

【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19年7月5日(2007.7.5)

【公表番号】特表2006-526634(P2006-526634A)
 【公表日】平成18年11月24日(2006.11.24)
 【年通号数】公開・登録公報2006-046
 【出願番号】特願2006-514920(P2006-514920)
 【国際特許分類】

A 6 1 K 31/166 (2006.01)
A 6 1 K 31/245 (2006.01)
A 6 1 K 31/167 (2006.01)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)
A 6 1 K 9/20 (2006.01)
A 6 1 K 9/48 (2006.01)
A 6 1 K 9/12 (2006.01)
A 6 1 K 47/26 (2006.01)
A 6 1 K 47/32 (2006.01)
A 6 1 K 47/38 (2006.01)
A 6 1 K 47/12 (2006.01)
C 0 7 C 219/34 (2006.01)
C 0 7 C 237/34 (2006.01)
C 0 7 C 237/20 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 31/166
 A 6 1 K 31/245
 A 6 1 K 31/167
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/00 1 0 1
 A 6 1 K 9/08
 A 6 1 K 9/20
 A 6 1 K 9/48
 A 6 1 K 9/12
 A 6 1 K 47/26
 A 6 1 K 47/32
 A 6 1 K 47/38
 A 6 1 K 47/12
 C 0 7 C 219/34
 C 0 7 C 237/34
 C 0 7 C 237/20

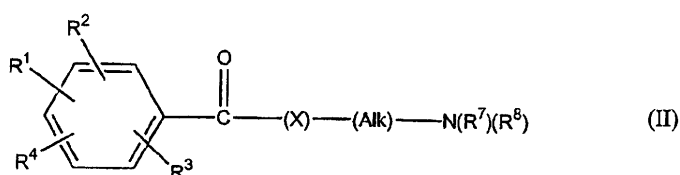
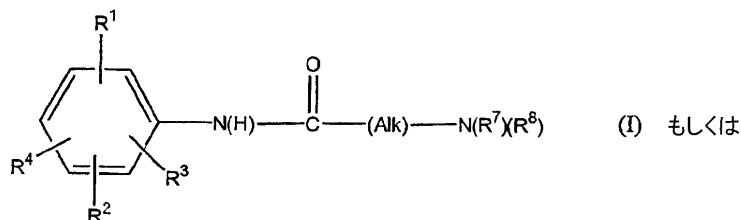
【手続補正書】
 【提出日】平成19年5月18日(2007.5.18)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】特許請求の範囲
 【補正対象項目名】全文
 【補正方法】変更
 【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経病態の徴候の観られるもしくは神経病態を患う哺乳類の処置のための医薬を調製するための、構造式 I もしくは構造式 II の化合物の使用方法であって、前記医薬は前記哺乳類に投与されるように構成されており、また、前記医薬は、構造式 I もしくは構造式 II の前記化合物、

【化 1】



(ここで、式中の

a) R^1 、 R^2 および R^3 が、独立に、H、OH基、ハロ基、CN基、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルコキシ基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルコキシ基、 (C_3-C_6) シクロアルキル $((C_1-C_6)$ アルキル)基、 (C_2-C_6) アルケニル基、 (C_2-C_6) アルキニル基、 (C_1-C_6) アルカノイル基、ハロ (C_1-C_6) アルキル基、ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルコキシカルボニル基、または、 (C_1-C_6) アルキルチオ基、チオ (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルカノイルオキシ基、または $N(R^5)(R^6)$ であるか、あるいは、 R^1 と R^2 とが共にメチレンジオキシ基となっており、

b) R^4 が、H、 (C_1-C_6) アルコキシ基、もしくは $N(R^5)(R^6)$ であって、

c) R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 が、独立に、H、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル $((C_1-C_6)$ アルキル)基、 (C_2-C_6) アルケニル基、アリール基、アリール (C_1-C_6) アルキル基、アリール (C_2-C_6) アルケニル基、ヘテロアリール基、ヘテロアリール (C_1-C_6) アルキル基、であって、前記のシクロアルキル基はオプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含むか、あるいは、 R^5 および R^6 、または R^7 および R^8 が、前記のNと共に、五員環もしくは六員環である複素環または複素芳香環であって、オプションとして R^1 で置換されていて、さらにオプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含むような、複素環または複素芳香環を構成しており、

d) (Alk) が、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_2-C_6) アルケニル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル (C_2-C_6) アルキル基、もしくは、 $[(C_2-C_6)$ アルキル (C_3-C_6) シクロアルキル $[(C_3-C_6)$ アルキル]基、であって、オプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含む、ならびに、

e) X が、OもしくはNH基である。)

