

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-544964
(P2009-544964A)

(43) 公表日 平成21年12月17日(2009. 12. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006. 01)	A 6 1 P 25/28	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/437 (2006. 01)	A 6 1 K 31/437	4 C O 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2009-521315 (P2009-521315)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月20日 (2007. 7. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月19日 (2009. 3. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2007/051706
 (87) 国際公開番号 WO2008/009868
 (87) 国際公開日 平成20年1月24日 (2008. 1. 24)
 (31) 優先権主張番号 0606698
 (32) 優先日 平成18年7月21日 (2006. 7. 21)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

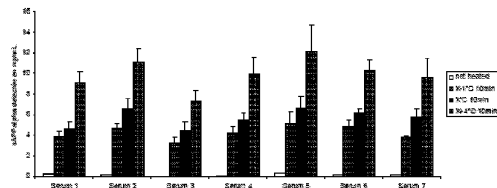
(71) 出願人 599022270
 エグゾニ・テラピューティック・ソシエテ
 ・アノニム
 EXONHIT THERAPEUTIC
 S SA
 フランス国、エフー75017 パリ、リ
 ュ・ブリュネル 26
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100113653
 弁理士 東田 幸四郎
 (74) 代理人 100116919
 弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患の治療のための方法およびツール

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病で観察されるような、認知機能が変化した神経変性疾患の治療のための組成物および方法に関するものである。さらに特定すれば、本発明は、ある血小板パラメーターの生化学アッセイに基づくことから採血により行うことができる、神経保護治療の活性および/または有効性をヒト臨床的にモニタリングするための戦略を提示する。本発明は、これらの戦略を実行するために適した方法、ツール、構成および組成物にもまた関するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料を熱処理する工程および免疫学的に定量する工程を含む、試料中の s A P P の免疫学的定量のための方法。

【請求項 2】

試料が、血液試料であるか、または血液もしくは他の生物学的液体から得られることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

熱処理工程が、約 60 ~ 70 の間に含まれる温度で s A P P エピトープをアンマスキングするために十分な時間、典型的には約 30 秒 ~ 10 分の間に含まれる時間、試料を処理することを含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 4】

免疫学的定量工程が特異的抗体により行われることを特徴とする、請求項 1 または 2 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

ヒト血液試料（派生物）中の s A P P の定量のための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項 6】

アルツハイマー病を有するヒト対象に由来する血液（派生物）試料中の s A P P の定量のための、請求項 5 記載の使用。

20

【請求項 7】

アルツハイマー病を有するヒト対象における治療の有効性を評価するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項 8】

哺乳動物における神経保護治療の有効性を評価またはモニタリングするための方法であって、該治療を受けた該哺乳動物からの生物学的試料中の s A P P の産生をインビトロまたはエクスピボで測定する工程を含み、該試料が血小板を含有し、s A P P の該産生が治療の有効性の指標である、方法。

【請求項 9】

神経保護治療が、ピラゾロピリジンおよび G A B A (A) レセプターモデュレーターの中から選択される化合物であることを特徴とする、請求項 8 記載の使用。

30

【請求項 10】

哺乳動物が神経変性疾患を有することを特徴とする、請求項 8 または 9 記載の方法。

【請求項 11】

生物学的試料が血液試料または血液派生物試料であることを特徴とする、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

s A P P の産生が、免疫学的試験、好ましくは E L I S A により測定されることを特徴とする、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物において測定された s A P P の産生が、参照レベルと、または治療前にもしくは治療の初期段階で測定された値と比較されることを特徴とする、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 14】

哺乳動物における血小板による A P P 産生を刺激または誘導するための医薬の調製のための、ピラゾロピリジンおよび G A B A (A) レセプターモデュレーターの中から選択される化合物の使用。

【請求項 15】

哺乳動物における血栓形成のリスクを低減するための医薬の調製のための、ピラゾロピリジンおよび G A B A (A) レセプターモデュレーターの中から選択される化合物の使用。

50

【請求項 16】

神経変性疾患を有する患者における血管合併症を軽減するための医薬の調製のための、ピラゾロピリジンおよびGABA(A)レセプターモデュレーターの中から選択される化合物の使用。

【請求項 17】

哺乳動物、特に神経変性疾患を有する患者における血小板凝集を阻害するための医薬の調製のための、ピラゾロピリジンおよびGABA(A)レセプターモデュレーターの中から選択される化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、アルツハイマー病で観察されるような、認知機能が変化した神経変性疾患の治療のための組成物および方法に関するものである。さらに詳細には、本発明は、ある血小板パラメーターの生化学アッセイに基づくことから採血により行うことのできる、神経保護治療の活性および/または有効性のヒトの臨床的なモニタリングのための戦略を提示する。本発明は、これらの戦略を実行するために適した方法、ツール、構成および組成物にもまた、関するものである。

【0002】

アルツハイマー病は、認知症の主因および最もよくみられる神経変性疾患に相当する。この進行性疾患は、記憶喪失ならびに言語能力、見当識および判断の低下を特徴とする。この疾患を患う患者の脳検査は、重要な記憶中枢である海馬、ならびに理性、言語および記憶に関与する大脳皮質のニューロン損失を示す。コリン作動性ニューロンは、この枯渇により特に影響される。

20

【0003】

アルツハイマー病を患う患者の脳に観察される主な異常は、細胞内および細胞外のタンパク質凝集物の蓄積である。APP(アミロイド前駆体タンパク質)の切断により生じるアミロイドペプチド(A β)の細胞内および細胞外凝集により形成する老人斑は、ニューロンおよびグリア細胞に波及する変化領域の特徴を示す。他の細胞内凝集物、神経原線維濃縮体、およびタウタンパク質は、認知症の深刻さと密接に関連すると思われる。

【0004】

家族性アルツハイマー病に実施された遺伝的研究は、四つの遺伝子、すなわちAPP、プレセニリン1および2(PS1およびPS2)ならびにアポリポタンパク質E(ApoE)がこの疾患の発生に関連することを示した。これらの遺伝子のそれぞれにおける突然変異または多型はA β ペプチドの産生増加を導くものの、シナプスおよびニューロンの損失を支配するメカニズムは、あまり理解されていないままである。したがって、特にA β ペプチドにより著しく誘導されうる酸化ストレス、炎症現象および免疫現象、またはさらに性ホルモン欠損、インスリン欠損および甲状腺機能低下症などの現象を伴ういくつかの仮説およびメカニズムが共存すると思われる。カルシウム流入および興奮毒性における変化の役割を強調する仮説もある。しかし、コリン作動性ニューロンの特別な脆弱性を完全な説明できる事象はなかった。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の使用に基づく、現在利用できる治療は、患者の認知機能を一時的に改善するだけであり、ましてアルツハイマー病の進行を減速することができる治療アプローチがアルツハイマー病と闘うことを意味しない。

30

40

【0005】

最近の観察がA β ペプチドに対する免疫療法アプローチにより薬理的に介入する可能性を強調しているとはいえ、APPの代謝およびA β ペプチド産生に関与するプロテアーゼであるセクレターゼを直接ターゲティングする方が、なおさら適切である。

【0006】

A β ペプチドは、アミロイド形成経路において、 β -セクレターゼ(BACE)および γ -セクレターゼ(プレセニリン)と呼ばれる二つのプロテアーゼによるAPPタンパク

