(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6566867号
(P6566867)

(45)発行日　令和1年8月28日(2019.8.28)　(24)登録日　令和1年8月9日(2019.8.9)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/68	(2006.01)	GO1N	33/68	ZNA
G01N 33/53	(2006.01)	GO1N	33/53	D
C07D 217/04	(2006.01)	CO7D	217/04	
C07D 215/06	(2006.01)	CO7D	215/06	
C07D 265/30	(2006.01)	CO7D	265/30	

請求項の数 29　(全 186 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-521863(P2015-521863)
(86)(22)出願日　平成25年7月12日(2013.7.12)
(65)公表番号　特表2015-529802(P2015-529802A)
(43)公表日　平成27年10月8日(2015.10.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/050368
(87)国際公開番号　WO2014/012054
(87)国際公開日　平成26年1月16日(2014.1.16)
審査請求日　平成28年7月12日(2016.7.12)
(31)優先権主張番号　61/671,445
(32)優先日　平成24年7月13日(2012.7.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　61/789,180
(32)優先日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515011210
ペイン　セラピューティクス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４４０４　サン　マテオ　ブリッジポイント　パークウェイ　２２１１　スイート　５００
(74)代理人　100092093
弁理士　辻居　幸一
(74)代理人　100082005
弁理士　熊倉　禎男
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井　賢治
最終頁に続く

(54)【発明の名称】生きている患者でのアルツハイマー病アッセイ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

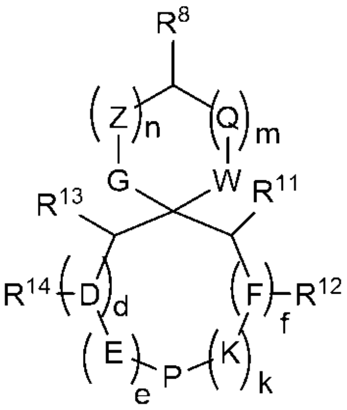
生きている患者のアルツハイマー病病理（ＡＤ病理）を有する可能性を測定する方法であって、以下の工程：

ａ）該生きている患者由来の身体標本調製物の第一の部分に存在する、ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量、あるいはＡβ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲの量、あるいは１種又は複数のタンパク質タンパク質複合体ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβの量を測定する工程；

ｂ）該身体標本調製物の第二の部分中の、該ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量、あるいはＡβ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲの量、あるいはタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Аβの量を測定する工程であって、該身体標本調製物の該第二の部分には、配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）のペンタペプチドに結合する化合物又は該化合物の薬学的に許容可能な塩が、更に、ＦＬＮＡ結合有効量で混合され含有されている工程；及び

ｃ）そのようにして測定された該値を比較する工程であって、比較することにより、該身体標本調製物の第二の部分中の、該ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量、あるいはＡβ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲの量、あるいはタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／

ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβの量について測定された量が、該化合物又は該化合物の該薬学的に許容可能な塩の存在下で有意に減少している場合は、該身体標本を採取した時点で該患者がＡＤ病理を有していたことを示し、一方該２つの測定値に有意差がない場合は、該身体標本を採取した時点で該患者がＡＤ病理を有していなかったことを示す工程、
を含み、
配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）のペンタペプチドに結合する前記化合物が、以下で規定される化合物（１）～（４）からなる群から選択されることを特徴とする方法。
（１）以下の式Ａの構造に一致する系列Ｃ－２の化合物、



