

(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2008-528665

(P2008-528665A)

(43) 公表日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl.

A61K 31/7084 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
C07H 19/167 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

F 1

A 61 K 31/7084
C 07 F 9/6561 C S P Z
C 07 H 19/167
A 61 K 31/675
A 61 P 1/16

テーマコード(参考)

4 C 057
4 C 086
4 H 050

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-553689 (P2007-553689)
(86) (22) 出願日 平成18年2月1日 (2006.2.1)
(85) 翻訳文提出日 平成19年9月12日 (2007.9.12)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2006/000343
(87) 國際公開番号 WO2006/082397
(87) 國際公開日 平成18年8月10日 (2006.8.10)
(31) 優先権主張番号 0502250.4
(32) 優先日 平成17年2月3日 (2005.2.3)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

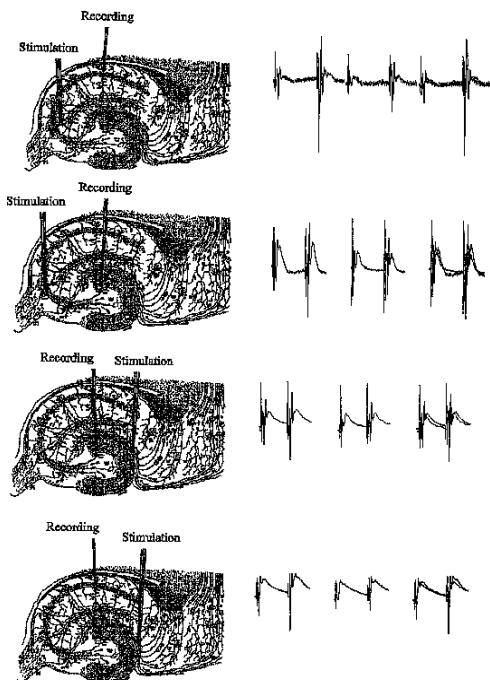
(71) 出願人 507261386
イムセス リミテッド
イギリス国 ロンドン ウィルソンストリート 21
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(72) 発明者 ミラー アンドリュー デービッド
イギリス国 ロンドン キスウィック テンブルロード 22
(72) 発明者 ライトマイケル
イギリス国 ロンドン フルハム フランクリンスクエア 15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ジヌクレオチドポリリン酸誘導体の使用法

(57) 【要約】

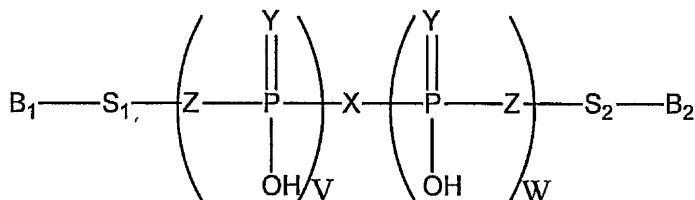
本発明は、式(1)を有するジヌクレオシドポリリン酸の類似体および誘導体、またはそれらの薬学的に許容される塩の、以下のうち1つまたは複数：虚血の治療、虚血耐性の誘導、脳虚血の修飾、虚血事象が惹起された時の低酸素性脱分極期の開始を遅らせるため；神経保護薬として；組織保護薬として；疼痛の治療；および炎症の治療、に用いるための医用薬剤の製造における使用法を提供し、式中、X₁は選択され、ここでX¹およびX²はH、Cl、BrおよびFより独立に選択され；それぞれのY₁はSおよびIより独立に選択され；それぞれのZ₁は-CX³X⁴-、-NH-、-O-より独立に選択され；ここでX³およびX⁴はH、Cl、BrおよびFより選択され；B₁およびB₂はアデニン、グアニン、キサンチン、チミン、ウラシル、シトシンおよびイノシンより独立に選択され；S₁およびS₂はリボース、開鎖リボース、2'-デオキシリボース、3'デオキシリボースおよびアラビノフラノシドより独立に選択される。V₁は0、1、2、3、4および5より選択され；W₁は0、1、2、3、4および5より選択され；かつ、V₁にW₁を加えたものは2から6までの整数である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)の化合物：



またはその薬学的に許容される塩の、

以下のうち1つまたは複数：

虚血の治療、

神経保護薬として；

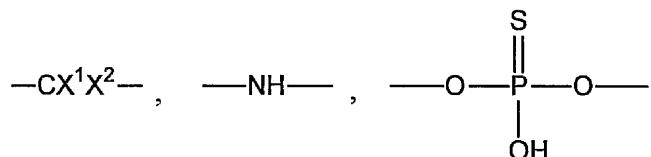
組織保護薬として；

疼痛の治療；および

炎症の治療；

に用いるための医用薬剤の製造における使用法；

式中、Xが

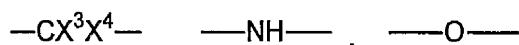


より選択され；

ここで X^1 および X^2 がH、Cl、BrおよびFより独立に選択され；

それぞれのYがSおよびOより独立に選択され；

それぞれのZが



より独立に選択され；

30

ここで X^3 および X^4 がH、Cl、BrおよびFより選択され； B_1 および B_2 がアデニン、グアニン、キサンチン、チミン、ウラシル、シトシンおよびイノシンより独立に選択され； S_1 および S_2 がリボース、2'-デオキシリボース、3'-デオキシリボース、アラビノフラノシドおよびそれらの開環形態より独立に選択され、 V が0、1、2、3、4および5より選択され； W が0、1、2、3、4および5より選択され；かつ V に W を加えたものが2から6までの整数である。

【請求項2】

 B_1 および B_2 のうち少なくとも1つがアデニンである、請求項1記載の式(1)の化合物の使用法。

40

【請求項3】

 B_1 および B_2 が両方ともアデニンである、請求項1または2のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項4】

 S_1 および S_2 が同じである、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項5】

 S_1 および S_2 がリボースである、請求項4記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項6】

50

それぞれのZが0である、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。
。

【請求項7】

Vが2である、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項8】

Wが2である、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項9】

Xが-CX¹X²-である、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の使用法。

【請求項10】

X¹およびX²が両方ともHである、前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物の
10 使用法。

【請求項11】

前記の請求項のいずれか一項記載の式(1)の化合物、またはその薬学的に許容される
塩の、以下のうち1つまたは複数：

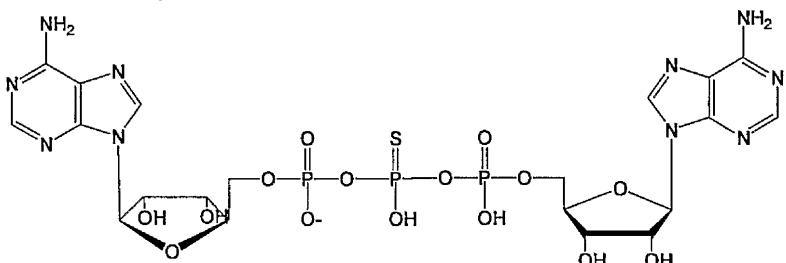
- (a) P2-受容体と関連のある疾患および病状の治療；
- (b) A1アデノシン受容体と関連のある疾患および病状の治療；
- (c) P2-受容体の活性の調節；
- (d) A1アデノシン受容体の活性の調節；ならびに
- (e) 哺乳動物細胞におけるGタンパク質依存性内向き整流性K⁺(GIRK)チャネルを介したK⁺流入を調節するため、
20

に用いるための医用薬剤の製造における使用法。

【請求項12】

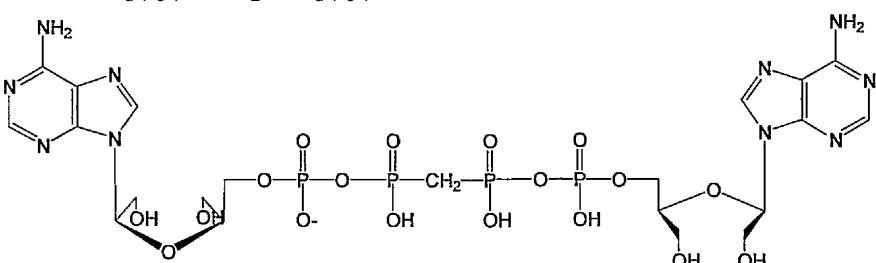
以下のものより選択される化合物：

- (a) App_spA



；

- (b) A_{dio}ppCH₂ppA_{dio}



；および

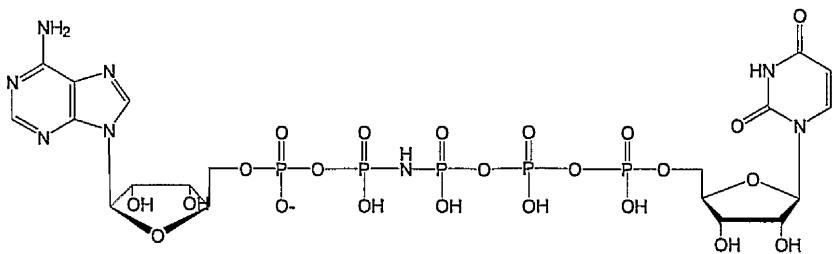
- (c) AppNH₂pppU

10

20

30

40



。

【請求項 1 3】

実施例のいずれか1つに関して本明細書に実質的に記載された通りの式(1)の化合物の使用法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ジヌクレオシドポリリン酸の類似体および誘導体の使用法に関する。 20

【背景技術】

【0 0 0 2】

ジヌクレオシドポリリン酸とは、ポリリン酸架橋によって連結した2つのヌクレオシド部分を含む一群の化合物のことである。ジヌクレオシドポリリン酸は化合物の重要な一つアミリーをなしており、細胞内および細胞外の両方で生物学的な役割があると考えられている^{1, 2}。

【0 0 0 3】

特に対象となる1つのジヌクレオシドポリペプチドは、ジアデノシン5',5''''-P¹, P⁴-四リン酸(Ap₄A)である。Ap₄Aは、原核生物および下等真核生物における細胞増殖および環境ストレスに対する細胞応答に働くと考えられており、さらに高等真核生物における細胞外シグナル伝達にも役割を果たすと考えられている^{3, 4}。また、Ap₄Aが、脳卒中およびパーキンソン病の規定されたラットモデルにおいて皮質および中脳での保護効果を有する可能性があることも報告されている⁵。

【0 0 0 4】

ジヌクレオシドポリリン酸の調製については数多くの合成方法が報告されており、その生物学的な役割をさらに詳細に研究するためにいくつかの試みがなされている^{6, 7}。このこと、およびこれらの化合物の多くが自然界に広く認められ、長年にわたって知られているという事実にもかかわらず³、この種の化合物の生物学的機能を明確にすることは結局困難であった。さらに言えば、この種の化合物の役割に関する混乱は、それらが「敵または味方」のいずれかとして作用しうるという曖昧な示唆も招いている⁸。一般に、インビボまたはエクスビボの生物学的機能をジヌクレオシドポリリン酸の存在と相關づける十分に再現性のある結果を得ることにはかなり困難であり、この理由は明らかではないが、加水分解による不安定性と関係づけられる可能性がある³。

【0 0 0 5】

また、ジヌクレオシドポリペプチドを研究および使用するための試みは、この種の化合物の天然の源からの単離および精製において遭遇する、たびたび起こる難題によっても妨げられてきた。例えば、ジアデノシンポリリン酸(Ap_nA; n = 2 ~ 6)は、生体液および組織試料における特異的で酵素的な加水分解および非特異的な加水分解に対して非常に不安定であるように思われる^{3, 10}。

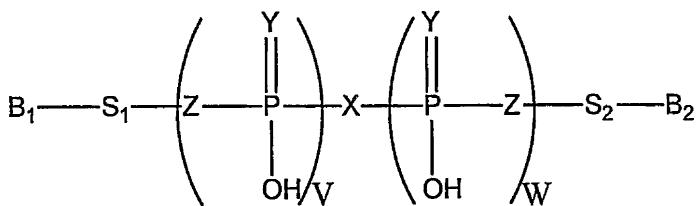
【発明の開示】

【0 0 0 6】

本発明は、先行技術の問題を軽減する。

【0 0 0 7】

1つの局面において、本発明は、式(1)の化合物：



またはその薬学的に許容される塩の、

以下のうち1つまたは複数：

虚血の治療、

神経保護薬として；

組織保護薬として；

疼痛の治療；および

炎症の治療

10

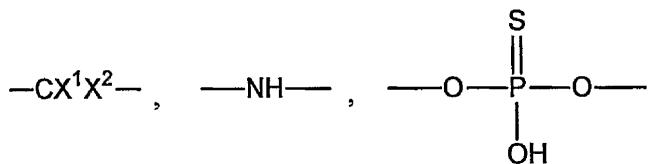
20

30

40

に用いるための医用薬剤の製造における使用法を提供し、

式中、Xは

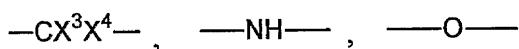


より選択され；

ここで X^1 および X^2 はH、Cl、BrおよびFより独立に選択され；

それぞれのYはSおよびOより独立に選択され；

それぞれのZは



より独立に選択され；

ここで X^3 および X^4 はH、Cl、BrおよびFより選択され；

B_1 および B_2 はアデニン、グアニン、キサンチン、チミン、ウラシル、シトシンおよびイノシンより独立に選択され；

S_1 および S_2 はリボース、開鎖リボース、2'-デオキシリボース、3'-デオキシリボースおよびアラビノフラノシドより独立に選択される。

【0008】

Vは0、1、2、3、4および5より選択され；Wは0、1、2、3、4および5より選択され；かつ、VにWを加えたものは2から6までの整数である。

【0009】

本発明者らは、本発明者らによるX基およびZ基の選択により、本発明者らが、生体液および組織試料の存在下で持続的で再現性のある生物学的アウトカムを与える化合物（および新規化合物）の使用法を提供することを見いだした。したがって、インピボでの再現性のある効果を可能にする使用法および新規化合物が提供される。