50

質の連続切断を經由して産生される40/42残基のフラグメントである。Aペプチドに関する配列は、APPの膜内ドメインと細胞外ドメインとの間の接合部に位置する。非アミロイド形成経路では、APPはAドメインの中でA領域のアミノ酸16(Lys)と17(Leu)との間で β -セクレターゼにより切断され、細胞外媒質中で塩析する可溶性APP部分(sAPP、105~125kDa、APP770型の残基1~688)と、C83(10kDa)と呼ばれる膜に保持されるフラグメント(膜貫通ドメインの部分およびC末端細胞内部分を有する)とを発生させ、C83自体は、 β -セクレターゼにより切断されて「APP細胞内ドメイン」ペプチド(AICD)およびP3ペプチド(3kDa)を発生させる。したがって、 β -セクレターゼの作用は、アミロイドペプチドの形成を妨げるだけでなく、APPの大型の細胞外N末端フラグメント(エクドメイン)の発生も刺激する。 β -セクレターゼにより発生するAPPの可溶性N末端フラグメント、すなわちsAPPは、小胞の内腔および細胞表面で構成的に塩析する。このようなAPP種は、APPを発現している細胞により馴化された培地にインビトロで分泌され、血漿および脳脊髄液中にインビボでみられる。

10

20

30

40

50

【0007】

β -セクレターゼの活性を刺激してsAPPのレベルを増加させると記載されたアプローチは、P2Y2ヌクレオチドレセプター、PACAP/PAC1レセプター、または様々な神経伝達物質に対するレセプター、例えばムスカリンレセプター、代謝型グルタミン酸レセプターもしくはさらにセロトニンレセプターなどのGタンパク質共役レセプターの活性化を伴う(概説についてはiii節を参照のこと)。神経伝達物質により刺激される経路は、sAPP産生モデュレーターとして文献で詳しく記載されているプロテインキナーゼC(PKC)系およびホスホリパーゼ系、ならびにMAPキナーゼを伴うが、例えばホルボールエステルによる、またはさらにセロトニン5-HT2aレセプターアゴニストおよびセロトニン5-HT2cレセプターアゴニストによるPKC依存性経路の刺激などである。cAMPの産生およびRac1GTPアーゼの動員を經由した、認知および記憶に役割を果たすことが知られているセロトニン5-HT(4)レセプターを伴う経路、あるいはさらにPKCおよび/もしくはMAPキナーゼを經由したアセチルコリン阻害剤、エストロゲン(17 β -エストラジオールなど)またはさらにテストステロンを伴う経路もある。EGFおよびインスリンなどのある種のホルモンおよび成長因子は、一般にそれぞれPKCまたはP13Kを經由したsAPPの産生を刺激することで知られている。他の薬理的薬剤もsAPPの産生を刺激することが最近になって記載されており、cAMP-プロテインキナーゼA(PKA)経路によるものは、例えばフォルスコリンであり、またPKC/MAPキナーゼ経路によるものは、例えばシクロオキシゲナーゼCOX阻害剤のような非ステロイド系抗炎症剤(イブプロフェン)、スタチン系HMG-CoAレダクターゼ阻害剤(ロバスタチン)、ラサギリン誘導體またはさらに(-)-エピガロカテキン-3-ガレートのようなポリフェノールである。しかし、全てのこれらアプローチは、薬理的ツールによりsAPPの産生を刺激しようと努める戦略の妥当性を実証することを可能にするが、ヒトの臨床的に使用するために適した新しい化合物をもたらさなかった。

【0008】

本発明は、sAPPフラグメントの産生を刺激することを意図した、エタゾレートを含めたピラゾロピリジンのクラスに属する化学化合物などの薬剤を使用するための理論的根拠を提供する。

【0009】

本発明は、sAPPの産生増加と、エタゾレートがROS(「活性酸素種」)により誘導される作用を、すなわち酸化ストレスを阻害する能力との間の関連についてもまた記載する。

【0010】

この酸化ストレス現象は、アルツハイマー病のいくつかの局面、すなわちニューロンの変性およびアストロサイトの炎症だけではなく、血小板の活性化および凝集にも不可欠な

役割を果たす。これらの後者の現象は、アルツハイマー病の血管合併症に関与し、血管性認知症の原因である。

【0011】

結果として、血小板活性化のレベルで酸化ストレスにより開始する経路に及ぼすエタゾレート阻害剤効果をモニタリングすることが可能である。さらに一般的には、血小板活性化レベルで神経保護化合物の阻害剤効果をモニタリングすることが可能である。

【0012】

したがって、初めて本発明は、神経保護化合物の有効性を臨床的または治療的にモニタリングするために、血小板の活性化または凝集に関連した任意の生物学的現象の測定を提案することを可能にする。APPからAペプチドおよびsAPPペプチドを発生させる能力は、神経系および血小板によって共有される。結果として、エタゾレートが酸化ストレスに及ぼす阻害作用がsAPPの産生増加に変換されることから、本発明は、血小板試料から、またはさらに一般的には血液試料からエタゾレートがAPPの成熟に及ぼす作用をモニタリングするための理論的根拠を提供する。

10

【0013】

本発明は、ピラゾロピリジンファミリーの任意の化合物の有効性を臨床的または治療的にモニタリングするための、血小板活性化または凝集に関連する任意の生物学的現象の測定もまた請求する。さらに、本発明は、ピラゾロピリジンファミリーの任意の化合物の有効性を確実に臨床的または治療的にモニタリングするための、血液中のAPP成熟における任意の変化の測定、特に血液試料または血小板調製物からのsAPP濃度の測定を主張することを可能にする。

20

【0014】

したがって、本発明の目的事項は、哺乳動物における神経保護治療の有効性を評価またはモニタリングする方法にあり、この方法は、前記治療を受けた哺乳動物からの生物学的試料中のsAPPの産生を（好ましくはインビトロまたはエクスピボで）測定する段階を含み、前記試料は血小板を含有し、sAPPの産生は、治療有効性の指標である。

【0015】

本発明の別の目的は、試料中のsAPPを免疫学的に定量する（immunological dosing）のための工程にあり、この工程は、（sAPPをアンマスキングするために）試料を熱処理する段階および免疫学的に定量する段階を含む。この工程は、任意の試料、特に血液もしくは血液派生物試料（血清、血小板など）、または他の生物学的液体からsAPPを定量するために適する。試料は、特に希釈、濃縮、濾過などにより前処理してもよい。

30

【0016】

神経保護治療

本発明は、哺乳動物における任意の神経保護治療の有効性を評価またはモニタリングするためにもまた使用してもよい。本発明の意味では、神経保護治療により、神経系に影響する疾患、特に神経変性疾患の治療に使用することができるか、または使用される任意の治療が意味される。この文脈で、ピラゾロピリジンおよびGABA(A)レセプターモデュレーターの中から選択された化合物を挙げることができる。

