

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6668045号
(P6668045)

(45) 発行日 令和2年3月18日(2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年2月28日(2020.2.28)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/405 (2006.01)	A 6 1 K 31/405
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 K 31/454 (2006.01)	A 6 1 K 31/454
A 6 1 K 31/137 (2006.01)	A 6 1 K 31/137
A 6 1 K 31/48 (2006.01)	A 6 1 K 31/48

請求項の数 6 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-221719 (P2015-221719)	(73) 特許権者	515314845
(22) 出願日	平成27年11月12日(2015.11.12)		ゾゲニクス インターナショナル リミテッド
(65) 公開番号	特開2016-216438 (P2016-216438A)		イギリス国 パークシャー メイデンヘッド ブロードウェイ シエナ コート
(43) 公開日	平成28年12月22日(2016.12.22)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成30年6月15日(2018.6.15)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	62/162,544	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成27年5月15日(2015.5.15)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
特許法第30条第2項適用	2015年5月12日、 http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125898 を通じて発表	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドラベ症候群を処置するための選択的5-HT受容体アゴニストおよびアンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬学的に許容される担体と、

5-HT_{2B}受容体サブタイプを作動させない5-HT受容体アゴニストと

を含む、ドラベ症候群を有する患者における発作を低減するための製剤であって、前記5-HT受容体アゴニストが、

3-[3-(2-ジメチルアミノエチル)-1H-インドール-5-イル]-N-(4-メトキシベンジル)アクリルアミド、

1H-インドール-5-オール、3-(1-メチル-4-ピペリジニル)-、

(4-プロモ-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル)メチルアミン臭化水素酸塩、

(6aR,9R)-N-((2R,5S,10aS,10bS)-5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオキソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ[3,2-a]ピロロ[2,1-c]ピラジン-2-イル)-7-メチル-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ[4,3-fg]キノリン-9-カルボキサミド、

(2S)-(+)-5-(1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル)-2-(ジメチルアミノ)テトラリン、および

それらの塩

からなる群より選択される、前記製剤。

【請求項2】

前記5-HT受容体アゴニストが、

3-[3-(2-ジメチルアミノエチル)-1H-インドール-5-イル]-N-(4-メトキシベンジル)アクリルアミド、

10

20

リルアミド、およびその塩である、請求項1記載の製剤。

【請求項3】

前記5-HT受容体アゴニストが、1H-インドール-5-オール、3-(1-メチル-4-ピペリジニル)-、およびその塩である、請求項1記載の製剤。

【請求項4】

前記5-HT受容体アゴニストが、(4-ブromo-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル)メチルアミン臭化水素酸塩、およびその塩である、請求項1記載の製剤。

【請求項5】

前記5-HT受容体アゴニストが、(6aR,9R)-N-((2R,5S,10aS,10bS)-5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオキソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ[3,2-a]ピロロ[2,1-c]ピラジン-2-イル)-7-メチル-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ[4,3-fg]キノリン-9-カルボキサミド、およびその塩である、請求項1記載の製剤。

10

【請求項6】

前記5-HT受容体アゴニストが、(2S)-(+)-5-(1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル)-2-(ジメチルアミノ)テトラリン、およびその塩である、請求項1記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、てんかんおよびドラベ症候群に起因する発作および関連機能障害を防止するための製剤および方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

てんかんは、反復発作を起こしやすいことを特徴とする脳の状態である。てんかんには数多くの原因があり、例えば分娩時外傷、周産期感染、無酸素、感染性疾患、毒素の摂取、脳の腫瘍、遺伝性障害または変性疾患、頭部傷害または頭部外傷、代謝障害、脳血管障害およびアルコール離脱が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0003】

てんかんのサブタイプは数多く特徴づけられている。例えば、次に挙げる状態のリストは非特許文献1に記載されている。

【0004】

30

I. 特発性てんかん症候群（焦点性または全般的）

A. 良性新生児けいれん

1. 家族性
2. 非家族性

B. 良性小児てんかん

1. 中心・中側頭部棘波を示すもの
2. 後頭部棘波を示すもの

C. 小児/若年欠伸てんかん

D. 若年ミオクロニーてんかん（覚醒時全般的強直間代発作を含む）

E. 上記以外の特発性てんかん

40

II. 症候性てんかん症候群（焦点性または全般的）

A. ウェスト症候群（乳児スパズム）

B. レノックス・ガストー症候群

C. 早期ミオクロニー脳症

D. 持続性部分てんかん

1. ラスムッセン症候群（脳炎型）
2. 制限型

E. 後天性てんかん性失語（ランドー・クレフナー症候群）

F. 側頭葉てんかん

G. 前頭葉てんかん

50

H. 外傷後てんかん

I. その他の症候性焦点性または全般性てんかん

III. 分類不明または複数の分類にわたる他のてんかん症候群

A. 新生児発作

B. 熱性発作

C. 反射てんかん

D. その他

【0005】

例えば上記リストのパートIIIからわかるように、てんかんにはまだ十分に特徴づけられていないサブタイプが依然として存在するので、上記のリストは決して完全ではない。

10

【0006】

てんかんのこれらのサブタイプが、異なる刺激によって引き金を引かれ、異なる生物学的経路によって制御され、遺伝的であれ環境的であれ、異なる原因を有することは、当業者にはわかるであろう。言い換えると、あるてんかんサブタイプに関する教訓が他のサブタイプには必ずしも当てはまらないことは、当業者にはわかるであろう。具体的に述べると、異なるてんかんサブタイプは、異なる抗けいれん薬に対して異なる応答を示す。

【0007】

ドラベ症候群は乳児期に始まる稀少難病型の難治性てんかんである。最初に、患者は遷延性発作を起こす。2年目には、他のタイプの発作も起こり始め、典型的には、これと同時に、頻回の脳低酸素によると思われる発育停滞が起こる。これが言語技能および運動技能の発達不良につながる。

20

【0008】

ドラベ症候群を有する小児は、1日に何度も発作を起こす可能性がある。ドラベ症候群の罹患者ではてんかん発作が死をもたらす可能性はるかに高く、ドラベ症候群と診断された患者の約10～15%は小児期、特に2歳～4歳の間に死亡する。加えて、患者には、整形外科的発育問題、成長障害および慢性感染を含む数多くの関連状態のリスクがある。

【0009】

特に懸念されるのは、ドラベ症候群を有する小児が、てんかん重積状態のエピソードをとりわけ起こしやすいことである。この重症・難治性の状態は、典型的には入院加療を伴う即時医療介入を必要とする医学的緊急事態と分類される。てんかん重積状態は命にかかわる場合もある。また、脳組織の損傷につながりうる脳低酸素とも関連付けることができる。ドラベ症候群を有する小児の頻繁な入院加療は、患者だけでなく家族および介護者にとっても、明らかに苦痛である。

30

【0010】

ドラベ症候群患者の治療費も高い。罹患小児は常時看護を必要とし、ティーンエイジに達すると、多くの患者は施設収容が必要になるからである。

【0011】

現在、ドラベ症候群を有する患者における発作の事例を低減するためにいくつかの抗けいれん療法を使用することはできるが、それらの治療法で得られる結果は典型的には不十分であり、それらの治療法はせいぜい発作の部分的停止に影響を及ぼすにすぎない。ドラベ症候群に関連する発作は、典型的には、従来の処置に対して抵抗性である。さらに、クロバザムやクロナゼパムなどの多くの抗けいれん薬は望ましくない副作用を有し、それが小児患者ではとりわけ激烈である。

40

【0012】

スチリペントールはドラベ症候群の処置に欧州では承認されているが、米国では承認されていない。これは、それ自体が抗けいれん活性を呈するのではなく、他の抗けいれん薬の代謝を阻害し、その結果、それらの活性を長引かせることによって作用する。しかし、スチリペントールの使用については、肝シトクロムP450に対するその阻害効果ゆえに、懸念が残る。さらに、ドラベ患者は数多くの異なる医薬を服用していることが多いので、スチリペントールと多数の薬物との相互作用は、ドラベ症候群の処置におけるその使用には

50

問題が多いことを意味する。スチリペントールの使用は、それをバルプロエートおよびクロバザムと共に補助療法として使用することしかできないという事実によって、さらに制約される。

【0013】

ドラベ症候群の主要な遺伝的原因としてニューロン特異的電位作動性ナトリウムチャネルのアルファ-サブユニット（SCN1a）における変異が2001年に発見されたことは、当技術分野において公知である（非特許文献2、非特許文献3）。非特許文献3によれば、「近年、特にその主要な遺伝的原因であるSCN1A遺伝子における変異の発見後は、診断が増加している」。

【0014】

これらの遺伝子変異の検出は、他の形態のてんかんとは異なる方法でドラベ症候群の診断を確認するために使用されている。このように、ドラベ症候群の原因は、他の形態のてんかんと比べて著しく異なっている。

【0015】

さらに、ドラベ症候群の症候と診断は、他の形態のてんかんとは著しく異なる。非特許文献2は、ドラベ症候群は「.....1歳未満での強直間代発作の出現、その後のミオクロニー発作および運動失調の発生、発作の発症に続く精神運動発達障害、および抗てんかん薬に対する応答不良」によって、他の形態のてんかんと鑑別することができると述べている。

【0016】

非特許文献3は次のように述べて、これをさらに裏付けている。「ドラベ症候群は、典型的には、既存の発育上の問題がなかった小児において、1歳未満で遷延性、熱性および無熱性、全般性間代または片側性間代てんかん発作を呈する。ミオクロニー発作、焦点性発作および非定型欠神発作を含む他の発作タイプが、1歳から4歳までの間に現れる（Dravet, 1978）」。

【0017】

このように、ドラベ症候群の症候と診断は、他の形態のてんかんとは著しく相違する。何か特定の化合物がドラベ症候群において有効であるだろうということを、当業者は自明だとは思わないだろうし、当然のこととも考えないであろう。

【0018】

さらにまた、前掲の非特許文献2からの抜粋で述べられているように、本発明以前は、ドラベ症候群はあらゆる既存のてんかん薬による処置に対して不応性であり、避けることのできない永続的障害につながると考えられていた。非特許文献2は次のようにも述べている。「ほとんどの場合、親はこれらの恐ろしい突然のけいれんを見て狼狽し、自分の子どもが死にかけているという第一印象を抱く。そこで彼らは、担当医が発作を管理する最も近い救急科に駆けつけることになるが、発作は持続性かつ薬物抵抗性であり、発作を止めるには通常より高用量のベンゾジアゼピンを必要とする（強調部分は引用者による）」。

【0019】

非特許文献3は次のように述べて、これをさらに裏付けている。「このてんかんは通常、標準的な抗てんかん薬物療法には不応性であり（強調部分は引用者による）、患児は、2歳から、認知障害、行動障害および運動障害をもたらすてんかん性脳症を発症する」。

【0020】

実際、本発明以前に、現行のてんかん薬を用いる追加薬物処置では、患者の20～30%でしか発作頻度の50%減少が起こらず、無発作になるのは5%未満であることが見いだされていた。非特許文献2も、ドラベ症候群患者が無発作になると期待することに対して、次のように警告している。「自分の子どもが無発作になってほしいと親が願うことは理解できるが、著しく薬物抵抗性であるこの症候群では、それが十中八九、達成不可能な目標であることを、彼らは知るべきである（強調部分は引用者による）」（21頁第1欄）。

【0021】

さまざまな形態のてんかんの処置に使用されてきた多種多様な薬物がある。以下のリストは網羅的ではないが、てんかんと診断された患者に広く処方されている薬物が含まれていると考えられる。

