

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7628716号

(P7628716)

(45)発行日 令和7年2月12日(2025.2.12)

(24)登録日 令和7年2月3日(2025.2.3)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 207/16 (2006.01)

C 0 7 D 207/16

C S P

A 6 1 K 31/401 (2006.01)

A 6 1 K 31/401

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/00

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/16

請求項の数 8 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-581707(P2022-581707)

(86)(22)出願日 令和3年7月6日(2021.7.6)

(65)公表番号 特表2023-533932(P2023-533932
A)

(43)公表日 令和5年8月7日(2023.8.7)

(86)国際出願番号 PCT/EP2021/068577

(87)国際公開番号 WO2022/008477

(87)国際公開日 令和4年1月13日(2022.1.13)

審査請求日 令和6年6月21日(2024.6.21)

(31)優先権主張番号 20382606.0

(32)優先日 令和2年7月7日(2020.7.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 523001692

アクレ セラピューティクス ソシエダッ
ド リミターダACCURE THERAPEUTIC
S, S. L.スペイン国 0 8 0 2 8 パルセロナ、パ
ルディリ レシャク 4 - 8、トレス イ
プランタ 5ア

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100103447

弁理士 井波 実

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100180873

最終頁に続く

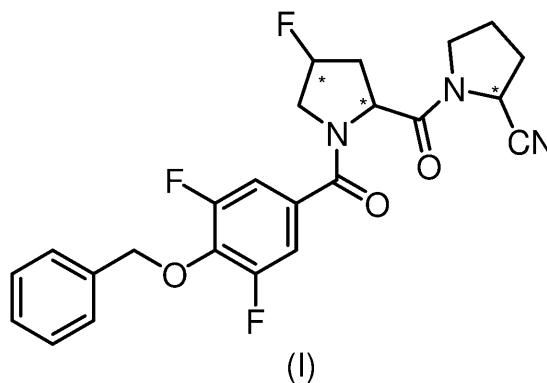
(54)【発明の名称】 1 - [1 - (4 - ベンジルオキシ - 3 , 5 - ジフルオロ - ベンゾイル) - 4 - フルオロ -
ピロリジン - 2 - カルボニル] - ピロリジン - 2 - カルボニトリル

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】

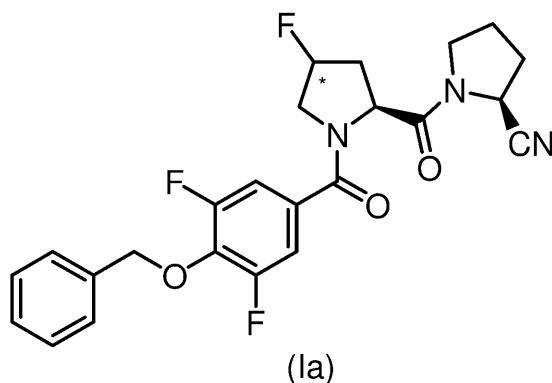


(式中、アスタリスクは、不斉中心を表す)の化合物、その立体異性体、または当該化合物もしくは立体異性体の塩。

【請求項 2】

式 (I) の化合物が、式 (I a) :

【化 2】



10

の化合物である、請求項 1 に記載の化合物、その立体異性体、または当該化合物もしくは立体異性体の塩。

【請求項 3】

前記化合物が、

- ・ (S) - 1 - ((2S, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (R) - 1 - ((2S, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (S) - 1 - ((2R, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (R) - 1 - ((2R, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (S) - 1 - ((2S, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (R) - 1 - ((2S, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (S) - 1 - ((2R, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
- ・ (R) - 1 - ((2R, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

20

30

40

から選択される、請求項 1 に記載の化合物、その立体異性体、または当該化合物もしくは立体異性体の塩。

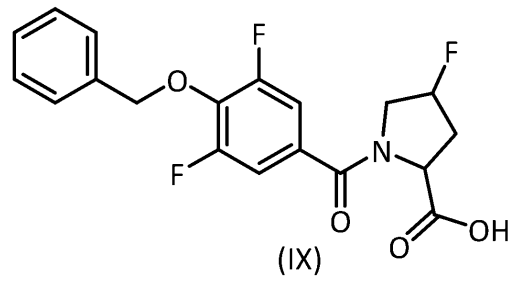
【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に定義される式 (I) の化合物を調製するための方法であって、

a) 式 (IX) :

50

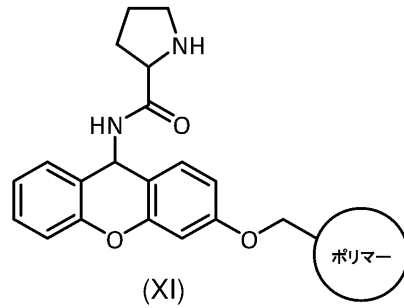
【化 3】



の化合物を、式 (X I) :

10

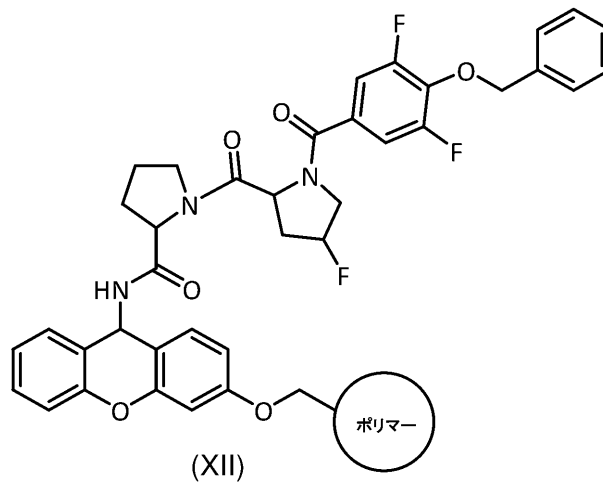
【化 4】



20

の化合物と反応させて、式 (X I I) :

【化 5】

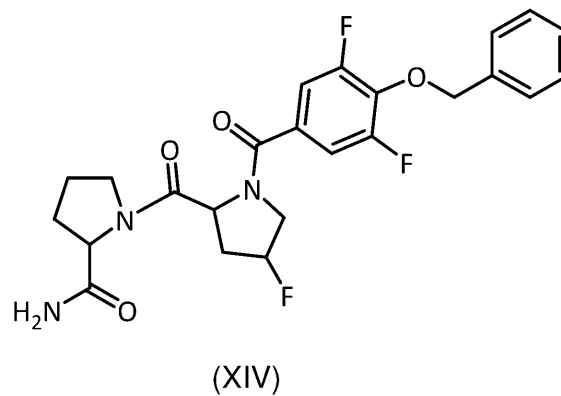


30

の化合物を得る工程、

b) 前記式 (X I I) の化合物を加水分解して、式 (X I V) :

【化 6】



40

の化合物を得る工程、および

50

c) 前記式 (XIV) の化合物を、カルボキサミド基をニトリル基に変換することができ、
条件に付して、前記式 (I) の化合物を得る工程
を含み、

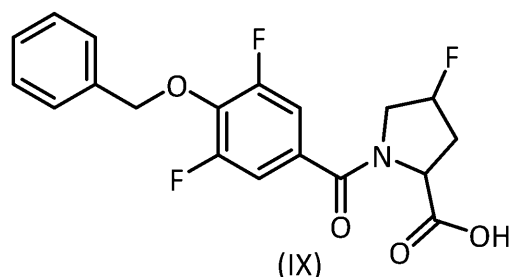
工程 b) および工程 c) が、別々に、またはワンポット反応で行われ得る、
方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の式 (I) の化合物、その立体位異性体、または当
該化合物もしくは立体異性体の塩を調製するための方法であって、

式 (IX) :

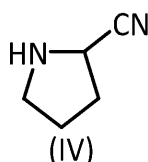
【化 7】



10

の化合物を、式 (IV) :

【化 8】



20

の化合物と反応させる工程を含む、方法。

【請求項 6】

少なくとも一つの請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の式 (I) の化合物、その立体異
性体、または当該化合物もしくは立体異性体の薬学的に許容される塩と、薬学的に許容さ
れる担体、アジュバントまたはビヒクルを含む、医薬組成物。

30

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の式 (I) の化合物、その立体異性体、または当
該化合物もしくは立体異性体の塩を含む、認知障害の治療および / または予防のための医薬
組成物。

【請求項 8】

前記認知障害が、統合失調症、大うつ病性障害、双極性感情障害、レム睡眠行動障害、
アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、パーキンソン病、レビー小体病、多系統萎縮症、
進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症または筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択
される疾患と関連する認知障害である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬理学的活性を有する化合物、より具体的には、1 - [1 - (4 - ベンジル
オキシ - 3 , 5 - ジフルオロ - ベンゾイル) - 4 - フルオロ - ピロリジン - 2 - カルボニ
ル] - ピロリジン - 2 - カルボニトリル、その立体異性体、およびそれらの塩、かかる化
合物の調製の方法、それらを含む医薬組成物、ならびに神経変性障害および / または認知
機能障害の療法および / または予防におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プロリルエンドペプチダーゼ (PREP) としても公知のプロリルオリゴペプチダーゼ

50

(EC 3.4.21.26) (POP) は、L-プロリン残基のC末端側でペプチドの加水分解を触媒するセリンプロテアーゼである。これは、哺乳動物において広く分布しており、脳を含むさまざまな器官から精製することができる。

【0003】

この酵素は、学習機能および記憶機能に関連するプロリン含有神経ペプチドの分解において重要な役割を果たす (Wilk Sら、Life Sci. 1983; 33: 2149 - 57; O'Leary RM、O'Connor B、J. Neurochem. 1995; 65: 953 - 63)。

【0004】

プロリルオリゴペプチダーゼ阻害の効果は、神経変性プロセスに関連する認知欠損の治療において試験されている。パーキンソン病を、サブスタンスPの枯渇を生じる神経毒である1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) による処置によりサルにおいて発生させた。その後、強力なPOP阻害剤であるS-17092による治療は、認知課題のパフォーマンスを増加させた (Schneider JSら、Neuropsychopharmacology 2002; 26(2): 176 - 82)。POP阻害が、エキスピボで α -シヌクレインのオリゴマー化を防止することも見出された (Myohanen TTら、Br. J. Pharmacol. 2012; 166(3): 1097 - 113)。アルツハイマー病 (AD) の場合において、動物モデルにおけるいくつかのインビボ実験は、POP阻害が神経保護効果および認知増強効果をもたらしたことを示した (Kato Aら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 283(1): 328 - 35およびToide Kら、Rev. Neurosci. 1998; 9(1): 17 - 29)。神経保護効果は、皮質細胞および小脳顆粒細胞がPOP阻害剤であるONO-1603による治療によって加齢誘発アポトーシスから防止されたときに、Katsubeのグループによって元々は観察された (Katsube Nら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999; 288(1): 6 - 13)。

【0005】

認知欠損の治療におけるPOP阻害剤による臨床試験は、数例のみ行われている。フェーズI臨床研究において、Morainのグループ (Morain Pら、Br. J. Clin. Pharmacol. 2000; 50(4): 350 - 9) は、上記で挙げたプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤であるS-17092が、健康な高齢対象において認知増強性および明確な用量依存性があることを見出した。また、有害作用は検出されなかった。その後の研究は、この化合物について、さらなるわずかな気分安定性を示唆した (Morain Pら、Neuropsychobiology 2007; 55(3-4): 176 - 83)。

【0006】

プロリルオリゴペプチダーゼ活性は、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病、ハンチントン病および多発性硬化症 (MS) を含むいくつかの神経変性疾患において変化している (死後) ことが報告されている (Mantle Dら、Clin. Chim. Acta 1996; 249(1-2): 129 - 39)。

【0007】

AD、MSおよびパーキンソン病などの神経変性疾患の病態形成における神経炎症の役割を示すかなりの量の証拠も存在する (Hirsch ECら、Lancet Neurol. 2009; 8(4): 382 - 97、Phillips Tら、Lancet Neurol. 2011; 10(3): 253 - 63)。POPは、脳においてT β 4からの炎症性テトラペプチドAc-SDKPの放出に関与する主な酵素であると考えられている (Yang Fら、Hypertension 2004; 43(2): 229 - 36、Nolte WMら、Biochemistry 2009; 48(50): 11971 - 81)。これは、POPの阻害が神経炎症を低減させるのに役立つ場合があり、その結果として、POP阻害剤がアルツハイマー病およびパーキンソン病などの炎症性構成成分を伴う

10

20

30

40

50

神経変性疾患の治療において有用である場合があり、特に、これらの疾患と関連する認知障害の改善に役立つ場合があることを示唆する。

【 0 0 0 8 】

脳皮質領域に広がる老人斑は、ADの典型的な神経病理学的特徴である。これらの斑の主なタンパク質構成成分は、アミロイド β -ペプチド($A\beta$)である。 $A\beta$ の沈着は、神経機能不全および脳死を引き起こす。このペプチドは、 β -アミロイド前駆体タンパク質(APP)に由来する。通常の条件下では、 APP は、 α -セクレターゼによって切断されて、 $A\beta$ 生成を妨げる可溶性 $APP\alpha$ を生成する。

【 0 0 0 9 】

興味深いことに、POP阻害は、細胞内IP3レベルを増加させ、これは、 $APP\alpha$ 産生の刺激に寄与する場合があり、次に $A\beta$ 生成を減少させるであろう。

10

【 0 0 1 0 】

加えて、Rossner(Rossner Sら、Neurochem. Res. 2005; 30(6-7): 695-702)は、 $A\beta$ 斑によって影響を受けるAD患者の脳構造において、POP免疫反応性ニューロンが少ないことを見出した。

【 0 0 1 1 】

加えて、サブスタンスPは、 β -アミロイドタンパク質の神経毒性作用を抑制することができると思われる(Kowall NWら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88(16): 7247-51)。プロリルオリゴペプチダーゼ阻害剤は、サブスタンスPの代謝を阻害して、 β -アミロイドタンパク質の神経毒性作用を抑制し得るサブスタンスPのレベルを維持するのに役立つ。

20

【 0 0 1 2 】

上記で挙げた効果を考慮すると、プロリルオリゴペプチダーゼ阻害剤は、アルツハイマー病の治療のために有用な薬物であり得、脳の損傷を防止し、この疾患と関連する認知障害を改善するのに役立つと思われる。

【 0 0 1 3 】

プロリルオリゴペプチダーゼはまた、多発性硬化症(MS)と関係する可能性があるいくつかの要因と関連している。例えば、POPは、ミクログリア毒性の調節に関与する(Klegeris Aら、Glia 2008; 56(6): 675-85)。実際に、POPおよびMSの間に直接的な関係が確立されており、再発寛解型MS(RR-MS)を有する患者の血漿POP活性は著しく低減した(Tenorio-Laranga Jら、J Neuroinflammation 2010; 7: 23)。興味深いことに、この低減は、疾患症状の重症度と相関したが、患者の年齢と相関しなかった。代わりに、POP活性および年齢の間の逆相関が、健康な対照において観察され、高齢対照において、そのレベルは、MS患者において見られるレベルと同等であった。

