

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5968878号  
(P5968878)

(45) 発行日 平成28年8月10日(2016.8.10)

(24) 登録日 平成28年7月15日(2016.7.15)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 31/7032	(2006.01)	A 6 1 K 31/7032
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00

請求項の数 9 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2013-514533 (P2013-514533)
(86) (22) 出願日	平成23年6月16日 (2011.6.16)
(65) 公表番号	特表2013-528627 (P2013-528627A)
(43) 公表日	平成25年7月11日 (2013.7.11)
(86) 國際出願番号	PCT/CN2011/000998
(87) 國際公開番号	W02011/157059
(87) 國際公開日	平成23年12月22日 (2011.12.22)
審査請求日	平成26年6月6日 (2014.6.6)
(31) 優先権主張番号	61/355,169
(32) 優先日	平成22年6月16日 (2010.6.16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	510118145 杏輝天力 (杭州) 藥業有限公司 中華人民共和国浙江省杭州市余杭經濟開發 區紅豐路599號
(74) 代理人	110000671 八田國際特許業務法人
(72) 発明者	林漢欽 台灣台北市水源路49号3樓之2
(72) 発明者	蘇慕寰 台灣宜蘭縣冬山鄉中山村84号
(72) 発明者	黃永名 台灣宜蘭縣冬山鄉中山村84号
(72) 発明者	唐靜靜 台灣宜蘭縣冬山鄉中山村84号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イソアクトエンドまたはその製薬上許容される塩の使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

イソアクトエンドまたはその製薬上許容される塩を患者のアミロイドペプチドの生成、蓄積または凝集を阻害するために有効な量で含む、アミロイドペプチドに関連する疾患または状態の治療のための薬剤組成物であって、前記疾患または状態が、前記アミロイドペプチドの生成、蓄積または凝集に関連し、

ヒトに対する有効な投与量は、1日あたり、体重1kgあたり、イソアクトエンドまたはその製薬上許容される塩が0.2~4.0mgに相当し、

前記イソアクトエンドまたはその製薬上許容される塩が、単一の有効成分である、薬剤組成物。

10

## 【請求項 2】

前記疾患または状態が、前記アミロイドペプチドの細胞外の生成、蓄積または凝集に関連する、請求項1に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 3】

前記アミロイドペプチドが、A 1-40またはA 1-42である、請求項1または2に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 4】

前記疾患または状態が、アルツハイマー病、軽度認知障害、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(HCHWA)オランダ型、グアム-パーキンソン痴呆複合、脳アミロイド血管症、封入体筋炎、前頭側頭認知症、加齢性黄斑変性症、

20

またはピック病である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

**【請求項 5】**

アルツハイマー病の治療のためのものである、請求項 4 に記載の薬剤組成物。

**【請求項 6】**

前記イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩は、学習および記憶能力を維持する、改善する、または回復するように、アミロイド ペプチドによって引き起こされる神経損傷またはアポトーシスを阻害するためのものである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

**【請求項 7】**

イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩を含み、10

ヒトに対する有効な投与量は、1日あたり、体重 1 kg あたり、イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩が 0.2 ~ 4.0 mg に相当し、

前記イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩が、単一の有効成分である、アミロイド ペプチドの生成、蓄積または凝集の阻害剤。

**【請求項 8】**

前記イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩が、前記アミロイド ペプチドの細胞外の生成、蓄積または凝集の阻害のために用いられる、請求項 7 に記載のアミロイド ペプチドの生成、蓄積または凝集の阻害剤。

**【請求項 9】**

前記アミロイド ペプチドが、A 1 - 4 0 または A 1 - 4 2 である、請求項 7 または 20 8 に記載のアミロイド ペプチドの生成、蓄積または凝集の阻害剤。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、全体的に、アミロイド ペプチド (A) 関連疾患または状態の予防または治療における活性成分の使用、およびアミロイド ペプチドの生成、蓄積または凝集を阻害する方法に関する。30

**【背景技術】**

**【0002】**

アルツハイマー病は 39 - 43 アミノ酸のペプチドの蓄積に関連していると考えられており、このようなペプチドはアミロイド ペプチドと呼ばれており、これはアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の加水分解生成物である。A 中でも、A 1 - 4 0 は最も多い形態であり、さらに、A 1 - 4 2 は神経に対してより毒性が強く、高度に原線維発生し、アルツハイマー病に対して最も関連の深い A の形態であると考えられている。A 単量体はオリゴマー化を通して可溶性の A オリゴマーを形成し、細胞外で不溶性の線維または老人斑をさらに形成しうる。

**【0003】**

一般に A - 関連疾患または状態は、ダウント症候群、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血 (HCHWA) オランダ型、グアム - パーキンソン痴呆複合 (Clinical Neurology and Neurosurgery (1990) 92 : 305 - 310) ; 脳アミロイド血管症 (J. Neuropath. Exp. Neuro. (2002) 61 : 282 - 293) ; 封入体筋炎 (Neurology (2006) 66 : 65 - 68) ; 前頭側頭認知症 (NeuroReport (2002) 13 - 5 : 719 - 723) ; 加齢性黄斑変性症 (Experimental Eye Research (2004) 78 : 243 - 256) ; ピック病 (Neuroscience Letters (1994) 171 : 63 - 66) などを含むと考えられている。

**【0004】**

50

20

30

40

50

上述の A - 関連疾患または状態は一般に A の生成、蓄積または凝集に関連し、これは先天的因素（例えば遺伝的形質）または後天性因子（例えば加齢または環境の影響）によって引き起こされる、生物に存在する A または A 凝集体の異常な量をもたらす。

#### 【0005】

一般に、A の生成、蓄積または凝集の阻害は、アルツハイマー病あるいは他の A - 関連疾患または状態の有効な予防または治療のためのアプローチとして用いられうると考えられている。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

A およびその凝集体は生物の多様な疾患または状態をもたらす可能性が高いため、本発明の目的の一つは、A の生成、蓄積または凝集の阻害のための活性成分であり、食品、飲料、チューイング品、パッチ、スキンケア製品などにおける添加剤として用いられうる、活性成分を提供することである。本発明の他の目的は、A - 関連疾患または状態を予防または治療するための薬剤および方法を提供することである。

10

#### 【0007】

上記目的を達成するために、本発明は、イソアクテオシド (isoacteoside) またはその製薬上許容される塩の A の生成、蓄積または凝集の阻害における使用、および A - 関連疾患または状態の予防または治療のための薬剤の調製における使用を開示する。

