

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6997800号  
(P6997800)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月21日(2021.12.21)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/381 (2006.01)	A 6 1 K	31/381	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

請求項の数 12 (全50頁)

(21)出願番号 特願2019-557789(P2019-557789)  
 (86)(22)出願日 平成30年4月26日(2018.4.26)  
 (65)公表番号 特表2020-517678(P2020-517678 A)  
 (43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)  
 (86)国際出願番号 PCT/IL2018/050463  
 (87)国際公開番号 WO2018/198123  
 (87)国際公開日 平成30年11月1日(2018.11.1)  
 審査請求日 令和3年2月17日(2021.2.17)  
 (31)優先権主張番号 251949  
 (32)優先日 平成29年4月26日(2017.4.26)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 イスラエル(IL)

(73)特許権者 516103068  
 メディカル リサーチ, インフラストラ  
 クチュア アンド ヘルス サービスーズ  
 ファンド オブ ザ テル アビブ メディ  
 カル センター  
 イスラエル国 テルアビブ ウェイズマン  
 ストリート 6  
 (74)代理人 100120891  
 弁理士 林 一好  
 (74)代理人 100165157  
 弁理士 芝 哲央  
 (74)代理人 100126000  
 弁理士 岩池 満  
 (72)発明者 カルニ アーロン  
 イスラエル国 9 0 7 7 2 4 3 メヴァセ  
 最終頁に続く

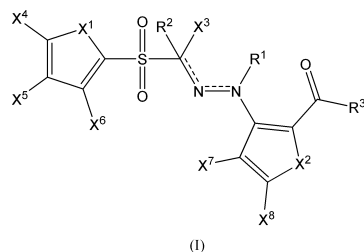
(54)【発明の名称】 神経炎症性障害の処置に使用される小有機分子

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

一般式(Ⅰ)の化合物又はその塩を含む医薬組成物であって、

## 【化1】



式中、

X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> は各々独立に S、O 又は N - R<sup>4</sup> であり、R<sup>4</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択され、

X<sup>3</sup> は、CN、ハロゲン、NO<sub>2</sub>、CO - X<sup>9</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>9</sup> からなる群から選択され、

X<sup>9</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> 及び X<sup>8</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、NO<sub>2</sub>、CN、CO - X<sup>10</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>10</sup> からなる群から各々独立に選択され、X<sup>10</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> の一方は存在せず、他方の R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、CO - X<sup>11</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>11</sup> からなる群から選択され、X<sup>11</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>3</sup> は、OR<sup>5</sup>、O - 及び NR<sup>6</sup> R<sup>7</sup> からなる群から選択され、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、点線の各々は独立に単結合又は二重結合である、

医薬組成物。

【請求項 2】

神経炎症性疾患の処置に使用される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

前記処置が追加の治療薬を更に含む、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記神経炎症性疾患が多発性硬化症である、請求項 2 又は 3 に記載の医薬組成物。

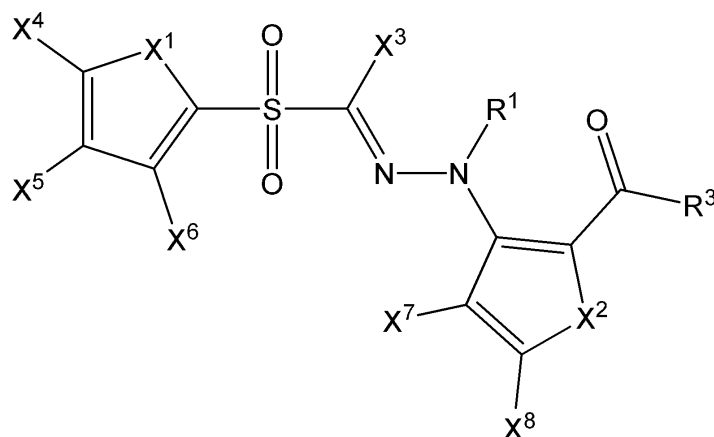
【請求項 5】

前記多発性硬化症が再発寛解型多発性硬化症である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

一般式 (I a) の化合物又はその塩を含む請求項 1 に記載の医薬組成物。

【化 2】



20

(Ia)

30

【請求項 7】

X<sup>1</sup> 及び X<sup>2</sup> は各々 S である請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

X<sup>3</sup> は CN である請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> 及び X<sup>8</sup> は各々 H である請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

R<sup>1</sup> は H である請求項 6 に記載の医薬組成物。

40

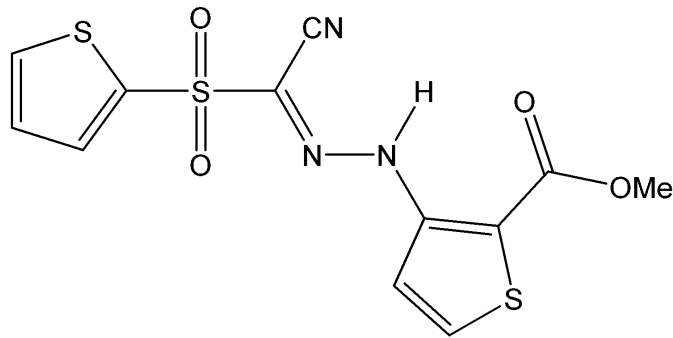
【請求項 11】

R<sup>3</sup> は OR<sup>5</sup> であり、R<sup>5</sup> はメチル又はエチルである請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記化合物が SM 1 である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【化 3】



SM1

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、神経変性及び神経炎症性疾患の治療薬の分野に関する。骨形成タンパク質（BMP: bone morphogenetic protein）の阻害剤として作用し得る小有機分子が、神経炎症性障害、特に多発性硬化症の処置に有用であるとして開示される。

## 【背景技術】

20

## 【0002】

多発性硬化症（MS: Multiple sclerosis）は、脳及び脊髄における神経細胞の保護外被であるミエリンが損傷を受けた周知の脱髄疾患である。非特許文献1[1]。骨形成タンパク質（BMP）は、発生及び病態中の髄鞘形成の阻害剤として示された（非特許文献2[2]で概説された）。

## 【0003】

特許文献1[17]は、BMPシグナル伝達の単一の遮断薬又は幾つかの遮断薬の組合せを含む神経炎症性又は神経変性疾患の処置用医薬組成物を開示する。

## 【0004】

特許文献2[3]は、BMP-2及びBMP-4に対する単一の抗体又は幾つかの抗体の組合せを含む神経炎症性又は神経変性疾患の処置方法を開示する。

30

## 【0005】

特許文献3[4]は、BMP2A阻害剤、特にsiRNA分子又はアンチセンス分子を用いて、組織外傷に起因しようと、慢性又は急性の退行性変化に起因しようと、損傷を受けたニューロン組織に関連する症候及び徴候の軽減又は減少の方法を開示する。

## 【0006】

非特許文献3[5]は、乏突起膠細胞前駆細胞（OPC: oligodendrocyte progenitor cell）に対するPPAR（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体）作動物質GW0742の効果を調べ、GW0742がOPCにおけるBMP2及びBMP4 mRNAレベルを、星状細胞における効果よりは低い、低下させることを示した。Simoniniらは、PPARが、OPC成熟において、BMP及びBMP拮抗物質の調節によって部分的に媒介されるある役割を果たすと結論した。

40

## 【0007】

非特許文献4[6]は、DG顆粒細胞下層（DG-SGZ）における海馬細胞増殖、及びアルツハイマー病のマウスモデルであるAPP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup>トランスジェニックマウスにおけるBMP4 mRNAレベルを評価した。研究者らは、BMP4 mRNA発現の増加とBrdU標識細胞数の減少との有意な相関を見だし、海馬のDG内のBMP4 mRNAの発現の増加が、APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup>トランスジェニックマウスにおける細胞増殖の減少の一因になり得ることを示唆した。

## 【0008】

50

非特許文献 5 [ 7 ] は、B M P が、乏突起膠細胞 - アストログリア前駆細胞 ( O - 2 A ) から星状細胞への選択的用量依存的分化を促進し、同時に乏突起膠細胞分化を抑制することを報告した。

【 0 0 0 9 】

非特許文献 6 [ 8 ] は、B M P が、マウス胚脳室下帯 ( S V Z ) 多分化能前駆細胞からのアストログリア系譜の選択的用量依存的生成を引き起こすことを示した。

【 0 0 1 0 】

非特許文献 7 [ 9 ] は、B M P 4 を過剰発現するトランスジェニックマウスを構築した。B M P 4 の過剰発現は、複数の脳領域における星状細胞の密度を著しく増加させ、乏突起膠細胞の密度を減少させた。ニューロン数や髄鞘形成パターンの変化は検出されず、全体的な構造異常もなかった。これらの観察の示唆するところによれば、B M P 4 は、乏突起膠細胞系譜ではなく星状細胞系譜に関与するように前駆細胞をインビボで誘導し、B M P は、インビボでの星状細胞の発生の重要な媒介物質である可能性がある。

【 0 0 1 1 】

非特許文献 8 [ 1 0 ] は、B M P 拮抗物質ノギンが、脳室下帯 ( S V Z ) に隣接する上衣細胞によって発現されることを示した。S V Z 細胞は、B M P 及びそれらの同族受容体を発現することが判明した。精製マウスノギンタンパク質は、神経形成をインビトロで促進し、グリア細胞分化を阻害し、異所性ノギンは、線条体に移植された S V Z 細胞のニューロン分化を促進した。研究者らは、したがって、上衣ノギン産生が、内在 B M P シグナル伝達を遮断することによって隣接 S V Z において神経原性環境をもたらすことを提案した。

【 0 0 1 2 】

特許文献 4 [ 1 1 ] は、目の症状、例えば加齢黄斑変性症を処置するためのイソチアゾールの使用を開示する。特許文献 5 [ 1 2 ] は、C 型肝炎の処置のためのシクロアルキル、アリール及びヘテロアリールアミノイソチアゾールを開示する。特許文献 6 [ 1 3 ] は、ケモカイン M I P - 1 アルファ及び R A N T E S の活性を阻害する活性化化合物を含む医薬組成物を開示する。それは、これらの医薬組成物を使用して炎症性疾患を処置する方法も対象とする。特許文献 7 [ 1 4 ] は、種々のプロテインキナーゼ ( 特に M E K 及び / 又は E R K ) を阻害するように誘導された置換イソチアゾール化合物を開示する。それは、M E K 及び / 又は E R K 機能の異常に関連する疾患の処置方法も対象とする。

【 0 0 1 3 】

多発性硬化症の処置の改善が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 4 】

【文献】国際公開第 2 0 1 3 / 1 8 6 7 7 7 号

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 1 3 9 9 8 3 号

米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 4 9 0 3 8 号

国際公開第 1 1 / 0 1 9 6 7 8 号

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 2 1 7 3 9 0 号

国際公開第 0 3 / 1 0 5 8 5 7 号

米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 3 9 0 3 7 号

【非特許文献】

【 0 0 1 5 】

【文献】Trapp, B. D. and Nave, K. A. Annu. Rev. Neurosci. 2008; 31: 247 - 269.

Grinspan J. B. [2015] Vitamins and Hormones, Chapter 6, volume 99, pages 195 - 222.

Simonini M. V. et al. ASN Neuro. 2010 Jan 15; 2 [ 1 ]; e00025

Li D. et al. Hippocampus 2008; 18: 692 - 8



Mabie P. C. et al. J. Neurosci. 1997, 17: 4112 - 4120

Gross R. E. et al. Neuron 1996, 17: 595 - 606

Gomes W. A. et al. Dev. Biol. 2003, 255: 164 - 177

Lim D. A. et al. Neuron 2000, 28: 713 - 726

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

小有機分子がBMP2を含めて、ただしそれに限定されない骨形成タンパク質(BMP)の阻害剤として作用し得ることが今回初めて開示される。さらに、BMPの阻害能力に基づいて選択された分子が、神経炎症性障害、特に多発性硬化症の処置において有用であることも開示される。本発明の一部の態様によれば、IC50が10 μM未満でBMP2を阻害可能な小有機分子が提供される。本発明の更なる態様によれば、BMP2とBMP4の両方を阻害可能な小有機分子が提供される。更なる態様によれば、BMP2を阻害可能な小有機分子は、多発性硬化症を含めて、ただしそれに限定されない神経炎症性疾患の処置に有用な医薬組成物中で提供される。

10

【0017】

本発明は、本明細書でSM1、SM6、SM7及びSM9と命名された特定の化合物を含めた式(I)～(IX)の小有機化合物が細胞に基づくアッセイにおいて骨形成タンパク質2(BMP2)の活性を阻害したという知見に部分的に基づく。さらに、これらの分子は、多発性硬化症(MS)を模倣した確立されたモデルである、再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎(RR-EAE: relapsing / remitting experimental autoimmune encephalomyelitis)の動物モデルにおいて、疾患進行を阻害した。特定の作用機序理論に拘泥するものではないが、これらの小有機分子は、脱髄を阻害することによって、再ミエリン化を誘発することによって、又はその両方によって、神経形成及び乏突起膠細胞発生を誘発し、ミエリン量を維持すると思われる。

20

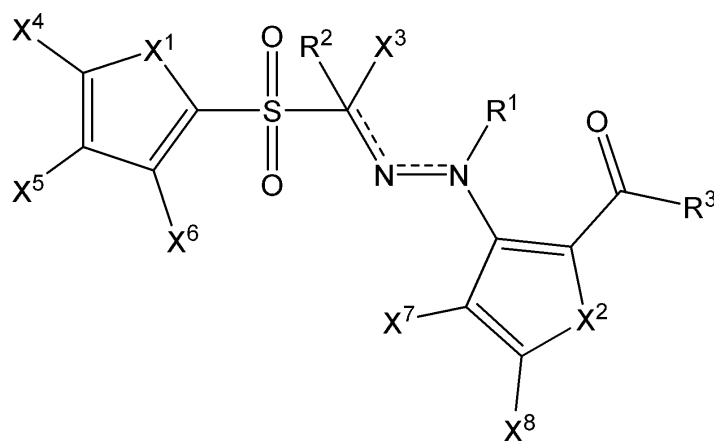
【0018】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式(I)の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

30

【0019】

【化1】



40

(I)

【0020】

式中、

X1及びX2は各々独立にS、O又はN-R4であり、R4は、H、アルキル、シクロアルキル、アリアル及びヘテロアリアルからなる群から選択され、

50

X<sup>3</sup> は、CN、ハロゲン、ニトロ、CO - X<sup>9</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>9</sup> からなる群から選択され、  
X<sup>9</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> 及び X<sup>8</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、ニトロ、CO - X<sup>10</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>10</sup> からなる群から各々独立に選択され、X<sup>10</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>1</sup> と R<sup>2</sup> の一方は存在せず、他方の R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、CO - X<sup>11</sup> 及び SO<sub>2</sub> X<sup>11</sup> からなる群から選択され、X<sup>11</sup> は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>3</sup> は、OR<sup>5</sup>、O - 及び NR<sup>6</sup> R<sup>7</sup> からなる群から選択され、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及び R<sup>7</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、

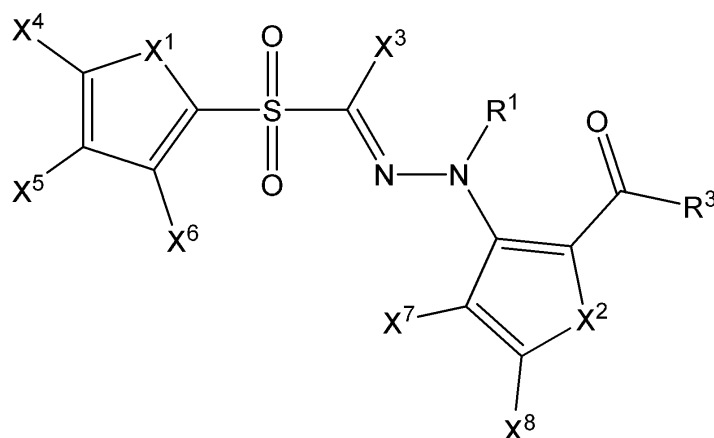
点線の各々は独立に単結合又は二重結合である。

【0021】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、式 (Ia) の化合物又はその塩を含む。

【0022】

【化2】



(Ia)

【0023】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (I) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0024】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (Ia) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup> 及び R<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0025】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (I) の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> の各々が記載の通りである、使用が提供される。

【0026】

一部の実施形態によれば、X<sup>1</sup> と X<sup>2</sup> はどちらも S である。

【0027】

一部の実施形態によれば、X<sup>3</sup> は CN である。

【0028】

10

20

30

40

50

一部の実施形態によれば、X 4、X 5、X 6、X 7 及び X 8 の各々は H である。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態によれば、R 1 は H である。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態によれば、R 3 は O R 5 である。

【 0 0 3 1 】

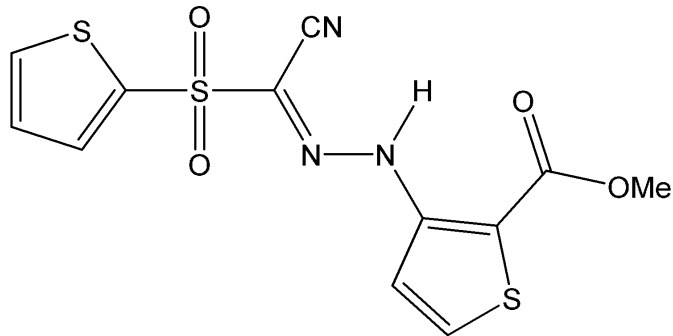
一部の実施形態によれば、R 5 はメチル又はエチルである。

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態によれば、化合物は式 S M 1 を有する。

【 0 0 3 3 】

【 化 3 】



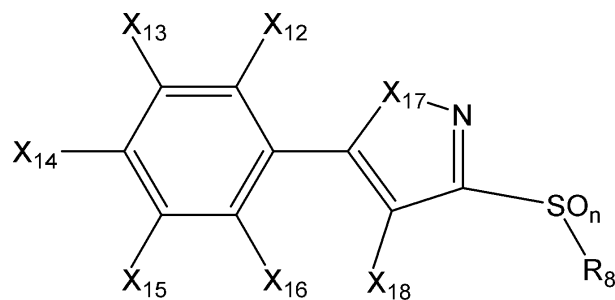
SM1

【 0 0 3 4 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式 ( I X ) の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 3 5 】

【 化 4 】



(IX)

【 0 0 3 6 】

式中、

X 1 2、X 1 3、X 1 5 及び X 1 6 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO 2、CO - X 1 9 及び SO 2 X 1 9 からなる群から各々独立に選択され、X 1 9 は、OH、O - 及び NH 2 からなる群から選択され、

X 1 4 及び X 1 8 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO 2、CO - X 2 0 及び SO 2 X 2 0 からなる群から各々独立に選択され、X 2 0 は、OH、O - 及び NH 2 からなる群から選択され、

X 1 7 は S、O 又は N - R 9 であり、R 9 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択され、

n は 1 又は 2 であり、

10

20

30

40

50

R<sup>8</sup> は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択される。

【 0 0 3 7 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 ( I X ) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>14</sup>、X<sup>15</sup>、X<sup>16</sup>、X<sup>17</sup>、X<sup>18</sup> 及び R<sup>8</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【 0 0 3 8 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための医薬組成物の調製における一般式 ( I X ) の化合物又はその塩及び薬学的に許容される担体の使用であって、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>14</sup>、X<sup>15</sup>、X<sup>16</sup>、X<sup>17</sup>、X<sup>18</sup> 及び R<sup>8</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

10

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup> 及び X<sup>16</sup> の各々は H である。

