

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7585561号
(P7585561)

(45)発行日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(24)登録日 令和6年11月11日(2024.11.11)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/451 (2006.01)

A 6 1 K 31/451

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/16

請求項の数 11 (全51頁)

(21)出願番号	特願2021-544758(P2021-544758)	(73)特許権者	519062797
(86)(22)出願日	令和2年2月4日(2020.2.4)		プリレニア ニューロセラピューティクス
(65)公表番号	特表2022-519103(P2022-519103		リミテッド
	A)		イスラエル国ヤクム6097200・ヤ
(43)公表日	令和4年3月18日(2022.3.18)		クム グリーンワーク ビジネス パーク
(86)国際出願番号	PCT/IL2020/050134		・マインドスペース オフィシズ・ビル
(87)国際公開番号	WO2020/161707		ディング ディー
(87)国際公開日	令和2年8月13日(2020.8.13)	(74)代理人	110001379
審査請求日	令和3年8月16日(2021.8.16)		弁理士法人大島特許事務所
(31)優先権主張番号	62/800,803	(72)発明者	ヘイデン、マイケル
(32)優先日	平成31年2月4日(2019.2.4)		イスラエル国ヘルツリーヤ467256
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		1・ハーメノフィム 10・スイート 3
			18・マインドスペース オフィシズ・
			プリレニア ニューロセラピューティクス
			リミテッド内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 パーキンソン病およびパーキンソニズムに関連する他の疾患のための低用量プリドピジン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

パーキンソン病の進行の予防、治療、または緩徐化における使用のための医薬組成物であって、前記パーキンソン病がグルコセレブロシダーゼ変異に関連するパーキンソン病であり、当該医薬組成物は、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む、使用のための組成物。

【請求項2】

前記使用が、対象における神経変性を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項3】

前記対象における前記神経変性が、ERストレスの増加、ニューロンミトコンドリア機能障害、自食作用流動の減少、血漿BDNFレベルの減少、脳脊髄液BDNFレベルの減少、ニューロンおよびBDNF軸索輸送の減少として提示される、請求項2に記載の使用のための組成物。

【請求項4】

前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が、少なくとも1日2回投与される、請求項1～3のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項5】

前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が、1日2回投与される、請求項4に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が、1日3回投与される、請求項4に記載の使用のための組成物。

【請求項 7】

前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が、1日4回投与される、請求項4に記載の使用のための組成物。

【請求項 8】

前記対象に対する前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が全身投与される、請求項1～7のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 9】

前記対象に対する前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が経口投与される、請求項8に記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

前記プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む前記医薬組成物が、吸入可能な粉末、注射剤、液体、ゲル、固体、カプセルまたは錠剤からなる群から選択される形態で投与される、請求項9に記載の使用のための組成物。

【請求項 11】

前記薬学的に許容されるプリドピジン塩がプリドピジン塩酸塩である、請求項1～10のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象に低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、パーキンソン病または他の疾患に関連するパーキンソニズムに罹患している対象を治療するための方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

プリドピジン（4-〔3-（メチルスルホニル）フェニル〕-1-プロピル-ピペリジン）（以前はACR16として知られる）は、ハンチントン病（HD）患者およびHDの動物モデルにおける運動機能を改善することがわかっている。その運動効果はもともとドーパミン受容体に対するその低親和性拮抗作用に起因していたが、ラットにおけるインビボPET研究は、行動に関連する用量のプリドピジンがドーパミンD2/D3Rではなくシグマ-1受容体（S1R）を占めることを示している。これは、D2Rと比較してS1Rではるかに高い結合親和性を示すインビトロ結合親和性アッセイと一致している（S1RについてのKi、約100nM、D2RについてのKi、10～30μMおよびD3RについてのKi、約1.6μM）。S1Rは、ミトコンドリア関連小胞体膜（MAM）で豊富なりガンド作動性シャペロンタンパク質であり、細胞の防御および生存のいくつかの経路を支持する。S1Rは、抗アポトーシス遺伝子の上方調節、ミクログリアの活性化の減少、活性酸素種（ROS）および一酸化窒素（NO）の生成の減少、栄養因子の分泌の増加を含む、複数の細胞メカニズムを調節する。

【0003】

パーキンソン病（PD）は、アルファシヌクレインの凝集、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、および神経炎症の間の相互作用が中心的な病原性の役割を果たす加齢関連神経変性疾患である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、一態様において、1日あたり少なくとも1つの医薬組成物を対象に投与することを含む、パーキンソン病もしくはパーキンソン病に関連する別の疾患またはパーキンソニズムに関連する別の疾患またはそれらの症状の進行の予防、治療、または緩徐化を必

10

20

30

40

50

要とする対象におけるそれを行うための方法を提供し、医薬組成物はプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は1日あたり1～100mgである。

【0005】

特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。

【0006】

特定の実施形態において、対象の機能低下は、振戦、動作緩慢、硬直、姿勢の不安定性、日常生活の活動を含む統一パーキンソン病評価尺度パートII（UPDRSパートII）による低下、およびPDの修正版ホーエンおよびヤール分類による低下からなる群から選択される症状として提示される。

10

【0007】

特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。

【0008】

特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、知的機能障害、思考障害、うつ病、やる気の減少、イニシアチブの減少、発話障害、救済の増加、嚥下障害、手書きの障害および痛覚の増加からなる群から選択される症状として提示される。

【0009】

特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。

20

【0010】

特定の実施形態において、対象における神経変性は、線維芽細胞GCアーゼ活性の減少、ERストレスの増加、ニューロンミトコンドリア機能障害、ニューロンミトコンドリアROS産生の増加、自食作用流動の減少、ニューロンミトコンドリア速度の減少、ミトファジーの減少、血漿BDNFレベルの減少、脳脊髄液（CSF）BDNFレベルの減少、ニューロンおよびBDNF軸索輸送の減少、脳または脳脊髄液（CSF）中のタンパク質凝集体の増加、脳炎症、ミクログリア活性化の増加、星状細胞活性化の増加、脳体積の減少、ニューロフィラメント軽鎖（NFL）血漿レベルの増加、またはニューロフィラメント軽鎖（NFL）脳脊髄液（CSF）レベルの増加として提示される。

30

【0011】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を少なくとも1日2回投与することを含む。

【0012】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含む。

【0013】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日3回投与することを含む。

【0014】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日4回投与することを含む。

40

【0015】

特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり10～100mgである。

【0016】

特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり50～100mgである。

【0017】

特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は

50

、1日あたり80～100mgである。

【0018】

特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり80mgである。

【0019】

特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90mgである。

【0020】

特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり100mgである。

【0021】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり80～100mgである。

【0022】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90mgである。

【0023】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、2つの医薬組成物のそれぞれは、異なる用量のブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含み、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は1日あたり90mgである。

【0024】

特定の実施形態において、方法は、対象に45mgのブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90mgである。

【0025】

特定の実施形態において、方法は、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を対象に全身投与することを含む。

【0026】

特定の実施形態において、方法は、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を対象に経口投与することを含む。

【0027】

特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、吸入可能な粉末、注射剤、液体、ゲル、固体、カプセルまたは錠剤からなる群から選択される形態で投与される。

【0028】

特定の実施形態において、薬学的に許容されるブリドピジン塩は、ブリドピジン塩酸塩である。

【0029】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、パーキンソン病（PD）、多系統萎縮症（MSA）、レビー小体型認知症（DLB）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病認知症（PDD）、ハンチントン病（HD）、アルツハイマー病、進行性核上麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群、リティコボディグ（Lyticobodig）病（グアムのALS複合体）、神経有棘赤血球症、神経セロイドリポフスチン症、オリブ橋小脳萎縮症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ウィルソン病、大脳皮質基底核変性症（CBD）、およびピック病からなる群から選択される神経変性状態の一部であるか、またはそれに関連している。

10

20

30

40

50

【0030】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、パーキンソン病（PD）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0031】

特定の実施形態において、PDはグルコセレブロシダーゼ変異に関連している（PD-GBA）。

【0032】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、多系統萎縮症（MSA）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0033】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、レビー小体型認知症（DLB）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0034】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0035】

一実施形態において、本発明は、低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与し、それによって対象を治療することを含む、パーキンソン病（PD）の治療を必要とする対象におけるパーキンソン病を治療するための方法を対象とする。

【0036】

一実施形態において、本発明は、低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含み、それにより、PDに罹患した対象における機能低下を緩徐化することを含む、PDに罹患した対象における機能低下を緩徐化する方法を対象とする。

【0037】

一実施形態において、本発明は、低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含み、それにより、PDに罹患した対象における機能的神経回復を誘発／促進することを含む、PDに罹患した対象における機能的神経回復を誘導／促進する方法を対象とする。

【0038】

別の実施形態において、パーキンソニズムは、グルコセレブロシダーゼ（GBA）欠損症に関連するパーキンソン病（PD-GBA）、多系統萎縮症（MSA）、またはレビー小体型認知症（LBD）に関連している。

【0039】

別の実施形態において、プリドピジンはプリドピジン塩酸塩である。

【0040】

別の実施形態において、プリドピジンは経口投与される。

【0041】

別の実施形態において、プリドピジンは、吸入可能な粉末、注射剤、液体、ゲル、固体、カプセルまたは錠剤の形態で投与される。

【0042】

別の実施形態において、プリドピジンは定期的に投与される。

【0043】

別の実施形態において、プリドピジンは、1日1回よりも少ない頻度で投与される。

【0044】

別の実施形態において、プリドピジンは、1日あたり1用量2用量または3用量で投与される。

【0045】

別の実施形態において、プリドピジンは、10mg／日～100mg／日の間の1日用量で投与される。

10

20

30

40

50

【0046】

別の実施形態において、プリドピジンは、 $20\text{ mg}/\text{日} \sim 90\text{ mg}/\text{日}$ の間の1日用量で投与される。

【0047】

別の実施形態において、プリドピジンは、 $45\text{ mg}/\text{日} \sim 90\text{ mg}/\text{日}$ の間の1日用量で投与される。

【0048】

別の実施形態において、プリドピジンは、 $20\text{ mg}/\text{日} \sim 50\text{ mg}/\text{日}$ の間の1日用量で投与される。

【図面の簡単な説明】

【0049】

本発明とみなされる主題は、本明細書の結論部分で特に指摘され、明確に特許請求される。しかしながら、本発明は、その目的、特徴、および利点とともに、構成および動作方法の両方に関して、添付の図面とともに読まれる場合、以下の詳細な説明を参照することによって最良に理解され得る。

【0050】

【図1A】低用量のプリドピジンの治療での行動の改善を示す図である。0.3または $1\text{ mg}/\text{kg}$ のいずれかのプリドピジン（それぞれPr id op 0.3またはPr id op $1\text{ mg}/\text{kg}$ ）または生理食塩水（群あたり $n=8 \sim 12$ 匹）で処置したマウスにおいて、自発的回転が週に1回評価された。結果は、10分間のテストセッション中の自発的な同側回転の数として表される。低用量のプリドピジン（ $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ ）は、すべてのテストで動物のパフォーマンスを改善した。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定を使用したこれらすべてのテストにおいて、低用量プリドピジン $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 処置マウスについては全体的な有意差が見られたが、高用量 $1\text{ mg}/\text{kg}$ プリドピジン処理マウスについては見られなかった。自発的回転：ANOVA $p < 0.0001$ 時間、処置、相互作用、時間 $F(4, 160) = 50.46$ 、処置 $F(3, 40) = 16.97$ 、相互作用 $F(12, 160) = 5.43$ 。

【図1B】低用量のプリドピジンの治療での行動の改善を示す図である。0.3または $1\text{ mg}/\text{kg}$ のいずれかのプリドピジン（それぞれPr id op 0.3またはPr id op $1\text{ mg}/\text{kg}$ ）または生理食塩水（群あたり $n=8 \sim 12$ 匹）で処置したマウスにおいて、前肢使用の非対称性（シリンダーテスト）が週に1回評価された。結果は、病変の反対側の足（左足）で実行された支持壁接触のパーセンテージとして表される。低用量のプリドピジン（ $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ ）は、すべてのテストで動物のパフォーマンスを改善した。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定を使用したこれらすべてのテストにおいて、低用量プリドピジン $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 処置マウスについては全体的な有意差が見られたが、高用量 $1\text{ mg}/\text{kg}$ プリドピジン処理マウスについては見られなかった。シリンダーテスト：ANOVA $p > 0.05$ 相互作用、 < 0.0001 時間および処置、時間 $F(4, 160) = 8.74$ 、処置 $F(3, 40) = 20.96$ 、相互作用 $F(12, 160) = 1.52$ 。

【図1C】低用量のプリドピジンの治療での行動の改善を示す図である。0.3または $1\text{ mg}/\text{kg}$ のいずれかのプリドピジン（それぞれPr id op 0.3またはPr id op $1\text{ mg}/\text{kg}$ ）または生理食塩水（群あたり $n=8 \sim 12$ 匹）で処置したマウスにおいて、前肢使用の非対称性（ステッピングテスト）が週に1回評価された。結果は、病変の反対側の足（左足）で実行された調整ステップのパーセンテージとして表される。低用量のプリドピジン（ $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ ）は、すべてのテストで動物のパフォーマンスを改善した。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定を使用したこれらすべてのテストにおいて、低用量プリドピジン $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 処置マウスについては全体的な有意差が見られたが、高用量 $1\text{ mg}/\text{kg}$ プリドピジン処理マウスについては見られなかった。ステッピングテスト：ANOVA $p = 0.006$ 相互作用、 $p = 0.0004$ 時間、 $p < 0.0001$ 処置、時間 $F(4, 160) = 5.46$ 、処置 $F(3, 40) = 75.4$

10

20

30

40

50

4、相互作用 $F(12, 160) = 2.44$ 、 $p < 0.05$ 、アスタリスク、対「生理食塩水」、番号記号、対「偽」、アンパサンド対「Pr id op 1」。

【図2A】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。TH陽性細胞の立体解析学的カウントは、黒質緻密部 (SNc) において実行された（破線は分析に含まれる領域の輪郭を示している）。データは、病変と同側のSNc由来の細胞の総数を示している（SNc全体の動物あたり7つの切片由来の平均 $\pm$ SEM）。一元配置ANOVA $p < 0.0001$ 、 $F(3, 39) = 44.29$ 、事後テューキー検定、 $p < 0.05$ アスタリスク対生理食塩水、番号記号、対偽。

【図2B】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。THについて免疫染色された黒質切片の低倍率の顕微鏡写真であり、種々の群を表している。スケールバー $100 \mu\text{m}$ 。

【図2C】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。THについて免疫染色された黒質切片の低倍率の顕微鏡写真であり、種々の群を表している。スケールバー $100 \mu\text{m}$ 。

【図2D】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。THについて免疫染色された黒質切片の低倍率の顕微鏡写真であり、種々の群を表している。スケールバー $100 \mu\text{m}$ 。

【図2E】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。THについて免疫染色された黒質切片の低倍率の顕微鏡写真であり、種々の群を表している。スケールバー $100 \mu\text{m}$ 。

【図2F】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表している。同じ切片からの高倍率の挿入図は、種々の群間の繊維密度および形態の違いを示している（生理食塩水処置の場合）。スケールバー、 $200 \mu\text{m}$ 。

【図2G】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表している。同じ切片からの高倍率の挿入図は、種々の群間の繊維密度および形態の違いを示している (0.3 mg/kg プリドピジンで処置したマウス)。スケールバー、 $200 \mu\text{m}$ 。

【図2H】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表している。同じ切片からの高倍率の挿入図は、種々の群間の繊維密度および形態の違いを示している (1 mg/kg のプリドピジンで処置したマウス)。スケールバー、 $200 \mu\text{m}$ 。

【図2I】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表している。無作為な試料領域で、高倍率で実行されたTH陽性繊維の画像セグメンテーション分析。値は繊維ピクセル/試料領域を示し、ひげは各群における値の全範囲を包含する（中央値は水平線として示されている）。クラスカル-ウォリスおよび事後ダン検定、 $p = 0.0091$ 、アスタリスク、 $p < 0.05$ 対生理食塩水。

【図2J】プリドピジン低用量 (0.3 mg/kg) での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量 1 mg/kg ではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表してい

10

20

30

40

50

る。腹外側線条体の断面積全体にわたるTH免疫染色の光学密度分析、病変と同側の側由来のOD値は、各動物の反対側の無傷の側由来のOD値のパーセンテージとして表される（線条体全体の動物あたり4つの切片由来の平均±SEM）。VL線条体、ANOVA $p = 0.0002$ 、 $F(2, 33) = 11.35$ 。事後テューキー検定、 $p < 0.05$ アスタリスク、対生理食塩水、アンパサンド、対Pridop 1。

【図2K】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）での慢性処置（ただし、プリドピジン高用量1mg/kgではない）が、神経組織学的回復を誘発することを示す図である。線条体切片の低倍率顕微鏡写真、破線は、TH繊維密度の分析に含まれる領域を表している。背外側線条体の断面積全体にわたるTH免疫染色の光学密度分析、病変と同側の側由来のOD値は、各動物の反対側の無傷の側由来のOD値のパーセンテージとして表される（線条体全体の動物あたり4つの切片由来の平均±SEM）。DL線条体、ANOVA $p = 0.039$ 、 $F(2, 33) = 3.56$ 。事後テューキー検定、 $p < 0.05$ アスタリスク、対生理食塩水、アンパサンド、対Pridop 1。

【図3A】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。SNcにおけるCD68陽性ミクログリア細胞の数。0.3mg/kgのプリドピジンを受けたマウスは、黒質および線条体レベルの両方で、生理食塩水で処置された対照と比較して、有意に少ない数のCD68陽性細胞を示した。一元配置ANOVA $p = 0.0002$ 、 $F(3, 28) = 9.005$ 。

【図3B】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Aに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm 。

【図3C】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Aに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm 。

【図3D】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Aに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm 。

【図3E】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Aに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm 。

【図3F】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。腹外側線条体におけるCD68陽性ミクログリア細胞の数。0.3mg/kgのプリドピジンを受けたマウスは、黒質および線条体レベルの両方で、生理食塩水で処置された対照と比較して、有意に少ない数のCD68陽性細胞を示した。一元配置ANOVA $p = 0.0005$ 、 $F(3, 28) = 8.049$ 。事後テューキー検定、 $p < 0.05$ アスタリスク、対生理食塩水、番号記号、対偽。

【図3G】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Fに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm 。

μm。

【図3H】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Fに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm。

【図3I】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Fに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm。

【図3J】高用量（1mg/kg）ではなくプリドピジン低用量（0.3mg/kg）での処置が、黒質線条体経路においてミクログリアの活性化を減少させることを示す図である。図3Fに対応する顕微鏡写真。低倍率の顕微鏡写真は4倍の対物レンズの下で撮影されたのに対して、挿入図は20倍の対物レンズの下で撮影された。スケールバー、100 μm。

