

(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 I

A 6 1 K 31/7032 (2006. 01)
 A 6 1 P 25/28 (2006. 01)
 A 6 1 P 27/02 (2006. 01)
 A 6 1 P 21/00 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7032
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 27/02
 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) 国際出願番号 PCT/CN2011/000998
 (87) 国際公開番号 W02011/157059
 (87) 国際公開日 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) 薬業有限公司
 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
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 林 漢 欽
 台湾台北市水源路49号3楼之2
 (72) 発明者 蘇 慕 實
 台湾宜蘭県冬山郷中山村84号
 (72) 発明者 黄 永 名
 台湾宜蘭県冬山郷中山村84号
 (72) 発明者 唐 静 静
 台湾宜蘭県冬山郷中山村84号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イソアクテオシ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】

イソアクテオシ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、イソアクテオシ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、薬剤組成物。

【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 - 4 0またはA 1 - 4 2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、

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、
ヒトに対する有効な投与量は、1 日あたり、体重 1 k g 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 m g 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。

10

【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 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。

20

【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 3 9 - 4 3 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 (A P P) の加水分解生成物である。A の中でも、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】

40

一般に A - 関連疾患または状態は、ダウン症候群、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 (C l i n i c a l N e u r o l o g y a n d N e u r o s u r g e r y (1 9 9 0) 9 2 : 3 0 5 - 3 1 0) ; 脳アミロイド血管症 (J . N e u r o p a t h . E x p . N e u r o . (2 0 0 2) 6 1 : 2 8 2 - 2 9 3) ; 封入体筋炎 (N e u r o l o g y (2 0 0 6) 6 6 : 6 5 - 6 8) ; 前頭側頭認知症 (N e u r o r e p o r t (2 0 0 2) 1 3 - 5 : 7 1 9 - 7 2 3) ; 加齢性黄斑変性症 (E x p e r i m e n t a l E y e R e s e a r c h (2 0 0 4) 7 8 : 2 4 3 - 2 5 6) ; ピック病 (N e u r o s c i e n c e L e t t e r s (1 9 9 4) 1 7 1 : 6 3 - 6 6) などを含むと考えられている。

【0004】

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、これは先天的因子（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。

【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】

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】

【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。

【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13A】図13A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13B】図13B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

10

20

30

40

50

を示す。

【図 1 4 A】図 1 4 A 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 1 4 B】図 1 4 B 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、原線維またはプラークの形状で存在し、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うると考えられる。

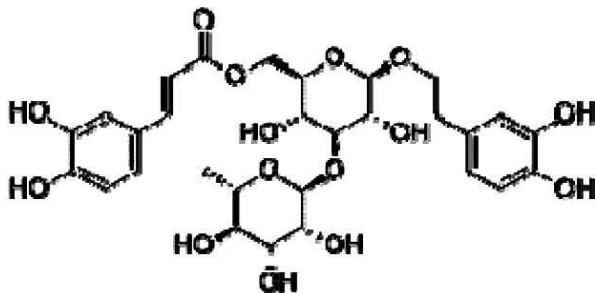
10

【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、*Cistanche 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

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うる。

【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る傾向を考慮して、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

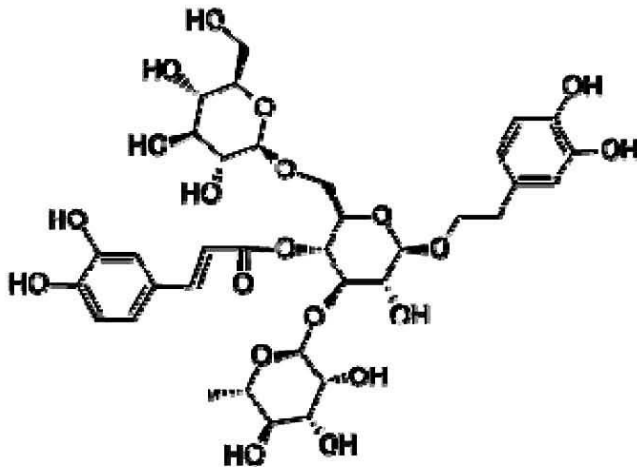
【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

