

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-511366

(P2022-511366A)

(43)公表日 令和4年1月31日(2022.1.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 D 211/32 (2006.01)	C 0 7 D 211/32	C S P 4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/445 (2006.01)	A 6 1 K 31/445	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	

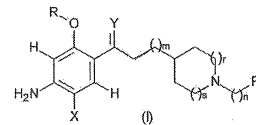
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-517453(P2021-517453)	(71)出願人	518334716
(86)(22)出願日	令和1年9月27日(2019.9.27)		ユニヴェルシテ・ドゥ・カーン・ノルマンディー
(85)翻訳文提出日	令和3年5月26日(2021.5.26)		UNIVERSITE DE CAEN
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/076229		NORMANDIE
(87)国際公開番号	WO2020/065028		フランス国、14000 カーン、エス プラナード・ドゥ・ラ・ペ
(87)国際公開日	令和2年4月2日(2020.4.2)	(71)出願人	507241492
(31)優先権主張番号	18306280.1		アンスティトゥート・ナショナル・ドゥ ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシヤル シュ・メディカル・(インセルム)
(32)優先日	平成30年9月28日(2018.9.28)		フランス・75013・パリ・リュ・ド ゥ・トルビア・101
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(71)出願人	506316557
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA( AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		サントル ナショナル ドゥ ラ ルシヤル 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経変性疾患の処置における神経保護剤としてのドネコブリド

## (57)【要約】

本発明は、神経変性疾患の予防及び/又は処置における神経保護剤としての使用のための式(I)の化合物に関する。

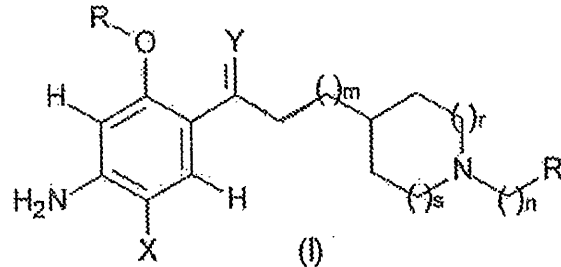


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

神経変性疾患の予防及び/又は処置における神経保護剤としての使用のための、以下の式 (I) の化合物：

## 【化 1】



10

(式中、

X は、

水素原子、又は

ハロゲン原子 (Hal) (ここで (Hal) はフッ素、塩素、臭素、若しくはヨウ素である)、又は

直鎖若しくは分枝鎖の  $C_p(Hal)_{2p+1}$  ポリハロゲン化アルキル基 (ここで  $p = 1, 2, 3, \text{又は} 4$  であり、(Hal) は上に示したものと同一意味を有する)

を表し；

Y は、

酸素原子、又は

硫黄原子、又は

N-R'' 基 (ここで、R'' は、水素原子、-OH 基、-O-A 基 (A は、直鎖又は分枝鎖の  $C_1 \sim C_6$  アルキル基を表し、特に A は、メチル基を表す)、又は直鎖若しくは分枝鎖の  $C_q H_{2q+1}$  アルキル基 ( $q = 1, 2, 3, \text{又は} 4$ ) を表す)

を表し；

m は、1、2、及び 3 から選択される整数であり；

n は、0、1、2、及び 3 から選択される整数であり；

r 及び s は、その値が、 $r = s = 0$ 、又は  $r = s = 1$ 、又は  $r = s = 2$ 、又は  $r = 0$  かつ  $s = 1$ 、又は最後に、 $r = 0$  かつ  $s = 2$  である整数であり；

R は、

水素原子、又は

1 個若しくは複数の F 原子を有していてもよい直鎖若しくは分枝鎖の  $C_1 \sim C_5$  アルキル基を表し；

R' は、

分枝鎖  $C_1 \sim C_6$  アルキル基、又は

1 つ若しくは複数の R 基を有していてもよく、また、酸素原子、又は R で置換されていてもよい窒素原子、又は硫黄原子、又は -SO<sub>2</sub>- 基若しくは -SO- 基を有していてもよい、 $C_3 \sim C_{10}$  シクロアルキル又は  $C_5 \sim C_{13}$  二環式基

を表す)、

並びにそのエナンチオマー又はジアステレオ異性体及びそのラセミ体、その酸との塩、その水和物又はその溶媒和物。

## 【請求項 2】

50

式 ( I ) において Y が、  
酸素原子、又は  
硫黄原子、又は

N - R " 基 ( ここで、R " は、水素原子、- O H 基、又は直鎖若しくは分枝鎖の  $C_1 H_{2q} + 1$  アルキル基 (  $q = 1, 2, 3, \text{又は} 4$  ) を表す )  
を表す、請求項 1 に記載のその使用のための化合物。

【請求項 3】

式 ( I ) において X がハロゲン原子を表す、請求項 1 又は 2 に記載のその使用のための化合物。

【請求項 4】

式 ( I ) において Y が酸素原子を表す、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 5】

式 ( I ) において m、n、r、及び s のすべてが値 1 を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 6】

式 ( I ) において R が、H、C H <sub>3</sub>、C H <sub>2</sub> C H <sub>3</sub>、又は C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> F を表す、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 7】

式 ( I ) において R ' が、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及び 4 - ピペリジン基からなる群から選択される基を表す、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

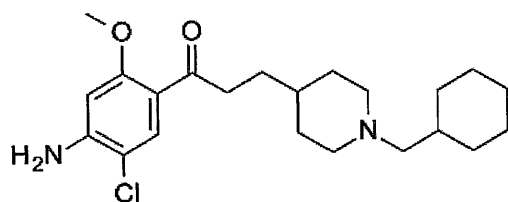
【請求項 8】

式 ( I ) において R がメチル基を表し、R ' が C<sub>4</sub> ~ C<sub>7</sub> シクロアルキル基を表す、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 9】

化合物が以下の式 ( I I ) :

【化 2】



(II).

のドネコプリド化合物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 10】

化合物が以下の式 ( I I I ) :

10

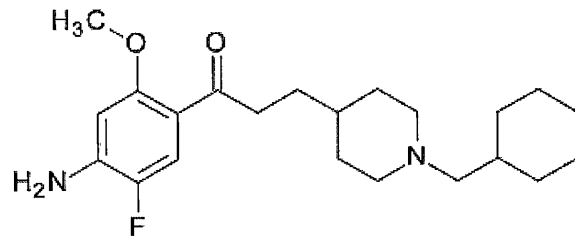
20

30

40

50

【化 3】



(III).

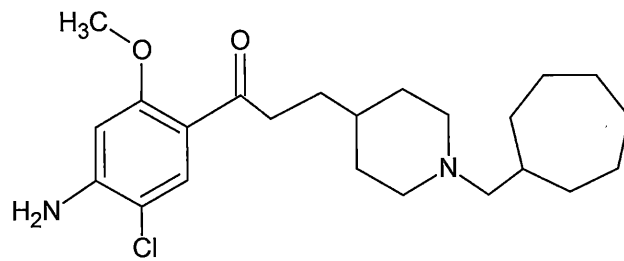
10

のフルコプリド化合物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 1 1】

化合物が以下の式 (VIII) :

【化 4】



(VIII).

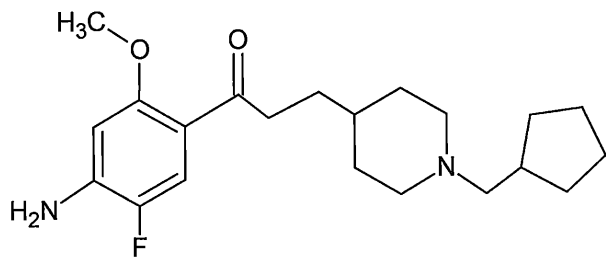
20

の MR 3 1 1 9 2 化合物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

【請求項 1 2】

化合物が以下の式 (V) :

【化 5】



(V).

40

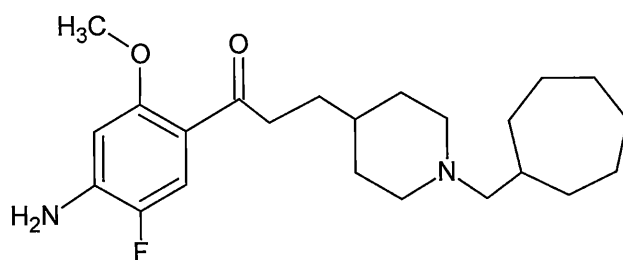
の MR 3 3 5 8 3 化合物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

50

## 【請求項 13】

化合物が以下の式 (VII) :

## 【化 6】



(VII).

10

の MR 3 6 0 1 4 化合物である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

## 【請求項 14】

前記の酸との塩が、フマレート又はジヒドロクロレートである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

20

## 【請求項 15】

神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症を含む運動ニューロン疾患、ダウン症候群、及び前頭側頭変性症からなる群から選択される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のその使用のための化合物。

## 【請求項 16】

神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される、請求項 15 に記載のその使用のための化合物。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は神経変性疾患の処置（治療）に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

神経変性疾患は、神経細胞の系統的変性及び脱落に基づく神経回路の神経ネットワークの崩壊により誘発されるものであり、これらの疾患は、様々な難治性の疾患、例えば、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病、レビー小体型認知症、血管性認知症、並びに (i) 非認知性神経変性、(ii) 非認知性神経筋変性及び (iii) 運動感覚性神経変性を含む加齢に関連する問題、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を含む運動ニューロン疾患、ダウン症候群、大脳皮質基底核神経節変性、多系統萎縮症、脳の萎縮、オリブ橋小脳変性症、核上性運動麻痺、フリードライヒ運動失調症、脊髄小脳変性症 2 型、前頭側頭変性 (FTD) 並びに原発性進行性失語症として公知である。

40

## 【0003】

神経変性疾患の臨床症候は、疾患に応じて軽いものから重篤なものまで様々である。臨床症候として、振戦、硬直、アキネジア、運動低下、動作緩慢、姿勢反射障害、自律神経異常症、腫脹、歩行障害、うつ病、感情鈍麻、混乱、学習変化、記憶欠損、認知機能障害、筋萎縮症、筋肉損失、肩帯の障害、構音障害、嚥下障害、呼吸障害、無感覚、運動麻痺及び認知症が挙げられ、これらは日常活動を実施する上で大きなハードルとなる。

## 【0004】

50

神経変性による死亡は、それらの発現、活動及び/又は規制に問題が生じた際におそらく神経変性疾患を引き起こす分子群が複数存在することから、複雑な機序である。これは、神経変性を阻害又は逆転するための有効な方法が今までのところ確立されていない理由を説明し得る。

【0005】

このような疾患の原因を取り去るための処置に加えて、神経ネットワークを再構築することもまた重要である。例えば、アミロイド ペプチドの細胞毒性が原因であると認識されているアルツハイマー病において、神経突起の萎縮とシナプシスの減少の両方が神経機能の悪化を誘発し、逆にこのような誘発の後でも、完全に性質変化せず、又は変性なしに生存している神経細胞は、これらがおそらくシナプスの回復のために活性化して神経突起を延ばすことができる場合、回復させることができると言われている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際出願WO2014195593号

【特許文献2】国際出願WO2008/009868号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版, 1035~1038頁及び1570~1580頁

20

【非特許文献2】Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91:706~716頁

【非特許文献3】Garciaら (2010) J. Neurosci. 30:7516~7527頁

【非特許文献4】Yoonら (2008) Learn Mem. 15:97~105頁

【非特許文献5】Spellmanら (2015) Nature 522:309~314頁

【非特許文献6】Wallaceら (2015) Handb. Exp. Pharmacol. 228:27~57頁

【非特許文献7】Albasserら (2009) Behav. Neurosci. 123:115~124頁

【非特許文献8】Zeamerら (2015) Dev. Cogn. Neurosci. 11:31~41頁

【非特許文献9】Watson & Lee (2013) J. Neurosci. 33:4192~4200頁

【非特許文献10】Broadbentら (2006) Learn Mem. 13:187~191頁

【非特許文献11】Bartschら (2010) Science 328:1412~1415頁

30

【非特許文献12】Oakleyら (2006) J. Neurosci. 26:10129~10140頁

【非特許文献13】Liu及びDuff (2008) J. Vis. Exp. 10:960頁

【非特許文献14】Morishima-Kawashimaら (2000) Am. J. Pathol. 157:2093~2099頁

【非特許文献15】Bevins及びBesheer (2006) Nat. Protoc. 1:1306~1311頁

【非特許文献16】Combesら (2015) J. Neurosci. Res. 93:633~643頁

【非特許文献17】Dauer及びPrzedborski (2003) Neuron 39:889~909頁

【非特許文献18】Callizotら (2019) PLoS One 14:e0215277頁

【非特許文献19】Visanjiら (2008) FASEB J. 22:2488~2497頁

【非特許文献20】Lewerenz及びMaher (2015) Front Neurosci. 9:469頁

40

【非特許文献21】Wang及びReddy (2017) J. Alzheimers Dis. 57:1041~1048頁

【非特許文献22】Martinouら (1992) Neuron. 8:737~744頁

【非特許文献23】Wangら (2013) Hum. Mol. Genet. 22:4706~4719頁

【非特許文献24】Wictorin (1992) Prog. Neurobiol. 38:611~639頁

【非特許文献25】Nakanoら (2000) J. Neurol. 247 (suppl. 5):v1~v15頁

【非特許文献26】Yamadaら (2003) J. Pharmacol. Sci. 91:267~270頁

【非特許文献27】Atabayら (1996) J. Neurosci. Res. 43:465~475頁

【非特許文献28】Baら (2003) J. Neurosci. Methods 123:11~22頁

【非特許文献29】Russoら (2004) Brain Res. 1009:40~53頁

50

【非特許文献 30】Yuら (2008) J. Neurosci. 28 : 7467 ~ 7475 頁

【非特許文献 31】Rauskolbら (2010) J. Neurosci. 30 : 1739 ~ 1749 頁

【非特許文献 32】Ivkovicら (1999) J. Neurosci. 19 : 5409 ~ 5419 頁

【非特許文献 33】Schinelliら (1988) J. Neurochem. 50 : 1900 ~ 1907 頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

よって、神経突起を保護することが可能であり、しかも神経突起の成長を増加させ、新規シナプスの形成を促進して、神経変性疾患を予防することも、治癒的に処置することもできる新規薬剤に対する重要な必要性が存在する。

10

【0009】

本発明はこの必要性を満たす。

【0010】

本発明は実際のところ、国際出願 WO2014195593号に開示されたドネコプリド化合物が、タウ過剰リン酸化を低減することに加えて、神経突起成長を増加させて、シナプス比を維持することができ、最も重要で予想外なことには、新規シナプスの形成を促進することができることから、この化合物は神経保護活性を有するという本発明者らの予期せぬ発見からもたらされたものである。

【0011】

神経突起に対するこの一般的及び効率的な保護作用により、ドネコプリド化合物は、神経突起変性が関与する任意の神経変性疾患を予防及び/又は処置するために非常に有望な神経保護剤である。

20

【0012】

この作用は、神経変性疾患の多くのモデル、特にアルツハイマー病モデル、パーキンソン病モデル、筋萎縮性側索硬化症モデル、ハンチントン病モデル、及び虚血又は外傷性脳傷害により誘発される神経変性疾患のモデルにおいて、以下の一般式(I)の多くの化合物で更に確認されている。

【課題を解決するための手段】

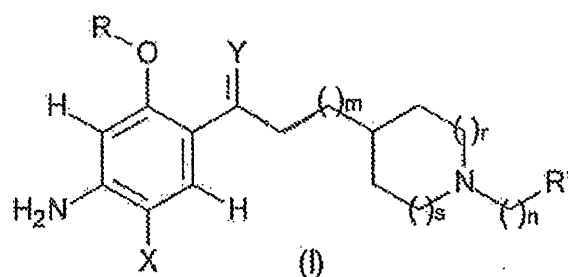
【0013】

よって、本発明は神経変性疾患の予防及び/又は処置における神経保護剤としての使用のための以下の式(I)の化合物：

30

【0014】

【化1】



40

【0015】

(式中、

Xは、

水素原子を表し、又は

ハロゲン原子 (Hal) を表し、ここで (Hal) はフッ素、塩素、臭素若しくはヨウ素であ

50

り、又は

直鎖若しくは分枝鎖の $C_p(Hal)_{2p+1}$ ポリハロゲン化アルキル (polyhalogenoalkyl) 基を表し、ここで $p=1, 2, 3$ 又は $4$ であり、(Hal)は上記に示されているのと同じ意味を有し、

Yは、

酸素原子を表し、又は

硫黄原子を表し、又は

N-R"基を表し、ここでR"は、水素原子、-OH基、-O-A基(ここでAは、直鎖又は分枝鎖の $C_1 \sim C_6$ アルキル基を表し、特にAは、メチル基を表し)、又は直鎖若しくは分枝鎖の $C_qH_{2q+1}$ アルキル基を表し、 $q=1, 2, 3$ 又は $4$ であり、

mは、1、2及び3から選択される整数であり、

nは、0、1、2及び3から選択される整数であり、

r及びsは、その値が、 $r=s=0$ 、又は $r=s=1$ 、又は $r=s=2$ 、又は $r=0$ 及び $s=1$ 、又は最後に $r=0$ 及び $s=2$ である整数であり、

Rは、

水素原子、又は

1個若しくは複数のF原子を有することが可能な直鎖若しくは分枝鎖の $C_1 \sim C_5$ アルキル基を表し、

R'は、

分枝鎖 $C_1 \sim C_6$ アルキル基、或いは

1つ若しくは複数のR基を有すること及び酸素原子、又はRで置換されていてもよい窒素原子、又は硫黄原子、又は-SO<sub>2</sub>-基若しくは-SO-基を保有することが可能な $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル又は $C_5 \sim C_{13}$ 二環式基を表す)

並びにそのエナンチオマー又はジアステレオ異性体及びそのラセミ体、その酸との塩、その水和物又はその溶媒和生成物に関する。

【発明を実施するための形態】

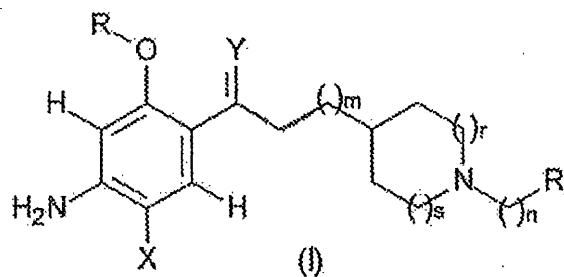
【0016】

<化合物>

本発明との関連で使用される化合物は、以下の式(1)の化合物：

【0017】

【化2】



【0018】

(式中、

Xは、

水素原子を表し、又は

ハロゲン原子(Hal)を表し、ここで(Hal)はフッ素、塩素、臭素若しくはヨウ素であり、又は

直鎖若しくは分枝鎖の $C_p(Hal)_{2p+1}$ ポリハロゲン化アルキル基を表し、ここで $p=1, 2$

10

20

30

40

50

、3又は4であり、(Hal)は上記に示されているのと同じ意味を有し、

Yは、

酸素原子を表し、又は

硫黄原子を表し、又は

N-R"基を表し、ここでR"は、水素原子、-OH基、-O-A基(ここでAは、直鎖又は分枝鎖のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基を表し、特にAは、メチル基を表す)、又は直鎖若しくは分枝鎖のC<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub>アルキル基を表し、q=1、2、3又は4であり、

mは、1、2及び3から選択される整数であり、

nは、0、1、2及び3から選択される整数であり、

r及びsは、その値が、r=s=0、又はr=s=1、又はr=s=2、又はr=0及びs=1、又は最後にr=0及びs=2である整数であり、 10

Rは、

水素原子、又は

1個若しくは複数のF原子を有することが可能な直鎖若しくは分枝鎖のC<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>アルキル基を表し、

R'は、

分枝鎖C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基、或いは

1つ若しくは複数のR基を有すること及び酸素原子、又はRで置換されていてもよい窒素原子、又は硫黄原子、又は-SO<sub>2</sub>-基若しくは-SO-基を保有することが可能なC<sub>3</sub>~C<sub>10</sub>シクロアルキル又はC<sub>5</sub>~C<sub>13</sub>二環式基を表す) 20

並びにそのエナンチオマー又はジアステレオ異性体及びそのラセミ体、その酸との塩、その水和物又はその溶媒和生成物である。

【0019】

特定の実施形態では、式(1)において、Yは、

酸素原子を表し、又は

硫黄原子を表し、又は

N-R"基を表し、ここでR"は、水素原子、-OH基、又は直鎖若しくは分枝鎖のC<sub>q</sub>H<sub>2q+1</sub>アルキル基を表し、q=1、2、3又は4である。

【0020】

特定の実施形態では、式(1)において、Xは、ハロゲン原子、特に塩素又はフッ素、より詳細には塩素、最も詳細にはフッ素を表す。 30

【0021】

別の特定の実施形態では、式(1)において、Yは酸素原子を表す。

【0022】

別の特定の実施形態では、式(1)において、m、n、r及びsのすべては値1を有する。

【0023】

別の特定の実施形態では、式(1)において、RはH、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Fを表す。好ましくは、RはCH<sub>3</sub>を表す。

【0024】

別の特定の実施形態では、式(1)において、R'はシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、4-ピペリジン及び-CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>の基で構成される群から選択される基を表す。別の特定の実施形態では、式(1)において、R'は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4-ピペリジン及び-CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>の基で構成される群から選択される基を表す。好ましくは、式(1)において、R'は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル及び4-ピペリジンの基で構成される群から選択される基を表す。好ましくは、式(1)において、R'は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル及び4-ピペリジンの基で構成される群から選択される基を表す。更に好ましくは、R'はC<sub>4</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル基を表す。更に好ましくは、R'は、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基又は2-ピペリジン基を表す。より好ましくは、R' 40 50

はシクロペンチル基を表す。更に好ましくは、R'はシクロヘキシル基を表す。更に好ましくは、R'は2-ピペリジン基を表す。最も好ましくは、R'はシクロヘプチル基を表す。

【0025】

別の特定の実施形態では、式(I)において、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はC<sub>4</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル基、特にシクロヘキシル基を表す。別の特定の実施形態では、式(I)において、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はC<sub>4</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル基、特にシクロペンチル基を表す。別の特定の実施形態では、式(I)において、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はC<sub>4</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル基、特に2-ピペリジン基を表す。別の特定の実施形態では、式(I)において、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はC<sub>4</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル基、特にシクロヘプチル基を表す。

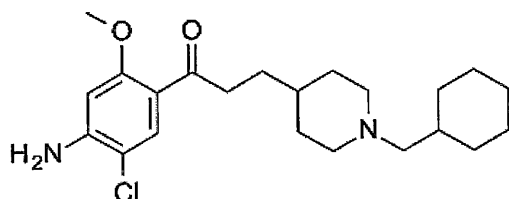
10

【0026】

特に好ましい実施形態では、式(I)において、Xは塩素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロヘキシル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明との関連で使用される化合物は以下の式(I)のドネコプリド化合物である：

【0027】

【化3】



(II).

20

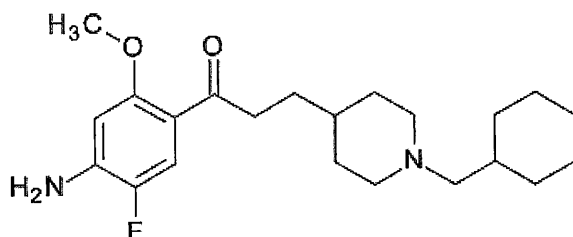
【0028】

別の特に好ましい実施形態では、式(I)において、Xはフッ素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロヘキシル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明との関連で使用される化合物は以下の式(III)のフルコプリド(flucopride)化合物である：

30

【0029】

【化4】



(III).