30

【 0 0 1 4 】

パーキンソン病の神経病理学的特徴は、レビー小体として公知の細胞内封入体と共に、黒質緻密部におけるメラニン化ドーパミン作動性ニューロンの進行性変性である。レビー小体の主な構成成分は、140アミノ酸タンパク質の α -シヌクレインである。ある一定の条件下では、 α -シヌクレインモノマーは、相互作用して、細胞毒性不溶性フィブリルを生じ得るプレフィブリル凝集体またはプロトフィブリルを形成する。これらのフィブリルは、プロテアソームによって分解されることはできず、それらは、この細胞内タンパク質分解系の機能を損なう。これは、サイトゾルにおける α -シヌクレインプロトフィブリル(およびプロテアソームによって分解される他のタンパク質)の蓄積をもたらす(Bennett MC、Pharmacol. Ther. 2005; 105(3): 311-31)、その結果として、 α -シヌクレインプロトフィブリルは、パーキンソン病患者の脳において増加する。これらのフィブリルは、 α -シヌクレインを過剰発現する細胞およびマウスモデルにおける神経毒性と関連していた(Masliyah Eら、Science 2000; 287(5456): 1265-9; Gosavi Nら、J. Biol. Chem. 2002; 277(50): 48984-92)。ミスフォールドした α -シヌ

40

50

クレインの異常蓄積は、酸化ストレスを促進し、細胞死を引き起こし得るミトコンドリア変化に至る場合がある (Hsu LJら、Am. J. Pathol. 2000; 157(2): 401-10)。さらまた、 α -シヌクレイン遺伝子における3つの点突然変異 (A53T、A30PまたはE46K) は、家族型パーキンソン病の病態形成に關与することが公知である (Polymeropoulos MHら、Science 1997; 276(5321): 2045-7; Zarranz JJら、Ann. Neurol. 2004; 55(2): 164-73)。

【0015】

α -シヌクレインの凝集速度は、このタンパク質が野生型ブタPOPのクローンとともにインキュベートされた場合に、増強され、この増強が、POP濃度に依存することがインビトロで示されている (Brandt Iら、Peptides 2008; 29(9): 1472-8)。また、POP活性がない突然変異バリエント (S544A) は、凝集速度を加速しなかった。

10

【0016】

増強された凝集は、POP阻害剤の添加によっても防止され得、その効果がPOP酵素活性に依存したことを示唆する。実験データは、POP阻害剤が、ヒト α -シヌクレインを過剰発現する神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において酸化ストレスにより誘導される α -シヌクレイン凝集の増加をブロックすることができることを示唆する (Myohanen TTら、Br. J. Pharmacol. 2012; 166(3): 1097-113)。POPは、SH-SY5Y細胞において α -シヌクレインと共局在化し、この共局在化は、POP阻害剤とのインキュベーション後に消失し、POPおよび α -シヌクレインの間の相互作用を示す。POP阻害剤による5日間の治療は、A30P α -シヌクレイントランスジェニックマウスの脳における可溶性 α -シヌクレインの量を低減した。これに関して、POP阻害剤は、オートファジーをモジュレートすることによって α -シヌクレインのクリアランスを増強することが報告されている (Myohanen TTら、Pharmacological Research 2020; 151: 104558)。

20

【0017】

このように、脳POP活性の阻害は、 α -シヌクレイン凝集を防止することができ、このようにして、レビー小体に存在する細胞毒性プロトフィブリルの形成を防止することができる。したがって、POP阻害剤は、加速された α -シヌクレイン凝集が記載されている神経変性障害の治療において、潜在的に治療的価値を有し得る。

30

【0018】

POPを阻害することができる化合物は、ラットにおいてスコポリアミンによって誘発される実験的認知機能障害を防止するために有効であり、POP阻害剤が記憶機能不全の軽減における機能を有することが推察される (Yoshimoto Tら、J. Pharmacobiodyn. 1987; 10: 730-5)。

【0019】

非競合的POP阻害剤であるロスマリン酸の亜慢性投与の効果 (63.7 μ Mの比較的高いIC50値を有する) が、ラットにおけるモリス水迷路において試験され、空間記憶の増強が報告された (Park DHら、Fitoterapia 2010; 81(6): 644-8)。

40

【0020】

双極性障害を有する患者が、血清における高レベルのPOPの活性を有することが見出されている。近年、POPは、特にイノシトール-1,4,5-トリホスフェート (IP3) の代謝におけるその関与に起因して、この疾患の治療のための標的としての重要性が上昇している。IP3は、神経ペプチドのカスケードにおいてシグナルの伝達における重要な分子である。特定の受容体への結合を通して、神経ペプチドは、IP3の増加を誘導し、これは、小胞体の膜上でその受容体に結合し、そしてCa²⁺の放出を誘導し、これが、学習および記憶において重要な役割を果たすと考えられる。最近の知見は、POPが

50

IP3の濃度をモジュレートすることを示している (Komatsu Y J. Neurosci. 1996; 16: 6342-52)。このように、真核性のキロタマホコリカビにおけるPOPの遺伝子の破壊は、IP3の上昇を介してリチウムに対する耐性を誘導し (Schulz Iら、Eur. J. Biochem. 2002; 269: 5813-20)、POPについてヒトのアンチセンスのグリオーマ細胞における高濃度IP3の原因であるPOPのタンパク質分解活性も低減したことが公知である。この効果は、これらの細胞が特定のPOP阻害剤で処置される場合にも観察される (Williams RSら、EMBO J. 1999; 18: 2734-45)。

【0021】

IP3シグナル伝達経路は、いくつかの薬物治療学の気分安定剤 (リチウム、カルバマゼピンおよびバルプロ酸) の作用に関与し、IP3シグナル伝達を調節するメカニズムの欠陥が、双極性障害を引き起こす場合がある。また、双極性障害を治療するために通常使用される気分安定薬であるバルプロ酸は、組換えPOPの活性を直接阻害する (Cheng Lら、Mol. Cell Neurosci. 2005; 29: 155-61)。要約すると、POP阻害剤が哺乳動物における双極性感情障害の防止および/または治療において有用であるという強い証拠が存在する。そのため、POPの新規阻害剤を提供することは、この障害または疾患の療法において興味深い。

10

【0022】

要約すると、さまざまな認知課題におけるいくつかのPOP阻害剤の効果が特徴付けられており、POP阻害剤が、学習および記憶に対してポジティブな効果を有するというコンセンサスが存在する (Morain Pら、CNS Drug Rev. 2002; 8 (1): 31-52; Shinoda Mら、Eur. J. Pharmacol. 1996; 305 (1-3): 31-8; Marighetto Aら、Learn. Mem. 2000; 7 (3): 159-69; Toide Kら、Pharmacol. Biochem. Behav. 1997; 56 (3): 427-34; Schneider JSら、Neuropsychopharmacology 2002; 26 (2): 176-82)。

20

【0023】

いくつかの特許および特許出願が、POP阻害剤を開示しているが: WO2008/077978A1、WO2005/027934A1、JP2011-037874A2、WO2005/002624A1、WO2004/060862A2、WO03/04468A1; DE19603510A1、US2006/0100253A1およびUS6,159,938A、インビボで研究中の化合物はわずかしかない (JTP-4819、S17092、Z-321、ONO-1603、Y-29794、ZTTA、Z-Pro-Prolinal、およびKYP-2047)。このリストから、リストにおける最初の4つの阻害剤が、臨床試験に入り、それらのどれも上市には達していない。

30

【0024】

WO2014/072498A1は、POPに対する高い親和性、および認知障害を治療するために使用される場合に阻害剤の作用が起こる脳に達するために血液脳関門を通過する良好な能力を有するPOP阻害剤を開示している。これは、認知障害の療法における使用のための良好な候補である化合物についての重要な特性である。

40

【0025】

WO2014/072498A1において、そこに開示される化合物の製剤が、任意の投与経路に適合され得ることが記載されていた。しかしながら、前記出願に開示されるインビボの実施例においてのみ、化合物は、皮下投与された。

【0026】

経口経路を通してPOP阻害剤を投与することが可能であることは、これが患者の視点から最も好都合であるので、有利であろう。

【0027】

そのため、特に、経口投与に十分に適合され、前記POP阻害剤が認知障害の療法にお

50

いて使用される場合に作用の部位である脳に効率的に達する、新たな P O P 阻害剤を特定するための必要性が存在する。セロトニン受容体アンタゴニスト（5 - H T 1 A 受容体）は、一般に、抗うつ薬として使用されている。しかしながら、それらは、著しい性機能障害を誘発し（U p h o u s e L、P h a r m a c o l . B i o c h e m . B e h a v . 2 0 1 4 ; 0 : 3 1 - 4 2）、成人集団における慢性療法のためのその使用を制限する。この理由のために、気分障害における認知に対するポジティブな効果を有し、かつそのような有害事象を有さない P O P 阻害剤は、患者のクオリティオブライフに著しい影響を有するであろう。

【発明の概要】

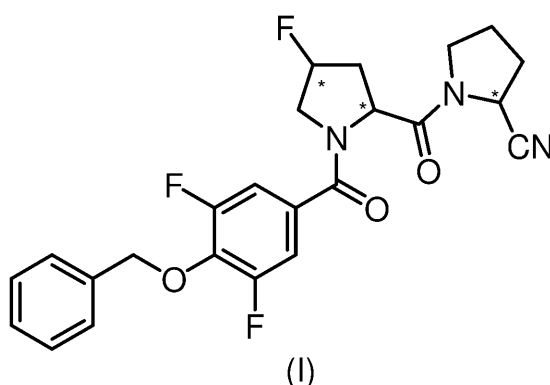
【0028】

本発明者らは、今般、1 - [1 - (4 - ベンジルオキシ - 3 , 5 - ジフルオロ - ベンゾイル) - 4 - フルオロ - ピロリジン - 2 - カルボニル] - ピロリジン - 2 - カルボニトリル、その立体異性体、およびそれらの塩が、高い効力で P O P を阻害することができるだけでなく、高い胃腸浸透能力を示し、経口投与された場合にそれらを特に有効にする高い脳曝露を達成し、性機能障害などの負の副作用を回避する 5 - H T 1 A 受容体へのわずかな結合を有することを成功裏に見出した。

【0029】

したがって、本発明の 1 つの態様は、式（I）：

【化 1】



（式中、式におけるアスタリスクは、不斉中心の存在を示す）を有する（1 - [1 - (4 - ベンジルオキシ - 3 , 5 - ジフルオロ - ベンゾイル) - 4 - フルオロ - ピロリジン - 2 - カルボニル] - ピロリジン - 2 - カルボニトリル、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩に関する。

【0030】

本発明の別の態様は、上記に定義される式（I）の化合物、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩を調製するための方法に関する。

【0031】

本発明の別の態様は、少なくとも一つの上記に定義される式（I）の化合物、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクルを含む、医薬または医薬組成物に関する。

【0032】

本発明の別の態様は、医薬としての使用のための、特に、認知障害および/または神経変性障害、例えば、シヌクレイノパチー（シヌクレインの蓄積に起因する疾患、例えば、パーキンソン病、レム睡眠行動障害、レビー小体病または多系統萎縮症）の防止および/または治療のための、上記に定義される式（I）の化合物、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩に関する。特に、認知障害は、統合失調症、大うつ病性障害、双極性感情障害、レム睡眠行動障害、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、パーキンソン病、レビー小体病、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症または筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される疾患と関連していてもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の態様は、哺乳動物における認知障害の治療または予防のための方法であって、治療量の上記に定義される式 (I) の化合物、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩を、前記治療を必要とする患者に投与することを特徴とする、方法に関する。特定の実施形態において、障害は、統合失調症、大うつ病性障害、双極性感情障害、レム睡眠行動障害、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、パーキンソン病、レビー小体病、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症または筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される疾患と関連する認知障害である。

【 0 0 3 4 】

本発明の別の態様は、医薬の調製のための、特に、認知障害、より特に、統合失調症、大うつ病性障害、双極性感情障害、レム睡眠行動障害、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、パーキンソン病、レビー小体病、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症または筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される疾患と関連する認知障害の防止および/または治療のための医薬の調製のための、上記に定義される式 (I) の化合物、その立体異性体、およびそれらの薬学的に許容される塩の使用に関する。これらの態様およびそれらの好ましい実施形態は、さらに、特許請求の範囲においても定義される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

【図 1】図 1 は、実施例 1、比較例 3 および比較例 4 の化合物についての P O P 阻害アッセイの結果を示す。

【図 2】図 2 は、実施例 1、比較例 3 および比較例 4 の化合物についての P A M P A アッセイの結果を示す。

【図 3】図 3 は、実施例 1 および比較例 3 の化合物についての C a c o - 2 アッセイの結果を示す。

【図 4】図 4 は、実施例 1 および比較例 3 の化合物についてのピボ脳曝露アッセイの結果を示す。

【図 5】図 5 a および 5 b は、実施例 1 および比較例 3 の化合物についての N O R 課題アッセイの結果を示す。

【図 6】図 6 は、実施例 1 および比較例 3 の化合物についての 5 - H T 1 A 受容体への結合の結果を示す。

【図 7】図 7 は、(S) - 1 - ((2 S , 4 R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリルの I R スペクトルを示す。

【図 8】図 8 は、(S) - 1 - ((2 S , 4 R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリルの ¹ H - N M R スペクトルを示す。

【図 9】図 9 は、(S) - 1 - ((2 S , 4 S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリルの I R スペクトルを示す。

【図 10】図 10 は、(S) - 1 - ((2 S , 4 S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリルの ¹ H - N M R スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 6 】

本発明の文脈において、以下の用語は、下記に詳述する意味を有する。

【 0 0 3 7 】

「塩」という用語は、本発明に従って使用される活性化合物の任意の形態として理解されなければならない。ここで、前記化合物は、イオン形態であるか、または荷電し、対イオン (カチオンまたはアニオン) とカップリングしているか、または溶液である。この定義は、第 4 級アンモニウム塩ならびに活性分子と他の分子およびイオンとの複合体、特に、

10

20

30

40

50

イオン相互作用を介して形成された複合体も含む。この定義は、特に、生理学的に許容される塩を含み、この用語は、「薬理的に許容される塩」または「薬学的に許容される塩」と同等であるとして理解されなければならない。

【 0 0 3 8 】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明の文脈において、特にヒトおよび／または哺乳動物において、適用または使用される治療のために適切な様式で使用される場合、生理学的に耐えられる任意の塩を意味する（通常、特に対イオンの結果として、毒性ではないことを意味する）。これらの生理学的に許容される塩は、カチオンまたは塩基と形成されてもよく、本発明の文脈において、特にヒトおよび／または哺乳動物において使用される場合に、本発明に従って使用される少なくとも一つの化合物 - 通常は酸（脱プロトン化したもの） - 例えばアニオンによって形成される塩であることが理解される。これらの生理学的に許容される塩はまた、アニオンまたは酸と形成されてもよく、本発明の文脈において、特にヒトおよび／または哺乳動物において使用される場合に、本発明に従って使用される少なくとも一つの化合物 - 例えば窒素において、通常はプロトン化したもの - 例えばカチオンおよび少なくとも一つの薬理的に耐えられるアニオンによって形成される塩であるとして理解される。この定義には、具体的に、本発明の文脈において、生理学的に耐えられる酸によって形成される塩、すなわち、特にヒトおよび／または哺乳動物において使用される場合に、特定の活性化合物と生理学的に耐えられる有機酸または無機酸との塩が含まれる。この種類の塩の例は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、メタンスルホン酸、ギ酸、酢酸、シュウ酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、マンデル酸、フマル酸、乳酸またはクエン酸と形成される塩である。

【 0 0 3 9 】

上記に記載される式（ I ）によって表される本発明の化合物は、分子中の 3 つの不斉中心の存在から生じるエナンチオマーを含み得る。単一エナンチオマーおよびそれらの二つ以上の任意の混合物は、本発明の範囲内である。

【 0 0 4 0 】

他に明記されない限り、本発明の化合物は、同位体標識形態、すなわち、一つ以上の同位体濃縮原子の存在のみが異なる化合物を含むことも意味する。例えば、重水素もしくは三重水素による少なくとも 1 つの水素原子の置き換え、または ^{13}C もしくは ^{14}C 濃縮炭素による少なくとも 1 つの炭素の置き換え、または ^{15}N 濃縮窒素による少なくとも 1 つの窒素の置き換えを除いて本構造を有する化合物は、本発明の範囲内である。

