

(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2009-518415

(P2009-518415A)

(43) 公表日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 31/519</b> (2006.01)	A 61 K 31/519	4C050
<b>A61P 9/12</b> (2006.01)	A 61 P 9/12	4C084
<b>A61P 3/10</b> (2006.01)	A 61 P 3/10	4C086
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	
<b>A61P 7/06</b> (2006.01)	A 61 P 7/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-544453 (P2008-544453)	(71) 出願人	506136483 バイオマリン ファーマシューティカル インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 949 ノバト ディジタル ドライブ 105
(86) (22) 出願日	平成18年12月5日 (2006.12.5)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成20年7月31日 (2008.7.31)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/046449	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02007/067570		
(87) 國際公開日	平成19年6月14日 (2007.6.14)		
(31) 優先権主張番号	60/742,578		
(32) 優先日	平成17年12月5日 (2005.12.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/764,979		
(32) 優先日	平成18年2月3日 (2006.2.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/817,847		
(32) 優先日	平成18年6月30日 (2006.6.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】疾患の処置のための方法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、糖尿病に関連する血管合併症、高脂血症、ならびにそれに限定されるものではないが、難治性高血圧、冠動脈疾患、肺動脈高血圧、うっ血性心不全、および溶血性貧血を含む様々な心血管障害の治療的介入のための新規な方法および組成物に関する。より具体的には、本明細書は、B H 4 およびその誘導体を含む組成物を使用してこのような血管障害を治療するための方法および組成物を記載する。B H 4 および他の治療レジメンの併用療法が意図される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

内皮機能不全を治療する方法であって、該内皮機能不全を治療するのに有効な量の(6R)-テトラヒドロビオブテリン(BH4)を、それを必要としているヒトに投与するステップを含む方法。

**【請求項 2】**

前記内皮機能不全が高血圧である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ヒトが2型糖尿病に罹患している、請求項1または請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記投与が経口で行われる、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

治療有効量が、1日当たり3mg/kg超～約15mg/kgの範囲である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

治療有効量が、1日当たり3mg/kg超～約10mg/kgの範囲である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記BH4が、1日当たり総用量約5mg/kgで経口投与される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記BH4が、1日当たり総用量約10mg/kgで経口投与される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記BH4が、1日当たり総用量約400mgで経口投与される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記BH4が1日2回投与される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記ヒトにBH4以外の治療薬を投与することをさらに含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記治療薬がPDE5阻害剤を含む、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記PDE5阻害剤が、シルデナフィル、シルデナフィルの医薬として許容可能な塩、シルデナフィルの溶媒和物、タダラフィル、タダラフィルの医薬として許容可能な塩、タダラフィルの溶媒和物、バルデナフィル、バルデナフィルの医薬として許容可能な塩、バルデナフィルの溶媒和物、ウデナフィル、ウデナフィルの医薬として許容可能な塩、ウデナフィルの溶媒和物、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記PDE5阻害剤が、シルデナフィルまたはその医薬として許容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 15】**

鎌状赤血球症を治療する方法であって、該鎌状赤血球症を治療するのに有効な量の(6R)-テトラヒドロビオブテリン(BH4)を、それを必要としているヒトに投与するステップを含む方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

10

20

30

40

50

**(関連出願)**

本出願は、2005年12月5日に出願された米国仮特許出願番号第60/742,578、2006年2月3日に出願された米国仮特許出願番号第60/764,979、および2006年6月30日に出願された米国仮特許出願番号第60/817,847の優先権を主張し、これらの各々は本明細書中に参考として援用される。

**【0002】****(発明の分野)**

本発明は一般に、血管疾患の治療的介入を対象とする。より具体的には本発明は、血管機能不全に関連する内皮機能不全を治療するための方法および組成物を対象とする。

**【背景技術】****【0003】**

糖尿病およびその心血管系合併症は、米国および西欧諸国の死亡および罹患の主な原因となっている。幾つかの原因因子は、疾患への遺伝的素因、性別、喫煙および食事などの生活習慣の要因、年齢、インスリン耐性、高血圧、ならびに高コレステロール血症を含む高脂血症を含むこれらの疾患の発症に関連しているとされる。

**【0004】**

糖尿病および関連の心疾患の治療選択肢には、コレステロール低下薬（例えばスタチン）、血管作用剤（例えばPPARリガンド、プロッカー）、ACE阻害剤、アンギオテンシンIIレセプタープロッカー、カルシウムチャネルプロッcker、ビタミン、および抗酸化物質（例えばナイアシン、アスコルビン酸、またはビタミンC）などの様々な治療剤が含まれる。血漿コレステロールを低下するためにスタチン薬物を使用するという論理的根拠は、重篤ではない閉塞を有する個体に冠状動脈の心臓発作が一般に発症する理由、および閉塞が毛細血管または静脈に発症しない理由に説明をつけることができない。スタチン薬物を使用する場合、該薬物は、肝動脈イベント再発の危険性を30～40%しか低減しない。血管作用薬を使用する論理的根拠は、血管および/または心臓平滑筋に直接的または間接的に作用することによって血圧を低下し、それによって血管の流れ抵抗を抑えることにある。但しかかる薬物は、高血圧および異常血流の一次的原因を治療するものではなく、該障害の結果として生じる作用を低減しようとするものである。かかる薬物は、圧受容器反射によって交感神経系を活性化して、有益なまたは望ましい効果ではない心拍および心筋収縮の増大をもたらす。ビタミンE、ビタミンC、プロブコール、およびカロテンは、近年糖尿病の治療に適用されている抗酸化物質の多くを構成している。しかしながら、これらの薬剤が単独でまたは他の薬剤と組み合わせて投与される場合には、いずれも細胞（即ち、皮膚または内皮）機能不全および他の酸化ストレス媒介性病理に適切に対処することができない。近年利用可能な全ての抗酸化物質は、それらの作用「機序」、組織内取込み、および関連する他の特徴が理由となり、内皮由来の弛緩因子代謝物質および作用に間接的にしか影響を与えることができず、特定の活性酸素種（ROS）にのみ作用する。さらにそれらは、誤って服用されると疾患の経過に悪影響を及ぼす恐れがある。

**【0005】**

さらに、かかる障害に対する現在の治療は短期的であり、長期的有効性に対して深刻な欠点を有している。糖尿病、ならびに関連する心臓の中枢および末梢血管系の急性および慢性閉鎖性血管疾患への治療薬の使用は、今までに長期的な好ましい結果に関して効果が無く、根本的な病態生理を治療せず、血管の構造および機能も正常状態には修復していない。

**【0006】**

治療剤のそれぞれは、患者に対していくらか有益な効果を有する一方、深刻な副作用があり、しばしば非生理学的投与量で摂取される必要がある。副作用は、しばしば用量関連性のものである。上記クラスの治療剤に関する副作用には、低血糖、腎機能不全、および横紋筋融解症を含むミオパシー、肝毒性、気道抵抗、ならびに妊婦によって摂取された場合の催奇形作用が含まれる。かかる薬物に関する他の副作用には、頭痛、心臓の動悸、不

10

20

30

40

50

安症、軽度鬱病、心筋梗塞、うっ血性心不全、倦怠感、および衰弱が含まれる。さらに薬理量では、疾患活動分子による一次的な原因に対するその作用に特効がなく、該疾患において治療できる作用が限られており、それらは幾つかの因子に依存して決まる。幾つかの場合、副作用は、紅潮および消化不良のように簡単なものであり得るが、治療レジメンへの患者の順守の深刻な欠如をもたらす恐れがある。薬物の副作用を相殺するために、様々な併用療法が治療選択肢として提案されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、重篤な副作用を生じることなく血管疾患の根本にある内皮機能不全を管理するための、一貫して有効な特異的薬剤が依然として必要とされている。本発明は、このような必要性に対処することを対象とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

(要旨)

一般に本発明は、血管疾患を生じる内皮機能不全の治療的介入を記載するものである。本発明は、内皮機能不全を特徴とする疾患または障害を有する対象を治療するための方法および組成物を企図し、その方法は、テトラヒドロビオブテリン (B H 4) またはその前駆体もしくは誘導体を含む組成物を単独で、または治療剤と組み合わせて対象に投与することを含み、前記投与は、前記 B H 4 含有組成物なしの前記内皮機能不全と比較して、前記対象の内皮機能不全を緩和するのに効果がある。本発明はさらに、内皮機能不全の対象を治療する方法を企図し、その方法は、血管拡張剤としての一酸化窒素 (N O) の生成を増大する因子または因子の組合せを単独で、または治療剤と組み合わせて投与することを含む。

20

【0009】

一態様では、本発明は、糖尿病関連血管合併症を有すると診断された対象を治療する方法を提供し、その方法は、B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体を単独で、または血管拡張剤としての一酸化窒素 (N O) の生成を増大する治療剤もしくは因子であるもう1つの薬剤と組み合わせて投与することを含む。

30

【0010】

一実施形態では、糖尿病関連血管合併症には、それに限定されるものではないが、異常血管コンプライアンス、内皮機能不全、および高血圧などの一般的血管機能の障害、難治性高血圧、ならびにインスリン感受性およびグルコース制御の障害が含まれる。別の実施形態では、糖尿病関連血管合併症には、それに限定されるものではないが間欠性跛行、末梢循環低下、皮膚血流低下、および創傷治癒欠陥などの異常末梢循環が含まれる。さらなる一実施形態では、糖尿病関連血管合併症には、それに限定されるものではないがうっ血性心不全、うっ血性心不全を伴うまたは伴わない肺高血圧症、運動関連狭心症、冠動脈疾患、および関連のアテローム性動脈硬化症などの心疾患；視神経萎縮および糖尿病性網膜疾患などの眼疾患；ならびに糖尿病性腎疾患の微量アルブミン尿、腎不全、および糸球体濾過量低下などの腎疾患が含まれる。

40

【0011】

関連の一実施形態では、治療剤は、それに限定されるものではないが P P A R リガンド (チアゾリジンドン、グリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン (Avandia) )、ピオグリタゾン) などのインスリン感受性を改善する薬剤、スルホニル尿素 (グリキドン、トルブタミド、グリメプリド、クロルプロパミド、グリピザイド、グリブリド、アセトヘキサミド) およびメグリチニド類 (メグリチニド、レパグリニド、ナテグリニド) などのインスリン分泌刺激薬、ならびにメトホルミンなどの肝臓のグルコース生成を低減する薬剤を含む、糖尿病を治療するために使用される薬剤である。

【0012】

第2の態様では、本発明は、糖尿病に関連しない血管疾患を有すると診断された対象を

50

治療する方法を提供し、その方法は、B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体を単独で、または血管拡張剤としての一酸化窒素（N O）の生成を増大する治療剤もしくは因子であるもう1つの薬剤と組み合わせて投与することを含む。かかる糖尿病に関連しない血管疾患は、肺血管疾患、溶血性貧血、卒中および関連の虚血性血管疾患（卒中、心疾患または冠状動脈疾患、動脈硬化症、または末梢血管疾患など）、血栓症、移植関連内皮機能不全、ならびに心疾患または冠状動脈疾患からなる群から選択される。一実施形態では、肺血管疾患には、それに限定されるものではないが、鎌状赤血球貧血および他の異常血色素症における肺圧、特発性肺高血圧、新生児の持続性肺高血圧（P P H N）が含まれる。さらなる一実施形態では、溶血性貧血には、遺伝性溶血性貧血および後天性溶血性貧血が含まれる。遺伝性溶血性貧血には、それに限定されるものではないが、鎌状赤血球貧血、サラセミア、G 6 P D 欠乏による溶血性貧血、ピルビン酸キナーゼ欠乏、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性球状赤血球症、遺伝性有口赤血球症、遺伝性卵形赤血球症、発作性夜間血色素尿症、およびヘモグロビン S C 疾患が含まれる。後天性溶血性貧血には、それに限定されるものではないが、微小血管症性溶血性貧血、特発性自己免疫性溶血性貧血、化学的または物理的薬剤または装置（左心補助循環装置）、機械弁およびバイパス装置）によって生じる非免疫性溶血性貧血、および二次免疫性溶血性貧血が含まれる。

10

20

30

40

#### 【0013】

別の実施形態では、卒中および関連の虚血性血管疾患には、それに限定されるものではないが脳卒中後の脳血管痙攣などの血管痙攣が含まれる。血栓症には、それに限定されるものではないが血管形成、血栓症、血餅形成、および凝血が含まれる。さらなる一実施形態では、移植関連内皮機能不全には、それに限定されるものではないが固形臓器移植後の血管機能不全およびシクロスボリン A 誘発性内皮機能不全が含まれる。さらに別の実施形態では、心疾患または冠状動脈疾患には、それに限定されるものではないが高コレステロール血症に関連するうっ血性心不全、血管機能不全、および狭心症、ならびに喫煙に関連する血管機能不全および狭心症が含まれる。

20

30

40

#### 【0014】

関連の一実施形態では、治療剤は、それに限定されるものではないが、ボセンタン、ダルセンタン、エンラセンタン、テゾセンタン、アトラセンタン、アンブリセンタンシタクスセンタンなどの、高血圧および他の内皮機能不全関連障害を治療するために一般に使用されるエンドセリンレセプター-アンタゴニスト；P D E 5 阻害剤（間接作用型）およびミノキシジル（直接作用型）などの平滑筋弛緩薬；カブトプリル、エナラプリル、リシノプリル、フォシノプリル、ペリンドプリル、キナプリル、トランドラブリル、ベナゼブリル、ラミブリルなどのアンギオテンシン変換酵素（A C E）阻害剤；イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタン、エプロサルタン、オルメサルタン、カンデサルタン、テルミサルタンなどのアンギオテンシン I I レセプター-ブロッカー；アテノロール、メトプロロール、ナドロール、ビソプロロール、ピンドロール、アセブトロール、ベタキソロール、プロプラノロールなどのブロッカー；ヒドロクロロチアジド、フロセミド、トルセミド、メトラゾンなどの利尿薬；アムロジピン、フェロジピン、ニソルジピン、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムなどのカルシウムチャネルブロッカー；レセプター-ブロッカードキサゾシン、テラゾシン、アルフゾシン、タムスロシン；ならびにクロニジンなどの中枢アゴニストを含む、血管疾患を治療するために使用される薬剤である。

30

40

#### 【0015】

一実施形態では、B H 4 またはB H 4 の前駆体もしくは誘導体とP D E 5 阻害剤との組合せは、血管圧パラメータ（複数）に予想外に有益な効果をもたらす。したがってB H 4 または前駆体もしくは誘導体は、かかる薬物の副作用を軽減すること、例えば血圧上昇を軽減することが期待される。

40

#### 【0016】

関連の一態様では、本発明は、精製 6 R B H 4 の量を1日に少なくとも2 0 0 m g（例えば、1 0 0 m g を1日に2回与える）、または1日に少なくとも1 5 0 m g、または1日に少なくとも1 0 0 m g の用量で高血圧に罹患しているヒトに投与することによって

50

、ヒトの高血圧を治療する方法を提供する。かかる例示的実施形態では、B H 4 の用量範囲は1日に500mg未満、または1日に400mg未満、または1日に300mg未満であってもよい。一実施形態では、B H 4 は、少なくとも1日に5mg/kgもしくは少なくとも1日に10mg/kgまたは1日に最大20mg/kgもしくは1日に最大30mg/kgの1日当たりの用量で投与される。B H 4 は単独で、または前記もしくは下記のいずれかなどの血管疾患もしくは高脂血症を治療するために使用される他の治療剤と組み合わせて投与することができる。

#### 【0017】

第3の態様では、本発明は、高脂血症を有すると診断された対象を治療する方法を提供し、その方法は、B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体を単独で、または血管拡張剤としての一酸化窒素(NO)の生成を増大する治療剤もしくは因子であるもう1つの薬剤と組み合わせて投与することを含む。関連の一実施形態では、治療剤は、それに限定されるものではないがスタチン(アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンカルシウム、シンバスタチン)およびニコチン酸などのLDLを低下する薬剤、コレステリルエステル転送タンパク質阻害剤(トルセトラピブなど)、フィブラーート、ゲムフィブロジル、フェノフィブラーート、ベザフィブラーート、シプロフィブラーートなどのPPARを刺激する薬剤、胆汁酸抑制剤、コレステチラミン、およびコレステポールなどの、胆汁酸と結合しその再吸着を防止し、コレステロール濃度を低下する薬剤、ならびにコレステロール吸収阻害剤を含む高脂血症を治療するために使用される薬剤である。B H 4 または前駆体もしくは誘導体は、かかる薬剤との組合せで投与することができ(スタチン/コレステリルエステル転送タンパク質阻害剤の組合せなど)、血圧上昇に関係する副作用を軽減することができる。

10

20

30

30

40

#### 【0018】

第4の態様では、本発明は、内皮機能不全を有する対象を治療する方法をさらに企図し、その方法は、血管拡張剤としての一酸化窒素(NO)の生成を増大するまたは正常化する因子または因子の組合せを単独で、または治療剤と組み合わせて投与することを含む。一実施形態では、かかる因子(複数)は、B H 4 のデノボ生合成の活性または発現を増大し、グアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼI(GTPCH1)、6-ピルボイルテトラヒドロプロテリンシンターゼ(PTPS)、およびセピアブテリン還元酵素からなる群から選択される。本発明の好ましい一実施形態では、B H 4 合成は、任意の1つまたは複数の環状アデノシン一リン酸(cAMP)類似体またはアゴニスト、例えばホルスコリン、8-ブロモcAMP、またはcAMP媒介性の細胞シグナリングを増大するように機能する他の薬剤、例えばインターロイキン-1、インターフェロン-(IFN-)、腫瘍壊死因子(TNF-)、c反応性タンパク質、HMG-CoA還元酵素(アトルバスタチンなどのスタチン)神経成長因子(NGF)、上皮成長因子(EGF)を含むサイトカインおよび成長因子、アドレノメデュリンおよび安息香酸エストラジオールを含むホルモン、ならびにNADPHおよびNADPH類似体、カフェイン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを含むシクロスボリンAメチルキサンチン、テオフィリン、レセルピン、過酸化水素などの他の化合物を使用してGTPCH1発現の発現を増大することによって高まる。

40

#### 【0019】

したがって本発明の一実施形態は、PDE1、PDE3、PDE5を含む11のホスホジエステラーゼファミリー(PDE1~11)の阻害剤を使用して3',5'-環状ヌクレオチドの分解を抑制することによって、GTPCH1レベルを増大することに関する。本発明のPDE阻害剤には、バイアグラ(Viagra)/シルダネフィル(sildenafil)、シアリス(cialis)/タダラフィル(tadalafil)、バルデナフィル(vardenafil)/レビトラ(levitra)、ウデナフィル(udenafil)、8-メトキシメチル-IBMX、UK-90234、デキサメタゾン、ヘスペレチン、ヘスペレジン、イルソグラジン、ビンポセチン、シロスタミド、ロリプラム、エチル-カルボリン-3-カルボン酸塩(-CCe)、テトラヒドロ-カル

50

ボリン誘導体、3-O-メチルケルセチン等が含まれる。

【0020】

本発明の別の実施形態は、B H 4 の合成機構のポリヌクレオチドの遺伝子治療または内皮標的送達によってB H 4 合成酵素レベルを増大することによって、B H 4 レベルを増大することに関する。本発明のさらに別の実施形態は、B H 4 合成酵素G T P C H 1、P T P S、S R、P C D、D H P R、およびD H F R を補給することによって、B H 4 レベルを増大することに関する。B H 4 合成酵素は、タンパク質の変異体を含む酵素の天然および非天然形態の全てを包含することを企図される。

【0021】

本発明の別の実施形態は、A P 活性を抑制することによって、アルカリフォスファターゼ(A P )の代わりに基質7,8-ジヒドロネオブテリン三リン酸をB H 4 合成酵素P T P Sに転換することによりB H 4 レベルを増大することに関する。A P 活性を抑制する薬剤または化合物には、リン酸類似体、レバミゾール、およびL - P h e が含まれる。本発明の別の実施形態は、アルカリフォスファターゼの合成を抑制するための低分子阻害性R N A (s i R N A )、アンチセンスR N A 、d s D N A 、小分子、中和抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および抗体フラグメントを含む、アルカリフォスファターゼを抑制する薬剤または化合物に関する。

【0022】

本発明の別の実施形態には、B H 4 合成のデノボ合成経路の酵素合成のために必要な触媒または補因子の活性を増大する薬剤または化合物が含まれる。

【0023】

本発明の別の実施形態には、B H 4 の合成に必要な酵素の分解を防止する薬剤または化合物が含まれる。本発明のさらに別の実施形態には、B H 4 の合成およびその合成酵素、例えばG T P C H 1、P T P S、およびS R に必要な触媒の分解を防止する薬剤または化合物が含まれる。

【0024】

本発明の別の実施形態は、サルベージ経路を介してB H 2 の還元を増大することによってB H 4 のレベルを高めることに関する。B H 4 は、I n v i v o でB H 2 に酸化する。キノイド形態(q B H 2 )および7,8-ジヒドロブテリンとして存在するB H 2 は、それぞれD H P R およびD H F R によってB H 4 に還元される。本発明の好ましい一実施形態は、N A D P H 、チオール、p - クロロメルクリ安息香酸、過酸化水素等を経路とする薬剤または化合物を使用して酵素P C D、D H P R 、およびD H F R の活性および合成を調整することによって、B H 2 からのB H 4 の再生成またはサルベージを増大することに関する。

【0025】

本発明の別の実施形態は、アスコルビン酸(ビタミンC)、トコフェロール(ビタミンE)、トコフェロール(例えばビタミンA)、セレン、カロテン、カロチノイド、フラボン、フラボノイド、葉酸塩、フラボン、フラバノン、イソフラボン、カテキン、アントシアニジン、およびカルコンを含む抗酸化物質などの薬剤または化合物を使用してB H 4 の酸化を低減することによって、B H 4 を安定化する薬剤に関する。

【0026】

さらなる一実施形態では、かかる因子(複数)は、一酸化窒素シンターゼの活性または発現を増大し、それによってN O の生成を増大することができる。

【0027】

さらに別の実施形態では、本発明は、G T P C H フィードバック調節タンパク質、G F R P を抑制する因子を企図する。本発明の好ましい一実施形態は、G T P C H 1 / G F R P 複合体へのB H 4 の結合を抑制し、それによってB H 4 によるフィードバック阻害を防止する薬剤または化合物に関する。本発明の薬剤または化合物には、複合体、構造類似体等に合わせて変えられた親和性を有するB H 4 の代替形態などの競合阻害剤が含まれる。さらに本発明の別の実施形態には、B H 4 の合成を誘発するC T P C H 1 / G F R P への

10

20

30

40

50

L - フェニルアラニンの結合を増大する薬剤または化合物が含まれる。本発明の別の実施形態には、L - フェニルアラニンの前駆体などのL - Ph e レベルを増大し、それによってG F R P およびB H 4 によるG T P C H 1 のフィードバック阻害を抑制する働きをする薬剤または化合物が含まれる。

## 【0028】

本発明のさらに別の実施形態は、G F R P の活性または合成を調整する薬剤または化合物に関する。本発明の好ましい一実施形態には、G F R P の活性を抑制する薬剤または化合物が含まれる。本発明の別の実施形態には、G F R P の合成を抑制するための、s i R N A 、小分子、抗体、抗体フラグメント等の使用が含まれる。

## 【0029】

本発明はさらに、グアノシン三リン酸、7 , 8 - ジヒドロ - ネオプテリン三リン酸、および6 - ピルボイルテトラヒドロビオプテリンを含むB H 4 の前駆体である薬剤または化合物を企図する。

## 【0030】

B H 4 は、1日に約0 . 1 m g / k g ~ 約30 m g / k g 、例えば約5 m g / k g ~ 10 m g / k g の量で投与される。B H 4 は、単回用量または多回用量で日々投与することができる。幾つかの実施形態では、B H 4 療法は連続的ではなく、B H 4 は、臨床的エンドポイントの改善（例えば、難治性高血圧の患者における正常血圧）が維持されるまで日々投与される。

## 【0031】

本発明のさらに別の態様では、B H 4 誘導体の投与は、やはり治療効果を達成する予想外の低用量で実施される。かかるB H 4 誘導体は、天然のB H 4 と比較して改善された生物学的特性を有することが企図される。一実施形態では、高血圧、血管疾患、または本明細書に記載の疾患のいずれかに合わせたB H 4 誘導体の有効量を、高フェニルアラニン血症などの他のB H 4 反応性障害の治療に合わせたB H 4 の通常用量未満にすることが企図される。特に本発明は、本明細書に記載の1' , 2' - ジアシル - (6 R , S ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - L - ビオプテリンまたは類脂質性テトラヒドロビオプテリンのいずれかが、改善された生物学的特性を低用量で示すことを企図する。

## 【0032】

また、室温で8時間を超えて安定なB H 4 の安定化結晶形態および医薬として許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤を含む組成物が企図される。投与されるB H 4 は、非結晶の安定化B H 4 よりも可溶性の高いB H 4 の安定化結晶形態であることが好ましい。より好ましくは、B H 4 の安定化結晶形態は、少なくとも99 . 5 % または99 . 9 % の純粋な6 R B H 4 を含む。ジヒドロビオプテリン(B H 2 )およびセピアプテリンなどの前駆体を投与することもできる。B H 4 は経口投与することができる。

## 【0033】

B H 4 は、筋肉内、皮下、または静脈内、肺内投与によってそれ単独で、またはそれに限定されるものではないが、恒常性を維持するために使用される薬剤および介入、アジュバント療法、ならびに特異的療法を含む内皮機能不全を治療するために近年使用されている他の治療剤もしくは介入と組み合わせて投与することができる。特異的療法には、それに限定されるものではないが、P P A R リガンド（チアゾリジンドン、グリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン（A v a n d i a ）、ピオグリタゾン）などのインスリン感受性を改善する薬剤、スルホニル尿素（グリキドン、トルブタミド、グリメブリド、クロルプロパミド、グリピザイド、グリブリド、アセトヘキサミド）およびメグリチニド類（メグリチニド、レパグリニド、ナテグリニド）などのインスリン分泌刺激薬、ならびにメトホルミンなどの肝臓のグルコース生成を低減する薬剤を含む、糖尿病を治療するために使用される薬剤が含まれ得る。特異的療法には、それに限定されるものではないが、ボセンタン、ダルセンタン、エンラセンタン、テゾセンタン、アトラセンタン、アンブリセンタンシタクスセンタンなどの、高血圧および他の内皮機能不全関連障害を治療するために一般に使用されるエンドセリンレセプターアンタゴニスト；P D E 5 阻害剤（間接作用

10

20

30

40

50

型) およびミノキシジル(直接作用型)などの平滑筋弛緩薬; カプトプリル、エナラプリル、リシノプリル、フォシノプリル、ペリンドプリル、キナプリル、トランドラプリル、ベナゼプリル、ラミプリルなどのアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤; イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタン、エプロサルタン、オルメサルタン、カンデサルタン、テルミサルタンなどのアンギオテンシンIIレセプターブロッカー; アテノロール、メトプロロール、ナドロール、ビソプロロール、ピンドロール、アセブトロール、ベタキソロール、プロプラノロールなどのブロッカー; ヒドロクロロチアジド、フロセミド、トルセミド、メトラゾンなどの利尿薬; アムロジピン、フェロジピン、ニソルジピン、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムなどのカルシウムチャネルブロッカー; レセプターブロッカードキサゾシン、テラゾシン、アルフゾシン、タムスロシン; ならびにクロニジンなどの中枢アゴニストを含む、血管疾患を治療するために使用される薬剤が含まれ得る。特異的療法には、それに限定されるものではないが、スタチン(アトバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンカルシウム、シンバスタチン)およびニコチン酸などのLDLを低下する薬剤、フィブロート、ゲムフィブロジル、フェノフィブロート、ベザフィブロート、シプロフィブロートなどのPPARを刺激する薬剤、胆汁酸抑制剤、コレステラミン、およびコレステチポールなどの、胆汁酸と結合しその再吸着を防止し、コレステロール濃度を低下する薬剤、ならびにコレステロール吸収阻害剤を含む高脂血症を治療するために使用される薬剤が含まれ得る。BH4および/またはNO生成の恒常性レベルを維持するために使用される薬剤には、グアノシン三リシン酸シクロヒドロラーゼI(GTPCH1)、6-ピルボイルテトラヒドロブテリンシターゼ(PTPS)、およびセピアブテリン還元酵素などのBH4のデノボ生合成の活性または発現を増大する因子(複数); ビタミンC、アスコルビン酸、トコフェロールなどのBH4を安定化するように作用し得る因子(複数); 一酸化窒素シンターゼの活性または発現を増大し、それによってNOの生成を増大する因子(複数); ならびにGTPCHフィードバック調節タンパク質、GFRPを抑制する因子が含まれ得る。

#### 【0034】

本発明は、結晶多形A、結晶多形B、結晶多形F、結晶多形J、結晶多形K、結晶水和形態C、結晶水和形態D、結晶水和形態E、結晶水和形態H、結晶水和形態O、溶媒和結晶形態G、溶媒和結晶形態I、溶媒和結晶形態L、溶媒和結晶形態M、溶媒和結晶形態N、およびそれらの組合せからなる群から選択される、1種または複数種のBH4の結晶形態を投与することを企図する。

#### 【0035】

他の実施形態では、BH4は、任意選択で葉酸塩前駆体、葉酸、および葉酸塩誘導体を含む葉酸塩と共に投与することができる。かかる葉酸塩には、それに限定されるものではないが、5-ホルミル-(6S)-テトラヒドロ葉酸およびその塩、5-メチル-(6S)-テトラヒドロ葉酸およびその塩、5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸およびその塩、5,10-メテニル-(6R)-テトラヒドロ葉酸およびその塩、10-ホルミル-(6R)-テトラヒドロ葉酸、5-ホルムイミノ-(6S)-テトラヒドロ葉酸その塩、(6S)-テトラヒドロ葉酸およびその塩、ならびに前記の組合せであるテトラヒドロ葉酸塩が含まれる。さらなる一実施形態では、BH4は、任意選択でアルギニンと共に投与することができる。