A

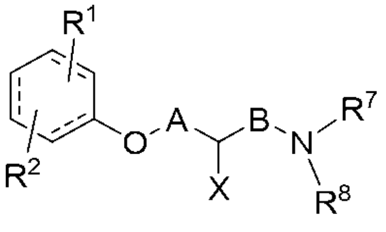
（式中
Ｑは、ＣＨＲ^{9}又はＣ（Ｏ）であり、Ｚは、ＣＨＲ^{10}又はＣ（Ｏ）であり、かつＱ及びＺのうち１つだけがＣ（Ｏ）であり；
ｍ及びｎは、それぞれが０また１であり、かつｍ＋ｎの合計は、１又は２であり；
Ｇ、Ｐ、及びＷは、それぞれが、ＮＲ^{20}、ＮＲ^{2}、ＮＲ^{7}、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、ここで、Ｒ^{7}及びＲ^{2}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ（Ｈ）$_{v}$（Ｄ）$_{h}$（式中、ｖ及びｈは、それぞれが、０、１、２、又は３であり、かつｖ＋ｈ＝３である）、Ｃ（Ｈ）$_{q}$（Ｄ）$_{r}$－脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{11}$ヒドロカルビル（式中、ｑ及びｒは、それぞれが、０、１、又は２であり、かつｑ＋ｒ＝０、１、又は２である）、脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビルスルホニル、又は脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルボイルであり、かつＲ^{20}は、以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－Ｒ^{1}であり；
ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれが、０又は１いずれかであり、（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）の合計＝２であり；
Ｄ及びＦは、同じであるか異なっていて、ＣＨ又はＣＤであり；
Ｅ及びＫは、同じであるか異なっていて、ＣＨ$_{2}$、ＣＨＤ、又はＣＤ$_{2}$であり；
Ｘは、ＳＯ$_{2}$、Ｃ（Ｏ）、ＣＨ$_{2}$、ＣＤ$_{2}$、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり、
環Ａは、芳香環系又はヘテロ芳香環系であり、この環系は、単環又は縮合した２つの環を含み；
Ｒ^{1}は、Ｈであるか、又は上限３個までの置換基、Ｒ^{1a}、Ｒ^{1b}、及びＲ^{1c}、を表し、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよく、これら３つの基、Ｒ$^{1a-c}$は、それぞれが個別に、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル置換、もしくはハロゲン置換のＣ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルスルホニル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルビルカルボキシラート、カルボキサミドもしくはスルホンアミド（アミド窒素はいずれのアミド基にあっても式ＮＲ^{3}Ｒ^{4}を有し、式中、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$ヒドロカルビルであるか、又はＲ^{3}とＲ^{4}は、該示さ

れている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、ＭＡｒ（式中、Ｍは、$-CH_2-$、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは、単環のアリール又はヘテロアリール基である）、及びNR^5R^6（式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、からなる群より選択され；

R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであるか、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1-C_8ヒドロカルビル基であって、このC_1-C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、該原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；

R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、あるいはR^{11}及びR^{13}はＨであり、かつR^{12}及びR^{14}はＨ又はＤであるか、あるいはR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が、該示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、Ｈ及びＤである。）

（２）以下の式Ａの構造に一致する系列Ａの化合物、



A

（式中

R^1及びR^2は、同じであるか異なっていて、それぞれ独立して、Ｈ、ハロゲン、C_1-C_{12}ヒドロカルビル、C_1-C_6アシル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、CF_3、及びNR^3R^4からなる群より選択され、

R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^3とR^4は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

Ａ及びＢは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＤＨ、又はCD_2であり；

Ｘは、ＯＨ又はNR^5R^6であり

R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

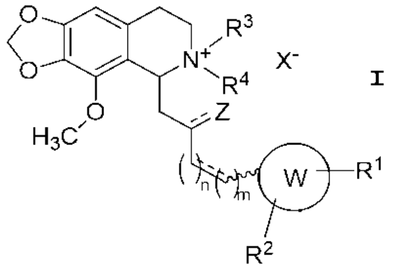
R^7及びR^8は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6アシル、C_1-C_6ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^7とR^8は、該示されている窒素と一緒になって環構造Ｗを形成し；

Ｗは、該示されている窒素を含めて５～１４個の原子を、該環構造中に有し、かつ随意に以下を有し：

ａ）１又は２個のさらなるヘテロ原子であって、該さらなるヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、又は硫黄である、及び

