

(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2021-504466

(P2021-504466A)

(43) 公表日 令和3年2月15日(2021.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 243/24 (2006.01)	C O 7 D 243/24 C S P	4 C O 5 0
A61K 31/4985 (2006.01)	A 6 1 K 31/4985	4 C O 6 5
A61K 31/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/53	4 C O 8 4
A61K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 31/551	4 C O 8 6
A61K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-545878 (P2020-545878)
 (86) (22) 出願日 平成30年11月23日 (2018.11.23)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年6月9日 (2020.6.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2018/082450
 (87) 国際公開番号 W02019/101970
 (87) 国際公開日 令和1年5月31日 (2019.5.31)
 (31) 優先権主張番号 17203377.1
 (32) 優先日 平成29年11月23日 (2017.11.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 520179291
 オスロ ユニヴェルシティ ホスピタル
 ホーエフ
 ノルウェー 0424 オスロ ニーダレ
 ン ポストボックス 4950
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 アロンセン ヤン マグナス
 ノルウェー 0851 オスロ ヴェスト
 グレンサ 1
 (72) 発明者 スコグスタッド ヨナス
 ノルウェー 0753 オスロ ポルフィ
 ルヴァイエン 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 頻脈の治療

(57) 【要約】

本発明は頻脈又は頻脈性不整脈の治療に使用される選択的 P D E 2 阻害剤である化合物を提供する。このような化合物は以下の症状、すなわち、心房頻脈、心房細動、心房粗動、発作性上室性頻脈、心室性期外収縮 (P V C)、心室細動及び心室頻脈のうちのいずれかの治療に使用することに特に適しており、且つ、単独で使用されても他の従来 of 心臓血管薬、例えば 遮断薬との併用治療で使用されてもよい。具体的には、本発明は心不全、C P V T、又は Q T 延長症候群に罹患している、又は罹患するリスクがある患者での心室頻脈の治療に使用される選択的 P D E 2 阻害剤である化合物を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の心室頻脈の治療又は予防に使用される選択的 P D E 2 阻害剤である化合物。

【請求項 2】

前記化合物に P D E 2 (例えばヒト P D E 2) 活性の阻害について少なくとも 1 種類の他の P D E タイプ (例えば少なくとも 1 種類の他のヒト P D E タイプ) と比較して少なくとも 10 倍の選択力がある、請求項 1 に記載される使用化合物。

【請求項 3】

前記化合物に P D E 2 (例えばヒト P D E 2) 活性の阻害について他の全ての P D E タイプ (例えば他の全てのヒト P D E タイプ) と比較して少なくとも 10 倍の選択力がある、請求項 2 に記載される使用化合物。

10

【請求項 4】

前記選択力が少なくとも 20 倍、好ましくは少なくとも 30 倍、より好ましくは少なくとも 50 倍、例えば少なくとも 100 倍である、請求項 2 又は請求項 3 に記載される使用化合物。

【請求項 5】

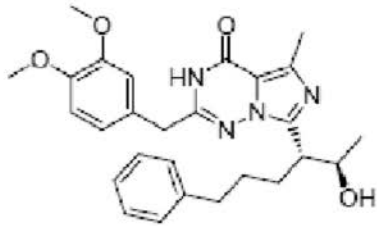
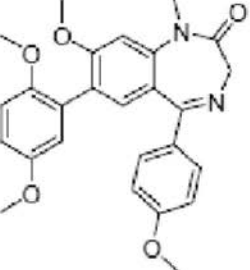
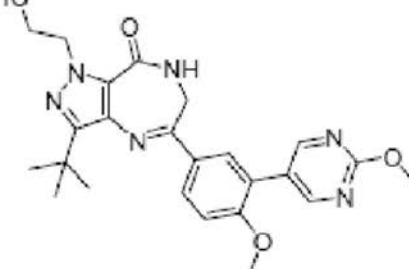
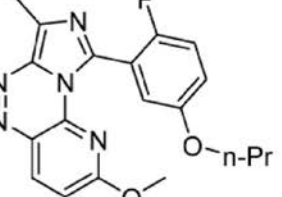
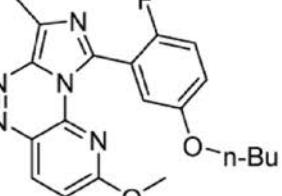
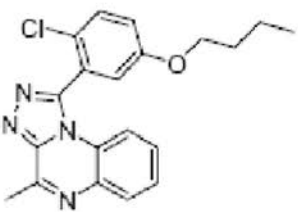
前記化合物が約 100 n M 未満、好ましくは約 50 n M 未満、例えば約 10 n M 未満の $I C_{50}$ 値で P D E 2、例えばヒト P D E 2 を阻害する、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか一項に記載される使用化合物。

【請求項 6】

前記化合物が以下の化合物、それらの薬学的に許容可能な塩、又はそれらのプロドラッグのうちのいずれかより選択される、請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか一項に記載される使用化合物。

20

【表 1 - 1】

化合物	名称
	BAY60-7550 2-(3,4-ジメトキシベンジル)-7-[(2R,3R)-2-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン-3-イル]-5-メチルイミダゾ[5,1-f][1,2,4]トリアジン-4(3H)-オン
	
	
	
	
	

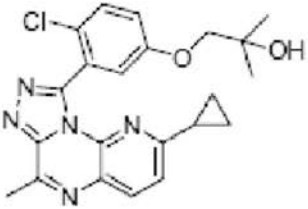
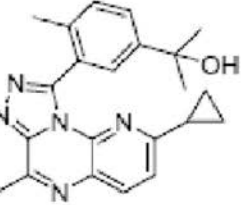
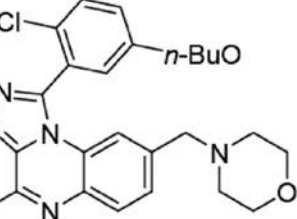
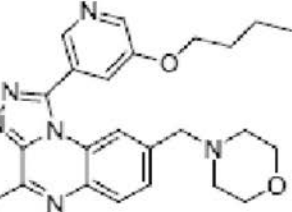
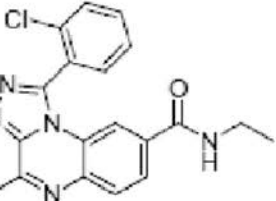
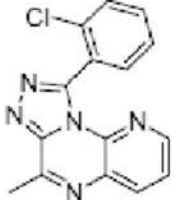
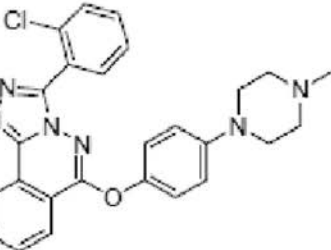
10

20

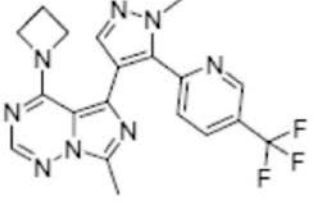
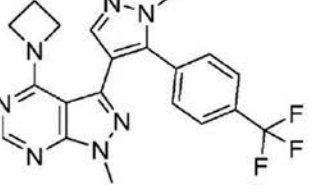
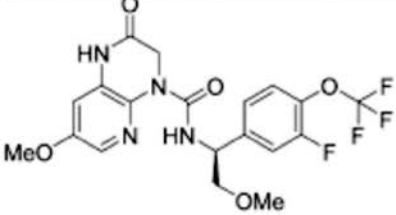
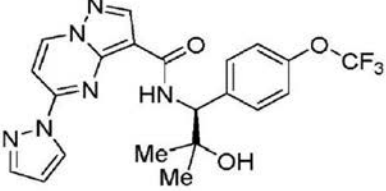
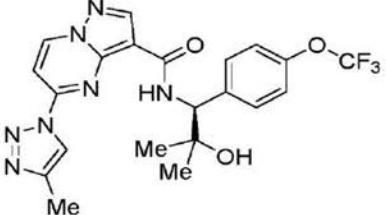
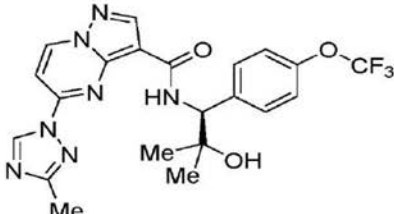
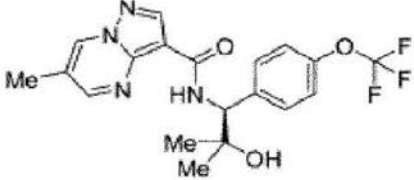
30

40

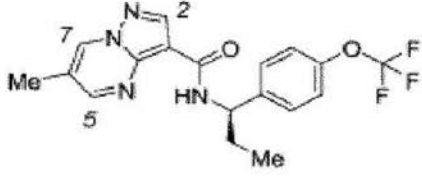
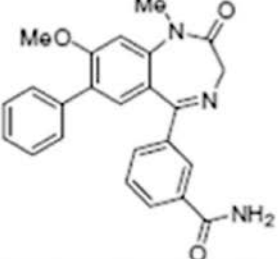
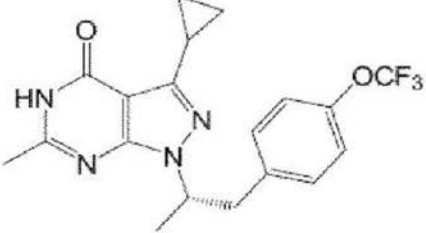
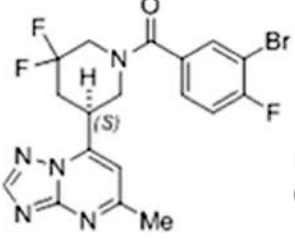
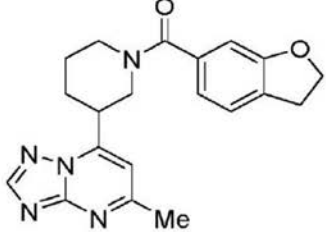
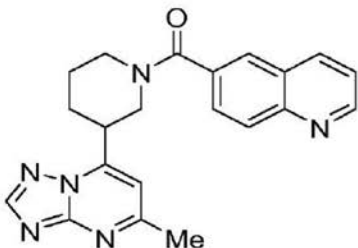
【表 1 - 2】

		10
		20
		30
		40
		40
	Lu AF64280	40
		40

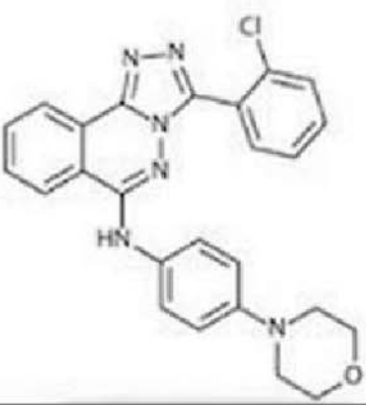
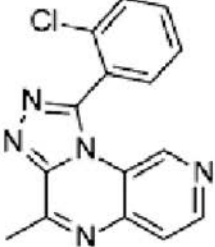
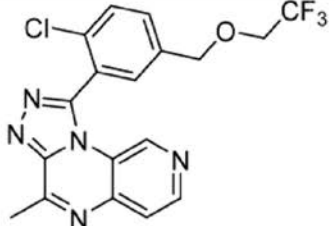
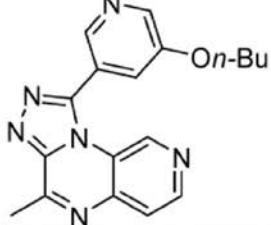
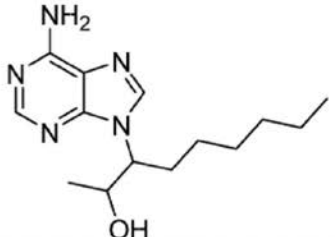
【表 1 - 3】

	PF-05180999	10
	TAK-915	20
	N-((1S)-1-(3-フルオロ-4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-2-メトキシエチル)-7-メトキシ-2-オキソ-2,3-ジヒドロピリド[2,3-b]ピラジン-4-(1H)-カルボキサミド	20
	N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル-5-(1H-ピラゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド	30
	N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル-5-(4-メチル-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド	30
	N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル-5-(3-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド	40
		40

【表 1 - 4】

		10
	<p>ND-7001 3-(8-メトキシ-1-メチル-2-オキソ-7-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]-[1,4]ジアゼピン-5-イル)ベンズアミド</p>	10
	<p>PDM-631 (S)-3-cycloプロピル-6-メチル-1-(1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロパン-2-イル)-1,5-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン</p>	20
	<p>DNS-8254 (5S)-1-[(3-ブromo-4-フルオロフェニル)カルボニル]-3,3-ジフルオロ-5-{5-メチル-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリミジン-7-イル}ピペリジン</p>	20
	<p>1-[2,3-ジヒドロ-1-ベンゾフラン-5-イル)カルボニル]-3-{5-メチル-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリミジン-7-イル}ピペリジン</p>	30
	<p>6-[(3-{5-メチル-[1,2,4]トリアゾロ[1,5-a]ピリミジン-7-イル}ピペリジン-1-イル)カルボニル]キノロン</p>	40

【表 1 - 5】

		10
		20
		30
		40
	EHNA (エリスロー9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)アデニン)	40

【請求項 7】

前記化合物が TAK-915 (N-((1S)-1-(3-フルオロ-4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-2-メトキシエチル)-7-メトキシ-2-オキソ-2,3-ジヒドロピリド[2,3-b]ピラジン-4-(1H)-カルボキサミド)、ND-7001 (3-(8-メトキシ-1-メチル-2-オキソ-7-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]-[1,4]ジアゼピン-5-イル)ベンズアミド)、請求項6において規定される PF-05180999 又は Lu AF64280、及びそれらの薬学的に許容可能な塩、及びそれらのプロドラッグから選択される、請求項1に記載される使用化合物。

【請求項 8】

前記化合物が TAK-915 (N-((1S)-1-(3-フルオロ-4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-2-メトキシエチル)-7-メトキシ-2-オキソ-2,3-ジヒドロピリド[2,3-b]ピラジン-4-(1H)-カルボキサミド) 又は請求項 6 において規定される PF-05180999、又はその薬学的に許容可能な塩若しくはプロドラッグである、請求項 1 に記載される使用化合物。

【請求項 9】

前記化合物が BAY60-7550 (2-(3,4-ジメトキシベンジル)-7-[(2R,3R)-2-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン-3-イル]-5-メチルイミダゾ[5,1-f][1,2,4]トリアジン-4(3H)-オン)、ND-7001 (3-(8-メトキシ-1-メチル-2-オキソ-7-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]-[1,4]ジアゼピン-5-イル)ベンズアミド)、請求項 6 において規定される PF-05180999、又は請求項 6 において規定される Lu AF64280、又はその薬学的に許容可能な塩若しくはプロドラッグである、請求項 1 に記載される使用化合物。

10

【請求項 10】

以前に心筋梗塞に罹患したことがある対象、心不全を発症している対象、又は頻脈になりやすい対象、例えばカテコールアミン誘発性多形性心室頻脈(CPV T)の遺伝的素因を有する対象の治療において使用される請求項 1～請求項 9 のいずれか一項に記載される化合物。

20

【請求項 11】

心不全、CPV T、又はQT延長症候群に罹患している、又は罹患するリスクがある対象の治療において使用される請求項 1～請求項 9 のいずれか一項に記載される化合物。

【請求項 12】

前記対象が以下、すなわち

以前に心不整脈であると診断され、且つ/又は心不整脈の治療を受けている対象、例えば遮断薬などの不整脈治療薬による治療を受けている対象、

植え込み型除細動器(ICD)を有する対象、及び

心不整脈の長期治療を受けている対象、例えば少なくとも6か月にわたって遮断薬による治療を受けている対象

30

のうちのいずれかより選択される、請求項 10 又は請求項 11 に記載される使用化合物。

【請求項 13】

前記対象が植え込み型除細動器(ICD)を有しており、且つ、不整脈治療薬、例えば遮断薬による治療を受けている、請求項 12 に記載される使用化合物。

【請求項 14】

前記遮断薬が、選択性遮断薬、例えばメトプロロールである、請求項 13 に記載される使用化合物。

【請求項 15】

前記対象が哺乳類対象、好ましくはヒトである、請求項 1～請求項 14 のいずれか一項に記載される使用化合物。

40

【請求項 16】

1種類以上の心臓血管薬、好ましくは高血圧、心不全、不整脈、及び/又は心筋梗塞後再灌流症候群の治療用の薬品であって、例えば以下の薬品、すなわち、遮断薬、カルシウム拮抗薬、ACE阻害剤、ATII/ブロッカー、及び不整脈治療薬のうちのいずれかより選択される前記薬品との併用治療において使用される請求項 1～請求項 15 のいずれか一項に記載される化合物。

【請求項 17】

前記遮断薬が、選択性遮断薬、例えばメトプロロールである、請求項 16 に記載される使用化合物。

【請求項 18】

50

請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか一項に規定される選択的 P D E 2 阻害剤を 1 種類以上の心臓血管薬、例えば不整脈治療薬と共に、且つ、所望により少なくとも 1 種類の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項 19】

前記不整脈治療薬が 遮断薬、好ましくは、選択性 遮断薬、例えばメトプロロールである、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

治療を必要とする対象（好ましくは哺乳類対象、例えばヒト）における心室頻脈の治療方法であって、請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか一項に規定される選択的 P D E 2 阻害剤、又は請求項 18 若しくは請求項 19 に記載の医薬組成物を前記対象に投与する工程を含む方法。

10

【請求項 21】

前記対象が以前に心筋梗塞に罹患したことがある、心不全を発症している、又は頻脈になりやすく、例えば前記対象がカテコールアミン誘発性多形性心室頻脈（C P V T）の遺伝的素因を有する、請求項 20 に記載される治療方法。

【請求項 22】

前記対象が心不全、C P V T、又は Q T 延長症候群に罹患している、又は罹患するリスクを有する、請求項 20 に記載される治療方法。

【請求項 23】

前記対象が以下、すなわち

20

以前に心不整脈であると診断され、且つ / 又は心不整脈の治療を受けている対象、例えば 遮断薬などの不整脈治療薬による治療を受けている対象、

植え込み型除細動器（I C D）を有する対象、及び

心不整脈の長期治療を受けている対象、例えば少なくとも 6 か月にわたって 遮断薬による治療を受けている対象

のうちのいずれかより選択される、請求項 20 ~ 請求項 22 のいずれか一項に記載される治療方法。

【請求項 24】

前記対象が植え込み型除細動器（I C D）を有しており、且つ、不整脈治療薬、好ましくは 遮断薬、例えばメトプロロールなどの、選択性 遮断薬による治療を受けている、請求項 23 に記載される治療方法。

30

【請求項 25】

前記方法が 1 種類以上の心臓血管薬、好ましくは高血圧、心不全、不整脈、及び / 又は心筋梗塞後再灌流症候群の治療用の薬品であって、例えば以下の薬品、すなわち、 遮断薬、カルシウム拮抗薬、A C E 阻害剤、A T I I / ブロッカー、及び不整脈治療薬のうちのいずれかより選択される前記薬品を（例えば、同時に、別々に、又は連続して）前記対象に投与する工程をさらに含む、請求項 20 ~ 請求項 24 のいずれか一項に記載される治療方法。

【請求項 26】

前記 遮断薬が、選択性 遮断薬、例えばメトプロロールである、請求項 25 に記載される治療方法。

40

【請求項 27】

対象の心室頻脈の治療に使用される医薬品の製造における請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか一項に規定される選択的 P D E 2 阻害剤又は請求項 18 若しくは請求項 19 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 28】

前記対象が請求項 21 ~ 請求項 24 のいずれか一項に規定されるとおりである、請求項 27 に記載の使用。

【請求項 29】

前記治療が 1 種類以上の心臓血管薬、好ましくは高血圧、心不全、不整脈、及び / 又は

50

心筋梗塞後再灌流症候群の治療用の薬品であって、例えば以下の薬品、すなわち、遮断薬、カルシウム拮抗薬、ACE阻害剤、A T I I / ブロッカー、及び不整脈治療薬のうちのいずれかより選択される前記薬品の前記対象への（例えば、同時の、別々の、又は連続した）投与をさらに含む、請求項 27 又は請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

前記遮断薬が、選択性遮断薬、例えばメトプロロールである、請求項 29 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して頻脈又は頻脈性不整脈の治療及び / 又は予防に関する。具体的には、本発明はそのような症状、特に心室頻脈の治療法及び / 又は予防法におけるホスホジエステラーゼ 2 (P D E 2) 阻害剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

心不整脈は心臓リズムが異常で速すぎるか遅すぎるかのどちらかである一群の症状である。速すぎる心拍数は成人では毎分 100 回を超えることが典型であり、「頻脈」として知られており、遅すぎる心拍数は毎分 60 回未満であることが典型であり、「徐脈」として知られている。正常心臓リズムの異常に関連する頻脈は「頻脈性不整脈」として知られる場合がある。しかしながら、「頻脈」及び「頻脈性不整脈」という用語は当技術分野では互換的に使用されることが多く、実用的には心拍数の増加に関連するあらゆる心臓リズム障害を説明するために臨床医によって使用される場合がある。多くの不整脈は深刻ではないが、中にはその対象を心不全、心臓発作、又は心停止などの合併症にかかりやすくするものもある。

【0003】

不整脈は刺激生成異常（自動能の上昇及び活動の誘発）、刺激伝導異常（リエントリー機構）、及び心臓電気刺激伝導系関連の問題に起因して生じる。不整脈は二軸に従って、すなわち遅いか速いか（徐脈であるか頻脈であるか）及び心房性であるか心室性であるかで分類され得る。

【0004】

上室性頻脈には心房頻脈、心房細動、心房粗動、及び発作性上室性頻脈が含まれる。心室頻脈性不整脈には心室性期外収縮 (P V C)、心室細動、及び心室頻脈が含まれる。心室頻脈は心室での誤った電氣的活動より生じる多くの場合に心拍数が規則的で速いタイプの頻脈である。心室頻脈は心筋梗塞時又は心筋梗塞後に、心不全又は心肥大時に、心筋症時に、又は構造的に正常な心臓に生じる場合があり、結果として心停止を引き起こす可能性がある。

【0005】

頻脈を含む大半の不整脈は薬品を用いて、ペースメーカーなどの医療手技を用いて、又は手術（例えばアブレーション）によって効果的に治療可能である。心室頻脈性不整脈向けの現行の薬理的治療戦略には アドレナリン作動性受容体の遮断薬並びに Ca^{2+} チャンネル、 Na^{+} チャンネル、及び K^{+} チャンネルの遮断薬等が含まれる。しかしながら、これらの薬剤は心室頻脈性不整脈の患者には最適治療にもかかわらず無効果であると判明することが多い。遮断薬の最適投与は副作用（例えば徐脈、低血圧、疲労等）のために制限されることが多く、一方で Ca^{2+} 遮断薬は収縮能に対する負の効果のために心不全時には一般に使用されない。特に Na^{+} 遮断薬と一部の K^{+} 遮断薬も不整脈誘発性作用のために構造的な疾患を有する患者には禁忌とされている (P r i o r i , S . G . ら著、心室性不整脈患者の管理と心臓突然死の予防に関する E S C ガイドライン 2015 年版、欧州心臓病学会 (E S C) 心室性不整脈患者の管理と心臓突然死の予防に関する特別委員会編、欧州小児先天性心疾患学会 (A E P C) 承認、E u r H e a r t J 誌、2015 年、第 36 巻 (第 41 号) : 2793 ~ 867 頁、及び A l - K h a t i b ら著、A H A ガイドラ

10

20

30

40

50

イン、2017年)。

【0006】

メトプロロールなどの遮断薬は心室頻脈を含む大半の種類の頻脈性不整脈の標準治療である。深刻な(致命的であり得る)心臓リズム異常(心室頻脈、発作性上室性頻脈、及び心房細動等)の治療に使用される他の薬品にはプロパフェノン塩酸塩(リスモル)が挙げられる。これは正常な心臓リズムを復元し、且つ、規則的で安定した心拍を維持するために使用される。プロパフェノンは局所的麻酔作用と心筋膜に対する直接的安定化作用を有するクラス1C不整脈治療薬である。リスモルに付随する悪性副作用は胃腸管系、心血管系、及び中枢神経系において最も頻繁に生じる。有害反応のために患者の約20%においてリスモルによる治療を中止する必要がある。

