

(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2004-505922

(P2004-505922A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl.⁷

C07F 9/6524

A61K 31/675

A61P 29/00

F I

C07F 9/6524

A61K 31/675

A61P 29/00

テーマコード (参考)

4C086

4H050

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2002-517073 (P2002-517073)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月26日 (2001.7.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月3日 (2003.2.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/008643
 (87) 国際公開番号 W02002/011737
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
 (31) 優先権主張番号 M12000A001827
 (32) 優先日 平成12年8月4日 (2000.8.4)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 503047641
 ウニヴェルシタ' デリ ストゥディ デ
 イ ミラノ
 UNIVERSITA' DEGLI S
 TUDI DI MILANO
 イタリア国 イー-20122 ミラノ
 ヴィア フェスタ デル ペルドーノ 7
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫
 (74) 代理人 100088328
 弁理士 金田 暢之
 (74) 代理人 100106297
 弁理士 伊藤 克博
 (74) 代理人 100106138
 弁理士 石橋 政幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炎症薬

(57) 【要約】

炎症状態の治療のために有用な医薬品としてのアデノシン - 5' - 三リン酸 - 2' , 3' - ジアルデヒド (o A T P) の使用が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬品として使用するための化合物アデノシン - 5' - 三リン酸 - 2' , 3' - ジアルデヒド。

【請求項 2】

炎症および疼痛の治療において使用するための、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

アデノシン - 5' - 三リン酸 - 2' , 3' - ジアルデヒドを活性成分として含む医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、炎症状態の治療のために有用な医薬品の調製におけるアデノシン - 5' - 三リン酸 - 2' , 3' - ジアルデヒド (o A T P) の使用に関する。

【0002】

o A T P 分子は A T P からリボースの 2' - および 3' 位にあるヒドロキシルのジアルデヒドへの酸化により誘導される。そのような酸化は P . N . L o w e e t a l . 、 「 過ヨウ素酸塩により酸化されたアデノシン三リン酸およびいくつかの関係化合物の調製および化学的性質 (P r e p a r a t i o n a n d c h e m i c a l p r o p e r t i e s o f p e r i o d a t e - o x i d i z e d a d e n o s i n e t r i p h o s p h a t e a n d s o m e r e l a t e d c o m p o u n d s) 」 、 B i o c h e m i c a l S o c i e t y T r a n s a c t i o n s 、 V o l . 7 : 1 1 3 1 ~ 1 1 3 3 、 1 9 7 9 に記載のとおり、過ヨウ素酸塩を用いて実施することができる。

20

【0003】

A T P 2' , 3' - ジアルデヒド誘導体は、酵素のヌクレオチド部位のリシン非プロトン化残基と反応してシッフ塩基またはジヒドロモルホリノ誘導体を生成することができる (C o l m a n , R . F . (1 9 9 0) 、 T h e E n z y m e s - S i g m a n , D . S . , a n d B o y e r , P . D . , e d s - V o l 1 9 、 p p . 2 8 3 ~ 3 2 3 、 A c a d e m i c P r e s s 、 S a n D i e g o) ため、伝統的に、酵素のヌクレオチド部位の親和性標識として用いられている (E a s t e r b r o o k - S m i t h , B . , W a l l a c e , J . C . & K e e c h , D . B . (1 9 7 6) E u r . J . B i o c h e m . 6 2 、 1 2 5 ~ 1 3 0) 。 o A T P 分子はまた、血小板活性化を調べ、A T P によるニワトリ骨格筋の刺激を阻害するためにも用いられている (P e a r c e , P . H . , W r i g h t , J . M . E g a n . C . M . & S c r u t t o n , M . C . (1 9 7 8) E u r . J . B i o c h e m . 8 8 、 5 4 3 ~ 5 5 4 ; T h o m a s , S . A . , Z a w i s a , M . J . , L i n , X . & H u m e , R . I . (1 9 9 1) B r . J . P h a r m a c o l . 1 0 3 1 9 6 3 ~ 1 9 6 9) 。 さらに、マクロファージ細胞株での試験により、o A T P は A T P による原形質膜を透過可能にする作用を阻止し、膜の e c t o - A T P アーゼによる外因性 A T P の加水分解レベルを低下させ、かつ A T P による腫脹、液胞化および細胞溶解作用を阻害することができると判明した (M u r g i a e t a l . T h e J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y (1 9 9 3) b y T h e A m e r i c a n S o c i e t y f o r B i o c h e m i s t r y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y , i n c . V o l . 2 6 8 N o . 1 1 p p 8 1 9 9) 。 o A T P は P 2 z / P 2 X 7 プリン受容体に対する拮抗作用を有することが示唆されている。P 2 z / P 2 X 7 を発現する小神経膠細胞からの I L - 1 (インターロイキン 1) の L P S (= l y p o 多糖) 依存性放出は事実、o A T P によって選択的に阻害される (F e r r a r i D . e t a l . J . E x p . M e d . (1 9 9 7) V o l . 1 8 5 N . 3 P a g . 5 7 9 ~ 5 8 2) 。

30

40

【0004】

現在、o A T P はインビボで顕著な抗炎症および抗侵害受容作用を発揮することが明らかにされている。実験モデルとして、フロイントの完全アジュバント (F C A) を足底内注

