

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502722

(P2005-502722A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/416	A 6 1 K 31/416	4 C 0 6 3
A 6 1 K 31/4162	A 6 1 K 31/4162	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁) 最終頁に続く

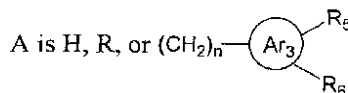
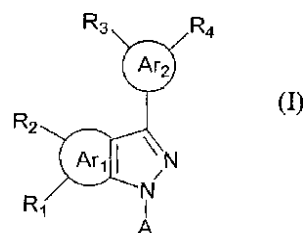
(21) 出願番号	特願2003-528495 (P2003-528495)	(71) 出願人	504096608 カールスバッド テクノロジー, インコーポレイテッド アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92008, カールスバッド, バルフォーコート 5923
(86) (22) 出願日	平成14年9月16日 (2002. 9. 16)	(74) 代理人	100072349 弁理士 八田 幹雄
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)	(74) 代理人	100110995 弁理士 奈良 泰男
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029294	(74) 代理人	100111464 弁理士 齋藤 悦子
(87) 国際公開番号	W02003/024397	(74) 代理人	100114649 弁理士 宇谷 勝幸
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		
(31) 優先権主張番号	60/322, 389		
(32) 優先日	平成13年9月14日 (2001. 9. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/242, 826		
(32) 優先日	平成14年9月13日 (2002. 9. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 学習及び記憶の亢進ならびに健忘症の治療

(57) 【要約】

学習及び記憶の促進または健忘症の治療方法。本方法は、このような必要のある患者に式 (I) の化合物を投与することを含む: Ar_1 、 Ar_2 、及び Ar_3 のそれぞれは、独立して、フェニル、チエニル、フリル、またはピロリルであり; R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 のそれぞれは、独立して、H、ニトロ、ハロゲン、R、OH、OR、C(O)OH、C(O)OR、C(O)SH、C(O)SR、C(O)NH₂、C(O)NHR、C(O)NRR'、ROH、ROR'、RSH、RSR'、ROC(O)R'OH、NHR、NRR'、RNHR'、若しくはRNR'R"であり; または R_1 及び R_2 が一緒に、 R_3 及び R_4 が一緒に、若しくは R_5 及び R_6 が一緒にOROであり; この際、R、R'、及びR"のそれぞれは、独立して、炭素原子数1~6のアルキルであり; ならびにnは、1、2、または3である。本化合物は、学習及び記憶を促進するまたは健忘症を治療するのに有効な量である。

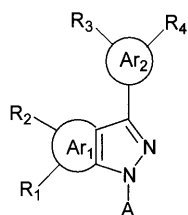


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

学習及び記憶の亢進または健忘症の治療が必要な患者に、有効量の下記式：

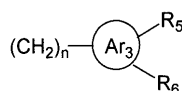
【化 1】



10

ただし、A は、H、R、または下記式：

【化 2】



であり；

Ar₁、Ar₂、及び Ar₃ のそれぞれは、独立して、フェニル、チエニル、フリル、またはピロリルであり； 20

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、及び R₆ のそれぞれは、独立して、H、ニトロ、ハロゲン、R、OH、OR、C(O)OH、C(O)OR、C(O)SH、C(OS)R、C(O)NH₂、C(O)NHR、C(O)NRR'、ROH、ROR'、RSH、RSR'、ROC(O)R'OH、NHR、NRR'、RNHR'、若しくは RNR'R'' であり；または R₁ 及び R₂ が一緒に、R₃ 及び R₄ が一緒に、若しくは R₅ 及び R₆ が一緒に ORO であり；この際、R、R'、及び R'' のそれぞれは、独立して、炭素原子数 1 ~ 6 のアルキルであり；ならびに

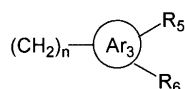
n は、1、2、または 3 である、

の化合物を投与することを有する、学習及び記憶の亢進または健忘症の治療方法。 30

【請求項 2】

A は、下記式：

【化 3】



である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

Ar₁ はフェニルである、請求項 2 に記載の方法。 40

【請求項 4】

R₁ 及び R₂ は、それぞれ、フェニルの 4 及び 5 位で置換される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

Ar₂ は 5'-フリルである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

R₃ 及び R₄ の一方が、フリルの 2 位で置換される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

Ar₃ はフェニルである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

50

n は 1 である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

$A r_1$ はフェニルである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

R_1 及び R_2 は、それぞれ、フェニルの 4 及び 5 位で置換される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

$A r_2$ は 5'-フリルである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

R_5 及び R_6 のそれぞれは H であり、かつ R_3 及び R_4 の一方がフリルの 2 位で置換される、請求項 11 に記載の方法。 10

【請求項 13】

R_1 及び R_2 のそれぞれは H である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C H_2 N C H_3$ である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C H_2 O H$ である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C H_2 O C H_3$ である、請求項 13 に記載の方法。 20

【請求項 17】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C O O C H_3$ である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C H_2 O H$ である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】

R_1 及び R_2 のそれぞれが H である、請求項 18 に記載の方法。 30

【請求項 20】

R_1 が H であり、かつ R_2 が F である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

R_1 が H であり、かつ R_2 が $O C H_3$ である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

R_1 及び R_2 が一緒に $O C H_2 O$ である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

$A r_1$ はチエニルである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 24】

$A r_2$ はフェニルである、請求項 3 に記載の方法。 40

【請求項 25】

R_3 及び R_4 の一方がフェニルの 4 位で置換される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

R_3 及び R_4 の一方が H であり、かつ他方が $C H_3$ である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

$A r_3$ はフェニルである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

n は 1 である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

R_3 及び R_4 の一方がフェニルの 4 位で置換される、請求項 28 に記載の方法。 50

【請求項 30】

R₃ 及び R₄ の一方が H であり、かつ他方が CH₃ である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

R₁ 及び R₂ のそれぞれが H であり、R₅ 及び R₆ の一方が H であり、かつ他方がフェニルの 3 位で置換される Cl である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

R₁ 及び R₂ のそれぞれが H であり、R₅ 及び R₆ の一方が H であり、かつ他方がフェニルの 4 位で置換される NO₂ である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

A は H である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 34】

A r₁ はフェニルである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

R₁ 及び R₂ は、それぞれ、フェニルの 4 及び 5 位で置換される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

A r₂ は 5'-フリルである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

R₃ 及び R₄ の一方がフリルの 2 位で置換される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

R₁ 及び R₂ のそれぞれが H である、請求項 37 に記載の方法。

20

【請求項 39】

R₃ 及び R₄ の一方が H であり、かつ他方が COOCH₃ である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

A r₂ は 5'-フリルである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 41】

R₃ 及び R₄ の一方がフリルの 2 位で置換される、請求項 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願

本願は、2001年9月14日に提出された米国仮特許出願第60/322,389号の優先権を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

背景

長期増強 (LTP) は、ある型の学習及び記憶に寄与するシナプス可塑性の長期継続する形態である。レビューとして、例えば、Bliss & Collingridge (1993) Nature 361: 31-39を参照。海馬のCA1領域では、LTPの誘発は、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体の活性化によって引き起こされるシナプス後ニューロンへのCa²⁺の侵入に依存する。例えば、Tsien et al. (1996) Cell 87: 1327-1338を参照。N-メチル-D-アスパラギン酸受容体は、広範な中枢神経系の疾患にかかわりがあると考えられるので、特に興味のあるものである。例えば、Foster et al. (1987) Nature 329: 395-396; および Mayer et al. (1990) Trends in Pharmacol. Sci. 11: 254-260を参照。

40

【0003】

酸化窒素は、脳内の新規な型の細胞間伝達物質として作用でき、LTP中で逆行性伝達物質として作用する可能性のある拡散性分子である。例えば、Son et al. (1996) Cell 87: 1015-1023; およびWilson et al. (1997) Nature 386: 338を参照。酸化窒素産生のための酵素である、酸化窒素合成酵素の阻害剤は、LTPの誘発を防止しうる。酸化窒素のダ

50

ウンストリームエフェクター (downstream effector) の一つが c G M P であり、これはまた L T P の誘発にかかわりがある。c G M P は、可溶性グアニリルシクラーゼによって生じる。可溶性グアニリルシクラーゼの阻害剤は L T P を抑制する。例えば、Zhuo et al. (1994) Nature368: 635-639 ; および Boulton et al. (1995) Neuroscience 69: 699-703 を参照。加えて、c G M P は、L T P の誘発に役割を果たす、c G M P 依存性プロテインキナーゼ G 等の、多くのタンパク質の活性を制御する。プロテインキナーゼ G の阻害剤は L T P の誘発を遮断し、プロテインキナーゼ G のアクチベーターは弱いテタヌス刺激にตอบสนองする L T P の誘発を亢進する。例えば、Zhuo et al. (1994) Nature368: 635-639 を参照。Zhuo et al. (1994) Nature 368: 635-639。したがって、酸化窒素、c G M P、及びプロテインキナーゼ G を含むシグナル伝達経路は、L T P の誘発にかかわりがある。シグナル伝達経路を調節する化合物の同定により、学習及び記憶を促進するのに有用な新規な治療が得られうる。

10

【発明の開示】

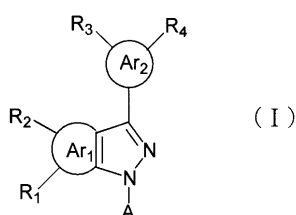
【0004】

要約

一態様においては、本発明は、学習および記憶の亢進方法の特徴とするものである。本方法は、このような必要のある患者に、下記式 (I) :

【0005】

【化1】



20

【0006】

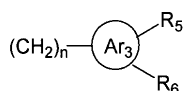
の融合ピラゾリル化合物を投与することを有する。

【0007】

A は、H、R、または下記式 :

【0008】

【化2】



30

【0009】

であり (以降、「 $(CH_2)_n Ar_3 (R_5) (R_6)$ 」と称する) ; Ar_1 、 Ar_2 、及び Ar_3 のそれぞれは、独立して、フェニル、チエニル、フリル、またはピロリルであり ; R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、及び R_6 のそれぞれは、独立して、H、ニトロ、ハロゲン、R、OH、OR、 $C(O)OH$ 、 $C(O)OR$ 、 $C(O)SH$ 、 $C(O)SR$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHR$ 、 $C(O)NRR'$ 、ROH、 ROR' 、RSH、 RSR' 、 $ROC(O)R'OH$ 、NHR、 NRR' 、 $RNHR'$ 、若しくは $RNR'R''$ であり ; または R_1 及び R_2 が一緒に、 R_3 及び R_4 が一緒に、若しくは R_5 及び R_6 が一緒にOROである。R、R'、及びR"のそれぞれは、独立して、炭素原子数1~6のアルキルであり ; および n は、1、2、または3である。当該化合物は、学習及び記憶の亢進に有効な量である。

40

【0010】

式 (I) は、ピラゾリル核及び少なくとも2個のアリール基、即ち、 Ar_1 及び Ar_2 を

50

含む。式(I)の化合物のサブセットは、Aが $(CH_2)_n Ar_3 (R_5) (R_6)$ であることを特徴とする。例えば、 Ar_1 がフェニルであり、ならびに R_1 及び R_2 が、それぞれ、フェニル基の4及び5位で置換される。 Ar_2 は5'-フリルであってもよく、この際、 R_3 及び R_4 の一方が、5'-フリル基の2位で置換され、例えば、1-ベンジル-3-(5'-ヒドロキシメチル-2'-フリル)-インダゾール(化合物1)がある。 Ar_2 はフェニルであってもよく、この際、 R_3 及び R_4 の一方がフェニル基の4位で置換され、例えば、1-(3-クロロ-ベンジル)-3-(4'-トリル)-インダゾール(化合物9)または1-(4-ニトロ-ベンジル)-3-(4'-トリル)-インダゾール(化合物10)がある。ある実施態様においては、 Ar_3 はフェニルであり、およびnは1である。

10

【0011】

式(I)の化合物の他のサブセットは、AがHであることを特徴とする。例えば、 Ar_1 がフェニルであり、ならびに R_1 及び R_2 が、それぞれ、フェニル基の4及び5位で置換される。他の例としては、 Ar_2 が5'-フリルであり、この際、 R_3 及び R_4 の一方が、5'-フリル基の2位で置換される。