40

【0030】

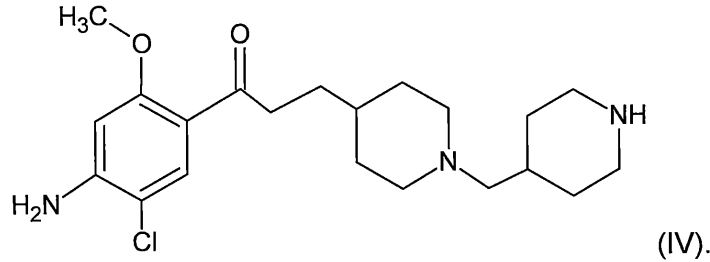
別の特に好ましい実施形態では、式(I)において、Xは塩素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'は2-ピペリジン基を表す。言

50

い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は以下の式(I V)の化合物MR31176である：

【0031】

【化5】



10

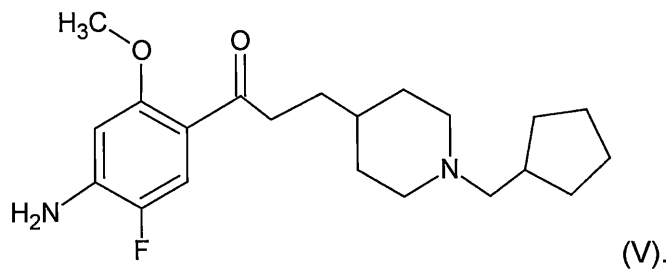
【0032】

別の特に好ましい実施形態では、式(I)において、Xはフッ素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロペンチル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は以下の式(V)の化合物MR33583である：

20

【0033】

【化6】



30

【0034】

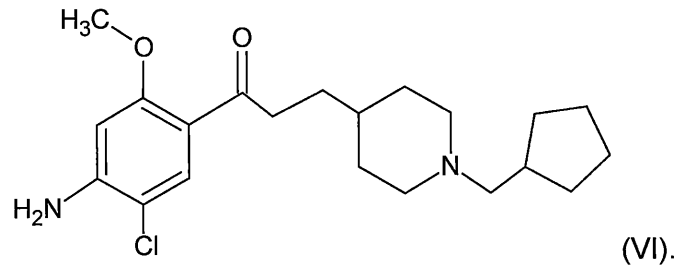
別の特に好ましい実施形態では、式(I)において、Xは塩素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロペンチル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は以下の式(VI)の化合物MR31172である：

40

【0035】

50

## 【化7】



10

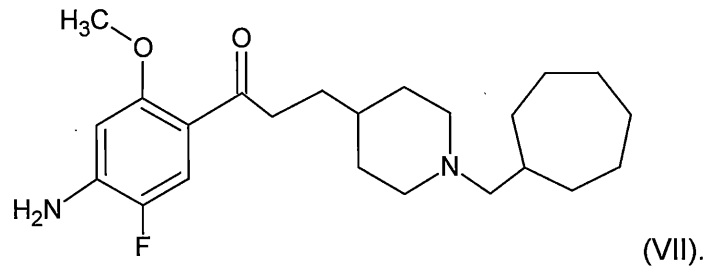
## 【0036】

別の特に好ましい実施形態では、式(1)において、Xはフッ素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロヘプチル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は以下の式(VII)の化合物MR36014である：

## 【0037】

## 【化8】

20



30

## 【0038】

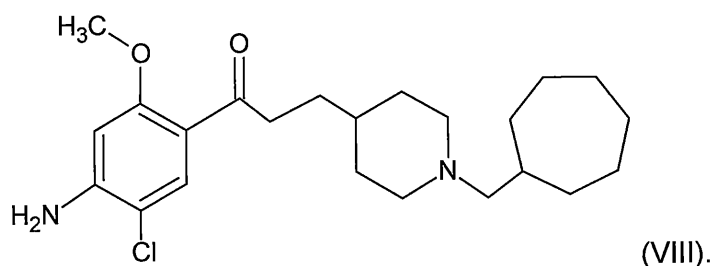
別の最も好ましい実施形態では、式(1)において、Xは塩素を表し、Yは酸素原子を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロヘプチル基を表す。言い換えると、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は以下の式(VIII)の化合物MR31192である：

## 【0039】

40

50

## 【化 9】



10

## 【0040】

別の特定の実施形態では、Xは塩素を表し、YはN-R"基を表し、R"は-O-A基を表し、Aはメチル基を表し、m、n、r及びsのすべては値1を有し、RはCH<sub>3</sub>を表し、R'はシクロヘキシル基を表す。言い換えると、特定の実施形態では、本発明の関連で使用される化合物は、化合物2-クロロ-4-[[2-[1-(シクロヘキシルメチル)-4-ピペリジル]エチル]-N-メトキシカルボニミドイル]-5-メトキシアニリンである。

20

## 【0041】

特定の実施形態では、上記で定義された化合物の酸との塩が使用される。より特定の実施形態では、前記酸との塩はフマレート (fumarate, フマル酸塩) 又はジヒドロクロレート (dihydrochlorate) である。

## 【0042】

より詳細には、特に好ましい実施形態では、本発明の関連で使用される化合物はドネコプリド(上記式(II)の)フマレート、特にドネコプリドフマレート水和物である。

## 【0043】

別の特に好ましい実施形態では、本発明と関連して使用される化合物はフルオコプリド(上記式(III)の)フマレートである。

30

## 【0044】

別の特に好ましい実施形態では、本発明と関連して使用される化合物はMR31176(上記式(IV)の)ジヒドロクロレート、特にジヒドロクロレート脱水物である。

## 【0045】

別の特に好ましい実施形態では、本発明の内容に使用される化合物はMR33583(上記式(V)の)フマレートである。

## 【0046】

別の特に好ましい実施形態では、本発明の内容に使用される化合物はMR31172(上記式(VI)の)フマレートである。

## 【0047】

別の特に好ましい実施形態では、本発明の内容に使用される化合物はMR36014(上記式(VII)の)フマレートである。

40

## 【0048】

別の特に好ましい実施形態では、本発明の内容に使用される化合物はMR31192(上記式(VIII)の)フマレートである。

## 【0049】

神経変性疾患

「神経変性疾患」とは、神経細胞の系統的変性及び脱落に基づく、神経回路の神経ネットワークの崩壊により誘発される疾患を本明細書で意味する。

## 【0050】

上で説明されたように、本発明者らは、ドネコプリドが神経突起に対する全般的及び効率

50

的な保護作用を示すことを実証した。この全般的神経保護作用により、ドネコプリドは、任意の神経変性疾患を予防及び/又は処置するための神経保護剤として使用することができる。

【0051】

発明者らは、神経変性疾患の多くのモデル、特にアルツハイマー病モデル、パーキンソン病モデル、筋萎縮性側索硬化症モデル、ハンチントン病モデル、及び虚血又は外傷性脳傷害により誘発される神経変性疾患のモデルにおいて、上記一般式(1)の多数の化合物、特に上記「化合物」のセクションで具体的に定義された化合物によるこの作用を更に確認した。

【0052】

神経変性疾患の例として、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病、レビー小体型認知症、血管性認知症、並びに(i)非認知性神経変性、(ii)非認知性神経筋変性及び(iii)運動感覚性神経変性を含む加齢に関連する問題、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を含む運動ニューロン疾患、ダウン症候群、大脳皮質基底核神経節変性、多系統萎縮症、脳の萎縮、オリブ橋小脳変性症、核上性運動麻痺、フリードライヒ運動失調症、脊髄小脳変性症2型、前頭側頭変性症(FTD)並びに原発性進行性失語症が挙げられる。

【0053】

特定の実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症を含む運動ニューロン疾患、ダウン症候群及び前頭側頭変性症からなる群から選択される。

【0054】

より特定の実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される。

【0055】

別の実施形態では、神経変性疾患はアルツハイマー病である。

【0056】

代替の実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病ではない神経変性疾患である。

【0057】

前記代替の実施形態では、神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される。

【0058】

医療適用

本発明は、上記「神経変性疾患」のセクションで定義されている神経変性疾患の予防及び/又は処置における神経保護剤としての使用のための、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物に関する。

【0059】

本発明はまた、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患の予防及び/又は処置のための神経保護剤の製造のための、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物の使用に関する。

【0060】

本発明は、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を予防及び/又は処置する方法であって、それを必要とする対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を神経保護剤として投与することを含む方法に更に関する。

【0061】

本発明は、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を患っている、又は患うリスクがある対象における神経保護の方法であって、前記対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を投与することを含む方法に更に関する。

【0062】

10

20

30

40

50

本発明によると、「対象」又は「それを必要とする対象」という用語は、上記「神経変性疾患」のセクションで定義されている神経変性疾患により影響を受ける又は影響を受ける可能性が高いヒト又はヒト以外の哺乳動物を対象とする。

【0063】

本発明との関係で、「処置する」又は「処置」という用語は、このような用語が適用される障害若しくは状態、又はこのような障害若しくは状態の1つ若しくは複数の症状の進行を逆転、緩和又は阻害することを意味する。

【0064】

本発明との関係で、「予防する」又は「予防」という用語は、このような用語が適用される障害若しくは状態、又はこのような障害若しくは状態の1つ若しくは複数の症状の開始を遅延又は予防することを意味する。

10

【0065】

「神経保護」とは、中枢神経系における変性的作用の予防又は阻害及びニューロン完全性の復元、特にニューロン変性の予防又は阻害を本明細書において意味する。

【0066】

「神経保護剤」は、上で定義された神経保護が可能な薬剤を本明細書において意味する。

【0067】

発明者は、本発明に関係して使用されている化合物は、神経突起成長を増加させ、シナプス比を維持し、タウ過剰リン酸化を低減させ、及び/又は新規シナプスの形成を促進することが可能であることをより詳細に実証した。

20

【0068】

したがって、特定の実施形態では、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物は神経突起成長を増加させるためのものである。

【0069】

本発明はまた、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を患っている、又は患うリスクがある対象において神経突起成長を増加させるための方法であって、前記対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を投与することを含む方法に関する。

【0070】

「神経突起成長」とは、ニューロン細胞体からの任意の突起の延長プロセス及び関連するシナプス発生を本明細書において意味する。

30

【0071】

「神経突起成長を増加させる」とは、同じ条件下ではあるが、目的の化合物が適用されずに観察された神経突起の成長と比較して、目的の化合物が適用された場合の神経突起の成長がより高度である(すなわち、より効率的、より速い又はより長い)、好ましくは統計学的に有意により高度であることを本明細書において意味する。好ましくは、神経突起成長は、同じ条件下ではあるが、目的の化合物が適用されずに観察された神経突起の成長と比較して、少なくとも120%増加する。

【0072】

別の特定の実施形態では、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物はシナプス比を維持するためのものである。

40

【0073】

本発明の別の目的は、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を患っている、又は患うリスクがある対象において、シナプス比を維持するための方法であって、前記対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を投与することを含む方法に関する。

【0074】

「シナプス比」とはシナプスの数とニューロンの数との比を本明細書において意味する。

【0075】

「シナプス比を維持する」とは、対照条件下で、例えば、同じ条件下ではあるが、目的の

50

化合物が適用されずに、又はニューロンが神経変性状態に直面していない条件下で観察されたシナプス比と比較して、目的の化合物が適用された場合のシナプス比が同様である(すなわち統計学的に有意に異なる)ことを本明細書において意味する。

【0076】

別の特定の実施形態では、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物は新規シナプスの形成を促進するものである。

【0077】

本発明の別の目的は、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を患っている、又は患うリスクがある対象において、新規シナプスの形成を促進するための方法であって、前記対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を投与することを含む方法に関する。

10

【0078】

「新規シナプスの形成を促進する」とは、同じ条件下ではあるが、目的の化合物が適用されずに観察された新しく形成されたシナプスの数と比較して、目的の化合物が適用された場合の新しく形成されたシナプスの数がより高い、好ましくは統計学的に有意により高いことを本明細書において意味する。好ましくは、新規シナプスの形成は、同じ条件下ではあるが、目的の化合物が適用されずに観察された新規シナプスの形成と比較して、少なくとも120%増加する。

【0079】

別の特定の実施形態では、上記「化合物」のセクションで定義されている化合物は、タウ過剰リン酸化を低減させるためのものである。

20

【0080】

本発明の別の目的は、上記「神経変性疾患」セクションで定義されている神経変性疾患を患っている、又は患うリスクがある対象においてタウリン酸化を低減させるための方法であって、前記対象に、治療的に効率的な量の上記「化合物」のセクションで定義されている化合物を投与することを含む方法に関する。

【0081】

「タウ過剰リン酸化」とは、タウタンパク質の異常に高いリン酸化、特にThr39、Ser46、Thr50、Ser68、Thr69、Thr71、Ser113、Thr153、Thr175、Thr181、Ser184、Ser185、Ser191、Ser198、Ser199、Ser202、Thr205、Ser208、Ser210、Thr212、Ser214、Thr217、Thr231、Ser235、Ser237、Ser238、Ser241、Ser258、Ser262、Ser285、Ser289、Ser305、Ser324、Ser352、Ser356、Tyr394、Ser396、Ser400、Thr403、Ser404、Ser409、Ser412、Ser413、Thr414、Ser416、Ser422、Ser433及びSer435残基のうちの少なくとも1つのタウタンパク質の異常なリン酸化を本明細書において意味する。

30

【0082】

「タウ過剰リン酸化を低減させる」とは、同じ条件下ではあるが、目的の化合物が適用されずに前記残基が異常にリン酸化したのに対して、目的の化合物が適用された場合、Thr39、Ser46、Thr50、Ser68、Thr69、Thr71、Ser113、Thr153、Thr175、Thr181、Ser184、Ser185、Ser191、Ser198、Ser199、Ser202、Thr205、Ser208、Ser210、Thr212、Ser214、Thr217、Thr231、Ser235、Ser237、Ser238、Ser241、Ser258、Ser262、Ser285、Ser289、Ser305、Ser324、Ser352、Ser356、Tyr394、Ser396、Ser400、Thr403、Ser404、Ser409、Ser412、Ser413、Thr414、Ser416、Ser422、Ser433及びSer435残基のうちの少なくとも1つ、特にタウタンパク質のSer212及びThr214残基のうちの1つが異常にリン酸化されないことを本明細書において意味する。

40

【0083】

「治療有効量」とは、任意の医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット/リスク比で、神経変性疾患の処置及び/又は予防において神経保護剤として作用するのに十分な化合物の量を本明細書において意味する。しかし、本発明の化合物の1日の総使用量は、健全な

50

医学的判断の範囲内で担当医により決定されることを理解されよう。任意の特定の対象に対する特定の治療有効量レベルは、処置されている障害及び障害の重症度、利用される特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、全般的な健康状態、性別及び食生活、利用される特定の化合物の投与の時間、投与経路及び排出速度、処置の期間、利用される特定の化合物と組み合わせる又は同時に使用される薬物、並びに医学的技術において周知の要因等を含む様々な要因に依存する。例えば、化合物の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要とされるレベルより低いレベルから開始し、所望の作用が達成されるまで用量を徐々に増加させることは十分に当業者の技術範囲内である。

【0084】

本発明と関係して使用されている化合物は、治療用組成物を形成するために、薬学的に許容される賦形剤、及び場合によって持続放出マトリックス、例えば、生分解性ポリマーを含む医薬組成物の形態で投与されてもよい。

10

【0085】

「薬学的に」又は「薬学的に許容される」とは、必要に応じて、哺乳動物、特にヒトに投与された場合、有害な、アレルギー性又は他の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。薬学的に許容される担体又は賦形剤は、任意の種類は無毒性の固体、半固体又は液体の充填剤、希釈剤、封入物質又は製剤助剤を指す。

【0086】

本発明と関係して使用されている化合物を含む医薬組成物の形態及び投与経路は、処置される状態、疾患の重症度、患者の年齢、体重、及び性別等に自然に依存する。

20

【0087】

本発明と関係して使用されている化合物は、局所的、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下又は眼内の投与等のために製剤化することができる。特定の実施形態では、本発明と関係して使用される化合物は経口的に投与される。

【0088】

代わりに、本発明と関係して使用されている化合物を含む医薬組成物は、注射可能な製剤のための薬学的に許容されるビヒクルを含有し得る。これらは特に等張性、滅菌の生理食塩水(リン酸モノナトリウム又はリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム若しくは塩化マグネシウム等、又はこのような塩の混合物)、又は滅菌水若しくは生理的食塩水の添加により、事例に応じて、注射溶液の構成を可能にする乾燥、特に冷凍乾燥組成物であってよい。

30

【0089】

医薬組成物を調製するために、有効量の本発明と関係して使用されている化合物を薬学的に許容される担体又は水性媒体中に溶解又は分散することができる。

【0090】

注射への使用に適した医薬品形態として、注射可能な滅菌溶液又は分散液の即時調製のための滅菌水性溶液又は分散液及び滅菌粉末が挙げられる。すべての場合において、形態は滅菌でなければならず、容易な注射針通過性が存在する範囲までの流動性を有さなければならない。この医薬品形態は、製造及び貯蔵条件下で安定していなければならない、微生物、例えば、細菌及び真菌の汚染作用に対抗して保存されなければならない。

40

【0091】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等)及びこれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であることができる。適正な流動度は、例えば、コーティング、例えば、レシチンの使用により、分散液の場合には必要とされる粒径の維持により、及び界面活性剤、安定化剤、凍結防止剤又は抗酸化剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、抗菌剤及び抗真菌剤により引き起こすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。

【0092】

注射可能な滅菌溶液は、活性化合物の必要量を上記列挙された他の成分のいくつかと共に

50

適当な溶媒中に組み込み、必要に応じて、これに続いて濾過滅菌することにより調製される。一般的に、分散液は、様々な滅菌された活性成分を、塩基性分散媒体及び上記列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。注射可能な滅菌溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、以前に滅菌濾過した溶液から、活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末を生成する真空乾燥及びフリーズドライ技術である。

【0093】

製剤化により、溶液は、投与製剤と適合性のある方式及び治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、様々な剤形、例えば、上記に記載されている種類の注射溶液で簡単に投与されるが、薬物放出カプセル剤等もまた利用することができる。

10

【0094】

水性溶液での非経口投与のため、例えば、溶液は必要であれば適切に緩衝され、液体希釈剤には十分な生理食塩水又はグルコースとの等張性が最初に付与されるべきである。これらの特定の水性溶液は静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。これに関連して、利用することができる滅菌水性媒体は本開示の観点から当業者に公知である。例えば、ある用量は、1 mLの等張NaCl溶液に溶解し、1000 mLの皮下注入流体に加えるか、又は提案された点滴部位に注射してもよい(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035~1038頁及び1570~1580頁を参照されたい)。用量における一部のばらつきは、処置を受けている対象の状態に応じて必ず生じる。投与責任者は、いずれにしても、個々の対象に対して適当な用量を決定する。

20

【0095】

本発明と関係して使用される化合物は通常、例えば、経口又は舌下の経路を取る錠剤、カプセル剤、マイクロカプセル、散剤、粒剤、シロップ剤、溶液又は懸濁液の形態で経口投与することができる。

【0096】

特定の実施形態では、本発明と関係して使用される化合物は、経口的に1~20 mg/kg(体重)の1日用量、特に2 mg/kgの1日用量で適切に投与される。

【0097】

別の特定の実施形態では、本発明と関係して使用されている化合物は、経口的に、週2回、1~20 mg/kg(体重)の用量で、特に1 mg/kgを週2回の用量で適切に投与される。

30

【0098】

別の特定の実施形態に従い、本発明と関係して使用される化合物は、1日当たり10~1000 mgの用量、好ましくは1日5回0.2~2 mgの用量で投与される。

【0099】

本発明は、以下の図及び実施例で更に例示される。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR31193の作用を示している。結果は、平均値±SEM(n=4~6/群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。\*p 0.05は有意であると考えられた。

40

【図2】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR31193の作用を示している。結果は、平均値±SEM(n=4~6/群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。\*p 0.05は有意であると考えられた。

【図3】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR31176の作用を示している。結果は、平均値±SEM(n=4~6/群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元

50

ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図4】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR31176の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図5】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR31192の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。 10

【図6】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR31192の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図7】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR33583の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図8】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR33583の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。 20

【図9】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR31192又はドネペジルの作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図10】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR31192又はドネペジルの作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。 30

【図11】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A)、全神経突起ネットワーク(B)、ニューロンの数により正規化された神経突起長(C)、及びタウ(AT100)のリン酸化(D)に対するMR36014又はドネペジルの作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図12】A 1-42で損傷した海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンのシナプスの保存に対するMR36014又はドネペジルの作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。 40

【図13】MPP+で損傷した中脳神経の初代培養物における、THニューロンの生存(A)、THニューロンの全神経突起ネットワーク(B)、及びTHニューロンにおけるaSynの凝集(C)に対するMR36014の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図14】MPP+で損傷した中脳神経の初代培養物における、THニューロンの生存(A)、THニューロンの全神経突起ネットワーク(B)、及びTHニューロンにおけるaSynの凝 50

集(C)に対するMR33583の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図15】グルタメートで損傷した皮質ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存(A~C)及び全神経突起ネットワークの保護(B~D)に対するMR36014(A~B)及びMR33583(C~D)の作用を示している。結果は、平均値 $\pm$ SEM( $n=4\sim 6$ /群)として、対照のパーセンテージとして表現される。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定。 $*p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図16】グルタメート損傷後の脊髄の運動ニューロンにおける、生存(A)、及び神経突起ネットワーク(B、C)に対するMR36014の作用を示している。結果は対照のパーセンテージとして表現され、平均値 $\pm$ SEM(100%=CT、化合物なし)を示す。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定、 $n=4\sim 6$ 。 $p < 0.05$ は有意であると考えられた。

10

【図17】グルタメート損傷後の脊髄の運動ニューロンにおける、生存(A)、神経突起ネットワーク(B、C)及びTDP-43の原形質の転座(D)に対するMR33583の作用を示している。結果は対照のパーセンテージとして表現され、平均値 $\pm$ SEM(100%=CT、化合物なし)を示す。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定、 $n=4\sim 6$ 。 $p < 0.05$ は有意であると考えられた。

【図18】成長因子欠乏後の中脳細胞の初代培養物における、GABA作動性ニューロン生存に対するMR33583の作用を示している。結果は対照のパーセンテージとして表現され、平均値 $\pm$ SEM(100%=CT、化合物なし)を示す。一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定、 $n=4\sim 6$ 。 $p < 0.05$ は有意であると考えられた。

20

【実施例】

【0101】

(実施例1)

この実施例は、A で損傷した(24時間曝露)ラット初代海馬ニューロンにおけるドネコブリドの作用を示すものである。

【0102】

アルツハイマー病(AD)は、主に65才より上の年齢の人々に影響を与える神経変性疾患であり、異なる臨床症候、例えば、思考、言語、及び学習能力における進行性の低下に悩まされる。様々なソースからのより多くの証拠が、AD病因における推定上の有毒性種としてA オリゴマー(A O)/プロトフィブリルを指摘している。

30

【0103】

A Oの溶液を生成し、A Oへの曝露の濃度及び時間を操作することにより、構造的変化(ニューロンの死亡)の早期作用(酸化ストレス)及び長期的発展を再現することが可能であった。

【0104】

A O(自動ウエスタンブロット法により正確に測定)を含有するA ペプチド溶液を使用した本実施例に使用されているモデルは、ADの本質的な神経病理的特徴を再現したものであった。

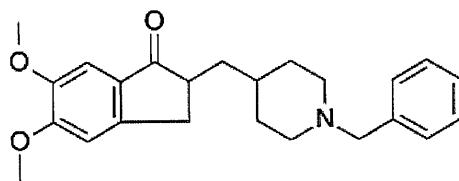
【0105】

この研究の狙いは、A で損傷した(24時間曝露)ラット初代海馬のニューロンにおいて、1種の試験化合物(いくつかの濃度でのドネコブリドフマレート)の作用を評価することであった。以下の式のドネペジル：

40

【0106】

## 【化10】



10

## 【0107】

(1つの濃度)を基準試験化合物として使用した。

## 【0108】

## 材料及び方法

〔海馬ニューロンの初代培養物〕

ラットの海馬ニューロンをCallizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716 頁に記載されている通り培養した。妊娠第17日の妊娠した雌のラット(Rats Wistar ; Janvier Labs社、France)を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔、これに続く頸部脱臼を使用して 殺した。次いで、胎児を子宮から取り出し、2 %ペニシリン(10,000 U/ml)及び 20 ストレプトマイシン(10 mg/ml)溶液(PS)及び1 %ウシ血清アルブミン(BSA)を有する、氷冷したL15 Leibovitz培地内に直ちに配置した。海馬ニューロンを、37 °Cで20分間、0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAの最終濃度のトリプシン-EDTA溶液で処理した。DNAse I グレードII(最終濃度0.5 mg/ml)及び10 %ウシ胎児血清(FCS)を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)の添加により、解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離し、次いで515 × gで、4 °Cで10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27サプリメントの2 %溶液を有するNeurobasal培地、2 mmol/lのL-グルタミン、2 %PS溶液、及び10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子(BDNF)からなる規定の培養用培地にペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。ポリ-L-リジンをプレコートした96ウェルプレート内に、1ウェル当たり20,000個の密度で細胞を播種し、大気(95 %)-CO<sub>2</sub>(5 %)インキュベーター内で、37 °Cで培養した。培地は2日ごとに交換した。

