて、心拍数を導出し (HR: 拍・分⁻¹; BPM)、平均動脈血圧を計算した (MAP: 拡張圧 + 1/3 * [収縮圧 - 拡張圧])。気流測定値を用いて、一回換気量 (V_T; mL; 圧力センサーは3mLシリンジで較正)、および呼吸頻度 (f; 呼吸数・分⁻¹; BrPM) を計算した。分時換気量 (V_E; mL・min⁻¹) は、f × V_T として計算した。

【0101】

外科処置後に動物を安定させた後、A₁Rアゴニストを静脈内 (IV) 注射によって投与し、HR、MAP、f、V_T、およびV_Eの変化を測定した。パイロット試験では、アデノシンの最適な投与量は、HRとMAPに堅牢で信頼性の高い変化が生じるまで、投与量を増やすことによって、決定した (1mg・kg⁻¹)。CPAの投与量は、アデノシンと同等の効果が、HRおよびMAPで生じるまで (6.3μg・kg⁻¹)、調整した。BnOCAの場合、最初は5μg・kg⁻¹を使用した。HRおよびMAPに対するアゴニスト効果は見られなかった。これが偽陰性でないことを確認するために、BnOCAの投与量を増やしたが (8.3μg・kg⁻¹)、それでもHRおよびMAPに対してアゴニスト効果はなかった。しかしながら、BnOCAはアデノシンと共投与すると拮抗作用を示したため (図8)、生理的に活性になるのに十分な高濃度でA₁Rに到達したはずである。これらの観察により、HRおよびMAPに対するアゴニスト効果の欠如は、第2種過誤によるものではないことが確認された。以降のすべての実験では、8.3μg・kg⁻¹のBnOCAを使用した。すべての注射は、350μL・kg⁻¹のボーラス法で静脈内投与した。

【0102】

実験研究において、ラットは、アデノシンの注射を受けた。心臓呼吸パラメーターがベースラインに戻った後 (5~10分)、ラットにBnOCAを投与した。BnOCAの効果が観察されるのに十分な時間をとった後、ラットに、単回注射でBnOCAを同時投与しながらアデノシンを投与した。心臓呼吸パラメーターがベースラインに戻った後、ラットにCPAを注射した。

【0103】

各薬物を注射した溶液の量自体が圧反射反応を誘導せず、心臓呼吸反応の偽の変化をもたらすことを確認するために、等量の生理食塩水 (0.9%) を注射した。これらは心拍数

10

20

30

40

50

にもMAPにも影響を与えなかった。アデノシンの反復投与が同じ反応を示し、反応が衰えなかったことを確認するために、ラットにアデノシン ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) を2回注射した。各アデノシン注射によって生成された心血管パラメーターの変化に有意差はなかった。

【0104】

呼吸に関するBnOCPAおよびCPAを直接比較するために、追加の一連の実験 ($n=4$) を行った。成体の雄のSpragueDawleyラット ($400 \sim 500 \text{ g}$) をウレタンで麻酔し、動脈カニューレ挿入を行わなかったことを除いて、上記のように器具を装着した。

【0105】

外科処置後に動物を安定させた後、BnOCPA ($8.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) を投与した。20分の回復期間の後、CPA ($6.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) を投与した。すべての注射は、 $350 \mu\text{l} \cdot \text{kg}^{-1}$ のボラス法として静脈内投与した。 f 、 V_T 、および V_E の変化を測定した。吐息などの呼吸事象の近くで投与が行われた場合は、注射の両側に20分の回復期間を設けて、2回目のIV投与を行った。BnOCPAの効果の測定値は、CPAが同じ製剤で呼吸の変化を誘発したときと、時間的に一致させた。これらのラット ($n=4$) と、心血管および呼吸記録の両方が計測されたラット ($n=4$) とで、BnOCPAに対する呼吸反応の間に差は観察されなかったため、データをプールした ($n=8$; 図9A~D)。

【0106】

脊髄切片の調製

8~12週齢 ($260 \sim 280 \text{ g}$) の成体の雄Sprague-Dawleyラットを、12時間の明/暗サイクルで空調された部屋に収容し、餌と水を自由に摂取させた。ラットを、イソフルランを使用して最終的に麻酔し、断頭した。脊柱、胸郭、および周囲の組織をすばやく取り出し、氷冷下 ($< 4^\circ\text{C}$)、次の組成の高スクロース含有aCSFで固定した: (mM) で、スクロースを127、KClを1.9、 KH_2PO_4 を1.2、 CaCl_2 を0.24、 MgCl_2 を3.9、 NaHCO_3 を26、D-グルコースを10、アスコルビン酸を0.5含む。椎弓切除術を実施し、脊髄と関連の根を穏やかに解剖し、脊柱および周囲組織から引き出した。続いて、硬膜および軟膜および前根を細い鉗子で除去し、脊髄を半切除した。脊髄への後根の入力が維持されるように注意をした。半切除した脊髄-後根調製物を、組織スライサーに固定し、Leica VT1000sミクロトームを使用して、冷却した ($< 4^\circ\text{C}$) 高スクロースaCSF中で、後根が付いた脊髄切片 (厚さ $400 \sim 450 \mu\text{m}$) をカットした。切片を、氷冷した標準aCSF (下記参照) を含む小ビーカーに移し、温度制御されたウォーターバスで、20分間で $35 \pm 1^\circ\text{C}$ に急速に温め、その後、取り出して、電気生理学的記録の前まで、室温 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) に維持した。切片のインキュベーションおよび電気生理学的記録のaCSFは、次の組成: (mM) で、NaClを127、KClを1.9、 KH_2PO_4 を1.2、 MgCl_2 を1.3、 CaCl_2 を2.4、 NaHCO_3 を26、およびD-グルコースを10含む、であった。同様の手順により、麻酔薬の過剰摂取による安楽死後、マカクの脊髄から記録を作成した。

【0107】

脊髄の電気生理学的記録

電気生理学的記録のために、脊髄切片を特注のチャンバーに移した。接続した切片と後根を、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、流速 $5 \sim 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ で、aCSFにより継続的に灌流し、記録全体を通して根を一定に一貫して保った。全細胞パッチクランプ記録は、パッチクランプ法の「ブラインド」バージョンを用いたAxopatch 1Dまたは700A増幅器を使用して、脊髄の後角ニューロンから取得した。パッチピペットは、次の組成の細胞内溶液で満たされたときに、抵抗が $3 \sim 8 \text{ M}\Omega$ の薄壁ホウケイ酸ガラスから引き出した: (mM) で、 K^+ グルコン酸塩を140; KClを10; EGTA-Naを1; HEPESを10; Na_2ATP を4、 Na_2GTP を0.3含む。記録は、全細胞パッチクラン

10

20

30

40

50

ブ法の「電流クランプ」モードで、aCSFで連続的に灌流された切片で、実施した（速度：4～10 mL/min；35±1℃）。薬物は、浴灌流によって切片に投与した。

【0108】

後根の電気刺激

興奮性シナプス後電位（EPSP）を、後根に配置された同心双極刺激電極を使用して後根の電気刺激によって誘発した。対照のEPSPは0.1 Hzで誘発した。

【0109】

薬剤

薬剤は、ストック溶液（1～10 mM）として調製され、使用日にaCSFで希釈した。化合物を、ジメチルスルホキシド（DMSO、DMSOの最終濃度0.01%）に溶解した。アデノシン、8-CPT（8-シクロペンチルテオフィリン）、NECA（5'-（N-エチルカルボキサミド）アデノシン）、およびCPA（N⁶-シクロペンチルアデノシン）は、Sigma-Aldrich（Poole, Dorset, UK）から購入した。BnOCPAは、以前に公開されたように、合成した（Knight et al., J. Med. Chem., 2016, 59, 947-964）。1, 3-[³H]-ジプロピル-8-シクロペンチルキサンチン（[³H]-DPCPX）は、PerkinElmer（Life and Analytical Sciences, Waltham, MA）から購入した。Gタンパク質シグナル伝達を干渉するためのペプチドは、Hello Bio（Bristol, UK）から入手し、公開された配列に基づいた（Varani et al., Adv Exp Med Biol 1051, 193-232 (2017)）。Goaの場合、ペプチドは、MGIANNLRGCGLYの配列を有していた。スクランブルバージョンは、LNRGNAYLCIGMGであった。Gobの場合、ペプチドは、MGIQNNLK YIGICの配列を有していた。ペプチドはストック溶液（2 mM）として調製し、-20℃で保存した。ストック溶液は、使用直前に、ろ過した細胞内溶液に溶解させた。

【0110】

分析

濃度応答曲線は、OriginPro2016（Origin Lab, Northampton, MA, USA）で作成し、Levenberg Marquadt反復アルゴリズムを使用してロジスティック曲線に適合させた。統計的有意性は、対応のないサンプルのt検定、および多重比較のためのボンフェローニ補正を使用した一元配置分散分析と二元配置分散分析を用いて、検定した。

【0111】

脊髄神経結紮（Chungモデル）

Chungモデル外科処置時に体重約250 gで7～8週齢の成体の雄Sprague-Dawleyラットを、Charles River, UK, Ltd. から購入した。動物を、12時間の明/暗サイクルで空調付きの部屋において、4つの群にして収容した。食料と水は自由に摂取できた。それらを隆起した金属メッシュ上に少なくとも40分間放置することにより、実験環境に3日間順応させた。ベースラインの足逃避の閾値（PWT）を、一連の段階的なvon Frey毛（以下を参照）を使用して、外科処置前に3日間連続して試験し、薬物投与前で、外科処置後6～8日目および外科処置後13～17日目に再評価した。

【0112】

外科処置の前に、各ラットを、酸素（2 L・min⁻¹）と混合した3%イソフルランで麻酔し、続いて、ケタミン（60 mg・kg⁻¹）とキシラジン（10 mg・kg⁻¹）をi.m.注射した。背中を剃り、ポビドンヨードで滅菌した。動物を腹臥位に置き、L4～6レベルをカバーする皮膚に、傍正中切開を行った。L5脊髄神経を注意深く単離し、6/0シルク縫合糸でしっかりと結紮した。次に、完全な止血の後、傷口を層状に閉じた。外科処置後の感染予防のために、抗生物質（アモキシペン、15 mg/ラット、i.p.）の単回投与を定期的に行った。動物を、完全に目覚めるまで温度制御された回復チャンバーに入れてから、ホームケージに戻した。ビヒクル（通常の生理食塩水）は、

10

20

30

40

50

各注射について、 $1\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ の静脈内（IV）経路を介して、および、 $10\text{ }\mu\text{ l}$ の髄腔内（IT）経路を介して、投与した。神経障害性疼痛状態が確認されたラットをランダムに次の8つの群に分けた：ビヒクルIV、BnOCPAが1、3、 $10\text{ }\mu\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ g IV；ビヒクルIT、BnOCPAが0.3、1、および 3 nmol IT 、の群。
【0113】

