(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-551249
(P2023-551249A)
(43)公表日　令和5年12月7日(2023.12.7)

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ* | *31/195 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/195 | | ４Ｃ０７６ |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/27 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/27 | | ４Ｃ２０６ |
| *Ａ６１Ｐ* | *25/28 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/28 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １１１ | |
| *Ａ６１Ｋ* | *9/20 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 9/20 | | |

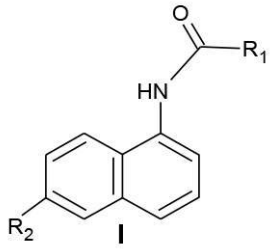
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全52頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-531700(P2023-531700)
(86)(22)出願日　令和3年11月18日(2021.11.18)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月30日(2023.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/CU2021/050012
(87)国際公開番号　WO2022/111742
(87)国際公開日　令和4年6月2日(2022.6.2)
(31)優先権主張番号　2020-0087
(32)優先日　令和2年11月24日(2020.11.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
キューバ(CU)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

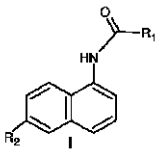
(71)出願人　521195180
セントロ デ ネウロシエンシアス デ キューバ、セネウロ
キューバ共和国 １１６００ ラ ハバナ、キューバナカン、エントレ ２５ イ ２７、ヌメロ １９８１８、カジェ １９０
(74)代理人　110000855
弁理士法人浅村特許事務所
(72)発明者　ロドリゲス ― タンティー、クリスレーヌ
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラヤ、ミラマー、ヌメロ ３０７ エスキナ テルセラ、カジェ ８８ア
(72)発明者　サブロン カラザナ、マルキザ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ラ リサ、レパルト フラガ、エントレ ３２０ イ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アルツハイマー病の治療のためのマルチターゲット治療薬としてのナフタレン誘導体の医薬組成物

(57)【要約】
本発明は、医薬化学に関し、具体的にはアルツハイマー病（ＡＤ）において影響を受けるコリン作動性、グルタミン酸作動性及びミトコンドリア系に対してマルチターゲット作用を示す化合物の医薬組成物であって、その一般式（Ｉ）がＩであるものに関する、
【化１】

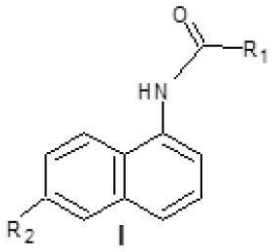


（Ｉ）
ここで、置換基Ｒ１及びＲ２は、本明細書及び特許請求の範囲に記載されている。これらの化合物の製剤は、経口、舌下、非経口、経皮、鼻腔内投与により有効性と耐性を高める。これらの化合物は、単独で、単剤療法として、現在ＡＤに使用されている多剤療法に代わって使用



(I)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アルツハイマー病の治療のためのマルチターゲット標的治療薬として作用する化合物の医薬組成物であって、化合物が式Ｉの化合物の群から選択されることを特徴とする医薬組成物。
【化１】



ここで
$R_1$：－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－アルキレニル－$R_3$、－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$R_4$；
$R_3$：－ＣＯＯＨ、－ＯＨ、－ＳＨ、－$NH_2$、－ＮＨ－アルキル－、－ＮＨ－アルキレニル－$NH_2$、－ＮＨ－アルキレニル－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－アルキレニル－Ｓ－$R_5$、－ＮＨ－ジチオカルバマートアルキル、－Ｎ－アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は薬学上許容できる上記の基の塩、
$R_4$：スクシンイミジル基
$R_5$：－Ｈ、－Ｃ（Ｏ）－アルキル、－Ｃ（Ｏ）－$C_6H_5$；及び
$R_2$：－Ｈ、－アルキル、
用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（－$CH_2$－）、エチレニル（－$CH_2CH_2$－）、又はプロピレニル（－$CH_2CH_2CH_2$－）を指す、
ここで、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含有する、
ここで、これらの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝産物、プロドラッグは、生きている哺乳動物の脳の血液脳関門を通過する。
【請求項２】
組成物が、脳内コリン作動性細胞と相互作用し、アセチルコリンエステラーゼの病的活性を阻害し、アセチルコリンの生理学的レベルを回復させることを特徴とする、請求項１記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項３】
組成物が、脳内グルタミン酸作動性細胞と相互作用し、ＮＭＤＡ受容体及びカイニン酸受容体の病的活性化を抑制し、グルタミン酸作動性系の生理学的機能を回復させることを特徴とする、請求項１記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項４】
組成物が、脳ミトコンドリアと相互作用し、ミトコンドリア膜電位の散逸を抑制し、膨潤を防止して反応性酸素種の生理学的レベルを維持することを特徴とする、請求項１記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項５】
組成物が、経口、局所、全身、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内及び鼻腔内、又はそれらの組み合わせで投与されることを特徴とする、請求項１記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項６】
錠剤の形態の医薬組成物の経口製剤が、活性成分の１ｍｇ～１００ｍｇを含有すること

を特徴とする、請求項１及び５に記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項７】

医薬組成物の錠剤が、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ））、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ及びポリビニルピロリドン、又はそれらの組み合わせの群から選択される、ポリマーマトリックスを含有することを特徴とする、請求項１及び６記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項８】

医薬組成物の錠剤のマトリックスが５％ｗ／ｗ～８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％ｗ／ｗ～７０％ｗ／ｗの割合であることを特徴とする、請求項７に記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項９】

医薬組成物の鼻腔用製剤が、１用量当たり活性成分の０．１ｍｇ～２５ｍｇを含有することを特徴とする、請求項１及び５に記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項１０】

医薬組成物の鼻腔用製剤が、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）及びポリアクリル酸（カルボール）誘導体、又はそれらの組み合わせの群から選択した、生体接着性賦形剤を０．０５～６％の割合で含有することを特徴とする、請求項１及び９のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項１１】

該医薬組成物の鼻腔用製剤が１０～６０ｍＰａｓの粘度を有することを特徴とする、請求項１及び１０に記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項１２】

医薬組成物の鼻腔用製剤が、０．０９～１．８％の濃度のＰＥＧ；０．０８～１％の濃度のトコフェロール；０．００７～０．４７％の濃度の塩化ベンザルコニウム、０．００３～０．１９％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウム、及び０．００５～０．０４％の濃度のプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌性防腐剤；及び３．５～５．５％の濃度のグリセロール、０．１７～０．３８％の濃度のＴｗｅｅｎ　８０、又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を含有することを特徴とする、請求項１、９、１０及び１１のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項１３】

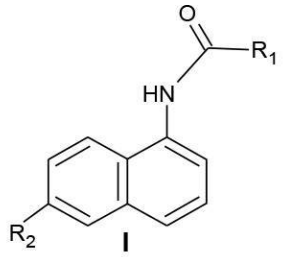
医薬組成物の鼻腔用製剤が５．５～６．５、好ましくは６．３のｐＨを有することを特徴とする、請求項１及び１２記載のマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項１４】

アルツハイマー病の単剤治療のための方法であって、該方法は以下を含むことを特徴とする上記方法：

ａ）式Ｉのマルチターゲット作用を有する化合物の医薬組成物を投与する、

【化２】



ここで
$R_1$：－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－アルキレニル－$R_3$、－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$R_4$；
$R_3$：－ＣＯＯＨ、－ＯＨ、－ＳＨ、－$NH_2$、－ＮＨ－アルキル－、－ＮＨ－アルキレニル－$NH_2$、－ＮＨ－アルキレニル－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－アルキレニル－Ｓ－$R_5$、－ＮＨ－ジチオカルバマートアルキル、－Ｎ－アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は薬学的に許容できる上記の基の塩、
$R_4$：スクシンイミジル基；
$R_5$：－Ｈ、－Ｃ（Ｏ）－アルキル、－Ｃ（Ｏ）－$C_6H_5$；及び
$R_2$：－Ｈ、－アルキル、
用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の直鎖又は分枝脂肪族鎖、好ましくはメチル又はエチルであることを特徴とし、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（－$CH_2$－）、エチレニル（－$CH_2CH_2$－）、又はプロピレニル（－$CH_2CH_2CH_2$－）を指す、
ここで、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含有する、
ここで、医薬組成物は、経口、局所、全身、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内及び鼻腔内の経路、又はそれらの組み合わせによって投与される、
ｂ）ステップａ）の化合物の医薬組成物が、生きている哺乳動物の脳の血液脳関門を通過する、
ｃ）脳内コリン作動性細胞をステップｂ）の医薬組成物の化合物と接触させ、アセチルコリンエステラーゼの病的活性を阻害してアセチルコリンの生理学的レベルを回復させる、
ｄ）脳内グルタミン酸作動性細胞をステップｂ）の医薬組成物の化合物と接触させ、ＮＭＤＡ受容体及びカイニン酸受容体の病的活性化を阻害して、グルタミン酸作動性系の生理学的機能を回復させる、及び
ｅ）脳ミトコンドリアをステップｂ）の医薬組成物の化合物と接触させ、ミトコンドリア膜電位の散逸を抑制し、膨潤を防止して反応性酸素種の生理学的レベルを維持する。
【請求項１５】
錠剤の形態の経口医薬組成物が、１ｍｇ～１００ｍｇの活性成分を含有することを特徴とする、請求項１４のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。
【請求項１６】
錠剤がポリマーマトリックスを含有し、このマトリックスは、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ、ポリビニルピロリドン又はその組み合わせの群から選択されることを特徴とする、請求項１４及び１５記載のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。
【請求項１７】
錠剤のマトリックスが５％ｗ／ｗ～８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％ｗ／ｗ～７０％ｗ／ｗの割合であることを特徴とする、請求項１４及び１６のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。
【請求項１８】

錠剤が、澱粉、乳糖、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、及び他の糖類、タルク、コロイド状二酸化ケイ素、カーボナート、酸化マグネシウム、リン酸カルシウム、二酸化チタン、ポビドン、ゼラチン、乳タンパク質、シトラート、タートラート、アルギナート、デキストラン、シリコーンエラストマー、ポリソルベート、アミロペクチン、パラベン、動植物油、プロピレングリコール、滅菌水、一価又は多価アルコール、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリルフマル酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、又はそれらの組合せの群から選択される賦形剤を使用することを特徴とする、請求項１４及び１５に記載のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

【請求項１９】

鼻腔用医薬組成物が０．１ｍｇ～２５ｍｇの活性成分を含有することを特徴とする、請求項１４のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

【請求項２０】

鼻腔用製剤が、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）及びポリアクリル酸（カルボール）誘導体、又はそれらの組み合わせの群から選択される、生体接着性賦形剤を０．０５～６％の割合で含有することを特徴とする、請求項１４及び１９のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

【請求項２１】

鼻腔用製剤が１０～６０ｍＰａｓの粘度を有することを特徴とする、請求項１４及び２０のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

【請求項２２】

鼻腔用製剤が、ＰＥＧ；トコフェロール；塩化ベンザルコニウム、ＥＤＴＡ二ナトリウム、メチルパラベン及びプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌防腐剤：並びにグリセロール及びＴｗｅｅｎ８０又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を含有することを特徴とする、請求項１４及び１９のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

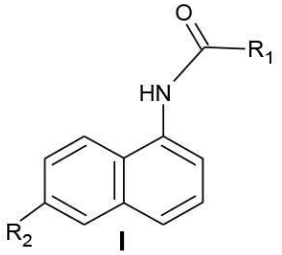
【請求項２３】

鼻腔用製剤は、６～７．５、好ましくは６．３のｐＨを有することを特徴とする、請求項１及び２２のアルツハイマー病の単剤治療のための方法。

【請求項２４】

アルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物であって、該化合物が式Ｉを有する化合物の群から選択されることを特徴とする、医薬組成物

【化３】




Ｉ

ここで

$R_1$：‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）ＮＨ‐アルキレニル‐$R_3$、‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）Ｏ‐Ｒ４；

$R_3$：‐ＣＯＯＨ、‐ＯＨ、‐ＳＨ、‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキル‐、‐ＮＨ‐アルキレニル‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキレニル‐ＮＨ‐Ｃ（Ｏ）‐アルキレニル‐Ｓ‐$R_5$、‐ＮＨ‐ジチオカルバマートアルキル、‐Ｎ‐アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は薬学上許容できる上記の基の塩、

$R_4$：スクシンイミジル基；

$R_5$：‐Ｈ、‐Ｃ（Ｏ）‐アルキル、‐Ｃ（Ｏ）‐$C_6H_5$；及び
$R_2$：‐Ｈ、‐アルキル。
用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（‐$CH_2$‐）、エチレニル（‐$CH_2CH_2$‐）、又はプロピレニル（‐$CH_2CH_2CH_2$）を指す、
ここで、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含有する、
ここで、これらの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝産物、プロドラッグは、生きている哺乳動物の脳の血液脳関門を通過する。
【請求項２５】
組成物が、脳内コリン作動性細胞と相互作用し、アセチルコリンエステラーゼの病的活性を阻害し、アセチルコリンの生理学的効果のレベルを回復させることを特徴とする、請求項２４のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項２６】
組成物が、脳内グルタミン酸作動性細胞と相互作用し、ＮＭＤＡ受容体及びカイニン酸受容体の病的活性化を抑制し、グルタミン酸作動性系の生理学的機能を回復させることを特徴とする、請求項２４のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項２７】
組成物が、脳ミトコンドリアと相互作用し、ミトコンドリア膜電位の散逸を抑制し、膨潤を防止して反応性酸素種の生理学的レベルを維持することを特徴とする、請求項２４記載のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項２８】
組成物が、経口、局所、全身、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、鼻腔内又はそれらの組み合わせで投与されることを特徴とする、請求項２４記載のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項２９】
錠剤の形態の経口医薬組成物が、活性成分の１ｍｇ～１００ｍｇを含有することを特徴とする、請求項２４及び２８に記載のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項３０】
医薬組成物、錠剤が、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ及びポリビニルピロリドン、又はそれらの組み合わせの群から選択される、ポリマーマトリックスを含有することを特徴とする、請求項２４及び２９のアルツハイマー病の治療で使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項３１】
医薬組成物錠剤のマトリックスが５％ｗ／ｐａ８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％ｗ／ｗ～７０％ｗ／ｗの割合であることを特徴とする、請求項３０記載のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項３２】
鼻腔用医薬組成物が、１用量あたり０．１ｍｇ～２５ｍｇの活性成分を含有することを特徴とする、請求項２４及び２８のアルツハイマー病の治療において使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。
【請求項３３】
鼻腔用製剤が、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（Ｃ

ＭＣ）及びポリアクリル酸の誘導体（カルボール）、又はそれらの組み合わせの群から選択される、生体接着性賦形剤を０．０５～６％の割合で含有することを特徴とする、請求項２４及び３２のアルツハイマー病の治療で使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項３４】

鼻腔用製剤が１０～６０ｍＰａｓの粘度を有することを特徴とする、請求項２４及び３３記載のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項３５】

鼻腔用製剤が、０．０９～１．８％の濃度のＰＥＧ；０．０８～１％の濃度のトコフェロール；０．００７～０．４７％の濃度の塩化ベンザルコニウム、０．００３～０．１９％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウム、０．００５～０．０４％の濃度のプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌防腐剤、及び３．５～５．５％の濃度のグリセロール、及び０．１７～０．３８％の濃度のＴｗｅｅｎ　８０、又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を含有することを特徴とする、請求項２４、３２及び３４のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【請求項３６】

鼻腔用製剤が５．５～６．５、好ましくは６．３のｐＨを有することを特徴とする、請求項２４及び３５のアルツハイマー病の治療に使用するためのマルチターゲット治療薬として作用する化合物の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、医薬化学に関連し、アルツハイマー病（ＡＤ）の影響を受けるコリン作動性、グルタミン酸作動性、及びミトコンドリア系の異なるメカニズムに対してマルチターゲット作用を示す式Ｉの化合物の医薬組成物に関する。これらの化合物の製剤は、経口、舌下、非経口、経皮、及び鼻腔内投与により、有効性と耐性を高める。

【０００２】

本発明は、式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、及びヒトに投与するためのプロドラッグを、ＡＤの治療のための活性物質又は原理として考慮した有効な製剤を提供することに特に有用である。

【背景技術】

【０００３】

世界人口の平均余命の延長に伴い、主として老人性認知症に関連した神経変性疾患が増加している。特に、アルツハイマー病（ＡＤ）は、６０歳以上の人口における発症率が高い（５０％～６０％）。この病気は、健忘症エピソード、見当識障害、実行・認知機能障害、幻覚、抑うつ、激越の発生を特徴とする進行性の認知症を引き起こす。

【０００４】

現在、この複雑な病因を持つ疾患を生み出す正確なメカニズムは、まだ議論中である。実験的証拠によれば、アミロイドカスケードの仮説とタウ蛋白質のリン酸化の仮説が、その起源において基本的な役割を果たすとされている（Ｈａｒｄｙ　ＪＡ，ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　１９９２；２５６：１８４－５；Ｈａａｓ　Ｃ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈｅｒｂ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ　Ｍｅｄ．２０１２；２：ａ００６２７０；Ｍｕｃｋｅ　Ｌ　ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ　Ｐｅｒｓｐｅｃｔ　Ｍｅｄ．２０１２；２：ａ００６３３８）。しかし、ミトコンドリア活性の変化、神経炎症仮説、代謝の役割に関する仮説（コレステロールやインスリンに関連する）、樹状突起仮説など、科学的知見によって支持される別の代替仮説も存在する。（Ｃａｓｔｅｌｌｏ　ＭＡ　ｅｔ　ａｌ．Ａｇｉｎｇ　Ｒｅｓ　Ｒｅｖ．２０１３；１２：２８２‐８；Ｃａｓｔｅｌｌｏ　ＭＡ　ｅｔ　ａｌ．Ａｇｉｎｇ　Ｒｅｓ　Ｒｅｖ．２

０１４；１３：１０‐２；Ｄｒａｃｈｍａｎ ＤＡ．ｉｎ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ Ｄｅｍｅｎｔ ２０１４；１０：３７２‐８０；Ｆｅｒｒｅｉｒａ ＳＴ ｅｔ ａｌ．Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ Ｄｅｍｅｎｔ ２０１４；１０（１ Ｓｕｐｐｌ）：Ｓ７６‐８３；Ｄｅ Ｆｅｌｉｃｅ ＦＧ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｄｉａｂｅｔｅｓ ２０１４；６３：２２６２‐７２；Ｄｅ Ｆｅｌｉｃｅ ＦＧ ｉｎ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２０１３；１２３：５３１‐９；Ｃｏｃｈｒａｎ ＪＮ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ Ｂｕｌｌ．２０１４；１０３：１８‐２８）。

【０００５】

一般に、ＡＤの神経病理は、炎症性免疫反応として現れ、脳内で自然免疫系と適応免疫系の両方が活性化し、β‐アミロイドペプチド（βＡ）とタウタンパク質の凝集を伴う神経化学カスケードを引き起こす。アミロイド線維やプラークの存在は、補体の活性化、ミクログリア、サイトカイン（ケモカイン）の放出、そして最後に拡散性の神経毒性を順次発生させることが示唆されている（Ｒｅｉｔｚ Ｃ．ｉｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ．２０１２ Ｊａｎ；２０１２：３６９８０８；Ｒｏｄｒｉｇｕｅ Ｋ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｐｓｙｃｈｏｌ Ｒｅｖ．２００９ Ｄｅｃｅｍｂｅｒ；１９（４）：４３６‐４５０．Ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ１１０６５‐００９‐９１１８‐ｘ；Ｂａｔｅｍａｎ，ＲＪ ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ ｄｉｓｅａｓｅ．Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ Ｍｅｄ．３６７，７９５‐８０４，２０１２；Ｋａｒｒａｎ，Ｅ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．１０，６９８‐７１２，２０１１）。一方、Ｓｏｙｏｎ Ｈｏｎｇらは Ｓｃｉｅｎｃｅ（２０１６，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．ａａｄ８３７３）で、無症候性ＡＤの初期段階には、βＡプラークの沈着前に補体とミクログリア、特にＣ１ｑタンパク質の増加を介した早期のシナプス消失があることを記載している。また、Ｃ１ｑの過剰発現には、βＡペプチドの初期凝集状態への関与が重要であることが知られている。脳における免疫反応としての慢性炎症は、多くの変性疾患において進行性の神経細胞死に重要な役割を担っている。そのため、常在するミクログリア細胞に付着した浸潤マクロファージや単球を含む食細胞系は、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン１（ＩＬ１）などのサイトカインや、ＡＤに関与する反応性酸素種（ＥＲＯＳ）、窒素（ＥＮＳＯ）を過剰量産生する。与えられた刺激に対するこの一連の反応は、局在するグリア細胞によって維持される攻撃の悪循環を引き起こし、それが貪食攻撃を誘発し、ニューロンを不可逆的に損傷させる（Ｍａｌｍ ＴＭ，ｉｎ Ｎｅｕｒｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１５，１２：８１‐９３；ＥｌＡｌｉ Ａ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｂｒａｉｎ，Ｂｅｈａｖｉｏｒ，ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２０１５，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｂｂｉ．２０１５．０７．０２１；Ｍｉｃｈａｕｄ Ｊ．‐Ｐ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｎ，８５，４，４５０‐２，２０１５）。

