(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2010-505848
(P2010-505848A)
(43)公表日　平成22年2月25日(2010.2.25)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K 45/00		4C057
A61P 27/02	(2006.01)	A61P 27/02		4C084
A61K 31/7076	(2006.01)	A61K 31/7076		4C086
A61P 27/06	(2006.01)	A61P 27/06		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-531464 (P2009-531464)
(86)(22)出願日　平成19年10月5日 (2007.10.5)
(85)翻訳文提出日　平成21年5月26日 (2009.5.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/021409
(87)国際公開番号　WO2008/045330
(87)国際公開日　平成20年4月17日 (2008.4.17)
(31)優先権主張番号　60/850,175
(32)優先日　平成18年10月6日 (2006.10.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503457367
ザ　トラスティーズ　オヴ　ザ　ユニヴァーシティー　オヴ　ペンシルバニア
アメリカ合衆国，ペンシルバニア州　１９１０４，フィラデルフィア，スイート　２００，チェスナット　ストリート　３１６０
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉　良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫　敏史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】眼内圧を低下させるための種交差性Ａ３アデノシン受容体アンタゴニストの効果的送達

(57)【要約】
【課題】緑内障などの眼内圧の上昇をもたらす眼疾患を有する個体において眼内圧を低下させる方法を提供する。
【解決手段】ジヒドロピリジン、ピリジンもしくはピリジニウム塩又はトリアゾロキナゾリン類及び、例えば、ヌクレオシド系A_3ＡＲアンタゴニストＭＲＳ－３８２０を初めとするA_3ＡＲアンタゴニスト活性を明確に有するこれらの誘導体を含むアデノシン受容体サブタイプA_3（A_3ＡＲ）アンタゴニストを含む医薬組成物を眼内圧低下有効量で上記個体に投与することを含む。さらに、眼内圧を低下させる局所投与される治療用組成物の送達を確実にする方法であって、前眼房への上記組成物の輸送を可能にするために微細針又はマイクロピペットにより患者の眼の角膜バリアを通してチャネルを物理的に開孔させることを特に必要とする方法が提供される。
【選択図】図１

【特許請求の範囲】
【請求項１】
眼内圧の上昇を特徴とする眼疾患を有する個体において眼内圧を低下させる方法であって、
アデノシン受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストを含む種交差性医薬組成物を眼内圧低下有効量で前記個体に投与する工程を含む方法。
【請求項２】
前記受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストが、ジヒドロピリジン、ピリジンもしくはピリジニウム塩又はトリアゾロキナゾリン類、あるいはアデノシン受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニスト活性を明確に有するこれらの誘導体を含む、請求項１の方法。
【請求項３】
前記方法における前記受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストが、ＭＲＳ－１０９７、ＭＲＳ－１１９１、ＭＲＳ－１２２０、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－１２９２、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－３６４２、ＭＲＳ－３７７１、ＭＲＳ－３８２６、ＭＲＳ－３８２７、ＭＲＳ１２２０、ＭＲＳ－１６４９、ＬＪ－１８３０、ＬＪ－１８３１、ＬＪ－ １８３３、ＬＪ－１８３４、ＬＪ－１８３５、ＬＪ－１８３６、ＬＪ－１８３７及びＭＲＳ－３８２０からなる組成物を含む、請求項１の方法。
【請求項４】
前記受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストが、２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオール、即ち、ＭＲＳ－３８２０を含む、請求項３の方法。
【請求項５】
さらに前記医薬組成物を局所的、全身的又は経口的に投与することを含む、請求項３の方法。
【請求項６】
さらに医薬組成物を軟膏剤、ゲル剤又は点眼剤として、患者の眼の涙液膜に局所投与することを含む、請求項５の方法。
【請求項７】
さらに前記眼の涙液膜に前記組成物を投与して０．１乃至３０分以内に、前記患者の眼の角膜を微細針又はマイクロピペットで突き刺すことを含む、請求項６の方法。
【請求項８】
前記突き刺し工程が、前記眼の眼内圧を低下させる前記組成物の有効性の侵襲的測定の一部である、請求項７の方法。
【請求項９】
侵襲的サーボ・ヌル技術を含む、請求項８の方法。
【請求項１０】
眼内圧の上昇が前記患者における緑内障を表す、請求項１の方法。
【請求項１１】
眼内圧の上昇を特徴とする眼疾患を有する個体において眼内圧を低下させる治療用組成物の送達を確実にする方法であって、
アデノシン受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストを含む医薬組成物を眼内圧低下有効量で前記個体の眼の涙液膜に投与すること、及び
前記眼の涙液膜に前記組成物を投与して０．１乃至３０分以内に、前記患者の眼の角膜を微細針又はマイクロピペットで突き刺すこと
を含む方法。
【請求項１２】
前記受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストが、ジヒドロピリジン、ピリジンもしくはピリジニウム塩又はトリアゾロキナゾリン類あるいはアデノシン受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニスト活性を明確に有するこれらの誘導体を含む、請求項１１の方法。
【請求項１３】

前記方法における前記受容体サブタイプA_3アンタゴニストが、ＭＲＳ－１０９７、ＭＲＳ－１１９１、ＭＲＳ－１２２０、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－１２９２、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－３６４２、ＭＲＳ－３７７１、ＭＲＳ－３８２６、ＭＲＳ－３８２７、ＭＲＳ１２２０、ＭＲＳ－１６４９、ＬＪ－１８３０、ＬＪ－１８３１、ＬＪ－ １８３３、ＬＪ－１８３４、ＬＪ－１８３５、ＬＪ－１８３６、ＬＪ－１８３７及びＭＲＳ－３８２０からなる組成物を含む、請求項１１の方法。

【請求項１４】

前記受容体サブタイプA_3アンタゴニストが、２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオール、即ち、ＭＲＳ－３８２０を含む、請求項１３の方法。

【請求項１５】

眼疾患を有する個体において眼内圧を低下させる方法であって、

眼内圧を低下させる眼内圧低下有効量のアデノシンサブタイプA_3のインビボでの生成を活性化又は増強する、眼内圧低下有効量の種交差性アデノシン受容体サブタイプA_3アンタゴニストプロドラッグを前記個体に投与する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、眼内圧を低下させるための種交差性薬剤としてのA_3サブタイプアデノシン受容体アンタゴニストの使用、及び標的部位への効果的な送達を確実にする方法を提供する。

【背景技術】

【０００２】

眼内圧の上昇（ＩＯＰ）を特徴とする疾患である緑内障は、不可逆的失明の主な原因である（キグリー（Ｑｕｉｇｌｅｙ）ほか、ブリティシュ・ジャーナル・オブ・オフサルモロジー（Ｂｒ．　Ｊ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．）８０：ｐ．３８９－３９３（１９９６年））。眼内圧は、毛様体上皮を通過する房水の流入速度と、前眼房からの流出に対する抵抗とによって決まる。一定の流出抵抗では、圧依存性及び圧非依存性流出量の合計が流入量と一致するまで、流入の増加はＩＯＰを上昇させることになる。通常、ＩＯＰが上昇すると、網膜神経節細胞の死及び視神経の萎縮に至る。上昇したＩＯＰを低下させることが、緑内障性失明の発症を遅らせ、その進行を遅延させる方法として現在に至るまで不等価的に文献に記載されている唯一つの方策である。流入の背後にある多くの輸送成分が知られている（図１）が、これらの調節については不明のところが多い。

【０００３】

眼房水は毛様体上皮によって形成され、この上皮は２層の細胞層、即ち、基質（ｓｔｒｏｍａ）に面する外側色素上皮（ＰＥ）細胞層及び房水と接触する内側非色素上皮（ＮＰＥ）細胞層を含む。Cl^-チャネルの活性のベースライン値が低く、移送される液中には塩素陰イオンが支配的な量で存在すること（コウカープラドス（Ｃｏｃａ－Ｐｒａｄｏｓ）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）、２６８：ｐ．Ｃ５７２－Ｃ５７９（１９９５年））を考えれば、Cl^-チャネル活性が房水分泌の律速因子である可能性が強い。したがって、眼中への房水の分泌は、２つの正反対の生理的過程、即ち、ＮＰＥ細胞による眼中への液分泌及びＰＥ細胞による液再吸収（眼からの分泌）の結果であると考えられる。さらに、非色素毛様体上皮（ＮＰＥ）細胞により塩素イオン（Cl^-）がCl^-チャネルを介して近傍の房水中に放出されると、分泌が増強されるように思われるのに対し、色素毛様体上皮（ＰＥ）細胞により近傍の基質へCl^-が放出されると、正味の分泌が低下するように思われる（シヴァン（Ｃｉｖａｎ）、カレント・トピックス・イン・メンブランズ（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｔｏｐｉｃｓ　ｉｎ　Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ）４５：ｐ．１－２４（１９９８年）；シヴァン（Ｃｉｖａｎ）、ニュース・イン・フィジオロジカル・サイエンス（Ｎｅｗｓ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｓｃｉ．）１２：ｐ．１５８－１６２（１９９７年））。

【０００４】
アデノシンはＮＰＥのＣｌ⁻チャネルを活性化し、これによりＣｌ⁻の放出が可能となることが分かっている（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）（セル・フィジオロジー（Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）４２）２７３：ｐ．Ｃ１３５４－Ｃ１３６１（１９９７年））。アデノシン、ATP及びこれらの関連化合物を包含する化合物類であるプリンは、一部Ｃｌ⁻チャネル活性の修飾によって房水分泌を調節することができる。ＮＰＥ細胞及びＰＥ細胞はいずれもＡＴＰを細胞外表面に放出し、そこでＡＴＰが細胞外酵素によりアデノシンへ代謝され得ると報告されており（ミッチェル（Ｍｉｔｃｈｅｌｌ）ほか、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ（Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ）Ｕ．Ｓ．Ａ．９５：ｐ．７１７４－７１７８（１９９８年））、両細胞型ともアデノシン受容体（ワックス（Ｗａｘ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）５７：ｐ．８９－９５（１９９３年）；ワックス（Ｗａｘ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）３５：ｐ．３０５７－３０６３（１９９４年）；クヴァンタ（Ｋｖａｎｔａ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）６５：ｐ．５９５－６０２（１９９７年））及びＡＴＰ受容体（ワックス（Ｗａｘ）ほか、上記文献１９９３年；シャヒデュラ（Ｓｈａｈｉｄｕｌｌａｈ）ほか、カレント・アイ・リサーチ（Ｃｕｒｒ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）１６：ｐ．１００６－１０１６（１９９７年））を有している。さらに、ウサギのインビトロ研究によってA_2アデノシン受容体と分泌増加及び眼内圧上昇とが関連付けられ（クロッソン（Ｃｒｏｓｓｏｎ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）３７：ｐ．１８３３－１８３９（１９９６年））、A_1アデノシン受容体とその逆とが関連付けられている（クロッソン（Ｃｒｏｓｓｏｎ）、ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・テラピュティクス（Ｊ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｅｘｐ．　Ｔｈｅｒ．）２７３：ｐ．３２０－３２６（１９９５年））。分泌とではなく、眼内圧との定性的に同様な関連がカニクイザルにおいて認められている（テイン（Ｔａｉｎ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）６４：ｐ．９７９－９８９（１９９７年））。

【０００５】
また、眼内圧は房水の再吸収を刺激することによっても低下された。原理的には、これは色素細胞層の側底面の塩素チャネルを活性化することにより達成されるとも考えられ、これによって塩素が基質中に放出されて戻ることになる。ＰＥ細胞では、これは抗エストロゲン剤タモキシフェンを用いることにより達成されている。

【０００６】
あるいは、アデノシン受容体（ＡＲ）がＩＯＰを低下させるための有望な標的であった。これは、マウスにおいてA_3アデノシン受容体をノックアウトすると、インビボでＩＯＰが低下することが分かっているからである。インビトロでの観察では、ノックアウトにより誘発されるＩＯＰの低下は、流入の減少によって媒介されることが明らかにされている。公表されている報告を集約すると、以下のことが分かった。即ち、１）　アデノシンは、ＮＰＥ細胞のＣｌ⁻チャネルを活性化する（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年）。２）Ｃｌ⁻チャネルの活性化は、A_3ＡＲによって媒介される（ミッチェル（Ｍｉｔｃｈｅｌｌ）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）２７６：ｐ．Ｃ６５９－　Ｃ６６６（１９９９年））。３）A_3ＡＲ活性化Ｃｌ⁻チャネルは、全ＮＰＥ細胞Ｃｌ⁻チャネルの主要な部分を構成する（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー（Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ）：セル・フィジオロジー（Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）：２７９：ｐ．Ｃ４４０－Ｃ４５１（２０００年））。４）A_3ＡＲアンタゴニストは、マウスの眼のＩＯＰを低下させる（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、ブリティッシュ・ジャーナル・

オブ・ファーマコロジー（Ｂｒ．　Ｊ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．）１３４：ｐ．２４１－２４５（２００１年）；アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）４３：ｐ．３０２１－３０２６（２００２年）；ヤング（Ｙａｎｇ）ほか、カレント・アイ・リサーチ（Ｃｕｒｒ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）３０：ｐ．７４７－７５４（２００５年））。５）　アデノシン受容体サブタイプＡ$_3$（Ａ$_3$ＡＲ）欠損マウスのＩＯＰは、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニストＭＲＳ－１１９１に反応しない。詳細に述べると、Ａ$_3$ＡＲアゴニストは、不死化ヒト及び新鮮調製ウシＮＰＥ細胞のＣｌ$^-$チャネル並びに完全な状態のウサギ虹彩－毛様体の房水指向Ｃｌ$^-$チャネルを増加させ、又は刺激すると報告されているのに対し、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニストは、毛様体上皮の房水を含む表面に面するＮＰＥ細胞のＣｌ$^-$チャネル活性を低下させる（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年；ミッチェル（Ｍｉｔｃｈｅｌｌ）ほか、上記文献、１９９９年）。これに対し、Ａ$_3$ＡＲアゴニストは、通常の流出経路の細胞には相対的にほとんど作用を示さない（フライッシュハウザー（Ｆｌｅｉｓｃｈｈａｕｓｅｒ）ほか、ジャーナル・オブ・メンブラン・バイオロジー（Ｊ．　Ｍｅｍｂｒ．　Ｂｉｏｌ．）１９３：ｐ．１２１－１３６（２００３年）；カール（Ｋａｒｌ）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー、セル・フィジオロジー（Ａｍ．　Ｊ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．）２８８：ｐ．Ｃ７８４－Ｃ７９４（２００５年））。