30

## 【0109】

〔ドネコプリド及びヒトA 1-42曝露〕

17日間の培養後、海馬ニューロンをA 1-42 溶液(以下を参照されたい)に曝露した。A 1-42調製は、Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716 頁に記載されている手順に従い行った。簡単に説明すると、A 1-42ペプチドを上述の規定の培養用培地に初濃度40 µMで溶解した。この溶液を暗所で、37 °Cで3日間穏やかに攪拌し、培養用培地内で使用される濃度へと適切に希釈した直後使用した(2 µM又は0.25 µMのオリゴマー(A 1-42)にそれぞれ対応する20 µM(プレート1)又は2.5 µM(プレート2))。

40

## 【0110】

ドネコプリドフマレート培養用培地に溶解し、A 1-42 の適用の1時間前に予備インキュベートした。A 1-42調製物を、ドネコプリドの存在下、対照培地内で希釈した最終濃度20 µM又は2.5 µMに加えた(=2 µM又は0.25 µMのA 1-42、自動ウエスタンブロット法で評価)。

## 【0111】

〔培養プレートの構成〕

1種の培養物に対して、96ウェルプレート(1条件当たり6つのウェル)内でドネコプリドフマレート(ドネコプリド)を試験した。A 1-42 の適用の1時間前に、化合物を予備インキュベ

50

ートした。以下の条件を評価した：

【 0 1 1 2 】

【 表 1 】

プレート 1(MAP-2/タウ)	プレート 2(PSD95/SYN)
対照(ビヒクル)	対照(ビヒクル)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ビヒクル	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ビヒクル
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(1 $\mu$ M)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(1 $\mu$ M)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(500 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(500 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(100 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(100 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(50 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(50 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(10 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(10 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(5 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(5 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(1 nM)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネコプリド(1 nM)
+ A $\beta$ (20 $\mu$ M 24 時間)/ドネペジル(1 $\mu$ M)	+ A $\beta$ (2.5 $\mu$ M 24 時間)/ドネペジル(1 $\mu$ M)

10

20

【 0 1 1 3 】

〔 エンドポイント評価 〕

30

〔 プレート1：生存、神経突起ネットワーク及びホスホタウ評価 〕

被毒させてから24時間後、海馬ニューロンをエタノール(95%)及び酢酸(5%)の冷たい溶液で、-20℃で5分間固定した。0.1%のサポニンで透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした：

a) 1%ウシ胎児血清及び0.1%のサポニンを含有するPBS中、1/1000希釈でのニワトリポリクローナル抗体抗微小管関連タンパク質2(MAP-2)(この抗体は、神経細胞体及び神経突起の特異的染色を可能にし、神経細胞の死及び神経突起ネットワークの研究を可能にする)。

b) 1%ウシ胎児血清及び0.1%のサポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのマウスモノクローナル抗体抗ホスホタウ(AT100)。

40

【 0 1 1 4 】

これらの抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ニワトリIgGに、室温で1時間曝露した。

【 0 1 1 5 】

各条件に対して、ImageXpress(Molecular Devices社)を使用して、20×倍率で1ウエル当たり30枚の像を撮った(全体のウエル領域を表すもの)。すべての画像は同じ取得パラメーターで撮った。Custom Module Editor(Molecular Devices社)を使用することにより、分析を自動的に実施した。

【 0 1 1 6 】

50

以下のエンドポイントを評価した：

- ニューロンの総数（ニューロン生存、MAP-2陽性ニューロンの数）
- 神経突起ネットワーク（MAP-2陽性ニューロン、単位： $\mu\text{m}$ ）
- ニューロン内のタウの領域（ $\mu\text{m}^2$ 、MAP-2陽性ニューロンとの重複）。

【0117】

[プレート2：シナプス評価]

被毒させてから24時間後、海馬ニューロンをエタノール(95%)及び酢酸(5%)の冷たい溶液で-20℃で、5分間固定した。0.1%のサポニンで透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした：

- a) 1%ウシ胎児血清及び0.1%のサポニンを含むPBS中、1/100希釈でのマウスモノクローナル抗体抗シナプス後肥厚95 kDa(PSD95)。
- b) 1%ウシ胎児血清及び0.1%のサポニンを含むPBS中、1/100希釈でのウサギポリクローナル抗体抗シナプトフィジン(SYN)。

10

【0118】

これらの抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含むPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgGに、室温で1時間曝露した。

【0119】

各条件に対して、ImageXpress(Molecular Devices社)を使用して、40×倍率で1ウェル当たり40枚の像を撮った。すべての画像は同じ取得パラメーターで撮った。

20

【0120】

Custom Module Editor(Molecular Devices社)を使用することにより、シナプス評価を自動的に実施した。

【0121】

以下のエンドポイントを評価した：

- シナプスの総数(PSD95/SYNの間で重複)。

【0122】

[統計分析]

すべての値は平均値 $\pm$ SEMとして表現される。一元ANOVAにより統計分析を実施し、これに続いてフィッシャーのPLSD検定を実施した。p < 0.05は有意であると考えられた。

30

【0123】

GraphPad Prismソフトウェアバージョン7.04を使用して、異なる条件に対するグラフ及び統計分析を実施した。\*p < 0.05は有意であると考えられた。

【0124】

結果

MAP-2海馬ニューロンの生存及び神経突起ネットワーク及びタウの過剰リン酸化に対するドネコプリドの作用。

【0125】

<ニューロンの生存>

40

海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの生存に対するドネコプリドの作用が以下の表1に示されている。

【0126】

## 【表 2】

表 1: MAP-2 ニューロン (対照の%)

	MAP-2 ニューロン (対照の%)		
	平均値	sem	n
対照	100	5	6
+ A $\beta$ 1-42 (20 $\mu$ M)	70	2	6
+ドネコプリド(1 nM)	70	2	5
+ドネコプリド(5 nM)	69	2	6
+ドネコプリド(10 nM)	73	2	5
+ドネコプリド(50 nM)	74	2	5
+ドネコプリド(100 nM)	<b>78*</b>	1	4
+ドネコプリド(500 nM)	<b>79*</b>	1	5
+ドネコプリド(1 $\mu$ M)	<b>62*</b>	2	5
+ドネペジル(1 $\mu$ M)	<b>82*</b>	2	5

\*: A $\beta$ 1-42 に対して  $p < 0.05$ 、一元 ANOVA、これに続くフィッシャーの LSD 検定により決定。

10

20

## 【 0 1 2 7 】

MAP-2ニューロンの重要な損失がA  $\beta$  ペプチドの適用に続いた。ここで陽性対照として使用したドネペジルは、ニューロンが消滅するのを有意に保護することができた。2つの用量のドネコプリド(100 nM及び500 nM)は、ドネペジルと同様の範囲まで神経保護作用を発揮した。

## 【 0 1 2 8 】

## &lt; 神経突起ネットワーク &gt;

海馬ニューロンの初代培養物における、MAP-2ニューロンの神経突起ネットワークに対するドネコプリドの作用が以下の表 2 に示されている。

30

## 【 0 1 2 9 】

40

50

## 【表 3】

表 2: MAP-2 神経突起ネットワーク (対照の%)

	MAP-2 神経突起ネットワーク (対照の%)		
	平均値	sem	n
対照	100	2	6
+ Aβ 1-42 (20 μM)	63	1	6
+ ドネコプリド(1 nM)	64	2	5
+ ドネコプリド(5 nM)	69	2	6
+ ドネコプリド(10 nM)	68	2	5
+ ドネコプリド(50 nM)	<b>71*</b>	3	5
+ ドネコプリド(100 nM)	<b>73*</b>	1	5
+ ドネコプリド(500 nM)	<b>79*</b>	3	6
+ ドネコプリド(1 μM)	<b>76*</b>	2	6
+ ドネペジル(1 μM)	<b>92*</b>	3	5

\*: Aβ1-42 に対して p<0.05、一元 ANOVA、これに続くフィッシャーの LSD 検定により決定。

10

20

## 【0130】

全神経突起ネットワークは Aβ 1-42 損傷により激しく縮小した。ドネペジルはほとんどすべての神経突起ネットワークを有意に保存した。4つの用量のドネコプリド(50 nM、100 nM、500 nM 及び 1 μM) もまた神経突起ネットワークに対する保護作用を発揮した。

## 【0131】

神経突起ネットワークは、培養物中のニューロンの数と比例する。1ニューロン当たりの神経突起の平均長を決定するために、全神経突起ネットワークをニューロンの数により正規化した。対応する結果が以下の表 3 に示されている。

30

## 【0132】

40

50

## 【表 4】

表 3: 神経突起ネットワーク/MAP-2 ニューロン (対照の%)

	神経突起ネットワーク/MAP-2 ニューロン (対照の%)		
	平均値	sem	n
対照	100	6	6
+ Aβ 1-42 (20 μM)	90	3	6
+ ドネコプリド(1 nM)	90	3	4
+ ドネコプリド(5 nM)	99	2	6
+ ドネコプリド(10 nM)	96	3	4
+ ドネコプリド(50 nM)	91	5	4
+ ドネコプリド(100 nM)	93	1	4
+ ドネコプリド(500 nM)	100	4	5
+ ドネコプリド(1 μM)	124*	5	5
+ ドネベジル(1 μM)	113*	4	4

\*: Aβ1-42 に対して p<0.05、一元 ANOVA、これに続くフィッシャーの LSD 検定により決定。

10

20

## 【0133】

この調整は、1ニューロン当たりの神経突起長がドネベジル及びドネコプリドの存在下で(1 μM)より長かったことを示し、これら2種の化合物が神経突起成長に対する作用を有したことを示唆した。

## 【0134】

< タウのリン酸化 >

海馬ニューロンの初代培養物におけるMAP-2ニューロンのタウ(AT100)のリン酸化に対するドネコプリドの作用が以下の表4に示されている。

## 【0135】

30

40

50

## 【表 5】

表 4: タウ (AT100) の領域/ニューロン (対照の%)

	タウ(AT100)の領域/ニューロン (対照の%)		
	平均値	sem	n
対照	100	4	5
+ Aβ 1-42 (20 μM)	200	11	5
+ドネコプリド(1 nM)	204	7	4
+ドネコプリド(5 nM)	201	8	5
+ドネコプリド(10 nM)	175	11	4
+ドネコプリド(50 nM)	<b>161*</b>	12	5
+ドネコプリド(100 nM)	<b>154*</b>	6	3
+ドネコプリド(500 nM)	<b>152*</b>	8	4
+ドネコプリド(1 μM)	198	8	5
+ドネペジル(1 μM)	<b>151*</b>	6	4

\*: Aβ1-42 に対して p<0.05、一元 ANOVA、これに続くフィッシャーの LSD 検定により決定。

10

20

## 【 0 1 3 6 】

タウ(AT100上の)過剰リン酸化がA 1-42の適用により観察された。ドネペジルはこの過剰リン酸化を有意に軽減することができた。同様に、ドネコプリド(50 nM、100 nM、500 nM)は用量依存性方式でタウの過剰リン酸化を有意に減少させた。

## 【 0 1 3 7 】

<海馬ニューロンの初代培養物における、シナプスに対するドネコプリドの作用>  
シナプスの形成を評価するため、シナプス後マーカーPSD-95、及びシナプス前マーカーシナプトフィジンの分布を研究した。PSD-95とシナプトフィジン染色の両方に対して陽性の構造をシナプスと考えた。

30

## 【 0 1 3 8 】

これらのシナプスに対するドネコプリドの作用が以下の表 5 に示されている。

## 【 0 1 3 9 】

40

50

## 【表 6】

表5: シナプスの数 (対照の%)

	シナプスの数 (対照の%)		
	平均値	sem	n
対照	100*	6	5
+ Aβ 1-42 (20 μM)	67	4	6
+ドネコプリド(1 nM)	69	5	4
+ドネコプリド(5 nM)	83*	3	5
+ドネコプリド(10 nM)	87*	7	5
+ドネコプリド(50 nM)	91*	3	6
+ドネコプリド(100 nM)	93*	3	4
+ドネコプリド(500 nM)	94*	5	4
+ドネコプリド(1 μM)	85*	4	5
+ドネペジル(1 μM)	88*	6	5

\*: Aβ1-42 に対して  $p < 0.05$ 、一元 ANOVA、これに続くフィッシャーの LSD 検定により決定。

10

20

## 【 0 1 4 0 】

A 1-42の適用により生じたストレスは、シナプスの数の減少を引き起こした (Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716 頁により以前に示されている通り)。

## 【 0 1 4 1 】

ドネペジルはシナプスの損失を軽減した。同様に、ドネコプリドもまた、用量依存性方式 (5 nM から 1 μM) で、シナプスの数を保存することができた。興味深いことに、この作用は低用量の化合物 (5 nM) で観察された。この作用は用量と共に増加した。

## 【 0 1 4 2 】

A 1-42ペプチドにより引き起こされた損傷により、ニューロンの数は実験条件下で減少し、これがシナプスの数の減少をもたらした。したがって、1ニューロン当たりのシナプスの数を予測するため、対照、A 1-42、ドネコプリド (500 nM、最も高いシナプスの数を示す条件)、及びドネペジル群に対するニューロンの数によりシナプスの数を正規化した。

30

## 【 0 1 4 3 】

この調整により、ドネペジルは作用がなかったのに対し、ドネコプリドのみが新規シナプスの形成を有意に促進したことを示した。

## 【 0 1 4 4 】

## 結論

本研究は、ドネコプリドがアルツハイマー病の *in vitro* モデルである、A 1-42ペプチドで損傷した海馬ニューロンの生存及び神経突起ネットワークに対して有益な作用を有することを示唆している。

40

## 【 0 1 4 5 】

更に、ドネコプリドは部位 AT100 上でタウの過剰リン酸化を減少させることができ、新規シナプスの形成を有意に刺激することができた。

## 【 0 1 4 6 】

ドネコプリドの作用は、ドネペジルの作用より大きかった。これはこの化合物が、特に神経変性疾患を処置するための神経保護剤として興味深い薬物候補であることを示唆している。

## 【 0 1 4 7 】

50

(実施例2)

本実施例は、本発明の化合物が、in vivoモデルのAD/sにおいてマウスの認知パフォーマンスを改善することができることを実証するものである。

## 【0148】

その目的のため、A 1-42オリゴマー(A O)を脳室内注射により投与した野生型C57Bl6/Jマウスを使用して、2種の化合物(ドネコプリドフマレート及びフルコプリドフマレート)の効力を調査した。

## 【0149】

化合物を3つの異なる用量で経口投薬した(強制経口投与を介して)。Y迷路試験、新奇物体認識アッセイ及びモリスの水迷路試験を使用して、認知パフォーマンスを評価した。10  
認知トライアルの終わりに、さらなるex-vivo分析用にすべての動物を 殺し、血液及び脳をサンプリングした。

## 【0150】

実験の概略的提示

簡単に説明すると、144C57Bl6/J雄のマウス(月齢3カ月)を納入してもらい、7日間又はそれよりも長く隔離して飼育した(1ケージ当たり4~5匹)。試験品目は1日1回異なる濃度で、-1日から+17日まで経口投薬した(強制経口投与を介して)。

## 【0151】

0日において、マウスにビヒクル又はA Oの単一icv注射を行った。

## 【0152】

+4日において(すなわち疾患誘導から4日後)、Y迷路試験を使用して空間的作業記憶を評価した。20

## 【0153】

+3日から+14日まで、学習能力及び長期記憶をMWMアッセイにおいて調査した。

## 【0154】

+15/+16日において、新奇物体認識試験(NOR)を使用して認識記憶を調査した。

## 【0155】

動物を+17日に 殺し、さらなるex-vivo分析用に組織を調製した。

## 【0156】

実験群の説明

研究は、1実験群当たり12匹のマウスを有する12の実験群に分割した合計144匹のマウスを含んだ。すべての動物にビヒクル又はA Oの単一(及び片側のみの)icv注射、総量1µLを行った。30

## 【0157】

異なる実験群は以下の通り定義した：

- ・ 群A (ビヒクルCTRL)：poビヒクル及びビヒクルのicv注射 (n=12)
- ・ 群B (A O CTRL)：poビヒクル及びA Oのicv注射(n=12)
- ・ 群C (陽性CTRL)：poドネペジル亜慢性及びA Oのicv注射(n=12)
- ・ 群D (ドネコプリドCTRL)：poドネコプリド (9 mg/kg)及びビヒクルのicv注射 (n=12) 40
- ・ 群E (フルコプリドCTRL)：poフルコプリド (9 mg/kg)及びビヒクルのicv注射 (n=12)
- ・ 群F (ドネコプリドで処置)：poドネコプリド (1 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群G (ドネコプリドで処置)：poドネコプリド (3 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群H (ドネコプリドで処置)：poドネコプリド (9 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群I (フルコプリドで処置)：poフルコプリド (1 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群J (フルコプリドで処置)：poフルコプリド (3 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群K (フルコプリドで処置)：poフルコプリド (9 mg/kg) 及びA Oのicv注射 (n=12)
- ・ 群L (陽性CTRL)：試験日にipドネペジル急性及びA Oのicv注射 (n=12) 40

## 【0158】

最大24匹のマウスに1日当たりicv注射し、6つの独立した作業で研究を実施した。すべての群からの2匹のマウスを各作業に含んだ。

## 【0159】

## 実験手順

## 〔動物住居〕

144 1C57Bl6/J雄の(Janvier社、France)マウス(月齢3カ月)の受理。納入されたら、動物を7日間、又はそれよりも長く隔離した。

## 【0160】

マウスを標準温度 ( $22 \pm 2$  )、並びに光制御及び湿気制御された環境 (8 am ~ 8 pmに明かり有り; 湿気  $55 \pm 10$  %) で、食料及び水を自由に摂取する状態で飼育した。マウスは群で飼育し、実験室職員が1日2回モニターした (8 am及び4 pm)。全般的な健康状態に2つ又はそれよりも多くの有意な問題があった場合には、影響を受けたマウスを殺した。許容不可能な健康状態の定義は以下の通り: 自発的運動がない、24時間の観察期間中飲食ができない、12 %を超える体量の減少、大量出血、自発発症の炎症(マウスの皮膚及び眼の全般的観察)、又は解剖学的構造の欠損。

## 【0161】

全手順にわたり、マウスは3回計量した (すなわち処置前及び+8及び+17日)。

## 【0162】

## 〔化合物の貯蔵、製剤及び投薬〕

0.9 %NaClに溶解することにより、経口投薬用に、ドネコプリド及びフルコプリドを製剤化した。疾患の誘導 (A Oのicv注射を介した) の1日前に化合物投薬(総量200  $\mu$ L)を開始し、19日連続して投薬を行った。

## 【0163】

## 〔定位注射〕

<マウス144匹のビヒクル又はA Oの単一脳室内注射 (1日当たり最大24匹のマウス、すべてのマウスは無作為抽出した)> : 麻酔下 (ケタミン/キシラジン混合物のそれぞれ10及び15 mg/kgの用量でのip注射)、A O(1  $\mu$ L)、又はビヒクル (1  $\mu$ L) を右の側脳室に注射した。注射は、26ゲージ針を装着した10  $\mu$ LのHamiltonマイクロシリンジを使用して行った。手順は、5 mg/kgの用量のメタカム (鎮痛) の皮下注射で終結した。次いで、動物をこれらのホーム-ケージに個々に配置し、動物が完全に回復するまで、ケージを温めたキャビネット内に配置した。動物を慎重にモニターして、麻酔後の回復を制御した。

## 【0164】

<A Oの調製> : A 1-42をBachem (ref H1368)から入手した (バッチ番号: 1052301)。安定したA 1-42オリゴマーの調製をGarciaら (2010) J. Neurosci. 30 : 7516 ~ 7527頁に記載されている通り実施した。オリゴマー調製物 (バッチ#2016-14として特定) は、A 1-42の安定したトリマー及びテトラマーの混合物、並びにペプチドのモノマー形態を含有した。使用されているすべてのオリゴマー調製物はオリゴマー組成物及びin vitro神経毒性の点から事前に特徴付けた。

## 【0165】

## 〔認知試験、Y迷路試験〕

各24匹のマウス (すなわち各実験群からマウス2匹)、合計144匹のマウスが+4日において関与する6つの独立したトライアル - 行動試験を投薬の1時間後に実施した。

## 【0166】

この試験は、前頭前皮質 (作業記憶) 及び海馬 (空間要素) により主に媒介される空間的な作業記憶を評価する。異なる要素については、Yoonら (2008) Learn Mem. 15 : 97 ~ 105頁及びSpellmanら (2015) Nature 522 : 309 ~ 314頁を参照されたい。

## 【0167】

前頭前皮質は、げっ歯類、霊長類及びヒトにおいて作業記憶を媒介する。

## 【0168】

自発的交替行動の測定は、空間的作業記憶、短期記憶の要素を評価するために行動薬理学者により広く使用されている。その最も単純な形態では、自発的交替行動は、連続する機会において、これらの慣習的な非強制のアーム選択を交互に行うというマウスの傾向を含む。

## 【0169】

この試験は、認知障害を誘発するためのA Oのicv点滴を使用して、成功裏に導入された(Garciaら(2010) J. Neurosci. 30:7516~7527頁)。

## 【0170】

<詳細なプロトコル>: Y迷路における自発的交替行動を記録することにより、即時の空間的作業記憶パフォーマンスを評価した。迷路は、遮光性Plexiglasで作製され、3つのアームのそれぞれは長さ40 cm、高さ14 cm、幅10 cmであり、等しい角度で配置される。装置は、すべてのアーム並びに中央ゾーン内で12~15ルクスが得られるように照明付き試験部屋内に均一に配置されている。マウスを1つのアームの中央に配置し、5分間のセッション中迷路を自由に探索させる。一連のアームへの進入をビデオに記録し(Smart v3.0ソフトウェア、Bioseb社)、マウスの後足がアーム内に完全に置かれた時点でアームへの進入が完了したと考える。交替とは、重複するトリプレットセットに対する3つのアームへの連続する進入と定義される。交替のパーセンテージは、実際の全交替の可能な交替に対する比として計算され、アーム進入の数マイナス2、これに100を掛けると定義される。このフェーズ中に平均スピード及び全距離をモニタリングすることにより、自発運動活性も記録し、評価する(例えばモチベーション指数)。

10

20

## 【0171】

<データ分析>: Graphpad/Prismコンピュータソフトウェアを統計分析に使用する。群間での比較のために、ノンパラメトリック分散分析(Kruskal Wallis試験)を行い、これに続いてノンパラメトリックMann-Whitney U試験を行った。値p 0.05は統計学的に有意と考えられる。データは平均値±SEMとして提示する。

## 【0172】

[認知試験、NORアッセイ]

各24匹のマウス(すなわち各実験群からマウス2匹)、合計144匹のマウスが+4日において関与する6つの独立したトライアル - 投薬から1時間後に行動試験を実施した。

30

## 【0173】

この試験は、項目に対する認識記憶を評価し、そのヒトでの同等のものは目視による一対比較(VPC)である(Wallaceら(2015) Handb. Exp. Pharmacol. 228:27~57頁)。物体に対する認知は、げっ歯類(Albasserら(2009) Behav. Neurosci. 123:115~124頁)、霊長類(Zeamerら(2015) Dev. Cogn. Neurosci. 11:31~41頁)及びヒト(Watson & Lee(2013) J. Neurosci. 33:4192~4200頁)において嗅周皮質により媒介される。

## 【0174】

マウスへのA Oの脳心室内注射は、新奇物体認識タスクにおける機能障害をもたらし、これはアセチルコリンエステラーゼ阻害剤ドネペジルで回復可能であり、細胞保護的及び神経保護的ミトコンドリア由来ペプチドにおいて、ヒトでの保護作用を示したことが事前に実証された。