【図4A】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）は、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて運動障害を改善しないことを示す図である。自発的回転は、6-OHDA病変または偽病変を維持するS1R KOマウスで週に1回評価され、その後0.3mg/kgプリドピジン（Pridop 0.3）または生理食塩水のいずれかで処置された（群あたりn=8~10匹）。結果は、10分間のテストセッション中の自発的な同側回転の数として表される。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定：自発回転：ANOVA $p < 0.0001$ 時間、処置、相互作用、時間 $F(4, 104) = 45.36$ 、処置 $F(2, 26) = 15.54$ 、相互作用 $F(8, 104) = 11.15$ 。

【図4B】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）は、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて運動障害を改善しないことを示す図である。前肢使用の非対称性（シリンダーテスト）は、6-OHDA病変または偽病変を維持するS1R KOマウスで週に1回評価され、その後0.3mg/kgプリドピジン（Pridop 0.3）または生理食塩水のいずれかで処置された（群あたりn=8~10匹）。結果は、病変の反対側の足（左足）で実行された支持壁接触のパーセンテージとして表される。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定：シリンダーテスト：ANOVA $p > 0.05$ 時間および相互作用、 $p < 0.0001$ 処置、時間 $F(4, 104) = 1.23$ 、処置 $F(2, 26) = 1.76$ 、相互作用 $F(8, 104) = 0.32$ 。

【図4C】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）は、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて運動障害を改善しないことを示す図である。前肢使用の非対称性（ステップングテスト）は、6-OHDA病変または偽病変を維持するS1R KOマウスで週に1回評価され、その後0.3mg/kgプリドピジン（Pridop 0.3）または生理食塩水のいずれかで処置された（群あたりn=8~10匹）。結果は、病変の反対側の足（左足）で実行された調整ステップのパーセンテージとして表される。反復測定ANOVAおよび事後ボンフェローニ検定：ステップングテスト：ANOVA $p > 0.05$ 時間および相互作用、 $p < 0.0001$ 処置、時間 $F(4, 104) = 0.46$ 、処置 $F(2, 26) = 346.4$ 、相互作用 $F(8, 104) = 1.35$ 、 $p < 0.05$ 、番号記号対「偽」。

【図5A】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。S1R KOマウスのSNcにおけるTH陽性細胞の立体解析学的カウント。図5Aにおけるデータは、病変と同側のSNc由来の細胞の総数を示している（SNc全体の動物あたり7つの切片由来の平均±SEM）。一元配置ANOVA $p < 0.0001$ 、 $F(2, 26) = 41.73$ 、事後ボンフェローニテスト、 $p < 0.05$ 番号記号対偽群。

【図5B】プリドピジン低用量（0.3mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷

マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。THに対して免疫染色された黒質切片の低倍率顕微鏡写真（破線は分析に含まれる領域の輪郭を示している）。スケールバー、100 μm 。一元配置ANOVA $p < 0.0001$ 、 $F(2, 26) = 41.73$ 、事後ボンフェローニテスト、 $p < 0.05$ 番号記号対偽群。

【図5C】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。THに対して免疫染色された黒質切片の低倍率顕微鏡写真（破線は分析に含まれる領域の輪郭を示している）。スケールバー、100 μm 。一元配置ANOVA $p < 0.0001$ 、 $F(2, 26) = 41.73$ 、事後ボンフェローニテスト、 $p < 0.05$ 番号記号対偽群。

【図5D】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。THに対して免疫染色された黒質切片の低倍率顕微鏡写真（破線は分析に含まれる領域の輪郭を示している）。スケールバー、100 μm 。一元配置ANOVA $p < 0.0001$ 、 $F(2, 26) = 41.73$ 、事後ボンフェローニテスト、 $p < 0.05$ 番号記号対偽群。

【図5E】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。外側線条体（破線で囲まれている）を通る無作為な試料領域で、高倍率で実行されたTH陽性線維の画像セグメンテーション分析。値は繊維ピクセル/試料領域として表され、ひげは各群における値の全範囲を包含し、中央値はバーとして表示される。マンホイットニー検定、 $p = 0.084$ 。

【図5F】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。腹外側線条体の断面積全体にわたるTH免疫染色の光学密度（OD）。病変と同側由来のOD値は、各動物の反対側の無傷の側由来のOD値のパーセンテージとして表される（線条体全体の動物あたり4つの切片由来の平均±SEM）。腹外側（VL）線条体、対応のないt検定、 $p = 0.516$ 。

【図5G】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。背外側線条体の断面積全体にわたるTH免疫染色の光学密度（OD）。病変と同側由来のOD値は、各動物の反対側の無傷の側由来のOD値のパーセンテージとして表される（線条体全体の動物あたり4つの切片由来の平均±SEM）。背外側（DL）線条体、 $p = 0.219$ 。

【図5H】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。生理食塩水処置由来のTH免疫染色線条体切片の代表的な顕微鏡写真。スケールバー、200 μm 。

【図5I】プリドピジン低用量（0.3 mg/kg）が、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいて神経回復効果がないことを示す図である。プリドピジン-0.3 mg/kg処置S1R KOマウス由来のTH免疫染色線条体切片の代表的な顕微鏡写真。スケールバー、200 μm 。

【図6A】0.3 mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3 mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の線条体試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウェスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパーセンテージとして示されている。対応のないt検定、線条体：GDNF $p = 0.003$ 。

【図6B】0.3 mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3 mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の線条体試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウェスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパ

10

20

30

40

50

ーセンテージとして示されている。対応のないt検定、線条体：BDNF $p = 0.013$ 。

【図6C】0.3mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の線条体試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウエスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパーセンテージとして示されている。対応のないt検定、線条体：pERK1/2 $p = 0.049$ 。

10

【図6D】0.3mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の黒質試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウエスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパーセンテージとして示されている。対応のないt検定、黒質：GDNF $p = 0.72$ 。

【図6E】0.3mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の黒質試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウエスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパーセンテージとして示されている。対応のないt検定、黒質：BDNF $p = 0.0008$ 。

20

【図6F】0.3mg/kgのプリドピジンでの処置が、栄養因子およびリン酸化されたERK1/2を上方調節することを示す図である。5週間、0.3mg/kgのプリドピジン（ $n = 9$ ）または生理食塩水（ $n = 11$ ）で処置された6-OHDA損傷野生型マウス由来の黒質試料を使用したGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2（pERK）のウエスタンブロット分析。結果は、 β -アクチンレベルに対して正規化され、プリドピジンで処置された動物由来のデータは、生理食塩水で処置された対照由来の値のパーセンテージとして示されている。対応のないt検定、黒質：pERK1/2 $p = 0.106$ 。

30

【図7】プリドピジンによる初期mHtt誘発ERストレスの用量依存的減少を示す図である。H2a-GFPは、STHdhQ7/7細胞においてHtt20Q-mCherryまたはHtt96Q-mCherry（エクソン1）と一時的に共発現された。H2a-GFP凝集は、細胞ストレスのマーカーである。トランスフェクションの4時間後に細胞は、プリドピジンなしで処置され、またはプリドピジンの濃度を上げながら（0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当する0.03 ~ 3 μM ）処置され、トランスフェクションの24時間後に共焦点顕微鏡において画像化された。Htt96Q-mCherry凝集体またはHtt20Q-mCherryを有する個々の細胞（実験あたり約150細胞）の画像を、凝集体を有するまたは有しない未処置細胞と比較して定量化した。比較のために、100%はHtt96Q-mCherry凝集体を示す未処置細胞におけるH2a-GFP相対強度を表し、0%はHtt96Q-mCherry凝集体を有さない未処置細胞におけるH2a-GFP相対強度を表す。グラフは3回の実験の平均 $\pm$ SEである。アスタリスクは、未処置と比較したP値、 < 0.05 (*) および < 0.01 (**) を示す。

40

【図8】プリドピジンが、ベル型の用量反応曲線で、eIF2 α -リン酸化、小胞体ストレスの尺度を減少させることを示す図である。HEK293細胞が、myc-Htt96Q（ひし形）またはmyc-Htt20Q（四角）でトランスフェクトされ、その後、プリドピジンの濃度を増加させながら（0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に相当する0

50

・0.3～150 μ M) 24時間処置された。総eIF2 α に対するeIF2 α -Pの比率がイムノブロットによって定量化された。

【図9】プリドピジンが、酸化ストレス後の皮質HDニューロンにおけるミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)を増加させることを示す図である。変異ハンチンチンを発現する線条体WTおよびYAC128ニューロンがプリドピジンで24時間処置され、オリゴマイシンに加えてFCCPで脱分極した後の $\Delta\Psi_m$ の変化を評価するためにTMRMが使用された($n=7\sim10$)。二元配置ANOVAは、線条体ニューロンにおけるプリドピジン処置の効果を明らかにした [$F(2, 107)=3.257$ 、 $p=0.0423$]。

【図10】プリドピジンがYAC128 HD線条体ニューロンにおける活性酸素種(ROS)を減少させることを示す図である。1 μ Mプリドピジンで処置された、または処置されていない線条体ニューロンが、MitroPY1蛍光プローブでインキュベートされた。示されるように、ミトコンドリアのH₂O₂は、アンチマイシンA(Ant A、2 μ M)の前後に、スピニングディスク共焦点において記録された($n=4$ 、約20個の細胞/条件と考えられる)。スケールバー=30 μ M。二元配置ANOVAは、ミトコンドリアのROS産生に対するプリドピジン処置の救済効果を明らかにする [$F(1, 389)=15.24$ 、 $p<0.0001$]。

【図11】プリドピジンがミトコンドリア速度を上げることを示す図である。軸索におけるミトコンドリア速度の定量分析は、0.1 μ Mプリドピジンの適用後のWTニューロンにおける加速された軸索輸送ミトコンドリア(n =粒子ステップ数)を明らかにする(Ionescu et al., 2019、図4Fから改変)。

【図12】プリドピジンがB104神経芽細胞腫細胞株におけるBDNF分泌を増強することを示す図である。データはpg/mlで表される(平均 $\pm$ SEM、* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、一元配置ANOVAとそれに続くダネット検定)。NE100、シグマー1受容体拮抗薬(1 μ M)。出典:Geva et al., 2016。

【図13】プリドピジンが、S1Rを介したメカニズムでALS運動ニューロンにおけるBDNF軸索輸送を増強することを示す図である。軸索輸送を視覚化および分析するために、脊髄抽出物がマイクロ流体チャンバーの近位コンパートメントに播種され、軸索は溝を通して遠位コンパートメントまで成長させられた。Qドット-BDNF粒子は遠位チャンバーにのみ導入され、軸索を介したそれらの逆行性輸送は共焦点スピニングディスク顕微鏡で視覚化された。WT(左から1列目)またはSOD1G93A(左から2列目～4列目)MNにおけるQドット-BDNF粒子のための瞬間的な速度値の棒グラフはSOD1G93A MNにおける速度が遅いことを示す。プリドピジンの適用は、SOD1G93A MN(0.1 μ Mおよび1 μ M)の両方の瞬間的な速度を加速する。S1R-MN(左から5列目～7列目)は、BDNFの軸索輸送の欠陥を明らかにする。0.1 μ Mまたは1 μ Mのいずれのプリドピジンもこれらの欠陥を回復することができなかった(n =qドット-BDNFステップの数)。データは平均 $\pm$ SEMとして示されている。* p 値 <0.05 、** p 値 <0.01 、*** p 値 <0.001 ($n=6$ の独立した実験、各実験の試料サイズはバーに示されている、スチューデントのt検定)(Ionescu et al., 2019、図3Cから改変)。

【発明を実施するための形態】

【0051】

本発明は、一態様において、1日あたり少なくとも1つの医薬組成物を対象に投与することを含む、パーキンソン病もしくはパーキンソニズムに関連する別の疾患またはそれらの症状の進行の予防、治療、または緩徐化を必要とする対象におけるそれを行うための方法を提供し、医薬組成物はプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は1日あたり1～100mgである。

【0052】

特定の実施形態において、方法は、パーキンソン病の進行を予防、治療、または緩徐化するためのものである。特定の実施形態において、方法は、パーキンソニズムに関連する

10

20

30

40

50

疾患の進行を予防、治療、または緩徐化するためのものである。特定の実施形態において、方法は、パーキンソン病の症状の進行を予防、治療、または緩徐化するためのものである。特定の実施形態において、方法は、パーキンソニズムに関連する疾患の症状の進行を予防、治療、または緩徐化するためのものである。特定の実施形態において、方法は、パーキンソニズムに関連する症状の進行を予防、治療、または緩徐化するためのものである。

【0053】

特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を予防することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を治療することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を緩徐化することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の機能低下を逆転することを含む。

10

【0054】

特定の実施形態において、対象の機能低下は、振戦、動作緩慢、硬直、姿勢の不安定性、日常生活の活動を含む統一パーキンソン病評価尺度パートII（UPDRSパートII）による低下、およびPDの修正版ホーエンおよびヤール分類による低下からなる群から選択される症状として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、振戦として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、動作緩慢として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、硬直として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、姿勢の不安定性として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、日常生活の活動を含む統一パーキンソン病評価尺度パートII（UPDRSパートII）による低下として提示される。特定の実施形態において、対象の機能低下は、PDの修正版ホーエンおよびヤール分類による低下として提示される。

20

【0055】

特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を予防することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を治療することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を緩徐化することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象の認知機能低下を逆転することを含む。

【0056】

特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、知的機能障害、思考障害、うつ病、やる気の減少、イニシアチブの減少、発話障害、救済の増加、嚥下障害、手書きの障害および痛覚の増加からなる群から選択される症状として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、知的機能障害として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、思考障害として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、うつ病として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、やる気の減少として表される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、イニシアチブの減少として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、発話障害として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、救済の増加として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、嚥下障害として提示される。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、手書きの障害を呈する。特定の実施形態において、対象の認知機能低下は、痛覚の増加として提示される。

30

40

【0057】

特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を予防、治療、緩徐化、または逆転することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を予防することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を治療することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を緩徐化することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象における神経変性を逆転することを含む。

【0058】

特定の実施形態において、対象における神経変性は、線維芽細胞GCアーゼ活性の減少、ERストレスの増加、ニューロンミトコンドリア機能障害、ニューロンミトコンドリア

50

R O S 産生の増加、自食作用流動の減少、ニューロンミトコンドリア速度の減少、マイトファジーの減少、血漿 B D N F レベルの減少、脳脊髄液 (C S F) B D N F レベルの減少、ニューロンおよび B D N F 軸索輸送の減少、脳または脳脊髄液 (C S F) 中のタンパク質凝集体の増加、脳炎症、ミクログリア活性化の増加、星状細胞活性化の増加、脳体積の減少、ニューロフィラメント軽鎖 (N F L) 血漿レベルの増加、またはニューロフィラメント軽鎖 (N F L) 脳脊髄液 (C S F) レベルの増加として提示される。

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態において、対象における神経変性は、線維芽細胞 G C アーゼ活性の減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、E R ストレスの増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ニューロンミトコンドリア機能障害として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ニューロンミトコンドリア R O S 産生の増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、自食作用流動の減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ニューロンミトコンドリア速度の減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、マイトファジーの減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、血漿 B D N F レベルの減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、脳脊髄液 (C S F) B D N F レベルの減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ニューロンおよび B D N F 軸索輸送の減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、脳または脳脊髄液 (C S F) 中のタンパク質凝集体の増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、脳炎症として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ミクログリア活性化の増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、星状細胞活性化の増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、脳体積の減少として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、ニューロフィラメント軽鎖 (N F L) 血漿レベルの増加として提示される。特定の実施形態において、対象における神経変性は、神経フィラメント軽鎖 (N F L) 脳脊髄液 (C S F) レベルの増加として提示される。

【 0 0 6 0 】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を少なくとも 1 日 2 回投与することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を少なくとも 1 日 3 回投与することを含む。特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を少なくとも 1 日 4 回投与することを含む。

【 0 0 6 1 】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を 1 日 2 回投与することを含む。

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を 1 日 3 回投与することを含む。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態において、方法は、対象にブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を 1 日 4 回投与することを含む。

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1 日あたり 1 0 ~ 1 0 0 m g である。特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1 日あたり 2 0 ~ 1 0 0 m g である。特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1 日あたり 3 0 ~ 1 0 0 m g である。特定の実施形態において、ブリドピジンまたはその薬学的に許

10

20

30

40

50

容される塩の総投与量は、1日あたり40～100mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり50～100mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり60～100mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり70～100mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり80～100mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90～100mgである。

【0065】

特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり80mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり85mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり95mgである。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり100mgである。

【0066】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり80～100mgである。特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり85～95mgである。

【0067】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は、1日あたり90mgである。

【0068】

特定の実施形態において、方法は、対象にプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、2つの医薬組成物のそれぞれは、異なる用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は1日あたり90mgである。

【0069】

特定の実施形態において、方法は、対象に45mgのプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を1日2回投与することを含み、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩の総投与量は1日あたり90mgである。

【0070】

特定の実施形態において、方法は、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を対象に全身投与することを含む。

【0071】

特定の実施形態において、方法は、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を対象に経口投与することを含む。

【0072】

特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、吸入可能な粉末、注射剤、液体、ゲル、固体、カプセルまたは錠剤からなる群から選択される形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、粉末の形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、注射可能な材料の形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、液体の形態で投与される。特定の実施形態において、プリド

10

20

30

40

50

ピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、ゲルの形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、固体の形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、カプセルの形態で投与される。特定の実施形態において、プリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物は、錠剤の形態で投与される。

【0073】

特定の実施形態において、薬学的に許容されるプリドピジン塩は、プリドピジン塩酸塩である。

【0074】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、パーキンソン病（PD）、多系統萎縮症（MSA）、レビー小体型認知症（DLB）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病認知症（PDD）、ハンチントン病（HD）、アルツハイマー病（AD）、進行性核上麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群、リティコボディグ（Lyticobodig）病（グアムのALS複合体）、神経有棘赤血球症、神経セロイドリポフスチン症、オリーブ橋小脳萎縮症、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ウィルソン病、大脳皮質基底核変性症（CBD）、およびピック病からなる群から選択される神経変性状態の一部であるか、またはそれに関連している。

【0075】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、PDの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、MSAの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、DLBの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、ALSの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、PDDの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、HDの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、ADの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、PSPの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、大脳皮質基底核変性症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、前頭側頭型認知症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、ゲルストマン-ストロイスラー-シャインカー症候群の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、リティコボディグ病の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、神経有棘赤血球症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、神経セロイドリポフスチン症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、オリーブ橋小脳萎縮症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、ウィルソン病の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、CBDの一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、ピック病の一部であるか、またはそれに関連している。

【0076】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、パーキンソン病（PD

10

20

30

40

50

）の一部であるか、またはそれに関連している。特定の実施形態において、PDはPD-GBAである。

【0077】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、多系統萎縮症（MSA）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0078】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、レビー小体型認知症（DLB）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0079】