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup> はハロゲンである。

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup> は Cl である。

【 0 0 4 2 】

一部の実施形態によれば、X<sup>18</sup> は CN である。

20

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態によれば、X<sup>17</sup> は O である。

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup> はメチルである。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態によれば、n は 2 である。

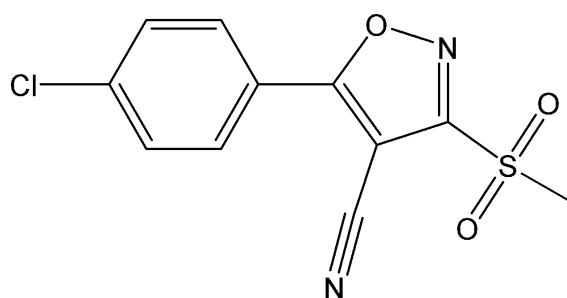
【 0 0 4 6 】

一部の実施形態によれば、化合物は式 S M 9 を有する。

【 0 0 4 7 】

【 化 5 】

30



SM9

40

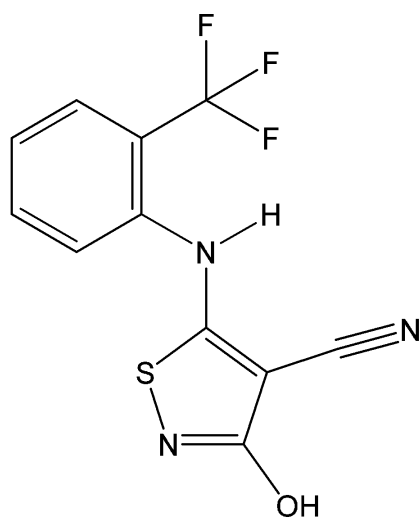
【 0 0 4 8 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式 S M 7 の化合物、そのエステル又は塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 4 9 】

50

【化 6】



SM7

10

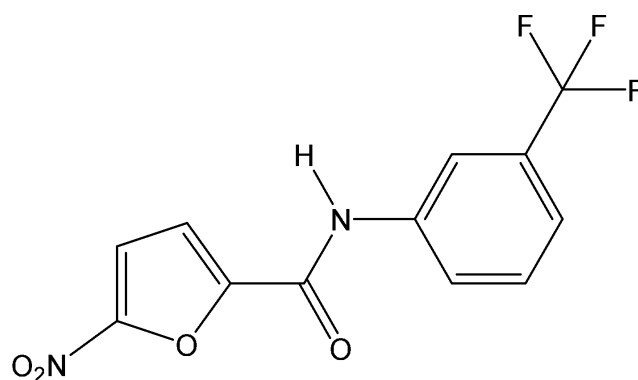
【 0 0 5 0】

一部の実施形態によれば、一般式 S M 6 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 5 1】

20

【化 7】



SM6

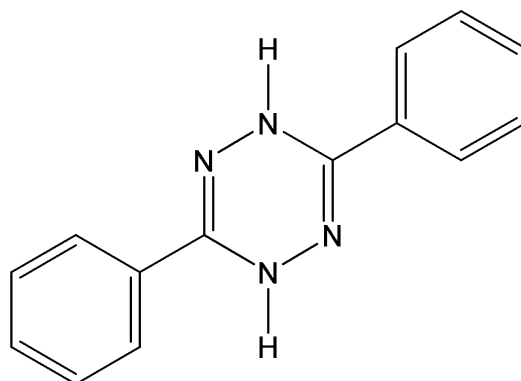
30

【 0 0 5 2】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式 S M 2 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 5 3】

【化 8】



SM2

40

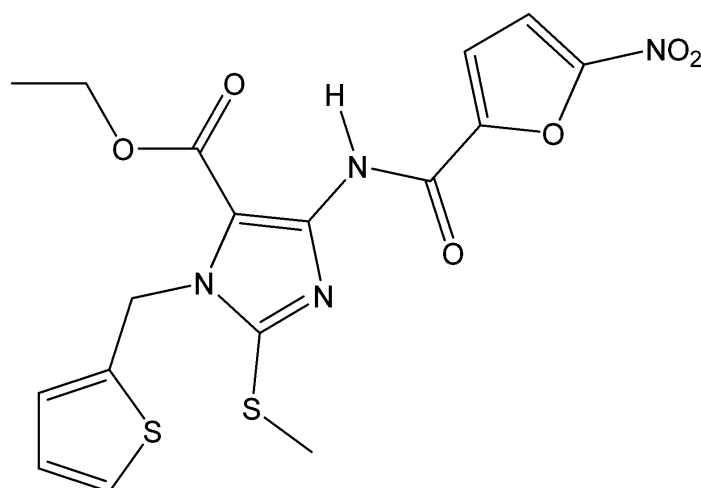
50

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態によれば、一般式 S M 3 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 5 5 】

【 化 9 】



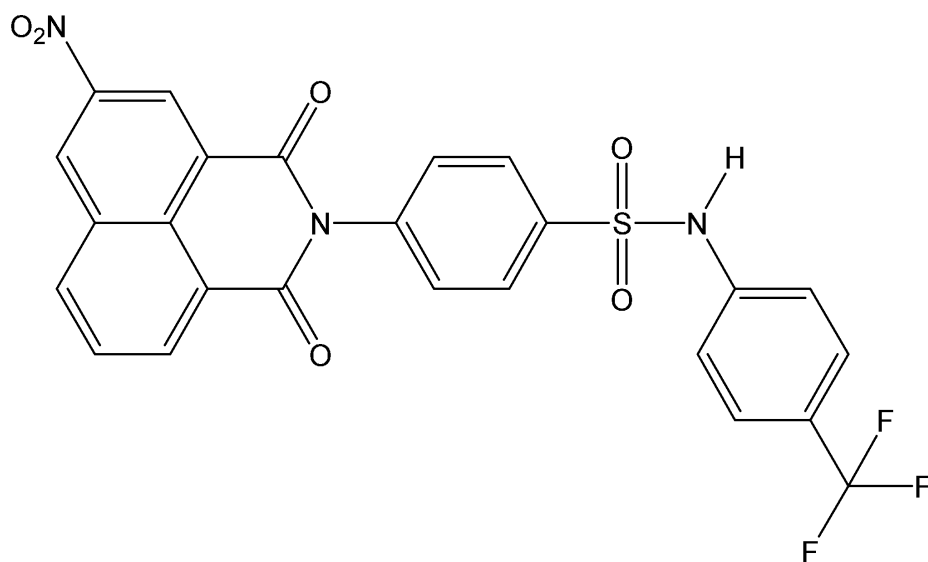
SM3.

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態によれば、一般式 S M 4 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 5 7 】

【 化 1 0 】



SM4.

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態によれば、一般式 S M 5 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 5 9 】

10

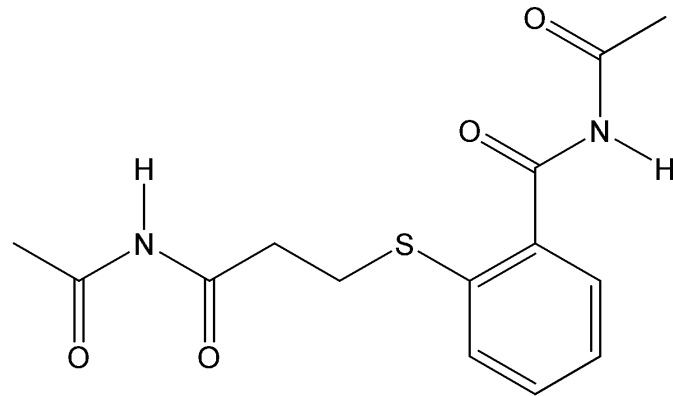
20

30

40

50

【化 1 1】



SM5.

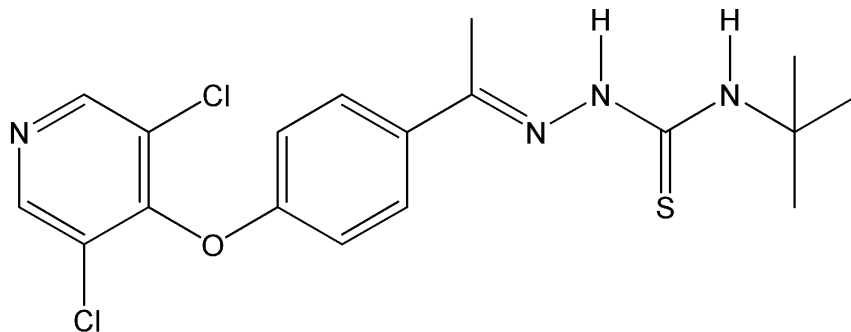
10

【0060】

一部の実施形態によれば、一般式 S M 8 の化合物又はその塩を含む医薬組成物が提供される。

【0061】

【化 1 2】



SM8.

20

【0062】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、神経炎症性疾患の処置に使用される。

【0063】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、追加の治療薬を更に含む。

【0064】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患は多発性硬化症である。

【0065】

一部の実施形態によれば、多発性硬化症は再発寛解型多発性硬化症である。

【0066】

一部の実施形態によれば、方法は、前記対象への追加の治療薬の投与を更に含む。

【0067】

一部の実施形態によれば、追加の治療薬は、少なくとも1種の化合物又は前記少なくとも1種の化合物を含む医薬組成物の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与される。

【0068】

本明細書に開示される主題をより理解し、それが実際に行われ得る方法を例示するために、添付図面を参照して、非限定的例のみによって、実施形態を以下に記述する。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】ハイスループットスクリーニング (HTS: High Throughput Screening) バイオアッセイ評価を示す図である。(A) BMP-2の存在又は非存在下で(「BMP-2あり」-正方形、「BMP-2なし」-菱形)、ウェル1個当た

30

40

50

りの $O.D_{405nm}$ として示される、 $CDP-Star$ （登録商標）化学発光基質によって求められる $ALP$ 活性。（B） $BMP-2$ の存在又は非存在下で（「 $BMP-2$ あり」- 正方形、「 $BMP-2$ なし」- 菱形）、ウェル1個当たりの $O.D_{405nm}$ として示される、 $Cell Titer-Glo$ （登録商標） $Luminescent$ 基質によって求められる細胞生存率。（C） $BMP-2$ の存在又は非存在下の（「 $BMP-2$ あり」- 正方形、「 $BMP-2$ なし」- 菱形）ウェル1個当たりの $ALP$ /細胞の比。

【図2】 $BMP-2$ による $ALP$ 刺激及び細胞生存率に対する $SM1 \sim SM9$ の効果を示す図である。 $SM1 \sim SM9$ の $ALP$ パーセント（%）（菱形）及び細胞生存率（%）（正方形）を様々な分子濃度（ $0.62 \mu M$ 、 $1.25 \mu M$ 、 $2.5 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 及び $10 \mu M$ ）について示す。

10

【図3】 $RR-EAE$ における $SM1 \sim SM9$ の効果を示す図である。 $RR-EAE$ マウスにおける $EAE$ 臨床スコア、免疫化後9日目から30日間のビヒクル単独（5%  $DMSO$ の $PBS$ 溶液、 $200 \mu g$ /マウス）に比べた、小分子（ $SM1 \sim 9$ それぞれ、 $10 mg/kg$ /日）で処置された各群（ $n=7$ ）。 $SM$ -菱形、ビヒクル-正方形。

【図4】 $RR-EAE$ における $SM1$ 、 $SM6$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。 $RR-EAE$ マウスにおける $EAE$ 臨床スコア、9日目から30日間のビヒクル単独（5%  $DMSO$ の $PBS$ 溶液、 $200 \mu l$ /マウス）（菱形）に比べた、2つの投与量 $10 mg/kg$ /日（正方形）及び $20 mg/kg$ /日（三角形）における $SM1$ 、 $SM7$ 、 $SM9$ 又は $SM6$ で処置された各群（ $n=14$ ）。

【図5】中程度-重度 $EAE$ のマウス数に対する $SM1$ 、 $SM6$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。臨床スコアが2/日/群以上のマウス数（ $10 mg/kg$ /日-正方形、 $20 mg/kg$ /日-三角形、ビヒクル-菱形）。

20

【図6】脱髄に対する $SM1$ 、 $SM6$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。（A）ビヒクル、 $SM1$   $10 mg/kg$ /日、 $SM1$   $20 mg/kg$ /日、 $SM7$   $10 mg/kg$ /日、 $SM9$   $10 mg/kg$ /日、 $SM9$   $20 mg/kg$ /日、 $SM6$   $10 mg/kg$ /日及び $SM6$   $20 mg/kg$ /日で処置されたマウスの $LF B$ で染色された腰髄切片（前側索）の代表的画像。（B）有髄領域の定量化。グラフは、免疫化後48日目における全脊髄切片に対する $LF B$ 染色領域パーセント（%）を示す。定量化を、 $Image J$ ソフトウェアを用いて6マウス/群及び3切片/マウスに対して行った。

【図7A】 $P19$ 細胞におけるニューロン表現型に対する $SM1$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。 $MAP-2$ 及び $Hoechst$ で染色された8日目の $P19$ 細胞の代表的画像である。

30

【図7B】 $P19$ 細胞におけるニューロン表現型に対する $SM1$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。 $\%MAP-2$ 陽性細胞の分析。分析を $Image J$ ソフトウェアによって行った。

【図8】ウエスタンブロットによって検出された $SMAD1/5/8$ シグナル伝達に対する $SM1$ 、 $SM7$ 及び $SM9$ の効果を示す図である。（A）刺激なし（「対照」）又は示したように $BMP-2$ 、 $BMP-2 + 抗BMP-2/4Ab$ 、 $BMP-2 + SM1$ 、 $SM7$ 若しくは $SM9$   $2.5 \mu M$ 及び $5 \mu M$ 刺激に応答したリン酸化 $SMAD$ （ $p-SMAD$ ）、全 $SMAD$ 及びチューブリンのウエスタンブロット。（B） $Image J$ ソフトウェアによって行われた $p-SMAD$ /チューブリンの定量化。

40

【図9】 $BMP-4/BMP-2$ によって誘導される $ATDC5$ バイオアッセイにおける $SM1$ 、 $SM7$ 、 $SM9$ 及び $SM6$ の効果を示す図である。 $BMP-4$ 刺激対 $BMP-2$ 刺激の存在下で $SM1$ 、 $SM7$ 、 $SM9$ 及び $SM6$   $2.5 \mu M$ 及び $5 \mu M$ の $ALP$ 誘導率及び細胞生存率。

【図10A】 $SVZ$ における神経芽細胞マーカーダブルコルチンの新規発現に対する $SM1$ 、 $SM7$ 、 $SM9$ 及び $SM6$ の効果を示す図である。 $SVZ$ における $BrdU$ 及びダブルコルチン（ $DCX$ ）の標識化を示す免疫蛍光画像。画像を、 $Zeiss 710$ 共焦点顕微鏡、冠状切片を用いて得た。 $LV$ 、側脳室、 $SVZ$ 、脳室下帯。画像のスケールバー： $a, c, e, g, i, k, m, o = 100 \mu m$ （倍率10倍）、及び画像： $b, d, f,$

50



h、j、l、n、p = 20  $\mu$ m (倍率63倍)。

【図10B】SVZにおける神経芽細胞マーカーダブルコルチンの新規発現に対するSM1、SM7、SM9及びSM6の効果を示す図である。SVZにおけるBrdU+DCX+細胞の定量化。分析を、Image Jソフトウェアを用いて各マウスの3個の切片(各群から3匹のマウス、全n=9)に対して行った。値を平均 $\pm$ SEMとして示し、スチューデントのt検定の結果を $*p < 0.05$ として表す。

【図11A】SGZにおけるダブルコルチンの新規発現に対するSM1、SM7、SM9及びSM6の効果を示す図である。(A)は、SGZにおけるBrdU+DCX+細胞の標識化を示す免疫組織化学画像である。画像を、Olympus 8.1顕微鏡(倍率10倍)を用いて得た。

10

【図11B】SGZにおけるダブルコルチンの新規発現に対するSM1、SM7、SM9及びSM6の効果を示す図である。(B)SGZにおけるBrdU+DCX+細胞の定量化。分析を、Image Jソフトウェアを用いて各マウスの3個の切片(各群から3匹のマウス、全n=9)に対して行った。値を平均 $\pm$ SEMとして示し、スチューデントのt検定の結果を $*p < 0.05$ として表す。

【図12A】SGZにおける成熟ニューロンマーカーNeuNの新規発現に対するSM1、SM7、SM9及びSM6の効果を示す図である。(A)は、SGZにおけるBrdU+NeuN+細胞の標識化を示す免疫組織化学画像である。画像を、Olympus 8.1顕微鏡(倍率10倍)を用いて得た。

【図12B】SGZにおける成熟ニューロンマーカーNeuNの新規発現に対するSM1、SM7、SM9及びSM6の効果を示す図である。(B)SGZにおけるBrdU+NeuN+の定量化。分析を、Image Jソフトウェアを用いて各マウスの3個の切片(各群から3匹のマウス、全n=9)に対して行った。値を平均 $\pm$ SEMとして示し、スチューデントのt検定の結果を $*p < 0.05$ として表す。

20

【発明を実施するための形態】

【0070】

本発明は、EAE、特に再発寛解型多発性硬化症を模倣したモデルである再発型のEAEを阻害するのに治療上有用である、BMPを阻害可能な小有機分子を提供する。

【0071】

本発明は、本明細書でSM1、SM6、SM7及びSM9と命名された特定の化合物を含めて、ただしそれらに限定されない式(I)~(IX)の小有機化合物が細胞に基づくアッセイにおいて骨形成タンパク質2(BMP2)の活性を阻害したという知見に部分的に基づく。これらの分子は、多発性硬化症(MS)を模倣した十分に確立されたモデルである、再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎(RR-EAE)動物モデルにおいて、疾患進行を阻害することが示された。特定の作用機序理論に拘泥するものではないが、これらの分子は、脱髄を阻害することによって、再ミエリン化を誘発することによって、又はその両方によって、神経形成及び乏突起膠細胞発生を誘発し、ミエリン量を維持すると思われる。

30

【0072】

したがって、一部の実施形態によれば、骨形成タンパク質2(BMP2)阻害剤を含む医薬組成物であって、BMP2阻害剤が小分子である、医薬組成物が提供される。一部の実施形態によれば、医薬組成物は、多発性硬化症などの神経炎症性疾患の処置に使用される。

40

【0073】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の骨形成タンパク質2(BMP2)阻害剤を投与するステップを含み、BMP2阻害剤が小分子である、方法が提供される。

【0074】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための医薬組成物の調製における骨形成タンパク質2(BMP2)阻害剤の使用であって、BMP2阻害剤が小分子である、使用が提供される。

50

## 【 0 0 7 5 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための骨形成タンパク質 2 ( B M P 2 ) 阻害剤の使用であって、 B M P 2 阻害剤が小分子である、使用が提供される。

## 【 0 0 7 6 】

一部の実施形態によれば、小分子は、分子量が 1 0 0 0 g / m o l 以下である。

## 【 0 0 7 7 】

一部の実施形態によれば、小分子は、式 ( I )、式 ( I I )、式 ( I I I )、式 ( I V )、式 ( V )、式 ( V I )、式 ( V I I )、式 ( V I I I )、式 ( I X ) からなる群から選択される式及びそれらの塩である。一部の実施形態によれば、小分子は、式 ( I )、式 ( V I )、式 ( V I I )、式 ( I X ) からなる群から選択される式及びそれらの塩である。一部の実施形態によれば、小分子は、式 ( I )、式 ( I X ) からなる群から選択される式及びそれらの塩である。一部の実施形態によれば、小分子は、 S M 1、 S M 2、 S M 3、 S M 4、 S M 5、 S M 6、 S M 7、 S M 8、 S M 9 からなる群から選択される式及びそれらの塩である。一部の実施形態によれば、小分子は、 S M 1、 S M 6、 S M 7、 S M 9 からなる群から選択される式及びそれらの塩である。一部の実施形態によれば、小分子は、 S M 1、 S M 9 からなる群から選択される式及びそれらの塩である。

