

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506296

(P2005-506296A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A61K 45/00

A61K 31/381

A61P 13/10

F 1

A 61 K 45/00

A 61 K 31/381

A 61 P 13/10

テーマコード(参考)

4 C 08 4

4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2002-576798 (P2002-576798)	(71) 出願人	000001029 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(86) (22) 出願日	平成14年3月29日 (2002.3.29)	(71) 出願人	503354893 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 15 260 ピッツバーグ サッカレー ホー ル 350
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月29日 (2003.9.29)	(74) 代理人	100105647 弁理士 小栗 昌平
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/009577	(74) 代理人	100105474 弁理士 本多 弘徳
(87) 國際公開番号	W02002/078523	(74) 代理人	100108589 弁理士 市川 利光
(87) 國際公開日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		
(31) 優先権主張番号	60/279,698		
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】過活動膀胱治療剤

## (57) 【要約】

本発明は、緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup>チャネル(slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel)開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する過活動膀胱治療剤、およびslowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel開口作用を指標として測定することを含む過活動膀胱治療剤のスクリーニング方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup> チャネル (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel) 開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する過活動膀胱治療剤。

**【請求項 2】**

緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup> チャネル (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel) 開口作用を有する化合物が、N-(5,5-ジオキシド-10-オキソ-4,10-ジヒドロチエノ[3,2-c][1]ベニゾチエピン-9-イル)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミドである請求項1記載の過活動膀胱治療剤。

10

**【請求項 3】**

緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup> チャネル (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel) 開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩の治療有効量を投与することを含む過活動膀胱の治療方法。

**【請求項 4】**

過活動膀胱治療剤の製造のための、緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup> チャネル (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel) 開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩の使用。

**【請求項 5】**

緩徐な不活性化を示すA型K<sup>+</sup> チャネル (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel) 開口作用を指標として測定することを含む過活動膀胱治療剤のスクリーニング方法。

20

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、過活動膀胱治療剤に関する。

**【背景技術】****【0002】**

過活動膀胱は尿意切迫感および頻尿の症状を呈している病的状態であり、切迫性尿失禁を併発している場合と併発していない場合があるが、これらの症状を説明できるような局所の病的要因または代謝系の要因がないとされている。蓄尿および排尿は、末梢および中枢神経系を含む複雑な反射経路の生理的制御を受けており [ユーロロジー (Urology)、50巻、サップルメント6A号、36-52頁 (1997年)]。尿意切迫感とは急激かつ強力な尿意を指し、切迫性尿失禁は尿意切迫感による不随意な尿漏れを指す。

30

**【0003】**

過活動膀胱に起因する尿意切迫感および切迫性尿失禁のような症状を有する患者には、多くの場合、膀胱内圧測定において排尿筋の不随意 (無抑制) 収縮が認められ、これは排尿筋過活動と呼ばれる。この排尿筋過活動が尿意切迫感と切迫性尿失禁の要因と考えられている。さらに、尿意切迫感は頻尿の要因ともなる。この排尿筋過活動は、2つのカテゴリーに分類される。患者に神経障害が認められる場合の神経因性膀胱 (排尿筋過反射)、および患者に神経障害が認められない場合の不安定膀胱 (排尿筋不安定症) である。不安定膀胱の要因はおそらくは神経因性膀胱もしくは排尿筋平滑筋自体の障害のいずれか (またはその両方) であると考えられている。神経因性膀胱と関係する神経障害にはパーキンソン病、脳卒中、糖尿病、多発性硬化症、末梢性神経障害および脊髄損傷などがある。

40

**【0004】**

膀胱における充満感はA線維およびC線維の二種類の膀胱知覚求心性ニューロンを介して中枢神経系に伝えられるが、通常の状態では、C線維は関与していない (silentである)。他方、膀胱の知覚過敏などの状態の下ではC線維の感受性が増大していることが知られている [クリニカル・ジャーナル・オブ・ペイン (Clinical J. Pain)、16巻、S86-89頁 (2000年)]。さらに、核上型脊髄損傷患者の過活動膀胱に、膀胱知覚求心路C線維を介した脊髄反射機構が関与していることが知られている [ジャーナル・オブ・ユーロロジー 50

(J. Urol.)、157巻、585-589頁(1997年)]。

【0005】

カリウム・チャネル( $K^+$  channel)は種々組織の細胞膜上に存在し、膜電位の調節を介して様々な生理作用に関与している。 $K^+$ チャネルは、電位依存性、 $Ca^{++}$ 感受性、およびその他のチャネルの性質により種々のタイプに分類される。緩徐な不活性化を示すA型 $K^+$ チャネル(slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel)は、カプサイシン感受性脊髄後根神経節(DRG)神経細胞に発現しており[ジャーナル・オブ・ニューロフィジオロジー(J. Neurophysiol.)、75巻、2629-2646頁(1996年)]、C線維の興奮性を制御している[ジャーナル・オブ・フィジオロジー(J. Physiol.)、494巻、1-16頁(1996年)]。正常ラットの膀胱求心性神経C線維の活動電位は、slowly-inactivating A-type  $K^+$ チャネルの効果により高い閾値を保っている。一方、慢性膀胱炎ラットにおいては、イオンチャネル特性が変化して、 $K^+$ 電流の減弱が起きている。このため膀胱炎時には、C線維の興奮性が上昇し、過活動膀胱が惹起されると考えられてきた[ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス(J. Neurosci.)、19巻、4644-4653頁(1999年)]。また、脊髄損傷後の過活動膀胱を示しているラットにおいてはslowly-inactivating A-type  $K^+$  channel密度が減少して、C線維の興奮性が上昇している。

10

【発明の開示】

【0006】

上記の知見により、我々は、脊髄損傷または膀胱炎などの神経因性膀胱のような種々病態から生じる過活動膀胱を、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口を介してC線維の興奮性を低下させることにより、治療できるという仮説を立てた。我々は、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channelの開口活性を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩が、過活動膀胱の治療に有用であることを見いだし、本発明を完成した。

20

本発明の目的は、優れた過活動膀胱治療剤を提供することにある。

【0007】

本発明は、

(1) slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する過活動膀胱治療剤、および

(2) slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物が、N-(5,5-ジオキシド-10-オキソ-4,10-ジヒドロチエノ[3,2-c][1]ベンゾチエピン-9-イル)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミドである(1)項記載の過活動膀胱治療剤に関する。

30

【0008】

本発明は、

(3) slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩の治療有効量を投与することを含む過活動膀胱の治疗方法、および

(4)過活動膀胱治療剤の製造のための、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩の使用に関する。

【0009】

さらに、本発明は、

(5) slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を指標として測定することを含む過活動膀胱治療剤のスクリーニング方法に関する。

40

本明細書における「slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物」は、その性質の一つとしてslowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有していれば、新規であるか公知であるかを問わず、また化合物の構造等に限定されず、すべてのslowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物を意味する。

【0010】

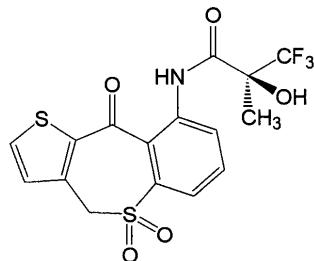
本発明で使用されるslowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物としては、(S)-(+)-N-(5,5-ジオキシド-10-オキソ-4,10-ジヒドロチエノ[3,2-c][1]ベンゾチエピン-9-イル)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロパンアミド[(S)-(+)

50

-N-(5,5-dioxido-10-oxo-4,10-dihydrothieno[3,2-c][1]benzothiepin-9-yl)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropanamide] (化合物1) などがある。化合物1はW098/46587に記載されている化合物1-25と同一化合物である。

【0011】

【化1】



化合物1

10

【0012】

本発明のスクリーニング方法において、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用の測定方法は特に限定されないが、例えば後記の試験例1および2に記載の方法などが挙げられる。

【0013】

本発明で用いられる化合物の薬理作用を試験例により以下に説明する。

20

【0014】

試験例1： DRG細胞におけるslowly-inactivating  $K^+$ 電流増強効果

<材料および方法>

動物の準備

試験は成熟Sprague Dawley系雌性ラットを用いて行った。未同定のDRGニューロン群あるいは膀胱神経を支配する特定のDRGニューロン群を用いて、2系列の実験を行った。膀胱を神経支配するDRGニューロン群は、細胞単離7日前にハロタン麻酔下動物の膀胱壁に注入した蛍光色素の4%(w/w)ファースト・ブルー(Fast Blue)(ポリロイ社(Polyloy), グロス・ウムスタッフ(Gross Umstat), ドイツ(Germany))の逆行性軸索輸送によって標識した。色素は膀胱の背側表面の3~6部位に28ゲージの注射針を用いて注入した(1部位当たり5~6  $\mu$ L、総容量20~30  $\mu$ L)。各注入部位は、隣接組織が色素で汚染するのを最小限にするため生理食塩水で洗った。

30

【0015】

<細胞分離>

DRGからの単離ニューロンはハロタン麻酔下動物から調製した。L6およびS1 DRGを動物より切り出し、0.3 mg/mLトリプシン(Type 3、シグマ社)、1 mg/mLコラゲナーゼ(Type 1、シグマ社)および0.1 mg/mLデオキシリボヌクレアーゼ(Type 4、シグマ社)を含む5 mLのDMEM(シグマ社)を加え、35℃で25分間振盪浴槽中で単離した。次いでトリプシン活性を中和させるためにトリプシン阻害剤(Type 2a、シグマ社)を加えた。個々のDRG細胞体は分散させて分離し、ポリ-L-リジンで覆われた35 mmのペトリ皿上に撒いた。

40

【0016】

<電気的記録>

色素標識された膀胱を支配する一次求心性ニューロンは、蛍光アタッチメント(UV-IAフィルター；励起波長、365 nm)付き倒立型位相差顕微鏡(ニコン社、東京、日本)を用いて特定した。培養皿中の各標識ニューロンに対し、室温(20°C~22°C)でギガオーム・シール・ホールセル記録法を実施した。通常、培養皿中には200~300個の非標識ニューロンのうち、3~7の標識細胞が含まれている。内液(KOHでpH 7.4に調整した)は以下の通り(mmol/L)：KCl 140、CaCl<sub>2</sub> 1、MgCl<sub>2</sub> 2、EGTA 11、HEPES 10、Mg-ATP 2、Tris-GTP 0.4。パッヂ電極の抵抗は、内液で満たされた時に1~4 MΩであった。ニューロンはNaCl 150、KCl 5、CaCl<sub>2</sub> 2.5、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10およびD-glucose 10(以上、mmol/L)を含む外液

