

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3914568号

(P3914568)

(45) 発行日 平成19年5月16日(2007.5.16)

(24) 登録日 平成19年2月9日(2007.2.9)

(51) Int. Cl.		F I	
C07C 53/128	(2006.01)	C07C	53/128
A61K 31/19	(2006.01)	A61K	31/19
A61P 25/16	(2006.01)	A61P	25/16
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28

請求項の数 3 (全 25 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-508855</p> <p>(86) (22) 出願日 平成7年8月25日(1995.8.25)</p> <p>(65) 公表番号 特表平10-505064</p> <p>(43) 公表日 平成10年5月19日(1998.5.19)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US1995/010775</p> <p>(87) 国際公開番号 W01996/006821</p> <p>(87) 国際公開日 平成8年3月7日(1996.3.7)</p> <p>審査請求日 平成14年7月31日(2002.7.31)</p> <p>(31) 優先権主張番号 08/298,108</p> <p>(32) 優先日 平成6年8月30日(1994.8.30)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 08/446,481</p> <p>(32) 優先日 平成7年5月22日(1995.5.22)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者</p> <p>セージス・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド</p> <p>アメリカ合衆国、カリフォルニア 94019、ハーフ・ムーン・ベイ、スウィート 200、ストーン・パイン・ロード 60</p> <p>(74) 代理人</p> <p>弁理士 津国 肇</p> <p>(74) 代理人</p> <p>弁理士 篠田 文雄</p> <p>(73) 特許権者</p> <p>ユニバーシティ・カレッジ・ダブリン</p> <p>アイルランド国、ダブリン 4、ベルフィールド (番地なし)</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 神経栄養性及び抗増殖性化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2 - n - ペンチル - 4 - ペンチン酸及びそのエナンチオマー、並びにそれらの薬学的に許容し得る塩。

【請求項2】

請求項1記載の化合物を含む、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS、ハンティングトン病、脳卒中発作、糖尿病性ニューロパシー及び外傷からなる群より選択される神経変性疾患の予防又は治療用医薬。

【請求項3】

請求項1記載の化合物のS - エナンチオマー。

【発明の詳細な説明】

関連出願に関する参照

本願は、1994年8月30日出願の米国特許出願第08/298,108号の一部継続出願であり、これを参考のためここに援用する。

発明の分野

本発明は、神経変性及び増殖性疾患の予防及び/又は治療に有用な方法及び組成物を提供するものである。本発明組成物は、ニューロン細胞の成熟を促進し、増殖を遅延させる。詳細には、本発明は、血液脳関門を通過することによって治療効果を及ぼすことのできる、非タンパク質性神経栄養性分子に関する。

背景

10

20

神経系が適正に機能するには、ニューロン細胞の成熟と保持が必要である。また、シナプス接合が適正に確立されることによって、異なるニューロン間での連絡が可能となる。ニューロン生存、又はシナプス接合の保持能が失われることは、アルツハイマー病、ハンティングトン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、脳卒中発作、並びに糖尿病性ニューロパシー及び外傷が原因のニューロン変性などの神経変性疾患と関連している。

神経変性疾患の多くは、ニューロン細胞の特定のクラスの消失又は変性と関連している。例えば、パーキンソン病においては、黒質のドパミン作動性ニューロンが変性する。一方、ALSは、運動ニューロンの消失と関連している。ヴェルニッケ-コルサコフ症候群は、通常、慢性アルコール症と関連しているが、乳頭体及び視床の背内側核への傷害による記憶消失を惹起する。Butters N., *Seminar Neurol.* (1984) 4:226-244。アルツハイマー病は、ある種のコリン作動性ニューロンの変性と関連すると考えられる。外傷の結果としての軸索の切断により、退行性の変性とニューロンの死が生じると考えられる。

神経変性と疾患の発症との間に関連があることにより、このような神経変性を遅延、予防又は回復させることのできる神経栄養薬の研究が促進された。今日までに、この分野における研究は、神経栄養性ポリペプチドの同定と特徴付けに絞られている。例えば、神経成長因子 (NGF)、毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor、CNTF)、脳欲求神経栄養因子 (brain drive neurotrophic factor、BDNF) などの効果の研究に関心が払われてきた。CNTFの一般的神経栄養効果、及び特に運動ニューロンに対するその栄養作用のため、ALS及びそのほかの神経変性疾患の治療に有用な薬物としての研究が行われるようになった。例えば、Collins et al.の米国特許第5,141,856号、及びMasiakowskiのWO 91/04316号を参照(これらは、参考のためここに援用する)。中枢のコリン作動性ニューロンからのニューロンの成長を促進することの認められているNGFは、アルツハイマー病の治療における有用な薬物であると示唆されている。今日までに認められている神経栄養性ポリペプチドのほとんどは、ニューロン細胞の相対的に制限された集団に対して活性である。一方、CNTFなどのそのほかの物質は、より多数のニューロン細胞型に対して活性である。

培養中のニューロン細胞の成熟又は分化を誘導する物質は、その増殖もまた阻害することが一般に観察されている。正常に増殖している交感神経及び知覚神経ニューロンへの胚前駆体は、NGFなどのある種の成長因子の存在下で、誘導されて成熟し、分割を停止する。ニューロンの成熟又は分化と抗有糸分裂作用との間の関連は、神経栄養因子に応答性であるある種の新生物細胞でも観察されている。例えば、ラットの褐色細胞腫であるPC12細胞は、NGFの存在下で長いニューリット (neurites) を形成し、分割を停止する。Green LA and Tischler AS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1976) 72: 2424-2428。そのほかのニューロン細胞においても、同様の効果が観察されている。

神経系の細胞は、多くの、致死性である可能性のある新生物形成性疾患を惹起する。例えば、神経芽腫と褐色細胞腫は、神経堤に起源を有する細胞から発生すると考えられている。グリア細胞、星状細胞及びシュヴァン細胞などの神経系の非ニューロン細胞もまた、異なる型の腫瘍を惹起する。ニューロン細胞に関する化学療法に使用されるほとんどの薬物は、細胞毒性であり、その特異性と浸透性は、比較的低い。成熟を惹起する薬物による新生物形成性疾患の治療には、ゴールまでには更に研究が必要であろう。Aaronson, S.A. *Science* (1991) 254: 1146-1153。

神経栄養性ポリペプチドは、最終的には、ある種の神経変性及び増殖性疾患の治療に有用であることが認められるであろうが、これらはそのバイオアベイラビリティの低さを特徴としており、これはそのサイズが比較的大きいために血液脳関門を通過しにくいためである。関連する標的組織への浸透性の低さのため、中枢神経系の神経変性疾患及び新生物形成性疾患の治療のためのこれらの使用が困難となっている。

抗痙攣薬であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) は、原発性の全身性発作、特にアブサンズ型発作の治療に有効である、側鎖を有するカルボン酸である。Pinder, R.M. et al., *Drugs* (1977) 13: 81-123。最近、VPAは、催奇形物質であることが報告されており、曝

10

20

30

40

50

露された胎児の1%~2%で神経管欠損を惹起する可能性のあることが示唆されている (Robert E. and Rosa F.W., による「母体へのバルプロ酸及び神経管欠損」、Lancet (1982) 2: 937)。更に、妊娠中のバルプロ酸の投与により、そのほかの欠損もまた多数誘発される (Nau et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1981) 219: 768-777)。特に重篤な出生時欠損である開放二分脊椎もまた、動物モデルでは、バルプロ酸によって誘発される (Ehlers et al., 1992a, b)。神経栄養性ポリペプチドと同様に、バルプロ酸もまた、ヒトの中樞神経系への移行は、非常に限られている (Loescher et al., Epilepsia (1988) 29: 311-316)。臨床的及び実験的バルプロ酸による奇形発生の総説については、Nau et al., Pharmacol. Toxicol. (1991) 69: 310-321; Nau, CIBA Foundation Symposium 181, p. 615-664; Marcel Dekker, 1993を参照。

In vitroにおける研究により、バルプロ酸塩が、その治療のための血漿中濃度の範囲内の濃度で、神経誘導細胞増殖の速度を強力に阻害することが証明されている (Regan, C., Brain Res. (1985) 347: 394-398)。バルプロ酸塩の抗増殖作用は、細胞周期のG₁期において明らかにされている点に限定されている。Martin M. and Regan C., Brain Res. (1991) 554: 223-228。バルプロ酸塩の存在下では、細胞は、形態によって判断されるように、分化した表現型となり、細胞-下層の接着性を高め、コンカナバリンAレクチン被覆表面に対する親和性を低下させる (Martin et al., Toxic in Vitro (1988) 2:43-48; Martin et al., Brain Res. (1988) 459: 131-137; Maguire and Regan, Int. J. Devl. Neurosci. (1991) 9: 581-586; Regan, C., Brain Res. (1985) 347:394-398)。バルプロ酸塩のこのような作用は、成長する神経管の細胞に限定されているようである。これは、in vivo実験モデルでは、バルプロ酸塩が、神経管欠損の発生率を高め、感覚上皮へ特異的に分離され、そこで細胞の混乱を生じさせることが示されているからである (Dencker et al., Teratology (1990) 41: 699-706; Ehlers et al., Teratology (1992) 45: 145-151; Ehlers et al., Teratology (1992) 46: 117-130; Kao et al., Teratogen. Mutagen. Carcinogen. (1981) 1: 367-382; Turner et al., Teratology (1990) 41: 421-442)。高体温は、神経管欠損を誘発する (Chernoff and Golden, Teratology (1988) 37: 37-42; Edwards, Teratogen. Mutagen. Carcinogen. (1986) 6: 563-582; Shiota, Am. J. Med. Genet. (1982) 12: 281-288; Finnell et al., Teratology (1986) 33: 247-252) が、また、in vivo及びin vitroの両方において細胞周期のG₁期における神経細胞を抑制し (Martin et al. Brain Res. (1991) 554: 223-228; Walsh and Morris, Teratology (1989) 40: 583-592) し; バルプロ酸塩で観察されるのと同様の前分化効果 (prodifferentiative effects) を示す (Martin and Regan, Brain Res. (1988) 459: 131-137)。したがって、一致した抗増殖及び前分化作用により、神経管欠損を誘発することのできる薬物を決定し、神経変性疾患の治療又は予防に有用な化合物の開発のための基礎を提供することができよう。

