

(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2010-535801
(P2010-535801A)

(43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)

(51) Int.Cl.

A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01)

F 1

A 61 K 31/4164
A 61 K 45/00
A 61 P 25/30
A 61 P 25/36

テーマコード(参考)

4 C 08 4
4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁)

(21) 出願番号 特願2010-520285 (P2010-520285)
(86) (22) 出願日 平成20年8月6日 (2008.8.6)
(85) 翻訳文提出日 平成22年4月7日 (2010.4.7)
(86) 国際出願番号 PCT/US2008/072357
(87) 国際公開番号 WO2009/021055
(87) 国際公開日 平成21年2月12日 (2009.2.12)
(31) 優先権主張番号 60/935,323
(32) 優先日 平成19年8月6日 (2007.8.6)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/956,555
(32) 優先日 平成19年8月17日 (2007.8.17)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/960,591
(32) 優先日 平成19年10月4日 (2007.10.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 510035060
シノシア・セラピューティクス・インコ
ポレイテッド
S y n o s i a T h e r a p e u t i c
s, l n c.
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア
州サウス・サンフランシスコ、ス威ート
1200、ゲートウェイ・ブルバード 6
O 1番
(74) 代理人 100068526
弁理士 田村 恭生
(74) 代理人 100100158
弁理士 鮫島 睦
(74) 代理人 100138900
弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】依存症治療方法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも一つの物質と化合物Aの乱用、依存、又は離脱症状の少なくとも一つの症状に罹り又は罹る可能性のある患者の治療方法を提供する。また、少なくとも一つの依存物質の少なくとも一つの依存症の相の及びコカイン依存症の少なくとも一つの相の確かな治療方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも一つの物質の乱用、依存又は離脱症に罹り又は罹る可能性のある患者に、治療上の有効量の化合物Aを投与することを含む患者の治療方法。

【請求項 2】

少なくとも一つの物質が、乱用薬物及び治療薬から選択される請求項1記載の方法。

【請求項 3】

乱用薬物が、神経刺激剤、オピオイド、幻覚剤、吸入剤、鎮静剤、精神安定剤、睡眠剤、抗不安剤、および違法薬物から選択される請求項2記載の方法。

【請求項 4】

神経刺激剤が、-フェニルイソプロピルアミン誘導体である請求項3記載の方法。

【請求項 5】

-フェニルイソプロピルアミン誘導体がアンフェタミン、デキストロアンフェタミン、及びメタンフェタミンから選択される請求項4記載の方法。

【請求項 6】

神経刺激剤が、エクスタシー、フェンメトラジン、メチルフェニデート、ジエチルプロピオン、ペモリン、マジンドール、(-)カチノン、及びフェンフルラミンから選択される請求項3記載の方法。

【請求項 7】

オピオイドが、ロータブ、トラマドール、ヘロイン、メタドン、ヒドロコドン、及びオキシコドンから選択される請求項3記載の方法。

【請求項 8】

幻覚剤がシロシビン、幻覚キノコ、リゼルギン酸ジエチルアミド(LSD)、フェンシリジン(PCP)、及びケタミンから選択される請求項3記載の方法。

【請求項 9】

吸入剤がベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1,3,5-トリフルオロベンゼン、1,2,4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される請求項3記載の方法。

【請求項 10】

治療薬が麻酔剤、鎮痛剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、筋弛緩剤、非ステロイド性抗炎症薬、OTC薬、及び抗うつ薬から選択される請求項2記載の方法。

【請求項 11】

乱用薬物が、コカイン、アルコール、カフェイン、アヘン、カンナビノイド、カンナビス、ベンゾジアゼピン、カリソプロドール、タバコ、ニコチン、バイコジン、ローセット、ペルコセット、ペルコダン、及びタイロックスから選択される請求項2記載の方法。

【請求項 12】

乱用薬物がコカインであり、化合物Aが、注意欠陥・多動性障害；多幸感；活力、興奮及び社会性の増加；空腹感及び疲労の減少；身体的及び精神的な感受性の顕著な増加；痛みの減少；気管支炎；息切れ；胸痛；動悸；不整脈；心筋症；心臓発作；散大瞳孔；吐き気；嘔吐；頭痛；回転性目眩(vertigo)；動搖性目眩(dizziness)；不安；精神障害；錯乱；鼻粘膜炎症；鼻粘膜痂皮；反復性鼻血；鼻づまり；顔面痛；情動不安；及びコカインの渴望から選択されるコカイン乱用及び依存の少なくとも一つの症状を減少させる請求項11記載の方法。

【請求項 13】

乱用薬物がコカインであり、化合物Aがコカイン乱用及び依存の少なくとも一つの陰性自覚症状を増加させる請求項11記載の方法。

【請求項 14】

乱用薬物がコカインであり、化合物Aが疲労、喜びの欠如、抑鬱、興奮、睡眠障害、食欲増加、神経運動遅延、動搖、過剰な疑い深さ、及びコカインの渴望から選択される少な

10

20

30

40

50

くとも一つの離脱症状を減少させる請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 5】

方法がさらに、セロトニン再取り込み阻害剤（S S R I）、セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（S N R I）、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（N R I）、ノルエピネフリン・ドバミン再取り込み阻害剤（N D R I）、セロトニン 5 - ヒドロキシトリプタミン 1 A (5 H T 1 A) アンタゴニスト、ドバミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシン A 2 A 受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（M A O I）、モノアミンオキシダーゼ B 阻害剤、ナトリウムチャネルプロッカー、カルシウムチャンネルプロッcker、中枢及び末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢 アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、N K - 1 受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子（C R F）アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤 / 抗精神病剤、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、 - アミノ酪酸（G A B A）アゴニスト、G A B A 代謝酵素阻害剤、G A B A 合成活性化剤、ドバミン D 2 受容体部分アゴニスト、ドバミン代謝酵素阻害剤、カテコール - O - メチル - トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドバミン受容体アゴニスト、5 H T 1 受容体部分アゴニスト、セロトニン 5 H T 2 受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む請求項 1 記載の方法。10

【請求項 1 6】

方法がさらに、ベンゾジアゼピン、レボドパ、カリソプロドール、モダフィニル、アカンプロセート、 - ブチロラクトン、 - ヒドロキシ酪酸、アヘン、シロシビン、幻覚キノコ、タバコ、及びニコチンから選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む請求項 1 記載の方法。20

【請求項 1 7】

の後に化合物 A を患者に投与する請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】

化合物 A の治療上の有効量を患者に投与することを特徴とする、患者における少なくとも一つの物質に対する、獲得、維持、消滅、及び再発から選択される、少なくとも一つの物質依存相の治療方法。30

【請求項 1 9】

化合物 A が、患者における獲得相の進展を阻害する請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

化合物 A が、患者における消滅相の進展を促進する請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 1】

化合物 A が、患者における再発の頻度を減少させる請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 2】

少なくとも一つの物質が乱用薬物及び治療薬から選択される請求項記載の 1 8 方法。

【請求項 2 3】

乱用薬物が、神経刺激剤、オピオイド、幻覚剤、吸入剤、鎮静剤、精神安定剤、睡眠剤、抗不安剤、及び違法薬物から選択される請求項 2 2 記載の方法。40

【請求項 2 4】

神経刺激剤が、 - フェニルイソプロピルアミン誘導体である請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 5】

- フェニルイソプロピルアミン誘導体が、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、及びメタンフェタミンから選択される請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

神経刺激剤が、エクスタシー、フェンメトラジン、メチルフェニデート、ジエチルプロピオン、ペモリン、マジンドール、(-) カチノン、及びフェンフルラミンから選択され50

る請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 7】

オピオイドが、ロータブ、トラマドール、ヘロイン、メタドン、ヒドロコドン、及びオキシコドンから選択される請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 8】

幻覚剤がシロシビン、幻覚キノコ、リゼルギン酸ジエチルアミド（LSD）、フェンシリジン（PCP）、及びケタミンから選択される請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】

吸入剤がベンゼン、トルエン、o - キシレン、m - キシレン、p - キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o - ジフルオロベンゼン、1、3、5 - トリフルオロベンゼン、1、2、4 - トリフルオロベンゼン、ペントフルオロトルエン、ペントフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される請求項 2 3 記載の方法。10

【請求項 3 0】

治療薬が、麻酔剤、鎮痛剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、筋弛緩剤、非ステロイド性抗炎症薬、OTC 薬、及び抗うつ薬から選択される請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 1】

依存薬物が、アルコール、カフェイン、アヘン、カンナビノイド、カンナビス、ベンゾジアゼピン、カリソプロドール、タバコ、ニコチン、バイコジン、ローセット、ペルコセット、ペルコダン、及びタイロックスである請求項 2 2 記載の方法。20

【請求項 3 2】

方法がさらに、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（SNRI）、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（NRI）、ノルエピネフリン - ドパミン再取り込み阻害剤（NDRI）、セロトニン 5 - ヒドロキシトリプタミン 1A (5HT1A) 受容体アンタゴニスト、ドパミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシン A2A 受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）、モノアミンオキシダーゼ B 阻害剤、ナトリウムチャネルプロッカー、カルシウムチャンネルプロッcker、中枢及び末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢 アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、NK - 1 受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子（CRF）アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤 / 抗精神病剤、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、- アミノ酪酸（GABA）アゴニスト、GABA 代謝酵素阻害剤、GABA 合成活性化剤、ドパミン D2 受容体部分アゴニスト、ドパミン代謝酵素阻害剤、カテコール - O - メチル - トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニスト、5HT1 受容体部分アゴニスト、セロトニン 5HT2 受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む請求項 1 8 記載の方法。30

【請求項 3 3】

化合物 A の治療上の有効量を患者に投与することを特徴とする、患者におけるコカイン依存に対する、獲得、維持、消滅、及び再発から選択される、少なくとも一つの相の治疗方法。40

【請求項 3 4】

化合物 A が患者の獲得相の進展を阻害する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

化合物 A が患者の消滅相を促進する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 6】

化合物 A が再発の頻度を少なくする請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 7】

化合物 A がコカインの乱用、依存、又は離脱からの少なくとも一つの症状を減少させる50

請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 8】

化合物 A が、患者の職場、学校、又は家庭において義務の重要な役割を履行することができないことによるコカイン使用による再発；身体的に有害な状況におけるコカイン使用による再発；コカインに関連した法的な問題による再発；及びコカインの影響により社会的又は対人的な問題が継続又は再発するにもかかわらず行うコカインの継続的な使用、から選択される少なくとも一つのコカイン乱用の症状を減少させる請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

化合物 A が、患者の耐性；離脱；コカインが、しばしば想定されていたよりも大用量又は長期間にわたって摂取されること；コカイン使用を減らす又は制御するための持続的な願い又はうまくいかない努力があること；コカインを得、コカインを使用し、又はコカインの影響から回復するための長時間が費やされること；コカインの使用のために重要な社会的、職業的、又は娯楽の活動をあきらめ又は減らすこと；及び、継続的又は再発による身体的又は精神的問題がコカインによって起こる又は悪化させるらしいことを知つてながらコカイン使用を続けることから選択される少なくとも一つのコカイン依存の症状を減少させる請求項 3 7 記載の方法。

10

【請求項 4 0】

化合物 A が、注意欠陥・多動性障害；多幸感；活力、興奮及び社会性の増加；空腹感及び疲労の減少；身体的及び精神的な感受性の顕著な増加；痛みの減少；気管支炎；息切れ；胸痛；動悸；不整脈；心筋症；心臓発作；散大瞳孔；吐き気；嘔吐；頭痛；回転性目眩（回転搖性目眩）；動搖性目眩（動搖性目眩）；不安；精神障害；錯乱；鼻粘膜炎症；鼻粘膜痂皮；反復性鼻血；鼻づまり；顔面痛；情動不安；及びコカインの渴望から選択される少なくとも一つのコカイン乱用及び依存の症状を減少させる請求項 3 7 記載の方法。

20

【請求項 4 1】

化合物 A が、少なくとも一つのコカイン乱用及び依存による陰性自覚症状を増加させる請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 2】

化合物 A が疲労、喜びの欠如、抑鬱、興奮、睡眠障害、食欲増加、神経運動遅延、動搖、過剰な疑い深さ、及びコカインの渴望から選択される少なくとも一つコカインの離脱症状を減少させる請求項 3 7 記載の方法。

30

【請求項 4 3】

化合物 A が、患者の、A D H D - I V、H A M - D、H A M - A、B D I、神経精神科検査 (Neuropsychiatric Inventory) によるやる気スコア (apathy scale)、及び認知機能検査スケール (cognitive function rating scale) の少なくとも一つの値を改善する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 4】

認知機能検査スケールが、W A I S - R、W M S - R、R A V L T、T r i a l s I - V I I、R C F T、及びT M T、P a r t s A 及びB から選択される請求項 4 3 記載の方法。

40

【請求項 4 5】

化合物 A が、患者によるコカイン使用の用量及び頻度の少なくとも一つを減らす請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

化合物 A が、患者の回復を促進する請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 7】

回復が、短期間の完全な回復、短期間の部分的回復、持続的な完全な回復、及び持続的な部分的回復の少なくとも一つにより特徴づけられる請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

化合物 A が、患者の回復している期間を引き延ばす請求項 3 3 記載の方法。

50

【請求項 4 9】

方法がさらに、少なくとも認知制御及び認知行動療法の少なくとも一つによる方法を含む請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 5 0】

方法がさらに、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (S S R I) 、セロトニン - ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (S N R I) 、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤 (N R I) 、ノルエピネフリン - ドバミン再取り込み阻害剤 (N D R I) 、セロトニン 5 - ヒドロキシトリプタミン 1 A (5 H T 1 A) 受容体アンタゴニスト、ドバミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシン A 2 A 受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤 (M A O I) 、モノアミンオキシダーゼ B 阻害剤、ナトリウムチャネルブロッカー、カルシウムチャンネルブロッカー、中枢及び末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢 アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢 アドレナリン受容体アンタゴニスト、N K - 1 受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子 (C R F) アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤 / 抗精神病剤、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、 - アミノ酪酸 (G A B A) アゴニスト、G A B A 代謝酵素阻害剤、G A B A 合成活性化剤、ドバミン D 2 受容体部分アゴニスト、ドバミン代謝酵素阻害剤、カテコール - O - メチル - トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドバミン受容体アゴニスト、5 H T 1 受容体部分アゴニスト、セロトニン 5 H T 2 受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む請求項 3 3 記載の方法。1020

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****本出願のクロスレファレンス**

本出願は、2007年8月6日に出願された 60/935,323 「Methods for Treating Dependence Using Nepicastat」、2007年8月17日に出願された 60/956,555 「Methods for Treating Dependence Using Nepicastat」及び2007年10月4日に出願された 60/960,591 「Methods for Treating Dependence Using Nepicastat」の米国仮特許出願について、35 U S C 第 119 条 (e) による利益を主張し、その全体が本明細書で引用される。30

【0 0 0 2】

本発明は、少なくとも一つの物質の少なくとも一つの乱用、依存または離脱の症状に罹り又は罹る可能性のある患者の、化合物 A による治療方法を提供する。また、少なくとも一つの物質の物質依存の少なくとも一つの相の確実な治療方法、及び、患者のコカイン依存の少なくとも一つの相の確実な治療方法を提供する。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

物質の乱用及び依存は、物質の渴望、探求、及び、物質の摂取制限の制御を喪失した使用によって特徴づけられる。これらの行動は、関連する問題の主要な物質の使用の問題として、及び他の行動を犠牲にして行われる。2004年、12歳以上のアメリカ人のうち約 2250 万人が、物質乱用による治療を必要としていた（アルコール又は違法薬物）。違法薬物乱用のみに関する費用の最新の見積りは、\$ 1810 億である（2002年）。

【0 0 0 4】

コカイン乱用及び依存の問題は、医療、社会及び法律上の大きな問題である。2005年の薬物使用と健康に関する全国調査によると、12歳以上のアメリカ人の約 13.9 % は生涯のうちに一度はコカインを試したことがあり、3.3 % はクラックコカインを試し

10

20

30

40

50

たことがあるとしている。より問題なのは、2004年は200万人だったのに対し、2005年には240万人が今でもコカイン使用者であり、増加していることである。現在のクラックコカイン使用者は、682,000人(2005年)であり、467,000人だった2004年に比べて増加している。2004年、薬物乱用警告ネットワークは、全国の薬物関連救急で救急治療室に入った人は、940,953人と見積もり、その中でもコカインが大多数を占めていた。

【0005】

明らかに、広く効果のある治療のアプローチが必要であり、その中の一つとしては、単独の認知行動療法又は随伴性マネジメントといった現在の行動療法よりも効果的な医療構成とすることが含まれる。様々な処置法が臨床試験において試され、注目すべき成功なく終わっている。特に、デシプラミン、フルオキセチン、ブロピオン、及びイミプラミンを含む多くの抗うつ剤の様々な無作為化対照試験が行われた。フェニトインの試験として、カルバマゼピン及びリチウムを含む気分安定剤の臨床試験も、プロモクリプチン、ペルゴリド、アマンタジン、マジンドール、及びメチルフェニデートを含む直接又は間接ドパミン受容体アゴニストも行われた。他の薬剤には、リタンセリン、ゲピロン、ニモジピン、及びナルトレキソンを含み、よく研究されている。これらの化合物はいずれも、確実な有効性は示さなかった。GABA系に作用するいくつかの治療薬、例えば、チアガピン、バクロフェン、及びビバガトリンは、コカイン依存の治療として評価されてきた。チアガピンの結果は同等であり、バクロフェンはわずかにより有望であったが、強力ではなかった。ビバガトリンの試験結果は、主として非盲検試験であるが同等に有望であった。これらの開発結果は、全般に思わしくなかった。

10

20

30

【0006】

ドパミン - ヒドロキシラーゼ(DBH)阻害剤であるジスルフィラムが、現存する最も薬理効果の高いコカイン依存症治療薬である。残念ながら、ジスルフィラムは、アルデヒド脱水素酵素、及び血漿エステラーゼを含むいくつかの酵素を非特異的に阻害する。ジスルフィラム及び関連する化合物キレート化銅は、アルデヒド脱水素酵素、血漿エステラーゼ及びDBHといった様々な酵素に必須の補助因子となっている。アルデヒド脱水素酵素を阻害することで、ジスルフィラムはアルコールの代謝(エタノール)を変化させ、ジスルフィラム - エタノール反応を起こす。この反応は、紅潮、吐き気及び、及び血圧低下を招く。

【0007】

血漿エステラーゼの阻害はコカインの消失を遅くし、血漿中コカイン濃度を上昇させる。実験室での研究では、鼻腔内コカイン処置に対しジスルフィラムで治療した場合、ジスルフィラムは顕著に血漿中コカイン濃度を上昇させた。しかし、増加したコカイン濃度は、身体的、主観的な効果にはコカインは関係ない。一連の制御下の試験で、6倍の血漿コカイン濃度の顕著な上昇が見られ、制御されていない違法使用においては、より上昇することが考えられる。続く静注を用いたコカイン投与では、ジスルフィラムは、おそらく血漿エステラーゼを阻害することにより、コカインの排出を遅らせた。初期には、鼻腔内投与による遅い吸収によって説明される血漿中濃度の上昇が見られた。

【0008】

いくつかの研究により、コカイン依存の治療に対するジスルフィラムの予備的な効果が示された。実験室での研究ではヒトに対しては、ジスルフィラムによる治療はコカインによる主観的な効果を軽減した。アルコール及びコカイン依存を併発している患者は、500mgまでのジスルフィラムで治療することにより、症状が改善された。同様にジスルフィラムで治療することにより、ブプレノルフィン投与を継続しているオピオイド - 及びコカイン - 依存患者のコカイン使用を減少した。近年、大型の臨床試験の結果、アルコールの服用パターンや心理療法の使用の型に関わらず、250mg / 日のジスルフィラム投与により、プラセボに対してコカイン使用を減少させることができた。この研究では、112人のコカイン依存のボランティアをランダムにプラセボ又はジスルフィラム投与し、2種のうちの1つの心理療法を施した。ジスルフィラム治療がコカイン使用量の減少につ

40

50

ながったことは、プラセボに対してコカイン陽性の尿サンプルがほとんどなかつたことから証明された。効果は大きくなく、この結果が再現されなければならないという問題が残る。

【0009】

ジスルフィラムは、ノルエピネフリン（NE）合成を触媒する単一の酵素であるDBHを阻害する。DBHは、ノルアドレナリン作動性神経において発現し、シナプス小胞に局在し、NEに応じて分泌される。DBHは血漿中で測定され、DBH濃度は、高度に遺伝性で、活性の多様性はDBHの遺伝子座の多様性によって主に説明される。T変異体（-1021C T）は、DBH遺伝子転写を減少させ、DBH活性を落とす。この対立遺伝子はよく見られる。アフリカ系アメリカ人のうち20%、北欧系アメリカ人のうち22%、日本人のうち16%と報告されている。対応するハプロタイプの頻度は、それぞれこれらの人口の0.32、0.34、及び0.09である。10

【0010】

ジスルフィラムは、低DBH活性の患者に、より効果的であるとのいくつかの報告がある。低DBH活性の患者において、コカイン陽性の尿の者は、250mg/日の繰り返しのジスルフィラム治療で、プラセボに対して減っていったが、62.5mg及び125mgの/日の繰り返しのジスルフィラム治療では有意に増加した（p < 0.04）。高DBH活性の患者においては、62.5mg/日の繰り返しのジスルフィラム治療では、コカイン陽性尿の患者はプラセボに対して増えた（p = 0.001）。このことから、250mg/日ジスルフィラム治療の効果は、低DBH活性の患者（CT遺伝子型）に限定されると考えられる。血漿中エステラーゼの阻害によるコカインクリアランスの減少により、コカインの多幸感に関連する乱用によるコカイン使用の増加が起こり、250mg/日よりも低いジスルフィラム投与は、コカイン使用を増加させると考えられる。20

【0011】

ジスルフィラムは、低DBH活性と関連のあるCT遺伝子型の患者によるコカイン使用を、より効果的に減少させる。おそらく、ジスルフィラムは、低DBH活性の患者においてより完全にDBHを阻害するため、ジスルフィラムはDBHがCT遺伝子型の患者において、より効果的に作用すると考えられる。ジスルフィラムがCT遺伝子型の患者においてより効果的であることは、DBHの阻害が、コカイン依存の治療におけるジスルフィラムの鍵となる作用機序であることを示すものである。30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

ジスルフィラムは、概念的実証としては、コカイン依存の治療に、DBH阻害剤が有望な化合物であることが示したが、コカイン依存の治療への有用性としては、アルコール及びコカインとの相互作用のために厳しく限定されている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、少なくとも一つの物質によって乱用、依存又は離脱の少なくとも一つの症状に罹り又は罹る可能性のある患者を治療する方法を提供する。方法は、患者に治療上の有効量の化合物Aを投与することを含む。40

【0014】

本発明は、また、少なくとも一つの物質による、少なくとも一つの物質依存相にある患者を治療する方法をも提供する。ここで少なくとも一つの物質依存相とは、獲得、維持、消滅、及び再発から選択されるものである。方法は、患者に治療上の有効量の化合物Aを投与することを含む。

【0015】

また、コカイン依存の少なくとも一つの相にある患者の治療方法をも提供する。ここで、少なくとも一つの相とは獲得、維持、消滅、及び再発から選択されるものである。方法は、患者に治療上の有効量の化合物Aを投与することを含む。50

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、標本数を5ないし15に変化した場合の効果量を示す。

【図2】図2は、個別の酵素アッセイの詳細を示す。

【図3】図3は、DBH及びある種の選択された酵素及び受容体(IC₅₀又はPKi)に対する、ネピカスタッフの親和性の表を示す。

【図4】図4は、ネピカスタッフによる酵素活性の阻害%を示す。

【図5】図5は、健常志願者におけるネピカスタッフ投与24時間後の尿中ドパミンレベルを示す。

【図6】図6は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの皮質におけるノルエピネフリンレベルを示す。 10

【図7】図7は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの皮質におけるドパミンレベルを示す。

【図8】図8は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの皮質におけるドパミン/ノルエピネフリン比を示す。

【図9】図9は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの腸間膜動脈におけるノルエピネフリンレベルを示す。

【図10】図10は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの腸間膜動脈におけるドパミンレベルを示す。 10

【図11】図11は、担体投与又は様々な濃度のネピカスタッフ投与後のSHRの腸間膜動脈におけるドパミン/ノルエピネフリン比を示す。 20

【発明を実施するための形態】

【0017】

本明細書中、以下の語句は、文脈において異なることを示さない限り、以下に示すことを示す。

【0018】

本明細書中「化合物A」は、(S)-5-アミノメチル-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール、(R)-5-アミノメチル-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール、及びそれらの混合物、それらの薬学的に許容される塩、例えば塩酸塩を含む。ある態様では、ネピカスタッフ((S)-5-アミノメチル-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール塩酸塩)が用いられる。 30

【0019】

本明細書中「化合物B」は、(R)-5-アミノメチル-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール、それらの薬学的に許容される塩、例えば塩酸塩を意味する。

【0020】

「薬学的に許容される塩」は、無機酸塩、例えば塩酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、スルフィン酸塩、硝酸塩、及び同様の塩；有機酸塩、例えばリンゴ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、2-ヒドロキシエチルスルホン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、及びアルカン酸塩、例えば酢酸塩、HOOC-(CH₂)_n-COOH(n=0-4)、及び同様の塩を含む。 40

【0021】

加えて、化合物が酸付加塩として得られた場合には、遊離の塩基は、酸性塩の溶液をアルカリ性にすることにより容易に得られる。逆に、生成物が遊離の塩基の場合、付加塩、特に薬学的に許容される塩は、適切な有機溶媒及び溶液を酸性にすることにより、塩基性の化合物から、従来の手順と同様の手順で酸付加塩が得られる。当該技術分野において通

10

20

30

40

50

常の知識を有する者は、非毒性の薬学的に許容される付加塩を合成するのに用いられる様々な合成方法を理解できるであろう。

【0022】

本明細書中、用語「患者」とは、ホルモン類を示す。ある実施態様中では、用語「患者」は、ヒトを示す

【0023】

用語「投与する (administer)」「投与すること (administering)」又は「投与 (administration)」とは、本明細書中、患者に化合物Aを直接投与すること又はその医薬組成物を投与することを示す。

【0024】

用語「治療する (treat)」又は「治療すること (treating)」とは、本明細書中、病態又は少なくとも一つの症状を、部分的に又は完全に和らげる、阻害する、妨げる、改善する、及び／又は、緩和することをいう。

【0025】

用語「罹っている (suffer)」又は「罹っていること (suffering)」とは、本明細書中、患者の一つ以上の診断された又は疑われている病態をいう。

【0026】

用語「罹る可能性がある (susceptible)」とは、本明細書中、少なくとも一つの病態の症状を示す可能性があることをいう。

【0027】

当該分野における通常の技術を有する者であれば、理解できることであるが、「物質乱用」は、しばしば、身体的及び／又は精神的に「依存」症状が関わる。また、物質乱用の場合に、依存症の個体からやめさせると、その個体はしばしば、睡眠及び気分障害及び乱用していた薬物への激しい渴望を含む特定の症状を示し、これは「離脱」として知られている。本明細書中に記載する方法は、薬物乱用それ自体、依存、及び離脱の治療を含む。

【0028】

用語「物質乱用」とは本明細書中、精神疾患の診断・統計マニュアル第4版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. Text revision (2000)) (「DSM-IV TR」) に記載された基準を参照し定義することができ、これは米国精神医学会、DSM-IV作成委員会が作成した。物質乱用の特徴は、物質の繰り返し使用に関連する再発及び顕著な有害作用から生じる不適切な物質の使用パターンである。DSM-IV TRに引用されているように、物質乱用とは、以下の少なくとも一つの症状を12ヶ月以内に引き起こす、臨床的に著しい障害又は苦痛につながる物質乱用と定義できる。その症状とは、(1)職場、学校、又は家庭において義務の重要な役割を履行することができないことによる物質の使用の再発；(2)身体的に有害な状況における物質の使用の再発；(3)物質に関する法的な問題による再発；及び(4)乱用物質の影響により社会的又は対人的な問題が継続又は再発しているにもかかわらず継続的な物質の使用を継続すること、である。加えて、DSM-IV TRでは、物質乱用は、物質依存の基準にはなかった症状を必要としている。ある態様では、物質乱用の患者にネビカスタッフを投与することにより、患者の乱用物質の使用量又は頻度が減少する。ある態様では、化合物Aを患者に投与することにより、少なくとも一つの物質乱用の症状を軽減する。例えば、これに限られるものではないが、多幸感、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用してきた物質の渴望、及び気分障害がある。ある態様では、化合物Aを投与することにより、患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させることができる。

【0029】

本明細書中、用語「症状を軽減する」とは、少なくとも一つの患者の病態の症状の頻度及び大きさを減少することを示す。特定の具体例では、患者は回復に向かい、もはや症状がなくなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本明細書中、用語「症状を増加させる」とは、少なくとも一つの患者の病態の頻度及び重篤性を増加させることを示す。

【 0 0 3 1 】

用語「物質依存」とは、本明細書中、DSM-IV TRに記載された基準を参照し定義することができる。DSM-IV TRに記載された物質依存の症状とは、以下の群から選択される少なくとも三つの症状を同じ12ヶ月の期間以内に同時に引き起こす、臨床的に著しい障害及び苦痛へとつながる物質の使用パターンと定義できる。その症状とは、(1)(a)望ましい効果を得るために実質的に物質の量が増加したことによる;又は(b)同一量の物質の継続的使用により実質的に効果が減少したことによる;耐性(2)(a)特定の物質による特徴的な離脱症状;又は(b)離脱症状を和らげ又は避けるために摂取された同一又は密接な関連性のある物質による離脱症状;(3)乱用物質は、しばしば想定されていたよりも大用量又は長期間にわたって摂取されること;(4)乱用物質の制御への継続的な望み又は成功しない努力があること;(5)乱用物質の取得活動、物質の使用、又はその影響からの回復に多大な時間が費やされること;(6)乱用物質の使用のために、重要な社会的、職業的又は娯楽の活動を諦め、又は減らすこと;及び(7)乱用物質の使用は、身体的又は精神的問題が発生又は悪化させることを継続的に又は再発するらしいことを知っているながら、続けてしまうことである。物質依存とは、耐性又は離脱が起こる身体的依存であってもよく、耐性又は離脱が起こらない非身体的依存性であってもよい。ある態様では、物質依存に対する化合物Aによる治療により、患者による使用量又は頻度を減少させる。ある態様では、化合物Aによる治療により患者において少なくとも一つのDSM-IV TR記載の物質依存の症状を減少させる。ある態様では、物質依存に対する化合物Aによる治療により、例えば、これに限定されるものではないが、多幸感、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、使用してきた依存物質の渴望、及び気分障害がある。ある態様では、化合物Aによる治療により、患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させる。

10

20

30

【 0 0 3 2 】

本明細書中「回復」とは、少なくとも一つの物質乱用の症状又は依存性が減少することを示す。ある態様では、回復という用語は、患者がアゴニストによる治療を受けている場合や、関連する物質を入手することが制御された状況にある場合には、適さない。ある態様では、回復とは、患者における物質乱用又は依存による少なくとも一つの症状が起こらない状態を示す。ある態様では、回復とは、患者における物質乱用又は依存による全ての症状が軽減された状態を示す。ある態様では、回復とは、患者における物質乱用又は依存による症状が起こらない状態を示す。ある態様では、回復とは、物質の使用が起こらない状態を示す。

40

【 0 0 3 3 】

ある態様では、回復は、少なくとも一つの短期間の完全回復、短期間の部分的回復、持続的な完全回復、及び持続的な部分的回復によって特徴づけられ、乱用及び物質依存の症状が一つも起こらない状態が1ヶ月以上続く場合にのみ適用する。これらの4つのタイプの回復の定義は、依存が消失してからの時間の間隔(短期間又は持続的回復)の違いによって、少なくとも一つの物質依存性又は乱用の継続性があるかどうかに基づいている(部分的又は完全回復)。

【 0 0 3 4 】

用語「短期間の完全回復」とは、少なくとも1ヶ月、しかし12ヶ月よりも短い期間、物質依存又は物質乱用の症状がないことを示す。

【 0 0 3 5 】

用語「短期間の部分的回復」とは少なくとも1ヶ月、しかし12ヶ月よりも短い期間、物質依存又は乱用物質の症状の少なくとも一つがあったが、物質依存又は乱用物質の基準には達しないことを示す。

【 0 0 3 6 】

50

用語「持続的な完全回復」とは、少なくとも12カ月以上にわたり、物質依存又は物質乱用の症状を生じていないことを示す。

【0037】

用語「持続的な部分的回復」とは、少なくとも12ヶ月にわたり、物質依存又は物質乱用の症状の少なくとも一つがあつたが、物質依存又は物質乱用の基準には達しないことを示す。

【0038】

ある態様では、化合物Aによる治療は患者の回復を促進する。ある態様では、化合物Aによる治療が患者の回復している期間を引き延ばす。

【0039】

用語「回復している期間を引き延ばす(prolong a period of remission)」とは、回復している患者の再発までの時間が増加することを示す。ある態様では、ストレスのたまる出来事が生じると、回復が途切れることがある。ある態様では、再発は、回復が途切れたときに起こる。ある態様では、化合物Aによる治療は、ストレスのたまる出来事による回復の途切れが生じうる可能性を減少させる。ある態様では、化合物Aによる治療は、短期間の部分的回復、短期間の完全回復、持続的な完全回復、持続的な部分的回復の少なくとも一つを促進する。

【0040】

「離脱」とは、関連物質の投与を軽減、遅延、又は中止したときに起こる症状の集合を言う。離脱の物質特異的症状は、例えば、社会的、職業的、及び他の重要な機能領域における臨床的に著しい障害又は苦痛につながる。これらの症状は、一般的な医学的な病態ではないため、他の精神障害によって説明することができない。必ず出はないが、離脱は通常、物質依存に関連していない。ある態様では、化合物Aによる治療により、患者の離脱の少なくとも一つの症状を軽減できる。ある態様では、離脱症状は、これらに限られるものではないが、例えば、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用してきた物質の渴望、気分障害、及び睡眠障害がある。ある態様では、化合物Aによる治療により、患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させる。

【0041】

用語「物質依存」とは、DSM-IV TRに言及されている以下の少なくとも一つの病態があることによって特徴づけられる：アルコール乱用；アルコール依存症；アルコール中毒；アルコール中毒による錯乱；アルコール離脱；アルコール離脱による錯乱；アルコール誘導性不安障害；アルコール誘導性気分障害；アルコール依存性継続的健忘障害；アルコール誘導性痴呆障害；錯覚を伴うアルコール誘発性精神障害；幻覚を伴うアルコール誘導性精神障害；アルコール誘導性性機能障害；アルコール誘導性睡眠障害；アルコール関連障害でここに明示されていないもの(NOS)；アンフェタミン乱用；アンフェタミン依存；アンフェタミン中毒；アンフェタミン中毒性錯乱；アンフェタミン離脱；アンフェタミン誘導性不安障害；アンフェタミン誘導性気分障害；妄想を伴うアンフェタミン誘導性精神障害；幻覚を伴うアンフェタミン誘導性精神障害；アンフェタミン誘導性性機能障害；アンフェタミン誘導性睡眠障害；アンフェタミン関連障害NOS；カンナビス乱用；カンナビス依存；カンナビス中毒；カンナビス中毒性錯乱；カンナビス誘導性不安障害；妄想を伴うカンナビス誘導性精神障害；幻覚を伴うカンナビス誘導性精神障害；カンナビス関連障害NOS；コカイン乱用；コカイン依存；コカイン中毒；コカイン中毒性錯乱；コカイン離脱；コカイン誘導性不安障害；コカイン誘導性気分障害；妄想を伴うコカイン誘導性精神障害；幻覚を伴うコカイン誘導性精神障害；コカイン誘導性性機能障害；コカイン誘導性睡眠障害；コカイン関連障害NOS；吸入剤乱用；吸入剤依存；吸入剤中毒；吸入剤中毒性錯乱；吸入剤誘導性不安障害；吸入剤誘導性気分障害；吸入剤誘導性持続性痴呆；妄想を伴う吸入剤誘導性精神障害；幻覚を伴う吸入剤誘導性精神障害；吸入剤関連障害NOS；オピオイド乱用；オピオイド依存；オピオイド中毒；オピオイド中毒性錯乱；オピオイド離脱；オピオイド誘導性気分障害；妄想を伴うオピオイド誘導性精神

10

20

30

40

50

障害；幻覚を伴うオピオイド誘導性精神障害；オピオイド誘導性性機能障害；オピオイド誘導性睡眠障害；オピオイド関連障害NOS；フェンシクリジン乱用；フェンシクリジン依存；フェンシクリジン中毒；フェンシクリジン中毒性錯乱；フェンシクリジン誘導性不安障害；フェンシクリジン誘導性気分障害；妄想を伴うフェンシクリジン誘導性精神障害；幻覚を伴うフェンシクリジン誘導性精神障害；及びフェンシクリジン関連障害NOSがある。

【0042】

用語「中止(cessation)」及び「離脱(remission)」は、DSM-IV TRに言及されている病態の特徴に従う必要はなく：ニコチン離脱；ニコチン関連障害でここに明示されていないもの；身体的依存を伴うニコチン依存；身体的依存を伴わないニコチン依存；短期間の完全回復したニコチン依存；短期間の部分回復したニコチン依存；持続的に完全回復したニコチン依存；持続的に部分的に回復したニコチン依存；アゴニスト治療によるニコチン依存；オピオイド離脱；オピオイド関連障害で明示されていないもの；身体的依存を伴うオピオイド依存；身体的依存を伴わないオピオイド依存；短期間の完全回復したオピオイド依存；短期間の部分回復したオピオイド依存；持続的に完全回復したオピオイド依存；持続的に部分的に回復したオピオイド依存；アゴニスト治療によるオピオイド依存；及び、制御された環境下でのオピオイド依存；エタノール離脱；身体的依存を伴うエタノール依存；身体的依存を伴わないエタノール離脱；短期間の完全回復をするエタノール離脱；短期間の部分的に回復するエタノール離脱；持続的に完全回復したエタノール離脱；持続的に部分的に回復したエタノール離脱；アゴニスト治療によるエタノール離脱；制御された環境下でのエタノール離脱；アンフェタミン離脱；及びコカイン離脱がある。

10

20

30

40

【0043】

本明細書中「アゴニスト治療による(on agonist therapy)」とは、アゴニストを物質乱用、依存、又は離脱の治療に用いることを示す。用語「アゴニスト」とは、患者が乱用、依存、又は離脱していた物質の反応の少なくとも一つ又は部分的な反応を誘発する化合物に限られず、例えば、小分子又は複合有機化合物又はタンパク質を含む因子をいう。例えば、「アゴニスト治療によるオピオイド依存」とはメタドン治療によるオピオイド依存を示す。

【0044】

あらゆる種類の物質の使用の減少によって離脱症状を引き起こしうる。例えば、いずれもニコチンを含むが、タバコ製品の使用を中止すると、ニコチン離脱症状が通常起こる。ヒトは、葉巻タバコ(cigarette)、葉巻(cigar)、又はパイプタバコの喫煙に限られず、タバコの経口又は鼻腔内摂取、又は嗜みタバコも含む、あらゆる形態のタバコの使用を中止した結果、しばしば、ニコチンの離脱症状に苦しむ。そのような経口又は鼻腔内摂取するタバコは、嗅ぎタバコ及び嗜みタバコに限られない。ニコチンの使用中止又はニコチンの使用量の減少後、しばしば24時間以内に、不機嫌、憂鬱な気分；意識朦朧；不眠；興奮性、フラストレーション又は怒り；不安；神経性振戦；集中力の欠如；落ち着きのなさ；心拍の低下；食欲増進又は体重増加；及びタバコ又はニコチンの渴望の症状が現れる。それらの症状は、しばしば社会的、職業上の、又は他の重要な機能を有する領域において臨床的に著しい苦痛又は障害を引き起こす。本明細書中に示す方法は、そのような症状が一般的な医学的病態でない場合にも、及び他の医学的障害としてうまく説明されない場合にも、ニコチン離脱症状に起因する一つ又はそれ以上の症状を緩和するのに用いることができる。本発明の方法は、ニコチン置換療法においてタバコから置換又は部分的置換した患者にも用いられる。こうして、そのような患者のあらゆる形態のニコチン依存を軽減し及び完全に消滅させるのを助ける。

【0045】

典型的には自己投与において、注射又は経口、喫煙又は鼻腔内投与による、オピオイドの投与を中断又は減少させることは、しばしば、オピオイド離脱の特徴を示す状態を引き起こす。この離脱症状は、オピオイドアンタゴニスト、例えばナロキソン又はナルトレキソンをオピオイド使用の後に投与することによっても引き起こされる。オピオイドの離脱

50

症状は、一般的にオピオイドアゴニスト効果と反対の症状によって特徴づけられる。そのような離脱症状には、不安；落ち着きのなさ；筋肉痛、しばしば背中及び脚に起こるもの；オピオイドの渴望；興奮及び痛みへの過敏性；不機嫌；吐き気又は嘔吐；流涙；鼻漏；乳頭膨張；立毛；発汗；下痢；あくび；発熱；及び不眠を含む。例えばヘロインといった、短時間効果型のオピオイドの依存の場合、離脱症状は通常、最後の投与後 6 - 24 時間以内に起こるのに対し、例えばメタドンといった、長時間効果型のオピオイドでは症状が出るまでに 2 - 4 日かかる。これらの症状は、しばしば、社会的、職業的、及び他の重要な機能領域における臨床的に著しい障害又は苦痛につながる。本明細書中に示す方法は、そのような症状が一般的な医学的病態でない場合にも、及び他の医学的障害としてうまく説明されない場合にも、オピオイド離脱症状に起因する一つ又はそれ以上の症状を緩和するのに用いることができる。

10

【0046】

エタノール（例えば、エタノール含有飲料）をやめ又は減少することにより、エタノール離脱症状が起こる。エタノール離脱症状は、エタノール摂取をやめ又は減少させた 4 ないし 12 時間以内に血中エタノール濃度が急速に落ちることにより特徴づけられる。このようなエタノール離脱症状は、エタノールの渴望；自律神経系の活動高進（例えば、発汗又は心拍 100 以上）；手の震え；不眠；吐き気；嘔吐；一過性の幻覚、幻触または幻聴；精神運動性激越；不安；及びてんかんの大発作を含む。これらの症状は、しばしば、社会的、職業的、及び他の重要な機能領域における臨床的に著しい障害又は苦痛につながる。本明細書中に示す方法は、そのような症状が一般的な医学的病態でない場合にも、及び他の医学的障害としてうまく説明されない場合にも、エタノール離脱症状に起因する一つ又はそれ以上の症状を緩和するのに用いることができる。