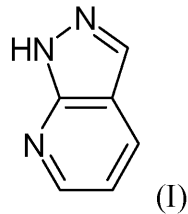
40

【0017】

本発明の意味では、ピラゾロピリジンファミリーの化合物は、任意の位置で置換または非置換された下記式(I)の任意の化合物を好都合に意味する。

【0018】

【化 1】



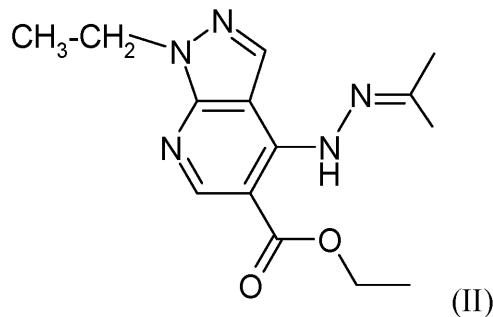
【 0 0 1 9 】

本発明に使用されるピラゾロピリジンファミリーの化合物は、特に以下の化合物の中から
10
ら選択される：

- 下記式 (I I) のエタゾレート：

【 0 0 2 0 】

【化 2】



【 0 0 2 1 】

エタゾレートは、本発明の好ましい態様を構成する。

【 0 0 2 2 】

- 4 - ブチルアミノ - 1 - エチル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル (トラカゾレート)、
 - 4 - ブチルアミノ - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (4 - アミノ - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 1 - イル) - D - 1 - デオキシ - リボフラノース
 - 1 - エチル - 4 - (N ' - イソプロピリデン - ヒドラジノ) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル (S Q 2 0 0 9)
 - 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - n - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン
 - 4 - アミノ - 1 - エチル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル (デスブチルトラカコレート)
 - 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボキサミド、
 - 1 - エチル - 6 - メチル - 4 - メチルアミノ - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - プロピル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - エチル - 4 - エチルアミノ - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 4 - アミノ - 1 - ブチル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル
 - 5 - (4 - アミノ - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 1 - イル) - 2 - ヒドロキシメチル - テトラヒドロフラン - 3 - オール、
 - 1 - アリル - 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5
- 30
40
50

- カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸、
- 4 - アミノ - 1 - エチル - 3 , 6 - ジメチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - ジメチルアミノ - 1 - エチル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 1 - エチル - 6 - メチル - 4 - プロピルアミノ - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 4 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ブタ - 3 - エニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - アリルアミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - イソプロピルアミン、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - N - n - プロピル - 1 H - ピラゾロ - [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボキサミド、
- 4 - アミノ - 1 - ブチル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - プロパ - 2 - イニルアミド
- 4 - アミノ - 1 - (3 - メチル - ブチル) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - N - (2 - プロペニル) カルボキサミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - ブチルアミド、
- 4 - アミノ - 1 - ブタ - 3 - イニル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ブタ - 3 - エニル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - アリルアミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - (3 - メチル - ブチル) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸イソブチルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - ブチルアミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - (3 - メチル - ブタ - 2 - エニル) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - シクロプロピルアミド、
- エチル 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - ヒ

10

20

30

40

50

ドロキサマート、

- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸プロパ - 2 - イニルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 4 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 4 - エニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - プロピルアミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - シクロプロピルメチル - アミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸 2 - メチルアリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - アリルアミド (I C I 1 9 0 , 6 2 2)、
- 4 - アミノ - 1 - ペンタ - 4 - イニル - N - 2 - プロペニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボキサミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - プロパ - 2 - イニルアミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - ブタ - 2 - イニルアミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - (2 - シクロプロピル - エチル) - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ヘキソ - 5 - イニル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸アリルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - シクロプロピルメチル - アミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸ブタ - 3 - エニルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸シクロプロピルメチルエステル、
- 4 - ブチルアミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - アリルアミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [2 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸 2 - シクロプロピルエチルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 3 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸シクロプロピルメチルエステル、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンタ - 4 - イニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸シクロプロピルメチルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ベンジル - 6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - ベンジルアミド、
- 4 - アミノ - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - フェニルアミド、
- 4 - アミノ - 6 - メチル - 1 - ペンチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸ベンジルエステル、
- 4 - アジド - 1 - - D - リボフラノシルピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン、

10

20

30

40

50

- 1 - ペンタ - 3 - イニル - N - 2 - プロペニル - 4 - プロピオンアミド - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボキサミド、
- 2 - (4 - アミノ - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 1 - イル) - 5 - ヒドロキシメチル - テトラヒドロ - フラン - 3 , 4 - ジオール、
- 2 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - エタノール、
- 3 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - プロパン - 1 - オール、
- 3 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - 酢酸プロピルエステル、
- 2 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - プロピオン酸エチルエステル、
- 2 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - ペンタン酸エチルエステル、
- 2 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - 安息香酸エチルエステル、
- 3 - (6 - メチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イルアミノ) - ペンタン酸プロピルエステル、
- N - ベンジリデン - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- N - フラン - 2 - イルメチレン - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- N - (4 - フルオロ - ベンジリデン) - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- N - (3 - フラン - 2 - イル - アリリデン) - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- N - (4 - メトキシ - ベンジリデン) - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- 4 - [(3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラゾノメチル] - ベンゾニトリル、
- N - ベンゾ [1 , 3] ジオキソール - 5 - イルメチレン - N ' - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (4 - ニトロ - ベンジリデン) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (2 - ニトロ - ベンジリデン) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (4 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (5 - ニトロ - フラン - 2 - イルメチレン) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (2 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - ヒドラジン、
- N - (3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 4 - イル) - N ' - (6 - ニトロ - ベンゾ [1 , 3] ジオキソール - 5 - イルメチレン) - ヒドラジン、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - メトキシ - ベンジルアミノ) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸
- 4 - (3 - クロロ - 4 - メトキシ - ベンジルアミノ) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - (ピリジン - 4 - イルメチル) - アミド、
- 4 - (3 - クロロ - 4 - メトキシ - ベンジルアミノ) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ

10

20

30

40

50

- [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - (テトラヒドロ - フラン - 2 - イルメチル) - アミド、
 - 4 - (3 - クロロ - 4 - メトキシ - ベンジルアミノ) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - (5 - ヒドロキシ - ペンチル) - アミド、
 - 4 - (3 - クロロ - 4 - メトキシ - ベンジルアミノ) - 1 - エチル - 1 H - ピラゾロ
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - [3 - (2 - オキソ - ピロリジン - 1 - イル) - プロピル
] - アミド、
 - 4 - tert - ブチルアミノ - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 1 H - ピラ
 ザロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 4 - シクロプロピルアミノ - 1 H - ピ
 ラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 4 - プロピルアミノ - 1 H - ピラゾロ
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 4 - フェニルアミノ - 1 H - ピラゾロ
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 4 - ブチルアミノ - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b]
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 4 - (2 - エトキシ - エチルアミノ)
 - 1 H - ピラゾロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 4 - ベンジルアミノ - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 1 H - ピラゾロ
 [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル、
 - 1 - (2 - クロロ - 2 - フェニル - エチル) - 4 - フェネチルアミノ - 1 H - ピラゾ
 ロ [3 , 4 - b] ピリジン - 5 - カルボン酸エチルエステル。

10

20

【 0 0 2 3 】

これらの化合物は、塩、エステル、ラセミ体、活性異性体などの形であってもよい。特定の一態様では、神経保護化合物は、エタゾレート、トラカゾレート (tracazolate) またはカルタゾレート (cartazolate) の中から、さらに好ましくはエタゾレートから選択される。