特定の実施形態において、パーキンソニズムまたはその症状は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の一部であるか、またはそれに関連している。

【0080】

本発明はさらに対象に低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それによって対象を治療することを含む、PDの低下の治療、阻害または低減を必要とする対象におけるそれを行うための方法を提供する。

【0081】

本発明はさらに、対象に低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それによってPDに罹患した対象における機能低下を緩徐化することを含む、PDに罹患した対象における機能低下を緩徐化する方法を提供する。

【0082】

本発明はさらに、対象に低用量のプリドピジンまたはその薬学的に許容される塩を投与し、それによってPDに罹患した対象における機能的神経回復を誘発／促進することを含む、PDに罹患した対象における機能的神経回復を誘発／促進する方法を提供する。

【0083】

別の実施形態において、本発明はさらに、グルコセレブロシダーゼ（GBA）変異に関連するパーキンソン病（PD）、GBA欠乏症、多系統萎縮症（MSA）またはレビー小体型認知症（LBD）を治療する方法を提供する。別の実施形態において、本発明はさらに、GBA突然変異に関連するPDを治療する方法を提供する。別の実施形態において、本発明はさらに、GBA欠乏に関連するPDを治療する方法を提供する。別の実施形態において、本発明はさらに、多系統萎縮症（MSA）に関連するパーキンソニズムを治療する方法を提供する。別の実施形態において、本発明はさらに、レビー小体型認知症（LBD）に関連するパーキンソニズムを治療する方法を提供する。

【0084】

リソソーム加水分解酵素グルコセレブロシダーゼ（GCase）をコードするGBA遺伝子の変異は、パーキンソン病（PD）を発症する最も一般的な危険因子であり、PD患者の5～20%が保因者である。PD-GBA患者は発症年齢が若く、一般的なPD患者集団よりも認知変化により関連する。

【0085】

PDおよびGBA遺伝子における劣性変異によって引き起こされるリソソーム蓄積症ゴーシェ病（GD）との間には臨床的な関連性がある。GD患者および遺伝子保因者はPDを発症するリスクが高くなる。（1）ERストレス、（2）ミトコンドリア機能障害、（3）自食作用の欠陥、（4）BDNFレベルおよび軸索輸送の欠陥を含む、GBA関連の神経変性に寄与するいくつかの細胞メカニズムが提案されている。

【0086】

パーキンソニズムは、MSAおよびLBDの両方の初期の特徴である。MSAの症状には、運動障害（筋肉の制御もしくは動きの喪失もしくは制限、または可動性の制限）を含み、PDと同様の振戦、硬直、および／または筋肉協調の喪失、発話および歩行（人の歩き方）の困難を含み得る。

【0087】

MSAは、男性および女性、およびすべての人種群を含む、まれな病気である。症状は

10

20

30

40

50

50代に現れる傾向があり、5年～10年の経過の間に急速に進行し、運動機能が徐々に失われ、最終的にはベッドに閉じ込められる。現在、病気の進行を緩徐化することができる薬はなく、治療法もない。MSAには、歴史的にシャイドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、および線条体黒質変性症と呼ばれていた障害を含む。

【0088】

レビー小体型認知症（LBD）は進行性の脳障害であり、レビー小体（アルファーシヌクレインと呼ばれるタンパク質の異常な沈着物）が、PDと同様の行動、認知、および運動を調節する脳の領域に蓄積する。

【0089】

一実施形態において、対象は、ヒト患者である。

【0090】

一実施形態において、プリドピジンは経口投与される。一実施形態において、プリドピジンは経口投与される。

【0091】

一実施形態において、プリドピジンは、吸入可能な粉末、注射剤、液体、ゲル、固体、カプセルまたは錠剤の形態で投与される。

【0092】

一実施形態において、プリドピジンは定期的に投与される。

【0093】

一実施形態において、プリドピジンは、1日1回よりも少ない頻度で投与される。一実施形態において、プリドピジンは毎日投与される。一実施形態において、プリドピジンは1日1回投与される。別の実施形態において、プリドピジンは、1日1回よりも頻繁に投与される。一実施形態において、プリドピジンは、1日2回または1日3回投与される。

【0094】

一実施形態において、10mg/日～100mg/日の間の低用量で投与されるプリドピジンの量。一実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、20mg/日～90mg/日の間である。一実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、45mg/日～90mg/日である。一実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、20mg/日～50mg/日である。別の実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、約20mg/日、22.5mg/日、約45mg/日、約67.5mg/日、約90mg/日、約100mg/日である。一実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、45mg/日である。一実施形態において、投与されるプリドピジンの量は、90mg/日である。

【0095】

一実施形態において、1日あたり1用量のプリドピジンの量が投与される。一実施形態において、1日あたり2用量のプリドピジンの量が投与される。

【0096】

一実施形態において、1用量で投与されるプリドピジンの量は、約10mg、約22.5mg、約45mg、約67.5mg、約90mgである。

【0097】

一実施形態において、1用量あたり45mgの量で、1日あたり2用量のプリドピジンの量が投与される。

【0098】

一実施形態において、プリドピジンの定期投与は、少なくとも3日、少なくとも30日、少なくとも42日、少なくとも8週間、少なくとも12週間、少なくとも24週間、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、少なくとも2年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、少なくとも20年、少なくとも25年、または30年以上継続する。

【0099】

一実施形態において、プリドピジンは、対象における症状の発症を遅らせることによって対象を治療する。

10

20

30

40

50

【0100】

前述の実施形態について、本明細書に開示される各実施形態は、他の開示される実施形態のそれぞれに適用し得ると考えられる。さらに、方法の実施形態に列挙された要素は、本明細書に記載の医薬組成物、使用、およびパッケージの実施形態において使用され得、逆もまた同様である。

【0101】

用語

【0102】

本明細書で使用される場合、特に明記されていない限り、以下の各用語は、以下の定義を有するものである。

【0103】

本明細書で使用される場合、「プリドピジン」は、プリドピジン塩基またはその薬学的に許容される塩を意味する。

【0104】

本発明に従って使用するための活性化合物は、意図された投与に適した任意の形態で提供され得る。適切な形態には、薬学的に許容される塩、および本発明の化合物のプレドラッグ形態またはプロドラッグ形態が含まれる。

【0105】

「その塩」は、化合物の酸性または塩基性塩を作製することによって修飾された本化合物の塩である。この点での「薬学的に許容される塩」という用語は、薬学的使用に適した本発明の化合物の比較的非毒性の無機および有機酸または塩基付加塩を指す。薬学的に許容される塩は、当技術分野で周知および記載されている手順によって形成され得る。そのような塩を調製する1つの手段は、本発明の化合物を無機塩基で処理することによるものである。

【0106】

本発明の化合物の酸付加塩の例は、塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、アコネート、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、ケイ皮酸塩、クエン酸塩、エンボネート、エナンテート、フマル酸塩、グルタミン酸塩、グリコール酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メタンスルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、フタル酸塩、サリチル酸塩、ソルビン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、トルエン-p-スルホン酸塩などを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、プリドピジンは、HCl塩または酒石酸塩などの薬学的に許容される塩である。好ましくは、本明細書に記載される本発明の任意の実施形態において、プリドピジンは、その塩酸塩の形態である。

【0107】

本明細書で使用される場合、ミリグラムで測定されるプリドピジンの「量」または「用量」は、調製物の形態にかかわらず調製物中に存在するプリドピジン（4-[3-(メチルスルホニル)フェニル]-1-プロピル-ピペリジン）のミリグラムを指す。例えば、「90mgのプリドピジン」を含む単位用量は、製剤の形態にかかわらず、製剤中のプリドピジンの量が90mgであることを意味する。したがって、塩、例えばプリドピジン塩酸塩の形態である場合、90mgのプリドピジンの用量を提供するために必要な塩形態の重量は、塩の存在のために90mgよりも大きいであろう。

【0108】

当業者が理解するように、「増加した」または「減少した」という用語は、患者の任意のタイプの症状を指す場合、対応する健康な対象、対応する健康な被験者の群、または患者自身の病歴における症状の存在および／または重症度と比較したものである。

【0109】

「機能低下」という用語は、いくつかの実施形態において、職業、財政、家事、必要とする低レベルの世話および日常生活動作（ADL）を維持する対象の能力のうちの1つ以上を指す。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、職業、財政、家事、必要とす

10

20

30

40

50

る低レベルの世話および日常生活動作（ＡＤＬ）を維持する１つ以上の対象能力の予防、治療、緩徐化、または逆転の方法を提供する。

【０１１０】

追加の機能障害／身体障害評価は、ジスキネジア患者のＵＤｙｓＲＳスケールに組み込まれている。このスケールは、ＡＤＬを実行する患者の能力の直接観察を招く。ＵＤｙｓＲＳのパート３および４は、患者のＡＤＬ機能がどのように影響を受けるかについて説明している。

【０１１１】

「機能低下」という用語は、例えば、ＰＤ患者の場合、日常生活の活動を含む統一パーキンソン病評価尺度パートＩＩ（ＵＰＤＲＳパートＩＩ）による低下を含む。例えば、ＰＤの修正版ホーエンおよびヤール分類は、ステージ０（疾患の兆候なし）、ステージ１（片側性疾患）、ステージ１．５（片側性および軸性病変）、ステージ２（両側性疾患、バランスの障害なし）、ステージ２．５（軽度の両側性疾患、プルテストで回復）、ステージ３（軽度から中等度の両側性疾患、ある程度の姿勢の不安定性、身体的に独立）、ステージ４（重度の障害、まだ補助なしで歩行または立つことができる）、およびステージ５（車椅子に縛られているか、補助がない限り寝たきりである）。

【０１１２】

「日常生活動作」という用語は、さらにシュワブおよびイングランドの日常生活動作スケールによる低下を含む。これには、１００％（完全に独立している。遅さ、困難、または障害なしにすべての雑用を行うことができる。本質的に正常である。任意の困難を認識していない。）、９０％（完全に独立している。ある程度の遅さ、困難、障害を伴いすべての雑用を行うことができる。２倍の時間がかかる場合がある。困難に気づき始めている。）、８０％（ほとんどの雑用で完全に独立している。２倍の時間がかかる。困難および遅さを意識している。）、７０％（完全に独立しているわけではない。いくつかの雑用でより困難。中には３～４倍のかかるものもある。１日の大部分を雑用に費やす必要がある。）、６０％（一部の依存関係。ほとんどの雑用を行うことができるが、非常にゆっくりと多くの労力を要する。間違い、いくつか不可能である。）、５０％（より依存する。半分手伝い、遅い。すべての困難。）、４０％（非常に依存している。すべての雑用を支援できるが、単独ではほとんどできない。）、３０％（努力を払って、時々、単独でいくつかの雑用を行うか、単独で開始する。多くの助けが必要である。）、２０％（単独では何もできない。いくつかの雑用を少し助けることができる。重大な病人。）、１０％（完全に依存、無力。完全に病人。）、および０％（嚥下、膀胱、腸の機能などの単調な機能が機能していない。寝たきり。）。

【０１１３】

本明細書で使用される場合、「単位用量」、「複数の単位用量」および「単位剤形（複数可）」は、単一の薬物投与実体／実体（複数）を意味する。「単位用量」、「複数の単位用量」および「単位剤形（複数可）」は、錠剤、カプセル、ピル、粉末、および顆粒などの経口剤形のために調製され得る。

【０１１４】

本明細書で使用される場合、数値または範囲の文脈における「約」は、列挙または特許請求された数値または範囲の９０～１１０％を意味する。

【０１１５】

「対象への投与」または「（ヒト）患者への投与」とは、関連する症状、例えば病的状態を遅延、緩和、治療、または軽減するために、対象／患者に薬剤、薬物、または治療薬を与える、調剤する、または適用することを意味する。経口投与は、本発明の化合物を対象に投与する１つの方法である。

【０１１６】

本発明による化合物は、基本形態または薬学的に許容される塩の形態で、好ましくは１つ以上のアジュバント、賦形剤、担体、緩衝液、希釈剤、および／または他の通常の医薬補助剤と一緒に医薬組成物で投与され得る。

10

20

30

40

50

【0117】

「薬学的に許容される担体」とは、合理的な利益／リスク比に見合った過度の有害な副作用（毒性、刺激、およびアレルギー反応など）なしにヒトおよび／または動物での使用に適した担体または賦形剤を指す。それは、本発明の化合物を対象に送達するための、薬学的に許容される溶媒、懸濁剤またはビヒクルであり得る。

【0118】

投与は定期投与であり得る。本明細書で使用される場合、「定期的投与」は、ある期間によって分離された反復／周期的投与を意味する。投与間の期間は、その時々で一貫していることが好ましい。定期的な投与は、例えば、1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、毎週、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回などの投与を含み得る。

10

【0119】

本明細書で使用される「治療する」または「治療」は、PDに罹患した対象における身体的、精神的または感情的制限の緩和、軽減、重症度の減少、排除または実質的排除、または改善を包含する。治療とは、病気に関連する症状の遅延または予防、あるいは欠損の減少も指す。

【0120】

本明細書で使用される場合、目的を達成するのに有効な量のような「有効な」とは、この開示の方法で使用された場合に合理的な利益／リスク比に見合った過度の有害な副作用（毒性、刺激、またはアレルギー反応など）なしに示された治療反応をもたらすのに十分な成分の量を意味する。例えば、PDの症状を治療するのに効果的な量。特定の有効量は、治療される特定の状態、患者の身体的状態、治療される哺乳動物の種類、治療の期間、併用療法の性質（もしあれば）、および採用される特定の製剤および化合物またはその誘導体の構造などの要因によって異なる。

20

【0121】

パラメータ範囲が提供される場合、その範囲内のすべての整数、およびその10分の1もまた、本発明によって提供されることが理解される。例えば、「22mg～300.0mg」には、22.0mg、22.1mg、22.2mg、22.3mg、22.4mgなど、300.0mgまでを含む。

【0122】

本発明は、以下の実験の詳細を参照することによってよりよく理解されるであろうが、当業者は、特定の実施例が、その後続く特許請求の範囲により完全に記載されるように、本発明の例示にすぎないことを容易に理解するであろう。

30

【0123】

実施例

【0124】

ヘミパーキンソン病のげっ歯類における潜在的なS1Rアゴニストとしてのプリドピジンの効果が研究された。線条体内6-ヒドロキシドーパミン（6-OHDA）病変を有するマウスはプリドピジンで5週間処置された。結果は、驚くべきことに、低用量（0.3mg/kgなど）で、プリドピジンが線条体の神経可塑性経路の上方調節を伴う行動的および神経組織学的回復を生じさせることを示している。プリドピジン治療は、S1Rを欠く6-OHDA損傷マウスにおいてこれらの有益な効果のいずれも示さなかった。薬物動態データは、有効量（0.3mg/kg）で、プリドピジンの最大脳濃度（C_{max}）が110ng/mlであり、ドーパミン受容体ではなくS1Rに選択的に結合するのに十分な濃度であることを示している。これらの結果は、S1Rアゴニストのように作用することにより、プリドピジンが運動線条体において変性ドーパミンニューロンを保護し、機能的に顕著なレベルのドーパミン作動性線維を回復し得ることを示した最初ものである。

40

【0125】

方法

【0126】

動物

50

【0127】

この研究は雄のC57BL6Jマウスで実施された（体重は約25gで、実験開始時は8～9週齢である）。合計65匹の野生型マウスおよび52匹のS1Rノックアウト（KO）マウスが使用された。S1Rノックアウトマウスおよび野生型同腹仔（両方の性別）は、C57BL6Jバックグラウンドで飼育された。そのS1R KO系統は、Mutant Mouse Resource Regional Centre (MMRRC) によって配布されたよく特徴付けられたSigmar1^{Gt} (OST422756) Lexマウス系統に由来する。マウスは、餌および水は自由摂取で12時間の明暗サイクルで飼育された。飼育条件および実験的処置は、動物研究に関するMalmö-Lund倫理委員会によって承認された。

10

【0128】

6-OHDA 病変

【0129】

病変は、以前に記載された手順 [Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental Parkinson's disease and parkinsonism. Brain: A Journal of Neurology. 2014;137 (Pt 7):1998-2014] に従って実施された。簡単に説明すると、マウスは、イソフルラン (Isoba (登録商標) vet, Apoteksbolaget, Solna, Stockholm, 108スウェーデン) で麻酔され、平らな頭蓋骨の位置で定位固定フレームに配置された。6-OHDA-HCl (Sigma-Aldrich AB, Stockholm, スウェーデン) は、1ミリリットルあたり3.2mgの遊離塩基の濃度で0.02%アスコルビン酸塩-生理食塩水に新たに溶解された。部位ごとに1マイクロリットルの毒素溶液を次の座標で右線条体に注入した（ブレグマ、矢状縫合、硬膜表面に対してmmで指定、Paxinos and Franklin, 2001を参照）：AP+1.0、ML-2.1、およびDV-2.9、部位1、およびAP+0.3、ML-2.3、およびDV-2.9、部位2。溶液はガラスキャピラリー（先端の直径約50（1μm））を介して0.5（1μL/min）の速度で注入され、各注入後、キャピラリーは2mi間置いたままであった。

20

30

【0130】

処置

【0131】

プリドピジンは、使用直前に生理食塩水に溶解され、1日1回の皮下（sc）注射で0.1mL/10g体重の量で注射された。最初の注射は、病変手術の完了直後に行われた。最初の実験において、プリドピジンは0.3または1.0mg/kgのいずれかで投与された。0.3mg/kgのプリドピジンのみが機能的に関連する神経回復を生じさせることを確認した後、この用量が残りの研究のために選択された。プリドピジンは常に午後2時頃に投与され、行動テストは常に午前9時～午前10時30分で実施された（プリドピジンの潜在的な運動効果による交絡因子を除外するために、このタイムラグは許容された）。

40

【0132】

行動テスト

【0133】

この研究に参加したすべてのマウスは、週に1回3つの行動テストを受けた。

【0134】

(i) 自発的回転活動

【0135】

片側黒質線条体除神経に起因する姿勢および自発運動の非対称性は、オープンフィールド

50

ドでの自発的回転のテストを使用して評価された。このテストにおいて、動物は試験環境の新規性に応じて6-OHDA病変と同側に一時的に向きを変え、テストを繰り返すとすべての動物において回転反応が徐々に低下する [Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxy dopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2011; 42 (3) : 327-340]。

10

【0136】

簡潔に言うと、各マウスはオープンフィールド (50×50 cm) の中央に個別に配置され、最大活動の期間に対応して、すぐに10分間ビデオ録画された [Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2011; 42 (3) : 327-340]。全回転 (360回転の連続) は、実験的に盲検化された調査員によってオフラインでカウントされた。データは、テストセッションごとに病変と同側の正味の完全に向きを変えた総数として表される。