【0010】

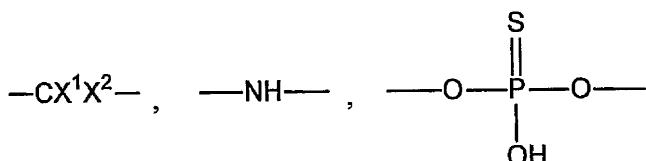
参照が容易になるように、本発明のこれらの局面およびさらなる局面について、しかるべきセクションの見出しの下にこれから考察する。しかし、それぞれのセクションの下にある教示は、それぞれの特定のセクションのみに必ずしも限定されるわけではない。

【0011】

好みしい局面

X

Xは、



より選択され、ここで X^1 および X^2 はH、Cl、BrおよびFより独立に選択される。

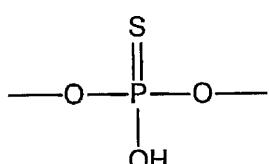
【0 0 1 2】

1つの局面において、Xは-NH-である。

【0 0 1 3】

1つの局面において、Xは

10



である。

【0 0 1 4】

1つの局面において、Xは-CX¹X²-である。

【0 0 1 5】

1つの局面において、X¹およびX²のうち少なくとも1つはHである。

20

【0 0 1 6】

1つの局面において、X¹およびX²のうち少なくとも1つはClである。

【0 0 1 7】

1つの局面において、X¹およびX²のうち少なくとも1つはBrである。

【0 0 1 8】

1つの局面において、X¹およびX²のうち少なくとも1つはFである。

【0 0 1 9】

好ましくは、X¹およびX²の両方がHである。

【0 0 2 0】

好ましくは、Xは-CX¹X²-であり、X¹およびX²は両方ともHである。

30

【0 0 2 1】

Y

それぞれのYは、SおよびOより独立に選択される。

【0 0 2 2】

1つの局面において、少なくとも1つのYはSである。

【0 0 2 3】

1つの局面において、それぞれのY基はSである。

【0 0 2 4】

1つの局面において、少なくとも1つのYはOである。

40

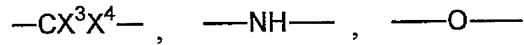
【0 0 2 5】

好ましくは、それぞれのY基はOである。

【0 0 2 6】

Z

それぞれのZは、



より独立に選択され、ここでX³およびX⁴はH、Cl、BrおよびFより選択される。

【0 0 2 7】

1つの局面において、少なくとも1つのZは-CX³X⁴-である。

【0 0 2 8】

50

1つの局面において、それぞれのZは-CX³X⁴-である。

【0 0 2 9】

1つの局面において、X³およびX⁴のうち少なくとも1つはHである。

【0 0 3 0】

1つの局面において、X³およびX⁴のうち少なくとも1つはCIである。

【0 0 3 1】

1つの局面において、X³およびX⁴のうち少なくとも1つはBrである。

【0 0 3 2】

1つの局面において、X³およびX⁴のうち少なくとも1つはFである。

【0 0 3 3】

好ましくは、X³およびX⁴の両方がHである。

【0 0 3 4】

好ましくは、Zは-CX³X⁴-であり、X³およびX⁴は両方ともHである。

【0 0 3 5】

1つの局面において、少なくとも1つのZは-NH-である。

【0 0 3 6】

1つの局面において、それぞれのZは-NH-である。

【0 0 3 7】

1つの局面において、少なくとも1つのZは-O-である。

【0 0 3 8】

好ましくは、それぞれのZは-O-である。

【0 0 3 9】

B₁およびB₂

B₁およびB₂は、アデニン、グアニン、キサンチン、チミン、ウラシル、シトシンおよびイノシンより独立に選択される。

【0 0 4 0】

1つの局面において、B₁およびB₂のうち少なくとも1つはウラシルである。

【0 0 4 1】

1つの局面において、B₁およびB₂のうち少なくとも1つはグアニンである。

【0 0 4 2】

好ましくは、B₁およびB₂のうち少なくとも1つはアデニンである。

【0 0 4 3】

好ましくは、B₁およびB₂のうち少なくとも1つはアデニンであり、B₁およびB₂のもう一方はグアニンである。

【0 0 4 4】

好ましくは、B₁およびB₂のうち少なくとも1つはアデニンであり、B₁およびB₂のもう一方はウラシルである。

【0 0 4 5】

好ましくは、B₁およびB₂は両方ともアデニンである。

【0 0 4 6】

S₁およびS₂
S₁およびS₂は、リボース、2'-デオキシリボース、3'デオキシリボース、アラビノフラノシドおよびそれらの開環形態より独立に選択される。

【0 0 4 7】

好ましくは、S₁およびS₂のうち少なくとも1つはリボースである。

【0 0 4 8】

好ましくは、S₁およびS₂のうち少なくとも1つはリボースの開環形態である。

【0 0 4 9】

好ましくは、S₁およびS₂のうち少なくとも1つはリボースであり、S₁およびS₂のもう一方はリボースの開環形態である。

10

20

30

40

50

【0050】

好ましくは、S₁およびS₂は同じである。

【0051】

好ましくは、S₁およびS₂はリボースである。

【0052】

VおよびW

Vは0、1、2、3、4および5より選択される。

【0053】

Wは0、1、2、3、4および5より選択される。

【0054】

10

VにWを加えたものは2から6までの整数であり、すなわちVとWとの合計は2、3、4、5または6でありうる。

【0055】

好ましくは、Vは2である。

【0056】

好ましくは、Wは2である。

【0057】

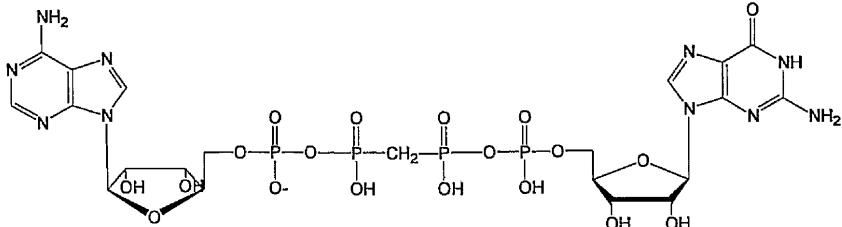
好ましくは、VにWを加えたものは4である。

【0058】

20

その他の局面および特徴

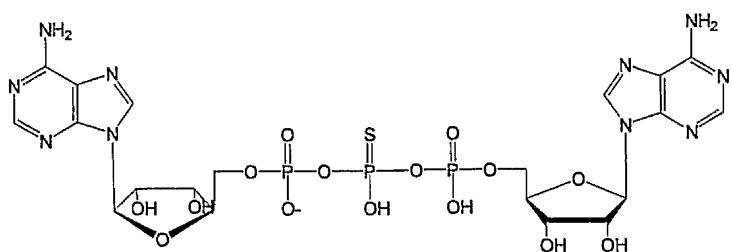
好ましくは、式(1)の化合物は以下のものである。



【0059】

30

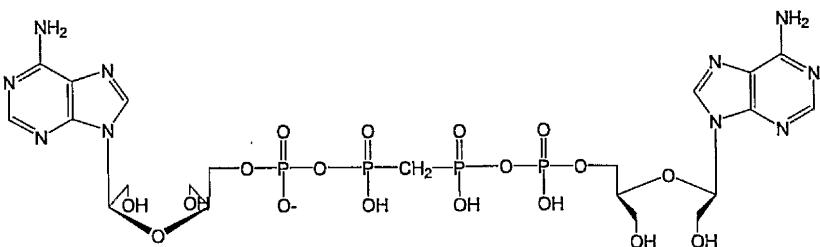
好ましくは、式(1)の化合物は以下のものである。



【0060】

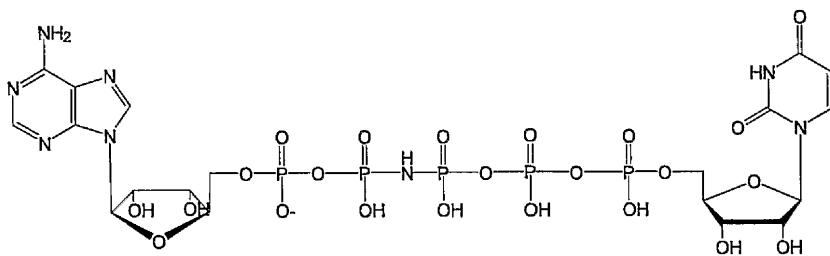
40

好ましくは、式(1)の化合物は以下のものである。



【0061】

好ましくは、式(1)の化合物は以下のものである。



【0062】

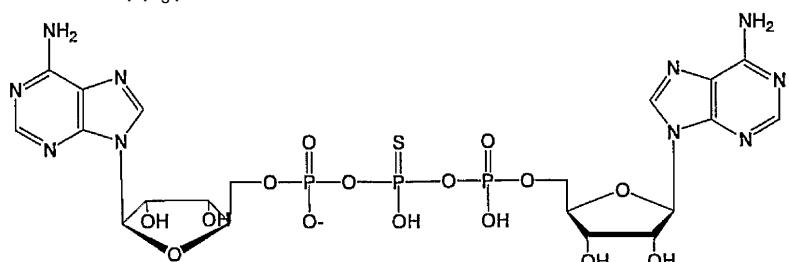
さらにもう1つの局面において、本発明は、本明細書に記載の式(1)の化合物、またはその薬学的に許容される塩の、以下のうち1つまたは複数：

- (a) P2-受容体と関連のある疾患および病状の治療；
- (b) A1アデノシン受容体と関連のある疾患および病状の治療；
- (c) P2-受容体の活性の調節；
- (d) A1アデノシン受容体の活性の調節；ならびに
- (e) 哺乳動物細胞におけるGタンパク質依存性内向き整流性K⁺(GIRK)チャネルを介したK⁺流入を調節するため、に用いるための医用薬剤の製造における使用法を提供する。

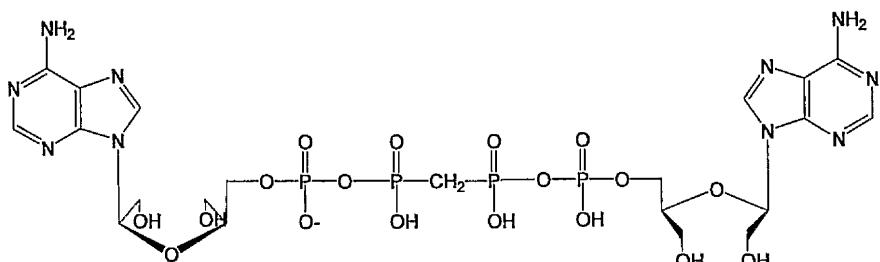
【0063】

さらにもう1つの局面において、本発明は、以下のもの：

- (a) App_spA

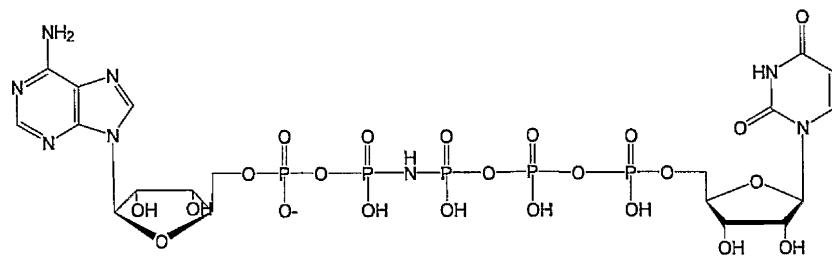


- (b) A_{dio}ppCH₂ppA_{dio}



; および

- (c) AppNH₂pppU



より選択される化合物を提供する。

【0064】

好ましくは、化合物はApp_spAである。

【0065】

好ましくは、化合物はA_{dio}ppCH₂ppA_{dio}である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

好ましくは、化合物はAppNH_nUである。

【 0 0 6 7 】**虚血**

1つの局面において、本発明は、虚血および虚血に関連した疾患および障害の治療に関する。これらの治療には、虚血耐性を誘導すること、脳虚血を調節すること、および虚血事象が惹起された時の低酸素性脱分極期の開始を遅らせることが含まれうる。虚血状態は、ヒトまたは動物の身体の臓器または部分に対する血液の供給が不十分な場合に起こる。このように血液の供給が不十分なことの結果として、身体の臓器または部分から酸素および栄養分、例えばグルコースなどが奪われる。これは身体の臓器または部分の障害を引き起こす恐れがある。例えば、中枢神経系（CNS）の任意の部分に対する血液供給が遮られれば、CNSのその部分の神経細胞（またはニューロン）が急速に変性すると考えられる。

10

【 0 0 6 8 】

特に、本発明は、以下の障害：限局性虚血；全虚血；脳虚血；神経細胞虚血、例えば脊椎損傷および頭部外傷に伴う神経細胞虚血など；心筋虚血；以下の群より選択される心血管疾患：高血圧、狭心症、安定および不安定狭心症、プリンツメタル狭心症、不整脈、血栓症、塞栓症、および慢性または急性のうっ血性心不全を含むうっ血性心不全；もしくは、間欠性跛行を含む、末梢血管障害に起因する下肢の虚血を特徴とする疾患；以下の群より選択される、平滑筋の攣縮を特徴とする疾患：尿管の攣縮、膀胱の攣縮、子宮痙攣および過敏性腸症候群、の治療のための；または以下の群より選択される外科的処置中の血管収縮および／もしくは虚血組織障害：バイパス移植、血管造影法、血管形成術、移植中の臓器保存、高血圧クリーゼもしくは術後高血圧、の予防における、医用薬剤の製造における化合物の使用法に関係しうる。