20

【0047】

コカイン乱用及び依存は、認知、行動上、及び身体的症状を生じうる。コカイン乱用及び依存の症状には、様々な程度の注意欠陥・多動性障害及び多幸感；活力、興奮、及び社会性の増加；空腹感及び疲労の減少；身体的及び精神的な感受性の顕著な増加；情動不安；痛みの減少；及びコカインの渴望が含まれる。呼吸器への影響には、例えば、気管支炎、息切れ、及び胸痛があり、及び心血管系への影響には、例えば、動悸、不整脈、心筋症、及び心臓発作が含まれる。症状には、瞳孔散大、吐き気、嘔吐、頭痛、回転搖性目眩、不安、動搖性目眩、精神障害、及び錯乱が含まれる。鼻からの吸引 (snorting) 又は吸入 (sniffing) によるコカインの投与では、耳、鼻及び喉への影響、例えば、鼻粘膜炎症、鼻粘膜痂皮、反復性鼻血、鼻づまり、及び顔面痛を含む症状を生じる。ある態様では、化合物 A による治療は、患者において少なくとも一つのコカイン乱用及び依存の症状を軽減する。ある態様では、ネピカスタッフ治療により、コカイン乱用及び依存による少なくとも一つの陰性自覚症状を増加させる。

30

【0048】

コカインの離脱症状には、疲労、喜びの欠如、抑鬱、興奮、睡眠障害、食欲増加、精神運動遅延、動搖、過剰な疑い深さ、及びコカインの渴望がある。化合物 A による治療により、少なくとも一つのコカインの離脱症状を軽減することができる。

40

【0049】

物質依存は相によって特徴づけられる：獲得、維持、消滅、及び再発がある。本明細書中、用語「獲得」とは、患者の物質に対する依存が開始し及び得られる物質依存相を示す。ある態様では、化合物 A による治療は、患者における獲得の進展を阻害する。ある態様では、化合物 A による治療は、患者における物質の使用量及び頻度の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、獲得相における化合物 A による治療により、患者における少なくとも一つの物質乱用及び依存による D S M - I V 記載の症状を軽減させる。ある態様では、獲得相における化合物 A による治療により、実施例に示したような、及びこれに限定されることなく、多幸感、無気力、興奮 無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用及び依存してきた物質の渴望、及び気分障害の少なくとも一つの物質乱用及び依存の症状を軽減する。ある態様では、ある態様では、化合物 A による治療により、患者に

50

とってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させることができる。

【0050】

「維持」とは、患者による安定した投与又は使用による物質依存相を示す。ある態様では、物質の使用量及び頻度の少なくとも一つにおいて現れる10%の変動は、安定な行動であると考えられている。ある態様では、維持相における化合物Aによる治療は、患者における少なくとも一つの物質乱用及び依存によるDSM-IV記載の症状を軽減する。ある態様では、維持相における化合物Aによる治療は、乱用物質及び依存の症状の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、実施例に示したような、及びこれに限定されることなく、維持相における化合物Aによる治療は、多幸感、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用及び依存してきた物質の渴望、及び気分障害の少なくとも一つの物質乱用及び依存の症状を軽減する。ある態様では、化合物Aを投与することにより、維持相にある患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させることができる。

10

【0051】

「消滅」とは、物質が患者に提供されない又は患者が物質の使用を控える物質依存相を示す。ある態様では、消滅相における物質依存が消滅又は減少することを示す。ある態様では、消滅相において少なくとも一つの離脱症状が生じることを示す。ある態様では、患者において化合物Aによる治療は消滅相を促進する。ある態様では、消滅相にある化合物Aによる治療は、患者における少なくとも一つの乱用及び依存物質によるDSM-IV記載の症状を減少させる。ある態様では、実施例に示したような、及びこれに限定されることなく、消滅相における化合物Aによる治療は、多幸感、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用及び依存してきた物質の渴望、及び気分障害の少なくとも一つの物質乱用及び依存の症状を軽減する。ある態様では、化合物Aによる治療により、患者の消滅相における離脱症状を軽減する。ある態様では、化合物Aを投与することにより、消滅相にある患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させることができる。

20

【0052】

「再発」とは、患者がある期間物質を使用しなかった後に物質乱用又は依存症状の再発を示す。ある態様では、回復後に再発する。ある態様では、再発の前に症状を消滅させるためのトレーニングを受けている。ある態様では、再発は、呼び水、ストレス、又は物質の使用において以前関わった関連するきっかけ又は刺激の環境に曝されることにより起こる。ある態様では、化合物Aによる治療は、患者における再発の頻度を減少させる。ある態様では、再発相にある化合物Aによる治療は、患者における少なくとも一つの乱用及び依存物質によるDSM-IV記載の症状を減少させる。ある態様では、実施例に示したような、及びこれに限定されることなく、再発相における化合物Aによる治療は、多幸感、無気力、興奮、無謀さ、判断力の低下、衝動強迫、攻撃性、怒り、乱用及び依存してきた物質の渴望、及び気分障害の少なくとも一つの物質乱用及び依存の症状を軽減する。ある態様では、化合物Aによる患者において、再発相における治療により離脱症状を軽減する。ある態様では、化合物Aを投与することにより、再発相にある患者にとってストレスのたまる出来事による乱用物質の渴望を減少させることができる。

30

【0053】

物質乱用、依存、離脱の治療は、相に従い行われる。ある態様では、患者が物質を使用しない最初の期間は、化合物Aによる治療の開始前が好ましい。ある態様では、最初は、化合物Aを低容量で投与する。ある態様では、望ましい治療効果が見られるまでは、投与量を上げていく。ある態様では、患者の症状、副作用及び物質の渴望を最小限にするという病態の治療に最適な投与量を決定するために化合物Aの投与量を上げていく。

40

【0054】

ある態様では、化合物Aによる治療が回復を促進する。ある態様では、化合物Aの投与量は、患者に回復が見られた後は、変わらない又は徐々に減らす。

【0055】

50

本発明は、少なくとも一つの物質からの、乱用、依存又は離脱の少なくとも一つの症状に罹り又は罹る可能性のある患者の治療方法を提供する。方法には、患者に治療上の有効量の化合物Aを投与することを含む。ある態様では、依存薬物及び治療薬から選択される少なくとも一つの物質がある。ある態様では、依存薬物は、神経刺激剤、オピオイド、幻覚剤、吸入剤、鎮静剤、精神安定剤、睡眠剤、抗不安剤、及び違法薬物から選択される。ある態様では、神経刺激剤は、-フェニルイソプロピルアミン誘導体である。ある態様では、-フェニルイソプロピルアミン誘導体は、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、及びメタンフェタミンから選択される。ある態様では、神経刺激剤は、エクスター、フェンメトラジン、メチルフェニデート、ジエチルプロピオン、ペモリン、マジンドール、(-)カチノン、及びフェンフルラミンから選択される。ある態様では、オピオイドは、ロータブ、トラマドール、ヘロイン、メタドン、ヒドロコドン、及びオキシコドンから選択される。ある態様では、幻覚剤は、シロシビン、幻覚キノコ、リゼルギン酸ジエチルアミド(LSD)、フェンシクリジン(PCP)、及びケタミンから選択される。ある態様では、吸入剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される。ある態様では、治療薬は、麻酔剤、鎮痛剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、筋弛緩剤、非ステロイド性抗炎症薬、OTC薬、及び抗うつ薬から選択される。ある態様では、依存薬物は、コカイン、アルコール、カフェイン、アヘン、カンナビノイド、カンナビス、ベンゾジアゼピン、カリソプロドール、タバコ、ニコチン、バイコジン、ローセット、ペルコセット、ペルコダン、及びタイロックスがある。ある態様では、依存薬物はコカインであり、化合物Aが患者のコカイン乱用及び依存の症状である、注意欠陥・多動性障害；多幸感；活力、興奮、及び社会性の増加；空腹感及び疲労の減少；身体的及び精神的な感受性の顕著な増加；痛みの減少；気管支炎；息切れ；胸痛；動悸；不整脈；心筋症；心臓発作；瞳孔散大；吐き気；嘔吐；頭痛；回転搖性目眩；動搖性目眩；不安；精神病；錯乱；鼻粘膜炎症；鼻粘膜痂皮；反復性鼻血；鼻づまり；顔面痛；情動不安；及びコカインの渴求の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、依存薬物はコカインであり、化合物Aがコカイン乱用及び依存の陰性自覚症状を増加させる。ある態様では、依存薬物はコカインであり、化合物Aは、疲労、喜びの欠如、抑鬱、興奮、睡眠障害、食欲増加、精神運動遅延、動搖、過剰な疑い深さ、及びコカインの渴求から選択されるコカイン離脱症状を減少させる。ある態様では、化合物Aによる治療により、患者の、注意欠陥・多動性障害IV評価尺度(AHD-IV)、ハミルトン鬱病評価尺度(HAM-D)、ハミルトン不安評価尺度(HAM-A)、ベック抑鬱評価尺度(BDI)、神経精神科検査によるやる気スコア、及び認知機能検査スケールの値の少なくとも一つを改善する。ある態様では、認知機能評価尺度は、ウェクスラー成人知能検査-改訂版(WAIS-R)、ウェクスラー記憶検査-改訂版(WMS-R)、レイの聴覚性言語性記憶の検査(RAVLT、試行I-VII)、レイの視覚認知能力検査(RCFT)、及びトレイルマイキングテスト(TMT、A及びB部)から選択される。ある態様では、化合物Aは、患者による物質の使用量及び頻度の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、化合物Aは、患者による少なくとも一つの物質による乱用、依存又は離脱症状の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、化合物Aは、職場、学校、又は家庭において義務の重要な役割を履行することができないことによる物質の使用の再発；身体的に有害な状況における物質の使用の再発；物質に関連する法的な問題による再発；及び、乱用物質の影響により社会的又は対人的な問題が継続又は再発するにもかかわらず行うコカインの継続的な使用から選択される、患者において再発した物質乱用の少なくとも一つの症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、耐性；離脱；乱用物質は、しばしば想定されていたよりも大用量又は長期間にわたって摂取されること；乱用物質の制御への継続的な望み及び/又は成功しない努力があること；乱用物質の取得活動、物質の使用、又はその影響からの回復に多大な時間が費やされること；乱用物質の使用のために、重要な社会的、職業的又は娯楽の活動を諦め

10

20

30

40

50

、及び／又は減らすこと；及び、物質により発生又は悪化させると考えられている継続的に及び／又は再発する身体的及び／又は精神的問題であることを知つてゐながら、物質の使用を続けてしまうことから選択される少なくとも一つの物質依存による症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、患者の回復を促進する。ある態様では、回復は、短期間の完全回復、短期間の部分的回復、持続的な完全回復、及び持続的な部分的回復により特徴づけられる。ある態様では、化合物Aは、患者において再発までの期間を引き延ばす。ある態様では、方法は、随伴性マネジメント及び認知行動療法の少なくとも一つの治療をさらに含む。ある態様では、方法はさらに、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）、セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（SNRI）、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（NRI）、ノルエピネフリン・ドパミン再取り込み阻害剤（NDRI）、セロトニン5-ヒドロキシトリプタミン1A（5HT1A）受容体アンタゴニスト、ドパミン-ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシンA_{2A}受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）、モノアミンオキシダーゼB阻害剤、ナトリウムチャネルプロッカー、カルシウムチャンネルプロッカー、中枢及び末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、NK-1受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子（CRF）アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤／抗精神病薬、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、-アミノ酪酸（GABA）アゴニスト、GABA代謝酵素阻害剤、GABA合成活性化剤、部分ドパミンD₂アゴニスト、ドパミン代謝酵素阻害剤、カテコール-O-メチル-トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニスト、5HT₁受容体部分アゴニスト、セロトニン5HT₂受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、パロキセチン、セルトラリン、シタロプラム、エスシタロプラム、及びフルオキセチンから選択されるSSRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、デュロキセチン、ミルタザピン、及びベンラファキシンから選択されるSNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ブプロピオン及びアトモキセチンから選択されるNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、NDRIであるブプロピオンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン-ヒドロキシラーゼ阻害剤はジスルフィラムである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アデノシンA_{2A}受容体アンタゴニストであるイストラデフィリンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、及びバルプロ酸から選択されるナトリウムチャネルプロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニモジピン、ラモトリジン、及びカルバマゼピンから選択されるカルシウムチャンネルプロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢及び末梢アドレナリン受容体アンタゴニストであるプラゾシンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢アドレナリン受容体アゴニストであるクロニジンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢又は末梢アドレナリン受容体アンタゴニストであるプロプラノロールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ブプロピオン、オランゼピン、リスペリドン、及びクエチアピンから選択される非典型的抗うつ剤／抗精神病薬である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アミトリプチリン、アモキサピン、デシプラミン、ドキセピン、イミプラミン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、及びトリミプラミントリミプラミンから選択される三環性抗うつ薬である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、フェニトイイン、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、バルプロ酸、トピラメート、チアガピン、ビバガトリン、及びレベチラセタムから選択される抗けいれん剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、グルタミン酸アンタゴニストであるトピラメートである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、バクロフェン、バルプロ酸、及びトピラメートから選択さ

10

20

30

40

50

れる GABA アゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン代謝酵素阻害剤であるカルビドパである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン D₂ 受容体部分アゴニストであるアリピプラゾールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ナルトレキソン及びナロキソンから選択されるオピオイド受容体アンタゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、カルバマゼピン及びリチウムから選択される気分安定剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン、プロモクリプチン、ペルゴリド、アマンタジン、マジンドール、及びメチルフェニデートから選択される直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニストである。ある態様では、少なくとも他の薬剤は、5HT₁ 受容体部分アゴニストであるゲピロンである。ある態様では、少なくとも他の薬剤は、セロトニン 5HT₂ 受容体アンタゴニストであるリタンセリンである。ある態様では、少なくとも他の薬剤は、オピオイドであるメタドンである。ある態様では、少なくとも他の薬剤は、オピオイド受容体部分アゴニストであるブプレノルフィンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニコチン受容体部分アゴニストであるチャンピックスである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される吸入剤である。ある態様では、方法は、ベンゾジアゼピン、レボドパ、カリソプロドール、モダフィニル、アカンプロセート、-ブチロラクトン、-ヒドロキシ酪酸、アヘン、シロシбин、幻覚キノコ、タバコ、及びニコチンから選択される少なくとも一つの他の薬剤を、治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、化合物 A は、物質を禁断中の期間経過後に患者に投与される。ある態様では、化合物 A を治療上の有効量を、治療効果が見られるまで増量して患者に投与する。ある態様では、化合物 A の用量は、回復してから減少させる。ある態様では、化合物 A の用量は、回復してからも変化がない。

【0056】

本発明は、患者における少なくとも一つの物質における少なくとも一つの物質依存相を治療するための方法も提供する。ある態様では、少なくとも一つの物質依存相は、獲得、維持、消滅、及び再発から選択される。方法は、患者に化合物 A の治療上の有効量を投与することを含む。ある態様では、化合物 A は、患者における獲得相の進行を阻害する。ある態様では、化合物 A は、患者における消滅相の進展を促進する。ある態様では、化合物 A は、患者における再発の回数を減少する。ある態様では、少なくとも一つの物質から依存薬物及び治療薬から選択される物質である。ある態様では、依存薬物は、神経刺激剤、オピオイド、幻覚剤、吸入剤、鎮静剤、精神安定剤、睡眠剤、抗不安剤、及び違法薬物から選択されるものである。ある態様では、神経刺激剤は、-フェニルイソプロピルアミン誘導体である。ある態様では、-フェニルイソプロピルアミン誘導体は、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、及びメタンフェタミンから選択されるものである。ある態様では、神経刺激剤は、エクスタシー、フェンメトラジン、メチルフェニデート、ジエチルプロピオン、ペモリン、マジンドール、(-)カチノン、及びフェンフルラミンから選択されるものである。ある態様では、オピオイドは、ロータブ、トラマドール、ヘロイン、メタドン、ヒドロコドン、及びオキシコドンから選択されるものである。ある態様では、幻覚剤は、シロシбин、幻覚キノコ、リゼルギン酸ジエチルアミド (LSD)、フェンシクリジン (PCP)、及びケタミンから選択されるものである。ある態様では、吸入剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択されるものである。ある態様では、治療薬は、麻酔剤、鎮痛剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、筋弛緩剤、非ステロイド性抗炎症薬、OTC 薬、及び抗うつ薬から選択されるものである。ある態様では、依存薬物は、アルコール、カフェイン、アヘン、カンナビノイド、カンナビス、ベンゾジアゼピン、カリソプロド

10

20

30

40

50

ール、タバコ、ニコチン、バイコジン、ローセット、ペルコセット、ペルコダン、及びタイロックスから選択されるものである。ある態様では、化合物Aの処方により、患者の、ADHD-IV、HAM-D、HAM-A、BDI、神経精神病による無気力評価尺度、及び認知機能評価尺度のスコアの少なくとも一つを改善する。ある態様では、認知機能評価尺度は、WAIS-R、WMS-R、RAVLT、試行I-VII、RCFT、及びTMT、A及びB部から選択される。ある態様では、化合物Aは、患者において少なくとも一つの物質の使用量及び頻度の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、化合物Aは、患者における少なくとも一つの物質による乱用、依存又は離脱症状の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、化合物Aは、職場、学校、又は家庭において重要な役割を履行することができないことによる物質の使用の再発；身体的に有害な状況における物質の使用の再発；物質に関連した法的な問題による再発；及び、乱用物質の影響により起き又は悪化した社会的又は対人的な問題が継続又は再発するにもかかわらず行う物質の継続的な使用の再発から選択される、患者による物質乱用の少なくとも一つの症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、耐性；離脱；乱用物質は、しばしば想定されていたよりも大量又は長期間にわたって摂取されること；乱用物質の使用を減少し又は制御することへの継続的な望み及び／又は成功しない努力すること；乱用物質の取得活動、物質の使用、及びその影響からの回復の少なくとも一つの活動に多大な時間が費やされること；乱用物質の使用のために、重要な社会的、職業的又は娯楽の活動を諦め、及び／又は減らすこと；及び、物質により発生又は悪化させると考えられている継続的に及び／又は再発する身体的及び／又は精神的問題であることを知っているながら、物質の使用を続けてしまうことから選択される少なくとも一つの物質依存による症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、患者の回復を促進する。ある態様では、回復は、短期間の完全回復、短期間の部分的回復、持続的な完全回復、及び持続的な部分的回復の少なくとも一つにより特徴づけられる。ある態様では、化合物Aは、患者において再発までの期間を引き延ばす。ある態様では、方法は更に、予備的マネジメント及び認知行動療法の少なくとも一つにより治療することを含む。ある態様では、方法はさらに、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(SNRI)、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤(NRI)、ノルエピネフリン・ドパミン再取り込み阻害剤(NDRI)、セロトニン5-ヒドロキシトリプタミン1A(5HT1A)受容体アンタゴニスト、ドパミン・ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシンA2A受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤(MAOI)、モノアミンオキシダーゼB阻害剤、ナトリウムチャネルブロッカー、カルシウムチャンネルブロッカー、中枢及び末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、NK-1受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子(CRF)アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤／抗精神病薬、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、-アミノ酪酸(GABA)アゴニスト、GABA代謝酵素阻害剤、GABA合成活性化剤、部分ドパミンD2アゴニスト、ドパミン代謝酵素阻害剤、カテコール-O-メチル-トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニスト、5HT1受容体部分アゴニスト、セロトニン5HT2受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、パロキセチン、セルトラリン、シタロプラム、エスシタロプラム、及びフルオキセチンから選択されるSSRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、デュロキセチン、ミルタザピン、及びベンラファキシンから選択されるSNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ブプロピオン及びアトモキセチンから選択されるNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、NDRIであるブプロピオンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン・ヒドロキシラーゼ阻害剤はジスルフィラムである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アデノシンA2

10

20

30

40

50

A受容体アンタゴニストであるイストラデフィリンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、及びバルプロ酸から選択されるナトリウムチャネルブロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニモジピン、ラモトリジン、及びカルバマゼピンから選択されるカルシウムチャンネルブロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢及び末梢アドレナリン受容体アンタゴニストであるプラゾシンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢アドレナリン受容体アゴニストであるクロニジンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢又は末梢アドレナリン受容体アンタゴニストであるプロプラノロールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、プロピオノン、オランゼピン、リスペリドン、及びクエチアピンである非典型的抗うつ剤/抗精神病薬である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アミトリプチリン、アモキサピン、デシプラミン、ドキセピン、イミプラミン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、及びトリミプラミントリミプラミンから選択される三環性抗うつ薬である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、フェニトイン、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、バルプロ酸、トピラメート、チアガピン、ビバガトリン、及びレベチラセタムから選択される抗けいれん剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、グルタミン酸アンタゴニストであるトピラメートである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、バクロフェン、バルプロ酸、及びトピラメートから選択されるGABAアゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン代謝酵素阻害剤であるカルビドバである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミンD₂受容体部分アゴニストであるアリピラゾールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ナルトレキソン及びナロキソンから選択されるオピオイド受容体アンタゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、カルバマゼピン及びリチウムから選択される気分安定剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン、プロモクリプチン、ペルゴリド、アマンタジン、マジンドール、及びメチルフェニデートから選択される直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、5HT₁受容体部分アゴニストであるゲピロンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、セロトニン5HT₂受容体アンタゴニストであるリタンセリンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、オピオイドであるメタドンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、オピオイド受容体部分アゴニストであるブプレノルフィンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニコチン受容体部分アゴニストであるチャンピックスである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される吸入剤である。ある態様では、方法はさらに、ベンゾジアゼピン、レボドバ、カリソプロドール、モダフィニル、アカンプロセート、-ブチロラクトン、-ヒドロキシ酪酸、アヘン、シロシビン、幻覚キノコ、タバコ、及びニコチンから選択される少なくとも一つの他の薬剤を、治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、化合物Aは、物質の禁断中の期間経過後に患者に投与される。ある態様では、化合物Aを治療上の有効量を、治療効果が見られるまで增量して患者に投与する。ある態様では、化合物Aの用量は、回復してから減少させる。ある態様では、化合物Aの用量は、回復してからも変化がない。

【0057】

本発明は、患者におけるコカイン依存の少なくとも一つの相を治療するための方法も提供する。ある態様では、少なくとも一つの物質依存相は、獲得、維持、消滅、及び再発から選択される。ある態様では、方法は、化合物Aの治療上の有効量を投与することを含む。ある態様では、化合物Aは、患者における獲得相の進行を阻害する。ある態様では、化合物Aは、患者における消滅相の進展を促進する。ある態様では、化合物Aは、患者における再発の回数を減少させる。ある態様では、化合物Aは、患者においてコカインの乱用

10

20

30

40

50

、依存、又は離脱の症状の少なくとも一つを減少させる。ある態様では、化合物Aは、職場、学校、又は家庭において重要な役割を履行することができないことによるコカインの使用の再発；身体的に有害な状況におけるコカインの使用の再発；コカインに関連した法的な問題による再発；及び、コカインの影響により起き又は悪化した社会的又は対人的な問題が継続又は再発するにもかかわらず行うコカインの継続的な使用の再発から選択される、患者によるコカイン乱用の少なくとも一つの症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、耐性；離脱；乱用物質は、しばしば想定されていたよりも大用量又は長期間にわたって摂取されること；コカインの使用を減少し又は制御することへの継続的な望み及び／又は成功しない努力をすること；コカインの取得活動、コカインの使用、及びその影響からの回復の少なくとも一つの活動に多大な時間が費やされること；コカインの使用のために、重要な社会的、職業的又は娯楽の活動を諦め、及び／又は減らすこと；及び、コカインの使用により継続的に又は再発すると考えられている身体的又は精神的問題が発生又は悪化するらしいことを知つていながらコカインの使用を続けてしまうこと、から選択される少なくとも一つのコカイン依存による症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、注意欠陥・多動性障害；多幸感；活力、興奮、及び社会性の増加；空腹感及び疲労の減少；身体的及び精神的な感受性の顕著な増加；痛みの減少；気管支炎；息切れ；胸痛；動悸；不整脈；心筋症；心臓発作；瞳孔散大；吐き気；嘔吐；頭痛；回転搖性目眩；動搖性目眩；不安；精神障害；錯乱；鼻粘膜炎症；鼻粘膜痂皮；反復性鼻血；鼻づまり；顔面痛；情動不安；及びコカインの渴望から選択されるコカイン乱用及び依存の少なくとも一つの症状を減少させる。ある態様では、化合物Aは、コカイン乱用及び依存の陰性自覚症状の少なくとも一つを増加させる。ある態様では、化合物Aは、患者の回復を促進する。ある態様では、回復は、短期間の完全回復、短期間の部分的回復、持続的な完全回復、及び持続的な部分的回復により特徴づけられる。ある態様では、化合物Aは、患者において再発までの期間を引き延ばす。ある態様では、方法は、随伴性マネジメント及び認知行動療法の少なくとも一つの治療をさらに含む。ある態様では、方法はさらに、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）、セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（SNRI）、ノルエピネフリン再取り込み阻害剤（NRI）、ノルエピネフリン・ドバミン再取り込み阻害剤（NDRI）、セロトニン5-HT1A受容体アンタゴニスト、ドバミン-ヒドロキシラーゼ阻害剤、アデノシン受容体アンタゴニスト、アデノシンA2A受容体アンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤（MAOI）、モノアミンオキシダーゼB阻害剤、ナトリウムチャネルプロッカー、カルシウムチャンネルプロッcker、中枢及び末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、中枢アドレナリン受容体アゴニスト、中枢又は末梢アドレナリン受容体アンタゴニスト、NK-1受容体アンタゴニスト、コルチコトロピン放出因子（CRF）アンタゴニスト、非典型的抗うつ剤／抗精神病薬、三環系抗うつ剤、抗けいれん剤、グルタミン酸アンタゴニスト、-アミノ酪酸（GABA）アゴニスト、GABA代謝酵素阻害剤、GABA合成活性化剤、部分ドバミンD2アゴニスト、ドバミン代謝酵素阻害剤、カテコール-O-メチル-トランスフェラーゼ阻害剤、オピオイド受容体アンタゴニスト、気分安定剤、直接的又は間接的ドバミン受容体アゴニスト、5-HT1受容体部分アゴニスト、セロトニン5-HT2受容体アンタゴニスト、オピオイド、カルボキシラーゼ阻害剤、オピオイド受容体部分アゴニスト、ニコチン受容体部分アゴニスト、及び吸入剤から選択される少なくとも一つの他の薬剤の治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、パロキセチン、セルトラリン、シタロプラム、エスシタロプラム、及びフルオキセチンから選択されるSSRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、デュロキセチン、ミルタザピン、及びベンラファキシンから選択されるSNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ブプロピオン及びアトモキセチンから選択されるNRIである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、NDRIであるブプロピオンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドバミン-ヒドロキシラーゼ阻害剤ジスルフィラムである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アデノシンA2A受容体アンタゴニストであるイストラデフィリンであ

10

20

30

40

50

る。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、及びバルプロ酸から選択されるナトリウムチャネルブロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニモジピン、ラモトリジン、及びカルバマゼピンから選択されるカルシウムチャンネルブロッカーである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢及び末梢 アドレナリン受容体アンタゴニストであるプラゾシンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢 アドレナリン受容体アゴニストであるクロニジンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、中枢又は末梢 アドレナリン受容体アンタゴニストであるプロプラノロールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、非典型的抗うつ剤／抗精神病薬プロピオン、オランゼピン、リスペリドン、及びクエチアピン。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、アミトリプチリン、アモキサピン、デシプラミン、ドキセピン、イミプラミン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、及びトリミプラミンから選択される三環性抗うつ薬である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、フェニトイン、ラモトリジン、カルバマゼピン、オキサカルバゼピン、バルプロ酸、トピラメート、チアガビン、ビバガトリン、及びレベチラセタムから選択される抗けいれん剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、グルタミン酸アンタゴニストであるトピラメートである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、バクロフェン、バルプロ酸、及びトピラメートから選択されるGABAアゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン代謝酵素阻害剤であるカルビドバである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミンD₂受容体部分アゴニストであるアリピラゾールである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ナルトレキソン及びナロキソンから選択されるオピオイド受容体アンタゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、カルバマゼピン及びリチウムから選択される気分安定剤である。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ドパミン、プロモクリプチン、ペルゴリド、アマンタジン、マジンドール、及びメチルフェニデートから選択される直接的又は間接的ドパミン受容体アゴニストである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、5HT₁受容体部分アゴニストであるゲピロンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、セロトニン5HT₂受容体アンタゴニストであるリタンセリンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、オピオイドであるメタドンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、オピオイド受容体部分アゴニストであるブプレノルフィンである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ニコチン受容体部分アゴニストであるチャンピックスである。ある態様では、少なくとも一つの他の薬剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペンタフルオロトルエン、ペンタフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択される吸入剤である。ある態様では、方法は、ベンゾジアゼピン、レボドバ、カリソプロドール、モダフィニル、アカンプロセート、-ブチロラクトン、-ヒドロキシ酪酸、アヘン、シロシбин、幻覚キノコ、タバコ、及びニコチンから選択される少なくとも一つの他の薬剤を、治療上の有効量を同時投与することを含む。ある態様では、化合物Aは、物質の禁断中の期間経過後に患者に投与される。ある態様では、化合物Aを治療上の有効量を、治療効果が見られるまで增量して患者に投与する。ある態様では、化合物Aの用量は、回復してから減少させる。ある態様では、化合物Aの用量は、コカイン依存から回復してからも変化がない。ある態様では、化合物Aは、患者の二次的物質による乱用、依存、又は離脱症状の少なくとも一つを治療する。ある態様では、少なくとも一つの二次的物質は、乱用薬物及び治療薬から選択されるものである。ある態様では、依存薬物が、神経刺激剤、オピオイド、幻覚剤、吸入剤、鎮静剤、精神安定剤、睡眠剤、抗不安剤、及び違法薬物から選択されるものである。ある態様では、神経刺激剤は、-フェニルイソプロピルアミン誘導体である。ある態様では、-フェニルイソプロピルアミン誘導体は、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、及びメタンフェタミンから選択されるものである。ある態様では、神経刺激剤は、エクスタシー、フェンメトラジン、メチルフェニデート、ジエチルプロピ

10

20

30

40

50

オン、ペモリン、マジンドール、(-)カチノン、及びフェンフルラミンから選択されるものである。ある態様では、オピオイドは、ロータブ、トラマドール、ヘロイン、メタドン、ヒドロコドン、及びオキシコドンから選択されるものである。ある態様では、幻覚剤は、シロシビン、幻覚キノコ、リゼルギン酸ジエチルアミド(LSD)、フェンシクリジン(PCP)、及びケタミンから選択されるものである。ある態様では、吸入剤は、ベンゼン、トルエン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、フルオロベンゼン、o-ジフルオロベンゼン、1、3、5-トリフルオロベンゼン、1、2、4-トリフルオロベンゼン、ペントフルオロトルエン、ペントフルオロベンゼン、及びペルフルオロベンゼンから選択されるものである。ある態様では、治療薬は、麻酔剤、鎮痛剤、抗コリン剤、抗ヒスタミン剤、筋弛緩剤、非ステロイド性抗炎症薬、OTC薬、及び抗うつ薬から選択されるである。ある態様では、乱用薬物は、アルコール、カフェイン、アヘン、カンナビノイド、カンナビス、ベンゾジアゼピン、カリソプロドール、タバコ、ニコチン、バイコジン、ローセット、ペルコセット、ペルコダン、及びタイロックスである。

10

【0058】

薬学的に許容される誘導体は、酸、塩基、エノールエーテル、及びエステル、エステル、水和物、溶媒和物、及びプロドラッグの形態が含まれる。誘導体は、例えば、対応する中性薬剤の少なくとも一つの性質において薬物動態学的性質が優れたものが選択される。化合物Aは、製剤化の前に誘導体化されていてもよい。

20

【0059】

化合物A又は薬学的に許容される誘導体の治療上の有効量は、中毒又は依存の重症度、依存、年齢及び患者の健康度合い、使用されてきた化合物の効力、及びその他の因子に依存して様々である。ある特定の態様では、治療上の有効量は、約0.1ミリグラム/(体重)kg(mg/kg)/日ないし約50mg/(体重)kg/日である。他の態様では、用量は、約1.0ないし約10mg/kg/日である。それゆえ、ある態様では、70kgのヒトにおける治療上の有効量は、約7.0ないし約3500mg/日であり、他のある態様では、約70ないし約700mg/日である。

20

【0060】

そのような疾患を治療の当該技術分野における通常の熟練者は、必要以上の試験を行うことなく、及び自分の知識や適用説明書に基づいて、中毒又は依存の治療又は予防のための化合物Aの治療上の有効量を確定することができる。一般には、一例として、これに限定されることなく、化合物Aは、医薬組成物として以下の経路によって投与される。経口、全身性(例えば、経皮、鼻腔内又は坐剤によって)又は非経口(例えば、筋肉内、静脈内又は皮下)である。医薬組成物は、一例として、これに限定されることなく、錠剤、丸薬、カプセル剤、半固体、散剤、持続性放出製剤、溶液、懸濁液、エリキシル剤、エアロゾル、又は、他のあらゆる適切な組成物の形態をとることができ、及びこれらは、一般に、化合物Aと少なくとも一つの薬学的に許容される賦形剤と併用される。許容される賦形剤は、一例として、これに限定されることなく、非毒性、投与補助剤、及び化合物の治療効果に悪影響を与えるようなものでない化合物である。そのような賦形剤は、例えば、あらゆる、固体、液体、半固体、又は、エアロゾルの場合には、当該技術分野における熟練者が一般に入手できるガス状の賦形剤であってもよい。

30

【0061】

固体の医薬賦形剤は、一例として、これに限定されることなく、デンプン、セルロース、タルク、グルコース、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、白墨、シリカゲル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、塩化ナトリウム、脱脂粉乳等がある。液体及び半固体の賦形剤は、水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール及び石油、動物性、植物性、又は合成油脂(例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等)を含む様々な油脂から選択されるものを含む。好ましい液体の担体は、特に注射用溶液としては、一例として、これに限定されることなく、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及びグリコール類がある。圧縮ガスをエアロゾル

40

50

形態の化合物の分散に用いてもよい。不活性ガスが適切であり、その目的に用いられる一例として、これに限定されることなく、窒素、一酸化炭素、亜酸化窒素等がある。

【0062】

医薬製剤は、一例として、これに限定されることなく、さらに保存剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、香料、浸透圧を調節する塩、緩衝剤、マスキング剤又は抗酸化剤を含んでいてもよい。ある特定の態様では、更に他の治療に有効な物質を含んでいてもよい。他の適切な医薬担体及びその剤形は、A. R. Alfonso Remington's Pharmaceutical Sciences 1985, 17th ed., Easton, Pa.: Mack Publishing Company に記載されている。

10

【0063】

組成物中の化合物Aの用量は、例えば、剤形、投与単位の用量、賦形剤の種類、及び医薬品科学における当該技術分野における者に知られている他の因子により、様々である。一般に、最終組成物は、10%（重量）ないし90%（重量）が化合物であり、好ましくは25%（重量）ないし75%（重量）であり、残部に賦形剤を含む。好ましくは、医薬組成物は、継続的な治療においては単一の投与ユニットの形態によって投与され、又は、症状の緩和が特に必要な場合に投与する際に、単一の投与ユニットの形態で投与される。

【実施例1】

【0064】

[¹⁴C] - ネピカスタッフの経口投与後、血漿中において、放射性同位体の大部分はネピカスタッフのN-結合グルクロニド（代謝物2、M2）に付随したが、同定できない極性断片（M1）が存在した。複数回投与においてもネピカスタッフの顕著な凝集は見られずT_{1/2}は、単回及び複数回投与において同様であった。T_{1/2}は10 - 14時間であった。速いアセチレーター表現型及び遅いアセチレーター表現型の間でC_{max}又はAUCの有意差は見られなかつたが、N-アセチル代謝物のC_{max}又はAUCは予想通り、速いアセチレーターに比べ、遅いアセチレーターではずっと低い値となつた。絶食及び食後の40mg錠剤の服用による薬物動態を比較すると、血漿中濃度の有意差は見られなかつた。T_{ax}は絶食では1.4時間だったのに対し、食後の服用では3.5時間に増加した。

20

【0065】

男性及び女性において40mgを単回投与した場合のネピカスタッフの薬物動態を比較した。AUCは約43%女性の方が男性よりも大きく、C_{max}は約23%女性の方が男性よりも大きかつた。T_{1/2}は、女性の方が男性よりも長かつた。ネピカスタッフ40mg投与後10日の薬物動態は、T_{1/2}には違いはなかつたが、AUCは健常者の方がCHEFの患者よりも高かつた。いずれの集団においても、複数回投与による顕著な蓄積はなかつた。

30

【0066】

ヒトにおいて、化合物に関連する放射能は、速やかに消失した。87.4%の投与された放射性標識体は、最初の72時間で82.4%が尿中に、及び5.01%が糞便中に回収された。10日間で、合計平均93.8%の放射性標識体が排泄された。血漿中、放射性同位体のT_{ax}は1 - 2時間（ネピカスタッフと同様である）であった。速い及び遅いアセチレーターのいずれにおいても、ネピカスタッフのN-結合グルクロニドは、0ないし48時間以上にわたり、血漿（26.8%）及び尿中（57.9%）に合計の放射性同位体は、もっとも大きな率で存在していた。血漿中の合計の放射性同位体の末端T_{1/2}は非常に長く（～100時間）、遅く消失する低濃度の極性断片の存在によるものと考えられる。

40

【実施例2】

【0067】

ネピカスタッフの認知機能への影響を調べるため、被験者に5又は40mgのネピカスタッフを投与したが、気分、睡眠、又は認知において顕著な障害はなかつた。甲状腺にお

50

ける^{1 2 3} I の取り込みを調べるために、5、40、及び 100 mg のネピカスタッフを投与したが、プラセボに対して有意差はなかった。単回で 200 mg のネピカスタッフの投与後、取り込みの減少は、プラセボに対して有意となつたが、10 mg のメチマゾール投与後におけるものよりは顕著に低かった。第 I 相臨床試験における単回投与試験において、5ないし 800 mg (塩酸塩として計算) のネピカスタッフの投与は、全般に健常者の男性において、耐性の値は良好であった。

【実施例 3】

【0068】

第 I 相臨床試験における複数回投与において、5 及び 40 mg のネピカスタッフの投与は、健常者の男性において、耐性の値は良好であった。

10

【0069】

8 日間以上 200 mg を投与した者 6 人中 5 人は、自然に湿疹が現れた。

【0070】

6 日間 200 mg のネピカスタッフ投与後に、1 人は心房不整脈及び断続的な右脚ブロックを形成した。

【実施例 4】

【0071】

16 人の治療を希望しないコカイン依存の入院患者のボランティアを、二重盲検、対象者内のプラセボコントロールと対比し、試験した。インフォームドコンセントを行った後、参加の可能性のあるボランティアは、外来患者用の精神医学上の及び医学上のスクリーニングを行った。適格性を有するボランティアを選び、身体検査、EKG、妊娠試験及び精神医学上の試験を完了した。参加者 (n = 12) は、毎日、投与量を増加させてコカイン投与を受け (0 mg 、 10 mg 、 20 mg 、及び 40 mg) 、ネピカスタッフを增量する增量法を用いて行った (0 mg 、 80 mg 、 160 mg) 。並行群の参加者 (n = 4) は、試験中盲検試験を保つため、毎日、プラセボを処置された。それぞれの用量を処置する段階において、毎日 4 日間に渡り、又はネピカスタッフの半減期の 4 倍以上の 10 ないし 14 時間間隔で投与した。それぞれの用量において 4 日目には、参加者は、コカインを 0 mg 、 10 mg 、 20 mg 、及び 40 mg の順に投与を受けた。コカインは、心血管及び主観的な効果の両方がベースラインに戻るのに十分な 1 時間間隔で投与した。心血管の指標は、継続的な EKG を用いて注意深くモニターし、コカインの投与を含む全ての過程を通じて頻繁に血圧を測定し、及び、停止パラメータを適切に設定し、あらかじめセットされた心血管の指標の限界を超える場合には、コカインを投与しないようにした。以前の試験において、コカイン 32 mg を 6 回の投与し、14 分の間隔で投与することが安全であり、投与間隔が 1 時間であれば、更に安全性が高いことが示されている。10 mg のコカイン投与の薬物動態の分析のため、投与から 3 日目に 0 mg ネピカスタッフ及び、3 日目に 80 mg 及び 160 mg のネピカスタッフを投与したもののが血液サンプルを集めた。得られた情報からは、相互作用は考えられない。

20

【0072】

それぞれの参加者は、試験が完了するまでに、約 12 日間かかる。16 人の参加者は、試験を 1 年以内に完了する。

40

【0073】

試験に参加するには、参加者は：

- 1 . 試験の時点では治療を必要としていない、英語を話すボランティアであること；
- 2 . 18 - 55 歳であること；
- 3 . コカイン依存の DSM - I V TR 基準を満たすこと；
- 4 . 自己申告書において静注によるコカイン使用及び少なくとも一つのコカイン使用による陽性尿があったこと；
- 5 . 生体情報として、安静時の脈拍が 50 及び 95 bpm の間にあり、血圧が 85 - 150 mmHg (最高血圧) 及び 45 - 96 mmHg (最低血圧) であること；この基準は、承認の 2 日前に満たさなければならない；

50

6. 血液及び化学物質検査において正常値の範囲内にあること (+/- 10%) 制限には以下の例外がある：a) 肝臓機能検査値（総ビリルビン、ALT、AST、及びアルカリホスファターゼ）< 正常値の3倍まで、及び b) 腎機能検査値（クレアチニン及びBUN）< 正常値の2倍まで；