【０００６】

ミトコンドリア機能障害は、ＡＤの病態生理における初期イベントとして記述されており、ＡＤ患者やトランスジェニックマウスにおいてβＡ沈着や記憶障害の前に現れる（Ｍａｕｒｅｒ，Ｉ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．Ａｇｉｎｇ ２０００，２１，４５５‐４６２；Ｃａｓｐｅｒｓｅｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＦＡＳＥＢ Ｊ．２００５，１９，２０４０‐２０４１；Ｍｏｓｃｏｎｉ，Ｌ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００８，１１４７，１８０‐１９５）。ＡＤ発症時には、βＡオリゴマーがミトコンドリアに蓄積し、エネルギー代謝の障害、酸化ストレス（ＯＥ）の増加、及びアポトーシスを引き起こす（Ｌｕｓｔｂａｄｅｒ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００４，３０４，４４８‐０４５２；Ｃａｓｐｅｒｓｅｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＦＡＳＥＢ Ｊ．２００５，１９，２０４０‐２０４１；Ｍａｎｃｚａｋ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．２００６，１５，１４３７‐１４４９）。ＡＤ患者やトランスジェニックマウスで行われた研究では、トリカルボン酸サイクルの酵素やシトクロムｃオキシダーゼの活性が常に低下していることが記載されている（Ｙａｔｅｓ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ １９９０，５５，１６２４‐１６

３０；Ｍａｕｒｅｒ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ Ａｇｉｎｇ ２０００，２１，４５５‐４６２；Ｃａｓｐｅｒｓｅｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＦＡＳＥＢ Ｊ．２００５，１９，２０４０‐２０４１；Ｌｅｕｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．２０１２，４６，１８６‐１９３）。同様のことが、トランスジェニックマウスの脳から単離されたミトコンドリアや、ＡＤの生理学の重要な要素であるＥＯの増加も見出されているβＡオリゴマーに曝露された単離ミトコンドリアについても述べられている（Ｃａｓｌｅｙ，ｅｔ ａｌ，ｉｎ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．Ｄｉｓ．２００２ａ．１０，２５８‐２６７；Ａｌｅａｒｄｉ，ＡＭ，ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｊ．Ｂｉｏｅｎｅｒｇ．Ｂｉｏｍｅｍｂｒ．２００５，３７，２０７‐２２５；Ｃａｓｐｅｒｓｅｎ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＦＡＳＥＢ Ｊ．２００５，１９，２０４０‐２０４１；Ｃｌｅｍｅｎｔｉ，ＭＥ ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．２００５，５７９，２９１３‐２９１８；Ｌｅｕｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．２０１２，４６，１８６‐１９３；Ｓｍｉｔｈ，ＭＡ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎａｔｕｒｅ １９９６，３８２，１２０‐１２１；Ｌｅｕｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．２０１２，４６，１８６‐１９３）。

【０００７】

ミトコンドリア機能障害の可能なメカニズムは、ミトコンドリア透過性遷移孔（ｍＰＴＰ）の開口と関連しており、これは$Ca^{2+}$及びＥＯ過負荷によって引き起こされ（Ｋｒｏｅｍｅｒ，Ｇ．ａｎｄ Ｒｅｅｄ，ＪＣ ｉｎ Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２０００，６，５１３‐５１９）、ｍＰＴＰ形成に寄与するプロアポトーシスタンパク質Ｂａｘなど、プロアポトーシス因子の放出を誘導する（Ｊｕｒｇｅｎｓｍｅｉｅｒ，ＪＭ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９８，９５，４９９７‐５００２；Ｍａｒｃｈ，Ｉ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９８，２８１，２０２７‐２０３１；Ｎａｒｉｔａ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９８，９５，１４６８１‐１４６８６）。その結果、アポトーシスを促進するシトクロムｃは、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子（ＡＰＡｆ‐１）と結合し、「アポトソーム」と呼ばれる複合体を形成して放出される（Ｌｉｕ，Ｘ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｃｅｌｌ １９９６，８６，１４７‐１５７；Ｙａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９７，２７５，１１２９‐１１３２）。

【０００８】

さらに、βＡに伴うミトコンドリア生体エネルギー機能障害は、グルタミン酸作動性興奮毒性を促進し、その結果、細胞死を引き起こすことが知られている。細胞のエネルギー貯蔵量を減らすことにより、細胞質膜電位が影響を受け、Ｎ‐メチル‐Ｄ‐アスパルタート（ＮＭＤＡ）受容体の$Mg^{2+}$遮断がなくなる。これにより、内因性グルタミン酸による持続的な活性化が可能になり、細胞内への$Ca^{2+}$イオンの進入が増加し、神経細胞に興奮毒性が生じ、ＡＤに特徴的な記憶障害に関連する事象が発生すると推測される（Ｚａｄｏｒｉ Ｄ．ｉｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ，２０１８，６２，５２３‐５４７）。この仮説を支持するのは、グルタミン酸拮抗薬がミトコンドリア毒素誘発性神経細胞死を減少させるという実証された事実である。これらの及び他の後続の証拠は、電子輸送チェーン及び／又はグルタミン酸受容体の活性化に関連する細胞内経路によって生成されたＲＯＳが、ニューロンの変性の原因である可能性を示唆している（Ｖｉｌｌｅｇａｓ Ｓ．ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａ Ｃｌｉｎｉｃａ，２０１５，１４５，２，７６‐８３）。

【０００９】

ＡＤは神経病理学的に複雑であることから、それが多因子疾患であることを示しているが、治療の観点からは、これまでそのようにアプローチされてこなかった。

【００１０】

規制当局から承認されている薬剤は４つしかない。これらは、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤（ＡＣｈＥＩ）とＮ‐メチル‐Ｄ‐アスパラギン酸受容体拮抗剤（ＮＭＤＡｒ）の２つのグループに属する（Ｃｈｉａｎｇ Ｋ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ａｎｎｕ Ｒｅｖ

Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｏｘｉｃｏｌ．２０１４；５４：３８１‐４０５；Ｆｒａｎｃｉｓ ＰＴ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ．２００５；２６：１０４‐１１；Ｈｕａｎｇ Ｙ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｃｅｌｌ．２０１２；１４８：１２０４‐２２．）

【００１１】

ＡＣｈＥＩとは、ドネペジル、リバスチグミン、ガランタミンのことである。これらの作用機序は、シナプス間隙のアセチルコリンエステラーゼを阻害することによりコリン作動性伝達を増加させ、したがって、ＡＤ患者の認知能力を高めることができる。ＡＣｈＥＩは、錠剤、カプセル、溶液などの即時放出型、経口投与用の放出制御型などを含む様々な製剤で提供されている（Ｖｉｌｌｅｇａｓ Ｓ．ｉｎ Ｍｅｄｉｃｉｎａ Ｃｌｉｎｉｃａ，２０１５，１４５，２，７６‐８３）。しかしながら、これらのＡＣｈＥＩは、これらの薬剤が安全性と耐性のために最大用量で投与された場合であっても、一部の患者に対して中程度の臨床的利益しか提供しない。さらに、これらの化合物は、食欲不振、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、及び体重減少を含む副作用を引き起こす（Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ２００８、Ｔｈｏｍｓｏｎ ＰＤＲ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｇｅｒｉａｔｒｉｃｓ：Ｖｏｌｕｍｅ ２０１１，１９，１；Ａｌｉ Ｔ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ ＰＬＯＳ ＯＮＥ，２０１５，７，１‐１０；Ｔｓｏｉ ＫＫＦ ｉｎ ＪＡＭＤＡ，１‐７，２０１５，ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｊａｍｄａ．２０１５．０８．００７）。

【００１２】

一方、ＮＭＤＡｒは、神経細胞のシナプス可塑性や記憶に必須な成分として働く神経伝達物質であるグルタミン酸のイオン性受容体である。これらの受容体の拮抗薬であるメマンチンは、中等度から重度のＡＤに示される神経保護効果により臨床で使用されている（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｅｘｃｅｌｌｅｎｃｅ．Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｐｐｒａｉｓａｌ ｇｕｉｄａｎｃｅ ２１７ Ｄｏｎｅｐｅｚｉｌ，ｇａｌａｎｔａｍｉｎｅ，ｒｉｖａｓｔｉｇｍｉｎｅ ａｎｄ ｍｅｍａｎｔｉｎｅ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ ｄｉｓｅａｓｅ ｗｗｗ．ｎｉｃｅ．ｏｒｇ．ｕｋ／ｇｕｉｄａｎｃｅ／ＴＡ２１７；Ｏ’Ｂｒｉｅｎ ＪＴ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ Ｐｓｙｃｈｏｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｏｘｆ Ｅｎｇｌ．２０１１；２５：９９７‐１０１９；Ｆｒａｎｃｉｓ ＰＴ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｃｉ．２００５；２６：１０４‐１１；Ｈｕａｎｇ Ｙ ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｃｅｌｌ．２０１２；１４８：１２０４‐２２）。メマンチンの副作用を軽減するために、放出制御製剤が開発され、２つの時間段階で薬物を放出することができ（ＵＳ５，３８２，６０１）、及び／又は１日１回の投与が可能になった（ＵＳ２００６／００５１４１６）。しかし、この治療法も病気の進行を止めるものではなく、ある段階での有益な効果しかなく、患者によってその効果は大きく異なる。

【００１３】

現在、この疾患に対する有効な治療法はなく、この複雑な病因の他のターゲットを見つけることを目的とした、以下のような他の治療戦略の開発が正当化されている：

- ＡＣｈ受容体拮抗薬（Ｈｏｍｅ‐ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ［ａｃｃｅｓｓｅｄ Ｍａｒｃｈ ２１，２０１６］．入手先：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／．Ｚａｗｉｅｊａ Ｐ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｇｅｒｉａｔｒ Ｇｅｒｏｎｔｏｌ．Ｉｎｔ．２０１２；１２：３６５‐７１ Ｆｒｏｌｉｃｈ Ｌ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ Ｄｉｓ．２０１１；２４：３６３‐７４。
- βＡ凝集抑制剤（Ａｉｓｅｎ ＰＳ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ａｒｃｈ Ｍｅｄ Ｓｃｉ．２０１１；７：１０２‐１１．Ｃａｌｔａｇｉｒｏｎｅ Ｃ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ Ｄｉｓ．２０１０；２０：５０９‐１６．Ｓａｌｌｏｗａｙ Ｓ，ｅｔ ａｌ ｉｎ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ．２０１１；７７：１２５３‐６２．Ｈｏｍｅ‐ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ ［ａｃｃｅｓｓｅｄ Ｍａｒｃｈ ２１，２０１

６］．入手先：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｌｉ‐ｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／）
‐　プロテアーゼ阻害剤／活性化剤（Ｙａｎ　Ｒ，ｅｔ　ａｌ．．．ｉｎ　Ｌａｎｃｅｔ　Ｎｅｕｒｏｌ．２０１４；１３：３１９‐２９．Ｖｅｌｌａｓ　Ｂ，ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｃｕｒｒ　Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ　Ｒｅｓ．２０１１；８：２０３‐１２．Ｘｉａ　Ｗ，ａｎｄ　ｃｏ．ｉｎ　Ｊ　Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ　Ｄｉｓ．２０１２；３１：６８５‐９６．）
‐　スタチンなどの脂質低下薬（Ｈｏｍｅ‐ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ［ａｃｃｅｓｓｅｄ　Ｍａｒｃｈ　２１，２０１６］．入手先：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｌｉ‐ｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／．Ｗｏｎｇ　ＷＢ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｅｐｉｄｅｍｉｏｌ　Ｄｒｕｇ　Ｓａｆ．２０１３；２２：３４５‐５８；Ｆｒｏｌｉｃｈ　Ｌ，ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｊ　Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ　Ｄｉｓ．２０１１；２４：３６３‐７４．）
‐　能動免疫療法（Ｐａｎｚａ　Ｆ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｅｘｐｅｒｔ　Ｒｅｖ　Ｃｌｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１４；１０：４０５‐１９；Ｒｙａｎ　Ｒ．ＪＭ　ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｊ　Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ　Ｄｉｓ．２００９；１７：２４３；Ｗｉｎｂｌａｄ　Ｂ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｌａｎｃｅｔ　Ｎｅｕｒｏｌ．２０１２；１１：５９７‐６０４；Ｓｃｈｎｅｅｂｅｒｇｅｒ　Ａ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ．２０１４；３７０：３２２‐３３．）
‐　受動免疫療法（Ｈｏｍｅ‐ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ［ａｃｃｅｓｓｅｄ　Ｍａｒｃｈ　２１，２０１６］入手先：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｌｉ‐ｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／．Ｐａｎｚａ　Ｆ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｅｘｐｅｒｔ　Ｒｅｖ　Ｃｌｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１４；１０：４０５‐１９；Ｓａｌｌｏｗａｙ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ．２０１４；３７０：３２２‐３３；Ｄｏｏｄｙ　ＲＳ．ｅｔ　ａｌ．Ｎ．Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ．２０１４；３７０：３１１‐２１；Ｏｓｔｒｏｗｉｔｚｋｉ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ａｒｃｈ　Ｎｅｕｒｏｌ．２０１２；６９：１９８‐２０７）。

【００１４】

これらの治療戦略は、いずれもヒトでの使用が承認されておらず、現在までにその有効性が証明されておらず、その大部分は否定的又は矛盾した結果を示してすらいる。これらの治療戦略の開発において、ＡＤ患者の脳代謝に影響を与える異なるターゲットと積極的に相互作用できる化合物を開発するというコンセプトはなかった。

【００１５】

Ｃａｒｒａｚａｎａら（ＷＯ２０１０１１８７０６Ａ４）は、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過してアミロイド斑に付着し、これらの構造を可視化するためのＳＰＥＣＴ、ＰＥＴ、ＭＲＩ技術を通じて診断薬として使用する、新しい中性、親油性、低分子量の化合物の合成を宣言する。この発明では、これらの化合物がアルツハイマー病やパーキンソン病の治療薬として使用できることが記載されている。一方、これらの著者らは、ＷＯ２０１４１３１３７４Ａ１において、これらの化合物は、可溶性オリゴマー、プレフィブリル構造、プロトフィブリル及びアミロイド生成繊維、並びにアミロイドプラークの阻害、減少、再フォールド、及び分解することができるため、この疾患の治療薬として使用することを述べている。しかし、これらの特許は、これらの化合物の抗コリン作用、抗酸化作用、抗グルタミン酸作用及び抗炎症作用を宣言しておらず、またＡＤの治療において今まで存在した困難を克服する新規な単剤療法の開発を可能にするマルチターゲット標的治療薬としての発見及び着想についても宣言していない。また、ＡＤの治療のための活性物質又は原理として、式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、ヒトへの投与のためのプロドラッグの投与のための有効な製剤を宣言するものでもない。

【００１６】

現在、放出制御型製剤の開発は、バイオ医薬品の分野で非常に精密な仕様を持つポリマー材料の使用と実質的に関連している。このため、１回の投与で薬物濃度を治療域に維持し、一定時間で連続的に放出することができる（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ，ＩＣ；Ｃｅｒｅｚ

ｏ，Ａ．；Ｓａｌｅｍ，ｉｎ ＩＩ Ｂｉｏａｄｈｅｓｉｖｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ａｒｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ，２０００，４１，１，１１５‐１２８；Ｖｉｎｔｉｌｏｉｕ，Ａ．，Ｌｅｒｏｕｘ，ＪＣ ｉｎ Ｏｒｇａｎｏｇｅｌｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅ ｉｎ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，２００８，１２５，１７９‐１９２）。マトリックス系では、活性成分は懸濁液又は溶液としてポリマー内に均一に分布し、その放出動態はマトリックスの構造と使用材料の化学的性質に依存する（Ｆｒｅｎｋｅｌ，Ｊ．，ｉｎ Ｒｕｂｂｅｒ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９４０，１３，２６４‐２７４；Ｔａｎａｋａ ｅｔ ａｌ．Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９８６，２ｎｄ ｅｄ．６，５１４；Ｆｙｆｅ，ＣＡ，Ｂｌａｚｅｒ，ＡＩ，ｉｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，１９９８，５２，２２１‐２２５）。マトリックス錠剤を製剤化するために使用される遅延又は修飾作用賦形剤は、不溶性又は不活性ポリマーマトリックス、脂質又は水不溶性マトリックス、又は親水性マトリックスであり得る。

【００１７】

親水性マトリックスは、活性成分を親水性ポリマーと混合することによって得られ、ポリマーマトリックスを生じさせる。セルロースエーテルは、生物学的に適合性が高く、毒性がないため、放出制御系の開発に広く使用されている親水性ポリマーである。最もよく知られているのは、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＭＣＮａ）、メチルセルロース（ＭＣ）、エチルセルロース（ＥＣ）、微結晶セルロース多糖類とその誘導体、ポリエチレングリシンオキシド、ポリエチレングリコールキトサン、ポリ（ビニルアルコール）、キサンタンガム、無水マレイン酸コポリマー、ポリ（ビニルピロリドン）、デンプン及びデンプン系ポリマー、マルトデキストリン、ポリ（２‐エチル‐２‐オキサゾリン）、ポリ（エチレンイミン）、ヒドロゲルポリウレタン、架橋ポリアクリル酸及びこれらの誘導体である。これらのマトリックスが使用される製剤において、他の適切な賦形剤とともに、錠剤、又は硬質ゼラチンカプセルを調製することが可能である（Ｄａｂｂａｇｈ，ＭＡ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ，１９９６，１４０，８５‐９５）

【００１８】

近年、鼻の上皮の透過性が高いため、分子量の大きい薬物の投与が可能であり、薬物の吸収速度が速く、血漿濃度プロファイルが静脈注射とほぼ同じになることもあることから、脳への薬物送達のための鼻腔内ルートの探索に多くの関心が集まっている（Ｍｉｃｈａｅｌ ＩＵ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ ２００１；５３：３‐２２）。この経路のその他の利点は、薬物吸収のための大きな表面積、患者による治療に対するより良い順守、治療血中濃度の迅速な取得、攻撃的な条件を提示しないこと、最初の肝経路の影響を回避することである。

【００１９】

文献には、鼻粘膜から脳への薬物の取り込みは、主に３つの異なる経路を経て行われると記載されている（Ｉｌｌｕｍ Ｌ．ｉｎ Ｅｕｒ Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ ２０００；１１：１‐１８；Ｆｒｅｙ ＷＨ ＩＩ．ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ Ｔｅｃｈ ２００２；２：４６‐４９．Ｖｙａｓ ＴＫ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ ２００５；２（２）：１６４‐１７５）。一つは全身経路で、全身循環により薬剤が吸収され、その後ＢＢＢを通過して脳に到達する。他の２つの直接経路は、嗅覚経路と三叉神経経路で、これにより薬物は鼻腔から脳脊髄液（ＣＳＦ）と脳組織へ部分的に移動する（Ｔｈｏｒｎｅ ＲＧ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ２００４；１２７：４８１‐４９６）。ＣＮＳへの薬物送達を実現するためには、薬物が鼻腔粘膜を効率的かつ迅速に透過する必要がある。したがって、剤形の設計は、鼻腔内投与後の薬物動態とバイオアベイラビリティに重要な役割を果たす。吸収される場所での薬物の保持と親密な接触は、製剤において考慮すべき２つの重要な要素である。製剤の粘度が高く