50

(NaOHでpH 7.4に調整した)で1.5 mL/minの流速で表面灌流した。全ての記録は、Axopatch-1D パッチクランプ増幅器(アクソン・インストルメンツ社 (Axon Instruments)、フォスター・シティ (Foster City)、カルフォルニア州 (CA))を用いて行い、データはPC LAMPソフトウェア (アクソン・インストルメンツ社 (Axon Instruments))にて取得して解析した。

#### 【0017】

電位固定記録では、外向きK<sup>+</sup>電流と内向きNa<sup>+</sup>電流を測定した。K<sup>+</sup>電流を単離するため、choline-Cl 150、KOH 5、CaCl<sub>2</sub> 0.03、HEPES 10、Mg(OH)<sub>2</sub> 3およびD-glucose10(以上、mmol/L)を含む外液(HClでpH 7.4に調整した)に変更した。

未同定DRGニューロンを用いた第1番目の一連の実験では、外向きK<sup>+</sup>電流を、-90 mVの保持電位から、長さ800 msの+60 mVの脱分極処置で誘発し、さらに1秒間の-20 mVの条件付き前パルスの後、セカンド・パルスとして+60 mVまで同様の脱分極パルスを順次与えることにより誘発した。ファースト・ブルーで標識した膀胱求心性DRGニューロンを用いた第2番目の実験群では、-120mVの保持電位 (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup>電流が完全に活性化される条件)から活性化された外向きK<sup>+</sup>電流から、-40 mVの保持電位 (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup>電流のほとんどが不活性化されている条件)から活性化された外向きK<sup>+</sup>電流を差し引くことによりslowly-inactivating A-type K<sup>+</sup>電流を分離した。化合物は低濃度から累積的に適用した。電流は最高点(ピーク)で測定し、対照(化合物適用前)で規格化した。

#### 【0018】

内向きNa<sup>+</sup>電流は、-90 mVの保持電位から+60 mV、800 msの長さの脱分極処置によって誘発した。電流は最高点(ピーク)で測定し、対照(化合物適用前)で規格化した。

未同定DRGニューロンを用いた実験で得られた結果を第1表～第5表に、カプサイシン感受性膀胱求心性ニューロンを用いた実験で得られた結果を第6表に示す。第1表には保持電位が-90 mV時 (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup>電流活性化条件) または-20 mV時 (slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup>電流不活性化条件) の電流変化に対する化合物1の作用を示す。第2表には20 mmol/Lテトラエチルアンモニウム (tetraethylammonium) 存在下での化合物1の作用、第3表には5 μmol/Lベラパミル (verapamil) 存在下での化合物1の作用、第4表には60 mmol/L テトラエチルアンモニウム (tetraethylammonium) 存在下での化合物1の作用を示す。第5表には、Na<sup>+</sup>電流に対する化合物1の作用を示す。第1～5表において、nは例数を表す。

#### 【0019】

#### 【表1】

第1表

化合物1 (mol/L)	HP: -90 mV	n	HP: -20 mV	N
5.0×10 <sup>-9</sup>	1.01 ± 0.03	7	0.98 ± 0.02	7
1.0×10 <sup>-8</sup>	0.99 ± 0.08	3	0.98 ± 0.04	3
2.5×10 <sup>-8</sup>	1.07 ± 0.03	5	1.01 ± 0.03	5
5.0×10 <sup>-8</sup>	1.07 ± 0.02	16	1.00 ± 0.01	16
1.0×10 <sup>-7</sup>	1.12 ± 0.03	10	1.02 ± 0.01	10
5.0×10 <sup>-7</sup>	1.15 ± 0.03	7	1.01 ± 0.02	7
1.0×10 <sup>-6</sup>	1.06 ± 0.02	13	1.00 ± 0.02	13
1.0×10 <sup>-5</sup>	0.96 ± 0.05	8	0.88 ± 0.07	8
5.0×10 <sup>-5</sup>	0.83 ± 0.09	3	0.81 ± 0.08	3

#### 【0020】

第1表は、未同定DRG細胞を用いた、膜電位固定法 (voltage clamp) で測定した電流に対

10

20

30

40

50

する化合物1の作用を表している。保持電位(HP) -90 mVから活性化される電流はslowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流を含む $K^+$ 電流を測定した成績であり、保持電位-20 mVから活性化される電流は遅延整流性 $K^+$ 電流を測定した成績である。第1表より、化合物1は化合物濃度 $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-7}$  mol/Lをピークにして、slowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流を増強するが、遅延整流性 $K^+$ 電流には影響しない(影響が少ない)ことが示唆された。なお、化合物1の効果(値)は、薬物適用前の値を1とした時の相対値で示す。

【0021】

【表2】

第2表

化合物1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
$5.0 \times 10^{-9}$	1.02 ± 0.02	8	0.99 ± 0.00	8
$5.0 \times 10^{-8}$	1.08 ± 0.02	10	0.99 ± 0.01	10
$1.0 \times 10^{-7}$	1.10 ± 0.01	3	0.99 ± 0.02	3
$5.0 \times 10^{-7}$	1.15 ± 0.04	14	1.01 ± 0.01	14
$1.0 \times 10^{-6}$	1.19 ± 0.05	4	1.00 ± 0.00	4
$5.0 \times 10^{-6}$	1.16 ± 0.03	10	0.98 ± 0.01	10
$1.0 \times 10^{-5}$	1.19 ± 0.01	3	1.01 ± 0.02	3
$5.0 \times 10^{-5}$	0.91 ± 0.04	8	0.84 ± 0.06	8
$5.0 \times 10^{-4}$	0.29 ± 0.02	4	0.25 ± 0.04	4

10

20

30

40

【0022】

第2表は、遅延整流性 $K^+$ 電流の阻害剤(blocker)であるテトラエチルアンモニウム存在下での化合物1の作用を表している。遅延整流性 $K^+$ 電流の阻害剤存在下でも、化合物1は同様の結果を示すことにより、化合物1の $K^+$ 電流増強効果は遅延整流性 $K^+$ channelを介したものではないことが示唆される。

【0023】

【表3】

第3表

化合物1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
$5.0 \times 10^{-8}$	1.03 ± 0.02	3	1.00 ± 0.00	3
$1.0 \times 10^{-7}$	1.13 ± 0.02	4	1.00 ± 0.01	4
$5.0 \times 10^{-7}$	1.17 ± 0.03	8	1.00 ± 0.01	8
$1.0 \times 10^{-6}$	1.11 ± 0.03	5	1.00 ± 0.01	5
$5.0 \times 10^{-6}$	1.02 ± 0.03	6	1.01 ± 0.01	6
$1.0 \times 10^{-5}$	0.99 ± 0.02	6	1.00 ± 0.02	6
$5.0 \times 10^{-5}$	0.94 ± 0.02	9	0.98 ± 0.01	9
$5.0 \times 10^{-4}$	0.61 ± 0.05	6	0.83 ± 0.06	6

【0024】

第3表は、遅延整流性 $K^+$ 電流の阻害剤(blocker)であるベラパミル(verapamil)存在下での化合物1の作用を示している。第3表においても第2表と同様の結果が得られていることにより、化合物1の $K^+$ 電流増強効果は遅発整流性 $K^+$ channelを介したものではないことが示唆される。

【0025】

50

【表4】

第4表

化合物1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
$5.0 \times 10^{-8}$	1.08 ± 0.02	12	1.00 ± 0.01	12
$5.0 \times 10^{-7}$	1.11 ± 0.03	12	0.97 ± 0.03	12
$5.0 \times 10^{-6}$	1.14 ± 0.05	10	0.97 ± 0.02	10
$5.0 \times 10^{-5}$	1.15 ± 0.08	7	0.95 ± 0.03	7
$5.0 \times 10^{-4}$	0.56 ± 0.05	5	0.54 ± 0.02	5

10

## 【0026】

第4表は高濃度のテトラエチルアンモニウム (TEA) 存在下での化合物1の作用を表している。高濃度のテトラエチルアンモニウム (TEA) は遅発整流性  $K^+$  電流の阻害剤 (blocker) として作用する。第4表においても第2表と同様の結果が得られていることにより、化合物1の  $K^+$  電流増強効果は遅発整流性  $K^+$  channel を介したものではないことが示唆される。

## 【0027】

【表5】

第5表

化合物1 (mol/L)	Na <sup>+</sup> 電流	n
$5.0 \times 10^{-8}$	0.99 ± 0.01	9
$5.0 \times 10^{-7}$	0.99 ± 0.01	9
$1.0 \times 10^{-6}$	0.99 ± 0.02	4
$5.0 \times 10^{-6}$	1.00 ± 0.00	6
$5.0 \times 10^{-5}$	1.00 ± 0.01	6
$5.0 \times 10^{-4}$	1.00 ± 0.01	5

20

30

## 【0028】

第5表はDRG細胞におけるNa<sup>+</sup>電流に対する化合物1の作用を表している。化合物1はNa<sup>+</sup>電流には影響しないことが第5表より明らかである。

## 【0029】

【表6】

第6表

化 合 物 1 (mol/L)	A-type $I_K$ (HP: -120 mV) - (HP: -40 mV)	n	遅延整流性 HP: -40 mV	n
$1.0 \times 10^{-6}$	1.26 ± 0.03	6	1.10 ± 0.01	6

40

50

## 【0030】

第6表は、ファースト・ブルーで標識されたカプサイシン感受性膀胱求心性ニューロン (C線維と推定されるニューロン) におけるslowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流 ( $I_K$ ) および遅延整流性  $K^+$ 電流に対する化合物1の作用を表している。slowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流は、-120 mVの保持電位 (slowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流が完全に活性化される条件) から活性化された外向き  $K^+$ 電流から、-40 mVの保持電位 (slowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流のほとんどが不活性化される条件) から活性化された外向き  $K^+$ 電流

を差し引くことにより単離した。第6表より、未同定DRGニューロンでの検討と同様に、化合物1はslowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流を増加させるが、遅延整流性 $K^+$ 電流には影響が少ないことが示された。

