

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-17343

(P2012-17343A)

(43) 公開日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/405 (2006.01)	A 6 1 K 31/405	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C 2 0 4
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
審査請求 有 請求項の数 24 O L 外国語出願 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-230632 (P2011-230632)	(71) 出願人	594066213
(22) 出願日	平成23年10月20日 (2011.10.20)		サウス、アラバマ、メディカル、サイエンス、ファウンデーション
(62) 分割の表示	特願2000-532118 (P2000-532118) の分割		SOUTH ALABAMA MEDICAL SCIENCE FOUNDATION
原出願日	平成11年2月23日 (1999.2.23)		アメリカ合衆国アラバマ州、36688、モービル、ビー、オー、ボックス、ユー - 1060 (番地なし)
(31) 優先権主張番号	60/075,555		
(32) 優先日	平成10年2月23日 (1998.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/112,565	(71) 出願人	594032322
(32) 優先日	平成10年12月16日 (1998.12.16)		ニューヨーク・ユニバーシティ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		New York University
			アメリカ合衆国 10012 ニューヨーク、ニューヨーク、ワシントン・スクエア・サウス 70
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医薬として用いるインドール - 3 - プロピオン酸、並びにそれらの塩およびエステル

(57) 【要約】

【課題】本発明は、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止すること、線維素生成疾患を処置すること、生物学的試料の酸化を減少させること、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することを提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、インドール - 3 - プロピオン酸 (IPA) またはそれらの塩もしくはエステルを用いて、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止すること、線維素生成疾患を処置すること、生物学的試料の酸化を減少させること、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞に及ぼすアミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止する方法であって、その細胞を有効量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルに細胞を曝露させることを含む方法。

【請求項 2】

細胞毒性の影響は細胞死である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞毒性の影響は脂質過酸化の増加である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞毒性の影響は細胞内 Ca^{2+} の増加である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞毒性の影響は酸素フリーラジカルの増加である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞はニューロン細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞はヒトの被験者に存在し、そしてその曝露がインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを全身投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が線維素生成疾患を有するヒトの被験者に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ヒトの被験者の線維素生成疾患を処置する方法であって、ヒトの被験者の線維素生成を防止するかまたは後退させるのに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを投与することを含む方法。

【請求項 10】

全身投与を行なう、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

線維素生成疾患はアルツハイマー病である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

線維素生成疾患はプリオン関連のエンセファロパシーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

生物学的試料の酸化を減少させる方法であって、その生物学的試料を有効量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルと接触させることを含む方法。

【請求項 14】

生物学的試料は細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

酸化を減少させることで脂質過酸化を減少させる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

酸化を減少させることで酸素フリーラジカルを減少させる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

フリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置する方法であって、それらの処置を必要とする患者にそれらの疾患または病気を処置するのに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを投与することを含む方法。

【請求項 18】

全身投与を行なう、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

疾患または他の病気はパーキンソン病、レビー小体型痴呆、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上麻痺、発作、アテローム硬化症、気腫および癌からなる群から選ばれるものである、請求項 17 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響が関与した疾患の処置における、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの使用。

【請求項 21】

線維素生成疾患の処置における、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの使用。

【請求項 22】

アルツハイマー病、プリオン関連のエンセファロパシーまたはそれらの組み合わせの処置における、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの使用。

【請求項 23】

フリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気の処置における、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの使用。

【請求項 24】

パーキンソン病、レビー小体型痴呆、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上麻痺、発作、アテローム硬化症、気腫、癌またはそれらの組み合わせの処置における、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はインドール - 3 - プロピオン酸の使用に関するものであり、より具体的にはアミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止するために、線維素生成疾患を処置するために、生物学的試料の酸化を減少させるために、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置するために、インドール - 3 - プロピオン酸を使用することに関する。

【背景技術】

【0002】

65歳より上のヒトの10パーセントは軽度から重度の痴呆を有すると見積もられている。アルツハイマー病（「AD」）は慢性的な痴呆の最も一般的な原因であり、米国の2百万人のヒトがその疾患を患っている。この疾患はかつては中年の病気であると考えられてきたが、アルツハイマー病の組織病理学的病変（すなわち、神経炎アミロイドブラーク、神経原線維変性および顆粒空胞ニューロン変性）は痴呆の老人の脳にも見られることが現在分かっている。それらの病変の数は知力の低下の程度と相関関係にある。この高い罹患率は人口における年配者の割合が増加する速度と合わせて、痴呆（および特に痴呆）を最も重要な現代の社会的健康問題の一つにしている。

【0003】

大脳アミロイド沈着はアルツハイマー病の主要な神経病理学上のマーカーである。そのアミロイドは40～42個のアミノ酸ペプチドからなり、このものはアミロイドベータタンパク質（「A β 」）と呼ばれる（グレナー（Glennner）およびワング（Wong）により1984）。ADにおけるアミロイド沈着物は主に老人班の成分として見出され、そして中枢血管や髄膜血管の壁に見出される（ロバキス（Robakis）およびパンガロス（Pangalos）により1994）。

【0004】

分子クロニングにより、A β はより大きなアミロイド前駆体タンパク質（「APP」）の小領域を含むことが示されている（ロバキスらにより1987；ワイドマン（Widemann）らにより1989）。要するに、このものは大きな細胞質外部分、より小さい細胞質内領域および単一の膜貫通ドメインを有するI型の内在性膜糖タンパク質である。APPは、そのN-末端部の分泌前に（サムバムルチ（Sambamurti）らにより1992；ロバキスおよびパンガロスにより1994）、広範囲な翻訳後修飾を受ける（パッポラ（Pappolla）およびロバキスにより1995；ロバキスおよびパンガ

10

20

30

40

50

ロスにより1994)。APPの生理的プロセッシングは、未同定の酵素、 α -セクレターゼによるA β 配列内の切断を含む(アンダーソン(Anderson)らにより1991)。より少量のAPP分子はアミロイド性分泌型APPまたは膜結合型APPを潜在的に産生できる他の2つの部位で切断される(ロバキスおよびパンガロスにより1994)。正常な細胞代謝の間に、A β も産生される(ハス(Haass)らにより1992; ショージ(Shoji)らにより1992)。

【0005】

アミロイドがADを引き起こすかどうかについてはいくつかの論争があるが、主に3方向の証拠がそれらアミロイド仮説を強化している。第1の証拠は、APP遺伝子内でいくつかの点突然変異体が同定されることで示される。これらの変異体は家族性障害を患っている患者のサブグループに限られており、従ってAPP遺伝子とADとの病原論上の関連が示唆されている(シャルティエ(Charlier)-ハーリン(Harlin)らにより1991; ケネディー(Kennedy)らにより1993)。第2の証拠として、アミロイドの一次的な沈着は神経原線維の変化の発生前に起こり(パッポラ(Pappolla)らにより1996)、この観察はアミロイドとニューロン変性の関連とも一致する。最後の証拠として、A β はニューロンに対して毒性であること(ヤンクナー(Yankner)らにより1990; ベール(Behl)らにより1992; ベールらにより1994; チャン(Zhang)らにより1994)、アミロイドペプチドがADにおけるニューロンの病状の原因となり得るという仮説を強化するという発見がこれまでに示されている。

10

20

【0006】

A β が神経毒性を有しているという発見は、アミロイド蓄積と神経変性との関連性があり得ることを示している。老化とADとの密接な関連性、および両状態の神経病理学上の類似のため、酸化ストレスはAD病変の病因に役割を果たしていると提案された。

【0007】

何人かの研究者により、酸素フリーラジカル(「OFRs」)がA β の細胞毒性に関連することが実証されている(ベール(Behl)により1992; ベールによる1994; ハリス(Harris)らにより1995; バターフィールド(Butterfield)らにより1994; グッドマン(Goodman)およびマトソン(Mattson)により1994)。酸化性傷害のマーカーはADの神経病理学上の病変と局所解剖的に関連しているので、それらの発見は重要である(パッポラらにより1992; フルタらにより1995; スミスらにより1995; パッポラらにより1996)。これらの観察のため、抗酸化剤はADの強力な治療剤として提案されている(マトソンにより1994; ヘンスリー(Hensley)らにより1994; パッポラらにより1996)。

30

【0008】

ADおよび他の線維素生成疾患を処置する方法についての要求はなお続いてある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【表 1】