機械的異痛症を試験するために、試験前に少なくとも40分間、動物を、隆起した金属メッシュ上の個々のパースペックスボックスに入れた。より低い力のフィラメントから始めて、各フィラメントを、6秒間、少し曲がるまで、足の腹側表面の中心に垂直に適用した。動物が刺激時に足を引っ込めたり持ち上げたりした場合は、テストした力よりもわずかに弱い力の毛を用いた。応答が観察されなかった場合は、わずかに強い力のある毛をテストした。最高値は15 gに設定した。信頼できる応答を誘発するのに必要な最小の力（5回の試行のうち3回で陽性）を、PWTの値として記録した。試験日に、BnOCPAまたはビヒクル投与の前、および投与後の1、2、4時間後に、PWTを評価した。動物を、2つの隣接する試験時点の間で休息させるために（約30分）、それらのホームケージに戻した。各実験の終わりに、動物をイソフルランで深い麻酔にかけ、断頭により殺した。

10

【0114】

運動機能のためのロータロッド試験

ロータロッドテストを使用して、BnOCPAの静脈内および腹腔内投与後の運動協調性を評価した。加速ロータロッド（Ugo Basile）を、170秒で速度が6 rpmから80 rpmに上がるように、設定した。7週齢（212～258 g）の雄のSprague Dawleyラット（ $n=24$ ）を、パフォーマンス時間が安定するまで、ロータロッドで、1日2回、2日間（セッションあたり2回以上の試行）、トレーニングにかけた。実験当日、3回のベースライン試験を記録した。化合物は、IPまたは尾静脈注射を介して静脈内投与した（ $10\text{ }\mu\text{ g} / \text{kg}$ 、1群あたり $n=6$ ）。対照群には生理食塩水を皮下投与し、陽性対照群にはモルヒネ（ $15\text{ mg} / \text{kg}$ ）を皮下投与した。落下までの待機時間（秒）は、薬剤投与後の1、2、3、および5時間で、3回測定した。

20

【0115】

細胞シグナル伝達アッセイ

CHO-K1-hA1R細胞を、10%ウシ胎児血清（FBS）を添加したHams F12培地混合物中、 37°C 、5% CO_2 、加湿雰囲気、ルーチンで培養した。cAMP阻害実験では、細胞を、白色384ウェルオプティプレートで1ウェルあたり2000細胞の密度で播種し、 $1\text{ }\mu\text{M}$ フォルスコリンとさまざまなアゴニスト濃度（ $1\text{ }\mu\text{M} \sim 1\text{ pM}$ ）で、30分間共刺激した。その後、LANCIE（商標）cAMPキットを使用して、cAMPレベルを測定した。

30

【0116】

個々の $\text{G}\alpha_i / \text{o} / \text{z}$ カップリングを測定するために、CHO-K1-hA1R細胞に、pcDNA3.1-GNAZ、または、pcDNA3.1〔これには、百日咳毒素（PTX）非感受性 $\text{G}\alpha_i / \text{o}$ タンパク質変異体（Gi1、Gi2、Gi3、Goa、Gobのためにそれぞれ、C351I、C352I、C351I、C351I、C351Iで、cDNA Resource Center；www.cdna.org、から入手）が含まれる〕で、500 ngのプラスミドとFugeneHDを3：1（Fugene：プラスミド）の比率で用いて、トランスフェクトした。次に、細胞を24時間インキュベートした後、 $100\text{ ng} / \text{ml}$ のPTXを添加して、内因性 $\text{G}\alpha_i / \text{o}$ の活性を阻害させ、さらに16～18時間インキュベートした。その後、トランスフェクトされた細胞を、cAMP阻害実験に従ってアッセイしたが、アゴニストおよび 100 nM フォルスコリンで共刺激した。

40

【0117】

β -アレスチン動員アッセイ

HEK293細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）（F9665、Sigma-Ald

50

rich) および $1\times$ 抗生物質-抗真菌剤 (Thermo Fisher Scientific) を添加した、DMEM/F-12 GlutaMAXTM (Thermo Fisher Scientific) で、ルーチンで増殖させた (DMEM 完全培地)。ヒト A₁R または A₃R でのリガンド刺激後の β -アレスチン 2 動員の分析のために、6 ウェルプレートの一つのウェルの HEK 293 細胞 (コンフルエンス $\geq 80\%$) に、A₁R-Nluc または A₃R-Nluc のいずれかと β -アレスチン 2-YFP (総量 $2\mu\text{g}$ 、比率 $1:6$) を、ポリエチレンイミン (PEI、 $1\text{mg}/\text{mL}$ 、 $\text{MW}=25,000\text{g}/\text{mol}$) (Polysciences Inc) を DNA:PEI 比が $1:6$ (w/v) で用いて、一時的にコトランスフェクトした。簡単に説明すると、 150mM 塩化ナトリウム (NaCl) を含む滅菌チューブに、DNA または PEI を添加し (最終容量 $50\mu\text{L}$)、室温で 5 分間インキュベートし、混合し、さらに 10 分間インキュベートしてから、組み合わせた混合物を細胞に滴下して添加した。トランスフェクションの 24 時間後、HEK 293 細胞を回収し、血清減少培地 (reduced serum media) (MEM、NEAA (Thermo Fisher Scientific)、 1% L-グルタミン (最終 2mM) (Thermo Fisher Scientific)、 2% FBS、および $1\times$ 抗生物質-抗真菌剤を添加) に、再懸濁し、そして、ポリ-L-リジンコーティング ($\text{MW}150,000\sim300,000$ 、Sigma-Aldrich) した白色 96 ウェルプレート (PerkinElmer Life Sciences) に、播種した ($50,000$ 細胞/ウェル)。播種の 24 時間後、培地を除去し、細胞を PBS で穏やかに洗浄し、 $90\mu\text{L}$ のフリマジン ($4\mu\text{M}$) を含む溶液 (0.49mM の MgCl_2 、 0.9mM の CaCl_2 、および 0.1% の BSA を添加した PBS) を各ウェルに加えた後、10 分間、暗室でインキュベートした。インキュベーション後、 $10\mu\text{L}$ のリガンド (NECA/CPA、アデノシン、BnOCPA) を、 $10\mu\text{M}\sim0.01\mu\text{M}$ の範囲で添加し、Mithras LB 940 (Berthold technology) を使用して、フィルタリングされた発光を、 450nm および 530nm で、1 時間、毎分、測定した。ここで、A₁R または A₃R の C 末端の Nluc は、BRET ドナー (その基質を酸化するルシフェラーゼ) として機能し、YFP は、蛍光アクセプターとして機能した。バックグラウンド発光を測定するために、ビヒクル対照 (DM SO) を追加した。

10

20

30

40

50

【0118】

放射性リガンド結合

放射性リガンド置換アッセイは、氷冷バッファー (2mM の MgCl_2 、 20mM の HEPES、 $\text{pH}7.4$) での CHO-K1-hA₁R 細胞のホモジナイゼーションから得られた、粗膜調製物 (1 チューブあたり $100\mu\text{g}$ タンパク質) を使用して、実施した。A₁R 選択的アンタゴニスト放射性リガンドである $1,3\text{-}[^3\text{H}]\text{-ジプロピル-8-シクロペンチルキサンチン}$ ($[^3\text{H}]\text{-DPCPX}$) についての、濃度 (1nM) で、 K_d 値 (1.23nM 、飽和結合実験で決定) あたりでの、結合を置換する能力は、NECA、アデノシン、CPA、BnOCPA、または HOCPA ($10\mu\text{M}\sim0.1\text{nM}$) の濃度を上げるにより、結合親和性 (K_i) を決定することができた。非特異的結合は、 $10\mu\text{M}$ の DPCPX の存在下で決定された。膜インキュベーションは、SterilinTM シンチレーションバイアル (Thermo Fisher Scientific; Wilmington, Massachusetts, USA) で、室温で 60 分間、実施した。遊離放射性リガンドを、Whatman (商標) ガラスマイクロファイバー GF/B 25mm フィルター (Sigma-Aldrich) でろ過することにより、結合した放射性リガンドから分離した。次いで、各フィルターを SterilinTM シンチレーションバイアルに入れ、 4mL の Ultima Gold XR 液体シンチラント (PerkinElmer) を添加し、室温で一晩インキュベートし、Beckman Coulter LS 6500 多目的シンチレーションカウンター (Beckman Coulter Inc.; Indiana, USA) を使用して、保持された放射活性を測定した。

【0119】

データ分析

シナプス伝達に対するA₁Rアゴニストの効果の濃度応答曲線は、OriginPro 2018 (OriginLab; Northampton, MA, USA) で作成し、Levenberg Marquadt 反復アルゴリズムを使用して、ロジスティック曲線に適合化した。OriginPro 2018は統計分析にも使用した。統計的有意性は、テキストに示されているように、対応のあるまたは対応のないt検定、または必要に応じて反復測定(RM)を使用した一元配置または二元配置分散分析(ANOVA)を使用して、テストした。多重比較のためのボンフェローニ補正を実施した。すべてのインビトロ細胞シグナル伝達アッセイのデータは、Prism 7.0e (Graphpad software, San Diego, CA) を使用して分析し、すべての濃度応答曲線は、応答範囲とIC₅₀を計算するために3パラメーターロジスティック方程式を使用して、適合化した。すべてのcAMPデータは、各アッセイと並行して実施されたフォルスコリン濃度-応答曲線に正規化された。アデノシンに対する統計的有意性は、多重比較のためのダネットの事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して計算した。放射性リガンド変位曲線は、log K_i値を生成する1サイト競合結合方程式(one-site competition binding equation)に適合化した。一元配置分散分析(ダネットの事後検定)を使用して、アデノシンと比較した場合の各化合物のlog K_i値を比較することにより、有意性を決定した。A₁RまたはA₃Rのいずれかへのβ-アレスチン2-YFPのリガンド誘導性動員の程度を決定するために、リガンド処理細胞(リガンド誘導性ΔBRET)からビヒクル処理細胞の530nm/450nmの発光を差し引くことによって、BRETシグナルを計算した。5分(最大応答)での各濃度のΔBRETを使用して、濃度応答曲線を作成した。

10

20

【0120】

すべてのインビボ心臓血管および呼吸のデータは、OriginPro 2018を使用して分析した。一元配置分散分析(One-way ANOVA)を、必要に応じて反復測定で、および多重比較のためのボンフェローニ補正をして、使用した。IV生理食塩水の効果について統計的有意性は、対応のあるt検定を使用してテストした。データは平均±SEMとして全体を通して報告し、n値は各実験において報告する。神経障害性疼痛の試験では、フィッシャーの最小有意差(LSD)事後検定を用いた一元配置分散分析を使用して、薬剤処置群をビヒクル群と比較した(OriginPro 2018)。有意レベルは、P<0.05に設定し、実際のP値は、グラフにおいて、以下の略語とアスタリスクによって、図の凡例と概要に報告した：ns, 有意差なし；*, P<0.05；**, P<0.02；***, P<0.001；****, P<0.0001。