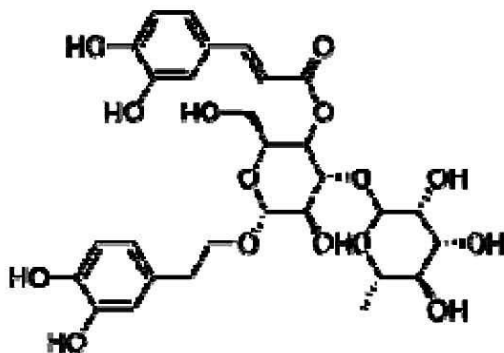
【 化 2 】

エチナコシド:



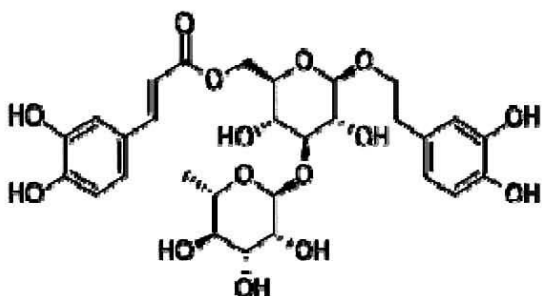
10

アクテオシド:



20

イソアクテオシド:



30

40

【 0 0 2 8 】

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 μ g / 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 μ g / ml を含む) 中で培養した。

【 0 0 2 9 】

実施例 2 : 細胞外の A 1 - 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 S H - S Y 5 Y 細胞の培地を、既知組成培地 (E M E M / F 1 2 培地 (カタログ番号 1 2 5 0 0 - 0 6 2)、H e p e s 5 m M、グルコース 0 . 6 %、N a H C O ₃ 3 m M、グルタミン 2 . 5 m M、インシュリン 2 5 μ g / m l、トランスフェリン 1 0 0 μ g / m l、プロゲステロン 2 0 n M、プトレシン 6 0 μ M、亜セレン酸ナトリウム 3 0 n M、ヘパリン 2 μ g / m l) に切り替えた。各ウェルは 1 × 1 0 ⁵ S H - S Y 5 Y 細胞を培地 3 0 0 μ l 中に有した。3 0 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、5 0 μ g / m l の濃度で 2 4 時間処理した。その後、各ウェルの培地中の A 1 - 4 0 のレベル (含量) 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) によって分析した。

【 0 0 3 0 】

10

ヒト神経芽腫 S H - S Y 5 Y 細胞は、A の細胞外蓄積を引き起こす。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 S H - S Y 5 Y ウェルの培地中の A 1 - 4 0 の百分率の値を示す。結果を平均 ± 標準偏差 (S D) 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 . 0 5、** : P < 0 . 0 1 および *** : P < 0 . 0 0 1 で表した。

【 0 0 3 1 】

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 - 4 0 のレベルを約 2 0 % 低減させ、D (イソアクテオシド) は、A 1 - 4 0 のレベルを約 4 7 . 4 4 ± 1 6 . 6 2 % 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 - 4 0

20

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。

【 0 0 3 2 】

実施例 3 : 細胞内の A 1 - 4 0 の蓄積に対する各試験試料の効果

各ウェルは 1 × 1 0 ⁵ の S H - S Y 5 Y 細胞を培地 3 0 0 μ l 中に有した。各ウェルの S H - S Y 5 Y 細胞を試験試料 A ~ D で 5 0 μ g / m l 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 - 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) を用いて決定した。

【 0 0 3 3 】

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、S H - S Y 5 Y ウェルの細胞内 A 1 - 4 0 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 の細胞内蓄積をもたらさないことが示された。

30

【 0 0 3 4 】

実施例 4 : A P P の発現に対する各試験試料の効果

各ウェルは 1 × 1 0 ⁵ S H - S Y 5 Y 細胞を培地 3 0 0 μ l 中に有した。各ウェルの S H - S Y 5 Y 細胞を試験試料 A ~ D で 5 0 μ g / m l の濃度で 2 4 時間それぞれ処理した後、細胞を均質化用バッファ (5 0 m M H e p e s p H 7 . 5、1 m M E D T A、1 5 0 m M N a C l、1 % N P - 4 0、1 m M P M S F、5 μ g / m l アプロチニン、1 0 μ g / m l 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 S D S - 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

40

【 0 0 3 5 】

図 3 は、細胞内の A P P 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、A P P の発現をダウンレギュレートしないことがわかった。

