

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-523919

(P2022-523919A)

(43)公表日 令和4年4月27日(2022.4.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/352 (2006.01)	A 6 1 K	31/352	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/216 (2006.01)	A 6 1 K	31/216	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 C 2 0 6
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全37頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-545944(P2021-545944)	(71)出願人	506115514		
(86)(22)出願日	令和2年2月5日(2020.2.5)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ		
(85)翻訳文提出日	令和3年10月4日(2021.10.4)		ィ オブ カリフォルニア		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/016820		The Regents of the U		
(87)国際公開番号	WO2020/163493		niversity of Califo		
(87)国際公開日	令和2年8月13日(2020.8.13)		rnia		
(31)優先権主張番号	62/801,271		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9		
(32)優先日	平成31年2月5日(2019.2.5)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2		
			番 フロア		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(71)出願人	594140915		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		ジョージタウン・ユニバーシティ		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		GEORGETOWN UNIVERS		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		ITY		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		アメリカ合衆国ディー・シー 2 0 0 5 7		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 神経変性疾患を治療するための物質および方法

(57)【要約】

フェノフィブラートとケンフェロールの組み合わせを投与することによる神経変性疾患の治療のための物質および方法が本明細書に記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における神経変性疾患を治療するための方法であって、フェノフィブラートおよびケンフェロールを、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記対象が神経変性疾患と診断されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象が神経変性疾患を発症するリスクがある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記対象が初期段階の神経変性疾患を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソンプラス症候群、家族性認知症、血管性認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、前頭側頭型認知症、網膜神経変性症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）または外傷性脳損傷（TBI）である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記パーキンソンプラス症候群が、多系統萎縮症（MSA）、進行性核上性麻痺（PSP）、および大脳皮質基底核変性症（CBD）からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記フェノフィブラートおよびケンフェロールが同時に投与される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記フェノフィブラートおよびケンフェロールが連続的に投与される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象に標準治療治療薬を投与することをさらに含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標準治療治療薬が、ドーパミン前駆体、ドーパミンアゴニスト、抗コリン作動薬、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、COMT 阻害剤、アマンタジン、リバスチグミン、NMDA アンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤、リルゾール、抗精神病剤、抗うつ剤、またはテトラベナジンおよびそれらの誘導体である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記対象が、対照対象と比較して、PGC-1 α 発現のレベルが低下していることを決定することをさらに含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記フェノフィブラートおよびケンフェロールが一定のモル比で投与される、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記フェノフィブラートとケンフェロールとのモル比が 1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、または 4 : 1 である、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記投与が、フェノフィブラート単独での治療と比較して脳内のフェノフィブラートのレベルを増加させる、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記レベルが少なくとも 2～4 時間増加する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記投与が、脳または中枢神経系における酸化ストレス剤のレベルを低下させる、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記投与が、脳または中枢神経系における炎症のレベルを低下させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への初回通過代謝を防止／低下させ、それにより対象におけるフェノフィブラートのレベルを増大させる方法であって、フェノフィブラートの初回通過代謝を低下させるのに十分なモル比でフェノフィブラートとケンフェロールの組み合わせを投与することを含む、方法。

【請求項 19】

前記対象が神経変性疾患を有する、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソンプラス症候群、家族性認知症、血管性認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、前頭側頭型認知症、網膜神経変性症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）または外傷性脳損傷である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記パーキンソンプラス症候群が、多系統萎縮症（MSA）、進行性核上性麻痺（PSP）または大脳皮質基底核変性症（CBD）である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象に標準治療治療薬を投与することをさらに含む、請求項 18～21 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記標準治療治療薬が、レボドパ、ドーパミンアゴニスト、抗コリン作動薬、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、COMT 阻害剤、アマンタジン、リバスチグミン、NMDA アンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤、リルゾール、抗精神病剤、抗うつ剤またはテトラベナジンおよびそれらの誘導体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

神経細胞または神経前駆細胞において PGC-1 α 発現を誘導する方法であって、神経細胞または神経前駆細胞をフェノフィブラートおよびケンフェロールと接触させることを含む、方法。

30

【請求項 25】

前記接触させるステップがインビボである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 PGC-1 α の誘導が PPAR α に非依存である、請求項 24 または請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記神経細胞がニューロンである、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記ニューロンがドーパミン作動性ニューロンである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ニューロンが、対象の皮質、線条体、または脊髄に由来する、請求項 27 に記載の方法。

40

【請求項 30】

前記神経細胞がグリア細胞または星状細胞である、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記投与が神経保護的である、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記神経保護が、脳の黒質領域における神経細胞の活性または数を増加させること、および／または線条体の正の末端の喪失を減少させることを含む、請求項 31 に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

前記ケンフェロールが天然源由来である、請求項 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記天然源が、ケンフェロールを含む植物または植物抽出物である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記天然源または抽出物が、緑茶、ケパー、ケール、茶、ブロッコリー、キャベツ、豆、エンダイブ、リーキ、トマト、イチゴまたはブドウである、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる 2019 年 2 月 5 日出願の米国仮特許出願第 62 / 801, 271 号の優先権の利益を主張する。

【0002】

政府支援の声明

本発明は、米国陸軍医学研究取得活動 (USAMRAA) によって授与された W81XWH-14-1-0123 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明における特定の権利を有する。

【0003】

20

本開示は、神経変性疾患の治療を必要とする対象における神経変性疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

神経変性疾患は、散发性または家族性であり、加齢とともに発生が増加する可能性がある。したがって、平均寿命が人口全体で増加するにつれて、神経変性疾患の発生が増加する。4 人のアメリカ人のうちの 1 人が、彼らの生涯で神経変性状態を発症すると予測されている。しかし、一般的に、状態を引き起こす根本的なメカニズムは十分に理解されておらず、神経変性疾患を予防または治療するために利用できる効果的な治療オプションはほとんどない。

30

【0005】

神経変性状態は、さまざまな程度の神経炎症を特徴とする。さらに、これらの障害には、主要ミトコンドリア制御因子、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ (PPAR γ) コアクチベーター-1 アルファ (PGC-1 α) の機能不全または調節不全を含む、ミトコンドリアの機能不全または調節不全が含まれることが示されている。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) アイソフォーム (例えば、 α 、 β / δ 、 γ)、特に PPAR α および PPAR- γ は、主に抗炎症効果、増強されたミトコンドリア機能、および AD、PD、HD、ALS の動物モデルの神経保護性抗酸化遺伝子の誘導、ならびに外傷性脳損傷 (TBI) [1 ~ 6] を通じて神経保護性であることが実証されている。PGC-1 α は、PPAR と提携して調節する転写コアクチベーターであり、とりわけミトコンドリアの生合成と細胞呼吸に関与する遺伝子を誘導する [7]。これらの PGC-1 α 調節活性は、PD、AD、ALS などの神経変性状態の対象の脳で低下する [8 ~ 10]。

40

【発明の概要】

【0006】

一態様では、対象における神経変性疾患を治療するための方法であって、フェノフィブラートおよびケンフェロールを、それを必要とする対象に投与することを含む、方法が本明細書に記載される。フェノフィブラートとケンフェロールは、同時にまたは連続して投与することができる。

【0007】

50

別の態様において、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への初回通過代謝を防止／低下させ、それにより、フェノフィブラートの初回通過代謝を低下させるのに十分なモル比でフェノフィブラートおよびケンフェロールの組み合わせを投与することを含む、対象におけるフェノフィブラートのレベルを増大させる方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートのレベルは、対象の脳および／または内臓において増強される。

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、対象に標準治療治療薬を投与することをさらに含む。神経変性疾患の治療のための例示的な標準治療治療薬には、標準治療治療薬はドーパミン前駆体、ドーパミンアゴニスト、抗コリン作動薬、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、COMT阻害剤、アマンタジン、リバスチグミン、NMDAアンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤、リルゾール、抗精神病剤、抗うつ剤、またはテトラベナジンおよびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、方法は、治療を受けている対象が、対照対象と比較して、PGC-1 α 発現のレベルが低下していることを決定することを含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、フェノフィブラートおよびケンフェロールは、一定のモル比で投与される。例えば、いくつかの実施形態において、ケンフェロールに対するフェノフィブラートのモル比は、1:2、2:1、3:1または4:1である。いくつかの実施形態において、ケンフェロールに対するフェノフィブラートのモル比は3:1である。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、フェノフィブラートおよびケンフェロールの投与は、フェノフィブラート単独での治療と比較して、脳内のフェノフィブラートのレベルを増加させ、脳または中枢神経系の酸化ストレス剤のレベルを低下させ、および／または脳または中枢神経系の炎症のレベルを低下させる。

【0012】

いくつかの実施形態において、対象は神経変性疾患と診断されている。いくつかの実施形態において、対象は神経変性疾患を発症するリスクがある。いくつかの実施形態において、対象は初期段階の神経変性疾患を有する。例示的な神経変性疾患には、これらに限定されないが、神経変性疾患は、パーキンソン病、パーキンソンプラス症候群、家族性認知症、血管性認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、前頭側頭型認知症、網膜神経変性症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）および外傷性脳損傷（TBI）が含まれる。いくつかの実施形態において、パーキンソンプラス症候群は、多系統萎縮症（MSA）、進行性核上性麻痺（PSP）または大脳皮質基底核変性症（CBD）である。

30

【0013】

別の態様において、神経細胞または神経前駆細胞をフェノフィブラートおよびケンフェロールと接触させることを含む、神経細胞または神経前駆細胞においてPGC-1 α 発現を誘導する方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、接触させるステップはインビボである。いくつかの実施形態において、PGC-1 α の誘導は、PPAR α に依存しない。いくつかの実施形態において、神経細胞はニューロン（例えば、ドーパミン作動性ニューロン、または対象の皮質、線条体または脊髄からのニューロン）である。いくつかの実施形態において、神経細胞はグリア細胞または星状細胞である。

40

【0014】

本明細書に記載の方法のいずれにおいても、フェノフィブラートおよびケンフェロールの投与は神経保護的である。いくつかの実施形態において、神経保護は、脳の黒質領域における神経細胞の活性または数を増加させること、および／または線条体における正の末端の喪失を減少させることを含む。

50

【0015】

いくつかの実施形態において、ケンフェロールは、天然源（例えば、ケンフェロールを含む植物または植物抽出物）に由来する。いくつかの実施形態において、天然の供給源または抽出物は緑茶である。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】フェノフィブラートが、PGC-1 α WTおよびPGC-1 α ヘテロ接合KOマウス由来の初代星状細胞におけるLPS誘発性炎症を阻害することを示している。PGC-1 α WT (PGC-1 α + / +) (A~C) およびPGC-1 α ヘテロ接合KO (PGC-1 α + / -) (D~F) マウスに由来する初代星状細胞を、5、10、および20 μ Mのフェノフィブラートで一晩、続いてLPSによって1時間処理した。全RNAを単離し、IL-1 β (A、D)、TNF- α (B、E) およびPGC-1 α (C、F) 遺伝子発現をRT-PCRにより決定した。PGC-1 α WT初代ミクログリアでは、LPS処理によりIL-1 β およびTNF- α レベルが増加し、20 μ Mでのフェノフィブラート処理によりこのLPS誘導IL-1 β 発現が有意に減少した(60%) (A) が、TNF- α の変化(B)またはPGC-1 α (C) の発現には失敗した。PGC-1 α ヘテロ接合KO一次ミクログリアでは、LPS治療はIL-1 β およびTNF- α レベルを増加させ、フェノフィブラート治療はこのLPS誘発IL-1 β 発現を有意に減少させた(55%) (D) が、TNF- α の発現を変化させることはできなかった(E)。10および20 μ Mでのフェノフィブラート処理は、PGC-1 α 発現を有意に増強した(1.5倍) (F)。***p<0.01、LPS対DMSO; #p<0.05、##p<0.01、###p<0.001、LPS+feno対LPS、スチューデント・ニューマン・クルズ事後解析を有するANOVA。

【図2】マウス初代星状細胞におけるフェノフィブラートを介した抗炎症作用には、PPAR α は必要ない。全RNAとタンパク質を収集した。PPAR α 遺伝子発現はqRT-PCRによって決定され(図2A)、タンパク質発現はウェスタンブロット分析によって決定された(図2B)。その後、10 nMのPPAR α siRNAをその後の実験に使用した。(図2C~2E) 初代星状細胞を10 nMのPPAR α siRNAまたはスクランブルsiRNAで30時間処理した後、20 μ Mのフェノフィブラートでさらに18時間処理した。次に、細胞を0.1 ng/mlのLPSで1時間処理した。全RNAは、PPAR α (図2C)、IL-1 β (図2D)、TNF α (図2E) 遺伝子発現のために抽出された。*p<0.05、**、p<0.01、一元配置ANOVAとその後のボンフェローニ多重比較検定。

