

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6588903号
(P6588903)

(45) 発行日 令和1年10月9日(2019.10.9)

(24) 登録日 令和1年9月20日(2019.9.20)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 31/22	(2006.01)
A 6 1 P 21/00	(2006.01)
C 1 2 N 15/11	(2006.01)
C 1 2 Q 1/6806	(2018.01)
A 6 1 K 31/19	(2006.01)
	A 6 1 K 31/22
	A 6 1 P 21/00
	C 1 2 N 15/11 Z N A
	C 1 2 Q 1/6806
	A 6 1 K 31/19

請求項の数 7 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-529439 (P2016-529439)
(86) (22) 出願日	平成26年11月14日 (2014.11.14)
(65) 公表番号	特表2016-539935 (P2016-539935A)
(43) 公表日	平成28年12月22日 (2016.12.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/065670
(87) 國際公開番号	W02015/073803
(87) 國際公開日	平成27年5月21日 (2015.5.21)
審査請求日	平成29年11月13日 (2017.11.13)
(31) 優先権主張番号	61/904,365
(32) 優先日	平成25年11月14日 (2013.11.14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	500020760 ザ・ユニバーシティ・オブ・クイーンズラ ンド オーストラリア4072クイーンズランド 州セント・ルチア
(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(74) 代理人	100102255 弁理士 小澤 誠次
(74) 代理人	100096482 弁理士 東海 裕作
(74) 代理人	100188352 弁理士 松田 一弘
(74) 代理人	100131093 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経変性障害、ならびにその治療及び診断法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

トリヘプタノインを含む、動物における筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療剤、予防剤、及び / 又は発症の遅延剤であつて、前記剤が、前記動物に投与され、それによって、前記動物において前記ALSが治療され、予防され、及び / 又は前記ALSの発症が遅延される、前記剤。

【請求項2】

動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも 5 %を含む量で、前記動物に与えられる、請求項1に記載の剤。

【請求項3】

動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも 20 %を含む量で、前記動物に与えられる、請求項2に記載の剤。

【請求項4】

動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも 30 %を含む量で、前記動物に与えられる、請求項2に記載の剤。

【請求項5】

動物がほ乳動物である、請求項1 ~ 4のいずれか1項に記載の剤。

【請求項6】

ほ乳動物がヒトである、請求項5に記載の剤。

【請求項7】

10

20

経口投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が全体として参照により本明細書に組み込まれる、2013年11月14日に出願された、米国仮特許出願第61/904,365号の利益を主張する。

【0002】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書とともに電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読フォーマットコピー（ファイル名：ULPI_018_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2014年11月12日、ファイルサイズ4キロバイト）。

10

【0003】

本発明は、概して神経変性及び／または神経筋障害の治療及び診断のための組成物ならびに方法に関する。より具体的には、本発明は、神経変性及び／または神経筋障害の治療、予防、及び／または発症の遅延のためのアナプレロティック剤の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの進行性消失とそれに付随する筋消耗を特徴とする神経変性障害である。これは、診断後2～5年以内に、増加する麻痺及び死をもたらす（Wijesekera及びLeigh, 2009）。運動ニューロンの死の原因は不明であるが、異常ミトコンドリア、ユビキチン化封入体及びニューロフィラメント凝集体が原因となると考えられている。

20

【0005】

ミトコンドリアは、トリカルボン酸（TCA）サイクル、ならびに細胞機能及び生存に必要な主な細胞エネルギー源である、アデノシン三リン酸（ATP）の大部分を産生する電子伝達系による脂肪酸のベータ-酸化及び酸化的リン酸化に関与する。したがって、運動ニューロン及び筋肉において低下したミトコンドリア機能は、エネルギー代謝の障害及びATP産生能力の低下をもたらすであろう。

30

【0006】

ヘプタン酸（C7脂肪酸）のトリグリセリドであるトリヘプタノインは、脂肪酸酸化の稀な遺伝性代謝障害を有する患者を治療するために米国で使用されている新規な代謝性治療剤である（Brunengraber及びRoeh, 2006, Roeh及びMochel, 2006）。トリヘプタノインは、ベータ-酸化によりプロピオニルCoAに代謝されるミトコンドリア内に拡散する中鎖脂肪酸として、ヘプタン酸を身体に供給する。また、ヘプタン酸は肝臓で-ヒドロペントノエート及び-ケトペントノエートのC5ケトンに代謝され、それは、両者ともモノカルボン酸輸送体により細胞に取り込まれる。プロピオニルCoAのカルボキシル化によりメチル-マロニルCoAが生成し、それはスクシニルCoAに代謝され、結果的にアナプレロシス、すなわちTCAサイクルの不十分なC4（4個の炭素を含む）中間体の再補充をもたらす（図1）。アナプレロティック酵素としては、神経細胞及び筋肉でオキサロ酢酸を生成するピルビン酸カルボキシラーゼ（Pcx）、そして最も重要なものとして、筋肉においてピルビン酸+グルタミン酸<=>-ケトグルタル酸+アラニンの反応を触媒するグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ1及び2（Gpt1及び2）、プロピオニルCoAカルボキシラーゼサブユニットA（PccA）及びB（Pccb）、ならびにメチルマロニルCoAムターゼ（Mut、図1）が挙げられる。

40

【0007】

家族性ALS患者の約20%で、また特発性ALS患者の亜集団で、スーパーオキシドグリムターゼ1（SOD1）のタンパク質変異が見出されている。通常、細胞質ゾルで見

50

られるが、ミトコンドリア内で変異SOD1が蓄積し、ALSで見出される多くのミトコンドリア障害の原因となると考えられる(Turner及びTalbot, 2008, Vučić及びKiernan, 2009, Shiら, 2010, Milanirら, 2011, Cozzolino及びCarri, 2012)。現在、SOD1において変異を過剰発現するマウスが、ALSの最も好ましい動物モデルの1つである。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、一部は、TCAサイクルが、神経変性障害ALSの病因において役割を果たし、アナブレロティック剤が疾患の発症及び/または進行に影響を及ぼし得るという発見に基づいている。

10

【0009】

本発明の1つの形態は、大まかに言えば、神経変性及び/または神経筋障害の治療、または予防及び/または発症の遅延のために、アナブレロティック剤を利用する方法に関する。

【0010】

第1の態様では、本発明は、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を有する動物の治療法を提供し、当該方法は、治療的有効量の1種以上のアナブレロティック剤を前記動物に投与し、それによって、当該動物において神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を治療するステップを含む、方法を提供する。

20

【0011】

第2の態様では、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を予防し、及び/または発症を遅延させる方法を提供し、当該方法は、治療的有効量の1種以上のアナブレロティック剤を当該動物に投与するステップを含む。

【0012】

第3の態様では、本発明は、神経変性及び/または神経筋疾患、障害または状態の予防、予防的及び/または治療的処置を、それを必要とする動物において行うことにおいて使用するための、トリヘプタノインを提供する。

【0013】

第4の態様では、本発明は、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を有する動物の予防、予防的及び/または治療的処置に使用するための、(i)治療的有効量の1種以上のアナブレロティック剤と：(ii)使用説明書とを含むキットを提供する。

30

【0014】

一実施形態では、前述の態様のいずれか1の神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態は運動ニューロン疾患(MND)である。

【0015】

他の実施形態では、MNDは、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、原発性側索硬化症(PLS)、進行性筋萎縮症(PMA)、進行性球性麻痺(PBP)、仮性球性麻痺、または脊髄性筋萎縮症(SMA)である。

【0016】

更に他の実施形態では、MNDは筋萎縮性側索硬化症である。

40

【0017】

一実施形態では、前述の態様のアナブレロティック剤は、グルタミン酸、グルタミン、ピルビン酸、及び1種以上のプロピオニルCoAの前駆体である。

【0018】

他の実施形態では、1種以上のプロピオニルCoAの前駆体は、不均一な鎖長の脂肪酸、トリグリセリド、C5ケトン体、リン脂質、分岐鎖アミノ酸及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0019】

他の実施形態では、1種以上のプロピオニルCoAの前駆体は不均一な鎖長の脂肪酸のトリグリセリドまたはリン脂質である。

50

【0020】

更に他の実施形態では、C5ケトン体は、-ヒドロキシペンタノエート及びケトペンタノエートから選択される。

【0021】

一実施形態では、プロピオニルCoAの前駆体はプロピオニカルニチンである。

【0022】

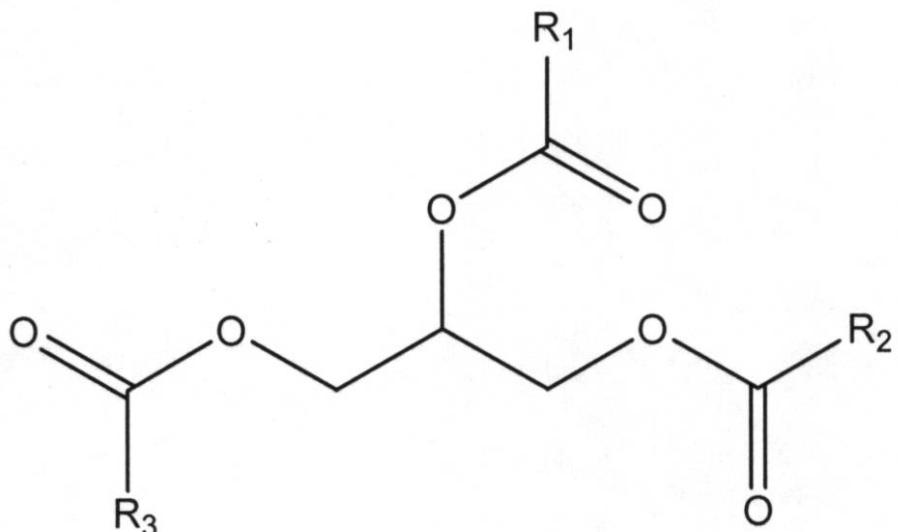
他の実施形態では、分岐鎖アミノ酸は、バリン、イソロイシン及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0023】

更に他の実施形態では、1種以上のプロピオニルCoAの前駆体は、1種以上の式I： 10

【0024】

【化1】



式I

20

30

の化合物であり、

式中、R₁、R₂及びR₃は、独立してアルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0025】

一実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₁～C₂₀アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。 40

【0026】

他の実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₃～C₁₅アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0027】

更に他の実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₅～C₁₂アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0028】

更に他の実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₆～C₉アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0029】

40

50

一実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル及びペンタデシルから選択され、全ての異性体を含む。

【0030】

他の実施形態では、式Iの化合物はトリヘプタノインである。

【0031】

他の実施形態では、式Iの化合物はトリノナノインである。

【0032】

他の実施形態では、式Iの化合物はトリペンタノインである。

【0033】

他の実施形態では、1種以上のアナプレロティック剤は、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約5%を含む量で、動物に与えられる。

10

【0034】

一実施形態では、1種以上のアナプレロティック剤は、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約20%を含む量で、動物に与えられる。

【0035】

他の実施形態では、アナプレロティック剤は、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約30%を含む量で、動物に与えられる。

【0036】

更に他の実施形態では、1種以上のアナプレロティック剤は、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約35%を含む量で、動物に与えられる。

20

【0037】

一実施形態では、動物はほ乳動物である。

【0038】

他の実施形態では、ほ乳動物はヒトである。

【0039】

本発明の他の形態は、大まかに言えば、神経変性及び/または神経筋障害に関連する遺伝子発現の変更、変化または相違を検出する方法に関する。

【0040】

第5の態様では、本発明は、動物が、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を有するか、罹患しやすいかを決定する方法を提供し、当該方法は、(i)エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする、1種以上の核酸の発現レベル、(ii)当該酵素の発現レベル及び/もしくは活性、ならびに/または(iii)エネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルを測定するステップを含む方法を提供する。

30

【0041】

一実施形態では、エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする、1種以上の核酸の発現レベルの低下もしくは減少、及び/または当該酵素の発現レベル及び/もしくは活性の低下もしくは減少、及び/もしくはエネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルの低下もしくは減少は、当該動物が神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態を有するか、罹患しやすいことを示す。

40

【0042】

第6の態様では、本発明は、1種以上のアナプレロティック剤の投与による、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態の治療または予防に対する動物の反応を監視する方法を提供し、当該方法は、(i)エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする1種以上の核酸の発現レベル、(ii)当該酵素の発現レベル及び/もしくは活性、ならびに/または(iii)エネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルを測定することを含む。

【0043】

一実施形態では、エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする1種以上の核酸の発現レベルの上昇、及び/または当該酵素の発現レベル及び/または活性の上昇、及び

50

/またはエネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルの上昇は、当該動物が1種以上のアナブロティック剤の投与に対して応答していることを示す。

【0044】

第5及び第6の態様によれば、酵素または代謝産物は、糖分解酵素または代謝産物、TCAサイクル酵素または代謝産物及びアナブロティック酵素または代謝産物からなる群から選択される。

【0045】

いくつかの実施形態では、糖分解酵素は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼアルファ1、グルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)、またはホスホフルクトキナーゼ(PFK)である。

10

【0046】

他の実施形態では、TCAサイクル酵素は、オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ及びコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニットAからなる群から選択される。

