

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3868502号
(P3868502)

(45) 発行日 平成19年1月17日(2007. 1. 17)

(24) 登録日 平成18年10月20日(2006. 10. 20)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 25/22 (2006. 01)	A 6 1 P 25/22
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 9 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-519934	(73) 特許権者	ニューロサーチ・アクティージェルスカブ
(86) (22) 出願日	平成9年10月27日(1997. 10. 27)		デンマーク国、DK-2750 バレルー
(65) 公表番号	特表2001-505661(P2001-505661A)		プ、ペデルストルプベイ、93
(43) 公表日	平成13年4月24日(2001. 4. 24)	(74) 代理人	弁理士 江崎 光史
(86) 国際出願番号	PCT/DK1997/000475		弁理士 三原 恒男
(87) 国際公開番号	W01998/019165		弁理士 奥村 義道
(87) 国際公開日	平成10年5月7日(1998. 5. 7)		弁理士 鍛冶澤 實
審査請求日	平成16年10月25日(2004. 10. 25)		
(31) 優先権主張番号	1182/96		
(32) 優先日	平成8年10月25日(1996. 10. 25)		
(33) 優先権主張国	デンマーク(DK)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗不安作用を有する化合物の同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗不安作用及び非鎮静作用又はほんの僅かの鎮静作用を有する化合物の同定方法に於て、
(i) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターで化合物の親和性及び(又は)有効性を測定し、

(ii) 工程(i)で測定された親和性及び(又は)有効性を異なるクローン化 G A B A_A レセプターサブタイプで同一化合物の親和性及び(又は)有効性と比較し、次いで

(iii) 2_3_2 G A B A_A レセプターサブタイプで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物を選ぶ

工程から成ることを特徴とする、上記方法。

10

【請求項2】

(i) クローン化された 2_3_2 G A B A_A レセプターへの及び異なるクローン化 G A B A_A レセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性を測定し、

(ii) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターに対して選択的親和性を有する化合物を選び、

(iii) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターで選択された化合物の有効性を測定し、次いで

(iv) クローン化 G A B A_A レセプターで選択的アゴニストである化合物を選ぶ、請求の範囲1記載の方法。

【請求項3】

20

(i) クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターへの及び異なるクローン化 G A B A_Aレセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性を測定し、

(ii) クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターに対して親和性を有する化合物を選び、

(iii) クローン化 G A B A_Aレセプターで選択された化合物の有効性を測定し、

(iv) クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターで選択的アゴニストである化合物を選ぶ

、請求の範囲 1 記載の方法。

【請求項 4】

G A B A_Aレセプターサブタイプに対するテスト化合物の親和性を、放射能標識された非選択性、高親和性ベンゾジアゼピンレセプターリガンド、たとえばトリチウム同位体放射能標識されたフルマゼニルTM又はフルニトラゼパムTMと置き換えられるテスト化合物の親和性を測定することによって決定する、請求の範囲 1 ないし 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 5】

G A B A_Aレセプターサブタイプに対するテスト化合物の有効性を、G A B A の存在及び不在下にレセプターに対する化合物の親和性を測定し、G A B A -比率を算出して決定する、請求の範囲 1 ないし 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

G A B A_Aレセプターサブタイプに対するテスト化合物の有効性を、パッチクランプ法を用いてクロライド流量を測定して決定する、請求の範囲 1 ないし 4 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターと異なるクローン化 G A B A_Aレセプターサブタイプが選択的不安作用を伝達しないことで知られているサブタイプである、請求の範囲 1 ないし 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターと異なるクローン化 G A B A_Aレセプターサブタイプが_{1, 3}又は₅ G A B A_Aレセプターサブユニットを含有する、請求の範囲 1 記載の方法。

【請求項 9】

クローン化_{2 3 2} G A B A_Aレセプターと異なるクローン化 G A B A_Aレセプターサブタイプが、サブユニット組合せ_{1 3 2}又は_{3 2 2}を含有する、請求の範囲 1 記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、選択的抗不安特性を有するベンゾジアゼピンレセプターリガンド、すなわち非鎮静抗不安薬の同定に、₂, ₃及び₂サブユニットから成るクローン化 G A B A_Aレセプターサブタイプを使用することに関する。

従来技術

重要な抑制性中枢伝達性の_γ-アミノ酪酸 (G A B A) に対するレセプターは 2 つの主要な種類、G A B A_Aレセプター及び G A B A_Bレセプターに分類される。