【 0 0 3 6 】

実施例 5 : 細胞外の A 1 - 4 0 の分解に対する各試験試料の効果

マウス神経芽腫 N e u r o - 2 a 細胞は、既知組成培地中に A - 分解酵素を放出するが、培地中に検出可能な量の A を産生しない。N e u r o 2 a 細胞を培地中で 2 4 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、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の試験試料A～Dおよび 10 ng の合成A 1-40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 1-40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、インビトロジェン）で分析し、ピ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 1-42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 1-42を冷蔵庫から取出し、室温に平衡にした。A 1-42を、1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサ-フルオロ-2-プロパノール（HFIP）に 1 mM の濃度で溶解させ、次いで室温で1時間静置した。A 1-42/HFIP溶液をハミルトンシリンジで分注し、次いで窒素ガス気流下で乾燥させ、その後 -20°C で保存した。HFIPで処理したA 1-42をPBSに溶解させ、各試験試料の処理を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、4 で24時間行い、振動-インキュベートしてA 1-42オリゴマーを調製した。A 1-42のオリゴマー化のレベルをチオフラビンT蛍光（ $E_x = 450 \text{ nm}$ 、 $E_m = 482 \text{ nm}$ ）によって分析した。

【0038】

図5は、A 1-40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 1-42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 1-42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 1-42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うる。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に、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（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、ピック病などが挙げられる。加えて、上記のA

10

20

30

40

50

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むうる。

【 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 ~ 1 1 においては、体重 2 5 0 ~ 3 0 0 g の雄の Sprague - Dawley (S D) ラットを BioL A S C O T a i w a n C o . L t d . から入手した。S D 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、N a b e s h i m a e t a l . (N e u r o s c i e n c e L e t t e r s (1 9 9 4) 1 7 0 : 6 3 - 6 6) (B r i t i s h J o u r n a l o f P h a r m a c o l o g y (1 9 9 9) 1 2 6 : 2 3 5 - 2 4 4) を参照することができる。

10

【 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 (e x p l o r a t i o n b e h a v i o r) 試験を第 7 日に行い、受動回避学習 (p a s s i v e a v o i d a n c e l e a r n i n g) 試験を第 8、9 日に行い、水中迷路 (w a t e r m a z e) 試験を第 1 0 ~ 1 3 日に行い、探索試験 (p r o b e t e s t) を第 1 4 日に行った。実験群を表 2 に示した。疑似群 (s h a m) は T F A 溶液 (6 4 . 9 % 滅菌 d d H ₂ O、3 5 % 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、T F A 溶液に溶解させた A 1 - 4 2 を 0 . 5 μ l で処理し、これは A 1 - 4 2 (T o c r i s 1 4 2 8 ; M W : 4 5 1 4 . 0 8) を 1 日あたり 3 0 0 p m o l / 1 2 μ l 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 (A r i c e p t) 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。

20

【 0 0 4 4 】

実施例 7 ~ 1 1 では、結果を平均 \pm 標準偏差 (S D) 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 . 0 5、** : P < 0 . 0 1 および *** : P < 0 . 0 0 1 で表した。

30

【 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	12
Aβ 1-42 対照群	Aβ 1-42		12
D 低剂量群		D 2.5 mg/kg	12
D 高剂量群		D 5 mg/kg	12
正対照群(アリセプト)		アリセプト 0.75 mg/kg	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 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 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 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】

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 1.0 cm 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) 5 mg/kg は、アリセプト 0.75 mg/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 12 A ~ E は、免疫組織化学染色の結果を示す。図 12 B においては、A 1 - 42 を持続注入したラットの脳に多数のプラークが見られた。図 12 C および図 12 D においては、試験試料 D (イソアクテオシド) 2.5 mg/kg で治療したラットの脳にはわずかなプラークしか見られず、試験試料 D (イソアクテオシド) 5 mg/kg で治療したラットの脳にはプラークがほとんど見られなかった。図 12 C を図 12 E 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プラークは、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 - 42 の生成の阻害またはプ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、50 mM 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
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

10

【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***
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

20

【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13B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 1-42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 1-42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。

30

【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 1-42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 1-42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。