7. 臨床的に正常な洞律動を示す EKG ベースラインを有すること、及び臨床的に顕著な不整脈を有しないこと；

8. 治療履歴を持ち、簡単な医師の試験により、許可した医師及び治験責任医師の判断において、試験の参加に臨床的に顕著な禁忌がないこと。

【0074】

参加予定者は、以下のいずれかに該当すると、参加できない：

10

1. てんかん発作の病歴又は疑いのある事実又は脳障害；

2. 以前に、意識消失、胸痛、又はてんかん発作を含みコカインに対する医学的副作用があつたこと；

3. 神経又は精神障害、例えば；

・精神障害、双極性疾患又はSCIDにより大うつと診断されたこと；

・臨床面接において器質性脳疾患又は痴呆と判断されたこと；

・現在治療が必要又は試験のコンプライアンスが困難になるであろう何らかの精神疾患の病歴があること；

・自殺を試みた経歴があること、及び／又は、SCIDにより現在自殺願望／計画を持っていると評価されたこと；

20

4. 参加予定者が降圧薬を服用しているにもかかわらず、臨床的に重篤な心臓病又は高血圧であるとPIにより判断されたこと；

5. 一親等以内の親族に早期の心血管疾患の有病又は死亡の家族歴があるとPIにより判断されたこと；

6. 神経内分泌系、自己免疫系、腎臓系、肝臓系、又は活動性感染症を含む未治療または不安定な疾患の事実があること；

7. HIV感染者であり現在症状があること、AIDSと診断されたこと、又は高レトロウイルス薬の投与を受けていること；

30

8. 妊娠又は授乳中であること。それ以外の女性は妊娠できない（例えば、外科的に不妊とした、不妊症、又は閉経後であること）、又は信頼できる形態の避妊を行っていること（例えば、禁欲していること、経口避妊薬、子宮内避妊器具、コンドーム、又は殺精子剤）。全ての女性は、病院の許可の前及び試験参加の終わりにおいて、尿による妊娠検査で、陰性でなければならない。

9. 喘息であること、又は現在 又は アゴニスト、テオフィリン、又は他の交感神経様作用薬を使用していること；

10. PI及び／又は許可する医師が安全に及び／又はうまく試験を完了させるには除外した方がよいと判断した他の疾患、病態を持つ、又は向精神薬を使用している者。

兆候が見え始めた時点で中止する基準

40

11. 薬物のスクリーンで、コカインの違法使用を示す場合、コカイン、アルコール、オピオイド、又は他の乱用薬物で本プロトコールの一環として得られたものでないものについて尿が陽性、又は呼気検査で検出されたこと；

12. 試験の手続に従えない者；

13. コカインに過剰に反応することにより以下の基準に該当する場合。

中止の基準

【0075】

参加者は、プロトコールに残るには、継続的に基準に適合していかなければならない。顕著な不整脈又は生体情報が以下の許容範囲外にある場合には、コカイン投与を開始してはならない。安静時脈拍は、< 130 bpm、及び血圧が 165 mmHg (最高血圧) 及び 100 mmHg (最低血圧) 以下であること。コカイン投与を受けて、生体情報が一過性の増加をすることはありうるため、これらの値は、治験に含むか／含まないかの基準値よ

50

りも高い。加えて、コカインの繰り返し投与は、コカイン毒性の兆候（動搖、精神障害、試験の手続に協力できないこと）がある場合には行わない（及び、治験医がコカインの投与を中止する）。

以後の参加を中止する基準

【0076】

以下のいずれかの兆候が現れた場合には、中止する。

- 1 . 最高血圧 B P > 180 mmHg が 5 分間以上続いたこと；
- 2 . 最低血圧 B P > 120 mmHg が 5 分間以上続いたこと；
- 3 . 心拍 > (220 - 年齢 × 0.85) bpm が 5 分間以上続いたこと。

患者選別基準の論理的根拠

10

【0077】

参加者は、より強力な内受容効果を受けることを避けるため、静注によるコカイン投与を受ける必要がある。判断未確定の心血管系疾患の患者の参加を避けるため、年齢の基準はあらかじめ定めていた。潜在的な基礎疾患の悪化を防ぐため活動性 H I V 疾患の参加者は除いた；コカイン依存により高いリスクを負う無症候性 H I V 疾患の患者もこの中に含めた。喘息患者（又は喘息治療薬服用者）は、アゴニスト薬及びコカインの有害な相互作用の可能性のために除いた。

治験薬

【0078】

コカインは、D A / N E 、及びセロトニンのシナプス前小胞への取り込みを阻害することによる典型的な神経作動効果を有する。コカインは約 90 分という短い排泄半減期を持つ。コカインの主な臨床効果は、精神運動の活発化及び交感神経系の緊張の増加であり、心拍及び血圧が上昇する事象として現れる。

20

【0079】

コカインは単回投与で上限 40 mgまでの用量で投与され、上限は 13 分間隔で 20 mg の用量を 10 回投与することからなる自己投与で 200 mg まで投与できる。これらの用量は、本試験の参加者が毎日使用していたと報告した用量に比べて、少量である；典型的には、毎日平均 250 mg ないし 500 mg 以上の投与パターンであった。

【0080】

提案した投与量よりもずっと多い用量となると、てんかん発作に関わり、重篤な心血管毒性及び死亡につながる。これらの毒性の可能性は、比較的低用量を用いること、そのおそれのあるボランティアへの注意深いスクリーニングを行うこと、コカイン投与後、参加者への注意深いモニタリングを行うこと、及び有害作用を生じた場合にはすみやかに医学的な介入を行えることにより、改善される。

30

【0081】

コカインは静注により投与されるため、バイオアベイラビリティは完全である。コカインは、まず血漿中エステラーゼによりベンゾイルエクゴニンに代謝され、これはネピカスタッフにより影響を受けるとの報告はない。ベンゾイルエクゴニン、及び他の少量の代謝物は腎排泄される。

【0082】

ヒトへの静注用のコカインは、N I D Aとの契約で得、コカインに関するN I D AのIND承認書はF D Aから得て提出した。

40

【0083】

午前 7 時に、用量を増加させてネピカスタッフ投与する (0 mg 、 80 mg 、及び 160 mg) 。それぞれの投与レベルで 4 日間投与を続ける。

【0084】

低い用量から始め、最初の試験手続を完了した後に用量を増加させることにより、ネピカスタッフ及びコカインの併用のリスクを最小限にする。このアプローチは、これまで 7 %ないし 20 % のボランティアに起こっていた発疹の可能性も減らすことができる。発疹は、用量及び治療期間に関連する。用量が 160 mg を超えると、発疹のリスクが大きく

50

なる。

【0085】

ネピカスタッフは、酵素阻害剤でないため薬物動態学的相互作用は想定していないが、10mgのコカイン投与において行った薬物動態学的評価により、ネピカスタッフのそれぞれの用量レベルにおける投与で3日目に確認できた。ネピカスタッフは、NEの合成を減らすため、ネピカスタッフでの治療中、コカインの効果は小さくなると考えられる。ネピカスタッフは血漿中及び脳内のDA濃度を高めるため、DA介在性の副作用、例えば、被害妄想が起こることが考えられる。これらの症状は、CHFでの試験中には見られなかつたが、これらの試験において刺激薬は投与されなかつた。

【0086】

同意に従い、参加者は、薬物使用を行っている証拠としてコカイン陽性尿サンプルを提出する必要がある。(使用可能な装置の数に限定があるため)ある参加者には、スクリーニング中及び試験中テレメトリーを装着するように指示し、心拍及び動きを記録した。この装置からのデータから、これらのパラメータの変化により薬物使用を特定できる。

【0087】

ニコチンに曝されるのを制限するため、試験前2時間以内は、コカイン摂取又は暴露に関わる喫煙は禁止される。参加者は、試験期間中、違法な及び処方による薬物の使用は控えるように指示され、これは毎日の尿及び呼気中のアルコールレベルによって確認される。

【0088】

参加者は、検査期間中、その日のだいたい同じ時間に服用するように指示されている。コカインは検査室で投与される。2分以上かけて、コカイン又は生理食塩水のプラセボを、シリンジポンプを用いて投与する。薬物投与の1時間後、心拍及び血圧をモニターした。

【0089】

参加者は目的の治療を受け、身体検査を受ける。血液は、CBC、電解質、LFT、及びクレアチニンを含む標準的検査のために、採取される。HIVスクリーニングは、参加者にサービスとして行われ、陽性の者はカウンセリングし、治療について言及した。

【0090】

(使用可能な装置の数に限定があるため)アクチハートミニミッター(Actihearth Mini Mitter)を用いて、ある参加者は参加許可の前に心拍及び動きを測定した。ミニミッターは、参加者の皮膚にペーストを用いて付着し、2週間までの期間で、侵襲なしにEGK及び動きを記録した。データは後の分析のためにPCにダウンロードできる。

【0091】

参加者は、精神疾患簡易構造化面接法(MINI)による、参加/排除の基準により決定されるコカイン及びニコチン依存のDSM-IV TR基準を満たさなければならない。MINIは、1990年に米国及び欧州で精神科医及び臨床医によってDSM-IV TR及びICD-10精神疾患のために開発された短い、構造的な診断用面接である。MINIは、臨床精神薬理学試験及び免疫学研究における評価及び結果の追跡に用いられている、精神評価及び構造化された精神科の面接の一つであり、世界でもっとも広く用いられている精神科の構造化診断の面接方法である。この装置は、被験者が薬物依存症の基準に適合しているか、及び何らかの大きな精神疾患を有しているかの判断において用いられる(例えば、情動障害、統合失調症)。

【0092】

嗜癖重症度指標 - ライト 臨床学的因子(ASI-Lite CF)バージョンは、検査の間、訓練を受けた研究員により投与される。嗜癖重症度指標 - ライトは、参加者の状態による、参加者の7つの分野における面接者による重症度の指標である(医療、雇用、薬物使用、アルコール使用、法的、家族/社会、及び精神)。ライトバージョンは、ASI構成スコアの計算に、全ての質問を維持したままのASIの短いバージョンである。A

10

20

30

40

50

S I の家族歴部分でも、A S I - ライトバージョンでは、最小限の家族歴の情報を集め、維持されている。

【0093】

1996年に改訂されたベック鬱評価尺度（B D I）の第3世代がある。この尺度は、オリジナルの、約10分で終了する21項目の質問形式である。B D I - I Iは、B D I - I Aに対して改訂され、鬱／苦痛のよい指標として存在する。この指標は、参加者のうち、試験期間中に臨床的に鬱になった者に対して用いられ、参加者の安全を計るにも有用である。

【0094】

現在、注意欠陥・多動性障害（A D H D）の症状を、A D H D - I V 評価スケールを用いて毎週評価している。

10

【0095】

神経精神科検査（N e u r o p s y c h i a t r i c I n v e n t o r y）により得られたやる気スコアをベースラインで補正した。

【0096】

頬の中を綿棒でこすってワットマンF T Aカードに適用し、D N Aを得た。これらのカードは、D N A抽出のための生体サンプルを安全に安定して保存することができる。予想されたゲノムD N Aは50 - 100 μgであり、現在入手可能な方法で500以上の遺伝子型のアッセイに十分用いられる量である。

20

【0097】

表現型は、5'エクソヌクレアーゼベース（タクマン社）の表現型アッセイを用いて行った。アッセイは、アプライドバイオシステム社（A B I；アッセイバイデザイン）によって行われた。対立遺伝子の分離は、A B I 3 7 3 0リアルタイムP C Rサイクラーによって行った。

【0098】

コカインの薬物動態の分析のための血液サンプルは、0 m gのネピカstatt投与期間中（検査第1日）及び80 m g及び160 m gのネピカstatt投与期間中（検査第4及び8日）に採取した。血液サンプルは、それぞれの用量レベルのネピカstatt投与3日に、コカイン10 m g投与後、15、20、30、40、50、60、90、120、180、240、300、360、420及び480分後に採取した。それぞれの用量レベルのネピカstatt投与に合わせて、他の用量のコカイン（0 - 40 m g）も投与し、薬物動態評価が他の評価に影響しないようにした。血液を採取し、血漿を分離して、分析まで-70で凍結させた。コカイン及びB Eは液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析装置（L C / M S / M S）を用いてアッセイした。これらのアッセイにおいては、参考試験機は、2.5 n g / m lの定量限界がある。薬物動態分析により、ネピカstattはコカインの薬物動態に影響を与えることが明確になった。

30

【0099】

D B Hは、N E貯蔵顆粒に貯蔵されN Eとともに分泌される。それゆえ、血漿中D B Hは、中枢神経系における酵素活性のよい指標となる。血液は、毎日午前10時に採取し（コカイン／プラセボ投与前）、次の分析のために保存した。D B H活性は、チラミン-オクトパミン法を用い、上述した高速液体クロマトグラフィー-蛍光分析法を用いて測定した。これにより、D B Hの経時変化の測定が可能となり、ネピカstattによるD B H阻害の薬力学に関する考察を提供することができる。D B Iは、気分の変化をモニターするために、プロトコールを通じて繰り返し投与された。

40

【0100】

0ないし100にスコア化するために、デジタル化された連続する10 cmの直線からなるコンピュータ化された視覚的アナログスケール（V A S）を用いて主観的効果を測定した。参加者は、カーソルを左端から、ラインに沿って左又は右に動かして鬱の度合いを左又は右のマウスピボタンによって表すよう指示されている。V A Sはコカインによる多幸感、情動不安及び渴望を迅速に反映するようデザインされている。これらは、「何らかの

50

薬物の効果」「高い」「よい効果」「興奮している」及び「悪影響」「被害妄想」「疑い深い」及び「入手できればコカインを使用する」「コカインを渴望する」「今はコカインを拒否できる」及び「コカインを欲する」。VAS測定は、コカイン投与前、及び、投与後5、10、15、20、30、及び45分に行われた。

【0101】

コカイン投与後5分後、(違法薬物提供者から現在購入するとしたら) \$50 / mgを基準に、その用量の薬物にいくら支払うかを参加者に質問した。コカインの価格は時間と場所により変化し、応答を標準化するため、基準値を提供した。

【0102】

治験薬による治療最終日の第13日、「試験期間」の全ての参加患者は、お金、又は、一連の二重盲検用のプラセボの投与又は20mgコカイン投与を選択した。ある期間ではプラセボ(生理食塩水)のみが選択可能であった。他の期間では20mgコカインのみが選択可能であった。参加者は自己投与のプラセボ又はお金、又は、20mgコカイン又はお金を選択した。これは、朝(午前)及び昼(午後)に行い、順序はランダムに、プラセボ又はネピカstattが被験者の数に釣り合うように投与した。

実験(選択)項:

【0103】

それぞれの試験期間中、それぞれ患者は、注射(青又は、緑)又はお金の一連の選択をするように求められる。色は、サンプル期間中の投与量に対応する(コカイン0mg又は20mg)。選択した2つの期間のそれぞれについて、点滴(一つの期間にはコカイン0mg静注、及び他の期間にはコカイン20mg)又はお金に関して参加者は10の選択をする。参加者は、お金を増額するオプション(\$0.05、\$0.05、\$0.05、\$0.05、\$1、\$4、\$7、\$10、\$13、及び\$16)又は患者管理鎮痛(PCP)ポンプを用いたコカイン(0mg又は20mg/静注/点滴)の一連の選択をすることができる。

【0104】

コカイン点滴を選択した患者は、PCAボタンを用い、それに対してお金を選択した者は、治験監督者に口頭で申告させた。点滴は、2分以上に渡って行われ、3分の休止時間をおく。そのような場合、5分間隔の選択がなされることになる。

【0105】

参加者はコカイン投与を選択したことを申告した直後にコカインを受け取る。あらかじめセットされた最大200mgまでの投与における生体情報が残る(10×20mg)。お金の選択者は、選択の直後に受け取るが、このお金は退院までに使わなければならない。

表は、合計16人の参加者の実験における選択期間である。

10

20

30

【表1】

	選択	8 参加人	8 参加人
午前	選択 1	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午前	選択 2	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午前	選択 3	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午前	選択 4	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午前	選択 5	0 mg コカインIV 又は \$ 1.00	20 mg コカインIV 又は \$ 1.00
午前	選択 6	0 mg コカインIV 又は \$ 4.00	20 mg コカインIV 又は \$ 4.00
午前	選択 7	0 mg コカインIV 又は \$ 7.00	20 mg コカインIV 又は \$ 7.00
午前	選択 8	0 mg コカインIV 又は \$ 10.00	20 mg コカインIV 又は \$ 10.00
午後	選択 9	0 mg コカインIV 又は \$ 13.00	20 mg コカインIV 又は \$ 13.00
午後	選択 10	0 mg コカインIV 又は \$ 16.00	20 mg コカインIV 又は \$ 16.00
午後	選択 1	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午後	選択 2	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午後	選択 3	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午後	選択 4	20 mg コカインIV 又は \$ 0.05	0 mg コカインIV 又は \$ 0.05
午後	選択 5	20 mg コカインIV 又は \$ 1.00	0 mg コカインIV 又は \$ 1.0
午後	選択 6	20 mg コカインIV 又は \$ 4.00	0 mg コカインIV 又は \$ 4.00
午後	選択 7	20 mg コカインIV 又は \$ 7.00	0 mg コカインIV 又は \$ 7.00
午後	選択 8	20 mg コカインIV 又は \$ 10.00	0 mg コカインIV 又は \$ 10.00
午後	選択 9	20 mg コカインIV 又は \$ 13.00	0 mg コカインIV 又は \$ 13.00
午後	選択 10	20 mg コカインIV 又は \$ 16.00	0 mg コカインIV 又は \$ 16.00

【0106】

ネピカstattの12の標本数は、最初の評価に適切な、治療されたグループが中程度から大きな大きさのものであれば、検出される。プロット(図1)は、有効なサイズが5ないし15に変化する様子を表す。サイズ12より大きいと、違いを検知する分析能力が上がっていくが、コストが増加する。プラセボ投与群は、盲検試験を保つためのものであり、比較群としては扱うことは意図していない。

【0107】

ネピカstatt治療群においては、分析は、主としてネピカstattの効果に向けられている。プラセボ治療群は、主として盲検を保つためにある。副作用及び有害作用(AEs)は表にし、ANOVA又はカイニ乗検定を用いて、治療条件で比較した。コカイン静注及びプラセボ投与における、ネピカstatt治療の主作用及び心血管への作用と、プラセボを用いた治療における効果とを、反復測定分散分析(時間が繰り返し単位)(ANOVA)、ピーク効果一元配置分散分析及び、必要なら曲線下面積ANOVAを用いて比較した。

【実施例5】

【0108】

チラミンからオクトパミンへの変換を測定することにより、ウシ及びヒトのドパミン-ヒドロキシラーゼ活性を測定した。ウシ副腎のドパミン-ヒドロキシラーゼはシグマ化学(St Louis, MO, USA)から得たのに対し、ヒトのドパミン-ヒドロキシラーゼは神経芽細胞腫細胞株SK-N-SHの培地から精製した。アッセイは、pH 5.2及び3.2で、0.125M NaAc、10mMフマル酸、0.5-2μM CuSO₄、0.1mg·ml⁻¹、0.1mMチラミン及び4mMアスコルビン酸を含んでいる培地中で行った。典型的なアッセイでは、反応混合物に0.5-1ミリ単位の酵素を加え、続いて、カタラーゼ、チラミン及びアスコルビン酸を含んだ基質混合物を加えて反応が開始した(最終容積200μl)。サンプルは、適切な濃度のネピカstatt又は化合物Bを含み又は含まず、37度30ないし40分培養された。25mM EDTA、240μM 3-ヒドロキシチラミン(内部標準)を含む停止液でクエンチした。サンプ

10

20

30

40

50

ルはオクトパミンを、逆相カラムクロマトグラフィー（HPLC、280 nm の紫外線を検出）で分析した。HPLC は、流速 1 ml · 分⁻¹ であり、リクロカート 125-4 RP-18 カラムを用い、及び均一溶出、10 mM 塩酸、10 mM 1-ヘプタンスルホン酸、12 mM テトラブチルアンモニウムホスファート及び 10 % メタノールで行った。活性 % は、内部標準を用いて作成した非線形 4 次元係数濃度反応曲線で適合させて、コントロールに基づいて計算した。

【0109】

ネピカstatt (S-エナンチオマー) 及び化合物 B (R-エナンチオマー) は、ウシ及びヒトドバミン - ヒドロキシラーゼの濃度依存的阻害活性を有する。算出した IC₅₀ 値は、それぞれ 8.5 ± 0.8 nm 及び 9.0 ± 0.8 nm であった。化合物 B (IC₅₀ 値は、ウシ及びヒト酵素それぞれに対し、25.1 ± 0.6 nm 及び 18.3 ± 0.6 nm であった) は、ネピカstatt よりもわずかに活性が弱かった。ネピカstatt は、強力な阻害剤であることが示された。S-エナンチオマー (ネピカstatt) の阻害活性は、下限ぎりぎりではあったが R-エナンチオマー (化合物 B) よりも有意に阻害効果があり、その阻害活性は立体特異的であることがわかった。

【0110】

選択された 12 の酵素及び受容体に対するネピカstatt の効果は、受容体は、確立されたアッセイを通じて決定した。それぞれの酵素アッセイの根底にある理念の簡単な説明は、図 2 にある。結合データは、用量反応曲線により、4 係数ロジスティック方程式に組み込んで分析した。Ki 値は、チェン・ブルソフの等式を用いて計算した。酵素活性は、IC₅₀ 値 (酵素活性の 50 % 阻害に必要な濃度) で表した。

【0111】

ネピカstatt は、他の酵素 (チロシンヒドロキシラーゼ、アセチル CoA 合成酵素、アシル CoA - コレステロールアシルトランスフェラーゼ、Ca²⁺ / カルモジュリンタンパク質キナーゼ I II、シクロオキシゲナーゼ - I、HMG - CoA 還元酵素、中性エンドペプチダーゼ、一酸化窒素合成酵素、ホスホジエステラーゼ I II、ホスホリパーゼ A 2、及びタンパク質キナーゼ C) 及び神経伝達物質受容体 (1A、1B、2A、2B、1 及び 2 アドレノセプター、M1 ムスカリノン受容体、D1 及び D2 ドバミン受容体、μ オピオイド受容体、5-HT1A、5-HT2A、及び 5-HT2C セロトニン受容体) に対する親和性 (IC₅₀ 又は Ki > 10 μM) は無視できる程度である。ネピカstatt は、他の 12 の受容体及び 13 の神経伝達物質受容体に対する親和性は無視できる程度であるため、ドバミン - ヒドロキシラーゼに対する高い選択性を示すといえる。

【0112】

SHR に関する試験においては、薬物、ネピカstatt ((S)-5-アミノメチル-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-1、3-ジヒドロイミダゾール-2-チオン塩酸塩) 及び対応する R-エナンチオマー (化合物 B) 投与チューブを用いて経口投与した。イヌの試験では、薬物はカプセルに充填し、経口的に投与した。全ての投与は、遊離塩基等価体として示す。

【0113】

雄の SHR (15-16 週齢、チャールスリバー社、Wilmington, MA, USA) をインビボ試験に用いた。試験の日には、動物は体重を計り、ランダムに媒体 (コントロール) 又は適切な用量のネピカstatt (3、10、30 又は 100 mg · kg⁻¹、経口) 又は化合物 B (30 mg · kg⁻¹、経口) を 12 時間ごとに、3 回連続して投与するため振り分けた。3 回目の投与の 6 時間後、ラットはハロタン麻酔をし、頭部を切除し、組織を迅速に摘出し、計量し、氷冷した過塩素酸に浸け、液体窒素で凍結させて、-70 °C で続く分析まで保存した。ノルアドレナリン及びドバミン濃度を定量するため、組織を短時間超音波処理し、13,000 rpm、30 分間、4 °C で遠心分離した。上清に、3、4-ジヒドロキシベンジルアミン (内部標準) を混合し、ノルアドレナリン及びドバミンを電気化学的に検出した。

【0114】

10

20

30

40

50

コントロール動物の基部組織カテコールアミン含有量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 湿重量) は、以下の通りであった。腸間膜動脈 (ノルアドレナリン、 10.40 ± 1.03 ; ドパミン、 0.25 ± 0.02)、左心室 (ノルアドレナリン、 1.30 ± 0.06 ; ドパミン、 0.02 ± 0.00) 及び大脳皮質 (ノルアドレナリン、 0.76 ± 0.03 ; ドパミン、 0.14 ± 0.01)。ネピカスタッフは、試験した 3 つの組織において、用量依存的にノルアドレナリン含有量を減少させ及びドパミン含有量及び、ドパミン / ノルアドレナリン比を増加させた。

【0115】

これらの変化は、 $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 投与の場合において、腸間膜動脈及び左心室において統計的に有意であった ($p < 0.05$) が、大脳皮質においては、 30 及び $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ においてのみであった。最高投与量 ($100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、経口) では、ノルアドレナリンは、腸間膜動脈、左心室及び大脳皮質においてそれぞれ、 47% 、 35% 、 42% 減少し、及びドパミンは、それぞれ 820% 、 800% 及び 86% 増加した。ネピカスタッフを $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、経口で投与した場合、R-エナンチオマー (化合物 B) と比べて、腸間膜動脈及び左心室において大きく変化した。

【0116】

雄のビーグル犬もインビボ試験に使用した ($10 - 16\text{kg}$ 、Marshall farms USA Inc、North Rose、NY、USA)。試験の日に、イヌを計量し、5日間、空のカプセル (コントロール) 又は、適切な用量のネピカスタッフ (0.05 、 0.5 、 1.5 又は $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 経口、bid) を投与するためにランダムに振り分けた。第 5 日における最初の投与の 6 時間後に、ペントバルビタールで安樂死させ、組織 (大脳皮質、腎動脈、左心室) を速やかに摘出した。組織は、続いて処置して及びノルアドレナリン及びドパミンの分析に用いた。

【0117】

データは、平均 \pm 平均値の標準誤差 (SEM) で表される。組織及び血漿カテコールアミンのデータは、それぞれノンパラメトリック一元配置分散分析 (ANOVA) 又は二元配置ANOVAを用いて分析し、フィッシュヤーの最小有意差法を用いて対比較した。 $P < 0.05$ であれば、統計的に有意である。

【0118】

コントロール動物の基部組織におけるカテコールアミン含有量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 湿重量) 配下の通りであった。腎動脈 (ノルアドレナリン、 10.7 ± 1.05 ; ドパミン、 0.22 ± 0.01)、左心室 (ノルアドレナリン、 2.11 ± 0.18 ; ドパミン、 0.07 ± 0.03) 及び大脳皮質 (ノルアドレナリン、 0.26 ± 0.02 ; ドパミン、 0.03 ± 0.00) であった。コントロール動物と比較すると、ネピカスタッフは、試験した 3 つの組織において、用量依存的にノルアドレナリン含有量を減少させ及びドパミン含有量及び、ドパミン / ノルアドレナリン比を増加させた。

【0119】

これらの変化は、3つの組織において $0.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{日}^{-1}$ の投与量において統計的に有意 ($p < 0.05$) であった。最高投与量 ($5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、bid、経口) では、腎動脈、左心室及び大脳皮質において、それぞれノルアドレナリンは 88% 、 91% 及び 96% 、及びドパミンは 627% 、 700% 及び 166% 増加した。

【0120】

雄のビーグル犬を、15日間、空のカプセル (コントロール) 又はネピカスタッフ ($2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、経口、bid) を経口投与するためにランダムに振り分けた。毎日、最初の投与の 6 時間後に、ドパミン及びノルアドレナリンの血漿中濃度を測定するために静脈血サンプルを採取した。サンプルを、ヘパリン及びグルタチオンを含むチューブに収集し、-4 で遠心分離し、分離した血漿を、-70 で分析まで保存した。カテコールアミンのベースラインの濃度は、二群の動物において互いに有意には異ならなかった。ネピカスタッフで処理した群の、血漿中ノルアドレナリン及びドパミン濃度はそれぞれ、 460.3 ± 59.6 及び $34.4 \pm 11.9\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、コントロール群はそれぞ

10

20

30

40

50

、 401.9 ± 25.5 及び $41.1 \pm 8.8 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。コントロール群と比較すると、ネピカスタッフ ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、bid、経口) は、有意にノルアドレナリンの血漿中濃度を有意に低下させ、ドパミンの血漿中濃度及びドパミン／ノルアドレナリン比を増加させた。

【0121】

この経路における活性の上昇が疾患の悪化につながるため、薬理学的方法による交感神経機能の阻害による調節は、治療戦略としてうつ血性心不全の管理に魅力的である。この試験の目的は、ネピカスタッフの効果の薬理学的特徴づけであり、ここでネピカスタッフは、酵素であるドパミン - ヒドロキシラーゼの阻害による交感神経におけるノルアドレナリン合成の調節を行う化合物である。

10

【0122】

インビボでのドパミン - ヒドロキシラーゼの阻害は、ノルアドレナリン受容体神経支配を受ける組織における、基質(ドパミン)レベルの上昇及び生成物(ノルアドレナリン)のレベルの低下につながると予測された。この予測は、インビボでの、中枢及び末梢組織におけるネピカスタッフのカテコールアミンレベルへの影響を見る実験で証明された。SHR及びビーグル犬とともに、ネピカスタッフは、用量依存的に末梢(腸間膜又は腎動脈、左心室)及び中枢(大脳皮質)組織におけるノルアドレナリン含有量の低下及びドパミン含有量の上昇を引き起こした。この観点からすると、化合物Bは、IC₅₀値が酵素の前者のエナンチオマーであるネピカスタッフよりも弱い作用である。ドパミン／ノルアドレナリン比も上昇したが、ドパミンのノルアドレナリンへの置換は、化学量論量的に起こったように見えなかった。これは、神経内の代謝による、組織のドパミンレベルの過小評価により説明できると考えられる。

20

【0123】

ネピカスタッフに大脳皮質におけるカテコールアミンレベルの調節能があることは、血液脳関門を薬物が浸透することを示唆している。イヌの大脳皮質におけるカテコールアミン量の変化の程度は、末梢組織におけるものに匹敵するものであった。しかし、SHRにおいてはネピカスタッフが低容量($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)の場合、大脳皮質におけるカテコールアミン量に影響を与えることなく、末梢組織において有意にノルアドレナリン及びドパミン含有量に変化を与えた。このことは、少なくともSHRにおいては、薬物は適度に末梢選択性を有するという。

30

【0124】

血漿中ノルアドレナリン濃度は、このパラメータは、神経系への取り込み及びカテコールアミンの代謝によるクリアランスによる影響を受けることはあるが、全般的な交感神経の活性のよい基準となる。イヌにおいて、血漿中のノルアドレナリン濃度のベースラインは、初期に驚くほど上昇したが、これはおそらく静脈切開術による血液サンプリングの方法によるストレスを反映していると考えられる。それにもかかわらず、コントロール群と比較すると、ネピカスタッフ処置によって、神経への取り込み又は代謝排泄に対して間接的ではあるが、神経伝達物質合成の減少及び放出に対応する、血漿中ノルアドレナリン濃度の有意な減少が見られた。ノルアドレナリン放出は、神経性ノルアドレナリンの総貯蔵の小分画であるので、ノルアドレナリン生合成の阻害剤が、ノルアドレナリン放出に影響を与えるのは、存在するカテコールアミンの貯蔵分が十分に使い果たされた後のこととなる。従って、血漿中ノルアドレナリン濃度の減少は、ネピカスタッフ投与第4日まで統計的に顕著な変化がなかったのは、交感神経系の緩やかな調節のためと考えられる。

40

【0125】

事実の蓄積から、うつ血性心不全における慢性の交感神経系の活性の高進は、不適応応答によることが示唆されている。この主張は、うつ血性心不全の患者へのカルベジロールの影響による長期の有病率及び死亡率に対して有利な効果を示した臨床試験によって裏付けられている。しかし、ほとんどの患者が、心血管系ホメオスタシスをサポートするのに、何らかのレベルの交感神経駆動を必要としていることは注目すべきである。事実、カルベジロールを含むブロッカーによる治療評価は、特に治療開始による血流力学的低下の

50

傾向により制限されている。交感神経系の高進による突然の離脱から生じる望ましくない効果には、注意深い用量滴定が必要である。ネピカスタッフといったドバミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤は、以下の理由によりこのような望ましくない作用を有しない。まず、このクラスの薬物は、アドレナリン放出を停止させるのではなく減弱させる、次に、徐々に系を変化させるため、用量滴定を必要としないためである。 - ブロッカーに対する他のネピカスタッフの利点は、ドバミン受容体への作動活性によりドバミンレベルを上昇させ、腎血管拡張、利尿及びナトリウム利尿といった腎機能に有益な効果をもたらす。

【0126】

ネピカスタッフは強力で、交感神経系の高進に関連のある心血管障害として評価される疾患の治療に有効である選択的で経口活性のあるドバミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤である。
10

【実施例6】

【0127】

ネピカスタッフは、テトラロン3 ($\text{C}_\text{H}_2\text{C}_\text{I}_2$ 中 - 65) で 3、5 - ジフルオロフェニルアセチルクロライドとエチレンを A_1C_1_3 - 触媒によるフリーデルクラフト反応させることにより得られる。)を、寺島により見出された条件 (LAH、(-) - 1R、2S - N - メチルエフェドリン、2 - エチルアミノピリジン) で、キラル還元することにより R - (+) - テトラロール4a (92 - 95% ee) を得、これを R - (+) - メシレートに変換し、続いてアジ化ナトリウムと反応させることによりアジド及びジヒドロナフタレン7 (9 : 1) の混合物が得られる。アジドを水素化し、生成物を無水塩酸で処理し、得られた S - (-) - アミン塩酸塩をストレッカー反応 (ホルムアルデヒド重亜硫酸塩付加体及び KCN) により S - (-) - アミノニトリルに変換した。ヘテロ環の形成は、アミノニトリルの一連のジホルミル化反応、続くチオシアノ酸による処置により行われる。競合するニトリル加水分解によって、一级アミドが相当量生成する。ニトリルのアミンへの還元は、THF 中 LAH を用いて行った (93 - 96% ee)。エナンチオマーは、寺島・ケトン還元の同様の経路で (+) - 1S、2R - N - メチルエフェドリンを不斉補助基として用いて行った (91.6% ee)。不斉中心の絶対配置は、S - (-) - 2 - テトラロールに関する先行文献をもとに決定した。
20

【0128】

融点は、ユニメルト・トーマス・フーバー・キャピラリー融点測定装置又はメトラー F B 81 HT 細胞を有するメトラー F P 90 プロセッサーで測定し、補正しなかった。質量は、フィニガン MAT 8230 (電子衝撃法又は化学イオン化法) 又はフィニガン MAT TSQ 70 (LSIMS) 分光計によって行った。 ^1H NMR スペクトルは、ブルカーアルメル AC F 300、AM 300、AMX 300 又は EM 390 分光計及びケミカルシフトは、ppm () で、テトラメチルシランを内部標準として用いて得られた。IR スペクトルは、ニコレット SPC FT - IR 分光計により行った。UV スペクトル解析は、バリアン・キャリ - 3 UV - 可視分光計により行った (リーマンラボ社)。旋光度は、パーキン・エルマー モデル 141 で測定した。キラル HPLC 測定は、レジスキラル AGP カラム ($4.6 \times 100 \text{ mm}$) で行った。溶出は、20 で、2% アセトニトリル - 98% 20 mM KH₂PO₄ (pH 4.7)、流量 1 mL / 分で行った。
30

【0129】

5、7 - ジフルオロ - 2 - テトラロン。SOCl₂ (100 mL) を 1 度に加え、3、5 - ジフルオロフェニル酢酸 (100 g, 0.58 mol) に加え、15 時間攪拌後、揮発性物質を減圧下留去した。生成した油性の酸クロライドを CH_2Cl_2 (200 mL) に溶解し、メカニカルスターで攪拌下 A_1C_1_3 (154 g, 1.16 mol) の CH_2Cl_2 (1.0 L) 懸濁液に滴下した。懸濁液は、-65 ドライアイス / アセトン浴で冷やし、及び反応液の温度が < -60 となるよう酸クロライド溶液を加えた。添加の後、エチレンガスを 10 分間 -65 で急速に反応混合物に吹き込んだ。反応混合物を、攪拌下、2 時間以上かけて 0 まで戻し、その後 -10 に冷却し、水 (500 mL) を最初は滴下し、その後急速に加えた。有機層を分離し、食塩水 (100 mL) で洗浄し
40

、及び $MgSO_4$ で乾燥した。有機層を減圧留去し、クーゲルロール収集装置により真空蒸留し、90 - 110で沸騰した物質を集め(1.0ないし0.7mmHg)、暗色の油性残渣を得た。蒸留物は、100 - 105で再蒸留し(0.3mmHg)、白色固体として得られた(73.6g、0.40mol; 70%)。融点46; IR(KBr) 1705 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃) 2.55(t, J = 7.5 Hz, 2H)、3.10(t, J = 7.5 Hz, 2H)、3.58(s, 2H)、6.70(m, 2H); MS m/z 182(M⁺)。Anal. Calcd for C₁₀H₈F₂O: C, 65.93; H, 4.42. Found: C, 65.54; H, 4.42。

【0130】

(R)-(+)-2-ヒドロキシ-5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフタレン。(−)1R、2S-N-メチルエフェドリン(81.3g、0.454mol)の無水Et₂O溶液(1.1L)に、1.0M水素化アルミニウムリチウムのEt₂O溶液(416mL、0.416mol)を45分かけて滴下し、穏やかに還流が続くようにした。添加終了後、反応混合物を還流温度で1時間加熱した後、室温に戻した。2-エチルアミノピリジン(111g、0.98mol)溶液の無水Et₂O(100mL)溶液を加え、穏やかに還流が続くような温度で加熱した。反応混合物はさらに1時間還流し、その間に薄い黄緑色の懸濁液となった。反応混合物を、ドライアイス/アセトン浴を用いて-65に冷却し、5、7-ジフルオロ-2-テトラロン(23.0g、126mmol)のEt₂O(125mL)溶液を、内部温度を-60以下に保つよう滴下した。滴下終了後、反応混合物は、-65ないし-68 3時間攪拌し、MeOH(100mL)を、内部温度が-60以下を保つようにクエンチした。反応は更に-65で10分攪拌し、その後、約-20まで戻した。3N HCl(2L)溶液を<35となるように添加の速度を制限した。完全に溶解させるため、攪拌速度を増加させた後、層を分離し、エーテル層を食塩水(200mL)で洗浄し、乾燥した(MgSO₄)。エーテル溶液を減圧留去し、残渣を温かいEt₂O(20mL)に溶解し、続いてヘキサン(200mL)を加えた。シード溶液は、0で1時間、氷浴で冷却したところ、結晶を析出したので、結晶を収集し、真空で乾燥し、アルコールを得た(10.9g、47%)。融点85; []²⁵_D+38.1°(c=1.83, CHCl₃); キラルHPLC 93.4% ee: ¹H NMR(CDCl₃) 1.70(br s, 1H)、1.76-1.88(m, 2H)、1.99-2.06(m, 2H)、2.63-3.08(m, 3H)、4.15(m, 1H)、6.60(m, 2H)。Anal. Calcd for C₁₀H₁₀F₂O: C, 65.21; H, 5.47. Found: C, 65.38; H, 5.42。(S)-エナンチオマー-4bのスペクトルは同一である: 融点84-85; []²⁵_D-37.8°(c=1.2, 4, CHCl₃); 92.4% ee キラルHPLC. Anal. Calcd for C₁₀H₁₀F₂O: C, 65.21; H, 5.47. Found: C, 65.47; H, 5.39。

【0131】

(R)-(+)-2-メタンスルホニルオキシ-5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフタレン。溶液R-(+)-5、7-ジフルオロ-2-テトラロール(59.0g、320mmol)及びEt₃N(74.2mL、53.9g、530mmol)の無水Et₂O溶液(1.78L)を、氷-MeOH浴を用いて冷却し(-15)、及びアルゴン雰囲気下、攪拌しながらMsCl(37.2mL、55.3g、480mmol)を5-10分以上かけて滴下した。5時間後、反応が終了し(TLCにより確認)、固体を溶解するために水を加えた。少量の酢酸エチルを加え、固体を完全に溶解させた。有機層を分離し、1N HCl、NaHCO₃水溶液、食塩水で、この順に洗浄し、MgSO₄で乾燥した。溶媒を留去すると、オフホワイトの固体が得られ(87.1g、332mmol)、そのまま次の反応に用いた。i-Pr₂Oによる少量サンプルの滴定により、分析用のサンプルを得た: 融点78.8-80.5; []²⁵_D+16.8°(c=1.86, CHCl₃); ¹H NMR 2.13-2.28(

10

20

30

40

50

m、2 H)、2.78 - 2.96 (m、2 H)、3.07 (s、3 H)、3.09 (dd、J = 17.1 Hz、4.7、1 H)、3.20 (dd、J = 17.2、4.7 Hz、1 H)、5.20 (m、1 H)、6.67 (m、2 H)。Anal. Calcd for C₁₁H₁₂F₂O₃S: C, 50.37; H, 4.61. Found: C, 50.41; H, 4.64。 (S)-エナンチオマー-5bのスペクトルは同一である。融点 79.9 - 80.9; [²⁵D] -16.6° (c = 2.23, CHCl₃)。Anal. Calcd for C₁₁H₁₂F₂O₃S: C, 50.37; H, 4.61. Found: C, 50.41; H, 4.65。

【0132】

(S)-(−)-2-アミノ-5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフタレン塩酸塩。アジ化ナトリウム (40.0 g, 0.62 mol) に DMSO (1 L) を加えた。メシレート (138 g, 0.53 mol) を1度に加え、加え、反応混合物を 50 16 時間 N₂ 雰囲気下で加熱した。反応混合物を H₂O (1.8 L) で希釈し、ペンタンで抽出し (4 × 250 mL)、続いて、合わせたペンタン抽出液を、H₂O (2 × 100 mL)、食塩水 (100 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥した。溶媒を減圧留去したところ、油状の揮発性物質を得たので、すぐにペンタンでシリカゲルクロマトグラフィーにかけ、ジヒドロナフタレンを揮発性の油状物として得た (8.50 g, 51.2 mmol)。さらに、ペンタン / CH₂Cl₂ (9:1) で溶出すると、アジド (101 g, 483 mmol) を無色の油状物として得た。IR (CHCl₃) 2103 cm⁻¹; m/z 171 (M⁺)。アジド 6a を酢酸エチル (1200 mL) に溶かし、2.5 L パール加圧反応容器 (60 psi) 中で、10% Pd/C (6 g) を用い 6 時間かけて水素化した。各時間ごとに、反応容器を真空に排気し、混入した N₂ を除くために水素を充填した。生じた混合物をセライト濾過し、HCl のエーテル溶液 (1 N, 500 mL) 中で攪拌し、細かい沈殿を酢酸エチルで濾過し、及び無水エーテルで洗浄した (濾過に約 4 時間要した)。湿潤固体を丸底フラスコに移し、残溶媒を真空下で除去し、白色固体を得た (90.4 g, 412 mmol; 77.9%)。融点 > 280; [²⁵D] -60.2° (c = 2.68, MeOH); ¹H NMR (d₆ - DMSO) 1.79 (m, 1 H)、2.33 (m, 1 H)、2.63 (m, 1 H)、2.83 - 2.92 (m, 2 H)、3.14 (dd, J = 16.7、5.0 Hz, 1 H)、3.46 (m, 1 H)、6.93 (d, J = 9.4 Hz, 1 H)、7.00 (dt, J = 9.4、2.5 Hz, 1 H)。Anal. Calcd for C₁₀H₁₂ClF₂N: C, 54.68; H, 5.51; N, 6.37。Found: C, 54.31; H, 5.52; N, 6.44。(R)-エナンチオマー-8bのスペクトルは同じである。融点 > 280; [²⁵D] +58.5° (c = 1.63, MeOH)。Anal. Calcd for C₁₀H₁₂ClF₂N: C, 54.68; H, 5.51; N, 6.37。Found: C, 54.64; H, 5.51; N, 6.40。