20

【 0 0 6 9 】**神経学的な疾患および障害**

本発明は、神経学的な疾患および障害の治療に、特に神経細胞の治療に有用でありうる。このような治療には、脳外傷、脳または脳血管虚血、神経変性疾患、神経細胞の中毐の治療、および神経移植片の保護が含まれる。

30

【 0 0 7 0 】

神経変性疾患とは、神経細胞死につながりうる正常な神経機能の変化を特徴とする一群の障害のことである（これらの疾患の大部分では、特に後期には、高度の神経細胞喪失が伴ってみられる）。これらの神経変性疾患には、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病およびハンチントン病が含まれうる。

40

【 0 0 7 1 】**疼痛**

もう1つの局面において、本発明は、疼痛の治療に有用でありうる。このような治療には、関節の病状（関節リウマチおよび変形性関節症など）に伴う疼痛、癌に伴う疼痛、術後疼痛、産後疼痛、歯の病状（虫歯および歯肉炎など）に伴う疼痛、熱傷（日焼けを含む）に伴う疼痛の治療、骨障害（骨粗鬆症、悪性腫瘍による高カルシウム血症、およびペジエット病）、スポーツ障害および挫傷に伴う疼痛の治療が含まれうる。

【 0 0 7 2 】**炎症**

もう1つの局面において、本発明は、炎症の治療に関係しうる。炎症は種々の病状によって引き起こされる可能性があり、このため例えば、本発明は、関節炎、心筋炎、脳炎、移植拒絶反応、全身性エリテマトーデス、痛風、皮膚炎、炎症性腸疾患、肝炎または甲状腺炎に関係しうる。

【 0 0 7 3 】**ストレス**

もう1つの局面において、本発明は、化学および／または環境ストレスの治療に関係しうる。特に、本発明は、神経学的プレコンディショニングを誘導するための化合物の使用

50

法に關係しうる。適した化合物の投与の後に、このような神經学的プレコンディショニングは、神經組織が、通常であれば致死的となるような化学および／または環境ストレスに対して耐えるおよび／または生存することを可能にする。本明細書に記載した化合物との使用法は、これらの化合物が、化学および／または環境ストレスに対する組織のプレコンディショニングにおいてメディエーターとして作用しうる一酸化窒素（NO）を誘発することと關係しうる。

【0074】

本発明をこれから、添付の図面を参照しながら、単なる例示としてさらに詳細に説明する。

【0075】

本発明についてこれから、以下の実施例でさらに詳細に説明する。

【0076】

実施例

エレクトロスプレー質量分析法（ES-MS）を、フラグメント強度を100%に設定したBruker Esquire 3000装置で行った。試料は、0.1%酢酸を含む1：1のアセトニトリル：水中に適用した。300KのD₂O中にある試料を用いて、プロトンおよびリンのNMRスペクトルを400MHz Bruker Ultrashieldで記録した。プロトンのスペクトルに関しては64回のスキャンを用い、リンに関しては1024回のスキャンを用いた。簡潔にするために、化合物同定のために特に有用な¹H NMRシグナルのみを記載している。

【0077】

化合物の調製

AppCH₂ppG

LysU反応混合物の10×1mlの部分をアリコートとして準備した。この混合物には、2mM L-リジン、10mMのMgCl₂、160 μM ZnCl₂および6Uのピロホスファターゼを、50mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.0中に含めた^{7,11}。ヌクレオチドを8mM ATPおよび4mM GMPPCP（，メチレン-グアノシン5'-三リン酸）となるように添加し、混合物をボルテックス処理して、LysUを9 μM濃度（二量体）となるように添加した。続いて混合物を38 °Cでインキュベートして、反応を、50mM Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）を媒質とする2mlのSOURCE 15Q (Amersham Biosciences) イオン交換カラムを用いるHPLCによってモニターし、0～0.5Mの塩の勾配を用いて2ml / 分で5分間かけて溶出させた⁹。25分後にATPおよびGMPPCPのピーク（以前には5.5分および5.2分で観察されている）が消失し、7.2分のAp₄Aピークおよび6.8分の標的によって置き換えられた。さらにインキュベーションを続けると1時間後にAp₄AがAp₃A（5.1分）に変換されたが、標的の分解は伴わなかった。AppCH₂ppGを、水を媒質とする60ml SOURCE Qカラムを用いて精製し、TEAB（炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液）の0～2Mの勾配を用いて8ml / 分で30分かけて溶出させ、貯蔵のために-20 °Cで凍結乾燥させた^{9,12}。SoQ / NaCl HPLCによって単一のピークが示され、生成物はES-MS (M-H)⁻が848.9m/zであった。

¹H NMR: 8.39 (1H, s, 8-H-AD), 8.15 (1H, s, 2-

H-Ad), 8.03 (1H, s, 8-H-Gu), 6.04 (1H, s, 1'-H-rib[Ad]), 5.82 (1H, s, 1'-H-rib[Gu]), 2.46

(2H, t, O-CH₂-O), 2-H-Guはおそらく不安定なために認められず、³¹P NMR: 8.74 (2P, m, β-P), -

10.63 (2P, m, α-P)

収率は90%+であった。

【0078】

AppNH₄pppU

AppNH₄pppUのLysU合成にはNHが置換されたアデノシン四リン酸が必要と考えられるが、これは入手可能でない。このため、本発明者らは脱水剤EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）を基にした化学結合を用いた¹³。AMPPNHP（アデノシン5'-(，-イミド)三リン酸、50mg）およびUDP（ウリジンニリン酸、150mg）を、10×1mlア

10

20

30

40

50

リコート中にて75mM MgCl₂を含む2M HEPES pH 6.5に溶解した。400mgのEDCを各アリコートに添加し、混合物を37℃でインキュベートして、この場合もSoQ / NaCl HPLC (UDP 3.8分、AMPPNHP 4.7分)によりモニターした。12時間後に、2つの生成物のピークが6.1分および7.0分に認められた。それらをSoQ / TEABカラムで抽出して凍結乾燥した^{9, 12}。どちらの生成物もSoQ / NaCl HPLCによって単一のバンドを示し、6.1分の方はES-MS (M-H) が788.6m/zであってUp₄Uとして同定され、一方、7.0分の方は890.7m/zであり、これはApppNHp pUと一致する。

ApppNHppU ¹H NMR: 8.52 (1H, s, 8-H-Ad), 8.21

(1H, s, 2-H-Ad), 7.87 (1H, s, 6-H-Ur), 6.08 (1H, s, 1'-H-rib[Ad]), 5.90 (2H, d 1'-H-rib[Ur]

10

and 5-H-Ur), 3-H-Urは認められず（おそらくは不安定）、O-NH-O 不明瞭，³¹P NMR:

複合的な多数の3つの接近したバンドが認められる、-10.89, -10.97 および -11.25

最後のものは -P、 -Pおよび -Pの重なりとして暫定的に同定された。

Up₄U ¹H NMR: 7.91 (2H, s, 6-H-

Ur), 5.93 (4H, s, 1'-H-rib and 5-H-Ur) ³¹P NMR: 単一のバンド (d m) が-11.46ppmに認めら

れる。

収率は初期のAMPPNHPに関しては45%であった（いくらかの出発材料が回収されたもの）。

20

【 0 0 7 9 】

A_{diol}ppCH₂ppA_{diol}

AppCH₂ppA (100mg、LysU結合によりATPおよびAMPPCP [, -メチレン-アデノシン5'-三リン酸]から以前に作製)⁹を2mlの蒸留水中に溶解した。150μlの0.3M過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を添加して、10分間おいた後に、50μlの0.5M水素化ホウ素ナトリウム水溶液を添加した（警告：H₂が発生した）。反応を通常通りSoQ / NaCl HPLCによってモニターしたところ、AppCH₂ppAの5.8分のピークはジアルデヒドへの酸化によって6.2分に上方移動し、ジオールへの還元によって4.4分に低下した。SoQ / TEABによる分離^{9, 12}によって2つの主バンドが得られ、それらを抽出して凍結乾燥した。どちらもSoQ / NaCl HPLCによって単一のピークを示し、分子量の高い方の生成物はES-MS (MH) が836.9m/zであり、低い方は585.7m/zであった。これらは、それぞれA_{diol}ppCH₂ppA_{diol}およびA_{diol}PPCH₂PPに一致する。

A_{diol}ppCH₂ppA_{diol} ¹H NMR: 8.34 (2H, s, 8-H-Ad), 8.13 (2H, s,

2-H-Ad), 5.96 (2H, s, 1'-H-rib), 3.97 (4H, s, 2'-H-rib), 3.80 (4H, s, 3'-H-rib), 3.70 (4H, s,

rib-CH₂-O), 2.31 (2H, t, O-CH₂-O) ³¹P NMR: 7.17 (2P, q, β-P), -11.16 (2P, d, α-P).

A_{diol}ppCH₂pp ¹H NMR: 8.41 (1H, s, 8-H-Ad), 8.22 (1H, s, 2-H-Ad), 6.01 (1H, s, 1'-H-rib),

4.01 (2H, s, 2'-H-rib), 3.74 (4H, m, 3'-H-rib and rib-CH₂-O), 2.36 (2H, t, O-CH₂-O) ³¹P

NMR: 7.50 (1P, m, β-P), 6.45 (1P, q d, γ-P), -10.56 (1P, d, δ-P), -11.21 (1P, d m, α-P)

収率は80%であった。

30

【 0 0 8 0 】

生物試験

以下の生物学的データは、ジヌクレオシドポリリン酸類似体の効果および機序を明らかにするために取得した。決定的なこととして、化合物がP2および/またはA1受容体作動薬であることが示されれば、それらは目覚ましい範囲にわたる潜在的な治療特性を有すると考えられる。ここ25年のうちに、鎮痛薬、抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬、向知性薬/認知増強薬、および脳卒中に関連したCNS障害に有効な種々の薬剤を含む、中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)の両方で用いられるP2および/またはA1受容体作動薬が多岐にわたるCNS作用性薬剤の作用を促進すること、またはそれらと相乗作用を示すことを

40

50

示唆する多くの研究がなされている。さらに、このような受容体作動薬はまた、それ自体が強力な神経学的化合物であるように思われる。

【0081】

脳卒中および虚血に対して

A1受容体作動薬として作用する化学物質は、神経細胞の興奮性および興奮性アミノ酸(EAA)放出の阻害をもたらす、安定な神経細胞膜電位を促進するように思われる²²。EAA放出の遮断は、すなわち、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の活性化に伴う神経傷害性続発症を予防する。A1受容体作動薬もまた、脳卒中に関連した細胞死および海馬神経変性を軽減することができる²²。

【0082】

てんかんに対して

A1受容体作動薬として作用する化学物質は、動物モデルにおいて種々の化学的および電気的な刺激によって誘導されるてんかん発作活性を低下させる^{23, 24}。電気的キンドリン発作モデルにおいて、A1受容体作動薬は、発作閾値を有意に変化させずに発作の重症度および持続時間を軽減する抗けいれん薬である²³。

【0083】

神経変性に対して

虚血、低酸素およびてんかんに伴う神経細胞の興奮性亢進が、加齢に伴う神経変性プロセスの基礎もなしていることは広く認められている。P2および／またはA1受容体作動薬として作用する化学物質はEAAの神経毒性を低下させ、神経細胞死を招くその結果としてのカルシウム恒常性の変化は、アルツハイマー病(AD)およびパーキンソン病(PD)と関連性のあるより微妙で長期的な変化を反映している可能性がある²⁵。これらの作動薬はフリーラジカル生成を阻害する強力な抗炎症薬であり²⁶、このため、神経伝達物質により媒介される神経細胞事象に対する直接的な効果を上回って潜在的なAD治療を提供する上で付加的な恩典を提供する可能性がある。A1受容体作動薬は、線条体ドーパミン(DA)D1受容体の高親和性状態を軽減することができる²⁷。機能的には、A1作動薬はレセルビン処理マウスにおけるDA D1受容体を介した運動活性をブロックする。または、これらの作動薬は、ウサギにおいて選択的DA D1活性化によって誘導される口周囲運動異常を減弱させることができる。精神運動機能の神経化学におけるドーパミン作動系とプリン作動系との間のこの動的な相互関係は、A1受容体の調節を介したドーパミン作動性機能障害の改善のための新たな可能性を提供する。

【0084】

不眠に対して

A1作動薬として作用する化学物質の脳内への直接投与は、睡眠全体の増加をもたらす、REM睡眠の潜時の短縮を伴うREM睡眠の増加として現れる、深睡眠において見られるものに類似したEEGプロフィールを誘発する²⁸。A1選択的作動薬はSWSの増加を誘発する前に徐波睡眠(SWS)および逆説睡眠(PS)を抑制する可能性がある。

【0085】

疼痛に対して

感覚求心路に対するATPの適用は、興奮性亢進および強い疼痛の知覚をもたらす。ヌクレオチドはまた、投与された局所的部位での侵害受容性応答も誘導することができ、他の有害刺激に対する侵害受容性応答も促進することができる²⁹。ATPの侵害受容誘発作用は、感覚求心路および脊髄に存在するP2X受容体によって媒介される。ホモマー性P2X3受容体およびヘテロマー性P2X2/3受容体は侵害受容性シグナルを特異的に伝達する感覚神経に高度に局在している³⁰。ATPは外傷に応答してさまざまな細胞種から放出され(例えば、交感神経、内皮細胞、内臓平滑筋)³¹、P2X3受容体の活性化が、内臓の侵害受容と関連のある末梢および中枢の感受性増加を惹起するとともにその一因となることについてはかなりの証拠がある³¹。P2X3受容体の発現は、末梢感覚線維に対する損傷の後に感覚求心路および脊髄においてアップレギュレートされる³²。このため、選択的で生物学的利用能のあるP2X3受容体拮抗薬の開発により、疼痛の治療のための新規化合物が得られることが期

