

(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2019-524743

(P2019-524743A)

(43) 公表日 令和1年9月5日 (2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 413/14 (2006.01)	C O 7 D 413/14 C S P	4 C O 6 3
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 93 頁)

(21) 出願番号	特願2019-502566 (P2019-502566)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成29年7月17日 (2017.7.17)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成31年1月18日 (2019.1.18)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2017/054307		3 5
(87) 国際公開番号	W02018/015868	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成30年1月25日 (2018.1.25)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	16180233.5	(74) 代理人	100095360
(32) 優先日	平成28年7月19日 (2016.7.19)		弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	16193779.2	(74) 代理人	100176094
(32) 優先日	平成28年10月13日 (2016.10.13)		弁理士 箱田 満
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

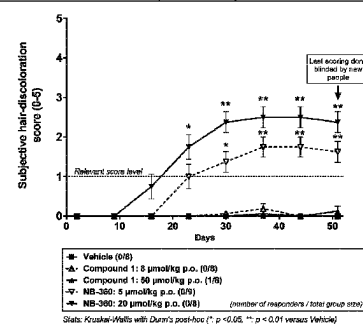
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リスク患者のアルツハイマー病の予防における使用のためのオキサジン誘導体

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のためのオキサジン誘導体 B A C E - 1 阻害薬及びかかるオキサジン誘導体を含む医薬組成物であって、詳細には、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、オキサジン誘導体 B A C E - 1 阻害薬及びかかるオキサジン誘導体を含む医薬組成物に関する。

Figure 1: Fur colour scores of C57BL/6 mice chronically treated with Compound 1 or NB-360 for 8 weeks (mean ± SEM)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 $N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド$ 又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある前記患者は、前記アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有するか、又はダウン症候群を有する、請求項 1 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

10

【請求項 3】

前記患者は、前記アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有し、及び前記遺伝的素因は、

(i) アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン-1 若しくはプレセニリン-2 の遺伝子における突然変異、又は

(ii) A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーの存在

である、請求項 2 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4】

アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある前記患者は、A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保有する、請求項 3 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

20

【請求項 5】

前記患者は、A p o E 4 アレルの 1 つのコピーを保有する、請求項 4 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 6】

前記患者は、A p o E 4 アレルの 2 つのコピーを保有する、請求項 4 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 7】

前記患者は、アミロイド陽性である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

30

【請求項 8】

前記アミロイド陽性は、P E T 又は C S F 測定によって決定される、請求項 7 に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 9】

前記患者は、60 ～ 75 歳である、請求項 3 ～ 8 のいずれか一項に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 10】

前記化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1 - 40 の少なくとも 70 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

40

【請求項 11】

前記化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1 - 40 の少なくとも 50 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 12】

前記化合物は、1 日 15 m g の用量で使用される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 13】

前記化合物は、1 日 50 m g の用量で使用される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載

50

の使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 14】

遊離形態である、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項 15】

請求項 1～13 のいずれか一項に記載の使用のための遊離形態又は薬学的に許容可能な塩の形態における化合物を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のためのオキサジン誘導体及びかかるオキサジン誘導体を含む医薬組成物であって、詳細には、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保有する、オキサジン誘導体及びかかるオキサジン誘導体を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病 (AD) は世界的に最も多く見られる神経障害の 1 つであり、最も一般的な消耗性の加齢に伴う病態であり、進行性の健忘、認知症、及び最終的に全般的な認知的不全及び死亡を引き起こす。現在、唯一の利用可能な薬理学的療法は、コリンエステラーゼ阻害薬などの対症的薬物又は AD の二次的行動症状を管理するために用いられる他の薬物である。AD 発病カスケードを標的とする研究治療には、アミロイド-β (Aβ) 種の産生、蓄積、又は毒性の続発症を妨げることを意図したものが含まれる (Kramp VP, Herrling P, 2011)。(1) Aβ に対する能動又は受動免疫療法によるアミロイドクリアランスの亢進；(2) β 部位 APP 切断酵素-1 (BACE-1、アミロイド前駆体タンパク質 [APP] のプロセッシングに参与する酵素) の阻害を通じた産生の減少によって Aβ を減少させることを標的とする戦略には治療的価値がある可能性がある。

【0003】

動物データ及びこの疾患の認知症ステージを標的とする最近の臨床試験で利益が限られていることに基づき、AD の進行を予防するか又は遅延させるのに Aβ 低減療法が発症前ステージで最も有効であり得るという考えが広まりつつある。この手法によれば、線維性 Aβ のプラトー、タウ (神経原線維) 病変の広範な出現及び不可逆的なシナプス又はニューロン欠損に先立ち、症状及び疾患の発症前又は最も初期の段階で当事者を治療することが可能となる。

【0004】

ε 4 アレルのアポリポタンパク質 E (ApoE4) 遺伝子は、アルツハイマー病 (AD) の主要危険因子である。APOE 遺伝子は、3 つの多型アレル、ε 2、ε 3 及び ε 4 で存在し、ε 3 が最も高頻度である。APOE アイソフォームによって Aβ クリアランス、凝集及び沈着への影響が異なる。ε 2 は、保護的であるように見える一方、ε 4 保因者には病変の亢進及び年齢依存性認知機能低下の加速が認められる (レビューについては、Liu CC et al., 2013 を参照されたい)。

【0005】

ヒト ApoE は、19 番染色体に位置し (遺伝子 APOE、UniProt P02649、18 アミノ酸のプロペプチドを含む 317 アミノ酸の遺伝子コード)、成熟形態は、299 アミノ酸で構成され、及び可動性リンカーによってつなぎ合わされた 2 つの別個の N 末端及び C 末端ドメインを有する。N 末端ドメインが受容体結合の結合ドメイン (aa136～150) を含む一方、脂質結合ドメイン (aa240～260) が C 末端部に位置する。ヒトでは 3 つの主要なアイソフォーム (apoE2、3 及び 4) が知られ、ApoE3 (112 位に Cys 及び 158 位に Arg を有する) のアレル頻度は、ヒトでは約 50～90% である。ヒトにおいて、ApoE2 (112 及び 158 位に Cys を有す

10

20

30

40

50

る)は、アレル頻度が1~5%であり、ApoE4(112及び158位にArgを有する)は、アレル頻度が5~35%である。ApoE3及び4は、高親和性でLDL受容体に結合する一方、ApoE2は、(Cys-158に起因して)低い親和性のみを有する。

【0006】

ApoE4ホモ接合体は、一般集団の約2~3%を占めると推定され、発症時年齢が平均68歳であり、他のAPOE遺伝子型の人と比べてAD症状の発症リスクがはるかに高い(Corder EH et al., 1993)。85歳までには、症候性ADの生涯リスクは、男性ホモ接合体で51%及び女性ホモ接合体で60~68%もの高さとなり得る。対応する85歳ApoE4ヘテロ接合体の危険率は、ApoE3/4遺伝子型を保因する男性及び女性についてそれぞれ23%及び30%、並びにApoE2/4遺伝子型を保因する男性及び女性についてそれぞれ20%及び27%である(Genin E et al., 2011)。ApoE4遺伝子の存在がAβクリアランス、凝集、及び沈着に影響を及ぼすことによってADリスクを高めることが提唱されている(Liu CC et al., 2013)。ApoE4ヘテロ接合体における脳アミロイド病変の存在は、ホモ接合体と比較してAD臨床症状の発症リスクを有意に増加させると予想される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書において「化合物1」と称される化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミドは、国際公開第2012/095469 A1号パンフレットに以前に記載された経口活性BACE阻害薬であり、BACE-2と比べてBACE-1に対する選択性が約3倍高く、及び関連するオフターゲット結合又は活性がない。

【0008】

これまでのところ実地では挫折及び失望の割合が高いことを考えると(Cummings JL et al., 2014)、リスク患者において任意の実験的疾患修飾性AD療法が有効であると判明するかどうかに関しては不確実性の度合いが高い。しかしながら、本明細書で化合物1によって実証された、(i)望ましくない副作用、例えば毛髪変色のない、ApoE4トランスジェニックマウス及びヒトApoE4保因者におけるAβレベルの低減；(ii)APP23マウスモデルにおけるアミロイドβ沈着の低下；及び特に(iii)基礎的AD病変への効果を示すものである脳脊髄液のAβ42/Aβ40比の上昇における有効性の度合いの高さは、AD臨床症状の発症リスクがある患者、詳細にはApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保因する患者のADの予防において化合物1が有効となるであろうことを強く示唆している。

【0009】

本明細書には第II相/第III相臨床試験が記載され、この試験は、認知障害のないApoE4ホモ接合体患者又は認知障害のないアミロイド陽性ApoE4ヘテロ接合体患者のADの予防における化合物1の有効性を実証するように設計された。現在の知識に基づき、BACE阻害薬療法は、アミロイド沈着の複数の潜在的原因とは無関係にアミロイドプラーク蓄積を低下させ且つ/又は予防するものと思われるため、この提案される臨床試験からの知見及び本明細書に記載される結果は、ApoE4ホモ接合体及びヘテロ接合体を越えたリスク患者(例えば、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、プレセニリン-1及び-2の遺伝子に突然変異を保因する患者(O'Brien RJ, Wong PC, 2011)又はダウン症候群患者(Head E et al., 2012))のADに一般化して適用可能であり得る。

【0010】

従って、本発明の第1の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスク

10

20

30

40

50

がある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

【0011】

本発明の第2の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のためのN-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物が提供される。

10

【0012】

本発明の第3の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防する方法であって、治療有効量の化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩をかかる患者に投与することを含む方法が提供される。

【0013】

20

本発明の第4の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防する方法であって、治療有効量の化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物をかかる患者に投与することを含む方法が提供される。

【0014】

本発明の第5の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。

30

【0015】

本発明の第6の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物の使用が提供される。

【0016】

40

本発明の第7の態様において、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防用医薬を製造するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】化合物1又はNB-360で8週間慢性治療したC57BL/6マウスの毛色スコア（平均値±SEM）である。

50

【図2】8及び50 $\mu\text{mol/kg}$ の化合物1による治療時のC57BL/6マウスにおける最終投与後の脳A β 40の減少(平均値 $\pm$ SD、 $n=4$ /群)である。

【図3】APOE4-TR雄及び雌マウスの前脳A β 40レベルに対する化合物1の急性投与の効果(3~5ヵ月齢、平均値 $\pm$ SEM)である。

【図4】APOE4-TR雄及び雌マウス(3~5ヵ月齢)のCSF A β 40レベルに対する化合物1の急性投与の効果(平均値 $\pm$ SEM)である。

【図5】APOE4-TR雄及び雌マウス(3~5ヵ月齢)のCSF A β 42レベルに対する化合物1の急性投与の効果(平均値 $\pm$ SEM)である。

【図6】APOE4-TR雄及び雌マウスにおける化合物1急性曝露(3~5ヵ月齢、平均値 $\pm$ SD)である。

【図7】脳PK/PD関係(個体データ)である。

【図8】脳PK/PD関係(平均値 $\pm$ SD)である。

【図9】ヒト対象の複数用量漸増経口投与試験における化合物1の2週間曝露後のCSF A β 40レベルに対する効果である。

【図10】ヒト対象のCSF A β 40レベルに対する化合物1の効果-3ヵ月時におけるベースラインからの%変化率(最終投与後24時間)である。

【図11】Triton TX-100抽出APP23脳のA β 40に対する化合物1の効果である。

【図12】Triton TX-100抽出APP23脳のA β 42に対する化合物1の効果である。

【図13】Triton TX-100抽出APP23脳のsAPP α に対する化合物1の効果である。

【図14】Triton TX-100抽出APP23脳のsAPP β (Swe)に対する化合物1の効果である。

【図15】APP23マウスの脳脊髄液中のA β 40に対する化合物1治療の効果である。

【図16】マウスにおけるギ酸可溶性A β 40に対する化合物1の効果である(値は平均値 $\pm$ SEMである)。

【図17】マウスにおけるギ酸可溶性A β 42に対する化合物1の効果である(値は平均値 $\pm$ SEMである)。

【図18】マウスにおけるギ酸可溶性全A β (40+42)に対する化合物1の効果である(値は平均値 $\pm$ SEMである)。

【図19】マウスにおけるギ酸可溶性A β 42/40比に対する化合物1の効果である(値は平均値 $\pm$ SEMである)。

【図20】プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 小型プラークの数(総面積に対して正規化したデータ)である。

【図21】プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 中型プラークの数(総面積に対して正規化したデータ)である。

【図22】プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 大型プラークの数(総面積に対して正規化したデータ)である。

【図23】プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 総プラーク面積(総面積に対して正規化したデータ)である。

【図24】総GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)である。平均値 $\pm$ SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図25】プラーク関連GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)である。平均値 $\pm$ SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図26】非プラーク関連GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)である。平均値 $\pm$ SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図27】近位GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)である。平均値 $\pm$ SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

10

20

30

40

50

【図 28】遠位 G F A P 陽性面積（総面積に対して正規化）である。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 29】総 I B A 1 陽性面積に対する化合物 1 治療の効果である。個別のミクログリア集団を示す（試料面積によって正規化）。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 30】プラーク関連 I B A 1 陽性面積に対する化合物 1 治療の効果である。個別のミクログリア集団を示す（試料面積によって正規化）。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 31】非プラーク関連 I B A 1 + 面積に対する化合物 1 治療の効果である。個別のミクログリア集団を示す（試料面積によって正規化）。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 32】近位 I B A 1 + 面積に対する化合物 1 治療の効果である。個別のミクログリア集団を示す（試料面積によって正規化）。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 33】遠位 I B A 1 + 面積に対する化合物 1 治療の効果である。個別のミクログリア集団を示す（試料面積によって正規化）。平均値 ± S E M を示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【図 34】単独投与時及び強力な C Y P 3 A 4 阻害薬イトラコナゾール又は強力な C Y P 3 A 4 誘導薬リファンピシンの併用投与時の化合物 1 の P K を判定する健常対象における 2 パート、非盲検、2 期、固定順序試験の設計である。

【図 35】ベースライン時に C S F A β 4 2 / A β 4 0 比 < 0.09 を有する非 A p o E 4 保因者及び A p o E 4 保因者健常高齢対象の化合物 1 による治療に応答した C S F A β 4 2 / A β 4 0 比のベースラインからの変化倍数である。比較はダネットの多重比較検定で行った。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の様々な実施形態を本明細書において記載する。

【0019】

本発明の第 1 の態様のシリーズ A 実施形態

実施形態 A 1：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 N - (6 - ((3 R , 6 R) - 5 - アミノ - 3 , 6 - ジメチル - 6 - (トリフルオロメチル) - 3 , 6 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 4 - オキサジン - 3 - イル) - 5 - フルオロピリジン - 2 - イル) - 3 - クロロ - 5 - (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩。

【0020】

実施形態 A 2：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因するか、又はダウン症候群を有する、実施形態 A 1 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0021】

実施形態 A 3：患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因し、及び遺伝的素因は、

(i) アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン - 1 若しくはプレセニリン - 2 の遺伝子における突然変異、又は

(i i) A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーの存在

である、実施形態 A 2 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0022】

実施形態 A 4：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保因する、実施形態 A 3 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0023】

10

20

30

40

50

実施形態 A 5：患者は、A p o E 4 アレルの 1 つのコピーを保因する、実施形態 A 4 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0024】

実施形態 A 6：患者は、A p o E 4 アレルの 2 つのコピーを保因する、実施形態 A 4 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0025】

実施形態 A 7：患者は、アミロイド陽性である、実施形態 A 1 ～ A 6 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0026】

実施形態 A 8：アミロイド陽性は、P E T 又は C S F 測定によって決定される、実施形態 A 7 に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

10

【0027】

実施形態 A 9：患者は、60 ～ 75 歳である、実施形態 A 3 ～ A 8 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0028】

実施形態 A 10：化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1 - 40 の少なくとも 70 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0029】

実施形態 A 11：化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1 - 40 の少なくとも 50 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

20

【0030】

実施形態 A 12：化合物は、1 日 10 ～ 30 m g の用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0031】

実施形態 A 13：化合物は、1 日 30 ～ 50 m g の用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0032】

実施形態 A 14：化合物は、1 日 15 m g の用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

30

【0033】

実施形態 A 15：化合物は、1 日 50 m g の用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0034】

実施形態 A 16：化合物は、70 ～ 170 n g / m l の血漿定常状態 C m a x 値をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0035】

実施形態 A 17：化合物は、200 ～ 500 n g / m l の血漿定常状態 C m a x 値をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 A 1 ～ A 9 のいずれか 1 つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

40

【0036】

実施形態 A 18：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 N - (6 - ((3 R , 6 R) - 5 - アミノ - 3 , 6 - ジメチル - 6 - (トリフルオロメチル) - 3 , 6 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 4 - オキサジン - 3 - イル) - 5 - フルオロピリジン - 2 - イル) - 3 - クロロ - 5 - (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保因する、化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

50

【0037】

実施形態 A 19：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 N-（6-（（3R, 6R）-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保因し、化合物は、1日15又は50mgの用量で使用される、化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0038】

実施形態 A 20：遊離形態である、実施形態 A 1～A 19のいずれか1つに係る使用のための化合物。

【0039】

実施形態 A 21：患者は、CYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 A 1～A 20のいずれか1つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0040】

実施形態 A 22：患者は、3ヵ月より長い期間にわたってCYP3A4阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 A 1～A 20のいずれか1つに係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0041】

実施形態 A 23：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である、実施形態 A 21又はA 22に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0042】

実施形態 A 24：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な誘導薬である、実施形態 A 23に係る使用のための化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

【0043】

本発明の第2の態様のシリーズB実施形態

実施形態 B 1：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 N-（6-（（3R, 6R）-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物。

【0044】

実施形態 B 2：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因するか、又はダウン症候群を有する、実施形態 B 1に係る使用のための医薬組成物。

【0045】

実施形態 B 3：患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因し、及び遺伝的素因は、

(i) アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン-1若しくはプレセニリン-2の遺伝子における突然変異、又は

(ii) ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーの存在

である、実施形態 B 2に係る使用のための医薬組成物。

【0046】

実施形態 B 4：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保因する、実施形態 B 3に係る使用のための医薬組成

10

20

30

40

50

物。

【0047】

実施形態B5：患者は、ApoE4アレルの1つのコピーを保有する、実施形態B4に係る使用のための医薬組成物。

【0048】

実施形態B6：患者は、ApoE4アレルの2つのコピーを保有する、実施形態B4に係る使用のための医薬組成物。

【0049】

実施形態B7：患者は、アミロイド陽性である、実施形態B1～B6のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

10

【0050】

実施形態B8：アミロイド陽性は、PET又はCSF測定によって決定される、実施形態B7に係る使用のための医薬組成物。

【0051】

実施形態B9：患者は、60～75歳である、実施形態B3～B8のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0052】

実施形態B10：化合物は、2週間の化合物曝露後にCSF中のAβ1-40の少なくとも70%の低下をもたらす1日用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

20

【0053】

実施形態B11：化合物は、2週間の化合物曝露後にCSF中のAβ1-40の少なくとも50%の低下をもたらす1日用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0054】

実施形態B12：化合物は、1日10～30mgの用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0055】

実施形態B13：化合物は、1日30～50mgの用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

30

【0056】

実施形態B14：化合物は、1日15mgの用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0057】

実施形態B15：化合物は、1日50mgの用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0058】

実施形態B16：化合物は、70～170ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

40

【0059】

実施形態B17：化合物は、200～500ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態B1～B9のいずれか1つに係る使用のための医薬組成物。

【0060】

実施形態B18：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物N-（6-（（3R, 6R）-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物であって

50

、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保因する、医薬組成物。

【0061】

実施形態 B 1 9 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防における使用のための化合物 N - (6 - ((3 R , 6 R) - 5 - アミノ - 3 , 6 - ジメチル - 6 - (トリフルオロメチル) - 3 , 6 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 4 - オキサジン - 3 - イル) - 5 - フルオロピリジン - 2 - イル) - 3 - クロロ - 5 - (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保因し、化合物は、1 日 1 5 又は 5 0 m g の用量で使用される、医薬組成物。

10

【0062】

実施形態 B 2 0 : 化合物は、遊離形態である、実施形態 B 1 ~ B 1 9 のいずれか 1 つに係る使用のための医薬組成物。

【0063】

実施形態 B 2 1 : 患者は、C Y P 3 A 4 の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに係る使用のための医薬組成物。

【0064】

実施形態 B 2 2 : 患者は、3 ヶ月より長い期間にわたって C Y P 3 A 4 阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに係る使用のための医薬組成物。

20

【0065】

実施形態 B 2 3 : C Y P 3 A 4 阻害薬は、C Y P 3 A 4 の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及び C Y P 3 A 4 誘導薬は、C Y P 3 A 4 の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である、実施形態 B 2 1 又は B 2 2 に係る使用のための医薬組成物。

【0066】

実施形態 B 2 4 : C Y P 3 A 4 阻害薬は、C Y P 3 A 4 の強力な阻害薬であり、及び C Y P 3 A 4 誘導薬は、C Y P 3 A 4 の強力な誘導薬である、実施形態 B 2 3 に係る使用のための医薬組成物。

【0067】

本発明の第 3 の態様のシリーズ C 実施形態

30

実施形態 C 1 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防する方法であって、治療有効量の化合物 N - (6 - ((3 R , 6 R) - 5 - アミノ - 3 , 6 - ジメチル - 6 - (トリフルオロメチル) - 3 , 6 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 4 - オキサジン - 3 - イル) - 5 - フルオロピリジン - 2 - イル) - 3 - クロロ - 5 - (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩をかかす患者に投与することを含む方法。

【0068】

実施形態 C 2 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因するか、又はダウン症候群を有する、実施形態 C 1 に係る方法。

40

【0069】

実施形態 C 3 : 患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保因し、及び遺伝的素因は、

(i) アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン - 1 若しくはプレセニリン - 2 の遺伝子における突然変異、又は

(i i) A p o E 4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーの存在

である、実施形態 C 2 に係る方法。

【0070】

実施形態 C 4 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E

50

4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保因する、実施形態 C 3 に係る方法。

【0071】

実施形態 C 5：患者は、A p o E 4 アレルの 1 つのコピーを保因する、実施形態 C 4 に係る方法。

【0072】

実施形態 C 6：患者は、A p o E 4 アレルの 2 つのコピーを保因する、実施形態 C 4 に係る方法。

【0073】

実施形態 C 7：患者は、アミロイド陽性である、実施形態 C 1～C 6 のいずれか 1 つに係る方法。

【0074】

実施形態 C 8：アミロイド陽性は、P E T 又は C S F 測定によって決定される、実施形態 C 7 に係る方法。

【0075】

実施形態 C 9：患者は、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74 又は 75 歳超である、実施形態 C 3～C 8 のいずれか 1 つに係る方法。

【0076】

実施形態 C 10：患者は、60～75 歳である、実施形態 C 3～C 8 のいずれか 1 つに係る方法。

【0077】

実施形態 C 11：化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に C S F 中、血中、又は血漿中の A β 1-40 の少なくとも 10、20、30、40、50、60、70 又は 80 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 C 1～C 10 のいずれか 1 つに係る方法。

【0078】

実施形態 C 12：化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に C S F 中、血中、又は血漿中の A β 1-40 の少なくとも 70 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 C 1～C 10 のいずれか 1 つに係る方法。

【0079】

実施形態 C 13：化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に C S F 中、血中、又は血漿中の A β 1-40 の少なくとも 50 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 C 1～C 10 のいずれか 1 つに係る方法。

【0080】

実施形態 C 14：化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に 10、20、30、40、50、60、70 又は 80 %～99、97、95、93、90、87、85、80、75、70、65、60、55、又は 50 % の範囲の C S F 中、血中又は血漿中の A β 1-40 の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 C 1～C 10 のいずれか 1 つに係る方法。

【0081】

実施形態 C 15：化合物は、少なくとも 80、85、90、93、95、97 又は 99 % の患者、或いは 80、85 又は 90～99、97、95 若しくは 93 % の患者に 40～70 %、45～65 % 若しくは 50～60 % の範囲、又は少なくとも 50 % の C S F 中、血中若しくは血漿中の A β 1-40 の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 C

10

20

30

40

50

1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0082】

実施形態C16：化合物は、少なくとも80、85、90、93、95、97又は99%の患者、或いは80、85又は90～99、97、95若しくは93%の患者に65～95%、75～90%若しくは80～90%の範囲、又は少なくとも80%のCSF中、血中若しくは血漿中のAβ1-40の低下をもたらす1日用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0083】

実施形態C17：化合物は、1日5～10、10～15、15～20、20～25、25～30、30～35、35～40、45～50、50～55mg、55～60mg、60～100mg、100～200、200～300mg、15～85mg、50～85mg、15～300mg、又は50～300mgの用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

10

【0084】

実施形態C18：化合物は、1日10～30mgの用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0085】

実施形態C19：化合物は、1日30～50mgの用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0086】

実施形態C20：化合物は、1日15mgの用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

20

【0087】

実施形態C21：化合物は、1日50mgの用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0088】

実施形態C22：化合物は、0～50、50～100、100～150、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、又は650～700ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

30

【0089】

実施形態C23：化合物は、70～170ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0090】

実施形態C24：化合物は、200～500ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態C1～C10のいずれか1つに係る方法。

【0091】

実施形態C25：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防する方法であって、治療有効量の化合物N-（6-（（3R, 6R）-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩をかかる患者に投与することを含み、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、方法。

40

【0092】

実施形態C26：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防する方法であって、治療有効量の化合物N-（6-（（3R, 6R）-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5

50

ー（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩をかかる患者に投与することを含み、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの1つ又は2つのコピーを保有し、化合物は、1日15又は50mgの用量で使用される、方法。

【0093】

実施形態C27：化合物は、遊離形態である、実施形態C1～C26のいずれか1つに係る方法。

【0094】

実施形態C28：化合物1は、医薬組成物中に含まれる、実施形態C1～C27のいずれか1つに係る方法。

【0095】

実施形態C29：患者は、CYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態C1～C28のいずれか1つに係る方法。

【0096】

実施形態C30：患者は、3ヵ月より長い期間にわたってCYP3A4阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態C1～C28のいずれか1つに係る方法。

【0097】

実施形態C31：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である、実施形態C29又はC30に係る方法。

【0098】

実施形態C32：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な誘導薬である、実施形態C31に係る方法。

【0099】

本発明の第5の態様のシリーズD実施形態

実施形態D1：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防するための化合物Nー（6ー（（3R, 6R）ー5ーアミノー3, 6ージメチルー6ー（トリフルオロメチル）ー3, 6ージヒドロー2Hー1, 4ーオキサジンー3ーイル）ー5ーフルオロピリジンー2ーイル）ー3ークロロー5ー（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【0100】

実施形態D2：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有するか、又はダウン症候群を有する、実施形態D1に係る使用。

【0101】

実施形態D3：患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有し、及び遺伝的素因は、

（i）アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリンー1若しくはプレセニリンー2の遺伝子における突然変異、又は

（ii）A p o E 4 アレルの1つ又は2つのコピーの存在である、実施形態D2に係る使用。

【0102】

実施形態D4：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、A p o E 4 アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、実施形態D3に係る使用。

【0103】

実施形態D5：患者は、A p o E 4 アレルの1つのコピーを保有する、実施形態D4に係る使用。

【0104】

実施形態D6：患者は、A p o E 4 アレルの2つのコピーを保有する、実施形態D4に係る使用。

10

20

30

40

50

【0105】

実施形態D7：患者は、アミロイド陽性である、実施形態D1～D6のいずれか1つに係る使用。

【0106】

実施形態D8：アミロイド陽性は、PET又はCSF測定によって決定される、実施形態D7に係る使用。

【0107】

実施形態D9：患者は、60～75歳である、実施形態D3～D8のいずれか1つに係る使用。

【0108】

実施形態D10：化合物は、2週間の化合物曝露後にCSF中のAβ1-40の少なくとも70%の低下をもたらす1日用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0109】

実施形態D11：化合物は、2週間の化合物曝露後にCSF中のAβ1-40の少なくとも50%の低下をもたらす1日用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0110】

実施形態D12：化合物は、1日10～30mgの用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0111】

実施形態D13：化合物は、1日30～50mgの用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0112】

実施形態D14：化合物は、1日15mgの用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0113】

実施形態D15：化合物は、1日50mgの用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0114】

実施形態D16：化合物は、70～170ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0115】

実施形態D17：化合物は、200～500ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される、実施形態D1～D9のいずれか1つに係る使用。

【0116】

実施形態D18：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、使用。

【0117】

実施形態D19：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病を予防するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、使用。

10

20

30

40

50

因し、化合物は、1日15又は50mgの用量で使用される、使用。

【0118】

実施形態D20：化合物は、遊離形態である、実施形態D1～D19のいずれか1つに係る使用。

【0119】

実施形態D21：化合物は、医薬組成物中に含まれる、実施形態D1～D20のいずれか1つに係る使用。

【0120】

実施形態D22：患者は、CYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態D1～D21のいずれか1つに係る使用。

10

【0121】

実施形態D23：患者は、3ヵ月より長い期間にわたってCYP3A4阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態D1～D21のいずれか1つに係る使用。

【0122】

実施形態D24：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である、実施形態D22又はD23に係る使用。

【0123】

実施形態D25：CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な誘導薬である、実施形態D24に係る使用。