50

入した後の、ラット後ろ足の片側炎症を用いている。処置ラットの対照側足、ならびに未処置ラットの足を対照として用いた。F C Aにより誘導された炎症は、注入後3時間から24～48時間まで、足体積の増加、高体温、および痛覚過敏により証明された。痛覚過敏は、侵害受容閾値を評価することができる、痛覚測定試験（足圧試験）によって評価した。o A T Pの足底内注入は、痛覚（侵害受容）を有意に低減し、すなわち侵害受容の閾値を高めた。o A T Pは異なる用量でも必ず、有意な用量依存性の鎮痛作用を引き起こし、この作用は約12～24時間持続し、作用のピークは投与後1時間ですでに認められた。さらに、o A T P処理ラットの足は、他の炎症徴候（腫脹および高体温）の減少も示した。さらなる試験において、o A T Pと、関節炎性病変に用いられる公知の抗炎症薬であるジクロフェナクとの間の比較により、o A T Pがジクロフェナクよりも有意に高い鎮痛作用を引き起こすことが判明した。ラットを白血球漏出阻害剤フコイジン（f u c o i d i n）で前処置した試験では、o A T P活性は炎症部位における白血球動員と無関係であることが明らかとなった。炎症部位のA T Pレベルは未処置ラットで有意に高く、このことはo A T Pが外因性A T Pの産生をいくらか阻止し、したがってその炎症誘発活性を防止することを示唆している。

10

【0005】

本発明は、炎症および疼痛状態を治療する医薬品としての、o A T Pの使用に関する。本発明はさらに、活性成分としてのo A T Pを、医薬品として許容される賦形剤と共に含む、医薬品組成物に関する。経口、局所または非経口投与に適した剤形は、例えば、錠剤、糖衣錠、カプセル剤、顆粒剤、散剤、坐剤、シロップ、液剤、懸濁剤、クリーム、軟膏、ゲル、ペースト、ローション、乳剤、スプレーである。医薬品組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook、Mack Pub. Co.、NY、USA、XVII Ed.の記載に従って調製することができる。1日1回以上で投与する単位用量あたりの活性成分の量は、治療する疾患の重症度および患者の状態に応じて、体重1 kgあたり0.05から100 mgの範囲でありうる。1日用量は通常、1～300 mg、好ましくは10～100 mgの範囲となる。

20

【0006】

本発明の化合物は、他の現在用いられている抗炎症薬との組み合わせで用いることもできる。

【0007】

下記の実施例は、本発明をさらに例示するものである。

30

【0008】

実施例1：o A T Pの薬理活性

ラットにおける炎症の誘導

体重約250 gの雄Fischer近交系ラット（Charles River Italy、Calco、Lecco、イタリア）を用いた。ラットに、短時間のイソフルラン麻酔下でフロイントの完全アジュバント（F C A）（0.15 ml）を右後ろ足に足底内注入した。この注入により、足体積の増加、高体温および痛覚過敏によって証明される片側の炎症が誘導された（注入後3時間から24～48時間まで）。痛覚過敏は、痛覚測定計（Ugo Basile、Comerio、イタリア）を用いて足圧閾値（グラム）、すなわち侵害受容閾値を示す、足の引き戻しを誘発するのに要する圧を調べる痛覚測定試験によって評価した。各試験には6から8匹のラットを用いた。これらの試験中、ラットは「標準倫理指針」（NIH、1985）に従って扱った。

40

【0009】

o A T Pによる処置

F C A注入から24時間後に、ラットの炎症足に異なる用量のo A T P（56から336 μ M）の足底内注入を行い、o A T P注入時を時間0と考えた。得られた侵害受容閾値を下記の表1に示す。

【0010】

【表1】

50

侵害受容閾値すなわち「足圧閾値」

	OATP56 μ M	112 μ M	224 μ M	336 μ M
0 分	60 \pm 1.6	65 \pm 2.0	50 \pm 1.5	60 \pm 1.9
30 分	120 \pm 2.1*	140 \pm 3.5*	350 \pm 5.4*	300 \pm 3.4*
60 分	190 \pm 2.3*	180 \pm 4.2*	400 \pm 10.3*	=>750 *1
90 分	85 \pm 2.5*	150 \pm 3.8*	300 \pm 11.2*	=>750 *2
120 分	75 \pm 1.8*	100 \pm 3.0*	185 \pm 7.1*	600 \pm 20.8*
240 分	75 \pm 2.6*	105 \pm 4.3*	180 \pm 8.9*	550 \pm 18.4*

*1,2 = カットオフ

【 0 0 1 1 】

データは足圧閾値（gで評価）の平均 \pm S.E.M.で表している。時間0'（未処置炎症足）に対し $p < 0.05$

* マン - ホイットニー（Mann - Whitney）検定。

【 0 0 1 2 】

oATP 56 μ mの代わりにoATP 35 μ mを用いて、または炎症プロセス（FCA注入）を24時間ではなく6もしくは12時間誘導して、同様の結果が得られた。さらに、oATP処置した足は未処置の足に比べて、痛みが少なく、炎症徴候（腫脹、高体温）の低下も認められた。

【 0 0 1 3 】

oATPは、用いた最少用量ですでに有意に高い効果が得られたが、用量依存性の効果が証明された。しかし、低用量では鎮痛効果の持続時間が短く、これはおそらく、P2X7受容体の不完全な飽和によると考えられる。

【 0 0 1 4 】

用いた最大oATP用量の効果を、他の一連の実験で、炎症プロセスを48時間前に誘導しておいたラットの足で、さらに長い時間試験した（表2）。データから、oATP注入により侵害受容閾値は、時間と共に漸減するとはいうものの、非常に長時間有意に高まることが明らかにされている。