あるいは、薬学的に許容されうるこれらの化合物の塩であって、構造式(I)の R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の内の二つが (C_1-C_3) アルキル基では無いことを条件とする、神経保護作用上の有効量を含むことを特徴とする、使用方法。

【請求項 2】

前記 (Alk) が、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、もしくは $-(CH_2)_4-$ のような (C_1-C_4) アルキル基であることを特徴とする、請求項 1 記載の使用方法。

【請求項 3】

前記の R^1 、 R^2 、 R^3 もしくは R^4 の内のひとつまたは二つが、 $N(R^5)(R^6)$ であることを特徴とする、請求項 1 もしくは 2 に記載の使用方法。

【請求項 4】

前記の R^5 および R^6 の双方が、 H であることを特徴とする、請求項 1、2 もしくは 3 に記載の使用方法。

【請求項 5】

前記の R^7 および R^8 の一方または双方が、 (C_1-C_6) アルキル基もしくは (C_3-C_6) シクロアルキル基であるか、あるいは、一方が H であって、他方が (C_1-C_6) アルキル基もしくは (C_3-C_6) シクロアルキル基であることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 6】

前記の R^1 、 R^2 、 R^3 もしくは R^4 の内のひとつまたは二つが、 (C_1-C_6) アルコキシ基であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 7】

前記の $(R^5)(R^6)N-$ が、パラ位もしくは位置番号4であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 8】

前記の R^1 、 R^2 、 R^3 もしくは R^4 の内のひとつまたは二つが、アミノ基であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 9】

前記の R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、 H であることを特徴とする、請求項 1 記載の使用方法。

【請求項 10】

前記化合物が、プロカインアミド、プロカイン、テトラカイン、もしくは薬学的に許容されるこれらの塩であることを特徴とする、請求項 1 記載の使用方法。

【請求項 11】

前記化合物を、経口投与することを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 12】

前記化合物を、非経口的に投与することを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 13】

前記化合物を、吸入もしくはガス注入によって与えることを特徴とする、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 14】

前記神経病態が、アルツハイマー病であることを特徴とする、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 15】

前記量が、 $A\beta$ ペプチドに起因する神経毒性を阻害するために有効な量であることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 16】

前記量が、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ もしくは $A\beta_{1-43}$ の神経毒性を阻害するために有効な量であることを特徴とする、請求項 15 記載の使用方法。

【請求項 17】

前記量が、グルタマート起因の神経毒性を阻害するために有効な量であることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 18】

前記神経病態が、グルタマート経路の過剰興奮に因るものであることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 19】

前記量が、神経細胞内のATP量を維持するために有効な量であることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 20】

構造式 I もしくは II の前記化合物が、ヒトに投与されることを特徴とする、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 21】

前記ヒトが、ADの初期段階にあることを特徴とする、請求項 20 記載の使用方法。

【請求項 22】

前記ヒトが、ADの患者であることを特徴とする、請求項 21 記載の使用方法。

【請求項 23】

前記ヒトが、血管性痴呆を患うことを特徴とする、請求項 20 記載の使用方法。

【請求項 24】

前記の R^2 が、Hであることを特徴とする、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 25】

前記の R^3 が、Hであることを特徴とする、請求項 24 記載の使用方法。

【請求項 26】

前記の R^1 、 R^2 および R^3 のそれぞれが、Hであることを特徴とする、請求項 25 記載の使用方法。

【請求項 27】

構造式(I)もしくは(II)の前記化合物が、薬学的に許容される担体と組み合わせられて投与されることを特徴とする、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の使用方法。