なると、鼻腔内での製剤の滞留時間が長くなり、その結果、吸収される確率が高くなることが知られている（Ｐｉｒｅｓ，Ａ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｊ Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ Ｓｃｉ．２００９；１２（３）：２８８‐３１１）。一方、鼻腔粘膜や粘液層には多種多様な酵素が含まれており、酵素分解を防ぐために、プロテアーゼやペプチダーゼ阻害剤を使用するなどのいくつかの手法が試みられている（Ｐｉｒｅｓ，Ａ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ Ｓｃｉ．２００９；１２（３）：２８８‐３１１）。また、上皮バリアに可逆的な変化をもたらし、脂質膜を修飾してこのバリアの透過性を高め、その流動性を高める、あるいは細胞間隙を開いて、副細胞輸送を増大させる吸収促進剤がある。これらの化合物は組織損傷の増大に関連してはいるが、キトサン、シクロデキストリン、リン脂質誘導体などの一部の化合物は、粘膜の改質による悪影響を上回る吸収率とバイオアベイラビリティの向上を示す（Ｐｉｒｅｓ，Ａ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊ Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ Ｓｃｉ．２００９；１２（３）：２８８‐３１１；Ｃａｓｅｔｔａｒｉ，Ｌ．ａｎｄ Ｉｌｌｕｍ，Ｌ．ｉｎ Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．Ｒｅｌｅａｓｅ ２０１４，１９０，１８９‐２００）。

【００２０】

粘膜付着性化合物は、粘膜層への医薬製剤の結合を可能にし、粘膜と薬剤の接触時間を増加させ、吸収を有利にする。これらには、アガロース、キトサン、ゼラチン、カラギーナン、ペクチン、セルロース誘導体、ポリアクリラート、ＰＥＧ、メタクリラート、アクリル酸、ＰＶＡアミノデキストラン、キトサン‐ＥＤＴＡ、ＰＡＣ、アルギナート、カルボキシメチルセルロース及びそのナトリウム形態（ＣＭＣ及びＮａ‐ＣＭＣ）、ヒドロキシエチル化デンプン、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、チオール化したポリマー、ポリアクリル酸、が挙げられる（Ｍａｎｓｕｒｉ，Ｓ． ｅｔ ａｌ．『Ｒｅａｃｔ．Ｆｕｎｃｔ．Ｐｏｌｙｍ．１００（２０１６）１５１‐１７２）。

【００２１】

鼻腔内ルートは、低分子量（１０００Ｄａ未満）の薬物の輸送に使用することができる（Ｂｅｈｌ ＣＲ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌ Ｒｅｖ １９９８；２９（１）：８９‐１１６）。様々な特許が、これらの低分子をＣＮＳに送達するための異なるアプローチを宣言している。

【００２２】

Ｑｕａｙ，Ｓ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．（ＵＳ２００３０２２５０３１Ａ１（２００３）及びＵＳ２００６０００３９８９Ａ１（２００６））は、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤（ドネペジル、タクリン、リバスチグミン、ガランタミンなど）による認知症、ＡＤ、学習障害、ニコチン離脱症候群の治療のための医薬組成物を請求する。この組成物は、薬物の鼻腔内投与のための液剤、ゲル剤又は粉末と、鼻腔内投与による薬物のＣＳＦへの経粘膜吸収のための透過性向上剤を含む。

【００２３】

Ｗｅｎｔ Ｇ．Ｔ．らは、ＵＳ２００５０２４５６１７Ａ１（２００５）において、Ｎ‐メチル‐Ｄ‐アスパラギン酸（ＮＭＤＡ）受容体拮抗薬（メマンチン）、モノアミン酸化酵素（ＭＡＯ）阻害薬又はＧＡＤＰＨ（セレギリン）阻害薬；及び医薬的に許容される担体の医薬組成物を請求し、その組成物は、パーキンソン病、多発性硬化症及びＡＤなどのＣＮＳ関連疾患の治療のために、経口、局所経上皮、皮下、静脈内、鼻腔内又は吸入投与のための持続放出剤形として投与される。ＵＳ２００６０２５２７８８Ａ１（２００６）では、これらの著者らは、メマンチンとドネペジルを組み合わせた組成物を発表しており、ＵＳ２００６０１８９６９４Ａ１（２００６）では、アミノアダマンチンの誘導体（メマンチン、リマンタジン、アマンタジン）と、脱炭酸酵素阻害剤（Ｌｅｖｏｄｏｐａ、Ｃａｒｂｉｄｏｐａ）又はカテコール‐Ｏ‐メチルトランスフェラーゼ阻害剤（ｔａｌｃａｐｏｎｅ、ｅｎｔａｃａｐｏｎｅ）とを、担体と一緒に様々な神経変性疾患の治療のために徐放性剤形で使用する組成物を明らかにしている。

【００２４】

Ｃｕｍｍｉｎｇｓ，Ｃ．Ｊ．らはＵＳ２００７００３７８００Ａ１（２００７）におい

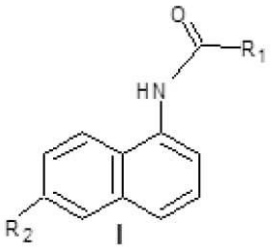
て、クロトリマゾール及びその誘導体を用いて、ハンチントン病やＡＤなどの神経疾患を治療する鼻腔内法を宣言している。一方、ＣＮ１６２１０３９（２００５）のＴａｏ，Ｔ．らは、老人性認知症の予防と治療、青少年の記憶と学習能力の改善のために鼻腔内投与されるＨｕｐｅｒｚｉｎｅ－Ａ及びその誘導体又は塩の体内に吸収利用され得る製剤を開示している。

【発明の概要】

【００２５】

本発明は、医薬化学に関連し、アルツハイマー病（ＡＤ）で影響を受けるコリン作動性、グルタミン酸作動性、ミトコンドリア系に対してマルチターゲット標的作用を示す式Ｉの化合物の医薬組成物に関するものである。これらの化合物の製剤は、その経口、舌下、非経口、経皮、鼻腔内投与により、有効性と耐性を高めるものである。

【化１】




ここで

$R_1$：－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－アルキレニル－$R_3$、－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$R_4$；

$R_3$：－ＣＯＯＨ、－ＯＨ、－ＳＨ、－$NH_2$、－ＮＨ－アルキル－、－ＮＨ－アルキレニル－$NH_2$、－ＮＨ－アルキレニル－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－アルキレニル－Ｓ－$R_5$、－ＮＨ－ジチオカルバマートアルキル、－Ｎ－アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は薬学的に許容できる上記の基の塩；

$R_4$：スクシンイミジル基；

$R_5$：－Ｈ、－Ｃ（Ｏ）－アルキル、－Ｃ（Ｏ）－$C_6H_5$；及び

$R_2$：－Ｈ、－アルキル。

用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである。用語「アルキレニル」は、直鎖又は分岐アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（－$CH_2$－）、エチレニル（－$CH_2CH_2$－）、又はプロピレニル（－$CH_2CH_2CH_2$－）のことを指す。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

具体的には、配合された式Ｉの化合物は、ＡＤの症状を改善するために複数の活性成分の組み合わせを使用する、今日使用されているマルチ療法の代わりとして、単独で使用することができる。式Ｉの化合物は、個々に抗コリン作用、抗酸化作用、抗グルタミン酸作用、抗炎症作用を呈するので、ＡＤの単剤療法に有効な活性成分である。さらに、それらはアミロイド原性ペプチドの凝集及びプラーク形成を阻害することができる（ＷＯ２０１０１１８７０６Ａ４において）。これにより、患者は、ＡＤに罹患している被験者の脳に存在する臨床症状及び生物学的変化を有意に改善する、単剤療法を受けることができる。

【００２７】

ヒトへの投与のための、式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、プロドラッグを、ＡＤの治療のための活性物質又は成分として提示した製剤は、経口、舌下、非経口、経皮及び鼻腔内投与を通じて、有効性、生物学的安全性、治療の順守及び耐性を高める、バイオアベイラビリティ、活性成分の滞在時間、及び適切な排泄性を高めることができる。

【００２８】

式Ｉの化合物は、キューバ特許第２００９－５７号、ＰＣＴ－ＣＵ２０１０－０００００１に記載されているように、簡便に調製することができる。

【００２９】

本発明において、式Ｉの化合物は、予期せずして、ミト保護特性を示す。図２（非限定的な実施例１から）は、電子伝達鎖（ＣＴＥ）のタンパク質複合体を通る電子の流れに関連する、ミトコンドリア膜電位（Δψ）の散逸に対する化合物１の効果を示す。エチレン－ビス（オキシエチレンニトリル）四酢酸（ＥＧＴＡ）で処理したミトコンドリアは、この実験の対照群であるため、ミトコンドリア電位の散逸が最も少ないことが分かる。この場合、ＥＧＴＡは反応液中の$Ca^{2+}$汚染物質のキレーターとして機能するため、ミトコンドリアは最良の状態で、その電位を最大限に保持する。ＥＧＴＡ＋３－クロロフェニルドラゾンカルボニルシアニド（ＣＣＣＰ）対照は、ＣＣＣＰが酸化的リン酸化アンカプラーとして作用してΔψを散逸させるため、ミトコンドリア損傷が起こる群である。化合物１は、０．１μｍｏｌ／Ｌから１００μｍｏｌ／Ｌの濃度範囲で、対照群（ＥＧＴＡ）と同様の電位散逸値を示している。これらの結果によると、化合物１は、試験した用量範囲において、電位の散逸に対する感受性を低下させることがわかった。

【００３０】

図３は、５０μｍｏｌ／Ｌの$Ca^{2+}$と２ｍｍｏｌ／Ｌの無機リン酸（Ｐｉ）によって誘導されたミトコンドリアの膨潤を、５４０ｎｍの吸光度の低下から分光測光法で評価した結果である。この場合、対照群（$Ca^{2+}$存在下）では、最大膨潤度の指標として、最大吸光度値を示すことが確認された。一方、ＥＧＴＡ（$Ca^{2+}$のキレーター）で処理したサンプルは、損傷していない対照であるため、低い吸光度値を示した（ｐ＜０．００１）。ＣＣＣＰで処理した群も低い吸光度値（ｐ＜０．００１）を示したが、これはアンカップリング時に$Ca^{2+}$イオンの侵入を阻止し、ミトコンドリアの膨潤を防ぐためである。同様の濃度の化合物１は、$Ca^{2+}$により誘発された膨潤の効果を逆転させるので、ミトコンドリアの完全性と機能性の保護剤として考えることができる。これらの効果は、観察されたミトコンドリア膜電位の散逸に対する効果に対応するものである。

【００３１】

また、ミトコンドリア膜電位（Δψ）の保持状態に直結する過酸化水素（$H_2O_2$）の生成に対する化合物１の効果も評価した。基礎状態では、ＥＧＴＡで処理した対照群で裏付けられるように、ミトコンドリアは多量の活性種を生成する。ＣＣＣＰによる処理を行った場合、同様の挙動が観察されたが（図４、非限定的実施例１より）、この場合、活性種の生成は、ＣＣＣＰを誘導するアンカップリングに関連し、ミトコンドリアＡＴＰａｓｅによるＡＴＰ生成には関連しない、つまりミトコンドリアの機能性の最適状態に関連すると推論された。化合物１による処理は、試験した用量範囲において$H_2O_2$産生から保護する。

【００３２】

以上のことから、本化合物は、ミトコンドリアが膜電位の散逸の影響を受けにくく、膨潤や反応性酸素種の発生を抑えるため、ミトコンドリア機能の保護剤として作用することが示唆された。

【００３３】

インシリコ研究に基づき、式Ｉの化合物は、ドネペジルと同様に、酵素ＡＣｈＥと相互作用する。これらの相互作用は、アミノ酸のＴｒｐ８４、Ｔｒｐ２７９及びＰｈｅ３３０とともに疎水性である。同様に、これらの化合物は、アセチルコリンとの反応に関与するキャビティのすべてのセリン残基と、リガンド／酵素結合に安定性を与える３つの水素結合を形成することによって相互作用し、これは化合物が酵素活性をブロックする可能性を示唆している。スコポラミン誘発健忘症（ＥＳＣ）モデルは、認知症及び老化に関連する認知障害を誘発するために最も広く用いられているモデルの１つである（Ｂａｊｏ Ｒ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ｒｅｐｏｒｔｓ ２０１５，５：９７４８；Ｇｉｌｌｅｓ Ｃ ａｎｄ Ｅｒｔｌｅ Ｓ．ｉｎ Ｄｉａｌｏｇｕｅｓ Ｃｌｉｎ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０００，２（３）：２４７－２５５；Ｈａｉｄｅｒ Ｓ ｅｔ ａｌ

．ｉｎ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．Ｂｕｌｌ．２０１６，１２７（Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ Ｃ）：２３４‐２４７）。この競合性のある非選択的ムスカリン性コリン作動性受容体拮抗薬の使用は、コリン作動性神経伝達を遮断し、認知症を誘発する有効な方法である。また、ＥＳＣは酵素アセチルコリンエステラーゼＡＣｈＥの活性の上昇を誘導し、受容体の遮断とともにコリン作動性神経伝達の欠損に寄与する。このモデルは、ドネペジルなどの酵素活性のそれらの阻害剤のｉｎ ｖｉｖｏ試験で使用されている（Ｓｈｉｎ ＣＹ，ｅｔａｌ．ｉｎ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ＆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１８，２６（３）：２７４‐２８１）。これらの効果とともに、ＥＯ誘導、神経炎症、ミトコンドリア機能障害、ｃＡＭＰのリン酸化低下、ＮＦＤＢ（脳由来神経刺激因子）の負の制御といった他のメカニズム、及びグリア酸性線維性タンパク質（ＧＦＡＤ）が観察される（Ｈａｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ，ｉｎ Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ２０１６，１２７，２３４‐２４７；Ｊｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｂｉｏｌ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．２００９，３２（２），２４２‐２４６；Ｋｏｎａｒ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ ＰＬＯＳ ＯＮＥ，２０１１，６，１１，ｅ２７２６５；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ｒｅｐｏｒｔｓ，２０１５，５，９６５１．；Ｗｏｎｇ‐Ｇｕｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｎｅｕｒｏｌ Ｒｅｓ．２０１７；３９（７），６４９‐６５９）。これらはすべてこのモデルで観察される認知機能障害に貢献する。

【００３４】

急性ＥＳＣモデルの行動評価は、短期空間記憶を評価するＹ迷路の「空間バージョン」（ＭｃＧａｕｇｈ ＪＬ，ｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１５３（１９６６）１３５１）を用いて行い、動物が迷路内の新しい空間を自発的に認識する能力に基づくものである。このプロトコルで評価される記憶は、海馬の機能を含む（Ｃｓｉｓｚａｒ Ａ．，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｈｅａｒｔ Ｃｉｒｃ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．（２０１３），３０５Ｈ１１２０‐１１３０；Ｏｌｔｏｎ ＤＳ ａｎｄ Ｐａｒａｓ ＢＣ，ｉｎ Ｎｅｕｒｏｐｓｙｃｈｏｌｏｇｉａ，１７（１９７９）６６９‐６８２．）。

【００３５】

図５（非限定例２）は、ＥＳＣモデルで評価した化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）のＹ迷路における行動試験の結果を示す。この実験では、対照群動物が新規アームへの選好性を持つことが観察され、それは２つのファミリーアームで費やした時間の有意な減少によって証明された（ｐ＜０．００１）。この優先的な行動プロファイルは、トレーニングの３０分前にＥＳＣを投与しても再現されなかった。この場合、新規アームで費やした時間は減少し、他の２つのアームに関して統計的に有意な差は観察されなかった。一方、化合物３を投与した群（投与量０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ）では、ＥＳＣによる健忘が有意に逆転した（ｐ＜０．００１）。このように、動物は対照群に類似した優先的な行動プロファイルを示し、見慣れたアームに比べ、新しいアームでの永続性が有意に増加することを特徴とした。この試験では、試験の３０分前に投与したドネペジル（陽性対照；用量：１ｍｇ／ｋｇ、ｉｐ）も、ＥＳＣによって誘発された欠損を逆転させ、これは他の著者及びこの薬剤の抗コリン作用と一致する（Ｌｅｅ ＪＳ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ｒｅｐｏｒｔｓ ２０１５，５：９６５１；Ｒｉｅｄｅｌ Ｇ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｂｅｈａｖ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．２００９，２０４（１）：２１７‐２２５）。このように、トレーニングの３０分前に０．１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲で単回投与した化合物３は、驚くべきことにＥＳＣの投与によって引き起こされる健忘作用を防ぐことが示された。異なる実験群の新規アームにおける滞留時間を比較した（図６、非限定的実施例２）。このように、対照群とＥＳＣの時間を比較すると、後者の群では明らかに減少しており（対照：１３３．８±９．３秒；ＥＳＣ：９８．８±４．２秒）、これは統計的に有意だった（ｐ＜０．００１）。化合物３を投与した群の動物の行動は、投与した濃度に依存した。１ｍｇ／ｋｇの用量までは、探索時間の漸増が見られ、ＥＳＣ群と有意差があった（ｐ＜０．０１）。より高用量では、このパラメータの減少が観察された。ドネペジル投与群の場合、予想通り、滞留時間はＥＳＣ群より有意に長かった。まとめると、

この実験では、１ｍｇ／ｋｇの３の用量が最大の効果を持つ用量として振る舞った。

【００３６】

長期記憶の研究のために（ＭｃＧａｕｇｈ ＪＬ，ｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１５３（１９６６）１３５１）「水迷路」が開発されている（モリスの水迷路、ＭＷＭ；Ｍｏｒｒｉｓ Ｒ，ｉｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ １９８４，１１（１）：４７‐６）。この行動モデルは、海馬依存的な空間ナビゲーションと参照記憶の測定法として有効であることが示されている。そのために、２日間のＭＷＭプロトコルが報告されており、これは、可視プラットフォームによる最初の一連のトレーニング試験に基づき、２４時間後に、ただし隠されたプラットフォームによる記憶試験が行われる（Ｇｕｌｉｎｅｌｌｏ Ｍ．，Ｍ．Ｇｅｒｔｎｅｒ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｂｅｈａｖ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．，１９６（２００９）２２０‐２２７）。このプロトコルは、高齢（１５～１８ヶ月）のトリプルトランスジェニック（３ｘＴＧ）マウスで検証されている。評価基準は、見えるプラットフォームでのトレーニングの最後の試験と、隠されたプラットフォームでの最初の試験（２４時間後）の脱出潜時（脱出までの時間）の差及び／又は比率である。このように、正確な空間戦略を身につけた動物は、隠されたプラットフォーム領域に向かって速やかに移動するため、長期記憶能力が失われることなく保たれていることがわかる。一方、隠されたプラットフォームを見つけるのに時間がかかる動物は、長期的な空間記憶に失敗し、脱出潜時が長くなる。

【００３７】

図７（非限定的実施例２）は、ＭＷＭを用いた急性ＥＳＣモデルにおける化合物３の行動評価結果である。この結果から、ＥＳＣを投与したマウスは長期空間記憶障害を有するが、化合物３を投与したマウスは長期空間記憶障害を有しないことがわかる。また、算術差、及び可視プラットフォームによる訓練の最後の試験の待ち時間と、隠されたプラットフォームによる最初の試験の待ち時間の比から、化合物３を投与した群は、ＥＳＣを投与した群と大きく異なることがわかる。このように、本実験の結果は、短期空間記憶に関するこれまでの経験で得られた結果を裏付けるものである。

【００３８】

これらの動物において、ＡＣｈＥ活性（μｍｏｌ／Ｌ／分／ｍｇタンパク質）を、脳ホモジネートの可溶性画分のサンプルにおいて、生体外で測定した（図８、非限定的実施例３）。その結果、ＥＳＣ投与群では、対照群と比較して、ＡＣｈＥ活性が有意に上昇（ｐ＜０．００１）していた。しかし、ＡＣｈＥ活性は、驚くべきことに、ＥＳＣ投与群と比較して、３で処理した群では有意に減少し（ｐ＜０．０５）、ドネゼピルで処理したものでは予想通り（ｐ＜０．０１）だった。