【0012】

本明細書中で使用される、「アリアル」ということばは、フェニル、チエニル、フリル、またはピロリルを含み、それぞれ、必要であれば一以上の置換部分を有する。置換部分は、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、若しくは R_6 が同一であってもあるいは異なるものであってもよい。置換部分は、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、メルカプト、シアノ、ニトロ、炭素原子数1~6のアルキル、炭素原子数1~6のアルケニル、炭素原子数1~6のアルコキシ、アリアル、ヘテロアリアル、またはヘテロシクリルであってもよく、この際、アルキル、アルケニル、アルコキシ、アリアル、ヘテロアリアル、及びヘテロシクリルは必要であれば炭素原子数1~6のアルキル、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、メルカプト、シアノ、またはニトロで置換されてもよい。「アルキル」ということばは、直鎖アルキル及び分岐鎖アルキル双方を意味する。

20

【0013】

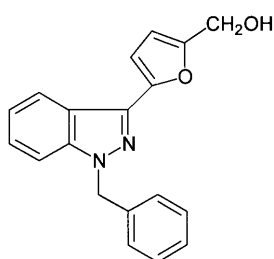
本発明の方法を実施するにあたって使用できるある特定の融合ピラゾリル化合物の具体例を以下に列挙する。

【0014】

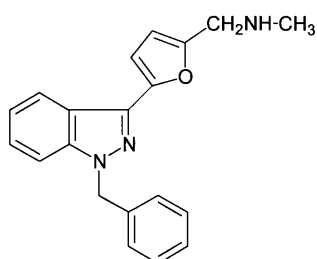
30

【化3】

化合物1



化合物2

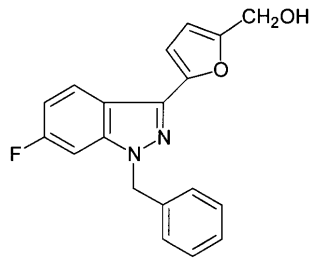


40

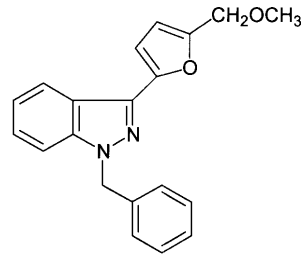
【0015】

【化4】

化合物 3

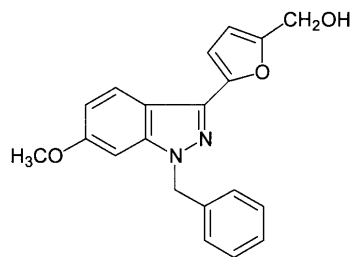


化合物 4



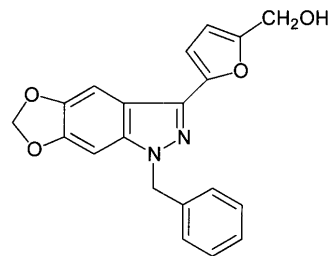
10

化合物 5



20

化合物 6

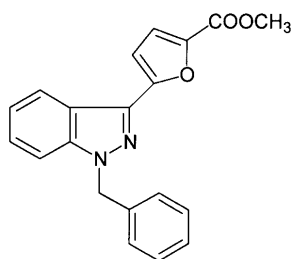


30

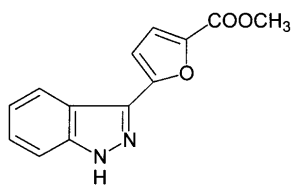
【 0 0 1 6 】

【 化 5 】

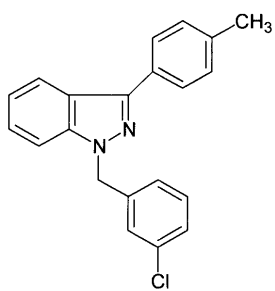
化合物 7



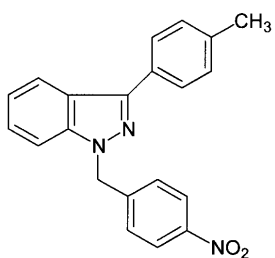
化合物 8



化合物 9



化合物 10



10

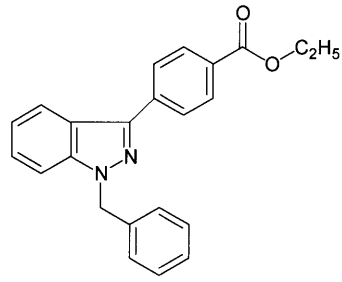
20

30

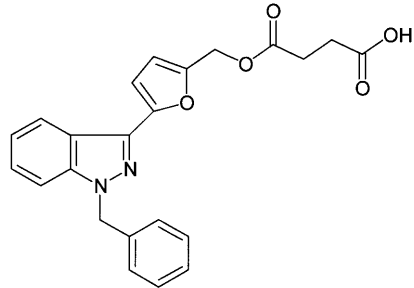
【 0 0 1 7 】

【 化 6 】

化合物 1 1

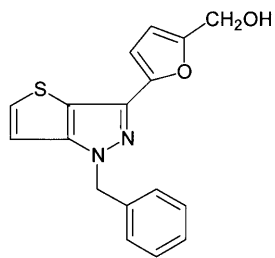


化合物 1 2



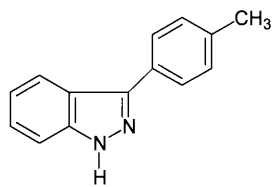
10

化合物 1 3



20

化合物 1 4

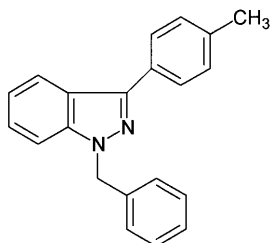


30

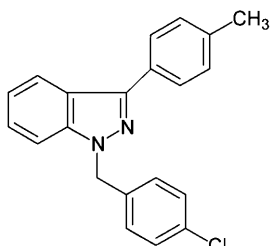
【 0 0 1 8 】

【 化 7 】

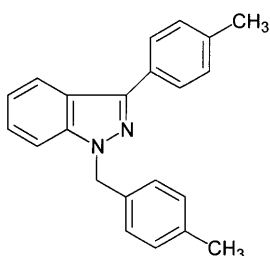
化合物 15



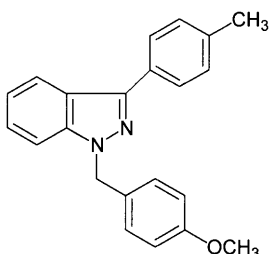
化合物 16



化合物 17



化合物 18



10

20

30

40

50

【0019】

上記融合ピラゾリル化合物は、当該化合物自体、ならびに適用できる場合には、これらの塩及びこれらのプロドラッグを含む。このような塩は、例えば、融合ピラゾリル化合物の負に荷電した置換基（例えば、カルボキシレート）及びカチオン間の相互作用によって形成されてもよい。適当なカチオンとしては、以下に制限されないが、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、及びテトラメチルアンモニウムイオン等のアンモニウムカチオンが挙げられる。同様に、正に荷電した置換基（例えば、アミノ）が負に荷電した対イオンと塩を形成してもよい。適当な対イオンとしては、以下に制限されないが、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、または酢酸塩が挙げられる。プロドラッグの例としては、患者に投与されると、上記融合ピラゾリル化合物を形成できる、エステル及び他の製薬上許容できる誘導体が挙げられる。

【0020】

本発明はまた、健忘症の治療方法の特徴とするものである。本方法は、このような必要のある患者に上記一以上の融合ピラゾリル化合物を有効量投与することを有する。本明細書中で使用される、「健忘症 (amnesia)」は、記憶の喪失を意味する。これは、神経心理的な疾患 (neuropsychological disorder) により生じることもある。「神経心理的な疾患」としては、以下に制限されないが、認識、学習、及び記憶の不足、神経変性疾患（例えば、ハンチントン病、パーキンソン病、またはアルツハイマー病）から派生する疾患、感情障害（例えば、双極性感情障害、気分変調性障害、または季節性気分障害）、及び鬱病が挙げられる。

【0021】

他の態様においては、本発明は、包装製品(packaged product)を特徴とするものである。本包装製品は、容器、容器に入っている一以上の融合ピラゾリル化合物、及び容器に付随し、学習及び記憶を亢進するためのまたは健忘症を治療するためのピラゾリル化合物の投与を示す説明文(例えば、ラベルまたはインサート)を含む。

【0022】

また、学習及び記憶を亢進するための、または健忘症を治療するための薬剤の製造を目的とする上記化合物の使用もまた本発明の範囲に包含される。

【0023】

本発明の他の態様、目的、及び利点は、詳細な説明から及び特許請求の範囲から明らかである。 10

【0024】

詳細な説明

本発明の方法を実施するにあたり使用される融合ピラゾリル化合物は、当業者に既知の方法(例えば、米国特許第5,574,168号を参照)によって調製できる。当該方法は、以下の合成経路を含む:アリアルアリアルケトンをまず、アリアルカルボニルクロライドを他のアリアル化合物とカップリングすることによって調製する。いずれかのアリアル化合物は必要であれば一または多置換されていてもよい。次に、このケトン、アリアル基が必要であれば一または多置換されていてもよい、アリアルアルキルヒドラジンと反応させて、3個のアリアル基を含むヒドラゾン形成する。ヒドラゾン基をアルキレンリンカーを介して融合ピラゾリル核に変換し、他のアリアル基をピラゾリル核の4-C及び5-Cで融合して、さらに3番目のアリアル基を直接ピラゾリル核の3-Cに連結する。融合ピラゾリル化合物の誘導体を、いずれかのアリアル基の置換基を修飾することによって得てもよい。 20

【0025】

上記合成経路で使用される化学物質としては、例えば、溶剤、試薬、触媒、保護基及び脱保護基試薬がある。上記方法はまた、本明細書中で詳細に記載される段階の前後に、融合ピラゾリル化合物を最終的に合成するために適当な保護基を付加するまたは除去する段階をさらに有していてもよい。加えて、様々な合成段階を別の配列(sequence)または順番(order)で行なって、所望の化合物を得てもよい。適当な融合ピラゾリル化合物を合成するのに有用な合成化学変換及び保護基方法(保護及び脱保護)は当該分野において知られており、これらとしては、例えば、R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); および L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)ならびにこれらの後の出版物に記載されるものがある。 30

【0026】

このようにして合成された融合ピラゾリル化合物は、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、または再結晶化等の方法によってさらに精製されてもよい。 40

【0027】

本発明の一態様としては、学習及び記憶の亢進方法または神経心理的な疾患から派生する健忘症の治療方法がある。当該方法は、このような必要のある患者に、有効量の一以上の融合ピラゾリル化合物及び製薬上許容できる担体を投与することを有する。本明細書中で使用される、「記憶」ということばは、意識プロセスを蓄積し、後にある程度忠実にこれらを再生する知力を意味する。心理学的なプロセスとしては、記憶は、保持、再生、及び認識を包含する。記憶の理論的なモデルとしては、感覚登録機構、短期記憶、作動記憶、及び長期記憶(意味記憶、手続き記憶、及びエピソード記憶を含む)がある。他の記憶の概念化としては、音声記憶、視覚記憶(visual memory)、運動記憶(motor memory)、及び認識記憶(recognition memory)がある。「治療」ということばは、健忘症、健忘症の症状 50

または健忘症の素質を治癒させる(cure)、治す(heal)、緩和する(alleviate)、軽くする(relieve)、変える、治療する(remedy)、改善する(ameliorate)、向上させる(improve)、または影響を与えることを目的として、神経心理的な疾患から派生する健忘症、健忘症の症状または健忘症の素質を有する、患者への融合ピラゾリル化合物を含む組成物の塗布(application)または投与として規定される。「有効量」は、このような必要のある患者に投与されると、患者に治療効果を与えるのに必要な融合ピラゾリル化合物の量として規定される。融合ピラゾリル化合物の有効量は、約0.01mg/kg~約300mg/kgの範囲であってもよい。有効量はまた、当業者には認識されるように、投与経路、賦形剤の使用、ならびに学習及び記憶を亢進するための他の薬剤との、あるいは健忘症を治療するための他の薬剤との併用の可能性によって異なる。

10

【0028】

本発明の方法を実施するのに、融合ピラゾリル化合物は、経口で、非経口で、吸入スプレーによってまたは移植用リザーバー(implanted reservoir)を介して投与できる。本明細書中で使用される、「非経口」ということばは、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液包内、胸骨内、包膜内、病変内及び頭蓋内注入または輸液技術を包含する。