文 献

- Anderson, J.P. らによる Neurosci Lett 128:126-129 (1991).
- Behl, C. らによる Biochem Biophys Res Commun 186:944-950 (1992).
- Behl, C. らによる Brain Res 645:253-264 (1994). 10
- Behl, C. らによる Cell 77:817-827 (1994).
- Burdick, D. らによる J Biol Chem 267:546-554 (1992).
- Busciglio, J. らによる Neurobiol Aging 13:609-612 (1992).
- Busciglio, J. らによる J Neurochem 61(4):1565-1568 (1993). 20
- Butterfield, D.A. らによる Biochem Biophys Res Commun 200:710-715 (1994).
- Chartier-Harlin, M.C. らによる Nature 353(6347):844-846 (1991).
- Copani, A. らによる Molecular Pharmacology 47(5):890-897 (1995).
- Furuta, A. らによる Am J Pathol 146:357-367 (1995).
- Glenner, G.G. および Wong, C.W. による Biochem Biophys Res Commun 120:885-890 (1984). 30
- Goodman, Y. および Mattson, M.P. による Exp Neurol 128:1-12 (1994).
- Haass, C. らによる Nature 359:322-324 (1992).
- Harris, M.E. らによる Experimental Neurol 131:193-202 (1995).
- Hensley, K. らによる Proc Natl Acad Sci USA 91(8):3270-3274 (1994). 40
- Johnson, H.E., および Crosby, D.G. による J Org Chem, 25:569ff (1969)
- Kemp, D.S., および Vellaccio, F. 編 Organic Chemistry, Worth Publishers, Inc., pp. 371-377 および 1258 (1980).

【表 2】

- Kennedy, A.M. らによる Brain 116:309-324 (1993).
- Le, W-D. らによる Brain Res 686:49-60 (1995).
- Mark, R.J. らによる J Neurosci 15:6239-6249 (1995).
- Mattson, M. P. による Ann N Y Acad Sci 747:50-76 (1994).
- Mattson, M.P. らによる Trends Neurosci 16:409-414 (1993). 10
- Mattson, M.P. らによる J Neurosci 12:376-389 (1992).
- Pappolla, M.A. らによる Am J Pathol 140:621-628 (1992).
- Pappolla, M. A. および Robakis, N.K. による In: Perspectives in behavioural medicine, Alzheimers disease and AIDS. 編 Stein, M. および Baum, M. による Academic Press, San Diego, CA, pp. 3-20 (1995).
- Pappolla, M.A. らによる Mol Chem Neuropathol 28:21-34 (1996). 20
- Pike, C.J. らによる J Neurosci 13:1676-1687 (1993).
- Robakis, N.K., および Pangalos, M. N. による Neurobiol Aging 15:S127-129 (1994).
- Robakis, N.K. らによる Proc Natl Acad Sci USA 84:4190-4194 (1987).
- Sambamurti, K. らによる J Neurosci Res 33:319-329 (1992). 30
- Shoji, M. らによる Science 258:126-129 (1992).
- Smith, M.A. らによる Amer J Pathol 145:42-47 (1994).
- Tsuzuki らによる Biochem Pharmacol, 41:R5-R8 (1991).
- Weidemann, A. らによる Cell 57:115-126 (1989).
- Weiss, J.H. らによる J Neurochem 62(1):372-375 (1994).
- Yankner, D.A. らによる Science 250:279-282 (1990). 40
- Zhang, Z. らによる Neurosci Lett 177:162-164 (1994).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止すること、線維素生成疾患を処置すること、生物学的試料の酸化を減少させること、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを用いて、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止すること、線維素生成疾患を処置すること、生物学的試料の酸化を減少させること、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することを提供する。

【発明の効果】

【0012】

本発明のインドール - 3 - プロピオン酸 (IPA) またはそれらの塩もしくはエステルを使用することにより、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止し、線維素生成疾患を処置し、生物学的試料の酸化を減少させ、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1はA β (25 ~ 35) のみに曝露させるか、またはIPAもしくはPBNと同時に曝露させたSK-N-SHヒト神経芽腫細胞を用いた場合の、パーセントで表わす生存度を示す棒グラフである。

【図2】図2はA β (25 ~ 35) のみに曝露させるか、またはIPAもしくはPBNと同時に曝露させたPC12ラットフェオクロモチーム細胞を用いた場合の、パーセントで表わす生存度を示す棒グラフである。

20

【図3】図3はA β (1 ~ 42) のみに曝露させるか、またはIPAもしくはPBNと同時に曝露させたSK-N-SHヒト神経芽腫細胞を用いた場合の、パーセントで表わす生存度を示す棒グラフである。

【図4】図4はアミロイドペプチドA β (1 ~ 42) もしくはDDTCのみに曝露させるか、またはそれぞれをIPAと一緒に曝露させることによって誘発される脂質過酸化の程度 (MDAを測定) を示す棒グラフである。

【図5】図5はDDTCによるスーパーオキシドジスムターゼの阻害によって誘発されるPC12ラット神経芽腫細胞の細胞死を防止することによる、IPAの抗酸化剤的活性を示す棒グラフである。

【図6】図6Aおよび図6Bは、24時間 (図6A) および48時間 (図6B)、A β (1 ~ 40) をインキュベーションした時の β シート形成に及ぼすIPAの影響を示す棒グラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0014】

(発明の要約)

本発明は細胞に及ぼすアミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止する方法に関する。その方法はその細胞を有効量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルと接触させることを含む。

【0015】

本発明は更に、ヒトの被験者の線維素生成疾患を処置する方法に関する。その方法はヒトの被験者に、線維素生成を抑制するかまたは後退させるのに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを投与することを含む。

40

【0016】

本発明は生物学的試料における酸化を減少させる方法にも関する。その方法はその生物学的試料を有効量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルと接触させる方法を含む。

【0017】

本発明はより更に、フリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たす疾患または他の病気を処置する方法に関する。その方法はヒトの被験者に、それらの疾患または病気を処置するのに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくは

50

エステルを投与することを含む。

【 0 0 1 8 】

(詳細な説明)

本発明は、天然の化合物であるインドール - 3 - プロピオン酸 (「 I P A 」) は細胞に及ぼすアミロイド β タンパク質の細胞毒性の影響を防止するのに特に有用であり、いずれかの線維素生成疾患を処置するのに特に有用であり、且つ細胞を酸化性損傷から保護するのに特に有用であるという性質を合わせて有しているという発見に基づいている。従って、本発明の化合物はアルツハイマー疾患および他の線維素生成疾患 (例えば、プリオン - 関連の疾患が挙げられるが、これに限定しない) の強力な治療剤である。そのものは、フリーラジカルおよび / または酸化ストレスが役割を果たしている他の疾患の処置について 10 の治療剤としても使用できる。これらの病気としてはパーキンソン病、レビー小体型痴呆、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上麻痺、他の種類のアミロイドーシス、発作、アテローム硬化症、気腫およびいくつかの種類の癌を含む。更に、データは I P A も抗線維素生成活性をも有することを示す。

【 0 0 1 9 】

本発明は、細胞に及ぼすアミロイド β タンパク質の細胞毒性の影響を防止する方法を提供する。その方法は、それらの細胞を有効量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルに曝露させることを含む。

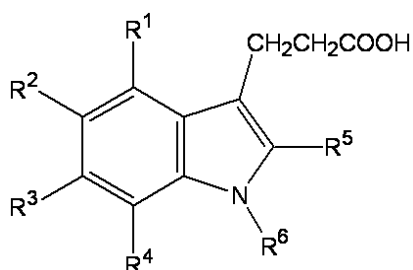
【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する「アミロイド β タンパク質」(「 A β 」) とは、アルツハイマー病 (「 A D 」) の主要な神経病理学的マーカーである大脳アミロイドを構成する 4 0 ~ 4 2 個のアミノ酸のペプチドを意味し、そして細胞に対して細胞毒性の影響を引き起こすことができる A β のフラグメントを意味する。例えば、それら A β フラグメントの 1 つは A β の 2 5 ~ 3 5 アミノ酸残基よりなるフラグメントである (グレナー (G l e n n e r) およびワング (W o n g) による、A β の完全アミノ酸配列 (f u l l a m i n o a c i d s e q u e n c e o f A β) 1 9 8 4 を参照、これは本明細書の一部を構成する))。 20