30

【0121】

分子動力学シミュレーション

【0122】

リガンドのパラメーター化

CHARMM36(10, 11)/CGenFF(12-14)力場の組み合わせは、実施したすべての分子動力学(MD)シミュレーションで使用した。BnOCPA、HOCPA、およびPSB36の初期トポロジーおよびパラメーターファイルは、Paramchem web serverから取得した。より高いペナルティは、いくつかのBnOCPA二面角の事項に関連していたため、これは、分子の断片化後、高スループット分子動力学(HTMD)パラメーター化機能と、ビジュアル・モレキュラー・ダイナミクス(VMD)力場ツールキット(ffTK)(17)の両方を使用して、HF/6-31G*レベルの理論で、最適化した。水中のBnOCPAの短期MDシミュレーションを実施して、最適化した回転可能な結合の動作を視覚的に検査した。

40

【0123】

BnOCPAおよびHOCPAの完全に動的なドッキングのためのシステムの作成

活性な、アデノシンおよびGタンパク質の結合状態のA₁Rの座標は、Protein

50

Data Bankデータベース (PDB ID 6D9H) から取得した。PDB ID 6D9Hにない細胞内ループ3 (ICL3) は、Modeller 9.19を使用して再構築した。Gタンパク質 α サブユニット (受容体TM6の活性様コンフォメーションに関与する重要な領域) のC末端ヘリックス (ヘリックス5) を除いて、Gタンパク質は、システムから取り除いた。BnOCPAとHOCPAは、受容体前庭から少なくとも20 Å離れた、2つの異なるシステムの細胞外バルクに配置した。得られたシステムを、Python HTMDスクリプトとTool Command Language (TCL) スクリプトの両方を利用できる、インハウススクリプトを用いて、シミュレーション用に作成した。簡単に説明すると、この多段階手法では、シミュレートしたpH 7.0 (滴定可能な側鎖の提案されるプロトン化は、目視検査によって確認) を考慮して、pdb 2pqrおよびpropkaソフトウェアを使用して、予備的な水素原子の追加を実施する。次に、80 Å×80 Åの正方形の1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (POPC) 二重層 (事前に、VMD Membrane Builder Plugin 1.1、Membrane Plugin、バージョン1.1; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/membrane/>を使用して構築) に、膜内で正しい方向性を取るためにOPMデータベースから取得したA₁R座標を考慮した挿入方法によって、受容体を埋め込んだ。受容体膜貫通バンドルと重なる脂質を除去し、VMD Solvate plugin 1.5 (Solvate Plugin、バージョン1.5; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/solvate/>) を使用して、TIP3P水分子をシミュレーションボックス (最終寸法80 Å×80 Å×125 Å) に追加した。最後に、VMD Autoionize plugin 1.3 (Autoionize Plugin、バージョン1.3; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/autoionize/>) を使用し、Na⁺/Cl⁻カウンターイオン (濃度0.150 M) を追加することによって、全体的な電荷の中性化を行った。H251 (イプシロン互変異性体) とH278 (プロトン化) を除いて、すべてのヒスチジン側鎖を、デルタ互変異性状態であるとみなした。

【0124】

MDエンジンACEMDを、平衡化および生産的シミュレーションの両方に使用した。システムを、Berendsenバロスタット (31) (目標圧力1 atm)、Langevinサーモスタット (目標温度300 K) を使用して、等温-等圧条件 (NPT) で平衡化し、減衰係数を1 ps⁻¹、積分時間を2 fsのステップとした。タンパク質と脂質原子間の衝突を、2000の共役勾配最小化ステップで減少させた後、タンパク質と脂質のリン原子に1 kcal・mol⁻¹・Å⁻²の位置拘束を付けて、2 nsの長さのMDシミュレーションを実施した。次に、タンパク質原子のみを拘束して、20 ナノ秒のMDシミュレーションを実施した。最後に、さらに5 nsの間、位置の拘束を、タンパク質骨格のアルファ炭素にのみ適用した。

【0125】

BnOCPAおよびHOCPAの動的ドッキング

教師あり (Supervised) MD (SuMD) アプローチは、対応する古典的な (教師なし (unsupervised)) MDシミュレーションよりも1桁または2桁速いタイムスケールで結合事象をシミュレートするための適応サンプリング法である。本研究では、A₁Rアゴニストのアデニン足場の重心と、受容体の、N2546・55、F171 ECL2、T2777・42、およびH2787・43との間の距離を、MDシミュレーション中の監視のために、考慮した。BnOCPAの動的ドッキングは、E172 ECL2側鎖とK265 ECL3側鎖の間に形成されたイオンブリッジによって妨げられた。したがって、このイオン相互作用の破壊を促進するために、メタダイナミクスエネルギーバイアスを導入し、結合した複合体の形成を促進させた。より正確には、ガウス間隔 (term) (高さ=0.01 kcal・mol⁻¹および幅=0.1 Å) を、PLUMED 2.3を使用して、E172 ECL2カルボキシル炭素と、正に帯電したK265 ECL3窒素原子との間の距離に沿って、1 psごとに、配置させた。各レプリカについて

、リガンドが結合状態（すなわち、アデニンと受容体残基の重心間の距離 $< 3 \text{ \AA}$ ）に達したときに、古典的な（教師なしでエネルギーバイアスのない）MDシミュレーションを、少なくともさらに 100 ns 実施した。

【0126】

BnOCPA 結合状態メタダイナミクス

BnOCPAの動的ドッキングにおいて、E172 ECL2-K265 ECL3イオン相互作用が果たす役割の詳細な分析を実施することにした。以前の動的ドッキングシミュレーションから得られた結合状態を使用して、3つの 250 ns の長さの十分に調整されたメタダイナミクスシミュレーションを実施し、これにより、開始点として結合モードAが得られた。考慮された集合変数(CV)は、i) E172 ECL2カルボキシル炭素と、正に帯電したK265 ECL3窒素原子との間の距離、および、ii) シクロペンチル環をフェニル部分に結合する4つの原子によって形成される二面角（これは、以前のSUMDシミュレーション中、最も柔軟なリガンドのねじれであった）、であった。ガウス幅はそれぞれ、 $0.1 \text{ \AA}$ と 0.01 ラジアンに設定され、高さは 0.01 kcal/mol に設定され、配置は 1 ps ごとに実施した（バイアス係数=5）。3つのレプリカにより、エネルギー面上の3つの主要なエネルギー最小値のサンプリングが可能になった。

10

【0127】

BnOCPA 結合モードA、B、CおよびDの古典的MDシミュレーション

BnOCPAおよびHOCPAが、A1Rに結合したときに、TM6および／またはTM7移動度に異なる影響を与える可能性があるという仮説を試験するために（および各BnOCPA結合モードの安定性をさらにサンプリングするために）、推定上の結合コンフォメーションA、B、およびCを、モデル化されたICL3を使用して実験的なA1R活性状態の座標に重ね合わせた。これにより、メタダイナミクスによって導入される可能性のあるA1R構造のアーティファクトが削除されるはずである。参照および対照として、さらに次の2つのシステムを検討した：i) 疑似アポA1R、および、ii) 同じ受容体活性コンフォメーションで重ね合わせた選択的A1RアンタゴニストPSB36。BnOCPA結合モードDは、アゴニストのベンジルを、L2536.56、T2576.52、K265 ECL3、T2707.35、およびL2697.34で区切られたECL3の下疎水性ポケットに向けるために、シクロペンチル環とN6窒素原子を接続する二面角を回転させることによって、モードBからモデル化された。Gタンパク質原子を除去し、得られたシステムを、上記のようにMD用に作成した。

20

30

【0128】

Goa、GobおよびGi2 GαCTヘリックスの動的ドッキング

BnOCPA：A1R複合体で実施された古典的なMDからランダムに抽出されたフレームを、シミュレーションボックスの細胞内溶媒バルク側に、Gαタンパク質Goa、Gob、Gi2のGαCTヘリックス5（最後の27残基）を配置する、3セットのシミュレーションのために、作成した。さらに対照として、バイアスのないリガンドHOCPA：A1R複合体で実施された古典的MDからのフレームを、ランダムに抽出して、Gob GαCTとともに、作成した。得られた4つのシステムを、POPC膜に埋め込み、上記のように作成した。

40

【0129】

Goa、GobおよびGi2 GαCTの認識メカニズムに対して、BnOCPAおよびHOCPAによって誘発されると推定される異なる構造的効果を、10個のSUMDレプリカを実施することによって試験した。各レプリカにおいて、GαCT残基348-352の重心と、A1R残基D422.37、I2326.33、およびQ2938.48の重心の間の距離は、 $8 \text{ \AA}$ 未満の値に達するまで監視した。その後、古典的MDシミュレーションをさらに 300 ns 実施した。

【0130】

A1R：GoaおよびGob複合体に対する古典的MDシミュレーション

A1RクライオEM構造（PDB ID 6D9H）は、シミュレートされた5つのシス

50

テムすべてのテンプレートとして使用した。内因性アゴニストのアデノシンを除去し、H O C P A および B n O C P A（モード B および D）を、G タンパク質の非存在下で古典的 M D シミュレーション用に作成されたシステムに、6 D 9 H を重ね合わせたオルソステリック部位に、挿入した。I C L 3 はモデル化されておらず、G タンパク質 α サブユニットの欠落部分もモデル化されていなかった。サブユニット β および γ が除去されると、G α N T ヘリックスは不自然な動きを避けるために残基 27 に縮められた（N T は 6 D 9 H の G β により拘束される）。G α サブユニットは、インハウススクリプトを用いて、G o a および G o b の一次配列に従って、変異された。得られた 5 つのシステムを P O P C メンブレンに埋め込み、上記のように作成した。

【0131】

古典的 M D シミュレーションの分析

モード A ~ C から始まる古典的な M D シミュレーション中、B n O C P A は、3 つの結合モードを迅速に交換することにより、3 つのコンフォメーションを行き来する傾向があった。各コンフォメーションによって T M ドメインに及ぼす影響を判断するために、21 μ s の M D シミュレーション（B n O C P A モード A、B n O C P A モード B、B n O C P A モード C）を幾何学的クラスタリングにかけた。より正確には、B n O C P A のフェニル環と I 175 E C L 2 アルファ炭素の間の距離が 5 Å 未満の場合、シミュレーションフレームはポーズ A で考え；B n O C P A のフェニル環と L 258 6.59 アルファ炭素の間の距離が 6 Å 未満の場合、ポーズ B で考え；B n O C P A のフェニル環と Y 271 7.36 アルファ炭素の間の距離が 6 Å 未満の場合、ポーズ C で考えた。モード D から開始された M D シミュレーション中、開始の平衡コンフォメーションに対するベンジル環の平均二乗偏差（R M S D）が 3 Å 未満の場合、フレームはモード D であると考えた。得られた 4 つのクラスターのそれぞれについて、G P C R 保存モチーフ N P X X Y（A₁R では N 7.49 P I V Y 7.53）の R M S D を、不活性な受容体状態を参照し考慮して、P l u m e d 2.3 を使用して計算し、得られた値を頻度分布としてプロットした（図 6）。T M 7 の細胞内半分に位置する N P X X Y モチーフの再配列は、G P C R 活性化の構造的特徴の 1 つと考えられる。G タンパク質が結合すると、受容体 T M バンドルの中心に向かって移動する。他の活性化マイクロスイッチ（例えば、R 3.50 と E 6.30 の間の塩ブリッジの破壊／形成）とは異なり、このコンフォメーション変化は、M D シミュレーションにアクセス可能なタイムスケールで発生すると考えられる。