【0029】

経口投与用の組成物は、以下に制限されないが、カプセル、錠剤、エマルジョンならびに水性懸濁液、分散液及び溶液などの経口で許容できる投与形態であってもよい。経口で使用される錠剤の場合には、一般的に使用される担体としては、ラクトース及びコーンスターチがある。ステアリン酸マグネシウム等の、潤滑剤もまた一般的に添加される。カプセル形態での経口投与では、使用できる希釈剤としては、ラクトース及び乾燥コーンスターチがある。水性懸濁液またはエマルジョンを経口で投与する場合には、活性成分を乳化または懸濁化剤と合わせた油相中に懸濁または溶解してもよい。必要であれば、適当な甘味、芳香、または着色剤を添加してもよい。吸入組成物は、製剤の分野において既知の技術に従って調製でき、当該分野において既知の、ベンジルアルコールまたは他の適当な保存剤、バイオアベイラビリティを促進するための吸収促進剤、フルオロカーボン、および/または他の可溶化若しくは分散剤を用いて、生理食塩水における溶液として調製されてもよい。

20

【0030】

滅菌注射用組成物、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、適当な分散または湿潤化剤(例えば、ツィーン80など)及び懸濁化剤を用いて当該分野において既知の技術に従って配合されてもよい。滅菌注射用製剤はまた、無毒な、非経口で許容できる希釈剤または溶剤における滅菌注射溶液または懸濁液、例えば、1,3-ブタンジオールにおける溶液であってもよい。使用される許容できるベヒクルや溶剤の中には、マンニトール、水、リンガー液及び等張食塩液がある。加えて、滅菌した不揮発性油が、従来、溶剤または懸濁媒体として使用される(例えば、合成モノ-またはジグリセリド)。オレイン酸及びそのグリセリド誘導體等の、脂肪酸が、特にポリオキシエチレン化形態の、オリーブ油またはヒマシ油等の、天然の薬学的に許容できる油と同様、注射剤の調製に使用できる。これらの油溶液または懸濁液はまた、長鎖アルコールの希釈剤若しくは分散剤、またはカルボキシメチルセルロースまたは同様の分散剤を含んでもよい。

30

40

【0031】

薬剤組成物における担体は、製剤の活性成分と適合でき(および好ましくは、これを安定化でき)、さらに治療を受ける患者に害のないという意味で「許容できる」ものでなければならない。例えば、融合ピラゾリル化合物との特定の、より可溶性の複合体を形成する、シクロデキストリン等の可溶化剤、または一以上の可溶化剤を、融合ピラゾリル化合物のデリバリー用の薬剤賦形剤として使用してもよい。他の担体の例としては、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、ラウリル硫酸ナトリウム、及びD&C イエロー#10(D&C Yellow #10)がある。

【0032】

適当なin vitroアッセイを用いて、融合ピラゾリル化合物の長期増強誘発能を予め評価し

50

てもよい。また、当該分野において既知の方法に従ってin vivoスクリーニングを行なってもよい。下記の具体的な実施例を参照のこと。

【0033】

さらに詳述しなくとも、上記説明は本発明を適度に行なうことができると考えられる。したがって、下記の具体的な実施態様は、単に詳細に説明することを意図するものであり、いずれの残りの開示を限定するものではないと解される。本明細書に列挙されたすべての公報は完全に参考のために引用される。

【0034】

1 - ベンジル - 3 - (5 ' - ヒドロキシメチル - 2 ' - フリル) - インダゾール (化合物 1) の合成

無水THF (20 mL) 中で無水塩化カルシウム (88.8 mg、0.8ミリモル) を硼水素ナトリウム (sodium borohydride) (60 mg、1.6ミリモル) と4時間攪拌することによって、硼水素カルシウム (calcium borohydride) をまず調製した。次に、88.0 mg の 1 - ベンジル - 3 - (5 ' - メトキシカルボニル - 2 ' - フリル) - インダゾール (0.27ミリモル) を含むTHF溶液30 mLを、 30 ± 2 で硼水素カルシウム溶液に滴下した。この混合物を還流しながら6時間加熱し、冷却し、クラッシュアイス中で急冷し、減圧下において、THFを除去し、さらに濾過することによって、固体生成物を得た。この固体をジクロロメタンで抽出した。抽出物を50 mLまで濃縮し、固体を石油エーテルを添加した後沈殿させた。この沈殿物を集めて、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル - ベンゼン) によって精製して、70.0 mg の 1 - ベンジル - 3 - (5 ' - ヒドロキシメチル - 2 ' - フリル) - インダゾールを87%の収率で得た。

【0035】

融点：108 ~ 109 。

【0036】

【化8】

MS (%), m/z: 304 (M^+).

IR (KBr) ν_{\max} : 3350 cm^{-1} (-OH).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 4.51 (2H, d, J=5.5 Hz, -CH₂O-), 5.31

(1H, t, J=5.5 Hz, -OH), 5.70 (2H, s, =NCH₂-), 6.48 (1H, d, J=3.4 Hz, H-4'), 6.97 (1H,

d, J=3.4 Hz, H-3'), 7.21-7.31 (6H, m, H-5, phenyl), 7.45 (1H, t, J=8.2 Hz, H-6), 7.75

(1H, dd, J=8.2, 1.8 Hz, H-7), 8.12 (1H, dd, J=8.2, 1.0 Hz, C4-H).

【0037】

電気生理試験

断頭後、成体 (長期増強の誘発を目的とした、150 ~ 250 mg) または幼体 (長期抑圧の誘発を目的とした、2 ~ 3週齢) のウイスター系ラットの脳をすばやく除き、海馬を解剖して取り出した。横方向の海馬スライス (transverse hippocampal slice) (450 μm 厚) を、124 mM NaCl、3 mM KCl、1.0 mM Na₂HPO₄、25 mM NaHCO₃、0.5 mM CaCl₂、5.0 mM MgSO₄、10 mM グルコースを含む氷冷切断用緩衝液中に即座に置き、95% O₂ 及び5% CO₂ で飽和した。次に、これらのスライスを、室温でインタフェースチャンバー中に維持し、人工脳脊髄液 (ACSF) で1 ~ 2 mL / 分の流速で灌流した。ACSFの組成は、124 mM NaCl、4.4 mM KCl、1.0 mM Na₂HPO₄、25 mM NaHCO₃、2.0 mM または2.5 mM CaCl₂、1.0 mM MgSO₄、10 mM グルコースを含み、95% O₂ 及び5% CO₂ のガスを流した (gassed) 。興奮性シナプス後電位 (field Excitatory Postsynaptic Potentials) (fEPSP) を、Schaffer側枝 / 交連経路 (commissural pathway) 上に置かれた双極刺激電極による試験パルスによって誘発し、2 M NaClで満たされたガラス製マイクロピペット電極 (5 ~ 10 M) を用いてCA1の放射状層から記録した。試験パルス期間は100 μsec であり、試験応答は0.02 Hzで誘発した。皮質 - 扁桃体経路 (cortico-amygdala pathway) の電位を記録するた

めに、刺激電極を、聴覚皮質から側扁桃体 (lateral amygdala) までの線維を含む、外包中に置いた。ピククリン (10 μ M) が、扁桃体の fEPSP を記録する際に灌流溶液中に存在した。灌流系で投与される融合ピラゾリル化合物の有効性を高めるために、記録チャンパー中の ACSF レベルは、海馬スライスをつかべるのではなく覆うのに十分高いものであった。すべての融合ピラゾリル化合物を ACSF 中で灌流した。

【0038】

誘発された fEPSP を記録し、データを分析した。fEPSP の初期勾配を算出し、データを fEPSP のベースライン勾配の平均のパーセントとして表わした。

【0039】

化合物 1 によって亢進した長期増強 (LTP) : LTP は、学習及び記憶に関する最も普及している神経生理学的モデルである。ラットの海馬スライスの Schaffer 側枝 - CA1 経路における LTP を、20 秒間隔で 100 Hz、1 秒の操作 (train) 2 回を与えることからなる、強いテタヌス刺激によって誘導した。強いテタヌス刺激によって、テタヌス刺激後 50 分で fEPSP 163.4 \pm 7.0% (n = 6) の勾配で LTP が誘発された。LTP は、6 分間 (テタヌス刺激前に 3 分及びテタヌス刺激後に 3 分)、化合物 1 (1.6 μ M) で灌流することによって顕著に亢進した。fEPSP の勾配は、テタヌス刺激後 50 分で 404.7 \pm 34.9% (n = 5) であった。

10

【0040】

LTP を誘発しない弱いテタヌス刺激は、20 Hz、0.5 秒の操作 1 回から構成された。予想しないことに、6 分間 (テタヌス刺激前に 3 分及びテタヌス刺激後に 3 分) の化合物 1 (1.6 μ M) による灌流は、LTP を誘発した。fEPSP の勾配は、1 時間で 172.9 \pm 10.7% (n = 7) であった。3 回の操作 (3 分間隔の 100 Hz、1 秒) の刺激では、扁桃体で 30 分以内にベースラインに減衰する一時的な増強が誘発された。しかしながら、同様の刺激操作でも、化合物 1 が存在すると、少なくとも 1 時間は安定して継続する連続 (enduring) LTP が誘発された (n = 4)。

20

【0041】

LTP 亢進に関する化合物 1 のメカニズム : 酸化窒素の役割を調べた。化合物 1 及び N^G-ニトロ-L-アルギニン-メチルエステル (L-NAME、RBI から購入) (300 μ M)、酸化窒素合成酵素阻害剤を同時に灌流することによって、化合物 1 によって誘発される LTP が有意に弱まった。これに対して、ヘムオキシゲナーゼ阻害剤である、亜鉛プロトポルフィリン (1 μ M) は、化合物 1 によって誘導される LTP に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、一酸化炭素ではなく酸化窒素が化合物 1 によって亢進される LTP の誘発にかかわりがあることが示される。

30

【0042】

化合物 1 を、可溶性グアニリルシクラーゼの特異的な阻害剤である、1H-[1,2,4]ジアゾロ[4,3,-a]キノキサリン-1-オン {1H-[1,2,4]diazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one} (ODQ、TOCRIS から購入) と共に同時に灌流した。ODQ がないと、LTP は、弱いテタヌス (50 Hz / 0.5 s) で化合物 1 によって誘発された。ODQ (5 μ M) があると、LTP は化合物 1 によって誘発されなかった。fEPSP の勾配は、107.8 \pm 3.9% (n = 5) であった。これらの結果から、可溶性グアニリルシクラーゼは化合物 1 によって亢進される LTP の誘発にかかわりがあることが示される。

40

【0043】

また、化合物 1 を、プロテインキナーゼ G の特異的な阻害剤である、KT5823 (Calbiochem 製) と共に同時に灌流した。KT5823 がないと、LTP は、弱いテタヌス (50 Hz / 0.5 s) で化合物 1 によって誘発された。KT5823 (2 μ M) があると、化合物 1 によって誘発される LTP は阻害された。fEPSP の勾配は、112.9 \pm 5.4% (n = 4) であった。これらの結果から、酸化窒素 - cGMP - プロテインキナーゼ G - シグナル伝達経路は化合物 1 によって亢進される LTP の誘発にかかわりがあることが示唆される。

【0044】

50

さらに、化合物 1 を、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体のアンタゴニストである、2 - アミノ - 5 - ホスホノペンタン酸 (2-amino-5-phosphonopentanoic acid) (AP5、RBI から購入) と共に同時に灌流した。AP5 がないと、LTP は、弱いテタヌス (50 Hz / 0.5 s) で化合物 1 によって誘発された。AP5 (100 μ M) があると、化合物 1 によって誘発される LTP は遅延した。fEPSP の勾配は、 $142.1 \pm 13.5\%$ ($n = 5$) であった。これらの結果から、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体からの Ca^{2+} の流入は化合物 1 によって亢進される LTP の誘発にかかわりがあることが示唆される。

【0045】

加えて、化合物 1 を、代謝型受容体 (metabotropic receptor) である、MCPG ((\pm)- α -メチル-(4-カルボキシフェニル)グリシン [(\pm)- α -methyl-(4-carboxyphenyl)glycine]; Sigma/RBI 製) と共に同時に灌流した。MCPG (100 μ M) があると、化合物によって誘発される LTP は抑制された。AP-5 及び MCPG の同時適用は、化合物 1 によって誘発される LTP を阻害した。fEPSP の勾配は、 $111.5 \pm 12.3\%$ ($n = 3$) であった。

10

【0046】

化合物 1 を強いテタヌス (100 Hz / 1 sec) を 2 回操作してから 10 分後に ACSF に (1.6 μ M で) 添加しても、LTP は化合物 1 によってさらに増強しなかったことから、酸化窒素が高周波による刺激時に放出され、化合物 1 により亢進する LTP の誘発はテタヌス刺激から数分以内でのみ起こることが示唆される。