#### 【0036】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになろう。但し、詳細な説明および特定の実施例は本発明の好ましい実施形態を示しているものの、この詳細な説明から本発明の精神および範囲における様々な変更および改変が当業者に明らかになると、いう理由から、これらは単なる例示のみよって与えられることを理解されたい。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0037】

以下の図は、本発明の明細書の一部を形成し、本発明の態様をさらに例示するために含まれる。本発明で提供する特定の実施形態の詳細な説明と共に図を参照することによって

10

20

30

30

40

50

、本発明をよりよく理解することができる。

【0038】

(好ましい実施形態の説明)

I. 内皮機能不全におけるBH4の役割

BH4は図1に示すように、酵素内皮一酸化窒素シンターゼ(eNOS)によるアルギニンからのNO生合成において必須の補因子である。アルギニンおよびBH4からのNOの産生不能は内皮に局在し、したがって内皮機能不全と呼ばれる。

【0039】

内皮機能不全は図2に示すように、内皮eNOSを使用して血管拡張剤としてのNOを生成する内皮(血管壁と血管の間のバリアを形成する単一細胞層上皮)の異常性不能を特徴とする(Alpら、J Clin Invest 2003年; 112(5): 725~735頁; Katusic、Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001年; 281(3): H981~H986頁; Meiningら、Biochem J 2000年; 349(Pt 1): 353~356頁; Pieper、J Cardiovasc Pharmacol 1997年; 29(1): 8~15頁; Fukudaら、Heart 2002年; 87(3): 264~269頁; Uedaら、J Am Coll Cardiol 2000年; 35(1): 71~75頁; Maierら、J Cardiovasc Pharmacol 2000年; 35(2): 173~178頁; Kakokiら、J Am Soc Nephrol 2000年; 11(2): 301~309頁; de Vriesら、Br J Pharmacol 2000年; 130(5): 963~974頁; Pannirselvamら、Br J Pharmacol 2002年; 136(2): 255~263頁; Shinozakiら、Circ Res 2000年; 87(7): 566~573頁; Cosentinoら、Eur Heart J 1998年; 19 Suppl G: G3~G8頁)。

10

20

30

40

【0040】

このNOの欠乏によって直接作用として過度の血管収縮が生じ、第2の作用として産生されるフリーラジカルが増大し(Channon、Trends Cardiovasc Med 2004年; 14(8): 323~327頁; Meiningら、Biochem J 2000年; 349(Pt 1): 353~356頁; Berkら、Biochemistry 2004年; 43(41): 13137~13148頁; Vasquez-Vivarら、Biochem J 2002年; 362(Pt 3): 733~739頁; Cosentinoら、Cardiovasc Res 1999年; 43(2): 274~278頁; Guzikら、Circulation 2002年; 105(14): 1656~1662頁)、血管損傷およびアテローム性動脈硬化症が促進され(Cosentinoら、Eur Heart J 1998年; 19 Suppl G: G3~G8頁; Vasquez-Vivarら、Biochem J 2002年; 362(Pt 3): 733~739頁)、血栓形成および凝血が増大する。全体的データは、NOが血流を支え、NOが無いと血流が減少し、アテローム性動脈硬化症および血餅の潜在的可能性が増大することを示している。したがって内皮機能不全は、血管収縮/高血圧、不適切な膨張、アテローム性動脈硬化症の促進、血管形成の増大、選択の増大、および高い心イベント率に関連している。

【0041】

鎌状赤血球症のトランスジェニックマウスマルクを使用した試験は、組織のNOSレベルおよび基底NOS活性が増大する一方、アセチルコリンなどの内皮依存性アゴニストへの血管拡張反応が低下したことを一貫して示している(Reiterら、Current Opinions in Hematology 10: 99~107頁(2003年))。したがって動物実験からの知見によって、NOが鎌状赤血球症に関連する慢性血管損傷に応答して代償的役割を担っていることが提示される。しかしこの実験では、他の因子がNOの生体利用能に影響すると思われる。鎌状赤血球症を有する女性では、卵巣に

50

より生成されるエストロゲンが、N O S 発現および基底内皮N O 生成を増大することによって内皮機能を保護する。したがって鎌状赤血球症を有する女性では、正常な基底N O および刺激N O が生成されていた。しかし、鎌状赤血球症を有する男性、ならびに血管閉塞クリーゼおよび急性胸部症候群を有する全ての患者は、基底N O および刺激N O の生成が少なかった。循環血漿ヘモグロビンおよびスーパーオキシドの組合せの作用によって、N O の破壊が生じる。鎌状赤血球症では、N O 生成の増大が、接着分子の内皮発現ならびにその後の赤血球および白血球の接着を低減し、それによって血管閉塞クリーゼの発症が防止される (Spaceら、Am. J. Hematology 63: 200~204 頁 (2000年))。N O はまた、血小板活性化およびトロンビン生成を低減し、それによって凝血が防止される。鎌状赤血球症の管理におけるN O の他の有益な作用には、喘息および鎌状赤血球症を有する対象の活性酸素種 (ROS) の不活化および平滑筋の弛緩が含まれる。

#### 【0042】

内皮機能不全へのBH4の関与の基本はここ数年で明らかになっており、表1に示すように、2次的BH4欠乏に起因して重要な病態生理学的工程となっていることが、様々な機構により明らかである (Meiningerら、Biochem J 2000年; 349 (Pt 1): 353~356頁; Meiningerら、FASEB J 2004年)。BH4は、アルギニンからN O を生成するためのeNOSの酵素反応 (図1) における補因子としてモル対モルベースで必要とされ、多くの場合、様々な因子によって生じるBH4の欠乏は、N O 生成不能の根本的原因となっていることが示されている。図3は、2次的BH4欠乏の病態生理の図を示すものである。

#### 【0043】

#### 【表1】

表1. BH4欠乏の背景にある疾患および機構

一般集団	病態生理	BH4での代替データまたは病態生理学的支援
糖尿病	GTPCHを介してグルコースがBH4生合成を抑圧する	代替によって、腕部、目、および腎臓の血管疾患が改善する
冠動脈疾患	アテローム硬化性変化が内皮機能低下に関連する	患者の血管標本へのBH4添加によって、アセチルコリンに対する遅れがちの応答が正常化する
高コレステロール血症	コレステロール増加がGTPCHでのBH4生合成を抑圧する	BH4の代替によって血管機能が修復される
喫煙	喫煙の酸化生成物がBH4プールの内皮を激減する	代替によって喫煙者の血管拡張が修復される
特発性肺高血圧	BH4生合成の変異体が内皮機能を低下する	BH4生合成ノックアウトマウスがPHを有しBH4で改善する
卒中	卒中後の内皮損傷が血管痙攣に至る	亜硝酸塩注入によって血管痙攣が改善する
溶血性貧血	遊離ヘムが内皮機能を破壊するフリーラジカルを生成する	未だデータは得られていないが、BH4プールの破壊が機構となっている可能性が高い
移植患者	虚血およびシクロスボリンAがBH4生合成の抑制によって血管機能不全を誘発する	BH4での代替によって、マウスの心臓移植モデルの血管損傷が低減する
新生児の肺高血圧(PPHN)	乳幼児、糖尿病の母親の多くに内皮機能の低下がある	NO吸入によって、酸化が改善され肺高血圧が低下する

第2の機能として、正常に機能するeNOSの結合二量体形を安定化するためにもBH4が必要であることが、最近のデータによって示されている (図4)。BH4が欠乏している場合、eNOSは機能不全の単量体に解離し、非結合状態になり、ペルオキシ亞硝酸などのフリーラジカル種が生成され、次いで根本的欠乏を悪化するBH4プールがさらに破壊される (Channon、Trends Cardiovasc Med 2004年; 14 (8): 323~327頁; Wernerら、Exp Biol Med (Ma

10

20

30

40

50

ywood) 2003年; 228(11): 1291~1302頁; Vasquez-Vivarら、Biochem J 2002年; 362(Pt 3): 733~739頁; Wei、Chem Rev 2003年; 103(6): 2365~2383頁)。

#### 【0044】

糖尿病患者では、グルコース濃度がより高いと、第1酵素GTPシクロヒドロラーゼ(GTPCH)の発現の低減によってBH4生合成が直接抑圧され(Meiningerら、Biochem J 2000年; 349(Pt 1): 353~356頁; Meiningerら、FASEB J 2004年; Caiら、Cardiovasc Res 2005年; 65(4): 823~831頁)、動物において血管機能不全に至るが、BH4での代替に応答し(Alpら、J Clin Invest 2003年; 112(5): 725~735頁; Yuら、J Ocul Pharmacol Ther 2001年; 17(2): 123~129頁; Meiningerら、Biochem J 2000年; 349(Pt 1): 353~356頁; Pieper、J Cardiovasc Pharmacol 1997年; 29(1): 8~15頁; Pannirselvamら、Br J Pharmacol 2002年; 136(2): 255~263頁; Hamonら、Clin Chim Acta 1989年; 181(3): 249~253頁)、ヒトにおいて血管機能不全に至るが、BH4での代替に応答する(Nystromら、Am J Physiol Endocrinol Metab 2004年; Channon、Trends Cardiovasc Med 2004年; 14(8): 323~327頁; Wernerら、Exp Biol Med (Maywood) 2003年; 228(11): 1291~1302頁; Heitzerら、Diabetologia 2000年; 43(11): 1435~1438頁; Guzikら、Circulation 2002年; 105(14): 1656~1662頁)。高コレステロール血症の過度のコレステロールもGTPCHを抑制すると思われるが、BH4投与によって改善する(Fukudaら、Heart 2002年; 87(3): 264~269頁)。心不全および冠動脈疾患有する患者も、BH4欠乏による内皮機能不全を有すると思われる(Setoguchiら、J Cardiovasc Pharmacol 2002年; 39(3): 363~368頁; Maierら、J Cardiovasc Pharmacol 2000年; 35(2): 173~178頁)。喫煙では、喫煙による過度の酸化化合物がBH4プールを破壊するが、BH4での代替によって機能が改善する(Katusic、Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001年; 281(3): H981~H986頁; Uedaら、J Am Coll Cardiol 2000年; 35(1): 71~75頁)。溶血性貧血では、遊離ヘムがフリーラジカルを生成し、それがBH4プールを激減する恐れもある(Rotherら、JAMA 2005年; 293(13): 1653~1662頁)。BH4欠乏の結果、NO生成不能に至る。鎌状赤血球症を有する対象では、BH4での代替が、肺動脈高血圧、虚血再かん流障害、ならびに血流低下による臓器障害、赤血球および白血球による閉塞および/または接着、および凝血による血管閉塞クリーゼの管理に有効となる。

#### 【0045】

最近の文献に基付いた6R-BH4の使用が可能な徵候の一覧には、以下が含まれる。糖尿病(Nystromら、Am J Physiol Endocrinol Metab 2004年; Channon、Trends Cardiovasc Med 2004年; 14(8): 323~327頁; Wernerら、Exp Biol Med (Maywood) 2003年; 228(11): 1291~1302頁; Alpら、J Clin Invest 2003年; 112(5): 725~735頁; Katusic、Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001年; 281(3): H981~H986頁; Yuら、J Ocul Pharmacol Ther 2001年; 17(2): 123~129頁; Heitzerら、Diabetologia 2000年; 43(11): 1435~1438頁; Meininger 50

ら、*Biochem J* 2000年；349(Pt 1)：353～356頁；*Pielerら、J Cardiovasc Pharmacol* 1997年；29(1)：8～15頁)、高コレステロール血症(*Fukudaら、Heart* 2002年；87(3)：264～269頁)、喫煙(*Lowelら、Drug Metab Dispos* 2004年；*Uedaら、J Am Coll Cardiol* 2000年；35(1)：71～75頁)、うっ血性心不全(*Setoguchiら、J Cardiovasc Pharmacol* 2002年；39(3)：363～368頁)、アテローム性動脈硬化症(*Channon、Trends Cardiovasc Med* 2004年；14(8)：323～327頁；*Katusic、Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001年；281(3)：H981～H986頁)；*Maierら、J Cardiovasc Pharmacol* 2000年；35(2)：173～178頁)、肺高血圧(*Pritchardら、Circulation* 2005年；111(16)：2022～2024頁)；*Khooら、Circulation* 2005年；111(16)：2126～2133頁)、冠動脈疾患(*Nyströmら、Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004年；*Maierら、J Cardiovasc Pharmacol* 2000年；35(2)：173～178頁；*Setoguchiら、J Am Coll Cardiol* 2001年；38(2)：493～498頁)、臓器移植後の再かん流障害／血管機能不全(*Yamashiroら、J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003年；44(1)：37～49頁；*Kakokiら、J Am Soc Nephrol* 2000年；11(2)：301～309頁；*Duranskiら、J Clin Invest* 2005年)、脳卒中後の血管痙攣(*Plutaら、JAMA* 2005年；293(12)：1477～1484頁)、および鎌状赤血球症を含む溶血性貧血(米国特許出願第2003/0078231号；*Woodら、Free Radical Biology & Medicine* 40：1443～1453頁(2006年))。これら徵候の全てにおいてBH4欠乏が生じ、一酸化窒素(NO)生成が欠乏し、遅れがちな信号を正常化するための血管系の応答が不能になる。

#### 【0046】

一般に本発明は、血管疾患を生じる内皮機能不全の治療的介入を記載するものである。本発明は、内皮機能不全を特徴とする疾患または障害を有する対象を治療するための方法および組成物を企図し、その方法は、テトラヒドロビオブテリン(BH4)またはその前駆体もしくは誘導体を含む組成物を単独で、または治療剤と組み合わせて対象に投与することを含み、前記投与は、前記BH4含有組成物なしの前記内皮機能不全と比較して、前記対象の内皮機能不全を緩和するのに効果がある。本発明は、内皮機能不全を有する対象を治療する方法をさらに企図し、その方法は、血管拡張剤としての一酸化窒素(NO)の生成を増大する因子または因子の組合せを単独で、または治療剤と組み合わせて投与することを含む。

#### 【0047】

##### 1. 糖尿病関連血管合併症

糖尿病および他の心疾患状態は、内皮での血管拡張剤と血管収縮剤との平衡性を変え、内皮機能不全に寄与する一酸化窒素(NO)生物活性の喪失を特徴とする。高血圧をもたらす血管収縮の増大、血流または他の信号に応答する不適切な拡張、血管形成および血小板凝集の増大、セレクチンなどの細胞表面接着分子の増大、活性酸素種(ROS)、例えばスーパーオキシド分子などの過度のフリーラジカル生成による凝血因子および加速性アテローム性動脈硬化症の増大の根底には、内皮機能不全がある。NOは、血管の恒常性の維持に中心的役割を担うので、NO生物活性の喪失は血管疾患の病因に寄与し、該疾患の負の転帰のマーカーとなる。

#### 【0048】

酸化ストレスに曝露された動脈のBH4の加速性異化作用は、糖尿病患者の動脈に存在することが知られている内皮機能不全の病因に寄与することが、最近の知見によって示唆

10

20

30

30

40

50

されている。さらに高グルコースが、B H 4 の細胞レベルの増大を防止する。糖尿病患者に認められるアスコルビン酸の欠乏も、e N O S に対するB H 4 レベルの実用性を低減することに寄与する。幸い、動物およびヒトでのB H 4 の実験的な補充は、内皮機能への有益な効果を示している。糖尿病またはアテローム性動脈硬化症を有する動物の血管輪を使用する高濃縮B H 4 の補充研究、および糖尿病を有する患者の哺乳類動脈環における高濃縮B H 4 の補充研究によって、B H 4 が内皮機能不全を潜在的に改善し、血管機能を修復し得ることが支持される。心臓血管および糖尿病の対象へのB H 4 の好ましい効果の幾つかの例には、以下が含まれる。B H 4 投与は、糖尿病または高コレステロール血症を有する患者の前腕の血流へのNO媒介性効果を増大するが、正常な対象への効果は増大しないと思われること(Heitzerら、Diabetologia. 43(11): 1435~8頁(2000年))。急性B H 4 は、冠動脈バイパスグラフト術を受けている糖尿病の対象の静脈グラフトおよび動脈の血管機能を修復すること(Guzikら、Circulation 105(14): 1656~1662頁(2002年))。B H 4 は、対照である対象と比較して、II型糖尿病および冠状動脈性心疾患を有する患者のインスリン感受性を増大すること(Nystromら、Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004年11月; 287(5): E919~25頁. Epub(2004年))。生合成経路におけるB H 4 前駆体の補充が、細胞内のB H 4 レベルを増大する助けとなり、in vivoでのNO合成を改善し、内皮機能を改善することも示されている。図5は、糖尿病におけるB H 4 欠乏の役割を示している。

10

20

30

40

50

#### 【0049】

##### 2. 制御されない高血圧

B H 4 の効果を、高血圧を有するヒトで研究した。制御されにくい高血圧(収縮期B P > 135 mmHg)を有し、従来の降圧療法での治療を受けている8人の患者に、経口用B H 4 (1日当たり5mg/kg、1日当たり10mg/kg)を8週間与えた。上腕動脈流媒介性の血管拡張(FMD)および各拡張については、ベースラインであるニトログリセリン舌下投与後および治療の8週間後および治療後1週間、ならびに血圧変化については9週間および治療後6週間の毎週、患者を評価した。FMDは、B H 4 治療の8週間後に有意に増大し、B H 4 使用終了の1週間後には、ベースラインに戻った。経口用B H 4 は、収縮期および拡張期血圧を有意に低下し、血圧は、療法停止後6週間でベースライン値に戻った。血圧降下は治療の3週間後に有意であり、B H 4 の両方の用量は類似の効果をもたらした。これらの知見は、B H 4 が、制御されにくい高血圧を有する患者の内皮依存性血管拡張を改善することを示している(Lefeverら、American Heart Association Scientific Sessions 2003年、Session No. AOP. 43.3、Presentation Number 2378)。

#### 【0050】

##### 3. 冠動脈疾患

冠動脈疾患は、内皮機能不全および加速性アテローム性動脈硬化症の組合せとして特徴付けることができる。B H 4 は、様々な研究で血管機能を修復することが示されている。B H 4 は冠動脈流を増大した(Fukudaら、2002年)。血管造影中に注入されたB H 4 は、冠血流速度の変化に基づく内皮機能不全を有する患者において、アセチルコリンに対する異常血管収縮を防止した(Maierら(2000年)J. Cardiovasc Pharmacol 35: 173~178頁)。B H 4 療法は、冠血流の改善およびアテローム性動脈硬化症/血栓形成の低減の両方をもたらした。糖尿病患者のMIの反復による死亡率は非常に高い。

#### 【0051】

##### 4. 肺血管疾患 - 肺動脈高血圧

NO欠乏は肺動脈高血圧(PAH)に存在するという幾つかの証拠がある。(1) PAHを有する患者は、呼気のNOレベルが低いことが示された。(2) B H 4 生合成の欠陥およびB H 4 欠乏を有するノックアウトマウスは、それらの大症状として肺高血圧を発症

する (Nandiら 2005 年、 Circulation 111 : 2086)。(3) シルデナフィル (PDE5 阻害剤) に関する最近のデータは、PAH では NO シグナリングが欠乏していることを示唆している。しかし、ヒトにおける BH4 での代替データは未だ見つかっていない。

【0052】

5. 鎌状赤血球症を含む溶血性貧血

内皮機能不全は溶血性貧血を有する患者に生じ、その問題の根底には NO の欠失があることを示す幾つかのデータが存在する。BH4 欠乏は、BH4 プールの酸化破壊による原因である可能性が高い。動物実験は、鎌状赤血球症に関連する慢性血管損傷に応答する代償的役割を NO が担うことを示唆している。循環血漿ヘモグロビンおよびスーパー オキシドの組合せの作用によって、NO の破壊が生じる (Reiterら、Current Opinions in Hematology 10 : 99 ~ 107 頁 (2003 年))。NO の生体利用能を増大するか、または鎌状赤血球症に関連する酸化ストレスおよび制御されないフリーラジカルの増殖を妨害する新しい治療手法が考慮されている。アルギニンとヒドロキシ尿素との併用投与によって、NO の生成を増大し、定常状態で SCD を有する患者におけるアルギニンの使用を改善することができる (Morrissら、J. Pediatric Hematology 25 (8) : 629 ~ 634 頁 (2003 年))。ヒドロキシ尿素およびアルギニンに加えて、NO レベルを増大するための吸入 NO などの他の療法、NO 破壊を低減するためのアロプリノール、ならびに NO 応答を増幅するためのスタチンおよびシルデナフィルが考慮されている (Mackら、Int'l. J. Biochem. Cell Biol. In Press (2006 年))。米国特許出願第 2003 / 0078231 号には、鎌状赤血球貧血を含む、酸化ストレスおよび制御されないフリーラジカルの増殖から生じる幾つかの疾患を治療するための、抗酸化特性を有する栄養または食品補助剤としての正常生体分子のスルホアデノシルメチオニン誘導体の使用が記載されている。米国特許出願第 2005 / 0239807A1 には、鎌状赤血球貧血などの酸化ストレスに関連する疾患を治療するための、NO ドナー生物活性 (例えばアロプリノール) を提供する群を含む反応性酵素を生成する酵素の阻害剤の使用が記載されている。

【0053】

鎌状赤血球症では、NO が、接着分子の内皮発現ならびにその後の赤血球および白血球の接着を低減し、それによって血管閉塞クリーゼの発症を防止する (Spaceら、Am. J. Hematology 63 : 200 ~ 204 頁 (2000 年))。細胞関連 NADPH オキシダーゼは、スーパー オキシドの供給源であることが示された (Woodら FASEB J. 19 (8) : 989 ~ 991 頁 (2005 年))。鎌状赤血球症に関連するスーパー オキシド ラジカルの急速な生成は、BH4 を酸化し、それによって BH4 の欠乏を生じることが知られている OH および ONOO などの第 2 の反応性酸素および窒素代謝産物の生成が誘発される恐れがある。ある研究では、鎌状赤血球トランスジェニック (S) マウスへの BH4 の前駆体セピアプテリンの投与は、血球接着の減衰に関連していた (Woodら、J. Free Radical Biology & Medicine 40 : 1443 ~ 1453 頁 (2006 年))。本発明と一致しているが、この筆者らはセピアプテリンによって外因性 BH4 の抗酸化特性および自動酸化特性が欠失することを具体的に示唆しており、本発明ではその使用が企図される。さらに上記のように、トランスジェニック 鎌状赤血球マウスモデルは、ヒトにおいて観測される NOS、NO、および BH4 のレベルを制御する複合体の恒常性維持機構を正確には反映することができない (Reiterら、Current Opinion in Hematology 10 : 99 ~ 107 頁 (2003 年))。

【0054】

6. 間欠性跛行

間欠性跛行は、末梢動脈疾患の最も顕著な症候である。間欠性跛行は、しばしば脚部の遠位動脈の病巣と相まって、腸骨動脈および大腿動脈を狭めるアテローム硬化性によって

10

20

30

40

50

生じることが最も多い。間欠性跛行において血流は、安静時のヒトの必要量に対しては十分である。しかしこのようなヒトが運動する場合、血管が閉塞され、したがって血流が制限され、運動筋の必要を満たすには不十分なレベルまで酸素供給が低下する。それに応じて身体は、血管を拡張するNOなどの因子の放出を低減し、トロンボキサン、セロトニン、アンギオテンシンII、エンドセリン、ノルエピネフリンなどの、血管を収縮する因子の放出を増大する。また、血球が異常をきたし血餅を形成しやすいという証拠がある。間欠性跛行の症候には、腓腹筋の委縮、足指先および足部にかけての体毛喪失、足指爪の肥厚、てかり突っ張りのある皮膚(shiny tight skin)、黒色に変色した非流血性の足指先の有痛性潰瘍、および幾つかの場合、脚部動脈の血餅形成が含まれる。間欠性跛行は、50歳以上の男性の5%もの数に影響を及ぼす恐れがある。影響を受けた10~20%では症候が悪化し、四肢壊死の発症により12人に1人が切断に至ることがある。間欠性跛行の療法には、生活習慣の変化(運動、喫煙およびアルコール摂取の停止)、運動療法、投薬(ペントキシフィリン(pentoxifyline)、ナフロニル(nafronyl)、抗血栓剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤シロスタゾール)、および補助剤(ビタミンE、B、およびC)、低コレステロール食、ならびに血管内修復が含まれる(Hiatt, Atherosclerosis Supplements (2005) in press; Woloskerら, Clinics 60(3): 193~200頁(2005年))。糖尿病患者の研究によって、BH4投与が、虚血誘発性血流およびFMDの改善に関連していたことが示されている。

10

20

30

40

50

## 【0055】

## 7. 新生児の持続性肺高血圧

新生児の持続性肺高血圧(PPHN)を有する満期出産乳児は、高い死亡率を有し、その数は恐らく年40,000人となる。死亡率は非常に高く、恐らく20~50%の範囲である。これらの乳児の多くは、高血糖によるBH4欠乏の関係に合致するLGAおよび糖尿病の母親の乳幼児である。

## 【0056】

## 8. 卒中および関連の虚血性血管疾患

犬の卒中モデルからのデータは、脳卒中後の血餅部位周辺の血管痙攣が伸展し、元のイベントよりも大きな損害を生じるが、亜硝酸塩溶液の注入によって防止できることを示している。

## 【0057】

## II. BH4および血管障害の治療

本発明は、BH4の投与に基付く血管障害の薬剤介入を記載するものである。本発明ではさらに、安定形態または他の形態の任意のタイプのBH4を使用して、様々な形態の血管疾患、それに限定されるものではないが、糖尿病がある場合およびない場合の、難治性または制御されない高血圧、間欠性跛行、冠動脈機能、肺動脈高血圧、および鎌状赤血球症を含む溶血性貧血を有する対象を含む患者集団を治療できることが企図される。かかるBH4系組成物は単独で、あるいは血管障害の治療に一般に使用される任意の他の治療剤および/または治療的介入と組み合わせて投与することができる。かかる薬剤には、それに限定されるものではないが、PPARリガンド(チアゾリジンドン、グリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン(Avandia)、ピオグリタゾン)などのインスリン感受性を改善する薬剤、スルホニル尿素(グリキドン、トルブタミド、グリメプリド、クロルプロパミド、グリピザイド、グリブリド、アセトヘキサミド)およびメグリチニド類(メグリチニド、レパグリニド、ナテグリニド)などのインスリン分泌刺激薬、ならびにメトホルミンなどの肝臓のグルコース生成を低減する薬剤を含む、糖尿病を治療するために使用される薬剤が含まれる。かかる薬剤には、それに限定されるものではないが、ボセンタン、ダルセンタン、エンラセンタン、テゾセンタン、アトラセンタン、アンブリセンタンシタクスセンタンなどの、高血圧および他の内皮機能不全関連障害を治療するために一般に使用されるエンドセリンレセプターアンタゴニスト; PDE5阻害剤(間接作用型)およびミノキシジル(直接作用型)などの平滑筋弛緩薬; カプトブリル、エナラブリル

、リシノプリル、フォシノプリル、ペリンドプリル、キナプリル、トランドラプリル、ベナゼプリル、ラミプリルなどのアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤；イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタン、エプロサルタン、オルメサルタン、カンデサルタン、テルミサルタンなどのアンギオテンシンⅠⅡレセプターブロッカー；アテノロール、メトプロロール、ナドロール、ビソプロロール、ピンドロール、アセブトロール、ベタキソロール、プロプラノロールなどのプロッカー；ヒドロクロロチアジド、フロセミド、トルセミド、メトラゾンなどの利尿薬；アムロジピン、フェロジピン、ニソルジピン、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムなどのカルシウムチャネルブロッカー；レセプターブロッカードキサゾシン、テラゾシン、アルフゾシン、タムスロシン；ならびにクロニジンなどの中枢アゴニストを含む、血管疾患を治療するために使用される薬剤が含まれる。かかる薬剤には、それに限定されるものではないが、スタチン（アトバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンカルシウム、シンバスタチン）およびニコチン酸などのLDLを低下する薬剤、フィブロート、ゲムフィブロジル、フェノフィブロート、ベザフィブロート、シプロフィブロートなどのPPARを刺激する薬剤、胆汁酸抑制剤、コレステラミン、およびコレステチポールなどの、胆汁酸と結合しその再吸着を防止し、コレステロール濃度を低下する薬剤、ならびにコレステロール吸収阻害剤を含む高脂血症を治療するために使用される薬剤が含まれる。

10

## 【0058】

本発明の幾つかの実施形態は、血管機能不全の治療を対象とし、その治療は、BH4またはその前駆体もしくは誘導体を含む組成物を単独で、または通常の血管治療と組み合わせて対象に投与することを含み、BH4を単独でまたは通常の血管療法と組み合わせて投与することは、単独でも通常の血管療法との組合せでもBH4を用いない場合の前記濃縮物と比較して、前記対象の臨床的に関連のあるエンドポイントを改善するのに有効である。

20

## 【0059】

本発明の一実施形態は、BH4組成物を、値を正常化するのに有効な量で異常エンドポイントを有する任意の患者に投与するものである。好ましい一実施形態では、かかる個体は特定の血管疾患有すると診断されている。本発明は、本明細書に記載の安定化BH4組成物を、エンドポイントを正常レベルに改善するのに有効な量で、特定の症候によって、および/または特定の血管疾患有を診断するために使用される一般的な試験によって特徴付けられる特定の血管疾患有を有すると診断された患者に投与することを企図する。

30

## 【0060】

本発明は、典型的な症候を有する患者をBH4で治療して、臨床的に関連のあるエンドポイントの正常値をもたらすことを企図していることが当業者には理解されよう。さらに、臨床的に関連のあるエンドポイントの最小限の正常範囲内にあるエンドポイント値の任意変化は、患者の治療レジメンの治療転帰であると解釈されよう。

