

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2003-524575(P2003-524575A)

【公表日】平成15年8月19日(2003.8.19)

【出願番号】特願2000-507667(P2000-507667)

【国際特許分類】

|                |           |
|----------------|-----------|
| C 0 7 D 401/04 | (2006.01) |
| A 6 1 K 31/444 | (2006.01) |
| A 6 1 P 9/10   | (2006.01) |
| A 6 1 P 25/28  | (2006.01) |
| A 6 1 P 25/34  | (2006.01) |
| A 6 1 P 43/00  | (2006.01) |

【F I】

|                |       |
|----------------|-------|
| C 0 7 D 401/04 |       |
| A 6 1 K 31/444 |       |
| A 6 1 P 9/10   |       |
| A 6 1 P 25/28  |       |
| A 6 1 P 25/34  |       |
| A 6 1 P 43/00  | 1 1 1 |

【手続補正書】

【提出日】平成17年8月25日(2005.8.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

3-(2,4-ジメトキシベンジリデン)アナバセイン(これはまた、「DMXB」または「GTS-21」として知られている)を示しており、これは、7選択的ニコチン性アゴニスト活性を有するベンジリデン-アナバセインのモデルである。他の3-(ベンジリデン)アナバセインは、ベンジリデン部分が異なる置換基である以外同じである。

【図2】

基底核の両側に外傷を受けたラットにおける受動的回避行動に対するシンナミリデン-アナバセインの効果を示す。外傷を加えていない対照値は、247 35 Sec 平均±であった。(A)は、3-シンナミリデンアナバセインである；(B)は、3-(メトキシシンナミリデン)アナバセインである；(C)は、3-(4-メトキシ-シンナミリデン)アナバセインである。投薬量は、mg/kgでのIPであり、A、BおよびCにおいて左から右へそれぞれ：0; 0.1; 0.3; 1.0および3.0である。<sup>\*</sup>は、生理食塩水対照(1因子ANOVA)と比較して、p < 0.05であることを示す。全ての値は、平均±SEM(n=4~6/群)である。

【図3】

脳アポトーシスに対する脳虚血(卒中)の効果、およびこのアポトーシスから保護するためのベンジリデン-アナバセイン 7ニコチン性アゴニストの能力を示す。ラットに、それらの共通の頸動脈を縛ることによって、30分間の虚血発作を与えた；アポトーシスの量(梗塞サイズに比例している)は、24時間後に決定した。一部の動物には、結紮の1時間前にベンジリデン-アナバセイン化合物であるDMXB(1 mg/kg IP、

塩重量)、または結紮の5分後にニコチン性アンタゴニストであるメカミラミン(0.5 mg/kg IP)、またはメカミラミンおよびDMXBの両方かまたはDMXBを与えた。結紮前に与えたDMXB単独だけが、アポトーシスから保護した(\*生理食塩水注射対照と比較して、 $p < 0.05$ ; 1因子ANOVA、n = 4~5/群)。

#### 【図4】

EC50濃度のニコチンへのn-アセチルコリンレセプタサブタイプの応答性に対する100 mMエタノールの効果を示す。

#### 【図5】

生理食塩水の対照の注射と比較して、DMXB(GTS-21)の注射によってラットでのニコチン自己投与の阻害を示す。

#### 【図6A】

培養した新皮質神経細胞でのEAA誘発細胞毒性に対するDMXBの効果を示す。処理なし。

#### 【図6B】

図6Aと同様であり、細胞を、1 mMグルタミン酸で10分間、次いで、洗浄後グルタミン酸で1時間インキュベートした。

#### 【図6C】

図6Aと同様であり、細胞を、グルタミン酸処理の前に、10 μM DMXBに24時間曝露した。

#### 【図6D】

図6Aと同様であり、細胞を、グルタミン酸処理の前に、10 μM DMXBおよび1 nM (-)ブンガロトキシンの同時適用に曝露した。スケールバー、50 μm。

#### 【図6E】

DMXB前処理による神経毒性の阻害。DMXBに曝露した24時間後、1 mM EAAを10分間または1時間添加し、続いて、それぞれ、無EAA培地を1時間添加するかまたは添加しなかった。対照の%は、これらにEAAを曝露したまたは曝露しないときの生存可能細胞の割合である。