【 0 0 1 5 】

【 表 2 】

10

20

30

侵害受容閾値すなわち「足圧閾値」

	OATP336 μ M
0 分	55 \pm 2.0
30 分	210 \pm 10.7
60 分	360 \pm 25.8
90 分	395 \pm 30.2
120 分	450 \pm 38.1
180 分	550 \pm 45.9
240 分	690 \pm 56.6
12 時間	400 \pm 29.7
24 時間	210 \pm 7.2
26 時間	190 \pm 3.3

10

20

【0016】

対照足（非炎症対照側の足および未処置の足の両方）の侵害受容閾値は、侵害受容閾値すなわち足圧閾値を g で評価して、約 100 ~ 150 であった。

【0017】

A T P (0 . 9 m m o l e) (細胞外 A T P は細胞溶解性で、したがって侵害受容信号を開始することができると考えられる) の足底内注入により、炎症足では 6 5 \pm 4 . 2 から 5 0 \pm 4 . 1 への低下が見られたのに比べて、非炎症足では炎症足よりも侵害受容閾値の有意に大幅な低下が引き起こされた (非炎症足で、1 2 0 \pm 3 . 2 から A T P の足底内注入の 2 4 0 分後に見られた 2 5 \pm 3 . 0 なる値) 。この結果はおそらく、細胞溶解性 A T P は非炎症足に比べて炎症足にはすでに大量に存在することを示している。他方、o A T P は、非炎症足においても、侵害受容閾値を短時間高めるのに有効で、最低 o A T P 濃度 (= 5 6 μ M) ですでに有効であった。非炎症足の用量 / 作用曲線は実際、異なる濃度の分子を用いて重ね合わせ可能であった (o A T P 投与後 1 2 0 分まで) 。o A T P 鎮痛効果が、内因性 β -エンドルフィンを産生することができる炎症細胞の活性化に多少なりとも関係しているかどうかを確認するために、一部のラットにフコイジン (1 0 m g / k g) を静脈内注入した。フコイジンは実際、白血球漏出およびそれらの炎症部位への蓄積を阻害する。フコイジンによる前処置を、ラットの片足に F C A を注入する 3 0 分前に、両足に行った。疼痛圧閾値 (P P T) を、o A T P 注入 (2 2 4 μ m) の前後に非炎症足および炎症足の両方で測定した。得られた結果を図 1 のグラフに示す。o A T P を注入しても、非炎症足の P P T 値が有意に変わることはなかったが、炎症足では、炎症誘発性 F C A の注入によって有意に低下した P P T レベルが o A T P 処置により回復した。したがって、o A T P 鎮痛効果は、白血球動員とは無関係であった。

30

40

【0018】

最後に、o A T P 抗侵害受容効果を、公知の抗炎症および鎮痛薬であるジクロフェナクと比較した。基準疼痛閾値を評価した後、ラット後足片側炎症を F C A 注入により誘導した。注入の 3 時間後、ラットを 2 群に分け、一方は o A T P (3 3 6 μ M) 、他方はジクロフェナク (1 5 m g) で局所処置を行った。o A T P の鎮痛効果はジクロフェナクの効果よりも有意に高かった (代表的試験の結果を図 2 に示す) 。o A T P およびジクロフ

50

エナクの濃度は、ラットに足底内注入する前に、分子が滅菌食塩水に十分溶解できるように選択した。

【0019】

最後に、ラットに α ATP を静脈内注入すると、試験した足底内用量で、反射はまだ明らかに存在していたが、約 2 時間の用量依存的な疼痛軽減が誘導された。

【0020】

ATP 含有量を、 α ATP 処置ラットの足および対照側未処置の足で評価した。足の皮下組織を炎症足および非炎症足の両方から摘出し、液体窒素中で速やかに凍結した。凍結組織試料を秤量し、リン酸緩衝液中でホモジナイズし、次いで K_2CO_3 で処理して中和し、最後に遠心分離した。発光法に従い、上清を ATP アッセイに用いた。

10

【0021】

ATP 値は α ATP 処置した足よりも未処置の足のホモジネートで有意に高かった（未処置ラットの新鮮組織 1 g あたり $1050 \pm 90 \text{ nmol/l}$ に対し、 α ATP 処置ラットの新鮮組織 1 g あたり $320 \pm 22 \text{ nmol/l}$ - 値はそれぞれ 7 つの実験の平均 \pm S.E.M.）。これは、 α ATP がある組織構造による外因性 ATP の産生を、その膜受容体に結合して阻止し、それにより外因性 ATP によって引き起こされる損傷を低減することを示している。

【0022】

実施例 2： α ATP 処置後の末梢皮下組織における ATP 含有量の変化

- ラットの足における ATP 含有量アッセイ

20

発明者らは、別のラット群で、炎症プロセスおよび/または α ATP 処置により足底内組織において誘導された ATP 含有量の変化を調べた。設定された時間に、足の皮下組織を摘出し、いかなる代謝活性も阻止するために、液体窒素中で速やかに凍結した。凍結組織を氷冷した 6% (w/v) $HClO_4$ 中、ポリトロン (Kinematica GmbH、Luzern、スイス) でホモジナイズし、ヌクレオチドを抽出した。以前に記載されている方法 (Marni et al., Transplantation (1988)、46:830~835) に従い、ホモジネートを遠心分離し、上清を ATP の定量のために用いた。ATP アッセイを発光法 (Ferrero et al., Res Commun Chem Path Pharmacol 1984; 45:55~67) により実施した。