【0133】

(S)-(−)-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)(シアノメチル)アミン。アミン塩酸塩 8a (50.27 g, 229 mmol) を NaOH (10.0 g, 250 mmol) の水 (150 mL) 溶液で処理し、溶液を得るために NaOH の粒を数個加えた。更に水 (300 mL) を加え、混合物を 50 沸に浸け、ホルムアルデヒド重亜硫酸ナトリウム付加体 (30.8 g, 230 mmol) で処理した。30 分攪拌後、KCN (15.0 g, 230 mmol) を加えた。反応混合物は、更に 1 時間、80 で攪拌し、室温に冷却し、酢酸エチルで抽出し、結晶化する油状物を得た (51.3 g)。TLC (5% MeOH - CH₂Cl₂) では、出発物質のアミンが約 10 - 15% 残った。シリカゲルクロマトグラフィーでは、ニトリル体 (39.4 g) 及び、空気中で速やかに炭酸塩を形成する出発物質の遊離アミン (7.12 g) を得た。アミンの再利用により、5.35 g の生成物を得た。合わせて収率 (44.8 g, 202 mmol; 87.5%): 融点 73.1 - 76.5; [²⁵D] -58.0° (c = 1.63, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃) 1.50 (50

b r s、1 H)、1.70(m、1 H)、2.05(m、1 H)、2.55-3.04(m、4 H)、3.22(m、1 H)、3.70(s、2 H)、6.62(m、2 H); MS m/z 222(M+). Anal. Calcd for C₁₂H₁₂F₂N₂: C、64.85; H、5.44; N、12.60. Found: C、65.07; H、5.47; N、1.2.44。(R)-エナンチオマー-9bのスペクトルは、同一であった。融点64.4-73.6; []²⁵_D+52.3°(c=2.12, CHCl₃)。Anal. Calcd for C₁₂H₁₂F₂N₂: C、64.85; H、5.44; N、12.60. Found: C、65.14; H、5.54; N、12.53。

【0134】

10

(S)-(−)-1-(5,7-ジフルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロナフト-2-イル)-5-シアノ-2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール。ニトリル(44.7g, 201 mmol)のブチルホルムエート(240mL)溶液を、N₂下19時間、加熱還流し(120浴)、溶媒を減圧下留去した。溶媒の残部を除くためにトルエンを加え、留去し、残渣を高真空下乾燥し、油状物を得た(53.2g)。ホルムアミド及びエチルホルムエート(48.7mL, 44.7g, 604 mmol)の無水THF(935mL)溶液を氷/MeOH(-15)下で冷却し、攪拌下、t-BuOK(1M THF中、302mL, 302 mmol)を20分以上かけて加えた。18時間攪拌後、溶媒を留去し、残渣を1N HCl(990mL)及びエタノール(497mL)に溶かし、KSCN(78.1g, 804 mmol)で処理した。混合物を85で1、3、5分攪拌後、氷浴につけると沈殿を生じた。濾過し、固体をスラリーとして10% MeOH/CH₂Cl₂のヘキサンで詰めたシリカゲル(1kg)にアブライした。10% アセトン/CH₂Cl₂で溶出し、生成物(18.05g, 62.1mmol; 30.8%)を得た。融点: 240.7-249.2; []²⁵_D-69.1°(c=1.18, DMSO); ¹H NMR(d₆-DMSO) 2.18(br m, 1H)、2.47(m, 1H)、2.75(m, 1H)、3.03-3.35(m, 3H)、5.19(m, 1H)、6.94(d, J=9.3 Hz, 1H)、7.03(dt, J=9.3, 2.4 Hz, 1H)、8.29(s, 1H)、13.3(br s, 1H); MS m/z 291(M⁺)。Anal. Calcd for C₁₄H₁₁F₂N₃S: C、57.72; H、3.80; N、14.42. Found: C、57.82; H、3.92; N、14.37。(1:1 MeOH/CH₂Cl₂の溶媒で、カラムを更に溶出すると、1級アミド11aが得られる: 融点261.9-262.7; []²⁵_D-90.5°(c=0.398); IR(KBr) 1593, 1630 cm⁻¹; ¹H NMR(d₆-DMSO) 2.14(m, 1H)、2.15-2.28(m, 1H)、2.74-3.05(m, 4H)、5.64(m, 1H)、6.90(d, J=9.2 Hz, 1H)、7.05(dt, J=9.5, 2.4 Hz, 1H)、8.73(s, 3H)、9.70(br s, 1H)、13.7(br s, 1H); MS m/z 309(M⁺)。Anal. Calcd for C₁₄H₁₃F₂N₃OS·0.25H₂O: C、53.57; H、4.33; N、13.39. Found: C、53.32; H、3.96; N、13.24。(R)-エナンチオマーのスペクトルは同一である。融点243.1、2、44.7; []²⁵_D+74.9°(c=2.14, DMSO)。Anal. Calcd for C₁₄H₁₁F₂N₃S: C、57.72; H、3.80; N、14.42. Found: C、57.85; H、3.85; N、14.45。

【0135】

40

(S)-1-(5,7-ジフルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロナフト-2-イル)-5-アミノメチル-2,3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール。上述のニトリル(5.00g, 17.2 mmol)のTHF(75mL)溶液を氷浴中、アルゴン下攪拌し、均一な溶液を得た。LAHのTHF(1M 34.3mL, 34.3mmol)溶液を10分以上かけて加え、溶液を30分間、0で攪拌し、1.5時間室温に戻す。

50

した。再び 0 に冷却し、飽和酒石酸ナトリウムカリウム溶液で、処理し混合物が自由に攪拌できるまで加えた。更に酒石酸溶液 (30 mL) を加え、有機層を分離し、水層を 10% MeOH / CH₂Cl₂ (200 mL) で抽出し、混合物を 15 分攪拌し、水 (100 - 150 mL) を加えた。有機層を分離し、水層を 10% MeOH / CH₂Cl₂ (2 × 125 mL) で抽出した。抽出物を合わせ、乾燥し (MgSO₄)、留去した。残渣を 5% MeOH / CH₂Cl₂ の溶出液で、シリカゲルクロマトグラフィー (5.2 g) にかけ、遊離のアミン (2.92 g, 9.89 mmol; 58%) を得た。融点 170 ; [α]_D²⁵ -11.0° (c = 1.59, DMSO)。Anal. Calcd for C₁₄H₁₅F₂N₃S · 0.25H₂O: C, 56.07; H, 5.21; N, 14.01. Found: C, 56.11; H, 5.10; N, 14.14.

10

【0136】

(S)-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-5-アミノメチル-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール塩酸塩(ネピカスタッフ)。塩酸塩は、メタノール (250 mL) に溶かした遊離アミン 2a (3.12 g, 10.6 mmol) に加熱しながら塩酸のエーテル溶液 (1 M, 20 mL, 20 mmol) を加えることにより合成した。溶媒を乾燥するまで留去することなく、部分的に減圧留去し、酢酸エチルで数回共蒸着することにより置換した。生じた沈殿を酢酸エチル (150 mL) 及びエーテル (150 mL) で濾過し、エーテルで洗浄し、窒素下で乾燥し、続いて高真空中下、78 で 20 時間乾燥して塩酸塩 (3.87 g) を得た。融点 245 (dec); [α]_D²⁵ +9.65° (c = 1.70, DMSO); (93% ee キラルHPLC); ¹H NMR (T = 320 °K, DMSO) 2.07 (m, 1H)、2.68 - 3.08 (m, 4H)、4.09 (m, 3H)、4.77 (m, 1H)、6.84 (m, 2H)、7.05 (s, 1H)、8.57 (br s, 3H)、1、2、4 (br s, 1H)。Anal. Calcd for C₁₄H₁₆C₁F₂N₃S · 0.5H₂O: C, 49.33; H, 5.03; N, 12.33. Found: C, 49.44; H, 4.96; N, 12.18. (R)-エナンチオマー (R)-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-5-アミノメチル-2、3-ジヒドロ-のスペクトルは、同一であった。融点 261 - 263; [α]_D²⁵ -10.8° (c = 1.43, DMSO)、91.6% ee キラルHPLC。Anal. Calcd for C₁₄H₁₆C₁F₂N₃S · 0.35H₂O: C, 49.73; H, 4.98; N, 1、2、4.2. Found: C, 49.80; H, 4.93; N, 12.39.

20

【0137】

ネピカスタッフは、ウシ (IC₅₀ = 8.5 ± 0.8 nM) 及びヒト (IC₅₀ = 9.0 ± 0.8 nM) のDBH の競合阻害剤であることが示された。R-エナンチオマー (R)-1-(5、7-ジフルオロ-1、2、3、4-テトラヒドロナフト-2-イル)-5-アミノメチル-2、3-ジヒドロ-2-チオキソ-1H-イミダゾール (IC₅₀ = 25.1 ± 0.6 nM; 18.3 ± 0.6 nM) であり、SKF102698 (IC₅₀ = 67.0 ± 4.2 nM; 85.0 ± 3.7 nM) は、それぞれウシ及びヒトの酵素に對してより低い阻害剤であった。DBH活性は、チラミンからオクトパミンへの変換アッセイにより測定した。ウシの副腎から得られるDBHは、シグマアルドリッヂ社 (St Louis, MO) より得た。ヒトから分泌されるDBHは、神経芽細胞腫細胞 SK-N-SH 株の培地から精製した。アッセイは、pH 5.2、32 下、0.125 M 酢酸エチル、10 mM フマル酸、0.5 - 2 μM CuSO₄、0.1 mg / mL カタラーゼ、0.1 mM チラミン及び4 mM アスコルビン酸存在下で行った。典型的なアッセイでは、0.5 - 1 ミリユニックット (milli unit) の酵素を反応混合物に加え、続いてカタラーゼ、チラミン、及びアスコルビン酸を含む基質混合物を加えて反応を開始した (最終の容積は、200 μL)。試料は、37 30 - 40 分間、適切な濃度の阻害剤を含み又は含まずに培養した。反応を、25 mM EDTA 及び 240 μM 3-ヒドロキシチラミン (内部標準) を含む反応停止液でクエンチした。試料は、逆相HPLC によって 280 nM

30

40

50

のUVを検出するUV検出計を用いて、オクトパミンを分析した。残存%活性は、コントロール(阻害剤なし)に基づいて、内部標準及び非線形4係数用量反応曲線から得られたIC₅₀値で補正し、計算した。

【0138】

確立したアッセイによって11の異なる酵素によるネピカスタッフの活性を測定した。選択した13の受容体に対するネピカスタッフの親和性は、標準的な濾過技術及び膜調製法を用いて放射性リガンド結合アッセイによって決定した。結合データは、4係数ロジスティクス方程式に反復曲線を適用して決定した。K_i値は、チェン-ブルソフ式を用いて計算した。図3は、DBH及び選択された系列の酵素及び受容体の範囲をネピカスタッフの相互作用の表を表す。ネピカスタッフは、他の系列の酵素及び神経伝達物質の受容体に対して弱い親和性しか持たなかった。これらのデータは、ネピカスタッフは、DBHのインビトロにおける強力で高選択的阻害活性を有することを示唆した。さらに、S-エナンチオマーであるネピカスタッフはR-エナンチオマーよりも約2-3倍強力であり、このことは、立体選択的であることを示している。10

【0139】

ネピカスタッフの経口投与を自然発症高血圧ラット(SHR)及び通常のイヌに投与したところ、用量依存的に末梢動脈(腎臓の又は腸間膜)、左心室及び大脳皮質における組織ドパミン(DA)/ノルエピネフリン(NE)比が増加した。通常のイヌに対し、慢性的なネピカスタッフの経口投与によっても、血漿DA/NE比を持続的に増加させた。無麻醉ラットに急速にネピカスタッフの経口投与を行うと、用量依存的及び長期間の(>4時間)降圧効果、及び節前交感神経刺激に対する降圧薬の反応の減弱が起こった。血清T₃及びT₄レベルは、腸間膜動脈においてドパミン/ノルエピネフリン比が上昇したが、用量(6.2mg/kg、経口、bid、10日間)による影響はなかった。心血管組織に対する交感神経駆動による強い調節能に基づき、ネピカスタッフは、うっ血性心不全の治療において臨床的な評価を得ている。20

【0140】

うっ血性心不全(CHF)は、アメリカ合衆国において主要な死因である。CHFは、自律神経系及びレニン-アンジオテンシン系(RAS)の顕著な活性化を特徴とする。これらの2つの神経ホルモン系の同時の活性化は、CHFの永続化及び進展に関係するとされる。神経ホルモン系のこれらの効果を阻害する治療は、CHFの病歴をよい方向に変更すると考えられる。事実、アンジオテンシンIIの生成を阻害するアンジオテンシン-変換酵素(ACE)阻害剤は、CHF患者の疾病率及び死亡率を減少させる。しかし、ACE阻害剤は、SNSを減弱させる限定的な間接的能力しかない。現在臨床評価を受けている30

-アドレナリン受容体アンタゴニストによるSNS阻害は、確実なアプローチである。直接SNSを調節する別の方法には、NEをドパミン(DA)に変換する酵素であるドパミン-ヒドロキシラーゼ(DBH)の阻害を介したノルエピネフリン(NE)生合成の阻害がある。DBHの阻害は、組織レベルのNEを減少させ、組織レベルのDAを上昇させ、それにより組織内DA/NE比を高める。このアプローチは、-アドレナリン受容体アンタゴニストに対して大きな利点を有する。例えば、-アドレナリン受容体刺激を減少させ、DAレベルを上昇させる。腎臓の血管拡張、ナトリウム利尿を促進し、アルドステロン放出を減少させる。以前のDBH阻害剤、フザリン酸及びSKF-102698は、小さい効果及び特異性という欠点のため心疾患の臨床開発から除外された。40

【0141】

ネピカスタッフは、自然発症高血圧ラット(SHR)及び正常ビーグル犬におけるインビボの生化学試験に用いる。試験日には、動物の体重を測定し、ランダムにプラセボ(担体)又は適切な用量のネピカスタッフを投与するために分類する。朝に開始して、それぞれのラットに、12時間ごとに3回経口投与した。3回目の投与6時間後、ラットにハロタン麻酔をかけ、断頭し、及び組織(大脳皮質、腸間膜動脈及び左心室)を迅速に摘出し、計量し、氷冷した0.4M過酸化水素酸に浸け、液体窒素で凍結させ、分析まで-70で保存した。組織NE及びDA濃度は、HPLCにより電気化学的検出を用いて濃度を50

分析した。雄のビーグル犬(10 - 16 kg、Marshall farms USA Inc、North Rose、NY)を試験に用いた。試験日には、イヌは、ランダムにプラセボ(空のカプセル)又は適切な用量のネピカスタッフを投与した。それぞれのイヌは、4.5日にわたり1日2回投与された。第5日、最初の投与から6時間後、イヌをペントバルビタールで安樂死させ、及び組織(大脳皮質、腎動脈、左心室)を摘出し、計測し、氷冷した0.4M過酸化水素酸に浸け、液体窒素で凍結させ、分析まで-70で保存した。組織NE及びDA濃度は、HPLCにより電気化学的検出を用いて濃度を分析した。

【0142】

ネピカスタッフの経口投与により、SHR及びイヌの(腸間膜又は腎)動脈、左心室及び大脳皮質において用量依存的にDA/NE比を上昇させた。10

【0143】

最高投与量(SHRには100 mg/kg、及びイヌには5 mg/kg)では、DA/NE比が、それぞれ動脈、左心室及び大脳皮質において、14、11及び3.2倍(SHR)及び9.5、15.1及び8.0倍(イヌ)であった。SHRにおいて30 mg/kgを投与した場合、SKF-102698(1)は、DA/NE比は、5.5倍、3.5倍及び2.7倍となり、同じ投与量でネピカスタッフでは、腸間膜動脈、左心室及び大脳皮質において、それぞれ8.3、7.5及び1.5倍となった。SHRにおいて30 mg/kgでは、化合物Bは、DA/NE比は腸間膜動脈、左心室及び大脳皮質においてそれぞれ2.6、3.5及び1.1倍増加したのみだった。これらのデータから、ネピカスタッフはSHR及びイヌにおいて期待した生化学的效果を有するが、後者においてより強力であることを示唆している。更に、ネピカスタッフはSHRにおいて、化合物B及びSKF-102698(1)よりも強力であった。20

【0144】

正常なイヌに対して、ネピカスタッフ(14.5日間処理)による血漿DA/NE比への慢性的な効果を調べた。動物は、14.5日間、ランダムに、経口又はプラセボ(空のカプセル)又はネピカスタッフ(2 mg/kg、bid)を投与した。毎日、血漿中のDA及びNE濃度の測定のために最初の投与の6時間後、血漿サンプルを採取した。サンプルは、ヘパリン及びグルタチオンを含むチューブに採取し、-4で遠心分離し、分析まで-70で保存した。30

【0145】

ネピカスタッフの経口投与(2 mg/kg; bid)によって効果のピークが約6-7日後に、その後新たな安定状態に達するのが7-14日後であるようなDA/NE比の増加が見られた。

【0146】

心血管組織に高交感神経駆動するモデルである、意識下拘束したSHRで、インビボでの血流力学的活性をさらに評価した。SHRにおける血流力学試験では、雄SHR(15-16週齢)を試験に用いた。動物は、エーテルにより軽度に麻酔し、血圧測定及び薬物投与のために左大腿動脈及び静脈にそれぞれカテーテルを通した。動物を、拘束装置に入れ、30-40分間回復させた。ベースライン測定の後、動物に経口で担体又は適切な用量のネピカスタッフを投与し、4時間血流力学係数を連続的に記録した。動物をペントバルビタールで麻酔し、温熱パッド(37)にのせ、ハーバード・ローデント・ベンチレーターで通気した。アトロピン及びツボクラリン(1 mg/kg、静注)投与後、ステンレススチールロッド(1.5 mm厚、150 mm長)を動物の眼窩から挿入した。ロッドに80Vの1 msパルス電気刺激を与え、異なる周波数(0.15、0.45、1.5、5、15 Hz)による周波数-昇圧反応曲線を得た。40

【0147】

ネピカスタッフの経口投与は、用量依存的降圧効果をもたらした。拘束装置に置き、30-40分間回復させた。ベースライン測定後、動物は担体又はネピカスタッフの最適な投与量のネピカスタッフを投与し、血流力学係数を続けて4時間記録した。ネピカスタッ50

トは、 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$ ($180, 210$ 及び 240 分) 及び $1 \text{ mg} / \text{kg}$ ($30, 210$ 及び 240 分) 全ての投与量及び時点で、有意な平均動脈性血圧の低下を起こした。

【0148】

平均血圧の最大の低下は、 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与した場合に、 $53 \pm 4 \text{ mmHg}$ (コントロール担体に比較して 33% 減少) であった。反応は遅く、安定状態に達するのに、3-4時間かかる。現在のところ、最高投与量 ($30 \text{ mg} / \text{kg}$) における抗高血圧効果の消失の正確な理由は、明確でない。心拍数は、 10 及び $30 \text{ mg} / \text{kg}$ (それぞれ 9.8 及び 10.5%) でわずかに有意な下降があったことを除いては、有意に影響されなかった。この試験に従い、ラットは穿刺を行い、ネピカスタッフ投与による脊髄の節前神経刺激 (PNS) 反応を投与後 5 時間後に測定した。周波数 - 昇圧反応曲線は有意に右にシフトした ($p < 0.05$)。心拍数は PNS では有意には影響を受けなかった。これらのデータは、ネピカスタッフは交感神経駆動による血管系への阻害し、及び SHR での抗高血圧効果のメカニズムであると考えられる。

【0149】

ネピカスタッフのヘテロ環部分は、ホルムの甲状腺機能の強力な抑制剤であるメチマゾールに構造的に似ているので、ネピカスタッフの甲状腺機能の影響を 2.0 及び $6.2 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口、bid、10 日にわたりヨウ素欠乏性スラーグドーリー (SD) 系ラット ($n = 9-12$) で評価した。メチマゾール ($1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口、bid) は、ポジティブコントロールとして用い、投与 4 時間後のホルムの血清中の T_3 (第 3 日、 31% 、 $p < 0.05$; 第 7 日及び 9 日、 42% 及び 44% 、 $p < 0.01$) 及び T_4 (第 3 日及び第 7 日、 46% 及び 58% 、 $p < 0.01$) を有意に減少させたのに対し、ネピカスタッフは試験中、有意な効果を示さなかった (第 3、7 及び 9 日)。両投与量において、ネピカスタッフ投与により腸間膜動脈における有意に DA / NE 比 (担体コントロールと比較して $p < 0.01$) が上昇したが、第 10 日の最終投与 4 時間後の皮質においては上昇しなかった。

【0150】

この試験は、ネピカスタッフが、DBH の強力な選択性及び経口での阻害剤であることを示唆している。この化合物は、動物モデルの有意な行動学上の影響を欠き、これらの発見は将来の研究の主題となるだろう。化合物ネピカスタッフは、心血管組織の交感神経駆動を効果的に調節するため、CHF の治療に試してきた。

【実施例 7】

【0151】

ドパミン及びノルエピネフリン濃度は、942 のうつ血性心不全 (CHF) 患者の血漿サンプルから決定した。試験の目的は：

【0152】

1. 投与後 4 週間後における様々な用量のネピカスタッフの、経心筋の (動脈性 - 冠状動脈洞) 及び冠状静脈洞のカテコールアミンレベル、及び、12 週を超える投与によるネピカスタッフの安全性及び耐性を評価するためである。

【0153】

2. 以下の評価項目のベースラインからの変化によるネピカスタッフの効果を評価するためである：

【0154】

a) 4 及び 12 週後の血漿中 (静脈) カテコールアミンレベル

【0155】

b) 4 及び 12 週後のクオリティオブライフ (QoL)、CHF 症状、包括的な評価、及び NYHA 分類

【0156】

c) 4 週間後の、心拍出量、全身血管抵抗、MVO₂、肺動脈圧、及び肺動脈楔入圧を含む血流力学係数

【0157】

10

20

30

40

50

d) C H F の 1 2 週を超える治療による入院率及び治療薬の投与量の変化

【 0 1 5 8 】

e) 4 及び 1 2 週後の血圧及び心拍

【 0 1 5 9 】

f) 4 及び 1 2 週後の 6 分間歩行試験

【 0 1 6 0 】

g) 1 2 週後の左心室駆出分画率、左心室収縮末期容積、及び左心室拡張末期容積

【 0 1 6 1 】

血液サンプルは、第 4 及び 1 2 週の投与 2 時間後、仰臥位の患者の末梢血管から採取された。さらなるサンプルは、第 0 日（例えば、投与を開始する前の日）の投与 2 時間後に対応する時間に、仰臥位の患者から採取した。加えて、患者群は、第 4 週の投与 2 時間後及び第 0 日（例えば、投与開始の前の日）の投与 2 時間後に、右心及び冠状静脈洞カテーテルを行った。患者のグループから、これらの患者の動脈性静脈及び冠状動脈洞から 3 回分のサンプルを採取した。

10

【 0 1 6 2 】

放射酵素測定法で、ドパミン及びノルエピネフリンの遊離塩基の濃度を決定した。この方法は、血漿サンプルをカテコール - O - メチルトランスフェラーゼ及びトリチウム S - アデノシルメチオニンと培養することを含む。培養が完了すると、液体 / 液体抽出により血漿から O - メチルカテコールアミンを抽出し、薄相クロマトグラフィーによって、分離した。それぞれのカテコールアミンに関連するバンドにマークをつけ、計数のため、シンチレーションバイアルに削る入れた。定量限界は、ドパミン又はノルエピネフリン 1 p g / 血漿 mL である。直線的变化は、0 . 0 4 5 mL ないし 1 mL の血漿を用いて、1 ないし 3 3 3 0 0 0 p g / 血漿 mL の範囲である。

20

【 0 1 6 3 】

採取したヒト血漿サンプルは、品質コントロール (Q C) サンプルとして用い、1 日 1 回、常用される方法の動作のモニターのために分析した。

【 実施例 8 】

【 0 1 6 4 】

前臨床のインビトロ及びインビボ薬理学試験をネピカスタッフで行った。化合物の D B H 阻害能をインビトロ試験で評価した。インビトロでの試験は、化合物による D B H の阻害活性、及び選択性の結合親和性の評価のためにある。インビボ試験は、4 つのカテゴリーに分類した：1) 生化学的效果（例えば、組織中ノルエピネフリンレベルの減少能及びドパミンレベルの増加能）、2) 甲状腺機能への効果、3) 心血管効果、及び 4) 行動学的効果。

30

【 0 1 6 5 】

ネピカスタッフは、ウシ及びヒト D B H の強力な阻害剤である。ヒト D B H に対するネピカスタッフの I C ₅₀ は 9 nM (C L 6 9 6 0) であり、D B H 阻害剤 S K F - 1 0 2 6 9 8 (8 5 nM) よりも有意に低かった。ネピカスタッフの S エナンチオマーは、化合物 B (1 8 nM) として示される R エナンチオマーよりも強力であった。

【 0 1 6 6 】

選択した受容体に対するネピカスタッフの結合親和性を測定した。ネピカスタッフは、M 1 、 D 1 及び D 2 、及び 5 H T _{1 A} 、 _{2 A} 及び 2 c に対しては 5 . 0 よりも小さい親和性であった。同様に、ラット及びサルにおいて、ネピカスタッフの N - アセチル代謝物は、これらの受容体に対して親和性を有しなかった。ネピカスタッフ及びその一次代謝産物は、上述した受容体の強力な阻害剤ではなかった。

40

【 0 1 6 7 】

自然発症高血圧ラット (S H R) におけるフェニレフリンに対するインビトロでの大動脈収縮反応は、正常血圧ウイスター - 京都ラットと比較して、減弱された。毎日、S H R にネピカスタッフ (1 0 m g / k g 、経口) を 2 1 日間投与することによってフェニレフリン応答性は、ウイスター - 京都ラットに匹敵するものとなった。

50

【0168】

結局、ネピカスタッフは、ラット及びイヌに対して効果的なDBH阻害剤であることがわかった。経口又は静脈内投与によって、両方の種においても心臓、腸間膜又は腎動脈、及び大脳皮質での有意な($p < 0.05$)組織内ノルエピネフリンの減少、ドバミンの増加、及びドバミン/ノルエピネフリンレベルの増加につながった。

【0169】

自然発症高血圧雄ラット(SHR)による試験で、ネピカスタッフは、経口投与又は $6.2 \text{ mg} / \text{kg}$ での腸間膜動脈への静注 0.5 ないし 4 時間後にノルエピネフリンを減少させ、及びドバミン及びドバミン/ノルエピネフリン比を増加させた。これらのパラメータの有意な変化は、 12 時間間隔で行った二つの静注($15 \text{ mg} / \text{kg}$)の 2 回目の投与後 6 時間におけるSD系雄ラットの左心室でも見られた。雄のSHRに対する 10 又は $30 \text{ mg} / \text{kg}$ の経口投与後、組織内カテコールアミンの 24 時間経過を試験した。 1 時間後のドバミン/ノルエピネフリン比の増加は有意であり、それは持続した($10 \text{ mg} / \text{kg}$ の腸間膜動脈投与で 12 時間、 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ の左心室投与で 24 時間)。有意な変化は、雄のSD系ラットにおいて腸間膜動脈への 2.0 及び $6.2 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口、bid投与では、 10 日後、ドバミン及びノルエピネフリンレベルの有意な変化が見られたが、大脳皮質においては有意な効果は見られなかった。SHRに 1 又は $10 \text{ mg} / \text{kg}$ /日、経口で 7 又は 25 日間投与した場合、ドバミン増加及びドバミン/ノルエピネフリン比の増加が腸間膜動脈及び大脳皮質において見られた。これらを考え合わせると、ラットにおいて、ネピカスタッフの腸間膜動脈への急性又は慢性投与(25 日間まで)では、ノルエピネフリンの減少及びドバミン及びドバミン/ノルエピネフリン比の増加が見られることがわかった。

10

20

30

40

【0170】

雄のSHR及びSD系ラットにおいて、 0.3 、 1 、 3 、 10 、 30 、及び $100 \text{ mg} / \text{kg}$ の経口投与 6 時間後に測定すると、ネピカスタッフの効果は、用量依存的であることがわかった。SHRにおいては、ドバミン/ノルエピネフリン比の有意な変化が、 $0.3 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与で腸間膜動脈において、 $3.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与で左心室において、及び $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与で大脳皮質において見られた。SD系ラットにおいては、ドバミン/ノルエピネフリン比の増加が、 $3.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与で腸間膜動脈において、 $1.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与で左心室において、及び $100 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与でのみ大脳皮質においても見られた。第 2 回目の投与-反応試験では、SHRにおいては、 12 時間間隔で 3.0 、 10 、 30 、又は $100 \text{ mg} / \text{kg}$ のいずれかを 3 回投与し、 3 回目の投与 6 時間後に組織を摘出した。ネピカスタッフは、左心室及び腸間膜動脈において有意な用量依存的ノルエピネフリン($10 \text{ mg} / \text{kg}$)の減少及びドバミン($3.0 \text{ mg} / \text{kg}$)、及びドバミン/ノルエピネフリン比($3.0 \text{ mg} / \text{kg}$)の増加をもたらした。ネピカスタッフのドバミン及びノルエピネフリン濃度、及びドバミン/ノルエピネフリン比への影響は、大脳皮質では 30 及び $100 \text{ mg} / \text{kg}$ においてのみであった。同様の有意な用量-反応効果が、ウイスター系雌ラットの左心室において、ネピカスタッフを 7 日間、飲料水(0.3 、 0.6 、及び $1.0 \text{ mg} / \text{ml}$)に混ぜて投与した場合に見られた。結論としては、ネピカスタッフは、ラットの大脳皮質(60 - $100 \text{ mg} / \text{kg}$ /日)においては、左心室及び腸間膜動脈(1 - $6 \text{ mg} / \text{kg}$ /日)よりもDBH阻害能は小さいことがわかった。

50

【0171】

ネピカスタッフ(Sエンチオマー)は、 12 時間間隔で 3 回投与($30 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口)した後、SHRの左心室及び腸間膜動脈において、Rエンチオマーよりも有意な効果が見られた。ネピカスタッフは、 1 回投与後または 3 回投与後($30 \text{ mg} / \text{kg}$)のSHRの左心室及び腸間膜動脈において、DBH阻害剤SKF-102698よりもノルエピネフリンの減少及びドバミン及びドバミン/ノルエピネフリン比の増加において、有意に効果が見られた。インビボ研究の結果から左心室及び腸間膜動脈における効果は、精製したDBH(上述参照)を用いたインビトロ研究によく対応していた。しかし、ネピカスタッフは大脳皮質においては、ノルエピネフリンレベルの減少及びドバミンレベルの増

加において、SKF-102698よりも有意に効果が小さかった。ノルエピネフリンは、レニンの放出を促進し、血漿中レニン活性を増加させることが示されている。それゆえ、ネピカスタッフ投与に伴うノルエピネフリンレベルの現象が、血漿中レニン活性の現象につながるか、関心のあるところである。しかし、雄SHRにおいてネピカスタッフ(30及び100mg/kg/日、経口、5日間)は、血漿中レニン活性を変化させなかつた。それゆえ、SHRに対して組織内ノルエピネフリンレベルを低下させる濃度のネピカスタッフを投与しても、血漿中レニン活性は変化しないことがわかつた。

【0172】

ネピカスタッフは、十二指腸内に30mg/kgを投与5時間後雄ビーグル犬の腸間膜動脈においては、有意にノルエピネフリンレベルの減少及びドパミン/ノルエピネフリン比を増加させたが、ドパミンレベルは変化させなかつた。ネピカスタッフを雄ビーグル犬に4.5日(5、15、及び30mg/kg、bid、又は10、30、及び60mg/kg/日)を投与した場合、10mg/kg/日及び60mg/kg/日まで安定状態を経て、有意なノルエピネフリンの減少、及び有意なドパミン及び腎動脈、腎皮質、及び腎髓質におけるドパミン/ノルエピネフリン比の増加が見られた。同様の結果が、左心室においても見られたが、ドパミンには有意な変化はなかつた。大脳皮質においては、ノルエピネフリンは、30及び60mg/kg/日の場合には有意に減少し、及びドパミン及びドパミン/ノルエピネフリン比は、全ての用量において有意に増加した。結論としては、ネピカスタッフは、イヌにおいて10mg/kg/日において強力な経口阻害活性のあるDBH阻害剤である。

10

20

【0173】

ネピカスタッフは、インビボでの甲状腺ペルオキシダーゼの強力な阻害剤であるメチマゾールと構造的類似性がある。低ヨウ素食を与えられたSD系雄ラットに、ネピカスタッフを10日間4又は12.4mg/kg/日、経口投与したところ、トリヨードチラミン又はチロキシンの血清レベルには、影響を与えたなかった。それに対し、メチマゾール(2mg/kg/日)は、血清中トリヨードチラミン又はチロキシンを有意に減少させた。それゆえ、ネピカスタッフは、メチマゾールとは異なり、トリヨードチラミン又はチロキシンに影響を与えないことがわかつた。

【0174】

意識下、拘束ストレスを与えたSHR(1.0-30mg/kg、経口)においては、ネピカスタッフ誘導性の有意な4時間までの降圧効果が見られ、心拍を有意に減少させた(10及び30mg/kg)。意識下、拘束ストレスを与えたSHR(10mg/kg、経口)によるネピカスタッフの降圧効果は、ドパミン受容体(DA-1)アンタゴニストであるSCH-23390による前処理によっては減少しなかつた。また、ネピカスタッフ(10mg/kg)は、血圧を意識下、拘束ストレスを与えた正常血圧ウイスター-京都ラットにおいて4時間後血圧を低下させたが、減少度(-13mmHg)は、SHR(-46mmHg)よりも小さかつた。まとめると、ネピカスタッフは、SHRの方が大きな効果があつたが、SHR及び正常血圧ラットの両方において、血圧の低下を起した。SHRにおける降圧効果は、DA-1受容体を介していないと考えられる。

30

40

【0175】

また、脊髄穿刺したSHRに対する節前神経刺激に対し、ネピカスタッフの投与(3mg/kg、経口)5時間後、有意に高血圧性及び頻脈性の反応を減少させた。それゆえ、ネピカスタッフは、交感神経刺激に対する血圧上昇を減少させる。

【0176】

麻酔したSHRにネピカスタッフ(3.0mg/kg、静注)を急速静注すると、3時間以上にわたり、平均動脈圧が低下するが、腎血流は低下せず、又は尿生産、又はナトリウム又はカリウムの尿排泄は変化させなかつた。腎における血管抵抗の計算値は、投与に従い低下するした。ネピカスタッフによる腎性血管拡張効果がDA-1受容体を介しているかを確かめるために、DA-1アンタゴニストSCH-23390を用いた。しかし、この化合物は、単独投与した場合には血圧を低下させたが、これにより結果の説明がつ

50

かなくなつた。結局、ネピカスタッフは、麻酔した S H R において腎機能を損なうことはなく、動脈圧が低下するにもかかわらず、腎血流は減少しなかつた。

【 0 1 7 7 】

S H R に 2 1 日間毎日のネピカスタッフ (1 及び 1 0 m g / k g 、経口) を投与し、心拍又は最高血圧をテール・カフ法 (t a i l c u f f m e t h o d) により測定した。しかし、ネピカスタッフ (1 0 m g / k g 、経口) 拘束ストレスを与え、動脈カニュレを用いて血圧を測定した場合には有意な降圧効果が見られた。

【 0 1 7 8 】

ネピカスタッフは、血圧無線遠隔変換器 (r a d i o - t e l e m e t r y b l o o d p r e s s u r e t r a n s d u c e r) を装着した S H R を用いた場合には、3 0 日間 3 0 及び 1 0 0 m g / k g / 日を投与した場合、有意に血圧が低下したが、3 及び 1 0 m g / k g / 日においては有意な効果は見られなかつた。2 4 時間以上かけて 3 0 及び 1 0 0 m g / k g / 日を投与した場合、3 0 日以上にわたり効果の減少は見られなかつた。心拍は増加せず、自発運動量に影響はなかつた。血圧低下を起こさなかつたアンジオテンシン変換酵素阻害剤エナラブリル (1 m g / k g 、経口) とネピカスタッフ (3 0 m g / k g) の 3 0 日以上の併用によっては、降圧効果の相乗効果が見られ、有意な左心室重量の減少が見られた。左心室重量の減少は、エナラブリル単独では見られない。それゆえ、ネピカスタッフを、3 0 日間、S H R に 3 0 及び 1 0 0 m g / k g / 日投与すると、血圧降下が見られ、エナラブリルと併用すると、左心室重量の減少を伴う付加的な血圧降下作用が見られた。

10

20

【 0 1 7 9 】

血圧無線遠隔変換器を装着した正常血圧ウイスター ラットにおけるネピカスタッフによる血圧降下の影響は、3 0 及び 1 0 0 m g / k g / 日を 7 日間投与した場合、S H R よりも小さかつた。3 0 m g / k g / 日において血圧降下の減少値のピークは - 1 0 m m H g であり、S H R では - 2 0 であった。1 0 0 m g / k g / 日において血圧降下の減少値のピークは - 1 7 m m H g であり、S H R - 4 2 であった。それゆえ、正常血圧ラットでは、S H R においてより大きな血圧降下作用を有することがわかつた。

30

【 0 1 8 0 】

麻酔した正常犬において、ネピカスタッフの急速静注 (1 - 1 0 m g / k g 、静注) 5 時間後、動脈圧、左心圧 (d p / d t ピークを含む) 、心拍、心拍出量又は腎血流といった心血管効果は生じなかつた。意識下、常に血圧無線遠隔変換器を装着したイヌにおいても、単回投与 (3 - 3 0 m g / k g 、静注) の 1 2 時間後、同様に効果は欠如していた。

40

【 0 1 8 1 】

頸動脈を動脈閉塞させた麻酔した雄ビーグル犬に対し、ネピカスタッフ (3 0 m g / k g 、十二指腸内投与) を投与した場合、直接の腎神経刺激、又は動脈圧の上昇による腎血流の減少といった有意な阻害効果を示さなかつた。しかし、麻酔した雄のビーグル犬において、ネピカスタッフ投与 5 時間後、ノルエピネフリンレベルの減少及びドパミン / ノルエピネフリン比の有意な増加を引き起ししたが、ドパミンレベルの増加は見られなかつた。それゆえ、組織内ノルエピネフリンレベルは有意に減少したが、有意な交感神経系の機能的な応答の阻害は見られなかつた。

【 0 1 8 2 】

頸動脈を動脈閉塞させた麻酔した雄ビーグル犬に対し、ネピカスタッフ 4 . 5 日間、1 0 m g / k g / 日を投与した場合、統計的に有意な血圧低下及び心拍の増加は見られなかつた。ネピカスタッフ処置により、静注のチラミン刺激に対し有意に心拍増加反応を減少させたが、血圧上昇の阻害においては、有意にではなくわずかに反応したのみだった。それゆえ、組織内ノルエピネフリンレベルの低下が最大値の場合における投与量でのネピカスタッフの慢性投与は、主として交感神経系の機能的な応答に対する阻害効果を持たない。

【 0 1 8 3 】

ネピカスタッフでは、1 . 0 - 3 0 m g / k g 、経口の急性投与後においても、マウス

50

において有意な総運動行動への影響は見られず、自発運動への影響は見られなかった（10 - 100 mg / kg、腹腔内投与）。ラットへの急性投与（3 - 100 mg / kg、腹腔内投与）では、自発運動又は音への驚愕反応への影響はなかった。

【0184】

行動学的影響は、10日間10、30、及び100 mg / kg / 日、経口投与によっては、見られなかった。直腸温も影響を受けなかった。運動行動及び音への驚愕反応は、DBH阻害剤SKF-102698（100 mg / kg / 日、経口）及び中枢性-アドレナリン受容体アゴニストクロニジン（20 mg / kg、bid、経口）によって有意に減少した。SHRに30日を超える投与（3 - 100 mg / kg / 日、経口）をしても運動行動には影響を与えたかった。それゆえ、ネピカスタッフは、ラットにおいて、中枢神経系を介した行動学的效果は検出されなかった。10

【0185】

ネピカスタッフは、ヒトにおいてはインビトロで、ラット及びイヌにおいてはインビボで、DBH強力な競合阻害剤である。ラットにおいては、ネピカスタッフ6 mg / kg / 日の経口投与は、心臓及び腸間膜動脈においてDBH阻害を起こした。他のDBH阻害剤SKF-102698と異なり、ネピカスタッフでは大脳皮質ではなく、左心室及び腸間膜動脈への選択性を示した。ネピカスタッフでは、行動学的な影響はラットでは見られなかった。イヌにおいては、DBH阻害効果の安定状態が心臓、腎動脈及び腎臓において10 mg / kg / 日投与の場合に見られた。ネピカスタッフは、SHRにおいて交感神経刺激（3 mg / kg、経口）による昇圧反応を有意に減少させ、30日間、毎日1回の投与（30 mg / kg / 日、経口）において血圧を有意に低下させた。結論としては、ネピカスタッフは、強力な交感神経系作用を左右するDBH阻害剤であるといえる。20

【実施例9】

【0186】

ネピカスタッフの高用量投与による以下の薬物動態を評価するために試験をデザインした。雄及び雌のラットの薬物動態を比較するため、及び脳におけるネピカスタッフのレベルを定量することにより、ネピカスタッフの中枢神経系への浸透性を決定するためのデザインである。

【0187】

体重180 - 220 gの雄ラット（Cr1 : CD BR Vaf+）を、投与前終夜及び投与後4時間、絶食させた。2%1-ヒドロキシプロピルメチルセルロース（粘度50センチポワズ）、1%ベンジルアルコール、及び0.6%トウイーン80（全てシグマ化学社）を含む水で製剤化して投与した。投与溶液の薬物濃度は、10、30、及び100 mg / kg投与についてはそれぞれ5、15、及び50 mg / mlであり、液体クロマトグラフィー（LC）で確認した。5 mg / ml投与用は、透明な溶液であり、それよりも高い濃度のものは半透明な懸濁液であった。投与体積は、2.0 ml / kgとした。投与後の様々な時間において、血液サンプルはヘパリンコーティングシリングによる心穿刺によって採取し、血漿を遠心分離により得た。ラットの脳は外科的に摘出し、全てのサンプルは分析まで - 20 で凍結しておいた。30

