

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5548675号
(P5548675)

(45) 発行日 平成26年7月16日 (2014. 7. 16)

(24) 登録日 平成26年5月23日 (2014. 5. 23)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 31/427 (2006. 01) A 6 1 K 31/427
A 6 1 P 25/28 (2006. 01) A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/16 (2006. 01) A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/00 (2006. 01) A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/06 (2006. 01) A 6 1 P 27/06

請求項の数 8 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-506476 (P2011-506476)	(73) 特許権者	391015708
(86) (22) 出願日	平成21年4月24日 (2009. 4. 24)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(65) 公表番号	特表2011-522782 (P2011-522782A)		パニー
(43) 公表日	平成23年8月4日 (2011. 8. 4)		BRISTOL-MYERS SQUIB
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/041634		B COMPANY
(87) 国際公開番号	W02009/132253		アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015
(87) 国際公開日	平成21年10月29日 (2009. 10. 29)		4 ニューヨーク パーク アベニュー
審査請求日	平成24年3月22日 (2012. 3. 22)		345
(31) 優先権主張番号	61/047, 729	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成20年4月24日 (2008. 4. 24)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100100158
			弁理士 鯨島 睦
		(74) 代理人	100126778
			弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を含めたタウ関連疾患の治療におけるエポチロンDの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療が必要な患者のアルツハイマー病を治療するための薬剤の製造におけるエポチロンDの使用であって、

患者に投与されるエポチロンDの毎月の累積用量が、 $0.01 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ である使用。

【請求項 2】

エポチロンDが経口投与される、請求項1の使用。

【請求項 3】

エポチロンDが静脈内投与される、請求項1の使用。

【請求項 4】

エポチロンDが、投与の20分～1時間後において0.5以上の脳透過性を示し、かつ、以下(1)24時間以上の脳内半減期、および/または(2)投与の24時間以上後において2以上の脳-肝臓間選択的保持率を示す、請求項1の使用。

【請求項 5】

エポチロンD治療の使用の中止を必要とする薬剤性の副作用を引き起こすことなく、該患者におけるアルツハイマー病を治療するのに有効である、請求項1の使用。

【請求項 6】

エポチロンDがヒト患者に静脈内投与される、請求項1の使用。

【請求項 7】

10

20

治療が必要な患者のアルツハイマー病を治療するための薬剤の製造におけるエポチロンDの使用であって、

患者に投与されるエポチロンDの毎月の累積用量が、 $0.01 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ であって、

エポチロンD治療の使用の中止を必要とする薬剤性の副作用を引き起こすことなく、該患者におけるアルツハイマー病を治療するのに有効である、
エポチロンDの使用。

【請求項8】

エポチロンDがヒト患者に静脈内投与される、請求項7の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、エポチロンDを用いるタウ関連疾患の治療に関し、より具体的には、エポチロンDを用いるアルツハイマー病の治療に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病（AD）とは、認知症の最も一般的な形態であり、2006年において、世界中で推定2700万人の人々が罹患している。ADでは、年齢が知られている最大の危険因子であり、85歳以上の人々における発症率は25～50%である。人口の平均年齢が上昇するにつれて、AD患者の数は指数関数的に増大すると予測される。ADは、65歳以上の人々の死因で5番目に多く、大半の患者は最終的に、自宅での介護者による介護を必要とする。結果として、ADは、甚大な経済的影響を有し、例えば、2005年の直接的および間接的な推定費用は、米国だけでも1480億ドルであった。経済的費用のほかに、ADは、患者およびその家族たちに対して計り知れない影響を及ぼし、重大な精神的苦痛および不安を引き起こす。

20

【0003】

記憶および他の認知機能の進行性低下を伴う認知症の存在に基づき、また、認知症の他の原因を除外することにより、患者がADを有する可能性が高いと診断する。臨床診断は、脳の神経病理学に基づき、具体的に述べると、診断には、脳の細胞外における斑の存在および濃縮、細胞内のもつれ、ならびに脳の神経変性を含めた、脳組織の評価を必要とするので、ADの診断が裏付けられるのは死後に限られる。通常はより低度ではあるが、斑およびもつれは認知の正常な成人においても観察されるので、認知症もまた、診断に必須の部分である。

30

【0004】

2つの薬剤クラスである、コリンエステラーゼ阻害剤およびN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）アンタゴニストが、現在のところ、ADについて承認されている。これらの2つの治療剤クラスは、ある程度の臨床的利益を示すが、多くの患者には効果がなく、これらの薬物は、疾患の進行をほとんどまたはまったく修飾することなく、ADの症状（例えば、認知機能）を改善するだけである。これらの理由で、この壊滅的な疾患に対する疾患修飾療法の同定が、医薬業界の主要な焦点である。

40

【0005】

ADを含めたタウオパチーを治療するための療法として、微小管安定化剤が示唆されている。例えば、Lee et al.（参考文献リスト、前出）を参照されたい。1994年5月に出版され、1996年12月3日に付与された米国特許第5,580,898号において、Trojanowskiらは、微小管を安定化させることによりAD患者を治療するためのパクリタキセル[TAXOL（登録商標）]の使用を示唆している。パクリタキセルは、癌患者の治療における微小管安定化剤として極めて有効であることが分かっている；しかし、ADに用いることを考えた場合、それは、脳透過性および末梢における神経障害の問題（以下でさらに説明する）を示し、ADを治療するための実行可能な療法としては浮上していない。

50

【0006】

1995年に、エポチロンBが、パクリタキセルに類似の微小管安定化効果を及ぼすことが報告された(Bollag et al. 1995年)。エポチロンAおよびエポチロンBは、細菌であるソランギウム・セルロースムの発酵生成物からHofleらにより単離された天然化合物である(例えば、WO93/10121)。Hofleらはまた、エポチロンC、D、E、F、ならびに他の異性体および変異体を含め、エス・セルロースムおよび改変株により生成された、37の天然のエポチロン変異体および関連の化合物も発見している(米国特許第6,624,310号)。

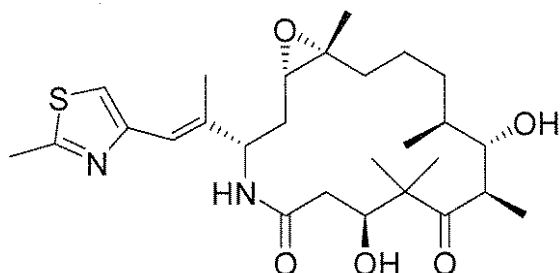
【0007】

天然エポチロンに固有の特徴は、潜在的な抗癌薬としてのそれらの探索に対する多大な関心を引き起こした。今日、天然エポチロンAおよびBの最初の発見以来20年近くが経過している。数百ものエポチロン類似体が発見され、様々な特許出願において記載され、「エポチロン」の表題の下に多数の文献が刊行されている(例えば、Altmann et al.、参考文献リスト、前出、396~423頁を参照されたい)。

【0008】

本出願の譲受人は、癌治療のために、エポチロンBの半合成類似体であるイキサベピロンを開発している。イキサベピロンの構造式は：

【化1】



である。

【0009】

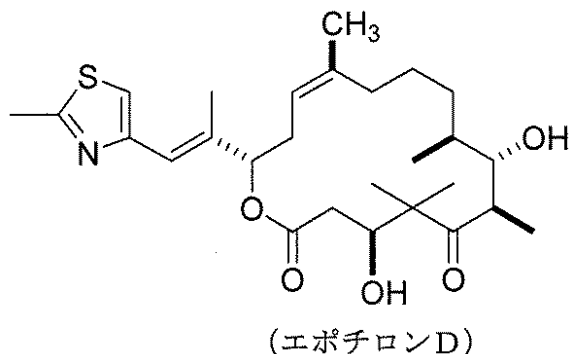
イキサベピロンの化学名は、(1S, 3S, 7S, 10R, 11S, 12S, 16R) -7, 11-ジヒドロキシー-8, 8, 10, 12, 16-ペンタメチル-3-[(1E)-1-メチル-2-(2-メチル-4-チアゾリル)エチニル]-17-オキサ-4-アザビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5, 9-ジオンである。本譲受人である、Bristol-Myers Squibb (BMS) 社へと譲渡された米国特許第6,605,599号もまた参照されたい。イキサベピロンは、転移性乳癌の治療についてFDAにより承認されている微小管安定化剤であり、IXEMPRA (登録商標)の商標名で、BMSにより市販されている。イキサベピロンは、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,605,599号または同第7,172,884号に記載の通りに調製することができる。

【0010】

Novartis Pharma AG社による卵巣癌治療のための第III相試験中にあるエポチロンB (パツピロンまたはEPO-906としても知られる)、Bayer Schering AG社による、卵巣癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、および黒色腫を含めた各種の癌の治療のための第II相試験中にある、エポチロンBのベンゾチアゾリル-7-プロペニル合成類似体であるサゴピロン (またはZK-EPO) を含めた、他の天然エポチロンおよび類似体が、癌治療のためのより進んだ臨床試験中にある。2007年に、乳癌からの脳転移を治療するためのサゴピロンによる第II相試験が、米国において開始された。加えて、エポチロンD類似体であるKOS-1584も、Kosan Biosciences社 (現在はBMS社により完全所有される子会社) による、非小細胞肺癌および充実性腫瘍を治療するための第II相臨床試験へと進んでおり、エポチロンDも、Hoffmann-La Roche社と提携するKosan社による、癌治療のため

の第 I I 相臨床試験へと進んでいた；しかし、エポチロン D により癌を治療するための臨床試験は 2007 年に打ち切られた。エポチロン D の構造は、以下の式：

【化 2】



10

により表わすことができる。

【0011】

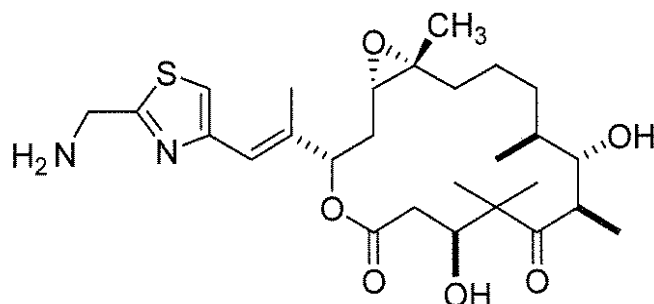
エポチロン D は、H o f l e らに帰属の米国特許出願第 09 / 313, 524 号において組成物として特許請求され、その出願および特許が U S P T O の特許審判抵触部に提訴の特許抵触第 105, 298 号の対象であった、D a n i s h e f s k y らに帰属の米国特許第 6, 242, 469 号および同第 6, 284, 781 号において説明されている。

【0012】

20

本出願の譲受人はまた、癌治療について、BMS-310705（本明細書における化合物 I I）も臨床評価している。BMS-310705 は、卵巣癌を治療するための第 I 相臨床試験を経過した；それは、アミノエポチロン F 類似体であり、化学構造：

【化 3】



30

を有する。

【0013】

化合物 I I（BMS-310705）は、本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 262, 094 号に記載の通りに調製することができる。

【0014】

エポチロン化合物および類似体のうちのいくつかは癌の治療について臨床評価される一方で、癌治療薬が A D を含めた神経変性疾患を治療するのに有効に用いられるかどうかは極めて予測外のことである。この予測不可能性には、様々な因子が影響している。1つの因子は、血液脳関門（B B B）に起因する、良好な脳透過性を達成することの実質的な困難である。化合物が神経変性脳疾患を治療するのに有用であるには、該化合物が B B B を超えることが必要である；しかし、B B B の機能は外部の物質および毒素から脳を保護することであるため、良好な B B B 透過性を有する有用な薬物の発見は困難である。加えて、B B B 透過性は、癌治療薬（脳腫瘍治療薬以外の）には望ましくない特徴である。癌治療薬の場合は通常、B B B 透過性の回避が求められるが、A D または他の神経変性脳疾患を治療するようにデザインされる薬物の場合、該化合物が有効であるためには、良好な B B B 透過性が必要である。したがって、例えば、パクリタキセルは極めて有効な癌治療薬であるが、B B B を介する脳透過性が低率であるため、A D などの脳疾患を治療するのに有

40

50

用な療法としては浮上していない。

【0015】

A Dおよび他の脳疾患の治療における、癌治療薬、特に、微小管安定化薬の有用性を評価することの予測不可能性に影響するさらなる因子は、薬物が脳を透過し、長時間にわたり脳内に保持され、末梢組織と比べて脳内において選択的に蓄積される能力に関与する。これらのパラメータは、脳対血漿比、脳内における半減期、また、末梢組織（中でも特に、肝臓）と比較した、脳内に保持される薬物量の比を用いて測定することができる。加えて、微小管安定化剤は、血漿から急速に消失することが典型的であるが、微小管を含有する組織からの消失はより緩徐であり、血漿レベルと組織レベルとの比較に適切な時間窓を設定することが重要となるため、これらの化合物について、脳透過性、脳内における保持、および脳内における選択的な蓄積を測定することは複雑である。特定の用量での微小管安定化剤が末梢組織に対して極めて細胞傷害性であることを踏まえると、脳対末梢組織比が特に重要な測定値である：パクリタキセルなどの微小管安定化剤を化学療法の用量で投与する場合、末梢における神経障害および他の副作用が生じることが多い（Postma et al. 1999年）。これらの副作用は、癌患者の治療では忍容されうるが、A Dおよび他の脳疾患に罹患する患者の治療には、異なる治療域および許容可能な副作用プロファイルが存在する。

10

【0016】

神経変性疾患への潜在的な適用について癌治療薬を検討することに関与するまたさらなる困難は、投与方式ならびにこれに関連するバイオアベイラビリティおよび細胞傷害性に関与する。

20

【0017】

I N S E R M社のA n d r i e u xらに帰属し、2004年1月30日に公開された、WO2005/075023 A1では、エポチロンA、B、C、D、E、およびF、ならびにベンゾチアゾリルおよびピリジルによるエポチロンBおよびDの類似体を含めた特定のエポチロンおよび類似体が、統合失調症または自閉症など、ニューロンの結合性欠損に関与する疾患の治療に有用でありうることが示唆されている。しかし、A n d r i e u xらは、ニューロンの結合性欠損に関連する疾患（すなわち、件の出願において特許請求された疾患）は、「神経変性を伴うアルツハイマー病などの進行性認知障害とは異なる」と述べて、A Dの治療のためのこれらの化合物の使用に対しては特許請求せず、したがって、この使用には反対の教示を行った。

30

【0018】

S c h e r i n g A G社のL i c h t n e rらに帰属するWO03/074053（'053）（2003年9月12日公開）では、原発性脳腫瘍、続発性脳腫瘍、多発性硬化症、およびA Dを含めた、脳腫瘍および他の脳疾患を治療するための、広範な種類のエポチロン化合物およびエポチロン合成類似体の使用に対して、広範な特許請求が行われている。L i c h t n e rらは、4つの化合物、すなわち、該明細書において、化合物1：4，8-ジヒドロキシ-16-（1-メチル-2-（2-メチル-4-チアゾリル）-エテニル）-1-オキサー-7-（1-プロピル）-5，5，9，13-テトラメチル-シクロヘキサデク-13-エン-2，6-ジオン；化合物2：ジヒドロキシ-3-（1-メチル-2-（2-メチル-4-チアゾリル）-エテニル）-10-プロピル-8，8，12，16-テトラメチル-4，17-ジオキサビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5，9-ジオン；および化合物3：7，11-ジヒドロキシ-3-（2-メチルベンゾチオアゾール-5-イル）-10-（プロプ-2-エン-1-イル）-8，8，12，16-テトラメチル-4，17-ジオキサビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5，9-ジオンと命名された化合物と比較されたパクリタキセルについての特定のデータを報告している（特許公開第WO '053号の21頁を参照されたい）。

40

【0019】

とりわけ、L i c h t n e rらは、上記の3つのエポチロン類似体について、脳内および血漿中における濃度データについて報告しているが、最長40分間にわたるデータに限

50

られている。そのパクリタキセルの脳内レベルが検出レベル未満であり、化合物のいずれについても、脳対肝臓比、半減期、または脳内保持（例えば、長時間にわたる脳組織内における薬物濃度）に関するデータを報告していないため、L i c h t n e rらは、脳内レベル対血漿中レベルについて、パクリタキセルに対する比較データを報告することができていない。

【0020】

上述の視点から、当技術分野では、タウオパチー、特にアルツハイマー病を治療する方法が依然として必要である。

【発明の概要】

【0021】

本発明者らは、行動学的研究および神経病理学的研究を含めた複数のインビボ研究に基づき、エポチロンDが、ADを含めたタウ関連疾患の治療において、著明に有利なプロファイル達成することを発見した。本発明者らは、エポチロンDが、該化合物をこのような疾患の治療に特によく適するものとする、有利な特性の顕著な組合せを示すことを発見した。これらの特性には、BBBを超える高レベルの脳透過性だけでなく、長時間にわたり、末梢組織、中でもとりわけ、肝臓内において見出される薬物レベルと比較して著明に長い脳内半減期、および脳内における著明に高い選択的保持率が含まれる。加えて、本発明者らは、タウ関連疾患、特に、ADの治療における著明な治療的利点を、低用量のエポチロンD、例えば、化学療法効果を達成するのに投与される用量の約100分の1である用量により達成しうることをさらに発見した。結果として、本発明者らは、エポチロンDの使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、エポチロンDによるタウ関連疾患の治療、特に、ADの治療における療法を可能とする方法を発見した。化学療法治療と比較した低用量を踏まえれば、癌を治療するためのエポチロンおよび類似体の投与時において誘導される副作用と比較して、いずれの副作用も大幅に軽減される。

【0022】

本発明は、著明に有利な治療プロファイルを示すエポチロンDを用いてタウオパチーを含めたタウ関連疾患を治療する方法、また特に、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0023】

本発明は、患者におけるタウ関連疾患を治療するための、エポチロンDを含む医薬組成物であって、本明細書で定義される良好な脳透過性、脳内における長い半減期、および脳内における選択的な保持（例えば、高度な脳対肝臓比）を含む治療プロファイルを示す組成物をさらに提供する。好ましい実施形態は、治療有効量のエポチロンDおよび薬学的に許容される担体を含む、タウオパチー、特にADを治療するための医薬組成物を含む。本発明のさらなる実施形態および態様を以下に示す。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、エポチロンD（化合物I）を用いるTg4510マウスについての実験の基本的なデザインを示す。