- Carbatrol、Epitol、Equetro、TEGretol（カルバマゼピン）
- Gabitril（チアガビン）
- Keppra（レベチラセタム）
- LaMictal（ラモトリギン）
- Lyrica（プレガバリン）
- Gralise、Horizant、Neurontin、Gabarone（ガバペンチン）
- Dilantin、Prompt、Di-Phen、Epanutin、Phenytek（フェニトイン） 10
- Topamax、Qudexy XR、Trokendi XR、Topiragen（トピラマート）
- Trileptal、Oxtellar（オキシカルバゼピン）
- Depacon、Depakene、Depakote、Stavzor（バルプロエート、バルプロ酸）
- Zonegran（ゾニサミド）
- Fycompa（ペランパネル）
- Aptiom（エスリカルバゼピン塩酸塩）
- Vimpat（ラコサミド）
- Sabril（ビガバトリン）
- Banzel、Inovelon（ルフィナミド）
- Cerebyx（フォスフェニトイン） 20
- Zarontin（エトスクシミド）
- Solfoton、Luminal（フェノバルビタール）
- Valium、Diastat（ジアゼパム）
- Ativan（ロラゼパム）
- Lonopin、Klonopin（クロナゼパム）
- Frisium、Onfi（クロバザム）
- Potiga（エゾガビン）
- Felbatol（フェルバメート）
- Mysoline（プリミドン）

【0022】 30

てんかんの処置に使用される薬物の種類は非常に多く、上に示したとおり、ドラベ症候群は薬物抵抗性であると考えられていたので、ドラベ症候群を処置するための特定薬物の使用は明らかに非自明な発明である。

【0023】

加えて、てんかんの処置に広く使用されている一定種類の薬物、すなわちカルバマゼピン、オキシカルバゼピン、ラモトリギン、ラコサミド、ルフィナミド、フェニトイン、およびフォスフェニトインを含むナトリウムチャンネル遮断薬は、ドラベ症候群では禁忌であることがわかっている。これらの薬物は、ほとんど全てのドラベ症候群患者において、発作発生率の増大につながることがわかっている。同様に、ビガバトリンおよびチアガビンを含む選択的GABA再取り込み阻害薬/GABA T阻害薬も、ドラベ症候群では避けるべきである。 40

【0024】

ナトリウムチャンネル遮断薬は、ナトリウムチャンネルの休止、活性化および不活性化というサイクルの特定段階で、多くの場合、不活性化状態からの回復を遅延させることによって、ナトリウムチャンネルに優先的に作用し、その結果、Na⁺の累積的低減を生じさせる。

【0025】

非てんかん脳は興奮（発作を惹起することができる）と抑制（発作を低減することができる）のバランスを自然にとっている。過剰な興奮性神経伝達によって引き起こされるてんかんでは、ナトリウムチャンネル遮断薬が有益である。なぜなら、ナトリウム遮断薬は、過剰な興奮を引き起こす神経伝達物質を低減するからである。 50

【0026】

対照的に、ドラベ症候群を有する患者は、ナトリウムチャネル機能の喪失を引き起こす SCN1A 変異などの遺伝子変異を有する。ナトリウムチャネル遮断薬が発作活動を防止するように働く機序からすると、ナトリウムチャネルを無効に（本質的に遮断）するこれらの変異は、発作を妨げ、ドラベ症候群を有する人がてんかんを起こす傾向を低下させるはずだと考えられるだろう。しかしこの機能喪失は実際には発作活動の増加につながる。なぜなら、この変異の結果は、発作を起こりやすくする興奮性神経伝達物質を相殺するために通常は脳内に正しい量で存在する抑制性神経伝達物質量の減少だからである。この場合、脳における興奮と抑制のバランスの問題は、興奮が過剰なことではなく、抑制が過少なことである。ナトリウムチャネル遮断薬をドラベ症候群患者に与えると、脳内の抑制性神経伝達物質の量がさらに減少して、バランスをさらに発作活動側へと傾かせることになる。

10

【0027】

非特許文献4では、「多くのAEDには効果がなく、ミオクロニー発作に有利に働くかミオクロニー発作を誘発さえしうるカルバマゼピンやピガバトリン、およびラモトリギンなど、特に若い患者にとっては、有害作用の原因になりうる」と述べられている。

【0028】

非特許文献5では、「この症候群の同定から間もなく、症状を悪化させる化合物、すなわち患者の80%までを巻き込むラモトリギンが同定された.....;カルバマゼピンおよびピガバトリンによる悪化は60%程度である。ラモトリギン、（および）カルバマゼピン...は、発作を悪化させうるので、避けるべきである」と述べられている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0029】

【非特許文献1】Meritt's Neurology, 12th Edition

【非特許文献2】Ceulemans, Developmental Medicine & Child Neurology, 2011, 53, 19-23

【非特許文献3】Brunklaus et al., BRAIN, 2012, pages 1-8

【非特許文献4】Arzimanoglou, Epilepsia, 50(Suppl. 8):3-9, 2009

【非特許文献5】Chiron et. al., Epilepsia, 52(Suppl. 2):72-75, 2011

【発明の概要】

30

【0030】

てんかんおよび/またはドラベ症候群と関係する発作および/または関連症状を低減するための方法であって、薬学的に許容される担体と、5-HT_{2B}受容体サブタイプを認識しない5-HT受容体アゴニストを含む治療有効量の製剤を、患者に投与する工程を含む方法を開示する。

【0031】

本発明の一局面は、5-HT受容体アゴニストが、3- [3- (2-ジメチルアミノエチル) -1H-インドール-5-イル] -N- (4-メトキシベンジル) アクリルアミド、[(4-プロモ-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩、(6aR,9R) -N- ((2R,5S,10aS,10bS) -5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオキソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ [3,2-a] ピロロ [2,1-c] ピラジン-2-イル) -7-メチル-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ [4,3-fg] キノリン-9-カルボキサミド、(2S) - (+) -5- (1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル) -2- (ジメチルアミノ) テトラリン、ならびにそれらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体からなる群より選択される、本明細書に記載の処置方法である。

40

【0032】

本発明の別の局面は、5-HT受容体アゴニストがロルカセリン [(1R) -8-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン] である、本明細書に記載の処置方法である。

【0033】

50

上に示したとおり、また当業者にはわかるであろうとおり、てんかんの処置に有用であることが公知のいくつかの薬物の使用は、ドラベ症候群を有する患者の処置においては、実際には有害である。これらに鑑み、さらにまたドラベ症候群は一般に薬物による処置が可能でないという従来の知見を考慮すると、ドラベ症候群の処置に有効な化合物があれば、改善された予想外の結果が得られるであろう。

【0034】

Ceulemans et. al. (Epilepsia, 53 (7) :1131-1139, 2012) は、ドラベ症候群の処置におけるフェンフルラミンの使用を開示し、患者を0.12~0.90mg/kg/日の量のフェンフルラミンによる長期処置の対象としたところ、患者の70%が無発作であったという結果を開示している。これは、ドラベ症候群の罹患者に有効な処置選択肢を初めて提供する有用で
10
予想外の結果である。フェンフルラミンは、複数の5-HTサブタイプ受容体を活性化する強力な5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT、セロトニン) 放出薬である。現在、0.1~1.7mg/kg/日の範囲の量またはそれを上回る量のフェンフルラミンによる処置が、ドラベ症候群における発作および関連認知機能低下の低減または排除に有効であると考えられている。

【0035】

5-HT受容体は中枢神経系および末梢神経系に見いだされる一群のGタンパク質共役受容体 (GPCR) およびリガンド作動性イオンチャネル (LGIC) である。これらは興奮性神経伝達と抑制性神経伝達をどちらも媒介する。セロトニン受容体は、その天然リガンドとして作用する神経伝達物質セロトニンによって活性化される。

【0036】

5-HT受容体は、グルタミン酸、GABA、ドーパミン、エピネフリン/ノルエピネフリン、およびアセチルコリンを含む数多くの神経伝達物質、ならびにオキシトシン、プロラクチン、バソプレシン、コルチゾール、コルチコトロピン、およびサブスタンスPなどを含む数多くのホルモンの放出を調整する。それらは、攻撃、不安、食欲、認知、学習、記憶、気分、悪心、睡眠、および体温調節など、さまざまな生物学的プロセスおよび神経学的プロセスに影響を及ぼす。

【0037】

複数の5-HTサブタイプ受容体があり、そのうちの14種類がヒトで記述されていて、そのそれぞれがさまざまな器官に分布して複数の機能を有している。これらのサブタイプ受容体には、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、および5-HT₇がある。本発明以前は、これらのサブタイプ受容体のうちのどれが、ドラベ症候群において活性である可能性があるかはわかっていなかった。

【0038】

フェンフルラミンは、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}および5-HT_{2C}受容体サブタイプに対する高いアフィニティーとこれらの受容体サブタイプにおける活性を有することが知られていた (Rothman et al, 2015)。5-HT_{2C}アゴニストは食欲抑制の引き金を引くので、フェンフルラミンは、人気の減量薬Fen-Phen (フェンフルラミン/フェンテルミン) の一部として、肥満の処置に応用されていた。しかし5-HT_{2B}受容体の活性化は心臓弁肥大と関連し、この薬物誘発性弁膜症が、結果として、1997年9月にFen-Phenを市場から撤退させることになった。
40

【0039】

このように、ドラベ症候群において活性を有する1つまたは複数の5-HT受容体サブタイプに対するアフィニティーを有し、かつ他の5-HTサブタイプに関連する心臓弁肥大などの副作用を回避するために十分な特異性を有する5-HT受容体アゴニストには、まだ満たされていない医療上の必要性がある。

【0040】

てんかんを有する患者における発作を処置するための化合物および/または製剤ならびにそれらの使用方法を提供することが、本発明の目的である。

【0041】

10

20

30

40

50

ドラベ症候群を有する患者における発作を処置するための化合物および/または製剤ならびにそれらの使用方法を提供することが、本発明のさらに別の目的である。

【0042】

ドラベ症候群を含むてんかんを有する患者における発作を処置するための5-HT受容体アゴニストおよび製剤ならびにそれらの使用方法を提供することが、本発明のさらに別の目的である。

【0043】

ドラベ症候群を含むてんかんを有する患者における発作を低減するのに有効な1つまたは複数の5-HT受容体に対するアフィニティーを有する1つまたは複数の5-HT受容体アゴニストを提供することが、本発明のさらに別の目的である。

10

【0044】

副作用に関連する1つまたは複数の5-HT受容体サブタイプに対するアフィニティーを有さない、ドラベ症候群を含むてんかんを有する患者における発作を低減するのに有効な5-HT受容体アゴニストを提供することが、本発明のさらに別の目的である。

【0045】

5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、および5-HT₇のうちの1つまたは複数、好ましくは5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、および5-HT₇のうちの1つまたは複数、より好ましくは5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₇のうちの1つまたは複数、より一層好ましくは5-HT_{2A}または5-HT_{2C}のうちの1つまたは複数に対するアフィニティーを有する5-HT受容体アゴニストを提供することが、本発明のさらに別の目的である。好ましい一態様では、5-HT受容体アゴニストが5-HT_{2A}受容体サブタイプに対するアフィニティーを有し、特に好ましい一態様では、5-HT受容体アゴニストが5-HT_{2A}受容体サブタイプに対して高い特異性を有する。別の好ましい態様では、5-HT受容体アゴニストが5-HT_{2C}受容体サブタイプに対するアフィニティーを有し、特に好ましい態様では、5-HT受容体アゴニストが5-HT_{2C}受容体サブタイプに対して高い特異性を有する。

20

【0046】

潜在的に危険な副作用に関連する5-HT受容体を作動させることを避けるために、十分な特異性を有する5-HT受容体アゴニストを供給することが、本発明のさらに別の目的である。好ましくは、5-HT受容体アゴニストは、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、および5-HT₇のうちの1つまたは複数、好ましくは、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆のうちの1つまたは複数、より好ましくは5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆のうちの1つまたは複数のアゴニストではない。5-HT受容体アゴニストが5-HT_{2B}受容体サブタイプを作動させないことは、特に好ましい。

30

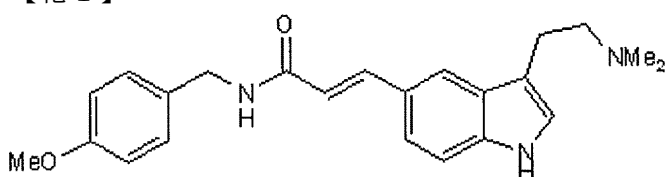
【0047】

好ましい受容体アゴニストとして、以下のアゴニストのうちの1つまたは複数が挙げられる：

GR 46611 [3- [3- (2-ジメチルアミノエチル) -1H-インドール-5-イル] -N- (4-メトキシベンジル) アクリルアミド]