20

【0047】

低周波による刺激 (LFS) によって誘発される可塑性に関する化合物 1 : LFS (1 Hz で 900 パルス) を、若いラット (7 ~ 14 日齢) から採取した海馬スライスにデリバリーして、長期抑圧 (LTD) を誘発した。1 Hz で海馬スライスを 3 分間刺激することによって、シナプス伝達の LTD は生じなかった。しかしながら、この短期の LFS は、化合物 1 の存在下で有意に LTD を誘発した ($83.4 \pm 10.9\%$, $n = 3$)。LFS 中 15 分間、化合物 1 (1.6 μ M) を灌流すると、LTD 可塑性は LTP に逆転した。0.02 Hz でのより弱い電気刺激を、酸化窒素ドナーニトロプルシド (300 μ M) 及び化合物 1 (1.6 μ M) 双方の存在下でデリバリーした。酸化窒素ドナーニトロプルシド (30 μ M) 及び化合物 1 (1.6 μ M) を同時に灌流することによって、LTD が誘発された。これらのデータから、酸化窒素ドナーは化合物 1 の存在下でテタヌス刺激の作用を模倣できることが示唆される。化合物 1 またはニトロプルシド単独では、0.02 Hz の刺激での fEPSP に増強を生じなかった。

30

【0048】

ピラゾリル化合物による LTP の促進 : 化合物 1 ~ 8 についても、海馬スライスでの LTP 誘発の促進を試験した。結果を表 1 に示す。テタヌス刺激 (50 Hz、0.5 s) してから 60 分後の fEPSP の勾配を示す。各化合物 (1.6 μ M) を、弱いテタヌス刺激の 3 分前及び 3 分後に灌流した。

【0049】

【表 1】

40

表1：LTP誘発の促進に関するピラゾリル化合物の効果

化合物	fEPSP
コントロール	108.4%
化合物1	172.9%
化合物2	165.9%
化合物3	218.9%
化合物4	216.9%
化合物5	180.8%
化合物6	260.3%
化合物7	200.3%
化合物8	180.6%

10

【0050】

行動負荷試験 (Behavioral Task Test)

モーリスの水迷路 (Morris water maze) : モーリスの水迷路を、目で識別できるようなキューのついた (with distinctive visual cues) 部屋にある丸いプール (224 cm 直径、46 cm 高さ) で行なった。水を36 cmの深さになるまでいれ、透明なプラスチック製のプラットホーム (25 x 25 cm、32 cm 高さ) を固定した4分円の中央部に置いた。ラットを以下の負荷環境中で2日間訓練した：透明なプラスチック製のプラットホームなしでプールの中を自由に水泳。各訓練のセッションは2分であり、ラットを実験者がプールから引き上げた。次に、ラットに、次の6日間、連続した毎日の訓練トライアルを4回行った。各訓練トライアルでは、各ラットを4分円の一つからランダムに水の中に置いた。ラットは、水面下に沈められたプラスチック製のプラットホーム上に登るまで泳ぎ続けなければならなかった。水中に置かれてからプラスチック製のプラットホームに登るまでの時間を記録し、脱出潜伏時間 (escape latency) として規定した。ラットが120秒たってもプラスチック製のプラットホームを見つけられなかった際には、実験者がラットを引き上げて、プラスチック製のプラットホームに置いた。各ラットを60秒間プラットホーム上に置き、この時間をトライアルの間隔とした。化合物1 (1 mg / kg) またはベヒクルを最初の訓練トライアルの10分前に各ラットに毎日注射した。それぞれの日の最後の訓練トライアル後、各ラットをタオルで乾燥させ、電気加熱器を収容ケージ (home cage) に置いた。

20

30

【0051】

実質証拠は空間的な情報の習得及び保持において海馬が関連のあることを示す。例えば、Ohon et al. (1979) Behav. Brain Sci. 2: 316-365; および Barnes (1988) Trend Neurosci. 11: 163-169を参照。モーリスの水迷路における空間的な記憶の習得に関する化合物1の効果を試験した。ラットに、毎日、4回連続して訓練トライアルを行なった。化合物1 (1 mg / kg) を、最初の訓練トライアルの10分前に毎日注射した (腹腔内、1 mg / kg)。データから、化合物1は最初の訓練日に2~4訓練の脱出潜伏期間を短縮したことが示され、これから化合物1は短期間記憶を促進することが示唆される。2~4訓練の脱出潜伏期間は、それぞれ、コントロール群では93.8 ± 8.7秒、79.3 ± 12.3秒及び57.6 ± 12.5秒、ならびに化合物1群 (n = 10) では50.4 ± 10.2秒、47.3 ± 6.8秒及び30.3 ± 10.3秒であった。次の3訓練日での最初の訓練の脱出潜伏期間もまた、化合物1群で顕著に短縮された。脱出潜伏期間は、それぞれ、コントロール群では91.1 ± 9.8秒、47.1 ± 3.9秒及び35.3 ± 6.1秒、ならびに化合物1群 (n = 10) では55.4 ± 12.8秒、15.3 ± 2.1秒、及び13.4 ± 1.7秒であった。これらの結果から、化合物1は長期間記憶をも促進することが示唆される。脱出潜伏期間は、化合物1は4日間日に1回投与したのみである

40

50

にもかかわらず、21日までの全実験期間をとおして化合物1群でより短かった。21日目の平均脱出潜伏期間は、コントロール群及び化合物1群で、それぞれ、 13.5 ± 1.8 秒及び 6.0 ± 0.5 秒(それぞれ $n = 10$)であった。上記結果から、化合物1は、学習及び記憶を改善するための有望な薬剤である。化合物1を、1.25%のカルボキシメチルセルロース(CMC)と混ぜて、連続した6日間、最初の訓練の30分前に直接胃に経口デリバリーした(10 mg / kg)。注射による投与と同様、化合物1の経口投与によっても、短期間及び長期間記憶が促進した。

【0052】

L-NAMEが海馬スライスの化合物1によって誘発されたLTPの促進を中和したので、*in vivo*実験を行ない、化合物1によって刺激された学習及び記憶の改善に関するL-NAMEの効果を試験した。これらの実験において、カニユレを長期にわたって移植したラットに、化合物1の腹腔内注射(1 mg / kg)を行うと共に、毎日の訓練の最初のトライアルの10分前に、L-NAME($1 \text{ mmol} / 10 \text{ mL}$)または生理食塩水を脳室内に注射した。データから、L-NAMEが仕事の顕著な記憶喪失を引き起こし、化合物1によって誘発される学習及び記憶の促進を有意に遮断したことが示される。KT5823の脳室内投与もまた、化合物1により誘発される促進を損なった。

10

【0053】

受動回避(*passive Avoidance*)および能動回避(*active avoidance*)負荷:ラットを、Liang et al. (1998, *Chin. J. Physiol.* 41: 33-44)に記載されるのと同様の方法で1訓練段階スルー受動障害回避負荷(*one-trial step-through passive inhibitory avoidance task*)について、訓練及び試験した。簡単にいうと、装置は、良く光が当たる安全なコンパートメント及び暗いショックコンパートメントにスライドするドアによって分けられたスルー形状のアレイ(*trough-shape alley*)であった。ドアに面した形で光の当たる側にラットを置いた。ラットを回転させると、ドアが開いた。ラットが暗いコンパートメントの中に入ったら、タイマーで制御された定電流ショック器(Lafayette Instruments, Model 80240 and Model 58010, Indiana, USA)により避けられないショックを足に与えた。足にショックを与えた後、ラットをアレイから取り出し、収容ケージに戻した。24時間または10日後に行なった保持試験では、ラットを再度アレイに入れ、4本の足すべてがショックコンパートメントに入る潜伏期間を保持スコアとして採った。ラットが5または10分にわたって入らなかった場合には、試験トライアルを終了して、300秒または600秒の天井スコア(*ceiling score*)を与えた。

20

30

【0054】

扁桃体も学習及び記憶に関連がある。この脳構造が特に感情的な情報を処理するのに関連があるということが研究により示された。例えば、Cahill and McGaugh (1990) *Behav. Neurosci.* 104: 532-543; および Gilbert et al. (1991) *Behav. Neurosci.* 105: 533-561を参照。酸化窒素もまた扁桃核における能動的に依存するシナプス可塑性(*activity-dependent synaptic plasticity*)及び受動的な回避学習にかかわりがあることが報告された。例えば、Bernabeu et al. (1995) *NeuroReport* 6: 1498-1500; Watanabe et al. (1995) *Brain Res.* 688: 233-236; および Teledgy and Kokavszky (1997) *Neuropharmacology* 36: 1583-1587を参照。受動的な回避学習に関する化合物1の効果を研究した。化合物1を、足ショック訓練の10分前に注射した(腹腔内、 1 mg / kg)。結果から、化合物1は光の当たるコンパートメントでの保持潜伏期間を顕著に延ばしたことが示される。記憶は数日間続く。保持スコアは、10日目に調べても非常に高かった。1日目及び10日目双方で試験した化合物1処置ラットで5分以上の長い保持潜伏期間を有するラットが非常に多かった(それぞれ、コントロール群では15匹中2匹および化合物1処置群では12匹中11匹)。化合物1を1.25% CMCと混ぜて、足にショックを与える前に直接胃にデリバリーした(10 mg / kg)。保持試験を、それぞれ、1日及び10日後に行なった。化合物1は、受動的な回避学習を非常に改善した(表2)。表3に示されるように、化合物1(腹腔内、 1 mg / kg)は、効果がより若いラットよりかなり顕著ではないものの、年齢のいったラットで学習行動を改善した。1年齢のラットをこの実験に選

40

50

んだ。化合物 1 (1 m g / k g) を足にショックを与える 1 0 分前に腹腔内注射した。保持試験を、それぞれ、1 日及び 1 0 日後に行った。

【 0 0 5 5 】

【 表 2 】

表 2 : 受動的な回避負荷における保持に関する経口による化合物 1 の改善

保持スコア (秒)		
	1 日目	1 0 日目
コントロール	54.9	224.1
	59.0	>600
	200.8	>600
	>600	>600
	12.3	24.7
	150.1	143.2
	12.3	12.1
	>300	543.4
	24.7	24.3
	平均±標準偏差 157.1±64.3	308.0±90.8
化合物 1	>600	454.0
	>600	>600
	>600	>600
	>600	>600
	15.0	15.0
	>300	207.1
	>300	453.2
	>300	>600
	>300	343.2
	77.1	500.2
	平均±標準偏差 369.2±70.2	437.3±62.4

10

20

30

【 0 0 5 6 】

【 表 3 】

表3：年配のラットにおける受動的な回避負荷における保持に関する
注射された化合物1の改善

保持スコア (秒)		
	1日目	10日目
コントロール	18.1	5.4
	4.2	2.2
	>300	>300
	74.7	58.5
	47.3	156.9
	平均±標準偏差 88.9±54.2	104.6±56.3
化合物1	>300	252.2
	>300	255.9
	207.1	85.8
	>300	>300
	58.1	12.9
	平均±標準偏差 233.0±47.3	181.4±55.7

10

20

【0057】

上記結果から、化合物1は、若い及び年配のラットの双方において受動的な回避の学習を改善できる。これらの負荷では、化合物1は、プロセスがLTPの誘発段階に関連すると考えられる、新たに形成される記憶の習得に特に影響を与える。足へのショックは、ラットにとって大きな刺激であると考えられる。酸化窒素は、この状況下で放出され、即座に代謝されると考えられる。化合物1は、化合物1が足のショックから30分後に注射されると、ラットに何ら効果を及ぼさなかった。これらの結果から、化合物1は、記憶負荷の前または間に投与されるときのみ学習行動を改善できることが示唆される。

【0058】

また、これらのデータから、化合物1は、足のショックから30分後に注射してもラットの回避行動に何ら効果を及ぼさないことが示された。加えて、化合物1によって誘発される促進の効果は、L-NAME及びKT5823（脳室内、それぞれ、1mmole及び0.2nmole）によって有意に中和された。これらの結果から、化合物1は、記憶の負荷の前または間に投与される場合のみ学習行動を改善できることが示唆される。さらに、足のショックを与える代わりにコンテキスト訓練(context training)の10分前に化合物1を投与すると、受動的な回避の保持スコアが延びることから、化合物1は足のショックがなくとも環境の合図に関して記憶の習得を促進することが示唆される。