40

【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

50

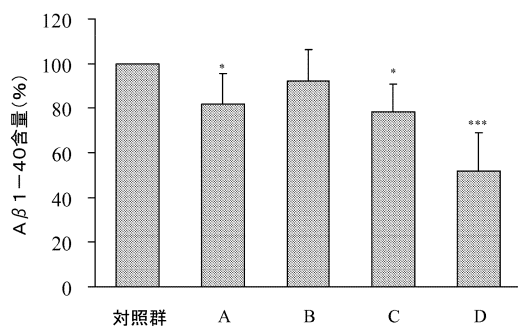
記憶または学習の欠損の改善に有意な効果を有することが示される。実施例 10 によれば、イソアクテオシドは、A β の凝集によるプラークの形成の阻害、またはプラークの除去に有効である。その上、実施例 11 によれば、イソアクテオシドは、A β 1-42 によってもたらされる神経伝達物質のレベルの低減を回復、したがって記憶または学習能力の欠損の改善に有効である。上記の細胞および動物の研究の結果から、イソアクテオシドまたはその等価な製薬上許容される塩は、毎日、患者に約 0.2 mg/kg ~ 4 mg/kg の治療上有効な量で投与することができ（すなわち、体重 60 kg の成人の推奨される投与量は約 12 mg ~ 240 mg である）、アルツハイマー病または他の A β - 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うることが示される。