20

【0124】

本発明の第7の態様のシリーズE実施形態

実施形態E1：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防用医薬を製造するための化合物N-(6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

【0125】

実施形態E2：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有するか、又はダウン症候群を有する、実施形態E1に係る使用。

30

【0126】

実施形態E3：患者は、アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を保有し、及び遺伝的素因は、

(i) アミロイド前駆体タンパク質、プレセニリン-1若しくはプレセニリン-2の遺伝子における突然変異、又は

(ii) ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーの存在である、実施形態E2に係る使用。

【0127】

実施形態E4：アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する、実施形態E3に係る使用。

40

【0128】

実施形態E5：患者は、ApoE4アレルの1つのコピーを保有する、実施形態E4に係る使用。

【0129】

実施形態E6：患者は、ApoE4アレルの2つのコピーを保有する、実施形態E4に係る使用。

【0130】

実施形態E7：患者は、アミロイド陽性である、実施形態E1～E6のいずれか1つに係る使用。

50

【0131】

実施形態 E 8 : アミロイド陽性は、P E T 又は C S F 測定によって決定される、実施形態 E 7 に係る使用。

【0132】

実施形態 E 9 : 患者は、60～75歳である、実施形態 E 3～E 8 のいずれか 1 つに係る使用。

【0133】

実施形態 E 10 : 化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1-40 の少なくとも 70 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

10

【0134】

実施形態 E 11 : 化合物は、2 週間の化合物曝露後に C S F 中の A β 1-40 の少なくとも 50 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

【0135】

実施形態 E 12 : 化合物は、1 日 10～30 mg の用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

【0136】

実施形態 E 13 : 化合物は、1 日 30～50 mg の用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

20

【0137】

実施形態 E 14 : 化合物は、1 日 15 mg の用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

【0138】

実施形態 E 15 : 化合物は、1 日 50 mg の用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

【0139】

実施形態 E 16 : 化合物は、70～170 ng/ml の血漿定常状態 C max 値をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

【0140】

実施形態 E 17 : 化合物は、200～500 ng/ml の血漿定常状態 C max 値をもたらす 1 日用量で使用される、実施形態 E 1～E 9 のいずれか 1 つに係る使用。

30

【0141】

実施形態 E 18 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防用医薬を製造するための化合物 N- (6- ((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6- (トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5- (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保有する、使用。

40

【0142】

実施形態 E 19 : アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者のアルツハイマー病の予防用医薬を製造するための化合物 N- (6- ((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6- (トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-5-フルオロピリジン-2-イル)-3-クロロ-5- (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者は、ApoE4 アレルの 1 つ又は 2 つのコピーを保有し、化合物は、1 日 15 又は 50 mg の用量で使用される、使用。

【0143】

実施形態 E 20 : 化合物は、遊離形態である、実施形態 E 1～E 19 のいずれか 1 つに

50

係る使用。

【0144】

実施形態 E 2 1 : 医薬は、医薬組成物である、実施形態 E 1 ~ E 2 0 のいずれか 1 つに係る使用。

【0145】

実施形態 E 2 2 : 患者は、CYP3A4 の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 E 1 ~ E 2 1 のいずれか 1 つに係る使用。

【0146】

実施形態 E 2 3 : 患者は、3 ヶ月より長い期間にわたって CYP3A4 阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない、実施形態 E 1 ~ E 2 1 のいずれか 1 つに係る使用。

【0147】

実施形態 E 2 4 : CYP3A4 阻害薬は、CYP3A4 の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及び CYP3A4 誘導薬は、CYP3A4 の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である、実施形態 E 2 2 又は E 2 3 に係る使用。

【0148】

実施形態 E 2 5 : CYP3A4 阻害薬は、CYP3A4 の強力な阻害薬であり、及び CYP3A4 誘導薬は、CYP3A4 の強力な誘導薬である、実施形態 E 2 4 に係る使用。

【0149】

更なる発明において、アルツハイマー病の治療又は予防方法が提供され、この方法は、治療有効量の化合物 N - (6 - ((3 R , 6 R) - 5 - アミノ - 3 , 6 - ジメチル - 6 - (トリフルオロメチル) - 3 , 6 - ジヒドロ - 2 H - 1 , 4 - オキサジン - 3 - イル) - 5 - フルオロピリジン - 2 - イル) - 3 - クロロ - 5 - (トリフルオロメチル) ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩を、それを必要としている患者に投与することを含み、ここで、患者は、CYP3A4 の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない。一実施形態において、患者は、3 ヶ月より長い期間にわたって CYP3A4 の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない。一実施形態において、患者は、3 ヶ月以下の期間にわたって CYP3A4 阻害薬又は誘導薬で同時に治療される。一実施形態において、CYP3A4 阻害薬は、CYP3A4 の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及び CYP3A4 誘導薬は、CYP3A4 の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である。一実施形態において、CYP3A4 阻害薬は、CYP3A4 の強力な阻害薬であり、及び CYP3A4 誘導薬は、CYP3A4 の強力な誘導薬である。一実施形態において、患者は、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74 又は 75 歳超である。一実施形態において、患者は、60 ~ 75 歳である。一実施形態において、化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に CSF 中、血中、又は血漿中の Aβ1-40 の少なくとも 10、20、30、40、50、60、70 又は 80 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される。一実施形態において、化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に CSF 中、血中、又は血漿中の Aβ1-40 の少なくとも 70 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される。一実施形態において、化合物は、2、13、26、52、78、104、130、156、182、208、234、260、286、312、338、332、390、又は 416 週間の化合物曝露後に CSF 中、血中、又は血漿中の Aβ1-40 の少なくとも 50 % の低下をもたらす 1 日用量で使用される。一実施形態において、化合物は、1 日 5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、25 ~ 30、30 ~ 35、35 ~ 40、45 ~ 50、50 ~ 55 mg、55 ~ 60 mg、60 ~ 100 mg、100 ~ 200、200 ~ 300 mg、15 ~ 85 mg、50 ~ 85 mg、15 ~ 300 mg、又は 50 ~ 300 mg の用量で使用される。一実施形態において、化合物は、1 日 10 ~ 30 mg の用量で使用される。一実施形態において、化合物は、1 日 30 ~ 50 mg の用量で使用される。一実施形態において、化合物は、1 日 15 mg の用量で使用され

10

20

30

40

50

る。一実施形態において、化合物は、1日50mgの用量で使用される。一実施形態において、化合物は、0～50、50～100、100～150、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、又は650～700ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される。一実施形態において、化合物は、70～170ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される。一実施形態において、化合物は、200～500ng/mlの血漿定常状態Cmax値をもたらす1日用量で使用される。更なる実施形態において、化合物は、遊離形態で使用される。

【0150】

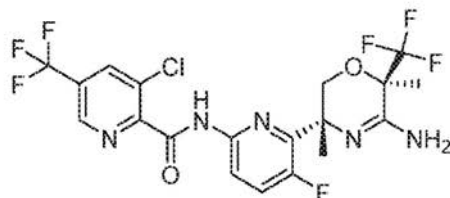
更なる発明において、医薬としての使用のための化合物N-（6-（（3R，6R）-5-アミノ-3，6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3，6-ジヒドロ-2H-1，4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩が提供され、ここで、この医薬によって治療される患者は、CYP3A4阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない。更なる本発明の別の態様において、アルツハイマー病の治療又は予防における使用のための化合物N-（6-（（3R，6R）-5-アミノ-3，6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3，6-ジヒドロ-2H-1，4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミド又はその薬学的に許容可能な塩が提供され、ここで、患者は、CYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない。更なる本発明の一実施形態において、患者は、3ヵ月より長い期間にわたってCYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療されない。更なる本発明の一実施形態において、患者は、3ヵ月以下の期間にわたってCYP3A4阻害薬又は誘導薬で同時に治療される。更なる実施形態において、CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な、中程度の、又は弱い誘導薬である。更なる実施形態において、CYP3A4阻害薬は、CYP3A4の強力な阻害薬であり、及びCYP3A4誘導薬は、CYP3A4の強力な誘導薬である。更なる実施形態において、化合物は、1日15又は50mgの用量で使用される。更なる実施形態において、化合物は、遊離形態で使用される。別の実施形態において、化合物は、医薬組成物中に含まれる。

【0151】

定義

本明細書で使用されるとき、用語「化合物1」又は「Compound 1」は、以下の構造式：

【化1】



を有するN-（6-（（3R，6R）-5-アミノ-3，6-ジメチル-6-（トリフルオロメチル）-3，6-ジヒドロ-2H-1，4-オキサジン-3-イル）-5-フルオロピリジン-2-イル）-3-クロロ-5-（トリフルオロメチル）ピコリンアミドを指す。

【0152】

実施例1では、別の化学命名フォーマットを使用して、「化合物1」は、3-クロロ-5-トリフルオロメチル-ピリジン-2-カルボン酸[6-（（3R，6R）-5-アミ

ノ-3, 6-ジメチル-6-トリフルオロメチル-3, 6-ジヒドロ-2H-[1, 4]オキサジン-3-イル)-5-フルオロ-ピリジン-2-イル]-アミドとも称される。

【0153】

用語「化合物1」、「Cmpd 1」及びその対応する完全な化学名は、本発明の記載全体を通じて同義的に使用される。この用語は、一方の形態の化合物のみを意図することが文脈上明らかに指示されない限り、遊離形態又は薬学的に許容可能な塩の形態のいずれの化合物も指すことが意図される。化合物1は、国際公開第2012/095469 A 1号パンフレット、実施例34に記載される。国際公開第2012/095469 A 1号パンフレット、詳細には実施例34の合成に関する開示は、全体として本明細書によって参照により援用される。

10

【0154】

本明細書で使用されるとき、用語「アルツハイマー病」又は「AD」は、発症前アルツハイマー病又は臨床的アルツハイマー病のいずれか一方のみを意図することが文脈上明らかにならない限り、発症前アルツハイマー病及び臨床的アルツハイマー病の両方を包含する。

【0155】

本明細書で使用されるとき、用語「臨床的アルツハイマー病」又は「臨床的AD」は、ADに起因する軽度認知障害(MCI)又はADに起因する認知症のいずれか一方のみを意図することが文脈上明らかにならない限り、ADに起因するMCI及びADに起因する認知症の両方を包含する。

20

【0156】

本明細書で使用されるとき、用語「発症前アルツハイマー病」又は「発症前AD」は、臨床症状がない中でのADのインビボ分子バイオマーカーの存在を指す。国立老化研究所(The National Institute on Aging)及びアルツハイマー病協会(Alzheimer's Association)が、発症前ADの異なるステージを規定する以下の表1に示すスキームを提供している(Sperling et al., 2011)。

【0157】

【表1】

30

表1: 発症前ADステージ分類

ステージ	説明	A β (PET 又は CSF)	ニューロン 傷害マーカー (タウ, FDG, sMRI)	僅かな認知変化の エビデンス
ステージ1	無症候性脳アミロイドーシス	陽性	陰性	陰性
ステージ2	無症候性アミロイドーシス+ 「下流」神経変性	陽性	陽性	陰性
ステージ3	アミロイドーシス+ニューロン傷害+ 僅かな認知/行動低下	陽性	陽性	陽性

sMRI = 構造磁気共鳴画像法

40

【0158】

本明細書で使用されるとき、用語「アルツハイマー病の予防」は、ADの予防的処置；又はADの発症又は進行を遅延させることを指す。例えば、ADの発症又は進行は、少なくとも0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10年遅延する。一実施形態において、「アルツハイマー病の予防」は、発症前ADの予防的処置；又は発症前ADの発症又は進行を遅延させることを指す。更なる実施形態において、発症前ADの発症又は進行は、少なくとも0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10年遅延する。別の実施形態において、「アルツハイマー病の予防」は、臨床的ADの予防的処置；又は臨床的ADの発症又は進行を遅延させることを指す。更なる実施形態において、臨床的ADの発症又は進行は、少なくとも0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は

50

10年遅延する。

【0159】

発症前ADの発症又は進行の遅延は、例えば、以下を測定することによる、開始時ベースライン値と比べたインビボ分子バイオマーカーを測定することにより評価し得る：

(a) 脳アミロイド沈着の減少。例えば、陽電子放射断層撮影 (PET) イメージングを使用して複合皮質アミロイド標準取込み値比 (SUVR) のベースラインからの変化量を測定することによる。SUVR比の測定に好適なPETトレーサーは、 ^{18}F -フルルベタピル ($((\text{E})-4-(2-(6-(2-(2-(2-([^{18}\text{F}]\text{-フルオロエトキシ})\text{エトキシ})\text{ピリジン-3-イル})\text{ビニル})-\text{N-メチルベンゼンアミン}))$) である。この方法により、認知障害のない個体の独立した試料におけるアミロイド蓄積の経時的展開を測定し得る (Palmqvist Set al., 2015)。SUVR測定は、予め定義した皮質脳関心領域 (ROI) において、予め定義した参照領域におけるトレーサー取込みと比べて計算し得る。皮質ROIには、限定はされないが、頭頂、後頭、外側側頭及び内側側頭新皮質領域、並びに初期ADで典型的に冒される領域を含め、ADで高いアミロイド沈着を有することが分かっている範囲が含まれる (Vlassenko AG et al., 2012)。一実施形態において、開始時ベースライン値に対する脳アミロイド沈着は、治療1年当たり0、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10.0%未満の速度で減少する；

(b) 基礎タウ病変への効果、より具体的にはPET及び好適なタウトレーサー、例えば ^{18}F -THK5351 (Harada Ret al., 2016) を使用して脳タウ病変のベースラインからのSUVR変化量を測定するか、又は脳脊髄液 (CSF) を使用して総タウ及びリン酸化タウを測定する (Forlenza OV et al., 2015)。一実施形態において、CSFタウ又はリン酸化タウのレベルは開始時ベースライン値と比べて治療1年当たり少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50%減少する；

(c) ^{18}F -FDG ($2\text{-デオキシ-}2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{フルオログルコース}$) PET (各スキャンにつき200MBq) を使用した、ニューロンのグルコース代謝、密度及び／又は活性に対する効果。AD罹患脳領域の ^{18}F -FDG PETシグナルは、ADにおける認知障害、続く認知低下及び神経病理に関連し、ADの臨床的及び発症前ステージにおいて時間の経過に伴い進行することが示されており、疾患及び治療有効性バイオマーカーである (Foster NL et al., 2007)。データの分析により、選択された参照領域と比べたグルコース代謝の変化が決定される。一実施形態において、開始時ベースライン値と比べて ^{18}F -FDG PETにより決定したときのAD罹患脳領域におけるニューロングルコース代謝の低下は、治療1年当たり5、10、15、20、25又は30%未満に限られる；

(d) ボリューム磁気共鳴画像法 (vMRI) により評価して脳容積のベースラインからの変化を測定したときの脳容積損失の低下の緩徐化。vMRIを使用すると、海馬、側脳室、及び総脳容積の変化を測定することができる。一実施形態において、海馬容積損失は、治療1年当たり1、2、又は3%未満に限られる；又は

(e) 本明細書の実施例10に記載されるとおり、皮質アミロイド沈着の指標となる、例えば0.09未満のベースラインCSF $\text{A}\beta_{1-42}/\text{A}\beta_{1-40}$ 比を有する対象における経時的CSF $\text{A}\beta_{1-42}/\text{A}\beta_{1-40}$ 比。一実施形態において、CSF $\text{A}\beta_{1-42}/\text{A}\beta_{1-40}$ 比は、少なくとも3、6、9、12、18、24、又は36ヵ月の期間で開始時ベースライン値と比べて少なくとも10、20、30、40、50、80、100、200%増加する。

【0160】

発症前ADの発症又は進行の遅延はまた、例えばアルツハイマー病予防イニシアチブ (API) 発症前複合認知 (APCC) 検査バッテリーを使用した、疾患の発症前ステージの変化を追跡する高感度認知尺度を用いて開始時ベースライン値と比べて評価してもよい。APCCは、遅発性AD (LOAD) の臨床ステージへの進行リスクがある個体の認知

低下を検出及び追跡する高感度ツールとして開発された (Langbaum JB et al., 2014)。

【0161】

臨床的ADの発症の遅延は、ADに起因する認知及び機能障害の遅延を測定することにより、例えばADに起因する軽度認知障害(MCI)及び／又はADに起因する認知症の臨床診断までの時間の遅延を測定することにより評価してもよい。例えば、国立老化研究所－アルツハイマー病協会ワーキンググループによって提案されるコア臨床診断基準がMCI (Albert MS et al., 2011) 又は認知症 (McKhann GM et al., 2011) の診断に用いられてもよい。欧州医薬品庁 (EMA) は、その「Draft guidelines on the clinical investigation of medicines for the treatment of AD and other dementias」(Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) / 539931 / 2014) において、ADに起因するMCI及びAD認知症の診断に向けた国立老化研究所基準を以下に示すとおり要約している。

【0162】

ADに起因するMCIの診断には、以下によって認められる個人内低下のエビデンスが必要である：

- a) 自己報告又は情報提供者の報告及び／又は臨床医の判断によって指摘されたとおりの、これまで達成されていたレベルからの認知の変化。
 - b) 年齢対応及び教育対応規範値と比べた少なくとも1つのドメイン (但し必ずしもエピソード記憶ではない) における認知障害；2つ以上の認知ドメインにおける障害は許容される。
 - c) 機能的能力の非依存性の維持、但しこの基準はまた、手段的日常生活動作 (IADL) の遂行における「軽度の問題」も、それが補助ありの場合のみであったとしても容認する (即ち非依存性が強く要求されるというよりむしろ、この基準は機能喪失に起因する軽度の依存性を許容する)。
 - d) 認知症がない、これは名目上、c (上記) に応じたものとなる。
 - e) 他の潜在的に認知症性の障害がない場合のADの表現型と一致する臨床像。以下によって診断の確信度を高めることが推奨され得る。
- 1) 最適：陽性Aβバイオマーカー及び陽性変性バイオマーカー
 - 2) 最適未満：
 - i. 陽性Aβバイオマーカー、変性バイオマーカーなし
 - ii. 陽性変性バイオマーカー、Aβバイオマーカー検査なし

【0163】

AD認知症の診断には、以下が必要である：

- a) 認知及び機能の個人内低下によって決定されたとおりの認知症の存在。
- b) 潜行性発症及び進行性認知低下。
- c) 2つ以上の認知ドメインにおける障害；健忘症症状が最も一般的であるが、この基準では、非健忘症症状 (例えば、実行機能及び視空間能力の障害) に基づく診断も許容される。
- d) 他の認知症障害に関連する顕著な特徴がないこと。
- e) 上記のADに起因するMCIの節で考察したバイオマーカーアルゴリズムによって診断の確信度を高めることが推奨され得る。

【0164】

ADに起因するMCI及びAD認知症の診断における認知障害及び低下は、例えば、以下を使用した、疾患の臨床ステージの変化を追跡する高感度認知尺度を使用して測定されてもよい：

- a) 臨床認知症評価 (CDR) 尺度－評価項目合計 (SOB)。CDRは、認知及び機能的遂行を判定する全般的評価基準であり、ADの臨床研究で広く用いられている (Mor

r i s J C, 1993)。この尺度は、6つのドメイン：記憶、見当識、判断力と問題解決、社会適応、家庭状況及び趣味、並びにセルフケアを評価する。各ドメインにスコアが割り当てられ、それらを合計して評価項目合計（SOB）スコアが求められる；

b) アーバンス神経心理検査（RBANS）。RBANS（Randolph C, 1998）は、診断目的及び神経認知状態の経時的変化の追跡の両方に向けて特別に設計された臨床ツールである。このバッテリーの主要な設計目標の1つは、最軽度認知症を検出して特徴付けることである；又は

c) 日常認知尺度（ECog）。ECogは、6つの認知に関連性のあるドメイン：日常記憶、日常言語、日常視空間能力、日常計画、日常秩序維持、及び日常注意散漫を含む39項目で構成される認知に関連性のある日常生活能力を測定する（Farias ST et al., 2008）。 10

【0165】

ADに起因するMCI及びAD認知症の診断に用いるのに好適なAβバイオマーカーには、例えば、上記に記載したとおり、CSF Aβ1-40、Aβ1-42又は脳βアミロイド老人斑のPETイメージングが含まれる。

【0166】

ADに起因するMCI及びAD認知症の診断に用いるのに好適な変性バイオマーカーは、発症前ADの発症又は進行の遅延の評価に用いられるインビボ分子バイオマーカーに関連して上記に記載され、例えば、基礎タウ病変への効果；ニューロングルコース代謝への効果；又は脳容積損失の低下の緩徐化が挙げられる。 20

【0167】

本明細書で使用されるとき、用語「患者」は、ヒト対象を指す。

【0168】

本明細書で使用されるとき、用語「アルツハイマー病の臨床症状を発症するリスクがある患者」は、以下を指す：

(a) アルツハイマー病の臨床症状を発症する遺伝的素因を有するヒト対象、例えば、

i. アミロイド前駆体タンパク質（APP）若しくはプレセニリン-1及び-2の遺伝子に突然変異を保有する対象（O'Brien RJ, Wong PC, 2011）、又は

ii. ApoE4アレルの1つ又は2つのコピーを保有する対象（Liu CC et al., 2013）、 30

(b) ダウン症候群のヒト対象（Head E et al., 2012）、又は

(c) 84歳超のヒト対象。

【0169】

本明細書で使用されるとき、用語「アミロイド陽性」は、検出可能なレベルの蓄積したAβを脳に有する患者を指す。一実施形態において、CSF中のAβ若しくはアミロイドPETイメージング、又は両方の評価に基づき患者が検出可能なレベルの蓄積したAβを脳に有する場合、その患者は、「アミロイド陽性」である。本明細書で使用されるとき、用語「PETによって決定されるアミロイド陽性」は、バックグラウンドと比較したアミロイドPETトレーサー貯留レベルの増加を指す。アミロイド陽性の測定に好適なPETトレーサーとしては、¹⁸F-フロルベタピル（Palmqvist S et al., 2015）、¹⁸F-フロルベタベン（Neuraceq）及び¹⁸F-フルテメタモル（Vizamy1）が挙げられる。例えば、脳¹⁸F-フロルベタピルPETスキャン（各スキャンにつき260MBq）に関する1.1以上のSUVRをアミロイド陽性診断閾値として使用してもよい（Schreiber S et al., 2015）。1.2又は1.3のSUVRも閾値として使用することができる。 40

【0170】

本明細書で使用されるとき、用語「CSF測定によって決定されるアミロイド陽性」は、健常対照群で観察されるものと比較したCSF Aβ1-42値の減少を指す。例えば、アミロイド陽性は、CSF中192ng/L以下のAβ1-42値によって決定されて 50

もよい (Mattsson N et al., 2015)。しかしながら、アミロイド陽性の決定に使用されるCSF A β 1-42カットオフ値は、用いられる詳細な技法に応じて変わることになる (Forlenza OV et al., 2015)。アミロイド陽性はまた、CSF中0.09未満のA β 1-42/A β 1-40比によって決定されてもよい (Janelidze S et al., 2016)。一実施形態において、A β 1-42/A β 1-40比又はA β 42/A β 40比は、0.20、0.15、0.10、0.09、0.08、0.07、0.06又は0.05未満又は0.20~0.01、0.15~0.01、0.10~0.01、又は0.05~0.01である。A β 1-40及びA β 1-42値は、例えば、Luminexプラットフォームでのモノクローナルシングül抗体サンドイッチ酵素結合免疫吸着 (ELISA) アッセイ (Herskovitz AZ et al., 2013) 又はMeso Scale Discovery (MSD) 96ウェルMULTI-ARRAYヒト/げっ歯類 (6E10) A β 40及び42サンドイッチイムノアッセイ (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA) を使用した標準的なイムノアッセイ技法を用いて測定し得る。

10

【0171】

本明細書で使用されるとき、用語「CYP3A4」は、シトクロムP450 3A4を指す。CYP3A4は、多様な薬物の代謝において主要な役割を果たす酵素である (Luo G et al., 2004)。

【0172】

本明細書で使用されるとき、用語「CYP3A4の誘導薬」は、CYP3A4活性レベルを増加させる薬物を指す。CYP3A4誘導薬の例としては、限定はされないが、カルバマゼピン、フェニトイン、リファンピシン、及びセント・ジョーンズ・ワートが挙げられる。CYP3A4活性の測定に好適な技法は周知である (例えば、Sevrioukova IF and Poulos TL, 2015を参照されたい)。CYP3A4の「強力な」、「中程度の」、及び「弱い」誘導薬は、化合物1の血漿曲線下面積 (AUC) (0~無限大の曲線下面積 (AUC_{inf}) として計算する) をそれぞれ $\geq 80\%$ 、 $\geq 50\% \sim < 80\%$ 、及び $\geq 20\% \sim < 50\%$ だけ低下させる薬物である。一実施形態において、「CYP3A4の誘導薬」は、「CYP3A4の強力な誘導薬」である。CYP3Aの強力な誘導薬の例としては、限定はされないが、カルバマゼピン、エンザルタミド、ミトタン、フェニトイン、リファンピン (別名リファンピシン)、及びセント・ジョーンズ・ワートが挙げられる。CYP3Aの中程度の誘導薬の例としては、限定はされないが、ボセンタン、エファビレンツ、エトラビリン、及びモダフィニルが挙げられる。CYP3Aの弱い誘導薬の例としては、限定はされないが、アルモダフィニル及びルフィナミドが挙げられる。<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#table3-3> (最終表示日2016年10月11日) を参照されたい。

20

30

【0173】

本明細書で使用されるとき、用語「CYP3A4の阻害薬」は、CYP3A4活性レベルを低下させる薬物を指す。CYP3A4活性の測定に好適な技法は周知である (例えば、Sevrioukova IF and Poulos TL, 2015を参照されたい)。CYP3A4阻害薬の例としては、限定はされないが、クラリスロマイシン、グレープフルーツジュース、及びイトラコナゾールが挙げられる。CYP3A4の「強力な」、「中程度の」、及び「弱い」阻害薬は、化合物1の血漿AUC (0~無限大の曲線下面積 (AUC_{inf}) として計算する) をそれぞれ ≥ 5 倍、 $\geq 2 \sim < 5$ 倍、及び $\geq 1.25 \sim < 2$ 倍増加させる薬物である。一実施形態において「CYP3A4の阻害薬」は、「CYP3A4の強力な阻害薬」である。CYP3Aの強力な阻害薬の例としては、限定はされないが、ボセプレビル、コビシスタット、コニバプタン、ダノプレビル及びリトナビル、エルビテグラビル及びリトナビル、グレープフルーツジュース、インジナビル及びリト

40

50

ナビル、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ロピナビル及びリトナビル、パリタプレビル及びリトナビル及び（オムビタスビル及び／又はダサブビル）、ポサコナゾール、リトナビル、サキナビル及びリトナビル、テラプレビル、チプラナビル及びリトナビル、トロレアンドマイシン、ポリコナゾール、クラリスロマイシン、ジルチアゼム、イデラリシブ、ネファゾドン、及びネルフィナビルが挙げられる。CYP3Aの中程度の阻害薬の例としては、限定はされないが、アプレピタント、シメチジン、シプロフロキサシン、クロトリマゾール、クリゾチニブ、シクロスポリン、ドロネダロン、エリスロマイシン、フルコナゾール、フルボキサミン、イマチニブ、トフィソパム、及びベラパミルが挙げられる。CYP3Aの弱い阻害薬の例としては、限定はされないが、クロルゾキサゾン、シロスタゾール、ホスアプレピタント、イストラデフィリン、アイバカフトール、ロミタピド、ラニチジン、ラノラジン、タクロリムス、及びチカグレロルが挙げられる。<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#table3-2>（最終表示日2016年10月11日）を参照されたい。

10

【0174】

本明細書で使用されるとき、用語「CYP3A4の阻害薬又は誘導薬で同時に治療される」は、患者がCYP3A4の阻害薬又は誘導薬による治療レジメンに供される一方で化合物1による治療レジメンにも供される状況を指す。一実施形態において、患者は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16週間より長くCYP3A4の阻害薬又は誘導薬と化合物1とで同時に治療されることはない。別の実施形態において、患者は、1、2、3、4、5、7、10、又は12ヵ月より長くCYP3A4の阻害薬又は誘導薬と化合物1とで同時に治療されることはない。特定の実施形態において、患者は、3ヵ月より長くCYP3A4の阻害薬又は誘導薬と化合物1とで同時に治療されることはない。

20

【0175】

本明細書で使用されるとき、用語「薬学的に許容可能な塩」は、本発明の化合物の生物学的有効性を保持し、且つ典型的には生物学的に又は他に望ましくないものでない塩を指す（Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 2nd Revised Edition (2011) P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth）。

30

【0176】

本明細書で使用されるとき、「医薬組成物」は、経口投与に好適な固体形態（典型的にはゼラチンカプセル）で、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体とを含む。

【0177】

本発明の化合物の「治療有効量」という用語は、開始時ベースライン値と比べたCSF又は血漿A β 1-40レベルの減少から明らかなおりの患者のBACE-1の阻害を誘発することになる本発明の化合物の量を指す。

【0178】

明確にするため、本明細書に範囲が提供されるときには常に、前記範囲が端点を含むことが意図される。例えば、1日30～50mgの用量範囲は、1日30及び50mgの用量も含む。