#### 【図6F】

DMXBまたはMK-801(各10 μM)を、10分間にわたって、1 mMグルタミン酸と共に、同時に適用した。<sup>\*</sup>および#は、それぞれ、グルタミン酸またはNMDA単独由来の $p < 0.05$ を意味する。値は、平均±SEM(n=5)を反映している。

#### 【図7】

グルタミン酸細胞毒性からのDMXB誘発保護に対するコリン作動性アンタゴニストの効果。各アンタゴニストは、24時間にわたって、1 μM DMXBまたは10 μMニコチンを含有する培地に添加した。HEX、1 μMヘキサメトニウム。MEC、1 μMメカミラミン。MLA、10 nMメチルリカコニチン。BTX、1 nM(-)ブンガロトキシン。ATR、1 μMアトロピン。<sup>\*</sup>および#は、それぞれ、DMXBまたはニコチン単独と比較して、 $p < 0.05$ を意味する(n=5)。

#### 【図8A】

病巣虚血発作に続いた梗塞サイズに対するDMXBの効果。前方ポールの5 mm後方の冠状切片であって、この場所で、梗塞サイズが最大であった。斜線領域は、典型的な28%梗塞(平均値)を有する染色された生理食塩水注射動物に由来する。底部：19%梗塞(平均値)を有するDMXB処理動物の冠状切片(同じ座標)。

#### 【図8B】

病巣虚血発作に続いた梗塞サイズに対するDMXBの効果。前方ポールの5 mm後方での全冠状領域の一部分としての梗塞サイズ。虚血の24時間前に、薬剤を注射した。MEC: 0.5 mg/kg IPメカミラミン；DMXB: 1 mg/kg IP。右パネル：虚血中に注射したDMXB、<sup>\*</sup>注射した生理食塩水と比較して、 $p < 0.05$ ；一元ANOVA(n=6~8)。

#### 【図9】

シンナミリジン構造とベンジリデン（GTS-21）との比較。

【図10】

受動的回避行動におけるDMXB誘発改善に対するメカミラミンの効果。成体SD白色種ラットを、基底核の両側に外傷を付け、そして教本で記述しているように、1ヶ月後、受動性回避行動について試験した。訓練および試験間隔に対する潜伏は、生理食塩水ビヒクリル、0.5 mg/kg DMXB、0.2 mg/kgメカミラミン（MEC）または両方の薬剤をIP注射した15分後に決定し、そして5匹の動物/群の平均±SEMとして、記述した。<sup>\*</sup>生理食塩水を注射した群と比較して、p < 0.05、一元ANOVA。

【図11】

基底核の両側に外傷を付けたラットでのMorris水課題における訓練に対するDMXBの効果。外傷を付けたまたは偽手術した動物を、教本で記述しているように、1ヶ月後に、訓練を開始した。外傷群および非外傷群において、毎日、最初の試行の15分前に、生理食塩水希釈液、0.5 mg/kg DMXB、0.2 mg/kgメカミラミン（MEC）、または両方の薬剤を、IP注射した。値は、その標的を見つけるのに必要な平均時間である（最大：60秒）（N = 5）。群間比較は、表1で記述する。

【図12】

基底核の両側に外傷を付けたラットでのMorris水課題における試行成績に対するDMXBの効果。図3で記述したように、動物に外傷を付け、訓練し、そして注射した。4日目にて、60秒の試行間隔中にて、その標的象限で費やした時間の断片を、各群に対して決定し、そして5匹の動物/群の平均±SEMとして表わした。<sup>\*</sup>生理食塩水を注射した外傷群と比較して、p < 0.05（一元ANOVA）。