10

【0007】

したがって、頻脈、特に心室頻脈の治療又は予防のための新しい薬品の必要性が残されている。我々は本明細書においてPDE2の阻害による Na^+/K^+ -ATPアーゼ(ナトリウムカリウムアデノシントリホスファターゼ又は「NK A」、 Na^+/K^+ ポンプ又はナトリウム・カリウムポンプとしても知られる)の局所的及び選択的活性化をこのような障害の新規治療戦略として提唱する。この機序はアドレナリン作動性受容体、カルシウムチャンネル、 Na^+ チャンネル、又は K^+ チャンネルを標的とすることにより心室頻脈を治療するために使用される遮断薬及びクラス1不整脈治療薬などの従来薬品の機序と異なる。

20

【0008】

PDE2は哺乳類動物にみられる多種多様なホスホジエステラーゼ(PDE)のうちの1つである。PDE酵素ファミリーは加水分解による制御を介して二次伝達物質である環状ヌクレオチドcAMP及び/又はcGMPの細胞内レベルを調節する。これらの環状ヌクレオチドは全ての哺乳類細胞で細胞内シグナル伝達分子として機能する。PDE酵素はホスホジエステル結合を切断することによりcAMP及び/又はcGMPを加水分解して対応するモノリン酸体を形成する。

【0009】

種々のPDEが基質特異性、阻害剤感受性、及びさらに近年になって配列相同性に基づいて11ファミリー(PDE1からPDE11)に細分されている。これらの11ファミリーは21遺伝子によってコードされ、幾つかのファミリーに複数のメンバーが含まれることになる。同じファミリーのPDEは機能的に関連がある。PDEは異なる基質特異性を有し、幾つかのものはcAMP選択的加水分解酵素であり(PDE4、PDE7、及びPDE8)、他のものはcGMP選択的加水分解酵素である(PDE5、PDE6、及びPDE9)。PDE2を含むその他のものはcAMPとcGMPの両方の加水分解を行う二重基質PDEである。

30

【0010】

幾つかのPDE阻害剤、具体的にはPDE3阻害剤、PDE4阻害剤、及びPDE5阻害剤は臨床使用について承認されている。ミルリノンなどのPDE3阻害剤は心臓血管治療に使用される。PDE2は脳において最も高い発現を示すが他の組織にも認められる。PDE2の阻害によってcAMPレベルとcGMPレベルの上昇が引き起こされ、これが認知機能を改善する可能性がある。現在までにPDE2阻害剤は主に様々な認知障害、例えば神経発生、学習、及び記憶に関する障害の治療、神経障害及び認知症、アルツハイマー病などの神経変性障害の治療等での使用についての文献で文書化されてきた。幾つかのPDE2阻害剤は認知障害について第I相試験を受け、それらの阻害剤にはTAK-915(武田薬品)、ND-7001(Neuro3d/Evotec)、及びPF-05180999(ファイザー)が含まれる。例えば、Mikamiら著、J. Med. Chem. 誌、2017年、第60巻(第18号):7677~7702頁においてTAK-915の経口投与がマウスの脳において3',5'-環状グアノシンモノリン酸(cGMP)レベルを上昇させること、及びラットにおいて認知パフォーマンスを改善することが示されている。これらの研究の結果としてこの化合物はヒト試験に進んだ。

40

50

【0011】

PDE2阻害剤について記述している他の文献には欧州特許出願公開第3026051号明細書、国際公開第2005/021037号パンフレット及び国際公開第2012/168817号パンフレットが挙げられる。欧州特許出願公開第3026051号明細書では前記化合物がPDE2A阻害活性を有しており、精神分裂病、アルツハイマー病等の予防薬又は治療薬として有用であることが示唆されている。国際公開第2005/021037号パンフレットでは公知のPDE2阻害剤が肺病変、具体的にはARDS（成人呼吸促迫症候群）、IRDS（新生児呼吸窮迫症候群）、ALI（急性肺障害）、及び気管支喘息の治療に使用される公知の肺サーファクタントと組み合わせられている。国際公開第2012/168817号パンフレットでは様々な化合物をPDE2阻害剤及び/又はCYPA4阻害剤として使用することについて記載されており、且つ、中枢神経系障害、認知障害、精神分裂病、及び認知症の治療に使用することが提唱されている。これらの文献の中にはいずれかのPDE2阻害剤をいずれかの心臓関連障害の治療に使用することを提唱しているものはない。

10

【0012】

PDE2は心臓組織でも発現しており、裏付けられてはいないが心不整脈の治療又は予防にPDE2阻害剤を使用することに関して幾らか考察されている（例えば国際公開第2006/072612号パンフレット、国際公開第2004/089953号パンフレット、国際公開第2016/073424号パンフレット及び国際公開第2006/024640号パンフレットを参照されたい）。例えば、国際公開第2004/089953号パンフレットと国際公開第2006/024640号パンフレットは、肺炎、関節炎、網膜盲、アルツハイマー病等を含む極めて広範囲の症状の治療又は予防に有効であり得ると主張されている新規PDE2阻害剤に関する。心筋でPDE2が見られることに基づくと、これらの文献は前記化合物が「心不整脈」の防止能力を有し得ることを提唱しているが、これを裏付ける証拠はない。これらの文献において開示されている前記化合物が心室頻脈はもちろんのこと、あらゆる特定の分類の心不整脈の治療又は予防に適切であり得るか示唆するものもない。こうした背景に反し、これらのPDE2阻害剤が本明細書において明示されるように頻脈の治療に必然的に適していることを予測できていなかった。

20

【0013】

「心不整脈」という用語により異なる治療アプローチを必要とする一連の様々な心臓リズム障害が広く定義される。不整脈の発生源（心房性か心室性か）と種類（頻脈性不整脈か徐脈性不整脈か）の両方を治療開始前に決定することが重要である。心房性不整脈は心室性不整脈と完全に異なる方法で治療されることが多い。例えば、アデノシンと強心配糖体（例えばジゴキシン）が様々な心房性不整脈の治療のために使用されるが、これらは心室性不整脈を誘発又は悪化させる可能性がある。同様に、頻脈性不整脈に適切な治療法は徐脈性不整脈の場合には概して禁忌である。例えば、メプロロールなどの遮断薬は頻脈性不整脈の治療法であるが徐脈性不整脈の原因となる。したがって、遮断薬（例えばメプロロール）は全ての種類の徐脈性不整脈には禁忌である。不整脈の治療は潜在的な原因又は基礎的な症状にも左右され得る。心不全時又は心筋梗塞後の心室頻脈性不整脈の治療はCPVT及びQT延長症候群などの遺伝疾患での心室頻脈性不整脈の治療とは異なる。例えば、フレカイニド（クラス1不整脈治療薬であるNa⁺チャネル遮断薬）はCPVT及びQT延長症候群で一般的に使用されるが、心不全時及び心筋梗塞後には禁忌である。したがって、心不整脈は発生源と種類に応じて異なる治療アプローチを必要とする異なるグループに分類され得る。「心不整脈」の治療全般への言及はどの種類の不整脈が治療される可能性があるのか示唆するには充分ではない。

30

40

【0014】

先行技術文献とは対照的に本発明は頻脈の治療又は予防、特に心室頻脈の治療又は予防に関連する。他の技術文献の教示は本明細書において提示される知見とは肯定的な意味で異なっている。例えば、Vettel, C.ら（Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induce

50

d Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* 誌、2017年、第120巻(第1号):120~132頁)はPDE2量が多くなるほど不整脈から防護され、且つ、重篤な虚血発作後の心筋収縮力が改善されることを示唆している。したがって、これらの文献は不整脈と心収縮不全から心臓を防護するための治療戦略としてのPDE2の活性化を提唱している。さらに国際公開第2005/035505号パンフレットはPDE阻害剤が心拍数を上昇させ、且つ、不整脈の原因にすらなり得ることに留意を促している。これは頻脈の治療でのPDE2阻害剤の使用を支持する本明細書において提示される我々の知見とは反対である。

【0015】

数種類の不整脈の重要な上流寄与因子としてNK A活性の低下が特定されているが(Faggioni, M.及びB. C. Knollmann著、*Arrhythmia Protection in Hypokalemia: A Novel Role of Ca²⁺-Activated K⁺ Currents in the Ventricle. Circulation* 誌、2015年、第132巻(第15号):1371~3頁)、我々の知る限りではNK Aの特異的活性化因子は存在しない。本明細書において提示される知見よりPDE2阻害が強力にNK Aを活性化し、且つ、心不全及び遺伝性不整脈症候群のマウス(一種のQT延長症候群のアンキリン^{+/-}マウス、及びカテコールアミン誘発性多形性心室頻脈(CPVT)マウス)において心室頻脈性不整脈を防止することが示される。不整脈を防止するPDE2阻害の能力は、AKAPからRII-PKAを脱離させる高い特異性を有するペプチドであるsuperAKAPの添加によって低下した。このことは、superAKAPがNK A電流に対するPDE2阻害の効果を無効にすることを示すデータと共に、PDE2がNK Aを調節し、且つ、局所領域におけるcAMPレベルを調節することにより心室頻脈性不整脈を防止することを示唆している。

【0016】

本明細書において記載される抗不整脈治療法としてのPDE2阻害は2つの点、すなわち(1)NK Aの活性化因子としての点、及び(2)個々の領域でのcAMPレベルを標的とすることによるという点で新しい治療戦略である。本明細書に付随している実施例において提示されるデータより、我々が心筋細胞特異的細胞核におけるPDE2のmRNAの発現上昇を見出したようにヒトの臓器肥大と加齢でPDE2が上方制御されることも示唆されている。これは以前のデータ(Mehel, H.ら著、*Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. J Am Coll Cardiol* 誌、2013年、第62巻(第17号):1596~606頁)と合っており、PDE2阻害がヒト慢性心臓疾患における望ましい抗不整脈標的であり得ることを示している。

【0017】

我々は、頻脈の治療及び/又は予防、特に心室頻脈の治療及び/又は予防のための新規治療戦略、すなわちPDE2阻害を本明細書において報告する。具体的に我々は、NK A及びPKA-RIIとの相互作用を介してNK A活性がPDE2によって局所的に調節される新規NK A調節機構を見出した。我々は、理論に捉われることを望むものではないが、抗心不全、アンキリンB^{+/-}マウス、及びCPVTに関してインビボと単離心室筋細胞の両方において見られる不整脈作用の根底にこの機構が存在することを提唱する。このことは、主にNCXを介したCa²⁺放出の増加(NK A活性上昇の下流効果)により細胞内Ca²⁺負荷がPDE2阻害によって減少するという知見、及びその領域のAKAP結合PKA-RIIを分断するsuperAKAPによって抗不整脈作用がインビボで消失することから裏付けられている。

【発明の概要】

【 0 0 1 8 】

本発明は対象の頻脈又は頻脈性不整脈の治療に使用される選択的 P D E 2 阻害剤を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明は、治療を必要とする対象における頻脈又は頻脈性不整脈の治療方法であって、選択的 P D E 2 阻害剤の治療有効量を前記対象に投与する工程を含む前記方法をさらに提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明は、対象の頻脈又は頻脈性不整脈の治療に使用される医薬品の製造における選択的 P D E 2 阻害剤の使用をさらに提供する。

10

【 0 0 2 1 】

本発明は、(i) 選択的 P D E 2 阻害剤又は選択的 P D E 2 阻害剤を含む医薬組成物、及び(i i) 対象の頻脈又は頻脈性不整脈の治療における(i) の使用に関する指示書及び / 又はラベルを含むパッケージも提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、治療を必要とする対象における頻脈又は頻脈性不整脈の治療のための併用治療方法であって、選択的 P D E 2 阻害剤の治療有効量と同時又は別々に(例えば連続して)1種類以上の心臓血管薬、例えば不整脈治療薬を前記対象に投与する工程を含む前記方法をさらに提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明は、選択的 P D E 2 阻害剤と1種類以上の心臓血管薬、例えば不整脈治療薬を所望により少なくとも1種類の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物も提供する。

20

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 4 】

本発明は対象の頻脈又は頻脈性不整脈の治療に使用される選択的 P D E 2 阻害剤を提供する。本明細書において定義される場合、「治療」には予防的治療、すなわち予防も含まれる。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用される場合、「頻脈」という用語は心拍数の増加、すなわち速すぎる心拍のことを指す。典型的には、この用語は成人では毎分100回を超える心拍数のことを指す場合がある。「頻脈性不整脈」という用語は正常心臓リズムの異常(すなわち心臓リズム異常)に関連する頻脈のことを指す。幾つかの事例ではこれらの用語は心拍数の増加に関連するあらゆる心臓リズム障害を説明するために当技術分野において互換的に使用される場合もある。

30

【 0 0 2 6 】

本発明は特に心室頻脈の治療及び / 又は予防、例えば心室頻脈を予防するための治療に関する。本明細書において使用される場合、「心室頻脈」という用語は心室で始まり、且つ、心臓の電気系の機能不全によって引き起こされる異常で非常に速い心臓リズムのことを指す。さらに具体的には、この用語は両心室より発生する一度に少なくとも3回連続する異常心拍を含む毎分100回を超える心拍数のことを指す。

40

【 0 0 2 7 】

一実施形態では本発明は、副作用が少ない心室頻脈の治療又は予防に関する。副作用の減少には以下の有害事象、すなわち、疲労、めまい、運動耐性の低下、徐脈、吐き気、下痢、心不全の悪化、頭痛、肺毒性(間質性肺炎、急性呼吸窮迫症候群、びまん性肺胞出血)、甲状腺機能不全、肝毒性、眼症状、及び Q T 延長症のうちの1種類以上の減少が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 2 8 】

本発明において使用される前記化合物は本明細書において規定されるように選択的 P D E 2 阻害剤、好ましくは選択的ヒト P D E 2 阻害剤である。「P D E 2 阻害剤」はホスホ

50

ジエステラーゼ2 (PDE2) の分解作用を阻害する効果を有するあらゆる化合物である。「ヒトPDE2阻害剤」はこれに従って解釈されるべきである。1つの実施形態では本発明において使用される前記化合物は選択的PDE2A阻害剤、例えば選択的ヒトPDE2A阻害剤である。

【0029】

本明細書において使用される場合、「選択的PDE2阻害剤」という用語は他のPDEタイプよりも選択的にPDE2を阻害する化合物、すなわち他のPDEタイプ、具体的には次のPDE1、PDE3、PDE4、PDE5、及びPDE10のうちの1種類以上よりもPDE2を強力に阻害する化合物のことを指す。具体的には、この化合物はPDE10を阻害するよりも強力にPDE2を阻害し得る。さらに具体的には、この化合物は他の全てのPDEタイプを阻害するよりも強力にPDE2を阻害し得る。

10

【0030】

本発明において使用されることが好ましい化合物は選択的ヒトPDE2阻害剤である化合物、すなわち他のヒトPDEタイプよりもヒトPDE2を選択的に阻害する化合物、例えば次のヒトPDE1、ヒトPDE3、ヒトPDE4、ヒトPDE5、及びヒトPDE10のうちの1種類以上よりもヒトPDE2を強力に阻害する化合物である。具体的には、この化合物はヒトPDE10を阻害するよりも強力にヒトPDE2を阻害し得る。さらに具体的には、この化合物は他の全てのヒトPDEタイプを阻害するよりも強力にヒトPDE2を阻害し得る。

20

【0031】

本発明において使用されるPDE2阻害剤にはPDE2 (例えばヒトPDE2) 活性の阻害について少なくとも1種類の他のPDEタイプ (例えばヒトPDEタイプ) と比較して、好ましくはPDE10 (例えばヒトPDE10) と比較して、例えば他の全てのPDEタイプ (例えば他の全てのヒトPDEタイプ) と比較して少なくとも10倍の選択力があってよい。幾つかの実施形態では (例えば他の全てのPDEタイプ又は他の全てのヒトPDEタイプと比較した) 選択力の程度が少なくとも20倍、例えば少なくとも30倍又は少なくとも50倍になる。他の実施形態では (例えば他の全てのPDEタイプ又は他の全てのヒトPDEタイプと比較した) 選択力の程度が少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、又は少なくとも1000倍であってよい。

30

【0032】

本発明において使用されるPDE2活性の阻害剤は、通常、約100nM未満、好ましくは約50nM未満、例えば約40nM未満、約30nM未満、約20nM未満、又は約10nM未満のIC₅₀値 (基質の加水分解を50%阻害する濃度) でPDE2、例えばヒトPDE2を阻害することになる。幾つかの実施形態では前記化合物は5nM未満又は1nM未満のIC₅₀値でPDE2、例えばヒトPDE2を阻害してよい。PDE活性の測定方法とIC₅₀値の決定方法はよく知られており、当技術分野において、例えば、参照により内容全体を本明細書に援用するWeeksら著、Int. J. Impot. Res. 誌、第17巻：5~9頁、2005年、及びSounessら著、British Journal of Pharmacology 誌、第118巻：649~658頁、1996年に記載されている。

40

【0033】

多岐にわたるPDE2阻害剤が知られており、それらの製造方法と共に文献及び先行特許出願公開に記載されている。本発明では所望のPDE2阻害活性を有するどの化合物を使用してもよく、参照により内容全体を本明細書に援用する以下の刊行物、すなわちBoessら (Neuropharmacology 誌、第47巻：1081~1092頁、2004年)、Maeharaら (European Journal of Pharmacology 誌、第811巻：110~116頁、2017年)、Gomezら (J. Med. Chem. 誌、第60巻：2037~2051頁、2017年)、及びRomboutsら (ACS Med. Chem. Lett. 誌、第6巻：282~2

50

86頁、2015年)のうちのいずれかに記載されるアッセイなど、当技術分野においてよく知られているPDE阻害アッセイと選択性アッセイを用いてそのような化合物を容易に決定することができる。

【0034】

本発明において使用するのに適切なPDE2阻害剤の例には参照により内容全体を本明細書に援用する以下の文書、すなわち、Trabancoら著、Towards selective phosphodiesterase 2A (PDE2A) inhibitors: a patent review (2010 - present)、Expert Opinion on Therapeutic Patents誌、第26巻(第8号):933~946頁、2016年、国際公開第2002/050078号パンフレット(バイエル)、国際公開第2004/089953号パンフレット(アルタナファーマ社)、国際公開第2006/024640号パンフレット(アルタナファーマ社)、国際公開第2006/072612号パンフレット(アルタナファーマ社)、国際公開第2006/072615号パンフレット(アルタナファーマ社)、国際公開第2004/41258号パンフレット(Neuro3d)、欧州特許出願公開第1548011号明細書(Neuro3d)、欧州特許出願公開第1749824号明細書(Neuro3d)、国際公開第2005/041957号パンフレット(ファイザー・プロダクツ社)、国際公開第2005/061497号パンフレット(ファイザー・プロダクツ社)、国際公開第2010/054253号パンフレット(バイオティー・セラピース社及びワイス)、国際公開第2012/104293号パンフレット(ベーリンガーインゲルハイム・インターナショナル社)、国際公開第2014/019979号パンフレット(ベーリンガーインゲルハイム・インターナショナル社)、国際公開第2013/000924号パンフレット(ヤンセンファーマ社)、米国特許出願公開第2012/0214791号明細書(ファイザー)、国際公開第2012/168817号パンフレット(ファイザー)、国際公開第2014/010732号パンフレット(武田薬品)、欧州特許出願公開第3026051号明細書(武田薬品)、国際公開第2005/021037号パンフレット(ファイザー)、Mikamiら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻:7677~7702頁、2017年、Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号):1058~1077頁、2017年、Masoodら著、JPET誌、第331巻(第2号):690~699頁、2009年、Gomezら著、Bioorg. Med. Chem. Lett. 誌、第23巻:6522~6527頁、2013年、Maeharaら著、European Journal of Pharmacology誌、第811巻:110~116頁、2017年、Gomezら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻:2037~2051頁、2017年、Romboutsら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、第6巻:282~286頁、2015年、Redrobeら著、Psychopharmacology誌、第231巻:3151~3167頁、2014年、及びBuijnsterら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、第5巻:1049~1053頁、2014年のうちのいずれかに記載される阻害剤が含まれる。あらゆるこのような化合物の薬学的に許容可能な塩又はプロドラッグも使用可能である。

10

20

30

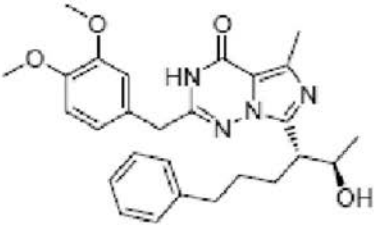
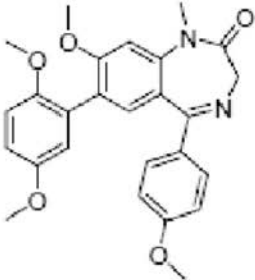
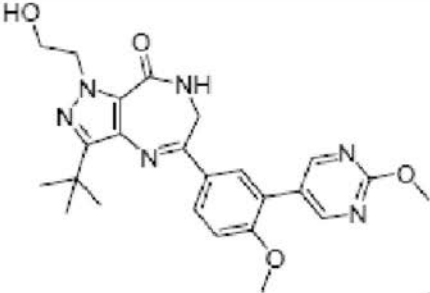
40

【0035】

本発明において使用される選択的PDE2阻害剤の具体例には以下の化合物、それらの薬学的に許容可能な塩及びプロドラッグが含まれる。

【0036】

【表 1 - 1】

化合物	名称	PDE 2 A IC ₅₀ 又は K _i 値*	選択力デ ータ*
	BAY60-7550 2-(3,4-ジメトキシベンジル)-7-[(2R,3R)-2-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン-3-イル]-5-メチルイミダゾ[5,1-f][1,2,4]トリアジン-4(3H)-オン	IC ₅₀ = 4.7 nM (Trabanco 等著、Expert Opinion on Therapeutic Patents 誌、第26巻(第8号): 933~946 頁、2016 年)	他のPDEに対して50倍超の選択力
		IC ₅₀ = 6 nM (Trabanco 等著、Expert Opinion on Therapeutic Patents 誌、第26巻(第8号): 933~946 頁、2016 年)	
		IC ₅₀ = 3.3 nM (Trabanco 等著、Expert Opinion on Therapeutic Patents 誌、第26巻(第8号): 933~946 頁、2016 年)	

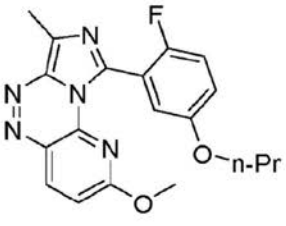

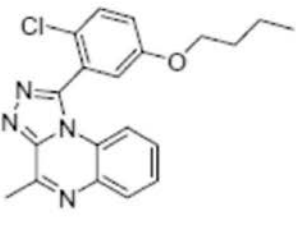
10

20

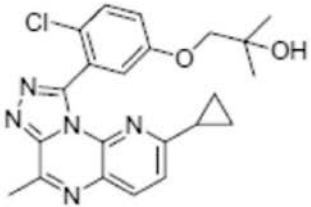
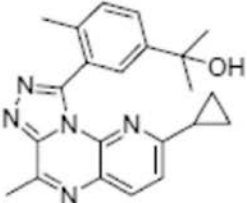
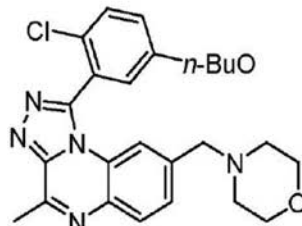
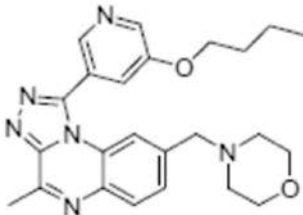
30

40

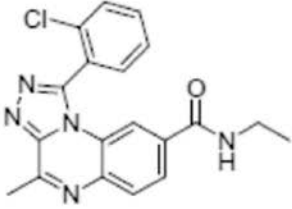
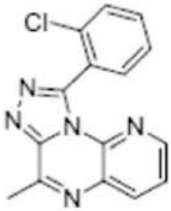
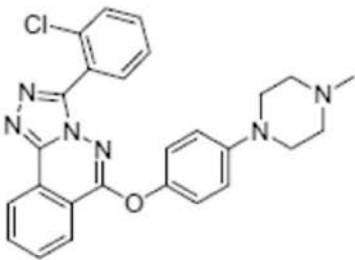
【表 1 - 2】