20

【0137】

(ii) シリンダーテスト

【0138】

垂直な探索中の前肢使用の非対称性は、ヘミパーキンソン病のげっ歯類における前肢の無動の検証された尺度を提供する [Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*. 2002; 15 (1) : 120-32]。テストは、[Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA] のように実行された。簡潔に言うと、マウスは個別にガラスシリンダー161 (直径10 cm、高さ14 cm) 中に配置され、3~5分間ビデオ録画された。病変の反対側の足によって独立して実行された支持壁接触の数は、各セッションにおけるすべての支持壁接触のパーセンテージとして表された。

30

【0139】

(iii) ステッピングテスト

【0140】

実験者が課した動き中に調整ステップを実行する能力の障害 (ステッピングテスト) は、PDに関連する運動および姿勢の欠損の両方を反映している [Blume SR, Cass DK, Tseng KY. Stepping test in mice: a reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*. 2009; 219 (1) : 208-11. Winkler C, Bentlage C, Nikkhah G, Samii M, Bjorklund A. Intranigral transplants of GABA-rich striatal tissue induce behaviora

40

50

l recovery in the rat Parkinson's Disease model and promote the effects obtained by intrastriatal dopaminergic transplants. *Experimental Neurology*. 1999;155(2):165-86]。マウスは、特注のプラスチック製の廊下（幅7cm、長さ1m、高さ10cmの壁に挟まれた）の入り口に配置され、尾でそっと持ち上げられ、一定の速度（1m/4s）で後方に引っ張られた。各試験はビデオ録画され、映像は各前肢によって実行された調整ステップの数を数えるために使用された。マウスが（逃げたり探索したりするために）廊下の壁に向かって体を90度回転させた試験は破棄された。各セッションにおいて、動物ごとに3つの有効な試験が得られるまでマウスはテストされた。結果は、総ステップ数に対する病変の反対側の前肢（左）によって実行されたステップのパーセンテージとして表された（セッションあたり3回の試験の平均）。

【0141】

脳の調製

【0142】

免疫組織化学に割り当てられたマウスは、最後のラグ/生理食塩水投与の翌日（最後の注射から約20時間の間隔）に灌流固定された。動物は、ペントバルビタールナトリウム（240mg/kg、i.p.）で深く麻酔され、0.9%生理食塩水、続いて氷冷緩衝4%パラホルムアルデヒド（pH7.4）で経心的に灌流された。迅速な抽出後、脳は、同じ固定剤に2時間浸し、氷冷リン酸緩衝25%ショ糖溶液中で一晩組織凍害から保護された。30個の冠状切片（厚さ1mm）がスライド式ミクロトームで切断され、非凍結溶液（0.1Mリン酸緩衝液中の30%エチレングリコールおよび30%グリセロール）中で-20℃で保存した。

【0143】

ウエスタンブロット分析のために準備された動物は、頸椎脱臼によって安楽死させられ、彼らの脳は急速に抽出され、砕いたドライアイス上で凍結された。組織試料はクリオスタットチャンバー（-14℃）中で解剖された。対軸方向レベルにまたがる冠状脳スライス、ブレグマに対して+1.18~-0.34mmは、マウスの脳形状コンテナを使用して抽出された。線条体は、メスの刃を使用して解剖された。黒質由来の組織試料は、ブレグマに対して体軸方向レベル-2.70~-3.80にまたがる直径2mmの組織パンチャーで採取された。試料は、さらに分析するまで凍結された。

【0144】

定量的免疫組織化学

【0145】

免疫組織化学および定量分析は、チロシンヒドロキシラーゼに対する一次抗体 [Mysona BA, Zhao J, Smith S, Bollinger KE. Relationship between sigma-1 receptor and BDNF in the visual system. *Experimental Eye Research*. 2018;167:25-30] (Pel-Freez、Rogers、ARからのウサギ抗TH抗血清、1:1000) および Cluster of Differentiation 68 (CD68) (AbD Serotec、Kidlington、Oxfordshire、英国からのラット抗CD68抗血清、1:1000) を使用した確立されたプロトコル [Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA. *Neurobiology of Disease*. 2011;42(3):327-340] に従って実行された。定量分析は、以下の方法を使用して、実験的に盲検化された研究者によって実行された。

【0146】

黒質緻密部 (SNc) におけるTH陽性細胞体の数は、[West MJ. *Stereological methods for estimating the total*

10

20

30

40

50

number of neurons and synapses: issues of precision and bias. Trends in Neurosciences. 1999; 22 (2) : 51-61] のように光学分留装置に従ってバイアスのない立体学を使用して決定された。

【0147】

分析は、NewCASTソフトウェア (Visiopharm) によって制御されるxy電動ステージを備えたNikon 80i顕微鏡を使用して実行された。試料採取画分は、確立されたプロトコル [Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profile of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. Neurobiology of Disease. 2011; 42 (3) : 327-340] に従って、動物ごとに片側あたり少なくとも100ニューロンをカウントするように選択され、SNcにおけるTH陽性ニューロンの総数は、光学分留装置式を使用して推定された。つまり、ニューロンの数 = $1 / ssf$ (スライス試料採取画分) $\times 1 / asf$ (面積試料採取画分) $\times 1 / tsf$ (厚さ試料採取画分) $\times E$ (カウントされたオブジェクトの数)

[West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. Trends in Neurosciences. 1999; 22 (2) : 51-61]。

【0148】

TH免疫反応性線維の密度は、画像セグメンテーションソフトウェア (VIS, Visiopharm Integrator System, Visiopharm, H0rs holm, デンマーク) を使用して、線条体の高度に除神経された外側部分において測定された。この目的のために、外側線条体は、明確に定義された解剖学的ランドマークを使用して、動物ごとに4つの体軸方向レベルにおいてNikon Eclipse 80i顕微鏡における低倍率 (4倍の対物レンズ) で輪郭が描かれた ([Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. Neurobiology of Disease. 2011; 42 (3) : 327-340] のように)。次に、自動無作為試料採取が100倍の対物レンズの下で適用され、すべての切片において関心対象の構造の一定の割合 (外側線条体断面積の10%) をカバーした。画像は、デジタルカメラ (Olympus DP72) で捕捉され、マウスごとに25~30個の試料領域が取得された (領域サイズ、5742 (im^2))。各画像で、ベイジアンアルゴリズムベースのピクセル分類器を使用して、明確なTH免疫陽性線維は、バックグラウンドオブジェクトから分離された [Westin JE, Lindgren HS, Gardi J, Nyengaard JR, Brundin P, Mohapel P, et al. Endothelial proliferation and increased blood-brain barrier permeability in the basal ganglia in a rat model of 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine-induced dyskinesia. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2006; 26 (37) : 9448-61]。

【0149】

結果は、試料領域あたりのTH免疫陽性ピクセルの総数（領域全体で平均化された）として表された。この群において存在する微細なドーパミン作動性繊維メッシュ（タイプI繊維、[Song DD, Haber SN. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(13):5102-14]）のため、この分析は偽病変動物では実行されなかった、これは明確な軸索構造の解決を妨げた。無作為な試料領域でのTH繊維の高倍率分析は、背外側および腹外側線条体全体にわたるTH免疫染色の光学密度（O.D.）測定によって補完された。この方法は実際の繊維分析よりもはるかに感度が低くなるが[Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain: A Journal of Neurology*. 2014;137(Pt 7):1998-2014]、関心領域全体にわたる全体的な神経支配密度の指標を提供する。

【0150】

OD分析は、NIH Image Jソフトウェアを使用して同じ体軸方向レベルで実行された[Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2011;42(3):327-340]。バックグラウンド値（各動物の脳梁で測定）を差し引いた後、病変と同側のODを、同じ動物の無傷の側のODのパーセンテージとして表した（無傷の側からの値は正常な神経支配密度を表す）[Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2011;42(3):327-340]。

【0151】

性活ミクログリアの形態を示すCD68免疫陽性細胞[Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isaacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *The European Journal of Neuroscience*. 2002;15(6):991-8, Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology*. 2013;35(5):601-12]は、SNcの本体（ブレグマの後方の体軸方向レベル3.40~3.64に対応）および腹外側線条体（ブレグマの前方0.26-0.02）で

手動でカウントされた。この目的のために、関心領域を描写するマスクは、4倍の倍率で定義され、試料領域（36, 921（サイズ1m²））は、NewCASTソフトウェア（Visiopharm）によって制御されるx-y電動ステージを使用して40倍の対物レンズの下でこのマスク内で無作為に採集された。病変と同側のCD68免疫陽性細胞の数は、反対側のCD68免疫陽性細胞のパーセンテージとして表された。

【0152】

ウエスタンブロット解析

【0153】

組織ホモジネートは、細胞溶解緩衝液（20mmol/L Tris（pH7.5）、150mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、1mmol/L EGTA、1% Triton X-100、2.5mmol/Lピロリン酸ナトリウム、1mmol/Lβ-3-グリセロールホスフェート、1mmol/L Na₃VO₄、11g/mLロイペプチン、および1mmol/Lフェニルメチルスルホニルフルオリド）において調製された。20マイクログラムのタンパク質を10%SDSポリアクリルアミドゲルで分離した。タンパク質は、ポリビニルジフルオリドメンブレンに転写され、ブロッキングバッファー（20mM Tris、136mM NaCl、pH7.6、0.1% Tween 20、5%脱脂粉乳）でインキュベートされた。その後、次の一次抗体のうちのひとつを使用して、膜は4℃で一晩インキュベートされた：ウサギポリクローナル抗GDNF（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA、1:1000）およびモノクローナル抗BDNF（Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:1000）、Thr202/Tyr204リン酸化ERK1/2に対するウサギポリクローナル抗体（p44/42-MAPK、Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA、1:2000）。適切な洗浄ステップに続いて、メンブレンはHRP結合二次抗体（Sigma-Aldrich, Deisenhofen, ドイツ、1:15000）とともにインキュベートされた。化学発光キット（Merck Millipore, Watford, Hertfordshire、英国）を使用して信号が視覚化され、CCDカメラ（LAS1000システム、富士フイルム、東京、日本）を使用して画像が取得された。NIH Image Jソフトウェアを使用して、特定の免疫反応性バンドで光学密度が測定された。次に、メンブレンは剥がされ、β-アクチン抗体（Sigma-Aldrich、1:50,000）で再探査された。次に、特定のバンドの光学密度は同じレーンのβ-アクチンバンドで正規化された。

【0154】

ブリドピジン脳組織結合

【0155】

ブリドピジンの脳結合特性は、製造元のプロトコルに従って、ThermoScientificからの急速平衡透析（RED）デバイスインサートを使用した急速平衡透析による新鮮なマウス脳ホモジネートを使用してインビトロで評価された。

【0156】

統計分析

【0157】

慢性処置期間にわたって記録された行動データは、反復測定分散分析（ANOVA）および事後ボンフェローニ検定を使用して比較された。残りのすべての分析は、対応のないt検定または1因子ANOVAおよび事後テューキー検定のいずれかを使用して実行された。線条体繊維密度は、これらのデータが正規分布していないため、ノンパラメトリック統計（クラスカル-ウォリスおよび事後ダン検定）を使用して分析された。特に明記しない限り、データは群平均±平均の標準誤差（SEM）として表される。ANOVAの正確なpおよびF値は図の凡例に報告されているが、事後のペアワイズ比較は有意または非有意のいずれかとして報告されている。すべての比較において、統計的有意性のレベルはp<0.05に設定されている。

【0158】

ERストレス測定

【0159】

ERストレスレベルは、ERストレスの初期段階のタンパク質指標としてH2a-GFPを使用して測定され得る。H2a-GFPは誤って折りたたまれた分泌タンパク質であり、ERストレスに応答して蓄積する。STHdhQ7/7は、7つのポリグルタミンリピート（野生型）を有するホモ接合型ヒト化ハンチンチン遺伝子（HTT）を含むノックイントランスジェニックマウス由来の線条体由来細胞株である。STHdhQ7/7細胞は、Htt96Q-mCherry（変異体、HD患者におけるHttの典型的な病原性発現を模倣）またはHtt20Q-mCherry（正常）コンストラクトのいずれかで

10

【0160】

ミトコンドリア機能障害の誘発および測定

【0161】

YAC128 HDマウス由来の皮質線条体ニューロンを1 μ Mプリドピジンで処理し、その後、アンチマイシンA（Ant A、細胞呼吸、特に酸化リン酸化およびATP産生を阻害する殺菌剤）で刺激してミトコンドリアの活性酸素種（ROS）産生を誘発した。ミトコンドリア機能は、ミトコンドリア内H₂O₂のレベルを検出する蛍光プローブMitroPY1のレベルを測定することによりアッセイされた。ミトコンドリア膜電位（MMP）は、正に変化した蛍光プローブTMRM（テトラメチルローダミンメチルエステル）を使用して、皮質および線条体ニューロンにおいて評価された。ニューロンは、Na⁺培地中で150 nM TMRM（クエンチング条件）とともに37°Cで30分間インキュベートされた。これらの条件下で、ミトコンドリアによるTMRMの保持は、Dymの変化を推定するために研究された。マイクロプレートリーダーSpectrofluorometer Gemini EM（Molecular Devices、米国）を使用して基底蛍光（503 nm励起および525 nm発光）が4分間記録された後、2.5 μ g/mLオリゴマイシンとともに2.5 μ M FCCPを添加して最大のミトコンドリア脱分極およびミトコンドリアプローブの放出を生じさせた。TMRM放出は、オリゴマイシン/FCCPの添加前後の蛍光の違いに基づいて計算された。

20

30

【0162】

軸索輸送の視覚化および分析

【0163】

軸索輸送（AT）を視覚化および分析するために、WTまたはSOD1G93A胚由来の脊髄抽出物がマイクロ流体チャンバーの近位コンパートメントに播種された。遠位コンパートメントにおける軸索にのみ導入されたQドット-BDNF粒子の逆行性軸索輸送は、ライブイメージングを使用して追跡された。

【0164】

実施例1：プリドピジンは6-OHDA損傷マウスにおける行動回復を誘発する

40

【0165】

線条体内6-OHDA病変または偽病変を維持している野生型マウスは、病変の同じ日から始めて35日間、プリドピジン（0.3または1.0 mg/kg）またはビヒクル溶液（「生理食塩水」）で毎日処置された。最終的な統計分析において、プリドピジンまたは生理食塩水で処置された偽病変動物は、それらが非常に類似した結果をもたらしたことを確認した後、1つの群（「偽」）にプールされた。群およびテストセッション間の自発的回転行動の比較は、処置および時点の間の全体的に有意な差を明らかにした（図1A）。6-OHDAが注射されたすべての群は、有意な同側回転バイアスを示し、これは、最初の週に最も顕著であり、その後、このテストで通常発生するように、すべての群で徐々に低下した [Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbra

50

ndt H, Ruscher K, Cenci 33. MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain: A Journal of Neurology*. 2014;137 (Pt 7):1998-2014. Francardo V, Rechia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 2011;42 (3):327-340]. しかしながら、この低下の程度において群間で非常に有意な差があった（処置および時間の間の相互作用については $p < 0.0001$ 、図1Aを参照）。確かに、生理食塩水で処置された6-OHDA損傷マウスは、第1週から第5週および最終週まで偽損傷動物との有意差を維持したが、プリドピジンで治療されたマウスは、治療期間の終わりまでに偽損傷対照とはもはや異ならなかった（図1A、5週目の薬物投与対偽の両方について $p > 0.05$ ）。

【0166】

さらに、 0.3 mg/kg の用量を投与されたマウスは、ほとんどの試験セッション中に生理食塩水で治療された動物から明らかに分岐したため、2つの用量のプリドピジンの間に違いが認められた（1～3週目のプリドピジン 0.3 mg/kg 対生理食塩水について $*p < 0.05$ ）一方、 1.0 mg/kg のプリドピジンで処置されたマウスは、最初のテストセッションでのみ生理食塩水群と異なった（図1Aの週を参照、 1 mg/kg のプリドピジン対生理食塩水について $p < 0.05$ ）。シリンダーテストにおいて、6-OHDA病変は、すべての処置群において反対側の前肢の使用で同様の欠損をもたらした（図1Bの1週目のデータを参照、生理食塩水処置されたマウスおよびプリドピジン処置されたマウスの両方で偽に対して約40%の差および $p < 0.05$ ）。偽病変対照とのこの有意差は、3週目まで、すべての群で維持された（図1B）。その後、 0.3 mg/kg のプリドピジンで処置したマウスは目に見える改善を示し、4週目および5週目に偽対照値に匹敵するパフォーマンスレベルに達した（図1B、4週目、生理食塩水に対して $p < 0.05$ 、偽に対して $p > 0.05$ 、5週目、生理食塩水および 1.0 mg/kg 用量の両方に対して $p < 0.05$ 、および偽物に対して $p > 0.05$ ）。対照的に、 1.0 mg/kg のプリドピジンによる処置は、シリンダーテストで反対側前肢の使用を回復しなかった（図1Bの5週目を参照、プリドピジン-1および生理食塩水群の両方において偽に対して約33%の差および $p < 0.05$ ）。ステッピングテストにおいても、群およびテストセッションの間に全体的に顕著な差が見られた（図1C）。病変によって誘発されたステッピング欠損は、最初はすべての群で重度であった（図1Cの1週目のデータを参照、生理食塩水およびプリドピジンで処置したマウスの両方において、偽に対して約60%の差および $p < 0.05$ ）。6つすべて6-OHDA損傷マウスは、処置の割り当てに関係なく、最初の2週間は有意な欠損を示し続けた。その後、 0.3 mg/kg のプリドピジンで処置された動物は徐々に改善を示し、4週目および5週目に生理食塩水で処置された群から顕著に逸脱した。偽の対照値には達していないが、 0.3 mg/kg のプリドピジンで処置されたマウスのパフォーマンスはビヒクルより約94%改善された（処置期間の終わりまでに生理食塩水（図1Cの5週目を参照、）-生理食塩水およびプリドピジン-1の両方に対するプリドピジン-0.3について $p < 0.05$ 、偽に対して $p > 0.05$ ）。 1.0 mg/kg のプリドピジンを受けた動物は、最後の2週間でステッピングパフォーマンスが改善する傾向を示したが、生理食塩水で処置したマウスとの差は有意に達しなかった（図1C、5週目におけるプリドピジン-1および生理食塩水群を参照、偽に対してそれぞれ約49%および約63%の差、両方の比較について $p < 0.05$ ）。

【0167】

実施例 2：プリドピジン は黒質線条体ドーパミンニューロンに対して神経保護および神経回復効果を有する

【0168】

SNcにおけるドーパミン作動性細胞体を数えるために偏りのない立体学が使用された。病変と同側において、生理食塩水で処理されたマウスは、黒質TH陽性ニューロンの約65%の減少を示した（すなわち、生理食塩水で処理されたマウスの約1960細胞対偽病変対照の約5076細胞、 $p < 0.05$ 、図2A）。0.3mg/kgのプリドピジンで処置されたマウスは、生理食塩水処置と比較して約55%の増加に対応する、有意な多数のTH陽性ニューロン（約3034細胞）を示した（図2A、* $p < 0.05$ ）。高用量のプリドピジン（1.0mg/kg）は、SN網様部においてより高密度のTH免疫陽性神経突起を生じさせたようにみえたが、SNcのドーパミン作動性細胞体の有意な保護を与えなかった（約1901細胞をカウント、生理食塩水に対して $p > 0.05$ ）（図2Bおよび図2Dを参照）。