【 0 0 4 1 】

式（ I ）の化合物またはそれらの塩は、好ましくは、薬学的に許容される形態または実質的に純粋な形態である。薬学的に許容される形態とは、とりわけ、希釈剤および担体などの通常の医薬添加物を除いて薬学的に許容されるレベルの純度を有し、通常の投薬量レベルで毒性であると考えられる材料を含まないことを意味する。薬物物質についての純度レベルは、好ましくは 50 % を上回り、より好ましくは 70 % を上回り、最も好ましくは 90 % を上回る。好ましい実施形態において、これは、95 % を上回る式（ I ）の化合物またはその塩である。

【 0 0 4 2 】

上述のように、「薬学的に許容される塩」という用語は、レシipientへの投与の際に、本明細書に記載される化合物を提供する（直接的にまたは間接的に）ことができる任意の塩を指す。しかしながら、薬学的に許容されない塩も、薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグの調製において有用であり得るので、本発明の範囲内であることが認識されるであろう。塩の調製は、当技術分野において公知の方法によって行うことができる。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「治療する（treat）」、「治療すること（treating）」および「治療（treatment）」という用語は、認知障害などの疾患または状態の根絶、除去、回復、軽減、改変または管理を含む。

【0044】

本明細書で使用される場合、「防止 (prevention)」、「防止すること (preventing)」、「防止的 (preventive)」、「防止する (prevent)」および「予防 (prophylaxis)」という用語は、認知障害などの疾患または状態の開始または発生を、その開始前に回避、最小化または困難にする式 (I) の化合物の能力を指す。

【0045】

したがって、「治療すること (treating)」もしくは「治療 (treatment)」および/または「防止すること (preventing)」もしくは「防止 (prevention)」とは、全体として、対象を苦しめる状態と関連する症状の少なくとも抑制または寛解を意味し、ここで、抑制および寛解は、パラメーター、例えば認知障害などの治療される状態と関連する症状の大きさの少なくとも低減を指すために、広義で使用される。そのため、本発明の方法は、状態が完全に阻害される状況、例えば、起きることを防止するか、または停止する状況、例えば、対象がもはやその状態を経験しないように終了させる状況も含む。そのため、本方法は、認知障害を防止することおよび管理することの両方を含む。

10

【0046】

「認知障害」および「軽度認知機能障害」という用語は、本明細書において、思考、学習または記憶と関連する精神活動における欠損によって特徴付けられる任意の状態を指定するために互換的に使用される。そのような障害の例としては、失認症、健忘症、失語症、失行症、せん妄、認知症および学習障害が挙げられる。

20

【0047】

認知障害は、ニューロン間のシグナルの伝達に關与するニューロンまたは他の構造の損傷または損失によって特徴付けられる他の状態と関連していてもよい (すなわち、他の状態によって引き起こされるか、またはその存在下において起こってもよい) (およびしばしば関連する)。そのため、認知障害は、アルツハイマー病、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト-ヤコブ病、前頭側頭葉変性症、ハンチントン病、多発性硬化症、正常圧水頭症、有機慢性脳症候群、パーキンソン病、ピック病、血管性認知症、レビー小体病、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺などの神経変性疾患と関連していてもよい。

【0048】

30

認知障害はまた、精神障害、例えば、不安障害、解離性障害、気分障害、例えば、双極性感情障害、統合失調症、ならびに身体表現性障害および虚偽性精神障害を含む、中枢神経系の正常な機能を損なう他の状態と関連していてもよい。

【0049】

本明細書に記載される化合物は、失認症、健忘症、失語症、失行症、せん妄、認知症、学習障害および他の認知障害を治療するために使用されてもよい。

【0050】

本発明の方法により治療され得る認知症の例としては、AIDS 認知症複合、ピンスワンガー病、レビー小体を伴う認知症、前頭側頭型認知症、多発梗塞性認知症、ピック病、意味性認知症および血管性認知症が挙げられる。

40

【0051】

本発明の方法により治療され得る学習障害の例としては、アスペルガー症候群、注意欠陥障害、注意欠陥多動障害、自閉症、小児期崩壊性障害、ダウン症およびレット症候群が挙げられる。

【0052】

本発明の方法により治療され得る失語症の例としては、進行性非能弁的失語症が挙げられる。

【0053】

本明細書に記載される化合物はまた、軽度であるか、またはそうでなければ日常生活を著しく妨げない精神活動における欠損を有する患者を治療するために使用されてもよい。

50

軽度認知機能障害は、そのような状態の例であり、軽度認知機能障害を有する患者は、認知症の症状（例えば、言語または記憶と一体となった困難さ）を呈するが、これらの症状の重症度は、認知症の診断が適切でない場合があるようなものである。本明細書に記載される化合物は、軽度認知機能障害、および他の、同様に重症度の低い形態の認知障害を治療するために使用されてもよい。

【 0 0 5 4 】

そのため、本発明の別の態様は、哺乳動物における認知障害の治療または予防のための方法であって、治療量の本発明の化合物を、前記治療を必要とする患者に投与することを特徴とする、方法である。

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態において、治療または予防の方法は、経口経路によって、治療量の本発明の化合物を前記治療を必要とする患者に投与することによって行われる。

【 0 0 5 6 】

特定の実施形態において、本発明の化合物は、0.01 ~ 1.90 mg / kg、例えば、0.01、0.05、0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80、0.85、0.90、0.95、1.0、1.05、1.10、1.15、1.20、1.25、1.30、1.35、1.40、1.45、1.50、1.55、1.60、1.65、1.70、1.75、1.80、1.85または1.90 mg / kgを含む1日用量で、経口投与される。本発明の化合物は、上記で挙げた示された1日経口用量のいずれかで、毎日1回、毎日2回、1日3回、1日4回、1日5回、または1日6回、投与されてもよい。

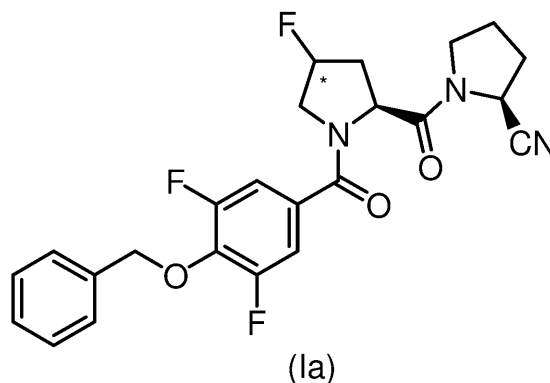
【 0 0 5 7 】

本発明の特定の実施形態において、本明細書に記載される化合物は、統合失調症、双極性感情障害、アルツハイマー病またはパーキンソン病と関連する認知障害を有する患者を治療するために使用されてもよい。

【 0 0 5 8 】

本発明の特定の実施形態において、化合物は、以下の式（I a）：

【化 2】



を有する。

【 0 0 5 9 】

式（I）の下にある本発明の特定の個々の化合物としては、下記にリストされる化合物：

・（S）- 1 - （（2S，4R）- 1 - （4 - （ベンジルオキシ）- 3，5 - ジフルオロベンゾイル）- 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル）ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・（R）- 1 - （（2S，4R）- 1 - （4 - （ベンジルオキシ）- 3，5 - ジフルオロベンゾイル）- 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル）ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・（S）- 1 - （（2R，4R）- 1 - （4 - （ベンジルオキシ）- 3，5 - ジフルオロ

ベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・ (R) - 1 - ((2R, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・ (S) - 1 - ((2S, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・ (R) - 1 - ((2S, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

10

・ (S) - 1 - ((2R, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル

・ (R) - 1 - ((2R, 4S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル、

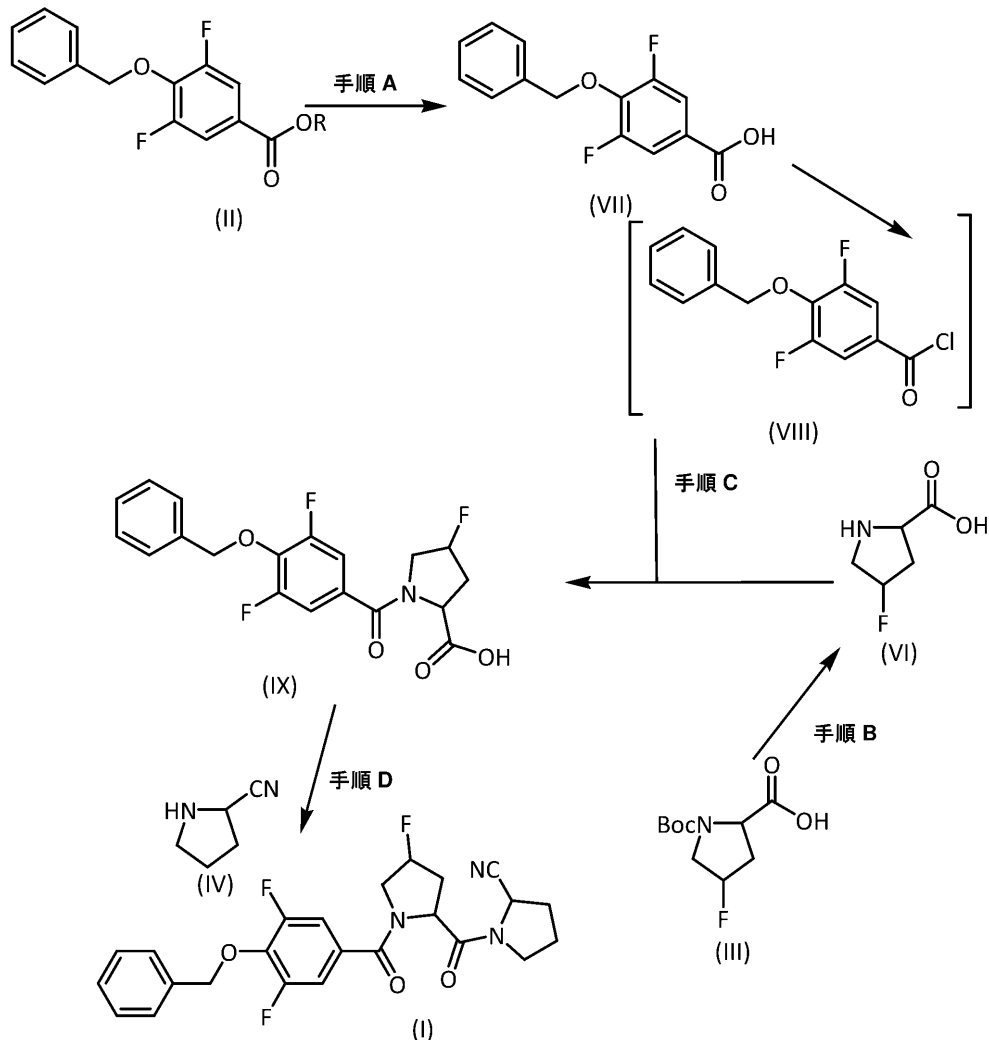
またはそれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。

【0060】

上記に定義される式(I)の化合物は、以下の一般スキームによって示される利用可能な合成手順によって得ることができる。

20

【化3】



30

40

50

【 0 0 6 1 】

第 1 工程において、式 (I I) のエステルを、エタノール (E t O H) もしくはメタノールなどの極性有機溶媒 (好ましくは、プロトン性極性有機溶媒)、または極性有機溶媒の混合物に溶解または懸濁させる。塩基水溶液を添加し、加水分解反応を、典型的には還流下で、室温および溶媒混合物の還流温度の間で構成される温度で、加水分解の完了まで、典型的には 0 . 5 ~ 4 時間、好ましくは 1 ~ 2 時間の時間、混合物を維持することによって行う。塩基溶液は、好ましくは、希アルカリ、例えば、N a O H などの無機性のものである。次いで、反応混合物を、室温まで放置し、好ましくは、反応容積のおよそ 5 分の 1 まで濃縮する。次いで、反応混合物を、氷浴中で冷却しながら、1 M の H C l 溶液などの酸溶液にゆっくりと添加して、中和させる。酸性化が沈殿をもたらす場合、固体を、濾過し、水で洗浄し、式 (V I I) の生成物が得られる。沈殿物が得られない場合、得られた溶液を、酢酸エチルなどの適切な有機溶媒で数回抽出し、有機相を乾燥させ、蒸発させる。式 (V I I) の粗生成物を、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する。

10

【 0 0 6 2 】

式 (I I I) のアミンの脱保護は、0 ~ 室温の範囲の低温で、ジオキサンなどの有機溶媒中の塩化水素溶液への添加または T F A / D C M 混合物を用いるなどの弱酸性条件下で達成される。反応物を、室温で 1 ~ 3 時間撹拌する。次いで、溶媒を蒸発乾固させて、使用される酸に応じて、式 (V I) のアミンの塩酸塩またはトリフルオロ酢酸塩が得られる。

【 0 0 6 3 】

式 (I X) の化合物を、式 (V I I) のカルボン酸および式 (V I) のアミンから、シヨッテン - バウマン条件下で調製する。したがって、塩化オキサリルなどの塩素化剤を、トルエンなどの有機溶媒中の式 (V I I) のカルボン酸の溶液に添加する。反応物を、50 ~ 80 の温度で 1 ~ 2 時間撹拌して、式 (V I I I) のカルボン酸塩化物を形成させる。溶媒の蒸発後、得られた粗製物を、T H F などの有機溶媒に可溶化し、0 などの低温で、式 (V I) のアミンの塩基性水溶液、典型的には式 (V I) のアミンの N a O H 水溶液に添加する。反応混合物を、低温で 1 ~ 2 時間、および室温で 2 ~ 4 時間の間、撹拌する。次いで、溶媒を蒸発させ、残った水性画分を、H C l 溶液の添加によって酸性 p H (3 ~ 4) に調整し、酢酸エチルにより抽出する。有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を、必要な場合、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する。

