

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4701330号
(P4701330)

(45) 発行日 平成23年6月15日 (2011. 6. 15)

(24) 登録日 平成23年3月18日 (2011. 3. 18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/44 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/44
G O 1 N 33/50 (2006. 01)	G O 1 N 33/50 Z
G O 1 N 33/15 (2006. 01)	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 29 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2006-505911 (P2006-505911)	(73) 特許権者	510299260
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004. 3. 5)		シービーティ・デベロップメント・リミテッド
(65) 公表番号	特表2006-519602 (P2006-519602A)		CBT DEVELOPMENT LIMITED
(43) 公表日	平成18年8月31日 (2006. 8. 31)		英国イーシー2ワイ・9エイダブリュー、ロンドン、ワン・ロープメーカー・ストリート、シティ・ポイント、モフォ・ノティシズ・リミテッド内
(86) 国際出願番号	PCT/GB2004/000902		
(87) 国際公開番号	W02004/079329	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004. 9. 16)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成19年3月5日 (2007. 3. 5)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	0305153. 9		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成15年3月7日 (2003. 3. 7)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用化合物の同定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アデノシン A 2 A 受容体の活性化により介在される疾患または状態の予防、処置、または改善のための可能性のある治療剤を同定する方法であって、少なくとも 7. 4 の高い方の pH、およびまた pH 5. 5 から 7. 2、または 5. 0 から 7. 0 の低い方の pH におけるアデノシン A 2 A 受容体に対する試験化合物の親和性を決定し、次に、低い方の pH における親和性が高い方の pH における親和性よりも 10 倍を超えて高い場合、化合物を該剤として同定する、を含む方法。

【請求項 2】

試験化合物の親和性の決定が、異なる濃度の標識化合物の受容体との結合を測定することを含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

試験化合物の親和性の決定が、結合した標識化合物のアデノシン A 2 A 受容体からの非標識試験化合物による置換を測定することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

アデノシン A 2 A 受容体が、組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜にある、請求項 1 から 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5】

アデノシン A 2 A 受容体の活性化により介在される疾患または状態の予防、処置、または改善のための可能性のある治療剤を同定する方法であって、少なくとも 7. 4 の高い方

20

の pH、およびまた 5.5 から 7.2、または 5.0 から 7.0 の低い方の pH における アデノシン A₂A 受容体での試験化合物の作用の有効性を決定し、次に、低い方の pH における有効性が高い方の pH における有効性よりも 10 倍を超えて高い場合、化合物を該剤として同定する、を含む方法。

【請求項 6】

試験化合物の作用の有効性の決定が、試験化合物を、アデノシン A₂A 受容体を含む組織、組織切片、完全な細胞、または部分的に破壊された細胞と接触させ、次に、組織、組織切片、完全な細胞、または部分的に破壊された細胞におけるシグナル伝達分子の蓄積または減少を測定することによりアデノシン A₂A 受容体の作用を決定する、を含む請求項 5 記載の方法。

10

【請求項 7】

シグナル伝達分子が cAMP、IP₃、または遊離カルシウムである、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

試験化合物の作用の有効性の決定が、試験化合物を、アデノシン A₂A 受容体を含む生体膜と接触させ、次に、アデノシン A₂A 受容体作用を、Gタンパク質の活性化；酵素活性；または生体膜に関連するイオンチャンネルを介したイオン流を測定することにより決定する、を含む請求項 5 記載の方法。

【請求項 9】

Gタンパク質の活性化が、放射性標識グアニンヌクレオチドを用いて測定されるか、あるいは測定される酵素活性が、アデニルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、またはプロテインキナーゼ活性であるか、あるいはイオン流が測定されるイオンチャンネルがカルシウムまたはカリウムチャンネルである、請求項 8 記載の方法。

20

【請求項 10】

試験化合物の作用の有効性の決定が、試験化合物を、アデノシン A₂A 受容体を含む組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜と接触させ、次に、アデノシン A₂A 受容体作用を、組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるプロテインキナーゼ活性を測定することにより決定する、を含む請求項 5 記載の方法。

【請求項 11】

30

試験化合物の作用の有効性の決定が、試験化合物を、アデノシン A₂A 受容体を含む組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜と接触させ、次に、アデノシン A₂A 受容体作用を、組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるホスホリパーゼ活性を測定することにより決定する、を含む請求項 5 記載の方法。

【請求項 12】

ホスホリパーゼ活性が、ホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ A₂ またはホスホリパーゼ D の活性である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

試験化合物の作用の有効性の決定が、試験化合物を、アデノシン A₂A 受容体を含む組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜と接触させ、次に、アデノシン A₂A 受容体作用を、組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるタンパク質リン酸化および／または脱リン酸化を測定することにより決定する、を含む請求項 5 記載の方法。

40

【請求項 14】

低い方の pH が 5.5 から 6.5 である、請求項 1 から 13 のいずれか記載の方法。

【請求項 15】

低い方の pH が 5.5 から 6.2 である、請求項 1 から 13 のいずれか記載の方法。

【請求項 16】

同定された剤が治療効果を有するか否かを決定することをさらに含む、請求項 1 から 1

50

5 のいずれか記載の方法。

【請求項 1 7】

非ヒト動物モデルを用いて、同定された剤が治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

同定された剤が疼痛または炎症に対する治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 または 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

同定された剤が、癌、虚血・再灌流損傷、過剰神経活性、敗血症、敗血性ショック、神経変性（アルツハイマー病を含む）、筋疲労、または筋痙攣に対する治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 から 1 8 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 2 0】

過剰神経活性が、てんかん、または炎症性疼痛および神経障害性疼痛を含む慢性疼痛または痛覚過敏におけるものである、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

同定された剤が、関節炎、喘息、乾癬、腸炎、関節リウマチ、過敏性腸症候群、または骨関節炎に対する治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 から 2 0 のいずれか記載の方法。

【請求項 2 2】

同定された剤が、腸の疼痛、背中の疼痛、癌性疼痛、H I V 性疼痛、幻肢痛、術後疼痛、糖尿病性神経障害、多発性神経障害、疱疹後神経痛、または三叉神経痛を含む、神経障害の結果として引き起こされる痛覚過敏に対する治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 から 2 0 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 2 3】

同定された剤が、腸の疼痛、背中の疼痛、癌性疼痛、線維筋痛、術後疼痛、骨関節炎、または関節リウマチを含む、炎症性疾患の結果として引き起こされる痛覚過敏に対する治療効果を有するか否かが決定される、請求項 1 6 から 2 0 のいずれか記載の方法。

【請求項 2 4】

同定された剤の治療効果が、p H 7 . 4 におけるアデノシン A 2 A 受容体での剤の E C 5 0 値より低い濃度で決定される、請求項 1 6 から 2 3 のいずれか記載の方法。

30

【請求項 2 5】

同定された剤の治療効果が、p H 7 . 4 におけるアデノシン A 2 A 受容体での剤の E C 5 0 値の 1 万分の 1 から 5 分の 1 の濃度で決定される、請求項 1 6 から 2 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 2 6】

アデノシン A 2 A 受容体の活性化により介在される疾患または状態の予防、処置、または改善のための可能性のある治療剤を同定する方法であって、試験化合物を、単離された病理組織、細胞、または膜、および対応する単離された正常組織、細胞、または膜のアデノシン A 2 A 受容体と、p H 7 . 4 におけるアデノシン A 2 A 受容体での試験化合物の E C 5 0 値より低い濃度で接触させ、次に、正常組織と病理組織との間で、試験化合物との接触に応答したアデノシン A 2 A 受容体の作用に差があるか否かを決定する、を含む方法。

40

【請求項 2 7】

試験化合物が、アデノシン A 2 A 受容体のアゴニストであり、かつ試験化合物に応答したアデノシン A 2 A 受容体の作用が、正常組織より病理組織において高い場合、試験化合物が可能性のある治療剤として同定される、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

病理組織が上皮組織を含む、請求項 2 6 または 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

乾癬、喘息、または C O P D を処置するための可能性のある治療剤を同定するための、

50

請求項 2 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、治療を必要とする部位を標的とし得る化合物の同定および治療上の使用に関する。

【0002】

正常な哺乳動物組織において、細胞外 pH は、pH 7.35 から 7.45 の間に厳密に制御されている。ある組織、特に、胃の内腔（pH 2 から 3 の間）、およびいくつかの上皮表面（例えば、肺表面の pH は約 6.8 である（Jayaraman, S. et al. (2001) Am. J. Physiol. Cell Physiol. 281, C1504-1511））はより低い pH 値となる。

10

【0003】

病理組織、例えば、炎症、虚血、および他の種類の損傷中、pH の低下が生じる。例えば、関節炎にかかった関節において、最大 1 単位の pH の低下が典型的に観察される（Andersson, S. E. et al. (1999) J. Rheumatol. 26, 2018-2024）。最近になって、骨関節炎にかかった関節の軟骨は、5.0 もの低い pH 値となることが示された（Konttinen, Y. T. et al., (2002) Arth. Rheum. 46, 953-960）。過剰な神経活性も、細胞外 pH の低下を生じ得る。例えば、てんかん発射、および脊髄の過剰刺激は、細胞外 pH の変化と関連する（Chesler, M. Prog. Neurobiol. (1990) 34, 401-427）。同様に、細胞外 pH の低下は、固形腫瘍（5.5 もの低い pH 値が観察される）において、おそらくは乏しい灌流および優位な解糖系の代謝の結果として観察される（Thistlethwaite, A. J. et al. Radiation Oncology Biol. Phys. (1985) 11, 1647-1652）。虚血において、血液供給の不足は、pH の降下（Immke, D. C. & McCleskey, E. W. (2001) Nature Neurosci. 4, 869-870）、続いて炎症細胞の活性化を生じる。

20

【0004】

これらの疾患および状態全てに共通する因子は、関与する組織のエネルギー需要が供給を上回ることである。このことは、乳酸およびピルビン酸産生を伴う嫌気性代謝を生じる。pH 変化の別の関与因子は、分泌胞（例えば、神経終末または炎症細胞におけるもの）の細胞外空間への放出であり、これは、これらの空胞の内容物が低い pH で維持されているからである。pH の低下は、組織の保護の手助けとなり得る。例えば、虚血性損傷に深く関与する CNS の NMDA 受容体は、pH 6.8 で阻害される。