【００３９】

慢性ＥＳＣモデルは、最近、ＡＤ治療のための新薬の実験的評価における別の選択肢として浮上してきた（Ｋｌｉｎｋｅｎｂｅｒｇ Ｉ ａｎｄ Ｂｌｏｋｌａｎｄ Ａ，ｉｎ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｂｉｏｂｅｈａｖ Ｒｅｖ ２０１０，３４（８）：１３０７‐１３５０）。げっ歯類では、ＥＳＣを１日１回投与の割合で１０日間連続投与（ｉ．ｐ．）することにより認知機能障害を誘導する。このモデルでは、急性期に発現するいくつかの特徴が維持される一方、ＡＤとより密接に関連する他の特徴が現れる。すなわち、アセチルコリンエステラーゼの活性／発現の上昇、合成酵素であるコリノアセチルトランスフェラーゼの活性／発現の低下、シナプス前末端レベルでのコリンの活性消費の欠損といったコリン作動性系の変性が起こる（Ｈａｉｄｅｒ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｂｒａｉｎ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｂｕｌｌｅｔｉｎ，２０１６，１２７，２３４‐２４７）。また、アミロイド前駆体タンパク質（ＡβＰＰ）の発現が増加し、凝集体βＡや過リン酸化タウが存在する（Ｂｉｈａｑｉ ＳＷ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｉｎｄｉａｎ Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１２，４４（５）：５９３‐５９８；Ｒａｍａｎｄｅｅｐ Ｋ，ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｉｎｔ Ｊ Ｐｒｅｖ Ｍｅｄ Ｒｅｓ．２０１５．Ｖｏｌ．１，Ｎｏ．２，ｐｐ．４５‐６４）。

【００４０】

図９（非限定的実施例４）は、化合物３の慢性ＥＳＣモデル（１．５ｍｇ／ｋｇ　１日投与、２週間）における長期記憶行動評価の結果を示す。化合物３は、ＥＳＣ投与の３日前から、次の２週間のＥＳＣ投与中に投与した。ＭＷＭの結果、ＥＳＣを投与したマウスの記憶障害が確認された。一方、化合物３（１及び１０ｍｇ／ｋｇ）を投与した群では、ＥＳＣ群と比較して、隠されたプラットフォームを用いた試験（Ｔ７）と可視プラットフォームを用いた最後の試験（Ｔ６）の最初の脱出潜時の比が有意に減少した。この結果は、１ｍｇ／ｋｇの用量が最大効果量として振る舞うことを示している。要するに、この結果から、本モデルでは、コリン作動性系の変性が誘導され、ＭＷＭの長期空間記憶の悪化が証明されたが、化合物３を使用することにより、この変性が防止されることが示された。

【００４１】

グルタミン酸受容体を介した興奮毒性は、ＡＤやパーキンソン病（ＰＤ）を含む多くの神経異常の病態生理の根底にあることが認識されている。グルタミン酸は、正常な生理状態では、神経発達、伝達、シナプス可塑性において中心的な役割を担っている。また、この神経伝達物質は記憶や学習過程に関与している。低酸素‐虚血のような急性細胞障害事象や、アルツハイマー病やパーキンソン病のような慢性神経変性疾患では、様々な病毒に反応して脳組織内のグルタミン酸濃度が上昇し、この現象は特に細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇により神経細胞死を誘発する。式Ｉの化合物は、驚くべきことに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験において、実施例５及び図１０に非限定的に示すように、グルタミン酸誘発性興奮毒性損傷に対して神経保護効果を有することが判明した。ここで、ＳＨ細胞‐ＳＹ５Ｙを化合物３（１．８～６０μｍｏｌ／Ｌ）で２４時間前処理し、その後、同濃度の３及び６０ｍｍｏｌ／Ｌのグルタミン酸と共インキュベートした（２４時間）。化合物３は、７．５及び１５μｍｏｌ／Ｌの濃度で神経細胞死を有意に減少させた（ｐ＜０．０５）。これらの結果は、神経保護がミトコンドリア代謝を異なる方法で調節しうることを示唆している。

【００４２】

興奮性細胞死は、グルタミン酸作動性系の他の受容体にも影響される。そのため、強力なグルタミン酸アゴニストであるカイニン酸（ＫＡ）やα‐アミノ‐３‐ヒドロキシ‐５‐メチル‐４‐イソキサゾールプロピオン酸（ＡＭＰＡ）の投与により、実験的に障害を誘発することができる（Ｗａｎｇ　Ｑ，ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｍｏｌ　Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．２００５，３１：３‐１６）。ＫＡをげっ歯類に投与すると、発作の再発、行動の変化、それに伴う神経細胞（特に海馬のＣＡ１及びＣＡ３領域）の変性が起こることが知られている（Ｗａｎｇ　Ｑ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｎ　Ｍｏｌ　Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．２００５，３１：３‐１６）。ＫＡによる神経細胞死は、ミクログリアやアストロサイトの活性化の上昇を伴い、炎症性サイトカインの発生を増加させる（Ｃｈｅｎ，Ｚ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎ　Ｊ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，２００５，６２（２），２０７‐２１８）。また、ＫＡ受容体の活性化は、ミトコンドリア膜の脱分極を生じさせ、その結果、細胞内の$Ca^{2+}$濃度を変化させる（Ｂｒｏｒｓｏｎ，ＪＲ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，１９９４，１４（１），１８７‐１９７）。そのため、ミトコンドリア機能に障害が引き起こされ（Ｗａｎｇ，Ｑ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，２００５，３１（１‐３），３‐１６）、ＲＯＳやＥＮＯＳの発生が増加し、ＯＥやニトロソ化ストレス（ＮＥ）が発生し、その有害な神経細胞作用により細胞死を誘発する（Ｕｅｄａ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｅｘｐ．Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓ．２００２，１４７（２），２１９‐２２６）。

【００４３】

我々の経験では、ＫＡ対照群の動物では、ＫＡ注射後１０～２０分以内で、無動、口や顔の動き、硬直した姿勢が観察され、場合によっては中程度の強直性間代発作が発生した。その後２０～６０分で、うなずき、反復運動、浮き沈みが観察され、その後、浮き沈みが続き、最終的にはより重度の強直間代性発作が生じた。しかし、化合物３（投与量：５及び５０ｍｇ／ｋｇ）で処理したものでは、これらの効果は、驚くべきことに、より少ない頻度と強度で現れた（図１１、非限定的実施例６）。図１１は、３（５及び５０ｍｇ／ｋｇ）で処置した群の総スコア（０～１２０分）の有意な減少を示し、その効果は５０ｍ

ｇ／ｋｇ用量でより大きかった。

【００４４】

式Ｉの化合物はこれまで製剤化されていないので、本発明の医薬組成物は、これらの化合物の物理化学的特性及び特異な方法で、組成物中の成分の重量比を考慮した、独自のものである。したがって、提示された製剤は、抗コリン作用、抗酸化作用、抗グルタミン酸作用及び抗炎症作用を有するこれらのマルチターゲット治療薬の特性を保証するものである。これらの製剤は、活性成分の有効血漿中濃度の経時的な持続投与を可能にし、これまでに記載されていない有効性を保証し、経口、舌下、非経口、経皮、鼻腔内投与による付着性と耐性を高めることができる。

【００４５】

本発明の、ヒトに投与するための式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、プロドラッグの医薬製剤は、適当な賦形剤を含み、固体、半固体、ゼラチン質又は液体形態、例えば錠剤、カプセル、懸濁液、エマルジョン、非経口溶液、経皮パッチ、点鼻液、粘膜粘着剤などであることができる。典型的には、製剤は、ビヒクル又は製剤の成分とともに、０．１～９９％、好ましくは１～８０％の活性化合物を含有するであろう。賦形剤は、液体、固体又は半固体の補助物質、有機及び無機性質の化合物で、天然又は合成起源で、生理学的に許容され、活性成分の製剤化に一般的に使用されるものである。

【００４６】

本発明で選択される医薬形態は錠剤であり、これは少なくとも１日に１回投与され、式Ｉの化合物、又はその医薬的に許容される塩の群から選択される治療活性成分、及び固体、半固体、ゼラチン質又は液体ポリマーマトリックスの医薬的に許容される担体を含有する。本発明の剤形は、前記剤形が水溶液にさらされたときに、治療上活性な薬剤の放出を２～２４時間の間で持続させる。前記製剤の投与後、活性成分の溶解率は６時間から１８時間の間に８０％超であり、薬剤の有効血漿レベルは２４時間維持される。活性成分は、製剤あたり約１～１００ｍｇの量で存在する。

【００４７】

本発明において、特にポリマーとして使用する錠剤：ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ、ポリビニルピロリドン又はその組み合わせ。２４時間修正放出製剤では、ポリマーは５％ｗ／ｗから８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％から７０％ｗ／ｗの範囲の量で存在する。１２時間修正放出製剤では、ポリマーは好ましくは５％ｗ／ｗから５０％ｗ／ｗの量で存在する。製剤は、文献に記載されている従来の方法で調製される。

【００４８】

図１２、１３及び１４は、活性成分の錠剤を得るための、本発明の限定とみなされるべきではない３つの錠剤製剤化（実施例７、８及び９）の制御放出プロフィールを示す：（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１）、６‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝ヘキサン酸）（２）及びメチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）。これらの製剤は、活性成分１０ｍｇと、結合剤としてのデンプン、崩壊剤としての微結晶セルロース、希釈剤としてのラクトース、滑沢剤としての二酸化ケイ素、潤滑剤としてのステアリン酸マグネシウムなどの添加物を異なる割合で含み、それをポリマーマトリックス：ＨＭＰＣ、ＨＰＣ及びＥｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯとして使用した。図１２、１３及び１４は、３つの製剤において、媒体のｐＨに依存する２つの放出相が存在することを示す。このように、錠剤（ＨＭＰＣ、ＨＰＣ、ＥｕｄｒａｇｉｔＲＳ　ＰＯ）を非酵素酸媒体に６０分間曝露した後、マトリックスからの活性成分の放出は顕著ではなく、１％未満の活性成分の放出にとどまった。一方、３つの製剤の錠剤をｐＨ７．５の緩衝液にさらすと、活性成分の放出過程が徐々に増加し、２４時間以内に９６％超のほぼ完全な媒体への放出が得られた。この放出は、非限定的に例示され

た３つの活性成分について起こる。

【００４９】

本発明の非限定的な性質で示された３つの製剤のこれらの放出プロファイルは、ｐＨが変化すると溶解曲線の傾きが増加することを明確に示し、これは活性成分の時間外持続放出があることを意味する。この放出パターンをヒトに応用すると、放出は２段階で行われ、血中の活性成分の濃度は徐々に、そして適度に上昇するため、望ましくない副作用を減らすことができる。これは特に、胃では活性成分含量の１％程度しか放出されないため、胃の副作用の可能性を回避するのに有効である。さらに、一般的に長い投与間隔での確実な徐放は、患者における薬理効果を向上させ、治療の順守と耐性を高める。

【００５０】

要約すると、本発明の式Ｉ化合物の錠剤製剤は、最適な放出プロファイルを有する。それは、錠剤が生理学的に適合する成分を組み込んで簡単かつ経済的な方法で製造できるように、アクセス可能なポリマーマトリックスを使用し、これは、悪性の副作用を生じることなく、投与を容易にする二相の徐放性組成物を提供する。

【００５１】

本発明で開発された経皮システムは、以下の連続した層で構成されている：ａ）親油性の保護外層；ｂ）式Ｉの活性成分を含有する層：ゲル、懸濁液、エマルジョンなどの形態；ここで化合物はマトリックス（アクリルであってもよい）に組み込まれ、その有効な貯蔵を保証する；ｃ）活性成分を放出する二面性制御膜；ｄ）放出モジュール：活性成分のリザーバーと薬物放出制御系を含み、一般にポリマー材料（カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、エチルセルロース、ゼラチン、メチルセルロース、デンプンなど；合成エラストマー：ポリブタジエン、ポリイソプレン、ネオプレン、ポリシロキサンなど；合成ポリマー：ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）などから作成される。ｅ）低アレルギー性粘着層：パッチを圧力で固定することができ、アクリルポリマー、低アレルギー性シリコーン、樹脂、鉱物油、ポリイソブチレンなどを含有する。ｆ）内部保護フィルム：システムを皮膚に適用する前に除去される。この外用パッチのコーティングにより、悪性の副作用なく、皮膚から血流にのって薬剤が連続的に穏やかに放出される。パッチは、その大きさと投与量キャパシティによって２種類に分けられる。１つは、面積５ｃｍ$^2$、活性成分の用量５ｍｇ、１日４ｍｇの化合物を放出するタイプ。もう１つは、面積とキャパシティが２倍になったものである。治療は、小さい方のパッチを１日１回使用することから始まり、耐性が良好で最低４週間経過した後、大きい方のパッチ（１０ｃｍ$^2$、１０ｍｇ／２４ｈ）を適用する。

【００５２】

本発明の式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、ヒトへの投与のためのプロドラッグの鼻腔用製剤は、溶媒、生体接着剤、防腐剤、抗酸化剤、界面活性剤／湿潤剤としての機能を有する異なる成分を使用する。非限定的な生体接着性賦形剤としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、これらはすべて０．５～７％の濃度で、ポリアクリル酸の誘導体（カルボール）は０．０１～１．５％である。ＰＥＧは活性成分の溶媒として使用される。生体接着性ポリマーは、鼻腔内の滞留時間を長くする目的で、非限定的に、１０～６０ｍＰａｓの粘度を有する。抗菌防腐賦形剤として、０．００５～０．５％の塩化ベンザルコニウム、又は０．００２～０．２％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウムと０．００５～０．０５％のプロピルパラベンと組み合わせたものが好ましく使用される。ｐＨは、リン酸塩又はクエン酸塩緩衝液の等張溶液を用いて６～７．５の間で調整される。等張化剤としては、特に、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、グルコースなどを挙げることができる。使用される好ましい抗酸化剤は、０．０５から２％のトコフェロールである。湿潤剤としては、３～６％のグリセロール）及び０．１～０．４％のＴｗｅｅｎ８０が使用され、浸透性を高めることができる。すべてのケースで使用された溶媒は、注射用水である。

【００５３】
鼻腔内投与は、中枢神経系（ＣＮＳ）に治療薬を送達する方法と考えられている。薬物の放出は、嗅覚経路と神経三叉路という、薬物が受容体や軸索輸送系に結合する必要のない細胞外経路に沿って数分以内に起こる（Ｔｈｏｒｎｅ，ＲＧ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ．２００２，１２７，４８１‐４９６）
【００５４】
図１５は、ＥＳＣの急性投与により誘発される健忘症に対する化合物３鼻腔内製剤投与の効果について、行動評価（Ｙ迷路試験）を行った結果である。見てわかるように、対照群との間に差はなく、使用した製剤がＹ迷路試験における動物の成績に影響を与えないことがわかる。予想通り、ＥＳＣを投与した動物の新規アームにおけるスキャン時間は、両対照群と比較して有意な減少（ｐ＜０．００１）が観察された。しかし、化合物３を投与した群の動物は、対照群（生理食塩水及びビヒクル）と同様の値を示しており、３がＥＳＣによる健忘を防止することが示された。図１６は、物体識別試験（ＯＤＴ）における結果を示す。新規物体の識別指数（ＤＩ）は、対照群と化合物３投与群との間に有意差は認められなかったが、一方、ＥＳＣ投与群では、ＤＩの大幅な低下が認められた（ｐ＜０．００１）。
【００５５】
本実験の結果、ＥＳＣの急性投与は、Ｙ迷路モデルとＯＤＴの両方で認知機能障害を誘発し、他の著者が観察したものと類似していることがわかった（ｄｅ Ｂｒｕｉｎ Ｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｎｅｕｒｏｄｅｇｅｎｅｒ Ｄｉｓ．２０１５；２０１５：２４２５０５．Ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１５／２４２５０５）。これとともに、化合物３の鼻腔内投与は、両モデルにおいて認知機能障害を予防し、これは、経口投与されたこの化合物の急性及び慢性ＥＳＣモデルにおけるこれまでの結果と一致する。３の鼻腔内投与により、経口投与よりも低用量でＥＳＣの健忘作用を予防することが可能となる。
【００５６】
以下の実施例及び図は、本発明を限定するものとしていかなる意味でも解釈されるべきではなく、ヒトへの投与のための、式Ｉの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物及びプロドラッグの医薬製剤のコリン作動性、グルタミン酸作動性及びミトコンドリア系の異なるメカニズムに対するマルチターゲット標的作用が説明される。
【図面の簡単な説明】
【００５７】
図の内容についての説明
【図１】本発明の非限定的な実施例のために選択された式Ｉの化合物のいくつかの構造と物理化学的特性。
【図２】式Ｉの化合物（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１）のラット肝臓から分離したミトコンドリアの膜電位に対する影響。
【図３】式Ｉの化合物（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１）のラット肝臓から分離したミトコンドリアの膨潤に対する影響。＊＊＊ ｐ＜０．００１ スチューデントｔ検定による対照に対する比較、ｐ＜０．０５を統計的に有意な差とみなした。
【図４】ラット肝臓から分離したミトコンドリアにおける反応性酸素種の生成に対する式Ｉの化合物（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１））の影響。＊＊＊ ｐ＜０．００１ スチューデントｔ検定によるＥＧＴＡ群との比較、ｐ＜０．０５を統計的に有意な差とみなした。
【図５】スコポラミン急性投与による記憶喪失モデル（ＥＳＣ）における化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用。対照、ＥＳＣ、及び３を単回投与した処理群（０．１、１、１０、及び２０ｍｇ／ｋｇ、ｉ．ｐ．）の獲得セッション後のＹ迷路における短期空間記憶。＊ ｐ＜０．０５，＊＊ ｐ＜０．０１，＊＊＊ ｐ＜０．００１。一元配置分散分析後、テューキーの事後検定（Ｔｕｒｋｅｙ's ｐｏｓｔ‐ｈｏｃ ｔｅ

ｓｔ）を実施。
【図６】スコポラミン急性投与による記憶喪失モデル（ＥＳＣ）における化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用。対照群、ＥＳＣ群、及び０．１、１、１０、及び２０ｍｇ／ｋｇの用量で３を投与した群の訓練セッション後、新規アームに永続的に滞在した時間。＊　ｐ＜０．０５，対照群に対する比較
【数１】

≈　ｐ＜０．０５

ＥＳＣに対する比較。一元配置分散分析後、テューキ―の事後検定を実施。
【図７】スコポラミン急性投与による記憶喪失モデル（ＥＳＣ）における化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節効果。上段：各実験群の２日間プロトコルにおけるＭＷＭの成績。下段：長期空間記憶、可視プラットフォームによる最後の試行の脱出潜時（Ｄ１Ｔ４）、可視プラットフォームによる最初の試行の脱出潜時（Ｄ２Ｔ１）。＊＊　ｐ＜０．０１，＊＊＊　ｐ＜０．００１、ＥＳＣ群との比較。
【数２】

≈　ｐ＜０．０５

対照群に対する比較。一元配置分散分析、テューキーの事後検定。
【図８】スコポラミンの急性投与による記憶喪失モデル（ＥＳＣ）における化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル｝アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用。対照群、ＥＳＣ投与群、メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）及びドネゼピルの急性ＥＳＣモデルの動物脳ホモジネートの可溶性画分における抗コリンエステラーゼ活性。バーは平均値±ＳＥＭに対応し、ｎ＝１０動物／群。＊＊＊　ｐ＜０．００１、対照群に対する比較。
【数３】

≈　ｐ＜０．０５

【数４】

≈≈　ｐ＜０．０１

ＥＳＣ群に対する比較。ｐ＜０．０５は、統計的に有意な差とみなされた。使用した統計検定：一元配置分散分析、テューキ―の事後検定。
【図９】スコポラミンの慢性使用による記憶喪失モデルにおける化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用。＊＊＊　ｐ＜０．００１、対照群に対する比較。
【数５】