【請求項 28】

前記担体が液体であることを特徴とする、請求項 27 記載の使用方法。

【請求項 29】

前記担体が固体であることを特徴とする、請求項 27 記載の使用方法。

【請求項 30】

薬学的に許容される担体と組み合わせられた、構造式(I)もしくは(II)の化合物を含むことを特徴とする、製剤。

【請求項 31】

グルタマート神経系もしくは経路の伝達亢進を含む神経障害を処置する医薬を調製するための構造式 I もしくは構造式 II の化合物の使用方法であって、

前記医薬が、前記神経障害の徴候の観られるもしくは前記神経障害を患う哺乳類に投与されるように構成され、

前記医薬が、構造式 I もしくは構造式 II の前記化合物の有効量を投与することを

含むことを特徴とする、使用方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

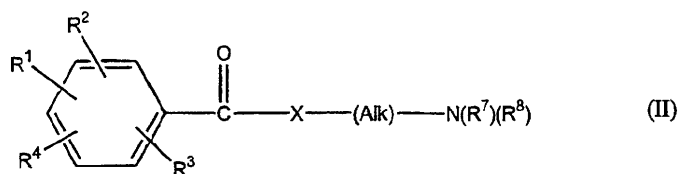
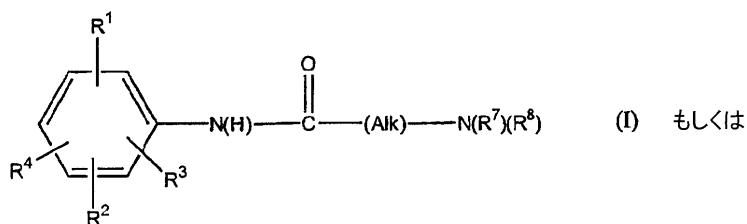
【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0004】

【化 2】



ここで、式中の、

a) R^1 、 R^2 および R^3 が、独立に、H、OH基、ハロ基、CN基、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルコキシ基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルコキシ基、 (C_3-C_6) シクロアルキル $((C_1-C_6)$ アルキル)基、 (C_2-C_6) アルケニル基、 (C_2-C_6) アルキニル基、 (C_1-C_6) アルカノイル基、ハロ (C_1-C_6) アルキル基、ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルコシカルボニル基、または、 (C_1-C_6) アルキルチオ基、チオ (C_1-C_6) アルキル基、 (C_1-C_6) アルカノイルオキシ基、または $N(R^5)(R^6)$ であるか、あるいは、 R^1 と R^2 とが共に、メチレンジオキシ基となっており

b) R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 が、独立に、H、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル $((C_1-C_6)$ アルキル)基、 (C_2-C_6) アルケニル基、アリール基、アリール (C_1-C_6) アルキル基、アリール (C_2-C_6) アルケニル基、ヘテロアリール基、ヘテロアリール (C_1-C_6) アルキル基、であって、前記のシクロアルキル基はオプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含むか、あるいは、 R^5 および R^6 、または R^7 および R^8 が、前記のNと共に、五員環もしくは六員環である複素環または複素芳香環であって、オプションとして R^1 で置換されている、また、オプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含むような、複素環または複素芳香環を構成しており、

c) (Alk) が、 (C_1-C_6) アルキル基、 (C_2-C_6) アルケニル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル基、 (C_3-C_6) シクロアルキル (C_2-C_6) アルキル基、もしくは、 $[(C_2-C_6)$ アルキル (C_3-C_6) シクロアルキル (C_3-C_6) アルキル]基、であって、オプションとして1~2個のS、過酸化物ではないO、もしくは $N(R^5)$ を含み、ならびに、

d) X が、O もしくは NH基である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

好ましくは、(Alk) は、 $-(CH_2)-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、もしくは $-(CH_2)_4-$ のような (C_1-C_4) アルキル基である。

好ましくは、 R^1 、 R^2 、 R^3 もしくは R^4 の内のひとつまたは二つが、 $N(R^5)(R^6)$ である。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