10

20

30

40

50

待される。

【 0 0 8 6 】

その一方で、A1受容体作動薬として作用する化学物質の投与は、広範囲にわたる動物モデルで疼痛緩和を与えている（例えば、マウスのホットプレート試験、マウスのテイルフレックアッセイ法、ラットのホルマリン試験、マウスの腹部収縮アッセイ法）^{29, 33, 34, 3}⁶。A1作動薬はまた、ラットモデルにおける神経因性疼痛の緩和にも有効であり³⁶、サブスタンスPおよびグルタミン酸作動薬NMDAの脊髄注射によって誘発される疼痛関連行動を阻害する。機械論的に言えば、A1受容体作動薬はラットにおいて、脊髄液中へのグルタミン酸の放出を阻害し、サブスタンスPの脳脊髄液レベルも低下させることができ^{29, 37, 38}。グルタミン酸は、臨床的疼痛状態と関連のある脊髄後角ニューロンの異常な興奮性亢進（中枢感受性増加）の重要なメディエーターである³⁹。サブスタンスPは侵害受容性応答のもう1つの重要なメディエーターである^{29, 37, 38}。A1作動薬については、ヒトの疼痛の緩和における有用性も示されている³⁸。A1作動薬の脊髄投与は、神経因性疼痛の患者におけるアロディニアを、正常な感覚知覚に影響を与えることなく緩和する。その注入は臨床的疼痛モデルにおける疼痛症状を改善し、神経因性疼痛を有する患者における自発痛、進行中の痛覚過敏およびアロディニアを軽減する。さらに、手術中の作動薬の低用量注入は、揮発性麻酔薬および術後のオピオイド鎮痛の必要性を減じさせる可能性がある^{37, 40}。

10

【 0 0 8 7 】

一般的方法

20

海馬切片の調製

本研究は、21日齢のWistarラット（WAG / GSto, Moscow, Russia）に対して行った。素早い断頭の後に、ラット脳を直ちに、120mM NaCl、5mM KCl、26mM NaHCO₃、2mM MgCl₂および20mMグルコースの組成を有する冷却（4℃）溶液の入ったペトリ皿に移した。神経細胞損傷の可能性を減らすためにカルシウム塩は含めなかった。この溶液には、pH 7.4に維持するために95%O₂ / 5%CO₂ 気体混合物による気泡を常に生じさせた。海馬切片（300-400 μm厚）は、興奮性連結の層状構造を保つために歯槽線維に沿って徒手的にカミソリ刃によって切り出した。プレインキュベーションおよび実験の間は、切片を、135mM NaCl、5mM KCl、26mM NaHCO₃、1.5mM CaCl₂、1.5mM MgCl₂および20mMグルコースを含み、95%O₂ / 5%CO₂による気泡を常時生じさせた30~31℃の細胞外溶液、pH 7.4中に完全に浸漬させた。25~50mMのピクロトキシン（RBI, Natick, MA, USA）も、介在ニューロンの抑制活性を抑制するため、実験中に細胞外溶液中に含めた。電気生理学的測定は少なくとも2時間のプレインキュベーションの後に記録した。

30

【 0 0 8 8 】

電気生理学的測定

40

興奮性シナプス後電流（EPSC）を、シェーファー側副 / 交連経路の刺激に応答した海馬のCA1サブフィールドにおける標準的なホールセルパッチクランプ法によって記録した。CA3野からの電気活性の広がりを防ぐために、苔状線維層へと伸びる錐体層に対して直角に切れ目を入れることによってミニ切片を調製した。パッチピペット用の細胞内溶液、pH 7.2は、100mM CsF（Merck, Darmstadt, FRG）、40mM NaH₂PO₄、10mM HEPES-CsOH、10mM Tris-HClを含む。2~3mMの臭化N-(2,6-ジメチルフェニルカルバモイルメチル)-トリエチルアンモニウム（QX-314；Tocris Cookson, Bristol, UK）を、電位依存性ナトリウム電導をロックするためにルーチン通りに細胞内溶液に添加した。パッチピペットは、二段階式の水平プラーによって軟ホウケイ酸ガラスから引いて作った。先端を熱加工して細胞内溶液を満たした後の時点で、それらの抵抗は2~3MΩであった。CA1錐体ニューロンの細胞体を描出するために、マイクロピペットからの食塩水噴流によって多形細胞層および白板を除去した。電流を、3kHzのフィルターをかけて12桁のADCボードによって400ms間隔でデジタルサンプリングし、さらなる解析のためにデータをハードディスクに保存した。アクセス抵抗を実験期間を通じてモニターしたが、それは典型的には6~9MΩの範囲であった。アクセス抵抗が実験中に25%を超えて変化した細胞からのデータは除外した。細胞外外

50

界電位をNi / Cr電極を用いて記録した。集合スパイクはデジタル化してコンピュータディスク上に保存した。受容体の拮抗薬の作動薬の効果は平均比 I/I_0 として測定したが、ここで I は物質の作用の下での電流であり、 I_0 は対照食塩水における電流である。シェーファー側副 / 交連経路の入力を刺激するためには、双極Ni / Cr電極を切片の表面に配置した。持続時間0.1~1msの電流パルス(10~100pA)を、絶縁された刺激装置HG 203(HiMed, London, UK)により0.066~0.2Hzで与えた。

【0089】

実験1

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイク(図5A)、逆行性に誘導された集合スパイク(図5B)および興奮性シナップス後電流、EPSC(図5C)の振幅の変化の経時的推移を測定した。時間経過に伴って、ラット海馬切片に対して適用するAp₂CH₂p₂Aの量を増やした。すなわち、1.9 μmのAp₂CH₂p₂Aを10分後に適用し、14分後にはこれを3.7 μmに増やし、18分後には7.4 μmに増やした。

10

【0090】

この実験において順行性(上の2つ)および逆行性(下の2つ)に誘導された集合スパイクを誘導するために用いた電極の位置は、図4に図示されている。AppCH₂ppAは、CA3-CA1シナップスを含む海馬ではすべてのシナップス経路において(図4)、順行性に誘発された外界電位の再現性のある急速かつ可逆的な阻害を生じさせることが見いだされた(図5A)。図5Aにおける経時的推移の右側には、経時的推移において点1(対照)および2(Ap₂CH₂p₂Aの効果)に対応する集合スパイク(5倍平均)の元の軌跡が示されている。

20

【0091】

順行性に誘発された外界電位とは対照的に、逆行性スパイク(ここおよび以下ではCA3-CA1シナップス)(図5B)ならびにCA1錐体ニューロンで記録したEPSC(図5C)の振幅は、不变のままであった。EPSCの減衰も変化せず、このことからAppCH₂ppAはいずれのEPSCのNMDA成分も調節しないことが示唆された(図5C)。

20

【0092】

これとは対照的に、文献では、Ap₄Aが興奮性シナップス後電流ならびに順行性に誘発された外界電位の阻害を誘導することが示されている¹⁴。これらの結果は再現するのが難しいこともわかつており、信頼性に乏しい。

30

【0093】

実験2

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。8分後に、ピリドキサール-リン酸-6-アゾフェニル-2',4'-ジスルfonyl酸(PPADS)(20 μM)を適用した。続いて12分後に、Ap₂CH₂p₂Aを適用した。

30

【0094】

ピリドキサール-リン酸-6-アゾフェニル-2',4'-ジスルfonyl酸(PPADS)を用いると、順行性スパイクに対するAppCH₂ppAのブロック効果が完全に消失することが見いだされた(図6)。図6は、左側で、順行性に誘導された集団の振幅の変化の経時的推移を示しており、右側では、経時的推移における点1(対照)および2(Ap₂CH₂p₂A / PPADSの効果)に対応する集合スパイク(5倍平均)の元の軌跡を示している。PPADSはよく知られた広帯域性P2-受容体ファミリー拮抗薬であるため^{15,16}、この結果により、観察されたAppCH₂ppA効果が従来とは異なる薬理作用を有する新規P2ファミリー受容体によって媒介されうると考えられることが示唆された。

40

【0095】

実験3

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。9分後に、-メチレン-ATP(100 μM)を適用した(図8)。

【0096】

50

実験4

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。時間経過に伴って、ラット海馬切片に対して適用するATP Sの量を増やした(図9)。すなわち、 $10\text{ }\mu\text{m}$ のATP Sを10分後に適用し；15分後にはこれを $20\text{ }\mu\text{m}$ に増やし；21分後には $50\text{ }\mu\text{m}$ に増やし；そして29分後には $100\text{ }\mu\text{m}$ に増やした。

【0097】

実験3および4は、P2Xおよび/またはP2Yファミリーの受容体の公知の作動薬を用いた作動薬実験である。しかし、 -メチレン-ATP (図8)およびATP S(図9)は、AppCH₂ppAと同じように、順行性に誘発された外界電位を阻害することはできなかった。観察された唯一の効果は、極めて高いヌクレオチド濃度($100\text{ }\mu\text{M}$)での弱くゆっくりと現れる阻害であった。用いた作動薬の濃度が高いことからみて、このような効果はたかだか非特異的なものである。したがって、AppCH₂ppAの効果が主要なP2XまたはP2Y-ファミリーの受容体によって媒介される可能性は低いように思われる。これはおそらく、Ap_nAが神経組織においてP2X₁₋₄、P2Y₁、P2Y₂およびP2Y₄受容体の作動薬として作用する能力が知られていることからみると、驚くべきことであろう¹⁵。

【0098】

実験5

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した(図10)。10分後に、ニイノシン四リン酸(Ip_4I)($20\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。続いて20分後に、Ap₂CH₂p₂A($7.4\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。

【0099】

実験6

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した(図11)。10分後に、ニイノシン四リン酸(Ip_4I)($20\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。続いて16分後に、Ap₂CH₂p₂A($7.4\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。

【0100】

AppCH₂ppAの効果が、ラット脳シナプス末端で以前に同定されているP4-ジヌクレオチド受容体¹⁷によって媒介されうるかという可能性について、実験5および6で評価した。しかし、高濃度のP4拮抗薬ニイノシン四リン酸(Ip_4I)($20\text{ }\mu\text{M}$)の添加によっても、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化に対するAppCH₂ppAの効果は変化しないことが見いだされた(図10)。さらに、 Ip_4I ($20\text{ }\mu\text{M}$)の添加は、AppCH₂ppAが、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化に対して影響を及ぼすようにさせることもないことが見いだされた(図11)。これらの結果は、P4-ジヌクレオチド受容体の媒介の可能性を完全に否定するものである。したがって、これらの結果は、新たなP2-ファミリー受容体が、観察されたAppCH₂ppA効果を媒介する可能性を示唆する。

【0101】

実験7

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。10分後に、ビククリン($50\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。続いて20分後に、Ap₂CH₂p₂A($7.4\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。

【0102】

AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害は、ビククリンの存在によって影響されなかった。

【0103】

実験8

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。10分後に、ヘキサメトニウム($100\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。続いて20分後に、Ap₂CH₂p₂A($7.4\text{ }\mu\text{M}$)を適用した。

【0104】

10

20

30

40

50

AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害は、ヘキサメトニウムの存在によって影響されなかった。

【0105】

実験9

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した(図7)。10分後に、ストリキニーネ(500nM)を適用した。続いて20分後に、Ap₂CH₂p₂A(7.4 μM)を適用した。

【0106】

AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害は、ストリキニーネの存在によって影響されなかった。

10

【0107】

実験10

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、逆行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。10分後に、シクロペンチルテオフィリン(CPT)(1 μM)を適用した。続いて26分後に、Ap₂CH₂p₂A(7.4 μM)を適用した。

【0108】

AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害は、CPTの存在によって失われた。

【0109】

実験7、8、9および10は、AppCH₂ppAの効果を媒介する受容体の場所を調べたものである。AppCH₂ppAはシナプス伝達を全く調節しないことから、順行性スパイクの厳密な阻害はシナプス後ニューロン興奮性のみの調節によって生じているに違いないと推論することができる。さらに、逆行性に誘発された外界電位はAppCH₂ppAによって調節されないため、調節の部位はシナプス後CA1樹状突起に位置しなければならない。CA1錐体ニューロンの樹状突起は、コリン作動性受容体およびGABA作動性受容体を含む数多くの受容体を介して媒介される皮質性調節の重要な標的であることがよく知られている。したがって、これらの実験では、-アミノ酪酸(GABA)受容体(実験7)、ムスカリン受容体(実験8)およびグリシン受容体(実験9)の公知の拮抗薬を用いた。しかし、これらの拮抗薬はいずれも、AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害に影響を及ぼさなかった。これに対して、A1アデノシン受容体拮抗薬の1つであるCPTの投与はAppCH₂ppAの効果を消失させることが認められ(図7)、これにより、AppCH₂ppAの効果が、実際には、PPADS感受性P2受容体活性化の下流にあるA1アデノシン受容体活性化によって媒介されることが示唆された。

20

30

【0110】

この示唆は、海馬切片に対するアデノシン(5 μM)の投与が、AppCH₂ppAと同様の様式で順行性スパイクを阻害することが以前に示されているという事実によって裏づけられる¹⁸。しかし、アデノシンの投与はEPSCの振幅も小さくすることが示されており¹⁹、これはAppCH₂ppA投与後に観察された効果とは著しく対照的である(図5C)。したがって、AppCH₂ppAにより媒介される効果はアデノシンのみによるものよりもかなり選択的である。

40

【0111】

実験11

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。5分後に、2-フェニル-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-1-オキシル3-オキシド、PTIO(1mM)を適用した(図12)。続いて11分後に、Ap₂CH₂p₂A(2.5 μM)を適用した。