【0047】

他の実施形態では、アナブロティック酵素は、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ1、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ2、プロピオニルCoAカルボキシラーゼサブユニットA及びB、ならびにメチルマロニルCoAムターーゼからなる群から選択される。

【0048】

本明細書全体を通じて、特に状況により必要とされない限り、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」及び「含んでいる(comprising)」などの単語は、述べられている完全体または完全体群の包含を意味するが、他の任意の完全体または完全体群の除外を意味するものではないことを理解されたい。

20

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】CNS及び筋肉における、簡略化したTCAサイクル及びアナブロシスを示す。四角形で囲まれた数字(「1」、「2」、及び「3」)は、以下のサイクルのC4中間体を補充し得るアナブロティック経路を示す：1.ピルビン酸カルボキシラーゼ(主にCNSにおいて)、2.プロピオニルCoAカルボキシラーゼ、及び3.グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(筋肉では非常に重要)。C5ケトン、イソロイシン(Ile)、バリン(Val)、及びヘプタン酸はプロピオニルCoAに代謝され、その結果、プロピオニルCoAカルボキシル化経路を介してアナブロティックであり得る。OAA-オキサロ酢酸、2-OG-2-オキソグルタル酸。

30

【図2】疾患の中期段階及び末期における、hSOD1^{G93A}マウスの腓腹筋における代謝の変化を示す。パネルAは、野生型(WT)またはhSOD1^{G93A}(SOD)マウスにおける、乳酸またはグルコースの代謝レベルを示す。乳酸レベルは、SODにおいては、WTマウスと比べ、中期段階(110~130日)で低下し、これは、解糖が減少したことを示す。一方、末期(150~175日)では、SODマウスにおいて、WTマウスと比べ、グルコースが上昇し、これは、グルコース代謝が低下したことを示す。パネルBは、中病期(110~130日)における、野生型(WT)またはhSOD1^{G93A}(SOD)マウスにおける、いくつかの酵素の酵素活性レベルを示す。データは、WTマウスと比べ、SODマウスの腓腹筋における最大酵素活性が低下することをデータは示す。PGI-グルコースリン酸イソメラーゼ-28.5%低下、PFK-ホスホフルクトキナーゼ-53%低下、OGDH-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ-25%低下。^{*}
p < 0.05 t-検定。N = 5~8マウス/群。

40

【図3A-3E】トリヘプタノイン処置が、hSOD1^{G93A}マウスにおいて、後肢握力の喪失を遅延させることを示す。図3A及び3Bは、対照食(CON)またはトリヘプタノイン(TRIH)食を与えられた野生型(図3A)またはhSOD1^{G93A}(図3B)マウスの後肢握力を示す。図3Aのデータは、トリヘプタノイン(緑色の開放三角形、n = 15)、及び対照食の野生型マウス(黒色の塗りつぶされた四角形、n = 12)の

50

間で、握力に明らかな差がないことを示す。図3Bのデータは、高コピー数の導入遺伝子 $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスでは、対照食（青色の開放円、 $n = 5$ ）に対し、トリヘプタノイン（赤色の十字型； $n = 8$ ）で、握力が時間とともに異なっていたことを示し、18及び19.5週において著しく高いグリップ強度であった（ $p < 0.05$ Bonferroni ポストホック試験）。図3Cは、対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスの平均後肢握力を示す。図3Cのデータは、対照食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウス（ $n = 8$ ）において、全体として高い後肢握力が経時的な曲線下面積に見られたことを示す（ $n = 5$ 、 $p < 0.05$ ；t-検定）。図3Dは、対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスにおける、後肢握力喪失の開始（週）を示す。図3Dのデータは、対照食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウス（ $n = 5$ 、 $p < 0.002$ ；t-検定）と比較した時に、トリヘプタノインを与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウス（ $n = 8$ ）において後肢握力喪失の開始が2.8週遅れたことを示す。図3Eは、マウスにおける、 $h\text{SOD1}^{G93A}$ 導入遺伝子コピー数に対してプロットした、後肢握力喪失の開始時の $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスの歳（週）を示す。図3Eのデータは、導入遺伝子コピー数に対する強度喪失開始の歳との間の線形回帰が、トリヘプタノイン（ $R^2 = 0.91$ ）に対して対照食（ $R^2 = 0.89$ ）を与えた群の間で顕著に異なることを示す。特に、x及びy切片は2つの回帰直線間で異なるが（ $p < 0.001$ ）、勾配（ $p = 0.90$ ）は異なるない。

【図3F】対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスのロータロッドにおけるバランス喪失の開始を（週で）示す。図3Fのデータは、対照食に対してトリヘプタノイン食を与えた $SOD1^{G93A}$ マウスにおけるバランス喪失の開始が顕著に13日遅れた（ $p = 0.0016$ ）ことを示す。

【図3G】マウスの歳に対してプロットした、対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた野生型（WT）または $h\text{SOD1}^{G93A}$ (SOD) マウスの体重を示す。図3Gのデータは、経時的な体重が、対照食に対してトリヘプタノインを与えた野生型マウスと、いずれかの食餌における $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスに対する対照食における野生型マウスとの間に顕著に異なっていたことを示す。

【図3H】対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスの体重減少の開始を示す。図3Hのデータは、対照食を与えた $SOD1^{G93A}$ マウス（ $n = 5$ ）と比較し、トリヘプタノインを与えたマウス（ $n = 8$ ）における体重減少の開始が、11日遅れたことを示す（ $p = 0.0076$ ，t-検定）。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

【図4】対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）食を与えた、10週齢の野生型（WT）または $h\text{SOD1}^{G93A}$ (SOD) マウスの運動ニューロン計測アッセイの結果を示す。図4のデータは、トリヘプタノインが、トリヘプタノイン（TRI H）を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスにおいて、運動ニューロンの死を軽減したことを示す。対照食（CON、 $n = 3$ ）を与えたマウスにおけるL2及びL5領域間の運動ニューロンの37%の統計的に有意な喪失は、21%の喪失を示すトリヘプタノインを与えたマウス（ $n = 4$ ）において統計的に有意ではない。一元分散分析により分析された立体的計測に、チューキーの多重比較検定が続く。

【図5】ハウスキーピング遺伝子に対する、対照食（CON）またはトリヘプタノイン（TRI H）を与えた、10週齢の野生型及び $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスの腓腹筋のGapdh、Pdhdhアルファ、Ogdh及びSdhdhサブユニットA mRNAの定量的リアルタイムPCRの結果を示す。Pdhalpha1、OGDH及びSDHサブユニットAの転写物のレベルは、対照食（CON）を与えた $h\text{SOD1}^{G93A}$ マウスで低下した。このPdhalpha1及びSDHalpha1転写物レベルの低下は、トリヘプタノインを給餌することにより減少した。各遺伝子及び各時点における一元分散分析に続き、有意であればBonferroni事後テストを行った（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ）。

【図6】アナブレロシスに関与する遺伝子、特に、ピルビン酸カルボキシラーゼPCX、

グルタミン酸ピルビン酸トランスフェラーゼ G p t 1 及び 2 、プロピオニル C o A カルボキシラーゼのアルファ (P c c a) 及びベータ (P c c b) サブユニット、ならびにメチルマロニルムターゼ (M u t) の相対的発現レベルを示す。発現を、対照食 (C O N) またはトリヘプタノイン (T R I H) を与えた 10 週齢の野生型及び h S O D 1 ^{G 9 3 A} マウスの腓腹筋において、ハウスキーピング遺伝子と比較する。各遺伝子及び各時点における 1 元分散分析に続き、有意であれば Bonferroni 事後テストを行った (* p < 0.05) 。

【図 7】 A L S 患者及び実験マウスにおいて見られる代謝の変化、ならびにトリヘプタノインの作用のメカニズムを示す。 M N D 患者及びマウス M N D モデルにおいては、解糖、クエン酸合成 (C S) 、オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (O G D H) (R u s s e l 10 1 ら、 2 0 1 2) の活性、及び複合体 I の活性 (A l l e n ら、 2 0 1 4) 、ならびにオキサロ酢酸 (O A A) 及び 2 - オキソグルタル酸 (2 - O G) のレベル (N i e s s e n ら、 2 0 0 7) が低下する (これらの酵素または代謝物の隣に点線の矢印で示す) 。また、中期段階 (1 1 0 ~ 1 3 0 日) における、 h S O D 1 ^{G 9 3 A} マウスでの P G I 、 P F K 及び O G D H の最大酵素活性が低下するという本発明者らの発見は、これらの酵素の隣に実線の矢印で示す。トリヘプタノインは、プロピオニル C o A に、後にスクシニル C o A に代謝される。これは、 1) T C A サイクルの代謝産物レベル、 2) アセチル C o A の酸化、及びアセチル C o A を供給する全ての原料、 3) 電子伝達系複合体 I 及び I I の電子の数、ならびに 4) A T P 生産を増大させ、神経細胞及び筋肉の生存率の改善をもたらすであろう。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 0 】

本発明は、少なくとも一部は、 T C A サイクルが、神経変性障害 A L S の病因において役割を果たし、アナプレロティック剤が疾患の発症及び / または進行に影響を及ぼし得るという発見に基づいている。

【 0 0 5 1 】

広い態様では、本発明は、治療的有効量の 1 種以上のアナプレロティック剤を動物に投与することにより、神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態を治療するだけでなく、神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態を予防し、及び / もしくは発症を遅延させる方法にも関する。

【 0 0 5 2 】

他の実施形態では、本発明は、神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態の予防、予防的及び / もしくは治療的処置において使用するためのトリヘプタノインを提供する。

【 0 0 5 3 】

本明細書で用いられる場合、「治療すること」(または「治療する」もしくは「治療」) は、発症し始めた後に神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態の兆候または症状を改善する治療介入を意味する。神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態と関連する「改善する」という用語は、治療のあらゆる観察可能な有益な効果を意味する。治療は、対象に対して有益であることが絶対的である必要はない。有益な効果は、当業者に公知のあらゆる方法または基準を用いて判定することができる。

【 0 0 5 4 】

本明細書で用いられる場合、「予防すること」(または「予防する」もしくは「予防的」) 、及び「発症を遅延する」は、神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態の症状、様相もしくは特徴の発症の前に、それぞれ、当該症状、様相もしくは特徴の発症を予防もしくは遅延するように開始する、一連の行動 (例えば、治療的有効量の、 1 種以上のプロピオニル C o A 前駆体を投与する) を意味する。そのような予防は、対象に有益であるために絶対的なものである必要はないことが理解されるべきである。「予防的」処置は、神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害または状態の症状を示していないか、または初期の症状のみを示す対象に対し、または神経変性及び / もしくは神経筋疾患、障害

10

20

30

40

50

または状態の症状、様相もしくは特徴のリスクを低減する目的で投与される処置である。「治療的」処置は、神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態の少なくとも1つの症状、様相もしくは特徴を示す対象に、当該症状、様相もしくは特徴を治療、改善もしくは逆転し、及び／または進行を少なくとも一部停止及び／または遅延するように、投与される処置である。

【0055】

本発明との関連で、「神経変性疾患、障害または状態」は、動物における神経細胞または神経組織の構造、機能、シグナル伝達及び／または数の進行性低下及び／または悪化を含む、あらゆる疾患、障害及び／または状態を意味する。本明細書で用いられる場合、「神経筋疾患、障害または状態」は、動物の筋肉を神経支配及び／または連結する神経細胞または神経組織の構造、機能、シグナル伝達及び／または数の進行性低下及び／または悪化を含む、あらゆる疾患、障害及び／または状態を意味する。

10

【0056】

神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態の原因は、遺伝子変異、タンパク質のミスフォールディング、及び／または凝集、自己免疫疾患、ミトコンドリア機能障害、軸索輸送の欠陥、異常なアポトーシス、及び／またはオートファジー、及び酸化ストレスの上昇、及び／または活性酸素種（ROS）産生が含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

限定されないが、神経変性障害としては、パーキンソン病及び関連障害、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病及び認知症の他の形態、脊髄小脳失調症、フリードライヒ失調症、ティサックス病、レビー小体病、プリオン病、（例えば、クロイツフェルトヤコブ病）、多発性硬化症（MS）、ピック病、シャイ・ドレーガー症候群、橋小脳形成不全、神経セロイドリポフスチン症、ゴーシェ病、鉄沈着を伴う神経変性、痙性失調症／対麻痺、核上性麻痺、中脳辺縁皮質認知症、視床変性、皮質・線条体・脊椎変性、皮質ベースの神経節変性、大脳小脳皮質変性、リー症候群、ポリオ後症候群、遺伝性筋萎縮症、脳炎、神経炎、水頭症、及び運動ニューロン疾患が挙げられる。

20

【0058】

更に、当業者は、神経筋障害としては、パーキンソン病及び関連障害、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、フリードライヒ失調症、ティサックス病、レビー小体病、末梢神経障害、重症筋無力症、MS、リー症候群、ポリオ後症候群、遺伝性筋萎縮症、痙性失調症／対麻痺、及び運動ニューロン疾患が挙げられるが、これらに限定されないことを理解するであろう。

30

【0059】

本発明との関連で、請求項に記載の方法による予防的及び／または治療的処置の対象となる神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態を有する動物は、既存の神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態を有するか、そのような疾患、障害または状態に罹患しやすいと判定されている。