30

【0023】

- 結果

発明者らは、 α ATP で処置した炎症足（24 時間の FCA 処置による）および非炎症足で、 α ATP 投与の 6 および 12 時間後、ならびに対照側未処置の足で ATP レベルを測定した。図 3 に示すとおり、非炎症組織において、 α ATP 処置は ATP レベルを有意に変化させることはなかった。データは代謝物の細胞内レベルを表していると考えられ、これは α ATP 処置によって有意に変化することはない。これとは対照的に、炎症組織の ATP レベルは非炎症組織よりも有意に高く、 α ATP 処置によって有意に低下した。実際、細胞からの ATP 放出（細胞外 ATP）は、細胞の損傷を必要とし、炎症または他の変性プロセス中に起こる。 α ATP と、多くの細胞および知覚神経末端上に局在する受容体との結合は、細胞外 ATP と同じ構造との結合を競合的に阻害するため、ATP に関係する細胞毒性を制限し、疼痛の軽減を引き起こすと考えられる。発明者らの結果より、炎症組織における α ATP 処置は、炎症または他の細胞により、おそらくはそれらの活性化の阻止を通じて、ATP のさらなる産生を制限することも明らかにされている。

40

【0024】

図 3：炎症または非炎症足の ATP レベルに対する α ATP 足底内注入の効果 ラットの足に α ATP ($35 \mu M$) を足底内注入した後、6 および 12 時間の時点の ATP 含有量：炎症（24 FCA 投与による）（黒）、炎症 - α ATP 処置（斜線）、非炎症（白）、非炎症 - α ATP 処置（横線）。* 炎症未処置の足と比較して $p < 0.005$ 、ウィルコクソン検定。データは 7 つの実験の平均 \pm S.E.M. で表している。

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】

A T P 注入の前後における非炎症足及び炎症足の疼痛圧閾値の結果を示す。

【図 2】

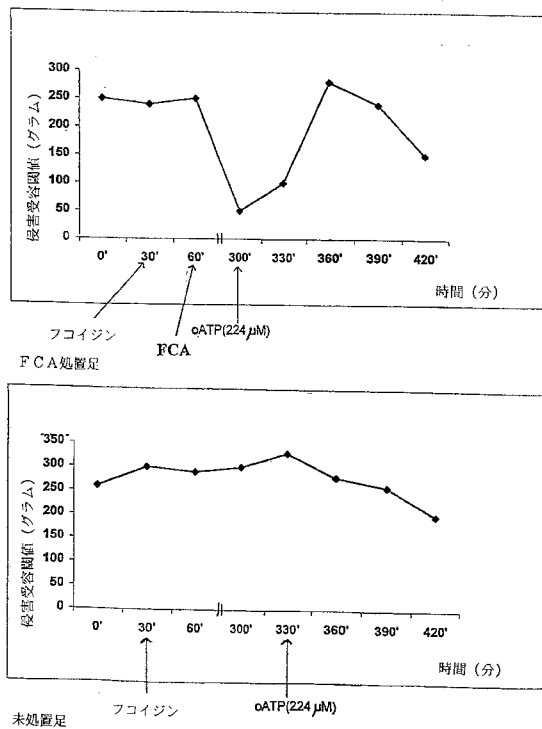
o A T P 抗侵害受容効果をジクロフェナクと比較した結果を示す。

【図 3】

炎症または非炎症足の A T P レベルに対する o A T P 足底内注入の効果を示す。

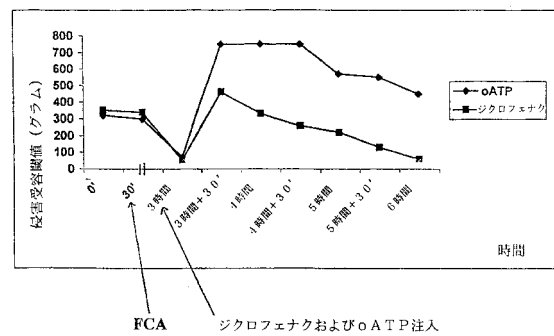
【図 1】

Figure 1



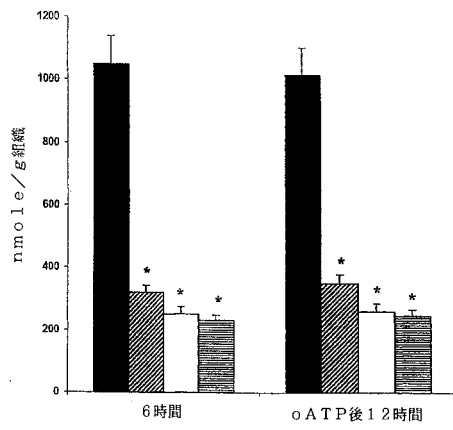
【図 2】

Figure 2



【 図 3 】

Figure 3



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/11737 A2(51) International Patent Classification: **A61K 31/7076**,
A61P 29/00

(21) International Application Number: PCT/EP01/08643

(22) International Filing Date: 26 July 2001 (26.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
MI2000A001827 4 August 2000 (04.08.2000) IT(71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO** [IT/IT]; Via Festa del Perdono, 7, I-20122 Milano (IT).