10

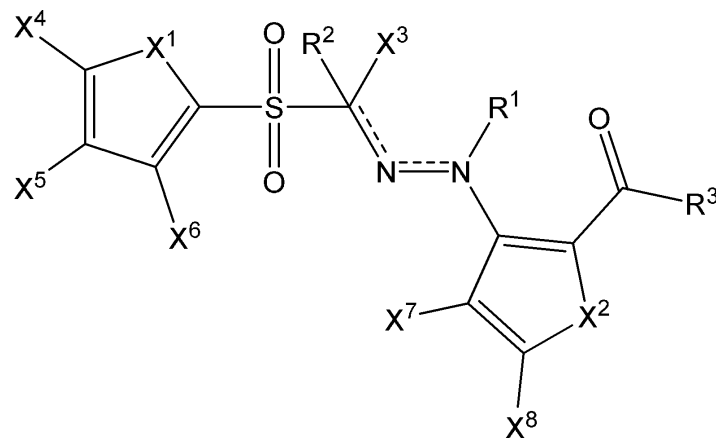
## 【 0 0 7 8 】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式 ( I ) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

20

## 【 0 0 7 9 】

## 【 化 1 3 】



(I)

30

## 【 0 0 8 0 】

式中、

X 1 及び X 2 は各々独立に S、O 又は N - R 4 であり、R 4 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択され、

40

X 3 は、C N、ハロゲン、ニトロ、C O - X 9 及び S O 2 X 9 からなる群から選択され、

X 9 は、O H、O - 及び N H 2 からなる群から選択され、

X 4、X 5、X 6、X 7 及び X 8 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、C N、ニトロ、C O - X 1 0 及び S O 2 X 1 0 からなる群から各々独立に選択され、X 1 0 は、O H、O - 及び N H 2 からなる群から選択され、

R 1 と R 2 の一方は存在せず、他方の R 1 及び R 2 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、C N、C O - X 1 1 及び S O 2 X 1 1 からなる群から選択され、X 1 1 は、O H、O - 及び N H 2 からなる群から選択され、

50

R<sup>3</sup> は、OR<sup>5</sup>、O- 及びNR<sup>6</sup>R<sup>7</sup> からなる群から選択され、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> 及びR<sup>7</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、点線の各々は独立に単結合又は二重結合である。

【0081】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (I) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及びR<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0082】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (I) の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及びR<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

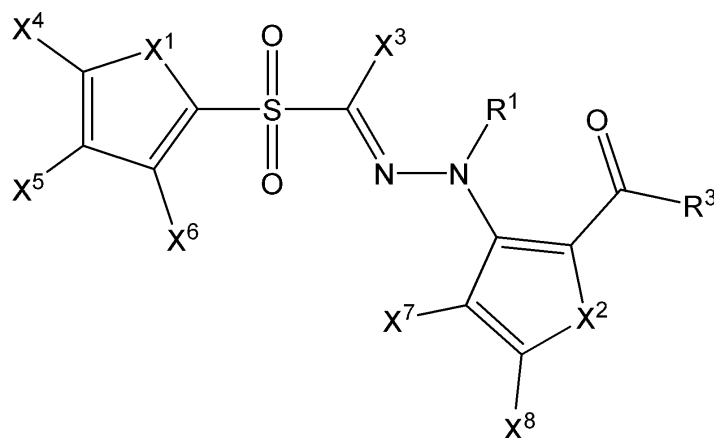
10

【0083】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、式 (Ia) の化合物又はその塩を含む。

【0084】

【化14】



20

(Ia)

30

【0085】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (Ia) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup> 及びR<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0086】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (Ia) の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、R<sup>1</sup> 及びR<sup>3</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

【0087】

40

一部の実施形態によれば、X<sup>1</sup> とX<sup>2</sup> は各々独立にS又はOである。一部の実施形態によれば、X<sup>1</sup> はS又はOである。一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> はS又はOである。一部の実施形態によれば、X<sup>1</sup> はSである。一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> はSである。一部の実施形態によれば、X<sup>1</sup> とX<sup>2</sup> はどちらもSである。

【0088】

一部の実施形態によれば、X<sup>3</sup> は、CN、ハロゲン及びニトロからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>3</sup> はCNである。

【0089】

一部の実施形態によれば、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup> 及びX<sup>8</sup> は、H、アルキル、ハロゲン、ヒドロキシ及びアルコキシからなる群から各々独立に選択される。一部の実施形態によ

50

れば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ は、各々独立にH又はハロゲンである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ はHである。一部の実施形態によれば、 $X^5$ はHである。一部の実施形態によれば、 $X^6$ はHである。一部の実施形態によれば、 $X^7$ はHである。一部の実施形態によれば、 $X^8$ はHである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ の少なくとも1つはHである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ の少なくとも2つはHである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ の少なくとも3つはHである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ の少なくとも4つはHである。一部の実施形態によれば、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 及び $X^8$ は、各々独立にHである。

【0090】

一部の実施形態によれば、 $R^1$ と $R^2$ の一方は存在せず、他方の $R^1$ 及び $R^2$ は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、 $CO-X^{11}$ 及び $SO_2X^{11}$ からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R^2$ は存在せず、 $R^1$ は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、 $CO-X^{11}$ 及び $SO_2X^{11}$ からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R^1$ はHである。

【0091】

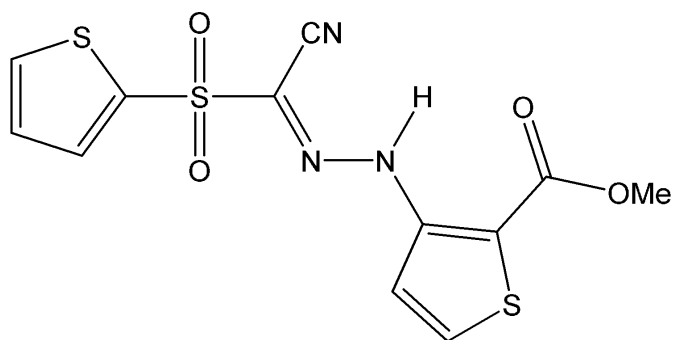
一部の実施形態によれば、 $R^3$ は、 $OR^5$ 及びO-からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R^3$ は $OR^5$ である。一部の実施形態によれば、 $R^5$ はアルキル鎖である。一部の実施形態によれば、 $R^5$ は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、ブチル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル及びイソブチルからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R^5$ はメチル又はエチルである。一部の実施形態によれば、 $R^5$ はメチルである。一部の実施形態によれば、 $R^3$ はOMe又はOEtである。一部の実施形態によれば、 $R^3$ はOMeである。

【0092】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM1を有する。

【0093】

【化15】



SM1

【0094】

一部の実施形態によれば、本発明は、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式(I X)の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

【0095】

10

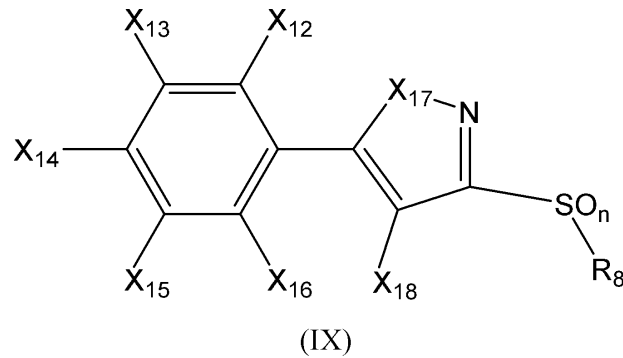
20

30

40

50

## 【化 1 6】



10

## 【0096】

式中、

X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO<sub>2</sub>、CO-X<sup>19</sup>及びSO<sub>2</sub>X<sup>19</sup>からなる群から各々独立に選択され、X<sup>19</sup>は、OH、O-及びNH<sub>2</sub>からなる群から選択され、

X<sup>14</sup>及びX<sup>18</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO<sub>2</sub>、CO-X<sup>20</sup>及びSO<sub>2</sub>X<sup>20</sup>からなる群から各々独立に選択され、X<sup>20</sup>は、OH、O-及びNH<sub>2</sub>からなる群から選

20

択され、  
X<sup>17</sup>はS、O又はN-R<sup>9</sup>であり、R<sup>9</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択され、

nは1又は2であり、

R<sup>8</sup>は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択される。

## 【0097】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式(I X)の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>14</sup>、X<sup>15</sup>、X<sup>16</sup>、X<sup>17</sup>、X<sup>18</sup>及びR<sup>8</sup>の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

30

## 【0098】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式(I X)の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>14</sup>、X<sup>15</sup>、X<sup>16</sup>、X<sup>17</sup>、X<sup>18</sup>及びR<sup>8</sup>の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

## 【0099】

一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシCN、及びNO<sub>2</sub>からなる群から各々独立に選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>は、H、アルキル、ハロゲン、ヒドロキシ及びアルコキシからなる群から各々独立に選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>は、各々独立にH又はハロゲンである。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>はHである。一部の実施形態によれば、X<sup>13</sup>はHである。一部の実施形態によれば、X<sup>15</sup>はHである。一部の実施形態によれば、X<sup>16</sup>はHである。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>の少なくとも1つはHである。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>の少なくとも2つはHである。一部の実施形態によれば、X<sup>12</sup>、X<sup>13</sup>、X<sup>15</sup>及びX<sup>16</sup>の少なくとも3つはHである。一部の実施形態によれば、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>及びX<sup>8</sup>は、各々独立にHである。

40

## 【0100】

一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>は、H、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、

50

CN及びNO<sub>2</sub>からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>は、NH<sub>2</sub>、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、CN及びNO<sub>2</sub>からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>は、ハロゲン及びヒドロキシからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>はハロゲンである。一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>は、F及びClからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>14</sup>はClである。

【0101】

一部の実施形態によれば、X<sup>18</sup>は、ハロゲン、CN、NO<sub>2</sub>、CO-X<sup>20</sup>及びSO<sub>2</sub>X<sup>20</sup>からなる群から選択され、X<sup>20</sup>は、OH、O<sup>-</sup>及びNH<sub>2</sub>からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>18</sup>はCNである。

【0102】

一部の実施形態によれば、nは2である。

【0103】

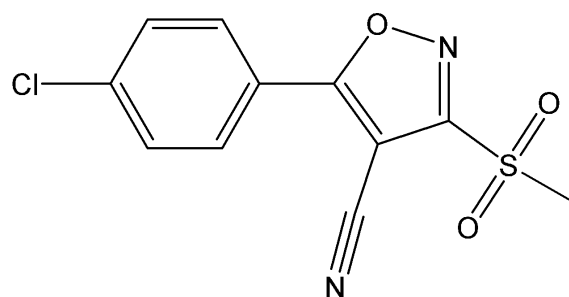
一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup>は、アルキル及びハロゲン化アルキルからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup>はアルキル基である。一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup>はC<sub>1</sub>~4アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup>は、Me、Et及びCF<sub>3</sub>からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、R<sup>8</sup>はMeである。

【0104】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM9を有する。

【0105】

【化17】



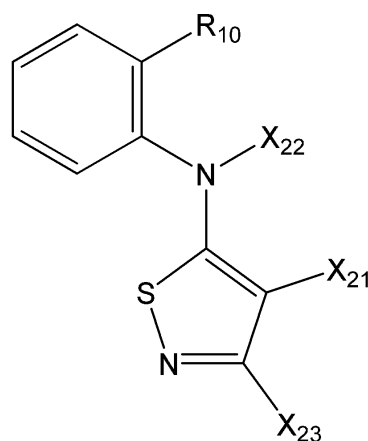
SM9

【0106】

一部の実施形態によれば、本発明は、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式(VI)の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

【0107】

【化18】



(VII)

【0108】

式中、

X<sup>2</sup> 1 及び R<sup>1</sup> 0 は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO<sub>2</sub>、CO - X<sup>2</sup> 3 及び SO<sub>2</sub> X<sup>2</sup> 3 からなる群から各々独立に選択され、X<sup>2</sup> 3 は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

X<sup>2</sup> 2 は、OR<sup>1</sup> 2、O - 及び NR<sup>1</sup> 3 R<sup>1</sup> 4 からなる群から選択され、R<sup>1</sup> 2、R<sup>1</sup> 3 及び R<sup>1</sup> 4 は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、

R<sup>1</sup> 1 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、CO - X<sup>2</sup> 4 及び SO<sub>2</sub> X<sup>2</sup> 4 からなる群から選択され、X<sup>2</sup> 4 は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択される。

10

【0109】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式(VII)の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>2</sup> 1、X<sup>2</sup> 2、R<sup>1</sup> 0 及び R<sup>1</sup> 1 の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0110】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式(VII)の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>2</sup> 1、X<sup>2</sup> 2、R<sup>1</sup> 0 及び R<sup>1</sup> 1 の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

【0111】

一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> 1 は、ハロゲン、CN、NO<sub>2</sub>、CO - X<sup>2</sup> 3 及び SO<sub>2</sub> X<sup>2</sup> 3 からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> 1 はCNである。

20

【0112】

一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> 2 はOR<sup>1</sup> 2である。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 2 はH又はアルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 2 はHである。一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup> 2 はOHである。

【0113】

一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 0 は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル及びハロゲンからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 0 はハロゲン化アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 0 はフッ化アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 0 はCF<sub>3</sub>である。

30

【0114】

一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 1 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、CO - X<sup>2</sup> 4 及び SO<sub>2</sub> X<sup>2</sup> 4 からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 1 はH又はCO - X<sup>2</sup> 4である。一部の実施形態によれば、R<sup>1</sup> 1 はHである。

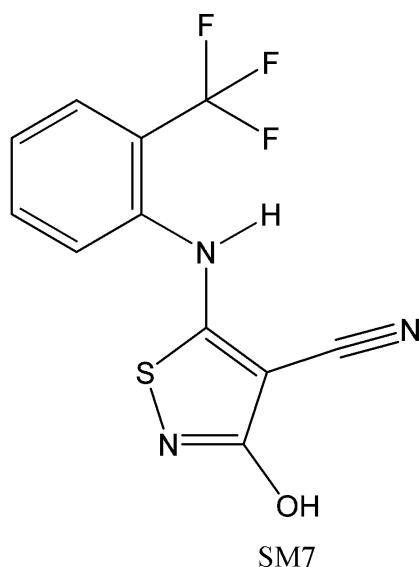
【0115】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM7を有する。

【0116】

40

【化 1 9】



10

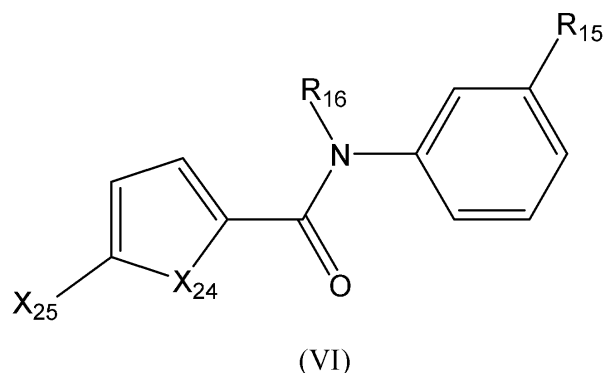
【 0 1 1 7】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式 ( V I ) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

【 0 1 1 8】

20

【化 2 0】



30

【 0 1 1 9】

式中、

X 2 4 は O 又は S である。

【 0 1 2 0】

R 1 5 及び X 2 5 は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN、NO<sub>2</sub>、CO - X 2 6 及び SO<sub>2</sub> X 2 6 からなる群から各々独立に選択され、X 2 6 は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R 1 6 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、CO - X 2 4 及び SO<sub>2</sub> X 2 4 からなる群から選択され、X 2 4 は、OH、O - 及び NH<sub>2</sub> からなる群から選択される。

40

【 0 1 2 1】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 ( V I ) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X 2 4、X 2 5、R 1 5 及び R 1 6 の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【 0 1 2 2】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 ( V I ) の化合物又はその塩の使用であって、X 2 4、X 2 5、R 1 5 及び R 1 6 の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

50



## 【 0 1 2 3 】

一部の実施形態によれば、 $X_{24}$  は O である。

## 【 0 1 2 4 】

一部の実施形態によれば、 $X_{25}$  は、アミン、ハロゲン、CN、 $NO_2$ 、 $CO - X_{26}$  及び  $SO_2 X_{26}$  からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $X_{25}$  は窒素原子を含む。一部の実施形態によれば、 $X_{25}$  は  $NO_2$  である。

## 【 0 1 2 5 】

一部の実施形態によれば、 $R_{15}$  は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル及びハロゲンからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R_{15}$  はハロゲン化アルキルである。一部の実施形態によれば、 $R_{15}$  はフッ化アルキルである。一部の実施形態によれば、 $R_{15}$  は  $CF_3$  である。

10

## 【 0 1 2 6 】

一部の実施形態によれば、 $R_{16}$  は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヘテロアリール、CN、 $CO - X_{24}$  及び  $SO_2 X_{24}$  からなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R_{16}$  は H 又は  $CO - X_{24}$  である。一部の実施形態によれば、 $R_{16}$  は H である。

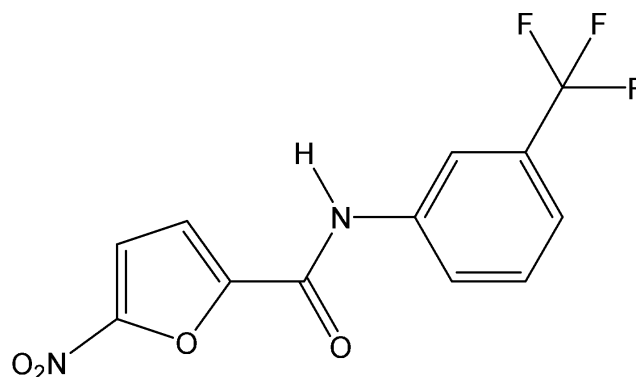
## 【 0 1 2 7 】

一部の実施形態によれば、化合物は式 SM 6 を有する。

## 【 0 1 2 8 】

## 【 化 2 1 】

20



SM6

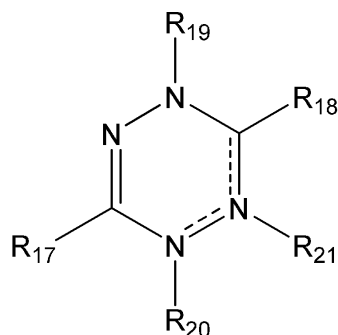
30

## 【 0 1 2 9 】

一部の実施形態によれば、本発明は、神経炎症性疾患の処置に使用される、一般式 (II) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 1 3 0 】

## 【 化 2 2 】



(II)

40

## 【 0 1 3 1 】

式中、

50

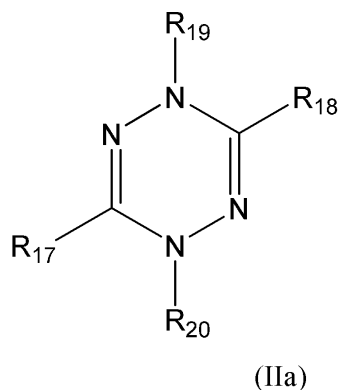
R<sup>17</sup> 及び R<sup>18</sup> は各々独立に、任意に置換されているフェニル環であり、  
 R<sup>19</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択され、  
 R<sup>20</sup> と R<sup>21</sup> の一方は存在せず、他方の R<sup>20</sup> 又は R<sup>21</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択され、  
 点線の各々は独立に単結合又は二重結合である。