【 0 0 2 4 】

GABA (A) モデュレーターは、フリーラジカル (ROS) の発現または活性をモデュレーションすることのできる天然または合成起源の任意の化学化合物、特に、植物、細菌、ウイルス、動物、真核生物、合成または半合成起源の有機または無機分子であってもよい。特定の例として、ベンゾジアゼピンを特に挙げることができる。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の範囲内で使用される化合物または治療は、異なる方法で処方または投与することができる。投与は、当業者に公知の任意の方法により、好ましくは経口的に、または全身もしくは局所注射により行ってもよい。注射は、典型的には眼内、腹腔内、脳内、静脈内、動脈内、皮下または筋肉内である。経口または全身投与が好ましい。投与される用量は、当業者が調整してもよい。典型的には、化学化合物について約 0.01 mg ~ 100 mg/kg が注射される。特定の単位投薬量は、例えば 1 回あたり 0.5 ~ 40 mg である。場合により他の活性薬剤または任意の薬学的に許容される賦形剤 (例えば安定化剤の存在下の緩衝液、食塩水または等張溶液など) と組み合わせ、繰り返し注射を行ってもよいことが了解されている。

40

【 0 0 2 6 】

薬学的に許容される担体または賦形剤は、緩衝液の溶質、溶媒、結合剤、安定化剤、乳化剤などの中から選択することができる。緩衝液または希釈液の溶質は、特にリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、乳糖、セルロース、カオリン、マンニトール、塩化ナトリウム、デンプン、粉砂糖およびヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) (持続放出用) である。結合剤は、例えばデンプン、ゼラチン、およびスクロース、グルコース、デキストロース、ラクトースなどの増量性溶質である。特にアルギン酸塩、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの天然ゴムまたは合成ゴム

50

もまた使用してもよい。他の賦形剤は、例えばセルロースおよびステアリン酸マグネシウムである。安定化剤は、例えば多糖（アラビアゴム、寒天、アルギン酸、グアーガムおよびトラガカント、キチンまたはその誘導体、ならびにセルロースエーテル）などの処方に組み入れてもよい。溶媒または溶質は、例えばリンゲル液、水、蒸留水、リン酸緩衝液、リン酸食塩水、および他の通常の液体である。

【0027】

試料

上記方法を実行するために、治療された対象に由来する、血小板を含有する任意の試料を使用することが可能である。実際に本発明は、神経保護化合物が血小板中における s A P P の産生を誘導することができることを示す。したがって、治療の有効性は、血小板を含有する任意の試料から s A P P アッセイにより評価およびモニタリングしてもよい。

10

【0028】

特定の一態様では、生物学的試料は、血液試料または血液由来の試料である。血液「由来の」試料とは、例えば試料の血小板を濃縮するため、他の細胞集団を除去するため、可能性のある病原体を不活性化するため、アッセイを較正するためなどの、例えば希釈、濾過、精製などにより処理された任意の血液試料と理解される。

【0029】

上記方法は、全ての哺乳動物、特にアルツハイマー病、パーキンソン病、ALS、ハンチントン病などの神経変性疾患を患う、好ましくはヒトに適用することができる。

20

【0030】

s A P P アッセイ

当業者にそれ自体公知の様々な技法を、s A P P をアッセイするために使用することができる。したがって、特に、s A P P に特異的な抗体の使用に基づく免疫学的技法を挙げることができる。このような抗体は、文献から得ることができるし（Exp. Neurol. 2003 Sep; 183(1):74-80）、当業者自身に公知の技法により産生させることもできる。したがって、非ヒト哺乳動物に s A P P または s A P P の任意のエピトープもしくはフラグメントを免疫処置することにより、このような抗体を産生させ、次にインビトロで s A P P と結合することができるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を単離および/または選択することが可能である。次いで、抗体の特異性は、A P P タンパク質全体ならびに/または A P P タンパク質由来の他のペプチド、例えばフラグメント C 8 3、A I C D ペプチドおよび P 3 ペプチドに対する抗体の結合試験の判定により確認してもよい。好ましくは、s A P P と特異的に結合することができ、C 8 3 フラグメント、A I C D ペプチドおよび P 3 ペプチドと特異的に結合できない抗体が使用される。結合の「特異性」は、s A P P への結合を、他のタンパク質またはペプチドへの可能性のある結合と区別することができることを示す。

30

【0031】

s A P P の産生を測定するための方法は、E L I S A または R I A 技法、特異的抗体でコーティングされた基質、磁気ボール、カラム、いくつかの抗体（捕捉抗体および検出抗体）などの使用を伴うことがある。好ましくは、E L I S A 試験が使用される。

40

【0032】

典型的には、測定された s A P P の産生を、参照レベルと、または前記哺乳動物における治療前にもしくは治療の初期段階で測定された値と比較する。したがって、治療に続いて、または治療の間に、患者において s A P P の産生レベルが漸進的に変化したかどうかを判定することが可能である。s A P P レベルの維持または増加は、治療の有効性の指標を構成する。

【0033】

さらに、本発明者らは、任意の試料に適用することができる、s A P P を免疫学的に定量するための改良法を開発した。この方法は、特に可溶性 s A P P フラグメントの特異的エピトープをアンマスキング（することで利用可能に）できるようにする試料処理段

50

階に依存する。実際に、本発明者らによって提示される結果は、適切なプロトコールがなければ、E L I S Aにより特異的および定量可能な方法でs A P Pを検出することができないことを示す。

【0034】

したがって、本発明の別の目的は、試料中のs A P Pの免疫学的定量的ための工程にあり、この方法は、(s A P Pエピトープをアンマスキングするために)試料を熱処理する段階および免疫学的定量的段階を含む。この工程は、任意の試料、特に血液試料もしくは血液派生物試料(血清、血小板など)、他の生物学的液体、または培養上清からのs A P Pの定量に適する。試料は、特に希釈、濃縮、濾過などにより前処理してもよい。

【0035】

好ましくは、熱処理段階は、約60 ~ 70 の間に含まれる温度でs A P Pエピトープをアンマスキングするために十分な時間、典型的には約30秒 ~ 10分の間に含まれる時間、試料を処理することを含む。実施例に示すように、このような方法は、ヒト血液試料からの、信頼でき、再現性があり、かつ特異的なs A P Pアッセイを可能にする。

【0036】

免疫学的アッセイは、s A P Pに特異的な任意の試薬、特に上記のもののような任意の特異的抗体を用いた、特にE L I S Aなどのそれ自体公知の様々な技法により行うことができる。これらの抗体の中で、A P Pのアミノ酸残基1 ~ 17に含有されるエピトープを認識する任意の抗体を特に挙げることができる。さらに具体的には、このような抗体またはキットは、SigmaもしくはBiosourceが販売するE L I S A A P Pキットのように市販されているか、または(A P Pの切断レベルで)s A P Pに特異的なある種の抗体もしくはs A P PおよびA P Pを認識する抗体である：