20

30

【 0 0 6 4 】

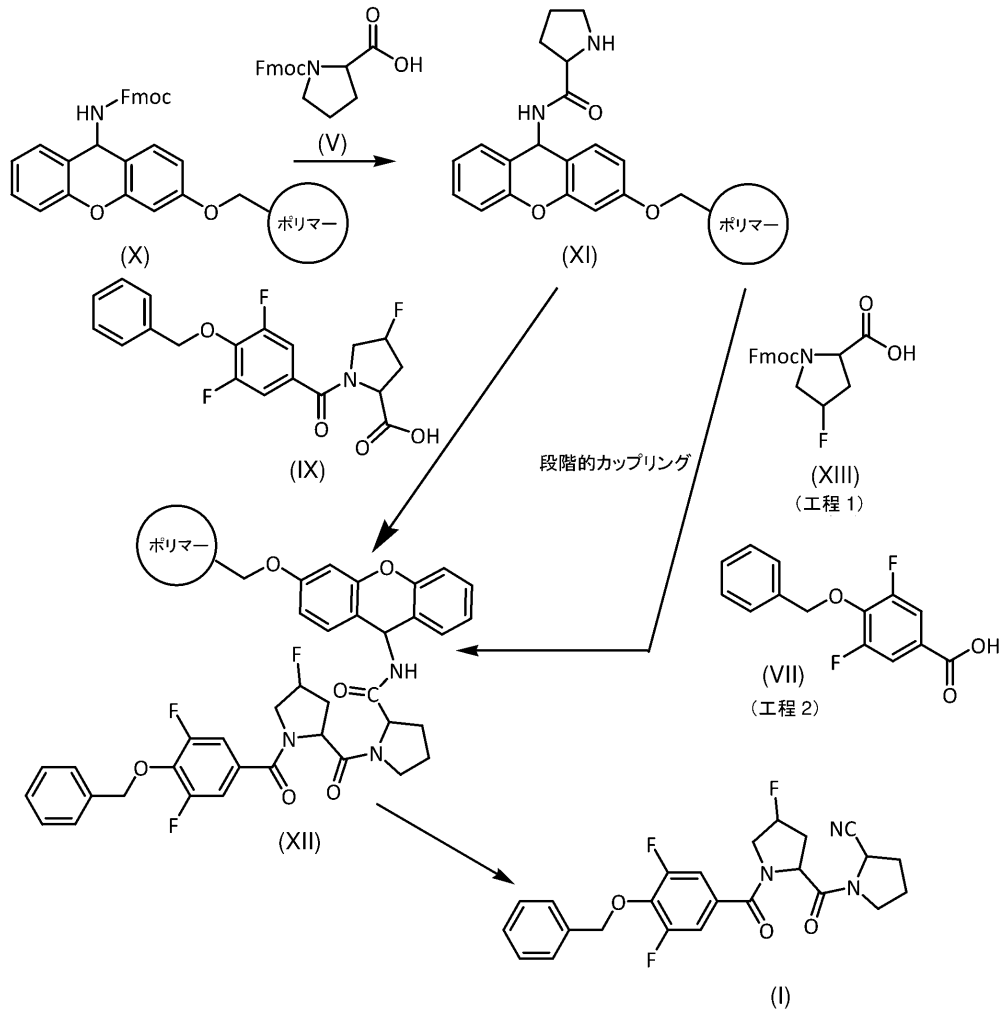
次いで、式 (I X) の生成物を、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (D I E A) などの塩基の存在下で、式 (I V) のピロリジン - 2 - カルボニトリルとカップリングさせ、カルボジイミドなどのカップリング試薬によって支援する。特に、式 (I X) の化合物を、ジクロロメタンなどの非プロトン性有機溶媒に溶解し、D I E A と一緒に、カルボジイミド、例えば、N - シクロヘキシルカルボジイミド、N ' - メチルポリスチレンなどの固体担持カルボジイミドに添加する。5 分後、式 (I V) のピロリジン - 2 - カルボニトリルおよび追加の D I E A を添加する。反応物を、室温で 8 ~ 16 時間撹拌する。次いで、反応混合物を濾過し、残った固体を非プロトン性有機溶媒で洗浄する。濾液を蒸発乾固させる。次いで、粗生成物を分取 R P - H P L C によって精製する。

40

【 0 0 6 5 】

あるいは、式 (I) の化合物は、以下のスキームに示され、下記に記載されるようにして調製されてもよい。

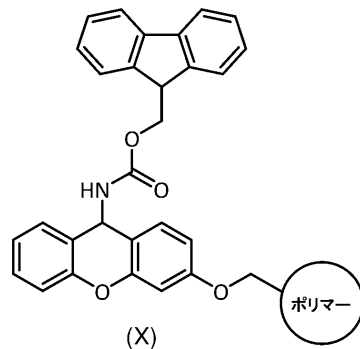
【化 4】



【 0 0 6 6 】

式 (X) の Sieber アミド樹脂などのアミン官能化樹脂を、ポリエチレン多孔性ディスクを備えたシリンジに入れる。樹脂を、ジクロロメタン (DCM) およびジメチルホルムアミド (DMF) などの適切な有機溶媒での洗浄によって膨潤させる。樹脂のアミン基が保護される場合 (すなわち、Sieber アミド樹脂の場合において)、保護基 (フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 保護基など) の除去は、DMF 中のピペリジン溶液などのアミン塩基溶液による処理によって達成される。

【化 5】



【 0 0 6 7 】

樹脂からの保護基の除去後、式 (V) の Fmoc 保護 L-プロリンを、DMF などの適切な有機溶媒中、トリアゾール (すなわち、TBTU) などの活性化剤および DIEA などのアミン塩基を使用して樹脂に付着させる。混合物を、1 ~ 2 時間の間、攪拌する。濾

【化 6】



式(ⅩⅠ)の生成物を、DMFなどの適切な有機溶媒中、HOAcなどの添加剤およびDIEAなどのアミン塩基の存在下または不存在下で、PyBOPなどの活性化剤を使用して、式(ⅩⅡ)の生成物とカップリングさせて、式(ⅩⅢ)の生成物が得られる。混合物を、1～2時間の総反応時間の間、手動で攪拌する。系統的再カップリングは、同じ量および時間を使用して行われる。カップリングの程度を、p-ニトロフェニルエステルNF31試験を使用して追跡してもよい。

(XII)

あるいは、式 (X I I) の生成物を、生成物 (X I) を最初に式 (X I I I) の化合物と段階的カップリングさせ、それに続いて F m o c 保護基を除去し、次いで、式 (V I I) の化合物とカップリングさせることによって得てもよい。

DCMなどの適切な有機溶媒で完全に洗浄され、乾燥させた式(XII)の生成物を、フラスコに移し、それに、トリフルオロ酢酸無水物およびピリジンを、少量の有機溶媒中で添加する。混合物を、20～40の温度で8～16時間保つ。次いで、反応混合物を濾過し、樹脂を同じ有機溶媒で洗浄する。濾液を収集し、溶媒を蒸発乾固させる。得られた粗製物を、酢酸エチルなどの適切な溶媒に溶解し、飽和NaHCO₃溶液および5%のKHSO₄水溶液で洗浄する。有機相を、乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗製物を、H₂O:CH₃CNに入れ、凍結乾燥させて、式(I)のペプチドニトリルが得られる。

あるいは、式(ⅩⅠⅠ)のペプチジル樹脂を、TFA/H₂O/TISの混合物により、1～2時間の間、処理してもよい。次いで、樹脂を、濾過し、TFAで洗浄し、濾液を収集し、溶媒を蒸発乾固させる。粗製物を、H₂O:CH₃CNの混合物に再懸濁させ、凍結乾燥させる。得られた粗ペプチドアミドを、DCMなどの適切な有機溶媒に入れ、例

例えば、五酸化リン、四塩化チタン、塩化チオニル、トリフルオロ酢酸無水物／ピリジンまたはトリフェニルホスフィン／四塩化炭素の存在下で、ニトリルに変換する。混合物を、室温で8～16時間保ち、溶媒を蒸発させ、残渣を酢酸エチルに入れる。その後、有機溶液を、 KHSO_4 水溶液および NaHCO_3 水溶液で洗浄する。有機相の乾燥および蒸発により、式(I)のペプチドニトリルが得られる。

【0072】

粗生成物をRP-HPLCによって精製する。

【0073】

上記に記載した本発明の化合物を調製するための方法が立体異性体の混合物を生じる場合、これらの異性体は、分取クロマトグラフィーなどの従来の技法によって分離されてもよい。不斉中心が存在する場合、化合物は、ラセミ体で調製されてもよく、または個々のエナンチオマーが、エナンチオ特異的合成によって、または分割によってのいずれかで調製されてもよい。

10

【0074】

出発物として使用される式(II)、(III)、(IV)および(V)の化合物、ならびに式(VII)の化合物の一部は、市販のもののいずれかであってもよく、当業者に周知の方法を使用して調製されてもよい。

【0075】

そのため、1つの態様において、本発明は、式(I)の化合物、またはそれらの薬学的に許容される塩、異性体、プロドラッグもしくは溶媒和物を調製するための方法を提供する。

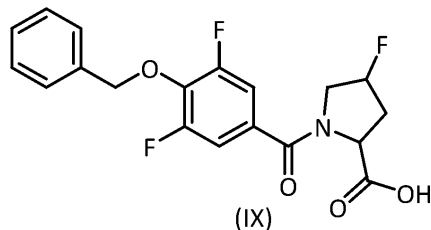
20

【0076】

1つの実施形態において、方法は、

a) 式(IX)：

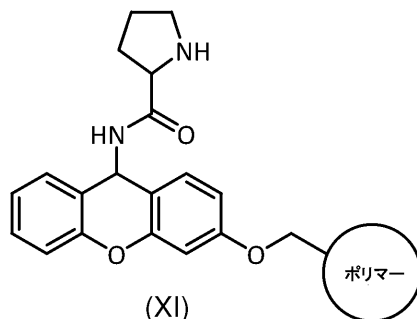
【化8】



30

の化合物を、式(XI)：

【化9】

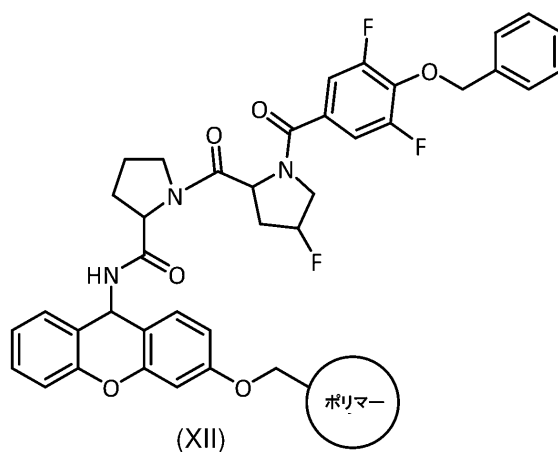


40

の化合物(式中、ポリマーは、本明細書に開示される合成方法の反応条件下で不活性であり、本明細書で用いられる溶媒に不溶性であるが膨潤性であるポリマー、例えば、低架橋ポリスチレンおよびポリエチレングリコールグラフトポリスチレンポリマーを表す)と反応させて、式(XII)：

50

【化 1 0】

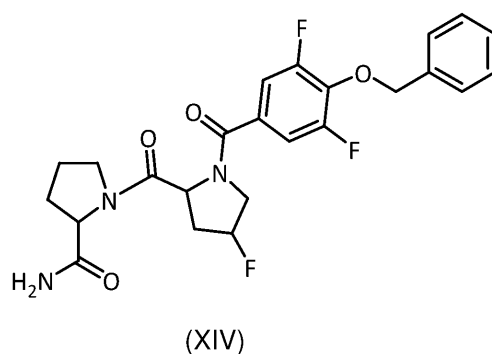


10

の化合物を得る工程、

b) 式 (X I I) の化合物を加水分解して、式 (X I V) :

【化 1 1】



20

の化合物を得る工程、および

c) 式 (X I V) の化合物を、カルボキサミド基をニトリル基に変換することができる条件に付して、式 (I) の化合物を得る工程

を含み、

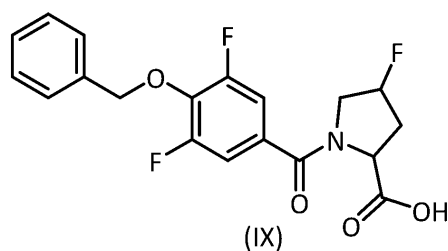
工程 b) および c) は、別々に、またはワンポット反応で行われ得る。

【0 0 7 7】

本発明の別の実施形態において、式 (I) の化合物またはそれらの薬学的に許容される塩、異性体、プロドラッグもしくは溶媒和物を調製するための方法は、

a) 式 (I X) :

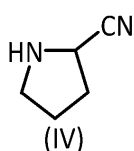
【化 1 2】



40

の化合物を、式 (I V) :

【化 1 3】



50

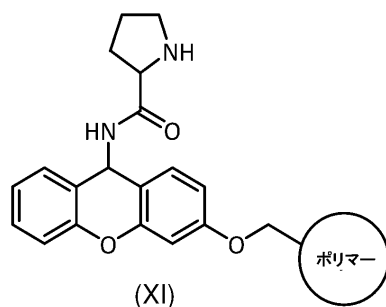
の化合物と反応させる工程を含む。

【 0 0 7 8 】

さらに別の実施態様において、方法は、

a) 式 (X I) :

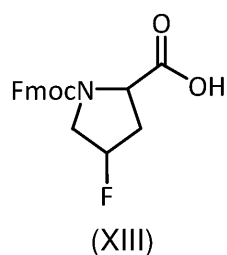
【 化 1 4 】



10

の化合物（式中、ポリマーは、本明細書に開示される合成方法の反応条件下で不活性であり、本明細書で用いられる溶媒に不溶性であるが膨潤性であるポリマー、例えば、低架橋ポリスチレンおよびポリエチレングリコールグラフトポリスチレンポリマーを表す）を、式 (X I I I) :

【 化 1 5 】



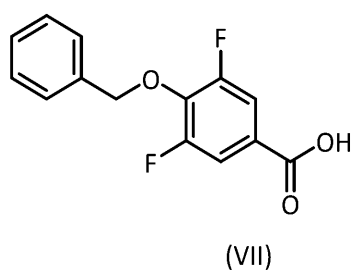
20

の化合物と反応させる工程、

b) Fmoc 保護基を除去する工程、

c) 式 (V I I) :

【 化 1 6 】



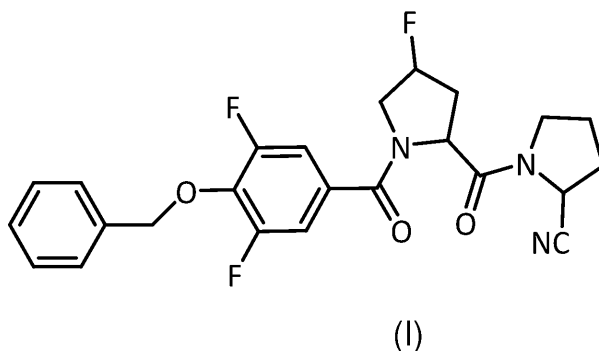
30

の化合物と反応させる工程、

d) 担持ポリマーから得られた生成物を加水分解して、式 (I) :

40

【化 17】



10

の化合物を得る工程を含む。

【0079】

一般式 (I) の化合物が、認知障害、特に中枢神経系の他の疾患または状態と関連する認知障害の治療において有用であることが見出された。

【0080】

本発明の特定の実施形態において、認知障害は、統合失調症、双極性感情障害、アルツハイマー病およびパーキンソン病からなる群から選択される疾患と関連する認知障害である。

20

【0081】

本発明は、患者への投与のための、本発明の化合物またはそれらの薬学的な塩、誘導体、プロドラッグもしくは立体異性体を、薬学的に許容される担体、アジュバントまたはビヒクルと一緒に含む、医薬または医薬組成物をさらに提供する。

【0082】

本発明による医薬組成物の補助材料または添加剤は、担体、賦形剤、担持材料、滑沢剤、フィラー、溶媒、希釈剤、着色剤、糖などの香味調整剤、抗酸化剤、結合剤、接着剤、崩壊剤、接着防止剤、流動促進剤および/または凝集剤の中から選択することができる。坐剤の場合において、これは、ワックスもしくは脂肪酸エステル、または非経口適用のための保存剤、乳化剤および/もしくは担体を意味していてもよい。これらの補助材料および/または添加剤、ならびに使用される量の選択は、医薬組成物の適用の形態に依存するであろう。

30

【0083】

本発明による医薬または医薬組成物は、ヒトおよび/または動物、好ましくは、乳児、小児および成人を含むヒトへの適用に好適な任意の形態であってもよく、当業者に公知の標準的な手順によって生成することができる。したがって、本発明による製剤は、局所または全身適用、特に、皮膚、経皮、皮下、筋肉内、関節内、腹腔内、静脈内、動脈内、膀胱内、骨内、陰茎海綿体内、鼻腔内、肺、頬側、舌下、眼、硝子体内、経皮的、直腸、経膈、経口、硬膜外、髄腔内、脳室内、大脳内、側脳室内、大槽内、脊髓内、脊髓周辺、頭蓋内、ポンプデバイスの有無にかかわらずニードルもしくはカテーテルを介した送達、または他の適用経路に適合されていてもよい。