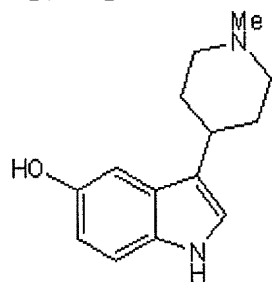
40

【化1】



BRL 54443 [1H-インドール-5-オール, 3- (1-メチル-4-ピペリジニル) -]

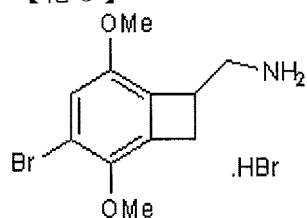
【化 2】



TCB 2 [(4-ブロモ-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩]

10

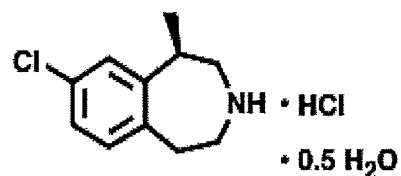
【化 3】



ロルカセリン [(1R) -8-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン]

20

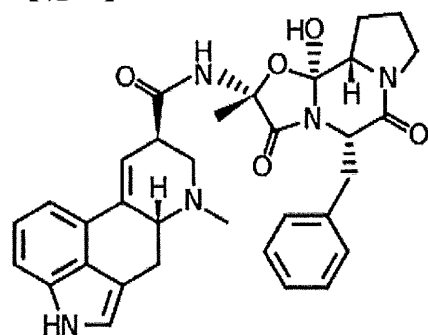
【化 4】



エルゴタミン [(6aR,9R) -N- ((2R,5S,10aS,10bS) -5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオキソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ [3,2-a] ピロロ [2,1-c] ピラジン-2-イル) -7-メチル-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ [4,3-fg] キノリン-9-カルボキサミド]

30

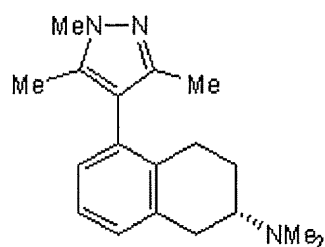
【化 5】



40

およびAS 19 [(2S) - (+) -5- (1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル) -2- (ジメチルアミノ) テトラリン]

【化 6】



50

ならびにそれらの塩、誘導体、断片、および複合体。

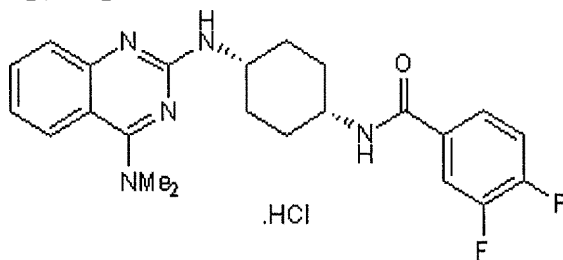
【0048】

特に好ましいのはロルカセリンである。ロルカセリンは、5-HT_{2B}受容体との比較で、5-HT_{2C}受容体に対して100倍のアフィニティーを有するからである。したがってロルカセリンは、ドラベ症候群を含むてんかんにおいてフェンフルアミンと類似する効力を有し、5-HT_{2B}受容体サブタイプに関連する弁膜症を含む心血管副作用を伴わないと予想される。

【0049】

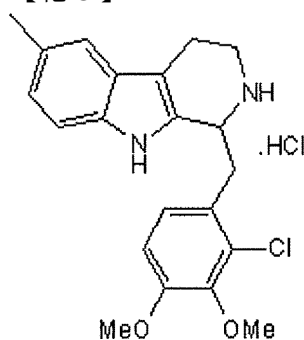
上述の5-HT受容体アゴニストを1つまたは複数の5-HT受容体サブタイプに対するアンタゴニストである1つまたは複数の5-HT受容体アンタゴニストと組み合わせて供給することが、本発明のさらに別の目的である。好ましくは、5-HT受容体サブタイプは、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、および5-HT₇のうちの1つまたは複数、好ましくは5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆のうちの1つまたは複数、より好ましくは5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆のうちの1つまたは複数である。5-HT受容体アンタゴニストが5-HT_{2B}受容体サブタイプのアンタゴニストであることは、特に好ましい。好ましい5-HT_{2B}受容体アンタゴニストとしては、ATC 0175 [N- [cis-4- [[4- (ジメチルアミノ) -2-キナゾリニル] アミノ] シクロヘキシル] -3,4-ジフルオロベンズアミド塩酸塩]

【化7】



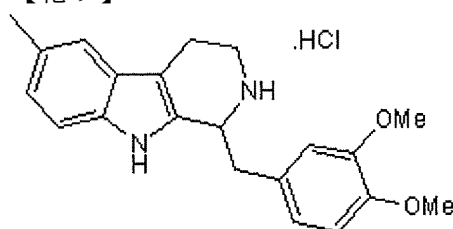
LY 266097 [1- [(2-クロロ-3,4-ジメトキシフェニル) メチル] -2,3,4,9-テトラヒドロ-6-メチル-1H-ピリド [3,4-b] インドール塩酸塩]

【化8】



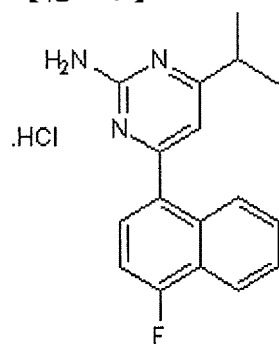
LY 272015 [1- [(3,4-ジメトキシフェニル) メチル] -2,3,4,9-テトラヒドロ-6-メチル-1H-ピリド [3,4-b] インドール塩酸塩]

【化9】



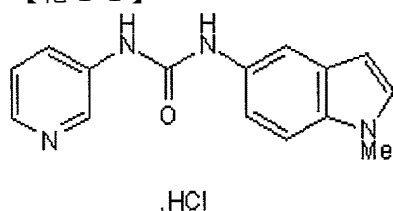
RS 127445 [4- (4-フルオロ-1-ナフタレニル) -6- (1-メチルエチル) -2-ピリミジンアミン塩酸塩]

【化 1 0】



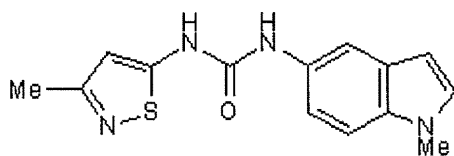
SB 200646 [N-(1-メチル-1H-インドール-5-イル)-N'-3-ピリジニルウレア]

【化 1 1】



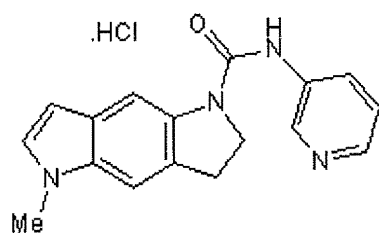
SB 204741 [N-(1-メチル-1H-インドリル-5-イル)-N'-(3-メチル-5-イソチアゾリル)ウレア]

【化 1 2】



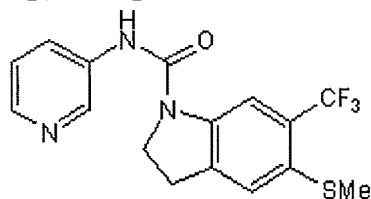
SB 206553 [3,5-ジヒドロ-5-メチル-N-3-ピリジニルベンゾ [1,2-b:4,5-b'] ジピロール-1 (2H) -カルボキサミド塩酸塩]

【化 1 3】



SB 221284 [2,3-ジヒドロ-5-(メチルチオ)-N-3-ピリジニル-6-(トリフルオロメチル)-1H-インドール-1-カルボキサミド]

【化 1 4】



SB 228357 [N-[3-フルオロ-5-(3-ピリジニル)フェニル]-2,3-ジヒドロ-5-メトキシ-6-(トリフルオロメチル)-1H-インドール-1-カルボキサミド]

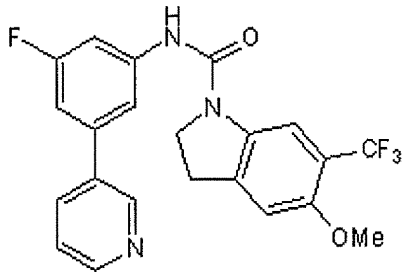
10

20

30

40

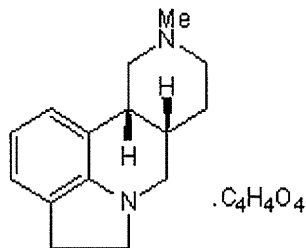
【化 1 5】



SDZ SER 082 [(+) -cis-4,5,7a,8,9,10,11,11a-オクタヒドロ-7H-10-メチルインドロ [1,7-bc] [2,6] -ナフチリジンフマル酸塩]

10

【化 1 6】



ならびにそれらの塩、誘導体、断片、および複合体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。上記5-HT受容体アゴニストのうちの1つまたは複数を、てんかんを患っている患者、好ましくはドラベ症候群を患っている患者に送達する工程を含む、てんかんの処置方法を供給することは、本発明のさらに別の目的である。

20

【 0 0 5 0 】

上記5-HT受容体アゴニストの1つまたは複数を上記5-HT受容体アンタゴニストのうちの1つまたは複数と組み合わせて、てんかんを患っている患者、好ましくはドラベ症候群を患っている患者に送達する工程を含む、てんかんの処置方法を供給することは、本発明のさらに別の目的である。

【 0 0 5 1 】

本発明が、ドラベ症候群の処置と、発作および関連する発育停滞の低減とをもたらすことは、本発明の利点である。

30

【 0 0 5 2 】

本発明が、低減した副作用および向上した安全性プロファイルで、ドラベ症候群の処置と、発作および関連する発育停滞の低減とをもたらすことは、本発明のさらに別の利点である。

【 0 0 5 3 】

本発明が、低減した副作用および向上した安全性プロファイルで、ドラベ症候群の処置と、発作および関連する発育停滞の低減とをもたらし、ここで前記副作用が、嗜癇、攻撃、食欲、血圧、心血管機能、嘔吐、心拍数、衝動性、記憶、気分、悪心、痛覚、陰茎勃起、瞳孔拡張、呼吸、性行動、睡眠、社会性、体温調節、血管収縮、学習、移動運動、片頭痛、不安、認知、想像、知覚、胃腸運動のうちの1つまたは複数に関連する副作用から選択されることは、本発明のさらに別の利点である。

40

【 0 0 5 4 】

本発明が、低減した副作用および向上した安全性プロファイルで、ドラベ症候群の処置と、発作および関連する発育停滞の低減とをもたらし、ここで前記副作用が、肺高血圧、弁膜症、心臓弁肥大、大動脈弁逆流、僧帽弁逆流、損傷（lesion）、および表面プラーク（surface plaques）から選択される心血管副作用から選択されることは、本発明のさらに別の利点である。

【 0 0 5 5 】

本発明のこれらの、そして他の目的、利点、および特徴は、より詳しく以下に説明する製剤および方法の詳細を読めば、当業者には明らかになるであろう。

50

【0056】

より具体的に述べると本発明は以下を提供する：

[1]

てんかんの一形態を有する患者における発作を低減する際の、
薬学的に許容される担体と、
5-HT_{2B}受容体サブタイプを作動させない5-HT受容体アゴニストと
を含む製剤の使用；

[2]

てんかんの形態がドラベ症候群であり、5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₇、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される受容体に対するアフィニティーと、その受容体における活性とを有する、[1]の使用；

10

[3]

5-HT受容体アゴニストが、
3- [3- (2-ジメチルアミノエチル) -1H-インドール-5-イル] -N- (4-メトキシベンジル)
) アクリルアミド、
1H-インドール-5-オール、3- (1-メチル-4-ピペリジニル) -、
 (4-ブromo-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩、
 (1R) -8-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン、
 (6aR,9R) -N- ((2R,5S,10aS,10bS) -5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオ
キソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ [3,2-a] ピロロ [2,1-c] ピラジン-2-イル) -7-メチル
-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ [4,3-fg] キノリン-9-カルボキサミド、
 [(2S) - (+) -5- (1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル) -2- (ジメチルアミノ) テ
トラリン、ならびに