≈　ｐ＜０．０５

【数６】

≈≈　ｐ＜０．０１

ＥＳＣ群に対する比較。一元配置分散分析、テューキーの事後検定。
【図１０】細胞株ＳＨ－ＳＹ５Ｙにおける、グルタミン酸（グルタマート、ｇｌｕｔａｍａｔｅ）によって誘発される興奮毒性障害に対する化合物メチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の神経保護作用。ＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞を異なる濃度の化合物３（１．８～６０μｍｏｌ／Ｌ）で２４時間処理し、その後、培地を再び化合物とグルタマート６０ｍｍｏｌ／Ｌを含有する新しい培地に置き換えた。対照：未処理細胞（ＮＴ）及びグルタマート（Ｇｌｕｔ）。生存率はＭＴＴ試験により決定した。メチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマートは、濃度（７．５及び１５μｍｏｌ／Ｌ）でグルタマートによって生じる細胞死を有意に減少した。各バーは平均値±ＳＥＭを表し、ｎ＝３。ｐ＜０．０５は統計的に有意な差とみなされた。
【図１１】カイニン酸のｉｃｖ投与により誘発された発作に対する化合物メチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の神経保護効果（異なる群の動物の最終スコア（０～１２０分）で表される）。バーは平均値±ＳＥＭを表し、１群あたりｎ＝７である。＊　ｐ＜０．０５；＊＊　ｐ＜＝．００１。対照群に対する比較。一元配置分散分析、テューキーの事後検定。ｐ＜０．０５の値は、統計的に有意な差とみなした。
【図１２】化合物：（Ｎ－［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］－β－アラニン（１）及びメチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の錠剤の製剤１の、酵素なしで、ｐＨ１．２、ｐＨ７．５及びｐＨ１．２から７．５まで変動させた、１８時間にわたる放出プロファイル。
【図１３】化合物：６－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝ヘキサン酸）（２）及びメチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の錠剤の製剤２の、酵素なしで、ｐＨ１．２、ｐＨ７．５、及びｐＨ１．２から７．５まで変動させた、１８時間にわたる放出プロファイル。
【図１４】化合物：メチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の錠剤の製剤３の、酵素なしで、ｐＨ１．２、ｐＨ７．５、及びｐＨ１．２から７．５まで変動させた、１８時間にわたる放出プロファイル。
【図１５】Ｙ迷路試験におけるスコポラミン（１．５ｍｇ／ｋｇ、ｉｐ）の急性投与により誘発される健忘症に対する化合物３の単回鼻腔内投与（７．２ｍｇ／ｋｇ）の効果。バーは、新規アームで費やされた時間の平均値±ＳＥＭを表す、ｎ＝１０匹／群。＊＊＊　ｐ＜０．００１；生理食塩水対照群及びビヒクル対照との比較。
【数７】

≈≈　ｐ＜０．０１

ＥＳＣ群に対する比較。単純ＡＮＯＶＡ検定後、テューキーの多重比較検定。
【図１６】物体識別試験におけるスコポラミン（１．５ｍｇ／ｋｇ．、ｉ．ｐ．）の急性投与により誘発される健忘症に対する化合物３の鼻腔内経路による単回投与（７４μｇ／ｋｇ）の効果。バーは識別指数の平均値±ＳＥＭを表し、ｎ＝１０匹／群である。＊＊＊　ｐ＜０．００１；生理食塩水対照群及びビヒクル対照との比較。

【数８】

≈≈≈　ｐ＜０．００１

スコポラミン群に対する比較。単純ＡＮＯＶＡ検定後、テューキーの多重比較検定。

【実施例】

【００５８】

以下に、式Ｉの化合物のうち３つについて実施例を示すが、これはいかなる意味でも本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【００５９】

実施例１．式１化合物（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１））のラット肝臓から単離したミトコンドリアの膜電位、膨潤、反応性酸素種の産生に及ぼす効果の評価。

ラットミトコンドリアの単離：雄のＷｉｓｔａｒラットの肝臓から、古典的な方法である差動遠心分離によりミトコンドリアを分離した（Ｍｉｒａｎｄｏｌａ　ＳＲ，ｅｔ　ａｌ．，ｉｎ　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　Ｒｅｓ　２０１０；８８：６３０‐３９）。

【００６０】

インキュベーションの手順：１２５ｍｍｏｌ／Ｌスクロース、６５ｍｍｏｌ／Ｌ　ＫＣｌ、１０ｍｍｏｌ／ＬのＨＥＰＥＳ‐ＫＯＨ、ｐＨ７．４を含有する標準インキュベーション培地で、３０℃にて５ｍｍｏｌ／Ｌコハク酸カリウム（プラス２．５μｍｏｌ／Ｌ　ロテノン）でミトコンドリアを活性化した。

【００６１】

ミトコンドリアアッセイ

ミトコンドリア膜電位及びＲＯＳは、蛍光プローブとして、それぞれ、サフラニン（１０μｍｏｌ／Ｌ）（Ｚａｎｏｔｔｉ　Ａ．，ａｎｄ　Ａｚｚｏｎｅ　ＧＦ　ｉｎ　Ａｒｃｈｉｖｅｓ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ　１９８０，２０１（１），２５５‐２６５）及びＡｍｐｌｅｘ　Ｒｅｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，ＯＲ，Ｅｕｇｅｎｅ）を用い、ホースラディッシュペルオキシターゼ（１ＩＵ／ｍＬ）の存在下（Ｖｏｔｙａｋｏｖａ　ａｎｄ　Ｒｅｙｎｏｌｄｓ，ｉｎ　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．２００１，７９（２），２６６‐７７）で分光測光法により測定した。測定は、日立蛍光分光光度計、モデルＦ‐４５００（東京、日本）において、λｅｘｃ４９５／λｅｍ　５８６ｎｍ（サフラニン）及びλｅｘｃ　５６３／λｅｍ　５８７ｎｍ（Ａｍｐｌｅｘ　Ｒｅｄ）で行った。これらの実験は、０．１ｍｍｏｌ／ＬのＥＧＴＡの存在下で行い、評価化合物はＮ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１）で、濃度範囲は０．１～１００μｍｏｌ／Ｌであった。ミトコンドリアの膨潤は、日立分光光度計、モデルＵ‐２９１０（日本）を用いて、５４０ｎｍにおける吸光度の減少から分光光度的に推定した。

【００６２】

データ解析：すべての場合において、データの正規分布と分散の均質性は、それぞれＫｏｌｍｏｇｏｒｏｖ　Ｓｍｉｒｎｏｖ検定とＬｅｖｅｎｅ検定を使用して評価した。ミトコンドリア機能変数の比較は、スチューデントのｔ検定によって実施した。有意水準は０．０５とし、データ解析にはＳｔａｔｉｓｔｉｃａ　８．０プログラム（ＳｔａｔＳｏｆｔ　Ｉｎｋ）を使用した。結果のグラフ表示は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　５．０プログラム（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）を用いて行った。

【００６３】

実施例２．スコポラミンの急性使用により誘発される記憶喪失モデルにおける化合物メチル（２‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用の評価。

動物

Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ(国立実験動物生産センター、ＣＥＮＰＡＬＡＢ、キューバ）から供給された若い雄のＯＦ‐１マウス（２０～２５ｇ）を使用した。実験前に動物を、７日間、実験室の条件（制御された温度２５±２℃、相対湿度６０±１０％、明暗サイクル１２時間）に適応させた。この期間中及び実験中は、水とＣＥＮＰＡＬＡＢ製のげっ歯類用標準飼料を自由に摂取させた。すべての手順は、実験動物の使用とケアに関する欧州委員会のガイドラインに従って実施され、研究動物ケア委員会の承認を得た。一貫したデータを得るために必要な最小限の動物数及び観察期間を使用した。

【００６４】

実験の設計

適応期間終了時、動物を体重に応じて、１群１２匹の５つの実験群にランダムに振り分けた。認知欠損の誘発にはスコポラミン臭化水素酸塩水和物（ＥＳＣ、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を用い、これを生理食塩水に溶解し、試験の３０分前に１．５ｍｇ／ｋｇの用量で腹腔内（ｉｐ）投与した（Ｍｉｒａｎｄａ ＨＦ ｅｔ ａｌ．ｉｎ．Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｓｃｉ．，２０１４ ２１（１）：６２‐６２）。使用した化合物３の用量は、０．１、１、１０及び２０ｍｇ／ｋｇ体重であった。この化合物は、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）を用いて製剤化した。投与スキームは、以下のように設計した：

【００６５】

群１（認知機能が正常なネガティブ対照）。３０分間隔で２回投与し、それぞれビヒクル（５％ＣＭＣ）を経口投与、生理食塩水をｉ．ｐ．投与とした。

群２（認知機能障害を有するポジティブ対照）。３０分間隔で２回投与し、１回目はビヒクル（５％ＣＭＣ）、２回目はＥＳＣ １ｍｇ／ｋｇを投与した。

群３、４、５及び６（０．１、１、１０及び２０ｍｇ／ｋｇの３で処理した）。３０分間隔で２回投与し、１回目は各群に対応した用量の３を、２回目はＥＳＣ １ｍｇ／ｋｇを投与した。行動評価は、この２回目の投与から３０分後に実施した。

【００６６】

行動試験

Ｙ迷路

短期空間記憶の試験は、迷路の周囲に迷路外トラックを設置したＹ迷路行動パラダイム（長さ４０ｃｍ×幅９ｃｍ×高さ１６ｃｍ）を用いて、新規空間選好の試験を通じて行われた。試験は、２時間の間隔を置いた２つの試行で構成された。最初のトレーニング試験（獲得）では、マウスは迷路の中央に置かれ、ランダムに選択されたアームの１つの端に向いていた。置かれた後、一方のアームを閉じた状態で１０分間迷路を探索させた（新規アーム）。この試験が終わると、マウスは元のケージに戻され、２回目の試験（回復試験）では、５分間、迷路の３つのアームを自由に探索することができた。各アームでの総滞在時間（探索）をビデオ録画から測定・分析した。アームの入り口は、当該アームに動物の４本の脚が入ることとして定義した。学習した課題の回復試験中の各アームでの滞留時間（秒）を統計解析に使用した。迷路は、走行の合間に７０％エタノールで洗浄した。すべてのマウスは、試験の１日前までにホームケージで行動試験室に搬送された。実験は午前８時から午後１２時３０分の間に実施した。

【００６７】

モリス水迷路（ＭＷＭ）。

体験は、１日目のトレーニングと２日目の試験の２日間行われた。すべてのマウスは、試験の少なくとも１日前までにホームケージで行動試験室に運ばれ、実験は午前８時から午後１２時３０分の間に実施された。動物は１日目（Ｄ１）に、水温２４±２℃の直径１２０ｃｍ、深さ５１ｃｍのプールで、各四分円の壁と室内の外部標識に高コントラストの視覚信号を配置し、一連の可視プラットフォーム試験において基準に従って訓練された。訓練段階は、可視プラットフォームによる４回の試験（Ｖ１‐Ｖ４）からなり、最後の試験は、慣れ後のその基本的な脱出潜時とされた。これをＤ１Ｖ４（１日目，試験可視プラ

ットフォーム４）とした。動物の訓練は、各マウスが同じ試験間隔、すなわち各試験の間に３０±１０分となるように時間をずらして行い、ランダムに選んだ迷路の異なる位置から毎回開始した。プラットフォームを視認できるようにするため、水槽の底面に対してコントラストの高い物体で識別した。１分以内に脱出できなかった動物は、手動でプラットフォームに誘導し、５～１０秒間その上に留まらせた後、撤去した。その後、乾燥させ、低体温を避けるために白熱灯で照らされたそれぞれのケージに入れた。最後の可視プラットフォーム試験（Ｄ２）から２４時間後、動物は隠されたプラットフォームによる一連の３つの試験（Ｔ１‐Ｔ３）で評価された。試験は３０分ごとに行われ、各試験の時間は最大１分であった。すべての試験において、プラットフォームは同じ場所に置かれたままであった。

【００６８】

統計解析。

すべてのデータは、平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）で表される。モリス水迷路のデータは、２つの方法で分析した。可視プラットフォーム訓練段階における脱出潜時は、２因子ＡＮＯＶＡ（処理×試行）を用いて分析した。長期記憶の試験では、可視プラットフォームによる訓練段階の最後の脱出潜時値（Ｄ１Ｖ４）と、２４時間後に行われた隠されたプラットフォームによる試験の最初の値（Ｄ２Ｔ１）を使用した。長期記憶容量に異常のないマウスは、最初の試験ではすぐに隠されたプラットフォームに到達するはずである。Ｄ２Ｔ１‐Ｄ１Ｖ４の差とＤ２Ｔ１／Ｄ１Ｖ４の比率でスコアリングシステムを作成した。成功した対象のＤ２Ｔ１‐Ｄ１Ｖ４スコアは０に近く、Ｄ２Ｔ１／Ｄ１Ｖ４スコアは１以下であるべきである。数値が高いほど２４時間後の脱出潜時が長く、動物の空間性能の欠損を意味する。この比較は、一元配置分散分析、その後のテューキーの事後検定を用いて行われた。Ｙ迷路のデータの分析も、上記の同じテストを使って行った。ｐ＜０．０５を統計的に有意な差とみなした。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ５（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）を用いて実施した。

【００６９】

実施例３．全脳ホモジネート中のＡＣｈＥ活性による、スコポラミンの急性使用で誘発される記憶喪失モデルにおける化合物メチル（２‐{［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ}エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用の評価。

マウスの脳におけるＡＣｈＥ活性は、脳ホモジネート上清中の酵素活性を決定するために適応されたＥｌｌｍａｎらの比色アッセイ（Ｅｌｌｍａｎ ＧＬ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，１９６１；７：８８‐９５）に従って決定した。簡単に手順は以下の通りであった；行動実験の終わりに、マウスを麻酔し、首を切って素早く脳を取り出し、氷冷したプレート上に置いた。それらを秤量し、１６０ｍｍｏｌ／Ｌスクロースを含有する冷たい１０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ‐ＨＣｌ緩衝液、ｐＨ７．２中でホモジナイズ（１／１０、ｗ／ｖ）した。ホモジネートを１０，０００ＸＧ、４℃で１０分間遠心分離し、得られた透明な上清を酵素源とし、これを分取（各群ｎ＝１０）して－２０℃で保存した。アッセイは、９６穴マイクロタイタープレートを用いてエルマン試薬（ＤＴＮＢ １０ｍｍｏｌ／Ｌ）、５０μＬホモジネート及び１０μＬヨウ化アセチルコリン（ＡＣｈＩ、２０ｍｍｏｌ／Ｌ）（最終量２００μＬ）により行った。５‐チオ‐２‐ニトロ安息香酸ジアニオンの黄色加水分解物（モル消衰係数：１３ ７００ｍｏｌ／Ｌ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$）の吸光度を４１２ｎｍで、１分間隔で２０分かけて測定した。ＡＣｈＥ活性は３連で行い、タンパク質１ｍｇあたり１分間に加水分解されたＡｃｈＩのｎｍｏｌで表した。タンパク質濃度は、修正Ｌｏｗｒｙ法（Ｍａｒｋｗｅｌｌ ＭＡＫ ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７８，８７（１）：２０６‐２１０）で決定した。

【００７０】

統計解析。

すべてのデータは、平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）で表される。コリンエステラーゼ活性値の比較は、一元配置分散分析、次いでテューキーの事後検定により行った。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ５（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）を用いて実施した。

【００７１】

実施例４．スコポラミンの慢性使用により誘発される記憶喪失モデルにおける化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の抗コリン性調節作用の評価。

動物：

国立実験動物生産センター（ＣＥＮＰＡＬＡＢ、キューバ）から供給された雄のＣ５７ＢＬ／６マウス（２０～２５ｇ）を使用した。実験中、動物はＣＥＮＰＡＬＡＢから供給された水と標準食を自由摂取した。すべての手順は、実験動物の使用とケアに関する欧州委員会のガイドラインに従って実施され、研究動物ケア委員会の承認を得た。一貫したデータを得るために必要な最小限の動物数及び観察期間を使用した。

【００７２】

実験の設計

適応期間終了時、動物を１２匹ずつ５つの実験群に体重に応じてランダムに振り分けた。認知欠損の誘発には、ＥＳＣ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を用い、これを生理食塩水に溶解し、１．５ｍｇ／ｋｇの用量で毎日腹腔内（ｉｐ）に２週間、午前中に投与した（Ｐａｒｋ ＪＨ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｊ Ｍｏｌ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０１６；５９（４）：５７９‐５８９）。化合物３を懸濁液として、０．５％可溶性デンプン（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）で調製し、１日量０．１、１、１０ｍｇ／ｋｇ体重（０．０１ｍＬ／ｋｇ）で胃内カニューレにより経口投与した。実験群は以下の通りである：

【００７３】

群１（認知機能が正常なネガティブ対照）。ビヒクル：デンプン０．５％（経口）及び生理食塩水（ｉ．ｐ．）を２週間毎日投与した。

群２（認知機能障害を有するポジティブ対照）。ＥＳＣ １．５ｍｇ／ｋｇを２週間連日投与し、ビヒクル（デンプン０．５％）を経口投与した。

群３、４、５ 化合物３の投与は、ＥＳＣの投与開始の４日前に開始した。各群の動物に、それぞれ０．１、１及び１０ｍｇ／ｋｇの用量で３を経口投与した。ＥＳＣの毎日の投与（１．５ｍｇ／ｋｇ）を２週間行った。この治療が終了した時点で、行動評価を開始した。

【００７４】

モリス水迷路（ＭＷＭ）：実施例２と同様に、２日間のＭＷＭ試験により、長期空間記憶を測定した。この場合、直径１．３５ｍの水槽を用いたので、訓練期間中に６回（Ｄ１Ｖ１～Ｄ１Ｖ６）、２４時間後に３回（Ｄ２Ｔ１～Ｄ２Ｔ３）の試験を実施した。このようにして、長期空間記憶は脱出潜時値Ｄ２Ｔ１／Ｄ１Ｖ６の商で決定された。

【００７５】

統計的な分析。

長期記憶データの解析のために、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍバージョン５プログラム（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）を用いて、非限定的な実施例２のものと同様の統計的手順を実施した。

【００７６】

実施例５．細胞株ＳＨ‐ＳＹ５Ｙにおける、グルタミン酸によって誘発される興奮毒性損傷に対する化合物メチル（２‐ ｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の神経保護作用。

化合物３は、１００ｍｍｏｌ／Ｌの濃度でＤＭＳＯに溶解し、その後、分注して－２０℃で保存した。ＲＰＭＩ １６４０（１Ｘ）＋ＧｌｕｔａＭａｘ培地（Ｇｉｂｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｏｓ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ，ＵＳＡ）は、ＨＥＰＥＳ緩衝液（２５ｍｍｏｌ／Ｌ）及びＬ‐グルタミン

（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を含み、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、１％ピルビン酸ナトリウム（１００ｍｍｏｌ／Ｌ）、１％抗生物質混合物 ペニシリン（１０，０００Ｕ／ｍＬ）‐トレプトマイシン（１０ｍｇ／ｍＬ）、１％ゲンタマイシン（１０ｍｇ／ｍＬ）、トリプシン‐ＥＤＴＡ（０．２５％）及びリン酸緩衝生理食塩水（１Ｘ ＤＰＢＳが補充された）。３‐（４，５‐ジメチルｌ‐２‐チアゾイル）‐２，５‐ジフェニルテトラゾール（ＭＴＴ）ブロミド，ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）及びグルタミン酸はＳｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）のものであった。

【００７７】

細胞培養：ＳＨ‐ＳＹ５Ｙヒト神経芽腫細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ‐２２６６）を、ＨＥＰＥＳ緩衝液（２５ｍｍｏｌ／Ｌ）及びＬ‐グルタミン（２ｍｍｏｌ／Ｌ）を含有するＲＰＭＩ１６４０培養液に、あらかじめ熱により不活性化した１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、１ｍｍｏｌ／Ｌ ピルビン酸ナトリウム、ベンジルペニシリン抗生物質混合物（１００Ｕ／ｍＬ）及びストレプトマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を入れてＴ７５ｃｍ$^2$フラスコで培養した。さらに、ゲンタマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加し、その後、完全培地（ＣＭ）とした。培養物は、５％$CO_2$、９５％空気、温度３７℃の湿度の高い雰囲気でインキュベートした。培地は２日ごとに交換し、細胞は５日ごとにトリプシン処理により４～５×１０$^6$細胞／７５ｃｍ$^2$フラスコの密度で継代培養し、実験作業及び／又は後の使用のための新世代の細胞の継代培養のために使用した。

【００７８】

メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）細胞毒性：ＳＨ‐ＳＹ５Ｙヒト神経芽細胞腫細胞をＲＰＭＩ１６４０（ＣＭ）で培養し、$CO_2$ ５％、空気９５％の雰囲気下で３７℃でインキュベートした。８０～９０％の間のコンフルエンスに達したとき、０．２５％トリプシンＥＤＴＡ混合液（１ｍＬ／２５ｃｍ$^2$）で２～３分間トリプシン処理し、細胞を剥離させる。その後、この懸濁液を同体積のＭＣで中和する。その後、１１２ＸＧで８分間遠心分離し、上清をデカンテーションで除去し、沈殿物を１ｍＬの完全培地に再懸濁し、血球計数装置で計数した。

【００７９】

細胞密度がわかった時点で、９６ウェル培養プレート（各ウェル２００μＬ）に８０×１０$^4$細胞／ウェルの濃度で播種し、２４時間インキュベーション後、各ウェルで１００μＬの上清を除去し、続いて加えた。ＣＭで調製した化合物３を異なる濃度（０．９３、１．８７、３．７５、７．５、１５、３０、６０、１００μｍｏｌ／Ｌ）で１００μＬを添加し、３７℃、５％$CO_2$、９５％空気の条件で再度２４時間インキュベートした。インキュベーション時間経過後、ＭＴＴアッセイにより細胞生存率を測定した。