- モノクローナル抗体6 E 1 0 (s A P Pに特異的)
- モノクローナル抗体2 B 3 (I B L s A P Pキットに包含される)、s A P Pに特異的
- モノクローナル抗体B A N 5 0、Aペプチド1 - 16 (P M I D : 1 0 4 8 0 8 8 7)に対する免疫処置により産生される
- モノクローナル抗体2 2 C 1 1 (s A P Pを認識する抗A P P抗体)
- ポリクローナルp o l y C 1 1抗体 (Upstate/Millipore、カタログ番号A B 5 3 6 8、Chemicon製)
- s A P P (ポリ)、O Y C製 (カタログ番号A P P - K P I - 抗血清)
- s A P P a (ポリ)、Signet Covance製 (カタログ番号S I G - 3 9 1 3 9)
- ウサギ抗s A P P抗体3 3 2 9、リコンビナント型s A P Pを特異的に認識する (P M I D : 9 4 6 5 0 9 2)。

【0037】

治療への応用

上に定義した神経保護治療が血小板におけるs A P P産生の誘導または刺激を可能にすると予想外に立証されたことから、この種の化合物の新しい治療的使用を構想することができる。

【0038】

したがって、本発明の目的は、哺乳動物における血小板によるs A P P産生を刺激または誘導するための医薬の調製にピラゾロピリジンおよびG A B A (A)レセプターモデュレーターの中から選択される化合物を使用することにある。

【0039】

本発明は、哺乳動物における血栓形成のリスクを低減させるための医薬の調製にピラゾロピリジンおよびG A B A (A)レセプターモデュレーターの中から選択される化合物を使用することにもまた関する。

【0040】

本発明は、神経変性疾患を患う患者における血管合併症を軽減するための医薬の調製にピラゾロピリジンおよびG A B A (A)レセプターモデュレーターの中から選択される化

10

20

30

40

50

合物を使用することにもまた関する。

【0041】

本発明は、哺乳動物、特に神経変性疾患を患う患者における血小板凝集を阻害するための医薬の調製にピラゾロピリジンおよびGABA(A)レセプターモデュレーターの中から選択される化合物を使用することにもまた関する。

【0042】

例示的および非限定的とみなされうる以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】未処置血清におけるsAPP アッセイを示す図である。

【図2】熱処理がELISAによるsAPPの検出に及ぼす効果を示す図である。

【図3】ヒト血清中のsAPPの検出を示す図である。

【図4】血清中のリコンビナントsAPPの検出を示す図である。

【図5】エタゾレートがsAPPのインビトロ産生を刺激することを示す図である。

【図6】エタゾレートがニューロンにおけるsAPP産生を刺激することを示す図である。

【図7】エタゾレートがsAPPのインビトロ産生を刺激することを示す図である。

【図8】エタゾレートがアミロイドペプチドの毒性に及ぼす効果およびGABA_A阻害剤がエタゾレートにより誘導される神経保護に及ぼす効果を示す図である。統計:Wilcoxon検定:###、 $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

【図9】 β -セクレターゼがエタゾレートにより誘導される神経保護に及ぼす阻害剤効果を示す図である。統計:Wilcoxon検定:*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ 。

【図10】抗sAPP中和抗体がエタゾレートにより誘導される神経保護に及ぼす効果を示す図である。統計:Wilcoxon検定:###、 $p < 0.001$; ***, $p < 0.001$ 。

【0044】

実施例

実施例1:sAPPのアッセイのための工程

血中を循環しているAPP可溶性フラグメント(sAPP)は血小板細胞および関連する β -セクレターゼ活性から生じる。このフラグメントは、年齢と共に、そしてアルツハイマー病(AD)の生理病理学的過程の間に減少することが示された。血中を循環しているsAPPは、APPのプロセッシングにおける変化をモニタリングするためのバイオマーカーとみなすことができ、この変化は、年齢と共に、そしてアルツハイマー病の生理病理学的過程の間に出現し、医療を受けることにより修正することができる。

【0045】

したがって、アルツハイマー病を治療するためにAPPのプロセッシングを改変することを目的とする治療の有効性を評価するために、血液凝固および血小板活性化後の血中の、さらに特定すれば血清中のsAPPレベルを正確に定量することに現実的な関心がある。

【0046】

下記の方法は、二重サンドイッチELISA技法により高親和性抗体-抗原を検出するために、sAPP可溶性フラグメントの特異的エピトープをアンマスキングして利用可能にするために開発された。

【0047】

実際に、血清試料を処理するために適したプロトコールなしでは、sAPPはELISAにより定量可能かつ特異的に検出することはできないであろう。図1に示すように、前処理を行わない血清単独は、sAPP(3.5ng/mL)の非常にはっきりと定量可能に検出されるが、これは、リコンビナントsAPP(+10ng/mL)が添加と共に増加するようには見えず、その一方で、添加された同量のsAPPは、およそ予想された量(10ng/mL)で検出される(8.7ng/mL)。特別な処理を行わない純粋な血清における

10

20

30

40

50

E L I S A 検出は、可溶性で循環している s A P P に特異的とは思われない。

【 0 0 4 8 】

血清中の可溶性 s A P P を利用し、それを信頼でき、特異的で、かつ再現性のある方法で定量可能とするために、本発明者らは、熱処理により、血清中に存在する s A P P が特異的 E L I S A 抗体に利用できるようにする試料の調製および処理方法を開発した。血清試料は、p H 7 . 4 のダルベッコ (Dulbecco) リン酸緩衝食塩水 (P B S) (Sigma # D 8 5 3 7)、5 % B S A、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 に最初希釈する。次に、希釈した試料を 6 6 で 1 0 分間熱処理し、次に 4 で冷却する。次に、試料を、s A P P に特異的なキットを使った E L I S A 技法により分析する。

【 0 0 4 9 】

図 2 に示すように、E L I S A による血清からの s A P P の検出は、加熱温度および熱処理時間 (温度範囲 6 0 ~ 7 0 ; X = 6 6) の関数として顕著に増加する。

【 0 0 5 0 】

この血清試料調製物および熱処理法を、3 回の別々の実験で 7 個の異なるヒト血清から評価した。図 3 が示すように、E L I S A によるヒト血清からの s A P P の検出は、この方法で再現性があるように見えることを示す (X = 6 6) 。

【 0 0 5 1 】

血清中の s A P P に関してこの方法をよりよく評価するために、本発明者らは、三つの漸増する量の s A P P (5、7 . 5 および 1 0 ng/mL) を使用することにより、ヒト血清中の s A P P 検出の直線性を評価した。図 4 は、異なる 3 日に同じ血清に行った 3 回の別々の実験の平均を示す。

【 0 0 5 2 】

図 4 が示すように、調製および熱処理後の生物学的マトリックス (血清) において添加 / 追加 (spike) された s A P P の量と E L I S A により検出された s A P P の量との間に非常に良好な比例関係がある。これらの結果は、処理後の血清に添加された s A P P がその血清の遊離 s A P P と競合しないことを示す。これらの結果は、異なる 3 日に行われた 3 回の実験にわたり良好な再現性を示す。

【 0 0 5 3 】

これらの結果から、処理後の血清中のリコンビナント s A P P の回収率は、内因性 s A P P を有さず、かつ同量の s A P P が添加された生物学的マトリックスに対応する試料と比較して計算することができよう。

【 0 0 5 4 】

下記表に示すように、三つの漸増する量での血清中リコンビナント s A P P の回収率 (予想値に対する % で表現) は、1 0 0 % ± 2 5 % の許容される限界内にある。