本発明は、AD患者のようなヒトといった哺乳類に観られる少なくともひとつのADの徴候を処置するために有用な薬剤を製造するために使用される構造式 I もしくは II の化合物のみならず、（例えば、ADを患うもしくはADの徴候のある哺乳類に用いるような）投薬治療に用いる構造式 I もしくは II の化合物を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

局所麻酔薬もしくは局所麻酔薬のすべては本発明において有用であると思われ、また、哺乳類の神経伝達を一時的に遮断する、技術的に認識される薬剤の種類である。これらは概して以下の三種の化学構造的分類に括することができる。すなわち、リドカインのような N-アリアルアミド類もしくはカルボキサミド類、ならびに、プロカイン、ベノキシナート（benoxinate）、およびプロパラカイン（proparacaine）のようなアミノアルキルベンゾアート類、ならびに、プロカインアミドのようなアミノアルキルベンゾアミド類である。好ましい N-アリアルアミドは、アミノ置換(C₁-C₅)カルボン酸の N-(C₇-C₂₂)アリアルアミド類であって、例えば、脂肪族(C₁-C₅)カルボン酸の N-[(モノ(C₁-C₄)アルキル)フェニル]アミドもしくは N-[(ジ(C₁-C₄)アルキル)フェニル]アミドであり、ここで酸は、R⁷ が H もしくは (C₁-C₅)アルキル基であり、R⁸ が (C₁-C₅)アルキル基であるような (R⁷)(R⁸)N-基で置換されているのが好ましい。例えば、好ましいカルボン酸は一般の構造式 (R⁷)(R⁸)N(X)CO₂H を有し、ここで、R⁷ および R⁸ は上述したものであり、また、X は、1,1-エチレン基、1,2-エチレン基、メチレン基、2,2-プロピレン基、1,3-プロピレン基、およびその類似物のような、分鎖もしくは直鎖の (C₁-C₅)アルキレン基である。別の好ましい種類の N-アリアルアミドとしては、五員環もしくは六員環の複素環脂肪族カルボン酸類の N-[(モノ(C₁-C₄)アルキル)フェニル]アミドまたは N-[(ジ(C₁-C₄)アルキル)フェニル]アミドであって、ここで酸は、ひとつもしくは二つの [(C₁-C₄)アルキル置換]N原子、すなわち、N-ブチルピペリジン-2-カルボン酸を含む。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

有用な局所麻酔薬は、クロロプロカイン（4-アミノ-2-クロロ安息香酸=2-(ジエチルアミノ)エチルエステル）（chloroprocaine; 4-amino-2-chlorobenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester）、プロカイン（4-アミノ安息香酸=2-(ジエチルアミノ)エチルエステル）（procaine; 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester）、テトラカイン（4-(ブチルアミノ)安息香酸=2-(ジメチルアミノエチル)エステル（tetracaine; 4-(butylamino)benzoic acid 2-(dimethylaminoethyl ester)）、Shupe（米国特許3,272,700号）を参照のこと、ならびに、ベノキシナート（4-アミノ-3-ブトキシ安息香酸=2-(ジエチルアミノ)エチルエステル）（benoxinate; 4-amino-3-butoxybenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester）（英国特許654,484号）、ならびに、プロパラカイン（3-アミノ-4-プロポキシ安息香酸=2-(ジエチルアミノ)エチルエステル）（proparacaine; 3-amino-4-propoxybenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester）、イソブカイン（2-メチル-2-[(2-メチルプロピル)アミノ]安息香酸 1-プロパノール）（isobucain; 1-propanol, 2-methyl-2-[(2-methylpropyl)amino]benzoate）、メプリルカイン（[(2-メ