【0132】

一部の実施形態によれば、化合物は一般式 (IIa) を有する。

【0133】

【化23】



【0134】

式中、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup> 及び R<sup>20</sup> の各々は本明細書に記載の通りである。

【0135】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (II) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup> 及び R<sup>20</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0136】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (II) の化合物又はその塩の使用であって、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup> 及び R<sup>20</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

【0137】

一部の実施形態によれば、R<sup>17</sup> は C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> である。一部の実施形態によれば、R<sup>18</sup> は C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> である。一部の実施形態によれば、R<sup>17</sup> と R<sup>18</sup> はどちらも C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> である。

【0138】

一部の実施形態によれば、R<sup>19</sup> は H である。

【0139】

一部の実施形態によれば、R<sup>20</sup> は H である。

【0140】

一部の実施形態によれば、R<sup>21</sup> は存在しない。

【0141】

一部の実施形態によれば、化合物は式 SM2 を有する。

【0142】

10

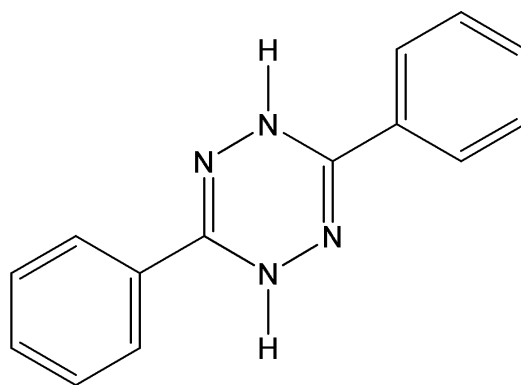
20

30

40

50

【化 2 4】



SM2

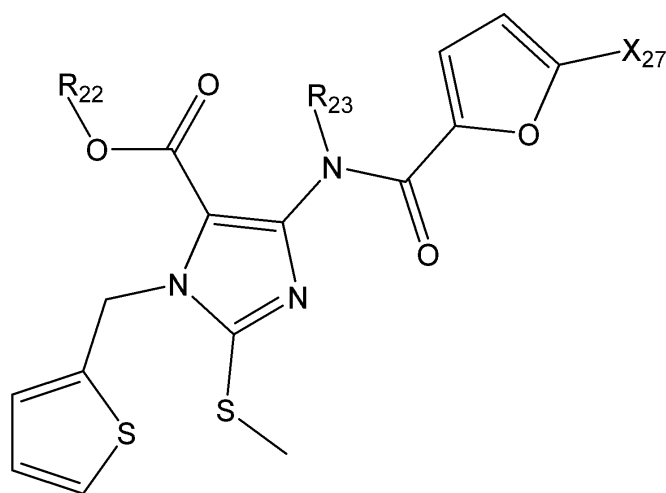
10

【0 1 4 3】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式 ( I I I ) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

【0 1 4 4】

【化 2 5】



(III)

20

30

【0 1 4 5】

式中、

R<sup>22</sup> 及び R<sup>23</sup> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、

X<sup>27</sup> は、ハロゲン化アルキル、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、CN及びNO<sub>2</sub>からなる群から選択される。

【0 1 4 6】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 ( I I I ) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>27</sup>、R<sup>22</sup> 及び R<sup>23</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0 1 4 7】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 ( I I I ) の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>27</sup>、R<sup>22</sup> 及び R<sup>23</sup> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

【0 1 4 8】

一部の実施形態によれば、X<sup>27</sup> は窒素原子を含む。一部の実施形態によれば、X<sup>27</sup> はNO<sub>2</sub>である。

40

50

## 【 0 1 4 9 】

一部の実施形態によれば、 $R^{22}$  はアルキル鎖である。一部の実施形態によれば、 $R^{22}$  は、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、ブチル、 $n$ -ブチル、 $sec$ -ブチル及びイソブチルからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、 $R^{22}$  はメチル又はエチルである。一部の実施形態によれば、 $R^{22}$  はエチルである。

## 【 0 1 5 0 】

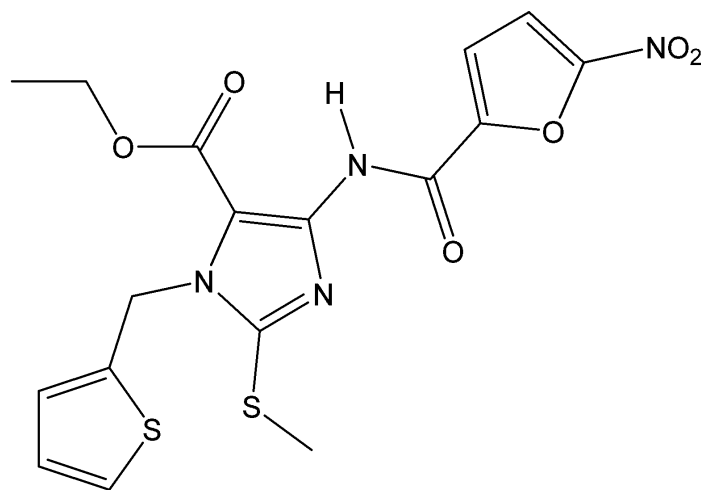
一部の実施形態によれば、 $R^{23}$  はHである。

## 【 0 1 5 1 】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM3を有する。

## 【 0 1 5 2 】

## 【 化 2 6 】



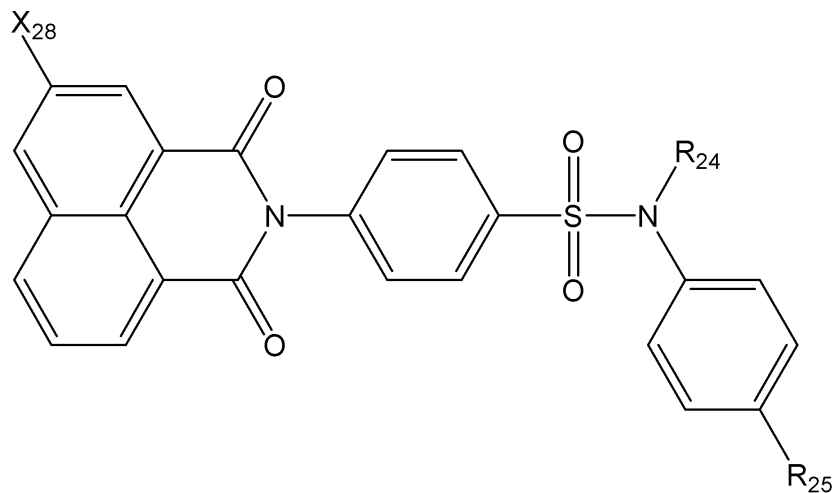
SM3

## 【 0 1 5 3 】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式(IV)の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 1 5 4 】

## 【 化 2 7 】



(IV)

## 【 0 1 5 5 】

式中、

$X_{28}$  は、ハロゲン化アルキル、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、CN及びNO<sub>2</sub>からなる群から選択される。

## 【 0 1 5 6 】

R<sup>2</sup><sub>4</sub> は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択され、  
R<sup>2</sup><sub>5</sub> は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル、アリール、アミン、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、ヘテロアリール、CN及びNO<sub>2</sub>からなる群から選択される。

## 【 0 1 5 7 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (I V) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>2</sup><sub>8</sub>、R<sup>2</sup><sub>4</sub> 及び R<sup>2</sup><sub>5</sub> の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

## 【 0 1 5 8 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (I V) の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>2</sup><sub>8</sub>、R<sup>2</sup><sub>4</sub> 及び R<sup>2</sup><sub>5</sub> の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

## 【 0 1 5 9 】

一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup><sub>8</sub> は窒素原子を含む。一部の実施形態によれば、X<sup>2</sup><sub>8</sub> はNO<sub>2</sub>である。

## 【 0 1 6 0 】

一部の実施形態によれば、R<sup>2</sup><sub>4</sub> はHである。

## 【 0 1 6 1 】

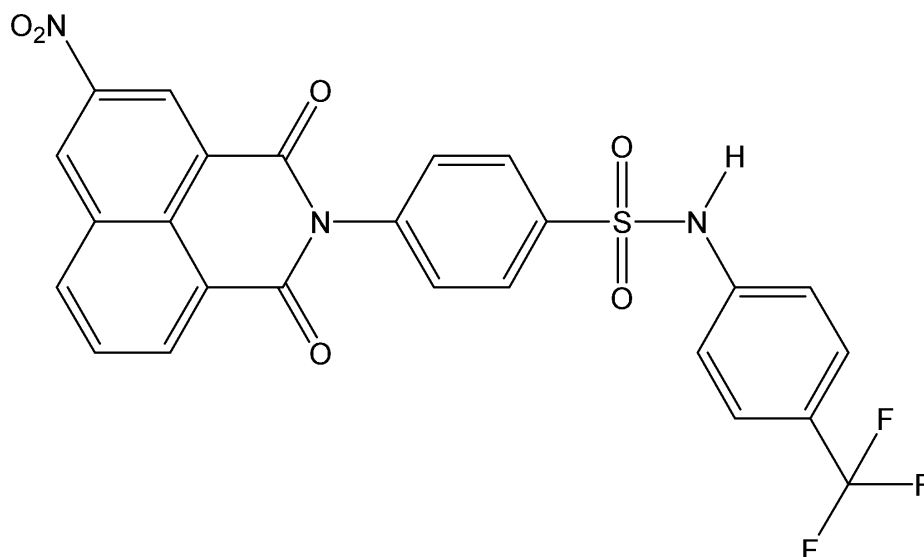
一部の実施形態によれば、R<sup>2</sup><sub>5</sub> は、アルキル、ハロゲン化アルキル、シクロアルキル及びハロゲンからなる群から選択される。一部の実施形態によれば、R<sup>2</sup><sub>5</sub> はハロゲン化アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>2</sup><sub>5</sub> はフッ化アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>2</sup><sub>5</sub> はCF<sub>3</sub>である。

## 【 0 1 6 2 】

一部の実施形態によれば、化合物は式 S M 4 を有する。

## 【 0 1 6 3 】

## 【 化 2 8 】



SM4

## 【 0 1 6 4 】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式 (V) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 1 6 5 】

10

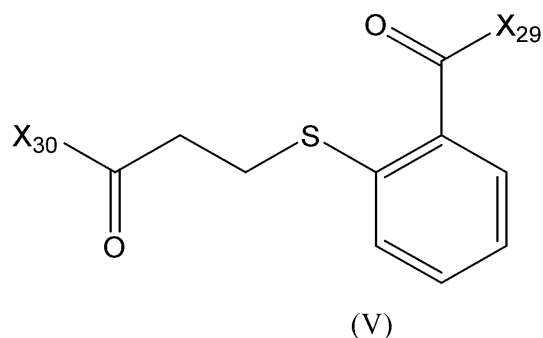
20

30

40

50

## 【化 2 9】



10

## 【0166】

式中、

X<sup>29</sup>は、OR<sup>26</sup>、O-及びNR<sup>27</sup>R<sup>28</sup>からなる群から選択され、R<sup>26</sup>、R<sup>27</sup>及びR<sup>28</sup>は、H、COR<sup>29</sup>、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、R<sup>29</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択され、

X<sup>30</sup>は、OR<sup>30</sup>、O-及びNR<sup>31</sup>R<sup>32</sup>からなる群から選択され、R<sup>30</sup>、R<sup>31</sup>及びR<sup>32</sup>は、H、COR<sup>33</sup>、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択され、R<sup>33</sup>は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から選択される。

20

## 【0167】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式(V)の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X<sup>29</sup>及びX<sup>30</sup>の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

## 【0168】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式(V)の化合物又はその塩の使用であって、X<sup>29</sup>及びX<sup>30</sup>の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

## 【0169】

一部の実施形態によれば、X<sup>29</sup>はNR<sup>27</sup>R<sup>28</sup>である。一部の実施形態によれば、R<sup>27</sup>はHである。一部の実施形態によれば、R<sup>28</sup>はCOR<sup>29</sup>である。一部の実施形態によれば、R<sup>29</sup>はアルキル基である。一部の実施形態によれば、R<sup>29</sup>はC<sub>1</sub>~4アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>29</sup>はメチルである。一部の実施形態によれば、X<sup>29</sup>はNHAcである。

30

## 【0170】

一部の実施形態によれば、X<sup>30</sup>はNR<sup>31</sup>R<sup>32</sup>である。一部の実施形態によれば、R<sup>31</sup>はHである。一部の実施形態によれば、R<sup>32</sup>はCOR<sup>33</sup>である。一部の実施形態によれば、R<sup>33</sup>はアルキル基である。一部の実施形態によれば、R<sup>33</sup>はC<sub>1</sub>~4アルキルである。一部の実施形態によれば、R<sup>33</sup>はメチルである。一部の実施形態によれば、X<sup>33</sup>はNHAcである。

40

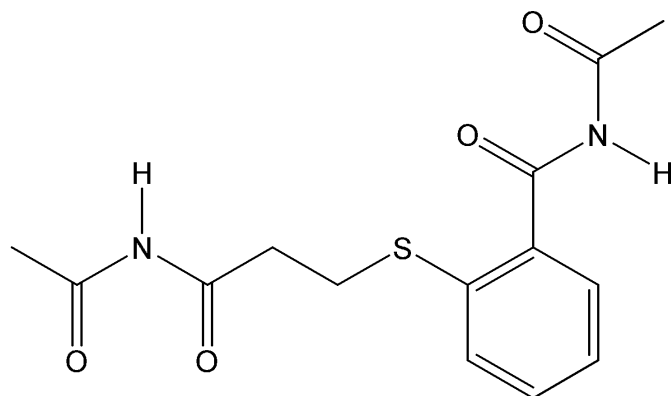
## 【0171】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM5を有する。

## 【0172】

50

【化 3 0】



SM5

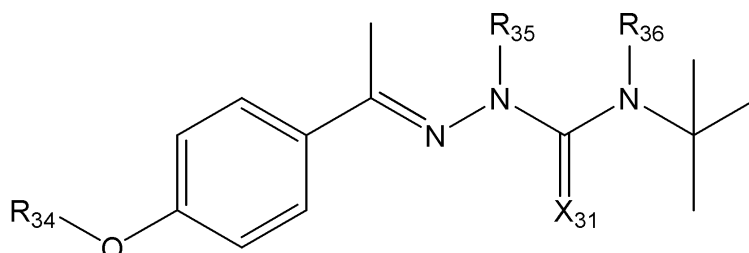
10

【0 1 7 3】

一部の実施形態によれば、本発明は、一般式 (V I I I) の化合物又はその塩を含む医薬組成物を提供する。

【0 1 7 4】

【化 3 1】



(VIII)

20

【0 1 7 5】

式中、

X 3 1 は、S 及び O から選択され、

R 3 4 は、ハロゲン化アリール及びハロゲン化ヘテロアリールから選択され、

R 3 5 及び R 3 6 は、H、アルキル、シクロアルキル及びアリールからなる群から各々独立に選択される。

【0 1 7 6】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に治療有効量の一般式 (V I I I) の化合物又はその塩を投与するステップを含み、X 3 1、R 3 4、R 3 5 及び R 3 6 の各々が本明細書に記載の通りである、方法が提供される。

【0 1 7 7】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患に罹患した対象の処置のための一般式 (V I I I) の化合物又はその塩の使用であって、X 3 1、R 3 4、R 3 5 及び R 3 6 の各々が本明細書に記載の通りである、使用が提供される。

【0 1 7 8】

一部の実施形態によれば、X 3 1 は S である。

【0 1 7 9】

一部の実施形態によれば、R 3 4 はハロゲン化ヘテロアリールである。一部の実施形態によれば、R 3 4 は、少なくとも 2 個のハロゲン原子を含む。一部の実施形態によれば、R 3 4 は、2 個のハロゲン原子を含む。一部の実施形態によれば、ハロゲン原子は塩素原子である。一部の実施形態によれば、R 3 4 はハロゲン化ピリジンである。一部の実施形態によれば、R 3 4 は以下である。

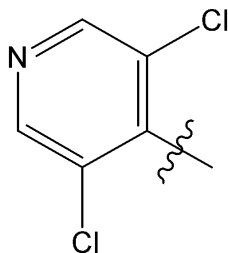
30

40

50

【 0 1 8 0 】

【 化 3 2 】



【 0 1 8 1 】

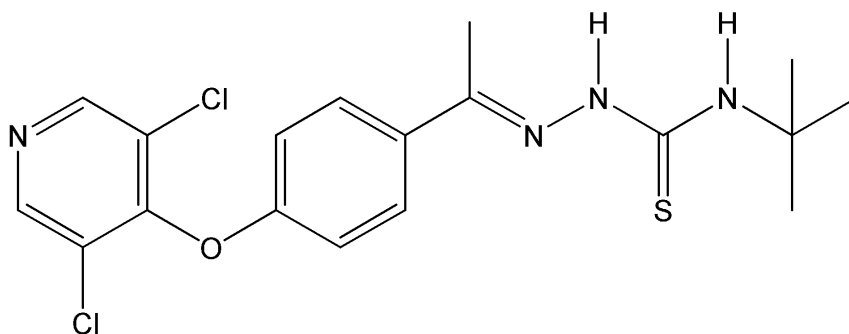
一部の実施形態によれば、R<sup>35</sup>はHである。一部の実施形態によれば、R<sup>36</sup>はHである。一部の実施形態によれば、R<sup>35</sup>とR<sup>36</sup>はどちらもHである。

【 0 1 8 2 】

一部の実施形態によれば、化合物は式SM8を有する。

【 0 1 8 3 】

【 化 3 3 】



SM8

【 0 1 8 4 】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、神経炎症性疾患の処置に使用される。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、追加の治療薬を更に含む。

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態によれば、神経炎症性疾患は多発性硬化症である。

【 0 1 8 7 】

一部の実施形態によれば、多発性硬化症は再発寛解型多発性硬化症である。

【 0 1 8 8 】

一部の実施形態によれば、方法は、前記対象への追加の治療薬の投与を更に含む。

【 0 1 8 9 】

一部の実施形態によれば、追加の治療薬は、少なくとも1種の化合物又は前記少なくとも1種の化合物を含む医薬組成物の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与される。

【 0 1 9 0 】

本発明に従って利用される化合物においては、

本明細書では「小分子」と「小有機分子」という用語は、互換性があり、分子量2000g/mol以下の有機分子を指す。一部の実施形態によれば、小分子の分子量は1000g/mol以下である。一部の実施形態によれば、小分子の分子量は750g/mol以下である。一部の実施形態によれば、小分子の分子量は500g/mol以下である。

【 0 1 9 1 】

本明細書では「カルボシクリル」という用語は、複数の炭素原子とN、S及びOから選択される1個以上のヘテロ原子とを含む環構造を指す。カルボシクリルは、単一の環構造を含む5若しくは6員環、又は2個以上の環を含む環構造とすることができ、前記2個以上