20

それらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体
からなる群より選択される、[2]の使用；

[4]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₇、および
それらの組み合わせからなる群より選択される受容体に対するアフィニティーと、その受
容体における活性とを有する、[2]の使用；

30

[5]

5-HT受容体アゴニストが、
3- [3- (2-ジメチルアミノエチル) -1H-インドール-5-イル] -N- (4-メトキシベンジル)
) アクリルアミド、
 (4-ブromo-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩、
 (1R) -8-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン、
 (6aR,9R) -N- ((2R,5S,10aS,10bS) -5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオ
キソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ [3,2-a] ピロロ [2,1-c] ピラジン-2-イル) -7-メチル
-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ [4,3-fg] キノリン-9-カルボキサミド、
 (2S) - (+) -5- (1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル) -2- (ジメチルアミノ) テ
トラリン、ならびに

40

それらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体
からなる群より選択される、[4]の使用；

[6]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₇からなる群より選
択される受容体に対するアフィニティーと、その受容体における活性とを有する、[4]の
使用；

[7]

5-HT受容体アゴニストが、
3- [3- (2-ジメチルアミノエチル) -1H-インドール-5-イル] -N- (4-メトキシベンジル

50

) アクリルアミド、

[(4-プロモ-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩

、
(6aR,9R) -N- ((2R,5S,10aS,10bS) -5-ベンジル-10b-ヒドロキシ-2-メチル-3,6-ジオキソオクタヒドロ-2H-オキサゾロ [3,2-a] ピロロ [2,1-c] ピラジン-2-イル) -7-メチル-4,6,6a,7,8,9-ヘキサヒドロインドロ [4,3-fg] キノリン-9-カルボキサミド、

[(2S) - (+) -5- (1,3,5-トリメチルピラゾール-4-イル) -2- (ジメチルアミノ) テトラリン、ならびに

それらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体
からなる群より選択される、[6]の使用；

10

[8]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{2A}受容体サブタイプ、5-HT_{2C}受容体サブタイプからなる群より選択される受容体に対して高い特異性と、その受容体における活性とを有する、[5]の使用；

[9]

5-HT受容体アゴニストが、

[(4-プロモ-3,6-ジメトキシベンゾシクロブテン-1-イル) メチルアミン臭化水素酸塩、(1R) -8-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピン

ならびにそれらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体
からなる群より選択される、[8]の使用；

20

[1 0]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、および5-HT₇からなる群より選択される受容体のアゴニストではない、[1]～[7]のいずれかの使用；

[1 1]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される受容体のアゴニストではない、[10]の方法；

[1 2]

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1F}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される受容体のアゴニストではない、[8]の使用；

30

[1 3]

5-HT受容体アゴニストと

5-HT受容体アンタゴニストと

を含む治療有効量の製剤を患者に投与する工程を含む、てんかんの一形態を有する患者における発作を低減することに関する使用；

[1 4]

5-HTアンタゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₆、5-HT₇、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される5-HT受容体サブタイプのアンタゴニストであり、さらに、

5-HT受容体アゴニストが、5-HT_{1D}、5-HT_{1E}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT_{5A}、5-HT_{5B}、5-HT₇、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される受容体に対するアフィニティーと、その受容体における活性とを有する、[13]の使用；

40

[1 5]

5-HTアンタゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT_{2C}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される受容体のアンタゴニストである、[14]の使用；

[1 6]

5-HTアンタゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される受容体のアンタゴニストである、[15]の使用；

[1 7]

50

5-HTアンタゴニストが5-HT_{2B}受容体サブタイプのアンタゴニストである、[16]の使用；
[18]

5-HTアンタゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1E}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される5-HT受容体サブタイプのアンタゴニストである、[14]の使用；

[19]

5-HTアンタゴニストが、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{1F}、5-HT_{2B}、5-HT₃、5-HT₄、および5-HT₆からなる群より選択される5-HT受容体サブタイプのアンタゴニストである、[18]の使用；

[20]

5-HTアンタゴニストが、

N- [cis-4- [[4- (ジメチルアミノ) -2-キナゾリニル] アミノ] シクロヘキシル] -3, 4-ジフルオロベンズアミド塩酸塩、

1- [(2-クロロ-3,4-ジメトキシフェニル) メチル] -2,3,4,9-テトラヒドロ-6-メチル-1H-ピリド [3,4-b] インドール塩酸塩、

1- [(3,4-ジメトキシフェニル) メチル] -2,3,4,9-テトラヒドロ-6-メチル-1H-ピリド [3,4-b] インドール塩酸塩、

4- (4-フルオロ-1-ナフタレニル) -6- (1-メチルエチル) -2-ピリミジンアミン塩酸塩

、

N- (1-メチル-1H-インドール-5-イル) -N'-3-ピリジニルウレア、

SB 204741 [N- (1-メチル-1H-インドリル-5-イル) -N''- (3-メチル-5-イソチアゾリル) ウレア] 、

3,5-ジヒドロ-5-メチル-N-3-ピリジニルベンゾ [1,2-b:4,5-b'] ジピロール-1 (2H) -カルボキサミド塩酸塩、

2,3-ジヒドロ-5- (メチルチオ) -N-3-ピリジニル-6- (トリフルオロメチル) -1H-インドール-1-カルボキサミド、

N- [3-フルオロ-5- (3-ピリジニル) フェニル] -2,3-ジヒドロ-5-メトキシ-6- (トリフルオロメチル) -1H-インドール-1-カルボキサミド、および

(+) -cis-4,5,7a,8,9,10,11,11a-オクタヒドロ-7H-10-メチルインドロ [1,7-bc] [2, 6] -ナフチリジンフマル酸塩、ならびに

それらの組み合わせ、塩、誘導体、断片、および複合体
からなる群より選択される、[17]の使用；

[21]

5-HTアゴニストがフェンフルラミンである、[11]～[20]のいずれかの使用；

[22]

使用に先だって患者が遺伝子検査に付され、前記患者がドラベ症候群に関連する遺伝子異常を有することが確認される、前記発明のいずれかの使用；

[23]

5-HT受容体アゴニストが、20mg以下、10mg以下、5mg以下、2mg以下、1mg以下を含む投与量製剤の群から選択される一回投与量製剤を使って、1日1回使用される、前記発明のいずれかの使用；

[24]

ドラベ症候群を有する患者における発作を低減する際の、

薬学的に許容される担体と、

(1R) -9-クロロ-1-メチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-3-ベンゾアゼピンとを含む製剤の使用；

[25]

てんかんの一形態を有する患者における発作を低減する際の、

薬学的に許容される担体と、

レボフェンフルラミンの非存在下でのデキスフェンフルラミンと

10

20

30

40

50

を含む製剤の使用；

[26]

てんかんの形態がドラベ症候群である、[25]の使用；

[27]

てんかんの一形態を有する患者における発作を低減する際の、

薬学的に許容される担体と、

デキスフェンフルラミンの非存在下でのレボフェンフルラミンと

を含む製剤の使用；ならびに

[28]

てんかんの形態がドラベ症候群である、[27]の使用。

10

【図面の簡単な説明】

【0057】

以下の詳細な説明を添付の図面と併せて読めば、本発明は最もよく理解される。一般的な慣行どおり、図面のさまざまな特徴は正確な縮尺ではないことを強調しておく。反対に、さまざまな特徴の寸法はわかりやすいように恣意的に拡大または縮小されている。図面には以下の図が含まれている。

【0058】

【図1】scn1Lab変異の遺伝子型判定および特徴付けに関するパネルA、B、C、D、EおよびFからなる。(A) scn1Lab遺伝子ドメインIIIサブユニット1における点変異の位置(*星印)。(B) scn1Lab変異体におけるT-G変異はメチオニン(M)をアルギニン(R)に変化させる。遺伝子型は、野生型を+/+で示し(scn1Lab^{+/+})、ヘテロ接合を+/-で示し(scn1Lab^{+/-})、ホモ接合を-/-で示す(scn1Lab^{-/-})。(C) アンプリコンの制限エンドヌクレアーゼ分析では、野生型の場合は250bpのバンドが得られ、ヘテロ接合scn1Lab^{+/-}変異体の場合は250bpと500bpのバンドが得られた。(D) 配列決定データにより、野生型scn1Lab^{+/+}と比較したヘテロ接合scn1Lab^{+/-}変異体(T-G変異)の遺伝的差異が確認された。(E) 野生型scn1Lab^{+/+}とヘテロ接合scn1Lab^{+/-}変異体との間に表現型の差異は観察されない。

20

【図2】ホモ接合scn1Lab^{-/-}変異の特徴付けに関するパネルAおよびBからなる。(A) ホモ接合scn1Lab^{-/-}変異体ゼブラフィッシュ幼生は、黒い色素沈着、うきぶくろの欠如、体のわずかな湾曲があるので、表現型で同定することができる(6dpf)。(B) ホモ接合scn1Lab^{-/-}変異体の場合、アンプリコンの制限エンドヌクレアーゼ分析では500bpのバンドが得られた。

30

【図3】ホモ接合scn1Lab^{-/-}幼生が同齢の野生型scn1Lab^{+/+}より高い移動運動活動を見せることを示す棒グラフである。バーは大運動(large movement)における平均累積距離(cm)を表す。データは大運動における平均累積距離±SD(各群n=72)を表す。***p<0.0001、野生型scn1Lab^{+/+}(白)対scn1Lab^{-/-}変異体(黒)。

【図4】自発的エレクトログラフ活動を図解する画像A、B、CおよびDからなる。(A) 7dpfの野生型scn1Lab^{+/+}幼生(前脳に設置された記録電極に注目されたい)と(B)その代表的な5分間のエレクトログラム(*拡大図)、および(C) 7dpfのホモ接合scn1Lab^{-/-}変異体幼生と(D)その代表的な5分間のエレクトログラム(*拡大図)。

40

【図5】7dpfの野生型scn1Lab^{+/+}と比較して7dpfのホモ接合scn1Lab^{-/-}幼生における高いてんかん様活動を強調するエレクトログラフ活動の定量化に関する棒グラフA、BおよびCからなる。バーは平均±SEMを表し、ホモ接合scn1Lab^{-/-}幼生はn=48、野生型scn1Lab^{+/+}はn=35である。***p<0.0001、てんかん様イベントの(A)頻度、(B)平均累積持続時間および(C)平均持続時間に関して、野生型scn1Lab^{+/+}(白)対scn1Lab^{-/-}変異体(黒)。

【図6】フェンフルラミン25μM(FA)による長時間処置(22時間)が、7dpfにおける移動運動活動をscn1Lab^{-/-}変異体では低下させるが、野生型scn1Lab^{+/+}では低下させないことを表す、単一の棒グラフである。(A)バーは、大運動における平均累積距離±SD(cm)(各群n=32)を表す。***p<0.0001、対照(Con)野生型scn1Lab^{+/+}(白)対対照

50

(Con) $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 (黒); $***p < 0.0001$ 、対照 (Con) $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 (暗色) 対フェンフルラミン処置 (FA) $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 (灰色)。

【図7】フェンフルラミンの抗てんかん様活性を裏付けるエレクトログラフ活動の定量化に関する棒グラフA、BおよびCならびに画像Dからなる。エレクトログラフ活動の定量化によって、ホモ接合 $scn1Lab^{-/-}$ 変異体におけるフェンフルラミン ($n=20$)、5-HT_{1D}アゴニスト ($n=17$)、5-HT_{2A}アゴニスト ($n=13$) および5-HT_{2C}アゴニスト ($n=12$) の抗てんかん様活性が裏付けられる。対照 (Con) $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 ($n=48$) に対して $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.001$ 、または $***p < 0.0001$ 。エレクトログラフ上の脳活動の減少は、てんかん様イベントの (A) 頻度および (C) 平均累積持続時間について、統計的に有意であった。これは、てんかん様イベントの (B) 平均持続時間については、常に当てはまるわけではなかった。 (D) VHC処置 $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 (-/- (Con)) およびフェンフルラミン処置 $scn1Lab^{-/-}$ 変異体 (-/- (FA)) の3分間の代表的エレクトログラム;スケールバー:1mV、30秒。