【図3】フェノフィブラートは、C57/B Lナীবマウスに経口投与した後、急速にフェノフィブリン酸に変換される。C57/B Lマウスにフェノフィブラート(100 mg/kg)を経口投与し、2、4、6、8時間後に脳、肝臓、血漿の試料を採取した。皮質(図3A)、中脳(黒質)(図3B)、線条体(図3C)、肝臓(図3D)および血漿(図3E)のフェノフィブリン酸レベルを、質量分析を使用して決定した。試験したすべての脳組織および血漿試料において、フェノフィブラート投与の2~4時間後に、フェノフィブリン酸レベルが高かった。データは平均 $\pm$ SEMとして表される。

【図4】LPS傷害に応答したIL-1 β 遺伝子発現は、BV2細胞においてフェノフィブラートによって阻害されるが、フェノフィブリン酸では阻害されない。BV2細胞をフェノフィブリン酸(FA)、陰性対照DMSO、陽性対照フェノフィブラート(Feno)と18時間インキュベートした後、0.1 ng/mlのLPSによる処理を1時間行った。次に、IL-1 β 遺伝子のqRT-PCR分析のために全RNAを単離した。LPS曝露はIL-1 β mRNA発現を6倍上昇させた。5、10、20 μ Mでのフェノフィブリン酸処理は上昇したIL-1 β レベルを低下させることができなかったが、フェノフィブラート処理(20 μ M)はIL-1 β レベルを80%有意に低下させた。**p<0.01、LPS+Feno対LPSスチューデント・ニューマン・クルズ事後解析を有するANOVA。

10

20

30

40

50

【図5】ケンフェロールは組換えhCES1bを特異的に阻害し、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解を防ぐ。異なる濃度のフェノフィブラートを、組換えhCES1b (0.05 mg/mL) を含むアッセイ混合物に添加し、8つの濃度のケンフェロール (0~50 μ M) の1つと100 mm Tris-Clバッファー (pH 7.4) で37℃で2分間プレインキュベートし、10分間の反応を開始した。反応を停止し、上澄みを収集し、フェノフィブリン酸レベルをLC-MS/MSによって決定した。Ki値を計算し、酵素阻害モデルにデータをフィッティングさせることによって阻害のタイプを決定した：競合 (図5A)、非競合 (図5B)、不競合 (図5C)、および混合 (図5D) モデル。試料は重複して分析され、平均値として表された。

【図6】ケンフェロールは、プールされたヒト肝ミクロソーム (HLM) におけるフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解を防ぐ。異なる濃度のフェノフィブラートを、HLM (1 mg/mL) を含むアッセイ混合物に添加し、8つの濃度のケンフェロール (0~50 μ M) の1つと100 mm Tris-Clバッファー (pH 7.4) で37℃で2分間プレインキュベートし、10分間の反応を開始した。反応を停止し、上澄みを収集し、フェノフィブリン酸レベルをLC-MS/MSによって決定した。Ki値を計算し、酵素阻害モデルにデータをフィッティングさせることによって阻害のタイプを決定した：競合 (図6A)、非競合 (図6B)、不競合 (図6C)、および混合 (図6D) モデル。試料は重複して分析され、平均値として表された。

【図7】フェノフィブラートとケンフェロール (化合物X) の同時送達は、BV2細胞において相乗的な抗炎症効果を発揮した。BV2細胞を、20 μ Mのフェノフィブラートおよび/または10または20 μ Mのケンフェロールとともに18時間インキュベートし、次に0.1 ng/mLのLPSに1時間曝露した。細胞溶解物を収集し、RT-PCRによってIL-1 β (図7A) およびPGC-1 α (図7B) 遺伝子発現のためにRNAを単離した。(A) LPS曝露はIL-1 β mRNAレベルを増加させ (5倍)、20 μ Mフェノフィブラート処理は、このIL-1 β 発現のLPS誘発性の増加を70%減少させた。フェノフィブラートとケンフェロールの同時送達は、この抗炎症効果を相乗的に増加させ、LPS誘発性のIL-1 β 発現の増加を完全に無効にした。ケンフェロール治療のみ (10、20 μ M) は、LPS誘発性のIL-1 β 発現の増加を60% (10 μ M) および85% (20 μ M) 減少させた。(図7B) 20 μ Mでのフェノフィブラート処理はPGC-1 α 発現を2倍増加させた。しかし、フェノフィブラート (20 μ M) とケンフェロール (10、20 μ M) の同時投与はPGC-1 α のアップレギュレーションを抑制した。ケンフェロール処理のみ (10、20 μ M) は、BV2細胞におけるPGC-1 α 発現を増強しなかった。***p<0.001、**p<0.01、*p<0.05、DMSOコントロールと比較、###p<0.001、LPS治療と比較、\$\$\$p<0.001、スチューデントのt検定によりフェノフィブラートのみの治療と比較。

【図8】組換えhCES1b (図8A) およびHLM (図8B) による、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解の標準曲線。異なる濃度のフェノフィブラートを、100 mm Tris-Clバッファー (pH 7.4) 中の組換えhCES1b (0.05 mg/mL) (図9A) またはプールされたヒト肝ミクロソーム (1 mg/mL) (図9B) を含むアッセイ混合物に37℃で添加し、10分間の反応を開始する。反応を停止し、上澄みを収集し、フェノフィブリン酸レベルをLC-MS/MSによって決定した。標準曲線をプロットし、Km値とVmax値を計算した。試料は重複して分析され、平均値として表された。

【図9】ケンフェロールの同時送達は、ナイーブC57/BLマウスにおいてインビボで脳のフェノフィブラートレベルを増強する。フェノフィブラートとケンフェロールを同時投与した、またはフェノフィブラートのみを投与したマウスの脳フェノフィブラート (図9A) およびフェノフィブリン酸 (図9B) のレベル。マウスは、強制経口投与により、「fenoのみ」グループの場合はビヒクルで、「feno+K」グループの場合はケンフェロール (50 mg/kg) で2日間前処置された。3日目に、「fenoのみ」グループのマウスにフェノフィブラート (100 mg/kg) を投与したのに対し、「feno

10

20

30

40

50

o + K」グループのマウスには、フェノフィブラート（100 mg / kg）およびケンフェロール（50 mg / kg）を同時投与した。治療後0、1、2、4、8、12、24時間（時点あたりn = 4）にマウスを殺し、脳を採取した。脳のフェノフィブラートおよびフェノフィブリン酸のレベルは、LC-MS / MSによって決定された。（図9A）1時間の強制経口投与後の「feno + K」グループのフェノフィブラートレベルは、「fenoのみ」グループと比較して有意に高かった（約4倍）。「Feno + K」グループは、経口投与後8時間まで、「fenoのみ」グループと比較して高レベルのフェノフィブラートを維持した。（図9B）1時間の強制経口投与後の「feno + K」グループのフェノフィブリン酸レベルは、「fenoのみ」グループと比較して有意に高かった（約2倍）。「Feno + K」グループは、経口投与後12時間まで、「fenoのみ」グループと比較して高レベルのフェノフィブリン酸を維持した。データは平均 ± SEMとして表される。* * p < 0.01、* p < 0.05、0時間の時点と比較したスチューデントのt検定。

【図10】ケンフェロールとフェノフィブラートの同時送達は、MPTP中毒後のマウスの黒質のドーパミン作動性ニューロンを保護する。C57BLマウスは、5日間のMPTP腹腔内注射（30 mg / kg）または生理食塩水を受けた後、14日間の腹腔内薬物治療を受けた。上のパネル（図10A～10H）は、生理食塩水対照、MPTPおよびMPTPとフェノフィブラートおよび／またはケンフェロール治療群の黒質切片の代表的なTH染色画像である。下のパネル（図10I）は、黒質のTH陽性ニューロンの立体的定量化を示している。MPTP（30 mg / kg）による亜慢性治療は、生理食塩水治療マウス（図10A）と比較した場合、黒質（図10B）のドーパミン作動性ニューロンの有意な喪失を誘発した。フェノフィブラート治療（150および200 mg / kg）は、MPTPに誘導される黒質ニューロンの喪失を防いだ（図10C、10F）。フェノフィブラート（150 mg / kg）とケンフェロール（50 mg / kg）の同時投与は、神経保護効果をわずかに増加させた（図10D、10I）。データは平均 ± SEMとして表される。グループA：生理食塩水 + 生理食塩水（n = 6）、グループB：MPTP + 生理食塩水（n = 5）、グループC：MPTP + Feno 150 mg / kg（n = 7）、グループD：MPTP + Feno 150 mg / kg + K 50 mg / kg（n = 7）、グループE：MPTP + Feno 150 mg / kg + K 100 mg / kg（n = 7）、グループF：MPTP + Feno 200 mg / kg（n = 5）、グループG：MPTP + Feno 200 mg / kg + K 50 mg / kg（n = 7）、グループH：MPTP + Feno 200 mg / kg + K 100 mg / kg（n = 7）。* * * * p < 0.0001、* p < 0.05、対応のないスチューデントのt検定、グループBと比較：MPTP + 生理食塩水。

【図11】ケンフェロールとフェノフィブラートの同時送達は、MPTP中毒後のマウスの線条体におけるドーパミン作動性神経突起を保護する。C57BLマウスは、5日間のMPTP腹腔内注射（30 mg / kg）または生理食塩水を受けた後、14日間の薬物治療を受けた。上のパネルは、生理食塩水対照、MPTPおよびMPTPとフェノフィブラート／化合物X治療群の線条体切片の代表的なTH染色画像である。下のパネルは、Image Jソフトウェアを使用した線条体のTH光学密度の定量化を示している。MPTP（30 mg / kg）による亜慢性治療は、生理食塩水治療マウス（図11A）と比較した場合、線条体ドーパミン作動性神経突起の有意な喪失を誘導した（図11B）。フェノフィブラート治療（150および200 mg / kg）は、MPTPによって誘導される線条体神経突起の喪失を防いだ（図11C、11F）。フェノフィブラート（150 mg / kg）とケンフェロール（50 mg / kg）の同時投与は、神経保護効果を増強した（図11D、11I）。データは平均 ± SEMとして表される。グループA：生理食塩水 + 生理食塩水（n = 6）、グループB：MPTP + 生理食塩水（n = 5）、グループC：MPTP + Feno 150 mg / kg（n = 7）、グループD：MPTP + Feno 150 mg / kg + K 50 mg / kg（n = 7）、グループE：MPTP + Feno 150 mg / kg + K 100 mg / kg（n = 7）、グループF：MPTP + Feno 200 mg / kg（n = 5）、グループG：MPTP + Feno 200 mg / kg + K 50 mg / kg（

n = 7)、グループH:MPTP+Feno 200mg/kg+K100mg/kg (n = 7)。****p<0.0001、*p、0.05、対応のないスチューデントのt検定、グループBと比較:MPTP+生理食塩水。

【図12】緑茶とケーパーは、ケンフェロールとその誘導体の代替天然源である。(図12A)さまざまなブランドのケーパー抽出物と緑茶抽出物中のケンフェロールのTQ-M S定量化。ケーパー抽出物(160~505ng/ml/g)は、緑茶抽出物(14~50ng/ml/g)と比較して「遊離」ケンフェロールの量が多いことを示した。さまざまなブランドの(図12B)ケーパー抽出物と(図12C)緑茶抽出物中のケンフェロール誘導体(複雑な分子と結合)のQTOF定性分析。緑茶抽出物($5 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$ AU)は、ケーパー抽出物($4 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ AU)と比較して、ケンフェロール誘導体の量がより多いことを示し、緑茶抽出物が化合物X-誘導体の良好な供給源であることを示す。データは平均±SEMとして表される。

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

本開示は、神経変性疾患を治療するための方法、および神経細胞または神経前駆細胞におけるPGC-1 α 発現を誘導するための方法を提供し、これらの方法は、神経変性疾患およびその症状を治療するのに有効なモル比でフェノフィブラートとケンフェロールの組み合わせを投与することを含む。本発明者らは、驚くべきことに、記載されたモル比でのフェノフィブラートおよびケンフェロールの投与が、いずれかの薬剤単独での治療よりも効果的であり、効力に必要な各薬剤の量を減らし、したがって未知の相乗効果を提供できることを見出した。