【図13A】

ラット新皮質での高親和性[<sup>3</sup>H]AChまたは[<sup>125</sup>I]-ブンガロトキシン（BXT）結合に対するDMXBまたはニコチンの長期的注射の効果。成体オスラットに、生理食塩水ビヒクリル、1 mg/kg DMXBまたは0.2 mg/kgニコチン（NIC）（IP）を、2週間にわたって、毎日、注射した。その時点で、新皮質を除去し、その教本で記述したように、高親和性[<sup>3</sup>H]AChまたは[<sup>125</sup>I]-ブンガロトキシン結合についてアッセイした。各値は、4匹の動物/群の平均±SEMである；<sup>\*</sup>生理食塩水を注射した対照値と比較して、p < 0.05（一元ANOVA）。3-CA、2-MeOCAおよび4-MeOCAに対するラット7AChRの応答。このラット7サブユニットをコードするRNAで注射した卵母細胞のピーカアゴニスト活性化電流に対する濃度-応答関係。全ての応答は、まず、500 μM ACh（これは、薬剤適用の5分前に適用した）に対する個々の卵母細胞-応答に関連して、測定した。応答は、1の応答が完全な効率を表わすように、AChで得ることができる最大応答に関連して、規準化した。500 μM ACh対照応答のACh最大に対する比は、Papkeら、1997から引き出した。

【図13B】

ラット新皮質での高親和性[<sup>3</sup>H]AChまたは[<sup>125</sup>I]-ブンガロトキシン（BXT）結合に対するDMXBまたはニコチンの長期的注射の効果。成体オスラットに、生理食塩水ビヒクリル、1 mg/kg DMXBまたは0.2 mg/kgニコチン（NIC）（IP）を、2週間にわたって、毎日、注射した。その時点で、新皮質を除去し、その教本で記述したように、高親和性[<sup>3</sup>H]AChまたは[<sup>125</sup>I]-ブンガロトキシン結合についてアッセイした。各値は、4匹の動物/群の平均±SEMである；<sup>\*</sup>生理食塩水を注射した対照値と比較して、p < 0.05（一元ANOVA）。3-CA、2-MeOCAおよび4-MeOCAに対するラット7AChRの応答。特定濃度での3-CA、2-MeOCAおよび4-MeOCAの適用後、ラット7注射卵母細胞の対照（500 μM）ACh応答のレジデュアルインヒビション。全ての応答は、500 μM ACh（これは、この実験アゴニスト適用の5分前に適用した）に対する卵母細胞応答に関連して表わされる。

**【図14A】**

3 - C A、2 - MeOCAまたは4 - MeOCAに対する4 2 A C h Rの応答。ラット4 2サブユニットをコードするRNAで注射した卵母細胞のピーカアゴニスト活性化電流に対する濃度 - 応答関係。応答は、まず、 $10 \mu M$

A C h（これは、薬剤適用の5分前に適用した）に対する応答に関連して表され、次いで、1の応答が全効能を表わすように、A C hで得ることができる最大応答に関連して、規準化した。 $10 \mu M$  A C h応答と最大A C h応答との間の比は、別個の研究で決定された。

**【図14B】**

3 - C A、2 - MeOCAまたは4 - MeOCAに対する4 2 A C h Rの応答。特定濃度での3 - C A、2 - MeOCAまたは4 - MeOCAの適用後、ラット4 2注射卵母細胞の対照( $10 \mu M$ )A C h応答のレジデュアルインヒビション。応答は、 $10 \mu M$  A C h（これは、実験的アゴニスト適用の5分前に適用した）に対する個々の卵母細胞応答に関連して表わされる。

**【図15】**

NGF欠乏下にて分化したPC12細胞における神経突起生存率に対するコリンの効果。1週間分化し、次いでNGF + 血清を欠乏させたPC12細胞を、4日間にわたって、無血清培地( $100 ng/ml$ のNGFと共にまたはそれなしで、特定コリン濃度 $\pm 10 \mu l$ メカミラミン)に曝露した。その時点で、PC12細胞発現神経突起の画分を定量し、そして3~4プレート/群の平均 $\pm SEM$ として表わした。<sup>\*</sup>未処理細胞と比較して、 $p < 0.05$ (一元ANOVA)。