【0112】

PTIOの使用により、AppCH₂ppAにより媒介される、順行性に誘発された外界電位の阻害の程度は、50%を上回って低下した(図12)。

【0113】

一酸化窒素(NO)は、P2受容体の活性化に応答したアデノシンの流出を媒介することが

50

示されている²⁰。このため、公知のNO特異的スカベンジャーであるPTIOの使用は、AppCH₂ppAにより媒介される、順行性に誘発された外界電位の阻害に対して、もしそれにP2受容体が関与している場合には、影響を及ぼすと考えられる。観察された低下は、この場合にP2受容体が直接的な役割を有するということに一致するものである。したがって、AppCH₂ppAにより媒介される効果は、AppCH₂ppAの結合に起因するPPADS感受性P2受容体活性化と、排他的なシナプス後A1受容体活性化を招くアデノシンの細胞内合成を後に刺激するNOの生成とを結びつける経路によって進行すると仮定することができる。

【0114】

実験12

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を測定した。10分後に、アデノシンデアミナーゼ(約2U/ml)を適用した。続いて20分後に、Ap₂CH₂p₂A(7.4μM)を適用した。

10

【0115】

AppCH₂ppAにより誘導される、順行性に誘発された外界電位の阻害は、アデノシンデアミナーゼの存在によって失われた。

【0116】

以前の研究で、ヌクレオシドにより活性化される受容体は、海馬ニューロンにおけるグルタミン酸放出のシナプス前阻害を生じさせることが観察されている²¹。このプロセスはいわゆるP3受容体(P2Y-テオフィリン感受性受容体)によって媒介され、これは観察されたAppCH₂ppA効果とある程度類似性がある。しかし、AppCH₂ppAの効果がアデノシンデアミナーゼによって失われるという事実はP3機序に一致するものであり、これはAppCH₂ppAの効果が類似の経路によっては媒介されないことを示している。

20

【0117】

実験13

一般的手順に従って調製したラット海馬切片のCA1区域における、順行性に誘導された集合スパイクの振幅の変化の経時的推移を、Ap₂CH₂p₂A(2.5μM)の添加の前および後に、22(図13)および36(図14)で測定した。

【0118】

この効果の温度依存性は、アデノシンなどの低分子メディエーターの拡散が関与するシグナル伝達経路に一致する。

30

【0119】

実験14

ジアデノシンポリリン酸の非加水分解性類似体によるNMDA-受容体媒介性電流の調節

ジアデノシンポリリン酸は、中枢神経系のシナプス末端において神経伝達物質の役割を果たしうる天然化合物である。ここで、本発明者らは、ジアデノシンポリリン酸AppCH₂ppAの非加水分解性類似体が、NMDA-受容体媒介性チャネルの機能に影響を及ぼしうることを示す。単離された海馬錐体ニューロンにおいて、低マイクロモル濃度で適用したAppCH₂ppAは、NMDAにより活性化される電流を濃度依存的な様式で増加させた。AppCH₂ppAのこれらの効果はプリンP2受容体拮抗薬PPADSおよびリアクティブブルーの存在下では消失し、このことからAppCH₂ppAの効果はプリン受容体の活性化によって媒介されることが示唆された。AppCH₂ppAの効果はEDTAの存在下では解消され、このことは、細胞外溶液中にごく微量で持続的に存在する二価陽イオンのいくつかが、P2受容体の活性化の下流にある観察された効果に関与することを示す。さらに、AppCH₂ppAの効果は、ニューロンをチロシンプロテインキナーゼ阻害薬であるゲニステインの非特異的阻害薬で前処理した後には失われた。これらのデータを総合すると、AppCH₂ppAにより増強されるNMDA電流は、二価陽イオンのいくつか、最も可能性の高いものとしてはZn²⁺によるNMDA受容体の持続的阻害を軽減することにより、チロシンキナーゼのP2受容体依存的活性化に起因すると推測することが可能となる。

40

【0120】

これらの結果は図15および16に示されている。

50

【0121】

図15は、AppCH₂ppA (1 μM) による、単離された海馬錐体ニューロンで記録された、NMDA受容体により活性化される電流の調節が、プリンP2受容体によって媒介されることを示している。

【0122】

NMDA-受容体により活性化される電流は、アスパラギン酸(ASP) (1mM) およびグリシン (10 μM) の1~2秒間にわたる同時適用によって誘発させた。Vh = Mg²⁺非含有溶液において -100mV。

(a) AppCH₂ppAの存在下および洗い流しの後での、対照における、NMDAにより活性化される電流の代表的な軌跡。

(b) NMDA電流のピーク振幅に対する、AppCH₂ppAおよび他のプリン作動薬；ADP (1 μM)、UTP (1 μM)、UDP (1 μM) の効果に関する統計値、

(c) 非特異的なプリンP2受容体拮抗薬PPADSによる、NMDA-電流の、AppCH₂ppAにより媒介される強化の阻害。

(d) 対照条件下およびP2拮抗薬PPADSの存在下での、NMDA-電流のピーク振幅に対するAppCH₂ppAの効果に関する統計値。

(e) P2Y受容体拮抗薬リアクティブブルー(RB)による、AppCH₂ppAにより媒介される効果の阻害。

【0123】

図16は、AppCH₂ppAによる、NMDA受容体により活性化される電流の調節が、二価陽イオンによる持続的阻害の緩和によって媒介されることを示している。

(a) NMDAにより活性化される電流の増強は、二価陽イオンのキレート剤であるEDTAの存在下では失われる。対照、EDTAの存在下およびAppCH₂ppAとEDTAとの存在下における、NMDAにより活性化される電流の代表的な軌跡。

(b) 対照条件下およびEDTAの前適用下での、NMDA-電流のピーク振幅に対するAppCH₂ppAの効果に関する統計値。

(c) チロシンプロテインキナーゼの非特異的阻害薬であるゲニステインによる、NMDA-電流のAppCH₂ppAにより媒介される強化の阻害。

(d) 対照条件下およびゲニステインの前処理後における、NMDA-電流のピーク振幅に対するAppCH₂ppAの効果に関する統計値。

【0124】

材料および方法

材料

細胞内溶液および細胞外溶液のためのすべての化学物質は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。

【0125】

細胞の調製

Wistarラット (12~17日齢) をエーテル麻酔下で断頭し、海馬（または小脳）を摘出した。それを、以下のもの (mM単位) を含む溶液中に切片 (300~500 μm) として切り出した。150 NaCl ; 5 KCl ; 1.25 NaH₂PO₄ ; 26 NaHCO₃ ; 1.1 MgCl₂ ; 10 グルコース ; pH 7.4。続いて切片を、コウジ菌 (Aspergillus oryzae) 由来の0.5mg / mlのプロテアーゼ (XXIII型) とともに32℃で10分間インキュベートした。CA1およびCA3錐体層からの単一の錐体細胞を錐体層における局所的な振動解離法によって単離し、CA3およびCA1海馬錐体ニューロンをそれらの特徴的な形態および部分的に保たれた樹状突起の分枝によって同定した。

【0126】

単離の後、細胞は通常2~4時間にわたり記録に好適であった。手順全体を通じて、切片を含む溶液には、pH 7.4を維持するために95% O₂および5% CO₂気体混合物を連続的に飽和させた。被験物質は貯蔵濃度10mMとしてDMSO中に溶解し、日々のアリコートとして-40℃で凍結保存した。これらの物質は、実験の直前に最終濃度となるように外部からの食塩水中に溶解した。

10

20

30

40

50

【0127】

電流の記録

単離されたニューロンにおける、NMDAにより活性化される電流は、コンピュータ化された「Pharma-Robot」設備 (Pharma-Robot, Kiev) を用いて、アスパラギン酸 (1mM) およびグリシン (1mM) を「濃度固定」モードで適用する段階によって誘導した (Krishtal et al., 1983)。この装置は、15ms以内での食塩水の完全な変化を可能にする。膜貫通電流は、ホールセル構成での従来のパッチクランプ法を用いて記録した。パッチクランプ用電極を、水平ブラー (Sutter Instruments) によって引いて作製し、先端の内径は1.4~1.8 μmであり、先端抵抗は2.5~5MΩであった。細胞内溶液は以下のものを含んだ (mM単位) : 70 Tris-PO₄; 5 EGTA; 40 TEA-Cl (塩化テトラエチルアンモニウム); 30 Tris-Cl; 5 Mg-ATP; 0.5 GTP; pH 7.2。細胞外溶液の組成は以下の通りであった (mM単位) : 130 NaCl; 3 CaCl₂; 5 KCl; 2 MgCl₂; 10 HEPES-NaOH; 0.1 μM TTX; pH 7.4。電流の記録はパッチクランプ増幅器 (DAGAN, USA) を用いて行った。膜貫通電流に3kHzフィルターをかけて、保存し、IBM-PCコンピュータで自作ソフトウェアを用いて解析した。NMDA応答は3分間隔で記録した。実験はすべて室温 (19~24°C) で実施した。

【0128】

実験15

AppCH₂ppAの抗侵害受容活性

実験手順 :

CFA誘導性の温熱性痛覚過敏。

ラットの右後肢の足底面に、50%CFA (Sigma) を含む生理食塩水の溶液100μlを注射することにより、一側性炎症を誘導した。CFA注射から48時間後に、急性有害温熱アッセイ法に関して以下に述べるのと同じ装置を用いて、温度刺激に対する痛覚過敏について評価した。

【0129】

熱感受性 :

機械的試験の後には毎日、ラットを温熱試験装置 (Plantar test, Ugo Basile, Italy) の中に入れ、そこで自由に移動させる。30分間の馴化の後に、一定の力のIR刺激をガラス基剤を通して足底に集中して与え、以前にHargreaves et al. 1988に記載されたように光電モニターを介して、足引っ込み反射の潜時を自動的に記録する。

【0130】

それぞれの試験セッションにおいて、(6匹の被験ラットからの)各ラットを、約15分間隔の3回の逐次的な試行によって試験した。

【0131】

結果

AppCH₂ppAの抗侵害受容活性。

AppCH₂ppAの侵害受容活性の特徴を調べるために、CFAにより誘導した温熱性痛覚過敏動物モデルにおいて、この化合物の効果を皮下投与後に評価した。AppCH₂ppAは温熱性痛覚過敏の軽減に明らかに効力があった (図17)。

【0132】

CFAの足底内投与によって誘導した48時間の炎症の後に、AppCH₂ppAは温熱性痛覚過敏を完全にプロックした (図17)。AppCH₂ppAのこの抗侵害受容効果は損傷肢に特異的であり、非損傷肢に関する足引っ込み潜時は被験用量でのAppCH₂ppAによってはそれほど効果的に変化しなかった。損傷肢におけるAppCH₂ppAの抗侵害受容効果は発現が遅れ、注射の3時間後に現れた。

【0133】

図17

AppCH₂ppAは、CFAの足底内投与から48時間後の足引っ込み潜時を増大させる。対照肢およびCFA注射肢における応答 (足引っ込み潜時 (平均 ± SEM))。

【0134】

10

20

30

40

50

AppCH₂ppA (50 μ mol / kg 皮下注射) は、ラットにおいてCFAにより誘導される温熱性痛覚過敏を弱める。

【 0 1 3 5 】

図18

AppCH₂ppAは、対側（炎症のない）肢における48時間時点での足引っ込め潜時を増大させる。対照肢および対側肢における応答（足引っ込め潜時（平均 ± SEM））。

【 0 1 3 6 】

AppCH₂ppA (50 μ mol / kg 皮下注射) は、ラットにおける温熱性痛覚過敏を弱める。

* P < 0.05 CFAとCFA + AP4 50uMとの比較

\$ P < 0.05 CFAと対照との比較

10

** P < 0.05 CFAと対側肢CFA + AppCH2ppA 50uMとの比較

P 対照とCFAとの比較 1.58E-12

P CFAとCFA + AP4 50uMとの比較 0.000314

P CFAとCFA + AP4 50uMとの比較 0.000501

P CFAと対側肢CFA + AP4 50uMとの比較 0.0043

P CFAと対側肢CFA + AP4 50uMとの比較 0.000335

P CFAと対側肢CFA + AP4 50uMとの比較 3.67E-06

P CFAと対側肢CFA + AP4 50uMとの比較 1.53E-07

P CFAと対側肢CFA + AP4 50uMとの比較 6.54E-05

20

【 0 1 3 7 】

装置の説明

7370 足底試験

非拘束動物における温熱刺激に対する痛覚過敏の測定

以下を特徴とする。

- ・行動エンドポイントの自動検出
- ・反復試験によって妥当性が影響されない
- ・他の温熱試験または機械的試験よりもバイオアッセイ感度が高い
- ・それぞれの動物がそれ自体の対照として役立つ

30

【 0 1 3 8 】

装置は基本的に以下からなる。

- ・移動式I.R.（赤外）線源
- ・ラット用の閉鎖容器を上に乗せるガラス板
- ・制御装置

【 0 1 3 9 】

多数の動物がかかわる場合には、試験のスピードを速めるために、3つの区画を有する閉鎖容器が提供されている。それぞれの区画内では動物は拘束されていない。

【 0 1 4 0 】

馴化期間の後に、ガラス床の下に配置されたI.R.線源（図を参照）が、操作者によって後肢のすぐ下に配置される。I.R.線源のスイッチを入れ、デジタル式の半導体タイマーを起動させるキーを押し下げるこによって試行を開始する。

40

【 0 1 4 1 】

ラットが疼痛を感じて肢を引っ込めると、反射する照射の急激な減少によってI.R.線源のスイッチが切れ、反応時間カウンターが停止する。

【 0 1 4 2 】

最も近い0.1sに当たる引っ込め潜時を決定する。

【 0 1 4 3 】

較正線量計

それぞれの足底試験は、そのI.R.線源が同じ力の線束（1平方cm当たりのmWとして表現される）を、それ故に同じ強度の侵害受容刺激を確実に送出するように、I.R.線量計によって正確に較正される。

50

【0144】

エンドユーザーはこの極めて有用な付属装置、Heat-Flow I.R. Radiometer Cat. 37300について考慮すべきであり、これはバッテリで動作し、I.R.プローブ、デジタル式メーター、ならびにテイルフリック試験および足底試験用のアダプターを備えた自給自足的な装置であり、すべての部品は、パンチ穴のあいた発泡体の内張がなされた頑丈な合成樹脂ケースの中に整然と収められている。

【0145】

37300線量計は実験者が以下を行うことを可能にする。

i) I.R.発光を検査すること（および必要であれば調整すること）。実際、足底試験のI.R.出力は、光学部品上に集まった塵、I.R.バルブの黒化、偶発的な打撃、温熱サイクルに起因する構成要素のエイジングなどのために、1~2年で2~3%減少する経過をたどる恐れがある。

さらに、バルブを交換した場合または電子機器が保守点検を受けた場合には、さらに大きな程度、例えば8~10%という出力の変化が起こる恐れがある。

ii) 2つまたはそれ以上の足底試験構成単位に、正確に同じ強度の温熱侵害受容性刺激を確実に送出させること。必要であれば、それらのバランスをとる。

iii) 文献中に記載された任意の等しいまたは異なる方法／装置と比較するための有用なデータである、絶対的な表現で、I.R.エネルギー（1sの持続時間にわたる1mWは1mJに相当する）を把握すること。

【0146】

文献

方法についての論文：

- K.M. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores and J. Joris: "A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia." Pain 32: 77-88, 1988.