【0188】

血漿（0.05又は0.5 ml）に、内部標準（5 µg / mlのネピカスタッフモノフルオロ口類似体及び5 mg / mlジチオスレイトールを含む50 µlメタノール）を混合した。サンプルは、200 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0、（0.5 ml）と混合し、3 mLの酢酸エチル / ヘキサンで抽出し（1 / 1、重量 / 重量）。分析体を含む有機層を250 mM 250 µlを酢酸で逆抽出し、100 µlの水層をLCで測定した。LCは、Keystone Hypersil BDS 15 cm C₈カラムを用いて室温で行った。移動相Aは、5 mMドデカンスルホン酸でpH 3.0にした12.5 mMリン酸カリウム、移動相Bアセトニトリルである。溶媒組成は、溶媒の構成が、40%のBで1 ml / minの流量であった。261 nmでのUV吸収を検出した。分析体の濃度は、未処置のラットに既知の濃度の血漿の分析体を投与して作成した標準曲線から決定した。4050

血漿中濃度データは、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （遊離塩基）で示す。

【0189】

脳は、簡単に生理食塩水で洗浄し、ペーパータオルで拭き、重量を測定した（1.5 - 2.0 g）。内部標準（20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のネピカスタッフのモノフルオロ類似体を含むメタノール溶液 50 μl ）を加え、0.5 mg/ml ジチオスレイトールを含む pH 7.0、200 mM リン酸ナトリウム 5 mL 溶液で脳をホモジナイズした。ホモジネート（2 ml）を 10 mL の酢酸エチル/ヘキサン（1/1、重量/重量）で抽出した。有機層を穏やかに 250 mM 酢酸の 150 μl で逆抽出した。

【0190】

水層に 100 μl のメタノール（あらゆる乳濁液を分散する）を加え、血漿を表す 100 μl を LC で分析した。脳組織中のレベルは、 g （遊離塩基）/g 脳組織で表される。

【0191】

薬物動態のパラメータを、平均血漿中濃度から計算した。血漿中半減期 ($T_{1/2}$) は、0.693/、ここで は、排泄速度は排泄速度定数によって、直線的回帰がある場合には、10 g 血漿中濃度 対 時間のデータを末端の直線的部分で決定する。血漿中濃度対時間曲線下面積 (AUC) は、時間ゼロから最後の定量可能な血漿中濃度を示した時間までを、台形ルールで計算した。AUC のゼロから無限大（総 AUC）は、以下の通り計算した：

【0192】

$\text{總 AUC} = \text{AUC}(0 - C_{last}) + C_{last} /$ 、ここで C_{last} は最後の定量可能な血漿中濃度である。

【0193】

雄ラットに対しネピカスタッフ 10、30、又は 100 mg/kg を単回経口投与した場合の血漿中濃度が得られた。ネピカスタッフの血漿中濃度は用量の増加に伴い上昇し、総 AUC 及び用量の間の関係は、直線的であった。排泄半減期は、高用量において、わずかに増加しているように見えた（雄ラットにおける 10、30、及び 100 mg/kg の経口投与の場合、それぞれ 1.70、2.09、及び 3.88 時間であった）。ネピカスタッフを 30 mg/kg を雌ラットに経口投与した場合、ネピカスタッフの血漿中総 AUC は、同用量を雄ラットに投与した場合よりも雌ラットにおいて 77% 高かった。脳内ネピカスタッフレベル ($\mu\text{g}/\text{g}$ で表す) は、初期には血漿中濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ で表す) よりも低かった。しかし、投与 2 時間後、ネピカスタッフの濃度は血漿中よりも高くなつた。

【0194】

血漿中ネピカスタッフレベルは、雄ラットに対する 10 ないし 100 mg/kg 投与の場合、総 AUC に基づき直線的に増加した。

【0195】

血漿中ネピカスタッフレベルは、30 mg/kg の投与量の場合、雌ラットにおける方が雄ラットよりも高かった。

【0196】

雄ラットに対しネピカスタッフ 10 mg/kg を投与した場合、脳内濃度は、初期には血漿中よりも低かったが、投与 2 時間後には脳内におけるネピカスタッフの濃度は、血漿中よりも高くなつた。

【実施例 10】

【0197】

この試験の目的は、自然発症高血圧ラットに対する単回経口投与による腸間膜動脈でのドバミン及びノルエピネフリンレベルへのネピカスタッフ（10 mg/kg）の効果を、24 時間の時間経過で調べることにある。カテコールアミンレベルは、ネピカスタッフ（10 mg/kg）又は担体（dH₂O；10 ml/kg）の単回経口投与の 1、2、4、6、8、12、16、又は 24 時間後において測定した。

【0198】

10

20

30

40

50

16 - 17 週齢、300 - 400 g の自然発症高血圧雄ラット (S H R) は食餌及び水を自由に与えられた。動物は午後試験の前に、計量し、ランダムに以下の処理群 (各群 n = 9) : ネピカスタッフ 10 mg / kg の単回経口投与、又は 1、2、4、6、8、12、16、又は 24 時間後に解剖する担体 (10 ml / kg) の単回経口投与の群、のいずれかに振り分けた。

【0199】

ネピカスタッフは、塩酸塩として合成され、ネピカスタッフは担体 (d H₂O) に溶解し、10 ml / kg の経口の繰り返し投与が可能なように調製した。全ての用量のネピカスタッフは、遊離塩基等価体として投与し、投与の朝に調製した。

【0200】

動物に解剖の朝、毎分投与した。投与 1、2、4、6、8、12、16 及び 24 時間後、9 匹の処置した動物及び 9 匹の担体を投与した動物をハロタン麻酔し、断頭し、迅速に左心室及び腸間膜動脈を摘出して計量した。腸間膜動脈は 0.4 M 過酸化水素酸 0.5 mL の入った遠心管に入れ、左心室は空のクリオチューブに入れた。両組織は、液体窒素で急速凍結し、-70 で保存した。腸間膜動脈カテコールアミンレベルは、電気化学的検出方法を用いて HPLC により分析した。断頭の際に体内からの血液を、ヘパリンを含んだチューブに採取し、4 で遠心し、血漿サンプルとした。

【0201】

それぞれの処理群は各時点で担体群と比較した。TRT、HARVEST 効果をもつ二元配置分散分析 (ANOVA) により分析し、それらの相互作用を調べた。TRT 因子による一元配置 ANOVA を、各摘出時に行った。処置群及び担体群における比較分析を、フィッシュラーの最小有意差法を用いて、実験あたりの同過誤率を制御するために行つた。ノルエピネフリン値は、4 時間後の時点においてのみ担体よりも有意 (p < 0.05) に低かった。6 時間後の時点では、下限ぎりぎりではあったが有意に低かった (0.05 < p < 0.1)。ドパミンレベルは、2 及び 6 時間後の摘出の際は担体よりも有意に高かった。ドパミン / ノルエピネフリン比は、1、2、4、6 及び 12 時間後の時点において、担体よりも有意 (p < 0.05) に高かった。

【0202】

一般に、自然発症高血圧ラットに対するネピカスタッフ 10 mg / kg の投与 1、2、4、6、8、12、16 又は 24 時間後において、腸間膜動脈におけるノルエピネフリン又はドパミンレベルに統計的に有意な効果を与えたなかった。しかし、処置後最初の 12 時間ににおいては、持続的なドパミン / ノルエピネフリン比の増加が見られた。16 及び 24 時間後の摘出における分析においては、3 つのパラメータには変化はなかった。

【実施例 11】

【0203】

この試験の目的は、SD 系ラットに対する静脈内投与によるネピカスタッフ (以下、ネピカスタッフと呼ぶ) の左心室での、ドパミン及びノルエピネフリンレベルへの影響を調べることにある。動物は、12 時間ごとに、担体 (7.5 % プロピレンギリコール + 2.5 % DMSO ; 1.0 ml / kg) 又は 15 mg / kg のネピカスタッフ 2 回の静脈内投与 (i.v.) を受ける。組織内ノルエピネフリン及びドパミンレベルを最後の化合物投与 6 時間後に測定した。

【0204】

300 - 400 g の 16 ないし 17 週齢の SD 系雄ラットに、食餌及び水を自由に与えた。午後試験の前に、動物を計量し、ランダムに以下の処理群 (各群 n = 10) : 担体 (1.0 ml / kg) 又はネピカスタッフ 15 mg / kg、のいずれかに振り分けた。

【0205】

ネピカスタッフを合成し、適切な容量の担体 (7.5 % プロピレンギリコール + 2.5 % DMSO) に溶解し、1.0 ml / kg として投与できるように調製した。ネピカスタッフは、遊離塩基等価体として投与し、初回投与の前日の午後に調製した。

【0206】

10

20

30

40

50

それぞれのラットに、摘出前日の午後に尾静脈に静注した。投与は、12時間後、翌朝にも行われた。最終投与の6時間後、ラットにハロタン麻酔をかけ、断頭し、左心室を迅速に摘出して計量した。左心室は、氷冷した0.4M過酸化水素酸1.0mL中に加え、組織は、組織内ドパミン及びノルエピネフリンレベルを、電気化学的検出方法により液体クロマトグラフィーにより測定した。

【0207】

ノルエピネフリンを処置の主作用として一元配置分散分析(ANOVA)を行った。クラスカル・ワリス検定をドパミンについて行い、処置群間に不均一な分散があるため、まずそれらの比を計算した。続いて、フィッシュヤーの最小有意差法を用いて、ネピカスタッフ処置ラット及び担体処置ラットを比較した。タイプ1の実験あたりの同過誤率5%以下となるようにボンフェローニ補正をすべてのp値を出す際に行つた。

10

【0208】

ネピカスタッフ15mg/kg投与の場合、担体投与動物と比較して、ノルエピネフリンレベルを51%有意に($p < 0.01$)減少させ、ドパミンレベルは472%有意に($p < 0.01$)増加し、ドパミン/ノルエピネフリン比は1117%有意に($p < 0.01$)増加した。

【0209】

結論としては、SD系ラットへのネピカスタッフの静脈内投与により、左心室においてDBHを有意に阻害したことがわかった。

20

【実施例12】

【0210】

この試験では、自然発症高血圧雄ラット(SHR)における皮質、左心室、及び腸間膜動脈における、ドパミン及びノルエピネフリンレベルを変化させる、ネピカスタッフの効果を評価した。動物には、12時間間隔で3、10、30又は100mg/kgを経口で、3回投与した。

30

【0211】

この試験では、Sエナンチオマー(ネピカスタッフ)をRエナンチオマー(化合物B)との効果の比較も、3回投与(30mg/kg)して行った。またこの試験では、ネピカスタッフを、以前ラットにおいて経口活性があることが示されていたDBH阻害剤である、SKF-102698、とも比較した。

【0212】

化合物は、遊離塩基等価体として調製し投与した。ネピカスタッフを適切な容量の担体に溶解した(ネピカスタッフはdH₂O、及びSKF-102698はPEG400:dH₂O=50:50(容積:容積))。用量3、10、30、及び100mg/kgのネピカスタッフ、及び30mg/kgのSKF-102698を10.0ml/kgとなるように調製した。

【0213】

15ないし16週齢自然発症高血圧雄ラット(SHR)(チャールス・リバー社)に食餌及び水を自由に与えた。動物は計量し、ランダムに以下の処置群:1)担体としての蒸留水(dH₂O)、又は3、10、30、及び100mg/kgのネピカスタッフ、2)化合物B30mg/kgの蒸留水溶液、又は、3)担体としてのPEG400:dH₂O又はSKF-102698を30mg/kg、に振り分けた。それぞれのラットに朝から開始して、3回、12時間間隔で経口投与した(投与チューブを用いた経口投与)。3回目の投与の6時間後、ラットをハロタン麻酔し、断頭し、皮質、腸間膜動脈、及び左心室を速やかに摘出し、計量し、氷冷した0.4M過酸化水素酸中に加え、液体窒素で凍結し、-70°Cで保存した。組織内ドパミン及びノルエピネフリンレベルを高速液体クロマトグラフィー及び電気化学的検出方法により分析した。

40

【0214】

4種の統計分析を行つた。最初のシリーズは、様々な投与量のネピカスタッフ、及び30mg/kgの化合物Bを担体コントロール動物と比較した。因子を用量及びブロッキン

50

グ因子を日とするノンパラメトリック一元配置分散分析(ANOVA)を、それぞれの組織及び種について別々に行った。全ての結果を報告する。処置群及びコントロール群の比較分析を、実験あたりの同過誤率を制御するためにダネット検定を用いて行った。2つめの統計的試験では、SKF-102698と、PEG-dH₂O担体処置群とを、ノンパラメトリックt-検定を用いて比較した。3つめの統計的試験では、30mg/kgにおける化合物Bと、ネピカスタッフとをノンパラメトリックt-検定を用いて比較した。4つめの統計的試験では、30mg/kgにおけるネピカスタッフと、SKF-102698とを、2つの異なる担体を用いたため、差異の違いを計算する直線的対比を以下の式に従い行った：

【0215】

10

$$\text{変化} = (\text{30mg/kg - 担体})_{\text{NEPICASTAT}} - (\text{30mg/kg - 担体})_{\text{SKF-102698}}$$

【0216】

この新しい変数にSASプロシージャーの一般的線形モデルによってゼロを代入しテストした。

【0217】

大脳皮質におけるドパミンレベルは、30及び100mg/kgのネピカスタッフ投与において、担体よりも有意に大きく($p < 0.05$)、ノルエピネフリンレベルは有意に低く($p < 0.05$)、及びドパミン/ノルエピネフリン比は有意に大きかった($p < 0.05$)。

20

【0218】

左心室におけるドパミンレベルは、3、10、30及び100mg/kg投与において、担体よりも有意に大きかった($p < 0.05$)。ノルエピネフリンレベルは、10、30及び100mg/kg投与において有意に低かった($p < 0.05$)。左心室におけるドパミン/ノルエピネフリン比は、ネピカスタッフ3、10、30、及び100mg/kg投与において、担体よりも有意に大きかった($p < 0.05$)。

【0219】

SHRの腸間膜動脈におけるドパミンレベルは、3、10、30及び100mg/kg投与において担体よりも有意に大きかった($p < 0.05$)。ノルエピネフリンレベルは、10、30、及び100mg/kg投与において担体よりも有意に低いとはいえたかった($p > 0.05$)。腸間膜動脈におけるドパミン/ノルエピネフリン比は、ネピカスタッフいずれのレベルにおいても担体よりも有意に大きかった($p < 0.05$)。

30

【0220】

化合物Bによる処置により、大脳皮質においてドパミン及びノルエピネフリンは両方とも、担体と比較して有意に増加し($p < 0.01$)、ドパミン/ノルエピネフリン比には影響を及ぼさなかった。ノルエピネフリンレベルは、ネピカスタッフにおいて化合物Bと比較して有意に低下した($p < 0.01$)。

【0221】

化合物Bによる処置により担体と比較して、左心室において、ドパミン及びドパミン/ノルエピネフリン比が有意に増加したが($p < 0.01$)、ノルエピネフリンレベルは有意に低下しなかった。ネピカスタッフは化合物Bよりも、ノルエピネフリンレベルをより有意に低下させ、ドパミン及びドパミン/ノルエピネフリン比を増加させた($p < 0.01$)。

40

【0222】

化合物Bによる処置により担体と比較して、腸間膜動脈において、ドパミン及びドパミン/ノルエピネフリン比が有意に増加したが($p < 0.01$)、ノルエピネフリンレベルを有意に低下させなかった。ネピカスタッフは化合物Bよりも有意に、ノルエピネフリンレベル低下させ、ドパミン及びドパミン/ノルエピネフリン比を増加させた($p < 0.01$)。

【0223】

50

大脳皮質におけるネピカスタッフをSKF-102698と比較すると、30mg/kg投与において、ドパミンレベルは皮質において、SKF-102698の30mg/kg投与の担体に対する場合よりも有意に増加した($p < 0.01$)。担体に対する増加は、SKF-102698における方がネピカスタッフよりも有意であった($p < 0.01$)。ノルエピネフリンレベルは、担体に対する減少は、ネピカスタッフよりもSKF-102698の方が有意に低下させた($p < 0.01$)。皮質におけるドパミン/ノルエピネフリン比は、SKF-102698の担体に対するよりも有意に増加させ($p < 0.01$)、SKF-102698の方がネピカスタッフにおけるよりも担体に対する増加は大きかった($p < 0.01$)。

【0224】

10

左心室におけるドパミンレベルは、SKF-102698では担体に対するよりも有意に増加し($p < 0.01$)、担体に対する増加はネピカスタッフの方がSKF-102698よりも大きかった($p < 0.01$)。SKF-102698処置によっては、ノルエピネフリンレベルは、担体に対して増加しなかったが、ネピカスタッフ処置では、SKF-102698よりも、担体と比較して有意にノルエピネフリンを低下させた($p < 0.01$)。左心室においてはドパミン/ノルエピネフリン比は、SKF-102698の担体に対するよりも有意に増加し($p < 0.05$)、ネピカスタッフの方が、SKF-102698の担体に対するよりも増加が大きかった($p < 0.05$)。

【0225】

20

腸間膜動脈におけるドパミンレベルは、SKF-102698では担体に対するよりも有意に大きく、担体に対する増加はネピカスタッフの方がSKF-102698よりも大きかった。ノルエピネフリンレベルは、SKF-102698の担体に対するよりも有意に低下し、ネピカスタッフは担体に対して、SKF-102698の担体に対してよりも、より有意に低下させた。左心室におけるドパミン/ノルエピネフリン比は、SKF-102698の担体に対するよりも有意に大きく、ネピカスタッフの担体に対する増加の方がSKF-102698の担体に対するよりも大きかった。

【0226】

30

結論としては、SHRに対し、12時間間隔で投与した場合、3回目の経口投与6時間後において、腸間膜動脈、左心室、及び大脳皮質において、ネピカスタッフはインビボでの強力なDBH阻害剤であることがわかった。30mg/kgの場合、Sエナンチオマーであるネピカスタッフが、Rエナンチオマー(化合物B)よりも3つのすべての組織において、より強力であった。さらに、ネピカスタッフは、3回の30mg/kg投与した場合、腸間膜動脈及び左心室においては、24時間以上に渡りSKF-102698よりも有効であったが、大脳皮質においては有効でなかった。

【実施例13】

【0227】

ネピカスタッフは、遊離塩基等価体として合成及び投与した。ネピカスタッフ及びメチマゾールは担体に溶解させて(66.7%プロピレングリコール:33.3%dH₂O)適切な濃度の投与用溶液を得、全ての投与が1.0ml/kgで行われるようにした。

【0228】

40

重量180-200gのSD系雄ラットに、投与14日前にヨウ素欠乏食を自由に与えた(ピュリナ社、5891C、Lot 1478、0.066±0.042mgヨウ素/試料kg)。動物を計量し、ランダムに以下の処置群(各群n=12):ネピカスタッフ2.0mg/kg、ネピカスタッフ6.2mg/kg、メチマゾール1mg/kg、又は担体1ml/kgに振り分けた。。各群のラットは、夜及び次の朝に約12時間間隔で、10日連続で行った。

【0229】

10日目の2回目の投与の4時間後、ハロタン麻酔し、断頭し、及び皮質、線条体、及び腸間膜動脈を摘出し、計量した。甲状腺機能の決定のためのコントロールとして用いただけであるため、組織サンプルはメチマゾール群からは摘出しなかった。腸間膜動脈、皮

50

質、及び線条体を速やかに氷冷した 0 . 4 M 過酸化水素酸に浸け、その日、HPLC によりノルエピネフリン及びドパミンレベルの測定に用いられるまで保存した。

【0230】

眼窩血サンプルは第 - 3、0、3、7、及び 9 日（第 0 日が、最初の投与日である）に採血した。血清サンプルは、放射性免疫アッセイを用いて T₃ 及び T₄ レベルを分析した。

【0231】

T₃ 及び T₄ レベルの変化を統計的評価するために、ベースラインからの変化を第 - 3 日から計算した。ノンパラメトリック二元配置被験者内分散分析（ANOVA）を行った。また一元配置 ANOVA も、コントロールからの有意差を検出するために行つた。実験あたりの同過誤率を制御するためフィッシュヤーの最小有意差法により、コントロール及びそれぞれの処置群を合わせて行つた。

【0232】

動物へのネピカスタッフ 2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg 投与によるノルエピネフリンレベルは、皮質においては、担体コントロールに対して有意に変化しなかった（p > 0 . 05）。2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg 投与群における腸間膜動脈におけるノルエピネフリンレベルは有意に低下し（p < 0 . 05）、2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg において両投与群とも線条体におけるノルエピネフリンレベルは、担体コントロールに比べ、下限ぎりぎりではあったが有意に低下した（p < 0 . 10）。

【0233】

ネピカスタッフ 2 . 0 又は 6 . 2 mg / kg 投与群のドパミンレベルは、3 つのすべての組織においていずれの投与量においても、担体コントロールに対して有意に変化しなかった（p > 0 . 05）。

【0234】

ネピカスタッフ 2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg 投与による皮質及び線条体におけるドパミン / ノルエピネフリン比は、担体コントロールに対して有意に変化しなかったが（p > 0 . 05）、ネピカスタッフ 2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg 投与による腸間膜動脈における比は、担体コントロールよりも有意に高くなつた（p < 0 . 05）。

【0235】

ネピカスタッフ 2 . 0 又は 6 . 2 mg / kg 投与では、ラット血清中の遊離 T₃ 又は総 T₄ レベルを変化させることによる甲状腺機能には影響を与えたなかった。陽性コントロールであるメチマゾール 1 . 0 mg / kg 投与では、T₃ レベルを全ての処置日及び T₄ レベルを第 3 及び 7 日において、担体コントロールよりも有意に低下させた（p < 0 . 05）。メチマゾール処置動物の T₄ レベルは、第 9 日において下限ぎりぎりではあったが有意に低下した（p < 0 . 15）。

【0236】

ネピカスタッフ（2 . 0 又は 6 . 2 mg / kg）では、ドパミン又はノルエピネフリンレベル、又はドパミン / ノルエピネフリン比に担体と比べて有意な変化は見られなかつた（p > 0 . 05）。線条体においては、6 . 2 mg / kg 投与群においてノルエピネフリンレベルに下限ぎりぎりではあったが有意な減少が見られたが（p < 0 . 10）、他の有意な変化は見られなかつた。ネピカスタッフ 2 . 0 及び 6 . 2 mg / kg 投与では、腸間膜動脈において有意にノルエピネフリンレベルを低下させ（p < 0 . 05）、有意にドパミン / ノルエピネフリン比を増加させたが（p < 0 . 05）、ドパミンレベルに有意差はなかつた。それゆえ、10 日間の投与により、ネピカスタッフは、SD 系ラットのインビボにおいて、大脳皮質又は線条体よりも腸間膜動脈に大きな効果を持つ、有効なドパミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤であることがわかつた。

【実施例 14】

【0237】

この試験は、ネピカスタッフをイヌに投与することにより、腎臓質及び腎皮質におけるドパミン及びノルエピネフリンレベルを決定する目的がある。雄ビーグル成犬を、ランダ

10

20

30

40

50

ムに4群に、各群8匹を振り分け、ネピカスタッフを経口投与した。ネピカスタッフは、5、15及び30mg/kgを単カプセル剤として投与した。担体は空のカプセルとした。それぞれのイヌに朝と午後に2用量を投与した(8-10時間間隔)。第5日朝に1用量を投与し、その6時間後にイヌを安楽死させた。腎臓質及び腎皮質サンプルを迅速に摘出し、計量し、氷冷した0.4M過酸化水素酸に浸け、液体窒素で凍結し、-70で保存した。

【0238】

ノルエピネフリン(NE)及びドパミン(D)レベルの定量のため、それぞれの組織を0.4M過酸化水素酸中、簡易な超音波処理をした。超音波後、ホモジネートを30分間4において13,000rpmで遠沈した。それぞれの上清を除去し、3、4-ジヒドロキシベンジルアミン(DHBA)を加えた。それぞれのサンプルからの抽出物は、電気化学的検出方法によりHPLC分離した。この方法は、それぞれの検体において定量限界2.0ng/mLであり、直線範囲は2.0ng/mLないし400ng/mLである。

10

【0239】

それぞれの検体において、組織の重量において計算し、組織のグラム数に対し、 μ グラムで表した。ドパミン、ノルエピネフリン及びドパミンレベルのノルエピネフリンレベルの比(D/NE)をそれぞれのイヌについて計算した。加えて、計算上の平均値及びD/NE比をそれぞれの処置群においてそれぞれの検体について計算した。

【実施例15】

【0240】

体重9-16kgの雄ビーグル犬(マーシャルファーム、North Rose、NY)を用いた。動物は水を自由に飲め、毎日1回午前10時までに食餌を与えられる。動物は、ランダムに以下の処置群(n=8/群)：プラセボ(空のカプセル)、又はネピカスタッフ2mg/kg bid(4mg/kg/日)、の一つに振り分けた。それぞれの動物は、毎日2用量、朝及び午後(8-10時間間隔)に投与される。血液サンプル(10ml)は、毎日、血漿中ネピカスタッフ及びカテコールアミンレベルの測定のために採血した。血液は、1時間以内にヘパリン及びグルタチオンを含むチューブに集め、-4で遠心した。血漿は、一つは血漿中カテコールアミンの測定のため、及びもう一つはネピカスタッフの分析のために、2つのサンプルに分けた。

20

【0241】

組織サンプルも、後の時点で組織内カテコールアミンの分析に必要と思われたときのために、イヌから採取した。第15日、午前の投与6時間後、最終血液サンプルを採血した(10ml)。イヌは、ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg、静注)で麻酔し、解剖台にのせ、2回目のペントバルビタール(80mg/kg、静注)で安楽死させた。速やかに正中開胸手術を行い、腹部切開を行った。腎動脈及び左心室を切り取った。開頭して前頭葉の大脳皮質を露出させ、生体組織を採取した。組織サンプルを計量し、氷冷した0.4M過酸化水素酸に浸け、液体窒素で凍結し、分析まで-70で保存した。

30

【0242】

血漿中のノルエピネフリン(NE)、ドパミン(DA)及びエピネフリン(EP)は、電気化学的検出方法を用いてHPLCにより分析した。ネピカスタッフの血漿中濃度は電気化学的検出方法を用いてHPLCにより分析した。

40

【0243】

B_{ox}-C_{ox}変換は、対数が適切な変動安定化変換であることを示した；それゆえすべての分析は対数値で行われる。イヌ1の第10日のDA濃度BQL(定量下限未満)を0とした；1n(0)は、欠損とした。分析は混合モデル(PROC MIXEDを用いた)を用いて行った。分析の日及び処置のカテゴリー変数が固定されており、イヌの処置が変量効果である。固定効果は、薬剤及びプラセボ群が日々変わることによる、日及び処置の相互作用が含まれる。間違った項目を特定のコントラストに訂正するCONTRASTによってコントラストが計算される。特に、比較する処置群のコントラストで平均2乗誤差を含む。

50

【0244】

ヘルマート変換を用いて安定状態の期間を計算した（SAS PROC GLMマニュアルを参照）。これらの変換は、それぞれの処置の平均を、それ以降の時点の処置の平均と比較する。安定状態の時間は、ヘルマートコントラストが統計的に有意であるとした最初の時点からの最大時間である。しかし、この方法は、本件に現れる場合のような、なだらかな変化のプロセスを検出することができないため、安定状態にある間の検体濃度の勾配も計算した。それぞれのイヌの安定状態にある間の勾配が計算され、動物ごとの勾配が得られる。そこから、勾配の単变量統計が計算され、平均勾配からの通常理論（Normal theory）の信頼区間、及び勾配ゼロの場合の仮説が試みられ、通常理論のp値が計算される。この勾配分析は、安定状態は濃度変化の期間であったかどうかの決定の基礎として用いられる。

10

【0245】

プラセボ群と比較し、ネピカスタッフ（2 mg / kg、bid）は、有意に血漿中NE（2.1倍）及びEPI（1.91倍）を減少させ、有意に血漿中DA（7.5倍）及びDA/NE比（13.6倍）を増加させた。

【0246】

血漿中NE及びEPIのピーク値の減少が第6日及び第8日にそれぞれ見られたが、血漿中DA及びDA/NE比の増加が第7日及び第6日にそれぞれ見られた。血漿中NE、DA及びEPIの安定状態は、それぞれおよそ第4、8及び6日であったと見られる。血漿中DA及びDA/NE比の変化は、全ての日の投与後において、プラセボと比較して有意に異なっていた。血漿中NEは、第4-9日及び第11-13日の投与後において、プラセボと比較して有意に異なっていた。血漿中EPIは、第7-9日及び第12日の投与後において、プラセボと比較して有意に異なっていた。

20

【0247】

ネピカスタッフの投与（2 mg / kg、bid）により、全ての薬物投与の日のネピカスタッフは血漿中濃度において有意に現れた。ピーク濃度は、投与2日後に現れた。有意なネピカスタッフのN-アセチル代謝物はいずれの日においても有意に現れることはなかった。

【0248】

ネピカスタッフ（2 mg / kg、bid、経口）の慢性投与（14.5日間）により、血漿NE及びEPIの有意な低下、及び血漿中DA及びDA/NE比の有意な増加が見られた。これらの変化は、ドパミン-ヒドロキシラーゼ酵素を阻害することを介して交感神経副腎系を阻害することを反映している。

30

【実施例16】

【0249】

ネピカスタッフを計量し、カプセルごとに5、15、及び30 mg / kg投与量となるようにカプセル剤を調製した（サイズ13-トーパック社；East Hanover、NJ）最初のイヌの体重を用いてそれぞれの動物の投与量を決定した。0 mg / kg / 日とは、イヌに空のカプセル（プラセボ）を投与する。全ての用量のネピカスタッフは、遊離塩基等価体として投与した。

40

【0250】

重量10-12 kgの32の雄ビーグル犬を、ランダムに以下の4つの処置群（各群n=8）：ネピカスタッフ0 mg / kg / 日（プラセボ）、10 mg / kg / 日（5 mg / kg bid）、30 mg / kg / 日（15 mg / kg bid）、又は60 mg / kg / 日（30 mg / kg bid）、に振り分けた。イヌの番号は、用量群Aには1-16をつけ、用量群Bには17-32をつけた。組織摘出のための最終の手術は、1日16動物を行い、2日以上がかかった。最初の化合物を投与する2又は3日前に、それぞれのイヌの重量を測定し、頭部、伏在静脈、及び頸静脈を覆う皮膚の部分の毛を剃った。投与は、1カプセルを経口投与、2回目は8-10時間後に投与することから構成される。第1-3日はスケジュール通り投与した。血漿中化合物濃度のベースラインを決定するために、第

50

4日には、午前の投与前に頸静脈から3mLの血液を採取した。次に、午前の投与を行い、投与1、2、4及び8時間後、血漿中化合物濃度を決定するために、3mLの血液サンプルを採取した。血液サンプルは、ヘパリンを含むチューブに入れ、4で遠沈し、-20で分析まで保存した。次に午後の投与をスケジュール通り行った。スケジュール通り午前の投与を行った。午前の投与約6時間後、血漿中化合物濃度の決定のために、最終の頸静脈から3mL血液サンプルを採取した。イヌにペントバルビタールナトリウムを、頭部又は伏在静脈に投与して麻酔し(~40mg/kg)、解剖室に運び、さらにペントバルビタールナトリウムを投与した(~80mg/kg、静注)。左心室、腎動脈、腎臓、腎髓質、腎皮質及び大脳皮質を速やかに摘出し、計量し、2mLの0.4M過酸化水素酸に加え、液体窒素で凍結させて-70で分析まで保存した。その後、カテコールアミン類をHPLCにより電気化学的検出方法を用いて分析した。すべての組織サンプルは2つの部分に分け、第2の部分は即時に液体窒素により凍結し、組織内化合物濃度の決定まで-70で保存した。第3に、貫壁サンプルは左心室から切り出し、即時に液体窒素で凍結させ、-70で分析まで保存し、受容体結合実験において用いた。

【0251】

貫壁のサンプルを50mMトリス-HCl、5mMNa₂EDTA緩衝液(pH7.4、4)で、ポリトロンP-10組織破碎装置を用いて(セッティング10、2×15秒間破碎)ホモジナイズした。ホモジネートは、500×gで10分間遠沈し、上清を氷浴で保存した。沈殿物は、再度懸濁して洗浄し、500×gで遠沈し、上清を合わせた。合わせた上清を48,000×gで20分間遠沈した。沈殿物は、再度懸濁して洗浄し、ホモジナイズ用の緩衝液で1回及び50mMトリス-HCl、0.5mMEDTA緩衝液で2回洗浄した(pH7.4、4)。沈殿した膜は-70で、必要となるまで保存した。飽和試験は、50mMトリス-HCl、0.5mMEDTA(pH7.4、32)を含む[³H]CGP-12177で行った。非特異的結合を10μMイソプロテノールによって特定した。総結合、非特異的結合、及び総カウントチューブを、0.016nMないし2nMの8つの濃度の[³H]CGP-12177のためにセットした。サンプルは、3260分間で培養した。サンプルはブランデルセルハーベスターを用いて0.1%PEI前処理GF/Bガラス纖維フィルターマットで濾過した。サンプルは、3回3秒間、室温の水で洗浄した。アクアゾルシンチレーション試薬をそれぞれのバイアルに加え、液体シンチレーションカウンターで放射性同位体を特定した。飽和結合等温を、最初の総リガンド濃度から遊離リガンド濃度への変換の後に分析した(総-結合=遊離)。個々の飽和等温をそれぞれの組織において計算した。細胞膜はタンパクとして、バイオ-ラッドタンパク質結合法を用いてグロブリンを標準物質として細胞膜のアッセイとした。受容体の密度は、タンパク質に対するmgで表され、それぞれの処置群の平均をとった。組織内カテコールアミン濃度は、ネピカスタッフ処置群をプラセボ(コントロール)群と比較して分析した。ノンパラメトリック一元配置分散分析(ANOVA)により、投与量を因子として、それぞれの組織及びそれぞれのカテコールアミン類を別々に測定した。それぞれの投与量における処置群とコントロールの対比分析を、実験あたりの同過誤率を制御するためダネット検定を用いて行った。Student-Newman-Keuls及びフィッシャーの最小有意差法を検証のために行った。組織及び血漿中の化合物濃度の分析は、2つの方法で行った。1つ目は、それぞれのパラメータを、それぞれの対応する用量を対応する用量の因子のパラメータとして比較するために個別のt-検定を行った。例えば、10mg/kg投与を3回行った場合、特定の組織又は血漿においては、30mg/kg投与群と匹敵する化合物濃度が見られるはずである。加えて、一元配置ANOVAにおいて、直線的直交コントラストを3つのすべての用量について計算した。対比t-検定は、担体群とネピカスタッフ10mg/kg/日投与群とにおいて結合の差異があるかを決定するために行った。

【0252】

イヌに0、5、15、又は30mg/kgのネピカスタッフのカプセル剤bidを10、30、及び60mg/kg/日となるよう4.5日間投与し、最後の投与の6時間後

10

20

30

40

50

に組織を摘出した。腎動脈においては、10、30及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合には、それぞれ86%、81%及び85%、有意にノルエピネフリンレベルを低下させた($p < 0.01$)。ドパミンレベルは10、30及び60mg/kg/日投与の場合には、それぞれ180%、273%及び268%、有意に増加させた($p < 0.01$)。10、30及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合には、ドパミン/ノルエピネフリン比を、それぞれ1711%、1767%及び1944%、プラセボに比べて有意に増加させた($p < 0.01$)。10及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合、大脳皮質ドパミンレベルは、それぞれ632%及び411%、有意に増加した($p < 0.01$)。ドパミン/ノルエピネフリン比は、10mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合には、531%増加し、及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与後においては、有意に($p < 0.01$)612%増加した。ノルエピネフリンレベルは、2つの投与量においては有意に変化をしなかった($p > 0.01$)。30mg/kg/日投与では、ノルエピネフリンは63%、有意に減少し($p < 0.01$)、比は86%、有意に増加したが($p < 0.01$)、ドパミンレベルはプラセボに対して174%、からうじて増加した($0.05 < p < 0.10$)。10、30及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合、ノルエピネフリンレベルは左心室においては、それぞれ85%、58%及び79%、有意に減少した($p < 0.01$)。ドパミン/ノルエピネフリン比はプラセボ動物に対して、それぞれ852%、279%及び607%有意に($p < 0.01$)。10、30、及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合には、ドパミンレベルの有意な変化は見られなかった。

10

20

30

40

【0253】

10、30及び60mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合、腎皮質において、プラセボと比較してノルエピネフリンレベルは、それぞれ86%、66%及び85%、有意に減少した($p < 0.01$)。これらの濃度において、ドパミンレベルは、それぞれ156%、502%及び208%、有意に増加した($p < 0.01$)。10、30、及び60mg/kg/day投与の場合、ドパミン/ノルエピネフリン比は、それぞれ1653%、1440%及び1693%、有意に増加した($p < 0.01$)。10、30及び60mg/kg/dayネピカスタッフ投与の場合、腎髄質、ドパミン/ノルエピネフリン比は、プラセボに対してそれぞれ555%、636%及び677%、有意に増加した($p < 0.01$)。10及び60mg/kg/day投与の場合、ドパミンレベルは522%、有意に増加し($p < 0.01$)、30mg/kg/dayでは、それぞれ150%及び156%、下限ぎりぎりではあったが有意に増加した($0.05 < p < 0.10$)。10mg/kg/日のネピカスタッフ投与の場合、ノルエピネフリンレベルは72%、プラセボに対して有意に減少した($p < 0.01$)。60mg/kg/day投与の場合、69%、下限ぎりぎりではあったが有意に減少した($0.05 < p < 0.10$)。

40

【0254】

第4日のネピカスタッフの血漿中濃度及び、第5日の組織及び血漿中濃度は、それぞれの投与レベルと、対応濃度の因子レベルは、用量に依存していた。それゆえ、投与点は以下の例外を除いて直線的であることがわかった(有意な結果からは、このデータは直線的でないことを示唆している)。

40

【0255】

腎髄質： $3 \times 10 < 30$ ($p < 0.05$)

腎髄質： $6 \times 10 < 60$ ($p = 0.077$)

血漿(第4日)： $2 \times 30 > 60$ ($p = 0.076$)

40

【0256】

第5日においては、全ての組織内ネピカスタッフレベルは、血漿中よりも高かった。

40

【0257】

10mg/kg/日のネピカスタッフ投与群における左心室サンプルでは、担体処置群と差がなかった。

40

【実施例17】

50

【0258】

ネピカstatttについて、チロシンヒドロキシラーゼ、NO合成酵素、ホスホジエステラーゼIII、ホスホリパーゼA2、中性エンドペプチダーゼ、Ca²⁺/カルモジュリンタンパク質キナーゼII、アセチルCoA合成酵素、アシルCoA-コレステロールアシルトランスフェラーゼ、HMG-CoA還元酵素、タンパク質キナーゼ（非選択的）及びシクロオキシゲナーゼ-Iに対する酵素活性を調べた。図4に示されるように、ネピカstatttは、調べた12すべての酵素についてIC₅₀ > 10 μMであり、ドバミン-3-ヒドロキシラーゼ阻害剤として抗選択的であるといえる。（>1000倍）。

【実施例18】

【0259】

ウシDBHはシグマ化学社(St. Louis, MO)から入手した。ヒト分泌性DBHは、神経芽細胞腫細胞株SK-N-SHの培養細胞から精製され、阻害活性のデータを得るために用いた。25mLゲルを含むレンチルレクチンセファロースカラムを充填し、50 mM KH₂PO₄、pH 6.5、0.5 M NaClで並行化した。カラムは、50 mM KH₂PO₄、pH 6.5、0.5 M NaCl中10%メチル-D-マンノピラノシド35mLを含む溶液を0.5 mL/分で溶出した。最も多く酵素活性を有する分画を集め、YM30膜を用いてアミコン攪拌細胞で濃縮した。メチル-D-マンノピラノシドを50 mM KH₂PO₄、pH 6.5、0.1 M NaClによるバッファー交換で除いた。濃縮した酵素溶液、-25で保存した。

【0260】

基質としてチラミン及びアスコルビン酸を用いてDBH活性を測定するのにHPLCアッセイを用いた。この方法は、逆相HPLCクロマトグラフィーによるチラミン及びオクトバミンの分離及び定量に基づく(Feilchenfeld, N.B., Richter, H. & Waddell, W.H. (1982). Anal. Biochem: A time-resolved assay of dopamine-3-hydroxylase activity utilizing high-pressure liquid chromatography. 122: 124-128)。アッセイは、pH 5.2、37で、0.125 M NaAc、10 mM フマル酸、0.5~2.0 μM CuSO₄、0.1 mg/mL カタラーゼ(6,500 u、ベーリングガーマンハイム社、Indianapolis, IN)、0.1 mM チラミン、及び4 mM アスコルビン酸を用いて行った。典型的なアッセイとしては、0.5~1.0 ミリユニックの酵素を反応混合物に加え、カタラーゼ、チラミン及びアスコルビン酸を含む基質混合物を加えて反応を開始した（最終容積200 μl）。試料は37で30~40分間培養した。反応は、25 mM EDTA及び240 μM 3-ヒドロキシチラミン（内部標準）を含む停止溶液でクエンチした。試料(150 μl)をギルソンオートサンプラーにアプライし、280 nm UV検出のHPLCで分析した。PC-1000ソフトウェア（サーモセパレーション（Thermo Separations）社製、Fremont, CA）をデータの統合及び分析に用いた。HPLCは、流速1 mL/分、リクロカート125-4 RP-18カラムを用いて10 mM 酸、10 mM 1-ヘプタンスルホン酸、12 mM テトラブチルアンモニウムホスファート、及び10%メタノールを含む均一濃度溶出で行った。残物質の活性%は、阻害剤を含まないコントロールから計算し、内部標準及び非線形4係数用量反応曲線から得られたIC₅₀値で補正した。

【0261】

[¹⁴C]-チラミンの精製。[¹⁴C]-チラミン塩酸塩はC18ライトロードカラム（2つのカラムを1つに結合したもの）で精製し、2 mLのMeOHで洗浄し、2 mLの50 mM KH₂PO₄、pH 2.3、30%アセトニトリル、及び続いてpH 2.3、4 mLの50 mM KH₂PO₄で洗浄した。真空マニホールド(Speed Mate 30、アプライドセパレーション（Applied Separations）社）を用いて、真空でカラムを洗浄し、溶出した。[¹⁴C]-チラミンをアプライし、カラムを50 mM KH₂PO₄、pH 2.3 6 mLで洗浄し、30%アセトニトリルを含む50