		$IC_{50} = 7.12$ nM (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26卷 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} = 282$ nM	10
		$IC_{50} = 4.12$ nM (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26卷 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} > 500$ nM	20
		$IC_{50} = 3$ nM (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26卷 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} >$ 1000 nM	30

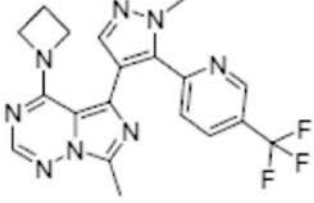
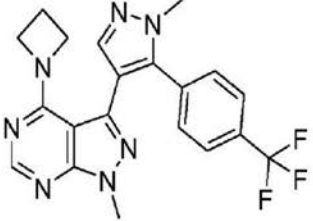
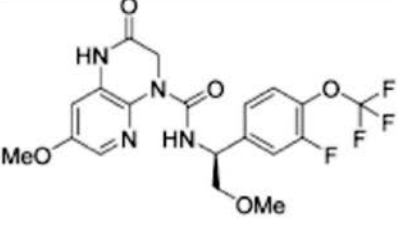
【表 1 - 3】

		$IC_{50} = 5 \text{ nM}$ (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26巻 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} =$ 1488 nM	10
		$IC_{50} = 12 \text{ nM}$ (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26巻 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} =$ 2403 nM	20
		$IC_{50} = 8 \text{ nM}$ (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26巻 (第8号): 933~946 頁、2016 年)	PDE10 $IC_{50} =$ 1622 nM	30
		$IC_{50} = 10 \text{ nM}$ (Buijnster sら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、 第5巻: 1049~1053 頁、2014 年)	rPDE10 $IC_{50} =$ 4183 nM 全てのP DEに対 して21 0倍超の 選択力	40

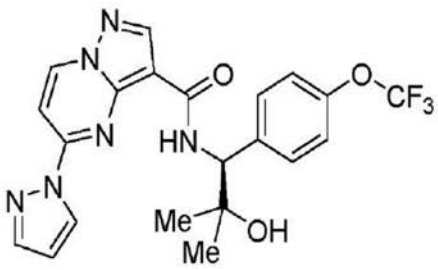
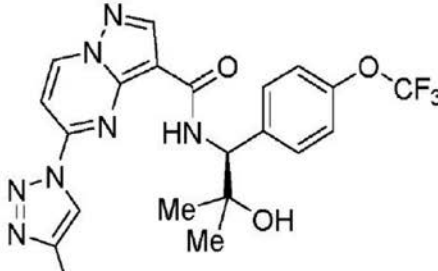
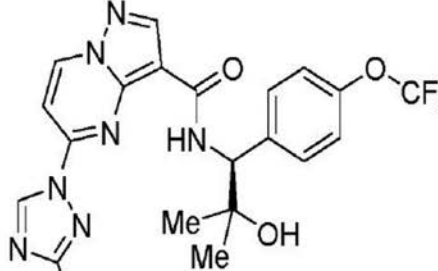
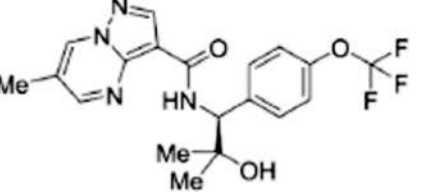
【表 1 - 4】

		$IC_{50} = 0.29$ nM (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26巻 (第8号): 933~946 頁、2016年 内の pIC_{50} 値から算 出)	PDE10 $IC_{50} = 21$ nM	10
		$IC_{50} = 15$ nM (Trabanco ら著、 Expert Opinion on Therapeuti c Patents 誌、第26巻 (第8号): 933~946 頁、2016 年)		20
	Lu AF 6 4 2 8 0	$K_i = 20$ nM (Redrobeら 著、 Psycho- pharmacolo gy誌、第 231巻: 3151~3167 頁、2014 年)	PDE10 $K_i = 1800$ nM	30

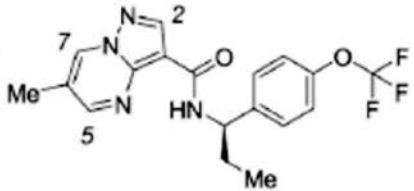
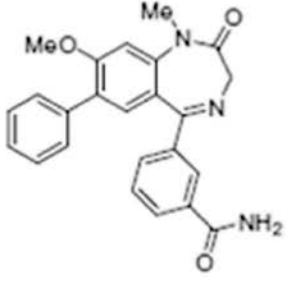
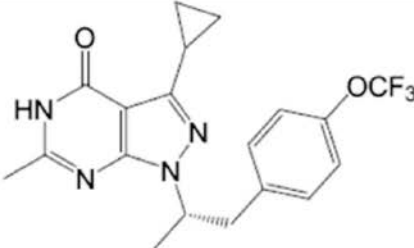
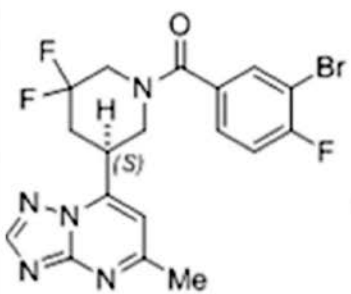
【表 1 - 5】

	PF-0518099	$IC_{50} = 1.61$ nM (米国特許出願公開2012/0214791号明細書、Gomezら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻: 2037~2051頁、2017年)	PDE 10Aに対して2000倍のPDE選択力	10
		$IC_{50} = 2.30$ nM (Trabancoら著、Expert Opinion on Therapeutic Patents 誌、第26巻(第8号): 933~946頁、2016年)	PDEファミリーの他のメンバーに対して500倍超の選択力	20
	TAK-915 N-((1S)-1-(3-フルオロ-4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-2-メトキシエチル)-7-メトキシ-2-オキソ-2,3-ジヒドロピリド[2,3-b]ピラジン-4-(1H)-カルボキサミド	$IC_{50} = 0.61$ nM (Mikamiら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻: 7677~7702頁、2017年)	PDE 10Aに対して4100倍のPDE選択力	30

【表 1 - 6】

	<p>N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル)-5-(1H-ピラゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド</p>	<p>IC₅₀ = 5.4 nM (Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号): 1058~1077頁、2017年)</p>	<p>他のPD Eに対して630倍の選択力</p>	10
	<p>N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル)-5-(4-メチル-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド</p>	<p>IC₅₀ = 5.4 nM (Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号): 1058~1077頁、2017年)</p>	<p>他のPD Eに対して690倍の選択力</p>	20
	<p>N-(1S)-2-ヒドロキシ-2-メチル-1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロピル)-5-(3-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド</p>	<p>IC₅₀ = 11 nM (Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号): 1058~1077頁、2017年)</p>	<p>他のPD Eに対して610倍の選択力</p>	30
		<p>IC₅₀ = 5.1 nM (Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号): 1058~1077頁、2017年)</p>		40

【表 1 - 7】

		$IC_{50} = 24 \text{ nM}$ (Mikamiら著、Chem. Pharm. Bull. 誌、第65巻(第11号): 1058~1077頁、2017年)	
	ND-7001 3-(8-メトキシ-1-メチル-2-オキソ-7-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]-[1,4]ジアゼピン-5-イル)ベンズアミド	$Ki = 114 \text{ nM}$ (Masoodら著、JPET 誌、第331巻(第2号): 690~699頁、2009年)	
	PDM-631 ((S)-3-シクロプロピル-6-メチル-1-(1-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)プロパン-2-イル)-1,5-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン)	$IC_{50} = 1.5 \text{ nM}$ (Maeharaら著、European Journal of Pharmacology誌、第811巻: 110~116頁、2017年)	他のPDEに対して2000倍超の選択力(1 μM において10%未満の阻害)
	DNS-8254 (5S)-1-[(3-ブロモ-4-フルオロフェニル)カルボニル]-3,3-ジフルオロ-5-[5-メチル-1,2,4-トリアゾロ[1,5-a]ピリミジン-7-イル]ピペリジン	$IC_{50} = 8 \text{ nM}$ (Gomezら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻: 2037~2051頁、2017年)	PDE10A $IC_{50} = 1700 \text{ nM}$

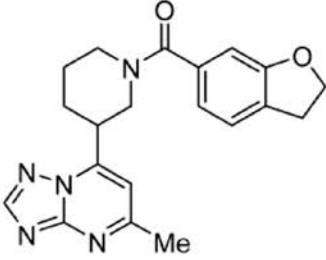
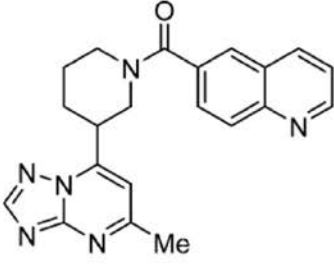
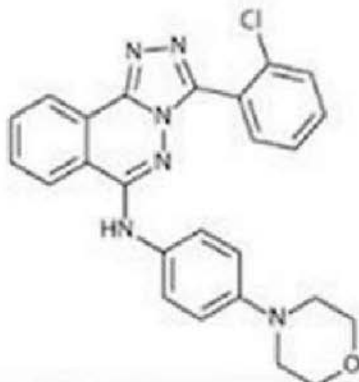
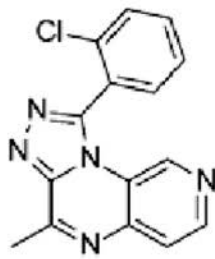
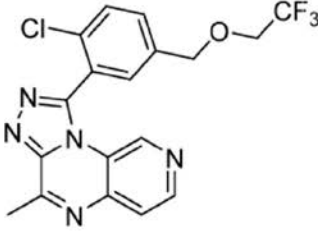
10

20

30

40

【表 1 - 8】

	<p>1 - [2, 3-ジヒドロ-1-ベンゾフラン-5-イル) カルボニル] - 3 - {5-メチル- [1, 2, 4]-トリアゾロ [1, 5-a] ピリミジン-7-イル} ピペリジン</p>	<p>IC₅₀ = 3 nM (Gomezら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻: 2037~2051頁、2017年)</p>	
	<p>6 - [(3 - {5-メチル- [1, 2, 4] トリアゾロ [1, 5-a] ピリミジン-7-イル} ピペリジン-1-イル) カルボニル] キノロン</p>	<p>IC₅₀ = 2 nM (Gomezら著、J. Med. Chem. 誌、第60巻: 2037~2051頁、2017年)</p>	
		<p>IC₅₀ = 4.2 nM (米国特許第7851472号明細書)</p>	
		<p>hPDE2A IC₅₀ = 29 nM (Romboutsら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、第6巻: 282~286頁、2015年)</p>	<p>rPDE10 IC₅₀ = 480 nM</p>
		<p>hPDE2A IC₅₀ = 3 nM (Romboutsら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、第6巻: 282~286頁、2015年)</p>	<p>rPDE10 IC₅₀ = 2450 nM</p>

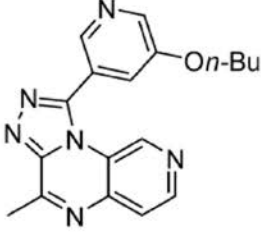
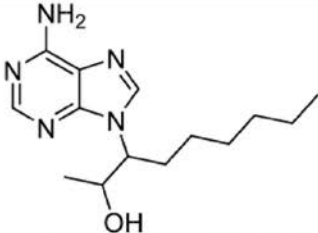
10

20

30

40

【表 1 - 9】

		hPDE2A $IC_{50} = 54$ nM (Rombouts ら著、ACS Med. Chem. Lett. 誌、 第6巻: 282 ~286頁、 2015年)	rPDE10 $IC_{50} =$ 3800 nM
	EHNA (エリスロ -9-(2-ヒドロキ シ-3-ノニル) アデ ニン)		

*記載されている刊行物から取得された値

【0037】

本発明において使用することが好ましいものは以下の選択的PDE2阻害剤、すなわちTAK-915、ND-7001、PF-05180999、LuAF64280、及びそれらの薬学的に許容可能な塩又はプロドラッグである。本発明において使用することが特に好ましいものはPF-05180999、TAK-915、それらの薬学的に許容可能な塩、及びそれらのプロドラッグである。

【0038】

このような化合物のPDE阻害活性は、参照により内容全体を本明細書に援用する以下の文書、すなわち、Boessら著、Neuropharmacology誌、第47巻: 1081~1092頁、2004年、Maeharaら著、European Journal of Pharmacology誌、第811巻: 110~116頁、2017年、Gomezら著、J. Med. Chem.誌、第60巻: 2037~2051頁、2017年、Romboutsら著、ACS Med. Chem. Lett.誌、第6巻: 282~286頁、2015年、及びRedrobeら著、Psychopharmacology誌、第231巻: 3151~3167頁、2014年のうちのいずれかに記載される方法を含む当技術分野において公知の方法により試験され得る。様々なPDEに対する化合物の特異性の決定には特定のPDEファミリーを単離し、cGMP/cAMPの分解に関するPDE活性を測定し、そして当該化合物その活性を阻害する程度を調べるアッセイが含まれる場合がある。

【0039】

本明細書において記載される前記PDE2阻害剤化合物のうちのいずれも薬学的に許容可能な塩の形で使用され得る。「薬学的に許容可能な塩」という用語は本明細書において使用される場合に本明細書において記載される前記化合物のうちのいずれかのあらゆる薬学的に許容可能な有機塩又は無機塩を指す。薬学的に許容可能な塩は対イオンなどの1種類以上の追加分子を含む場合がある。これらの対イオンは親化合物の電荷を安定させるあらゆる有機基又は無機基であってよい。

【0040】

本発明において使用される前記PDE2阻害剤化合物が塩基である場合に適切な薬学的に許容可能な塩は有機酸又は無機酸とこの遊離塩基の反応によって調製され得る。この目的のために使用され得る酸の非限定的な例には塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルホン酸、メタンスルホン酸、リン酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、

10

20

30

40

50

酢酸、トリフルオロ酢酸、及びアスコルビン酸が挙げられる。本発明において使用される前記 P D E 2 阻害剤化合物が酸である場合に適切な薬学的に許容可能な塩は有機塩基又は無機塩基とのこの遊離酸の反応によって調製され得る。この目的のために適切であり得る塩基の非限定的な例にはアルカリ金属及びアルカリ土類金属の水酸化物、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、又は水酸化セシウム、アンモニア、並びにジエチルアミン、トリエチルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、及びジシクロヘキシルアミンなどの有機アミンが挙げられる。塩形成のための手法は当技術分野において常用されている。

【 0 0 4 1 】

適切な塩の例には塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、及びスルホン酸、例えばメタンスルホン酸との塩が挙げられる。他の適切な塩には酢酸塩、クエン酸塩、及びフマル酸塩などの有機塩が挙げられる。

10

【 0 0 4 2 】

代わりに、本明細書において記載される前記 P D E 2 阻害剤化合物のうちのいずれもプロドラッグの形で提供され得る。「プロドラッグ」という用語は使用条件下で、例えば体内において変換を起こして活性薬品を放出する活性化合物の誘導体のことを指す。プロドラッグは、必ずというわけではないが、この活性薬品に変換されるまで薬学的に不活性であってよい。本明細書において使用される場合、「プロドラッグ」という用語は本明細書において記載される前記活性 P D E 2 阻害剤化合物のうちのいずれかに生理的条件下で変換されるあらゆる化合物にまで及ぶ。適切なプロドラッグには生理的条件下で前記所望の P D E 2 阻害剤に加水分解される化合物が含まれる。

20

【 0 0 4 3 】

通常、プロ基を使用して活性のために少なくとも部分的に必要なと考えられる親分子内の 1 つ以上の官能基をマスクすることによりプロドラッグを得ることができる。本明細書において使用される「プロ基」は、活性薬品内の官能基をマスクするために使用され、且つ、官能基を脱離させて前記活性薬品を提供するために特定の使用条件下（例えば、体への投与）で切断などの変換を起こす基を意味する。通常、プロ基は使用条件下、例えばインビボで切断可能な結合又は複数の結合を介してこの活性薬品の官能基に結合している。このプロ基の切断は使用条件下で自然に、例えば加水分解により起こる場合があり、或いは他の物理的又は化学的手段、例えば酵素により、温度変化に曝すことにより、又は pH 変化に曝すこと等により触媒又は誘導される場合がある。他の物理的又は化学的手段によって切断が誘導される場合、これらは使用条件、例えば標的部位の pH 条件に内因的なものであってよく、又はこれらは外因的に与えられてもよい。

30

【 0 0 4 4 】

プロドラッグを提供するために活性化合物内の官能基をマスクするのに適切な多種多様なプロ基が当技術分野においてよく知られている。例えばヒドロキシ官能基は、親ヒドロキシ基を生み出すためにインビボで加水分解され得るエステル、リン酸エステル、又はスルホン酸エステルとしてマスクされ得る。アミド官能基は、親アミノ基を生み出すためにインビボで加水分解され得る。カルボキシル基は、親カルボキシル基を生み出すためにインビボで加水分解され得るエステル又はアミドとしてマスクされ得る。適切なプロ基の他の例が当業者に明らかになる。このプロ基の正確な性質は必要に応じて、例えばこのプロドラッグの所望の油又は水への溶解性、このプロドラッグの意中の投与モード、及び/又は前記活性薬品化合物を生じさせるための標的部位におけるこのプロドラッグの意中の代謝モードに応じて選択され得る。このプロ基は、例えば、所望により水溶解性を増減させるために親水性でも親油性でもよい。プロ基の選択によって胃腸管からの吸収性の向上、薬品安定性の改善等の他の望ましい特質が付与される場合もある。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書において記載される前記 P D E 2 阻害剤は頻脈又は頻脈性不整脈の治療で使用するのに適切である。例えば、これらの阻害剤は以下の障害、すなわち心房頻脈、心房細動、心房粗動、発作性上室性頻脈、心室性期外収縮 (P V C)、心室細動、及び心室頻脈

50

のうちのいずれかの治療に使用され得る。好ましい実施形態では前記化合物は心室頻脈の治療に使用され得る。不整脈に関連する症状、例えば頻脈性不整脈の治療は本発明の好ましい態様を形成する。

【0046】

したがって、1つの実施形態では本明細書において記載される前記化合物は以下の症状、すなわち、心房頻脈、心房細動、心房粗動、発作性上室性頻脈、心室性期外収縮(PVC)、心室細動、及び心室頻脈のうちのいずれかの治療又は予防、例えば不整脈に関連するあらゆるこのような症状の治療又は予防に使用され得る。

【0047】

1つの実施形態では本明細書に記載される前記PDE2阻害剤は心室頻脈の治療又は予防を目的としたものである。心室頻脈を予防するための対象の治療は本発明の好ましい実施形態である。治療に適切な対象(例えば患者)には心室頻脈になりやすいと診断された対象、及び以前に少なくとも1回の心室頻脈の発生を経験したことがあり、したがってさらに発作を起こしやすい対象が含まれる。このような対象の治療はさらなる心室頻脈イベントの発生を減少させる、好ましくは解消することを目的としている。

10

【0048】

頻脈又は頻脈性不整脈(例えば、心室頻脈)は後天性でも先天性でもあり得る。例えば、これらの不整脈は以下の障害、すなわち、先天性心不全、高血圧、心筋梗塞(心筋梗塞の最中又は心筋梗塞後)、うっ血性心不全、再灌流障害又は再灌流損傷、虚血、狭心症、拡張型心筋症、心筋梗塞後心不全、動脈硬化性末梢動脈疾患、糖尿病、肥大型心筋症、心筋炎、チャンネル病(例えばQT延長症候群、カテコールアミン誘発性多形性心室頻脈(CPVT)、又はブルガダ症候群)、拘束型心筋症、浸潤性心疾患(例えばアミロイドーシス)、及び肺性高血圧と右心室不全を引き起こす肺胞性低酸素症のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない心臓に関連する様々な障害に付随する、又はそのような障害から生じる場合がある。

20

【0049】

本明細書において使用される場合、「治療」、「治療すること」、及び「治療する」という用語は対象の前記所定の疾患又は障害に向けた治療方法と予防方法の両方を含む。具体的には、これらの用語は、(i)前記障害の発生防止、又は前記障害が発生するリスクの軽減、特に前記障害になる素因が存在する可能性が前記対象にあるがその障害を発症しているときとまだ診断されていないときのリスクの軽減、(ii)前記障害の抑制、特にその障害のさらなる発生(進行)の停止又はその障害の発症の遅延化、及び(iii)前記障害の軽減、特に所望の転帰に達するまでの前記障害の退行の誘発を含む。

30

【0050】

本発明による治療方法から利益を受ける可能性がある対象(例えば患者)には以下の対象、すなわち、以前に心筋梗塞に罹患したことがある対象、心不全を発症している対象、及び本明細書において記載される頻脈症状のうちのいずれかになる素因が存在する可能性がある対象、例えばそのような症状、例えば身体活動又は精神的ストレスに応答して異常に速く、且つ、不規則な心拍(頻脈)が引き起こされるカテコールアミン誘発性多形性心室頻脈(CPVT)の遺伝的素因を有する対象のうちのいずれかが含まれるがこれらに限定されない。以下の症状、すなわち、心不全、心筋梗塞後心筋炎、肥大性心筋症、CPVT、QT延長症候群、及びブルガダ症候群のうちのいずれかに罹患している、又はその症状の素因が存在する可能性がある対象は、本明細書において記載される前記方法による治療に特に適している。本発明に従って治療される可能性がある好ましい対象(例えば患者)群には心不全、CPVT、又はQT延長症候群に罹患している対象、又はそのリスクがある対象が含まれる。

40

【0051】

一実施形態では本発明は、以下の症状、すなわち、心不全、心筋梗塞後心筋炎、肥大性心筋症、CPVT、QT延長症候群、及びブルガダ症候群のうちのいずれかに罹患している、又はその症状の素因が存在する可能性がある対象(例えばヒト患者)における心室頻

50

脈の治療及び / 又は予防に関する。

【 0 0 5 2 】

C P V T 及び Q T 延長症候群は心室頻脈のリスクが高い遺伝的症候群である。これらの症状を有するほぼ全ての患者が現在のところ何らかの抗不整脈治療を受けている。心不全には様々な症状が含まれるが、心室頻脈の付随リスクが多くの場合に存在し得る。特に本発明は、心不全、C P V T、又は Q T 延長症候群に罹患している対象、又はそのリスクがある対象における心室頻脈の治療及び / 又は予防に関する。

【 0 0 5 3 】

頻脈（例えば心室頻脈）の素因が存在する可能性がある対象には以前に心不整脈（例えば心室頻脈）の診断及び / 又は治療を受けたことがある対象、例えば心臓リズム異常に対処するための遮断薬などの不整脈治療薬を処方されたことがある対象又は対象植え込み型除細動器（I C D）を有する対象が含まれる。I C D を有する有症状心不全患者は特に本明細書において開示される治療方法から利益を受ける可能性がある。

10

【 0 0 5 4 】

I C D は心室頻脈及び / 又は心臓突然死のリスクが高い患者、例えば心不全又は Q T 延長症候群の患者に移植されることが典型である。この装置の移植から 1 ~ 3 年以内は患者の 2 0 ~ 3 5 % が適切なショックを受けることになる。すなわち、I C D が致死的となり得る心室頻脈を正常な心臓リズムに転換する。しかしながら、患者の 3 分の 1 が不適切なショックを受ける場合もある。すなわち、I C D が不必要なショックを与える。I C D がショックを与えるときは常に心臓機能の低下による 2 ~ 5 倍の死亡率の上昇がこれに付随する。したがって、患者に加えられる可能性がある不適切な I C D ショックの量を減少可能であることが重要である。基礎心疾患、例えば心室頻脈を治療又は予防するための有効な薬物治療の利用によりこれを達成することができる。したがって、1 つの実施形態では本明細書において記載される前記方法は、I C D が移植されている患者で心室頻脈を治療又は予防するため、特に患者に加えられる可能性がある不適切な I C D ショックの数を減少させる、又は最少にするために使用される場合がある。