20

【0018】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用される多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する: Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994)、THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988)、THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)、およびHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

30

【0019】

本明細書に引用される各刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、本開示と矛盾しない範囲で、その全体が参照により組み込まれる。

【0020】

本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는ように、ここでは、単数形「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」は、文脈が明確にそうでないことを示さない限り複数の指示対象が含まれることに留意されたい。

【0021】

本明細書で 사용되는場合、以下の用語は、特に明記しない限り、それらに帰する意味を有する。

40

【0022】

定義

本明細書で 사용되는「神経細胞」または「神経細胞の集団」という用語は、ニューロン(ドーパミン作動性ニューロンを含む)およびグリア細胞(星状細胞、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、およびミクログリア)の両方を含む。任意選択で、神経細胞または神経細胞の集団は、中枢神経系細胞を含む。

【0023】

本明細書で 사용되는「神経前駆細胞」という用語は、神経細胞に分化する幹細胞を指す

50

。

【0024】

「対照」という用語は、神経変性疾患を欠く対象からの値、または神経変性疾患を欠く対象の集団を例示する既知の対照値、またはPGC1 α タンパク質などのバイオマーカーのベースラインまたは健康な対象レベルを有することを意味する。上記のようないくつかの場合において、対照値は、神経変性疾患の発症前またはそのための治療の開始前の同じ対象からのものであり得る。

【0025】

「治療する」、「治療すること」、および「治療」という用語は、神経変性疾患の1つ以上の影響または症状を軽減または遅延させる方法を指す。対象が病気であると診断することができる。治療は、症状だけでなく、根底にある病状を軽減する方法を指すこともある。対象への投与の効果は、これに限られるものではないが、神経変性疾患または障害の1つ以上の症状の軽減、神経学的疾患または傷害の重症度の低下、神経学的疾患または傷害の完全な除去、または1つ以上の症状の発症または悪化の遅延の効果を有することができる。例えば、開示された方法は、治療前の対象と比較した場合、または対照対象または対照値と比較した場合に、対象の疾患の1つ以上の症状が約10%減少した場合に治療とみなされる。したがって、減少は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、またはその間の任意の量の減少であり得る。

【0026】

「予防する」、「予防すること」、または「予防」という用語は、神経変性疾患またはその1つ以上の症状の発症、発生率、重症度、または再発を予防、遅延、回避、除去、未然防止、停止、または妨害する方法を意味する。例えば、開示された方法は、ケンフェロールと組み合わせてフェノフィブラートを投与されなかった神経変性に感受性のある対照対象と比較した、神経変性に感受性のある対象における神経変性または神経変性の1つ以上の症状（例えば、振戦、衰弱、記憶喪失、硬直、痙縮、萎縮）の発症、発生、重症度、もしくは再発の減少または発症の遅延がある場合の予防であると考えられる。開示された方法はまた、治療を受ける前の対象の進行と比較してケンフェロールとフェノフィブラートまたはその類似体を受けた後、神経変性に感受性のある対象において神経変性または神経変性の1つ以上の症状の発症、発生率、重症度、もしくは再発の減少または遅延がある場合に予防であると考えられる。したがって、神経変性の発症、発生率、重症度、または再発の減少または遅延は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%、またはその間の任意の量の減少であり得る。

【0027】

本明細書で使用される「対象」という用語は、個人を意味する。好ましくは、対象は霊長類などの哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。人間以外の霊長類も対象である。対象という用語には、ネコ、イヌなどの飼育動物、家畜（たとえば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、および実験動物（たとえば、フェレット、チンチラ、マウス、ウサギ、ラット、アレチネズミ、モルモットなど）が含まれる。したがって、獣医用の使用および医療製剤が本明細書で企図される。

【0028】

本開示は、一定モル比のフェノフィブラートまたはその類似体とケンフェロールとの組み合わせが、対象の神経変性疾患に関連する症状を治療することができるという発見に基づく。フェノフィブラートは、肝臓を最初に通過する間にインビボで急速に加水分解され、カルボキシルエステラーゼ酵素によってフェノフィブリン酸に代謝される。フェノフィブリン酸は、経口フェノフィブラートの脂質低下特性を提供する活性部分であると報告されている。フェノフィブラートの神経保護および抗炎症特性は、その代謝物であるフェノフィブリン酸ではなく、フェノフィブラート自体に起因する（実施例6を参照）。神経変性疾患を治療するためのフェノフィベートの使用は、米国特許公開第2016/0220523号に以前に記載されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本開示は、フェノフィブラートまたはその類似体とケンフェロールとの組み合わせ

が、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への代謝を防止（またはその速度を低下）させ、それによってマウスの脳におけるフェノフィブラートのレベルを増大させるという驚くべき効果を特定する（実施例 7 を参照）。

【0029】

一態様では、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールを、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における神経発生性疾患を治療する方法が本明細書に記載される。フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、好ましくは、一定のモル比で投与される。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体とケンフェロールとのモル比は、1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、または 4 : 1 である。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールの投与は、フェノフィブラート単独での治療と比較して、脳内のフェノフィブラートのレベルを増加させ、脳または中枢神経系の酸化ストレス剤のレベルを低下させ、および／または脳または中枢神経系の炎症のレベルを低下させる。

【0031】

いくつかの実施形態において、対象は、神経変性疾患を発症するリスクがある。いくつかの実施形態において、対象は神経変性疾患と診断されている。当業者は、神経変性疾患を発症している、または発症するリスクのある対象を診断する方法を知っている。たとえば、次のテストの 1 つ以上を使用できる：遺伝子テスト（たとえば、TDP-43 遺伝子の突然変異の識別）または家族分析（たとえば、家族歴）、中枢神経系イメージング（たとえば、磁気共鳴画像法およびポジトロン放出断層撮影）、臨床または行動検査（例えば、筋力低下、振戦、筋緊張、運動技能、または記憶の評価）、または臨床検査。

20

【0032】

神経変性疾患は、初期段階の神経変性疾患である可能性がある。いくつかの実施形態において、神経変性疾患は、パーキンソン病、パーキンソンプラス症候群、家族性認知症、血管性認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、前頭側頭型認知症、網膜神経変性症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）または外傷性脳損傷（TBI）である。いくつかの実施形態において、パーキンソンプラス症候群は、多系統萎縮症（MSA）、進行性核上性麻痺（PSP）または大脳皮質基底核変性症（CBD）である。

30

【0033】

また、本明細書には、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールをフェノフィブラートの初回通過代謝を低下させるのに十分なモル比で投与することを含む、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への初回通過代謝を防止／低下させる方法が記載される。

【0034】

別の態様において、細胞をフェノフィブラートまたはその類似体またはケンフェロールと接触させることを含む、神経細胞または神経前駆細胞においてPGC-1 α 発現を誘導する方法が本明細書に記載される。接触させるステップは、インビボまたはインビトロのいずれかで実施することができる。いくつかの実施形態において、神経細胞はニューロンである。いくつかの実施形態において、ニューロンはドーパミン作動性ニューロンである。いくつかの実施形態において、ニューロンは、対象の皮質、線条体、または脊髄内のニューロンである。いくつかの実施形態において、神経細胞はグリア細胞または星状細胞である。

40

【0035】

神経変性疾患

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、神経変性疾患と診断された対象にフェノフィブラートおよびケンフェロールを投与することを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、神経変性疾患を発症するリスクがある対象にフェノ

50

フィブラートおよびケンフェロールを投与することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、初期段階の神経変性疾患を有する。

【0036】

例示的な神経変性疾患には、パーキンソン病、パーキンソンプラス症候群、家族性認知症、血管性認知症、アルツハイマー病、ハンチントン病、多発性硬化症、レビー小体型認知症、軽度認知障害、前頭側頭型認知症、網膜神経変性症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）および外傷性脳損傷（TBI）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、パーキンソンプラス症候群は、多系統萎縮症（MSA）、進行性核上性麻痺（PSP）または大脳皮質基底核変性症（CBD）である。

【0037】

アルツハイマー病（AD）は、慢性の進行性神経変性を特徴としている。ADの神経変性には、初期のシナプト毒性、神経伝達物質の障害、細胞外 β -アミロイド（ $A\beta$ ）沈着物と細胞内神経原線維の蓄積、神経膠症、そして後の段階でのニューロンの喪失と関連する脳萎縮が含まれる（Danyysz et al., Br J Pharmacol. 167:324-352, 2012）。初期の研究では、 $A\beta$ ペプチドがヒト大脳皮質細胞培養におけるグルタメート毒性を増強する能力を持っている可能性があることが示された（Mattson et al., J Neurosci. 12:376-389, 1992、Li et al., J Neurosci. 31(18):6627-38, 2011）。

【0038】

いくつかの実施形態において、対象は、前臨床または初期のアルツハイマー病を患っている。本明細書で使用される「初期アルツハイマー病」という用語は、軽度から中等度の疾患よりも重症度が低く、および／または発症が早いアルツハイマー病の病期を指す。「初期アルツハイマー病」という用語は、前臨床疾患（無症候性および前症候性疾患を含む）だけでなく、前認知症（前駆症状としても知られ、本明細書では前駆症状と呼ばれる）を含む。特許がどのタイプのアルツハイマー病であるかを評価するために使用される診断基準は、The Lancet Neurology, 2007, Volume 6, Issue 8, pages 734-746およびThe Lancet Neurology, 2010, Volume 9, Issue 11, pages 1118-1127に公開されている基準を使用して決定でき、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0039】

本明細書に記載のフェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールの組み合わせの投与は、神経変性疾患に関連する1つ以上の症状を軽減または治療することが本明細書で企図されている。このような症状には、1つ以上の運動技能、認知機能、ジストニア、舞踏病、うつ病などの精神症状、脳および線条体の萎縮、および神経機能障害が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

投与は、本明細書に記載される治療を受けていない対象と比較して、総運動スコアのより遅い進行をもたらすと企図される。いくつかの実施形態において、より遅い進行は、舞踏病サブスコア、バランスおよび歩行サブスコア、手の動きサブスコア、眼球運動サブスコア、最大ジストニアサブスコアおよび動作緩慢評価からなる群から選択される1つ以上の運動スコアの改善の結果である。

【0041】

一般に、PDは、パーキンソン病の主要な症状（安静時振戦、動作緩慢、硬直）の神経学的病歴と臨床検査によって診断される。個人はまた、姿勢の不安定性および片側性の発症について評価され得る。場合によっては、医師は統一パーキンソン病評価尺度（UPDRS）または運動障害学会の改訂版のUPDRS（Goetz et al., Mov Disord. 2007 Jan; 22(1):41-7）を使用することがある。修正されたUPDRSは、次のようなサブスケールを持つ4つのスケール構造を使用する：（1

10

20

30

40

50

）日常生活の非運動体験（１３項目）、（２）日常生活の運動体験（１３項目）、（３）運動検査（１８項目）および（４）運動合併症（６項目）。各サブスケールは０～４の評価を有し、０＝通常、１＝軽微、２＝軽度、３＝中程度、４＝重度である。臨床医は、英国パーキンソン病協会の脳バンク臨床診断基準（Hughes A J, Daniel S E, Kilfor L, Lees A J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's diseases. A clinic-pathological study of 100 cases. JNNP 1992, 55: 181-184）によって開発された基準を使用することもできる。

【００４２】

ハンチントン病は、症状の発症と運動および神経機能の低下の進行によって定義または特徴づけられることがよくある。HDは５つの段階に分けることができる。初期HDの患者（段階１および２）は、認知の問題についての懸念が高まっており、これらの懸念は中程度／中間のHD（段階３および４）の間も一定である。後期または進行したHD（ステージ５）の患者は、認知能力が不足している（Ho et al., Clin Genet. Sep 2011; 80 (3): 235-239）。

【００４３】

ステージの進行は次のように観察できる。初期段階（ステージ１）。HDと診断され、自宅と職場の両方で完全に機能することができる。初期中間段階（段階２）では、その人は雇用可能であり続けるが、能力は低く、いくつかの困難を伴って日常業務を管理することができる。後期中間段階（段階３）では、その人はもはや仕事をしたり、家事の責任を管理したりすることができなくなる。日々の財務やその他の日常業務を処理するための支援または監督が必要である。初期の進行段階の患者（病期４）は、もはや日常生活において独立していないが、家族や専門職のキャリアに支えられて自宅で生活することができる。進行した段階（段階５）では、その人は日常の活動を完全にサポートする必要があり、通常は専門的な介護が必要である。HDの患者は通常、症状が最初に現れてから約１５～２０年後に死亡する。