30

【0059】

能動的な回避の試験では、ラットを、ドアに面した状態で暗いコンパートメントに置いた。ドアを半分開けたところ、ラットがドアを超えて光のあたるコンパートメントに折り返すのに10秒かかった。ラットが10秒以内に安全な側にいった場合には、ラットをこの実験には選ばなかった。足のショックを10秒後に入れた。ラットが安全なコンパートメントに逃げたら、ドアを閉めた。暗いショックコンパートメントでの保持時間を48時間後に測定した。ラットがコンテキスト訓練の日に10秒以内に光の当たるコンパートメントに入ったら、そのラットを捨てた。足のショックを1日目に暗いコンパートメントに入ってから10秒後に与えた。記憶の保持を2日目に試験した。足のショックを与える10分前に、化合物1を注射すると、記憶の保持が顕著に上がり、ショックコンパートメントから安全なコンパートメントへの脱出潜伏期間が短くなる。さらに、化合物1によって誘導される記憶の促進効果は、L-NAME及びKT5823（脳室内、それぞれ、1m

40

50

mol e及び0.2nmol e)によって効果的に阻害された。ゆえに、化合物1は、N O - c G M P - P K G 経路による受動回避及び能動回避試験双方においてラットの学習行動を有意に改善する。

【0060】

ロッド試験(rotorod test):この実験は、マウス(オス、20~25gm)で行った。ロッド装置(rotorod apparatus)は、プラスチック製の円筒形のロッド(3cm直径×13cm長さ)であった。このロッドの端を2つの壁で支えて、壁の底から25cm離れた。ロッドの端の壁は、マウスがロッドを降りれ(climb off)ないくらい十分高かった。3回トライアルを各実験で行った。化合物1(1mg/kg)またはベヒクルを初めのトライアルの20分前に腹腔内注射した。ロッド試験の各トライアルでは、マウスをロッドの上に置き、ロッドから落ちるまでの時間を計った。最大3分までとした。間隔は10分であった。ロッドを28rpmで電気モーターで回転させた。

10

【0061】

小脳の酸化窒素もまた、LTD及び運動学習(motor learning)に関連があると報告された。例えば、Li et al. (1995) J. Neurophysiol. 74: 489-494を参照。運動学習を改善する化合物1を研究した。マウスをこの種の実験に選んだ。化合物1(腹腔内、1mg/kg)は、回転ロッド(28rpm)でのマウスの運動協調(motor coordination)を有意に改善した。コントロールマウスの行動はトライアル数を増やすと改善が得られ、3回目のトライアルでより良好な改善が得られた。しかしながら、化合物1で処置されたマウスは、最初のトライアルの時さえロッドで良好なバランスを示し、2回目のトライアルでは非常に良好な運動協調を示した。化合物1が小脳で主に作用することによって運動学習をも改善できることは明白である。

20

【0062】

他の実施態様

本明細書中で開示された態様はすべていずれの組み合わせで組み合わせられてもよい。本明細書中で開示された各態様は、同様の、等価の、または類似の目的を果たす別の態様に置換されてもよい。ゆえに、特記しない限り、開示された各態様は、一般的な一連の等価のまたは類似の態様の例でしかない。

【0063】

上記から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に認識でき、本発明の精神及び概念を逸脱することなく、様々な用途及び条件に適合させるために本発明の様々な変更や修飾を行なうことができる。例えば、融合ピラゾリル化合物に構造が類似する化合物を本発明を実施するにあたって使用してもよい。ゆえに、他の実施態様もまた特許請求の範囲に含まれる。

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/024397 A2

- (51) International Patent Classification: A61K Shinyi Chiu, Taipei (TW). KUO, Sheng-Chu [—]; 91 Tsueh-Shih Road, 404 Taichung (TW). LEE, Fang-Yuan [—]; No. 1191, Sec. 1, Chang Shan Rd., Tachia, Taichung (TW). TENG, Che-Ming [/]; 100 Szewei Road, Taipei 106 (TW).
- (21) International Application Number: PCT/US02/29294
- (22) International Filing Date: 16 September 2002 (16.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/322,389 14 September 2001 (14.09.2001) US
10/242,826 13 September 2002 (13.09.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/322,389 (CON)
Filed on 14 September 2001 (14.09.2001)
US Not furnished (CON)
Filed on 13 September 2002 (13.09.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US): CARLSBAD TECHNOLOGY, INC. [US/US]; 5923 Balfour Court, Carlsbad, CA 92008 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): FU, Wen-Mei [/]; 4th Floor, No. 7-1, Lane 16, Wun-Zhou Street, Taipei 106 (TW). LIANG, Keng-Chen [—]; 4th Floor, 1 Chang-Hsing Street, Taipei (TW). CHIEN, Wei-Lin [—]; 3F-1, No. 6, Lane 215, Sungren Road,
- (74) Agent: TSAO, Rocky, Y.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/024397 A2

(54) Title: ENHANCEMENT OF LEARNING AND MEMORY AND TREATMENT OF AMNESIA

(57) Abstract: A method for enhancing learning and memory or treating amnesia. The method includes administering to a subject in need thereof a compound of the formula (I): each of Ar₁, Ar₂, and Ar₃, independently, is phenyl, thienyl, furyl, or pyrrolyl; each of R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, and R₆, independently, is H, nitro, halogen, R, OH, OR, C(O)OH, C(O)OR, C(O)SH, C(O)SR, C(O)NH₂, C(O)NHR, C(O)NRR', ROH, ROR', RSH, RSR', ROC(O)R'OH, NHR, NRR', RNHR', or RNRR''; or R₁ and R₂ together, R₃ and R₄ together, or R₅ and R₆ together are ORO; wherein each of R, R', and R'', independently is C₁-C₂ alkyl; and n is 1, 2, or 3. The compound is in an effective amount for enhancing learning and memory or treating amnesia.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Enhancement of Learning and Memory and Treatment of Amnesia

RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. provisional application number
5 60/322,389 filed on September 14, 2001.

BACKGROUND

Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting form of synaptic plasticity that contributes to some types of learning and memory. For review, see, e.g., Bliss & Collingridge (1993) *Nature* 361: 31-39. In the hippocampus CA1 region, induction of
10 LTP is dependent on Ca^{2+} entry into the postsynaptic neuron triggered by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. See, e.g., Tsien *et al.* (1996) *Cell* 87: 1327-1338. The *N*-methyl-D-aspartate receptor has drawn particular interest since it appears to be involved in a broad spectrum of Central Nervous System disorders. See, e.g., Foster
et al. (1987) *Nature* 329: 395-396; and Mayer *et al.* (1990) *Trends in Pharmacol. Sci.*
15 11: 254-260.

Nitric oxide is a diffusible molecule that can act as a novel type of intercellular messenger in the brain and may act as a retrograde messenger during LTP. See, for example, Son *et al.* (1996) *Cell* 87: 1015-1023; and Wilson *et al.* (1997) *Nature* 386: 338. Inhibitors of nitric oxide synthase, the enzyme for nitric oxide production, can
20 prevent induction of LTP. One of the downstream effectors of nitric oxide is cGMP, which is also involved in the induction of LTP. cGMP is generated by a soluble guanylyl cyclase. Inhibitors of the soluble guanylyl cyclase suppress LTP. See, for example, Zhuo *et al.* (1994) *Nature* 368: 635-639; and Boulton *et al.* (1995) *Neuroscience* 69: 699-703. In addition, cGMP controls activities of many proteins,
25 including cGMP-dependent protein kinase G, which may play a role in the induction of LTP. Inhibitors of protein kinase G block induction of LTP, and activators of protein kinase G facilitate the LTP induction in response to weak tetanic stimuli. See, for example, Zhuo *et al.* (1994) *Nature* 368: 635-639. Zhuo *et al.* (1994) *Nature* 368: 635-639. Accordingly, a signaling pathway including nitric oxide, cGMP, and protein

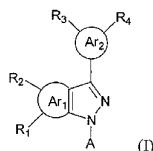
WO 03/024397


PCT/US02/29294

kinase G is involved in induction of LTP. Identification of compounds that modulate the signaling pathway could provide new therapeutics useful in enhancing learning and memory.

SUMMARY

5 In one respect, this invention features a method for enhancing learning and memory. The method includes administering to a subject in need thereof a fused pyrazolyl compound of the formula (I):



10 A is H, R, or $(\text{CH}_2)_n$ - (referred to as " $(\text{CH}_2)_n\text{Ar}_3(\text{R}_5)(\text{R}_6)$ "

hereinafter); each of Ar_1 , Ar_2 , and Ar_3 , independently, is phenyl, thienyl, furyl, or pyrrolyl; each of R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , and R_6 , independently, is H, nitro, halogen, R, OH, OR, $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{SH}$, $\text{C}(\text{O})\text{SR}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{NHR}$, $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$, ROH, ROR' , RSH, RSR' , $\text{ROC}(\text{O})\text{R}'\text{OH}$, NHR, NRR' , RNHR' , or $\text{RNR}'\text{R}''$; or R_1 and R_2 together, R_3 and R_4 together, or R_5 and R_6 together are ORO. Each of R , R' , and R'' , independently is C_1 - C_6 alkyl; and n is 1, 2, or 3. The compound is in an effective amount for enhancing learning and memory.

Formula (I) includes a pyrazolyl core and at least two aryl groups, i.e., Ar_1 and Ar_2 . A subset of the compounds of formula (I) are featured by that A is $(\text{CH}_2)_n\text{Ar}_3(\text{R}_5)(\text{R}_6)$. For example, Ar_1 is phenyl, and R_1 and R_2 are substituted at positions 4 and 5 of the phenyl group, respectively. Ar_2 can be 5'-furyl, and one of R_3 and R_4 is substituted at position 2 of the 5'-furyl group, e.g., 1-benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-indazole (Compound 1). Ar_2 can also be phenyl, and one of R_3 and R_4 is substituted at position 4 of the phenyl group, e.g., 1-(3-chloro-benzyl)-3-

WO 03/024397

PCT/US02/29294

(4'-tolyl)-indazole (Compound 9) or 1-(4-nitro-benzyl)-3-(4'-tolyl)-indazole (Compound 10). In some embodiments, Ar₃ is phenyl, and n is 1.

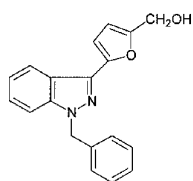
Another subset of the compounds of formula (I) are featured by that A is H.

For example, Ar₁ is phenyl, and R₁ and R₂ are substituted at positions 4 and 5 of the phenyl group, respectively. In another example, Ar₂ is 5'-furyl, and one of R₃ and R₄ is substituted at position 2 of the 5'-furyl group.

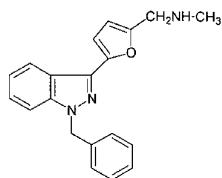
The term "aryl" as used herein includes phenyl, thienyl, furyl, or pyrrolyl, each of which optionally includes one or more substituted moieties. The substituted moieties may be the same as or different from R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, or R₆. They can be halogen, amino, hydroxyl, mercapto, cyano, nitro, C₁-C₆ alkyl, C₁-C₆ alkenyl, C₁-C₆ alkoxy, aryl, heteroaryl, or heterocyclyl, wherein alkyl, alkenyl, alkoxy, aryl, heteroaryl, and heterocyclyl are optionally substituted with C₁-C₆ alkyl, halogen, amino, hydroxyl, mercapto, cyano, or nitro. The term "alkyl" refers to both linear alkyl and branched alkyl.