催奇形性であるバルプロ酸塩関連化合物の構造活性相関の研究により、高度な催奇形性に関する厳密な構造的要件が示唆されている。Nau, H. et al. Pharmacol. & Toxicol. (1991) 69: 310-321。構造活性相関の研究は、親薬物分子 (少なくともバルプロ酸の場合において) が、その催奇形作用の原因であるが、その代謝物は原因ではないことを証明した以前の研究の結果として可能であった (Nau, Fundam Appl Toxicol. (1986) 6: 662-668)。高度に催奇形性である分子が、その最大の催奇形活性を示すには、水素原子、遊離カルボキシル官能基、そしてそれぞれ3個の炭素を有する2個の鎖により炭素原子2で分岐していることが必要であることが報告されている (Nau and Loescher, 1986; Nau and Scott, 1986)。これらの厳密な構造要件を満たさない物質は、非常に低い、又は無視できる程度の催奇形活性しか有さないが、幾つかの実験モデルでは、良好な抗痙攣活性を示すことがある。したがって、これらの化合物は、有用な抗てんかん薬であろう (Nau et al., Neurology (1984) 34: 400-402; Loescher and Nau, Neuropharmacol (1985) 24: 427-435; Wegner and Nau, Neurology (1992) 42 (Supp.5): 17-24; Elmazar et al., J. P. Harm. Sci. (1993) 82: 1255-1258)。催奇形活性により、立体異性体による選択性のあることが証明され、胚内での薬物と特異的構造との間の立体選択的相互作用が示唆された

10

20

30

40

50

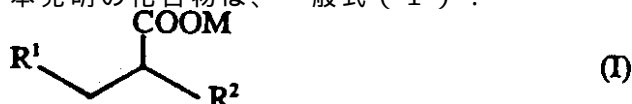
。 4 - エン - V P A (2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸) (Hauck and Nau, Toxicol Lett (1989) 49: 41-48) 及び 4 - イン - V P A (2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸) (Hauck and Nau, Pharm.Res. (1992) 9: 850-855) の場合には、S - エナンチオマーが、対応する R - エナンチオマーよりも強力な催奇形性物質であることが証明されている。立体選択的催奇形性は、エナンチオマーの内因性催奇形能の相違によるものであり、その薬動力学の相違によるものではない。ある組み合わせの両方のエナンチオマーが標的組織に同程度に達しても、一方が他方よりもより強力であったからである (Hauck et al., Toxicol. Lett (1992) 60: 145-153) 。このほかの例によっても、催奇形性においては顕著な立体選択性があるが、抗痙攣及び鎮静効果においてはそうではないことが支持されている (Hauck et al., Life Sci. (1990) 46: 513-518; Nau et al., Pharmacol. & Toxicol. (1991) 69:310-321) 。バルプロ酸塩の炭素原子 2 に結合した炭素鎖が、3 個の炭素原子よりも長くても短くても、その催奇形性は低下した。Nau et al. Id.。バルプロ酸塩の抗有糸分裂活性は、治療上の可能性のある利点としてではなく、むしろその催奇形性の可能性と関連するものとして示唆されてきた。非催奇形性のバルプロミド (valpromide) アナログは、抗増殖性ではないからである (Regan et al., Toxic in Vitro (1991) 5: 77-82) 。バルプロ酸塩の催奇形性アナログは、ほとんど、又は全く副作用を有さない、より有望な抗てんかん薬を製造する目的で、今日まで合成されてきており、そのほかの治療目的のために当然有用であるとは示唆されていない。

神経変性及び増殖性疾患の治療に有用な化合物を決定するために努力が続けられてきたにもかかわらず、より高い有効性と効能を有する有用な化合物が、いまだ求められている。

発明の要約

本発明は、ニューロン機能を促進し、細胞の有糸分裂を阻害するために有用な化合物、医薬組成物、及びその方法を提供するものである。したがって、本発明は、神経変性及び増殖性疾患を予防及び治療する方法もまた提供するものである。

本発明の化合物は、一般式 (I) :



[式中、

R¹ は、- C₁H₃、- CH = CH₂ 又は - CH₂ - CH₃ であり、

R² は、飽和又は不飽和であり、分岐している又は分岐していない、C₁ - C₃₀ アルキル基 (これは、場合により、C₃ - C₉ 脂肪族もしくは芳香族性環式炭化水素基又は複素環基によって置換されている) であり、

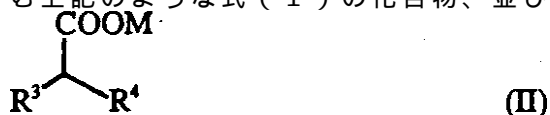
M は、水素又は金属原子である]

で示される。式 (I) は、2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸 (4 - イン - V P A) 又は 2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸 (4 - エン - V P A) ではなく、R¹ が、- CH₂ - CH₃ である場合、R² は、C₅ ~ C₃₀ である。

本発明は、本発明化合物を調製する方法も提供するものである。

本発明は、細胞の有糸分裂を阻害し、及び / 又はニューロン機能を促進するために有用であり、本発明の治療における使用に適した化合物の有効量を、個体への投与に適した医薬担体と共に含有する医薬組成物も提供するものである。

更に、本発明は、ニューロンの機能及び / 又は生存を促進する方法に関し、詳細には、神経変性疾患を有する個体を治療する方法に関する。神経変性疾患の治療に有用な化合物としては、2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸及び 2 - n - プロピル - 4 - ペンテン酸を含む上記のような式 (I) の化合物、並びに式 (II) :



[式中、

10

20

30

40

50

R^3 及び R^4 は、互いに独立して、 $C_1 - C_{30}$ の、飽和又は非飽和であり、分岐している及び/又は分岐していない、脂肪族炭化水素（これは、場合により、 C_{3-9} 脂肪族もしくは芳香族性環式炭化水素基又は複素環基によって置換されている）であり、

Mは、水素又は金属原子である]

で示される化合物が挙げられる。

神経栄養性である本発明化合物及び組成物は、ほかの場合であればその機能を失い、変性し、又は死亡するニューロンの生存と機能を促進するために使用することができる。したがって、神経変性疾患であると診断された個体の治療に加えて、本発明化合物及び組成物は、神経変性疾患を発症する危険があると認められた個体におけるこのような疾患の発症を予防又は遅延させるために、予防的に使用することもできる。

10

本発明の別の実施態様においては、神経変性疾患の治療に有用な化合物及び組成物は、増殖性疾患の治療にも使用することができる。本化合物及び組成物の抗増殖活性は、本化合物及び組成物を、治療を必要とするヒトに投与することによって各種腫瘍の形成を予防又は遅延させるために使用することができる。この治療は、これらの化合物が、中枢神経系（CNS）に浸透するのであれば、ニューロン又はグリア起源の腫瘍の治療に特に有用である。

ニューロン及びグリア細胞の生存率を高めるのに有用な神経栄養性化合物を提供することが、本発明の目的である。

成熟して機能するニューロン又はグリア細胞と関連した特徴の発現を促進するのに有用な化合物及び組成物を提供することも、本発明の別の目的である。

20

ニューロン又はグリア細胞の生存及び機能を促進することによって、各種神経変性疾患の予防及び/又は治療に有用な化合物及び組成物を提供することが、本発明の目的である。本発明の別の目的は、ニューロン、グリア又は関連細胞の病理的増殖を阻害するのに有用な化合物及び組成物を提供することである。

【図面の簡単な説明】

図1：2-n-ブチル-4-ペンチン酸；及び2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の抗増殖効果の用量-応答相関。ニューロ-2a神経芽腫細胞を、試験物質の存在下、 25 cm^2 のフラスコ中で48時間培養した。48時間後、細胞を観察し、写真を撮影し、血球計を用いた計数のためにトリプシンと共に回収した。細胞数は、コントロール値の平均 \pm SEM ($n=3$) (%)として表示した。

30

図2：ニューロ-2a神経芽腫細胞のニューリット成長の誘導。神経芽腫細胞を、2-n-ブチル-4-ペンチン酸（1.0 mM、2 mM）；及び2-n-ペンチル-4-ペンチン酸（0.3 mM、0.5 mM）の存在下で培養した。培養の24時間後、試験物質を細胞に加え、48時間試験物質として保持し、その後、2.5%グルタルアルデヒド及び0.5 Mリン酸ナトリウム緩衝液中、4で一夜固定した。細胞を四酸化オスミウムで後固定（post fix）し、記載するように走査顕微鏡検査のために標本を作成した。固定し、染色した細胞を、走査型電子顕微鏡により、加速電圧15 kVで観察した。

図3：ニューロ-2a神経芽腫細胞における神経細胞接着分子（NCAM）の免疫蛍光。パネルA。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸（1.0 mM）の存在下における細胞成長により、コントロール細胞と比較して、NCAMに対する免疫蛍光の増強が示された。パネルB。2-n-ブチル-4-ペンチン酸及び2-n-ペンチル-4-ペンチン酸のその濃度を上昇させての存在下、神経芽腫細胞を48時間培養した。次に細胞を固定し、ウサギ抗NCAM抗体による染色のために標本を作成した。ローダミンと結合させた第二の抗ウサギ抗体を、細胞とインキュベートして、結合した抗NCAM抗体を検出した。細胞を、励起波長535 nmで蛍光顕微鏡により観察した。免疫蛍光は、平均 \pm SEMとして表示した。

40

図4：スコポラミン-誘導記憶消失の、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸による用量に依存した回復。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸及びスコポラミンを、示したとおりに、それぞれ3時間及び6時間訓練後期間に投与した。動物は、24時間目に、記憶を想起させるために試験し、判定期間として300秒を採用した。結果は、平均値と四分位数範囲（interquartile range）で表示した。

50

図5：海馬歯状回及び鼻皮質における神経細胞接着分子ポリシアリル化 (polysialylated) ニューロンの発生率の年齢に依存した低下の、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸による減衰。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を、表示した用量で40日間慢性的に投与した。コントロールの動物には、2-(2-メチルプロピル)-4-ペンチン酸を投与した。これらの化合物の慢性投与によっても、動物の体重増加に対する作用はなかった。結果は、平均±SEM (n=6) として表示した。

図6：それぞれの脳領域並びに腎及び肝における2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の分布。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸は、1日1回10日間、静脈内経路 (84 mg/kg) により投与した。動物は、最後の薬物投与の30分後に屠殺した。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の組織内濃度を、ガスクロマトグラフィー選択的イオンモニタリング質量分光測定によって測定した。結果は、単一の動物実験を示す。

10

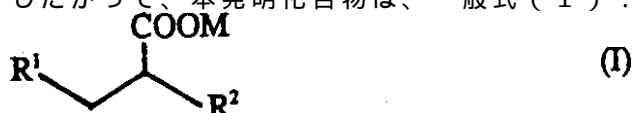
発明の詳細な説明

本発明は、バルプロ酸誘導体、その製造方法、及びこれらの化合物を含有する医薬組成物に関する。本発明は、神経変性疾患の予防及び治療に有用な、ニューロンの機能と分化を促進する方法にも関する。本発明の化合物及び組成物の抗有糸分裂活性は、細胞周期の特定の段階における細胞の停止、並びに新生物形成性疾患の予防及び治療に有用である。

本発明の目的は、CNSに浸透するバルプロ酸の強力な催奇形性アナログを、神経変性疾患を治療し、その発症を遅延させることのできる神経栄養性/神経保護薬として提供することによって達成される。本発明の化合物及び組成物は、新生物形成性、又は新生物形成の可能性のある細胞の細胞増殖速度と転移の可能性をコントロールするのにも有用である