40

G A B A_Aレセプターは、リガンド関門イオンチャンネルファミリーのメンバーであり、哺乳類脳中でもっとも豊富な抑制性レセプターである。各 G A B A_Aレセプター複合体 (complex) は神経細胞膜を通過するクロライド流量を支配するクロライドイオンチャンネルを、小さい変調分子 (modulatory molecule)、たとえばベンゾジアゼピン類、バルビツール酸塩類、ピクトキシニン類及び特定のステロイド類に対する多種多様の認識部位と共に有する。G A B A はそのレセプターと相互に作用する場合、イオンチャンネルは開放され、クロライド流入量は増加し、そしてその細胞は興奮刺激にあまり応答しなくなる。この G A B A で誘発されたイオン流動を、種々の剤 (ベンゾジアゼピンレセプター又は認識部位と相互に作用する剤も含めて) によって調節することができる。

G A B A_Aレセプター複合体、たとえばベンゾジアゼピンレセプター上の変調部位に結合

50

するか又はこれと相互に作用し、GABAの作用にレセプターの正の変調効果を及ぼす剤は、ベンゾジアゼピンレセプターアゴニスト又は半アゴニストと呼ばれる。アゴニストは一般に筋弛緩作用、睡眠作用、鎮静作用、抗不安作用及び(又は)抗けいれん作用を生じる。

GABAの作用に負の変調効果を及ぼすベンゾジアゼピンレセプターリガンドは逆アゴニストと呼ばれる。一方、内在性活性のないベンゾジアゼピンレセプターリガンドはアンタゴニストと呼ばれる。

ベンゾジアゼピンレセプターに対して親和性を有する、種々の一連の化合物に属する多数の化合物は、この30年間合成されている。特に、強い抗不安活性を有し、かつ鎮静剤作用のないベンゾジアゼピンレセプターモデュレーターを開発するのにいくつかのグループに目が向けられている。しかし、ベンゾジアゼピンレセプター部位は種々の障害及び疾病を治療するために、依然としてCNSと相互作用する極めて興味のある生物学的部位としてみなされるので、このレセプター部位で作用する、ほとんどすべての以前に合成された化合物は、その容認されていない副作用のゆえに、臨床上の開発でうまくいっていない。

GABA_Aレセプターは、 α 、 β 、及び γ たん白質サブユニットの組合せを含有する高分子ヘテロペンタメリック(heteropentameric)集合体を構造上構成する。この様なGABA_Aレセプターのいくつかのサブユニット(α ₁₋₆, β ₁₋₃, 及び γ ₁₋₃)は、最近の分子生物学の技術を用いて特徴づけられている。個々の哺乳類GABA_Aレセプターサブユニットの数を考慮すれば、理論上存在しうる種々のサブユニット変更を有するペンタメリックサブタイプの数、圧倒的である。したがって天然のGABAレセプターのサブユニット補体を正確に示すこと及びその生理学的役割を決定することは重要な挑戦である。特異的GABA_Aレセプターサブタイプは、ベンゾジアゼピンの抗不安作用を伝達するのに関与すると信じられている。しかし不安障害の病態生理学に係る特異的サブタイプ及び(又は)サブユニットは、現在知られていない。

ラットでの解剖/挙動研究から、ベンゾジアゼピンMidazolamTMの抗葛藤作用が、基底外側の扁桃核で伝達されることが示される(European Journal of Pharmacology, 1982 82 115-116及びNeuroscience Letters, 1985 53 285-288)。上述した様に、6つのサブユニットが存在し、ベンゾジアゼピンは α -サブユニットに結合するか又は β サブユニットと γ サブユニットの間の境界面で結合すると信じられている。 α ₁サブユニットはラット脳全体にほぼ均一に分布し、ベンゾジアゼピンレセプターリガンドの鎮静作用に係ると信じられている。 α ₄及び α ₆サブユニットに対するベンゾジアゼピンの親和性は低く、したがってベンゾジアゼピンがこれらのサブユニットを介してその作用を伝達するとはとても考えられない。

その場のハイブリット形式(hybridization)を伴う解剖学的研究から、 α ₁, α ₂, α ₃, α ₄及び α ₅サブユニットは基底外側扁桃様核中に存在し、 α ₂は最も豊富な α -サブユニットであることが示される(The Journal of Neuroscience, 1992 12(3)1040-1062)。

更に、 α ₃サブユニットは基底外側扁桃様核中で最も豊富な α サブユニットであり、 α ₃-サブユニットは主に α ₂サブユニットとの組合せで発現されるらしいことが示される(The Journal of Neuroscience, 1992 12(3)1040-1062, and Biochem. J. 1995 310 1-9)。

同様に基底外側扁桃様核中で最も豊富な α サブユニットは α ₂サブユニットである。これらの知見によれば α ₂ α ₃ α ₂GABA_Aレセプターサブタイプがベンゾジアゼピンの抗不安作用の単独伝達物質であると提案されている。

強い抗不安特性を有しかつクローン化GABA_Aレセプターサブタイプに低い鎮静作用を及ぼす新規ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストの親和性及び有効性を測定することによって、本発明者は、この新規ベンゾジアゼピンレセプターリガンドが α ₂ α ₃ α ₂GABA_Aレセプターサブタイプに対する完全アゴニストであり、そして α ₁ α ₂ α ₂GABA_Aレセプターサブタイプに対する半アゴニストであることを見出した。