#### 【0008】

20

好ましくは、前記イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩は、学習および記憶能力を維持する、改善する、または回復するように、アミロイド ペプチドによって引き起こされる神経損傷またはアポトーシスを阻害するために提供される。

#### 【0009】

好ましくは、前記薬剤のヒトに対する有効な投与量は、1日あたり、体重 1 kg あたり、イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩が、0.2 ~ 4.0 mg に相当する。

#### 【0010】

本発明の上述した、ならびに他の目的、特徴、および利点をよりよく理解するために、以下に本発明を添付の図面を参照して実施例を用いて詳細に説明する。

#### 【図面の簡単な説明】

30

#### 【0011】

【図 1】図 1 は、各ウェルの細胞外 A 1 - 40 の百分率の値を示す。図 1 の結果は、本発明の試験試料 D (イソアクテオシド) は細胞外の A 1 - 40 の蓄積の低減において有意な活性を有することを示す。

【図 2】図 2 は、各ウェルの細胞内 A 1 - 40 の百分率の値を示す。

【図 3】図 3 は、APP の発現に対する試験試料の効果を示す。

【図 4】図 4 は、A 1 - 40 の分解に対する試験試料の効果を示す。

【図 5】図 5 は、A 1 - 40 のオリゴマーヒ化に対する試験試料の効果を示す。

【図 6】図 6 は、A の生成、除去、および凝集の過程を表す。

【図 7】図 7 は、動物の研究の実験スケジュールを表す。

40

【図 8】図 8 は、ラットの探索行動パフォーマンスに対する試験試料の効果を示す。

【図 9】図 9 は、ラットの受動回避反応パフォーマンスに対する試験試料の効果を示す。

【図 10】図 10 は、ラットの水中迷路空間パフォーマンスに対する試験試料の効果を示す。

【図 11】図 11 は、ラットの水中迷路プローブ (探索) 試験パフォーマンスに対する試験試料の効果を示す。

【図 12】図 12 (A) ~ (E) は、ラットの免疫組織化学染色の結果を示す。

【図 13 A】図 13 A は、ラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンの含量の測定結果を示す。

【図 13 B】図 13 B は、ラットの脳の皮質および海馬におけるコリンの含量の測定結果

50

を示す。

【図14A】図14Aは、ラットの脳の皮質におけるアセチルコリンエステラーゼの活性を示す。

【図14B】図14Bは、ラットの脳の海馬におけるアセチルコリンエステラーゼの活性を示す。

**【発明を実施するための形態】**

**【0012】**

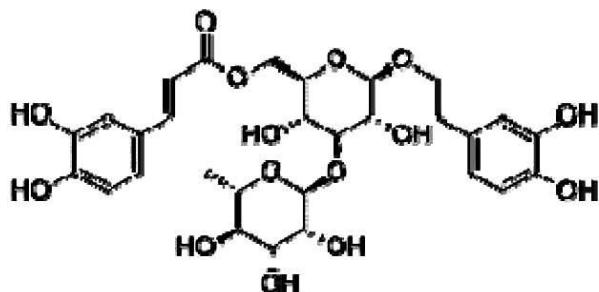
Aによってもたらされる多様な疾患は共通の特徴：A凝集体の生成を有する。これらのA凝集体は、原線維またはplaquesの形状で存在し、生物の系、器官、組織または体液に沈降し、様々な疾患または状態をもたらす。したがって、Aの生成、蓄積または凝集の阻害は、A-関連疾患または状態を効果的に予防または治療するためのアプローチとして用いられると考えられる。10

**【0013】**

上述の観点から、本発明は、下記の構造を有するイソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩の、Aの生成、蓄積、または凝集、特にAの細胞外の生成、蓄積、または凝集を阻害する（例えば、低減するまたは予防する）ための活性成分としての使用を開示する。

**【0014】**

**【化1】**



20

**【0015】**

米国特許第7,087,252号には、エチナコシド(echinacoside)25~50重量%およびアクテオシド(acteoside)5~15重量%を含む、Cistanches tubulosa(Schenk)Wightの肉厚の茎から調製され、老年性認知症に対して提供される、薬剤調製が開示されている。イソアクテオシドおよび多様な他のフェニルエタノイドグリコシドは薬剤調製に含まれることが知られている。30

**【0016】**

本発明においては、イソアクテオシドの水和物もしくは他の溶媒和物、プロドラッグまたは代謝産物は、イソアクテオシドの機能的等価物とみなす。本明細書中に記載されるプロドラッグは、加水分解、酸化または他の反応によって、生物学的環境（インビボまたはインビトロ）下でイソアクテオシドを生成しうる前駆体化合物を意味する。本明細書中に記載されるイソアクテオシドの代謝産物は、細胞または生物におけるイソアクテオシドの代謝によって生成されうる化合物を意味する。40

**【0017】**

イソアクテオシドの製薬上許容される塩が個人に投与されると、前記製薬上許容される塩は一般にイソアクテオシドと等価または同様の治療効果を与え、アレルギーなどの有害な副作用をもたらすことなく、生理学的に許容される。イソアクテオシドの製薬上許容される塩としては、特に制限されないが、鉄、カルシウム、およびマグネシウムの塩などが挙げられる。

**【0018】**

本明細書中で用いられる「予防」の用語は、生物において疾患または状態の発生を避けるまたは遅らせるることを意味する。本明細書中で用いられる「治療」の用語は、疾患または状態の進行を遅らせるもしくは止める、または、個人をその改善されたもしくは正常の

40

50

状態に戻すことを意味する。

**【0019】**

「アミロイド ペプチド( A ) - 関連疾患または状態」の用語は、一般に、 A の生成、蓄積または凝集に関連して起こる疾患または状態を意味し、特に A によって引き起こされる疾患または状態を意味する。異常な生成、蓄積または凝集が一定の疾患または状態を有する個人の一定の比率に見られた場合、前記疾患または状態は、 A に関連していると考えられる。加えて、 A が一定の疾患または状態において影響を受ける病的特徴の発生に近いどこかで凝集したとき、前記疾患または状態もまた A に関連していると考えられる。

**【0020】**

本発明によって提供される A 阻害の活性成分は、 A の生成、蓄積または凝集を阻害するための使用を容易にするために、食品、飲料などにおける添加剤として用いられる。