20

【 0 0 5 5 】

心室頻脈などの心不整脈の長期治療を受けている対象（例えば、遮断薬を少なくとも 6 か月又は少なくとも 1 2 か月にわたって処方されている対象）は特に本明細書において記載される治療方法から利益を受ける可能性がある。遮断薬は一般的に心室頻脈の第一選択治療であり得るが、それらの効力は症状及び患者の間で異なる。本明細書において記載される前記方法は、従来の治療（例えば遮断薬を使用する治療）が心不整脈（特に心室頻脈）を治療するのに充分ではない患者の治療に、又は従来薬品（例えば遮断薬）が禁忌（例えば A V ブロック）であるか、若しくはこの対象によって忍容されない場合に特に使用される。

30

【 0 0 5 6 】

1 つの実施形態では V A 誘発症状を最小限に抑えるため、及び / 又は（例えば C P V T において特に一般的な）不適切な I C D ショックを減少させるために本治療方法を用いて I C D を有する患者を治療する場合がある。

【 0 0 5 7 】

1 つの実施形態では心室頻脈などの心不整脈に対する従来治療も受けている I C D を有する患者を治療するために本治療方法を用いる場合がある。このような患者には I C D を有し、且つ、遮断薬を用いる治療を受けている患者（例えば、遮断薬を少なくとも 6 か月又は少なくとも 1 2 か月にわたって処方されている患者）が含まれる。

40

【 0 0 5 8 】

本明細書において使用される場合、「治療有効量」は所望の薬理効果及び / 又は治療効果を引き起こす量、すなわち意図する目的を達成するために有効である前記 P D E 2 阻害剤の量に関連する。個々の患者の必要量が異なる場合がある一方で前記活性薬剤の最適な範囲の有効量の決定は当業者の能力の範囲内である。本明細書に記載される前記化合物のいずれかを使用して疾患又は障害を治療するための薬剤投与計画は、病状の性質及びその

50

重症度を含む様々な因子に応じて選択されることが一般的である。

【0059】

本明細書において使用される場合、「対象」は通常では哺乳類動物である。「哺乳類動物」という用語には例えばイヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、及びヒトが含まれる。前記対象はヒトであることが好ましい。

【0060】

本明細書において記載される前記PDE2阻害剤は医薬組成物の形で投与されることが典型である。医薬組成物は、すぐに利用可能な成分を用いる従来法で製剤可能である。したがって、前記PDE2阻害剤は、錠剤、丸剤、粉剤、ロゼンジ剤、サッシェ剤、カシェー剤、エリキシル剤、懸濁剤（注射液又は点滴液としてのもの）、乳剤、液剤、シロップ剤、エアロゾル剤（固形剤としてのもの、又は液体媒体中のもの）、軟膏、軟質及び硬質ゼラチンカプセル剤、坐剤、無菌注射液、無菌パッケージ粉剤等の従来のガレヌス製剤などの医薬組成物を作製するための1種類以上の従来の担体、希釈剤、及び/又は賦形剤と混合されてよい。

10

【0061】

適切な賦形剤、担体、又は希釈剤はラクトース、ブドウ糖、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、コーンスターチ、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、ミクロクリスタリンセルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水飴、水、水/エタノール、水/グリコール、水/ポリエチレン、グリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、鉱物油若しくは固形脂肪などの脂肪質、又はそれらの適切な混合物である。カルボキシポリメチレン、カルボキシメチルセルロース、フタル酸酢酸セルロース、又はポリ酢酸ビニルなどの持続放出製剤を得るための薬剤を使用してもよい。前記組成物はその他に滑沢剤、湿潤剤、増粘剤、着色剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、浸透圧活性剤、乳化剤、懸濁化剤、保存剤、甘味剤、着香剤、例えば経鼻送達のための吸着増強剤（胆汁塩、レシチン、界面活性剤、脂肪酸、キレート剤）等を含んでもよい。前記医薬組成物は、当技術分野においてよく知られている手法を用いることにより患者への投与後に前記PDE2阻害剤を即時放出、持続放出、又は遅延放出するように製剤される。

20

30

【0062】

このような組成物中の有効成分（すなわち前記PDE2阻害剤）は前記製剤の約0.01重量%～約99重量%の割合、好ましくは約0.1～約50重量%、例えば10重量%の割合で含まれてよい。

【0063】

前記投与は、例えば経口投与、非経口投与（例えば筋肉内投与、皮下投与、腹膜内投与、又は静脈内投与）、経皮投与、パッカル投与、直腸投与、又は局所投与、又は吸入による投与を含む医療分野で知られているあらゆる適切な方法によるものであり得る。好ましい投与経路は経口経路と非経口経路（例えば静脈内経路又は腹膜内経路）である。したがって、本発明において使用される好ましい製剤は錠剤、カプセル剤、又は静注液である。

40

【0064】

錠剤は直接打錠法、又は標準流動床技術等を用いる造粒法により調製されることが典型である。錠剤はフィルム被覆層又は腸溶被覆層などの別の被覆層で被覆されていることが好ましい。カプセル剤はゼラチンカプセル剤であることが好ましい。注射用組成物は調製済み溶液又は投与前に溶解される乾燥物質であり得る。全ての静注用組成物は滅菌されている。加熱滅菌及び無菌的調製などのあらゆる滅菌方法が用いられてよい。

【0065】

単位用量は選択したPDE2阻害剤及び治療される疾患又は障害に応じて異なる。単位用量は0.1mg～500mgの間、より好ましくは1mg～300mgの間で変化することが典型である。典型的な一日用量は0.1mg～2gまで、より好ましくは1mg～

50

1 g まで、例えば 1 mg ~ 600 mg までであり得る。

【0066】

対象の体重 kg 当たりの典型的な一日用量は 0.01 mg / kg ~ 50 mg / kg の間、好ましくは 0.1 mg / kg ~ 40 mg / kg の間、例えば 1 mg / kg ~ 20 mg / kg 又は 5 mg / kg ~ 10 mg / kg の間で変化し得る。

【0067】

投与計画は臨床状態に応じて変化する。典型的な平均的投与は 1 日に 1 回、2 回、又は 3 回であり、好ましくは 1 日に 1 回又は 2 回である。

【0068】

投与される前記活性化合物の正確な投与量と治療期間の長さは、対象の年齢と体重、治療を必要とする具体的な症状とその重症度、及び投与経路等を含む多数の因子に左右される。当業者は適切な投与量を容易に決定することができる。

【0069】

本明細書において記載されるような抗不整脈治療法としての PDE 2 阻害は、例えば既知の治療選択肢（例えば 遮断薬を使用する治療）よりも効果的である場合、及び / 又は現行の治療が適切ではない場合、例えばこれらの治療選択肢がいずれかの所与の患者群で禁忌である場合に単独で用いられる場合がある。あるいは、本明細書において記載される前記治療方法のうちのいずれも、治療対象の前記障害又は疾患の治療に有効である 1 種類以上の追加活性薬剤の投与（すなわち現行の体制への追加療法としての投与）と都合よく併用される場合がある。このような治療方法は前記 PDE 2 阻害剤又は前記 PDE 2 阻害剤を含む医薬組成物と前記追加活性薬剤の同時投与、個別投与、又は連続投与を包含し得る。前記活性薬剤が同時に投与される場合、これらの薬剤は混合製剤の形で提供されてよい。したがって、本明細書において記載される前記医薬組成物はそのような活性薬剤のうちの 1 種類以上をさらに含む場合がある。

【0070】

前記 PDE 2 阻害剤と共投与される可能性がある他の活性薬剤には心臓血管薬が含まれ得る。例えば、前記 PDE 2 阻害剤は高血圧、心不全、不整脈、及び / 又は心筋梗塞後再灌流症候群を治療する 1 種類以上の薬品と共投与される場合がある。そのような薬品の例には 遮断薬、カルシウム拮抗薬、ACE 阻害剤、ATII / ブロッカー、及び不整脈治療薬が挙げられる。1 つの実施形態ではこの心臓血管薬は 遮断薬、例えばアセプトロール、アテノロール、ベタキソロール、ピソプロロール、セリプロロール、メトプロロール、ネビボロール、又はエスモロールなどの β_1 選択性 遮断薬であり得る。特定の実施形態ではメトプロロールは、本明細書において記載される症状のうちのいずれかの治療又は予防、特に心室頻脈の治療又は予防において PDE 2 阻害剤と共投与される場合がある。

【0071】

以下の実施例を単なる例示として、且つ、次の添付図面を参照して提示する。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図 1】 cAMP と局所的な AKAP 結合 PKA によって NKA 電流が調節されていることを示す図である。(A) NKA 電流測定のプロトコルの概要である。単離された心筋細胞を -20 mV で電圧固定し、対称的な Na^+ 濃度の溶液で外部より灌流し、且つ、内部で透析した（左側のパネル）。その灌流液からの K^+ の除去により NKA 電流が測定された（右側のパネル）。(B) cAMP 濃度の上昇の NKA 電流に対する効果を示す図である。 $^* = 0$ の cAMP に対して $p < 0.05$ 。2 ~ 5 匹のラットに由来する 6 ~ 13 ARVM。(C) 20 μ M の superAKAP の NKA 電流に対する効果を示す図である。2 匹のラットに由来する 6 ~ 7 ARVM。 $^* = 100 \mu$ M の cAMP に対して $p < 0.05$ 。

【0073】

【図 2】 PDE 2 によって NKA 活性が調節されていることを示す図である。(A) 3 種類の異なる PDE 2 阻害剤の NKA 電流に対する効果を示す図である。3 匹のラットに由

10

20

30

40

50

来する 5 ~ 8 A R V M。対照に由来する N K A 電流と B a y 6 0 - 7 5 5 0 に由来する N K A 電流、及び対照に由来する N K A 電流と P F 0 5 1 8 0 9 9 9 に由来する N K A 電流がペアになっている。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。(B) P D E 2 K O マウスと W T マウスでの N K A 電流を示す図である。3 匹のマウスに由来する 7 ~ 8 筋細胞。* = W T に対して $p < 0.05$ 。(C) P D E 3 阻害と P D E 4 阻害の N K A 電流に対する効果を示す図である。(D) イソプレナリン及び P D E 阻害剤を用いる処理後のホスホレマン (P L M) 上のセリン 6 8 におけるリン酸化を示す図である。

【 0 0 7 4 】

【図 3】 N K A と P D E 2 が共局在し、相互作用することを示す図である。(A ~ B) A R V M における N K A と P D E 2 の近接ライゲーションアッセイを示す図である。* = 抗体を含まない、又は単一の抗体を含む実験に対して $p < 0.05$ 。(C) H E K 2 9 3 細胞における N K A と P D E 2 の共免疫沈降を示す図である。

10

【 0 0 7 5 】

【図 4】 P D E 2 阻害により $C a^{2+}$ トランジェントの振幅と筋小胞体 (S R) $C a^{2+}$ 負荷量が減少することを示す図である。(A) A R V M における $C a^{2+}$ トランジェントの振幅 (左) (3 匹のラットに由来する 1 2 A R V M)、 $C a^{2+}$ 放出速度 (中央) (3 匹のラットに由来する 1 2 A R V M)、及び筋小胞体 (S R) $C a^{2+}$ 負荷量 (右) (3 匹のラットに由来する 1 1 A R V M) に対する B a y 6 0 - 7 5 5 0 の効果を示す図である。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。(B ~ C) $C a^{2+}$ トランジェントに対する B a y 6 0 - 7 5 5 0 の効果 (B) と通常のカフェイン応答 (C) の代表的なトレースを示す図である。(D) P D E 2 K O と W T における $C a^{2+}$ トランジェントの振幅 (左) (3 匹のマウスに由来する 1 4 ~ 1 6 筋細胞)、 $C a^{2+}$ 放出速度 (中央) (3 匹のマウスに由来する 1 4 ~ 1 6 筋細胞)、及び筋小胞体 (S R) $C a^{2+}$ 負荷量 (右) (3 匹のマウスに由来する 1 1 ~ 1 4 筋細胞) を示す図である。* = W T に対して $p < 0.05$ 。

20

【 0 0 7 6 】

【図 5】 P D E 2 阻害により N C X 依存性 $C a^{2+}$ 放出が増加することを示す図である。(A) 主要 $C a^{2+}$ 放出タンパク質の活性を測定するためのプロトコルを示す代表的トレースを示す図である。(B) S E R C A 2 活性 (左) (3 匹のラットに由来する 1 0 A R V M)、N C X 活性 (中央) (3 匹のラットに由来する 1 1 A R V M)、及び非 S E R C A 2 / 非 N C X 性 $C a^{2+}$ 放出 (右) (2 匹のラットに由来する 5 A R V M) に対する B a y 6 0 - 7 5 5 0 の効果を示す図である。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。(C) P D E 2 K O と W T における S E R C A 2 活性 (左) (3 匹のマウスに由来する 1 0 ~ 1 4 筋細胞)、N C X 活性 (中央) (3 匹のマウスに由来する 1 0 ~ 1 4 筋細胞)、及び非 S E R C A 2 / 非 N C X 性 $C a^{2+}$ 放出 (右) (3 匹のマウスに由来する 4 ~ 5 筋細胞) を示す図である。* = W T に対して $p < 0.05$ 。(D) S B F I を用いて測定された細胞内 $N a^{+}$ を示す図である。代表的トレース (左) と平均データ (右)。3 匹のラットに由来する 6 A R V M。

30

【 0 0 7 7 】

【図 6】 P D E 2 阻害が L T C C と R y R 活性に対して効果を持たないことを示す図である。(A ~ B) B a y 6 0 - 7 5 5 0 処理による L T C C の代表的トレース (A) と平均データ (B) を示す図である。3 匹のラットに由来する 5 A R V M。(C ~ D) B a y 6 0 - 7 5 5 0 処理による $C a^{2+}$ スパーク頻度の代表的トレース (C) と平均データ (D) を示す図である。2 匹のラットに由来する 6 A R V M。(E) B a y 6 0 - 7 5 5 0 による $N a^{+}$ 電流の平均データを示す図である。3 匹のラットに由来する 6 ~ 7 A R V M。

40

【 0 0 7 8 】

【図 7】 P D E 2 阻害により結紮後 H F 及び A n k B $^{+/-}$ において細胞性不整脈が減少することを示す図である。(A) 結紮後 H F に由来する筋細胞 (3 匹のマウスに由来する 6 筋細胞) とシャムに由来する筋細胞 (1 匹のマウスに由来する 2 筋細胞) における B a y 6 0 - 7 5 5 0 による N K A 電流を示す図である。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。(B) 結紮後 H F 筋細胞における $C a^{2+}$ トランジェントの振幅 (左) (3 匹のマウスに由来す

50

る 11 ~ 12 筋細胞) と Ca^{2+} 放出速度 (右) (3 匹のマウスに由来する 10 ~ 12 筋細胞) に対する Bay 60 - 7550 の効果を示す図である。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。(C) 結紮後 HF 筋細胞に由来する Ca^{2+} ウェーブを検出するためのプロトコルの代表的トレースを示す図である。(D) 結紮後 HF マウスに由来する単離筋細胞 (3 匹のマウスに由来する 11 ~ 12 筋細胞)、Ank B^{+/-} マウスに由来する単離筋細胞 (3 匹のマウスに由来する 18 筋細胞)、及び WT (Ank B^{+/+}) マウスに由来する単離筋細胞 (3 匹のマウスに由来する 11 ~ 13 筋細胞) における Ca^{2+} ウェーブの頻度を示す図である。* = 対照に対して $p < 0.05$ 。

【0079】

【図 8】結紮後 HF マウスにおいて PDE 2 阻害により心室頻脈と死が防止されることを示す図である。(A) 結紮後 HF マウスにおけるインビボ不整脈のためのプロトコルを示す図である。(B) VT (両方向 VT 及び多源性 VT) の例と洞調律の例を示す HF マウスに由来する代表的な ECG トレースを示す図である。(C) HF マウス (両群において $n = 5$) における Bay 60 - 7550 による心室頻脈と死 (左) 及び QT 時間 (右) を示す図である。* = ベヒクルに対して $p < 0.05$ 。(D) HF マウス (両群において $n = 5$) における PF 05180999 による心室頻脈 (左) 及び QT 間隔 (右) を示す図である。

10

【0080】

【図 9】Ank B^{+/-} マウスにおいて PDE 2 阻害により心室頻脈が防止されることを示す図である。(A) Ank B^{+/-} マウスにおけるインビボ不整脈のプロトコルを示す図である。(B) Ank B^{+/-} マウス (両群において $n = 8$) における Bay 60 - 7550 による心室頻脈 (左) 及び QT 間隔 (右) を示す図である。* = ベヒクルに対して $p < 0.05$ 。(D) Ank B^{+/-} マウス (両群において $n = 5$) における PF 05180999 による心室頻脈 (左) 及び QT 間隔 (右) を示す図である。* = ベヒクルに対して $p < 0.05$ 。

20

【0081】

【図 10】PDE 2 阻害により cAMP の局所的プールを介して NKA 電流が増加し、細胞性不整脈が抑制されることを示す図である。(A) Bay 60 - 7550 を用いる処理後のマウス (2 マウス、マウス当たり 2 回反復) に由来する心室筋細胞における全体的細胞内 cAMP レベルを示す平均データ (左) と代表的トレース (右) を示す図である。陽性対照としてイソプレナリンを使用した。(B) NKA と PKA 触媒部位及び PKA - RI I との間の共免疫沈降を示す図である。(C) superAKAP / RIAD を用いる処理 (3 匹のラットに由来する 5 ~ 8 ARVM) の後の EHNA による NKA 電流を示す図である。* = RIAD に対して $p < 0.05$ 。(D) superAKAP を用いる前処理後の結紮後 HF マウスに由来する筋細胞 (3 匹のマウスに由来する 10 ~ 14 筋細胞) 及び Ank B^{+/-} マウスに由来する筋細胞 (2 マウスに由来する 10 ~ 13 筋細胞) における Bay 60 - 7550 による Ca^{2+} ウェーブを示す図である。* = superAKAP に対して $p < 0.05$ 。

30

【0082】

【図 11】結紮後 HF マウス及び Ank B^{+/-} マウスにおいて superAKAP を用いる前処理の後ではそれ以上 PDE 2 阻害により心室頻脈が防止されないことを示す図である。(A) 結紮後 HF マウス及び Ank B^{+/-} マウスにおける Bay 60 - 7550 及び superAKAP / スクランブルを使用するインビボ不整脈のプロトコルを示す図である。(B) HF マウス (両群において $n = 6$) における Bay 60 - 7550 及び superAKAP / スクランブルによる心室頻脈 (左) 及び QT 間隔 (右) を示す図である。* = ベヒクルに対して $p < 0.05$ 。(D) Ank B^{+/-} マウス (両群において $n = 5$) における Bay 60 - 7550 及び superAKAP / スクランブルによる心室頻脈 (左) 及び QT 間隔 (右) を示す図である。

40

【0083】

【図 12】提唱されている PDE 2 による局所的な NKA の調節機構を示す図である。(

50

A) PDE2とNK Aが共通の領域で集合し、そこでPDE2が局所的にcAMPレベルとAKAP結合PKA-RII活性を調節すると提唱する。PKA-RIIはホスホレマンをリン酸化し、それによりNK A活性が調節される。(B) AKAPからPKA-RIIを脱離させるsuperAKAPを使用するとPDE2はこれ以上NK Aを調節することができない。

【0084】

【図13】ヒト心臓肥大症及び加齢において、並びにラット結紮後HFにおけるPDE2-mRNAの発現上昇を示す図である。単離され、選別された心筋細胞核に由来するmRNAシーケンシングデータを示す。

【0085】

【図14】結紮後HFマウスにおいてPDE2阻害により心室頻脈が防止されることを示す図である。HFマウスにおける歴史的対照(n=15)、ND-7001(n=5)、及びLuAF64280(n=3)による心室頻脈を示す。* = 対照に対してp < 0.05。

【0086】

【図15】Ca²⁺誘発性心室性不整脈の防止において遮断薬よりもPDE2阻害が優れていることを示す図である。(A) AnkB^{+/-}マウスにおける長期基準研究のプロトコルを示す図である。(B) 4処理群におけるECGレコーディングの代表的トレースを示す図である。(C) 4処理群における心室頻脈性不整脈と心室頻脈の存在を示す平均データを示す図である。対照は11マウス、メトプロロールは15マウス、Bay60-7550は13マウス、Bay60-7550+メトプロロールは15マウスである。(D) 処理対象(左)又はカフェイン(右)の注射による4処理群におけるQT時間を示す図である。* = p < 0.05。# = p < 0.01。

【0087】

【図16】PDE2阻害がRyR活性に対して効果を持たないことを示す図である。(A) フィールド刺激ARVMにおけるCa²⁺スパーク頻度、Ca²⁺トランジェントの振幅、及び筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量に対するPDE2阻害の代表的トレースと平均データを示す図である。3匹のラットに由来する18ARVM。* = 対照に対してp < 0.05。(B) 非刺激ARVMにおけるCa²⁺スパーク頻度及び筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量に対するPDE2阻害の代表的トレースと平均データを示す図である。3匹のラットに由来する19ARVM(Bay60-7550)と22ARVM(対照)。(C) サボニン透過処理後のARVMにおけるCa²⁺スパーク頻度に対するPDE2阻害の代表的トレースと平均データを示す図である。3匹のラットに由来する25ARVM(Bay60-7550)と24ARVM(対照)。

【0088】

【図17】PDE2阻害が他の抗不整脈標的に対して効果を持たないことを示す図である。(A) LTCCに対するPDE2阻害の効果を示す図である。3匹のラット(両群)に由来する8ARVM(対照)と10ARVM(Bay60-7550)。(B) バックグラウンドK⁺電流に対するPDE2阻害の効果を示す図である。3匹のラットに由来する7ARVM(両群)。(C) Na⁺電流に対するPDE2阻害の効果を示す図である。3匹のラットに由来する7ARVM(対照)と8ARVM(Bay60-7550)。(D) 活動電位持続時間に対するPDE2阻害の効果を示す図である。* = 対照に対してp < 0.05。

【0089】

【図18】CPVTマウスにおいてPDE2阻害により心室頻脈が防止されることを示す図である。CPVTマウスにおける対照(n=6)及びBay60-7550(n=7)による心室頻脈を示す。* = 対照に対してp < 0.05。

【実施例】

【0090】

実施例1

10

20

30

40

50

ホスホジエステラーゼ2Aの阻害により Na^+/K^+ -ATPアーゼが活性化され、且つ、心室頻脈が防止されることを実証するために以下の方法を実施した。

【0091】

方法

動物モデル

米国立衛生研究所により出版された実験動物の管理と使用に関する指針（NIH出版番号第85-23号、1996年改訂）に従って動物実験を実施した。プロジェクトはノルウェー国立動物実験委員会よっての承認された（FDU2146、7016及び7040）。12時間：12時間の昼夜サイクルの温度制御室の中で体重約300gの雄ウイスターラット（メルガード、デンマーク）をケージ当たり2匹ずつ飼育し、自由に飲食させた。同様の条件下でマウスを飼育し、ケージ当たり最大で6匹のマウスの飼育を認めた。上行大動脈の標準的緊縛によりC57BL6/Jマウスにおいて大動脈結紮を実施し、14～16週間にわたってこれらのマウスを追跡した。以前に説明されたように（Aronsen, J.M.ら著、Noninvasive stratification of postinfarction rats based on the degree of cardiac dysfunction using magnetic resonance imaging and echocardiography. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology誌、2017年、第312巻（第5号）：H932～H942頁）心エコー検査及び死後検査によりうっ血性心不全の発症を確定した。以前に説明されたように（Mohler, P.J.ら著、Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. Nature誌、2003年、第421巻（第6923号）：634～9頁）アンキリンB^{+/+}マウスを飼育した。以前に説明された方法で（Hougen, K.ら著、Cre-loxP DNA recombination is possible with only minimal unspecific transcriptional changes and without cardiomyopathy in Tg(alpha MHC-MerCreMer) mice. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology誌、2010年、第299巻（第5号）：H1671～H1678頁）PDE2A-floxマウスをalpha-MHC MerCreMerマウスと交配、且つ、使用してPDE2Aの心筋細胞特異的な役割を調べた。