【００８０】

グルタミン酸誘導性神経細胞死に対するメチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチウムカルバマートの神経保護作用：化合物３の神経保護効果を評価するために、細胞株ＳＨ‐ＳＹ５Ｙを８０～９０％の間のコンフルエンスに達するまで培養し、細胞をトリプシン処理し、続いて血球計数器で計数した。細胞密度がわかったら、９６ウェル培養プレート（各ウェル２００μＬ）に８０×１０$^4$細胞／ウェルの濃度で播種した。その後、３７℃、５％$CO_2$の湿潤環境で２４時間インキュベーションした後、各ウェルに１００μＬの上清を排除し、完全培地で調製した化合物３を異なる濃度（０．９３；１．８７；３．７５；７．５；１５；３０；６０μｍｏｌ／Ｌ）で１００μＬ加え、再度３７℃、５％$CO_2$、９５％空気の条件で２４時間インキュベーションした。インキュベーション時間が経過したら、各ウェルに１００μＬの上清を排除し、前日と同じ濃度で１００μＬの新鮮な化合物３混合物と完全培地中の６０ｍｍｏｌ／Ｌの新鮮なグルタミン酸を加え、$CO_2$ ５％、空気９５％、３７℃の条件下で再び２４時間インキュベートした。インキュベーション時間後、ＭＴＴアッセイにより細胞の生存率を測定した。

【００８１】

細胞生存率。ＭＴＴアッセイ：細胞生存率は、生存細胞でのみ活性を持つミトコンドリアデヒドロゲナーゼによるＭＴＴ（３‐（４，５‐ジメチル‐２‐チアゾリル）‐２，５‐ジフェニル‐２Ｈテトラゾリウムブロミド）の酵素的変換から得られるホルマザンブルー生成物を通じて測定した。アッセイは９６ウェルプレートで行われ、細胞はストレッサーとしてグルタミン酸、化合物３、又はその両方に異なる時間及び濃度でさらされた。異なる処理に供した後、ＭＴＴ（ＭＣで５ｍｇ／ｍＬに調製した新鮮なもの）を加え、５０μＬ／ウェルを加え、３７℃で５％$CO_2$、９５％空気の雰囲気中で４時間インキュベートした。その後、各ウェルにイソブチルアルコール（ＳＤＳ１０％、２‐ブタノール５０％、０．２５μＬ　ＨＣｌ　２ｍｍｏｌ／Ｌ）を１００μＬ加えてホルマザン結晶を可溶化し、３０分前に各ウェルの光学濃度をＣｌａｒｉｏｓｔａｒ分光光度計（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）で５７０ｎｍで測定した。ＯＤ値の補正は６９０ｎｍで行った。各実験について３回の複製を実施した。結果は、グルタミン酸で処理しない細胞群について得られた光学密度に対する各実験変法の光学密度の割合として表した。

【００８２】

実施例６　カイニン酸のｉｃｖ投与によって誘発される発作に対する化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の神経保護作用。

実験動物及び群

国立実験動物生産センター（ＣＥＮＰＡＬＡＢ、キューバ）から供給された若い雄のＯＦ‐１マウス（２０～２５ｇ）を使用した。実験を実施する前の動物の適応及び維持の条件は、非限定的な実施例２で展開したものと同様であった。マウスを、以下の５つの実験群（７匹群）に分けた：対照群（ＰＢＳ　２μＬ、ｉｃｖ）、発作対照群（ＫＡ　２μＬ、ｉｃｖ）及び１、５、５０ｍｇ／ｋｇ（０．０１ｍＬ／ｋｇ）及びＫＡ　２μＬ、ｉｃｖの用量で化合物３を胃カニュレーションにより経口投与した３群。化合物３は、５％カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）ビヒクル中の懸濁液として調製した。対照群における３及びビヒクルの投与は、ＫＡのｉｃｖ注射の１時間前に実施された。すべての動物に、ＰＢＳ中で調製したＫＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を０．５ｍｇ／ｍＬの濃度で投与した。

【００８３】

ＫＡ　ｉｃｖ投与。

ＫＡのｉｃｖ投与のために、マウスは６８５．７１ｍｇ／ｋｇの抱水クロラールでｉ．ｐ．麻酔をかけ、デュアルマニピュレータに乗せた。定位固定フレームと頭蓋骨を露出させた。側脳室の脳定位座標は、前頂と腹側硬膜を基準として、前後方向－０．８ｍｍｏｌ／Ｌ、外側±１．０ｍｍｏｌ／Ｌ、背腹方向－３．０ｍｍｏｌ／Ｌと正確に測定し、歯棒を０ｍｍｏｌ／Ｌとした。定位固定装置のアームに取り付けた自動マイクロパーフォレーションにより、頭蓋骨に穿頭孔を開けた。この孔から１０μＬの２８ゲージＨａｍｉｌｔｏｎ（登録商標）シリンジを入れ、定位固定装置の別のアームに取り付け、シリンジのピストンを右側脳室内に手動で下ろし、３分間内容物を空にした。

【００８４】

行動観察

発作のスコアリングは、以下の測定基準を用いて、Ｒａｃｉｎｅスケール（Ｒ．Ｊ．Ｒａｃｉｎｅ，ｉｎ　Ｃｌｉｎ．Ｎｅｕｒｏｐｈｙｓｉｏｌ．１９７２，３２　２８１‐２９４）に従って行われた：（１）無動、口と顔の動き、（２）前肢の伸展及び／又は尾の伸展、硬直姿勢、（３）反復運動、頭の揺れ、（４）急停止と転倒、（５）連続した急停止と転倒、（６）重度の強直間代発作、（７）死。各動物は独立した２人の観察者によって観察され、行動は２時間にわたって定量化された。この時間間隔での各動物の累積スコアの合計を統計解析に使用した。

【００８５】

統計解析

すべてのデータは平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）で表され、一元配置分散分析に

続いてテューキーの事後検定を用いて分析された。群間比較には、ＫＡのｉｃｖ投与が行われた２時間後に、各実験群の累積スコアの平均を用いた。ｐ＜０．０５を統計的に有意な差とみなした。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ５（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）を用いて実施した。

【００８６】

実施例７．活性成分Ｎ－［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］－β－アラニン（１）及びメチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）のヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）での錠剤の製造のための処方１。

すべての成分は、処方で必要とされる量に従って秤量された。活性成分及びポリマーマトリックスを４０号篩メッシュで篩い分け、その後、３０ｒｐｍで５分間混合した。その後、１５分ごとに、残りの成分を５０ｒｐｍの速度で、均質な混合物が得られるまで添加した。次に、この混合物を高速回転機で、平型、斜め型、溝なしダイを用いて圧縮する。

【００８７】

得られた錠剤は、滑らかで均一であり、重量変動は１％未満であり、適切な硬度（４．５１±０．３７ｋｇｆ）であり、耐摩耗性が良好で、適切な崩壊時間が得られ、活性成分の含有量は９０～１１０％であることがわかった。

【００８８】

試験対象の親水性マトリックスからの活性成分の放出プロファイルの統計処理は、Ｏｒｉｇｉｎ ５．０ ソフトウェアを用い、信頼水準９５％で実施した。

１錠あたりの製造処方１

【表１】

| 成分 | 重量(mg) | % |
|---|---|---|
| 活性成分 | 10 | 10 |
| HPMC | 25 | 25 |
| 乳糖一水和物 | 9 | 9 |
| デンプン | 21 | 21 |
| 微結晶セルロース | 32 | 32 |
| 二酸化ケイ素 | 1.5 | 1.5 |
| ステアリン酸マグネシウム | 1.5 | 1.5 |
| 錠剤重量(mg) | 100 | 100 |

【００８９】

実施例８．活性成分Ｎ－［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］－β－アラニン（１）及びメチル（２－｛［４－（１－ナフチルアミノ）－４－オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）のヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）との錠剤の製造のための処方２。

すべての成分は、処方で必要とされる量に従って秤量された。活性成分とポリマーマトリックスを４０号ふるいメッシュでふるい分け、その後、３０ｒｐｍで５分間混合した。その後、１５分ごとに、残りの成分を５０ｒｐｍの速度で、均質な混合物が得られるまで添加した。次に、この混合物を高速回転機で平型、斜め型及び溝なしダイを使用して圧縮する。

【００９０】

得られた錠剤は滑らかで均一であり、重量変動は１％未満であり、適切な硬度（４．５１±０．３７ｋｇｆ）であり、良好な耐摩耗性、適切な崩壊時間であり、活性成分の含有量は９０～１１０％の間に認められる。

【００９１】

親水性マトリックスからの活性成分の放出プロファイルの統計処理は、Ｏｒｉｇｉｎ５．０ソフトウェアを用いて、信頼水準９５％で実施した。

１錠あたりの製造処方２

【表２】

| 成分 | 重量(mg) | % |
|---|---|---|
| 活性成分 | 10 | 10 |
| ヒドロキシプロピルセルロース(HPC) | 30 | 30 |
| 乳糖一水和物 | 8 | 8 |
| デンプン | 20 | 20 |
| 微結晶セルロース | 30 | 30 |
| 二酸化ケイ素 | 1 | 1 |
| ステアリン酸マグネシウム | 1 | 1 |
| 錠剤重量(mg) | 100 | 100 |

【００９２】

実施例９：活性成分メチル（２‐{［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ}エチル）ジチオカルバマート（３）のＥＵＤＲＡＧＩＴと乳糖との錠剤の製造のための処方３。

すべての成分は、処方で必要とされる量に従って秤量された。活性成分とポリマーマトリックスを２０号ふるいメッシュでふるい分け、その後、３０ｒｐｍで５分間混合した。その後、１５分ごとに、残りの成分を５０ｒｐｍの速度で、均質な混合物が得られるまで添加した。次に、この混合物を高速回転機で平型、斜め型及び溝なしダイを使用して圧縮する。

【００９３】

得られた錠剤は滑らかで均一であり、重量変動は１％未満であり、適切な硬度（５．０１±０．６８ｋｇｆ）であり、良好な耐摩耗性、適切な崩壊時間であり、活性成分の含有量は９０～１１０％であった

【００９４】

親水性マトリックスからの活性成分の放出プロファイルの統計処理は、Ｏｒｉｇｉｎ５．０ソフトウェアを用いて、信頼水準９５％で実施した。

１錠あたりの製造処方３

【表３】

| 成分 | 重量(mg) | % |
|---|---|---|
| 活性成分 | 10 | 10 |
| EUDRAGIT RS PO | 39 | 39 |
| 乳糖一水和物 | 40 | 40 |
| 微結晶性セルロース | 9 | 9 |
| 二酸化ケイ素 | 1 | 1 |
| ステアリン酸マグネシウム | 1 | 1 |
| 錠剤重量(mg) | 100 | |

【００９５】
実施例１０：メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の鼻腔用製剤
溶液Ａ：化合物３をＰＥＧ４００、トコフェロール、及びグリセロールに可溶化する。
溶液Ｂ：４０％の水に撹拌と加熱（８０℃）で完全に溶解するまでＨＰＭＣを再懸濁する。
溶液Ｃ：６０％の水に、塩化ベンザルコニウム、$NaH_2PO_4$、$Na_2HPO_4$、ＮａＣｌ、ＥＤＴＡ、及びＴｗｅｅｎ　８０を溶解する。ｐＨが６．３に維持されることが確認されている。
【００９６】
次に、溶液ＢとＣを合わせ、均質な溶液が得られるまで撹拌する。次に、溶液Ａをこの溶液にゆっくりと加え、撹拌し、最後に０．２μｍｏｌ／Ｌの膜で濾過する。
【表４】

| 成分 | 濃度 (mg/mL) |
|---|---|
| 活性成分3 | 6 |
| PEG 400 | 3 |
| HPMC | 5 |
| 塩化ベンザルコニウム | 0.2 |
| $NaH_2PO_4$ | 2 |
| $Na_2HPO_4$ | 0.7 |
| NaCl | 7.4 |
| Tween 80 | 0.25 |
| EDTA | 0.15 |
| グリセロール | 5 |
| 水 | 最終体積 1mL になるように加える。 |

【００９７】
実施例１１：１（Ｎ‐［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］‐β‐アラニン（１）の鼻腔用製剤

溶液Ａ：化合物３をＰＥＧ４００、トコフェロール、及びグリセロールに可溶化させる。
溶液Ｂ：４０％の水に撹拌と加熱（８０℃）により完全に溶解するまでＨＰＭＣを再懸濁する。
溶液Ｃ：６０％の水に、塩化ベンザルコニウム、$NaH_2PO_4$、$Na_2HPO_4$、ＮａＣｌ、ＥＤＴＡ、及びＴｗｅｅｎ　８０を溶解する。ｐＨが６．３に維持されることが確認されている。

【００９８】

次に、溶液ＢとＣを合わせ、均質な溶液が得られるまで撹拌する。次に、溶液Ａをこの溶液にゆっくりと加え、撹拌し、最後に０．２μｍｏｌ／Ｌの膜で濾過する。

【表５】

| 成分 | 濃度 (mg/mL) |
|---|---|
| 活性成分1 | 6 |
| PEG 400 | 3 |
| CMC | 5 |
| 塩化ベンザルコニウム | 0.2 |
| $NaH_2PO_4$ | 2 |
| $Na_2HPO_4$ | 0.7 |
| NaCl | 7.4 |
| トコフェロール | 0.1 |
| Tween 80 | 0.2 |
| EDTA | 0.1 |
| グリセロール | 5 |
| 水 | 最終体積 1mL になるように加える |

【００９９】

実施例１２．製剤１、２、及び３の溶解プロファイルの試験。

溶出試験は、キューバ規格（ＣＥＣＭＥＤ：Ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ　Ｎｏ．４１．Ｈａｖａｎａ：ＣＥＣＭＥＤ；２００７）及び米国薬局方（ＵＳＰ　３６，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ：Ｍａｃｋ　Ｐｒｉｎｔｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　２０１３，ｐ　３２２０‐３２２１）に示されるものを考慮した。

【０１００】

製剤（実施例７、８及び９）の各バッチの２０錠の重量を確認した。それらのすべては、初期製剤に関連する誤差なく、選択されたマトリックスの薬物放出プロファイルが決定された、許容される錠剤の重量値の範囲内である。

【０１０１】

放出プロファイルを決定するための手段：

媒体１．‐酵素を含まない模擬胃液　ｐＨ　１．２±０．０５

２ｇのＮａＣｌ（分析用ニート）を秤量し、１０００ｍＬフラスコ中の７ｍＬのＨＣｌに溶解する。フラスコは蒸留水で満杯にする。この溶液のｐＨは１．２である。

【０１０２】

媒体２．‐酵素を含まない模擬腸液　ｐＨ　７．５±０．１

一塩基性リン酸カリウム　６．８ｇを秤量し、１０００ｍＬのメスフラスコに移した。その後、水２５０ｍＬを加え、固体を溶解し、０．２Ｎ　ＮａＯＨ溶液１９０ｍＬと二重

蒸留水４００ｍＬを加えた。最後に二重蒸留水で１０００ｍＬとした。溶液のｐＨは、０．２Ｎ　ＮａＯＨでｐＨ７．５±０．１に調整した。

【０１０３】

手順

各錠剤を溶解装置（Ｄｉｓｔｅｋ，Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　６１００　モデル）に入れ、６００ｍの溶出溶媒‐１を入れ、３７°÷０．５℃で、３０ｒｐｍで６０分間攪拌した。試験開始５分、１５分、３０分、６０分後に試験溶媒の一部を直ちに０．４５μｍｏｌ／Ｌのフィルターで濾過した。

【０１０４】

その後、溶解装置から溶出溶媒‐１を排出し、それを温度３７℃±０．５℃で溶出溶媒‐２の６００ｍＬと交換し、３０ｒｐｍでさらに８時間攪拌した。

【０１０５】

サンプルは５分から１０８０分まで実施し、指示された時間でサンプルは直ちに０．４５μｍｏｌ／Ｌのフィルターで濾過した。

【０１０６】

各溶出溶媒中の試料溶液の吸光度値は、決定した最大吸光度長で求めた。製剤化された化合物を定量するため、０．０２５～０．１５０ｍｇ／ｍＬの濃度範囲で、紫外可視分光光度法検量線（λｍａｘ）を行い、調整ブランク（溶出溶媒）を使用した。

【０１０７】

得られたデータの分析によると、使用した方法論は、分析方法論に求められる直線性（Ｒ＞０．９９９）、精度（再現性、繰り返し性）及び正確さのパラメータに準拠しており、本試験で用いた濃度範囲及び実験条件において、正確かつ精密な結果を得ることができる。

【０１０８】

実施例１３．スコポラミンの慢性使用で誘発される記憶喪失モデルにおける、化合物メチル（２‐｛［４‐（１‐ナフチルアミノ）‐４‐オキソブタノイル］アミノ｝エチル）ジチオカルバマート（３）の鼻腔内投与（例１０による製剤）の抗コリン性調節効果の評価。

動物

国立実験動物生産センター（ＣＥＮＰＡＬＡＢ、キューバ）から供給された雄のＣ５７ＢＬ／６マウス（２０～２５ｇ）を使用した。実験を実施する前の動物の適応及び維持の条件は、非限定的な実施例４で展開したものと同様であった。

【０１０９】

実験の設定。

適応期間の終了時に、動物を１０匹ずつの４つの実験群に体重に従ってランダムに分配した：２つの健康な対照群では、一方は鼻腔経路を介してビヒクルを投与し（Ｇ１）、他方は生理食塩水をｉｐを介して投与した（Ｇ２）；病気の対照群では、鼻腔生理食塩水を投与し、その後、生理食塩水に溶解したＥＳＣを投与した（１．５ｍｇ／ｋｇ、ｉｐ）（Ｇ３）、及び治療群では非限定的実施例１０の製剤に従って調製した化合物３を投与し、１５分後にＥＳＣを投与する（１．５ｍｇ／ｋｇ、ｉｐ）（Ｇ４）。この実験は、２つの行動モデル（隠されたアームモダリティのＹ迷路と物体識別モデル）における化合物３の鼻腔用製剤の効果を試験するために、記載した同じ条件下で２つの実験シリーズで実施された。このようにして、合計６０匹の動物が使用された。

【０１１０】

鼻腔内投与については、先に述べた方法論に従った（Ｈａｎｓｏｎ，Ｌ．Ｒ．，ｅｔａｌ．ｉｎＪ．Ｖｉｓ．Ｅｘｐ．２０１３（７４），ｅ４４４０，ｄｏｉ：１０．３７９１／４４４０）。簡単に説明すると、マウスの頭部を頸部を伸ばした仰臥位で保持し、その後、利き手で、自動ピペットに６μＬの薬剤又はビヒクルを装填した。ピペットの先端を左鼻孔に近づけ、約３μＬのピペット内容物を排出した。２～３秒後、同じ鼻の穴で同じ操作を繰り返した。この操作の終了時、動物を仰臥位に保ち、同じ操作を今度は右の鼻

孔で繰り返した。終了後、マウスをケージに入れ、２分後に両鼻孔に再度塗布した。このシステムにより、動物は３回固定され、総量３０μＬが適用され、これは化合物３の用量７．２ｍｇ／ｋｇ体重に相当する。最後の投与終了から１５分後、各動物にＥＳＣ又はそのビヒクル（生理食塩水）を１．５ｍｇ／ｋｇずつｉ．ｐ．投与し、３０分後に行動実験を実施した。

【０１１１】

行動試験

Ｙ迷路

短期空間記憶の試験は、海馬に依存する空間記憶の認識を評価するために、チームの周りに迷路外トラックを有するＹ迷路行動パラダイム（長さ４０ｃｍ×幅９ｃｍ×高さ１６ｃｍ）を用いて、新規空間選好の試験を通じて実施された。この試験は、非限定的な実施例２で説明したのと同じプロトコルに沿って展開された。実験は、８時から１２時３０分ａｍの間に実施された。