**【0021】**

本発明によって提供される、イソアクテオシドまたはその製薬上許容される塩を活性成分として含む、 A - 関連疾患または状態を治療するための薬剤または薬剤組成物は、適当な担体、希釈剤または賦形剤などを含んでもよく、粉末、顆粒、錠剤、トローチ、丸薬、カプセル、水溶液もしくは油性溶液、懸濁液、クリーム、軟膏、ゲル、エアロゾル、坐薬、パッチ、または任意の他の所望の形態で存在しうる。上記の薬剤または薬剤組成物は、経口、局所、非経口、皮膚、鼻腔内、眼、眼内または他の経路で投与されうる。

**【0022】**

本明細書中、「または」の用語は、他に規定のないかぎり、一般に「および/または」として定義される。

**【0023】**

人口の加齢に伴って、加齢に関連する痴呆は老人性疾患に関連する現在の医学研究者における主要な関心事のひとつになっている。アルツハイマー病は痴呆の最も多い型である。アルツハイマー病は、患者が段階的にその認知能力を失い、異常な行動を示し、その後言語能力および運動能力を失う可能性があることを特徴とする慢性進行性神経変性疾患であり、したがってアルツハイマー病は患者およびその家族の生活の質に大きな影響を容易に与える。アルツハイマー病に罹患している患者の数がだんだんと増加して、患者の家族および社会に重い負担を与えていた傾向を考慮して、本発明では実験を実施する際に、アルツハイマー病により関連の大きいアミロイド ペプチド( A )を選択した。

**【実施例】**

**【0024】**

以下の実施例では、 A の実験を実施するために表1に列挙した試験試料を用い、これをなんらの試験試料も添加しないビヒクル対照群と比較した。

**【0025】**

**【表1】**

表1:試験試料

記号	試験試料	純度(%)	入手元
A	フェニルエタノイドグリコシドを含む調製	—	Tianlife® (US 7087252B2に開示された 抽出物を参照)
B	エチナコシド	99	杏輝研究室
C	アクテオシド	97	杏輝研究室
D	イソアクテオシド	97	杏輝研究室

10

20

30

40

50

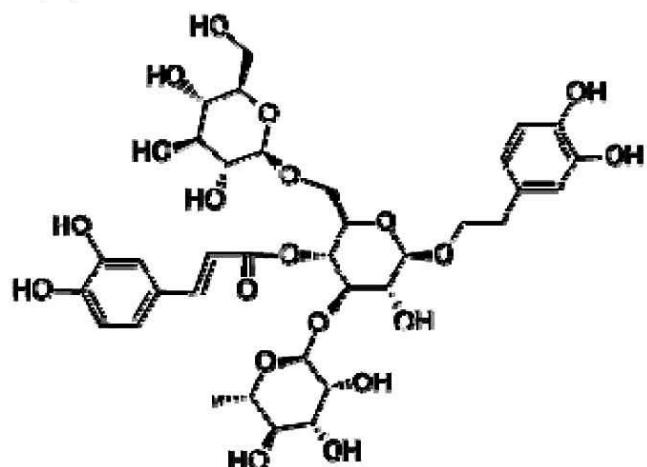
## 【0026】

エチナコシド (Echinacoside)、アクテオシド (Acteoside) およびイソアクテオシド (Isoacteoside) の化学構造を以下に示す。

## 【0027】

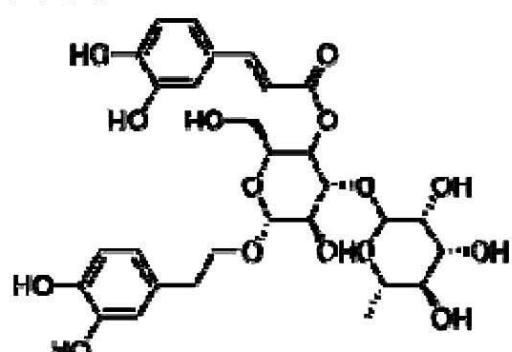
## 【化2】

エチナコシド:



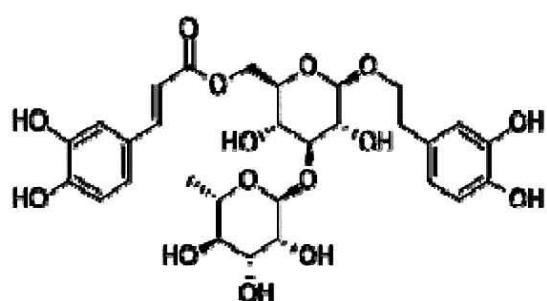
10

アクテオシド:



20

イソアクテオシド:



30

40

## 【0028】

## 実施例1：神経芽腫細胞培養

野生型ヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) をイーグル最小必須培地 (EMEM) / Ham's F12 培地 (1:1 混合物) (FBS 10%、ペニシリン 10 ユニット / ml、ストレプトマイシン 10 µg / ml を含む) 中で培養した。野生型マウス神経芽腫 Neuro-2a 細胞を最小必須培地 (MEM) (FBS 10%、ペニシリン 10 ユニット / ml、ストレプトマイシン 10 µg / ml を含む) 中で培養した。

## 【0029】

## 実施例2：細胞外の A1-40 の蓄積に対する各試験試料の効果

50

実施例1の野生型ヒト神経芽腫SH-SY5Y細胞の培地を、既知組成培地(EMEM/F12培地(カタログ番号12500-062)、Hepes 5mM、グルコース0.6%、NaHCO<sub>3</sub> 3mM、グルタミン2.5mM、インシュリン25μg/ml、トランスフェリン100μg/ml、プロゲステロン20nM、コレシン60μM、亜セレン酸ナトリウム30nM、ヘパリン2μg/ml)に切り替えた。各ウェルは1×10<sup>5</sup> SH-SY5Y細胞を培地300μl中に有した。30分後、各ウェルを表1に与えられる試験試料A～Dのそれぞれで、50μg/mlの濃度で24時間処理した。その後、各ウェルの培地中のA 1-40のレベル(含量)を、ヒトA 1-40イムノアッセイキット(カタログ番号KHB3482 インビトロジエン)によって分析した。

## 【0030】

10

ヒト神経芽腫SH-SY5Y細胞は、A 1の細胞外蓄積を引き起す。図1は、どの試験試料でも処理していないビヒクル対照群における百分率の値に対する、各SH-SY5Yウェルの培地中のA 1-40の百分率の値を示す。結果を平均±標準偏差(SD)の形態で示した。ビヒクル対照群と試験試料で処理した群との間の有意な差を、\* : P < 0.05、\*\* : P < 0.01および\*\*\* : P < 0.001で表した。