【0132】

水素結合および原子接触は、G e t C o n t a c t s 分析ツール (<https://github.com/getcontacts/getcontacts>) を使用して計算し、占有率（相互作用が起こった M D フレームのパーセンテージ）について表した。

【0133】

S u M D 後の G o a、G o b および G i 2 G α C T 古典的 M D シミュレーションの分析各システムについて、G α C T が A₁R 細胞内結合部位に到達した後に実施した古典的 M D シミュレーションのみが分析の対象となった。

【0134】

A₁R クライオ E M P D B 構造 6 D 9 H で報告された G i 2 G α C T の最後の 15 残基に対する R M S D 値は、V M D を使用して計算した。R M S D プロットのピークに関連付けられた M D フレーム（図 7 A、D の状態 C S 1、M S 1、M S 2、および M S 3）は、V M D クラスタリングプラグイン (<https://github.com/luisico/clustering>) を使用して、G α C T ヘリックス全体のアルファ炭素原子と 3 Å のカットオフを選択することによって、クラスター化された。

【0135】

実施例 1

シクロペンチルアデノシン（C P A）誘導体の合成：一般的方法

t B u O C P A を、以下の方法に従って製造した。

【0136】

10

20

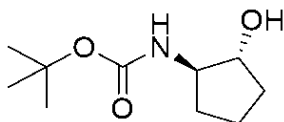
30

40

50

(i) *tert*-ブチル ((1*R*, 2*R*)-2-ヒドロキシシクロペンチル) カルバメート (1)

【化7】



(1)

【0137】

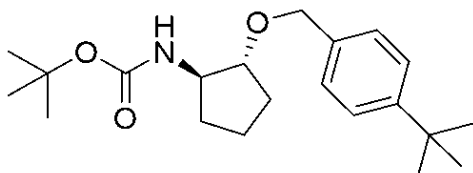
((1*R*, 2*R*)-2-アミノシクロペンタノール塩酸塩 (1当量、10.9 mmol) を、ジクロロメタン 70 mL に溶解し、二炭酸ジ-*tert*-ブチル (1当量、10.9 mmol) を加えた。懸濁液を室温で攪拌した。懸濁液に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (1当量、10.9 mmol) を加えた。2時間後、透明な溶液を減圧下で濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル勾配) による精製後、1を白色の固体として得た (2.03 g、10.3731 mmol、93%)。

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.71 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 1.95 - 1.68 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.42-1.24 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.37 - 1.24 (m, 2H). ¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.73, 77.84, 76.49, 59.20, 32.53, 30.08, 28.75, 20.83. HR-MS: (NSI⁺), ACN, [M+H]⁺: *m/z* 計算値 224.1250, 実測値 224.1257, Δ: -3.41 ppm.

【0138】

(ii) *tert*-ブチル ((1*R*, 2*R*)-2-((4-(*tert*-ブチル)ベンジル)オキシ)シクロペンチル) カルバメート (2)

【化8】



(2)

【0139】

化合物 1 (1当量、1.242 mmol) および 4-*tert*-ブチルベンジルブロミド (1当量、1.242 mmol) を、乾燥 THF に溶解した。反応混合物を 0℃ に冷却し、60% NaH 鉱油分散液 (2当量、2.484 mmol) を加えた。0℃ で 1時間 30分後、メタノール (0.1 mL) および NH₄Cl 水溶液を加え、フラスコを氷浴から取り出した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル勾配) による精製後、2を油として得た (126 mg、0.363 mmol、30%)。

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.93 - 6.84 (m, 1H), 4.51 - 4.40 (m, 2H), 3.75 (s, 1H), 3.69 (m, 1H), 1.94 - 1.72 (m, 2H), 1.65 - 1.51 (m, 3H), 1.40 (m, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.27 (s, 9H). ¹³C NMR: (101 MHz, DMSO) δ 155.44, 150.09, 136.33, 127.77, 125.33, 84.81, 78.01, 70.08, 56.89, 34.66, 31.63, 30.65, 30.55, 28.76, 21.88. HR-MS: (NSI⁺), ACN, [M+H]⁺: *m/z* 計算値 348.2533, 実測値 348.2533, Δ: 0.03 ppm.

【0140】

(iii) ((1*R*, 2*R*)-2-((4-(*tert*-ブチル)ベンジル)オキシ)シクロペンタン-1-アミニウムクロリド (3)

10

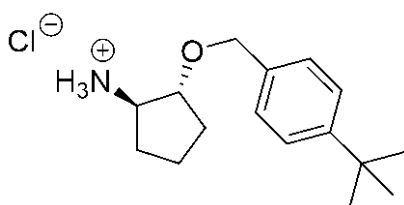
20

30

40

50

【化 9】



(3)

【0141】

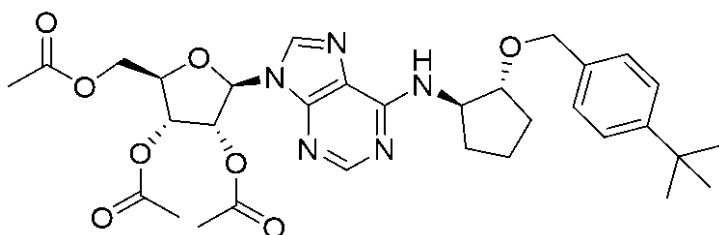
化合物 2 (1 当量、0.329 mmol) をジオキサン 1 mL に溶解し、4 N の HCl (5 当量、1.649 mmol) ジオキサン液を加えた。5 時間後、溶媒を減圧下で除去した。ジクロロメタンで共蒸発させた後、3 を白色固体として得た (93 mg、0.328 mmol、99%)。

^1H NMR: (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.02 (s, 2H), 7.42 - 7.35 (m, 2H), 7.28 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 4.54 - 4.39 (m, 2H), 3.93 - 3.86 (m, 1H), 3.42 (s, 1H), 2.00 (m, 2H), 1.75 - 1.48 (m, 5H), 1.28 (s, 9H). ^{13}C NMR: (75 MHz, DMSO- d_6) δ 150.35, 135.74, 128.01, 125.38, 82.82, 70.70, 56.29, 34.70, 31.63, 30.27, 28.92, 21.64. HR-MS: (NSI+), ACN, $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 計算値 248.2005, 実測値 248.2009, Δ : -1.70 ppm.

【0142】

(iv) (2R, 3R, 4R, 5R) - 2 - (アセトキシメチル) - 5 - (6 - ((1R, 2R) - 2 - ((4 - (tert-ブチル) ベンジル) オキシ) シクロペンチル) アミノ) - 9H-プリン-9-イル) テトラヒドロフラン-3, 4-ジイル ジアセテート (4)

【化 10】



(4)

【0143】

(2R, 3R, 4R, 5R) - 2 - (アセトキシメチル) - 5 - (6 - クロロ - 9H-プリン-9-イル) テトラヒドロフラン-3, 4-ジイル ジアセテート (1 当量、0.235 mmol) を、イソプロパノール 15 mL に溶解した。NaHCO₃ (3 当量、0.705 mmol)、および、3 (1.5 当量、0.352 mmol) を加えた。反応混合物を一晚還流下、105℃で加熱した。反応が完了してから、反応混合物を室温まで冷却し、残った固体を濾別し、無水エタノールで洗浄した。濾液を減圧下でエバポレートした。シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル勾配) による精製後、4 を固体として得た (52.7 mg、0.0845 mmol、36%)。

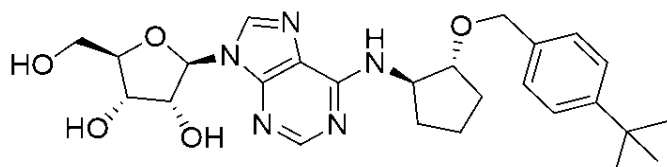
^1H NMR: (300 MHz, Methanol- d_4) δ 8.31 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.25 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 6.03 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 5.73 (dd, J = 5.7, 4.5 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.50 - 4.35 (m, 3H), 4.01 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.08 (d, J = 1.8 Hz, 6H), 2.05 - 1.99 (m, 1H), 1.90 - 1.57 (m, 5H), 1.29 (s, 9H). ^{13}C NMR: (101 MHz, Methanol- d_4) δ 170.80, 169.98, 169.74, 154.33, 152.85, 139.22, 135.53, 127.34, 124.73, 86.39, 84.68, 80.21, 72.99, 70.74, 70.61, 62.83, 33.90, 30.39, 30.26, 30.03, 21.11, 19.24, 19.0

4, 18.87. HR-MS: (NSI+), ACN, $[M+H]^+$: m/z 計算値 624.3012, 実測値 624.3028, Δ : -2.53 ppm.

【0144】

(v) (2R, 3R, 4S, 5R) - 2 - (6 - ((1R, 2R) - 2 - (4 - (tert-ブチル)ベンジル)オキシ)シクロペンチル)アミノ) - 9H-プリン-9-イル) - 5 - (ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3, 4-ジオール (tBuOC PA)

【化11】



10

(tBuOC PA)

【0145】

化合物4 (1当量、0.0834 mmol) をメタノール4 mL に溶解し、 K_2CO_3 (0.6当量、0.0500 mmol) を室温に加えた。30分後、反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製後、tBuOC PA を白色の固体として得た (30 mg、0.0603 mmol、73%)。

20

^1H NMR: 300 MHz, Methanol- d_4) δ 8.16 (s, 2H), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.85 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 6.5, 5.1 Hz, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.40 - 4.55 (m, 1H), 4.22 (dd, J = 5.1, 2.5 Hz, 1H), 4.06 - 4.09 (m, 1H), 3.87 - 3.91 (m, 4.0 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 12.6, 2.5 Hz, 1H), 3.64 (dd, J = 12.5, 2.6 Hz, 1H), 2.09 - 2.20 (m, 1H), 1.99 - 1.85 (m, 1H), 1.80 - 1.45 (m, 4H), 1.18 (s, 9H). ^{13}C NMR: (101 MHz, Methanol- d_4) δ 154.46, 152.15, 150.22, 140.05, 135.50, 127.33, 124.74, 89.95, 86.85, 84.58, 74.06, 71.32, 70.70, 62.13, 33.91, 30.38, 30.19, 29.99, 21.09. UPLC: t_R = 3.01 min. (NSI+), ACN, $[M+H]^+$: m/z 計算値 498.2690, 実測値 498.2711, Δ : -4.21 ppm.