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

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

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **FERRERO, Maria, Elena** [IT/IT]; Via Festa del Perdono, 7, I-20122 Milano (IT).(74) Agents: **MINOJA, Fabrizio** et al.; Bianchetti Bracco Minoja S.r.l., Via Rossini, 8, I-20122 Milano (IT).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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



WO 02/11737 A2

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY MEDICAMENT

(57) Abstract: The use of adenosine-5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde (oATP) as a medicament useful for the treatment of inflammatory conditions is disclosed.

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

ANTI-INFLAMMATORY MEDICAMENT

The present invention relates to the use of adenosine-5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde (oATP) in the preparation of medicaments useful for the treatment of inflammatory conditions.

- 5 The oATP molecule derives from ATP by oxidation of the hydroxyls present at the ribose 2'- and 3' positions to dialdehydes. Such an oxidation can be carried out with a periodic acid salt, as described in P. N. Lowe et al., "Preparation and chemical properties of periodate-oxidized adenosine triphosphate and some related compounds", Biochemical Society Transactions, Vol. 7:1131-1133, 1979.
- 10 ATP 2',3'-dialdehyde derivative is traditionally used as affinity marker for enzymatic nucleotidic sites (Easterbrook-Smith, B., Wallace, J.C. & Keech, D.B. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 125-130), because it is capable of reacting with the lysine unprotonated residues present in the nucleotidic sites to form Schiff bases or dihydromorpholino derivatives (Colman, R.F. (1990) in The
- 15 Enzymes - Sigman, D. S., and Boyer, P.D., eds - Vol 19, pp. 283-323, Academic Press, San Diego). The oATP molecule has also been used to study platelet activation and inhibit stimulation of chicken skeletal muscle by ATP (Pearce, P.H., Wright, J.M. Egan. C.M. & Scrutton, M.C. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 543-554; Thomas, S.A., Zawisa, M. J., Lin, X. & Hume, R.I.
- 20 (1991) Br. J. Pharmacol. 103, 1963-1969). Furthermore, studies on macrophage cell lines proved that oATP is able to block the plasmatic membrane permeabilisation effect induced by ATP, to reduce the hydrolysis level of exogenous ATP by membrane ecto-ATPases and to inhibit the swelling, vacuolisation and cellular lysis effects induced by ATP (Murgia et al. The
- 25 Journal of Biological Chemistry, (1993) by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, inc., Vol. 268, No. 11, pp 8199). oATP

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

2

has been suggested to have antagonistic activity on P2z/P2X7 purinoceptors. IL-1 β (interleukin 1 β) LPS (= lipopolysaccharide) – dependant release from microglial cells expressing P2z/P2X7 is in fact selectively inhibited by oATP (Ferrari D. et al., J. Exp. Med., (1997) Vol. 185, N. 3, Pag. 579-582).

5 It has now been found that oATP exerts *in vivo* remarkable anti-inflammatory and antinociceptive effects. As experimental model, a unilateral inflammation in rat hind paw, after intraplantar injection of Freund's complete adjuvant (FCA), has been used. The controlateral paw of treated animals, as well as that of untreated animals, were used as controls. Inflammation induced
10 by FCA was evidenced, from 3 h until 24-48 h following injection, by increase in paw volume, hyperthermia and hyperalgesia. The latter was evaluated by an algesyometric test (paw pressure test) capable of evaluating the nociceptive threshold. Intraplantar injection of oATP significantly reduced pain sensing (nociception), i.e. it increased nociceptive threshold. Different doses of oATP
15 always induced a significant, dose-dependent analgesic effect, lasting approximately 12-24 hours, with an effect peak already one hour after the administration. Furthermore, paws of oATP-treated rats showed reduction of the other inflammatory signs (swelling and hyperthermia). In a further test, comparison between oATP and diclofenac, a known anti-inflammatory drug
20 used in arthritic pathologies, proved that oATP induces a significantly higher analgesic effect than diclofenac. A test in which rats were pre-treated with fucoidin, a leukocyte diapedesis inhibitor, showed that oATP activity is independent of leukocyte recruitment at the inflammation site. ATP levels at the inflammation sites were significantly higher in untreated animals, which
25 suggests that oATP may somewhat block exogenous ATP production, thus preventing its pro-inflammatory activity.

The present invention relates to the use of oATP as medicament for the treatment of inflammatory and pain conditions. The invention further relates to

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

3

pharmaceutical compositions containing oATP as active ingredient, together with pharmaceutically acceptable excipients. Suitable forms for the oral, topical or parenteral administrations are, for example, tablets, sugar coated pills, capsules, granulates, powders, suppositories, syrups, solutions, suspensions, creams, ointments, gels, pastes, lotions, emulsions, spray. The pharmaceutical compositions can be prepared according to what described in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., NY, USA, XVII Ed. The amount of active ingredient per unitary dosage may range from 0.05 to 100 mg per Kg body weight, to be administered once or more times daily, depending on the severity of the disease to be treated and the conditions of the patient. The daily dosage will usually range from 1 to 300 mg, preferably from 10 to 100 mg.

The compound of the invention may also be used in combination with other currently used anti-inflammatory drugs.

The following example further illustrates the invention.