【０００７】

現在、点眼剤として緑内障に処方されている薬剤としては、ピロカルピン、チモロール、ベタキソロール、レボブノロール、メチプラノロール、エピネフリン、ジピベフリン、ラタノプロスト、カルバコール、エコチオフェートなどの強力なコリンエステラーゼ阻害剤及びドルゾラミデット（ｄｏｒｚｏｌａｍｉｄｅｔ）などの炭酸脱水酵素阻害剤が挙げられる。緑内障の薬物療法へのこうしたアプローチの多くは眼への流入速度を低下させるものである。しかしながら、今日まで、これらの薬剤のいずれも、部分的に副作用及び投薬スケジュールの不都合のため、満足のいくものではなく、また、種交差性の有効性についてはこれまでに報告されていない。このような次第ではあるが、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニスト化合物が緑内障の治療のためにＩＯＰを低下させるのに有用で種交差性であり、有効性の向上、作用の持続化及び副作用の低減を示すことを立証すること、並びに治療用医薬化合物を眼に投与する特定の方法が他の方法よりも効果的であるかどうかについて調べることも、なお求められ続けている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は有効性が向上し、作用が持続化し、副作用が低減した、緑内障治療のために眼内圧を低下させることができる化合物への要望に応えるものであり、さらに、種非依存性の強力なＡ$_3$阻害剤を角膜を通過させて送達することによって、アデノシン受容体サブタイプＡ$_3$のアンタゴニストに対する反応の種間変動が実質的に避けられることを明らかにするものである。齧歯類の実験動物における良好な反応が、ヒトにおける同様に良好な効果を表すものでもあることが重要である。このことは、マウスが自然発生及び遺伝子操作による突然変異の機能的意味を研究するための好ましい実験動物であるので、特に重要である。したがって、本発明の一実施態様において、眼における眼内圧を低下させる好ましい方法は、アデノシン受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストを含む種交差性医薬組成物を眼内圧低下有効量で対象動物又はヒトに投与する工程を含む。この実施態様の一態様においては、上記Ａ$_3$受容体アンタゴニストはジヒドロピリジン、ピリジンもしくはピリジニウム塩又はトリアゾロキナゾリン類である。さらに、本発明の範囲内には、これらの部類から選ばれる、明確にＡ$_3$受容体アンタゴニスト活性を示す化合物の誘導体も想定されている。

【０００９】

特定の実施態様において、上記受容体サブタイプＡ$_3$アンタゴニストは、ＭＲＳ－１０

９７、ＭＲＳ－１１９１、ＭＲＳ－１２２０、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－１２９２、ＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－３６４２、ＭＲＳ－３７７１、ＭＲＳ－３８２６、ＭＲＳ－３８２７、ＭＲＳ－３８２０、ＭＲＳ　１２２０、ＬＪ－１８３０、ＬＪ－１８３１、ＬＪ－　１８３３、ＬＪ－１８３４、ＬＪ－１８３５、ＬＪ－１８３６及び　ＬＪ－１８３７の中から選ぶことができる。ヌクレオシド系の種交差性アデノシン受容体（ＡＲ）サブタイプＡ３アンタゴニストである例示的な薬剤（ＭＲＳ－３８２０）の適用について、インビボで眼内圧（ＩＯＰ）を低下させることにより緑内障患者に対する治療効果を得る本発明の一般的な目的のために以下に説明する。

【００１０】

有利なことに、上記医薬組成物は局所的、全身的又は経口的に投与される。好ましくは、この医薬組成物は軟膏剤、ゲル剤、点眼剤又は注射剤である。したがって、それは、角膜が、涙液膜への滴剤の局所適用によって眼の内部にそのような医薬組成物を治療的に送達することに対する実質的なバリアとなるのかどうかを調べることを目的する。

【００１１】

本発明の別の目的、利点及び新規な特徴については、単に例示を目的としたものであり、本発明を決して限定するものではない以下の記載、実施例及び図においてある程度説明するが、ある程度は、以下の検討時に当業者に明瞭に理解されるであろうし、又は発明の実施によって知ることができる。

【００１２】

上述の概要及び以下の本発明の詳細な説明は、添付図面と照合して読めばよく理解されよう。しかしながら、本発明は図示の仕組み及び手段に厳密に限定されるものではないことは、理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】眼の非色素上皮（ＮＰＥ）及び色素上皮（ＰＥ）細胞並びにＡＴＰ、アデノシン（Ａｄｏ）及びタモキシフェン（ＴＭＸ）の房水の移動に対する効果を示す模式図である。Ｅｃｔｏ：細胞外酵素、$Ａ_3$：アデノシン受容体サブタイプ$Ａ_3$

【図２Ａ】ＮＰＥ細胞のＩＢ－ＭＥＣＡ刺激等張性収縮（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ）に対する$Ａ_3$アンタゴニストの効果を示すグラフである。図は、$Ａ_3$選択的アンタゴニストＭＲＳ－１０９７（３００ｎＭ）が、$Ａ_3$選択的アゴニスト$Ｎ^6$－（３－ヨードベンジル）－アデノシン－５’－Ｎ－メチルウロナミド（ＩＢ－ＭＥＣＡ）により誘発される収縮を防止した（Ｐ＜０．０１、Ｆ分布検定）ことを示す。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図２Ｂ】ＮＰＥ細胞のＩＢ－ＭＥＣＡ刺激等張性収縮（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ）に対する$Ａ_3$アンタゴニストの効果を示すグラフである。図は、$Ａ_3$選択的アンタゴニストＭＲＳ－１１９１（１００ｎＭ）が、ＩＢ－ＭＥＣＡにより誘発される特徴的な収縮を防止した（ｎ＝４、Ｆ分布検定でＰ＜０．０１）ことを示す。ＭＲＳ－１１９１がＩＢ－ＭＥＣＡの非存在下では細胞容積に影響を与えなかったことから、この相互作用の特異性が裏付けられた（ｎ＝４）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図３Ａ】ＮＰＥ細胞のアデノシン刺激等張性収縮（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ）に対する選択的$Ａ_3$アンタゴニストの効果を示すグラフである。１０μＭアデノシンによるアデノシン受容体の非選択的活性化により誘発される特徴的な収縮は、３００ｎＭのＭＲＳ－１０９７（ｎ＝４）の適用によって防止された（Ｐ＜０．０１、Ｆ分布検定）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図３Ｂ】ＮＰＥ細胞のアデノシン刺激等張性収縮（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ）に対する選択的$Ａ_3$アンタゴニストの効果を示すグラフである。１０μＭアデノシンによるアデノシン受容体の非選択的活性化により誘発される特徴的な収縮は、１００ｎ

ＭのＭＲＳ－１１９１（ｎ＝３）の適用によって防止された（Ｐ＜０．０１、Ｆ分布検定）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図３Ｃ】ＮＰＥ細胞のアデノシン刺激等張性収縮（ｉｓｏｔｏｎｉｃ　ｓｈｒｉｎｋａｇｅ）に対する選択的$Ａ_3$アンタゴニストの効果を示すグラフである。１０μＭアデノシンによるアデノシン受容体の非選択的活性化により誘発される特徴的な収縮は、１００ｎＭのＭＲＳ－１５２３（ｎ＝３）の適用によって防止された（Ｐ＜０．０１、Ｆ分布検定）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図４Ａ】ＮＰＥ細胞の等張容積に及ぼすアデノシン受容体アゴニストの影響を示すグラフである。$Ａ_3$選択的アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡは１００ｎＭで速やかな収縮をもたらした（ｎ＝４、$ｖ_∞$＝９５．６±０．２％、τ＝４．５±０．６分、Ｆ分布検定でＰ＜０．０１）。これに対し、$Ａ_1$選択的アゴニスト$Ｎ^6$－シクロペンチルアデノシン（ＣＰＡ）は１００ｎＭでほとんど影響を与えず、３μＭでは全く影響しなかった（ｎ＝４）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図４Ｂ】ＮＰＥ細胞の等張容積に及ぼすアデノシン受容体アゴニストの影響を示すグラフである。１００ｎＭにおいて、$Ａ_2$選択的アゴニストＣＧＳ－２１６８０は影響を示さなかったが、$Ａ_3$選択的アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡは、この場合も収縮をもたらした（ｎ＝４、Ｆ分布検定でＰ＜０．０１）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図４Ｃ】高濃度（３μＭ）で、$Ａ_2$選択的アゴニストＣＧＳ－２１６８０も等張性収縮を誘発した。しかしながら、細胞を選択的$Ａ_3$受容体アンタゴニストＭＲＳ－１１９１（１００ｎＭ）とプレインキュベートすると、この作用は無くなった（ｎ＝４、Ｆ分布検定でＰ＜０．０１）。実線の曲線は単一指数関数を有する最小二乗適合であり、一方、有意な収縮を示さなかったデータセットは点線で結ばれている。

【図５】完全な状態のウサギ毛様体上皮を通過する短絡電流（$Ｉ_{sc}$）に対するＩＢ－ＭＥＣＡの影響を示すグラフである。データ解析の最初の段階として、薬剤の添加直前の２０分間のベースライン電流を線形最小二乗解析によってフィッティングさせた。この解析によって得られた線をその薬剤の導入後４５分の時点まで外挿した。各電流レスポンスをそれぞれの外挿ベースラインから差し引いて定ゼロ電流近似の共通の初期ベースラインを得た。全ての記録は薬剤導入時（０時間）に対して正しく位置合わせした。対照（溶媒）、溶媒を含むＩＢ－ＭＥＣＡ及び溶媒について補正したＩＢ－ＭＥＣＡの記録は別々に平均した。反応に対する$Ｃｌ^-$の寄与を特定するためにＩＢ－ＭＥＣＡは常に５ｎＭの$Ｂａ^{2+}$の存在下に添加した。

【図６Ａ】化学構造を示す図である。図は生理的アゴニストのアデノシン、完全アゴニストＣＬ－ＩＢ－ＭＥＣＡ並びにヌクレオシド誘導体ＭＲＳ－３７７１及びＭＲＳ－３６４２の構造を示す。

【図６Ｂ】化学構造を示す図である。図はＭＲＳ－３８２０、（２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオールの構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

房水分泌に影響を与える際のアデノシン（Ａｄｏ）などの$Ａ_3$受容体アゴニストの提案されている作用機構を図１に示した。ＡＴＰがＰＥ及び／又はＮＰＥ細胞から放出される。次いで、細胞外酵素（ｅｃｔｏ）によってＡＴＰがアデノシンに変換される。次に、このアデノシンがＮＰＥ細胞の$Ａ_3$受容体に結合し、その結果、$Ｃｌ^-$チャネルが開く。これによって房水の産生が増加し、眼内圧が上昇する。さらに、ＡＴＰ及びタモキシフェンによって同時刺激すると、ＰＥ細胞からの$Ｃｌ^-$流出が活発になり、房水形成の正味の減少がもたらされる。ＡＴＰはＰＥ細胞の$Ｐ_2$受容体に作用し、$Ｃｌ^-$チャネルの開孔を促

進し、房水産生を減少させることにより眼内圧の低下をもたらす。

【００１５】

本発明には、等張液中の細胞容積測定により求められるＮＥ細胞の種交差性収縮を、アデノシン受容体サブタイプ$Ａ_3$アンタゴニスト（本明細書では「$Ａ_3$アンタゴニスト」と呼ぶ）が抑制するという観察が含まれる。この細胞収縮の抑制は、眼内圧の低下をもたらすことになる、ＮＰＥ細胞膜を通しての房水分泌の正味の低下を意味する（図１）。こうした$Ａ_3$受容体はヒト及びウサギのＮＰＥ細胞に存在し、アデノシンによるＮＰＥ塩素（$Ｃｌ^-$）チャネルの活性化の基礎を構成している。ＰＥ細胞の収縮は、ＰＥ細胞膜から基質への房水の正味の再吸収の刺激を意味しており、これによって房水形成の正味の低下及び眼内圧の低下がもたらされる（図１）。よって、こうした$Ａ_3$選択的アデノシン受容体はＮＰＥ細胞の塩素チャネル活性を増大させ、この受容体を$Ａ_3$アンタゴニスト又はその関連化合物によりブロックすると、塩素チャネル活性及び房水中へのＮＰＥ細胞による分泌が低下する。そのため、$Ａ_3$アンタゴニストは、緑内障及び眼内圧を低下させることが望まれる眼の他の異常状態の種交差性治療剤として、眼内圧を低下させるために用いることができる。

【００１６】

完全な状態のウサギ毛様体上皮を通過する短絡電流、懸濁培養ヒトＮＰＥ細胞の細胞容積並びにパッチクランプした培養ヒト及び新鮮ウシＮＰＥ細胞からの全細胞電流の測定から、アデノシン受容体を占拠すると哺乳動物のＮＰＥ細胞における$Ｃｌ^-$分泌が刺激されることが明らかにされている（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年；米国特許第６，５２８，５１６号）。下記の実施例に示したデータから明らかなように、こうした効果は$Ａ_3$受容体によって媒介される。$Ａ_3$受容体はヒトＨＣＥ細胞（ヒトＮＰＥ細胞の細胞株）及びウサギ毛様体のいずれにも存在する。