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

血清中のリコンビナント sAPP α の回収率			
試料	予想される濃度 (ng/mL)		
	5	7.5	10
1/部分標本-1	106.0	95.2	100.7
1/部分標本-2	122.2	113.1	114.2
1/部分標本-3	118.9	103.5	101.1
1/部分標本-4	113.4	109.9	111.3
1/部分標本-5	119.2	104.1	101.2
回収率の平均	115.9	105.2	105.7
標準偏差	6.4	6.9	6.5
CV%	5.5	6.5	6.2

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

F D A は、文書US Food And Drug Administration Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2 0 0 1 年 5 月) における診断工程に適用される E L I S A アッセイについての作業基準を規定している。以下の文書は、イムノアッセイのための許容基準および実証基準を具体的に述べている。

- Findlay et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (2000) 1249-1273

- Viswanathan et al. Workshop/Conference Report - Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. The AAPS Journal 2007; 9 (1) Article 4 (<http://www.aapsj.org>)

【 0 0 5 7 】

下記データは、I B L が販売する s A P P キットにより実行される本発明のアッセイ法の性能が、F D A により勧告される基準を満たすことを示す。

【 0 0 5 8 】

【表 2】

	sAPP α	濃度 (ng/ml)		
		5	7.5	10
回収率	% 回収率	115.9	105.2	105.7
シリーズ間精度	CV%	5.5	6.5	6.2
	CV%	4.6	6.4	5.5
シリーズ内精度	CV%	5.3	5.3	1.9
直線性	r ²	0.99923		
	CV%	1.8	4.0	4.1
LOQ (ng/ml)	正確度 %	98.1	96.6	96.0
		1.0		
マトリックス効果	% 回収率	95.8		
	CV%	13.1		
特異性	正確度 %	90.0		
	%	95.1		
	CV%	6.2		

LOQ: 定量限界 ; CV% : 変動係数

【 0 0 5 9 】

実施例 2 : エタゾレートは s A P P の産生を刺激する

ヒト A P P を過剰発現している、安定的にトランスフェクションされた H E K 2 9 3 細胞を、アール塩を含有し、10%ウシ胎児血清 (F C S)、2 mM L - グルタミン (Sigma, Lyon, France)、1 x 可欠アミノ酸および抗生物質を補充した改変イーグル培地中で維持した。表示した様々な濃度の分子を 10 cm プレート上に広げてから 48 時間、または担体として D M S O を用いて 24 時間、細胞を処理した。s A P P は、市販の抗体による E L I S A よびウエスタンプロットにより測定されていた。

【 0 0 6 0 】

得られた結果を図 5 に示すが、この結果は、エタゾレートが s A P P の分泌を誘導することを示す。

【 0 0 6 1 】

実施例 3 : エタゾレートは皮質ニューロンによる s A P P の産生を刺激する

17 日齢の Wistar ラット胚から単離した皮質ニューロン中の s A P P の産生を測定した。細かく切り分けて 0.25% トリプシンを含有する溶液に入れた皮質構造から細胞を得る。解離した細胞は、6 μ g/mL のポリオルニチンでコーティングした培養皿中の添加物

を含有する神経基本培地（1 × B 2 7、2 mM L - グルタミン、0 . 6 % グルコース、抗生物質および抗真菌剤、ならびに2 % ウマ血清）に1 cm²あたり5 0 0 , 0 0 0 個の密度で蒔く。細胞は3 7 °C および5 % C O₂で維持する。蒔いてから2 4 時間後に、細胞を抗真菌剤として5 μM A r a C（5 - シトシンアラビノフラノシド）で処理する。インビトロで4 日後に、培地の半分を、ウマ血清を有さない培地に交換し、成熟させるためにこの培地中で7 ~ 1 0 日間、培養物を維持する。

【0 0 6 2】

s A P P は、培地を1 回交換し、新鮮培地中で2 4 時間蓄積させた後に、市販されている抗体を使ったウエスタンブロットにより測定した。定量は、スキャンしたオートラジオグラフィ画像のデンストメトリー解析により行った。図6 が示すように、エタゾレート（0 . 2 および2 μMで2 4 時間）は、皮質ニューロンからのs A P P の塩析を刺激する。示したデータは、2 回の繰り返しで行った独立した3 回の実験の平均 ± S E Mであり、対照（未処理培養物）に対するパーセントの形で表す。

10

【0 0 6 3】

実施例4：エタゾレートはs A P P のインビボ産生を刺激する

脳内のA P P プロセシングの生理学的モデルであるモルモットにおいてインビボでs A P P の産生を研究した。エタゾレートまたは賦形剤（生理食塩水）は、実験開始時に体重2 5 0 ~ 2 7 0 gの雄性Hartley白色種モルモットに用量1 0 mg/kgを1 日1 回1 5 日間連続で経口投与した。最終投与の1 時間後に、モルモットを屠殺し、直ちに脳を抜き取り、窒素中で凍結させ、- 8 0 °C で保存した。0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0、5 0 μg/mLゲンタマイシンおよびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するp H 7 . 5 の2 0 mM T r i s 塩基溶液に皮質を4 分でホモジナイズした。可溶性s A P P はE L I S A 試験により測定し、結果は、抽出物中に存在するタンパク質の量に関して基準化した。

20

【0 0 6 4】

図7 は、賦形剤で処置した対照動物と比較したときの、エタゾレートで処置した動物の脳から測定されたs A P P 量の増加を示す。エタゾレートにより誘導される3 倍の増加は、統計的に非常に有意である（*** : Wilcoxon検定によりp < 1 E - 4）。

【0 0 6 5】

得られた結果は、エタゾレートがs A P P の分泌を誘導することを示す。

【0 0 6 6】

実施例5：エタゾレートの神経保護作用はインビボでのs A P P の産生を必要とする

A 2 5 - 3 5 ペプチドは、アミロイドペプチドの神経毒性フラグメントを有し、化合物の神経保護作用を研究するために古典的に使用されるツールである。各実験の初めに、7 ~ 1 0 日経たニューロン培養物を新鮮培地と交換し、濃度3 3 . 5 μMのA 2 5 - 3 5 アミロイドペプチドを添加する6 時間前にエタゾレート阻害化合物で処理する。古典的および再現的に、この濃度は神経培養物に3 0 % ~ 4 0 %の毒性を発生する。

30

【0 0 6 7】

エタゾレートの神経保護作用を特徴付けるためにいくつかの実験を行う。神経保護がG A B A A レセプターを伴うかどうかを実証するために、エタゾレートの1 時間前に、それぞれ濃度5 0 μM、2 0 μMおよび1 0 μMのG A B A A レセプターアンタゴニストであるピクロトキシン（P T X）、ガバジン / S R 9 5 5 3 1、およびピククリン（B I C）を予備インキュベーションする。

40

【0 0 6 8】

最近、いくつかの研究は、s A P P が、特にインビトロおよびインビボでアミロイドペプチドに対して神経栄養機能および神経保護機能を有することを示したが、これは、エタゾレートがセクレターゼ経路を経由してその神経保護作用を仲介できることを示唆している。アミロイドペプチドに対してエタゾレートの神経保護作用を提供するのがs A P P の阻害であるか、それともその産生の阻害であるかを判定するために、抗s A P P 中和抗体（3 E 9 抗体）およびセクレターゼ阻害剤をそれぞれ使用する。s A P P の中和のために、皮質細胞にエタゾレートと同時に3 E 9 抗体（5 μg/ml）を添加する。