10

20

30

40

50

【0092】

細胞の単離

雄ウイスターラットを4%イソフルラン、65% N_2O 、及び31% O_2 内で麻酔し、挿管し、そして2%イソフルラン、66% N_2O 、及び32% O_2 を通気した。痛みへの反射作用の消失により外科的深麻酔を確認した。切開後の血栓症予防のために150IEのヘパリンを静脈内投与した。心臓を切除し、すぐに4の0.9% NaCl 中で冷却した。大動脈にカニューレを装着し、改変ランゲンドルフ法により冠動脈に37で2～4分間にわたって緩衝液A（25mM Hepes、130mM NaCl 、5.4mM KCl 、0.4mM NaH_2PO_4 、0.5mM MgCl_2 、22mM D-グルコース、pH7.4）を逆行的に灌流し、その後で0.8g/LコラゲナーゼII（ワージントン・バイオケミカル社、米国）及び6.7 μM の CaCl_2 を含有する緩衝液Aを18～22分間にわたって灌流した。心房及び右心室自由壁を除去した後に500 μL の2%BSAを添加した8～10mLの前記灌流液の中にLVを小片に切断して入れ、1分間にわたってパストールピペットを使用して注意深くピペット操作することにより機械的にLVを単離した。心筋細胞懸濁液をナイロンメッシュ（200 μm 、ブルマイスター、ロレンスコグ、ノルウェー）に通して濾過し、室温で放置して沈降させた。沈降（約5分間）の直後に上清を除去した。単細胞実験とcAMP測定のための初代培養物の作製のために（1

) 0.1% BSAと0.1mM CaCl₂、(2) 0.1% BSAと0.2mM CaCl₂、及び(3) 0.05% BSAと0.5mM CaCl₂を含有する緩衝液Aでこれらの心筋細胞を3回洗浄した。近接ライゲーションアッセイ用の初代培養物の作製のためにBSAの濃度を低下させた(0.1%、0.05%、及び0%)緩衝液A中でこれらの心筋細胞を3回洗浄した。

【0093】

近年に説明されたものと同様のプロトコル(Ackers - Johnson, M.ら著、A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart. Circ Res誌、2016年、第119巻(第8号): 909~20頁)に基づいてシャム手術又はAB手術の後にPDE2欠損マウス、アンキリン^{+/+}マウス、及びC57BL6/Jマウスから左心室筋細胞を単離した。マウスを5%イソフルランと95%O₂の混合物の中で麻酔し、そして5%イソフルランと95%O₂の混合物を人工換気により通気した。痛みへの反射作用の消失により外科的深麻酔を確認した。開胸した後に行大動脈と下大静脈を切断した。右心室に5mMのEDTAを含む7mLの緩衝液Aを注入した。その後、大動脈を鉗子で固定し、心臓を切除した。左心室に10mLの前記緩衝液とその後で3mLのEDTAを含まない前記緩衝液を2~5分間にわたって注入した。その後、0.8mg/mLコラゲナーゼIIを含有する予備加熱済みの溶液Aを約20分間にわたって左心室に注入した。心房及び右心室を除去した。残りの手順は上記のランゲンドルフベースの単離法について説明された手順と同様であった。

10

20

【0094】

近接ライゲーションアッセイ

単離された心筋細胞を室温のPBSの中で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)に移し、そして30分間にわたって穏やかに振盪し、その後で再びPBSの中で2回洗浄した。次にこの心筋細胞懸濁液をそれぞれ8µgのラミニン(Invitrogen)で被覆された0.8cm²のウェルに移し、そして37°Cで2時間にわたってインキュベートした。PBSをPBS中の0.1%トリトンX100溶液と交換し、そして37°Cで10分間にわたってインキュベートした。その後、製造業者のプロトコル(Soderberg, O.ら著、Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat Methods誌、2006年、第3巻(第12号): 995~1000頁)に従ってDuolink IIプライエタリシステム(Olinkバイオサイエンス、ウプサラ、スウェーデン)を用いて近接ライゲーションアッセイを実施した。

30

【0095】

Zeiss LSM710共焦点顕微鏡(543nmのHeNeレーザーで励起、MBS488/543ダイクロイックミラーを通過、565~589nmで放射光を収集)で心筋細胞をスキャンした。ホールセル平均濃淡値を測定することによる単一細胞内蛍光強度の分析のためにImageJ 1.44pソフトウェア(<http://imagej.nih.gov/ij>)を使用した。バックグラウンド蛍光シグナルについて結果を補正した。

40

【0096】

ホールセル電圧クランプ実験

Axoclamp 2B又は2A増幅器とpCLAMPソフトウェア(両方ともアクソン・インスツルメンツ、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国)を使用してホールセル連続電圧クランプを単離された心筋細胞に行った。シグナルを10kHzで収集し、分析前にローパスフィルターでフィルタリングした。実験中及び実験間で全ての増幅器設定とプログラム設定を一定にした。これらの細胞を37°Cで灌流し、且つ、溶液の迅速な

50

切り換えができるように灌流システムを調整した。

【0097】

NKA電流

広口タイプのパッチピペット(1.5~2.5M)に内液(Despa, S.及びD.M. Bers著、Na/K pump current and [Na]ⁱ) in rabbit ventricular myocytes: local [Na]ⁱ depletion and Na buffering. Biophys J誌、2003年、第84巻(第6号):4157~66頁より改変して17mM NaCl、13mM KCl、85mMアスパラギン酸カリウム、20mM TEA-Cl、10mM HEPES、5mM Mg-ATP、0.7mM MgCl₂(スタンフォード大学のMaxchelatorを使用すると遊離Mg²⁺は約1.0mM)、3mM BAPTA、1.15mM CaCl₂(150nMの遊離Ca²⁺)、pH=7.2(KOHで調節)を充填した。ホールセルアクセスの達成後にこれらの細胞を少なくとも4分間にわたって-20mVにおいて透析した。残りの実験での保持電位は-20mVであった。ほとんどの細胞で直列抵抗は3~6Mであり、9Mを超える直列抵抗を有する細胞を全て廃棄した。

10

【0098】

溶液A(140mM NaCl、5mM Hepes、5.4mM KCl、1mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂、5.5mM D-グルコース、及び0.4mM NaH₂PO₄)中で前記細胞をパッチした。pHを7.4に調節した。ホールセルアクセスの達成後に溶液B(108mM N-メチル-D-グルカミン、17mM NaCl、10mM D-グルコース、5mM HEPES、15mM KCl、5mM NiCl₂、2mM BaCl₂、1mM MgCl₂、HClでpHを7.4に調節)で細胞を灌流した。実験当日に5μMのcAMPとペプチド(1μM若しくは20μMのsuperAKAP又は1μMのRIAD)を前記内液に添加した。細胞外KClの急速除去(等量のTrisClで置換)によりNKA電流を誘起した。NKA電流に対する細胞内Na⁺濃度勾配の影響を減少させるために対称的なNa⁺濃度の溶液(すなわち、前記灌流液と前記内液の両方でNa⁺濃度が同じ)を使用した。実験当日に100nMのBay60-7550、100nMのPF05180999、又は10μMのEHNAを前記灌流液に添加してNKA電流に対するPDE2阻害の効果を測定した。ペアードレコーディングとアンペアードレコーディングの両方を実施したが、1つのデータセット内では一致するようにした。ペアードレコーディングでは対照条件時及びPDE2阻害剤を使用したときのNKA電流を同じ細胞で測定するが、レコーディング間で少なくとも5分間を空けた。望ましくない時間依存性効果を最小限に抑えるためにPDE2阻害剤を使用するレコーディングと使用しないレコーディングの間で1つの細胞での最初のNKA電流のレコーディングを交互に行った。細胞の静電容量にNKA電流を関連付けて細胞サイズの違いを考慮した。

20

30

【0099】

L型Ca²⁺電流(LTCC)

広口タイプのパッチピペット(1.4~1.8M)に内液(Leroy, J.ら著、Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest誌、2011年、第121巻(第7号):2651~61頁より改変して122mM CsCl、10mM HEPES、10mM Mg-ATP、0.7mM MgCl₂(約0.6mMの遊離Mg²⁺)、5mM Na₂ホスホジクレアチニン、10mM EGTA、0.2mM CaCl₂(3nMの遊離Ca²⁺)、CsOHでpH7.2に調節)を充填した。全てのレコーディングで直列抵抗は4~8Mの間であった。保持電位は-45mVであり、0.125Hzにおいて-45~0mVまでの100ms二乗電圧ステ

40

50

ップにより Ca^{2+} トランジェントを誘発した。前記細胞を溶液 A 中でパッチしたが、ホールセルアクセスの達成後に溶液 C (Leroy, J. 著、Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest 誌、2011年、第121巻(第7号): 2651~61頁より変更して 118mM NaCl、20mM CsCl、5mM D-グルコース、1.8mM MgCl_2 、10mM HEPES、0.8mM NaH_2PO_4 、1.8mM CaCl_2 、NaOHで pH 7.4 に調節) を適用した。レコーディングを開始する前に少なくとも4分間にわたって前記内液を平衡化させた。LTC C が完全に安定になった後でレコーディングを開始した。対照レコーディングと Bay 60-7550 を使用するレコーディングを同じ細胞に行った。

10

【0100】

Na⁺電流

低抵抗性ピペット(1.4~2.5M)に内液(Leroy, J. 著、Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca^{2+} channel complex regulates Ca^{2+} current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J Clin Invest 誌、2011年、第121巻(第7号): 2651~61頁より変更して 122mM CsCl、10mM HEPES、5mM Mg-ATP、0.7mM MgCl_2 (約0.6mMの遊離 Mg^{2+})、5mM Na_2 ホスホジクレアチニン、10mM EGTA、0.2mM CaCl_2 (3nMの遊離 Ca^{2+})、CsOHで pH 7.2 に調節) を充填した。全てのレコーディングで直列抵抗は4~7.5Mの間であった。前記細胞を溶液 A 中でパッチしたが、ホールセルアクセスの達成後に溶液 D (125mM N-メチル-D-グルカミン、10mM NaCl、5mM CsCl、5mM D-グルコース、1.2mM MgCl_2 、10mM HEPES、5mM NiCl_2 、CsOHで pH 7.4 に調節) を適用した。実験当日に 20 μM のニフェジピンを添加して L 型 Ca^{2+} チャネルを阻害した。保持電位は -80mV であった。1Hz において保持電位 -80mV ~ -10mV までの 50ms 二乗電圧ステップを適用することにより非連続モード(9kHzのスイッチングレート)で Na⁺電流を測定した。対称的な Na⁺溶液と低い直列抵抗によって良好な電圧対照を維持した。これらの実験の前に -70mV ~ +50mV までの範囲で一段毎に -10mV ずつ上昇させる多段階プロトコル(全てが -80mV の保持電位より)を行って最大のピーク電流を生み出すテスト電位を決定したところ、対照と Bay 60-7550 の間で差が存在しなかった。レコーディングを開始する前に少なくとも4分間にわたって前記内液を平衡化させた。Na⁺電流が完全に安定になった後でレコーディングを開始した。対照レコーディングと Bay 60-7550 を使用するレコーディングの大部分を別々の細胞に行った。しかしながら、一部の細胞集団では対照と Bay 60-7550 の両方を同じ細胞でレコーディングした。

20

30

【0101】

フィールド刺激実験

ホールセル Ca^{2+} トランジェント

10~15分間にわたって 5 μM の Fluor 4-AM (Molecular Probes、ユージーン、米国) を負荷し、続いて5分間にわたって脱エステル化を行ったフィールド刺激筋細胞において Ca^{2+} トランジェントを記録した。同じ細胞(ラット心室筋細胞)又は PDE 2 KO 若しくは WT の心室筋細胞に 100nM の Bay 60-7550 を使用して、又は使用せずに実験を行った。ペプチドを使用する実験では 1 μM のどちらかの TAT 結合ペプチド(superAKAP 又は対応するスクランブルペプチド)と筋細胞を20分間にわたってインキュベートした。その後、レコーディング時には同じペプチドを含有する溶液 A で筋細胞を灌流した。

40

50

【0102】

Cairn Research オプトスキャンモノクロメータ (485 nm 励起、515 nm 放射のロングパス) (Cairn Research 社、フェイヴァシャム、英国) を使用して細胞蛍光を得た。各実験の後に無細胞時の蛍光を得て、前記トレースから減算してバックグラウンド蛍光について補正を行った。レコーディングを開始する前に少なくとも3分間にわたって、又は Ca^{2+} トランジェントが安定化するまで 0.5 Hz で細胞を刺激した。 Ca^{2+} トランジェント (ベースライン Ca^{2+} レベルとピーク Ca^{2+} レベルの両方) が安定しない細胞を廃棄した。その後、フィールド刺激を停止し、10 mM のカフェインによる短時間のパルス刺激を加えた。筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 含量をカフェインで誘起された Ca^{2+} 上昇のピークとして記録した。NCX 活性を抑制するために 10 mM の Ni^{2+} を前記灌流液に添加した後に同じ実験を行った。通常の特ランジェント ()、カフェインによる特ランジェント (Ca_{caff})、及びカフェインと Ni^{2+} による特ランジェント (Ni) から Ca^{2+} 放出相を単一指数関数にあてはめることにより τ 値を得た。フィールド刺激 Ca^{2+} トランジェントとカフェイン誘起 Ca^{2+} 上昇との間の速度定数の差として SERCA 2 速度定数を計算し (Trafford, A.W., M.E. Diaz、及び D.A. Eisner 著、Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca content and sarcolemmal fluxes during the transient stimulation of the systolic Ca transient produced by caffeine. Ann N Y Acad Sci 誌、1998 年、第 853 巻: 368 ~ 71 頁)、一方で Ni にどのような差も存在しない場合の NCX を介した Ca^{2+} 放出として Ca_{caff} を解釈した。

10

20

【0103】

細胞性不整脈の検出プロトコル

結紮後 HF マウス、Ank B^{+/-} マウス、及び WT (Ank B^{+/+}) に由来する単離心室筋細胞を 0.5 Hz では 3 分間、1 Hz では 1 分間にわたって事前調整した後、各刺激頻度の後に 15 秒間にわたって刺激を停止した。以前に説明されたように (Aronsen, J.M. 著、Hypokalaemia induces Ca(2+) overload and Ca(2+) waves in ventricular myocytes by reducing Na(+), K(+)-ATPase alpha 2 activity. J Physiol 誌、2015 年、第 593 巻 (第 6 号): 1509 ~ 21 頁) 休止中に Ca^{2+} ウェーブ及び / 又は自発性収縮を検出した。試験対象基準は電気刺激の 10 秒前の目視検査にて棒状で条線がある心筋細胞であること、及び Ca^{2+} ウェーブが存在しないことであった。100 nM の Bay 60-7550 を使用して、及び使用せずに細胞性不整脈を記録した。一部の実験では 1 μ M の TAT 結合スクランブルペプチド又は super AKAP と 100 nM の Bay 60-7550 を使用して細胞性不整脈を検出した。ペプチドを使用する実験ではこのプロトコルの開始前に 20 分間にわたって細胞をこれらのペプチドと共にインキュベートした。

30

【0104】

ホールセル Na^{+} 測定

細胞質 Na^{+} 濃度を測定するため、室温で 120 分間にわたって 0.05% プルロニック F-127 の存在する 10 μ M の SBF I の中に単離されたラット心室筋細胞を入れておき、その後で 20 分間にわたって脱エステル化を行った。溶液 A を灌流し、且つ、0.5 Hz でフィールド刺激を与えている筋細胞において光電子増倍管 (フォトン・テクノロジー・インターナショナル、ニュージャージー州、米国) を使用して SBF I 比を検出した。以前に説明されたように (Baartscbeer, A., C.A. Schumacher、及び J.W. Fiolet 著、Small changes of cytosolic sodium in rat ventricular myocytes measured with SBF I in emission ratio mode. J Mol Cell Cardiol 誌、1997 年、第 29 巻 (第 12

40

50

号) : 3375 ~ 83頁) 単独励起 (340 nm) と二元レシオメトリック放射 (410 nm / 590 nm) を使用した。シグナルを1 Hzで収集し、安定化させた後で記録を開始した (通常10分間)。細胞質 Na^+ に対するPDE2阻害の効果を試験するために100 nMのBay 60-7550を適用した。

【0105】

0 mMと20 mMの Na^+ を含む溶液で各細胞を灌流することによりその細胞を調整した。以前に説明されたように (Despa, S.ら著、Intracellular $[\text{Na}^+]$ and Na^+ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. J Physiol誌、2002年、第539巻 (第1号) : 133 ~ 43頁) この範囲ではSBFIシグナルは細胞内 Na^+ レベルと比例すると考えられた。2種類の異なる校正溶液を作製し、それらの溶液を混合して所望の Na^+ 濃度を達成した。両方の校正溶液が0.01 mM グラミシジン、0.1 mM ウアイン、5 mM Hepes、5.5 mM グルコース、2 mM EGTAを含み、トリス塩基でpH 7.2に調節された。145 mMの Na^+ を含む校正溶液は115 mMのグルコン酸Na、30 mMのNaCl、0 mMのKClも含んだ。145 mMの K^+ を含む校正溶液は115 mMのグルコン酸K、30 mMのKCl、0 mMのNaClも含んだ。

10

【0106】

共焦点 Ca^{2+} 測定

以前に記載されているように (Louch, W.E.ら著、T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca^{2+} release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. J Physiol誌、2006年、第574巻 (第2号) : 519 ~ 33頁) 共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM Live 7) を使用してラインスキャンモードで Ca^{2+} スパークを記録した。簡単に説明すると、細胞の長軸方向に沿って512ピクセルの線を描画した。スキャン時間は1.5ミリ秒であった。ラット心室筋細胞を1 Hzで3分間にわたってフィールド刺激した後、 Ca^{2+} スパークを刺激停止直後に記録した。数秒後、10 mMのカフェインを適用して筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 負荷量を測定した。スパーク頻度に対する負荷量依存性効果を防止するため、筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 負荷量に Ca^{2+} スパーク頻度を関連付けた。同じ細胞でBay 60-7550を使用して、及び使用せずに Ca^{2+} スパークを測定した。ImageJ (NIH) 内のSparkMaster (Picht, E.ら著、SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. Am J Physiol Cell Physiol誌、2007年、第293巻 (第3号) : C1073 ~ 81頁) を使用して Ca^{2+} スパークを検出、及び分析した。

20

30

【0107】

不整脈のインビボレコーディング

結紮後HFマウス、Ank B^{+/-}マウス、及びWT (Ank B^{+/+}) マウスを4%イソフルラン、65% N₂O、及び31% O₂内で麻酔し、そして2%イソフルラン、66% N₂O、及び32% O₂を通気した。痛みへの反射作用の消失により外科的深麻酔を確認した。無作為に1匹おきにマウスを治療群のうちの1つに分け、次のマウスを他の群に割りあてた。1つの比較の中 (例えば、ベヒクル対Bay 60-7550) で同腹仔対照を使用することを確実にするように努力した。体温を安定に維持するために40 に予熱した手術台上でマウスの四肢に付属のECG電極を取り付けて1リードECGレコーディングを行った。このプロトコル全体の中でVEVO 2100ソフトウェア (Visualsonics、トロント、カナダ) によりECGを連続的に記録した。シグナルをフィルタリングしなかった。このプロトコルの開始前に3 ~ 5分間にわたってベースラインECGを記録し、この期間で稀にマウスに心室性期外収縮があった場合にこれらのマウスを除外し、薬品の注射の前にこのプロトコルを停止した。これらのマウスにBay 60-7550又

40

50

はベヒクル (3 mg / kg) 又は P F 0 5 1 8 0 9 9 9 (1 mg / kg) のいずれかを最初に腹腔内 (i . p .) 投与し、10 分間にわたって作用させた (V e t t e l , C . 著、P h o s p h o d i e s t e r a s e 2 P r o t e c t s A g a i n s t C a t e c h o l a m i n e - I n d u c e d A r r h y t h m i a a n d P r e s e r v e s C o n t r a c t i l e F u n c t i o n A f t e r M y o c a r d i a l I n f a r c t i o n . C i r c R e s 誌、2017年、第120巻 (第1号) : 120 ~ 132頁) 後に1回目のカフェインの (120 mg / kg で腹腔内) 注射を行った。ペプチドを使用する実験では5 mM (割合が全体重の0.7と推定される体の液相中にペプチドが自由に分布すると仮定することにより算出された) の T A T 結合 s u p e r A K A P 又はスクランブルペプチドを5分間にわたってカフェイン注射の前に腹腔内 (i . p .) 注射した。A n k B ^{+/+} マウスを使用する実験では1回目の注射の10分後に2回目のカフェイン (120 mg / kg で腹腔内) の腹腔内 (i . p .) 注射を行った。このプロトコルの終了後に心臓を切除してこれらの動物を殺処理し、肺と心臓の重量を量り、左心室をエッペンドルフチューブに移し、ただちに液体窒素に移し、そして - 80 で保存した。このプロトコル全体の中で E C G を記録した。V E V O ソフトウェアを使用して E C G を分析した。

【0108】

イムノプロット用的心筋細胞溶解物の調製

10 mM の B D M を含む非滅菌溶液 A を 37 °C まで予熱し、そして溶液 A / B D M 中の4% ラミニンで1時間にわたってプラスチックウェルを被覆した。先に説明したようにラット心室筋細胞を単離し、溶液 A / B D M 中に再懸濁し、前記ラミニン被覆ウェルに播種し、そして37 °C で1時間にわたってインキュベートした。その後、これらの細胞を溶液 A / B D M 中で穏やかに洗浄し、再び37 °C で1時間にわたってインキュベートした。その後、表示どおりにペプチド、イソプレナリン、又は阻害剤を添加し、10分間にわたって平衡化させた。最後に細胞を高温の (90 ~ 100 °C) 溶解緩衝液 (1% S D S 、2 mM N a ₃ V O ₄、10 mM T r i s - H C l 、10 mM N a F、d H ₂ O、p H 7、4) の中に回収し、液体窒素に移し、そして - 80 °C で保存した。

【0109】

免疫沈降

H E K 2 9 3 形質移入細胞の溶解物を抗体と2時間にわたってインキュベートし、その後で50 μ L のプロテイン A / G P L U S アガロースビーズ (s c - 2003、サンタクルーズバイオテクノロジー) を4 °C で一晩にわたって添加した。免疫複合体を冷 I P 緩衝液 (20 mM H E P E S 、p H 7 . 5、150 mM N a C l 、1 mM E D T A 、1% トリトン X - 100) 中で3回洗浄し、4 °C で1分間にわたって3000 g で遠心分離にかけ、S D S 負荷緩衝液中で煮沸し、そしてイムノプロットングにより分析した。F L A G - P D E 2 を形質移入していない H E K 2 9 3 細胞を対照に使用した。

【0110】

イムノプロットング

4 ~ 15% 又は15% の S D S - P A G E 後の P V D F 膜へのプロットングで免疫沈降物を分析した。それらの P V D F 膜とペプチド膜を T B S T 中の1% カゼイン又は5% ミルク中で60分間にわたって室温でブロックし、一次抗体と4 °C で一晩にわたってインキュベートし、T B S - T 中で10分間にわたって3回洗浄し、そして H R P 結合一次抗体又は二次抗体とインキュベートした。プロットを E C L P r i m e (G E ヘルスケア、R P N 2232) 中でインキュベートし、そして L A S - 4000 (富士フイルム、東京、日本) によって化学発光シグナルを検出した。

【0111】

抗体

S e r 6 8 - P L M はウィリアム・フラーから贈られた。H E K 2 9 3 細胞からの免疫沈降物では F L A G - P D E 2 と G F P - N K A をプロットするために抗 F L A G 抗体と抗 G F P 抗体を使用した。P D E 2 抗体と N K A ₁ 抗体を近接ライゲーションアッセイ

10

20

30

40

50

実験に使用した。

【0112】

cAMP測定

GloSensor (Promega、米国)を含有するアデノウイルス・タイプ5を成体マウス心室筋細胞に形質移入し、cAMP測定の前に48時間にわたって培養した。このセンサーはcAMPに結合し、cAMPにするとcAMPレベルに比例する光シグナルを発する。