【0025】

【図2】図2は、エポチロンD（化合物I）の投与以前である2.5カ月後におけるTg4510マウスに対するモリス水迷路（MWM）検査の結果を示す。

【0026】

【図3】図3は、エポチロンD（化合物I）投与の2カ月後である4.5カ月後におけるTg4510マウスに対するMWM検査の結果を示す。

【0027】

【図4】図4は、エポチロンD（化合物I）を2カ月間にわたり投与された4.5カ月齢のTg4510マウスにおける5日間の訓練の18時間後の探索データを示す。「TQ」とは標的四分円を表わし、「AR」とは隣接する右側の四分円を表わし、「AL」とは隣

10

20

30

40

50

接する左側の四分円を表わし、「OP」とは、向かい側の四分円を表わす。行動の2つの測定値、すなわち各四分円内における%による経路長（A）およびプラットフォーム通過回数（B）が記載される。

【0028】

【図5】図5は、ビヒクル、1mpkのエポチロンD（化合物I）、および10mpkのエポチロンD（化合物I）による治療の5.5ヵ月後のTg4510マウスにおける海馬のCA1領域およびCA3領域内のニューロンカウントを示す。

【0029】

【図6】図6は、ビヒクル、1mpkのエポチロンD（化合物I）、および10mpkのエポチロンD（化合物I）で治療したTg4510マウスに対する海馬のリン酸化タウ染色を示す。群当たり3匹ずつのマウスに由来する代表的な切片を示す。AT8陽性染色は、暗灰色および暗黒色である。

10

【0030】

【図7】図7A～7Bは、ビヒクル、1mpkのエポチロンD（化合物I）、および10mpkのエポチロンD（化合物I）で治療したTg4510マウスにおける神経原線維変化についてのガリヤス銀染色を示す。図7Aは、皮質染色の代表的な顕微鏡写真を示し、ここでは黒い銀染色が陽性である。非トランスジェニックマウスでは、より明るい背景染色および一部の血管染色が観察された。図7Bは、皮質および海馬の両方における銀染色の定量化を示す。

20

【0031】

【図8】図8A～8Dは、最長24時間の様々な間隔での静脈内投与後におけるマウスの血漿、脳、および肝臓における化合物II（図8A）、イキサベピロン（図8B）、パクリタキセル（図8C）、およびエポチロンD（化合物I）（図8D）の濃度を示す。

【0032】

【図9】図9は、投与の5～24時間後までの経口投与（35mpk）後の脳内におけるエポチロンD（化合物I）および化合物III（本明細書の実施例7に記載の）の濃度を示す。

【0033】

【図10】図10は、投与後最長1週間の時間間隔後のマウスの血漿、脳、および肝臓におけるエポチロンD濃度を示す。

30

【0034】

（略号）

以下は、本明細書において用いられる様々な用語の略号である。

3R = 3回の反復

4R = 4回の反復

AD = アルツハイマー病

APP = β アミロイド前駆体タンパク質

BBB = 脳血液関門

BMS = Bristol-Myers Squibb社

CHCl₃ = クロロホルム

40

CH₂Cl₂ = 塩化メチレン

DMAp = 4-ジメチルアミノピリジン

EtOAc = 酢酸エチル

HPLC = 高速液体クロマトグラフィー

FDA = 米国食品医薬品局

FTDP-17 = 第17染色体と関連するパーキンソン病を伴う前頭側頭部認知症

H、h、hr = 時間

IP = 腹腔内

IV = 静脈内

LDA = リチウムジイソプロピルアミド

50

LLQ = 定量下限

< LLQ = LLQ 未満、検出不能

MAP = 微小管関連タンパク質

MeOH = メタノール

min = 分

MT = 微小管

mpk = キログラム当たりのミリグラム

MWM = モリス水迷路

nM = ナノモルの

NQ = < LLQ である 1 つまたは複数のデータ点に起因して定量不能

10

PEG = ポリエチレングリコール

PGP = P 糖タンパク質

PO = 経口（経口投与）

PVP = ポリビニルピロリドン

RT = 室温

SiO₂ = シリカゲル

TBAF = テトラブチルアンモニウムフルオリド

TBS = トリス緩衝生理食塩液

TEA = トリエチルアミン

TFA = トリフルオロ酢酸

20

THF = テトラヒドロフラン

TPGS = d- α -トコフェリルポリエチレングリコール 1000 スクシネート

【0035】

（定義）

本明細書で用いられる「約」とは、問題とされる測定値および測定を行うために用いられる測定器を考慮して当業者が決定する、特定の値に対する標準偏差の許容範囲内（すなわち、測定系の限界）を意味する。例えば、「約」とは、1 つまたは複数の標準偏差内を意味しうる。製剤および用量に適用される「約」は、報告される数の 10 % 以内、より好ましくは 5 % 以内、さらにより好ましくは 2 % 以内にある偏差を意味しうる。

【0036】

30

本明細書において、x が数値を示す場合の「少なくとも x」および「x 以上」という用語は、それらが同じ意味を有することを意図するものとして、本明細書では互換的に用いられる。

【0037】

「脳透過性」とは、化合物が BBB を超える能力を指す。大半の微小管安定化剤に対する末梢クリアランスが急速であるために、投与の比較的短時間後、例えば、投与の約 20 分～1 時間後における脳対血漿比を測定して、脳透過性自体を評価することが重要である。本明細書で定義される良好な脳透過性を有する化合物とは、投与の約 20 分～1 時間後において、0.5 以上の脳対血漿比、より好ましくは 0.8 以上、最も好ましくは 1 以上の比（ここでも、投与の約 20 分～1 時間後において）を示す化合物を意味する。化合物または薬物が、高度な脳／血漿比のこの基準（例えば、本明細書の特許請求の範囲において列挙される）を満たすかどうかを評価する場合、薬物濃度を評価するのにヒトの脳組織を解析することはできないので、インビボにおける非ヒト研究に依拠しなければならない。

40

【0038】

「認知的利益」とは、治療を必要とする少なくとも 1 人の患者について、認知試験、全体的機能の測定値、ならびに日常生活の活動および行動を特徴とする認知機能の改善またはその低下の軽減が観察または報告されることを意味する。認知的利益は、患者または患者群における認知低下を測定する目的でデザインされる認知検査により測定される。このような検査の例には、ADAS-cog（アルツハイマー病評価スケール、認知サブスケ

50

ール) および M M S E (ミニメンタルステート検査) などの認知検査; N P I (神経精神症状検査票) などの行動検査; A D C S - A D L (アルツハイマー病共同研究一日常生活動作検査) などの日常生活動作検査; ならびに C I B I C - p l u s (医師の面接に基づく変化の印象)、および C D R (臨床的認知症評価) の下位尺度累計などの全体的な機能検査が含まれる。

【0039】

本明細書で用いられる「長時間」とは、24時間以上、典型的には24～76時間を意味する。

【0040】

本明細書で用いられる「高度な選択的保持率」または「高度な選択的保持」とは、投与の長時間後において測定した場合、薬物または化合物が、1つの組織または内臓、特に、脳において、他の組織および内臓、特に、肝臓において見出されるよりはるかに高いレベルで保持されることを意味する。本明細書で定義される通りにより具体的に述べると、高度の選択的保持率とは、脳内における薬物濃度が、投与の24時間以上後に肝臓で見出される濃度の4倍以上、より好ましくは、少なくとも6倍以上、最も好ましくは、投与の24時間以上後に少なくとも8倍以上であることを意味する。化合物または薬物が、高度な選択的保持のこの基準(例えば、本明細書の特許請求の範囲において列挙される)を満たすかどうかを評価する場合、薬物濃度を評価するのにヒトの脳組織を解析することはできないので、当然非ヒト研究に依拠しなければならない。

【0041】

「基礎疾患に対する影響」とは、C S F中または血漿中における生化学的マーカー、脳容量の変化、機能的画像化により測定される脳機能の変化、および剖検後において観察されうる組織病理学または生化学における変化を含めた、該疾患過程と関連するバイオマーカーおよび他のパラメータの測定値の改善を意味する。A Dの臨床試験に用いる典型的なバイオマーカーには、タウ、ホスホタウ、ベーターアミロイド、およびイソプロスタノールなど、C S F中において測定される解析物のほか、フルオロデオキシグルコース P E T および容量測定 M R I などの脳画像化モダリティが含まれる。潜在的に有用でありうるさらなるバイオマーカー、特に、シナプス活性、M T の完全性/機能、および酸化ストレスを検討するバイオマーカーには、G A B A、神経ペプチド Y、アルファシヌクレイン、ニューログリンおよび血管作動性腸ペプチド、チューブリン、タウフラグメント、ユビキチン化タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質の可溶性形態、クロモグリン B、4-ヒドロキシノネナール、ニトロチロシン、および8-ヒドロキシデオキシグアニジンが含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

投与スケジュールとの関係で用いられる場合の「断続的」とは、該投与スケジュールが不規則に中断することを意味する。例えば、毎日、毎週、隔週、または毎月の投与スケジュールは、投与間の休止が各場合において定期的であり、薬物を投与する投与周期により定義されるので、この定義の下では断続的とは考えられない。しかし、5日間施薬した後で2日間休薬する; または30日周期の第1、8、および15日において投与される投与など、1回または複数回の不規則な中断を伴う、より精緻な投与スケジュールならば、断続的であると考えられるであろう。

【0043】

本明細書で用いられる「長い半減期」または「長い脳内半減期」とは、薬剤の半減期が投与後20時間以上(これは、用量非依存性であると考えられる)であり、より好ましくは、投与後30時間以上にわたり、最も好ましくは、投与後40時間以上にわたることを意味する。選択的保持率についてと同様、化合物の脳内半減期が長いかどうかを評価する場合には、インビボにおける非ヒト試験に依拠しなければならない。

【0044】

本明細書で用いられる「低用量」とは、化学療法効果を達成するのに投与される用量(例えば、所与の特定の投与方式、臨床試験、および/または実験)を著明に下回る用量の

10

20

30

40

50

エポチロンD化合物、好ましくは、化学療法用量の10分の1以下の用量、より好ましくは、50分の1以下の用量、またさらにより好ましくは化学療法用量、すなわち、所与の実験、研究、または試験について、同じ投与方法を用いて化学療法的に有効であると既に評価された用量の100分の1以下の用量を意味する。例えば、エポチロンDの第II相臨床試験において投与された用量は、4週間ごとに、3週間にわたり、毎週1回、90分間の注入として投与された 100 mg/m^2 であり（3週間施薬し、1時間休薬）、4週間ごとに投与された 300 mg/m^2 の累積総量に相当した。本明細書で定義される、この臨床試験用量と比べた低用量ならば、 30 mg/m^2 以下の静脈内投与後1カ月間の累積用量、より好ましくは、 6 mg/m^2 以下の用量、またさらにより好ましくは、 3 mg/m^2 以下の用量を意味するであろう。したがって、代替的な例として、4週間ごとに1回投与される場合の、上記の臨床試験用量と比較した低用量ならば、 30 mg/m^2 の用量、より好ましくは、 6 mg/m^2 の用量、またさらにより好ましくは、 3 mg/m^2 の用量を意味するであろう。バイオアベイラビリティは、投与方式に依存して変化しうる（例えば、経口投与対静脈内投与では、経口投与時に達成されるバイオアベイラビリティの方が低い）ので、相対用量（すなわち、所与の用量が本明細書で定義される「低用量」であるかどうかの評価）は、同じであるかまたは類似の投与方式を伴う比較に基づくべきである。

10

【0045】

本明細書で用いられる「治療を必要とする患者」とは、1）軽度の認知障害から進行した認知症を有する患者を含め、任意の臨床病期におけるタウ関連疾患（タウオパチー、特に、ADを含めた）を有すると既に診断された患者；および／または2）タウ関連疾患（タウオパチー、特に、ADを含めた）の早期症状および早期徴候または前駆症状および前駆徴候を有する患者；および／または3）年齢、遺伝、または他の因子によりタウ関連疾患（タウオパチー、特に、ADを含めた）に対して感受性であると診断されており、疾患の症状または徴候の発生または進行または悪化もしくは増悪を遅延させるためにある治療コースが医学的に推奨される患者に対するエポチロンDの使用を包含することを意図する。

20

【0046】

「統計学的に有意な認知的利益」とは、評価された少なくとも10%以上の患者、より好ましくは、少なくとも25%以上の患者、またさらにより好ましくは、50%以上の患者群について、治療の6カ月～1年後において、認知的利益（認知機能の改善またはその低下の軽減）が見られることを意味する。好ましくは、対照群と比較した比率での改善が評価され、これにより少なくとも10%の改善（例えば、プラセボと対照との比較検査スコアに基づき評価され、「改善」とは、患者状態の低下の軽減を包含することを意図する）が反映され、より好ましくは、25%以上の比率で改善が観察され、最も好ましくは、35%以上の比率で改善が観察される。

30

【0047】

本明細書で定義される「タウ関連疾患」とは、「タウオパチー」である疾患のほか、タウにおける異常と関連する疾患も意味する。タウ関連疾患には、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）の亜型、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、嗜銀顆粒性疾患を含めた前頭側頭認知症、並びに、パーキンソン病、ダウン症候群、脳炎後パーキンソン病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン-ピック病C型、ボクサー認知症、プリント病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症、グアム島パーキンソン認知症複合、多発性硬化症、緑内障、糖尿病性網膜症、および外傷性脳傷害；ならびにハンチントン病、レビー小体型認知症、シャルコーマリー-トウス病、遺伝性痙攣性対麻痺、および多発性全身性萎縮症が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0048】

本明細書で定義される「タウオパチー」とは、脳内におけるタウタンパク質の線維形態（もつれ）と関連する神経変性疾患を意味する。これらの疾患にはADが含まれる；しかし、他のタウオパチーには、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認

50

知症（FTDP-17）の垂型、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、および嗜銀顆粒性疾患を含めた前頭側頭認知症も含まれるが、これらに限定されない。

【0049】

「治療有効量のエポチロンD」とは、

（1）認知症、記憶喪失、理解力の低下、日常生活動作を行う際の障害、ならびに／または運動障害および視覚など、中枢神経を介する影響などの認知機能を含めた、タウ関連疾患（好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、AD）の少なくとも1つの症状を軽減または緩和し；かつ／あるいは

（2）タウ関連疾患（好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、AD）と関連する認知機能の喪失の発生または悪化を可逆化、軽減、予防、阻害するか、もしくは遅延させ、かつ／または運動障害および視覚を含めた、中枢神経を介する前記疾患の1つもしくは複数の影響の発生もしくは悪化を、可逆化、軽減、予防、阻害するか、もしくは遅延させるのに十分な量のエポチロンDを意味する。本発明の好ましい実施形態において、エポチロンDの医薬化合物は、タウ関連疾患（好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、AD）の症状を軽減または緩和する際に治療的に有効であるだけでなく、基礎疾患（すなわち、上記で定義した）に対して影響を及ぼす際にも有効である。

【0050】

（本発明の代替的な実施形態）

本発明者らは、タウ関連疾患の治療に投与されるエポチロンDが、特に、他の微小管安定化剤と比較して、著明なレベルの脳透過性、長い脳内半減期、および選択的保持を達成することを見出した。本発明者らは、注目すべきことに、タウ関連疾患（特定すれば、タウオパチー、より特定すれば、AD）の治療における治療効果の増大が、低用量のエポチロンDにより達成されることをさらに発見した。タウ関連疾患、好ましくはADの有効な治療に、それ自体としては比較的低用量のエポチロンDを投与することができる。こうして、本発明者らは、アルツハイマー病を有する患者に対するエポチロンDの投与を用いてADを治療する方法を開発した。該方法は、ヒト患者におけるADを治療する際に治療的に有効であることが期待される一方で、また、これによりもたらされる副作用は、微小管安定化剤を化学療法でヒト患者に投与する場合に生じることが典型的な副作用と比較して、重篤さの程度が著明に低いか、またはより少数である。軽減されるかまたは消失する副作用には、1つまたは複数の胃腸障害（悪心、下痢、口内炎／粘膜炎、嘔吐、食欲不振、便秘、および／または腹痛を含むが、これらに限定されない）、肝臓毒性、好中球減少症、白血球減少症、骨髓抑制、脱毛症、筋肉痛／関節痛、疲労、筋骨格痛、爪障害、発熱、頭痛、皮膚落屑、および／または様々なグレードレベルにおける神経感覚効果が含まれる。

【0051】

本発明の代替的な実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、該エポチロンD化合物が、本明細書で定義される、良好な脳透過性、長い脳内半減期、および高度な選択的保持率から選択される2つ以上の特性を有し、より好ましくは、該エポチロンDが、本明細書でこれらの用語が定義される、良好な脳透過性、長い脳内半減期、および選択的保持率の3つの特性すべてを示す方法が提供される。

【0052】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、投与時における該エポチロンD化合物が、

・投与の20分～1時間後において測定された0.5以上、より好ましくは0.8以上、最も好ましくは1以上の脳透過性；および／または

・少なくとも24時間、より好ましくは、少なくとも30時間、最も好ましくは最長40時間以上の脳内半減期；および／または

・投与の24時間以上後において少なくとも4の脳-肝臓間選択的保持率、より好まし

10

20

30

40

50

くは、24時間以上後において6以上の比率、最も好ましくは、投与の24時間以上後において8以上の倍率

のうちの2つ以上から選択される特性を有する方法が提供される。

【0053】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、投与時における該エポチロンD化合物が、

- ・投与の20分～1時間後において測定された0.5以上、より好ましくは0.8以上、最も好ましくは1以上の脳透過性；および／または

- ・少なくとも24時間、より好ましくは、少なくとも30時間、最も好ましくは最長40時間以上の脳内半減期；および／または

- ・投与の24時間以上後において少なくとも4の脳-肝臓間選択的保持率、より好ましくは、24時間以上後において6以上の比率、最も好ましくは、投与の24時間以上後において8以上の倍率

の3つすべてから選択される特性を有する方法が提供される。

【0054】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、該患者におけるADを治療する際に治療的に有効な方法が提供される。

【0055】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、ADの治療において認知的利益、より好ましくは、統計学的に有意な認知的利益をもたらす方法が提供される。

【0056】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、基礎疾患に対する影響、より好ましくは、基礎疾患に対する統計学的に有意な影響を及ぼす方法が提供される。

【0057】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、その使用の中止を必要とする、消化器における副作用、白血球減少症、および／または神経毒性などの副作用を引き起こすことなく、基礎疾患に対して影響を及ぼし、認知的利益をもたらし、かつ／または他の形で治療的に有効な方法が提供される。

【0058】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDの用量が、本明細書に定義される低用量である方法が提供される。

【0059】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDの用量が、毎日、毎週、または断続的な投与周期で投与される、 $0.001 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ 、または代替的に、 $0.0003 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ の用量である方法が提供される。