【0169】

線条体DA神経支配密度に対するプリドピジン処置の効果を調べるために、TH免疫陽性軸索線維が、外側尾状核被殻にわたって断面積の推定10%を無作為に試料採取することによって高倍率で測定された（図2Fにおいて斜線で囲まれている）。この分析は、無傷の線条体における明確な繊維を解像することが不可能であるため、偽病変マウスには適用され得なかった [Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nisbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA., Song DD, Haber SN. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2000; 20 (13): 5102-14, Granado N, Ares-Santos S, Tizabi Y, Moratalla R. Striatal Reinnervation Process after Acute Methamphetamine-Induced Dopaminergic Degeneration in Mice. Neurotoxicity Research. 2018]。

【0170】

0.3mg/kgのプリドピジンでの慢性処置は、TH繊維プロファイルの数を著しく増強し（図2Fおよび図4Gを参照）、生理食塩水を注射した動物と比較して中央値が約15倍増加した（図2I、 $p < 0.05$ ）。プリドピジン0.3mg/kgで処置されたすべての動物は、拡大した静脈瘤を抱える太くて高度に分岐した軸索の豊富さを示し（図2Gの挿入図）発芽反応を示す [Song DD, Haber SN. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2000; 20 (13): 5102-14, Granado N, Ares-Santos S, Tizabi Y, Moratalla R. Striatal Reinnervation Process after Acute Methamphetamine-Induced Dopaminergic Degeneration in Mice. Neurotoxicity Research. 2018]。明らかに豊富ではないが、1.0mg/kgのプリドピジンで処置したマウスでも同様の形態学的特徴が見られたが（図2H）、この大量投与の効果は統計的有意性に達成しなかった（図2I、 $p > 0.05$ フォルプリドピジン-1対生理食塩水）。

【0171】

DA神経支配レベルの全体的な推定値は、これらの領域の全範囲にわたって腹外側線条

体および背外側線条体のTH免疫染色のODを測定することによって得られた(図2J、図2K)。腹外側線条体において、 0.3 mg/kg のプリドピジンでの処置は、生理食塩水対照レベルを超えるTH ODの2倍超の増加をもたらした($p < 0.05$) (図2J)。 1 mg/kg のプリドピジンで処置されたマウスは、統計的有意性に達しない増加の傾向を示した(図2J)。 0.3 プリドピジンで処置された動物は、背外側線条体においてTH ODのわずかではあるが有意な増加を示し、 1 mg/kg のプリドピジンで処置された動物は、やはり傾向のみを示した(図2K)。まとめると、これらの結果は、 0.3 mg/kg のプリドピジンによる処置が、高度に枯渇した外側線条体の顕著なドーパミン作動性再神経支配を伴って、黒質DA細胞体の部分的保護を提供したことを示している。後者の効果は、げっ歯類での前肢の使用を制御する領域である腹外側象限において特に顕著であった[Chang JW, Wachtel SR, Young D, Kang UJ. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. Neuroscience. 1999;88(2):617-28、Cousins MS, Salamone JD. Skilled motor deficits in rats induced by ventrolateral striatal dopamine depletions: behavioral and pharmacological characterization. Brain Research. 1996;732(1-2):186-94]。高用量のプリドピジン(1 mg/kg)は、どのパラメータに対しても有意な効果には達成しなかった。

【0172】

プリドピジン処置の神経回復効果は、それが関与する領域におけるミクログリア活性化の減少と一致するかどうか研究された。この目的のために、SNcおよび腹外側線条体のCD68免疫陽性ミクログリア細胞の数を数えた。この数は、 0.3 mg/kg のプリドピジンで処置したマウスの両方の領域で有意に減少した(図3A、図3F、プリドピジン- 0.3 対生理食塩水について $p < 0.05$ 、偽に対して $p > 0.05$)。高用量のプリドピジンで処置されたマウスは、SNcにおいて効果に向かう傾向を示したが(図3A、偽に対して $p > 0.05$)、腹外側線条体においては効果を示さなかった(図3F、偽に対して $p < 0.05$ 、生理食塩水に対して $p > 0.05$)。

【0173】

実施例3：プリドピジンによる処置はシグマー1KOマウスにおいて効果的ではない

【0174】

6-OHDA病変または偽病変を維持しているS1R KOマウスにおけるプリドピジンの有効量(0.3 mg/kg)が研究された。 0.3 mg/kg のプリドピジンまたは生理食塩水で処置されたS1R KO損傷マウスは、処置の5週間を通して同様のレベルの自発的回転(図4A)およびシリンダーテスト(図4B)およびステッピングテスト(図4C)において前肢使用の非対称性を示した(すべてのテストおよびセッションにおいて、プリドピジン対生理食塩水について $p > 0.05$)。さらに、プリドピジンによる処置は、黒質DAニューロン(図5A)または線条体TH線維密度(図5E~図5G)のいずれにも硬貨を有しなかった(すべてのパラメータでプリドピジン対生理食塩水について $p > 0.05$)。これらのデータは、S1Rが存在しない場合、プリドピジンは、損傷した黒質線条体DA経路に対して修復作用を発揮し得ないことを明確に示している。

【0175】

この実験の興味深い付随的発見は、S1R KOマウスが黒質線条体損傷の特徴的なパターンで6-OHDA病変に反応したことである。実際、野生型動物と比較して、6-OHDA損傷S1R KOマウスは、SNcにおけるDA細胞体の軽度の喪失を特徴付けていたが(約61%の損失に代わって約22%、図2A対図5Aにおける生理食塩水群を参照)、外側線条体のTH繊維の低い密度を特徴付けた(KO対野生型マウスにおける中央

10

20

30

40

50

値 899 対 584 2 繊維ピクセル／試料面積、図 2 I 対図 5 E における生理食塩水群を参照)。

【0176】

S1R KOマウスの黒質細胞体と比較した線条体ドーパミン作動性線維のより重度の変性は、野生型遺伝子型と比較して病変誘発性運動障害の明らかな違い、特に前肢のステッピングにおけるより重度の欠損と一致するそれほど重度ではない回転バイアスを説明する可能性がある(図 1 および図 4 を参照)。

【0177】

実施例 4: プリドピジンは線条体において神経栄養因子を上方調節し、ERK1/2 を活性化する

【0178】

プリドピジン 0.3 mg/kg による前肢の使用の逐次の改善、および付随する誘発される線条体 DA 線維密度の増加は、栄養因子によって媒介される神経回復作用を示しており、その脳レベルは S1R の薬理的刺激により上昇し得る [Penas C, Pascual-Font A, Mancuso R, Fores J, Casas C, Navarro X. Sigma receptor agonist 2-(4-morpholinethyl) 1 phenylcyclohexanecarboxylate (Pre084) increases GDNF and BDNF expression and promotes neuroprotection after root avulsion injury. Journal of Neurotrauma. 2011; 28 (5): 831-40; Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci 33. MA. Fujimoto M, Hayashi T, Urfer R, Mita S, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones regulate the secretion of brain-derived neurotrophic factor. Synapse. 2012; 66 (7): 630-9]。

【0179】

GDNF、BDNF、およびリン酸化 ERK1/2 (ニューロトロフィンシグナル伝達の主要な細胞内エフェクター [Garcia-Martinez JM, Perez-Navarro E, Gavalda N, Alberch J. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the arborization of cultured striatal neurons through the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway. Journal of Neuroscience Research 2006; 83 (1): 68-79]) のウエスタンブロット分析は、線条体内 6-OHDA 病変を維持する野生型マウスの追加群において実施され、その後、0.3 mg/kg のプリドピジンまたは生理食塩水で 35 日目まで処置された。プリドピジンは、GDNF および BDNF レベルの有意な線条体上方調節を促進した(生理食塩水に対してそれぞれ +37.6% および +80.8%、両方のマーカーについて $p < 0.05$ 、図 6 A、図 6 C)。SN において、BDNF レベルのみが有意な増加を示した(生理食塩水に対して +88.5%、図 6 D、 $p < 0.05$)。プリドピジン 0.3 mg/kg での処置はまた、リン酸化 ERK1/2 の線条体および黒質レベルの増加を生じさせ(図 6 E、図 6 F)、これは線条体においてのみ有意に達した(生理食塩水に対して +71%、 $p < 0.05$ 、図 6 E)。

【0180】

低用量 (0.3 mg/kg) の効果プロファイルは、外側線条体における黒質 DA 細胞体の保護およびドーパミン作動性線維密度の回復の両方を含む。この領域において、TH 陽性線維ネットワークは軸索の再生の典型的な形態学的特徴を示した。これらの形態学的観察に加えて、前肢使用の緩やかな回復(プリドピジン処置の 4 週間後にのみ有意になった)は、機能回復の中心的なメカニズムとして発芽する DA 軸索末端の刺激を指している

10

20

30

40

50

。この解釈は、線条体において0.3 mg/kgのプリドピジンによって生じるGDNF、BDNF、およびリン酸化ERK1/2の有意な上方調節によってさらに裏付けられる。これらの要因は、インビトロおよびインビボの両方で黒質線条体DAニューロンからの神経突起伸長を強く刺激する。

【0181】

高用量のプリドピジン(1 mg/kg)は、ほとんどの行動および神経組織学的エンドポイントで全体的に効果がなかった。0.3 mg/kgのプリドピジンの神経回復効果がS1Rに依存するという明確な証拠は、S1Rにおけるこの用量を評価することによって得られた。

【0182】

実施例5：マウスにおけるプリドピジンの薬物動態

【0183】

マウスにおけるプリドピジンの薬物動態

【0184】

第1の薬物動態(PK)研究において、プリドピジンは、経口投与された(p.o.、これはヒトで使用される投与経路である)。この研究では、4用量のプリドピジン(0.3、3、10、および30 mg/kg、用量あたりN=24匹)が雄のC57BL/6マウスに強制経口投与により7日間投与された。血液および脳の試料は、次の時点で、投与群ごとに3匹の異なるマウスから収集された：薬物投与前(t=-10分)および薬物投与後15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、および8時間。経口(p.o.)および皮下(s.c.)投与の間で薬物のPKプロファイルを比較するために第2の研究が実施された。ここで、PKは、経口または皮下のいずれかで30 mg/kgプリドピジン(水中のHCl塩当量)を7回毎日投与した後に検査された(N=投与経路あたり24匹のマウス)。血液および脳の試料は、以下の時点で、時点ごと、経路ごとに3匹の動物から収集された：投与前、最後の投与後15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間、および8時間。

【0185】

血漿試料は、K₃-EDTAチューブ(Becton-Dickinson、Mississauga、ON、カナダ)に配置され、1500 gで5分間遠心分離された。脳組織は収集され、それ以上のプロセスはなく凍結された。分析の前に、事前に秤量した脳試料は希釈され、ホモジナイズ溶液4 mLに対して330脳1 gの比率で、0.32 Mスクロースを含む、pH 7.4の0.01 Mリン酸緩衝液でホモジナイズした。

【0186】

プリドピジン血漿および脳濃度の定量化ならびに薬物動態分析

【0187】

プリドピジンおよびその内部標準であるACR354(4-(3-(メチルスルホニル)フェニル)-1-(プロピルド7)-ピペリジニウムクロリド)は、EDTA血漿およびマウス脳ホモジネート(リン酸緩衝生理食塩水中1:3、pH 7.4)からアセトニトリルへの液液抽出によって抽出された。簡単に説明すると、LC-MS/MS分析は、Shimadzu SIL-20ACオートサンプラーおよびShimadzu CTO-20ACカラムオーブンを備えたShimadzu LC-20ADポンプで実行された。MS/MSシステムは、エレクトロスプレーイオン化プローブを備えたMDS Sciex API-5000質量分析計(Toronto、カナダ)であった。

【0188】

分析対象物のクロマトグラフィー分離は、Phenomenex、Synergi 2.5 μHydro-RPカラムで達成された。直線性は、0.3および3 mg/kg用量群の血漿において2 ng/mLの定量下限(LLoQ)で2~3000 ng/mLであり、脳ホモジネートにおいて2 ng/mLのLLoQで2~3000 ng/mLであり、高用量ではそれぞれ2 ng/mLおよび75 ng/mLのLLoQで、血漿において25~20,000 ng/mLおよび脳ホモジネートにおいて75~60,000 ng/mLで

10

20

30

40

50

あった。品質管理（QC）試料の公称濃度（精度値）からのプリドピジン濃度の偏差は、すべての検量線で15%未満であった。PKパラメータは、WinNonlin 6.3を使用した血管外投与についての非コンパートメントモデリングにより、名目時間に従って、つまりスケジュールされた時点から±5%以内での群平均濃度－時間データを使用して計算された。1mg/kg投与後のプリドピジン曝露を推定するために、用量正規化曝露が使用された（表1を参照）。

【0189】

表1：C57BL6マウスへのプリドピジン投与後の血漿および脳への曝露。表は、プリドピジンの漸増用量（0.3、1、3、10、および30mg/kg）の投与後の血漿および脳中のプリドピジンの濃度を示している。最大Q3濃度（C_{max}）は、ミリリットルあたりのナノグラムおよびマイクロモルで表される。AUC（特定の用量の後に全身循環に到達するプリドピジンの量に対応する曲線下面積）は、ng*時間/mLおよびpM*時間で表される。各データポイントは、3匹のマウスから得られた平均値を表す。1mg/kg用量についてのパラメータは、0.3、3、10、および30mg/kg群の平均C_{max}/用量およびAUC_{0-last}/用量値に基づいて外挿される。

【0190】

【表1】

用量 [mg/kg]	C _{max} [ng/mL]	C _{max} [μM]	AUC _{0-last} [ng*h/mL]	AUC _{0-last} [μM*h]	T _{max} [h]
血漿					
0.3	22	0.08	26	0.09	0.25
1 ¹⁾	109	0.4	116	0.4	該当せず
3	277	1.0	406	1.4	0.5
10	1369	4.9	936	3.3	0.25
30	2577	9.2	3101	11.0	0.25
脳					
0.3	110	0.39	120	0.43	0.25
1 ¹⁾	331	1.2	392	1.4	該当せず
3	763	2.7	1051	3.7	0.25
10	3506	12.5	2971	10.6	0.5
30	6396	22.7	10836	38.5	0.25

1)推定値

【0191】

プリドピジンは、経口および皮下単一用量投与後に同様の血漿および脳PKを示し、血漿におけるC_{max}について117%およびAUC_{0-t}について90%、脳組織におけるC_{max}について88%およびAUC_{0-t}について96%の相対的な経口/皮下曝露比を示した。したがって、経口投与後のプリドピジン曝露データは、皮下投与によって達成された曝露を適正に表している。経口投与後の用量反応PK研究は、薬物の血漿および脳の曝露が用量に比例することを示した（表1）。血漿に対する脳の比率の測定は、プリドピジン濃度は、0.3mg/kgの用量では血漿よりも脳において4～5倍高く、1～30mg/kgの用量範囲では2～3倍高いことが示された（脳対血漿におけるC_{max}およびAUC値、表1を参照）。

【0192】

0.3および1mg/kgのプリドピジンの投与は、それぞれ110および331ng/mLの脳C_{max}値（390nMおよび1200nMに対応）をもたらし、0.25時

間の中央値 T_{max} で発生し、対応する AUC_{0-last} 値は 120 および $392 \text{ ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$ (0.43 および $1.4 \text{ h} \cdot \mu\text{M}$ に対応) であった。プリドピジンは、3 時間後にはすでに脳の総レベルは $3 \text{ ng} / \text{mL}$ (11 nM に対応、そのうち約 2 nM のみが遊離) に近づき、急速に除去された。プリドピジンの遊離画分は、市販のインビトロタンパク質結合アッセイを使用して決定された。 0.3 および $1 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量では、脳組織中のプリドピジンの非結合 (遊離) 画分は約 50% と推定された。したがって、 C_{max} で脳の遊離プリドピジン濃度は、 0.3 および $1 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量について、それぞれ 55 および $165.5 \text{ ng} / \text{mL}$ (または 195 nM および 600 nM) に対応すると推定された。ラット $S1R$ へのプリドピジンの報告された結合親和性に基づく ($K_{i69.7 \text{ nM}}$, [Sahlholm K, Arhem P, Fuxe K, Marcellino D. The dopamine stabilizers ACR16 and (–)-OSU6162 display nanomolar affinities at 42. the sigma-1 receptor. Molecular Psychiatry. 2013;18 (1):12–4.])、 C_{max} で、 0.3 および $1 \text{ mg} / \text{kg}$ のプリドピジンの両方の用量で $S1R$ の 100% の占有率が得られることは妥当であるといえる。この濃度は、この用量では、これらがシグマ-1 受容体に対してのみ選択的に結合することを示している。

【0193】

実施例 6：GBA 関連 PD において GCase 活性が低下する

【0194】

GBA は、リソソーム加水分解酵素グルコセレブロシダーゼ (GCase) をエンコードする。GCase 活性は、ヒト対照線維芽細胞、ヘテロ接合性 GBA 変異 ($N370S / wt$ および $L444P / wt$) を有する PD 患者の線維芽細胞、および特発性 (散発性) PD 患者 (iPD) 由来の線維芽細胞において測定された。GCase 活性は、 $N370S / wt$ および $L444P / wt$ 線維芽細胞においてそれぞれ 32% および 35% 顕著に減少することが示された。iPD 線維芽細胞において GCase 活性の喪失は見られなかったため、GBA 欠損症に関連する PD にはさまざまな作用機序が関与している (Sanchez-Martinez et al. 2016)。

【0195】

実施例 7：小胞体ストレス

【0196】

誤って折りたたまれたタンパク質の蓄積は、変異型 GBA ドーパミン作動性ニューロンにおける ER ストレスにつながる

ER において誤って折りたたまれたタンパク質が蓄積すると、タンパク質の再折り畳みに対する細胞の能力が過負荷になり、ER ストレスが誘発され得る。Fernandes et al. において、ドーパミン作動性ニューロンは、健康な対照および GBA- $N370S$ 変異を有する PD 患者から採取されたヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) から分化された。2 つの ER 常駐シャペロンタンパク質、Bip / GRP78 およびカルレチキュリンのレベルは、対照由来のドーパミン作動性培養と比較した場合、GBA- $N370S$ ドーパミン作動性ニューロン培養における有意な上方調節を明らかにし、ER ストレスの増加を示している (Fernandes et al. 2016)。