40

【0179】

【表 2】

略語一覧

略語	説明	
APP	アミロイド前駆体タンパク質	
A β	β -アミロイドペプチド	
aq.	水溶液	
AUC	曲線下面積、化合物曝露の記述に用いられる	
AUEC	効果曲線下面積、経時的効果の記述に用いられる	10
A β 40	β -アミロイドペプチド 40	
A β 42	β -アミロイドペプチド 42	
A β 1-40	β -アミロイドペプチド 1-40	
A β 1-42	β -アミロイドペプチド 1-42	
BACE-1	β 部位 APP 切断酵素-1	
BACE-2	β 部位 APP 切断酵素-2	
BACE	β 部位 APP 切断酵素	
BLQ	定量限界未満	
Boc ₂ O	ジ- <i>tert</i> -ブチルジカーボネート	20
C	濃度	

【 0 1 8 0 】

【表 3】

略語	説明	
CB	臨床生化学	
Cb	小脳試料	
CI	信頼区間	
Comp.	化合物	
conc.	濃縮された	
Cpd	化合物	10
CPP	化学的及び薬学的プロファイリング (部門)	
CSF	脳脊髄液	
CVP	大静脈穿刺血液試料	
d	日	
DCM	ジクロロメタン	
DDI	薬物間相互作用	
DEA	ジエチルアミン	
DMF	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	
DMSO	ジメチルスルホキシド	20
EDC	1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド	
EDTA	エチレンジアミンテトラエチルアセテート(ethylenediamine tetraethyl acetate)	
ESI	エレクトロスプレーイオン化	
EtOAc	酢酸エチル	
FA	脂肪酸	
Fbr	前脳試料	
g	グラム/重力加速度	
GFAP	グリア線維酸性タンパク質(アストロサイトマーカー)	
h, hr	時間	30
HOAt	1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール	
HPLC, LC	高速液体クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー	
IBA1	イオン化カルシウム結合アダプター分子 1 (ミクログリアマーカー)	
IC ₅₀	阻害濃度 50	
kg	キログラム	
LLOQ	定量下限	
LSmeans	最小二乗平均	
MeOH	メタノール	40
min	分	
ml	ミリリットル	
μl	マイクロリットル	
μM	マイクロモル濃度	
μmol	マイクロモル	
MC	メチルセルロース	
min	分	

【表 4】

略語	説明	
MS	質量分析	
MSD	MesoScale Discovery (イムノアッセイキットの供給業者)	
NaCl	塩化ナトリウム	
nM	ナノモル濃度	
nmol	ナノモル	
NMR	核磁気共鳴分光法	10
ns	有意差なし	
PD	薬力学的	
PET	陽電子放射断層撮影	
pg	ピコグラム	
PK	薬物動態学的	
PMEL	プレメラノソームタンパク質	
pmol	ピコモル	
p.o.	経口	
q.d.又は QD	毎日	20
q.s.	適量	
Rel.	相対	
Rf	保持係数	
rpm	毎分回転数	
Rt	保持時間(分)	
RT, rt	室温	
SEM	平均値の標準誤差	
SD	標準偏差	
Stats	統計	30
Swe	スウェーデン型、APP の「スウェーデン型」二重突然変異の存在を示す	
t _{1/2}	半減期	
TBME	tert-ブチルメチルエーテル	
THF	テトラヒドロフラン	
tiss	組織	
TLC	薄層クロマトグラフィー	
Tris	トリスヒドロキシメチル(アミノメタン)緩衝物質	
TBS	トリス緩衝生理食塩水	40
TX-100	triton-X-100 (界面活性剤、CAS 番号 9002-93-1)	
UPLC	超高性能液体クロマトグラフィー	
vs	対	

【実施例】

【0182】

以下の実施例は、どのように化合物 1 を調製し得るかを例示し（実施例 1）；比較化合物 NB-360 で観察される望ましくない毛髪変色の副作用なしに野生型マウスの A β レベルを減少させるのに化合物 1 が有効であることを実証し（実施例 2）；APOE4 トランスジェニックマウスモデルで化合物 1 の PK/PD 効果を明らかにし（実施例 3）；フ

ファースト・イン・ヒューマン臨床試験で化合物1のPD効果を明らかにし（実施例4）；3ヵ月臨床試験で化合物1の安全性及び忍容性を実証し（実施例5）；3ヵ月臨床試験で化合物1 PD応答に対するApoE4遺伝子型の効果を明らかにし（実施例6）；APP23 ADマウスモデルでアミロイドプラークの数及び面積の減少における化合物1の治療有効性を実証し（実施例7）；ApoE4ホモ接合体リスク患者において化合物有効性試験をどのように実施し得るかを例示し（実施例8）；CYP3A4の強力な阻害薬又は誘導薬と併用して投与したとき化合物1のAUCがどのように影響を受けるかを明らかにし（実施例9）；及びApoE4保因患者及び非保因患者の両方で化合物1による治療が基礎AD病変にどのように影響を与えるかを実証する（実施例10）。

【0183】

実施例1：化合物1の調製

化合物1の調製については、国際公開第2012/095469 A1号パンフレット（実施例34）に記載される。化合物1はまた、以下に記載するとおり調製されてもよい。

【0184】

NMR法

プロトンスペクトルは、特に注記されない限り、Bruker 400MHz ultrashield分光計で記録する。化学シフトは、メタノール（ δ 3.31）、ジメチルスルホキシド（ δ 2.50）、又はクロロホルム（ δ 7.29）に対するppm単位で報告する。少量の乾燥試料（2～5mg）を適切な重水素化溶媒（0.7mL）に溶解する。シミングは、自動化され、スペクトルは、当業者に周知の手順に従って得られる。

【0185】

一般的クロマトグラフィー情報

HPLC方法H1（ R_{tH1} ）：

HPLC－カラム寸法：3.0 x 30mm

HPLC－カラムタイプ：Zorbax SB-C18, 1.8 μ m

HPLC－溶出液：A）水+0.05vol.-%TFA；B）ACN+0.05vol.-%TFA

HPLC－グラジエント：30－100%B 3.25分，流量=0.7ml/分

LCMS方法H2（ R_{tH2} ）：

HPLC－カラム寸法：3.0 x 30mm

HPLC－カラムタイプ：Zorbax SB-C18, 1.8 μ m

HPLC－溶出液：A）水+0.05vol.-%TFA，B）ACN+0.05vol.-%TFA

HPLC－グラジエント：B10－100%B 3.25分，流量=0.7ml/分

UPLCMS方法H3（ R_{tH3} ）：

HPLC－カラム寸法：2.1 x 50mm

HPLC－カラムタイプ：Acquity UPLCHSS T3, 1.8 μ m

HPLC－溶出液：A）水+0.05vol.-%ギ酸+3.75mM酢酸アンモニウム
B）ACN+0.04vol.-%ギ酸

HPLC－グラジエント：2－98%B 1.4分，98%B 0.75分，流量=1.2ml/分

HPLC－カラム温度：50℃

LCMS方法H4（ R_{tH4} ）：

HPLC－カラム寸法：3.0 x 30mm

HPLC－カラムタイプ：Zorbax SB-C18, 1.8 μ m

HPLC－溶出液：A）水+0.05vol.-%TFA；B）ACN+0.05vol.-%TFA

HPLC－グラジエント：70－100%B 3.25分，流量=0.7ml/分

LCMS方法H5（ R_{tH5} ）：

10

20

30

40

50

HPLC-カラム寸法：3.0 x 30 mm

HPLC-カラムタイプ：Zorbax SB-C18, 1.8 μm

HPLC-溶出液：A) 水+0.05 Vol.-% TFA; B) ACN+0.05 Vol.-% TFA

HPLC-グラジエント：80-100% B 3.25分, 流量=0.7 ml/分

LCMS方法H6 (Rt_{H6}):

HPLC-カラム寸法：3.0 x 30 mm

HPLC-カラムタイプ：Zorbax SB-C18, 1.8 μm

HPLC-溶出液：A) 水+0.05 Vol.-% TFA; B) ACN+0.05 Vol.-% TFA

HPLC-グラジエント：40-100% B 3.25分, 流量=0.7 ml/分

【0186】

a) 2-ブロモ-5-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン

370 ml THF中ジイソプロピルアミン (25.3 g, 250 mmol) の溶液を-75℃のドライアイスアセトン浴で冷却した。温度を-50℃未満に維持しながら BuLi (100 ml, 250 mmol, ヘキサン中 2.5 M) を滴下して加えた。混合物の温度が再び-75℃に達した後、45 ml THF中 2-ブロモ-5-フルオロピリジン (36.7 g, 208 mmol) の溶液を滴下して加えた。この混合物を-75℃で1時間攪拌した。トリエチルクロロシラン (39.2 g, 260 mmol) を速やかに加えた。温度は、-50℃未満のままであった。冷却浴を除去し、反応混合物を-15℃に温まるまで放置し、NH₄Cl 水溶液 (10%) に注いだ。TBMEを加え、層を分離させた。有機層をブラインで洗浄し、MgSO₄・H₂Oで乾燥させ、ろ過して蒸発させると、褐色の液体が得られ、これを0.5 mmHgで蒸留させて表題化合物を淡黄色の液体 (b.p. 105~111℃) として得た。HPLC: Rt_{H4} = 2.284 min; ESIMS: 290, 292 [(M+H)⁺, 1 Br]; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.14 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 1.00-0.82 (m, 15H).

【0187】

b) 1-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-エタノン

500 ml THF中ジイソプロピルアミン (25.4 g, 250 mmol) の溶液を-75℃に冷却した。温度を-50℃未満に維持しながら BuLi (100 ml, 250 mmol, ヘキサン中 2.5 M) を滴下して加えた。反応温度が再び-75℃に達した後、60 ml THF中 2-ブロモ-5-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン (56.04 g, 193 mmol) の溶液を滴下して加えた。この混合物をドライアイス浴中で70分間攪拌した。N,N-ジメチルアセトアミド (21.87 g, 250 mmol) を速やかに加え、反応温度が-57℃に上昇した。この反応混合物をドライアイス浴中で15分間攪拌し、次に-40℃に温まるまで放置した。これを2 M HCl 水溶液 (250 ml, 500 mmol)、250 ml 水及び100 ml ブラインの混合物に注いだ。この混合物をTBMEで抽出し、ブラインで洗浄し、MgSO₄・H₂Oで乾燥させ、ろ過して蒸発させると、黄色の油が得られ、これをシリカゲルカラムでヘキサン/0~5% TBMEによる溶出によって精製して58.5 gの表題化合物を黄色の液体として得た。TLC (Hex/TBME 99/1): R_f = 0.25; HPLC: Rt_{H4} = 1.921 min; ESIMS: 332, 334 [(M+H)⁺, 1 Br]; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.57 (d, 1H), 2.68 (s, 3H), 1.00-0.84 (m, 15H).

【0188】

c) (S)-2-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-2-トリメチルシラニルオキシ-プロピオニトリル

最初は、100 ml 乾燥DCM中に水 (54 mg, 3.00 mmol) を溶解させるこ

10

20

30

40

50

とにより触媒溶液を調製した ($\leq 0.001\%$ 水)。この湿潤 DCM (44 ml、1.32 mmol 含水量) を 20 ml 乾燥 DCM 中チタン (IV) ブトキシド (500 mg、1.47 mmol) の十分に攪拌した溶液に加えた。得られた澄明な溶液を 1 時間還流した。次に、この溶液を室温に冷却し、2, 4-ジ-tert-ブチル-6-[[(E)- (S)-1-ヒドロキシメチル-2-メチル-プロピルイミノ]-メチル]-フェノール [CAS 155052-31-6] (469 mg、1.47 mmol) を加えた。得られた黄色の溶液を室温で 1 時間攪拌した。この触媒溶液 (0.023 M、46.6 ml、1.07 mmol) を 223 ml 乾燥 DCM 中 1-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-エタノン (35.53 g、107 mmol) 及びシアン化トリメチルシリル (12.73 g、128 mmol) の溶液に加えた。この混合物を 2 日間攪拌し、蒸発させて、47 g の粗表題化合物をオレンジ色の油として得た。HPLC: $R_{t_{H_5}} = 2.773 \text{ min}$; ESI-MS: 431, 433 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.46 (d, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.00 (t, 9H), 1.03-0.87 (m, 15H), 0.20 (s, 9H).

10

【0189】

d) (R)-1-アミノ-2-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-プロパン-2-オールヒドロクロリド

ボラン・硫化ジメチル錯体 (16.55 g、218 mmol) を 470 ml THF 中の粗 (S)-2-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-2-トリメチルシラニルオキシ-プロピオニトリル (47 g、109 mmol) の溶液に加えた。この混合物を 2 時間還流した。加熱浴を除去し、MeOH を慎重に滴下して加えることにより反応混合物をクエンチした。気体の発生が止んだ後、6 M HCl 水溶液 (23.6 ml、142 mmol) をゆっくりと加えた。得られた溶液を蒸発させて、残渣を MeOH 中に溶解して蒸発 (2 回) させて、以降の反応に十分な純度の 44.5 g の黄色の泡を得た。HPLC: $R_{t_{H_1}} = 2.617 \text{ min}$; ESI-MS: 363, 365 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.93 (s, br, 3H), 7.53 (d, 1H), 6.11 (s, br, 1H), 3.36-3.27 (m, 1H), 3.18-3.09 (m, 1H), 1.53 (s, 3H), 0.99-0.81 (m, 15H).

20

30

【0190】

e) (R)-N-(2-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-(トリエチルシリル)ピリジン-2-イル)-2-ヒドロキシプロピル)-4-ニトロベンゼンスルホンアミド

335 ml THF 中の粗 (R)-1-アミノ-2-(6-ブロモ-3-フルオロ-4-トリエチルシラニル-ピリジン-2-イル)-プロパン-2-オールヒドロクロリド (43.5 g、109 mmol) の溶液に 500 ml 水中 NaHCO₃ (21.02 g、250 mmol) の溶液を加えた。この混合物を 0~5℃ に冷却し、100 ml THF 中 4-ニトロベンゼンスルホンクロリド (26.5 g、120 mmol) の溶液を滴下して加えた。温度を室温に到達させながら得られたエマルションを一晩攪拌した。この混合物を TBME で抽出した。有機層を MgSO₄・H₂O で乾燥させ、ろ過して蒸発させると、オレンジ色の樹脂が得られ、これをシリカゲルカラムでヘキサン/10~20% EtOAc による溶出により精製して、37.56 g の表題化合物を黄色の樹脂として得た。TLC (Hex/EtOAc 3/1): $R_f = 0.34$; HPLC: $R_{t_{H_4}} = 1.678 \text{ min}$; ESI-MS: 548, 550 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 8.40 (d, 2H), 8.06 (t, 1H), 7.97 (d, 2H), 7.45 (d, 1H), 5.42 (s, 1H), 3.23 (d, 2H), 1.44 (s, 3H) 0.97-0.81 (m, 15H); Chiral HPLC (Chiralpak AD-H 1213, UV 210 nm): 90% ee.

40

【0191】

f) 6-ブロモ-3-フルオロ-2-[(S)-2-メチル-1-(4-ニトロ-ベンゼ

50

ンスルホニル) - アジリジン - 2 - イル] - 4 - トリエチルシラニル - ピリジン

510 ml THF 中トリフェニルホスフィン (21.55 g、82 mmol) 及び (R) - N - (2 - (6 - ブロモ - 3 - フルオロ - 4 - (トリエチルシリル) ピリジン - 2 - イル) - 2 - ヒドロキシプロピル) - 4 - ニトロベンゼンスルホンアミド (37.56 g、69 mmol) の溶液を 4 °C に冷却した。温度を 10 °C 未満に維持しながらトルエン中アゾジカルボン酸ジエチルの溶液 (40 重量%、38.8 g、89 mmol) を滴下して加えた。冷却浴を除去し、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。この反応混合物を約 1000 ml トルエンで希釈し、ロータリーエバポレータにおける蒸発によって THF を除去した。得られた粗生成物のトルエン溶液をシリカゲルカラムでヘキサン / 5 ~ 17 % EtOAc による溶出により予め精製した。最も純粋な画分を合わせ、蒸発させ、TBME / ヘキサンから結晶化させて、29.2 g の表題化合物を白色の結晶として得た。HPLC: $R_{tH4} = 2.546 \text{ min}$; ESI-MS: 530, 532 $[(M+H)^+]$, 1 Br; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.40 (d, 2H), 8.19 (d, 2H), 7.39 (d, 1H), 3.14 (s, 1H), 3.02 (s, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.03 - 0.83 (m, 15H); $\alpha [D] - 35.7^\circ$ (c = 0.97, DCM).

10

【0192】

g) 6 - ブロモ - 3 - フルオロ - 2 - [(S) - 2 - メチル - 1 - (4 - ニトロ - ベンゼンスルホニル) - アジリジン - 2 - イル] - ピリジン

フッ化カリウム (1.1 g、18.85 mmol) を 25 ml THF 中 6 - ブロモ - 3 - フルオロ - 2 - [(S) - 2 - メチル - 1 - (4 - ニトロ - ベンゼンスルホニル) - アジリジン - 2 - イル] - 4 - トリエチルシラニル - ピリジン (5 g、9.43 mmol) 及び AcOH (1.13 g、9.43 mmol) の溶液に加えた。DMF (35 ml) を加え、懸濁液を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を NaHCO_3 飽和水溶液及び TBME の混合物に注いだ。層を分離し、ブライン及び TBME で洗浄した。合わせた有機層を $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ で乾燥させ、ろ過して蒸発させると、黄色の油が得られ、これを TBME / ヘキサンから結晶化させて、3.45 g の表題化合物を白色の結晶として得た。HPLC: $R_{tH6} = 2.612 \text{ min}$; ESI-MS: 416, 418 $[(M+H)^+]$, 1 Br; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.41 (d, 2H), 8.19 (d, 2H), 7.48 (dd, 1H), 7.35 (t, 1H), 3.14 (s, 1H), 3.03 (s, 1H), 2.04 (s, 3H); $\alpha [D] - 35.7^\circ$ (c = 0.89, DCM).

20

30

【0193】

h) (R) - 2 - [(R) - 2 - (6 - ブロモ - 3 - フルオロ - ピリジン - 2 - イル) - 2 - (4 - ニトロ - ベンゼンスルホニルアミノ) - プロポキシ] - 3, 3, 3 - トリフルオロ - 2 - メチル - プロピオン酸エチルエステル

DMF (158 ml) 中 (R) - 3, 3, 3 - トリフルオロ - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - プロピオン酸エチルエステル (11.93 g、64.1 mmol) の溶液の真空排気 / 窒素フラッシュを 2 回行った。水浴による冷却を用いて約 25 °C の反応温度を維持しながら DMF (17 ml) 中 KOtBu (6.21 g、55.5 mmol) の溶液を滴下して加えた。15 分後、固体の 6 - ブロモ - 3 - フルオロ - 2 - [(S) - 2 - メチル - 1 - (4 - ニトロ - ベンゼンスルホニル) - アジリジン - 2 - イル] - ピリジン (17.78 g、42.7 mmol) を加え、攪拌を 3 時間継続した。この反応混合物を 1 M HCl (56 ml)、ブライン及び TBME の混合物に注いだ。層を分離し、ブライン及び TBME で洗浄した。合わせた有機層を $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ で乾燥させ、ろ過して蒸発させた。粗反応生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン / 25 ~ 33 % TBME) によって精製すると 16.93 g の表題化合物が黄色の樹脂として得られ、これは、異性体副生成物により不純であった ($^1\text{H-NMR}$ によるとき 70 : 30 比)。

40

HPLC: $R_{tH6} = 2.380 \text{ min}$; ESI-MS: 602, 604 $[(M+H)^+]$, 1 Br; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.32 (d, 2H), 8.0

50

7 (d, 2H), 7.46–7.41 (m, 1H), 7.30–7.23 (m, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.39–4.30 (m, 2H), 3.95 (d, 1H), 3.84 (d, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.40–1.34 (m, 3H) + 異性体副生成物.

【0194】

i) (R)–2–[(R)–2–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2–(4–ニトロ–ベンゼンスルホニルアミノ)–プロポキシ]–3, 3, 3–トリフルオロ–2–メチル–プロピオンアミド

NH₃/MeOH (7M、482ml) 中 (R)–2–[(R)–2–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2–(4–ニトロ–ベンゼンスルホニルアミノ)–プロポキシ]–3, 3, 3–トリフルオロ–2–メチル–プロピオン酸エチルエステル (16.93g、28.1mmol) の溶液を密閉容器内において 50℃ で 26 時間攪拌した。この反応混合物を蒸発させ、残渣を DCM から結晶化させて、9.11g の表題化合物を無色の結晶として得た。

HPLC: Rt_{H6} = 2.422min; ESIMS: 573, 575 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 8.33 (d, 2H), 8.06 (d, 2H), 7.42 (dd, 1H), 7.30–7.26 (m, 1H), 7.17 (s, br, 1H), 6.41 (s, 1H), 5.57 (s, br, 1H), 4.15 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.65 (s, 3H).

【0195】

j) N–[(R)–1–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2–((R)–1–シアノ–2, 2, 2–トリフルオロ–1–メチル–エトキシ)–1–メチル–エチル]–4–ニトロ–ベンゼンスルホンアミド

85ml DCM 中 (R)–2–[(R)–2–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2–(4–ニトロ–ベンゼンスルホニルアミノ)–プロポキシ]–3, 3, 3–トリフルオロ–2–メチル–プロピオンアミド (8.43g、14.70mmol) 及びトリエチルアミン (5.12ml、36.8mmol) の懸濁液を 0–5℃ に冷却した。無水トリフルオロ酢酸 (2.49ml、17.64mmol) を 30 分かけて滴下して加えた。更なるトリエチルアミン (1.54ml、11.07mmol) 及び無水トリフルオロ酢酸 (0.75ml、5.29mmol) を加えて反応を完了させた。14ml アンモニア水 (25%) 及び 14ml 水を加えることにより反応混合物をクエンチした。このエマルションを 15 分間攪拌し、更なる水及び DCM を加え、層を分離した。有機層を MgSO₄・H₂O で乾燥させ、ろ過して蒸発させた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/10–25% EtOAc) による精製により、8.09g の表題化合物を黄色の樹脂として得た。

HPLC: Rt_{H6} = 3.120min; ESIMS: 555, 557 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 8.35 (d, 2H), 8.11 (d, 2H), 7.50 (dd, 1H), 7.32 (dd, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.39 (d, 1H), 4.22 (d, 1H), 1.68 (s, 6H).

【0196】

k) (2R, 5R)–5–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4] オキサジン–3–イルアミン

92ml エタノール中 N–[(R)–1–(6–ブロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2–((R)–1–シアノ–2, 2, 2–トリフルオロ–1–メチル–エトキシ)–1–メチル–エチル]–4–ニトロ–ベンゼンスルホンアミド (9.18g、16.53mmol) 及び N–アセチルシステイン (5.40g、33.10mmol) の溶液を真空排気し、窒素でフラッシュした。K₂CO₃ (4.57g、33.1mmol) を加え、混合物を 80℃ で 3 日間攪拌した。反応混合物を元の容積の約 1/4 になるまで真空濃縮し、水と TBME とに分配した。有機層を 10% K₂CO₃ 水溶液で洗浄し、N

a_2SO_4 で乾燥させ、ろ過して蒸発させると、黄色の油が得られた。シリカカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／14～50%（EtOAc：MeOH 95：5））により、4.55 gの表題化合物をオフホワイトの固体として得た。

HPLC： $R_{tH2} = 2.741 \text{ min}$ ；ESIMS：370, 372 $[(M+H)^+]$, 1Br⁺； ^1H -NMR（400 MHz, DMSO- d_6 ）：7.71–7.62 (m, 2H), 5.97 (s, br, 2H), 4.02 (d, 1H), 3.70 (d, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.47 (s, 3H)。

【0197】

l) (2R, 5R)–5–(6–アミノ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イルアミン

ガラス／ステンレス鋼オートクレーブを窒素でパージし、エチレングリコール（130 ml）中 Cu_2O （0.464 g、3.24 mmol）、アンモニア（101 ml、25%、aq.、648 mmol、30当量）及び（2R, 5R）–5–（6–プロモ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル）–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イルアミン（8 g、21.6 mmol）を加えた。オートクレーブを閉じ、懸濁液を60℃に加熱し、溶液を約48時間攪拌した（最大圧力0.7バール、内部温度59～60℃）。反応混合物を酢酸エチル及び水で希釈した。有機相を水で洗浄し、12%アンモニア水で4回洗浄し、及び最後にブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過して蒸発させた。粗生成物（7 g、幾らかのエチレングリコールを含む、定量的収率）を更なる精製なしに次の工程で使用した。

HPLC： $R_{tH3} = 0.60 \text{ min}$ ；ESIMS：307 $[(M+H)^+]$ 。

【0198】

m) [(2R, 5R)–5–(6–アミノ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イル]–カルバミン酸 tert–ブチルエステル

ジクロロメタン（185 ml）中（2R, 5R）–5–（6–アミノ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル）–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イルアミン（6.62 g、21.6 mmol）、 BoC_2O （4.72 g、21.6 mmol）及びヒューニツヒ塩基（5.66 ml、32.4 mmol）の溶液を室温で18時間攪拌した。反応混合物をNaHCO₃飽和水溶液及びブラインで洗浄した。水層をジクロロメタンで逆抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過して蒸発させると、淡緑色の固体が得られた（14 g）。この粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（シクロヘキサン：酢酸エチル95：5～60：40）にかけて、7.68 gの表題化合物を得た。

TLC（シクロヘキサン：酢酸エチル3：1）： $R_f = 0.21$ ；HPLC： $R_{tH3} = 1.14 \text{ min}$ ；ESIMS：408 $[(M+H)^+]$ ； ^1H -NMR（400 MHz, CDCl₃）：11.47 (br. s, 1H), 7.23 (dd, $J = 10.42, 8.78 \text{ Hz}$, 1H), 6.45 (dd, $J = 8.78, 2.64 \text{ Hz}$, 1H), 4.50 (br. s, 2H), 4.32 (d, $J = 2.38 \text{ Hz}$, 1H), 4.10 (d, $J = 11.80 \text{ Hz}$, 1H), 1.69 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H)。

【0199】

n) ((2R, 5R)–5–{6–[(3–クロロ–5–トリフルオロメチル–ピリジン–2–カルボニル)–アミノ]–3–フルオロ–ピリジン–2–イル}–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イル)–カルバミン酸 tert–ブチルエステル

[(2R, 5R)–5–(6–アミノ–3–フルオロ–ピリジン–2–イル)–2, 5–ジメチル–2–トリフルオロメチル–5, 6–ジヒドロ–2H–[1, 4]オキサジン–3–イル]–カルバミン酸 tert–ブチルエステル（3.3 g、8.12 mmol）

、3-クロロ-5-トリフルオロメチルピコリン酸 (2.2 g、9.74 mmol)、HOAc (1.99 g、14.62 mmol) 及び塩酸EDC (2.33 g、12.18 mmol) の混合物をDMF (81 ml) 中、室温で48時間撹拌した。この反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水及びブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過して蒸発させた。粗生成物 (12 g) をシリカゲルクロマトグラフィー (シクロヘキサン対シクロヘキサン：酢酸エチル1：1) にかけて、5.2 gの表題化合物を得た。

TL C (シリカ、シクロヘキサン：酢酸エチル3：1) : $R_f = 0.47$; HPLC : $R_{t_{H_3}} = 1.40 \text{ min}$; ESI MS : 615, 616 $[(M+H)^+, 1Cl]$; ^1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 11.68 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.81 (dd, $J = 1.82, 0.69 \text{ Hz}$, 1H), 8.45 (dd, $J = 8.91, 3.14 \text{ Hz}$, 1H), 8.19 (dd, $J = 1.88, 0.63 \text{ Hz}$, 1H), 7.59 (dd, $J = 9.79, 9.16 \text{ Hz}$, 1H), 4.38 (d, $J = 2.13 \text{ Hz}$, 1H), 4.18 (d, $J = 11.80 \text{ Hz}$, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.60 (s, 9H).

10

【0200】

o) 3-クロロ-5-トリフルオロメチル-ピリジン-2-カルボン酸 [6-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-トリフルオロメチル-3, 6-ジヒドロ-2H-[1, 4]オキサジン-3-イル)-5-フルオロ-ピリジン-2-イル]-アミド

ジクロロメタン (81 ml) 中 ((2R, 5R)-5-{6-[3-クロロ-5-トリフルオロメチル-ピリジン-2-カルボニル]-アミノ}-3-フルオロ-ピリジン-2-イル)-2, 5-ジメチル-2-トリフルオロメチル-5, 6-ジヒドロ-2H-[1, 4]オキサジン-3-イル)-カルバミン酸tert-ブチルエステル (4.99 g、8.13 mmol) 及びTFA (6.26 ml、81 mmol) の混合物を室温で18時間撹拌した。溶媒を蒸発させて、酢酸エチルなどの好適な有機溶媒及びアンモニア水で残渣を希釈した。氷を加え、有機相を水及びブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、蒸発させて、3.78 gの表題化合物を得た。

20

HPLC : $R_{t_{H_3}} = 0.87 \text{ min}$; ESI MS : 514, 516 $[(M+H)^+, 1Cl]$; ^1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 11.11 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.13 (dd, $J = 8.8, 2.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.80-7.68 (m, 1H), 5.88 (br. s, 2H), 4.12 (d, $J = 11.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.72 (d, $J = 11.4 \text{ Hz}$, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.49 (s, 3H).