10

【図8】同齢の野生型 $scn1Lab^{+/+}$ と比較した7dpfの $scn1Lab^{-/-}$ 変異体における神経伝達物質の量の低減に関する単一の棒グラフである。バーは、頭部6個分のホモジネートの質量 (mg) あたりの神経伝達物質の平均量 (nmol) $\pm$ SEMを表す;各群 $n=9$ 。 $*p < 0.05$ 、野生型 $scn1Lab^{+/+}$ (黒) 対野生型 $scn1Lab^{+/+}$ (白)。

【図9】アゴニストの活性プロファイルに関する短期処置と長期処置についての2つの画像からなる。6つの機能的アナログ (5-HT_{1D}アゴニスト、5-HT_{1E}アゴニスト、5-HT_{2A}アゴニスト、5-HT_{2C}アゴニスト、5-HT_{5A}アゴニスト、および5-HT₇アゴニスト) による短時間処置および長時間処置は、 $scn1Lab^{-/-}$ 幼生における移動運動活動を低下させる。スポークの長さは機能的類似体による減少の統計的有意性を表す。すなわち、最初の内円に達するバーは $p < 0.05$ を表し、外側の円に達するバーは $p < 0.0001$ を表す。疑問符 (?) は選択的5-HT_{5A}アゴニストが存在しないことを示す。

20

【図10】アゴニストの活性プロファイルを表す長期処置に関する単一の画像からなる。3つの機能的類似体 (5-HT_{1D}アゴニスト、5-HT_{2A}アゴニスト、5-HT_{2C}アゴニスト) による長時間処置は、 $scn1Lab^{-/-}$ 幼生におけるエレクトログラフ活動を低下させる。スポークの長さは機能的類似体による減少の統計的有意性を表す。すなわち、最初の内円に達するバーは $p < 0.05$ を表し、2番目の内円に達するバーは $p < 0.01$ を表す。疑問符 (?) は選択的5-HT_{5A}アゴニストが存在しないことを示す。

30

【図11】フェンフルラミンの活性プロファイルを表す短期処置および長期処置に関する2つの画像からなる。5-HTサブタイプアンタゴニスト (5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、または5-HT₇) とのコンビナトリアル短時間および長時間処置は、 $scn1Lab^{-/-}$ 幼生においてフェンフルラミンによって引き出される移動運動活動の減少を打ち消す。スポークの長さは機能的類似体による減少の統計的有意性を表す。すなわち、最初の内円に達するバーは $p < 0.05$ を表し、2番目の内円に達するバーは $p < 0.001$ を表す。疑問符 (?) は選択的5-HT_{5A}アゴニストが存在しないことを示す。

【図12】フェンフルラミンとその機能的類似体 (アゴニスト) のリストである表1からなる。NDは未決定を意味する。

【図13】アンタゴニストのリストである表2からなる。NDは未決定を表す。

40

【図14】機能的類似体 (アゴニスト) の活性プロファイルを表す表3からなる。 $scn1Lab^{-/-}$ 幼生における移動運動活動で評価した短時間処置および長時間処置。結果を適当な対照 (VHC処置) に対して標準化し、パーセンテージ $\pm$ SD (%) として表した;各群 n =少なくとも9。増加 ($\uparrow$) または減少 ($\downarrow$) の統計的有意性を括弧内に記す: VHC処置群に対して $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.001$ 、および $***p < 0.0001$ 。

【図15】フェンフルラミンの活性プロファイルに関する情報を表す表4からなる。いくつかの5-HTサブタイプアンタゴニストとのコンビナトリアル短時間および長時間処置は、 $scn1Lab^{-/-}$ 幼生においてフェンフルラミンによって引き出される移動運動活動の減少を打ち消す。結果を適当な対照 (FA処置) に対して標準化し、パーセンテージ $\pm$ SD (%) として表した;各群 n =少なくとも9。コンビナトリアル処置による増加 ($\uparrow$) または減少 ($\downarrow$)

50

)の統計的有意性を括弧内に記す: FA処置群に対して $*p<0.05$ 、 $**p<0.001$ 、および $***p<0.0001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0059】

態様の説明

発明の詳細な説明

本製剤および本方法の説明に先だって、本発明は、当然ながら、さまざまな態様をとりうるので、本発明が、ここに記載する特定の製剤および方法に限定されないことを理解すべきである。本発明の範囲は本願請求項によってのみ限定されるので、本明細書において使用する術語には特定の態様を説明するという目的しかなく、限定を意図していないこと

10

【0060】

値の範囲が提示されている場合、その範囲の上限と下限の間の各中間値も、文脈上そうでないことが明白である場合を除き、下限の10分の1単位までは、具体的に開示されているものと理解される。明示された範囲内にある任意の明示された値または中間値と、その明示された範囲内にある他の任意の明示された値または中間値とで挟まれる小範囲のそれぞれは、本発明に包含される。これらの小範囲の上限および下限は独立してその範囲に含まれる場合も除外される場合もあり、一方または両方の端点を小範囲に含むかどうかの端点も小範囲には含まない各範囲も、本発明に包含される（ただし、明示された範囲内の特に除外された端点を除く）。明示された範囲が端点の一方または両方を含む場合は、それら含まれる端点の一方または両方を除外した範囲も、本発明に含まれる。

20

【0061】

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用される技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の通常の知識を有する者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと類似するまたは等価な方法および材料はいずれも本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料を以下に説明する。本明細書において言及する刊行物はいずれも、その刊行物への言及と関係する方法および材料を開示し説明するために、参照により本明細書に組み入れられる。

【0062】

本明細書および本願請求項において使用される場合、単数形「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」は、文脈上そうでないことが明白である場合を除き、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって例えば、「ある製剤(a formulation)」への言及は複数のそのような製剤を包含し、「前記方法(the method)」への言及は、1つまたは複数の方法および当業者に公知であるその等価物への言及を包含する、などである。

30

【0063】

本明細書において議論する刊行物は、本願の出願日前にそれらが開示されていたから記載するにすぎない。本発明が先行発明を理由としてそれらの公開に先行する資格がないことの自認であると解釈すべき記述は、本明細書にはない。さらに、記載されている刊行日は実際の刊行日とは異なる可能性があり、実際の刊行日については別途確認する必要があるかもしれない。

40

【0064】

発明の概要

上述のように、フェンフルラミンは、ドラベ症候群を含むてんかんを有する患者における発作を低減するのに有効であることが公知の5-HT受容体アゴニストである。フェンフルラミンは、5-HT_{2B}、5-HT_{2B}および5-HT_{2C}受容体サブタイプに対する高いアフィニティと前記受容体サブタイプにおける活性とを有することが知られており、ドラベ症候群における活性が、これら受容体サブタイプのうちの1つまたは複数と関連しているのか、他の5-HT受容体サブタイプと関連しているのか、あるいは他の無関係な作用様式と関連しているのかはわかっていなかった。5-HT_{2B}受容体の活性化は心臓弁肥大と関連している。そこで

50

本発明者らは、考えうる副作用を避けつつフェンフルラミンの効力を維持しているドラベ症候群の処置を創製することが可能かどうかを決定したいと考えた。

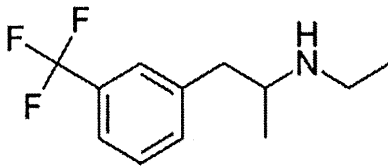
【0065】

さまざまな5-HT受容体サブタイプに対して高い特異性とアフィニティーとを有するアゴニストを選択した。5-HT_{5A}受容体および5-HT_{5B}受容体に対して特異性を有するアゴニストは入手できなかったため、両者に対してアフィニティーを有するエルゴタミンを利用した。これらの化合物を、てんかんのゼブラフィッシュモデルを使用し、急性ばく露プロファイルと慢性ばく露プロファイルの両方を使って、スクリーニングし、フェンフルラミンの活性と比較した。

【0066】

フェンフルラミン (3-トリフルオロメチル-N-エチルアンフェタミン) は、次の構造を有する：

【化17】



(RS) -N-エチル-1- [3- (トリフルオロメチル) フェニル] プロパン-2-アミン。

【0067】

これは、そのIUPAC名が示すとおり、2つのエナンチオマー、すなわちデキスフェンフルラミンとレボフェンフルラミンのラセミ混合物である。

【0068】

フェンフルラミンは、神経伝達物質の小胞貯蔵庫を破壊し、セロトニントランスポーター機能を逆転させることによって、セロトニンの放出を引き起こす。

【0069】

各エナンチオマーは、ちょうど右手と左手が一つの軸に沿って反転している点以外は同じであるのと同様に（手は向きを変えるだけでは同一に見えるようにすることができない）、重ね合わせることはできない（同一でない）互いの鏡像である2つの立体異性体のうちの一つである。

【0070】

本発明の一局面は、てんかんの一形態を有する患者、特にドラベ症候群を有する患者における発作を低減する際の、レボフェンフルラミンの非存在下でのデキスフェンフルラミンの使用を含む。

【0071】

本発明の別の局面は、てんかんの一形態を有する患者、特にドラベ症候群を有する患者における発作を低減する際の、デキサフェンフルラミンの非存在下でのレボフェンフルラミンの使用である。

【0072】

フェンフルラミンは、予想どおり、急性適用後にも慢性適用後にも、高レベルの活性を示し、5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、5-HT₅、および5-HT₇特異的アゴニストも同様であった。

【0073】

さらに、フェンフルラミンを前記モデルにおいて5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}、および5-HT₇受容体アンタゴニストと一緒に使用した。効力を示す大運動の減少がこれらの試行では見られなかったことから、フェンフルラミンの効力はこれらの受容体サブタイプの1つまたは複数に関係していることが示唆される。

【0074】

注目すべきことに、5-HT_{2B}アゴニストはゼブラフィッシュモデルにおいて何の活性も示さなかったことから、5-HT_{2B}受容体に関連する心臓副作用を回避しつつ5-HT受容体アゴニストでドラベ症候群を含むてんかんを処置することは可能であることが実証された。

【0075】

異なる患者の年齢、サイズ、性別、状態および異なる5-HT受容体アゴニストの使用に依存して、異なる5-HT受容体アゴニストを異なる量で投与することができる。ただし一般的には、てんかんの処置、特にドラベ症候群の処置に関係して使用される5-HT受容体アゴニストは、肥満の処置に関係する量と比較して、大幅に少ない量で使用される。これらの少量は、肥満の処置に関係して使用される用量の半分、または4分の1、または10分の1でありうる。

【0076】

この投薬は驚くほど少量で使用する事ができ、それでもなお、ドラベ症候群患者における発作の排除に有効でありうる。投薬は毎日の投薬であってよく、約0.5mg/kg/日未満、約0.45mg/kg/日未満、約0.4mg/kg/日未満、約0.3mg/kg/日未満、約0.25mg/kg/日未満、または約0.2mg/kg/日～約0.1mg/kg/日、約0.05mg/kg/日、もしくは約0.01mg/kg/日を使用する投薬でありうる。言い換えると、各用量は、約0.5mg/kg/日未満～約0.01mg/kg/日の用量をもたらす一日投薬量単位からの用量であることができる。そのような用量は、体重減少を達成するための投与について提案されているフェンフルラミンの1日量より少ない。

10

【0077】

患者には、20mg以下、10mg以下、5mg以下、2mg以下、1mg以下の量の5-HTアゴニストから構成される一日投薬量単位を使って、1日単位で投与することができ、前記投薬単位は経口送達用であるか、または注射用であることができる。

20

【0078】

てんかんを有する患者、特にドラベ症候群を有する患者が、極めて若い患者であるのに対して、肥満の処置を受ける患者は一般に高齢である点でも、本発明の方法を肥満の処置に使用される方法と識別することができる。肥満の処置を受ける患者は一般に20歳を越えており、ドラベ症候群の処置を受ける患者は一般に18歳未満、15歳未満、10歳未満、5歳未満、2歳未満、1歳未満、6ヶ月未満、または1ヶ月～6ヶ月である。