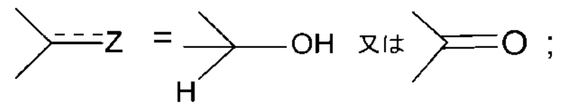
ｂ）１つ又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基であって、該１つ又は複数の置換基は、合計で上限８個まで原子を有し、該原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される；かつ

破線（－－－－）は、１、２、又は３本の随意の二重結合を表す。）
（３）以下の式Ｉの構造に一致する系列Ｂの化合物、

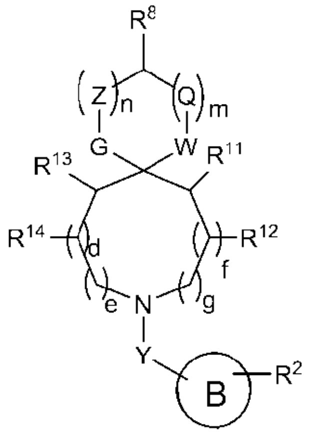


I

（式中
ｎ＝０又は１であり；
ｍ＝０又は１であり；
ｍ＋ｎ＝０、１、又は２であり；



Ｗは、芳香環であり、環中に０、１、又は２個のヘテロ原子を有し、該ヘテロ原子は、該環において、窒素、酸素、又は硫黄、あるいはそれらの混合物であることが可能であり；
Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビル、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、シアノ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、トリフルオロメチル、及びヒドロキシルからなる群より選択され；
Ｒ^{2}は、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビル、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルオキシ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、及びハロゲンからなる群より選択され；
Ｒ^{3}は、存在しないか、又はＣ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルであり；
Ｒ^{4}は、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ヒドロカルビルであり；
Ｘ$^-$は、アニオンであるか、又はＲ^{3}が存在しない場合は存在せず；
破線は、該示されている炭素原子間の随意の二重結合を示し；かつ
波線は、該随意の二重結合が存在する場合に、該示されているフェニル置換基がＺ配置にあることもＥ配置にあることも可能であることを示す。）、及び
（４）以下の式Ａの構造に一致する系列Ｃ－１の化合物。



A

（式中
Ｇ及びＷは、ＮＲ^{20}、ＮＲ^7、ＣＨ$_2$、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、ここで、Ｒ

^{7}は、Ｈ、C_1－C_{12}ヒドロカルビル、又はC_1－C_{12}ヒドロカルボイルであり、かつR^{20}は、以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－R^1基であり；

Ｘ及びＹは、同じであるか異なっていて、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｓ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり；

Ｑは、CHR^9又はＣ（Ｏ）であり；Ｚは、CHR^{10}又はＣ（Ｏ）であり；

ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれ、０又は１いずれかであり、かつ合計（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）＝２であり；

ｍ及びｎは、それぞれ、０又は１であり、かつｍ＋ｎの合計は、１又は２であり；

環Ａ及び環Ｂは、同じであるか異なっていて、芳香環系又はヘテロ芳香環系であり；

R^1及びR^2は、同じであるか異なっていて、それぞれが、水素であることも可能であるし、水素以外の上限３個までの置換基を表すことも可能であり（R^{1a}、R^{1b}、及びR^{1c}、ならびにR^{2a}、R^{2b}、及びR^{2c}）、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよく、これら６つの基$R^{1a\text{-}c}$及び$R^{2a\text{-}c}$は、それぞれ個別に、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、C_1－C_7ヒドロカルボイル、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル置換、もしくはハロゲン置換のC_1－C_7ヒドロカルボイル、C_1－C_6ヒドロカルビルスルホニル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、C_1－C_7ヒドロカルビルカルボキシラート、カルボキサミドもしくはスルホンアミド（該アミド窒素はいずれの基にあっても式NR^3R^4を有し、式中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビルであるか、又はR^3とR^4は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、ＭＡｒ（式中、Ｍは、$-CH_2-$、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは単環のアリール基である）、及びNR^5R^6（式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビル、C_1－C_4アシル、C_1－C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、からなる群より選択され；