【0060】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDが静脈内投与され、毎月の

10

20

30

40

50

投与周期にわたるエポチロンDの累積用量（すなわち、スケジュール、例えば、毎週、隔週、3週間施薬で1週間休薬などにかかわらず、1カ月の周期にわたって投与される化合物の総用量）が、 $0.001 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.01 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.01 \sim 3 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.1 \sim 3 \text{ mg/m}^2$ 、最も好ましくは、 $0.1 \sim 1 \text{ mg/m}^2$ の範囲にある方法が提供される。

【0061】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDが経口投与され、毎日のベースで計算されたエポチロンDの用量が、 $0.001 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.01 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.1 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.2 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ の範囲にある方法が提供される。

10

【0062】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDが経口投与され、毎月の累積ベースのエポチロンD用量（すなわち、スケジュール、例えば、毎日、毎週、隔週などにかかわらず、1カ月の周期にわたり投与される化合物の総用量）が $0.03 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.30 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $3 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $6 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ の範囲にある方法が提供される。

【0063】

20

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDが毎日1回、毎週1回、隔週1回、または毎月1回から選択される投与スケジュールで経口投与される方法が提供される。

【0064】

本発明の別の実施形態によれば、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、エポチロンDが毎日1回から選択される投与スケジュールで経口投与され、エポチロンDの毎日の用量が $0.2 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ である方法が提供される。

【0065】

30

本発明の別の態様によれば、上記で列挙された本発明の実施形態のいずれか1つによる、AD以外の他のタウオパチーを治療する方法が提供される。例えば、このような他のタウオパチーには、本明細書の「タウオパチーに関連する疾患」の定義において言及される1つまたは複数の疾患が含まれる。例えば、本発明の一実施形態は、ADだけでなく、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）の亜型、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、嗜銀顆粒性疾患を含めた前頭側頭認知症、並びに、パーキンソン病、ダウン症候群、脳炎後パーキンソン病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン-ピック病C型、ボクサー認知症、プリント病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症、グアム島パーキンソン認知症複合、多発性硬化症、緑内障、糖尿病性網膜症、および/または外傷性脳傷害から選択される疾患もまた治療するための、上記実施形態のいずれかによるエポチロンDの使用を含む。好ましい実施形態は、AD；17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）の亜型、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、および嗜銀顆粒性疾患を含めた前頭側頭認知症から選択される疾患が含まれるがこれらに限定されないタウオパチーを治療するための、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるエポチロンDの使用を含む。

40

【0066】

本発明の別の実施形態によれば、タウ関連疾患、より好ましくは、タウオパチー、最も好ましくは、ADの治療において用いられるエポチロンDが提供される。

【0067】

上記の本発明の方法の各々はまた、1つまたは複数の、本発明の他の方法とも組み合わせ

50

せうることが意図され、本明細書では、上記の本発明の方法によるこのように多様な組合せのすべてが意図される。例えば、上記の本発明の方法による1つの組合せは、アルツハイマー病を治療する方法であって、治療有効量のエポチロンDを患者に投与する工程を含み、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、該患者におけるADを治療する際に治療的に有効であり；エポチロンDの用量が、静脈内投与される毎月の累積用量 $0.001 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ であり；かつ／またはエポチロンDの用量が、毎日経口投与される $0.001 \sim 2 \text{ mg/m}^2$ であり；かつ／またはエポチロンDの用量が、経口投与もしくは静脈内投与について上記で表わされた好ましい範囲のうちのいずれか1つのうちにある用量から選択される方法を含みうる。

10

【0068】

また、列挙された治療方法のいずれかを、ヒト患者におけるタウオパチー、好ましくは、ADの治療において用いられるエポチロンDを伴う実施形態と組み合わせることも意図される。したがって、例えば、上記の代替的な実施形態の組合せを含む、本発明の一実施形態ならば、ADを治療するためのエポチロンDを含み、該使用はADを治療する際に治療的に有効であり、該エポチロンDは、毎日、毎週、または断続的な投与周期で投与される、 $0.001 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ 、または代替的に、 $0.00003 \sim 0.3 \text{ mg/pk}$ の用量で該患者に投与されるであろう。さらに別の実施形態ならば、タウオパチー、特に、ADを治療するためのエポチロンDを含み、該エポチロンDが低用量でヒト患者に投与され、基礎疾患に対して影響を及ぼし、かつ／または認知的利益をもたらす際に治療的に有効であろう。

20

【0069】

本発明の別の実施形態によれば、タウ関連疾患、好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、ADの治療を必要とするヒト患者に投与するのに適するエポチロンDを含む医薬製剤であって、該製剤の投与が、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、該患者における疾患を治療する際に治療的に有効な医薬製剤が提供される。

【0070】

本発明のさらに別の実施形態によれば、タウ関連疾患、好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、ADの治療を必要とするヒト患者に投与するのに適するエポチロンDを含む医薬製剤であって、該製剤の投与が、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、該疾患の治療において統計学的に有意な認知的利益をもたらす医薬製剤が提供される。

30

【0071】

本発明のさらに別の実施形態によれば、タウ関連疾患、好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、ADの治療を必要とするヒト患者に投与するのに適するエポチロンDを含む医薬製剤であって、その使用の中止を必要とする薬剤性の副作用および／または薬物の血漿中濃度レベルを引き起こすことなく、基礎疾患に対する影響を及ぼす際に有効な医薬製剤が提供される。

【0072】

本発明のさらに別の実施形態によれば、タウ関連疾患、好ましくは、タウオパチー、より好ましくは、ADの治療を必要とするヒト患者に投与するのに適する医薬製剤であって、 $0.0001 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.001 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.001 \sim 3 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.001 \sim 1 \text{ mg/m}^2$ 、最も好ましくは、 $0.001 \sim 0.5 \text{ mg/m}^2$ の用量単位のエポチロンDを含む医薬製剤が提供される。

40

【0073】

本発明のさらに別の実施形態によれば、ヒト患者に静脈内投与するための医薬製剤であって、 $0.001 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.01 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.01 \sim 3 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $0.1 \sim 3 \text{ mg/m}^2$

50

、最も好ましくは、 $0.1 \sim 1 \text{ mg/m}^2$ の範囲にある毎月の累積用量のエポチロンDのデリバリーに適する医薬製剤が提供される。

【0074】

本発明のさらに別の実施形態によれば、ヒト患者に経口投与するための医薬製剤であって、 $0.03 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは、 $0.30 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $3 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ 、さらにより好ましくは、 $6 \sim 60 \text{ mg/m}^2$ の範囲にある毎月の累積経口用量のエポチロンDのデリバリーに適する医薬製剤が提供される。

【0075】

本発明のさらに別の実施形態によれば、ヒト患者に投与するための医薬製剤であって、約0～50%のプロピレングリコール、約1～10%のTPGS、約0.5～10%エタノール、約0～90%の水、および／または約5～85%のPEG-400などのPEGを含む、薬学的に許容される溶媒系中においてエポチロンDを含む医薬製剤が提供される。

【0076】

本明細書では、上記の本発明の医薬製剤の各々による組合せもまた意図される。

【0077】

(有用性)

(タウオパチー)

タウオパチーは、脳組織内におけるタウタンパク質の異常な形態と関連する神経変性疾患である。アルツハイマー病(AD)が、タウの機能不全を伴う最初の神経変性疾患として同定された。特に、その存在がADにおける特徴的病態の1つである神経原線維変化が、タウタンパク質の線維形態、リン酸化過剰形態、立体構造が変化した形態を含有することが判明した。その後、17番染色体に連鎖しパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症(FTDP-17)、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性症、ピック病、および嗜銀顆粒性疾患を含めた他のタウオパチーが同定された。さらに、タウ異常性との連鎖(過剰リン酸化タウ、タウ凝集物、および／またはH1/H1タウハプロタイプとの関連を含む)は、パーキンソン病、ダウン症候群、脳炎後パーキンソン病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン-ピック病C型、ボクサー認知症、プリント病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症、グアム島パーキンソン認知症複合、多発性硬化症、緑内障、糖尿病性網膜症、および外傷性脳傷害と関連づけられている。(Avila et al. 2004年; Bartosik-Psujek et al. 2006年; Dickey et al. 2006年; Wostyn et al. 2008年)。

【0078】

タウとは、微小管(MT)に結合してこれを安定化させる、 $50 \sim 75 \text{ kDa}$ の微小管関連タンパク質(MAP)である。タウには6つの一次配列変異体が存在し、これらの変異体は、選択的スプライシングにより形成される(Lace et al. 2007年)。スプライス変異体は、微小管結合ドメインの3つの反復(3R)または4つの反復(4R)と組み合わせた、0、1つ、または2つのN末端挿入(0N、1N、または2N)を含有する。反復ドメインが微小管の安定化に必要であるのに対し、該反復ドメインの両側にあるプロリンに富む領域は、微小管に対する結合に必要である(Preuss et al. 1997年)。反復ドメインおよびプロリンに富む領域は複数のキナーゼによりリン酸化され、これにより、タウが微小管から解離する。タウのN末端は、微小管表面から外側に伸び、そこで、微小管間の間隔を決定し、運動タンパク質であるダイナクチンが微小管に結合することを補助する(Magnani et al. 2007年)。正常な細胞では、3Rタウおよび4Rタウがほぼ同等レベルで存在する。4Rタウは、3Rタウより強固に微小管に結合する。

【0079】

タウは、ニューロンにおいて最も豊富であり、そこでは、主に軸索に局在化している。タウは、ニューロンの軸索における主要な微小管関連タンパク質であり、そのMAP1ファミリーはニューロンにおいて広く分布するが、そのMAP2ファミリーは主に細胞体樹状突起にある。タウは、軸索の微小管を安定化させ、これにより、分解の標的とされるタンパク質、細胞小器官、脂質、細胞成分の輸送、および細胞体とシナプス末端との間にお

ける二方向的な細胞シグナル伝達分子の輸送を促進する。タウの機能不全が生じると、軸索による輸送が妨げられ、これにより、ニューロンの機能および生存に影響が及ぼされる。マウスにおいてタウ遺伝子をノックアウトしても結果として生じる帰結は軽度であるが、タウ遺伝子およびMAP 1 B遺伝子の両方を除去すると、該二重ノックアウトマウスは胚の段階で死滅する。発生を含めた多くの場合において、一部のMAP発現における変化は、互いに代替し合うと考えられる (Avila et al. 2004年)。

【0080】

一部の症例、特に、FTDP-17および他の前頭側頭認知症では、タウをコードする遺伝子(場合によって、MAP Tとも呼ばれる)における突然変異により、タウオパチーが引き起こされる。FTDP-17における多くの突然変異では、インビトロにおいて微小管に対する結合が低下し、かつ/またはそれらが線維を形成する傾向が増大する (Lace et al. 2007)。タウオパチーに関連する他の突然変異では、主に3 Rまたは4 Rのタウを生成するタウのスプライスパターンが変化する。N末端における、さらに別のクラスのタウ突然変異は、ダイナクチンに対する結合能力を変化させる (Magnani et al. 2007年)。これらの突然変異のすべては、タウの正常な機能を妨げる可能性を有する。ADの場合、 β アミロイド ($A\beta$) により、タウにおける異常がもたらされると考えられる。

【0081】

もつれおよび他のタウ凝集物がタウオパチーの病理学的特徴であるが、複数の筋からの証拠により、一部の他の可溶性で未同定の異常なタウ形態が神経毒性であることが示唆されている。凝集して神経原線維変化をもたらすタウが直接には病原性でないことを示唆するデータには、ヒト脳およびマウスモデルに対する観察が含まれる。例えば、異なる領域および異なる病期のアルツハイマー病脳に対する検討により、神経原線維変化が生じても、数十年間にわたりニューロンは生存し機能するという結論が得られている (Morsch et al. 1999年)。同様に、ヒトタウ (hタウ) によるトランスジェニックマウスは、もつれおよび重篤な神経変性を示すが、もつれを伴うニューロンは、選択的な損傷の徴候を示さず、このモデルにおいて観察されるニューロンの劇的な喪失を説明するにはあまりに少数である (Andorfer et al. 2005年)。誘導性のタウトランスジェニック株であるTg4510は、タウP301Lを誘導すると、劇的で急速なもつれの形成、神経変性、および行動学的障害を示す (Santacruz et al., 2005年)。タウP301Lの発現を抑制すると、神経変性および認知障害は大幅に軽減されるが、もつれの形成は持続する。これらのマウスを用いるさらなる研究は、可溶性のタウ多量体が、認知障害と相関することを示す。類似のタウ多量体はまた、FTDP-17およびADの脳組織においても観察されている (Berger et al. 2007年)。ようやく、 β アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の突然変異形態を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて、非線維性タウがADにおける行動学的障害に関与していることの証拠が得られた (Roberson et al., 2007年)。これらのAPPマウスをタウノックアウトマウスと交配させると、アミロイド斑は形成されるが、行動学的障害およびシナプスの異常は防止された。このAPP株ならば、シナプス欠損および行動学的障害が存在しても、タウの異常は検出できないであろう。まとめると、これらの研究は、可溶性で未同定の異常なタウ形態が神経毒性種である可能性が高いことを示す。

【0082】

(タウオパチーを治療するための微小管安定化剤)

神経変性疾患におけるタウの役割については、2つの主要な仮説が存在する。1つの仮説が、タウの異常な形態により細胞機能が破壊されることを仮定するのに対し、他の仮説は、機能的タウの喪失により微小管が不安定化することを仮定する (Avila et al. 2004年; Lace et al. 2007年)。微小管安定化剤が、タウオパチーを治療するための療法として示唆されているのは、第2の仮説に基づく (Lee et al. 1994年; 米国特許第5, 580, 898号)。軸索輸送の不適切な破壊が、タウの異常が同定されている疾患に加えた多くの疾患に関与している。これらには、ハンチントン病、レビー小体型認知症、シャルコーマリーートゥース病、遺伝性痙攣性対麻痺、および多発性全身性萎縮症が含まれる (

10

20

30

40

50

Roy et al. 2005年)。

【0083】

微小管安定化剤が、タウを過剰発現するマウスに有益でありうるかどうかを調べるため、P r P T 4 4 タウトランスジェニックマウスをパクリタキセルにより治療した (Zhang et al., 2005年)。P r P T 4 4 マウスは、脊髄ニューロンにおいて、正常なヒト O N 3 R タウを過剰発現し、その結果として、タウの過剰発現に起因する運動障害を発生する。3 カ月間にわたるパクリタキセル治療により運動機能不全が軽減され、微小管数、および脊髄前根における軸索輸送が増大した。パクリタキセルは、C N S 透過性は低いが、血液脳関門の外側にある、脊髄前角におけるニューロンからの遠心性軸索に影響を及ぼすことが可能であった。興味深いことに、このモデルにおけるタウ病態 (球状物) には影響が及ばなかった。このモデルはニューロンの喪失を示さないで、ニューロンの生存に対する微小管安定化剤の効果は評価することができなかった。加えて、脊髄のタウオパチーにおいて観察される運動利益が、皮質-海馬間のタウオパチーにおける認知的利益へと変換されるかどうか不明である。例えば、2つの異なるタウオパチートランスジェニックマウス株を、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (G s k 3) を過剰発現するトランスジェニックマウスに交配させたところ、反対の結果が観察された。脊髄のタウオパチーモデルのタウ-G s k 3 バイジェニック動物では病態が軽減されたのに対し、前脳のタウオパチーモデルのタウ-G s k 3 バイジェニック動物は病態の増悪を示した (Spittaels et al. 2000年; Terwel et al. 2008年)。

【0084】

複数の動物モデルにおける、配列 N A P V S I P Q のペプチドである N A P の効果についての説明として、微小管の安定化が提起されている。特に、胎児アルコール症候群マウスおよびアポリポタンパク質 E 欠損マウスにおける中脳動脈閉塞 (脳卒中モデル)、頭部外傷、コリン毒性病変、老化、および発達障害を含めた、多くの細胞モデルおよびインビボモデルにおいて、N A P は、神経栄養活性、抗炎症活性、抗アポトーシス活性、および神経保護活性を有する (Gozes et al. 2006年; Gozes 2007年)。タウオパチーの場合、3 または 6 カ月にわたる N A P の投与は、3 x T g マウスにおける可溶性のタウを増加させる一方で、A β レベルを低下させ、リン酸化過剰タウおよびサルコシルに不溶性のタウを低減することが報告されている (Matsuoka et al. 2007年; Matsuoka et al. 2008年)。3 x T g マウスは、A P P およびタウ-P 3 0 1 L を過剰発現する (Oddo et al. 2003 年)。N A P 活性の機構は完全には明確にされていないが、N A P によるアフィニティークラムに対するチューブリンの結合、ならびに培養ニューロンにおける微小管の形成および/または安定化に対する効果に基づき、N A P が微小管に結合するという証拠が存在する (Divinski et al. 2006年)。N A P はまた、A β の凝集を阻害することも知られており、このため、3 x T g モデルではタウの上流において作用する可能性がある。N A P は、ラットにおけるパクリタキセル誘導型末梢性神経障害に対して保護的でありうるので、典型的な微小管安定化剤として作用する可能性は高くない (米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 4 7 1 6 8 A 1 号)。パクリタキセルなどの微小管安定化剤が化学療法の高用量で投与されると末梢性神経障害が生じることが多く (Postma et al. 1999年)、これは、末梢神経における微小管の過剰安定化およびバンドリングから生じると考えられる。N A P によりラットにおけるパクリタキセル誘導型末梢性神経障害が予防されるので、パクリタキセルと N A P とは、同一の機構を介して作用する可能性が低い。

【0085】

微小管安定化剤は、タウの明白な機能不全とは無関係の神経保護効果を及ぼしうるという示唆もなされている。微小管安定化化合物は、A β 4 2、可溶性の A β 4 0 に由来する酸化的ストレス、リソソームの破壊、カルシウム誘導型毒性、およびグルタミン酸誘導型毒性を含めた多数の毒性損傷から培養ニューロンを保護する (Burke et al. 1994年; Furukawa 1995年; Sponne et al. 2003年; Michaelis et al. 2005年; Butler et al. 2007 年)。微小管が、輸送機構だけでなく、細胞シグナル伝達の調節、特に、おそらくは原形質膜の近傍における高分子シグナル伝達複合体の固定を介する、カルシウムによるシグナ

ル伝達の調節においても重要な役割を果たすことが仮定されている (Michaelis et al. 2005年)。微小管安定化剤はまた、反応性酸素分子種の生成を低下させ、A T Pの生成に関与する酸化的リン酸化遺伝子の発現を増大させることにより、ミトコンドリアの機能を増強することも示されている (Wagner et al. 2008年)。微小管安定化剤はまた、癌細胞における有糸分裂紡錘体を破壊する際の細胞シグナル伝達にも広範な影響を及ぼすことが知られている (Bergstralh et al. 2006年)。

【0086】

(脳透過性微小管安定化剤)