Example 1: oATP pharmacological activity

Induction of inflammation in rats

Male Fischer inbred rats (Charles River Italy, Calco, Lecco, Italy) weighing about 250 g were used. Rats, under brief isoflurane anaesthesia received an intraplantar injection of Freund's complete adjuvant (FCA) (0.15 ml) into the right hind paw. This injection induced a unilateral inflammation (from 3 h until 24-48 h following injection) evidenced by increase in paw volume, hyperthermia and hyperalgesia. Hyperalgesia was assessed by an algesymetric test, using an analgesyometer (Ugo Basile, Comerio, Italy) to determine the paw pressure threshold, expressed in grams, namely the pressure required to elicit paw withdrawal, which indicates the nociceptive threshold value. 6 to 8 rats were used for each test. During these trials, animals were treated according to the "standard ethical guidelines" (NIH, 1985).

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

4

Treatment with oATP

Rat inflamed paw received, 24 hrs after FCA injection, intraplantar injection of different doses of oATP (56 to 336 μ M), considering time 0 the moment of oATP injection. The nociceptive threshold values obtained are reported in the following Table 1.

TABLE 1

NOCICEPTIVE THRESHOLD OR "PAW PRESSURE THRESHOLD"

	OATP 56 μ M	112 μ M	224 μ M	336 μ M
0'	60 \pm 1.6	65 \pm 2.0	50 \pm 1.5	60 \pm 1.9
30'	120 \pm 2.1*	140 \pm 3.5*	350 \pm 5.4*	300 \pm 3.4*
60'	190 \pm 2.3*	180 \pm 4.2*	400 \pm 10.3*	=> 750 *1
90'	85 \pm 2.5*	150 \pm 3.8*	300 \pm 11.2*	=> 750 *2
120'	75 \pm 1.8*	100 \pm 3.0*	185 \pm 7.1*	600 \pm 20.8*
240'	75 \pm 2.6*	105 \pm 4.3*	180 \pm 8.9*	550 \pm 18.4*

*1.2 = cut off

Data are expressed as mean \pm S.E.M. of paw pressure threshold (evaluated in g) $p < 0.05$ vs. time 0' (untreated inflamed paw)

* Mann-Whitney test.

Similar results were obtained using oATP 35 μ m in place of oATP 56 μ m or inducing the inflammatory process (FCA injection) for 6 or 12 h instead of 24 h. Furthermore, oATP treated paws were less painful and also showed reduction of inflammatory signs (swelling, hyperthermia) compared with untreated paws.

A dose-dependent effect of oATP was evidenced, although already significantly high effects were attained at the minimal dose used. Lower doses had however a less lasting analgesic effect in time, possibly due to incomplete saturation of P2X7 receptors.

The effect of the maximal oATP dose used was tested in a further set of experiments, for more prolonged times, on rat paws in which the inflammatory

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

5

process had been induced 48 hrs before (table 2). The data prove that oATP injection significantly increases nociceptive threshold values for an exceedingly long time, although progressively decreasing in time.

TABLE 2

5	<u>NOCICEPTIVE THRESHOLD OR "PAW PRESSURE THRESHOLD"</u>	
		OATP336 μ M.
10	0'	55 \pm 2.0
	30'	210 \pm 10.7
	60'	360 \pm 25.8
	90'	395 \pm 30.2
	120'	450 \pm 38.1
	180'	550 \pm 45.9
15	240'	690 \pm 56.6
	12 hours	400 \pm 29.7
	24 hours	210 \pm 7.2
	26 hours	190 \pm 3.3

The nociceptive threshold values of the control paws (both noninflamed controlateral and untreated paws) were approximately 100-150, expressed as nociceptive threshold or paw pressure threshold and evaluated in g.

20 Intraplantar injection of ATP (0.9 mmoles) (extracellular ATP is cytolytic and therefore possibly able to initiate a nociceptive signal) induced reduction of nociceptive threshold significantly higher in noninflamed paws than in inflamed paws (values of 120 ± 3.2 to 25 ± 3.0 found in noninflamed paws, 240' after intraplantar injection of ATP) in comparison with a decrease
 25 from 65 ± 4.2 to 50 ± 4.1 in inflamed paws. This result possibly indicates that cytolytic ATP is already present in higher amounts in inflamed paws than in noninflamed ones. On the other hand, oATP was effective in increasing nociceptive threshold, for a short time, also in noninflamed paws, being already effective at the lowest oATP concentration ($=56 \mu$ M). Dose/effect curves in
 30 noninflamed paws were in fact superimposable (until 120' after oATP administration) using different concentrations of the molecule. In order to

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

6

ascertain whether oATP analgesic effect was somewhat related to the activation of inflammatory cells able to produce endogenous β -endorphins, some rats were intravenously injected with fucoidin (10 mg/kg). Fucoidin in fact inhibits leukocyte diapedesis and their accumulation at the inflammation site. Pre-treatment with fucoidin was carried out in both paws, 30' before FCA injection in one of the rat paws. Pain pressure threshold (PPT) was measured in both noninflamed and inflamed paws, before and after oATP injection (224 μ M). The obtained results are reported in the graphics of Figure 1. oATP injection did not significantly change PPT values in noninflamed paws, while in inflamed paws oATP treatment restored PPT levels which had been severely reduced by the injection of pro-inflammatory FCA. oATP analgesic effect was therefore independent of leukocyte recruitment.

Finally, oATP antinociceptive efficacy was compared with that of a known anti-inflammatory and analgesic drug, diclofenac. After evaluation of the basal pain threshold, unilateral inflammation of the hind paw of rats was induced by FCA injection. 3 Hours after the injection, animals were divided in 2 groups, which were treated locally one with oATP (336 μ M) and the other with diclofenac (15 mg). oATP analgesic efficacy was significantly higher than that of diclofenac (results of a typical trial are reported in Figure 2). oATP and diclofenac concentrations were selected as to allow good dissolution of the molecule in sterile saline, before the intraplantar injection in rats.