【0060】

一実施形態では、この広い態様の神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態は運動ニューロン疾患である。

40

【0061】

概括的に言えば、運動ニューロン疾患は、通常、疾患に冒された動物の運動ニューロンが関与する神経変性及び／または神経筋障害の形態である。当業者に容易に理解されるように、運動ニューロンは、体幹、肢及び指骨の随意筋、ならびに発声、嚥下及び呼吸に影響を与える筋肉を制御する神経細胞である。したがって、MNDの臨床症状としては、筋力低下及び／または消耗、筋けいれん、嚥下困難、不明瞭な発語、筋振戦／線維束形成、認識力低下、呼吸困難、呼吸不全、疲労、及び体重減少が挙げられるが、これらに限定されない。運動ニューロン疾患としては、筋萎縮性側索硬化症（ALS、ルーゲーリック病としても知られる）、原発性側索硬化症（PLS）、進行性筋萎縮症（PMA）、進行性

50

球麻痺（PBP）、仮性球性麻痺及び脊髄性筋萎縮症（SMA）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

上記を考慮すると、運動ニューロン疾患は、ALS、PLS、PMA、PBP、仮性球性麻痺またはSMAであり得る。

【0063】

一実施形態では、運動ニューロン疾患はALSである。

【0064】

「アナプレロティック剤」は、TCAに組み込まれた際に、TCAサイクルの1種以上の枯渇したC4（4個の炭素を含む）中間体を補充するか、またはTCAサイクルの1種以上の中間体のレベルを維持もしくは増加させ、または両者を実施する物質を意味する。
10

【0065】

当業者が認識するように、TCAサイクル中間体のレベルは、TCAサイクルの正常な機能及び調節のために重要である。しかし、ほとんどのTCAサイクル中間体は、細胞内の他の代謝経路に関与し、その結果、ミトコンドリアからそれらが流出することに続いて、それらのそれぞれのレベルは、TCAサイクルで減少することが見られる可能性がある。その後、このようなTCAサイクル中間体のレベルの減少は、サイクルの最適な機能を阻害する可能性がある。TCAサイクルにアナプレロティック剤を入れることにより、この流出が克服され、それにより、サイクルの最適な機能のためのTCAサイクルサイクル中間体の適切なレベルが維持される。
20

【0066】

一実施形態では、本発明の1種以上のアナプレロティック剤は、クエン酸、アルファ-ケト-グルタル酸（2-オキソグルタル酸）、グルタミン酸、グルタミン、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、ピルビン酸、及び／または1種以上のプロピオニルCoAの前駆体である。

【0067】

これらのアナプレロティック剤の任意の適切な塩（例えば、カルシウム、ナトリウム、マグネシウムまたはカリウム塩）、プロドラッグ、類似体、誘導体、置換及び／または分岐型、前駆体及び誘導体も、本発明の範囲内であることが企図される。例えば、本発明の塩としては、グルタミン酸モノナトリウム、ピルビン酸カルシウム（及びピルビン酸カルシウム一水和物）、クレアチンピルベート、ピルビン酸マグネシウム、ピルビン酸カリウム及びピルビン酸ナトリウムを挙げることができる。
30

【0068】

アナプレロティック剤の一実施形態はプロピオニルCoAの前駆体である。「プロピオニルCoAの前駆体」は、それから、動物体の細胞または組織内で起こる1以上の代謝反応によりプロピオニルCoAが形成し得る物質を意味する。

【0069】

これには、その範囲内に、妥当な場合、それらの塩、プロドラッグ、類似体、誘導体、置換、非置換の分岐型、及び他の不均一な鎖長の脂肪酸、及び誘導体が含まれる。

【0070】

プロピオニルCoAの前駆体の典型例は、不均一な鎖長の脂肪酸、特に7個の炭素-脂肪酸、ヘプタノエート、不均一な鎖長の脂肪酸のトリグリセリドを含むトリグリセリド、式1の化合物、1つ以上の不均一な脂肪酸を含むリン脂質、C5ケトン体（例えば、-ケトペントノエート（3-ケト吉草酸）、及びヒドロキシペントノエート（3-ヒドロキシ吉草酸）であるが、これらに限定されない）である（Kinman 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab 291(4): E860-6, Brunengraber及びRoe 2006, J Inherit Metab Dis 29(2-3): 327-31）。上記プロピオニルCoAの前駆体の例としては、その化合物自体、ならびに該当する場合はそれらの塩、プロドラッグ、溶媒和物及び誘導体が挙げられる。
40
50

【0071】

いくつかの実施形態では、プロピオニルC_oAの少なくとも1種の前駆体は、不均一な鎖長の脂肪酸、トリグリセリド、リン脂質、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0072】

少なくとも1種のプロピオニルC_oAの前駆体は、不均一な鎖長の脂肪酸、例えば7個の炭素の脂肪酸であってもよい。他の実施形態では、少なくとも1種のプロピオニルC_oAの前駆体は、トリグリセリド、例えば不均一な鎖長の脂肪酸のトリグリセリドである。更なる実施形態では、少なくとも1種のプロピオニルC_oAの前駆体は、1または2個の不均一な鎖長の脂肪酸を含むリン脂質である。いくつかの実施形態では、少なくとも1種のプロピオニルC_oAの前駆体はC5ケトン体である。10

【0073】

プロドラッグの例としては、ヒドロキシアルカノエートのエステル、オリゴマー、例えばオリゴ(3-ヒドロキシ吉草酸)(Seebach 1999, Int J Biol Macromol 25(1-3): 217-36)、ならびに個体に投与されたときにプロピオニルC_oAを供給し得る、他の薬学的に許容される誘導体が挙げられる。溶媒和物は、前述のプロピオニルC_oAの前駆体と薬学的に許容される溶媒との間に形成される複合体を指す。薬学的に許容される溶媒の例としては、水、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、酢酸、及びエタノールアミンが挙げられる。本明細書で用いられる場合、本発明の「誘導体」化合物は、例えば他の化学的部分との結合または複合体形成により変化する。20

【0074】

ある特定の実施形態では、プロピオニルC_oAの前駆体は、不均一な鎖長の脂肪酸である。本発明は、その範囲内に不均一な鎖長の脂肪酸のエステルをも含む。不均一な鎖長の脂肪酸は、奇数個の炭素数の脂肪酸をも意味する場合があることを当業者は認識するであろう。不均一な鎖長の脂肪酸は、プロピオン酸、ペンタン酸、ヘプタン酸、ノナン酸及びウンデカン酸からなる群から選択することができる。

【0075】

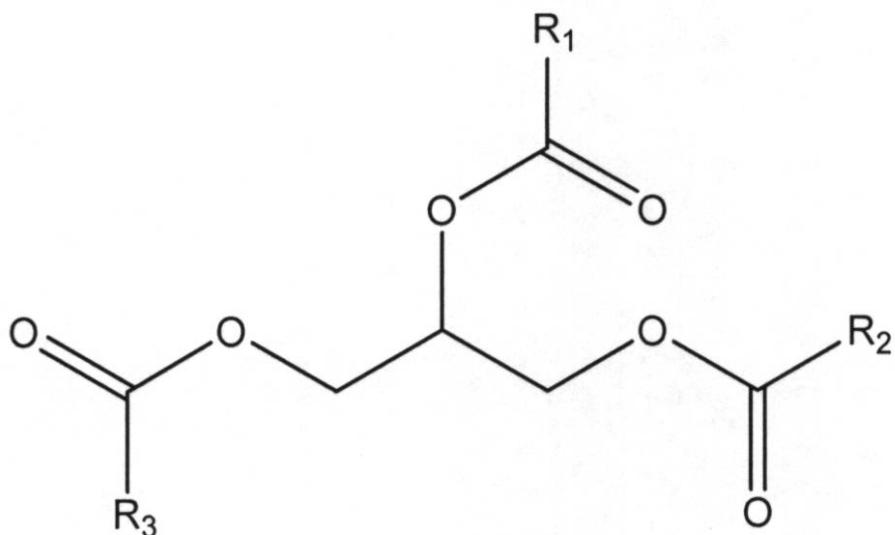
置換、不飽和及び/または分岐鎖の不均一な鎖長の脂肪酸、ならびに他の修飾された不均一な鎖長の脂肪酸は、本発明の範囲を逸脱することなく使用することができる。30

【0076】

他の実施形態では、少なくとも1種のプロピオニルC_oAの前駆体は、式I:

【0077】

【化2】



10

式 I

20

の化合物の1以上であってもよく、
式中、

R₁、R₂及びR₃は、独立してアルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0078】

一実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₁～C₂₀アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。 30

【0079】

更なる実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₃～C₁₅アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0080】

他の更なる実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₅～C₁₂アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。

【0081】

更に他の更なる実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してC₅～C₉アルキル、アルケニルまたはアルキニルから選択される。 40

【0082】

ある特定の実施形態では、R₁、R₂及びR₃は同一であり、C₅、C₆、C₇、C₈、及びC₉アルキルからなる群から選択され、特定の実施形態では、C₅、C₇及びC₉アルキルから選択され、更に他の特定の実施形態では、C₇アルキルである。

【0083】

いくつかの実施形態では、R₁、R₂及びR₃は、独立してメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル及びペンタデシルから選択され、全ての異性体を含む。

【0084】

50

R_1 、 R_2 及び R_3 は、独立してヘキシル、ヘプチル、オクチル及びノニルから選択してもよく、全ての異性体が含まれる。

【0085】

特定の実施形態では、式Iの化合物は奇数個の炭素のトリグリセリドである。ある特定の実施形態では、奇数個の炭素のトリグリセリドは、トリペンタノイン、トリヘプタノイン及びトリノナノインから選択される。

【0086】

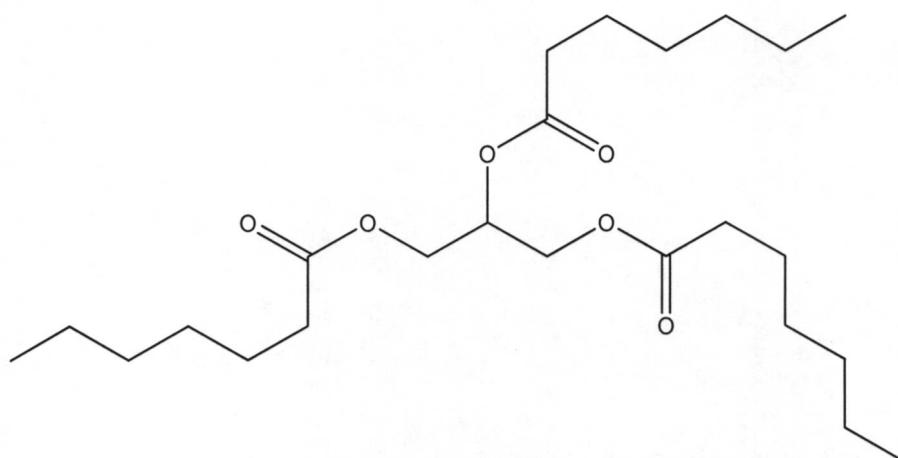
一実施形態では、式Iの化合物は1、2または3個のC7鎖を含んでいてもよいC7トリグリセリドである。

【0087】

一実施形態では、式Iの化合物は、下記に示すトリヘプタノインである。この化合物は、1,3-ジ(ヘプタノイルオキシ)プロパン-2-イルヘプタノエート、1,2,3-プロパントリイルトリヘプタノエート、及びグリセロールトリヘプタノエートを含む、多くの他の名称によっても知られ得る。

【0088】

【化3】



10

20

30

トリヘプタノイン

【0089】

他の実施形態では、式Iの化合物はトリノナノインである、この化合物は、グリセロールトリノナノエート及びグリセリルトリペラルゴネートを含む多くの他の名称によっても知られ得る。

【0090】

「アルキル」という用語は、任意に置換されている、1~20個の炭素原子を有する直鎖及び分岐鎖の炭化水素基を意味する。必要に応じて、アルキル基は特定の数の炭素原子を有してもよく、例えばC₁~C₆アルキルであり、これは直鎖状または分枝鎖状配置において1、2、3、4、5または6個の炭素原子を含む。アルキル基の非限定的例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、s-及びt-ブチル、ペンチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、ヘキシル、ヘプチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2-エチルブチル、3-エチルブチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペントデシルが挙げられる。

【0091】

40

50

「アルキレン」という用語は、アルカンジイルとしても知られる、いずれかの末端で置換されている飽和脂肪族鎖を意味する。非限定的な例としては、-CH₂-、-CH₂CH₂-及び-CH₂CH₂CH₂-を挙げることができる。

【0092】

「アルケニル」という用語は、2~20個の炭素原子を有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する、任意で置換された不飽和の直鎖状または分枝鎖状の炭化水素基を意味する。必要に応じて、アルケニル基は特定の数の炭素原子を有してもよく、例えばC₂~C₆アルケニルであり、これは直鎖状または分枝鎖状配置において2、3、4、5または6個の炭素原子を含む。アルケニル基の非限定的な例としては、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、s-及びt-ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプタ-1,3-ジエン、ヘキサ-1,3-ジエン、ノナ-1,3,5-トリエン等が挙げられる。