## 【0031】

図1を参照すると、ビヒクル対照群と比較して、試験試料A(フェニルエタノイドグリコシドを含む調製)およびC(アクテオシド)はA 1-40のレベルを約20%低減させ、D(イソアクテオシド)は、A 1-40のレベルを約47.44±16.62%低減させた。図1の結果から、試験試料D(イソアクテオシド)は、細胞外のA 1-40の蓄積の低減において有意な活性を有することが示唆された。

20

## 【0032】

## 実施例3：細胞内のA 1-40の蓄積に対する各試験試料の効果

各ウェルは1×10<sup>5</sup>のSH-SY5Y細胞を培地300μl中に有した。各ウェルのSH-SY5Y細胞を試験試料A～Dで50μg/mlの濃度でそれぞれ処理した後、各ウェルの細胞から細胞ホモジネートをそれぞれ調製し、各ウェルの培地中のA 1-40の量を、ヒトA 1-40イムノアッセイキット(カタログ番号KHB3482 インビトロジエン)を用いて決定した。

## 【0033】

30

図2は、どの試験試料でも処理していないビヒクル対照群に対する、SH-SY5Yウェルの細胞内A 1-40の百分率の値を示す。図2を参照すると、試験試料A～Dは有意なA 1の細胞内蓄積をもたらさないことが示された。

## 【0034】

## 実施例4：APPの発現に対する各試験試料の効果

各ウェルは1×10<sup>5</sup> SH-SY5Y細胞を培地300μl中に有した。各ウェルのSH-SY5Y細胞を試験試料A～Dで50μg/mlの濃度で24時間それぞれ処理した後、細胞を均質化用バッファ(50mM Hepes pH7.5、1mM EDTA、150mM NaCl、1% NP-40、1mM PMSF、5μg/ml アプロチニン、10μg/ml ロイペプチン)中で均質化した。細胞残屑を遠心分離によって除去した。タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、次いでPVDF膜に移し、その後、イムノプロット(抗A 1-17、6E10または抗-APP C-末端抗体)によってホロAPPの量を評価した。

40

## 【0035】

図3は、細胞内のAPPの発現に対する試験試料A～Dの効果を、どの試験試料でも処理していないビヒクル対照群に対する百分率で表す。図3に示されるように、試験試料A～Dは、APPの発現をダウンレギュレートしないことがわかった。

## 【0036】

## 実施例5：細胞外のA 1-40の分解に対する各試験試料の効果

マウス神経芽腫Neuro-2a細胞は、既知組成培地中にA 1-分解酵素を放出するが、培地中に検出可能な量のA 1を産生しない。Neuro-2a細胞を培地中で24時間

50

インキュベートし、次いで、細胞を除いて培地を引き出した。培地を個々に、 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の試験試料 A ~ D および  $10\text{ ng}$  の合成 A ~ 1 - 4 0 で 24 時間処理し、次に、培地中の酵素の促進に対する各試験試料の効果を調べた。各ウェルに残った A ~ 1 - 4 0 の量をヒト A ~ 1 - 4 0 イムノアッセイキット（カタログ番号 K H B 3 4 8 2、インビトロジェン）で分析し、ビヒクル対照群と比較して百分率で示した。図 4 を参照すると、試験試料 D (イソアクテオシド) は A の分解を加速しない。

#### 【0037】

##### 実施例 6 : A ~ 1 - 4 2 のオリゴマー化に対する各試験試料の効果

乾燥したヒト A ~ 1 - 4 2 を冷蔵庫から取出し、室温に平衡にした。A ~ 1 - 4 2 を、 $1, 1, 1, 3, 3, 3$  - ヘキサ - フルオロ - 2 - プロパンノール (H F I P) に  $1\text{ mM}$  の濃度で溶解させ、次いで室温で 1 時間静置した。A ~ 1 - 4 2 / H F I P 溶液をハミルトンシリングで分注し、次いで窒素ガス気流下で乾燥させ、その後 - 20 度で保存した。H F I P で処理した A ~ 1 - 4 2 を P B S に溶解させ、各試験試料の処理を、 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で、4 度で 24 時間行い、振動 - インキュベートして A ~ 1 - 4 2 オリゴマーを調製した。A ~ 1 - 4 2 のオリゴマー化のレベルをチオフラビン T 蛍光 ( $\text{Ex} = 450\text{ nm}$ 、 $\text{Em} = 482\text{ nm}$ ) によって分析した。

#### 【0038】

図 5 は、A ~ 1 - 4 0 のオリゴマー化に対する試験試料 A ~ D の効果を百分率で示す。図 5 を参照すると、試験試料 A (フェニルエタノイドグリコシドを含む調製)、B (エチナコシド)、C (アクテオシド) および D (イソアクテオシド) は、A ~ 1 - 4 2 のオリゴマー化の阻害に対して活性を有することが明らかになり、ここで、イソアクテオシド (D) は、A ~ 1 - 4 2 のオリゴマー化を有意に、 $98.93 \pm 1.70\%$  阻害することができた。すなわち、イソアクテオシド (D) は、A ~ 1 - 4 2 のオリゴマー化を有意に阻害し、さらに A が原線維または老人斑を形成することを阻害する。

#### 【0039】

図 6 は、A の生成、除去、および凝集の過程を表す (Pharmacology & Therapeutics (2005) 108: 131)。培地中の細胞外の A の蓄積 (1) は、細胞内の A の蓄積 (2)、APP の発現 (3)、A の分解 (4)、A のオリゴマー化 (5) および A の生成 (6) によって影響されることが示される。実施例 2 ~ 6 の細胞の研究の結果によれば、試験試料 A ~ C と比較して、イソアクテオシド (D) は培地中の細胞外の A の蓄積 (1) の低減に有効であり、A のオリゴマー化 (5) を有意に阻害することができ、これはあらかじめ A の凝集を阻害していると考えられる。その上、細胞外の A の蓄積 (1) の低減に対するイソアクテオシド (D) の効果は、イソアクテオシドの細胞内の A の蓄積 (2) の促進、細胞の APP の発現 (3) の低減、または細胞外の A の分解 (4) の促進によるものではない。したがって、イソアクテオシド (D) の効果は A の生成の低減に直接作用することが示唆される。

#### 【0040】

まとめると、イソアクテオシド (D) またはその製薬上許容される塩は、A の生成、蓄積または凝集を阻害するための活性成分として用いられる。したがって、イソアクテオシド (D) が A によって引き起こされる神経損傷またはアポトーシスを有効に阻害するため、さらに、学習または記憶能力を維持する、改善する、または回復するために提供されうることが期待される。加えて、上述したこれらの結果によれば、イソアクテオシド (D) またはその製薬上許容される塩は、A の生成、蓄積または凝集を阻害するためばかりではなく、A - 関連疾患または状態を予防または治療するためにも提供されうる。