これらの知見に基づき、抗不安作用(anxiolytic potential)を有する化合物の新規同定方法が開発された。

発明の要旨

10

20

30

40

50

本発明の目的は、クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターへのテスト物質の親和性及び（又は）有効性を測定し、次いで選択的抗不安作用を伝達しないことが知られている他の GABA_Aレセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性及び（又は）有効性と比較することによって、選択的抗不安特性を有するベンゾジアゼピンレセプターリガンド（すなわち非-鎮静剤）を同定する方法を提供することである。本発明は選択的抗不安活性を有する化合物に関する化学情報をスクリーニングするのに及び選択的抗不安活性を有する薬剤を製造するのに重要な手段を提供する。

したがって、その第一の観点によれば、本発明は、抗不安作用及び非鎮静作用又はほんの僅かの鎮静作用を有する化合物の同定方法を提供する。

その方法は

(i) クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターで化合物の親和性及び（又は）有効性を測定し、

(ii) 工程(i)で測定された親和性及び（又は）有効性を異なるクローン化 GABA_Aレセプターサブタイプで同一化合物の親和性及び（又は）有効性を比較し、次いで

(iii) $2/3/2$ GABA_Aレセプターサブタイプで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物を選ぶ、

工程から成る。

もう一つの観点によれば、本発明は、本発明の方法によって得られた抗不安作用を有する化合物を提供する。

第三の観点によれば、本発明は $2/3/2$ GABA_Aレセプターサブタイプで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物を提供する。

別の観点によれば、本発明は本発明の化合物を薬剤として使用すること及びこれらの化合物を含有する薬学的調製物に関する。

最後に、本発明は $2/3/2$ GABA_Aレセプター選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物の治療上有効な量を不安に悩む患者に投与してこの患者を治療する方法に関する。

発明の詳細な説明

本発明は、抗不安活性及び非鎮静又はほんの僅かの鎮静作用を有するベンゾジアゼピンレセプターリガンドとしての作用（potential）を有する化合物の同定を提供する。

本発明の方法は、クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターへの結合に対する化合物（テスト化合物）の親和性及び（又は）有効性を測定し、この様に測定された親和性及び（又は）有効性と、別のクローン化 GABA_Aレセプタータイプへの結合に対する同一化合物の親和性及び（又は）有効性を比較することから成る。この方法で、 $2/3/2$ GABA_Aレセプターサブタイプで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物を同定することができる。

これから明らかかなように、GABA_Aレセプターへの選択的親和性は、このレセプターへのある化合物の親和性が他の GABA_Aレセプターへのこの化合物の親和性よりも高いことを意味する。

更に、これから明らかかなように、GABA_Aレセプターの選択的アゴニストは GABA_Aレセプターの正のモデュレーターである。このレセプターは他の GABA_Aレセプターに対するよりもこのレセプターに対する方がはるかに高い有効性を有する。

好ましい実施態様で、本発明の方法は、

(i) クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターへの及び異なるクローン化 GABA_Aレセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性を測定し、

(ii) クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターに対して選択的親和性を有する化合物を選び、

(iii) クローン化 $2/3/2$ GABA_Aレセプターで選択された化合物の有効性を測定し、次いで

(iv) クローン GABA_Aレセプターで選択的アゴニストである化合物を選ぶことから成る。

10

20

30

40

50

他の好ましい実施態様で、本発明の方法は、

- (i) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターへの及び異なるクローン化 G A B A_A レセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性を測定し、
- (ii) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターに対して親和性を有する化合物を選び、
- (iii) クローン化 G A B A_A レセプターで選択された化合物の有効性を測定し、
- (iv) クローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターで選択的アゴニストである化合物を選ぶ、

ことから成る。G A B A_A レセプターサブタイプに対するテスト化合物の親和性は、放射能標識された非選択性、高親和性ベンゾジアゼピンレセプターリガンド、たとえばトリチウム同位体放射能標識されたフルマゼニルTM又はフルニトラゼパムTMと置き換えられるテスト化合物の親和性を測定することによって決定される。

あるいはG A B A_A レセプターサブタイプに対するテスト化合物の有効性はG A B Aの存在及び不在下にレセプターに対する化合物の親和性を測定し、G A B A -割合を算出して決定される。

もう1つの好ましい実施態様で、G A B A_A レセプターサブタイプに対するテスト化合物の有効性は、パッチクランプ法を用いるクロライド流量の測定によって決定される。