【０１１２】

物体識別

物体認識試験（ＯＲＴ）は、ＣＮＳ疾患のげっ歯類モデルにおける学習及び記憶の様々な側面、特に認識記憶を調べるために一般的に用いられる行動試験である。使用したプロトコルは３段階からなり、第１慣らし段階（１日目）、第２慣らし段階（２日目）、そして最後に試験段階（３日目）である。すべての段階は５分続き、３日間連続して実施された。第１段階では、動物をプレキシガラスの箱（２５ｃｍ×２５ｃｍ×２５ｃｍ）内に入れた。動物の行動はビデオカメラで記録された。この第１日目は、環境に慣れるために、実験３０分前に動物を試験室に連れてきた。その後、マウスは５分間、物がない状態で箱の中を自由に探索させた。２日目には、２つの同じ物体を箱の中の対向する２つの位置に、最も近い角から同じ距離で同時に置くというトレーニング試験を各マウスに実施した。この段階では、マウスは同一の物体を５分間探索させた後、ホームケージに戻された。試験段階（３日目）では、この段階の前に、２つの馴染みのある物体のうち１つを新しい物体と交換し、動物を同じ箱に戻した。この試験で使用された物体はすべて、形と色は異なるが大きさは同じであった。これらは箱の床に固定され、動かないようになっている。嗅覚信号の存在を避けるため、各試験の後は必ず箱全体と対象物を７０％アルコールで洗浄した。新しい物体と相対する物体を識別する能力は、物体を探索するのに必要な時間を通して観察された。物体探索時間は、動物が物体から２ｃｍの距離に鼻を向けたり、匂いを嗅いだり、蹴ったりした時間と定義した。物体の上に座ったり立ったりすることは探索と認めなかった。スキャン時間は、スマートビデオソフトウェアを用いて手動で解析した。識別指数（ＩＤ）は以下のように算出した。

ＩＤ＝新規物体探索時間／新規物体探索時間＋馴染みのある物体探索時間。

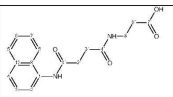
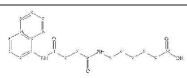
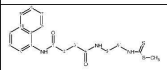
【０１１３】

統計解析

すべてのデータは平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）で表され、一元配置分散分析に続いてテューキーの事後検定を用いて分析された。ｐ＜０．０５を統計的に有意な差とみなした。統計解析は、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ ｖｅｒｓｉｏｎ ５（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）を用いて実施した。

【図面】

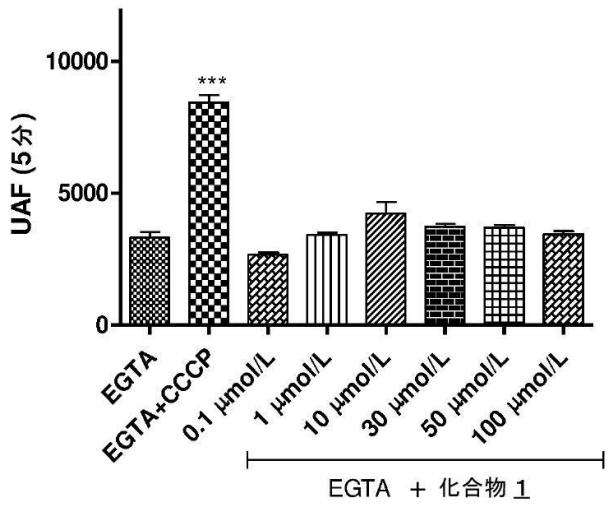
【図１－１】

| 化合物 | 構造 | 物理化学的性質 |
|---|---|---|
| N−[4−(1−ナフチルアミノ)−4−オキソブタノイル]−β−アラニン (1) |  | 分子量: 314.3 g/mol。白い結晶性粉末。品質規格。HR-TOF/MS (m/z): 計算値 $C_{17}H_{18}N_2O_4$: 314.33; 実測値 315.13 (M + H) *. T.f: 172.5-174.8 ℃. Rf: 0.1 (酢酸エチル). HPLC. Phenomenex C18 クロマトグラフィーカラム (150 x 4.6 /mmol/L, 4 /µmol/L, 80Å). 移動相: $H_2O$/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). 保持時間: 25.051分 純度: 99.76%. |
| 酸 6−[[4−(1−ナフチルアミノ)−4−オキソブタノイル]アミノ]ヘキサン酸 (2): |  | 分子量: 356.3 g/mol。白い結晶性粉末。品質規格。HR-TOF/MS (m/z): 計算値 $C_{20}H_{24}N_2O_4$: 357.42 (M * H) *; 実測値 357.18. T.f: 129.9-133 ℃. Rf: 0.6 (CHCl3: CH3OH, 10: 3). HPLC. Phenomenex C18 クロマトグラフィーカラム (150 x 4.6 /mmol/L, 4 /µmol/L, 80Å). 移動相: H2O/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). 保持時間: 27.935分 純度: 99.19%. |
| メチル (2−[[4−(1−ナフチルアミノ) −4−オキソブタノイル]アミノ]エチル) ジチオカルバマート (3): |  | 分子量: 375.5 g/mol。薄黄色, 結晶性粉末。品質規格。HR-TOF/MS (m/z): 計算値 $C_{18}H_{21}N_3O_2S_2$: 375,511; 実測値 377.121 (M + D) +. T.f: 140-141 ℃. Rf: 0.3 (酢酸エチル). |

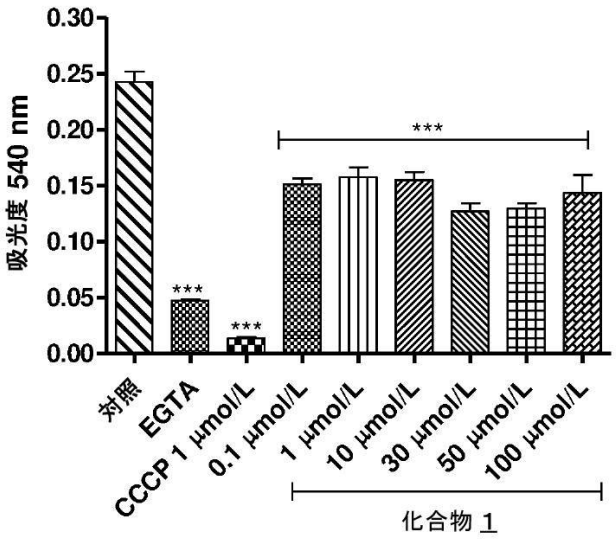
【図１－２】

| | | |
|---|---|---|
| | | HPLC. Phenomenex C18 クロマトグラフィーカラム (150 x 4.6 /mmol/L, 4 /µmol/L, 80Å). 移動相: $H_2O$/TFA (0.1%) ACN/TFA (0.05%). 保持時間: 31.428分 純度: 96.59%. |

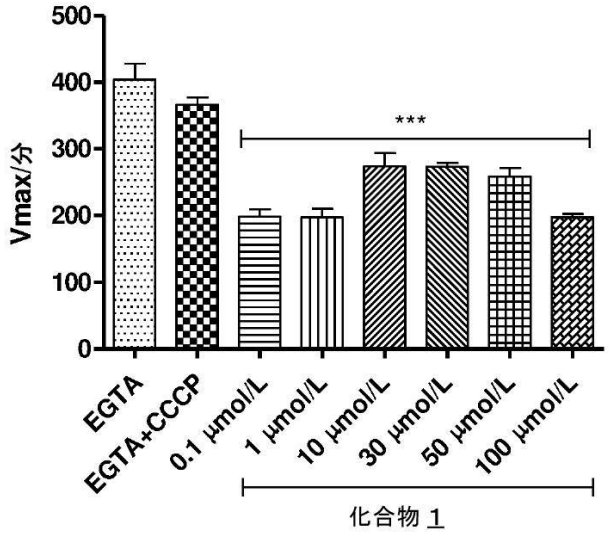
【図２】



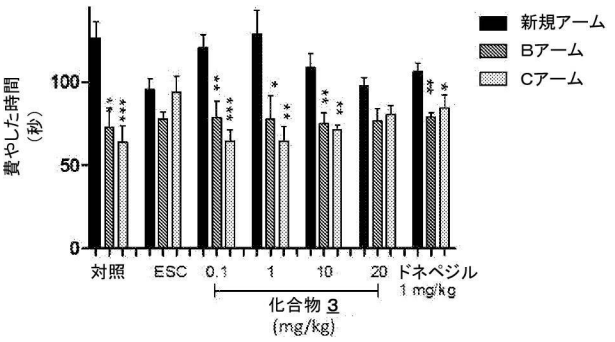

【図３】



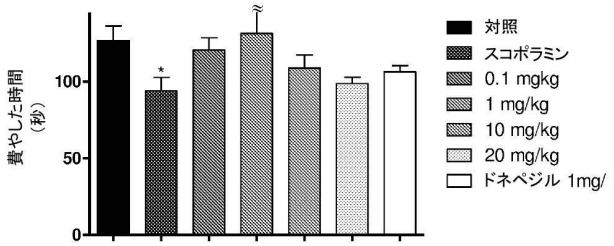
【図４】


Vmax/分
500
400
300
200
100
0
***
EGTA
EGTA+CCCP
0.1 μmol/L
1 μmol/L
10 μmol/L
30 μmol/L
50 μmol/L
100 μmol/L
化合物 1

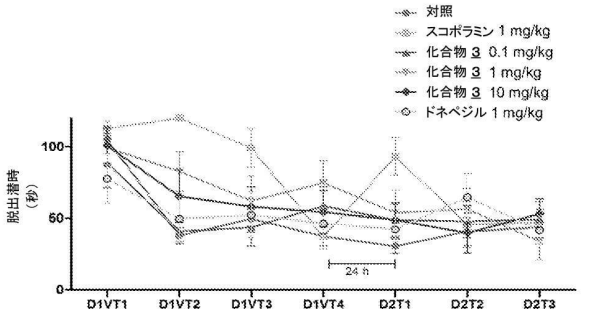
【図５】

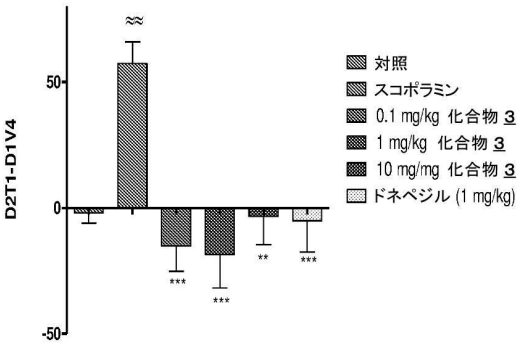

費やした時間
(秒)
新規アーム
Bアーム
Cアーム
対照
ESC
0.1
1
10
20
ドネペジル
1 mg/kg
化合物 3
(mg/kg)

【図６】

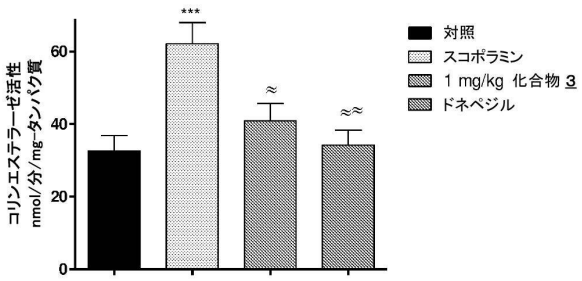

費やした時間
(秒)
対照
スコポラミン
0.1 mgkg
1 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg
ドネペジル 1mg/

【図７】

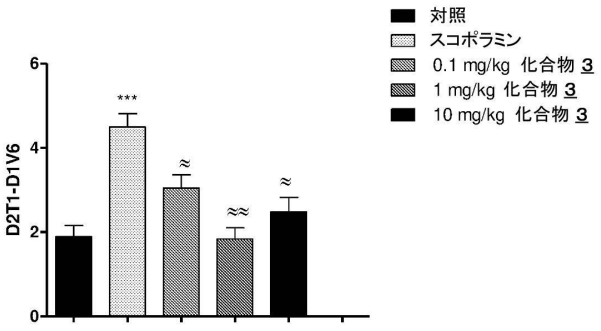

対照
スコポラミン 1 mg/kg
化合物 3 0.1 mg/kg
化合物 3 1 mg/kg
化合物 3 10 mg/kg
ドネペジル 1 mg/kg
脱出潜時
(秒)
24 h
D1VT1
D1VT2
D1VT3
D1VT4
D2T1
D2T2
D2T3


D2T1-D1V4
対照
スコポラミン
0.1 mg/kg 化合物 3
1 mg/kg 化合物 3
10 mg/mg 化合物 3
ドネペジル (1 mg/kg)

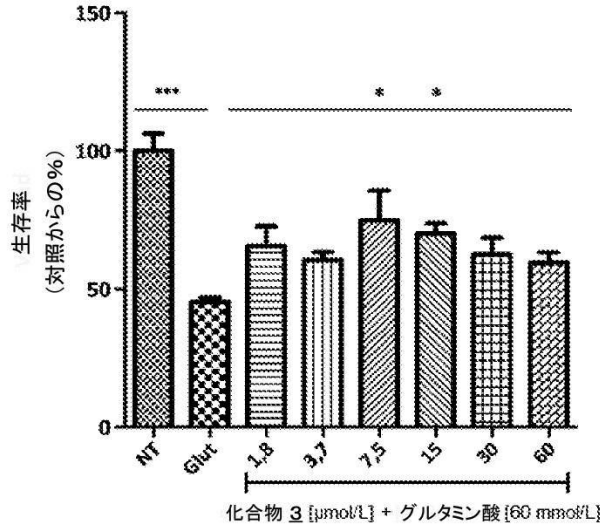
【図８】


コリンエステラーゼ活性
nmol/分/mg-タンパク質
対照
スコポラミン
1 mg/kg 化合物 3
ドネペジル

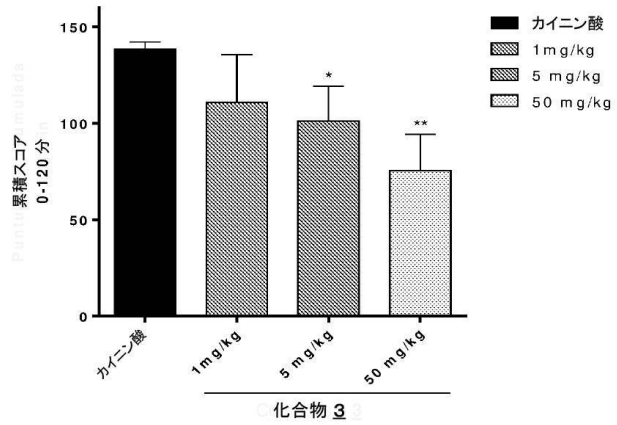
【図９】


D2T1-D1V6
対照
スコポラミン
0.1 mg/kg 化合物 3
1 mg/kg 化合物 3
10 mg/kg 化合物 3

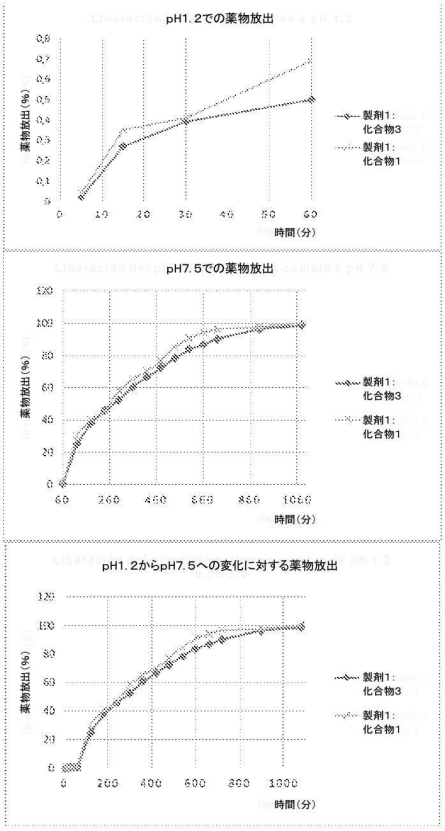
【図１０】


生存率
（対照からの%）
NT
Glut
化合物 3 [μmol/L] + グルタミン酸 [60 mmol/L]

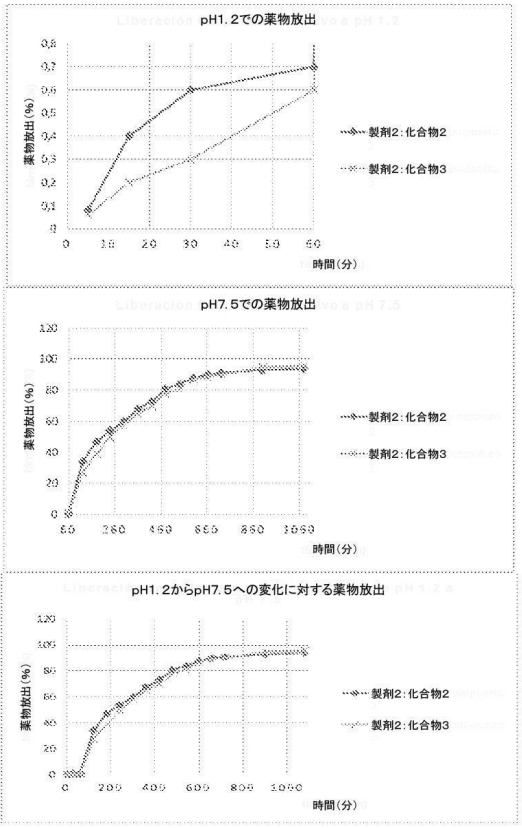
【図１１】


累積スコア
0-120 分
カイニン酸
1mg/kg
5 mg/kg
50 mg/kg
化合物 3

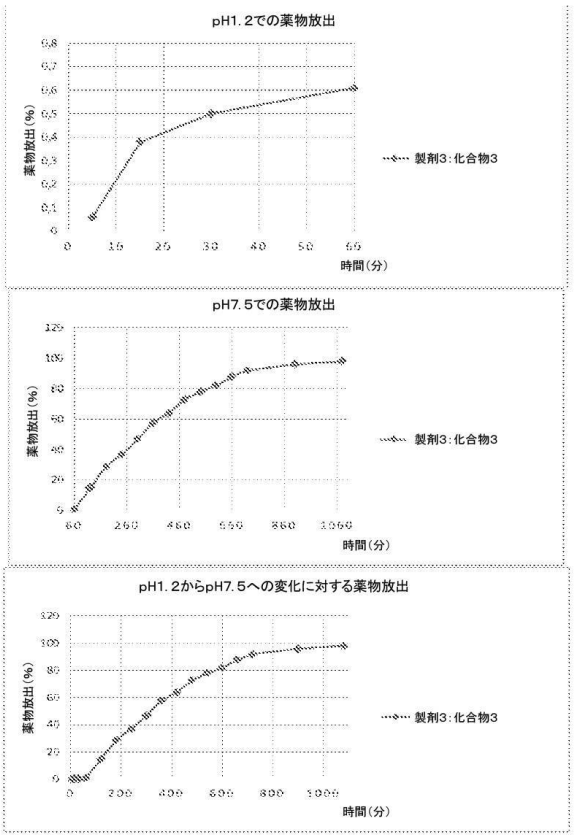
【図１２】



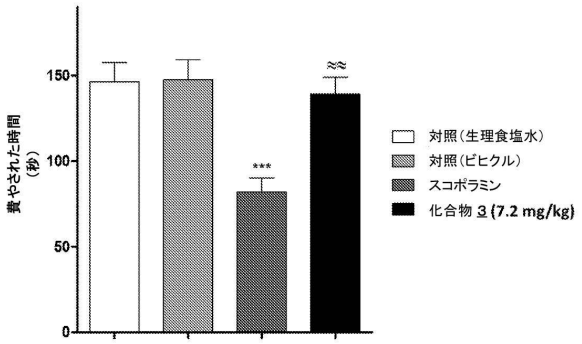

【図１３】



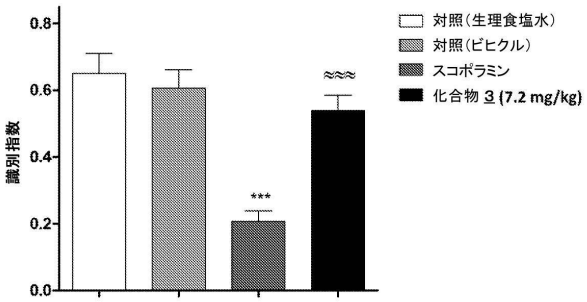

【図１４】



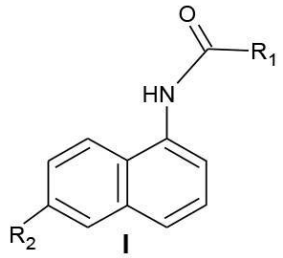

【図１５】



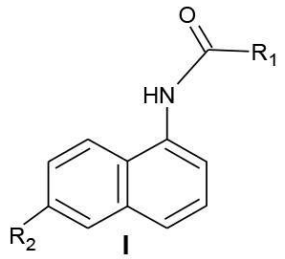
【図１６】



【手続補正書】
【提出日】令和4年5月20日(2022.5.20)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含む、放出制御型経口医薬組成物：
ａ．式Ｉのマルチターゲット化合物、