【0113】

核の単離と選別 / mRNAシーケンシング

以前に説明されたように (Thienpont, B.ら著、The H3K9 dimethyltransferases EHMT1/2 protect against pathological cardiac hypertrophy. J Clin Invest誌、2017年、第127巻(第1号):335~348頁)核の単離/選別とmRNAシーケンシングを実施した。

10

【0114】

統計学

データを平均値 ± S.E.として提示する。電圧クランプ実験とフィールド刺激実験についてはシュートメントの両側t検定を使用し、一方で細胞性不整脈とインビボ不整脈についての全ての実験ではフィッシャーの正確確率検定を使用した。p < 0.05を有意とした。

20

【0115】

結果

PDE2はNK A活性を調節する

細胞内Na⁺濃度勾配の望ましくない効果を低減させるため、単離されたラット心室筋細胞を対称的な濃度のNa⁺(すなわち、前記灌流液と前記内液でNa⁺濃度が同じ)に曝露する電圧クランププロトコルを実施した。飽和濃度の細胞外K⁺の除去(15mMから0mMの[K⁺]_oまで)の後にNK A電流がK⁺感応性電流として測定された(図1A参照)。NK A電流は濃度応答依存的に増加し(図1B)、一方でAKAPからPKA-R IとPKA-R IIの両方を脱離させる高用量のsuperAKAP(Goldら著、Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits, Mol. Cell誌、2006年11月3日、第24巻(第3号):383~95頁)によりNK A電流が減少した(図1C)。このことは局所的なcAMPの調節によってNK A活性が調節されること、及びcAMP分解性ホスホジエステラーゼであるPDE2~4を阻害することによるcAMPの増加がNK A電流を増加させる可能性があることを示唆しており、次にこのことを試験することにした。

30

【0116】

3種類の異なる薬理的阻害剤(EHNA、PF05180999、及びBay60-7550)を使用するPDE2阻害によりNK A電流がしっかりと増加し(図2A)、一方でシロスタミドを使用するPDE3阻害もロリプラムを使用するPDE4阻害も検出可能などのような効果も有さなかった(図2C)。PDE2欠損マウスモデルにおけるNK A電流の増加も見られ(図2B)、PDE2がNK A活性を調節するという発見をさらに強めることになった。

40

【0117】

前記機能レコーディングと合致して、PDE2の阻害後にホスホレマン(PLM)のリン酸化がそのPKAリン酸化の主要部位であるセリン68において増加することも発見した。PDE4阻害によりPLMのセリン68リン酸化が増加する一方でPDE3阻害は何の効果もないことも発見した(図2D)。

【0118】

PDE2とNK Aは共局在し、相互作用する

50

PDE2はNK A活性を調節する主要cAMP-PDEであると考えられる。PDE2が局所的な調節作用を介してNK Aを調節している場合、この相互作用は治療目的のために特異的に標的とされる可能性がある。30~40nmの解像度でタンパク質間の細胞内共局在を検出するために使用される近接ライゲーションアッセイ(Duolink(登録商標))(Soderberg, O.ら著、Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat Methods誌、2006年、第3巻(第12号):995~1000頁)を実施してPDE2とNK Aが同じ細胞内区画に存在するか調べた。図3A(右の画像)の光点は完全なラット心室筋細胞中でのPDE2とNK Aとの共局在を示唆しており、一方で他方の画像は陰性対照である。図3Bはそれらの光点の定量を示しており、右側の3本のバーはNK A抗体とPDE2抗体の両方が存在したときにはるかに高いレベルの光点が存在したことを示している。次にFLAGタグ付きPDE2とGFPタグ付きNK A又はGFP-NK AだけをHEK293細胞内で共発現させ、FLAGを免疫沈降した。FLAG-PDE2と共発現させるとGFPタグ付きNK Aのレベルが高くなり、PDE2とNK Aが共免疫沈降することが示された(図3C)。これらの結果はPDE2とNK Aが細胞内で共局在することを示しており、提唱されたPDE2によるNK A活性の局所的調節の構造的な基礎を提供する。

10

【0119】

PDE2阻害によりCa²⁺トランジェントの振幅と筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量が減少する

20

PDE2がNK A活性を調節し、且つ、NK Aと共局在することを示したので次にPDE2が心室筋細胞におけるCa²⁺ホメオスタシスに影響を与えるか調査することにした。最初にFluo4-AMが負荷され、フィールド刺激を受けたラット心室筋細胞におけるCa²⁺トランジェントを測定し、Bay60-7550の適用後にCa²⁺放出速度が変化することなくCa²⁺トランジェントの振幅が減少することが観察された(図4A~B)。カフェインの短時間のパルス刺激を用いて筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量を測定し(図4C)、観察されたCa²⁺トランジェントの振幅の減少と一致してPDE2阻害後に筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量が減少すること(図4A、右側のパネル)を発見した。PDE2KOマウスから単離された心室筋細胞でも同じ実験を行い、Ca²⁺放出速度には何の効果も無く、Ca²⁺トランジェントの振幅と筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量を減少させる同様の結果が得られた(図4D)。

30

【0120】

PDE2阻害はNCX介在性Ca²⁺放出を増加させる

PDE2阻害後のCa²⁺トランジェントの振幅と筋小胞体(SR)Ca²⁺負荷量の減少は心室筋細胞中の主要なCa²⁺処理タンパク質、すなわちL型Ca²⁺チャネル、RyR、NCX、SERCA、又は非SERCA/非NCX性Ca²⁺放出タンパク質(PMCA及びミトコンドリアユニポーター)の活性変化によって説明可能であった。PDE2阻害後のCa²⁺ホメオスタシスにおける様々なCa²⁺処理タンパク質の役割を解明するために一連の実験を行い、その中でBay60-7550の適用後のそれらのタンパク質の活性を測定した。PDE2阻害後のラット心室筋細胞でSERCA機能又は非SERCA/非NCX活性にたいするどのような効果も見られなかったが、一方でNCXを介したCa²⁺放出が著しく増加した(図5A~B)。PDE2KOマウスにおいて実施した実験でも同じパターンが見られ、NCXを介したCa²⁺放出が増加し、SERCAと非SERCA/非NCX性Ca²⁺処理タンパク質の活性は変化しなかった(図5C)。NK A活性の変化はNa⁺の局所的な変化又は全体的な変化を介してNCX活性に影響する可能性があったが(Despa, S., J.B. Lingrel, 及びD.M. Bers著、Na(+)/K(+)-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca²⁺ transients and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in ca

40

50

rdiac myocytes. Cardiovasc Res誌、2012年、第9巻(第4号):480~6頁)、SBFIを使用しても全体的な細胞内 Na^+ にどのような差異も検出することができず(図5D)、局所的 Na^+ 濃度勾配が関与することが示唆された。

【0121】

電圧固定したラット心室筋細胞ではL型 Ca^{2+} 電流(図6A~B)又は Na^+ 電流(図6E)に対するPDE2阻害のどのような効果も見られなかった。また、共焦点顕微鏡観察でラインスキャンモードを用いてFluo4-AM負荷ラット心室筋細胞における Ca^{2+} スパークを測定し、これにより、対照とPDE2阻害との間で Ca^{2+} スパーク頻度に差が存在しないことが明らかになり、RyR活性が変わらないことが示唆された(図6C~D)。

10

【0122】

このようにPDE2阻害はNKA電流の増加、NCXを介した Ca^{2+} 放出の増加、及び Ca^{2+} トランジェントの振幅と筋小胞体(SR) Ca^{2+} 負荷量の減少を引き起こし、これらの結果は以下の推論に合う。すなわち、(1)NKA活性の上昇により局所的細胞内 Na^+ の減少が引き起こされる。(2)その減少した細胞内 Na^+ によりNCXを介した Ca^{2+} 流出の原動力が増強され、すなわち、NCXを介してより多くの Ca^{2+} が筋細胞から放出される。最後に、(3)NCXを介したより多くの筋細胞膜 Ca^{2+} の放出とはSERCAを介した細胞内 Ca^{2+} 循環に利用可能な Ca^{2+} が少なくなることを意味し、細胞から Ca^{2+} が除去され、それにより Ca^{2+} トランジェントと筋小胞体(SR) Ca^{2+} 負荷量が減少することが最終的な効果である。

20

【0123】

PDE2阻害は細胞性頻脈を防止する

Ca^{2+} 過剰負荷は十分に確立された不整脈の原因であり(Pogwizd, S.M.及びD.M. Bers著、Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. Trends Cardiovasc Med誌、2004年、第14巻(第2号):61~6頁、並びにKranias, E.G.及びD.M. Bers著、Calcium and cardiomyopathies. Subcell Biochem誌、2007年、第45巻:523~37頁)、 Ca^{2+} ウェーブ(Aronsen, J.M.ら著、Hypokalaemia induces Ca^{2+} overload and Ca^{2+} waves in ventricular myocytes by reducing Na^+ , K^+ -ATPase α_2 activity. J Physiol誌、2015年、第593巻(第6号):1509~21頁)と有害な副次効果(Pezhouman, A.ら著、Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation. Circulation誌、2015年、第132巻(第16号):1528~1537頁)を引き起こし、逆に細胞内 Ca^{2+} を減少させる薬剤、例えば Ca^{2+} チャンネル遮断薬は不整脈を防止する可能性がある。心不全は大きな心室性不整脈のリスクを有する疾患(Pogwizd, S.M.及びD.M. Bers著、Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. Trends Cardiovasc Med誌、2004年、第14巻(第2号):61~6頁)であり、一方でアンキリンB症候群は4型QT延長症候群の原因となる遺伝疾患(Mohler, P.J.ら著、Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. Nature誌、2003年、第421巻(第6923号):634~9頁)である。PDE2阻害により Ca^{2+} トランジェントの振幅が減少するため、PDE2阻害により心室筋細胞における Ca^{2+} ウェーブが心不全マウス及びアンキリンB^{+/+}マウス(QT延長症候群)で防止されるといふ仮説を立てた。まず、結紮後心不全マウスに由来する心室筋細胞においてP

30

40

50

D E 2 阻害により N K A 電流が増加し、且つ、 $C a^{2+}$ トランジェントが減少することを確認した (図 7 A ~ B)。心不全マウスとアンキリン $B^{+/}$ マウス (Q T 延長症候群) の両方に由来する筋細胞でかなりの量の $C a^{2+}$ ウェーブが検出されたが、P D E 2 阻害により $C a^{2+}$ ウェーブは大いに減少又は消失した (図 7 C ~ D)。W T マウス (アンキリン $B^{+/}$ マウスの同腹仔) では $C a^{2+}$ ウェーブの頻度に差が存在せず、これは対照条件時の低頻度の $C a^{2+}$ ウェーブを考慮して予期されたとおりである (図 7 D、右側のパネル)。

【 0 1 2 4 】

結論として、公知の心不整脈モデルでは P D E 2 阻害により細胞性頻脈が防止される。

【 0 1 2 5 】

P D E 2 阻害は心不全マウス及びアンキリン $B^{+/}$ 症候群 (Q T 延長症候群) マウスにおいて心室頻脈を防止する

P D E 2 阻害によりインピボで心室頻脈が防止されるか試験するため、麻酔された結紮後 H F マウスと A n k B $^{+/}$ マウスに 1 2 0 m g / k g の用量でカフェインを急速注入するプロトコル (K a n n a n k e r i l , P . J . 著、M i c e w i t h t h e R 1 7 6 Q c a r d i a c r y a n o d i n e r e c e p t o r m u t a t i o n e x h i b i t c a t e c h o l a m i n e - i n d u c e d v e n t r i c u l a r t a c h y c a r d i a a n d c a r d i o m y o p a t h y . P r o c N a t l A c a d S c i U S A 誌、2 0 0 6 年、第 1 0 3 巻 (第 3 2 号) : 1 2 1 7 9 ~ 8 4 頁) を実施し、1 リード E C G で心臓リズムをモニタリングした (図 8 A 及び図 9 A にプロトコルが概説される)。このプロトコルを W T 動物でも試し、その場合は 1 回のカフェイン注射は不整脈を誘発するのに充分ではなく (データを示さず)、一方で結紮後 H F マウスと A n k B $^{+/}$ マウスの両方は心室性不整脈を示した。正常な洞調律の例と心室頻脈の例が図 8 B に示されており、観察された典型的な心室頻は両方向心室頻拍と多源性心室頻拍であった。B a y 6 0 - 7 5 5 0 を使用する実験ではベヒクル注射 (対照) を受けた 5 匹のうち 4 匹 (8 0 %) の心不全マウスで心室頻脈と心停止が発生し、一方でこの結果は 3 m g / k g の用量で B a y 6 0 - 7 5 5 0 の注射 (V e t t e l , C . 著、P h o s p h o d i e s t e r a s e 2 P r o t e c t s A g a i n s t C a t e c h o l a m i n e - I n d u c e d A r r h y t h m i a a n d P r e s e r v e s C o n t r a c t i l e F u n c t i o n A f t e r M y o c a r d i a l I n f a r c t i o n . C i r c R e s 誌、2 0 1 7 年、第 1 2 0 巻 (第 1 号) : 1 2 0 ~ 1 3 2 頁) を受けた 5 匹のうち 0 匹 (0 %) の心不全マウスで見られた (図 8 C)。B a y 6 0 - 7 5 5 0 群の 1 匹のマウスで心室性不整脈が発生したが、注目すべきことにこれは心停止にまで至らなかった。P F 0 5 1 8 0 9 9 9 を使用する実験ではベヒクル注射 (対照) を受けた 5 匹のうち 4 匹 (8 0 %) の心不全マウスで心室頻脈が発生し、一方でこの結果は 1 m g / k g の用量で P F 0 5 1 8 0 9 9 9 の注射を受けた 5 匹のうち 1 匹 (2 0 %) の心不全マウスで見られた (図 8 D)。

【 0 1 2 6 】

アンキリン $B^{+/}$ マウス (Q T 延長症候群) に対して B a y 6 0 - 7 5 5 0 を使用する実験では対照群 (ベヒクル注射) の 8 匹のうち 5 匹 (6 3 %) で心室頻脈が発生した (図 8 D)。さらに、2 匹のマウスで上室性頻脈が発生した (データを示さず)。一方、介入群 (B a y 6 0 - 7 5 5 0 注射) の 8 匹のうち 0 匹 (0 %) で心室頻脈 (図 9 C) 又は上室性頻脈 (データを示さず) が発生した。P F 0 5 1 8 0 9 9 9 を使用する実験では対照群 (ベヒクル注射) の 5 匹のうち 5 匹 (1 0 0 %) で心室頻脈が発生し、一方で 1 m g / k g の用量の P F 0 5 1 8 0 9 9 9 により 5 匹のうち 1 匹 (2 0 %) で心室頻脈が発生した (図 9 D)。

【 0 1 2 7 】

Q T 延長症は心室頻脈の公知のリスク因子である (O s a d c h i i , O . E . 著、I m p a c t o f h y p o k a l e m i a o n e l e c t r o m e c h a n i c a l w i n d o w , e x c i t a t i o n w a v e l e n g t h a n d r e p o l a r i z a t i o n g r a d i e n t s i n g u i n e a - p i g a n d

10

20

30

40

50

rabbit hearts. PLoS One誌、2014年、第9巻(第8号): e105599頁)。カフェイン後注射に対するベースラインECGからQT間隔の延長が結紮後HFマウスとAnk B^{+/-}マウスの両方のベヒクル群で観察され、一方でBay 60-7550群及びPF05180999群ではQT間隔に差が存在しなかった(図8C~D及び図9C~D、右側のパネル)。

【0128】

まとめると、確立された心不整脈のマウスモデルでPDE2阻害により有害な心室頻脈とQT延長症が防止されることが見られている。このことはPDE2阻害が様々な臨床背景、例えば心不全患者における心臓頻脈治療の新しい標的であることを示している。

【0129】

NKAのPDE2調節は局所的PKA-RII活性に依存する

PDE2とNKAは完全な心室筋細胞内で共局在するため、興味深い可能性としてNKAのPDE2調節が局所的cAMP濃度勾配及び局所的PKA活性に依存することが挙げられる。この考えに合致してBay 60-7550を用いる処理後にcAMPレベルのどのような全体的な増減も検出されなかった。イソプレナリンが陽性対照使用され、20nMのイソプレナリンを適用することでcAMPレベルが大いに上昇した(図10A)。低用量のRIAD及びsuperAKAP(1μM)が非常に特異的なAKAP結合PKA-RIIの解離因子(RIAD)とAKAP結合PKA-RIIの解離因子(superAKAP)であることが確定されており、一方でより高濃度のsuperAKAP(20μM)によってPKA-RIIとPKA-RIIの両方が脱離する(Goldら著、Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits, Mol. Cell誌、2006年11月3日、第24巻(第3号): 383~95頁)。電圧固定した筋細胞へのsuperAKAP(高用量と低用量の両方)の透析後にNKA電流はPDE2阻害によって変化しなかった。しかしながら、それでもPDE2阻害によってRIAD(PKA-RII解離因子)の存在下でNKA電流が増加し、NKAのPDE2調節が専らAKAPに結合した局所的なPKA-RIIではなくPKA-RIIの活性に依存することが示唆された(図10C)。NKA₂とPKA上の触媒部位及びPKA-RIIの両方との間の正の共免疫沈澱(IP)も見られた(図10B)。これはNKA、PDE2、及びAKAP結合PKA-RIIから構成される局所的調節複合地という考えを裏付けるものである(提唱モデルについては図12参照)。

【0130】

PDE2阻害の抗不整脈作用はAKAP結合PKA-RIIに依存する

我々はPDE2阻害が局所的cAMPプールの調節を介してNKAを活性化し、且つ、心室性不整脈を防止することを提唱しており、そこでPDE2阻害により防止される細胞性不整脈とインビボ不整脈の両方がsuperAKAPの適用後に再発するだろうという仮説を立てた。図10Cに示されているように、TAT-superAKAPと共に細胞をインキュベートし、且つ、灌流したとき、Bay 60-7550が存在するとCa²⁺ウェーブの頻度が増加する。結紮後HFとAnk B^{+/-}の両方において、且つ、調査した両方の刺激頻度においてCa²⁺ウェーブ量の増加が見られた(図10D)。

【0131】

インビボでPDE2阻害の抗不整脈作用を元に戻すsuperAKAPの能力も図11Aに概説されるように調査した。結紮後HFマウス(6匹のうちの4匹)とAnk B^{+/-}マウス(5匹のうちの3匹)の両方でTAT-superAKAPが注射されると心室性不整脈がBay 60-7550処理時に再発した。しかしながら、結紮後HFマウス(6匹のうちの0匹)とAnk B^{+/-}マウス(5匹のうちの0匹)ではTAT-superAKAPが注射されるとBay 60-7550処理時に不整脈が観察されなかった。PDE2阻害によりNKAを活性化する局所的シグナル伝達ドメインの調節を介して細胞性頻脈とインビボ頻脈が防止されることがこれらの結果から確認される。

10

20

30

40

50

【0132】

PDE2はヒト心臓肥大症及び加齢時に心筋細胞において上方制御される

PDE2阻害を将来の抗不整脈治療選択肢とするため、PDE2がヒト心臓組織に存在し、且つ、疾患時に存在することを確定する必要がある。ヒト心不全時にPDE2が上方制御されることが以前に報告されているが(Mehel, H.ら著、Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. J Am Coll Cardiol誌、2013年、第62巻(第17号):1596~606頁)、これらの分析は他の細胞種も含む左心室組織に対して行われた(Thienpont, B.ら著、The H3K9 dimethyltransferases EHMT1/2 protect against pathological cardiac hypertrophy. J Clin Invest誌、2017年、第127巻(第1号):335~348頁)。単離、且つ、選別された心筋細胞核に対してmRNAシーケンシングを実施し、PDE2A-mRNA発現がヒト左心室心臓肥大症時、及び加齢個体において上方制御されることを発見した。PDE2A-mRNA発現は結紮後HFラットに由来する心筋細胞核でも上昇した(図13)。したがって、適切な疾患モデルの心筋細胞でPDE2Aが上方制御されることが、すなわち、ヒトにおいて不整脈治療目的でPDE2Aを標的とすることが可能であることがわかる。

10

【0133】

結論

PDE2阻害により局所的PKA活性の調節を介してNK A活性を増大し、最終的には筋細胞Ca²⁺負荷の減少及び催細胞性不整脈性と催インピボ不整脈性の減少を引き起こす新しい抗不整脈機構によりPDE2阻害が結紮後HFマウスとヘテロ接合性アンキリンB^{+/-}マウス(QT延長症候群)において心室頻脈を強力に防止することが示された。PDE2阻害後にNCXを介したCa²⁺放出が増加し、それにより筋細胞のCa²⁺負荷の減少についての機序が提議され、一方で我々の知る限りではPDE2阻害により調節されるCa²⁺処理タンパク質はLTCC、RyR、SERCA2、及び非SERCA2/非NCX性Ca²⁺放出タンパク質を含んで他に存在しなかった。NCXを介したCa²⁺放出の増加はNCXに対する直接的なPDE2介在性作用又は細胞内Na⁺の改変に至る下流効果のどちらかにより説明可能であった。アドレナリン作動性シグナル伝達の活性化とその後のPLMのリン酸化がNCXを負に調節することが以前に示されている(Cheung, J.Y.ら著、Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger by phospholemman. Ann N Y Acad Sci誌、2007年、第1099巻:119~34頁、及びWanichawan, P.ら著、Development of a high-affinity peptide that prevents phospholemman (PLM) inhibition of the sodium/calcium exchanger 1 (NCX1). Biochem J誌、2016年、第473巻(第15号):2413~23頁)。したがって、PDE2阻害がPLMに対する作用によりNCXを介したCa²⁺放出を増加させることはありそうにない。NK A活性化が細胞内Na⁺の減少を引き起こし、それが我々と他のグループによって以前に示されたようにNCXに対する下流効果を有する可能性があった(Aronsen, J.M.ら著、Hypokalaemia induces Ca(2+) overload and Ca(2+) waves in ventricular myocytes by reducing Na(+), K(+)-ATPase alpha2 activity. J Physiol誌、2015年、第593巻(第6号):1509~21頁、並びにDespa, S., J.B. Lingrel、及びD.M. Bers著、Na(+)/K(+)-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca2(+) transients and sarcopl

20

30

40

50

asmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 誌、2012年、第95巻(第4号): 480~6頁)。NK AとNC Xは局所的 Na^+ 領域内で相互作用することが示されており、その領域では全体的細胞内 Na^+ の変化による Ca^{2+} ホメオスタシスと収縮能に対する下流効果はほとんど予測されていない(Despa, S., J. B. Lingrel、及びD. M. Bers著、*Na(+)/K(+)-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca^{2+} transients and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 誌、2012年、第95巻(第4号): 480~6頁)。本研究ではSBFIを使用する細胞内 Na^+ 測定は感度が低いが全体的な細胞内 Na^+ の変化は見られず(Baartscheer, A., C. A. Schumacher、及びJ. W. Fiolet著、*Small changes of cytosolic sodium in rat ventricular myocytes measured with SBFI in emission ratio mode. *J Mol Cell Cardiol* 誌、1997年、第29巻(第12号): 3375~83頁、及びSwift, F.ら著、*The Na^+/K^+ -ATPase alpha2-isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 誌、2007年、第75巻(第1号): 109~17頁)、観察されたNC Xに対する効果は限られた領域における局所的 Na^+ プールのNK A調節によるものであることが示唆された。***