40

## 【0175】

<詳細プロトコル>: 認知力試験の1日前(すなわち+15日)、10分間トライアルの間マウスを慣らし、この間マウスは空の開放されたフィールド内に配置する。認知力試験の日(すなわち日+16)、動物を同じ開放されたフィールド内に配置し、5分間のトライアルの間2つの同一の物体について自由に探索させる(獲得トライアル)。次いで、トライアル間の5分間、動物をこれらのホーム-ケージに戻す。保持トライアルの間、動物には2つの異なる物体を探索させる: 1つは馴染みの物体及び1つは新奇物体。この間、実験者は処置については知らされておらず、マウスが活発に各物体を探索する時間を記録する。すべて

50

のトライアルはビデオに記録する(Smart v3.0 ソフトウェア、Bioseb社)。次いで、識別指数を生成する：識別指数=(新奇物体を探索する時間-馴染みのある物体を探索する時間)/全探索時間。

【0176】

<データ分析>：Graphpad/Prismコンピュータソフトウェアを統計分析に使用する。ノンパラメトリック分散分析(Kruskal Wallis試験)を行い、これに続いてノンパラメトリックMann-Whitney U試験を行って群間を比較する。値 $p < 0.05$ は統計学的に有意と考えられる。データは平均値 $\pm$ SEMとして提示される。

【0177】

〔認知試験、MWMアッセイ〕

各24マウス(すなわち各実験群からマウス2匹)、合計144匹のマウスが+4日において関与する6つの独立したトライアル。

【0178】

空間基準記憶は、場所を特定するための空間手がかりを覚えている能力を試験するプロセスである。これは、仮想の水迷路タスクを使用して、げっ歯類 (Broadbentら (2006) Learn Mem. 13 : 187 ~ 191頁) 及びヒト (Bartschら (2010) Science 328 : 1412 ~ 1415頁) において海馬により媒介される。この試験もまた学習要素を含む。

【0179】

マウスにおけるA $\beta$  icv注射は、Morris型水迷路において空間基準記憶の欠損を誘発する (Garciaら (2010) J. Neurosci. 30 : 7516 ~ 7527頁)。

【0180】

<詳細なプロトコル>：馴化トライアル(可視プラットフォーム) - Morris型水迷路 (MWM)を、Garciaら (2010) J. Neurosci. 30 : 7516 ~ 7527頁に記載されている通り実施した。実験装置は、21 で水を深さ25 cmまで含有し、水表面を介した視野を遮断するために、水性アクリル乳剤を添加することにより遮光性が付与された円形水槽 (直径=100 cm ; 高さ=50 cm) からなる。プラットフォーム (直径=10 cm) を使用し、四分円の中点に配置する。プールは、100ルクスで均一に照らされた試験部屋内に位置する。ビデオ追跡記録システムを使用して、動物の遊泳軌跡を記録する。試験の少なくとも30分前にはマウスを実験部屋に入れて、実験部屋の条件に順応できるようにする。可視プラットフォームへのナビゲーションをスペースナビゲーションの前に行って、すべてのマウスの視覚及び運動能力を評価する。マウスには、トライアル間の間隔を少なくとも1時間あけて、1日当たり4回の60秒トライアルを行う(連続して2日間)。マウスが一度プラットフォームを発見すると、30秒の追加時間の間これらを単独でプラットフォームに残す。部屋の中に追加の手がかりはない。プラットフォームの位置及び出発点は、プール4つの四分円全体にわたってランダムに分配する。60秒後、プラットフォームを発見できなかったマウスは、その場所に誘導し、30秒間プラットフォーム上に配置する。

【0181】

記憶獲得トライアル (隠されたプラットフォームを用いた学習トライアル) - これらを連続して5日間実施し、逃避潜時の定常状態に到達するために使用する。試験の少なくとも30分前にはマウスを実験部屋に入れて、実験部屋の条件に順応できるようにする。隠されたプラットフォームを水面下1 cmに浸し、1つの四分円の中点に配置する。プールは100ルクスで均一に照らされた試験部屋の中に位置し、様々な突出した視覚的手がかりを含有する。ビデオ追跡記録システムを使用して、遊泳軌跡、遊泳距離、遊泳スピード及び走触性を記録する。マウスには、トライアル間の間隔を少なくとも1時間あけて、1日当たり4回の60秒トライアルを行う。マウスは60秒間自由に泳がせ、追加の30秒間隠されたプラットフォーム上に単独で放置し、次いでトライアル間の間隔の間にこれらのホームケージに戻す。開始位置 (四分円の境界にセットする) は各動物に対してランダムに選択する。各トライアルにおいて、隠されたプラットフォーム上に脱出するのに必要とされる時間を記録する。60秒後、プラットフォームを発見できなかったマウスは、プラットフォームに誘導し、30秒配置してから、これらのホームケージに戻す。

10

20

30

40

50

## 【0182】

記憶保持トライアル（プローブトライアル、プラットフォームなし）-最後のトレーニングセッションの2日後これらを実施する。今回もまた試験の少なくとも30分前には、マウスを実験部屋に順化させる。プラットフォームを除去し、各動物には60秒間の遊泳が許される。トライアルの間、標的の四分円内で費やした時間、反対の四分円内で費やした時間、及び以前のプラットフォームの場所の横断を測定し、ビデオ追跡記録でモニターする。

## 【0183】

<データ分析>：Graphpad/Prismコンピュータソフトウェアを統計分析に使用する。ノンパラメトリック分散分析（Kruskal Wallis試験）を行い、これに続いて、群間の比較のためノンパラメトリックMann-Whitney U試験を行う。値 $p < 0.05$ は統計学的に有意と考えられる。データは平均値 $\pm$ SEMとして提示される。

10

## 【0184】

〔組織サンプリング〕

マウスを+17日に 殺した。

## 【0185】

<血液試料の収集>：麻酔下でマウスを脱血する。1 mLシリンジで、大静脈からおよそ600  $\mu$ Lの全血を採取した。血液をBD Microtainer K2Eチューブ（ref. 365975）又はSarstedt LiHeミクロチューブ（ref. 41.1503.005）に収集した。チューブを穏やかに反転し、試料を氷上に配置した。Microtainerを4 で5分間、8600 gで遠心分離した。およそ250  $\mu$ Lの血漿をエッペンドルフチューブに移し、さらなる分析用に-80

20

## 【0186】

<脳試料の収集>：血液採取後、マウスは、0.9 %生理食塩水で心臓内を瞬間灌流した。全脳を取り出し、脳半球を分離した。反対側の左脳半球を液体窒素中で瞬間冷凍し、-80 でさらなる分析（すなわち化合物曝露）のために貯蔵した。同側の右脳半球を使用して、海馬、前頭前皮質、及び皮質を単離した。冷却した担体上ですべての脳構造を単離し、液体窒素中で瞬間冷凍した。

## 【0187】

結果

30

〔空間作業記憶に対する本発明の化合物の作用〕

ビヒクル又はA Oのいずれかのicv注射の4日後、マウスの空間作業記憶に対するドネコプリド及びフルコプリドの作用を決定するため、Y迷路試験を実施した。5分間トライアルの間、動物はY迷路デバイスを探索させ、実験手順に記載されている通り、交替行動を採点した。

## 【0188】

ビヒクル対照群（群A）からのマウスは、Y迷路の探索において、正常な行動を示し、交替行動は $68.0 \pm 3.0$  %であった。これらの結果は同様の対照群の過去の観察と一致する（Garciaら（2010）J. Neurosci. 30 : 7516 ~ 7527頁を参照されたい）。

## 【0189】

40

予想された通り、A O（群B）の単回icv注射は、ビヒクル対照マウスと比較して、Y迷路試験における認知パフォーマンスの有意な機能障害をもたらし（ $p=0.0026$ ）、交替は $54.0 \pm 2.0$  %のみであった。

## 【0190】

ドネペジルを経口投薬し、A Oをicv注射した陽性対照マウス（群C）は、対照マウスとは区別ができず（ $66.1 \pm 1.8$  %の交替行動）、A O注射したマウスとは統計的に異なった（ $p=0.0011$ ）。ドネペジルをip投薬し（急性的に）、A Oをicv注射した陽性対照マウス（群L）は、対照マウスとは統計的に異なり（ $p=0.0278$  ;  $60.8 \pm 1.9$  %の交替行動）、またA Oを注射したマウスとも統計的に異なった（ $p=0.0421$ ）。

## 【0191】

50

ドネコプリド (9 mg/kg/日) を投薬し、ピヒクルをicv注射したマウス (群D) は、 $59.3 \pm 4.0$  %の交替行動を示し、これは対照マウスとも異ならず ( $p=0.2640$ )、A Oを注射したマウスとも異ならなかった ( $p=0.5371$ )。

【0192】

フルコプリド (9 mg/kg/日) を投薬し、ピヒクルをicv注射したマウス (群E) は、 $63.1 \pm 2.3$  %の交替行動を示し、これは対照マウスと異ならず ( $p=0.1166$ )、A Oを注射したマウスとは異なった ( $p=0.0111$ )。

【0193】

マウスには用量を漸増させたドネコプリド (1、3及び9 mg/kg/日) を投薬し、A Oをicv注射した (それぞれ、群F、G及びH)。3 mg/kg/日の用量で、ドネコプリドは、A O誘発性の空間作業記憶の機能障害を阻害した。実際に、群Gのマウスは、 $65.5 \pm 4.4$  %の交替行動を示し、これは対照マウスと異ならず ( $p=0.5543$ )、A Oを注射したマウスとは異なった ( $p=0.0137$ )。1 mg/kg/日の用量でドネコプリドは、空間作業記憶のA O誘発性機能障害に対する作用はなかった。これらのマウスは $56.6 \pm 3.7$  %の交替行動を示し、これは対照マウスと異なり ( $p=0.0488$ )、A Oを注射したマウスと異ならなかったからである ( $p=0.6859$ )。より高い異質性により、群Hのマウス (ドネコプリド、9 mg/kg/日を投薬) は、中間表現型を示し、交替行動は $64.3 \pm 5.1$  %であり、これは対照マウスと異ならず ( $p=0.5994$ )、またA Oを注射したマウスとも異ならなかった ( $p=0.1316$ )。

10

【0194】

マウスには用量を漸増させたフルコプリド (1、3及び9 mg/kg/日) を投薬し、A Oをicv注射した (それぞれ、群I、J及びK)。1及び3 mg/kg/日の用量で、フルコプリドは、空間作業記憶のA O誘発性機能障害を阻害した。実際に、群I及びJのマウスは、 $67.1 \pm 2.7$  %及び $65.3 \pm 4.1$  %の交替行動をそれぞれ示し、これは対照マウスと異ならず (群I及びJに対してそれぞれ $p=0.9754$ 及び $p=0.6936$ )、A Oを注射したマウスとは異なった (群I及びJに対してそれぞれ $p=0.0029$ 及び $p=0.0454$ )。対照的に、9 mg/kg/日の用量で、フルコプリドは空間作業記憶のA O誘発性機能障害からマウスを保護することができなかった。実際に、群Kのマウスは、 $59.1 \pm 3.0$  %の交替行動を示し、これは対照マウスとは異なるが ( $p=0.0290$ )、A Oを注射したマウスとは異なる ( $p=0.2346$ )。

20

30

【0195】

〔本発明の化合物の学習能力及び長期記憶に対する作用〕

本発明の化合物の学習能力及び長期記憶に対する作用を決定するため、MWM試験を、ピヒクル又はA Oのいずれかのicv注射の+3~+14日後に実施した。

【0196】

< 馴化トライアル >

第1ステップにおいて (ピヒクル又はA Oのicv点滴の+3日及び+4日後に馴化トライアルを実施した)、他の視覚的手がかりの不在下で、水から可視プラットフォームへと脱出するためにマウスを訓練した。これらのトライアルの間、逃避潜時、遊泳距離及び遊泳スピードを記録した。逃避潜時において群間の有意な差異はなかった。遊泳スピード又は遊泳距離における差異は検出されなかった。

40

【0197】

全体で、これらのデータは、処置が、水から脱出するためのマウスの物理的能力にも、モチベーションにも影響を与えなかったことを示唆している。

【0198】

< 学習トライアル >

マウスの学習能力を5日間連続してモニターした (ピヒクル又はA Oのicv点滴の+7日から+11日後)。動物には、1日当たり4回のトライアルを実施し、視覚的手がかりを使用して、隠されたプラットフォームを突き止めるよう訓練した。これらの学習トライアルの間、逃避潜時、遊泳距離及び遊泳スピードを記録した。

50

## 【0199】

トライアル開始の時点で、平均逃避潜時における群間での統計学的に有意な差異はなかった。よって、すべての群はある程度の学習を示していたように見えた。

## 【0200】

ビヒクル対照群のマウス（群A）はプラットフォームの位置の特定を効率的に学習し、トレーニングの5日後（第5日）、マウスは $11.7 \pm 1.5$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.00031$ ）。対照的に、A Oを注射したマウス（群B）は、トレーニングの5日後、行動障害を示し、 $17.3 \pm 2.0$ 秒の平均逃避潜時をもたらした（ $p=0.4537$ 、第1日から異ならない、 $p=0.00293$ 、対照マウスからは有意に異なる）。

## 【0201】

ドネペジルを亜慢性的に投薬（po）し、A Oをicv注射したマウス（群C）は、プラットフォーム位置の特定を効率的に学習した。5日間のトレーニング後（第5日）、マウスは $14.7 \pm 1.9$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.09593$ ）。第5日において、これらのパフォーマンスは対照マウスと異ならず（ $p=0.2188$ ）、A Oを注射したマウスと異ならなかった（ $p=0.3477$ ）。

## 【0202】

急性的に（試験当日に）ドネペジル（ip）を投薬し、A Oをicv注射したマウス（群L）は、プラットフォーム位置の特定を効率的に学習した。トレーニングの5日後（第5日）、マウスは $13.4 \pm 1.5$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.01573$ ）。第5日に、これらのパフォーマンスは対照マウスと異ならず（ $p=0.4187$ ）、A Oを注射したマウスと異ならなかった（ $p=0.1272$ ）。

## 【0203】

ドネコプリド（9 mg/kg/日）又はフルコプリド（9 mg/kg/日）を投薬し、ビヒクルをicv注射した（それぞれ群D及びE）マウスは正常な認知パフォーマンスを示した。トレーニングの5日後（第5日）、ドネコプリドを投薬したマウスは $13.0 \pm 1.7$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.01778$ ）。第5日において、これらのパフォーマンスは、対照マウス（ $p=0.5476$ ）と異ならず、A Oを注射したマウス（ $p=0.10731$ ）と異ならなかった。トレーニングの5日後（第5日）、フルコプリドを投薬したマウスは $16.3 \pm 2.0$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.04439$ ）。第5日において、これらのパフォーマンスは対照マウスと異なり（未知の理由による）（ $p=0.06709$ ）、A Oを注射したマウスと異ならなかった（ $p=0.7235$ ）。第4日において、フルコプリドが $14.2 \pm 1.9$ 秒の平均逃避潜時を示し、これは対照マウスと異ならず（ $p=0.7933$ ）、A Oを注射したマウスと異ならなかった（ $p=0.1225$ ）ことは注記する価値がある。

## 【0204】

マウスには用量を漸増させたドネコプリドを投薬し、A Oをicv注射した（群F、G及びH）。ドネコプリドの存在（3 mg/kg/日の用量）は、A Oを注射したマウスと比較して、マウスの学習能力の改善をもたらした。実際に、群Gのマウスは、トレーニングの5日後、 $12.7 \pm 1.5$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.02933$ ）。これらのパフォーマンスは対照マウスと異ならなかったが（ $p=0.6284$ ）、A Oを注射したマウスとは異なった（ $p=0.07381$ ）。

## 【0205】

マウスには用量を漸増させたフルコプリドを投薬し、A Oをicv注射した（群I、J及びK）。フルコプリドの存在（1及び3 mg/kg/日の用量）は、A Oを注射したマウスと比較して、マウスの学習能力の改善をもたらした。ただし、9 mg/kg/日の用量での化合物は作用がなかった。フルコプリド、1 mg/kg/日を投薬したマウスは、トレーニングの5日後、 $13.1 \pm 1.1$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.03759$ ）。これらのパフォーマンスは、対照マウスと異ならなかったが（ $p=0.4367$ ）、A Oを注射したマウスとは異なった（ $p=0.07422$ ）。同様に、フルコプリド、3 mg/kg/日を投薬したマウスは、トレーニングの5日後、 $12.5 \pm 1.1$ 秒の平均逃避潜時を示した（第1日と比較して $p=0.00146$ ）。これらのパフォーマンスは、対照マウスと異ならなかったが（ $p=0.64$

10

20

30

40

50

77)、A Oを注射したマウスとは異なった ( $p=0.04328$ )。

【0206】

<プロブトライアル>

最後のトレーニングセッションから4日後及びビヒクル又はA Oのicv注射から14日後に長期記憶パフォーマンスを決定した。プラットフォームを取り除き、各動物を60秒間遊泳させた。プロブトライアルの間、プールの様々な四分円の中で費やした時間、以前のプラットフォームの場所を横断した数及び最初の横断の時間(すなわち標的に対する反応潜時)を決定した。プロブトライアルの間、遊泳スピードの差異は群間で観察されず、正常な物理的能力及びモチベーションを示した。

【0207】

横断の数 - ビヒクル対照群のマウス(群A)は、平均横断数が $5.3 \pm 0.6$ であり、正常な行動を示した(図3)。これらの結果は同様の対照群の過去の観察と一致する。予想されたように、A Oの単回icv注射(群B)は、ビヒクル対照マウスと比較して認知パフォーマンスの有意な機能障害をもたらし、平均横断数は $2.2 \pm 0.4$ に低減した(対照マウスと比較して $p=0.0010$ )。

【0208】

ドネペジル(po)を亜慢性的に投薬し、A Oをicv注射したマウス(群C)は、改善された行動を示し、平均横断数は $3.7 \pm 0.4$ であった。これらのマウスはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.0502$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0214$ )。同様に、ドネペジル(ip)を急性的に投薬し(試験当日に)、A Oをicv注射したマウス(群L)は、改善された行動を示し、平均横断数は $3.8 \pm 0.4$ であった。これらのマウスはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.0857$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0159$ )。

【0209】

ビヒクルの存在下で、ドネコプリド(9 mg/kg/日)又はフルコプリド(9 mg/kg/日)投薬したマウス(それぞれ群D及びE)は、正常な認知パフォーマンスを示し、平均横断数は $4.6 \pm 0.5$ 及び $4.6 \pm 0.7$ であった。これらのマウスはビヒクル対照マウスと異ならず(ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.4003$ 及び $p=0.3945$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった(ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.0026$ 及び $p=0.0077$ )。

【0210】

マウスには用量を漸増させたドネコプリドを投薬し、A Oをicv注射した(群F、G及びH)。ドネコプリドの存在(すべての用量で)は、横断数を使用して評価した長期記憶のA O誘発性機能障害の阻害をもたらした。最大作用には3 mg/kg/日の用量で到達した(群G)。実際に、これらのマウスは、正常な行動を示し、平均横断数は $5.1 \pm 0.6$ であり、これはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.6575$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0018$ )。

【0211】

マウスには用量を漸増させたフルコプリドを投薬し、A Oをicv注射した(群I、J及びK)。フルコプリドの存在(すべての用量で)は、横断数を使用して評価した長期記憶のA O誘発性機能障害の阻害をもたらした。最大作用には3 mg/kg/日の用量で到達した(群J)。実際に、これらのマウスは、平均横断数が $4.1 \pm 0.6$ であり、正常な行動を示し、これはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.1668$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0242$ )。

【0212】

標的に対する反応潜時 - ビヒクル対照群のマウス(群A)は、正常な行動を示し、標的に対する平均反応潜時は $12.0 \pm 1.9$ 秒であった。これらの結果は同様の対照群の過去の観察と一致している。予想されたように、ビヒクル対照マウスと比較して認知パフォーマンスの有意な機能障害をもたらし、A Oの単回icv注射(群B)は、標的に対する平均反応潜時が $24.4 \pm 4.7$ 秒に増加した(対照マウスと比較して $p=0.0074$ )。

10

20

30

40

50

## 【0213】

亜慢性的にドネペジル (po) を投薬し、A Oをicv注射した (群C) マウスは、改善された行動を示し、標的に対する平均反応潜時は $14.6 \pm 2.7$ 秒であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず ( $p=0.6860$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった ( $p=0.0272$ )。同様に、急性的に (試験当日に) ドネペジル (ip) を投薬し、A Oをicv注射した (群L) マウスは、改善された行動を示し、標的に対する平均反応潜時は $13.3 \pm 2.3$ 秒であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず ( $p=0.9264$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった ( $p=0.0028$ )。

## 【0214】

ビヒクルの存在下でドネコプリド (9 mg/kg/日)又はフルコプリド(9 mg/kg/日)を投薬したマウス (それぞれ群D及びE) は、正常な認知パフォーマンスを示すことが判明し、標的に対する平均反応潜時は $7.2 \pm 1.5$ 秒及び $12.0 \pm 2.1$ 秒であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず (ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.0524$ 及び $p=0.7582$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった (ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.0017$ 及び $p=0.0082$ )。 10

## 【0215】

マウスには用量を漸増させたドネコプリドを投薬し、A Oをicv注射した (群F、G及びH)。ドネコプリドの存在 (すべての用量で) は、標的に対する反応潜時を使用して評価した長期記憶のA O誘発性機能障害の阻害をもたらした。最大作用には1 mg/kg/日の用量で到達した (群F)。実際に、これらのマウスは、正常な行動を示し、標的に対する平均反応潜時は $9.3 \pm 1.4$ 秒であり、これはビヒクル対照マウスと異ならず ( $p=0.2548$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった ( $p=0.0005$ )。 20

## 【0216】

マウスには用量を漸増させたフルコプリドを投薬し、A Oをicv注射した (群I、J及びK)。フルコプリドの存在 (9 mg/kgの用量のみ) は、標的に対する反応潜時を使用して評価した長期記憶のA O誘発性機能障害の阻害をもたらした。実際に、群Kのマウスは、正常な行動を示し、標的に対する平均反応潜時は $10.7 \pm 1.9$ 秒であり、これはビヒクル対照マウスと異ならず ( $p=0.6891$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった ( $p=0.031$ )。 30

## 【0217】

四分円内での時間 - ビヒクル対照群のマウス (群A) は、標的四分円の中で有意により多く時間を費やした (反対の四分円の中で費やした時間と比較して $p=0.0001$ )。これらの結果は同様の対照群の過去の観察と一致する。予想されたように、A Oの単回icv注射 (群B) は、ビヒクル対照マウスと比較して、認知パフォーマンスの有意な機能障害をもたらし、標的四分円の中よりも反対の四分円の中でより多くの時間を費やした (標的四分円対反対の四分円の中で費やした時間を比較した場合、 $p=0.0779$ )。ドネペジルの亜慢性又は急性の投薬 (群C及びL) は、異なる四分円の中で費やした時間を読み取り値として使用すると、長期記憶のA O誘発性機能障害を改善できなかった。同様に、ドネコプリド及びフルコプリドは、プローブ試験の間四分円の訪問頻度を改善しなかった。 40

## 【0218】

〔認識記憶に対する本発明の化合物の作用〕

認識記憶に対する試験項目の作用を決定するため、ビヒクル又はA Oのいずれかのicv注射から16日後、NOR試験を実施した。行動トリアルは、実験手順に記載されている通り実施した。

## 【0219】

ビヒクル対照群のマウス (群A) は、平均識別指数が $0.35 \pm 0.04$ であり、正常な行動を示した。これらの結果は同様の対照群の過去の観察と一致する。予想されたように、A Oの単回icv注射 (群B) は、ビヒクル対照マウスと比較して、認知パフォーマンスの有意な機能障害 ( $p=0.0001$ ) をもたらし、平均識別指数は $-0.01 \pm 0.03$ であった。A Oを注射したマウスは、新奇物体と馴染みのある物体とを区別することができなかった。 50

## 【0220】

亜慢性的にドネペジル(po)を投薬し、A Oをicv注射したマウス(群C)は、正常な行動を示し、平均識別指数が $0.29 \pm 0.09$ であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.7439$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0192$ )。