10

20

30

40

50



の環の各々は5又は6員環とすることができる。環構造中の2個以上の環は、互いに縮合することができ、又は共有結合を介して互いに連結することができる。

#### 【0192】

「アルキル」、「アルケニル」及び「アルキニル」炭素鎖という用語（単数又は複数）は、指定しない場合、各々1～20個の炭素又は1若しくは2～16個の炭素を含む炭素鎖を指し、直鎖又は分岐鎖である。こうした各基は置換されていてもよい。一部の実施形態においては、炭素鎖は、1～10個の炭素原子を含む。一部の実施形態においては、炭素鎖は、1～6個の炭素原子を含む。一部の実施形態においては、炭素鎖は、2～6個の炭素原子を含む。一部の実施形態においては、アルキルはハロゲン化アルキルである。ハロゲン化アルキルという用語は、トリフルオロメチルなど、ただしそれに限定されない少なくとも1個のハロゲン原子に共有結合した任意のアルキル鎖を指す。アルケニル炭素鎖は、2～20個の炭素、又は2～18個の炭素、又は2～16個の炭素、又は2～14個の炭素、又は2～12個の炭素、又は2～10個の炭素、又は2～8個の炭素、又は2～6個の炭素、又は2～4個の炭素を含むことができる。アルケニル炭素鎖は、同様に、1～8個の二重結合、又は1～7個の二重結合、又は1～6個の二重結合、又は1～5個の二重結合、又は1～4個の二重結合、又は1～3個の二重結合、又は1個の二重結合、又は2個の二重結合を含むことができる。2～20個の炭素、又は2～18個の炭素、又は2～16個の炭素、又は2～14個の炭素、又は2～12、又は炭素2～10個の炭素、又は2～8個の炭素、又は2～6個の炭素、又は2～4個の炭素のアルキニル炭素鎖。アルキニル炭素鎖は、同様に、1～8個の三重結合、又は1～7個の三重結合、又は1～6個の三重結合、又は1～5個の三重結合、又は1～4個の三重結合、又は1～3個の三重結合、又は1個の三重結合、又は2個の三重結合を含むことができる。例示的なアルキル、アルケニル及びアルキニル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、イソヘキシル、アリル（プロペニル）及びプロパルギル（プロピニル）が挙げられるが、それらに限定されない。「ハロゲン化アルキル」という用語は、それに共有結合した少なくとも1個のハロゲンを有するアルキル基を指す。例示的なハロゲン化アルキル基としては、トリフルオロメチル、クロロメチルなどが挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0193】

「-C<sub>1</sub>～C<sub>5</sub>-アルキレン-」と命名された基は、1～5個の炭素原子を有するアルキレンである。一部の実施形態においては、該基は、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン及びペンチレンから選択され、又はイソプロピレンなどの～5個の炭素原子を有する任意の他のアルキル及び他のものである。該基は置換されていてもよい。

#### 【0194】

「-C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>-アルケニレン-」と命名された基は、少なくとも2個の炭素原子と1個以上のC=C結合（二重結合）とを含む炭素基である。該基は置換されていてもよい。

#### 【0195】

「シクロアルキル」とは、ある実施形態においては3～10個の炭素原子、別の実施形態においては3～6個の炭素原子の飽和単環又は多環式環系を指し、シクロアルケニル及びシクロアルキニルとは、それぞれ少なくとも1個の二重結合及び少なくとも1個の三重結合を含む単環又は多環式環系を指す。シクロアルケニル及びシクロアルキニル基は、一部の実施形態においては3～10個の炭素原子、更なる実施形態においては4～7個の炭素原子を含むことができ、シクロアルキニル基は、更なる実施形態においては8～10個の炭素原子を含むことができる。シクロアルキル、シクロアルケニル及びシクロアルキニル基の環系は、1個の環で構成され得、又は縮合、架橋若しくはスピロ結合様式で連結され得る2個以上の環で構成され得る。

#### 【0196】

「アリール」とは、6～10個の炭素原子を含む芳香族単環式又は多環式基を指す。アリール基としては、非置換又は置換フルオレニル、非置換又は置換フェニル、非置換又は置換ナフチルなどの基が挙げられるが、それらに限定されない。「-C<sub>6</sub>-アリーレン-」

10

20

30

40

50

基は、フェニル又はフェニル置換基である。

【 0 1 9 7 】

「ヘテロアリール」とは、環系中の 1 個以上、一部の実施形態においては 1 ~ 3 個の原子がヘテロ原子、すなわち、例えば、窒素、酸素又は硫黄を含めた炭素以外の元素である、ある実施形態においては約 5 ~ 約 15 員の、単環式又は多環式芳香環系を指す。ヘテロアリール基は、任意にベンゼン環と縮合している。ヘテロアリール基としては、フリル、イミダゾリル、ピリミジニル、テトラゾリル、チエニル、ピリジル、ピロリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、キノリニル及びイソキノリニルが挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 1 9 8 】

「ヘテロシクリル」とは、環系中の 1 個以上、ある実施形態においては 1 ~ 3 個の原子がヘテロ原子、すなわち、窒素、酸素又は硫黄を含めて、ただしそれらに限定されない炭素以外の元素である、一実施形態においては 3 ~ 10 員、別の一実施形態においては 4 ~ 7 員、更なる一実施形態においては 5 ~ 6 員の、飽和単環式又は多環式環系を指す。ヘテロ原子（単数又は複数）が窒素である実施形態においては、窒素は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、ヘテロアラルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリルアルキル、アシル、グアニジンで任意に置換されており、又は窒素は四級化されて、置換基が上記のように選択されたアンモニウム基を形成することができる。

【 0 1 9 9 】

「ハライド」、「ハロゲン」及び「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を表す。

【 0 2 0 0 】

「アルコキシ」という用語は、- O - アルキルを指す。したがって、アルコキシ基は、酸素に単結合したアルキル（炭素及び水素鎖）基である。非限定的例としては、メトキシ（OMe）及びエトキシ（OEt）が挙げられる。

【 0 2 0 1 】

基「- O -」及び「O -」とは、負に帯電した酸素原子を指す。負に帯電した酸素原子は、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$ を含めて、ただしそれらに限定されない金属カチオン、 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ 、 $\text{R}'''$ 及び $\text{R}''''$ が各々独立に水素原子又はアルキル基であり得る $\text{NR}'\text{R}''\text{R}'''\text{R}''''$ な $\text{R}'\text{R}''\text{R}'''$ の有機カチオンなどのカチオンと結合していることを理解されたい。

【 0 2 0 2 】

「アミン」という用語は、-  $\text{NR}'\text{R}_2$ 基を指す。「-  $\text{NR}'\text{R}''$ 」基とは及び $\text{RR}_2$ が、各々本明細書に定義される又は当該技術分野で既知の水素、アルキル、アルケニル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、エステル及びカルボニルから独立に選択される、アミン基を指す。

【 0 2 0 3 】

本明細書では「塩」又は「その塩」という用語は、本明細書に開示される化合物の薬学的に許容される塩を指す。非限定的例としては、酸付加カチオン塩及びアニオン塩が挙げられる。「酸付加カチオン塩」は、一般に、塩基性原子を有する化合物が酸性環境に曝露されたときに形成される。これらには、非限定的例として、窒素含有化合物のプロトン化によって形成されるものなどのアンモニウムイオンが含まれる。「アニオン塩」は、一般に、水素原子を有する化合物が塩基性環境に曝露されたときに形成される。これらには、非限定的例として、カルボン酸の脱プロトン化又はエステルの鹸化によって形成され得るカルボキシレート、及び脱プロトン化窒素原子を有する化合物が含まれる。

【 0 2 0 4 】

可能な置換に関して、「任意に置換されている」又は他に「置換された」と列挙された任意の 1 つの基は、その原子のいずれかの上の本来の原子又は基（水素原子など）を置換する 1 個以上の原子又は原子群を有すると言える。一部の実施形態においては、置換基は、

10

20

40

50

アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ハロゲン、アルキレン - C O O H、エステル、 - O H、 - S H 及び - N H から選択される。一部の実施形態においては、あるリガンド上の置換基の数は、0 又は 1 又は 2 又は 3 又は 4 又は 5 又は 6 又は 7 又は 8 又は 9 又は 20 個の置換基である。

【0205】

本発明は、本明細書で S M 1、S M 6、S M 7 又は S M 9 と命名された化合物のいずれかの使用を更に提供する。

【0206】

本発明は、式 ( I ) の少なくとも 1 種の化合物、例えば、本明細書で「S M 1」又は「S M 9」と命名された化合物と、場合によっては、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤とを含む組成物、例えば、医薬組成物を更に提供する。

10

【0207】

別の一態様によって、本発明は、神経炎症性障害、例えば、多発性硬化症、神経毒性又は脳損傷の処置に使用される、「S M 1」、「S M 6」、「S M 7」又は「S M 9」と命名された少なくとも 1 種の化合物と、場合によっては、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。

【0208】

本発明は、本明細書で列挙された化合物のいずれかの鏡像異性体、立体異性体又は任意の他の異性体も包含する。

20

【0209】

本発明の化合物又はそれらの鏡像異性体、立体異性体若しくは異性体のいずれかの治療効果を、インビトロで又は動物モデル、例えば、E A E 動物モデルで試験することができる。

【0210】

これらの化合物のすべてを商業供給源、例えば、Thermo Fisher Scientific Inc. から入手することができる。

【0211】

本発明の化合物は、プロドラッグとして改変及び投与することができる。

【0212】

本明細書では「医薬組成物」という用語は、本明細書に記載の少なくとも 1 種の有機小分子の調製物を指す。さらに、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含む。

30

【0213】

「薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤」という用語は、任意の及びすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤などを含み、生物を著しく刺激せず、投与された小有機化合物の生物活性及び性質を阻害しない、担体又は希釈剤を指す。アジュバントはこの用語に含まれる。ここでは「賦形剤」という用語は、医薬組成物に添加して、活性成分の投与を更に容易にする不活性物質を指す。

【0214】

賦形剤又は無毒担体の限定されない例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及び種々のデンプン、グルコース、スクロース、ナトリウムサッカリン、マンニトール、ラクトース、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ステアリン酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、タルカム、ポリアルキレングリコール及びポリエチレングリコールが挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0215】

本発明に係る医薬組成物は、当該技術分野で周知のプロセスによって、1 種以上の薬学的に許容される担体を用いて、例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、乳化、カプセル化、封入又は凍結乾燥プロセスによって、製造することができる。適切な処方、選択される投与経路に依存する。医薬組成物は、固体剤形、例えば、散剤、丸剤、錠剤などとして、又は溶液剤、乳濁液剤、懸濁液剤、エアロゾル剤、シロップ剤若しくはエリキシル剤として

50

、製造することができる。

【0216】

本明細書に定義される「処置」又は「処置方法」という用語は、治療対象における疾患の自然経過を変える試みにおける臨床介入を指し、予防によって、又は臨床病理の過程において、行うことができる。処置の望ましい効果としては、疾患の発生又は再発の防止、症候の緩和、軽減又は解消、疾患進行速度の減少、疾患重症度又は状態の改善又は緩和、予後の改善、疾患の症候の発生の遅延、再発の遅延、並びに神経形成及び髄鞘形成の誘導が挙げられる。

【0217】

一部の実施形態においては、MSに罹患した対象に対する本発明に係る処置の効果は、障害レベルを表す0.5単位刻みの0～10の範囲の尺度である「総合障害度評価尺度」(EDSS: Expanded Disability Status Scale)によってモニターすることができる。スコアリングは、神経科医による検査に基づく。EDSSステップ1.0～4.5は、補助なしで歩くことができるMSの人を指し、以下の8つの機能系(FS: functional system)における障害の程度に基づく: 錐体、小脳、脳幹、感覚、腸&膀胱、視覚、大脳及びその他(歩行運動)[15]。各機能系は、0(正常)～5又は6(最大障害)の尺度でスコア化される。EDSSステップ5.0～9.5は、歩行障害によって定義される。

10

【0218】

「神経炎症性障害」、「神経炎症性疾患」又は「神経炎症性症状」という用語は、本明細書では区別なく使用され、免疫応答が神経系の成分を損なう状態を指す。一般例は、中枢神経系の炎症性脱髄並びにそれに続く神経細胞及び軸索の損傷を特徴とする多発性硬化症(MS)及び視神経脊髄炎(NMO)である。炎症性機序は、血管炎、サルコイドーシス、ベーチェット病などの中枢神経系が関与する全身性炎症性症状、並びに神経変性、精神障害、神経毒性状態、卒中及び脳傷害を含めて、多数の他のCNS障害の病態形成にも関係している。

20

【0219】

本明細書に定義される「神経変性疾患、症状又は障害」という用語は、脳又は脊髄におけるニューロン死を含めて、ニューロンの構造又は機能の進行性喪失である。神経変性は、ウイルス性傷害後に認められ、大部分は、高齢者に一般に認められるアルツハイマー病(AD: Alzheimer's disease)、パーキンソン病(PD: Parkinson's disease)、筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis、ルーゲーリッグ病とも称する)などの種々のいわゆる「神経変性疾患」において認められる。

30

【0220】

幾つかの特定の実施形態においては、本発明に係る医薬組成物は、「脱髄疾患」の処置用である。本明細書に定義される「脱髄疾患」という用語は、ニューロンの髄鞘が損傷を受け、又は除去されて、神経細胞の機能が阻害される、任意の神経系疾患である。

【0221】

一部の実施形態においては、本発明に係る神経変性疾患は多発性硬化症である。更なる特定の実施形態においては、本発明に係る医薬組成物は、多発性硬化症の処置用である。

40

【0222】

本明細書に定義される「多発性硬化症」(MS)という用語は、ミエリン、乏突起膠細胞及び軸索を破壊する中枢神経系の慢性炎症性神経変性疾患である。MSは、若年成人で最も一般的な神経疾患であり、一般に20～40歳で出現する。MSの症候は、片目の視力喪失、複視などの視覚障害の出現から筋力低下疲労、疼痛、知覚麻痺、凝り及び不安定、運動失調、並びに振戦、めまい、不明瞭発語、嚥下困難、情緒障害などの他の症候まで様々である。疾患の進行とともに、患者は、その歩行運動能力を失い、認知機能低下、毎日の活動の自己管理の喪失に遭遇し、重度の障害及び依存になる可能性がある。

【0223】

50

免疫系の要素が脳の細胞（グリア及び／又はニューロン）を攻撃し、軸索の保護髄鞘を損なうので、MS症候が発生する。これらの攻撃が起こる領域は、脳を介したメッセージの伝達を混乱させる病変部と称される。

【0224】

多発性硬化症は、疾患進行を特徴とする4つのタイプに分類される：（1）再発（症状再燃の発作）とそれに続く寛解（安定化及び可能な回復の期間、一部の寛解では完全な回復、別の寛解では部分的回復又は回復せず）を特徴とする、再発寛解型MS（RRMS）。RRMSの症候は軽度から重度まで様々であり、再発は数日又は数か月持続し得る。MSを有する人の80パーセント超が再発寛解型サイクルで始まる。（2）二次性進行型MS（SPMS：Secondary-progressive MS）は、再発寛解型MSを有する人において発生する。SPMSにおいては、再発が起こり得るが、有意義な期間の寛解（安定化）がなく、障害が次第に悪化する。（3）その発生から徐々に着実に進行し、MS症例の20パーセント未満を占める、原発性進行性MS（PPMS）。寛解期間がなく、症候は一般に強度が低下しない。（4）進行性再発性MS（PRMS：Progressive-relapsing MS）。このタイプのMSにおいては、人々は、着実に悪化する症候と寛解期間の発作の両方を経験する。

10

【0225】

現在、多発性硬化症は治癒しない。処置は、通常、MS発作を処置する戦略、症候を管理する戦略、及び疾患の進行を遅らせる戦略に焦点が置かれる。MSの処置に使用される公知の薬剤としては、再発中に急増する炎症を抑制するのに主に使用されるコルチコステロイド、多発性硬化症の進行を遅らせ、発作の数を減少させ、発作の重症度を低下させるベータインターフェロン、MS発作の数を減少させるグラチラマー酢酸塩（Copaxone（登録商標））、フィンゴリモド（Gilenya（登録商標））、ナタリズマブ（Tyssabri（登録商標））、及び当該技術分野で既知の他の薬剤が挙げられる。再発率を低下させ、障害進行に穏やかに影響する新しい療法としては、フマル酸ジメチル（BG-12、Tecfidera（登録商標））、テリフルノミド（Aubagio（登録商標））、アレムツズマブ（Campath（登録商標）1-H、Lemtrada（登録商標））及びオクレリズマブ（Ocrevus（商標））が挙げられる。

20

【0226】

多発性硬化症の診断は、当該技術分野で既知の任意の方法によって行うことができ、CSFオリゴクローナルバンド形成を含めた脳脊髄液試験のための腰椎穿刺（脊椎穿刺）、脳のMRIスキャン、脊椎（脊髄）のMRIスキャン、及びニューロン経路機能検査（誘発電位試験）を含む。

30

【0227】

下記実施例（例えば、実施例2及び3）に示すように、本発明の小有機化合物SM1、SM7及びSM9の腹腔内投与は、多発性硬化症（MS）を模倣した確立されたモデルである再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎（RR-EAE）動物モデルにおける臨床症状を改善した。

【0228】

本明細書に定義される「実験的自己免疫性脳脊髄炎」（EAE、又は実験的アレルギー性脳脊髄炎（Experimental Allergic Encephalomyelitis））という用語は、一般に、多発性硬化症（MS）及び急性散在性脳脊髄炎（ADEM）を含めて、ただしそれらに限定されない、ヒトCNS脱髄疾患の動物モデルとして広く受け入れられた中枢神経系（CNS：central nervous system）の誘導炎症性脱髄疾患を指す。

40

【0229】

EAEは、マウス、ラット、モルモット、ウサギ及び霊長類を含めた多数の種において誘導することができる。疾患誘導は、通常、動物を種々の抗原に曝露することによって行われる。最も一般に使用される抗原は、脊髄ホモジネート（SCH：spinal cord homogenate）、精製ミエリン、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、ミエリ

50

ンプロテオリピドタンパク質（PLP又はリポフィリン）、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG：myelin oligodendrocyte glycoprotein）などのミエリンタンパク質、又はこれらのタンパク質のペプチドであり、すべてが免疫学と病理学の両方に関して異なる疾患特性を有する異なるモデルをもたらす。

【0230】

使用される抗原及び動物の遺伝子構成に応じて、齧歯動物は、単相性のEAE、再発寛解型又は慢性EAEを示し得る。典型的な感受性の齧歯動物は、免疫処置の約2週間後に臨床症状が出現し、再発寛解型疾患の症候を示す。

【0231】

多発性硬化症のモデリングは、SJL/Jマウスを用いて行うことができる。このEAEモデルは、8週齢SJL/J雌性マウスにおいて（百日咳毒素と一緒に）プロテオリピドタンパク質（PLP）断片によって誘導される。このモデルは、再発寛解型（RR）疾患経過を示し、MS患者において観察されるものに似ている。

10

【0232】

多発性硬化症のモデリングは、C57BL/6雌性マウスを用いて行うこともでき、疾患はミエリン-乏突起膠細胞糖タンパク質ペプチド（MOG：myelin-oligodendrocyte glycoprotein）を用いて誘導される。このモデルは、疾患の進行性（慢性とも称される）型である。

【0233】

当該技術分野で知られているように、モデル動物は、通常、以下のスコアリング指標を用いて疾患活動性（「疾患活動性指標」、DAI：Disease Activity Indexと称する）についてスコア化される：正常マウス、疾患の明白な徴候なし「0」、たるんだ尾又は後肢虚弱であるが両方ではない「1」、たるんだ尾及び後肢虚弱「2」、部分的後肢麻痺「3」、完全な後肢麻痺「4」、及び死又は人道的理由による絶命「5」。別のDAI、例えば、以下のスコアリングを使用するDIAもある：尾部弛緩「1」、軽度から中程度の後肢虚弱「2」、重度の後肢虚弱「3」、1本以上の肢の完全な麻痺「4」、瀕死「5」。