【0147】

そのほかの論文：

- K.M. Hargreaves, R. Dubner and J. Joris: "Peripheral Action of Opiates in the Blockade of Carrageenan-Induced Inflammation" Pain Research and Clinical Management. Vol. 3. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 55-60, 1988

- G. Benneth and Y.K. Xie: "A Peripheral Neuropathy in Rat that Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man" Pain 33: 87-107, 1988.

- M. Iadarola and G. Draisici: "Elevation of Spinal Cord Dynorphin mRNA Compared to Dorsal Root Ganglion Peptide mRNAs During Peripheral Inflammation" In: The Arthritic Rat as a Model of Clinical Pain? by J. Besson and G. Guilbaud (eds.) Elsevier Press, Amsterdam: 173-183, 1988.

- A. Costello and K.M. Hargreaves: "Suppression of Carrageenan-Induced Hyperalgesia. Edema and Hyperthermia by a Bradykinin Antagonist" European J. Pharmacol., 1989.

- K.M. Hargreaves, R. Dubner and A. Costello: "Corticotropin Releasing Factor (CRF) has a Peripheral Site of Action for Antinociception" European J. Pharmacol., 1989.

- J. Hylden, R. Nahin, R. Traub and R. Dubner: "Expansion of Receptive Fields of Spinal Lamina I Protection Neurons in Rats with Unilateral Adjuvant-Induced Inflammation: The Contribution of Central Dorsal Horn Mechanisms" Pain 37: 229-244, 1989.

【0148】

10

20

30

40

50

さらに、このデバイスを用いた30件を上回る要約書が、米国（例えば、神経科学学会）および国際（例えば、国際疼痛研究学会）学会で呈示されている。

http://www.ugobasile.com/site/manuals/condensed_catalogue.pdf

<http://www.ugobasile.com/site/product2.asp?ID=3>

【0149】

上記の明細書中に言及されたすべての刊行物は、参照により本明細書に組み入れられる。当業者には、発明の範囲および精神を逸脱することなく、本発明に記載された方法およびシステムに対するさまざまな改変物および変形物が明らかであると考えられる。本発明をその特定の態様とともに説明してきたが、特許請求する本発明がこのような特定の態様に過度に制限されるべきではないことが理解されるべきである。実際には、本発明の実施に関して説明した態様のさまざまな改変が、化学、生物学または関連分野の当業者には明らかであり、それらも発明の範囲に含まれるものとする。

10

【0150】

参考文献

1. Pintor, J.; Gualix, J.; Miras-Portugal, M.T. *Mol. Pharm.*, **1997**, 51, 277-284.
2. Oaknin, S.; Rodriguez-Ferrer, C.R.; Aguilar, J.S.; Ramos, A.; Rotllan, P. *Neurosci. Lett.*, **2001**, 309, 177-180.
3. *Ap4A and other dinucleoside polyphosphates*, Ed. A. G. McLennan, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
4. Plateau, P.; Blanquet S., *Adv. Micro. Physiol.*, **1994**, 36, 81.
5. Wang, Y., Chang, C. F., Morales, M., Chiang, Y. H., Harvey, B. K., Su, T. P., Tsao, L. I., Chen, S., Thiemermann, C. *J. Neuroscience* **2003**, 23, 7958-65. 10
6. Ortiz, B.; Sillero, A.; Gunther Sillero, M. A.; *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 212, 263.
7. Theoclitou, M.-E.; Wittung, E. P. L.; Hindley, A. D.; El-Thaher, T. S. H.; Miller, A. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2009-2019.
8. McLennan, A. G. *Pharmacol Ther.*, **2000**, 87, 73-89.
9. Wright, M., Tanner, J. A., and Miller, A. D. *Anal Biochem*, **2003**, 316, 135-138.
10. Guranowski, A. *Pharmacol Ther.*, **2000**, 87, 117-39.
11. Theoclitou, M. E.; El-Thaher, T. S. H.; Miller, A. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 659-661. 20
12. Wright, M.; Miller, A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 2813-2816.
13. Ng, K. E.; Orgel, L. E. *Nucleic Acids. Res.*, **1987**, 15 (8), 3573-3580.
14. Klishin, A.; Lozovaya, N.; Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T.; Krishtal, O. *Neuroscience*, **1994**, 58, 235-6.
15. Pintor, J.; Diaz-Hernandez, M.; Gualix, J.; Gomez-Villafuertes, R.; Hernando, F.; Miras-Portugal, M. T. *Pharmacol Ther.*, **2000**, 87, 103-15.
16. Bianchi, B. R.; Lynch, K. J.; Touma, E.; Niforatos, W.; Burgard, E. C.; Alexander, K. M.; Park, H. S.; Yu, H.; Metzger, R.; Kowaluk, E.; Jarvis, M. F.; van Biesen, T. *Eur J Pharmacol.*, **1999**, 376, 127-38. 30
17. Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T. *Br J Pharmacol*, **1995**, 115, 895-902.
18. Greene, R. W.; Haas, H. L. *Prog Neurobiology*, **1991**, 36, 329-41.
19. Klishin, A.; Lozovaya, N.; Krishtal, O. *Neuroscience*, **1995**, 65, 947-53.
20. Juranyi, Z.; Sperlagh, B.; Vizi, E. S. *Brain Res*, **1999**, 823, 183-90.
21. Mendoza-Fernandez, V.; Andrew, R. D.; Barajas-Lopez, C. *2000 J Pharmacol Exp Ther*, **2000**, 293, 172-9. 40
22. Rudolphi K; Schubert P; Parkinson F. E.; Fredholm B.B. *Trends Pharmacol Sci*. **1992**, 13, 439 - 445.

23. Knutson L. J. S.; Murray T. F. *Adenosine and ATP in epilepsy. In Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics.* Eds. Jacobson K. A.; Jarvis M. F. Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 423 - 447.
24. Dragunow M.. *Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function.* Ed. Phillis J. W., Boca Raton, FL, CRC Press, 1991, 367 - 379.
25. IJzerman A. P.; van der Wenden N. M. *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics* Ed. Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F., Wiley-Liss, Inc. New York, 1997, 129-148. 10
26. Firestein G. *Drug Dev. Res.* **1996**; 39: 371-376.
27. Ferre S.; Fredholm B. B.; Morelli M.; Popoli P.; Fuxe K. *Trends Neurosci* **1997**; 20:482-487.
28. Carley D.; Radulovacki M.; *Purinergic Approaches in experimental Therapeutics.* Eds. Jacobson K. A.; Jarvis M. F., Wiley-Liss, New York, pp.515-526.
29. Sawynok J. *Eur J Pharmacol* **1998**; 347:1-11.
30. Cook S. P.; Vulchanova L.; Hargreaves K. M.; Elde R.; McCleskey E. W. *Nature* **1997**; 387:505-508. 20
31. Burnstock G. A. *Lancet* **1996**, 347, 1604-1605.
32. Vulchanova L.; Arvidsson U.; Riedl M.; Wang J.; Buell G.; Surprenant A.; North R. A.; Elde R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 8063-8067.
33. Keil G. J.; DeLander G. E. *Life Sci* **1992**; 51:L171-L176.
34. Kowaluk E. A.; Bhagwat S. S.; Jarvis M. F. *Curr. Pharmaceut. Design* **1998**; 4: 403-416.
35. Poon A.; Sawynok J. *Pain* **1998**; 74:235-245. 30
36. Lee Y. W.; Yaksh T. L. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**; 277: 1642-1648.
37. Segerdahl M.; Ekblom A.; Sandelin K.; Wickman M.; Sollevi A. *Anesth Analg* **1995**; 80:1145-1149.
38. Sollevi A. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* **1997**; 110:135-136.
39. Woolf, C.J. *Textbook of Pain*, 3rd Ed. Eds Wall, P.; Melzack, R. D., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, 101-112.
40. Fukunaga A. F. *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics.* Eds Jacobson K. A., Jarvis M. F., Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 471 - 493. 40

【図面の簡単な説明】

【0 1 5 1】

【図1】AppCH₂ppGの合成を示している。【図2】AppNH₃pppUの合成を示している。【図3】A_{dio}ppCH₂ppA_{dio}の合成を示している。

【図4】電極の位置を図示しながら、順行性（上の2つ）および逆行性（下の2つ）誘導した集合スパイクの概略図を示している。

【図5】順行性に誘導された集合スパイク（図5A）、逆行性に誘導された集合スパイク（図5B）および興奮性シナプス後電流、EPSC（図5C）に対する、種々の量のAppCH₂ppAの効 50

果を示している。

【図6】順行性スパイクに対するピリドキサール-リン酸-6-アゾフェニル-2',4'-ジスルフォン酸(PPADS)およびAppCH₂ppAの影響を示している。

【図7】順行性スパイクに対するシクロペンチルテオフィリン(CPT)およびAppCH₂ppAの影響を示している。

【図8】順行性スパイクに対する-, -メチレン-ATPの効果を示している。

【図9】順行性スパイクに対する種々の量のATP-Sの効果を示している。

【図10】順行性スパイクに対するニイノシンテトラヒドロリン酸(|p₄|)およびAppCH₂ppAの影響を示している。

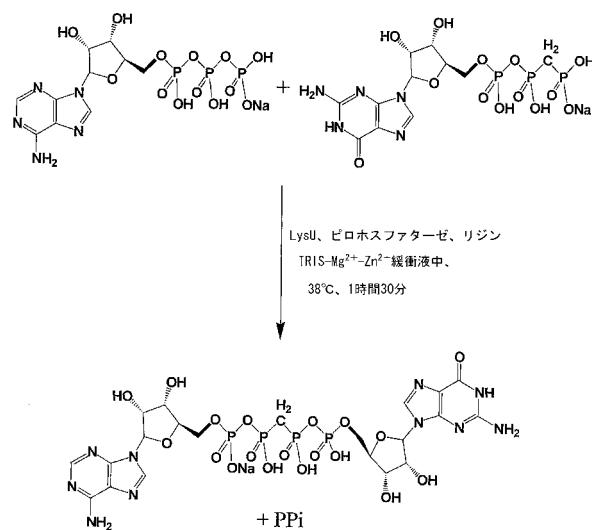
【図11】逆行性スパイクに対するニイノシンテトラヒドロリン酸(|p₄|)およびAppCH₂ppAの影響を示している。 10

【図12】順行性スパイクに対する2-フェニル-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-1-オキシル3-オキシド(PT10)およびAppCH₂ppAの影響を示している。