【0093】

「アルキニル」という用語は、2~20個の炭素原子を有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有する、任意で置換された不飽和の直鎖状または分枝鎖状の炭化水素基を意味する。必要に応じて、アルキニル基は特定の数の炭素原子を有してもよく、例えばC₂~C₆アルキニル基は、直鎖状または分枝鎖状配置において2、3、4、5または6個の炭素原子を含む。アルキニル基の非限定的な例としては、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル等が挙げられる。

【0094】

他の実施形態では、本発明は、1または2種の不均一な鎖長の脂肪酸を含むリン脂質の投与を企図する。リン脂質は、ホスファチジン酸(ホスファチデート)、ホスファチジルエタノールアミン(セファリン)、ホスファチジルコリン(レシチン)、ホスファチジルセリン及びホスホイノシチドからなる群から選択することができる。

【0095】

当業者は、プロピオニルCoAの前駆体の標準的な製造方法を認識している。当業者は、例えば、合成法に関するテキスト(その非限定的な例は、Smith M. B. 及びMarch J., March's Advanced Organic Chemistry, 第5版, John Wiley & Sons Inc., 2001、ならびにLarock R. C., Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Ltd., 1989)を参照することにより、本明細書に記載された化合物を得るための適切な条件を決定することができる。更に、官能基の選択的操作は、他の官能基の保護を必要とする場合がある。不必要的副反応を防止するための適切な保護基は、Green及びWuets, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons Inc., 第3版, 1999に提供されている。

【0096】

本発明のいくつかの実施形態では、プロピオニルCoAの前駆体は7個の炭素原子(C₇)の脂肪酸源またはその誘導体である。このような7個の炭素の脂肪酸源またはその誘導体の例としては、トリヘプタノイン、n-ヘプタン酸、n-ヘプタノエート、n-ヘプタン酸を含むか、n-ヘプタン酸と、n-ペンタン酸、n-ノナン酸、またはその両者のような異なる脂肪酸とを含むトリグリセリドが挙げられるが、これらに限定されない。7個の炭素の脂肪酸源の誘導体の例としては、4-メチルヘキサノエート、4-メチルヘキセノエート、3-ヒドロキシ-4-メチルヘキサノエート、5-メチルヘキサノエート、5-メチルヘキセノエート及び3-ヒドロキシ-5-メチルヘキサノエートが挙げられるが、これらに限定されない。

【0097】

例えば、7個の炭素の脂肪酸源は、当該技術分野で公知の任意の手段により3つのn-ヘプタン酸分子及びグリセロールのエステル化により製造することができるトリグリセリドである、トリヘプタノインである。トリヘプタノインは、Ultrafragenyx Ph

10

20

30

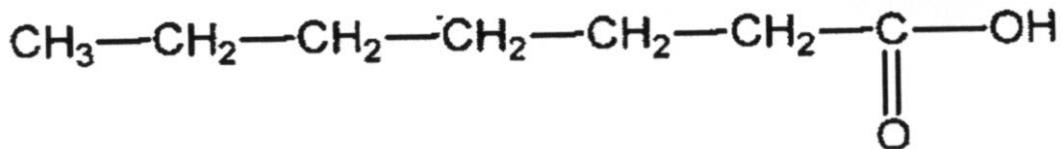
40

50

armaceutical から市販されてもいるが、これらに限定されない。

【0098】

7 個の炭素の脂肪酸の他の例は、n-ヘプタン酸である。n-ヘプタン酸は、以下の構造を有する、飽和の直鎖状の7個の炭素の脂肪酸である。



10

【0099】

ヘプタン酸は、種々のフーゼル油に相当量あることがわかっており、当該技術分野における公知の任意の手段により抽出することができる。それはまた、希硫酸中、過マンガン酸カリウムを用いてヘプタルデヒドを酸化することにより合成することができる (Ruhoff, Org. Syn. Coll. vol III, 315 (1943))。ヘプタン酸は、また Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) を通して市販されている。

【0100】

本発明によれば、任意の7個の炭素の脂肪酸源またはその誘導体を、本発明において提供される治療法のために使用することができる。ヘプタン酸、ヘプタノエート及びトリヘプタノインという用語は、本明細書において区別なく使用することができる。ヘプタン酸、ヘプタノエート及びトリヘプタノインは、本明細書の全体にわたって本発明において使用される例示的な7個の炭素の脂肪酸源として使用され、本発明の例示であることが意図されるが、決して本発明の範囲を限定すると解釈すべきでないことが、当業者により理解されるであろう。置換された不飽和、または分岐鎖ヘプタノエート、ならびに他の修飾された7個の炭素の脂肪酸源を、本発明の範囲を逸脱することなく使用することができる。

20

【0101】

いくつかの実施形態では、C7脂肪酸源は、最小限の不純物を有する製剤において提供され、例えば、製剤は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のトリヘプタノインを含む。他のいくつかの実施形態では、C7脂肪酸源は酸価を有し、0.1mg KOH/gr以下の酸価、2.8mg KOH/gr以下のヒドロキシル価を有する。

30

【0102】

本発明によれば、プロピオニルCoAの誘導体は、単独の薬剤として、または他の治療薬または治療法とともに使用することができる。いくつかの実施形態では、それらは他の治療薬と組み合わせて使用することができる。例えば、プロピオニルCoAの前駆体は、カルニチン助剤、ビオチン、ビタミンB12、またはそれらの組み合わせと併用して用いることができる。カルニチン助剤の例はL-カルニチンである。ビタミンB12の例はシアノコバラミンである。

40

【0103】

「投与」または「投与する」は、選択された経路により、組成物（例えば、1種以上のアナプレロティック剤を含む組成物）を対象に導入することを意味する。

【0104】

「治療的有効量」という用語は、その薬剤で治療される対象において所望の効果を達成するのに十分な特定の薬剤の量を記述する。例えば、これは、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態の1または複数の症状の発生を減少し、軽減し、予防し、及び/または遅延するのに必要な1種以上のアナプレロティック剤を含む組成物の量であり得る。いくつかの実施形態では、「治療的有効量」は、神経変性及び/もしくは神経筋疾患、障害または状態の症状を減少または取り除くのに十分である。他の実施形態では、「治

50

療的有効量」は、所望の生物学的効果を達成するのに十分な量、例えば、神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態と関連する、正常に機能しないミトコンドリア機能を少なくとも一部において逆転させるのに効果的な量である。

【0105】

理想的には、アナブレロティック剤の治療的有効量は、対象において相当な細胞毒性効果を起こさずに所望の効果を誘発するのに十分な量である。神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態の1以上の症状の発症を減少し、軽減し、予防し、及び／または遅延するのに有用なアナブレロティック剤の有効量は、治療される対象、任意の関連疾患、障害及び／または状態のタイプ及び重症度、ならびに治療組成物の投与法に依存するであろう。

10

【0106】

本発明は、食餌由来カロリー摂取量の100%未満である1種以上のアナブレロティック剤の治療量の範囲内に含まれ、約5%～約90%、約15%～約80%、約20%～約60%、約25%～約50%、及びまたは約30%～約40%の範囲内であってもよい。

【0107】

特定の実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤は、食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約20.5%、少なくとも約21%、少なくとも約21.5%、少なくとも約22%、少なくとも約22.5%、少なくとも約23%、少なくとも約23.5%、少なくとも約24%、少なくとも約24.5%、少なくとも約25%、少なくとも約25.5%、少なくとも約26%、少なくとも約26.5%、少なくとも約27%、少なくとも約27.5%、少なくとも約28%、少なくとも約28.5%、少なくとも約29%、少なくとも約29.5%、少なくとも約30%、少なくとも約30.5%、少なくとも約31%、少なくとも約31.5%、少なくとも約32%、少なくとも約32.5%、少なくとも約33%、少なくとも約33.5%、少なくとも約34%、少なくとも約34.5%、少なくとも約35%、少なくとも約35.5%、少なくとも約36%、少なくとも約36.5%、少なくとも約37%、少なくとも約37.5%、少なくとも約38%、少なくとも約38.5%、少なくとも約39%、少なくとも約39.5%、少なくとも約40%、少なくとも約40.5%、少なくとも約41%、少なくとも約41.5%、少なくとも約42%、少なくとも約42.5%、少なくとも約43%、少なくとも約43.5%、少なくとも約44%、少なくとも約44.5%、少なくとも約45%、少なくとも約45.5%、少なくとも約46%、少なくとも約46.5%、少なくとも約47%、少なくとも約47.5%、少なくとも約48%、少なくとも約48.5%、少なくとも約49%、少なくとも約49.5%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、またはそれ以上を含む量で、動物に与えられる。

20

【0108】

一実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤が、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約5%を含む量で動物に与えられる。

30

【0109】

更なる実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤が、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約20%を含む量で動物に与えられる。

40

【0110】

他の更なる実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤が、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約30%を含む量で動物に与えられる。

【0111】

更に他の実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤が、動物にとっての食餌由来カロリー摂取量の少なくとも約35%を含む量で動物に与えられる。

【0112】

「食餌由来カロリー摂取量の%」は、KJouleの%またはKcalの%と関連し得

50

ることを当業者は認識するであろう。

【0113】

1種以上のアナブレロティック剤を患者に提供するために、任意の安全な投与経路を使用してもよい。例えば、経腸、経口、直腸、非経口、舌下、頬、十二指腸内、胃内、静脈内、関節内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脳室内、経皮等を使用することができる。治療効果を達成するのに効果的な濃度でトリヘプタノインを含む食物の摂取により投与することができる。または、カプセルとして、またはリポソーム内、溶液または懸濁液内に混入して、単独で、または他の栄養素、甘味料及び／または香味料と組み合わせて投与することができる。カプセル及び錠剤は、セラック、及び公知の他の腸溶性剤でコーティングすることができる。

10

【0114】

剤形としては、錠剤、分散剤、懸濁液、注射、溶液、シロップ、油剤、トローチ、カプセル、座剤、エアロゾル、経皮パッチ等が挙げられる。これらの剤形は、この目的のために特に設計された、注入もしくは移植制御放出デバイス、またはこの様式で更に作用するようにされた他の形態のインプラントも含んでよい。治療薬の制御放出は、例えば、アクリル樹脂を含む疎水性ポリマー、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸及びポリグリコール酸、ならびにヒドロキシプロピルメチルセルロース等の特定のセルロース誘導体でコーティングすることにより達成することができる。更に、制御放出は、他のポリマー材料、リポソーム、及び／またはミクロスフェアを用いることにより達成することができる。

20

【0115】

経腸、腹腔、経口または非経口投与のためのアナブレロティック剤は、それぞれ、所定量の本発明の治療薬を、粉末もしくは顆粒として、または水溶液として、または水性液体、非水性液体、水中油型エマルション、もしくは油中水型液体エマルション中の懸濁液として含むカプセル、サシェ剤または錠剤等の別個の単位で存在していてもよい。ある特定の実施形態では、一種以上のアナブレロティック剤の投与は、経口によるものである。そのような1種以上のアナブレロティック剤の治療的有効量は、薬学的方法のいずれかにより調製することができるが、全ての方法は、前述の1種以上の薬剤を、1種以上の必要な成分を含む担体と会合させるようにするステップを含む。一般に、そのような組成物は、本発明の薬剤を液体担体もしくは微粉化した個体担体またはその両者と均一かつ均質に混合し、その後、必要に応じて製品を所望の体裁に成形することにより調製することができる。

30

【0116】

アナブレロティック剤は、剤形に適合した方法で、また薬剤的に有効である量で投与することができる。本発明との関連で、患者に投与される用量は、適切な期間にわたり、患者において有益な反応をもたらすのに十分であるべきである。投与すべき薬剤の量は、治療される対象に依存し、年齢、性別、体重及び一般的健康状態、医師の判断に依存するであろう要因に依存し得る。

【0117】

治療法は、ヒト、及び家畜（例えば、ウマ、ウシ及びヒツジ）、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ及びネコ）、実験動物（例えば、マウス、ラット及びモルモット）及び競技用動物（例えば、競走馬、グレーハウンド及びラクダ）等の非ヒトほ乳動物を含む、ほ乳動物（しかし、これらに限定されない）の予防的または治療的処置に適用可能であることも認識されるであろう。

40

【0118】

更なる態様では、本発明は、(i)治療的有効量の1種以上のアナブレロティック剤と、(ii)使用説明書とを含む、神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態を有する動物の治療のためのキットを提供する。

【0119】

1種以上のアナブレロティック剤は、トリペンタノイン、トリヘプタノイン及びトリノ

50

ナノインから選択することができる。

【0120】

特定の実施形態では、1種以上のアナブレロティック剤はトリヘプタノインである。

【0121】

本態様の1種以上のアナブレロティック剤は、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を更に含んでいてもよい。このような薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤は、全身投与に安全に使用することのできる固形状もしくは液状賦形剤、希釈剤もしくは封入物質を含んでいてもよい。薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を記述する有用な参考文献は、参照により本明細書に組み入れられる、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991) である。 10