チル)(2-プロピルアミノ)プロピル]ベンゾアート) (meprylcaine; [(2-methyl)(2-propylamino)propyl]benzoate)、ピペロカイン(2-メチルピペリジン-1-イルプロピル(ベンゾアート)) (piperocaine; 2-methylpiperidin-1-ylpropyl(benzoate))、プロポキシカイン(2-(ジエチルアミノ)エチル-([2'-メチル-4'-アミノ]ベンゾアート)) (propoxycaine; 2-(diethylamino)ethyl-([2'-methyl-4'-amino]benzoate))、ブタカイン(((3-ジブチルアミノ)プロピル)-(2'-アミノベンゾアート)) (butacaine; ((3-diethylamino)propyl)-(2'-aminobenzoate))、シクロメチルカイン(((3-2'-メチルピペリジン-1-イル))プロピル)-[4'-シクロヘキシルオキシ-ベンゾアート]) (cyclomethylcaine; ((3-2'-methylpiperidine-1-yl))propyl)-[4'-cyclohexyloxy-benzoate])、ヘキシルカイン([2-シクロヘキシルアミノ)(1-メチル)]エチル(ベンゾアート)) (hexylcaine; ([2-cyclohexylamino)(1-methyl)]ethyl(benzoate))、ならびに、プロパラカイン(((2-ジエチルアミノ)エチル)[(4'-プロピルオキシ-3'-アミノ)ベンゾアート]) (proparacaine; ((2-diethylamino)ethyl)[(4'-propyloxy-3'-amino)benzoate])、を含む。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

本発明に係る化合物の、抗ウイルス薬としての能力は、当該技術において公知である薬理学的モデルを用いるか、もしくは後述する試験法を用いて、定量することができる。

以下の記述は、ヒトに用いる治療もしくは予防のための構造式 I の化合物を含む、薬学的な投与形態を示す。

(i) 錠剤 1	mg/錠
プロカインアミド	100.0
乳糖	77.5
ポビドン	15.0
クロスカルメロースナトリウム	12.0
微細結晶セルロース	92.5
ステアリン酸マグネシウム	3.0
300.0	

(ii) 錠剤 2	mg/錠
テトラカイン	20.0
微細結晶セルロース	410.0
デンプン	50.0
デンプングリコール酸ナトリウム	15.0
ステアリン酸マグネシウム	5.0
500.0	

(iii) カプセル	mg/カプセル
テトラカイン	10.0
コロイド二酸化珪素	1.5
乳糖	465.5
アルファ化デンプン	120.0
ステアリン酸マグネシウム	3.0
600.0	

(iv) 注射液 1 (1mg/ml)	mg/ml
リドカイン	1.0
リン酸水素二ナトリウム	12.0
リン酸二水素ナトリウム	0.7
塩化ナトリウム	4.5
1.0N 水酸化ナトリウム水溶液 (pH 7.0-7.5に調整)	適量
注射用水	1mL程度

(v) 注射液 2 (10mg/ml)	mg/ml
プロカイン	10.0
リン酸二水素ナトリウム	0.3
リン酸水素二ナトリウム	1.1
ポリエチレングリコール400	200.0
0.1N 水酸化ナトリウム水溶液 (pH 7.0-7.5に調整)	適量
注射用水	1mL程度

(vi) エアロゾル	mg/缶
リドカイン	20.0
オレイン酸	10.0
トリクロロモノフルオロメタン	5,000.0
ジクロロジフルオロメタン	10,000.0
ジクロロテトラフルオロエタン	5,000.0

本発明について、後述する詳細な例を参照してさらに記述する。なお、 $A\beta_{1-42}$ ペプチドは American Peptide Co. (Sunnyvale, CA) から購入した。プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロカインアミド、酸化防止剤としての tert-ブチル-フェニルニトロソ (PBN)、N-メチル-D-アスパラート (NMDA) 受容体拮抗薬としての (+)-M801、およびテトロドトキシン (TTX) は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロカインアミド、SP015、SP016およびSP017は図1に示した。細胞培養供給器は GIBCO (Grand Island, NY) から、細胞培養プラスチック容器は Coming (Corning, NY) および Packard BioSciences Co. (Meriden, CT) から購入した。RNA STAT-60 は TEL-TEST, Inc. (Friendswood, TX) から入手した。TaqMan(R) 逆転写剤、ランダムヘキサマー、および SYBR(R) Green PCR Master Mix は、Applied Biosystems (Foster City, CA) から入手した。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

[G. リアルタイムRT-PCR定量法 (Q-PCR)]