30

【0146】

上記の合成方法は、例えば、工程 (ii) において酸素のアルキル化のために代替の求電子試薬を使用することにより、本発明による他の化合物を製造するために、当業者が適応させることができることが理解される。

【0147】

実施例2

ラット海馬におけるシナプス伝達に対する化合物 BnOC PA の効果

哺乳動物の脳組織における A_1 受容体アゴニスト化合物 BnOC PA の作用を評価するために、まず、シナプス前終末のアデノシン A_1 受容体の活性化によって強く阻害される興奮性シナプス伝達に対する効果を調べた。アゴニストの効果を、確立されたアデノシン受容体アゴニスト (アデノシン、CPA、および NECA) の効果と比較した。シナプス伝達は、内因性の非特異的アゴニストであるアデノシン (図1A) によって阻害され、 IC_{50} (最大阻害濃度の半分) は、 $20 \pm 4.3 \mu M$ ($n=11$ の切片、図1B) であった。アデノシンによって引き起こされるシナプス伝達の阻害を反転させる特定のアデノシン A_1 受容体アンタゴニスト 8-CPT ($2 \mu M$) の適用 (図1A) は、アデノシン濃度-応答曲線に、平行かつ右方向へのシフトをもたらした (IC_{50} は $20 \pm 4.3 \mu M$ から $125 \pm 10 \mu M$ にシフト、 $n=5$; 図1B)。これらのデータにより、アデノシンの阻害効果が、 A_1 受容体の活性化を介したものであることが確認される。CPA と NECA はどちらも、シナプス伝達を阻害し、これは 8-CPT によって反転され、 IC_{50} は、それぞれ、 $11.8 \pm 2.7 nM$ ($n=11$ の切片、図1C、D)、および $8.3 \pm 3 n$

40

50

M ($n = 11$ の切片；図 1 E、F) であった。

【0148】

化合物 B n O C P A は、シナプス伝達を阻害し、これは、A₁ 受容体アンタゴニスト 8 - C P T ($4 \mu\text{M}$ 、 $n = 12$ ；図 2) の同時適用によって反転された。濃度応答曲線から、化合物 B n O C P A の I C₅₀ は、 $65 \pm 0.3 \text{ nM}$ ； $n = 11$ の切片、と計算された (図 2 B)。

【0149】

シナプス伝達のこの阻害が本質的にシナプス前であるかどうかを確かめるために、ペアパルス比が伝達物質放出の初期可能性に反比例する、ペアパルス促進実験を実施した。これにより、伝達物質の放出を減少させることによりシナプス伝達を阻害する化合物は、ペアパルス促進を増加させることが予想される。化合物 B n O C P A (100 nM) は、ペアパルスの促進を有意に増加させた (ペアパルス間隔が 50 ms の場合、ペアパルス比は対照切片の 1.88 ± 0.08 から 2.41 ± 0.08 に増加した。 $n = 6$ の切片、図 2 C)。したがって、化合物 B n O C P A の作用は、海馬においてシナプス伝達を阻害するシナプス前 A₁ 受容体の活性化と一致している。

【0150】

実施例 3

海馬切片の発作活性に対する化合物 B n O C P A の効果

海馬切片において誘発された発作活性に対する非典型的アゴニスト化合物 B n O C P A の作用を調べた。発作活性中に、アデノシンを放出させて A₁ 受容体を活性化し、活性のバーストを終了させ、次のバーストの発生を遅らせる。したがって、外因性アデノシンおよび他の A₁ 受容体リガンドの適用は、活性を阻害すると予想される (例えば、M. J. Wall et al., 2015 参照)。化合物 B n O C P A の作用を、典型的なアゴニストの作用と比較した。形式的に Mg^{2+} フリー／増加 K^{+} (6 mM) の a C S F を使用して、頻繁なニューロンスパイクを特徴とする強力な長期的なてんかん様活性の出現によって反映される、海馬の発作活性を開始させた (例えば、J. Lopatar et al., Neuropharmacology, 2011, 61, 25-34、参照)。アデノシン ($20 \sim 100 \mu\text{M}$ 、 $n = 5$ の切片、図 3 A)、および N E C A (300 nM 、 $n = 4$ の切片、図 3 B) は、アゴニストのウォッシュアウト後に回復した発作活性を、迅速かつ可逆的に消失させた。化合物 B n O C P A ($0.3 \sim 1 \mu\text{M}$ (すなわち、シナプス伝達に対する I C₅₀ (65 nM) の約 $5 \sim 15$ 倍)) は発作活性を消失させず、バースト頻度と持続時間のいずれにもほとんど影響を与えないようであった ($n = 6$ の切片；図 3 C)。化合物 B n O C P A がシナプス伝達を強く阻害したこと (実施例 2 参照) を考えると、これは驚くべき結果であった。

【0151】

A₁ 受容体アゴニストの抗発作効果には 2 つの要素があり：それは、興奮性シナプス伝達のシナプス前抑制、および神経細胞膜電位のシナプス後過分極、である。発作活性に対する化合物 B n O C P A の弱い作用は、他の典型的な A₁ 受容体アゴニストとは異なり、シナプス後膜電位を過分極できないことから生じたと仮定される。

【0152】

実施例 4

錐体細胞の膜電位過分極に対する化合物 B n O C P A の作用

シナプス後 A₁ 受容体活性化の影響を確かめるために、 K^{+} チャネルの活性化を介して生成される C A 1 錐体細胞における膜電位過分極の程度を測定した。アデノシン ($100 \mu\text{M}$) および C P A (300 nM) は、錐体細胞の膜電位を著しく過分極化した (アデノシン：膜電位が $-69.4 \pm 1.5 \text{ mV}$ から $-74.1 \pm 1.5 \text{ mV}$ に変化、平均変化は $-4.7 \pm 0.5 \text{ mV}$ 、 $n = 8$ ；C P A：膜電位が $-64 \pm 2.1 \text{ mV}$ から $-71.3 \pm 1.4 \text{ mV}$ に変化、平均変化は $-7.3 \pm 0.85 \text{ mV}$ 、 $n = 7$ ；図 4 A、B)。高濃度でも、化合物 B n O C P A は、C P A と比較して膜電位にほとんど影響を与えず ($300 \text{ nM} \sim 1 \mu\text{M}$ ； $0.45 \pm 0.2 \text{ mV}$ 、 $n = 18$ 細胞、 $P = 1.3 \times 10^{-7}$)、C P A によって引き起こされるものよりも有意に小さかった。同一の化合物 B n O C P A の溶液 (

10

20

30

40

50

300 nM) を、姉妹海馬切片のシナプス伝達に対してさらにテストし、シナプス伝達を消失させることで活性があることを確認した (図 4 C)。したがって、アデノシンおよび CPA とはまったく対照的に、化合物 B n O C P A は、シナプス前 A₁ 受容体を活性化するが (図 2)、シナプス伝達の IC₅₀ の 15 倍の濃度でさえも、シナプス後受容体を活性化しなかった (図 4)。

【0153】

化合物 B n O C P A がシナプス後 A₁ 受容体に結合するがそれらを活性化しない場合、受容体アンタゴニストと同様に作用し、他の受容体のバイアスされたアゴニストで観察される特性である、他のアゴニストによる活性化を、防止することが予想され得る。この理論をテストするために、化合物 B n O C P A (300 nM、10 分) を最初に適用し、次に、化合物 B n O C P A の存在下で CPA (300 nM) を適用した。膜電位に対する CPA の作用は、化合物 B n O C P A によって有意に減少した ($P = 2.89 \times 10^{-5}$) (平均過分極が -7.3 ± 0.85 mV から 2.7 ± 2 mV に低下した; 図 4 A、B)。これらの結果は、化合物 B n O C P A が、シナプス後 A₁ 受容体に結合するがそれらを活性化しないことと一致している。

【0154】

B n O P C A が、シナプス後過分極を媒介する K⁺ チャネルを阻害したかどうか、または他の何らかの方法で G タンパク質シグナル伝達を非特異的に妨害したかどうかをテストするために、G A B A_b 受容体アゴニストのバクロフェンを、C A 1 錐体細胞に適用した。B n O C P A は、バクロフェンによって生成される膜過分極に影響を与えず (図 4 D、4 E)、シナプス後膜電位に対する B n O C P A の作用が、ニューロンの発火を促進する顕著なシナプス後脱分極を伴う発作活性のモデル (低 Mg²⁺ / 高 K⁺) において、なぜ B n O C P A はほとんど作用がなかったかの理由を説明している可能性が高いことが確認された。対照的に、同等の濃度の CPA は、ニューロンの発火を完全に抑制した (図 4 F、G; 図 3 も参照)。

【0155】

実施例 5

B n O C P A は独特のシグナル伝達バイアスを示す

B n O C P A の前例のない特性の分子原理を調査するために、ヒト A₁ R (h A₁ R) を発現する組換え細胞システム (C H O - K 1 細胞) を作成した。B n O C P A は、h A₁ R で強力な (IC₅₀、0.7 nM; 表 1) 完全アゴニストであり、CPA および N E C A と同等の親和性で、そしてアデノシンよりも高い親和性で、受容体に結合した (図 5 A、B)。P T X 処理細胞にトランスフェクトされた個々の G i / o サブユニットの個々の百日咳毒素 (P T X) 非感受性変異体を使用して、アデノシン、CPA、N E C A、およびバイアスのないアゴニスト H O C P A が、一連の G i / o サブユニット、特に G o a に、カップリングすることを観察した (図 5 C ~ E; 表 1)。まったく対照的に、B n O C P A は、独特で選択性の高い G α サブユニット活性化プロファイルを有し、G o a を活性化できないという点で、2 つの G o アイソフォームを区別した (図 5 C ~ E; 表 1)。したがって、B n O C P A は、G o a を介した c A M P 蓄積の阻害に対するアデノシンの作用を低下させるはずであると我々は仮定した。これは確かに事実であり (図 5 F)、C N S の膜電位に対して B n O C P A のアンタゴニスト作用と平行であった (図 4 A、B)。β - アレスチン動員の B R E T アッセイを使用して、B n O C P A および典型的 A₁ R アゴニストの作用が、β - アレスチンを介して媒介される可能性を除外した。B n O C P A、CPA、またはアデノシンのいずれかを使用し、A₁ R の β - アレスチンの動員は、観察されなかった (データは示していない) が、これは、A₁ R について以前に報告されたものと一致した観察である。β - アレスチン動員の欠如は、A₁ R の細胞質尾部にセリンおよびスレオニン残基が欠如しているためである可能性が高く、これにより、A₁ R は、β - アレスチンのシグナル伝達に対して本質的に偏っている。