30

【0005】

上記の疾患の別の共通因子は、アデノシンである。アデノシンは、4 種の既知の受容体、アデノシン A1、A2A、A2B、および A3 受容体に作用する、偏在的局所性ホルモン／神経伝達物質である。アデノシンは、一般に、組織におけるエネルギーの供給と需要とのバランスをとる働きをする。例えば、心臓において、放出されたアデノシンは、心房および結節における A1 受容体介在性作用により、心臓の動きを遅くさせ（Belardinelli, L & Isenberg, G Am. J. Physiol. 224, H734-H737）、一方同時に、エネルギー（すなわち、グルコース、脂質、および酸素）供給を増加させるために冠動脈を拡張させる（Knabb et al., Circ. Res. (1983) 53, 33-41）。同様に、炎症中、アデノシンは炎症活性を抑制するために働き、一方で、過剰な神経活性状態（例えば、てんかん）において、アデノシンは神経発射を抑制する（Klitgaard et al., Eur J. Pharmacol. (1993) 242, 221-228）。この系、またはその変形系が全ての組織に存在する。従って、pH が降下した状態下で、局所性アデノシンは、エネルギーの供給と需要とのバランスをとり、これにより正常組織機能および pH を保持するために働く。

40

【0006】

アデノシン自体は、上室性頻拍症を診断し、処置するために用いられ得る。アデノシン A1 受容体アゴニストは、強力な鎮痛剤として作用することが知られている（Sawynok, Eur J Pharmacol. (1998) 347, 1-11）。アデノシン A2A 受容体アゴニストは、抗炎症剤として作用することが知られている（例えば、US 5,877,180、および WO 99

50

／34804)。実験動物において、A₂A受容体アゴニストは、敗血症、関節炎、および腎臓動脈、冠動脈、または大脳動脈の閉塞から生じる虚血・再灌流損傷を含む広範な状態に対して有効であると示されてきた。これらの状態の共通因子は、炎症応答の低減であり、これは全てではないがほとんどの炎症細胞上の該受容体の阻害作用により引き起こされる。

【0007】

しかしながら、アデノシン受容体の偏在的分布は、アデノシン受容体アゴニストの投与が有害な副作用を生じることを意味している。このことが、一般に、アデノシンベースの治療の開発を妨げてきた。選択的A₁受容体アゴニストは徐脈を生じる。第1の選択的A₂A受容体アゴニスト（2-[4-(2-カルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]-5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、またはCGS21680）が、フェーズ2A臨床試験において可能性のある抗高血圧剤として試験された。しかしながら、投与により、血圧の大降下および心拍出量の増加が引き起こされた。FR2162128は、アデノシン誘導体（少なくとも2個の炭素原子からなる低級アルキル基を含む2-アルコキシアデノシン誘導体を含む）が血圧降下活性および冠動脈拡張活性を有することを開示している。

10

【0008】

Bartlett等（J. Med. Chem. 1981、24、947-954）は、1-メチルイソグアノシン類似体の評価を開示している。これらの類似体は、2-メトキシアデノシン（スポンゴシン（spongosine）としても知られている）を含む。この化合物および他の化合物は、経口投与後のげっ歯類において、その骨格筋弛緩作用、体温低下作用、心血管作用、および抗炎症作用について試験された。2-メトキシアデノシンは、20mg/kg経口投与したラットにおいて、カラギーナン（carageenan）誘発炎症を25%抑制した。しかしながら、平均血圧の低下（41%）および心拍数の低下（25%）も、この用量で該化合物を投与した後に観察された。

20

それゆえ、投与され得るアデノシン受容体アゴニストに最小限の副作用をもたらす必要がある。

【0009】

AskalanとRichardson（J. Neurochem. (1994) 63:1477-1484）は、アデノシンA₂A受容体リガンド結合部位におけるヒスチジン残基の役割について記載している。具体的には、リガンド結合のpH依存度が調べられた。あるリガンドについて親和性の2から4倍の増大が、周囲のpHを7.0から5.5に低下させると観察された。しかしながら、アデノシンA₂A受容体の作用は研究されていなかった。

30

【0010】

Hiley等は、ラットの単離された灌流上腸間膜動脈床において、アデノシンに対する応答へのpHの作用を調べた。灌流液のpHを6.8に低下させると、アデノシンに対する拡張性応答が10倍増強された。

【0011】

この度、意外なことに、本出願人は、生理的範囲内にある比較的低いpH値において、ある化合物が高いpH値においてより実質的に高い（およそ100倍高い）、アデノシン受容体に対する親和性および／または作用効力を有することを見出した。このことは、受容体がpHの変化に応答して、その構造を変化させるためであると思われる。

40

【0012】

本出願人は、アデノシン受容体のpH感受性を利用して、低いpH条件下で高い受容体親和性および／または効力をただ有する他のアデノシン受容体リガンドが同定され得ることを理解している。次に、かかるアデノシン受容体リガンドの作用は、既知のアデノシン受容体リガンドの投与に関連する重篤な副作用を生じることなく、病理組織のような低いpH領域を標的とし得る。

【0013】

本発明により、可能性のある治療剤を同定する方法が提供され、該方法は、高い方のp

50

H（少なくともpH7.2）、およびまた低い方のpH（5.5から7.2）におけるアデノシン受容体に対する試験化合物の親和性および／または有効性を決定し、次に、低い方のpHにおける親和性および／または有効性が、高い方のpHにおけるものより高い場合、化合物を該剤として同定する、を含む。

【0014】

低い方のpHにおける、可能性のある治療剤のアデノシン受容体に対する親和性および／またはアデノシン受容体でのその有効性と、高い方のpHにおけるそれらとの差が、できるだけ大きいことが好ましい。親和性および／または有効性に大きな差がある場合、剤は有益な治療効果を有する用量で投与されることができ、剤の高用量と関連する任意の副作用は回避されるか、あるいは最小限に抑えられると予測される。好ましくは、低い方のpHにおける親和性および／または有効性は、高い方のpHにおける親和性および／または有効性より10倍、より好ましくは、100倍、最も好ましくは、1000倍を超えて高い。

10

【0015】

低い方のpHにおいてより高い親和性および／または有効性を有するアゴニストは、治療、例えば、疼痛、特に、神経障害性疼痛または慢性炎症性疼痛、および関節炎の予防、処置、または改善において有用であり得る。これらのアゴニストの選択性は、それらが、病理組織、例えば、関節炎にかかった関節を標的とすることができ、これにより先行技術により示唆されるものより低い用量の有効投与を可能とし、副作用を最小限に抑えることを意味している。

20

【0016】

受容体がpH7で存在するものとは異なる構造形をとることが分かると、本発明の方法を用いて、低いpHにおいて高親和性でアデノシンA2A受容体にのみ結合するリガンドが同定され得る。これらのリガンドは低いpHにおいてのみ有効なアゴニストであるので、それらは、pHが抑えられている体内部位、最も著しくは、関節炎の関節包および同様の炎症性疼痛部位においてのみ作用し得る。

【0017】

本発明の方法を用いて、低いpHにおいて高親和性でアデノシンA1受容体にのみ結合するリガンドが同定され得る。かかるリガンドは、過度の組織活性、例えば、神経活性を低下させる際に有用であり、かつ既知のアデノシンA1受容体アゴニストと比較して低減した副作用を有すると予測される。既知のアゴニストの副作用は、徐脈および動脈炎を含む。

30

【0018】

本発明の方法を用いて、低いpHにおいて高親和性でアデノシンA3受容体にのみ結合するリガンドが同定され得る。かかるリガンドは、炎症疾患の処置において有用であると予測される。

【0019】

本明細書において提供される情報に基づき、当業者は、特定の疾患状態の処置に適した活性剤を同定することができる。これらの剤は、病理組織において選択的に活性であり、従って、正常組織における受容体と関連する副作用の発生率および重篤度を低減させる。

40

【0020】

単離された組織および細胞調製物において、pH感受性は正確に測定され得る。それゆえ、証拠が病理（例えば、炎症性疼痛）動物モデルで得られた後、適当な基準に見合った化合物が続く薬剤発見の「ヒット」となるであろう。

【0021】

本発明の方法を用いて同定された化合物は、種々の状態の治療（予防を含む）において役立つと予測される。これらは、予防、処置、または改善がアデノシン受容体の活性化により介在される疾患または状態を含む。例としては、炎症、虚血・再灌流損傷、過剰神経活性（例えば、てんかん、または炎症性疼痛および神経障害性疼痛を含む慢性疼痛または痛覚過敏）、敗血症、敗血性ショック、神経変性（例えば、アルツハイマー病）、および

50

エネルギー需要が供給を上回っている他の状態、例えば、筋疲労または選手の痙攣のような局所組織のエネルギー需要が供給を上回るか、および／またはpHが低下している疾患または状態を含む。

【0022】

本発明の方法を用いて同定された化合物は、疼痛、具体的には、以下の種類の疼痛：腸の疼痛、膵臓の疼痛、骨盤／会陰の疼痛、背中の疼痛、腰痛、胸痛、心臓痛、骨盤の疼痛／PID、関節痛（例えば、腱炎、滑液包炎、急性関節炎と関連するもの）、頸痛、産科系の疼痛（陣痛または帝王切開）、癌性疼痛、HIV性疼痛、幻肢痛、術後疼痛、慢性神経障害性疼痛、腰椎手術の失敗による疼痛（failed back surgery pain）、身体外傷後疼痛（銃創、交通事故、または火傷により引き起こされる疼痛を含む）、瘢痕組織疼痛、急性帯状疱疹疼痛、急性膵炎突出痛（癌）、疱疹後神経痛、三叉神経痛の予防、処置、または改善において有効であり得る。

10

【0023】

本発明の方法を用いて同定された化合物は、神経障害性疼痛、または糖尿病性神経障害、多発性神経障害、線維筋痛、筋膜痛症候群、骨関節炎、関節リウマチ、座骨神経痛または腰椎神経根障害、脊椎管狭窄症、顎関節症、腎臓痛、月経困難症（dysmenorrhoea）／子宮内膜症により引き起こされる、あるいは関連する他の疼痛の予防、処置、または改善において有効であり得る。