【0122】

本態様の、ある特定の実施形態は、神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態の1または複数の症状のための1種以上の追加の治療薬を更に含んでいてもよい。これらとしては、例えば、酸化防止剤、抗炎症剤、抗アポトーシス化合物、コリンエステラーゼ阻害剤、アセチルコリン受容体アゴニスト及び／またはアンタゴニスト、-アドレナリン受容体アゴニスト及び／またはアンタゴニスト、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素ドナー、鎮痛薬、リルゾール(Rilutek(登録商標))、筋弛緩薬及び／または抗けいれん薬が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0123】

本態様の1種以上のアナブレロティック剤は、上で説明した剤形を含んでいてもよい。更に、当業者は、本態様のある特定の実施形態が、当該キットの剤形、及び／または組成物を投薬するのに適切な器具を含んでいてもよいことを容易に認識するであろう。このような投薬器具は、例えば、1以上のシリンジ及び／または針、プリスター・パック、アプリケーター、適切に形成した容器、吸入装置、スプーン、点滴器、噴霧器、経皮パッチ、ガーゼ、及び／または包帯(これらに限定されない)を含んでいてもよい。

【0124】

他の更なる態様では、本発明は、動物が、神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態を有するか、罹患しやすいかを決定する方法を提供し、当該方法は、(i)エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする、1種以上の核酸の発現レベル、(ii)当該酵素の発現レベル及び／もしくは活性、ならびに／または(iii)エネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルを測定するステップを含む。 30

【0125】

更に他の更なる態様では、本発明は、1種以上のアナブレロティック剤の投与による、神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態の治療または予防に対する動物の応答を監視する方法を提供し、当該方法は、(i)エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする1種以上の遺伝子の発現レベル、(ii)当該酵素の発現レベル及び／もしくは活性、ならびに／または(iii)エネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルを測定するステップを含む。 40

【0126】

神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態は上に記載されている。

【0127】

「エネルギー代謝」は、細胞のエネルギー供給、したがって生体のエネルギー供給の維持に関する全ての化学反応及び／または過程の総和を意味する。これらの反応及び／または過程は、主に酵素により触媒され、通常、エネルギーを抽出するために、グルコースのような炭水化物等の大きい分子の小さい分子への分解を伴っている。本発明については、これらの反応及び／または過程に関する、またはそれらの結果として產生される物質を代謝産物と呼ぶ。概括的に言えば、エネルギー代謝としては、解糖、TCAサイクル、酸化的リン酸化、アナブレロシス及び嫌気性呼吸が挙げられるが、これらに限定されない 50

。

【0128】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、酵素または代謝産物は、糖分解酵素または代謝産物、TCAサイクル酵素または代謝産物、ならびにアナブレオティック酵素または代謝産物からなる群から選択することができる。

【0129】

糖分解酵素の非限定的例としては、ヘキソキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、フルクトースニリン酸アルドラーーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、及びジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼが挙げられる。

【0130】

特定の実施形態では、糖分解酵素は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼアルファ1、グルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)、またはホスホフルクトキナーゼ(PFK)である。

【0131】

糖分解代謝産物の非限定的例としては、グルコース、グルコース6-リン酸、フルクトース6-リン酸、フルクトース1,6-二リン酸、グリセルアルデヒド3-リン酸、1,3-ビスホスホグリセリン酸、3-ホスホグリセリン酸、2-ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸及び乳酸が挙げられる。

【0132】

TCAサイクル酵素の非限定的例としては、クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ、スクシニルCoAシンターゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、フマラーゼ、複合体I(別名、NADHデヒドロゲナーゼ、またはNADHユビキノン酸化還元酵素)、及びリンゴ酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。

【0133】

TCAサイクル酵素は、オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ及びコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体サブユニットAからなる群から選択することができる。

【0134】

TCAサイクル代謝産物の非限定的例としては、アセチルCoA、クエン酸、シス-アコニット酸、イソクエン酸、オキサロコハク酸、オキソグルタル酸、スクシニルCoA、コハク酸、フマル酸(fumurate)、リンゴ酸及びオキサロ酢酸が挙げられる。

【0135】

アナブレオティック酵素の非限定的例としては、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、メチルマロニルCoAムターゼ、アデニロコハク酸リアーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ1、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ2ならびにプロピオニル-CoAカルボキシラーゼA及びBが挙げられる。

【0136】

アナブレオティック酵素は、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ1、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ2、プロピオニルCoAカルボキシラーゼサブユニットA及びB、ならびにメチルマロニルCoAムターゼからなる群から選択することができる。

【0137】

アナブレオティック代謝産物の非限定的例としては、アスパラギン酸、アラニン、GA B A、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、アルファ-ケトグルタル酸(2-オキソ-グルタル酸)、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、ヒスチジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、イソロイシン、バリン、プロピオニルCoA、メチルマロニルCoA及びアデニロコハク酸が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0138】

適切な技術分野の当業者は、乳酸、アラニン、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン及びアスパラギン酸等のTCAサイクル及び／またはアナブレロシスと関連する代謝産物のレベルが低下すると、これは、TCAサイクル中間体がより少なく、及び／またはアナブレロシスがより少ないことを示すと容易に認識するであろう。

【0139】

当業者に十分に認識されるように、増加したまたは減少した発現レベル（例えば、核酸もしくはタンパク質発現、または代謝産物のレベル）または活性に対する本明細書における言及は、発現の相対的及び絶対的レベルを含み、包含する。例として、発現または活性の相対的レベルは、例えば、正常もしくは非罹患個体、または個体の集団から得た試料におけるように、発現または活性の基準または標準レベルと比較して決定することができる。

10

【0140】

神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態を有するか罹患しやすい動物における、代謝産物のレベル、酵素のタンパク質発現、遺伝子発現及び／または酵素活性のレベルの変化または変質は、当該動物から得られた生物試料由来のこれらのレベルを、神経変性及び／または神経筋疾患、障害または状態を有していないか、罹患しやすくないことがわかっている他の動物のこれらのいずれかのレベル、または一般的な集団もしくは基準集団のこれらのレベルと、比較することにより決定することができる。

【0141】

20

一実施形態では、エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする、1種以上の核酸の発現レベルの低下もしくは減少、及び／または当該酵素の発現レベル及び／もしくは活性の低下もしくは減少、及び／もしくはエネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルの低下もしくは減少は、当該動物が神経変性及び／もしくは神経筋疾患、障害または状態を有するか、罹患しやすいことを示す。

【0142】

更に他の実施形態では、エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする1種以上の核酸の発現レベルの上昇、及び／または当該酵素の発現レベル及び／もしくは活性の上昇、及び／またはエネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物のレベルの上昇は、当該動物が1種以上のアナブレロティック剤の投与に対して応答していることを示す。

30

【0143】

通常、エネルギー代謝に関連する酵素をそれぞれコードする1種以上の核酸、及び／または当該酵素、及び／またはエネルギー代謝に関連する1種以上の代謝産物は、生物試料中で検出または測定される。試料は、動物から得られる液体、細胞もしくは組織試料であってもよい。

【0144】

これに関連し、「核酸」は、ゲノムDNA及びcDNAを含むが、これらに限定されない一本または二本鎖DNAであってもよく、またはmRNA及びm_iRNAを含むが、これらに限定されない一本または二本鎖RNAであってもよい。核酸の特定の例は、核酸配列の増幅に由来する「増幅産物」である。これらの酵素をコードする核酸の核酸増幅に適切なプライマーの非限定的例は、表1に示すそれぞれのヌクレオチド配列を含む。

40

【0145】

【表1】

表1. 代謝関連遺伝子の遺伝子発現試験に使用する、遺伝子名、GenBank受け入れ番号、シンボル、順方向及び逆方向プライマー配列（配列番号1～20）

遺伝子	記号	5'から3'の配列	
プロピオニル CoA カルボキシラーゼ(サブユニット A) NM_144844.2	Pcca	F AGAATTGCAAGGGAAATTGG (配列番号1) R CTAAGCCATCCCTGGTCTC (配列番号2)	10
プロピオニル CoA カルボキシラーゼ(サブユニット B) NM_025835.2	Pccb	F AGCCTACAACATGCTGGACA (配列番号3) R GGTCCCTCCCATTCAATTCTTG (配列番号4)	
メチルマロニル CoA ムターゼ NM_008650.3	Mut	F CCAAACACTGACCGTTCTCA (配列番号5) R GGAATGTTAGCTGCTTCAGG (配列番号6)	
ピルビン酸カルボキシラーゼ NM_008797.3	Pcx	F GAGCTTATCCCGAACATCCC (配列番号7) R TCCATACCATTCTCTTGGCC (配列番号8)	20
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ E1 アルファ 1 NM_008810.2	Pdha1	F AACTTCTATGGAGGCAACGG (配列番号9) R CTGACCCCTGATTAGCAGCAC (配列番号10)	
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ NM_008084.2	Gapdh	F ATACGGCTACAGAACAGGG (配列番号11) R TCTTGCTCAGTGTCCCTTGCT (配列番号12)	
オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ NM_010956.4	Ogdh	F TGCAGATGTCAATGATGAC (配列番号13) R GCAGCACATGGAAGAAGTTG (配列番号14)	30
コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体(サブユニット A) NM_023281.1	Sdha	F GGAACACTCCAAAAACAGACCT (配列番号15) R CCACCACTGGTATTGAGTAGAA (配列番号16)	
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ 1 NM_182805.2	Gpt1	F TGAGGTTATCCGTGCCAATA (配列番号17) R GTCCGGACTGCTCAGAAGAT (配列番号18)	40

グルタミン酸ピルビン酸トラン スアミナーゼ2(アラニンアミノ トランスフェラーゼ) NM_173866.3	Gpt2	F GCGACGGTATTCTACAATCC (配列番号 19) R CGCGGAGTACAAGGGATACT (配列番号 20)
----------------------------------------------------------------	------	----------------------------------------------------------------------------

【0146】

当該技術分野において周知であるように、遺伝子発現の測定法としては、ノーザンプロットティング、核酸増幅技術（例えば、q P C R、リアルタイム P C R 及び競合 P C R）、高処理発現プロファイリング（例えば、マイクロアレイ）、遺伝子発現連鎖解析（S A G E）及びRNA - seqが挙げられるが、これらに限定されない。 10

【0147】

エネルギー代謝に関連する酵素の発現レベルを測定することに適した技術は、同様によく知られている。そのような技術としては、免疫学的検定（例えば、ウェスタンプロット）、放射免疫測定、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、タンパク質マイクロアレイ技術（例えば、逆相タンパク質マイクロアレイ（P R R A））、組織学的方法（例えば、免疫蛍光法（I F）及び免疫組織化学的検査（I H C））、比色分析／蛍光分析／発光アッセイ及びプロテオミクス手法、例えば質量分析（M S）及び高速液体クロマトグラフィー（H P L C）が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0148】

また、エネルギー代謝に関連する代謝産物のレベルの測定に適した技術は、当該技術分野で周知である。そのような技術としては、比色分析／蛍光分析／発光酵素学的アッセイ、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、ガスまたは液体クロマトグラフィーと組み合わせた質量分析（M S）（G C - M S または L C - M S）及び組織学的方法（例えば、G A B Aについての免疫蛍光法（I F）及び免疫組織化学的検査（I H C））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0149】

当業者は、参考により本明細書に組み入れられる、E i s e n t h a l R 及びD a n s o n MによるE n z y m e A s s a y s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h (The Practical Approach Series) (第2版, O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , 2 0 0 2) に記載されているような、酵素活性を測定するための標準法を十分に知っている。 30

【0150】

本発明が容易に理解され、実用に供することができるよう、以下の非限定的な例が提供される。

【実施例】

【0151】

実施例1：動物にモデルにおけるA L Sについてのトリヘプタノインの効果 40

材料及び方法

動物

全ての実験はクイーンズランド大学動物倫理委員会により認可されており、クイーンズランド州の動物保護法（Queensland Animal Care and Protection Act）2001のガイドラインに従っている。使用する動物の苦しみ及び数を最小にするために全ての努力がなされた。野生型及びh S O D 1^{G 9 3 A}マウス（B 6 . C g - T g (S O D 1^{*} G 9 3 A) 1 G u r / J、ストック番号 0 0 4 4 3 5 , Jackson laboratory、米国メイン州）を、h S O D 1^{G 9 3 A}のオスをC 5 7 B / L 6 野生型のメス（クイーンズランド大学）と交配することにより作製した。マウスを、12時間明環境、12時間暗環境に収容し、食物及び水は自由に与えた。 50

実験は、動物の遺伝子型及び食餌介入に対し盲検法で行った（マウスがA L Sの表現型を発現し始めるまで）。

【0152】

食餌介入

離乳直後、マウスを、標準食（SF11-027、Specialty Feeds、米国ワシントン州）または35%のカロリーがトリヘプタノイン油（Sasol, Germany）に由来する同等の食餌（SF11-028、Specialty Feeds）のいずれかに配置した。全ての食餌は、タンパク質、ミネラル、酸化防止剤及びビタミン含有量が、そのカロリー密度に対して同等であった（Thomasら、2012）。トリヘプタノインは、食餌中のショ糖、複合炭化水素及び長鎖脂肪の一部を置換する。

