

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成24年5月10日 (2012.5.10)

【公表番号】特表2010-523708(P2010-523708A)

【公表日】平成22年7月15日 (2010.7.15)

【年通号数】公開・登録公報2010-028

【出願番号】特願2010-503234(P2010-503234)

【国際特許分類】

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 P 25/18 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K 9/14 (2006.01)

A 6 1 K 9/20 (2006.01)

G 0 1 N 27/62 (2006.01)

G 0 1 N 30/64 (2006.01)

G 0 1 N 30/84 (2006.01)

G 0 1 N 30/88 (2006.01)

G 0 1 N 30/86 (2006.01)

【 F I 】

A 6 1 K 31/519

A 6 1 P 25/18

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 7/06

A 6 1 K 47/12

A 6 1 K 47/14

A 6 1 K 9/08

A 6 1 K 9/14

A 6 1 K 9/20

G 0 1 N 27/62 V

G 0 1 N 27/62 X

G 0 1 N 27/62 D

G 0 1 N 30/64 C

G 0 1 N 30/84 Z

G 0 1 N 30/88 E

G 0 1 N 30/88 J

G 0 1 N 30/86 J

【手続補正書】

【提出日】平成23年3月23日 (2011.3.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

テトラヒドロピオブテリン（ＢＨ４）経口投与するための組成物であって、該組成物は、ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩の治療的有効量を含有し、食品なしで摂取したときと比較して食品と共に摂取したときに、該ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩の吸収が上昇することが、該組成物を投与されるヒトに通知される、組成物。

## 【請求項 2】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩を絶食条件下で投与したときと比較して、該ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩を高脂肪高カロリー食と共に投与したときに  $C_{max}$  および  $AUC$  が約 30 % 上昇することが前記ヒトに通知される、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 99.5 % 純粋である、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記精製されたＢＨ４が、以下の：8.7 (vs)、5.63 (m)、4.76 (m)、4.40 (m)、4.00 (s)、3.23 (s)、3.11 (vs)、好ましくは 8.7 (vs)、6.9 (w)、5.90 (vw)、5.63 (m)、5.07 (m)、4.76 (m)、4.40 (m)、4.15 (w)、4.00 (s)、3.95 (m)、3.52 (m)、3.44 (w)、3.32 (m)、3.23 (s)、3.17 (w)、3.11 (vs)、3.06 (w)、2.99 (w)、2.96 (w)、2.94 (m)、2.87 (w)、2.84 (s)、2.82 (m)、2.69 (w)、2.59 (w)、および 2.44 (w) の  $d$  値 ( $A$ ) で表される特徴的なピークを持つ、X 線粉末回折パターンを示す、塩酸塩としての結晶性多形である、請求項 3 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 2 mg / kg の日用量で投与されるように処方されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 5 mg / kg の日用量で投与されるように処方されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 10 mg / kg の日用量で投与されるように処方されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 20 mg / kg の日用量で投与されるように処方されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記ヒトが高フェニルアラニン血症と診断されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記ヒトが精神神経障害と診断されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記ヒトが心血管疾患と診断されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記ヒトが貧血と診断されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

対象におけるテトラヒドロピオブテリン（ＢＨ４）またはその製薬的に許容される塩の腸貯留時間を増大させるための調合物であって、該調合物が（１）ＢＨ４またはその製薬的に許容される塩と、（２）腸運動性を低速化させる薬剤とを含み、該調合物によって該

対象に投与される B H 4 またはその製薬的に許容される塩が腸運動性を低速化させる薬剤を含まない B H 4 またはその製薬的に許容される塩の対照調合物と比較して、より長い腸貯留時間を有する、調合物。

【請求項 1 4】

前記 B H 4 またはその製薬的に許容される塩の腸貯留時間が前記対照調合物と比較して少なくとも 2 倍長い、請求項 1 3 に記載の調合物。

【請求項 1 5】

前記薬剤が脂肪酸、グリセロール脂肪酸エステル、またはその組合せである、請求項 1 3 または 1 4 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 1 6】