20

したがって、本発明化合物は、一般式 (I) :



[式中、

R¹は、-C(CH₃)₂H、-CH=CH₂又は-CH₂-CH₃であり、

R²は、独立して、飽和又は少なくとも1個の二重もしくは三重結合により不飽和であり、分岐している又は分岐していない、C₁₋₃₀アルキル基 (これは、場合により、脂肪族もしくは芳香族性C₃₋₉環式炭化水素基又は複素環基によって置換されている) であり、ただし、R¹が、-CH₂-CH₃である場合、R²は、C₅₋₃₀であり、式 (I) は、2-n-プロピル-4-ペンチン酸又は2-n-プロピル-4-ペンチン酸 (4-エン-VPA) ではなく、

30

Mは、水素又は金属原子である]

で示される。

本発明は、本化合物のラセミ混合物及びエナンチオマーR及びS型のそれぞれ、並びに薬学的に許容しうるその塩を包含する。

好ましくは、R¹は、-C(CH₃)₂Hであり、R²は、分岐していない飽和C₂-C₁₀アルキル基である。より好ましくは、R²は、分岐していない、飽和C₄-C₆アルキル基である。

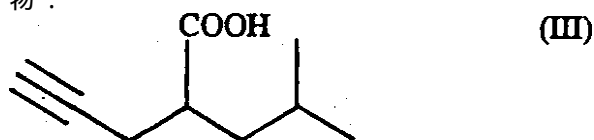
R²の好ましい置換基の例としては、-(CH₂)₁₋₉-CH₃、より好ましくは-(CH₂)₃₋₆-CH₃、最も好ましくは-(CH₂)₄₋₅-CH₃が挙げられる。最も好ましい化合物は、2-n-ブチル-4-ペンチン酸 (R¹が、-C(CH₃)₂Hであり; R²が、-(CH₂)₃-CH₃である)、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸 (R¹が、-C(CH₃)₂Hであり; R²が、-(CH₂)₄-CH₃である)、そして2-n-ヘキシル-4-ペンチン酸 (R¹が、-C(CH₃)₂Hであり; R²が、-(CH₂)₅-CH₃である) である。更に、両方のエナンチオマーとそのラセミ混合物が、本発明の範囲内であると考えられるが、S-エナンチオマー型が特に好ましい。好ましい金属原子は、ナトリウム又はそのほかのアルカリ金属と、例えばカルシウム又はマグネシウムなどのアルカリ土類金属である。

40

好ましい化合物の催奇形、抗増殖、及び前分化活性は、抗てんかん薬であるバルプロ酸よりもはるかに高い。

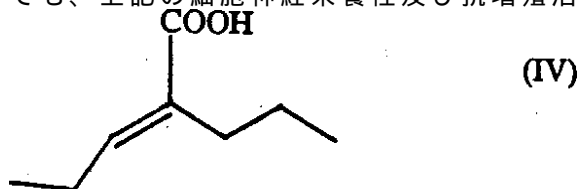
50

R¹又はR²が、更に分岐すると、対応する化合物の活性が低下する。これは、以下の化合物：



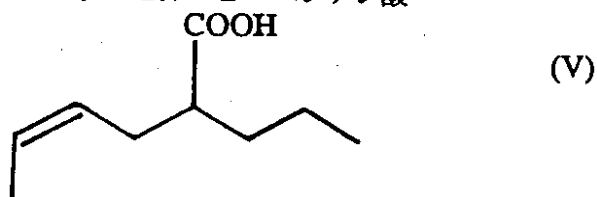
の催奇形、抗増殖、及び前分化活性が低いことによって証明される。

C₂及びC₃の間が不飽和である(IV)ことと、C₅をメチル化(V、VI)することによっても、上記の細胞神経栄養性及び抗増殖活性は低下するが、消失するわけではない。



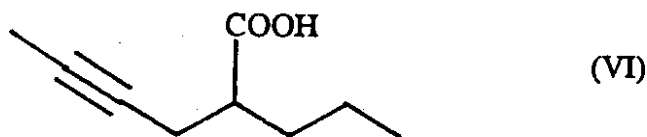
10

2-n-プロピル-2-ペンテン酸



20

2-n-プロピル-4-ヘキセン酸



30

2-n-プロピル-4-ヘキシニン酸

我々の基本的仮説と一致して、化合物(IV)(Nau et al., Neurology (1984) 34: 400-402; Nau and Loescher, Fundam Appl. Toxicol. (1986) 6: 669-676; Nau and Scott, Nature (1986) 323: 276-278; Vorhees et al., Teratology (1991) 43: 583-590; Ehlers et al., Devel. Pharmacol. Ther. (1992) 19: 196-204)及び化合物(VI)(Nau et al., Pharmacol. & Toxicol. (1991) 69: 310-321; Elmazar et al., J. Pharm. Sci. (1993) 82: 1255-1258)の催奇形活性は、非常に低いか、又は検出不可能なほどであるが、実験モデルでは、その抗痙攣特性は良好である。

本発明化合物及び組成物は、バルプロ酸塩のより強力な催奇形性アナログであり、その親化合物よりも大きい抗増殖及び神経栄養性/神経保護活性を示す。飽和されたバルプロ酸塩アナログ(ここで、両方の鎖は、最大の活性を示すためには、それぞれ3個の炭素原子を有していなければならない)とは反対に、一方の鎖が4~10個の炭素原子を有する場合、他方の鎖の位に二重又は三重結合があると、より高い活性が示される。2-n-プロピル-4-ペンチン酸、2-n-ブチル-4-ペンチン酸、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸、2-n-ヘキシル-4-ペンチン酸、2-n-ヘプタ-4-ペンチン酸、及び2-n-オクタ-4-ペンチン酸が、合成された、最も強力な、バルプロ酸塩関連催奇形性物質である。2-n-ブチル-4-ペンチン酸、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸、2-n-ヘキシル-4-ペンチン酸、2-n-ヘプタ-4-ペンチン酸、及び2-n-オクタ-4-ペンチン酸が、より好ましい。最も好ましいのは、2-n-ペンチル-4-ペ

40

50

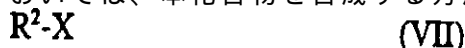
ンチン酸及び2-n-ヘキシル-4-ペンチン酸である。

本発明による使用のために好ましい化合物は、キラル炭素を有する。キラリティの結果、異なるエナンチオマー型の有効性と活性は異なるであろう。例えば、S-2-n-プロピル-4-ペンチン酸は、R-エナンチオマー型よりも有意に高い催奇形活性を有する。Hauck and Nau, *Pharm. Res.* (1992) 9: 850-855; Hauck et al. *Toxicol. Lett.* (1992) 60: 145-153. Nau et al. *Pharmacol. Toxicology* (1991) 69: 310-321を参照。これを、参考のためにここに援用する。上記の化合物に一般的な規則はないが、S-エナンチオマー型が好ましい。

本発明化合物は、適当に置換されたマロン酸ジエチルエステルを、適当な不飽和アルキル化剤（直鎖アルキルのハロゲン化物など）と反応させることによって調製する。次に生成物を加水分解し、脱カルボキシル化する。

この反応は、不飽和官能基で置換されたマロン酸ジエチルエステルを、適当なアルキルハロゲン化物と反応させる逆の方法でも調製することができる。この反応の後に、やはり加水分解と脱カルボキシル化を行う。

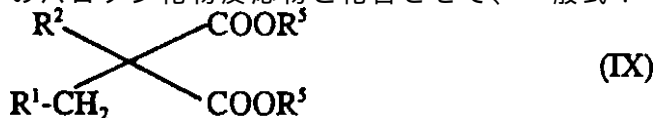
本発明の新規化合物は、本発明の方法によって調製することができる。一つの実施態様においては、本化合物を合成する方法は、マロン酸ジエステル反応物を、一般式：



[式中、 R^2 は、飽和又は不飽和であり、分岐している又は分岐していない $\text{C}_1 - \text{C}_{30}$ アルキル基であり、 X は、ハロゲンである]で示される第一のハロゲン化物反応物と化合させることを含む。この第一の反応により、2-アルキル-マロン酸ジエステルを得る。次にこの2-アルキル-マロン酸ジエステルを、更に一般式：



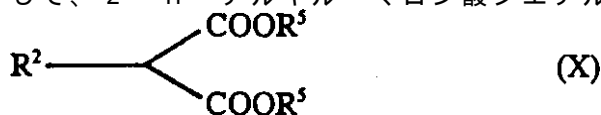
[式中、 R^1 は、 $-\text{C}(\text{H})_2$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ である]で示される第二のハロゲン化物反応物と化合させて、一般式：



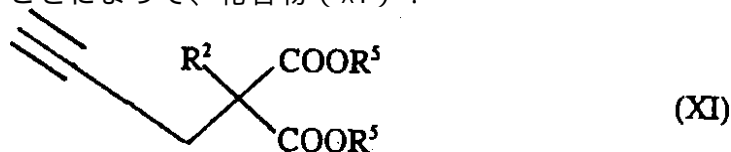
[式中、 R^5 は、アルキル基である]で示される化合物を得る。

次に、得られたジエステルを加水分解し、脱カルボキシル化し、場合により塩に変換する。別の実施態様においては、反応を行う順番を逆にして、 $\text{R}^1-\text{CH}_2-\text{X}$ をマロン酸ジエステルと化合させて、更に R^2-X と反応させるなどのようにする。

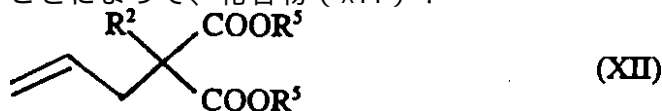
本発明化合物を調製する好ましい方法においては、マロン酸ジエチルエステルを塩基（例えば、ナトリウムエチラート）で処理して、2位の炭素を脱プロトン化する。次に、得られた脱プロトン化エステルを、直鎖アルキルハロゲン化物の形のアルキル化剤により処理して、2-n-アルキル-マロン酸ジエチルエステルを得る。



この生成物を、ナトリウムエチラートと2-プロピルハロゲン化物によりアルキル化することによって、化合物(XI)：



を得るか、又はナトリウムエチラートと2-プロペンハロゲン化物によりアルキル化することによって、化合物(XII)：



10

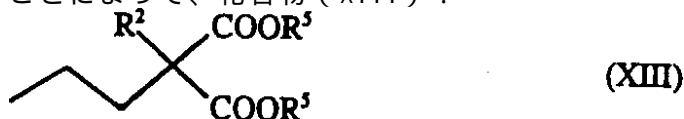
20

30

40

50

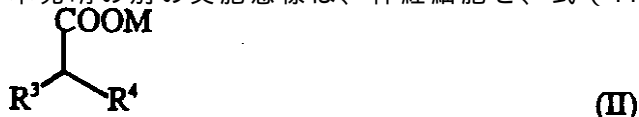
を得るか、又はナトリウムエチラートと2-プロピルハロゲン化物によりアルキル化することによって、化合物(XIII)：