10

【0153】

酵素アッセイ

サイトゾル及びミトコンドリア画分を、冷却した分離緩衝液（10 mM EDTA, 215 mM D-マンニトール, 75 mM ショ糖 sucrose, 0.1% BSA及び20 mM HEPES, pH 7.4）中、均質化（Potter-Elvehjem組織粉碎器）により、腓腹筋から分離した。試料を、4、700 gで10分間遠心分離した。上清を集め、4、10, 500 gで10分間遠心分離し、上清を集め、ペレットを1 mLの分離緩衝液に再懸濁した。遠心分離ステップを繰り返し、集められた上清（サイトゾル画分）及び再懸濁した沈殿物（ミトコンドリア画分）を-80に貯蔵した。

20

【0154】

全ての酵素の活性は、Sunrise Tecanマイクロプレートリーダー（Tecan、スイスMannedorf）により25で連続分光学的定量法により測定した。NAD及びNADPの還元（それぞれ、OGDH及びPGI活性）、またはNADHの酸化（PFK活性）を、340 nmの波長における時間による吸光度の変化により測定した。全ての活性率は、BCAタンパク質アッセイキット（Thermo Scientific, Illinois, USA）を用い、試料中のタンパク質のミリグラムに対して補正した。

【0155】

OGDHアッセイ

本アッセイは、Lai及びCooper, 1986から改変した。アッセイ混合物は、50 mM Tris-HCl（pH 7.4）、0.2 mM ナトリウムCoA、2 mM ニコチンアミドアデニジヌクレオチド、0.5 mM チアミンピロリン酸、0.5 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、及び10 μLの試料から分離したミトコンドリアを含んでいた。反応は、NADの還元を測定するために、10 mM のオキソグルタル酸を加えることにより開始した。

30

【0156】

PGIアッセイ

グルコースリン酸イソメラーゼ（PGI）の活性を、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼを介したNADP還元に反応を結合させることにより測定した。アッセイ混合物は、100 mM Tris-HCl（pH 7.4）、0.6 mM ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリン酸、17.5 mM 塩化マグネシウム、5 U/mL グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G8404, Sigma Aldrich）、及び5 μLの試料からのサイトゾル画分を含んでいた。反応は、10 mM のフルクトース6-リン酸を加えることにより開始した。

40

【0157】

PFKアッセイ

ホスホフルクトキナーゼの活性を、NADHの酸化を測定するための酵素、アルドラーーゼ、-グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ及びトリオースホスフェートイソメラーゼに、反応からのフルクトース1, 6-ビスリン酸の產生を結合させることにより測定した。アッセイ混合物は、80 mM Tris-HCl（pH 7.4）、2 mM ジチオス

50

レイトール、3 . 6 mM アデノシン三リン酸、0 . 6 mM 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、20 mM 塩化マグネシウム、6 U / mL アルドラーゼ (A 8 8 1 1 , Sigma Aldrich)、1 U / mL - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、及び 5 U / mL のトリオースホスフェートイソメラーゼ (G 1 8 8 1 , Sigma Aldrich)、ならびに 5 μ L の試料からのサイトゾル画分を含んでいた。反応は、15 mM のフルクトース 6 - リン酸を加えることにより開始した。

【0158】

行動試験及び観察

動物は、光サイクル内で、約 3 ~ 4 時間の行動試験を受けた。外部刺激の変化によって引き起こされる可能性の影響を最小にするように、全ての行動試験は、最小限の刺激での環境で行った。全ての試験セッション前に動物を秤量した。マウスを観察し、あらゆる非 ALS 関連死が試験から除外されることを保証するために、疾患の進行を追跡し、神経学的スコアシートに従って等級分けした。神経学的スコアは、ALS 治療開発研究所 (ALS therapy development institute) で開発された基準 (Gilliland, 2009) から改変した。倫理学的要件に従い、食料ホッパーに到達するにはあまりにも弱くなった hSOD1^{G93A} マウスは、ケージの床に湿った食物を与えられた。マウスが仰向けにされた後、15 秒以内に自分自身を正すことができない時に、試験の終点と定義された。末期または 25 週齢に達すると、トランスジェニックマウス及びそれぞの野生型の同腹仔は、ペントバルビタールの過剰投与 (120 mg / kg、腹腔内、Provet、オーストラリア) により安楽死させた。腓腹筋及び尾を含む組織を、次の分析のために集めた。体重の減少が開始した時点を判断するため、本発明者らは、12 ~ 17 週の組み合わせた平均体重の 10 % 以上が減少したことが観察され、それ以降の 3 回の全ての測定値が、もとの平均体重の 90 % 以下であった日と定義した。

【0159】

後肢握力試験

後肢握力試験を、T - バー力変換器 (Ugo Basile、イタリア) を用いて週に 2 回行った。動物は尾より保持され、その後肢が 60 ° の角度で下向きに引っ張られる前に T - バーをつかんでいることが確実にされた。両方の後肢が同時にバーを離れる場合にのみ、力変換器の読み取りを行った。各トレーニングセッションで、マウスあたり 10 回の試験の平均値を記録した。握力が低下した時点を比較するため、9 ~ 13 週の組み合わせた平均握力が 30 % 以上低下し、それ以降の 3 回の測定値がもとの平均強度の 70 % 以下であった場合に、その時点を記録した。

【0160】

ロータロッド試験

ロータロッド試験を、マウスについて設計されたロータロッド (Ugo Basile、イタリア) を用い、週に 1 回を 10 回繰り返した。動物をロッド上に配置させ、その後、1 分あたり 25 回転で 3 分間回転させた。動物が落ちる時間を記録した。本発明者らは、この時間がゼロである、ロータロッド上でバランスを失う歳を定義した。

【0161】

定量的遺伝子型決定

全てのマウスは、hSOD1^{G93A} 導入遺伝子の相対的コピー数を評価するために既に開示されている手段 (Alexanderら、2004) に従い、リアルタイム定量的 PCR により、死後に遺伝子型を同定した。使用したプライマーは、従来の PCR による遺伝子型決定のために Jackson の研究室によって文書化されている (http://jaxmice.jax.org)。5 ng のゲノム DNA 及び 5 μ L の SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems、米国カリフォルニア州) と混合した、各反応における順方向及び逆方向プライマーの最終濃度は、hSOD について 0 . 4 μ M であり、マウスインターロイキン 2 (mIL2) について 0 . 5 μ M であった。アッセイの温度プロファイルは、最初は 95 ° で、10 分間で開始、次いで、95 ° で 30 秒間、60 ° で 1 分間、及び 72 ° で 30 秒間を 40 サイクルであった

10

20

30

40

50

(A B I 7 9 0 0 H T F a s t R e a l - T i m e P C R s y s t e m , A p p l i e d B i o s y s t e m s)。最後に、95で2分間加熱し、60に15秒間冷却し、最後に15秒間で95までの2%の加熱勾配により、溶解曲線を作成した。陰性対照においてD N Aを置換するために水を加えた。C T値は、S e q u e n c e D e t e c t i o n S o f t w a r e 2.4により、生データから計算した。次いで、以下に記載した式を用いてコピー数を計算した。

$$\text{コピー数} = (2^{(C T_{hSOD1} \log_2 1.82) - (C T_{mIL2} \log_2 2.01)})2$$

【0162】

R N A抽出、c D N A合成、定量的リアルタイムP C Rアッセイ

安楽死の後、すぐに腓腹筋を取り出し、液体窒素中に凍結させた。R N Aを抽出するために、筋肉試料を製造業者の説明書に従って、液体窒素中で冷却した乳鉢及び乳棒を用いて微粉碎し、T R I試薬(L i f e T e c h n o l o g i e s、米国カリフォルニア州)に溶解し、抽出した。混入D N Aを、D N AアーゼI処理により除去し、製造業者の説明書に従って、T e t r o c D N A合成キット(B i o l i n e、英国ロンドン)を用いてc D N Aを合成した。

【0163】

定量的リアルタイムP C Rにより、いくつかの代謝関連遺伝子(G a p d h、P d h a 1、O g d h、S d h a、P c x、G p t 1、G p t 2、P c c a、P c c b及びM u t)の発現をアッセイした。全てのプライマー対(表1)を、筋c D N Aの4倍連続希釈系列を用いて、効率について評価した。得られた各プライマーの勾配を、式、4^{[(- 1 / 勾配) - 1] * 10⁰】に適用することにより効率を計算するために使用した。反応物は、希釈c D N A、5 μLのS Y B R G r e e n M a s t e r m i xならびにそれぞれ8 μMの順方向及び逆方向プライマーからなり、最初の加熱開始後に増幅させた。サイクリング及び溶解曲線についての条件は、定量的遺伝子型決定について記載したものと同一であった。試料がD N A汚染されていないことを確認するために、逆転写酵素処理なしの試料をアッセイした。ハウスキーピング遺伝子(T b p、B 2 m及びH m b s)の幾何平均に対する目的の遺伝子(g o i)の発現倍率(C T)を、各プライマー対の個々の効率(E)を考慮し、適応式を用いて計算した(V a n d e s o m p e l e r a、2 0 0 2)。}

$$\Delta C T_{g o i} = 2^{-[(C T_{g o i} \log_2 E_{g o i})}$$

$$- 3 \sqrt{(C T_{T b p} \log_2 2.03)(C T_{B 2 m} \log_2 2.03)(C T_{H m b s} \log_2 1.86)}]$$

10

20

20

【0164】

運動ニューロンの計数

35日～70日齢までマウスに対照食またはトリヘプタノイン食を与え、その時点でマウスにペントバルビタール(100 mg / k g、腹腔注射)で麻酔をかけ、0.9%食塩、次いで4%パラホルムアルデヒドでかん流した。脊髄を取り出し、更に4%のパラホルムアルデヒド中で固定し、続いてO C Tコンパウンド中に埋め込み、腰椎から16 μmの連続薄片を切り出した。切片を冷却P B Sで洗浄し、酢酸緩衝液(p H 3.4)中の0.1%チオニンで染色した。既に記載したように(B a n k s r a, 2 0 0 1 ; 2 0 0 3; F o r g a r t y r a, 2 0 1 3)、運動ニューロンを、立体的方法を用いて計数した。手短に言えば、脊髄の一方の側からの外側細胞柱(L M C)中の運動ニューロンを計数し、濃く染色された細胞質、淡い核及び暗く染色された核小体を有する大型のニューロンのみを計数した(C l a r k e及びO p p e n h e i m, 1 9 9 5)。全ニューロン計測数を得るために、第2腰椎から第5腰椎からの10薄片毎に計数し、薄片数で割り、L M Cを含む薄片の合計数でかけた。

【0165】

データ解析

統計は、いくつかの群の解析について、一元または二元配置分散分析、それに続いてB

30

40

40

50

onferroni 多重比較試験を用い、GraphPad プリズムソフトウェア（バージョン 5.03）で実施した。体重減少の発生、及び後肢握力の曲線下面積（AUC）の比較のために、両側不対 t 検定を使用した。勾配及び切片の比較を用いた線形回帰分析により、導入遺伝子のコピー数対後肢握力の減少及び体重減少の齢を比較した。データは、平均 ± 標準誤差で表わす。

【0166】

握力とロータロッドのバランスの喪失の発症の平均標準偏差を用いた検出力解析は、n = 5 が、0.05 の有意水準での 80% の力でそれぞれ、2.3 及び 1.5 週間の間の変化を観察するのに十分であったことを示した。

【0167】

結果

hSOD1^{G93A} マウスの筋肉における代謝の変化

最初に、本発明者らは、疾患の中期段階及び末期において、hSOD1^{G93A} マウスでエネルギー代謝に影響があるかを確認することを試みた。具体的には、本発明者らは、腓腹筋で、中期段階（110 ~ 130 日）で乳酸のレベルが 29% 低下したことを見出しそれは解糖作用が減少したことを示す（図 2、パネル A）。これは、グルコースリン酸の最大活性が 28.5%、またホスホフルクトキナーゼの最大活性の 53% 低下したが、酸化的ストレス感受性 TCA サイクル酵素 - オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼの最大活性が 25% 低下したという観察により説明することができる（* p < 0.05 t - 検定、N = 5 - 8 マウス / 群、図 2、パネル B）。対照的に、末期においては、筋肉のグルコースレベルは 1.9 倍上昇し、これは、解糖作用の喪失を示唆している。

【0168】

トリヘプタノインは、hSOD1^{G93A} マウスにおいて、後肢握力及びバランスの喪失の発症を遅らせる。hSOD1^{G93A} マウスにおける ALS の特徴の 1 つは、筋肉量及び強度の進行性の喪失である。したがって、後肢握力試験を使用し、対照食またはトリヘプタノイン食のいずれかでのマウスにおける疾患の進行の経過を評価した。トリヘプタノイン食のものと比較した場合、対照食（n = 12）における野生型マウスの平均後肢握力との間には観察可能な相違はなかった（n = 15；全ての hSOD1^{G93A} マウスは、導入遺伝子コピー数が低い）。対照食及びトリヘプタノイン食の野生型マウスの平均後肢握力は、一貫して 300 ~ 600 mN であった（図 3 A）。