10

20

30

40

50

$\text{mM K H}_2\text{P O}_4$ 2 mLで溶出した。溶出液は、アセトニトリルを除くために凍結乾燥し、 H_2O に再懸濁させ、-20°で保存した。

【0262】

酵素アッセイは放射活性法によって行った。酵素活性は、 $[{}^1{}^4\text{C}]$ チラミンを基質として用い、C18カラムを用いて生成物を分離する。アッセイは、200mL容器に、100mM NaAc、pH 5.2、10mM フマル酸、0.5μMCuSO₄、4mM アスコルビン酸、0.1mg/mlカタラーゼ及び様々な濃度のチラミンを加えて行った。それぞれの反応における総カウント数は~150,000cpmであった。ウシDBH(各反応につき0.18ng)を37中、反応緩衝液中、チラミン及び阻害剤と混合した。反応は、アスコルビン酸/カタラーゼ混合物を加えることにより開始し、37で30分間培養した。反応は、25mM EDTA、50mM KH₂PO₄、pH 2.3の100mLで停止させた。MeOHであらかじめ洗浄し、50mM KH₂PO₄、pH 2.3で平衡化したC18ライトロードカラム(2つのカラムを1つに結合したもの)に全混合物をアプライした。シンチレーションバイアルへの溶出液は、KH₂PO₄、pH 2.3緩衝液で2回、続いて2mLの同じ緩衝液で洗い込んだ。レディセーフシンチレーション液(16ml)をシンチレーションバイアルに加え、 ${}^1{}^4\text{C}$ 放射性同位体の計測のために試料を加えた。

10

【0263】

チラミン濃度: 0.5、1、2、3、4mMの場合における阻害の速度を調べるため、0、1、2、4、8nMのネピカstatt濃度で試験した。 ${}^1{}^4\text{C}$ カウントは、上述で行ったのと同一であった。酵素を含まないプランクコントロールは、バックグラウンドを得るために行った。データは、バックグラウンドの計算のために集められ、nmol/min活性に変換し、プロットした(1/V対1/S軸)。Km'は、傾斜及びY切片から計算され、Ki値を得るために、線形回帰により計算した。

20

【0264】

基質濃度が37でpH 5.2、0.1mMチラミン、4mMアスコルビン酸の場合におけるヒト及びウシDBHに対するSKF-102698、ネピカstatt及び化合物BのIC₅₀値をHPLCアッセイにより求めた。3つのすべての化合物とも、用量依存的にウシ及びヒトのいずれの酵素についてDBH阻害活性を有していた。

30

【0265】

ネピカstatt、化合物B及びSKF-102698のIC₅₀値から、Sエナンチオマー(ネピカstatt)はヒトの酵素についてRエナンチオマーよりも強力であることがわかった(化合物Bよりも3倍、ウシDBHに対して2倍)。ネピカstattは、SKF-102698よりも8倍ウシDBHに対して、及び9倍ヒトDBHに対して活性を有することがわかった。

30

【0266】

0.6mMにおけるKmは、ラインウィーバー-バークプロットで求めた。ネピカstatt(1-8nM)は競合阻害剤において見られるKmに大きなシフトが見られた。ネピカstattによるウシDBH阻害は、チラミンと競合していると考えられる。線形回帰によりKiは、4.7±0.4nMと算出した。

40

【0267】

ネピカstattは強力なヒト及びウシDBH阻害剤である。SKF-102698の8-9倍強力な阻害効果を有する。ネピカstatt(Sエナンチオマー)は、化合物B(Rエナンチオマー)よりも2-3倍強力である。ネピカstattによるウシDBH阻害は、Kiが4.7±0.4nMとなり、チラミンと競合していると考えられる。

【実施例19】

【0268】

ネピカstattの親和性は、標準的放射性リガンド結合アッセイ法によって測定した。

【0269】

競合結合データは、4パラメータロジスティック法により逐次曲線にフィッティングさ

50

せて、分析した。ヒル係数及び $I_{C_{50}}$ 値は直接得られた。競合するリガンドの pK_i (-log K_i)は、チェンブルソフの等式により $I_{C_{50}}$ 値から計算した。

【0270】

ネピカスタッフは、1受容体に対して中程度の親和性を有した(pK_i は6.9-6.7)。他の全ての受容体に対する親和性は比較的低かった($pK_i < 6.2$)。

【実施例20】

【0271】

投与に際しては、担体とネピカスタッフ粉末を混合し、振とうすることにより、ネピカスタッフ製剤60-mg/mlを調製しておいた。6-及び20-mg/mlのネピカスタッフ製剤は、60-mg/ml製剤を担体で希釈することにより得た。再構成したネピカスタッフ製剤は使用期間中、活性を保っていた。水溶性の担体及びネピカスタッフ製剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ベンジルアルコール、及びポリソルベート80を含んでいる。

【0272】

用量選択は、マウスにネピカスタッフ250、1000、又は2500mg/kgを単回経口投与する急性毒性試験に基づいて行った。1000及び2500mg/kgの場合に毒性の臨床的なサインが現れ死亡した。

【0273】

担体又はネピカスタッフ製剤の単回経口投与は、げっ歯類用挿管器を用いて強制投与により行った。経口ルートが選択されたのは、臨床的に投与される経路と考えられるからである。投与用量は、投与前に記録した個々の体重に基づいて計算した(本明細書において体重は表にしていない)。食餌及び水は、プロトコールに1.5時間と特定して記載しなかった場合には、2.5ないし3.5時間前にやめさせた。この違いは試験の整合性に影響を与えるものではなかった。

【0274】

臨床所見を投与前に記録した。投与後、最初の60分、それぞれの処置群のマウスは、3匹までの群として、約10分間隔で臨床所見を評価し、プロトコール仕様の行動テストを行った。30-mg/kg投与群の1匹、及び100-mg/kg投与群の1匹は投与後に死亡したので、試験から除いた。残ったマウスは、観察/試験期間の終了後に安楽死させ、試験から除いた。

【0275】

各群6匹の雄マウスに、それぞれ投与チューブを用いて0(担体)、30、100、又は300mg/kgのネピカスタッフを単回経口投与した。臨床所見は、試験製剤の投与60分後に開始した。観察終了後、残ったすべてのマウスは安楽死させ、試験から除いた。

【0276】

担体コントロール群と比較して、30-、100-、及び300-mg/kg群において体温低下が見られた。処置に関連した臨床的拳動又は相対的な行動の変化は見られなかつた。直腸温度データ及び観察及び行動試験データが得られた。処置に関連した臨床的拳動又は相対的な行動の変化は見られなかつた。異常な群衆性(その他の反応としてリストに挙げた)は、100-mg/kg投与群に見られたが、300-mg/kg投与群には見られなかつた;これは偶然に起こつたことと考えられる。100-mg/kg投与群に1匹見られた臨床学的/行動学的变化とは、不活発化、異常な歩き方及び姿勢、誘発行動の減少、異常な無抵抗性、及び穏やかな/継続した発声であった;これらの変化は、ネピカスタッフによるものではない。30-及び100-mg/kg投与群において、投与後1匹ずつ死亡したことは、偶然であると考えられ、試験から除いた。

【実施例21】

【0277】

この試験の目的は、DBH阻害剤であるSKF-102698及びネピカスタッフ投与により、自発運動又は音への驚愕反応に変化を及ぼすかを調べることにある。それゆえ、

10

20

30

40

50

これらの行動の変化は、これらの化合物の中核神経系での働きを反映していると考えられる。

【 0 2 7 8 】

成熟 S D 系雄ラット（試験日の体重 250 - 350 g）は、チャールスリバー社から入手した。ラットは、9時から21時に電気をつける通常の明／暗サイクルで飼育した。動物は、つがいで通常の金属ワイヤーケージで、食餌及び水は自由に摂らせた。

【 0 2 7 9 】

自発運動箱は、18" × 18"、高さ 12" のプレキシガラス（登録商標）の箱からなる。プレキシガラス（登録商標）の箱は、1インチ幅フォトビームの及び箱ごとに 32 まで番号を付けられたフォトセンサーからなるオムニテックデジスキャン動物行動モニター（モデル番号 R X X C M - 16）によって囲まれている。オムニテックデジスキャン分析装置によって、フォトビームの遮断の数を分析した（モデル番号 D C M - 8）。動物は、外部音を遮断するため、ホワイトノイズ装置の稼働している部屋の中で試験をした。

10

【 0 2 8 0 】

音への驚愕反応試験は、8つの S R - L a b 小動物用驚愕反応測定装置（サンディエゴインスツルメンツ社、San Diego、CA）による自動試験台において行った。ラットは、それぞれ、防音装置を組み込んだプレキシガラス（登録商標）シリンドラー（直径 10 cm）に入れた。騒音（上昇及び下降時間が 1 秒の広帯域雑音）を、動物の 30 cm の上のスピーカから発せられる。電圧加速度計により被検体の動きを 0 ないし 4095 の任意の電圧に変換する。

20

【 0 2 8 1 】

薬物投与前に、72 のラットそれぞれを驚愕装置に入れ、5 分の順応時間の後、ラットに騒音を 15 分にわたり 20 秒間ずつ（計 45 回の驚愕）騒音に曝した。驚愕 11 ないし 45 の平均の驚愕をそれぞれのラットについて計算した（最初の 10 回の驚愕は除く。）。これらのラットのうち、それぞれの群において同様の平均驚愕値を示した、64 を 8 処置群のいずれかに振り分けた。8 つの処置群とは：SKF - 102698 (100 mg / kg) 及びその担体 (50% 水 / 50% ポリエチレングリコール)、クロニジン (40 μg / kg)、ネピカスタッフ (3、10、30 及び 100 mg / kg)、及びそれらの担体である d H₂O、である。以前の試験から、ラット間において驚愕反応には顕著な多様性があるが、その日及びその次の日に測定することにより、ラット内において高度の一貫性があることが示されている。

30

【 0 2 8 2 】

この試験方法により、その次の日に、8 匹のラットにそれぞれの薬物処置をし、即時に運動行動箱に入れ、ラットの運動行動を 4 時間観察した（各処置群 1 匹のラット）。次にラットを移動ケージに 15 分おいた。15 分の開始時に、クロニジン投与を受けたラットは次の 40 μg / kg の注射を受けた。次にラットを驚愕装置に入れ、5 分の順応時間の後、90 dB の騒音に 1 分間隔で 4 時間曝した。

40

【 0 2 8 3 】

運動行動を評価するために、水平行動（光線を遮断した回数）、動きの回数、及び休息時間を測定した。それぞれのパラメータを別々に分析した。それぞれの時間間隔（又はサンプルという）について、その日の処置による効果を試験するために、二元配置分散分析（ANOVA）を順位化したデータ（ノンパラメトリック法）を用いて行った。処置群と担体コントロール群の対比試験を、ダネット t - 検定によっても行った。

【 0 2 8 4 】

驚愕反応を評価するため、それぞれの驚愕の直前に、200 ミリ秒間に発揮される平均の力、及び最大の力を測定した。平均最大、及び平均電圧（MAX MEAN 及び AVG MEAN）を、それぞれの試験（TRIAL N）のそれぞれの処置（TREAT）ごとに計算し、これらの値をプロットした。プロットは本明細書に添付した。試験 1 - 60 を時間 = 1、試験 61 - 120 を時間 = 2、試験 121 - 180 を時間 = 3 及び試験 181 - 240 を時間 = 4 とした。平均最大及び平均驚愕反応を、それぞれの処置についてそれぞ

50

の時間で計算した。平均値を、共分散を用いて分析した。研究者の関心となっているのは、ある時間における処置間の比較であって、時間による処置内の影響ではない。それゆえ、驚愕反応を時間で分析した。モデルは、試験された日、驚愕反応のベースライン、及び処置の項目を含む。日は阻害要因であり、驚愕反応のベースラインは共変数である。上述のそれぞれの目的物には、3つの異なるモデルがあった。多重比較の可能なダネット検定の手法で、様々な用量のネピカスタッフを担体と比較した。

【0285】

4つのネピカスタッフ処置群を担体処置したコントロール群と比較したが、全体としては、試験中3つの項目について、いずれの時間においても、有意な差はなかった。

【0286】

担体処置したコントロール群と比較し、クロニジン処置群は、2及び2.5時間における水平方向の運動が有意に活発となり、2時間では運動量が有意に増加し、2時間では休息時間が有意に減少した（すべて $p < 0.05$ ）。1時間後では、クロニジン処置群が、担体処置したコントロール群よりも休息時間は有意に多かったことは注目すべきである（ $p < 0.05$ ）。

【0287】

担体処置したコントロール群と比較して、SKF-102698処置群は、有意に水平方向の活動が減少し、2.5時間において運動量が有意に減少した（両方とも $p < 0.05$ ）。SKF-102698処置群は、担体処置したコントロール群よりも1.5及び4時間後では運動量が有意に増加していたことは注目すべきである（いずれも $p < 0.05$ ）。SKF-102698及び担体処置群において、休息時間に有意な差はなかった。

【0288】

一般に、水平運動及び運動量は、最初の2時間で減少し、最後の2時間に低くとどまった。同様に、休息時間は、最初の2時間で増加し、最後の2時間は多かった。

【0289】

ネピカスタッフは、ラットの自発運動に有意に影響を与えたかった。動物にネピカスタッフ3、10、30又は100mg/kgを投与した場合、担体処置したコントロール群と比較して、水平方向の運動、運動量及び休息時間に有意差はなかった。

【0290】

驚愕反応において、全体としていずれの反応についてもいずれの時間においても、ネピカスタッフ及び担体処置による有意差は見られなかった（ $p > 0.05$ ）。全体として、時間2における平均驚愕反応は、下限ぎりぎりではあったが有意であり、（ $p = 0.0703$ ）、ダネット検定では、ネピカスタッフ30mg/kg投与群において、担体群よりも有意に平均驚愕反応が見られた（ $p < 0.05$ ）。ベースラインは、平均驚愕反応において、統計的には、時間3及び4の両方において平均驚愕反応は有意であり（ $p = 0.05$ ）、時間1及び2における、最大驚愕反応、及び時間2における平均驚愕反応は下限ぎりぎりではあったが有意であった（ $p = 0.10$ ）。

【0291】

SKF-102698（100mg/kg）では、いずれの時間において驚愕反応を測定した場合でも、担体との有意差はなかった。

【0292】

クロニジンは、担体に比べ、最大及び平均驚愕反応を時間1において（ $p < 0.01$ ）及び時間2においては平均驚愕反応についてのみ（ $p = 0.0352$ ）、統計的に有意に低下した。クロニジン処置において、時間2における最大驚愕反応、及び時間3における平均驚愕反応は、水投与群よりも下限ぎりぎりではあったが有意であった。

【0293】

ネピカスタッフ3、10、30、又は100mg/kg投与では、いずれの時間においても担体と比較して、最大または平均驚愕反応に効果を及ぼさなかった。SKF-102698投与では、担体（PEG）の場合と同様の挙動を示した。クロニジンは、有効に早期の段階からの最大及び平均驚愕反応を低下させ、後半では担体投与の場合と同じように

10

20

30

40

50

拳動した。

【実施例 2 2】

【0 2 9 4】

ラットに対するネピカスタッフ投与の慢性の投与効果を見た。最初の投与前 3 ないし 13 日目の間に、ラットを驚愕装置に入れ、5 分の順化の時間の後、ラットに 20 分に渡り、1 分間に平均 1 回の 118 dB の騒音を与えた（試験間の間隔の変数は、30 から 90 秒とした。）。驚愕反応を測定し、最後の 20 の驚愕反応をそれぞれのラットについて計算した。ラットは、ランダムに 8 つの処置群：ネピカスタッフ、5、15 又は 50 mg / kg、bid；SKF-102698、50 mg / kg、bid；クロニジン、20 μg / kg、bid；d - アンフェタミン、2 mg / kg、bid；dH₂O 又はシクロデキストリン（SKF-102698 の担体）に分類した。ラットに 10 ml / kg 投与の経口強制投与を行った。ラットには、午前及び夕方に 10 日間投与した。午前及び夕方の投与時間間隔は、6 及び 10 時間である。以前の研究により、驚愕反応への多様性には有意差はあるが、その日および次の日において高い一貫性を示し、この手順が音への驚愕反応に最も適切であることが示されている。10

【0 2 9 5】

96 全てのラットを同日に試験することは不可能であったため（8 処置群、n = 12）、投与計画をずらし、毎日 8 ラットについて実施した。これら 12 グループの 8 ラットは、それぞれ 8 つの処置群から 1 匹ずつ選ぶことからなることで、日の違いのバランスをとることができる。さらに、すべての処置群は 8 つの運動行動装置によってもバランスをとったが、驚愕反応装置に関しては、処置群間のバランスとれなかった。20

【0 2 9 6】

投与中及び慢性投与の後に以下の行動試験；中核体温、運動行動、音への驚愕反応、及び聴覚驚愕に対するプレパルスインヒビション、を行った。

【0 2 9 7】

動物は、ホワイトノイズ発生装置の稼働している部屋の中で行った。運動行動試験は、第 10 日の中核体温を測定した直後に行った（第 10 日のネピカスタッフ及び SKF-102698 の第 10 日の朝の投与を行った約 3 時間 35 分後で、クロニジン及び d - アンフェタミンの毎日の投与の 20 分前）。運動行動試験は、1 時間行った。診断用プログラムは、光線及び光センサーが適切に働くかを確認するために、運動行動装置はそれぞれの試験の前に作動させた。運動行動は、行動テストとなる中枢ドパミンレベルの変化に敏感に応答し（Dietze and Kuschinsky, 1994）、この行動試験は DBH 阻害剤のインビボ試験として可能性のある敏感な試験であることがわかった。D - アンフェタミンは、このアッセイにおいて陽性コントロールとして用いた。30

【0 2 9 8】

ラットの中核体温の測定は、直腸プローブを 2 cm それぞれのラットの直腸に挿入して行った。それぞれのラットの中核体温は 3 回測定し、平均を計算した。中核温度は、第 10 日の慢性投与の直前に行い（ベースラインを決定するため）、第 1 日、5、及び 10 日のネピカスタッフ及び SKF-102698 の朝の投与の 3.5 時間後、及びクロニジン及び d - アンフェタミン投与の 15 分前に行った。中核体温は、ドパミン及びノルエピネフリンレベルに敏感に反応し、この行動試験が、DBH 阻害剤のインビボ試験として可能性のある敏感なアッセイであることがわかった。クロニジン（2 アゴニスト）、及び d - アンフェタミン（ドパミン分泌剤）をこのアッセイのポジティブコントロールとして行った。40

【0 2 9 9】

音への驚愕反応（速い筋収縮が強い音のノイズのバースト音に合わせて、起こること）、及びプレパルスインヒビション（驚愕しない刺激の直後に驚愕刺激を与えた場合における、驚愕反応のあらゆる減少を分析することにより測定した感覚運動ゲーティング）を 8 つの SRLab（サンディエゴインスツルメンツ社，San Diego, CA）による試験台において行った。ラットは、それぞれ防音装置を組み込んだプレキシガラスシ50

リンダー（直径 10 cm）に入れた。聴覚騒音（上昇及び下降時間が 1 秒の広帯域雑音）を、動物の 30 cm の上のスピーカーから発せられる。また、これらのスピーカーは、試験期間中 68 dB のバックグラウンドのノイズを出していた。プレキシガラスシリンダーの下に電圧加速度計を備えた電圧加速度計により、被検体の動きを電圧に変換し、続いて S R - L a b ソフトウェアおよびインターフェース集合体を有する PC で修正してデジタル化（目盛り 0 ないし 4095）する。デシベル計は、スピーカーの 8 つの試験台の平均値の ± 1 % の修正を行うために用いた。加えて、S R - L a b 修正装置は、8 つの驚愕検出装置をそれぞれ平均値の ± 2 % の修正をするために用いた。驚愕反応及びプレパルスインヒビションテストは、運動行動試験の直後（朝のネピカスタッフ及び SKF - 102698 注射の約 4 時間 40 分後、及び第 10 日の追加のクロニジン及び d - アンフェタミンの投与 10 分後）。驚愕反応及びプレパルスインヒビションテストは、それぞれのラットを S R - L a b 試験台に置き、5 分間の順応時間を経て、異なる 3 つのうちの 1 つのバースト音を、1 分間に平均 1 回で（30 から 90 秒の様々な試行間隔）、1 時間にわたり行った（合計 60 のバースト音及び驚愕反応）。これらの異なる 3 つのタイプのバースト音は、大きなバースト音（118 dB）、及び比較的静かなバースト音（77 dB）で構成され、比較的静かなバースト音は大きなバースト音よりも 100 m 秒前に発生させた（プレパルスインヒビションテスト）。試験のバースト音は、擬似乱数に従い発生させた。プレパルスインヒビションは、中脳辺縁系ドパミンレベルの変化に敏感である。さらに、音への驚愕反応は、ドパミン及びノルエピネフリンレベルの変化にも敏感であり、このことからこれらの行動試験は、インビボでの DBH 阻害剤の効果測定の試験として可能性のある敏感なアッセイである。クロニジン及び d - アンフェタミンは、音への驚愕反応及びプレパルスインヒビションの陽性コントロールとして用いた。

10

20

30

【0300】

毎日の行動試験は以下のようにスケジュールされている。t = 0 で、DBH 阻害剤を注射する。3.5 時間後、中核体温を測定する。3 時間 35 分後、運動行動を測定する。4 時間 40 分、驚愕反応及びプレパルスインヒビションを測定する。

【0301】

3 回の体温測定を試験時間ごとに個々に行う。3 つの記録値の平均を計算した。

【0302】

それぞれのラットの自発運動を、試験中に光線を遮った合計として計算した。

【0303】

被検体の反応を、刺激の後 40 m 秒後に記録した。驚愕反応をそれぞれのバースト音の直後から、40 回の平均をとって計算した（1 / ミリ秒）。音への驚愕反応は、118 dB の聴覚刺激によって得られた被検体の驚愕の平均反応を計算した。プレパルスインヒビション値は、118 dB パルス単独の平均値から、77 dB - 118 dB パルスの対比較による平均値（上述したプレパルスインヒビションテスト）を引いたものを、[118 dB パルス単独 - プレパルスインヒビション] ÷ 118 dB 単独）。

【0304】

全体の一元配置 ANOVA を、それぞれの動物のベースラインが変化する都度行った。続く t - 検定を、興味があったので比較のため行った。

【0305】

自発運動行動を 15 分ごとに 1 時間測定した。それぞれの時間帯（15 分ごと）に分析した。処置群間における差を見るためクラスカル・ワリス検定（ノンパラメトリック検定）を行った。全体として有意な差が見られなかったら、多重比較のためのボンフェローニの補正を行った。

【0306】

各処置（TREAT）及び各試験（TRIALN）について、トライアルタイプ T (TRIALT) について平均電圧 (AVGMEAN) 及び平均プレパルスインヒビション率 (RATIO) を計算した。プレパルスインヒビション値は、118 dB パルス単独の平

40

50

均値から、77 dB - 118 dB パルスの対比較による平均値（プレパルスインヒビション試験の仕方は、上述）を引いたものを、118 dB パルス単独の平均値で割ったものである（[118 dB パルス単独 - プレパルスインヒビション] ÷ 118 dB 単独）。

【0307】

これらの値は、それぞれの処置の試験番号及び試験のタイプに対してプロットし、これらのプロットは本明細書に添付した。y 軸は変化することに注意すべきである。試験 1 - 15 は時間 1、試験 16 - 30 は時間 2、試験 31 - 45 は時間 3、及び試験 46 - 60 は時間 4 に対応する。時間に対し、平均プレパルスインヒビション率及び動物の驚愕の平均を示したプロットも添付した。

【0308】

平均驚愕反応及びプレパルスインヒビション率を、分散分析を用いて分析した。このモデルは、治療薬、治療薬を投与された動物、時間及び治療の相互作用の項目を含む。治療薬を投与された誤差項を用いて治療効果を調べた。時間による全体としての治療効果を調べた。フィッシャーの最小有意差法を用いて、多重比較を行った。全体としての処置又は時間による処置の効果が有意でなかった場合には（p 値 > 0.05）、ボンフェローニ補正を行った。全体としての治療効果が有意でなかった場合には、特定の対比較を行った。さらに、特定の対治療の効果が有意でなかった場合には（p 値 > 0.05）、時間に対する治療効果の修正を行った。全体としての治療効果及び時間に対する処置がともに有意でなかった場合には（p 値 > 0.05）、個別の比較についての時間及び平均時間について、ボンフェローニ補正を行った。

10

20

【0309】

分析に際しては、体重の投与前からの変化をそれぞれの動物について計算した。反復測定二元配置 ANOVA を用いて、治療効果全体、時間、及び時間経過による治療の相互作用を評価した。一元配置 ANOVA は、その日の治療効果を評価するために用いた。

【0310】

第 1 日目の陽性コントロール（d - アンフェタミン及びクロニジン）は、慢性投与によって有意に中核体温を上昇させたが、他の化合物はいずれもどの時点においても中核体温に有意差はなかった。

30

【0311】

d - アンフェタミン群は、担体コントロール群よりも全ての時点において有意に自発運動を増加させた。しかし、クロニジン群は、担体コントロール群と比べ有意差はなかった。SKF - 102698 50 mg / kg bid 群は、最初の 45 分では担体コントロール群よりも有意に自発運動を低下させたが（例えば、サンプル 1 - 3）、45 分以降では有意差はなかった。

【0312】

どの時点においても、全体としてネピカスタッフは有意な治療効果を示さなかった。対比によってもネピカスタッフ治療群は、担体コントロール群と比較して、有意差はなかった。また、2つの担体コントロール群（d H₂O 及び SKF の担体）は、有意差はなかった。

40

【0313】

プレパルスインヒビションにおいてはいずれの治療群も、有意な差を示さなかった。全体として統計的に、SKF - 102698 群及びシクロデキストリン群において、時間による有意な差はなかった（p = 0.0001）。時間経過による治療効果の相互作用は、統計的にはシクロデキストリン対 d H₂O (p = 0.0283) では有意差があったが、他ではなかった。治療効果は、関心のある比較においてはいずれも有意差はなかった。しかし、SKF 投与群は、シクロデキストリン投与群よりも下限ぎりぎりではあったが高い割合で、プレパルスインヒビション効果があった（p = 0.0782）。

【0314】

時間 1 及び 2 において、クロニジン投与群はプレパルスインヒビションにおいて担体コントロール投与群よりも、ちょうど有意な効果を示したが、時間 3 及び 4 においては、担

50

体投与群よりも有意な差は示さなかった。d - アンフェタミンもSKF - 102698も、それらの担体からいずれの時間においても有意差はなかった。ネピカスタッフ投与群は、dH₂Oと比較していずれの時間においても有意差はなかった。

【0315】

SKF - 102698投与群だけは、音への驚愕反応に有意差があった。関心のあった全ての比較対象において、時間経過による治療効果は統計的に有意差があった（全てp = 0.0001）。時間経過による治療効果の相互作用は、統計的にはアンフェタミン対dH₂O、クロニジン対dH₂O、及びシクロデキストリン対dH₂O（全てp < 0.05）において有意差があったが、他は有意差はなかった。治療効果は、SKF - 102698 50mg / kg bid 対シクロデキストリン（p = 0.0007）、及びネピカスタッフ 50mg / kg bid 対SKF - 102698 50mg / kg bid（p = 0.0047）において有意差があったが、他はなかった。SKF - 102698 50mg / kg bid 投与群は、シクロデキストリン投与群よりも有意に低い驚愕反応を示し、ネピカスタッフ 50mg / kg bid 投与群と比較しても有意に低い驚愕反応を示した。
10

【0316】

SKF - 102698（50mg / kg bid）投与群は、シクロデキストリン投与群よりもいずれの時間においても有意に低い驚愕反応を示した。時間1及び3、ネピカスタッフ（50mg / kg bid）投与群は、SKF - 102698（50mg / kg bid）投与群に比べ、有意に高い驚愕反応を示した。その他の有意差は見られなかった。
20

【0317】

全体として又は対比較において、投与前からの体重の変化による有意差は見られなかった。

【0318】

d - アンフェタミン投与群は、担体コントロール投与群よりも投与前からの体重変化が、有意に小さかった（p < 0.01）。毎日分析した結果、担体コントロール投与群は、アンフェタミン投与群よりも処置日4 - 10において、投与前からの体重増加が有意であった。しかし、クロニジン投与群では、担体コントロール投与群に比べ、いずれの時点においても、有意差はなかった。SKF - 102698（50mg / kg bid）投与群では、担体コントロール投与群（SKF担体）と比べて、処置前から有意に小さい増加であった。毎日分析した結果、第3及び6日を除く第2 - 10日において、投与前に比べ、SKF - 担体コントロール投与群は、SKF - 102698投与群よりも有意に大きな体重増加が見られた。重要なことは、SKF - 担体及び担体コントロール投与群では、いずれの日においても体重の変化はなかった。
30

【0319】

全体として、いずれの時点においてもいずれの用量においても、ネピカスタッフによる体重による治療効果に有意な変化はなかった。対比較では、いずれの時点でもネピカスタッフ - 処置群は、担体コントロール投与群に比べて有意差はなかった。興味深いことに、体重変化においてSKF - 102698（50mg / kg bid）投与群及びネピカスタッフ（50mg / kg bid）投与群においては、全体として有意差があった。毎日分析した結果、SKF - 102698（50mg / kg bid）投与群はネピカスタッフ（50mg / kg bid）投与群よりも第7 - 9日において体重は有意に低かった。
40

【実施例23】

【0320】

1 - メチル - 4 - フェニル - 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロピリジン（MPTP）はRBI社（Natick, MA）より購入した。MPTPは、投与において2mg / mL濃度（遊離塩基）で水に懸濁させ、各動物に、体重（kg）と同じ体積（mL）を皮下注射した。950g動物は、2mg / mLのMPTPを0.95mL、結果として2.0mg / kgの投与を受ける。

【0321】

10

20

30

40

50

サルは、13 h / 11 hの明暗サイクル下、食餌及び水を自由に摂取できるようにした。すべての手順はN I Hのガイドラインに従い、動物実験委員会（I A C U C）の承認を得ている。動物は、それぞれ飼育され、少なくとも行動試験の1ヶ月前から、集団に慣れようとした。

【0322】

6匹のリスザルのうち、3匹は障害を与えず、3匹は障害を与え（2 mg / kg のM P T P を3ヶ月前に投与した）ネピカスタッフの最適な投与経路の研究のために用いた。（i）食餌に混入させ、（ii）経口シリンジ、及び（iii）経口投与チューブを含む3経路を試みた。ネピカスタッフ溶液（5 mg / ml）をマシュマロに混入させたものを、障害を与えたなかった3匹のサルに試みたところ、まずい味によるためと考えられるが摂取せず、よい投与経路とはいえないかった。経口シリンジによるネピカスタッフ（0.5、2、及び5 mg / kg）投与を、障害を与えたなかった3匹のサル及び障害を与えた3匹のサルに試みたところ、最高濃度において吐き出す経口にあったため、許容できる投与経路ではなかった。経口投与チューブによる投与では、3匹のM P T P 障害を与えたサルに最高濃度の薬物（5 mg / kg）を投与したところ、うまく投与できた。

10

【0323】

ネピカスタッフの安全性及び耐容性を調べるために3匹は障害を与えず、3匹は障害を与えた（2 mg / kg のM P T P を3ヶ月前に投与した）6匹のリスザルを用いた。動物に、0.5、2.0、又は5.0 mg / kg の濃度のネピカスタッフを毎日2回、5日間（異なる投与レベルの場合には2日間のウォッシュアウト期間を設けた）投与した（午前10時及び午後2時）。ネピカスタッフは、0.5、2.0 及び 5.0 mg / kg 投与の場合には経口シリンジで、及び 5.0 mg / kg 投与の場合には投与チューブで行った。薬物は、低濃度の2投与群では、十分な耐容性があった。5.0 mg / kg を投与した障害を与えたなかった1匹のサルは、投与期間の最後の2日にうすいベージュ色の軟便となり、1日は薬物による離脱であるとわかった。

20

【0324】

24匹のリスザルのうち、14の雌及び10の雄をパーキンソン病モデルとして用いた。24の動物をランダムに各群6匹ずつ4つの処置群のいずれか振り分けた。投与群は、以下のように構成される：プラセボ（水）処置を受けるグループA（6匹）；ネピカスタッフ 1 mg / kg / 日（0.5 mg / kg を1日2回）投与を受けるグループB（5匹）；4 mg / kg / 日（2 mg / kg 1日2回）投与を受けるグループC（6匹）；及び 10 mg / kg / 日（5 mg / kg 1日2回）投与を受けるグループD（6匹）。グループBは、M P T P 障害の直後に1匹死亡したが、補充しなかった。

30

【0325】

障害を与える前に各動物は、赤外線行動モニター（I R A M）ケージを用いて自発運動行動の定量的な評価を行った。全ての記録は60分間ずつ10回行われ、2週間を超えて記録した。動物の行動は、1ないし3人の臨床評価者によって、パーキンソン病臨床評価尺度（C R S）を1日1回（正午ないし午後1時）、3ないし5日連続して評価した。正常動物では、通常C R Sで3よりも大きな評価は現れない。活動モニタリング（I R A M）及び臨床評価により、それぞれの動物の平均ベースライン行動値が作成できた。

40

【0326】

動物には、2.0 mg / kg（遊離塩基）のM P T P を皮下注射によってパーキンソン様症状を発生させた。M P T P 障害の2ないし4週間後に行動評価を行った。自発運動をI R A Mで60分、3ないし5日観察した。1ないし3人の臨床評価者が3ないし5日間、動物の臨床行動（C A S）を評価した。

【0327】

いくつかの場合には、臨床評価尺度の総合平均スコアが3よりも大きいことと定義されるパーキンソン病症状を示すには、追加のM P T P（2 mg / kg）投与が必要となった。有効性評価の試験開始後3週間以内に、すべての動物は、M P T P 後の行動評価（I R A M及びC R S）を受けた。この最終M P T P 後評価に基づき、臨床パーキンソン様症状

50

のベースラインを作成し、統計分析の前処理値とした。

【0328】

L-DOPAに対する反応性、及びネピカstattの有効性を動物で確かめた。試験は、最後のMPTP投与の後、4ないし12週間に行った。2.5、5、又は7.5mg/kgの濃度のL-DOPAを、1日2回（午前10時及び午後2時）7日続けて強制経口投与した。IRAM及びCRSによって行動を評価した。臨床評価は、最後の4日間、午前10時の投与後60ないし90分後に行った。評価者（1ないし3人）は、どの処置群かを知らされずに行った。IRAM評価は、期間中最後の2ないし5日間、午後2時の投与後すぐから行った。それぞれの用量の間には少なくとも2日のウォッシュアウト期間を設けた。

【0329】

ネピカstatt又は水（プラセボ）を12日間の投与後、L-DOPA投与後少なくとも2日のウォッシュアウト期間を設けた。薬物は、1日2回午前10時及び午後2時に強制経口投与によって投与された。行動はIRAM及びCRSによって評価した。CRSは、ネピカstatt投与の最後の5日間、午前10時の投与後、60ないし90分後に行った。評価者（1ないし3人）は、どの処置群かを知らされずに行った。IRAMは、薬物処置の最後の5日間に、午後2時の投与直後から90分かけて行った。

【0330】

統計分析のために、自発運動及び臨床評価値をモニターした。各動物について、平均の自発運動を、MPTP障害を与える前後で測定した。MPTP障害前のベースラインは、1時間のモニター時間で10回行い平均をとった。MPTP（前処理）障害後の行動評価は、有効性評価の試験開始後3週間以内に行なった。MPTP障害後の自発運動は、1時間のモニター時間で3ないし5回行い平均をとった（IRAMS）。活動のモニタリングは、「動きの回数/10分」として記録した。より高いスコアであるほど、素早く動いていくことになる。ウィルコクソン符号順位検定を用いてMPTP障害前後の活動をそれぞれの投与群の動物について比較した（グループAないしD）。

【0331】

それぞれの薬物レベルによる投与後、少なくとも90分にわたり、10分間隔でIRAMにより自発運動をモニターした。率が高いと、動きが速い動物であるといえる（パーキンソン病症状を示していない）。

【0332】

統計分析は、プラセボ及び1、4、及び10mg/kgの試験薬物を投与した場合における記述統計、及び10分間ごとのデータの平均をグラフ化することからなる。次にグラフから傾向を見出した。グラフによる分析と違いがなかったため、さらなる統計分析は行わなかつた。

【0333】

IRAMデータが十分集まらなかつたので、MPTP（前処置）障害後と2.5、5.0、及び7.5mg/kg L-DOPA及びネピカstatt（1、4、10mg/kg/日又はプラセボ）処置との、統計分析の比較は行わなかつた。ネピカstatt投与では90分間のデータが集まつたが、MPTP障害後60分後のデータのみが収集された。

【0334】

CRSでは、MPTP障害前の動物で臨床評価尺度のスコアが3よりも大きいものはいなかつた。MPTP障害後の臨床評価尺度のスコアは、有効性評価の試験開始後3週間以内に1ないし3の臨床評価者が3ないし5日連続で測定を行い、平均をとった（CRS）。

【0335】

8つのパーキンソン病の特徴をそれぞれの動物について評価し、これら8つの特徴のスコアを足し合計スコアを得た。それぞれの動物について、それぞれの投与量での単一の臨床評価スコアは、複数の投与日について（投与量ごとに）全ての臨床評価者（1ないし3人）の得たスコアの平均をとることにより得た。この平均CRSを統計分析に用いた。より低いスコアの方が、パーキンソン病でないと評価される。

10

20

30

40

50

【0336】

統計分析は以下により構成される：（1）プラセボとネピカスタッフ1、4、及び10 mg / kg / 日投与の場合の平均CRSを、クラスカル・ワリス検定（ノンパラメトリック分散分析）を用いて比較した。この比較を、それぞれの動物について、MPTP後の最終評価によって修正されたそれぞれの薬物濃度において、繰り返した。修正された臨床評価スコアとは、各濃度におけるMPTP後の臨床評価スコアの比である。（2）対比較（前処理としての）MPTP障害後の2.5、5.0、及び7.5 mg / kg L-ドバ及びプラセボ処置の平均CRSを、フリードマン検定（ノンパラメトリック分散分析、反復測定）を用いて比較した。同じ分析を1、4、及び10 mg / kg 濃度のネピカスタッフでも行った。ノンパラメトリックデータを分析するときは、ダネットポストホック分析を必要であれば、行った。

10

【0337】

IRAM（行動モニタリング）及びCRS（臨床評価尺度）は、それぞれのリスクアルのMPTP障害の程度を評価するために用いた。

【0338】

グループA：プラセボ処置群の場合、動きの多様性 / 10分 / 動物の程度が高かったため、IRAM群における障害前及び障害後において有意差はなかった。ウィルコクソン符号順位検定：W = 19、N = 6、P < 0.06であり、帰無仮説は採択された。グループAの平均CRSは、8.9、幅4.8ないし15.4だった。全ての動物においてMPTP障害の後、臨床評価スコアが有意に增加了。（障害を与えたかった）正常動物は、通常スコアは3より小さい。

20

【0339】

グループB：1 mg / kg / 日処置群の場合、動きの多様性 / 10分 / 動物の程度が高かったため、IRAM群における障害前及び障害後において有意差はなかった。ウィルコクソン符号順位検定：W = 9、N = 5、p < 0.06であり、臨床評価スコア（CRS）の帰無仮説は採択された。グループBの平均CRSは、10.32、幅4.3ないし16.1だった。全ての動物においてMPTP障害の後、臨床評価スコアが有意に增加了。（障害を与えたかった）正常動物は、通常スコアは3より小さい。

20

【0340】

グループC：4 mg / kg / 日処置群の場合、動きの多様性 / 10分 / 動物の程度が高かったため、IRAM群における障害前及び障害後において有意差はなかった。ウィルコクソン符号順位検定：W = 17、N = 6、P > 0.06であり、臨床評価スコア（CRS）の帰無仮説は採択された。グループCの平均CRSは、8.97、幅6.5ないし17.3だった。全ての動物においてMPTP障害の後、臨床評価スコアが有意に增加了。（障害を与えたかった）正常動物は、通常スコアは3より小さい。

30

【0341】

グループD：10 mg / kg / 日処置群の場合、動きの多様性 / 10分 / 動物の程度が高かったため、IRAM群における障害前及び障害後において有意差はなかった。ウィルコクソン符号順位検定：W = 21、N = 6、P > 0.06であり、臨床評価スコア（CRS）の帰無仮説は採択された。グループDの平均CRSは、8.02、幅4.0ないし15.6だった。全ての動物においてMPTP障害の後、臨床評価スコアが有意に增加了。（障害を与えたかった）正常動物は、通常スコアは3より小さい。

40

【0342】

IRAM測定による投与群内における、ベースライン（MPTP障害前）及びMPTP障害後の自発運動は、各動物におけるIRAMの高い多様性から全体として有意差はなかった。CRS結果は、MPTP障害前及びMPTP障害後における違いを表している。MPTP障害前の動物ではスコアは3よりも大きくなかった。MPTP障害後におけるスコアは3よりも大きかった。すべての投与群（AからD）において、平均CRSは、可能な合計スコア24のうち8ないし10を占めていた。

【0343】

50

プラセボ処置群及び3つの濃度のネピカスタッフ(1、4、10mg/kg/日)を、MPTP障害を与えたリスザルに投与したことによって検出しうる違いはなかった。ネピカスタッフ4及び10mg/kg/日投与のいずれにおいても、及びプラセボは(前処理としての)MPTP障害後の状態に有意な改善が見られた。全ての投与群において、L-ドパ5mg/kg及び7.6mg/kg投与のいずれにおいても、グループCの7.5mg/kg投与及びグループBの5mg/kg投与における例外を除いて、(前処理としての)MPTP障害後の状態に、有意な改善が見られた。MPTP障害後と比較して、L-ドパ2.5mg/kg投与の場合には、有意な差は見られなかった。