前記脂肪酸がオレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸、エルシジン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、およびパルミトレイン酸からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の調合物。

【請求項 1 7】

前記グリセロール脂肪酸エステルがモノエステル、ジエステル、トリエステル、またはその組合せである、請求項 1 5 に記載の調合物。

【請求項 1 8】

前記グリセロール脂肪酸エステルがグリセロールモノエステルとグリセロールジエステルとの組合せである、請求項 1 7 に記載の調合物。

【請求項 1 9】

前記薬剤がモノオレイン酸グリセロールとジオレイン酸グリセロールとの組合せである、請求項 1 8 に記載の調合物。

【請求項 2 0】

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩および腸運動性を低速化させる薬剤を含む、B H 4 またはその製薬的に許容される塩の経口調合物。

【請求項 2 1】

前記薬剤が脂肪酸、グリセロール脂肪酸エステル、またはその組合せである、請求項 2 0 に記載の調合物。

【請求項 2 2】

前記脂肪酸がオレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸、エルシジン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、およびパルミトレイン酸からなる群より選択される、請求項 2 1 に記載の調合物。

【請求項 2 3】

前記グリセロール脂肪酸エステルがモノエステル、ジエステル、トリエステル、またはその組合せである、請求項 2 0 に記載の調合物。

【請求項 2 4】

前記グリセロール脂肪酸エステルがグリセロールモノエステルとグリセロールジエステルとの組合せである、請求項 2 3 に記載の調合物。

【請求項 2 5】

前記薬剤がモノオレイン酸グリセロールとジオレイン酸グリセロールとの組合せである、請求項 2 4 に記載の調合物。

【請求項 2 6】

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩の水溶液、抗酸化剤、および pH 緩衝剤を含む、B H 4 またはその製薬的に許容される塩の液体調合物。

【請求項 2 7】

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および pH 緩衝剤の乾燥粉末混合物を含む、水溶液中への構成のための B H 4 またはその製薬的に許容される塩の乾燥粉末調合物。

【請求項 2 8】

前記 B H 4 またはその製薬的に許容される塩が 1 0 % w / v までの量で存在する、請求

項 2 6 または 2 7 に記載の調合物。

【請求項 2 9】

前記抗酸化剤が少なくとも 2 種の抗酸化剤を含む、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 0】

前記少なくとも 2 種の抗酸化剤が還元剤抗酸化剤を含む、請求項 2 6 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 1】

酸抗酸化剤共力薬および / またはキレート剤をさらに含む、請求項 2 9 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 2】

前記抗酸化剤が 5 % w / v までの量で存在する、請求項 2 6 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 3】

密封容器で提供され、非酸化性ガスのブランケットを含む、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 4】

前記非酸化性ガスがアルゴン、窒素、二酸化炭素、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 3 3 に記載の調合物。

【請求項 3 5】

酸性 pH を有する、請求項 2 6 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 6】

甘味料および矯味矯臭剤をさらに含む、請求項 3 5 に記載の調合物。

【請求項 3 7】

中性 pH を有する、請求項 2 6 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の調合物。

【請求項 3 8】

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩を含有する水溶液を提供するステップと ;

B H 4 またはその製薬的に許容される塩を含有する該溶液に抗酸化剤および pH 緩衝剤を添加するステップと ;

抗酸化剤および pH 緩衝剤の添加の前またはその後に、B H 4 またはその製薬的に許容される塩を含有する該水溶液に不活性ガスまたは二酸化炭素を散布するステップと ;

B H 4 またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および pH 緩衝剤を含有する該散布溶液を容器内に密閉するステップと ;

を含む、B H 4 またはその製薬的に許容される塩の液体調合物を作製する方法。

【請求項 3 9】

前記容器内で前記溶液の上に非酸化性ガスのブランケットを提供するステップをさらに含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