#### 【0031】

試験例2：DRG細胞における膜電位変化

＜材料および方法＞

動物の準備

試験は成熟Sprague Dawley系雌性ラットを用いて行った。未同定のDRGニューロン群および膀胱神経を支配する特定の膀胱支配DRGニューロン群は、細胞単離7日前にハロタン麻酔下動物の膀胱壁に注入した蛍光色素の4%(w/w)ファースト・ブルー(Fast Blue)(ポリロイ社(Polyloy), グロス・ウムスタット(Gross Umstat), ドイツ(Germany))の逆行性軸索輸送によって標識した。色素は膀胱の背側表面の3~6部位に28ゲージの注射針を用いて注入した(1部位当たり5~6  $\mu$ L、総容量20~30  $\mu$ L)。各注入部位は、隣接組織が色素により汚染するのを最小限にするため生理食塩水で洗った。

#### 【0032】

＜細胞分離＞

DRGからの単離ニューロンはハロタン麻酔下動物から調製した。L6およびS1 DRGを動物より切り出し、0.3 mg/mLトリプシン(Type 3、シグマ社)、1 mg/mLコラゲナーゼ(Type 1、シグマ社)および0.1 mg/mLデオキシリボヌクレアーゼ(Type 4、シグマ社)を含むD MEM(シグマ社)5mLを加え、35℃で25分間振盪浴槽中で単離した。次いでトリプシン活性を中和するためにトリプシン阻害剤(Type 2a、シグマ社)を加えた。個々のDRG細胞体は分散させて分離し、ポリ-L-リジンで覆われた35 mmのペトリ皿上に撒いた。

#### 【0033】

＜電気的記録＞

色素標識された膀胱を支配する一次求心性ニューロンは、蛍光アタッチメント(UV-IAフィルター；励起波長、365 nm)付き倒立型位相差顕微鏡(ニコン社、東京、日本)を用いて特定した。細胞分離6~8時間以内に、培養皿中の各標識ニューロンに対し、室温(20~22℃)でギガオーム・シール・ホールセル記録法を実施した。通常、培養皿中には200~300個の非標識ニューロンのうち、3~7の標識細胞が含まれている。内液(KOHでpH 7.4に調整した)は以下の通り(mmol/L)：KCl 140、CaCl<sub>2</sub> 1、MgCl<sub>2</sub> 2、EGTA 11、HEPES 10、Mg-ATP 2、Tris-GTP 0.4。パッチ電極の抵抗は、内液で満たされた時に1~4 MΩであった。ニューロンは、NaCl 150、KCl 5、CaCl<sub>2</sub> 2.5、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10およびD-glucose 10(以上、mmol/L)を含む外液(NaOHでpH 7.4に調整した)で1.5 mL/minの流速で表面灌流した。全ての記録は、Axopatch-1Dパッチクランプ増幅器(アクソン・インストルメンツ社(Axon Instruments)、フォスター・シティ(Foster City)、カルフォルニア州(CA))を用いて行い、データはPCLAMPソフトウェア(アクソン・インストルメンツ社)にて取得して解析した。

#### 【0034】

電流固定記録では、DRG細胞の膜電位を化合物適用の前後で測定した。膜電位は、コントロール(化合物適用前)で規格化した。

膜電位に対する化合物1の影響を第7表に示す。

#### 【0035】

【表7】

第7表

化合物1 (mol/L)	膜電位 (mV)	n
0	-47.95 ± 0.22	20
$1.0 \times 10^{-9}$	-48.10 ± 0.48	10
$1.0 \times 10^{-8}$	-49.80 ± 0.65	5
$1.0 \times 10^{-7}$	-57.17 ± 0.53	6
$1.0 \times 10^{-6}$	-53.67 ± 0.74	6
$5.0 \times 10^{-6}$	-50.50 ± 0.88	4
$5.0 \times 10^{-5}$	-48.50 ± 1.28	4
$5.0 \times 10^{-4}$	-42.67 ± 1.46	3

## 【0036】

第7表は、DRG細胞における膜電位に対する化合物1の作用を表している。化合物1がslowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流を増強、すなわち外向き電流を増加することにより過分極（膜電位のマイナス側への変化）を誘起することが示されている。この作用は、DRG細胞の興奮性を低下させることを示唆する。

## 【0037】

以上の試験例1および試験例2の結果より、化合物1がslowly-inactivating A-type  $K^+$ 電流の増強作用を有することが明らかとなった。

## 【0038】

## 試験例3：神経因性膀胱の抑制作用

実験は、チエン(Cheng)らの方法[ブレイン・リサーチ(Brain Res.)、678巻、40-48頁(1995年)]に準じて行った。

実験には、雌性SD系ラット8~10週令(日本エスエルシー社供給)を使用した。ラットは室温19~25℃、湿度30~70%、一日12時間照明(午前7時~午後7時)の飼育室にて、金属ケージに5~7匹ずつ収容し、市販の固形飼料と水を自由に摂取させて飼育した。

## 【0039】

ラットに脊髄損傷を誘起した。ラットをジエチルエーテルで麻酔し、背側胸髄部分の皮膚を切開した。第7~8胸椎部分の椎弓を切除した。第7~8胸髄付近を5mm程度切除し、止血のため切除部分の創腔に酸化セルロースを充填した。切開部分を手術用絹糸で縫合した。脊髄損傷手術後、完全に自律排尿が認められるまで、1日2回(8~9時および18~19時の間)、手圧排尿を約3週間行った。また、抗生物質アンピシリン(ampicillin、シグマ社製；150mg/kg)の筋肉内投与を1日1~2回、約2週間行った。

## 【0040】

脊髄損傷4~5週間後、ラットに膀胱カテーテル手術を施した。ジエチルエーテル麻酔下に、腹部正中を切開して膀胱を露出した。組織を傷つけないよう、先端を鈍化させたポリエチレンチューブ(PE-50；ベクトン・ディッキンソン社)に生理食塩液(大塚製薬工場、徳島、日本)を満たし、膀胱頂部より挿入した。この膀胱カテーテルを手術用絹糸で固定、留置した。また、他端は皮下を通して背頸部より導出して栓を取り付け、皮膚に手術用糸で固定した。

## 【0041】

膀胱カテーテル手術4~6日後にシストメトリー試験を行った。ラットをボールマンケージ(夏目製作所社)に入れ、膀胱カテーテルに三方活栓を連結し、一方は圧トランスデューサー(日本光電社)を連結し、他方は生理食塩液注入用にインフュージョンポンプ(ハーバード・アパラタス社)に配置した50mL注射筒(テルモ社)に連結した。圧トランスデューサーからの膀胱内圧信号を、接続したひずみ圧力アンプ(AP-601G；日本光電社)にて増幅し、これを収納したポリグラフシステム(RPM-6008；日本光電社)を介してサーマル

10

20

30

40

50

アレイレコーダー (RTA-1200; 日本光電社) 上に記録した。測定準備終了60~90分後、室温の生理食塩液を10 mL/hの流速で膀胱内に30分間持続注入し、排尿収縮が発現するのを確認した。30分後に再び30分間の生理食塩液注入を行い、膀胱内圧を測定し薬物投与前値とした。試験化合物（化合物1）は0.5 w/v%メチルセルロース水溶液で1 mg/mLとなるよう懸濁させた。この懸濁液を0.5 w/v%メチルセルロース水溶液でさらに希釈し、目的濃度の投与用懸濁液または溶液を調製し、1 mL/kgの容量で経口投与した。投与後1、3、5時間を溶媒または薬物投与後の測定時点とし、各時点の前後15分間（薬物投与後45~75分、165~195分、285~315分）に生理食塩液の膀胱内注入を行った。

## 【0042】

通常の排尿機能の指標として排尿収縮を、神経因性膀胱の指標として排尿前収縮を測定した。各30分間の測定期間に観察されるすべての排尿収縮値の平均、各排尿収縮間に発現する最大排尿前収縮値の平均をそれぞれ、各時点の排尿収縮および排尿前収縮の大きさとした。なお、両収縮値については、チャート紙に記録された膀胱内圧波形からコンピューター (PC-9801NS/R; NEC社製)で制御したデジタイザー (KD3220; グラフテック社)で読み取り、Lotus 1-2-3 R2.5J (ロータス社製)上でWJ2形式ファイルとして保存した。WJ2形式ファイルをExcel for Windows version 7.0 (マイクロソフト社製)に取り込んだ。排尿前収縮および排尿収縮の大きさは、薬物投与前の値を100としたときの相対値に換算し、群毎に平均±標準誤差を求めた。

## 【0043】

化合物1の結果については、第8表に溶媒または薬物投与後の排尿前収縮の値(%)を、  
第9表に排尿収縮の値(%)を示す。

## 【0044】

## 【表8】

第8表

	化合物1 (mg/kg, p.o.)			
	コントロール	0.001	0.01	0.1
投与前	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
1時間後	115.0 ± 12.1	83.5 ± 6.8	59.6 ± 8.1*	52.3 ± 9.1*
3時間後	128.4 ± 21.5	95.4 ± 12.0	51.2 ± 6.7*	33.3 ± 6.3*
5時間後	120.2 ± 24.5	105.5 ± 20.8	42.2 ± 7.2*	28.5 ± 6.2*

\*: p<0.05(コントロール群との比較)

(n=5-6; Dunnetの検定)

## 【0045】

## 【表9】

第9表

	化合物1 (mg/kg, p.o.)			
	コントロール	0.001	0.01	0.1
投与前	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
1時間後	97.5 ± 5.9	106.5 ± 11.3	114.4 ± 9.5	109.3 ± 6.3
3時間後	99.3 ± 4.8	101.7 ± 9.5	117.6 ± 13.9	110.2 ± 5.4
5時間後	94.2 ± 6.5	103.1 ± 6.5	117.6 ± 12.7	112.4 ± 7.0

## 【0046】

試験例3の結果によれば、化合物1は脊髄損傷ラットの排尿前収縮(排尿筋過活動)を抑

10

20

30

40

50

制したが、排尿収縮（生理的な収縮）には影響が認められなかった。

【0047】

試験例4：不安定膀胱抑制作用

実験はマルムグレン (Malmgren) らの方法 [ジャーナル・オブ・ユーロロジー (J. Urol.)、142巻、1134-1138頁 (1989年)] に準じて行った。

実験には、雌性SD系ラット8~10週令 (日本エスエルシー供給) を使用した。ラットは室温19~25℃、湿度30~70%、一日12時間照明 (午前7時~午後7時) の飼育室にて、金属ケージに5~7匹ずつ収容し、市販の固形飼料と水を自由に摂取させて飼育した。