【００４４】

ハンチントン病の症状のゆっくりとした低下の兆候は、以下のパラメーターの１つ以上のベースラインからの変化を使用して測定される：（i）機能評価のための標準試験の使用（例えば、UHDRS全機能的能力、LPAS、独立スケール）；（ii）神経心理学的評価（例、UHDRS認知評価、マティス認知症評価尺度、トレイルメイキングテストAおよびB、フィギュアキャンセルテスト、ホプキンス言語学習テスト、アーティキュレーションスピードテスト）；（iii）精神医学的評価（UHDRS行動評価、モンゴメリーおよびアスパーグうつ病評価尺度）ならびに（iv）認知的評価（例、認知症転帰測定スイート（DOMS））。

【００４５】

フェノフィブラート

フェノフィブラートは、内因性高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症の治療に以前から使用されていたフィブラート化合物である。フェノフィブラートの調製は、米国特許第４，０５８，５５２号に開示されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。フェノフィブリン酸は、フェノフィブラートの活性代謝物である。フェノフィブラートは水に溶けないため、胃腸（GI）管での吸収が制限される。この問題を克服するために、代替の処方と戦略が使用されてきた。この参照によりそれらのすべてが、本明細書に組み込まれる、米国特許第４，８００，０７９号および第４，８９５，７２６号（微粉化フェノフィブラート）、米国特許第６，２７７，４０５号（錠剤またはカプセル内の顆粒の形態の微粉化フェノフィブラート）、米国特許第６，０７４，６７０号（固体状態での微粉化フェノフィブラートの即時放出、米国特許第５，８８０，１４８号（フェノフィブラートとビタミンEの組み合わせ）、米国特許第５，８２７，５３６号（フェノフィブラートの可溶化剤としてのジエチレングリコールモノエチルエー

10

20

30

40

50

テル（D G M E））、および米国特許第 5, 545, 628 号（フェノフィブラートと 1 つ以上のポリグリコシル化グリセリドの組み合わせ）を参照されたい。他の多くの誘導体、類似体および配合物は当業者に知られている。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 4, 058, 552 号に記載されているような p-カルボニルフェノキシイソ酪酸の他のエステルを使用することができる。フェノフィブラート類似体には、米国特許第 4, 800, 079 号で定義されているものが含まれる。例として、ゲムフィブロジルは、本明細書に開示される方法で使用する可以使用。

【0046】

フェノフィブラートは、必要に応じて適切な溶媒または可溶化剤に溶解される。フェノフィブラートは、例えば、陰イオン性（例えば SDS）および非イオン性（例えば、T r i t o n X-100）界面活性剤、錯化剤（N-メチルピロリドン）を含む多くの異なる可溶化剤に可溶であることが知られている。フェノフィブラートまたはフェノフィブラート誘導体の経口投与のための改善された生物学的利用能を有する液体および半固体配合物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願公開第 WO 2004/002458 号に記載されている。

【0047】

ケンフェロール

ケンフェロール（3, 5, 7-トリヒドロキシ-2-（4-ヒドロキシフェニル）-4H-1-ベンゾピラン-4-オン）は、多くの食用植物（例えば茶、ブロッコリー、キャベツ、ケール、豆、エンダイブ、リーキ、トマト、イチゴ、ブドウ）に見られる天然に存在するフラボノイドであり、抗酸化作用、抗炎症作用、神経保護作用、抗アテローム生成作用、抗癌作用など、さまざまな薬理学的特徴を備えている [19、20]。

【0048】

インビトロおよびインビボ調査からの証拠は、ケンフェロールがアルツハイマー病（AD）の治療候補としての可能性を提供する可能性があることを示唆している。ケンフェロールは、マウス皮質ニューロン、PC12 神経芽細胞腫、および T47D ヒト乳がん細胞内での β -アミロイド誘導毒性および凝集効果をインビトロで防止する [21~23]。同様に、ケルセチン、ケンフェロール、イソラムネチンを含むイチョウの葉由来のフラボノール混合物は、BDNF シグナル伝達経路を刺激し、ダブルトランスジェニック AD マウスモデル（TgAPPsw / PS1e9）から分離されたニューロン内の β -アミロイド蓄積を減少させた。これらのダブルトランスジェニック AD マウスでのインビボ研究により、フラボノール投与後の BDNF 発現の増強が確認され、認知機能の改善と相関している [24]。ケンフェロールはまた、酸化ストレスを抑制し、海馬のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性を高め、D-ガラクトース誘発性記憶障害のあるマウスの学習能力と記憶能力を改善することも注目された [25]。ケンフェロールまたはケンフェロールを含む製品による前処理は、MPTP、6-OHDA、または PD のロテノン神経毒性動物モデル内のドーパミン作動性神経毒性に対する保護を提供する [26~29]。

【0049】

医薬組成物および投与経路

いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、適切な担体、賦形剤または希釈剤とともに 1 つ以上の組成物に配合される。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、同じ組成物に配合される。代替の実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、別個の組成物に配合される。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、同時に（任意選択で、同じまたは異なる組成物で）投与される。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、連続して投与される。

【0050】

担体という用語は、化合物または組成物と組み合わせた場合に、使用目的または目的のためにその化合物もしくは組成物の調製、貯蔵、投与、送達、有効性、選択性、または他の

10

20

30

40

50

任意の特徴を補助または促進する化合物、組成物、物質、もしくは構造を意味する。例えば、担体は、有効成分の分解を最小限に抑え、対象における有害な副作用を最小限に抑えるように選択することができる。そのような薬学的に許容される担体には、生理食塩水、緩衝生理食塩水、人工脳脊髄液、デキストロース、および水を含むがこれらに限定されない、無菌の生体適合性薬学的担体が含まれる。

【0051】

担体は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、または薬学配合物で使用するための当該技術分野で周知の他の物質を包含する。組成物で使用するための担体の選択は、組成物の意図された投与経路に依存するであろう。これらの物質を含む薬学的に許容される担体および配合物の調製は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia Pa., 2005に記載されている。生理的に許容される担体は、リン酸塩、クエン酸塩、もしくは他の有機酸塩などの緩衝剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに／またはTWEEN（登録商標）（ICI, Inc.; Bridgewater, N. J.）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（商標）（BASF; Florham Park, N. J.）などの非イオン性界面活性剤を含む。

【0052】

意図される投与様式に応じて、医薬組成物は、例えば、錠剤、坐剤、丸薬、カプセル、粉末、液体、エアロゾル、または懸濁液などの固体、半固体、または液体剤形の形態であり得、好ましくは、正確な投薬量の単回投与に適した単位剤形であり得る。組成物は、治療有効量の本明細書に記載の化合物またはその誘導体を、薬学的に許容される担体と組み合わせて含み、さらに、他の医用剤、医薬剤、担体、または希釈剤を含むことができる。薬学的に許容されるとは、生物学的またはその他の望ましくないものではなく、許容できない生物学的効果を引き起こしたり、それが含まれる医薬組成物の他の成分と有害な方法で相互作用したりすることなく、選択された化合物とともに個体に投与できる物質を意味する。本明細書に記載のフェノフィブラートもしくはその類似体および／またはケンフェロール、または非経口注射に適したその薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグを含む組成物は、生理学的に許容される滅菌水溶液または非水溶液、分散液、懸濁液または乳濁液、および滅菌注射可能溶液または分散液に再構成するための滅菌粉末を含み得る。好適な水性および非水性担体、希釈剤、溶媒、またはビヒクルの例には、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロールなど）、それらの好適な混合物、植物油（オリーブ油など）、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。

【0053】

本明細書に記載の組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含むことができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって促進され得る。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなども含めることができる。注射可能な医薬剤型の持続性吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

【0054】

本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩またはプロドラッグの経口投与のための固体剤形には、カプセル、錠剤、丸薬、粉末、および顆粒が含まれる。かかる固体剤形では、本明細書に記載の化合物またはその誘導体は、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウムなどの少なくとも1つの通例の不活性賦形剤（もしくは担体）、または（a）充填剤または増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、およびケイ酸、（b）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、およびアカシア、（c）保湿剤、例えば、グリセロール、（d）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモおよびタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定の複合ケイ酸塩、および炭酸ナトリウム、（e）溶解遅延剤、例えば、パラフィン、（f）吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物、（g）湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール、（h）吸着剤、例えば、カオリンおよびベントナイト、（i）潤滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、またはそれらの混合物と混合される。カプセル剤、錠剤、および丸剤の場合、剤形は緩衝剤も含んでもよい。

10

【0055】

同様のタイプの固体組成物は、賦形剤、例えば、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用して、軟質および硬質充填ゼラチンカプセル剤の充填剤として使用し得る。

20

【0056】

錠剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、および顆粒などの固体剤形は、コーティングおよびシエル、例えば、腸溶性コーティングおよび当該技術分野で周知の他のものを用いて調製され得る。それらは不透明化剤を含むことができ、またそれらが腸管の特定の部分で遅延して活性化化合物または複数の化合物を放出するような組成のものであり得る。使用され得る包埋組成物の例は、ポリマー物質およびワックスである。活性化化合物はまた、適切な場合、上記の賦形剤の1つ以上とともにマイクロカプセル化された形態であり得る。

【0057】

フェノフィブラートまたはその類似体ならびにケンフェロールまたはその薬学的に許容される塩またはプロドラッグの経口投与のための液体剤形には、薬学的に許容される乳濁液、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルが含まれる。活性化化合物に加えて、液体剤形は、当該技術分野で一般に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの物質の混合物などを含有し得る。

30

【0058】

そのような不活性希釈剤に加えて、組成物はまた、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、甘味剤、香味剤、または芳香剤などの追加の薬剤を含むことができる。

40

【0059】

懸濁液は、活性化化合物に加えて、追加の薬剤、例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天、ならびにトラガカント、またはこれらの物質の混合物などを含有し得る。

【0060】

直腸投与用の本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩またはプロドラッグの組成物は、任意選択で、坐薬であり、これは、化合物を、通常室温では固体であるが体温で液体であり、それ故に直腸または腔内で溶解して活性化化合物を放出する好適な

50

非刺激性賦形剤または担体、例えば、カカオバター、ポリエチレングリコール、または坐薬ワックスなどと混合することによって調製され得る。

【0061】

フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールは、例えば、エクスビボ、インビトロ、およびインビボを含む、任意の数の方法で神経細胞または神経前駆細胞に投与することができる。インビボ投与は、中枢または末梢神経系神経細胞を対象とすることができる。したがって、対象が中枢神経系でPGC-1 α レベルの低下を発症している、または発症するリスクがある場合、インビボ接触は有用である可能性がある。いくつかの実施形態において、フェノフィブラートおよびケンフェロールは、脳室内(ICV)投与によって投与される。

10

【0062】

インビトロでの接触は、例えば、移植のために細胞を処理する際に望ましい場合がある。神経細胞は、同じまたは異なる対象の神経系からの外植片であることができ、幹細胞に由来することができる、または細胞株に由来することができる。神経細胞は、脱分化された後、神経細胞系統に分化させられる非神経細胞に由来する可能性がある。このような細胞は、人工多能性幹細胞である可能性がある。フェノフィブラートは血液脳関門を通過するため、対象にフェノフィブラートを全身投与することにより、中枢神経系の神経細胞をフェノフィブラートと接触させることができる。フェノフィブラートは、例えば、局所注射、ポンプ、または徐放性インプラントによって髄腔内に投与することができる。

【0063】

通常の成人のフェノフィブラートの投与量は、1日あたり3つのゼラチンカプセルであり、それぞれに100mgのフェノフィブラートが含まれている。当業者は、有効量のフェノフィブラートを選択することにより、投薬量または投薬計画を選択することができる。そのような有効量には、神経細胞においてPGC-1 α の発現を誘導する量、抗炎症特性を有する量、酸化ストレスの1つ以上の効果を低下させる量が含まれる。さらに、フェノフィブラートの有効量は、リン酸化されたAMPKのレベルを増加させ、ミトコンドリア数を増加させ、細胞の生存率を増加させる。フェノフィブラートまたはその類似体とケンフェロールを組み合わせると、フェノフィブラートまたはその類似体を単独で投与する場合と比較して、対象に必要なフェノフィブラートまたはその類似体の有効用量が減少すると企図される。