40

【0084】

本発明の好ましい実施形態において、医薬組成物は、固体または液体のいずれかの経口形態である。経口投与に好適な剤型は、錠剤、丸剤、カプレット、ジェルキャップ、チューインガム、カプセル剤、顆粒剤、滴剤、シロップ剤または液剤であってもよく、当技術分野において公知の従来の賦形剤、例えば、結合剤、例えば、シロップ、アラビアガム、ゼラチン、ソルビトール、トラガントもしくはポリビニルピロリドン；フィラー、例えば、ラクトース、糖、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウム、ソルビトールもしくはグリシン；錠剤化滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム；崩壊剤、例えば、デンプン、ポリビニルピロリドン、デンプングリコール酸ナトリウムもしくは微結晶性セルロース

50

；または薬学的に許容される湿潤剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムを含有していてもよい。

【 0 0 8 5 】

別の実施形態において、医薬組成物は、非経口的ではない鼻腔内投与のための生成物の形態、好ましくは、鼻腔内投与のための生成物の形態である。典型的には、鼻腔内投与は、送達デバイスとして鼻腔用スプレー、スクイズボトル、および液体ドロップャーを使用することによって行われる。これらのデバイスで使用するために、医薬組成物は、有利には、本発明の化合物の溶液または懸濁液である。

【 0 0 8 6 】

組成物は、従来の配合、充填または錠剤化の方法によって調製されてもよい。大量のフィラーを用いて、配合操作の繰り返しを使用して、これらの組成物全体にわたって活性薬剤を分布させてもよい。そのような操作は、当技術分野において従来のものである。錠剤は、例えば、湿式造粒または乾式造粒によって調製されてもよく、場合により、通常の薬務において周知の方法に従ってコーティング、特に腸溶コーティングでコーティングされてもよい。

10

【 0 0 8 7 】

医薬組成物はまた、適切な単位剤型において、非経口投与に、例えば、無菌の液剤、懸濁剤もしくは再構成可能な乾燥調製物、エアロゾルまたはスプレーに適合されていてもよい。適正な賦形剤、例えば、増量剤、緩衝剤または界面活性剤を使用することができる。

【 0 0 8 8 】

20

本発明の組成物は、経皮適用のための溶解形態におけるまたはパッチにおける析出物として製剤化されてもよい。

【 0 0 8 9 】

皮膚適用としては、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、懸濁剤またはエマルジョンが挙げられる。

【 0 0 9 0 】

直腸適用の好適な形態は、坐剤による。

【 0 0 9 1 】

挙げられた製剤は、スペインおよび米国の薬局方ならびに類似の参考テキストに記載または言及されている方法などの標準的な方法を使用して調製される。

30

【 0 0 9 2 】

本発明の1つの実施形態において、式(Ⅰ)の化合物が治療有効な量で使用されることが好ましい。医師は、最も好適である本治療剤の投薬量を決定し、これは、投与の形態および選択される特定の化合物により変わり、さらにまた、治療中の患者、患者の年齢、疾患の種類、または治療される状態により変わる。組成物が経口投与される場合、より少ない量が非経口で与えられる場合と同じ効果を生じるために、より多くの量の活性薬剤が必要であり得る。化合物は、同等の治療剤と同じ様式で有用であり、投薬量レベルは、これらの他の治療剤が一般に用いられるのと同じ桁のレベルである。活性化合物は、典型的には、1日1回以上、例えば、毎日1回、2回、3回または4回、0.011~1.90mg/kg/日の範囲の典型的な総1日用量で投与される。

40

【 0 0 9 3 】

本発明の化合物および組成物は、他の薬物とともに使用して、併用療法を提供してもよい。他の薬物は、同じ組成物の一部を形成していてもよく、または同じ時もしくは異なる時での投与のための別々の組成物として提供されてもよい。

【 0 0 9 4 】

特に、少なくとも一つの式(Ⅰ)の化合物および少なくとも一つの別の薬物の組み合わせは、その同時の、別々のまたは順次の投与のために、少なくとも薬学的に許容される担体、添加剤、アジュバントまたはビヒクルとともに製剤化されてもよい。これは、式(Ⅰ)の化合物および他の薬物の組み合わせが以下のように投与され得るという意味を有する。

a) 次いで両方が常に同時に投与される、同じ医薬製剤の一部である組み合わせとして。

50

b) それぞれ、それらのうちの1つが同時の、順次のまたは別々の投与の実現性を与える2つの単位の組み合わせとして。特定の実施形態において、式(I)の化合物は、同時であるが、他の薬物と独立して(すなわち、2つの単位で)に投与される。別の特定の実施形態において、式(I)の化合物が最初に投与され、次いで、他の薬物が別々にまたは順次に投与される。さらに別の特定の実施形態において、他の薬物が最初に投与され、次いで、式(I)の化合物が、定義される通り、別々にまたは順次に投与される。

【0095】

本発明の文脈において、以下の頭字語および略語を使用し、意味を下記に詳述する。

A c O E t	酢酸エチル	
A D	アルツハイマー病	10
A U C	曲線下面積	
B B B	血液脳関門	
B o c	t e r t - ブトキシカルボニル	
B S A	ウシ血清アルブミン	
D B U	1, 8 - ジアザビシクロ [5 . 4 . 0] ウンデカ - 7 - エン	
D C M	ジクロロメタン	
D M E M	ダルベッコ改変イーグル培地	
D I	識別指数	
D I E A	N , N ' - ジイソプロピルエチルアミン	
D M F	ジメチルホルムアミド	20
D M S O	ジメチルスルホキシド	
E t O H	エタノール	
F m o c	9 - フルオレニルメトキシカルボニル	
F P L C	高速タンパク質液体クロマトグラフィー	
F T I R	フーリエ変換赤外分光計	
H B S S	ハンクス平衡塩溶液	
H O A t	1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾール	
h P O P	ヒトプロリルオリゴペプチダーゼ	
I P	腹腔内	
I P 3	イノシトールトリホスフェート	30
I P T G	イソプロピル β - D - 1 - チオガラクトピラノシド	
L B	溶原性ブロス	
M A L D I - T O F	マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型	
M K - 8 0 1	ジゾシルピン	
M S	多発性硬化症	
N M R	核磁気共鳴	
N O R	新規物体認識	
O D	光学密度	
P A M P A	並行人工膜透過性アッセイ	
P B S	リン酸緩衝生理食塩水	40
P C	ホスファチジルコリン	
P E	ホスファチジルエタノールアミン	
p E T M 1 0	プラスミド p E T M 1 0	
P I	ホスファチジルイノシトール	
P O P	プロリルオリゴペプチダーゼ	
P S	ホスファチジルセリン	
P y B O P	(ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート	
R P - H P L C	逆相高速液体クロマトグラフィー	
S D	標準偏差	50

S D S - P A G E ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動

T B T U O - (ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロ
ニウムテトラフルオロボレート

T E E R 経内皮電気抵抗

T F A トリフルオロ酢酸

T H F テトラヒドロフラン

T I S トリイソプロピルシラン

T r i s トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

T β 4 サイモシンペータ - 4 タンパク質

U P L C 超高速液体クロマトグラフィー

10

Z - G - P - A M C (N - ベンジルオキシカルボニル - G l y - P r o - メチルクマリ
ニル - 7 - アミド)

【実施例】

【0096】

以下の実施例は、本発明のある特定の実施形態の単なる例示であり、決して限定するものとして考慮され得ない。

【0097】

実施例に記載される調製のために使用された具体的合成条件

手順A：式(II)のエステルの式(VII)のカルボン酸への加水分解

式(II)のエステル(1mmol)を95%のEtOHに可溶化する。NaOH(3.7mmol)を添加し、反応物を、およそ2時間、還流で維持する。次いで、これを、室温まで放置する。反応混合物を濃縮して、およそ15~20mLにし、次いで、この溶液を、氷浴中で冷却しながら、1MのHCl溶液にゆっくり添加する。白色固体沈殿を、濾過によって収集し、水で洗浄し、次の合成工程の前に十分に乾燥させる。沈殿が生じない場合において、得られた溶液をAcOEtで抽出(3×)し、有機相を、乾燥させ、蒸発させる。粗生成物を、必要により、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する。

20

【0098】

手順B：式(VI)のアミンを得るための式(III)のBoc保護アミンの脱保護

式(III)のBoc保護アミン(1mmol)を、0℃で、ジオキサン中の4MのHCl(20mL)にゆっくり添加する。反応物を、室温で2時間撹拌する。次いで、溶媒を蒸発乾固させて、式(VI)のアミンの塩酸塩が得られる。

30

【0099】

手順C：式(VIII)のカルボン酸塩化物の形成による、式(VI)のアミンの式(VII)のカルボン酸へのカップリング

塩化オキサリル(1.5mmol)を、トルエン(5mL)中の式(VII)のカルボン酸(1mmol)の溶液に添加する。反応物を、0℃で1.5時間撹拌して、式(VIII)のカルボン酸塩化物を形成させる。溶媒の蒸発後、得られた粗製物を、THFに可溶化し、式(VI)のアミン(1.1mmol)のNaOH水溶液に0℃で添加する。反応混合物を、0℃で1.5時間および室温で3時間撹拌する。次いで、THFを蒸発させ、残った水性画分を、1MのHCl溶液の添加によって酸性pH(3~4)に調整し、酢酸エチルにより抽出する。有機相を、ブラインで洗浄し、乾燥し、濾過し、蒸発させる。式(IX)の粗生成物を、必要な場合、フラッシュクロマトグラフィーによって精製する。

40

【0100】

手順D：溶液中での式(IX)の生成物の式(IV)のピロリジン-2-カルボニトリルへのカップリング

式(IX)の生成物(1.2mmol)をDCMに溶解し、DIEA(1mmol)と一緒に、N-シクロヘキシルカルボジイミド、N'-メチルポリスチレン(3mmol)に添加する。5分後、式(IV)の(S)-ピロリジン-2-カルボニトリル(1mmol)およびDIEA(1mmol)を添加する。反応物を、室温で終夜撹拌する。次いで、

50

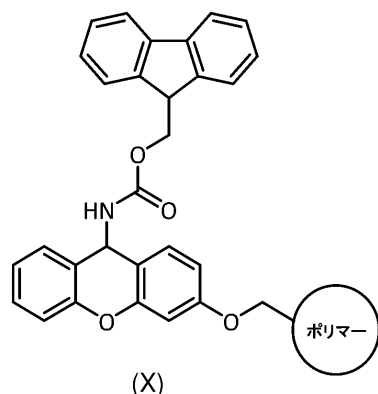
反応混合物を濾過し、残った固体をDCMで洗浄する。濾液を蒸発乾固させる。次いで、粗生成物を分取RP-HPLCによって精製し、凍結乾燥して、式(I)の生成物が得られる。

【0101】

手順E：固相上での合成のための一般手順

樹脂の膨潤/前処理：式(X)のSieberアミド樹脂(1当量)を、ポリエチレン多孔性ディスクを備えたシリンジに入れる。樹脂を、DCMおよびDMFによる洗浄によって膨潤させる。フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)保護基の除去を、DMF中の20%のピペリジン溶液による処理によって達成する。

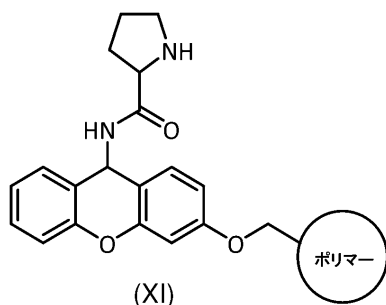
【化18】



【0102】

次いで、式(V)のFmoc保護L-プロリン(4当量)を、DMF中のTBTU(4当量)およびDIEA(8当量)を使用して樹脂に付着させる。混合物を、90分の間、断続的に手動で攪拌する。濾過および洗浄した後、カップリングの程度を、Kaiser試験を使用して追跡し、必要な場合に、再カップリングを行う。Fmocを、DMF中の20%のピペリジン溶液、およびその後のピペリジン/DBU/トルエン/DMF(20:5:5:70)溶液による処理によって、除去して、式(XI)の生成物が得られる。Fmocの除去は、p-ニトロフェニルエステルNF31試験を使用して評価する(Maddler, A.ら、Eur. J. Org. Chem. 1999; (11): 2787-91に記載)。

【化19】



【0103】

式(IX)の生成物(2当量)を、DMF中のPyBOP(2当量)、HOAt(6当量)およびDIEA(6当量)を使用して、式(XI)の生成物にカップリングさせて、式(XII)の生成物が得られる。混合物を、総反応時間である90分の間、断続的に手動で攪拌する。系統的再カップリングは、同じ量および時間を使用して行う。カップリングの程度を、p-ニトロフェニルエステルNF31試験を使用して追跡する。

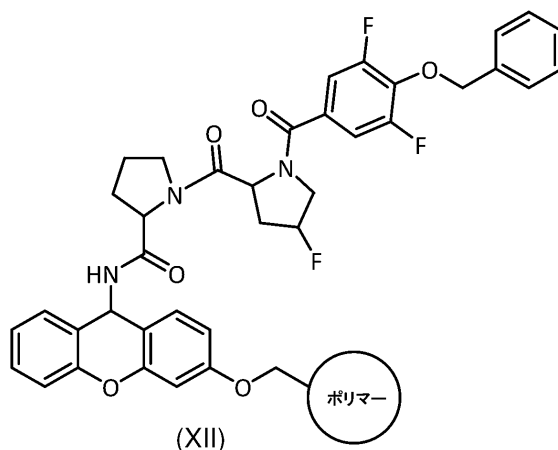
【0104】

あるいは、式(XIII)の生成物(4当量)を、DMF中のPyBOP(4当量)、HOAt(12当量)およびDIEA(12当量)を使用して、式(XI)の生成物にカ

カップリングさせる。混合物を、総反応時間である 90 分の間、断続的に手動で撹拌する。カップリングの程度を、p - ニトロフェニルエステル NF 3 1 試験を使用して追跡し、必要により、再カップリングを行う。Fmoc 基を、DMF 中の 20 % のピペリジン溶液による処理、およびピペリジン / DBU / トルエン / DMF (20 : 5 : 5 : 70) 溶液による処理によって、除去する。その後、式 (VII) の生成物 (4 当量) を、DMF 中の PyBOP (4 当量)、HOAt (12 当量) および DIEA (12 当量) を使用して組み込んで、式 (XII) の生成物が得られる。混合物を、総反応時間である 90 分の間、断続的に手動で撹拌する。カップリングの程度を、p - ニトロフェニルエステル NF 3 1 試験を使用して追跡し、必要により、再カップリングを行う。

【化 20】

10



20

【0105】

DCM で完全に洗浄され、乾燥させた式 (XII) の生成物を、丸底フラスコに移し、DCM (およそ 2 mL / 100 mg) 中のトリフルオロ酢酸無水物 (5 当量) およびピリジン (10 当量) を添加する。混合物を、室温で終夜保つ。次いで、反応混合物を濾過し、樹脂を DCM で洗浄する。濾液を収集し、溶媒を蒸発乾固させる。得られた粗製物を、AcOEt に溶解し、飽和 NaHCO₃ 溶液および 5 % の KHSO₄ 水溶液で洗浄する。有機相を、乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗製物を、H₂O : CH₃CN (1 : 1) に入れ、凍結乾燥させて、式 (I) のペプチドニトリルが得られる。