ラットに部分的尿道閉塞を誘起した。ラットをペントバルビタール・ナトリウム (大日本製薬社、大阪、日本) 50 mg/kg腹腔内投与で麻酔し、下腹部部分の皮膚および筋肉を正中切開した。ポリエチレンチューブ (PE-20；ベクトン・ディッキンソン社) を尿道に挿入した。尿道基部を剥離して二重結紮した後、ポリエチレンチューブを引き抜くことにより、尿道の部分的閉塞を誘起した。切開部分を手術用絹糸で縫合した。抗生物質アンピシリン (ampicillin、シグマ社製；150 mg/kg) の筋肉内投与を行った。

10

【0048】

尿道閉塞手術後6週間経過し、膀胱が肥大したラットに膀胱カテーテル手術を施した。ペントバルビタール・ナトリウム麻酔下に、腹部正中を切開して膀胱を露出した。組織を傷つけないよう、先端を鈍化させたポリエチレンチューブ (PE-50；ベクトン・ディッキンソン社) に生理食塩液 (大塚製薬工場社、徳島、日本) を満たし、膀胱頂部より挿入した。この膀胱カテーテルを手術用絹糸で固定、留置した。また、他端は皮下を通して背頸部より導出して栓を取り付け、皮膚に手術用糸で固定した。

20

【0049】

膀胱カテーテル手術4~6日後にシストメトリー試験を行った。ラットをボールマンケージ (夏目製作所社) に入れ、膀胱カテーテルに三方活栓を連結し、一方は圧トランスデューサー (日本光電社) を連結し、他方は生理食塩液注入用にインフュージョンポンプ (ハーバード・アパラタス社) に配置した50 mL注射筒 (テルモ社) に連結した。圧トランスデューサーからの膀胱内圧信号を、接続したひずみ圧力アンプ (AP-601G；日本光電社) にて増幅し、これを収納したポリグラフシステム (RPM-6008；日本光電社) を介してサーマルアレイレコーダー (RTA-1200；日本光電社) 上に記録した。測定準備終了60~90分後、室温の生理食塩液を10 mL/hの流速で膀胱内に実験終了まで持続注入し、排尿収縮および排尿前収縮が発現するのを確認した。生理食塩液注入開始3時間後から30分間のチャートを薬物投与前値とした。試験化合物は0.5 w/v%メチルセルロース水溶液で1 mg/mLとなるよう懸濁させた。この懸濁液を0.5 w/v%メチルセルロース水溶液でさらに希釈し、目的濃度の投与用懸濁液または溶液を調製した。1 mL/kgの容量で経口投与した。投与後1、3、5時間を試験化合物投与後の測定時点とし、各時点の前後15分間 (薬物投与後45~75分、165~195分、285~315分) を測定期間とした。

30

【0050】

通常の排尿機能の指標として排尿収縮を、不安定膀胱の指標として排尿前収縮を測定した。各30分間の測定期間に観察されるすべての排尿収縮値の平均、各排尿収縮間に発現する最大排尿前収縮値の平均をそれぞれ、各時点の排尿収縮および排尿前収縮の大きさとした。なお、両収縮値については、チャート紙に記録された膀胱内圧波形からコンピューター (PC-9801NS/R；NEC社製) で制御したデジタイザー (KD3220；グラフテック社) で読み取り、Lotus 1-2-3 R2.5J (ロータス社製) 上でWJ2形式ファイルとして保存した。WJ2形式ファイルをExcel for Windows version 7.0 (マイクロソフト社製) に取り込んだ。排尿前収縮および排尿収縮の大きさは、薬物投与前の値を100としたときの相対値に換算し、群毎に平均±標準誤差を求めた。

40

第10表に溶媒または化合物1投与後の排尿前収縮の値(%)を、第11表に溶媒または化合物1投与後の排尿収縮の値(%)を示す。

【0051】

【表10】

50

第10表

		化合物1 (mg/kg, p.o.)		
		0.001	0.01	0.1
投与前	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
1時間後	105.5 ± 6.5	105.9 ± 7.8	59.5 ± 4.1***	55.8 ± 8.2***
3時間後	109.4 ± 14.8	100.3 ± 10.0	69.5 ± 4.4*	66.2 ± 4.7*
5時間後	103.3 ± 3.6	104.2 ± 10.2	67.8 ± 5.5**	69.2 ± 7.4**

\*: p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001(コントロール群との比較)

(n=5-6; Dunnet の検定)

10

## 【0052】

## 【表11】

第11表

		化合物1 (mg/kg, p.o.)		
		0.001	0.01	0.1
投与前	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
1時間後	102.5 ± 3.5	99.3 ± 2.3	99.6 ± 1.2	106.2 ± 9.2
3時間後	104.4 ± 5.1	101.5 ± 3.3	92.6 ± 3.2	105.2 ± 9.6
5時間後	96.6 ± 3.2	98.7 ± 5.2	90.1 ± 4.3	100.1 ± 8.6

## 【0053】

試験例4の結果によれば、化合物1は、膀胱肥大ラットにおいて排尿時の収縮である排尿収縮には影響を与えたかった（通常の排尿には影響なし）が、正常排尿時以外の不規則な排尿筋不安定症である排尿前収縮を抑制した。

## 【0054】

試験例3および試験例4において、本発明に用いた化合物は、排尿前収縮（排尿筋過活動）を抑制し、過活動膀胱治療剤として有用であることが示された。したがって、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩は、過活動膀胱の治療剤として有用であることが示唆される。

## 【0055】

## 試験例5：急性毒性試験

雄性dd系マウス（体重 $20 \pm 1$ g）を1群3匹用い、試験化合物を経口または腹腔内投与した。投与後7日の死亡状況を観察し、最小致死量（MLD）値を求めた。

その結果、化合物1のMLDは、経口投与で $> 1000$ mg/kgであった。

## 【0056】

以上の試験例1～5の結果により、slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩は、過活動膀胱治療剤として有用である。

slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩はそのままあるいは各種の製薬形態で使用することができる。本発明の製薬組成物は、活性成分として、有効な量のslowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩を薬理学的に許容される担体と均一に混合して製造できる。これらの製薬組成物は、例えば経口または非経口（静脈内を含む）などの投与に対して適する単位服用形態にあることが望ましい。

## 【0057】

経口服用形態にある組成物の調製においては、何らかの有用な薬理学的に許容される担体

20

30

40

50

が使用できる。例えば懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、ショークロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ゴマ油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを使用して製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤および顆粒剤などは、ラクトース、グルコース、ショークロース、マンニトールなどの賦形剤、でん粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの表面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤およびカプセル剤は、投与が容易であるという理由で、最も有用な単位経口投与剤である。錠剤やカプセル剤を製造する際には固体の製薬担体が用いられる。

10

また、注射剤は、例えば蒸留水、塩溶液、グルコース溶液または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製することができる。この際、常法に従い適当な助剤を用いて、溶液、懸濁液または分散液として調製される。

20

### 【0058】

slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩は、上記製薬形態で経口的にまたは注射剤などとして非経口的に投与することができ、その有効用量および投与回数は、例えば投与形態、患者の年齢、体重、症状などにより異なるが、1~900 mg / 60 kg / 日、好ましくは1~200 mg / 60 kg / 日が適当である。

20

以下に、実施例によって本発明の様態を説明する。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0059】

##### 実施例1：錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製した。

化合物1の250 gを、マンニトール1598.5 g、でん粉グリコール酸ナトリウム100 g、軽質無水ケイ酸10 g、ステアリン酸マグネシウム40 gおよび黄色三二酸化鉄1.5 gと常法により混合した。この混合物を用い、径8 mmの杵臼をもった打錠機（菊水社製、Purepress Correct-12型）で打錠を行って、錠剤（1錠あたり活性成分25 mgを含有する）を得た。

30

処方を第12表に示す。

30

#### 【0060】

##### 【表12】

第12表

処方	化合物1	25	mg
	マンニトール	159.85	mg
	でん粉グリコール酸ナトリウム	10	mg
	軽質無水ケイ酸	1	mg
	ステアリン酸マグネシウム	4	mg
	黄色三二酸化鉄	0.15	mg
		200	mg

40

#### 【0061】

##### 実施例2：カプセル剤

常法により、次の組成からなるカプセル剤を調製した。

化合物1の500 gを、ラクトース300 g、軽質無水ケイ酸100 gおよびラウリル硫酸ナトリウム100 gと常法により混合した。この混合物をカプセル充填機（Zanasi社製、LZ-64型）により、ハードカプセル1号に充填し（1カプセルあたり100 mg）、カプセル剤（1カプセルあたり活性成分50 mgを含有する）を得た。

50

処方を第13表に示す。

【0062】

【表13】

第13表

処方	化合物1	50	mg
	ラクトース	30	mg
	軽質無水ケイ酸	10	mg
	ラウリル硫酸ナトリウム	10	mg
		100	mg

10

20

30

【0063】

実施例3：注射剤

常法により、次の組成からなる注射剤を調製する。

化合物1の1gを精製ダイズ油100gに溶解させ、精製卵黄レシチン12gおよび注射用グリセリン25gを加える。この混合物を常法により注射用蒸留水で1000mLとして練合・乳化する。得られた分散液を0.2μmのディスポーザブル型メンプランフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2mlずつ無菌的に充填して、注射剤(1バイアルあたり活性成分2mgを含有する)を得る。

処方を第14表に示す。

【0064】

【表14】

第14表

処方	化合物1	2	mg
	精製ダイズ油	200	mg
	精製卵黄レシチン	24	mg
	注射用グリセリン	50	mg
	注射用蒸留水	1.72	ml
		2.00	ml

【産業上の利用可能性】

【0065】

本発明は、slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel開口作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する膀胱過活動治療剤、およびslowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel開口作用を指標として測定することを含む過活動膀胱治療剤のスクリーニング方法を提供する。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/078523 A2

(51) International Patent Classification: A61B **Adrian** [US/US]; 219 Halket Street, Third Floor, Pittsburgh, PA 15213 (US); **KARASAWA, Akira** [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731 (JP); **YOSHIMURA, Naoki** [US/US]; 6490 Jackson Street, Pittsburgh, PA 15206 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/09577

(22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)

(25) Filing Language: English **(74) Agents:** **PERRY, Lawrence, S.** et al.; Fitzpatrick, Celia, Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112 (US).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/279,698 30 March 2001 (30.03.2001) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.** [JP/JP]; 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 (JP); **UNIVERSITY OF PITTSBURGH** [US/US]; 350 Thackenay Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

(72) Inventors; and **(81) Designated States (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, FE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(75) Inventors/Applicants (for US only): **YAMAGATA, Tsuyoshi** [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731 (JP); **ATSUKI, Kaoru** [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731 (JP); **OHNO, Tetsuji** [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731 (JP); **SHIRAKURA, Shiro** [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka 411-8731 (JP); **DEGROAT, William, C.** [US/US]; 6557 Burchfield Avenue, Pittsburgh, PA 15217 (US); **SCULPOREANU,**

**(84) Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KU, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, Tl, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/078523 A2

(54) Title: AGENT FOR THE TREATMENT OF OVERACTIVE BLADDER

(57) Abstract: The present invention provides an agent for the treatment of overactive bladder, comprising, as an active ingredient, a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a method for screening agents for the treatment of overactive bladder, comprising measuring a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity as an index.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

## SPECIFICATION

## AGENT FOR THE TREATMENT OF OVERACTIVE BLADDER

## FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to agents for the treatment of overactive bladder.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Overactive bladder is a medical condition referring to the symptoms of urinary urgency and frequency, with or without urge urinary incontinence, when appearing in the absence of local pathologic or metabolic factors that would account for these symptoms. Storage and voiding of urine are physiologically controlled by complex reflex pathways including peripheral and central nervous systems (*Urology*, 50 Suppl. 6A: 36-52 (1997)). The urinary urgency refers to urgent and strong desire to void, and the urge urinary incontinence refers to involuntary urine leakage due to the urinary urgency.