【００１７】

$Ａ_3$選択的アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡ（$Ｎ^6$－（３－ヨードベンジル）－アデノシン－５’－Ｎ－メチルウロナミド）は$Ｂａ^{2+}$の存在下でウサギ虹彩－毛様体を通過する短絡電流を増大させたが、これはＮＰＥ細胞からの$Ｃｌ^-$の流出が増大することと一致した変化である。$Ｃｌ^-$コンダクタンスを特定するためのグラミシジンの存在下で、ＩＢ－ＭＥＣＡはヒトＨＣＥ細胞を用量依存性に収縮させ、そのＫｄ値約５５ｎＭは、１００ｎＭのＩＢ－ＭＥＣＡで心筋細胞の$Ａ_3$受容体が刺激されることと一致している（シャヒデュラ（Ｓｈａｈｉｄｕｌｌａｈ）ほか、カレント・アイ・リサーチ（Ｃｕｒｒ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）１６：ｐ．１００６－１０１６（１９９７年））。高度に特異的な$Ａ_3$アゴニスト$Ｃｌ^-$ＩＢ－ＭＥＣＡもグラミシジンの存在下でＨＣＥ細胞の収縮をもたらした。グラミシジンは容易に細胞膜を仕切って陽イオン選択的孔を形成し、容積調節の研究に広く用いられている（ホフマン（Ｈｏｆｆｍａｎｎ）ほか、「インタラクション・オブ・セル・ボリューム・アンド・セル・ファンクション（Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｖｏｌｕｍｅ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ）」ラング（Ｌａｎｇ）ほか編、スプリンゲル（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ）、ハイデルベルグ（Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ）ドイツ、ｐ．１８８－２４８、ＡＣＥＰシリーズ（ＡＣＥＰ　Ｓｅｒｉｅｓ）１４（１９９３年））。こうした条件下では、細胞内$Ｃｌ^-$の放出が低浸透圧性（シヴァン（Ｃｉｖａｎ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）３５：ｐ．２８７６－２８８６（１９９４年））及び等張性細胞収縮（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年）のいずれにおいても律速因子になる。

【００１８】

さらに、$Ａ_3$アンタゴニストＭＲＳ－１０９７及びＭＲＳ－１１９１は、$Ａ_1$及び$Ａ_{2A}$受容体に対するその$Ｋ_i$よりもはるかに低い濃度でＩＢ－ＭＥＣＡにより誘発される収縮を防止した。$Ａ_1$アゴニストＣＰＡは細胞容積に対して一定した効果を示さなかった。$Ａ_{2A}$アゴニストＣＧＳ－２１６８０は低濃度では効果を示さなかった。ＣＧＳ－２１６８０の収縮に対する効果は$Ａ_3$受容体に対する$Ｋ_i$値よりも５００倍高い濃度で検出され

たに過ぎず、その効果はA_3アンタゴニストＭＲＳ－１１９１によってブロックされた。A_3アンタゴニストＭＲＳ－１０９７、ＭＲＳ－１１９１及びＭＲＳ－１５２３は１０μＭのアデノシンにより生じる収縮をブロックした。本発明者らはＭＲＳ－１５２３、ＭＲＳ－３６４２、ＭＲＳ－３７７１、ＭＲＳ－３８２６、ＭＲＳ－１６４９及びＭＲＳ－３８２７をそれぞれ試験して、これらがマウスでＩＯＰを低下させることを見出した。ＭＲＳ－１２２０並びにヌクレオシドＬｊ－１８３０、Ｌｊ－１８３１、Ｌｊ－１８３３、Ｌｊ－１８３４、Ｌｊ－１８３５、Ｌｊ－１８３６及びＬｊ－１８３７（これら全てはＮＩＨのＬ．Ｓ．ジョンウン（Ｊｅｏｎｇ）、韓国により合成された）も有効である。したがって、さらに、A_3受容体アンタゴニスト活性を明確に有する、ジヒドロピリジン、ピリジンもしくはピリジニウム塩又はトリアゾロキナゾリン類の誘導体も本発明の範囲内に想定されている。以上の観察結果を総合すると、ヒトＮＰＥ細胞のＨＣＥ株によるCl^-放出のアデノシン刺激活性化は、主にアデノシン受容体サブタイプA_3の占拠によって媒介されることが分かる。

【００１９】

一実施態様において、ＮＩＨのＬ．Ｓ．ジョンウン（Ｊｅｏｎｇ）、韓国により合成されたA_3アンタゴニストＭＲＳ－３８２０（２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオール）は、２５０μＭ（マイクロモル）の局所適用液滴濃度を用いて正常マウスで非侵襲的に試験したところ、最初の適用後２０分以内に眼内圧（ＩＯＰ）を有意に低下させた。投与後３０分ではさらに大きな低下が認められた（１６．７±１．１　ｍｍＨｇのベースラインから４．２±０．７　ｍｍＨｇ、対応のある　ｔ－検定でｐ＜０．００１）。本発明の方法のポイントは、（時間又は大きさに関して）定量的ではなく、定性的であることにある。この場合の「有意に」とは、少なくとも＜０．０５フォローの測定可能なＩＯＰの低下を意味し、これはこの用語の通常受け入れられている定義である。有意な変化とは、ＩＯＰが前処置状態から少なくとも５％又は少なくとも１０％又は少なくとも２０％又は少なくとも３０％又は少なくとも５０％又は少なくとも６０％又は少なくとも７５％又は少なくとも９０％、並びに最大９９％の差だけ低下する変化である。以下のデータから明らかになるが、通常５乃至１０分又は１５分又は２０分又は２５分又は３０分又は、最も多くの場合３５分以上、最大４５分又は最大１時間の全測定期間にわたって、ＭＲＳ３８３０は眼内圧を種交差性に有意に低下させた。ＩＯＰの変化は統計的に有意であったが、このような効果が単に偶然に観察され得る確率は１／２０未満（Ｐ＜０．０５）であった。さらに、下記でより詳細に説明され、種非依存性の強力なA_3阻害剤を送達してCl^-チャネルを活性化することにより非色素毛様体上皮（ＮＰＥ）細胞を積極的に収縮させることを支持することになるが、このＩＯＰ低下を明確な「種非依存性」作用として利用した。

【００２０】

「種交差性」及び「種非依存性」は、通常の意味、即ち、得られるデータが、選択した試験動物の種と無関係であり、その結果が全く文字通り種間の差違を超えているという意味で用いられる用語である。このA_3受容体アンタゴニストのプロドラッグ体も眼への投与が想定されており、これは次いで活性アンタゴニストへ転換され、さらにこれが眼内圧を低下させた。

【００２１】

別の実施態様において、A_3アンタゴニストのヨウ化２，４－ジエチル－１－メチル－３－（エチルスルファニルカルボニル）－５－エチロキシカルボニル－６－フェニルピリジウム（ＮＲＳ－１６４９）を用いて眼内圧を低下させた。ＭＲＳ化合物類の合成については概ね米国特許第６，５２８，５１６号に開示されており、これは引用により本明細書に組み込まれている。代表的なＭＲＳ化合物である３，５－ジアシル－１，２，４－トリアルキル－６－フェニルピリジニウム誘導体は極めて高い水溶性（４３ｍＭ）を示し、かつ、容易にエーテルへ抽出することができる。さらに、この化合物のプロドラッグ体である対応する１－メチル－１，４－ジヒドロピリジンは、組織ホモジネートの存在下にインビトロで酸化されて化合物ＭＲＳ－１６４９を形成することができる。したがって、A_3

受容体アンタゴニストのプロドラッグ体を眼に投与し、次いで、これを活性アンタゴニストに変換させ、これにより眼内圧を低下させることができることが想定されている。

【００２２】

以下の実施例で説明する具体的なＡ$_3$受容体アンタゴニストであるＭＲＳ－１０９７（３－エチル５－ベンジル－２－メチル－６－フェニル－４－スチリル－１，４－（±）－ジヒドロピリジン－３，５－ジカルボキシレート）、ＭＲＳ－１１９１（３－エチル５－ベンジル－２－メチル－６－フェニル－４－フェニルエチニル－１，４－（±）－ジヒドロピリジン－３，５－ジカルボキシレート）（ジャンほか、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．）４０：ｐ．２５９６－２６０８（１９９７年））、ＭＲＳ－１５２３（リーほか、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．）４２：ｐ．７０６－７２１（１９９９年））及びＭＲＳ－３８２０（２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオール）の他に、眼内圧を低下させる任意のＡ$_3$受容体アンタゴニスト又はそのアナログも本発明の範囲内にある。本発明に用いるための他のＡ$_3$受容体アンタゴニストとしては、ヤコブソン（Ｊａｃｏｂｓｏｎ）（トレンズ・イン・ファーマコロジカル・サイエンシズ（Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．）１９：ｐ．１８４－１９１（１９９８年））に記載されているものがあり、ＭＲＳ－１３３４（３－エチル５－（４－ニトロベンジル）２－メチル－６－フェニル－４－フェニルエチニル－１，４－（±）－ジヒドロピリジン－３，５－ジカルボキシレート）、ＭＲＳ１０６７（３，６－ジクロロ－２’－（イソプロポキシ）－４’－メチルフラボン）、ＭＲＳ－１２２０（９－クロロ－２－（２－フリル）－５－フェニルアセチルアミノ－［１，２，４］－トリアゾロ［１，５－ｃ］キナゾリン）、Ｌ２４９３１３（６－カルボキシメチル－５，９－ジヒドロ－９－メチル－２－フェニル－［１，２，４］－トリアゾロ［５，１－ａ］［２，７］ナフチリジン）及びＬ２６８６０５（３－（４－メトキシフェニル）－５－アミノ－７－オキソ－トリアゾロ［３，２］ピリミジン、ＶＵＦ８５０４（４－メトキシ－Ｎ－［２－（２－ピリジニル）キナズジン－４－イル］ベンズアミド）などが挙げられる。

【００２３】

以下に示したデータは、ＮＰＥ細胞の収縮をブロックし、ＰＥ細胞の収縮を促進する種々の種交差性薬剤の能力を示している。これらの薬剤の正味の効果は、インビボで眼内圧を低下させることである。眼内圧を低下させるためのＡ$_3$受容体アンタゴニストの４つの化学物質クラス、即ち、ジヒドロピリジン類（例えば、ＭＲＳ １０９７、ＭＲＳ １１９１）、ピリジン類、ピリジニウム塩類（例えば、化合物２３（シエ（Ｘｉｅ）ほか、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．）４２：ｐ．４２３２－４２３８（１９９９年））及びトリアゾロキナゾリン類（例えば、ＭＲＳ１２２０（プグリエセ（Ｐｕｇｌｉｅｓｅ）ほか、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー（Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．）１４７：ｐ．５２４－５３２（２００６年））、並びにＡ$_3$ＡＲアンタゴニスト活性を有するこれらの誘導体（例えば、トリアゾロキナゾリン誘導体ＭＲＳ１２２０及びヌクレオシドＬＪ－１８３０、ＬＪ－１８３１、ＬＪ－１８３３、ＬＪ－１８３４、ＬＪ－１８３５、ＬＪ－１８３６及びＬＪ－１８３７）の使用も本発明の要旨の範囲内に想定されている。これらのクラスの化合物についてはＰＣＴ／Ｗ０９７／２７１７７及び米国特許第６，５２８，５１６号にも開示されている。

【００２４】

化合物がＡ$_3$受容体アンタゴニストとして作用することができるかどうかの判定は、標準的な薬理学的結合アッセイを用いておこなうことができる。しかしながら、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニストのＩＯＰ低下効果が治療対象の種とは無関係であることを立証する試験を着手する際には、小さなマウスの眼におけるＩＯＰの変化の信頼できる測定を可能にする方法が必要であった。そこで、小さなマウスの眼に対して本発明者らが開発した侵襲的サーボ・ヌル技術によってマウスＩＯＰに対するＡ$_3$ＡＲアンタゴニストの効果を測定した。

この技術では先端径が約５マイクロメートルの細い中空ガラス針で角膜を突き刺す必要がある。この侵襲的サーボ・ヌル技術（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００１年）を用いて正常マウスで認められたＩＯＰの比較的大きな（約５ｍｍＨｇの）低下から、上記で示したように、A_3アンタゴニストは緑内障患者を治療するためのインビボ治療用化合物として適応となることが示唆されている。しかしながら、別の２つの観察結果が注眼された。第一に、サルにおいてA_3ＡＲアンタゴニストを局所適用すると、ＩＯＰは極めてわずかに低下するに過ぎなかった（オカムラ（Ｏｋａｍｕｒａ）ほか、バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー・レター（Ｂｉｏｏｒｇ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ．　Ｌｅｔｔ．）１４（１４）：ｐ．３７７５－３７７９（２００４年））が、この場合の測定は角膜を穿刺することなく非侵襲的に行われたことである。第二に、A_3ＡＲアンタゴニストの局所適用に対するマウスＩＯＰの反応は、侵襲的サーボ・ヌル技術で測定したマウスでは他の哺乳動物に比し、はるかにより速やかであった（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００１年、２００２年；パング（Ｐａｎｇ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）８０（２）：ｐ．２０７－２１４（２００５年））ことである。この第二の知見については下記の実施例１でさらに詳細に説明する。