20

【0234】

上記スコアリング指標は、したがって、本発明の小有機分子の治療効果を決定するために、疾患の重症度及び再発のモニタリングに使用することができる。

30

【0235】

したがって、一実施形態においては、本発明の化合物をRR-MSの処置に使用することができる。

【0236】

別の実施形態においては、本発明の化合物を二次性進行型MS（SPMS）、原発性進行性MS（PPMS）又は進行性再発性MS（PRMS）の処置に使用することができる。

【0237】

別の一態様においては、本発明は、多発性硬化症を処置する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の「SM1」、「SM6」、「SM7」及び「SM9」からなる群から選択される式の少なくとも1種の化合物、又は前記少なくとも1種の化合物を含む医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

40

【0238】

例として、本発明の化合物又は本発明の医薬組成物を投与するステップは、それらに限定されないが、以下の投与経路によって実施することができる：経口、直腸、経粘膜、経鼻、腸、又は筋肉内、皮下及び髄内注射、並びに髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内又は眼内注射を含めた非経口送達。あるいは、本発明に係る医薬組成物を、例えば、対象の組織領域、例えば、患部CNS領域に医薬組成物を直接注射することによって、全身ではなく局所的に投与することができる。

【0239】

一部の実施形態においては、本発明の小有機分子を追加の治療薬と組み合わせて投与する。

50

## 【0240】

追加の治療薬は、多発性硬化症を治療するのに、又は再発率を低下させ、障害進行に作用するのに、適切である、又は知られている、任意の治療薬とすることができる。非限定的例としては、インターフェロンベータ1 (Avonex (登録商標)、Betaseron (登録商標)、Rebif (登録商標) など)、グラチラマー酢酸塩 (Copaxone (登録商標))、フィンゴリモド (Gilenya (登録商標))、ナタリズマブ (Tyssabri (登録商標))、オクレリズマブ (Ocrevus (登録商標)) 及び当該技術分野で既知の他の薬剤が挙げられる。

## 【0241】

追加の治療薬は、すべての入手可能な供給源からの間葉幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell)、MSC 様細胞、神経前駆細胞、CD34<sup>+</sup>細胞、CD133<sup>+</sup>細胞、人工多能性幹細胞 (iPSC: induced pluripotent stem cell)、分化多能性幹細胞などを含めて、ただしそれらに限定されない細胞の投与を含めた細胞療法とすることができる。

10

## 【0242】

一実施形態においては、前記追加の治療薬は、BBBが開くのを媒介する薬剤、例えば、静脈内に注射することができるマンニトールである。

## 【0243】

追加の治療薬は、本発明の小有機化合物と一緒に処方することができ、又は別の組成物の一部とすることができる。追加の薬剤は、本発明の化合物と一緒に又は別々に投与することができる。それは、本発明の化合物又は医薬組成物の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与することができる。

20

## 【0244】

当該技術分野で知られているように、「血液脳関門 (BBB: blood-brain barrier)」という用語は、循環血液からの中樞神経系の構造上の膜分離に関する。

## 【0245】

本発明に係る少なくとも1種の小有機分子の「治療有効量 (単数又は複数)」という用語は、病状を治癒、抑止又は少なくとも軽減するために、当該技術分野で既知の考慮事項によって決定される。投与の正確な用量及び頻度は、患者の疾患の重症度、投与経路、及び化合物の薬物動態学に依存する。用量の決定は、通常の手順であり、医師及び他の当業者によく知られている。本発明の方法に使用される任意の調製物の場合、投与量又は治療有効量は、動物モデル、例えば、EAEで行われるインビトロアッセイ、細胞培養アッセイ及びインビボ実験から最初に推定することができる。

30

## 【0246】

例えば、下記投与量を多発性硬化症のEAEマウスモデルに基づいて推定した。下記実施例2及び3に示すように、SM1、SM7又はSM9の各々10mg/kg又は20mg/kgによる処置は、EAEを改善した。顕著なことに、処置EAEマウスの症候は、検査の各相において、対照よりも重篤でなかった。この効果は、処置EAEマウス群において、より重症型の疾患 (すなわち、臨床スコア2~5) を示すマウスが少なかったという事実によっても明らかになった。さらに、処置は、EAEマウスの脊髄中のミエリン量を増加させ、これらのSM処置に応答して再ミエリン化プロセスの増加若しくは脱髄の減少又はその両方を示すことが判明した。

40

## 【0247】

治療投与量の非限定的例としては、約70kgの人1名当たり400~800mgが挙げられるが、それに限定されない。

## 【0248】

なお、投与すべき小有機分子の量は、特定の薬剤の分子量及び他の特徴を考慮して、約5~25%変動し得ることを注記するべきである。したがって、本明細書に定義される「約」という用語は、本明細書に定義される量の5~25%の変動を指す。好ましくは、「約」という用語は、指定値の+/-10%、より好ましくは+/-5%、更により好ましく

50

は + / - 1 %、更により好ましくは + / - 0 . 1 % の変化を包含する。

【 0 2 4 9 】

本発明に係る小有機分子又はそれを含む任意の医薬組成物は、患者に 1 回又は複数回投与することができる。小有機分子又はそれを含む医薬組成物は、病状を治癒、抑止又は少なくとも軽減するために、当業者に公知の考慮事項によって決定して、連続的に又は不連続な時間に患者に投与することができる。

【 0 2 5 0 】

本明細書に記載の小有機分子の毒性及び治療効果は、標準薬学手順によってインビトロ、細胞培養物又は実験動物において測定することができる。これらのインビトロ、細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトに使用されるある範囲の投与量を処方するのに使用することができる。投与量は、使用剤形及び投与経路に応じて変動し得る。

10

【 0 2 5 1 】

本明細書では「対象」という用語は、例えば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、モルモット、霊長類、ヒトなどの温血動物を意味する。本発明の方法は、神経変性疾患に罹患したヒト対象の処置用に特に意図されるが、他の哺乳動物対象も含まれる。対象と患者という用語は、本明細書では区別なく使用される。

【 0 2 5 2 】

本発明は、多発性硬化症に罹患した対象の処置の方法に使用される式「S M 1」、「S M 6」、「S M 7」又は「S M 9」の化合物及び薬学的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤も開示し、前記方法は、前記少なくとも 1 個の小有機分子及び薬学的に許容される担体を前記対象に投与するステップを含む。

20

【 0 2 5 3 】

多発性硬化症に罹患した対象の処置のための医薬組成物の調製における式「S M 1」、「S M 6」、「S M 7」又は「S M 9」の少なくとも 1 種の化合物及び薬学的に許容される担体の使用も更に開示される。

【 0 2 5 4 】

本発明の化合物は、最初に、B M P - 2 シグナル伝達をインビトロで阻害するその能力に基づいて選択された。実施例 1 に示すように、小有機分子 S M 1、S M 6、S M 7 及び S M 9 は、マウス A T D C 5 細胞において細胞傷害性を生じずに、B M P - 2 をインビトロで阻害するその能力について大きなライブラリからスクリーニングされた。さらに、実施例 4、7 及び 8 に示すように、これらの化合物は、神経分化をインビトロで示す幾つかのマーカーの増加を示した。

30

【 0 2 5 5 】

本明細書に定義される「骨形成タンパク質（単数又は複数）」（B M P）という用語は、サイトカイン又はメタボロゲン（m e t a b o l o g e n）としても知られる成長因子の一群を指す。B M P は、骨及び軟骨の形成を誘導し、胚脳発生において複数の役割を有する。20 種の B M P がこれまで発見され、そのうち、6 種の B M P（すなわち B M P - 2 ~ B M P - 7）は、タンパク質の形質転換成長因子（ベータ）スーパーファミリーに属する。特に、本発明は、ニューロンの増殖及び発生に関連する B M P に関する。非限定的例としては、B M P - 2 及び B M P - 4 が挙げられる。特定の一実施形態においては、B M P はヒト B M P である。

40

【 0 2 5 6 】

他の骨形成タンパク質として「骨形成タンパク質 2」（すなわち B M P - 2）は、骨及び軟骨の発生において重要な役割を果たす。それは、ハリネズミ経路、T G F シグナル伝達経路、及びサイトカイン - サイトカイン受容体相互作用に関与する。それは、心臓細胞分化及び上皮間葉転換にも関与する。B M P - 2 は、ジスルフィド結合ホモ二量体として作用し、骨の産生を刺激することが示された。

【 0 2 5 7 】

一部の実施形態においては、本発明に係る骨形成タンパク質 2 は、N C B I（N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n）

50



受託番号 N M \_ 0 0 1 2 0 0 . 2 のヒト B M P - 2 である。

【 0 2 5 8 】

「骨形成タンパク質 4」(すなわち B M P - 4)も骨及び軟骨の発生、特に歯及び肢の発生並びに骨折修復に関与する。この特別なファミリーメンバーは、ヒトにおける軟骨内の骨形成の開始に重要な役割を果たす。それは、筋発生、骨石灰化及び尿管芽発生に関与することが示された。ヒト胚発生においては、B M P - 4 は、胚の初期分化及び背腹軸の確立に必要な重要なシグナル伝達分子である。B M P - 4 は、脊索の背部から分泌され、(脊索の腹部から放出される)ソニックヘッジホッグと協調して作用して、その後の構造の分化のために背腹軸を確立する。

【 0 2 5 9 】

一部の実施形態においては、本発明に係る骨形成タンパク質 4 は、N C B I ( N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n ) 受託番号 P 1 2 6 4 4 のヒト B M P - 4 である。

【 0 2 6 0 】

B M P は、骨形成タンパク質受容体 ( B M P R : b o n e m o r p h o g e n e t i c p r o t e i n r e c e p t o r ) と称される細胞表面の特定の受容体と相互作用する。B M P R を介したシグナル伝達は、タンパク質の S M A D ファミリーのメンバーの動員をもたらす。本明細書では「B M P シグナル伝達」という用語は、B M P とその受容体の結合によって惹起されるシグナル伝達経路、及びこの結合によって誘導される後続の細胞プロセス、例えば、タンパク質の S M A D ファミリーのメンバーの動員を指す。

【 0 2 6 1 】

本発明は、本明細書に開示される特定の例、プロセスステップ及び材料に限定されず、こうしたプロセスステップ及び材料がある程度変わり得ることを理解されたい。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を記述するために使用されるにすぎず、限定することを意図したものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びその均等物によってのみ限定されることも理解されたい。

【 0 2 6 2 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲では、単数形「1つの ( a , a n ) 」及び「前記 ( t h e ) 」は、特に明示しない限り、複数形も含むことに留意しなければならない。

【 0 2 6 3 】

別段の記載がない限り、本明細書で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が関連する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。以下の用語が本明細書に記載の本発明のために定義される。

【実施例】

【 0 2 6 4 】

更なる説明がなくとも、当業者は、前述の説明によって、本発明を最大限に利用することができると考えられる。以下の好ましい具体的実施形態は、したがって、単なる説明であって、特許請求した発明を決して限定するものではないと解釈すべきである。

【 0 2 6 5 】

本明細書に特に記述しない当該技術分野で既知の標準分子生物学手順は、一般に、S a m b r o o k & R u s s e l l 、 2 0 0 1 に本質的に従う。

【 0 2 6 6 】

略語：

小分子 - S M

実験的自己免疫性脳脊髄炎 - E A E 、

再発寛解型 - R R 、

多発性硬化症 - M S 、

再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎 - R R - E A E 、

プロテオリピドタンパク質ペプチド - P L P 、

ミエリン - 乏突起膠細胞糖タンパク質ペプチド - M O G 、

10

20

30

40

50

リン酸緩衝食塩水 - P B S ( P h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n e ) 、  
完全フロイントアジュバント - C F A ( C o m p l e t e F r e u n d ' s A d j u v  
a n t ) 、  
百日咳毒素 - P T X 、  
骨形成タンパク質 - B M P 、  
血液脳関門 - B B B 、  
中枢神経系 - C N S 、  
時間 - h r 、 h 、  
分 - m i n 。

【 0 2 6 7 】

10

#### 実験手順

##### ハイスルーブットスクリーニング ( H T S ) バイオアッセイ

ポリ - L - リジン ( S i g m a - A l d r i c h ) を 3 8 4 ウェルプレートに添加し、室  
温で 3 0 分インキュベーション後に除去した。D M E M / F 1 2 、 2 % F B S 、 ペニシリ  
ン 1 0 0 単位 / m l 、 ストレプトマイシン ( B i o l o g i c a l i n d u s t r i e s ) 1 0 0 m g / m l を含むアッセイ培地を、各ウェルに添加した。次いで、組換えヒト  
B M P - 2 ( r h B M P - 2 、 R & D S y s t e m s ) を、最終濃度 2  $\mu$  g / m l まで  
各ウェルに添加した。A T D C 5 細胞 ( S i g m a - A l d r i c h ) を収集し、アッセ  
イ培地に再懸濁し、最終濃度 2 0 0 0 細胞 / ウェルまで添加した。最後に、ヘパリン ( S  
i g m a - A l d r i c h ) を、最終濃度 2  $\mu$  g / m l まで添加した。細胞を、4 8 時間  
3 7  $^{\circ}$  C で 5 % C O <sub>2</sub> と一緒に加湿チャンバ中で B P M - 2 の潜在的小分子阻害剤の存在又  
は非存在下でインキュベーションした。インキュベーション後、A L P レベル及び細胞生  
存率を、完全に自動化された手順で測定した。細胞を P B S で洗浄し、プロテアーゼ阻害  
剤カクテル ( S i g m a - A l d r i c h ) を補充した P B S 中に 0 . 2 % T r i t o n  
X - 1 0 0 を含む溶解緩衝剤を用いて溶解し、室温で 2 5 分間インキュベーションした。  
次いで、C D P - S t a r ( 登録商標 ) 化学発光基質 ( S i g m a - A l d r i c h ) を  
添加し、2 5 分間室温で暗所でインキュベーション後に発光を測定して、A L P レベルを  
求めた。最後に、C e l l T i t e r - G l o ( 登録商標 ) 試薬 ( B i o l o g i c a l  
I n d u s t r i e s ) を添加し、1 0 分間インキュベーション後に発光を測定して、細  
胞生存率を求めた。

20

30

【 0 2 6 8 】

##### マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎 ( E A E ) 誘導

S J L 雌性マウス ( 6 ~ 8 週齢 ) において 0 . 1 m l P B S 中のプロテオリピドタンパ  
ク質ペプチド ( S i g m a - A l d r i c h によって合成された P L P 1 3 9 - 1 5 1 )  
1 0 0  $\mu$  g / マウスで皮下免疫処置して ( 0 日目 ) 、 R R - E A E を誘導した。結核菌 H  
3 7 R A ( M T 、 D I F C O 製 ) 5 0 0  $\mu$  g を含む等量の完全フロイントアジュバント ( C  
F A 、 D I F C O 製 ) でペプチドを乳化した。0 . 2 m l P B S 中の百日咳毒素 ( P  
T X 、 S i g m a - A l d r i c h 製 ) 3 0 0 n g も、マウスに腹腔内注射した。2 回目  
の P T X 注射 ( 3 0 0 n g / マウス ) を、4 8 時間後に行った。

【 0 2 6 9 】

40

マウスの R R - E A E 症候をモニターし、以下のようにスコア化した：疾患なし「 0 」、  
尾部麻痺「 1 」、後肢虚弱「 2 」、後肢麻痺「 3 」、後肢及び前肢虚弱 / 麻痺「 4 」、瀕  
死「 5 」。

【 0 2 7 0 】

マウスを含む全手順を A n i m a l E t h i c a l C o m m i t t e e o f t h e  
S o u r a s k y M e d i c a l C e n t e r のガイドラインに従って行った。

【 0 2 7 1 】

##### P 1 9 細胞のインビトロ分化アッセイ

7 . 5 % 子ウシ血清、2 . 5 % ウシ胎仔血清及び 0 . 4  $\mu$  l / m l ペニシリン - ストレプ  
トマイシン ( G i b c o ) を含む最少必須培地 ( a M E M : a - m i n i m u m e s s

50

essential medium) (Gibco) 中で  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  で P19 細胞を成長させた。細胞に新しい培地を 48 時間毎に補充した。分化検査の場合、P19 細胞を濃度  $2 \times 10^5$  細胞 / 60 mm 細菌皿で培養し、刺激しないか、又は以下の刺激と一緒にインキュベーションした。

1)  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  全トランス型レチノイン酸 (RA: retinoic acid) (Sigma)

2) RA +  $5 \text{ ng/ml}$  rhBMP2 (R&D systems)

3) RA + rhBMP-2 +  $500 \text{ ng/ml}$  マウス抗ヒト BMP-2 / 4 mAb (R&D systems)

4) RA + rhBMP-2 + SM1 / SM7 / SM9 (Maybridge (Hit Finder (商標) コレクション)) 濃度:  $0.625$ 、 $1.25$  及び  $2.5 \mu\text{M}$ 。 10

#### 【0272】

RA、BMP 補助剤及び SM を含む培地を、48 時間後に補充した。4 日後、RA 処理中に形成された凝集体を、酵素的に ( $0.05\% \text{v/v}$  トリプシン -  $0.02\% \text{v/v}$  EDTA) かつ機械的に分散させ、組織培養グレードの皿の中で培養した。この段階で、細胞を、RA、BMP 及び SM を含まない培地中で培養し、培地を 48 時間毎に新しくした。MAP-2 陽性ニューロンを、8 日目 (すなわち、RA 処置後 4 日目) に免疫蛍光によって調べた。手短に述べると、7 日目に細胞をカバーガラス付きの 24 ウェルプレート中で最終濃度  $5 \times 10^4$  細胞 / ウェルで再培養した。8 日目に細胞を PBS で洗浄し、 $4\% \text{PFA}$  で 15 分間固定し、 $0.5\% \text{Triton Tx}$  で透過処理し、 $10\% \text{FCS}$ 、 $0.1\% \text{BSA}$  及び  $0.05\% \text{Tween}$  で 30 分間ブロックし、MAP2 ウサギ mAb ( $1:100$ 、D5G1、Cell Signaling) で 1 時間染色した。ウサギに対する Alexa Fluor (登録商標) 488 複合 IgG 抗体で 1 時間標識化して二次抗体ステップを行った ( $1:1000$ 、Molecular Probes USA)。 20

#### 【0273】

ウェスタンブロット分析による SMAD1 / 5 / 8 シグナル伝達の測定

P19 細胞を 6 ウェルプレートに播いた ( $3.5 \times 10^5$  細胞 / ウェル)。翌日、細胞を処理しないか、又は  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  RA、 $5 \text{ ng/ml}$  BMP-2 若しくは SM で 4 時間処理した。細胞を氷冷 PBS で洗浄し、収集し、プロテアーゼ阻害剤カクテル及びホスファターゼ阻害剤としてオルトバナジン酸ナトリウム ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (Sigma-Aldrich) を補充した氷冷 RIPA 緩衝剤 (Sigma-Aldrich) を用いて溶解した。タンパク質濃度を、BCA タンパク質アッセイキット (Pierce、Rockford、IL) を用いて測定した。細胞溶解物 (タンパク質  $40 \sim 60 \mu\text{g}$ ) を、 $4 \sim 15\% \text{SDS-PAGE}$  ゲル電気泳動によって分離し、次いでニトロセルロース膜に  $0.2 \text{ A}$  で 2 時間転写した。膜を  $5\% (\text{w/v})$  脱脂粉乳で室温で 1 時間ブロックし、次いで抗ホスホ Smad1 / 5 / 9、抗 Smad1 (Cell signaling Technology、Beverly、MA、USA) 及び抗チューブリン (Sigma-Aldrich) 抗体と一緒に室温で 2 時間インキュベーションした。膜を洗浄し、アルカリホスファターゼ複合二次抗体 (Jackson Laboratories Immune Research、PA、USA) と一緒にインキュベーションした。シグナルを、増感化学発光キット (Clarity、BioRad Laboratories、Richmond、CA) を用いて検出し、デジタル画像を、MicroChem (DNR Bio-imaging Systems、Jerusalem、Israel) によってキャプチャーした。タンパク質レベルを、ImageJ ソフトウェアを用いて定量化し、{アルファ} - チューブリンに対して規準化した。 30