【0024】

本発明の方法を用いて同定された化合物は、炎症性疼痛、または骨関節炎、関節リウマチ、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎のような関節炎状態、または喘息、慢性閉塞性肺疾患、線維症、多発性硬化症、敗血症、敗血性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌ショック、毒素性ショック、出血性ショック、成人呼吸窮迫症候群、脳マラリア、臓器移植の拒絶反応、癌に続発する疼痛、HIV、慢性肺炎症性疾患、珪肺症、肺肉腫（pulmonary sarcosis）、骨吸収疾患、再灌流損傷、移植片体宿主病、多発性硬化症、重症筋無力症、同種移植拒絶反応、感染に起因する発熱および筋肉痛、AIDS関連症候群（ARC）、ケロイド形成、瘢痕組織形成、クローン病、潰瘍性大腸炎およびピレスिस（pyresis）、過敏性腸症候群、骨粗鬆症、脳マラリア、細菌性髄膜炎、またはアムホテリシンB処置、インターロイキン-2処置、OKT3処置、またはGM-CSF処置に由来する副作用により引き起こされる、あるいは関連する他の疼痛の予防、処置、または改善において有効であり得る。

20

30

【0025】

本発明の方法により同定された化合物は、特に、関節炎（特に、関節炎の関節包におけるもの）、喘息、乾癬、および腸炎を含む、特有の種の炎症の予防、処置、または改善において有効であり得る。

【0026】

本発明の方法により同定された化合物は、特に、関節リウマチ、過敏性腸症候群、または骨関節炎の予防、処置、または改善において有効であり得る。

【0027】

化合物の有用性は、以下に記載の放射性リガンドアッセイにより決定されてもよい。親和性の増大は、高親和性結合部位（すなわち、アゴニスト活性部位）について測定され得る一方で、異なるpH値におけるアゴニストの有効性が、低親和性状態と高親和性状態との差を評価することにより決定され得る。これは、GTPおよびそれらの安定な類似体（受容体の高親和性部状態を低親和性状態に変換し、これにより、アゴニストによる受容体の活性化を模倣する）を用いて行われ得る。有効でないリガンド（すなわち、アンタゴニスト）は、これらの異なる親和性状態間で差を生じない。あるいは、異なるpH値において異なる親和性および／または有効性を有するアゴニストが、2次メッセンジャーの生成または除去（例えば、cAMP蓄積、イノシトールリン酸代謝回転、カルシウムシグナル伝達、キナーゼ活性化等の刺激または阻害）の測定のような機能的アッセイにおいて同定され得る。

40

50

【0028】

アデノシン受容体に対する試験化合物の親和性は、以下の方法：

i) 複数の濃度の標識試験化合物（放射性標識試験化合物を含む）の、組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜に存在するアデノシン受容体との結合；

ii) かかる受容体を生じる組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜を用いた非標識試験化合物とのインキュベーションによる、結合した標識化合物のアデノシン受容体からの解離、

のいずれにより決定されてもよい。標識化合物は、試験化合物、または受容体の選択的リガンドのいずれであってもよい。

10

【0029】

アゴニストの有効性は、その受容体を活性化するその能力に影響すると考えられるだろう。高い有効性を有するアゴニストは最大限の受容体応答を顕現させ、そして部分的アゴニストはよりわずかな応答を顕現させる。アデノシン受容体での試験化合物の作用の有効性は、以下の方法：

i) 組織、組織切片、完全な (intact) 細胞、または部分的に破壊された細胞における cAMP、IP3、および遊離カルシウムを含むシグナル伝達分子の蓄積または減少の測定による、アデノシン受容体作用の決定；

ii) Gタンパク質活性化の測定による（例えば、放射性標識グアニンヌクレオチドの使用による）、あるいは酵素活性（例えば、アデニルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、またはプロテインキナーゼ）の測定による、あるいはアデノシン受容体により活性化されたイオンチャネル（例えば、カルシウムまたはカリウムチャネル）を介したイオン流の測定による、試験化合物に応答したアデノシン受容体の活性化の評価するための生体膜の使用；

20

iii) 組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるプロテインキナーゼ活性の測定による、アデノシン受容体活性の決定；

iv) 組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるホスホリパーゼ活性（例えば、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼA2、ホスホリパーゼD）の測定による、アデノシン受容体活性の決定；

v) 組織、組織切片、完全な細胞、破壊された細胞、または細胞に由来する膜におけるタンパク質リン酸化および脱リン酸化の測定による、アデノシン受容体活性の決定、のいずれにより決定されてもよい。

30

【0030】

化合物の活性レベル（すなわち、その固有の有効性）は、所望の効果に依存して変動可能である。例えば、低い有効性のアゴニストは、受容体脱感作の発生率を低減させる際、あるいは、すなわち、多くの受容体を保持するそれらの組織に対して余分な標的化の余地を与える際に有用であり得る。活性は、以下に報告される任意の活性剤に対するものと、好ましくは、少なくとも50%高く、より好ましくは、少なくとも同等の高さである。差は、好ましくは、生理的pH（7.4）とpH5.5または例えば、6.2（極度の虚血組織）、6.5、7.0（慢性炎症の範囲での典型）、または7.2より上の間でみられる。代わりに、低親和性の部分的アゴニストは、受容体と結合し、内在性伝達物質／ホルモン（例えば、アデノシン）の結合を防ぐ機能的アンタゴニストとして用いられ得る。

40

【0031】

可能性のある治療剤が同定されると、次に該剤が、例えば、疼痛または炎症（特に、上述の任意の疾患または状態）に対する治療効果を有するか否かが決定されてもよい。好ましくは、非ヒト動物モデルを用いて、同定された剤が治療効果を有するか否かが決定される。任意の適当な動物モデルが用いられてもよい。例としては、コラーゲンIIの注射により誘発された関節炎、ストレプトゾトシン糖尿病により誘発された神経障害性疼痛を含む。

【0032】

50

好ましくは、同定された剤の治療効果は、pH 7.4におけるアデノシン受容体での該剤のEC50値より下の濃度で決定される。より好ましくは、治療効果は、EC50値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から100分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1の濃度で決定される。

【0033】

同定された剤が、最小限に抑えられた副作用で投与され得るかを確かめるために、同定された剤により引き起こされる副作用（例えば、静脈、血圧降下、または頻脈）が決定されてもよい。好ましくは、これらは、pH 7.4におけるアデノシン受容体での剤のEC50値より小さい濃度で決定される。より好ましくは、副作用は、EC50値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1の濃度で決定される。

10

【0034】

アデノシンA1またはA2受容体のアゴニストである、多数の化合物が同定された。これらの化合物は、低い方のpHにおいてアデノシンA1またはA2受容体に対して、より高い親和性を有する。受容体は、pHの変化にตอบสนองして、その構造を変化させると考えられている。この変化が生じる正確な機序は分かっていないが、これらの受容体とのアゴニストの結合に関与し、かつ生理的範囲のpK値を有するヒスチジン残基が関与すると考えられる。

【0035】

図1は、親和性の増大が、リガンド結合実験におけるpHがpH 7.4からpH 5.5に低減されるに伴い、2-メトキシアデノシンを用いて観察されたことを示す。図2は、親和性の同様の増大はpH 7.0およびpH 6.8において観察されたが、原型A2A受容体アゴニストであるCGS21680はこの作用を示さないことを示す。親和性変化の別の意外な結果は、アデノシンA2A受容体における2-メトキシアデノシンの有効性が約100倍増大されたことである（図3）。対照的に、3'-デオキシー-2-メトキシアデノシンは、pHが7.4から6.2に下げられた場合に、A1受容体において親和性の増大を示した。ヒトA1受容体からの[3H]-DPCPXの置換における高親和性部位について決定されたKi値は、pH 7.4において 158 ± 85 nMであり、pH 6.2において 405 ± 114 nMであった。従って、アデノシン受容体アゴニストおよび部分的アゴニストは、組織pHの局所変化によって大いに影響され得ること、そして意外なことに、これらのリガンドの有効性が増大されるか、あるいは低減され得ることが明らかとなる。有効性の低減を示す化合物は、低親和性部分的アゴニストとして作用するようである。

20

30

【0036】

本出願人は、可能性のある治療剤がまた、試験化合物を、かなりのアデノシン受容体（すなわち、有益な治療効果を顕現させるのに十分なアデノシン受容体）を（pH 7.4において）活性化すると予測されるものより低用量でインビボまたはインビトロにおいて投与し、次に、正常組織と比較して病理組織において受容体を活性化するのに必要な用量の差を評価することにより同定され得ることを意図している。

【0037】

本発明のさらなる態様によると、可能性のある治療剤を同定する方法が提供され、該方法は、試験化合物をアデノシン受容体（A1、A2A、A2B、またはA3アデノシン受容体）と、病理組織、細胞、または膜、および対応正常組織、細胞、または膜において、pH 7.4におけるアデノシン受容体での試験化合物のEC50値より低い濃度で接触させ、次に、正常組織と病理組織間で、試験化合物との接触にตอบสนองしたアデノシン受容体の作用に差があるか否かを決定する、を含む。

40

【0038】

好ましくは、試験化合物は、EC50値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1の濃度でアデノシン受容体と接触される。

50

【0039】

試験化合物がアデノシン受容体のアゴニストであり、試験化合物に応答したアデノシン受容体の作用が、正常組織においてより病理組織において大きい場合、試験化合物は可能性のある治療剤として同定される。病理組織が上皮組織を含む場合、上皮性疾患（例えば、乾癬、喘息、COPD）の処置のための可能性のある治療化合物が同定され得る。