乾燥製品を作製するために B H 4 またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および pH 緩衝剤を含有する前記溶液を凍結乾燥するステップをさらに含む、請求項 3 8 または 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 B H 4 またはその製薬的に許容される塩が二塩酸サプロブテリンを含む、請求項 3 8 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

メタノール、酢酸ナトリウム、クエン酸、E D T A、および 1 , 4 - ジチオエリスリトールを含む水溶液を含む、ジヒドロピオブテリン、ピオブテリン、およびその類似体の逆相 H P L C 分離のための移動相溶液。

【請求項 4 3】

前記メタノールが2体積%の量で存在する、請求項42に記載の溶液。

【請求項44】

50 mM 酢酸ナトリウム、5 mM クエン酸、48  $\mu$ M EDTA、および160  $\mu$ M 1, 4 - ジチオエリスリトールを含む、請求項43に記載の溶液。

【請求項45】

メタノール、酢酸ナトリウム、クエン酸、EDTA、および1, 4 - ジチオエリスリトールを含む水溶液を含む移動相を使用して、ジヒドロバイオプテリンおよびバイオプテリン、またはジヒドロバイオプテリンの類似体およびバイオプテリンの類似体を含有する混合物に逆相HPLCを実施するステップ；

を含む、ジヒドロバイオプテリンおよびバイオプテリン、またはその類似体を塩基形およびジヒドロ形の両方を含有する混合物から分離する方法。

【請求項46】

前記移動相に使用されるメタノールが2体積%の量で存在する、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記移動相が、50 mM 酢酸ナトリウム、5 mM クエン酸、48  $\mu$ M EDTA、および160  $\mu$ M 1, 4 - ジチオエリスリトールを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記混合物が血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを含む、請求項45～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

バイオプテリンを含む血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを酸化に供するステップと；

該酸化されたサンプルをヨウ素滴定に共するステップと；

該酸化されたサンプルをイオン交換カラムに通過させるステップと；

HPLCおよびタンデム質量分析法を使用して、該サンプル中の総バイオプテリンおよび酸化バイオプテリンを測定するステップと；

該酸化形を除いた該総バイオプテリン間の差として、還元型バイオプテリンの量を計算するステップと；

を含む、タンデム質量分析法と組み合わされた逆相HPLC (LC/MS/MS) を使用してバイオプテリンを測定する方法。

【請求項50】

ヨウ素滴定の前に前記サンプルをKCl、HClまたはTCAによって処理するステップをさらに含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

ヨウ素滴定の前に、前記サンプルをKI、IまたはNaOHで処理するステップと、該アルカリ性の酸化サンプルをHClまたはTCAによる酸性化に供するステップとをさらに含む、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

バイオプテリンならびにジヒドロバイオプテリンおよびテトラヒドロバイオプテリンのうちの少なくとも1つ、またはバイオプテリンならびにジヒドロバイオプテリンおよびテトラヒドロバイオプテリンのうちの少なくとも1つの類似体を含む混合物を提供するステップと；

逆相HPLCによって該混合物中のバイオプテリン種を分離するステップと；

テトラヒドロプテリンおよびその類似体の場合に、存在する該テトラヒドロプテリンおよびその類似体を第1の電極によってキノノイドジヒドロバイオプテリン形に酸化して、続いて該キノノイド形を第2の電極にて存在するテトラヒドロバイオプテリンおよびその類似体に還元して戻すことによって電気化学検出を行うステップと；種の濃度を決定するために還元反応によって発生した電流を測定するステップと、および/または

ジヒドロバイオプテリン、その類似体、バイオプテリン、またはその類似体の場合、ジヒドロバイオプテリン種のバイオプテリンへのカラム後酸化の後に蛍光検出によってこのような種

を測定するステップと；

を含む、ビオプテリン種の混合物中のビオプテリンを定量する方法。

【請求項 53】

ビオプテリン種またはその類似体を含む前記混合物が血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを含む、請求項 52 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