R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであるか、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1－C_8ヒドロカルビル基であって、該C_1－C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、該原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；

R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、あるいはR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が、該示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、Ｈ及びＤである。）

【請求項２】

アルツハイマー病（ＡＤ）の可能性がある生きている患者における治療の予後を、配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）のペンタペプチドに結合する化合物又は該化合物の薬学的に許容可能な塩を用いて測定する方法であって、以下の工程：

ａ）該生きている患者由来の身体標本調製物の第一の部分に存在する、ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量、あるいはＡβ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲの量、あるいは１種又は複数のタンパク質タンパク質複合体ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβの量を測定する工程；

ｂ）該身体標本調製物の第二の部分中の、該ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量、あるいはＡβ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲの量、あるいはタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Аβの量を測定する工程であって、該第二の身体標本調製物には、配列番号１のＦＬＮＡペンタペ

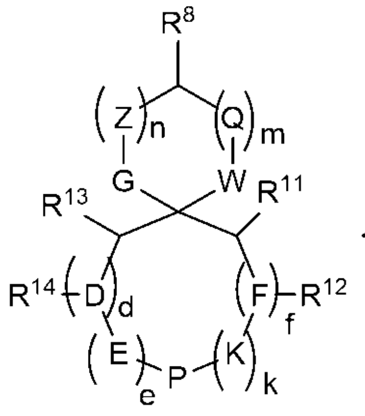
プチドに結合する化合物又はその塩がＦＬＮＡ結合有効量で外部から更に添加され含有されている工程；及び

ｃ）工程（ａ）及び工程（ｂ）で測定された該量を比較する工程であって、工程（ｂ）で測定された量が、工程（ａ）で測定された該値より有意に小さい場合は、該標本を採取した該患者にとって該治療を行ったことによる恩恵があるという予後と一致する工程、

を含み、

配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）のペンタペプチドに結合する前記化合物が、以下で規定される化合物（１）～（４）からなる群から選択されることを特徴とする方法。

（１）以下の式Ａの構造に一致する系列Ｃ－２の化合物、



A

（式中

Ｑは、ＣＨＲ^{9}又はＣ（Ｏ）であり、Ｚは、ＣＨＲ^{10}又はＣ（Ｏ）であり、かつＱ及びＺのうち１つだけがＣ（Ｏ）であり；

ｍ及びｎは、それぞれが０また１であり、かつｍ＋ｎの合計は、１又は２であり；

Ｇ、Ｐ、及びＷは、それぞれが、ＮＲ^{20}、ＮＲ^{2}、ＮＲ^{7}、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、ここで、Ｒ^{7}及びＲ^{2}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ（Ｈ）$_{v}$（Ｄ）$_{h}$（式中、ｖ及びｈは、それぞれが、０、１、２、又は３であり、かつｖ＋ｈ＝３である）、Ｃ（Ｈ）$_{q}$（Ｄ）$_{r}$－脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{11}$ヒドロカルビル（式中、ｑ及びｒは、それぞれが、０、１、又は２であり、かつｑ＋ｒ＝０、１、又は２である）、脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビルスルホニル、又は脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルボイルであり、かつＲ^{20}は、以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－Ｒ^{1}であり；

ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれが、０又は１いずれかであり、（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）の合計＝２であり；

Ｄ及びＦは、同じであるか異なっていて、ＣＨ又はＣＤであり；

Ｅ及びＫは、同じであるか異なっていて、ＣＨ$_{2}$、ＣＨＤ、又はＣＤ$_{2}$であり；

Ｘは、ＳＯ$_{2}$、Ｃ（Ｏ）、ＣＨ$_{2}$、ＣＤ$_{2}$、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり、