【0040】

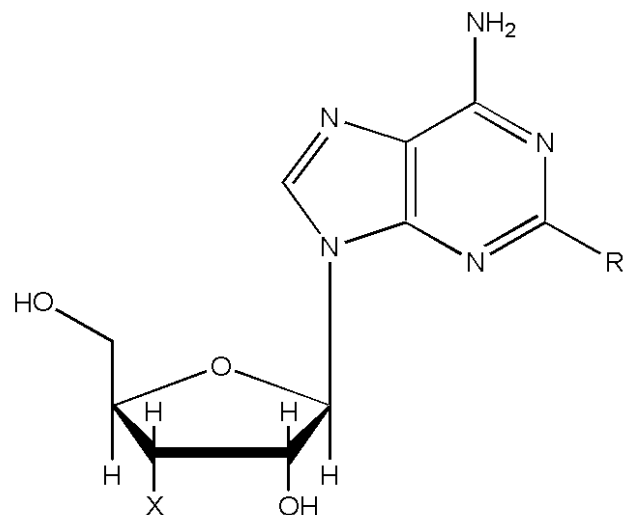
異なるpHにおいて異なる受容体親和性および／または有効性を有するか、あるいは正常組織と比較して病理組織においてアデノシン受容体の異なる作用を引き起こす、アデノシン受容体アゴニストは、アデノシンの誘導体を含む。従って、本発明の方法は、スクリーニング方法として（特に、アデノシンの誘導体をスクリーニングするため）用いられ得ることが意図されるだろう。pH 7.4において低い親和性（すなわち、アデノシン受容体に対する $K_d > 0.5 \mu M$ ）、および／または有効性を有する誘導体が好ましい。異なるアデノシン受容体に対する誘導体の選択性は、低減したpHで変化し得るので、与えられた化合物の選択性は、正常pHおよび低減したpHにおいて決定されるべきである。

【0041】

本発明によると、以下の一般式：

【化1】

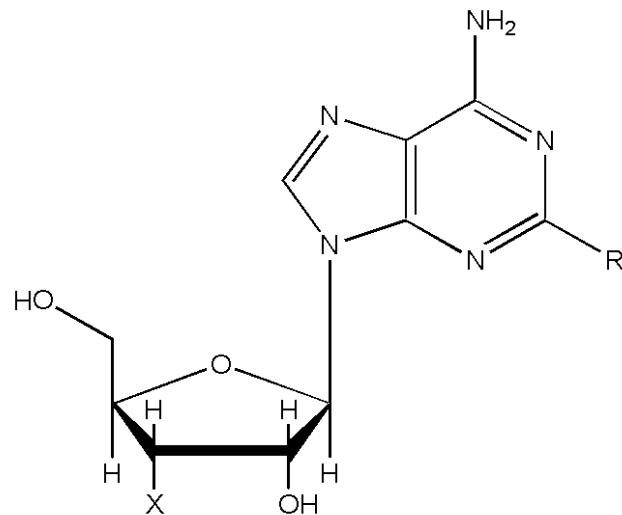
(I)



（式中、RはC₁ - 4アルコキシであり、XはOHである）

【化 2】

(II)



(式中、RはC₁ - 4アルコキシであり、XはHである)

の化合物が見出され、これらの多くが、低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有すると考えられる。

【0042】

実施例10において例示される化合物は、低い方のpHにおいてアデノシンA_{2A}受容体に対してより高い親和性を有することが見出されている。

【0043】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、一般式(I)または(II)、あるいは実施例10の化合物は、種々の疾患または状態の予防、処置、または改善において医薬として用いられ得る。これらは、予防、処置、または改善がアデノシン受容体の活性化により介在される、疾患または状態を含む。例としては、局所性組織エネルギー需要が供給を上回っているか、および／またはpHが低下している疾患または状態を含む。

【0044】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、一般式(I)または(II)、あるいは実施例10の化合物は、特に、癌、炎症、虚血・再灌流損傷、疼痛、過剰な神経活性(例えば、てんかん、または炎症性疼痛および神経障害性疼痛を含む慢性疼痛または疼痛過敏におけるもの)、敗血症、敗血性ショック、神経変性(アルツハイマー病を含む)、筋疲労または筋痙攣(特に、選手の痙攣)の予防、処置、または改善のための医薬の製造のために用いられ得る。

【0045】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体における作用のより高い有効性を有する、一般式(I)または(II)、あるいは実施例10の化合物は、以下の種類の疼痛：腸の疼痛、膵臓の疼痛、骨盤／会陰の疼痛、背中の疼痛、腰痛、胸痛、心臓痛、骨盤の疼痛／PID、関節痛(例えば、腱炎、滑液包炎、急性関節炎と関連するもの)、頸痛、産科系の疼痛(陣痛または帝王切開)、

癌性疼痛、H I V 性疼痛、幻肢痛、術後疼痛、慢性神経障害性疼痛、腰椎手術の失敗による疼痛、身体外傷後疼痛（銃創、交通事故、または火傷により引き起こされる疼痛を含む）、瘢痕組織疼痛、急性帯状疱疹疼痛、急性膵炎突出痛（癌）、疱疹後神経痛、三叉神経痛；神経障害性疼痛、または糖尿病性神経障害、多発性神経障害、線維筋痛、筋膜痛症候群、骨関節炎、関節リウマチ、座骨神経痛または腰椎神経根障害、脊椎管狭窄症、顎関節症、腎臓痛、月経困難症/子宮内膜症により引き起こされるか、あるいは関連する他の疼痛；または炎症性疼痛、または骨関節炎、関節リウマチ、リウマチ様脊椎炎、痛風性関節炎の様な関節炎状態、または喘息、慢性閉塞性肺疾患、線維症、多発性硬化症、敗血症、敗血性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌ショック、毒素性ショック、出血性ショック、成人呼吸窮迫症候群、脳マラリア、臓器移植の拒絶反応、癌に続発する疼痛、H I V、慢性肺炎症性疾患、珪肺症、肺肉腫、骨吸収疾患、再灌流損傷、移植片体宿主病、多発性硬化症、重症筋無力症、同種移植拒絶反応、感染に起因する発熱および筋肉痛、A I D S 関連症候群（A R C）、ケロイド形成、瘢痕組織形成、クローン病、潰瘍性大腸炎およびピレスス、過敏性腸症候群、骨粗鬆症、脳マラリア、細菌性髄膜炎、またはアムホテリシンB処置、インターロイキン-2処置、O K T 3処置、またはG M - C S F処置に由来する副作用により引き起こされるか、あるいは関連する他の疼痛の予防、処置、または改善において有効であり得る。

10

【0046】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、式（I）の化合物、式（I I）の化合物、および実施例10の化合物は、特に、関節炎（特に、関節炎の関節包におけるもの）、喘息、乾癬、および腸炎を含む特定の種類の炎症の予防、処置、または改善に有効であり得る。

20

【0047】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、式（I）の化合物、式（I I）の化合物、および実施例10の化合物は、特に、関節リウマチ、過敏性腸症候群、または骨関節炎の予防、処置、または改善に有効であり得る。

【0048】

本発明により、癌、炎症、虚血・再灌流損傷、疼痛、過剰な神経活性（例えば、てんかん、または炎症性疼痛および神経障害性疼痛を含む慢性疼痛または痛覚過敏におけるもの）、敗血症、敗血性ショック、神経変性（アルツハイマー病を含む）、筋疲労または筋痙攣（特に、選手の痙攣）の予防、処置、または改善方法がさらに提供され、これは、低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対するより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、本発明の方法により同定された化合物、または式（I）または（I I）、または実施例10の化合物を、かかる予防、処置、または改善の必要な対象に投与することを含む。

30

【0049】

式（I）の化合物は、2-メトキシアデノシン、2-エトキシアデノシン、2-プロポキシアデノシン、2-イソプロポキシアデノシン、および2-ブトキシアデノシンを含む。式（I）の好ましい化合物は、2-メトキシアデノシン、2-エトキシアデノシン、および2-ブチルオキシアデノシンである。

40

【0050】

式（I I）の化合物は、3'-デオキシ-2-メトキシアデノシン、3'-デオキシ-2-エトキシアデノシン、3'-デオキシ-2-プロポキシアデノシン、3'-デオキシ-2-イソプロポキシアデノシン、および3'-デオキシ-2-ブトキシアデノシンを含む。式（I I）の好ましい化合物は、3'-デオキシ-2-プロポキシアデノシン、3'-デオキシ-2-イソプロポキシアデノシン、および3'-デオキシ-2-ブトキシアデノシンである。

【0051】

50

２－メトキシアデノシンは、アデノシン A_{2A} 受容体での EC₅₀ 値が 3 μM であると報告されている (Daly, J.W. et al. (1993) Pharmacol. 46, 91-100)。しかしながら、この化合物は、意外なことに、血漿濃度 0.2 μM またはそれ未満で抗痛覚過敏活性および抗炎症活性がすでに見出されていた。この低用量において、２－メトキシアデノシンは、副作用の発生率および重篤度を低減した。鎮痛剤としての ２－メトキシアデノシンの活性は、国際特許出願番号 PCT/GB03/05379 (本願出願日において未公開) の主題である。

【0052】

低い方の pH においてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、式 (I) の他の化合物、および式 (I I) の他の化合物 (および実施例 10 の化合物) (および、本発明の方法を用いて同定された化合物) も、他のアデノシン受容体アゴニストより低用量でずっと有効であると考えられる。したがって、かかる化合物は、副作用の低減した発生率および重篤度を有する用量で有効に投与され得る。これらの化合物は、代わりにあるいはさらに、他のアデノシン受容体アゴニストと比較して副作用の低減した発生率および重篤度を有し得る。

【0053】

疼痛は 2 つの要素を有し、それぞれが、感覚神経の活性化に関与する。第 1 の要素は、感覚神経が、例えば、皮膚の加温または加圧の結果として刺激される際の早期フェーズまたは即時フェーズである。第 2 の要素は、以前に損傷された組織を刺激する知覚機序の感受性の増大の結果である。この第 2 の要素は、痛覚過敏と呼ばれ、組織損傷から生じる慢性疼痛の全ての型に関与するが、疼痛知覚の早期フェーズまたは即時フェーズには関与しない。

【0054】

従って、痛覚過敏は、組織損傷により引き起こされる、疼痛認知の増大した状態である。この状態は、損傷した個体による損傷組織の保護を促進し、組織修復が生じる時間を与えるために恐らく設計された、神経系の本来の応答である。2 つの既知の、この状態の背後にある原因が存在し、それは、感覚神経活性の増大、および脊髄で生じる侵害受容情報の神経処理の変化である。痛覚過敏は、慢性炎症 (例えば、関節リウマチ) 状態において、および感覚神経損傷が生じた場合 (すなわち、神経障害性疼痛)、弱められ得る。