【0079】

肥満に関する患者の処置とてんかんおよびドラベ症候群に関する患者の処置とのさらに別の相違は、患者の検査が考えられるかどうかに関係する。具体的に述べると、ドラベ症候群に関して患者を処置する前には、その患者を遺伝子変異について検査することが望ましい。これは、変異のない患者および異なる形態のてんかんを有する患者は、5-HTアゴニスト受容体で処置すると有害な反応をするかもしれないからである。したがって処置に先だって患者を検査することが望ましい。検査は、ドラベ症候群に関連付けられているSCN1A（例えば、部分的なまたは完全な欠失変異、短縮化変異および/またはミスセンス変異、例えば電位領域または細孔領域S4～S6におけるもの）、SCN1B（例えばナトリウムチャンネルβ1サブユニットをコードする領域）、SCN2A、SCN3A、SCN9A、GABRG2（例えばγ2サブユニットをコードする領域）、GABRD（例えばσサブユニットをコードする領域）および/またはPCDH19遺伝子における変異について行うことができる。

30

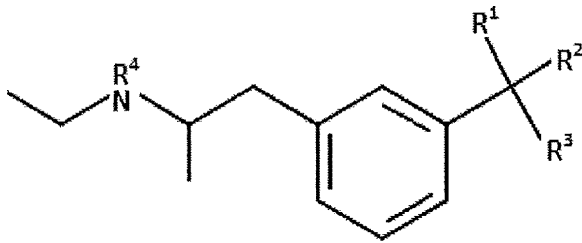
【0080】

特定の5-HTアゴニストを上を開示し説明したが、公知の化合物に基づいて他のアゴニストが創製され、試験されるかもしれない。例えばフェンフルラミンの誘導体を使って製剤が創製されるかもしれない。そのような製剤は、次のように記載することができるだろう。

40

薬学的に許容される担体と、
治療有効量の、構造（I）：

【化 18】



の化合物であって、式中、 R^4 が、水素および1～4個の炭素を含むアルキル基からなる群より選択され、 R^1 、 R^2 および R^3 のそれぞれが、F、Cl、Br、およびIからなる群より選択され、ただし、 R^4 が水素である場合、 R^1 、 R^2 および R^3 のそれぞれは同時にはFでないものとする、化合物とを含む製剤。

【実施例】

【0081】

以下の実施例は、本発明をなす方法および本発明を使用する方法を当業者に完全に開示し説明するために提示するものであって、本発明者らがその発明であるとみなす範囲を限定する意図はなく、下記の実験が、実施した全てのまたは唯一の実験であることを表すというつもりでもない。使用した数字（例えば量、温度など）については正確性を確保するように努めたが、多少の実験誤差および偏差は考慮されるべきである。別段の表示がある場合を除き、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧または大気圧近傍である。

【0082】

実施例1

scn1Lab変異に関してヘテロ接合 (scn1Lab^{+/-}) であるゼブラフィッシュ胚 (Danio rerio) を、タッフル・ロングフィン (Tupfel longfin) 野生型 (WT scn1Lab^{+/+}) と戻し交配した。成体ゼブラフィッシュは、標準的水産養殖条件下、28.0°C、14時間/10時間の明/暗周期で飼育した。受精卵は自然産卵によって収集した。麻酔下の魚 (トリカイン0.02%) を鰭切除し、PCRによって遺伝子型判定を行った。遺伝子型判定後に、試料を精製し (MinElute PCR精製キット)、LGC Genomicsによって配列決定が行われた。同齢のタッフル・ロングフィン野生型幼生を対照群として使用した (WT scn1Lab^{+/+})。これらの胚および幼生は、28.0°Cのインキュベーター中、胚培地 (ダニー (Danieau) 液) : 1.5mM HEPES、pH7.6、17.4mM NaCl、0.21mM KCl、0.12mM MgSO₄、および0.18mM Ca (NO₃)₂において、14時間/10時間の明/暗周期に保った。実行したゼブラフィッシュ実験は全て、ルーヴェン大学倫理委員会 (Ethische Commissie van de KU Leuven、承認番号061/2013) およびベルギー連邦公衆衛生・食品安全・環境局 (Federale Overheidsdienst Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu、承認番号LA1210199) によって承認された。

【0083】

ホモ接合scn1Lab^{-/-}変異体と対照WT scn1Lab^{+/+}の移動運動活動を評価するために、4～8dpfのゼブラフィッシュ幼生を96ウェルプレートにおいて100 μLの胚培地に入れた。毎日、自動追跡デバイス (ZebraBox (商標) 装置; ViewPoint、フランス国リヨン) で、30分間の順化後に10分間、幼生の軌道を追跡した (100秒の積分間隔)。記録は全て、日中の同じ時刻に行った。ZebraLab (商標) ソフトウェア (ViewPoint、フランス国リヨン) を使って、大運動の総距離を記録し、定量化した。1条件あたり少なくとも24匹の幼生を使った少なくとも3回の独立した実験からのデータをプールした。

【0084】

7dpfのゼブラフィッシュ幼生前脳におけるオープンフィールド記録によって、てんかん様活動を測定した。前脳にガラス電極を配置するために、ホモ接合scn1Lab^{-/-}変異体と対照WT scn1Lab^{+/+}を、2%低融点アガロース (Invitrogen) に包埋した。このガラス電極は

、124mM NaCl、2mM KCl、2mM MgSO₄、2mM CaCl₂、1.25mM KH₂PO₄、26mM NaHCO₃および10mM グルコースでできた人工脳脊髄液 (aCSF) (抵抗1~5MΩ) で満たし、高インピーダンス増幅器に接続した。次に、電流クランプモードで、1kHzのローパスフィルタをかけ、0.1Hzのハイパスフィルタをかけて、デジタルゲイン10、10μsのサンプリング間隔で、記録を行った (MultiClamp 700B増幅器、Digidata 1440Aデジタイザー、どちらもAxon Instruments、米国)。1回の記録を10分間行った。以前に記述されたように (Orellana-Paucar et al, 2012)、棘波状突発活動の持続時間によって、てんかん様活動を定量化した。Clampfit 10.2ソフトウェア (Molecular Devices Corporation、米国) を利用してエレクトログラムを分析した。自発的てんかん様イベントは、振幅がバックグラウンドノイズの3倍を超え、かつ50ミリ秒 (ms) より長く持続した場合に、考慮した。野生型ZF幼生では50msより短い持続時間を有するてんかん様イベントの観察頻度が低かったことから、この閾値を選んだ。

【0085】

フェンフルラミンはPeak International Products B.V.から入手した。機能的類似体 (アゴニスト) およびアンタゴニストは、異なる5-HTサブタイプ受容体に対するそれぞれの選択的高アフィニティー (エルゴタミンを除く、下記参照) (ナノモル濃度域のK_i) と、それぞれのlogP値 (すなわち>1、ゼブラフィッシュ幼生において良好なバイオアベイラビリティを呈すると予想される (Milan, 2003)) とに基づいて選択した。化合物は、Sigma-Aldrichから購入した5-HT_{2A}アンタゴニスト (ケタンセリン)、5-HT₄アゴニスト (シサプリド) および5-HT_{5A}アゴニスト (エルゴタミン) を除いて、Tocris Bioscienceから入手した。化合物をジメチルスルホキシド (DMSO、99.9%分光法用、Acros Organics) に溶解し、最終DMSO濃度が0.1%w/vになるように胚培地で希釈し、これを媒体対照 (VHC) にもした。

【0086】

各化合物の最大許容濃度 (MTC) を評価するために、6dpf齢のWT *scn1Lab*^{+/+}ゼブラフィッシュ幼生を、96ウェルプレート (組織培養プレート、平底、FALCON (登録商標)、米国) 中、標準的な水産養殖条件下、28℃、14時間/10時間の明/暗周期で、さまざまな濃度の化合物またはVHCと共にインキュベートした (培地は毎日補充した)。各幼生を、次に挙げる毒性の徴候について、48時間にわたって顕微鏡下で個別にチェックした: 尾に軽く接触した時の接触応答の減少または欠如、姿勢の崩れ、身体変形、浮腫、心拍数または循環の変化、および死亡。最大許容濃度 (MTC) を、試料へのばく露から48時間以内に12匹のゼブラフィッシュ幼生中12匹に毒性の徴候が観察されない最も高い濃度と定義した。この実験研究の全体を通して、このMTC (表1および表2) を使用した。

【0087】

scn1Lab^{-/-}変異体およびWT *scn1Lab*^{+/+}の幼生を同じプレートに配置し、受精後6日目 (6 days post fertilization (dpf)) に、96ウェルプレートの個々のウェルにおいて、フェンフルラミン (25μM)、機能的類似体 (それぞれのMTC) またはVHCで処置した。28℃、14時間/10時間の明/暗周期でのインキュベーションと、30分間のチャンバー順化後に、6dpfおよび7dpfの幼生を、暗条件下で10分間、移動運動活動について追跡した (100秒の積分間隔)。1.5時間のインキュベーション時間をさらに短時間処置という (6dpf)。さらにまた、これらの幼生を22時間超インキュベートした後、すなわち長時間処置後に分析した (7dpf)。パラメータlardistを使って総移動運動活動を定量化し、cmの単位でプロットした。各処置条件あたり少なくとも9匹の幼生を使った2回 (5-HT_{1B}アゴニスト、5-HT_{1F}アゴニスト、5-HT₃アゴニスト、5-HT₄アゴニスト、5-HT_{5A}アゴニスト、5-HT₆アゴニスト、および5-HT_{1B}アンタゴニストと、5-HT₇アンタゴニストを除く全てのアンタゴニスト) または3回 (フェンフルラミン、5-HT_{1A}アゴニスト、5-HT_{1D}アゴニスト、5-HT_{1E}アゴニスト、5-HT_{2A}アゴニスト、5-HT_{2B}アゴニスト、および5-HT_{2C}アゴニスト) の独立した実験から得たデータを一つにプールした。

【0088】

上述のように、7dpfのゼブラフィッシュ幼生前脳におけるオープンフィールド記録によ

10

20

30

40

50

って、てんかん様活動を測定した。scn1Lab^{-/-}変異体およびWT scn1Lab^{+/+}幼生を、6dpf時に、フェンフルラミン (25 μM)、先のアッセイ (下記参照) において移動運動低減活性を呈した機能的類似体 (5-HT_{5A} アゴニストを除く) (MTC)、陰性対照 (3.125 μM 5-HT_{2B} アゴニスト) またはVHCと共に、最低22時間インキュベートした (長時間処置)。各実験条件につき少なくとも8匹のscn1Lab^{-/-}変異体幼生から、7dpfの幼生の記録をとった。野生型幼生ではてんかん様活動があまり観測されないので、処置WT scn1Lab^{+/+}幼生については、各条件につき少なくとも5匹を分析した。さまざまな処置条件についてエレクトログラフ記録を定量化した。

【0089】

7dpf齢のゼブラフィッシュ幼生の頭部を使って神経伝達物質ドーパミン、ノルアドレナリンおよびセロトニンの存在量を決定した。チューブ1本につき6つの頭部を、100 μlの0.1M酸化防止剤バッファー (ビタミンCを含有するもの) 中、氷上で1分間ホモジナイズした。ホモジネートを4°C、15000gで、15分間遠心分離した。上清 (70 μl) を滅菌チューブに移し、分析するまで-80°Cで保存した。

【0090】

神経伝達物質の決定はマイクロボアLC-ECD法に基づき (Sophie Sarre, Katrien Thorre, Ilse Smolders, 1997)、VUBの神経科学センター (Center for Neurosciences) C4N (ベルギー国ブラッセル) と共同して行った。クロマトグラフィーシステムは、LC Packing s/Dionex (オランダ国アムステルダム) のFAMOSマイクロオートサンプラー、Gilson (フランス国ヴィリエル-ベル) の307ピストンポンプ、DionexのDEGASYS DG-1210脱気装置、およびAntec (オランダ国ズテルワウデ) のμ-VT03フローセル (0.7mmグラッシーカーボン作用電極、Ag/AgCl基準電極、25 μmスぺーサー) を装着したDECADE II電気化学検出器からなった。移動相は、87%V/V水性バッファー溶液pH5.5 (100mM酢酸ナトリウム三水和物、20mMクエン酸一水和物、2mMデカンスルホン酸ナトリウム、0.5mMエデト酸二ナトリウム) および13%V/Vアセトニトリルであった。この移動相を60 μL/分の流速で注入した。オートサンプラートレイの温度は15°Cに設定し、注入体積は10 μLとした。Bioanalytical Systems (米国インディアナ州ウエストラファイエット) のマイクロボアUniJet C8カラム (100×1.0mm、5 μm) を固定相として使用した。分離と検出は35°Cで行い、検出電位はAg/AgClに対して+450mVとした。データ取得はData Apex (チェコ共和国プラハ) のClarityクロマトグラフィーソフトウェア・バージョン3.0.2によって行った。神経伝達物質の量 (単位: nmol) を6つの頭部の総質量に基づいて計算した。