を得る。

ジエステル(XI)と(XII)と(XIII)を、エタノール/水中、熱処理と共に、水酸化カリウムにより加水分解し、脱カルボキシル化する。

本発明の別の実施態様は、神経細胞を、式(II)：



[式中、 R^3 及び R^4 は、互いに独立して、飽和又は不飽和であり、分岐している又は分岐していない、 $C_1 - C_{30}$ 脂肪族炭化水素(これは、場合により、少なくとも1個の二重又は三重結合を有している)である]で示される化合物の神経栄養量と接触させることによる、神経機能の促進である。好ましくは、 R^3 及び R^4 は、分岐しておらず、 R^3 は、3個未満、又は3個に等しい炭素鎖を有する。 R^4 は、好ましくは、飽和アルキル基であり、好ましくは、例えば $-(CH_2)_{1-9}-CH_3$ のように $C_2 - C_{10}$ であり、より好ましくは、例えば $-(CH_2)_{3-5}-CH_3$ のように $C_4 - C_6$ である。式(I)と関連した上記の化合物に加えて、ニューロン機能の促進と、細胞の有糸分裂の阻害に有用なそのほかの化合物

は、WO 94/06743として公表されたNau et al.のPCT出願PCT/DE 93/00861に記載されており、これを参考のためにここに援用する。
ニューロン機能を促進するために有用な好ましい化合物としては、例えば2-n-プロピル-4-ペンチン酸(R^3 は、 $-CH_2-CH_2-$ ； R^4 は、 $-(CH_2)_2-CH_3$ である)；バルプロ酸($R^3 = R^4 = -(CH_2)_2-CH_3$ である)；2-n-プロピルヘキサン酸(R^3 は、 $-(CH_2)_3-CH_3$ であり、 R^4 は、 $-(CH_2)_2-CH_3$ である)；そして2-n-ブチルヘキサン酸($R^3 = R^4 = -(CH_2)_3-CH_3$ である)が挙げられる。

神経変性疾患の予防及び治療には、ニューロン機能の促進が特に有用である。神経変性疾患としては、バルプロ酸塩アナログの少なくとも一つ又はバルプロ酸塩自体に反応性である、ニューロン変性をもたらすいかなる疾患も含まれる。

バルプロ酸塩及びそのアナログと関連した神経栄養活性は、有糸分裂の阻害、ニューリット成長の増加、及びNCAM発現などの分化を示すin vitro指標に基づいて、決定することができる。例えば、ニューリットの成長の促進能は、胎児の知覚及び交感神経ニューロンを含むある種の培養神経細胞の生存率を高めることと関連している。増殖している未成熟な神経芽細胞は、in vitroでは、丸い形状を有し、培地表面に緩く接着している。神経栄養因子の存在下では、これらの細胞は、より接着性となり、新芽の過程は、ニューリットとして当業者には知られている。したがって、in vitroにおけるニューリット成長は、所望の神経保護効果を示すことが予想される化合物を標的細胞と接触させる濃度を決定するためのアッセイとして使用することができる。

In vitroにおけるニューリット成長を評価する方法は、当業者には良く知られており、例えば顕微鏡による直接的な視覚による検査、又はコンピューターによる映像処理の使用によって、評価することができる。

本発明化合物及び組成物の神経保護作用を評価するために使用することのできる神経栄養因子の別の特徴は、ある特定の型の細胞の生存に対する促進能である。例えば、NGFの非存在下では死亡する特定の型の細胞の生存には、NGFがin vitroで必要とされる。このようなNGF依存性細胞としては、胎芽日(Embryonic day)約E5~E8におけるヒナ脊髄神経節のニューロンが挙げられる。

走査電子顕微鏡では、細胞が有する細胞-下層の接着性の増強能が説明される。これにより、腫瘍細胞に典型的である円熟し、群となった成長は、除去され、下層との平坦で増強された相互作用が誘導される(図2)。In vivoにおいては、これらのニューリットは、

10

20

30

40

50

更に分化して軸索と樹状突起となり、そのほかのニューロンとシナプスを形成すると一般に考えられている。神経変性に関与する疾患の間、シナプスの消失と、軸索及び樹状突起の変性が生じ、その結果、ニューロン機能が欠損するかもしれない。

バルプロ酸塩アナログの神経栄養活性に由来する分化を示す別の指標は、NCAM発現の増大である。更に、NCAMの割合の増加は、ニューリットの成長を増強する。Doherty et al., *Nature* (1990) 343: 464-466。NCAMは、記憶形成において基本的な役割を果たすと報告されている。最近の学習の強化 (consolidation) の間に抗-NCAMを脳室内に投与すると、記憶消失が誘導されるからである。Doyle et al., *J. Neurochem.* (1992) 59: 1570-1573を参照。これを、参考のためにここに援用する。In vitroにおけるセロトニンに誘発されるシナプス構造の変化の後に、*Aplysia* NCAM相同体の速やかなエンドサイトーシスが起ることが報告されている (Bailey et al., *Science* (1992) 256: 645-649)。

個体の脳領域の発達の間、又は神経発生の進行を呈する成熟体では、NCAMは、一時的にそのシアリル化 (sialylation) 相を増大させる。総説であるRegan, *Int. J. Biochem.* (1991) 23: 513-523 (これを、参考のためにここに援用する) と、Rougon (1993) *Eur. J. Cell Biol.* 61: 197-207を参照。シナプス特異的NCAMイソフォーム (NCAM 180) は、分化したニューロンと関連しており、発達の後期の段階の間、シナプス発生の期間が完了するまで、そのシアリル化相を増大させる。Breen et al., *J. Neurochem* (1988) 50: 712-716。受動的忌避応答の強化の間に、同様の、NCAM 180のイソフォーム特異的シアリル化が起きる。Doyle et al., *J. Neurosci Res.*, (1992) 31: 513-523。我々は、成熟した雄性ウイスター系ラットを用いた急性及び慢性研究において、これらの化合物及び組成物が、in vivoにおいて神経栄養作用を示すことができることを観察した。急性研究により、そのほかの神経保護薬について用いられているような一回試験受動的忌避パラダイム (one trial passive avoidance paradigm) において、6時間訓練後スコポラミン病変の記憶消失効果を回復させることができることが示された (Doyle et al., *J Neurochem.* 1993 61: 266-272; Doyle and Regan, *J. Neural Transm.* 1993 92: 33-49)。

したがって、神経変性疾患の治療及び予防方法は、バルプロ酸塩及びそのアナログが、ニューリット成長、ニューロン細胞の生存、及びNCAM発現を促進するなどの神経栄養活性を有するかに依存する。

治療方法により、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、糖尿病性ニューロパシー、脳卒中発作などの疾患 (しかし、これらに限定されるわけではない) に由来する神経変性を有する人には、恩恵がもたらされると考えられる。更に、開示化合物及び組成物のニューリット促進活性によっても、外傷性神経傷害を有する個体にも、恩恵がもたらされるであろう。

本発明の別の実施態様においては、細胞を、上記の式 (II) の化合物の有糸分裂阻害量と接触させることによって、細胞周期の特定の段階に細胞を停止させて、細胞を分化状態におくための方法が提供される。有糸分裂を阻害するための R^3 、 R^4 、及びMの好ましい置換基は、単に細胞の有糸分裂を阻害するために使用するのであれば、式 (II) がバルプロ酸塩ではない限り、ニューロン機能を促進するための置換基と同じである。この方法で有糸分裂を予防するのは、分化した表現型と関連した特異的タンパク質の発現を増強するために有用である。この増強された発現により、このようなタンパク質の精製が促進される。更に、増殖性疾患を治療するには、治療を必要とする個体にバルプロ酸塩及び/又はその抗有糸分裂性アナログの別の化合物を投与することによって、有糸分裂を停止又は遅延させることは有用である。

我々は、試験を行ったすべての細胞において、バルプロ酸塩又はその抗有糸分裂性アナログに対する感受性を観察した。このような細胞型としては、始原の星状細胞、ヒト星状細胞、そして心、腎及び免疫系由来のそれらが挙げられる。したがって、バルプロ酸塩及びここに記載するそのほかのアナログの抗増殖作用は、各種細胞型及び特に上記に記載するそれらに由来する各種腫瘍に対して、広い適用性を有するはずである。

バルプロ酸塩及びその活性アナログの神経栄養及び/又は抗有糸分裂有効量は、標準的な用量応答曲線を用いて決定することができる。したがって、代表的な細胞を、各種濃度の試験化合物の存在下、*in vitro*で培養することができる。適当な時点で、異なる条件下での細胞を、適当なパラメーター（例えば、抗有糸分裂活性については、細胞数；神経栄養活性については、ニューリット成長）について試験し、ED₅₀値を決定すればよい。

本発明の好ましい化合物は、バルプロ酸塩で観察されるよりも低いED₅₀値（< 0.5 mM）で、最も顕著な抗増殖作用を及ぼす（図1）。したがって、これらの化合物は、バルプロ酸塩の鎮静及び肝毒性副作用を示さない濃度で作用すると予想される。好ましい化合物は、バルプロ酸塩で観察される前分化作用も及ぼす。ニューロ-2a神経芽腫細胞系では、これらは顕著なニューリトジェニック（neuritogenic）な応答を誘導し、これはその抗増殖効果と相関している（図2）。

更に、これらの化合物のより強力な化合物は、神経細胞接着分子（NCAM）の割合を増加させる（図3）。この細胞認識系は、発達の間、そして以降は、成熟動物における情報蓄積の間の神経の柔軟性（plasticity）を、その割合とグリコシル化の状態を変更することによって、調節する（Doyle et al., *J. Neurosci Res.*, (1992) 31: 513-523）。スコポラミン誘導記憶消失を回復させる、ピラセタム関連化合物などの薬物は、NCAMグリコシル化及び/又は割合の非特異的増加に参与する神経保護メカニズムによって作用すると考えられる（Doyle et al., *J. Neurochem.* (1993) 61: 266-272）。したがって、NCAM発現を誘導する薬物は、神経保護的である可能性があるとして予想される。

本発明は、また上記の式（I）又は（II）から選択される化合物を含有する、神経変性又は増殖性疾患の治療に有用な医薬組成物を提供するものである。式（I）又は（II）の化合物に加えて、この医薬組成物は、補助薬及び担体も含むことができる。この組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、口内錠、座剤、再構成可能（reconstitutable）な散剤、又は液状製剤（経口又は無菌の非経口水剤もしくは懸濁剤）の形であることができる。

投与量を一貫させるために、本発明組成物は、単位用量の形であることが好ましい。

経口投与用単位用量剤型は、錠剤及びカプセル剤であることができ、結合剤（例えば、シロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガント、又はポリビニルピロリドン）；充填剤（例えば、乳糖、糖、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウム、ソルビトール、又はグリシン）；崩壊剤（例えば、デンプン、ポリビニルピロリドン、デンプングリコール酸ナトリウム、又は微結晶セルロース）；又は薬学的に許容しうる湿潤剤（ラウリル硫酸ナトリウムなど）などの通例の賦形剤を含有することができる。