#### 【0041】

上記の A - 関連疾患または状態としては、特に制限されないが、アルツハイマー病、軽度認知障害、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血 (H C H W A) オランダ型、グアム - パーキンソン痴呆複合、脳アミロイド血管症、封入体筋炎、前頭側頭認知症、加齢性黄斑変性症、ピック病などが挙げられる。加えて、上記の A

を主に A 1 - 4 0 を用いて、または高度に原線維発生する A 1 - 4 2 を用いて例示したが、A は他のペプチドフラグメントもまた含みうる。

#### 【 0 0 4 2 】

上記試験試料の中でも、イソアクテオシド (D) は、A の生成、蓄積または凝集の低減に対して優れた効果を有する。以下の実施例 7 ~ 11においては、体重 250 ~ 300 g の雄の Sprague - Dawley (SD) ラットを Bi o L A S C O Taiwan Co. Ltd. から入手した。SD ラットは、A 1 - 4 2 を脳室内に注入して神経損傷を生じさせ、その記憶および学習能力に影響を与え、ラットの脳に老人斑様凝集体を形成させ、アルツハイマー病の動物モデルとして用いた。A によって誘導されるアルツハイマー病の動物モデルとしては、例えば、Nabeshima et al. (Neuroscience Letters (1994) 170 : 63 - 66) (British Journal of Pharmacology (1999) 126 : 235 - 244) を参照することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

ラットに、その左脳室に注入カニューレを注入するために麻酔をかけた。切開を縫合した後、ラットをケージに戻した。図 7 は、動物の研究の実験スケジュールを示す。A 1 - 4 2 の注入開始後、探索行動 (exploration behavior) 試験を第 7 日に行い、受動回避学習 (passive avoidance learning) 試験を第 8、9 日に行い、水中迷路 (water maze) 試験を第 10 ~ 13 日に行い、探索試験 (probe test) を第 14 日に行った。実験群を表 2 に示した。擬似群 (sham) は TFA 溶液 (64.9% 滅菌 ddH<sub>2</sub>O、35% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸) で処理し、他の実験群は、1 時間あたり、TFA 溶液に溶解させた A 1 - 4 2 を 0.5 μl で処理し、これは A 1 - 4 2 (Tocris 1428; MW: 4514.08) を 1 日あたり 300 pmol / 12 μl に相当する。実験期間を通して、試験 (すなわち、探索行動試験、受動回避学習試験、および水中迷路試験) の 1 時間前に試験試料をラットに経口で投与した。表 2 に、各実験群の条件を示す。表 2 中、D は表 1 に示されるイソアクテオシドであり、アリセプト (Aricept) は、アルツハイマー病などの痴呆の治療のための市販薬である。すべての試験試料は、二次蒸留水を用いて毎日新しく調製され、胃管によって経口投与された。

#### 【 0 0 4 4 】

実施例 7 ~ 11 では、結果を平均 ± 標準偏差 (SD) の形態で示した。A 1 - 4 2 対照群と他の実験群との間の有意な差を、\* : P < 0.05、\*\* : P < 0.01 および \*\*\* : P < 0.001 で表した。

#### 【 0 0 4 5 】

すべてのラットを殺してその脳を除去し、薄片に切断して染色した。神経伝達物質もまた試験した。

#### 【 0 0 4 6 】

## 【表2】

表2:動物実験設計

群	誘導因子 (脳室内注入)	試験試料 (胃管によって経口投与)	ラット数	
擬似群	TFA 溶液	二次蒸留水 D 2.5 mg/kg D 5 mg/kg アリセプト 0.75 mg/kg	12	
A $\beta$ 1-42 対照群	A $\beta$ 1-42		12	
D 低剂量群			12	
D 高剂量群			12	
正対照群(アリセプト)			12	

## 【0047】

## 実施例7：探索行動試験および装置

探索行動試験装置は、箱(40 cm × 40 cm × 40 cm)と、直径3 cmの穴を、端から7 cmの距離に4 cmの間隔で16個有するステンレスの底板と、から構成される。各ラットのエントリーカウントを10分間記録した。

## 【0048】

図8は、表2によるラットによって行われた探索行動(exploration behavior)試験の結果を示す。図8を参照するとA $\beta$  1-42の脳室内注入は、ラットの探索活動を低減させ、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトはラットの探索活動の改善に有効であり、試験試料D(イソアクテオシド)5 mg/kgは、アリセプト0.75 mg/kgよりも高い効果を示す。

## 【0049】

## 実施例8：受動回避反応試験

受動回避装置は、明区画、暗区画およびこれらの2つの区画の間のギロチンドアから構成される。

## 【0050】

各ラットを明区画に入れ、ギロチンドアを開けた。90秒以内に暗区画に入ったラットを選択してこの実験で試験した。

## 【0051】

トレーニング試験では、選択されたそれぞれのラットを個々に明区画に入れ、ギロチンドアを開けた。暗区画に入ると、ギロチンドアが閉まり、暗区画のラットに床を通して電気ショックが5秒間与えられる。その後、ラットを暗区画から出し、そのホームケージに戻した。

## 【0052】

前記トレーニング試験の24時間後、ラットを個々に明区画に入れ、ギロチンドアを開け、各ラットのステップスルー待ち時間(step-through latency、STL)を記録した。

## 【0053】

図9は、表2によるラットの受動回避反応の結果を示す。図9を参照すると、A $\beta$  1-42の脳室内注入はラットの受動回避学習反応の有意な障害を引き起こし、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトは、A $\beta$  1-42の脳室内注入によって引き起こされたラットの受動回避学習の障害を回復させる。図9に示すように、試験試料D(イソアクテオシド)2.5 mg/kgは、アリセプト0.75 mg/kgと同等の効果を示し、試験試料D(イソアクテオシド)5 mg/kgは、アリセプト0.75 mg/kgよりも高い効果を示す。