## 【0221】

急性的に(試験当日に)ドネペジル(ip)を投薬し、A Oをicv注射したマウス(群L)は、正常な行動を示し、平均識別指数は $0.30 \pm 0.07$ であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.9158$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0030$ )。

## 【0222】

ビヒクルの存在下でドネコプリド(9 mg/kg/日)又はフルコプリド(9 mg/kg/日)を投薬したマウス(それぞれ群D及びE)は、正常な認知パフォーマンスを示すことが判明し、平均識別指数は $0.29 \pm 0.04$ 及び $0.36 \pm 0.06$ であった。これらのマウスは、ビヒクル対照マウスと異ならず(ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.3071$ 及び $p=0.8205$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった(ドネコプリド及びフルコプリドに対してそれぞれ $p=0.0007$ 及び $p=0.0003$ )。

## 【0223】

マウスには用量を漸増させたドネコプリドを投薬し、A Oをicv注射した(群F、G及びH)。ドネコプリドの存在(すべての用量で)は、認知記憶のA O誘発性機能障害の用量依存性阻害をもたらした。最大作用には9 mg/kg/日の用量で到達した(群H)。実際に、これらのマウスは、正常な行動を示し、平均識別指数は $0.43 \pm 0.06$ であり、これはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.3440$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0003$ )。

## 【0224】

マウスには用量を漸増させたフルコプリドを投薬し、A Oをicv注射した(群I、J及びK)。フルコプリドの存在(すべての用量で)は、認知記憶のA O誘発性機能障害の用量依存性阻害(ベル型曲線)をもたらした。最大作用は3 mg/kg/日の用量で到達した(群J)。実際にこれらのマウスは、正常な行動を示し、平均識別指数は $0.46 \pm 0.05$ であり、これはビヒクル対照マウスと異ならず( $p=0.1039$ )、A O注射したマウスとは有意に異なった( $p=0.0003$ )。

## 【0225】

結論

全体で、これらのデータはドネコプリド及びフルコプリドの両方がA Oを投与したマウスの認知パフォーマンスを改善させたことを強く示唆している。

## 【0226】

(実施例3)

本実施例は、アルツハイマー病の5XFADマウスモデルへの慢性投与において、ドネコプリド及びフルコプリドの抗記憶喪失、抗アミロイド及び抗炎症性作用を示すものである。

## 【0227】

研究の論理的根拠

この研究の目的は、アルツハイマー病のマウスモデルにおける慢性投与において、ドネコプリド及びフルコプリドの潜在的な抗記憶喪失、抗アミロイド及び抗炎症性作用を評価することであった。

## 【0228】

使用したマウスモデルは、5XFAD系統であった(Jackson Laboratory社において、「B6SJL-Tg(APP<sup>SwFILon</sup>,PSEN1<sup>\*M146L</sup>\*L286V)6799Vas/mMjax」、MMRRC Stock No: 34840-JAX又は「B6.Cg-Tg(APP<sup>SwFILon</sup>,PSEN1<sup>\*M146L</sup>\*L286V)6799Vas/mMjax、MMRRC Stock No: 34848-JAXと称される)。

## 【0229】

これらの5XFADトランスジェニックマウスは、2つのFAD突然変異、M146L及びL286

10

20

30

40

50

Vを持つヒトPS1と共に、スウェーデン (K670N、M671L)、フロリダ (I716V)、及びロンドン (V717I) の家族性アルツハイマー病 (FAD) 突然変異を有する突然変異体ヒトAPP(695) を過剰発現する。両方の導入遺伝子をマウスThy1プロモーターで調節して、脳内の過剰発現を促進させる。5XFADマウスは、アルツハイマー病アミロイド病理の主要な特徴を反復し、神経細胞内のAβ42誘発性神経変性及びアミロイド斑形成の有用なモデルである。

#### 【0230】

##### 方法及び実験計画法

###### 〔マウス〕

動物実験は、1986年11月24日の欧州共同体理事会 (the Council of the European Communities) による指令 (86/609/EEC) に従い行った。動物の苦痛を最小化し、使用するマウスの数を減少させるようあらゆる努力を払った。5XFADマウスの生成はOakleyら (2006) J. Neurosci. 26: 10129~10140頁に記載されている。これらのトランスジェニックマウスは、スウェーデン (K670N、M671L)、フロリダ (I716V) 及びロンドン (V717I) の家族性AD (FAD) 突然変異を持つヒトAPP(695)と、2つのFAD突然変異M146L及びL286Vを持つヒトプレセニン1 (PS1) の両方を過剰発現する。両方の導入遺伝子の発現は、マウスThy1プロモーターのニューロン特異的エレメントにより調節される。5XFAD系統(B6/SJL遺伝的バックグラウンド)は、半接合体トランスジェニックマウスをB6/SJL F1ブリーダーと交配することにより維持された。5XFAD系統 (C57BL/6J遺伝的バックグラウンド) は、半接合体トランスジェニックマウスをC57BL/6J F1ブリーダーと交配することにより維持された。すべての動物は、テールゲノムDNAを使用したPCRにより遺伝子型を決定した。トランスジェニック及びWTマウスを発明者らの動物施設内で飼育し、食物及び水を自由に摂取させ、12時間の明暗サイクル下、22~24 週で飼育した。雌の5XFADマウスをこの研究に使用した。各実験に対して、マウスの年齢は月で示される(2週間区切りで)。

#### 【0231】

###### 〔薬物〕

ドネコプリド (ドネコプリドフマレート、MR31155) 及びフルコプリド (フルコプリドフマレート、MR31193) は、CERMN、Caen、Franceにおいて合成された。

#### 【0232】

RS 67333 (1-(4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシ-フェニル)-3-(1-ブチル-4-ピペリジニル)-1-プロパノン) を基準5-HT<sub>4</sub>受容体アゴニストとして使用し、Tocris Bioscience (R&D Systems Europe社、Lille、France) から購入した。

#### 【0233】

投与前、化合物をDMSO (37.5 µg/µl、-20 °Cで貯蔵) に再懸濁させ、0.9 %NaCl中で1:250に新たに希釈した。ピヒクル溶液 (0.9 %NaCl、0.4 %DMSO) を対照として使用した。

#### 【0234】

###### 〔動物の処置〕

5XFADマウスは、2つの異なるプロトコルに従い、薬物又はピヒクルで慢性的処置を施した。各実験では、薬物又はピヒクル溶液を週2回i.p.投与した (1 mg/kg)。「プロトコル1」では、マウス (n=1群当たり6~7匹のマウス) は、月齢2カ月から4カ月まで2カ月間化合物で処置した。「プロトコル2」では、マウス (n=7) は、月齢1カ月から4カ月まで3カ月間化合物で処置した。各プロトコルの終わりに、マウスを100 mg/kgケタミン及び10 mg/kgキシラジンの生理食塩水中混合物で麻酔下におき、PBSを経心灌流した。脳を氷上にすばやく単離し、嗅球及び小脳を取り除き、2つの脳半球を分割した。一方の脳半球をドライアイス上で凍結し、生化学的分析用に-80 °Cで貯蔵し、他方は免疫組織化学法(IHC)用に4 %PFA中に後固定した。

#### 【0235】

###### 〔脳脊髄液(CSF)の収集〕

マウスを麻酔下におき、定位固定装置に載せた。頸部皮膚を切り取り、マイクロトラクター (Fine Science Tools社、Heidelberg、Germany) の助けを受けて皮下組織及び筋肉を分離した。次いで、マウスを寝かせて、身体に対して頭部が約135°の角度を形成するように置いた (Liu及びDuff (2008) J. Vis. Exp. 10:960頁)。キャピラリーチューブ (ボロシリケートガラス、B100-75-10、Sutter Instruments社、Novato、California、USA) を使用して、大槽の硬膜に穴を開けた。キャピラリー作用によりCSFを収集し、0.5 mLマイクロチューブに移し、直ちにドライアイス上で凍結し、使用時まで-80 で貯蔵した。解凍したら、国際出願WO2008/009868号に記載されている通り、試料を60 で5分間加熱し、さらなる冷凍-解凍サイクルなしに分析した。

#### 【0236】

10

##### 〔脳抽出物の調製〕

5XFADマウス及び対照の脳の脳半球、前頭皮質及び海馬を解凍し、秤量し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Applied Science社、Meylan、France) を有する4容量のトリス-生理食塩水 (50 mM トリス-HCl pH=7.4、150 mM NaCl) 中でホモジナイズした。生成したホモジネートを54,000 × gで20分間遠心分離し、上清 (「可溶性画分」) を収集し、貯蔵用に-80 でアリコートした。短い超音波処理で、50 mM トリス-HCl、pH=7.6中の10容量の6MグアニジンHClにペレットを再懸濁させ、再度26,500 × gで20分間遠心分離した。上清 (「不溶性画分」) をアリコートし、-80 で貯蔵した (Morishima-Kawashimaら (2000) Am. J. Pathol. 157:2093~2099頁)。

#### 【0237】

20

##### 〔A<sub>40</sub>及びA<sub>42</sub>の定量化〕

A<sub>40</sub> (ヒトアミロイド (1-40)アッセイキット、#27713) 又はA<sub>42</sub> (ヒトアミロイド (1-42)アッセイキット、#27719) の投与のためのIBL International (Hamburg、Germany) 製ELISAキットを製造者の指示書に従い使用した。Infinite 2000ルミネセンスカウンターを使用して、反応を620 nm及び450 nmで読み取った。入手した値を各試料のタンパク質濃度に正規化し、BCAタンパク質アッセイ (Sigma-Aldrich) を使用して測定した。

#### 【0238】

##### 〔免疫組織化学法〕

ビプラトーム (Microm HM 650V、Thermo Scientific社、Saint Herblain、France) を使用して30マイクロメートルの厚さの切片を切り取り、凍結防止剤培地内で、-20 で貯蔵した。アミロイド斑の標識のため、前頭皮質、海馬及び嗅内皮質の浮遊性組織切片 (ブレグマからの座標: 前頭皮質=1.98 mm、海馬=-1.94 mm、嗅内皮質=-3.08 mm) をPBS中で十分に洗浄し、次いでブロッキング溶液 (PBS; 3 %BSA; 0.1 %Triton X-100) 中で1時間インキュベートした。切片を、細胞核を検出するためにHoechst色素 (1:1000、Life Technologies社、Saint Aubin、France) で15分間染色して、次いで新たに調製したチオフラビンT溶液 (#T3516-5G、Sigma-Aldrich) (最終濃度: ブロッキング緩衝液中0.01 mg/ml) で15分間染色した。70 %エタノール中で5分間洗浄後、試料を、カバーガラスを有するポリ-リジンスライド上にマウントした。GFAP (グリア細胞繊維性酸性タンパク質) 染色のため、浮遊性脳切片を前の通りブロッキングし、ポリクローナルウサギ抗GFAP (1:1000、Z0334、Dako社、Les Ulis、France) と共に4 で終夜インキュベートした。チオフラビンT染色及び70 %エタノールでの洗浄後、2次Alexafluor 594ヤギ抗ウサギ抗体 (1:1000、A11012、Life Technologies社) を2時間の間加えた。PBS洗浄及びマウンティングを前に記載された通り実施した。

30

40

#### 【0239】

##### 〔画像取得及び分析〕

Axiolmager Z1顕微鏡 (Carl Zeiss S.A.S.社、Marly le Roi、France) を用いて画像を取得した。チオフラビンT染色の分析を無分別に実施した。データは、同じ脳領域/動物からの2~3枚の組織切片中の1 mm<sup>2</sup>当たりの粒子の平均数として提示される (Im

50

age Jソフトウェア)。Image Jソフトウェアを使用してGFAP発現を定量化し、結果を面積率として表現する。

【0240】

〔新奇物体認識試験〕

新奇物体認識 (NOR) 試験を使用して、マウスの認知パフォーマンスを試験した (Bevin s及びBesheer (2006) Nat. Protoc. 1: 1306~1311頁)。試験開始前の薬物処置中、動物には十分に注意を払った。マウスは、毎日試験の少なくとも1時間前には試験部屋に慣らした。試験は、薄暗い明かりの部屋の中に配置されたPlexiglasボックス (幅: 35 cm、長さ: 20 cm、高さ: 20 cm) 内で行った。第1日及び第2日には、各マウスを空のボックスに10分/日慣らした。第3日には、2つの物体 (プラスチックのおもちゃで作られたもの) をケージ内、向かいの壁から5 cm離して配置した。トレーニングセッション中、各動物を壁に向いている2つの物体の間に配置し、次いで5分間物体を探索させた。次いで、マウスをこれらのホームケージに戻し、24時間後に5分間の試験セッションを行い、このセッションでは2つの(馴染みのある)物体のうちの1つを新しい(新奇の)ものに置き換えた。全体の実験をビデオに記録し、物体探索 [マウスの鼻を物体に接触させることで費やした時間又は 1 cmの距離でにおいを嗅ぐことにより費やした時間] を無分別に測定した。2つのパラメーターが考えられた: 試験中の全探索時間 ([新奇/(馴染みのある+新奇)] × 100) に対して、1) トレーニングセッション中、動物が2つの馴染みのある物体と触れ合うことに費やした探索時間(秒)、及び2) 動物が新奇の物体と触れ合うことに費やした探索時間。識別指数もまた計算した ([新奇-馴染みのある]/[馴染みのある+新奇])。 10

【0241】

〔統計分析〕

すべての値は平均 ± SEMとして表現される。処置の有意な作用を、複数の比較群の事例において、ANOVA分析これに続くテューキーのポストホック検定で決定した。他のすべての事例では、不对スチューデントのt検定を使用した。すべての統計試験に対して、P 0.05が有意であると考えられた。分析はGraphPad Prism 7 (GraphPad Software社、La Jolla、CA) で実施した。 20

【0242】

結果

〔5XFAD脳におけるアミロイド負荷に対するドネコプリド及びフルコプリドの作用〕  
27匹の雌の5XFADマウス (B6/SJL遺伝的バックグラウンド) をこの研究に使用した。マウスにはビヒクル又は化合物(1 mg/kg) i.p.を週2回2カ月間、月齢2~4カ月の間与えた。 30

【0243】

A<sub>40</sub>及びA<sub>42</sub>は、溶解性及び不溶性画分において、脳抽出物から定量化した。結果はビヒクルの%として表現される。

【0244】

得られた結果は以下の表6に提示されている:

【0245】

10

20

30

40

50

## 【表 7】

表 6: A $\beta$ <sub>40</sub> 及び A $\beta$ <sub>42</sub> レベル (対照の%)

	可溶性画分			不溶性画分		
	A $\beta$ <sub>40</sub>	SEM	n	A $\beta$ <sub>40</sub>	SEM	n
ビヒクル	100.00	11.38	7	100.00	14.56	7
ドネコプリド	110.18	10.68	7	79.97	6.40	7
フルコプリド	110.51	16.67	7	97.16	10.43	7
	A $\beta$ <sub>42</sub>	SEM	n	A $\beta$ <sub>42</sub>	SEM	n
ビヒクル	100.00	11.26	6	100.00	6.70	7
ドネコプリド	65.93*	8.36	7	67.85*	12.59	6
フルコプリド	30.19****	8.04	7	73.16	4.62	7

\*: ビヒクルに対して  $p < 0.05$ 、一元 ANOVA これに続くテューキーの検定により決定。

## 【0246】

表 6 に提示されたビヒクル群の値は以下の通りであった：

\* 可溶性画分：

- ・ A<sub>40</sub> =  $9.48 \pm 1.08 \mu\text{g}/\text{mg}$  のタンパク質、
- ・ A<sub>42</sub> =  $0.24 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$  のタンパク質、

\* 不溶性画分：

- ・ A<sub>40</sub> =  $0.68 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{mg}$  のタンパク質、
- ・ A<sub>42</sub> =  $10.84 \pm 0.73 \mu\text{g}/\text{mg}$  のタンパク質。

## 【0247】

< 抗アミロイド作用 >。5XFAD マウス脳 of 可溶性画分において、ドネコプリド及びフルコプリド (1 mg/kg、週 2 回) の慢性投与は、A<sub>40</sub> レベルに対してはいかなる変化もなく、A<sub>42</sub> レベルを有意に減少させることができた (ドネコプリドについては \* $p < 0.05$  対ビヒクル、及びフルコプリドについては \*\*\*\* $p < 0.0001$  対ビヒクル、一元 ANOVA これに続くテューキーの検定で決定)。同様に、不溶性画分において、ドネコプリドは、マウス脳内の A<sub>42</sub> 負荷を減少させた (\* $p < 0.05$  対ビヒクル、一元 ANOVA これに続くテューキーの検定で決定)。不溶性 A<sub>40</sub> レベルは両方の薬物の影響を受けなかった。

## 【0248】

[5XFAD マウスにおける、記憶、CSF のアミロイド負荷、アミロイド斑及びアストログリアーシスに対するドネコプリド及びフルコプリドの作用]

28 匹の雌の 5XFAD マウス (C57BL/6J 遺伝的バックグラウンド) を本研究に使用した。マウスには、週 2 回、3 カ月間、月齢 1 カ月から 4 カ月までビヒクル又は化合物 (1 mg/kg) i.p. を与えた。

## 【0249】

処置の終わりに、新奇物体認識試験 (NOR) において長期記憶パフォーマンスに対してマウスを評価した。セッション間の間隔は 24 時間であった。トレーニングセッション中 10 秒未満の間、2 つの物体のいずれかを探索する又は両方の物体を探索することができなかったマウスはならず、すべてのマウスがデータ分析に含まれた。

## 【0250】

< 抗記憶喪失症作用 >。月齢 1 カ月の 5XFAD 雌及び WT 同腹子を RS 67333、ビヒクル、ドネコプリド又はフルコプリド (1 mg/kg、週 2 回 3 カ月) で処置し、次いで認識記憶を新奇物体認識 (NOR) 試験で評価した。急性作用による妨害を回避するため、処置終

10

20

30

40

50

了の3日後に馴化セッションを開始した。トレーニングセッション及び試験間の間隔は24時間であった。ビヒクル処置したマウスは記憶パフォーマンスの損失を提示し、同様の探索時間及び非有意な識別指数で示されている通り、新奇物体と馴染みのある物体とを区別することができなかった。RS 67333での処置は、ビヒクルで処置したマウスと比較して、新奇物体の探索に専念している時間のパーセンテージがより高いことにより示される通り、認知機能障害を逆転させる (\*\*p 0.01対馴染みのある物体、二元ANOVAこれに続くシダック検定により決定)。同様に、ドネコプリド及びフルコプリドによる慢性処置は、記憶改変を予防することができた (ドネコプリドについては\*\*p 0.01対馴染みのある物体、フルコプリドについては\*p 0.05対馴染みのある物体、二元ANOVAこれに続くシダック検定により決定)。3つの化合物で処理した群の識別指数は、確率レベルゼロとは異なった (不對スチューデントのt検定により決定)。トレーニングセッション中の全探索時間は、4つの群で有意に異ならず、ドネコプリド又はフルコプリドで処置した5XFADマウスにおける認識記憶改善は、探索活動の増加に続発するものではないことを示している。

10

#### 【0251】

<CSFのアミロイド負荷>。RS 67333、ドネコプリド又はフルコプリドで処置した(1 mg/kg、週2回3カ月)5XFADマウスの脳脊髄液 (CSF) 中のA<sub>42</sub>濃度は対照と比較して有意に異ならず、慢性の5-HT<sub>4</sub>受容体刺激は、CSF中のアミロイドレベルに影響を与えなかったことを示した (一元ANOVAこれに続くテューキーの検定により決定)。

#### 【0252】

<抗アミロイド作用>。前頭皮質、海馬及び嗅内皮質を、アルツハイマー病により早期に影響を受け、アミロイド堆積物を極めて豊富に含む5XFADマウス脳(前頭、中央及び尾側のセクション)及びヒト脳領域の代表的領域として分析した。

20

#### 【0253】

ドネコプリド処置 (1 mg/kg、週2回3カ月) は、ビヒクルと比較して、前頭皮質内の (16 ± 3 %の減少、ビヒクルと比較して\*\*p 0.01) 及び嗅内皮質内の (24 ± 4 %の減少、ビヒクルと比較して\*\*p 0.01) アミロイド斑の数を有意に低減させた。プラーク数の有意な減少は、フルコプリド処置 (1 mg/kg、週2回3カ月) 後の嗅内皮質にもまた観察され、対照に対して28 ± 6 %減少した (ビヒクルと比較して\*\*p 0.01)。RS 67333-処置後 (1 mg/kg、週2回3カ月)、前頭皮質と嗅内皮質のどちらにも有意な作用は見られなかった。RS 67333、ドネコプリド又はフルコプリドで処置した (1 mg/kg、週2回3カ月) 5XFADマウスの海馬内のアミロイド斑の数は対照と比較して有意に異ならなかった。統計は一元ANOVAこれに続くテューキーの検定で決定した。

30

#### 【0254】

<抗炎症作用>。アストログリア (抗GFAP抗体、グリア細胞繊維性酸性タンパク質) の免疫組織化学評価は、ドネコプリド及びRS 67333の慢性の処置 (1 mg/kg、週2回3カ月) は、アストログリオシスを有意に減少させたことを示した (ビヒクルを与えた対照と比較して、処置した動物の脳の内嗅スライスにおいてGFAP染色がそれぞれ54 ± 10 %及び62 ± 6 %低減、ビヒクルと比較して\*p 0.01)。嗅内皮質において、フルコプリド処置 (1 mg/kg、週2回3カ月) は、GFAP染色の51 ± 5 %の減少を誘発させ、これは有意に近いものであった (p=0.06)。しかし、RS 67333、ドネコプリド又はフルコプリド (1 mg/kg、週2回3カ月) で処置した5XFADマウスの前頭皮質又は海馬のGFAP染色は、対照と比較して、有意に異なることはなかった。統計は一元ANOVAこれに続くテューキーの検定により決定した。

40

#### 【0255】

#### 結論

この研究は、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデルである5XFADマウスへの慢性投与により、ドネコプリド及びフルコプリドが抗アミロイド作用 (A<sub>42</sub>レベル及びアミロイド斑の減少) 及び抗炎症性作用 (アストログリオシスの減少) を発揮したことを実証している。これらの作用は嗅内皮質及び前頭皮質において主に突出している。

50

更に、ドネコプリド及びフルコプリドの慢性投与は、5XFADマウスにおいて、抗記憶喪失症作用を発揮し、記憶欠損の出現を予防することができる。

【0256】

これらすべての作用は同等であり、時には、RS 67333 (基準として選択された5-HT<sub>4</sub>受容体アゴニスト)の作用より大きなものであり、ドネコプリド及びフルコプリドがアルツハイマー病に対する有望な薬物であることを指摘している。

【0257】

(実施例4)

本実施例は、上で定義された一般式(I)の複数の化合物の、アミロイドペプチドオリゴマーで被毒した海馬ニューロンに対する神経保護作用を開示するものである。

10

【0258】

材料及び方法

〔海馬ニューロンの初代培養物〕

ラットの海馬ニューロンをCallizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716 頁に記載されている通り培養した。簡単に説明すると、妊娠第17日の妊娠した雌のラット (Rats Wistar ; Janvier Labs社、France) を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して 殺した。次いで、胎児を子宮から取り出し、2 %ペニシリン (10,000 U/ml) 及びストレプトマイシン (10 mg/ml) 溶液 (PS) 及び1 %ウシ血清アルブミン (BSA) を有する、氷冷したL15 Leibovitz培地内に直ちに配置した。海馬を、37 °C で20分間、0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAの最終濃度のトリプシン-EDTA溶液で処理した。DNase I グレードII (最終濃度0.5 mg/ml) 及び10 %ウシ胎児血清 (FCS) を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の添加により、解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離した。

20

【0259】

次いで細胞を515 × gで、4 °C で10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27サプリメントの2 %溶液を有するNeurobasal培地、2 mmol/lのL-グルタミン、2 %PS溶液、及び10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子 (BDNF) からなる規定の培養用培地にペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。ポリ-L-リジンをプレコートした96ウェルプレート内に、1ウェル当たり20,000個の密度で細胞を播種し、大気 (95 %) -CO<sub>2</sub> (5 %) インキュベーター内で、37 °C で培養した。