タウオパチーおよび他の神経変性疾患に対する微小管安定化剤の治療標的は、脳内の微小管である。しかし、微小管安定化剤は、特に、消化管および造血細胞における細胞増殖の阻害、ならびに末梢性神経障害など、末梢組織に対する毒性を引き起こしうる。したがって、タウオパチーおよび他の神経変性疾患に対する治療指標を最大化するためには、末梢組織と比較して優れた脳透過性および脳内における選択的保持を示す微小管安定化剤を同定することが極めて望ましい。化合物が、末梢組織の場合と比べて長い半減期で脳組織に結合する能力は、極めて望ましい特性である。

【0087】

タキサン系の微小管安定化剤は、P-糖タンパク質 (PGP)、A T P結合カセット、多剤耐性タンパク質、および乳癌耐性タンパク質など、多数の多剤耐性輸送体に対する基質である。これらの多剤耐性輸送体は、化合物が腫瘍組織および脳組織内に蓄積されることを妨げる。多数の研究者が、多剤耐性輸送体、特に、PGPの基質とならないタキサンの合成に努めているが、成果は限られている (Minderman et al. 2004年; Rice et al. 2005年; Ballatore et al. 2007年)。パクリタキセルと共にPGP阻害剤を共投与することもまた試みられている (Fellner et al. 2002年)。これらの試みは、タキサンがある程度脳内に侵入する結果を示し、例えば、PGP阻害剤により腎内パクリタキセルレベルの約30分の1の脳内パクリタキセルレベル、またはKU-237により μ Mの範囲の脳内パクリタキセルレベルが達成されたが、投与後4時間にわたるに過ぎなかった (Michaelis 2006年)。これより、PGP阻害剤の使用は、タキサンの脳透過性を上昇させるための魅力的な方法ではない。

【0088】

(調製方法および製剤)

エポチロンDは、新規に化学合成され、また、ソランギウム・セルロースムの発酵における副産物として、エス・セルロース菌株の発酵からも単離された、既知の化合物である。エポチロンDの全体的な合成は、Danishefskyらに帰属する米国特許第6,242,469号において報告されており、エポチロンDおよび他のエポチロン化合物を調製するためのさらなる方法は、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,204,388号、同第6,288,237号、同第6,303,342号; WO03/072730、米国特許第6,410,301号; 米国特許出願公開第2002/0137152号 A1; 米国特許第6,867,333号、米国特許出願公開第2006/004065号において見出すことができる。エポチロンDを製造するための合成方法は、フルスケールの医薬開発には実用的でないと特徴づけられている。1つの代替的な調製方法は、例えば、米国特許第7,172,884号 B2に記載の通り、比較的高収量のエポチロンBをもたらすようにデザインされた改良株を用いてエポチロンBの大規模発酵を行うことであり、該エポチロンBを脱エポキシド化して、エポチロンDを生成させることができる。脱エポキシド化の方法はよく知られているが、特に、エポチロンDに適用された、Danishefskyらに帰属する米国特許第6,965,034号 (WO99/43653) においてもまた見出すことができる。

【0089】

エポチロンDのさらなる作製方法は、米国特許第6,998,256 B2号および同第7,067,286号、「Methods of Obtaining Epothilone D using Crystallization and/or By the Culture of Cells in the Presence of Methyl Oleate」に記載されてお

10

20

30

40

50

り、そこでは、ミキソコックス・キサントゥスの菌株であるK111-40-1およびK111-72、4、4、ならびに／またはKosan Biosciences社（現BMS社）によりエポチロンDの生成を改善する目的で開発された他の組換え菌株を用いる、生合成によるエポチロンDの生成が説明されている。エポチロンDを作製するための発酵条件および精製条件もまた、それらの各々がKosan社（本譲受人である現BMS社）に譲渡され、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,998,256B2号および同第7,067,286号のほか、米国特許第6,583,290号、同第6,858,411号、同第6,921,650号、および同第7,129,071号に記載されている。また、Lau et al., Kosan Biosciences, 「Optimizing the Heterologous Production of Epothilone D in *Myxococcus xanthus*」、Biotechnology & Bioengineering, 78巻、3号、280～288頁（2002年5月5日）も参照されたい。

10

【0090】

エポチロンDを作製するのに用いるまたさらなる方法は、米国特許出願第12/118,432号において説明されている。この出願は、エポチロンDなどのエポチロンを調製するための化学工程および生合成工程の組合せを開示している。例えば、組換え細胞の発酵を介して、エポチロン合成に用いる1つまたは複数の中間体を得、次いで、該出願で開示された、該組換え細胞を用いて生合成された中間体を、化学合成を介して最終的なエポチロン化合物へと転換する方法が提供されている。

【0091】

本発明の方法において用いられるエポチロンDは、当技術分野で知られる各種の方法により、典型的には、静脈内（IV）投与、皮下投与、経口投与などにより、患者に投与することができる。例えば、エポチロンDは、薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤により製剤化することができる。エポチロンDを含む医薬組成物は、所望の投与方式に適切な固形物または液状物のビヒクル、希釈剤、および添加剤を用いる古典的な方法により製剤化することができる。

20

【0092】

非経口投与のための例示的な組成物には、例えば、マンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液、等張性の塩化ナトリウム溶液（0.9%の塩化ナトリウム注射液〔生理食塩液〕または5%のデキストロース注射液）など、適切な非毒性の非経口的に許容される希釈剤もしくは溶媒、または合成のモノグリセリドもしくはジグリセリドおよび脂肪酸を含めた他の適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を含有しうる、注射溶液または懸濁液が含まれる。本発明の薬学的に許容される組成物および／または本発明の化合物を投与する方法は、エタノール、N,Nジメチルアセトアミド、プロピレングリコール、グリセロール、およびポリエチレングリコール、例えば、ポリエチレングリコール300および／またはポリエチレングリコール400が含まれるがこれらに限定されない共溶媒の使用も包含しうる。d-α-トコフェリルポリエチレングリコール1000スクシネート（TPGS）、Cremophor、Solutol HS 15、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ボロキサマー、N-アルキルピロリドン（例えば、N-メチルピロリドン）および／またはポリビニルピロリドンなどのピロリドンが含まれるがこれらに限定されない界面活性物質（surfactants）（薬学的に許容される界面活性物質（surface active agent））を用いて、その表面張力を低下させることにより化合物の拡散特性または湿潤特性を増大させることができる；しかし、Cremophorの使用は不利であり、好ましくない。製剤はまた、リン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、L-アルギニン、L-リシン、L-ヒスチジン、L-アラニン、グリシン、炭酸ナトリウム、トロメタミン（トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタンまたはトリスとしても知られる）および／またはこれらの混合物が含まれるがこれらに限定されない、1つまたは複数の「バッファー」（例えば、酸または塩基の増分添加時において、培地が実質的な酸性またはアルカリ性の変化に抵抗する能力を付与する成分）の使用も含みうる。

30

40

【0093】

50

Cremophorなどの非イオン性界面活性物質の使用を回避する製剤を含めた、エポチロン化合物を投与するための製剤は、当技術分野で説明されている。例えば、プロピレングリコールおよびエタノールの混合物を含む、静脈内投与で用いられる製剤は、米国特許第6,683,100号で説明されている。さらなる製剤は、ポリエチレングリコール／無水アルコール、またはプロピレングリコールまたはグリセロール／無水アルコールの組合せを含みうる。例えば、BMS社に帰属するWO2006/105399 (PCT/US2006/011920)は、容量で約30～70パーセントのPEG 300および／またはPEG 400の各々に対して、容量で約30～70パーセントの無水アルコールの混合物を包含する製剤を開示するが、これは、生理食塩液またはデキストロスによる静脈内投与用注入液により希釈することができ、静脈内投与を介してエポチロンDを患者に投与する際の使用に適用することができる。このような製剤では、エタノール量を最小化させて、エタノール投与と関連する副作用を回避することが好ましい。溶媒の最適比率は、当業者が容易に得ることができる。

【0094】

エポチロンDおよび類似体を投与するために特にデザインされた、さらに好ましい製剤は、Kosan社（現BMS社）に帰属する米国特許第7,091,193号（また、米国特許出願公開第2005/0148543号としても公開されている）で開示されている。この特許は、エポチロンDおよびヒドロキシプロピルーベーターシクロデキストリンをアルコール水溶液中で混合し、次いでこれを凍結乾燥する製剤について説明している。実施形態は、60%のtert-ブタノール水溶液中で混合し、次いでこれを凍結乾燥させる（本発明による個別の低用量単位の調製にふさわしく成分を減量することができる）、約10mgのエポチロンDおよび約0.4gのヒドロキシプロピルーベーターシクロデキストリンの使用を伴う。次いで、凍結乾燥された有効成分の「ケーキ」を、水、エタノール、ならびに／またはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール400、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（Tween 80の商標名で市販されている）、および関連の酸素化された炭化水素が含まれうるグリコールの使用により、静脈内投与用に再構成することができる。多様な鎖長および分子量のグリコール（例えば、ポリエチレングリコール1000、他のTWEEN化合物）も用いることが理解される。

【0095】

より具体的な例として述べると、本発明による、エポチロンDの患者へのデリバリーに用いる製剤は、約0～50%のプロピレングリコール、約1～10%のTPGS、約0.5～10%のエタノール、約0～90%の水、および／または約5～85%のPEG-400などのPEGを含みうる。より具体的に述べると、製剤は、

50%のプロピレングリコール、10%のTPGS、10%のエタノール、30%の水；または

10%のプロピレングリコール、40%のPEG-400、5%のTPGS、5%のエタノール、40%の水；または

85%のPEG-400、10%のTPGS、5%のエタノール；または

8.5%のPEG-400、1%のTPGS、0.5%のエタノール、90%の水を含みうる。

【0096】

本発明による、エポチロンDを投与するのに好ましい1つの方法は、経口投与を伴う。米国特許第6,576,651号は、薬学的に許容される1つまたは複数の酸中和化バッファーを用いて、エポチロンを経口投与するための方法を開示する。しかし、好ましい投与方法であれば、固形物の錠剤もしくはカプセル、または流体もしくはゼラチンを充填したカプセルを含めた、錠剤またはカプセルの使用を伴うであろう。エポチロンDの固形物の錠剤またはカプセルは、1つまたは複数の腸溶性コーティングにより調製することができる。腸溶性コーティングは、経口摂取可能な剤形からの薬剤の放出を停止させる目的で、多年にわたり用いられている。成分および／または厚さに応じて、腸溶性コーティングは、必要な時間にわたり胃酸に対して抵抗性であった後に、胃の下部または小腸の上部に

において崩壊し始め、薬剤の徐放を可能とする。一部の腸溶性コーティングは、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6, 224, 910号、同第5, 225, 202号、同第2, 809, 918号、同第3, 835, 221号、同第4, 728, 512号、および同第4, 794, 001号で開示されている。

【0097】

エポチロンDの使用を目的とする腸溶性コーティングされた錠剤は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第11/281, 834号で説明されており、これを用いてエポチロンの錠剤またはカプセルを製剤化し、本発明を実施することができる。この製剤は、そこに有効成分（すなわち、エポチロンD）が適用される糖ビーズなど、不活性の基剤粒子の使用を伴い、次いで、これを腸溶性コーティング用ポリマー、および／または1つもしくは複数のサブコーティング層により封入する。次いで、該ビーズをカプセル内に組み入れる。エポチロンDの錠剤またはカプセルを製剤化するのに用いられる腸溶性コーティングには、例えば、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ酢酸フタル酸ビニル、酢酸フタル酸セルロース、アクリル酸コポリマー、およびメタクリル酸コポリマーなどの腸溶性コーティング用ポリマーが含まれる。腸溶性コーティングを形成するのに用いるメタクリル酸コポリマーの一例は、EUDRAGIT（登録商標）L-30-D 55水性コポリマー懸濁液であり、これは、エチルエステル基に対する遊離カルボキシル基の比が約1:1であり、平均分子量が約250, 000である、メタクリル酸およびアクリル酸エチルに由来の陰イオン性コポリマーを含み、重量で30%の固形物を含有する水性分散液として供給される。EUDRAGIT（登録商標）L-30-D 55水性コポリマー懸濁液は、ドイツ、Rohm-Pharma社により市販されている。

【0098】

エポチロンDのカプセルを形成するための腸溶性コーティングされたビーズを調製する場合、エポチロンDのコアと、腸溶性コーティングとの間に位置して、これらの層の間の接触を最小化する1つまたは複数のサブコーティング層を包含することが望ましいことがある。例えば、サブコーティング層を形成するのに適する物質には、デンプン；ゼラチン；スクロース、グルコース、デキストロース、糖蜜、およびラクトースなどの糖；アカシアゴムなど、天然および合成のゴム、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ならびにPVA-PVAコポリマーなど、ポリビニルピロリドン（PVP）のポリマーおよびコポリマー；エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース；ポリエチレングリコール；ならびに蠟が含まれる。サブコーティング層は、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、クエン酸トリエチル、トリアシチン、フタル酸ジエチル、セバシン酸トリブチル、またはこれらの組合せなど、1つまたは複数の可塑剤をさらに含む。

【0099】

エポチロンDの錠剤またはカプセルは、必要または所望でありうる香味剤、防腐剤、または着色剤など他の材料を所望により含む。

【0100】

エポチロンDの適切な用量は、患者の体重、患者の身体状態などの典型的な因子と共に、本明細書に記載の知見を考慮に入れ、当業者が決定することができる。該用量は、ADなどのタウオパチーを含めたタウ関連疾患を治療するのに有効な量でエポチロンDを含有するものとする。一般に、タウ関連疾患（ADなどのタウオパチーを含めた）を治療するのに投与されるエポチロンDの用量範囲は、 $0.0001 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ 、より好ましくは $0.001 \sim 5 \text{ mg/m}^2$ であると考えられる。経口投与および静脈内投与により好ましい他の用量範囲は、上記の代替的实施形態の節において記載されている。エポチロンおよびこれらの類似体により既に投与された化学療法用量との比較を目的として、本明細書では単位 mg/m^2 を用いる。しかし、該薬物を施される（または施された）動物種ならびに患者の体重および／または身長を考慮すると、単位 mg/m^2 は、 mpk へと容易に変換することができる。例えば、体重が約70kgのヒト患者の場合、 $0.0001 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ の用量範囲は、約 $0.00003 \sim 0.3 \text{ mpk}$ へと変換される。用量の

変換に関するさらなる情報は、www.rphworld.com/viewlink-25045.htmlおよびFreireich et al., Cancer Chemother. Reports, 50巻、4号、219頁（1966年）において見出すことができる。

【0101】

薬物は、毎日、毎週、または断続的に投与することができる。例えば、薬物は、3週間にわたり施薬した後で1週間休薬するか、または2週間施薬した後で1週間休薬するか、または当業者により決定されうる他の投与スケジュールの下で投与することができる。選択される特定の用量は、選択される投与方式および投与レジメに依存する。1つの好ましいスケジュールは、毎日1回の経口投与スケジュールである。各適用間においてより長い時間が規定される場合（静脈内投与の場合が典型的である）、各単位用量は毎日の用量が施される場合よりも高量でありうる。

10

【0102】

とりわけ、ある第I相臨床試験において癌治療のために患者に投与されたエポチロンD用量は、投与ごとに $9 \sim 150 \text{ mg/m}^2$ の用量漸増を伴う第I相試験の後で、4週間のうちの3週間にわたり毎週（すなわち、4週間ごとに第1、8、および15日において）90分間の注入としての 100 mg/m^2 であった。投与スケジュールおよび投与方式も用量に影響を及ぼすが、AD治療に意図される薬物の用量は、第I相臨床試験において癌患者を治療するために投与されたエポチロンDの治療用量の約10分の1であり、また、約100分の1であることがより可能性が高く、また意図される別の実施形態では1000分の1をさらに下回る。

20

【0103】

本発明は、添付の図面に言及する、以下の非限定的な実施例によりさらに詳細に説明される。方法の説明に後続する実施例において説明される実験では、以下の方法が用いられた。

【0104】

（実験の方法、実施例1～5）

侵襲性のタウトランスジェニックマウス株であるTg4510の作製については、近年説明がなされている（Santacruz et al., 2005年；Berger et al., 2007年）。カルモジュリンキナーゼIIプロモーターを用いて、FTDP-17において見出されたタウ突然変異体であるタウP301Lを、Tg4510株に発現させた。Tg4510株は、いくつかの点：

30

1. タウ発現レベルが高いこと（マウスタウと比べて13倍）；
 2. タウ発現が前頭側頭葉に制約されること（これにより、脊髄においてタウを発現した過去のタウ株を特徴づけていた運動障害を回避する）；
 3. 測定可能な認知障害に続き、4. 5カ月後に、急速で広範な神経変性が見られること（5. 5カ月後までに60%のCA1ニューロンが失われた）
- において固有であった。

【0105】

（Tg4510研究のための薬物の調製）

0（ビヒクル）、1mpk、および10mpkのエポチロンD（化合物I）を、10%のエタノール、90%の水中で 10 ml/kg として、26ゲージの注射針により腹腔内投与した。100%のエタノール中で10倍濃度の原液を作製し、投与直前に希釈した。マウスへの投与は3つのコホートで行い、データを統合して、ビヒクル群、1mpk群、および10mpk群のそれぞれに対する最終マウス数を、それぞれ、12匹、9匹、および15匹とした。マウスへの投与は、ドラフト内で行った。

40

【0106】

（Tg4510研究のための注射および行動学的検査のスケジュール）

この研究では、Tg4510マウスを用いた。これらのマウスは、前脳においてヒトP301L突然変異タウを過剰発現する、十分に特徴づけられた、侵襲性のタウオパチーモデルである（Santacruz et al., 2005年；Berger et al., 2007年）。マウスは、AD脳

50

において観察されるものと同様のものつれを含めたタウの異常形態の蓄積、行動学的障害、また最終的にはニューロンの喪失を特徴とする。9週齢（±15日）のとき、ドラフト内で実施されるリン酸緩衝生理食塩液の単回模擬注射により、マウスを取扱いに馴らした。次いで、48時間にわたり、ドラフト内のケージでマウスを飼育した。48時間後、マウスを清浄なケージへと移し、一連の行動学的検査を行った。

【0107】

次いで、6日間にわたり、モリス水迷路（MWM）でマウスを検査した。2回目の探索試行における環状通過指数のランクスコアを用いる行動学的解析の結果に基づき、マウスを治療群に分けた。投与開始時においてマウスは11週齢（±15日）であり、これらに毎週1回投与した。第1週の投与後、身体位置検査、振戦検査、体毛外見検査、歩行検査、接触回避検査、身体拘束検査、四肢把持検査、および立ち直り反射検査の解析を含めた神経身体傾向検査のパネル（SHIRPA変法）を実施した。加えて、毎週の各投与の48時間後において、体毛外見、四肢把持、立ち直り反射について、また、任意の明白な定型的行動についてマウスを検査した。研究の経過において、明白な毒性、体重減少、または運動障害の徴候は観察されなかった。