Set forth below are some specific examples of the fused pyrazolyl compounds which can be used to practice the method of this invention:

Compound 1



Compound 2:

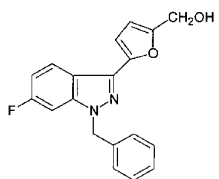


20

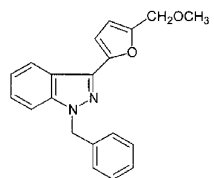
WO 03/024397

PCT/US02/29294

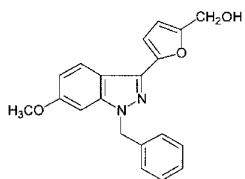
Compound 3:



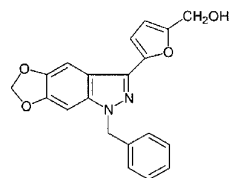
Compound 4:



5 Compound 5:



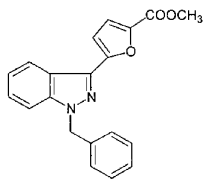
Compound 6:



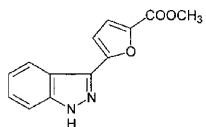
WO 03/024397

PCT/US02/29294

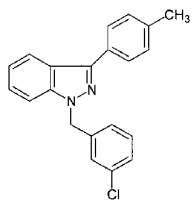
Compound 7:



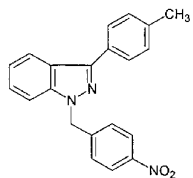
Compound 8:



5 Compound 9:



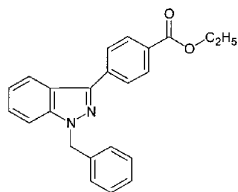
Compound 10:



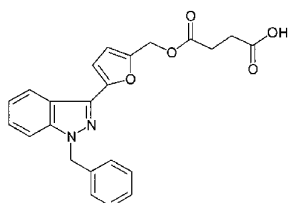
WO 03/024397

PCT/US02/29294

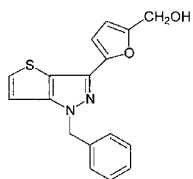
Compound 11:



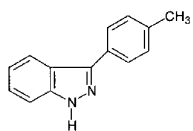
Compound 12:



5 Compound 13:



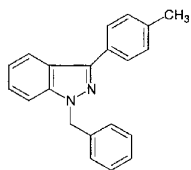
Compound 14:



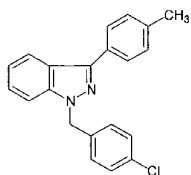
WO 03/024397

PCT/US02/29294

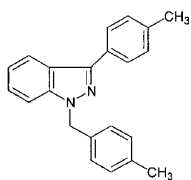
Compound 15:



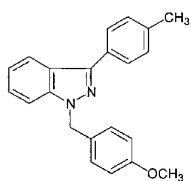
Compound 16:



5 Compound 17:



Compound 18:



The fused pyrazolyl compounds described above include the compounds
10 themselves, as well as their salts and their prodrugs, if applicable. Such salts, for

WO 03/024397

PCT/US02/29294

example, can be formed by interaction between a negatively charged substituent (e.g., carboxylate) on a fused pyrazolyl compound and a cation. Suitable cations include, but are not limited to, sodium ion, potassium ion, magnesium ion, calcium ion, and an ammonium cation such as tetramethylammonium ion. Likewise, a positively charged substituent (e.g., amino) can form a salt with a negatively charged counterion. Suitable counterions include, but are not limited to, chloride, bromide, iodide, sulfate, nitrate, phosphate, or acetate. Examples of prodrugs include esters and other pharmaceutically acceptable derivatives, which, upon administration to a subject, are capable of providing fused pyrazolyl compounds described above.

This invention also features a method for treating amnesia. The method includes administering an effective amount of one or more of the fused pyrazolyl compounds described above to a subject in need thereof. As used herein, amnesia refers to loss of memory. It may result from neuropsychological disorders. Examples of "neuropsychological disorders" include, but are not limited to, cognitive, learning, and memory deficits, disorders derived from neurodegenerative disorders (e.g., Huntington's disease, Parkinson's disease, or Alzheimer's disease), mood disorders (e.g., bipolar disorder, dysthymia, or seasonal affective disorder), and depression.

In another aspect, this invention features a packaged product. The packaged product includes a container, one or more fused pyrazolyl compounds in the container, and a legend (e.g., a label or an insert) associated with the container and indicating administration of the pyrazolyl compounds for enhancing learning and memory or for treating amnesia.

Also within the scope of this invention is the use of the above-described compounds for the manufacture of a medicament for enhancing learning and memory, or for treating amnesia.

Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and from the claims.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

DETAILED DESCRIPTION

A fused pyrazolyl compound used to practice the method of this invention can be prepared by procedures well known to a skilled person in the art (see, e.g., U.S. Patent No. 5,574,168). They include the following synthetic route: An aryl aryl ketone is first prepared by coupling an arylcarbonyl chloride with another aryl compound. Either aryl compound is optionally mono- or multi-substituted. The ketone then reacts with an arylalkylhydrazine, the aryl group of which is also optionally mono- or multi-substituted, to form a hydrazone containing three aryl groups. The hydrazone group is transformed into a fused pyrazolyl core via an alkylene linker, another aryl group is fused at 4-C and 5-C of the pyrazolyl core, and the third aryl group is directly connected to 3-C of the pyrazolyl core. Derivatives of the fused pyrazolyl compound may be obtained by modifying the substituents on any of the aryl groups.

The chemicals used in the above-described synthetic route may include, for example, solvents, reagents, catalysts, protecting group and deprotecting group reagents. The methods described above may also additionally include steps, either before or after the steps described specifically herein, to add or remove suitable protecting groups in order to ultimately allow synthesis of the fused pyrazolyl compound. In addition, various synthetic steps may be performed in an alternate sequence or order to give the desired compounds. Synthetic chemistry transformations and protecting group methodologies (protection and deprotection) useful in synthesizing applicable fused pyrazolyl compounds are known in the art and include, for example, those described in R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); and L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) and subsequent editions thereof.

A fused pyrazolyl compound thus synthesized can be further purified by a method such as column chromatography, high pressure liquid chromatography, or recrystallization.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

One aspect of this invention is a method for enhancing learning and memory or treating amnesia that is derived from neuropsychological disorders. The method includes administering to a subject in need thereof an effective amount of one or more fused pyrazolyl compounds and a pharmaceutically acceptable carrier. As used
5 herein, the term "memory" refers to the capability of the mind to store up conscious processes and reproduce them later with some degree of fidelity. As a psychological process, memory includes retention, reproduction, and recognition. Theoretical models of memory include a sensory register, short-term memory, working memory, and long-term memory (including semantic memory, procedural memory, and
10 episodic memory). Other conceptualizations of memory include auditory memory, visual memory, motor memory, and recognition memory. The term "treating" is defined as the application or administration of a composition including a fused pyrazolyl compound to a subject, who has amnesia derived from neuropsychological disorders, a symptom of amnesia or a predisposition toward amnesia, with the purpose
15 to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve, or affect amnesia, the symptoms of amnesia or the predisposition toward amnesia. "An effective amount" is defined as the amount of a fused pyrazolyl compound which, upon administration to a subject in need thereof, is required to confer therapeutic effect on the subject. An effective amount of a fused pyrazolyl compound may range from
20 about 0.01 mg/kg to about 300 mg/kg. Effective doses also vary, as recognized by those skilled in the art, depending on route of administration, excipient usage, and the possibility of co-usage with other agents for enhancing learning and memory, or with other agents for treating amnesia.

To practice the method of the present invention, a fused pyrazolyl compound
25 can be administered orally, parenterally, by inhalation spray or via an implanted reservoir. The term "parenteral" as used herein includes subcutaneous, intracutaneous, intravenous, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasynovial, intrasternal, intrathecal, intralesional and intracranial injection or infusion techniques.

A composition for oral administration can be any orally acceptable dosage
30 form including, but not limited to, capsules, tablets, emulsions and aqueous suspensions, dispersions and solutions. In the case of tablets for oral use, carriers which are commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such

WO 03/024397

PCT/US02/29294

as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form, useful diluents include lactose and dried corn starch. When aqueous suspensions or emulsions are administered orally, the active ingredient can be suspended or dissolved in an oily phase combined with emulsifying or suspending agents. If desired, certain sweetening, flavoring, or coloring agents can be added. An inhalation composition can be prepared according to techniques well-known in the art of pharmaceutical formulation and can be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to enhance bioavailability, fluorocarbons, and/or other solubilizing or dispersing agents known in the art.

A sterile injectable composition, for example, a sterile injectable aqueous or oleaginous suspension, can be formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents (such as, for example, Tween 80) and suspending agents. The sterile injectable preparation can also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example, as a solution in 1,3-butanediol. Among the acceptable vehicles and solvents that can be employed are mannitol, water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium (e.g., synthetic mono- or diglycerides). Fatty acids, such as oleic acid and its glyceride derivatives are useful in the preparation of injectables, as are natural pharmaceutically-acceptable oils, such as olive oil or castor oil, especially in their polyoxyethylated versions. These oil solutions or suspensions can also contain a long-chain alcohol diluent or dispersant, or carboxymethyl cellulose or similar dispersing agents.

A carrier in a pharmaceutical composition must be "acceptable" in the sense of being compatible with the active ingredient of the formulation (and preferably, capable of stabilizing it) and not deleterious to the subject to be treated. For example, solubilizing agents such as cyclodextrins, which form specific, more soluble complexes with the fused pyrazolyl compound, or one or more solubilizing agents, can be utilized as pharmaceutical excipients for delivery of the fused pyrazolyl compound. Examples of other carriers include colloidal silicon dioxide, magnesium stearate, cellulose, sodium lauryl sulfate, and D&C Yellow # 10.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

A suitable *in vitro* assay can be used to preliminarily evaluate a fused pyrazolyl compound's ability to increase long-term potentiation induction. *In vivo* screening can also be performed by following procedures well known in the art. See the specific examples below.

5 Without further elaboration, it is believed that the above description has adequately enabled the present invention. The following specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever. All of the publications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

10

Synthesis of 1-benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-indazole (Compound 1)

Calcium borohydride was first prepared by stirring anhydrous calcium chloride (88.8 mg, 0.8 mmole) with sodium borohydride (60 mg, 1.6 mmole) in anhydrous THF (20 mL) for 4 hrs. Then a 30 mL THF solution containing 88.0 mg 1-benzyl-3-(5'-methoxycarbonyl-2'-furyl)-indazole (0.27 mmole) was added dropwise to the calcium borohydride solution at 30±2 °C. The mixture was heated under reflux for 6 hrs, cooled, quenched into crushed ice, placed at a reduced pressure to remove THF, and filtered to obtain a solid product. The solid was extracted with dichloromethane. The extract was concentrated to 50 mL and a solid precipitated after petroleum ether was added. The precipitate was collected and purified by column chromatography (silica gel-benzene) to obtain 70.0 mg 1-benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-indazole at a yield of 87%. mp: 108-109°C.

MS (%), m/z: 304 (M⁺).

25 IR (KBr) ν_{max} : 3350 cm⁻¹ (-OH).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 200 MHz) δ : 4.51 (2H, d, J=5.5 Hz, -CH₂O-), 5.31 (1H, t, J=5.5 Hz, -OH), 5.70 (2H, s, =NCH₂-), 6.48 (1H, d, J=3.4 Hz, H-4'), 6.97 (1H, d, J=3.4 Hz, H-3'), 7.21-7.31 (6H, m, H-5, phenyl), 7.45 (1H, t, J=8.2 Hz, H-6), 7.75 (1H, dd, J=8.2, 1.8 Hz, H-7), 8.12 (1H, dd, J=8.2, 1.0 Hz, C4-H).

30

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Electrophysiology Tests

After decapitation, brains of either adult (150-250 mg, for the induction of long-term potentiation) or young (2-3 weeks old, for the induction of long-term depression) Wistar rats were rapidly removed, and the hippocampus was dissected out. Transverse hippocampal slices (450 μ m thickness) were immediately placed in an ice-cold cutting buffer containing 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.5 mM CaCl₂, 5.0 mM MgSO₄, 10 mM glucose, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. The slices were then maintained in an interface chamber at room temperature, and perfused at flow rate of 1-2 mL/min with artificial cerebrospinal fluid (ACSF). The composition of ACSF contained 124 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.0 mM or 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 10 mM glucose, gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. The field Excitatory Postsynaptic Potentials (fEPSP) was evoked by test pulses through a bipolar stimulating electrode placed on the Schaffer collateral/commissural pathway, and recorded from the stratum radiatum of CA1 using a glass micropipette electrode (5-10 M Ω) filled with 2 M NaCl. The test pulse duration was 100 μ sec, and test responses were elicited at 0.02 Hz. To record field potentials in the cortico-amygdala pathway, a stimulating electrode was placed in the external capsule, which contained fibers from the auditory cortex to the lateral amygdala. Bicuculine (10 μ M) was present in the perfusion solution when the fEPSPs of amygdala were recorded. To increase the effectiveness of fused pyrazolyl compounds that were applied through the perfusion system, the ACSF level in the recording chamber was sufficiently high to cover the hippocampal slices but not to float them. All fused pyrazolyl compounds were perfused in ACSF.

Evoked fEPSPs were recorded and data were analyzed. The initial slope of the fEPSPs was calculated, and the data were expressed as percentages of the average of the base-line slope of the fEPSPs.

Long-term potentiation (LTP) enhanced by Compound 1: LTP is the most prevailing neurophysiological model for learning and memory. LTP in the Schaffer collateral-CA1 pathway of rat hippocampal slices was induced by strong tetanic stimulation, which consists of two 100 Hz, 1 sec trains delivered 20 sec apart. The strong tetanus induced LTP in the slope of the fEPSP 163.4 \pm 7.0% (n = 6) at 50 min

WO 03/024397

PCT/US02/29294

after the tetanus. LTP was markedly enhanced by perfusion with Compound 1 (1.6 μ M) for 6 min (3 min before and 3 min after the tetanus). The fEPSP slope was $404.7 \pm 34.9\%$ ($n = 5$) at 50 min after the tetanus.