30

【0260】

培地は2日ごとに交換した。96ウェル-プレートに対して、60ウェルのみを使用した。最初と最後のライン及びカラムのウェルは使用せず(あらゆる縁の作用を回避するため)、滅菌水を充填した。

【0261】

〔試験化合物及びヒトA<sub>β</sub> 1-42の曝露〕

< 試験化合物 > : 以下の化合物を試験した :

- MR31193
- MR31176
- MR31192、及び
- MR33583

40

< 予備インキュベーション > : 培養の第17日に、化合物を培養用培地に溶解し、A<sub>β</sub> 1-42曝露前、初代海馬ニューロンと共に1時間予備インキュベートした。

【0262】

< 損傷 > : 培養の17日後、海馬ニューロンをA<sub>β</sub> 溶液 (以下を参照されたい) に曝露した。A<sub>β</sub> 1-42調製は、Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716頁に記載されている手順に従って行った。本研究で使用されたA<sub>β</sub> 1-42のバッチ番号は10 %のオリゴマーを含有する (Combesら (2015) J. Neurosci. Res. 93 : 633 ~ 643頁で実

50

施したようにWBで定量化)。簡単に説明すると、A<sub>1-42</sub>ペプチドを上述の規定の培養用培地に初濃度40 μmol/lで溶解した。この溶液を暗所で、37 °Cで3日間穏やかに攪拌し、培養用培地内で使用される濃度へと適切に希釈した直後使用した(2 μmol/l又は0.25 μmol/lのオリゴマー(A<sub>1-42</sub>O)にそれぞれ対応する20 μmol/l又は2.5 μmol/l)。A<sub>1-42</sub>調製物を、化合物の存在下、対照培地内で希釈した最終濃度20又は2.5 μmol/lに加えた(それぞれ2 μmol/l又は0.25 μmol/lのA<sub>1-42</sub>O、自動WBにより決定)。

#### 【0263】

〔エンドポイント評価〕

被毒させてから24時間後、上清を取り出し、将来の解析的分析のために直ちに凍結した。これらを-20 °Cで6カ月まで保持した。次いで、海馬ニューロンをエタノール(95%)及び酢酸(5%)の冷たい溶液で、-20 °Cで5分間固定した。これらを再度PBS中で2回洗浄し、次いで透過処理し、0.1%のサポニン及び1%のFCSを含有するPBSの溶液を使用して、室温で15分間非特異的部位をブロッキングした。

10

#### 【0264】

<免疫染色: MAP-2/AT100> - 固定及び透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした:

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/1000希釈でのニワトリポリクローナル抗体抗微小管関連タンパク質2(MAP-2)(この抗体は細胞体及び神経突起を特異的に染色し、神経細胞消滅及び神経突起ネットワークの研究を可能にする); 並びに

20

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/100希釈でのマウスモノクローナル抗体抗ホスタウ(AT100)。

#### 【0265】

これらの抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ニワトリIgGに室温で1時間曝露した。

#### 【0266】

各条件に対して、ImageXpress(登録商標)(Molecular Devices社)を使用して、20×倍率で1ウェル当たり30枚の像を撮った(全体のウェル領域を表すもの)。すべての画像は同じ取得パラメーターを使用して生成した。Custom Module Editor(登録商標)(Molecular Devices社)により、画像から分析を直接的及び自動的に実施した。以下の読み取り値を調査した:

30

- ニューロンの総数(ニューロン生存数、MAP-2陽性ニューロンの数)  
 - 神経突起ネットワーク(MAP-2陽性ニューロン、単位: μm)  
 - AT100の領域(μm<sup>2</sup>、MAP-2陽性ニューロンと重複)。

#### 【0267】

免疫染色: PSD95及びSYN - 固定及び透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした:

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/200希釈でのマウスモノクローナル抗体抗シナプス後肥厚95 kDa(PSD95);  
 - 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/100希釈でのウサギポリクローナル抗体抗シナプトフィジン(SYN)。

40

#### 【0268】

これらの抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgGに室温で1時間曝露した。

#### 【0269】

各条件に対して、ImageXpress(Molecular Devices社)を使用して、40×倍率で1ウェル当たり40枚の像を撮った。すべての画像は同じ条件で撮った。Custom Module Editor(登録商標)(Molecular Devices社)を使用することにより、シナプス評価を

50

自動的に実施した。以下のエンドポイントを評価した：

- シナプスの数 (PSD95/SYNの間で重複)

〔統計分析〕

すべての値は平均値 $\pm$ SEM (平均の標準誤差) として表現される。統計分析を一元ANOVA、これに続くダネットの検定又はLSDフィッシャーの検定で実施した。p 0.05は有意であると考えられた。

【0270】

結果

以下の結果を得た。

- MR31193は強い神経保護作用を示す (生存、神経突起及びシナプスのネットワーク) 10  
。図1及び図2を見て分かる通り、作用はベル型曲線に従い、生存及び神経突起ネットワークについて最大作用は100 nMの濃度で観察された (図1A~図1C)。シナプスネットワークに対する最大作用はより低い濃度で得られた (5 nM~100 nMの間、図2)。タウ過剰リン酸化に対する有意な作用もまた観察され、最大の作用は50 nMで観察された (図1Dを参照されたい)。
- 図3及び図4を見て分かる通り、MR31176は高濃度で神経保護作用を示す (生存、神経突起及びシナプスのネットワーク。タウ過剰リン酸化に対する有意な作用もまた高濃度で観察された (図3Dを参照されたい)。
- 図5及び図6を見て分かる通り、MR31192は、非常に低用量で非常に強い神経保護作用を示す (例えば、生存に対して1~5 nM、図5Aを参照されたい)。神経突起ネットワークについても、非常に大きな作用がすべての試験した用量において観察された (図5Bを参照されたい)。図5Cを見て分かる通り、この化合物は神経栄養作用も更に示した (神経突起成長を誘発させた)。シナプスの数もまた低用量で増加した (1~5 nM、図6を参照されたい)。重要な作用はタウ過剰リン酸化でも観察された (図5Dを参照されたい)。
- ベル型曲線に従う神経保護作用はMR33583でも観察された (図7及び図8を参照されたい)。活性のある濃度は50~500 nMより上であった。神経突起ネットワークに対する強い作用はほとんどすべての試験した用量で観察された (図7Bを参照されたい)。ベル型作用はタウ過剰リン酸化でも観察され、最大作用は50~100 nMであった (図7Dを参照されたい)。

【0271】

これらの結果は、すべての試験した一般式(1)の化合物は神経保護剤であり、化合物MR31193、MR31192及びMR33583が特に効率的であることを確認している。

【0272】

(実施例5)

本実施例は化合物MR31192、及びMR36014の神経保護作用を示すものである。

【0273】

材料及び方法

〔海馬ニューロンの初代培養物〕

ラット海馬ニューロンを、Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706~716 40  
頁により記載されている通り培養した。簡単に説明すると、妊娠第17日の妊娠した雌のラット (Rats Wistar ; Janvier Labs社、France) を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して 殺した。次いで、胎児を子宮から取り出し、2 %ペニシリン (10,000 U/ml) 及びストレプトマイシン (10 mg/ml) 溶液(PS)及び1 %ウシ血清アルブミン (BSA) を有する、氷冷したL15 Leibovitz培地内に直ちに配置した。海馬を、37 °Cで20分間、0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAの最終濃度のトリプシン-EDTA溶液で処理した。DNase I グレードII (最終濃度0.5 mg/ml) 及び10 %ウシ胎児血清 (FCS) を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地 (DME M) の添加により、解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離した。

【0274】

次いで、細胞を $515 \times g$ で、4 で10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27サプリメントの2 %溶液を有するNeurobasal培地、2 mmol/lのL-グルタミン、2 %PS溶液、及び10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子 (BDNF) からなる規定の培養用培地にペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。ポリ-L-リジンをプレコートした96ウェルプレート内に、1ウェル当たり20,000個の密度で細胞を播種し、大気 (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %) インキュベーター内で、37 で培養した。

#### 【0275】

培地は2日ごとに交換した。96ウェル-プレートに対して、60ウェルのみを使用した。最初と最後のライン及びカラムのウェルは使用せず (あらゆる縁の作用 (エッジ効果) を回避するため)、滅菌水を充填した。

10

#### 【0276】

[試験化合物及びヒトA 1-42曝露]

<試験化合物> : 以下の化合物を試験した :

- MR31192、
- MR36014、及び
- ドネペジル

<予備インキュベーション> : 培養の第17日に、化合物を培養用培地に溶解し、A 1-42曝露前、初代海馬ニューロンと共に1時間予備インキュベートした。

#### 【0277】

<損傷> : 培養の17日後、海馬ニューロンをA 溶液 (以下を参照されたい) に曝露した。A 1-42調製は、Callizotら (2013) J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716頁に記載されている手順に従い行った。本研究で使用されたA 1-42のバッチ番号は10 %のオリゴマーを含有する (Combesら (2015) J. Neurosci. Res. 93 : 633 ~ 643頁で実施したようにWBで定量化)。簡単に説明すると、A 1-42ペプチドを上述の規定の培養用培地に初濃度40  $\mu\text{mol/l}$ で溶解した。この溶液を暗所で、37 で3日間穏やかに攪拌し、培養用培地内で使用される濃度へと適切に希釈した直後使用した (2  $\mu\text{mol/l}$ 又は0.25  $\mu\text{mol/l}$ のオリゴマー(A 0) にそれぞれ対応する20  $\mu\text{mol/l}$ 又は2.5  $\mu\text{mol/l}$ )。A 1-42調製物を、化合物の存在下、対照培地内で希釈した最終濃度20又は2.5  $\mu\text{mol/l}$ に加えた (それぞれ2  $\mu\text{mol/l}$ 又は0.25  $\mu\text{mol/l}$ のA 0、自動WBにより決定)。

20

30

#### 【0278】

[エンドポイント評価]

被毒させてから24時間後、上清を取り出し、将来解析的分析のため直ちに凍結した。これらを-20 で6カ月まで保持した。次いで、海馬ニューロンをエタノール (95 %) 及び酢酸 (5 %) の冷たい溶液で、-20 で5分間固定した。これらを再度PBS中で2回洗浄し、次いで透過処理し、0.1 %のサポニン及び1 %のFCSを含有するPBSの溶液を使用して、室温で15分間非特異的部位をブロッキングした。

#### 【0279】

<免疫染色 : MAP-2/AT100> - 固定及び透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした :

40

- 1 %ウシ胎児血清及び0.1 %サポニンを含有するPBS中、1/1000希釈でのニワトリポリクローナル抗体抗微小管関連タンパク質2 (MAP-2) (この抗体は細胞体及び神経突起を特異的に染色し、神経細胞消滅及び神経突起ネットワークの研究を可能にする) ; 並びに
- 1 %ウシ胎児血清及び0.1 %サポニンを含有するPBS中、1/100の希釈でのマウスモノクローナル抗体抗ホスタウ (AT100)。

#### 【0280】

これらの抗体を、1 %FCS、0.1 %サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ニワトリIgGに、室温で1時間曝露した。

50

## 【0281】

各条件に対して、ImageXpress(登録商標)(MolecularDevices社)を使用して、20×倍率で1ウェル当たり30枚の像を撮った(全体のウェル領域を表すもの)。すべての画像は同じ取得パラメータを使用して生成した。Custom Module Editor(登録商標)(Molecular Devices社)により、画像から分析を直接的及び自動的に実施した。以下の読み取り値を調査した：

- ニューロンの総数(ニューロン生存、MAP-2陽性ニューロンの数)
- 神経突起ネットワーク(MAP-2陽性ニューロン、単位： $\mu\text{m}$ )
- AT100の領域( $\mu\text{m}^2$ 、MAP-2陽性ニューロンと重複)。

## 【0282】

<免疫染色：PSD95及びSYN> - 固定及び透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした：

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含むPBS中、1/200希釈でのマウスモノクローナル抗体抗シナプス後肥厚95 kDa (PSD95)；
- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含むPBS中、1/100希釈でのウサギポリクローナル抗体抗シナプトフィジン (SYN)。

## 【0283】

これらの抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含むPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgGに室温で1時間曝露した。

## 【0284】

各条件に対して、ImageXpress (Molecular Devices社)を使用して、40×倍率で1ウェル当たり40枚の像を撮った。すべての画像は同じ条件で撮った。Custom Module Editor(登録商標)(Molecular Devices社)を使用することにより、シナプス評価を自動的に実施した。以下のエンドポイントを評価した：

- シナプスの数(PSD95/SYNの間で重複)

## 【0285】

## 〔統計分析〕

すべての値は平均値 $\pm$ SEM(平均の標準誤差)として表現される。統計分析を一元ANOVA、これに続くダネットの検定又はLSDフィッシャーの検定で実施した。p 0.05は有意であると考えられた。

## 【0286】

## 結果

図9及び図10を見て分かる通り、化合物MR31192は、濃度500 pMまで活性があり(生存及び神経突起ネットワーク、図9A、図9B、図9Cを参照されたい)、タウ過剰リン酸化の有意な減少(図9Dを参照されたい)もまた100 pMで観察されている。シナプスに対する神経保護作用は500 pMで更に観察されている(図10を参照されたい)。

## 【0287】

したがって、化合物MR31192は、非常に低用量、特に100 nMより低い用量で効率的である(100 pM~500 pMの間)。これら非常に低用量では、MR31192は、ドネペジルで観察されたもの、ただし1  $\mu\text{M}$ で観察されたものと同様の神経保護作用を示す。

## 【0288】

図11及び図12を見て分かる通り、化合物MR36014(MR31192のフッ素アナログ)は、nM用量においてMR31192により得られるものと同様の神経保護プロファイルを示す。神経保護作用はpM用量でもまた観察された。この作用は生存及び神経突起ネットワークに対して(図11A、図11B、図11Cを参照されたい)及びタウ過剰リン酸化に対して(図11Dを参照されたい)特に有意である。シナプスに対する作用は濃度50 pMまで有意である(図12を参照されたい)。これら非常に低用量において、MR36014は、ドネペジルで観察されたもの、ただし1  $\mu\text{M}$ で観察されたものと同様の神経保護作用を示す。

10

20

30

40

50

## 【0289】

したがって、両方の化合物は非常に低用量で活性があり (nM用量及びpM用量の両方で)、これは潜在的な毒性及び/又は副作用を回避するために特に興味深い。

## 【0290】

(実施例6)

本実施例は、MPP+で損傷したドーパミン作動性TH-陽性ニューロンに対するMR36014及びMR33583の神経保護作用を示すものである。

## 【0291】

パーキンソン病 (PD) は、年齢70才を超える集団の約1 %に影響を与える一般的神経変性の運動障害である。PDは、アルツハイマー病に続いて2番目に一般的な神経変性疾患である。PDを患っている患者は、70 %の症例において、静止時振戦を伴う運動不安定性の症状を最初の症状として示す。他の臨床症候は硬直、動作緩慢及び姿勢保持障害及び多くの場合認知機能障害、うつ病及び睡眠障害を含む。

10

## 【0292】

黒質 (SN) 変性をもたらす病理学的機序は複数あるが、いくつかの経路が中心となっていると考えられる：プロテアソーム機能障害にリンクするタンパク質凝集、ミトコンドリア機能障害 (特定のDA-毒素によっても引き起こされる)、及びドーパミン (DA) 放出の機能障害。

## 【0293】

Dauer及びPrzedborski (2003) Neuron 39 : 889 ~ 909頁により確認された通り、ドーパミンニューロン特異的毒素 (DA-毒素)、特に1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6テトラヒドロピリジン (MPTP、神経毒素MPP+のプロドラッグ)、6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) 又はロテノンはヒトにおいてパーキンソニズムを引き起こす。これらの毒素は主として、動物において病理を実験的に模倣するために科学者により使用されている。DA-毒素神経毒性を減少させる任意の物質は、PDの処置又は予防のための新規治療剤として有用となり得る。

20

## 【0294】

本研究の狙いは、MPP+で損傷したドーパミン作動性TH-陽性ニューロンに対するMR36014及びMR33583 (4つの濃度) の神経保護作用を調査することであった。試験化合物は、MPP+適用前に1時間予備インキュベートした (4 µM、48時間)。試験化合物の神経保護作用 (生存及び神経突起ネットワーク) を調査した。加えて、原形質アルファ-シヌクレイン蓄積に対する作用を研究した。

30

## 【0295】

材料及び方法

## 〔中脳神経の初代培養物〕

すべての実験は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針 (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) に従い行い、現在の欧州連合規則に従った (European Union regulations)(Directive 2010/63/EU)。契約番号：A1301310。

## 【0296】

ラットドーパミンニューロンを、Callizotら (2019) PLoS One 14 : e0215277頁及びVisanjiら (2008) FASEB J. 22 : 2488 ~ 2497頁に記載されている通りに培養した。簡単に説明すると、妊娠第15日の妊娠した雌のラット (Wistar) を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して殺した。日齢15日のラット胎仔 (Janvier社、France) から得た中脳を顕微鏡で解剖した。胚性中脳を取り出し、2 %ペニシリン-ストレプトマイシン (PS) 及び1 %ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するLeibovitz (L15) の氷冷培地内に配置した。中脳屈の腹側部、すなわちドーパミンニューロンが豊富な脳を発達させる領域を細胞調製のために使用した。

40

## 【0297】

37 で20分間トリプシン処理することにより中脳を分離した (最終濃度0.05 %トリブ

50

シン及び0.02 %EDTAの溶液)。DNAase I グレードII (0.5 mg/ml) 及び10 %子牛胎児血清 (FCS) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の添加により反応を停止した。次いで、10 mlピペットを介して3回通過させることにより、細胞を機械的に解離した。次いで、L15培地中BSA (3.5 %) 層上で、細胞を180×gで、4 で10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27 (2 %) を補充したNeurobasal、L-グルタミン (2 mM)、2 %PS溶液、10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子 (BDNF) 及び1 ng/mlの神経膠由来の神経栄養因子 (GDNF) からなる規定の培養用培地に細胞ペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。96ウェルプレート (ポリ-L-リジンでプレコート) 内に、40,000個の細胞/ウェルの密度で細胞を播種し、加湿したインキュベーター内で、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>/95 %大気雰囲気内で維持した。培地の半分は2日ごとに新鮮培地と交換した。

10

【0298】

簡単に説明すると、培養の第6日において、培地を取り除き、新鮮培地を加え、試験化合物有り又は無し、及びMPP+有り又は無しで、対照培地内で48時間希釈した。1条件当たり6つのウェルを評価した。

【0299】

〔試験化合物及びMPP+曝露〕

<予備インキュベーション> : 培養の第6日において、化合物を培養用培地内で希釈し、初代ドパミンニューロンと共に1時間予備インキュベートしてから、MPP+に曝露した。

【0300】

<損傷> : 試験化合物のインキュベーション1時間後、MPP+を最終濃度4 μMまで加え、化合物の存在下、培養用培地内で48時間希釈した。

20

【0301】

〔培養プレートの構成〕

試験化合物を96-ウェルプレート内で試験した (1条件当たりn=6培養ウェル)。MR36014及びMR33583を1時間予備インキュベートしてから、MPP+により被毒させる。以下の条件を評価した :

【0302】

【表8】

30

プレート1 (TH/α-syn)
対照(ビヒクル)
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / ビヒクル
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR36014 500 pM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR36014 1 nM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR36014 5 nM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR36014 10 nM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR33583 500 pM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR33583 1 nM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR33583 5 nM
+ MPP+ (4 μM, 48 時間) / MR33583 10 nM

40

【0303】

〔エンドポイント評価〕

被毒させてから48時間後、細胞培養物上清を取り出し、将来の分析用に直ちに凍結した

50

。4 %パラホルムアルデヒドのPBS中溶液、pH=7.3で細胞を室温で20分間固定した。細胞をPBS中で2回洗浄した。0.1 %サポニン及び1 %FCSを含有する溶液を使用して、細胞膜透過化及び非特異的部位のブロッキングを室温で15分間行った。

#### 【0304】

<免疫染色：TH及び  $\alpha$ -syn> - 培養物を以下と共にインキュベートした：

- 1 %FCS、0.1 %サポニンを含有するPBS中、1/10,000希釈で、マウスにおいて生成されたモノクローナル抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体、室温で2時間。
- 1 %FCS、0.1 %サポニンを含有するPBS中、1/200希釈で、ウサギにおいて生成されたポリクローナル抗アルファシヌクレイン ( $\alpha$ -syn) 抗体、室温で2時間。

#### 【0305】

これらの抗体を、1 %FCS、0.1 %サポニンを含有するPBS中、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgGを希釈1/800で、及びAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギIgGを1/400希釈で、室温で1時間曝露した。

#### 【0306】

<自動コンピュータ分析> - 各条件に対して、ImageXpress(登録商標) (Molecular Devices社) を使用して、同じ取得パラメーターを使用して10×倍率(20枚の像)で20枚の像(全体のウェル領域を描写)を自動的に撮った。画像から、Custom Module Editor(登録商標) (Molecular Devices社) により、分析を直接的及び自動的に実施した。以下の読み取り値を測定した：

- THニューロンの総数の分析 (TH陽性ニューロン)、
- TH陽性ニューロンの全神経突起ネットワーク (単位： $\mu\text{m}$ )
- $\alpha$ -syn凝集 (THと  $\alpha$ -syn染色との間で重複する領域、単位： $\mu\text{m}^2$ )

#### 〔統計分析〕

すべての値は平均値 $\pm$ SEM (平均の標準誤差) として表現される。統計分析は一元ANOVA、これに続くダネットの検定又はLSDフィッシャーの検定により実施した。p < 0.05は有意であると考えられた。

#### 【0307】

#### 結果

〔MPP+での損傷後の、THニューロンの生存、神経突起ネットワーク及び  $\alpha$ -syn凝集に対するMR36014の作用〕。

#### 【0308】

MPP+の適用は、事前に示されているように (Callizotら (2019) PLoS One 14 : e0215277頁)、生存の減少 (図13A)、神経突起ネットワークの損失 (図13B) 及び  $\alpha$ -synの病理学的蓄積 (図13C) により観察されるように、ドパミンニューロンに対して明白な神経毒性を誘発させた。

#### 【0309】

MR36014の適用は、この化合物がTHニューロン生存を改善し (1 nMから10 nMへ)、これらの神経突起ネットワークを保護し (すべての調査した用量)、 $\alpha$ -synの蓄積を減少させた (すべての調査した用量) ことから、THニューロンに対して強い全体的神経保護作用を有した。

#### 【0310】

〔MPP+での損傷後の、THニューロンの生存、神経突起ネットワーク及び  $\alpha$ -syn凝集に対するMR33583の作用。〕

MPP+での損傷後、MR33583は、ニューロンの生存を改善し (100 nM、図14Aを参照されたい)、神経突起ネットワークを部分的に保護した (10 nMから100 nMへ、図14Bを参照されたい)。MR33583のプラス効果は  $\alpha$ -synの凝集でも観察された (50 nM及び100 nM、図14Cを参照されたい)。

#### 【0311】

#### 考察

研究の狙いは、パーキンソン病のin vitroモデルにおいて、MR36014及びMR33583

10

20

30

40

50

の神経保護作用を調査することであった。

【0312】

この研究は以下を示す：

- 両方の化合物は、ドパミンニューロンに対して、MPP+の毒性に反対に作用する、
- MR36014は、この化合物がTHニューロンの生存を促進するためのより高い効力を示したため、MR33583よりも強力である。
- MR36014はMR33583より低い用量で活性があった。

【0313】

全体で、本研究は、MR36014及びMR33583がパーキンソン病に対する興味深い薬物候補であること、及びMR36014がMR33583よりも活性があることを示した。

10

【0314】

(実施例7)

本実施例は、グルタメートで損傷後のラットの初代皮質ニューロンに対する化合物MR36014及びMR33583の神経保護作用の評価を開示するものである。

【0315】

グルタミン酸作動性システム、及び特にNMDA受容体（グルタミン酸作動性受容体）は、学習及び記憶のプロセスに主要な役割を有する。シナプス可塑性は、NMDA受容体シグナル伝達により調節することができる。しかしNMDA受容体の過剰活性化及びグルタミン酸作動性の興奮毒性は神経変性疾患の一般的な病理学的特徴である（Lewerenz及びMaher (2015) Front Neurosci. 9 : 469頁）。