環Ａは、芳香環系又はヘテロ芳香環系であり、この環系は、単環又は縮合した２つの環を含み；

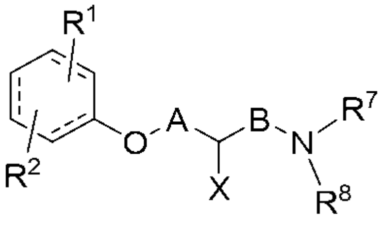
Ｒ^{1}は、Ｈであるか、又は上限３個までの置換基、Ｒ^{1a}、Ｒ^{1b}、及びＲ^{1c}、を表し、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよく、これら３つの基、Ｒ$^{1a-c}$は、それぞれが個別に、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル置換、もしくはハロゲン置換のＣ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルスルホニル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルビルカルボキシラート、カルボキサミドもしくはスルホンアミド（アミド窒素はいずれのアミド基にあっても式ＮＲ^{3}Ｒ^{4}を有し、式中、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$ヒドロカルビルであるか、又はＲ^{3}とＲ^{4}は、該示さ

れている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、ＭＡｒ（式中、Ｍは、$-CH_2-$、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは、単環のアリール又はヘテロアリール基である）、及びＮR^5R^6（式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、からなる群より選択され；

R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであるか、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1-C_8ヒドロカルビル基であって、このC_1-C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、該原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；

R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、あるいはR^{11}及びR^{13}はＨであり、かつR^{12}及びR^{14}はＨ又はＤであるか、あるいはR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が、該示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、Ｈ及びＤである。）

（２）以下の式Ａの構造に一致する系列Ａの化合物、



A

（式中

R^1及びR^2は、同じであるか異なっていて、それぞれ独立して、Ｈ、ハロゲン、C_1-C_{12}ヒドロカルビル、C_1-C_6アシル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、CF_3、及びＮR^3R^4からなる群より選択され、

R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^3とR^4は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

Ａ及びＢは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＤＨ、又はCD_2であり；

Ｘは、ＯＨ又はＮR^5R^6であり

R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

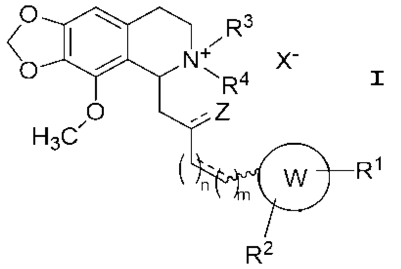
R^7及びR^8は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6アシル、C_1-C_6ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^7とR^8は、該示されている窒素と一緒になって環構造Ｗを形成し；

Ｗは、該示されている窒素を含めて５～１４個の原子を、該環構造中に有し、かつ随意に以下を有し：

ａ）１又は２個のさらなるヘテロ原子であって、該さらなるヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、又は硫黄である、及び

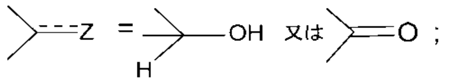
ｂ）１つ又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基であって、該１つ又は複数の置換基は、合計で上限８個まで原子を有し、該原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される；かつ