【0065】

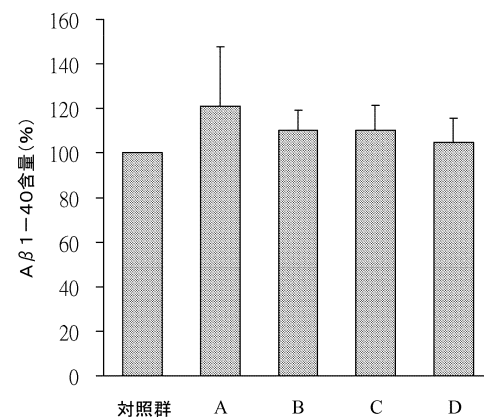
10

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。

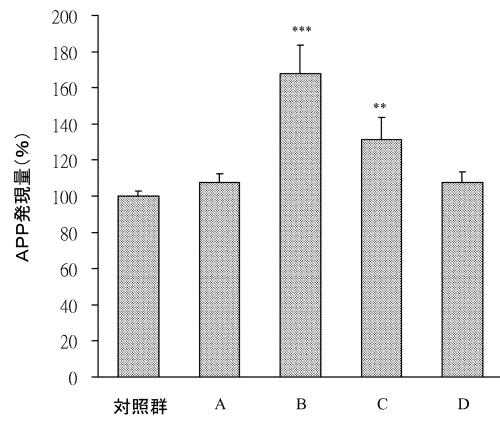
【図 1】



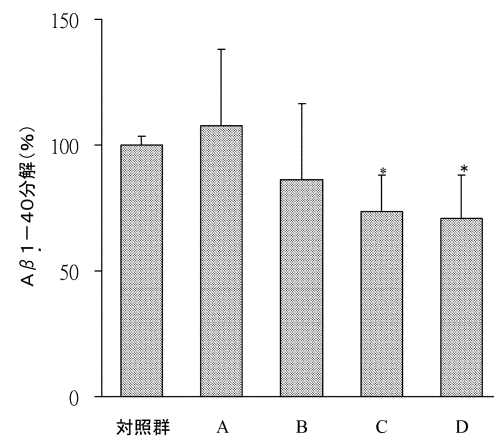
【図 2】



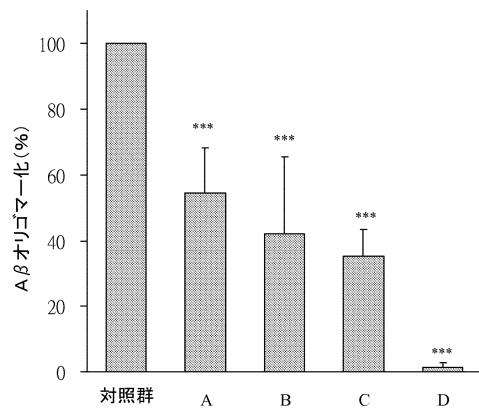
【図 3】



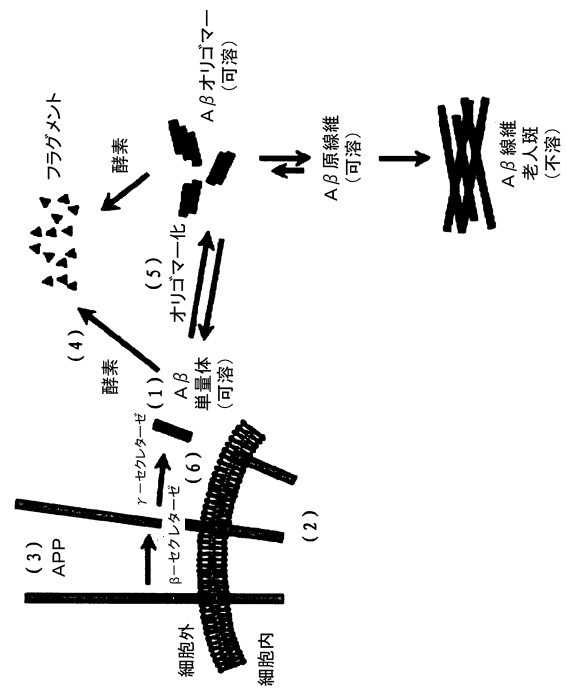
【図 4】



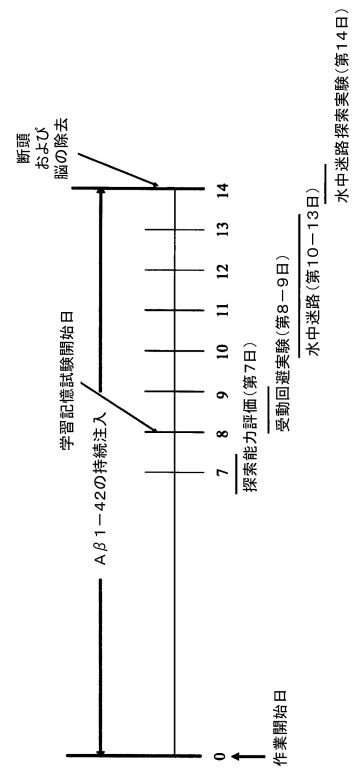
【図 5】



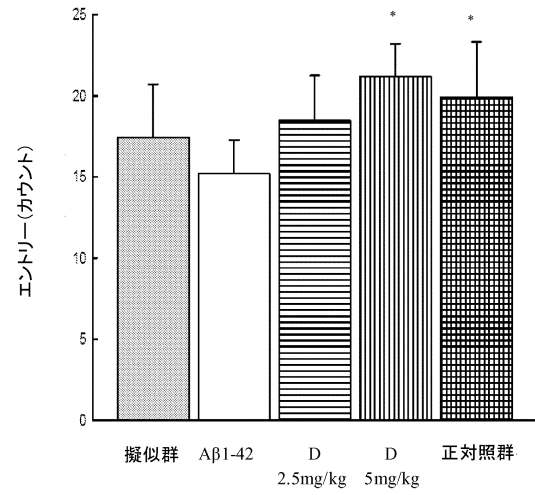
【図 6】



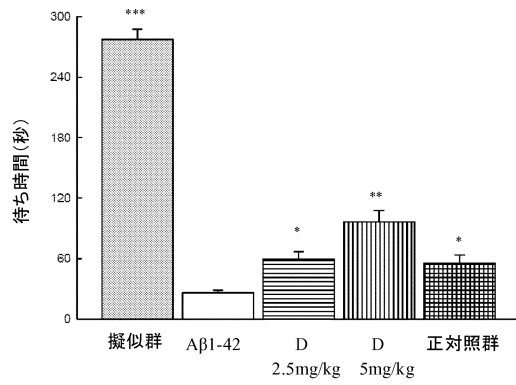
【図 7】



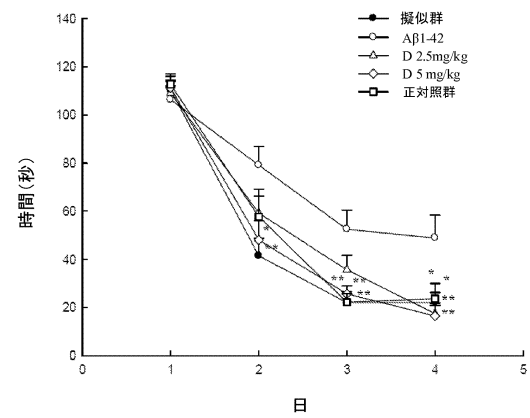
【図 8】