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用するインドール - 3 - プロピオン酸とは、式

【 化 1 】



[式中、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵およびR⁶は水素、置換アルキル基、無置換アルキル基、置換アリール基、無置換アリール基、アルコキシ基、置換または無置換アミノ基、チオール基、アルキルチオ基、アリールチオ基などからなる群から独立に選ばれる] 40
を有する化合物を含むことを意味する。R⁵およびR⁶は水素が好ましい。適当なインドール - 3 - プロピオン酸の一例は、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵およびR⁶の各々が水素である上記の式を有するインドール - 3 - プロピオン酸である。好ましい置換基は、抗酸化性および抗線維素生成性質に有意に影響を及ぼさない基であり、これについては以下でより詳細に記載する。他の好ましい置換基は脳への浸透を増大させる基であり、例えば共有結合した親油性部分である。これらの置換基は利用可能な水素原子を有するインドール核のいずれかの原子上に存在してもよい。親油性部分の結合様式は重要ではなく、このものは炭素 - 炭素結合、炭素 - 酸素結合、炭素 - 窒素結合または炭素 - 硫黄結合によって与えられ 50

る。しかしながら、得られた化合物の親油性を最大限とするには、極性が最少限となるような結合が与えられることが好ましい。従って、親油性部分は炭素-炭素結合で結合することが好ましい。それら親油性部分とは炭化水素（例えば5～20個の炭素原子を有するアルキル基）であってもよい。これらのアルキル基は無置換であってもよく（例えば、ヘキシルまたはドデシル）、または置換アルキル基がベンジル基またはフェニルエチル基である場合のように、例えばアリール部分等で置換されていてもよい。或いは、親油性部分は置換または無置換のホモサイクリック環（例えば、フェニル基またはトリル基）、ホモサイクリック環系、ヘテロサイクリック環、ヘテロサイクリック環系、または多環性の親油性「かご状」部分（例えば、アダマンタン）であってもよい。特に、多環「かご状」化合物を用いることは特に有利である（ツヅキ（Tsuzuki）により1991）。 10

【0022】

いくつかのインドール-3-プロピオン酸は商業的に入手可能である。他のものはインドール-3-プロピオン酸の製造についての従来法の改変によって製造可能であり、その従来法としては例えばジョンソン（Johnson）およびクロスビー（Crosby）による1969の文献、および米国特許第5,300,506号、米国特許第5,077,293号および特開平3,127,732号（これらは本明細書の一部を構成する）が挙げられる。

【0023】

上で示す通り、本発明は上記のインドール-3-プロピオン酸の塩を用いても行なうことができる。適当な塩としては、例えば医薬的に許容し得る塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩およびアンモニウム塩）を含む。インドール-3-プロピオン酸の塩は、その酸の水溶液または分散したものを適当な塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸カリウム）と混合することによって、対応するインドール-3-プロピオン酸から従来の方法によって製造可能である。 20

【0024】

加えて、上でも示した通り、本発明は上記のインドール-3-プロピオン酸のエステルを用いて行なうことができる。それらエステルの例としては、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ベンジルエステルなどを含む。例えば、上に記載の親油性エステル部分を持つインドール-3-プロピオン酸エステルは、インドール-3-プロピオン酸エステルの脳への浸透を増大させるのに有利に使用することもできる。インドール-3-プロピオン酸エステルは、当該分野の当業者にとって知られた様々な方法によって、それらに対応する酸または塩から製造することができ、例えば、まずそれらの酸を酸クロリドに変換し、次いでその酸クロリドを適当なアルコールと反応させることによって製造することができる。エステルを製造するための他の適当な方法については、ケンプ（Kemp）およびベラシオ（Vellaccio）により1980に記載されている。 30

【0025】

インドール-3-プロピオン酸、それらの塩またはエステルは、抗酸化性および/または抗線維素発生性質を有し、および/またはAβの細胞毒性の影響を防止するものが好ましい。様々なインドール-3-プロピオン酸、その塩およびエステルは、Aβの細胞毒性の影響を防止する機能が保持されていることを確認するために、本明細書に開示の方法を用いて容易にアッセイすることができ、それらのアッセイとしては例えば、細胞の生存度、脂質過酸化、細胞内Ca²⁺および酸素フリーラジカルについてのアッセイが挙げられる。細胞に及ぼすAβの他の細胞毒性の影響の防止としては、例えば膜の水ぶくれ、細胞収縮、染色質の異常な分布および核崩壊の防止を容易に顕微鏡観察することができる。様々なインドール-3-プロピオン酸による抗酸化性効果および抗線維素生成効果は従来の方法（例えば、本出願の実施例に記載の方法）によってアッセイすることができる。 40

【0026】

上で示したように、Aβの細胞毒性上の影響または細胞殺傷上の影響は、例えば細胞の生存度の減少（すなわち、細胞死）、脂質過酸化の増加（酸素フリーラジカルの増加の指標）、細胞内のCa²⁺レベルの増加、分散した膜の水ぶくれ、細胞収縮、核膜に対する染 50

色質の異常分布および核崩壊を含む。

【 0 0 2 7 】

A β の細胞毒性の影響は、ニューロン細胞（中枢神経系および末梢神経系の細胞を含む）で最も容易に見られ、そして線維素生成疾患（例えば、アルツハイマー病）を患っているヒトの被験者において最も容易に起こる。

【 0 0 2 8 】

A β の細胞毒性の影響を防止するためのインドール - 3 - プロピオン酸（またはそれらの塩もしくはエステル）の有効量は、当該分野で知られる従来の方法（例えば、以下に記載する用量 - 応答曲線の決定）によって容易に決めることができる。本発明に従って投与されるべきインドール - 3 - プロピオン酸（またはそれらの塩もしくはエステル）の実際の好ましい量は、インドール - 3 - プロピオン酸の具体的な形態（すなわち、塩、エステルもしくは酸）、製剤化された具体的な組成物および投与方法によって変わることは、認められるであろう。インドール - 3 - プロピオン酸（またはそれらの塩もしくはエステル）の作用を改変し得る多数の因子が当業者によって考慮され、それらの因子としては例えば、体重、性別、規定食、投与時間、投与経路、排泄の割合、被験者の体調、薬物の組み合わせ、および反応感度や激烈が挙げられる。投与は、最大許容用量の範囲内で連続してまたは周期的に行なうことができる。ある病気の組に対する最適な投与の割合は、従来の用量投与試験を用いて当業者によって確かめられることができる。

10

【 0 0 2 9 】

本発明はヒトの被験者の線維素生成疾患を処置する方法を更に提供する。その方法は、線維素生成を抑制するかまたは後退させる（すなわち、線維素原の生成を抑制するかまたは後退させる）のに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを投与することを含む。本明細書で使用する「線維素生成疾患」とは望ましくない線維素原（フィブリル）の沈積を伴ういずれかの疾患または病気を含むことを意味する。非限定的な例として、それらの病気または疾患はアミロイドまたはアミロイド様沈積物の異常な生成から生じる障害または病気を含み、例えばプリオン関連のエンセファロパシー、アルツハイマー痴呆またはアルツハイマー病（「AD」）および他のアミロイドーシス障害を含むが、これらに限定されない。プリオン関連のエンセファロパシーの例としては、ヒトのクロイツフェルト - ヤコブ病（「CJD」）およびゲルストマン - ストロイスラー - シャインカー病（「GSS」）、羊やヤギのスクラピーおよび蓄牛の海綿上脳症を含む。

20

30

【 0 0 3 0 】

本発明はフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置する方法を更に提供する。その方法は、それらの疾患または病気を処置するのに有効な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを投与することを含む。フリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または病気としては、パーキンソン病、レビー小体型痴呆、筋萎縮性側索痴呆、進行性核上麻痺、気腫および他の種類の癌を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 3 1 】

インドール - 3 - プロピオン酸並びにそれらの塩およびエステルは、アミロイドベータタンパク質が細胞に及ぼす細胞毒性の影響を防止するのと同様に、フリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置するのに有効であるので、これらの化合物はアミロイドベータタンパク質が関与する疾患（例えば、AD）を処置するのに特に有用であると期待される。

40

【 0 0 3 2 】

インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルに関する全ての指示として、適当な用量については上述の通りであり、そして適当な投与経路については全身投与（特に、用いたインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルが血液脳関門を越える場合）を含む。全身投与としては、以下で更に詳細に述べる通り、非経口投与および経口投与を含む。

50

【0033】

インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルは、単独で投与するかまたは組成物として適合し得る担体と一緒に投与することができる。適合し得る担体としては、例えば適当な医薬的担体または希釈剤を含む。それらの希釈剤成分または担体成分は、本発明で使用するインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの治療学的効果を低下させないように、選択すべきである。