30

【0106】

あるいは、式 (XII) のペプチジル樹脂を、TFA / H₂O / TIS の混合物 (95 : 2.5 : 2.5、およそ 2 ~ 5 mL / 100 mg) により、1 ~ 2 時間の間、処理してもよい。次いで、樹脂を、濾過し、TFA で洗浄し、濾液を収集し、溶媒を蒸発乾固させる。粗製物を、H₂O : CH₃CN (1 : 1) の混合物に再懸濁させ、凍結乾燥させる。得られた粗ペプチドアミドを、DCM に入れ、トリフルオロ酢酸無水物 (5 当量) およびピリジン (10 当量) を添加する。混合物を、室温で終夜保ち、溶媒を蒸発させ、残渣を AcOEt に入れる。その後、有機溶液を、5 % の KHSO₄ 水溶液および 5 % の NaHCO₃ 水溶液で洗浄する。有機相の乾燥および蒸発により、式 (I) のペプチドニトリルが得られる。

40

【0107】

粗生成物を RP - HPLC によって精製する。

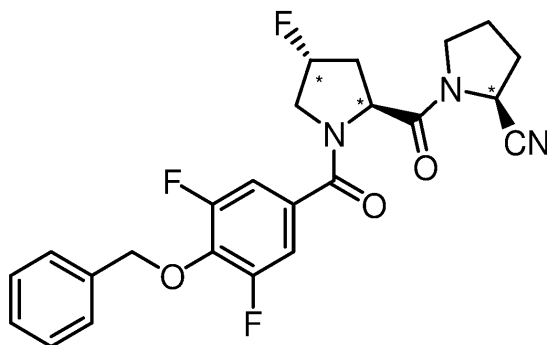
【0108】

実施例 1

(S) - 1 - ((2S, 4R) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3, 5 - ジフルオロベンゾイル) - 4 - フルオロピロリジン - 2 - カルボニル)ピロリジン - 2 - カルボニトリル

50

【化 2 1】



10

市販の式(V)のFmoc保護L-プロリン(Fmoc-L-Pro-OH)(249, 7mg、0.7mmol)、式(III)の(2S, 4R)-4-フルオロ-1-Fmoc-ピロリジン(pyrrolidine)-2-カルボン酸(533mg、1.5mmol)および式(VII)の4-ベンジルオキシ-3,5-ジフルオロ安息香酸(271mg、1mmol)を、市販のSieberアミド樹脂(333.3mg、0.2mmol、1当量)上で、上記の手順Eに記載した段階的カップリングにより、順次カップリングさせる。RP-HPLCによる精製により、156mg(0.341mmol)の最終生成物を得る。

融点137.6~139.1。FTIR: 1642、1582、1517、1414、1381、1317、1230、1203、1172、1064、1036cm⁻¹。¹H-NMR(CDCl₃、400MHz)δ(ppm): 7.42(2H, m)、7.35(3H, m)、7.12(2H, m)、5.30(1H, m)、5.23(1H, m)、4.93(1H, dd)、4.82(1H, m)、3.87(2H, m)、4.08/3.69(2H, m)、2.58/2.36(2H, m)、2.26(2H, m)、2.24(2H, m)。

20

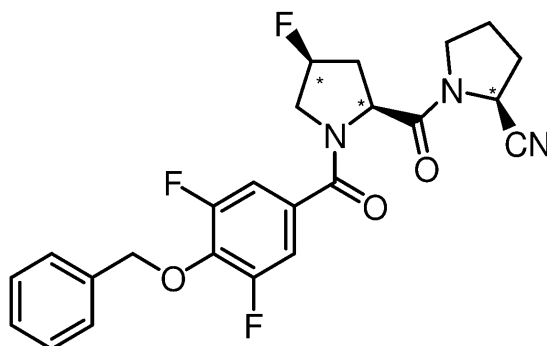
【0109】

実施例2

(S)-1-((2S, 4S)-1-(4-(ベンジルオキシ)-3,5-ジフルオロベンゾイル)-4-フルオロピロリジン-2-カルボニル)ピロリジン-2-カルボニトリル

30

【化 2 2】



40

この化合物を、(2S, 4R)-4-フルオロ-1-Fmoc-ピロリジン(pyrrolidine)-2-カルボン酸を(2S, 4S)-4-フルオロ-1-Fmoc-ピロリジン(pyrrolidine)-2-カルボン酸で置き換えたが実施例1に記載した方法に従って調製した。RP-HPLCによる精製により、138mg(0.302mmol)の最終生成物を得る。

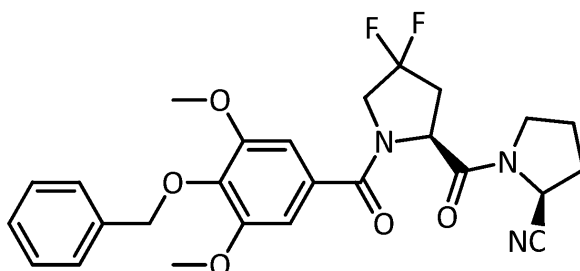
融点135~137。FTIR: 3483、2954、1653、1581、1518、1437、1417、1383、1356、1321、1234、1203、1172、1065、1039、1005、960、901、856、762、737、696cm⁻¹。

50

【 0 1 1 0 】

比較例 3 :

(S) - 1 - ((2 S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジメトキシベンゾイル) - 4 , 4 - ジフルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
【化 2 3】



10

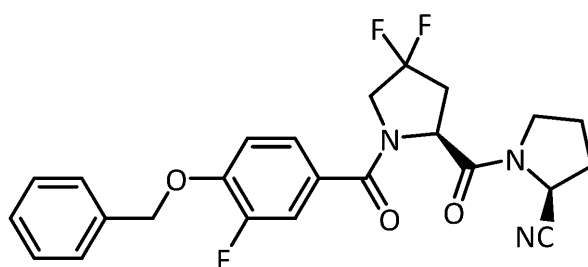
市販の Sieber アミド樹脂 (2 5 0 m g 、 0 . 1 9 m m o l 、 1 当量) 、市販の Fmoc - L - プロリン (Fmoc - L - Pro - OH) (2 5 8 m g 、 0 . 7 7 m m o l) および ((S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 , 5 - ジメトキシベンゾイル) - 4 , 4 - ジフルオロピロリジン - 2 - カルボン酸) (1 6 1 m g 、 0 . 3 8 m m o l) から始めて、生成物を、上記に記載した手順 E に従って調製する。RP - HPLC による精製により、1 8 m g (0 . 0 3 6 m m o l) の最終生成物を得る。

【 0 1 1 1 】

20

比較例 4 :

(S) - 1 - ((S) - 1 - (4 - (ベンジルオキシ) - 3 - フルオロベンゾイル) - 4 , 4 - ジフルオロピロリジン - 2 - カルボニル) ピロリジン - 2 - カルボニトリル
【化 2 4】



30

市販の Fmoc - 保護 L - プロリン (Fmoc - L - Pro - OH) (1 5 0 m g 、 0 . 4 5 m m o l) 、 Fmoc - 4 , 4 - ジフルオロ - L - プロリン (1 6 6 m g 、 0 . 4 5 m m o l) および 4 - ベンジルオキシ - 3 - フルオロ安息香酸 (1 0 9 m g 、 0 . 4 5 m m o l) を、市販の Sieber アミド樹脂 (2 0 0 m g 、 0 . 1 5 m m o l 、 1 当量) 上で、上記の手順 E に記載した段階的カップリングにより、順次カップリングさせる。RP - HPLC による精製により、1 4 m g (0 . 0 3 0 m m o l) の最終生成物を得る。

【 0 1 1 2 】

薬理学データ

40

新規化合物の (ヒト) プロリルオリゴペプチダーゼ活性に対する阻害効果の決定

プロリルオリゴペプチダーゼ (POP) の発現および精製

POP を、下記に要約される文献の手順 (Tarrago T ら、ChemBioChem 2006 ; 7 : 827 - 33) に従って、大腸菌における発現および His テイル融合を使用するアフィニティー精製によって得た。

【 0 1 1 3 】

hPOP 発現 : 大腸菌 BL21 コンピテント細胞を、pETM10 hPOP で形質転換した。発現を誘導するために、カナマイシン (5 0 μ g / m L) を含有する LB 培地 (5 0 m L) の前培養物に、1 つのコロニーを接種し、3 7 °C で終夜成長させた。翌日、LB 培地の 2 つの培養物 (5 0 0 m L) に、終夜培養物 (1 0 m L) を接種した。接種され

50

た培養物を、OD₅₉₅が1.2になるまで(2.5~3時間)、37 °Cおよび220 rpmで成長させた。次いで、IPTGを添加し(1 mMの最終濃度)、誘導を25 °Cで終夜行なった。細胞を回収(3500 g、15分間、4 °C)し、ペレットを懸濁緩衝液(50 mL)[Tris-HCl、pH 8(50 mM)、NaCl(300 mM)、イミダゾール(1 mM)]に懸濁させ、50%および0.5パルスの強度で、4サイクル(15秒の超音波処理および15秒の静止からそれぞれなる)の使用により超音波処理し、試料を氷上で保った。超音波処理後、試料を遠心分離(4000 g、30分間、4 °C)し、上清をPOP精製のために直ぐに使用した。AKTAエクスプローラーFPLCシステムを精製のために使用した。上清を、5カラム容積の懸濁緩衝液により予め平衡化したHiTrap Q₁カラム(5 mL)に、1 mL/分の流れで適用した。カラムを、280 nmでの吸光度が基礎レベルに戻るまで、懸濁緩衝液で洗浄した。次いで、カラムを5容積の洗浄緩衝液(50 mMのTris-HCl、pH 8、300 mMのNaCl、300 mMのイミダゾール)ですすいだ。溶出を、4容積の溶出緩衝液(50 mMのTris-HCl、pH 8、300 mMのNaCl、500 mMのイミダゾール)により行なった。画分(4 mL)を、溶出全体の間収集した。POP活性を、すべての画分においてチェックし、陽性のものを、SDS-PAGEによって分析し、BioSafe Comassie Stain G-250で染色した。陽性画分を収集し、緩衝液としてTris-HCl(50 mM、pH 8)を用いて、HiPrep 26/10脱塩カラムの使用によって脱塩した。組換えhPOPを、標準としてBSAを用いるBio-Radタンパク質アッセイにより定量化した。組換え酵素のアリコート調製し、液体窒素で直ぐに凍結し、-80 °Cで貯蔵した。

【0114】

POP阻害アッセイ

POP活性を、POP基質としてZ-G-P-AMC(N-ベンジルオキシカルボニル-Gly-Pro-メチルクマリニル-7-アミド)を使用して、Toideら(Toide Kら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995; 274: 1370-8)によって記載された方法に従って決定した。反応を、多重反応を同時に追跡するのを可能にする96ウェルマイクロタイタープレートにおいて行なった。それぞれの反応について、活性緩衝液(134 μL、100 mMのリン酸Na/K緩衝液、pH 8.0)を、hPOP(hPOPバッチの活性に応じて20~60 nMの範囲)および対応する新化合物溶液(3 μL)とともに37 °Cで15分間プレインキュベートした。新化合物のストック溶液を、DMSO(100 mM)中で調製し、希釈物を、このストック溶液からDMSOを用いて調製した。

【0115】

プレインキュベーション後、Z-G-P-AMC(10 μL、40%の1,4-ジオキサン中3 mM)を添加し(3 μL、40%の1,4-ジオキサン中1.5 mM、条件B)、反応物を、37 °Cで1時間インキュベートした。反応を、酢酸ナトリウム(150 μL、1 M、pH 4)を添加することにより停止し、AMCの形成を蛍光的に測定した。励起および放出の波長は、それぞれ、360/40 nmおよび485/20 nmであった。

【0116】

いくつかの濃度点(25 pM~400 μMの範囲)を、それぞれの化合物について測定した。プロリルオリゴペプチダーゼに対する阻害活性を、式1に従って算出した。それぞれの新化合物について、hPOPの存在下(a)および非存在下(b)での蛍光を測定した。最大蛍光(0%の阻害活性)は、阻害性化合物の非存在下でのhPOPの試料から得た。新規化合物の阻害効力を推定するために、活性を、化合物のlog濃度に対してプロットし、GraphPad Prismソフトウェアを使用してシグモイド曲線に調整し、POP活性の50%を阻害するのに必要な化合物の濃度として定義されるIC₅₀値を、得られた曲線から決定した。

【数1】

10

20

30

40

50

$$\text{阻害活性 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{a-b}{c-d} \right) \right] \times 100 \quad (\text{式 1})$$

式中、

a は、基質 + 試験化合物 + h P O P の存在下での蛍光強度に対応し、

b は、基質 + 試験化合物の存在下での蛍光強度に対応し、

c は、基質 + h P O P の存在下での蛍光強度に対応し、

d は、基質の存在下での蛍光強度に対応する。

【 0 1 1 7 】

新化合物は、ヒトプロリルオリゴペプチダーゼに対して高い阻害能力を示す。結果を第 1 表に要約する。

【 表 1 】

第 1 表：ヒトプロリルオリゴペプチダーゼの阻害

化合物 (実施例番号)	IC ₅₀ (nM)	SD
実施例 1	45.0	7.01
比較例 3	48.7	20.3
比較例 4	365.3	103.6

【 0 1 1 8 】

第 1 表のデータは、図 1 に表される。前記図において、バーは、平均値 ± 標準偏差 (S D) を表す。

【 0 1 1 9 】

化合物の透過性の決定

並行人工膜透過性アッセイ (P A M P A)

K a n s y M ら、J . M e d . C h e m . 1 9 9 8 ; 4 1 (7) : 1 0 0 7 - 1 0 に記載された並行人工膜透過性アッセイ (P A M P A) を使用して、化合物が受動拡散によって血液脳関門 (B B B) を通過する能力を決定した (D i L ら、E u r . J . M e d . C h e m . 2 0 0 3 ; 3 8 (3) : 2 2 3 - 3 2) 。化合物の有効透過性 (P _e) を、2 0 0 μ M の初期濃度で測定した。緩衝溶液を、製造業者の説明書に従って市販の濃縮物から調製した。p H を、0 . 5 M の N a O H 溶液を使用して、7 . 4 に調整した。新化合物のストック溶液を、D M S O 中で調製し、緩衝溶液で最終 2 0 0 μ M の濃度 (0 . 5 % の D M S O 含有量) に希釈した。P A M P A サンドイッチを分離し、それぞれのドナーウェルを 2 0 0 μ L の化合物溶液で満たした。アクセプタープレートに配置し、膜の下側が緩衝液と接触するのを確実にした。ドデカン中の 4 μ L のリン脂質 (2 0 m g / m L) の混合物を、それぞれのウェルのフィルターに添加し、2 0 0 μ L の緩衝溶液を、それぞれのアクセプターウェルに添加した。プレートを、覆い、1 0 0 r p m での軌道攪拌下、飽和湿度雰囲気中、室温で 4 時間インキュベートした。4 時間後、アクセプターおよびドナーコンパートメントの内容物を H P L C によって分析した：ドナープレートからのそれぞれのウェルの 1 5 0 μ L およびアクセプタープレートからのそれぞれのウェルの 1 5 0 μ L を H P L C バイアルに移し、それぞれの試料を逆相 C ₁₈ カラム (1 5 0 m m × 4 . 6 m m × 5 μ m 、 1 0 0) に注入した (アクセプターウェルから注入あたり 1 0 0 μ L 、ドナーウェルから、t ₀ 参照について注入あたり 1 0 μ L) 。輸送も、M A L D I - T O F 分光法によって確認した。