Weak tetanic stimulation which did not induce LTP consisted of a 20 Hz, 0.5 sec train. Unexpectedly, perfusion with Compound 1 (1.6 μ M) for 6 min (3 min before and 3 min after the tetanus) induced LTP. The fEPSP slope was $172.9 \pm 10.7\%$ ($n = 7$) at 1 hr. Three trains (100 Hz, 1 sec at 3 min interval) of stimulation induced a transient potentiation that decayed to baseline within 30 min in amygdala. However, the same trains of stimulation induced an enduring LTP that lasts stably for at least 1 hr in the presence of compound 1 ($n = 4$).

Mechanism of Compound 1 on LTP enhancement: The role of nitric oxide was investigated. Concomitant perfusion with Compound 1 and N^G -nitro-L-arginine-methylester (L-NAME, purchased from RBI) (300 μ M), a nitric oxide synthase inhibitor, significantly attenuated LTP induced by Compound 1. On the other hand, Zinc protoporphyrin (1 μ M), a heme oxygenase inhibitor, did not affect LTP induced by Compound 1. The results indicate that nitric oxide but not carbon monoxide is involved in the Compound 1-enhanced LTP induction.

Compound 1 was co-perfused with 1 H-[1,2,4]diazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one (ODQ, purchased from TOCRIS), a specific inhibitor of a soluble guanylyl cyclase. Without ODQ, LTP was induced by Compound 1 at weak tetanus (50 Hz/0.5s). With ODQ (5 μ M), LTP was not induced by Compound 1. The fEPSP slope was $107.8 \pm 3.9\%$ ($n = 5$). The results indicate that the soluble guanylyl cyclase is involved in the Compound 1-enhanced LTP induction.

Compound 1 was also co-perfused with KT5823 (from Calbiochem), a specific inhibitor of a protein kinase G. Without KT5823, LTP was induced by Compound 1 at weak tetanus (50 Hz/0.5s). With KT 5823 (2 μ M), the LTP induced by Compound 1 was inhibited. The fEPSP slope was $112.9 \pm 5.4\%$ ($n = 4$). The results suggest that the nitric oxide-cGMP-protein kinase G-signaling pathway is involved in the Compound 1-enhanced LTP induction.

Compound 1 was further co-perfused with 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, purchased from RBI), a *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist. Without AP5, LTP was induced by Compound 1 at weak tetanus (50 Hz/0.5s). With

WO 03/024397

PCT/US02/29294

AP5 (100 μM), the LTP induced by Compound 1 was delayed. The fEPSP slope was $142.1 \pm 13.5\%$ ($n = 5$). The results suggest that Ca^{2+} influx from *N*-methyl-D-aspartate receptor plays a role is involved in the Compound 1-enhanced LTP induction.

In addition, Compound 1 was co-perfused with MCPG ((\pm)- α -methyl-(4-
5 carboxyphenyl)glycine; from Sigma/RBI), a metabotropic receptor. With MCPG (100 μM), the LTP induced by Compound was reduced. Simultaneous application of AP-5 and MCPG inhibited the LTP induced by Compound 1. The fEPSP slope was $111.5 \pm 12.3\%$ ($n = 3$).

LTP was not further potentiated by Compound 1 when Compound 1 was
10 added to the ACSF (at 1.6 μM) 10 min after 2 trains of strong tetanus (100 Hz/1 sec), suggesting that nitric oxide is released upon high frequency stimulation and the Compound 1-enhanced LTP induction occurred only within a few minutes after the tetanization.

Compound 1 on plasticity induced by low-frequency stimulation (LFS): LFS
15 (900 pulses at 1 Hz) was delivered to hippocampal slices taken from young rats (7~14 day-old) to induce long-term depression (LTD). Stimulation of hippocampal slices at 1 Hz for 3 min produced no LTD of synaptic transmission. However, this short-duration LFS induced significant LTD in the presence of Compound 1 ($83.4 \pm 10.9\%$, $n = 3$). Perfusion of Compound 1 (1.6 μM) for 15 min during LFS reversed the LTD
20 plasticity into LTP. A weaker electrical stimulation at 0.02 Hz was delivered in the presence of both nitric oxide donor nitroprusside (300 μM) and Compound 1 (1.6 μM). Simultaneous perfusion of the nitric oxide donor nitroprusside (30 μM) and Compound 1 (1.6 μM) induced LTD. The data suggest that nitric oxide donor is able to mimic the action of tetanic stimulation in the presence of Compound 1. Compound
25 1 or nitroprusside alone produced no potentiation on fEPSP at 0.02 Hz stimulation.

Enhancement of LTP by pyrazolylcompounds: Compounds 1-8 were also tested to enhance LTP induction in hippocampal slices. The results are shown in Table 1. The fEPSP slopes 60 min after tetanus (50 Hz, 0.5s) are shown. Each compound (1.6 μM) was perfused 3 min before and 3 min after the weak tetanus.

30

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Table 1: Effects of pyrazolyl compounds on the enhancement of LTP induction

Compounds	fEPSP
Control	108.4%
Compound 1	172.9%
Compound 2	165.9%
Compound 3	218.9%
Compound 4	216.9%
Compound 5	180.8%
Compound 6	260.3%
Compound 7	200.3%
Compound 8	180.6%

Behavioral Task Tests

Morris water maze: Morris water maze was performed in a circular pool (224
5 cm in diameter, 46 cm in height) located in a room with distinctive visual cues. Water
was filled to a depth of 36 cm and a transparent plastic platform (25×25 cm, 32 cm in
height) was located at the center of a fixed quadrant. Rats were trained for two days
in the task environment: free-swimming in the pool without the transparent plastic
platform. Each training session was 2 min and the rats were picked up from the pool
10 by an experimenter. Then, rats received 4 consecutive daily training trials for the
following six days. During each training trial, each rat was placed into the water
randomly from one of the quadrants. The rat had to swim until it climbed onto the
plastic platform submerged underneath the water. The time duration from being
placed into the water to climbing onto the plastic platform was recorded and defined
15 as escape latency. If the rat failed to find the plastic platform after 120 s, it was
picked up by the experimenter and placed onto the plastic platform. Each rat stayed
on the platform for 60 s, which also served as the interval of trial. Compound 1 (1
mg/kg) or vehicle was daily injected to each rat 10 min before the first training trial.
After the last training trial of each day, each rat was dried by a towel, and an electric
20 heater was placed in its home cage.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Substantial evidence implicates the hippocampus in acquisition and retention of spatial information. See, e.g., Ohon *et al.* (1979) *Behav. Brain Sci.* 2: 316-365; and Barnes (1988) *Trend Neurosci.* 11: 163-169. The effect of Compound 1 on the acquisition of spatial memory in the Morris water maze was tested. Rats received 4 consecutive training trials every day. Compound 1 (1 mg/kg) was daily injected (i.p., 1 mg/kg) 10 min before the first trial of training. The data show that Compound 1 shortened the escape latency of 2-4 trials on the first training day, suggesting that Compound 1 promotes short-term memory. The escape latencies of 2-4 trials were 93.8±8.7 s, 79.3±12/3 s and 57.6±12.5 s for a control group, and 50.4±10.2 s, 47.3±6.8s and 30.3±10.3 for the Compound 1 group (n = 10), respectively. The escape latencies of the first trial on the following 3 training days were also markedly shortened in the Compound 1 group. The escape latencies were 91.1±9.8 s, 47.1±3.9 s and 35.3±6.1 s for the control group, and 55.4±12.8 s, 15.3±2.1 s, and 13.4±1.7 s for the Compound 1 group (n = 10), respectively. These results suggest that Compound 1 also enhances long-term memory. The escape latency is shorter in the Compound 1 group throughout the whole experimental period up to 21 days although Compound 1 was only administered once for 4 days. The mean escape latency on the day-21 is 13.5±1.8 s and 6.0±0.5 s (n=10 each) for the control group and the Compound 1 group, respectively. From results shown above, Compound 1 is a promising drug for improving learning and memory. Compound 1 was mixed with 1.25% carboxymethylcellulose (CMC) and orally delivered to stomach (10 mg/kg) directly 30 min before the first trial for 6 successive days. Similar to injected administration, oral administration of Compound 1 also promoted short-term and long-term memory.

Since L-NAME antagonized Compound 1-induced LTP enhancement in hippocampal slices, *in vivo* experiments were performed to test the effect of L-NAME on the improved learning and memory provoked by Compound 1. In these experiments, rats chronically implanted with cannulae were injected intracerebroventrically with L-NAME (1 mmole/10 mL) or saline 10 min before the first trial of daily training, concomitant with i.p. injection of Compound 1 (1 mg/kg). The data show that L-NAME caused profound amnesia of the task and significantly blocked the enhanced learning and memory induced by Compound 1.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Intracerebroventricular administration of KT 5823 also impaired the Compound 1-induced enhancement.

Passive Avoidance and active avoidance task: Rats were trained and tested on a one-trial step-through passive inhibitory avoidance task with a procedure as described in Liang *et al.* (1998, *Chin. J. Physiol.* 41: 33-44). Briefly, an apparatus was a trough-shape alley divided by a sliding door into a well-lit safe compartment and a dark shock compartment. A rat was placed in the lit side facing away from the door. As the rat turned around, the door was opened. After the rat stepped into the dark compartment, it received an inescapable footshock via a constant current shocker controlled by a timer (Lafayette Instruments, Model 80240 and Model 58010, Indiana, USA). After administration of the foot-shock, the rat was removed from the alley and returned to its home cage. In a retention test given 24 hrs or 10 days later, the rat was reintroduced into the alley and the latency of stepping into the shock compartment with all four feet was taken as a retention score. If a rat did not step through in 5 or 10 min, the test trial was terminated and a ceiling score of 300 s or 600 s was assigned.

The amygdala is also implicated in learning and memory. Studies have shown that this brain structure is particularly involved in processing affective information. See, e.g., Cahill and McGaugh (1990) *Behav. Neurosci.* 104: 532-543; and Gilbert *et al.* (1991) *Behav. Neurosci.* 105: 533-561. It has been reported that nitric oxide is also involved in activity-dependent synaptic plasticity and passive avoidance learning in amygdaloid nucleus. See, e.g., Bernabeu *et al.* (1995) *NeuroReport* 6: 1498-1500; Watanabe *et al.* (1995) *Brain Res.* 688: 233-236; and Teledgy and Kokavszky (1997) *Neuropharmacology* 36: 1583-1587. The effect of Compound 1 on passive avoidance learning was studied. Compound 1 was injected (i.p., 1 mg/kg) 10 min before foot-shock training. The results show that Compound 1 markedly prolonged the retention latencies in the lighted compartment. The memory lasts for several days. The retention scores were very high even if tested on day 10. There were much more rats which had retention latencies longer than 5 min in Compound 1-treated rats (2 out of 15 in a control group and 11 out of 12 in a Compound 1-treated group, respectively) tested on both day-1 and day-10. When the Compound 1 was mixed with 1.25% CMC and delivered to stomach directly (10 mg/kg) before foot-shock. The retention

WO 03/024397

PCT/US02/29294

test was performed 1 day and 10 days later, respectively. Compound 1 greatly improved passive avoidance learning (Table 2). As shown in Table 3, Compound 1 (i.p., 1 mg/kg) promoted learning behavior in aged rats although the effect is much less pronounced than in younger rats. Rats of 1-year-old were chosen for this experiment. Compound 1 (1 mg/kg) was i.p. injected 10 min before foot-shock. The retention test was performed 1 day and 10 days later, respectively.

Table 2: Enhancement of oral Compound 1 on the retention in a passive avoidance task.

Retention Scores (sec)		
	Day-1	Day-10
Control	54.9	224.1
	59.0	>600
	200.8	>600
	>600	>600
	12.3	24.7
	150.1	143.2
	12.3	12.1
	>300	543.4
	24.7	24.3
	mean±std	157.1±64.3
Compound 1	>600	454.0
	>600	>600
	>600	>600
	>600	>600
	15.0	15.0
	>300	207.1
	>300	453.2
	>300	>600
	>300	343.2
	77.1	500.2
mean±std	369.2±70.2	437.3±62.4

10

WO 03/024397

PCT/US02/29294

Table 3: Enhancement of injected Compound 1 on the retention in a passive avoidance task in aged rat.