【0034】

それらの組成物は望む用途（例えば経口投与、非経口投与または局所投与）に適したいずれかの適当な形態に調剤することができる。経口用途に適当な用量形態は、錠剤、分散させた粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤および皮膚パッチ剤を含む。錠剤のための不活性な希釈剤および担体は、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトースおよびタルクを含む。錠剤は顆粒化剤および崩壊剤（例えば、デンプンおよびアルギン酸）、結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンおよびアカシア）および滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸およびタルク）を含んでもよい。錠剤はコーティングしないか、または崩壊および吸収を遅延させるために公知の技術によってコーティングしてもよい。カプセル剤で使用し得る不活性な希釈剤および担体としては、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウムおよびカオリンを含む。懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤は従来の賦形剤（例えば、セルロースメチル、トラガカント、アルギン酸ナトリウム）；湿潤剤（例えば、レシチンおよびポリオキシエチレンステアレート）；および保存剤（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸エチル）を含んでもよい。

10

20

【0035】

非経口投与に適当な用量形態としては、溶液剤、懸濁剤、分散剤、乳化剤などを含む。それらは滅菌した固体の組成物の形態で製造して、使用する直前に滅菌した注射可能な媒質中に溶解するかまたは懸濁してもよい。それらは当該分野で公知の懸濁化剤または分散化剤を含有してもよい。非経口投与の例としては、心室内投与、大脳内投与、筋肉内投与、静脈内投与、腹膜内投与、直腸投与および皮下投与が挙げられる。

【0036】

本発明は生物学的試料の酸化を減少させる方法にも関する。この方法を用いて減少させることのできる酸化の種類としては例えば、酸素フリーラジカルプロセスによって媒介される脂質過酸化および酸化を含む。生物学的試料としては、例えば細胞または細胞の群（例えば、組織）であってもよい。それら生物学的試料を上で記載したようなインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルと接触させる。接触はいずれかの適当な方法を用いて行なうことができる。例えば、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルは、生物学的試料の周辺にある細胞外環境にまで運搬され得る。或いは、インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルは、例えば微量注入によって細胞へ直接に導入することができる。インドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルの酸化プロセスを減少させるのに有効な量は従来法によって決めることができ、それらの方法としては例えば様々な量のインドール - 3 - プロピオン酸またはそれらの塩もしくはエステルを運搬し、そして酸化の生成物（例えば、酸素フリーラジカル）または脂質過酸化の生成物の濃度を追跡することが挙げられる。

30

40

【0037】

（実施例）

本発明は、以下に示す非限定的な例により一層理解されるであろう。

【実施例1】

【0038】

試験は、IPAがアルツハイマーアミロイドペプチド（「A β 」）に対する神経保護活性を有するか否かを調べるために行なった。この40～43アミノ酸ペプチドの広範囲での大脳沈積は、アルツハイマー病におけるニューロンの広範囲な変性およびニューロンの死を引き起こす。

【0039】

50

A β の細胞毒性の影響に対するIPAの細胞保護作用を示す目的で、ヒトの神経芽細胞系SK-N-SHの細胞を用いた。これらの細胞を、50 μ MのA β (25~35)に、A β の活性な毒性フラグメント(ヤンクナー(Yankner)らにより1990)に、50 μ MのIPAと共に、またはIPAなしに曝露させた。コントロールとして、その実験をA β なしで繰り返した。正のコントロールとしては、IPAの代わりに公知の抗酸化剤、フェニル-N-t-ブチルニトロソ(「PBN」)を用いた。

【0040】

その結果を図1に示すが、その図の棒グラフはパーセントで表わす生存度を示す。A β のみでは細胞に対して著しい細胞毒性の影響を有するが、IPAおよびPBNは共に強力な保護的活性を有する。

10

【実施例2】

【0041】

実施例1の実験を、PC12ラットクロム親和性細胞腫細胞を用いて繰り返した。その結果を図2に示すが、その結果は図1に示した結果と本質的に同一である。

【実施例3】

【0042】

実施例1の実験を、SK-N-SHヒト神経芽細胞腫細胞系を用いたA β (1~42)ペプチドを用いて繰り返した。その結果を図3に示すが、その結果は実施例1について示した結果と一致する。

【実施例4】

20

【0043】

IPAの細胞保護の性質は少なくとも部分的には抗酸化剤活性の結果であるという可能性を調べるために、A β または酸化ストレスに曝露させたPC12細胞中におけるマロン酸ジアルデヒド(「MDA」)のレベル、脂質過酸化のマーカーを調べた。細胞をジエチルジチオカルボネート(「DDTC」)、スーパーオキシドジスムターゼ阻害剤およびある決まった酸化性損傷のモデルに曝露させることによって、酸化ストレスをかけた。PC12細胞を、アミロイドペプチドのみに曝露させるか、またはIPAと一緒にアミロイドペプチドに曝露させた。他の実験では、細胞をDDTCのみに曝露させるか、またはIPAと一緒にDDTCに曝露させた。その結果を図4に示す。IPAは処置した細胞中でのマロン酸ジアルデヒドの産生を有意に減少させることが見られ、このことはIPAが抗酸化剤活性を有することを示している。図4はIPAについての神経保護活性および抗酸化剤活性の両方を示す。

30

【実施例5】

【0044】

実施例4で見られた観察を更に確認するために、我々はIPAが酸化ストレス(DDTC)に曝露させた細胞の死を防止するのに有効であるかどうかを調べた。PC12神経芽細胞腫の細胞を様々な量のDDTCで、様々な量のIPAと共にまたはIPAなしに処理した。その結果を図5に示す。IPAの抗酸化剤活性は、DDTCによるスーパーオキシドジスムターゼの阻害によって誘発される神経芽細胞腫細胞の細胞死を防止することによって示される。このことは、IPAがDDTCに曝露させた細胞の生存率を増加するという先に得られたデータと一致する。

40

【実施例6】

【0045】

IPAがA β 線維素生成に影響を及ぼすかどうかを決定するために、150 μ MのA β (1~40)を超純水(すなわち、蒸留し、ろ過し且つ滅菌した水)にpH7で溶解させた300 μ MのIPAおよび塩化ナトリウムと一緒にインキュベートした。コントロールとして、その超純水を用いて等量の塩化ナトリウムを含有するIPAを溶解させ、このものを150 μ MのA β (1~40)にpH7で加えた。1つの実験においては、その溶液(すなわち、IPA含有溶液およびコントロール溶液)を24時間インキュベートした。第2の実験では、よれらの各溶液を48時間インキュベートした。各インキュベーション

50

の期間の最後に、 $2\ \mu\text{M}$ のチオフラビンTを含有する $50\ \text{mM}$ のグリシン-NaOH緩衝液(pH 9.2)を各試料($5\ \mu\text{L}$)に加えて、最終的な量を $2\ \text{mL}$ とした。 β シート形成の直接的な尺度である蛍光を、日立F-2000蛍光分光計を用いて、励起波長 $435\ \text{nm}$ で、発光波長 $485\ \text{nm}$ で測定した。各条件につき3つの試料の平均の標準偏差を決定し、その結果を図6A(インキュベーションを24時間)および図6B(インキュベーションを48時間)に示す(棒グラフとして)。24時間および48時間インキュベーションした実験の両方において、蛍光量はコントロール(標識したA β)と比べて、IPA含有試料(標識したA β +IPA)の場合には有意に低い。このことは、コントロールと比べてIPA含有試料の場合には β シート形成が起こりにくいことを示し、言い換えればIPAが抗線維素生成であることを示す。

10

【0046】

好ましい実施態様を本明細書で詳細に示し且つ記載してきたが、様々な改良、追加、置換などを本発明の精神から逸脱せずに行なうことができ、従ってそれらは特許請求の範囲に記載する本発明の範囲内であるとみなされることは、当該分野の当業者にとって明らかであろう。

【産業上の利用可能性】

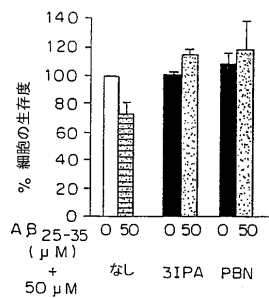
【0047】

本発明のインドール-3-プロピオン酸(IPA)またはそれらの塩もしくはエステルの使用により、アミロイドベータタンパク質の細胞毒性の影響を防止し、線維素生成疾患を処置し、生物学的試料の酸化を減少させ、およびフリーラジカルおよび/または酸化ストレスが役割を果たしている疾患または他の病気を処置することができるため、工業的利用価値が高い。