In patients suffering from the symptoms such as urinary urgency and urge urinary incontinence due to overactive bladder, involuntary (uninhibited) contraction of the detrusor muscle is frequently observed in a cystometric measurement, and is called detrusor overactivity. This detrusor overactivity is considered to

- 1 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

be a cause of urinary urgency and urge urinary incontinence. Moreover, urinary urgency can lead to urinary frequency. The detrusor overactivity is divided into 2 categories: neurogenic bladder (detrusor hyperreflex) when a neurological problem is found in a patient, and unstable bladder (detrusor instability) when a neurological problem is not found. It is considered that the cause of unstable bladder is potentially neurogenic bladder or disorder of detrusor smooth muscle *per se* (or both of them). Examples of the neurological problem relating to neurogenic bladder include Parkinson's disease, stroke, diabetes, multiple sclerosis, neuropathy and spinal cord injury.

Feeling of the filled bladder is transferred to the central nervous system via two bladder afferent neurons, the A<sub>δ</sub>-fiber and the C-fiber; however, under the normal condition, the C-fiber is not involved (silent). On the other hand, sensitivity of the C-fiber is known to be increased under the condition of bladder hypersensitivity and the like (*Clinical J. Pain*, 16: 886-89 (2000)). Furthermore, it is known that a spinal cord reflex mechanism via the C-fiber bladder afferents is involved in the overactive bladder in patients with supranuclear spinal cord injury (*J. Urol.*, 157: 585-589 (1997)).

The potassium (K<sup>+</sup>) channel is present on cell membranes of various tissues and is involved in various physiological activities via the control of membrane

WO 02/078523

PCT/US02/09577

potential. The  $K^+$  channel is classified into various types depending on the voltage-dependency,  $Ca^{++}$ -sensitivity, and other properties of the channel. The slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel is expressed in capsaicin-sensitive dorsal root ganglion (DRG) neuronal cells (*J. Neurophysiol.*, 75: 2629-2646 (1996)) and controls excitability of the C-fiber (*J. Physiol.*, 494: 1-16 (1996)). The action potential of bladder afferent C-fiber of normal rats keeps a high threshold value by the effect of the slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel. In contrast, in the rats with chronic cystitis, the  $K^+$  current is attenuated due to the changes in this ion channel characteristic. Thus, it has been supposed that at the time of cystitis excitability of the C-fiber increases, resulting in the overactive bladder (*J. Neurosci.*, 19: 4644-4653 (1999)). In addition, in the rats with overactive bladder following spinal cord injury, density of the slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel is reduced and excitability of the C-fiber is increased.

## DISCLOSURE OF THE INVENTION

According to the above observations, we have made the hypothesis that the overactive bladder, resulting from various diseases such as neurogenic bladder like spinal cord injury or bladder cystitis, can be treated by reducing excitability of the C-fiber through opening the slowly-

- 3 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

inactivating A-type K<sup>+</sup> channel. We have found a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof is useful for the treatment of overactive bladder, and we have achieved the present invention.

An object of the present invention is to provide an excellent agent for the treatment of overactive bladder.

The present invention relates to

- (1) an agent for the treatment of overactive bladder, comprising, as an active ingredient, a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and
- (2) the agent for the treatment of overactive bladder according to (1), wherein the compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity is *N*-(5,5-dioxido-10-oxo-4,10-dihydrothieno[3,2-c][1]benzothiepin-9-yl)-3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropanamide.

The present invention relates to

- (3) a method for the treatment of overactive bladder, which comprises administering a therapeutically effective amount of a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and
- (4) use of a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and

WO 02/078523

PCT/US02/09577

acceptable salt thereof for the manufacture of the agent for the treatment of overactive bladder.

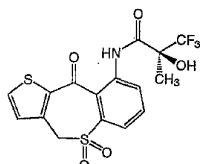
Furthermore, the present invention relates to  
(5) a method for screening agents for the treatment of overactive bladder, comprising measuring a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity as an index.

The term "compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity" as used herein means all compounds having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity regardless of a novel compound or a known compound and without limitation to the structure of compounds, so long as they have the slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity as one of their properties.

The compounds having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity used in the present invention include (S)-(+)-(5,5-dioxido-10-oxo-4,10-dihydrothieno[3,2-c][1]benzothiepin-9-yl)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropanamide (Compound 1). Compound 1 is the same as Compound 1-25 described in WO 98/46587.

WO 02/078523

PCT/US02/09577



Compound 1

In the screening method of the present invention, the method for measuring a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity is not particularly limited, but examples thereof include methods described in Test Examples 1 and 2 described below.

The pharmacological activities of the compound used in the present invention are described below based on Test Examples.

Test Example 1: Facilitatory effects on slowly-inactivating K<sup>+</sup> currents in DRG cells

Materials and methods

Animal preparation:

Experiments were performed on adult female Sprague Dawley rats. First and second series of the experiments were performed, respectively, in unidentified DRG neurons and a specific population of DRG neurons innervating the urinary bladder. The population of DRG neurons that innervate the urinary bladder were labeled by retrograde

WO 02/078523

PCT/US02/09577

axonal transport of the fluorescent dye, Fast Blue (4% w/v) (Polyloy, Gross Umstadt, Germany), injected into the wall of the bladder in halothane-anesthetized animals 7 days before the dissociation. The dye was injected with a 28 gauge needle at three to six sites on the dorsal surface of the organ (5-6  $\mu$ L per site, total volume of 20-30  $\mu$ L). Each injection site was washed with saline to minimize contamination of adjacent organs with the dye.

**Cell dissociation:**

Freshly dissociated neurons from DRG were prepared from halothane-anesthetized animals. L6 and S1 DRG were dissected from animals and then dissociated in a shaking bath for 25 minutes at 35°C with 5 mL DMEM (Sigma) containing 0.3 mg/mL trypsin (Type 3, Sigma), 1 mg/mL collagenase (Type 1, Sigma), and 0.1 mg/mL deoxyribonuclease (Type 4, Sigma). Trypsin inhibitor (Type 2a, Sigma) was then added thereto to neutralize the activity of trypsin. Individual DRG cell bodies were isolated by trituration and then plated on a poly-L-lysine-coated 35 mm Petri dishes.

**Electrical recordings:**

Dye-labeled primary afferent neurons that innervate the urinary bladder were identified using an inverted phase-contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with

WO 02/078523

PCT/US02/09577

fluorescent attachments (UV-1A filter; excitation wavelength, 365 nm). Gigahm-seal whole-cell recordings were performed at room temperature (20-22°C) on each labeled neuron in a culture dish that usually contained three to seven labeled cells among a few hundred unlabeled neurons. The internal solution contained (in mmol/L): KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 11, HEPES 10, Mg-ATP 2, and Tris-GTP 0.4 adjusted to pH 7.4 with KOH. Patch electrodes had resistances of 1-4 MΩ when filled with the internal solution. Neurons were superfused at a flow rate of 1.5 mL/minutes with an external solution containing (in mmol/L): NaCl 150, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, and D-glucose 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. All recordings were made with an Axopatch-1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), and data were acquired and analyzed by PCLAMP software (Axon Instruments).

In voltage-clamp recordings, outward K<sup>+</sup> currents and inward Na<sup>+</sup> currents were measured. For the isolation of K<sup>+</sup> currents, the external solution was changed to one containing (in mmol/L): choline-Cl 150, KOH 5, CaCl<sub>2</sub> 0.03, HEPES 10, Mg(OH)<sub>2</sub> 3, and D-glucose 10, adjusted to pH 7.4 with HCl.

In first series of experiments using unidentified DRG neurons, outward K<sup>+</sup> currents were evoked by voltage steps to +60 mV, 800 ms long from a holding potentials of -

WO 02/078523

PCT/US02/09577

90 mV, this was followed by a 1-second conditioning prepulse to -20 mV followed by a second pulse to +60 mV, identical to the first in the sequence. In the second series of experiments using Fast Blue-labeled bladder afferent neurons, slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents were isolated by subtraction of outward K<sup>+</sup> currents activated from a holding potential of -40 mV (on the condition of inactivation of the majority of slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents) from those activated from a holding potential of -120 mV (on the condition of full activation of slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents). A compound was added cumulatively, starting with a lower concentration. Currents were measured at the maximum (peak) and normalized to control (before addition of the compound).

Inward Na<sup>+</sup> currents were evoked by voltage steps to +60 mV, 800 ms long from a holding potential of -90 mV. Currents were measured at the maximum (peak) and normalized to control (before addition of the compound).

The results obtained in unidentified DRG neurons are shown in Tables 1 to 5, and the results obtained in capsaicin-sensitive bladder afferent neurons are shown in Table 6. Table 1 shows the activity of Compound 1 upon changes in currents when the holding potential is -90 mV (on the condition of activation of slowly-inactivating A-

WO 02/078523

PCT/US02/09577

type  $K^+$  currents) or -20 mV (on the condition of inactivation of slowly-inactivating A-type  $K^+$  currents). Table 2 shows the activity of Compound 1 in the presence of 20 mmol/L tetraethylammonium, Table 3 shows the activity of Compound 1 in the presence of 5  $\mu$ mol/L verapamil, and Table 4 shows the activity of Compound 1 in the presence of 60 mmol/L tetraethylammonium. Table 5 shows the activity of Compound 1 upon  $Na^+$  currents. In Tables 1 to 5, n means the number of cases.