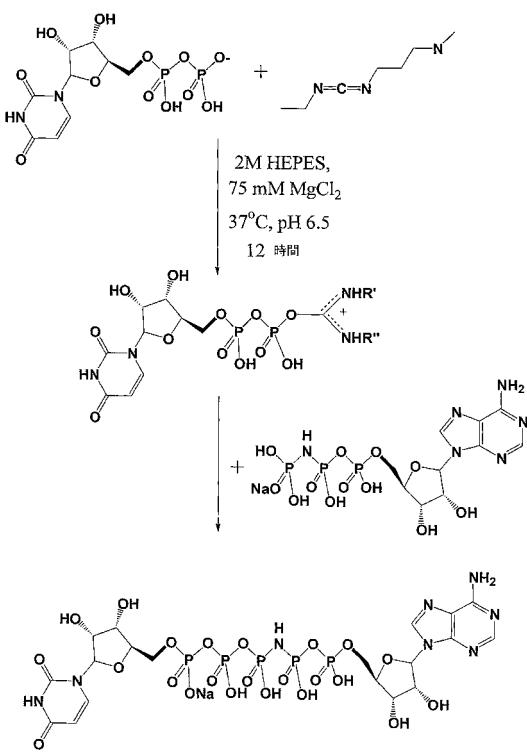
【図13】22での順行性スパイクに対するAppCH₂ppAの影響を示している。

【図14】36での順行性スパイクに対するAppCH₂ppAの影響を示している。

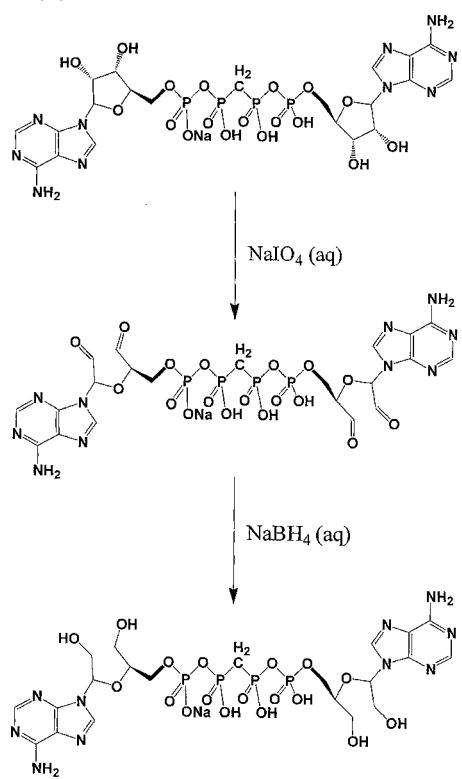
【図1】



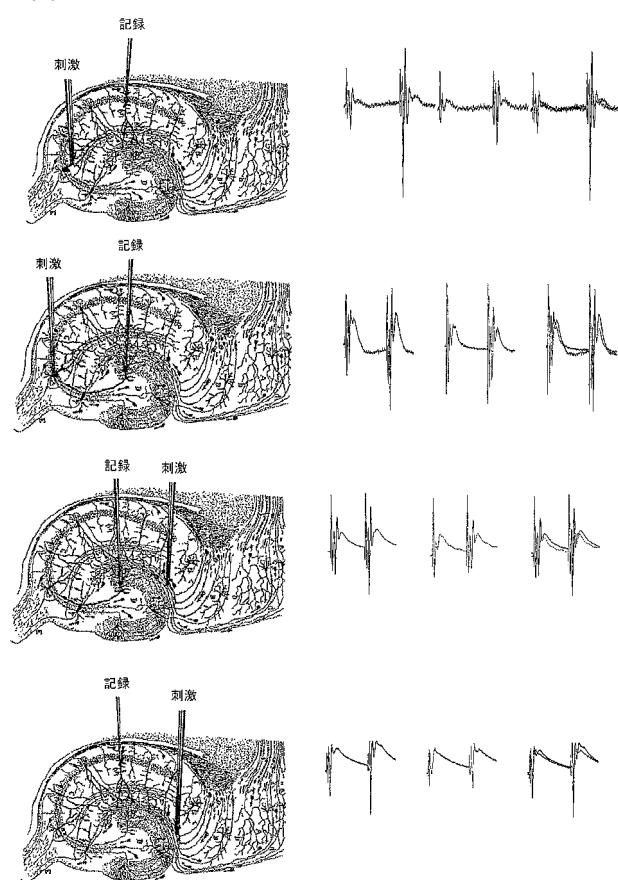
【図2】



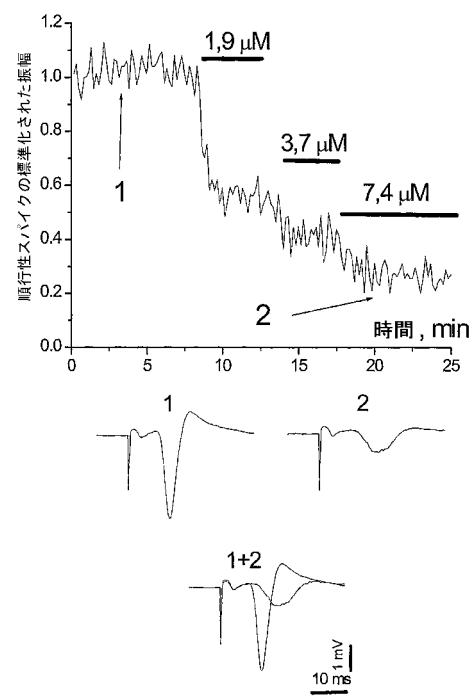
【図3】



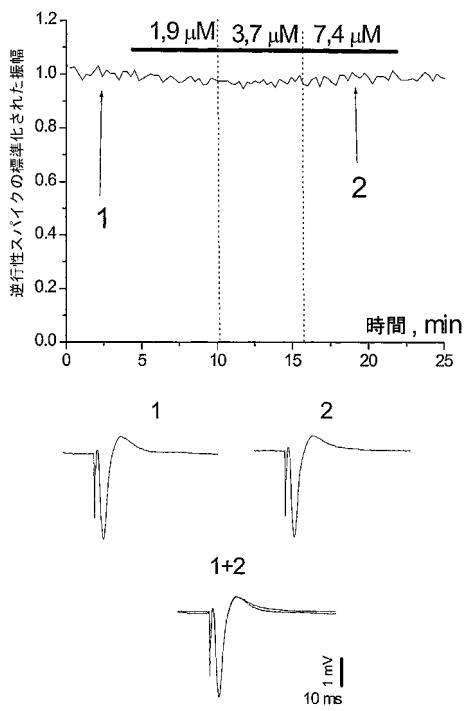
【図4】



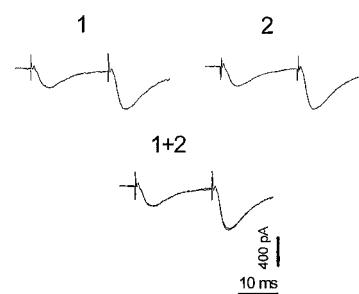
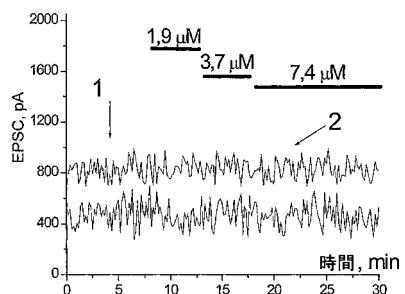
【図5 A】



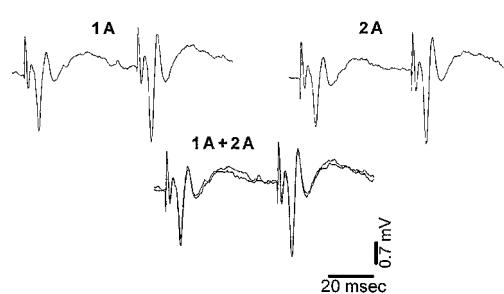
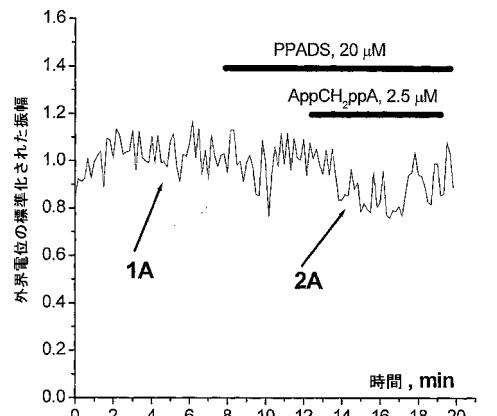
【図5 B】



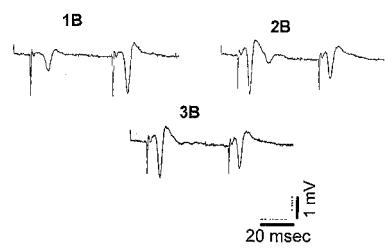
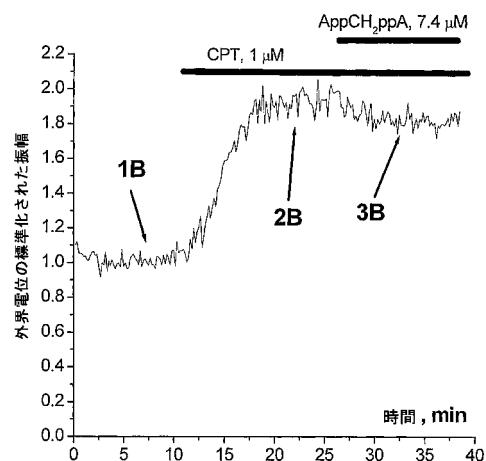
【図5C】



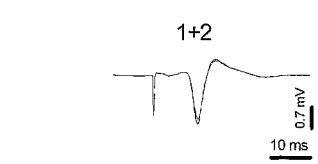
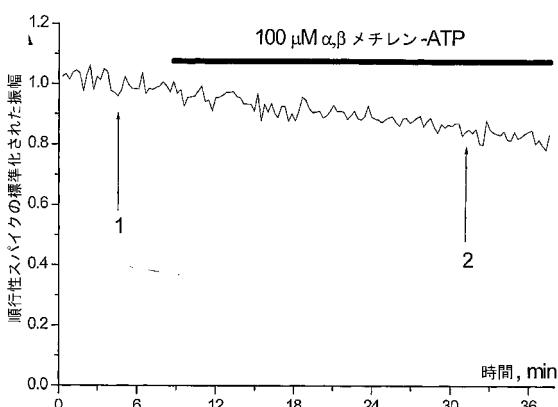
【図6】