固体の経口組成物は、混合し、充填し、打錠するなどの通例の方法によって調製することができる。多量の充填剤を用いる組成物に活性成分を分散させるには、混合操作を繰り返すことができる。このような操作は、当業界においては通例の操作であるのは勿論のことである。錠剤は、通常の薬剤学的習慣において良く知られている方法により、特に腸溶性被膜により被覆することができる。

経口の液状の製剤は、例えば、乳剤、シロップ剤、又はエリキシル剤の形であることができ、あるいは使用前に水又はそのほかの適当なビヒクルにより再構築するための乾燥製品として提供することもできる。このような液状製剤は、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル、水素化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチン、モノオレイン酸ソルビタン、又はアラビアゴム）；非水性ビヒクル（これは、食用油脂を含む）（例えば、アーモンドオイル分留ココナッツオイル、油性エステル（グリセリン、プロピレングリコール、又はエチルアルコールのエステルなど））；保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、又はソルビン酸）；そして所望であれば通例の香料又は着色料などの通例の添加剤を含有することができる。

非経口投与のためには、液状の単位投与剤型は、本化合物と無菌ビヒクルを用いて調製し、使用する濃度に応じて、ビヒクル中に懸濁又は溶解させる。水剤を調製するには、本化合物を注射用水に溶解し、ろ過滅菌し、適当なバイアル又はアンプルに充填し、密封する

10

20

30

40

50

。好都合には、局所麻酔剤、保存料及び緩衝剤などの補助剤を、ビヒクルに溶解することができる。安定性を高めるためには、組成物をバイアルに充填後、凍結して、真空下で水を除去する。非経口懸濁剤は、本化合物を溶解する代わりにビヒクルに懸濁する以外は、ほぼ同様の方法で調製し、滅菌は、ろ過によっては完了することはできない。本化合物は、滅菌ビヒクルに懸濁する前に、エチレンオキシドに曝露することによって滅菌することができる。好都合には、界面活性剤又は湿潤剤を、組成物に含有させて、化合物の均一な分布を容易にする。

このような疾患の治療に使用する化合物の用量は、疾患の重症度、患者の体重、そして本化合物の相対的有効性により、通例の方法で変化させる。

抗増殖及び神経保護作用は、重篤な肝毒性副作用を惹起することなく、所望の有糸分裂の阻害又は神経保護を達成するのに十分なはずである。達成される血漿中濃度は、標的細胞と治療有効濃度の化合物を接触させるのに十分であろう。投与する化合物の有効量を決定して、所望の治療効果を得るために、標準的な臨床技術を使用することができる。ヒトにおける予想治療濃度の範囲を決定するには、対応する動物モデルにおいて、*in vitro*でまず用量応答曲線を決定する。例えば、マウスのニューロ - 2 a - 神経芽腫細胞の有糸分裂は、バルプロ酸塩によって阻害され、その ED_{50} 値は、 $1.0 \sim 1.3$ mMである。ヒト由来のものを含むそのほかの細胞系もまた、活性を評価するために同様に使用することができる。

実施例 1

n - ブチルマロン酸ジエチルエステル 0.1 mol及び 3 - プロモ - 1 - プロピン 0.1 mol を、乾燥アルゴン洗浄フラスコに入れ、60 に加熱した。この混合物に、ナトリウムエタノレート 0.1 mol (ナトリウム 0.1 mol及び乾燥エタノール 50 molから調製) を、混合物の沸騰を維持するように、滴下して加えた。添加の終了後、TLC (シリカアルミニウムシート、ヘキサン/酢酸エチル 7.5/1) が出発物質が存在していないことを示すまで (通常 1 ~ 2 時間)、混合物を加熱した。減圧下でエタノールを留去し、残存する塩を水に溶解し、生成物を CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。減圧下で蒸留して、非対称に置換されたマロン酸ジエチルエステルを得た。

融点 $_{0.3\text{mbar}}$: 78 ~ 82

ジアルキル化マロン酸エステルを、水酸化カリウム 20.3 g (0.35 mol)、水 50 ml 及びエタノール 100 ml を含む溶液中で加熱した。けん化の完了後、減圧下でエタノールを留去した。残存する残渣を水で希釈し、エーテルで洗浄した。水相を濃 HCl で酸性化 (pH < 2) し、エーテルで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮して、ジアルキルマロン酸粗生成物を得た。粗生成物を加熱 (120 ~ 180) することによって、脱カルボキシル化を行った。暗色の残渣を真空下で 2 回蒸留して、所望の生成物を得た。

全体的収率: 18%

沸点 $_{0.1\text{mbar}}$: 75 ~ 78

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0.94 (3H, t, CH_3), 1.34 (4H, m, 2 x CH_2), 1.72 (2H, m, CH_2 - CHRCOOH), 2.04 (1H, t, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2.36-2.68 (3H, m, $\text{CHRCOOH-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$),

11.88 (1H, s, 広域, COOH)-

実施例 2

n - ペンチルマロン酸ジエチルエステル 0.1 mol を、3 - プロモ - 1 - プロピン 0.1 mol と、実施例 1 に記載したように反応させた。

全体的収率: 14%

沸点 $_{15\text{mbar}}$: 135

10

20

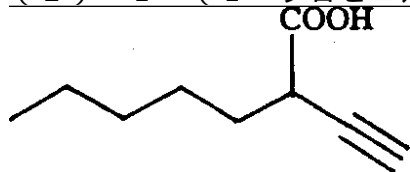
30

40

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 0.92 (3H, t, CH_3), 1.32 (6H, m, $3 \times \text{CH}_2$), 1.72 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CHRCOOH}$), 2.04 (1H, t, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2.40-2.72 (3H, m, $\text{CHRCOOH-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C}$), 11.32 (1H, s, 広域, COOH)

実施例 3

(\pm) - 2 - (2 - プロピニル) - オクタン酸 (ヘキシル - 4 - イン)



10

合成は、ジアニオン法 (Petraghani, Synthesis 521, 1982) により行った。

ガラス器具類は全てオープンで乾燥し、反応装置は、操作期間を通じてアルゴンで洗浄した。

新たに蒸留したジイソプロピルアミン 0.2 mol と乾燥テトラヒドロフラン 130 ml を含む溶液に、*n*-ブチル-リチウム 0.2 mol を 0 で加えることによって、リチウム-ジアニオン (0.2 mol) を調製した。オクタン酸 (0.1 mol) を加え、次に 19-ヘキサメチルリン酸トリアミドを加えて、ジアニオンを溶解させた。得られた混合物を室温で 30 分間攪拌し、次に -60 に冷却し、シリンジを通じて 3-ブロモ-1-プロピン (0.1 mol) を速やかに加えた。温度はすぐに上昇した。-60 に温度を戻した後、反応物を攪拌し、反応が終了するまで (約 1.5 時間) TLC (ヘキサン: 酢酸エチル = 7.5 : 1 プラス 5% 酢酸) で観察を行った。冷却物を除去し、10% HCl 200 ml を加えた。相を分離し、水相をエーテルで 2 回抽出した。有機相を合わせ、半飽和 NaCl 溶液で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して、黄色の油状物を得た。蒸留により、無色の液体 (沸点 82 ~ 84、0.1 mbar) を得た。

20

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) = 0.88 (3H, t, CH_3), 1.40 (8H, mc, CH_2), 1.90 (2H, mc, CH_2), 2.04 (1H, t, $\equiv\text{-H}$), 2.32 - 2.68 (3H, m, CH_2 , H_α), 12.04 (1H, s 広域, COOH).

実施例 4

以下に記載する好ましい例は、本発明の範囲内であるが、これらに限定されるわけではない：

30

- 2 - *n* - プロピル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - プロブ - 1¹ - エニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - プロブ - 2¹ - エニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *i* - プロピル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *i* - プロペニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - ブチル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - ブト - 1¹ - エニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - ブト - 2¹ - エニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - ブト - 3¹ - エニル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (1¹ - メチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (1¹ - メチルプロブ - 1¹ - エニル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (1¹ - メチルプロブ - 2¹ - エニル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (2¹ - メチルプロピル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (2¹ - メチルプロブ - 1¹ - エニル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (2¹ - メチルプロブ - 2¹ - エニル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - tert - ブチル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - *n* - ペンチル - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (1¹ - メチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
- 2 - (2¹ - メチルブチル) - 4 - ペンチン酸、

40

50

- 2 - (1¹, 1¹, 2¹ - トリメチルプロブ - 2¹ - エニル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 2¹, 2¹ - トリメチルプロピル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - n - ヘプチル - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹ - メチルヘキシル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹ - メチルヘキシル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (3¹ - メチルヘキシル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (4¹ - メチルヘキシル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (5¹ - メチルヘキシル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 1¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 2¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 3¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 4¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹, 2¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹, 3¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹, 4¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (3¹, 3¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (3¹, 4¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (4¹, 4¹ - ジメチルペンチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 1¹, 2¹ - トリメチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 1¹, 3¹ - トリメチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (1¹, 2¹, 3¹ - トリメチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹, 2¹, 3¹ - トリメチルブチル) - 4 - ペンチン酸、
 2 - (2¹, 3¹, 3¹ - トリメチルブチル) - 4 - ペンチン酸。

10

20

実施例 5

細胞系の維持

ダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM; Flow Laboratories) (10%ウシ胎児血清 (Tissue Culture Services)、グルタミン 200 mM、及びゲンタマイシン 100 μg/ml 又はペニシリン/スレプトマイシン抗生剤 (Sigma Chemicals) 100 単位/ml 及び 100 μg/ml を補給) 中、マウスニューロ - 2 a 神経芽腫細胞系 (Klebe and Ruddle, 1969 J. Cell Biol., 43: 69A) を培養した。細胞を、9%CO₂を含む湿潤大気中、37℃で保

30

抗増殖アッセイ

ニューロ - 2 a 細胞を、1 × 10⁴個/cm²の密度で、25 cm²フラスコ (Costar) に蒔いた。24時間の回収期間の後、ジメチルスルホキシド (DMSO) のピヒクル中、試験する物質を細胞に加えたが、その量は、細胞を浸している培地の総量の0.2%であった。DMSOピヒクルのみを含むフラスコをコントロールとした。48時間のインキュベーションの後、倒立位相差顕微鏡 (Leitz Diavert) を用いて、細胞を調べ、写真を撮影した (Ilford 50ASAフィルム)。次に、トリプシン処理により細胞を回収し、血球計数器 (改良型Neubauerモデル) を用いて計数した。

40

図1に、細胞増殖低下の結果を示す。

走査型電子顕微鏡検査

走査型電子顕微鏡で検査する細胞は、前述したように25 cm²フラスコ内で成長させておいた。被検物質に48時間曝露した後、0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液に2.5%グルタルアルデヒドを含む溶液 (pH 7.4) 中、細胞を4℃で一晩固定した。次に細胞をリン酸緩衝1%四酸化オスミウム中、室温で1時間後固定し、洗浄し、一連の濃度のエタノール (20、40、60、80、そして最終100%) を順に用いて、徐々に1時間かけて脱水した。