破線（－－－－）は、１、２、又は３本の随意の二重結合を表す。）
（３）以下の式Ｉの構造に一致する系列Ｂの化合物、

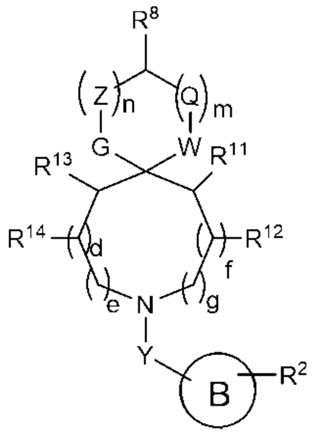


Ｉ

（式中
ｎ＝０又は１であり；
ｍ＝０又は１であり；
ｍ＋ｎ＝０、１、又は２であり；



Ｗは、芳香環であり、環中に０、１、又は２個のヘテロ原子を有し、該ヘテロ原子は、該環において、窒素、酸素、又は硫黄、あるいはそれらの混合物であることが可能であり；
R^1は、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、シアノ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、トリフルオロメチル、及びヒドロキシルからなる群より選択され；
R^2は、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、及びハロゲンからなる群より選択され；
R^3は、存在しないか、又はC_1－C_6ヒドロカルビルであり；
R^4は、C_1－C_6ヒドロカルビルであり；
X^-は、アニオンであるか、又はR^3が存在しない場合は存在せず；
破線は、該示されている炭素原子間の随意の二重結合を示し；かつ
波線は、該随意の二重結合が存在する場合に、該示されているフェニル置換基がＺ配置にあることもＥ配置にあることも可能であることを示す。）、及び
（４）以下の式Ａの構造に一致する系列Ｃ－１の化合物。



Ａ

（式中

Ｇ及びＷは、ＮＲ^{20}、ＮＲ^{7}、ＣＨ$_{2}$、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、ここで、Ｒ^{7}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビル、又はＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルボイルであり、かつＲ^{20}は、以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－Ｒ^{1}基であり；

Ｘ及びＹは、同じであるか異なっていて、ＳＯ$_{2}$、Ｃ（Ｏ）、ＣＨ$_{2}$、ＣＤ$_{2}$、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｓ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり；

Ｑは、ＣＨＲ^{9}又はＣ（Ｏ）であり；Ｚは、ＣＨＲ^{10}又はＣ（Ｏ）であり；

ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれ、０又は１いずれかであり、かつ合計（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）＝２であり；

ｍ及びｎは、それぞれ、０又は１であり、かつｍ＋ｎの合計は、１又は２であり；

環Ａ及び環Ｂは、同じ又は異なる、芳香環系又はヘテロ芳香環系であり；

Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、同じであるか異なっていて、それぞれが、水素であることも可能であるし、水素以外の上限３個までの置換基を表すことも可能であり（Ｒ^{1a}、Ｒ^{1b}、及びＲ^{1c}、ならびにＲ^{2a}、Ｒ^{2b}、及びＲ^{2c}）、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよく、これら６つの基Ｒ$^{1a-c}$及びＲ$^{2a-c}$は、それぞれ個別に、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル置換、もしくはハロゲン置換のＣ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルボイル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルスルホニル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{7}$ヒドロカルビルカルボキシラート、カルボキサミドもしくはスルホンアミド（該アミド窒素はいずれの基にあっても式ＮＲ^{3}Ｒ^{4}を有し、式中、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$ヒドロカルビルであるか、又はＲ^{3}とＲ^{4}は、該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、ＭＡｒ（式中、Ｍは、－ＣＨ$_{2}$－、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは単環のアリール基である）、及びＮＲ^{5}Ｒ^{6}（式中、Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アシル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はＲ^{5}とＲ^{6}は該示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、該追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、からなる群より選択され；

Ｒ^{8}、Ｒ^{9}、及びＲ^{10}は、それぞれＨであるか、又はＲ^{8}、Ｒ^{9}、及びＲ^{10}のうち２つがＨであり、１つがＣ$_{1}$－Ｃ$_{8}$ヒドロカルビル基であって、該Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{8}$ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、該原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；

Ｒ^{11}、Ｒ^{12}、Ｒ^{13}、及びＲ^{14}は、全てＨであるか、あるいはＲ^{11}とＲ^{12}の対又はＲ^{13}とＲ^{14}の対のうち一方が、該示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、Ｈ及びＤである。）

【請求項３】

α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の前記量を測定する、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

タンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβを測定する、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項５】

前記身体標本は、リンパ球である、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項６】

前記測定は、固相アッセイとして行われる、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項７】

前記身体標本調製物は、水性組成物中で、複合体の該タンパク質のうちの１つに特異的に結合し、該複合体が存在する場合にそれを捕獲する、第一の受容体と接触させられる、

請求項１又は２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項８】

前記第一の受容体は、アッセイプレートのウェルに固定されている、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