50

二つの β -セクレターゼ阻害剤、すなわち化合物であるフューリン阻害剤 I (Hwang EM, Kim SK, Sohn JH, Lee JY, Kim Y, Kim YS, Mook-Jung I. Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 20; 349(2):6 54-9.) および T A P I (Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. Biochem J. 2001 Aug 1; 357(Pt 3): 78 7-94) を、エタゾレート添加の 1 時間前に前処理に使用する。

【 0 0 6 9 】

全ての処理は、少なくとも 2 回、少なくとも二つの異なる培養物で実施される。4 8 時間インキュベーション後に、M T T 試験により毒性を測定する。未処理平均に対して基準化した結果を Wilcoxon 検定により統計解析する。0 . 0 5 以下の p で有意な値を決定する。

10

【 0 0 7 0 】

M T T :

毒性は、M T T 試験を使用することにより測定する。化合物と共にインキュベーション後に、最終濃度 0 . 5 mg/mL の M T T をウェル毎に添加する。次に、プレートを手間 3 7 で 3 0 分間インキュベートする。培地を抜き取り、結晶を 5 0 0 μ L の D M S O (ジメチルスルホキシド) に再懸濁する。5 5 0 nm での吸光度を読み取り、生存率を計算する。

【 0 0 7 1 】

結果 :

得られた結果を図 8 ~ 1 0 に示す。これらの結果は、アミロイドペプチド A $_{25-35}$ により誘導されたニューロンの死滅に本発明の化合物が及ぼす保護作用を例示する。

20

【 0 0 7 2 】

エタゾレートによりニューロンを同時処理する間に、用量依存的保護作用が観察されるが (図 8)、特に用量 0 . 2 μ M で 9 0 % の細胞生存率が得られる。この作用は、三つの G A B A_A 阻害剤の使用により遮断され、統計解析は、この作用が高度に有意であることを示している (0 . 2 μ M E H T 0 2 0 2 を 0 . 2 μ M E H T 0 2 0 2 およびアンタゴニストと比較した後の Wilcoxon 検定で $p < 1 e - 4$)。結果は、7 回の独立した実験の平均 \pm S E M に対応する。

30

【 0 0 7 3 】

図 9 および 1 0 は、s A P P の産生または活性の阻害剤の存在下で皮質ニューロンに及ぼすエタゾレートにより得られた結果を示す。表示した結果により、エタゾレートがこれらの細胞に保護作用を達成することが可能で、この保護作用が、二つの β -セクレターゼ阻害剤である化合物フューリン阻害剤 I および T A P I を用いた処理により阻害されることが示される (図 9)。これらのデータは、s A P P の産生を担う β -セクレターゼ活性が、エタゾレートにより誘導される神経保護に必要なであることを示す。

【 0 0 7 4 】

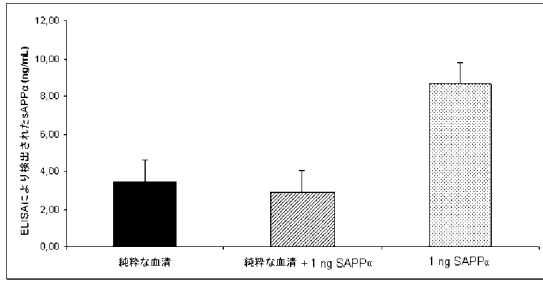
図 1 0 は、抗 s A P P 中和抗体を培地に添加した場合に、エタゾレートの神経保護作用が失われることから、エタゾレートにより誘導される神経保護が s A P P の産生を必要とすることを示す。

40

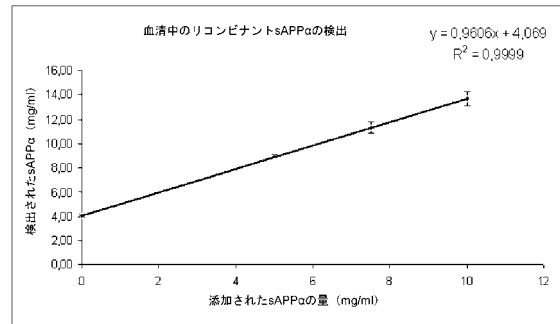
【 0 0 7 5 】

本発明は、G A B A_A レセプターを経由して作用するアミロイドペプチドにより誘導される毒性に及ぼすエタゾレートの神経保護作用を記録する。この神経保護作用は、 β -セクレターゼ経路の活性化および s A P P の産生に関連する。