## 【0054】

10

20

30

40

50

### 実施例 9：水中迷路試験

この実施例では、水中迷路プールを4つの四半分に分割し、隠されたプラットフォームを第4の四半分に設置し、水面下1.0cmに沈めた。各ラットは4時間の間隔で1日当たり2回の試験を受け、各試験は隠されたプラットフォームを見つけるために2分間行った。1回目の試験は空間パフォーマンス(spatial performance)試験のために行った。各ラットを、隠されたプラットフォームを見つけるために最大120秒間泳がせた。成功すると、ラットにプラットフォーム上で30秒間の休息時間を与えた。決められた時間内に成功しなかった場合は、ラットのスコアを120秒とし、その後ラットをプラットフォーム上に乗せ、30秒間の休息時間を与えた。空間パフォーマンス試験は4日間連続して行った。5日目に、隠されたプラットフォームを水中迷路プールから取り去り、各ラットを第1の四半分に入れ、60秒間泳がせた。各ラットが隠されたプラットフォームが位置していた四半分で過ごした時間を、プローブテスト(probe test)の間に記録した。

#### 【0055】

図10は、表2の動物によって行われた空間パフォーマンス試験の結果を示し、図11は、表2の動物によって行われたプローブ試験の結果を示す。図10および図11を参照すると、A-1-42によってもたらされる水中迷路パフォーマンスおよびプローブ試験の欠損は、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトによって改善され、試験試料D(イソアクテオシド)5mg/kgは、アリセプト0.75mg/kgよりも高い効果を示すことが示された。

#### 【0056】

### 実施例10：ラットの脳の免疫組織化学染色

水中迷路パフォーマンス試験の後、すべてのラットの頭部を切断しその脳を速やかに頭蓋骨から除去し、次いで、その脳の海馬部分のA-1-42に対して免疫組織化学染色を行った。図12A-Eは、免疫組織化学染色の結果を示す。図12Bにおいては、A-1-42を持続注入したラットの脳に多数のブラークが見られた。図12Cおよび図12Dにおいては、試験試料D(イソアクテオシド)2.5mg/kgで治療したラットの脳にはわずかなブラークしか見られず、試験試料D(イソアクテオシド)5mg/kgで治療したラットの脳にはブラークがほとんど見られなかった。図12Cを図12Eと比較すると、試験試料D(イソアクテオシド)で治療したラットの脳におけるブラークは、アリセプトで治療したラットの脳のものよりも少ないことが明らかである。この結果によれば、試験試料D(イソアクテオシド)はA-1の生成の阻害またはブラークの凝集の除去に有効である。

#### 【0057】

### 実施例11：ラットの皮質および海馬における神経伝達物質の含量

水中迷路パフォーマンス試験の後、すべてのラットの頭部を切断しその脳を速やかに頭蓋骨から除去した。神経伝達物質の濃度および酵素のレベル(含量)を分析するために、GlowinskiおよびIversenの方法にしたがって脳の皮質および海馬を分離し、次いで皮質および海馬をそれぞれ計量し、50mMのNa-リン酸バッファー(pH 7.8)を添加して均質化した。

#### 【0058】

表3および表4は、それぞれ、表2によるラットの脳の皮質および海馬における神経伝達物質であるドーパミン(DA)およびその代謝産物(DOPACおよびHVA)の濃度を示す。表3および表4を参照すると、A-1-42はラットの皮質および海馬におけるDAのレベルを低減させ、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトはA-1-42によって引き起こされるラットの皮質および海馬におけるDAのレベルの低減を回復させる。

#### 【0059】

## 【表3】

表3:表2に示す実験によるラットの脳の皮質におけるDAの含量ならびにその代謝産物であるDOPACおよびHVAの含量の測定結果

	DOPAC	HVA	DA	
擬似群	16.75±1.70*	3.71±0.58	3.92±0.44**	
ビヒクル	11.66±1.13	2.76±0.43	2.33±0.28	
D 2.5 mg/kg	12.53±3.33	2.92±0.58	2.67±0.43	10
D 5 mg/kg	13.80±3.03	2.74±0.69	3.84±0.47*	
アリセプト	10.49±2.38	2.42±0.78	3.10±0.46	

## 【0060】

## 【表4】

表4:表2に示す実験によるラットの脳の海馬におけるDAの含量ならびにその代謝産物であるDOPACおよびHVAの含量の測定結果

	DOPAC	HVA	DA	
擬似群	5.87±0.92	3.68±0.41	5.36±0.75***	20
ビヒクル	5.13±0.80	3.39±0.36	1.00±0.21	
D 2.5 mg/kg	4.98±1.15	3.68±0.46	5.41±1.30***	
D 5 mg/kg	4.13±0.45	3.29±0.25	4.07±0.59***	
アリセプト	3.19±1.00	2.45±0.33	1.33±0.37	

## 【0061】

図13Aは、表2によるラットの脳の皮質および海馬における神経伝達物質であるアセチルコリンの含量の測定結果を示し、図13は表2によるラットの脳の皮質および海馬におけるコリンの含量の測定結果を示す。図13Aおよび図13Bを参照すると、A 1 - 4 2はラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンレベルを低減させ、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトはA 1 - 4 2によって引き起こされるラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンのレベルの低減を回復させ、ここで試験試料D(イソアクテオシド)5mg/kgは特に効力が高い。

## 【0062】

図14Aおよび図14Bは、表2によるラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンエステラーゼの活性をそれぞれ示す。図14Aおよび図14Bを参照すると、A 1 - 4 2はラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンエステラーゼの活性を増加させ、試験試料D(イソアクテオシド)およびアリセプトはA 1 - 4 2によって引き起こされるラットの脳の皮質および海馬におけるアセチルコリンエステラーゼの活性の増加を改善する。

## 【0063】

A 凝集体は細胞の損傷を引き起こすため、さらに多様な疾患または状態をもたらす。実施例2～6の細胞の研究の結果から、イソアクテオシド(D)は、A の生成、蓄積または凝集の阻害、さらにA の凝集体の形成の防止に有効であり、したがってイソアクテオシドはアルツハイマー病あるいは他のA - 関連疾患または状態の予防または治療に用いられる。