【0055】

低い方の pH においてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、本発明の方法により同定される化合物、式 (I) または (I I) の化合物、および実施例 10 の化合物は、アデノシン受容体を活性化すると分かっているものより十分に低い濃度を与えることが予測される用量で投与される場合でさえ、神経障害性疼痛および炎症性疼痛に罹患している哺乳動物において、疼痛認知を阻害するのに有効であると考えられる。これらの用量において、これらの化合物は、他のアデノシン受容体アゴニストの投与と関連する有意な副作用を生じることなく、そしてまた正常な感覚認知を低減させることなく、神経障害性疼痛および炎症性疼痛を処置できる。

【0056】

低い方の pH においてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、本発明の方法により同定された化合物、式 (I) または (I I) の化合物、実施例 10 の化合物は、腸の疼痛、背中の疼痛、癌性疼痛、HIV 性疼痛、幻肢痛、術後疼痛、糖尿病性神経障害、多発性神経障害、疱疹後神経痛、および三叉神経痛を含む神経障害の結果として引き起こされる疼痛 (特に、痛覚過敏) の予防、処置、または改善のための抗痛覚過敏剤として用いられ得る。

【0057】

低い方の pH においてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、本発明の方法により同定された化合物、式 (I) または (I I) の化合物、あるいは実施例 10 の化合物は、腸の疼痛、背中の

疼痛、癌性疼痛、線維筋痛、術後疼痛、骨関節炎、および関節リウマチを含む炎症性疾患の結果として引き起こされる疼痛（特に、痛覚過敏）の予防、処置、または改善のための抗痛覚過敏剤として用いられ得る。

【0058】

低い方のpHにおいてアデノシン受容体に対してより高い親和性、および／またはアデノシン受容体での作用のより高い有効性を有する、本発明の方法により同定された化合物、式(I)または(I I)の化合物、および実施例10の化合物は、主要な2種類の既知鎮痛剤である化合物と比較して、疼痛（特に、痛覚過敏）を処置するために用いられるときの利点（例えば、増大した有効性および／または低減した副作用）を有すると予測される。(i)非ステロイド系抗炎症剤(NSAID)、および関連COX-2阻害剤；および(ii)モルヒネベースのアヘン剤がある。これら両方の種類の鎮痛剤は、一般的な侵害受容性疼痛を制御するのに有効である。しかしながら、それらは、神経障害性疼痛のようなある種の痛覚過敏性疼痛に対してはあまり有効でない。多くの医療従事者は、これらの化合物の投与により引き起こされる副作用、および患者がそれらの中毒となり得る可能性のせいで、神経障害性疼痛に作用するのに必要な高用量でアヘン剤を処方するのを嫌がる。NSAIDは、アヘン剤より随分効果が小さいので、より高用量のこれらの化合物が必要とされる。しかしながら、このことは、これらの化合物が胃腸管の炎症を引き起こすため、望ましくない。

10

【0059】

対象に投与される、本発明の方法により同定された化合物、または式(I)または(I I)、あるいは実施例10の化合物の量は、pH7.4におけるアデノシン受容体での該化合物のEC50値より低い最高血漿濃度を与える量でなければならない。

20

【0060】

化合物のEC50値は、異なるアデノシン受容体（すなわち、A1、A2A、A2B、A3アデノシン受容体）に対して異なるようであると考えられるだろう。投与されるべき化合物の量は、異なる受容体での化合物の最も低いEC50値と比べて、計算されるべきである。

【0061】

最高血漿濃度は、EC50値の千分の1から5分の1、または50分の1から3分の1（より好ましくは、千分の1から20分の1、百分の1または50分の1から5分の1、50分の1から10分の1、または10分の1から5分の1）であり得る。好ましくは、最高血漿濃度は、EC50値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1である。

30

【0062】

好ましくは、投与量は、pH7.4におけるアデノシン受容体での化合物のEC50値の千分の1と5分の1の間、より好ましくは、千分の1と20分の1、または百分の1と5分の1、または50分の1と5分の1の間で1時間より長く維持される血漿濃度を生じる。より好ましくは、投与量は、1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1で1時間より長く維持される血漿濃度を生じる。

40

【0063】

誤解を避けるために、化合物のEC50値は、本明細書において、受容体応答のベースラインと受容体応答の最大値との中間の受容体応答（例えば、用量応答曲線を用いて決定される）を誘発する化合物の濃度として定義される。

【0064】

EC50値は、標準条件（pH7.4に緩衝化した平衡塩類溶液）下で決定されるべきである。単離された膜、細胞、および組織を用いてのEC50の決定のため、これは、pH7.4の緩衝塩類溶液（例えば、細胞培地）中であらう（例えば、Daly et al. (Pharmacol. (1993) 46, 91-100)、または好ましくは、Tilburg et al. (J. Med. Chem. (2002) 45, 91-100)に記載）。EC50はまた、正常健常動物において、あるいは正常健常動物

50

において正常条件（すなわち、酸素化血液、またはpH7.4に緩衝化された酸素化等張培地）下でかん流された組織において、アデノシン受容体介在性応答を測定することによりインビボで決定され得る。

【0065】

あるいは、投与される、本発明の方法により同定された化合物、または式（I）または（II）の化合物、あるいは実施例10の化合物の量は、アデノシン受容体におけるKd値の千分の1から20分の1、千分の1から3分の1、より好ましくは、百分の1から5分の1、または50分の1から10分の1の最高血漿濃度を生じる量であってもよい。より好ましくは、アデノシン受容体でのKd値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1の最高血漿濃度を生じる量である。

10

【0066】

化合物のKd値は、異なるアデノシン受容体（すなわち、A1、A2A、A2B、A3アデノシン受容体）に対して異なるだろうと考えられるであろう。投与されるべき化合物の量は、異なる受容体に対する化合物の最低Kdまたは最高Kdと比較して計算されてもよい。

【0067】

好ましくは、投与される化合物の量は、アデノシン受容体での化合物のKd値の千分の1と5分の1の間、より好ましくは、千分の1と20分の1、または百分の1と5分の1、または50分の1と5分の1の間で少なくとも1時間維持される血漿濃度を生じる量である。より好ましくは、量は、アデノシン受容体での化合物のKd値の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1で少なくとも1時間維持される血漿濃度を生じる量である。

20

【0068】

それぞれの受容体での化合物のKd値は、標準条件下で、アデノシン受容体の供給源として、これらの受容体を内在的に発現している組織または細胞のいずれか由来、あるいはアデノシン受容体遺伝子をコードするDNAベクターでトランスフェクションされた細胞由来の細胞膜を用いて、決定されるべきである。あるいは、アデノシン受容体を発現している細胞を用いた全細胞調製物が用いられてもよい。異なる受容体選択性に標識（例えば、放射性標識）されたリガンドを緩衝（pH7.4）塩溶液（例えば、Tilburg et al, J. Med. Chem. (2002) 45, 420-429参照）において用い、結合親和性を決定し、これによりそれぞれの受容体での化合物のKdが決定されるべきである。

30

【0069】

あるいは、投与される、本発明の方法により同定された化合物、または式（I）または（II）の化合物、あるいは実施例10の化合物の量は、化合物が投与されるべき対象と同種の動物において徐脈、血圧降下、または頻脈の副作用を生じる化合物の最小用量の千分の1から5分の1、または50分の1から3分の1（好ましくは、千分の1から20分の1、または百分の1または50分の1から5分の1）の量であってもよい。好ましい量は、副作用を生じる最小用量の10分の1から5分の1である。より好ましい量は、副作用を生じる最小用量の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1である。

40

【0070】

好ましくは、投与される量は、副作用を生じる最小血漿濃度の千分の1と20分の1、または百分の1または50分の1と5分の1との間で、1時間より長く維持される血漿濃度を生じる。より好ましくは、投与される量は、副作用を生じる最小血漿濃度の1万分の1から5分の1、または1万分の1から20分の1、または1万分の1から百分の1、最も好ましくは、1万分の1から千分の1で1時間より長く維持される血漿濃度を生じる。

【0071】

あるいは、投与される、本発明の方法により同定された化合物、式（I）または（II）

50

）の化合物、あるいは実施例 10 の化合物の量は、化合物が投与されるべき対象と同種の動物において徐脈、血圧降下、または頻脈の副作用を生じる化合物の最小血漿濃度の千分の 1 から 5 分の 1、または 50 分の 1 から 3 分の 1（好ましくは、千分の 1 から 20 分の 1、または百分の 1 または 50 分の 1 から 5 分の 1）の血漿濃度を生じる量であってもよい。好ましくは、量は、副作用を生じる最小血漿濃度の 10 分の 1 から 5 分の 1 の血漿濃度を生じる。より好ましくは、副作用を生じる最小血漿濃度の 1 万分の 1 から 5 分の 1、または 1 万分の 1 から 20 分の 1、または 1 万分の 1 から百分の 1、最も好ましくは、1 万分の 1 から千分の 1 の血漿濃度を生じる。

【0072】

好ましくは、投与される量は、副作用を生じる最小血漿濃度の千分の 1 と 20 分の 1、または百分の 1 または 50 分の 1 と 5 分の 1 の間で 1 時間より長く維持される血漿濃度を生じる。より好ましい量は、副作用を生じる最小血漿濃度の 1 万分の 1 から 5 分の 1、または 1 万分の 1 から 20 分の 1、または 1 万分の 1 から百分の 1、最も好ましくは、1 万分の 1 から千分の 1 で、1 時間より長く維持される血漿濃度を生じる。

【0073】

本発明の方法を用いて同定された化合物、または式 (I) または (II) の化合物、あるいは実施例 10 の化合物の適当な投薬量は、患者の年齢、性別、体重、および状態、化合物の有効性、および投与経路などで変動するであろう。適当な投薬量は、当業者によって容易に決定され得る。

【0074】

投与される、本発明の方法により同定された化合物、または式 (I) または (II) の化合物、あるいは実施例 10 の化合物の量は、0.001 から 15 mg/kg、または 0.01 から 15 mg/kg、例えば、0.01 から 5 または 10 mg/kg、または 0.001 から 0.01 mg/kg でなければならないと予測される。量は、6 mg/kg、好ましくは、少なくとも 0.001、または 0.01、または 0.05 mg/kg、例えば、0.01 から 2 mg/kg 未満であってもよい。量は、少なくとも 0.1 mg/kg、例えば、0.1 から 1 または 2 mg/kg、または 0.2 から 1 mg/kg であってもよい。典型的な量は、0.2 または 0.6 から 1.2 mg/kg である。