【 0 1 2 0 】

使用したリン脂質混合物は、以下の組成を有する A v a n t i p o l a r l i p i d s によって提供されたブタ極性脳脂質抽出物であった：1 2 . 6 % のホスファチジルコリン (P C) 、 3 3 . 1 % のホスファチジルエタノールアミン (P E) 、 1 8 . 5 % のホスファチジルセリン (P S) 、 4 . 1 % のホスファチジルイノシトール (P I) 、 0 . 8 % の

ホスファチジン酸および 30.9% の他の化合物。

【 0 1 2 1 】

4 時間後、有効透過性 (P_e) を式 2 を使用して算出し、輸送のパーセンテージ ($T\%$) を式 3 を使用して算出し、リン脂質膜の化合物保持 ($R\%$) を式 4 を使用して算出した。

【数 2】

$$P_e = \frac{-218.3}{t} \times \log \left[1 - \frac{2C_A(t)}{C_D(t_0)} \right] \times 10^{-6} \text{ cm/s} \quad (\text{式 2})$$

【数 3】

10

$$T\% = \frac{C_A(t)}{C_D(t_0)} \times 100 \quad (\text{式 3})$$

【数 4】

$$R\% = \left(1 - \frac{C_D(t) + C_A(t)}{C_D(t_0)} \right) \times 100 \quad (\text{式 4})$$

式中、

t は、時間 (h) であり、

20

$C_A(t)$ は、時間 t でのアクセプターウェルにおける化合物濃度であり、 $C_D(t)$ は、時間 t でのドナーウェルにおける化合物濃度であり、

$C_D(t_0)$ は、 t_0 でのドナーウェルにおける化合物濃度である。

【 0 1 2 2 】

第 2 表に示される指標 P_e 値に基づいて、新規化合物は、BBB を通過する良好な透過性を示す (第 3 表) 。

【表 2】

第 2 表：指標 P_e 値

指標 P_e 値 ($\text{cm}/\text{秒}$)	CNS 内での輸送
$P_e \geq 4 \cdot 10^{-6}$	良好
$2 \cdot 10^{-6} \leq P_e < 4 \cdot 10^{-6}$	疑わしい
$P_e < 2 \cdot 10^{-6}$	不良

30

【表 3】

第 3 表：新化合物の有効透過性 (P_e) および輸送のパーセンテージ

化合物 (実施例番号)	P_e ($\times 10^{-6} \text{ cm}/\text{秒}$)	SD	%T	SD	%R	SD
1	4.7	0.1	18.1	0.4	24	3.5
比較例 3	22.14	5.86	29.92	4.80	10.93	1.60
比較例 4	-	-	10.43	2.06	-	-

40

【 0 1 2 3 】

第 3 表のデータは、図 2 に表される。前記図において、バーは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) を表す。

【 0 1 2 4 】

Caco-2 アッセイ

Caco-2 細胞は、ヒト薬物吸収を予測するためのインビトロモデルとして広く使用されている。Caco-2 細胞株は、ヒト結腸直腸癌に由来し、培養されると、細胞は、単層の極性腸細胞に自発的に分化する。

50

【0125】

Caco-2細胞の単層を通過する薬物透過性は、男性におけるインビボ吸収と良く相関することが示されており (Zhao YHら、2001、J. Pharmaceut. Sci. 90: 749-784)、腸吸収の予測のための十分に確立されたインビトロの方法になっている (Kansy Mら、2001、Pharmacokinetic optimization in drug research、Testa Bら編、447-646)。

【0126】

実験を、CacoReady透過性キット (Ready Cell、バルセロナ、スペイン) を使用して行った。

10

【0127】

キットの受領の同じ週に、細胞の輸送培地を、キットとともに提供されたユーザーマニュアルに従って液化し、その後、輸送培地を、新鮮なダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、低グルコース) と置き換えた。

【0128】

20日目の細胞培養と等しい3日後、バリア系の品質および細胞間のタイトジャンクションの存在を、細胞バリアの経内皮電気抵抗 (TEER) を測定することによってチェックした。200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ の (またはそれよりも高い) TEER値は、バリア系が、吸収アッセイに許容されることを示す。電極を、UV光下で30分間、エタノール (70%) 中に浸すことによって滅菌した。その後、電極を、室温で事前に温めたDMEM培地中で30分間、平衡化した。TEER測定を室温で行い、 $1357 \pm 168 \Omega \cdot \text{cm}^2$ の平均値を得、細胞バリアの完全性を確認した。

20

【0129】

透過性アッセイに先んじて、輸送緩衝液を、調製し ($\text{HBSS} (1 \times) - \text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$)、実験の間の細胞の温度ストレスを回避するために、37℃に温めた。並行して、試験される化合物を、輸送緩衝液 ($\text{HBSS} (1 \times) - \text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$) 中50 μM の最終濃度で溶解した。0.5%のDMSOを含有させ、この量は、細胞に十分に耐容性を示し、バリア完全性に影響を及ぼさない。化合物を、50 μM の濃度で試験した。

【0130】

透過性アッセイの前に、頂端および基底コンパートメントのDMEMを、吸引によって除去した。10 μL の容積の培地を、細胞が乾燥し、それらのバリア性に損傷を与えるのを防止するために、それぞれのコンパートメントに残した。両コンパートメントを、輸送緩衝液ですすぎ、基底 (底部) コンパートメントを、300 μL の輸送緩衝液で、頂端 (上部) コンパートメントを75 μL の輸送緩衝液で満たした。

30

【0131】

基底コンパートメントの内容物を、吸引によって完全に除去し、250 μL の輸送緩衝液で再び満たした。頂端コンパートメントの内容物も、吸引によって除去し、細胞が乾燥するのを回避するために、10 μL の輸送緩衝液を残した。65 μL の試験される化合物溶液を、それぞれのウェルに添加した。

【0132】

輸送実験 (頂端から基底) のために、細胞を、化合物を含有する溶液とともに、37℃で2時間インキュベートした。その後、コンパートメントの内容物を、回収し、HPLCによって分析した (カラムC18 Sunfire 100mm $\times$ 4.6mm、3.5mm、100Å、Waters; 流速1mL/分; グラジエント 8分での0~100%のB A = H_2O 中の0.045%のトリフルオロ酢酸およびB = アセトニトリル中の0.036%のトリフルオロ酢酸、220nmで検出)。すべての実験を、三連で行った。

40

【0133】

コンパートメントから試料を除去した後、アッセイの間の細胞バリアの完全性をチェックするために、基底コンパートメントを250 μL の輸送緩衝液で、頂端コンパートメントを輸送緩衝液中20 μM の濃度の65 μL のLucifer Yellow (LY) 溶

50

液で再び満たした。細胞バリアを、L Y 溶液とともに、37℃で1時間インキュベートした。L Y を、透過性アッセイのためのバリア完全性マーカーとして使用する。インキュベーション後、コンパートメントの内容物を、収集し、蛍光光度計を使用して分析した。

【0134】

完全に機能的なCaco-2バリアについて、L Y の透過性は、1時間後に、0.7%未満であるはずである。アッセイ後、L Y 透過性は、化合物の評価の間のバリアのバリア完全性を示すこの輸送平均を下回った。

【0135】

Caco-2透過性アッセイにおいて、化合物についての輸送のパーセンテージ(T%)を、以下の式に従って算出した。

【数5】

$$T\% = \frac{C_A(t)}{C_D(t_0)} \times 100$$

式中、tは、時間(時間)であり、C_A(t)は、時間tでの基底コンパートメント(アクセプター)における化合物の濃度であり、C_D(t₀)は、時間0での頂端コンパートメント(ドナー)における化合物の濃度である。

【表4】

第4表：透過性(Caco-2アッセイ)

化合物 (実施例番号)	%T	SD
1	45	3
比較例3	5.7	1

【0136】

上記に示したように、実施例1の化合物の胃透過性は、比較例3の胃透過性よりも非常に高い。前記図において、バーは、平均値±標準偏差(SD)を表す。

【0137】

第4表のデータは、図3に表される。

【0138】

インビボ脳曝露

それぞれの化合物について、実験の日に7~8週齢の24頭の成体雄マウスを、研究のために使用し、群間で無作為に割り当てた。実験を、下記の表に記載される3群の動物において行った。

【表5】

群	処置、経路/用量、 投与の体積	群あたりのマウス	血漿および脳試料の回数
1	処置なし(対照群)	N=3	投薬前
2	比較例3、IP、5 mg/kg、10mL/kg	N=21 (それぞれの試料採取時間について3頭の動物)	T0+5分、T0+30分、T0+1時間、T0+2時間、T0+4時間、T0+7時間、T0+24時間
3	実施例1、PO、5 mg/kg、10mL/kg	N=21 (それぞれの試料採取時間について3頭の動物)	T0+5分、T0+30分、T0+1時間、T0+2時間、T0+4時間、T0+7時間、T0+24時間

mg、ミリグラム；mL、ミリリットル；h、時間；kg、キログラム；min、分；N、動物の数；IP、腹腔内；PO、口による；T、時間；min、分

【0139】

化合物の投与後、末端部血液を、腹腔内投与（比較例 3）または経口投与（実施例 1）後のいくつかの時点で得た。

【0140】

リン酸緩衝生理食塩水による経心臓灌流後、脳も収集した。すべての試料を、生物分析まで - 80 で貯蔵した。

【0141】

血漿試料を室温（RT）で解凍し、試料を、内部標準として 20 ng/mL のフェナセチンを含む 2 倍容積のアセトニトリルを用いてタンパク質沈殿させた。試料を全体的に混合し、それに続いて、2, 200 × g で 20 分間遠心分離した。上清を、150 mM のリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）で 1:1 希釈し、UPLC 96 ウェルプレートにピペティングして、分析の間待った。

10

【0142】

脳試料を、秤量し、RT で解凍し、4 倍容積のリン酸緩衝生理食塩水を用いてピーズホモジナイザーにおいて組織をホモジネートすることによって、分析のために調製した。ホモジネートを、血漿試料と同様に処理した。

【0143】

参照（校正）試料を、実施例 1 および比較例 3 が 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 および 10000 ng/mL の濃度までブランクの血漿および脳ホモジネートを添加した後、実際の研究試料と同様に調製した。品質管理試料を、実施例 1 および比較例 3 が 20、200 および 2000 ng/mL までブランクの血漿および脳ホモジネートを添加した後、実際の研究試料と同様に調製した。

20

【0144】

比較例 3 および実施例 1 の化合物のレベルを、マウス血漿および脳から定量化した。試料を、UPLC/QE - オービトラップ - 質量分析を使用して、目的に合った生物分析法を使用して分析した。

【0145】

時間に沿った化合物の濃度（ng/mL）をプロットし、血漿および脳試料における曲線下面積（AUC）を、Graphpad Prism（商標）5.0 を使用して算出した。血漿と脳の比を以下の通り算出した。

30

【数 6】

$$\text{BBB 通過 \%} = \frac{\text{AUC}_{\text{brain}}}{\text{AUC}_{\text{plasma}}} \times 100$$

【表 6】

第 5 表：脳曝露

化合物 (実施例番号)	%BBB
1	25.3
比較例 3	21

40

【0146】

第 5 表のデータは、図 4 に表される。

【0147】

上記に示したように、経口投与によって実施例 1 の化合物を使用する場合、前記化合物が腹腔内投与される場合でさえ、他の化合物によって達成される脳曝露よりも高い脳曝露を達成することが可能である。

【0148】

ミクロソーム安定性(ラット)

ミクロソーム安定性は、化合物が、経口投与後に代謝初回通過を克服し、全身曝露に達

50

するかを予測するために有用である。血流中での化合物の半減期を予測するためにも有用である。

【0149】

ラット (Sprague-Dawley) のプールされた肝臓ミクロソーム (カタログ番号 452501) 中での化合物の安定性を、供給業者 (BD Bioscience) によって提供された説明書に従って調べた。試験される化合物のストック溶液 (500 μM) を、DMSO 中で調製した。2 μL の化合物を、以下の混合物中の 1 μM の最終濃度でインキュベートした。

- 713 μL の H₂O
- 200 μL の 0.5 M のリン酸カリウム (pH 7.4)
- 50 μL の NADPH 再生系溶液 A (BD Bioscience、カタログ番号 451220)
- 10 μL の NADPH 再生系溶液 B (BD Bioscience、カタログ番号 451220)

10

【0150】

得られた混合物を、37 に 5 分間温めた。その後、25 μL の肝臓ミクロソームを、0.5 mg/mL の最終濃度で添加した。混合物を、軌道攪拌 (100 rpm) を伴って、37 でインキュベートした。選択された時点で、100 μL のアリコートをし、抽出し、100 μL のアセトニトリルと混合した。得られた沈殿を、ボルテックスで 1 分間振とうした。試料を 4 で 30 分間保ち、その後、試料を 20,000 × g、4 で 30 分間遠心分離した。上清を濾過し、その後、UPLC-MS によって分析した。すべての安定性試験を、二連で行った。

20

【表 7】

第 6 表：ミクロソーム安定性 (ラット)

化合物 (実施例番号)	半減期 (分)
実施例 1	12
比較例 3	<5
比較例 4	<5

30

【0151】

これらのデータは、比較例 3 および比較例 4 が、経口投与後に代謝初回通過を克服できないことを示唆する。そのため、経口投与後に全身循環に達しないであろう。実際に、比較例 3 は、経口投与後に効力を示さず、非常に低い薬物の血漿レベルで検出された。

【0152】

マウスにおける PK

静脈内ボラス投与後の化合物の薬物動態を、雄 Swiss Albino マウスにおいて実施した。研究は、施設内動物倫理委員会 (IAEC) の指針に従い、動物実験の管理および監督を目的とする委員会 (CPCSEA)、インドの要件に従って実施した。

【0153】

研究を、複合プロファイルを生成するために、わずかな試料採取設計 (n = 3 / 時点) を使用して、化合物あたり 12 頭のマウスで実施した。化合物を、0.5 mg/mL の濃度で、生理食塩水 (0.9 NaCl) 中の 2% の Tween 80 (登録商標) に溶解した。マウスに、2 mL/kg の投薬体積で、26 G ニードルでガイドされた 1 mL の BD シリンジを使用して、外側尾静脈を通じた静脈ボラスによって、1 mg/kg の化合物溶液の単回用量を投与した。

40

【0154】

血液試料を、投薬の 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、24 および 48 時間後に収集した (時点あたり n = 3)。それぞれの時点で、120 μL の血液を、後眼窩神経叢穿刺によって収集し、200 mM の K₂EDTA 溶液 (血液 1 mL あたり 2

50

0 μL) を含有するラベル付けしたマイクロチューブに移した。血液試料を、5000 × g、4 ± 2 で5分間遠心分離した。血漿試料を、生物分析まで - 60 以下で貯蔵した。

【0155】

血漿試料を、1.06 ng/mL の LLOQ を用いる LC-MS/MS 法を使用して分析した。血漿における薬物動態パラメーターを、有効な Phoenix WinNonlin (登録商標) ソフトウェア (バージョン 6.3) の非コンパートメント分析ツールを使用して算出した。濃度時間曲線下面積 (AUC_{last}) を、線形台形規則によって算出した。最高血漿中濃度 (C_{max}) および最高血漿中濃度に達するまでの時間 (T_{max}) は、観測値であった。クリアランス (CL) および分布容積 (V_{ss}) は、予測値であった。

10

【表8】

第7表：薬物動態(マウス)

化合物 (実施例番号)	AUC _{last} (ng・時間/mL)	CL (mL/分/kg)	V _{ss} (L/kg)
1	127	99.6	1.19
比較例3	131	126	0.64
比較例4	22.7	697	9.06