【0156】

全細胞パッチクランプ記録からのデータは、B n O C P A が、神経細胞膜電位に影響を及

10

20

30

40

50

ばさなかったことを示しており（図4A、B）、一方、組換えhA₁Rでの実験は、BnOCPAが、Goaを活性化しないことを示した（図5C、E）。したがって、特にシナプス外部位でGoaが高く発現される、海馬のA₁Rは、Goaを介して作用して、膜の過分極を誘発するはずであると予測した。これをテストするために、GoaとGobに対する一連の、以前に検証された干渉ペプチドを、全細胞電位固定記録の間、CA1錐体細胞に注入した。Goa干渉ペプチドの導入は、アデノシン誘導の外向き電流の有意な減衰を引き起こしたが（図5G、H）、スクランブルペプチドおよびGobペプチドはいずれも、電流振幅に影響を与えなかった（図5G、H）。したがって、膜電位過分極は、主にGoaのA₁R活性化を介して発生している。したがって、BnOCPAが、Goaを活性化できないことを示す組換え受容体から得たデータ（図5C、E）は、BnOCPAが、膜過分極を引き起こさず、実際に、CPAまたはアデノシンによって誘発される過分極をそれぞれ防止または反転させた理由を説明している（図4A、B）。

10

【0157】

実施例6

BnOCPAによって示されるシグナル伝達バイアスは、非標準的な結合モード、およびGαサブユニットとの選択的相互作用に、反映されている

BnOCPAの通常ではないシグナル伝達特性および非常に特異的なGαカップリングをより十分に理解するために、動的ドッキングシミュレーションを実施し、A₁R（PDBコード6D9H）のアクティブクライオEM構造を用いて、明示的で完全に柔軟な環境におけるBnOCPAの基本的なオルソステリック結合モードを研究した。BnOCPAを、バイアスのないアゴニストであるアデノシンとHOCPA、およびA₁Rのアンタゴニスト（PSB36）と比較した。BnOCPAは、アデノシンおよびHOCPAと同じフィンガープリントで、受容体と結合した。メタダイナミクスを使用したBnOCPAドッキング状態のさらなる調査により、このフィンガープリントの交換可能なバリエーション（すなわち、モードA、B、およびC）（BnOCPA固有のベンジル（Bn）基の方向によって区別できる）が、明らかになった。可能なBnOCPA結合モードを確立した後、BnOCPAによって示される経験的に観察されたGタンパク質選択性に対する、オルソステリックアゴニスト、Gタンパク質αサブユニットα5（C末端）ヘリックス（GαCT）、およびGαタンパク質サブユニット、のそれぞれの寄与を調べた（表1、図5A～D）。

20

30

【0158】

Gタンパク質の非存在下でのシミュレーション

まず、Drorrら（PNAS USA, 108, 18684-18689 (2011)）に従って、BnOCPA結合A₁Rのダイナミクスを、HOCPA、A₁RアンタゴニストPSB36、またはアポ受容体のいずれかに結合した受容体の対応ダイナミクスと比較したが、これは、Gタンパク質の非存在下で受容体の細胞内領域が応答する方法に、リガンド依存性の違いがあるかもしれないという仮説による。これらのシミュレーションでは、不活性化が可能なように、そして結果がGタンパク質に依存しないように、Gタンパク質を省略した。BnOCPA結合モードA～Cは、MDシミュレーション中、交換可能であったが、GPCR活性化の構造的な特徴であるN7.49PXXY7.53モチーフの変化によりモニタリングされるように、明らかに異なるダイナミクスに関連付けられた。シミュレーション中にBnOCPAのベンジル基によって示された高い柔軟性とその親油性を考慮して、MD中に探索されなかったさらなる結合（すなわち、モードD）を仮定し、シミュレーションした。このコンフォメーションには、A₁/A₂Aの選択性に関与するECL3の下疎水性ポケットが関与する。4つのBnOCPA結合モード（A～D）を重ね合わせると、シミュレートされた条件下でのBnOCPAのベンジル基の運動性が高いことが明らかになった（データは示していない）。

40

【0159】

N7.49PXXY7.53ダイナミクスの定量化は、HOCPA、BnOCPAモードA、BnOCPAモードC、およびアポ受容体が、保存されたN7.49PXXY7.5

50

3モチーフのRMSDと類似の分布を示すことを明らかにした(図6A)。対照的に、非標準的なBnOCPA結合モードBおよびDは、アンタゴニストPSB36と類似の方法で、N7.49pXXY7.53バックボーンの、活性コンフォメーションから不活性コンフォメーションへの部分的な遷移に関与していた(図6B)。全体として、シミュレーションでは、モードDが最も安定したBnOCPAポーズであることが明らかになったが、モードBが、21μsのうち3.6μsを占めていた。

【0160】

GαCTの動的ドッキング。

A₁RとGタンパク質との間のアゴニスト駆動相互作用をシミュレートするために、Gタンパク質(Gi2、Goa、Gob)のα5(C末端)ヘリックス(GαCT)を、HOCPAおよびBnOCPAに結合したアクティブなA₁R構造(ここでもGタンパク質を欠如した)に、動的にドッキングさせた。これにより、A₁Rとの複合体の形成に対するさまざまなGαCTの影響を評価し、Goa、Gob、Gi2のうち、GobのGαCTのみが、BnOCPAに結合した活性A₁Rと完全に関与し、表1にまとめられたGタンパク質選択性の実験的観察に一致する、という仮説をテストした。図7Aは、HOCPAまたはBnOCPAのどちらが結合しているかに関係なく、標準状態(CS1)に関連させて、準安定状態(MS1)を介してA₁RにドッキングしたGobのGαCTを示している。CS1の形状は、クライオEM、A₁R:Gタンパク質複合体に見られる標準的な配置に対応することがわかったが、状態MS1は、ニューロテンシン受容体で観察された近年報告の非標準的な状態に類似しており、標準の状態に向かう途中の中間体であると考えられる。対照的に、図7Bは、GoaおよびGi2のGαCTが、A₁Rにドッキングして準安定状態MS2およびMS3を形成することを示している。MS2は、β₂-アドレナリン受容体:GsCT縮合複合体に類似しており、活性化経路の中間体であって、Gタンパク質の特異性に関連する構造であると提案される。ただし、この場合、非生産的な経路にあるようである。

【0161】

完全なGタンパク質に関するMDシミュレーション

非機能のBnOCPA:A₁R:Goa複合体が異常なダイナミクスを示すという仮説をテストするために、A₁R:BnOCPA(モードBまたはD)複合体に結合したGoaおよびGobタンパク質の、またはA₁R:HOCPA(機能システム)に結合したGobタンパク質の、Gαサブユニットを検討することにより、シミュレーションの複雑性を増加させた。GoaとGobの最も明らかな違いは、Goaのα4-β6ループおよびα3-β5ループと、受容体のヘリックス8(H8)の間の、一時的な水素結合の形成を含んでいた(データは示していない)。ニューロテンシン受容体:Gタンパク質複合体の非標準状態でも同様の接触が存在する。全体として、Goaは、TM3およびICL2残基とより多く相互作用し、一方、TM5およびTM6は、ICL1とともに、Gobにより多く関与した。興味深いことに、N7.49pXXY7.53モチーフの下に配置される、R2917.56およびI2928.47は、GoaまたはGobと相互作用する異なる傾向を示した。このシナリオでは、BnOCPAによって安定化される特定のA₁Rコンフォメーション(Gタンパク質の非存在下でのシミュレーションで示唆、図6A~B)は、GoaとGobの活性化プロセス中に、異なる中間状態をもたらす得ることが妥当といえる。

【0162】

実施例7

心拍数および平均動脈圧に対する化合物BnOCPAの作用

神経系アデノシンA₁受容体を標的とする臨床的に有用な化合物の開発に対する主要な障害の1つは、心臓におけるA₁受容体の強力な発現、およびそれらが活性化したときの心臓血管系へのその後の影響である。これらのA₁受容体の活性化は、負の変伝導性(房室結節の伝導速度の低下)であり、洞速度(sinus rate)の低下を引き起こす。心房(心室ではない)収縮性の低下、および心筋に対するカテコールアミンの刺激作用の減衰もあ

10

20

30

40

50

る。房室結節におけるアデノシンの影響は、 $G_i\beta\gamma$ 結合 K^+ チャネルの開放、および I_{Ca} を含む他の電流の抑制の結果である。

【0163】

BnOCPA の、天然の生理学的系における明確な異なる効果、強い $G\alpha$ バイアス、独特の結合特性、および選択的 $G\alpha$ 相互作用を考えると、これらの特性は、治療的使用のための A_1R アゴニストの開発に対する主要な障害—心臓血管系 (CVS) において、その活性化が心拍数と血圧の両方を顕著に低下させるその強力な作用—を回避する可能性がある」と仮定された。これらの CVS 作用は、心臓において高レベルで発現し、心機能の調節に重要な役割を果たす、 G_oa を介する可能性が高いため、 G_oa に対する BnOCPA の作用の欠如により、BnOCPA が、CVS に対して最小の影響を有することが予測された。

10

【0164】

心臓生理学に対する化合物 BnOCPA の影響を試験するために、2つのアプローチが取られた。最初に、単離されたカエルの心臓の収縮率に対する、アデノシンおよび化合物 BnOCPA の作用を比較した。カエル (*Xenopus laevis*) を、(中枢反射系を取り除くために) 脊髄穿刺を行い、露出した心臓に直接、薬剤を適用した。30 μM のアデノシン (哺乳類の海馬シナプス抑制について約 IC_{50}) を適用すると、心拍数が 42 ± 1.2 BPM から 35.5 ± 1.2 BPM に可逆的に低下した (平均 6.25 ± 0.6 BPM の低下、約 15% の低下、 $n=4$ のカエル)。アデノシンからの回復後、300 nM (シナプス抑制の IC_{50} の約 5 倍) の化合物 BnOCPA を適用すると、心拍数に有意な作用はなかった (0.6 ± 0.2 BPM の変化) が、その後のアデノシン適用の作用は低下した (化合物 BnOCPA 後に、対照条件での 6.25 BPM から 0.27 ± 0.2 BPM への低下)。典型的な A_1 受容体アゴニスト CPA は、HR を 6.2 ± 0.5 BPM ($n=3$) 低下させた (図 8A)。したがって、BnOCP は、心臓の A_1R を活性化しないようであるが、代わりに、内因性アゴニストの作用を妨げるアンタゴニストのように振る舞う。