【0075】

本発明の方法により同定された化合物、または式 (I) または (II) の化合物、あるいは実施例 10 の化合物の単位投薬量は、典型的には、活性剤最大 500 mg（例えば、1 から 500 mg、好ましくは、5 から 500 mg）を含む。好ましくは、活性剤は、活性剤、および生理的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤を含む医薬組成物の形態である。好ましい投薬量は、（ヒト）対象 1 kg 当たり、活性剤 0.1 から 2、例えば、0.5 から 1、典型的には、約 0.6 mg である。これらの濃度において、効果的な処置は、血圧降下を付随させずに（例えば、わずか 10%）、実質的に達成され得る。

【0076】

70 kg ヒト対象に好ましい用量は、420 mg、好ましくは、少なくとも 0.7 mg、より好ましくは、少なくとも 3.5 mg、最も好ましくは、少なくとも 7 mg 未満である。より好ましくは、7 から 70 mg、または 14 から 70 mg である。

【0077】

上で特定された投薬量は、化合物が任意の有益な治療効果を有するのに必要であると予測されるもの（アデノシン A_{2A} 受容体でのスポンゴシンの EC₅₀ 値に基づく）より、有意に少ない（最大約 1000 倍少ない）。

【0078】

本発明の方法により同定された化合物、または式 (I) または (II) の化合物、あるいは実施例 10 の化合物は、他の治療剤、例えば、抗炎症剤（ステロイド、NSAID、メトトレキサート）、鎮痛剤（例えば、アヘン剤、NSAID、カンナビノイド、タキキニン調節剤、またはブラジキニン調節剤）、抗痛覚過敏剤（例えば、ガバペンチン、プレガバリン、カンナビノイド、ナトリウムまたはカルシウムチャンネル調節剤、抗てんかん剤

10

20

30

40

50

、または抗抑制剤）と共に、あるいはなしで、投与されてもよい。

【0079】

一般に、本発明の方法により同定された化合物、または式（I）または（II）の化合物、あるいは実施例10の化合物は、既知の手段により、任意の適した剤形で、任意の適した経路により、投与され得る。本発明の化合物は、好ましくは、経口、非経腸、舌下、経皮、髄腔内、または経粘膜投与される。他の適した経路は、静脈内、筋肉内、皮下、吸入、および局所を含む。投与される薬剤の量は、典型的には、例えば、静脈内投与される場合より、経口投与される場合の方が多くであろう。

【0080】

例えば、経口投与に適した組成物は、固形単位用量剤形、および錠剤、カプセル剤、バイアル、およびアンプル剤のような、例えば、注入用に液剤を含有しているものを含み、ここで、活性剤は、既知の手段により、生理的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体と共に製剤されている。適当な希釈剤および担体は既知であり、例えば、適当な結合剤などと一体となったラクトース、およびタルクを含む。

【0081】

本発明の化合物の好ましい投与頻度は、1日当たり2回または3回であると予測される。

【0082】

本発明の化合物はまた、より有効な薬剤、またはさらに低減した副作用を有する薬剤を同定するためのベースとなり得る。

【0083】

式（I）の化合物の（特に、炎症、または痛覚過敏の様な疼痛の予防、処置、または改善のための）使用に関する本発明の実施態様は、2-メトキシアデノシンを除いてもよい。

【0084】

式（I）の化合物に関する本発明の実施態様は、2-プロポキシアデノシン、および／または2-イソプロポキシアデノシンを除いてもよい。

【0085】

式（II）の化合物に関する本発明の実施態様は、3'-デオキシ-2-メトキシアデノシン、および／または3'-デオキシ-2-エトキシアデノシンを除いてもよい。

【0086】

本発明の実施態様は、本明細書において、添付の図面

[図面中：

図1は、pH7.4と比較してpH5.5におけるアデノシン受容体A_{2A}に対する2-メトキシアデノシンの親和性の増大を示す；

図2は、ラットのアデノシンA_{2A}受容体に対する2-メトキシアデノシン（しかし、CGS21680ではない）の親和性が、pHが低下（7.4から7.0、そして6.8）するにつれて増大することを示す；

図3は、pH7.4と比較してpH7.0におけるアデノシンA_{2A}受容体に対する2-メトキシアデノシン（しかし、CGS21680ではない）の有効性の増大を示す；

図4は、2-メトキシアデノシンが、カラギーナン誘発炎症の痛覚過敏作用を阻害することを示す；

図5は、2-メトキシアデノシン（0.624mg/kg、経口）が、血圧または心拍数に対して有意な作用を有さないことを示す；

図6は、神経障害性疼痛の慢性狭窄損傷モデルにおける2-メトキシアデノシンの抗痛覚過敏作用を示す；

図7は、2-メトキシアデノシン（62.4および624μg/kg、腹腔）が、血圧に影響しない濃度で、インドメタシン（3mg/kg、経口）と同等の効果でカラギーナン（CGN）誘発炎症を抑制することを示す；および

図8は、2-メトキシアデノシン（0.6mg/kg）をラットに投与した後の経時血

10

20

30

40

50

漿濃度変化を示す]

と関連し、例示のみの目的で記載される。

【0087】

実施例 1

アデノシン A₂A 受容体に対する 2-メトキシアデノシンの親和性は、pH が低減されるにつれて増大する

ラットの線条体膜を、2 nM [3H]-CGS 21680、1 単位/ml アデノシンデアミナーゼ、および増加数濃度の 2-メトキシアデノシン（事前に濾過し、液体シンチレーションカウントした）の存在下、22℃にて90分間インキュベーションした。データを、1 部位結合曲線、および 2 部位結合曲線に当てはめた（図 1 参照）：

- a) 特異的結合の総量をパーセンテージとして表し；
- b) 高親和性状態における部位の割合を表し；
- c) 高親和性状態の K_i を表し（pH 7.4 において N. B. 曲線の傾斜（nH）は、ほぼ一致し、2 部位の当てはめのための曲線の当てはめアルゴリズム（the curve fitting algorithm for a two site fit）は、高親和性状態に対する実際の特性を定義できなかった）；および
- d) 低親和性状態の K_i を表す。

【0088】

実施例 2

異なる pH におけるアデノシン A₂A 受容体に対する 2-メトキシアデノシンと CGS 21680 の親和性の比較

[3H]-CGS 21680 結合の置換を、実施例 1 に記載のように行った。結果（図 2 に示す）は、ラットアデノシン A₂A 受容体に対する 2-メトキシアデノシン（しかし、CGS 21680 ではない）の親和性が、pH が低減（7.4 から 7.0、そして 6.8）するのに伴い、増大することを示している。

【0089】

実施例 3

アデノシン A₂A 受容体に対する 2-メトキシアデノシン（しかし、CGS 21680 ではない）の有効性は、pH 7.4 と比較して pH 7.0 において増大する

ヒト A₂A 受容体を HEK 293 細胞で発現させ、cAMP 蓄積を刺激するアゴニストの能力を、ホスホジエステラーゼ酵素を阻害するためにロリプラムの存在下で評価した。結果を図 3 に示す。

【0090】

実施例 4

2-メトキシアデノシンはカラギーナン誘発炎症の痛覚過敏作用を阻害する

図 4 は、2-メトキシアデノシンが、カラギーナン誘発炎症の痛覚過敏作用を阻害することを示す：A. 2-メトキシアデノシン（0.6 mg/kg）は、カラギーナン（CGN）誘発温熱性痛覚過敏（CITH）を、インドメタシン（3 mg/kg 経口）に匹敵する効果で阻害する。B. 投与後 3 時間における 2-メトキシアデノシンの濃度・応答関係。

【0091】

カラギーナン（2%、10 μ l）を右の後足に投与した。熱源を、処置した後足と無処置の後足の近くに置いた。後足を引っ込めるまでの時間（paw withdrawal latencies）の差を示す。2-メトキシアデノシンをカラギーナンと同時に投与した。2-メトキシアデノシンは、インドメタシン（Indo, 3 mg/kg 経口）と同様に有効であった。

【0092】

実施例 5

2-メトキシアデノシン（0.624 mg/kg 経口における）は、血圧または心拍数に対して有意な作用を示さない

移植可能な放射線遠隔測定装置を、1 グループ当たり 6 匹のラットの腹腔にセットした

10

20

30

40

50

。装置の圧カテーテルを腹大動脈に、そして2本の電極を、リードIIポジション（腹腔／右肩の左側部）の皮膚下に通した。個々のラットを、データ取得のための放射線受容器（DSI）上の各ケージに入れた。次に、血圧に対する0.6mg/kg 2-メトキシアデノシン、またはピークルの作用を評価した。結果を図5（A：血圧；B：心拍数）に示す。

【0093】

実施例6

神経障害性疼痛の慢性狭窄損傷モデルにおける2-メトキシアデノシンの抗痛覚過敏作用

2-メトキシアデノシン（0.624mg/kg 経口）は、ラット座骨神経の慢性狭窄損傷により引き起こされる温熱性痛覚過敏を阻害する。麻酔下で、右足の座骨神経を露出させ、4本の緩い結紮糸を神経束の周りに結んだ。およそ2週間後、ラットは、手術した足に温熱性痛覚過敏を発症し、これは右足と左足の足を引っ込めるまでの時間の差により判断した。2-メトキシアデノシンの投与は痛覚過敏を低減し、これは、引っ込めるまでの時間の差の低減により示された。2-メトキシアデノシンは、カルバマゼピン（CBZ, 100mg/kg 皮下注射）と同等、あるいはそれより有効であった。結果を図6に示す。

10

【0094】

実施例7

2-メトキシアデノシン（62.4および624μg/kg 腹腔）は、血圧に影響しない濃度にて、カラギーナン（CGN）誘発炎症を、インドメタシン（3mg/kg 経口）に匹敵する効果で阻害する

カラギーナン（2%, 10マイクロタイター）を、右の後足に投与し、足の体積を体積変動測定法により評価した。2-メトキシアデノシンをカラギーナンと同時に投与した。結果を図7に示す。2-メトキシアデノシンは、インドメタシン（Indo, 3mg/kg 経口）と同等に有効であった。