30

【0201】

実施例2：野生型マウスにおける化合物1及び比較化合物NB-360の慢性投与

化合物1の特に毛皮の変色に対する慢性治療効果を調べ、野生型マウスにおける有効用量を決定し、及び有効性と毛色変化との間のウィンドウを比較BACE-1阻害薬化合物NB-360 (N-((3-((3R, 6R)-5-アミノ-3, 6-ジメチル-6-(トリフルオロメチル)-3, 6-ジヒドロ-2H-1, 4-オキサジン-3-イル)-4-フルオロフェニル)-5-シアノ-3-メチルピコリンアミド) (Neumann U et al., 2015; 及びShimshek DR et al., 2016) のものと比較するため、本明細書に記載される試験を市販の野生型マウスで行った。

40

【0202】

動物

C57BL/6マウスはCharles River Laboratories、フランスに注文した。

【0203】

化合物製剤化及び投与

化合物1及びNB-360は、懸濁液として製剤化した。媒体、化合物1又はNB-360は10 ml/kgの容積で1日1回 (朝)、8週間にわたって経口投与した。媒体：

50

水中 0.5% メチルセルロース中 0.1% Tween 80。

【0204】

体重及び毛色のスコア付け

体重を週3回（月曜日、水曜日、金曜日）測った。任意の毛髪の色の変化の主観的スコア付けを週1回（水曜日）実施した。スコア（灰色の毛皮の体に対する%）：0：変化なし；1：スポット；2：>30%；3：>50%；4：>75%；5：100%。毛色の変化が観察された場合、動物を写真に撮って記録した。最後の毛色スコア付けは本試験に関与しない人が盲検で行った。

【0205】

エキソビポ試料及び試料採取方法

血液試料は、全血化合物レベルの分析に使用し、生存期間中に尾静脈から EDTA チューブ（CB300、Sarstedt、ドイツ）に採るか、又は剖検日に体幹血液から EDTA エッペンドルフチューブ（Milian SA、CatNo TOM-14、Fisher Scientific、Wohlen、スイス）若しくは血清チューブ（CB300Z、Sarstedt、Nuembrecht、ドイツ）に採るかのいずれかとした。

【0206】

アミロイド-β（Aβ）分析用の血漿を EDTA 血液の遠心（8000rpm/6800×g、15分、4℃）によって収集し、低タンパク質結合性エッペンドルフチューブ（003 0108.116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ）に収集した。

【0207】

室温で20分後、遠心（8000×g、15分、4℃）によって血清を分離し、低タンパク質結合性エッペンドルフチューブに収集して、腎毒性バイオマーカーに関して調べた。全ての血液/血漿/血清試料は、ドライアイスで凍結し、分析時まで-80℃で保存した。

【0208】

断頭後、直ちに脳を摘出し、生理食塩水でリンスし、正中矢状断した。小脳の左半分を化合物レベルの分析に使用し、ガラスチューブ（Chromacol、125×5-SVT051、Welwyn Garden City、英国）に入れ、秤量してドライアイスで凍結し、前脳の左半分（嗅球なし）を Aβ 分析に使用し、金属プレート上にドライアイスで凍結して、低タンパク質結合性チューブ（003 0108.116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ）に入れた。

【0209】

化合物レベルの分析ため腹側及び背側皮膚を採取し、秤量してドライアイスで凍結した。

【0210】

化合物レベルの分析

生体試料の化合物1及びNB-360レベルを血液、脳及び皮膚で液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（HPLC/MS/MS）によって定量化した。脳試料は2容量のKH₂PO₄緩衝液と混合し、Covaris（登録商標）装置を使用してホモジナイズした。皮膚試料は約6倍容量のメタノール/水と混合し、Precellysチューブを使用してホモジナイズした。30μLの血液、脳又は皮膚ホモジネートのいずれも構造的に関連性のある内部標準でスパイクし、続いて少なくとも6倍過剰容量のアセトニトリルと混合してタンパク質を沈殿させた。上清をLC/MS/MSシステムに直接注入して分析にかけた。

【0211】

10

20

30

40

【表 5】

表 2: 血液及び脳試料の機器条件

分析方法	HPLC/MS/MS
MS	Sciex QTrap 5500; ポジティブイオンモードでの加熱エレクトロスプレーイオン化
MS/MS 法	[CHS360]: 450.0 Da $[M+H]^+$ → 292.0 Da / CE 37 eV 化合物 1: 514.0 Da $[M+H]^+$ 140.1/180.1 Da / CE 53/85 eV 内部標準 (IS): 400.0 Da $[M+H]^+$ → 131.0 Da / 55 40 eV
HPLC HPLC カラム	Flux Rheos Allegro (Thermo Scientific / Reinach BL, スイス) Phenomenex Kinetix C8 50*2.1mm, 2.6 μ M (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)
緩衝液 A // 緩衝液 C	A: H ₂ O + 0.1 %ギ酸 // C: アセトニトリル + 0.1 %ギ酸
グラジエント	ポンプ 1: 0.0' 98% A, 2% C // 0.3' 70% A, 30% C // 7.5' 40% A, 60% C // 9.5' 1% A, 99% C // 10.25' 1% A, 99% C // 10.3' 99% A, 1% C // 12.3' 99% A, 1% C. 流量 300-350 μ l/分

10

20

【 0 2 1 2 】

【表 6】

表 3: 皮膚試料の機器条件

分析方法	HPLC/MS/MS
MS	TSQ Quantum ultra (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.); ポジティブイオンモードでの加熱エレクトロスプレーイオン化
MS/MS 法	[CHS360]: 450.0 Da $[M+H]^+ \rightarrow 116.9$ Da / CE 43 eV 化合物 1: 514.0 Da $[M+H]^+ \rightarrow 375.0$ Da / CE 28 eV 内部標準 (IS) 400.0 Da $[M+H]^+ \rightarrow 131.0$ Da / CE 40 eV
HPLC HPLC カラム	Flux Rheos Allegro (Thermo Scientific / Reinach BL, スイス) Synergie Hydro RP 50*2.0mm, 2.5 μ M (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)
緩衝液 C // 緩衝液 D	C: H ₂ O + 0.1 % 酢酸 // D: メタノール + 0.1 % 酢酸
グラジエント	ポンプ 1: 0.0' 90% C, 10% D // 0.1' 90% C, 10% D // 4.5' 20% C, 80% D // 5.5' 2% C, 98% D // 5.6' 2% C, 98% D // 5.7' 90% C, 10% D // 7.0' 90% C, 10% D. 流量 400 μ l/分
各ランの判定基準	校正標準: LLOQ で $\pm 20\%$ 及び他の濃度レベルで $\pm 15\%$ の範囲内の偏り。検量線の両方の端点における少なくとも 1 つの値を含む個別の逆算値の少なくとも 3/4 がこの判定基準を満たす。 クオリティコントロール試料: 個別の値の少なくとも 2/3 について $\pm 30\%$ の範囲内の偏り。各 QC レベルにおける少なくとも 1 つの値がこの判定基準を満たす。 ダイナミックレンジ: 全ての化合物について 0.4~12500 ng/mL

【0213】

マウス脳内 A β 40 の分析
 脳のホモジナイゼーション

凍結マウス前脳を秤量し、9 容量 (w/v) の氷冷 TBS-Complete (20 mM トリス-HCl pH 7.4、137 mM NaCl、1 $\times$ Complete [プロテアーゼ阻害薬カクテル錠: 1836145、Roche Diagnostics GmbH、Penzberg、ドイツ]) 中で音波処理 (90% デューティサイクル、出力制御 5、40~55 パルス、[Sonifier 450、Branson]) によってホモジナイズした。ホモジナイゼーション後、分析用に数個の 50 μ l アリコート調製し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

【0214】

標準としての合成 A β 1-40 溶液の調製

ヒト A β ペプチド (1-40) トリフルオロ酢酸塩 (H1194.1000、Bachem、Bubendorf、スイス) を A β 1-40 の検量線として使用した。これを無水 DMSO (41647、Fluka) に 1 mg/ml の濃度で室温 (RT) において約 30 分間可溶化し、次に完全に可溶化されたことを目視で確認した。

【0215】

残りの溶液の 20 $\times$ 5 μ l アリコート及び 100 μ l アリコートを低結合性チューブ (0030108.094、Eppendorf、Hamburg、ドイツ) に調製し、窒素ガスで覆って A β ペプチドを酸化から保護し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。検量線のために

5 μ l アリコートを一度のみ使用し、次に廃棄した。

【0216】

マウス脳内 A β 40 の決定

マウスの内因性 A β 40 を Meso Scale Discovery (MSD) 96 ウェル MULTI-ARRAY ヒト/げっ歯類 (4G8) A β 40 超高感度アッセイ (#K110FTE-3、Meso Scale Discovery、Gaithersburg、USA) で決定した。このアッセイは、検量線及び試料調製を除いて製造者の指示に従って実施した。各 1:10 前脳ホモジネートの 50 μ l アリコートを使用して Triton X-100 (TX-100) 可溶性 A β 40 を 1% TX-100 で前脳から抽出し、1% TX-100 の最終濃度及び 1:20 前脳希釈度に達するように TBS complete (20 mM トリス-HCl pH 7.4、137 mM NaCl、1 $\times$ Complete [プロテアーゼ阻害薬カクテル錠: 1836145、Roche Diagnostics GmbH、Penzberg ドイツ]) 中 50 μ l 2% TX-100 と混合した。試料を氷上で 15 分間インキュベートし、5 分毎にボルテックスした。試料を超遠心 (100000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、15 分) し、50 μ l の澄明な上清を新しいチューブに移した。A β 40 アッセイについては、上清を更に 1:100 の最終前脳希釈度となるように 3% Blocker A 溶液 (キットからのもの) 中に 1:5 希釈し、プレートに加えた。

10

【0217】

合成 A β 1-40 ペプチド (1.56~100 pg/ml) でスパイクした 1% Blocker A 溶液の対応する希釈物で検量線を作成し、但し非トランスジェニックマウス脳試料は別とした。この場合、検量線は、合成 A β 1-40 ペプチド (1.56~100 pg/ml) でスパイクした、対応して希釈した APP ノックアウトマウス前脳で作成した。全ての試料及び標準について、1 ウェル当たり 25 μ l を加えた。決定毎にデュプリケートウェルを実施した。計算にはデュプリケートウェルからの平均値を使用した。MSD は、定量化ソフトウェアを提供していないため、試料及び標準の相対単位を SOTmax PRO 4.0 にインポートして標準曲線の計算及び試料の定量化を行った。

20

【0218】

結果

NB-360 又は化合物 1 で慢性治療した C57BL/6 マウスの体重及び毛色に対する効果

30

野生型ナীবマウス (C57BL/6) を化合物 1 又は NB360 で 8 週間慢性治療し、3 日毎 (月曜日、水曜日、金曜日) に体重を測定した。全体的に見て媒体と比較した治療群の有意な体重の差を観察することができなかったと共に、56 日目における試験終了時にも有意な差を観察することができなかった。それにも関わらず、治療群について有意な体重増加 (0 日目と 56 日目との体重比較) を観察することができた。

【0219】

試験中、NB-360 で治療したマウスに毛色変化が観察された。C57BL/6 の黒色の毛皮が徐々に斑点状に灰色になった。これらの灰色の斑点は、動物の腹側部に見られ、一方で背側部に影響はなかった。灰色の斑点の出現は、治療 3 週間後に現れ、高用量及び低用量 NB-360 群で異なる程度を呈した。主観的スコア付け方式を実施して毛皮変色を定量化した。NB-360 群の全ての動物が毛皮変色を示した。低用量 NB-360 群 (20 μ mol/kg) は、ごく僅かであるが有意な毛皮スコア変化を示した一方、高用量 NB-360 群 (100 μ mol/kg) は、より重度の深刻な毛色変化を呈した、図 1。注目すべきことに、毛皮変色の広がり及び増加は、5 週間の NB-360 治療後にプラトーに達し、それ以上の変化はなかった。重要なことに、化合物 1 治療群に検出可能な明らかな毛色変化はなかった。

40

【0220】

血液及び組織における曝露

血中の化合物 1 曝露を 1 日目の初回投与後、14 日目の中間時点及び最終投与後の試験

50

終了時に決定した。一貫して、最終日における曝露は、実験の開始時よりも低かった。曝露は、化合物 1 について約 35 % 減少した。

【0221】

種々の組織における $AUC_{0-24 \text{ 時間}}$ として表される最後 24 時間にわたる化合物 1 の曝露を表 4 に要約する。血液について、 AUC は、1、4、7、及び 24 時間時のデータから計算し、並びに「mini」 AUC は、4 及び 24 時間時のデータのみから計算した。これらの 2 つの値の比較は、大きい差を示さない。組織曝露については、4 及び 24 時間時のデータのみが利用可能であった。「mini」 AUC は、組織曝露を十分に代表すると結論付けた。

【0222】

化合物 1 及び NB-360 の両方について、脳内及び皮膚における曝露は、血中よりはるかに高かった、表 4。詳細には、皮膚曝露は、血液曝露より数倍高かった。加えて、特に NB-360 について、皮膚の背側部と比べて腹側部で曝露がより高いように見えた、表 5。全ての組織で曝露の良好な用量比例性があった。

【0223】

【表 7】

表 4: 最終投与後(56 日目)の様々な血液及び脳組織における化合物 $AUC_{0-24 \text{ 時間}}$

化合物	用量 ($\mu\text{mol/kg}$)	$AUC_{\text{血液}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) ^a	$AUC_{\text{血液}}$ ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$) ^b	$AUC_{\text{脳}}$ ($\mu\text{mol/kg}\cdot\text{h}$) ^b	$AUC_{\text{背側皮膚}}$ ($\mu\text{mol/kg}\cdot\text{h}$) ^b	$AUC_{\text{腹側皮膚}}$ ($\mu\text{mol/kg}\cdot\text{h}$) ^b
NB-360	20	6.93	5.60	16.39	46.9 ^c	104.81
	100	35.89	25.26	114.45	294	712.16
化合物 1	8	3.43	3.49	11.61	54.3	78.29
	50	28.93	18.53	88.93	271.6	308.7

^a 1,4,7, 及び 24 時間時点の AUC ; ^b 4 及び 24 時間時点の AUC ; ^c 24 時間について $n=2$

【0224】

【表 8】

表 5: 化合物の血液曝露に対して正規化した組織曝露(低用量及び高用量の平均)

化合物	rel. $AUC_{\text{脳}}$	rel. $AUC_{\text{背側皮膚}}$	rel. $AUC_{\text{腹側皮膚}}$	腹側／背側比
NB-360	2.8	7.5	17.4	2.3
化合物 1	3.2	12.6	16.8	1.3

Rel.: 相対 - $AUC_{\text{血液}}$ に対して正規化

【0225】

マウス脳におけるアミロイド β の低下

試験最終日、最終投与を受けた後 4 時間及び 24 時間で $n=4$ マウス群を犠牲にした。前脳を分離し、 β -アミロイドペプチド 1-40 に関して分析した。媒体群及び治療群の $A\beta_{40}$ 濃度を表 6 にまとめ、図 2 に視覚化する。対応する媒体治療群に対するパーセント減少率を計算した。治療により、最終投与後 4 時間で有意な $A\beta_{40}$ の減少が生じた。化合物 1 は、最終投与後 24 時間もなお媒体と比べて $A\beta_{40}$ の 25 % の減少を示し、しかし、これは有意でなかった。高用量群では、化合物 1 は、最終投与後 24 時間に有意に低いレベルの $A\beta_{40}$ を示した。50 $\mu\text{mol/kg}$ の化合物 1 用量群は、ほぼ平坦なプロファイルを示し、全 24 時間の時間経過にわたって 80 ~ 90 % の $A\beta_{40}$ 減少であった。

【0226】

【表9】

表6: 最終投与後のマウス脳の A β 40 レベルに対する BACE 阻害薬治療の効果(平均値 $\pm$ SD, n=4)

	用量 (μ mol/kg)	時間	平均 A β 40 脳 (pg/g)	%対媒体 減少率	同じ時点の 対媒体 有意性	Mini AUEC (%)
媒体	n.a.	4	1316.1 $\pm$ 338.0	100	n.a.	
媒体	n.a.	24	1469.6 $\pm$ 152.8	100	n.a.	
化合物 1	8	4	432.8 $\pm$ 140.5	67.1	p < 0.01	46.2
化合物 1	8	24	1098.6 $\pm$ 148.7	25.3	n.s.	
化合物 1	50	4	93.4 $\pm$ 83.7	92.9	p < 0.01	88.5
化合物 1	50	24	233.8 $\pm$ 36.5	84.1	p < 0.01	

n.s.: 有意差なし

10

【0227】

20

NB-360 は、BACE-2 と比べて BACE-1 に 1.0 倍の選択性を与える BACE-1 及び BACE-2 酵素阻害インビトロアッセイにより示されるとおり (Neumann U et al., (2015))、二重 BACE-1 / BACE-2 阻害薬である。同じアッセイにおいて、化合物 1 は、BACE-2 と比べて BACE-1 に 3 倍の選択性を有することが分かった。結論として、化合物 1 と NB-360 との間の酵素選択性及び組織分布の中程度のばらつきが、慢性マウス試験における毛髪変色の発生に効果を及ぼすものと考えられる。インビボで活性であるにも関わらず、化合物 1 は、マウスにおいて毛髪変色の徴候を示さなかった。

【0228】

実施例 3: APOE4-TR マウスにおける化合物 1 の急性 PK / PD 用量反応試験

30

ヒト APOE4 コンテキストにおける APP 代謝に対する化合物 1 の効果を調べるため、ヒト APOE4 アレルを保因するトランスジェニックマウスにおける PK / PD 試験を実施した (マウス Apo e 遺伝子をヒト APOE4 に置き換えた; APOE4-TR; (Knouff C et al., 1999))。

【0229】

この試験では、3~5 ヶ月齢の雄及び雌 APOE4-TR 動物を種々の用量 (3、10、30 μ mol / kg) の化合物 1 で急性治療し、治療後 4 及び 24 時間で犠牲にした。

【0230】

動物

雄及び雌トランスジェニックホモ接合 APOE4-TR (B6.129P2-Apo e t m 3 (APOE * 4) Mae N8、Taconic、モデル 001549、3~5 ヶ月齢、n = 48) を Taconic から入手した。

40

【0231】

用量選択

化合物 1 は、3、10 及び 30 μ mol / kg で投与した。

【0232】

化合物形態、製剤化及び用量設定

化合物 1 は、懸濁液として製剤化した。媒体又は化合物は、経口投与によって 10 ml / kg の容量で 1 回与えた。媒体: 水中 0.5% メチルセルロース中 0.1% Tween 80。

50

【0233】

【表10】

表 7: 治療群

治療	0時間における用量	n =	1日目	
			+4時間	+24時間
A	化合物 1: 3 $\mu\text{mol/kg}$	12	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)
B	化合物 1: 10 $\mu\text{mol/kg}$	12	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)
C	化合物 1: 30 $\mu\text{mol/kg}$	12	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)
V	媒体 (0.1 % Tween 80, 0.5 % MC)	12	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)	犠牲 (n=3 ♀ n=3 ♂)

10

【0234】

体重

体重は、投与前に1回測った。

20

【0235】

エキソビボ試料及び試料採取方法

血液試料は、全血化合物レベルの分析に使用し、剖検日に体幹血液からEDTAエッペンドルフチューブ (Millian SA、Cat No TOM-14、Fisher Scientific、Wohlen、スイス)、又は血清チューブ (CB300Z、Sarstedt、Nuembrecht、ドイツ) に採った。

【0236】

アミロイド- β ($A\beta$) 分析用の血漿をEDTA血液の遠心 (8000 rpm / 6800 $\times g$ 、15分、4 $^{\circ}\text{C}$) によって収集し、低タンパク質結合性エッペンドルフチューブ (003 0108. 116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ) に収集した。

30

【0237】

全ての血液／血漿／血清試料は、ドライアイスで凍結し、分析時まで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0238】

断頭後、直ちに脳を摘出し、生理食塩水でリンスし、正中矢状断した。左小脳を化合物レベルの分析に使用し、ガラスチューブ (Chromacol、125 $\times$ 5-SV T051、Welwyn Garden City、英国) に入れ、秤量してドライアイスで凍結し、前脳の左半分 (嗅球なし) を $A\beta$ 分析に使用し、金属プレート上にドライアイスで凍結して、低タンパク質結合性チューブ (003 0108. 116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ) に入れた。右脳は、4%パラホルムアルデヒドに固定し、PBSで洗浄し、次に可能性のある今後の組織学的分析のためにパラフィンに包埋した。

40

【0239】

試験終了時に尾を採取し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0240】

【表 1 1】

表8: 化合物レベルの分析

分析方法	HPLC/MS/MS
脳ホモジナイズ方法	脳試料を 2 容量のメタノール/水(2/8 v/v)と混合し、Precellys®装置を使用してホモジナイズした。
試料調製方法	30 μ L の血液又は脳ホモジネートを汎用内部標準(ラベタロール)でスパイクし、続いて 200 μ L アセトニトリルと混合した(タンパク質沈殿)。上清の 1 μ L アリコート LC/MS/MS システムに注入して分析にかけた。
MS	AB Sciex Triple Quad 5500 (AB Sciex, Brugg AG, スイス); ポジティブイオンモードでのターボイオンエレクトロスプレーイオン化
MS/MS 方法	1.[化合物 1]: 508.2 Da $[M+H]^+ \rightarrow 139.1; 180.1; 375.1$ Da / CE 85;83;43 eV 2.[ラベタロール]: (内部標準) 329.0 $[M+H]^+ \rightarrow 294.0$ 及び 311.2 Da / CE 26 及び 19 eV
HPLC	Waters Acquity UPBINARY (Waters/ Dättwil AG, スイス)
HPLC カラム	Synergi Kinetex C18, 50*2.1 mm, 2.6 μ m (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)
緩衝液 A // 緩衝液 C	A: H ₂ O + 0.1 % 酢酸 // B: メタノール/アセトニトリル (1/1) + 0.1 % 酢酸
グラジエント	ポンプ 1: 0.0' 98% A, 2% B // 2.5' 10% A, 90% B // 2.6' 1% A, 99% B // 3' 98% A, 2% B // 4' 98% A, 2% B. 流量 0.0' - 2.5' = 400 μ l/分 // 2.6' - 4.0' = 500 μ l/分
LLOQ	化合物 1: 0.4 ng/mL
ダイナミックレンジ:	0.4~12500 ng/mL (化合物 1)
校正標準	LLOQ で-0.3~-2.4%及び他の濃度レベルで-12.3~14.4%の範囲内の偏り
クオリティコントロール	全ての血液クオリティコントロール試料の-4.3~14.4 %の範囲内の偏り。全ての脳クオリティコントロール試料の 16.8~31.8 %の範囲内の偏り: 1 つの脳 QC は $\pm 30\%$ 外であった
各ランの判定基準	校正標準: LLOQ で $\pm 30\%$ 及び他の濃度レベルで $\pm 20\%$ の範囲内の偏り。検量線の両方の端点における少なくとも 1 つの値を含む個別の逆算値の少なくとも 3/4 がこの判定基準を満たす。 クオリティコントロール試料: 個別の値の少なくとも 2/3 について $\pm 30\%$ の範囲内の偏り。各 QC レベルにおける少なくとも 1 つの値がこの判定基準を満たす。

【0 2 4 1】

マウス脳内 A β 4 0 並びに C S F 中 A β 4 0 及び A β 4 2 の分析

脳のホモジナイゼーション

凍結マウス前脳を秤量し、9 容量 (w / v) の氷冷 T B S - C o m p l e t e (2 0 m M トリス - H C l p H 7 . 4、1 3 7 m M N a C l、1 $\times$ C o m p l e t e [プロテ

アーゼ阻害薬カクテル錠：1 836 145、Roche Diagnostics GmbH、Penzberg、ドイツ）中で音波処理（90%デューティサイクル、出力制御5、40～55パルス、[Sonifier 450、Branson]）によってホモジナイズした。ホモジナイゼーション後、分析用に数個の50 μ l アリコートを調製し、-80℃で保存した。

【0242】

標準としての合成A β 1-40溶液の調製

ヒトA β 1-40トリフルオロ酢酸塩（H 1194.1000、Bachem、Bubendorf、スイス）をA β 1-40の検量線として使用した。これを無水DMSO（41647、Fluka）に1mg/mlの濃度で室温（RT）において約30分間可

10

【0243】

残りの溶液の20×5 μ l アリコート及び100 μ l アリコートを低結合性チューブ（0030 108.094、Eppendorf、Hamburg、ドイツ）に調製し、窒素ガスで覆ってA β ペプチドを酸化から保護し、-80℃で保存した。検量線のために5 μ l アリコートを一度のみ使用し、次に廃棄した。

【0244】

マウス脳内A β 40の決定

マウスの内因性A β 40をMeso Scale Discovery (MSD) 96 ウェルMULTI-ARRAYヒト/げっ歯類（4G8）A β 40超高感度アッセイ（# K110FTE-3、Meso Scale Discovery、Gaithersburg、USA）で決定した。このアッセイは、検量線及び試料調製を除いて製造者の指示に従って実施した。各1：10前脳ホモジネートの50 μ l アリコートをを使用してTriton X-100（TX-100）可溶性A β 40を1%TX-100で前脳から抽出し、1%TX-100の最終濃度及び1：20前脳希釈度に達するようにTBS complete（20mMトリス-HCl pH7.4、137mM NaCl、1×Complete [プロテアーゼ阻害薬カクテル錠：1 836 145、Roche Diagnostics GmbH、Penzberg ドイツ]）中50 μ l 2%TX-100と混合した。試料を氷上で15分間インキュベートし、5分毎にボルテックスした。試料を超遠心（100000×g、4℃、15分）し、50 μ lの澄明な上清を新しいチューブに移した。A β 40アッセイについては、上清を更に1：100の最終前脳希釈度となるように3%Blocker A溶液（キットからのもの）中に1：5希釈し、プレートに加えた。

20

30

【0245】

合成A β 1-40ペプチド（1.56～100 pg/ml）でスパイクした1%Blocker A溶液の対応する希釈物で検量線を作成し、但し非トランスジェニックマウス脳試料は別とした。この場合、検量線は、合成A β 1-40ペプチド（1.56～100 pg/ml）でスパイクした、対応して希釈したAPPノックアウトマウス前脳で作成した。全ての試料及び標準について、1ウェル当たり25 μ lを加えた。決定毎にデュプリケートウェルを行った。計算にはデュプリケートウェルからの平均値を使用した。MSDは、定量化ソフトウェアを提供していないため、試料及び標準の相対単位をSOFITmax PRO 4.0にインポートして標準曲線の計算及び試料の定量化を行った。

40

【0246】

結果

APOE4-TRマウス（マウスAPOE遺伝子をヒトAPOE4に置き換えた）を3つの異なる用量（3、10及び30 μ mol/kg）のBACE阻害薬化合物1で急性治療した。最終投与後4時間及び24時間で動物を犠牲にし、前脳を分離した。様々な群のA β 40及びA β 42濃度を図3、図4及び図5；及び表9、表10及び表11にまとめる。媒体治療群に対するパーセント減少率を計算した。いずれの治療によっても、最終投与後4時間及び24時間で有意且つ用量依存的なA β 40の減少が生じ、効果は、4時間

50

で 43～77% 及び 24 時間で 20～66% の範囲であった。低い方の 2 つの用量群（3 及び 10 $\mu\text{mol/kg}$ ）について、A β 40 低減効果は、4 及び 24 時間で有意に減少したが、最終投与後 24 時間で実質的にベースラインレベルに近かった。高用量の化合物 1（30 $\mu\text{mol/kg}$ ）は、ほぼ平坦なプロファイルを示し、全 24 時間の時間経過にわたって 77～66% の A β 40 減少であった。

【0247】

【表12】

表 9: APOE4-TR マウス脳のアβ40 レベルに対する化合物 1 治療の効果(n=6 (n=3 雄, n=3 雌))

用量	投与 レジーム	時間	平均 Aβ40 脳 (pmol/g)±SD	%対媒体 減少率	対媒体 有意性	Mini AUEC (%)
媒体	急性	4/24	0.200±0.034	n.a.	n.a.	n.a.
3 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.114±0.024	43	p<0.0001	32
3 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.160±0.033	20	p<0.05	
10 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.074±0.014	63	p<0.0001	47
10 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.139±0.041	31	p<0.001	
30 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.046±0.006	77	p<0.0001	72
30 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.068±0.021	66	p<0.0001	

n.a.: 該当なし, 媒体: 全ての媒体を合わせたもの

【0248】

【表13】

表 10: APOE4-TR マウス CSF の Aβ40 レベルに対する化合物 1 治療の効果(n=6 (n=3 雄, n=3 雌))

用量	投与 レジーム	時間	平均 Aβ40 CSF (pmol/ml)±SD	%対媒体 減少率	対媒体 有意性	Mini AUEC (%)
媒体	急性	4/24	0.1826±0.0956	n.a.	n.a.	n.a.
3 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.1308±0.06381	28	ns	26
3 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.1402±0.07911	23	ns	
10 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.07527±0.03356	59	p<0.05	37
10 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.1565±0.08348	14	ns	
30 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4	0.02533±0.01093	86	p<0.001	77
30 $\mu\text{mol/kg}$	急性	24	0.06083±0.03445	67	p<0.01	

n.a.: 該当なし, 媒体: 全ての媒体を合わせたもの, ns: 有意差なし

【0249】

10

20

30

40

【表 1 4】

表 11: APOE4-TR マウス CSF の A β 42 レベルに対する化合物 1 治療の効果(n=6 (n=3 雄, n=3 雌))