20

【0165】

哺乳動物の CVS に対する BnOCPA の作用を完全に調査するために、ウレタン麻酔し、自発呼吸する成体ラットにおける心拍数 (HR) および平均動脈血圧 (MAP) について、その作用を測定した (図 8B、C、D)。安静時 HR 432 ± 21 BPM (1分あたりの心拍数) は、アデノシン ($1 mg \cdot kg^{-1}$) によって、 147 ± 12 BPM (約 66%、 $P=3 \times 10^{-11}$) に、有意に低下した。BnOCPA ($10 \mu g \cdot kg^{-1}$) は、HR に有意な作用を与えなかった (約 6%、 442 ± 20 BPM、に対して、 416 ± 21 BPM; $P=1$) が、同時注入の場合にアデノシンの徐脈作用を消失させた ($P=2.7 \times 10^{-9}$) (平均変化 51 ± 4 BPM; 約 12%; $P=0.67$)。CPA ($420 ng \cdot kg^{-1}$) は、HR を有意に低下させ (408 ± 17 から 207 ± 29 BPM; 約 50%、 $P=1.9 \times 10^{-8}$)、アデノシンの作用と有意差がない低下であった ($P=0.12$) が、BnOCPA ($P=9.0 \times 10^{-9}$)、および BnOCPA 存在下のアデノシン ($P=6.7 \times 10^{-7}$) の両方の効果とは、有意に異なっていた。 86 ± 9 mmHg の安静時 MAP は、アデノシンによって有意に低下した (約 47%、 46 ± 4 mmHg; $P=1.4 \times 10^{-4}$)。BnOCPA は、MAP において有意な ($P=1$) 作用を与えず (88 ± 11 mmHg、に対して、 85 ± 13 mmHg)、同時注入した場合のアデノシンへの応答にも有意な ($P=1$) 作用を与えなかった (51 ± 4 mmHg; $P=0.01$)。CPA は、MAP を有意に低下させ (83 ± 8 mmHg から 51 ± 5 mmHg; $P=0.016$)、BnOCPA の非存在下または存在下でのアデノシンの作用と、有意差がない低下であった ($P=0.63$ および $P=1$)。*** $p < 0.001$ 。薬剤注射と同等の量の生理食塩水は、HR または MAP のいずれにも影響を与えず、反復投与によるアデノシン応答の作用の低下はなかった (データは示していない)。したがって、BnOCPA は、CVS の A_1R でアゴニストとして作用しないようであり、代わりに、心臓において A_1R の徐脈作用に拮抗するようである。

30

40

50

【0166】

単離したカエルの心臓および呼吸したラットの両方に対する作用は一貫しており、海馬ニューロンにおける膜電位過分極について観察された化合物 B n O C P A の作用と類似している。化合物 B n O C P A は、心拍数および M A P に、ほとんどまたはまったく作用を与えないが、A₁ 受容体を活性化するアゴニストの作用をブロックする。心臓血管系に対する作用がないことは、神経系障害のための新しい A₁ 受容体リガンドの開発のためのリード化合物として、化合物 B n O C P A の有用性を高める。

【0167】

実施例 8

呼吸

呼吸に対する有害作用（呼吸困難）は、全身の A₁ R アゴニストの使用を制限するため、さらに、呼吸に対する B n O C P A の作用を調べた。ウレタン麻酔をかけた自発呼吸の成体ラットにおいて、選択的 A₁ R アゴニスト C P A の静脈内注射は、有意に呼吸抑制を引き起こした。まったく対照的に、B n O C P A は、呼吸について認識可能な作用を与えなかった（図 9 A ~ D）。

10

【0168】

実施例 9

疼痛

C V S および呼吸に対する B n O C P A の作用の欠如は、これまで有害な心臓呼吸事象によって厳しく制限されてきた、A₁ R アゴニストの潜在的な適用：鎮痛剤としての A₁ R アゴニスト、の調査を促進させた。

20

【0169】

図 10 は、ラット（A、B）および非ヒト霊長類（マカク、C、D）の両方の脊髄の後角のニューロンに作用する脊髄侵害受容（疼痛感知）後根求心性神経におけるシナプス伝達についての、B n O C P A および C P A の効果を示す。B n O C P A（図 10 A）は、後角ニューロンへの電氣的に誘発した後根入力を、強く抑制した。比較のために、図 10 B に、典型的な A₁ R アゴニスト C P A の同様の効果を示す。図 10 C、D は、脊髄への後根入力の抑制における、非ヒト霊長類の脊髄の対応ニューロンでの B n O C P A の効果を示している。この活性の抑制は、鎮痛をもたらすものである。図 5 から、C P A を使用してこれを行うと、血圧と心拍数が大きく低下するが、B n O C P A は、そのような作用を有していない。

30

【0170】

実施例 10

インビボ疼痛モデル

B n O C P A の鎮痛剤としての可能性をさらに試験するために、慢性神経障害性疼痛（脊髄神経結紮）のラットモデル（その特徴は機械的異痛症であり、影響を受けた手足はそれまで無害だった触覚刺激に敏感になる）、を使用した。静脈内（図 9 E）および髄腔内（図 9 F）の両方の B n O C P A は、用量依存的に機械的異痛症を強力に反転させたが、本当の鎮痛と間違われる可能性のある運動機能に対する抑制効果はなかった（データは示していない）。したがって、B n O C P A は、心肺作用のない用量で、そして、非オピオイド鎮痛剤のプレガバリンおよびガバペンチンよりも数桁低い用量で、強力な鎮痛特性を示す。

40

【0171】

結論

非定型 A₁ アデノシン受容体アゴニストである化合物 B n O C P A の作用は、シナプス伝達、膜電位過分極、海馬における発作活性、および脊髄侵害受容求心性神経について、特徴づけられた。その作用は、十分に確立されたリガンド（アデノシン、C P A、および N E C A）と比較された。すべてのアゴニストは、シナプス伝達を阻害し、ペアパルス促進を増加させ、これらの効果は、A₁ 受容体アンタゴニスト 8 - C P T によってブロックされた。したがって、すべてのアゴニストの作用は、シナプス前 A₁ 受容体の活性化と一致

50

した。

【0172】

化合物 B n O C P A は、アデノシンおよび C P A とは異なり、錐体細胞の膜電位を過分極化しないことが見出された。非常に高濃度（最大 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、シナプス伝達に対する IC_{50} の約 15 倍）でも、作用はなかった。化合物 B n O C P A は、C P A によって生成される膜電位過分極を低下させ、アデノシンの作用を反転させており、シナプス後 A₁ 受容体に結合する。したがって、化合物 B n O C P A は、シナプス前およびシナプス後 A₁ 受容体を区別でき、シナプス前受容体で強力なアゴニストであるが、シナプス後 A₁ 受容体でアンタゴニストと同様に作用する。

【0173】

化合物 B n O C P A は、活性を消失させる他の典型的なアデノシン受容体アゴニスト（C P A、N E C A、およびアデノシン）とは異なり、発作活性のモデルにおいて、ほとんど影響を及ぼさなかった。A₁ 受容体アゴニストによって生成される発作抑制に寄与すると予想される少なくとも 2 つのプロセスがあり：それは、シナプス伝達の阻害、および、活性電位発火の低下につながる膜電位の過分極、である。使用した発作モデルにおいて、活性は主に活性電位発火によって発動されるため、化合物 B n O C P A の弱い作用は、神経細胞膜電位を過分極化できないことと一致している。

【0174】

単離したカエルの心臓、および麻酔した呼吸ラットの調製物の両方を用いて、同じ作用が、両方の調製物で観察され：それは、アデノシンおよび典型的 A₁ 受容体アゴニスト C P A は、心拍数に対して明らかな抑制作用があるが、化合物 B n O C P A は、有意な作用がないことである。化合物 B n O C P A の適用後に、心拍数に対するアデノシンの作用が著しく低下することも観察され、これは、海馬で観察されたアデノシンおよび C P A によって誘発される膜過分極についての、化合物 B n O C P A のアンタゴニスト作用と一致している。したがって、B n O C P A は、心臓の A₁ 受容体を活性化させず、内因性アゴニストであるアデノシンを含む他の A₁ 受容体アゴニストによるこれらの受容体の活性化も、低下させる。

【0175】

したがって、天然の A₁ R を、別個のシグナル伝達経路を介してシグナル伝達するように誘導することができ、そうすることができる新規の化学種を同定した。

【0176】

当業者には、本発明の範囲から逸脱することなく、前記の実施形態に対するいくつかの変形が想定されることが理解されるものである。

【0177】

前記の特徴、および／または添付の図面に示されるものの任意の数の組み合わせは、先行技術に対して明らかな利点を提供し、したがって本明細書に記載の本発明の範囲内にあることも、当業者によって理解されるものである。