Finally, intravenous injection of oATP in rats, at the tested intraplantar doses, induced dose-dependent pain relief for approximately two hours, although reflex were apparently still present.

ATP content was assessed in oATP treated rat paws and controlateral untreated ones. Paw subcutaneous tissues were removed from both inflamed and noninflamed paws and rapidly frozen in liquid nitrogen. The frozen tissue samples were weighed, homogenised in phosphate buffer, then treated with

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

7

K₂CO₃ and neutralised, finally centrifuged. The supernatant was used for ATP assay, following the luminescence method.

ATP values were significantly higher in homogenates from untreated paws than in oATP treated paws (1050±90 nmoles/g fresh tissue in untreated animals, vs. 320±22 nmoles/g fresh tissue in oATP treated animals – each value is the mean ± S.E.M. of 7 experiments). This indicates that oATP blocks the production of exogenous ATP by some tissular structure, binding to its membrane receptors, thereby reducing the damage induced by exogenous ATP.

Example 2: modification of ATP content in peripheral subcutaneous tissues following oATP treatment.

- Assay of ATP content in rat paw.

We determined in a separate group of rats the modifications in ATP content induced in the plantar tissue by the inflammatory process and/or by oATP treatment. At established times, paw subcutaneous tissues were removed and rapidly frozen in liquid nitrogen, with the aim of blocking any metabolic activity. The frozen tissue was homogenized with a polytron (Kinematica GmbH, Luzern, Switzerland) in ice-cold 6% (w/v) HClO₄ to extract nucleotides. The homogenate was centrifuged and the supernatant was used for ATP determination, following the procedure previously described (Marni et al., Transplantation (1988), 46: 830-835). ATP assay was performed by luminescence method (Ferrero et al., Res Commun Chem Path Pharmac 1984; 45: 55-67).

- Results

We measured ATP levels, in inflamed (by 24 h FCA treatment) and noninflamed paws treated with oATP, at 6 and 12 h following oATP administration, and in controlateral untreated paws. As reported in figure 3, in noninflamed tissues oATP treatment did not significantly change ATP levels: the data could express the intracellular levels of the metabolite, which is not

WO 02/11737

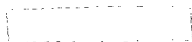
PCT/EP01/08643

8

significantly modified by oATP treatment. On the contrary, the levels of ATP in inflamed tissues, significantly higher than in non inflamed tissues, were significantly reduced by oATP treatment. In fact the release of ATP (extracellular ATP) from cells requires their damage and occurs during inflammatory or other degenerative processes. The binding of oATP with the receptors localized on many cells and also on sensory nerve terminals could competitively block the binding of extracellular ATP to the same structures, so limiting ATP-related cytotoxicity and inducing pain relief. Our results indicate also that oATP treatment in inflamed tissues limits further production of ATP by inflammatory or other cells possibly through a block of their activation.

Figure 3: Effect of oATP intraplantar injection on ATP levels of inflamed or noninflamed paws.

ATP content, at 6 and 12 h following intraplantar oATP (35 μ M) injection in rat paws: inflamed (by 24 FCA administration) (filled bars), inflamed-oATP treated (hatched bars), noninflamed (open bars), noninflamed-oATP-treated (horizontal line bars). * $p < 0.005$ compared with inflamed untreated paws, Wilcoxon test. Data are expressed as means \pm S.E.M. of 7 experiments.



WO 02/11737

PCT/EP01/08643

9

CLAIMS

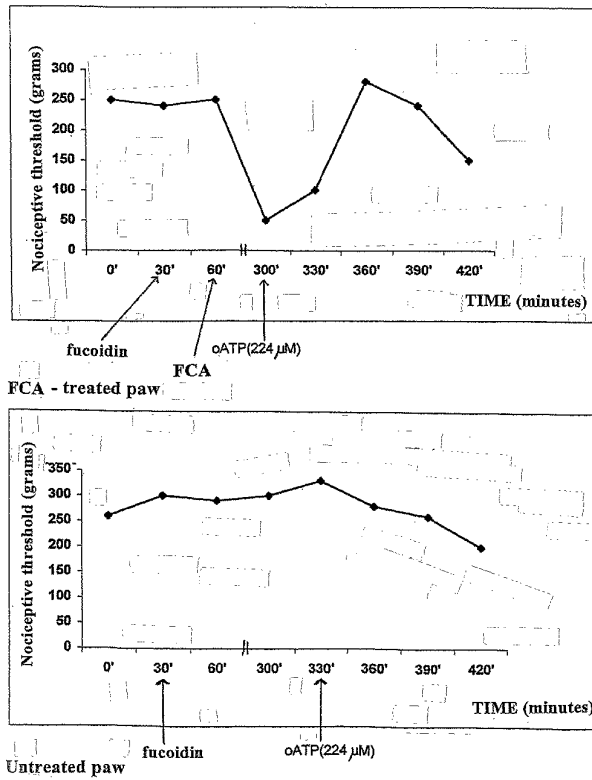
1. The compound adenosine-5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde for use as a medicament.
- 5 2. The compound of claim 1 for use in the treatment of inflammation and pain.
3. Pharmaceutical compositions containing adenosine-5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde as active ingredient.