#### 【0274】

実施例 1

小分子のハイスループットスクリーニング

BMP-2 と BMP 受容体 IA の構造 - 機能関係を評価する ATDC5 細胞アッセイが、Keller ら (Nature Structural & Molecular Biology) によって 40

10

20

30

40

50

g y 2004 11、481～488)に最初に記載された。多量の治療薬候補をスクリーニングするために、BMP阻害を検出するATDC5細胞バイオアッセイを、ハイスループットスクリーニングに使用するように改作した。バイオアッセイは、BMP-2及びヘパリンの投与によるマウスATDC5細胞におけるアルカリホスファターゼ(ALP)産生の刺激、並びに阻害剤候補の存在下におけるALPレベルの測定に基づく。アッセイは、以下の特徴によって特徴付けられる。

【0275】

(a) HTS自動化機器の最適条件が、BMP-2の存在下のALP産生とBMP-2の非存在下(刺激なし)のALP産生との十分な相違(すなわち、0.5を超える陽性Zプライム)が得られるように見いだされた。

10

【0276】

(b) 高感度法がHTSのALP測定用に設計された。すなわち、CDP-Star(登録商標)化学発光基質及び発光測定の使用。

【0277】

(c) ALP産生と細胞生存率の両方を同時に測定した。CDP-Star(登録商標)による発光シグナルが消えた後に細胞生存率を評価するCell Titer-Glo(登録商標) Luminescent Cell Viability Assayによってこれを行った。潜在的に有毒な試験小分子はBMP-2シグナル伝達の妨害によるよりも細胞傷害活性によってALPレベルを低下させ得るので、ALP産生と細胞生存率の両方の同時評価が必要であった。したがって、単に細胞死を引き起こす分子を除外するために、同じ細胞培養物においてALPレベルと細胞生存率の両方を調べることが不可欠であった。バイオアッセイの明細については、上記実験手順の項で詳述した。

20

【0278】

この完全自動化試験の有効性を図1に示す。図1(A)は、ヘパリンの存在下でrhBMP-2による刺激に応答したATDC5細胞におけるALP活性を示す。ALP活性を、CDP-Star(登録商標)化学発光基質を用いて測定した。明らかに、図1(B)に示すように、rhBMP-2による細胞の刺激は細胞数を減少させる。これは、ATDC5細胞のBMP-2によって誘導される軟骨形成とそれに続く増殖の減少の結果かもしれない。図1(C)に示すように、ALP/細胞の比は4.3倍と誘導され、 $Z' = 0.59$ であった。 $Z'$ は、効果の有意性、すなわちBMP2の存在下のALPシグナルがBMP2の非存在下のシグナルのレベルに比べてどのくらい高いかを示すパラメータである。 $Z'$ が1に近いほど差が大きい。計算を以下のように行う。

30

$$Z' = 1 - 3 \left( \frac{\sigma_p + \sigma_n}{\mu_p + \mu_n} \right)$$

ここで、 $\sigma$  = 標準偏差、 $\mu$  = 平均、 $p$  = 陽性(BMPあり)、 $n$  = 陰性(BMPなし)及び $I$  = 値

【0279】

小分子(SM: small molecule)のライブラリを、上記ハイスループットスクリーニングバイオアッセイによってスクリーニングした。前もって培養したHit Finder(商標) Collectionを用いて、有機「薬物様」化合物からなるMaybridgeライブラリから約7600個のSMをスクリーニングした。ポリ-L-リジンでのコーティング後、かつrhBMP-2添加前に、化合物を各ウェルに最終濃度5  $\mu$ Mまで添加した。第1のスクリーニング後、25%を超えるBMP-2シグナル伝達阻害率及び20%未満の細胞毒性率を示す96種の候補分子を、BMP-2阻害について選択した(本明細書では「ヒット」と称する)。様々な濃度(0.62  $\mu$ M、1.25  $\mu$ M、2.5  $\mu$ M、5  $\mu$ M及び10  $\mu$ M)のこれらの分子をバイオアッセイで更に試験して、IC<sub>50</sub>を計算した。IC<sub>50</sub>決定後、17種の陽性ヒットを得た。最良のIC<sub>50</sub>値を示した9種の分子を更なる分析のために選択した。これらの分子を本明細書ではSM1～SM9と称する。SM1～SM9の阻害活性及び細胞系に対するそれらの細胞傷害効果を、図2に示す。ALPレベル及び細胞生存率を、SMを含まないBMP-2存在下のALPの割合又は生存率発光レベルとして図2に示す。SMを様々な濃度、すなわち、0.6

40

50

2  $\mu$ M、1 . 2 5  $\mu$ M、2 . 5  $\mu$ M、5  $\mu$ M及び1 0  $\mu$ Mで試験した。

【 0 2 8 0 】

表 1 に S M 1 ~ S M 9 の化学名、構造及び I C 5 0 値を要約する。

【 0 2 8 1 】

表 1

【表 1】

SM 番号	Maybridge 番号	化学名	IC 50 ( $\mu$ M)
SM1	KM03702	メチル 3 - [(2 E) - 2 - [シアノ (チオフェン-2-イルスルホニル) メチリデン] ヒドラジニル] チオフェン-2-カルボキシラート	2.6
SM2	XBX00117	1, 4-ジヒドロ-3, 6-ジフェニル-1, 2, 4, 5-テトラジン	8.5
SM3	SEW00102	エチル 2 - (メチルチオ) - 4 - [[[(5-ニトロ-2-フリル) カルボニル] アミノ] - 1 - (2-チエニルメチル) - 1 H-イミダゾール-5-カルボキシラート	2.6
SM4	GK01385	4 - (5-ニトロ-1, 3-ジオキソベンゾ (d e) イソキノリン-2-イル) - N - [4 - (トリフルオロメチル) フェニル] ベンゼンスルホンアミド	10
SM5	BTB11505	N 1 - アセチル-2 - ([3 - (アセチルアミノ) - 3-オキソプロピル] チオ) ベンズアミド	3.8
SM6	BR00086	N 2 - [3 - (トリフルオロメチル) フェニル] - 5-ニトロ-2-フルアミド	9.7
SM7	RF02433	3-ヒドロキシ-5 - [2 - (トリフルオロメチル) アニリン] イソチアゾール-4-カルボニトリル	2.2
SM8	SPB07118	1 - t e r t -ブチル-3 - [E-1 - (4 - (3, 5-ジクロロピリジン-4-イル) オキシフェニル] エチリデンアミノ) チオ尿素	2.8
SM9	KM01484	5 - (4-クロロフェニル) - 3-メチルスルホニル-1, 2-オキサゾール-4-カルボニトリル	4.4

【 0 2 8 2 】

実施例 2

R R - E A E モデルを用いた疾患進行に対するインピボでの S M の効果

上記実施例 1 で確認された小分子阻害剤の効果を、S J L マウスにおいて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E) モデルを用いてインピボで更に試験した。E A E は、再発寛解型多発性硬化症 (M S) のモデルとして役立つ。E A E を実験手順の項に記載のように誘導した。S M 1 ~ 9 又はピヒクル単独 (5 % D M S O の P B S 溶液) を、2 5 0  $\mu$ g / マウス (1 0 m g / k g / 日) の腹腔内注射によって、免疫化後 9 日目から開始して次の 3 0 日間毎日投与した。動物を誘導後 4 5 日目まで E A E の症候についてモニターし、以下のようにスコア化した：0 = 疾患なし、1 = 尾部麻痺、2 = 後肢虚弱、3 = 後肢麻痺、4 = 後肢 + 前肢麻痺及び 5 = 瀕死。

【 0 2 8 3 】

図 3 に示すように、有益な効果が、分子 S M 1、S M 7 及び S M 9 による処置で認められた ( $p < 0 . 0 1$  対ピヒクル)。最も明白な効果が、S M 1 - K M 0 3 7 0 2 による処置で認められた。有益な効果は、免疫化後 1 9 日目で既に認められた (E A E 臨床スコアはピヒクル群における  $1 . 1 \pm 0 . 3$  に対して  $0 . 5 \pm 0 . 2$ )。この効果は 2 7 日目まで増加し、そのとき臨床スコアは  $0 . 3 \pm 0 . 3$  に達した。

【 0 2 8 4 】

S M 7 - R F 0 2 4 3 3 及び S M 9 - K M 0 1 4 8 4 も、免疫化後 2 1 日目から E A E を

改善した（EAE臨床スコアは、ピヒクル群の $1.1 \pm 0.3$ に対してSM7及びSM9処置群それぞれ $0.6 \pm 0.1$ 及び $0.8 \pm 0.3$ ）。明らかに、SM6は、この実験で有益な効果を何ら示さなかったが、何らかの比較上の結果を得るために、次の実験にも更なる分析のために選択された。

#### 【0285】

4種の上記分子SM1、SM6、SM7 & SM9を用いて実験を繰り返した。2つの投与量、用量 $10 \text{ mg/kg}$ 及び用量 $20 \text{ mg/kg}$ 、すなわち $250 \mu\text{g/マウス}$ 及び $500 \mu\text{g/マウス}$ の分子を9～38日目に投与した以外は実験を上記と同様の条件で行った（図4参照）。

#### 【0286】

低投与量 $10 \text{ mg/kg}$ のSM1による処置で有意な有益効果が認められた（ $p = 0.0005$ 対ピヒクル）。高用量のSM1で回復傾向も認められたが、統計的に有意ではなかった（ $p = 0.09$ ）。さらに、低投与量と高投与量の両方のSM9による処置もEAEを改善した。ここで、高投与量 $20 \text{ mg/kg}$ は低投与量よりも効力があつた（ $10 \text{ mg/kg bw}$ の場合 $p = 0.049$ 、 $20 \text{ mg/kg}$ の場合 $p = 0.0001$ ）。以前の实验と同様に、回復は、第2及び第3の再発（それぞれ23～31日目及び37～44日目）中に主に認められた。

#### 【0287】

SM6による処置の効果はより軽度であり、有意でなかった。しかし、以前の实验と反対に、SM7は処置マウスの大部分の死を招く毒作用を有することが認められ、実験終了（48日目）までに、8匹のマウスが $10 \text{ mg/kg}$ の低用量群で死亡し、マウスのすべてが $20 \text{ mg/kg}$ の高用量群で死亡した。

#### 【0288】

少なくともスコア2（後肢不全麻痺）を示す動物の数も検査中いつでも分析した（図5参照）。示したように、平均臨床スコア分析と同様に、SM1（主に低投与量 $10 \text{ mg/kg}$ ）とSM9（主に高投与量 $20 \text{ mg/kg}$ ）の両方が、中程度～重度のEAEスコアのマウス数の減少に関連して有益な効果を示した。

#### 【0289】

興味深いことに、SM6で処置されたマウス群においては、より重度のEAEのマウスの数が減少した（第2の再発中：SM6処置群の2～3匹のマウス対ピヒクル群の5～6匹のマウス、及び第3の再発中：SM6処置群の5～7匹対ピヒクル群の8～9匹のマウス）。明らかに、SM6は、重度EAEの回復に対して効果を有する。

#### 【0290】

##### 実施例3

EAEにおける脱髄に対するSM1、SM6、SM7及びSM9の効果

脱髄及び再ミエリン化プロセスに対するSMの直接効果を分析した。脊髄を各群の6匹のマウスから取り出し、脊髄の腰部を切断し（ $10 \mu\text{m}$ 冠状パラフィン切片）、ミエリン及び浸潤部染色のためにLFB-H&E（ルクソールファストブルーとH&E）処理した。図6Aに示すように、浸潤部及び脱髄の数の増加がピヒクル処置群において認められた。すべての検査したSMで有髄領域%のわずかな上昇傾向があつたが（図6B）、有意な効果は、 $10 \text{ mg/kg}$  SM7（ $10 \text{ mg/kg}$  SM7処置群における $34.0 \pm 0.8\%$ 対ピヒクルにおける $28.3 \pm 1.8\%$   $p = 0.04$ 、高投与量は毒性のために検査されなかった）、 $20 \text{ mg/kg}$  SM9（ $34.6 \pm 1.6\%$ 、 $p = 0.03$ ）、及び $10 \text{ mg/kg}$  SM6（ $34.8 \pm 1.6\% = p, 0.03$ ）で認められた。これらの結果は、これらのSM処置に应答した再ミエリン化プロセスの増加若しくは脱髄の減少又はその両方を示している可能性がある。

#### 【0291】

##### 実施例4

インビトロでの神経形成に対するSM1、SM7及びSM9の効果

次に、P19分化モデルにおける神経形成に対する小分子の効果を測定した。マウス胚由

10

20

30

40

50

来の奇形癌腫細胞である P 1 9 細胞は、レチノイン酸 ( R A ) 刺激にตอบสนองしてニューロンに分化し、この分化は、 r h B M P - 2 ( 骨形成タンパク質 - 2 ) の添加によって阻止され得ることが実証された [ 8 ]。ニューロン分化はニューロンマーカー M A P - 2 の発現によって表され、 B M P - 2 の添加はこのマーカーのレベルを低下させる。マウス抗 B M P - 2 / 4 モノクローナル抗体の添加は、 B M P - 2 の効果を逆転させ、ニューロン表現型の獲得を誘導する。したがって、 P 1 9 細胞におけるニューロンマーカー M A P - 2 の発現に対する S M 1、 S M 7 及び S M 9 の効果を R A 及び B M P - 2 の存在下で調べた。3つの分子濃度を試験した： 0 . 6 2 5  $\mu$  M、 1 . 2 5  $\mu$  M 及び 2 . 5  $\mu$  M。

#### 【 0 2 9 2 】

M A P - 2 陽性細胞は、刺激の非存在下では観察されなかった。図 7 A ~ 7 B に示すように、 P 1 9 細胞の R A 刺激は、 M A P - 2 + 細胞数を増加させた ( 7 3 . 8  $\pm$  6 . 5 % )。 r h B M P - 2 の添加は、 M A P - 2 + 細胞数を有意に減少させ ( 3 1 . 4  $\pm$  4 . 3 % )、すなわちニューロン表現型を阻止し、抗 B M P - 2 / 4 m A b の添加は、 M A P - 2 + 細胞数を増加させることによって B M P - 2 の効果を逆転させた ( 8 3 . 6  $\pm$  3 . 5 %、 p < 0 . 0 1 対 R A + B M P - 2 )。抗 B M P - 2 / 4 中和 m A b の効果と同様に、 S M 1、 S M 7 及び S M 9 は、 B M P - 2 の効果を逆転させ、単なる R A + B M P - 2 刺激に比べて、 M A P - 2 + 細胞 ( ニューロン ) 数を増加させた。

#### 【 0 2 9 3 】

S M 1 は、ニューロン表現型をすべての検査濃度で誘導したが、より高濃度の 2 . 5  $\mu$  M において最も著しかった ( 6 2 . 2  $\pm$  3 . 9 %、 p < 0 . 0 1 対 R A + B M P - 2 )。

#### 【 0 2 9 4 】

用量依存的効果も S M 7 では認められ、ニューロン表現型を低濃度と中濃度の両方、特に中濃度の 1 . 2 5  $\mu$  M において誘導した ( 7 6 . 1  $\pm$  3 . 1 %、 p < 0 . 0 1 対 R A + B M P - 2 )。恐らくは毒作用のために、より高濃度では有意な効果が認められなかった。 S M 9 は、低濃度では有効でなく、 1 . 2 5  $\mu$  M 及び 2 . 5  $\mu$  M の中濃度と高濃度の両方で神経形成を誘導した ( それぞれ 7 6 . 4  $\pm$  1 2 . 6 % 及び 8 0 . 6  $\pm$  1 0 . 0 %、 p < 0 . 0 5 対 R A + B M P - 2 )。

#### 【 0 2 9 5 】

##### 実施例 5

P 1 9 細胞における S M A D シグナル伝達に対する S M 1、 S M 7 及び S M 9 の効果標準的な B M P シグナルは、 S M A D リン酸化を介して媒介されることが知られている。 B M P は、 I 及び I I 型セリン / スレオニンキナーゼ受容体の複合体に結合することによってシグナルを伝達する。リガンド結合は、受容体のリン酸化を誘導し、次いで受容体 S m a d ( R - S m a d ) 1、 5 及び 8 を介して標準的なシグナル伝達を活性化する。 R - S m a d は、活性化 I 型受容体によってリン酸化される。次いで、それらは S m a d 4 と複合し、核移行を誘発する [ 1 6 ]。 P 1 9 細胞において B M P - 2 による刺激にตอบสนองして誘導される標準的な S M A D 1 / 5 / 8 シグナル伝達のリン酸化に対する S M の効果を調べた。

#### 【 0 2 9 6 】

図 8 A 及び 8 B に示すように、 r h B M P - 2 による P 1 9 細胞の 4 時間の刺激は、 p - S M A D 発現 ( チューブリン発現に対して規準化 ) を 4 . 9 倍誘導した。抗 B M P - 2 / 4 m A b の添加は、 B M P - 2 単独による刺激に比べて、 p - S M A D 発現を 7 6 . 2 % 阻害した。 S M 7 及び S M 9 は、特に低濃度 2 . 5  $\mu$  M において、 S M A D リン酸化に対して最も明白な効果を示した ( 単なる B M P - 2 による刺激に比べて、 S M 7 及び S M 9 それぞれで p - S M A D / チューブリンの 4 0 . 0 % 及び 4 2 . 7 % の減少 )。 S M 1 は、 S M A D リン酸化に対して軽度の効果しか示さなかった ( 2 . 5  $\mu$  M 及び 5  $\mu$  M でそれぞれ 2 4 . 2 % 及び 1 9 . 9 % の阻害 )。

#### 【 0 2 9 7 】

##### 実施例 6

B M P - 4 阻害に対する S M 1、 S M 7、 S M 9 及び S M 6 の効果

BMP - 2 と BMP - 4 の高い相同性のために、BMP - 2 及び BMP - 4 シグナル伝達を阻害する SM の能力も調べた (抗 BMP - 2 / 4 mAb の効果と同様)。ATDC 5 細胞の刺激のために rh BMP - 4 を rh BMP - 2 の代わりに使用した以外は、スクリーニングに使用した同じバイオアッセイ (すなわち、ALP 及び生存率検出を伴う ATDC 5 バイオアッセイ) によって BMP - 4 中和を分析した。

図 9 に示すように、SM 1 と SM 6 は、BMP - 4 及び BMP - 2 によって誘導される ALP 産生に対して同じ効果を有した。SM 7 と SM 9 のどちらも、BMP - 4 よりもわずかに大きく BMP - 2 を阻害すると思われた (2.5  $\mu$ M SM 7 の場合、BMP - 4 の 29.8% 阻害に比べて BMP - 2 の 47.3% 阻害、及び 2.5  $\mu$ M SM 9 の場合、BMP - 4 の 18.9% 阻害に比べて BMP - 2 の 29.1% 阻害)。

10

【0298】

#### 実施例 7

脳室下帯 (SVZ) 及び顆粒細胞下層 (SGZ) における神経芽細胞マーカーダブルコルチン (DCX) の新規発現に対する SM 1、SM 7、SM 9 及び SM 6 の効果

RR - EAE を誘導したマウスに小分子 SM 1、SM 7、SM 9、SM 6 又は対応するビヒクル 250  $\mu$ g / マウス (低 - L) 又は 500  $\mu$ g / マウス (高 - H) を腹腔内注射した。SM を免疫化後 9 日目から 30 日間毎日注射した。免疫組織化学分析では、各群の 3 匹のマウスに免疫化後 9 日目から 8 日間プロモ - 2' - デオキシウリジン (BrdU) を毎日腹腔内注射した。図 10A ~ 10B を見て分かるように、EAE マウスの SVZ における BrdU + DCX + 細胞の定量化によれば、SM 9 L (低用量の SM 9) は BrdU + DCX + 細胞において有意な増加をもたらした。対照ビヒクルに比べて SM 9 H、SM 1 L、SM 1 H 及び SM 6 H による BrdU + DCX + 細胞の誘導の増加傾向も結果から明らかである。

20

【0299】

次に、マウスの SGZ における BrdU + DCX + 細胞の量を評価した。

図 11A ~ 11B は、SM 又はビヒクル処置後の EAE マウスにおける BrdU + DCX + 細胞の免疫組織化学的標識化を示す。BrdU + DCX + 細胞の定量化から、ビヒクル処置に比べて SM 9 L、SM 6 L 及び SM 7 L によって誘導された BrdU + DCX + 細胞の増加傾向と共に、SM 9 H による SGZ における BrdU + DCX + 細胞の有意な誘導増加が明らかになった。

30

【0300】

#### 実施例 8

SGZ における成熟ニューロンマーカー NeuN の新規発現に対する SM 1、SM 7、SM 9 及び SM 6 の効果。

この実験では、マウスの SGZ における BrdU + NeuN + 細胞の量を評価した。図 12A ~ 12B は、Olympus 8.1 顕微鏡 (倍率 10 倍) を用いた、SM 又はビヒクルで処置された EAE マウスにおける BrdU + NeuN + 細胞の免疫組織化学的標識化を示す。BrdU + NeuN + 細胞の定量化から、ビヒクル処置に比べて SM 9 H によって誘導された BrdU + NeuN + 細胞の増加傾向と共に、SM 1 H 及び SM 9 L 処置マウスによる SGZ における BrdU + NeuN + 細胞の有意な誘導増加が明らかになった。

40

【0301】

#### 引用文献

背景として本開示の主題に関連すると考えられる参考文献を以下に示す。

[1] Trapp, B. D. and Nave, K. A. Annu. Rev. Neurosci. 2008; 31: 247 - 269.