10

【0108】

8回目の投与後（19週齢±15日）にも再度、MWMにより6日間にわたりマウスを検査した。行動学的検査後、動物が採取時である5.5カ月齢となるまで、投与を再開した。動物の飼育および取扱いは、研究機関における動物管理使用委員会および米国国立衛生研究所による基準に従った。

20

【0109】

（モリス水迷路のプロトコール）

1回は投与前、またもう1回は投与開始の2カ月後の2回にわたり、マウスをモリス水迷路（MWM）により検査した。水迷路検査の第2ラウンドは、別の検査室で実施した。検査前の2～3日間にわたり、マウスを実験室に馴らした。水面下0.5～1.0cmに置かれた直径16cmのプラットフォームを伴う、直径1.5mの水迷路内にマウスを入れた。非毒性の白色塗料で水を不透明にし、水温を22～25℃に調節した。

【0110】

各試行後にプラットフォーム上において10秒間の休息時間を伴う、各々が最長90秒間の試行を1日当たり4回ずつマウスに施した。マウスが90秒間以内にプラットフォームを見出さなかった場合は、マウスをプラットフォームへと静かに誘導し、10秒間にわたりそこに滞留させた。検査室は各々、マウスがプラットフォームの位置を学習するのに応じてマウスの方向付けが可能となるように、外部に大型の目印を有した。各試行後における低体温症を予防するため、マウスを保温電球下においた。試行間の間隔は25～45分間の範囲であった。HVS Image社（英国、バッキンガム）製のAdvanced Tracker VP200型ソフトウェアを用いてマウスを追跡し、プラットフォームに到着するまでに通過したのべの距離を決定した。

30

【0111】

5回の試行による習得経路長についての統計学的解析は、反復測定分散分析を伴った。該統計学的モデルは、動物間項としての「治療」（0、1mpk、または10mpkのエポチロンD（化合物I））と、各動物に対する反復測定としての5回の試行とを包含した。該解析が有意な治療効果、または治療－試行間の交互作用を示した場合、ダネット検定を用いて、1mpk群と10mpk群との差違をビヒクル群と比較した。ダネット検定を用いて、各四分円内における探索経路長、および各四分円内におけるプラットフォーム通過回数を解析した。すべての場合において、1mpk群および10mpk群をビヒクル群と比較した。すべての計算は、Windows XP Professional基本システム下にあるSAS、version 9.1により行った。

40

【0112】

習得訓練は5日間にわたり連続で実施した。探索試行は、第6日における最後の習得訓練の18時間後に実施した。これらの60秒間にわたる試行では、プラットフォームを取

50

り除き、マウスが標的四分円内において通過した距離と、該プラットフォームがかつて位置した領域の通過回数とを測定した。すべての動物について泳動速度をモニタリングした；薬物治療が泳動速度の変化を引き起こさなかったことは、該薬物が運動行動に影響を及ぼさないことと符合する。浮遊時間（泳動速度＜5 cm／秒）もまた、治療群間で変動しなかった。

【0113】

（組織採取）

5. 5カ月後に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、断頭した。脳を速やかに摘出し、正中線に沿って2つの半球に分割した。右半球を20 mLの4%パラホルムアルデヒド（屠殺日に新たに調製した）中に入れ、4℃で一晩にわたり保管した。翌日、20 mLのTBS（pH7.4、20 mM TRIS、100 mM NaCl）を含有する試験管に脳を移し、次いで、加工するまで4℃で保存した。右半球をパラフィン包埋し、5ミクロンで切片化し、正に帯電したスライドガラス上に載せた。60℃のオーブン内で一晩にわたり該スライドガラスを乾燥させ、染色するまで室温で保管した。左半球は、ドライアイス上で凍結させた（2分以内）。

【0114】

（ガリヤス法）

ガリヤス染色法を用いて、銀陽性の神経原線維変化および異栄養性神経突起を検出した。パラフィン包埋してスライドガラス上に載せた薄片（5ミクロン）を脱パラフィン化し、キシレン（10分ずつ2回）、100%エタノール（10分ずつ2回）、95% MeOH／5% H₂O₂（30分間）、95%エタノール（5分ずつ2回）、80%エタノール（5分ずつ2回）、50%エタノール（5分ずつ2回）、および水（5分ずつ2回）中における一連のインキュベーションにより再水和化した。次いで、5%過ヨウ素酸中で5分間にわたり切片を静置し、dH₂O中で5分ずつ2回にわたり洗浄し、ヨウ化銀のアルカリ溶液（1%硝酸銀を含有する）中で1分間にわたり静置した。

【0115】

0.5%酢酸中で10分間にわたり切片を洗浄し、新たに調製した現像液中で15分間にわたり静置し、0.5%酢酸中で5分間にわたり再度洗浄した。脱イオン化水中ですすいだ後、0.1%金コロイド中で5分間にわたり切片を静置し、脱イオン化水中で再度すすいだ。1%チオ硫酸ナトリウム（ハイポ）中で5分間にわたり切片をインキュベートし、次いで、水道水中ですすいだ。0.1%ニュークリアファストレッド中で2分間にわたり対比染色を実施した。次いで、切片を水道水中ですすぎ、アルコールの勾配系列（95%、100%、100%）中で2分間にわたり脱水し、10回ずつ浸漬する3回交換のキシレン中で清浄化した。最後に、Cytoseal 60封入剤（ミシガン州、カラマザー、Richard-Allan Scientific社製）およびカバースリップをスライドに添加した。ノンパラメトリックのクルスカール-ワリス検定を用いた後で、Graphpad Prism 4を用いるダンの多重比較検定により統計学的解析を実施した。パラメトリックANOVAに続くダネットの事後検定によっても同じ結果が得られた。

【0116】

（免疫組織化学）

パラフィン包埋した薄片（5ミクロン）を脱パラフィン化し、3回交換のキシレン、2回交換の100%エタノール、および1回交換の95%エタノール中で再水和化した後、水中ですすいだ。10 mMクエン酸ナトリウムバッファー、pH6.0中のスライドを、Black and Decker スチーマー（型番：HS900）内で30分間にわたり蒸気曝露し、次いで、30分間にわたり冷却することにより、抗原賦活を実施した。90% MeOH中に0.6%の過酸化水素中で15分間にわたるインキュベーションにより、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去する。TBS中での洗浄後、TBS中10%の正常ヤギ血清中で1時間にわたりスライドをブロックした。この後、ブロック液中で希釈したAT8ホスホタウ抗体（イリノイ州、ロックフォード、Pierce Biot

10

20

30

40

50

technology社、Goedert et al.、1995年）により、4℃で一晩にわたりインキュベートした。TBS中で3回の洗浄後、抗マウスIgG抗体と共に室温で1時間にわたりスライドをインキュベートした。TBS中での洗浄後、Vectastain ABC Eliteキット（カリフォルニア州、バーリングラム、Vector Labs社製）を用いて1時間にわたりシグナルを検出した後で、Vector labs社製のジアミノベンザジン試薬を用いて検出した。ヘマトキシリンにより核を青色に対比染色した後、2回にわたりスコットの水道水代替液（イリノイ州、リッチモンド、Surgipath社製、型番：02900）中にスライドを浸漬し、次いで、水道水中ですすいだ。次いで、アルコールの勾配系列（95%、100%、100%）中で切片を脱水し、次いで、3回交換のキシレン中で清浄化した。次いで、カバースリップおよびCytoseal 60封入剤を添加した。

10

【0117】

（立体解析）

Aperio ScanScope（カリフォルニア州、ビスタ、Aperio Technologies社製）を用いて、ニッスル染色されたスライドを走査してデジタル画像化した。高解像度で脳切片全体の画像を収集し、Spectrum（Aperio社製のソフトウェア）内のファイルとして保存した。画像を加工するため、抜粋ツールを用いて、海馬全体を包含する4,000×4,000ピクセルの領域を取り込み、JPEGファイルとして保存してMetamorph（カリフォルニア州、サニーベール、Molecular Devices社製）へとインポートし、海馬のCA1領域およびCA3領域内における細胞喪失の定量化を行った。パラフィン包埋された組織薄片に適するため、単一切片の解像法の改変形（Moller et al. 1990年）を用いて細胞喪失を定量化した。細胞の相対数を得るため、パラフィン包埋した脳を、ブレグマ間の矢状面に沿って側面方向に約0.75mmずつスライスしながら、切片を5枚目ごとに回収した。Metamorphソフトウェアを用いて、3つの領域を線描し、切片当たりのカウントを記録した。各画像では同じ領域を用い、スライド5枚おきに、動物1匹当たり5枚の切片のカウントを記録した。ANOVAの後でダネットの事後検定を用いて、統計学的解析を実施した。

20

【発明を実施するための形態】

【0118】

（実施例1）

30

上記で説明した、エポチロンD（化合物I）によるTg4510実験のデザインを図1に示す。この実験では、各群の治療前における行動が同様であると判定されるように、2.5カ月後にMWMでマウスを検査し、3つの群（N=12、13、16）のうちの1つに割りつけた。2.5カ月後から、ビヒクルだけ、または1mpkもしくは10mpkのエポチロンD（化合物I）を伴うビヒクルの腹腔内（IP）注射を、毎週マウスに投与した。4.5カ月後に再度MWMでマウスを検査し、認知行動に対する治療効果を判定した。5.5カ月後にマウスを安楽死させ、脳を回収し、後続の解析にかけた。

【0119】

腫瘍異種移植実験において、典型的には、実験者は30mpkのエポチロンD（化合物I）を5日間にわたり隔日で腹腔内投与し、150mpkの累積用量をもたらす（Choue et al.、1998年）。このため、本明細書に記載の、12週間にわたる1mpkエポチロンD（化合物I）による治療は、腫瘍学用量の約100分の1であると考えられ、10mpkでの治療は、この種の実験において投与される典型的な腫瘍学用量の約10分の1である。1mpkおよび10mpkのエポチロンD（化合物I）を、2または6カ月間にわたり毎週1回マウスに腹腔内投与したところ、肝臓、腎臓、心臓、睾丸、副腎、骨髄、末梢神経、胃、ならびに小腸および大腸を含めた多数の組織において、組織病理学的異常は観察されなかった。

40

【0120】

図2は、エポチロンD（化合物I）またはビヒクルの投与以前である2.5カ月後におけるTg4510マウスに対するMWM検査の結果を示す。投与以前の群間では、習得ま

50

たは探索試行において統計学的な有意差が見られず、これが、動物を群分けするための根拠であった。言い換えれば、図2は、各群の治療前における行動が同様であったことを示す点で、対照として機能する。

【0121】

次いで、Tg4510マウスに、1mpk、10mpkのエポチロンD（化合物I）、およびビヒクルを毎週1回腹腔内投与し、12週間にわたるこの毎週の投与に続く4.5カ月後に、MWM検査を実施した。図3で報告される結果は、1mpkのエポチロンD（化合物I）で治療されたマウスが、ビヒクルで治療されたマウスより迅速（すなわち、統計学的に有意な形で（ $p < 0.01$ ））に、MWMで隠されたプラットフォームの位置を特定しうること示した。10mpk治療群は、ビヒクル群と比較して改善への傾向を示した。これらの知見は、エポチロンD（化合物I）によるTg4510マウスの治療が、ビヒクル治療と比べて統計学的に有意な認知機能の改善をもたらし、加えて、より低用量である1mpkが、より高用量（10mpk）と比較して結果を改善したことも示す。とりわけ、この実施例において本発明者らは、このパラダイムを用いる曝露が、マウスにおける1mpk用量および10mpk用量を比較する個別の実験に基づき、用量依存的であることをさらに確認した。1mpk群と比べた10mpk群における行動学的改善の低下が、10mpk治療動物における薬物レベルの予測外の低下に起因しなかったのは、このためである。

【0122】

（実施例2）

図4は、1mpk、10mpkのエポチロンD（化合物I）、およびビヒクルを2カ月間にわたり投与された4.5カ月齢のTg4510マウスにおける5日間の訓練の18時間後における探索データを示す。図4において、「TQ」とは標的四分円を表わし、「AR」とは隣接する右側の四分円を表わし、「AL」とは隣接する左側の四分円を表わし、「OP」とは、向かい側の四分円を表わす。行動の2つの測定値、すなわち各四分円内における%による経路長（A）およびプラットフォーム通過回数（B）を図4に示す。標的四分円の優先は、研究の習得期においてプラットフォームが位置していた場所をマウスが記憶していたことを示す。データから見られる通り、ビヒクル治療マウスは、経路長（A）およびプラットフォーム通過回数（B）のいずれの測定値についても、TQ、AR、AL、およびOPの各々に対して同様の結果を伴う偶然性で行動し、四分円における優先を示さなかった。しかし、1mpk（化合物I）で治療したマウスは、例えば、プラットフォームがTQに配置されていたことを想起する記憶において、いずれの測定値においても、ビヒクル群と比較して統計学的な有意差を示した。加えて、10mpk群は、%による経路長（A）において、ビヒクル群と比較してこれを有意に上回る行動を示したが、プラットフォーム通過回数の測定値（B）を用いた場合はそうでなかった。

【0123】

（実施例3）

脳病態に対するエポチロンD（化合物I）の効果を判定するため、前出の実験によるTg4510マウスの部分集団（ $N = 5$ ）に由来する脳組織を検討した。先行研究は、Tg4510マウスが、5.5カ月後に、海馬のCA1領域内にあるニューロンの約60%を喪失することを示していた（Santacruz et al. 2005年）。したがって、本発明者らは、海馬のCA1領域におけるニューロン数をまず検討し、この後、CA3領域を検討した。図5は、ビヒクル、1mpkのエポチロンD（化合物I）、および10mpkのエポチロンD（化合物I）による治療の5.5カ月後のマウスにおける、海馬のCA1領域およびCA3領域内のニューロンカウントを示す。

【0124】

驚くべきことに、図5で見られる通り、1mpkのエポチロンD（化合物I）で治療したTg4510マウスは、ビヒクル治療動物より実質的に多くのCA1ニューロンを有した。実際、ビヒクルで治療したマウスと、1mpkのエポチロンD（化合物I）で治療したマウスとの差は、1mpkのエポチロンD（化合物I）が、ビヒクルとの統計学的な有

意差 ($p < 0.01$) を伴ってニューロン喪失を防止したことを示す。10 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したマウスは、CA1ニューロンレベルが、ビヒクル治療マウスと1 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したマウスとの中間であった。これらの結果は、実施例1および2の行動学的研究による知見、すなわち、100分の1の低用量 (すなわち、腫瘍異種移植実験において投与された化学療法用量の) が、タウオパチーの治療において結果の著明な改善を一貫してもたらしたことを示す知見と符合し、これを補強する。

【0125】

また、海馬のCA3領域の総細胞カウントについても同様の傾向が観察され、ビヒクル治療マウスと比較して、1 mpkマウスと非トランスジェニックマウスとの間に著明な差違がみられた。治療群におけるCA3領域の細胞カウントの上昇は、この月齢での神経変性がより高度なCA1領域におけるほど顕著ではない；しかし、これらの結果は、脳の複数の領域における基礎疾患に対する影響を示す。

【0126】

(実施例4)

CA1領域におけるリン酸化タウ染色に対する治療効果もまた検討した。AT8抗体は、残基202および205の両方においてリン酸化したタウを認識する。AD患者および他のタウオパチー患者の脳では、過剰リン酸化タウのこの形態が極めて豊富である。

【0127】

図6は、上記のビヒクル、1 mpkのエポチロンD (化合物I)、および10 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したTg4510マウスに対するAT8ホスホタウ染色を示す。ホスホタウ染色は、暗黒色で示される。驚くべきことに、1 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したマウスは、特に、ビヒクル治療マウスと比べて、はるかに低度のホスホタウ染色を示した。10 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したマウスは、中間レベルのホスホタウ染色を示した。

【0128】

(実施例5)

ガリヤス銀染色により、皮質における神経原線維変化の形成に対するエポチロンD (化合物I) による治療効果を検討した。図7は、上記のビヒクル、1 mpkのエポチロンD (化合物I)、および10 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したTg4510マウスの前頭皮質における神経原線維変化についてのガリヤス銀染色を示す。図7Aにおいて、銀染色は黒色 (陽性) であり、「NT」は非トランスジェニックを表わし、これにより、血管に関連する一部の非特異的染色が示される。図7Aで見られる通り、1 mpkのエポチロンD (化合物I) で治療したマウスは、ビヒクル治療マウスよりはるかに低レベルの神経原線維変化を示した；図7Bでは、この研究のすべての動物についてこれを定量化している。1 mpk投与では、皮質および海馬の両方において、基礎疾患に対する著明な影響が観察され、10 mpk投与でもまた、改善への傾向が示された。

【0129】

前出の実施例に記載の通り、エポチロンD (化合物I) によるTg4510マウスの治療は、時間と共に、非治療のTg4510マウスと比較して認知低下を防止し、認知機能を改善した。さらに、基礎疾患に対する影響の尺度としての神経病理学的検査 (すなわち、細胞カウント検査、ホスホタウ染色検査、および銀染色検査) は、エポチロンDによる治療が、非治療のTg4510マウスと比較して統計的に有意なレベルでニューロン喪失を防止し、異常なタウの蓄積を低下させ、神経原線維変化の形成を防止することを示す。したがって、本発明者らは、本明細書において、微小管安定化化合物、すなわち、エポチロンDにより治療すると、認知喪失、タウ病態、および神経変性が防止されることを最初に発見し、裏付けたと考える。

【0130】

加えて、本発明者らは、本明細書において、エポチロンDによる治療で達成可能な治療効果は、非直線的に用量依存的である可能性が高いことも発見した。具体的に述べると、

10

20

30

40

50

報告された行動学的研究および神経病理学的研究の各々において、一貫した用量依存的な結果が繰り返し得られたが、そこでは、低用量（1 m p k）（腫瘍異種移植実験における化学療法用量の約100分の1）時に、ビヒクルと比較して、すべての測定値で著明に増強された有益な効果が得られる一方、高用量（10 m p k）では、大半の測定値について効果への傾向が示され、MWM探索検査の1つの測定値ではビヒクルを上回る統計学的な有意差が示された。