組織培養フラスコの基底部のセクションを除去し、臨界点乾燥して、細胞の縮みとひび割れを最小限にとどめた。これは、試料をポラロン (Polaron) 臨界点乾燥機内に配置し、

50

チェンバーをCO₂で数回処理して、エタノールを完全に除去することによって行った。

1時間後、温度と圧力を、それぞれ40 と1200 lbs/in²に上昇させ、その段階で、二酸化炭素臨界点に到達し、乾燥を終了した。

次に標本をチェンバーから取り出し、伝導カーボンセメント (conductive carbon cement) (Neubauer) を用いて、走査型電子顕微鏡に適したスタブ (stub) 上にマウントし、真空下 (5 × 10⁻² torr)、アルゴンガスの存在下、20 mAの電流で、3分間、金によりスパッター被覆した (Polaron E5100)。金被覆後、試料を、加速電圧15 kVで走査型電子顕微鏡 (JEOL35C) で調べた。映像は、図2に示すように、フィルム (Kodak Plus-X Pan 120フィルム) に記録した。

蛍光顕微鏡

細胞を、24ウエルのプレートに、1 × 10⁴ 個/cm²の密度で蒔いた。24時間の回収期間の後、試験中の薬物に細胞を更に48時間曝露した。中性緩衝ホルマリンの濃度を順に上昇させながら (10、30、50、70、90そして100%の最終濃度) 含有するDMEMによる10分間培養を6回行って、細胞を徐々に固定した。固定が完了したら、細胞をリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) で30分間かけて3回洗浄した。次に細胞を、1% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝食塩水中に1:50に希釈したウサギ抗NCAM抗体 (Pliophys et al. *J. Neuropsychiatr.* 2:413-417, 1990) と共に、室温で1時間インキュベートし、リン酸緩衝食塩水 (pH7.4) で3回30分間洗浄した。洗浄した細胞を次に、1% (W/V) ウシ血清アルブミン (Sigma) (ローダミンと結合) を含有するリン酸緩衝食塩水に1:50に希釈した第二の抗ウサギ抗体と共に室温で1時間インキュベートした。細胞をリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) で再び3回洗浄し、次に蛍光増強剤を含有するCitifluor (Agar Scientific) を用いてマウントした。ローダミンの蛍光を、Leitz DMRB蛍光顕微鏡上で励起波長535 nm (Leica filter block N2.1) を用いて、視覚化した。蛍光強度を、Quantimet 500映像解析システムを用いて、細胞-細胞接触点で調べた。蛍光強度は、コントロールで観察されたのとは相対的に、細胞接触点で、灰色のレベルとして表示した。図3には、NCAM免疫蛍光の増大を示す。

実施例6

急性及び慢性のin vivoにおける研究

本発明化合物及び組成物が、in vivoにおいて神経栄養作用を及ぼすことができるかどうかを、成熟雄性ウイスター系ラットを用いて、急性及び慢性研究により検討した。急性研究の結果、そのほかの神経保護薬について用いられているような、一回試験受動的忌避パラダイム (one trial passive avoidance paradigm) において、6時間訓練後スコポラミン病変の記憶消失効果を回復させることができることが示された (Doyle et al., *J. Neurochem.* 1993 61: 266-272; Doyle and Regan, *J. Neural Transm.* 1993 92: 33-39)。

2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を、直後の3時間訓練後期間に投与し、6時間訓練後時間にスコポラミンを投与した。全ての投与は、表示した訓練後時間に腹腔内経路により行った。更に、少なくとも3匹の動物からなる3群に、3時間目に2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を、6時間目にビヒクルを投与して、このパラダイムにおいて化合物が有するかもしれない望ましくない作用について、評価とコントロールを行った。このデータは、平均値と四分位数範囲 (interquartile range) 範囲を示す箱型のプロットとして示し、統計学的有意差は、非パラメトリックデータについては、Mann-WhitneyのU検定で確立した。

ビヒクルのみを投与した動物は全て、平均潜伏値300秒で、良好な記憶想起を示して、暗い、ショックコンパートメントに入り、忌避タスクの良好な獲得が示された (図4)。

6時間訓練後に投与したスコポラミンにより、24時間目の想起が低下し、平均潜伏値が65秒であった。これにより、本薬物が、この学習モデルにおいて、強力な記憶喪失症薬としての有効性を有することが証明された。これらの神経栄養化合物の学習欠損を阻害又は低下させる能力を評価するために、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を、3時間訓練後に腹腔内投与し、6時間訓練後に前回のようスコポラミンを投与した。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸は、用量に依存して、24時間訓練後に観察されたスコポラミン誘

10

20

30

40

50

導記憶欠損を低下させることが認められた(図4)。スコポラミン誘導記憶消失の回復は、50.4~134 mg/kgの用量範囲の2-n-ペンチル-4-ペンチン酸により得られ、高度に有意な回復が、84 mg/kgの用量で観察された。この用量では、副作用は観察されなかった。134.0 mg/kgを投与したところ、スコポラミン誘導記憶消失の軽減は大きかったが、より変動的であった。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸及びビヒクルのみを投与された、残りの3群では、抗記憶消失効果は、試験を行った最高濃度(134 mg/kg)でのみプラトーに達した。これは、動物の想起能の変動によるものであると考えられ、ベル型の用量応答作用が示唆された。運動活性に変動は観察されなかったからである。慢性研究により、これらの化合物及び組成物が、顆粒細胞層/海馬歯状回の門縁(hilar border)に位置する神経細胞接着分子ポリシアリル化ニューロンの集団における、年齢依存の低下を防止するかどうかを評価した。この領域における活性化ポリシアリル化ニューロンの発生率は、記憶形成の間に劇的に上昇し、逆に、記憶欠損が顕著になると老化と共に低下する(Fox and Regan, Neurochem. Res. 1995 20: 521-526)。その結果、記憶関連神経形質ポテンシャル(neuroplastic potential)の指標があると考えられる。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸16.8及び50.4 mg/kgを、生後40~80日間慢性的に腹腔内投与すると、ポリシアリル化ニューロンの数の約70%の自然低下が観察された場合に、2-(2-メチルプロピル)-4-ペンチン酸(2-n-ペンチル-4-ペンチン酸で見られる抗増殖及び前分化効果を有さない)16.8 mg/kgを投与したコントロール動物と比べて、有意な防止効果が示された(図5)。この防止効果は、評価を行った最大用量である50.4 mg/kgで約25%に達し、これは、ヒトの生涯における約2.5年を示す。更に、鼻内皮質(entorhinal cortex)には、ポリシアリル化ニューロンが観察され、単一のバンドとして、鼻周囲皮質(perirhinal cortex)を通じて梨状皮質のレベルまで伸展していた。この皮質細胞集団は、生後40~80日間にわたって2-n-ペンチル-4-ペンチン酸50.4 mg/kgに曝露後、2-(2-メチルプロピル)-4-ペンチン酸16.8 mg/kgを投与されたコントロール動物と比較して、約2倍の防止及び/又は活性化を示した(図5)。

鼻内皮質におけるポリシアリル化ニューロンの劇的な防止及び/又は活性化は、そのほかの脳領域におけるのとは反対に、皮質への2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の分布の相違と関連していると考えられる。単一の動物実験では、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の静脈内ボラス投与(84 mg/kg)により、試験を行ったそのほかの脳領域と比較して、2~4倍高い皮質への分布が示された(図6)。この皮質への浸透は、腎で観察されるのと同様であった。更に、血漿の分析により、2-n-ペンチル-4-ペンチン酸の遊離濃度が、約60 µg/gであるのが示され、これは、非結合画分の20%に対応していた。動物群間で体重増加が不変(図5)であること、そしてオープンフィールドでの観察においては、異常な行動が見られなかったことにより示されるように、いずれの用量においても、副作用は見られなかった。

受動的忌避訓練

学習/記憶研究のために、一回試験ステップスルー明暗モデル(one-trial step-through, light-dark model)を開発し、バリデートした。装置は、幅300 mm、奥行き260 mm、高さ270 mmのボックスから構成されていた。前部及び上部は透明であり、実験者が、装置内の動物の行動を観察することができた。ボックスは、2個のコンパートメントに別れ、幅50 mm、高さ75 mmの小さな開口部を有する、中央のシャッターによって分離されていた。小さい方のコンパートメントは、幅90 mmであり、低パワー(6 V)照明源を有しており、明コンパートメントとした。大きい方のコンパートメントは、幅210 mmであり、照明はしなかった。

暗コンパートメントの床は、直径5 mm、間隔12.5 mmのステンレススチールのバ-16本の格子から構成されていた。電流発生器を用いて、格子の床に0.75 mAの電流を通し、16本のバーに0.5秒間づつスクランブルを行った。40~60 kOhmの抵抗範囲を、ラットの群(250~350 g)について算出し、装置を対応させた。抵抗変化による電圧の自動変化により急激な電流がもたらされることが、動物の抵抗を検出する電子回路に

10

20

30

40

50

より確実に行われるようにした。

動物は、全ての研究の開始の3日前に試験室に入れて、新しい環境に慣れるための時間を確保した。この期間の後、動物を、低レベルの赤色照明下で2分づつ3日間処理した。それぞれの処理セッションの後、動物の体重を測定し、オープンフィールドアリーナに配置し、そこで歩行と一般行動を評価した。4日目、つまり訓練日に、それぞれのラットを処理し、体重を測定し、前述したようにオープンフィールドアリーナで評価を行った。しかし、行動評価の後、動物を、受動的忌避訓練装置の、小さい、明コンパートメントに入れ、後ろの壁に向き合うようにした。ドアは、速やかかつ慎重に閉じた。

ラットが、向きを変えて、コンパートメントの前部パネルに向き合う（通常は30秒未満の順応時間の後）と、タイマーを始動し、大きい方の暗コンパートメントに入るまでの潜伏時間を記録した。この時間は、通常20秒未満であった。動物が暗コンパートメントに入り、4本の足が全部、スチール製の格子の床に接すると、遠隔操作により、床のバーに、0.75mAの電流が流された。5秒間の最大衝撃時間を設定し、動物は、ほぼいつも、この時間内に、安全な明コンパートメントに戻ったが、これは逃避潜伏期間（escape latency）として知られている。

それぞれのラットについて、逃避潜伏期間を記録し、動物をその住居ケージに速やかに戻した。衝撃を与えた動物の一方とは対であるコントロール群の動物には、足の衝撃を与えず、しばらくは装置を探索させた。それぞれの訓練セッションの間、両方のコンパートメントは、完全に拭い、嗅覚を混乱させる可能性を排除した。