## 【0061】

## 1. 併用療法

本発明はさらに、BH4を単独で、または血管機能不全を治療するために一般に使用される薬剤もしくは介入と組み合わせて投与することによる、様々なタイプの血管機能不全の治療的介入を企図する。BH4療法を、血管機能不全を治療するための通常の薬剤または介入と組み合わせて、かかる患者のかかる疾患有の臨床的に関連のあるエンドポイントを治療によって高められることを理解されたい。上記のように血管機能不全の治療は、恒常性を維持し、アジュバント療法を提供し、特異的療法を提供して臨床的に関連のあるエンドポイントを改善することを対象とする。恒常性は、有害なフリーラジカルの生成を増大することなしに、BH4およびNO生成のレベルを含む、血管機能不全に罹患しやすくなる因子を修正することによって維持される。アジュバント療法は、一次療法の有効性を増大する薬剤を投与するか、または介入を施すことからなる。特異的療法は、臨床的に関連のある正常なエンドポイントの維持を対象とする。血管機能不全を治療するために現在使用されている通常の薬剤および介入は既に論じた。血管機能不全を管理または治療するた

40

50

めに使用される通常の介入の幾つかには、抗糖尿病薬、様々なタイプの血管疾患を治療するために使用される薬剤、および抗高脂血症療法が含まれる。糖尿病を治療するために使用される薬剤には、それに限定されるものではないが、P P A R リガンド（チアゾリジンドン、グリタゾン、トログリタゾン、ロシグリタゾン（A v a n d i a ）、ピオグリタゾン）などのインスリン感受性を改善する薬剤、スルホニル尿素（グリキドン、トルブタミド、グリメプリド、クロルプロパミド、グリピザイド、グリブリド、アセトヘキサミド）およびメグリチニド類（メグリチニド、レパグリニド、ナテグリニド）などのインスリン分泌刺激薬、ならびにメトホルミンなどの肝臓のグルコース生成を低減する薬剤が含まれる。血管疾患を治療するために使用される薬剤には、それに限定されるものではないが、ボセンタン、ダルセンタン、エンラセンタン、テゾセンタン、アトラセンタン、アンブリセンタンシタクスセンタンなどの、高血圧および他の内皮機能不全関連障害を治療するために一般に使用されるエンドセリンレセプターアンタゴニスト；P D E 5 阻害剤（間接作用型）およびミノキシジル（直接作用型）などの平滑筋弛緩薬；カプトプリル、エナラブリル、リシノブリル、フォシノブリル、ペリンドブリル、キナブリル、トランドラブリル、ベナゼブリル、ラミブリルなどのアンギオテンシン変換酵素（A C E ）阻害剤；イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタン、エプロサルタン、オルメサルタン、カンデサルタン、テルミサルタンなどのアンギオテンシンⅠ I レセプターブロッカー；アテノロール、メトプロロール、ナドロール、ビソプロロール、ピンドロール、アセブトロール、ベタキソロール、プロプラノロールなどのブロッカー；ヒドロクロロチアジド、フロセミド、トルセミド、メトラゾンなどの利尿薬；アムロジピン、フェロジピン、ニソルジピン、ニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムなどのカルシウムチャネルブロッカー；レセプターブロッカードキサゾシン、テラゾシン、アルフゾシン、タムスロシン；ならびにクロニジンなどの中枢アゴニストが含まれる。高脂血症を治療するために使用される薬剤には、それに限定されるものではないが、スタチン（アトバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチンカルシウム、シンバスタチン）およびニコチン酸などのL D L を低下する薬剤、フィブロート、ゲムフィブロジル、フェノフィブロート、ベザフィブロート、シプロフィブロートなどのP P A R を刺激する薬剤、胆汁酸抑制剤、コレステラミン、およびコレステポールなどの、胆汁酸と結合しその再吸着を防止し、コレステロール濃度を低下する薬剤、ならびにコレステロール吸収阻害剤が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0062】

血管機能不全を管理および／または治療するために単独で、または治療剤および介入と組み合わせて投与されるB H 4 は、必ずしも本明細書に記載の安定化B H 4 組成物である必要はない。当業者には、室温および光の下で不安定なB H 4 組成物を生成する方法が知られている。かかる組成物を使用する療法は、B H 4 組成物の不安定性によって妨害されるが、その使用は、血管疾患を治療するために使用されるB H 4 治療および通常の療法の工程を用いて血管機能不全に罹患している患者が治療される幾つかの併用療法に、なおも企図されている。

#### 【0063】

かかる安定化B H 4 組成物を生成するための方法および組成物をさらに詳細に記載する。本発明の安定化B H 4 組成物は、8時間超、または少なくとも24時間、3カ月、6カ月、9カ月、12カ月もしくはそれ以上室温で安定なB H 4 単独の結晶を含む。本発明の方法および組成物は、通常の任意の投与経路によって、それに限定されるものではないが、経口、筋肉内注入、皮下注入、静脈内注入等によって送達することができる安定化B H 4 の医薬組成物を企図する。本発明の組成物はさらに、B H 4 組成物の安定性を延長する助けとなる抗酸化物質と組み合わせてB H 4 組成物を含むことができる。

#### 【0064】

本発明の幾つかの方法には、血管疾患を有する患者に治療転帰をもたらすために、B H 4 と通常の薬剤および介入とを組み合わせて使用することが含まれる。本明細書に企図される併用療法の適切な治療転帰を実現するために、B H 4 組成物および薬剤／介入は、一

般に所望の治療転帰をもたらすように組み合わせた有効な量で対象に投与されることになる。このプロセスには、同時に B H 4 組成物および薬剤 / 介入を投与することが含まれ得る。このことは、治療剤および B H 4 の両方を組み合わせた 1 つの製剤として含む単一組成物または薬理作用のある製剤を投与することによって、あるいは介入の実施と同時に B H 4 製剤を投与することによって実現できる。あるいは薬剤 / 介入は、B H 4 の薬理作用のある製剤（錠剤、注入、または飲料）とおよそ同時に摂取される。他の代替では、B H 4 治療は、数分から数時間の範囲の間隔で、薬剤 / 介入の先または後に行うことができる。薬剤 / 介入および B H 4 組成物が別々に投与される実施形態では、一般に、両方の薬剤がそれらの効果を同時に発揮して、その後も B H 4 が患者に有利な効果を確実に発揮できるようにされよう。このような場合、薬剤 / 介入の約 2 ~ 6 時間内（前または後）に、最も好ましくはわずか約 1 時間の遅延時間で B H 4 を投与するように企図される。しかし、2 ~ 6 時間という 2 種類の薬剤の投与間隔は単に例示的なものであり、さらに間隔が長くてもよく、例えば 24 時間、36 時間、48 時間、72 時間、1 週間、またはそれ以上の B H 4 および第 2 の薬剤 / 介入の投与間隔も企図され得ることを理解されたい。幾つかの実施形態では、B H 4 療法を、B H 4 の 1 日当たりの用量が患者に無期限に投与される連続療法とすることが企図される。

10

#### 【 0 0 6 5 】

##### 2. 療法で使用するための B H 4 組成物

本発明は、本明細書に企図する治療で使用できる組成物について論じる。

20

#### 【 0 0 6 6 】

米国特許第 5,698,408 号、第 2,601,215 号、第 3,505,329 号、第 4,540,783 号；第 4,550,109 号、第 4,587,340 号、第 4,595,752 号、第 4,649,197 号、第 4,665,182 号、第 4,701,455 号、第 4,713,454 号、第 4,937,342 号、第 5,037,981 号、第 5,198,547 号、第 5,350,851 号、第 5,401,844 号、第 5,698,408 号、およびカナダ特許出願第 2,420,374 号（それぞれ参照によって本明細書に組み込まれる）には、それぞれ、本発明の組成物として使用できるジヒドロビオブテリン、B H 4 およびその誘導体の生成方法が記載されている。かかる任意の方法を使用して、本発明の治療方法に使用するための B H 4 組成物を生成することができる。

30

#### 【 0 0 6 7 】

米国特許第 4,752,573 号、第 4,758,571 号、第 4,774,244 号、第 4,920,122 号、第 5,753,656 号、第 5,922,713 号、第 5,874,433 号、第 5,945,452 号、第 6,274,581 号、第 6,410,535 号、第 6,441,038 号、第 6,544,994 号、および米国特許公開第 2,002,018,795 号、第 2,002,010,664 号、第 2,002/007,678 号、第 2,003,003,261 号（それぞれ参照によって本明細書に組み込まれる）それぞれには、様々な治療のための B H 4 の投与方法が記載されている。これらの特許のそれぞれは、本明細書に記載の血管疾患治療に適合できることが当業者に知られている B H 4 組成物の投与方法の一般的教示を提供するものとして、参照によって本明細書に組み込まれる。

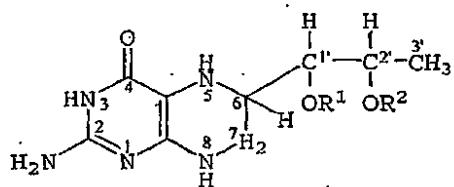
40

#### 【 0 0 6 8 】

特に米国特許第 4,540,783 号には、本発明の治療方法によれば有用な 1',2'-ジアシル-(6R,S)-5,6,7,8-テトラヒドロ-L-ビオブテリンである B H 4 誘導体、およびその無機塩または有機塩が記載されている。好ましくは、医薬として許容可能な塩は、本発明の治療方法に合わせて使用される。米国特許第 4,540,783 号に記載の化合物は、一般式 (I) を有する。

#### 【 0 0 6 9 】

## 【化1】



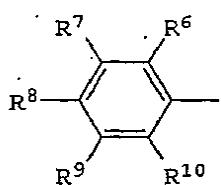
式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、同じかまたは異なっており、それぞれがアシル基である。

## 【0070】

アシル基は、好ましくは1～10個の炭素原子、特に3～10個の炭素原子を有する。好ましくは、アシル基は一般式R<sup>5</sup>COによって表され、式中、R<sup>5</sup>は水素であるか、または1個もしくは複数の炭素原子、特に2～9個の炭素原子を有する炭化水素残基である。R<sup>5</sup>で表される炭化水素残基の好ましい例は、例えば飽和または不飽和の、1個または複数の炭素原子、好ましくは2～9個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖のアルキル基、次の一般式で表される置換または非置換のフェニル基である。

## 【0071】

## 【化2】



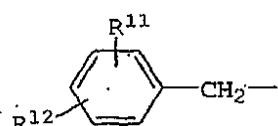
10

20

式中、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、およびR<sup>10</sup>は水素であるか、または直鎖もしくは分岐鎖のアルキル基（但し、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>の炭素原子の総数が好ましくは3以下になる）、次の一般式で表される置換もしくは非置換のベンジル基である。

## 【0072】

## 【化3】

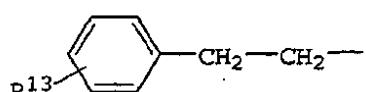


30

式中、R<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>は、水素、メチル、またはエチル（但し、R<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>の炭素原子の総数が好ましくは2以下になる）、ならびに次の一般式で表される置換もしくは非置換のアリールアルキル基である。

## 【0073】

## 【化4】



40

式中、R<sup>13</sup>は、水素またはメチル基である。上記アシル基の中でも、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、およびベンゾイルが最も好ましい。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が同じであることが好ましい。

## 【0074】

一般式(I)の化合物は、2つのジアステレオマー、即ち1',2'-ジアシル-(6R)-5,6,7,8-テトラヒドロ-L-ビオブテリンおよび1',2'-ジアシル-(6S)-5,6,7,8-テトラヒドロ-L-ビオブテリンを有し、それらは6位でジアステレオマーになっている。本発明の化合物には、その2つのジアステレオマーおよび

50

それらの混合物が含まれる。

【0075】

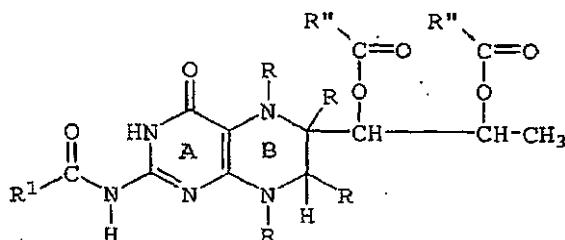
本発明の化合物(I)は、塩酸塩、硫酸塩、またはリン酸塩などの無機塩、酢酸塩、シユウ酸塩、または錯塩などの有機塩の形態であつてよい。

【0076】

米国特許第4,550,109号には、類脂質性ビオブテリンおよびテトラヒドロビオブテリンであるBH4誘導体が記載されている。これらの類脂質性BH4誘導体は、本発明の治療方法に従つて、医薬として許容可能な塩として投与することができる。米国特許第4,550,109号に記載の化合物は、以下の構造によつて表される。

【0077】

【化5】



式中、

Rは、環Bに2つの2重結合がある場合は存在せず、

Rは、環Bに2つの2重結合が無い場合は水素であり、

R'およびR''は、独立に、飽和または不飽和の脂肪族炭化水素基であり、これらは類脂質性化合物に類脂質性を付与するような分子量で平衡を保つ。

【0078】

一般に、R'およびR''は、1~31個の炭素単位を有する炭化水素から選択され、R' + 2R''の炭素単位の合計は10を超える33未満に制限される。

【0079】

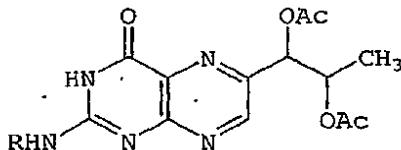
これらの誘導体では、2-N-アシル基は、望ましくは最終生成物に類脂質性を付与するために9~32個、好ましくは9~20個の炭素単位とする。2-N-アシル基は、デカノイル、パルミトイyl、ステアロイル、およびリノレイルによって例示される。2-N-アシル基は、ステアロイルのように飽和であつても、リノレイルのように不飽和であつてもよい。さらに、フェニルアセチルのような非毒性の芳香族2-N-アシル基は、最終生成物に望ましい類脂質性を付与することもできる。1',2'-ジ-O-アシル基は、望ましくは2~8個、好ましくは2~4個の炭素単位を有する低分子量のアルキルおよびアルケニル、例えばアセチルである。

【0080】

米国特許第4,550,109号には、次式のビオブテリン化合物も記載されている。

【0081】

【化6】



式中、Rは、飽和または不飽和であつてよい天然に存在する脂肪酸であり、AcはCOCH<sub>3</sub>である。これらのビオブテリン化合物を水素化して、本発明の治療方法によれば有用な、対応するテトラヒドロビオブテリンを形成することができる。基R脂肪酸の例示的な鎖長は、C<sub>10</sub>~C<sub>18</sub>単位の範囲である。例示的化合物には、2-N-アセチル-1',2'-ジ-O-アセチル-L-ビオブテリン、2-N-デカノイル-1',2'-ジ-O-

10

20

30

40

50

- アセチル - L - ビオブテリン、2 - N - パルミトイール - 1' , 2' - ジ - O - アセチル - L - ビオブテリン、2 - N - ステアロイル - 1' , 2' - ジ - O - アセチル - L - ビオブテリン、2 - N - リノレイル - 1' , 2' - ジ - O - アセチル - L - ビオブテリン、および 2 - N - フェニルアセチル - 1' , 2' - ジ - O - アセチル - L - ビオブテリン、ならびに対応するテトラヒドロビオブテリンが含まれる。

#### 【0082】

B H 4 を生成する上記の一般法に加えて、本発明は特に、安定化 B H 4 組成物、好ましくは 99.5% または 99.9% の純粋な 6 R B H 4 である B H 4 組成物を生成し使用することを企図する。B H 4 それ自体が投与される場合、米国特許出願第 11 / 143,887 号（およびそれに相当する、WO 2005 / 049000 として公開されている 2004 年 11 月 17 日出願の国際特許出願 PCT / US04 / 38296）および米国特許出願第 10 / 990,316 号（およびそれに相当する、WO 2005 / 065018 として公開されている 2004 年 11 月 17 日出願の国際特許出願 PCT / IB04 / 04447）に記載の塩または多形または結晶形態のいずれかを、精製された形態として投与することができる。様々な結晶形態を、錠剤、粉剤、または経口投与用の他の固体に好都合に形成することができる。結晶形態は、食品への通常の添加剤として有用であることも分かっている。その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、WO 2006 / 055511 として公開されている 2005 年 11 月 16 日出願の国際特許出願 PCT / US05 / 41252 に記載のように、B H 4 は、安定な固体製剤として投与することができる。B H 4 の投与形態および経路を、以下にさらに詳細に論じる。

#### 【0083】

好ましい実施形態では、本発明の方法によって、患者の必要に応じて B H 4 の 1 日用量 約 10 mg / kg ~ 約 20 mg / kg をその患者に提供することを企図する。当然のことながら当業者は、投与によって実現される効果に応じてこの用量を増減して調節することができる。1 日の用量は、単位用量として投与することができ、あるいは好都合な間隔で多回用量として投与することもできる。例示的実施形態では、1 日の用量は、5 mg / kg、6 mg / kg、7 mg / kg、8 mg / kg、9 mg / kg、10 mg / kg、11 mg / kg、12 mg / kg、13 mg / kg、14 mg / kg、15 mg / kg、16 mg / kg、17 mg / kg、18 mg / kg、19 mg / kg、20 mg / kg、22 mg / kg、24 mg / kg、26 mg / kg、28 mg / kg、30 mg / kg、32 mg / kg、34 mg / kg、36 mg / kg、38 mg / kg、40 mg / kg、42 mg / kg、44 mg / kg、46 mg / kg、48 mg / kg、50 mg / kg、またはそれ以上 (mg / kg) であってよい。

#### 【0084】

本発明の低用量での治療方法では、低用量、例えば 1 日当たり 0.1 ~ 5 mg / kg の用量が企図され、それには 0.1 ~ 2 mg / kg または 0.1 ~ 3 mg / kg または 1 mg / kg ~ 5 mg / kg の用量が含まれる。1 日当たり 5 mg / kg 未満の用量が好ましい。本発明によれば、かかる用量は、研究による関連のあるエンドポイントに改善をもたらすと予想され、B H 4 誘導体は、かかる用量の天然 B H 4 と比較して、改善された生物学的特性を有すると予想される。特に本発明は、1' , 2' - ジアシル - (6 R , S ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - L - ビオブテリンまたは本明細書に記載の類脂質性テトラヒドロビオブテリンのいずれかが、低用量で改善された生物学的特性を示すことを企図する。

#### 【0085】

本発明は特に、B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体を、1 日当たり体重 1 kg につき 0.1 ~ 5 mg の範囲の用量で任意の投与経路を介して、それに限定されるものではないが経口投与によって、1 日当たりの用量を 1 回で、または 1 日当たりの用量を多数回に分割して（例えば 2、3、または 4 回）、少なくとも 1、2、3、または 4 週もしくはそれ以上、または 1、2、3、4、5、6 カ月もしくはそれ以上の期間、本願で言及する症状のいずれか、またはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2005 年 6 月

10

20

30

40

50

1日出願の米国特許出願第11/143,887号（およびそれに相当する、WO 2005/049000として公開されている2004年11月17日出願の国際特許出願PCT/US04/38296）に言及されている血管の病状のいずれかを治療するために使用することを企図する。例示的用量には、1日に5mg/kg未満、1日に4.5mg/kg以下、1日に4mg/kg以下、1日に3.5mg/kg以下、1日に3mg/kg以下、1日に2.5mg/kg以下、1日に2mg/kg以下、1日に1.5mg/kg以下、1日に1mg/kg以下、または1日に0.5mg/kg以下が含まれる。体表面積当たりの同等の用量も企図される。

#### 【0086】

平均的な体重／体表面積（例えば70kg）のヒトについて、本発明は、400mg未満の1日の総用量も企図する。かかる例示的な1日の総用量には、360mg/日、350mg/日、300mg/日、280mg/日、210mg/日、180mg/日、175mg/日、150mg/日、または140mg/日が含まれる。例えば350mg/日または175mg/日は、175mgの経口用製剤で1日1回または2回、容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、320mg/日以下、160mg/日以下、または80mg/日以下が含まれる。かかる用量は、80または160mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、45、90、135、180、225、270、315、または360mg/日もしくはそれ以下が含まれ、これらは45または90mgの経口用製剤で容易に投与することができる。さらに他の例示的な1日の総用量には、60、120、180、240、300、または360mg/日が含まれ、これらは60または120mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、70、140、210、280、または350mg/日が含まれ、これらは70または140mgの経口用製剤で容易に投与することができる。例示的な1日の総用量には、55、110、165、220、275、または330mg/日も含まれ、これらは55mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、例えば65mgまたは75mgの製剤としての、65、130、195、260、もしくは325mg/日、または75、150、225、300、もしくは375mg/日が含まれる。

#### 【0087】

##### 3. 医薬組成物

本発明による投与のための医薬組成物は、医薬として許容可能な形態のBH4を、任意選択で医薬として許容可能な担体と組み合わせて含む第1の組成物を含むことができる。これらの組成物は、所期の目的を実現する任意の手段によって投与することができる。本発明による組成物の投与のための量およびレジメンは、血管疾患を治療するために当業者によって容易に決定され得る。上記のように当業者は、ある医療状況で近年提案されているBH4の量およびレジメン、例えばNOS活性の調整を目的とする組成物を最初に使用することができる。負荷試験でBH4を投与するために使用されている記載の処方、製剤、投与経路等のいずれも、本発明で使用するために容易に改変することができる。

#### 【0088】

本発明の範囲内の組成物には、所期の目的を実現するために有効な量のBH4、その類似体および誘導体を含む本発明の全ての組成物が含まれる。同様に、本発明の幾つかの治療方法が、血管疾患を治療するために一般に使用される薬剤および介入に加えてBH4系組成物が投与される併用療法を企図される場合、本発明の医薬組成物は、血管疾患を治療するために使用される通常の薬剤および介入と組み合わせて投与する際、血管疾患の症候の1つまたは複数の改善を実現するのに有効な量の少なくともBH4系治療剤、その類似体または相同体を含む全ての組成物も企図する。当然のことながら、緩和され得る最も明白な症候とは、併用療法が臨床的に関連のあるエンドポイントを改善する症候であるが、他の症候等も監視され得る。かかる徴候は、当業者に知られている技術を使用して監視される。

#### 【0089】

10

20

30

40

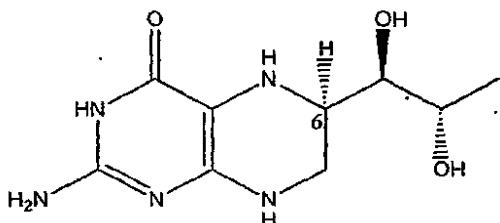
50

## (6R)-L-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩の結晶多形

BH4、特にBH4の二塩酸塩は結晶多形性を示すことが見出されている。BH4の構造を以下に示す。

【0090】

【化7】



10

BH4の(6R)形態は、既知の生物活性形態であるが、BH4は周囲温度で不安定であることも知られている。BH4のある結晶多形はより安定であり、周囲条件下での分解に対して安定であることが見出されている。

【0091】

BH4は取扱いが困難であり、したがってその二塩酸塩(Schircks Laboratories, Jona, スイス)として生成され、その吸湿性および酸化への感受性に起因する物質の分解を防止するために窒素下で封止したアンプルで提供される。米国特許第4,649,197号には、(6R)-および6(S)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩を、そのジアステレオマーに分離することは、6(R,S)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩の低い結晶化度に起因して困難であると開示されている。欧州特許第0079574号には、テトラヒドロビオブテリンの調製が記載されており、固体のテトラヒドロビオブテリン二塩酸塩は中間体として得られる。S. Matsuuraらは、Chemistry Letters 1984年、735~738頁、およびHeterocycles、23巻、No. 12、1985年、3115~3120頁に、無色針状形態の結晶固体としての6(R)-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩を記載しており、それらはJ. Biocchem. 98、1341~1348頁(1985年)に開示されているX線分析によって特徴付けられる。結晶生成物には旋光度6.81°が見られたが、それは欧州特許A2-0191335、実施例6の白色結晶形態の結晶固体について報告されている旋光度6.51°に類似している。

20

【0092】

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩の作製中に得られた結果によって、該化合物が、多形および溶媒和物を含む様々な結晶形態で存在できることが示された。この分野での継続的な関心には、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩の個々の結晶形態の効果的で信頼性のある調製方法、ならびに好ましくは製剤の製造および調製における取扱いおよび処理が容易で、その際に安定であり、物質形態または配合済み生成物として高い保存安定性をもたらし、あるいは安定形態の製造での制御結晶化の中間体として適したそれより不安定な形態をもたらす結晶形態を提供する制御された結晶化条件が必要とされる。

30

【0093】

## 多形B

最も安定であることが見出された結晶多形は、本明細書では「形態B」あるいは「多形B」と呼ばれる。(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリン二塩酸塩作製の研究および作製中に得られた結果によって、以前調製されてはいたが多形性およびそのBH4結晶の安定性への効果は認識されていなかった幾つかの結晶固体が存在することが明らかになった。

40

【0094】

多形Bは、約20超の最も高い熱力学的安定性を有するわずかに吸湿性の無水物である。さらに形態Bは、その熱安定性、標的条件による調製の可能性、その適切な形態およ

50

び粒経に起因して、容易に処理し取り扱うことができる。融点は約 260 (  $H_f > 140 \text{ J/g}$  ) であるが、溶融の前およびその最中の分解に起因して、明確な融点を検出することができない。これらの際立つ特性によって、多形 B は高温で調製される医薬適用分野で特に実現可能なものとなる。多形 B は、0.2  $\mu\text{m}$  ~ 500  $\mu\text{m}$  の範囲であってよい粒経を有する微粉として得ることができる。

#### 【0095】

形態 B は、以下の d 値 ( ) で表される X 線粉末回折パターンを示す。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 ) 、 2.44 ( w ) 。図 6 は、( 6R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の形態 B によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

#### 【0096】

本明細書で使用されるように、以下の括弧内の略記は、( vs ) = 非常に強い強度、( s ) = 強い強度、( m ) = 中程度の強度、( w ) = 弱い強度、および( vw ) = 非常に弱い強度を意味している。特徴的な X 線粉末回折パターンを図 6 に示す。

#### 【0097】

BH4 の他の多形は、製造および配合中の安全な取扱いのために十分な化学的および物理的安定性を有すると同時に、その純粋形態または製剤として高い保存安定性を実現することが見出された。さらに、形態 B および BH4 の他の多形は、非常に多量に調製することができ（例えば 100 キロ規模）、長時間にわたって保存できることが見出された。

#### 【0098】

結晶形態 B を含めた全ての結晶形態（多形、水和物、および溶媒和物）は、最も安定な多形 B の調製に使用することができる。多形 B は、適切な極性の非水性溶媒中の非晶質形態または多形 B 以外の形態、例えば多形 A の懸濁液の相を平衡化することによって得ることができる。したがって本明細書に記載の医薬調製物は、( 6R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形 B の調製物を指す。

#### 【0099】

BH4 の他の形態は、室温で BH4 の他の形態を溶媒に分散し、多形 B を生成するのに十分な時間をかけてその懸濁液を周囲温度で攪拌し、その後結晶形態 B を単離し、単離形態 B から溶媒を除去することによって形態 B に変換することができる。本明細書で使用する周囲温度は、0 ~ 60 、好ましくは 15 ~ 40 の範囲の温度を意味する。適用温度は、処理および攪拌中に、その温度を段階的または継続的に低下することによって変更してもよい。他の形態を形態 B に変換するのに適切な溶媒には、それに限定されるものではないが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、他の C3 - および C4 - アルコール、酢酸、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、メチル - t - ブチルエーテル、1,4 - ジオキサン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、他の C3 ~ C6 - 酢酸塩、メチルエチルケトン、ならびに他のメチル - C3 ~ C5 アルキル - ケトンが含まれる。相の均衡化を完了するための時間は、最大 30 時間、好ましくは最大 20 時間または 20 時間未満であってよい。

#### 【0100】

多形 B は、最大約 5 % の水を含有する溶媒混合物から、特にエタノール、酢酸、および水の混合物から結晶化することによって得ることもできる。( 6R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形 ( B ) は、任意選択で高温にて、エタノール、酢酸、および水を含む溶媒混合物に好ましくは形態 B よりも低エネルギーの固体形態を溶解するか、または( 6R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形 B を溶解し、該溶液に種を添加し、得られた懸濁液を冷却し、形成した結晶を単離することによって調製できることが見出された。溶解は室温で、または最大 70 、好ましくは最大

10

20

30

40

50

50 で実施することができる。溶解のために最終溶媒混合物を使用してよく、または出発材料を最初に水に溶解し、次いで他の溶媒を両方もしくは順に添加してもよい。溶媒混合物の組成物は、体積比が 1 : 3 : 2 ~ 1 : 9 : 4、好ましくは 1 : 5 : 4 の水 : 酢酸 : テトラヒドロフランを含むことができる。該溶液は、好ましくは攪拌される。冷却とは、- 40 ~ 0 、好ましくは 10 ~ 30 に下げた温度を意味し得る。適切な種は、類似または同一の形態を有するもう 1 つのバッチまたは結晶からの多形 B である。単離後、結晶形態 B を、アセトンまたはテトラヒドロフランなどの非溶媒で洗浄し、通常の方式で乾燥することができる。

#### 【0101】

多形 B は、メタノール、エタノール、および酢酸などの非溶媒を添加し、水溶液から結晶化することによって得ることもできる。結晶化および単離手順は、有利には溶液を冷却することなく室温で実施することができる。したがってこのプロセスは、工業規模での実施に非常に適している。

#### 【0102】

本明細書に記載の組成物および方法の一実施形態では、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形 B を含む組成物は、形態 B 以外の固体形態または(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の形態 B を周囲温度で水に溶解し、懸濁液を形成するのに十分な量の非溶媒を添加し、任意選択で懸濁液を一定時間攪拌し、その後形成した結晶を単離することによって調製される。該組成物はさらに、以下に記載の医薬組成物に改変される。

#### 【0103】

水溶液中の(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の濃度は、溶液に対して 10 ~ 80 重量パーセント、より好ましくは 20 ~ 60 重量パーセントであつてよい。好ましい非溶媒（即ち、BH4 の懸濁液を調製するのに有用な溶媒）は、メタノール、エタノール、および酢酸である。非溶媒は水溶液に添加することができる。より好ましくは、水溶液を非溶媒に添加する。懸濁液の形成後の攪拌時間は、最大 30 時間、好ましくは最大 20 時間、または 20 時間未満とすることができる。濾過および乾燥による単離は、上記の既知の方式で実施される。

#### 【0104】

多形 B は非常に安定な結晶形態であり、容易に濾別し乾燥し、粉碎して製剤に所望の粒経に実現可能となる。

#### 【0105】

##### 多形 A

(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の別の結晶多形は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための BH4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 A」または「多形 A」と呼ぶものとする。多形 A はわずかに吸湿性であり、約 3 重量パーセントの含有量まで水を吸着し、それを 10 / 分の速度で加熱して 50 ~ 200 で連続的に放出する。多形 A は吸湿性無水物であり、形態 B に対して準安定形態である。しかし、密封容器で保存すれば周囲条件で数ヶ月にわたって安定である。形態 A は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形 A は、一般に 1 μm ~ 約 500 μm の範囲の中程度の所望の粒経範囲を有する固体粉末として調製することができる。

#### 【0106】

特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す多形 A を、以下の d 値 ( ) で表した。15.5 (vs.) 、 12.0 (m) 、 6.7 (m) 、 6.5 (m) 、 6.3 (w) 、 6.1 (w) 、 5.96 (w) 、 5.49 (m) 、 4.89 (m) 、 3.79 (m) 、 3.70 (s) 、 3.48 (m) 、 3.45 (m) 、 3.33 (s) 、 3.26 (s) 、 3.22 (m) 、 3.18 (m) 、 3.08 (m) 、 3.02 (w) 、 2.95 (w) 、 2.87 (m) 、 2.79 (w) 、 2.70 (w) 。図 7 は、(6R) - L -

10

20

30

40

50

エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の形態 A によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

【 0 1 0 7 】

多形 A は、波数 ( cm - 1 ) で表される特徴的なラマンスペクトル帯を示す。 2 9 3 4 ( w ) 、 2 8 8 0 ( w ) 、 1 6 9 2 ( s ) 、 1 6 8 3 ( m ) 、 1 5 7 7 ( w ) 、 1 4 6 2 ( m ) 、 1 3 6 0 ( w ) 、 1 2 3 7 ( w ) 、 1 1 0 8 ( w ) 、 1 0 0 5 ( v w ) 、 8 8 1 ( v w ) 、 8 1 3 ( v w ) 、 7 1 7 ( m ) 、 6 8 7 ( m ) 、 6 7 3 ( m ) 、 6 5 9 ( m ) 、 5 5 0 ( w ) 、 5 3 0 ( w ) 、 4 9 2 ( m ) 、 3 7 1 ( m ) 、 2 5 8 ( w ) 、 2 0 7 ( w ) 、 1 0 1 ( s ) 、 8 7 ( s ) cm - 1 .