Table 1

Compound 1 (mol/L)	HP: -90 mV	n	HP: -20 mV	n
5.0×10 <sup>-9</sup>	1.01 ± 0.03	7	0.98 ± 0.02	7
1.0×10 <sup>-8</sup>	0.99 ± 0.08	3	0.98 ± 0.04	3
2.5×10 <sup>-8</sup>	1.07 ± 0.03	5	1.01 ± 0.03	5
5.0×10 <sup>-8</sup>	1.07 ± 0.02	16	1.00 ± 0.01	16
1.0×10 <sup>-7</sup>	1.12 ± 0.03	10	1.02 ± 0.01	10
5.0×10 <sup>-7</sup>	1.15 ± 0.03	7	1.01 ± 0.02	7
1.0×10 <sup>-6</sup>	1.06 ± 0.02	13	1.00 ± 0.02	13
1.0×10 <sup>-5</sup>	0.96 ± 0.05	8	0.88 ± 0.07	8
5.0×10 <sup>-5</sup>	0.83 ± 0.09	3	0.81 ± 0.08	3

Table 1 shows the activity of Compound 1 on currents measured by a voltage clamp using unidentified DRG cells. The currents at a holding potential (HP) of -90 mV are results of the measurement of slowly-inactivating A-

- 10 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

type K<sup>+</sup> currents, and the currents at an HP value of -20 mV are results of the measurement of delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. Table 1 shows that Compound 1 increases slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents with a peak compound concentration of from 1×10<sup>-7</sup> to 5×10<sup>-7</sup> mol/L, but does not have no influences (little influences) upon delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. Also, effects (values) of Compound 1 are shown by relative values when the values before the compound application are defined as 1.

Table 2

Compound 1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
5.0×10 <sup>-9</sup>	1.02 ± 0.02	8	0.99 ± 0.00	8
5.0×10 <sup>-8</sup>	1.08 ± 0.02	10	0.99 ± 0.01	10
1.0×10 <sup>-7</sup>	1.10 ± 0.01	3	0.99 ± 0.02	3
5.0×10 <sup>-7</sup>	1.15 ± 0.04	14	1.01 ± 0.01	14
1.0×10 <sup>-6</sup>	1.19 ± 0.05	4	1.00 ± 0.00	4
5.0×10 <sup>-6</sup>	1.16 ± 0.03	10	0.98 ± 0.01	10
1.0×10 <sup>-5</sup>	1.19 ± 0.01	3	1.01 ± 0.02	3
5.0×10 <sup>-5</sup>	0.91 ± 0.04	8	0.84 ± 0.06	8
5.0×10 <sup>-4</sup>	0.29 ± 0.02	4	0.25 ± 0.04	4

Table 2 shows the activity of Compound 1 in the presence of tetraethylammonium as a blocker of delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. Since Compound 1 shows the same results in the presence of the blocker of delayed rectifier

$K^+$  currents, it is suggested that the  $K^+$  currents increasing effect of Compound 1 is not mediated by the delayed rectifier  $K^+$  channel.

Table 3

Compound 1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
$5.0 \times 10^{-8}$	$1.03 \pm 0.02$	3	$1.00 \pm 0.00$	3
$1.0 \times 10^{-7}$	$1.13 \pm 0.02$	4	$1.00 \pm 0.01$	4
$5.0 \times 10^{-7}$	$1.17 \pm 0.03$	8	$1.00 \pm 0.01$	8
$1.0 \times 10^{-6}$	$1.11 \pm 0.03$	5	$1.00 \pm 0.01$	5
$5.0 \times 10^{-6}$	$1.02 \pm 0.03$	6	$1.01 \pm 0.01$	6
$1.0 \times 10^{-5}$	$0.99 \pm 0.02$	6	$1.00 \pm 0.02$	6
$5.0 \times 10^{-5}$	$0.94 \pm 0.02$	9	$0.98 \pm 0.01$	9
$5.0 \times 10^{-4}$	$0.61 \pm 0.05$	6	$0.83 \pm 0.06$	6

Table 3 shows the activity of Compound 1 in the presence of verapamil as a blocker of delayed rectifier  $K^+$  currents. Since the results obtained in Table 3 are similar to those in Table 2, it is suggested that the  $K^+$  currents increasing effect of Compound 1 is not mediated by the delayed rectifier  $K^+$  channel.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Table 4

Compound 1 (mol/L)	HP: -90 mV	N	HP: -20 mV	n
5.0×10 <sup>-8</sup>	1.08 ± 0.02	12	1.00 ± 0.01	12
5.0×10 <sup>-7</sup>	1.11 ± 0.03	12	0.97 ± 0.03	12
5.0×10 <sup>-6</sup>	1.14 ± 0.05	10	0.97 ± 0.02	10
5.0×10 <sup>-5</sup>	1.15 ± 0.08	7	0.95 ± 0.03	7
5.0×10 <sup>-4</sup>	0.56 ± 0.05	5	0.54 ± 0.02	5

Table 4 shows the activity of Compound 1 in the presence of high concentration tetraethylammonium (TEA). The high concentration tetraethylammonium (TEA) acts as a blocker of delayed rectifier K<sup>+</sup> currents. Since the results obtained in Table 4 are also similar to those in Table 2, it is suggested that the K<sup>+</sup> currents increasing effect of Compound 1 is not mediated by the delayed rectifier K<sup>+</sup> channel.

Table 5

Compound 1 (mol/L)	Na <sup>+</sup> ion currents	n
5.0×10 <sup>-8</sup>	0.99 ± 0.01	9
5.0×10 <sup>-7</sup>	0.99 ± 0.01	9
1.0×10 <sup>-6</sup>	0.99 ± 0.02	4
5.0×10 <sup>-6</sup>	1.00 ± 0.00	6
5.0×10 <sup>-5</sup>	1.00 ± 0.01	6
5.0×10 <sup>-4</sup>	1.00 ± 0.01	5

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Table 5 shows the activity of Compound 1 upon  $\text{Na}^+$  currents in DRG cells. It is evident from Table 5 that Compound 1 does not exert influence upon  $\text{Na}^+$  currents.

Table 6

Compound 1 (mol/L)	A-type $I_K$ (HP: -120 mV)- (HP: -40 mV)	n	Delayed rectifier HP: -40 mV	n
$1.0 \times 10^{-6}$	$1.26 \pm 0.03$	6	$1.10 \pm 0.01$	6

Table 6 shows the activity of Compound 1 upon slowly-inactivating A-type  $\text{K}^+$  currents ( $I_K$ ) and delayed rectifier  $\text{K}^+$  currents in Fast Blue-labeled bladder afferent neurons that were sensitive to capsaicin (presumed C-fiber neurons). Slowly-inactivating A-type  $\text{K}^+$  currents were isolated by subtraction of outward  $\text{K}^+$  currents activated from a holding potential of -40 mV (on the condition of inactivation of the majority of slowly-inactivating A-type  $\text{K}^+$  currents) from those activated from a holding potential of -120 mV (on the condition of full activation of slowly-inactivating A-type  $\text{K}^+$  currents). As demonstrated in unidentified DRG neurons, Table 6 shows that Compound 1 increases slowly-inactivating A-type  $\text{K}^+$  currents, but have smaller influences upon delayed rectifier  $\text{K}^+$  currents.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

**Test Example 2: Changes in membrane potential in DRG cells****Material and methods****Animal preparation:**

Experiments were performed on adult female Sprague Dawley rats. A population of unidentified DRG cells and a population of DRG neurons that innervate the urinary bladder were labeled by retrograde axonal transport of the fluorescent dye, Fast Blue (4% w/v) (Polyloy, Gross Umstadt, Germany), injected into the wall of the bladder in halothane-anesthetized animals 7 days before the dissociation. The dye was injected with a 28 gauge needle at three to six sites on the dorsal surface of the organ (5-6  $\mu$ L per site, total volume of 20-30  $\mu$ L). Each injection site was washed with saline to minimize contamination of adjacent organs with the dye.

**Cell dissociation:**

Freshly dissociated neurons from DRG were prepared from halothane-anesthetized animals. L6 and S1 DRG were dissected from animals and then dissociated in a shaking bath for 25 minutes at 35°C with 5 mL DMEM (Sigma) containing 0.3 mg/mL trypsin (Type 3, Sigma), 1 mg/mL collagenase (Type 1, Sigma), and 0.1 mg/mL deoxyribonuclease (Type 4, Sigma). Trypsin inhibitor (Type 2a, Sigma) was then added thereto to neutralize the activity of trypsin. Individual DRG cell bodies were

WO 02/078523

PCT/US02/09577

isolated by trituration and then plated on a poly-L-lysine-coated 35 mm Petri dishes.

Electrical recordings:

Dye-labeled primary afferent neurons that innervate the urinary bladder were identified using an inverted phase-contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with fluorescent attachments (UV-1A filter; excitation wavelength, 365 nm). Gigaohm-seal whole-cell recordings were performed within 6-8 hours after cell dissociation at room temperature (20-22°C) on each labeled neuron in a culture dish that usually contained three to seven labeled cells among a few hundred unlabeled neurons. The internal solution contained (in mmol/L): KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 11, HEPES 10, Mg-ATP 2, and Tris-GTP 0.4 adjusted to pH 7.4 with KOH. Patch electrodes had resistances of 1-4 MΩ when filled with the internal solution. Neurons were superfused at a flow rate of 1.5 mL/minutes with an external solution containing (in mmol/L): NaCl 150, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, and D-glucose 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. All recordings were made with an Axopatch-1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), and data were acquired and analyzed by PCLAMP software (Axon Instruments).

- 16 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

In current-clamp recordings, membrane potential of DRG cells were measured before and after compound applications. The membrane potentials were normalized to control (before addition of the compound).

Effect of Compound 1 on membrane potential is shown in Table 7.