本発明は、例えば、以下を提供する：

(項目 1)

テトラヒドロビオプテリン (BH4) またはその製薬的に許容される塩の治療的有効量をそれを必要とするヒトに投与するステップと、食品なしで摂取したときと比較して食品と共に摂取したときに、該 BH4 またはその製薬的に許容される塩の吸収が上昇することを該ヒトに通知するステップとを含む、BH4 を経口投与する方法。

(項目 2)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩を絶食条件下で投与したときと比較して、該 BH4 またはその製薬的に許容される塩を高脂肪高カロリー食と共に投与したときに Cmax および AUC が約 30% 上昇することが上記ヒトに通知される、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 99.5% 純粋である、項目 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4)

上記精製された BH4 が、以下の：8.7 (vs)、5.63 (m)、4.76 (m)、4.40 (m)、4.00 (s)、3.23 (s)、3.11 (vs)、好ましくは 8.7 (vs)、6.9 (w)、5.90 (vw)、5.63 (m)、5.07 (m)、4.76 (m)、4.40 (m)、4.15 (w)、4.00 (s)、3.95 (m)、3.52 (m)、3.44 (w)、3.32 (m)、3.23 (s)、3.17 (w)、3.11 (vs)、3.06 (w)、2.99 (w)、2.96 (w)、2.94 (m)、2.87 (w)、2.84 (s)、2.82 (m)、2.69 (w)、2.59 (w)、および 2.44 (w) の d 値 (A) で表される特徴的なピークを持つ、X 線粉末回折パターンを示す、塩酸塩としての結晶性多形である、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 2 mg/kg の 1 日用量で投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 5 mg/kg の 1 日用量で投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 10 mg/kg の 1 日用量で投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

上記 BH4 またはその製薬的に許容される塩が少なくとも 20 mg/kg の 1 日用量で投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

上記ヒトが高フェニルアラニン血症と診断されている、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 0 )

上記ヒトが精神神経障害と診断されている、項目 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 1 )

上記ヒトが心血管疾患と診断されている、項目 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 2 )

上記ヒトが貧血と診断されている、項目 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 3 )

対象におけるテトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩の腸貯留時間を増大させる方法であって、該対象に調合物を投与するステップを含み、該調合物が ( 1 ) B H 4 またはその製薬的に許容される塩と、 ( 2 ) 腸運動性を低速化させる薬剤とを含み、該調合物によって投与される B H 4 またはその製薬的に許容される塩が腸運動性を低速化させる薬剤を含まない B H 4 またはその製薬的に許容される塩の対照調合物と比較して、より長い腸貯留時間を有する、方法。

( 項目 1 4 )

上記 B H 4 またはその製薬的に許容される塩の腸貯留時間が上記対照調合物と比較して少なくとも 2 倍長い、項目 1 3 に記載の方法。

( 項目 1 5 )

上記薬剤が脂肪酸、グリセロール脂肪酸エステル、またはその組合せである、項目 1 3 または 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 6 )

上記脂肪酸がオレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸、エルシジン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、およびパルミトレイン酸からなる群より選択される、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 1 7 )

上記グリセロール脂肪酸エステルがモノエステル、ジエステル、トリエステル、またはその組合せである、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 1 8 )

上記グリセロール脂肪酸エステルがグリセロールモノエステルとグリセロールジエステルとの組合せである、項目 1 7 に記載の方法。

( 項目 1 9 )

上記薬剤がモノオレイン酸グリセロールとジオレイン酸グリセロールとの組合せである、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩および腸運動性を低速化させる薬剤を含む、B H 4 およびその製薬的に許容される塩の経口調合物。

( 項目 2 1 )

上記薬剤が脂肪酸、グリセロール脂肪酸エステル、またはその組合せである、項目 2 0 に記載の調合物。

( 項目 2 2 )