Retention Scores (sec)		
	Day-1	Day-10
Control	18.1	5.4
	4.2	2.2
	>300	>300
	74.7	58.5
	47.3	156.9
	mean±std 88.9±54.2	104.6±56.3
Compound 1	>300	252.2
	>300	255.9
	207.1	85.8
	>300	>300
	58.1	12.9
	mean±std 233.0±47.3	181.4±55.7

5

From results shown above, Compound 1 can improve the learning of passive avoidance in both young and aged rats. In these tasks, Compound 1 preferentially affects the acquisition of newly-formed memory, a process which is thought to be related to the induction phase of LTP. Foot-shock is thought to be a great stimulation to rats. Nitric oxide is supposed to be released under this situation and quickly metabolized. Compound 1 did not exert any effect on rats when Compound 1 was injected 30 min after foot-shock. These results suggest that Compound 1 can improve learning behavior only it was administered before or during the memory tasks.

The data also showed that Compound 1 did not exert any effect on rat avoidance behavior when it was injected 30 min after foot-shock. In addition, the enhancement effect induced by Compound 1 was significantly antagonized by L-NAME and KT5823 (i.c.v., 1 mmole and 0.2 nmole, respectively). These results

WO 03/024397

PCT/US02/29294

suggest that Compound 1 can improve learning behaviors only when it was administered before or during the memory tasks. Furthermore, Compound 1 administered 10 min before the context training instead of the administration of foot-shock prolonged the retention scores of passive inhibitory avoidance, suggesting that
5 Compound 1 enhanced the acquisition of memory for environmental cues without foot-shock.

For the test of active avoidance, the rat was placed in the dark compartment, facing the door. The door was opened halfway, and the rat had 10 sec to shuttle over the door to lit compartment. Rat was not chosen for this experiment if the rat crossed
10 to the safe side within 10 sec. Foot-shock was turned on at 10 s later. Rat escaped into safe compartment and the door was closed. The retention time on dark shock compartment was measured 48 hr later. The rats were discarded once the rats enter lit compartment within 10 s on the day of context training. Foot-shock was administered 10 s after putting in the dark compartment on day-1. Memory retention was tested on
15 day-2. Injection of Compound 1, 10 min before foot-shock caused noticeable increase in the retention of memory and decrease in the escape latency from the shock- to the safe-compartment. Furthermore, the memory enhancement effect induced by Compound 1 was effectively inhibited by L-NAME and KT5823 (i.c.v., 1 mmole and 0.2 nmole, respectively). Thus, Compound 1 significantly improves learning
20 behaviors of rats in both passive avoidance and active avoidance tests via NO-cGMP-PKG pathway.

Rotorod Test: This experiment was performed with mice (male, 20-25 gm). A rotorod apparatus was a plastic cylindrical rod (3 cm in diameter x 13 cm in length). The rod was supported at the ends by two walls and was 25 cm from the base of the
25 walls. The walls at the ends of the rod were high enough so that the mice cannot climb off the rod. Three trials were performed for each experiment. Compound 1 (1 mg/kg) or vehicle was i.p. injected 20 min before the first trial. For each trial of the rotorod test, the mice were placed on the rod and timed until they fell off the rod. They were timed up to a maximum of 3 min. The interval was 10 min. The rod was
30 turned by an electric motor at 28 rpm.

Cerebellar nitric oxide has been also reported to be involved in LTD and motor learning. See, e.g., Li *et al.* (1995) *J. Neurophysiol.* 74: 489-494. Compound 1

WO 03/024397

PCT/US02/29294

improving motor learning was studied. Mice were chosen for this kind of experiment. Compound 1 (i.p., 1 mg/kg) significantly improved motor coordination of mice on a turning rotorod (28 rpm). The performance of control mice got improvement with increasing trial numbers, with a better improvement at the third trial. However, mice
5 treated with Compound 1 showed good balance on the rod even if at first trial, and got very good motor coordination at second trial. It is obvious that Compound 1 can also improve motor learning by mainly acting on the cerebellum.

OTHER EMBODIMENTS

All of the features disclosed in this specification may be combined in any
10 combination. Each feature disclosed in this specification may be replaced by an alternative feature serving the same, equivalent, or similar purpose. Thus, unless expressly stated otherwise, each feature disclosed is only an example of a generic series of equivalent or similar features.

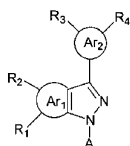
From the above description, one skilled in the art can easily ascertain the
15 essential characteristics of the present invention, and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. For example, a compound structurally analogous to a fused pyrazolyl compound can also be used to practice the present invention. Thus, other embodiments are also within the claims.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

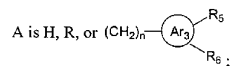
WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for enhancing learning and memory or treating amnesia, comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of a compound of the formula:



5

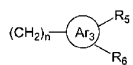
wherein



each of Ar_1 , Ar_2 , and Ar_3 , independently, is phenyl, thienyl, furyl, or pyrrolyl;
 each of R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , and R_6 , independently, is H, nitro, halogen, R, OH,
 10 OR, $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, $\text{C}(\text{O})\text{SH}$, $\text{C}(\text{O})\text{SR}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{NHR}$, $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$, ROH,
 ROR' , RSH, RSR', $\text{ROC}(\text{O})\text{R}'\text{OH}$, NHR, NRR', RNHR', or RNR'R''; or R_1 and R_2
 together, R_3 and R_4 together, or R_5 and R_6 together are ORO; wherein each of R, R',
 and R'', independently is C_1 - C_6 alkyl; and
 n is 1, 2, or 3.

15

2. The method of claim 1, wherein A is



3. The method of claim 2, wherein Ar_1 is phenyl.

4. The method of claim 3, wherein R_1 and R_2 are substituted at positions 4 and 5 of phenyl, respectively.

5. The method of claim 2, wherein Ar_2 is 5'-furyl.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

6. The method of claim 5, wherein one of R₃ and R₄ is substituted at position 2 of furyl.
7. The method of claim 2, wherein Ar₃ is phenyl.
8. The method of claim 7, wherein n is 1.
- 5 9. The method of claim 8, wherein Ar₁ is phenyl.
10. The method of claim 9, wherein R₁ and R₂ are substituted at positions 4 and 5 of phenyl, respectively.
11. The method of claim 10, wherein Ar₂ is 5'-furyl.
12. The method of claim 11, wherein each of R₅ and R₆ is H, and one of R₃
10 and R₄ is substituted at position 2 of furyl.
13. The method of claim 12, wherein each of R₁ and R₂ is H.
14. The method of claim 13, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₂NCH₃.
15. The method of claim 13, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₂OH.
16. The method of claim 13, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₂OCH₃.
17. The method of claim 13, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is COOCH₃.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

18. The method of claim 12, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₂OH.
19. The method of claim 18, wherein each of R₁ and R₂ is H.
20. The method of claim 18, wherein R₁ is H, and R₂ is F.
- 5 21. The method of claim 18, wherein R₁ is H, and R₂ is OCH₃.
22. The method of claim 18, wherein R₁ and R₂ together are OCH₂O.
23. The method of claim 2, wherein Ar₁ is thienyl.
24. The method of claim 3, wherein Ar₂ is phenyl.
25. The method of claim 24, wherein one of R₃ and R₄ is substituted at
10 position 4 of phenyl.
26. The method of claim 25, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₃.
27. The method of claim 24, wherein Ar₃ is phenyl.
28. The method of claim 27, wherein n is 1.
- 15 29. The method of claim 28, wherein one of R₃ and R₄ is substituted at position 4 of phenyl.
30. The method of claim 29, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is CH₃.
31. The method of claim 30, wherein each of R₁ and R₂ is H, one of R₅ and
20 R₆ is H, and the other is Cl substituted at position 3 of phenyl.

WO 03/024397

PCT/US02/29294

32. The method of claim 30, wherein each of R₁ and R₂ is H, one of R₃ and R₆ is H, and the other is NO₂ substituted at position 4 of phenyl.
33. The method of claim 1, wherein A is H.
34. The method of claim 33, wherein Ar₁ is phenyl.
- 5 35. The method of claim 34, wherein R₁ and R₂ are substituted at positions 4 and 5 of phenyl, respectively.
36. The method of claim 35, wherein Ar₂ is 5'-furyl.
37. The method of claim 36, wherein one of R₃ and R₄ is substituted at position 2 of furyl.
- 10 38. The method of claim 37, wherein each of R₁ and R₂ is H.
39. The method of claim 38, wherein one of R₃ and R₄ is H, and the other is COOCH₃.
40. The method of claim 33, wherein Ar₂ is 5'-furyl.
41. The method of claim 40, wherein one of R₃ and R₄ is substituted at
15 position 2 of furyl.

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/024397 A3

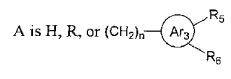
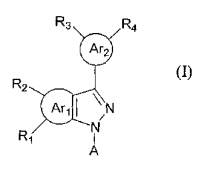
- (51) International Patent Classification: **A61K 31/415**
- (21) International Application Number: PCT/US02/29294
- (22) International Filing Date: 16 September 2002 (16.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
 - 60/322,389 14 September 2001 (14.09.2001) US
 - 10/242,826 13 September 2002 (13.09.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
 - US 60/322,389 (CON)
 - Filed on 14 September 2001 (14.09.2001)
 - US Not furnished (CON)
 - Filed on 13 September 2002 (13.09.2002)
- (71) Applicant (for all designated States except US): **CARLSBAD TECHNOLOGY, INC.** [US/US]; 5923 Ballfour Court, Carlsbad, CA 92008 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **FU, Wen-Mei** [—/—]; 4th Floor, No. 7-1, Lane 16, Wan-Zhou Street, Taipei 106 (TW). **LIANG, Keng-Chen** [—/—]; 4th Floor, 1 Chang-Hsing Street, Taipei (TW). **CHIEN, Wei-Lin** [/]; 3F-1, No. 6, Lane 215, Sungren Road, Shinyi Chiu, Taipei (TW). **KUO, Sheng-Chu** [—/—]; 91
- (74) Agent: **TSAO, Rocky, V.**; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 6 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ENHANCEMENT OF LEARNING AND MEMORY AND TREATMENT OF AMNESIA



(57) Abstract: A method for enhancing learning and memory or treating amnesia. The method includes administering to a subject in need thereof a compound of the formula (I): each of Ar₁, Ar₂, and Ar₃, independently, is phenyl, thienyl, furyl, or pyrrolyl; each of R₁, R₂, R₃, R₄, and R₅, independently, is H, nitro, halogen, R, OH, OR, C(O)OH, C(O)OR, C(O)SH, C(O)SR, C(O)NH₂, C(O)NHR, C(O)NRR', ROH, ROR', RSH, RSR', ROC(O)R', OH, NHR, NHR', RNHR', or RNR'R'', or R₁ and R₂ together, R₃ and R₄ together, or R₄ and R₅ together are ORO; wherein each of R, R', and R'', independently is C₁-C₆ alkyl; and n is 1, 2, or 3. The compound is in an effective amount for enhancing learning and memory or treating amnesia.

WO 03/024397 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/29294
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 31/415 US CL : 514/406 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/406		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,574,168 A (KLUO et al.) 12 November 1996 (12.11.96), see the entire document.	1-41
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	*P*	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone.
L documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z*	document member of the same patent family
I document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2002 (18.11.2002)	Date of mailing of the international search report 23 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Raymond J. Herley III	
	Telephone No. 703-308-1235	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
C 0 7 D 405/04	C 0 7 D 405/04	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100124615

弁理士 藤井 敏史

(72) 発明者 フ, ウェン - メイ

台湾, タイペイ 106, ウン - ゴウ ストリート, レイン 16, ナンバー 7 - 1, フォース
フロア

(72) 発明者 リャン, ケン - チェン

台湾, タイペイ, チャン - シン ストリート 1, フォース フロア

(72) 発明者 チェン, ウェイ - リン

台湾, タイペイ, シンイ チウ, スングレン ロード, レイン 215, ナンバー 6, 3エフ -
1

(72) 発明者 クオ, シェン - チュ

台湾, タイチュウ 404, フスエー - シー ロード 91

(72) 発明者 リー, ファン - ユアン

台湾, タイチュウ, タチア, チュン シャン ロード, セクション 1, ナンバー 1191

(72) 発明者 テン, チェ - ミン

台湾, タイペイ 106, スゼウエイ ロード 100

F ターム(参考) 4C063 AA01 BB01 CC75 DD22 EE01

4C086 AA01 AA02 BC37 CB22 CB27 GA02 GA07 MA01 MA04 NA14

ZA12 ZA15 ZA16 ZA18