【0131】

（実施例6：静脈内ボーラス実験における、他の微小管安定化剤と比較したエポチロンDの効能）

一群の実験において、ヌードマウス3匹／群の尾静脈に、1～12 m p kの用量で静脈内ボーラス投与を行った後で、イキサベピロン（アザーエポチロンB類似体）、化合物I I（BMS 310705、21アミノ酸のエポチロンF）、およびエポチロンD（化合物I）を評価し、パクリタキセルと比較した。5%のデキストロースを含有する10%のCremophor、10%のエタノール、および80%の水を用いて、4つの化合物の各々を5 ml / kgで投与した。図8A～8Dおよび表1で報告する通り、各化合物の相対的な脳透過性を決定するため、有機相の抽出後における、タンデム質量分析を伴う液体クロマトグラフィー（LC / MS / MS）を用いて、単回投与後の様々な時点において、該化合物の血漿レベル、脳レベル、および肝臓レベルを測定した。パクリタキセル治療マウスでは、肝臓レベルを測定しなかった。

【0132】

図8Aは、様々な時点における1 m p kでの静脈内投与後のマウスの血漿、脳、および肝臓における化合物I Iの濃度を示す。

【0133】

図8Bは、様々な時点における12 m p kでの静脈内投与後のマウスの血漿、脳、および肝臓におけるイキサベピロンの濃度を示す。

【0134】

図8Cは、様々な時点における4 m p kでの静脈内投与後のマウスの血漿および脳におけるパクリタキセルの濃度を示す。

【0135】

図8Dは、様々な時点における5 m p kでの静脈内投与後のマウスの血漿、脳、および肝臓におけるエポチロンD（化合物I）の濃度を示す。

【0136】

データは、特に、血漿中薬物の初期の分布およびクリアランスの後のより後期の時点において、脳対肝臓の化合物レベルの比率により測定される、化合物I Iおよびイキサベピロンの末梢組織と比べた脳レベルが適度であることを示した。予測される通り、パクリタキセルの脳レベルは低かった。特に、パクリタキセルの脳レベルは、投与後少なくとも24時間にわたり血漿中の薬物レベルを超えなかった。投与の6および24時間後における、肝臓レベルを超えた高い脳レベルにより裏付けられる通り、エポチロンD（化合物I）が、この実験において調べた化合物より、顕著に良好な脳透過性および選択的保持の特性を兼ね備えたことは、予測外であった。これは、血漿および組織、中でもとりわけ、潜在的な毒性部位である肝臓を含めた末梢と比べて、標的臓器（脳）における予測外のエポチロンD（化合物I）保持を裏付ける。

【0137】

より具体的に述べると、表1は、ヌードマウスを用いる静脈内ボーラス投与（表中で報告される通り、m p kを変化させた）後において、4つの微小管安定化剤であるパクリタキセル、化合物I I（BMS 310705）、イキサベピロン、およびエポチロンDについて脳透過性を比較するデータを報告し、このデータは図8A～8Dにも反映されている。脳対血漿比は一般に、血漿からの急速な喪失、および微小管に対する結合を介する脳内における薬物の保持に起因して、投与後の各化合物について、時間と共に上昇する。次いで、脳対血漿比は、6～24時間後において低下を示す化合物I Iで観察される場合な

ど、脳内における保持が低度である化合物では低下しうる。時間と共に変化するにもかかわらず、この脳対血漿比は、投与後短時間（例えば、投与の20～60分後）のデータを比較する場合、化合物に固有の脳透過性の尺度を提供する。本明細書の表において、脳対血漿比および脳対肝臓比は、まず、個別の動物について該比を計算し、次いで、該比の平均を決定することにより計算した；本明細書の表は、このようにして得られた平均値を報告する。

【表1】

表1

化合物	用量 (mpk)	時間(時間)	血漿中 濃度 (nM)	脳内濃度 (nM)	脳対血漿 比	脳対肝臓 比
パクリタキセル	4	1	447	47	0.10	NQ
		6	43	16	0.37	NQ
		24	12	15	1.25	NQ
化合物 II	1	6	3	6.8	2.1	0.01
		24	1	1.3	1.2	0.02
イキサベピロン	12	0.12	11,236	579	0.05	0.05
		0.33	3057	495	0.16	0.09
		1	390	284	0.73	0.07
		2	171	360	2.1	0.11
		6	53	371	7.0	0.30
		24	8	236	30	1.2
エポチロン D	5	6	6	2794	470	149
		24	1	2046	2046	1204

【0138】

表1を見ると、投与の1時間後における0.1の脳対血漿比により裏付けられる通り、パクリタキセルは脳透過性が低い；イキサベピロンは、投与の1時間後における脳対血漿比が0.73であり、パクリタキセルより脳透過性が高い（表1）。投与の6～24時間後の時点において、脳対血漿比は、固有の脳透過性および脳内保持（半減期）の両方を反映する。エポチロンD投与の6および24時間後におけるデータは、この群において脳対血漿比がこれに次いで高い化合物であるイキサベピロンを、少なくとも60倍上回る脳対血漿比を示す。

【0139】

脳対肝臓比は、末梢組織と比較した脳内保持および脳内半減期についてのより特異的な尺度を提供するだけでなく、末梢組織と比較した選択的保持も提供する。主に、それが十分に灌流され、他の多くの末梢組織より高レベルを示す傾向にあるために選択される肝臓は、非細胞性の血漿と異なり、化合物が保持されうる微小管を含有するので、この比は有用である。最適の測定時点が20～60分後である脳対血漿比と対照的に、血漿レベルが著明に低下し、これにより、脳細胞および肝臓細胞内に特異的に保持される薬物のより正確な測定を可能とする、投与後のより後期の時点（例えば、24時間後以降）で脳対肝臓比を比較することが好ましい。脳対肝臓比の比較は、エポチロンDが、肝臓と比べて脳内に高度で選択的に保持されることを示す。例えば、24時間後におけるエポチロンDの脳対肝臓比は1204であり、これは、同じ1組の実験におけるイキサベピロン（1.2）および化合物II（0.02）の低い比率と比較してはるかに高い比率であることが注目値に値する。

【0140】

別個の実験では、異なる研究者の手により、上記と同様のプロトコルを用いるが、中程度に老齢の三重トランスジェニックマウスを伴う、静脈内ボラス投与後において、よ

り長時間、すなわち最長168時間にわたり、エポチロンDの血漿中濃度および脳内濃度が評価された（Oddo et al. 2003年）。この実験結果を、以下の表2および図10において報告する。

【表2】

表2(エポチロンDのみ)

時間(時間)	血漿中濃度(nM)	脳内濃度(nM)	脳/血漿比	脳/肝臓比
0.05	25,100	1127	0.04	0.42
0.17	2003	595	0.28	1.1
.33	549	529	0.86	0.38
1	325	422	1.2	0.42
3	70	468	6.1	0.30
6	43	141	3.3	0.24
16	0.8	210	265	NQ
24	0.9	82.7	89	NQ
96	<LLQ (0.6 nM)	25.2	NQ	NQ
168	<LLQ (0.6 nM)	16.3	NQ	NQ

【0141】

これらのデータは、脳組織内におけるエポチロンDの保持が、単回投与の少なくとも168時間（7日間）後まで延長されたことを示す。エポチロンDの脳内レベルの絶対値および比率は、表1および2で異なる；表1および2に記載の実験は、異なるマウス株と共に異なる研究者により異なる時点において個別に実施されたことに注意することが重要である。本発明者らは、静脈内注射回数の小さな差が、正確な曝露プロファイル、特に、脳内濃度に影響を及ぼす最大血漿中濃度を変化させること、またさらに、静脈内注射回数が研究者間で異なる場合があることを観察した。結果を単一の実験内で比較することが最良であるのはこのためである。この問題点にもかかわらず、互いに比較された微小管安定化剤の全体的な傾向および相対的な特徴は一貫しており、これらの結果は、エポチロンDが、高度に脳透過性であり、化合物II、イキサベピロン、およびパクリタキセルと比較して、脳透過性および脳内保持が実質的に改善されていることを示す。例えば、2つの個別の実験から得られたデータの比較を行う場合であっても、投与の6時間後におけるエポチロンDの脳対血漿比は、表における2046および表2における89であり、表1におけるパクリタキセル（0.37）および化合物II（2.1）についての同じ時点における比率をやはり顕著に上回る。表2に記載の研究における肝臓レベルは、24時間後において定量下限（この研究では49 nMのLLQ）未満まで低下したため、この時点における脳対肝臓比は定量不能（NQ）であった。

【0142】

WO03/074053A1は、脳疾患を治療するための特定のエポチロンの使用について広く開示している。この特許公開によれば、3つのエポチロン（エポチロンDは含まない）の血漿中レベルおよび脳内レベルは、5 mpkの静脈内ボラス投与後の最初の40分間において測定された。WO03/074053A1において化合物Iとして同定される物質：4，8-ジヒドロキシー-16-（1-メチル-2-（2-メチル-4-チアゾリル）-エチニル）-1-オキサ-7-（1-プロピル）-5，5，9，13-テトラメチル-シクロヘキサデク-13-エン-2，6-ジオン、およびパクリタキセルについて、該特許公開で報告された脳内濃度および血漿中濃度のデータを、下記の表1において再現する。WO03/074053において、データは、μg/mlおよび分の単位により報告された；比較を目的として、このデータをnMに変換し、nMおよび時間の単位によ

り表3で報告する。このデータ（表3による）は、本明細書において本発明者らにより独立して裏付けられたものではなく、該特許公開で示された値（時間およびnMへと変換された）に基づき再現される。加えて、WO 03/074053内において、化合物Iの立体異性および／または調製方法は報告されておらず、13 E/Z混合物が言及されている（13頁、15行目）ことが注意される。

【表3】

表3

化合物	時間(時間)	血漿中濃度(nM)	脳内濃度(nM)	脳対血漿比
化合物 III	0.17	1540	580	0.4
	0.33	1150	1540	1.3
	0.67	580	1150	2
パクリタキセル	0.17	940	<LLQ	NQ
	0.33	700	<LLQ	NQ
	0.67	230	<LLQ	NQ

10

【0143】

データが報告されたのは40分後までに限られたので、脳対血漿比を検討することによりこの研究から評価しうるのは脳透過性だけである。検出レベルは開示されなかったが、脳内レベルがLLQ未満であるため、パクリタキセルは脳透過性が低いと推測される（表1のデータと符合する）。WO 03/074053A1において、投与の少なくとも24時間後において測定する必要がある脳内保持の測定値、および末梢組織との比較による選択的な脳透過性は論じられなかった。

20

【0144】

（実施例7：経口投与によるエポチロンDの能力）

タウオパチー治療における、エポチロンDの能力をさらに分析するために、化合物を2つの実験で評価し、それぞれ10mpkおよび35mpkで、C57BL/6マウスに強制経口投与した。また、これらの実験では、4, 8-ジヒドロキシ-16-(1-メチル-2-(2-メチル-4-チアゾリル)-エチニル)-1-オキサ-7-(1-プロピル)-5, 5, 9, 13-テトラメチル-シクロヘキサデカン-13-エン-2, 6-ジオンの異性体（本明細書における、化合物III）も評価され、エポチロンDと化合物IIIとの対照比較も行われた。以下では、まず、化合物IIIの製造および単離の実験を詳細に記載し、次いで生物学的、インビボデータを記載する。

30

【0145】

（一般的な実験情報）

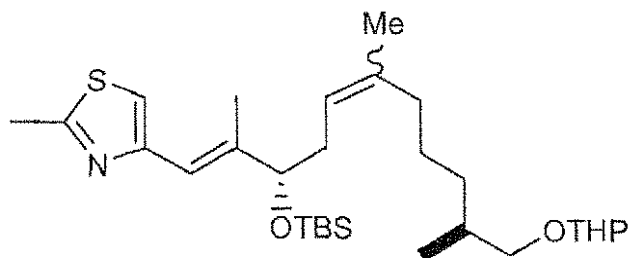
以下の手順では、温度は全てセルシウス度を用いた。¹H-NMRスペクトルは、Bruker 500、400、または300MHz装置を用い、また化学シフトはテトラメチルシラン（ $\delta = 0.0$ ）に関してppm（ δ ）で記録した。全ての蒸発は、減圧下で行なった。特に断りがなければ、LC/MS分析はWaters装置で行ない、Phenomenex-Luna 3.0×50mm S10逆相カラムを用いて、流速4mL/分で、0.1% TFAのMeOH/水溶液グラジエント〔3分で0～100%、4分でランタイム〕を使用し、UV検出器を220nmにセットするか、あるいはPhenomenex-Luna 3.0×50mm 10 μ 逆相カラムを用いて流速5mL/分で、10mM酢酸アンモニウムのアセトニトリル/水溶液グラジエント〔3分で5～95%、4分でランタイム〕を使用し、UV検出器を220nmにセットした。特に断りがなければ、精製は、40～63メッシュのシリカゲルカラムによって、またはBIOTAGE（登録商標）Horizonシステムを用いて、または特定のHPLC装置および条件を用いて行なった。

40

【0146】

工程1：

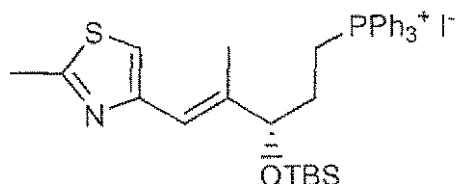
【化 4】



合成中間体-1

10

【化 5】



ホスホニウム塩 A

ホスホニウム塩 A [Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc., 119:7974-7991 (1997)] に
 従って製造；40.5 g、57.9 mmol] の THF 溶液 (300 mL) に、0 ° でナト
 リウムビス (トリメチルシリル) アミド (63.7 mL、63.7 mmol) を加え、溶液
 を5分間、攪拌した。(6S)-6-メチル-7- (テトラヒドロ-2H-ピラン-2-
 イルオキシ) ヘプタン-2-オン (US 7, 326, 798 に従って製造；14.54 g
 、63.7 mmol) の THF 溶液 (50 mL) を急速に加え、混合液を16時間かけて
 室温に加温した。反応混合液を飽和 NH₄Cl に注ぎ、EtOAc (300 mL) で抽出
 した。有機層を食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、減圧中で蒸発させ
 た。粗生成物をシリカゲルカラムで精製して (EtOAc / ヘキサン、0 ~ 10 %) 、合
 成中間体-1 を得た (16 g、30.7 mmol、53 %) 。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)
 δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.20-5.05 (m, 1H), 4.6-4.5 (m, 1H), 4.15-4.00
 (m, 1H), 3.9-3.8 (m, 1H), 3.6-3.3 (m, 2H), 3.25-3.05 (m, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.3
 5-2.15 (m, 2H), 2.05 -1.90 (m, 5H), 1.90-1.75 (m, 1H), 1.75 -1.65 (m, 3H), 1.65
 -1.45 (m, 6H), 1.45 -1.25 (m, 3H), 1.15 -1.00 (m, 1H), 1.00-0.80 (m, 12H), 0.05
 - -0.05 (dd, 6H). MS (LCMS) [M+H]⁺ = 522.44, [M+Na]⁺ = 544.42.

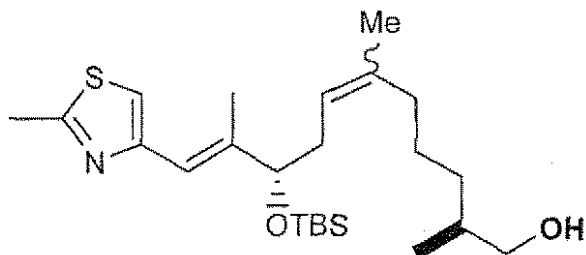
20

30

【0147】

工程 2 :

【化 6】



合成中間体-2

40

合成中間体-1 (16 g、30.7 mmol) のエタノール溶液 (300 mL) に室温
 で、p-トルエンスルホン酸一水和物 (5.83 g、30.7 mmol) を加えた。混合液
 を7時間、攪拌し、飽和 NaHCO₃ に注ぎ、塩化メチレン (300 mL) で2回抽出し
 た。有機層を合わせて、食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。濾過して、溶媒

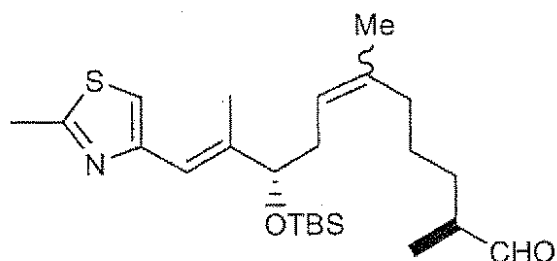
50

を除去した後、粗物質をB I O T A G E（登録商標）システムで精製して（E t O A c／ヘキサン、10～45％）、合成中間体-2を得た（9.8 g、22.4 mmol、73％）。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.92-6.90 (m, 1H), 6.45-6.40 (m, 1H), 5.15-5.00 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 1H), 3.50-3.30 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.35-2.15 (m, 2H), 2.1-1.9 (m, 5H), 1.75-1.50 (m, 5H), 1.50-1.25 (m, 3H), 1.10-0.75 (m, 13H), 0.05 - -0.05 (dd, 6H). MS (LCMS) [M+H] = 438.29, [M+Na] = 460.24.