次に動物を想起試験、つまり暗コンパートメントに忘れずに行かないようにする能力についての試験に、訓練の24時間後に付した。動物を前述したように処理し、体重を測定し、評価を行い、再び安全なコンパートメントに入れた。動物が、前面パネルに向き合うように向きを変えると、タイマーを始動し、頭のみ、前足2本、そして最終的に足4本が暗コンパートメントに入るまでの潜伏期間を記録した。バーには電流を流さず、動物を取りだし、その住居ケージに戻す前に、5分間のカットオフ又は判定時間を与えた。動物の4本の足全部が暗コンパートメントに入るまでに要した時間を、動物の想起能の基本的評価として使用し、1群当たり少なくとも6匹を用いて、平均及びパーセント範囲を算出した。非パラメトリックデータについては、Mann-WhitneyのU検定により、群間の有意差を評価した。

オープンフィールド行動

オープンフィールド研究により、受動的忌避訓練の必須部分を形成した。オープンフィールド装置は、黒く塗った木から構築した（長さ620mm、幅620mm、高さ150mm）。装置の白く塗った床は、77mm毎に線をひいて、77mm×77mmのますに分けた。それぞれの動物をアリーナの中央に置き、装置の側部に行かせ、その時点で、タイマーを始動した。運動活性の測定値として、次の5分間にわたって横断した線の数を計数した。

評価を行ったそのほかの行動としては、後足で立つ（rearing）、身づくろいをする（grooming）、立毛、排便、姿勢が挙げられる。いずれも、動物の健康状態を示す良い指標である。体重は、当然記録した。すべての観察は、日周期への影響を最小限にするために、08.00～14.00の間に、静かな室内で、低レベル照明下で行った。この行動評価は、訓練スケジュールに回答しない動物又は望ましくない介在効果（試験結果を混乱させる恐れがある）を検出するには、評価できないほど重要であった。

免疫組織化学的検査

顆粒細胞層/海馬歯状回の門領域における神経細胞接着分子ポリシアリル化ニューロンの発生率を、免疫組織化学的技術により確率した。新たに切開した脳を、最適な切断温度化合物（Gurr, U.K.）中で速やかに被覆し、液体窒素冷却n-ヘキサン中で素早く凍結し、更に処理する必要が生じるまで、-80℃で保存した。12µmの水平クリオスタット（cryostat）切片を、MICROM（シリーズ500）クリオスタットを用いて、凍結組織から切り出した。中隔-側頭軸索中途である同一点からの分析のために、連続切片を得（歯状細胞の分析のためには、プレグマから-5.6mmに等しく、皮質細胞の分析のためにはプレグマから-8.10mmに等しい（Paxinos and Watson, The Rat Brain in Stereotaxic C

10

20

30

40

50

ordinates, Academic Press, 1986))、0.1% (w/v) ポリ-1-リシン被覆ガラススライド上に、解凍マウントした。切片を70% (v/v) エタノールに30分間固定し、0.1Mリン酸緩衝0.9%食塩水 (pH7.4、PBS) の洗浄用緩衝液中で、10分間ずつ2回洗浄し、非特異的染色を除くために、1% (w/v) ウシ血清アルブミン (Sigma Chemical Co., U.K.) 及び1% (v/v) 正常ヤギ血清 (DAKO, Denmark) を含有するPBSからなるインキュベーション用緩衝液に1:500に希釈した抗NCAM-PSA (Rougon et al., J. Cell Biol. 1986 103: 2429-2437) と共に、加湿チェンバー内、室温で、一夜 (20時間) 培養した。切片を再び洗浄し、インキュベーション用緩衝液に1:100に希釈した蛍光結合ヤギ抗マウスIgM (Calbiochem. U.K.) に3時間曝露した。切片に最終的な洗浄を行った後、蛍光増強培地であるCitifluor (Agar, U.K., 登録商標) にマウントした。励起波長495nm、発光波長525nmで、Letiz DMRB蛍光顕微鏡を用いて、染色パターンを観察した。免疫蛍光染色は、第一又は第二抗体のいずれかを省略し、そしてシアル酸の2,8ホモポリマーを含有するコロミン酸 (1mg/ml, Sigma Chemical Co., U.K.) により、抗NCAM-PSAを前吸収することによって、完全に除去されるため、特異的である。適切である場合、切片は、プロピジウムヨージド (40ng/ml PBS。これは、励起波長552nm、発光波長570nmを用いて検出することができる) に短時間曝露する (60秒間) ことによって、後染色した。

10

歯状顆粒細胞層内そして門縁における、NCAM-PSA免疫応答性ニューロンの総数を、10個の交互の12 μ mの切片で計数して、5~10 μ m神経細胞形質の二重形数を防止し、顆粒細胞層の総面積 (プロピジウムヨージド標識細胞すべてを含む) で割り、平均顆粒細胞面積 (このレベルで0.15 \pm 0.01mm²) で掛け、それぞれの動物群における平均 \pm SEMを算出した。これらの平均値を用いて、それぞれの動物群における平均 \pm SEMを確立した。Quantimet 500映像解析システムを用いて、面積測定を行った。統計学的解析には、StudentのT検定を用いた。

20

2-n-ペンチル-4-ペンチン酸のGC-MS解析

薬物投与の4日前に、ペントバルビトンナトリウム (60mg/kg) の麻酔下、左頸静脈に留置カニューレ (内径0.5mm) を導入した。20%ポリビニルピロリドン (ヘパリン50単位/mlを含有) により、カニューレを解放したまま保持し、1日2回洗浄した。2-n-ペンチル-4-ペンチン酸 (84mg/kg) を1日1回10日間ボラス投与した。薬物の最後の投与の後30分で動物を屠殺し、脳を取り出し、それぞれの領域に切開し、あらかじめ重量を測定しておいたバイアルに入れ、必要となるまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。肝及び腎も同様に処理した。血液は、心臓穿刺により採取し、ヘパリン化試験管にとり、血漿は、1500rpmで10分間遠心分離することによって得た。上清を少量ずつ分け、あらかじめ重量を測定しておいたバイアル中で凍結保存した。

30

2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を抽出するには、組織を、2~10倍量のH₂Oに、超音波処理によってホモジナイズした。1N NaH₂PO₄緩衝液 (pH5.0) 50 μ l及び酢酸エチル1ml (内部標準として2-メチル-2-エチルヘキサノ酸1 μ g/mlを含有) を加えて、100~200 μ lずつを、抽出した。混合物を15分間振盪し、1分間遠心分離し、20 $^{\circ}$ Cで窒素流により、上清を約200 μ lに濃縮し、アセトニトリル100 μ lを加えた。酢酸エチルのみで抽出を繰り返し、抽出相を合わせ、溶媒を蒸発させて最終量を10~20 μ lとした。ピリジン30 μ lと、N-メチル-N-トリメチルシリル-トリフルオロアセトアミド30 μ lを少なくとも30分間かけて室温で加えることによって、トリメチルシリル化を行い、1 μ l部分をガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) に注入した。血清部分を、Amicon MPS-1限外ろ過装置 (YMT-膜、カットオフ30kDa) により限外ろ過した後、非結合2-n-ペンチル-4-ペンチン酸を測定した。ジェットセパレーターを介してFinnigan MAT CH-7-A質量分析計 (2100D Superincosで操作) と接続したPerkin-Elmer F22-9-Cを用いて、GC-MS解析を行った。DB1701で被覆した溶融シリカメガボア (Megabore) カラム (30m \times 内径0.53mm、フィルム厚1 μ m) を用いた。インジェクターの温度は、220 $^{\circ}$ Cに保持した。当初の温度は、80 $^{\circ}$ Cとした。注入後、温度を80 $^{\circ}$ Cで1分間保持し、速やかに120 $^{\circ}$ Cまで昇温させ、次

40

50

に4 /分の速度で190 まで昇温させた。検出は、以下のイオンを用いて、選択的イオンモニタリングモードで行った：2 - n - ペンチル - 4 - ペンチン酸については、m/z 225、2 - メチル - 2 - エチルヘキサ酸内部標準については、イオンm/z 215。直線状の検量線グラフを用いて、それぞれの組織内濃度を求めた。

実施例 7

バルプロ酸及びバルプロ酸関連カルボン酸の催奇形性

NMR I系マウスにおける、バルプロ酸、及びその一方の側鎖の長さがいろいろであるバルプロ酸関連カルボン酸の催奇形性を検討した。表1及び2には、以下の化合物に関する結果を記載する：VPA（バルプロ酸）、エチル - 4 - イン - VPA（2 - n - エチル - 4 - ペンチン酸）、4 - イン - VPA（2 - n - プロピル - 4 - ペンチン酸）、ブチル - 4 - イン - VPA（2 - n - ブチル - 4 - ペンチン酸）、ペンチル - 4 - イン - VPA（2 - n - ペンチル - 4 - ペンチン酸）及びヘキシル - 4 - イン - VPA（2 - n - ヘキシル - 4 - ペンチン酸）。それぞれのカルボン酸化合物を、ナトリウム塩としてmmol/kgの用量で投与した。胎児死亡率値は、総着床物のパーセントを反映し、脳ヘルニア値は、生存胎児のパーセントを反映している。影響を受けた胎児の数は、括弧内に示す。本発明のカルボン酸の催奇形作用は、*Nat. in Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 243-250 (1985) 及び米国特許出願第08 / 344 , 810号（1994年11月23日出願）（これを、参考のためにここに援用する）に記載されているマウス脳ヘルニアモデルにより求めた。雌性NMR I系マウスを、雄性NMR I系マウスと、6.00 ~ 9.00の間、交配させた。受精後最初の24時間を、妊娠0日とみなした。カルボン酸のナトリウム塩の溶液を、妊娠8日の朝、マウスに腹腔内注射した。妊娠18日の9.00 ~ 12.00の間に、動物をジエチルエーテルにより麻酔し、次に子宮を取り出した。着床部位の数と吸収及び死亡胎児の数（胎児死亡率）を求めた。生存していた胎児の体重をそれぞれ測定し、脳ヘルニアに関する検査を行った。

10

20

表1

カルボン酸	用量 ¹ (mmol/kg)	同腹子の数	生存胎児数	胎児体重 (平均±SD) (g)	胎児死亡率 ² (%)	脳ヘルニア ³ (%)
VPA	3.0	8	60	1.07 ± 0.10	49	42
エチル-4-イン- VPA	1.85	6	73	1.12 ± 0.09	5	0
4-イン- VPA	1.85	7	21	0.92 ± 0.12	76	81(17)
	1.23	13	89	1.03 ± 0.13	16	12
ブチル-4-イン- VPA	1.85	8	27	0.88 ± 0.06	69	96(26)
	1.25	9	63	0.99 ± 0.09	45	71(45)
ベンチル-4-イン- VPA	1.85	9	26	0.84 ± 0.11	78	81(21)
	1.25	6	44	1.02 ± 0.09	40	60(26)
ヘキシル-4-イン- VPA	1.85	3	0	-	100	-
	1.5	6	12	0.86 ± 0.07	84	100(12)
	1.25	7	29	0.96 ± 0.06	67	79(23)
	1.0	7	37	1.03 ± 0.05	54	70(26)
	0.5	13	165	1.25 ± 0.10	18	7(9)
コントロール		14	152	1.19 ± 0.12	11	0