Table 7

Compound 1 (mol/L)	Membrane potential (mV)	n
0	-47.95 ± 0.22	20
1.0×10 <sup>-9</sup>	-48.10 ± 0.48	10
1.0×10 <sup>-8</sup>	-49.80 ± 0.65	5
1.0×10 <sup>-7</sup>	-57.17 ± 0.53	6
1.0×10 <sup>-6</sup>	-53.67 ± 0.74	6
5.0×10 <sup>-6</sup>	-50.50 ± 0.88	4
5.0×10 <sup>-5</sup>	-48.50 ± 1.28	4
5.0×10 <sup>-4</sup>	-42.67 ± 1.46	3

Table 7 shows the activity of Compound 1 upon membrane potential in DRG cells. It showed that Compound 1 increases slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents, namely increases outward currents to effect hyperpolarization (a negative change of membrane potential). This activity suggests reduction of excitability of DRG cells.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Based on the results of Test Examples 1 and 2, it was revealed that Compound 1 has an activity of increasing slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> currents.

Test Example 3: Activity of inhibiting detrusor hyperreflexia

The test was carried out in accordance with the method of Cheng et al. (Brain Res., 678: 40-48 (1995)).

Female SD rats of 8 to 10 weeks of age (supplied by Japan SLC) were used in the test. Five to seven animals of these rats were put in each metal cage and reared by allowing them to freely take commercially available chow and water, in a rearing room at a room temperature of from 19 to 25°C and a humidity of from 30 to 70% under illumination for 12 hours (from 7 a.m. to 7 p.m.) per day.

Spinal cord injury was induced in rats. Each rat was anesthetized with diethyl ether and the skin of the backside thoracic cord part was incised. Vertebral arch around the 7th to 8th thoracic vertebrae was excised in a length of about 5 mm, and the wound cavity of the excised part was filled with cellulose oxide for blood stanching. The incised part was sutured with a surgical silk thread. After the spinal cord injury operation, forced-pressure urination was manually carried out for about 3 weeks twice a day (between 8 and 9 o'clock and 18 and 19 o'clock) until complete automatic micturition developed. Also,

WO 02/078523

PCT/US02/09577

intramuscular injection of the antibiotic ampicillin (manufactured by Sigma, 150 mg/kg) was carried out once or twice a day for about 2 weeks.

Four to five weeks after the spinal cord injury, each rat was subjected to bladder catheter operation. The bladder was exposed by midline incision of the abdomen under diethyl ether anesthesia. A polyethylene tube (PE-50; Becton Dickinson) having a blunt end to protect tissues from injury was filled with physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Industries, Tokushima, Japan) and inserted from the bladder top. This bladder catheter was fixed with a surgical silk thread and indwelled. Also, the other end was exposed subcutaneously from the back neck, plugged and then fixed to the skin with the surgical thread.

Four to six days after the bladder catheter operation, a cystometry test was carried out. The rat was put in a Ballman cage (Natsume Seisakusho), a three way cock was connected to the bladder catheter, one end of the cock was connected to a pressure transducer (Nihon Kohden) and the other end was connected to a 50 mL capacity syringe (Terumo) arranged to an infusion pump (Harvard Apparatus) for physiological saline injection. The intravesical pressure signal from the pressure transducer was amplified by a strain pressure amplifier (AP-601G; Nihon Kohden) connected thereto and recorded on a thermal array recorder (RTA-1200; Nihon Kohden) via a polygraph system (RPM-6008;

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Nihon Kohden) contained therein. Sixty to ninety minutes after the completion of the preparation, physiological saline kept at room temperature was continuously injected into the bladder at a flow rate of 10 mL/h for 30 minutes, and the occurrence of micturition contraction was confirmed. Thirty minutes after the treatment, physiological saline was injected again over 30 minutes, and the intravesical pressure was measured to be used as a pre-drug administration value. The test compound (Compound 1) was suspended in 0.5 w/v% aqueous methyl cellulose at a concentration of 1 mg/mL. This suspension was further diluted with 0.5 w/v% aqueous methyl cellulose to prepare a suspension or solution for the administration at the intended concentration, and orally administered at a volume of 1 mL/kg. The period of 1, 3 or 5 hours after the administration was used as the measuring time after the administration of the solvent or the drug tested, and the intravesical injection of physiological saline was carried out during a duration of 15 minutes around each measuring time (45 to 75 minutes, 165 to 195 minutes and 285 to 315 minutes after the administration of the drug).

Micturition contraction was measured as the index of normal voiding function, and pre-micturition contraction as the index of detrusor hyperreflexia. The average of all micturition contraction values observed during each of the 30 minutes-measuring periods and the average of maximum

WO 02/078523

PCT/US02/09577

pre-micturition contraction values observed during each micturition contraction period were respectively defined as the size of micturition contraction and pre-micturition contraction at each period. In this case, both of the contraction values were read out from the intravesical pressure wave form recorded on the chart paper, using a digitizer (KD3220; Graphtech) controlled by a computer (PC-9801NS/R; manufactured by NEC), and stored as a WJ2 type file on Lotus 1-2-3 R2.5J (manufactured by Lotus). The WJ2 file was put in Excel for Windows version 7.0 (manufactured by Microsoft). Sizes of pre-micturition contraction and micturition contraction were converted to relative values when the values before the drug administration was defined as 100, and average  $\pm$  standard error was calculated for each group.

The results for Compound 1 are shown in Table 8 on the value (%) of pre-micturition contraction after the administration of the solvent or agent, and in Table 9 on the value (%) of micturition contraction.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Table 8

Control	Compound 1 (mg/kg, p.o.)		
	0.001	0.01	0.1
Before administration	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
After 1 hour	115.0 ± 12.1	83.5 ± 6.8	59.6 ± 8.1*
After 3 hours	128.4 ± 21.5	95.4 ± 12.0	51.2 ± 6.7*
After 5 hours	120.2 ± 24.5	105.5 ± 20.8	42.2 ± 7.2*

\*: p&lt;0.05 (comparison with the control group)

(n = 5-6; Dunnett's test)

Table 9

Control	Compound 1 (mg/kg, p.o.)		
	0.001	0.01	0.1
Before administration	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
After 1 hour	97.5 ± 5.9	106.5 ± 11.3	114.4 ± 9.5
After 3 hours	99.3 ± 4.8	101.7 ± 9.5	117.6 ± 13.9
After 5 hours	94.2 ± 6.5	103.1 ± 6.5	117.6 ± 12.7

According to the results shown in Test Example 3, Compound 1 inhibited pre-micturition contraction (detrusor overactivity) in spinal cord-injured rats, but had no influence on micturition (physiological) contraction.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

**Test Example 4: Activity of inhibiting detrusor instability**

The test was carried out in accordance with the method of Malmgren et al. (*J. Urol.*, 142: 1134-1138 (1989)).

Female SD rats of 8 to 10 weeks of age (supplied by Japan SLC) were used in the test. Five to seven animals of these rats were put in each metal cage and reared by allowing them to freely take commercially available solid chow and water, in a rearing room at a room temperature of from 19 to 25°C and a humidity of from 30 to 70% under illumination for 12 hours (from 7 a.m. to 7 p.m.) per day.

Partial urethra obstruction was induced in rats. Each rat was anesthetized by intraperitoneal administration of 50 mg/kg of pentobarbital sodium (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) and the skin and muscle of the abdominal side were cut by midline incision. A polyethylene tube (PE-20; Becton Dickinson) was inserted into urethra. The urethra base was peeled and double-ligated, and then the polyethylene tube was pulled out to induce partial obstruction of the urethra. The incised part was sutured with a surgical silk thread. The antibiotic ampicillin (manufactured by Sigma, 150 mg/kg) was intramuscularly injected.

Six weeks after the urethra obstruction operation, each rat with hypertrophic bladder was subjected to bladder catheter operation. The bladder was exposed by midline incision of the abdomen under pentobarbital sodium

WO 02/078523

PCT/US02/09577

anesthesia. A polyethylene tube (PE-50; Becton Dickinson) having a blunt end to protect tissues from injury was filled with physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Industries, Tokushima, Japan) and inserted from the bladder top. This bladder catheter was fixed with a surgical silk thread and indwelled. The other end was exposed subcutaneously from the back neck, plugged and then fixed to the skin with the surgical silk thread.

Four to six days after the bladder catheter operation, a cystometry test was carried out. The rat was put in a Ballman cage (Natsume Seisakusho), a three way cock was connected to the bladder catheter, one end of the cock was connected to a pressure transducer (Nihon Kohden) and the other end was connected to a 50 mL capacity syringe (Terumo) arranged to an infusion pump (Harvard Apparatus) for physiological saline injection. The intravesical pressure signal from the pressure transducer was amplified by a strain pressure amplifier (AP-601G; Nihon Kohden) connected thereto and recorded on a thermal array recorder (RTA-1200; Nihon Kohden) via a polygraph system (RPM-6008; Nihon Kohden) contained therein. Sixty to ninety minutes after the completion of the preparation, physiological saline kept at room temperature was continuously injected into the bladder at a flow rate of 10 mL/h until the completion of the test, and the occurrence of micturition contraction and pre-urination contraction were confirmed.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Charts for 30 minutes after 3 hours from the commencement of the physiological saline injection were used as the values before the drug administration. The test compound was suspended in 0.5 w/v% aqueous methyl cellulose at a concentration of 1 mg/mL. This suspension was further diluted with 0.5 w/v% aqueous methyl cellulose to prepare a suspension or solution for the administration at the intended concentration. This was orally administered at a volume of 1 mL/kg. The period of 1, 3 or 5 hours after the administration was used as the measuring time after the administration of the drug tested, and a duration of 15 minutes around each measuring time (45 to 75 minutes, 165 to 195 minutes and 285 to 315 minutes after the administration of the drug) was used as the measuring period.

Micturition contraction was measured as the index of normal voiding function, and pre-micturition contraction as the index of detrusor instability. The average of all micturition contraction values observed during each of the 30 minutes-measuring periods and the average of maximum pre-micturition contraction values observed during each micturition contraction period were respectively defined as the size of micturition contraction and pre-micturition contraction at each period. In this case, both of the contraction values were read out from the intravesical pressure wave form recorded on the chart paper, using a

WO 02/078523

PCT/US02/09577

digitizer (KD3220; Graphtech) controlled by a computer (PC-9801NS/R; manufactured by NEC), and stored as a WJ2 type file on Lotus 1-2-3 R2.5J (manufactured by Lotus). The WJ2 file was put in Excel for Windows version 7.0 (manufactured by Microsoft). Sizes of pre-micturition contraction and micturition contraction were converted to relative values when the values before the drug administration was defined as 100, and average  $\pm$  standard error was calculated for each group.

Table 10 shows the value (%) of pre-micturition contraction after the administration of the solvent or Compound 1, and Table 11 shows the value (%) of micturition contraction after the administration of the solvent or Compound 1.