上記脂肪酸がオレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸、エルシジン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、およびパルミトレイン酸からなる群より選択される、項目 2 1 に記載の調合物。

( 項目 2 3 )

上記グリセロール脂肪酸エステルがモノエステル、ジエステル、トリエステル、またはその組合せである、項目 2 0 に記載の調合物。

( 項目 2 4 )

上記グリセロール脂肪酸エステルがグリセロールモノエステルとグリセロールジエステルとの組合せである、項目 2 3 に記載の調合物。

( 項目 2 5 )

上記薬剤がモノオレイン酸グリセロールとジオレイン酸グリセロールとの組合せである

、項目 2 4 に記載の調合物。

(項目 2 6 )

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩の水溶液、抗酸化剤、および p H 緩衝剤を含む、B H 4 またはその製薬的に許容される塩の液体調合物。

(項目 2 7 )

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および p H 緩衝剤の乾燥粉末混合物を含む、水溶液中への構成のための B H 4 またはその製薬的に許容される塩の乾燥粉末調合物。

(項目 2 8 )

上記 B H 4 またはその製薬的に許容される塩が 1 0 % w / v までの量で存在する、項目 2 6 または 2 7 に記載の調合物。

(項目 2 9 )

上記抗酸化剤が少なくとも 2 種の抗酸化剤を含む、項目 2 6 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 0 )

上記少なくとも 2 種の抗酸化剤が還元剤抗酸化剤を含む、項目 2 6 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 1 )

酸抗酸化剤共力薬および / またはキレート剤をさらに含む、項目 2 9 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 2 )

上記抗酸化剤が 5 % w / v までの量で存在する、項目 2 6 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 3 )

密封容器で提供され、非酸化性ガスのブランケットを含む、項目 2 6 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 4 )

上記非酸化性ガスがアルゴン、窒素、二酸化炭素、およびその組合せからなる群より選択される、項目 3 3 に記載の調合物。

(項目 3 5 )

酸性 p H を有する、項目 2 6 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 6 )

甘味料および矯味矯臭剤をさらに含む、項目 3 5 に記載の調合物。

(項目 3 7 )

中性 p H を有する、項目 2 6 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の調合物。

(項目 3 8 )

テトラヒドロピオブテリン ( B H 4 ) またはその製薬的に許容される塩を含有する水溶液を提供するステップと；

B H 4 またはその製薬的に許容される塩を含有する該溶液に抗酸化剤および p H 緩衝剤を添加するステップと；

抗酸化剤および p H 緩衝剤の添加の前またはその後に、B H 4 またはその製薬的に許容される塩を含有する該水溶液に不活性ガスまたは二酸化炭素を散布するステップと；

B H 4 またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および p H 緩衝剤を含有する該散布溶液を容器内に密閉するステップと；

を含む、B H 4 またはその製薬的に許容される塩の液体調合物を作製する方法。

(項目 3 9 )

上記容器内で上記溶液の上に非酸化性ガスのブランケットを提供するステップをさらに含む、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0 )

乾燥製品を作製するために B H 4 またはその製薬的に許容される塩、抗酸化剤、および



pH緩衝剤を含有する上記溶液を凍結乾燥するステップをさらに含む、項目38または39に記載の方法。

(項目41)

上記BH4またはその製薬的に許容される塩が二塩酸サプロブテリンを含む、項目38~40のいずれか一項に記載の方法。

(項目42)

メタノール、酢酸ナトリウム、クエン酸、EDTA、および1,4-ジチオエリスリトールを含む水溶液を含む、ジヒドロピオブテリン、ピオブテリン、およびその類似体の逆相HPLC分離のための移動相溶液。

(項目43)

上記メタノールが2体積%の量で存在する、項目42に記載の溶液。

(項目44)

50mM酢酸ナトリウム、5mMクエン酸、48μM EDTA、および160μM 1,4-ジチオエリスリトールを含む、項目43に記載の溶液。

(項目45)