多形 A は、 ( 6 R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水溶液を凍結乾燥するか、または水除去することによって得ることができる。 ( 6 R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の多形 A は、 ( 6 R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩を周囲温度で水に溶解し、 ( 1 ) 溶液を凝固するために溶液を低温に冷却し、減圧下で水を除去するか、または ( 2 ) 前記水溶液から水を除去することによって調製することができる。

【 0 1 0 8 】

結晶形態 A は、濾過によって単離し、次いで乾燥して、吸収された水を生成物から蒸発させることができる。乾燥条件およびその方法は知られており、単離生成物の乾燥または本明細書に記載の変形 ( 2 ) に従う水除去は、真空下で、例えば最大 8 0 、好ましくは 3 0 ~ 8 0 の範囲の高温を適用するか、または高温および真空状態を適用して実施することができる。変形 ( 2 ) で得られる沈殿物の単離の前に、相の平衡化のために、懸濁液を一定期間攪拌することができる。水溶液中の ( 6 R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の濃度は、溶液に対して 5 ~ 4 0 重量パーセントであってよい。

【 0 1 0 9 】

急速冷却は、出発材料としての固溶液を得るのに好ましい。溶媒が完全に除去されるまで、減圧が適用される。凍結乾燥は、当技術分野で周知の技術である。溶媒除去を完了するための時間は、 0 . 0 1 ~ 1 m b a r で適用され得る真空状態、使用される溶媒、および凍結温度に依存して決まる。

【 0 1 1 0 】

多形 A は、室温または室温未満において実質的に水が存在しない条件下で安定であり、それは窒素下の室温で 5 日間と 1 8 時間、それぞれ攪拌したテトラヒドロフランまたは第 3 プチルメチルエーテル中懸濁液の相の平衡化試験で実証される。濾過および室温での空気乾燥によって、未変化の多形 A が産出される。

【 0 1 1 1 】

多形 F

( 6 R ) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の別の結晶多形は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための B H 4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 F 」または「多形 F 」と呼ぶものとする。多形 F はわずかに吸湿性であり、約 3 重量パーセントの含有量まで水を吸着し、それを 1 0 / 分の速度で加熱して 5 0 ~ 2 0 0 で連続的に放出する。多形 F は、準安定形態および吸湿性無水物であり、低い周囲温度では形態 A よりも安定であり、高温では形態 B よりも不安定であり、形態 F は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形 F は、一般に 1  $\mu$  m ~ 約 5 0 0  $\mu$  m の範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

【 0 1 1 2 】

多形 F は、以下の d 値 (  $\text{\AA}$  ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す。 1 7 . 1 ( v s . ) 、 1 2 . 1 ( w ) 、 8 . 6 ( w ) 、 7 . 0 ( w ) 、 6 . 5 ( w ) 、 6 . 4 ( w ) 、 5 . 9 2 ( w ) 、 5 . 7 2 ( w ) 、 5 . 1 1 ( w ) 、 4 . 9 2 ( m ) 、 4 . 8 6 ( w ) 、 4 . 6 8 ( m ) 、 4 . 4 1 ( w ) 、 4 . 1 2 ( w ) 、 3 . 8 8 ( w ) 、 3 . 8 3 ( w ) 、 3 . 7 0 ( m ) 、 3 . 6 4 ( w ) 、 3 . 5 5 ( m ) 、 3 .

10

20

30

40

50

4.9 (s)、3.46 (vs)、3.39 (s)、3.33 (m)、3.31 (m)、3.27 (m)、3.21 (m)、3.19 (m)、3.09 (m)、3.02 (m)、および2.96 (m)。図8は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の形態Fによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

#### 【0113】

多形Fは、前記低エネルギー形態をほとんど溶解しない適切な極性の非水性溶媒、特にメタノール、エタノール、プロパノール、およびイソプロパノールなどのアルコール中の多形Aの懸濁液の相を平衡化することによって得ることができる。(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形Fは、室温未満では(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩をほとんど溶解しない非水性溶媒中に、前記(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の固体形態Aの粒子を分散し、多形Fを生成するのに十分な時間をかけて前記温度でその懸濁液を攪拌し、その後結晶形態Fを単離し、単離形態Fから溶媒を除去することによって調製することもできる。溶媒の除去および乾燥は、大気下、乾燥下、または窒素ガスもしくは希ガスなどの乾燥保護ガスの下、室温以下で、例えば0°に下げる実施することができる。相の平衡化中の温度は、好ましくは5~15°であり、最も好ましくは約10°である。

10

#### 【0114】

##### 多形J

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の別の結晶多形は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態J」または「多形J」と呼ぶものとする。多形Jはわずかに吸湿性であり、空気湿度で取り扱う場合、水を吸着する。多形Jは、準安定形態および吸湿性無水物であり、相対湿度75%超などの高い相対湿度条件に曝露してそれから得られる下記の形態Eに逆変換することができる。形態Jは、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Jは、一般に1μm~約500μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

20

#### 【0115】

形態Jは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。14.6 (m)、6.6 (w)、6.4 (w)、5.47 (w)、4.84 (w)、3.29 (vs)、および3.21 (vs)。図9は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の形態Jによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

30

#### 【0116】

多形Jは、真空中、中程度の温度で形態Eを脱水することによって得ることができる。特に(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形Jは、形態Eを取り出し、真空中で形態Eを処理することによって形態Eから水を除去して、中程度の温度で形態Jを得ることによって調製することができる。中程度の温度とは、25~70°の範囲、最も好ましくは30~50°の範囲の温度を意味し得る。

#### 【0117】

##### 多形K

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の別の結晶多形は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態K」または「多形K」と呼ぶものとする。多形Kはわずかに吸湿性であり、約2.0重量パーセントの含有量まで水を吸着し、それを10°/分の速度で加熱して50°~100°で連続的に放出する。多形Kは、準安定形態および吸湿性無水物であり、高温では形態Bよりも不安定であり、形態Kは、安定な多形、特に形態Bを生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Kは、一般に1μm~約500μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

40

#### 【0118】

50

形態 K は、以下の d 値 ( ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す。14.0 (s)、9.4 (w)、6.6 (w)、6.4 (w)、6.3 (w)、6.1 (w)、6.0 (w)、5.66 (w)、5.33 (w)、5.13 (v w)、4.73 (m)、4.64 (m)、4.48 (w)、4.32 (v w)、4.22 (w)、4.08 (w)、3.88 (w)、3.79 (w)、3.54 (m)、3.49 (v s)、3.39 (m)、3.33 (v s)、3.13 (s)、3.10 (m)、3.05 (m)、3.01 (m)、2.99 (m)、および 2.90 (m)。図 10 は、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の形態 K によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

## 【0119】

多形 K は、少量の水を含有する極性溶媒の混合物から、少量のアスコルビン酸の存在下で結晶化することによって得ることができる。溶媒混合物用の溶媒は、酢酸およびメタノール、エタノール、n-、またはイソプロパノールなどのアルコールから選択することができる。特に、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形 K は、少量の水および少量のアスコルビン酸を含有する酢酸およびアルコールまたはテトラヒドロフランの混合物に、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を高温で溶解し、室温未満の温度に下げる前記ニ塩酸塩を結晶化し、沈殿物を単離し、単離沈殿物を任意選択で真空下にて、高温で乾燥することによって調製することができる。適切なアルコールは、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、およびイソプロパノールであるが、エタノールが好ましい。酢酸対アルコールまたはテトラヒドロフランの比は、2 : 1 ~ 1 : 2 であってよく、好ましくは約 1 : 1 である。(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶解は、高い含水量の存在下で実施することができる、より多量の貧溶媒 (anti-solvent) 混合物を添加して、完全な沈殿を得ることができる。最終組成物の含水量は、溶媒混合物に対して 0.5 ~ 5 重量パーセントであってよく、アスコルビン酸の量は、溶媒混合物に対して 0.01 ~ 0.5 重量パーセントであってよい。溶解のための温度は 30 ~ 100 の範囲であってよく、好ましくは 35 ~ 70 であり、乾燥温度は 30 ~ 50 の範囲であってよい。沈殿物は、単離後、例えば濾過後にエタノールなどのアルコールで洗浄することができる。多形 K は、例えばイソプロパノール中で相を平衡化し、任意選択で 30 ~ 40 などの室温を超える温度で形態 B の結晶を播種することによって、最も安定な形態 B に容易に変換することができる。

## 【0120】

## (6 R) L - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和形態

以下でさらに述べるように、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩は、幾つかの結晶性水和物として存在することが見出され、本明細書ではこれを形態 C、D、E、H、および O と記載し定義するものとする。これらの水和形態は、本明細書に記載の医薬調製物のための BH4 の安定な形態として、BH4 の安定な結晶多形を含む組成物の調製において有用である。

## 【0121】

## 水和形態 C

(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための BH4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 C」または「水和物 C」と呼ぶものとする。水和形態 C はわずかに吸湿性であり、約 5.5 重量パーセントの含水量を有しており、このことは形態 C が一水和物であることを示している。水和物 C は、約 9.4 (H<sub>f</sub> は約 31 J/g) の融点を有し、水和形態 C は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形 C は、一般に 1 μm ~ 約 500 μm の範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

## 【0122】

形態 C は、以下の d 値 ( ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折

10

20

30

40

50

パターンを示す。18.2 (m)、15.4 (w)、13.9 (vs)、10.4 (w)、9.6 (w)、9.1 (w)、8.8 (m)、8.2 (w)、8.0 (w)、6.8 (m)、6.5 (w)、6.05 (m)、5.77 (w)、5.64 (w)、5.44 (w)、5.19 (w)、4.89 (w)、4.76 (w)、4.70 (w)、4.41 (w)、4.25 (m)、4.00 (m)、3.88 (m)、3.80 (m)、3.59 (s)、3.50 (m)、3.44 (m)、3.37 (m)、3.26 (s)、3.19 (vs)、3.17 (s)、3.11 (m)、3.06 (m)、3.02 (m)、2.97 (vs)、2.93 (m)、2.89 (m)、2.83 (m)、および2.43 (m)。図11は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和形態Cによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

10

### 【0123】

水和形態Cは、溶媒に対して好ましくは約5重量パーセントの量の水を含有する非溶媒中の多形Bなどの多形の懸濁液の相を周囲温度で平衡化することによって得ることができる。(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和形態Cは、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を非溶媒に、例えばヘプタン、メタノール、エタノール、1-もしくは2-プロパノールなどのC1~C4-アルコール、酢酸エチルなどの酢酸塩、アセトニトリル、酢酸もしくはテトラヒドロフランなどのエーテル、ジオキサン、第3ブチルメチルエーテル、またはかかる非溶媒の二元もしくは三元混合物に懸濁し、それに十分な水を添加して一水和物を形成し、一水和物を形成するのに十分な時間をかけて周囲温度以下(例えば0~30)で懸濁液を攪拌することによって調製することができる。十分な水とは、溶媒の量に対して1~10重量パーセント、好ましくは3~8重量パーセントの水を意味し得る。固体は濾別し、大気下でおよそ室温にて乾燥することができる。固体は幾らかの水を吸収し、したがって5.5重量パーセントの理論値よりも多い含水量を有することがある。水和形態Cは、形態DおよびBに対して不安定であり、大気下および相対的な低湿度の下、約40の温度で多形Bに容易に変換される。形態Cは、室温で懸濁液を平衡化することによって、より安定な水和物Dに変換することができる。

20

### 【0124】

#### 水和形態D

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の別の水和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態D」または「水和物D」と呼ぶものとする。水和形態Dはわずかに吸湿性であり、約5.0~7.0重量パーセントの含水量を有することができ、このことは形態Dが一水和物であることを示している。水和物Dは、約153(H<sub>f</sub>は約111J/g)の融点を有し、形態Cよりもかなり安定であり、周囲温度で空気湿度に曝露される場合にも安定である。したがって水和形態Dは、製剤を調製するために使用することができ、または安定な多形を生成するための中間体および出発材料として使用することもできる。多形Dは、一般に1μm~約500μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

30

### 【0125】

形態Dは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。8.6 (s)、6.8 (w)、5.56 (m)、4.99 (m)、4.67 (s)、4.32 (m)、3.93 (vs)、3.88 (w)、3.64 (w)、3.41 (w)、3.25 (w)、3.17 (m)、3.05 (s)、2.94 (w)、2.92 (w)、2.88 (m)、2.85 (w)、2.80 (w)、2.79 (m)、2.68 (w)、2.65 (w)、2.52 (vw)、2.35 (w)、2.34 (w)、2.30 (w)、および2.29 (w)。図12は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和形態Dによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

### 【0126】

40

50

水和形態 D は、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の濃縮水溶液を、過剰の非溶媒、例えばヘキサン、ヘプタン、ジクロロメタン、1 - もしくは 2 - プロパノール、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル、酢酸、またはテトラヒドロフラン、ジオキサン、第 3 ブチルメチルエーテルなどの他のもの、またはかかる非溶媒の混合物におよそ室温で添加し、その懸濁液を周囲温度で搅拌することによって得ることができる。結晶固体は濾別し、次いで乾燥室素下、周囲温度で乾燥することができる。好ましい非溶媒はイソプロパノールである。水溶液の添加は、急速な沈殿を回避するために滴加で実施することができる。(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水和形態 D は、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の濃縮水溶液を、過剰の非溶媒におよそ室温で添加し、その懸濁液を周囲温度で搅拌することによって調製することができる。過剰の非溶媒とは、水対非溶媒の比が 1 : 10 ~ 1 : 1000 であることを意味し得る。形態 D は、一水和物に関連する小過剰の水を含有しており、この結晶性水和物のわずかな吸湿性に起因して水を吸収すると考えられる。水和形態 D は、周囲温度および 70 % 未満の相対湿度で、既知の水和物の中で最も安定なものと思われる。水和形態 D は、この水和物が安定な条件下で調製される製剤に使用することができる。周囲温度とは 20 ~ 30 を意味し得る。

10

## 【0127】

## 水和形態 E

(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の別の水和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための BH4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 E」または「水和物 E」と呼ぶものとする。水和形態 E は、約 10 ~ 14 重量パーセントの含水量を有し、そのことは形態 E が二水和物であることを示している。水和物 E は室温未満の温度で形成される。水和形態 E は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。水和物 E は、室素下または任意選択により真空下で、乾燥によって非含水形態 J を生成するのに特に適している。形態 E は非吸湿性であり、かなり高い相対湿度の下、即ち約 60 % を超え最大約 85 % の相対湿度で安定である。多形 E は、一般に 1 μm ~ 約 500 μm の範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

20

## 【0128】

形態 E は、以下の d 値 ( ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す。15.4 (s)、6.6 (w)、6.5 (w)、5.95 (vw)、5.61 (vw)、5.48 (w)、5.24 (w)、4.87 (w)、4.50 (vw)、4.27 (w)、3.94 (w)、3.78 (w)、3.69 (m)、3.60 (w)、3.33 (s)、3.26 (vs)、3.16 (w)、3.08 (m)、2.98 (w)、2.95 (m)、2.91 (w)、2.87 (m)、2.79 (w)、2.74 (w)、2.69 (w)、および 2.62 (w)。図 13 は、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水和形態 E によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

30

## 【0129】

水和形態 E は、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の濃縮水溶液を、約 10 ~ - 10 、好ましくは 0 ~ 10 の温度に冷却した過剰の非溶媒に添加し、その懸濁液を前記温度で搅拌することによって得ることができる。結晶固体は濾別し、次いで乾燥室素下、周囲温度で乾燥することができる。非溶媒は、例えばヘキサン、ヘプタン、ジクロロメタン、1 - もしくは 2 - プロパノール、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル、酢酸、またはテトラヒドロフラン、ジオキサン、第 3 ブチルメチルエーテルなどの他のもの、またはかかる非溶媒の混合物などである。好ましい非溶媒はイソプロパノールである。水溶液の添加は、急速な沈殿を回避するために滴加で実施することができる。(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水和形態 E は、(6R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の濃縮水溶液を過剰の非溶媒に添加し、それを約 10 ~ - 10 の温度に冷却し、その懸濁液を周囲温度で搅拌すること

40

50

によって調製することができる。過剰の非溶媒とは、水対非溶媒の比が1:10~1:100であることを意味し得る。好ましい非溶媒はテトラヒドロフランである。別の調製プロセスは、多形Bを相対湿度70~90%、好ましくは約80%の空気雰囲気に曝露することを含む。水和形態Eは二水和物であると思われ、幾らかの追加の水が吸収され得る。多形Eは、真空下0~100 mbarの圧力で、20~50を意味し得る中程度の温度で、乾燥によって多形Jに変換することができる。形態Eは、高い相対湿度でのその安定性が理由となり、半固体形態の製剤に特に適している。

#### 【0130】

##### 水和形態H

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の別の水和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態H」または「水和物H」と呼ぶものとする。水和形態Hは、約5.0~7.0重量パーセントの含水量を有し、そのことは形態Hが吸湿性一水和物であることを示している。水和形態Hは室温未満の温度で形成される。水和形態Hは、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Hは、一般に1 μm~約500 μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

10

#### 【0131】

形態Hは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。8.6 15.8 (vs)、10.3 (w)、8.0 (w)、6.6 (w)、6.07 (w)、4.81 (w)、4.30 (w)、3.87 (m)、3.60 (m)、3.27 (m)、3.21 (m)、3.13 (w)、3.05 (w)、2.96 (m)、2.89 (m)、2.82 (w)、および2.67 (m)。図14は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水和形態Hによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

20

#### 【0132】

水和形態Hは、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩を、酢酸および水の混合物に周囲温度で溶解し、次いで非溶媒を添加して結晶固体を沈殿させ、得られた懸濁液を冷却し、冷却した懸濁液を一定期間攪拌することによって得ることができる。結晶固体を濾別し、次いで真空下、周囲温度で乾燥する。非溶媒は、例えばヘキサン、ヘプタン、ジクロロメタン、1-もしくは2-プロパノール、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル、酢酸、またはテトラヒドロフラン、ジオキサン、第3ブチルメチルエーテルなどの他のもの、またはかかる非溶媒の混合物などである。好ましい非溶媒はテトラヒドロフランである。(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の水和形態Hは、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩を、酢酸と酢酸よりも少量の水との混合物に周囲温度で溶解し、非溶媒を添加し、得られた懸濁液を-10~10、好ましくは-5~5の範囲の温度に冷却し、懸濁液を前記温度で一定期間攪拌することによって調製することができる。一定期間とは1~20時間を意味し得る。酢酸と水との重量比は2:1~25:1、好ましくは5:1~15:1であってよい。酢酸/水と非溶媒との重量比は1:2~1:5であってよい。水和形態Hは、その吸湿性に起因して、吸収されたわずかな過剰の水を含む一水和物であると思われる。

30

#### 【0133】

##### 水和形態O

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオプテリンニ塩酸塩の別の水和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態O」または「水和物O」と呼ぶものとする。水和形態Oは、およそ室温の温度で形成される。水和形態Oは、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Oは、一般に1 μm~約500 μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

40

#### 【0134】

50

形態Oは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。15.9(w)、14.0(w)、12.0(w)、8.8(m)、7.0(w)、6.5(w)、6.3(m)、6.00(w)、5.75(w)、5.65(m)、5.06(m)、4.98(m)、4.92(m)、4.84(w)、4.77(w)、4.42(w)、4.33(w)、4.00(m)、3.88(m)、3.78(w)、3.69(s)、3.64(s)、3.52(vs)、3.49(s)、3.46(s)、3.42(s)、3.32(m)、3.27(m)、3.23(s)、3.18(s)、3.15(vs)、3.12(m)、3.04(vs)、2.95(m)、2.81(s)、2.72(m)、2.67(m)、および2.61(m)。図15は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の水和形態Oによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

10

### 【0135】

水和形態Oは、得られる相対湿度が約52%となる水蒸気を含む窒素雰囲気に、多形Fを約24時間曝露することによって調製することができる。わずかに吸湿性無水物の形態Fを使用して、相対湿度52%の下で形態Oを調製できるということは、形態Oが水和物であり、周囲温度および湿度条件下で形態Fよりも安定であることを示している。

### 【0136】

#### (6R)-L-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態

以下でさらに述べるように、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩は、幾つかの結晶溶媒和形態として存在することが見出され、本明細書ではこれを形態G、I、L、M、およびNと記載し定義するものとする。これらの溶媒和形態は、本明細書に記載の医薬組成物のためのBH4の安定形態として、BH4の安定な結晶多形を含む組成物の調製において有用である。

20

### 【0137】

#### 溶媒和形態G

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩のエタノール溶媒和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態G」または「水和物G」と呼ぶものとする。エタノール溶媒和形態Gは、約8.0~12.5重量パーセントのエタノール含量を有しており、このことは形態Gが吸湿性のモノエタノール溶媒和物であることを示している。溶媒和形態Gは室温未満の温度で形成される。形態Gは、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Gは、一般に1μm~約500μmの範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

30

### 【0138】

形態Gは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。14.5(vs)、10.9(w)、9.8(w)、7.0(w)、6.3(w)、5.74(w)、5.24(vw)、5.04(vw)、4.79(w)、4.41(w)、4.02(w)、3.86(w)、3.77(w)、3.69(w)、3.63(m)、3.57(m)、3.49(m)、3.41(m)、3.26(m)、3.17(m)、3.07(m)、2.97(m)、2.95(m)、2.87(w)、および2.61(w)。図16は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態Gによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

40

### 【0139】

エタノール溶媒和形態Gは、水に溶解したL-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を結晶化し、大過剰のエタノールを添加し、得られた懸濁液を周囲温度以下で攪拌し、単離固体を、空気または窒素下、およそ室温で乾燥することによって得ることができる。ここで大過剰のエタノールとは、水を10%未満、好ましくは約3~6%を含む、エタノールおよび水の生成混合物を意味する。(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩のエタノール付加形態Gは、およそ室温から75°の温度で(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を水または水とエタノールの混合物に

50

溶解し、加熱した溶液を室温に冷却し、5～10に冷却し、完全な沈殿のために任意選択でエタノールを添加し、得られた懸濁液を20～5の温度で攪拌し、白色結晶固体を濾別し、その固体を空気下または窒素などの保護ガスの下、およそ室温の温度で乾燥することによって調製することができる。このプロセスは、およそ室温で(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を少量の水に溶解し、次いで過剰のエタノールを添加し、次いで相の平衡化のために十分な時間をかけて、得られた懸濁液を攪拌する、第1の変形で実施することができる。第2の変形では、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩をエタノールに懸濁し、任意選択で少量の水を添加し、その懸濁液を加熱し(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を溶解し、その溶液を約5～15の温度に冷却し、追加のエタノールを懸濁液に添加し、次いで相の平衡化のために十分な時間をかけて、得られた懸濁液を攪拌することができる。

10

## 【0140】

## 溶媒和形態I

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の酢酸溶媒和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態I」または「水和物I」と呼ぶものとする。酢酸溶媒和形態Iは、約12.7重量パーセントの酢酸含量を有しており、このことは形態Iが吸湿性酢酸一溶媒和物であることを示している。溶媒和形態Iは室温未満の温度で形成される。酢酸溶媒和形態Iは、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形Iは、一般に1μm～約500μmの範囲の中程度の所望の粒経範囲を有する固体粉末として調製することができる。

20

## 【0141】

形態Iは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。14.5(m)、14.0(w)、11.0(w)、7.0(vw)、6.9(vw)、6.2(vw)、5.30(w)、4.79(w)、4.44(w)、4.29(w)、4.20(vw)、4.02(w)、3.84(w)、3.80(w)、3.67(vs)、3.61(m)、3.56(w)、3.44(m)、3.27(w)、3.19(w)、3.11(s)、3.00(m)、2.94(w)、2.87(w)、および2.80(w)。図17は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態Iによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

30

## 【0142】

酢酸溶媒和形態Iは、L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を酢酸および水の混合物に高温で溶解し、さらなる酢酸を溶液に添加し、約10の温度に冷却し、次いで形成した懸濁液を約15に温め、次いで相の平衡化のために十分な時間をかけて、得られた懸濁液を攪拌することによって得ることができるが、その攪拌は最長3日間続くことがある。次いで結晶固体を濾別し、空気下または窒素などの保護ガスの下、およそ室温の温度で乾燥する。

30

## 【0143】

## 溶媒和形態L

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩のエタノール溶媒和物/水和物の混合結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するためのBH4の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態L」または「水和物L」と呼ぶものとする。形態Lは、4%から最大13%のエタノールおよび0%～約6%の水を含有することができる。形態Lは、エタノール中、約0～20の温度で処理される場合、形態Gに変換することができる。さらに形態Lは、有機溶媒中、周囲温度(10～60)で処理される場合、形態Bに変換することができる。多形Lは、一般に1μm～約500μmの範囲の中程度の所望の粒経範囲を有する固体粉末として調製することができる。

40

## 【0144】

50

形態 L は、以下の d 値 ( ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す。14.1 (v s)、10.4 (w)、9.5 (w)、9.0 (v w)、6.9 (w)、6.5 (w)、6.1 (w)、5.75 (w)、5.61 (w)、5.08 (w)、4.71 (w)、3.86 (w)、3.78 (w)、3.46 (m)、3.36 (m)、3.06 (w)、2.90 (w)、および 2.82 (w)。図 18 は、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態 L によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

#### 【0145】

形態 L は、水和形態 E をエタノールに室温で懸濁し、相の平衡化のために 10 ~ 20 時間という十分な時間をかけてその懸濁液を 0 ~ 10 、好ましくは約 5 の温度で攪拌することによって得ることができる。次いで結晶固体を濾別し、好ましくは 30 の減圧下または窒素下で乾燥する。T G - F T I R による分析は、形態 L が不定量のエタノールおよび水を含有できること、即ち形態 L が多形（無水物）として、混合エタノール溶媒和物 / 水和物として、または水和物としても存在し得ることを示している。

10

#### 【0146】

##### 溶媒和形態 M

(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩のエタノール溶媒和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための B H 4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 M 」または「水和物 M 」と呼ぶものとする。形態 M は、4 % から最大 13 % のエタノールおよび 0 % ~ 約 6 % の水を含有することができ、このことは形態 M がわずかに吸湿性のエタノール溶媒和物であることを示している。溶媒和形態 M は室温で形成される。形態 M は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。というのは、形態 M がエタノール中、約 - 10 ° ~ 15 の温度で処理される場合には形態 G に変換され、エタノール、C 3 および C 4 アルコール、または T H F およびジオキサンといった環式エーテルなどの有機溶媒中で処理される場合には形態 B に変換され得るからである。多形 M は、一般に 1 μm ~ 約 500 μm の範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

20

#### 【0147】

形態 M は、以下の d 値 ( ) で表される特徴的なピークを有する特徴的な X 線粉末回折パターンを示す。18.9 (s)、6.4 (m)、6.06 (w)、5.66 (w)、5.28 (w)、4.50 (w)、4.23 (w)、および 3.22 (v s)。図 19 は、(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態 M によって示される特徴的な X 線回折パターンのグラフである。