WO 02/11737

PCT/EP01/08643

1/3

Figure 1

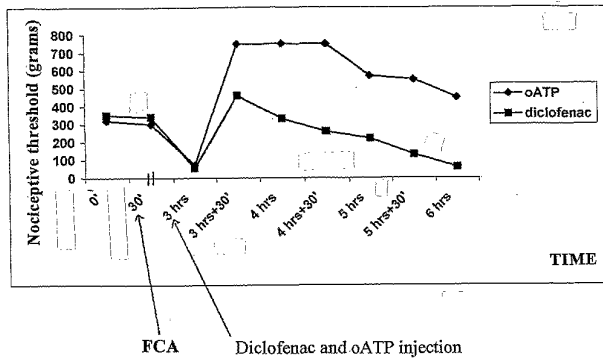


WO 02/11737

PCT/EP01/08643

2/3

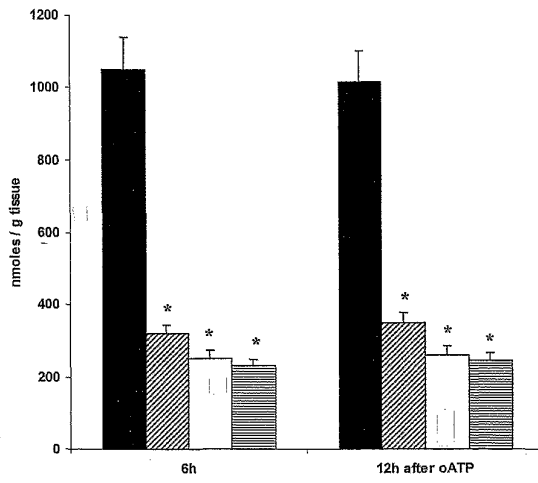
Figure 2



WO 02/11737

PCT/EP01/08643

3/3

Figure 3

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/11737 A3(51) International Patent Classification: **A61K 31/7076**,
A61P 29/00

(21) International Application Number: PCT/EP01/08643

(22) International Filing Date: 26 July 2001 (26.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: M12000A001827 4 August 2000 (04.08.2000) IT

(71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO** [IT/IT]; Via Festa del Perdono, 7, I-20122 Milano (IT).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **FERRERO, Maria, Elena** [IT/IT]; Via Festa del Perdono, 7, I-20122 Milano (IT).(74) Agents: **MINOJA, Fabrizio** et al.; Bianchetti Bracco Minoja S.r.l., Via Rossini, 8, I-20122 Milano (IT).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report: 2 May 2002

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



WO 02/11737 A3

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY MEDICAMENT

(57) Abstract: The use of adenosine-5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde (oATP) as a medicament useful for the treatment of inflammatory conditions is disclosed.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08643
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/7076 A61P29/00		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DI VIRGILIO FRANCESCO ET AL: "Purinergic P2X7 receptor: A pivotal role in inflammation and immunomodulation." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 45, no. 3-4, November 1998 (1998-11), pages 207-213, XP001056870 ISSN: 0272-4391 abstract page 210, left-hand column, paragraph 2 -page 211, right-hand column, paragraph 2 --- -/--	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 claim 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 February 2002		12/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Escolar Blasco, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 01/08643

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHULZE-LOHOFF ECKHARD ET AL: "Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 275, no. 6 PART 2, December 1998 (1998-12), pages F962-F971, XP002191118 ISSN: 0002-9513 abstract page F970, left-hand column, paragraph 4	1-3
X	HU YUN ET AL: "Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 42, 16 October 1998 (1998-10-16), pages 27170-27175, XP002191119 ISSN: 0021-9258 abstract See Discussion	1-3
X	LIU JUDY S H ET AL: "Modulation of Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes." JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 20, no. 14, 15 July 2000 (2000-07-15), pages 5292-5299, XP002191120 ISSN: 0270-6474 abstract page 5298, left-hand column, paragraph 3	1-3
X	MUTINI C ET AL: "Mouse dendritic cells express the P2X7 purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 AUG 15) 163 (4) 1958-65. , XP002191121 abstract page 1964, right-hand column, paragraph 3 -page 1965, left-hand column, paragraph 2; figure 7 --- -/--	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/08643

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOLINI ANNA ET AL: "Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 112, no. 3, February 1999 (1999-02), pages 297-305, XP002191122 ISSN: 0021-9533 abstract page 304, right-hand column, paragraph 2	1-3
X	SIKORA A ET AL: "Cutting edge: purinergic signaling regulates radical-mediated bacterial killing mechanisms in macrophages through a P2X7-independent mechanism." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1999 JUL 15) 163 (2) 558-61., XP002191123 abstract page 560, right-hand column, paragraph 3 -page 561, left-hand column, paragraph 1; figure 4	1-3
X	PIZARRO J M ET AL: "EFFECT OF NUCLEOTIDE ANALOGUES ON ROTAVIRUS TRANSCRIPTION AND REPLICATION" VIROLOGY, vol. 184, no. 2, 1991, pages 768-772, XP001061622 ISSN: 0042-6822 abstract page 772, left-hand column, line 6 - line 10; table 1 page 769, left-hand column, line 5 - line 7	1,3

フロントページの続き

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

(72)発明者 フェッレロ、 マリア、 エレナ

イタリア国 イー - 2 0 1 2 2 ミラノ ヴィア フェスタ デル ペルドーノ

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 DA38 MA01 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23
 MA28 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA59 MA60 MA63
 MA66 NA14 ZB11
 4H050 AA01 AA03 AB21 AB22