【0091】

統計的解析はGraphPad Prism 5ソフトウェア (GraphPad Software, Inc.) を使って行った。一元配置ANOVAとその後のDunnett多重比較検定を使って幼生の移動運動活動を評価した。値を平均±標準偏差 (SD) として表す。LFP測定 (エレクトログラフ上の脳活動) はマン・ホイットニー検定によって分析した。処置群と等価な対照群 (scn1Lab^{-/-}変異体またはWT scn1Lab^{+/+}) との間の統計的に有意な差 (p<0.05) は、ゼブラフィッシュ幼生の移動運動またはエレクトログラフ上の脳活動の減少または増加を示すとみなした。scn1Lab^{-/-}変異体の神経伝達物質量は、全てのデータが正規性検定 (ダゴスティーノ・ピアソン (D'Agostino & Pearson) オムニバス正規性検定) に合格したので、スチューデントのt検定によってWT scn1Lab^{+/+}幼生と比較した。

【0092】

結果

ヘテロ接合またはホモ接合scn1Lab変異体における点変異により、遺伝子型判定で、それら変異体をWT scn1Lab^{+/+}と識別することが可能になった (図1)。ヘテロ接合scn1Lab^{+/-}変異体では、PCR産物がAT3632G (野生型アレル) とAG3632G (点変異を有するアレル) とを含有する (図1A)。この点変異はチミン (AT3632G) をグアニン (AG3632G) に変え、それがメチオニン (M) をアルギニン (R) に転換する (図1B)。PagIによる消化は、長さが異なる2つの断片 (250塩基対および500塩基対) をもたらす。これに反して、成体WT scn1Lab^{+/+}ゼブラフィッシュのPCR産物はAT3632Gだけしか含有せず、したがってPagI消化後

10

20

30

40

50

は1つの断片 (250塩基対) しか見えないことになる。ホモ接合 *scn1Lab^{-/-}* 変異体はAG3632 Gだけを有する。PacIはAT3632Gだけを認識するので、これらホモ接合変異体の遺伝子型判定は1つの可視断片 (500塩基対) をもたらす。さらにまた、配列決定データ (LGC Genomics) により、野生型 *scn1Lab^{+/+}* と比較したヘテロ接合 *scn1Lab^{+/-}* 変異体の遺伝的差異 (T-G変異) が確認された (図1D)。

【0093】

WT幼生と比較して、ホモ接合 *scn1Lab^{-/-}* 変異体は、大運動の総距離 (lardist) として表される移動運動活動の増加を呈し、これにより、以前に公表されたデータ (Baraban et al, 2013) が確認される。この行動の相違は、4dpfには既に存在し、6dpf~8dpfの間で最大であった (図3)。

10

【0094】

反復てんかん様イベントは、*scn1Lab^{-/-}* 変異体では 4.31 ± 0.33 イベント/10分間記録の平均頻度で、また同齢のWT *scn1Lab^{+/+}* 幼生では 0.91 ± 0.19 イベント/10分間記録の頻度で起こった。このてんかん様イベントの頻度の相違は統計的に有意であった (図5A、 $p < 0.001$)。その結果、てんかん様イベントの平均累積持続時間は、WT *scn1Lab^{+/+}* 幼生と比較して、*scn1Lab^{-/-}* 変異体では有意に高かった (*scn1Lab^{-/-}* 変異体は 692.0 ± 69.18 ms/10分間記録、対してWT *scn1Lab^{+/+}* は 89.62 ± 20.33 ms/10分間記録) (図5B、 $p < 0.0001$)。さらにまた、この相違はてんかん様イベントの平均持続時間、すなわち1回のてんかん活動に費やされた時間にも反映された (*scn1Lab^{-/-}* 変異体は 160.2 ± 11.81 ms/10分間記録、対してWT *scn1Lab^{+/+}* は 48.88 ± 8.807 ms/10分間記録) (図5C、 $p < 0.0001$)。

20

【0095】

フェンフルラミン (25 μ M) による長期処置 (22時間) は、7dpfのホモ接合 *scn1Lab^{-/-}* 変異体におけるてんかん様移動運動活動を有意に減少させた (図6、 $p < 0.0001$)。短時間のインキュベーション (1.5時間) でも同様の結果が得られた (データ未掲載)。フェンフルラミンの6つの機能的類似体、すなわち5-HT_{1D}アゴニスト、5-HT_{1E}アゴニスト、5-HT_{2A}アゴニスト、5-HT_{2C}アゴニスト、5-HT_{5A}アゴニストおよび5-HT₇アゴニストも、移動運動低減活性を呈した (ほとんどの場合、短時間処置後および長時間処置後に観察された)。エルゴタミンは興味深い活性を示したが、この化合物はあまり選択的な5-HT_{5A}アゴニストではないので、この結果は多少注意して解釈すべきである。残念なことに、これ以上に選択的な他の5-HT_{5A}アゴニストは市販されていない。さらにまた、5-HT_{2C}アゴニストと5-HT₇アゴニストを例外として、これらの化合物は同齢の野生型ゼブラフィッシュ幼生では移動運動活動を減少させなかったことから、*scn1Lab^{-/-}* 変異体に対する選択的効果が示される (表3)。本発明者らは、ホモ接合 *scn1Lab^{-/-}* 変異体に対する5-HTアンタゴニストの移動運動修飾活性も調査した。しかし、活性であるものではなく (データ未掲載)、一定のセロトニン受容体を (遮断ではなく) 刺激することが*scn1Lab^{-/-}* 変異体の移動運動活動に及ぼす有利な効果が強調された。

30

【0096】

てんかん様活動の低減を、フェンフルラミンおよび先のアッセイで移動運動低減活性を呈した機能的類似体 (5-HT_{5A}アゴニストを除く) を使った長時間処置後に、7dpfのゼブラフィッシュ幼生前脳におけるオープンフィールド記録によって測定した。5-HT_{2B}アゴニストを陰性対照として含めた。フェンフルラミンはホモ接合 *scn1Lab^{-/-}* 変異体におけるてんかん様イベントの頻度、平均累積持続時間および平均持続時間を劇的に減少させた (それぞれ 1.7 ± 0.4046 イベント/10分間記録、 200.8 ± 50.38 ms/10分間記録、 85.11 ± 18.28 ms/10分間記録) (図7)。一般に、5-HT_{1D}アゴニスト、5-HT_{2C}アゴニスト、そしてとりわけ5-HT_{2A}アゴニストで匹敵する効果が、少なくともてんかん様イベントの頻度および平均累積持続時間の場合は観察されたが (図7Aおよび図7C)、5-HT_{1E}アゴニスト、5-HT₇アゴニストおよび5-HT_{2b}アゴニストでは観察されず、後者は予想どおりであった (図7)。

40

【0097】

フェンフルラミンの作用機序を調査するために、本発明者らはこの化合物を、先に観察されたとおり移動運動活動の低減に関与することを示した5-HTサブタイプ受容体のアンタ

50

ゴニスト、すなわち5-HT_{1D}⁻、5-HT_{2A}⁻、5-HT_{2C}⁻および5-HT₇⁻のアンタゴニストと併用した。アゴニスト5-HT_{5A}は先に述べた理由から含めなかった。著しく特異的な5-HT_{1E}アンタゴニストは現時点では入手することができないので、目下のアッセイでこの5-HTサブタイプ受容体を調査することはできなかった（Leung, 2009）。しかし、5-HT_{1E}アゴニストはLFP測定においててんかん様活動を低減できないことが先の結果で示されているので、この受容体がフェンフルラミンの抗てんかん様作用に参与する可能性は低い。

【0098】

5-HT_{1D}アンタゴニストまたは5-HT_{2C}アンタゴニストによる処置は、短時間処置後でも長時間処置後でも、scn1Lab^{-/-}幼生においてフェンフルラミンが引き出す移動運動活動の減少を有意に打ち消した（ $p < 0.05$ ）（表4）。同様の結果が5-HT_{2A}アンタゴニストでも見られたが、長時間処置後には見られなかった（表3）。

10

【0099】

さらにまた、5-HT₇アンタゴニストによるフェンフルラミンの効果の阻害はなかった。さらに、5-HT₇アゴニストを除くと、これらの化合物は一般に同齢の野生型ゼブラフィッシュ幼生では効果がなかった（表3）。

【0100】

先の結果ではscn1Lab^{-/-}変異体幼生におけるセロトニン作動性アゴニストの有益な効果が強調されているので、これらのDSゼブラフィッシュは神経伝達障害を有する可能性が高い。そこで本発明者らは、scn1Lab^{-/-}変異体における神経伝達物質の量を、同齢の野生型ゼブラフィッシュ幼生と比較して決定した。7dpfのscn1Lab^{-/-}変異体の頭部ホモジネートは、同齢のWT scn1Lab^{+/+}幼生と比較して、統計的に有意なセロトニンの減少を示した（スチューデントのt検定、 $p < 0.05$ ）。ドーパミンおよびノルアドレナリンの量も減少していたが、これは統計的に有意ではなかった（スチューデントのt検定、それぞれ $p = 0.1150$ 、 $p = 0.0772$ ）（図8）。

20

【0101】

図9、図10、図11は、レーダー表示で図示した5-HTサブタイプアゴニストとフェンフルラミンの活性プロファイルの要約である。スポークの長さが観察された活性の統計的有意性を表している。

【0102】

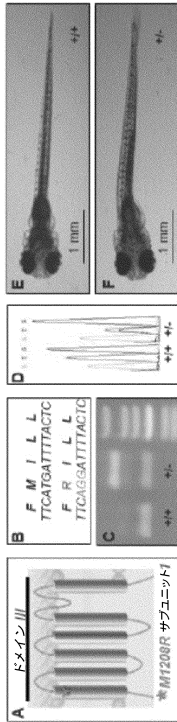
ここでは、本発明を、最も実用的で最も好ましい態様であるとみなされる方法で示し、説明した。しかし、本発明の範囲内でのそこからの逸脱は可能であり、そしてこの開示を読めば当業者は自明な変更を思いつくであろうと、認識される。

30

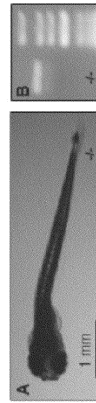
【0103】

本発明をその具体的態様に関して説明したが、本発明の真の要旨および範囲から逸脱することなく、さまざまな改変を加えることができ、等価物で置き換えうることは、当業者には理解されるはずである。加えて、特定の状況、材料、組成物、プロセス、1つまたは複数のプロセスステップを本発明の目的、要旨および範囲に適合させるために、多くの変更を加えることもできる。そのような変更は全て本願請求項の範囲内にあるものとする。