20

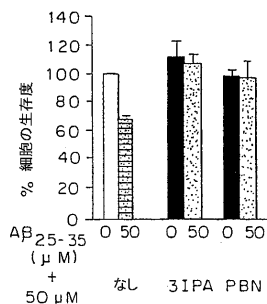
【図1】

FIG. 1



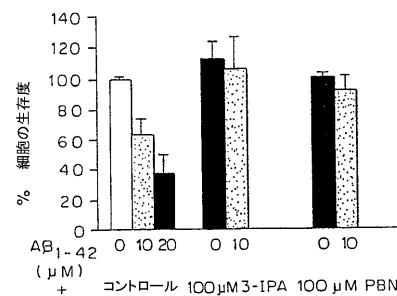
【図2】

FIG. 2



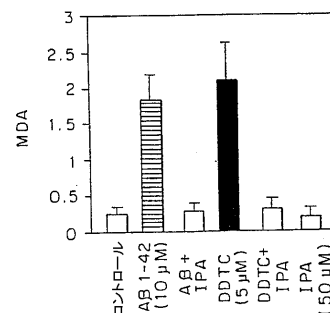
【図3】

FIG. 3



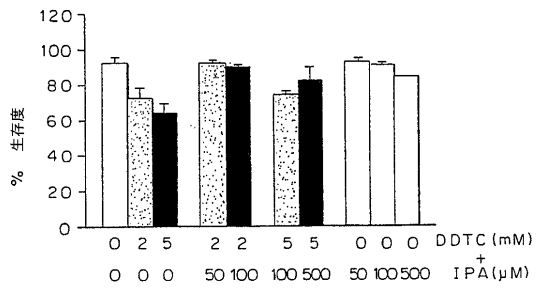
【図4】

FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6A

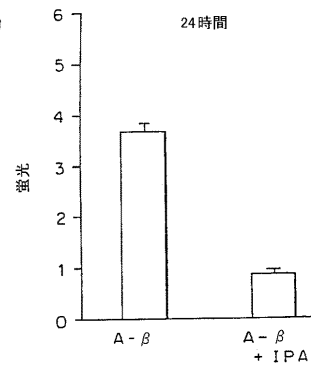
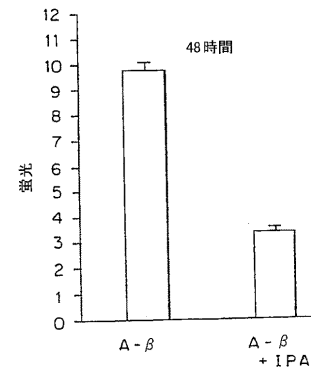


FIG. 6B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 39/06	(2006.01)	A 6 1 P 39/06	
C 0 7 D 209/18	(2006.01)	C 0 7 D 209/18	

(74)代理人 100068526

弁理士 田村 恭生

(74)代理人 100100158

弁理士 鯨島 睦

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(72)発明者 ミゲル・エイ・パッボラ

アメリカ合衆国 3 6 6 9 5 アラバマ州モービル、ヒルクレスト・ロード 1 5 0 0 番、アパートメント 1 1 2 8

(72)発明者 ブラス・フランジオーネ

アメリカ合衆国 1 0 1 1 6 ニューヨーク州ニューヨーク、イースト・サーティフォース・ストリート 3 3 0 番、アパートメント 3 5 ビー

(72)発明者 ジョージ・ギソ

アメリカ合衆国 1 1 3 7 3 ニューヨーク州エルムハースト、エイティエイス・ストリート 4 7 - 0 9 番

(72)発明者 ブルクハルト・ペゲラー

ドイツ連邦共和国 3 7 0 8 5 ゲッティンゲン、アイゼナッハー・シュトラッセ 7 番

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC14 MA01 MA04 MA17 MA22 MA23 MA32 MA35

MA37 MA41 MA43 MA52 MA59 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA02

ZA15 ZA16 ZA45 ZA59 ZA94 ZB26

4C204 BB01 BB09 CB03 DB18 EB02 FB01 GB01

【外国語明細書】

INDOLE-3-PROPIONIC ACIDS, SALTS AND ESTERS THEREOF USED AS MEDICAMENTS

The present application claims priority from U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/075,555, filed February 23, 1998, and from U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/112,565, filed December 16, 1998.

Throughout this application, various publications are referenced, many in parenthesis. Full citations for these publications are provided at the end of each part of the application. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in this application.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a use of indole-3-propionic acid and, more particularly, to the use of indole-3-propionic acid to prevent cytotoxic effects of amyloid beta protein, to treat fibrillogenic diseases, to decrease oxidation in biological samples, and to treat diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role.

BACKGROUND OF THE INVENTION

It is estimated that ten percent of persons older than 65 years of age have mild to severe dementia. Alzheimer's Disease ("AD") is the most common cause of chronic dementia with approximately two million people in the United States having the disease. Although once considered a condition of middle age, it is now known that the histopathologic lesions of Alzheimer's Disease (i.e., neuritic amyloid plaques, neurofibrillary degeneration, and granulovascular neuronal degeneration) are also found in the brains of elderly people with dementia. The number of such

- 2 -

lesions correlates with the degree of intellectual deterioration. This high prevalence, combined with the rate of growth of the elderly segment of the population, make dementia (and particularly AD) one of the most important current public health problems.

Deposition of cerebral amyloid is a primary neuropathologic marker of Alzheimer's Disease. The amyloid is composed of a 40-42 amino acid peptide called the amyloid beta protein ("A β ") (Glenner and Wong, 1984). Amyloid deposits in AD are found mainly as components of senile plaques, and in the walls of cerebral and meningeal blood vessels (Robakis and Pangalos, 1994).

Molecular cloning showed that A β comprises a small region of a larger amyloid precursor protein ("APP") (Robakis et al., 1987; Weidemann et al., 1989). Briefly, this is a type I integral membrane glycoprotein having a large extracytoplasmic portion, a smaller intracytoplasmic region, and a single transmembranous domain. APP undergoes extensive post-translational modifications (Pappolla and Robakis, 1995; Robakis and Pangalos, 1994) prior to the secretion of its N-terminal portion (Sambamurti et al., 1992; Robakis and Pangalos, 1994). Physiologic processing of APP involves cleavage within the A β sequence by an unidentified enzyme, alpha-secretase (Anderson et al., 1991). Smaller quantities of APP molecules are cleaved at two other sites that could potentially produce amyloidogenic secreted or membrane bound APP (Robakis and Pangalos, 1994). A β is also produced during normal cellular metabolism (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992).

There is some controversy as to whether amyloid causes AD; however, three main lines of

- 3 -

evidence have strengthened the amyloid hypothesis. The first piece of evidence is provided by the identification of several point mutations within the APP gene. These mutations segregate within a subgroup of patients afflicted with a familial form of the disorder and thus suggest a pathogenetic relationship between the APP gene and AD (Chartier-Harlin et al., 1991; Kennedy et al., 1993). Secondly, amyloid deposition temporally precedes the development of neurofibrillary changes (Pappolla et al., 1996) and this observation is also consistent with a link between amyloid and neuronal degeneration. Finally, it has been shown that A β is toxic to neurons (Yankner et al., 1990; Behl et al., 1992; Behl et al., 1994; Zhang et al., 1994), a finding that also strengthened the hypothesis that the amyloid peptide may contribute to the neuronal pathology in AD.

The finding that A β has neurotoxic properties has provided a possible connection between amyloid accumulation and neurodegeneration. Because of the close association between aging and AD and the similarities in the neuropathology of both conditions, oxidative stress has been proposed to play a role in the pathogenesis of AD lesions.

Several investigators demonstrated that oxygen free-radicals ("OFRs") are related to the cytotoxic properties of A β (Behl, 1992; Behl, 1994; Harris et al., 1995; Butterfield et al., 1994; Goodman and Mattson, 1994). Such findings are important, since markers of oxidative injury are topographically associated with the neuropathologic lesions of AD (Pappolla et al., 1992; Furuta et al., 1995; Smith et al., 1995; Pappolla et al., 1996). Because of these observations, antioxidants have been proposed as

- 4 -

potential therapeutic agents in AD (Mattson, 1994; Hensley et al., 1994; Pappolla et al., 1996).

A need continues for methods of treating AD and other fibrillogenic diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method of preventing cytotoxic effects of amyloid beta protein on cells. The method includes contacting the cells with an effective amount of an indole-3-propionic acid or an ester or salt thereof.

The present invention further relates to a method of treating a fibrillogenic disease in a human subject. The method includes administering, to the human subject, an amount of indole-3-propionic acid or an ester or salt thereof effective to inhibit or reverse fibrillogenesis.

The present invention also relates to a method of decreasing oxidation in a biological sample. The method includes contacting the biological sample with an effective amount of a indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof.