20

【0316】

グルタメート興奮毒性は、虚血及び外傷性脳傷害による急性神経系損傷並びにアルツハイマー病（AD）及びハンチントン病（HD）における慢性神経変性に関連づけられてきた。NMDARの過剰活性化を介した興奮毒性ニューロン死は、カルシウム（Ca<sup>2+</sup>）の細胞への過剰流動の原因となる。これは、増加した酸化ストレス、プロテアーゼ、例えば、カルパインの不適当な活性化、Ca<sup>2+</sup>関連経路の異常調節、ミトコンドリアの損傷及びアポトーシスのカスケードを含む、細胞死をもたらす一連の応答を引き起こす。

【0317】

この観点から、グルタメート興奮毒性を減少させる物質による早期薬理的処置は、ニューロンの生存を改善するため（及び認知機能を改善するため）の非常に良好なオプションを意味し得るし、アルツハイマー病と診断された患者に対する興味深い治療上の戦略を意味し得る（Wang及びReddy (2017) J. Alzheimers Dis. 57 : 1041 ~ 1048頁）。

30

【0318】

本研究は、グルタメートでの損傷後、ラット初代皮質ニューロンにおけるMR36014及びMR33583（4つの濃度）の神経保護作用を評価するものである。試験化合物は、グルタメート適用前（20 μM、20分間）、1時間予備インキュベートした。試験化合物の神経保護作用（生存及び神経突起ネットワーク）を調査した。

【0319】

材料及び方法

〔皮質ニューロンの初代培養物〕

すべての実験は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針（National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）に従い行い、現在の欧州連合規則に従った（European Union regulations）（Directive 2010/63/EU）。契約番号：A1301310。

40

【0320】

ラット皮質ニューロンは、Callizotら（2013）J. Neurosci. Res. 91 : 706 ~ 716 頁に記載されている通り培養した。妊娠第15日の妊娠している雌のラット（Wistar）を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して殺した。簡単に説明すると、胎児を採取し、2%ペニシリン（10,000 U/mL）及びストレプトマイシン（10 mg/mL）溶液（PS）及び1%ウシ血清アルブミン（BSA）を有する氷冷したL15 Leibovitz培地

50

内に直ちに配置した。0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAの最終濃度のトリプシン-EDTA溶液で37 °Cで20分間皮質を処置した。DNase I グレードII (最終濃度0.5 mg/ml) 及び10 %ウシ胎児血清 (FCS) を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の添加により解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離した。次いで、細胞を515 × gで、4 °Cで10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27サプリメントの2 %溶液を有するNeurobasal培地、2 mmol/lのL-グルタミン、2 %PS溶液、及び10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子 (BDNF) からなる規定の培養用培地にペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。

【0321】

10

ポリ-L-リジンをプレコートした96ウェルプレート内に、1ウェル当たり25,000個の密度で細胞を播種し、大気(95 %)-CO<sub>2</sub>(5 %)インキュベーター内で、37 °Cで培養した。

【0322】

縁作用を回避するため、最初と最後のカラム並びに最初と最後のプレートのラインは研究で使用しなかった。空のウェルには水を充填した。

【0323】

培地は2日ごとに交換した。11日間の培養後、皮質ニューロンをA 溶液で損傷した(以下を参照されたい)。

【0324】

[試験化合物及びグルタメート曝露]

20

<予備インキュベーション> : 培養の第13日、化合物を培養用培地に溶解し、グルタメートへの曝露前、初代皮質ニューロンと共に1時間予備インキュベートした。

【0325】

<損傷> : 試験化合物のインキュベーションから1時間後、依然として試験化合物の存在下で20分間、対照培地内で希釈した最終濃度20 μMにグルタメートを加えた。20分後、グルタメートを洗浄し、試験化合物を有する新鮮な培養用培地を追加の48時間加えた。

【0326】

[培養プレートの構成]

試験化合物を96-ウェルプレート内で試験した(1条件当たりn=6培養ウェル)。以下の条件を評価した :

30

【0327】

【表9】

プレート1 (MAP-2)
対照(ビヒクル)
+グルタメート(20 μM, 20分) / ビヒクル
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR36014 500pM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR36014 1 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR36014 5 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR36014 10 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR33583 1 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR33583 10 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR33583 50 nM
+グルタメート(20 μM, 20分) / MR33583 100 nM

40

50

## 【0328】

〔エンドポイント評価〕

<免疫染色：MAP-2（生存及び神経突起ネットワーク）> - 被毒させてから48時間後、細胞培養物上清を取り出し、将来の分析のために、直ちに凍結した。細胞をエタノール（95%）及び酢酸（5%）の冷たい溶液で、-20℃で5分間固定した。細胞をPBS中で2回洗浄した。細胞を透過処理し、0.1%サポニン及び1%FCSを含有するPBSの溶液を用いて、室温で15分間、非特異的結合部位をブロッキングした。

## 【0329】

培養物を、マウスモノクローナル抗体抗微小管関連タンパク質2（MAP-2）と共に、1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈で2時間インキュベートした。この抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG（1/400希釈）に室温で1時間曝露した。MAP-2は、ニューロンの細胞体及び神経突起に存在するニューロンのマーカーであり、これによって、ニューロンの生存及び神経突起ネットワークの長さの研究が可能となる。

## 【0330】

<自動コンピュータ分析> - 各条件に対して、ImageXpress（登録商標）（Molecular Devices社）を使用して、20×倍率で1ウェル当たり30枚の像を撮る（全体のウェル領域を表すもの）。すべての画像は同じ取得パラメーターを使用して生成される。画像から、Custom Module Editor（登録商標）（Molecular Devices社）により、分析を直接的及び自動的に実施する。

## 【0331】

以下の読み取り値を調査する：

- 全ニューロン生存（MAP-2陽性、数）、（データは1ウェル当たり30枚の像のニューロンの平均数で表現）。
- 全神経突起ネットワーク（MAP-2、単位：μm）、（データは1ウェル当たり30枚の像のニューロンの平均値で表現）。

## 【0332】

〔統計分析〕

すべての値は平均値±SEM（平均の標準誤差）として表現される。統計分析を一元ANOVA、これに続くダネットの検定又はLSDフィッシャーの検定により実施した。p < 0.05は有意であると考えられた。

## 【0333】

結果

〔グルタメートで損傷した皮質ニューロンに対するMR36014及びMR33583の作用〕  
グルタミン酸作動性損傷は、皮質ニューロンの損失（図15A及び図15C；32%のニューロン死）及び全神経突起ネットワークの収縮（図15B及び図15D；38%の神経突起損失）を誘発させた。

## 【0334】

<ニューロンの生存>。グルタメートの1時間前に加え、グルタメート適用後48時間放置したMR36014は、1 nMで皮質ニューロンを死滅から有意に保護し（図15Aを参照されたい）。同じ実験条件下で、MR33583は、50 nM及び100 nMで皮質ニューロンを確かに消滅から保護した（図15Cを参照されたい）。

## 【0335】

<神経突起ネットワーク>。すべてのMR36014の試験濃度（50 pM～10 nM）は、神経突起ネットワークを有意に保護し、1 nMにおいて最大の作用が得られた（図15Bを参照されたい）。MR33583は、1 nMから100 nMで神経突起ネットワークを有意に保護した。作用はベル型曲線に従い、50 nMにおいて最大の作用を有した（図15Dを参照されたい）。

## 【0336】

考察

10

20

30

40

50

研究の狙いは、グルタミン酸作動性の興奮毒性により誘発させたニューロンストレスの *in vitro* モデルにおけるMR36014及びMR33583の神経保護作用を調査することであった。グルタミン酸作動性ストレスは、アルツハイマー病及び脳虚血を含む、異なる神経疾患に存在する病理学的特徴である。

#### 【0337】

研究の結果と一致して、以下を結論づけることができる：

- 両方の化合物は、皮質ニューロンに対するグルタメートの毒性に反対に作用する、
- MR36014及びMR33583は同様の効力を示したが、MR36014はより低い用量で活性があった(ニューロンの生存に対して)。

#### 【0338】

全体で、この研究は、MR36014及びMR33583が、グルタミン酸作動性ストレスが関与する神経疾患に対する興味深い薬物候補であることを示している。

#### 【0339】

##### (実施例8)

本実施例は、グルタメート損傷後のラット初代皮質ニューロンに対するMR36014及びMR33583の神経保護作用の評価を開示するものである。

#### 【0340】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、通常四肢における、しかし時には延髄筋における、限局性脱力の潜行性の開始を特徴とする致死性障害であり、これは進行するとほとんどすべての骨格筋に運動麻痺が生じる。ALSと前頭側頭葉型痴呆(FTLD)との間には有意な臨床病理学的及び遺伝的重複がある。ALSでは、呼吸器の運動麻痺による死亡は通常5年以内に生じる。細胞病理は開始時には限局性であるが、隣接するニューロン集団が連続的に関与することを示唆するパターンで拡散する。運動ニューロンの死は、運動ニューロン及びオリゴデンドロサイトにおける凝集タンパク質の堆積、並びに神経炎症と併せて生じる。

#### 【0341】

ALSの複雑な病態生理は多くの潜在的治療ターゲットを提示する。広範囲な薬剤が調査されてきたにもかかわらず、抗グルタミン酸作動性薬物であるリルゾール(Rilutek(登録商標))のみが一貫した有効性を実証しており、疾患の処置に対して承認された唯一の薬物である。しかし、リルゾールの有効性は中程度である - リルゾールはALS患者の生存期間を数カ月長引かせ(約7%)、機能的手段に対する作用は最小であった。

#### 【0342】

ALSにおいて運動ニューロンの死を引き起こす正確な分子経路は未知のままであるが、一部の可能な機序は、a) グルタメート媒介性興奮毒性；b) 神経栄養因子の低減(BDNF、GDNF...)；c) ミトコンドリアの改変及び酸化的損傷；d) ニューロンの萎縮及び死をもたらす細胞骨格タンパク質の異常を含む。

#### 【0343】

TDP-43(転写活性化反応エレメントDNA結合タンパク質43 kDa)は、ALSのほとんどの場合において、運動ニューロンの細胞形質に蓄積することが示されている。TDP43は核と細胞形質との間を活発に行き来するRNAプロセシングのいくつかの態様に関与している核RNA-結合タンパク質である。

#### 【0344】

本研究の狙いは、グルタメート損傷後の初代脊髄運動ニューロン(MN)に対するMR36014及びMR33583(4つの濃度)の作用を評価することであった。

#### 【0345】

##### 材料及び方法

[脊髄運動ニューロンの初代培養物]

すべての実験は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)に従い行い、現在の欧州連合規則に従った(European Union regulations)(Directive 2010/63/EU)。契約番号：A1301310。

10

20

30

40

50

## 【0346】

ラット脊髄運動ニューロン (MN) は、Martinouら (1992) Neuron. 8 : 737 ~ 744 頁及びWangら (2013) Hum. Mol. Genet. 22 : 4706 ~ 4719頁に記載されている通り培養した。簡単に説明すると、妊娠第14日の妊娠した雌のラット (Rats Wistar ; Janvier Labs社、France) を、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して殺した。次いで、胎児を子宮から取り出し、2 %ペニシリン (10,000 U/ml) 及びストレプトマイシン (10 mg/ml) 溶液 (PS) 及び1 %ウシ血清アルブミン (BSA) を有する氷冷したL15 Leibovitz培地内に直ちに配置した。

## 【0347】

最終濃度0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAのトリプシン-EDTA溶液で、37 °Cで20分間脊髄を処理した。DNase I グレードII (最終濃度0.5 mg/ml) 及び10 %ウシ胎児血清 (FCS) を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の添加により解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離した。次いで、細胞を515 × gで、4 °Cで10分間遠心分離した。上清を廃棄し、B27サプリメントの2 %溶液を有するNeurobasal培地、2 mmol/lのL-グルタミン、2 %PS溶液、及び10 ng/mlの脳由来の神経栄養因子 (BDNF) からなる規定の培養用培地にペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。ポリ-L-リジンをプレコートした96ウェルプレート内に、1ウェル当たり20,000個の密度で細胞を播種し、大気 (95 %) - CO<sub>2</sub> (5 %) インキュベーター内で、37 °Cで培養した。

10

20

## 【0348】

培地は2日ごとに交換した。最初のライン及びカラムのウェルは培養に使用せず (縁作用を回避するため)、滅菌水を充填した。培養の13日後、運動ニューロンをグルタメートで損傷させた。

## 【0349】

〔試験化合物及びグルタメート曝露〕

< 予備インキュベーション > : 培養の第13日、化合物を培養用培地に溶解し、グルタメートへの曝露前、初代皮質ニューロンと共に1時間予備インキュベートした。

## 【0350】

< グルタメート損傷 > : 培養の第13日に、1時間の予備インキュベーション後、依然として化合物の存在下、20分間対照培地内で希釈した最終濃度5 µMにグルタメートを加えた。20分後、グルタメートを洗い流し、化合物を有する新鮮な培養用培地を追加の24時間加えた。

30

## 【0351】

〔培養プレートの構成〕

試験化合物を96ウェルプレート内で試験した (1条件当たりn=6培養ウェル)。

## 【0352】

以下の条件を評価した :

## 【0353】

40

【表 10】

プレート 1 (MAP-2/TDP-43) 運動ニューロン
対照(ビヒクル)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / ビヒクル
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR36014 (500 pM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR36014 (1 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR36014 (5 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR36014 (10 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR33583 (1 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR33583 (10 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR33583 (50 nM)
+グルタミン酸(5 $\mu$ M, 20 分) / MR33583 (10 nM)

10

## 【0354】

〔エンドポイント評価〕

20

被毒させてから24時間後、上清を取り出し、将来の分析のために直ちに凍結した。細胞をエタノール(95%)及び酢酸(5%)の冷たい溶液で、-20℃で5分間固定した。0.1%サポニンでの透過化後、細胞を以下と共に2時間インキュベートした：

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのマウスモノクローナル抗体抗微小管関連タンパク質2(MAP-2)。この抗体を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgGに室温で1時間曝露した。

- 1%ウシ胎児血清及び0.1%サポニンを含有するPBS中、1/100希釈でのウサギポリクローナル抗体抗核ターナルDNA-結合タンパク質43(TDP-43)。抗体TDP-43を、1%FCS、0.1%サポニンを含有するPBS中、1/400希釈でのAlexa Fluor 568ヤギ抗ウサギに室温で1時間曝露した。

30

## 【0355】

各条件に対して、ImageXpress(登録商標)(Molecular Devices社)を使用して、20 $\times$ 倍率で、同じ取得パラメーターを使用して、1ウェル当たり30枚の像を自動的に撮った(全体のウェル領域を表すもの)。画像から、Custom Module Editor(登録商標)(Molecular Devices社)により、分析を直接的及び自動的に実施した。

## 【0356】

〔エンドポイント分析〕

以下のエンドポイントを自動的に評価した：

- ニューロン生存の分析(MAP-2染色、ニューロンの数)、
- 神経突起ネットワークの分析(MAP-2染色、全神経突起長、単位： $\mu$ m)、
- 神経突起ネットワーク/ニューロンの分析(ニューロンネットワーク/MAP2ニューロンの数)、
- MAP-2陽性ニューロンにおける原形質TDP-43の分析(MAP-2と原形質TDP-43との間の重複、単位： $\mu$ m<sup>2</sup>)。

40

## 【0357】

〔統計分析〕

すべての値は平均値 $\pm$ SEM(平均の標準誤差)として表現される。統計分析は一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定で実施した。p < 0.05は有意であると考えられた。

50

## 【0358】

結果

〔グルタメートで損傷した脊髄運動ニューロンの初代培養物におけるMR36014の作用〕  
〈ニューロンの生存〉。大きなMAP-2脊髄運動ニューロンの損失がグルタメートの適用の後に続いた(42%のニューロン死)(図16A)。500 pM及び1 nMにおいて、MR36014は脊髄運動ニューロンの生存を有意に改善した。

## 【0359】

〈神経突起ネットワーク〉。神経突起ネットワークはグルタメート損傷により激しく減少した(46%の神経突起損失、図16B)。MR36014は、500 pM及び1 nMにおいて神経突起ネットワークを有意に保護した。神経突起ネットワークの長さはニューロンの数に比例する。「神経突起ネットワーク長」/「ニューロンの数」の比率を計算して、1ニューロン当たりの神経突起の平均長を予測した。比率はMR36014により改変されなかった(図16C)。

10

## 【0360】

〔グルタメートで損傷した脊髄運動ニューロンの初代培養物におけるMR33583の作用〕  
〈ニューロンの生存〉。図17に示されているように、大きなMAP-2脊髄運動ニューロンの損失がグルタメートの適用の後に続いた(図17A)。MR33583(グルタメートの1時間前に加え、損傷後24時間放置)は用量依存性神経保護作用を発揮した(10~100 nM)。

## 【0361】

〈神経突起ネットワーク〉。図17に示されているように、神経突起ネットワークはグルタメート損傷により激しく減少した(図17B)。MR33583は、神経突起ネットワークを10 nMから100 nMで用量依存性方式により有意に保護した。比率はMR36014により改変されなかった(図17C)。

20

## 【0362】

〈TDP43〉。最も高い用量でMR33583(100 nM)は、脊髄運動ニューロンの細胞形質におけるTDP43のシグナルを減少させた(図17D)。

## 【0363】

考察

本研究の狙いは、グルタメートで損傷した脊髄運動ニューロンの初代培養物に基づく、筋萎縮性側索硬化症の*in vitro*モデルにおいて、2つの化合物、MR36014及びMR33583の神経保護作用を評価することであった。

30

## 【0364】

本研究の結果は以下を示唆する：

- ・ MR36014は、ニューロンの生存を改善し、神経突起ネットワークを保護したことから、500 pM及び1 nMにおいて明白な神経保護作用を提供した。
- ・ MR33583は、すべてのパラメーターにおいて明白な神経保護作用を示した(ニューロンの生存、神経突起ネットワークの保存及び原形質TDP43の蓄積)。

## 【0365】

全体で、これらの結果は、MR36014及びMR33583が脊髄運動ニューロンに対して神経保護を媒介することができ、これらが筋萎縮性側索硬化症に対する潜在的な薬物候補であることを示唆している。

40

## 【0366】

(実施例9)

本実施例は、成長因子欠乏状態でのラット初代GABA作動性ニューロンに対するMR33583の神経保護作用の評価を示すものである。

## 【0367】

HD(ハンチントン病)は、白人社会において、10000人中およそ4~10人に影響を与える常染色体優性の遺伝性神経変性疾患である。HD脳は、線条体のMSN(中型有棘ニューロン)の損失、心室の拡大及び対応する上層皮質の収縮を特徴とする。GABA作動性(

50

アミノ酪酸)細胞は、いくつかの小さな集団の介在ニューロンと共に、線条体の最も数の多い神経細胞の種類である(ラットでは90~95%及びヒトでは85%を超える)(Wictorin(1992) Prog. Neurobiol. 38:611~639頁)。MSNは、これらのGAD64酵素の発現を特徴とする。これらは、線条体への大部分のインプットを受け取り、皮質、視床及び中脳からの求心性神経を受け取り、並びに線条体の主要な出力ニューロンであり、淡蒼球及び黒質を含むCNS(中枢神経系)の様々な領域に突出している。よって、これらは、動作、認知及び感情の制御に重要な基底核内の複雑なニューロンループを形成する(Nakanoら(2000) J. Neurol. 247(suppl. 5):v1~v15頁)。

【0368】

成長因子の重要性及び神経変性疾患(例えば、AD、PD又はHD)におけるこれらの低減は、多くの場合これらの病態の複数の原因のうちの一つとして取り上げられてきた。BDNF又はGDNFの遺伝的並びに薬理的欠乏は、学習及び記憶を妨げ、ニューロン死に発展した(Yamadaら(2003) J. Pharmacol. Sci. 91:267~270頁)。成長因子欠乏モデルは、いくつかの神経細胞型、例えば、げっ歯類ニューロンの初代培養物(Atabayら(1996) J. Neurosci. Res. 43:465~475頁)、ヒトSK-N-SH及びSH-SY5Y神経芽細胞腫細胞(Baら(2003) J. Neurosci. Methods 123:11~22頁; Russoら(2004) Brain Res. 1009:40~53頁)において特徴付けられてきた。

10

【0369】

これらの成長因子が欠乏した状態下で、重篤な生存率の損失は、アポトーシスの細胞死によるものであり、これは、切断されたカスパーゼ-3、PARP及びH2A.Xを含めた、アポトーシス関連パラメーターの有意な上方調節により検出される。加えて、抗アポトーシスBcl-2の遺伝子及びタンパク質の発現は下方調節されることが示されているが、これに対してアポトーシス促進性Baxのものは上方調節された。加えて、脳由来の神経栄養因子(BDNF)の欠乏は、p75NTRシグナル伝達の増加を介してカスパーゼを活性化することにより、細胞死経路を引き起こすことが示されている(Yuら(2008) J. Neurosci. 28:7467~7475頁)。

20

【0370】

興味深いことに、Bdnf-/-マウスはまた、構造特異的な神経構造の改変及び行動異常を示す。これらは、皮質及び海馬における樹状複雑性及び背骨密度の低減、並びに線条体における更により大きな範囲までの低減を示し、影響を受けた細胞の90%はGABA作動性MSNである(Rauskolbら(2010) J. Neurosci. 30:1739~1749頁)。

30

【0371】

本研究の狙いは、ハンチントン病のin vitroモデルにおける、成長因子の欠乏(BDNF及びGDNFの欠乏)後の線条体のMSNの生存における、MR33583(4つの濃度)の神経保護作用を調査することであった。

【0372】

材料及び方法

[GABA作動性ニューロンの初代培養物]

すべての実験は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針(National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)に従い行い、現在の欧州連合規則に従った(European Union regulations)(Directive 2010/63/EU)。契約番号:A1301310。

40

【0373】

ラットの線条体のMSNをIvkovicら(1999) J. Neurosci. 19:5409~5419頁及びSchinelliら(1988) J. Neurochem. 50:1900~1907頁に記載されているように培養した。簡単に説明すると、妊娠第15日の妊娠した雌のラットを、CO<sub>2</sub>チャンバーでの深麻酔及び頸部脱臼を使用して殺した。胎児を採取し、2%ペニシリン(10,000 U/ml)及びストレプトマイシン(10 mg/ml)溶液(PS)及び1%ウシ血清アルブミン(BSA)を有する、氷冷したL15 Leibovitz培地内に直ちに配置した。中脳屈の限定された腹側部のみを細胞調製に使用した。この部分は、MSN細胞が豊富な脳を生み出す領域

50

だからである。これらの領域を、最終濃度0.05 %トリプシン及び0.02 %EDTAのトリプシン-EDTA溶液で、37 °Cで20分間処理した。DNase I グレードII (最終濃度0.5 mg/ml) 及び10 %ウシ胎児血清 (FCS) を含有する、4.5 g/lのグルコースを有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の添加により解離を停止した。10 mlピペットの先端を介した3回の強制的通過により細胞を機械的に解離した。次いで、180 x gで、室温で10分間、L15培地内のBSA (3.5 %) 層上で細胞を遠心分離した。上清を廃棄し、B27 (2 %) を補充したNeurobasal、L-グルタミン (2 mM)、1 %PS溶液、BDNF (10 ng/ml) 及びGDNF (1 ng/ml) からなる規定の培養用培地に細胞ペレットを再懸濁した。トリパンブルー排除試験を使用して、生存細胞をNeubauerサイトメーターでカウントした。96ウェル-プレート内に (ウェルはポリ-L-リジンでプレコートした) 40,000個の細胞/ウェルの密度で細胞を播種し、大気 (95 %) / CO<sub>2</sub> (5 %) インキュベーター内で、37 °Cで培養した。

10

## 【0374】

全ての縁作用 (エッジ効果) を回避するため、最初と最後のカラム並びに最初と最後のプレートのラインは研究に使用しなかった。空のウェルには水を充填した。培地は2日ごとに交換した。

## 【0375】

〔試験化合物及び成長因子の欠乏〕

< 予備インキュベーション > : 培養の第13日、試験化合物を培養用培地内で希釈し、成長因子 (BDNF及びGDNF) の欠乏前、GABA作動性ニューロンと共に1時間予備インキュベートした。