用量	投与 レジーム	時間	平均 A β 42 CSF (pmol/ml) $\pm$ SD	%対媒体 減少率	対媒体 有意性	Mini AUEC (%)
媒体	急性	4/24	0.1174 $\pm$ 0.05610	n.a.	n.a.	n.a.
3 μ mol/kg	急性	4	0.0524 $\pm$ 0.02173	55	ns	38
3 μ mol/kg	急性	24	0.09317 $\pm$ 0.05304	21	ns	
10 μ mol/kg	急性	4	0.02318 $\pm$ 0.00446	80	p<0.01	50
10 μ mol/kg	急性	24	0.09438 $\pm$ 0.09019	20	ns	
30 μ mol/kg	急性	4	0.0080 $\pm$ 0.00395	93	p<0.001	81
30 μ mol/kg	急性	24	0.03717 $\pm$ 0.02438	68	p<0.05	

n.a.: 該当なし, 媒体: 全ての媒体を合わせたもの, ns: 有意差なし

【0 2 5 0】

血液及び脳における急性投与についての 4 時間及び 24 時間時点の PK データを図 6 及び表 1 2 に示す。血液及び脳における AUC_{0-24 時間}として表される 24 時間にわたる化合物 1 の曝露を表 1 3 にまとめる。血液及び脳における化合物 1 曝露は、用量比例的であり、24 時間後に予想どおりの化合物レベルの僅かな低下を呈し、これも用量比例的であった。脳内の化合物曝露は、血中よりもはるかに高かった。脳血液比は、3、10 及び 30 μ mol/kg 用量群について同様であり、それぞれ 4 時間で 5、3 及び 4 及び 24 時間で 9、4、及び 3 であった。異なる用量での化合物曝露の低下の比較を可能にする 4 時間/24 時間の曝露比を計算した(表 1 2)。化合物 1 は、中程度の 2~5 倍の曝露減少であり、異なる用量間及び血液と脳との間で大きい差はなかった。

【0 2 5 1】

【表 1 5】

表 12: APOE4-TR マウスの血液及び脳における化合物 1 レベル(n=6 (n=3 雄, n=3 雌))

治療	投与	時間	平均血液 (pmol/ml) $\pm$ SD	曝露比 4h/24h (血液)	平均脳 (pmol/g) $\pm$ SD	曝露比 4h/24h (脳)
3 μ mol/kg	急性	4	105 $\pm$ 8		512 $\pm$ 216	
3 μ mol/kg	急性	24	25 $\pm$ 7	4.2	210 $\pm$ 262	2.4
10 μ mol/kg	急性	4	317 $\pm$ 50		995 $\pm$ 151	
10 μ mol/kg	急性	24	88 $\pm$ 25	3.6	324 $\pm$ 109	3.1
30 μ mol/kg	急性	4	985 $\pm$ 224		3409 $\pm$ 741	
30 μ mol/kg	急性	24	259 $\pm$ 68	3.8	743 $\pm$ 267	4.6

【0 2 5 2】

【表 16】

表 13: APOE4-TR マウスの血液及び脳における化合物 1 AUC_{0-24時間}

治療	投与	AUC _{血液} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	AUC _脳 ($\mu\text{mol/kg}\cdot\text{h}$)
3 $\mu\text{mol/kg}$	急性	1.56	8.67
10 $\mu\text{mol/kg}$	急性	4.86	15.83
30 $\mu\text{mol/kg}$	急性	14.92	49.82

10

4時間及び24時間時点のAUC

【0253】

全ての用量群について個々の動物の脳の薬物動態学的／薬力学的関係を図7に示す。化合物1について明らかなPK／PD関係が見られた。低化合物レベルでは、A β 減少の有効性は最小限であったが、高化合物レベルでは最大限の有効性効果が認められた。

【0254】

図8は、異なる用量における平均値のPK／PD関係を示す。ここでもやはり、A β 減少に対する曝露依存的効果が見られ、明らかな最小限及び最大限の有効性効果があった。

【0255】

20

結論

本実施例に提供される試験は、化合物1が、APOE4-TRマウスにおいてインビボで経口アベイラビリティのある、中枢作用性であり且つ強力なBACE阻害薬であることを実証する。マウス内因性ApoE遺伝子座からヒトAPOE4を発現するAPOE4-TRマウスを使用して化合物1のPK／PD関係を調べた。ApoE4は、アルツハイマー病の高リスク因子とされており、APOE4-TRマウスは、アルツハイマー脳におけるApoE4効果に類似している。

【0256】

APOE4-TRマウスにおける化合物1のPK特性は、野生型マウスで観察されるものと違いがなかった。血液及び脳における用量依存的化合物1曝露（脳内レベルがはるかに高い）が観察された。更に、24時間後の曝露低下は、野生型マウスで観察されるものと同様であった。30 $\mu\text{mol/kg}$ の化合物1がAPOE4-TRの脳内のA β 減少に対して最大の効果を生じ（>70%）、急性投与について同程度が24時間にわたって続いた。PK／PD関係は野生型マウス及びラットと非常に類似していた。最も高い用量（30 $\mu\text{mol/kg}$ ）でAPOE4-TRマウスの脳内のA β 減少に対する最大有効性効果が僅かに低いことが見られた。これは、APOE4-TRマウスで観察されるアミロイド β のクリアランス速度が遅いことに起因し得る（Castellano JM et al., 2011）。

30

【0257】

実施例4：ファースト・イン・ヒューマン試験

40

この試験は、臨床的に完了しており、主として健康成人及び高齢対象における化合物1の安全性及び忍容性並びに薬物動態学及び薬力学を評価する無作為化、二重盲検、プラセボ対照、単一及び複数用量漸増経口投与試験であった。この試験の目的は、化合物1の単一及び複数最大耐量を決定すること、及び主要PDバイオマーカーとしてCSF中A β を用いて薬物動態学／薬力学（PK／PD）関係を評価することであった。

【0258】

60歳以上の健常高齢対象において、750mg単一用量及び2週間にわたる300mg QDの最高試験用量が安全で忍容されることが決定された。薬物作用の主要バイオマーカーとしてCSF中A β 濃度を用いた薬力学的評価はまた、健常高齢対象にも適用された。A β 40濃度の用量依存的低下が単回投与及び複数回投与後にそれぞれ最大約80%

50

及び 90 % まで決定された (表 14 及び表 15、図 9)。

【0259】

【表 17】

表 14: CSF 中の A β 40 - ベースラインからの経時的パーセント変化率の概要

		単回投与				
時間 (h)		プラセボ	化合物 1 10 mg	化合物 1 90 mg	化合物 1 300 mg	化合物 1 750 mg
12 h	N	12	6	6	8	8
	平均値 (SD)	1.6 (6.66)	-11.6 (8.31)	-14.2 (35.83)	-35.8 (16.40)	-36.2 (13.58)
	中央値	0.2	-12.5	-28.0	-44.1	-38.6
	最小値 - 最大値	-7 - 16	-21 - 1	-36 - 58	-54 - -13	-53 - -10
24 h	N	12	6	5	8	7
	平均値 (SD)	-2.2 (12.84)	-15.0 (10.21)	-44.8 (12.48)	-68.3 (10.65)	-67.4 (15.54)
	中央値	-2.3	-14.3	-49.2	-72.5	-70.6
	最小値 - 最大値	-22 - 22	-31 - -4	-55 - -25	-79 - -52	-82 - -36
34 h	N	11	6	5	8	7
	平均値 (SD)	5.1 (14.83)	-9.7 (14.72)	-50.0 (8.87)	-78.3 (4.75)	-79.1 (8.88)
	中央値	4.1	-12.5	-45.4	-79.3	-82.3
	最小値 - 最大値	-22 - 29	-25 - 10	-60 - -41	-84 - -69	-87 - -60

【0260】

【表 18】

表 15: CSF 中の A β 40 15 日目におけるベースラインからのパーセント変化率の概要 (最終投与後 24 時間)

		複数回投与			
		化合物 1	化合物 1	化合物 1	化合物 1
	プラセボ	10 mg	30 mg	90 mg	300 mg
N	16	8	8	8	8
平均値 (SD)	-7.2 (6.04)	-60.1 (9.91)	-80.0 (3.89)	-88.2 (3.07)	-93.6 (0.61)
中央値	-8.0	-61.5	-80.2	-89.1	-93.5
最小値 ; 最大値	-18 ; 2	-77 ; -48	-86 ; -76	-92 ; -82	-94 ; -93

【0261】

実施例 5 : 3 ヶ月用量範囲探索安全性及び忍容性試験

第 I 相臨床用量範囲探索安全性及び忍容性試験において 60 歳以上の健常高齢対象に化合物 1 を投与した。この試験は、ClinicalTrials.gov に NCT02576639 識別コードで収載されている。

【0262】

この無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験は、並列群設計を有し、化合物 1 は、1 日 1 回、経口用量で 5 治療群 (化合物 1 : 2 mg、10 mg、35 mg 又は 85 mg QD 及びプラセボ) に投与した。

【0263】

この試験の主要目的は、ファースト・イン・ヒューマン試験で 2 週間及び 4 週間の継続

期間にわたって得られたこれまでの安全性及び忍容性データを拡大し、それにより A D のリスクがある対象における将来の長期有効性試験の開始を可能にすることであった。加えて、将来の有効性試験のための用量選択判断を裏付けるため、薬物動態学的／薬力学的モデル化に関連するデータを入手した。

【 0 2 6 4 】

この試験では、化合物 1 は、3 ヶ月にわたる 2、10、35 及び 85 mg の 1 日 1 回用量が安全で忍容されることが分かった。CSF A β レベルに対する化合物 1 投与の薬力学的効果を表 16 及び図 10 に示す。A β 低減の程度は、時間が経っても安定しており、約 2～3 週間後に PD 定常状態に達した。

【 0 2 6 5 】

10

【表 19】

表 16: 3 ヶ月時における CSF 中の A β - A β 38、A β 40、及び A β 42 のベースラインからのパーセント変化率の分析

パラメータ	治療	N	Lsmean (SE)	差(90% CI) 化合物 1-プラセボ	P 値
A β 38 (pg/mL)	プラセボ	21	-2.41 (1.430)		
	化合物 1: 2mg	22	-20.58 (1.397)	-18.17 (-21.49, -14.85)	<.001
	化合物 1: 10mg	21	-62.60 (1.430)	-60.18 (-63.54, -56.83)	<.001
	化合物 1: 35mg	23	-82.96 (1.366)	-80.55 (-83.83, -77.27)	<.001
	化合物 1: 85mg	20	-89.23 (1.470)	-86.81 (-90.22, -83.41)	<.001
A β 40 (pg/mL)	プラセボ	21	-2.79 (1.389)		
	化合物 1: 2mg	22	-22.66 (1.355)	-19.87 (-23.09, -16.65)	<.001
	化合物 1: 10mg	21	-62.96 (1.388)	-60.18 (-63.43, -56.92)	<.001
	化合物 1: 35mg	23	-83.19 (1.325)	-80.41 (-83.59, -77.22)	<.001
	化合物 1: 85mg	20	-90.40 (1.429)	-87.62 (-90.93, -84.30)	<.001
A β 42 (pg/mL)	プラセボ	21	-2.76 (1.310)		
	化合物 1: 2mg	22	-24.00 (1.277)	-21.24 (-24.28, -18.21)	<.001
	化合物 1: 10mg	21	-64.15 (1.308)	-61.39 (-64.47, -58.31)	<.001
	化合物 1: 35mg	23	-82.49 (1.250)	-79.73 (-82.73, -76.73)	<.001
	化合物 1: 85mg	20	-89.38 (1.348)	-86.62 (-89.76, -83.49)	<.001

20

30

40

調整済み Lsmeans, Lsmeans の差, 90% CI 及び P 値は、治療を固定効果とし、及びベースライン AB レベルを共変量とした ANCOVA モデルから得た。

【 0 2 6 6 】

2、10、35 及び 85 mg で毎日投与して 3 ヶ月後（91 日後）の化合物 1 の薬物動態パラメータを表 17 に示す。

【 0 2 6 7 】

【表 20】

表 17: 91 日目の化合物 1 薬物動態パラメータ

	C _{max,ss} (ng/mL)		
	10 mg qd.	35 mg qd.	85 mg qd.
結果	80	229	602
平均値 (CV%)	(36)	(33)	(25)

10

【0268】

C_{max,ss} 値は、指定用量で 1 日 1 回 (qd) 投与して 91 日後の化合物 1 の最高血漿定常状態濃度を表す。「CV%」は、パーセンテージ変動係数を表す。

【0269】

これらの結果に基づき、15 mg の化合物 1 の 1 日 1 回用量は、70～170 ng/mL の血漿 C_{max,ss} 値をもたらすことが予想され、及び 50 mg の化合物 1 の 1 日 1 回用量は、200～500 ng/mL の血漿 C_{max,ss} 値をもたらすことが予想される。

20

【0270】

実施例 4 及び 5 に提供されるデータに基づき、計量薬理学的モデル化から、対象の 90% で 80% の CSF Aβ40 低下を達成するのに 50 mg の 1 日用量、及び 60% の CSF Aβ40 低下を実現するのに 15 mg の用量が予測される。

【0271】

実施例 6：化合物 1 による治療への応答性に対する ApoE4 遺伝子型の効果

実施例 5 及び 6 に記載する完了したファースト・イン・ヒューマン試験及び 3 ヶ月用量範囲探索安全性及び忍容性臨床試験において、初回投与前（ベースライン）並びにそれぞれ 2 週間及び 3 ヶ月間の複数回投与後に腰椎穿刺を用いて CSF 中 Aβ 濃度を得た。また、同意した対象の ApoE4 遺伝子型も得た。被験治療を受け、且つ薬力学的効果の判定に影響を及ぼす可能性のある大きいプロトコル逸脱がなかった対象において、Aβ40 及び Aβ42 濃度のベースラインからのパーセント変化率を計算した。以下の表 18～表 21 は、治療群及び ApoE 遺伝子型（E4 ヘテロ接合体対 E4 非保因者）別のベースラインからのパーセント変化率の要約統計量を提供する。CSF データを有する 1 人の対象のみが E4 ホモ接合体であった（3 ヶ月用量範囲探索安全性及び忍容性試験から）。この対象は、プラセボで治療し、Aβ40 及び Aβ42 の両方の濃度の 11% の低下を示したが、以下の表には含めない。データは、ApoE4 保因者と非保因者との間に化合物 1 による治療への CSF Aβ40 及び Aβ42 応答性に差がないことを示している。

30

【0272】

【表 2 1】

表 18: 3 ヶ月時における ApoE 遺伝子型及び化合物 1 治療群別のベースラインからの A β 40 % 変化率

		E4 ヘテロ接合体	E4 非保因者
プラセボ	n	9	8
	平均値 (SD)	-3 (7)	-2 (5)
	中央値	-2	-1
	範囲	-19 ; 9	-13 ; 5
化合物 1: 2 mg	n	10	12
	平均値 (SD)	-21 (11)	-24 (9)
	中央値	-18	-22
	範囲	-46 ; -3	-41 ; -10
化合物 1: 10 mg	n	3	15
	平均値 (SD)	-67 (7)	-64 (6)
	中央値	-64	-65
	範囲	-75 ; -61	-73 ; -54
化合物 1: 35 mg	n	8	12
	平均値 (SD)	-84 (3)	-82 (5)
	中央値	-85	-83
	範囲	-88 ; -79	-91 ; -72
化合物 1: 85 mg	n	2	17
	平均値 (SD)	-91 (0)	-91 (2)
	中央値	-91	-90
	範囲	-91 ; -91	-94 ; -87

【 0 2 7 3 】

10

20

30

【表 2 2】

表 19: 3 ヶ月時における ApoE 遺伝子型及び化合物 1 治療群別のベースラインからの A β 42 % 変化率

		E4 ヘテロ接合体	E4 非保因者
プラセボ	n	9	8
	平均値 (SD)	-2 (4)	-2 (7)
	中央値	-0	-1
	範囲	-10 ; 4	-12 ; 8
化合物 1: 2 mg	n	10	12
	平均値 (SD)	-23 (9)	-24 (9)
	中央値	-23	-21
	範囲	-44 ; -8	-42 ; -12
化合物 1: 10 mg	n	3	15
	平均値 (SD)	-66 (7)	-65 (5)
	中央値	-63	-66
	範囲	-74 ; -62	-75 ; -56
化合物 1: 35 mg	n	8	12
	平均値 (SD)	-83 (5)	-81 (6)
	中央値	-85	-83
	範囲	-89 ; -72	-88 ; -68
化合物 1; 85 mg	n	2	17
	平均値 (SD)	-88 (2)	-90 (2)
	中央値	-88	-90
	範囲	-90 ; -87	-92 ; -84

【 0 2 7 4】

10

20

30

【表 2 3】

表 20: ファースト・イン・ヒューマン臨床試験における 2 週時の ApoE 遺伝子型及び化合物 1 治療群別のベースラインからの A β 40 %変化率

		E4 ヘテロ接合体	E4 非保因者
プラセボ	n	5	9
	平均値 (SD)	-12 (3)	-6 (6)
	中央値	-11	-4
	範囲	-18 ; -9	-17 ; 2
化合物 1: 10 mg	n	3	4
	平均値 (SD)	-56 (10)	-59 (7)
	中央値	-53	-61
	範囲	-67 ; -49	-64 ; -48
化合物 1: 30 mg	n	0	7
	平均値 (SD)		-80 (4)
	中央値		-81
	範囲		-86 ; -76
化合物 1: 90 mg	n	2	5
	平均値 (SD)	-90 (2)	-89 (2)
	中央値	-90	-90
	範囲	-92 ; -89	-91 ; -86
化合物 1: 300 mg	n	1	6
	平均値 (SD)	-93	-94 (1)
	中央値	-93	-94
	範囲	-93 ; -93	-94 ; -93

10

20

【 0 2 7 5】

【表 2 4】

表 21: ファースト・イン・ヒューマン臨床試験における 2 週時の ApoE 遺伝子型及び化合物 1 治療群別のベースラインからの A β 42 %変化率

		E4 ヘテロ接合体	E4 非保因者
プラセボ	n	5	9
	平均値 (SD)	-12 (4)	-4 (10)
	中央値	-9	-4
	範囲	-17 ; -8	-18 ; 17
化合物 1: 10 mg	n	3	4
	平均値 (SD)	-59 (11)	-58 (11)
	中央値	-64	-59
	範囲	-67 ; -47	-70 ; -46
化合物 1: 30 mg	n	0	7
	平均値 (SD)		-80 (6)
	中央値		-82
	範囲		-86 ; -72
化合物 1: 90 mg	n	2	5
	平均値 (SD)	-87 (2)	-86 (5)
	中央値	-87	-87
	範囲	-89 ; -86	-90 ; -78
化合物 1: 300 mg	n	1	6
	平均値 (SD)	-89	-92 (1)
	中央値	-89	-91
	範囲	-89 ; -89	-93 ; -90

【0 2 7 6】

実施例 7 : プラーク担持雄 A P P 2 3 マウスの B A C E 阻害薬化合物 1 による慢性治療処置

概要

プラーク担持年齢 (12 ヶ月) の A P P 2 3 トランスジェニックマウスに化合物 1 を 2 つの用量で 6 ヶ月間慢性投与した。媒体のみを受けた群と比較して、0.03 g / kg 餌の化合物 1 の投与により媒体群と比較してアミロイド β 40 及び 42 の僅かな減少が生じ、及び 0.3 g / kg 餌の投与により強い減少が生じた。マウス脳内 A β 量は、ベースライン時 (12 ヶ月齢) のマウスと同様であった。血漿及び C S F 中可溶性 A β は、高用量群で有意に減少したのみであった。免疫組織化学によって検出したときのプラーク負荷も低用量群で僅かに (約 20 %) 減少し、及び高用量群で強く (約 70 %) 減少した。小型、中型及び大型プラークの数は、等しく治療に応答した。活性化アストロサイトの数を G F A P 染色によって決定した。全 G F A P 免疫応答性は、化合物 1 による治療によって用量依存的に減少した。G F A P 陽性アストロサイトの大多数は、プラークに関連しなかったが、プラーク関連アストロサイトは、プラークから遠位にあるものと比較して化合物 1 治療に対してより強く応答した。I B A 1 染色によって活性化ミクログリア細胞を検出した。I B A 1 陽性ミクログリアの数は、化合物 1 治療によって用量依存的に減少した。アミロイドプラークにごく近接したミクログリアは、プラークから遠位にあるミクログリアと比較して治療によってより多く減少した。

【0 2 7 7】

要約すれば、化合物 1 治療は、未治療媒体と比較して脳アミロイド β 負荷の用量依存的な減少、及びマウス脳内の 2 つの神経炎症マーカー、活性化アストロサイトの数及びミクログリア細胞の数の相関的減少を示した。

【0278】

方法

動物及び用量選択

雄トランスジェニックヘテロ接合APP23 (B6, D2-Tg (Thy1App) 23Sdz (Sturchler-Pierrat C et al., 1997)、12～14ヵ月齢、n=64) を餌ペレット中の0.3 g/kg又は0.03 g/kgの化合物1で治療した。

【0279】

【表25】

10

表 22: 治療群

群	治療	n =
A	化合物 1: 0.03 g/kg 餌	18
B	化合物 1: 0.3 g/kg 餌	18
C	媒体/対照	18
D	ベースライン	10

20

3つの治療群, n=18匹のマウス/治療群; 1つのベースライン群, n=10

【0280】

エキソビポ試料及び試料採取方法

血液試料は全血化合物レベルの分析に使用し、剖検日に体幹血液からEDTAエッペンドルフチューブ (Milian SA、Cat No TOM-14、Fisher Scientific、Wohlen、スイス)、又は血清チューブ (CB300Z、Sarstedt、Nuembrecht、ドイツ) に採った。

【0281】

アミロイドβ (Aβ) 分析用の血漿をEDTA血液の遠心 (8000 rpm/6800×g、15分、4℃) によって収集し、低タンパク質結合性エッペンドルフチューブ (003 0108. 116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ) に収集した。

30

【0282】

全ての血液/血漿/血清試料は、ドライアイスで凍結し、分析時まで-80℃で保存した。

【0283】

断頭後、直ちに脳を摘出し、生理食塩水でリンスし、正中矢状断した。脳の左半分を化合物レベルの分析に使用し、ガラスチューブ (Chromacol、125×5-SVT051、Welwyn Garden City、英国) に入れ、秤量してドライアイスで凍結し、前脳の左半分 (嗅球なし) をAβ分析に使用し、金属プレート上にドライアイスで凍結して、低タンパク質結合性チューブ (003 0108. 116、Eppendorf、Hamburg、ドイツ) に入れた。

40

【0284】

試験終了時に尾を採取し、-20℃で保存した。

【0285】

化合物レベルの分析

生体試料の化合物1レベルを血液及び脳で液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (HPLC/MS/MS) によって定量化した。脳試料は、2容量のKH₂PO₄緩衝液と混合し、Covaris (登録商標) 装置を使用してホモジナイズした。30 μLの

50

血液又は脳ホモジネートのいずれも構造的に関連性のある内部標準でスパイクし、続いて少なくとも6倍過剰容量のアセトニトリルと混合してタンパク質を沈殿させた。上清をLC/MS/MSシステムに直接注入して分析にかけた。

【0286】

【表26】

表 23: 血液及び脳試料の機器条件

分析方法	HPLC/MS/MS
MS	Sciex QTrap 5500; ポジティブイオンモードでの加熱エレクトロスプレーイオン化
MS/MS法	514.0 Da $[M+H]^+$ 140.1/180.1 Da / CE 53/85 eV
HPLC HPLC カラム	Flux Rheos Allegro (Thermo Scientific / Reinach BL, スイス) Phenomenex Kinetix C8 50*2.1mm, 2.6 μ M (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)
緩衝液 A // 緩衝液 C	A: H ₂ O + 0.1 % 酢酸 // C: アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
グラジエント	ポンプ 1: 0.0' 98% A, 2% C // 0.3' 70% A, 30% C // 7.5' 40% A, 60% C // 9.5' 1% A, 99% C // 10.25' 1% A, 99% C // 10.3' 99% A, 1% C // 12.3' 99% A, 1% C. 流量 300-350 μ l/分
各ランの判定基準	校正標準: LLOQ で $\pm 20\%$ 及び他の濃度レベルで $\pm 15\%$ の範囲内の偏り。検量線の両方の端点における少なくとも1つの値を含む個別の逆算値の少なくとも3/4がこの判定基準を満たす。 クオリティコントロール試料: 個別の値の少なくとも2/3について $\pm 30\%$ の範囲内の偏り。各 QC レベルにおける少なくとも1つの値がこの判定基準を満たす。 ダイナミックレンジ: 0.4~12500 ng/mL

10

20

【0287】

マウス組織内 A β 40 及び A β 42 の分析

脳のホモジナイゼーション

凍結マウス前脳を秤量し、9容量 (w/v) の氷冷 TBS-Complete (20 mM トリス-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 1 $\times$ Complete [プロテアーゼ阻害薬カクテル錠: 1836145, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, ドイツ]) 中で音波処理 (90% デューティサイクル、出力制御 5, 40~55 パルス, [Sonifier 450, Branson]) によってホモジナイズした。ホモジナイゼーション後、分析用に数個の 50 μ l アリコートを調製し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

30

【0288】

標準としての合成 A β 溶液の調製

ヒト A β ペプチド (1-40) トリフルオロ酢酸塩 (H1194.1000, Bachem, Bubendorf, スイス) を A β 1-40 の検量線として使用した。これを無水 DMSO (41647, Fluka) に 1 mg/ml の濃度で室温 (RT) において約 30 分間可溶化し、次に完全に可溶化されたことを目視で確認した。

40

【0289】

残りの溶液の 20 $\times$ 5 μ l アリコート及び 100 μ l アリコートを低結合性チューブ (0030108.094, Eppendorf, Hamburg, ドイツ) に調製し、窒素ガスで覆って A β ペプチドを酸化から保護し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。検量線のために 5 μ l アリコートを一度のみ使用し、次に廃棄した。

【0290】

APP23 マウス脳内 Triton X-100 可溶性 A β の決定

マウスにおけるヒト A β 40 及び 42 を Meso Scale Discovery (MSD) 96 ウェル MULTI-ARRAY ヒット/げっ歯類 (6E10) A β 40/42

50

アッセイ (Meso Scale Discovery, Rockville, MD, USA) で決定した。このアッセイは、検量線及び試料調製を除いて製造者の指示に従って実施した。各 1 : 10 前脳ホモジネートの 50 μ l アリコートを使用して Triton X-100 (TX-100) 可溶性 A β 40 及び 42 を 1 % TX-100 で前脳から抽出し、1 % TX-100 の最終濃度及び 1 : 20 前脳希釈度に達するように TBS complete (20 mM トリス-HCl pH 7.4、137 mM NaCl、1 $\times$ Complete [プロテアーゼ阻害薬カクテル錠: 1836145、Roche Diagnostics GmbH、Penzberg ドイツ]) 中 50 μ l 2 % TX-100 と混合した。試料を氷上で 15 分間インキュベートし、5 分毎にボルテックスした。試料を超遠心 (100000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、15 分) し、50 μ l の澄明な上清を新しいチューブに移した。上清を更に 1 : 100 の最終前脳希釈度となるように 3 % Blocker A 溶液 (キットからのもの) で 1 : 5 希釈し、プレートに加えた。

【0291】

合成 A β 1-40 ペプチド (1.56 ~ 100 pg/ml) でスパイクした 1 % Blocker A 溶液の対応する希釈物で検量線を作成し、但し非トランスジェニックマウス脳試料は別とした。この場合、検量線は、合成 A β 1-40 ペプチド (1.56 ~ 100 pg/ml) でスパイクした、対応して希釈した APP ノックアウトマウス前脳で作成した。全ての試料及び標準について、1 ウェル当たり 25 μ l を加えた。決定毎にデュプリケートウェルを行った。計算にはデュプリケートウェルからの平均値を使用した。試料及び標準の相対単位を SOFTmax PRO 4.0 にインポートして標準曲線の計算及び試料の定量化を行った。

【0292】

APP23 マウス脳内ギ酸可溶性 A β 40 の決定

50 マイクロリットルの前脳ホモジネートを 116.6 μ l 100 % ギ酸と混合して、70 % の最終ギ酸濃度を得た。試料を氷上で保存し、5 分毎にボルテックスした。中和のため、50 μ l の混合物を新しいチューブにピペティングし、1 $\times$ Complete プロテアーゼ阻害薬を含有する 950 μ l の 1 M トリス塩基を加えた。チューブを室温で一晩保存し、次に Eppendorf Microcentrifuge において 4 $^{\circ}$ C で 15 分間、14000 rpm で遠心した。上層から 100 μ l を取り出し、100 μ l の 3 % Blocker A 溶液 (Meso Scale アッセイキットの一部) と混合した。この試料をアッセイプレートに直接加えるか (希釈 1 : 1332)、又は 1 % Blocker A 溶液で更に希釈した。