Table 10

		Compound 1 (mg/kg, p.o.)		
		0.001	0.01	0.1
Control				
Before administration	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
After 1 hour	105.5 $\pm$ 6.5	105.9 $\pm$ 7.8	59.5 $\pm$ 4.1***	55.8 $\pm$ 8.2***
After 3 hours	109.4 $\pm$ 14.8	100.3 $\pm$ 10.0	69.5 $\pm$ 4.4*	66.2 $\pm$ 4.7*
After 5 hours	103.3 $\pm$ 3.6	104.2 $\pm$ 10.2	67.8 $\pm$ 5.5**	69.2 $\pm$ 7.4**

\*: p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 (comparison with the control group)

(n = 5-6, Dunnett's test)

Table 11

	Compound 1 (mg/kg, p.o.)		
	Control	0.001	0.01
Before administration	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
After 1 hour	102.5 ± 3.5	99.3 ± 2.3	99.6 ± 1.2
After 3 hours	104.4 ± 5.1	101.5 ± 3.3	92.6 ± 3.2
After 5 hours	96.6 ± 3.2	98.7 ± 5.2	90.1 ± 4.3
			100.1 ± 8.6

According to the results shown in Test Example 4, Compound 1 had no influence on micturition contraction which is the contraction at micturition in rats with hypertrophic bladder (no influence on normal voiding), but inhibited pre-micturition contraction which is irregular, detrusor instability at the time other than normal voiding.

Test Examples 3 and 4 show that the compound used in the present invention inhibits the pre-urination contraction (detrusor overactivity) and are useful as an agent for the treatment of overactive bladder. Thus, it is considered that the compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof is useful as an agent for the treatment of overactive bladder.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

**Test Example 5: Acute toxicity test:**

The test compound was administered orally or intraperitoneally to 3 animals per group of dd male mice (body weight, 20 ± 1 g). Minimum lethal dose (MLD) value was obtained by observing mortality on the 7th day after the administration.

As a result, MLD of Compound 1 was >1,000 mg/kg by oral administration.

Based on the results of Test Examples 1 to 5, the compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof is useful as an agent for the treatment of overactive bladder.

The compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof can be used as it is or in various dose forms. Pharmaceutical compositions of the present invention can be produced by uniformly mixing an effective amount of the compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient with a pharmacologically acceptable carrier. It is preferred that these pharmaceutical compositions are in a unit dose form suitable for oral or parenteral (including intravenous) administration or the like.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

In preparing a composition in the oral dose form, certain useful pharmacologically acceptable carriers can be used. For example, oral liquid preparations such as suspensions or syrups can be produced using water; saccharides, such as sucrose, sorbitol, fructose, or the like; glycols, such as polyethylene glycol, propylene glycol, or the like; oils, such as sesame oil, olive oil, soybean oil, or the like; antiseptics, such as p-hydroxybenzoic acid esters or the like; flavors, such as strawberry flavor, peppermint, or the like; or the like. Capsules, tablets, powders and granules can be produced using fillers, such as lactose, glucose, sucrose, mannitol, or the like; disintegrators, such as starch, sodium alginate, or the like; lubricants, such as magnesium stearate, talc, or the like; binders, such as polyvinyl alcohol, hydroxypropylcellulose, gelatin, or the like; surfactants, such as fatty acid esters or the like; plasticizers, such as glycerine or the like; or the like. Tablets and capsules are the most useful unit oral administration preparations because of their easy administration. In producing tablets or capsules, solid pharmaceutical carriers are used.

In addition, injections can be prepared using a carrier comprising distilled water, a salt solution, a glucose solution or a mixture of salt water and a glucose solution. In this case, they are prepared as solutions,

WO 02/078523

PCT/US02/09577

suspensions or dispersions using suitable auxiliaries in the conventional way.

The compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof can be administered orally in the above dose forms or parenterally as injections, and, although its effective dose and administration frequency may vary depending, for example, on the dose form, the age and body weight of each patient, and symptoms of the disease, from 1 to 900 mg/60 kg/day, preferably from 1 to 200 mg/60 kg/day, is suitable.

The embodiments of the present invention are described below based on Examples.

#### BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

##### Example 1: Tablets

Tablets having the following composition were prepared in the conventional way.

Compound 1 (250 g) was mixed with 1598.5 g of mannitol, 100 g of sodium starch glycollate, 10 g of light anhydrous silicic acid, 40 g of magnesium stearate and 1.5 g of yellow ferric oxide in the conventional way. The resulting mixture was applied to a tablet making machine having a punch and die of 8 mm in diameter (Purepress Correct-12, manufactured by Kikusui) to obtain tablets (containing 25 mg of the active component per one tablet).

- 30 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

The prescription is shown in Table 12.

Table 12

Prescription	Compound 1	25 mg
	Mannitol	159.85 mg
	Sodium starch glycollate	10 mg
	Light anhydrous silicic acid	1 mg
	Magnesium stearate	4 mg
	Yellow ferric oxide	0.15 mg
		200 mg

**Example 2: Capsules**

Capsules having the following composition were prepared in the conventional way.

Compound 1 (500 g) was mixed with 300 g of lactose, 100 g of light anhydrous silicic acid and 100 g of sodium lauryl sulfate in the conventional way. The resulting mixture was packed in hard capsules No. 1 (100 mg per one capsule) using an encapsulation machine (LZ-64, manufactured by Zanasi) to obtain capsules (containing 50 mg of the active component per one capsule).

The prescription is shown in Table 13.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Table 13

Prescription	Compound 1	50 mg
	Lactose	30 mg
	Light anhydrous silicic acid	10 mg
	Sodium lauryl sulfate	10 mg
		100 mg

## Example 3: Injections

Injections having the following composition are prepared in the conventional way.

Compound 1 (1 g) is dissolved in 100 g of purified soybean oil, and 12 g of purified yolk lecithin and 25 g of glycerol for injection are added thereto. The resulting mixture is kneaded with distilled water for injection (total: 1,000 mL) and emulsified therein in the conventional way. The obtained dispersion is aseptically filtered using a 0.2  $\mu$ m disposable membrane filter and then aseptically dispensed into glass vials in 2 ml portions to obtain injections (containing 2 mg of the active component per one vial).

The prescription is shown in Table 14.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

Table 14

Prescription	Compound 1	2 mg
	Purified soybean oil	200 mg
	Purified yolk lecithin	24 mg
	Glycerol for injection	50 mg
	Distilled water for injection	1.72 ml
		2.00 ml

## INDUSTRIAL APPLICABILITY

The present invention provides an agent for the treatment of overactive bladder, comprising, as an active ingredient, a compound having a slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a method for screening agents for the treatment of overactive bladder, comprising measuring a slowly-inactivating A-type  $K^+$  channel opening activity as an index.

WO 02/078523

PCT/US02/09577

## CLAIMS

1. An agent for the treatment of overactive bladder, comprising, as an active ingredient, a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
2. The agent for the treatment of overactive bladder according to claim 1, wherein the compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity is N-(5,5-dioxido-10-oxo-4,10-dihydrothieno[3,2-c][1]benzothiepin-9-yl)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropanamide.
3. A method for the treatment of overactive bladder, which comprises administering a therapeutically effective amount of a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
4. Use of a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity, or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the manufacture of the agent for the treatment of overactive bladder.

- 34 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/078523

PCT/US02/09577

5. A method for screening agents for the treatment of overactive bladder, comprising measuring a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity as an index.

- 35 -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/078523 A3(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: A61K 31/38

Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagazumi-cho, Saitama, 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/09577

(22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/279,698 30 March 2001 (30.03.2001) US

(71) Applicants (for all designated States except US): KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. [JP/JP]; 6-1, Otemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 (JP). UNIVERSITY OF PITTSBURGH [US/US]; 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YAMAGATA, Tsuyoshi [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagazumi-cho, Saitama, 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

ATSUKI, Kaoru [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagazumi-cho, Saitama, 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

OHNO, Tetsuji [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagazumi-cho, Saitama, 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

SHIRAKURA, Shiro [JP/JP]; c/o Pharmaceutical Research Institute, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 1188, Shimotogari, Nagazumi-cho, Saitama, 350 Thackeray Hall, Pittsburgh, PA 15260 (US).

DEGROAT, William, C. [US/US]; 6357 Bunchfield Avenue, Pittsburgh, PA 15217 (US).

SCULPOREANU, Adrian [US/US]; 219 Halset Street, Third Floor, Pittsburgh, PA 15213 (US).

KARASAWA, Akira [JP/JP]; c/o

(74) Agents: PERRY, Lawrence, S. et al.; Fitzpatrick, Cella, Harper &amp; Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ME, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TZ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:

24 July 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/078523 A3

(54) Title: AGENT FOR THE TREATMENT OF OVERACTIVE BLADDER

(55) Abstract: The present invention provides an agent for the treatment of overactive bladder, comprising, as an active ingredient, a compound having a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a method for screening agents for the treatment of overactive bladder, comprising measuring a slowly-inactivating A-type K<sup>+</sup> channel opening activity as an index.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09577
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A 61 K 31/38 US CL : 514/431		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/431		
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) STN (registry structure search, embase, biosis, medline, capsus and usapfull)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P -- Y,P	US 6,211,227 B1 (YOSHIDA et al.) 03 April 2001(22.10.1998), whole document.	1-4 -- 5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>*C* 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)</p> <p>*D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>Date of the actual completion of the international search 30 July 2002 (30.07.2002)</p> <p>Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20331 Facsimile No. (703)305-3230</p>		<p>Date of mailing of the international search report <b>17 JUN 2003</b></p> <p>Author/Examiner Minna Moenie <i>Minna Moenie</i> Telephone No. (703)308-1235</p>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100115107

弁理士 高松 猛

(74)代理人 100090343

弁理士 濱田 百合子

(72)発明者 山形 強

静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内

(72)発明者 厚喜 薫

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵工業株式会社内

(72)発明者 大野 哲司

静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内

(72)発明者 白倉 史郎

静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内

(72)発明者 デグロート, ウィリアム, シー

アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 15217, ピッツバーグ, パーチフィールド アベニュー  
6357

(72)発明者 スカルポレアヌ, エイドリアン

アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 15213, ピッツバーグ, ハルケット ストリート 21  
9, サード フロア

(72)発明者 吉村 直樹

アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 15206, ピッツバーグ, ジャクソン ストリート 64  
90

(72)発明者 唐沢 啓

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵工業株式会社内

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA811

4C086 AA01 CA04 MA01 MA04 NA14 ZA81