【0134】

古典的なジギタリス誘発性不整脈によって明らかのようにNK A活性低下は新たな不整脈誘発経路であるが、最近になってNK A活性低下は我々のグループ(Aronsen, J. M.ら著、*Hypokalaemia induces Ca^{2+} overload and Ca^{2+} waves in ventricular myocytes by reducing $Na(+), K(+)-ATPase$ alpha2 activity. *J Physiol* 誌、2015年、第593巻(第6号): 1509~21頁)とPezhoumanら(Pezhouman, A.ら著、*Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation. *Circulation* 誌、2015年、第132巻(第16号): 1528~1537頁)によって低カリウム血症誘発性不整脈に役割を有する(Faggioni, M.及びB. C. Knollmann著、*Arrhythmia Protection in Hypokalemia: A Novel Role of Ca^{2+} -Activated K^+ Currents in the Ventricle. *Circulation* 誌、2015年、第132巻(第15号): 1371~3頁)ことも強調されている。このことはNK A活性の上昇が抗不整脈作用を有する可能性があることを意味しているが、そのようなNK A活性化因子は存在せず、この機会は無開拓のまま残されている。我々は本明細書においてPDE 2阻害がNK A活性を30~50%増大させることを報告している。我々と他のグループは同様のNK A活性の低下が強い不整脈誘発性作用を有することを以前に報告している。全体的なNK A活性のわずかな変化がNK Aアイソフォーム及びNC Xとの共同存在に依存的に収縮能に関する大きな下流効果に転化し得ることも以前に示されている(Despa, S., J. B. Lingrel、及びD. M. Bers著、*Na(+)/K(+)-ATPase alpha2-isoform preferentially modulates Ca^{2+} transients and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 誌、2012年、第95巻(第4号): 480~6頁)。****

【0135】

以前の研究からPDE2の過剰発現がカテコールアミン誘発性不整脈を防止することが見いだされたが(Vettel, C.ら著、Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. Circ Res誌、2017年、第120巻(第1号):120~132頁)、これは明らかに我々の発見とは対照的である。PDE2は二重特異性PDEであり、cGMPとcAMPの両方を分解するが、異なる親和性と最大速度を有する(Bender, A.T.及びJ.A. Beavo著、Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev誌、2006年、第58巻(第3号):488~520頁)。重要なことに、PDE2活性は高度に区分化されていることが示されており、特定の領域でcAMPレベルが調節され、このことはPDE2が様々な領域において高度に分化した役割を有する可能性があることを示唆している(Zaccolo, M.及びM.A. Movsesian著、cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. Circ Res誌、2007年、第100巻(第11号):1569~78頁)。アドレナリン作動性受容体のカテコールアミン誘発性活性化後にPDE2の過剰発現によりcAMPの細胞内上昇が限定されることが予期される(Vettel, C.ら著、Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. Circ Res誌、2017年、第120巻(第1号):120~132頁)。しかしながら、特定の区画においてcAMPが変化するか、又は観察された有益な効果がcAMPレベルの全体的な低下によるものであるのかは明らかではない。本研究で我々はPDE2阻害によりNKA電流が増加し、細胞内Ca²⁺負荷が減少し、且つ、アドレナリン作動性受容体を事前に活性化することなく細胞性頻脈とインビボ頻脈が防止されることを報告する。アドレナリン作動性受容体を活性化しないでPDE2阻害後にcAMPレベルが全体的に上昇(又は低下)することは見られておらず、PDE2阻害が特定の領域のcAMPレベルを調節することで利益を与えることが示唆される。我々は、PDE2阻害がCa²⁺処理タンパク質に対してほとんど、又は全く他の効果を持たずにNKAを特異的に活性化すると提唱する。我々のアプローチは2つの重要な部分で以前の研究と異なっている。すなわち、(1) アドレナリン作動性受容体の活性化により細胞内cAMPの全体的増加が引き起こされ、(2) PDE2の過剰発現は必ずしも特定の領域におけるcAMPを変えないが、cAMPレベルの全体的低下を反映する可能性がある。PDE2阻害後の心臓肥大症に対する有益な作用が以前の研究によって発見されたが、局所的PKA活性の毀損後にこの作用は抑制された(Zoccarato, A.ら著、Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2. Circ Res誌、2015年、第117巻(第8号):707~19頁)。本研究での我々の発見と共にこのことは、PDE2阻害が特定の領域におけるcAMPの増加に起因して利益を与え、一方で提唱されたPDE2過剰発現の有益な作用は全体的なcAMP分解を含む非特異的な作用に起因する可能性があることを示唆する。

10

20

30

40

【0136】

実施例2

マウスにおける心室頻脈の防止に関する他の公知のPDE2阻害剤の活性を実証するためにそれらの阻害剤を使用して実施例1の方法を繰り返した。

50

【0137】

不整脈のインビボレコーディング

実施例1において説明された設定と同じ実験設定を用いてABから1週間後のHFマウスにおいてND-7001(10mg/kg)とLuAF64280(20mg/kg)を試験した。対照注射にDMSOを使用した。前記PDE2阻害剤の注射とその後のカフェイン注射の前に全てのマウスにおいて顕著な心筋リモデリングが確認された。

【0138】

結果

PDE2阻害は心不全マウスにおいて心室頻脈を防止する

ND-7001とLuAF64280の両方によりHFマウスでVTが防止され、ND-7001では5匹のうち0匹(0%)でVTが発生し、LuAF64280では3匹のうち0匹(0%)でVTが発生した(図14)。まとめると、Bay60-7550、PF05180999、ND-7001、及びLuAF64280の4種類のPDE2阻害剤によりHFマウスでVTが防止された。

10

【0139】

結論

確立されたモデルにおいてさらに2種類のPDE2阻害剤により心室頻脈が防止されることが示された。

【0140】

実施例3

一般的に使用される不整脈治療薬であるメトプロロールと比較して、且つ、メトプロロールと組み合わせて前記PDE2阻害剤Bay60-7550の抗不整脈作用を調べた。

20

【0141】

不整脈のインビボレコーディング

実施例1において説明された方法と同じ方法で前記PDE2阻害剤Bay60-7550の抗不整脈作用をメトプロロールと比較して調べた。対照注射を受ける群とBay60-7550とメトプロロールの組合せを受ける群も含めた。無作為に、しかし群のサイズを予め決めてマウスを処理群に割り当てた。全ての群を5日間にわたって処理し、5.5mg/kgのメトプロロール(Zhou, Q.ら著、Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca²⁺ release. Nat. Med. 誌、2011年、第17巻(第8号):1003~9頁参照)を毎日1回(午前中に)注射し、一方で3mg/kgのBay60-7550と対照を毎日2回(午前午後)に注射した。長期注射のためにBay60-7550を5%エタノールと95%ヒマワリ油の混液中に溶解し、対照群は同じベヒクルを受けた。メトプロロールのみの群に5%エタノールを注射に加えてエタノール依存性効果を最小限に抑えた。5日目に最後の注射の前に全ての動物のベースラインECGをレコーディングした。前記不整脈プロトコルの10~20分前に最後の注射を行った。実施例1において説明されたように最後の注射、麻酔、不整脈誘発、ECG記録、及びECG分析を実施した。

30

【0142】

結果

PDE2阻害はCa²⁺誘発性心室性不整脈の防止について 遮断薬よりも優れている

臨床的には 遮断薬がHFと遺伝的不整脈症候群の両方の場合で心室頻脈性不整脈を防止するために最も一般的に使用される不整脈治療薬である(Al-Khatib, S. M.ら著、2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Gui

40

50

delines and the Heart Rhythm Society. Circulation誌、2017年参照)。この抗不整脈作用機序は主に アドレナリン作動性受容体の下流でcAMP/PKA依存性効果を抑止することであり、一方でPDE2阻害の抗不整脈作用はNKAの特異的活性化と細胞内Ca²⁺レベルの低下に起因すると我々は提唱している。我々は以下の疑問について調査を行った。第1に、Ca²⁺誘発性心室性不整脈の防止に関してPDE2阻害は 遮断薬よりも優れているのか。第2に、PDE2阻害の抗不整脈作用は 遮断薬と組み合わせられたときもあるのか。これらの疑問に答えるために55匹のAnk B+/-マウスを4群、すなわちベヒクル群、メトプロロール(5.5mg/kg)群、Bay 60-7550(3mg/kg)群、又はBay 60-7550(3mg/kg)とメトプロロール(5.5mg/kg)の組合せの群に無作為に割り当てた。全てのマウスが5日間にわたって注射を受け、最終日にこれらのマウスにカフェイン(120mg/kg)を注射して心室性不整脈を誘発させた(図15A)。ベヒクル群では11匹のうち8匹でVTが発生し、且つ、11匹のうち11匹で心室性不整脈(VT、心室性二段脈、又は連結期の長い心室性期外収縮(VES))が発生した。メトプロロール群では15匹のうち5匹でVTが発生し、且つ、15匹のうち14匹で心室性不整脈(VT、心室性二段脈、及び連結期の長いVES)が発生した。一方、Bay 60-7550で処理されたマウスでは心室性不整脈が著しく少なく(13匹のうち4匹がVT及び心室性二段脈)、一方で13匹のうち2匹でVTが発生した。メトプロロールとBay 60-7550の組合せを受けた群では15匹のうち0匹でマウスVTがあり、15匹のうち2匹で心室性不整脈(心室性二段脈)があった(図15B及びC)。メトプロロール単独とBay 60-7550との組合せの両方でメトプロロール注射後にQT延長症があった。メトプロロール群及びベヒクル群と対照的にBay 60-7550を受けた群ではどちらもカフェイン注射後にQT延長症が発生しなかった(図15D)。

【0143】

遮断薬は現代の抗不整脈治療の基礎であるが、我々の結果からPDE2阻害はこの治療方式を補完し、且つ、相加的効果すら提供することが可能であると示唆される。

【0144】

結論

PDE2阻害単独によって、又はメトプロロールとの併用によって対照又はメトプロロール単独よりも効率的にCa²⁺誘発性心室性不整脈が防止されたことが前記結果から明らかに示唆されている。多くの心臓病患者が既に 遮断薬を使用しているため、PDE2阻害剤と 遮断薬の併用が 遮断薬単独よりも優れているということは重要な発見である。このことは、PDE2阻害が追加療法として有効であり、幾つかの臨床背景で非常に適切である可能性があることを示唆している。

【0145】

実施例4

実施例1の実験を拡大してBAY 60-7550に関してCa²⁺電流、Na⁺電流、K⁺電流、及び活動電位(AP)も調査した。

【0146】

L型Ca²⁺電流(LTCC)

広口タイプのパッチピペット(1.4~1.8MΩ)に内液(Leroy, J.ら著、Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J. Clin. Invest.誌、2011年、第121巻(第7号):2651~61頁 ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATAより改変して122mM CsCl、10mM HEPES、5mM Mg-ATP、0.7mM MgCl₂(0.6mMの遊離Mg²⁺)、5mM Na₂ホスホジクレアチニン、10mM EGTA、0.2mM CaCl₂(3nMの遊離Ca²⁺)、0.005mM cAMP、CsOHでpH7.2に調節)を充填した。全て

のレコーディングで直列抵抗は4～8 M の間であった。-45 mV～55 mVまでの範囲の(10 mV毎の)ステップで100 msの電圧ステップを-45 mVの保持電位から様々な試験電位まで実施した。

【0147】

Na⁺電流

低抵抗性ピペット(1.4～2.5 M)に内液(Leroy, J.ら著、Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice. J. Clin. Invest. 誌、2011年、第121巻(第7号):2651～61頁より改変して122 mM CsCl、10 mM HEPES、5 mM Mg-ATP、0.7 mM MgCl₂(0.6 mMの遊離Mg²⁺)、5 mM Na₂ホスホジクレアチニン、10 mM EGTA、0.2 mM CaCl₂(3 nMの遊離Ca²⁺)、0.005 mM cAMP、CsOHでpH7.2に調節)を充填した。全てのレコーディングで直列抵抗は4～7.5 M の間であった。前記細胞を溶液A中でパッチしたが、ホールセルアクセスの達成後に溶液D(125 mM N-メチル-D-グルカミン、10 mM NaCl、5 mM CsCl、5 mM D-グルコース、1.2 mM MgCl₂、10 mM HEPES、5 mM NiCl₂、CsOHでpH7.4に調節)を適用した。実験当日に20 μMのニフェジピンを添加してL型Ca²⁺チャネルを阻害した。保持電位は-80 mVであった。-80 mV～70 mVまでの範囲の(15 mV毎の)ステップで50 msの電圧ステップを-80 mVの保持電位から様々な試験電位まで実施した。

10

20

【0148】

バックグラウンドK⁺電流

以前に説明されたように(Aronsen, J.M.ら著、Hypokalaemia induces Ca(2+) overload and Ca(2+) waves in ventricular myocytes by reducing Na(+), K(+)-ATPase alpha2 activity. J Physiol誌、2015年、第593巻(第6号):1509～21頁参照)K⁺電流を測定した。簡単に説明すると、-170 mV～50 mVまでの範囲の(10 mV毎の)ステップで500 msの電圧ステップを-80 mVの保持電位から様々な試験電位まで実施した。パルスの終末近くの安定期で電流を分析した。対照レコーディングとBay 60-7550を使用するレコーディングを同じ細胞に行った。ピペット抵抗は2～2.5 M であり、直列抵抗は4～8 M であった。

30

【0149】

活動電位(AP)

3 msの閾値上電流注入によりAPを誘発した。ピペット液は130 mM KCl、10 mM NaCl、10 mM HEPES、5 mM Mg-ATP、1 mM MgCl₂、0.5 mM EGTA、0.005 mM cAMPを含み、KOHでpH7.2に調節した。溶液Aで前記細胞を灌流した。ピペット抵抗は2～2.5 M であり、直列抵抗は4.8～9.3 M であった。0%がピーク電位であり、且つ、100%が休止膜電位である20%(APD20)、50%(APD50)、70%(APD70)、及び90%(APD90)でAPを分析し、所与の相対電位において実際の膜電位を測定した。対照レコーディングとBay 60-7550を使用するレコーディングを同じ細胞に行った。

40

【0150】

結果

PDE2阻害は高い標的特異性を有する

現在の抗不整脈治療薬は、Na⁺チャネル、K⁺チャネル、及びCa²⁺チャネルの阻害剤を含むクラス1～クラス4の不整脈治療薬に分類可能である。我々は図16cにおいてPDE2阻害がCa²⁺電流に対して何の効果も無いことを示した。我々はここでPDE2阻

50

害が電圧固定したARVMにおいて Ca^{2+} 電流(図17a)、 K^+ 電流(図17b)、又は Na^+ 電流(図17c)に対して何の効果も無いことも示した。 Na^+ 電流、 K^+ 電流、及び Ca^{2+} 電流の抑制により活動電位持続時間(APD)が延長されることが予期される。一方、PDE2阻害は Na^+ 電流、 K^+ 電流、及び Ca^{2+} 電流に影響せずにNKA活性を選択的に増大させるというモデルと合致して、APがAPD50、APD70、及びAPD90においてPDE2阻害により短くなること(図17d)が観察された。これらの結果は、PDE2阻害が他の以前に知られている抗不整脈標的に何の効果も無く、非常に特異的にNKAを活性化することを示している。

【0151】

結論

現在の心室性不整脈に対する薬理的治療戦略にはクラスI~クラスIVの不整脈治療薬が含まれる。しかしながら構造的疾患の患者には不整脈誘発性作用のために禁忌とされている不整脈治療薬もある。新しい不整脈治療戦略は、あまり多くの標的外効果を有さず、特定の不整脈の機構を標的とするものであることが好ましい。PDE2阻害剤は、SERCA、RyR、非SERCA/非RyR性 Ca^{2+} 放出タンパク質、 Ca^{2+} 電流、 Na^+ 電流、及び K^+ 電流(内向き整流チャネルと遅延整流チャネル)を含む Ca^{2+} 処理タンパク質及びイオンチャネルに対して効果を有さずにNKAを活性化することが我々の結果から示唆される。この高レベルの特異性はNKAとPDE2との間の密接な相互作用に由来すると考えられる。

【0152】

多種多様な分子生物学及び画像撮影の技術を使用することにより、NKAとPDE2が心筋細胞において相互作用し、且つ、共局在すること、及びPDE2阻害がcAMPを全体的に増加させるのではなくNKAの周囲でcAMPを局所的に増加させることが示されている。さらに、非常に特異的にAKAPからRII-PKAを脱離させるペプチドであるsuperAKAPが存在するとNKAのPDE2調節が鈍くなる。このことと合致して、superAKAPが存在すると心不全又はAnkB^{+/+}でPDE2阻害によりVTが防止されず、このことはこの抗不整脈作用が局所的なcAMP領域に左右されることを示している。したがって、抗不整脈治療法としてのPDE2阻害は2つの点、すなわち(1)NKAの活性化因子としての点、及び(2)個々の領域でのcAMPレベルを標的とすることによるという点で新しい治療戦略である。

【0153】

実施例5

不整脈のインビボレコーディング

以前に説明されたように(Lehnart SEら著、Leaky Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice、Journal of Clinical Investigation誌、2008年6月、第118巻(第6号):2230~45頁)CPVTマウスを飼育した。CPVTマウスにおいてBay60-7550(3mg/kg)を試験した。心室頻脈を誘発させるためにこれらのマウスに60mg/kgのカフェインと50ng/kgのイソプレナリンを注射した。対照注射として50%エタノールを使用した。

【0154】

結果

PDE2阻害はCPVTマウスにおいて心室頻脈を防止する

Bay60-7550はCPVTマウスにおいてVTを防止し、対照での100%(6匹のうち6匹)と対照的にBay60-7550では7匹のうち2匹(28%)でVTが発生した(図18)。まとめると、PDE2阻害は3種類の異なるマウスモデルであるHF、アンキリンB^{+/+}(QT延長症候群)、及びCPVTにおいて心室頻脈を防止する。