【0148】

工程3：

【化7】



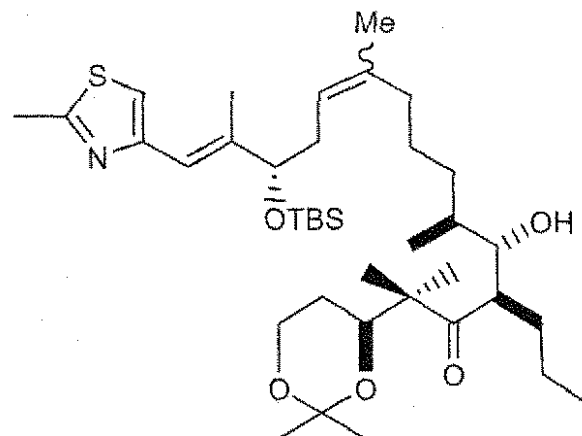
合成中間体-3

シュウ酸クロリド（2.94 mL、33.6 mmol）の塩化メチレン溶液（100 mL）に、DMSO（4.88 mL、68.8 mmol）を-78°でゆっくり加えた。10分、攪拌した後、合成中間体-2（7 g、15.99 mmol）の塩化メチレン溶液（100 mL）を加え、30分間、攪拌を継続した。TEA（11.14 mL、80 mmol）を加え、混合液を-10°に加温した。飽和NaHCO₃を加えた後、反応混合液を塩化メチレン（100 mL）で2回抽出した。有機層を合わせて、食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、蒸発させて、粗生成物を黄色の油状物として得た。ショートSiO₂カラムで濾過し、15% EtOAc／ヘキサン溶媒で溶離し、減圧濃縮して、合成中間体-3を無色の油状物として得た（7 g、16 mmol、100％）。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.6-9.5 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.4 (m, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.1-4.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.3-2.2 (m, 3H), 2.2-1.8 (m, 5H), 1.7-1.5 (m, 4H), 1.4-1.2 (m, 3H), 1.1-1.0 (m, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

【0149】

工程4：

【化8】



合成中間体-4

Klar et al. [Angew. Chem. Int. Ed., 45:7942-7948 (2006)] の方法に従った。THF（200 mL）に、-78°で新しく調製したLDA（70 mL、0.5 M、35 mmol）を加え、続いて（S）-2-（2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-4-イル

10

20

30

40

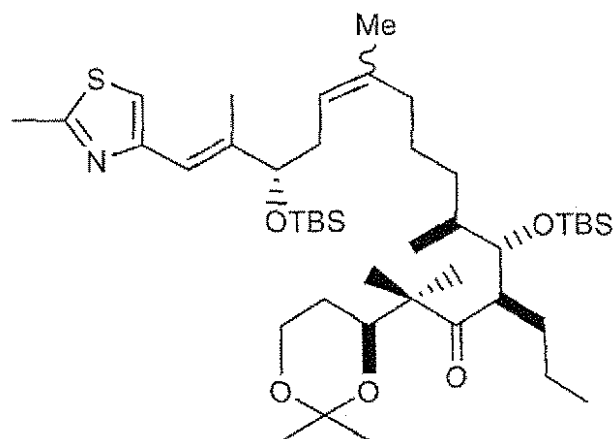
50

)-2-メチルヘプタン-3-オン(8.48g、35mmol)を加えた[Klar et al., Synthesis, 2:301-305 (2005)]。攪拌を30分間、-30°で続けた。-78°で冷却後、ZnCl₂溶液(1.0M、35.0mL、35mmol)を加え、得られた溶液を20分間、攪拌した。合成中間体-3(7g、16.06mmol)のTHF溶液(50mL)を20分かけて加えた。混合液を、さらに8時間、-78°で攪拌した。混合液を飽和NH₄Clに注ぎ、EtOAc(300mL)で2回抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、減圧中で濃縮した。残渣をSiO₂カラムで精製して(EtOAc/ヘキサン、0~10%)、合成中間体-4を最初の溶離物および主要なアルドール異性体として得た(7.5g、11mmol、69%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (m, 1H), 6.43 (m, 1H), 5.15 -5.05 (m, 1H), 4.15 - 4.00 (m, 2H), 4.00-3.80 (m, 2H), 3.50-3.40 (m, 1H), 3.30-3.20 (m, 1H), 2.85 -2.75 (m 1H), 2.69 (s, 3H), 2.35 -2.15 (m, 2H), 2.10-1.90 (m, 5H), 1.75 - 0.75 (m, 41H), 0.05 - -0.05 (d, 6H). MS (LCMS) [M+H] = 678.47, [M+Na] = 700.44.

【0150】

工程5:

【化9】



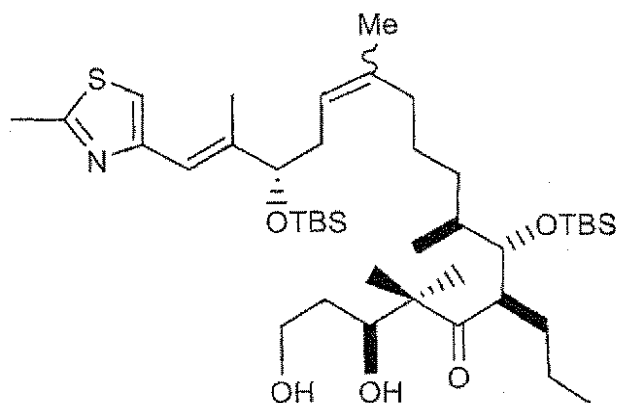
合成中間体-5

合成中間体-4(8g、11.8mmol)の塩化メチレン溶液(200mL)に0°で2,6-ルチジン(6.87mL、59mmol)を加え、続いてtert-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート(8.13mL、35.4mmol)を加えた。混合液を16時間かけて室温に加温し、飽和NaHCO₃に注ぎ、塩化メチレンで抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を減圧中で除去した。残渣をSiO₂カラムで精製して(EtOAc/ヘキサン、5~10%)、合成中間体-5を得た(7.8g、9.84mmol、83%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.15 -5.05 (m, 1H), 4.25 -4.20 (m, 1H), 4.10 -4.00 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 1H), 3.90 - 3.75 (m, 1H), 3.75 - 3.70 (m, 1H), 3.10 -3.00 (, 1H), 2.70 (s, 3H), 2.35 -2.15 (m, 2H), 2.00-1.85 (m, 5H), 1.70 - 0.75 (m, 50H), 0.10 - -0.05 (m, 12H). MS (LCMS) [M+H] = 792.48, [M+Na] = 814.44.

【0151】

工程6:

【化10】



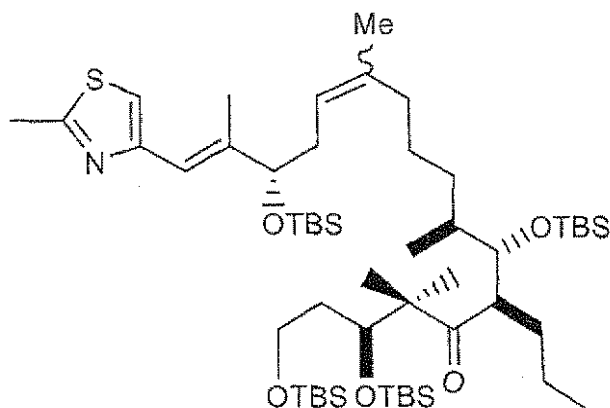
合成中間体-6

合成中間体-5 (6.8 g、8.58 mmol) のエタノール溶液 (100 mL) に室温で、p-トルエンスルホン酸一水和物 (1.8 g、9.44 mmol) を加えた。6時間、攪拌した後、飽和 NaHCO_3 を加え、混合液を EtOAc で抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、減圧中で濃縮した。反応を、合成中間体-5 (1 g) を用いて繰り返した。粗生成物を合わせて、BIOTAGE (登録商標) システムで精製して (EtOAc / ヘキサン、10~40%)、合成中間体-6を得た (5 g、6.65 mmol、68%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 1H), 4.00-3.90 (m, 1H), 3.90-3.80 (m, 1H), 3.75-3.65 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 1H), 3.10-2.90 (m, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.00-0.75 (m, 50H), 0.10- -0.05 (m, 12H). MS (LCMS) $[\text{M}+\text{H}] = 752.42$.

【0152】

工程7:

【化11】



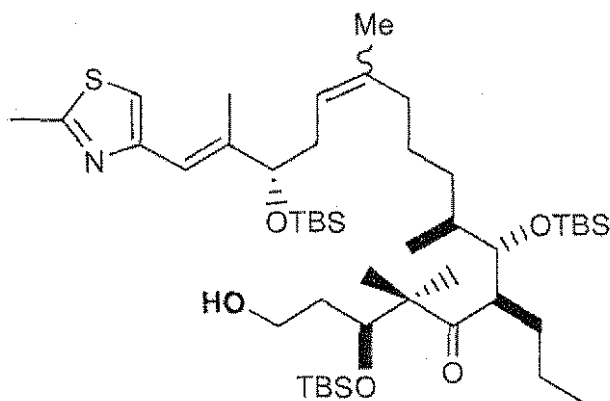
合成中間体-7

合成中間体-6 (5 g、6.65 mmol) の塩化メチレン溶液 (200 mL) に 0° で2, 6-ルチジン (7.7 mL、66.5 mmol) を加え、続いてtert-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (9.16 mL、39.9 mmol) を加えた。混合液を16時間かけて室温に加温し、次いで飽和 NaHCO_3 に注ぎ、塩化メチレンで抽出した有機溶媒を蒸発させ、粗混合液を EtOAc / ヘキサン (10~20%) で SiO_2 層に通じて濾過し、合成中間体-7を油状物として得た (6.9 g、100%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.20-5.05 (m, 1H), 4.10-4.00 (m, 1H), 3.95-3.85 (m, 1H), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 1H), 3.10-3.00 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.00-0.75 (m, 67H), 0.10- -0.05 (m, 24H).

【0153】

工程 8 :

【化 1 2】



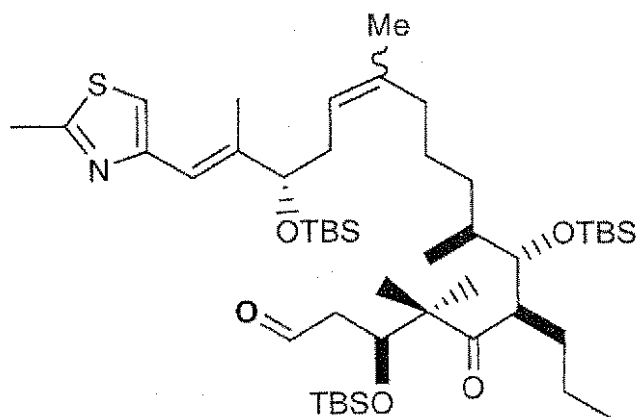
合成中間体-8

合成中間体-7 (5 g、5.1 mmol) の塩化メチレン (80 mL) および MeOH (40 mL) 溶液に、0 °で (+/-) -カンファー-10-スルホン酸 (1.18 g、5.1 mmol) を加えた。混合液を 0 °で 6 時間攪拌し、飽和 NaHCO₃ に注ぎ、塩化メチレンで抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濃縮して、合成中間体-8 を油状物として得た (3.6 g、4.15 mmol、81%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.90 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.1-4.0 (m, 2H), 3.85-3.75 (m, 1H), 3.7-3.6 (m, 2H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.3-2.2 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 6H), 1.7-1.5 (m, 5H), 1.5-1.3 (m, 3H), 1.3-1.1 (m, 6H), 1.1-1.0 (m, 4H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1- -0.1 (m, 18H). MS (LCMS) [M+H] = 866.49.

【0154】

工程 9 :

【化 1 3】



合成中間体-9

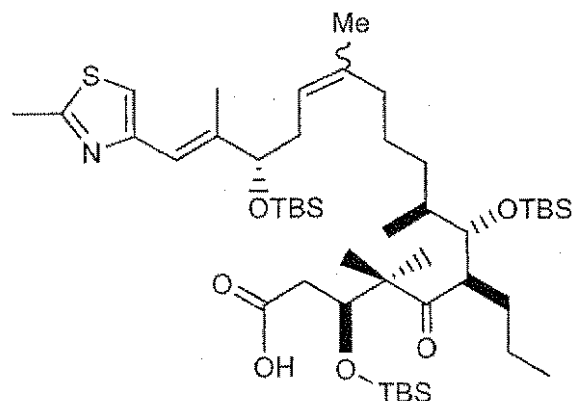
シュウ酸クロリド (0.8 mL、9.14 mmol) の塩化メチレン溶液 (40 mL) に -78 °で、DMSO (1.24 mL、17.5 mmol) を加えた。10 分間、攪拌した後、合成中間体-8 (3.6 g、4.15 mmol) の塩化メチレン溶液 (40 mL) を加えた。30 分後、TEA (3.76 mL、27.0 mmol) を加え、反応混合液を 2 時間かけて 0 °に加温した。飽和 NaHCO₃ を加え、混合液を塩化メチレンで抽出した有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、減圧中で濃縮し、合成中間体-9 を油状物として得た (3.6 g、4.16 mmol、100%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 9.77 (m, 1H), 6.9 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.3 (s, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.5-4.4 (m, 1H), 4.1-4.0 (m, 1H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.7 (s, 3H), 2.6-2.1

(m, 4H), 2.0-1.9 (m, 4H), 1.7-1.5 (m, 4H), 1.5 -1.3 (m, 5H), 1.3-1.1 (m, 5H), 1.1-1.0 (m, 3H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1- -0.1 (m, 18H).

【0155】

工程10:

【化14】



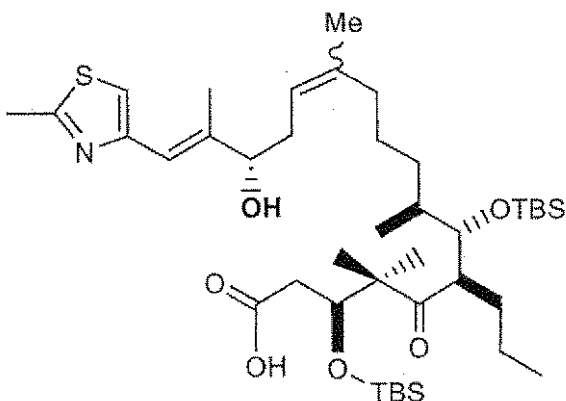
合成中間体-10

合成中間体-9 (3.6 g、4.16 mmol) の t-BuOH (85 mL) および THF (120 mL) 溶液に 0 ° で、水 (30 mL)、2-メチルブター-1-エン (18.5 g、264 mmol)、リン酸二水素ナトリウム (1.6 g、13.2 mmol)、および亜塩素酸ナトリウム (2.98 g、26.4 mmol) を加えた。0 ° で2時間、攪拌した後、混合液を飽和 Na₂S₂O₃ 溶液 (100 mL) に注ぎ、EtOAc (300 mL) で3回、抽出した。有機層を合わせて、食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、減圧中で濃縮した。残渣を B I O T A G E (登録商標) システムで精製して (EtOAc/ヘキサン, 10~50%)、合成中間体-10を無色の油状物として得た (2.8 g、3.18 mmol、72%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.93 (s, 1H), 6.66 (s, 0.5H), 6.46 (s, 0.5H), 5.25-5.0 (m, 1H), 4.4-4.3 (m, 1H), 4.2-4.0 (m, 1H), 3.9-3.7 (m, 1H), 3.2-3.0 (m, 1H), 2.7 (d, 3H), 2.6-2.4 (m, 1H), 2.4-2.0 (m, 3H), 2.0-1.0 (m, 23H), 1.0-0.8 (m, 35H), 0.1- -0.1 (m, 18H). MS (LCMS) [M+H] = 881.53.

【0156】

工程11:

【化15】



合成中間体-11

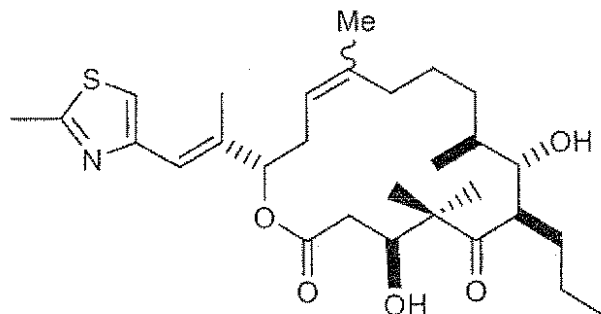
合成中間体-10 (2.8 g、3.18 mmol) の THF 溶液 (5 mL) に室温で、TBAF (42 mL、1.0 M) を加えた。混合液を6時間、攪拌し、次いで飽和 NH₄Cl に注ぎ、EtOAc (300 mL) で2回、抽出した。有機層を合わせて、HCl (1.0 N、200 mL)、飽和 NaHCO₃、および食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、合成中間体-11を粘稠性油状物として得た (2.6 g、3.3 mmol、100%)

)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.9 (s, 1H), 6.6-6.5 (m, 1H), 5.2-5.1 (m, 1H), 4.4-4.3 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.4-3.2 (m, 1H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.8-2.7 (m, 2H), 2.66 (d, 3H), 2.5-2.4 (m, 1H), 2.4-2.3 (m, 2H), 2.3-2.2 (m, 1H), 2.0-0.8 (m, 46H), 0.1-0.0 (m, 12H). MS (LCMS) $[\text{M}+\text{H}] = 766.3$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}] = 748.3$.

【0157】

工程12:

【化16】



化合物Ⅲの13 E/Z 混合物

合成中間体-11 (2.6 g、3.3 mmol) の THF 溶液 (27 mL) に室温で、TEA (2.36 mL、17 mmol) を加え、続いて2, 4, 6-トリクロロ塩化ベンゾイル (3.31 g、13.57 mmol) を加えた。反応混合液を20分間、攪拌し、次いでトルエン (260 mL) で希釈した。トルエン溶液を4時間かけて、DMA P (3.86 g、31.6 mmol) のトルエン攪拌混合液 (1400 mL) にゆっくり加えて、その後、TLCは完了を示した。HCl (4.0 N、12.5 mL) を加え、溶媒を減圧下で除去した。残渣を部分的にBIOTAGE (登録商標) システムで精製して (EtOAc / ヘキサン、0~10%)、モノ-シリル生成物および化合物 III を含有する上記の混合物 (13 E/Z 異性体) を含む混合物を得た (1.1 g)。MS (LCMS) (520.2, 634.2).

この物質は、さらなる精製をすることなく、脱保護を行なった。

【0158】

工程13: 化合物 III

上記反応混合物 (102 mg) の溶液に、 -20° で、TFA / CH_2Cl_2 (1 mL、20% v/v) を加えた。反応混合液を氷浴に移して、1時間、攪拌した。溶媒を減圧中で除去し、少量のトルエンを加え、次いで再び蒸発させて、白色の固形物を得た。同じ反応を部分的に精製した混合物 (125 mg) で繰り返した。2つの反応残渣を合わせて、 SiO_2 カラムで精製して (EtOAc / ヘキサン、20~35%)、白色の固形物を得た (180 mg)。白色の固形物を MeOH (5 mL) 中に取り込み、HPLCで精製した (Varian、Dynamax PDA-2 検出器; Waters C18 column; A: 0.05% TFA の水溶液; B: 0.05% TFA のアセトニトリル溶液、均一濃度)。2つの主要なピークを得た (ピーク1、73.4 mg、38%; およびピーク2、41.8 mg、22%)。

【0159】

ピーク1が、13-Z [1-オキサナンバリング (oxa numbering)] 異性体であることを、C-14オレフィンプロトンおよびC-13メチルの間のNOEの観察によって決定した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.14 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 1H), 3.35-3.25 (m, 1H), 2.92 (s, 3H), 2.55-2.45 (m, 2H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.25-2.15 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.90-1.80 (m, 1H), 1.80-1.65 (m, 5H), 1.60-1.45 (m, 2H), 1.45-1.30 (m, 5H), 1.25-1.15 (m, 3H), 1.05-0.95 (m, 6H), 0.90-0.85 (t, 3H). MS (LCMS) $[\text{M}+\text{H}] = 520.3$.