【0293】

マウス CSF 中 A β 40 の分析

マウス CSF 試料 (3 μ l) を 57 μ l の 1 % Blocker A (MSD) で希釈し、アッセイプレートに 25 μ l を加えた。

【0294】

マウス血漿中 A β 40 の分析

血漿試料 (30 μ l) を 30 μ l の 3 % Blocker A (MSD) と混合し、アッセイプレートに 25 μ l を加えた。

【0295】

二重蛍光免疫組織化学を用いたアミロイド β プラーク及び活性化アストロサイトの組織学的分析

アミロイドペプチドの C 末端部を認識するウサギ抗 A β 一次抗体 (この抗体は、Schneider-Fischer G, Paganetti PA, 1996; Schneider-Fischer G et al., 1997 に記載されるとおり産生された) を用いてアミロイドプラークを染色した。市販のウサギ抗 GFAP (Dako Schweiz GmbH、Baar、スイスからのリファレンス Z0334) を用いて活性化アストロサイトを検出した。

【0296】

10

20

30

40

50

全ての染色は、完全に自動化された機器Ventana Discovery（登録商標）Ultra（Roche Diagnostics Schweiz AG、Rotkreuz、スイス）を用いて実施した。全ての化学物質は、Roche Diagnosticsにより供給された。

【0297】

全ての被験動物を使用し、3マイクロメートルの脳組織切片を新しく切り出し、SuperFrost+スライド上に収集した。組織切片を脱パラフィン化し、無溶媒条件下（EZprep溶液）で再水和させて、続いてEDTAベースの緩衝液（CC1溶液）中での32分間の熱回復サイクルによって抗原回復（デマスキング）を実施した。続いて、DISCOVERY阻害薬（リファレンス07017944001（Roche））を使用してスライドを4分間ブロックした。抗体希釈剤に1/20, 000希釈した一次抗体を手作業で組織切片に加え、室温で1時間インキュベートした。短時間の後固定（0.05%のグルタルアルデヒド）を実施した後、多量体UltraMap-抗ウサギHRP既製抗体（リファレンス05269717001）を16分間適用した。

10

【0298】

製造者の推奨に従ってDISCOVERY FITC（登録商標）を用いて検出を実施した。次に、スライドを92℃で20分間熱変性させた後、第2の一次抗体（1/2, 000希釈した抗GFAP）を手作業で適用し、1時間インキュベートした。UltraMap-抗ウサギHRP抗体を再び20分間使用して、DISCOVERYローダミンキット（リファレンス07259883001）との組み合わせでGFAPを検出した。

20

【0299】

スライドを洗浄し、Prolong（登録商標）Gold退色防止試薬（リファレンスP36931、ThermoFisher、スイス）を使用してマウントし、Hamamatsuスライドスキャナ機器（NanoZoomer 2.0 HT、スキャニングソフトウェアNDP-Scanバージョン2.5、Hamamatsu Photonics France、Swiss Office、Solothurn、スイス）によって40倍対物レンズで更にスキャンした。スキャニング設定は、以下のとおりであった：DAPIフィルタによる露光時間は、FITCフィルタについても57msに設定した。TRITCフィルタの露光時間（ローダミンの検出）は、14.2msに設定した。

【0300】

二重蛍光免疫組織化学を用いたアミロイドβプラーク及び活性化ミクログリア細胞の分析

30

同じ抗体を用いてアミロイドプラークを染色し、Wako Chemicals GmbH（Neuss、ドイツ）からの、抗体希釈剤で1/200希釈したウサギ抗IBA1抗体（リファレンス019-19741）を用いてミクログリア細胞を検出した。染色プロトコルは、アミロイドβプラーク及びアストロサイトのプロトコルと全く同様であった。スライドを同じ設定でスキャンした。

【0301】

画像解析

画像解析に基づく定量的プラーク評価のため、MS Visual Studio 2010及びMatrox MIL V9ライブラリ（Matrox Inc、Quebec、カナダ）からの多くの機能をベースとして有標の画像解析プラットフォーム（ASTORIA、自動保存画像解析）を開発した。

40

【0302】

β-アミロイドプラーク及び神経炎症分析のため、以下の一連の工程を実施した：

- スライドをHamamatsu NanoZoomerによって40倍の倍率でスキャンした。各蛍光標識（DAPI、FITC及びTRITC）について別個の画像を作成した。
- 緑色FITCチャンネル画像でのAβプラーク評価用に脳切片において皮質を画定するため手作業でROI（関心領域）の輪郭を描き、次に得られた輪郭を他の2つのチャン

50

ネル画像にも使用する（得られたxmlファイルをコピーする）。

- － インハウスで開発したImageScope（V12.1.0.5029、Aperio Inc.，USA）プラグインを実行して、3つの蛍光チャンネルの各々について*.tif画像タイル（10倍の倍率）を作成及びエクスポートする。

【0303】

画像バッチ処理：

- － 各個別の蛍光チャンネル画像へのアクセスを通じて各切片の組み合わせトゥルーカラー画像（DAPI、FITC、TRITC）を得る。
- － 黒色の未染色バックグラウンドからの有効試料（輪郭を描いたROIの範囲内にある）のセグメンテーション。
- － 緑色チャンネル画像（FITC標識A β プラーク）のオブジェクトのセグメンテーションに適応閾値処理法を適用する。
- － 緑色（FITC）チャンネルにおいてシグナルを示す小さ過ぎるデブリの除去後、正しい後続の個々のオブジェクト分析のための接触オブジェクトの分離。
- － 形態学的トッパット変換及び閾値処理による赤色チャンネルのTRITC標識オブジェクト（アストロサイト又はミクログリアを示すGFAP又はIba1染色に特異的）のセグメンテーション。
- － 特徴ベースのオブジェクト分類。

10

【0304】

4つのオブジェクトカテゴリ

20

- － 除外すべき非特異的デブリ（ぼやけ過ぎている、小さ過ぎるオブジェクト）
- － 小型プラーク（40～1000ピクセル）
- － 中型プラーク（1000～6500ピクセル）
- － 大型プラーク（>6500ピクセル）

【0305】

有効プラークに関する幾つかの形態測定上及び濃度測定上の特徴の計算

- － プラーク数
- － 非線形的方法での適切な抗体の染色強度の測定及び使用に基づく「比光学濃度」（これは、タンパク質（抗原）濃度の大きさを反映することが記載されている（Rahier et al.，1989；Ruifrok et al.，2001））
- － TRITC+シグナル対プラーク面積比に基づく「プラーク関連GFAP又はIba1」、プラーク周囲の拡張円形範囲内にあるTRITC+シグナルの比に基づく「近位GFAP又はIba1」の評価

30

【0306】

結果

【0307】

【表 27】

表 24: 脳及び血液の化合物 1 レベル

用量(餌ペレット)	時間(試験開始後)	組織/体液	平均量(nM) $\pm$ SD
0.03 g/kg	2 ヶ月	血液	134 $\pm$ 49
0.3 g/kg	2 ヶ月	血液	1802 $\pm$ 306
0.03 g/kg	4 ヶ月	血液	406 $\pm$ 76
0.3 g/kg	4 ヶ月	血液	2597 $\pm$ 346
0.03 g/kg	6 ヶ月	血液	207 $\pm$ 28
0.3 g/kg	6 ヶ月	血液	1861 $\pm$ 151
0.03 g/kg	6 ヶ月	脳	556 $\pm$ 92
0.3 g/kg	6 ヶ月	脳	6152 $\pm$ 1212

10

【0308】

2 ヶ月及び 4 ヶ月の投与後、及び 6 ヶ月時の試験終了時に化合物 1 の血中濃度を決定した。表 24 に示されるとおり、試験期間中にわたって一定の曝露があり、動物間のばらつきは、平均して 18% (8~36%) で許容できるものであった。平均化合物 1 血中濃度は、0.03 g/kg 餌投与群について 0.25 $\pm$ 0.13 μ M (平均値 $\pm$ SD)、及び 0.3 g/kg 投与群について 2.10 $\pm$ 0.47 μ M であり、化合物用量の 10 倍差と良好に一致した。この試験で観察された曝露は、大まかに毎日 5 及び 45 mg/kg 経口用量の化合物 1 に対応した。実験終了時に決定された脳/血液比は、0.03 g/kg 群について 2.7、及び 0.3 g/kg 群について 3.3 であった。

20

【0309】

A β 代謝産物の生化学的決定：マウス脳からの Triton X-100 可溶性 A β 代謝産物

30

脳ホモジネートを緩衝液中 1% Triton X-100 で抽出し、得られた上清を可溶性形態の A β 代謝産物に相当すると見なした。A β 40 及び 42 に加えて、本発明者らは、N 末端 A β 断片 sAPP α (α -セクレターゼの直接の切断産物) 及び sAPP β (Swedish) (BACE1 切断の直接の産物) を決定した。表 25 に示されるとおり、可溶性 A β 40 及び 42 は非治療群において試験期間中にわたって中程度に (2 倍未満) 増加する。この年齢で A β 発現及び A β 生成の変化が起こることは知られていないため、媒体群 (18~20 ヶ月齢) の値の増加は、A β 沈着からの「漏出」(これは数倍増加する、以下を参照されたい) によって起こることが想定される。また、非治療群では、可溶性 A β 代謝産物 sAPP α 及び β の値にも有意な変化はなかった。

【0310】

40

低用量 (0.03 g/kg 化合物 1 / kg 餌) の化合物 1 で治療したマウスは、可溶性 A β 40 及び 42 の弱い、但し有意差のない減少並びに sAPP α の中程度の増加を示した (表 25 及び表 26、図 11、図 12 及び図 13)。可溶性 A β 40 及び 42 は、有意に 29% 減少した (表 25 及び表 26、図 14)。0.3 g/kg 用量の化合物 1 で治療したマウスは、A β 及び sAPP β (Swedish) の両方の有意な減少並びに sAPP α の 3 倍の増加を示した (表 25 及び表 26、図 11、図 12 及び図 14)。

【0311】

まとめると、化合物 1 治療は、全ての可溶性 BACE1 切断産物の用量依存的減少及び sAPP α の用量依存的増加を生じさせた。

【0312】

50

【表 2 8】

表 25: 化合物 1 による治療後のマウス脳 Aβ40 及び 42 レベル

治療群(n)	Aβ40 (ng/g tiss.) 平均値 ± SEM	Aβ42 (ng/g tiss.) 平均値 ± SEM	sAPPα (μg/g tiss.) 平均値 ± SEM	sAPPβ (Swe) (μg/g tiss.) 平均値 ± SEM
ベースライン (10)	152.3 ± 4.6	46.4 ± 1.3	207 ± 28	96.8 ± 7.9
0.03 g/kg 餌 (16)	190.2 ± 18.6	106.3 ± 10.0	435 ± 40	78.5 ± 4.0
0.3 g/kg 餌 (13)	120.8 ± 18.9	30.3 ± 4.2	1147 ± 36	24.6 ± 0.96
媒体 (18)	213.8 ± 17.3	133.0 ± 17.7	302 ± 30	110.5 ± 6.4

10

【0 3 1 3】

【表 2 9】

表 26: 群間の変化率の比較(ダネットの多重比較検定)

比較群	Aβ40	Aβ42	sAPPα	sAPPβ (スウェーデン型)
0.03 g/kg vs 媒体	-4.6% 有意差なし	-20.1% 有意差なし	+44% 有意差なし	-29.0% p < 0.0001
0.3 g/kg vs 媒体	-43.7% p = 0.001	-77.3% p < 0.0001	+279.8% p < 0.0001	-77.7% p < 0.0001
媒体 vs ベースライン	+141% 有意差なし	+186% p < 0.0001	+31.4% 有意差なし	+12.4% 有意差なし

20

【0 3 1 4】

30

C S F 中 A P P 代謝産物

剖検時に全てのマウスから C S F を採取した。ベースライン群の試料は、約 6 ヶ月間保存し、試験終了時に残りの試料と共に分析した。表 2 7 及び図 1 5 のデータは、C S F A β がベースライン群 (1 2 ヶ月齢の A P P 2 3 マウス) で最も高いが、媒体群 (1 8 ヶ月齢の A P P 2 3 マウス) では下がることを示している。この媒体群と比較して、0. 0 3 g / k g 餌化合物 1 治療群では C S F A β 4 0 が非有意に減少し、0. 3 g / k g 餌化合物 1 治療群では有意に減少する。高いベースライン値の理由は、現在のところ分かっていない。これは、オリゴマー型の A β の解離がより高いモノマー濃度につながり得るときの長期保存の効果であると仮定される。C S F A β は、脳抽出物からの T r i t o n T X - 1 0 0 可溶化 A β よりも、A β 生成の変化に直接応答する可溶性アミロイド β の定常状態濃度を代表する。低い化合物 1 用量 (- 4. 6 ~ - 2 0 %) での小さく有意でない治療効果、並びに高い化合物 1 用量 (- 4 3. 7 ~ - 7 7 %) での顕著で有意な効果は、脳組織から単離された可溶性 A β 種と C S F 中 A β 4 0 との間で非常に類似している。

40

【0 3 1 5】

【表 3 0】

表 27: CSF Aβ40 の結果概要

治療群 (n)	Aβ40 (ng/ml) 平均値 ± SEM	対媒体変化率	有意性
ベースライン (10)	48.8 ± 3.15	+42.7%	p<0.0001
0.03 g/kg 餌 (16)	31.2 ± 2.11	-8.6%	有意差なし
0.3 g/kg 餌 (12)	15.6 ± 1.8	-54.3%	p<0.0001
媒体 (18)	34.2 ± 1.16	n.a.	n.a.

10

【0 3 1 6】

前脳内のギ酸可溶性アミロイド-β ペプチド

不溶性 A β 種をギ酸で抽出した後、A P P 2 3 マウス脳内の沈着形態のアミロイド-β に対する化合物 1 の治療効果を調べた。表 2 8 及び表 2 9 及び図 1 6 ～図 1 9 に示されるとおり、媒体群では、ベースラインと比較して沈着 A β の大幅な増加が観察された。A β 4 2 は A β 4 0 より多く増加し（A β 4 2 / 4 0 比は、媒体群で 5 5 % 増加した）、そのより高い凝集傾向と一致した。A β 4 0 及び A β 4 2 は、低用量の化合物 1 による治療後に媒体と比較して約 1 7 % の減少を示したが、これは、統計的有意性には達しなかった。抽出材料の A β 4 2 / 4 0 比は変化しなかった。高い化合物 1 治療群では沈着 A β 4 0 及び A β 4 2 の強力に有意な（約 8 0 % 対媒体）減少が観察され、A β 4 2 / 4 0 比が 0 . 0 7 のベースライン値に戻った。要約すれば、高用量の化合物 1 による治療は、A P P 2 3 マウスのアミロイド β の増加をほぼ完全に阻止した。

20

【0 3 1 7】

【表 3 1】

30

表 28: マウス前脳におけるギ酸可溶性アミロイド-β ペプチド

治療群 (n)	Aβ40 (μg/g) 平均値 ± SEM	Aβ42 (μg/g) 平均値 ± SEM	全 Aβ 平均値 ± SEM	42/40 比 平均値 ± SEM
ベースライン (10)	22.7 ± 3.3	1.45 ± 0.2	24.2 ± 2.4	0.068 ± 0.0097
0.03 g/kg 餌 (16)	170.9 ± 14.8	18.6 ± 1.9	189.5 ± 15.5	0.103 ± 0.0198
0.3 g/kg 餌 (12)	43.7 ± 5.0	3.1 ± 0.5	46.8 ± 5.4	0.068 ± 0.0155
媒体 (18)	208.7 ± 17.6	22.2 ± 2.0	231.0 ± 19.5	0.106 ± 0.0136

40

【0 3 1 8】

【表 3 2】

表 29: 群比較及び統計(ダネットの多重比較検定)

比較群	Aβ40	Aβ42	全 Aβ	Aβ42/40 比
0.03 g/kg vs 媒体	-18.1%	-16.3%	-17.9%	-2.5%
	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし
0.3 g/kg vs 媒体	-79.2%	-86.2%	-79.8%	-36.5%
	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
媒体 vs	+820%	+1348%	+854%	+55%
ベースライン	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

10

【0 3 1 9】

アミロイド病変及び神経炎症の組織学的評価：プラーク数及びプラーク面積

アミロイドペプチドの C 末端部を認識する抗 A β 抗体で APP23 脳切片上のアミロイドプラークを染色した。更に詳しいデータ分析のため、APP23 マウスにおける様々な形態のアミロイド β 沈着を「小型」、「中型」及び「大型」プラークに分類した。更に、総免疫染色面積を決定した。定量化結果は、表 3 0 及び表 3 1 及び図 2 0 ～図 2 3 に示す。A β 沈着の大多数は、「小型」プラークに分類される一方、「中型」プラークの数は、10 分の 1 であり、及び「大型」プラークの数は、100 分の 1 であった。全ての形態のプラークの数は、媒体群では試験期間中に約 4 ～ 6 倍増加し、総プラーク面積についても同じことが観察された。化合物 1 による治療は、この増加を低用量治療群で約 25 %、及び高用量治療群で約 60 % 減少させた。媒体群における A β の増加及び 0.3 g / k g 餌化合物 1 治療群における効果は、組織学的分析では生化学的決定と比較して低い。二次元組織学的分析は、実際には三次元の全てで起こるプラーク容積変化を完全には再現しないこともある。

20

【0 3 2 0】

【表 3 3】

30

表 30: APP23 マウスのプラーク数及びプラーク面積に対する化合物 1 治療の効果、総面積に対して正規化(1000000 * 平均値 ± SEM)

治療群 (n)	小型プラークの数	中型プラークの数	大型プラークの数	総プラーク面積
ベースライン (10)	2.73 ± 0.20	0.32 ± 0.03	0.02 ± 0.01	12.05 ± 1.37
0.03 g/kg 餌 (13)	10.06 ± 1.55	1.06 ± 0.14	0.09 ± 0.02	18.56 ± 2.59
0.3 g/kg 餌 (12)	5.78 ± 0.75	0.58 ± 0.10	0.04 ± 0.01	12.79 ± 2.33
媒体 (17)	14.43 ± 1.37	1.38 ± 0.10	0.12 ± 0.01	22.33 ± 1.86

40

【0 3 2 1】

【表 3 4】

表 31: 群比較及び統計

比較群	小型プラークの 数	中型プラークの 数	大型プラークの 数	総プラーク面積
0.03 g/kg vs 媒体	-30.3% p<0.05	-22.9% 有意差なし	-29.9% 有意差なし	-26.4% p< 0.05
0.3 g/kg vs 媒体	-60.0% p<0.0001	-57.9% p<0.0001	-68.2% p<0.0001	-59.5% p<0.0001
媒体 vs ベースライン	428.6% p<0.0001	331.2% p<0.0001	500% p<0.0001	378.8% p<0.0001

10

【0 3 2 2】

活性化アストロサイトに対する効果

G F A P（グリア線維性酸性タンパク質）は、静止アストロサイトにも活性化アストロサイトにも見られる。G F A P免疫応答性は、多くの場合にアストロサイト数及び活性化のマーカーとして使用される。A P P 2 3 マウスでは、正規化 G F A P 陽性面積がマウスの年齢と共に約 2 倍増加し、この増加は、化合物 1 治療によって用量依存的に減少した（表 3 2 及び表 3 3 及び図 2 4～図 2 8）。G F A P 免疫応答性をアミロイドプラークとの関連性に関して更に分析した（I B A 1 免疫応答性と同様に実施した）。この分析は、G F A P 免疫応答性の大部分が非プラーク関連（遠位）であり、10 %のみがプラーク関連又は近位であることを示している。プラーク関連及び近位 G F A P 免疫応答性の割合が媒体群で増加したことから、アミロイドプラークのごく近傍におけるアストロサイト数／活性化の優勢な増加が示唆される。遠い非プラーク関連 G F A P 陽性染色について、加齢による増加は低かった。化合物 1 治療の効果も、プラーク関連及び非プラーク関連 G F A P 免疫応答性間で異なった。プラーク関連／近位 G F A P 免疫応答性に対する効果は、非プラーク関連／遠位染色に対するよりも強力であった。これらのデータは、化合物 1 が G F A P 染色に対するその効果を主にアミロイドプラークの直ちに近傍に、恐らくプラーク自体に対する効果によって及ぼすことを示唆している。

20

30

【0 3 2 3】

【表 3 5】

表 32: GFAP 陽性面積として表した活性化アストロサイトに対する化合物 1 治療の効果、総面積に
対して正規化(100 * 平均値 ± SEM)

治療群 (n)	総 GFAP+ 面積	プラーク 関連 GFAP+ 面積	非プラーク 関連 GFAP+ 面積	近位 GFAP+面積	遠位 GFAP+ 面積
ベースライン (10)	12.05 ± 1.37	0.74 ± 0.12	11.31 ± 1.28	1.41 ± 0.21	9.90 ± 1.11
0.03 g/kg 餌 (13)	18.56 ± 2.59	2.29 ± 0.47	16.27 ± 2.19	4.11 ± 0.86	12.16 ± 1.52
0.3 g/kg 餌 (12)	12.79 ± 2.33	1.16 ± 0.32	11.63 ± 2.06	1.91 ± 0.51	9.72 ± 1.65
媒体 (17)	22.33 ± 1.86	3.26 ± 0.33	19.07 ± 1.62	5.71 ± 0.56	13.36 ± 1.25

10

20

【 0 3 2 4 】

【表 3 6】

表 33: 正規化 GFAP 陽性面積に関する治療効果及び統計

比較群	総 GFAP+ 面積	プラーク 関連 GFAP+面積	非プラーク 関連 GFAP+面積	近位 GFAP+面積	遠位 GFAP+面積
0.03 g/kg vs 媒体	-16.9% 有意差なし	-29.8% 有意差なし	-14.6% 有意差なし	-28.0% 有意差なし	-8.9% 有意差なし
0.3 g/kg vs 媒体	-42.7% p<0.01	-64.3% p<0.001	-39.0% p<0.05	-66.6% p<0.001	-27.2% 有意差なし
媒体 vs ベースライン	+85.3% p<0.01	+338.2% p<0.0001	+68.6% p<0.05	+306.4% p<0.0001	+34.9% 有意差なし

30

【 0 3 2 5 】

I B A 1 陽性ミクログリアに対する効果

I B A 1 (イオン化カルシウム結合アダプター分子 1) は、ミクログリア／マクロファージ特異的タンパク質である。I B A 1 免疫応答性は、多くの場合にミクログリア数及び活性化のマーカーとして使用される。A P P 2 3 マウスでは、正規化 I B A 1 陽性面積がマウスの年齢と共に約 5 倍増加し、この増加は、化合物 1 治療によって用量依存的に減少した(表 3 4 及び表 3 5)。I B A 1 免疫応答性をアミロイドプラークとの関連性に関して更に分析した。この分析は、I B A 1 免疫応答性の約 7 5 % が非プラーク関連(遠位)であり、2 5 % のみがプラーク関連又は近位であることを示している。プラーク関連及び近位 I B A 1 免疫応答性の割合は媒体群で増加した。それより程度は低い、遠い非プラーク関連 I B A 1 陽性染色もマウスの年齢と共に増加した。化合物 1 治療の効果もプラーク関連及び非プラーク関連 I B A 1 免疫応答性間で異なった。プラーク関連／近位 I B A 1 免疫応答性に対する効果は強力で有意であった。非プラーク関連／遠位染色に対して有意な効果は見られなかった。これは、図 2 9 ～ 図 3 3 に更に示され、プラーク面積と比べ

40

50

た総 I B A 1 染色及びプラーク関連 I B A 1 染色の効果が示される。これらのデータは、化合物 1 が I B A 1 染色に対するその効果を主にアミロイドプラークの直ちに近傍に、恐らくプラーク自体に影響を与えることによって及ぼすことを示唆している。プラークに対する効果は、プラークから遠いミクログリア活性化／数（これは、I B A 1 + 免疫応答性の大部分である）にそれほど強く影響を及ぼさない。

【0326】

【表37】

表 34: IBA1 陽性ミクログリアに対する化合物 1 治療の効果、総面積により正規化(値は平均値 ± SEM である)

治療群 (n)	総 IBA1+ 面積	プラーク関連 IBA1+面積	非プラーク関連 IBA1+面積*	近位 IBA1+面積	遠位 IBA1+面積
ベースライン (7)	1.94 ± 0.20	0.53 ± 0.09	1.37 ± 0.15	0.29 ± 0.04	1.08 ± 0.12
0.03 g/kg 餌 (7)	5.76 ± 0.83	1.79 ± 0.51	3.98 ± 0.54	1.23 ± 0.22	2.74 ± 0.42
0.3 g/kg 餌 (6)	6.31 ± 0.92	0.88 ± 0.19	5.70 ± 1.00	0.65 ± 0.05	5.05 ± 0.98
媒体 (7)	9.24 ± 1.38	3.00 ± 0.57	6.20 ± 1.04	2.34 ± 0.49	3.86 ± 0.75

【0327】

【表38】

表 35: 正規化 IBA1 陽性面積に関する治療効果及び統計

比較群	総 IBA1+ 面積	プラーク関連 IBA1+面積	非プラーク関連 IBA1+面積*	近位 IBA1+面積	遠位 IBA1+ 面積
0.03 g/kg vs 媒体	-37.4% p<0.05	-40.5% 有意差なし	-39.2% 有意差なし	-47.4% p<0.05	-28.9% 有意差なし
0.3 g/kg vs 媒体	-28.5% 有意差なし	-70.6% p<0.01	-8.2% 有意差なし	-72.2% p<0.01	+30.7% 有意差なし
媒体 vs ベースライン	+374.6% p<0.001	+389.3% p<0.001	+360.9% p<0.001	+598.4% p<0.0001	+287.1% p<0.05

【0328】

実施例 8：A D の臨床症状の発生リスクがある参加者における化合物 1 の有効性を評価する無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験の概要

本明細書に記載する臨床試験では、認知が実質的に悪化する可能性がより高い個体を妥当なタイムフレームで選択するための予後診断強化戦略として、臨床試験セッティング内で实际的に評価することのできる A p o E 4 ホモ接合体の同定を利用する。この試験は、C l i n i c a l T r i a l s . g o v に N C T 0 2 5 6 5 5 1 1 識別コードで収載されている。代替として、本実施例は、認知障害のない A p o E 4 保因者（ホモ接合体；又は脳アミロイドの更なる高濃度化（「アミロイド陽性」）が例えば P E T 又は C S F 測定により決定されたヘテロ接合体）、60～75 歳、1 日 1 回経口用量の 15 又は 50 mg 化合物 1 で行われてもよい。この試験は、C l i n i c a l T r i a l s . g o v に N C T 0 3 1 3 1 4 5 3 識別コードで収載されている。

【0329】

計画された臨床試験における少なくとも 5 年の治療期間中、参加者の大部分が A D に起因する軽度認知障害（M C I）又は認知症と診断されるであろうことが予想される。これらの診断の大多数は、M C I であると予想され、M C I は、認知症の診断に 2～4 年先行

10

20

30

40

50

すると予想される。

【 0 3 3 0 】

【 表 3 9 】

表 36: AD 臨床症状の発生リスクがある参加者における化合物 1 の有効性を評価する無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験の概要

試験名	アルツハイマー病(AD)の臨床症状の発生リスクがある参加者における化合物 1 の有効性を評価する無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験	10
試験の種類	介入	
目的及び理由 付け	本試験の目的は、AD 臨床症状の発生リスクがある参加者の認知、全般的臨床状態、及び基礎的病変に対する本療法の効果を判定することである。AD に起因する軽度認知障害(MCI)及び／又は AD に起因する認知症への進行リスクが特に高い集団を代表するものとして、APOE4 ホモ接合体(HM)遺伝子型及び年齢 60 歳以上 75 歳以下の認知障害のない個体を選択する。	20
主要目的	・ イベント発生までの時間(Time-to-event: TTE)に対する化合物1の効果をプラセボと比べて実証すること。なお、イベントは、AD に起因する MCI 又は AD に起因する認知症のいずれか早く起こる方の診断として定義される。 ・ APCC (API Preclinical Composite Cognitive Battery: API 発症前複合認知バッテリー)検査スコア(Langbaum JB <i>et al.</i>, 2014)のベースラインから 60 ヶ月目までの変化量によって測定したときの認知に対する化合物 1 の効果をプラセボと比べて実証すること。	30

【 0 3 3 1 】

【表 4 0】

副次的目的	重要な副次的目的 - 臨床認知症評価法(Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes: CDR-SOB)スコア(Morris JC, 1993)のベースラインから 60 ヶ月目までの変化量によって測定したときの全般的臨床状態に対する化合物 1 の効果をプラセボと比べて実証すること。 副次的目的 - 有害事象(AE)、及び脳構造 MRI の変化、臨床検査、皮膚検査、コロンビア自殺重症度評価尺度(Columbia Suicide Severity Rating Scale: C-SSRS) (Posner K <i>et al.</i>, 2011)を含めた認知に関しない神経学的及び精神医学的所見、バイタルサイン及び心電図(ECG)によって測定したときの化合物 1 の安全性及び忍容性をプラセボと比べて実証すること。 - アーバンス神経心理検査 (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status: RBANS) (Randolph C. 1998)の総得点 (Total Scale)スコア及び個別の神経認知領域の指標得点に関するベースラインから 60 ヶ月目までの変化量によって測定したときの認知に対する化合物 1 の効果をプラセボと比べて実証すること。 - 参加者及び試験パートナーがそれぞれ報告する日常認知(Everyday Cognition: ECog) (Farias ST <i>et al.</i>, 2008)総スコアのベースラインから 60 ヶ月目までの変化量によって測定したときの機能に対する化合物 1 の効果をプラセボと比べて実証すること。 - 以下に関するベースラインから 24 及び 60 ヶ月目までの変化量によって測定したときの AD 関連バイオマーカー(アミロイド沈着及び神経変性尺度)に対する化合物1の効果をプラセボと比べて実証すること: - 脳陽電子放射断層撮影(PET)イメージングを用いて得られるアミロイドトレーサー¹⁸F-フルルベタピルの結合、 - 容積 MRI 測定、及び - CSF Aβ₁₋₄₀、Aβ₁₋₄₂、総タウ及びホスホタウ₁₈₁レベル
-------	---