【0155】

結論

10

20

30

40

50

心室頻脈のリスクを上昇させる別の心疾患が P D E 2 阻害により防止されることが示された。

【 図 1 】

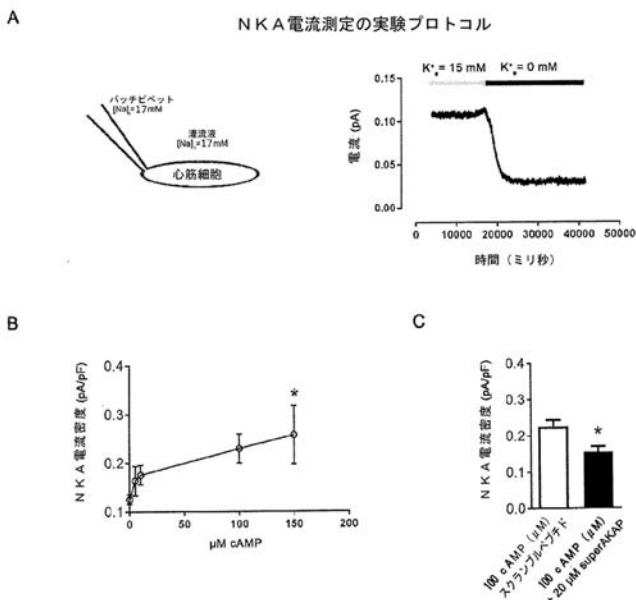


図 1

【 図 2 】

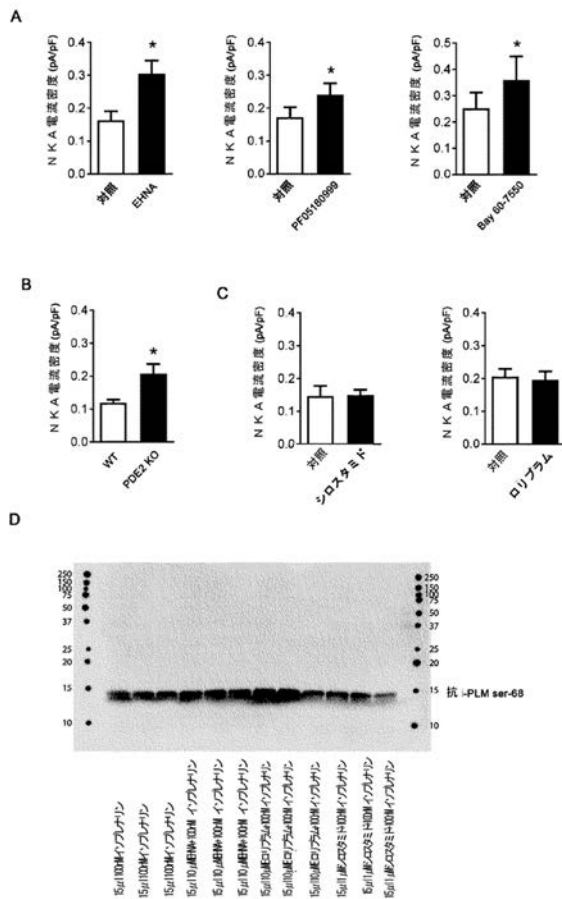


図 2

【 図 3 】

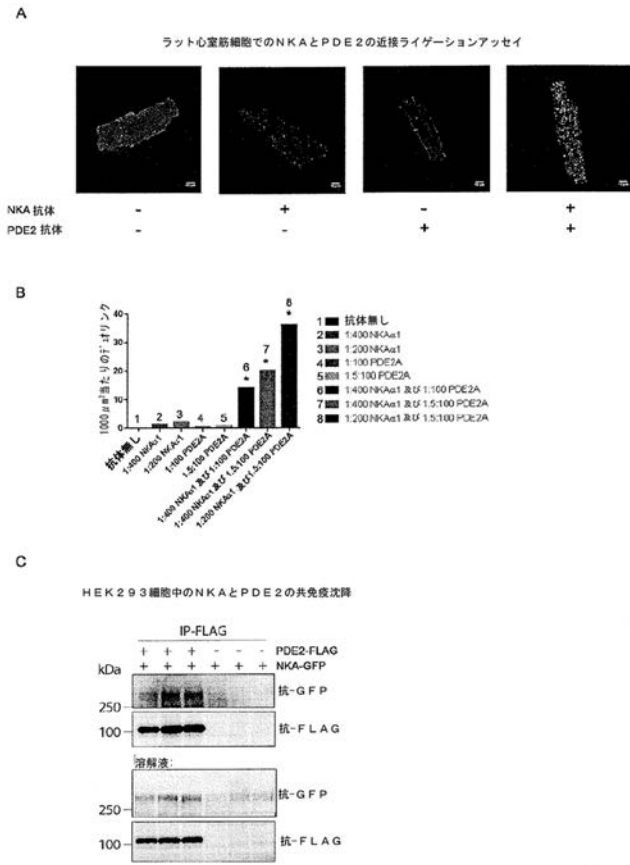


図 3

【 図 4 】

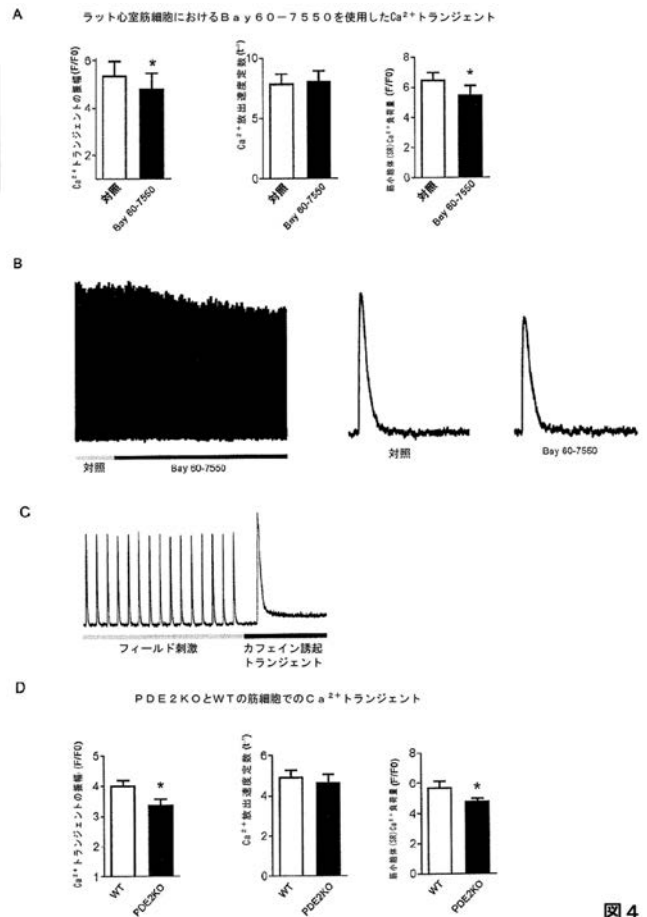


図 4

【 図 5 】

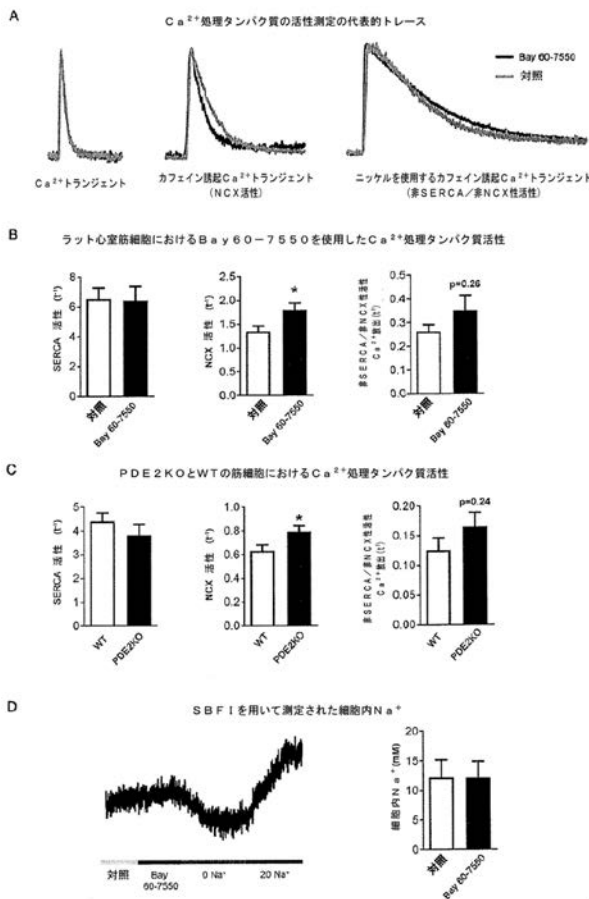


図 5

【 図 6 】

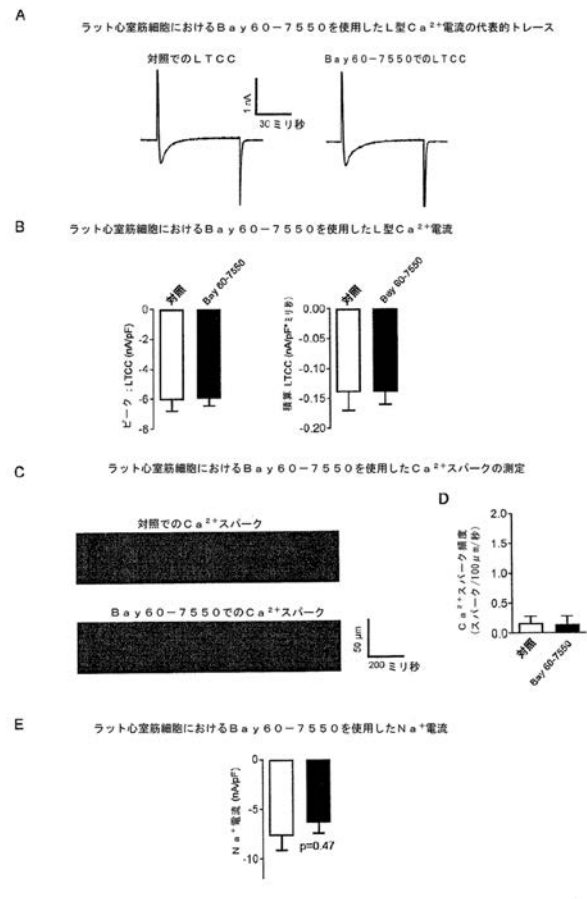


図 6

【 図 7 】

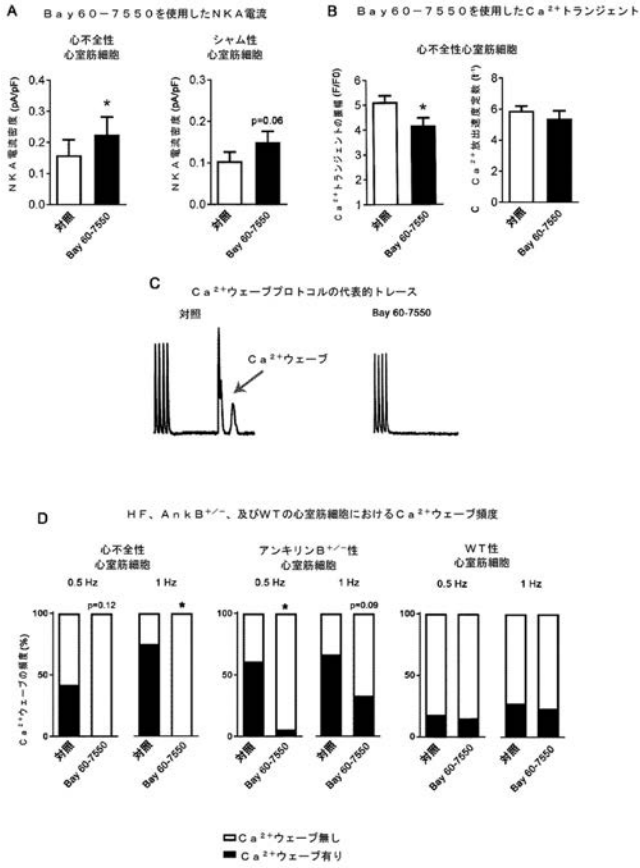


図 7

【 図 9 】

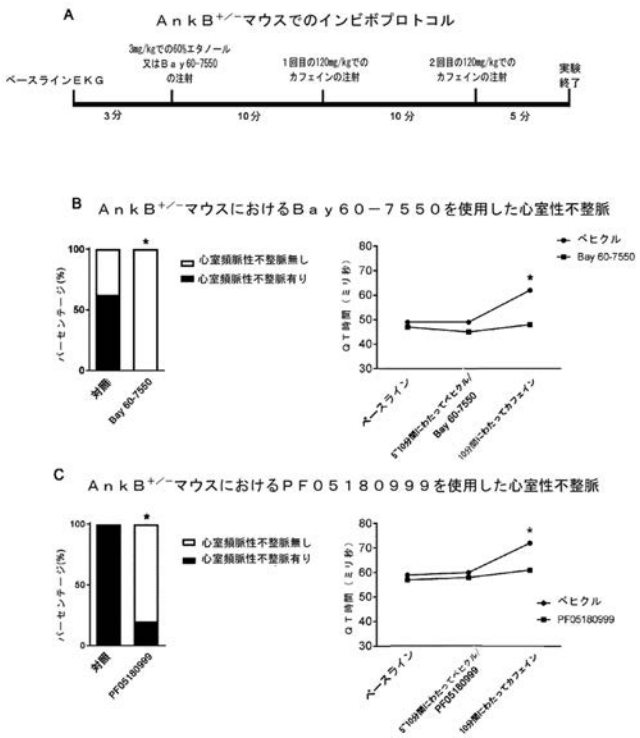


図 9

【 図 8 】

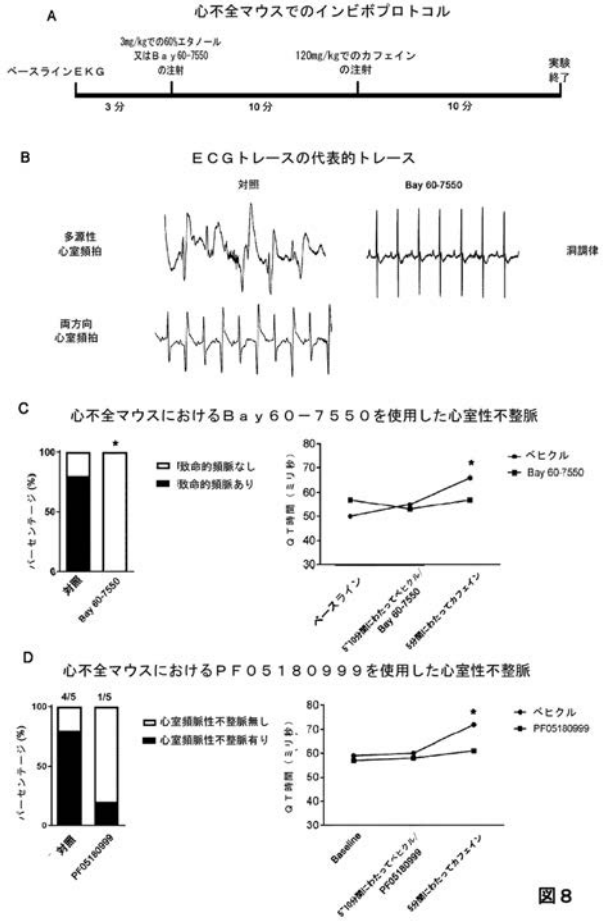


図 8

【 図 10 】

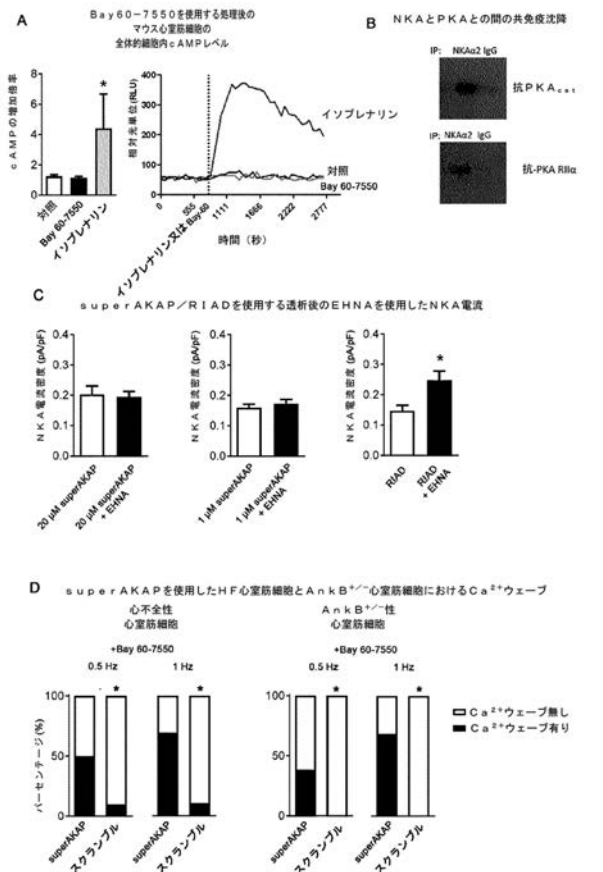


図 10

【 図 1 1 】

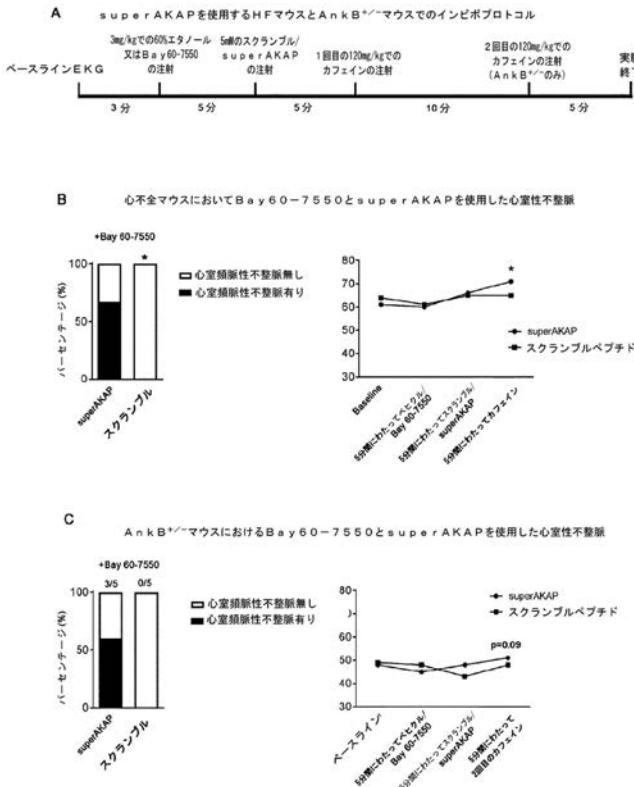


図 1 1

【 図 1 2 】

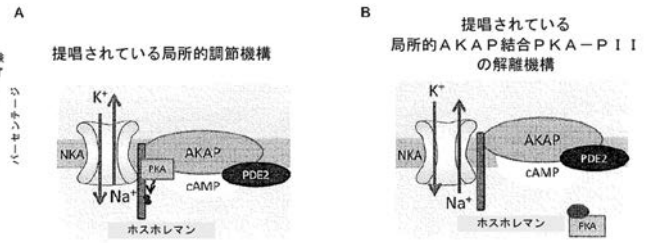


図 1 2

【 図 1 3 】

心筋細胞特異的PDE2A-mRNA発現

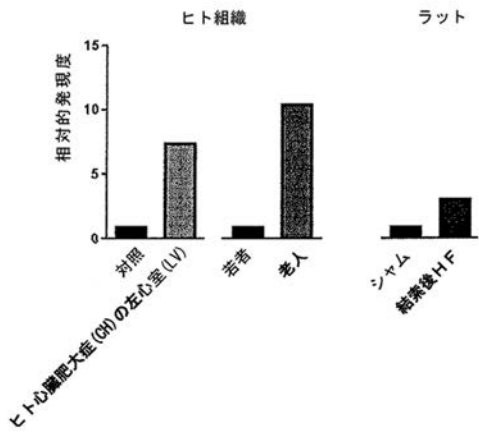


図 1 3

【 図 1 4 】

A HFマウスにおいてPDE2阻害剤を使用した心室頻脈性不整脈

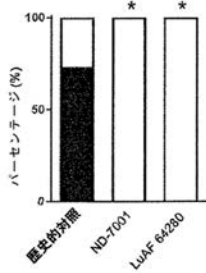


図 1 4

【 図 1 5 】

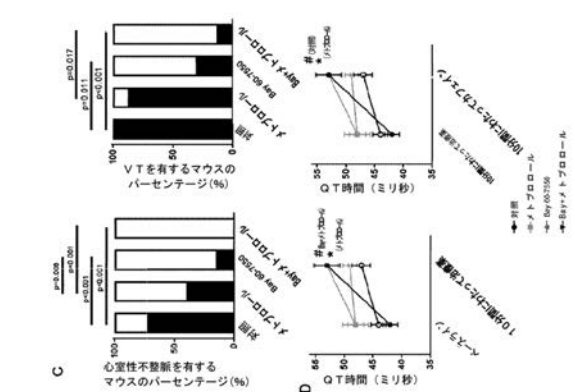
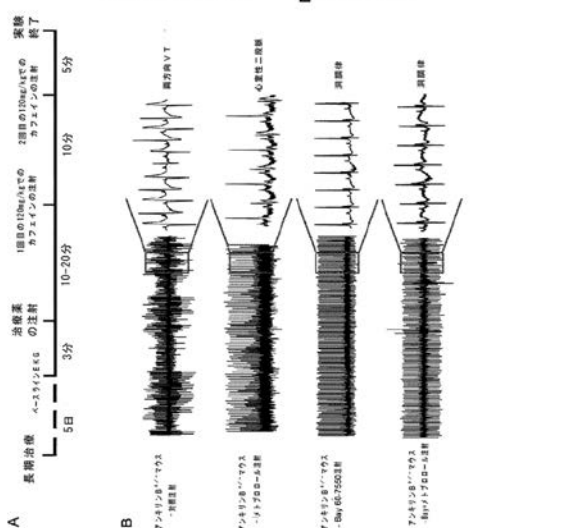
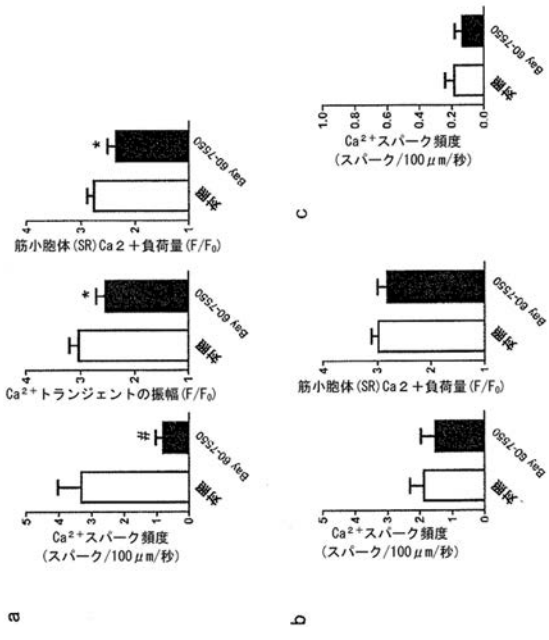


図 1 5



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

図 1 6

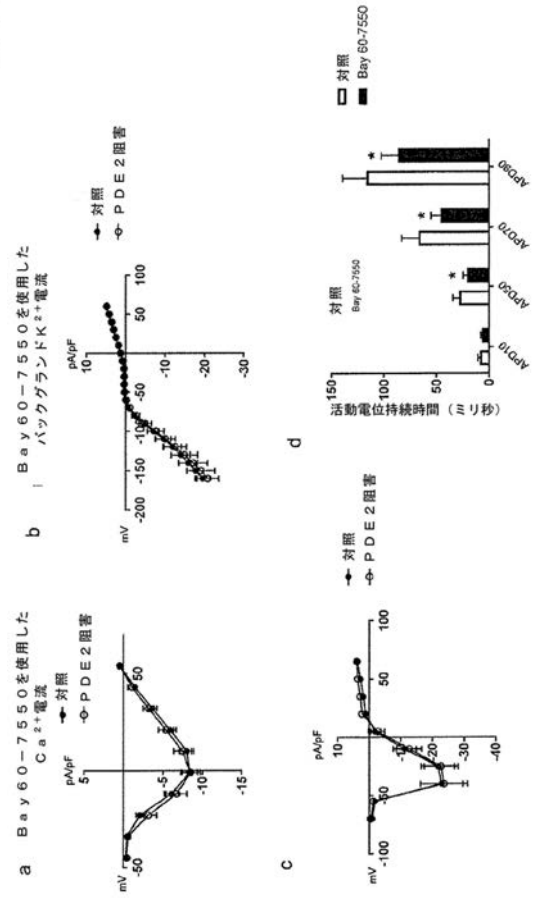


図 1 7

【 図 1 8 】

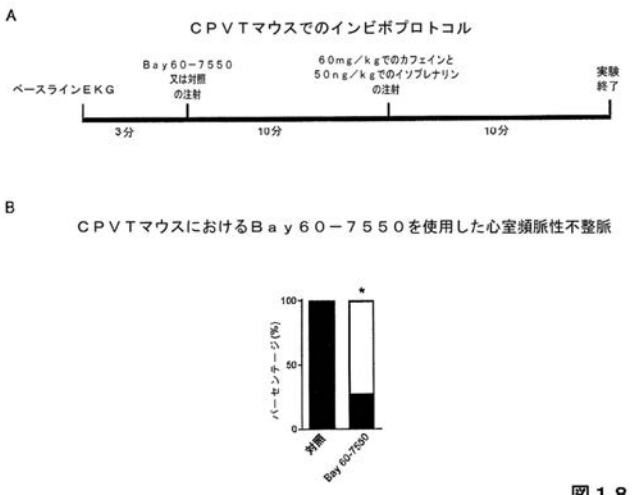


図 1 8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/082450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K31/44 A61P9/06	A61K31/4985 A61K31/522 A61K31/53 A61K31/5513
ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, 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 2004/089953 A1 (ALTANA PHARMA AG [DE]; TENOR HERMANN [DE]; BAER THOMAS [DE]; HATZELMAN) 21 October 2004 (2004-10-21) cited in the application	1-5,9-15
Y	page 35, second paragraph from the bottom, last line	6-8
X	WO 2006/024640 A2 (ALTANA PHARMA AG [DE]; SCHMIDT BEATE [DE]; WEINBRENNER STEFFEN [DE]; F) 9 March 2006 (2006-03-09) cited in the application	1-5,9-15
Y	page 35, second paragraph from the bottom, last line	6
Y	EP 3 026 051 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL [JP]) 1 June 2016 (2016-06-01) the whole document	6-8
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 February 2019		Date of mailing of the international search report 18/02/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Albayrak, Timur

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/082450

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/021037 A1 (ALTANA PHARMA AG [DE]; WOLLIN STEFAN-LUTZ [DE]) 10 March 2005 (2005-03-10) the whole document -----	6-8
Y	WO 2012/168817 A1 (PFIZER [US]; HELAL CHRISTOPHER J [US]; CHAPPIE THOMAS ALLEN [US]; HUMP) 13 December 2012 (2012-12-13) cited in the application the whole document -----	6-8
Y	MIKAMI SATOSHI ET AL: "Discovery of Clinical Candidate N-((1S)-1-(3-Fluoro-4-(trifluoromethoxy)ph enyl)-2-methoxyethyl)-7-methoxy-2-oxo-2,3- dihydropyrido[2,3-b]pyrazine-4(1H)-carboxa mide (TAK-915): A Highly Potent, Selective, and Brain -Penetrating Phosphodiesterase 2A Inhibitor for the Treatment of Cognitive Disorders", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 60, no. 18, 28 September 2017 (2017-09-28), pages 7677-7702, XP002781406, the whole document -----	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/082450

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 2004089953	A1	21-10-2004	AU 2004228360 A1	21-10-2004		
			CA 2517336 A1	21-10-2004		
			EP 1601675 A1	07-12-2005		
			HR P20050848 A2	30-06-2006		
			IS 8045 A	26-09-2005		
			JP 2006519243 A	24-08-2006		
			RS 20050637 A	15-11-2007		
			US 2006106037 A1	18-05-2006		
			WO 2004089953 A1	21-10-2004		

WO 2006024640	A2	09-03-2006	AT 471324 T	15-07-2010		
			AU 2005279221 A1	09-03-2006		
			BR P10514586 A	17-06-2008		
			CA 2578368 A1	09-03-2006		
			CN 101133057 A	27-02-2008		
			EA 200700537 A1	26-10-2007		
			EP 1791543 A2	06-06-2007		
			ES 2347337 T3	28-10-2010		
			HK 1115590 A1	25-11-2011		
			IL 181271 A	28-11-2013		
			JP 5140427 B2	06-02-2013		
			JP 2008511586 A	17-04-2008		
			KR 20070047834 A	07-05-2007		
			NZ 553160 A	27-08-2010		
			US 2009005372 A1	01-01-2009		
			US 2010286140 A1	11-11-2010		
			WO 2006024640 A2	09-03-2006		
			ZA 200701137 B	26-11-2008		

			EP 3026051	A1	01-06-2016	EP 3026051 A1
JP W02015012328 A1	02-03-2017					
US 2016159808 A1	09-06-2016					
WO 2015012328 A1	29-01-2015					

WO 2005021037	A1	10-03-2005	AU 2004268387 A1	10-03-2005		
			CA 2536458 A1	10-03-2005		
			EP 1660132 A1	31-05-2006		
			JP 2007504117 A	01-03-2007		
			US 2006229242 A1	12-10-2006		
			WO 2005021037 A1	10-03-2005		

WO 2012168817	A1	13-12-2012	AU 2012265970 A1	28-11-2013		
			CA 2836851 A1	13-12-2012		
			CN 103596956 A	19-02-2014		
			EP 2718295 A1	16-04-2014		
			JP 2014516074 A	07-07-2014		
			KR 20140019466 A	14-02-2014		
			SG 195085 A1	30-12-2013		
			US 2014080806 A1	20-03-2014		
			WO 2012168817 A1	13-12-2012		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/5025 (2006.01)	A 6 1 K 31/5025	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/138 (2006.01)	A 6 1 K 31/138	
A 6 1 P 9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 D 471/14 (2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 4
	C 0 7 D 487/04	1 5 3
	C 0 7 D 487/04	1 4 5
	C 0 7 D 487/04	1 4 3
	C 0 7 D 471/14	1 0 2

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

F ターム(参考) 4C050 AA01 BB05 BB06 CC07 CC08 CC11 EE04 FF02 FF05 GG01
GG03 GG04 HH01 HH04
4C065 AA04 BB04 CC04 DD05 EE03 HH01 JJ03 KK02 LL01 PP03
4C084 AA19 NA05 NA14 ZA36 ZC20 ZC75
4C086 AA01 AA02 BC54 BC73 CB05 CB07 CB08 CB09 GA02 GA07
MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA36 ZC20 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA21 NA05 NA14 ZA36 ZC20 ZC75