The present invention still further relates to a method of treating diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role. The method includes administering, to the human subject, an amount of indole-3-propionic acid or an ester or salt thereof effective to treat such disease or condition.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a bar graph illustrating viabilities expressed as percentages using SK-N-SH human neuroblastoma cells exposed to either A β (25-35)

- 5 -

alone or in conjunction with IPA or PBN.

Figure 2 is a bar graph illustrating viabilities expressed as percentages using PC12 rat pheochromocytoma cells exposed to either A β (25-35) alone or in conjunction with IPA or PBN.

Figure 3 is a bar graph illustrating viabilities expressed as percentages using SK-N-SH human neuroblastoma cells exposed to either A β (1-42) alone or in conjunction with IPA or PBN.

Figure 4 is a bar graph illustrating the degree of lipid peroxidation (MDA measurement) induced by exposing cells to either amyloid peptide A β (1-42) or DDTC alone or each along with IPA.

Figure 5 is a bar graph showing the antioxidant activity of IPA by preventing cell death of PC12 rat neuroblastoma cells induced by inhibition of superoxide dismutase by DDTC.

Figures 6A and 6B are bar graphs showing the effect of IPA on β sheet formation upon incubation of A β (1-40) for 24 hours (Figure 6A) and 48 hours (Figure 6B).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on the discovery that the natural compound indole-3-propionic acid ("IPA") has a combination of properties which render it particularly useful for preventing the cytotoxic effects of amyloid beta protein on cells, for treating any fibrillogenic disease, and for protecting cells from oxidative damage. Accordingly, the compounds of the present invention are powerful therapeutic agents in Alzheimer's Disease and other fibrillogenic diseases, such as, without limitation, prion-related diseases. It may also be used as a

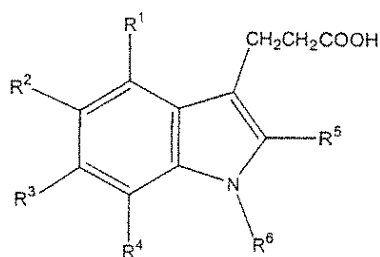
- 6 -

therapeutic agent for the treatment of other diseases where free radicals and/or oxidative stress plays a role. These conditions include Parkinson's Disease, Lewy body dementia, amyotrophic lateral sclerosis, progressive supranuclear palsy, other forms of amyloidoses, stroke, atherosclerosis, emphysema, and some forms of cancer. Furthermore, data show that IPA also has antifibrillogenic activity.

The subject invention provides a method of preventing cytotoxic effects of amyloid beta protein on cells. The method comprises exposing the cells to an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof.

As used herein, "amyloid beta protein" ("A β ") refers to the 40-42 amino acid peptide that makes up the cerebral amyloid which is the primary neuropathologic marker of Alzheimer's Disease ("AD"), and refers to fragments of the A β capable of causing cytotoxic effects on cells. For example, one such fragment of A β is the fragment made of up amino acid residues 25-35 of A β (see Glenner and Wong 1984 for the full amino acid sequence of A β , which is hereby incorporated by reference).

As used herein, indole-3-propionic acids are meant to include compounds having the formula:



where R¹, R², R³, R⁴, R⁵, and R⁶ are independently selected from the group consisting of hydrogen,

- 7 -

substituted alkyl groups, unsubstituted alkyl groups, substituted aryl groups, unsubstituted aryl groups, alkoxy groups, substituted or unsubstituted amino groups, thiol groups, alkylthio groups, arylthio groups, and the like. Preferably, R^5 and R^6 are hydrogen. One example of a suitable indole-3-propionic acid is indole-3-propionic acid, which has the above formula where each of R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , and R^6 is a hydrogen atom. Preferred substituents are those which do not significantly affect the antioxidant and antifibrillogenic properties of the indole-3-propionic acids, as described in more detail below. Other preferred substituents are those which enhance brain-penetration, such as a covalently bonded lipophilic moiety. These substituents can be present on any atom of the indole nucleus which has an available hydrogen. The mode of attachment of the lipophilic moiety is not critical, and can be effected by a carbon-carbon, carbon-oxygen, carbon-nitrogen, or carbon-sulfur bond. To maximize the lipophilicity of the resulting compound, however, it is preferred that attachment be effected so as to minimize polarity. Consequently, it is preferred that the lipophilic moiety be attached via a carbon-carbon bond. The lipophilic moiety can be a hydrocarbon, such as an alkyl having from 5 to 20 carbons. These alkyls can be unsubstituted, such as hexyl or dodecyl, or substituted, such as with an aryl moiety, as in the case where the substituted alkyl is a benzyl or a phenylethyl group. Alternatively, the lipophilic moiety can be substituted or unsubstituted homocyclic rings, such as phenyl groups or a tolyl groups, homocyclic ring systems, heterocyclic rings, heterocyclic ring systems, or multicyclic lipophilic "cage" moieties, such as adamantane. In particular,

- 8 -

the use of the multicyclic "cage" compounds are particularly advantageous (Tsuzuki, 1991).

Some indole-3-propionic acids can be obtained commercially. Others can be prepared by modifications to conventional procedures for the preparation of indole-3-propionic acid, such as the ones described in Johnson and Crosby, 1969) and in U.S. Patent No. 5,300,506, U.S. Patent No. 5,077,293, and JP 03/127,732, each of which are hereby incorporated by reference.

As indicated above, the present invention can also be carried out using salts of the above-described indole-3-propionic acids. Suitable salts include, for example, pharmaceutically acceptable salts, such as sodium salts, potassium salts, and ammonium salts. Salts of indole-3-propionic acid can be made by conventional methods from the corresponding indole-3-propionic acid by mixing the an aqueous solution or dispersion of the acid with an appropriate base (e.g., sodium, potassium, or ammonium hydroxide, or sodium or potassium carbonate).

In addition, also as indicated above, the present invention can be carried out using esters of the above-described indole-3-propionic acids. Examples of such esters include methyl ester, ethyl ester, propyl ester, benzyl ester, and the like. Indole-3-propionic acid esters bearing a lipophilic ester moiety, such as those described above, can also be used advantageously to increase the brain penetration of the indole-3-propionic acid ester. Indole-3-propionic acid esters can be prepared from their corresponding acids or salts by a variety of methods known to those skilled in the art, such as, for example, by first transforming the acid to the acid chloride and then reacting the acid

- 9 -

chloride with a suitable alcohol. Other suitable methods for making esters are described in Kemp and Vellaccio, 1980.

Preferably, the indole-3-propionic acid, salt, or ester has antioxidative and/or antifibrillogenic properties and/or prevents the cytotoxic effects of A β . Various indole-3-propionic acids, salts, and esters can readily be assayed to ensure that the function of preventing the cytotoxic effects of A β is retained using the methodology disclosed herein, such as assays for cell viability, lipid peroxidation, intracellular Ca²⁺, and oxygen free-radicals. The prevention of other cytotoxic effects of A β on cells can readily be observed microscopically, such as the prevention of membrane blebbing, cell retraction, abnormal distribution of chromatin, and karyorrhexis. Antioxidation and antifibrillogenic effects of the various indole-3-propionic acids can be assayed by conventional methods, such as those described in the Examples of this application.

As indicated above, the cytotoxic or cell killing effects of A β include, for example, decreased cell viability (i.e., cell death), increased lipid peroxidation (an indicator of increased oxygen free-radicals), increased intracellular Ca²⁺ levels, diffuse membrane blebbing, cell retraction, abnormal distribution of chromatin towards the nuclear membrane, and karyorrhexis.

The cytotoxic effects of A β are most readily seen in neuronal cells (including cells of the central and peripheral nervous systems), and occur in human subjects afflicted with fibrillogenic diseases, such as Alzheimer's Disease.

The effective amount of the indole-3-

- 10 -

propionic acid (or salt or ester thereof) for prevention of the cytotoxic effects of A β can be readily determined by conventional methods known in the art, such as establishing dose-response curves, as described below. It will be appreciated that the actual preferred amount of the indole-3-propionic acid (or salt or ester thereof) to be administered according to the present invention will vary according to the particular form of the indole-3-propionic acid (i.e., whether it is a salt, an ester, or an acid), the particular composition formulated, and the mode of administration. Many factors that may modify the action of the indole-3-propionic acid (or salt or ester thereof) can be taken into account by those skilled in the art; e.g., body weight, sex, diet, time of administration, route of administration, rate of excretion, condition of the subject, drug combinations, and reaction sensitivities and severities.