20

【0095】

実施例8

2-メトキシアデノシン（0.6mg/kg）のラットへの投与後の経時的血漿濃度変化

アデノシン受容体での2-メトキシアデノシンのEC50値（pH7.4において測定）は、900ng/ml（3μM）であった。図8より、血漿濃度は、3時間より長い間EC50値の2%より上を保つとみることができる。抗炎症作用および抗痛覚過敏作用を、最高血漿濃度が、インビトロで決定したEC50値の1%と30%の間にあるときに観察した（血圧変化はない）。最高血漿濃度がEC50値に達すると、血圧の著しい低下が何時間も続く。

30

【0096】

実施例9

低い方のpHにおけるアデノシン受容体アゴニストの増大した親和性は、対応するGTPシフトの増大と関連しており、これは、これらのアゴニストが、低い方のpHにおいてより効き目があることを示唆している。これらの結果を以下に概略する。

【0097】

表1. ラット線条体A2A受容体からの3H-CGS21680の置換（値はKi（nM）である）

40

【表 1】

	p H 7 . 4	p H 5 . 5
C G S 2 1 6 8 0	1 0 . 5 ± 2 . 1	2 . 8 ± 1 . 0
N E C A	3 . 5 ± 0 . 9	1 . 1 ± 0 . 2
C V 1 8 0 8	1 7 0 ± 2 0	3 5 ± 9
R - P I A	1 7 2 ± 2 1	2 1 ± 1 . 4
S - P I A	1 7 1 2 ± 4 2 3	2 7 1 ± 4 . 9

N E C A : 5 ' N-エチルカルボキサミドアデノシン ; C V 1 8 0 8 : 2-フェニルアミノアデノシン ; P I A : フェニルイソプロピルアデノシン 10

【0098】

上記の全てが、アゴニストに対してただ1つの親和性状態を現し、これは、高親和性状態と低親和性状態が、親和性において類似していることを示唆している。しかしながら、2-メトキシアデノシンおよび2-エトキシアデノシンは、低い方のpHにおいて2種類の明らかな親和性状態を現す(表2)。高親和性状態は、結合部位総数の約25%に対応し、GTPの存在により破壊された。このことは、それらが高親和性アゴニスト結合状態に対応することを示唆している。

【0099】

表2. ラット線条体A2A受容体からの3H-CGS21680の置換(値はKi(nM))である) 20

【表2】

2-メトキシアデノシン

pH 7.4: 高親和性 検出不可 低親和性 2500±200

pH 5.5: 高親和性 12.1±2.7 低親和性 1200±100

2-エトキシアデノシン

pH 7.4: 高親和性 245±76 低親和性 6600±2200

pH 5.5: 高親和性 2.8±1.2 低親和性 1200±120

【0100】

さらに、化合物は、低い方のpHにおいてラットA1受容体に対して高親和性を示すことを発見した(表3)。 30

【0101】

表3. ラット皮質A1受容体からの3H-DPCPXの置換(Ki(nM))

【表3】

2-クロロアデノシン

pH 7.4: 高親和性 4.4±1.8 低親和性 1670±346

pH 6.2: 高親和性 3.7±0.5 低親和性 1660±40

3'-デオキシ-2-クロロアデノシン

pH 7.4: 高親和性 227±74 低親和性 11,500±850 40

pH 6.2: 高親和性 17±46 低親和性 13,400±2400

【0102】

両方のpH値において、GTPの安定な類似体(GppNHp)は、3'-デオキシ-2-クロロアデノシンにより認識される高親和性状態を破壊した。

【0103】

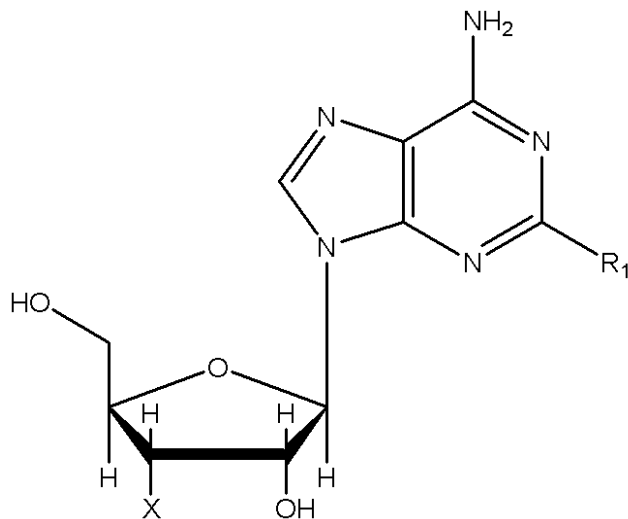
実施例10

化合物は、低い方のpHにおいてアデノシンA2A受容体に対してより高い親和性を有することが見出された

以下に挙げる化合物は、pH7.2よりpH5.5においてアデノシンA2A受容体に 50

対してより高い親和性を有することが見出された。A2A受容体結合アッセイを、 $[3H]$ -CGS21680を用いて行い、実施例1に記載のように分析した。pH 5.5にて検出した高親和性結合部位および低親和性結合部位の K_i 値、およびpH 7.4にて検出した該部位の K_i を示す。

【化3】



【0104】

X = OH のとき

【表4】

構造 R_1	pH 5.5 (K_{i1}) nM	pH 5.5 (K_{i2}) nM	pH 7.4 (K_{i2}) nM
OCH ₃	1.5	380	1300
OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	11	560	280
OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3	170	1500
OPh	71	1200	2500
O-(4-シアノ)Ph	4	380	1300
O-(3-Ph)Ph	0.7	135	620
5-インダニルオキシ	12	175	760
O-(3-CH(CH ₃) ₂)Ph	16	240	560
NH(CH ₃)	24	2240	1356
NHCH ₂ CH ₃	130	3500	1200
N(CH ₃) ₂	24	21440	13350
NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.7	20	290
NHPh	5	2028	160
NH-(4-MeO)Ph	3	180	55
NH-(4-F)Ph	10	150	200
NH-シクロペンチル	2	60	420
NH-シクロヘキシル	0.4	100	1000
N-CH ₃ , N-CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	26	2600	4000
OCH ₂ シクロペンチル	0.2	54	200
SO ₂ CH ₂ CH ₃	100	5250	39000
OCH ₂ CH ₂ OH	4	164	203
CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	15	630	800

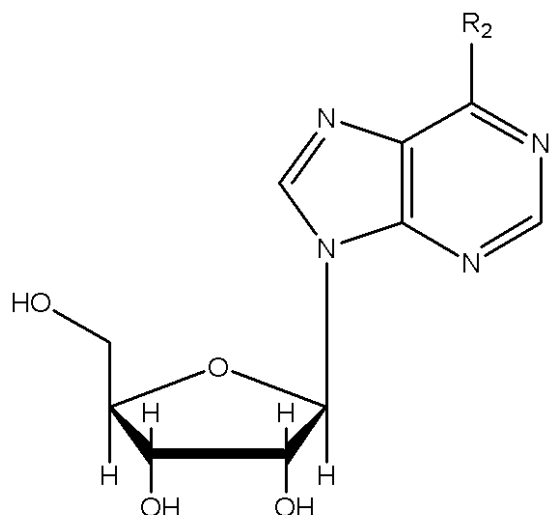
【0105】

X = H のとき

【表 5】

構造 R ₁	p H 5 . 5 (K i 1) n M	p H 5 . 5 (K i 2) n M	p H 7 . 4 (K i 2) n M
0 CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	1 3	4 4 0	2 9 9 0

【化 4】

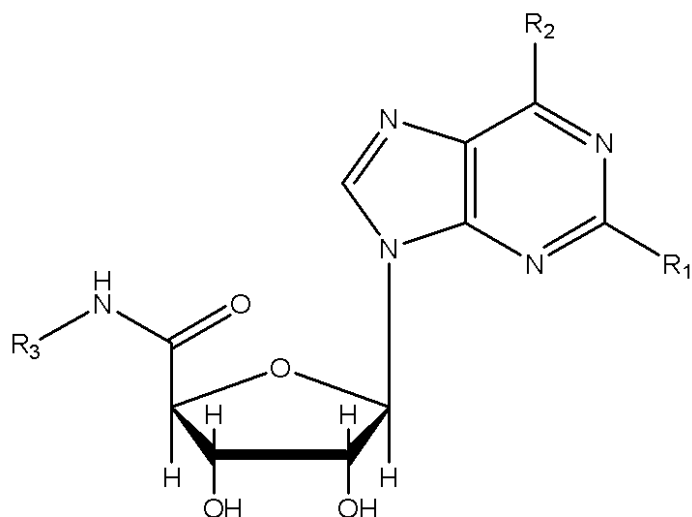


【 0 1 0 6 】

【表 6】

構造 R ₁	p H 5 . 5 (K i 1) n M	p H 5 . 5 (K i 2) n M	p H 7 . 4 (K i 2) n M
N(CH ₃) ₂	4 2	9 4 0 0	4 5 0 0 0 0
NHCH ₂ CHC(CH ₃) ₂	1 . 5	3 8 0	8 6 0 0
N-CH ₃ , N-CH ₂ Ph	7	2 1 0 0	1 8 5 0 0
ピペラジニル	3 8	7 0 0 0	5 0 0 0
N-Me, N-(CH ₂ CH ₂ OCH ₃)	1 3	6 4 7 0	1 3 0 0 0

【化 5】



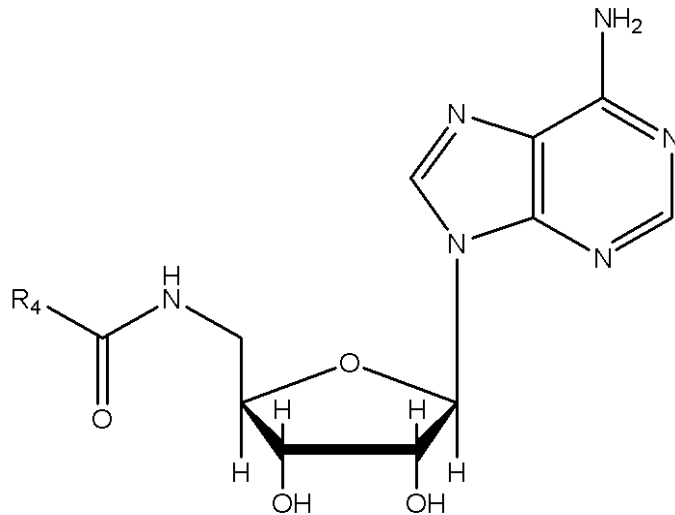
【 0 1 0 7 】

【表 7】

R ₁	R ₂	R ₃	pH 5.5 (Ki1) nM	pH 5.5 (Ki2) nM	pH 7.4 (Ki2) nM
H	NH ₂	CH(CH ₃) ₂	5	190	1930
H	NH ₂	H	9	180	270
H	NHCH ₃	CH(CH ₃) ₂	188	3420	2440
OCH ₃	NH ₂	Ph	230	53400	26100