【００２５】

抗エストロゲン剤と、ＡＴＰもしくはＮＰＥ細胞からのＡＴＰ放出を促進することができる任意の化合物との併用により、眼内圧を低下させることについても、これ自体又はA_3アンタゴニストなどとの更なる併用も想定されている。眼内圧を低下させるためのカルモデュリンアンタゴニストの使用も本発明の範囲内にあり、このようなアンタゴニストとしては塩酸カルミダゾリウム、カルモデュリン結合ドメイン、クロールプロマジンＨＣｌ、メリチン、フェノキシベンザミンＨＣｌ、ジマレイン酸トリフロペラジン、Ｗ－５、Ｗ－７、Ｗ－１２及びＷ－１３が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの化合物はカルビオケム社（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）（サンディエゴ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ）、カリフォルニア州から入手できる。眼内圧の低下が確認された上記化合物のアナログの使用も本発明の範囲内にある。

【００２６】

これらの薬剤は、緑内障などの、眼内圧の上昇に伴って生じる、又はこれが原因となる眼疾患を治療するのに用いることができる。こうした薬剤は、ＩＯＰが上昇している哺乳動物又は他の動物、好ましくはヒトへの投与用の薬剤を製造するための従来の方法に従って加工することができる。本発明の対象としている患者又は対象（本明細書ではこれらを総称して「個体」と呼ぶ）には、緑内障として認識される病状をもたらすタイプの眼のＩＯＰ上昇を患っているか、その素因を有する任意の動物又はヒトを含める。

【００２７】

これらの薬剤は、通常の賦形剤、即ち、これら薬剤と有害に反応しない、非経口的、経腸的（例えば、経口的）又は局所適用に適した医薬用として許容可能な有機又は無機担体物質と混合して用いることができる。好適な医薬用として許容可能な担体としては、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール類、ポリエチレングリコール類、ゼラチン、乳糖、アミロース、澱粉などの炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリド及びジグリセリド類、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル類、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。こうした製剤は滅菌し、必要に応じて、助剤、例えば、その活性薬剤と有害に反応しない滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色、矯味矯臭及び／又は芳香剤などと混合することができる。また、これらは、所望の場合、他の活性薬剤、例えば、ビタミン類と組み合わせることができる。

【００２８】

非経口的適用の場合、注射用滅菌溶液、好ましくは油性溶液もしくは水溶液、及び懸濁液、乳濁液又は坐剤を含む埋込剤が特に好適である。アンプル剤は便利な単位投与形態で

ある。経腸的適用の場合、錠剤、液剤、ドロップ剤、坐剤又はカプセル剤が特に好適である。加糖ビヒクル使用の場合、シロップ剤、エリキシル剤などを用いることができる。リポソーム、又は活性薬剤が、例えば、マイクロカプセル化、複合コーティングなどによって段階的分解性コーティングで保護されているものなどの持続放出及び制御放出組成物を処方することができる。また、薬剤を凍結乾燥して注射用製剤を調製することも可能である。

【００２９】

局所適用の場合、局所適用に適合性の担体を含み、好ましくは水より大きい動的粘度を有する粘性乃至半個体又は個体形態である非噴霧可能形態が用いられる。好適な製剤としては液剤、懸濁剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リニメント剤、膏薬、エアロゾル剤などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらは、必要に応じて、滅菌され、又は助剤、例えば、防腐剤、安定剤、湿潤剤、緩衝剤もしくは浸透圧、眼透過性などに影響を与える塩と混合する。局所適用の場合、活性成分が、好ましくは固体もしくは液体不活性担体物質との組合せで、スクイーズボトルに又は加圧された揮発性、通常ガス状の噴射剤、例えばフレオンと混合して包装されている噴霧可能なエアロゾル製剤も好適である。

【００３０】

好ましい実施態様においては、薬剤を、点眼剤、眼用ゲル剤及び眼軟膏剤を含む、眼に投与するのに適した医薬製剤に製剤化する。最近ワン（Ｗａｎｇ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐｅｒｉｍ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）８５：ｐ．１０５－１１２（２００７年）に報告されている、標的領域への局所適用薬物の通過をブロック又は阻害する角膜の最近発見されたバリア効果についても留意されたい。この効果は、動物又はヒト患者の眼へＩＯＰ低下薬を送達する際に、医療関係者によって考慮される必要があると考えられる。

【００３１】

全身性投与の場合、本発明による薬剤の投与量は通常、約０．１μｇ／ｋｇ乃至１０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約１０μｇ／ｋｇ乃至１ｍｇ／ｋｇである。局所投与の場合、約０．０００００１％乃至１０％、好ましくは約０．１％乃至４％の活性成分の投与量が想定されている。いうまでもなく、薬剤の実際の好ましい量は使用する具体的な薬剤、疾患の重症度、処方される具体的な組成物、適用様式及び治療対象の種によって異なることになる。所与の宿主に対する投与量は、通常の考慮事項を用いて、例えば、対象化合物及び既知の薬剤の異なる活性を、例えば、適切な通常の薬理学的プロトコルによって通例通り比較することにより決定することができる。こうした薬剤は、１日当たり１回未満（例えば、１日おきに）乃至１日当たり４回投与する。

【００３２】

本発明を、以下の限定されない具体例を参照することによってさらに明確化する。本発明によって含まれる定義並びに基本的な技術を実施するための方法及び手段が記載されている分子生物学の標準的な教科書を参照されたい。本発明の目的から逸脱したりその範囲を狭めたりすることなく、材料及び方法の両方に対して多くの修正を行うことができることは、当業者に明瞭に理解されよう。

【実施例】

【００３３】

以下の実施例では、実施例１乃至３で、それぞれ２つの課題について説明する。第一は、ＩＯＰ低下薬を涙液膜に点滴剤として局所適用した場合、そのような薬物の眼の内部への治療的送達に対して角膜が実質的なバリアとなるかどうかを明らかにすることである。第二は、投与したアンタゴニストに対するアデノシン受容体サブタイプ$Ａ_3$の反応に、種間変動が存在するかどうか、即ち、この反応が非依存性であるかどうかを明らかにすることである。なぜなら、このような確認なしには、齧歯類実験動物で良好な反応が得られても、そのことが必ずしもヒトで同様に良好な効果が得られることを保証しないからである。以下の実施例では、特定の材料及び方法を、多くの場合、米国特許第６，５２８，５１

６号に開示されているような、これまでに報告された実験に使われた材料及び方法に相当する仕方で用いる。

【００３４】

総じて、数値データは平均値±１ＳＥで示す。実験回数は記号Ｎで示す。実験及びベースライン測定値が同じ平均値及び分布を共有するとの帰無仮説は、表に示したように、スチューデントｔ－検定を用い、Ｆ分布の有意上限によって検定した。このｔ－検定は単一平均間又は単一適合パラメータ間で有意性を比較するために適用した。Ｆ分布を適用することにより、各種懸濁液における容積測定値の経時変化が、単一のデータ点群を反映することができるかどうかを検定した。

【００３５】

材料：

グラミシジン、アデノシン、２－クロロアデノシン、タモキシフェン、ＡＴＰ、１７α及びβエストラジオール、ＤｉＣ$_8$、カルバコール、アトロピン、ヒスタミン並びにトリフルオペラジンは、シグマ・ケミカルス社（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ）（セントルイス（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ）、ミズーリ州）から入手した。ＣＰＡ（Ｎ^6－シクロペンチルアデノシン）、ＣＧＳ－２１６８０、ＩＢ－ＭＥＣＡ、Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ及びＭＲＳ－１１９１（３－エチル５－ベンジル－２－メチル－６－フェニル－４－フェニルエチニル－ｌ，４－（±）－ジヒドロピリジン－３，５－ジカルボキシレート）はリサーチ・バイオケミカルス・インターナショナル社（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）（ナティック（Ｎａｔｉｃｋ）、マサチューセッツ州）から入手した。フラ－２はモレキュラー・プローブズ社（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）（ユージーン（Ｅｕｇｅｎｅ）、オレゴン州）から購入した。ＭＲＳ－１０９７、ＭＲＳ－１５２３及びＭＲＳ－３８２０は、ケネスＡ．ヤコブソン（Ｋｅｎｎｅｔｈ　Ａ．　Ｊａｃｏｂｓｏｎ）博士（米国国立衛生研究所）及びブルースＬ．リャン（Ｂｒｕｃｅ　Ｌ．　Ｌｉａｎｇ）博士（ペンシルベニア大学）により提供された。化合物Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（ＭＨ－Ｃ－７－０８、ロット番号ＣＭＶＩＩＩ－１２）は、米国国立精神保健研究所化学合成プログラム、契約Ｎ０１ＭＨ３０００３の一部としてリサーチ・バイオケミカルズ・インターナショナル社（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）により提供され、フラ－２ＡＭはモレキュラー・プローブズ社（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，　Ｉｎｃ．）（ユージーン、オレゴン州）から入手した。ＮＰＰＢ［５－ニトロ－２－（３－フェニルプロピルアミノ）ベンゾエート］及びスタウロスポリンは、バイオモル・リサーチ・ラボラトリーズ社（Ｂｉｏｍｏｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ．）（プリマス・ミーティング（Ｐｌｙｍｏｕｔｈ　Ｍｅｅｔｉｎｇ）、ペンシルベニア州）から入手した。

【００３６】

細胞培養：

ＨＣＥ（ヒト毛様体上皮（ｈｕｍａｎ　ｃｉｌｉａｒｙ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ））細胞株（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年）は、成人上皮の初代培養から得られた不死化ＮＰＥ細胞株である。細胞は１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ａ－１１１５－Ｌ、ハイクローン・ラボラトリーズ社（ＨｙＣｌｏｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ｉｎｃ．）、ローガン（Ｌｏｇａｎ）、ユタ州）及び５０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（#１５７５０－０１１ギブコＢＲＬ社（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）、グランドアイランド、ニューヨーク州)を含有するダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、#１１９６５－０２７、ギブコＢＲＬ社）において５％ＣＯ$_2$中３７℃で増殖させた（ワックス（Ｗａｘ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）５７：ｐ．３０５７－３０６３（１９９３年）；ヤントルノ（Ｙａｎｔｏｒｎｏ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）４９：ｐ．４２３－４３７（１９８９年））。この増殖培地のオスモル濃度は３２８ｍＯｓｍであった。細胞は６乃至７日毎に継代し、継代後８乃至１３日に集密となった後に実験に用いた。ウシ色素毛様体上皮の初代培養からの不死化ＰＥ細胞株も適合条件下で増殖させた。

【００３７】
等張溶液中における細胞容積の測定：
ＰＥ及びＮＰＥ細胞の容積を測定した。その理由は、液の移動がＰＥ及びＮＰＥ細胞容積のそれぞれの変化の根底にあるからである。また、このことは、房水の分泌の根底にある液の移動と同じであると考えられる（図１）。
【００３８】
細胞をトリプシン処理（ヤントルノ、上記文献）して単一のＴ－７５フラスコから採取した後、上記ＨＣＥ細胞又はウシ細胞のＤＭＥＭ（又は、適切な場合、Cl^-不含培地）懸濁液の０．５ｍｌアリコートを、（各ｍＭ単位で）１１０．０のＮａＣｌ、１５．０のＨＥＰＥＳ［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－　ピペラジンエタンスルホン酸］、２．５の$CaCl_2$、１．２の$MgCl_2$、４．７のＫＣｌ、１．２のKH_2PO_4、３０．０の$NaHCO_3$及び１０．０のグルコースを含有する、ｐＨ７．４及びオスモル濃度２９８乃至３０５ｍＯｓｍの各試験溶液２０ｍｌに添加した。細胞の平行アリコートを同じ日に検討した。１つのアリコートは通常、対照として用い、その他は懸濁時に種々の実験条件にさらした。対照及び実験アリコートには常に同量の溶媒ビヒクル（ジメチルホルムアミド、ＤＭＳＯ又はエタノール）を添加した。これらの懸濁液の検討順序を変えることにより、系統的な時間依存性アーチファクトを排除した（シヴァン（Ｃｉｖａｎ）ほか、エクスメンタル・アイ・リサーチ（Ｅｘｐ．　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．）５４：ｐ．１８１－１９１（１９９２年）；シヴァンほか、１９９４年）。
【００３９】
等張懸濁液の細胞容積を１００μｍアパーチャを用い、クールター計数器（モデルＺＢＩ－チャネライザー（Ｃｈａｎｎｅｌｙｚｅｒ）ＩＩ）で測定した（シヴァンほか、上記文献、１９９４年）。以前に報告されたように（ワックスほか、上記文献、１９９３年）、懸濁液の細胞容積（v_C）は分布関数のピークとした。細胞収縮は、時間（ｔ）の関数として、単一指数関数：

$$v_C = v_{28} + (v_0 - v_\infty) - [e^{-(t - t_0)/\tau}] \qquad (1)$$

であって、式中、v_∞は定常状態細胞容積、v_0はフィッティング対象の経時変化の最初の時点（t_0）の細胞容積、及びτは収縮の時定数であるものとする関数にフィッティングさせた。データ処理を目的として、データを、等張容積１００％とした最初の時点に規準化した。フィット（ｆｉｔｓ）は非線形最小２乗法回帰解析により得られ、v_∞及びτを変数とすることが可能となった。
【００４０】
アデノシンがＮＰＥ細胞のCl^-チャネルを活性化することにより、等張細胞収縮を引き起こすことを示した以前の研究（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年）では、使用されたアデノシンの濃度はアデノシン受容体サブタイプA_1、A_{2A}、A_{2B}又はA_3を活性化するのに十分高かった。これらの受容体を識別するために、これらの受容体に選択的な一連のアゴニスト及びアンタゴニストを用いる実験を繰り返した。グラミシジンの存在下では、A_3アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡは濃度依存性に細胞を収縮させた。ＩＢ－ＭＥＣＡ誘発収縮の見掛けのK_dは５５±１０ｎＭであった。ＩＢ－ＭＥＣＡはA_3受容体の高度に選択的なアゴニストであり、このA_3受容体に対するK_iは、A_1又はA_{2A}受容体に対するそれの５０分の１以下である（ガロ－ロドリゲス（Ｇａｌｌｏ－Ｒｏｄｒｉｇｅｚ）ほか、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Ｊ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ．）３７：ｐ．６３６－６４６　（１９９４年）；ヤコブソン（Ｊａｃｏｂｓｏｎ）ほか、上記文献、１９９５年；ヤコブソン（Ｊａｃｏｂｓｏｎ）ほか、ＦＥＢＳレターズ（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．）３３６：ｐ．５７－６０（１９９３年））。
【００４１】
A_3選択的アンタゴニストがＩＢ－ＭＥＣＡによってもたらされる推定A_3媒介収縮をブロックすることができるかどうかについても調べた。懸濁液の平行アリコートを、ヒトA_1／A_{2A}／A_3受容体への結合のK_i値（ｎＭ単位で）が５，９３０／４，７７０／１０８である（ヤコブソン（Ｊａｃｏｂｓｏｎ）ほか、ニューロファーマコロジー（Ｎｅ