【0197】

プリドピジンは mHtt 誘発性 ER ストレスを減少させる

【0198】

変異型 Htt96Q-mCherry (拡張) コンストラクトでトランスフェクトされた STHdhQ7 / 7 細胞は、ER ストレスを示す高レベルの蓄積 H2a-GFP とともに、目に見える Htt96Q-mCherry 凝集体 (通常は細胞ごとに 1 つの大きな凝集体) を示す。目に見える凝集体がない Htt20Q-mCherry (正常) または Htt96Q-mCherry を発現する STHdhQ7 / 7 細胞は、低レベルの H2a-GFP (ER ストレスなし) を示す。プリドピジンは、mHtt 凝集体について陽性の細

10

20

30

40

50

胞におけるH2a-GFPの蓄積を用量依存的に有意に減少させ、凝集体のない細胞またはHtt20Q-mCherryを発現する細胞のH2a-GFPレベルを変化させない(図7)。したがって、プリドピジンは、Htt誘発される小胞体ストレスを用量依的に減少させる。

【0199】

ERストレスに対するプリドピジンの効果は、翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化レベルを評価することによってさらに研究された。eIF2 α のリン酸化はERストレス応答の特徴である。Htt96Q-mCherryを発現するSTHdhQ7/7細胞は、eIF2 α -リン酸化(eIF2 α -p)における3.5倍の増加を示す。プリドピジンは、細胞のERストレスの減少を示すeIF2 α -P(eIF2 α -P/eIF2 α の比率)の有意な減少を示すが、高濃度では示さない(図8)。0.03~3 μ Mの有効濃度は、45mg BID以下のヒト用量(Cmax約2 μ M)と相関している。

【0200】

実施例8：ミトコンドリア機能障害

【0201】

ミトコンドリア機能は、変異GBAニューロンにおいて損なわれている

【0202】

ミトコンドリア機能は、MitoTracker Red(MitoRed)を使用してミトコンドリア膜電位(MMP、 $\Delta\psi$ m)を測定することにより、変異GBAおよびWTニューロンにおいて評価された。総ミトコンドリア含有量は、MitoTracker Green(MitoGreen)を使用して決定された。WT対照と比較して、変異GBAニューロンはベースラインMMPが低いことを示したが、総ミトコンドリア含有量は増加した。MitoRedおよびMitoGreenの比率は、対照よりも変異型GBAニューロンにおいて顕著に低く、ミトコンドリア機能の障害を裏付けている(Liet al. 2019)。

【0203】

ミトコンドリアのROSレベルは、MitoSOX Red、ROSのミトコンドリア指標を使用して、生きている変異型GBAニューロンにおいても評価された。対照と比較して、変異型GBAニューロンは、スーパーオキシド産生の高いレベルを示すMitoSOX Red蛍光の増加を示した(Liet al. 2019)。

【0204】

ミトコンドリア輸送は、GBA欠乏症の結果として、おそらくアルファシヌクレインタンパク質およびその凝集のレベルの上昇の結果として、さらに損なわれる。ミトコンドリアの動きは、外因性の野生型(WT)または変異型(A35T) α -シヌクレインが遺伝的に導入された海馬ニューロンにおいて分析された。WTまたはA53T α -シヌクレインの過剰発現は、ニューロンの神経突起に沿ったミトコンドリアの平均速度を大幅に低下させる(Xie and Chung 2012)。

【0205】

マイトファジーとしても知られる異常なまたは機能しないミトコンドリアのクリアランスは、GBAの欠乏の結果として中断される。マイトファジーは、CCCP(カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラジン、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の脱共役剤)によって変異型GBAニューロンにおいて誘発され、MitoGreen標識ミトコンドリアとLysoTracker Red標識リソソームとの共局在を測定することによって評価された。変異型GBAニューロンは、WTと比較してミトコンドリアおよびリソソームの共局在が少なく、マイトファジーの障害を示している(Liet al. 2019)。

【0206】

プリドピジンはミトコンドリアのROS産生を低下させる

【0207】

HDマウスニューロンは、酸化的チャレンジに対する感受性の増加を示し、結果として

、ROSのレベルが増加、不十分な抗酸化反応をもたらす。YAC128 HDマウス由来の線条体ニューロンは、ROS産生を誘発する前に、1 μ Mのプリドピジン (≤ 45 mg BIDでのヒトへの曝露に関連) で処理された。プリドピジンは、ミトコンドリアによるROS産生の強力および有意な減少を示す (図10)。

【0208】

プリドピジンはミトコンドリアの速度を増加させる。ミトコンドリア輸送は、局所的に適用されたプリドピジン処理の有無にかかわらず、野生型運動ニューロンの軸索において評価され、プリドピジンが軸索におけるミトコンドリア輸送を加速することを明らかにした。0.1 μ Mの有効濃度は、45 mg bid未満のヒト用量での曝露と相関する (Ionescu et al. 2019) (図11)。

【0209】

S1Rの遺伝的欠失は、マイトファジーの障害につながる。野生型 (WT) 網膜外植片におけるマイトファジープロセス中に、ミトコンドリアタンパク質VDAC1およびTIMM23の両方が同様の割合で大幅に減少する。ただし、S1R-/-網膜外植片において、これら2つのマーカーは減少せず、マイトファジーの誘発後に2~3倍に増加し、WTと比較したS1R-/-細胞におけるミトコンドリアクリアランスの障害を示している (Yang et al. 2019)。したがって、プリドピジンによって正に調節されるS1R活性は、マイトファジーに不可欠である。

【0210】

実施例9：自食作用の欠陥

【0211】

GBAがsiRNAによって遺伝的に削除されたSH-SY5Y細胞において、自食作用流動は減少する。自食作用流動はLC3B-IEレベルによって測定される。対照と比較して高いレベルは、オートファゴソームのクリアランスがGBA欠損細胞において損なわれていることを示している (Magalhaes et al. 2016)。

【0212】

自食作用の低下は、初代ラット皮質ニューロンにおける α -シヌクレインの凝集につながる

シナプスタンパク質 α -シヌクレインの蓄積および凝集は、PDの病因において重要な役割を果たしている。不溶性画分における α -シヌクレインレベルの顕著な増加は、凝集体におけるその蓄積を示し、ホスホリパーゼD阻害剤の適用によって自食作用が減少したラット皮質細胞において観察された。アルファ-シヌクレインの凝集は、PDおよびPD-GBAの特徴であり、神経細胞死に直接関連している (Bae et al. 2014)。

【0213】

S1Rの活性化は自食作用活動を増強する

【0214】

S1Rアゴニストで処理されたHeLa細胞は、自食作用流動について評価された。S1Rの活性化は、対照条件と比較した場合、自食作用流動を有意に誘発する (Christ et al. 2019)。

【0215】

実施例10：BDNF

【0216】

ゴーシェ病 (GD、GBA変異) において血漿BDNFレベルが低下する

【0217】

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、神経系の発達および生存にとって重要であり、シナプス可塑性の鍵である。BDNFレベルの低下は、PDおよびADなどの神経変性疾患に関連している。GD患者において、血漿におけるBDNFレベルも大幅に低下する (Vairo et al. 2015)。

【0218】

プリドピジンは、S1Rを介したメカニズムにおいてBDNF分泌および軸索輸送を増

10

20

30

40

50

強する

【0219】

100 nMおよび1 μ Mのプリドピジンは、対照の未処理細胞と比較して、B104神経芽細胞腫細胞株におけるBDNF分泌を増強した。細胞が既知のS1RアンタゴニストであるNE100と共培養された場合、BDNF分泌は阻害された（Geva et al. 2016）（図12）。1 μ Mの有効濃度は、ヒトの用量 $\leq$ 45 mg bidと相関する。

【0220】

プリドピジン処置は、S1Rを介したメカニズムにおいてALSニューロンのBDNF軸索輸送を救助する

10

【0221】

BDNF軸索輸送速度は、ALS SOD1G93A運動ニューロンにおいて大幅に低下する。0.1および1 μ Mのプリドピジンでの培養物の処置は、SOD1G93A運動ニューロンの速度を用量依存的に大幅に加速する。1 μ Mのプリドピジンは、ヒトの用量 $\leq$ 45 mg bidと相関する。この効果は、S1Rが遺伝的に削除された運動ニューロンでは無効になり、S1Rに依存するメカニズムを示している（Ionescu et al. 2019）（図13）。

20

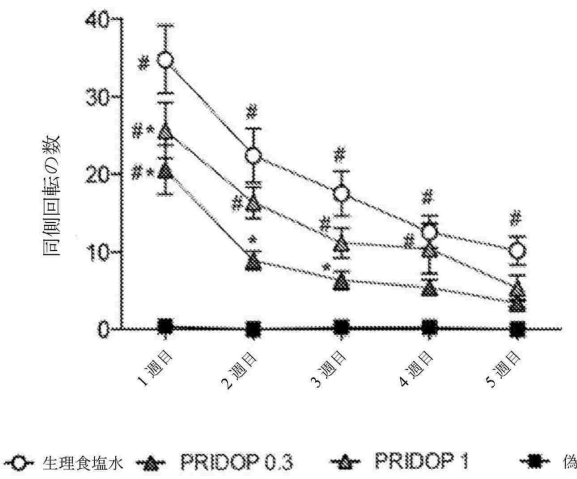
30

40

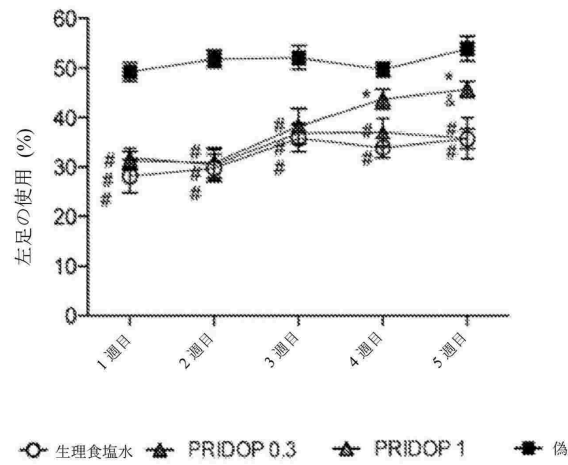
50

【図面】

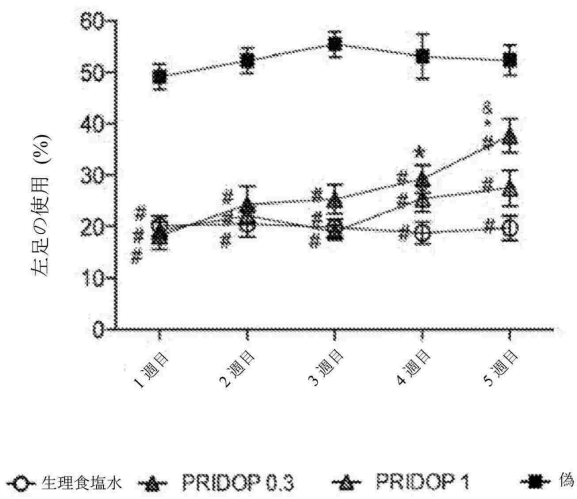
【図 1 A】



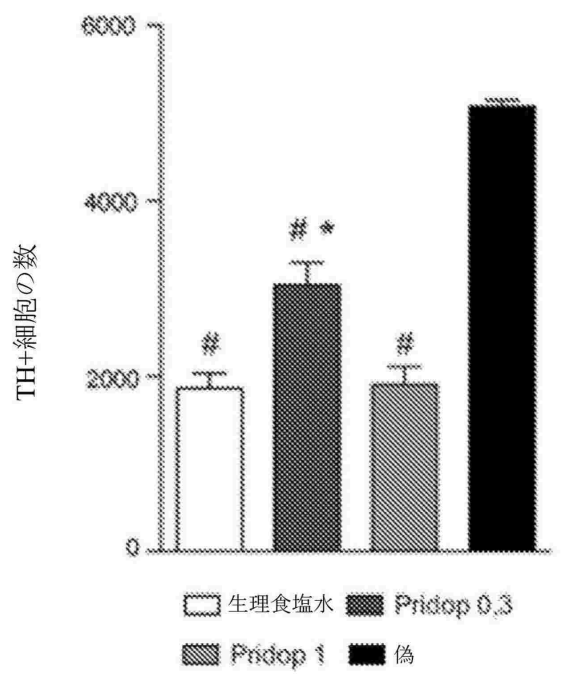
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A】