【0344】

フリードマン検定、記述統計及び、及びダネットポストホック検定を行い、プラセボ処置との行動モニターを全てのネピカスタッフ濃度で投与後10-90分において処置群及びL-ドパ投与群を比較した。それぞれの投与量で10分間隔のプロットを行った。プラセボと比較した場合、薬物の違いによる(ネピカスタッフ)4及び10mg/kg/日投与における違いはなかった。1mg/kg/日投与においては、動物はプラセボ処置群よりも遅かった。4つの異なる処置群(ネピカスタッフ1、4、及び10mg/kg、及びプラセボ)についての非-対比較分析により、ネピカスタッフは、MPTP障害の非ヒトPDモデルであるプラセボ(水)と比較して、パーキンソン病の症状を有意に示さなかつた。動物(同一群について処置の前後で試験した)の対比較分析により、ネピカスタッフ4及び10mg/kg/日投与においては、(前処理としての)MPTP障害後と比較して有意にパーキンソン様症状を示した。プラセボは、有意な効果といえるかの境界にあつた。同じ対比較を用いて、L-ドパ5及び7.5mg/kgを試みたところ、全ての群においてMPTP障害後の状態と比較して、グループB(L-ドパ5mg/kgで効果なし)及びグループC(L-ドパ7.5mg/kgで効果なし。)以外では、有意な効果が得られた。しかし、L-ドパ2.5mg/kgでは、有意な効果は見られなかつた。

【0345】

薬物動態研究は、リスザルにおけるネピカスタッフの血漿中濃度を測定することによって行った。この研究では、安全性及び耐容性試験と同時に行つた。3つのMPTP障害を起こさせたリスザル(#353、358及び374)を用いた。分析のために1mLの血液を採取した(各動物の大腿静脈から採血した)。異なる薬物濃度の間には2日間のウォッシュアウト期間を設けて、濃度1、4、及び10mg/kgのネピカスタッフを5日間投与した。血液は、最初の薬物投与の1時間前にベースラインを作成するために、及びそれぞれの濃度において最初の投与の6時間後に採取した。

【0346】

第2に、薬物動態研究は、安定状態のネピカスタッフの血漿濃度を決定するために行つた。この研究は、3つの異なる濃度をそれぞれ12日間投与した場合における薬効研究と同時に进行了。1mLの血液を大腿静脈から第1日の最初の投与後6時間後、第7日の最初の投与後6時間後、及び第12日の最初の投与の6時間後に採取した。ベースラインにおける血漿濃度は、投与1週間前に採血したサンプルから決定した。

【0347】

また、この研究は対比較分析を表すが、ここでこの分析は、動物間の多様性を減らすため、同一動物の処置前後を比較し、少數の動物を使用する非-対比較研究よりも有意な薬効の検出においてより適切である。

【実施例24】

【0348】

自然発症高血圧雄ラット(280-345g; チャールスリバー社, Kingstion, NY)を終夜絶食させ、エーテル麻酔した。血圧の記録及び化合物投与のために、それぞれ大腿動脈及び大腿静脈にPE50チューブを挿入した。動物をMAYO拘束器に入れて、脚を緩く拘束器にテープで留めた。実験中を通して、実験中それぞれのチューブの開存性を保つためヘパリンナトリウム生理食塩水(50単位のヘパリンナトリウム/m1)を使用した。IBMパソコンを用いて、MI² BioReport(登録商標)ソ

10

20

30

40

50

フトウエアモジュールを用いて以下のパラメータ：平均動脈圧（M A P）、心拍（H R）、及び試験中の特定の時間におけるそれぞれのパラメータのベースラインからの変化を記録した。

【0349】

全ての化合物は、使用の日に溶解させた。ネピカstatttは、遊離塩基濃度が1 m g / m l となるように脱イオン化水（担体）に溶解させた。経口投与容積は、ネピカstattt又は担体は1 0 m l / k gとした。遊離塩基濃度が0 . 2 m g / m l となるようにS C H - 2 3 3 9 0 を生理食塩水（担体）に溶かした。ネピカstattt又は生理食塩水は、1 . 0 m l / k gを、続いて0 . 2 m L の等張生理食塩水を静脈内にボーラス投与した。

10

【0350】

外科的手術の後、各動物は、少なくとも1時間の回復期間を与えられた。動物は、ランダムに4つの処置群に割り振られた。すなわち、担体（静注）/担体（経口）；担体（静注）/ネピカstattt（経口）；S C H - 2 3 3 9 0 （静注）/担体（経口）；又はS C H - 2 3 3 9 0 （静注）/ネピカstattt（経口）である。一旦動物が安定（少なくとも1時間）したら、血圧及び心拍のベースラインを、15分以上の平均をとることにより決定した。一旦血圧及び心拍のベースラインが確定されると、動物にS C H - 2 3 3 9 0 （2 0 0 μ g / k g ）又は担体（生理食塩水、1 m l / k g ）を、静脈内投与した。15分後、ネピカstattt（1 0 m g / k g ）又は担体（脱イオン化水、1 0 m l / k g ）を投与した。

20

【0351】

血圧及び心拍のベースラインを決定するために静脈内投与の15分前にパラメータを測定した。続いて、S C H - 2 3 3 9 0 又は担体投与の5、10、及び15分後にパラメータを測定した。続くネピカstatttの経口投与又は担体は、パラメータは15、30、60、90、120、150、180、210、及び240分後に記録した。

20

【0352】

実験の終わりには、各動物はハロタン麻酔し、断頭して安楽死させた。皮質、左心室（尖）、及び腸間膜動脈を解剖し、計量し、0 . 4 M 過酸化水素酸で固定した。次に組織は液体窒素で凍結させ、- 7 0 で保存した。後日、生化学的分析をこれらの組織について行い、ドパミン及びノルエピネフリンレベルを含むカテコールアミンレベルを測定した。血圧及び心拍は別々に分析した。血圧及び心拍のベースラインからの変化は、処置、時間及びそれらの相互作用を用いて分散分析（A N O V A ）により分析した。分析は、静注後及び経口投与後ともに行った。さらなる分析は、それぞれ効果の主要要素を時間として、A N O V A によって時間ごとに分析した。全体として有意な治療効果がなかった場合には、ボンフェロー二補正を用いてフィッシャーの最小有意差法により分析を行った。

30

【0353】

追加の分析を、それぞれの処置群によるベースラインの比較を行うために主要な処置の効果及び以下の対比較を行うためにA N O V Aを行った。S C H - 2 3 3 9 0 （静注）/担体（経口）対 担体（静注）/担体（経口）、担体（静注）/ネピカstattt（経口）対 担体（静注）/担体（経口）、及びS C H - 2 3 3 9 0 （静注）/ネピカstattt（経口）対 担体（静注）/ネピカstattt（経口）を比較した。

40

【0354】

処置群間において、心拍のベースライン又は平均動脈圧に有意差はなかった。

【0355】

S C H - 2 3 3 9 0 投与を静脈内処置により行うと、経口投与後1 2 0 分から2 4 0 分にかけて、担体コントロール投与群と比較して心拍の有意な減少が見られた（p < 0 . 0 5 ）。ネピカstatttは、担体処置動物において見られたほど、心拍を減少させなかつた。投与後1 5 0 及び1 8 0 分においては統計的には有意であった（p < 0 . 0 5 ）。試験を通して、心拍は大きな多様性が見られたことは注目すべきである。

【0356】

S C H - 2 3 3 9 0 の静脈内投与では、静注後1 5 分間において、わずかだが（5 ± 1

50

mmHg)、担体投与群よりも平均動脈圧に有意な減少が見られた($p < 0.05$)。ネピカスタッフの経口投与においては、投与30分以降試験時間中において平均動脈圧が有意に減少した($p < 0.05$)。SCH-23390による前処理では、ネピカスタッフ単独の時に見られたように有意な降圧効果は見られなかった。

【実施例25】

【0357】

15週齢の雄Cr1:COBS(WI)BRラットを用いた。常に血圧無線遠隔変換器(TA11PA-C40、データサイエンス社, St. Paul, MN)を装着した24のラットを動脈圧、心拍、及び運動行動の測定に用いた。ラットは、ペントバルビタールナトリウム(60mg/kg、静注)で麻酔し、腹部の毛を剃った。無菌下、解剖は正中線に従って行った。腹部の大動脈にカテーテルのついた無線遠隔電送器のユニットを、カニュレを通して装着した。電送器を腹筋に縫いつけた後、皮膚を閉じた。それぞれのラットは、薬物投与の前に少なくとも2週間回復させた。試験開始の3日前、ラットをランダムに4処置群：担体(経口)、ヒドララジン(10mg/kg、経口)、ネピカスタッフ(30mg/kg、経口)、ネピカスタッフ(100mg/kg、経口)、に振り分けた。

10

【0358】

最高血圧(SBP)、最低血圧(DBP)、平均血圧(MBP)、心拍(HR)、及び運動行動(MA)をモニターした。ネピカスタッフ及びヒドララジンを微量のトウイーン80を含む水溶液として調製した。すべての投与において、ラットに遊離塩基等価体が10ml/kgとなるように投与した。

20

【0359】

SBP、DBP、MBP、HR、及びMAのデータを継続的に収集するためにコンピュータ化されたデータ収集システムを用い、各ラットにつき、5分ごとに10秒ずつ行った。これらは1時間ごとに平均値を取り、標準誤差(SEM)を計算した。全ての値は、平均値±標準誤差で表した。統計的に有意差があるとは、 p 値が0.05よりも小さいことと定義する。MBP、HR及びMAのデータは別々に分析した。それぞれの分析は、毎日26時点で行われた。主効果を、治療及び時間及びそれらの相互作用として二元配置ANOVAを用いて分析した。全体としての治療効果又は有意な相互作用を検出した場合には、その時点において一連の一元配置ANOVAを行った。各時点での対比較はダネットの手法を用いて行った。全体としての治療効果が見られなかった場合には、コントロールとの対比較はボンフェローニ補正を用いて臨界値を補正して行った。

30

【0360】

これらのパラメータの前処置の数値を計算した後、それぞれのラットのグループに、7日間毎日、担体、ネピカスタッフ又はヒドララジンの投与を行った。

【0361】

ネピカスタッフの経口投与30mg/kg(以後全て経口投与である)は、血圧をゆっくりと下げる傾向にあったが、第1日においては、血圧低下効果は確実ではなかった。効果が進み、最大の低下効果は、-10mmHgが第2日の13時間に見られた。同様の降圧効果が試験を通して見られた。100mg/kg、最大-11mmHg降圧反応を第1日目の投与から22時間後に生じた($p < 0.01$)。MBPは、減少し続け、第3日に最低値は約-17mmHgとなった($p < 0.01$)。MBPは試験中ずっと低いままだった。

40

【0362】

ヒドララジン10mg/kgを投与すると10時間以内に急速な血圧低下を生じた。MBPは、第1日の1時間以内に最大の-24mmHg($p < 0.01$)の低下が見られた。同様の一過性の降圧効果が試験を通じて見られた。

【0363】

ネピカスタッフ30及び100mg/kg投与では、第1日目にはHRに確実な影響を与えたなかった。しかし、第2日目、ネピカスタッフ100mg/kg投与においては、投

50

与 3 時間後には - 1 0 0 b / m m の徐脈反応が現れた。有意であるが、様々な程度の、はつきりしない徐脈効果が、第 3 - 7 日において見られた。比較として、ヒドララジンは 1 0 m g / k g 投与で、様々な程度の頻脈が試験を通じて見られた。

【 0 3 6 4 】

試験を通じて、いずれの薬物による治療も M A には確実な影響を与えたなかった。

【 0 3 6 5 】

体重は毎日記録した。体重の投与前からの変化に関しては、全体としての治療効果、日、日と治療効果相互作用を要素として用いて二元配置 A N O V A により分析した。次に、一元配置 A N O V A を毎日行い、薬物治療群と担体コントロール投与群との対比較を、ダネットの手法、及び複数の比較対象がある場合に適合させるためにフィッシャーの最小有意差法を用いて行った。担体処置の対象と比較して、いずれの薬物も体重には効果はなかった ($p < 0 . 0 5$)。ネピカスタッフ 1 0 0 m g / k g 投与では、第 3 日において体重が減少する傾向にあったが、統計的には有意ではなかった。

10

【 実施例 2 6 】

【 0 3 6 6 】

ネピカスタッフは、ドパミンからノルエピネフリンへの変換を減少させる。基本的なネピカスタッフ活性の測定は、血漿又は尿中ドパミンのノルエピネフリンに対する比の増加率で計算する。ネピカスタッフ処置は、血漿又は尿中レベルのドパミン又はドパミン / ノルエピネフリン比を上昇させることができた。

20

【 0 3 6 7 】

図 5 では、健常志願者にネピカスタッフを投与した場合における 2 4 時間後の尿中ドパミンレベルを示す。

【 0 3 6 8 】

反復測定分散分析モデルを用いて分析したところ、プラセボ投与に対し、2 0 0 m g のネピカスタッフ投与群は平均臥位血漿ドパミン / ノルエピネフリン比の有意な増加が見られた ($p < 0 . 0 5$)。尿中ドパミンレベルは、ネピカスタッフ 4 0 m g 及び 2 0 0 m g の投与後 1 0 日間増加した。

30

【 実施例 2 7 】

【 0 3 6 9 】

慢性心疾患 (C H F) の患者に、毎日ネピカスタッフ 4 0 、 8 0 、及び 1 2 0 m g を投与し、一般に 1 0 日は耐容性があった。有意な副作用が見られたのは、1 6 0 m g においてだった。

【 0 3 7 0 】

1 6 0 m g で 8 日間以上治療した場合、8 患者の中の 4 人に湿疹が生じた。発疹した中の 2 人は搔痒を伴った。1 人の患者は発疹に息切れを伴った。

【 0 3 7 1 】

8 0 m g を投与された中の 1 人の患者は、症候性起立性低血圧のため試験から離脱した。同時投与の治療薬は、ヒドララジン及び 3 つの利尿剤を含む。プラセボを含み全ての投与量において、起立性低血圧が偶発的に起こった。1 6 0 m g 投与を受けた 8 患者中の 6 人は、症候性起立性低血圧を生じた。

40

【 0 3 7 2 】

C H F 患者における試験中 2 人が死亡した。1 人は C H F (患者は 8 0 m g 1 日 1 回投与を受けていた) の悪化によるものであり、もう 1 人はプラセボ投与を受けていた患者の突然死だった。

【 0 3 7 3 】

薬物と関連すると思われる深刻な副作用は、クレアチニンレベルであり、これは入院が必要である。医学的に有意な症状で、試験薬物と関係のないと思われるものは、2 患者における C H F の悪化 (1 人は続いて急性の M I 及び心停止を起こした) 、1 患者における不安定狭心症、1 患者における非典型的胸痛、及びの乳房癌の病歴のある 1 患者における副腎腫瘍である。

50

【 0 3 7 4 】

うつ血性心不全患者における試験では、ネピカスタッフ投与後10日間の、血漿ドパミンレベル、ノルエピネフリンレベル、及びドパミン／ノルエピネフリン比の変化を調べた。

【 0 3 7 5 】

うつ血性心不全患者における試験では、ネピカスタッフ投与後30日間の、血漿ドパミンレベル、ノルエピネフリンレベル、及びドパミン／ノルエピネフリン比、及び、レベル及び比の変化を調べた。30日間のネピカスタッフ処置により、ドパミン／ノルエピネフリンレベルが上がった。

【 実施例 2 8 】

10

【 0 3 7 6 】

げっ歯類にネピカスタッフを投与した場合における脳内のドパミン／ノルエピネフリン比を測定した。げっ歯類にネピカスタッフ又はジスルフィラムを投与した場合、ドパミン／ノルエピネフリン比は、増加した。

【 0 3 7 7 】

関連する分野における通常の技術を有する者にとっては明らかなことであるが、ここに記載した他の適切な方法及び適用の変更及び改変は、適切であり、発明の範囲及びそのいかなる態様からも外れることはない。発明は特定の態様と関連して記載されているが、それは、以下の請求項によって定義される発明の精神及び範囲に含まれている代替案、変更、及び等価体を網羅するために記載している。

20

【 実施例 2 9 】**【 0 3 7 8 】**

ラットにおける薬物の短期記憶又はワーキングメモリに対する効果を調べるために遅延場所あわせ課題 (delayed-matching-to-position (D M T P) test) を行った。

【 0 3 7 9 】

ネピカスタッフのD M T P課題の開始前に、最高用量のネピカスタッフ (100mg / kg 経口) 急性及び繰り返し投与による、行動学的／生理学的效果を評価するため、及び、フィゾスチグミンを繰り返し投与し最大耐容経口用量を調べるために、予備試験を行った。

【 0 3 8 0 】

30

予備試験において、ネピカスタッフ (30及び100mg / kg 経口) 又は担体を、同一の重量範囲に調節された (400 - 480g) SD系雄ラット (n = 8) に急性投与した。薬物又は担体投与1、3及び24時間後に、各動物がどのような処置を受けたか知られていかない観察者によって観察された。同様に別の試験において、フィゾスチグミン (1、3、10又は30mg / kg 経口) 又は担体を各グループ8匹のラットに投与した。薬物又は担体投与1、3及び24時間後に観察した。

【 0 3 8 1 】

繰り返し試験の予備試験は、ネピカスタッフ (100mg / kg 経口) 又は担体を1日2回 (06:00及び18:00)、10日間 (第11日は1回) 各グループ8匹のラットに投与した。動物の重量は試験を通じてモニターされ、第5日には、盲検試験による独立した観察者によって、行動学的／生理学的效果を評価するために、以下の繰り返し投与を行った。別々の試験として、各グループ8匹のラットに、担体又はフィゾスチグミン (0.3、1、3又は10mg / kg 経口) を同じ投与スケジュールで投与した。動物の体重は、試験期間中を通してモニターした。

40

【 0 3 8 2 】

ネピカスタッフ (30又は100mg / kg 急性経口投与) によっては、明らかな行動学的／生理学的变化はもたらさなかった。同様に、ネピカスタッフ 100mg / kg の繰り返し経口投与による明らかな効果はなかった。しかし、後者の投与によって、動物の体重は11日後に平均28g減少したが、コントロールでは平均1g増加した。薬物処置を受けた11日間の動物は、コントロール群に比べて、取り扱いにおいて怒りっぽくなつて

50

いた。

【 0 3 8 3 】

フィゾスチグミンの急性投与は、 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 以上の投与量においては、明らかな行動学的效果が見られた（そしゃく運動及び唾液）。毒性のサインが $30 \text{ mg} / \text{kg}$ 経口（チアノーゼ、震え、頭を持ち上げる、運動失調）から見られた。フィゾスチグミン 3 及び $10 \text{ mg} / \text{kg}$ の繰り返しの経口投与では、毒性が見られた（ $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与群の 8 匹のうち 3 匹は第 2 日に死亡し、 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与群においては 8 匹のうち 2 匹は第 5 日に震えを起こしていた。）。フィゾスチグミン 0.3 又は $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 投与では影響はなかった。

【 0 3 8 4 】

これらの研究結果から、DMTP 課題のためのネピカスタッフ投与の最高用量は $30 \text{ mg} / \text{kg}$ （経口）とし、フィゾスチグミンの繰り返し投与には $1 \text{ mg} / \text{kg}$ （経口）に減らして用いることとした。

【 0 3 8 5 】

DMTP 課題において、間隔を 0、8、16 又は 32 秒遅らせていく、ラットはレバーの場所を覚えるように訓練され、食餌を報酬として得る。以下の訓練では、DMP-T 試験で行いながら、ネピカスタッフ（1、3、10 及び $30 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口 bid）又はフィゾスチグミン（ $1.0 \text{ mg} / \text{kg}$ 、経口、bid）の 10 日間に渡る繰り返し投与の効果を見た。試験の第 11 日目には、ネピカスタッフ及びフィゾスチグミン処理された動物に、スコポラミン臭素酸塩（ $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、皮下投与、30 mm の前処理時間）を同時投与した。DMTP のパイロット試験は、スコポラミン $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ の選択精度によっては著しい障害を与えることがわかったため、スコポラミンの用量は、DMTP のパイロット試験のデータに基づいて選択した。ネピカスタッフ又はフィゾスチグミンを投与する群に加え、以前担体を投与した群にスコポラミンを投与した。他の群のラットは、実験中担体のみを投与した。最終のスコポラミンの試験は、慢性投与が DMTP 課題においてスコポラミンに起因する障害の選択精度を小さくできるかを決定する目的がある。

【 0 3 8 6 】

この試験において依存する項目は、訂正の選択、選択をするまでの待ち時間、及び 70 分試験時間中に完成できた回数である。最初の項目の変化は、記憶及び／又は注意機能の変化を示唆しているのに対し、後の 2 つの項目の変化は、薬物による非認識下の効果の指標となる。

【 0 3 8 7 】

試験開始時に体重 200 - 290 g だった 56 匹の SD 系雄ラットを用いた。ケージによって 4 つのグループに分け、ラット 1 匹につき約 12 - 15 g の食餌を与えた。これは、ラットに食餌を自由に与えた場合の約 85 % の重さに当たる。体重が減り始めた動物には追加の食餌を与えた。水は自由に摂取できるようにした。動物は、午前 6 時に点灯し 12 : 12 時間ごとの明／暗サイクルで飼育した。

【 0 3 8 8 】

キャムデン社の、2 つの伸縮自在のレバー及び食餌ケースが中央に位置するオペラント箱 12 個を用いて行動試験を行った。食餌ケースの前には、ラットがそれを後ろへ押して食餌を得られるフラップがついている。箱は修正して、仕切を食餌ケースのいずれの側でも適合するようにした。仕切は、透明なパースペックスであり、箱の床から天井までの大きさであり、中心付近では 105 mm となっている。オペラント箱は、音及び光が減弱される構造体に包まれている。装置の制御には、ポールフレイコントロールシステムインターレース（Paul Fray Control System Interlaces）及びアラクニッドソフトを内蔵したアコーン A5000 (Acorn A5000) コンピュータプログラムが用いられている。

【 0 3 8 9 】

試験中ケージは点灯しておき、まずラットを製剤「A」にしてノイス（Noyes）45 mg の食餌ペレットを、食餌ケースのフラップの後ろから取り出すように訓練した。次

10

20

30

40

50

にラットを左と右の両方のレバーを押して報酬として食餌を得るように訓練した。左又は右のいずれかのレバーは30mm中、ランダムに現れている。レバーを押すとレバーが戻り、食餌ペレットが出てきて、ケースの電灯が光る。電灯は、食餌ペレットを取るまでついたままである。

【0390】

次に、D M T P課題を開始した。これ以降の全ての訓練は、仕切のある実験ケージで行った。試験はまず50分行われた。ラットを実験ケージに入れ、ケージの電灯を点灯させて実験を開始した。試験は30秒間隔(ITT)で行われ、2つのうちの1つのレバー(サンプルレバー)が装置の中に挿入されている。レバー押し行動が行われるまでは、レバーは入ったままである。レバー押し行動によりレバーが戻り、ケースの電灯が光る(食餌は出てこない)。ケースのフラップを押すと、ケースの電灯が消滅し、両方のレバーに入る。サンプルレバーを押して(例えば、以前紹介した)両方のレバーが戻ると、食事ペレットが出てきて、ケースの電灯が光る。ケースの電灯はフラップを押すまではついている。間違ったレバー(サンプルレバーと反対のレバー)押しでは、食餌ペレットは出ず、10秒でタイムアウト(TO)となり、ケージのライトが消される。次の試験は、30秒のITTで開始される。挿入されたレバーは、挿入されたレバーは、半ランダムに決定されている。16回の試験ブロックのうち右及び左のレバーは8回ずつサンプルレバーとなっている。

10

【0391】

訂正の手順をこれ以降の訓練において用いた。サンプルレバー(左又は右)として設定されるかどうかは、訂正なしの試行においては、コンピュータによって決めた(例えば、最初の試行及び続く試行で正しい選択が行われる)。不正確な選択の都度、選ばれなかつたレバー(例えば「正しい」レバー)を続く試行においては、「訂正」試行ではサンプルレバーとして設定した。これらの訂正の試行は、固定化した行動を防ぐために行った(例えば、いつも左又は右のいずれかを押し、50%の正解率となること)。訂正の試行が行われた回数を記録したが、正解率の評価には、訂正試行以外のデータのみを用いた。

20

【0392】

以下の24の試行のうち、動物は位置の適合試験において高い正確性を有していた。25回目の試行では、サンプルレバー押しから、次の選択レバーが現れるまでの間に、遅延時間を設けた。サンプルレバーを押し、最初にフラップを押した後、0(即時)、4、8又は16秒間、選択レバーは入ったままである。4タイプの指令(0、4、8又は16秒遅延)が、16試行ブロックに対して各4回ずつ2回は左に、及び2回は右になるよう半ランダムにセットした。ラットが、遅延時間後30秒の予定時間内に選択行動をとらなかつた場合、試行は終了し、次の試行が始まるという時間制限を設けた。そのような試行は、不完全として数え、データ分析には含めなかつた。ITTの終了後、同じ試行を開始した。試行25以降は、不正確な選択によるタイムアウトはなくし、試行時間を70秒とした。

30

【0393】

0 - 16秒の遅延を設けた以下の26試行(試行25 - 50)のうち、試行間の間隔は10秒とし、その後の8試行(試行51 - 58)は、遅延を64秒まで伸ばした。しかし、64秒の遅延は効率が悪かつたため、その後の試行には用いなかつた。試行59では、0、8、16及び32秒の遅延を設けた。これらの遅延は、以下の全ての試行において用いた。59の試行を行い、24以上を完了したのは、56のラットのうち51のみだった(正しい選択及び正しくない選択の和)。これらのラットは、行動の評価(正解率、反応までの時間、及び正解した回数)によって、半ランダムに以下の7群: 担体 / 担体(n=7)、担体 / スコポラミン(n=)、ネピカスタッフ1.0mg/kg / スコポラミン(n=7)、ネピカスタッフ3.0mg/kg / スコポラミン(n=7)、ネピカスタッフ10.0mg/kg / スコポラミン(n=7)、ネピカスタッフ30mg/kg / スコポラミン、及びフィゾスチグミン / スコポラミン(n=8)、に振り分けた。

40

【0394】

50

60 - 69 試行を行うため、1日のうち午前6時及び午後6時に、ラットに担体、フィゾスチグミン(Phys)又はネピカスタッフ(1、3、10又は30mg/kg)を投与した。試行68及び69の担体処置の動物が高い選択精度を示したため、0、8、16及び32秒の遅延を最終試行(試行70)でも行い、担体/担体処置群以外に、試験前30分前にスコポラミン臭素酸塩0.1mg/kgを投与しておいた(皮下投与)。担体/担体群の動物には、最終試行の30分前に生理食塩水を投与した(皮下投与)。それゆえ、11日間における7群への薬物投与は以下の通りである:

【表2】

群	試行60 - 69 (0、8、16、及び32秒遅延)	試行70 (0、4、8、及び32秒遅延)
1 担体	担体/担体	
2 担体	担体/スコポラミン	
3 ネピカスタッフ 1.0 mg/kg	ネピカスタッフ 1.0 mg/kg / スコポラミン	
4 ネピカスタッフ 3.0 mg/kg	ネピカスタッフ 3.0 mg/kg / スコポラミン	
5 ネピカスタッフ 10 mg/kg	ネピカスタッフ 10 mg/kg / スコポラミン	
6 ネピカスタッフ 30 mg/kg	ネピカスタッフ 30 mg/kg / スコポラミン	
7 フィゾスチグミン	フィゾスチグミン / スコポラミン	

10

20

30

40

50

【0395】

データを収集し、1) 正解率、2) 選択からサンブルレバーを選ぶまでの反応時間、及び3) 正解及び不正解の選択が完了した合計数を含む項目をD M P T研究において分析した。先の2つの依存項目は、不正解の試行の回数の計算のためにのみ収集した。

【0396】

統計分析の検出力及び検出感度を増加させるため、最初の10の薬物処置期間(試行60 - 69)において、第1日から第10日までの試験のデータの図が含まれているが、データは2つのブロックに分けた(ブロック1 - 5)。また、担体/担体及び担体/スコポラミン投与群は最初の10日間の試験で同じ処置を受けるため、統計分析のために、まとめてブロック1 - 5に設定した。

【0397】

薬物処置の被検体間の因子及び被検体内の遅延時間(0、8、16又は32秒)の二元配置分散分析(ANOVA)を、正しい選択の確率及び反応時間の分析のために用いた。これらの分析は、別々に行われ、それぞれのブロックのデータごとに行った。一元配置ANOVAをそれぞれの遅延について行った結果、有意な相互作用が見られた。両側ダネットt-検定に続く一元配置ANOVAにより有意な主効果が得られた。適切な場合には、完了した試行の平均回数を分析するためにダネットポストホック検定に続く一元配置ANOVAを行った。

【0398】

全ての統計分析は、スーパーアノーバソフトウェアを用いて、マッキントッシュコンピュータで行った。アルファは、試験中0.05にセットした。4つの遅延時間の試行において選択を完了することができなかった動物は、分析の正解率及び遅延に対する応答試験の分析からは除外した。正解率及び反応の遅延の分析には、5ブロックに分けた薬物投与群及びスコポラミン投与群の動物の数を、分析に含め記録した。遅延時間を設けた試行における、薬物の全体としての効果の評価は、試行を完了した全ての動物の数が含まれている。

【0399】

フィゾスチグミン硫酸塩(1.0mg/kg、RBI社)及びネピカスタッフ(1、3、10及び30mg/kg、ロシュ社)は、1日2回、午前6時及び午後6時に経口投与した。スコポラミン臭素酸塩(0.1mg/kg、シグマ社)は、前の試験の30分前に投与した。フィゾスチグミン及びネピカスタッフは、蒸留水に溶解又は懸濁させ、2.5ml/kgとして投与した。スコポラミン臭素酸塩は、生理食塩水に溶解させ、1.0m

1 / kg として投与した。全ての投与用量は、体重を基準に表示した。

【0400】

最初の試験ブロックでは、DMTP課題において正解率及び遅延に対する選択反応において、薬物処置群において有意な効果は示さなかった。薬物処置は、完了した試行の数に影響を与えたかった ($F(5, 45) = 0.319, p = 0.899$)。

【0401】

ブロック2において、ネピカスタッフ及びフィゾスチグミンは、試行中、いずれの項目においても有意な効果を示さなかった。効果は統計的には有意差はなかったが ($F(5, 45) = 1.717, p = 0.150$)、試行を完了できた動物が減っていったという傾向があった。これはネピカスタッフ3又は30mg/kg及びフィゾスチグミン投与群において、わずかであるがより顕著に見られた効果であった。4種の遅延においては、ネピカスタッフ30.0mg/kg投与群の動物は7動物のうち4動物しか試行を完了できなかった。

10

【0402】

ブロック3においては、フィゾスチグミン処置群は、遅延とは独立した選択の不正確性があった。正解率のANOVAによる分析では、薬物処置の有意な主効果が見られたが、薬物処置×遅延時間の相互作用においては、有意差は見られなかった。薬物処置の主効果をダネットポストホック検定で分析したところ、フィゾスチグミン処置群のみが担体処置群に比べて有意差を示した。薬物処置群は、このブロックにおいて、反応の遅延又は試行を完了した数において、有意差を示さなかった ($F(5, 45) = 0.701, p = 0.625$)。

20

【0403】

ブロック4では、薬物処置による正解率への効果はあったが、統計的有意差までは示さなかった ($p = 0.056$)。しかし、薬物処置群のANOVA分析により、薬物処置×遅延に対する応答の相互作用において、有意に遅延に対する応答に障害を与え、有意差を示した。続く一元配置ANOVAにより、統計的には0、8、16及び32秒遅延による処置は、32秒遅延のみ有意であった；0、8、16及び32秒遅延による場合、それぞれ、 $F(5, 40) = 2.115, p = 0.084$ ； $F(5, 40) = 1.403, p = 0.244$ ； $F(5, 40) = 2.259, p = 0.067$ ； $F(5, 40) = 3.325, p = 0.013$ であった。ダネットポストホック検定において、32秒遅延におけるネピカスタッフ10.0mg/kg投与群のみ担体処置群よりも長い遅延時間が可能であった。薬物治療は、ブロック4において試験を完了した回数は、有意ではなかった ($F(5, 45) = 1.533, p = 0.199$)。

30

【0404】

ブロック5では、ネピカスタッフを試みたところ、用量及び遅延時間依存性の選択の正確性に障害が生じ、二元配置ANOVAにより処置×遅延に対する応答の相互作用における有意差が見られ、続く一元配置ANOVAでは、0、8、16及び32秒遅延では、有意な差 (32秒遅延、 $F(5, 39) = 0.327, p = 0.894$ ； $F(5, 39) = 0.825, p = 0.539$ ； $F(5, 39) = 1.188, p = 0.333$ ； $F(5, 39) = 3.018, p = 0.021$ 、0、8、16及び32) が見られた。ダネットポストホック検定では、32秒遅延における、ネピカスタッフ10及び30mg/kg処置群は、担体処理の動物よりは効果は大きかった。

40

【0405】

ブロック5において、ネピカスタッフ及びフィゾスチグミンは、試行を完了した数は有意ではなかった ($F(5, 45) = 1.692, p = 0.156$)。

【0406】

スコポラミン臭素酸塩を投与しても、多くの動物は、試行において遅延による効果を示さなかった。10.0mg/kgのネピカスタッフ+スコポラミン投与群においては、1匹のラット、30.0mg/kgのネピカスタッフ+スコポラミン投与群においては2匹のラットのみが4つの遅延時間において、試行を完了できた。事実、担体/担体及び担体

50

/スコポラミンにおいてそれぞれ7匹及び4匹のラットが試行を完了し、それ以外の全ての群において、4つの遅延による試行を完了できたのはn < 4であった。

【0407】

全てのスコポラミン処置群において、試行を完了することができた数は減少した(F(6, 16) = 8.801, p = 0.001)。

【0408】

スコポラミン処置群のうちの少数のために、選択の正確性及び反応遅延データによってANOVAを行わなかった。加えて、4つの遅延において正解率の平均を求められなかつた。担体/スコポラミン群の正確性を担体/担体群と比較したt-検定からは、スコポラミンは有意に背tんたくの正確性を減少させることができた(t₍₉₎ = 4.15, p = 0.003)。被検体が4匹よりも小さい場合には、それ以上の分析は行わなかつた。しかし、興味深いことに、ネピカスタッフ+スコポラミン30.0mg/kg処置群の中の2匹は、スコポラミン単独よりも正確な選択をした。この30.0mg/kg処置動物は、担体/スコポラミン処置群又は他のスコポラミン処置群のいずれの動物よりも、正確な選択をした。

10

【0409】

ネピカスタッフ単独で投与した場合、DMTP課題においては、ネピカスタッフの記憶向上効果にはつながらないと考えられる。遅延に伴う記憶障害は、担体処置した5つのブロックでは、消失したと考えられることは、注目すべきである。しかし、第5ブロックは遅延性の記憶障害が起こり、0秒遅延では100%の正確性、32秒遅延では80%の正確性であった。このように担体処置動物では、天井効果は見られなかつた。

20

【0410】

とりわけ、第5ブロックにおいてネピカスタッフは選択的な記憶混乱効果があつた。フィゾスチグミンは、いずれの処置日の効果も改善せず、第3ブロックにおいては正確性に関して遅延非依存性の障害が現れた(第5及び6日)。第11日、スコポラミン臭素酸塩(0.1mg/kg)及びネピカスタッフ又はフィゾスチグミンを同時投与した、スコポラミン負荷試験は、DMTP課題を完了した被検体が少なかつたために、分析できなかつた。しかし、ネピカスタッフ及びスコポラミン30.0mg/kg投与を受けた中の2匹のラットはDMTP課題を行え、選択の正確性は、他のいずれのスコポラミン処置動物よりも正確であった。これよりネピカスタッフは、「非認識性」の他のマスクされていた効果のため、スコポラミンによって引き起こされた記憶の破壊をいくらか弱めることが可能であるといえる。

30

【0411】

ネピカスタッフは、有意に用量及び遅延時間依存性の選択の正確性への障害を引き起こす。ネピカスタッフ10.0mg/kg処置された動物は、0、8及び16秒遅延では、正確性において何ら障害を受けなかつた。対照的に、32秒の遅延では、ネピカスタッフ10.0mg/kg投与群においては、担体処置群に比べて、障害を受けた。最高用量30.0mg/kg投与を行つた場合、0秒遅延では正確性に障害はなく、8及び16秒遅延においては正確性に障害が出る傾向にあり、担体と比較して、32秒遅延の場合には有意な障害が生じた。これらの薬物による遅延時間依存性の選択の正確性への障害は、化合物は直接短期記憶又はワーキングメモリに作用していることが考えられる。動物は十分に動くことができ、DMTP課題を正確に行うことができる。短い遅延の場合及び、保持間隔が長い場合にだけ、障害を起こす。試験した化合物で、このモデルの試験化合物で、ようなプロファイルを示したものはほとんどなかつた。記憶障害を誘発するとされる多くの化合物は、全ての遅延で選択の正確性の障害が見られた(例えば、MK-801、スコポラミン)。ネピカスタッフの10.0mg/kg投与では、第4ブロックの試行において、32秒遅延の場合に、担体処置動物よりも完了するのに時間がかかり、効果は小さかつた。効果は用量非依存的であり、30.0mg/kgを投与した場合には効果は見られなかつた。ネピカスタッフ投与動物は、担体投与動物よりも完了しにくい傾向にある:この傾向は、最後の2ブロックの試行で見られた。しかし、様々なデータがあるため、これら

40

50

の傾向は、統計的有意性には届かなかった。この多様なデータは予想外だった。これは、慢性の経口投与管理による最初のストレスが、これらの食餌摂取動物において、特に最初の数ブロックの試行において効果を落とさせたものと考えられる。すべての群において、最初と2番目のブロックにおいて試行を完了した数が減少した。最初の減少から回復した動物は、より一貫した行動を次の3ブロックにおける試行では示した。

【0412】

我々は、動物の体重はある場合には5%を超えて総体重が減少し始めたことを発見した。体重減少を示した動物は別にして、毎日の試行の後に追加の食餌を与えた。この追加によって試行が完了したかどうかに多様性が出たのかもしれない。しかし、体系的な記録はなされていないが、大まかな観察から30mg/kg投与群には、他の群よりも追加の食餌を与えるべきだった。この観察は、ネピカスタッフ100mg/kgの経口投与による予備試験に顕著な体重減少を引き起こした結果と一致している。

10

【0413】

フィゾスチグミンは、DMTP課題においてラットの行動を改善しなかった。フィゾスチグミンを投与された動物は、ブロック3においては正解率に有意に障害が出た。対照的に、フィゾスチグミンによって障害された正解率へのネピカスタッフ投与の効果は、遅延時間とは関係ないものであった：相互作用に関する分散分析は、統計的有意差を有しなかった。それゆえ、正確な反応へのフィゾスチグミンの効果は、この用量を投与した場合に見られる行動学上の毒性効果の二次的なものであると考えられる。フィゾスチグミンによる、統計的な有意差はなく、選択の正確性の障害により、試行の最後の2ブロックにおいて動物は、耐性を獲得していると考えられる。

20

【0414】

最後に、フィゾスチグミンはスコポラミンによる試験中、スコポラミンの効果を弱めることはなかった。異なる用量のフィゾスチグミンによりスコポラミンに対して効果がある可能性がある。我々は、本件の投与管理によってフィゾスチグミンによりスコポラミンの効果を弱めるかを試みたことがなかったので、本件の結果を比較すべきデータの履歴がない。フィゾスチグミンの効果がなかったのは、急性投与に比べて、低容量の場合、フィゾスチグミンの慢性投与を行わなければならなかつたのであると考えられる。動物は、スコポラミンの効果を減弱するのに必要な高用量のフィゾスチグミンの繰り返し投与による耐容性がなかったと考えられる（予備試験の結果を参照）。加えて、ネピカスタッフはスコポラミンの効果を弱めるようではなかつたが、30.0mg/kgのネピカスタッフを投与した2匹は、スコポラミン試験中、他のスコポラミン処置群よりも選択の正確性が上昇したことは興味深い。さらなる研究が必要である。ネピカスタッフによる急性又は慢性投与により、スコポラミンの効果を弱めるか明確にする必要がある。

30

【0415】

ネピカスタッフは、8日間の投与により、特定の記憶破壊効果を生じたと見られる。フィゾスチグミンは改善せず、3ブロックの試験期間において遅延時間非依存的な選択正解率への障害を引き起こした（第5及び6日）。スコポラミン負荷試験において、第11日に動物に、スコポラミン臭素酸塩（0.1mg/kg）及びネピカスタッフ又はフィゾスチグミンを同時投与したが、DMTP課題を完了できたネピカスタッフ及びフィゾスチグミン処置群が少なかつたために、分析できなかつた。しかし、30.0mg/kgのネピカスタッフ及びスコポラミン投与を受けたラットのうちDMTP課題を完了できた2匹のラットは、他のスコポラミン処置を受けたどのラットよりも高い選択正解率を示した。これよりネピカスタッフは、「非認識性」の他のマスクされていた効果のため、スコポラミンによって引き起こされた認識破壊をいくらか弱めることが可能であるといえる。最終ブロックの試験において、ネピカスタッフ誘導性投与量及び遅延時間依存性の障害による選択正解率の減少を試験した。これは他の記憶障害薬からは予測できない発見であった。スコポラミン及びMK-801、といった注意及び/又は運動/やる気の因子の障害による選択正解率への遅延時間非依存的障害によると考えられる。対照的に、変化及び注意又は変化/注意行動を説明できない。この結果は、受容体又は薬理作用において新しい受容体

40

50

に選択的又は、ワーキングメモリの重要な基質である。

【実施例 30】

【0416】

近年、我々はネピカスタッフが、選択的ドパミン - ヒドロキシラーゼ阻害剤であることを示し、S H Rにおいて急性の降圧効果の効果の研究を行った。ネピカスタッフ降圧効果は、慢性的に同系統のラットで行った。さらに、我々は、ネピカスタッフ及びアンジオテンシン変換酵素阻害剤エナラブリルとの同時投与の相乗効果の可能性を調べた。この処置によるS H Rにおける心肥大効果も調べた。

【0417】

雄 S H R / N C R 1 B R ラット（食餌を与える時に 22 - 28 週齢）で、/ N C r I 10 B R ラットと体重の合うラットを用いた。4 種の実験を順に行った。

シリーズ I

担体

エナラブリル	1 0 m g / k g
ネピカスタッフ	3 m g / k g
ネピカスタッフ	1 0 m g / k g

シリーズ I I

担体

エナラブリル	1 0 m g / k g
ネピカスタッフ	3 0 m g / k g
ネピカスタッフ	1 0 0 m g / k g

20

シリーズ I I I

担体

エナラブリル	1 m g / k g
ネピカスタッフ	3 0 m g / k g
ネピカスタッフ	3 0 m g / k g + エナラブリル 1 m g / k g

シリーズ I V

エナラブリル	1 m g / k g (E 1)
ネピカスタッフ	1 5 m g / k g + E 1
ネピカスタッフ	3 0 m g / k g + E 1
ネピカスタッフ	6 0 m g / k g + E 1