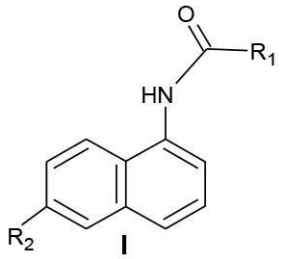


ここで
$R_1$：‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）ＮＨ‐アルキレニル‐$R_3$、‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）Ｏ‐$R_4$；
$R_3$：‐ＣＯＯＨ、‐ＯＨ、‐ＳＨ、‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキル‐、‐ＮＨ‐アルキレニル‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキレニル‐ＮＨ‐Ｃ（Ｏ）‐アルキレニル‐Ｓ‐$R_5$、‐ＮＨ‐ジチオカルバマートアルキル、‐Ｎ‐アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は前述の基の薬学的に許容できる塩、
$R_4$：スクシンイミジル基；
$R_5$：‐Ｈ、‐Ｃ（Ｏ）‐アルキル、‐Ｃ（Ｏ）‐$C_6H_5$；及び
$R_2$：‐Ｈ、‐アルキル。
用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（‐$CH_2$‐）、エチレニル（‐$CH_2CH_2$‐）又はプロピレニル（‐$CH_2CH_2CH_2$‐）を指す、
ｂ．式Ｉの活性成分の放出制御に実質的に寄与するポリマーマトリックス、
前記組成物は、その使用環境において２時間から２４時間まで活性成分の放出を維持し；６時間から１８時間の間に８０％の溶解率を有し、２４時間で９０％超の溶解率を有する。
【請求項２】
錠剤が、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ及びポリビニルピロリドン、又はその組み合わせの群から選択される、５％ｗ／ｗ～８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％ｗ／ｗ～７０％ｗ／ｗの割合であるポリマーマトリックス中に、１ｍｇ～１００ｍｇの活性成分を含むことを特徴とする、請求項１に記載の放出制御経口医薬組成物。
【請求項３】
以下を含む鼻腔用医薬組成物：
ａ．式Ｉのマルチターゲット化合物、



ここで
$R_1$：‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）ＮＨ‐アルキレニル‐$R_3$、‐アルキレニル‐Ｃ（Ｏ）Ｏ‐$R_4$；
$R_3$：‐ＣＯＯＨ、‐ＯＨ、‐ＳＨ、‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキル‐、‐ＮＨ‐アルキレニル‐$NH_2$、‐ＮＨ‐アルキレニル‐ＮＨ‐Ｃ（Ｏ）‐アルキレニル‐Ｓ‐$R_5$、‐ＮＨ‐ジチオカルバマートアルキル、‐Ｎ‐アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は前述の基の薬学的に許容できる塩、
$R_4$：スクシンイミジル基；
$R_5$：‐Ｈ、‐Ｃ（Ｏ）‐アルキル、‐Ｃ（Ｏ）‐$C_6H_5$；及び
$R_2$：‐Ｈ、‐アルキル、
用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の、直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（‐$CH_2$‐）、エチレニル（‐$CH_2CH_2$‐）又はプロピルレニル（‐$CH_2CH_2CH_2$‐）を指す。
ｂ．式Ｉの活性成分の鼻腔内での滞留時間を増加させることに実質的に寄与する生体接着性ポリマー、
前記医薬形態は、神経経路への薬物の効果的なアクセスを保証する。
【請求項４】
用量あたり０．１ｍｇ～２５ｍｇの活性成分を、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）及びポリアクリル酸の誘導体（カルボール）、又はそれらの組み合わせの群から選択される、１０～６０ｍＰａｓの粘度を有する、０．０５～６％の割合の賦形剤に配合されて含有することを特徴とする、請求項３に記載の鼻腔用医薬組成物。
【請求項５】
０．０９～１．８％の濃度のＰＥＧ；０．０５～０．７％の濃度のＣＭＣ、０．０８～１％の濃度のトコフェロール；０．００７～０．４７％の濃度の塩化ベンザルコニウム、０．００３～０．１９％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウム、及び０．００５～０．０４％の濃度のプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌防腐剤；及び３．５～５．５％の濃度のグリセロール及び０．１７～０．３８％の濃度のＴｗｅｅｎ８０、又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を、リン酸緩衝液で調整した、５．５～６．５のｐＨ、好ましくは６．３のｐＨで含有することを特徴とする、請求項４記載の鼻腔用医薬組成物。
【請求項６】
０．０９～１．８％の濃度のＰＥＧ；０．０５～０．７％の濃度のＣＭＣ、０．０８～１％の濃度のトコフェロール；０．００７～０．４７％の濃度の塩化ベンザルコニウム、０．００３～０．１９％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウム、及び０．００５～０．０４％の濃度のプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌防腐剤；及び３．５～５．５％の濃度のグリセロール及び０．１７～０．３８％の濃度のＴｗｅｅｎ８０、又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を、リン酸緩衝液で調整した、５．５～６．５のｐＨ、好ましくは６．３のｐＨで含有することを特徴とする、請求項４記載の鼻腔用医薬組成物。

【請求項７】
ＡＤに存在するコリン作動性、グルタミン酸作動性系の障害、ミトコンドリア及び炎症性レドックス系の不均衡に使用するためのマルチターゲット化合物の医薬組成物であって、前記化合物が、式Ｉを有する化合物の群から選択されることを特徴とする医薬組成物



Ｉ

ここで
$R_1$：－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－アルキレニル－$R_3$、－アルキレニル－Ｃ（Ｏ）Ｏ－$R_4$；
$R_3$：－ＣＯＯＨ、－ＯＨ、－ＳＨ、－$NH_2$、－ＮＨ－アルキル－、－ＮＨ－アルキレニル－$NH_2$、－ＮＨ－アルキレニル－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－アルキレニル－Ｓ－$R_5$、－ＮＨ－ジチオカルバマートアルキル、－Ｎ－アルキルジチオカルバマートアルカリ土類金属塩；又は前述の基の薬学的に許容できる塩、
$R_4$：スクシンイミジル基；
$R_5$：－Ｈ、－Ｃ（Ｏ）－アルキル、－Ｃ（Ｏ）－$C_6H_5$；及び
$R_2$：－Ｈ，－アルキル、用語「アルキル」は、飽和炭素原子及び水素原子の、直鎖又は分枝脂肪族鎖であることを特徴とし、好ましくはメチル又はエチルである、用語「アルキレニル」は、直鎖又は分枝アルキル基の二価の類似体、好ましくはメチレニル（－$CH_2$－）、エチレニル（－$CH_2CH_2$－）又はプロピレニル（－$CH_2CH_2CH_2$－）を指す、ここで前記医薬組成物は薬学的に許容できる賦形剤を含有する。

【請求項８】
錠剤が、ポリエチレンオキシド、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ＣＣＮａ）、セルロース誘導体、Ｅｕｄｒａｇｉｔ　ＲＳ　ＰＯ及びポリビニルピロリドン、又はその組み合わせの群から選択される、５％ｗ／ｗ～８０％ｗ／ｗ、好ましくは１０％ｗ／ｗ～７０％ｗ／ｗの割合であるポリマーマトリックス中に、１ｍｇ～１００ｍｇの活性成分を含有することを特徴とする、請求項７のＡＤに存在するコリン作動性、グルタミン酸作動性系の障害、ミトコンドリア及び炎症性レドックス系の不均衡に使用するためのマルチターゲット化合物の医薬組成物。

【請求項９】
前記鼻腔用医薬組成物は、用量あたり０．１ｍｇ～２５ｍｇの活性成分を、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＭＰＣ）、ヒドロキシプロピルセルロース（ＨＰＣ）、メチルセルロース（ＭＣ）、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）及びポリアクリル酸の誘導体（カルボール）、又はそれらの組み合わせの群から選択される、１０～６０ｍＰａｓの粘度を有する、０．０５～６％の割合の賦形剤に配合されて含有することを特徴とする、請求項７に記載のＡＤに存在するコリン作動性、グルタミン酸作動性系の障害、ミトコンドリア及び炎症性レドックス系の不均衡に使用するためのマルチターゲット化合物の医薬組成物。

【請求項１０】
０．０９～１．８％の濃度のＰＥＧ；０．０５～０．７％の濃度のＣＭＣ、０．０８～１％の濃度のトコフェロール；０．００７～０．４７％の濃度の塩化ベンザルコニウム、０．００３～０．１９％の濃度のＥＤＴＡ二ナトリウム、及び０．００５～０．０４％の濃度のプロピルパラベン、又はそれらの組み合わせの群から選択される抗菌防腐剤；及び３．５～５．５％の濃度のグリセロール、０．１７～０．３８％の濃度のＴｗｅｅｎ　８

０、又はそれらの組み合わせの群から選択される保湿剤を、リン酸緩衝液で調整した、５．５～６．５のｐＨ、好ましくは６．３のｐＨで含有することを特徴とする、請求項７のＡＤに存在するコリン作動性、グルタミン酸作動性系の障害、ミトコンドリア及び炎症性レドックス系の不均衡に使用するためのマルチターゲット化合物の医薬組成物。

【国際調査報告】

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CU2021/050012

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
INV. A61K31/167 A61K31/27 A61P25/28 A61K9/00 A61K9/20 A61K47/06
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
|---|---|---|
| X | US 2016/106691 AI (CARRAZANA MARQUIZA SABLON [CU] ET AL)<br>21 de Abril de 2016 (2016-04-21) | 1-36 |
| Y | Reivindicaciones 1-7<br>párrafos [0046] , [0055]<br>figuras 1-15 ; ejemplos 1-8 ; "componentes" A-B , D-E, G | 1-5,7,8,<br>10,13,<br>14,<br>16-18,<br>20,<br>23-28,<br>30,31,<br>33,36 |
| | ----- | |
| | -/-- | |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

| Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. | Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional |
|---|---|
| 16 de Marzo de 2022 | 25 de Marzo de 2022 |
| Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional<br>EPO | Funcionario autorizado |
| N° de fax | N° de teléfono |

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Enero 2015)

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

PCT/CU2021/050012

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones N° |
|---|---|---|
| X | RIVERA-MARRERO SUCHITIL ET AL: "A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer'sdisease" , BIOORGANIC, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 20, 11 de Agosto de 2020 (2020-08-11) , XP086296996, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/ J. BMC.2020.115700 [recuperado el 11.08.2020] todo el documento, en particular :la administration of compound 8 to a mice model of Alzheimer | 1-36 |
| Y | | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |
| X | WO 2020/094161 Al (CENT NEUROCIENCIAS CUBA) 14 de Mayo de 2020 (2020-05-14) reivindicaciones 1-11 párrafos [0012] | 1-13 |
| Y | | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |
| X,P | EP 3 878 475 Al (CENTRO DE NEUROCIENCIAS DE CUBA [CU] ET AL.) 15 de Septiembre de 2021 (2021-09-15) reivindicaciones 1-14 párrafo [0011] ejemplo 8 | 1-13 |
| Y,P | | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Enero 2015)

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional Nº

PCT/CU2021/050012

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| US 2016106691 | A1 | 21-04-2016 | CA | 2904762 A1 | 04-09-2014 |
| | | | CU | 20130027 A7 | 30-10-2014 |
| | | | JP | 6595345 B2 | 23-10-2019 |
| | | | JP | 2016510007 A | 04-04-2016 |
| | | | US | 2016106691 A1 | 21-04-2016 |
| | | | WO | 2014131374 A1 | 04-09-2014 |
| | | | ZA | 201506583 B | 31-07-2019 |
| WO 2020094161 | A1 | 14-05-2020 | CA | 3118959 A1 | 14-05-2020 |
| | | | CN | 113226381 A | 06-08-2021 |
| | | | CU | 20180138 A7 | 20-10-2020 |
| | | | EP | 3878475 A1 | 15-09-2021 |
| | | | JP | 2022515706 A | 22-02-2022 |
| | | | KR | 20210091216 A | 21-07-2021 |
| | | | US | 2021290782 A1 | 23-09-2021 |
| | | | WO | 2020094161 A1 | 14-05-2020 |
| EP 3878475 | A1 | 15-09-2021 | CA | 3118959 A1 | 14-05-2020 |
| | | | CN | 113226381 A | 06-08-2021 |
| | | | CU | 20180138 A7 | 20-10-2020 |
| | | | EP | 3878475 A1 | 15-09-2021 |
| | | | JP | 2022515706 A | 22-02-2022 |
| | | | KR | 20210091216 A | 21-07-2021 |
| | | | US | 2021290782 A1 | 23-09-2021 |
| | | | WO | 2020094161 A1 | 14-05-2020 |

Formulario PCT/ISA/210 (anexo_familia de patentes) (Enero 2015)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2021/050012

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**
INV. A61K31/167 A61K31/27 A61P25/28 A61K9/00 A61K9/20
A61K47/06
ADD.
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)
A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | US 2016/106691 A1 (CARRAZANA MARQUIZA SABLON [CU] ET AL)<br>21 April 2016 (2016-04-21) | 1-36 |
| Y | claims 1-7<br>paragraphs [0046], [0055]<br>figures 1-15; examples 1-8; compounds A-B, D-E, G | 1-5,7,8,<br>10,13,<br>14,<br>16-18,<br>20,<br>23-28,<br>30,31,<br>33,36 |

-----
-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 16 March 2022 | 25/03/2022 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Renard, Delphine |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2021/050012

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | RIVERA-MARRERO SUCHITIL ET AL: "A new naphthalene derivative with anti-amyloidogenic activity as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease", BIOORGANIC, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 20, 11 August 2020 (2020-08-11), XP086296996, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/J.BMC.2020.115700 [retrieved on 2020-08-11] | 1-36 |
| Y | whole document, in particular the administration of compound 8 to a mice model of Alzheimer | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |
| | ----- | |
| X | WO 2020/094161 A1 (CENT NEUROCIENCIAS CUBA) 14 May 2020 (2020-05-14) | 1-13 |
| Y | claims 1-11<br>paragraph [0012] | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |
| | ----- | |
| X,P | EP 3 878 475 A1 (CENTRO DE NEUROCIENCIAS DE CUBA [CU] ET AL.) 15 September 2021 (2021-09-15) | 1-13 |
| Y,P | claims 1-14<br>paragraph [0011]<br>example 8 | 1-5,7,8, 10,13, 14, 16-18, 20, 23-28, 30,31, 33,36 |
| | ----- | |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/CU2021/050012

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| US 2016106691 A1 | 21-04-2016 | CA 2904762 A1 | 04-09-2014 |
| | | CU 20130027 A7 | 30-10-2014 |
| | | JP 6595345 B2 | 23-10-2019 |
| | | JP 2016510007 A | 04-04-2016 |
| | | US 2016106691 A1 | 21-04-2016 |
| | | WO 2014131374 A1 | 04-09-2014 |
| | | ZA 201506583 B | 31-07-2019 |
| WO 2020094161 A1 | 14-05-2020 | CA 3118959 A1 | 14-05-2020 |
| | | CN 113226381 A | 06-08-2021 |
| | | CU 20180138 A7 | 20-10-2020 |
| | | EP 3878475 A1 | 15-09-2021 |
| | | JP 2022515706 A | 22-02-2022 |
| | | KR 20210091216 A | 21-07-2021 |
| | | US 2021290782 A1 | 23-09-2021 |
| | | WO 2020094161 A1 | 14-05-2020 |
| EP 3878475 A1 | 15-09-2021 | CA 3118959 A1 | 14-05-2020 |
| | | CN 113226381 A | 06-08-2021 |
| | | CU 20180138 A7 | 20-10-2020 |
| | | EP 3878475 A1 | 15-09-2021 |
| | | JP 2022515706 A | 22-02-2022 |
| | | KR 20210091216 A | 21-07-2021 |
| | | US 2021290782 A1 | 23-09-2021 |
| | | WO 2020094161 A1 | 14-05-2020 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *A61K* | *47/10* | *(2017.01)* | A61K | 47/10 | |
| *A61K* | *47/38* | *(2006.01)* | A61K | 47/38 | |
| *A61K* | *47/32* | *(2006.01)* | A61K | 47/32 | |
| *A61K* | *47/22* | *(2006.01)* | A61K | 47/22 | |
| *A61K* | *47/18* | *(2017.01)* | A61K | 47/18 | |
| *A61K* | *47/14* | *(2017.01)* | A61K | 47/14 | |
| *A61K* | *47/34* | *(2017.01)* | A61K | 47/34 | |

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,NE,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,IT,JO,JP,KE,KG,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,NI,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．ＴＷＥＥＮ

３２２、ヌメロ ３２００６、カジェ ３１
(72)発明者 メネンデス ソト デル ヴァレ、ロベルト
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォリュシオン、エントレ パセオ イ ２、アパルタメント ４、ヌメロ ９５７、アヴェニダ ２５
(72)発明者 ベンコモ マルティネス、アルベルト
キューバ共和国、アルテミサ、カイミト、ヴェレダ ヌエヴァ、ヌメロ ８７０１、カジェ ３６ アリヴェラ マレロ、スキティル
(72)発明者 ガルシア プポ、ラウラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ボイエロス、エムビル、エントレ ロドリゲス モリーネ イ エントラーダ、ヌメロ １２８０８、カジェ カウリー
(72)発明者 ガルシア プポ、ラウラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、サン ミゲル デル パドロン、バリオ オブレロ、エントレ テルセライ フィナール、ヌメロ １４５１１ アルトス、カジェ メルカド
(72)発明者 ゴンザレス メサ、レオノーラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、マリアナオ、エントレ カジェ １２８ イ １２８ ベ、アパルタメント ７、ヌメロ １２６３２、アヴェニダ ５７
(72)発明者 レオン チャヴィアーノ、サミラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ラ リサ、エントレ ２３ イ ２５、アパルタメント ３、エディフィシオ ２３０８、カジェ ２４０
(72)発明者 アギラ コルドヴァ、アドリアナ
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォリュシオン、エントレ エルミタ イ アユンタミエント、ヌメロ ５５６、カジェ ラ ローザ
(72)発明者 カストロ － パロミノ アンテラ、カスレーン
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォリュシオン、エントレ ２３ イ ２１、アパルタメント １、エディフィシオ ５０３、カジェ エフェ
(72)発明者 ペントン、ロル、ジゼル
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラヤ、エントレ キンタエフェ イ セプティマ、ヌメロ ５３９、カジェ １１０
(72)発明者 オターニョ タマヨ、ラウラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ボイエロス、エントレ カジェヨン ラ ローザ イ パストラ、アパルタメント ２３、ヌメロ ５０３、カジェ ペルラ
(72)発明者 ペレス ペレラ、ラファエラ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ラ リサ、エントレ ２３０ イ ２３２、アパルタメント １１、ヌメロ ２３００８、アヴェニダ ３３

(72)発明者　セルヴァンテス ラノス、マイエル
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラヤ、エントレ ６８ イ ７０、ヌメロ ６８０４、カジェ １３
(72)発明者　ディアス ガルシア、オレステス デ イエスズ
キューバ共和国、ラ ハバナ、ラ リサ、エントレ ７３ イ アヴェニダ ７５、ヌメロ ７３０７、カジェ ２１６
(72)発明者　ドレステ ブラウン、ミリアム
キューバ共和国、ラ ハバナ、プラヤ、エントレ ３６ イ ４２、ヌメロ ３６０６、カジェ ３９

Ｆターム（参考）　4C076　AA36 AA95 BB01 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25 CC01 DD28A
DD29A DD38A DD38X DD41A DD43A DD45A DD49R DD51R DD59R DD67A EE09A
EE16A EE23A EE23X EE27A EE32A EE36A EE38A EE41A EE42A EE53A EE54A FF70
4C206　AA01 AA02 GA13 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA55 MA72
MA79 MA86 NA14 ZA16 ZC20

【要約の続き】
これらの化合物は、単独で、単剤療法として、現在ＡＤに使用されている多剤療法に代わって使用することができる。ＡＤ治療の活性成分として、ヒトに投与するための、これらの化合物、その塩、水和物、エナンチオマー、異性体、代謝物、プロドラッグの製剤は、バイオアベイラビリティ、活性成分の滞留時間、適切な排泄を高め、効果、バイオセーフティ、治療への順守及び耐性を向上する。