10

20

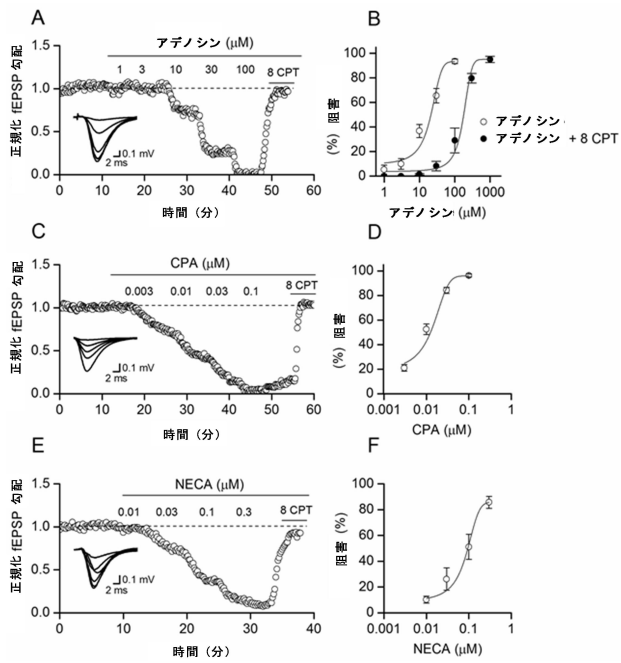
30

40

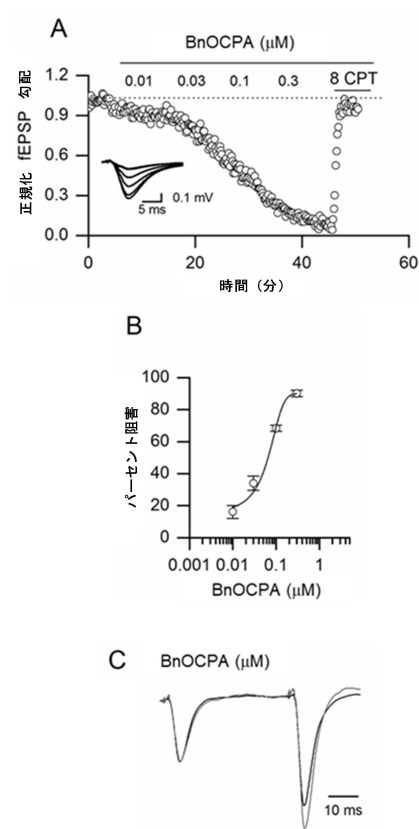
50

【図面】

【図 1】



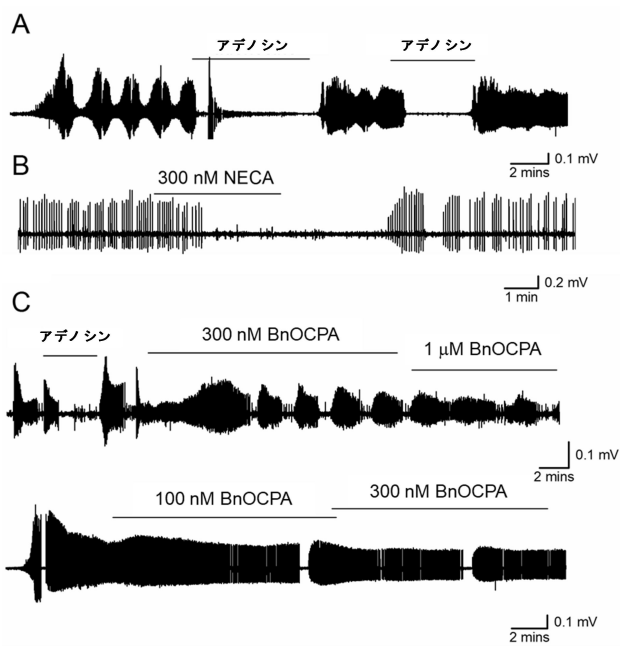
【図 2】



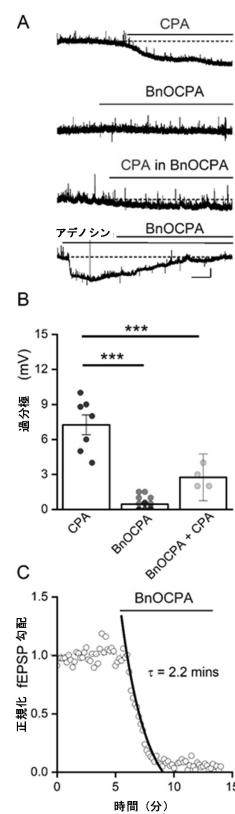
10

20

【図 3】



【図 4 - 1】

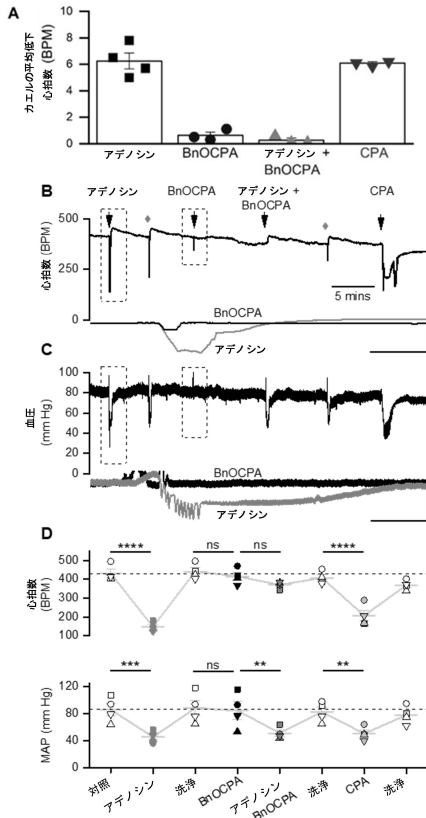


30

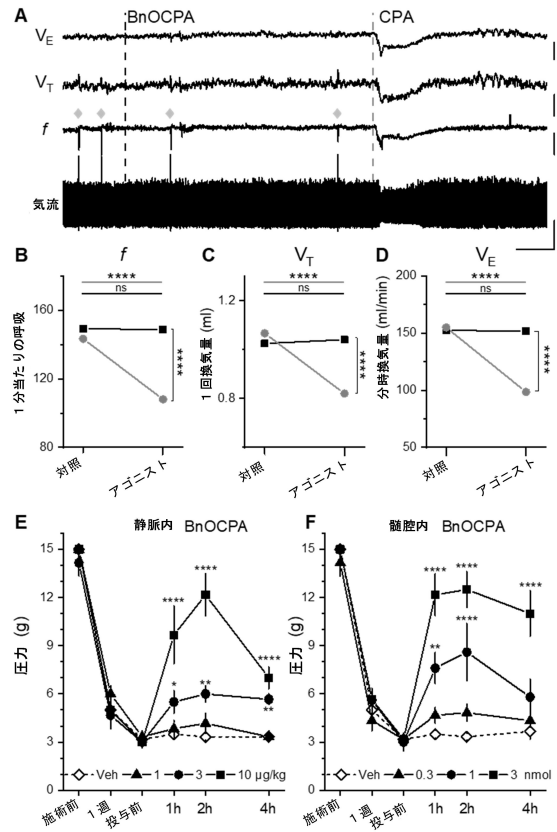
40

50

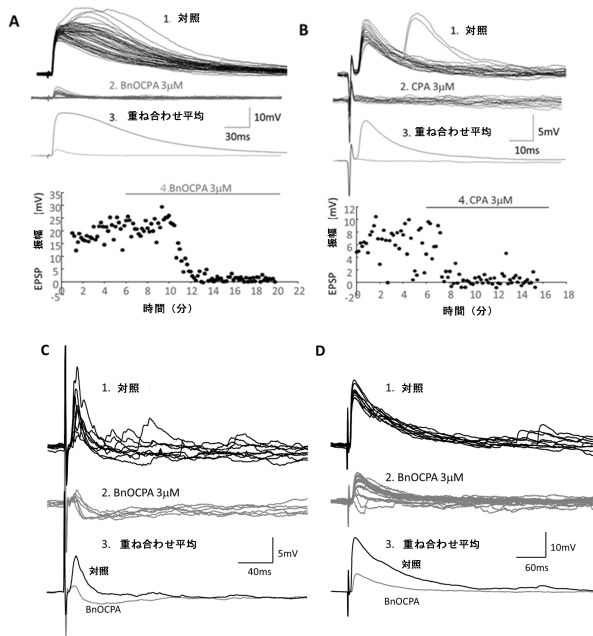
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/050734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/7076 A61P25/00 A61P29/02 C07H19/16 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07H A61P		
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) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANTHONY KNIGHT ET AL: "Discovery of Novel Adenosine Receptor Agonists That Exhibit Subtype Selectivity", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 59, no. 3, 1 February 2016 (2016-02-01), pages 947-964, XP055697790, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01402 cited in the application	11,14,15
A	page 948; compounds 5,6; sequence 1 page 952 - page 953; table 1; compounds 5,6 page 957, paragraph Conclusions ----- -/-	1-10,12,13
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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		Date of mailing of the international search report
5 June 2020		16/06/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Megido, Benigno

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/050734

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOBSON KENNETH A ET AL: "Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors", NEUROPHARMACOLOGY, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 104, 12 December 2015 (2015-12-12), pages 31-49, XP029535617, ISSN: 0028-3908, DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2015.12.001 page 34; figure 1; compound 8 page 33, left-hand column, paragraph bottom	1,2, 5-10,15
X	----- GOADSBY P J ET AL: "Adenosine A1 receptor agonists inhibit trigeminovascular nociceptive transmission", BRAIN,, vol. 125, no. 6, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 1392-1401, XP008125260, ISSN: 0006-8950 the whole document	1,2, 5-10,15
X	----- COLLINS S D ET AL: "THE EFFECT OF GR79236, A HIGHLY SELECTIVE ADENOSINE A1 RECEPTOR AGONIST, ON THE TREATMENT OF NEUROPATHIC PAIN IN THE RAT", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, WILEY-BLACKWELL, UK, vol. 129, no. Proceedings Sup, 5 January 2000 (2000-01-05), page 76P, XP001105251, ISSN: 0007-1188 the whole document	1,2, 5-10,15
X	----- WO 2011/119919 A1 (JAGTAP PRAKASH [US]) 29 September 2011 (2011-09-29) cited in the application	1-3,5-15
Y	page 23 - page 32; compounds 1-3, 6, 7, 10, 16-18, 21 pages 4,9,36 reference to US 7 423 144; page 10, last paragraph	4
Y	----- US 7 423 144 B2 (INOTEK PHARMACEUTICALS CORP [US]) 9 September 2008 (2008-09-09) paragraph [5.6.3] - paragraph [5.6.5] ----- -/--	4

5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/050734

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	Mark J. Wall ET AL: "Abbreviated summary", bioRxiv, 5 April 2020 (2020-04-05), XP055697815, DOI: 10.1101/2020.04.04.023945 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.04.023945v1.full.pdf [retrieved on 2020-05-25] the whole document -----	1-15

5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2020/050734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011119919 A1	29-09-2011	AU 2011230618 A1	11-10-2012
		BR 112012023747 A2	23-08-2016
		CA 2792265 A1	29-09-2011
		CL 2012002612 A1	21-12-2012
		CN 102822188 A	12-12-2012
		CO 6620038 A2	15-02-2013
		EA 201290959 A1	30-04-2013
		EP 2552932 A1	06-02-2013
		JP 2013523738 A	17-06-2013
		KR 20130029049 A	21-03-2013
		SG 184223 A1	30-10-2012
		US 2011245194 A1	06-10-2011
		WO 2011119919 A1	29-09-2011
		ZA 201207089 B	26-03-2014

US 7423144 B2	09-09-2008	AT 462704 T	15-04-2010
		AU 2005249430 A1	15-12-2005
		BR PI0510406 A	26-12-2007
		CA 2567289 A1	15-12-2005
		CN 103087133 A	08-05-2013
		CY 1110159 T1	14-01-2015
		DK 1758596 T3	26-07-2010
		EA 200602197 A1	31-08-2007
		EP 1758596 A2	07-03-2007
		EP 2221307 A1	25-08-2010
		ES 2343421 T3	30-07-2010
		HK 1104457 A1	19-11-2010
		HR P20100344 T1	31-08-2010
		IL 179400 A	30-12-2010
		JP 4484928 B2	16-06-2010
		JP 2008500361 A	10-01-2008
		JP 2010090177 A	22-04-2010
		JP 2013116920 A	13-06-2013
		KR 20070028456 A	12-03-2007
		KR 20110134945 A	15-12-2011
		ME 01072 B	20-10-2012
		NO 339450 B1	12-12-2016
		NZ 551951 A	27-08-2010
		PL 1758596 T3	31-01-2011
		PT 1758596 E	23-06-2010
		US 2005282768 A1	22-12-2005
		US 2009062314 A1	05-03-2009
		US 2012264706 A1	18-10-2012
		WO 2005117910 A2	15-12-2005

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 K	31/7076	(2006.01)	A 6 1 K	31/7076

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 時岡 恭平

(72)発明者

フレンジエッリ, ブルーノ

英国シーブイ 4・8 ユーダブリュー、ウエスト・ミッドランズ、コベントリー、カービー・コーナ
ー・ロード、ユニバーシティ・ハウス、ザ・ユニバーシティ・オブ・ウォーリック内

(72)発明者

ウォール・マーク

英国シーブイ 4・8 ユーダブリュー、ウエスト・ミッドランズ、コベントリー、カービー・コーナ
ー・ロード、ユニバーシティ・ハウス、ザ・ユニバーシティ・オブ・ウォーリック内

F ターム (参考)

4C057 BB02 DD01 LL31 LL41

4C086 AA01 AA02 AA03 EA18 GA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14

ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA08 ZA15 ZA16 ZA18 ZA22 ZA36 ZA94

ZB11 ZC21 ZC42