ｕｒｏｐｈａｒｍａｃｏｌ．）３６：ｐ．１１５７－１１６５（１９９７年））選択的A_3選択的アンタゴニストのＭＲＳ－１０９７とプレインキュベートした。３００ｎＭのＭＲＳ－１０９７と２分間プレインキュベートすると、１００ｎＭのＩＢ－ＭＥＣＡがその特性として誘発する等張収縮がブロックされた（図２Ａ）。ヒトA_1／A_{2A}／A_3受容体への結合のK_i値（ｎＭ単位で）が４０，１００／＞１００，０００／３１．４である別の高度に選択的なA_3アンタゴニストＭＲＳ－１１９１も使用した。１００ｎＭのＭＲＳ－１０９７と２分間プレインキュベートすると、１００ｎＭのＩＢ－ＭＥＣＡに対するその後の反応が阻止された（図２Ｂ）。

【００４２】

アデノシン受容体に到達する生理的アゴニストは、毛様体上皮細胞によるＡＴＰの放出及び細胞外酵素活性から生じるヌクレオシドのアデノシンそのものであると思われる（ミッチェル（Ｍｉｔｃｈｅｌｌ）ほか、上記文献、１９９８年）。アデノシンは、培養ヒトＮＰＥ細胞の等張収縮を３乃至１０μＭのEC_{50}で誘発する（シヴァン（Ｃｉｖａｎ）ほか、上記文献、１９９７年）。この濃度範囲では、アデノシンはアデノシン受容体の４種のサブタイプ全ての非選択的アゴニストとしても作用する（フレドホルム（Ｆｒｅｄｈｏｌｍ）ほか、ファーマコロジカル・レビューズ（Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｒｅｖ．）４６：ｐ．１４３－１５６（１９９４年）；フレドホルム（Ｆｒｅｄｈｏｌｍ）ほか、トレンズ・イン・ファーマコロジカル・サイエンシズ（Ｔｒｅｎｄｓ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｓｃｉ．）１８：ｐ．７９－８２（１９９７年））。図３に示したように、１００ｎＭのA_3選択的アンタゴニストＭＲＳ－１１９１（図３Ｂ）又は３００ｎＭのA_3選択的アンタゴニストＭＲＳ－１０９７（図３Ａ）と２分間プレインキュベートすると、１０μＭアデノシンがその特性としてもたらす収縮がブロックされた。ヒトA_1／A_{2A}／A_3受容体への結合のK_i値（ｎＭ単位で）が１５，６００／２，０５０／１９である（リー（Ｌｉ）ほか、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Ｊ．　Ｍｅｄ．　Ｃｈｅｍ．）４１：ｐ．３１８６－３２０１、１９９８年）A_3アンタゴニストのＭＲＳ－１５２３もアデノシンの作用を排除した。

【００４３】

したがって、特異的なA_3アンタゴニストが非特異的なアデノシンに対する反応を阻害することができることから、その他の受容体がCl^-チャネルの活性化に寄与することは極めて少ないことが示唆される。このことをさらに調べるために、A_1及びA_{2A}アゴニストの作用を調べた。ＣＰＡはA_1受容体に対するK_iが０．６ｎＭであるA_1選択的アゴニストである。しかしながら、ＣＰＡは３０ｎＭ及び１μＭ（データは示されていない、Ｎ＝３）及び３μＭ（図４Ａ）で有意な収縮を生じなかった。１００ｎＭという中間濃度では有意性の不確かなわずかで緩徐な作用が検出された（図４Ａ）。A_3サブタイプに対するＣＰＡのK_iが４３ｎＭである（クロッツ（Ｋｌｏｔｚ）ほか、上記文献）ことを考えると、A_3受容体との多少の交差反応性は期待できるかも知れない。ＣＧＳ－２１６８０は、A_{2A}受容体に対して２２ｎＭのIC_{50}値を有する（ハッチソン（Ｈｕｔｃｈｉｓｏｎ）ほか、ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・テラピュティクス（Ｊ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｅｘｐ．　Ｔｈｅｒ．）２５１：ｐ．４７－５５、１９８９年；ジャビス（Ｊａｒｖｉｓ）ほか、ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・テラピュティクス（Ｊ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　Ｅｘｐ．　Ｔｈｅｒ．）２５３：ｐ．８８８－８９３、１９８９年）、広く用いられているA_{2A}アゴニストである。ＣＧＳ－２１６８０は１００ｎＭ濃度では検出可能な作用を示さなかった（図４Ｂ）が、３０倍高い濃度（３μＭ）では等張収縮を誘発した（図４Ｃ）。

【００４４】

しかしながら、A_3受容体におけるＣＧＳ－２１６８０のK_iは６７ｎＭであり（Ｋｌｏｔｚ）ほか、上記文献）、したがって、ＣＧＳ－２１６８０は上記高濃度ではA_{2A}受容体又はA_3受容体を介して作用していたかも知れない。これらの可能性を区別するために、懸濁液の平行アリコートを１００ｎＭのアンタゴニストＭＲＳ－１１９１とプレイン

キュベートした。その結果、ＭＲＳ－１１９１が上記高濃度のＣＧＳ－２１６８０により生じる収縮を阻止した（図４Ｃ、Ｐ＜０．０１、Ｆ検定）ことから、観察された収縮はA_3受容体との交差反応性によって媒介されたことが明らかとなった。現在、高親和性のA_{2B}アゴニストは存在しない（Ｋｌｏｔｚ）ほか、上記文献）ので、A_{2B}受容体刺激の寄与については追跡されなかったが、A_3アンタゴニストが１０μＭのアデノシンに対する反応を阻害することができる（図４）ことはA_{2B}受容体の役割を否定するものである。例えば、１０μＭのＭＲＳ－１１９１は組換えヒトA_{2B}受容体に結合している放射性リガンドと置換しなかったので、これは真に選択的なA_3アンタゴニストである。

【００４５】

経上皮測定：

動物実験、好ましくはウサギにおいて、麻酔して屠殺（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、ジャーナル・オブ・メンブラン・バイオロジー（Ｊ．　Ｍｅｍｂｒ．　Ｂｉｏｌ．）１４６：ｐ．２９３－３０５（１９９５年））後、カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、１９９５年に記載の方法で、虹彩－毛様体（Ｉ－ＣＢ）を摘出、分離した。一実験において、瞳孔及び虹彩中央部（ｃｅｎｔｒａｌ　ｉｒｉｓ）をルーサイトディスクで閉塞し、虹彩－毛様体をルーサイトチャンバーの両半分の間に取り付けた。露出された組織の体環は０．９３cm^2の投影表面積を有した。標本を、（ｍＭ単位で）１１０のＮａＣｌ、１０．０のＨＥＰＥＳ（酸）、５．０のＨＥＰＥＳ（Na^+）、３０．０の$NaHCO_3$、２．５の$CaCl_2$、１．２の$MgCl_2$、５．９のＫＣｌ及び１０．０のグルコースを含有する、３０５ｍＯｓｍのオスモル濃度のリンゲル液中でｐＨ７．４を維持するために９５％乃至５％CO_2で連続的にバブルした。次いで、この溶液に$BaCl_2$（５ｍＭ）を添加してK^+電流をブロックした。経上皮電圧を０ｍＶに固定し、溶液直列抵抗を補正し、チャート式記録計で短絡電流をモニターした。データは、デジデータ１２００Ａ（ＤｉｇｉＤａｔａ　１２００Ａ）コンバーター及びアクソスコープ（ＡｘｏＳｃｏｐｅ）１．１ソフトウェア（アクソン・インストルメンツ社（Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、フォスターシティ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ）、カリフォルニア州）によって１０Ｈｚでデジタル方式により取得した。自動平均化を１００の減少因子で行って６／分の最終サンプリング速度を得た。

【００４６】

考えられる溶媒効果の補正：

高濃度（１００μＭ）のアデノシンはウサギ毛様体を通過する短絡電流を増大させることが分かっている（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年）。したがって、高濃度（３０μＭ）のA_3アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡについて、これが短絡電流に影響するか否かを調べた。この濃度では、ビヒクル（ジメチルホルムアミド）自体が有意な効果を示す（図５、最も下の曲線）。この溶媒効果を以下の通りに補正した。即ち、溶媒単独を初期に（０．１％となるように）導入した後、アゴニストを含む同容の溶媒を（０．２％となるように）導入し、さらに３番眼の同容の溶媒単独を（０．３％の最終濃度となるように）添加して終了した。溶媒の初回の添加後の短絡電流の減少は３回目よりも常に大きかった。４つの実験のそれぞれにおいて、初回及び３回目の添加の経時変化を平均することによって、実験期間中、アゴニストを含まない溶媒濃度を０．１％から０．２％まで上昇させることの効果を評価した。図５は、平均溶媒効果の平均曲線、ＩＢ－ＭＥＣＡを作用させた後の未補正平均経時変化、及び溶媒補正した反応の平均曲線±１ＳＥＭを示す。これらの実験は、K^+電流の寄与をできるだけ少なくするために、５ｍＭのBa^{2+}の存在下で実施した。ＩＢ－ＭＥＣＡは短絡電流の有意な増加を生じたが、Ba^{2+}の存在下で短絡電流が増加したことは、この効果がＮＰＥ細胞の側底膜のCl^-コンダクタンスを活性化することによって媒介されることを示唆するものである。その刺激の持続性はA_3刺激に反応した細胞収縮の経時変化と一致している。

【００４７】

（実施例１）

眼内標的への局所用薬物の送達に対する角膜バリア

マウスＩＯＰに対するＡ$_3$ＡＲアンタゴニストの効果は、従来より、小さなマウスの眼に対して本発明者らが開発した侵襲的サーボ・ヌル技術によって測定されている。この技術では、先端径が約５マイクロメートルの細い中空ガラス針で角膜を突き刺す必要がある（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００１年、２００２年）。しかしながら、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニスト化合物のインビボにおけるＩＯＰ低下効果を立証するために、試験技法を改良した。マウスＩＯＰを非侵襲的に測定する気動眼圧計を採用した（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）４６：ｐ．３２７４－３２８０、（２００５年））。この技法を用いると、Ａ$_3$ＡＲアンタゴニスト（ＭＲＳ－１１９１）が局所適用後にマウスＩＯＰを有意に低下させ始めるには、３０分を要することが分かった。これに対して、ＩＯＰを侵襲的サーボ・ヌル技術で測定すると、同じ薬剤が約１分以内にＩＯＰを低下させ始めた。同様に、非侵襲的測定では、非選択的ＡＲアゴニストのアデノシンにより誘発されたＩＯＰの増加は１０分遅れて観察された。以上の結果から、局所適用したＡ$_3$ＡＲアンタゴニストに対するマウスＩＯＰの速やかな反応は、実はマイクロピペットの先端部周囲の損傷組織から薬剤が侵入した結果であることが強く示唆されたが、同じ効果が、マウスの極めて薄い角膜（深さ約１７０マイクロメータ）を横切る拡散による薬剤のはるかに緩徐な送達後にも認められた。

【００４８】

この効果を立証するために、試験動物において全く別のパラメータをモニターした。（１）カルバコール（縮瞳薬）の局所適用後の瞳孔サイズ並びに（２）侵襲的サーボ・ヌル・マイクロピペット装置（ＳＮＭＳ：　ｓｅｒｖｏ－ｎｕｌｌ　ｍｉｃｒｏｐｉｐｅｔｔｅ　ｓｙｓｔｅｍ）及び非侵襲的気動眼圧測定法（ｐｎｅｕｍｏｔｏｎｏｍｅｔｒｙ）の両者により測定したプリン作動性薬剤に対する眼内圧（ＩＯＰ）反応をモニターすることによりマウスの眼のバリア性。

【００４９】

試験動物は、タコニック社（Ｔａｃｏｎｉｃ　Ｉｎｃ．）（ジャーマンタウン（Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ）、ニューヨーク州）から入手した７乃至９週令、体重２５乃至３０ｇのｂｌａｃｋ　Ｓｗｉｓｓ非近交系雌雄マウスであり、１２：１２－ｈ明／暗の照明サイクル下に維持して餌と水を自由に与えた。マウスは、プロパラカインＨＣｌ５％の局所適用で補ったケタミン（２５０ｍｇ／ｋｇ）の腹腔内投与で麻酔してＩＯＰ測定を行った。ＩＯＰは、侵襲的（ＳＮＭＳ）、及び気動眼圧測定法により非侵襲的に、別々の動物で測定した。

【００５０】

瞳孔径を測定するために、瞳孔及びすぐ横に置いた１ｍｍ刻みの定規をデジタルカメラで撮像した。機械的応力をかけるのを避け、その結果としてマイクロピペットの先端部を前房内の位置からずらすのを避けるよう注意を払った。長さをイメージＪ（ＩＭＡＧＥ　Ｊ）（国立衛生研究所（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ））によって測定し、瞳孔径をその定規に対して較正した。