他の好ましい実施態様で、本発明の方法で使用される、別のクローン化 G A B A_A レセプターサブタイプ これはクローン化 2_3_2 G A B A_A レセプターではない は、選択的抗不安作用を伝達しないことで知られているサブタイプである。更に好ましいこの別のクローン化 G A B A_A レセプターは、 1_1 又は 3_1_5 G A B A_A レセプターサブユニットを含有する。最も好ましい実施態様で、この別のクローン化 G A B A_A レセプターサブタイプはサブユニット組合せ 1_3_2 又は 3_2_2 を含有する。

本発明の特別の実施態様で、クローン化ラット又はヒト G A B A_A レセプターサブユニットを発現する安定な C H O (Chinese hamster ovary) 細胞を、 2_3_2 G A B A_A レセプターサブタイプへのテスト化合物の親和性に関してこの化合物を検査するのに使用する。このレセプターサブタイプへのこの化合物の親和性を、選択的抗不安作用を伝達しないと信じられている G A B A_A レセプタータイプ、たとえば 1_1 レセプターサブユニットを有する G A B A_A レセプターサブタイプへの化合物の親和性と比較する。クローン化レセプターに対するテスト化合物の親和性は、非選択性放射能標識されたベンゾジアゼピンレセプターリガンド、たとえばトリチウム同位体放射能標識されたフルマゼニルTM又はフルニトラゼパムTMと置き換えられる化合物の能力を測定することによって決定される。結合の阻害は、クローン化 G A B A_A レセプタータイプを発現する細胞の膜調製物を用いて、通常の試験管内結合アッセイによって測定される。

テスト化合物の有効性、すなわちこの化合物がベンゾジアゼピンレセプターでアゴニスト、逆アゴニスト又はアンタゴニストであるかどうかは、使用されるレセプターサブタイプ夫々に関してこの化合物の G A B A -比率を算出して決定することもできる。G A B A -比率は、G A B Aの存在下に測定されたテスト化合物の親和性とG A B Aの不存在下に測定された化合物の親和性の比率である。完全アゴニストであるベンゾジアゼピンレセプターリガンドは、一般に1.8 - 3のG A B A比率を有し、半アゴニストは1.0 - 1.8の比率を有し、アンタゴニストは約1の比率を有する。ところが逆アゴニストは約0.5 - 1のG A B A比率を有する。したがってG A B A -比率の計算は、テスト化合物の有効性の目安を提供する。

化合物の有効性も、パッチクランプ法を用いて電気生理学的実験で測定することもできる。

本発明の方法によれば、G A B A_A レセプターサブユニットを発現するすべての細胞を使用することができる。好ましい細胞は、C H O細胞、又は他のげっし類線維芽細胞系、たとえばB H K (baby kiney hamster cells)及びマウスLtk⁻細胞、昆虫細胞、たとえばS f - 9、及びH E K 2 9 3又はH e L a細胞である。この細胞によって発現されるG A B A_A サブユニットは動物(ラット又はウシ)又はヒトに由来する。

他の観点によれば、本発明は本発明の方法によって得られた抗不安作用を有する化合物を

10

20

30

40

50

提供する。

第三の観点によれば、本発明は 2_3_2 GABA_Aレセプターサブタイプで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物を提供する。

別の観点によれば、本発明は本発明の化合物を薬剤として使用すること及びこれらの化合物を含有する薬学的調製物に関する。

最後に、本発明は 2_3_2 GABAレセプターで選択的ベンゾジアゼピンレセプターアゴニストである化合物の治療上有効な量を不安に悩む患者に投与してこの患者を治療する方法に関する。

例

本発明を次の例によって詳述するが、本発明はこれによって限定されない。

10

種々の GABA_Aレセプターサブタイプに対する 5-アセチル-1-(3-(3-ピリジル)フェニル)ベンズイミダゾール O-エチルオキシムの親和性を、昆虫の細胞中で発現された組換え GABA_Aレセプターによって調べる。GABAの不存在及び存在下での化合物の親和性の比率 (GABA比率) はクローン化レセプターのサブユニット組合せに依存する。化合物は、 2_3_2 GABA_Aレセプターサブタイプで完全アゴニストに対する GABA比率及び 1_2_2 GABA_Aレセプターサブタイプで半アゴニストに対する GABA比率を有する。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/566

(72)発明者 イエンセン・ライフ・ヘルス
デンマーク国、DK 2 6 0 0 グロストルupp、スメデランド 2 6 べー、ニューロサーチ・ア
クティーゼルスカブ

(72)発明者 ヨハンセン・ティーナ・ホルム
デンマーク国、DK 2 6 0 0 グロストルupp、スメデランド 2 6 べー、ニューロサーチ・ア
クティーゼルスカブ

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特表平08 - 504330 (JP, A)
Richard I. Shader, et.al, Use of Benzodiazepines in Anxiety Disorders , The NEW ENGLAN
D JOURNAL OF MEDECINE, 1993年, Vol.328, p1398-1405

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/50

A61K 45/00

A61P 25/22

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/566