30

#### 【0148】

エタノール溶媒和形態 M は、L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩をエタノールに溶解し、その溶液を窒素下の周囲温度で、即ち 10 ~ 40 で蒸発させることによって得ることができる。形態 M は、速度約 20 ~ 100 ml / 分の少量の乾燥窒素流の下で形態 G を乾燥することによって得ることもできる。窒素下の乾燥度に依存してエタノールの残量は変わり、即ち約 3 % ~ 13 % となり得る。

40

#### 【0149】

##### 溶媒和形態 N

(6 R) - L - エリスロ - テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の別の溶媒和結晶形態は、本明細書に記載の医薬調製物に使用するための B H 4 の安定な好ましい形態であることが見出され、本明細書ではこれを「形態 N 」または「水和物 N 」と呼ぶものとする。形態 N は、イソプロパノールを合計最大 10 % と水を含有することができ、このことは形態 N がわずかに吸湿性のイソプロパノール溶媒和物であることを示している。形態 N は、形態 D をイソプロパノールで洗浄し、その後真空下約 30 で乾燥することによって得ることができる。形態 N は、安定な多形を生成するための中間体および出発材料として特に適している。多形 N は、一般に 1 μm ~ 約 500 μm の範囲の中程度の所望の粒径範囲を有する固体粉末として調製することができる。

50

## 【0150】

形態Nは、以下のd値( )で表される特徴的なピークを有する特徴的なX線粉末回折パターンを示す。19.5(m)、9.9(w)、6.7(w)、5.15(w)、4.83(w)、3.91(w)、3.56(m)、3.33(v s)、3.15(w)、2.89(w)、2.81(w)、2.56(w)、および2.36(w)。図20は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の溶媒和形態Nによって示される特徴的なX線回折パターンのグラフである。

## 【0151】

イソプロパノール形態Nは、L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩を、イソプロパノールおよび水の混合物(例えば4:1の体積比で混合する)4.0mlに溶解することによって得ることができる。この溶液に、イソプロパノール(IPA、例えば約4.0ml)をゆっくり添加し、得られた懸濁液を0℃に冷却し、この温度で数時間(例えば約10~18時間)攪拌する。この懸濁液を濾過し、固体残渣をイソプロパノールで室温にて洗浄する。次いで、得られた結晶材料を周囲温度(例えば約20~30℃)および減圧下(約2~10mbar)で数時間(例えば約5~20時間)乾燥する。TG-FTRによって、25~200℃で9.0%の重量喪失が示されるが、これはイソプロパノールおよび水の両方に帰するものである。この結果は、形態Nがイソプロパノール溶媒和物の形態または混合イソプロパノール溶媒和物/水和物の形態で、あるいは少量の水を含有する非溶媒和形態として存在できることを示している。

10

## 【0152】

多形の調製については、懸濁液の攪拌(相の平衡化)、沈殿、再結晶化、蒸発、溶媒様水分収着法、または溶媒和物の分解などの当技術分野で周知の結晶技術を使用することができる。希釈した飽和または過飽和の溶液を、適切な核形成剤を用いた播種での結晶化、またはそれなしの結晶化に使用することができる。最大100℃の温度を適用して、溶液を形成することができる。結晶化および沈殿を開始するために、-100℃、好ましくはマイナス30℃に冷却することができる。準安定多形または疑似多形を使用して、より安定な形態の調製のための溶液または懸濁液を調製し、溶液濃度をより高めることができる。

20

## 【0153】

驚くべきことに、水和形態Dは水和物の中で最も安定な形態であり、形態BおよびDは製剤に使用するのに特に適していることが見出された。形態BおよびDは、目的とする製造、好都合な結晶寸法および形態に起因する良好な取扱い、様々なタイプの製剤の生成条件下での非常に良好な安定性、保存安定性、高い可溶性、および高い生体利用能などの幾つかの利点を提供する。したがって、本明細書に開示の組成物および方法の一実施形態は、(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の多形Bおよび/または水和形態Dならびに医薬として許容可能な担体または希釈剤を含む医薬組成物である。

30

## 【0154】

(6R)-L-エリスロ-テトラヒドロビオブテリンニ塩酸塩の結晶形態は、葉酸もしくはテトラヒドロ葉酸、またはナトリウム、カリウム、カルシウム、もしくはアンモニウム塩などのその医薬として許容可能な塩のそれぞれ単独と一緒に、またはさらにアルギニンと一緒に使用することができる。結晶形態：葉酸またはその塩：アルギニンの重量比は、約1:10:10~約10:1:1であってよい。

40

## 【0155】

本発明は、本明細書に記載のテトラヒドロビオブテリン多形のいずれか、またはかかる多形のいずれかを含む安定な医薬組成物を、内皮機能不全に関連する状態の治療のために使用する方法を提供する。葉酸塩前駆体、葉酸、または葉酸塩誘導体を含む葉酸塩との併用治療も企図されており、テトラヒドロビオブテリンまたはBH4前駆体もしくはBH4誘導体と葉酸塩の両方を含む医薬組成物または食品を用いる治療も同様に企図される。例示的な葉酸塩は、共に参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,011,040号および第6,544,994号に開示されており、それには葉酸(プロロイルモノグ

50

ルタミン酸)、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、5-メチルテトラヒドロ葉酸、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸、5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸、5,10-ホルムイミノテトラヒドロ葉酸、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸(ロイコボリン)、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸、10-メチルテトラヒドロ葉酸、1つもしくは複数の葉酸ポリグルタミン酸、葉酸のブテリン部分もしくは葉酸ポリグルタミン酸のピラジン環が還元されてジヒドロ葉酸塩もしくはテトラヒドロ葉酸塩を与える化合物、またはN-5もしくはN-10位が、酸化の様々なレベルで1つの炭素単位を担持する前記化合物全ての誘導体、またはそれらの医薬として相溶性のある塩、またはそれらの2つ以上の組合せが含まれる。例示的なテトラヒドロ葉酸塩には、5-ホルミル-(6S)-テトラヒドロ葉酸、5-メチル-(6S)-テトラヒドロ葉酸、5,10-メチレン-(6R)-テトラヒドロ葉酸、5,10-メテニル-(6R)-テトラヒドロ葉酸、5-ホルムイミノ-(6S)-テトラヒドロ葉酸、または(6S)-テトラヒドロ葉酸、およびその塩が含まれる。

10

## 【0156】

## 4. 製剤

本明細書に記載の製剤は、好ましくは経口製剤として投与される。経口製剤は、好ましくはカプセル剤、錠剤、ピル剤、およびトローチ剤などの固体製剤、または水性懸濁剤、エリキシル剤、およびシロップ剤などの液体製剤である。本明細書に記載のBH4の様々な形態は、粉剤(微粒子)、顆粒剤、懸濁剤、もしくは溶剤として直接使用することができ、あるいは他の医薬として許容可能な成分と組み合わせて成分を混合し、任意選択でそれらを微粉碎し、次いで例えば硬質もしくは軟質ゼラチンから構成されるカプセルに充填するか、錠剤、ピル剤、もしくはトローチ剤に圧縮するか、または懸濁剤、エリキシル剤、およびシロップ剤用の担体にそれらを溶解することができる。コーティングは、ピル剤を形成するための圧縮後に適用することができる。

20

20

## 【0157】

医薬として許容可能な成分は、様々なタイプの製剤について周知であり、様々な製剤のタイプに合わせた、例えば天然または合成ポリマーなどの結合剤、賦形剤、潤滑剤、界面活性剤、甘味剤および矯味剤、コーティング材料、保存剤、色素、増粘剤、助剤、抗菌剤、抗酸化物質、および担体であってよい。本明細書に記載の組成物に有用な結合剤の非限定的例には、ガムトラガカント、アカシア、デンプン、ゼラチン、および生分解性ポリマー、例えばジカルボン酸、アルキレングリコール、ポリアルキレングリコール、および/または脂肪族ヒドロキシカルボン酸のホモまたはコポリエステル；ジカルボン酸、アルキレンジアミン、および/または脂肪族アミノカルボン酸のホモまたはコポリアミド；対応するポリエステル-ポリアミド-コポリマー、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、およびポリカーボネートが含まれる。生分解性ポリマーは、直鎖、分岐、または架橋であってよい。幾つかの例は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、およびポリ-d,1-ラクチド/グリコリドである。ポリマーの他の例は、水溶性ポリマー、例えばポリオキサアルキレン(ポリオキサエチレン、ポリオキサプロピレン、およびそれらの混合ポリマー、ポリアクリルアミドおよびヒドロキシアルキル化ポリアクリルアミド、ポリマレイン酸およびそのエステルまたはアミド、ポリアクリル酸およびそのエステルまたはアミド、ポリビニルアルコールおよびそのエステルまたはエーテル、ポリビニルイミダゾール、ポリビニルピロリドン、ならびにキトサンなどの天然ポリマーである。

30

30

## 【0158】

本明細書に記載の組成物に有用な賦形剤の非限定的な例には、第2リン酸カルシウムなどのリン酸塩が含まれる。本明細書に記載の組成物に使用される潤滑剤の非限定的例には、天然または合成油、脂肪、ワックス、またはステアリン酸マグネシウムなどの脂肪酸塩が含まれる。

40

## 【0159】

本明細書に記載の組成物に使用するための界面活性剤は、アニオン性、アニオン性、両性、または中性であってよい。本明細書に記載の組成物に有用な界面活性剤の非限定的な

50

例には、レシチン、リン脂質、硫酸オクチル、硫酸デシル、硫酸ドデシル、硫酸テトラデシル、硫酸ヘキサデシル、および硫酸オクタデシル、オレイン酸Na、またはカプリン酸Na、1-アシルアミノエタン-2-スルホン酸、例えば1-オクタノイルアミノエタン-2-スルホン酸、1-デカノイルアミノエタン-2-スルホン酸、1-ドデカノイルアミノエタン-2-スルホン酸、1-テトラデカノイルアミノエタン-2-スルホン酸、1-ヘキサデカノイルアミノエタン-2-スルホン酸、および1-オクタデカノイルアミノエタン-2-スルホン酸、ならびにタウロコール酸およびタウロデオキシコール酸、胆汁酸およびそれらの塩、例えばコール酸、デオキシコール酸、およびグリココール酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウムまたはラウリン酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、セチル硫酸ナトリウム、塩酸化ヒマシ油およびジオクチルスルホハク酸ナトリウム、コカミドプロピルベタインおよびラウリルベタイン、脂肪アルコール、コレステロール、グリセロールモノまたはジステアリン酸、グリセロールモノまたはジオレイン酸およびグリセロールモノまたはジパルミチン酸、ならびにステアリン酸ポリオキシエチレンが含まれる。

10

## 【0160】

本明細書に記載の組成物に有用な甘味剤の非限定的な例には、スクロース、フルクトース、ラクトース、またはアスパルテームが含まれる。本明細書に記載の組成物に使用するための嬌味剤の非限定的な例には、ペパーミント、冬緑樹の油またはチェリーもしくはオレンジ風味などの果実の風味が含まれる。本明細書に記載の組成物に使用するためのコーティング材料の非限定的な例には、ゼラチン、ワックス、セラック、糖類、または他の生分解性ポリマーが含まれる。本明細書に記載の組成物に使用するための保存剤の非限定的例には、メチルまたはプロピルパラベン、ソルビン酸、クロロブタノール、フェノール、およびチメロサールが含まれる。

20

## 【0161】

本明細書に記載の水和形態Dは、飲料用溶液を提供するために水性環境下で崩壊する、発泡性の錠剤または粉剤として配合することもできる。シロップ剤またはエリキシル剤は、本明細書に記載の多形、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、メチルパラベンのような保存剤、色素、および嬌味剤を含有することができる。

30

## 【0162】

消化管の体液と接触する活性薬剤の制御放出を実現し、血漿中の活性な薬剤の実質的に不变で効果的なレベルを提供するために、本明細書に記載の多形から徐放製剤を調製することもできる。本目的では、結晶形態は、生分解性ポリマー、水溶性ポリマー、またはその両方の混合物、および任意選択で適切な界面活性剤のポリマーマトリックスに埋め込むことができる。この状況における埋込みとは、ポリマーのマトリックスへの微粒子の組込みを意味し得る。制御放出製剤は、既知の分散または乳化コーティング技術を介して、分散微粒子または乳化微細液滴を封入することによって得ることもできる。

## 【0163】

個々の必要性は様々であるが、各成分の有効量の最適な範囲の決定は当業者によってなされる。BH4の一般的用量は、1日に体重1kg当たり約1～約20mgを含み、通常は約5(1mg/kg × 体重5kg)～3000mg/日(30mg/kg × 体重100kg)の量になろう。かかる用量は、単回用量で投与することができ、または多回用量に分割することもできる。継続的な連日投与が企図されると同時に、幾つかの臨床指標が改善されて特定の閾値を超える場合には、BH4療法を停止することが望ましい。当然のことながらこの療法は、臨床上の改善指標が低下するイベントでは再び開始することができる。

40

## 【0164】

本発明の組成物の適切な用量は、受容者の年齢、健康状態、および体重、ある種の併用療法、もしあれば治療頻度および所望の効果の性質(即ち、所望の肺動脈圧の低下量)によって決まるることを理解されよう。投与の頻度は、動脈酸素圧への薬力学的効果にも依存して決まる。しかし最も好ましい用量は、当業者によって理解または決定されるように、

50

過度の実験なしに個々の対象に合わせて調整することができる。このことには一般に、標準的な用量の調節、例えば患者が低体重である場合には用量を低減することが含まれる。

【0165】

上記のように、各治療に必要とされる総用量は、多回用量または単回用量で投与することができる。B H 4 組成物は単独で、または疾患もしくは他のその症候を対象とする他の治療剤と組み合わせて投与することができる。

【0166】

本明細書に記載の開示から明らかなように、幅広い態様において本願は、結晶化 B H 4 製剤を含有する組成物の臨床適用を企図する。本組成物は、適切な医薬組成物に、即ちかかる併用療法における *in vivo* 適用に適した形態に配合されるべきである。これには一般に、発熱物質ならびにヒトまたは動物にとって有害となり得る他の不純物を基本的に含まない組成物を調製することが含まれよう。好ましくは、結晶化 B H 4 組成物を含む製剤は、血管疾患の治療に直接使用できるようなものであり得る。

10

【0167】

一般には、B H 4 を摂取に適するようにする適切な塩および緩衝液を使用することが望ましいであろう。本発明の水性組成物は、医薬として許容可能な担体または水性媒体に溶解または分散した有効量の B H 4 を含む。かかる組成物は、経口または注入によって投与することができる。

【0168】

「医薬として許容可能なまたは薬理学的に許容可能な」という用語は、動物またはヒトに投与する場合に、副作用、アレルギー、または他の有害な反応をもたらさない分子の存在および組成物を指す。本明細書で使用される「医薬として許容可能な担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸收遅延剤等が含まれる。医薬活性のある物質へのかかる媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。従来の任意の媒体または薬剤が治療組成物と相溶性がない場合以外、治療組成物におけるその使用が企図される。補助的な有効成分も、組成物に組み込むことができる。例示的実施形態では、医薬としてのタンパク質製剤は、固形コーンシロップ、高オレイン酸ベニバナ油、カカオ脂、大豆油、L-ロイシン、リン酸三カルシウム、L-チロシン、L-プロリン、酢酸L-リシン、D A T E M (乳化剤)、L-グルタミン、L-バリン、リン酸水素二カリウム、L-イソロイシン、L-アルギニン、L-アラニン、グリシン、L-アスパラギン-水和物、L-セリン、クエン酸カリウム、L-トレオニン、クエン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、L-ヒスチジン、L-メチオニン、アスコルビン酸、炭酸カルシウム、L-グルタミン酸、L-シスチン二塩酸塩、L-トリプトファン、L-アスパラギン酸、塩化コリン、タウリン、m-イノシトール、硫酸第一鉄、パルミチン酸アスコルビル、硫酸亜鉛、L-カルニチン、酢酸トコフェリル、塩化ナトリウム、ナイアシンアミド、混合トコフェロール、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、チアミン塩化物塩酸塩、ビタミンAパルミテート、硫酸マンガン、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、カロテン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、塩化クロム、モリブデン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミンを含むことができる。補助剤中のアミノ酸、ミネラル、およびビタミンは、成分のそれぞれの1日推奨用量を実現する量で提供されるべきである。

20

30

40

【0169】

本明細書で使用される「医薬として許容可能な担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸收遅延剤等が含まれる。医薬活性のある物質へのかかる媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。従来の任意の媒体または薬剤が治療組成物と相溶性がない場合以外、治療組成物におけるその使用が企図される。補助的な有効成分も、組成物に組み込むことができる。

【0170】

本発明の活性組成物には B H 4 の従来の医薬調製物が含まれ、これは本明細書で論じられており、当業者にも知られているものである。本発明のこれらの組成物の投与は、食事

50

補給のための一般的な任意の経路を介して行われよう。タンパク質は、好ましくは B H 4 と同様に経口投与される。

【 0 1 7 1 】

幾つかの実施形態では、血管疾患の治療に使用される B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体を、吸入によって投与される吸入可能な製剤として配合することが企図される。B H 4 またはその前駆体もしくは誘導体それ自体は、エアロゾル製剤として調製することができる。吸入可能な組成物を使用して肺高血圧を治療する方法は当業者に知られており、例えば米国特許第 6,756,033 号（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されており、プロスタグランジン調製物の吸入送達による肺高血圧の治療を教示している。プロスタグランジンに関する前記特許に記載されている吸入技術は、B H 4 および / またはその前駆体および誘導体の吸入調製物の生成にも有用となろう。さらに、B H 4 系組成物およびプロスタグランジン調製物の併用投与によって、内皮機能不全を治療できることが企図される。

10

【 0 1 7 2 】

活性化合物は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した遊離塩基または薬理学的に許容可能な塩の水溶液として投与するために調製することができる。分散剤は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物、ならびに油中で調製することもできる。保存および使用の通常条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含有する。

20

【 0 1 7 3 】

B H 4 組成物は、注入使用に適切な製剤として調製することができる。かかる組成物は、滅菌注入溶液または分散液を即時調製するための、滅菌水溶液または分散液と滅菌粉末を含む。全ての場合において、この製剤は滅菌されなければならない、シリンジ適用が容易な程度まで流体でなければならない。この製剤は、製造および保存条件下で安定でなければならない、バクテリアおよび菌類などの微生物の汚染作用を受けないよう保存されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であつてよい。例えばレシチンなどのコーティングを使用し、分散液の場合には必要な粒径を維持し、界面活性剤を使用することによって、適切な流動性を維持することができる。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール等によって実現することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注入可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸マグネシウム、およびゼラチンを組成物に使用することによって実現することができる。

30

【 0 1 7 4 】

注入可能な滅菌溶剤は、必要量の活性化合物を先に列挙した様々な他の成分と共に適切な溶媒に組み込み、次いで必要に応じて滅菌濾過することによって調製される。一般に分散剤は、ベースとなる分散媒および先に列挙したものから他の必要な成分を含有する滅菌ビヒクルに、様々な滅菌有効成分を組み込むことによって調製される。注入可能な滅菌溶剤の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、先の滅菌濾過溶液から、有効成分と所望の追加の任意成分との粉末を産出する真空乾燥および凍結乾燥技術である。

40

【 0 1 7 5 】

本明細書に記載の方法で使用するための B H 4 組成物の好ましい製剤は、錠剤製剤である。驚くべきことに、錠剤製剤にアスコルビン酸を添加することによって製剤の安定性が増大することが見出されている。特定の安定化機構に限定するものではないが、B H 4 を様々な賦形剤と共に製剤に混合する場合、少量のアスコルビン酸でも（例えば 2 重量 % 未満）B H 4 との複合体が生成され、B H 4 が分解される 1 つまたは複数の経路が抑制されると思われる。したがって、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、W O 2006 / 055511 として公開されている 2005 年 11 月 16 日出願の国際特許出願 P

50

C T / U S 0 5 / 4 1 2 5 2 により詳細に述べられているように、本明細書で使用するための B H 4 のある例示的な錠剤製剤は、アスコルビン酸を含む。

【 0 1 7 6 】

例示的な安定な経口製剤は、製剤の安定性または他の特徴を改善する以下の追加成分、結合剤、崩壊剤、酸性抗酸化物質もしくは潤滑剤、またはそれらの組合せの 1 つまたは複数を含有する。例示的な安定な錠剤製剤は、結合剤および崩壊剤、任意選択で酸性抗酸化物質、さらに任意選択で潤滑剤を含む。結合剤の例示的な濃度は約 1 w t % ~ 約 5 w t % または約 1 . 5 ~ 3 w t % であり、結合剤対 B H 4 の例示的な重量比は、約 1 : 1 0 ~ 約 1 : 2 0 の範囲である。崩壊剤の例示的な濃度は約 1 w t % ~ 約 2 0 w t % であり、崩壊剤対 B H 4 の例示的な重量比は、約 1 : 5 ~ 約 1 : 1 0 の範囲である。抗酸化物質の例示的な濃度は約 1 w t % ~ 約 3 w t % であり、抗酸化物質対 B H 4 の例示的な重量比は、約 1 : 5 ~ 1 : 3 0 の範囲である。一例では、アスコルビン酸が抗酸化物質であり、B H 4 との比が 1 : 1 未満、例えば 1 : 2 以下、または 1 : 1 0 以下で使用される。本発明の安定な錠剤製剤の潤滑剤の例示的な濃度は約 0 . 1 w t % ~ 約 2 w t % であり、潤滑剤対 B H 4 の例示的な重量比は、約 1 : 2 5 ~ 1 : 6 5 の範囲である。

10

【 0 1 7 7 】

安定な固体製剤は、治療される状態にとって適切な他の治療剤、例えば葉酸塩前駆体、葉酸、または葉酸塩誘導体を含む葉酸塩；ならびに / あるいはアルギニン；ならびに / あるいはビタミン C および / またはビタミン B 2 (リボフラビン) および / またはビタミン B 1 2 などのビタミン；ならびに / あるいは L - ドーパまたはカルビドパなどの神経伝達物質前駆体；ならびに / あるいは 5 - ヒドロキシトリプトファンを任意選択で含むことができる。

20

【 0 1 7 8 】

本明細書に記載の組成物に使用される B H 4 は、好ましくは二塩酸塩として配合されるが、B H 4 の他の形態が所望の生物活性を有し、その結果 B H 4 の他の塩形態を使用できることが企図される。

【 0 1 7 9 】

医薬として許容可能な塩基付加塩は、アルカリ金属およびアルカリ土類金属または有機アミンなどの金属またはアミンを用いて形成することができる。化合物の医薬として許容可能な塩は、医薬として許容可能なカチオンを用いて調製することもできる。適切な医薬として許容可能なカチオンは当業者には周知であり、アルカリ、アルカリ土類、アンモニウム、および第 4 級アンモニウムカチオンが含まれる。炭酸塩または炭酸水素塩も可能である。カチオンとして使用される金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、アンモニウム、カルシウム、または鉄等である。適切なアミンの例には、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、N , N ' ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N メチルグルカミン、およびプロカインが含まれる。

30

【 0 1 8 0 】

医薬として許容可能な酸付加塩には、無機または有機酸塩が含まれる。適切な酸塩の例には、塩酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩、リン酸塩が含まれる。他の適切な医薬として許容可能な塩は当業者に周知であり、例えば酢酸、クエン酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸、塩酸、臭化水素酸、硫酸、またはリン酸；および有機カルボン酸、スルホン酸、スルホもしくはリン酸または N 置換スルファミン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカル酸、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、サリチル酸、4 アミノサリチ酸、2 フェノキシ安息香酸、2 アセトキシ安息香酸、エンボン酸 ( e m b o n i c a c i d ) 、ニコチン酸、もしくはイソニコチン酸；およびタンパク質の天然合成に関与するアミノ酸などのアミノ酸、例えばグルタミン酸もしくはアスパラギン酸、ならびにフェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、2 ヒドロキシエタンスルホン酸、

40

50

エタン 1 , 2 ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4 メチルベンゼンスルホン酸、ナフタレン 2 スルホン酸、ナフタレン 1 , 5 ジスルホン酸、2 もしくは 3 ホスホグリセリン酸塩、グルコース 6 リン酸塩、N シクロヘキシルスルファミン酸(チクロ形成を伴う)、またはアスコルビン酸などの他の酸有機化合物が含まれる。

## 【 0181 】

特に、無機または有機酸との BH4 塩が好ましい。代替の BH4 塩形態の非限定的例には、酢酸、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、フマル酸、およびマンデル酸の BH4 塩が含まれる。

## 【 0182 】

BH4 投与の頻度は、薬剤の薬物動態パラメータおよび投与経路に依存して決まることになる。最適な製剤は、投与経路および所望の用量に依存して当業者によって決定されよう。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences、18巻(1990年、Mack Publ. Co.、Easton PA 18042) 1435 1712 頁参照。かかる製剤は、投与薬剤の物理的状態、安定性、in vivo 放出速度、および in vivo クリアランス速度に影響を与える。投与経路に依存して、適切な用量は、体重、体表面積、または臓器寸法に従って算出することができる。適切な治療用量を決定するのに必要な算出のさらなる改良は、特に本明細書に開示の投与情報およびアッセイ、ならびに動物またはヒトの臨床試験で観測される薬物動態データに照らして、過度の実験なしに当業者によって定期的に行われる。

10

20

## 【 0183 】

適切な投与量は、phe の血中濃度を決定するために確立されたアッセイの使用と、関連する用量反応データを併用して確定することができる。最終投与レジメンは、薬物作用を改変する因子、例えば薬物の特定の活性、患者の障害の重篤度および応答性、患者の年齢、状態、体重、性別、および食事、任意感染症の重篤度、投与時間、ならびに他の臨床因子を考慮して、担当医によって決定されよう。研究が実施される際、特定の疾患および状態に対する適切な投与レベルおよび治療期間に関してさらなる情報が明らかとなろう。

30

## 【 0184 】

本発明の医薬組成物および治療方法は、人間医学および獣医学分野に有用となり得ることを理解されよう。したがって、治療される対象は哺乳類であり、好ましくはヒトまたは他の動物であり得る。動物目的では、対象には、例えば牛、羊、豚、馬、およびヤギを含む家畜、犬および猫などのペット、外来動物および/または動物園の動物、マウスラット、ウサギ、モルモット、およびハムスターなどの実験動物；ならびに鶏、七面鳥アヒル、およびガチョウなどの家禽が含まれる。

40

## 【 0185 】

本発明の幾つかの態様では、BH4 を単独で、またはかかる疾患の治療のために従来使用されているもう 1 つの薬剤または介入と組み合わせて使用して本明細書に記載の疾患を治療するために必要な全ての成分は、キット内にパッケージすることができる。特に本発明は、本明細書に記載の疾患の治療的介入に使用するためのキットを提供し、そのキットは、BH4 またはその誘導体もしくは前駆体、ならびに送達可能な形態の医薬品を調製するための緩衝液および他の成分を含む医薬品のパッケージー式、および/またはかかる医薬品を送達するための装置、および/またはかかる BH4 系医薬品との併用療法に使用される任意の薬剤、および/または医薬品と共にパッケージされる本明細書に記載の疾患の治療のための指示物を含む。この指示物は、印刷紙などの任意の有形表現媒体、またはコンピュータ読み取り可能な磁気もしくは光媒体、またはインターネットを介して接続可能な世界規模のウェブページなどの遠隔コンピュータデータを参照するための指示物に固定することができる。

## 【 0186 】

I II . BH4 合成および/または NO 生成を変更する因子

50

本発明は、内皮機能不全を特徴とする疾患または障害を治療する方法を企図し、その方

法は、テトラヒドロビオプテリン（B H 4）またはその前駆体もしくは誘導体を増大する薬剤を含む組成物を単独で、または治療剤と組み合わせて前記対象に投与することを含み、前記投与は、前記B H 4含有組成物を用いない内皮機能不全と比較して、前記対象の前記内皮機能不全を緩和するのに有効である。

【0187】

本発明の一実施形態は、第1の速度制御酵素G T P C H 1、P T P S、およびS Rを含む、B H 4合成経路の酵素の発現もしくは合成または活性を増大することによって、B H 4のレベルを増大する1つまたは複数の薬剤を含む。本発明の好ましい一実施形態では、B H 4合成は、任意の1つまたは複数の環状アデノシンーリン酸（c A M P）類似体またはアゴニスト、例えばホルスコリン、8-プロモc A M P、またはc A M P媒介性の細胞シグナリングを増大するように機能する他の薬剤、例えばインターロイキン-1、インターフェロン-（I F N - ）、腫瘍壞死因子（T N F - ）、c反応性タンパク質、H M G - C o A還元酵素（アトルバスタチンなどのスタチン）神経成長因子（N G F）、上皮成長因子（E G F）を含むサイトカインおよび成長因子、アドレノメデュリンおよび安息香酸エストラジオールを含むホルモン、ならびにN A D P HおよびN A D P H類似体、カフェイン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを含むシクロスボリンAメチルキサンチン、テオフィリン、レセルピン、過酸化水素などの他の化合物を使用してG T P C H 1発現の発現を増大することによって高まる。

10

【0188】

ホスホジエステラーゼはc G M Pおよびc A M Pなどの3' 5' - 環状ヌクレオチドを分解することが、当技術分野で十分に確立されている。c A M Pは、G T P C H 1の既知の活性化因子、B H 4合成のための速度制御酵素、e N O Sに必要な補因子である。したがってホスホジエステラーゼファミリーの阻害剤は、B H 4合成酵素G T P C H 1への第2の活性化作用を有する。したがって本発明の一実施形態は、P D E 1、P D E 3、P D E 5を含む11のホスホジエステラーゼファミリー（P D E 1 ~ 11）の阻害剤を使用して3' 5' - 環状ヌクレオチドの分解を抑制することによって、G T P C H 1レベルを増大することに関する。本発明のP D E阻害剤には、バイアグラ（V i a g r a）/タダラフィル（t a d a l a f i l）、シアリス（c i a l i s）/シルダネフィル（s i l d a n e f i l）、バルデナフィル（v a r d e n a f i l）/レビトラ（l e v i t r a）、8-メトキシメチル-IB MX、U K - 9 0 2 3 4、デキサメタゾン、ヘスペレチン、ヘスペレジン、イルソグラジン、ビンポセチン、シロスタミド、ロリプラム、エチルカルボリン-3-カルボン酸塩（- C C E）、テトラヒドロ- -カルボリン誘導体、3-O-メチルケルセチン等が含まれる。