【００５１】

ＳＮＭＳ法（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００１年）によって、外径５乃至１０ｍｍの近接マイクロピペットを高導電性溶液で満たし、角膜を通過させて前房中に進めた。ｗｗｗ．ｉｏｖｓ．ｏｒｇ／ｅｇｉ／ｌｅｔｔｅｒｓ／４６／９／３２７４＃４２２で入手可能なワン（Ｗａｎｇ）ほか、インベスティゲイティブ・オフサルモロジー・アンド・ビジュアル・サイエンス（Ｉｎｖｅｓｔ．　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．　Ｖｉｓ．　Ｓｃｉ．）（シリアルオンライン）（２００６年８月３１日）による改良技術では、安定性が改善され、記録の背景ノイズが減少したことにより、抵抗が初期に用いられた０．２５乃至０．４ＭΩではなく０．１乃至０．３　ＭΩであるマイクロピペットの作製が可能になった。充填溶液は３ＭＫＣｌではなく、３ＭＫＣｌから２ＭＮａＣｌへ減少させた。充填マイクロピペットの抵抗をブリッジ回路で平衡をとらせ、その先端を角膜を通して進めた。前眼房に侵入させると、ＩＯＰが導電性のずっと低い房水をマイクロピペット先

端部に押し入れ、元の充填溶液と置き換える。これによってマイクロピペットの抵抗が増大し、このため、ブリッジ回路の平衡がくずれてベローズが逆圧を生じることにより充填溶液の位置が元に戻り、上記抵抗が初期値に復帰する。したがって、逆圧の値はＩＯＰに等しい。これまで通り（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００１年）、記録の安定により薬剤適用の過程で何十分もの間連続して測定することが可能となった。

【００５２】

ちなみに、ＩＯＰを気動眼圧測定法（ＯＢＴ）（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００５年）によって非侵襲的に測定した。すでに述べたように、眼血液トモグラフィー（ＯＢＴ： ｏｃｕｌａｒ ｂｌｏｏｄ ｔｏｍｏｇｒａｐｈｙ）気動眼圧計（ｐｎｅｕｍｏｔｏｎｏｍｅｔｅｒ）の市販のチップ（血流分析計［ＢＦＡ：Ｂｌｏｏｄ Ｆｌｏｗ Ａｎａｌｙｚｅｒ］プローブチップ；パラディグム・メディカル・インダストリーズ社（Ｐａｒａｄｉｇｍ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ Ｉｎｃ．））を特注のマウントに取り付けた。定圧源からの空気流をこのマウントに通過させてＢＦＡチップの先端を形成するダイヤフラムに到達させた。この空気流がダイヤフラムを外側へ移動させることにより、プローブチップの壁の穴からこの空気を大気中に逃がすことが可能になる。ＢＦＡチップのベースにＴ結線を介して接続したトランスデューサで圧をモニターした。３軸マイクロマニピュレータを用いてプローブアセンブリを角膜へ進めた。ベースライン出力測定値のシフトが示したように、プローブチップを十分に進めて涙液膜と接触させた。改良法では、このチップを、マイクロピペットの先端部が涙液膜から視覚的にずれるまで引っ込めた。次いで、その出力をゼロに調整した後、再び上記チップを進めた。角膜に接触させることによりＢＦＡチップのダイヤフラムが押圧され、このため、空気流の溢出穴への接近が遮断されて、チップのベースの圧が上昇する。プローブを進めると共に生じるこの圧上昇はその特性として、ＩＯＰの終点と見なされる相対的プラトー又は湾曲（ｉｎｆｌｅｃｔｉｏｎ）領域を示す。

【００５３】

この方法を簡素化して上記終点の確認を迅速化し、次いで、上記プローブを約１０秒間隔でほぼ５０ｍｍの規準化ステップの約１０ステップで進めて湾曲領域を確認した（ワン（Ｗａｎｇ）ほか、上記文献、２００６年）。いずれにせよ、圧記録が同時に測定する心拍と明らかに同期した圧の変動を示すものであれば、上記終点は実用上満足できるものであると考えられた。ＩＯＰの気動眼圧測定法による概算値は、カニューレ挿入した標本における圧力計での測定値及びサーボ－ヌル技術により得られる概算値と一致することが以前に見出されていた（アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００５年）。ＩＯＰのベースライン値を確立した後、マイクロマニピュレータを進める軸に沿った位置を記録し、プローブと角膜との接触を中止した。その後、マウスの位置を定位的に維持してプローブチップを同じ位置へ進めることにより遅れた時点でのＩＯＰの測定値を得た。角膜に長時間圧がかかることに伴う潜在的なアーチファクトを避けるために測定は１０分間隔で行った。このプロトコルに続く対照の測定値では３０分を超える測定時間にわたって高い安定性が示された。

【００５４】

心拍数は尾に圧トランスデューサ（ＭＬＴｌＯｌＯ、アドインストルメンツ社（Ａｄｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、米国）を巻き付けてモニターした。ＩＯＰ及び心拍信号を帯域ろ波（１乃至１００Ｈｚ）し、シグナルコンディショナ（サイバーアンプ（ＣｙｂｅｒＡｍｐ）３８０、アクソン・インストルメンツ社（Ａｘｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｉｎｃ．）、米国）を用いて増幅した後、アナログ・ディジタル変換器（ミニデジ（ＭｉｎｉＤｉｇｉ）１Ａ２－チャネル取得システム（ｔｗｏ－ｃｈａｎｎｅｌ ａｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ）、アクソン・インストルメンツ社、米国）をギャップ・フリーのモードで用いて１ｋＨｚでデジタル化した。得られたデジタル・ファイルをクランプフィット（Ｃｌａｍｐｆｉｔ）９（アクソン・インストルメンツ社）を用いてオフラインで解析した。

【００５５】

ケタミンＨＣｌはフェニックス・ファーマシューティカル社（Ｐｈｏｅｎｉｘ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｉｎｃ．）（セントジョーゼフ（Ｓｔ． Ｊｏｓｅｐｈ）、ミズーリ州）から購入した。他の薬剤はシグマ・ケミカルス社（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｃｏ．）（セントルイス（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ）、ミズーリ州）から入手した。薬剤はエッペンドルフ型ピペットで局所適用した。ＭＲＳ－１１９１及びＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡは最初にＤＭＳＯに溶かし、次いで塩化ベンザルコニウムを含有する生理食塩溶液に加えることにより角膜透過性を高めた。最終の液滴溶液には記載の濃度の薬剤を＜２％のＤＭＳＯ及び０．０００５％の塩化ベンザルコニウムと共に２９５乃至３００ｍＯｓｍのオスモル濃度で含ませた。ＤＭＳＯは、親水性化合物アデノシン、カルバコール及びカルボキシフルオレスセインを含有する液滴からは完全に除去した。

【００５６】

侵襲的に測定するＩＯＰに対する効果は局所適用後１０分に測定した。何故なら、この時間を過ぎると、マイクロピペットの存在の継続が、対照条件下でさえ、ＩＯＰの下げ傾向と関連付けられ得るからである。これに対して、非侵襲的技術を用いる場合では、気動眼圧計からの空気流に関連付けられる眼の乾燥を未然に防ぐために、より小さな液滴（１０ｍｌの代わりに５ｍｌ）をより頻回（１回の代わりに３回）眼に適用した。非侵襲的プロトコルの場合、ＩＯＰは対照条件下で３０分間安定であった。

【００５７】

瞳孔径は、マウスの両眼への４０ｍＭ（０．０７３ｍｇ）縮瞳薬カルバコール含有液滴１０ｍｌの局所添加の前、及び１０分後に測定した。一方の眼は穿刺せず、他方の眼にはＳＮＭＳマイクロピペットを突き刺した。この突き刺しには各マウスの左眼か右眼のいずれかを無作為に選んだ。そのように低い適用濃度でマイクロピペットの非存在下にカルバコールを１０分間作用させても瞳孔サイズに有意な作用はなかった。ベースライン径は１．８０±０．１１であり、カルバコールの適用によりわずかに変化し、０．１２±０．１７ｍｍ増大した（ｎ＝６、Ｐ＞０．４）。これに対し、他方の眼の角膜にマイクロピペットを突き刺した場合には、カルバコールの局所適用は瞳孔径を３８％減少させ、２．００±０．１５ｍｍのベースラインから０．７６±０．０９ｍｍ収縮させた（ｎ＝６、Ｐ＜０．０００５）。１０分の１の液滴濃度及び用量（４ｍＭ及び７．３ｎｇ）では、カルバコールは、角膜への突き刺しの有無にかかわらず瞳孔サイズに対し作用を示さなかった（データは示されていない、ｎ＝２）。以上の結果から、ＳＮＭＳ眼圧測定法に用いた細先端のマイクロピペットで生じた角膜穿孔によってさえ、涙液膜から眼内標的部位への薬剤送達が容易になり得ることが分かる。

【００５８】

さらに、眼中への薬剤滲透がマイクロピペットによる角膜の突き刺しによって影響されるか否かについて、０．００３％のカルボキシフルオレセイン（０．３ｍｇ）含有の液滴１０ｍｌを２匹のマウスの眼に局所適用して調べた。カルボキシフルオレセインは眼のバリア層を余り通過しない極性の高い分子である。各マウスで、先ず、近接マイクロピペットを一方の眼の房水中へ進め、片方の眼には突き刺ししなかった。５分後に、この色素を等張食塩液で洗浄した。突き刺しを行ったマウスの眼の前房には緑色蛍光が認められたが、対照の眼では認められず、このことから、マイクロピペットによる角膜穿孔によって涙から房水中への薬剤及び化学物質の移送が容易になり得ることが再び示唆された。

【００５９】

１０ｍＭの非選択的ＡＲアゴニスト・アデノシンを１０ｍｌ（２６．７ｍｇ）の液滴容量で局所適用すると、マウスＩＯＰは速やかに上昇した。ピーク反応は数分以内に達成され、１０分後のベースラインに対する上昇の平均値±Ｓ．Ｅ．Ｍ．は２４．０±４．７ｍｍＨｇであった（ｎ＝１４、Ｐ＜０．００１）。同様に、選択的なＡ３アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ（２００ｎＭ、１．０９ｎｇ）は、ＩＯＰを１０．０±２．９ｍｍＨｇ上昇させた（ｎ＝９、Ｐ＜０．０１）。確立された選択的ジヒドロピリジン系Ａ３アンタゴニストＭＲＳ－１１９１は反対の効果を示した。２．５ｍＭ（１１．９４ｍｇ）の液滴濃度で、ＭＲＳ－１１９１は、この場合も適用後数分にわたって、ＩＯＰを６．１±１．１

ｍｍＨｇ低下させた（ｎ＝６、Ｐ＜０．００１）。

【００６０】

角膜の突き刺しを行わずに、アデノシン、Ｃｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ及びＭＲＳ－１１９１（各５μｌの液滴）に対する反応において、非侵襲的な気動眼圧測定法によるＩＯＰの測定値を調べたところ、検出可能な上昇は、侵襲的サーボ・ヌル技術により測定したそれよりも緩徐で小さかった。ＳＮＭＳ及び気動眼圧測定法による測定値間の差は、ＩＯＰの有意な上昇を生じない選択的Ａ３アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡの場合でさらに著しかった。確立されたＡ３アンタゴニストであるＭＲＳ－１１９１により誘発されたＩＯＰ低下の気動眼圧計による測定値は、ＳＮＭＳで検出されたものにより近かった。しかしながら、気動眼圧測定法により観察された最大の低下は、ＭＲＳ－１１９１の最初の適用の３０分後の実験の終了時に認められた。これに対し、ＳＮＭＳにより検出されたＭＲＳ－１１９１の最大効果はずっと早期の９．６乃至１．１分に認められた。

【００６１】

上記実験の注眼すべき知見は、（１）４０ｍＭ（０．０７３ｍｇ）カルバコールの局所適用では、マイクロピペットによる角膜突き刺し後、速やかな縮瞳が生じたが、角膜突き刺しを伴わない局所適用後では生じず、（２）アゴニストのアデノシン及びＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡ並びにアンタゴニストＭＲＳ－１１９１の局所投与により誘発されるＩＯＰに対する効果は、気動眼圧測定法による非侵襲的測定の場合、ＳＮＭＳ眼圧測定法による侵襲的測定の場合よりも小さく緩徐であることであった。マウス角膜の薄さを初めとする多くの要因が関係している可能性があるが、最終的には、局所適用された治療用化合物の前房への送達にはＩＯＰ測定技術自体が大きな役割を果たしていることが、本明細書に示した実験で確認された。ＳＮＭＳ法では直径が通常検圧技術に用いられる微細針よりも約５乃至１０分の１の５乃至１０ｍｍである細い近接マイクロピペットを使用するにもかかわらず、これによる角膜の突き刺しは標的への薬剤の送達を有意に変化させる。

【００６２】

先端が細いと、漏れが最低限に抑えられるが、侵襲的及び非侵襲的技術によりＩＯＰの測定を並行して行うことによってマウスの眼の皮膜が、その薄い構造にもかかわらず、薬剤の浸透に対する十分なバリアとなることが論証される。カルバコール及びプリン作動性薬剤を用いて得られた上記結果は、薬剤の送達が角膜のマイクロピペットによる突き刺しによって増強されることを立証している。今回検討したプリン作動性薬剤は全て角膜突き刺し時に局所適用した場合にはマウスＩＯＰに対して迅速で大きな効果を示したが、未処置の眼に適用した場合には、作用速度に大きなばらつきがみられた。こうしたプリン作動性薬剤の眼浸透性は、相対疎水性の単純関数ではなかった。局所適用した薬剤の浸透が緩徐で有りすぎて完全な状態の眼において確実な生理作用を発現することができなくても、ＳＮＭＳ眼圧測定法によるマウスＩＯＰの測定を補完的に行うことにより、角膜又は眼の皮膜を通した薬剤の送達が容易となり、薬剤効果が高められる。