30

【0418】

それぞれの動物の処置において、動脈性血圧、心拍、及び運動行動を観察するために 24 匹の S H R に常に血圧無線遠隔変換器を装着した。ラットをペントバルビタールナトリウム (6 0 m g / k g 、腹腔内投与) で麻酔し、腹部の毛を剃った。麻酔下、正中線に従い解剖した。腹部の大動脈にカテーテルのついた無線遠隔電送器のユニットを、カニュレを通して装着した。電送器を腹筋に縫いつけた後、皮膚を閉じた。それぞれのラットは、薬物投与の前に少なくとも 2 週間回復させた。ラットは、8 時から 20 時に電気をつける通常の明 / 暗サイクルで個別に飼育した。

【0419】

実験開始の 3 日前、ラットをランダムに 4 処置群に振り分け、最高血圧 (S B P) 、最低血圧 (D B P) 、平均血圧 (M B P) 、心拍 (H R) 、及び運動行動 (M A) をモニターした。投与前のパラメータを測定した後、それぞれの群のラットに 30 日間毎日ネピカスタッフ及び / 又はエナラブリルを投与した (後述参照) 。

【0420】

最後の処置の 24 時間後、ラットは安楽死させ、左心室を摘出し、重量を測定し (湿重量) 、乾燥重量を得るため少なくとも 24 時間、凍結乾燥した。投与前のこれらのパラメータを測定した後、それぞれの群のラットは 30 日のネピカスタッフ及び / 又はエナラブリルを 30 日間投与した。

【0421】

40

50

各試験の開始において、無線遠隔装置を装着した各群のラットの数は常に 6 とした。シリーズ I では、ウイスター - 京都ラット (W K Y) は 7 匹を同様に飼育し、担体 (水) を投与したのに対し、シリーズ I I I 及び I V では 2 匹のラットを各群に追加し、同様に処置した (S H R の肥大化への影響の統計分析を行うためにそれぞれの群の動物の数を 2 匹ずつ増やした)。これらのラットは無線遠隔装置の装着又はモニタリングは行わなかった。

【 0 4 2 2 】

ネピカstattとエナラブリルはいずれも水溶液として調製した。すべての投与において、ラットに遊離塩基等価体が 1 0 m l / k g となるように投与した。エナラブリル (バソテック (登録商標)) は、市販されているものを地域の薬局から入手した。

10

【 0 4 2 3 】

S B P 、 D B P 、 M B P 、 H R 、及び M A のデータを継続的に収集するためにコンピュータ化されたデータ収集システムを用いた。収集は各ラットにつき、5 分ごとに 1 0 秒ずつ行った。これらは 1 時間ごとに平均値を取り、標準誤差 (S E M) を計算した。処置終了後には、左心室重量 (乾燥及び湿重量) を測定した。体重は毎日記録した。

【 0 4 2 4 】

全ての値は、平均値 ± 標準誤差で表した。統計的に有意差があるとは、 p 値が 0 . 0 5 よりも小さいことと定義する。

【 0 4 2 5 】

M B P 、 H R 及び M A のデータは別々に分析した。それぞれの分析は、毎日 2 6 時点で行われた。二元配置 A N O V A には、主効果として、治療及び時間及びそれらの相互作用を用いた。全体としての治療効果又は有意な相互作用を検出した場合には、その時点における一元配置 A N O V A を行った。各時点での対比較はダネットの手法を用いて行った。全体としての治療効果が見られなかった場合には、コントロールとの対比較はボンフェローニ補正を用いて臨界値を補正して行った。

20

【 0 4 2 6 】

左心室重量については、組織の湿重量及び乾燥重量は最終体重を共変量として共分散による分析を行ったのに対し、組織の湿重量 / 体重及び組織の乾燥重量 / 体重の比を分析する際にはクラスカル・ワリス検定を用いた。全体としての処置の効果を全グループについて検出できなかった場合には、ボンフェローニ補正を行ってから多重比較を行った。

30

【 0 4 2 7 】

体重については、投与前からの変化に関する二元配置 A N O V A を処置、日、及び日ごとの処置との相互作用による全体の効果を分析するために行った。一元配置 A N O V A を日ごとに行い、薬物処置群と担体コントロール投与群との対比較を、ダネットの手法及びフィッシュラーの最小有意差法によって多重比較に適合させて行った。

【 0 4 2 8 】

シリーズ I 及び I I については、ネピカstatt 3 及び 1 0 m g / k g の経口投与 (これ以降は全て経口投与である) では、3 0 日間のいずれの時点においても血圧に有意な効果を与えたかった (データは掲示していない)。ネピカstatt 3 0 m g / k g では、第 1 日において M B P を緩やかに下げ、第 3 日目は最大 - 2 0 m m H g となり (p < 0 . 0 1) 、 2 4 時間ではほとんど回復しなかった。同様の降圧薬の効果が試験中見られた。 1 0 0 m g / k g では、第 1 日の投与後 2 1 時間後に - 2 9 m m H g の降圧反応が見られた。 M B P は続けて減少し、第 3 日の最低値は約 - 4 2 m m H g (p < 0 . 0 1) であり、 M B P は、ずっと低いままだった。

40

【 0 4 2 9 】

エナラブリル 1 0 m g / k g は継続して M B P を低下させた。最大下降比は、第 5 日の投与後 1 時間以内に現れた。 M B P は - 2 9 m m H g (p < 0 . 0 1) は、第 5 日に投与後 1 時間後に現れた。

【 0 4 3 0 】

シリーズ I I I において、エナラブリル 1 m g / k g (n = 6) 又はネピカstatt 3

50

0 mg / kg (n = 6) の単独投与では、降圧効果は小さかったが、2つの化合物 (n = 6) の同時投与は大きな降圧反応を起こした（第1日、16時間後に -21 mmHg、p < 0.01）。反応開始及び進行は、ゆっくりで緩やかだった。第2日に2回目の同時投与を行った場合、ほぼ1日に渡り、より大きな効果が見られた（-25 mmHg、13時間後に p < 0.01）。相乗効果は試験中を通じて見られた。

【0431】

シリーズIVにおいては、エナラブリルにより降圧しない用量でのネピカスタッフの相乗効果を調べた。エナラブリル (1 mg / kg) 存在下では、ネピカスタッフ 60 mg / kg は最初、15又は30 mg / kg 投与の場合より大きく長いエナラブリルの効果が見られたが、第8日ないし第30日においては、大きな効果は見られなかった。それゆえ、試したネピカスタッフの投与量 (15、30及び60 mg / kg) には関係がなかったといえる。ネピカスタッフ 15 mg / kg 及び E1 群は、低い平均血圧を示し、より大きな標準誤差となった（2匹のラットは他よりも大きい降圧効果を示した）。

10

【0432】

ネピカスタッフ 3 及び 10 mg / kg 投与群は、30日間の試験においては、継続して心拍 (HR) に影響を与えたわけではなかった。しかし、ネピカスタッフ 100 mg / kg 投与群では、投与後最初の数時間においては、担体コントロール投与群よりも低いHRを示す傾向にあった。エナラブリル 1 mg / kg 投与群では HR に影響を与えたかったに対し、ネピカスタッフ 10 mg / kg 投与群は、投与 2 時間以内に一過性のわずかな頻脈を起こす傾向があった。シリーズIIにおいては、例えば、エナラブリル (1 mg / kg)、ネピカスタッフ (30 mg / kg) 又はそれらの併用では、いずれも継続的には HR に影響を与えたかった。シリーズIVにおいて、ネピカスタッフ (15、30及び60 mg / kg) 及びエナラブリル (1 mg / kg) 処置群は、エナラブリル (1 mg / kg) 単独処置群よりも、より低いHRを示す傾向にあった。

20

【0433】

試験を通じて、運動行動 (MA) についてはいずれの薬物処置群も有意な効果を示さなかつた。

【0434】

SHRにおいて、ネピカスタッフ 3 - 100 mg / kg 投与群は、心臓の肥大化を示さなかつた (p > 0.05)。エナラブリル (10 mg / kg) は、シリーズIIにおいて、左心室重量を有意に減少させたが、シリーズIでは見られなかつた。シリーズIIIにおいては、エナラブリル 1 mg / kg 投与群では肥大化は見られなかつたが、エナラブリル (1 mg / kg) 及びネピカスタッフ (30 mg / kg) の同時投与群では左心室重量が SHRにおいて有意に減少した (p < 0.01)。しかし、シリーズIV、エナラブリル (1 mg / kg) 及びネピカスタッフ 15、30 及び 60 mg / kg の同時投与群では、エナラブリル単独と比べて左心室重量に差はなかつた (p > 0.05)。

30

【0435】

担体処置群と比較して、SHRへのネピカスタッフ 3 及び 10 mg / kg 投与群は、SHRの体重に影響を与えたかった (p > 0.05)。しかし、ネピカスタッフ 30 及び 100 mg / kg 投与群においては、体重が大きく増加した (p < 0.05)。

40

【0436】

比較として、エナラブリル 10 mg / kg 投与群では、ラットの体重を有意に減少するか、影響はなかつた (p < 0.05)。エナラブリル 1 mg / kg 投与群では、わずかに体重を減少したが、エナラブリル (1 mg / kg) 及びネピカスタッフ (30 及び 60 mg / kg) の同時投与群では、ラットの体重はわずかに増加した。

【0437】

担体、エナラブリル、及びネピカスタッフ 3 及び 10 mg / kg 処置群のラットの投与前の体重は、それぞれ 38.7 ± 1.1、41.5 ± 1.2、40.7 ± 4.0 及び 41.5 ± 1.2 g であった。

【0438】

50

担体、エナラブリル、及びネピカスタッフ 30 及び 100 mg / kg 処置群のラットの投与前の体重は、それぞれ 399 ± 10 、 389 ± 6 、 389 ± 9 、及び 401 ± 10 g であった。

【 0439 】

担体、エナラブリル、及びエナラブリルを含みまは含まないネピカスタッフ 30 mg / kg 処置群のラットの投与前の体重は、それぞれ 365 ± 9 、 371 ± 8 、 361 ± 7 、及び 369 ± 7 g であった。

【 0440 】

エナラブリル単独及びネピカスタッフ 15、30、及び 60 mg / kgとの同時投与を行ったラットの投与前の体重は、それぞれ 357 ± 6 、 363 ± 6 、 347 ± 8 、及び 346 ± 8 g であった。

10

【 0441 】

30 日間の処置を 4 シリーズ行い観察したところ 4 匹が死亡した。死亡の原因は特定されていないが、ネピカスタッフ処置に関連するものではないように見えた。

【 0442 】

30 日間の慢性のネピカスタッフの経口投与による血圧、心拍、運動行動及び左心室重量への影響を、4 シリーズで行い、血圧無線遠隔変換器を装着した自然発症高血圧ラット (SHR) で評価した。ネピカスタッフ 3 及び 10 mg / kg (n = 6) 投与群では血圧に影響はなかった。ネピカスタッフ 30 mg / kg (n = 6) 投与群では、降圧効果のピークは - 20 mmHg で、第 3 日に生じた (p < 0.01)。降圧効果は、緩やかであったが、試験中を通じて検出された。ネピカスタッフ 100 mg / kg (n = 5) 投与群では、より大きな降圧効果を示した。効果は緩やかで、第 3 日に - 42 mmHg でピークが生じた (p < 0.01)。降圧効果は、残りの試験期間中も比較的生じた。比較のため、アンジオテンシン変換酵素阻害剤エナラブリル (10 mg / kg、n = 6) 投与したところ、- 20 ないし - 30 mmHg の降圧効果が試験期間中を通して見られた。エナラブリル (1 mg / kg) の単独投与では、有意な降圧効果を示さなかつたが、ネピカスタッフ (30 mg / kg；n = 6)との同時投与では、大きく長期間の降圧効果が見られた (p < 0.01)。相乗効果を 30 日間見られた。エナラブリル (1 mg / kg) によるネピカスタッフの相乗的な降圧効果は、15、30、及び 60 mg / kg で見られたが、これらの効果は用量依存的ではなかつた。

20

30

【 0443 】

ネピカスタッフ 3 - 10 mg / kg 又はエナラブリル 1 mg / kg 投与群においては、有意な心拍への効果は見られなかつた。しかし、ネピカスタッフ 30 又は 100 mg / kg 投与群は、ラットの起床時間にわずかに徐脈が見られた。対照的に、エナラブリル 10 mg / kg 投与においては一過性の頻脈が見られた。ネピカスタッフ (15、30、及び 60 mg / kg) 及びエナラブリル (1 mg / kg) の同時投与では、エナラブリル (1 mg / kg) 単独投与の場合よりも心拍が遅くなつた。いずれの処置群においても運動行動への影響は見られなかつた。

【 0444 】

ネピカスタッフ 30 (n = 6) 及び 100 (n = 5) mg / kg 処置群においては、SHR の左心室肥大化に関し、有意な効果は見られなかつた。エナラブリル (1 mg / kg、n = 8) 又はネピカスタッフ (30 mg / kg、n = 7) 単独でも、肥大化を防がなかつたが、両化合物の同時投与では (n = 8)、有意に SHR の左心室重量を減少させた。しかし、同時投与の左心室重量への効果はネピカスタッフ (15、30 及び 60 mg / kg) の用量依存的ではなく、統計的にはエナラブリル (1 mg / kg) 単独と差がなかつた。

40

【 0445 】

4 シリーズの試験において、4 匹が 30 日間の投与経過において死亡した。3 匹はネピカスタッフ投与群で、1 匹は担体投与群においてであった。死亡の原因は特定されていないが、ネピカスタッフ処置に関連するものではないように見えた。

50

【0446】

ネピカスタッフ 30 及び 100 mg / kg 投与において、SHR 30 日間の投与において、反射的な頻脈を生ずることなく SHR の血圧を有意に低下させた。降圧効果を生じない用量のエナラブリル (1 mg / kg) とネピカスタッフ (30 mg / kg) の同時投与では、SHR において、抗高血圧及び心室肥大を防止した。しかし、これらの効果は、ネピカスタッフ (15、30 及び 60 mg / kg) に用量依存的ではなかった。

【実施例 31】

【0447】

試験は、麻酔した、装置を搭載したイヌにおいて、自律神経作用薬の応答に対するネピカスタッフの効果を評価するために行われた。

10

【0448】

ビーグルは、朝晩に食餌を与え、0 (担体) 又はネピカスタッフ 60 mg / kg を、十二指腸カニュレを通じて単回の十二指腸内投与をした。担体 - コントロール投与群は雄 1 匹及び雌 1 匹、及びネピカスタッフ - 処置群は雄 2 匹及び雌 2 匹ずつからなる。それぞれの動物は、イソフルレンガスで麻酔下、外科的手術により装置を装着した。試験製剤を投与する前、自律神経作用薬である、ノルエピネフリン (3 μg / kg)、イソプロテノール (0.3 μg / kg)、及びアセチルコリン (10 μg / kg) を静脈内投与し、平均血圧を測定した。各動物に試験製剤を単回ボーラス投与し、自律神経作用薬による血圧変化を投与後約 1、2、及び 3 時間後に測定した。実験終了後、それぞれのイヌは安樂死させ、試験から除いた。

20

【0449】

イヌは、試験化合物の血流力学係数を求める場合によく使われるので、用いた。ビーグル犬は、マーシャルファーム社 (North Rose, NY) から購入した。それぞれのイヌは、供給業者の施した耳の入れ墨によって各個体を特定した。動物は実験室の条件下に少なくとも投与の少なくとも 3 週間、慣らされた。順応期間中、各動物についての一般的な条件を検討し、健康的であると考えられる条件を用いた。イヌはランダムに処置群に振り分けた；雄は偶数、雌は奇数の番号に振り分けた。

【0450】

各群に振り分けた後、イヌは個別にステンレススチールのケージに飼育し、試験番号、及び入れ墨で特定した。飼育の部屋の環境はコントロールできるようになっている。ケージは毎日洗浄し、動物は消毒したケージに 1 週間おきに移し替えられた。ピュリナ認定ケーナインチャウ (Purina Certified Canine Chow) (登録商標) を 1 日 1 回及び水は自由に与えた。

30

【0451】

処置の日、イヌは約 14 ないし 16 ヶ月である。雄は体重 10.3 ないし 12.9 kg で、雌は 8.5 ないし 1.2 kg だった。

【0452】

投与においては、ネピカスタッフ粉末を担体と混合して 60 - mg / ml の懸濁液とした。使用の間 60 - mg / ml のネピカスタッフ製剤は、有効性を保っていた。各投与の日に、ノルエピネフリン (60 μg / ml)、イソプロテノール (6 μg / ml)、及びアセチルコリン (200 μg / ml) の水溶液を、滅菌水で調製した。

40

【0453】

雄 1 匹及び雌 1 匹の担体 - コントロール投与群に 1 ml / kg の担体、及び雄 2 匹及び雌 2 匹のネピカスタッフ - 処置群に 1 ml / kg の 60 mg / ml のネピカスタッフ溶液を投与した。総投与量は、各動物とも 60 mg / kg である。

【0454】

投与量は、ネピカスタッフの 2 つの試験に基づいて選択した。イヌにおける急性毒性研究において、400 mg / kg の経口投与により一過性の臨床兆候が現れた。1 ヶ月の研究では、1 日 1 回、5、20、又は 80 mg / kg の経口投与を行った。80 mg / kg / 日では、毒性の臨床兆候が現れた。

50

【0455】

担体又はネピカスタッフ製剤の単回の十二指腸内投与は、十二指腸カニュレを通して、直接十二指腸に投与した。十二指腸ルートを選択したのは、ネピカスタッフの投与経路として経口ルートが提案されている経路だからである。投与容積は、投与前に記録した個々の体重に基づいて計算した（本明細書においてデータは表にしていない）。それぞれの試験の後、イヌを測定し、過量のペントバルビタールナトリウム（300mg/kg、静注）で安樂死させ、試験から除いた。

【0456】

プロトコールに記載された手順に従い、イヌに外科的に装置を装着した。イヌは外科的手術の前には、終夜、絶食させた。試験を行う各動物は、まず、ケタミン（10mg/kg）及びジアゼパム（0.5mg/kg）の混合物を静注で注入して麻酔した。各動物は試験中、体温を保つために温水が循環しているパッドの敷いてある手術用テーブルに乗せ、機械的に換気した。麻酔用の手術台をイソフルランガスで充満させた（酸素中1.5%ないし2%の1回換気量、流量約1.5L/分）。直腸温度は、血中のガス濃度を測定するためだけにモニターし、データは本明細書には記載していない。外部針電極を皮下に埋込み、麻酔を標準肢導出ECGでモニターした。

10

【0457】

左大腿静脈にカニュレを通して、自律神経作用薬の投与のためポリエチレンチューブの先を大静脈に通した。左大動脈にポリエチレンチューブのカニュレを50U/mlのヘパリン・生理食塩水溶液で満たしたポリエチレンチューブのカニュレを通した。動脈カニュレの先は胸大動脈に通し、外部圧力トランステューサーに接続し、最高血圧及び最低血圧を記録した。動脈血サンプルは、血中pH、PCO₂、及びPO₂の分析のために動脈カニュレから採取した。

20

【0458】

正中線に沿った開腹手術を行い、幽門括約筋の尾方にある十二指腸を摘出した。十二指腸に針を挿入し、生理食塩水を満たしたカニュレの先は、試験製剤の投与のために針を通して細胞内腔まで達した。針は切開部位から抜き取り、カニュレはそこに固定し、カニュレの栓は腹部から外に出し、及び切開した腹部の皮膚を再び閉じた。

【0459】

外科的な測定の際は、必要ならば排気設備をつけ、動脈血pH、PCO₂濃度がほぼ通常値になるようにした（pH = 7.43ないし7.50及びPCO₂ = 22ないし27mmHg）。

30

【0460】

自律神経作用薬である、ノルエピネフリン（3μg/kg）、イソプロテレノール（0.3μg/kg）、及びアセチルコリン（10μg/kg）を静脈内にボーラス投与（約15秒）し、大腿静脈カニュレを用いて、各投与間は約10分をかけて行った。それぞれの薬剤の投与後、カニュレは3mLの水で洗浄した。薬剤の投与は、最初のアセチルコリン投与の約20分後に行った。

【0461】

2回目のアセチルコリン投与の約30分後、担体又はネピカスタッフを1ml/kgで、各動物に投与した。十二指腸に、十二指腸カニュレを通じてボーラス投与した。投与直後に十二指腸カニュレは担体溶液3mLで洗浄した。投与約50、110、及び170分後、10分間隔で自律神経作用薬を繰り返し投与した。

40

【0462】

大動脈血圧、心拍、及びECGは、継続的に直接ポリグラフレコーダに記録した。血中pH、PCO₂、及びPO₂の値は、血液サンプルを採取したおよその時間で、血中ガス分析器から手動でポリグラフチャートに記録した。心拍、ECG、及び血中ガス係数は、麻酔のレベル及び動物の調製の安定性を測定することのみに用いた；これらのデータは、本明細書には掲載していない。

【0463】

50

最高血圧、最低血圧、及び平均大動脈血圧は、投与前（ベースライン）及びそれぞれ薬剤のピーク反応（ベースラインからの最大変化）の時点で測定した。最高血圧、最低血圧、及び平均大動脈血圧、及び血中 pH、PCO₂、及びPO₂は、試験製剤投与の約 50、110、及び 170 分後に測定した。

【0464】

ノルエピネフリンに対する反応は、それぞれのノルエピネフリン投与において、平均大動脈血圧、及びピーク血圧の時点での増加によって特徴づけられる。イソプロテレノール及びアセチルコリンに対する反応は、それぞれのイソプロテレノール及びアセチルコリン投与において、平均大動脈血圧、及びピーク血圧の時点での増加によって特徴づけられる。

10

【0465】

試験の最後に、それぞれのイヌは過量のペントバルビタールナトリウム（約 300 mg / kg、静注）で安樂死させ、試験から除いた。

【0466】

本件処置に関する投与前後におけるノルエピネフリンの応答の違いはなかった。イヌにおける担体コントロール群では、投与後のノルエピネフリン応答は、投与前よりも小さいものだった；これは偶然と考えられる。イソプロテレノールの投与前後における応答の違いはなかった。本件処置に関し、アセチルコリンの投与前後の応答の違いはなかった。

【0467】

外科的に装置を装着したビーグル犬の十二指腸に 60 mg / kg のネピカスタッフを投与した。自律神経作用薬（ノルエピネフリン、イソプロテレノール、及びアセチルコリン）の静脈内投与に対する血圧の反応を投与前及び投与の約 1、2、及び 3 時間後に測定した。処置に関する自律神経作用薬の応答の違いは見られなかった。

20

【実施例 32】

【0468】

DBH 阻害剤（DBHI）であるネピカスタッフ急性腹腔内投与によるマウスの自発運動への効果を調べた。このクラスの化合物は自発運動に影響があるとされている。

【0469】

成熟雄 CD-1 (ICR) マウス（試験日の体重 30 - 40 g）を、8 匹を 1 群として、午前 9 時から午後 9 時までの通常の明 / 暗サイクルで飼育した。食餌及び水は自由に摂取させた。いずれの動物も投薬を受けたことがない。いずれの動物も 1 回しか使われない。

30

【0470】

自発運動を、自動化された 14ステーション活性モニタリングシステムでモニターした（サンディエゴ社）。各ステーションは、壁に等間隔で設置された 3 つの光線放出器及び 3 つの光線検出器を含む透明なパースペクスケージからなる（25 cm × 45 cm × 20 cm ; w × 1 × h）。

【0471】

マウスは少なくとも 1 時間前に試験室に入れた。マウスを個別にいずれかのケージに入れ、30 分間探索させた。この馴化期間の後、マウスの腹腔内にネピカスタッフ（10、30 及び 100 mg / kg）、SKF-102698（30 及び 100 mg / kg）、コカイン（30 mg / kg）又は担体を投与し、即時に同じケージに戻した。60 分の前処理時間の後、運動行動を 180 分観察した。各動物について 30 分ごとに活動数及び移動数（2 回連続の光線の遮りと定義される）を記録した。

40

【0472】

処置、時間間隔、及び時間に対する処置の効果の相互作用の、全体としての効果を評価するために、総合順位データ（ノンパラメトリック技術）を用いて、反復測定二元配置分散分析（ANOVA）により行った。一元配置 ANOVA は、あるならば、いずれの時間間隔において処置の効果があるかを調べるために、それぞれの時間間隔において行った。ダネットの手法及びフィッシャーの最小有意差法を用いて、複数比較の問題を修正して対

50

比較を各時間間隔について行った。

【0473】

ネピカスタッフの投与量は3 - 100 mg / kgであり、これを水に溶解させ、超音波をかけた。SKF-102698の投与量は、30 - 100 mg / kgとした。コカイン塩酸塩は、30 mg / kgとした。化合物の投与体積は、1 ml / 100 gとなるようにした。報告した全ての投与は遊離塩基の形態で存在し、コカインのみ塩を用いた。

【0474】

全体評価の分析モデルでは、処置及び時間において有意な効果が見られたが($p < 0.01$)、時間に対する処置の効果の相互作用に関しては、有意な効果は見られなかった。
分析の各時点は、時間間隔1 - 4の総合的な効果であるが(例えば、最初の120分は、
全て $p < 0.01$ だった)、全体として有意な処置の効果は、時間間隔5及び6において
は見られなかった(例えば、最後の60分)。

10

【0475】

活動数及び移動数の両方についてコカインを担体投与群と比較した場合、処置及び時間において、いずれも有意な効果があったのに対し(両方とも $p < 0.01$)、時間に対する処置の効果の相互作用に関しては、有意な効果は見られなかった。各時間間隔においてコカイン投与群は、総活動度及び移動度において、時間間隔1 - 4においては、有意差を示したが、5及び6群においては示さなかった(全て $p < 0.05$)。

【0476】

対照的に、担体コントロール投与群と比較して、ネピカスタッフ - 処置群又はSKF-102698 - 処置群において、いずれの時間間隔においても、総活動数又は移動数に有意差はなかった。

20

【0477】

コカインは、投与量30 mg / kgにおいて、運動促進剤としての効果を示した。対照的に、ネピカスタッフ3、10、30又は100 mg / kgの急性投与では、いずれの時間間隔においても、担体コントロール投与群と比較して、総活動数又は移動数に有意差はなかった。同様に、SKF-102698 30の30及び100 mg / kgの投与では、いずれの時間間隔においても、担体コントロール投与群と比較して、総活動数又は移動数に有意差はなかった。これらのデータから、DBHIは、マウスの運動行動に影響を与えないことが示唆される。

30

【実施例33】

【0478】

ネピカスタッフ及びドパミン - - ヒドロキシラーゼ阻害剤の急性投与は、自然発症高血圧ラットの左心室において、腸間膜動脈における酵素を阻害することが示された。7日及び25日間におけるネピカスタッフ1 mg / kg又は10 mg / kgを経口投与した場合、SHRの大脳皮質及び腸間膜動脈におけるノルエピネフリン及びドパミンレベルの変化を調べた。

【0479】

ネピカスタッフ1及び10 mg / kgを遊離塩基の形態で調製した。薬物は担体(dH₂O)に溶解し、10.0 ml / kgとなるように調製した。

40

【0480】

試験の開始時に16 - 17週齢である自然発症高血圧雄ラット(SHR)を用いた。動物は、食餌及び水を自由に摂取できるようにした。動物はランダムに以下のいずれかの処置群:ネピカスタッフの経口投与10 mg / kg、1 mg / kg、又は脱イオン水で調製した担体、をそれぞれに10 ml / kgとなるように投与する群に振り分けた。ラットは、7又は25日間、担体、1 mg / kg又は10 mg / kgネピカスタッフ(n = 8)を、第25日だけn = 9で経口投与した。第7日には、化合物を投与した4時間後、動物はハロタン麻酔して断頭し、皮質及び腸間膜動脈は摘出し、計量し、及び24匹のラットで分析した(n = 8 / 処置群)。残りの31匹のラットは、以下の18日間、3つの処置のうちのどれかについて経口投与を受けた。最後の処置から4時間後、この投与群から腸間

50

膜動脈及び皮質を摘出し、計量し、カテコールアミンレベルの分析に用いた。

【0481】

第25日に安楽死させた動物は、血圧を測るためにも用いられた。最後の血圧は、第22日に測定した。

【0482】

統計的には、3つの処置を、各時期において（第7又は第25日間）、3つの分析をノンパラメトリック一元配置分散分析（ANOVA）により行った。対比較分析をコントロール群と比較して、実験あたりの同過誤率を制御するためにサンプルサイズの違いを適合させて、フィッシャーの最小有意差法を用いて行った。それぞれの変数は、別々に分析した。図6-11において、*は $p < 0.05$ 、及び、**は $P < 0.01$ を示す。

10

【0483】

7日間の処置した場合、10mg/kg投与群は、担体投与群と比べて大脳皮質におけるノルエピネフリンレベルは、有意に低く（ $p < 0.1$ ）、ドバミン/ノルエピネフリン比（ $p < 0.05$ ）は有意に高かった。7日間の処置の場合、担体と比較しても、いずれの二つの処置群（1又は10mg/kgネピカstatt）においても、ドバミンレベルに有意な差はなく（ $p > 0.05$ ）、又は、1mg/kgネピカstatt投与群においてもノルエピネフリンレベル又はドバミン/ノルエピネフリン比に有意差はなかった（図6-8）。10mg/kgネピカstatt投与群において、第7日におけるドバミン/ノルエピネフリン比は、わずかに有意差があった（ $p < 0.05$ ）。

20

【0484】

25日間の1mg/kgネピカstatt投与群においては、担体投与群と比べて皮質におけるドバミンレベルが有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。この投与群においては、担体投与群と比べて皮質中のドバミン/ノルエピネフリン比も有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。10mg/kgネピカstatt投与群においてもこの比は、担体に比べて有意に大きかった（ $p < 0.05$ ）。いずれの投与群においても、コントロールと比較して、ノルエピネフリンレベルに有意差はなく（ $p > 0.05$ ）、10mg/kg投与群におけるドバミンレベルにも有意差はなかった（図6-8）。

20

【0485】

腸間膜動脈において、第7日（ $p < 0.05$ ）及び25日（ $p < 0.01$ ）の投与において、10mg/kg投与群は、担体投与群に比べて、ドバミン及びドバミン/ノルエピネフリン比が有意に高かった。担体投与群は、ノルエピネフリンレベルに有意な差はなかった。有意に（ $p < 0.05$ ）コントロールネピカstatt 1mg/kg投与群（図9-11）と比べても、有意に差はなかった。

30

【0486】

ネピカstattは、7及び25日に投与した場合、ドバミン- - -ヒドロキシラーゼを有意に阻害した。自然発症高血圧ラット（SHR）皮質及び腸間膜用いられた。10mg/kgでは、1mg/kgのネピカstatt投与群に比べ、より大きな阻害が見られたので、測定した効果は用量依存的であったといえる。

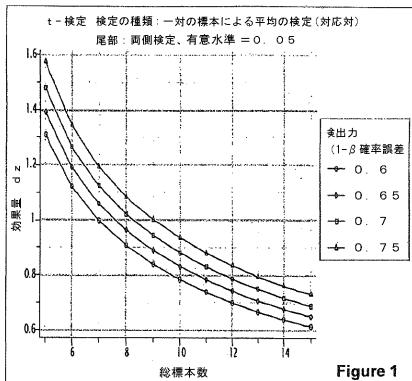
30

【0487】

当該関連技術分野の通常の知識を有するものには明白であるが、ここに記載した、方法や適用における他の適切な変更及び適用は適切であり、本発明の範囲から離れることなく又はあらゆる態様に用いることができる。発明は、特定の態様に関連して記載されているが、本発明を限定するために記載したのではなく、反対に、本発明の範囲及び発明の変更及び等価体が、以下の発明の範囲で定義される及び発明の範囲及び精神そのような代替、変更及び等価体もカバーするものである。

40

【図1】



【図2】

Figure 2

酵素	アッセイ方法
チロシンハイドロキシラーゼ	[³ H] チロシンからDOPAへの変換時に放出される [³ H] ₂ O
アセチルCoA合酶素	[³ H] 酢酸ナトリウムの利用
アセチルCoA-コレステロールアシルトランスフェラーゼ	[¹⁻¹⁴ C] バルミトイルCoA内因性コレステロールエステルの形成
Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ	B B 4 0 (合成ペプチド基質) の [³² P] リン酸化
シクロオキシゲナーゼ-1	アラキドン酸の酸化によるマロンジアルデヒドの分光光度法による定量
HMG-CoA還元酵素	[¹⁴ C] -HMG-CoAからの [¹⁴ C] メバロン酸の生成
中性エンドペプチダーゼ(ヒト)	グルタリル-Ala-Ala-Phenylalanine-NaFによる活性測定
NO合成酵素(構成的)	[³ H] -アルギニンから [³ H]-シトルリンへの変換
NO合成酵素(誘導型)	インターフェロン-γ及びリボボリ多糖により誘導されたマウスマクロファージの細胞質分画における i NOS 反応による生成物 (NO ₂ 、及びNO ₃) の定量
ホスホジエステラーゼ阻害剤 I I I	[³ H] -cAMPから [³ H] -AMPへの変換に続く [³ H] -アデノシンへの変換
ホスホリバーゼA ₂	[¹⁴ C] -3-ホスファチジルコリンからの [¹⁴ C] バルミチン酸の形成
プロテインキナーゼ(選択性)	ヒストンH1 [³² P] のリン酸化

【図3】

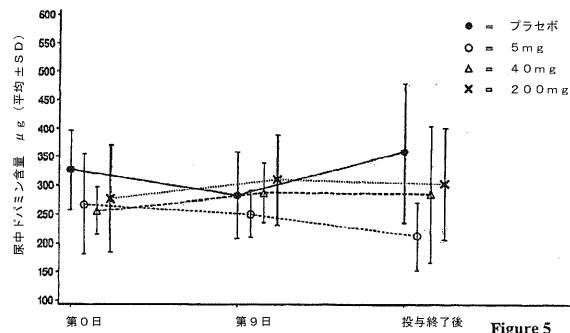
酵素又は受容体	IC ₅₀ (酵素)又はpK _i (受容体)
酵素	
ドバミン-β-ヒドロキシラーゼ(ウシ)	8.5 nM
ドバミン-β-ヒドロキシラーゼ(ヒト)	9 nM
アセチルCoA合酶素	< 1.0 μM
アシルCoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ	< 1.0 μM
Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I I	< 1.0 μM
シクロオキシゲナーゼ-1	< 1.0 μM
HMG-CoA還元酵素	< 1.0 μM
中性エンドペプチダーゼ(ヒト)	< 1.0 μM
NO合成酵素(構成的)	< 1.0 μM
NO合成酵素(誘導型)	< 1.0 μM
ホスホジエステラーゼ阻害剤 I I I	< 1.0 μM
ホスホリバーゼA ₂	< 1.0 μM
プロテインキナーゼ(非選択性)	< 1.0 μM
受容体	
α _{1A} 、α _{1B} アドレナリン受容体	< 5
α _{2A} 、α _{2B} アドレナリン受容体	< 5
β ₁ 、β ₂ アドレナリン受容体	< 5
M ₁ アドレナリン受容体	< 5
D ₁ 、D ₂ アドレナリン受容体	< 5
μ-オピオイド受容体	< 5
5-HT _{1A} 、5-HT _{2A} 、5-HT _{2C} セロトニン受容体	< 5

【図4】

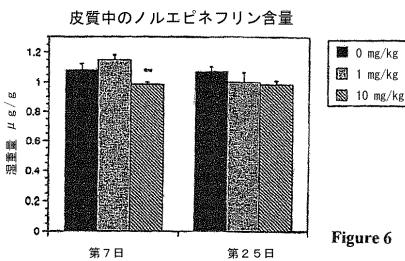
酵素	N	ネビカスタッフの濃度(μM)	酵素による阻害%	IC ₅₀ *(μM)
チロシンハイドロキシラーゼ	2	100	-11	> 100
NO合成酵素(構成的)	2	10	6	> 10
NO合成酵素(誘導型)	2	1.0	-1	> 10
ホスホジエステラーゼ阻害剤 I I I	2	100	-9	> 100
ホスホリバーゼA ₂	2	300	3	> 300
中性エンドペプチダーゼ(ヒト)	2	10	-12	> 10
Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I I	2	100	53	~100
アセチルCoA合酶素	2	100	-4	> 100
アセチルCoA-コレステロールアシルトランスフェラーゼ	2	100	6	> 100
HMG-CoA還元酵素	2	30	16	> 30
プロテインキナーゼ(非選択性)	2	300	39	> 300
シクロオキシゲナーゼ-1	2	300	44	> 300

* IC₅₀の予想値

【図5】



【図6】



【図7】

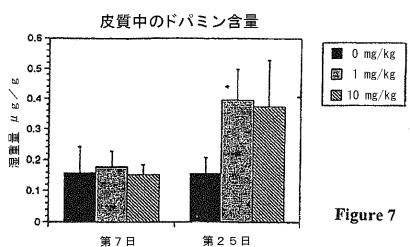


Figure 7

【図10】

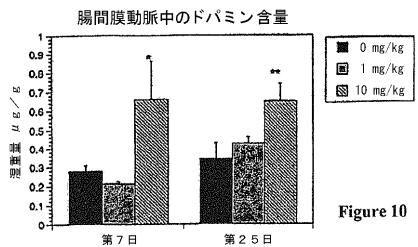


Figure 10

【図8】

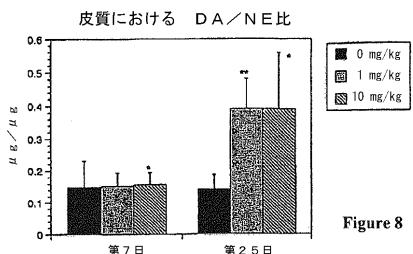


Figure 8

【図11】

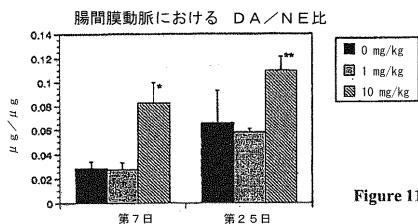


Figure 11

【図9】

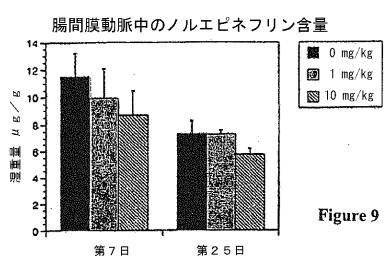


Figure 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/72357																		
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 43/50; A61K 31/415 (2008.04) USPC - 514/396 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																				
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/396</p>																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/235.8; 514/389; 514/417; 435/7.1; 548/542; 548/547																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Google: Scholar/Patents: dopamine hydroxylase inhibitor addiction																				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003/0040015 A1 (KIM et al.) 27 February 2003 (23.02.2003) para [0004], [0008]</td> <td>1-16, 18-50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0058336 A1 (NAKINISHI et al.) 16 March 2006 (16.03.2006) para [0004] [0012]-[0018], [0036], [0038], [0073]</td> <td>1-16, 21-31, 36, 38, 45-48</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,593,367 B1 (DEWEY et al.) 15 July 2003 (15.07.2003) col 5, ln 31-48; col 6, ln 33-47, ln 50-51, ln 57-67; col 9, 13-25; col 10, ln 8-15, ln 20-25; col 16, ln 50-56</td> <td>10, 12, 14-16, 18-50</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,958,896 A (RENSHAW et al) 28 September 1999 (28.09.1999) col 1, ln 30-37, col 2, ln 17-30; col 6, ln 49-67</td> <td>43-44, 49</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NICH et al. Sex differences in cocaine-dependent individuals' response to disulfiram treatment. Addictive Behaviors, 2004, Vol 29, pp 1123-1128, pg 1127, para 2</td> <td>13, 41</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2003/0040015 A1 (KIM et al.) 27 February 2003 (23.02.2003) para [0004], [0008]	1-16, 18-50	Y	US 2006/0058336 A1 (NAKINISHI et al.) 16 March 2006 (16.03.2006) para [0004] [0012]-[0018], [0036], [0038], [0073]	1-16, 21-31, 36, 38, 45-48	Y	US 5,593,367 B1 (DEWEY et al.) 15 July 2003 (15.07.2003) col 5, ln 31-48; col 6, ln 33-47, ln 50-51, ln 57-67; col 9, 13-25; col 10, ln 8-15, ln 20-25; col 16, ln 50-56	10, 12, 14-16, 18-50	Y	US 5,958,896 A (RENSHAW et al) 28 September 1999 (28.09.1999) col 1, ln 30-37, col 2, ln 17-30; col 6, ln 49-67	43-44, 49	Y	NICH et al. Sex differences in cocaine-dependent individuals' response to disulfiram treatment. Addictive Behaviors, 2004, Vol 29, pp 1123-1128, pg 1127, para 2	13, 41
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 2003/0040015 A1 (KIM et al.) 27 February 2003 (23.02.2003) para [0004], [0008]	1-16, 18-50																		
Y	US 2006/0058336 A1 (NAKINISHI et al.) 16 March 2006 (16.03.2006) para [0004] [0012]-[0018], [0036], [0038], [0073]	1-16, 21-31, 36, 38, 45-48																		
Y	US 5,593,367 B1 (DEWEY et al.) 15 July 2003 (15.07.2003) col 5, ln 31-48; col 6, ln 33-47, ln 50-51, ln 57-67; col 9, 13-25; col 10, ln 8-15, ln 20-25; col 16, ln 50-56	10, 12, 14-16, 18-50																		
Y	US 5,958,896 A (RENSHAW et al) 28 September 1999 (28.09.1999) col 1, ln 30-37, col 2, ln 17-30; col 6, ln 49-67	43-44, 49																		
Y	NICH et al. Sex differences in cocaine-dependent individuals' response to disulfiram treatment. Addictive Behaviors, 2004, Vol 29, pp 1123-1128, pg 1127, para 2	13, 41																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* 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																				
Date of the actual completion of the international search 22 October 2008 (22.10.2008)	Date of mailing of the international search report 14 NOV 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																			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/72357
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 17 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Claim 17 is an incomplete claim, being indefinite, and therefore unsearchable.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>		
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

フロントページの続き

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T
R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,
BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K
G,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 トム・ヴォイヴォーデ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、スウィート 1 2 0 0、ゲ
ートウェイ・ブルバード 6 0 1 番、シノシア・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 マルク・モラン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、スウィート 1 2 0 0、ゲ
ートウェイ・ブルバード 6 0 1 番、シノシア・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 レスリー・ピックフォード

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ、スウィート 1 2 0 0、ゲ
ートウェイ・ブルバード 6 0 1 番、シノシア・セラピューティクス内

F ターム(参考) 4C084 AA19 AA23 MA02 NA05 ZA021 ZC202 ZC412 ZC422

4C086 AA01 AA02 BC38 MA01 MA02 MA03 MA04 NA05 NA14 ZA02