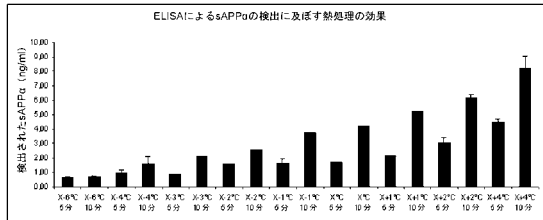
【 図 1 】



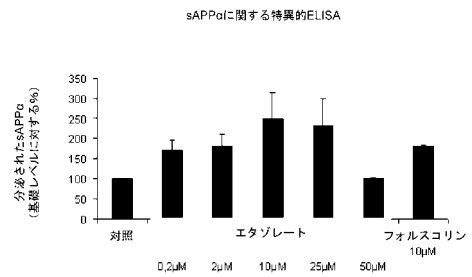
【 図 4 】



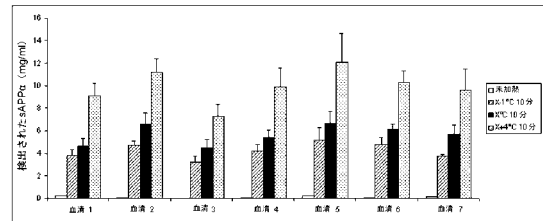
【 図 2 】



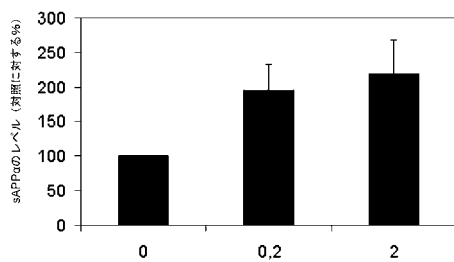
【 図 5 】



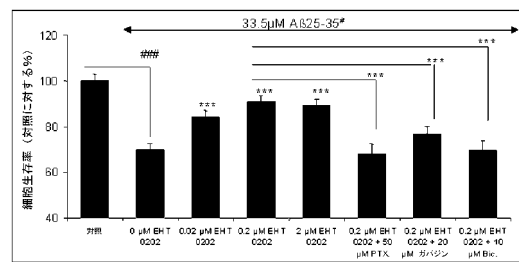
【 図 3 】



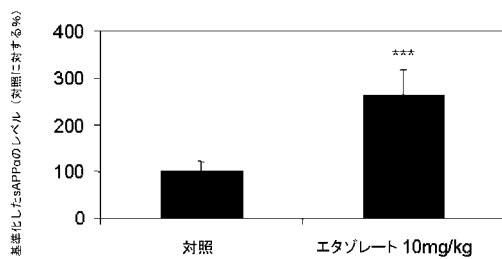
【 図 6 】



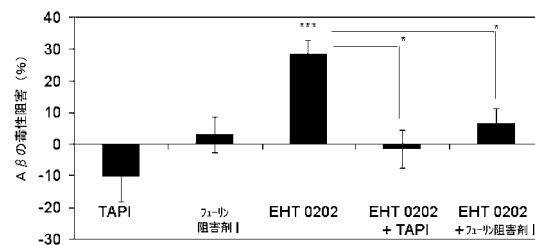
【 図 8 】



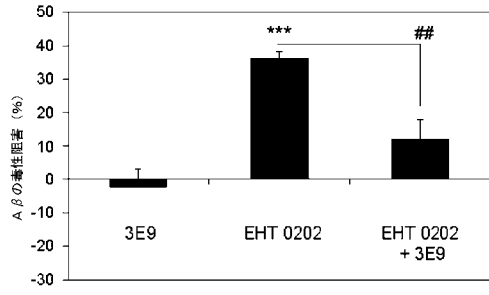
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/051706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT.		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANG ET AL: "Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease" JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO, AMSTERDAM, NL, vol. 240, no. 1-2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 53-58, XP005215581 ISSN: 0022-510X	1,2,4-8, 10-13
Y	the whole document en particulier: abstract page 54, right-hand column, paragraph 2 - page 55, left-hand column, paragraph 1 table 1 page 58, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3	3,9
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 décembre 2007		Date of mailing of the international search report 25/03/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gall, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/051706

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	BASKIN F ET AL: "Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD." NEUROLOGY 23 MAY 2000; vol. 54, no. 10, 23 May 2000 (2000-05-23), pages 1907-1909, XP002462506 ISSN: 0028-3878 the whole document en particulier: abstract page 1908, left-hand column, paragraph 2	1-7
Y	WO 89/03038 A (BOON MATHILDE ELISABETH [NL]; KOK LANBRECHT PIET [NL]) 6 April 1989 (1989-04-06) the whole document en particulier: abstract claims 1,3	3
Y	US 5 843 794 A (SINGER JACQUES [US]) 1 December 1998 (1998-12-01) the whole document en particulier: abstract claims 1-3	3
Y	WO 03/080609 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; WITHERINGTON JASON [GB]) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document en particulier: abstract	9
Y	WO 01/90084 A (MERCK SHARP & DOHME [GB]; CASTRO PINEIRO JOSE LUIS [GB]; CHURCHER IAN) 29 November 2001 (2001-11-29) the whole document en particulier: y abstract	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2007/051706

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See supplemental sheet

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

See supplemental sheet

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2007/051706

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-13

methods and processes involving the immunological dosage of sAPalpha

1.1 Claims: 1-7

immunological dosage method of sAPPalpha

1.2 Claims: 8-13

method for assessing or following the effectiveness of a neuroprotecting treatment involving the measurement of sAPPalpha production

2. Claims: 14-17

use of a compound chosen among pyrazolopyridines and GABA(A) receptor modulators to prepare a medicament for stimulating or inducing sAPPalpha productio.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2007/051706

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8903038	A	NL 8702338 A	17-04-1989
US 5843794	A	NONE	
WO 03080609	A	AU 2003215676 A1	08-10-2003
WO 0190084	A	AU 784150 B2	09-02-2006
		AU 6043701 A	03-12-2001
		CA 2409998 A1	29-11-2001
		EP 1294702 A1	26-03-2003
		JP 2003534333 T	18-11-2003
		US 2004082572 A1	29-04-2004

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/051706

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. GO1N33/68	GO1N33/53	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)		
GO1N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TANG ET AL: "Platelet amyloid precursor protein processing: A bio-marker for Alzheimer's disease" JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO, AMSTERDAM; NL, vol. 240, no. 1-2, 15 janvier 2006 (2006-01-15), pages 53-58, XP005215581 ISSN: 0022-510X	1,2,4-8, 10-13
Y	le document en entier en particulier: abrégé page 54, colonne de droite, alinéa 2 - page 55, colonne de gauche, alinéa 1 tableau 1 page 58, colonne de gauche, alinéa 2 - alinéa 3	3,9
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*&* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
17 décembre 2007	25/03/2008	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Gall, Anne-Laure	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/051706

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	BASKIN F ET AL: "Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD." NEUROLOGY 23 MAY 2000, vol. 54, no. 10, 23 mai 2000 (2000-05-23), pages 1907-1909, XP002462506 ISSN: 0028-3878 le document en entier en particulier: abrégé page 1908, colonne de gauche, alinéa 2	1-7
Y	WO 89/03038 A (BOON MATHILDE ELISABETH [NL]; KOK LANBRECHT PIET [NL]) 6 avril 1989 (1989-04-06) le document en entier en particulier: abrégé revendications 1,3	3
Y	US 5 843 794 A (SINGER JACQUES [US]) 1 décembre 1998 (1998-12-01) le document en entier en particulier: abrégé revendications 1-3	3
Y	WO 03/080609 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; WITHERINGTON JASON [GB]) 2 octobre 2003 (2003-10-02) le document en entier en particulier: abrégé	9
Y	WO 01/90084 A (MERCK SHARP & DOHME [GB]; CASTRO PINEIRO JOSE LUIS [GB]; CHURCHER IAN) 29 novembre 2001 (2001-11-29) le document en entier en particulier: y abrégé	9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2007/051706**Cadre n° II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2(a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas érigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n° III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}.
voir feuille supplémentaire

- Remarque quant à la réserve
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande internationale No. PCT/FR2007/051706

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICHS SUR PCT/SA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-13

Procédés et méthodes impliquant le dosage immunologique de la sAPalpha

1.1. revendications: 1-7

Procédé de dosage immunologique de la sAPPalpha

1.2. revendications: 8-13

Méthode pour évaluer ou suivre l'efficacité d'un traitement neuroprotecteur comprenant la mesure de la production de sAPPalpha

2. revendications: 14-17

Utilisation d'un composé choisi parmi les pyrazolopyridines et les agents modulateurs des récepteurs GABA(A) pour la préparation d'un médicament pour stimuler ou induire la production de sAPPalpha

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/051706

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8903038	A	06-04-1989	NL 8702338 A	17-04-1989
US 5843794	A	01-12-1998	AUCUN	
WO 03080609	A	02-10-2003	AU 2003215676 A1	08-10-2003
WO 0190084	A	29-11-2001	AU 784150 B2	09-02-2006
			AU 6043701 A	03-12-2001
			CA 2409998 A1	29-11-2001
			EP 1294702 A1	26-03-2003
			JP 2003534333 T	18-11-2003
			US 2004082572 A1	29-04-2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 シュバイヒホフアー, ファビアン

フランス国、エフ - 9 4 1 3 0 ノジャン・シュール・マルヌ、アヴニュー・ヴァル・ドゥ・ボージェ 3 6

(72)発明者 デジレ, ローラン

フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、ブルヴァール・ケラーマン 1 0 2

(72)発明者 ブルダン, ジェローム

フランス国、エフ - 3 8 1 0 0 グルノーブル、リュ・ドゥ・ラ・バジャティエール 1 8 エ

Fターム(参考) 2G045 AA29 BA11 BB20 BB60 CA24 CA25 CB01 DA36 FB03

4C084 AA17 NA14 ZA161 ZC411

4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA04 NA14 ZA16 ZC41