六穴プレートで18時間培養したPC12細胞を、プロカインの濃度を高めながら、必要な時間をかけて処理した。処理後、細胞を $1\mu\text{M}$ の $A\beta_{1-42}$ に24時間曝露した。培養の終わりに、RNA STAT-60 (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX) を製造者の指示に従って用いて、細胞の total RNAを抽出した。ABI Prism 7700 sequence detection system (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Foster, City, CA) を用いたQ-PCR法によって、HMG-CoA還元酵素mRNAを定量した。RT反応 (逆転写酵素反応) は、公知の方法 [Xu et al. (2003) J. Pharmacol. Ther., 307:1148-57] にしたがって、それぞれの反応について TaqMan(R)

Reverse Transcription Reagents に、1 μ g の total RNA、およびプライマーとしてランダムヘキサマーを併せて用いた。ラットの HMG-CoA還元酵素 mRNA を、Q-PCR法によって定量するために、プライマーおよびプローブの選択のために構成された PE/AB Primer Express software を用いて、プライマーを GenBank Accession Number BC 019782 にしたがって設計した。上述したプライマーは、5'-GAC TGT GGT TTG TGA AGC TGT CAT-3' (24 nucleotides) であり、逆転写プライマーは、5'-AAT ACT TCT CTC ACC ACC TTG GCT-3' (24 nucleotides) である。プライマーは、BioSynthesis, Inc. (Lewisville, TX) が合成したものである。反応は、10 μ l の SYBR(R) Green PCR Master Mix、および 1 μ l のプライマー混合液に、2 μ l の cDNA を溶いたものを含む、20 μ l の反応混合液中で行った。以下のサイクルの条件を用いた。すなわち、初期ステップとして 50°C で 2 分間および 95°C で 10 分間、を行った後に、95°C で 15 秒および 60°C で 1 分間、を 40 サイクル行った。AmpliTaq Gold ポリメラーゼは、95°C に 10 分間置いて活性化した。同時に 18S RNA を増幅し、内部対照として用いた。プライマーダイマーのような、PCR 産物の非特異的産物の汚染を除くために、サイクル手順の後に、すべての最終 PCR 産物に対して融解曲線分析を行った。また、ゲノム DNA の汚染を除くために、それぞれのサンプルに対して、RT 反応を起こさない PCR 反応も行った。PCR 産物を回収し、3% (w/v) アガロース電気泳動ゲル上で泳動させて産物の大きさを確認した。18S RNA およびサンプルの Ct 値 (threshold cycle values; Ct values) を、PE/AB computer software を用いて算出した。Ct は、反応が最大の指数増殖期にあるところに定めた。依存的転写量を $x = 2^{\Delta \Delta Ct}$ として計算し、ここで、 $\Delta \Delta Ct = \Delta E - \Delta C$ であり、また $\Delta E = Ct_{\text{experiment}} - Ct_{18S}$ 、 $\Delta C = Ct_{\text{control}} - Ct_{18S}$ である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

〔考察〕

過去の十年を通して、ADに関連するコリン作動性神経系 (cholinergic network) の機能障害の改善が科学コミュニティにおける主要な論点となっている。これによって、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (acetylcholinesterase inhibitors; AChEI) が、タクリンを筆頭とした治療分類として創設されることになった。有望な臨床データにもかかわらず、タクリンの有用な作用効果は控えめなものであり、また、新世代の AChEI として示されているガラントミン (galantamine) およびドネペジルは、症候の遅延をタクリンと比較して改善できていない。この 1~2 年間程度の短期の遅延は、患者とその関係者にとってはかけがえのないものではあるけれども、おそらくはコリン作動性のニューロンの進行性変性 (progressive degeneration) に因るものであり、AChEI の使用を制限するものとなる。AD によって損なわれた患者のコリン作動性神経伝達の改善が、実際の価値と必要性を有しているとは言え、これはこの病気の進行を食い止めるもしくは回復に向かわせるには不十分なものである。近年、グルタマート作動性 NMDA サブタイプ受容体の拮抗薬であるメマンチン (memantine) が承認されて米国市場にリリースされているが、AD 薬の開発においては大きな進展がなされていないと言える。本発明は、プロカインを出発点としたデータベースのスクリーニングによって得られた天然化合物の類似系統から誘導された、新しい分類の化合物を与えるものである。これらの分子は、ラット褐色細胞腫である PC12 細胞を、 $A\beta_{1-42}$ の神経毒性から保護することができる。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、プロカインの化学構造式、およびいくつかのプロカイン誘導体の化学構造式を示したものである。SP015、SP016、およびSP017は、プロカインおよびプロカインアミドを部分構造とした天然化合物データベースのスクリーニングによって同定されたものである。