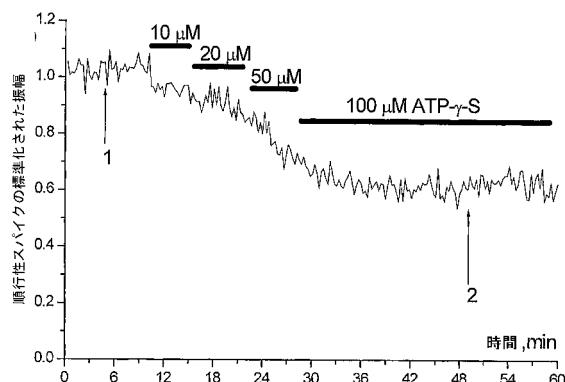
【図7】



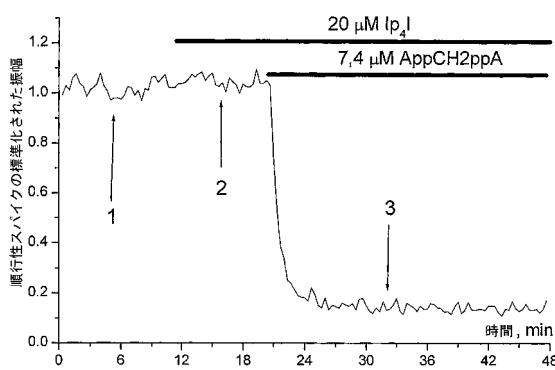
【図8】



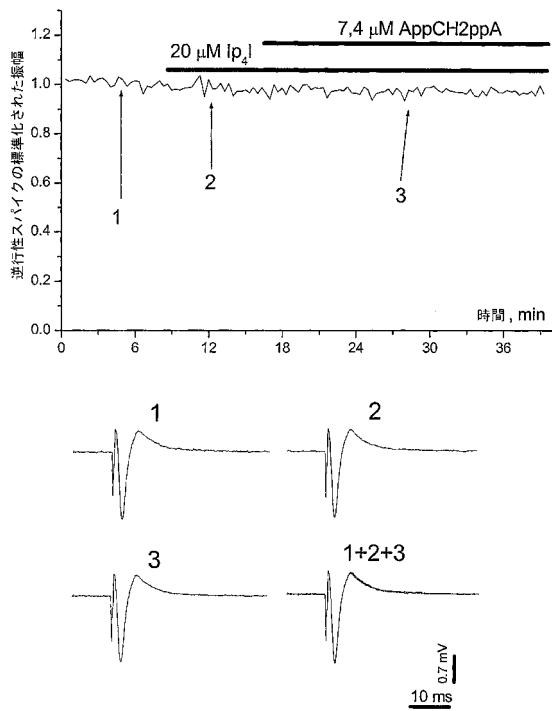
【図9】



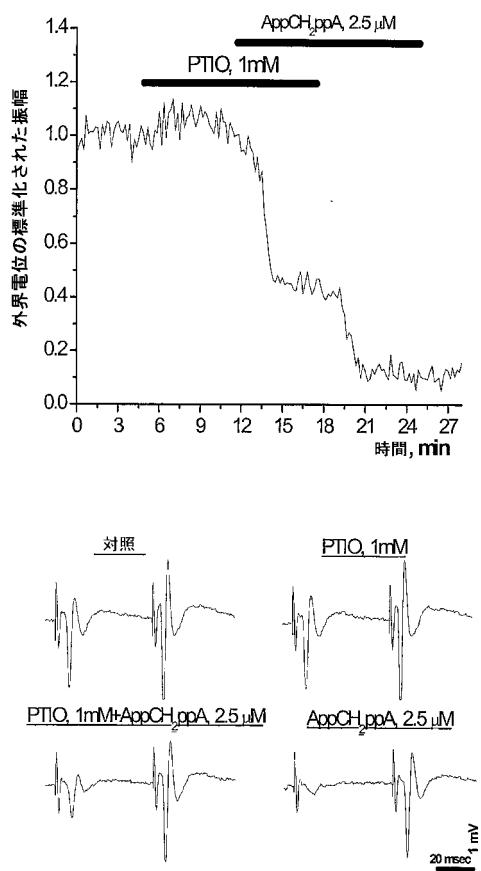
【図10】



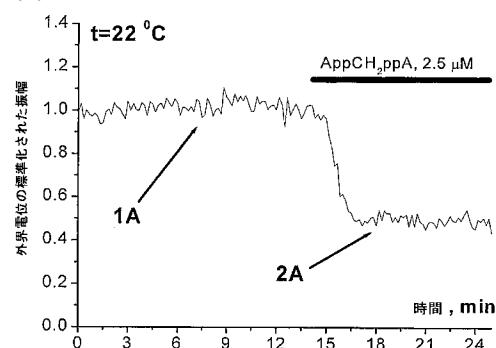
【図11】



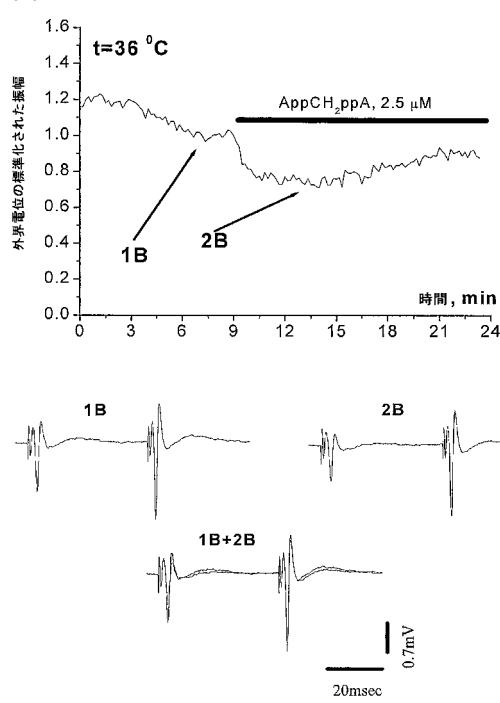
【図12】



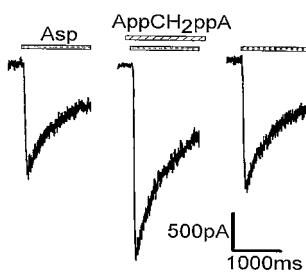
【図13】



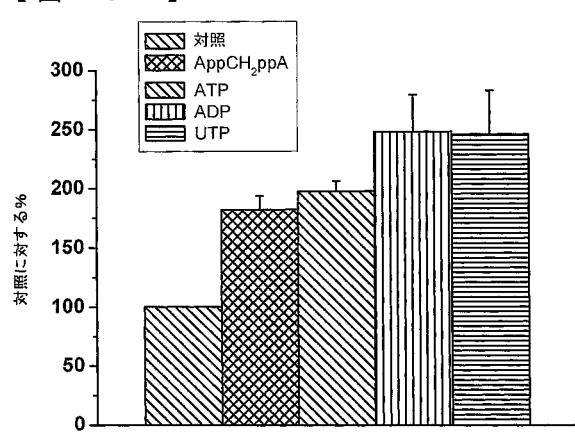
【図14】



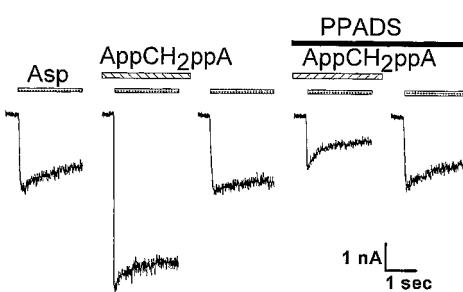
【図15 A】



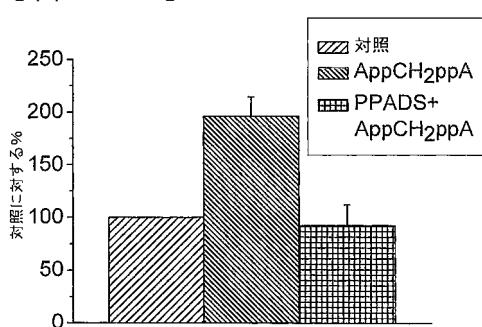
【図15 B】



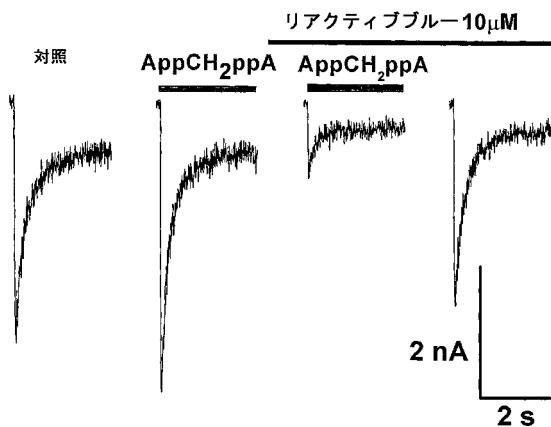
【図15 C】



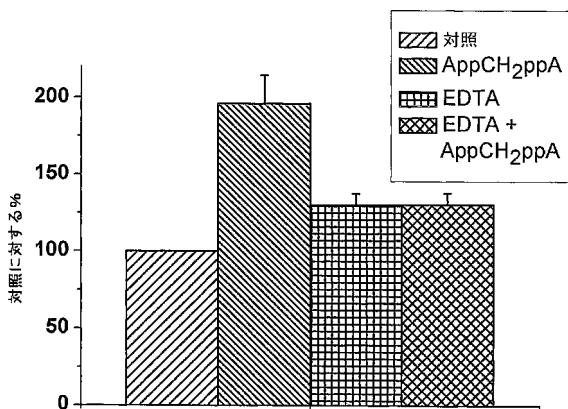
【図15 D】



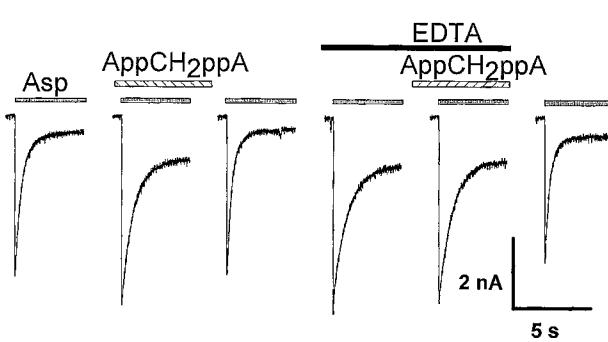
【図 15 E】



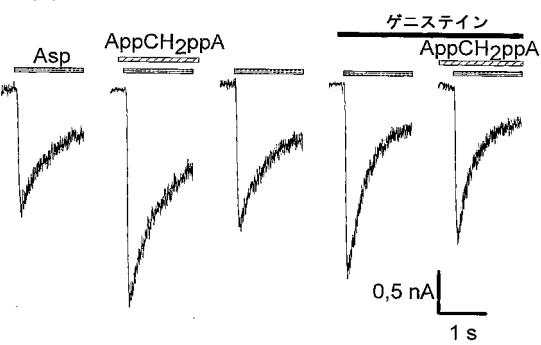
【図 16 B】



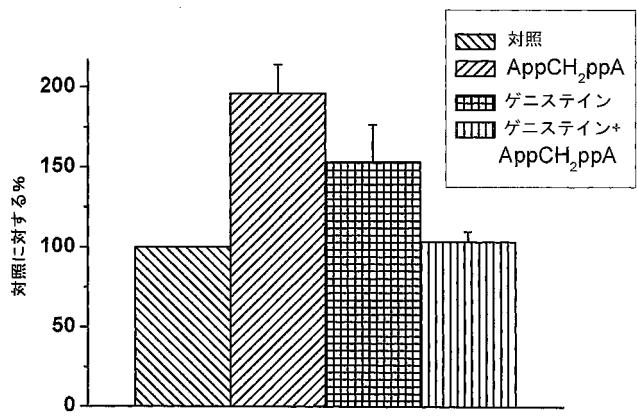
【図 16 A】



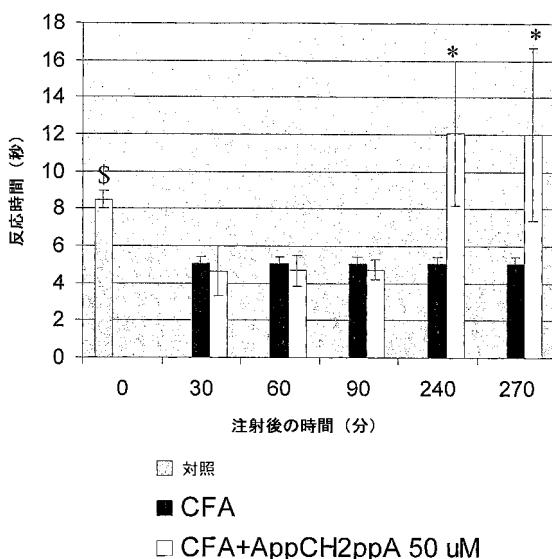
【図 16 C】



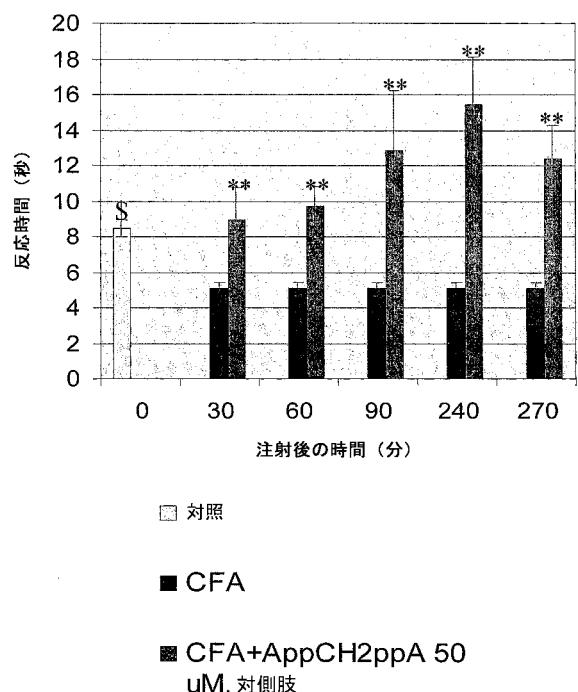
【図 16 D】



【図 17】



【図18】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No PCT/GB2006/000343
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/7084 C07H21/00 C07H21/02 C07H21/04			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07H			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 03/000056 A (INSPIRE PHARMACEUTICALS, INC; COWLEN, MATTHEW, S; YERXA, BENJAMIN, R;) 3 January 2003 (2003-01-03) The whole document, in particular page 6	1-13	
X	WO 03/039473 A (INSPIRE PHARMACEUTICALS, INC; PETERSON, WARD, M; YERXA, BENJAMIN, R) 15 May 2003 (2003-05-15) The whole document, in particular page 5	1-13	
X	US 2003/125299 A1 (PETERSON WARD M ET AL) 3 July 2003 (2003-07-03) the whole document	1-13	
X	US 2002/103158 A1 (RIDEOUT JANET ET AL) 1 August 2002 (2002-08-01) page 2	1-13	
		-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/>	See patent family annex.
* Special categories of cited documents :			
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		'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	
'E' earlier document but published on or after the international filing date		'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	
'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)		'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	
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		&* document member of the same patent family	
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search 13 June 2006		Date of mailing of the international search report 20/06/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 91 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klein, D	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/193340 A1 (YERXA BENJAMIN R ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19) page 10; table 1	1-13
X	WO 99/03480 A (WILLIAM HARVEY RESEARCH LIMITED; THIEMERMANN, CHRISTOPH; WANG, JUN) 28 January 1999 (1999-01-28) page 5, line 20 - line 25	1-13
X	WO 98/55494 A (WILLIAM HARVEY RESEARCH LIMITED; THIEMERMANN, CHRISTOPH; BLACKBURN, GE) 10 December 1998 (1998-12-10) The whole document, in particular page 11	1-13
X	US 5 837 861 A (PENDERGAST ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) the whole document	1-13
X	WO 98/34942 A (INSPIRE PHARMACEUTICALS, INC; PENDERGAST, WILLIAM; YERXA, BENJAMIN, R;) 13 August 1998 (1998-08-13) page 7	1-13
A	VAHLENSIECK, U. ET AL: "Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (AP6A) via A1-adenosine receptors" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY , 119(5), 835 -844 CODEN: BJPCBM; ISSN: 0007-1188, 1996, XP009067425	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000343

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03000056	A	03-01-2003	GB JP	2394419 A 2005508297 T		28-04-2004 31-03-2005
WO 03039473	A	15-05-2003	BR CA CN EP JP MX	PI0213897 A 2465894 A1 1612739 A 1450820 A2 2005532254 T PA04004215 A		23-05-2006 15-05-2003 04-05-2005 01-09-2004 27-10-2005 08-07-2004
US 2003125299	A1	03-07-2003		NONE		
US 2002103158	A1	01-08-2002		NONE		
US 2002193340	A1	19-12-2002		NONE		
WO 9903480	A	28-01-1999	AU	8351498 A		10-02-1999
WO 9855494	A	10-12-1998	AU	7781998 A		21-12-1998
US 5837861	A	17-11-1998	US ZA	2001031743 A1 9801073 A		18-10-2001 19-02-1999
WO 9834942	A	13-08-1998	AU AU BR CA CN EP JP NO NZ US	738907 B2 6324298 A 9807169 A 2279963 A1 1292795 A 0981534 A2 2001526635 T 993776 A 337225 A 6348589 B1		27-09-2001 26-08-1998 06-06-2000 13-08-1998 25-04-2001 01-03-2000 18-12-2001 06-10-1999 28-03-2002 19-02-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 0 7 D 473/34 (2006.01)	C 0 7 D 473/34	3 2 1

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

(72)発明者 タナー ジュリアン アレクサンダー

中国 香港 ミッドレベル バビントンパス 25 ローウェンコート 16エイ

(72)発明者 ロゾバヤ ナタリヤ

イギリス国 ロンドン サウスケンシングトン アームストロングロード フラワーズビルディング
ジーティーシーインペリアルカレッジ シーオー プロフェッサー エー.ミラー

F ターム(参考) 4C057 BB02 DD01 LL29 LL41

4C086 AA01	AA02	AA03	DA34	EA18	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA08
ZA15	ZA16	ZA36	ZA38	ZA42	ZA54	ZA66	ZA75	ZA89	ZA94
ZA96	ZB11	ZC02	ZC31						
4H050 AA01	AA03	AB20							

【要約の続き】