Administration can be carried out continuously or periodically within the maximum tolerated dose. Optimal administration rates for a given set of conditions can be ascertained by those skilled in the art using conventional dosage administration tests.

The invention further provides a method of treating fibrillogenic diseases in a human subject. The method includes administering an amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective to inhibit or reverse fibrillogenesis, i.e., inhibit or reverse fibril formation. As used herein, "fibrillogenic diseases" are meant to include any disease or condition involving the undesirable deposition of fibrils. As non-limiting examples thereof, such diseases or conditions include disorders or diseases resulting from abnormal formation of

- 11 -

amyloid or amyloid-like deposits, such as, but not limited to, prion-related encephalopathies, Alzheimer's dementia or disease ("AD"), and other amyloidosis disorders. Examples of prion-related encephalopathies include Creutzfeldt-Jakob disease ("CJD") and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease ("GSS") in humans, scrapie in sheep and goats, and spongiform encephalopathy in cattle.

The present invention further provides a method of treating diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role. The method includes administering an amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective to treat the disease or condition. Diseases or conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role include, without limitation, Parkinson's Disease, Lewy body dementia, amyotrophic lateral sclerosis, progressive supranuclear palsy, emphysema, and some forms of cancer.

Since indole-3-propionic acid and salts and esters thereof are effective in treating diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role as well as preventing cytotoxic effects of amyloid beta protein on cells, these compounds are expected to be particularly useful in treating diseases associated with the amyloid beta protein, such as AD.

For all of the indications of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof, suitable dosage amounts are discussed above, and suitable routes of administration include systemic administration (particularly in cases where the indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof employed is one which crosses the blood-brain barrier). Systemic

- 12 -

administration includes parenteral and oral administration, for example, as discussed in further detail below.

The indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof can be administered alone or in combination with compatible carriers as a composition. Compatible carriers include suitable pharmaceutical carriers or diluents. The diluent or carrier ingredients should be selected so that they do not diminish the therapeutic effects of the indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof as used in the present invention.

The compositions may be made up in any suitable form appropriate for the desired use; e.g., oral, parenteral, or topical administration. Suitable dosage forms for oral use include tablets, dispersible powders, granules, capsules, suspensions, syrups, elixirs, and skin patches. Inert diluents and carriers for tablets include, for example, calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, and talc. Tablets may also contain granulating and disintegrating agents such as starch and alginic acid, binding agents such as starch, gelatin, and acacia, and lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, and talc. Tablets may be uncoated or may be coated by known techniques to delay disintegration and absorption. Inert diluents and carriers which may be used in capsules include, for example, calcium carbonate, calcium phosphate, and kaolin. Suspensions, syrups, and elixirs may contain conventional excipients, for example, methyl cellulose, tragacanth, sodium alginate; wetting agents, such as lecithin and polyoxyethylene stearate; and preservatives, e.g., ethyl-p-hydroxybenzoate.

Dosage forms suitable for parenteral

- 13 -

administration include solutions, suspensions, dispersions, emulsions, and the like. They may also be manufactured in the form of sterile solid compositions which can be dissolved or suspended in sterile injectable medium immediately before use. They may contain suspending or dispersing agents known in the art. Examples of parenteral administration are intraventricular, intracerebral, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, rectal, and subcutaneous administration.

The present invention also relates to a method of decreasing oxidation in a biological sample. Examples of the types of oxidations that can be decreased using this method include lipid peroxidation and oxidations that are mediated by oxygen free-radical processes. The biological sample can be, for example, a cell or a group of cells, e.g. a tissue. The biological sample is contacted with an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof, such as the ones described above. Contacting can be carried out using any suitable method. For example, the indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof can be delivered to the extracellular environment surrounding the biological sample. Alternatively, the indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof can be introduced directly into a cell, for example, by microinjection. The amount of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective to decrease oxidative processes can be determined by conventional methods, such as by delivering varying amounts of the indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof and monitoring the concentration of the products of oxidation, such as oxygen free-radicals or the products of lipid peroxidation.

- 14 -

The present invention will be better understood with respect to the following non-limitative examples.

Example 1

Tests were conducted to determine whether IPA had neuroprotective activity against the Alzheimer's amyloid peptide ("A β "). Widespread cerebral deposition of this 40-43 amino acid peptide causes extensive degeneration and death of neurons in Alzheimer's Disease.

To illustrate the cytoprotective affects of IPA against the cytotoxic effects of A β , cells of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH were used. These cells were exposed to 50 μ M A β (25-35), the actively toxic fragment of A β (Yankner et al., 1990) with or without 50 μ M of IPA. As a control, the experiments were repeated without A β . As a positive control, the well-known anti-oxidant, phenyl-N-t-butylnitron ("PBN") was substituted for IPA.

The results are shown in Figure 1 as a bar graph illustrating viabilities expressed as percentages. While A β alone has a pronounced cytotoxic effect on the cells, both IPA and PBN have strong protective activity.

Example 2

The experiment of Example 1 was repeated using PC12 rat pheochromocytoma cells. The results are shown in Figure 2 and are essentially identical to the results depicted in Figure 1.

Example 3

The experiment of Example 1 was repeated

- 15 -

using the A β (1-42) peptide using the SK-N-SH human neuroblastoma cell line. The results are shown in Figure 3 and are consistent with those shown with respect to Example 1.

Example 4

In order to investigate the possibility that the cytoprotective properties of IPA are also the result, at least in part, of anti-oxidant activity, the levels of malondialdehyde ("MDA"), a marker of lipid peroxidation, in PC12 cells exposed to A β or to oxidative stress were examined. Oxidative stress was delivered by exposing cells to diethyldithiocarbonate ("DDTC"), an inhibitor of superoxide dismutase and an established model of oxidative injury. The PC12 cells were exposed to either amyloid peptide alone or amyloid peptide along with IPA. In other experiments, the cells were exposed to either DDTC alone or DDTC with IPA. The results are shown in Figure 4. It can be seen that IPA significantly decreases the production of malondialdehyde in treated cells, indicating that IPA has anti-oxidant activity. Figure 4 shows both the neuroprotective and the anti-oxidant activities of IPA.

Example 5

To further confirm the observations shown in Example 4, we studied whether IPA was effective in preventing death of cells exposed to oxidative stress (DDTC). PC12 neuroblastoma cells were treated with varying amounts of DDTC, with or without varying amounts of IPA. The results are shown in Figure 5. The anti-oxidant activity of IPA is shown by preventing cell death of neuroblastoma cells induced by inhibition of the superoxide dismutase by DDTC. This is in

- 16 -

agreement with the previously presented data that IPA increases the survival of cells exposed to DDTC.

Example 6

To determine whether IPA had an effect on A β fibrillogenesis, 150 μ M A β (1-40) was incubated with 300 μ M IPA, sodium salt, dissolved in ultrapure water (i.e., distilled, filtered, and sterilized) at a pH of 7. As a control, the ultrapure water used to dissolve the IPA containing an equivalent amount of sodium chloride was added to 150 μ M A β (1-40) at a pH of 7. In one experiment, each of the solutions (i.e., the solution containing IPA and the control solution) was incubated for 24 hours. In a second experiment, each of the solutions was incubated for 48 hours. At the end of each incubation period, 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.2) containing 2 μ M thioflavin T was added to each sample (5 μ L) to a final volume of 2 mL. Fluorescence, which is a direct measure of β sheet formation, was measured at an excitation wavelength of 435 nm and an emission wavelength of 485 nm using a Hitachi F-2000 fluorescence spectrometer. The average and standard deviations of the mean of 3 samples per condition were determined, and the results are presented (as bar graphs) in Figure 6A (24 hour incubation) and Figure 6B (48 hour incubation). In both the 24 and 48 hour incubation experiments, the amount of fluorescence is significantly less in the samples containing IPA (labeled A-beta + ipa) relative to control (labeled A-beta). This indicates that less β sheet formation occurred in the samples containing IPA relative to control, which, in turn, indicates that IPA is antifibrillogenic.

- 17 -

Although preferred embodiments have been depicted and described in detail herein, it will be apparent to those skilled in the relevant art that various modifications, additions, substitutions and the like can be made without departing from the spirit of the invention and these are therefore considered to be within the scope of the invention as defined in the claims which follow.