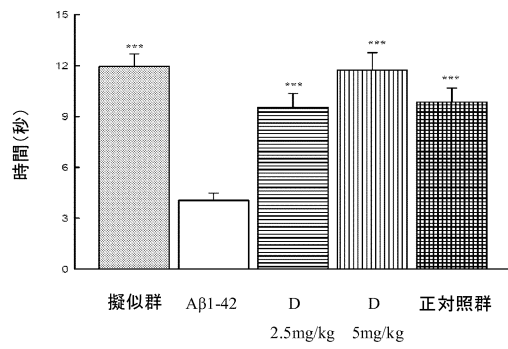
【図 9】



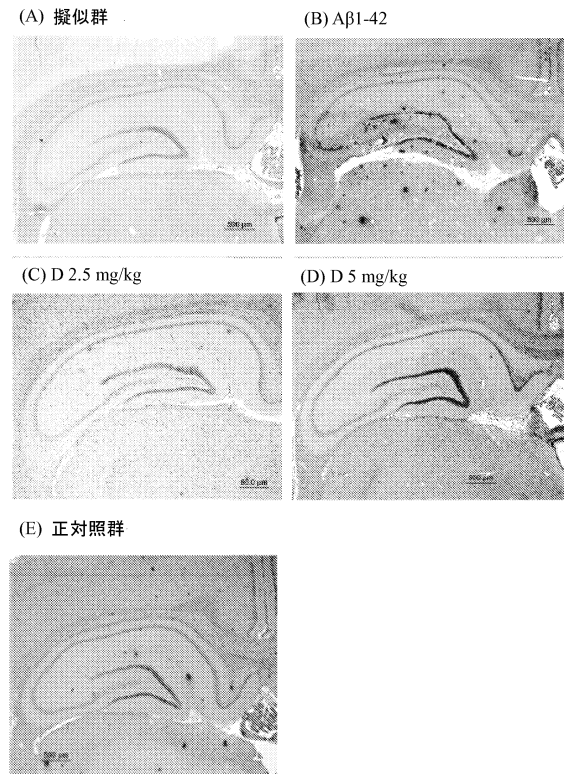
【図 10】



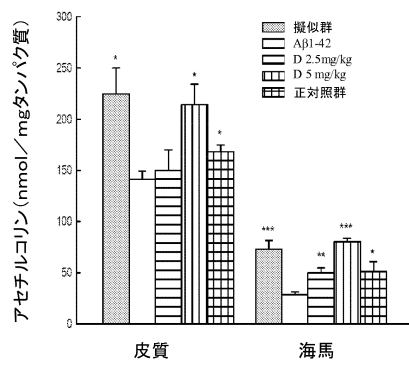
【図 1 1】



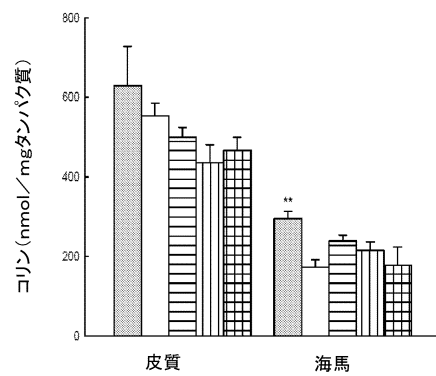
【図 1 2】



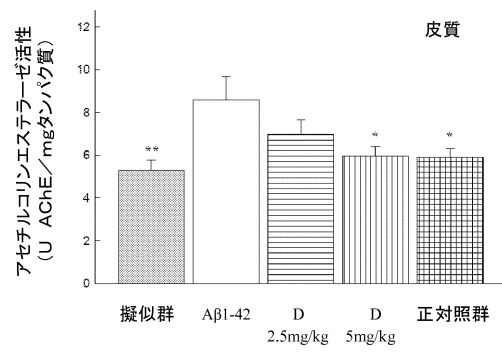
【図 1 3 A】



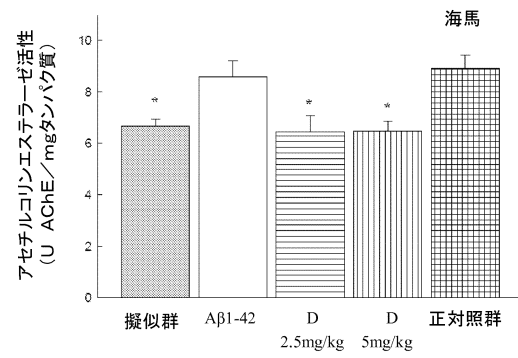
【図 1 3 B】



【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)

A61K 31/33-33/44

A61P 25/28

A61P 27/02

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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

Japio-GPG/FX