20

30

【0064】

必要に応じて、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールを毎日投与する。

【0065】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、所望の生理学的応答を生み出すのに十分な任意の量として定義される。例として、フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールの全身投与量は、例えば、1日あたり300~400mgを含む、1日あたり1~1000mgであり得る（例えば、1~5回の用量で投与される）。当業者は、阻害剤の特定の特性、それを投与される対象、投与様式、治療または予防される疾患の種類および重症度などに基づいて、以下に記載されるように投与量を調整するであろう。さらに、治療の期間は、数日、数週間、数ヶ月、数年、または対象の寿命の間であり得る。例えば、神経変性疾患を発症する、または発症するリスクのある対象への投与は、効果が持続し、副作用が管理可能である限り、少なくとも毎日（例えば、1日1回、2回、3回）、隔日、週2回、毎週、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、6週間ごと、2か月ごと、3か月ごと、または6か月ごと、数週間、数か月、または数年ごとであり得る。

40

【0066】

フェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールを投与するための有効な量およびスケジュールは、経験的に決定することができ、そのような決定を行うことは、当該技術分野の技術の範囲内である。投与のための投薬量範囲は、疾患または障害の1つ以上の症状が影響を受ける（例えば、減少または遅延する）所望の効果を生み出すのに十分な

50

大きさの範囲である。投与量は、望ましくない交差反応、細胞死などの実質的な有害な副作用を引き起こすほど多くてはならない。一般に、投与量は、神経変性疾患の種類、種、年齢、体重、一般的な健康状態、対象の性別および食事、投与の方式および時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、および特定状態の重症度によって異なり、当業者によって決定することができる。禁忌が発生した場合は、個々の医師が投与量を調整できる。投与量は変動する可能性があり、1日1回以上の用量で投与することができる。

【0067】

併用療法

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、神経変性疾患の治療のための標準治療治療薬を投与することをさらに含む。本明細書で使用される場合、「標準治療」という用語は、あるタイプの病気と診断された特定のタイプの患者に対して臨床医によって一般的に受け入れられている治療を指す。いくつかの実施形態において、標準治療治療薬は、レボドパ、ドーパミンアゴニスト、抗コリン作動剤、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、COMT阻害剤、アマンタジン、リバスチグミン、NMDAアンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤、リルゾール、抗精神病剤、抗うつ剤またはテトラベナジンである。

【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のフェノフィブラートまたはその類似体およびケンフェロールを使用する併用療法は、数分から数週間から数ヶ月の範囲の間隔で、追加の標準治療治療薬の投与に先行または後続し得る。例えば、個々のモダリティは、互いに約24時間以内、例えば、互いに約6～12時間以内、または互いに約1～2時間以内、または互いに約10～30分以内に投与される。状況によっては、ただし、個々のモダリティのそれぞれの投与の間に数日間（2、3、4、5、6または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）が経過する場合、治療期間を大幅に延長することが望ましい場合がある。併用療法的一方または両方の薬剤／療法による反復治療が特に企図されている。

【0069】

治療の有効性のモニタリング

PGC-1 α の誘導および活性を測定するための方法は当該技術分野で知られており、以下の実施例1に提供されている。たとえば、Ruiz et al. (2012) *Ac cardiac-specific robotized cellular assay identified families of human ligands as inducers of PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis* PLoS One: 7: e46753を参照されたい。PGC-1 α レベルは、例えば、PGC-1 α に対する抗体または他の検出手段を使用して直接評価することができる。PGC-1 α 活性は、例として、ミトコンドリア機能の調節、例えば、酸化的代謝を評価することによって検出することができ、ミトコンドリア遺伝子、例えば、LDH-2、ATP5jなどの活性または発現を検出することによって評価することができる。

【0070】

開示された方法および組成物に使用できる、組み合わせて使用できる、調製に使用できる、または製品である物質、組成物、および成分が開示される。これらおよび他の物質は、本明細書に開示されており、これらの物質の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示されている場合、それぞれのさまざまな個別、集合的な組み合わせ、またはこれらの化合物の交換の具体的な参照は、明示的に開示されていない可能性があることが理解され、それぞれが特に本明細書で企図され、説明されている。例えば、方法が開示および議論され、その方法を含む多くの分子に対して行うことができるいくつかの変更が議論される場合、特に反対の指示がない限り、その方法のありとあらゆる組み合わせおよび交換、ならびに可能な変更が具体的に企図される。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも具体的に企図され、開示される。この概念は、開示された組成物を使用する方法のステップを含むがこれらに限定されない、本開示のすべての態様に適用される

。したがって、実行できる様々な追加のステップがある場合、これらの追加のステップのそれぞれは、開示された方法の任意の特定の方法ステップまたは方法ステップの組み合わせで実行でき、そのような各組み合わせまたはサブセットは、具体的に企図されており、開示されているとみなされるべきである。

【実施例】

【0071】

実施例1－フェノフィブラートは、PGC-1 α WT (PGC-1 α +/-) およびヘテロ接合PGC-1 α ノックアウト (PGC-1 α +/-) マウスに由来する初代星状細胞におけるリポ多糖 (LPS) 誘発性炎症を阻害する

出生後のヘテロ接合性マウスからの初代星状細胞を単離して培養し、これらのヘテロ接合性ノックアウトマウスを繁殖させることによって野生型マウスを得た。星状細胞をさまざまな濃度のフェノフィブラートで一晩処理した後、0.1 ng/mL LPSで1時間処理した。全RNAを単離し、炎症誘発性サイトカインであるIL-1 β およびTNF- α の遺伝子発現をRT-PCRで測定した。結果は、フェノフィブラートがWT (PGC-1 α +/-) とヘテロ接合 (PGC-1 α +/-) の初代星状細胞の両方で抗炎症保護効果を発揮したことを示している (図1)。これらのデータは、フェノフィブラートが両方のタイプの星状細胞で活性である一方で、Ppargc1aの単一コピーを運ぶ星状細胞でより活性であることを示唆している。これは、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など、PGC-1 α レベルが病理学的に低下する神経変性疾患にも影響を与える可能性がある。

【0072】

実施例2－PPAR α は、マウス初代星状細胞におけるフェノフィブラート媒介性抗炎症効果には必要ない。

次の例は、フェノフィブラートを介した抗炎症効果が、siRNAによるPPAR α 発現のサイレンシング後のマウス初代星状細胞で抑制されなかったことを示している。

【0073】

異なる濃度のPPAR α siRNAをマウス初代星状細胞に48時間加えた。全RNAとタンパク質を収集した。PPAR α 遺伝子発現はqRT-PCRによって決定され (図2A)、タンパク質発現はウエスタンブロット分析によって決定された (図2B)。その後、10 nM PPAR α siRNAをその後の実験に使用した。 (図2C-2E) 初代星状細胞を10 nM PPAR α siRNAまたはスクランブルsiRNAで30時間処理した後、20 μ Mフェノフィブラートでさらに18時間処理した。次に、細胞を0.1 ng/mLのLPSで1時間処理した。全RNAは、PPAR α (図2C)、IL-1 β (図2D)、TNF α (図2E) 遺伝子発現のために抽出された。結果は、フェノフィブラートがt eo主要神経膠細胞集団において、PPAR α に依存しない方法で抗炎症効果を媒介したことを示している。

【0074】

実施例3－フェノフィブラートは、インビボでフェノフィブリン酸への迅速な初回通過加水分解を受ける。

経口投与後、フェノフィブラートは急速にフェノフィブリン酸に変換され、活性代謝物およびPPAR α リガンドが抗高脂血症活性の促進に関与することが報告されている [17、18]。フェノフィブラートの薬物動態が、100 mg/kgのフェノフィブラートの経口用量を受けたマウスの脳、肝臓、および血漿で測定された。フェノフィブラートの大部分は肝臓でフェノフィブリン酸に代謝された。フェノフィブリン酸のごく一部だけが血流と脳に入る (図3)。

【0075】

実施例4－抗炎症特性は、BV2細胞において、その初回通過代謝物であるフェノフィブリン酸ではなく、フェノフィブラートによって媒介される。

フェノフィブラートは、肝臓を最初に通過する間にインビボで急速に加水分解され、カルボキシルエステラーゼ酵素によってフェノフィブリン酸に代謝される。フェノフィブリン

10

20

30

40

50

酸は、経口フェノフィブラートの脂質低下特性を提供する活性部分であると報告されている。フェノフィブラートの神経保護特性が親分子に依存するのか、その一次代謝物に依存するのかは、これまで定義されていない。これは、神経変性疾患の治療としてのフェノフィブラート療法の現在の追求における大きな欠点であった。プロドラッグのフェノフィブラートはこれまでのすべてのインビトロアッセイに使用されてきたため、フェノフィブリン酸が抗炎症効果を同等に発揮できるのかも評価された。これを試験するために、BV2細胞をさまざまな濃度（0、5、10、および20 μM ）のフェノフィブリン酸（FA）または20 μM フェノフィブラートで18時間処理した後、LPSに1時間曝露した。総BV2細胞RNAは、qRT-PCR分析を介してIL-1 β 遺伝子発現のために抽出された。驚くべきことに、フェノフィブリン酸はどの濃度でもIL-1 β の発現を阻害しなかったのに対し、20 μM のフェノフィブラートは強力な抗炎症効果を発揮することが発見された（図4）。これらの結果は、フェノフィブリン酸ではなく、フェノフィブラートが以前の実験で見られた抗炎症効果を媒介したことを明らかにした。

10

【0076】

実施例5 ケンフェロールは、インビトロでのカルボキシルエステラーゼエステラーゼ（hCES1b）の阻害を介して、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解を防止する

肝臓でフェノフィブラート加水分解物をフェノフィブリン酸に還元するのに効果的な、天然に存在するエステラーゼ阻害剤としてのケンフェロールの可能性が調査された。ヒトカルボキシルエステラーゼ（CES）は、セリンエステラーゼスーパーファミリーに属し、5つのCES（1～5）グループに分類される。CES1およびCES2サブファミリーは、ヒトのさまざまな生体異物および薬物の加水分解における最も重要な参加者である。ヒトCES1は肝臓内で高度に発現しており、主に内因性の加水分解酵素／エステラーゼ活性に寄与している。ヒトCES1アイソフォームは、小腸、マクロファージ、肺上皮、心臓、精巣にも低レベルで見られる。ヒトCES1Aは、hCES1b（CES1A1とも呼ばれる）とhCES1cの2つのアイソフォームにさらに分類される。研究は、hCES1bはヒト肝臓内で機能する主要な（野生型）アイソフォームであり、フェノフィブラートを含むエステル／チオエステル／アミド結合を含む基質の加水分解に重要であると示唆している。したがって、一連の研究において、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への組換えヒトCES1b媒介能力加水分解を特異的に阻害するケンフェロールの効力が、酵素阻害アッセイを使用して研究された。次に、プールされたヒト肝ミクロソーム（HLM）を使用して、他の肝エステラーゼに対するケンフェロールの全体的なエステラーゼ阻害特性を評価した。

20

30

【0077】

KmおよびVmax値の決定：最初に、ミカエリスメンテン定数（Km）、最大速度の半分が観察される基質濃度、およびVmax（反応の最大速度）値を、以下の酵素アッセイでhCES1bまたはHLMのいずれかを使用してフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解について決定した。アッセイ手順：100mM Tris-Clバッファー（pH7.4）、および組換えhCES1b（0.05mg/mL）またはプールされたHLM（1mg/mL）を含むインキュベーション混合物を37℃に温めた。異なる濃度のフェノフィブラートを添加して、10分間のアッセイを開始した。内部標準を含む停止溶液を加えることにより反応を停止させた。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）分析を使用してフェノフィブリン酸を測定するために上清を収集しながら、試料を遠心分離してタンパク質を沈殿させた。組換えhCES1b（図5A）またはHLM（図5B）のいずれかによるフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解の標準曲線をプロットした。KmおよびVmax値は、データを酵素反応速度モデルにフィッティングさせることによって計算された（表1）。

40

【0078】

50

【表 1】

表 1. マトリックス組換え hCES1b および HLM を使用したフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解の K_m および V_{max} 値。

化合物	生成物	マトリックス	$K_m(\mu M)$	$V_{max}(nmol/min/mg)$
フェノフィブラート	フェノフィブリン酸	hCES1b	6.04	28.3
		HLM	5.40	96.3