【００６３】

（実施例２）

インビボ動物モデルにおけるA_3ＡＲアンタゴニストの種非依存性効果

これまでの研究に用いられたA_3ＡＲアンタゴニストは、培養ヒトＮＰＥ細胞のアデノシン誘発収縮をブロックし、マウスのＩＯＰを低下させた。このＮＰＥ細胞は、ヒト非色素毛様体上皮の初代培養から得られたクローン４からのものであった（マーチン－バサロ（Ｍａｒｔｉｎ－ Ｖａｓａｌｌｏ）ほか、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー（Ｊ． Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．）１４１：ｐ．２４３－２５２（１９８９年）参照）。しかしながら、そうした研究に用いられたジヒドロピリジン系ＭＲＳ－１１９１及びピリジン系ＭＲＳ－１５２３などの複素環誘導体は、さまざまな種のA_3ＡＲに対して多様な親和性を示した。この多様性は、ヒトA_3受容体に比し、ラットのそれに対する上記アンタゴニストの親和性が１０乃至＞３０，０００倍と極めて高かったことによって例示される（ヤング（Ｙａｎｇ）ほか、上記文献、２００５年）。したがって、アンタゴニストの選択性に一般性がないことにより、化合物のA_3選択性がヒトと著しく異なり得る動物

モデルにおいて既知のＡ$_3$アンタゴニストが臨床的に妥当なものである可能性を評価できることに限界があった。

【００６４】

この親和性の問題に対処するために、Ａ$_3$受容体におけるＩＢ－ＭＥＣＡの高親和性が種を超えて拡大しているＡ$_3$アゴニストを修飾することによってＡ$_3$アンタゴニストを構築した。Ａ$_3$アンタゴニスト、例えば、ＭＲＳ－１２９２（ガオ（Ｇａｏ）ほか、バイオケミカル・ファーマコロジー（Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．）６５：ｐ．１６７５－１６８４（２００３年））が培養ヒトＮＰＥ細胞のアデノシン誘発収縮をブロックし、かつ、マウスのＩＯＰを低下させるのに有効であるという以前の立証（ヤング（Ｙａｎｇ）ほか、上記文献、２００５年）を参照されたい。ＭＲＳ－１２９２は２つの理由でマウスを用いて試験した。遺伝子組換えマウスは、生きている動物において分子生理学及び薬理学を研究する都合のよい機会を与えてくれる（例えば、アビラ（Ａｖｉｌａ）ほか、上記文献、２００３年）。第２に、ＩＯＰの測定によりＭＲＳ－１２９２の標的パラメータに対する効果を評価することが可能になった。しかしながら、広く認められているアデノシン刺激プロトコルはマウスでは用いなかった。何故なら、アデノシンはＡ$_3$受容体を刺激するのみならず、ＩＯＰに対して独立した効果を示す他のＡＲをも活性化するからである。したがって、インビボのマウスでＭＲＳ－１２９２の効果を直接評価するために、薬剤適用の前後でＩＯＰをモニターした。ＩＯＰはサーボ・ヌル・マイクロピペット装置（ＳＮＭＳ）でモニターした。この試験プロトコルについてはヤング（Ｙａｎｇ）ほか、上記文献、２００５年に詳細に記載されており、この文献は引用により本明細書に組み込まれている。

【００６５】

ＭＲＳ－１２９２は、Ａ$_3$受容体におけるＩＢ－ＭＥＣＡの高親和性が種を超えて拡大しているアゴニストＩＢ－ＭＥＣＡに構造的に関連しているヌクレオシド誘導体である。また、ＭＲＳ－１２９２はヒト及びラットの両者においてＡ$_3$受容体選択的でもある。特に、Ａ$_3$受容体に対するラット対ヒトの親和性比はＭＲＳ－１２９２と選択的Ａ$_3$アゴニストとで同様である。ＭＲＳ－１２９２がヤング（Ｙａｎｇ）ほか（上記文献、２００５年）によって試験されたところ、これは、培養ヒトＮＰＥ細胞及び変化したマウスＩＯＰに対する非プリン系Ａ$_3$アンタゴニストの効果を模倣する際、Ａ$_3$アデノシン受容体アンタゴニストとして作用することが分かった。具体的には、測定開始前の２分間アンタゴニストで前処理し、グラミシジンを含有する対照溶液に懸濁した培養ヒトＮＰＥ細胞は、６０分の実験時間にわたって軽度の収縮を示した（Δv_∞＝１．２±０．１％）。記号Δv_∞は定常収縮を表す。アデノシン（１０μＭ）は収縮の程度を７倍増大させた。ＭＲＳ－１２９２はこの大きさを有意に減少させ（Δv_∞＝１．９±０．２％、スチューデントｔ－検定でｐ＜０．００１）、アデノシン誘発収縮を減速させた。ＭＲＳ－１２９２の存在下では、収縮の時定数（τ）は３．８±０．６から１１．７±２．６へ延長された（ｐ＜０．０２）。１，４－ジヒドロピリジンＡ３アンタゴニストＭＲＳ－１１９１の存在下では、アデノシン処理細胞は指数関数的収縮を示さなかった。これまでに述べたように、従来から、ＭＲＳ－１１９１は、ヒト、ラット及びマウスのＡＲに拮抗させるのに成功裡に用いられてきた。

【００６６】

２５μＭの推定アンタゴニストＭＲＳ－１２９２を含有する液滴を局所添加すると、８乃至１９分（平均１５±１分）までにＩＯＰが４．４±０．８ｍｍＨｇ（ｎ＝１０、ｐ＜０．００５、スチューデントｔ－検定）の最大の低下を示した。ちなみに、同じ容量の生理食塩水を同じオスモル濃度で添加しても、１４分後にＩＯＰは有意な変化を示さなかった（－０．３±１．２ｍｍＨｇ、ｎ＝６、ｐ＞０．８）。したがって、これまでの観察結果と一致して、Ａ$_3$ＡＲアゴニストＩＢ－ＭＥＣＡでは１４０ｎＭでＩＯＰは４．６±１．６ｍｍＨｇの速やかな上昇を示した（ｎ＝６、スチューデントｔ－検定でｐ＜０．０５）。１０分の１の濃度のＩＢ－ＭＥＣＡでは、ＩＯＰは２．２±０．５ｍｍＨｇ上昇した（ｐ＜０．０２）。これに対して、極めて高い液滴濃度（１４００ｎＭ）のＩＢ－ＭＥＣ

Ａは、恐らくＡ$_{2A}$ＡＲとの交差反応のため、有意な作用を示さなかった（－１．２±１．９ｍｍＨｇ）。

【００６７】

おおよその範囲を見積もるために、ヤング（Ｙａｎｇ）らは、「浸透度」を、多くのアデノシンアゴニスト及びアンタゴニストの最低有効液滴濃度に対するインビトロでの受容体における公表Ｋｉ値の比と定義した。したがって、マウスで試験されたプリン作動性薬剤の浸透度は１：１００から１：１，０００の範囲であり、これは、ウサギ及び霊長類に局所適用された薬剤の薬剤浸透度１：１００とあまり異ならない。この経験則は、マウスの眼で局所効果が検討されたアシルグアニジン・ブロッカー及びブメタニドにも当てはまる。したがって、ヤング（Ｙａｎｇ）らが本実験のＭＲＳ１２９２に関して２００３年の引用文で報告した約１：１，０００の浸透度は過去の研究と一致している。

【００６８】

同様な戦略によって、２種の新規Ａ$_3$アンタゴニストＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１を開発した。先の化合物ＭＲＳ－１２９２はＡ$_3$アゴニストＩＢ－ＭＥＣＡの修飾体であった。これらの２種の新規薬剤（ＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１）は、より選択的なＡ$_3$アゴニストＣｌ－ＩＢ－ＭＥＣＡの修飾体（図６に構造が示されている）であり、したがって、ＭＲＳ－１２９２よりさらに選択的であると期待された。侵襲的サーボ・ヌル技術を用いて、両新規薬剤トＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１が侵襲的測定によりマウスＩＯＰを低下させるのに有効であることが分かった（表１）。

【００６９】

表１では、侵襲的測定の場合、前述のように対照条件下でさえＩＯＰの下げ傾向がみられたことを踏まえて１０分の終点を用いた。また、気動眼圧計を用いる非侵襲的技術に関してはより小さい液滴をより頻回に適用する必要性を上記で説明している。上述のように、非侵襲的プロトコルの場合、ＩＯＰは対照条件下で３０分間安定であった。

【００７０】

【表１】

表１：Ａ$_3$アゴニスト及びアンタゴニストの局所適用後のＩＯＰに対する効果

クラス	薬剤	濃度	気動眼圧計			サーボ・ヌル		
			N	Δ(IOP)	P	N	Δ(IOP)	P
非選択的アゴニスト	アデノシン	10mM	9	+4.8±1.7	<0.05	9	+22.4±6.5	<0.01
A_3アンタゴニスト	MRS-1191	25mM(2%DMSO)	9	-3.9±1.0	<0.01	6	-6.1±1.1	<0.001
A_3アンタゴニスト	MRS-3771	25mM(2%DMSO)	4	+0.3±2.6	>0.9			
		250μM(2%DMSO)	9	+0.4±0.6	>0.5	9	-3.0±1.1	<0.05
A_3アンタゴニスト	MRS-3642	250μM(2%DMSO)	6	+0.2±1.1	>0.8	10	-4.2±1.2	<0.01
A_3アゴニスト	CL-IB-MECA	200nM(1%DMSO)	6	+0.7±1.4	>0.6	9	+10.0±2.9	<0.01
CL-IB-MECA モノプロピオニル	MRS-3824	200nM(1%DMSO)				9	+1.9±1.3	>0.1
CL-IB-MECA ジプロピオニル	MRS-3823	200nM(1%DMSO)	4	+0.2±0.8	>0.8			
MRS-3642 のジアセチルエステル	MRS-3826	250μM(2%DMSO)	6	-0.5±0.8	>0.5	4	-4.0±0.8	<0.05
MRS-3642 のモノアセチルエステル	MRS-3827	250μM(2%DMSO)	9	-0.8±1.1	>0.4	6	-4.4±1.3	<0.05
						6	-3.8±0.8	<0.01
MRS-3771 のジベンジルエステル	MRS-3833	2μM(1%DMSO)	6	-0.2±0.9	>0.8			
		200nM(1%DMSO)	9	-1.7±0.6	<0.03		0.02±3.8	>0.9
MRS-3642 修飾体 (ラット/ヒト A_3アンタゴニスト)	MRS-3820	250μM(2%DMSO)	6	-4.2±0.7	<0.002	7	-1.5±0.6	<0.05
		75μM(0.6%DNSO)				6	-3.1±1.4	>0.07
		25μM(0.2%DNSO)	6	-0.6±1.5	>0.7	6	-4.9±1.7	<0.05
		5μM(0.2%DNSO)				6	-2.2±0.7	<0.03
対照	2%DMSO		9	-1.4±1.5	>0.3	6	-0.5±0.6	>0.4

【００７１】

侵襲的に測定した場合、ＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１によるＩＯＰ低下の平均値±ＳＥＭはそれぞれ４．２±１．２ｍｍＨｇ（Ｎ＝１０、Ｐ＜０．０１）及び３．０±１．０ｍｍＨｇ（Ｎ＝１０、Ｐ＜０．０３）であった（表１）。データは全てＢｌａｃｋ　Ｓｗｉｓｓマウスを用いて得られた。ＭＲＳ－３７７１の局所添加によりＣ５７マウスのＩＯＰも（３．３±０．６ｍｍＨｇ）低下した（Ｎ＝６、Ｐ＜０．０１、表２）。これに対し、ＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１は非侵襲測定期間にわたってはＩＯＰに対して効果を示さなかった。

【００７２】

（実施例３）

ＭＲＳ－３８２０の種非依存性効果

前述の種交差性の結果を踏まえて、A_3ＡＲアンタゴニストとしての種交差性の有効性を保持し、マウスＩＯＰの速やかな低下を生じるのに十分角膜を透過可能である２種のヌクレオシド系A_3ＡＲアンタゴニストＭＲＳ－３６４２及びＭＲＳ－３７７１の一連の修飾体を開発した。これにより各化合物の効力をＩＯＰの侵襲的測定によって測定することが可能になったが、さらに、その角膜を速やかに通過する能力についてＩＯＰの非侵襲的測定によって観察することができる可能性もあった。ＭＲＳ－３７７１及び３６４２の多くのエステルについて試験した。侵襲的に測定した場合、ＭＲＳ－３８２４は無効であった（表１）。ＭＲＳ－３８３３は、非侵襲的測定では２００ｎＭでＩＯＰを軽度に低下させたが、他の濃度では侵襲的及び非侵襲的測定のいずれにおいても無効であった（表１）。ＭＲＳ－３８２６及び－３８２７は、侵襲的に測定された場合にはマウスＩＯＰを低下させたが、非侵襲的測定期間においては効果を示さなかった。