20

30

【0189】

本発明の別の実施形態は、遺伝子治療またはB H 4合成機構のポリヌクレオチドの内皮標的送達によりB H 4合成酵素のレベルを増大することによって、B H 4のレベルを増大することに関する。遺伝子治療に使用されるB H 4合成遺伝子を特許請求している出願済み特許には、米国特許第2 0 0 3 0 1 9 8 6 2 0号が含まれる。本発明のさらに別の実施形態は、B H 4合成酵素G T P C H 1、P T P S、S R、P C D、D H P R、およびD H F Rを補充することによってB H 4のレベルを増大することに関する。B H 4合成酵素によって、活性および不活性なタンパク質の変異体を含む酵素の全ての天然および非天然形態が含まれることが確立されていることが企図される。

40

【0190】

本発明の別の実施形態は、A P活性を抑制することによって、アルカリフォスファターゼ（A P）の代わりに基質7, 8-ジヒドロネオプテリン三リン酸をB H 4合成酵素P T P Sに転換することによりB H 4レベルを増大することに関する。A P活性を抑制する薬剤または化合物には、リン酸類似体、レバミゾール、およびL - P h eが含まれる。本発明の別の実施形態は、アルカリフォスファターゼの合成を抑制するための低分子阻害性R N A（s i R N A）、アンチセンスR N A、d s D N A、小分子、中和抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および抗体フラグメントを含む、アルカリフォスファターゼ

50

を抑制する薬剤または化合物に関する。

【0191】

本発明の別の実施形態には、B H 4 合成のデノボ合成経路の酵素合成のために必要な触媒または補因子の活性を増大する薬剤または化合物が含まれる。

【0192】

本発明の別の実施形態には、B H 4 の合成に必要な酵素の分解を防止する薬剤または化合物が含まれる。本発明のさらに別の実施形態には、B H 4 の合成およびその合成酵素、例えばG T P C H 1 、P T P S 、およびS R に必要な触媒の分解を防止する薬剤または化合物が含まれる。

【0193】

本発明の別の実施形態は、B H 4 によりG T P C H 1 / G F R P 複合体のフィードバック調整を抑制することによって、B H 4 のレベルを増大することに関する。本発明の好ましい一実施形態は、G T P C H 1 / G F R P 複合体へのB H 4 の結合を抑制し、それによってB H 4 によるフィードバック阻害を防止する薬剤または化合物に関する。本発明の薬剤または化合物には、複合体、構造類似体等に合わせて変えられた親和性を有するB H 4 の代替形態などの競合阻害剤が含まれる。さらに本発明の別の実施形態には、B H 4 の合成を誘発するC T P C H 1 / G F R P へのL - フェニルアラニンの結合を増大する薬剤または化合物が含まれる。本発明の別の実施形態には、L - P h e の前駆体などの、L - P h e レベルを増大する薬剤または化合物が含まれる。

【0194】

本発明のさらに別の実施形態は、G F R P の活性または合成を調整する薬剤または化合物に関する。本発明の好ましい一実施形態には、G F R P の活性を抑制する薬剤または化合物が含まれる。本発明の別の実施形態には、G F R P の合成を抑制するための、s i R N A 、小分子、抗体、抗体フラグメント等の使用が含まれる。

【0195】

本発明の別の実施形態は、サルベージ経路を介してB H 2 の還元を増大することによってB H 4 のレベルを増大することに関する。B H 4 は、i n v i v o でB H 2 に酸化する。キノイド形態 (q B H 2 ) および7 , 8 - ジヒドロブテリンとして存在するB H 2 は、それぞれD H P R およびD H F R によってB H 4 に還元される。本発明の好ましい一実施形態は、N A D P H 、チオール、p - クロロメルクリ安息香酸、過酸化水素等を経路とする薬剤または化合物を使用して酵素P C D 、D H P R 、およびD H F R の活性および合成を調整することによって、B H 2 からのB H 4 の再生成またはサルベージを増大することに関する。

【0196】

本発明の別の実施形態は、アスコルビン酸 (ビタミンC) 、ビタミンE 、トコフェロール (例えばビタミンA) 、セレン、カロテン、カロチノイド、フラボン、フラボノイド、葉酸塩、フラボン、フラバノン、イソフラボン、カテキン、アントシアニジン、カルコン等を含む抗酸化物質などの薬剤または化合物を使用してB H 4 の酸化を低減することによって、活性B H 4 のレベルを増大することに関する。米国特許および特許出願第6544994号、第20050119270号、第20030007961号、および第20020052374号には、B H 4 および抗酸化物質の使用が記載されている。

【0197】

本発明のさらに別の実施形態には、グアノシン三リン酸、7 , 8 - ジヒドロ - ネオブテリン三リン酸、および6 - ピルボイルテトラヒドロビオブテリンを含むB H 4 の前駆体である薬剤または化合物が含まれる。

【実施例】

【0198】

V I I . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明者が本発明の実施に十分機能することを発見した技術を示すもの

10

20

30

40

50

であり、したがってその実施に好ましい態様を構成すると考え得ることを、当業者は理解すべきである。但し、開示されている幾つかの実施形態において多くの変更を加えることができるが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを、当業者は本開示に照らして理解すべきである。

【0199】

実施例1

6R-テトラヒドロビオブテリンを用いた臨床評価

以下の実施例は、本発明の治療方法におけるBH4の臨床評価に使用するためのパラメータに対する指針を提供する。全体を通して本明細書で論じられるように、BH4は、糖尿病関連および非糖尿病性の心血管系合併症、例えばそれに限定されるものではないが、抵抗性高血圧、間欠性跛行、冠動脈高血圧、冠動脈機能、肺動脈高血圧、および鎌状赤血球症を含む溶血性貧血の治療に使用されよう。安全性、薬物動態、ならびにサロゲートおよび明確化臨床エンドポイント両方の最初の応答に関してBH4の1日の経口用量を評価することになる臨床試験が行われよう。この試験は、関連の試験によるエンドポイント、例えば間欠性跛行に関しては歩行中の疼痛発症の改善における有効性を評価し、30人の評価可能な患者に関する十分な安全性の情報を収集するために、最短期間、それに限定する必要はないが各患者につき1週間行われることになろう。

10

【0200】

この試験の最初の用量は、約2～約10mg/kg、または約1～20mg/kgで変わることになる。この用量が患者に臨床的エンドポイントの改善をもたらさないか、または直接的な有意の臨床的利益をもたらさないイベントにおいては、必要に応じて用量を増加し、最小限の追加期間中、それに限定する必要はないが1週間それを維持して安全性を確立し、さらなる有効性を評価すべきである。低用量、例えば0.1～2mg/kgの用量が企図され、1mg/kg～5mg/kgの用量も同様である。かかる用量は、関連の試験によるエンドポイント、それに限定されるものではないがアテローム硬化性合併症または肺高血圧に関係するエンドポイントに改善をもたらすことが期待される。

20

【0201】

本発明は特に、BH4またはその前駆体もしくは誘導体を、1日当たり体重1kgにつき1～5mgの範囲の用量で任意の投与経路を介して、それに限定されるものではないが経口投与によって、1日当たりの用量を1回で、または1日当たりの用量を多数回に分割して（例えば2、3、または4回）、少なくとも1、2、3、または4週間もしくはそれ以上、または1、2、3、4、5、6ヶ月もしくはそれ以上の期間、本願で言及する血管の病状のいずれか、またはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる、2005年6月1日出願の米国特許出願第11/143,887号に言及されている血管の病状のいずれかを治療するために使用することを企図する。例示的用量には、1日に5mg/kg未満、1日に4.5mg/kg以下、1日に4mg/kg以下、1日に3.5mg/kg以下、1日に3mg/kg以下、1日に2.5mg/kg以下、1日に2mg/kg以下、1日に1.5mg/kg以下、1日に1mg/kg以下、または1日に0.5mg/kg以下が含まれる。体表面積当たりの同等の用量も企図される。

30

【0202】

平均的な体重/体表面積（例えば70kg）のヒトについて、本発明は、400mg未満の1日の総用量も企図する。かかる例示的な1日の総用量には、360mg/day、350mg/day、300mg/day、280mg/day、210mg/day、180mg/day、175mg/day、150mg/day、または140mg/dayが含まれる。例えば350mg/dayまたは175mg/dayは、175mgの経口用製剤で1日1回または2回、容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、320mg/day以下、160mg/day以下、または80mg/day以下が含まれる。かかる用量は、80または160mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、45、90、135、180、225、270、315、または360mg/dayもしくはそれ未満が含まれ、これらは45または90mgの経口用製剤で容易に投与することができる。さらに他

40

50

の例示的な1日の総用量には、60、120、180、240、300、または360mg/日が含まれ、これらは60または120mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、70、140、210、280、または350mg/日が含まれ、これらは70または140mgの経口用製剤で容易に投与することができる。例示的な1日の総用量には、55、110、165、220、275、または330mg/日も含まれ、これらは55mgの経口用製剤で容易に投与することができる。他の例示的な1日の総用量には、例えば65mgまたは75mgの製剤としての、65、130、195、260、もしくは325mg/日、または75、150、225、300、もしくは375mg/日が含まれる。

## 【0203】

10

BH4それ自体が投与される場合、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許出願第11/143,887号に記載の塩または多形、および2005年11月16日出願の国際特許出願PCT/US05/41252に記載の安定な固体製剤のいずれかを投与することができる。その有益な活性を保持するBH4の例示的な前駆体および誘導体は、米国特許出願第11/143,887号に記載されている。

## 【0204】

安全性の測定には、有害イベント、アレルギー反応、完全な臨床化学パネル（腎臓および肝臓機能）、検尿、および分類を伴うCBCが含まれる。さらに、他のパラメータも監視されよう。本発明は、血流の循環ならびに6R-BH4の一般分布および半減期における薬物の薬物動態パラメータの決定も企図する。これらの測定は、用量を臨床反応と関連付ける助けになろう。

20

## 【0205】

## 方法

糖尿病関連および非糖尿病関連の血管障害を有する患者は、ベースライン、病歴および健康検査、ならびに臨床状態における特定の徴候（例えば、間欠性跛行の患者におけるトレッドミル試験中の疼痛の発症）を診断するために一般に使用される、それに限定されるものではないが血圧測定、6分間歩行試験、および心エコー検査試験を含む様々な診断試験を受けることになる。提案されるヒトのBH4用量である2～約10mg/kgは、1日1～3回の用量に分割して投与されよう。臨床的エンドポイントは、頻繁に監視されることになる。完全な評価は、治療期間終了の1週間後に実施されよう。用量増加が必要ならば、患者は先に概説した同じスケジュールに従うことになる。安全性は、試験全体を通して監視されよう。

30

## 【0206】

## 診断および対象／非対象基準

対象は、性別、年齢、および一般的な診断試験によって確認された特定血管障害の立証済み診断に基付いて選択されることになる。

## 【0207】

## 用量、経路、およびレジメン

患者は、1日当たり5mg/kgの用量のBH4を摂取することになる。臨床的エンドポイントが十分な量で改善されず、臨床的利益が観測されないイベントでは、20mg/kgの1日の総用量が投与されるまで、必要に応じて用量を増加することができる。1日のBH4投与は、液剤、粉剤、錠剤、またはカプセル剤として経口投与されるか、または経鼻胃チューブを介して投与されよう。1日の総用量は、単回用量として、または場合により1日用量を2回もしくは3回に分割して与えることができる。患者は臨床的に観測されると同時に、任意の有害反応についても監視されよう。任意の異常な症候が観測される場合、治験薬投与は直ちに停止され、試験継続に関する決定がなされよう。

40

## 【0208】

## BH4の安定性

BH4療法は、試験過程中に有意な急性または慢性薬物反応が生じない場合に安全であると決定されよう。薬物の長期投与は、臨床試験、臨床検査、または他の適切な試験にお

50

いて有意な異常性が観測されない場合に安全であると決定されよう。

【0209】

実施例 2

糖尿病患者における 6 R - テトラヒドロビオブテリンでの臨床評価

糖尿病患者の第 1 / 2 相または第 2 a 相における用量効果、投与間隔、および安全性の確立

任意の第 2 a 相の投与 / 有効性試験を開始する前に、様々な糖尿病集団で第 1 / 2 短相の用量増加試験を実施して、血管コンプライアンスへの用量効果を確立し、安全性を考慮すべきである。最初の試験によって、用量範囲およびレジメン、ならびに臨床的エンドポイントを支持するために監視され得る血管機能エンドポイントの範囲が確立されよう。最初の試験の対象は、有意な血管疾患（微小血管コンプライアンスの減少）および高血圧を有する糖尿病患者であり、B H 4 の 1 日の経口用量 0、1、2、5、10、および 20 mg / kg は、1 日 1 回または 1 日 2 回の投与レジメンで投与されることになる。患者は、投与で安定化したら 1 日の間に、血管コンプライアンス、かん流 / 再かん流 / 前腕血流および血圧について、治療の 1 週間かけて監視されよう。この試験によって、第 2 相の適切な用量範囲および 1 日のレジメンが評価され、臨床開発ならびにこの集団の安全性を支持するために使用される定量的な有効性の測定値の存在が確立されよう。

10

【0210】

糖尿病集団の第 2 a 相および第 2 b 相における徴候の調査

適切な集団、用量 / レジメン、および徴候は、2 つ以上の試験における第 2 a 相プログラムで、30 ~ 60 日という比較的短い生命治療期間で評価されることになる。任意の第 2 a 相試験に含まれる特定の医療を必要とする、かなり焦点を絞った糖尿病患者の任意の群では、血管機能不全の変化の他の臨床的インパクトと同時に、内皮機能およびインスリン耐性の生化学的マーカーの評価を評価するために、様々な他の測定値が同時に評価されることになる。

20

【0211】

適切な集団 / 徴候における第 2 b 相試験は、より長期間の治療を試験して、より大きな集団での第 3 相試験を設計し、特定用量を評価するために実施されよう。

【0212】

選択糖尿病における選定された第 1 徴候の第 3 相試験

30

第 3 相試験は、非常に重要な徴候に焦点を当てるものであるが、第 2 または第 3 のエンドポイントとしての血管機能の支持情報の発生も含まれよう。最小限 2 つの制御された第 3 相試験が実施されることになるが、多様な併用薬を用いている患者、腎不全などの特定の医療問題を有する患者、または疾患範囲内の他の結果にある患者などのリスクのある他の集団を含むために、追加の第 2 相または第 3 相の設計が考慮されよう。

40

【0213】

一般的血管機能

血管コンプライアンス / 内皮機能不全 / H T N : 血管コンプライアンスおよび C 2 異常および H T N の変化の証拠がある様々な糖尿病患者は、用量を 0、1、2、5、10、および 20 mg / kg と增量する 1 週間の間に、小血管における血管コンプライアンスの C 2 測定値について評価されることになる。血管コンプライアンスおよび H T N への B H 4 増大の効果が評価され、B H 4 の用量効果が患者の様々な集団で確立されることになる。1 日の間の薬物効果が決定され、レジメンを確立する一助にされよう。

【0214】

難治性高血圧 : 第 2 a 相試験は、無作為化二重盲検プラシーボ試験設計に基づいて開始されることになる。この試験は、血圧が 140 mmHg / 90 mmHg より高く、3 種の医薬品を使用している患者 80 人を必要とするものである。総患者数には、糖尿病患者 40 人が含まれる。1 群当たり患者 20 人とし、プラシーボ群を含む 4 群とする。非対象基準には、重篤な肢虚血、心不全、および整形外科的合併症が含まれよう。B H 4 は、0 ~ 10 mg / kg の範囲の用量で 4 週間患者に投与されよう。患者は、収縮期および拡張期

50

血圧の測定値について評価され、歩行時の血圧について監視されることになる。

【0215】

インスリン感受性／グルコース制御：グルコースが制御されにくく、一般的な経口用抗糖尿病薬に不応症であるかまたは応答しにくい糖尿病患者は、グルコース／インスリン濃度、Hg b A 1 c の測定値に基づいて評価されることになる。B H 4 の投与は、グルコース耐性試験およびグルコース制御 (Hg b A 1 C の減少) の結果を改善することが期待される。かかる患者は、様々な処方において評価され得る。

【0216】

末梢灌流

特定の糖尿病関連徵候の試験

間欠性跛行：第2a相試験は、1:1の二重盲検プラシーボ試験設計に基づいて実施されることになる。この試験は、糖尿病患者40人を含む間欠性跛行の患者80人を含むことになる。非対象基準には、重篤な肢虚血、心不全、および整形外科的合併症が含まれよう。患者は、10mg/kgの用量のプラシーボまたはB H 4 を12週間投与されよう。腓腹筋痛を有し、長距離歩行能力が制限された患者は、疼痛が始まるまでの一定期間および距離を歩行する能力についてトレッドミルで評価されることになる。特に、傾斜トレッドミルでの最長歩行時間、疼痛のない歩行距離、血圧、血流、血流依存性拡張 (FMD) 、および生活の質 (QoL) の臨床的に関連のあるエンドポイント。B H 4 の投与は、末梢灌流の最も臨床的に関連のあるエンドポイントである運動への遅れがちな血管反応および長距離にわたる歩行能力を改善することが期待される。

10

20

【0217】

末梢灌流の低下：四肢への血流が低下した患者は、B H 4 用量の増加による四肢への血流改善について評価され、切断の頻度を低減されよう。

【0218】

皮膚血流および創傷治癒の低下：糖尿病性潰瘍または皮膚血流低下を有する患者は、皮膚への血流改善について評価され、B H 4 療法での創傷治癒を高められよう。

【0219】

心疾患

うつ血性心不全 (CHF) または肺高血圧：血圧上昇および血管機能低下を合併するCHFを有する糖尿病患者は、心エコー検査、心拍出量／心臓駆出分、および6分間歩行試験によって得られる測定値に基づいて評価されることになる。B H 4 療法は、血圧を低下し、心血流を増大して心臓機能を相乗的に改善し、6分間歩行試験を改善することが期待される。

30

【0220】

運動時の狭心症：運動限定期的な狭心症を有し、硝酸塩療法を必要とする糖尿病患者は、対象がB H 4 を投与された状態で狭心症を発症するまでトレッドミルで歩行できる時間を測定し、冠血流を監視することによって評価されることになる。B H 4 療法は、冠血流を改善し、それによってトレッドミルで試験する際に狭心症を遅延するか、または排除することが期待される。

【0221】

冠動脈疾患 (CAD) および関連するアテローム性動脈硬化症：以前1度心筋梗塞 (MI) または虚血イベントを経た、初期または後期アテローム性動脈硬化症および冠動脈疾患を有する糖尿病患者は、アテローム性動脈硬化症の進行の防止および／またはMI／卒中／死亡の減少について評価されることになる。第2a相試験は、無作為化二重盲検プラシーボ試験設計に基づいて実施されることになる。この試験は、冠動脈バイパスグラフト術 (CABG) を必要とするCADを示す糖尿病患者40人を含む患者80人を含むことになる。1群当たり患者20人とし、プラシーボ群を含む4群とする。非対象基準は、心不全および不安定な狭心症の発症とする。患者は、0～10mg/kgのB H 4 またはプラシーボを4週間投与されよう。患者は、冠動脈機能不全、大血管機能不全、CAD、活性酸素種の組織レベル、およびB H 4 レベルについて評価されることになる。B H 4 療法

40

50

は、アテローム性動脈硬化症の進行速度、M I の頻度、および他の血管イベントを低減することが期待される。急性的には、血管拡張の改善および血栓形成の低減によって、冠動脈機能が増大することが期待され、その後のアテローム性動脈硬化症の低減によって、血管疾患の進行が改善することが期待される。

#### 【0222】

##### 眼科疾患

視神経委縮または糖尿病性網膜疾患：網膜血管機能不全に起因する視力低下を有する糖尿病患者は、視力および網膜への血流測定に関して評価されることになる。B H 4 は、血流を改善して視力を改善することが期待される。

#### 【0223】

##### 腎疾患

糖尿病性腎疾患の微量アルブミン尿または腎不全 / 糸球体濾過量 (G F R) 減少：腎臓の血管疾患に合致する尿へのタンパク質の流出またはクレアチニンレベルの上昇を有する糖尿病患者は、24時間内の標本の尿へのタンパク質の流出およびG F R の測定に関して評価されることになる。B H 4 療法は、タンパク尿を低減し、G F R を改善することが期待される。

#### 【0224】

##### 糖尿病患者の肺高血圧

うっ血性心不全のある肺高血圧またはうっ血性心不全のない肺高血圧を有する糖尿病患者は、6分間歩行試験の実施能力、C H F の発症、および肺動脈圧の測定値に関して評価されることになる。B H 4 療法は、肺動脈圧および心血管系機能を改善することが期待される。動物モデルにおいて、B H 4 欠乏および肺高血圧が関係している幾つかのデータが存在する。

#### 【0225】

##### 実施例 3

##### 糖尿病に関連しない他の心血管系徴候の試験

##### 肺血管疾患

原発性肺動脈高血圧 (P A H)：第1b相試験は、非盲検用量暫定試験設計に基付いて実施されよう。この試験は、原発性P A Hを有する10～20人の患者を含むことになる。非対象基準には、医薬品への不安定な応答が含まれよう。B H 4 の用量は、0～10mg / kgで4～12週間滴定されることになる。患者は、6分間歩行試験、ニューヨーク心臓協会 (N Y H A) スコア、ボルグ呼吸困難スコア、肺動脈および心臓機能の心電図による評価に関して評価されることになる。

#### 【0226】

鎌状赤血球の肺高血圧または他の異常血色素症 (H b)：うっ血性心不全のある肺高血圧またはうっ血性心不全のない肺高血圧を有するH b - S患者は、6分間歩行試験の実施能力、C H F の発症、および肺動脈圧の測定値に関して評価されることになる。B H 4 療法は、肺動脈圧および心血管系機能を改善することが期待される。

#### 【0227】

特発性肺高血圧 (I P H)：その疾患に関して既知の心血管系の原因が無いI P H患者、特に40歳未満の若年の患者は、6分間歩行試験、C H F の発症、肺動脈圧の測定値に関して評価されることになる。B H 4 療法は、肺動脈圧およびC V機能を改善することが期待される。

#### 【0228】

新生児の持続性肺高血圧 (P P H N)：P P H Nである満期妊娠者の乳児は、肺圧の解決、酸素化の回復、および死亡率に関して評価されることになる。B H 4 療法は、酸素化を改善する肺動脈圧およびシャントの急速で完全な改善をもたらすことが期待される。非実用的であり毒性のある一酸化窒素吸入療法とは異なり、B H 4 は非毒性であり、有効となろう。

#### 【0229】

10

20

30

40

50

### 卒中および関連の虚血性血管疾患

脳卒中後の脳血管痙攣：対象には、入院中で急性脳卒中の治療を受けている脳卒中後の患者が含まれることになる。患者は、梗塞面積および脳かん流の治療前後に関して評価されることになる。B H 4 療法は、痙攣に弛緩をもたらし、梗塞面積を低減することが期待される。犬の卒中モデルからのデータによって、血餅部位周辺の脳卒中後の血管痙攣が伸展し、元のイベントよりも大きな損害を生じるが、亜硝酸塩溶液の注入によって防止できることが示される。

#### 【0230】

##### 移植関連内皮機能不全

固形臓器移植後の血管機能不全：この試験には、固形臓器移植を受けた患者が含まれることになる。対象は、移植後の血管機能不全によって生じた臓器機能不全について評価されることになる。B H 4 は、移植後の臓器機能を改善し、移植された臓器の損失を低減することが期待される。

10

#### 【0231】

シクロスボリンA（C s A）誘発性内皮機能不全：臓器移植後のC s Aの患者は、移植後の血管機能不全によって生じた臓器機能不全について評価されることになる。B H 4 療法は、臓器機能を改善し、血管合併症の頻度を減少することが期待される。

#### 【0232】

Brandacherら、Transplantation、81(4)：583(2006年)には、同種移植の生着が、テトラヒドロビオブテリンおよびシクロスボリンAによって有意に延長されたことが報告されている。同種異系の非治療対照と比較して、全ての群において移植組織内のペルオキシ亜硝酸の形成が低下した。簡潔には、近交系雄性ラットの2つの完全な同種異系を得た。頸部異所性心臓移植を実施し、心臓同種移植の生着を毎日の触診および検査によって決定し、重篤な拒絶反応を示す完全な心拍停止を組織学によって確認した。移植後、5～10匹の動物の群を7日間B H 4で治療した(8時間毎に50mg/kgを新たにリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、筋肉内投与した)。ラットを術後1日後または6日後に屠殺し、組織学的評価のために移植片を除去した。HPLCによる硝酸塩および亜硝酸塩測定のために、対応する血漿サンプルを収集した。組織サンプルを液体窒素で直ちに凍結し、-75°Cで保存するか、またはホルマリンに浸漬しパラフィンに埋め込んだ後、H&E染色もしくは免疫組織化学によって分析した。治療を受けていない同種移植は、移植後およそ7日および8日に拒否反応を示した(平均グラフト生着率7.1±0.7日)のに対し、テトラヒドロビオブテリンは、12.3±4.9日に生着を延長した(治療を受けていない同種移植との差異p<0.05)。組織学的評価の際、B H 4治療を受けた心臓は、単核細胞の浸潤およびいくらかの炎症性浸潤の病巣を示した。治療を受けていない動物およびB H 4で治療した動物において、6日目に硝酸塩および亜硝酸塩濃度が増大した。データは、テトラヒドロビオブテリンが同種移植生着を有意に延長することを示した。

20

#### 【0233】

##### 心疾患または冠状動脈疾患

血管機能不全／狭心症：高コレステロール血症患者および喫煙者は、アテローム性動脈硬化症の進行の防止および／またはMI、卒中、死亡の低減について評価されることになる。B H 4 療法は、アテローム性動脈硬化症の進行速度を低下し、冠動脈血管拡張を改善し、血栓形成を低減することが期待される。

30

#### 【0234】

うつ血性心不全：CHFを有する非糖尿病患者は、心エコー検査、心拍出量／心臓駆出分、および6分間歩行試験を使用して、CHFの発症について評価されることになる。B H 4 療法は、血圧を低下し、心血流を改善して心臓機能を相乗的に改善し、6分間歩行試験を改善することが期待される。

40

#### 【0235】

##### 溶血性貧血 - 鎌状赤血球症

50

溶血性貧血は、赤血球の早期破壊から生じる不適切な数の循環赤血球（貧血）を特徴とする。溶血性貧血の原因の幾つかには、感染症、薬物療法、自己免疫性障害、および遺伝的障害が含まれる。それに限定されるものではないが、鎌状赤血球貧血、発作性夜間血色素尿症、ヘモグロビンSC疾患、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性卵形赤血球症、特発性自己免疫性溶血性貧血、化学薬剤または物理薬剤によって引き起こされる非免疫性溶血性貧血、二次免疫性溶血性貧血、およびサラセミアを含む、様々なタイプの溶血性貧血がある。溶血性貧血の幾つかの一般的治療には、葉酸、鉄補充、およびコルチコステロイド、ならびに緊急時の輸血が含まれる。治療のタイプ、予後、および合併症は、溶血性貧血のタイプによって変わり得る。合併症には、心血管虚脱および既存の心疾患、肺疾患、または脳血管疾患の悪化が含まれる。

10

### 【0236】

患者は、悪寒、疲労、蒼白、息切れ、頻脈、黄疸、暗色尿、および拡大脾腫を含む症候について評価されることになる。溶血の存在は、間接的ビリルビンレベルの上昇、低血漿ハプトグロビン、尿中ヘモグロビン、尿中ヘモシデリン、尿中および糞中ウロビリノーゲンの増加、網状赤血球絶対数の増加、低赤血球数（RBC）および低ヘモグロビン、ならびに血清LDHの上昇の検出によって決定されよう。同位体標識技術による赤血球の寿命の直接的測定を使用して、寿命を測定することになる。溶血であることが確立されると、より具体的な試験を使用して、溶血性貧血の特定のタイプを同定することになる。該疾患によって影響を受ける他の関連測定値には、尿酸、TIBC、RBC指数、タンパク質電気泳動-血清、カリウム試験、血小板数、末梢血液塗抹、白血球アルカリフォスファターゼ、血清鉄、ヘマトクリット、フェリチン、熱性または寒冷凝集素、Donath-Lanssteiner試験、直接および間接クームス試験、CBC、血液分類、AST、および24時間尿タンパク質が含まれよう。

20

### 【0237】

#### 鎌状赤血球症

鎌状赤血球貧血またはヘモグロビンSS疾患（HbSS）としても知られる鎌状赤血球症は、半月型の異常赤血球を特徴とする遺伝性障害であり、この赤血球が小型血餅を異常に生じる機能を果たし、「鎌状赤血球の疼痛クリーゼ」と呼ばれる痛みを伴う発現症状の再発性発症に寄与している。鎌状赤血球症は、赤血球を重合しその形状を変形するものであり、赤血球の早期崩壊および/または破裂に至るヘモグロビンSと呼ばれる異常なタイプのヘモグロビンによって引き起こされる。脆性の鎌状赤血球は、身体組織への送達酸素が少なく、血流を妨害する小片に細分化する恐れがある。鎌状赤血球貧血は、常染色体劣性遺伝し、約500人に1人のアフリカ系アメリカ人ならびに幾つかの他の民族に影響を及ぼしている。鎌状赤血球症は出生時に存在しているが、症候は、一般に月齢4ヶ月後に発症し、命に関わる恐れがある。血管の閉塞および障害を受けた臓器は、痛みを伴う急性発現症状、または溶血性クリーゼ（障害を受けた赤血球の崩壊）、脾臓による捕捉クリーゼ（血球の蓄積に起因する脾臓膨張）、および形成不全クリーゼ（感染症誘発性の骨髄赤血球生成の停止）を含む「クリーゼ」を引き起こす恐れがある。これらの痛みを伴うクリーゼは、背骨、長骨、および胸骨に影響を及ぼす恐れがあり、疼痛制御および静脈内輸液のために入院を必要とするに十分重篤なものとなり得る。度重なるクリーゼによって、腎臓、肺、骨、目、および中枢神経系に障害を引き起こす恐れがある。