10

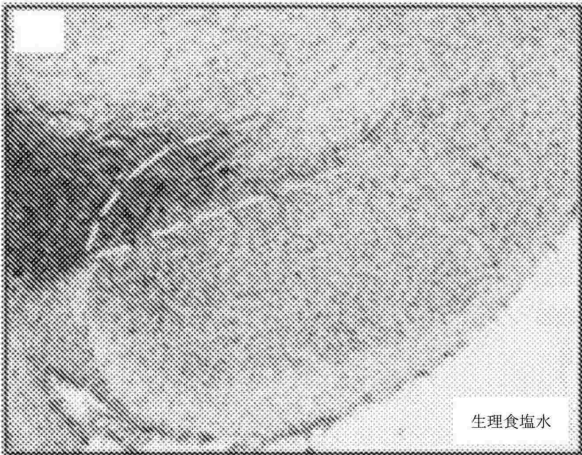
20

30

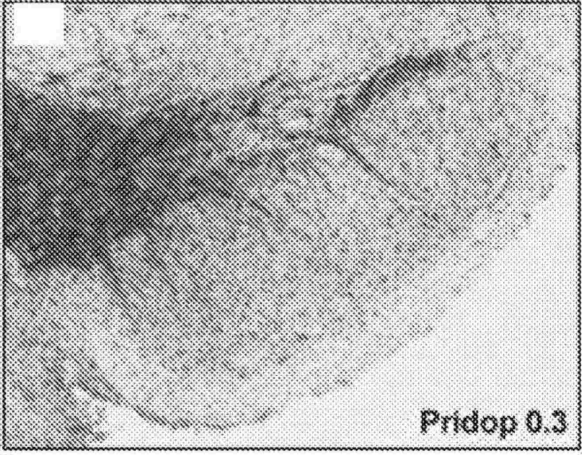
40

50

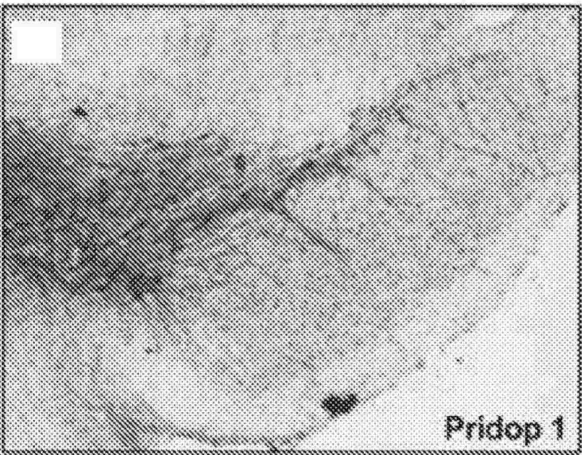
【図 2 B】



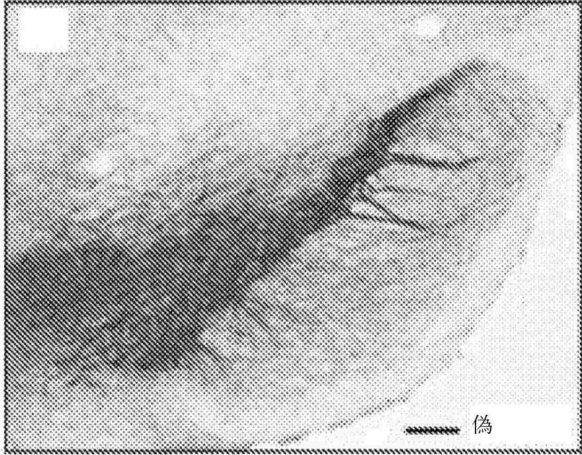
【図 2 C】



【図 2 D】



【図 2 E】



10

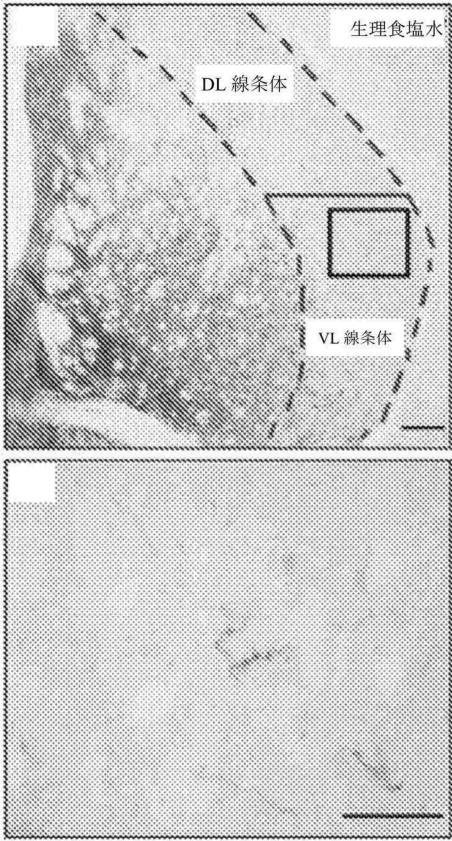
20

30

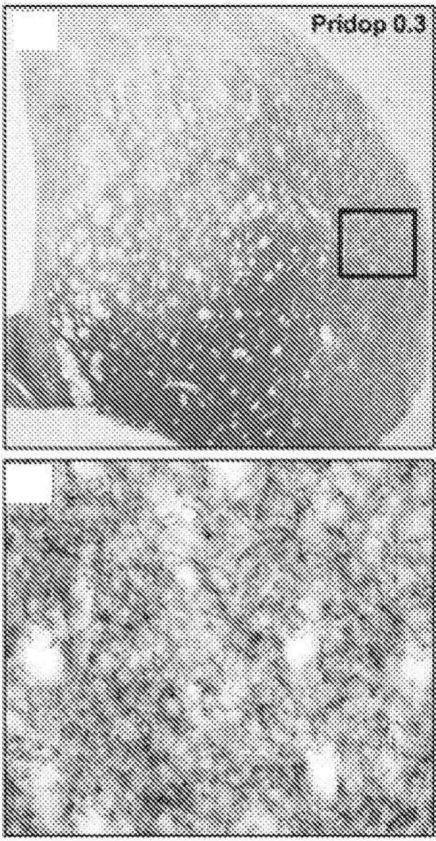
40

50

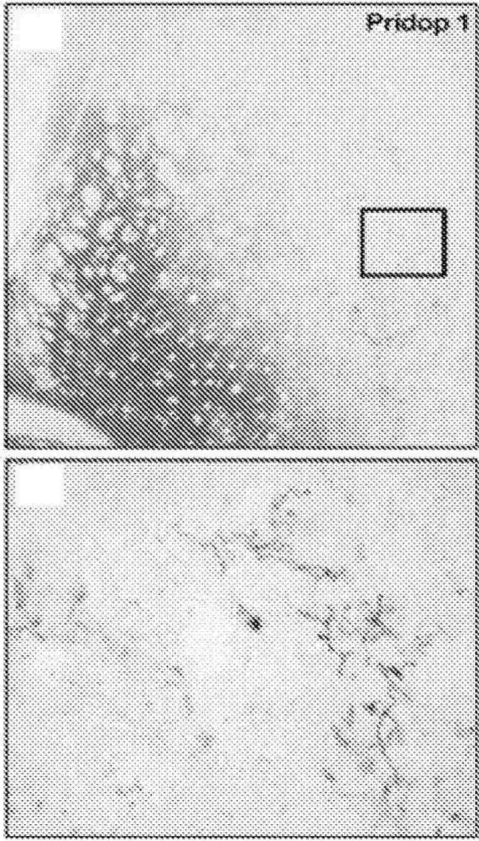
【図 2 F】



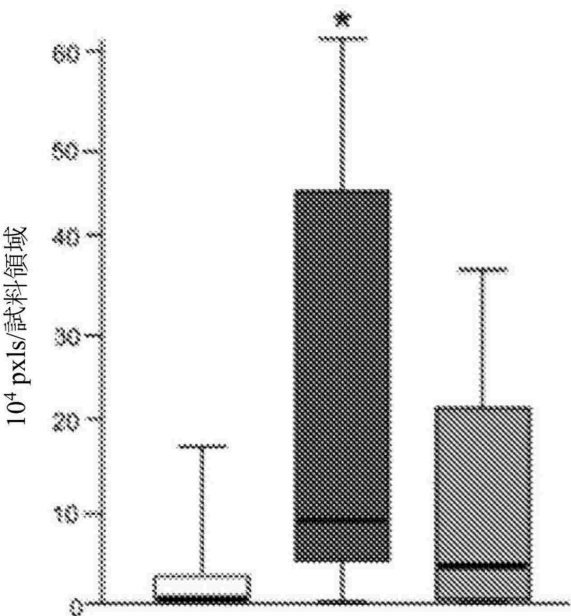
【図 2 G】



【図 2 H】



【図 2 I】



10

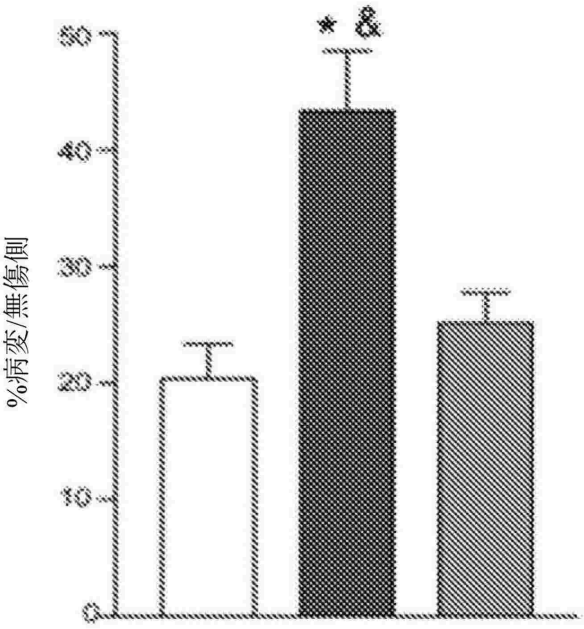
20

30

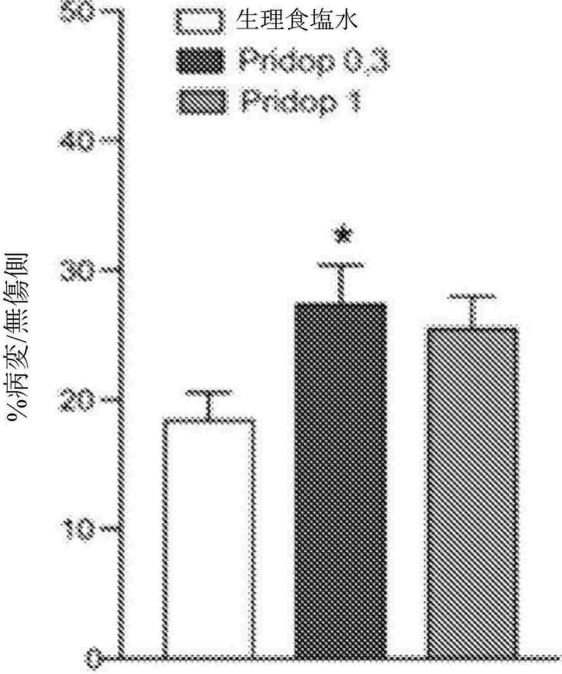
40

50

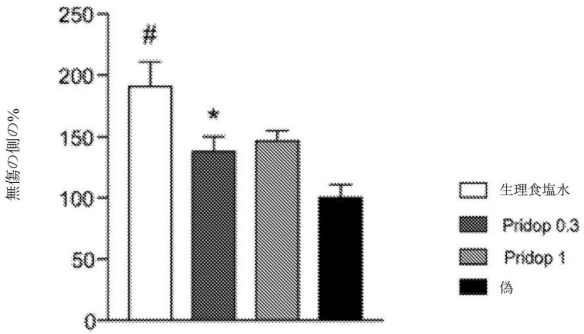
【図 2 J】



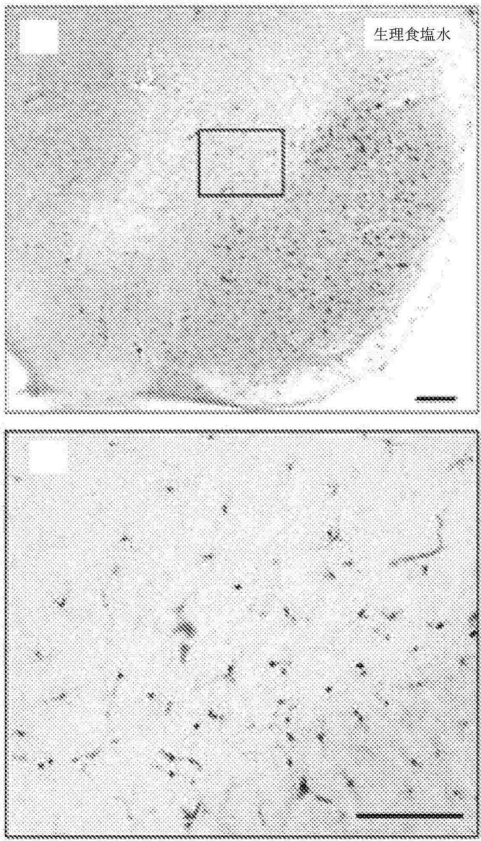
【図 2 K】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

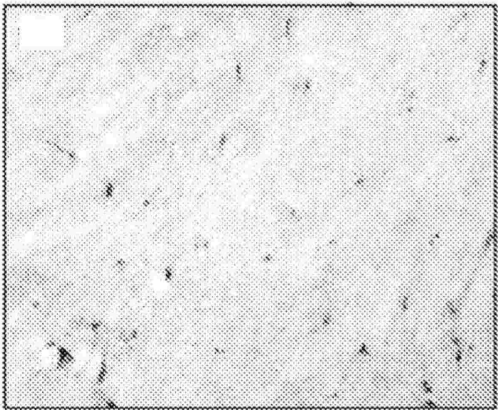
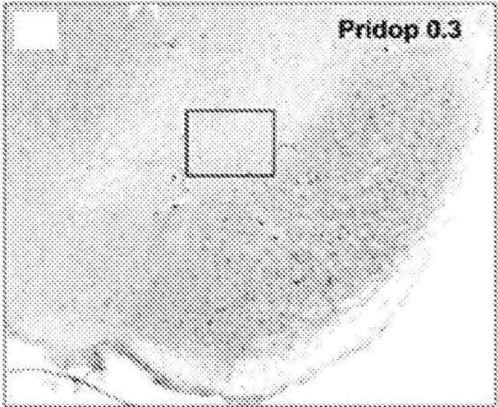
20

30

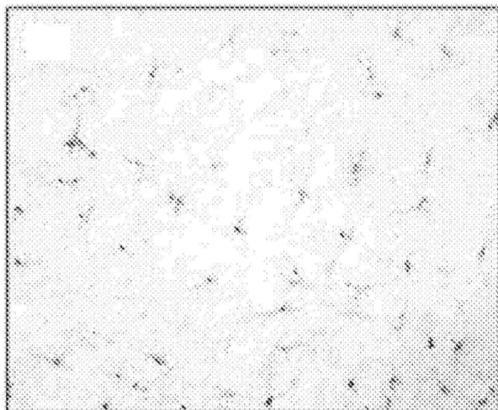
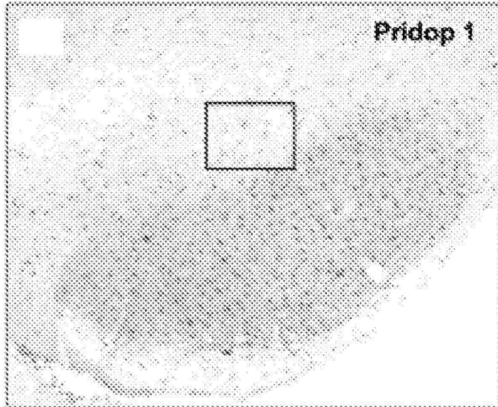
40

50

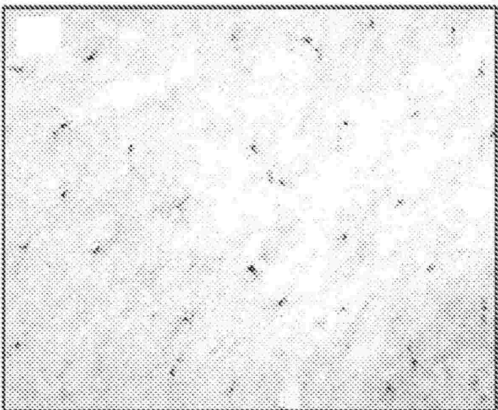
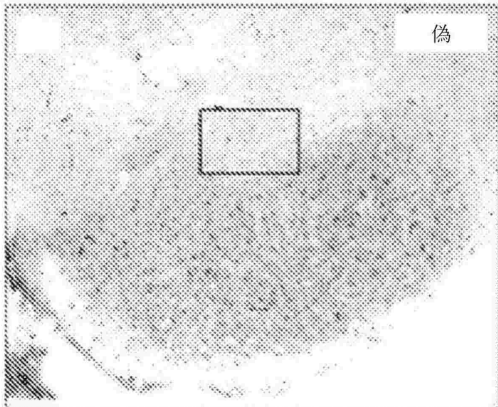
【図 3 C】