【００７３】

ヌクレオシド系A_3ＡＲアンタゴニストＭＲＳ－３８２０は侵襲的及び非侵襲的測定のいずれによっても有効であることが分かった。ＭＲＳ－３８２０（ＬＪ－１２５１）は、ＭＲＳ－３６４２の修飾体であるが、ＮＩＨのジョンウン（Ｊｅｏｎｇ）により作製された。ＭＲＳ－３８２０の構造（２－（２－クロロ－６－（３－ヨードベンジルアミノ）－９Ｈ－プリン－９－イル）テトラヒドロチオフェン－３，４－ジオール）は図６Ｂに示した。特に、ＭＲＳ－３８２０は非侵襲的に測定されたＩＯＰを２０分以内に低下させることが分かった。表１に示したように、濃度反応相関は侵襲的及び非侵襲的技術のいずれによっても測定したが、反応の大きさを直接比較することは可能ではない。何故なら、上述のように、これら２つの技術で用いるプロトコル及び時間的終点は必然的に異なるからである。２５０μＭのＭＲＳ－３８２０局所適用後、非侵襲的に測定された最大反応は３０分後の－４．２±０．７ｍｍＨｇであった（表１）。その上、この２５０μＭのＭＲＳ－３８２０は、さらに短い間隔である適用後２０分にＩＯＰを３．４±０．７ｍｍＨｇ低下させ、この低下は有意であった（Ｎ＝６、Ｐ＝０．００４）。ＭＲＳ－３８２０によるＩＯＰの低下が侵襲的及び非侵襲的のいずれにおいても測定されたことは、この化合物が角膜に速やかに浸透し、標的部位である非色素毛様体上皮のA_3受容体においてアンタゴニストとして作用することができることを示している。前記で引用した、毛様体上皮細胞及び組織を用いたインビトロ研究（カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、１９９７年；ミッチェル（Ｍｉｔｃｈｅｌｌ）ほか、上記文献、１９９９年；カレ（Ｃａｒｒｅ）ほか、上記文献、２０００年）では、A_3受容体における拮抗が非色素毛様体上皮細胞のCl^-チャネル活性を低下させることが示されている。その後の房水形成速度の低下がＩＯＰの低下を招いたのである。

【００７４】

【表２】

表２：サーボ・ヌル技術により侵襲的に測定したＣ５７マウス眼内圧に対するＭＲＳ－３７７１局所適用の効果

実験番号	マウスの系	ベースライン（mmＨg）	ＭＲＳ３７７１（mmＨg）	ＩＯＰの変化（mmＨg）
０５０７２９Ｂ	Ｃ５７	１３．６	１２．７	－０．９
０５０７２９Ｃ	Ｃ５７	１６．４	１１．８	－４．６
０５０８０１Ｃ	Ｃ５７	１１．４	８．９	－２．５
０５０８０１Ｄ	Ｃ５７	２２．８	１９．４	－３．４
０５０８０２Ａ	Ｃ５７	２０．８	１６．２	－４．６
０５０８０２Ｂ	Ｃ５７	１４．３	１０．５	－３．９
平均値		１６．５	１３．２	－３．３
±ＳＥＭ		±１．８	±１．６	±０．６
対応のあるｔ検定				Ｐ＝０．００２

【００７５】

未公表のＭＲＳ－３８２０結合測定結果に表１のデータが加われば、この化合物がA_3受容体との結合において機能的に種交差性であることがさらに立証される。実験は、（ＨＥＫ２９３細胞で発現させたA_{2A}ＡＲ以外の）アデノシン受容体をコードしているｃＤＮＡを安定的に形質移入した接着ＣＨＯ細胞を用いて実施した。結合実験は、A_1、A_{2A}及びA_3受容体のリガンドとして、それぞれ［^{3}Ｈ］ＣＣＰＡ、［^{3}Ｈ］ＣＧＳ－２１６８０及び［^{125}Ｉ］ＡＢ－ＭＥＣＡを用いて行った。本明細書に提示した値は平均値±ＳＥＭ、Ｎ＝３乃至４として表した。ＮＥＣＡは非特異的結合を測定するために用いた。ヒト及びラットのA_3受容体へのＭＲＳ－３８２０の結合の間に有意差は認められなかった。具体的には、ヒトA_3受容体への結合では４．２±０．５ｎＭ、ラットA_3受容体への結合では３．９±１．２ｎＭであった。このA_3受容体への結合は高度に選択的でもあった。

【００７６】

上記４種の既知ヒトアデノシン受容体のそれぞれにおける効力（Ｋｉ、ｎＭ±ＳＥＭ）は、２，４８５±９４０ｎＭ（A_1）、３４１±７４．６ｎＭ（A_{2A}）、１０μＭでも＜１０％（A_{2B}）及び４．１６±０．５０ｎＭ（A_3）であった。さらに、ＭＲＳ－３８２０の結合はヒトA_3受容体を中和する。ＣＨＯ細胞で発現させたヒトA_3受容体における環状ＡＭＰ機能アッセイでは、ＭＲＳ－３８２０はアゴニスト（ＣＬ－ＩＢ－ＭＥＣＡ）の用量－反応曲線をアンタゴニストとして１．９２ｎＭのＫＢ値に相当する右方へシフトさせた。したがって、ＭＲＳ－３８２０の種交差性アンタゴニストとしての有効性がヒト及びラット（ヤコブソン及びガオ（Ｊａｃｏｂｓｏｎ ａｎｄ Ｇａｏ）、上記文献参照）並びにマウス（表１）において機能的A_3アンタゴニストとして立証された。正常マウスのＩＯＰの大きな低下は、A_3ＡＲアンタゴニストが効力を有する可能性を示していた。示されているように、薬剤の親和性が高いことによって副作用を生じる可能性が低下した。さらに、上記のＩＯＰに対する効果によってＭＲＳ－３８２０が角膜を通過するという証拠が得られた。

【００７７】

したがって、本発明は、種交差性の、強力なA_3阻害剤を角膜バリアを通過させて送達し、非色素毛様体上皮（ＮＰＥ）細胞のCl^-チャネル活性を低下させることによって房水形成速度を低減させ眼内圧を低下させる決定的な方法を提供する。

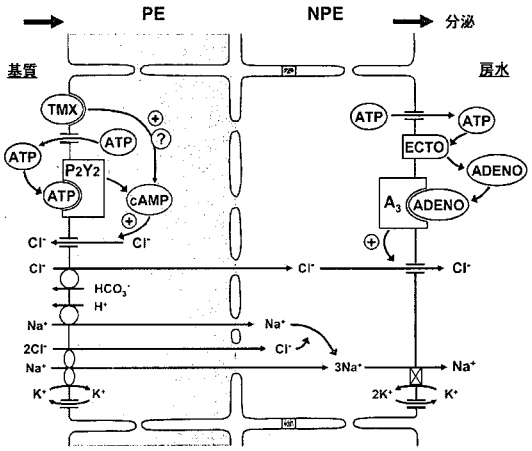
【００７８】

この文書に引用又は記載された各特許、特許出願及び刊行物の開示内容については、その全体が引用により本明細書に組み込まれている。

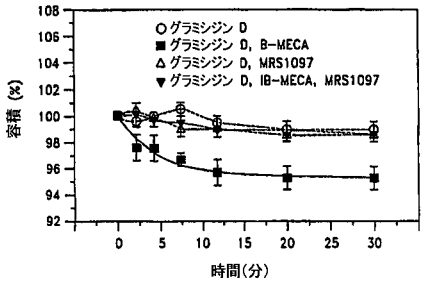
【００７９】

上記の明細書は特定の好ましい実施態様に関して説明したものであり、多くの詳細は例示を目的として記載されものであるが、本発明が種々の修正及び実施態様の追加を受け得ること、並びに本明細書に記載された詳細の一部が本発明の基本原理を逸脱することなく相当程度変更され得ることは、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく当業者には明瞭に理解されよう。また、そのような修正及び実施態様の追加は添付の特許請求の範囲に包含されるものである。

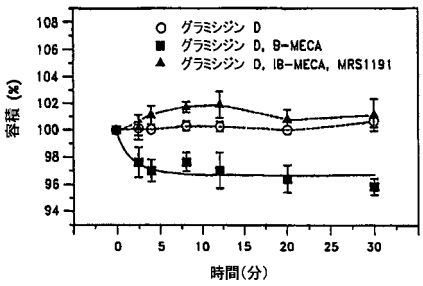
【図１】



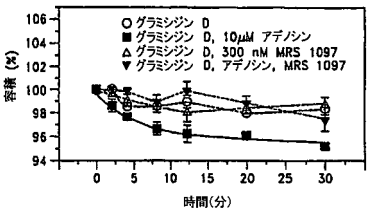
【図２Ａ】



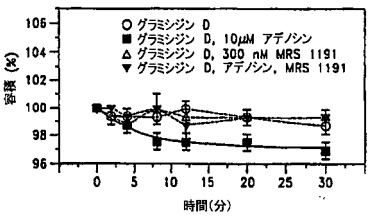
【図２Ｂ】



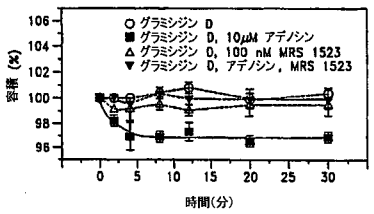
【図３Ａ】



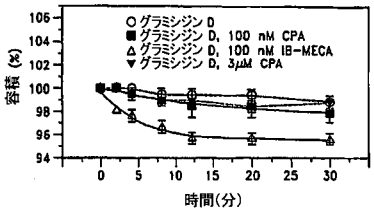
【図３Ｂ】



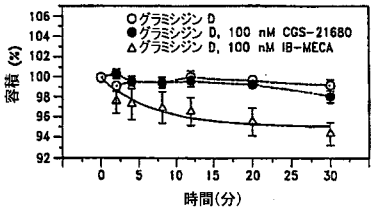
【図３Ｃ】



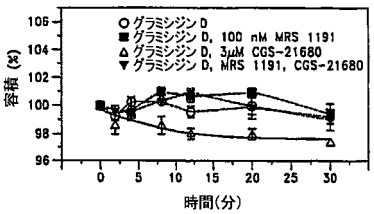
【図４Ａ】



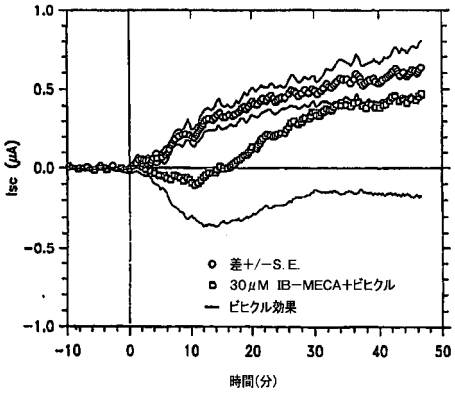
【図４Ｂ】



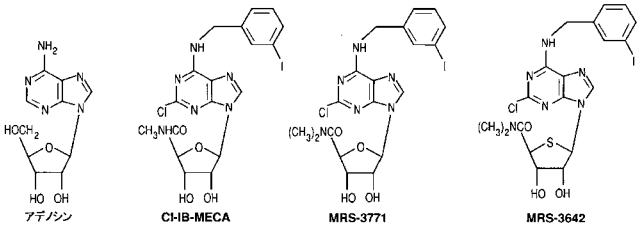
【図４Ｃ】



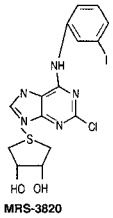
【図５】



【図６Ａ】



【図６Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 07/21409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 31/52 (2008.01)
USPC - 514/913; 514/263.1
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)
USPC- 514/913; 514/263.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC-514/912, 913, 263.2, 263.1 (text search-see search terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB) and Google Patent/Scholar
Search terms: adenosine antagonist a3, corneal, eye, thiophene, impale

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6,528,516 B1 (Civan et al.) 04 March 2003 (04.03.2003) col 2, ln 45-47, col 2, ln 66 to col 3, ln 11, col 8, ln 66 to col 9, ln 15, col 12, ln 21, col 25, ln 29-48; col 12 ln 18-26.	1-3, 5-6, 10, 15 4, 7-9, 11-14
Y	Gao et al. "Conversion of A3 adenosine receptor agonists into selective antagonists by modification of the 5-ribofuran-uronamide moiety" Bioorg Med Chem Lett February 2006 v16 p596; p9, Chart 1, compounds 6 and 7	4, 14
Y	Avila et al. "Reliable measurement of mouse intraocular pressure by a servo-null micropipette system" Invest Ophthalmol Vis Sci 2001 v42 p1841; abstract, p1842, para 8	7-9, 11-14
Y	US 7,064,112 B1 (Fishman) 20 June 2006 (20.06.2006) abstract, col 7, ln 1-44	4, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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	Date of mailing of the international search report
01 February 2008 (01.02.2008)	13 MAR 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｈ 19/167	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｈ 19/167		

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

(72)発明者 モーティマー，シヴァン，エム.
アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９１０４－６０８５，フィラデルフィア，ハミルトン ウォーク ３７００，エー３０３ リチャーズ ビルディング，ユニヴァーシティー オブ ペンシルバニア

(72)発明者 ヤコブソン，ケニース，エー.
アメリカ合衆国，メリーランド州 ２０８９２－０８１０，ベセズダ，ルーム ビー１エー－１９，ビルディング ８エー，ナショナル インスティチュート オブ ヘルス，ナショナル インスティチュート オブ ダイアベティス アンド ダイジェスティブ アンド キドニー ディズィーズ，モレキュラー レコグニッション セクション エルビーシー

(72)発明者 アビラ，マーセル，ワイ.
コロンビア国，ボゴタ，アプト １１４，エー ナンバー１１８－０６ カレラ ４７

(72)発明者 ストーン，リチャード
アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９１０４－６０７５，フィラデルフィア，ディー－６０３ リチャーズ ビルディング，スクール オブ メディシン，ユニヴァーシティー オブ ペンシルバニア

Ｆターム(参考) 4C057 AA17 BB02 CC01 CC05 DD01 DD03 LL31 LL34
4C084 AA17 MA28 MA52 MA58 MA66 NA14 ZA331 ZC422
4C086 AA01 AA02 EA18 MA01 MA04 MA28 MA52 MA58 MA66 NA14
ZA33 ZC42