【0156】

比較例4は、マウスにおける静脈内 (iv) 投与後に非常に高いクリアランスを示し、これは、化合物が、高い代謝初回通過を被ることを示し (マイクロソーム安定性データと一致する)、化合物が経口投与後に全身循環に達しないことを示唆する。

20

【0157】

認知機能障害動物モデルにおける学習および記憶に対する新化合物の効果

【0158】

新化合物を、認知機能障害のための薬理学的モデルにおける認知増強剤としてのそれらの有効性について評価した。新化合物の効果を、未処置および MK-801 処置げっ歯動物 (マウスまたはラット) において評価した。MK-801 は、さまざまな学習および記憶パラダイムにおいて動物のパフォーマンスを損なう N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の非競合的アンタゴニストである (Castellano C ら、Curr. Drug Targets 2001; 2: 273-83.; Riedel G ら、Behav. Brain Res. 2003; 140: 1-47)。MK-801 はまた、感覚処理、運動過剰、常同症および運動失調における欠損を含むげっ歯動物の行動に対するさまざまな効果を生じる。MK-801 処置によって誘発される行動的表現型は、認知欠損の動物モデルとして広く使用されている (Bardgett ME ら、Brain Res. Bull. 2003; 60: 131-42; Van der Staay FJ ら、Behav. Brain Res. 2011; 220: 215-29; Mutlu O ら、Pharmacol. Biochem. Behav. 2011; 99: 557-65)。

30

【0159】

試験される化合物が認知増強剤として作用するかどうかを決定するために、正常な認知行動を回復するそれらの能力を、新規物体認識試験などの広く使用されている試験により試験した (Dere E ら、Neurosci. Biobehav. Rev. 2007; 31: 673-704; Boess FG ら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007; 321: 716-25); 受動的または抑制性回避課題 (Sarter M ら、Psychopharmacology (Berl) 1992; 107: 144-59); モリス水迷路 (D'Hooge R ら、Brain Res. Rev. 2001; 36: 60-900); および T 迷路転換課題 (Boess FG ら、Neuropharmacology 2004; 47: 1081-92; Spowart-Manning L ら、Behav. Brain Res. 2004; 151: 37-46)。

40

【0160】

50

新POP阻害剤の評価のための代表例として、行動試験のそれぞれに従ったプロトコール、ならびに物体認識試験および受動的回避試験において得られた結果を記載する。

【0161】

新規物体認識課題

新規物体認識（NOR）課題は、げっ歯動物が新規物体を探索するための自然選好に基づく（Ennaceur Aら、Behav. Brain Res. 1988；31：47 - 59）。これは、視覚学習および記憶の欠損を研究するための関連する非報酬試験である。簡潔には、NOR課題手順は、3つのトライアル：馴化、訓練および保持から構成された。それぞれの動物を、物体の非存在下で10分間、直径40cmの円形アリーナに慣れさせる（馴化セッション）。翌日、動物を、訓練トライアルのために10分間円形アリーナに入れ、2つの同一の物体を対称な位置に配置した。この工程は、2連続日の間行った。3日目に、物体の一方を、異なる物体によって置き換えた。訓練トライアルにおいて使用しなかった物体を、保持トライアルにおいて新規物体として使用した。次いで、動物を、10分間自由に探索させ、それぞれの物体を探索するのに費やした時間を記録した。動物は、新規物体を探索するのにより多くの時間を費やすと予想され、これは、インタク

10

【0162】

経口経路によって投与される化合物

実験を、8～9週齢の雄C57/B16マウス（群あたりn = 7～9頭の動物）を使用して行った。化合物を、生理食塩水（0.9%のNaCl）中の5%のTween 80（登録商標）の混合物を用いて溶解して、0.5mg/mLの強度の溶液を得た。

20

【0163】

試験を、3つの部分：馴化、訓練および試験に分けた。初日に、動物を、10分間、アリーナ（円形、直径40cm）に慣れさせた。次の2日間、動物を、10分間、アリーナに配置された2つの同一の物体を自由に探索させた。試験セッション（4日目）において、物体の一方を、新規物体によって置き換えた。このセッションより前の、試験35分前に、動物に、研究中の化合物（生理食塩水中の5%のTween 80（登録商標）、5mg/kg）またはビヒクル（生理食塩水中の5%のTween 80（登録商標）、体重100gあたり1mL）をos（po）により投与した。認知欠損を誘発するために、ジゾシルピン（MK-801）を、試験20分前に、陰性対照群または薬物試験群に、生理食塩水中0.2mg/kg用量で、皮下投与した。ベースライン対照群に、生理食塩水を注射した。

30

【0164】

薬物投与後、それぞれのマウスを、10分間、物体を自由に探索させた。識別指数（DI）を、評価のためのパラメーターとして定義した。

【数7】

$$\% DI = \left(\frac{\text{新物体に向けられた時間} - \text{慣れ親しんだ物体に向けられた時間}}{\text{新物体に向けられた時間} + \text{慣れ親しんだ物体に向けられた時間}} \right) \times 100$$

40

【0165】

実験を、アリーナの1.5m上に配置したウェブカメラを使用して記録した。円形アリーナの領域において探索された時間のパーセンテージとしてマウスによる移動距離を、Panlab SMART 2.0ソフトウェアを使用して分析した。

【0166】

腹腔内経路によって投与される化合物

実験を、8～9週齢の雄C57/B16マウス（群あたりn = 7～9頭の動物）を使用して行った。化合物を、生理食塩水（0.9%のNaCl）中の5%のTween 80（

50

登録商標)の混合物を用いて溶解して、0.5 mg/mLの強度の溶液を得た。

【0167】

試験を、3つの部分：馴化、訓練および試験に分けた。初日に、動物を、10分間、アリーナ(円形、直径40cm)に慣れさせた。次の2日間、動物を、10分間、アリーナに配置された2つの同一の物体を自由に探索させた。試験セッション(4日目)において、物体の一方を、新規物体によって置き換えた。このセッションより前の、試験35分前に、動物に、研究中の化合物(生理食塩水中の5%のTween 80(登録商標)、5 mg/kg)またはビヒクル(生理食塩水中の5%のTween 80(登録商標)、体重100gあたり1 mL)を腹腔内投与した。認知欠損を誘発するために、ジゾシルピン(MK-801)を、試験20分前に、陰性対照群または薬物試験群に、生理食塩水中0.2 mg/kg用量で、皮下投与した。ベースライン対照群に、生理食塩水を注射した。

10

【0168】

薬物投与後、それぞれのマウスを、10分間、物体を自由に探索させた。識別指数(DI)を、評価のためのパラメーターとして定義した。

【数8】

$$\% DI = \left(\frac{\text{新物体に向けられた時間} - \text{慣れ親しんだ物体に向けられた時間}}{\text{新物体に向けられた時間} + \text{慣れ親しんだ物体に向けられた時間}} \right) \times 100$$

【0169】

実験を、アリーナの1.5 m上に配置したウェブカメラを使用して記録した。円形アリーナの領域において探索された時間のパーセンテージとしてマウスによる移動距離を、Panlab SMART 2.0ソフトウェアを使用して分析した。

20

【0170】

実施例1の化合物および比較例3の化合物を投与した場合に得られた結果を、下記の表に提供する。

【表9】

第8表：NOR課題試験

	化合物	識別指数%
腹腔内	対照	39.5 ± 3.9**
	MK 801 (sc)	21 ± 4.7
	MK 801 (sc) + 実施例1 (ip)	30.3 ± 3.9
	MK 801 (sc) + 比較例3 (ip)	42.7 ± 3.3***
経口	対照	53.3 ± 2.7***
	MK 801 (sc)	16.6 ± 5.9
	MK 801 (sc) + 実施例1 (po)	42.1 ± 5.1**
	MK 801 (sc) + 比較例3 (po)	20.1 ± 2.9

30

40

【0171】

第8表のデータは、図5a(腹腔内投与)および図5b(経口投与)に表される。前記図において、バーは、動物の平均 ± s.e.m.を表す。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001対基礎(基礎MK 801)の認知欠損の条件(一元ANOVA検定は、ダネット事後検定に従う)。

【0172】

上記に示したように、実施例1の化合物は、それが経口経路によって投与された場合に、比較例3よりも優れており、これを経口投与に特に好適にする。

【0173】

選択性プロファイル(5-HT1Aへの結合)

50

実験を、C e r e p / E u r o f i n sからのS a f e t y S c r e e n 4 4（登録商標）パネルを使用して行った。化合物を、1 0 0 μ M（1 %のD M S O中）の濃度で試験した。

【 0 1 7 4 】

化合物の結合を、それぞれの標的に特異的な放射性標識リガンドの結合の阻害パーセンテージとして算出した。

【 0 1 7 5 】

結果を、試験化合物の存在下で得られた対照特異的結合の阻害パーセントとして表す。

【数 9】

$$100 - \left(\frac{\text{測定された特異的結合}}{\text{対照特異的結合}} \times 100 \right)$$

10

【 0 1 7 6 】

5 0 %よりも高い阻害を示す結果は、試験化合物の有意な効果を表すと考えられる。

【表 1 0】

第9表：5-HT1A受容体への結合

化合物	対照特異的結合の阻害%	SD
実施例 1	-6.3	1.2
比較例 3	64.6	5.6

20

【 0 1 7 7 】

第9表のデータは、図6に表される。

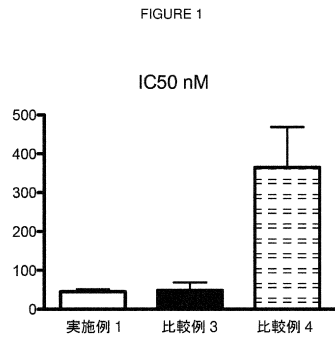
30

40

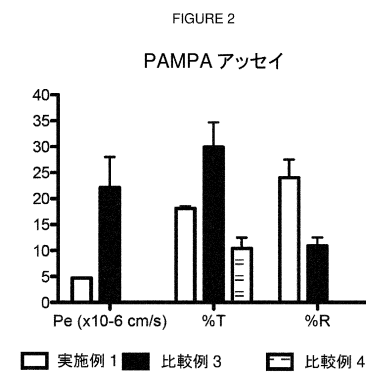
50

【図面】

【図 1】

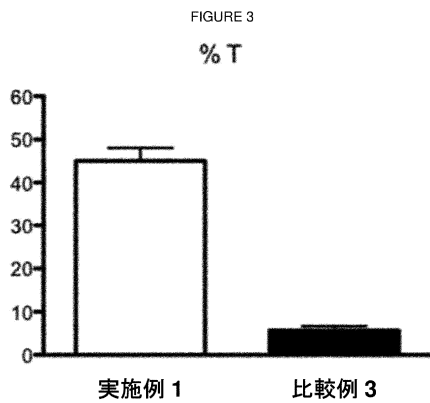


【図 2】

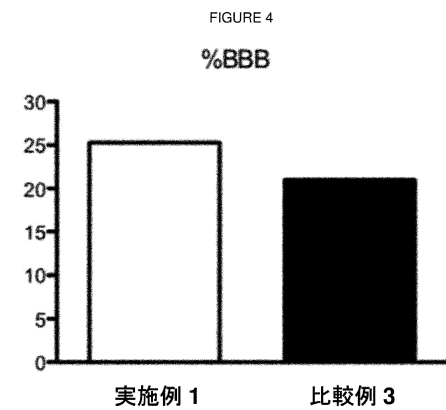


10

【図 3】

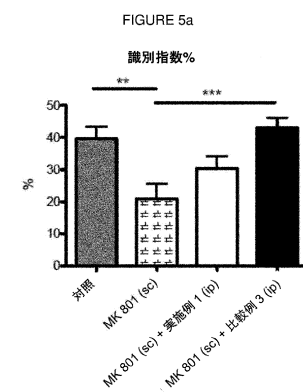


【図 4】

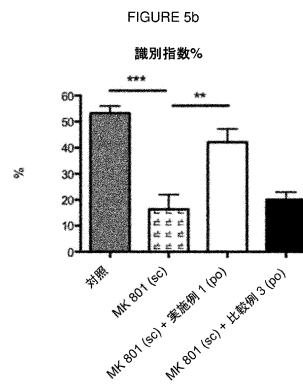


20

【図 5 a】



【図 5 b】

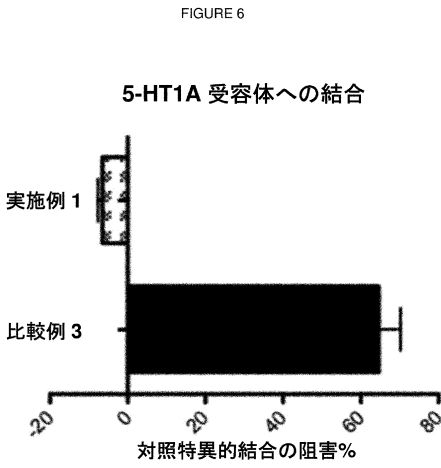


30

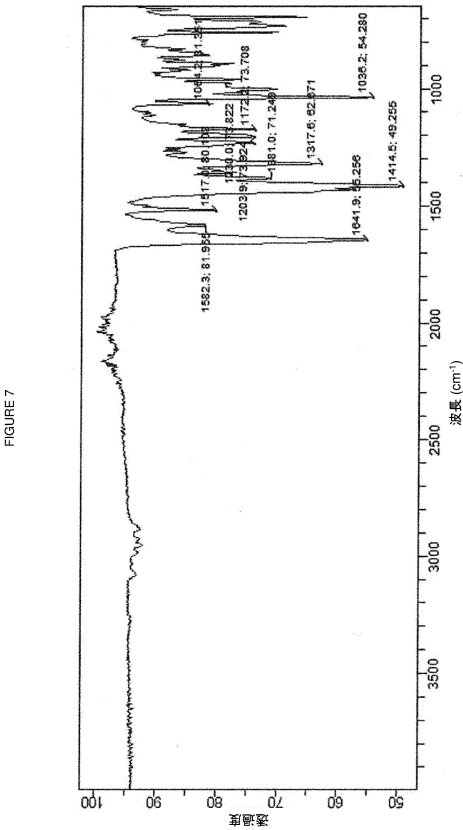
40

50

【 図 6 】

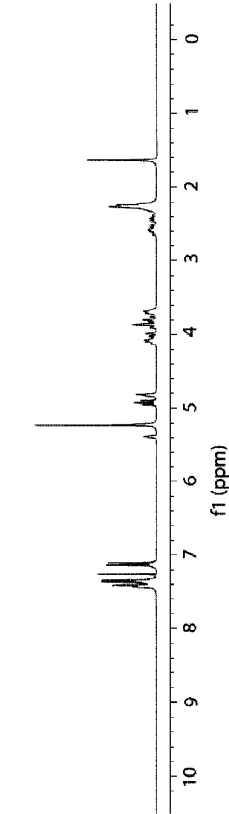


【 図 7 】



【 図 10 】

FIGURE 10



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18
A 6 1 P	25/20	(2006.01)	A 6 1 P 25/20
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 タラゴ クルア、テレサ
スペイン国 0 8 0 2 8 パルセロナ、バルディリ レシャク 4 - 8、トレス イ ブランタ 5 ア、
アクレ セラピューティクス ソシエダッド リミターダ

(72)発明者 ブラデス コサノ、ロヘル
スペイン国 0 8 0 2 8 パルセロナ、バルディリ レシャク 4 - 8、トレス イ ブランタ 5 ア、
アクレ セラピューティクス ソシエダッド リミターダ

審査官 坂口 岳志

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 0 7 2 4 9 8 (W O , A 1)
特表 2 0 0 6 - 5 1 6 5 5 7 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 D
A 6 1 K
A 6 1 P
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)