【0160】

10

20

30

40

50

ピーク 2 が、13-E 異性体（実施例 7 の化合物 III、以下）であることを、C-14 オレフィンプロトンおよび C-13 メチルの間の NOE が存在しないことから決定した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.03 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 5.3-5.2 (m, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.45-4.40 (m, 1H), 3.65-3.60 (m, 1H), 3.4-3.3 (m, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.6-2.3 (m, 4H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.95-1.85 (m, 1H), 1.8-1.7 (m, 2H), 1.57 (s, 3H), 1.50-1.35 (m, 4H), 1.29 (s, 3H), 1.25-1.10 (m, 3H), 1.0-0.9 (m, 6H), 0.9-0.8 (t, 3H). MS (LCMS) [M+H] = 520.3.

【0161】

（エポチロン D および化合物 III による経口インビボ研究）

各化合物（すぐ上記の実験に従い調製され説明された、エポチロン D および化合物 III）について、群（10mpk 群および 35mpk 群）当たり 3 匹ずつのマウスに、85% の PEG-400、10% の TP GS、および 5.0% のエタノールを用いて 10 ml/kg で投与した。投与後の様々な間隔で、組織ホモジナイゼーション、アセトニトリルによる抽出、およびタンデム質量分析を伴う液体クロマトグラフィー（LC/MS/MS）に従い、血漿、脳、および肝臓における化合物レベルを測定した。研究からの結果を表 4 および 5 にまとめ、また、35mpk 研究の結果を図 9 で報告する。具体的に述べると、表 4 では、投与の 24 時間後まで（化合物 III について、所与の LLQ に対して依然として検出可能な範囲まで）の経口投与（10mpk）後の脳内におけるエポチロン D（化合物 I）および化合物 III の濃度を報告し、投与の 5～24 時間後まで（ここでもまた、化合物 III について、検出可能な範囲まで）の経口投与（35mpk）後の脳内におけるエポチロン D（化合物 I）および化合物 III の濃度を表 5 では報告し、図 9 ではプロットする（化合物 III についての検出可能な脳内濃度の値が 1 つだけであったため、表 4 のデータについてはプロットを作製しなかった）。以下の表 4 および 5 では、値が < LLQ であった場合、LLQ 値をカッコ内に記録する。

【表 4】

表 4

化合物	時間(時間)	血漿中濃度 (nM)	脳内濃度 (nM)	脳/血漿比	脳/肝臓比
化合物 III	1	12.3	9.6	0.8	0.1
	5	1.3	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ
	7	1.2	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ
	24	<LLQ (0.2 nM)	<LLQ (3.7 nM)	NQ	NQ
エポチロン D	1	15.1	10.6	0.7	0.4
	3	3.9	7.0	1.8	1.3
	4	2.5	9.9	4.0	3.4
	8	1.4	6.4	4.6	1.8
	13	0.1	6.3	47.3	5.1
	24	0.2	9.1	44.5	8.0
	48	<LLQ (0.1 nM)	5.4	NQ	NQ
	96	<LLQ (0.1 nM)	3.0	NQ	NQ

【表 5】

表 5

化合物	時間(時間)	血漿中濃度 (nM)	脳内濃度 (nM)	脳/血漿比	脳/肝臓比
化合物 III	1	47.7	67.7	2.3	0.4
	5	3.0	4.6	1.4	NQ
	24	0.7	<LLQ	NQ	NQ
エポチロン D	1	52.7	61.3	1.1	0.5
	5	3.6	76.9	25.2	11.3
	24	<LLQ (0.5 nM)	118	NQ	18.7

10

【0162】

化合物 I I I について見られる通り、より後期の時点（すなわち、1 時間後以降）に由来する組織レベルは、脳組織内において、化合物 I I I レベルが急激に低下することを示す。こうして、いずれの実験でも測定可能な脳レベルを欠くことに観察される通り、化合物 I I I は脳内保持が低度である。エポチロン D の経口投与が 1 時間後において 0.7 および 1.1 の脳対血漿比を示したことは、良好な脳透過性を示す。化合物 I I I と異なり、エポチロン D の脳内レベルは、24 時間を超えて維持された（表 2、4、および 5、図 9～10）。エポチロン D の経口投与についての脳対肝臓比は、エポチロン D が、脳内に選択的に保持されることを示し、静脈内投与後の表 1 および 2 におけるデータと符合する。特に、エポチロン D の脳対肝臓比は、10 mpk および 35 mpk で投与した 24 時間後において、それぞれ、8 および 19 であった（表 4 および 5）。これらの値は、エポチロン D の顕著に高度な選択的脳対肝臓保持率を反映する。

20

【0163】

（実施例 8：静脈内投与、経口投与、および腹腔内投与後におけるエポチロン D の半減期データ）

タウオパチーの治療について、エポチロン D の特性をさらに評価するため、複数の研究からエポチロン D の脳内半減期を計算し、その結果を表 6 で報告する。長半減期化合物の正確な脳内半減期を計算するため、単回投与後における複数時点の半減期を測定する必要がある。脳内濃度が単回投与後の 7 日間全体にわたり測定された、表 2 に記載の研究から、静脈内投与後におけるエポチロン D（化合物 I）の脳内半減期は 61 時間である（表 6）。複数の経路および用量による投与後におけるマウスの脳内半減期は、平均 46.0 ± 7 時間であった（表 6）。同様に、ラットにおける静脈内投与後における脳内半減期は 31 時間であった（表 6）。これに対し、化合物 I I I の脳内半減期は、図 9 に反映される通り、エポチロン D より著明に短いことが明らかであった。エポチロン D の脳内半減期についてのさらなる例示として、ある研究結果（上記の表 2 において報告したデータ）をプロットする図 10 を示すが、これにより、5 mpk の静脈内ボラス投与の最長 175 時間後における脳内濃度レベルが示される。

30

【表 6】

表 6

種	経路	用量(mpk)	半減期(時間)
マウス	静脈内	5	61
マウス	経口	10	46
マウス	腹腔内	1	44
	腹腔内	10	41, 37, 45, 46
ラット	静脈内	1	31

40

【0164】

50

(引用文献)

Altmann et al., "The Chemistry and Biology of Epothilones - The Wheel Keeps Turning", Chem. Med. Chem., Vol. 2 (2007).

【0165】

Andorfer, C. et al., "Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms", J. Neurosci., 25(22):5446-5454 (2005).

【0166】

Andrieux, A. et al., "Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia", Biol. Psychiatry, 60(11):1224-1230 (2006).

10

【0167】

Avila, J. et al., "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions", Physiol. Rev., 84(2):361-384 (2004).

【0168】

Ballatore, C. et al., "Paclitaxel C-10 carbamates: potential candidates for the treatment of neurodegenerative tauopathies", Bioorg. Med. Chem. Lett., 17(13):3642-3646 (2007).

【0169】

Bartosik-Psujek, H. et al., "The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis", J. Neural. Transm., 113(3):339-345 (2006).

20

【0170】

Berger, Z. et al., "Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy", J. Neurosci., 27(14):3650-3662 (2007).

【0171】

Bergstralh, D.T. et al., "Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination", Cancer Treat. Rev., 32(3):166-179 (2006).

【0172】

Bollag, D.M. et al., "Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action", Cancer Res., 55(11):2325-2333 (1995).

30

【0173】

Burke, W.J. et al., "Taxol protects against calcium-mediated death of differentiated rat pheochromocytoma cells", Life Sci., 55(16):313-319 (1994).

【0174】

Butler, D. et al., "Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers", Eur. J. Pharmacol., 562(1-2):20-27 (2007).

【0175】

Chou, T.C. et al., "Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising in vivo profile relative to epothilone B", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:9642-9647 (1998).

40

【0176】

Dickey, C.A. et al., "Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies", Expert Opin. Ther. Targets, 10(5):665-676 (2006).

【0177】

Divinski, I. et al., "Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin", J. Neurochem., 98(3):973-984 (2006).

【0178】

50

Fellner, S. et al., "Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo", *J. Clin. Invest.*, 110(9):1309-1318 (2002).

【0179】

Furukawa, K. et al., "Taxol stabilizes $[Ca^{2+}]_i$ and protects hippocampal neurons against excitotoxicity", *Brain Res.*, 689(1):141-146 (1995).

【0180】

Gerth et al. "Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)", *J. Antibiotics*, 49(6):560-563 (June 1996),

【0181】

Goedert, M. et al., "Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205", *Neurosci. Lett.*, 189:167-170 (1995).

10

【0182】

Gozes, I., "Activity-dependent neuroprotective protein: from gene to drug candidate", *Pharmacol. Ther.*, 114(2):146-154 (2007).

【0183】

Gozes, I. et al., "Neurotrophic effects of the peptide NAP: a novel neuroprotective drug candidate", *Curr. Alzheimer Res.*, 3(3):197-199 (2006).

【0184】

Kolman, A., "Epothilone D (Kosan/Roche)", *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 5(6):657-667 (2004).

20

【0185】

Lace, G.L. et al., "A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases", *Clin. Neuropathol.*, 26(2):43-58 (2007).

【0186】

Lee et al., "Microtubule stabilizing drugs for the treatment of Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging*, 15(Suppl. 2):S87-S89 (1994).

【0187】

Magnani, E. et al., "Interaction of tau protein with the dynactin complex", *EMBO J.*, 26(21):4546-4554 (2007).

30

【0188】

Matsuoka, Y. et al., "Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage", *J. Mol. Neurosci.*, 31(2):165-170 (2007).

【0189】

Matsuoka, Y. et al., "A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325(1):146-153 (2008).

40

【0190】

Michaelis, M.L., "Ongoing in vivo studies with cytoskeletal drugs in tau transgenic mice", *Curr. Alzheimer Res.*, 3(3):215-219 (2006).

【0191】

Michaelis, M.L. et al., "{beta}-Amyloid-induced neurodegeneration and protection by structurally diverse microtubule-stabilizing agents", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312(2):659-668 (2005).

【0192】

Michaelis, M.L. et al., "Cytoskeletal integrity as a drug target", *Curr. Alzheimer Res.*, 2(2):227-229 (2005).

50

【0193】

Minderman, H. et al., "Broad-spectrum modulation of ATP-binding cassette transport proteins by the taxane derivatives ortataxel (IDN-5109, BAY 59-8862) and t RA96023", *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53(5):363-369 (2004).

【0194】

Moller, A. et al., "Efficient estimation of cell volume and number using the nucleator and the disector", *J. Microsc.*, 159(Pt. 1):61-71 (1990).

【0195】

Morsch, R. et al., "Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58(2):188-197 (1999).

10

【0196】

Oddo, S. et al., "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction", *Neuron*, 39(3):409-421 (2003).

【0197】

Postma, T.J. et al., "Peripheral neuropathy due to biweekly paclitaxel, epirubicin and cisplatin in patients with advanced ovarian cancer", *J. Neuro-Oncology*, 45:241-246 (1999).

【0198】

Preuss, U. et al., "The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells", *J. Cell Sci.*, 110(Pt. 6):789-800 (1997).

20

【0199】

Rice, A. et al., "Chemical modification of paclitaxel (Taxol) reduces P-glycoprotein interactions and increases permeation across the blood-brain barrier in vitro and in situ", *J. Med. Chem.*, 48(3):832-838 (2005).

【0200】

Roberson, E.D. et al., "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science*, 316(5825):750-754 (2007).

【0201】

30

Roy, S. et al., "Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases", *Acta Neuropathol.*, 109(1):5-13 (2005).

【0202】

Santacruz, K. et al., "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function", *Science*, 309(5733):476-481 (2005).

【0203】

Spittaels, K. et al., "Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice", *J. Biol. Chem.*, 275(52):41340-41349 (2000).

【0204】

40

Spohne, I. et al., "Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation", *J. Biol. Chem.*, 278(5):3437-3445 (2003).

【0205】

Terwel, D. et al., "Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice", *Am. J. Pathol.*, 172(3):786-798 (2008).

【0206】

Wagner, B.K et al., "Large-scale chemical dissection of mitochondrial function", *Nat. Biotech.*, 26(3):343-351 (2008).

【0207】

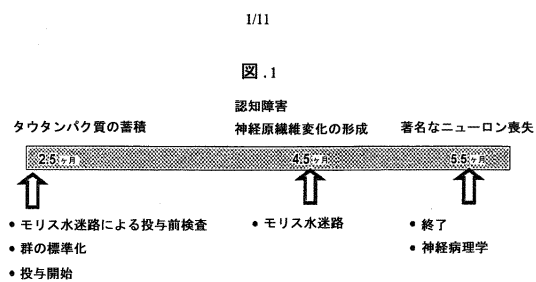
50

Wostyn, P. et al., "Alzheimer's disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure", Clin. Neurol. Neurosurg., 110(2):101-109 (2008).

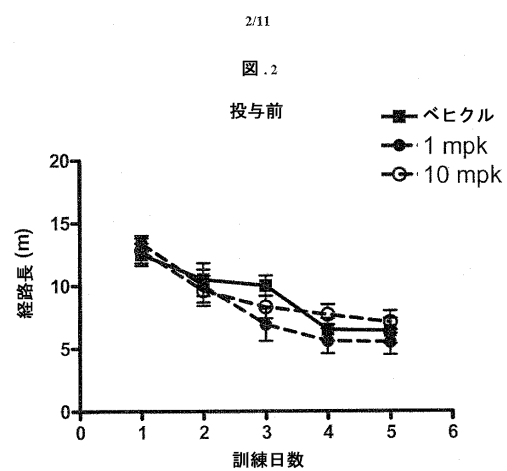
【0208】

Zhang, B. et al., "Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(1):227-231 (2005).

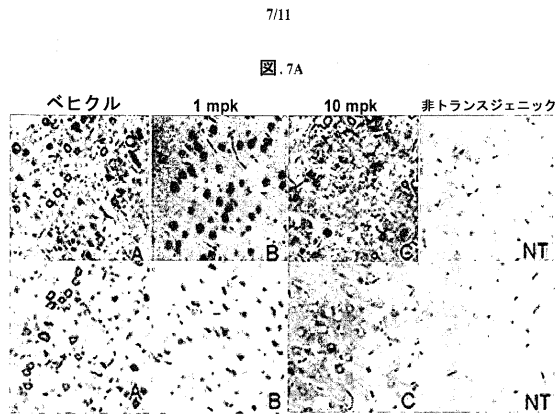
【図1】



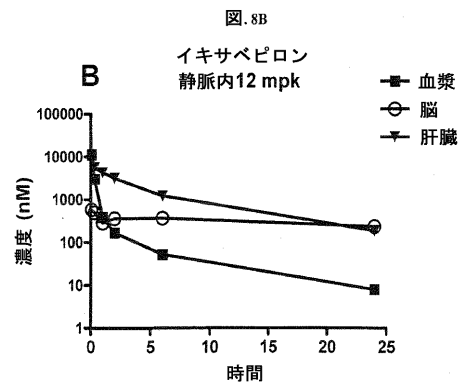
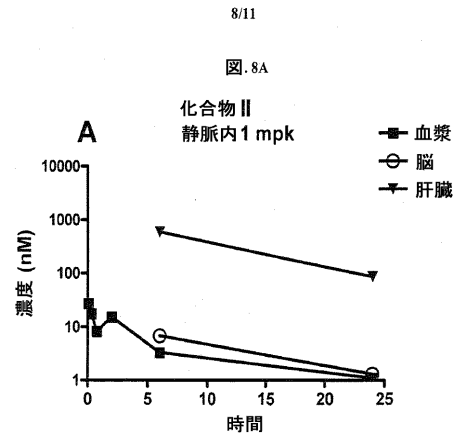
【図2】



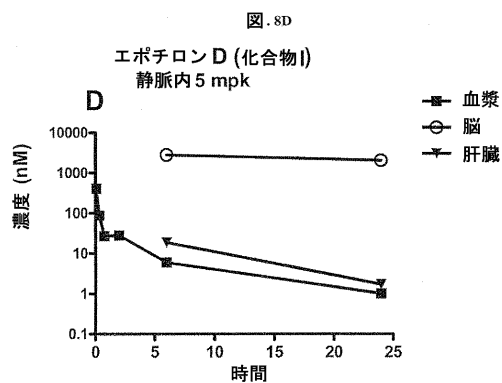
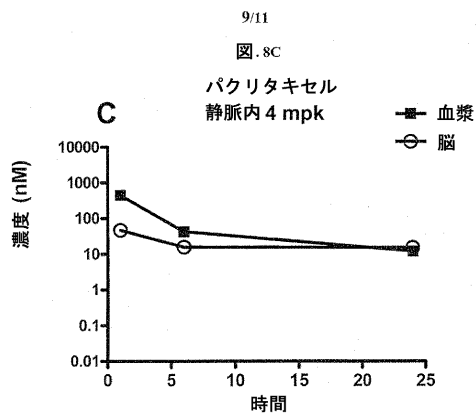
【図 7】



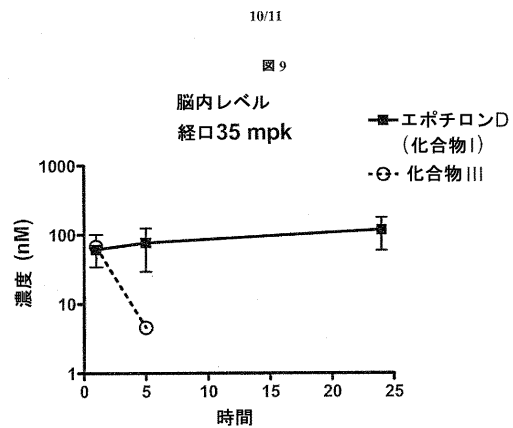
【図 8 - 1】



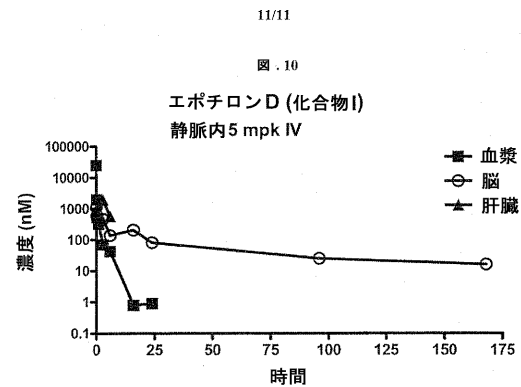
【図 8 - 2】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(72)発明者 チャールズ・エフ・オールブライト

アメリカ合衆国06492コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ5番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ドナ・マリー・バーテン

アメリカ合衆国06492コネチカット州ウォリングフォード、リサーチ・パークウェイ5番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 フランシス・ワイ・リー

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表2007-524655 (JP, A)

国際公開第2008/024303 (WO, A1)

国際公開第2008/024304 (WO, A1)

国際公開第2008/024305 (WO, A1)

特表2004-527478 (JP, A)

特表2005-525360 (JP, A)

J.Biol.Chem., 2006年, 281(1), p.229-240

J.Neurochem., 1998年, 70(4), p.1623-1627

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

医中誌WEB