【0169】

実験の過程で、いくつかの hSOD1^{G93A} マウスが、22 週齢以降に後肢握力の喪失を発生することが観察された。hSOD1^{G93A} 導入遺伝子コピー数の分析により、hSOD1^{G93A} マウスの亜集団が、わずか 12 ~ 17 コピーの SOD1 導入遺伝子しか有していないことが示された。全てのマウスを評価したところ（図 3 E）、導入遺伝子コピー数に対する強度喪失開始の歳の間の線形回帰が、トリヘプタノイン（R² = 0.91）と対照食（R² = 0.89）供給群間で顕著に相違している。特に、x 及び y 切片は 2 つの回帰直線（p < 0.001）間で異なっているが、勾配では異なる（p = 0.90）（これは、トリヘプタノインが、後肢握力喪失の発症を効果的に遅延させることを示す）。

【0170】

以下の分析では、SOD1 導入遺伝子をわずか 12 ~ 17 コピー有するマウスを、握力及び遺伝子発現の分析から除外した。導入遺伝子を 19 ~ 24 コピー有するマウスを、高コピー導入遺伝子数を有する 1 つのグループとして一緒にした。両食餌群の hSOD1^{G93A} マウスの握力は、400 mN を越えることは全く無かった（図 3 B）。後肢握力喪失の時間経過は、トリヘプタノイン食のものと比較した時、対照食（n = 5）の高コピー数 hSOD1^{G93A} マウスの間で顕著に異なっていた（図 3 B、n = 8；p = 0.04、二元分散分析）。Bonferroni の多重比較試験は、トリヘプタノイン食の hSOD1^{G93A} マウスが、対照食の hSOD1^{G93A} マウスと比較した時に、1.8 及び 1.9.5 週齢で高い後肢握力を有することを示した（図 3 B、p < 0.05）。トリヘプ

10

20

30

40

50

タノインの各マウスについての経時的握力の曲線下面積は、対照食に対し、38%増加した（ $p = 0.024$ 、 t -検定、図3C）。対照食のhSOD1^{G93A}マウスは、16.5週齢で後肢握力を喪失し始めた。トリヘプタノインを与えられたhSOD1^{G93A}マウスよりも、後肢握力の喪失の発症時間は2.8週遅れた（図3D）。ロータロッド試験では、hSOD1^{G93A}マウスの行動は大きく異なり、多くのマウスでは、どのようにロッドでバランスをとるかについて学ぶ「動機を与えられない」ようであり、満足のいく、発症前のベースラインに達しなかった。したがって、本発明者らは、マウスがロッド上にとどまることができなかった時点を評価することだけができた。トリヘプタノインは、バランスの喪失の発生を1.6週遅らせた（ $p = 0.0016$ ；図3F）。

【0171】

トリヘプタノインを与えたhSOD1^{G93A}マウスと与えていないものの体重減少及び生存期間体重は、hSOD1^{G93A}遺伝子導入マウスにおける疾患の他の指標である。対照食の野生型マウス（ $n = 12$ ）と比較した時、トリヘプタノイン食の野生型マウス（ $n = 15$ ）は、より遅い速度で体重が増加し、選別された時に軽くなっていた（ $p < 0.0001$ 、図3G）。14週齢で、トリヘプタノインを与えた野生型マウスは、対照食の野生型マウスより約3g軽かった（ $p < 0.05$ ）。この体重の相違は、22週齢で約4gまで増加した。

【0172】

対照食（ $n = 5$ ）及びトリヘプタノイン食（ $n = 8$ ）の19～24コピーのhSOD1導入遺伝子を有するマウスは、対照食の野生型マウスと比較した時に、軽かった（ $p < 0.0001$ ）。全時間にわたり、異なる食餌hSOD1^{G93A}遺伝子導入マウスの間に統計的な有意な差異はなかった。しかし、対照食と比較すると、トリヘプタノインを与えたhSOD1^{G93A}マウスは、7～16週から体重増加の減少の傾向を示した。生後20週後の疾患過程の間に、対照食及びトリヘプタノイン食のhSOD1^{G93A}マウスの体重は同様になった（図3G）。hSOD1^{G93A}マウスにおける体重減少の発生は、トリヘプタノイン給餌より1.6週遅れた（図3F、 $p = 0.007$ 、両側不対 t -検定）。

【0173】

hSOD1^{G93A}マウスの少数のみが疾患の末期に達し、したがって、本発明者らの生存分析は制限された力しか有しない。対照食（ $n = 5$ ）とトリヘプタノイン（ $n = 7$ ）のhSOD1^{G93A}マウスを比較した時、末期に達するまでの日数に相違は見られなかつた（172.4±3.9に対し、174.9±3.5、 $p = 0.653$ ）。これは、この小規模の試験では、トリヘプタノイン処置が生存期間を変化させなかつたことを示す。

【0174】

運動ニューロンの計数

本発明者らは、疾患の発症に相当する70日での、マウスにおけるL2及びL5間の立体制的計数により運動ニューロン数を評価した。ニューロン数は、野生型マウスと顕著に異ならなかつたので（ $n = 4$ 、図4）、対照食を与えた野生型（CON、 $n = 3 \sim 4$ ）に対する、hSOD1^{G93A}の運動ニューロンの37%の統計的に有意な喪失は、トリヘプタノインを与えることにより、軽減された。

【0175】

遺伝子発現試験

TCAサイクル代謝またはアナブレロシスが、発症の10週目に中間のコピー数のhSOD1^{G93A}マウスの腓腹筋で障害を受け得る程度を評価するため、定量的リアルタイムPCRを用い、これらの経路に関与する遺伝子の発現を比較した。2つの食餌群のhSOD1^{G93A}マウスは類似のhSOD1^{G93A}コピー数を有し、対照食においては12～17（平均14.4コピー）であり、トリヘプタノイン給餌群では12～20（平均15.75）コピーを有した（ $p = 0.51$ 、不対 t -検定）。本発明者らは、解糖に関与する酵素（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ-Gapdh）、TCAサイクル（2-オキソグルタル酸及びコハク酸デヒドロゲナーゼ、図5）及び筋肉のアナ

10

20

30

40

50

プレロティック経路に関する酵素の発現を試験することを選択した。後者は、オキサロ酢酸を産生するピルビン酸カルボキシラーゼ (P c x)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ 1 及び 2 (G p t 1 及び 2、図 5)、プロピオニル Co A カルボキシラーゼ経路の酵素 (図 6)、すなわち、一緒にプロピオニル Co A をスクシニル Co A に代謝する、プロピオニルカルボキシラーゼのアルファ及びベータサブユニット (P c c a 及び P c c b)、及びメチルマロニルムターゼ (M u t) を含む。トリヘプタノインが、観察された任意の変化を軽減することができるかどうかを調査するために、トリヘプタノインを与えられたマウスを本分析に含ませた。

【0176】

10 週齢の発症前の h S O D 1^{G 9 3 A} マウスでは、定量的リアルタイム P C R により 10 、野生型マウスと比較した時に、いくつかのデヒドロゲナーゼ及びメチルマロニルムターゼの発現が低下したことが示された。すなわち、本発明者らは、h S O D 1^{G 9 3 A} マウスにおいて、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの A 1 サブユニット (P d h a 1) が 24%、2 - オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (O g d h) が 30%、コハク酸デヒドロゲナーゼのサブユニット A (S d h a) が 23%、メチルマロニルムターゼ (M u t) が 27.5%、m R N A レベルについて統計学的に有意に減少することを見出した (図 3、5 ; 事後テストにおいて、全て事後検定において $p < 0.05$)。トリヘプタノインを与えることにより、h S O D 1^{G 9 3 A} マウスは、ピルビン酸及びコハク酸デヒドロゲナーゼの発現の変化から保護されたが、2 - オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ及びメチルマロニルムターゼからは保護されなかった。糖分解を起こす G a p d h、ならびにアナブレロシスに関与する遺伝子、G p t 1 及び 2、P c c a 及び P c c b を含む、調査を行った他の遺伝子では m R N A レベルの変化は見られなかった (図 5 及び 6)。また、トリヘプタノインの供給によりいくつかの m R N A レベルの低下が防止され、これは、効果的に筋肉及びその代謝を維持することを示す。

【0177】

考察

トリヘプタノインの効果及び臨床的意義

本研究の発見の 1 つは、h S O D 1^{G 9 3 A} マウスが、解糖及び T C A サイクルの活性において代謝の変化を示すことである (図 7 に要約)。トリヘプタノインは、グルコースに対する代替燃料を供給し、T C A サイクル、それによってグルコースを含む燃料の酸化を改善するので、これらの代謝の欠陥は、トリヘプタノインを供給することによって機構的に対処することができる。

【0178】

実際に、トリヘプタノインは、T C A サイクルに関与する酵素の遺伝子発現の減少を減らし、h S O D 1^{G 9 3 A} マウスにおいて疾患の発症及び疾患の進行を遅らせた。これは、握力の喪失及びロータロッドにおけるバランスの喪失、体重の減少、ならびに代謝遺伝子の発現の減少の回復の開始において、運動ニューロンの死の遅れとして観察された。本発明者らのデータにより、トリヘプタノインの供給が、疾患の症状の発症前に開始された、h S O D 1^{G 9 3 A} マウスの状態が明らかに改善されたことが示された。一方、発症前の h S O D 1^{G 9 3 A} マウスでは、既に脚部屈筋ニューロンの喪失が見られる (N g o r a 、 2012)。

【0179】

中鎖トリグリセリドとしては、トリヘプタノインは、搬送システムの介入なしで拡散により全ての組織及びミトコンドリアに入ることができるヘプタン酸を、急速に血液に供給する。また、肝臓により C 5 ケトンが急速に産生され、それらはモノカルボン酸輸送体によりほとんどの組織に入ることができる。したがって、この経路を介したアナブレロシスは、治療開始の直後に開始されると期待される。

【0180】

握力及びバランスの喪失に関する本発明者らの検出力解析は、本発明者らの研究が、これらの運動症状の解析に関して適当な数のマウスを使用したことを示している。このこと

10

20

30

40

50

から、本発明者のデータは、体重に関する潜在的な交絡的影響にもかかわらず、筋機能が明らかに保護されていること（疾患修飾）を示す。これらのデータは非常に有望であり、ALS患者の安全性の第1相臨床評価を保証するものである。

【0181】

h S O D 1 ^{G 9 3 A} マウスの筋肉における代謝変化

乳酸レベルは、ピルビン酸のものと強く相関しているので、筋肉中の乳酸レベルの低下は、解糖の減少であると解釈された。本発明者らは、糖分解酵素PGI及びPFKの活性の低下、ならびにOGDHの活性の低下のためにピルビン酸のレベルが低下し、これはTCAサイクルが遅くなつたことを示すと仮定した。更に、本発明者らの定量的リアルタイムPCRデータにより、健康な野生型マウスと比較した場合、解糖、TCAサイクル及びアナブレロシスに関与するいくつかの酵素の発現が、後肢握力がまだ正常である10週齢の時点（図3B）、h S O D 1 ^{G 9 3 A} マウスの腓腹筋内で顕著に減少していることが示された（図5、6）。まとめると、これらの酵素のこの特定の下方調節は、TCAサイクルが初期症状の発症前に筋肉内で減速し、組織の生存のためには十分でないATPが產生されることを示している。更に、本発明者らは、25週において、筋肉の主要なアナブレロティック酵素である、2種のグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（gpt1及びgpt2）のmRNAレベルが低下していることを見出たが、これは、TCAサイクル中間体のレベルが低下していることを示唆している（データは示さず）。

【0182】

疾患の経過を遅くすることに加え、トリヘプタノインは、野生型マウスと比較し、h S O D 1 ^{G 9 3 A} からの腓腹筋で減少している、いくつかの酵素の下方調節を防止した。この知見は、トリヘプタノインによるエネルギー代謝の正常化が特定の代謝遺伝子の発現低下を防止し得、次いでエネルギー供給及び組織の生存率を最適化するための健全な代謝を維持するのに役立つことを意味する。

【0183】

結論

本研究は、トリヘプタノインが、ALSの有望な新規な治療法であることを明らかにする。本発明者のデータは、ALS患者における、トリヘプタノインの初期臨床安全性及び認容性試験を支持している。

【0184】

本明細書全体を通じて、その目的は、本発明をいかなる1つの実施形態または特定の特長群にも限定することなく、本発明のいくつかの実施形態について述べることである。本発明から逸脱することなく、記述され例示されている実施形態に様々な変更と修正がなされてもよい。

【0185】

本明細書において言及される各特許及び特定の書類の開示、コンピュータプログラムならびにアルゴリズムは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。参照により組み込まれる文書中の定義が本明細書内で提供される定義と一致しない場合は、本明細書内で提供する定義が優先される。

【0186】

参考文献

Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, Heiman-Patterson TD. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 130: 7-15.

Allen SP, Rajan S, Duffy L, Mortiboys H, Higginbottom A, Grierson AJ, Shaw PJ. Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiology of Aging* 2014, 35:1499-1509.

Banks GB, Chau TN, Bartlett SE, Noakes PG. Promotion of motoneuron survival and branching in rapsyn-deficient mice. *J Comp Neurol* 2001, 429: 156-165.