10

20

30

40

【表 4 1】

試験デザイン	本治療エボックは無作為化、二重盲検、プラセボ対照デザインに従い、ここで参加者は被験治療又はその対応するプラセボの投与を少なくとも 60 ヶ月間、最長 9 6 ヶ月まで受け、TTE エンドポイントのターゲットイベント数が観察及び確認された時点より長くなることはない。
対象集団	本治療エボック集団は、その APOE4 HM 遺伝子型及び年齢(60~75 歳)に基づき AD 臨床症状の発生リスクがある男性及び女性参加者からなることになる。 無作為化は年齢群及び地域によって層別化されることになる
組入れ基準	・ 男性又は女性、年齢 60 歳以上 75 歳以下。女性は閉経後で妊娠の可能性がないと考えられなければならない。 ・ ミニメンタルステート検査(MMSE) (Folstein MF <i>et al.</i>, 1975) 総スコア $\geq$ 24、及びスクリーニング時に実施する記憶テストによって判定したとき認知障害がないこと、及び以下によって定義されたとおりであること: ○ ホモ接合 APOE4 遺伝子型、 ○ 参加者が試験パートナーを持つことをいとわない

10

20

【 0 3 3 3 】

【表 4 2】

除外基準	・ 強力な CYP3A4 誘導薬又は強力な CYP3A4 阻害薬によって現在慢性治療中であること(>3 ヶ月) ・ 参加者が全ての試験要求事項を遂行できない可能性がある何らかの能力の欠如 ・ 現在の医学的又は神経学的状態が認知又は認知評価の実施に影響を及ぼす可能性があること ・ 安全性、忍容性及び試験評価を妨げ得る、又は参加者を特別な危険に陥れ得る進行した疾患、重度進行性疾患又は不安定疾患 ・ 過去 60 ヶ月以内の、治療済み又は未治療の、任意の器官系の悪性病変歴 ・ ChEI による治療及び／又は別の AD 治療(例えばメマンチン)の適応がある、又は現在治療中であること ・ 治験責任医師の意見で認知低下の主因である可能性のある、参加者に危険を及ぼす可能性のある、又は安全性モニタリング上の十分な MRI 評価を妨げる可能性のある AD と無関係の所見を示す脳 MRI 結果 ・ 過去 6 ヶ月の自殺念慮、又は過去 2 年の自殺行動 ・ 治験責任医師の意見でそれが薬物乱用に起因する場合の、スクリーニング時の陽性薬物スクリーン ・ 一時的な病態の結果ではない、スクリーニング時の著しく異常な検査結果 ・ 臨床的に有意な現在の ECG 所見
------	--

10

20

30

【 0 3 3 4 】

【表 4 3】

被験治療及び 対照治療	化合物 1 及びプラセボ: アーム 1: 化合物 1, 50 mg カプセル p.o. 1 日 1 回投与 アーム 2: プラセボから化合物 1 p.o. 参加者は治療エポック期間中にわたり化合物 1、50 mg 又はプラセボ 1 日 1 回、経口摂取による 3 ヶ月治療用の服薬供給分を分配されることになる
有効性評価	• AD に起因する MCI 又は AD に起因する認知症(MCI/認知症) (診断検証フォーム) • API 発症前複合認知(API Preclinical Composite Cognitive: APCC)バッテリー • アーバンス神経心理検査(Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status: RBANS) • レーヴン色彩マトリックス検査(Raven's Progressive Matrices) (Raven JC <i>et al.</i>, 1992; Raven JC, 2000) • ミニメンタルステート検査(MMSE) • 臨床認知症評価法(Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes: CDR-SOB) • 日常認知スケール(Everyday Cognition Scale: ECog) • 神経精神目録質問票(Neuropsychiatric Inventory-Questionnaire: NPI-Q) (Kaufer <i>et al.</i>, 2000) • 老年期うつ病評価尺度(Geriatric Depression Scale: GDS) (Sheikh JI, Yesavage JA, 1986) • ライフスタイル質問票 (Carlsson AC <i>et al.</i>, 2013) • クオリティ・オブ・ライフ (QOL -AD) (Logsdon RG <i>et al.</i>, 1999 及び Thorgrimsen L <i>et al.</i>, 2003)

10

20

30

40

【表 4 4】

安全性評価	・ 身体的及び神経学的検査(皮膚検査を含む) ・ バイタルサイン ・ 体重 ・ 臨床検査値判定 ・ 心電図(ECG) ・ 安全性脳 MRI スキャン ・ 有害事象及び重篤有害事象 ・ コロンビア自殺重症度評価尺度(Columbia-Suicide Severity Rating Scale: C-SSRS)	10
他の評価	・ 薬物動態 ・ バイオマーカー ○ イメージングバイオマーカー ・ 容積 MRI ・ 安静時機能 MRI ・ アミロイド PET ・ FDG PET ○ 体液バイオマーカー ・ CSF 系バイオマーカー ・ 血液系バイオマーカー(ファーマコゲノミクス(RNA)及びファーマコジェネティクス(DNA)についての血清、血漿、血液)	20
		30

【 0 3 3 6】

【表 4 5】

データ分析	主要分析には、両方の主要エンドポイントの仮説の統計的検定が含まれる。統計的検定は、実薬被験治療を対応する対照群としてのプラセボと比較することになる。予め定義付けられた検定戦略を用いて2つ以上の仮説の検定についての第 1 種の過誤率を調整することになる。 副次的エンドポイント(CDR-SOB、ECog、APCC バッテリー及び RBANS に含まれる個別尺度、PET、容積 MRI、CSF 中の総タウ、リン酸化タウ)は、全て、CDR-SOB についての一般化線形混合モデル(GLMM)、並びに治療を因子とし、重要な共変量を調整する主要エンドポイント APCC の手法と同様の混合モデル反復測定(MMRM)などの縦断的モデルを用いて分析することになる。副次的安全性パラメータ(AE、SAE、検査結果、バイタルサイン、ECG、安全性脳 MRI スキャン)については、記述統計が提供されることになる。
-------	---

10

20

【0 3 3 7】

実施例 9：単独投与時及び強力な CYP 3 A 4 阻害薬イトラコナゾール又は強力な CYP 3 A 4 誘導薬リファンピシンの併用投与時の化合物 1 の薬物動態のヒト試験における健常ボランティアでの薬物間相互作用 (DDI) 試験において、化合物 1 の PK に対する強力な CYP 3 A 4 阻害薬 (イトラコナゾール) 及び強力な CYP 3 A 4 誘導薬 (リファンピシン) の効果を判定した。DDI 試験設計の概要は、図 3 4 に示す。200 mg q. d. の用量のイトラコナゾールは、化合物 1 と共に投与したとき、化合物 1 を単独で投与したときと比較して化合物 1 の平均 AUC を 2 ～ 3 倍増加させ、化合物 1 の平均 C_{max} を 25 % 増加させた (表 3 7)。600 mg q. d. の用量のリファンピシンは、化合物 1 と共に投与したとき、化合物 1 を単独で投与したときと比較して化合物 1 の平均 AUC を 5 ～ 6 倍低下させ、化合物 1 の平均 C_{max} を 2.5 倍低下させた (表 3 8)。結論として、第 1 相研究における化合物 1 曝露に対する強力な CYP 3 A 4 誘導薬及び強力な CYP 3 A 4 阻害薬の効果は、CYP 3 A 4 / 5 が化合物 1 の排出に大きい重要性を有することを示している。

30

【0 3 3 8】

【表 4 6】

表 37: 薬物動態結果－化合物 1 の血漿 PK パラメータに対するイトラコナゾールの効果の統計的
分析: 化合物 1 30 mg SD + イトラコナゾール 200 mg QD vs 化合物 1 30 mg SD

パラメータ [単位]	治療	n*	調整幾何 平均値	幾何平均値比 (被験/対照)	比の 90% CI
AUCinf (ng*hr/mL)	化合物 1 30 mg SD	17	3560	3.05	[2.91 , 3.20]
	化合物 1 30 mg SD + イトラコナゾール 200 mg QD	17	10900		
AUClast (ng*hr/mL)	化合物 1 30 mg SD	17	3150	2.20	[2.11 , 2.30]
	化合物 1 30 mg SD + イトラコナゾール 200 mg QD	17	6930		
Cmax (ng/mL)	化合物 1 30 mg SD	17	74.1	1.23	[1.18 , 1.29]
	化合物 1 30 mg SD + イトラコナゾール 200 mg QD	17	91.3		

n* = 欠損値のない対象の数

治療及び対象を固定効果とした ANOVA モデルを各対数変換 PK パラメータにフィッティング
した。結果を逆変換して「調整幾何平均値」、「幾何平均値比」及び「90%CI」を求めた。

【0 3 3 9】

10

20

30

【表 4 7】

表 38: 薬物動態結果—化合物 1 の血漿 PK パラメータに対するリファンピシンの効果の統計的分析:

化合物 1 100 mg SD + リファンピシン 600 mg QD vs 化合物 1 100 mg SD

パラメータ [単位]	治療	n*	調整幾何 平均値	幾何平均値比 (被験/対照)	比の 90% CI
AUCinf (ng*hr/mL)	化合物 1 100 mg SD	13	10200	0.172	[0.152, 0.194]
	化合物 1 100 mg SD + リファンピシン 600 mg QD	13	1750		
AUClast (ng*hr/mL)	化合物 1 100 mg SD	13	8560	0.196	[0.176 , 0.219]
	化合物 1 100 mg SD + リファンピシン 600 mg QD	13	1680		
Cmax (ng/mL)	化合物 1 100 mg SD	13	222	0.414	[0.365 , 0.470]
	化合物 1 100 mg SD + リファンピシン 600 mg QD	13	92.2		

n* = 欠損値のない対象の数

治療及び対象を固定効果とした ANOVA モデルを各対数変換 PK パラメータにフィッティングした。結果を逆変換して「調整幾何平均値」、「幾何平均値比」及び「90%CI」を求めた。

【0340】

実施例 10：健常高齢 A p o E 4 ヘテロ接合体及び A p o E 4 非保因者における化合物 1 による治療に应答したベースラインからの A β 4 2 / A β 4 0 比の変化量の判定

脳内 A β 沈着の増加は、確立された P E T トレーサー、例えば ¹¹C-ピッツバーク化合物 B、¹⁸F-フロルベタベン、又は ¹⁸F-フルテメタモルを使用した皮質 A β の P E T イメージングにより、また C S F A β 1-4 2 の低下としても決定することができる。幾つかの試験が、脳内アミロイド β 病変の検出について P E T イメージングと C S F A β 1-4 2 分析との間の高い一致を示している (Weigand S D et al., 2011; Barthel H et al., 2011; Schipke C G et al., 2017)。この相関は、C S F A β 1-4 2 の減少が脳内のアミロイド β 沈着が増加した結果であることを示唆している。A β 1-4 2 と対照的に、皮質アミロイド沈着物に蓄積しにくい A β 1-4 0 の C S F 濃度は、高い皮質アミロイド β 負荷を有する患者であっても事実上一定のままである。これと一致して、A β 1-4 2 単独の代わりに C S F A β 1-4 2 / A β 1-4 0 比を使用したとき、よりロバストな P E T-C S F 相関が得られることが実証されている (Pannee J et al., 2016; Janelidze S et al., 2016)。脳内アミロイド β 病変の検出の診断ツールとして A β 1-4 2 / A β 1-4 0 比を使用することは十分に確立されているが、抗アミロイド剤による治療に应答したこのパラメータの変化についてはこれまで記載がない。

【0341】

実施例 5 に記載する健常高齢対象における完了した 3 ヶ月用量範囲探索安全性及び忍容性臨床試験において、初回投与前 (ベースライン) 及び 3 ヶ月の複数回投与後に腰椎穿刺を用いて C S F 中 A β 4 0 及び A β 4 2 濃度を得た。多数の対象が、皮質アミロイド沈着を示すものである正常値未満 (0.09 のカットオフ未満) のベースライン C S F A β 4 2 / A β 4 0 を有することが分かった。比が 0.09 未満の対象の割合は、非保因者 (15%) と比較して A p o E 4 保因者 (33%) の群で高い。これは、A p o E 4 保因者

のアミロイドーシス発症リスクが高いことと一致する。

【0342】

0.09未満のベースラインCSF $A\beta 42/A\beta 40$ 比を有する対象において、化合物1による3ヵ月の治療の終了時におけるCSF $A\beta 42/A\beta 40$ 比を決定した、図35。化合物1による治療により、同じ対象のベースライン値と比較して $A\beta 42/A\beta 40$ 比が用量依存的に増加したことが分かった。 $A\beta 42/A\beta 40$ 比の増加は、ApoE4アレルの保因者及び非保因者の両方の治療への応答に認められた。具体的には、35mg及び85mg1日用量により、 $A\beta 42/A\beta 40$ 比の1.36倍 ($p < 0.01$ 対プラセボ) 及び1.46倍 ($p < 0.01$ 対プラセボ)の増加が生じた。

【0343】

この結果は、より高用量の化合物1で治療した対象の皮質アミロイドーβ負荷の減少に対応した、脳からCSFへの $A\beta 42$ の輸送の増加を示すものである。皮質アミロイドーβ負荷の減少は、化合物1がApoE4アレルの保因者及び非保因者の両方においてADに特有のアミロイド病変を修飾する能力を有し、従ってこれらの患者群のいずれにおいてもADの予防に有効であると予想されることを示している。

【0344】

参考文献

- Albert MS et al., (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the national Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*; 7: 270-9. 20
- Barthel H et al., (2011) Cerebral amyloid-beta PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and Healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol.*, 10: 424-435.
- Carlsson AC et al., (2013) Seven modifiable lifestyle factors predict reduced risk for ischemic cardiovascular disease and all-cause mortality regardless of body mass index: A cohort study. *International Journal of Cardiology*; 168: 946-952. 30
- Castellano JM et al., (2011) Human apoE1s isoforms differentially regulate brain Amyloid-β peptide clearance. *Sci Transl Med*; 3(89): 89ra57).
- Corder EH et al., (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*; 261(5123): 921-3. 40
- Cummings JL et al., (2014) Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*; 6: 37.
- Farias ST et al., (2008) The measurement of everyday cognition (ECog): Scale development and psychometric properties. *Neurops* 50

ychology; 22 (4) : 531–544.

Folstein MF et al., (1975) A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J. Psychiat. Res. ; 12 : 189–198.

Forlenza OV et al., (2015) Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease: Diagnostic accuracy and prediction of dementia. *Alzheimers Dement. (Amst)* ; 1 (4) : 455–463.

Foster NL et al., (2007) FDG-PET Improves Accuracy in Distinguishing Frontotemporal Dementia and Alzheimer's Disease. *Brain* ; 130 (10) : 2616–2635.

Genin E et al., (2011) ApoE and Alzheimer disease: A major gene with semi-dominant inheritance. *Mol. Psychiatry* ; 16 (9) : 903–907.

Harada R et al., (2016) 18F-THK5351: A Novel PET Radiotracer for Imaging Neurofibrillary Pathology in Alzheimer Disease. *J. Nucl. Med.* ; 57 (2) : 208–214.

Head E et al., (2012) Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *Eur. J. Neurodegener. Dis.* ; 1 (3) : 353–364.

Herskovitz AZ et al., (2013) A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS ONE* ; 8 (7) : e67898. doi:10.1371/journal.pone.0067898.

Janelidze S et al., (2016) Swedish BioFINDER study group, Hansson O. CSF A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 3 (3) : 154–65.

Jansen WJ et al., (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis *JAMA* ; 313 (19) : 1924–38.

Kaufer et al., (2000) Validation of the NPI-Q, a brief clinical form of the Neuropsychiatric Inventory. *J. Neuropsychiatry Clin. Neuroscience* ; 12 : 233–239

Knouff C et al. (1999) Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J. Clin. Invest.* ; 103 (11) : 1579–1586).

Kramp VP, Herrling P, (2011) List of drugs in development for neurodegenerative diseases: Update June 2010. *Neurodegenerative*

10

20

30

40

50

- Dis. ; 8 : 44 – 94.
- Langbaum JB et al., (2014) An empirically derived composite cognitive test score with improved power to track and evaluate treatments for preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* ; 10 (6) : 666 – 74.
- Liu CC et al., (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* ; 9 : 106 – 118.
- Logsdon RG et al., (1999) Quality of life in Alzheimer's disease: Patient and caregiver reports. *Journal of Mental Health & Aging* ; 5 (1) : 21 – 32. 10
- Luo G et al., (2004) CYP3A4 Induction by Xenobiotics: Biochemistry, Experimental Methods and Impact on Drug Discovery and Development. *Current Drug Metabolism* ; 5 : 483 – 505
- Mattsson N et al., (2015) Predicting Reduction of Cerebrospinal Fluid β -Amyloid 42 in Cognitively Healthy Controls. *JAMA Neurology* ; 72 (5) : 554 – 560. 20
- McKhann GM et al., (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute of Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* ; 7 : 263 – 269.
- Medina M et al., (2014) New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem. Pharmacol.* ; 88 (4) : 540 – 547. 30
- Morris JC, (1993) The Clinical Dementia Rating (CDR) : Current version and scoring rules. *Neurology* ; 43 : 2412 – 2414.
- Neumann U. et al., (2015) A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- β and neuroinflammation in APP transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration* ; 10 : 44. 40
- O'Brien RJ, Wong PC, (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* ; 34 : 185 – 204.
- Palmqvist S et al., (2016) Cerebrospinal fluid analysis detects cerebral amyloid- β accumulation earlier than positron emission tomography. *Brain* ; 139 : 1226 – 1236.
- Pannee J et al., (2016) Reference measurem 50

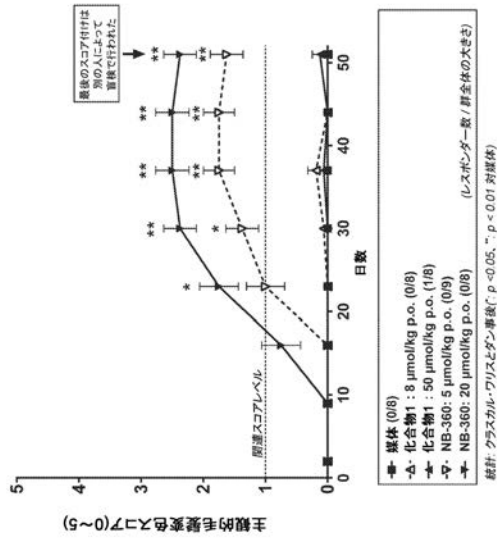
- ent procedure for CSF amyloid beta ($A\beta$) 1-42 and the CSF $A\beta$ 1-42 / $A\beta$ 1-40 ratio—a cross-validation study against amyloid PET. *J Neurochem*; 139 (4) : 651–658.
- Posner K et al., (2011) The Columbia–Suicide Severity Rating Scale: Initial Validity and Internal Consistency Findings From Three Multisite Studies With Adolescents and Adults. *Am. J. Psychiatry*; 168 : 1266–1277. 10
- Rahier J et al., (1989) Determination of antigen concentration in tissue sections by immunodensitometry. *Laboratory Investigations*; 61 : 357–363.
- Randolph C, (1998) The Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status (RBANS). Pearson; San Antonio.
- Raven JC et al., (1992) Standard progressive matrices—1992 edition; Raven manual: Section 3. Oxford Psychologists Press; Oxford. 20
- Raven JC, (2000) Standard Progressive Matrices—1998 Edition, updated 2000. Manual for Standard Progressive Matrices (Section 3) : NCS Person, Inc. ; San Antonio.
- Ruifrok AC et al., (2001) Quantification of Histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant. Cytol. Histol.* ; 23 : 291–299.
- Schipke CG et al., (2017) Correlation of florbetaben PET imaging and the amyloid peptide $A\beta$ 42 in cerebrospinal fluid. *Psychiatry Research* (265) : 98–101. 30
- Schrader–Fischer G, Paganetti PA, (1996) Effect of alkalinizing agents on the processing of the β -amyloid precursor protein. *Brain Research*; 716 (1–2) : 91–100.
- Schrader–Fischer G et al., (1997) Insertion of Lysosomal Targeting Sequences to the Amyloid Precursor Protein Reduces Secretion of β A4. *Journal of Neurochemistry* 68 (4) : 1571–1580. 40
- Schreiber S et al., (2015) Comparison of Visual and Quantitative Florbetapir F 18 Positron Emission Tomography Analysis in Predicting Mild Cognitive Impairment Outcomes. *JAMA Neurol.* ; 72 (10) : 1183–1190.
- Sevrioukova IF, Poulos TL, (2015) Current Approaches for Investigating and Predicting Cytochrome P450 3A4–Ligand Interactio 50

- ns. Adv. Exp. Med. Biol. ; 851 : 83 - 105.
- Sheikh JI, Yesavage JA, (1986) Geriatric Depression Scale (GDS). Recent evidence and development of a shorter version. In T. L. Brink (Ed.), Clinical Gerontology: A Guide to Assessment and Intervention (pp. 165-173). NY: The Haworth Press, Inc.
- Shimshek DR et al., (2016) Pharmacological BACE1 and BACE2 inhibition induces Hair depigmentation by inhibiting PMEL17 processing in mice. Sci. Rep. ; 6 : 21917 ; doi : 10.1038/srep21917. 10
- Sperling RA et al., (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. Alzheimers Dementia ; 7 (3) : 280 - 292. .
- Sturchler-Pierrat C et al., (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ; 94 (24) : 13287 - 13292. 20
- Thorgrimsen L et al., (2003) Whose Quality of Life Is It Anyway? The Validity and Reliability of the Quality of Life-Alzheimer's Disease (QoL-AD) Scale. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. ; 17 : 201 - 208.
- Vlassenko AG et al., (2012) PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease Biochim. Biophys. Acta ; 1822 (3) : 370 - 379. 30
- Weigand SD et al., (2011), Transforming cerebrospinal fluid Abeta42 measures into calculated Pittsburgh Compound B units of brain Abeta amyloid. Alzheimer's Dement : J. Alzheimer's Assoc. , 7 : 133 - 141.
- 【0345】

本明細書に引用される全ての参考文献、例えば科学刊行物又は特許出願公報は、各参考文献があらゆる目的から全体として参照により援用されることが具体的且つ個別的に指示されたものとみなすのと同程度に全体として及びあらゆる目的から参照により本明細書に援用される。前述の本発明は、理解を明確にするための例示及び実施例としていくらか詳細に記載されているが、当業者には、本発明の教示を踏まえれば、それに対して添付の特許請求の範囲の趣旨又は範囲から逸脱することなく特定の変更形態及び修正形態がなされ得ることは容易に明らかであろう。 40

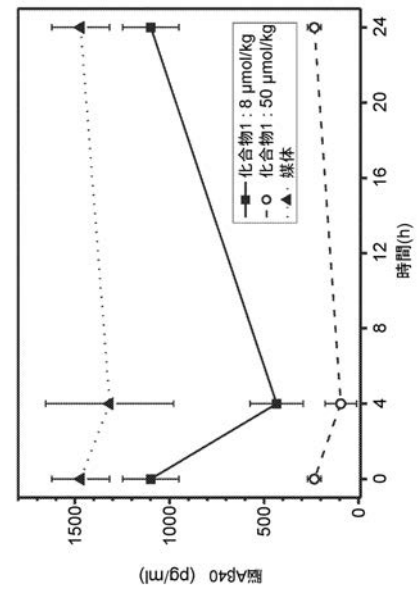
【図 1】

図1: 化合物1又はNB-360で8週間慢性投与したC57BL/6マウスの毛色スコア(平均値±SEM)



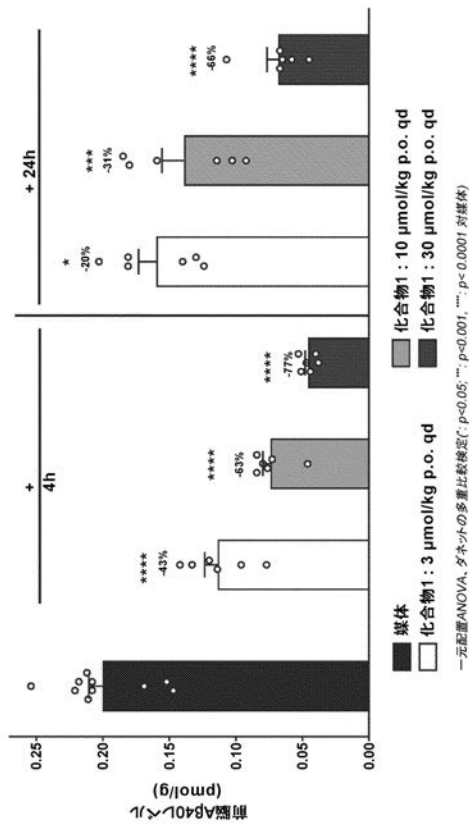
【図 2】

図2: 8及び50μmol/kgの化合物1による治療のC57BL/6マウスにおける最終投与後の脳Aβ40の減少(平均値±SD, n=4/群)



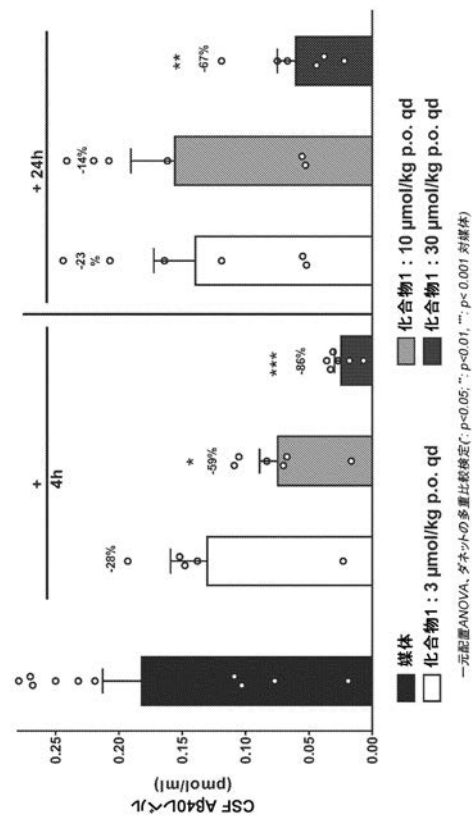
【図 3】

図3: APOE4-TR雄及び雌マウスの前脳Aβ40レベルに対する化合物1の急性投与の効果(3~5ヶ月齢, 平均値±SEM)



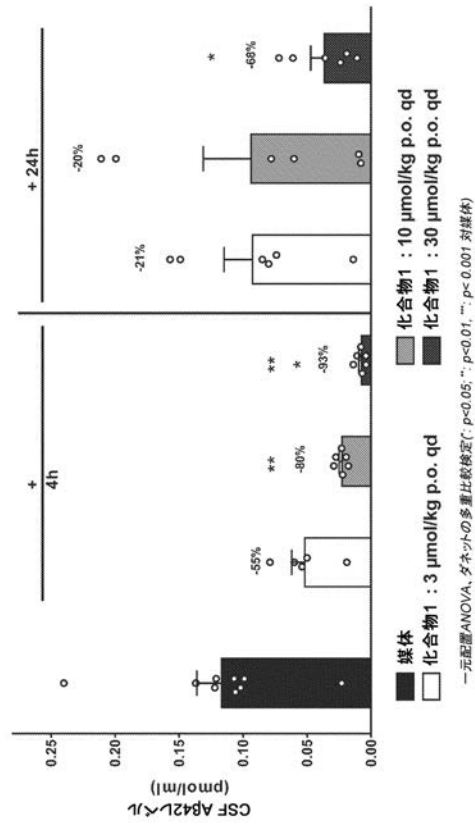
【図 4】

図4: APOE4-TR雄及び雌マウス(3~5ヶ月齢)のCSF Aβ40レベルに対する化合物1の急性投与の効果(平均値±SEM)



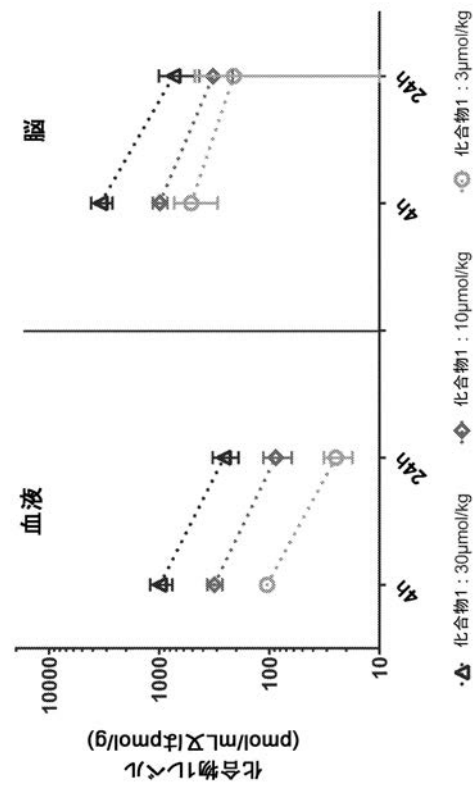
【図 5】

図5: APOE4-TR雄及び雌マウス(3~5ヵ月齢)のCSF Aβ42レベルに対する化合物1の急性投与の効果(平均値±SEM)