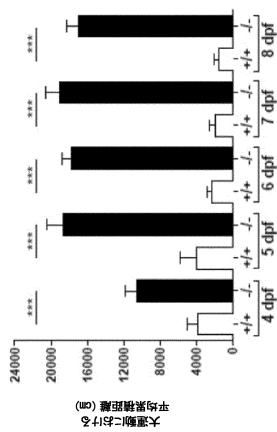
【図 1】



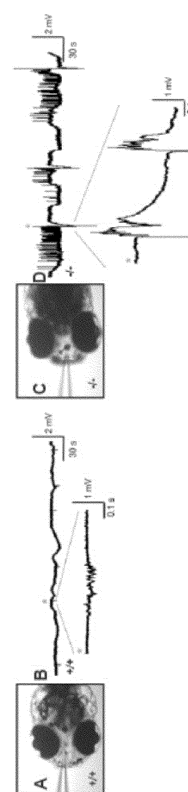
【図 2】



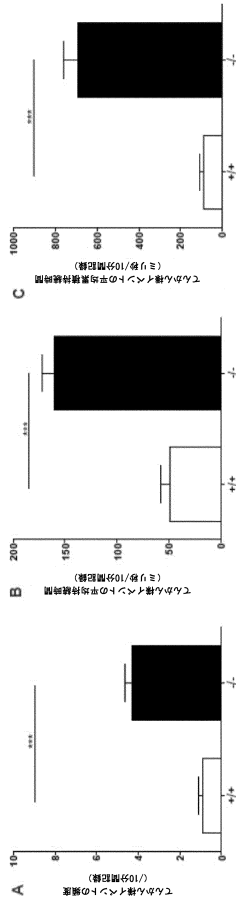
【図 3】



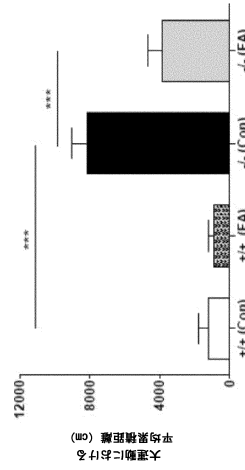
【図 4】



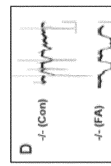
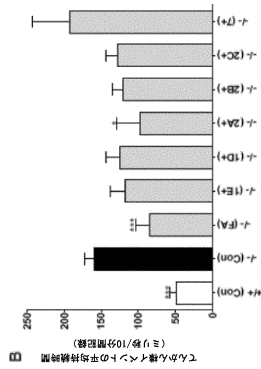
【図 5】



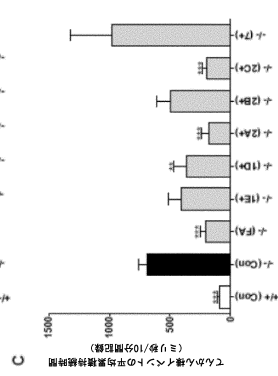
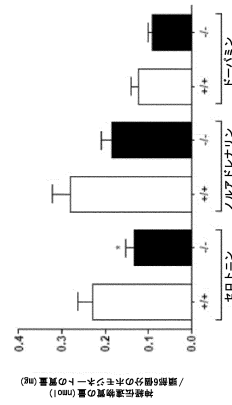
【図 6】



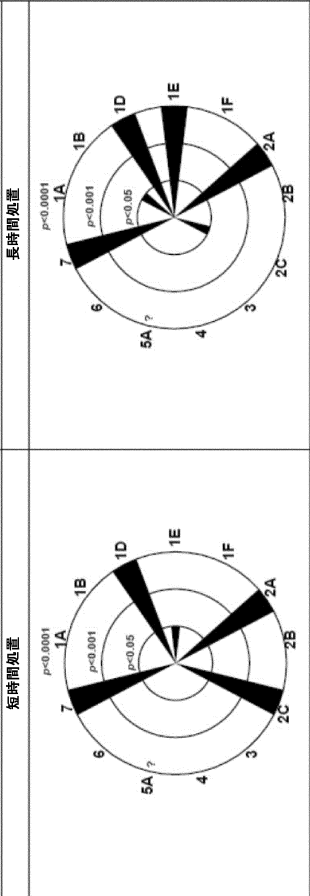
【図 7】



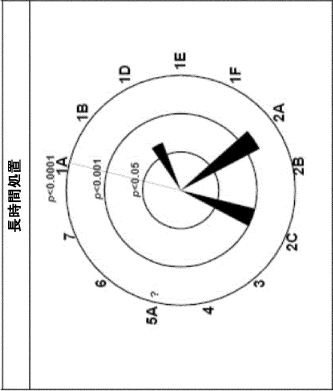
【図 8】



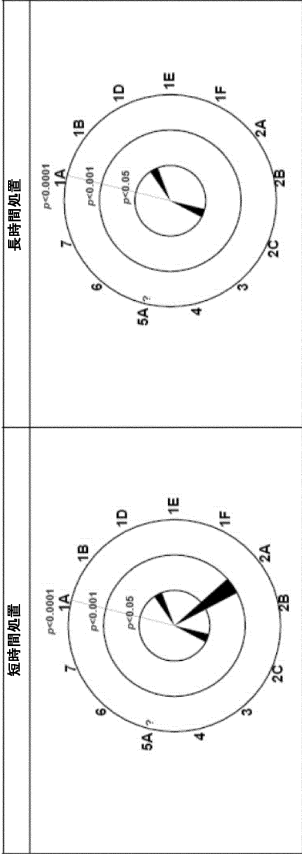
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【図 12】

アゴニスト	略号	フルネーム	MTC (μM)	LogP	Ki (nM)	Ki (nM) 他の受容体
2A-2B-2C	FA	フェンフルラミン	100	3.48	3183 (2C)	4134 (2B) / 5216 (2A)
	1A	IPSA	0.25	1.76	10	-
	1B	CP94	10	2.55	2	89 (1A) / 860 (1C) / 49 (1D) /
	1D	GR4	12.5	3.561	0.2	-
1E	BRL	BRL 54443	25	1.987	1	1.25 (1F) / 63.1 (1A) / 100 (2A) / 316 (2B) / 1000 (2C) / 501 (4) / 631 (7)
1F	LY34	LY 344864	31.25	3.865	6	-
2A	TCB	TCB 2	12.5	1.459	0.75	-
2B	BW7	BW 723C86	3.125	3.17	1.07	-
2C	Lor	ロルカセリン	12.5	2.523	15	122 (2A) / 174 (2B)
3	SR5	SR 57227	31.25	1.426	ND	ND
4	CIS	シサブリド	1.5625	3.989	1.4	-
5	ERGO	エルゴタミンD	0.39	2.077	10	非選択的
6	EMDT	2-エチル-5-メトキシ-N,N-ジメチルトリプタミン	0.15625	3.124	16	-
7	AS	AS 19	62.5	3.212	ND	-

表 1

【図 1 3】

表 2

アンタゴニスト	略号	フルネーム	MTC (μM)	LogP	Ki (nM)	Ki (nM) 他の受容体
1D	LY 31	LY 310762	2.5 μM	4.439	249	-
2A	KETA	ケタンセリン	0.625 μM	2.811	0.53	100 (2C)
2C	SB 24	SB 242084	0.3125 μM	4.586	1	100 (2B) / 158 (2A)
7	SB 25	SB 258719	3.125 μM	5.399	31.6	-

【図 1 5】

表 4

フェンフルラミンのプロファイル (移動運動活動)		ホモ接合son1Lab ^{-/-} 幼生 (ドラベ)		野生型son1Lab ^{+/+} (対照)	
フェンフルラミン +アンタゴニスト	処置	短時間 (%)	長時間 (%)	短時間 (%)	長時間 (%)
1D	LY 31	123.7±14.3(**)	119.5±11.6(**)	85.5±9.8(*†)	109.6±21.8
1E		利用できる選択的5-HT _{1C} アンタゴニストがない			
2A	KETA	185.7±40.9(**††)	127.9±24.6	83.6±14.1	93.1±40.4
2C	SB 24	123.3±10.1(**)	118.7±13.6(**†)	95.4±11.5	74.9±26.7
7	SB 25	127.4±25.8	120.8±28.7	94.9±16.9	265.6±94.2(**††)

【図 1 4】

表 3

アゴニストのプロファイル (移動運動活動)		ホモ接合son1Lab ^{-/-} 幼生 (ドラベ)		野生型son1Lab ^{+/+} (対照)	
アゴニスト	処置	短時間 (%)	長時間 (%)	短時間 (%)	長時間 (%)
2A-2B-2C					
1A	FA	45.0±20.0(***)↓	47.2±9.8(***)↓	135.4±20.7(*†)	74±27.8
1B	IPSA	120.7±24.8	132.9±17.5	168.1±26.0(***)†	181.2±71.0(*†)
1D	CP94	89.5±11.2	82.2±16	100.9±13.3	72.8±26.3
1E	GR4	66.6±12(***)↓	69±11.8(***)↓	169.4±49.6(**†)	124.3±15.1
1F	BRL	76.8±14.4(*†)	73.2±8.0(***)↓	149.5±14.1(***)†	64.3±10.5(*†)
2A	LY34	92.8±15.8	92±11.7	172.2±30(***)†	113.9±31.8
2B	TCB	26.5±5.6(***)↓	55.9±7.8(***)↓	130.6±16.7(*†)	63.9±25.1(*†)
2C	BW7	100.3±15.0	99.7±7.5	116±15.2	66.9±15.0(*†)
3	Lor	87.3±11.3	72.9±11.9(***)↓	122.4±17.7	61.2±53.1(***)↓
4	SR5	118.2±18.1	98.1±16.3	174.1±46.0	130.4±37.9
5	CIS	105.1±18.7	104±19.3	89.8±18.2	94.1±25.1
6	ERGO	50.2±11.7(***)↓	50.9±24.2(***)↓	229.4±22.7(***)†	154.2±41.0(*†)
7	EMDT	117.3±5.1	120.4±16.8	187±37.0(***)†	118.7±35.4
	AS	39.7±8.4(***)↓	62.4±13.4(***)↓	76±12.7	31.7±16.2(***)↓

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 31/415 (2006.01) A 6 1 K 31/415

- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ド ウィッテ ピーター
ベルギー王国 ケッセルロー プレーディクヘレンベルグ 2 5
- (72)発明者 ラガエ リーヴェン
ベルギー王国 アウト ヘフェルレー ポスラーン 1 5 エイ
- (72)発明者 スルブロン ジョー
ベルギー王国 ビルゼン ゾンフーヴェストラート 6

審査官 大西 隆史

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 5 / 0 6 6 3 4 4 (WO, A 1)
米国特許出願公開第2 0 0 9 / 0 1 4 3 3 6 3 (US, A 1)
国際公開第2 0 1 4 / 1 7 7 6 7 6 (WO, A 1)
ISAAC, Methvin, Serotonergic 5-HT_{2C} Receptors as a Potential Therapeutic Target for the Design Antiepileptic Drugs, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2 0 0 5 年, Vol. 5, Issue 1, p. 59-67
LEIT, Silvana et al., Design and synthesis of tryptamine-based 5HT_{2C} agonists for the treatment of certain CNS disorders, Division of Medicinal Chemistry Scientific Abstracts for the 240th National ACS Meeting and Exposition, 2 0 1 0 年 7 月 2 8 日, MEDI 367
MULLEY, John C. et al., SCN1A Mutations and Epilepsy, Human Mutation, 2 0 0 5 年 6 月, Vol. 25, Issue 6, p. 535-542
PITTALA, Valeria et al., 5-HT₇ Receptor Ligands: Recent Developments and Potential Therapeutic Applications, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2 0 0 7 年, Vol. 7, Issue 9, p. 945-960
O'NEILL, Michael F. et al., GR46611 potentiates 5-HT receptor-mediated locomotor activity in the guinea pig, European Journal of Pharmacology, 1 9 9 9 年 4 月 9 日, Vol. 370, Issue 2, p. 85-92
GHAREDAGHI, Mohammad H. et al., The role of different serotonin receptor subtypes in seizure susceptibility, Exp. Brain Res., 2 0 1 4 年 2 月, Vol. 232, Issue 2, p. 347-367
BUCHANAN, Gordon F. et al., Serotonin neurones have anti-convulsant effects and reduce seizure-induced mortality, The Journal of Physiology, 2 0 1 4 年, Vol. 592, Issue 19, p. 4395-4410
KLEIN, M. T. and TEITLER, M., Distribution of 5-HT_{1E} receptors in the mammalian brain

and cerebral vasculature: an immunohistochemical and pharmacological study, British Journal of Pharmacology, 2012年 6月, Vol. 166, No. 4, p. 1290-1302

LOPEZ-MERAZ, Maria-Leonor et al., 5-HT1A receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats, Neuropharmacology, 2005年 9月, Vol. 49, Issue 3, p. 367-375

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-33/44

A61K 38/00-51/12

A61P 1/00-43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)