10

【0079】

ケンフェロールの阻害定数 (K_i) の決定: 次に、hCES1b (図 6A~6D) または HLM (図 7A~7D) のいずれかによるフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解を防ぐケンフェロールの阻害定数 (K_i 、最大阻害の半分を生成するために必要な濃度) が決定された。100 mM Tris-Cl バッファー (pH 7.4)、組換え hCES1b (0.05 mg/mL) またはプールされたヒト肝ミクロソーム (1 mg/mL)、および 8 つの濃度のケンフェロールまたは陽性対照阻害剤 (ビス (4-ニトロフェニル) -リン酸、BNP) を含むインキュベーション混合物を 37°C で 2 分間プレインキュベートした。次に、フェノフィブラートを添加して 10 分間の反応を開始した (最終濃度: $0.1 \times K_m$ 、 $0.3 \times K_m$ 、 $1 \times K_m$ 、 $3 \times K_m$ 、 $6 \times K_m$ 、および $10 \times K_m$)。内部標準を含む停止溶液を加えることにより反応を停止させた。試料を遠心分離してタンパク質を沈殿させ、LC-MS/MS 分析のために上清を収集した。フェノフィブリン酸は標準曲線を使用して定量化された。 K_i 値を計算し、特定の酵素阻害モデルにデータをフィッティングさせることによって阻害のタイプを決定した (表 2)。ケンフェロールは、競合阻害モデルを使用して計算した、 $36.2 \mu M$ の低い K_i 値で hCES1b 加水分解酵素活性を特異的に阻害し、 $110 \mu M$ の高い K_i 値でプールされた HLM を阻害した。

20

【0080】

【表 2】

表 2. マトリックス組換え hCES1b および HLM を使用したフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への加水分解を阻害するためのケンフェロールの K_i 値。BNP-ビス (4-ニトロフェニル) -ホスフェート-陽性対照。

30

試験化合物	マトリックス	阻害モデル							
		競合		非競合		不競合		混合	
		$K_i(\mu M)$	R^2	$K_i(\mu M)$	R^2	$K_i(\mu M)$	R^2	$K_i(\mu M)$	R^2
ケンフェロール	hCES1b	36.2	0.900	101	0.903	64.7	0.902	101	0.903
BNP		0.044	0.920	0.170	0.917	0.096	0.882	0.044	0.920
ケンフェロール	HLM	110	0.974	235	0.975	131	0.974	110	0.974
BNP		1.67	0.828	5.17	0.826	3.02	0.818	1.66	0.828

40

【0081】

したがって、これらの上記の発見は、ケンフェロールが、ヒト肝臓におけるフェノフィブラートの加水分解に関与する重要な酵素である hCES1b の加水分解酵素活性を特異的に阻害することを示唆している。したがって、ケンフェロールは、フェノフィブラートのフェノフィブリン酸への初回通過代謝を阻害し、それによってフェノフィブラートの CN

50

S バイオアベイラビリティの可能性を高めるために、フェノフィブラートと組み合わせて使用するための潜在的な候補である。

【0082】

実施例6—フェノフィブラートとケンフェロールの同時送達は、BV2細胞において相乗的な抗炎症効果を発揮する

抗炎症特性は、その活性代謝物であるフェノフィブリン酸ではなく、プロドラッグであるフェノフィブラートによって媒介されるようであるため、フェノフィブラートのバイオアベイラビリティを高めることにより、CNS内のPGC-1 α 発現を増加させることが試みられた。CNSにおけるフェノフィブラートレベルの増強は、より強力なPGC-1 α 媒介性神経保護効果をもたらすと企図された。以下の実施例は、肝臓におけるカルボキシルエステラーゼによるフェノフィブラートのフェノフィブリン酸への初回通過加水分解を阻害することにより、CNSフェノフィブラートレベルを増加させる方法を提供する。

10

【0083】

BV2細胞におけるフェノフィブラートとケンフェロールの同時送達の抗炎症効果を評価した。20 μ Mのフェノフィブラートおよび／または10または20 μ MのケンフェロールをBV2細胞に18時間添加した後、LPSに1時間曝露した。qRT-PCRによるIL-1 β およびPGC-1 α 遺伝子発現の測定のために細胞溶解物を収集した。ケンフェロール治療のみでIL-1 β の発現が抑制され（図7A）、報告されている抗炎症性を裏付けている[20]。フェノフィブラートとケンフェロールの同時送達は、相乗的な抗炎症効果ではないにしても、相加効果を発揮し（図7A）、神経炎症の基礎レベルを特徴とする疾患では併用療法が有効である可能性があることを示唆している。しかし、ケンフェロールが高用量で送達された場合、ケンフェロールはフェノフィブラートを介したPGC-1 α 遺伝子のアップレギュレーションをわずかに抑制したようであった（図7B）。

20

【0084】

実施例7—フェノフィブラートとケンフェロールの同時送達は、マウスのインビボでの脳フェノフィブラートレベルを増加させた

次に、ケンフェロールがインビボで脳のフェノフィブラートレベルを増強する能力を、ナイーブなC57／BLマウスで評価した。C57／BL6マウスは、グループA（n=28）とグループB（n=28）の2つのグループに分けられた。グループAのC57／BL6マウスは、ケンフェロール（50mg／kg）で2日間前処置され、3日目にケンフェロール（50mg／kg）とフェノフィブラート（100mg／kg）の組み合わせが投与された。グループBのマウスはビヒクルを2日間投与され、3日目にフェノフィブラート（100mg／kg）のみが投与された。すべての薬物投与は強制経口投与によって行われた。続いて、薬物投与後の7つの異なる時点、それぞれ0、1、2、4、8、12および24時間でマウスを殺した。脳組織を採取し、直ちに液体窒素で凍結し、分析まで-80℃で保存した。凍結した脳組織をメタノール：水混合物（20：80）でホモジナイズし、遠心分離してタンパク質を沈殿させ、上清を収集して、LC-MS／MSを介してフェノフィブラートとフェノフィブリン酸の定量レベルを測定した。ケンフェロールとフェノフィブラートの同時送達は、脳のフェノフィブラート（図9A）とフェノフィブリン酸（図9B）のレベルがピークに達したと思われる1時間の時点で増加した。フェノフィブラートとケンフェロールの両方を投与されたマウスでは、フェノフィブラートのみを投与されたマウスと比較して、フェノフィブラートとフェノフィブリン酸のレベルが少なくとも4～8（それぞれFとFA）時間高濃度に維持された。これらのマウスのインビボの結果は、ケンフェロール投与が脳のフェノフィブラートレベルを高めるために使用できることを示唆している。

30

40

【0085】

実施例8—フェノフィブラートおよびケンフェロールの同時送達は、パーキンソン病（PD）のMPTPマウスモデルにおける神経保護を増強した。

ケンフェロールとフェノフィブラートの同時送達の神経保護効果は、PDのマウスモデルで研究された。13週齢で、C57／BL6マウスをMPTP（30mg／kg）または

50

生理食塩水（腹腔内）のいずれかで5日間連続して治療し、続いて14日間の腹腔内生理食塩水または腹腔内フェノフィブラートおよび／またはケンフェロール治療を行った。C57／BL6マウスは、1グループあたり8匹の動物からなる8つのグループに分けられた。グループA：生理食塩水＋生理食塩水治療、グループB：MPTP＋生理食塩水治療、グループC：MPTP＋150mg／kgフェノフィブラート、グループD：MPTP＋150mg／kgフェノフィブラートおよび50mg／kgケンフェロール治療、グループE：MPTP＋150mg／kgフェノフィブラートおよび100mg／kgケンフェロール治療、グループF：MPTP＋200mg／kgフェノフィブラート、グループG：MPTP＋200mg／kgフェノフィブラートおよび50mg／kgケンフェロール治療、グループH：MPTP＋200mg／kgフェノフィブラートおよび100mg／kgケンフェロール治療。治療の終わりに、これらの動物を殺し、パラホルムアルデヒド（PFA）で灌流し、免疫組織化学的分析のために脳切片をチロシンヒドロキシラーゼ（TH）で染色した。5日間のMPTP（30mg／kg）亜慢性治療は、生理食塩水治療マウス（図10A、11A）と比較した場合、黒質（図10B）のドーパミン作動性ニューロンの有意な喪失を誘発し、線条体（図11B）の神経突起喪失を伴うことが観察された。その後のフェノフィブラート治療（150および200mg／kg）は、MPTPに誘導される黒質ニューロン（図10C、10F）および線条体神経突起（図11C、11F）の喪失を防ぎ、我々の以前の発見を確認した。フェノフィブラート（150mg／kg）とケンフェロール（50mg／kg）の同時投与は、フェノフィブラート単独での治療と比較して神経保護効果を増加させ（図10D、11D）、ケンフェロールがMPTP誘発神経毒性を防ぐために相加的に作用することを示している。しかし、非常に高用量のフェノフィブラートと高用量のケンフェロール（100mg／kg）の同時投与は、神経保護の改善を示さず（図10I、11I）、最大の神経保護を引き出すためにはこれら2つの薬剤を一定の質量比で送達する必要があることを示している。

10

20

30

40

【0086】

例9－緑茶とケーパーはケンフェロールとその誘導体の潜在的な天然源である神経変性障害および外傷性脳損傷のリスクがあるかまたはそれらに苦しんでいる患者を治療するための神経保護療法としての、ケンフェロールとフェノフィブラートの同時投与が特に企図されている。ケンフェロールは抗炎症剤として固有の活性を持っており、栄養補助食品として個別に処方することができる。したがって、ケーパーや緑茶などの分子を含む天然資源中のケンフェロールの相対量を、トリプル四重極MS（TQ－MS）分析を使用して調査した。地元の小売店で購入した5つの異なるブランドのケーパー（Mezzetta、IPS、Napoleon、Isola、Fanti）と3つのブランドの緑茶（Bigelow、Lipton、Tetley）。ケーパーを室温でMeOH：水（1：1）で24時間抽出し、緑茶を沸騰水中で3分間抽出した。TQ－MSの結果は、緑茶抽出物（14～50ng／ml／g）と比較してケーパー抽出物（160～505ng／ml／g）に大量の「遊離」ケンフェロールが存在することを示した（図15A）。一方、2つの抽出物の四重飛行時間（QTOF）MS定性分析（それらのm／zあたり）が、ケーパー抽出（ $4 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ AU）（図12B、12C）と比較して、緑茶抽出物中に含まれるケンフェロール誘導体は1～2桁高いレベル（ $5 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$ AU）を示した。TQ－MSは、「遊離」ケンフェロールの量のみを与え、含まれているケンフェロール誘導体（複雑な分子と結合）は与えない。後者は、QTOF MS定性分析によって決定される。全体として、結果は、緑茶抽出物とその分子の代替源を提供する可能性のあるケンフェロール誘導体を大量に含んでいることを示唆している。

【0087】

本明細書で引用されている刊行物およびそれらが引用される資料は、参照によりその全体が具体的に本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態について説明されている。それにもかかわらず、様々な修正がなされ得ることが理解されるであろう。したがって、他の実施形態は以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

【0088】

50

参考文献：

1. Agarwal, S., A. Yadav, and R. K. Chaturvedi, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. [0089]
2. Carta, A. R., et al., Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model. *Neuroscience*, 2011. 194: p. 250-61. [0090] 10
3. Combs, C. K., et al., Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci*, 2000. 20 (2) : p. 558-67. [0091] 20
4. Mandrekar-Colucci, S., J. C. Karlo, and G. E. Landreth, Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2012. 32 (30) : p. 10117-28. [0092]
5. Mandrekar-Colucci, S., et al., PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases. *ASN Neuro*, 2013. 5 (5) : p. e00129. [0093] 30
6. Pisanu, A., et al., Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2014. 71: p. 280-91. [0094] 40
7. Wu, Z., et al., Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 1999. 98 (1) : p. 115-24. [0095]
8. Eschbach, J., et al., PGC-1alpha is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 2013. 22 (17) : p. 3477-84. 50

[0096]

9. Qin, W. , et al. , PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. Arch Neurol, 2009. 66 (3) : p. 352-61.

[0097]

10. Zheng, B. , et al. , PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. Sci Transl Med, 2010. 2 (52) : p. 52ra73.

10

[0098]

11. Ventura-Clapier, R. , A. Garnier, and V. Veksler, Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. Cardiovasc Res, 2008. 79 (2) : p. 208-17.

[0099]

12. Chanda, D. , et al. , Fenofibrate differentially regulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. Hepatology, 2009. 50 (3) : p. 880-92.

20

[0100]

13. Steinberg, G. R. and B. E. Kemp, AMPK in Health and Disease. Physiological reviews, 2009. 89 (3) : p. 1025-78.

[0101]

14. Jager, S. , et al. , AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via a direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. 104 (29) : p. 12017-22.