【図2】 図2（のパネルA～C）は、MTT法によって測定された、ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞の生長への $A\beta_{1-42}$ の作用を示すグラフ（A）、および、細胞内のATP濃度の測定によって測定された、ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞の生存率への $A\beta_{1-42}$ の作用を示すグラフ（B）である。遊離ラジカルの生成における $A\beta_{1-42}$ の作用を、蛍光プローブ（蛍光標識）である 2,7-DCF を用いて測定した（C）。 $A\beta_{1-42}$ の濃度を高めながらPC12細胞に曝露し（Cは対照群を指す）、曝露の24時間後に種々のパラメータを測定した。統計的解析は、一方向ANOVAに続いてDunnett法によって行った。Mean $\pm$ SD, n=6。特に定めない限り、対照群と比較して * : $p<0.05$, *** : $p<0.001$ 。

【図3】 $A\beta_{1-42}$ の神経毒性に対する、非競合性NMDA拮抗薬である (+)-MK801 の保護作用である。PC12細胞は、 $A\beta_{1-42}$ の濃度を高めながら24時間曝露する前に、(+)-MK801 の濃度を高めながら24時間前培養した。細胞生存率はMTT法によって測定した。対照細胞（C）は、(+)-MK801 にも $A\beta_{1-42}$ にも曝露しなかった。統計的解析は、一方向ANOVAに続いてDunnett法によって行った。Mean $\pm$ SD, n=6。 (+)-MK801 0 μ M と比較して * : $p<0.05$, *** : $p<0.001$ 。

【図4】 PC12細胞における $A\beta_{1-42}$ 起因の遊離ラジカルの生成に対する、化合物の作用である。PC12細胞は、 $A\beta_{1-42}$ の濃度を高めながら曝露する前に、プロカイン（A）、リドカイン（B）、テトラカイン（C）、およびプロカインアミド（D）の濃度を高めながら24時間前培養した。遊離ラジカルの生成は、24時間の $A\beta_{1-42}$ への曝露の後に、蛍光プローブである 2,7-DCF を用いて測定した。対照細胞は、薬理学的な試薬 にも $A\beta_{1-42}$ にも曝露しなかった。統計的解析は、一方向ANOVAに続いてDunnett法によって行った。Mean $\pm$ SD, n=6。濃度 0 μ M と比較した。図を見やすくするため、有意度を表す星印は付していない。

【図5】 PC12細胞のグルタマートに起因する細胞死に対する、プロカインおよびSP008（(4-エチルピペラジニル-1-イル)-2',3',4'-トリメトキシベンゾアート）の神経保護作用である。PC12細胞は、100 μ M のグルタマートに24時間曝露する前に、プロカインもしくはSP008の濃度を高めながら24時間前培養した。細胞生存率はMTT法によって測定した。統計的解析は、一方向ANOVAに続いてDunnett法によって行った。Mean $\pm$ SD, n=6。0 μ M と比較して ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ 。対照群と比較して ^{xxx} : $p<0.001$ 。

【図6】 PC12細胞における、HMG-CoA還元酵素mRNAの合成に対する、プロカインの作用である。PC12細胞は、 $A\beta_{1-42}$ 1 μ M に24時間曝露する前に、プロカイン 1 μ M もしくは 10 μ M で18時間前培養した。24時間の期間の最後に、リアルタイムPCR定量法（real time quantitative PCR）を用いて発現したHMG-CoA mRNAを定量した。統計的解析は、一方向ANOVAに続いてDunnett法によって行った。Mean $\pm$ SD, n=3。特に定めていない限り、対照群と比較して * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$ 。