10

20

30

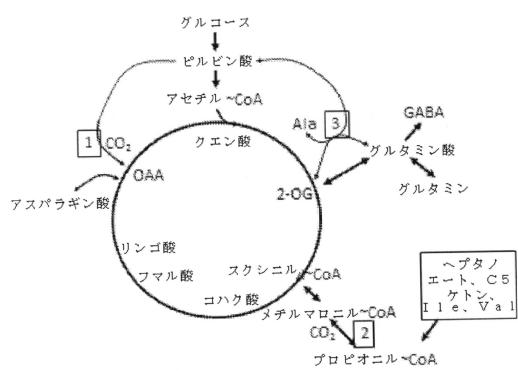
40

50

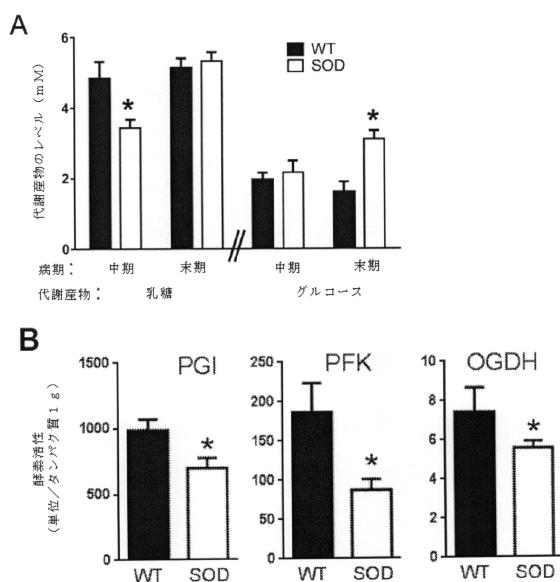
- Banks GB, Choy PT, Lavidis NA, Noakes PG. Neuromuscular synapses mediate motor axon branching and motoneuron survival during the embryonic period of programmed cell death. *Dev Biol* 2003; 257: 71-84.
- Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: Current and future. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 327-331.
- Clarke PGH, Oppenheim RW. Neuron death in vertebrate development: in vivo methods. *Methods Cell Biol*. 1995, 46: 277-321. Cozzolino M, Carri MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progr Neurobiol* 2012; 97: 54-66.
- Forgarty MJ, Smallcombe, KL, Yanagawa, Y, Obata K, Bellingham MC, Noakes PG. Genetic deficiency of GABA differentially regulates respiratory and non-respiratory motor neuron development. *Plos ONE* 2013, 8: e56257
- Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S. No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS. *PLoS One* 2009; 4: e6489.
- Lai JCK and Cooper AJL. Brain -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex: Kinetic Properties, Regional Distribution, and Effects of Inhibitors. *J. Neurochem* 1986, 47, 1376-1386.
- Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Res Int* 2011; 2011: 458427
- Niessen HG, Debska-Vielhaber G, Sander K, Angenstein F, Ludolph AC, Hilfert L, Willker W, Leibfritz D, Heinze HJ, Kunz WS, Vielhaber S. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 2007, 25:1669-1677.
- Ngo ST, Baumann F, Ridall PG, Pettitt AN, Henderson RD, Bellingham MC, McCombe PA. The relationship between Bayesian motor unit number estimation and histological measurements of motor neurons in wild-type and SOD1G93A mice. *Clin Neurophysiol* 2012; 123: 2080-2091.
- Roe CR, Mochel F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: The therapeutic potential. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 332-340.
- Russell AP, Wada S, Vergani L, Hock MB, Lamon S, Leger B, Ushida T, Cartoni R, Wadley GD, Hespel P, Kralli A, Soraru G, Angelini C, Akimoto T. Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 2012, 49C:107-117.
- Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H. Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alz Dis* 2010; 20 Suppl 2: S311-324.
- Steyn FJ, Ngo ST, Lee JD, Leong JW, Buckley AJ, Veldhuis JD, McCombe PA, Chen C, Bellingham MC. Impairments to the GH-IGF-I Axis in hSOD1G93A Mice Give Insight into Possible Mechanisms of GH Dysregulation in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Endocrinol* 2012; 153: 3735-3746.
- Thomas NK, Willis S, Sweetman L, Borges K. Triheptanoin in acute mouse seizure models. *Epilepsy Res* 2012; 99: 312-317.
- Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progr Neurobiol* 2008; 85: 94-134.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
- Vucic S, Kiernan MC. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Current molecular medicine* 2009; 9: 255-272.

Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet J Rare Dis 2009; 4: 3.

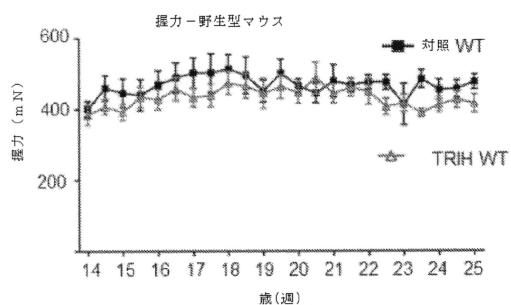
【図1】



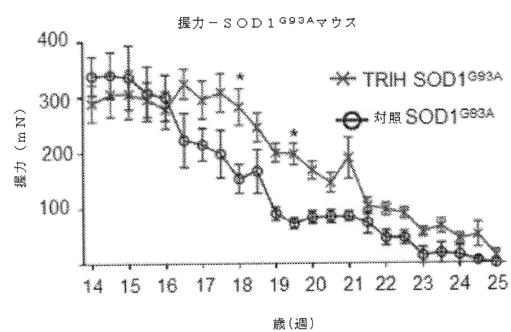
【図2】



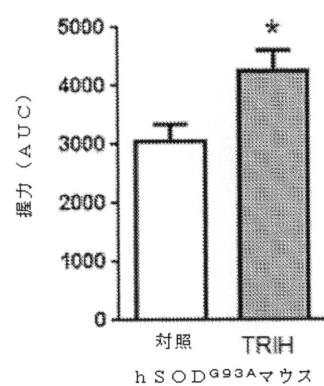
【図3 A】



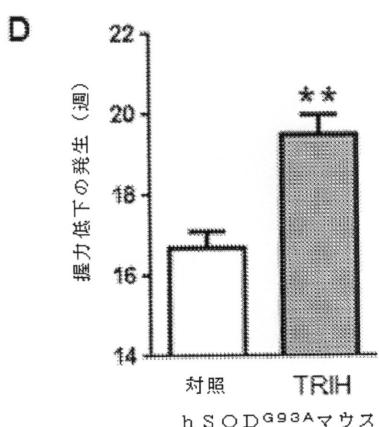
【図3 B】



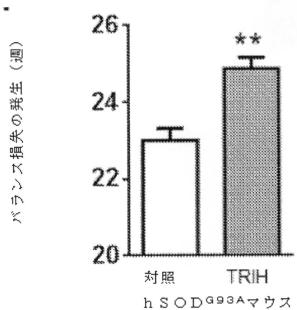
【図3 C】



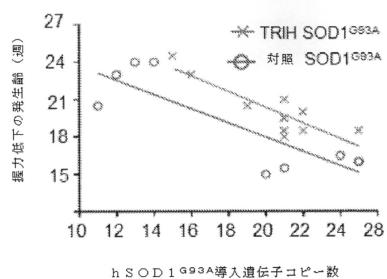
【図3 D】



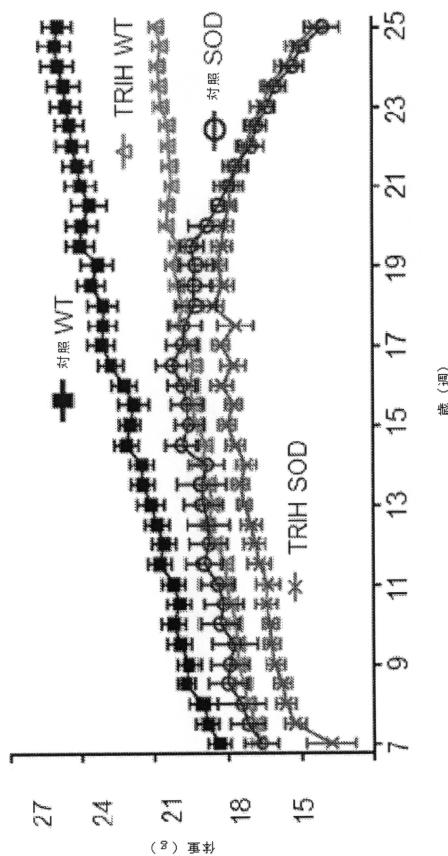
【図3 F】



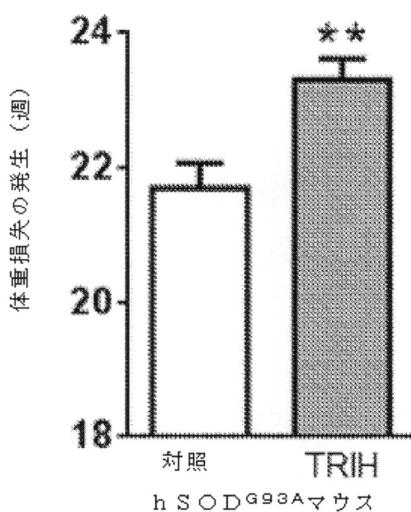
【図3 E】



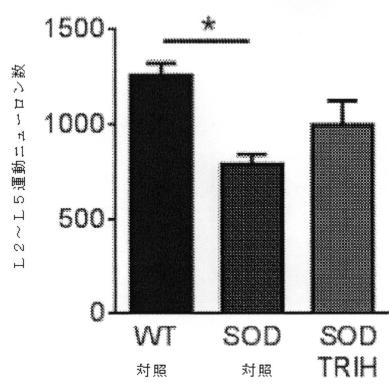
【図3G】



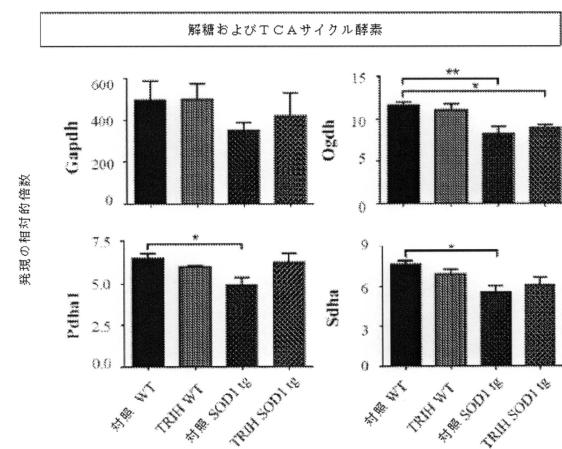
【図3H】



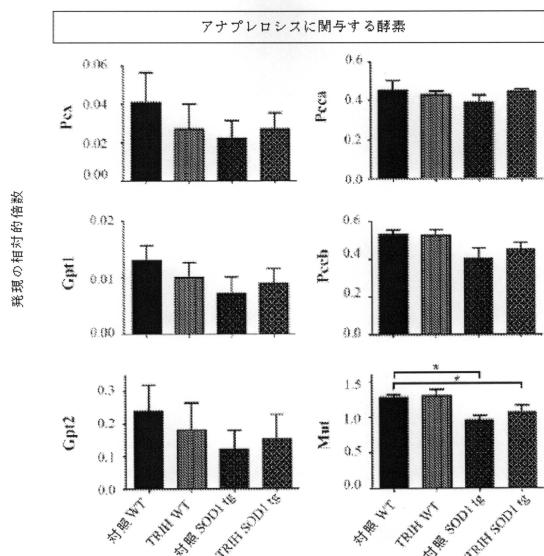
【図4】



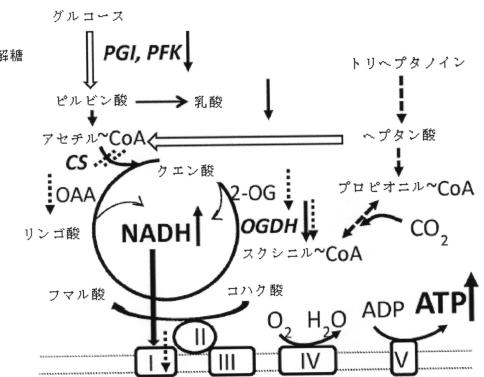
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0006588903000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K	31/198	(2006.01) A 6 1 K 31/198
A 6 1 K	31/7032	(2006.01) A 6 1 K 31/7032
A 6 1 P	25/28	(2006.01) A 6 1 P 25/28
A 6 1 P	25/02	(2006.01) A 6 1 P 25/02
A 2 3 L	33/10	(2016.01) A 2 3 L 33/10
G 0 1 N	33/68	(2006.01) G 0 1 N 33/68
G 0 1 N	33/50	(2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(72)発明者 ボルヘス カリン

オーストラリア国 クイーンズランド 4072 セントルシア ザ ユニバーシティ オブ クイーンズランド スカーマンビルディング 65 スクール オブ バイオメディカル サイエンシズ 気付

(72)発明者 ゴ シューアン ティー.

オーストラリア国 クイーンズランド 4072 セントルシア ザ ユニバーシティ オブ クイーンズランド スカーマンビルディング 65 スクール オブ バイオメディカル サイエンシズ 気付

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 欧州特許出願公開第02599482 (EP, A1)

国際公開第2008/068230 (WO, A1)

特表2013-528648 (JP, A)

PLOS ONE, 2012年11月, 7(11), e49191

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2012年10月, 33, p.175-182

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31 / 00 - 33 / 44

WPI

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)