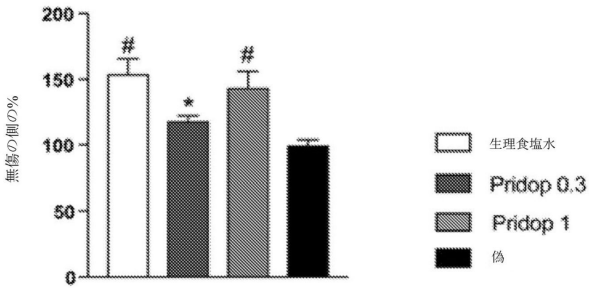
【図 3 D】



【図 3 E】



【図 3 F】



10

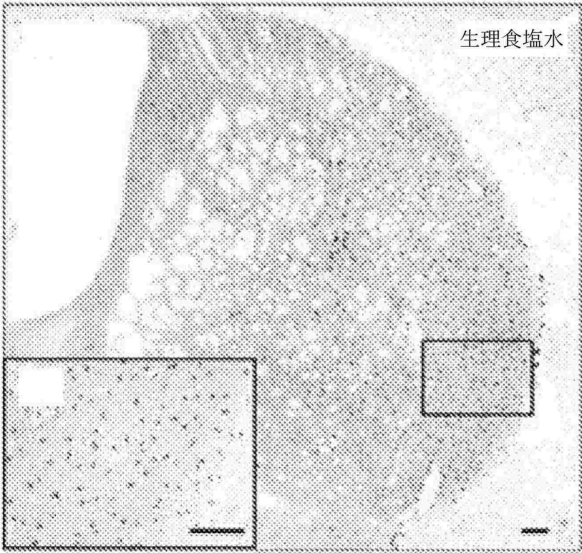
20

30

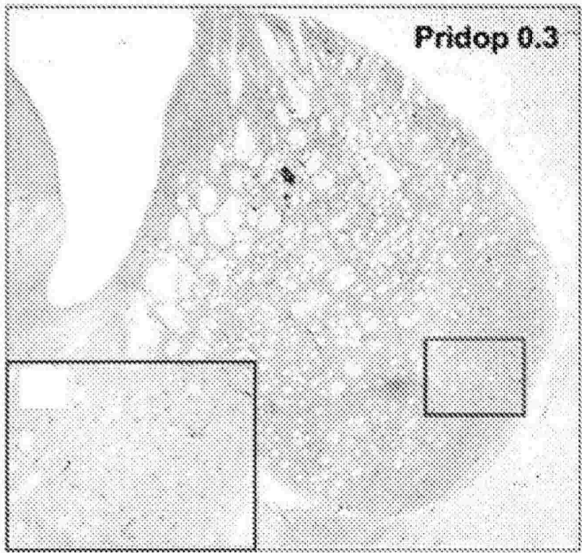
40

50

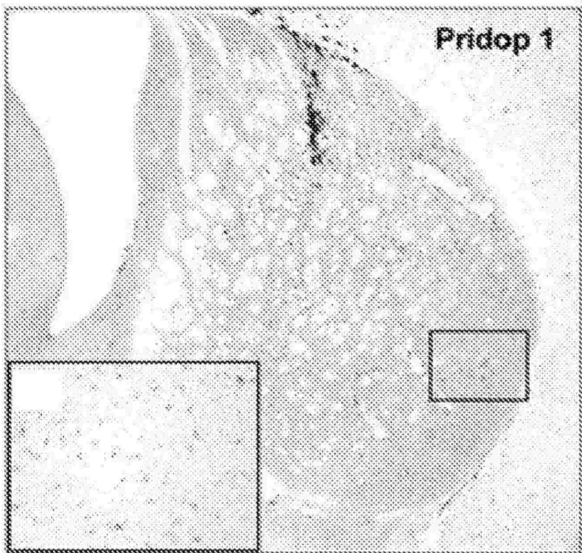
【図 3 G】



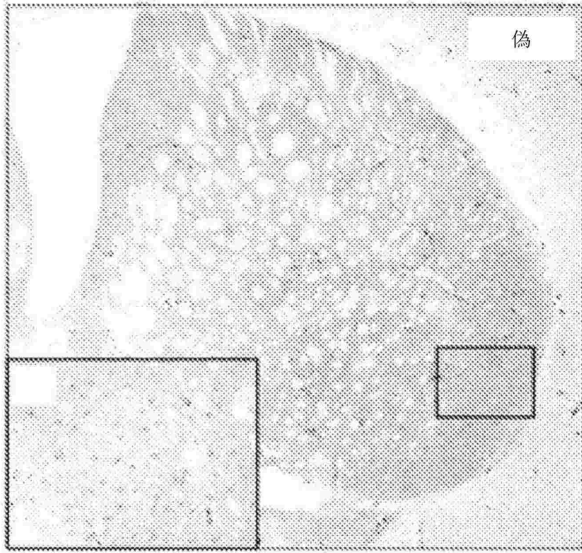
【図 3 H】



【図 3 I】



【図 3 J】



10

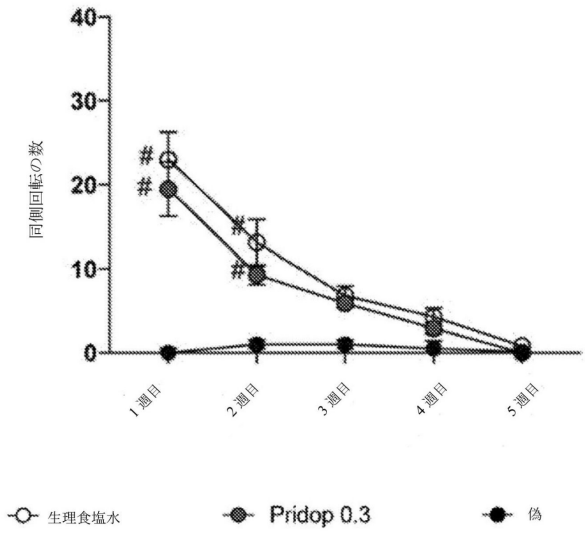
20

30

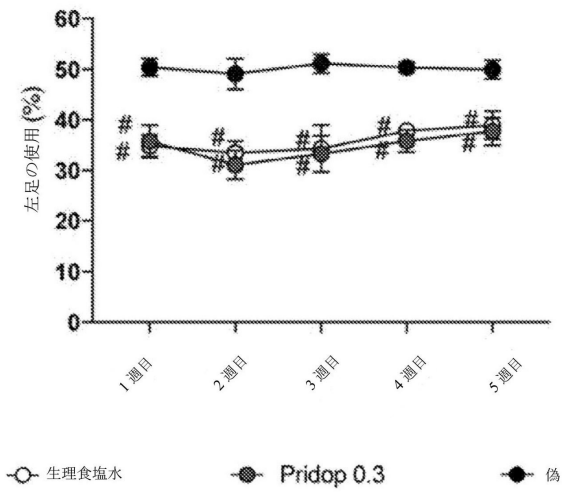
40

50

【図 4 A】

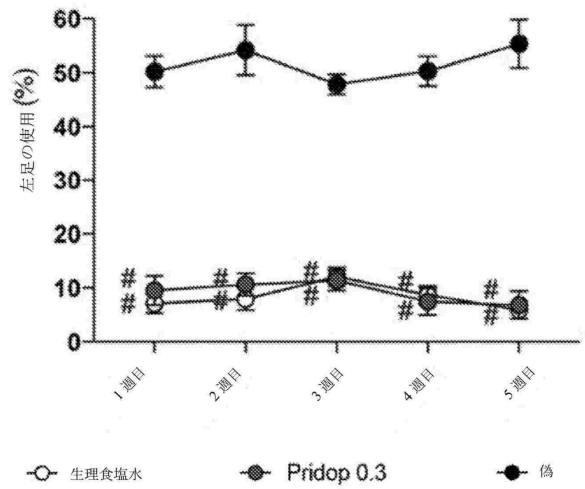


【図 4 B】

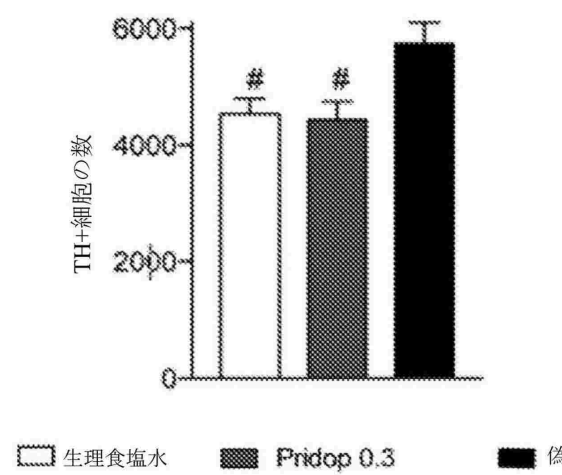


10

【図 4 C】



【図 5 A】



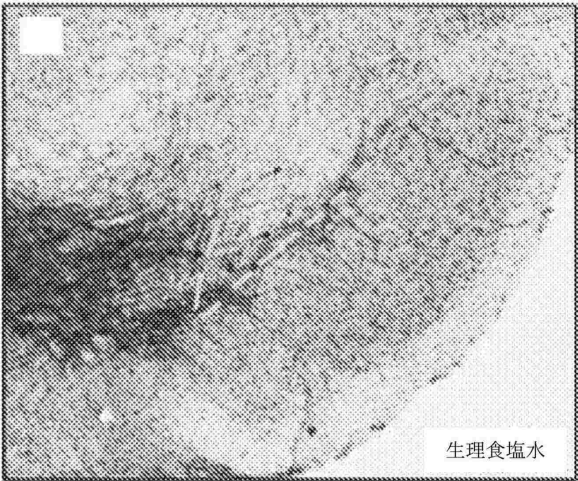
20

30

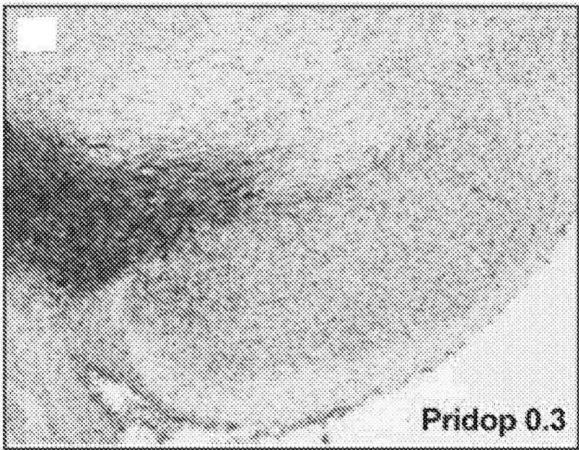
40

50

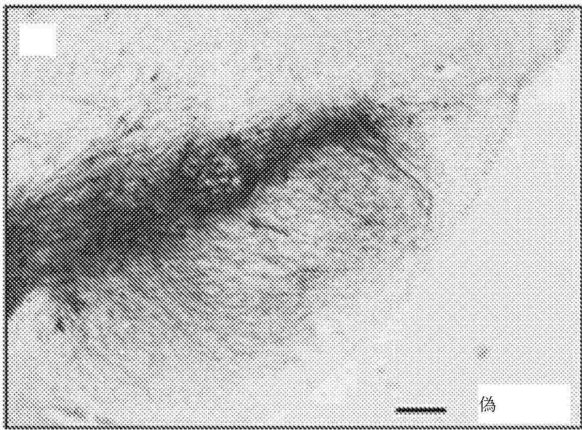
【図 5 B】



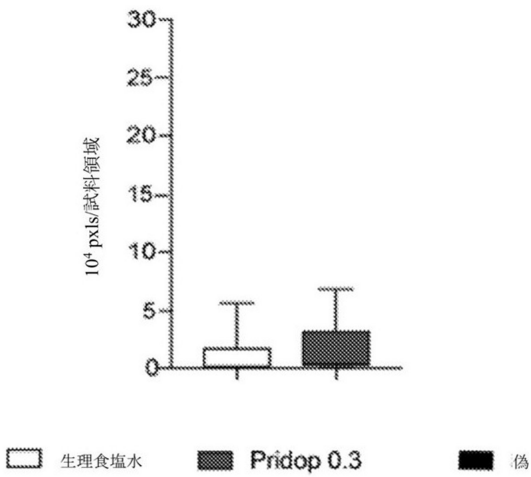
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 5 E】



10

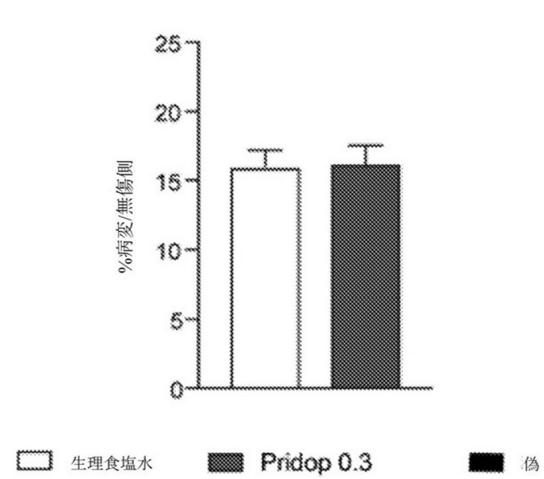
20

30

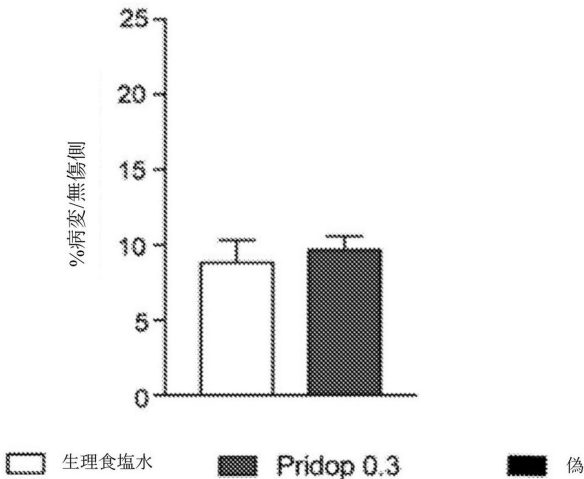
40

50

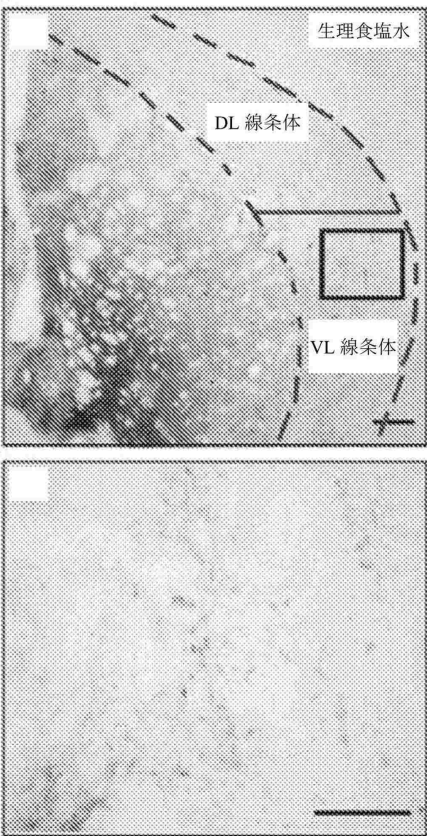
【図 5 F】



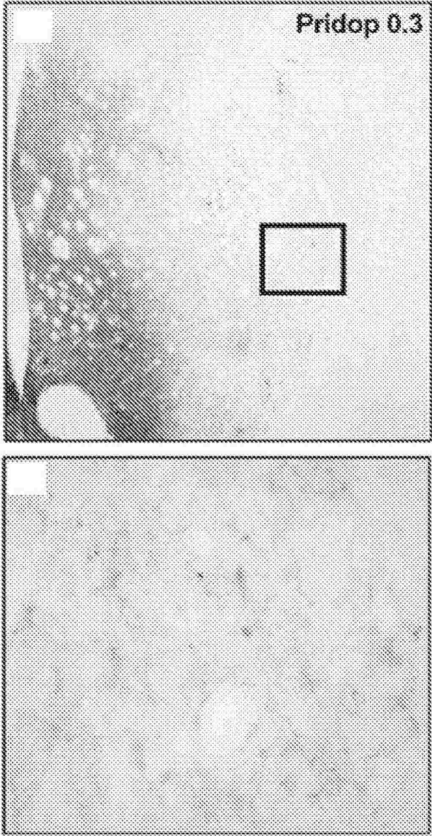
【図 5 G】



【図 5 H】



【図 5 I】



10

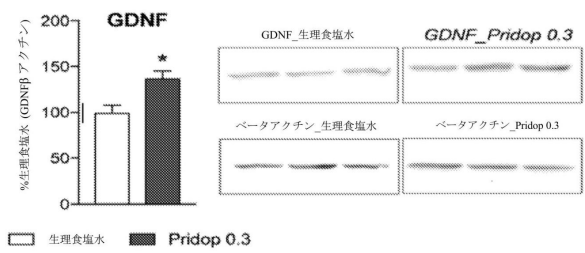
20

30

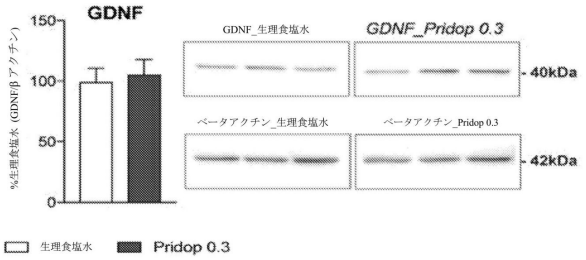
40

50

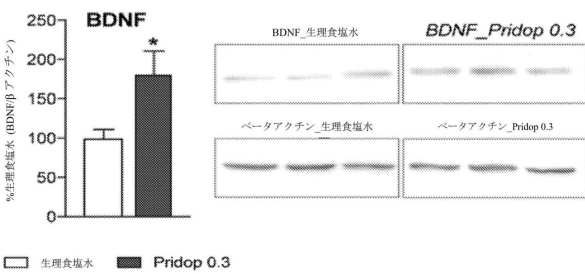
【図 6 A】



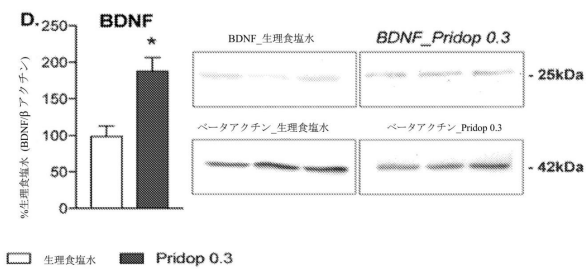
【図 6 B】



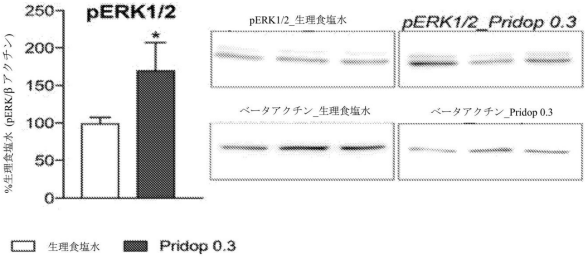
【図 6 C】



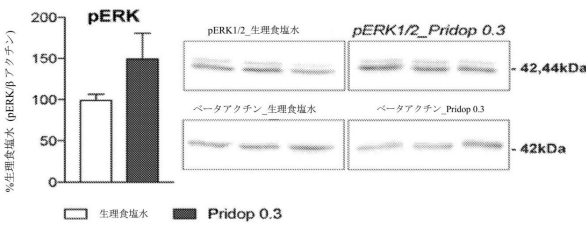
【図 6 D】



【図 6 E】



【図 6 F】



10

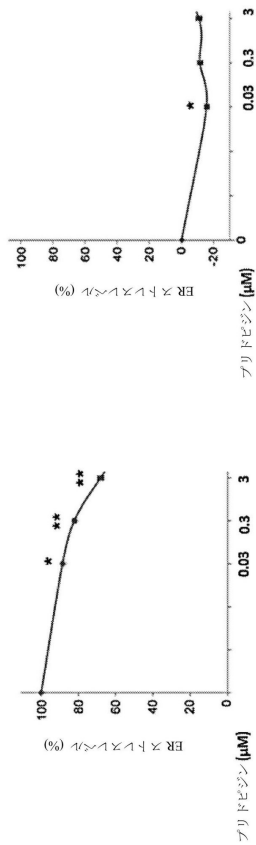
20

30

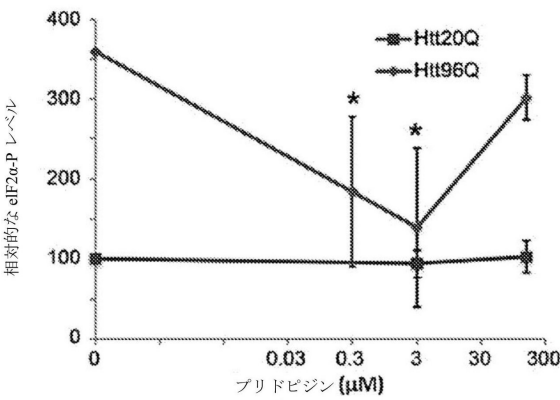
40

50

【図 7】



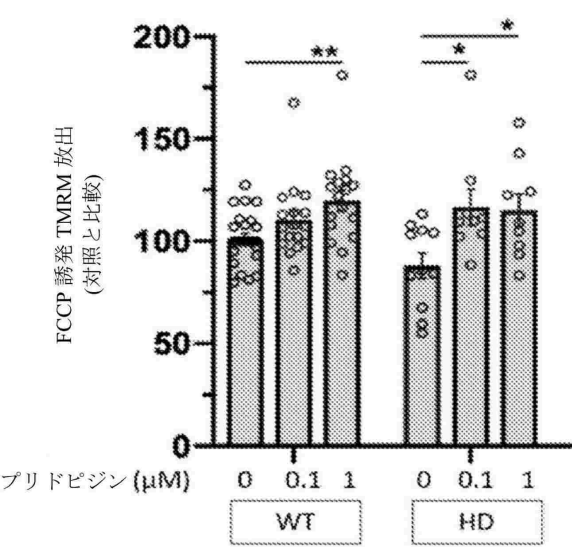
【図 8】



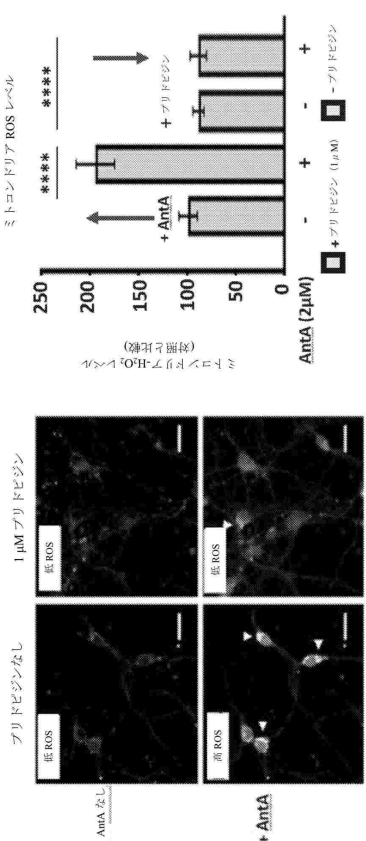
10

20

【図 9】



【図 10】

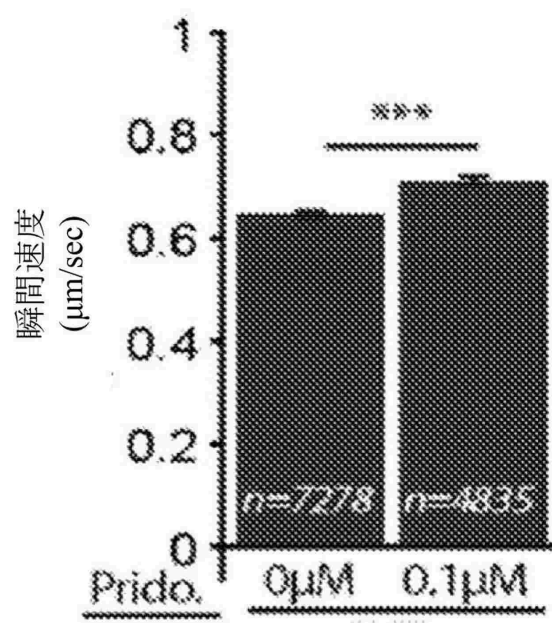


30

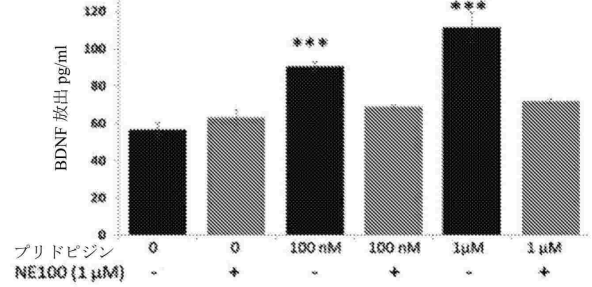
40

50

【図 1 1】

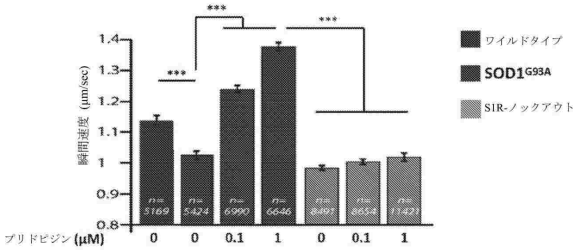


【図 1 2】



10

【図 1 3】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 ゲヴァ、ミカル
イスラエル国イーブン－イエフダ 0 0 0 0 ・ロズマリン 5 ・ピー．オー．ボックス 7 2 5 3
- (72)発明者 チェンチ、ニルソン・アンジェラ
スウェーデン王国ルンド 2 2 1 0 0 ・ルンド ユニバーシティ・デパートメント オブ エクスペ
リメンタル メディカル サイエンス・バサル ガングリア パソサイシオロジー ユニット・ビーエ
ムシー・エフ 1 1
- 審査官 金子 亜希
- (56)参考文献 特表 2 0 1 8 － 5 0 6 5 6 9 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 3 ／ 0 8 6 4 2 5 (W O , A 1)
2017 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders Late-Breaking
Abstracts, MDS study Group Abstracts and Guided Poster Tour Information , 2017年
Mov Disord, 2018年12月21日, 34(5), 708-716
医学のあゆみ (別冊) , 2014年, 2014(10):103-107
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
A 6 1 K 3 1 ／ 4 5 1
A 6 1 P 2 5 ／ 1 6
J S T P l u s ／ J M E D P l u s ／ J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s ／ R E G I S T R Y ／ M E D L I N E ／ E M B A S E ／ B I O S I S (S T
N)