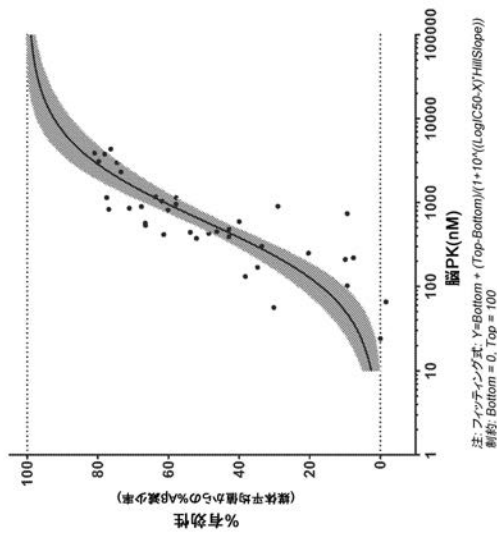
【図 6】

図6: APOE4-TR雄及び雌マウスにおける化合物1急性投与(3~5ヵ月齢, 平均値±SD)



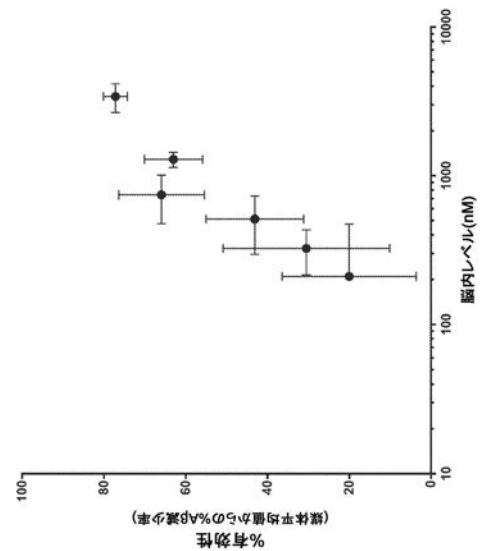
【図 7】

図7: 脳PK/PD関係(個体データ)



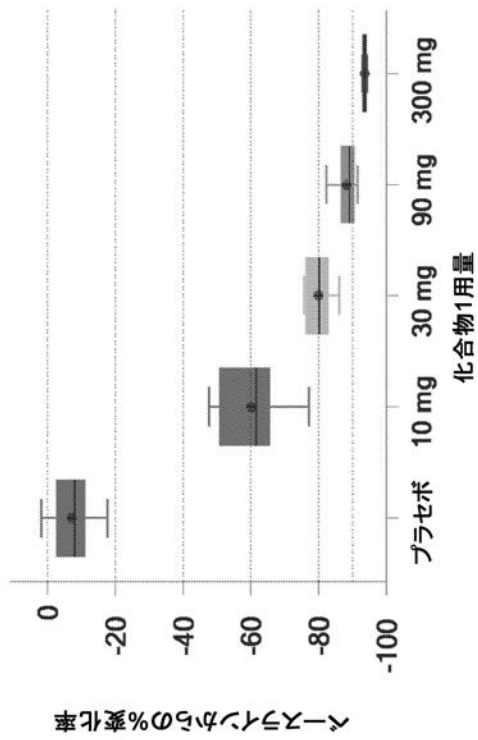
【図 8】

図8: 脳PK/PD関係(平均値±SD)



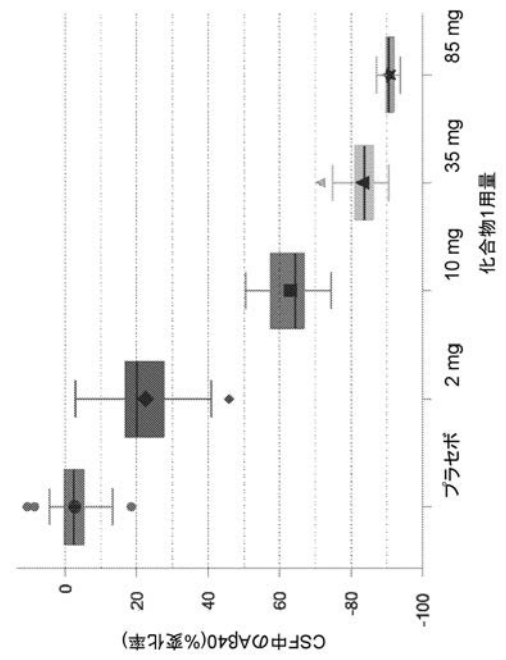
【図 9】

図9: ヒト対象の増量増経口投与試験における化合物1の2週間増量後のCSF Aβ40レベルに対する効果



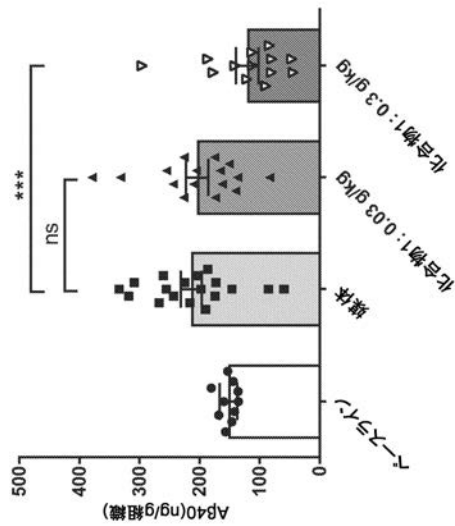
【図 10】

図10: ヒト対象のCSF Aβ40レベルに対する化合物1の効果 - 3ヵ月時におけるベータサインからの%変化率(最終投与後24時間)



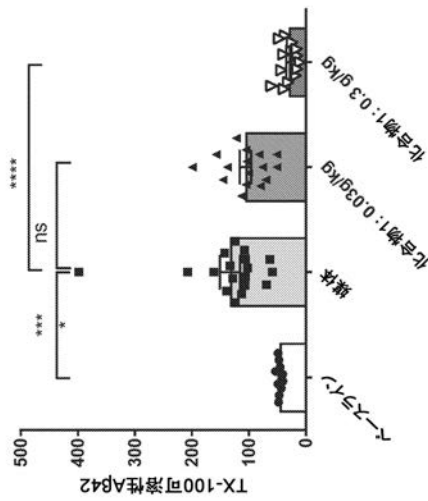
【図 11】

図11: Triton TX-100抽出APP23腫のAβ40に対する化合物1の効果

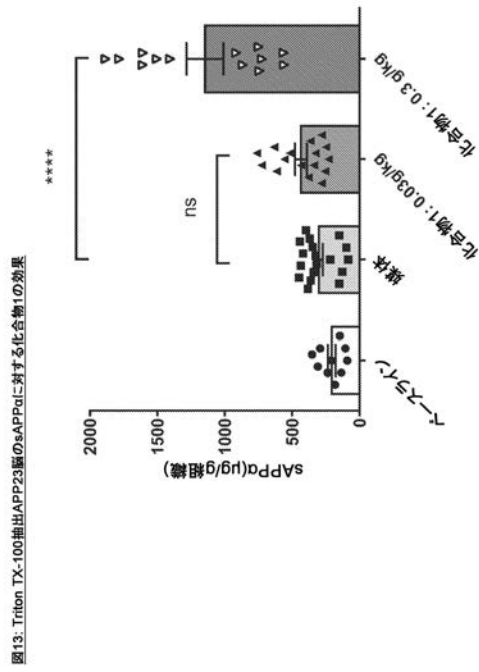


【図 12】

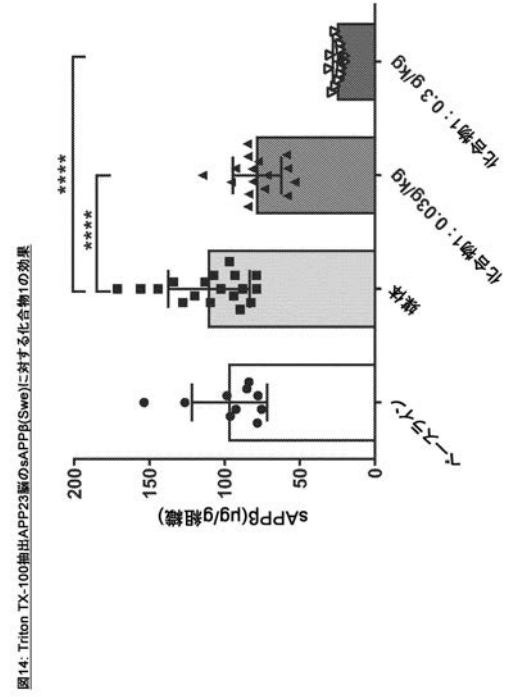
図12: Triton TX-100抽出APP23腫のAβ42に対する化合物1の効果



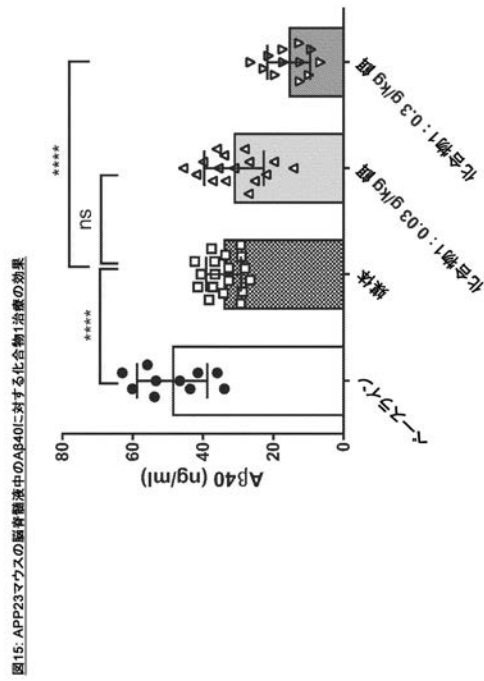
【図 13】



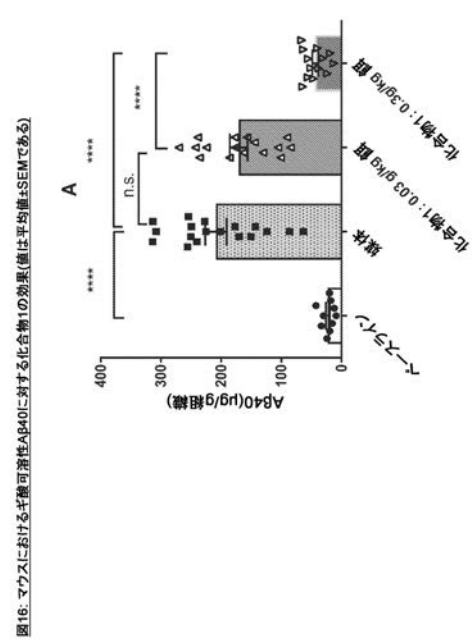
【図 14】



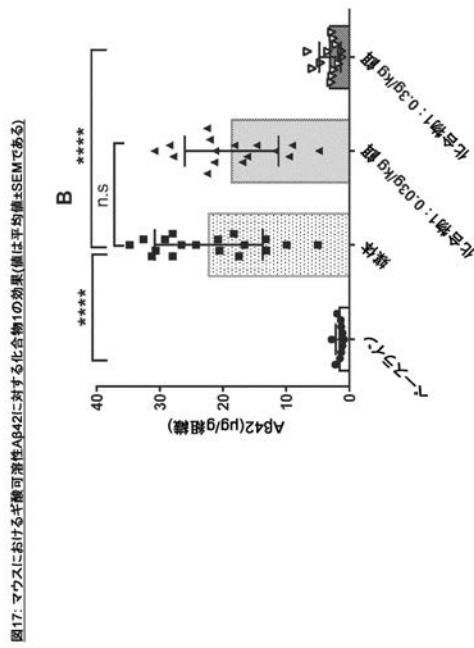
【図 15】



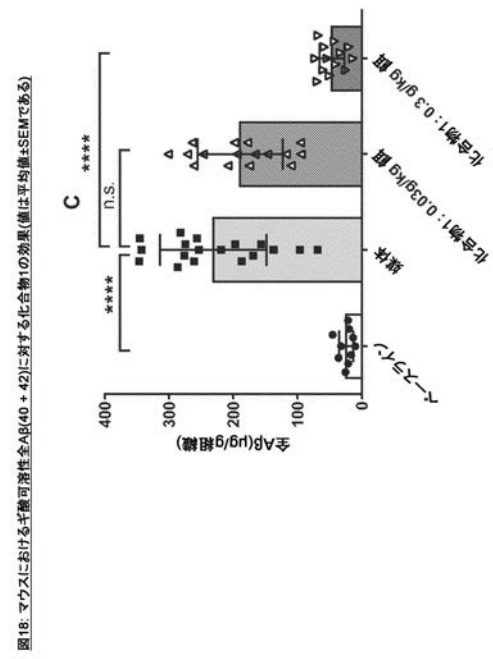
【図 16】



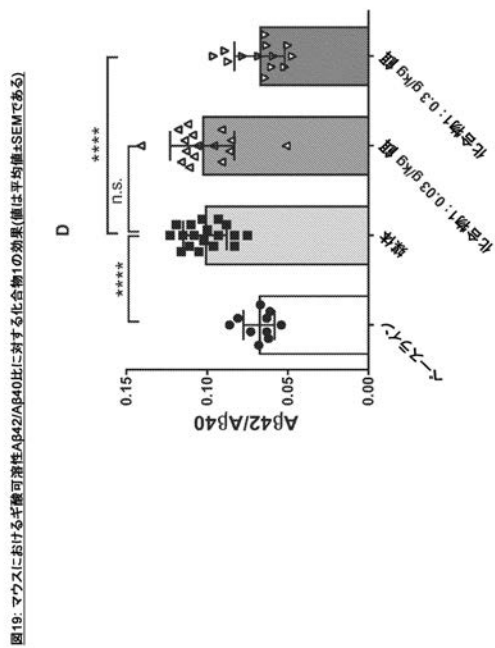
【図 17】



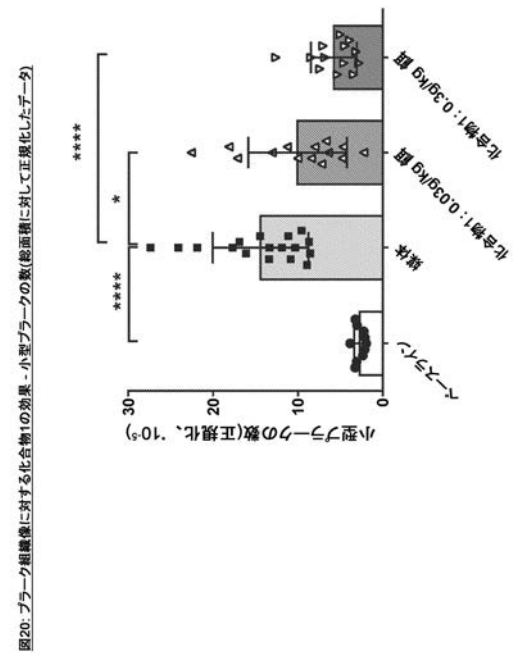
【図 18】



【図 19】

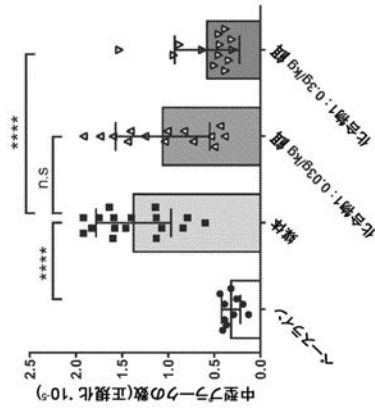


【図 20】



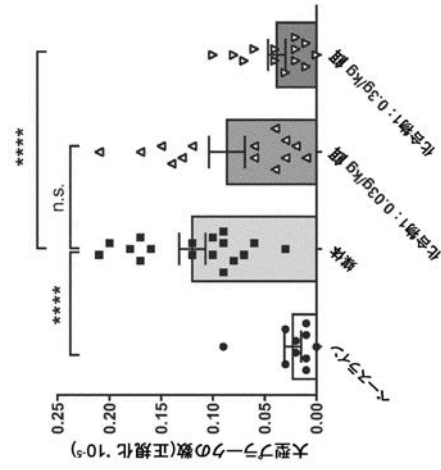
【図 2 1】

図21: プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 中型プラークの数(総面積に対して正規化したデータ)



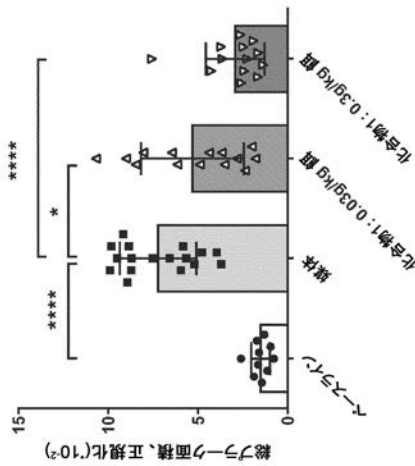
【図 2 2】

図22: プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 大型プラークの数(総面積に対して正規化したデータ)



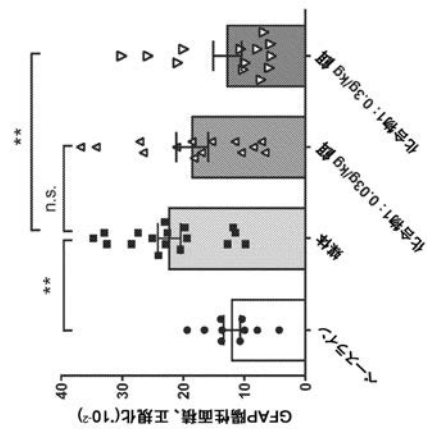
【図 2 3】

図23: プラーク組織像に対する化合物1の効果 - 総プラーク面積(総面積に対して正規化したデータ)



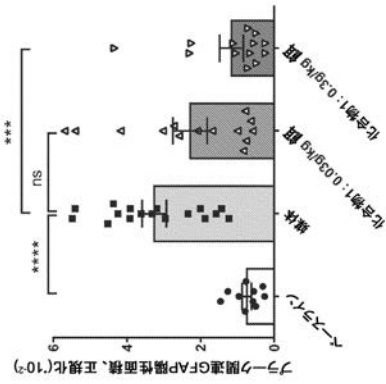
【図 2 4】

図24: 総GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)、平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



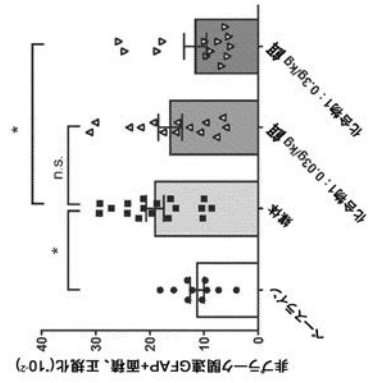
【図 25】

図25: プラーク関連GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



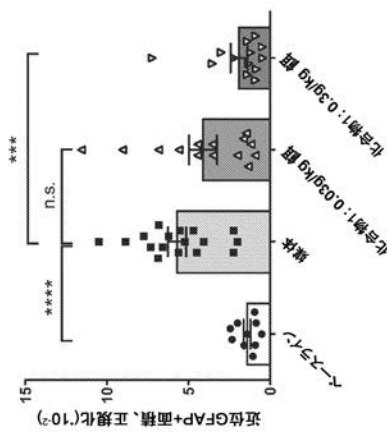
【図 26】

図26: 非プラーク関連GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



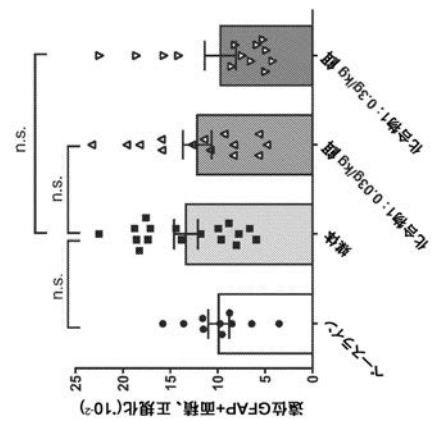
【図 27】

図27: 近位GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



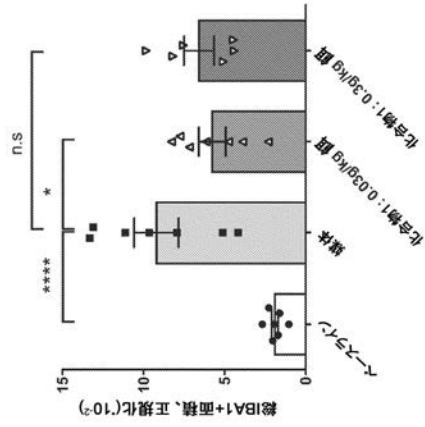
【図 28】

図28: 遠位GFAP陽性面積(総面積に対して正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



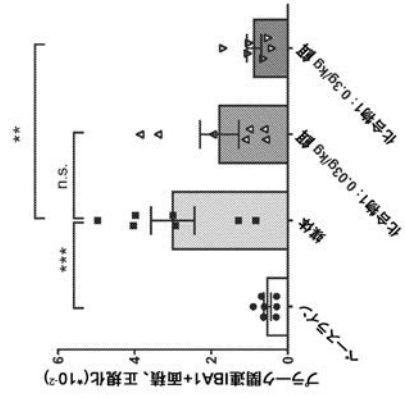
【図 29】

図29: 総IBA1陽性面積に対する化合物1治療の効果。個別のミクログリア集団を示す(試料面積によって正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



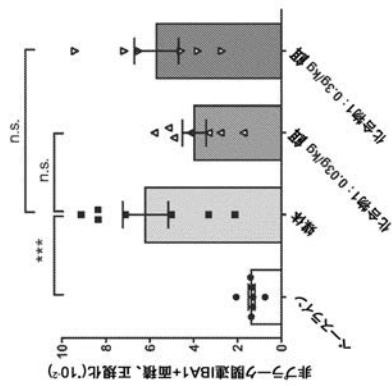
【図 30】

図30: プラーク関連IBA1陽性面積に対する化合物1治療の効果。個別のミクログリア集団を示す(試料面積によって正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



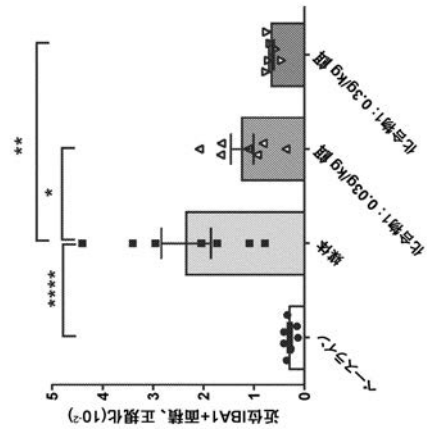
【図 31】

図31: 非プラーク関連IBA1+面積に対する化合物1治療の効果。個別のミクログリア集団を示す(試料面積によって正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



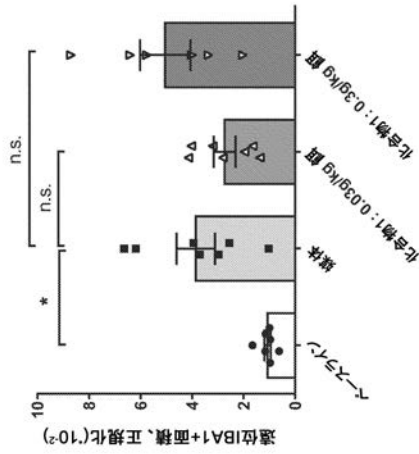
【図 32】

図32: 近位IBA1+面積に対する化合物1治療の効果。個別のミクログリア集団を示す(試料面積によって正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定で行った。



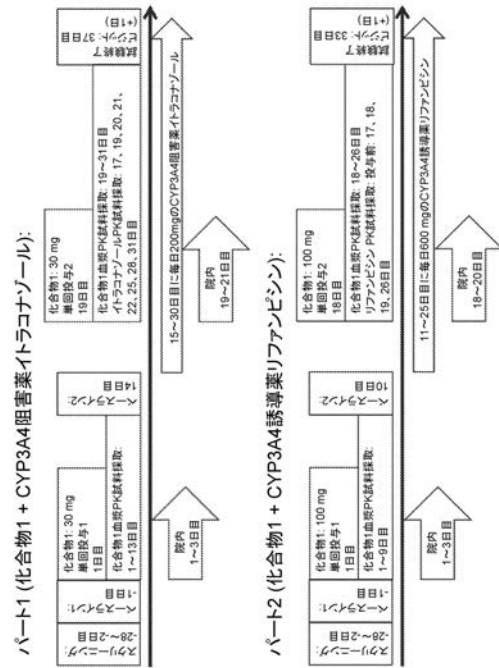
【図 3 3】

図33: 遠位BA1+面積に対する化合物1治療の効果。個別のミクログリア集団を示す(試料面積によって正規化)。平均値±SEMを示す。比較はダネットの多重比較検定を行った。



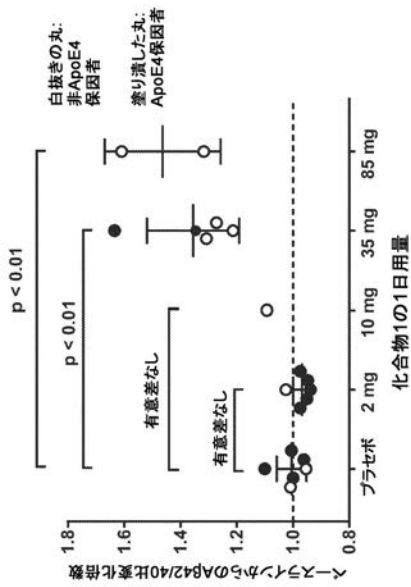
【図 3 4】

図34: 単剤投与時及び強力なCYP3A4阻害薬イトラコナゾール又は強力なCYP3A4誘導薬リファンピシンの併用投与時の化合物1のPKを判定する標準対象における2パート、非盲検、2期、固定順序試験の設計



【図 3 5】

図35: ベースライン時にCSF Aβ42/Aβ40比<0.09を有する非ApoE4保因者及びApoE4保因者健康高齢対象の化合物1による治療に反応したCSF Aβ42/Aβ40比のベースラインからの変化倍率



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/054307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/5377 A61P25/28
ADD.

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)

A61K A61P

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/095469 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BADIGER SANGAMESH [IN]; CHEBROLU MURALI [IN]; HURTH) 19 July 2012 (2012-07-19) cited in the application	1-15
Y	claims 10,12,15 page 43, line 30 - page 46, line 16 compound 34; page 111 page 50, line 23 - line 25 ----- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 application or patent 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

6 October 2017

Date of mailing of the international search report

24/10/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loher, Florian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/054307

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COMBARROS O ET AL: "Epistasis in sporadic Alzheimer's disease", NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 30, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 1333-1349, XP026322135, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.11.027 [retrieved on 2008-02-21] page 1336, left-hand column, last paragraph -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/054307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012095469	A1	19-07-2012	
		AP 3807 A	30-09-2016
		AR 084849 A1	26-06-2013
		AU 2012206561 A1	01-08-2013
		CA 2824220 A1	19-07-2012
		CL 2013001964 A1	29-11-2013
		CL 2014002518 A1	05-12-2014
		CN 103403001 A	20-11-2013
		CN 106117193 A	16-11-2016
		CO 6751293 A2	16-09-2013
		CR 20130339 A	04-09-2013
		CU 20130101 A7	29-01-2014
		CY 1117580 T1	26-04-2017
		DK 2663561 T3	06-06-2016
		EA 201391032 A1	30-12-2013
		EP 2663561 A1	20-11-2013
		ES 2576182 T3	06-07-2016
		GT 201300179 A	06-06-2014
		HK 1188453 A1	23-09-2016
		HR P20160647 T1	01-07-2016
		HU E029226 T2	28-02-2017
		JP 5715710 B2	13-05-2015
		JP 2014502626 A	03-02-2014
		KR 20130119970 A	01-11-2013
		MA 34898 B1	01-02-2014
		MX 336966 B	08-02-2016
		MY 162413 A	15-06-2017
		NZ 612990 A	28-11-2014
		PE 11102014 A1	05-09-2014
		PL 2663561 T3	31-10-2016
		PT 2663561 E	07-06-2016
		SG 191812 A1	30-08-2013
		SM T201600144 B	01-07-2016
		TN 2013000285 A1	20-01-2015
		TW 201309688 A	01-03-2013
		UA 113051 C2	12-12-2016
		US 2012184539 A1	19-07-2012
		US 2014107118 A1	17-04-2014
		US 2015203481 A1	23-07-2015
		UY 33865 A	31-08-2012
		WO 2012095469 A1	19-07-2012

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN

(72)発明者 ロペスーロペス, クリスティーナ

スイス国 バーゼル 4002, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー

(72)発明者 ノイマン, ウルフ

スイス国 バーゼル 4002, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ

Fターム(参考) 4C063 AA03 BB01 CC54 DD12 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BC73 GA08 GA09 MA01 MA04 NA14 ZA16