10

20

30

40

表2

物質 ¹	同腹子の数	胎児死亡率	生存胎児数	胎児体重 (平均±S.D)	脳ヘルニア (%)
4-イン-VPA	13	16	89	1.03 ± 0.13	12
ブチル-4-イン-VPA	9	45	63	0.99 ± 0.09	71 (45)
ベンチル-4-イン-VPA	6	40	44	1.02 ± 0.09	60 (26)
ヘキシル-4-イン-VPA	7	67	29	0.96 ± 0.06	79 (23)

¹ 各カルボン酸のナトリウム塩の体重1kg当り1.25mmolを妊娠8日目の朝に投与した。

我々は、本発明の実施態様を多数記載してきたが、本発明の方法を利用したそのほかの実施態様を提供するために、その基本的構成を変更することができるのは明らかである。したがって、本発明の範囲は、実施例により上記に記載した特定の実施態様よりは、ここに

添付する請求の範囲によって定義されると理解される。

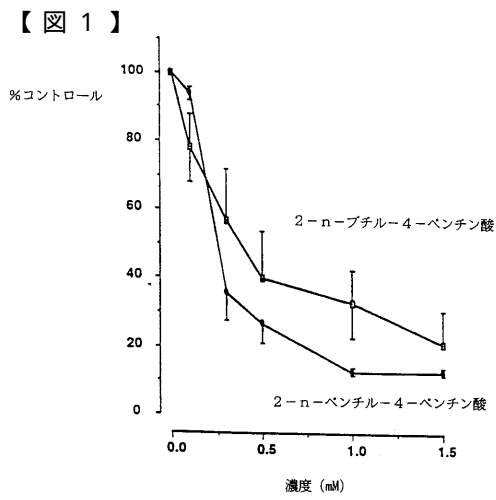


FIG. 1

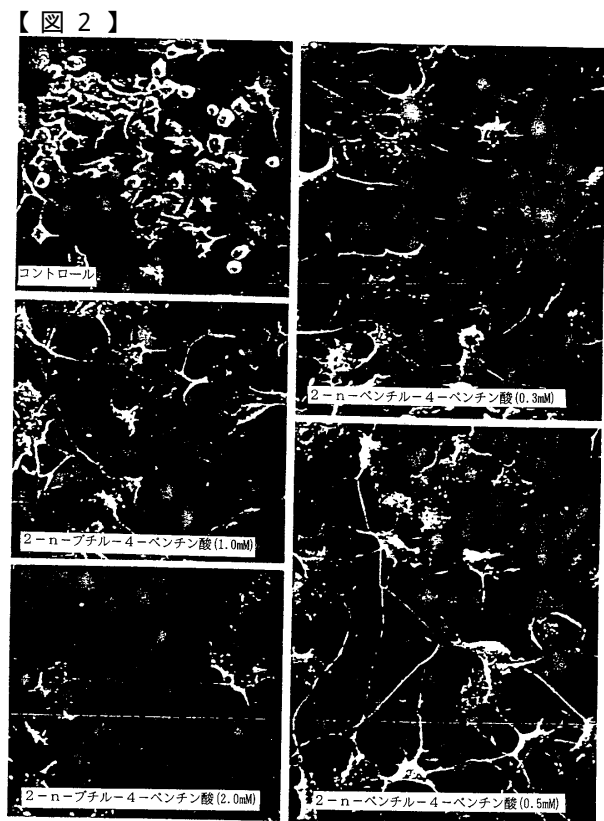
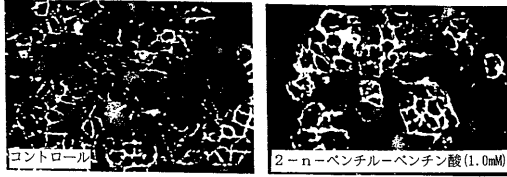


FIG. 2

【 図 3 】
3A

パネルA：ニューロー2 a 神経芽腫細胞免疫蛍光



3B

パネルB：ニューロー2 a 神経芽腫細胞蛍光強度

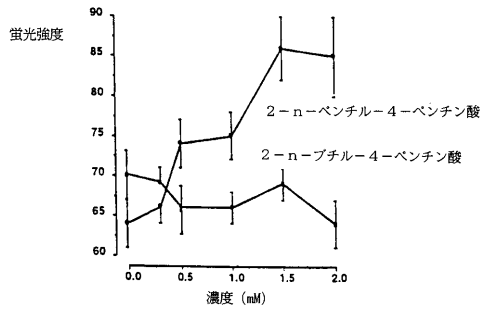
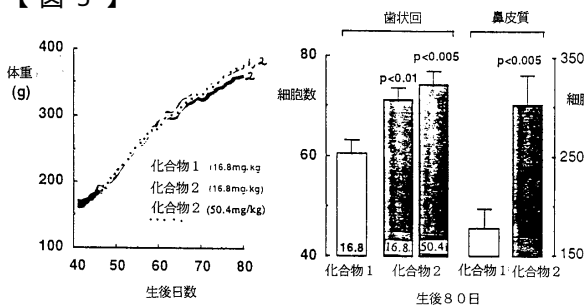


FIG. 3

【 図 5 】



化合物1： 2-(2-メチルプロピル)-4-ペンチン酸
化合物2： 2-n-ベンチル-4-ペンチン酸

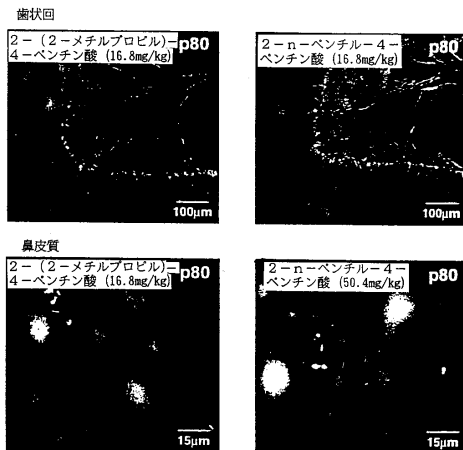
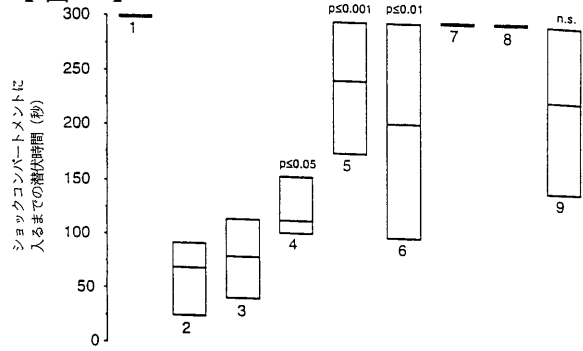


FIG. 5

【 図 4 】



処置

プロトコル

- | 処置 | プロトコル |
|--|-----------------------------|
| 1 ビヒクル: 0.5mls 0.9% (w/v) 食塩水 | ビヒクル3時間+ビヒクル6時間 (n=7) |
| 2 ビヒクル: 0.5mls 0.9% (w/v) 食塩水
薬物: スコボラミン 0.8mg/kg ip | ビヒクル3時間+スコボラミン6時間 (n=8) |
| 3 薬物: ABS-205 16.8mg/kg ip
薬物: スコボラミン0.8mg/kg ip | ABS-205 3時間+スコボラミン6時間 (n=5) |
| 4 薬物: ABS-205 50.4mg/kg ip
薬物: スコボラミン0.8mg/kg ip | ABS-205 3時間+スコボラミン6時間 (n=6) |
| 5 薬物: ABS-205 84.0mg/kg ip
薬物: スコボラミン0.8mg/kg ip | ABS-205 3時間+スコボラミン6時間 (n=6) |
| 6 薬物: ABS-205 134.0mg/kg ip
薬物: スコボラミン0.8mg/kg ip | ABS-205 3時間+スコボラミン6時間 (n=6) |
| 7 薬物: ABS-205 50.4mg/kg ip
ビヒクル: 0.5mls 0.9% (w/v) 食塩水 | ABS-205 3時間+ビヒクル6時間 (n=3) |
| 8 薬物: ABS-205 84.0mg/kg ip
ビヒクル: 0.5mls 0.9% (w/v) 食塩水 | ABS-205 3時間+ビヒクル6時間 (n=3) |
| 9 薬物: ABS-205 134.0mg/kg ip
ビヒクル: 0.5mls 0.9% (w/v) 食塩水 | ABS-205 3時間+ビヒクル6時間 (n=4) |

FIG. 4

【 図 6 】

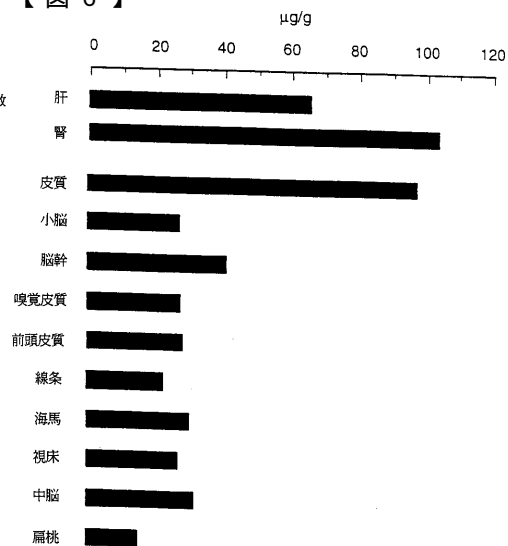


FIG. 6

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 津国 肇

(74)代理人

弁理士 渡辺 睦雄

(74)代理人

弁理士 津国 肇

(74)代理人

弁理士 佐伯 とも子

(72)発明者 ナウ,ハインツ

ドイツ連邦共和国、デー - 1 4 1 6 3 ベルリン、ヘガウエルヴェーク 4 3

(72)発明者 リーガン,チャーラン・エム

アイルランド国、ダブリン、カウンティ、サンディコーブ、ロウワー・アルバート・ロード 5 5

審査官 吉良 優子

(56)参考文献 米国特許第 0 4 4 2 3 0 6 4 (U S , A)

特開昭 5 9 - 0 6 7 2 6 6 (J P , A)

LAMBERT,C. et al., Tetrahedron Letters, 1 9 8 4 年, Vol.25, No.46, p.5323-5326

SPENCER,R.W. et al., J.Am.Chem.Soc., 1 9 8 6 年, Vol.108, No.18, p.5589-5597

KATO,K. et al., J.Med.Chem., 1 9 8 5 年, Vol.28, No.3, p.287-294

NEGRETE,G.R. et al., Tetrahedron Asymmetry, 1 9 9 1 年, Vol.2, No.2, p.105-108

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 53/128

A61K 31/19

A61P 25/16

A61P 25/28

CA(STN)

REGISTRY(STN)