- 18 -

REFERENCES

- Anderson, J.P., et al., Neurosci Lett 128:126-129 (1991).
- Behl, C., et al., Biochem Biophys Res Commun 186:944-950 (1992).
- Behl, C., et al., Brain Res 645:253-264 (1994).
- Behl, C., et al., Cell 77:817-827 (1994).
- Burdick, D., et al., J Biol Chem 267:546-554 (1992).
- Busciglio, J., et al., Neurobiol Aging 13:609-612 (1992).
- Busciglio, J., et al., J Neurochem 61(4):1565-1568 (1993).
- Butterfield, D.A., et al., Biochem Biophys Res Commun 200:710-715 (1994).
- Chartier-Harlin, M.C., et al., Nature 353(6347):844-846 (1991).
- Copani, A., et al., Molecular Pharmacology 47(5):890-897 (1995).
- Furuta, A., et al., Am J Pathol 146:357-367 (1995).
- Glenner, G.G., and Wong, C.W., Biochem Biophys Res Commun 120:885-890 (1984).
- Goodman, Y., and Mattson, M.P., Exp Neurol 128:1-12 (1994).
- Haass, C., et al., Nature 359:322-324 (1992).
- Harris, M.E., et al., Experimental Neurol 131:193-202 (1995).
- Hensley, K., et al., Proc Natl Acad Sci USA 91(8):3270-3274 (1994).
- Johnson, H.E., and Crosby, D.G., J Org Chem, 25:569ff (1969)
- Kemp, D.S., and Vellaccio, F., eds., Organic Chemistry, Worth Publishers, Inc., pp. 371-377 and 1258 (1980).

- 19 -

- Kennedy, A.M., et al., Brain 116:309-324 (1993).
- Le, W-D., et al., Brain Res 686:49-60 (1995).
- Mark, R.J., et al., J Neurosci 15:6239-6249 (1995).
- Mattson, M.P., Ann N Y Acad Sci 747:50-76 (1994).
- Mattson, M.P., et al., Trends Neurosci 16:409-414 (1993).
- Mattson, M.P., et al., J Neurosci 12:376-389 (1992).
- Pappolla, M.A., et al., Am J Pathol 140:621-628 (1992).
- Pappolla, M. A., and Robakis, N.K., In: Perspectives in behavioural medicine, Alzheimers disease and AIDS. Eds Stein, M., and Baum, M., Academic Press, San Diego, CA, pp. 3-20 (1995).
- Pappolla, M.A., et al., Mol Chem Neuropathol 28:21-34 (1996).
- Pike, C.J., et al., J Neurosci 13:1676-1687 (1993).
- Robakis, N.K., and Pangalos, M.N., Neurobiol Aging 15:S127-129 (1994).
- Robakis, N.K., et al., Proc Natl Acad Sci USA 84:4190-4194 (1987).
- Sambamurti, K., et al., J Neurosci Res 33:319-329 (1992).
- Shoji, M., et al., Science 258:126-129 (1992).
- Smith, M.A., et al., Amer J Pathol 145:42-47 (1994).
- Tsuzuki et al., Biochem Pharmacol, 41:R5-R8 (1991).
- Weidemann, A., et al., Cell 57:115-126 (1989).
- Weiss, J.H., et al., J Neurochem 62(1):372-375 (1994).
- Yankner, D.A., et al., Science 250:279-282 (1990).
- Zhang, Z., et al., Neurosci Lett 177:162-164 (1994).

- 20 -

WHAT IS CLAIMED:

1. A method of preventing a cytotoxic effect of amyloid beta protein on cells comprising:
exposing the cells to an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof.
2. A method according to claim 1, wherein the cytotoxic effect is cell death.
3. A method according to claim 1, wherein the cytotoxic effect is increased lipid peroxidation.
4. A method according to claim 1, wherein the cytotoxic effect is increased intracellular Ca^{2+} .
5. A method according to claim 1, wherein the cytotoxic effect is increased oxygen free-radicals.
6. A method according to claim 1, wherein the cells are neuronal cells.
7. A method according to claim 1, wherein the cells are present in a human subject and wherein said exposing comprises:
administering the indole-3-propionic acid or salt or ester thereof systemically.
8. A method according to claim 1, wherein the cells are present in a human subject having a fibrillogenic disease.
9. A method of treating a fibrillogenic disease in a human subject comprising:

- 21 -

administering an amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective to prevent or reverse fibrillogenesis in the human subject.

10. A method according to claim 9, wherein said administering is carried out systemically.

11. A method according to claim 9, wherein the fibrillogenic disease is Alzheimer's Disease.

12. A method according to claim 1, wherein the fibrillogenic disease is a prion-related encephalopathy.

13. A method of decreasing oxidation in a biological sample comprising:

contacting the biological sample with an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof.

14. A method according to claim 13, wherein the biological sample is a cell.

15. A method according to claim 13, wherein said decreasing oxidation results in decreasing lipid peroxidation.

16. A method according to claim 13, wherein said decreasing oxidation results in decreasing oxygen free-radicals.

17. A method for treating diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress

- 22 -

play a role comprising:

administering to a patient in need of such treatment an amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective for the treatment of said disease or condition.

18. A method according to claim 17, wherein said administering is carried out systemically.

19. A method according to claim 17, wherein the disease or other condition is selected from the group consisting of Parkinson's Disease, Lewy body dementia, amyotrophic lateral sclerosis, progressive supranuclear palsy, stroke, atherosclerosis, emphysema, and cancer.

20. Use of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof in the treatment of diseases associated with the cytotoxic effects of amyloid beta protein.

21. Use of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof in the treatment of fibrillogenic diseases.

22. Use of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof in the treatment of Alzheimer's Disease, a prion-related encephalopathy, or combinations thereof.

23. Use of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof in the treatment of diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role.

- 23 -

24. Use of indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof in the treatment of Parkinson's Disease, Lewy body dementia, amyotrophic lateral sclerosis, progressive supranuclear palsy, stroke, atherosclerosis, emphysema, cancer, or combinations thereof.

The cytotoxic effects of amyloid beta protein on cells are prevented by contacting the cells with an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof. Furthermore, a fibrillogenic disease can be treated in a human subject by administering to the human subject an amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof effective to prevent or reverse fibrillogenesis. Oxidation in a biological sample can be decreased by contacting the biological sample with an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof. Additionally, diseases or other conditions where free radicals and/or oxidative stress play a role can be treated by administering an effective amount of an indole-3-propionic acid or a salt or ester thereof.

FIG. 1

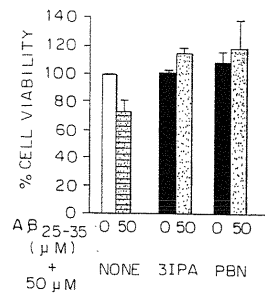


FIG. 3

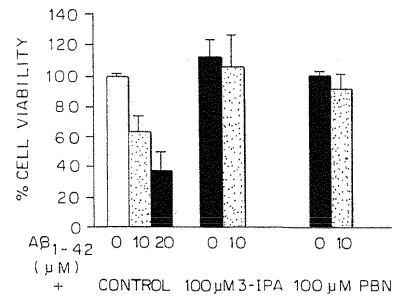


FIG. 2

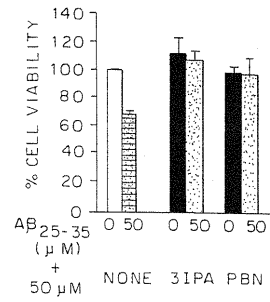


FIG. 4

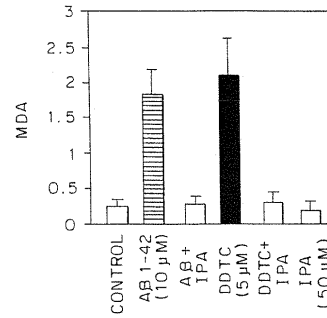


FIG. 5

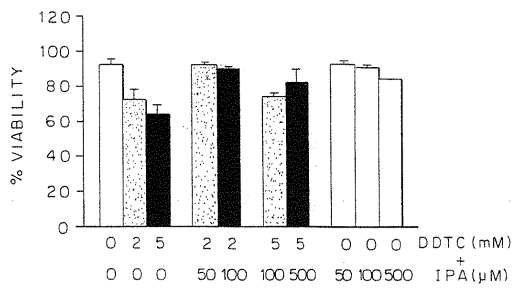


FIG. 6A

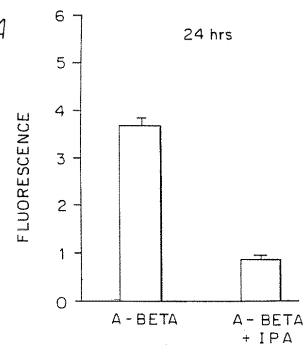


FIG. 6B