30

[0102]

15. Handschin, C. , et al. , An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. 100 (12) : p. 7111-6.

40

[0103]

16. Chen, L. W. , et al. , Activating mitochondrial regulator PGC-1alpha expression by astrocytic NGF is a therapeutic strategy for Huntington's disease. Neuropharmacology, 2012. 63 (4) : p. 719-32.

[0104]

50

17. Caldwell, J., The biochemical pharmacology of fenofibrate. *Cardiology*, 1989. 76 Suppl 1: p. 33-41; discussion 41-4.
[0105]
18. Godfrey, A. R., J. Digiacinto, and M. W. Davis, Single-dose bioequivalence of 105-mg fenofibric acid tablets versus 145-mg fenofibrate tablets under fasting and fed conditions: a report of two phase I, open-label, single-dose, randomized, crossover clinical trials. *Clin Ther*, 2011. 33 (6): p. 766-75. 10
[0106]
19. Calderon-Montano, J. M., et al., A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*, 2011. 11 (4): p. 298-344.
[0107]
20. Chen, A. Y. and Y. C. Chen, A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*, 2013. 138 (4): p. 2099-107. 20
[0108]
21. Roth, A., W. Schaffner, and C. Hertel, Phyt oestrogen kaempferol (3, 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone) protects PC12 and T47D cells from beta-amyloid-induced toxicity. *J Neurosci Res*, 1999. 57 (3): p. 399-404.
[0109]
22. Ono, K., et al., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2003. 87 (1): p. 172-81. 30
[0110]
23. Choi, S. M., et al., Effects of Flavonoid Compounds on beta-amyloid-peptide-induced Neuronal Death in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Chonnam Med J*, 2014. 50 (2): p. 45-51. 40
[0111]
24. Hou, Y., et al., Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. *Neuropharmacology*, 2010. 58 (6): p. 911-20.
- [0112]
25. Lei, Y., et al., インビボ investigation on the potential of galangin, kaempferol and myricetin for protection of D-galactose-

induced cognitive impairment. Food Chem, 2012. 135 (4) : p. 2702-7.

[0113]

26. Ablat, N., et al., Neuroprotective Effects of a Standardized Flavonoid Extract from Safflower against a Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. Molecules, 2016. 21 (9) .

[0114]

27. Ren, R., et al., Neuroprotective Effects of A Standardized Flavonoid Extract of Safflower Against Neurotoxin-Induced Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease. Sci Rep, 2016. 6 : p. 22135. 10

[0115]

28. Li, S. and X. P. Pu, Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. Biol Pharm Bull, 2011. 34 (8) : p. 1291-6. 20

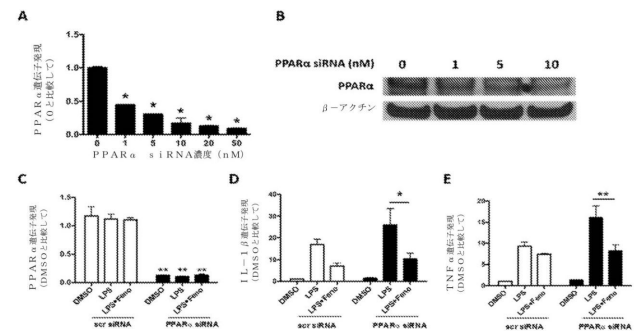
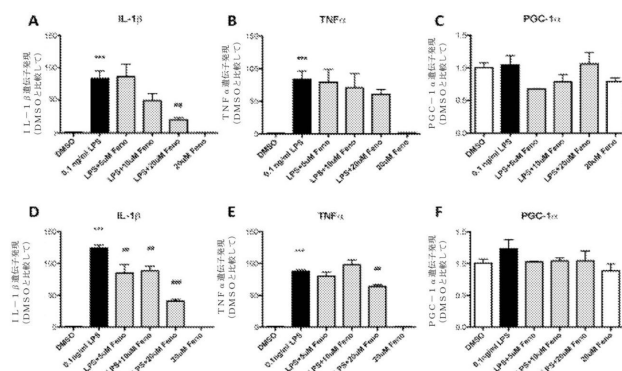
[0116]

29. Datla, K. P., et al., The antioxidant drink effective microorganism-X (EM-X) pre-treatment attenuates the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesion rat model of Parkinson's disease. J Pharm Pharmacol, 2004. 56 (5) : p. 649-54.

【図面】

【図 1】

【図 2】

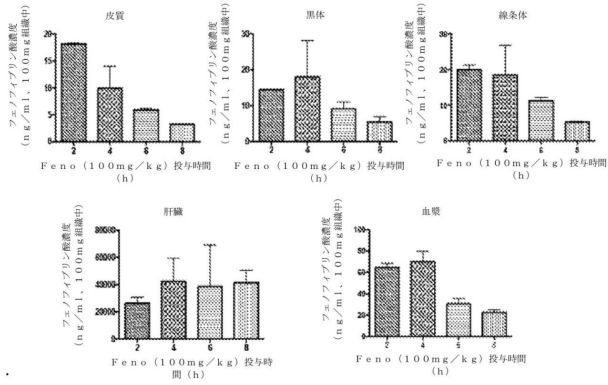


30

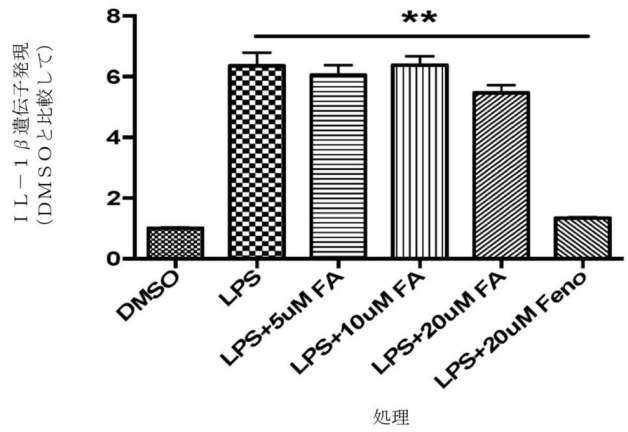
40

50

【図 3】

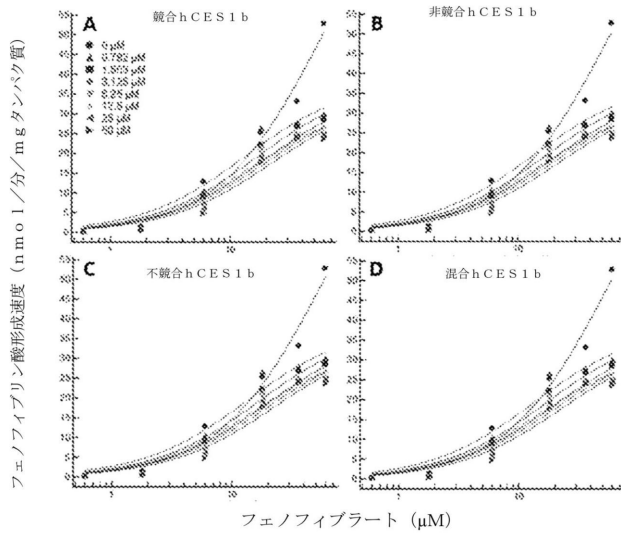


【図 4】

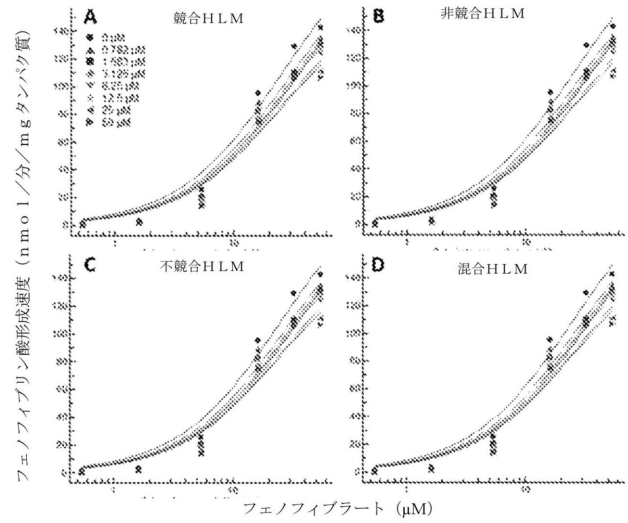


10

【図 5】



【図 6】



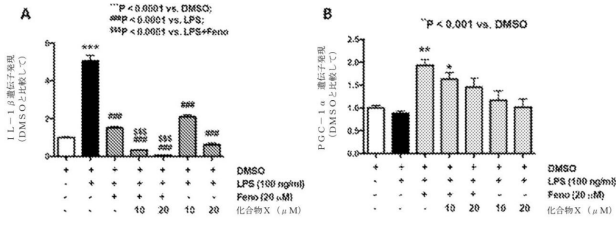
20

30

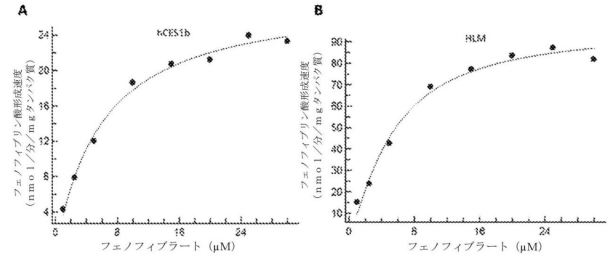
40

50

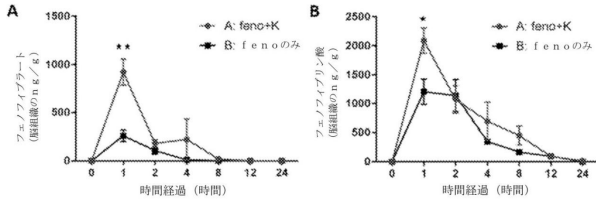
【図 7】



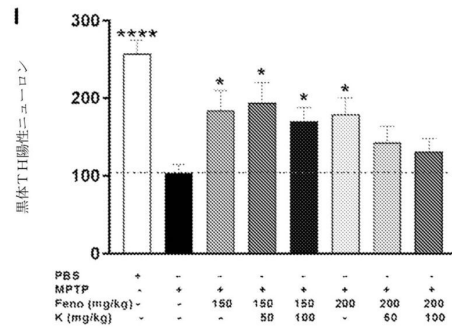
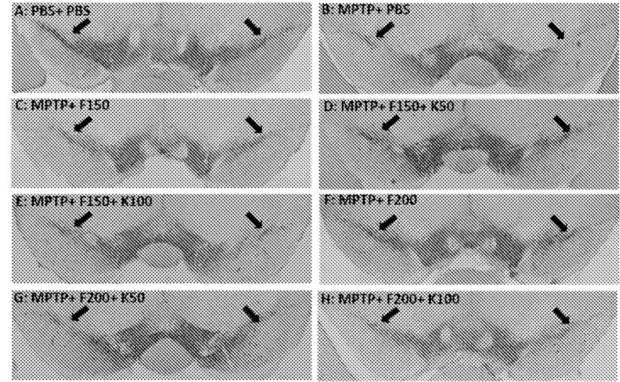
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