【化 6】

10



20

【0108】

【表 8】

構造 R ₄	pH 5.5 (Ki1) nM	pH 5.5 (Ki2) nM	pH 7.4 (Ki2) nM
CH ₂ CH ₂ CH ₃	145	53550	16900
NHCH ₂ CH ₃	40	5900	6570

30

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図 1】図 1 は、pH 7.4 と比較して pH 5.5 におけるアデノシン受容体 A2A に対する 2-メトキシアデノシンの親和性の増大を示す。

【図 2】図 2 は、ラットのアデノシン A2A 受容体に対する 2-メトキシアデノシン（しかし、CGS 21680 ではない）の親和性が、pH が低下（7.4 から 7.0、そして 6.8）するにつれて増大することを示す。

40

【図 3】図 3 は、pH 7.4 と比較して pH 7.0 におけるアデノシン A2A 受容体に対する 2-メトキシアデノシン（しかし、CGS 21680 ではない）の有効性の増大を示す。

【図 4】図 4 は、2-メトキシアデノシンが、カラギーナン誘発炎症の痛覚過敏作用を阻害することを示す。

【図 5】図 5 は、2-メトキシアデノシン（0.624 mg/kg、経口）が、血圧または心拍数に対して有意な作用を有さないことを示す。

【図 6】図 6 は、神経障害性疼痛の慢性狭窄損傷モデルにおける 2-メトキシアデノシンの抗痛覚過敏作用を示す。

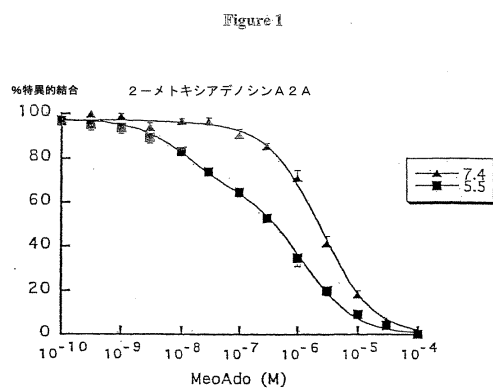
【図 7】図 7 は、2-メトキシアデノシン（62.4 および 624 μg/kg、腹腔）が

50

、血圧に影響しない濃度で、インドメタシン（3 mg / kg、経口）と同等の効果でカラギーナン（CGN）誘発炎症を抑制することを示す。

【図8】図8は、2-メトキシアデノシン（0.6 mg / kg）をラットに投与した後の経時血漿濃度変化を示す。

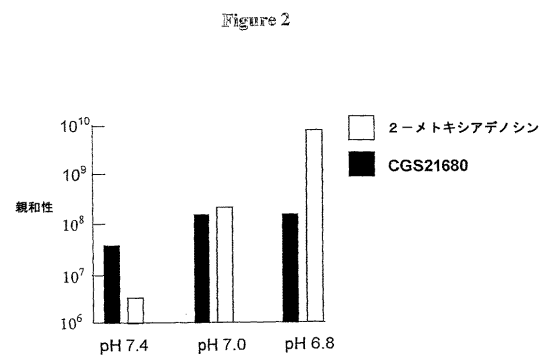
【図1】



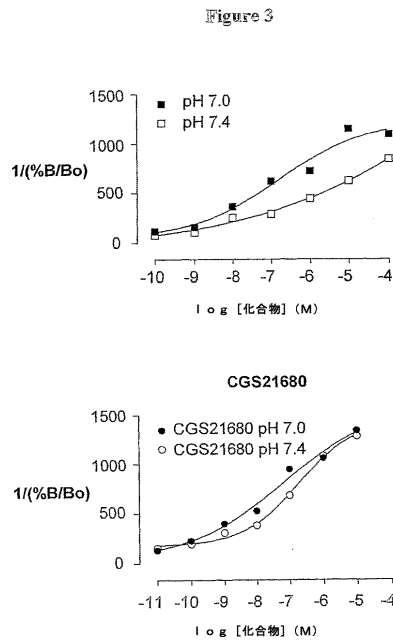
7.4 nH = 0.98		
	値	誤差
a	97.341	1.2299
b	0.010921	0.019883
c	1.7634e-09	1.5018e-08
d	2.3928e-06	1.9792e-07
Chisq	68.506	NA
R	0.99823	NA

5.5 nH = 0.49		
	値	誤差
a	97.402	0.6432
b	0.32887	0.023195
c	1.2105e-08	2.7649e-09
d	1.2248e-06	1.2605e-07
Chisq	26.441	NA
R	0.99937	NA

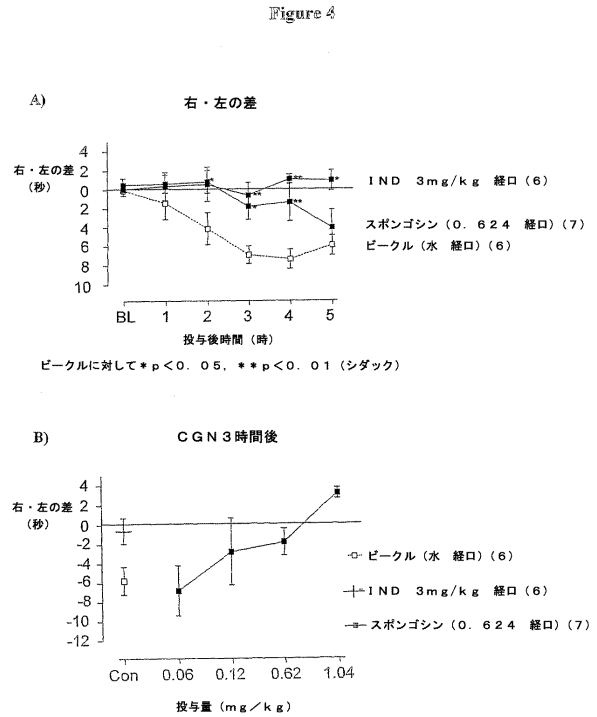
【図2】



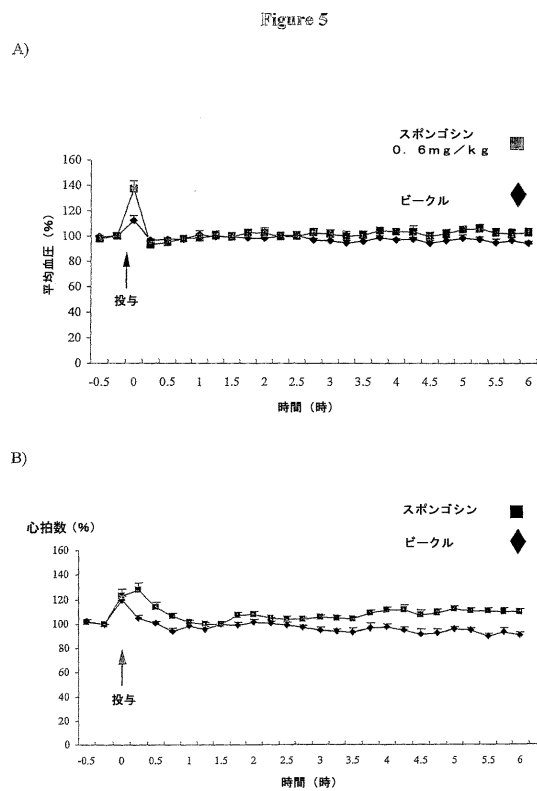
【図 3】



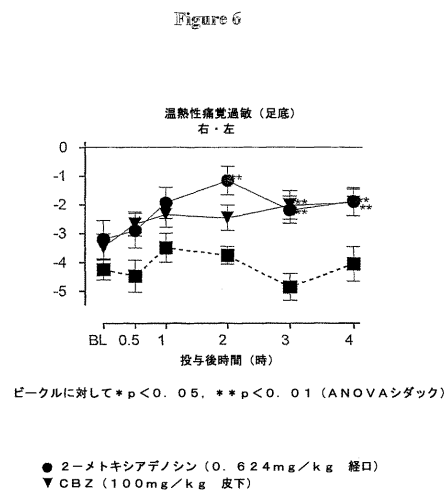
【図 4】



【図 5】



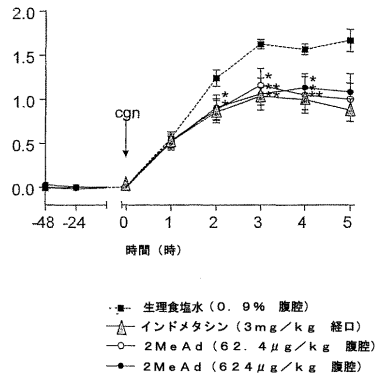
【図 6】



【図 7】

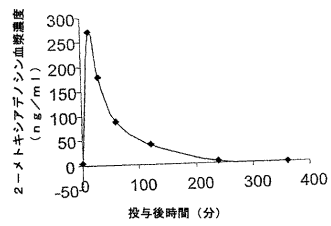
Figure 7

足の体積の増加 (ml)



【図 8】

Figure 8



フロントページの続き

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 ピーター・リチャードソン

英国シービー１・ピーエフ、ケンブリッジ、ハッドストック、バートロウ・ロード、ヒルクレスト
・コティッジ

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 3 8 7 2 8 (WO, A 1)

J. Neurochemistry, 1994, Vol.63, No.4, pp.1477-1484

Int. J. Biochem., 1984, Vol.14, pp.399-404

Mol. Pharmacol., 1981, Vol.19, pp.228-235

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12Q 1/00- 3/00

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

MEDLINE/CaPlus/BIOSIS/WPIDS(STN)