## 【0064】

実施例7～9の動物の研究の結果から、イソアクテオシドはA によってもたらされる

10

20

30

40

50

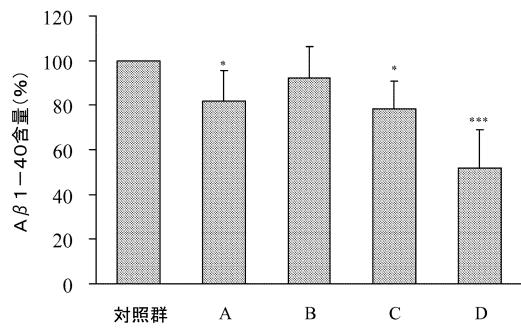
記憶または学習の欠損の改善に有意な効果を有することが示される。実施例 10によれば、イソアクテオシドは、A の凝集によるプラークの形成の阻害、またはプラークの除去に有効である。その上、実施例 11によれば、イソアクテオシドは、A 1 - 4 2 によってもたらされる神経伝達物質のレベルの低減を回復、したがって記憶または学習能力の欠損の改善に有効である。上記の細胞および動物の研究の結果から、イソアクテオシドまたはその等価な製薬上許容される塩は、毎日、患者に約 0 . 2 m g / k g ~ 4 m g / k g の治療上有効な量で投与することができ（すなわち、体重 6 0 k g の成人の推奨される投与量は約 1 2 m g ~ 2 4 0 m g である）、アルツハイマー病または他の A - 関連疾患または状態の予防または治療のためのアプローチとして用いられることが示される。

## 【 0 0 6 5 】

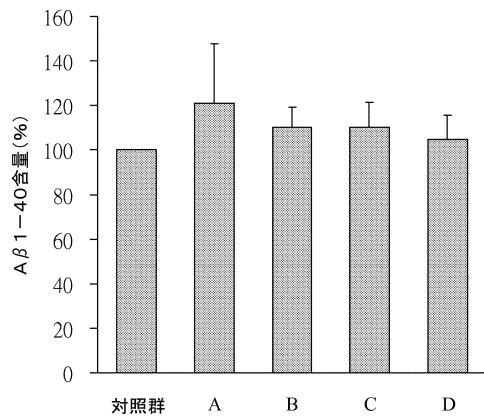
10

本発明をいくつかの好ましい実施形態を用いて説明したが、これらは本発明を制限するものではない。当業者による本発明の精神を逸脱しない多様な等価な置換および変更も依然として添付の特許請求の範囲に包含される。