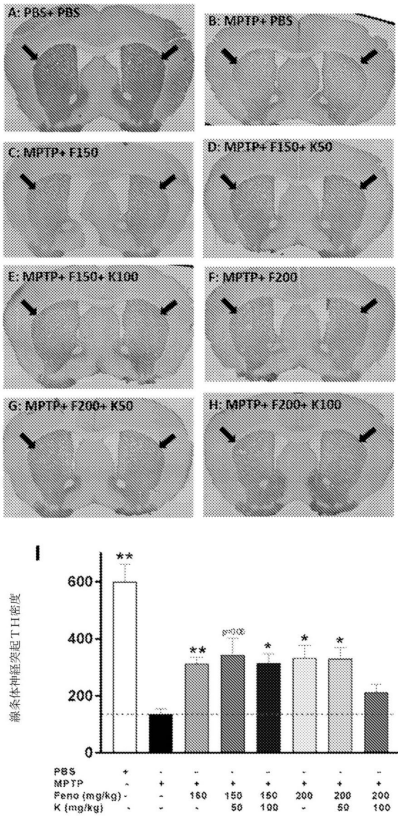
20

30

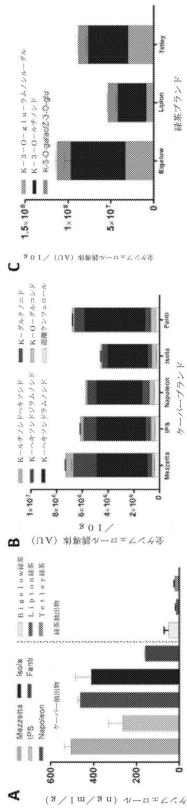
40

50

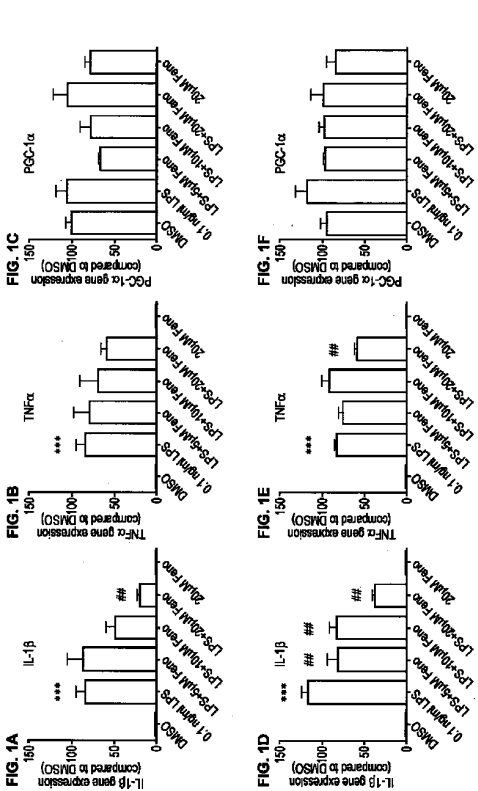
【図 1 1】



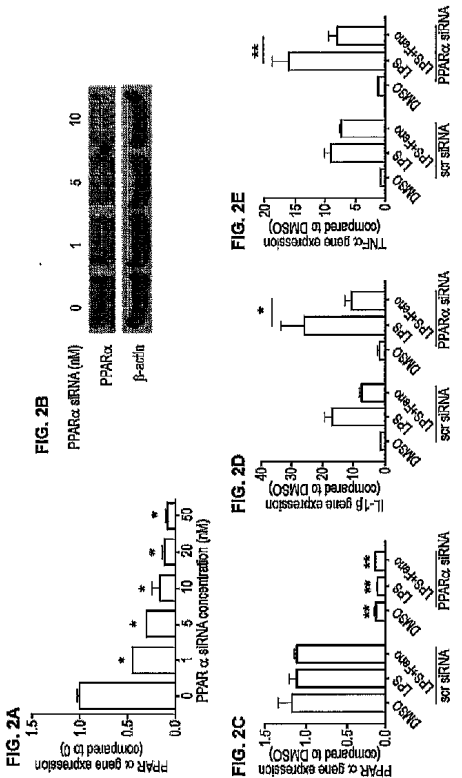
【図 1 2】



【図】



【図】



10

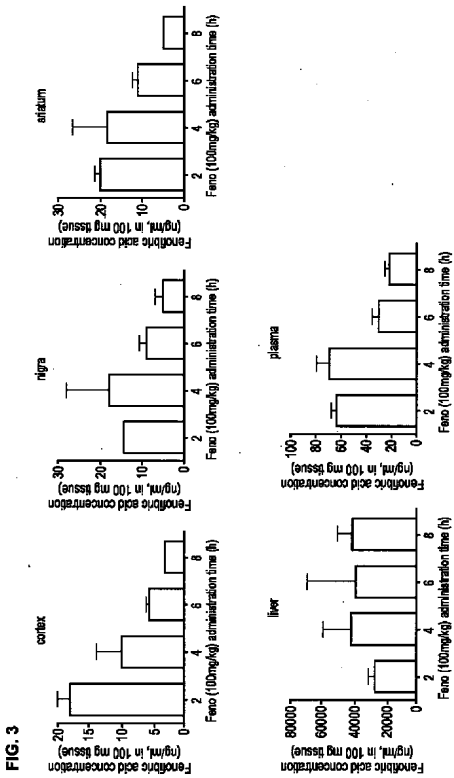
20

30

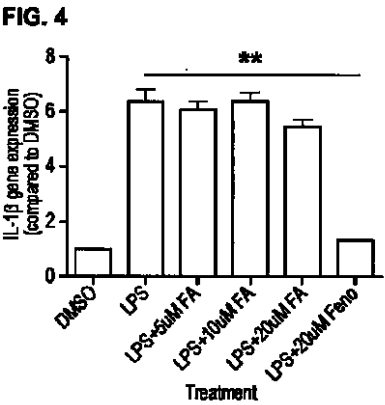
40

50

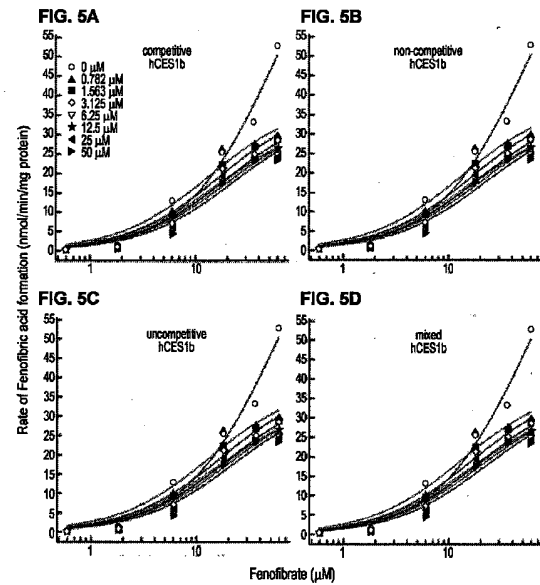
【図】



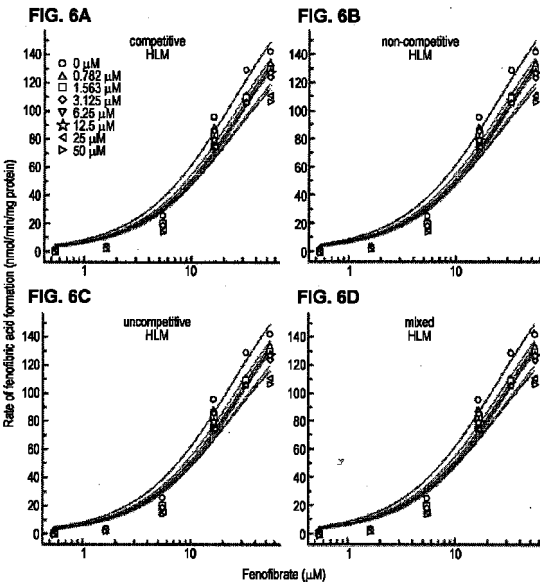
【図】



【図】



【図】



10

20

30

40

50

【 図 】

FIG. 12A

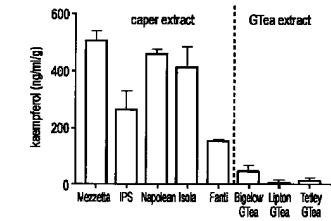


FIG. 12B

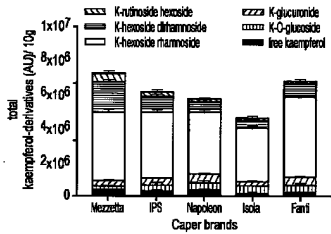
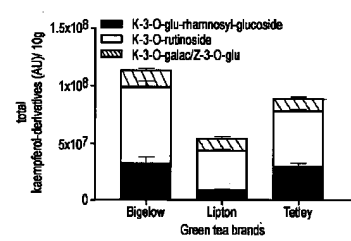


FIG. 12C



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/16820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 31/4164; A61K 31/496; A61K 45/06 (2020.01)

CPC - A61K 31/12; A61K 31/122; A61K 31/194; A61K 31/327

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0276393 A1 (Milburn et al.) 07 December 2006 (07.12.2006); para[0010] para[0148]	1-6, and 16-17
Y	US 2016/0220523 A1 (Georgetown University) 04 August 2016 (04.08.2016); Abstract para[0003] para[0020] para[0046]	1-6, and 16-17
A	WO 2013/049621 A1 (The Board Of Regents Of The University Of Oklahoma) 04 April 2013 (04.04.2013); Abstract	1-6, and 16-17
A	US 2011/0077232 A1 (Monopoli et al.) 31 March 2011 (31.03.2011); entire document	1-6, and 16-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 July 2020

Date of mailing of the international search report

11 SEP 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/16820

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-15, 27-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

—See Supplemental Box—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-6, and 16-17

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 20/16820

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-6, and 16-17 directed to a method for treating a neurodegenerative disease in a subject comprising administering fenofibrate and kaempferol to a subject in need thereof

10

Group II: Claims 18-23 directed to a method to prevent/reduce the first-pass metabolism of fenofibrate to fenofibric acid and thereby augment levels of fenofibrate in a subject comprising administering a combination of fenofibrate and kaempferol in a molar ratio sufficient for reducing first pass metabolism of fenofibrate

Group III: Claims 24-26 directed to a method of inducing PGC-1 α expression in a neural cell or a neural progenitor cell comprising contacting a neural cell or a neural progenitor cell with fenofibrate and kaempferol

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I requires a method for treating a neurodegenerative disease, not required by groups II-III

Groups II requires a method to prevent/reduce the first-pass metabolism of fenofibrate to fenofibric acid and thereby augment levels of fenofibrate in a subject, not required by groups I and III

Groups III requires a method of inducing PGC-1 α expression in a neural cell or a neural progenitor cell, not required by groups I-II

20

Common Technical Features:

Groups I-III share the technical feature of a method comprising administering fenofibrate and kaempferol to a subject in need thereof. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being obvious over US 2006/0276393 A1 to Milburn et al. (hereinafter 'Milburn'), in view of US 2016/0220523 A1 to Georgetown University (hereinafter 'Georgetown'). Milburn teaches a method comprising administering PPAR agonist and kaempferol to a subject in need thereof (para[0010] "In another embodiment, the invention provides a method for treating or preventing a neurodegenerative disease or disorder comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of at least one sirtuin-activating compound in combination with at least one PPAR agonist", para[0148] "In one embodiment, exemplary sirtuin-activating compounds are those described in Howitz et al. (2003) Nature 425: 191 and include, for example, Kaempferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavone)", but does not teach wherein the PPAR agonist is fenofibrate. However, Georgetown teaches fenofibrate is a can be used to treat a neurodegenerative disease (Abstract "Provided herein are methods of treating or preventing a neurodegenerative by administering fenofibrate or an analog thereof"). Thus, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to be motivated to apply fenofibrate as a PPAR agonist (see WO 2013/049621 A1 to The Board Of Regents Of The University Of Oklahoma (hereinafter 'Oklahoma', Abstract "The PPAR-alpha agonist is fenofibrate") to the method disclosed by Milburn by routine experimentation, in order to find the most effective combination treating neurodegenerative disease (para[0010] "In another embodiment, the invention provides a method for treating or preventing a neurodegenerative disease or disorder").

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-III lack unity under PCT Rule 13.

Note Re: Item 4: claims 7-15, and 27-34 are determined unsearchable because they are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

、ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティーセブンス・アンド・オー・ストリート (番地の表示
なし)

(74)代理人 110000523

アクシス国際特許業務法人

(72)発明者 ハワード・ジェイ・フェデロフ

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア州アーバイン、コルトレーン・コート 1

(72)発明者 スダカール・ラジャ・スブラマニウム

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア州アーバイン、ガブリエリーノ・ドライブ 1 1 0 8

(72)発明者 マッシモ・エス・フィアンダカ

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア州アーバイン、ミュラサキ・ストリート 5 1

(72)発明者 マーク・イー・マプストン

アメリカ合衆国 9 2 6 1 7 カリフォルニア州アーバイン、カロー・コート 6

(72)発明者 シアオミン・スー

アメリカ合衆国 2 0 0 5 7 ワシントン・ディーシー、ノースウエスト、サーティ・セブンス・アン
ド・オー・ストリート

F ターム (参考) 4C084 AA22 NA05 ZA021 ZA151 ZA161 ZA331 ZA941 ZC751

4C086 AA01 AA02 BA08 GA17 MA02 MA04 NA05 ZA02 ZA15 ZA16
ZA33 ZA94 ZC75

4C206 AA01 AA02 DB25 DB43 MA02 MA04 NA05 ZA02 ZA15 ZA16
ZA33 ZA94 ZC75