メタノール、酢酸ナトリウム、クエン酸、EDTA、および1,4-ジチオエリスリトールを含む水溶液を含む移動相を使用して、ジヒドロピオブテリンおよびピオブテリン、またはジヒドロピオブテリンの類似体およびピオブテリンの類似体を含む混合物に逆相HPLCを実施するステップ；

を含む、ジヒドロピオブテリンおよびピオブテリン、またはその類似体を塩基形およびジヒドロ形の両方を含有する混合物から分離する方法。

(項目46)

上記移動相に使用されるメタノールが2体積%の量で存在する、項目45に記載の方法。

(項目47)

上記移動相が、50mM酢酸ナトリウム、5mMクエン酸、48μM EDTA、および160μM 1,4-ジチオエリスリトールを含む、項目46に記載の方法。

(項目48)

上記混合物が血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを含む、項目45~47のいずれか一項に記載の方法。

(項目49)

ピオブテリンを含む血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを酸化に供するステップと；

該酸化されたサンプルをヨウ素滴定に共するステップと；

該酸化されたサンプルをイオン交換カラムに通過させるステップと；

HPLCおよびタンデム質量分析法を使用して、該サンプル中の総ピオブテリンおよび酸化ピオブテリンを測定するステップと；

該酸化形を除いた該総ピオブテリン間の差として、還元型ピオブテリンの量を計算するステップと；

を含む、タンデム質量分析法と組み合わせられた逆相HPLC(LC/MS/MS)を使用してピオブテリンを測定する方法。

(項目50)

ヨウ素滴定の前に上記サンプルをKCl、HClまたはTCAによって処理するステップをさらに含む、項目49に記載の方法。

(項目51)

ヨウ素滴定の前に、上記サンプルをKI、IまたはNaOHで処理するステップと、該アルカリ性の酸化サンプルをHClまたはTCAによる酸性化に供するステップとをさらに含む、項目49に記載の方法。

(項目52)

ピオブテリンならびにジヒドロピオブテリンおよびテトラヒドロピオブテリンのうちの

少なくとも1つ、またはビオプテリンならびにジヒドロビオプテリンおよびテトラヒドロビオプテリンのうちの少なくとも1つの類似体を含む混合物を提供するステップと；

逆相HPLCによって該混合物中のビオプテリン種を分離するステップと；

テトラヒドロプテリンおよびその類似体の場合に、存在する該テトラヒドロプテリンおよびその類似体を第1の電極によってキノノイドジヒドロビオプテリン形に酸化して、続いて該キノノイド形を第2の電極にて存在するテトラヒドロビオプテリンおよびその類似体に還元して戻すことによって電気化学検出を行うステップと；種の濃度を決定するために還元反応によって発生した電流を測定するステップと、および／または

ジヒドロビオプテリン、その類似体、ビオプテリン、またはその類似体の場合、ジヒドロビオプテリン種のビオプテリンへのカラム後酸化の後に蛍光検出によってこのような種を測定するステップと；

を含む、ビオプテリン種の混合物中のビオプテリンを定量する方法。

(項目53)

ビオプテリン種またはその類似体を含む上記混合物が血液、血漿、組織ホモジネート、または尿のサンプルを含む、項目52に記載の方法。

本発明は、6R-(L-エリスロ)-5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリン(BH4)、またはその製薬的に許容される塩を、その経口生物学的利用能を改善または最大化する、および／あるいは1回の投与から次の投与までの経口生物学的利用能の一貫性を改善または最適化する方式で投与する方法に関するものである。このような方法は、代謝性疾患、循環器疾患、貧血、および精神神経障害を含む、いずれのBH4反応性障害の治療にも利用可能である。本発明の方法は、臨床症状のより良好な制御、たとえば血漿フェニルアラニンレベル、血圧、神経伝達物質レベル、または他の臨床パラメータの変動縮小を好都合に可能にする。