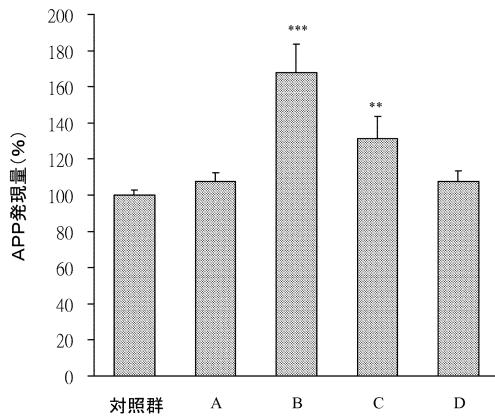
【 図 1 】



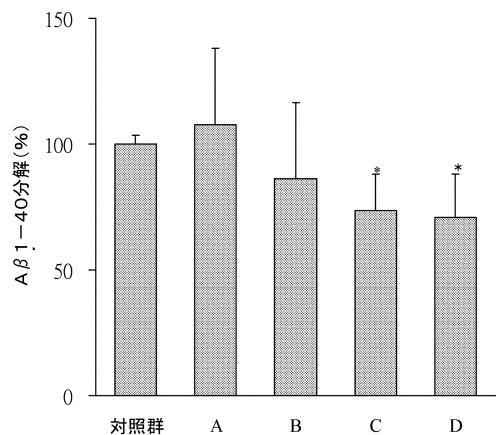
【 図 2 】



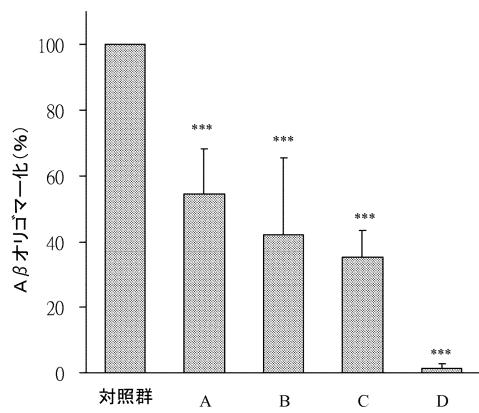
【図3】



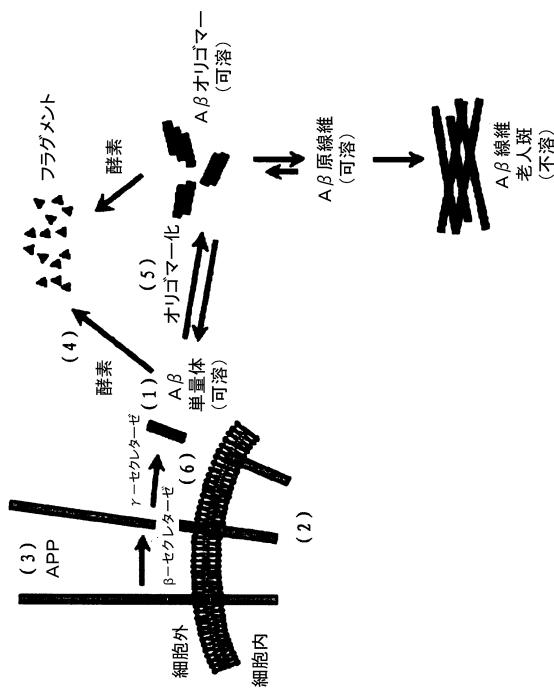
【図4】



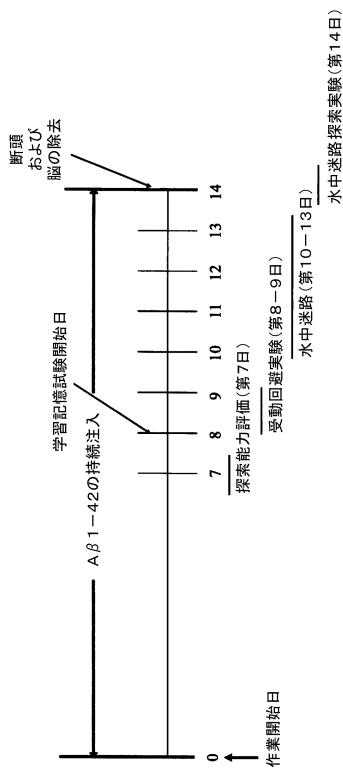
【図5】



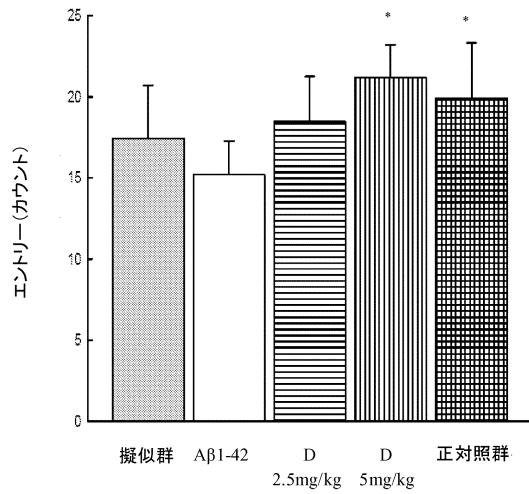
【図6】



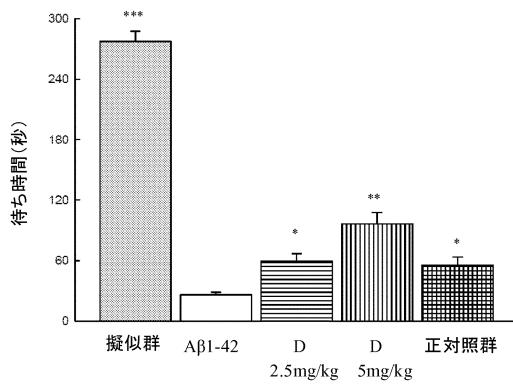
【図7】



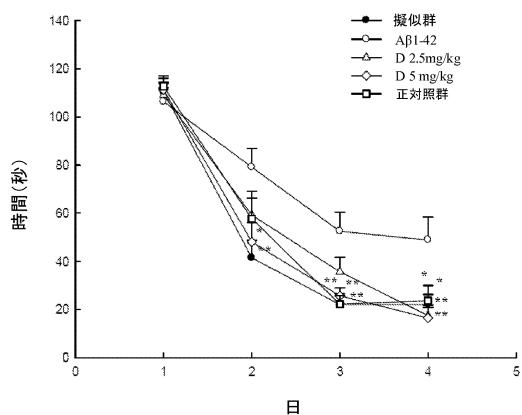
【図8】



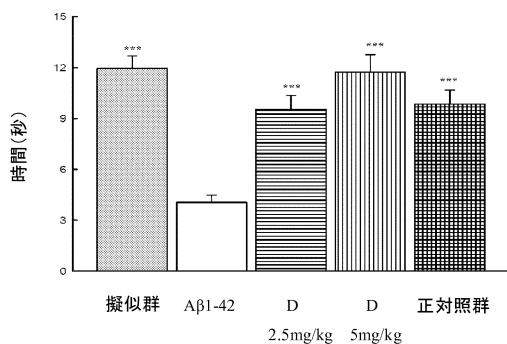
【図9】



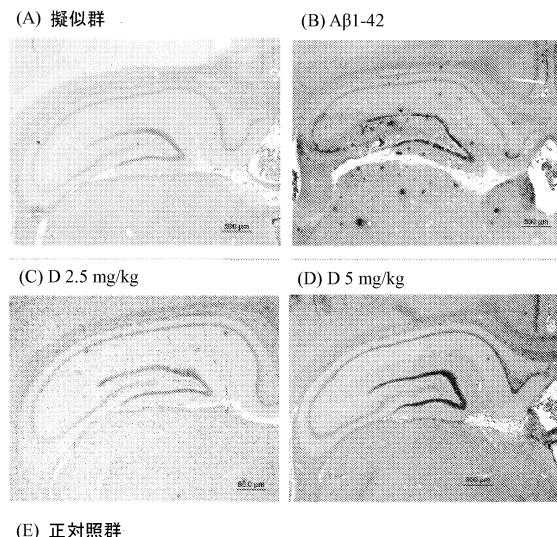
【図10】



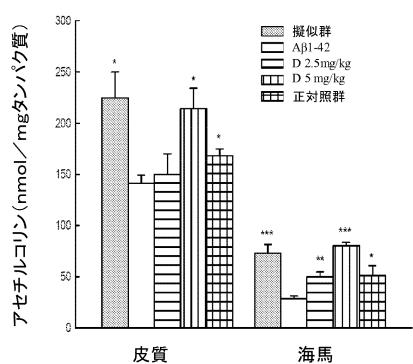
【図11】



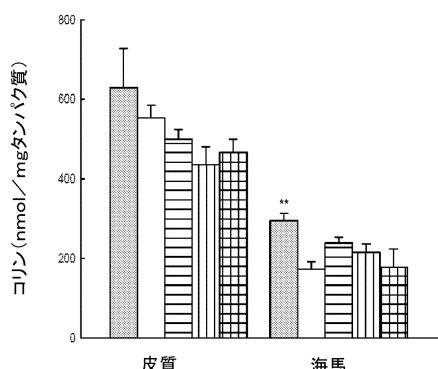
【図12】



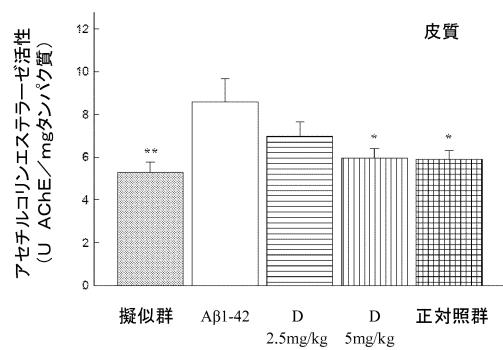
【図13 A】



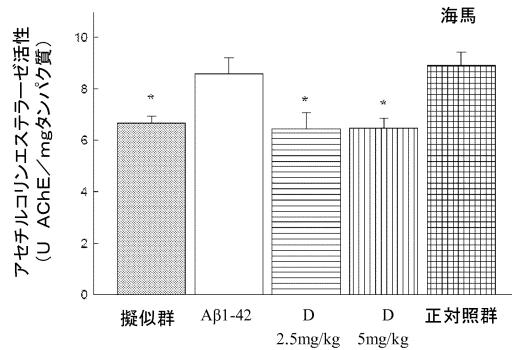
【図13 B】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



---

フロントページの続き

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 特開2009-263279(JP,A)  
特開2009-209063(JP,A)  
特開2009-196908(JP,A)  
欧州特許出願公開第01736167(EP,A1)  
中国特許出願公開第1526400(CN,A)  
Journal of Traditional Medicines, 2007, Vol.24, p.58  
Planta Medica, 1989, Vol.55, p.458-462  
Journal of Neuroscience Research, 2006, Vol.84, p.427-433

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31 / 33 - 33 / 44  
A 61 P 25 / 28  
A 61 P 27 / 02  
WPI  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
Japio - GPG / FX