[2] Grinspan J. B. (2015) Vitamins and Hormones, Chapter 6, volume 99, pages 195 - 222.

[3] US 2015 / 139983

[4] US 2008 / 0249038

[5] Simonini M. V. et al. ASN Neuro. 2010 Jan

50



15 ; 2 ( 1 ) ; e 0 0 0 2 5

[ 6 ] Li D . et al . Hippocampus 2008 ; 18 : 692 - 8

[ 7 ] Mabie P . C . et al . J . Neurosci . 1997 , 17 : 4112 - 4120

[ 8 ] Gross R . E . et al . Neuron 1996 , 17 : 595 - 606

[ 9 ] Gomes W . A . et al . Dev . Biol . 2003 , 255 : 164 - 177

[ 10 ] Lim D . A . et al . Neuron 2000 , 28 : 713 - 726

[ 11 ] WO 11 / 019678

[ 12 ] US 2006217390

10

[ 13 ] WO 03 / 105857

[ 14 ] US 2004039037

[ 15 ] Kurtzke , J . F . neurology 1983 : 33 ( 11 ) : 1444 - 1452

[ 16 ] Bani - Yaghoub M , Felker JM , Sans C , Naus CC . Exp Neurol . 2000 ; 162 : 13 - 26 .

[ 17 ] WO 2013 / 186777

【 0302 】

本明細書における上記参考文献の確認が、これらが本開示の主題の特許性に何らかの点で関連することを意味するものと考えるべきではない。

20

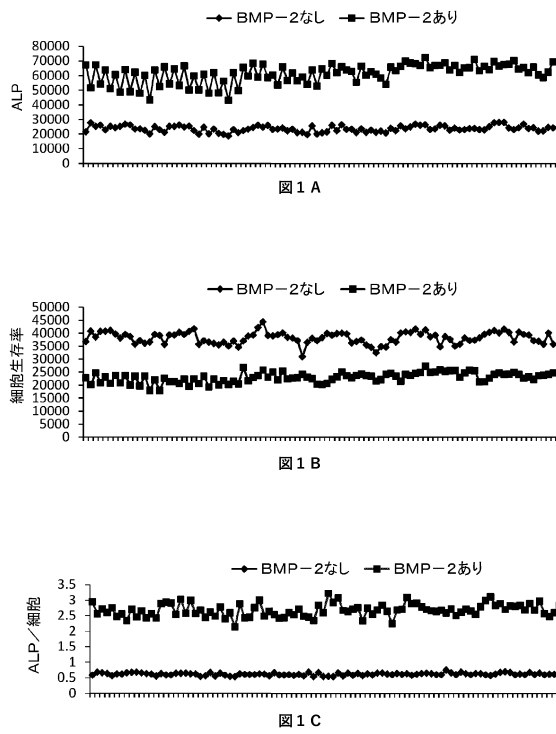
30

40

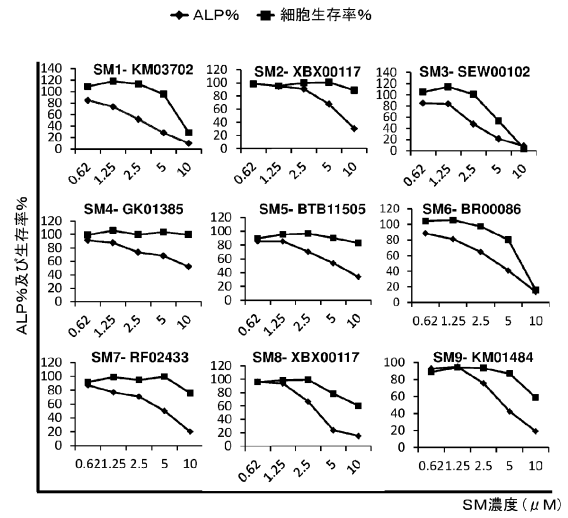
50

【図面】

【図 1】



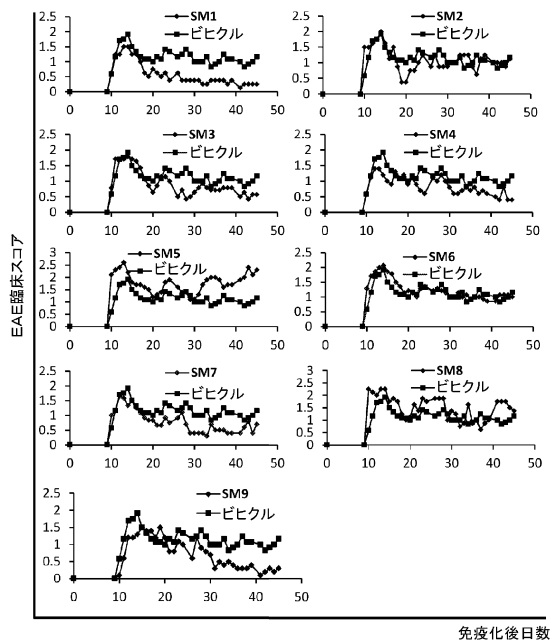
【図 2】



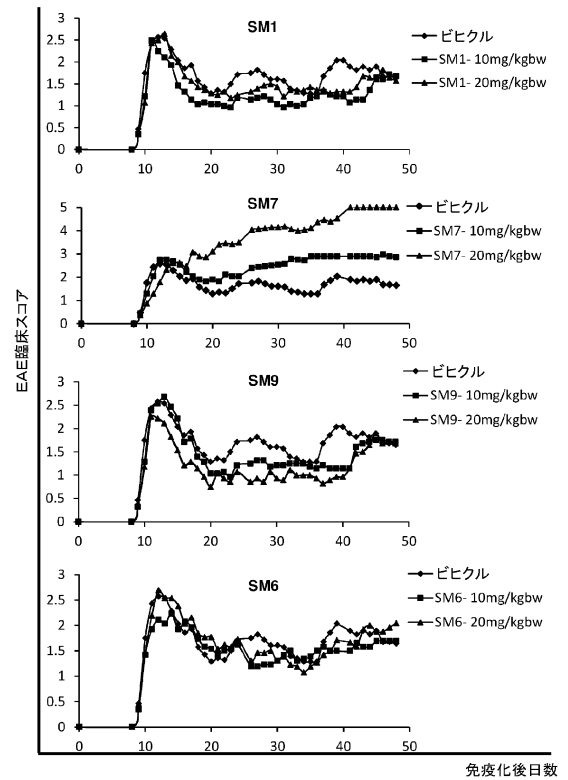
10

20

【図 3】



【図 4】

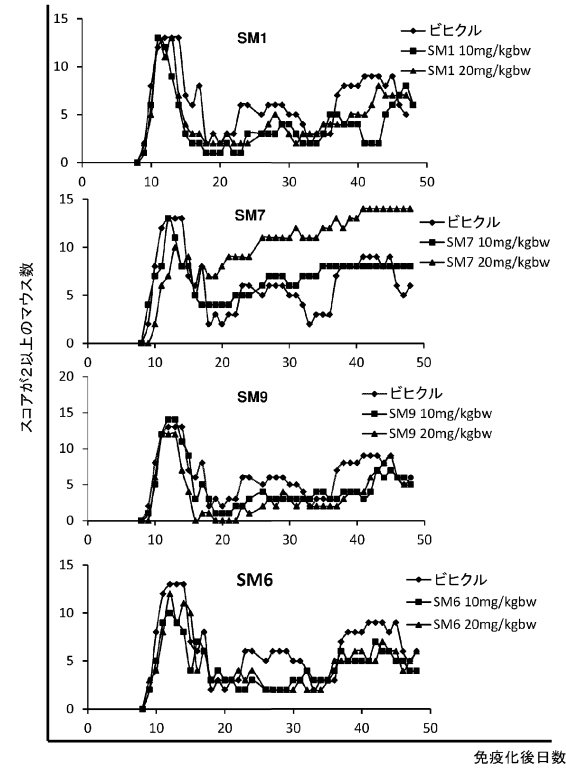


30

40

50

【図 5】



【図 6】

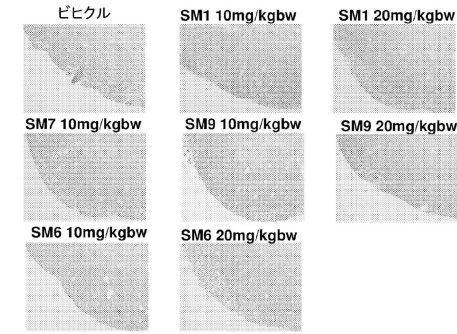


図 6 A

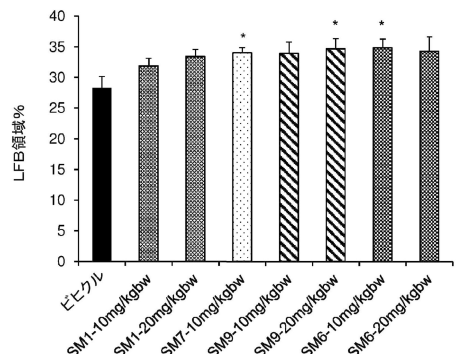
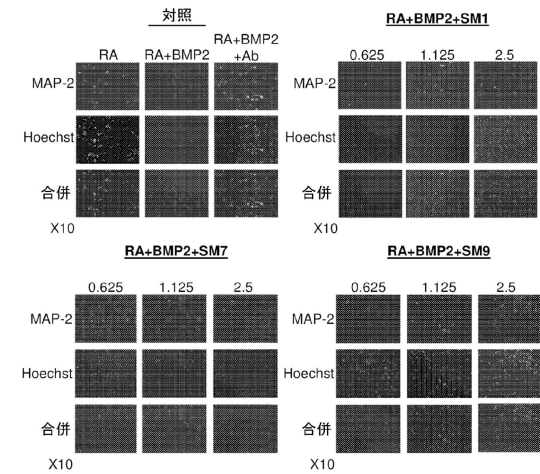
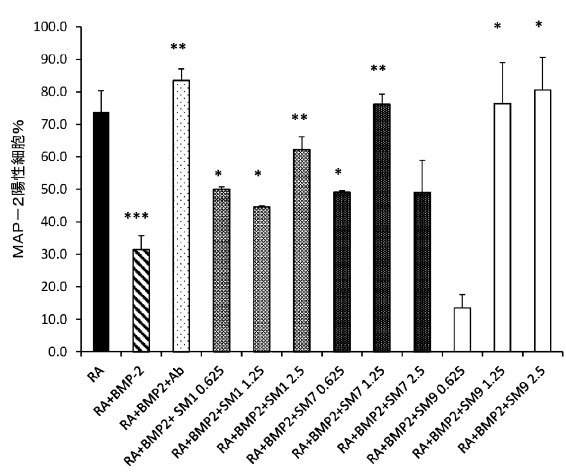


図 6 B

【図 7 A】



【図 7 B】



10

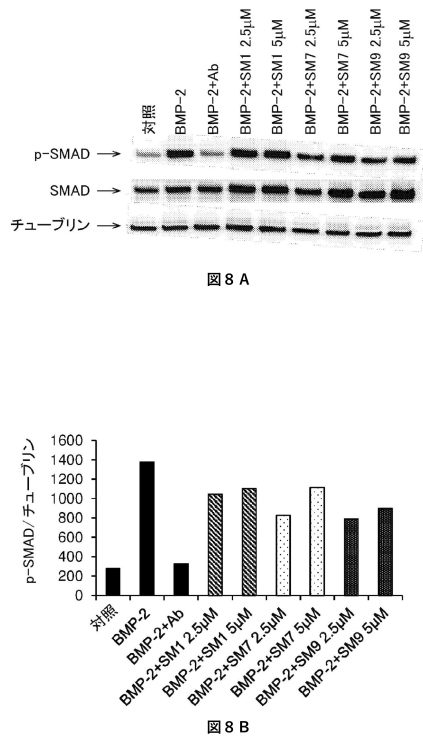
20

30

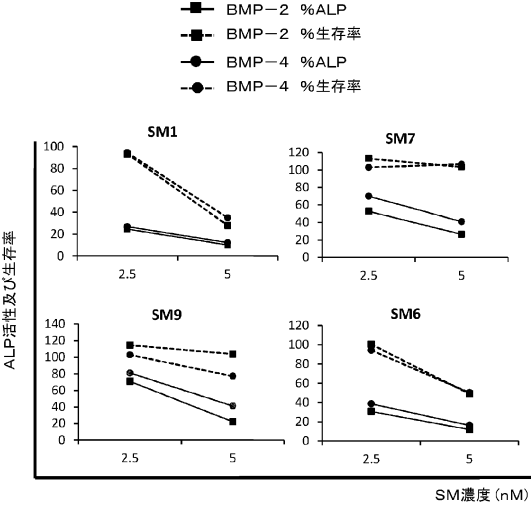
40

50

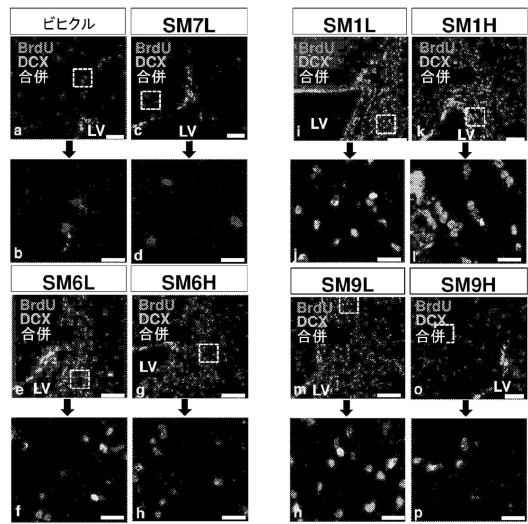
【 図 8 】



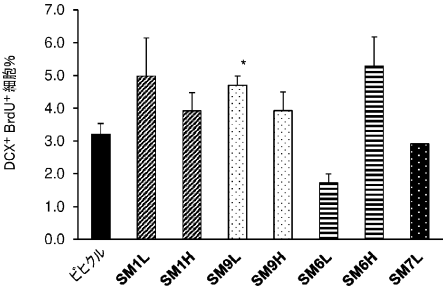
【 図 9 】



【 図 10 A 】



【 図 10 B 】



10

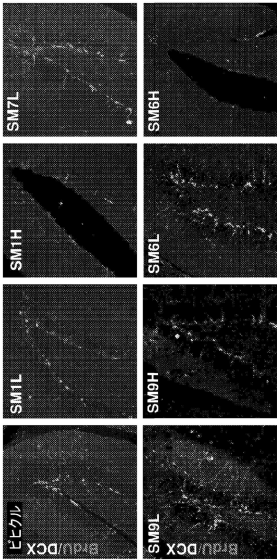
20

30

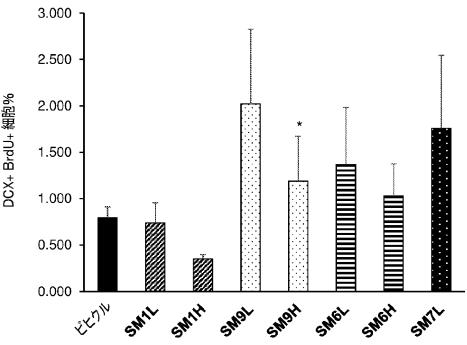
40

50

【図 1 1 A】

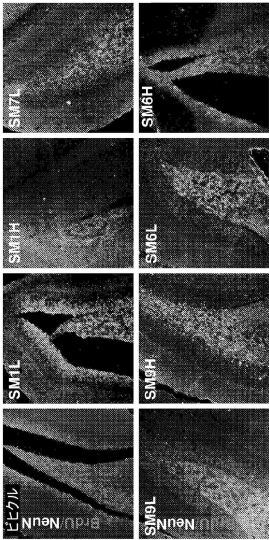


【図 1 1 B】

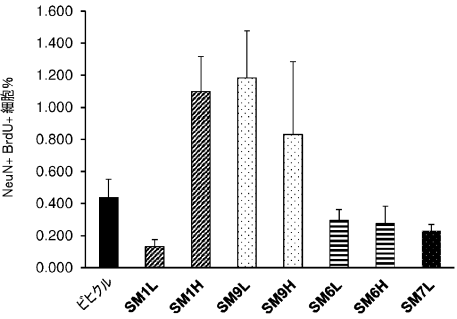


10

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



20

30

40

50

## フロントページの続き

レット ツィオン ヤスミン ストリート 43  
(72)発明者 ファインベルク カリン ベルナデット  
イスラエル国 52451 ラマット ガン ピアリク 32  
審査官 伊藤 幸司  
(56)参考文献 国際公開第2013/186777(WO, A2)  
特表2005-538060(JP, A)  
特表2016-515119(JP, A)  
特開2012-105555(JP, A)  
特表2012-533545(JP, A)  
特表2011-514908(JP, A)  
中国特許出願公開第1807411(CN, A)  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A61K  
A61P  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)