20

## 【0376】

< 成長因子の欠乏 > : 試験化合物とのインキュベーションの1時間後、培地の半分を、成長因子を含まない培地と交換した。欠乏は96時間適用された。

## 【0377】

〔培養プレートの構成〕

試験化合物を96ウェルプレート内で試験した (1条件当たりn=6培養ウェル)。以下の条件を評価した :

## 【0378】

【表11】

30

プレート1 (GAD67)
対照(ビヒクル)
+成長因子の欠乏/ビヒクル
+成長因子の欠乏/ MR33583 (1 nM)
+成長因子の欠乏/ MR33583 (10 nM)
+成長因子の欠乏/ MR33583 (50 nM)
+成長因子の欠乏/ MR33583 (10 nM)

40

## 【0379】

〔エンドポイント評価〕

成長因子欠乏から96時間後、細胞培養物上清を取り出し、将来の分析のために直ちに凍結した。細胞をエタノール (95 %) 及び酢酸 (5 %) の冷たい溶液で、-20 °Cで5分間固定した。細胞をPBS中で2回洗浄し、次いで透過処理した。0.1 %サポニン及び1 %FCSを含有するPBSの溶液で、室温で15分間非特異的部位をブロッキングした。

## 【0380】

50

<免疫染色：GAD67 (生存)> - 1 %ウシ胎児血清及び0.1 %サポニンを含むPBS中、1/200希釈で、マウスモノクローナル抗GAD67抗体と共に培養物を2時間インキュベートした (この抗体はGABA作動性ニューロンを特異的に染色する)。1 %FCS、0.1 %サポニンを含むPBS中、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG (1/400希釈) に室温で1時間この抗体を曝露した。

【0381】

<自動コンピュータ分析> - 各条件に対して、ImageXpress(登録商標) (Molecular Devices社) を使用して、20×倍率で1ウェル当たり30枚の像を撮った (全体のウェル領域を表すもの)。すべての画像は同じ取得パラメーターを使用して生成した。画像から、Custom Module Editor(登録商標) (Molecular Devices社) により分析を直接的及び自動的に実施した。

10

【0382】

以下の読み取り値を調査した：MSN生存の分析(GAD67染色、GABA作動性ニューロンの数)。

【0383】

〔統計分析〕

すべての値は平均値 $\pm$ SEM (平均の標準誤差) として表現される。統計分析は、一元ANOVA、これに続くフィッシャーのLSD検定で実施した。p 0.05は有意であると考えられた。

【0384】

20

結果

〔成長因子の欠乏によりストレスがかかったGABA作動性ニューロンの初代培養物におけるMR33583の作用〕

<ニューロンの生存>。大きなGAD-67陽性GABA作動性ニューロンの損失が、成長因子の欠乏後に続いた (図18)。

【0385】

MR33583 (50 nM) は、GABA作動性ニューロンの生存の改善を示し、有意な神経保護作用を発揮した。

【0386】

考察

30

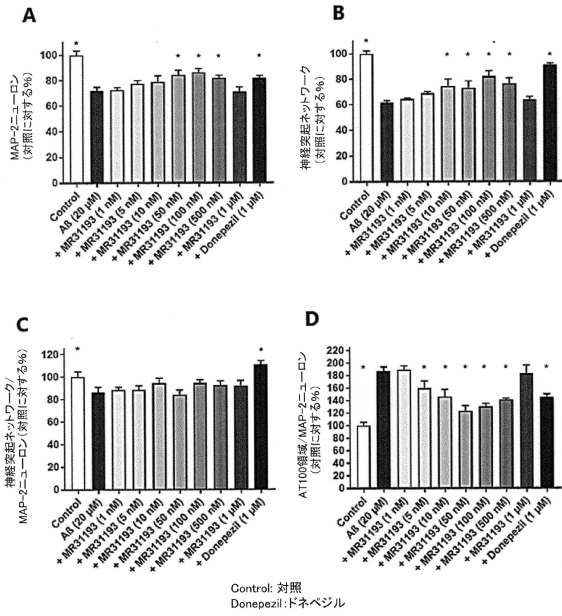
全体で、これらの結果は、MR33583が、GABA作動性ニューロンにおいて神経保護作用 (50 nM) を促進することができ、ハンチントン病に対する潜在的な薬物候補になり得ることを示唆している。

40

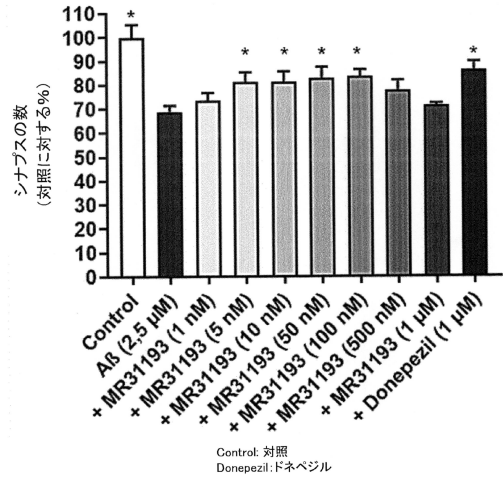
50

【 図 面 】

【 図 1 】



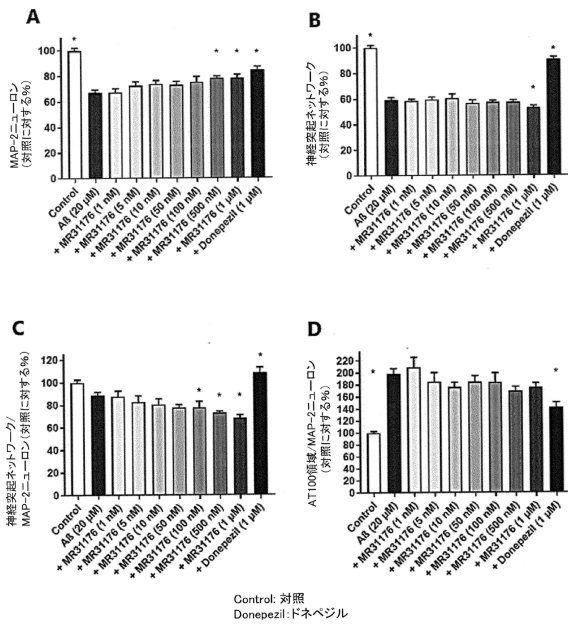
【 図 2 】



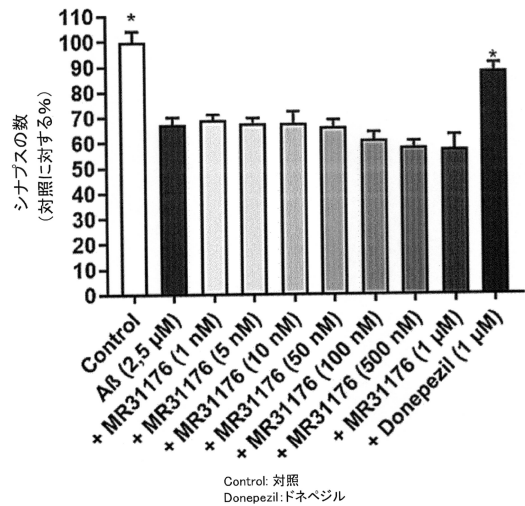
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

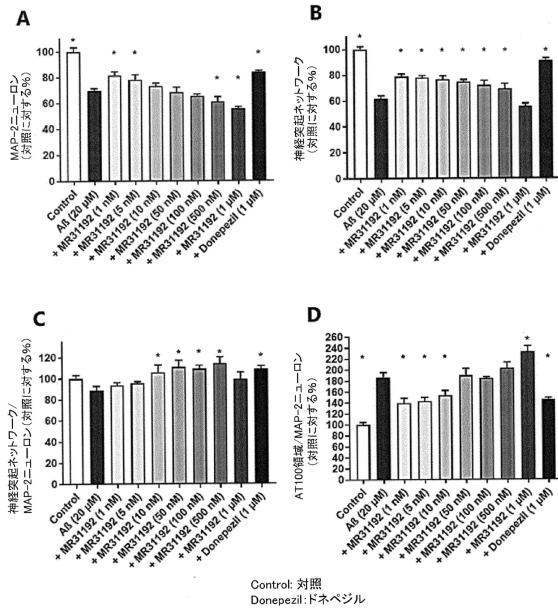


30

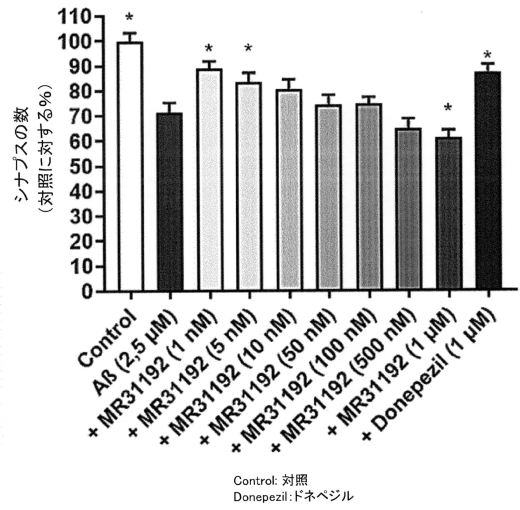
40

50

【 図 5 】



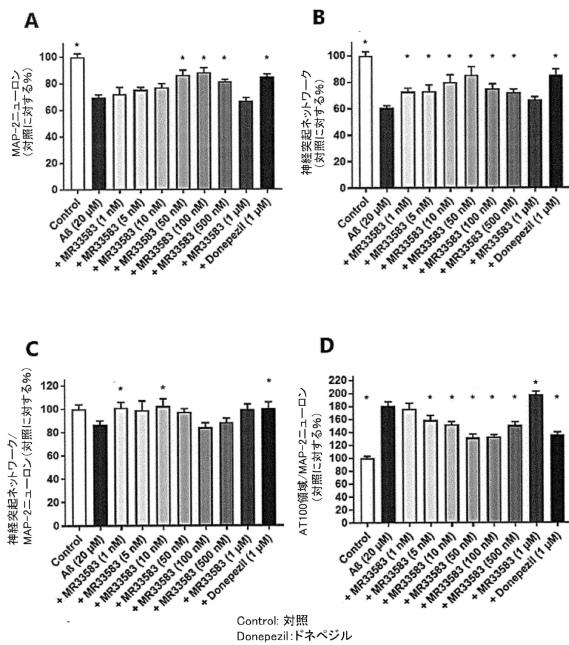
【 図 6 】



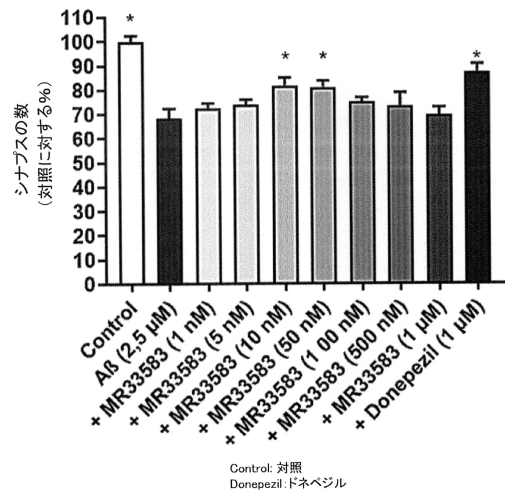
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

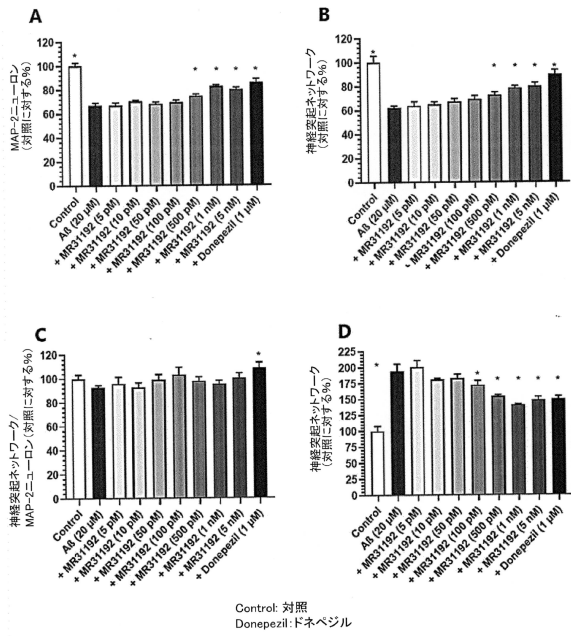


30

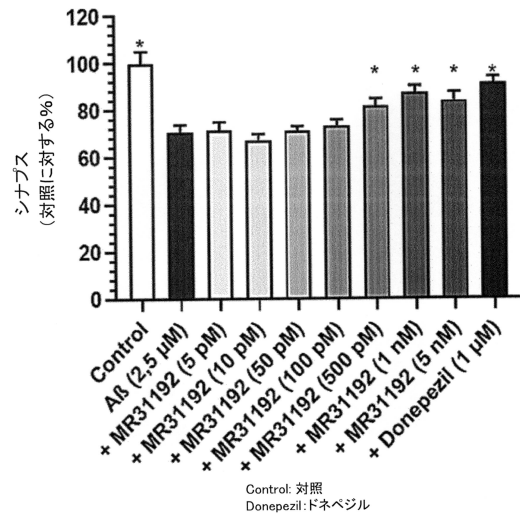
40

50

【 図 9 】



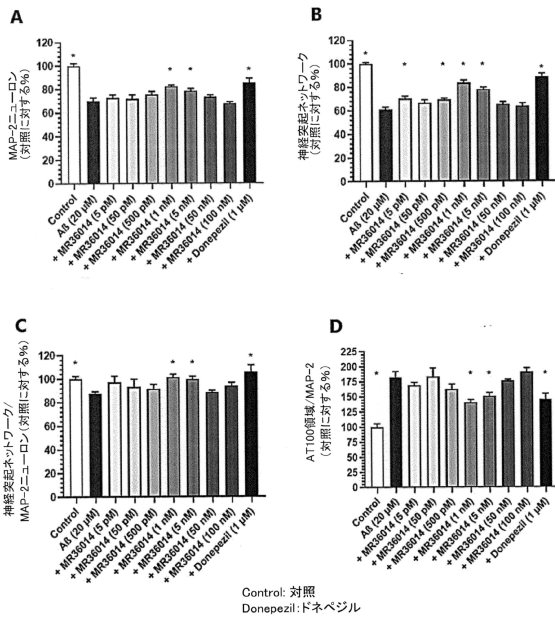
【 図 10 】



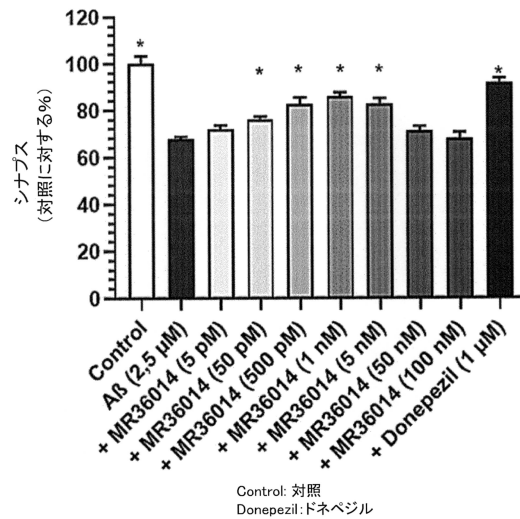
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

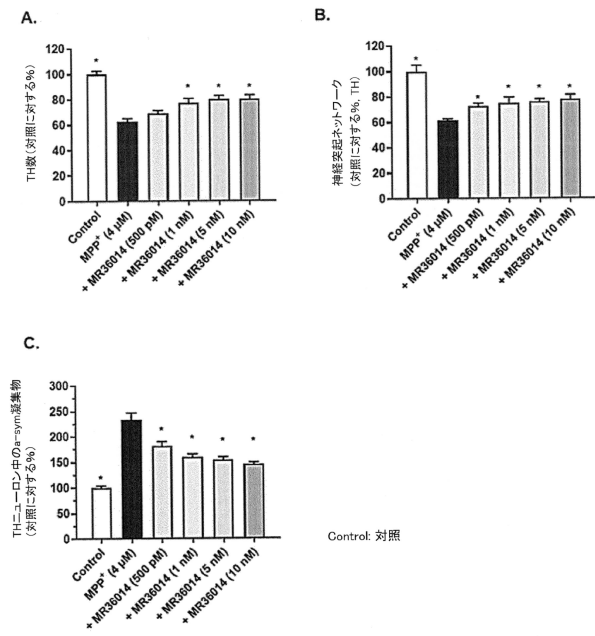


30

40

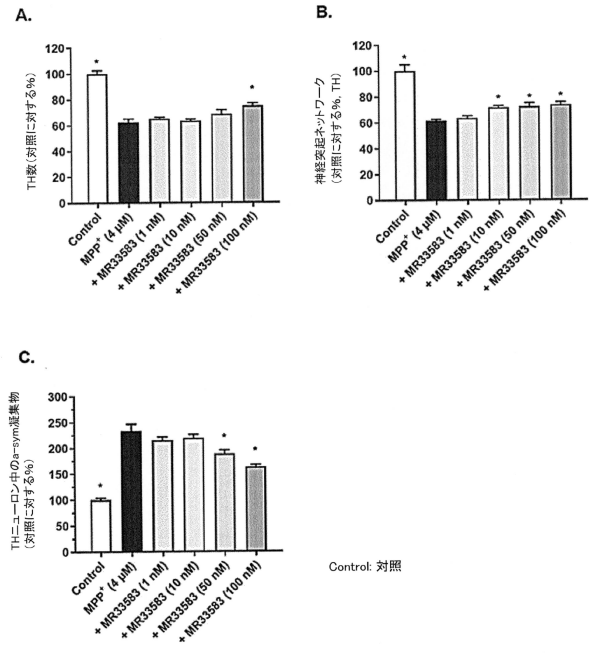
50

【 図 1 3 】



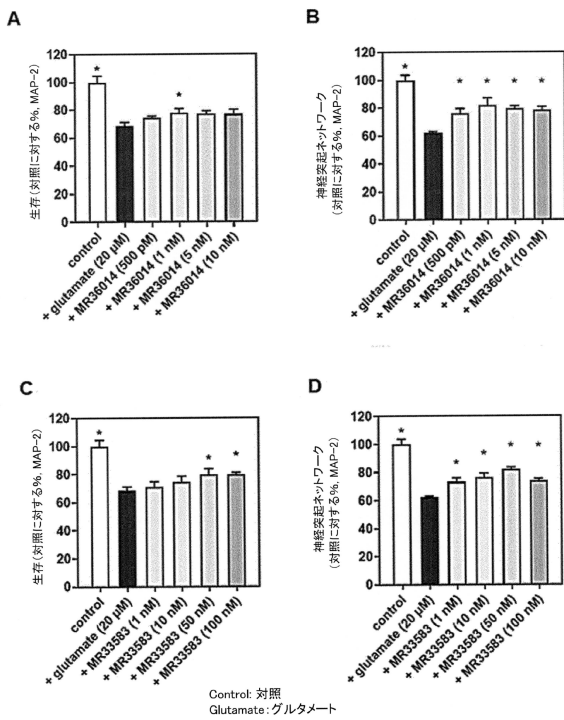
10

【 図 1 4 】

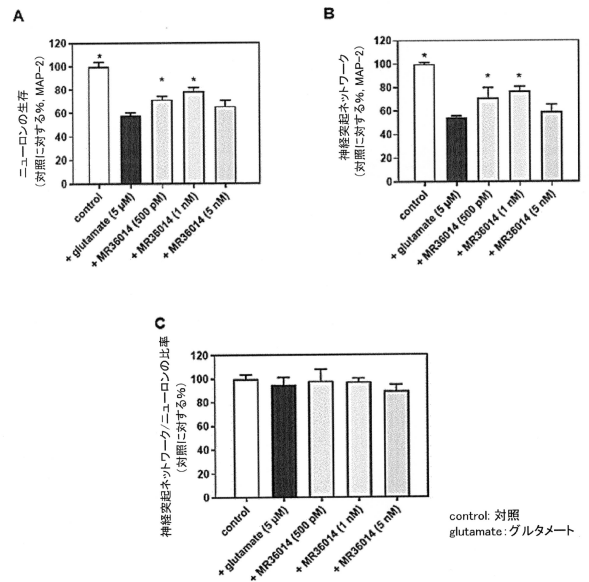


20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

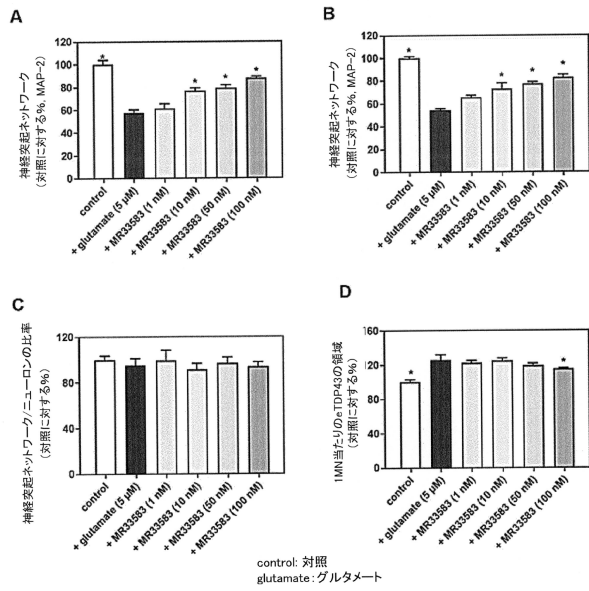


30

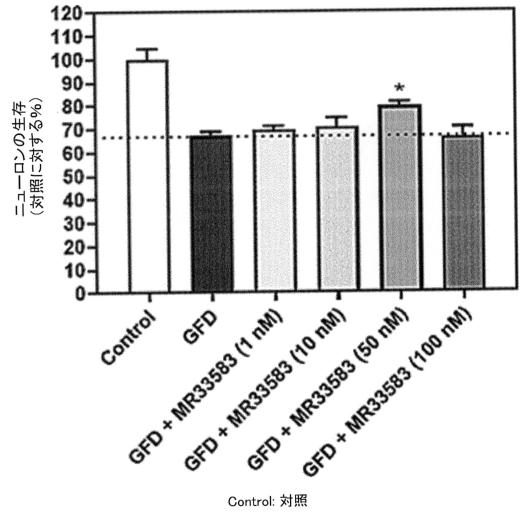
40

50

【 図 17 】



【 図 18 】



10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/076229
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07D211/32 A61K31/445 A61P25/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/195593 A2 (UNIV CAEN [FR]) 11 December 2014 (2014-12-11) cited in the application claims 1-7, 12, 13, 14, 17, 18, 19; examples 1-36; tables 4-6 ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 2 December 2019		Date of mailing of the international search report 12/12/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sotoca Usina, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2019/076229

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YAHIAOUI SAMIR ET AL: "Design, synthesis, and pharmacological evaluation of multitarget-directed ligands with both serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) partial agonist and 5-HT6R antagonist activities, as potential treatment of Alzheimer's disease", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 121, 26 May 2016 (2016-05-26), pages 283-293, XP029685745, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2016.05.048 Scheme 1; figures 4, 5; table 1 -----</p>	1-16
X	<p>BARANGER KEVIN ET AL: "Chronic treatments with a 5-HT4receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease", NEUROPHARMACOLOGY, vol. 126, 2017, pages 128-141, XP085229901, ISSN: 0028-3908, DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2017.08.031 page 132, paragraphs 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 - page 138; figures 3-7 -----</p>	1-16

10

20

30

40

1

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/076229

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014195593 A2	11-12-2014	CN 105705488 A	22-06-2016
		EP 3004058 A2	13-04-2016
		FR 3006686 A1	12-12-2014
		HK 1225381 A1	08-09-2017
		JP 6386541 B2	05-09-2018
		JP 2016522215 A	28-07-2016
		US 2016122300 A1	05-05-2016
		WO 2014195593 A2	11-12-2014
-----			

10

20

30

40

50