30

### 【0238】

治療は長期的となり、葉酸の補充を含み、急速な赤血球の代謝回転を理由として、細胞生成に不可欠な要素が必要とされる。療法は、症候の管理および制御に焦点を当て、クリーゼの頻度を制限しようとするものである。痛みを伴う発現症状は、鎮痛薬および適切な水分摂取を伴って治療される。ヒドロキシ尿素（Hydrea）は、痛みを伴うクリーゼおよび急性胸部症候群の発現症状の頻度を減少し、輸血の必要性を低減することによって、ある患者の一助となることが見出された。しかし幾らか懸念があり、ヒドロキシ尿素が白血病を引き起こす恐れがあることが確立されている。身体が胎児性ヘモグロビンをより多く生成するように誘導して鎌状赤血球の量を低減する薬剤、または鎌状赤血球への酸素

40

50

の結合を増大する薬剤を含む、より新しい他の療法が検討されている。骨髄移植は治癒をもたらし得るが、移植管理に使用する薬物の毒性、適切なドナーの検出困難、およびコスト高に起因して、少数の患者にしか適応されない。抗菌剤およびワクチンは、鐸状赤血球症を有する子どもに一般的な細菌感染症を防止するために使用できる。さらなる治療には、急性胸部症候群のための部分的交換輸血、卒中などの神経系イベントのための輸血もしくは手術、腎疾患のための透析もしくは腎臓移植、持続勃起症のための洗浄もしくは手術、眼疾患のための手術、股関節壊死のための人工股関節置換手術、有意な胆石症の存在による胆囊摘出、創傷治癒、酸化亜鉛、または下腿潰瘍のための手術、薬物更生および心理社会的合併症のためのカウンセリングが含まれ得る。

## 【0239】

10

過去において、鐸状赤血球症を有する患者は、鐸状赤血球の大部分の患者は20～40歳で臓器不全によってしばしば死亡していたが、管理の改善によって生存率が改善され、患者は40～50歳の年齢まで生存するようになった。死亡原因には、臓器不全、感染症、および肺動脈高血圧が含まれる。合併症には、貧血および胆石をもたらす形成不全および溶血性クリーゼの再発、多系統疾患（腎臓、肝臓、肺）、麻薬乱用、脾臓による捕捉症候群、急性胸部症候群、持続勃起症の結果としての勃起機能不全、失明／視覚障害、神経学的症候および卒中、関節破壊、胆石、感染症、例えば肺炎、胆囊炎、骨髄炎、および尿路感染症、形成不全クリーゼ、腎臓の組織死、脾臓機能喪失、および下腿潰瘍をもたらすパルボウィルスB19感染症が含まれる。

## 【0240】

20

鐸状赤血球貧血は、鐸状赤血球形質を有する2種のキャリアから生じ、鐸状赤血球形質の全てのキャリアについて遺伝カウンセリングが推奨される（アフリカ系アメリカ人の約12人に1人が鐸状赤血球形質を有する）。鐸状赤血球貧血の出生前診断が利用可能である。感染症の迅速な治療、適切な酸素化、および脱水症防止によって、赤血球の鐸状化を防止することができる。抗生素およびワクチン接種によって、感染症を防止することができる。組織の脱酸素を防止するために患者は、激しい身体活動、特に脾臓が膨張している場合、情緒的ストレス、高高度および非加圧の航空飛行などの低酸素含有量を伴う環境、感染症および脱水症の既知の発生源を避けるよう助言される。

## 【0241】

30

患者は、蒼白、黄色皮膚／目、疲労、息切れ、頻脈、成長および思春期遅発症、感染症への感受性、下腿潰瘍、黄疸、骨痛、腹痛発作、および発熱を含む一般的な症候について評価されることになる。血尿（血尿症）、頻尿、過度の口渴、痛みを伴う勃起（該疾患有する10～40%の男性に生じる持続勃起症）、胸痛、および視力低下／失明を含む他の症候も監視されよう。

## 【0242】

40

鐸状赤血球貧血を有する患者を診断し監視するための試験には、完全血球算定（CBC）、ヘモグロビン電気泳動、および鐸状赤血球試験が含まれよう。他の試験には、鐸状赤血球を示す末梢血液塗抹、尿円柱または血尿、血清ヘモグロビンの低下、ビリルビン増加、高白血球数、血清カリウムの増加、血清クレアチニンの上昇、および血中酸素飽和状態の低減が含まれよう。CTスキャンまたはMRIは、特定の環境下の卒中を露呈し得る。

## 【0243】

50

## 実施例 4

## 臨床試験における高血圧のためのB H 4投与

## 予備試験

先の試験は、B H 4の非経口注入または単回経口投与を使用した。したがって、数日から数週間にわたる長期の経口用B H 4が内皮機能不全に持続的改善をもたらすかどうかは知られていなかった。この試験は、高血圧患者におけるB H 4での長期的経口療法が、内皮機能不全改善の結果としての動脈圧（BP）の低下をもたらすかどうかを評価するものである。経口用B H 4の作用期間およびB H 4の様々な用量に対する高血圧患者の応答を研究するために、2つの試験を実施した。

## 【0244】

制御されない高血圧を有し、従来の安定な降圧療法を受けていた場合 (B P 135 / 85)、または新規に高血圧と診断された場合 (B P 140 / 90) で、18 ~ 75 歳の年齢の対象を採用した。患者は、現在の降圧療法を継続され、それを変更なしに維持した。非対象基準は、妊娠の可能性がある女性対象、高血圧の第2の原因であることが既知の症候性冠状動脈または末梢血管疾患の近年の病歴、制御されない重篤な高血圧 (B P > 収縮期 180 mmHg および / または拡張期 110 mmHg)、平均余命を 6 カ月未満に制限すると思われる重篤な合併症、腎臓または肝臓の機能不全、最近 6 週間以内の任意の降圧併用療法の変更、および任意の出血性障害とした。B H 4 粉末を Schircks Laboratories (Jona、イス) から得た。B H 4 がビタミン C と併用投与される場合、ビタミン C を 1 mg / B H 4 を 1 mg の比で B H 4 をビタミン C と混合して、適切な寸法のカプセルに入れた。対象には、そのピル剤を冷蔵庫または冷凍庫で保存するように助言した。

10

## 【0245】

## 試験 1：経口用 B H 4 の作用の開始時間および期間

8 人の対象を採用し、3 人は男性で、平均年齢は 60.5 ± 10.9 歳であった。対象は 2 群の一方に割り当てられた。1 群は、1 日に B H 4 を 10 mg / kg (n = 4) 8 週間摂取し、他方の群は 1 日に B H 4 を 2 分割して経口用量で与えられる 5 mg / kg (n = 4) を 8 週間摂取した。これらの用量は、フェニルケトン尿症に使用される B H 4 の用量をベースにした。治療期間中は毎週、ならびに終了の 1 週間後および 6 週間後に B P 測定を実施した。平均血圧を (S B P + 2 × D B P) / 3 として算出した。

20

## 【0246】

上腕動脈内皮依存および非依存関数を、超音波を使用して、ベースライン、B H 4 治療の 8 週間後、および療法終了の 1 週間後に測定した。この技術は、Prasadら、Circularization、2000 年 101 (20) : 2349 ~ 54 頁に記載されているように実施した。簡潔には、11 MHz の高解像度超音波振動子 (Acuson Inc) を使用して、温度制御された室内で、利き手ではない腕の肘前窓上方の上腕直径を測定した。前腕の B P カフを > 200 mmHg まで 5 分間膨張し、急速に収縮させ、充血開始 1 分後に上腕直径を測定することによって、血流依存性血管拡張 (FMD) を測定した。全ての測定について 3 つの直径を、3 つの個別の拡張終期フレームで測定し平均した。FMD を示す最大上腕動脈拡張を得るために、以下の方程式を使用した。(充血した平均直径 - 平均ベースライン直径) ÷ 平均ベースライン直径 × 100。内皮依存性血管拡張性の応答を測定するために、対象はニトログリセリン 0.4 mg を舌下投与され、5 分後に上腕直径を上記のように測定した。内皮依存性血管拡張を得るために、以下の方程式を使用した。(ニトログリセリン後の平均直径 - ベースライン平均直径) ÷ ベースライン平均直径 × 100。

30

## 【0247】

試験 1 および試験 2 の両方について、統計的分析後の第 1 のエンドポイントは、B H 4 療法中の収縮期、平均、および拡張期 B P の低下であった。第 2 のエンドポイントには、FMD としての内皮機能の改善が含まれる。反復した測定データの線形混合効果モデルを使用して、ベースラインから治療期間終了までの B P の変化および 100 mg 用量群と 200 mg 用量群との間の変化の差を分析した。週に関する二次項は、治療期間にわたって非線形トレンドを占めるモデルに含まれていた。用量、週、および週の 2 乗は、該モデルの主効果項であり、用量割る週および用量割る週の 2 乗は、該モデルの相互作用項であった。相互作用項は、2 つの用量群の間の変化パターンの差を示している。FMD データは、student の両側 t - 検定を使用して分析した。全ての結果を平均 ± SD として表し、p 値 < 0.05 は統計的に有意であるとみなす。

40

## 【0248】

試験 1 の結果は、両群において、B H 4 による収縮期 (p = 0.005 二次トレンド) および平均動脈 B P (p = 0.01) の有意な低下があったことを示した。図 A は血圧応

50

答を示す。各値は、平均±標準誤差である。SBP=収縮期血圧、MBP=平均血圧、DBP=拡張期血圧；p値はANOVAによって決定した。

【0249】

結果は、収縮期BPが平均で3週間後に $13 \pm 9 \text{ mmHg}$  ( $p = 0.004$ ) および5週間後に $15 \pm 15 \text{ mmHg}$  ( $p = 0.04$ ) だけ低下し、この低下が治療の8週間持続したことを示した。BPは、療法終了の6週間後に治療前のレベルに戻った ( $p = \text{ns}$ 、ベースラインと比較)。BH4で心拍には有意な変化がなく、拡張期BPの変化は、統計的有意性に達しなかった。BH4用量 $5 \text{ mg/kg}$ および $10 \text{ mg/kg}$ の間にも、統計的に有意な差はなかった。

【0250】

上腕動脈の血流依存性血管拡張は、平均でBH4の8週間後に $3.4 \pm 1\%$ ～ $8.2 \pm 3.4\%$  ( $p = 0.05$ 、 $n = 6$ ) 上昇し、療法終了の6週間後にベースラインレベルに戻った ( $3.7 \pm 1.3\%$ 、 $p = \text{ns}$ 、ベースラインと比較)。ニトログリセリン媒介性血管拡張には依然として変化がなかった (BH4の前 $11.9 \pm 3\%$ およびBH4の後 $16.1 \pm 5\%$ 、 $p = 0.1$ )。

【0251】

試験2：経口用BH4の用量反応の研究

参加に適するとされた20人の対象のうち、経過観察の採用に関して返答が得られなかつたために4人をならし期間 (run-in phase) 中に排除した。男性の対象は6人であり、平均年齢は $59.5 \pm 8.3$ 歳であった。8人の対象が、経口用BH4を $200 \text{ mg b.i.d.}$  (1日2回) 摂取し、8人が経口用BH4を $100 \text{ mg b.i.d.}$  摂取した。2群間にベースラインの特徴の有意な差はなかった。BH4は1:1の比でビタミンCと混合されたので、全ての対象は、最初の2週間は1日2回、割り当てられたBH4用量でビタミンCを摂取した。2週間のならし期間後、対象は割り当てられた用量のBH4だけをその後4週間摂取した。ならし期間および治療期間の間に、心拍およびBP測定を毎週行った。平均血圧は ( $SBP + 2 \times DBP$ ) / 3として算出した。次いでBH4を終了し、終了後1週目および4週目に経過観察を実施し、そこでBPおよび心拍測定を行った。BH4療法の終了時およびBH4終了の1ヶ月後、薬物治療を開始する前に、定期的化学検査およびLFT'sを行った。

【0252】

試験2では、2週間のビタミンCならし期間の終了時、4週間の経口用BH4療法の終了時、およびBH4終了の4週間後に、上腕動脈内皮依存性および非依存性関数を上記のように測定した。

【0253】

ビタミンCでのならし期間中、いずれの群にも心拍またはBPに有意な変化はなかった。16人の対象における収縮期、拡張期、および平均動脈BPは、それぞれビタミンCの2週間前は $152 \pm 11$ 、 $84 \pm 13$ 、 $106 \pm 10 \text{ mmHg}$ であり、ビタミンCの2週間後は $148 \pm 19$ 、 $86 \pm 11$ 、および $106 \pm 12 \text{ mmHg}$ であった (全て $p = \text{ns}$ )。

【0254】

$200 \text{ mg b.i.d.}$  の経口用BH4を与えられた対象は、収縮期 ( $p = 0.03$ ) および平均BP (線形トレンド分析により $p = 0.04$ ) が有意に上昇した。図Bは、 $200 \text{ mg b.i.d.}$  のBH4で治療を受けた群の血圧応答の図である。値は平均±標準誤差である。SBP=収縮期血圧、MBP=平均血圧、DBP=拡張期血圧；p値はANOVAによって決定した。拡張期BPの低下は、統計的有意性に達しなかった ( $p = 0.08$ )。平均BPは、1週間後有意に低かった ( $p = 0.02$ )。その後数週間BPはさらに有意に低下し、収縮期BPが平均 $16 \text{ mmHg}$ 低下した3週間後に底に達した。 $p = 0.04$  (図B)。療法の終了1週間後、BPは依然として低かったが、BH4の終了4週間後にはBPは上昇し、ベースラインレベルに戻った。

【0255】

10

20

30

40

50

200 mg b. i. d. の B H 4 で、 F M D に有意な改善があった (n = 7)。 F M D は、 B H 4 療法の開始時の  $3.7 \pm 3\%$  から療法 4 週間後の  $7.1 \pm 4.9\%$  まで改善した (p = 0.016)。 B H 4 療法の終了 1 ヶ月後、 F M D はベースラインレベルに戻った (ベースラインと比較して  $3.2 \pm 1.1\%$ 、 p = 0.6)。

#### 【0256】

100 mg b. i. d. の B H 4 を与えられた対象では、 B P に統計的に有意な変化が観測されなかった。図 C は、 100 mg b. i. d. の B H 4 で治療を受けた群の血圧応答の図である。値は平均  $\pm$  標準誤差である。 S B P = 収縮期血圧、 M B P = 平均血圧、 D B P = 拡張期血圧。 100 mg b. i. d. または 200 mg b. i. d. で治療を受けたいずれの群にも、 B H 4 での心拍の有意な変化はなかった。

10

#### 【0257】

100 mg b. i. d. の B H 4 を与えられた対象では F M D に有意な変化がなかった ( $5.3 \pm 2.5\%$  対  $6.2 \pm 3.5\%$  ; p = 0.55)。試験中いずれの群にも、ニトログリセリン媒介性の内皮依存性血管拡張の有意な変化はなかった。

#### 【0258】

いずれの試験中も有意な有害イベントはなかった。結果は、制御されにくい高血圧または新規に診断された高血圧のいずれかを有する対象の動脈 B P を低下するのに、経口用 B H 4 での長期治療が有効であることを示している。この効果は 200 mg b. i. d. 以上の用量で観測され、心拍に変化はなかった。対象には、やはり B P の低下をもたらす用量での B H 4 療法後に、内皮機能不全の有意な改善があった。 B P の低下は、療法の 1 週間以内に明らかとなり、最大 8 週間の継続療法の間、タキフィラシーなしに持続した。血圧は、療法終了後少なくとも 1 週間は依然として低かったが、 4 週間後にはベースラインに戻った。経口用 B H 4 は、任意の重篤な副作用なしに十分耐えられると思われた。

20

#### 【0259】

##### さらなる臨床試験

第 2 相の多施設無作為化二重盲検プラシーボ制御平衡試験を開始して、制御されにくい全身性高血圧の対象の血圧に対する、 1 日 2 回 (b. i. d.) 8 週間投与される 1 日に 10 mg / kg の 6 R B H 4 の効果を評価した。動脈収縮期血圧 (S B P) 、動脈拡張期血圧 (D B P) 、内皮一酸化窒素シンターゼ (e N O S) 活性、および内皮機能不全を含む幾つかのパラメータを評価した。 2 型糖尿病および制御されにくい高血圧の両方を有する患者で、インスリン感受性への効果も評価する。この試験中、降圧療法および適用可能ならば糖尿病療法には、依然として変更は加えられない。

30

#### 【0260】

この試験の対象基準には、無作為化前の少なくとも 3 ヶ月間同時に一貫して摂取される作用機序が異なる少なくとも 2 種の通常の降圧剤を使用しても制御されにくい立証済み本態性高血圧の病歴 (2 つの場合を個別に測定した B P 収縮期少なくとも 140 mm H g および / または拡張期 90 mm H g ) 、最初の 2 週間のスクリーニング期間中、平均 S B P が少なくとも 135 mm H g であり 160 mm H g 以下、平均 D B P が少なくとも 85 mm H g であり 110 mm H g 以下の範囲内である平均 S B P および平均 D B P が含まれる。さらに糖尿病の患者は、少なくとも 3 ヶ月間同じ療法を使用して治療を受けていた 2 型糖尿病の立証済み病歴を有していなければならない。

40

#### 【0261】

試験の非対象基準には、妊娠の計画または可能性があること ; B H 4 の任意の製剤を用いた前治療 ; 6 R B H 4 の任意の賦形剤に対する既知のアレルギーまたは過敏性 ; 高血圧について既知の第 2 の原因 ; 出血性障害、失神もしくは眩暈の病歴、胃腸の重篤な逆流性疾患 (G E R D) 、症候性冠状動脈もしくは末梢血管疾患、不整脈、臓器移植、臓器不全、または 1 型糖尿病などの、試験への参加または安全性を妨害すると思われる合併症または状態 ; 平均余命を 6 ヶ月未満に制限すると思われる任意の重篤な合併症 ; 血清クレアチニン  $> 2.0 \text{ mg / dL}$  または正常値上限の 2 倍を超える肝酵素レベル ; (a) 葉酸塩代謝を抑制することが知られている任意の薬物 (例えばメトトレキサート) 、 (b) レボ

50

ドバ、または(c)任意のホスホジエステラーゼ(PDE)5阻害剤(例えば、Viagra(登録商標)、Cialis(登録商標)、Levitra(登録商標)、またはRevatio(商標))もしくは任意のPDE3阻害剤(例えばシロスタゾール、ミルリノン、またはベスナリノン)との併用療法が含まれる。

【0262】

対象基準を満たし非対象基準によって排除されなかった対象は、6R BH4またはプラシーボを8週間の治療期間中に摂取し、第9週および第12週に経過観察訪問を行うことになる(即ち、1週間後および4週間後の経過観察)。治療期間中、BPトラフおよび心拍(HR)を毎週測定し、両方の経過観察訪問でBPおよびHRを測定する。BPを得るための方法は、全試験を通して標準化され、BP測定のタイミングは、各対象に合わせて標準化される。定期的臨床検査およびバイオマーカーのための血液および尿サンプルを、第0、4、8、および12週に収集する。糖尿病コホートについて、空腹時のインスリンおよびグルコース濃度、ならびにHgb A1Cのための血液を、第0、8、および12週に収集する。ECGを第8週および第12週に評価する。

【0263】

各訪問時に生体徵候を記録する。mmHgとして測定するSBPおよびDBP、1分当たりの脈拍としての心拍(HR)、ならびに1分当たりの呼気としての呼吸数(RR)。健康診断には、体重、一般的な外観、頸部、胸部/肺、心音、腹部、および下肢の評価が含まれる。

【0264】

2週間のスクリーニング期間の間、各3回の訪問時にBPを3回測定する(10分間に3回反復)。これらの9つの測定値を使用してBPが対象基準を満たすかどうかを決定することによって、平均SBPおよびDBP値を算出する。無作為化の後、BPを再度3回測定し(第0週の訪問)、これら3つの値の平均をベースライン値とする。

【0265】

第1週で始まる治療期間中、週毎のBPトラフ測定値を朝の試験薬投与の前に得る。BPは、1日のうちおよそ同じ時に測定すべきである(約90分以内)。

【0266】

標準の12誘導心電図を記録し、以下の測定値を収集する。心拍、心調律、間隔測定(即ちPR、QRS、QT、QTc)、および軸。完全自動の自由行動下24時間BP監視(ABPM)装置を、第0週および第8週の治療で24時間適用する。ABPMによって、収縮期および拡張期BPを測定し記録する。多数のBP測定値をプロットして、BPプロファイルを表示することができる。血液(血漿)および尿サンプルを収集して、内皮機能不全および酸化ストレスの標準的バイオマーカーを評価する。また数人の対象が、超音波検査を使用してFMD、体血管抵抗、および動脈コンプライアンスの追加測定を受ける。

【0267】

血液および尿サンプルでの臨床検査評価には、以下が含まれる。

血液学:白血球数と分類、赤血球数、血小板数、ヘモグロビン、およびヘマトクリット

血液生化学検査:アルブミン、アルカリフィオスファターゼ、ALT(SGPT)、AST(SGOT)、総ビリルビン、BUN、カルシウム、塩化物、総コレステロール、クレアチニン、GGT、グロブリン、グルコース、LDH、リン、カリウム、総タンパク質、ナトリウム、および尿酸

空腹時(4~6時間)血清脂質:トリグリセリド、総コレステロール、低比重リポタンパク質(LDL)、および高比重リポタンパク質(HDL)

2型糖尿病を有する対象における追加の血液生化学検査:空腹時グルコースおよびインスリン、ならびにHgb A<sub>1</sub>C

検尿:定期検査:外観、色、pH、比重、ケトン、タンパク質、グルコース、ビリルビン、亜硝酸塩、ウロビリノーゲン、および顕微鏡検査

標準バイオマーカー(以下)に対して収集される朝一番の排尿サンプル:微量アルブミン

10

20

30

40

50

## 尿

内皮機能不全および酸化ストレスのバイオマーカー：標準的バイオマーカー（血漿および尿）：硝酸塩／亜硝酸塩、cGMP、およびイソプラスタン

肥満度指数（BMI）ならびに空腹時血清インスリンおよびグルコース濃度の結果を使用して、2型糖尿病の対象のインスリン感受性を評価する。HbA1Cも測定する。

## 【0268】

試験の完了時、1日10mg/kgの経口用BH4での治療の、血圧、内皮機能、およびインスリン感受性への効果を評価する。本発明は、収縮期および/または拡張期血圧の統計的に有意な減少が観測されることを企図する。内皮機能および/またはインスリン感受性の測定値も、BH4での治療後に改善し得る。1日当たり2mg/kg～10mg/kgの範囲内の追加用量の効果を、さらなる試験で評価する。

## 【0269】

## 実施例5

## PDE5阻害剤と組み合わせたBH4のin vivo効果

この試験によって、PDE5阻害剤ケエン酸シルデナフィルと組み合わせた高用量の6R-BH4の、in vivoでの心血管系効果を評価した。処理済みおよび未処理の研究用純血種の雄ビーグル犬8匹に、以下の表に記載の2重ラテン方格クロスオーバーデザインで投与した。全ての動物は、強制経口投与によって投与された。試験物質は5mL/kgの用量で投与され（併用投与については総用量10mL/kg）、対照動物には10mL/kgの用量で投与した。300mgの錠剤として提供された6R-BH4（サブロブテリン二塩酸塩）（錠剤1個当たり100mgの有効な6R-BH4）を、乾燥材を用いて室温で保存した。

## 【0270】

## 【表2】

	投与期間1	投与期間2	投与期間3	投与期間4
動物	1日目	4日目	8日目	11日目
No. 1	6R-BH4 <sup>a</sup>	6R-BH4 + シルデナフィル <sup>b</sup>	対照 <sup>c</sup>	シルデナフィル <sup>d</sup>
No. 2	6R-BH4 + シルデナフィル	シルデナフィル	6R-BH4	対照
No. 3	対照	6R-BH4	シルデナフィル	6R-BH4 + シルデナフィル
No. 4	シルデナフィル	対照	6R-BH4 + シルデナフィル	6R-BH4
No. 5	対照	6R-BH4 + シルデナフィル	シルデナフィル	6R-BH4
No. 6	6R-BH4 + シルデナフィル	6R-BH4	対照	シルデナフィル
No. 7	シルデナフィル	対照	6R-BH4	6R-BH4 + シルデナフィル
No. 8	6R-BH4	シルデナフィル	6R-BH4 + シルデナフィル	対照

<sup>a</sup> 6R-BH4を与えられた動物は、5mL/kgの用量で100mg/kg摂取した。

<sup>b</sup> 併用治療を受けた動物は、6R-BH4(100mg/kg:用量5mL/kg)に次いである用量のケエン酸シルデナフィル(30mg/kg:用量5mL/kg)を摂取し、総用量は10mL/kgであった。

<sup>c</sup> 対照群の動物は、用量10mL/kgの逆浸透水を摂取した。

<sup>d</sup> ケエン酸シルデナフィルを与えられた動物は、用量5mL/kgで30mg/kg摂取した。

治療の開始時、動物は月齢約7～10ヶ月であり、投与前のそれらの体重は、7.8～12.0kgの範囲であった。

10

20

30

40

50

## 【0271】

治療開始の少なくとも2週間前に、動物を終夜絶食させ、麻酔をし、心電図（ECG）および血圧送信機を腹部に移植し、腹壁を縫合した。血圧カテーテルを動脈に配置し、腹大動脈に向かって進めた。動物を、死亡、異常性、ならびに疼痛および苦痛の徴候について1日2回（午前および午後）チェックした。観測されるさらなる知見を記録した。全ての動物が、計画されていた試験終了まで生存した。

## 【0272】

投与前の期間中（投与の前日を含む）に3回、投与期間の3日目、10日目に詳細な観察を行った。各投与日には、投与の少なくとも90分前にECGおよび血圧測定値を記録し、投与後は少なくとも8時間継続し、次いで投与後少なくとも24時間通して各1時間に一定期間中、少なくとも15分間記録した。血圧測定値には、収縮期、拡張期、ならびに平均動脈圧および脈圧（収縮期-拡張期）が含まれていた。各投与日には、投与前ならびに投与の約2、4、8、12、および24時間後に血圧評価を行った。

10

## 【0273】

RR間隔、QT、および心拍修正したQT（Fridericia法を使用するQTc）を含むECG測定値の定量的評価を実施した。

## 【0274】

陽性変力作用（+dP/dt<sub>最大値</sub>）および心拍を、投与前ならびに投与の約2、4、8、12、および24時間後の左室圧信号から算出した。

20

## 【0275】

心血管系作用および毒性の評価は、死亡、臨床徴候、体重、腹部温度測定、心電図分析および血行動態データ（収縮期、拡張期、および平均動脈圧）、変力状態（+dP/dt<sub>最大値</sub>）、ならびに心拍を含む心血管系パラメータをベースにした。様々な治療について投与後24時間にわたる平均収縮期圧を、図Dに示す。様々な治療について投与後24時間にわたる平均拡張期圧を、図Eに示す。様々な治療について投与後24時間にわたる平均動脈圧を、図Fに示す。様々な治療について投与後24時間にわたる平均動脈脈拍圧を、図Gに示す。平均（+dP/dt<sub>最大値</sub>）を図Hに示す。平均心拍を図Iに示す。

## 【0276】

ECGで測定したQT間隔は、クエン酸シルデナフィルを単独で、または6R-BH4と組み合わせて与えられた動物において投与の2時間後および4時間後に減少した。QT間隔は、クエン酸シルデナフィル単独と、6R-BH4との組合せとの間で異なっていた。6R-BH4を単独で与えられた動物において、対照からはQT変化は見られなかった。したがってQT変化は、クエン酸シルデナフィル投与のみに帰するものであった。心拍修正されたQT間隔（QTc）に変化は観測されなかった。QTcによってQT間隔データが正規化されたことは、QT間隔の減少がクエン酸シルデナフィル投与後に見られた心拍上昇（RR間隔の減少）の結果であったことを示している。試験物質投与の前および後の両方で、2匹の動物が発作性心室頻拍を示し、他の動物が単独の一過性不整脈を示した。不整脈は、試験物質の結果ではなく、血圧測定のために左心室内に埋め込まれたカテーテルに帰するものであった。

30

## 【0277】

治療関連収縮期圧、平均動脈圧、または+dP/dt<sub>最大値</sub>の変化は観測されなかった。拡張期圧は、全ての時点にわたって対照と比較した場合、組合せ投与またはクエン酸シルデナフィル単独を与えられた動物において有意に低下した。この効果は、6R-BH4単独での投与後には観測されなかった。クエン酸シルデナフィル単独と、6R-BH4との組合せとの効果の間には有意な差が見られなかったが、これは主にクエン酸シルデナフィルの効果であったことを示す。6R-BH4とクエン酸シルデナフィルとの併用投与は、この効果を増大することなく、抑制することもなかった。

40

## 【0278】

心拍は、全ての時点にわたって、クエン酸シルデナフィル単独または6R-BH4との組合せを与えられた動物において有意に上昇した。クエン酸シルデナフィル単独と、6R

50

- B H 4 と組み合わせたクエン酸シルデナフィルとの間に有意な差は認められなかつたが、これは主にクエン酸シルデナフィルの効果であり、6 R - B H 4 がこの効果を増大することなく、軽減することもなかつたことを示す。

【0279】

動脈脈拍圧は、クエン酸シルデナフィル単独を与えられた動物で、投与の2、4、および8時間後に有意に上昇した。動脈脈拍圧は、クエン酸シルデナフィルを投与し、6 R - B H 4 と組み合わせて投与した2時間後および4時間後に有意に上昇した。これらの変化は、これらの治療後に見られた拡張期圧の低下に続発したものと考えられる。

【0280】

動脈脈拍圧は、2時間および8時間の時点において、クエン酸シルデナフィル単独の投与と比較して、クエン酸シルデナフィルおよび6 R - B H 4 の組合せを与えられた動物で有意に低下したが、これはクエン酸シルデナフィルによって引き起こされた脈圧上昇に対して、6 R - B H 4 が軽減作用を及ぼし得ることを示す。

10

【0281】

試験の結果は、クエン酸シルデナフィルおよび6 R - B H 4 と組み合わせたクエン酸シルデナフィルが、犬の拡張期圧の低下をもたらしたことを示した。この血圧低下には、心拍の上昇および動脈脈拍圧の低下が伴っていた。血圧の低下および心拍の上昇は、犬におけるクエン酸シルデナフィルの効果であることが立証される。心拍および脈圧の上昇は、血圧の上昇に続発することが結論付けられた。6 R - B H 4 単独の効果は、測定された心血管系パラメータのいずれにも認められなかつた。

20

【0282】

記載のようにこれらの結果は、P D E 5 阻害剤と6 R - B H 4との組合せが、これらの犬においてシルデナフィル単独でも観測されたであろう、クエン酸シルデナフィル誘発性の観測された脈圧上昇を軽減するという予想外の効果を示唆するものであった。

【0283】

1 k g 当たり 1 0 0 m g の6 R - B H 4 を、1 k g 当たり 3 0 m g のクエン酸シルデナフィルに添加しても、これらの犬におけるクエン酸シルデナフィルの心血管系作用に悪影響を及ぼさなかつた。

【0284】

本明細書に開示または請求される組成物および/または方法の全ては、過度の実験なしに本開示に照らして生成し実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態にして述べてきたが、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の組成物および/または方法、ならびにその方法のステップまたは一連のステップに変形形態を適用できることが、当業者には理解されよう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関係する幾つかの薬剤で本明細書に記載の薬剤を代替できるとともに、同一または類似の結果が達成されることが明らかとなろう。全てのかかる類似の代替および改変は、添付の請求項の範囲で定義される本発明の精神、範囲、および概念に含まれるとみなされることが、当業者には明らかである。

30

【図面の簡単な説明】

【0285】

40

【図1】図1は、NOの生成の図である。

【図2】図2は、内皮機能不全およびB H 4 欠乏の図である。

【図3】図3は、二次的B H 4 欠乏の病態生理の図である。

【図4】図4は、二次的B H 4 欠乏および非結合 e N O S の図である。

【図5】図5は、糖尿病およびB H 4 欠乏の図である。

【図6】図6は、(6 R) - B H 4 形態Bによって示される特徴的なX線回折パターンの図である。

【図7】図7は、(6 R) - B H 4 形態Aによって示される特徴的なX線回折パターンの図である。

【図8】図8は、(6 R) - B H 4 形態Fによって示される特徴的なX線回折パターンの

50

図である。

【図 9】図 9 は、(6 R) - B H 4 形態 J によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 10】図 10 は、(6 R) - B H 4 形態 K によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 11】図 11 は、(6 R) - B H 4 形態 C によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 12】図 12 は、(6 R) - B H 4 形態 D によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 13】図 13 は、(6 R) - B H 4 形態 E によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。 10

【図 14】図 14 は、(6 R) - B H 4 形態 H によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 15】図 15 は、(6 R) - B H 4 形態 O によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 16】図 16 は、(6 R) - B H 4 形態 G によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 17】図 17 は、(6 R) - B H 4 形態 I によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。 20

【図 18】図 18 は、(6 R) - B H 4 形態 L によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 19】図 19 は、(6 R) - B H 4 形態 M によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。

【図 20】図 20 は、(6 R) - B H 4 形態 N によって示される特徴的な X 線回折パターンの図である。 30

【図 21】図 21 は、1 日に 5 mg / kg の用量の B H 4 を投与されたヒトの血圧応答の図である。

【図 22】図 22 は、200 mg の用量の B H 4 を 1 日に 2 回投与されたヒトの血圧応答の図である。

【図 23】図 23 は、100 mg の用量の B H 4 を 1 日に 2 回投与されたヒトの血圧応答の図である。 30

【図 24】図 24 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均収縮期圧の図である。

【図 25】図 25 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均拡張期圧の図である。

【図 26】図 26 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均動脈圧 (arterial pressure) の図である。

【図 27】図 27 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均動脈脈拍圧 (arterial pulse pressure) の図である。 40

【図 28】図 28 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均 (+ dP / dt 最大値) の図である。

【図 29】図 29 は、B H 4 およびシルデナフィルをそれぞれ単独で、または組み合わせて治療した後の、投与後 24 時間にわたる平均心拍の図である。

【図1】

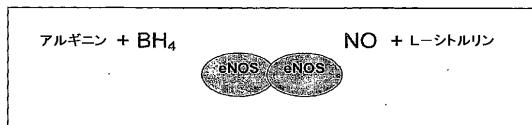


Figure 1

【図2】

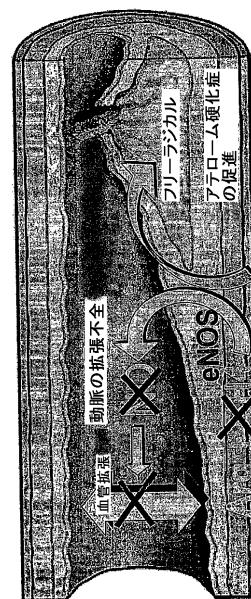


Figure 2

【図3】

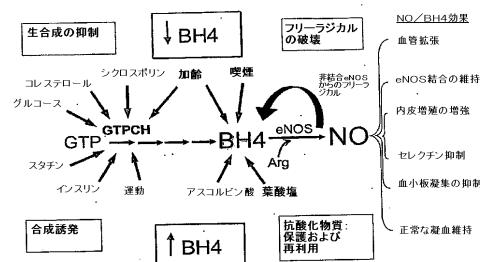


Figure 3

【図6】

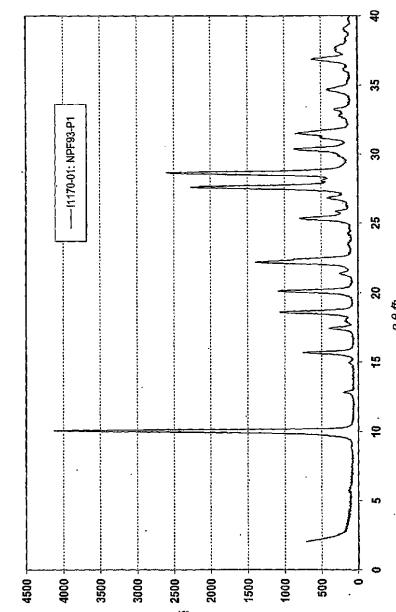


Figure 6

【図4】

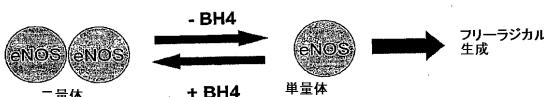


Figure 4

【図5】

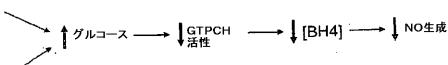


Figure 5

【図7】

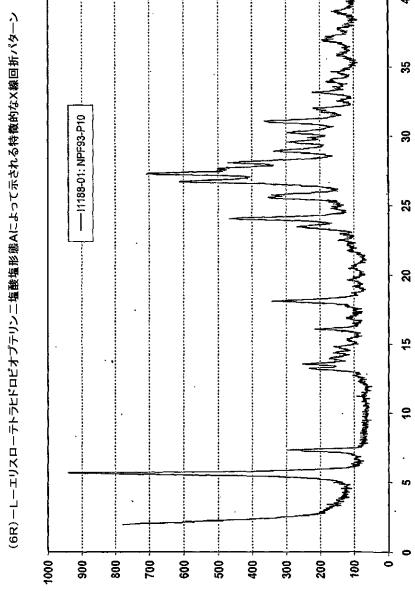


Figure 7

【図8】

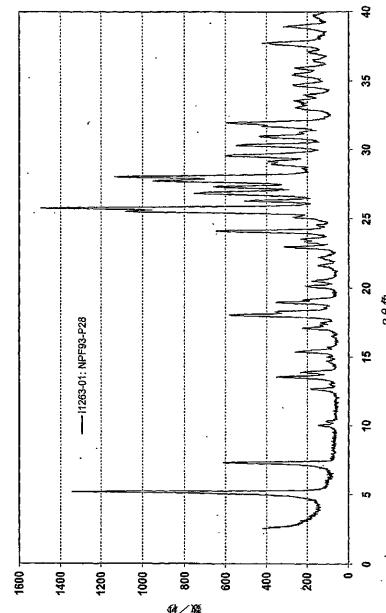


Figure 8

【図9】

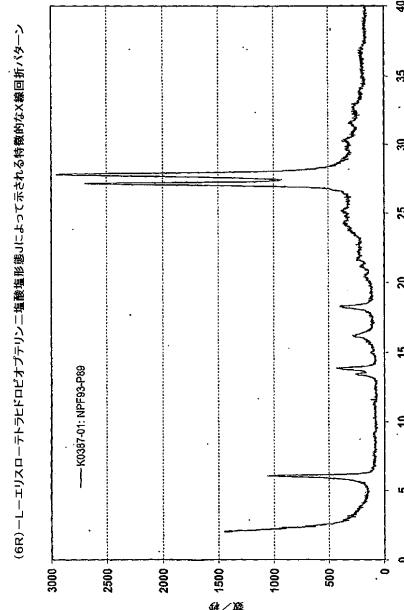


Figure 9

【図10】

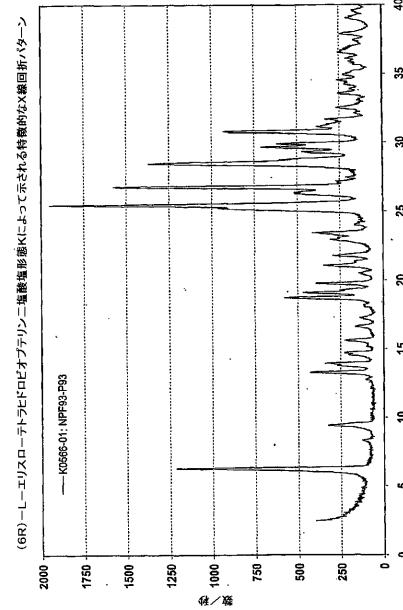


Figure 10

【 図 1 1 】

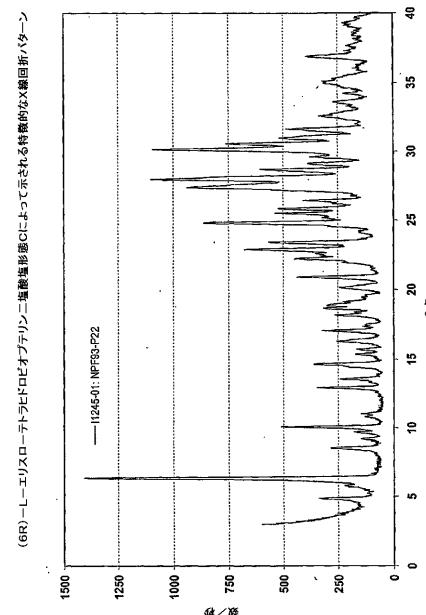


Figure 11

【図12】

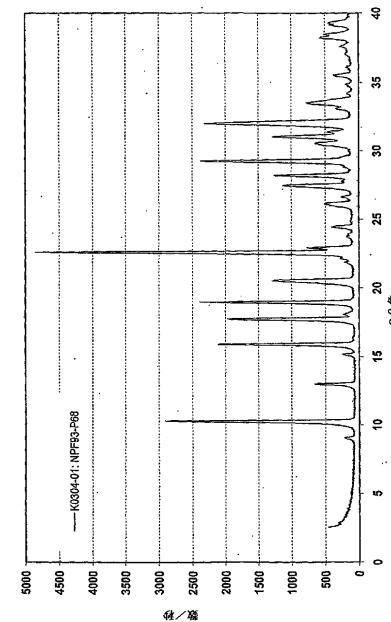


Figure 12

【 図 1 3 】

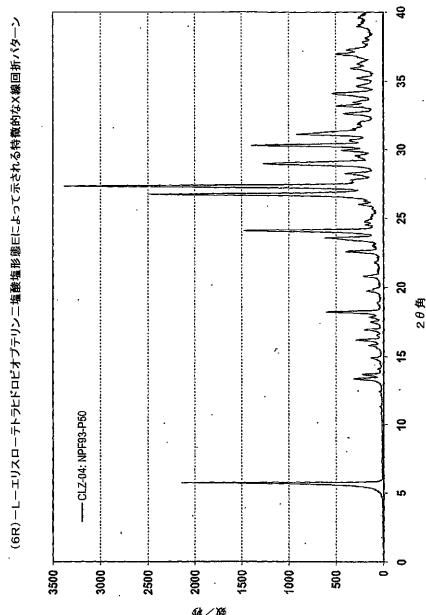
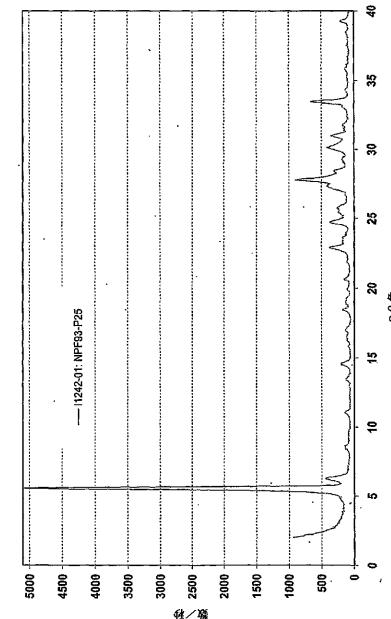


Figure 13

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

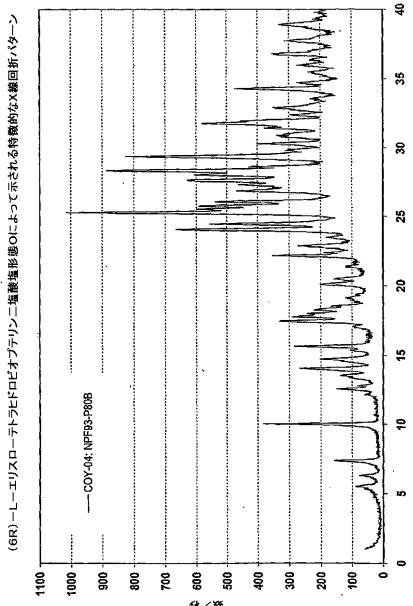


Figure 15

【 図 1 6 】

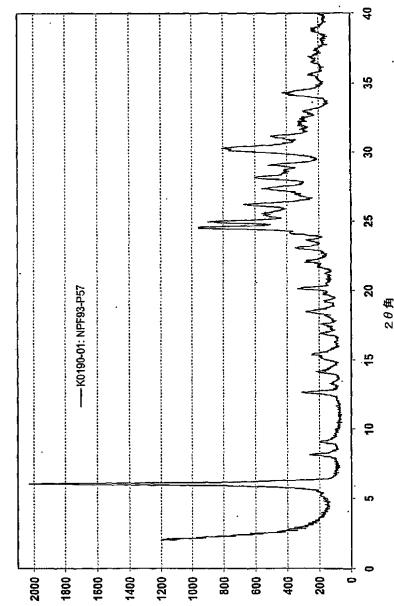


Figure 16

【 図 17 】

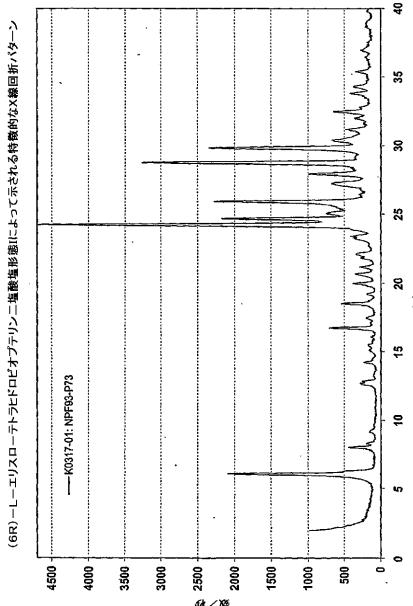


Figure 17

【 図 1 8 】

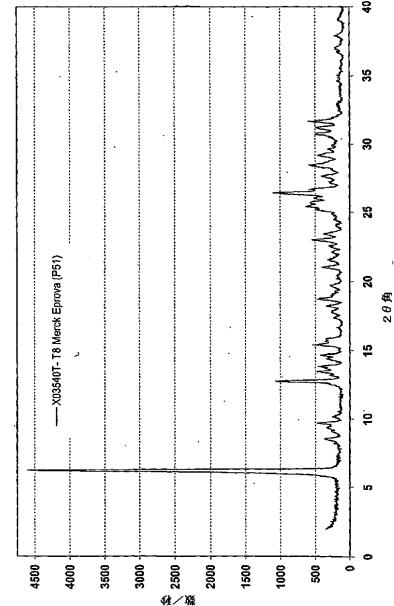


Figure 18

【図19】

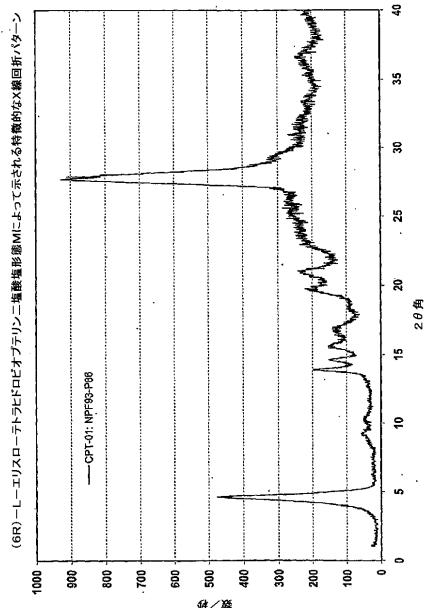


Figure 19

【図20】

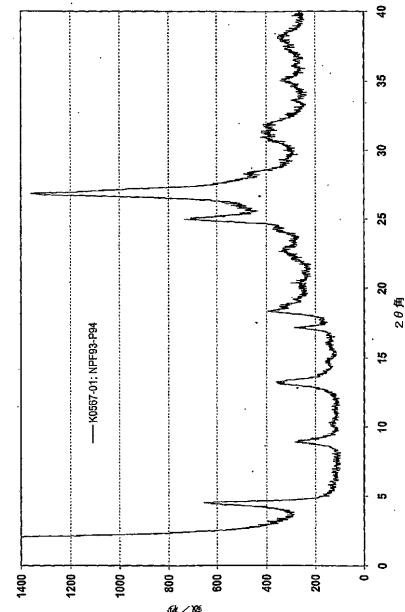


Figure 20

【図21】

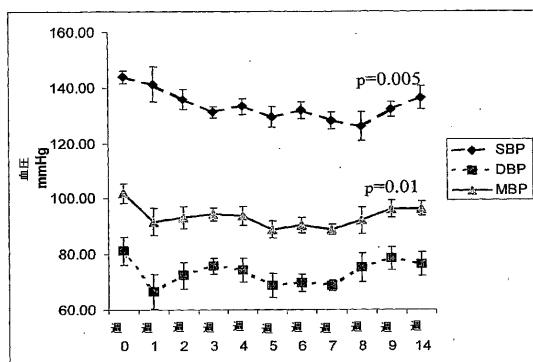


Figure 21

【図22】

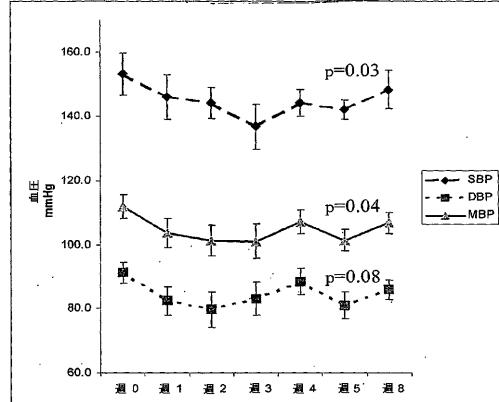


Figure 22

【図23】

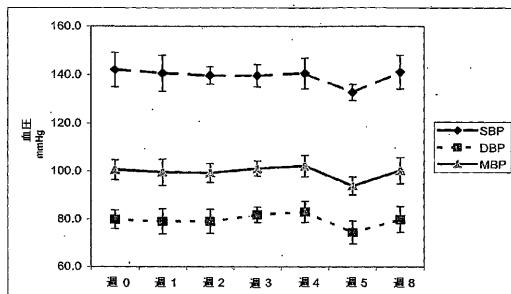


Figure 23

【図24】

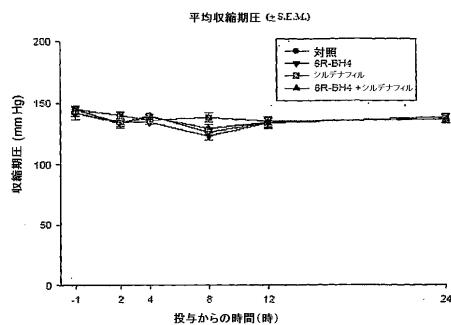


Figure 24

【図26】

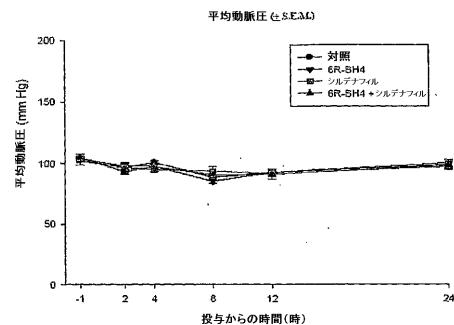


Figure 26

【図25】

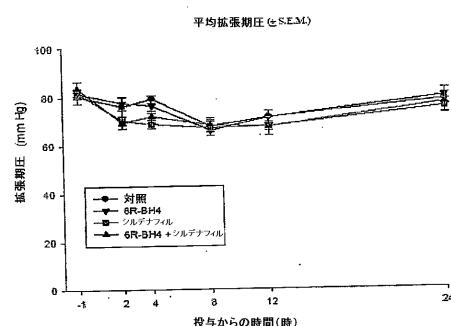


Figure 25

【図27】

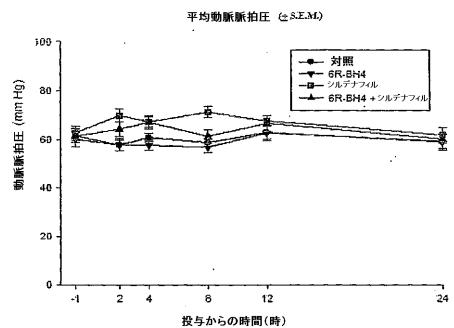


Figure 27

【図28】

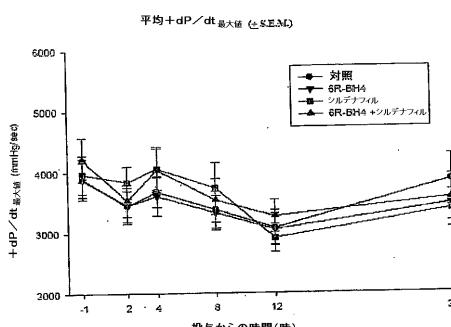


Figure 28

【図29】

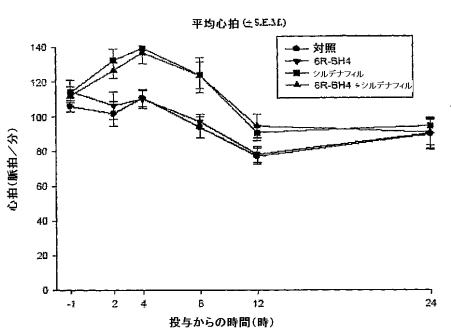


Figure 29

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/046449
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/519 A61P9/10 A61P9/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/56551 A (UNIV ZURICH [CH]; SCHMID RALPH A [CH]; SCHOEDON GABRIELE [CH]) 9 August 2001 (2001-08-09) claims 1-12	1-14
X	HONG H-J ET AL: "SUPPLEMENTATION WITH TETRAHYDROBIOPTERIN SUPPRESS THE DEVELOPMENT OF HYPERTENSION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS" HYPERTENSION, vol. 38, 2001, pages 1044-1048, XP002952174 ISSN: 0194-911X page 1047, left-hand column, paragraph 3 abstract	1-14
	—/—	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention can not be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"S" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report	
28 March 2007	11/04/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5618 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-9016	Authorized officer Young, Astrid	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/046449

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALO O ET AL: "Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model" CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 59, no. 2, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 501-511, XP004722355 ISSN: 0008-6363 page 501, right-hand column, paragraph 2 - page 501, left-hand column, paragraph 1 page 510, right-hand column, paragraph 2	1-14
X	CHANNON KEITHM: "Tetrahydrobiopterin" TRENDS IN CARDIOVASCULAR MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 8, November 2004 (2004-11), pages 323-327, XP004676489 ISSN: 1050-1738 page 326, left-hand column, paragraph 2 - page 326, right-hand column, paragraph 2	1-14
X	KHOO JEFFREY P ET AL: "Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension" CIRCULATION, LIPPINCOT WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, US, vol. 111, no. 16, 26 April 2005 (2005-04-26), pages 2126-2133, XP002390660 ISSN: 1524-4539 page 2130, right-hand column - page 2133, left-hand column	1-14
X	KASE HIROYUKI ET AL: "Supplementation with tetrahydrobiopterin prevents the cardiovascular effects of angiotensin II-induced oxidative and nitrosative stress" JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 23, no. 7, July 2005 (2005-07), pages 1375-1382, XP009081327 ISSN: 0263-6352 abstract	1-14
	----- -/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/046449

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATUSIC ZVONIMIR S: "Vascular endothelial dysfunction: Does tetrahydrobiopterin play a role?" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 281, no. 3 Part 2, September 2001 (2001-09), pages H981-H986, XP009081326 ISSN: 0002-9513 page H983, right-hand column, paragraph 3 page H984; table 1	1-14
X	MADEDDU PAOLO: "Correction of endothelial dysfunction by tetrahydrobiopterin: new hope for the treatment of arterial hypertension?" JOURNAL OF HYPERTENSION JUL 2005, vol. 23, no. 7, July 2005 (2005-07), pages 1335-1336, XP009081329 ISSN: 0263-6352 the whole document	1-14
X	WO 2005/018620 A (CELL CT COLOGNE GMBH [DE]; BLOCH WILHELM [DE]; SOMMER FRANK [DE]; KLOT) 3 March 2005 (2005-03-03) page 4, paragraphs 3,4 claims 1-37	1-14
X	WOOD KATHERINE C ET AL: "Endothelial NOS mediates hypoxia/reoxygenation induced leukocyte and platelet adhesion in cerebral vermis of sickle cell transgenic (beta(s)) mice" FASEB JOURNAL, vol. 19, no. 4, Suppl. S, Part 1, March 2005 (2005-03), page A702, XP009081351 & EXPERIMENTAL BIOLOGY 2005 MEETING/35TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES; SAN DIEGO, CA, USA; MARCH 31 -APRIL 06, 2005 ISSN: 0892-6638 the whole document	15
P,X	WO 2006/063215 A (BIOMARIN PHARM INC [US]; KAKKIS EMIL D [US]) 15 June 2006 (2006-06-15) page 6, paragraph 3 claims 1-82	1-14
P,X	WO 2006/120176 A (ALTANA PHARMA AG [DE]; HESSLINGER CHRISTIAN [DE]; SCHUDT CHRISTIAN [DE]) 16 November 2006 (2006-11-16) claims 1-22	1-14
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2006/046449
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/112772 A (ASTRAZENECA AB [SE]; LJUNGGREN ANDERS [SE]; MORSING PETER [SE]) 26 October 2006 (2006-10-26) claims 1-24 _____	1-14
P,X	REN ET AL: "Hope or hype: The obsession for tetrahydrobiopterin and GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) in cardiovascular medicine" JOURNAL OF CARDIOTHORACIC-RENAL RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1, no. 1, March 2006 (2006-03), pages 15-21, XP005385800 ISSN: 1574-0668 page 18, right-hand column - page 19 _____	1-14
P,X	WOOD ET AL: "Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction" FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, XX, vol. 40, no. 8, 15 April 2006 (2006-04-15), pages 1443-1453, XP005393294 ISSN: 0891-5849 page 1443, right-hand column - page 1444, left-hand column, paragraph 3 page 1451, left-hand column - right-hand column _____	15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/046449

## Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

## Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2006/046449

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0156551 A	09-08-2001	AU 2660901 A	14-08-2001
WO 2005018620 A	03-03-2005	NONE	
WO 2006063215 A	15-06-2006	NONE	
WO 2006120176 A	16-11-2006	NONE	
WO 2006112772 A	26-10-2006	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 9/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
<b>C 0 7 D 487/04</b> (2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 7
	C 0 7 D 487/04	1 4 2

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,L,A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オッペンハイマー, ダニエル アイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 4 6, カストロ バレー, ヒルズバロー ドライブ  
4 5 1 6

(72)発明者 カッキス, エミール ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 4 9, ノバト, ラグナ ビスタ ドライブ 2 5 1  
2

(72)発明者 ドレンボーム, アレハンドロ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 4 1, ミル バレー, スタンフォード アベニュー  
1 2 0

F ターム(参考) 4C050 AA01 BB05 BB08 CC08 EE04 FF02 FF05 GG03 GG04 HH01

HH04

4C084 AA19 MA02 MA52 ZA361 ZA421 ZC202 ZC351 ZC751

4C086 AA01 AA02 CB06 CB09 MA01 MA02 MA04 MA52 NA05 NA14  
ZA36 ZA42 ZA55 ZC35 ZC75