固相支持体に固定された第二の受容体が、前記第一の受容体に特異的に結合する、請求項７に記載の方法。

【請求項１０】

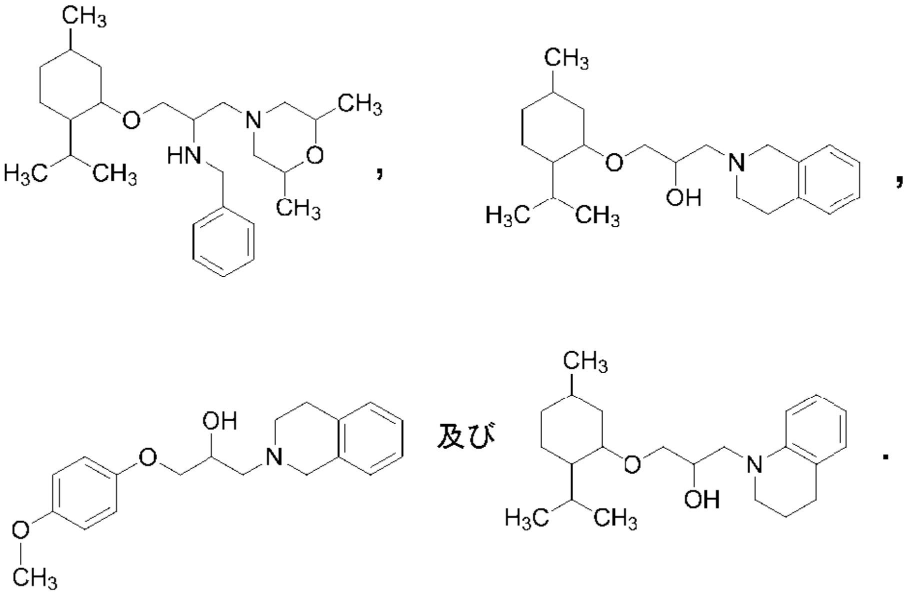
前記第一の受容体は、パラトープ含有分子である、請求項７に記載の方法。

【請求項１１】

前記第一の受容体は、水不溶性粒子に固定されている、請求項７に記載の方法。

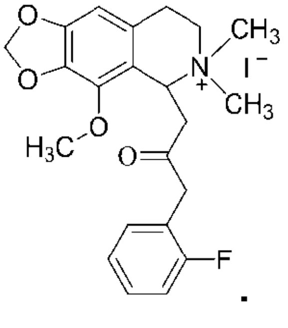
【請求項１２】

前記化合物は、以下に式を示す化合物の１種又は複数と構造が一致する系列Ａの化合物である、請求項１又は２に記載の方法。



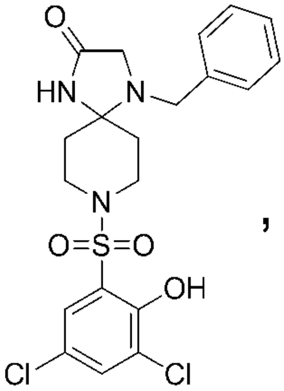
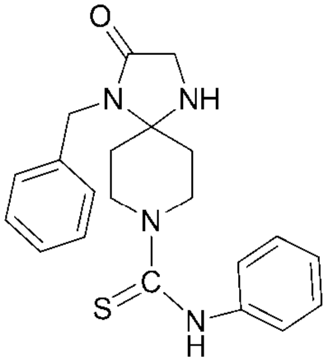
【請求項１３】

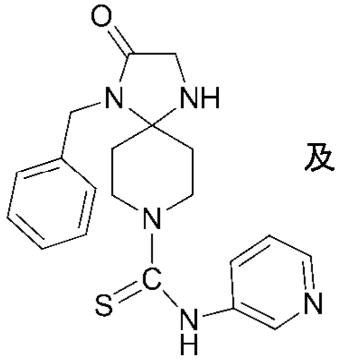
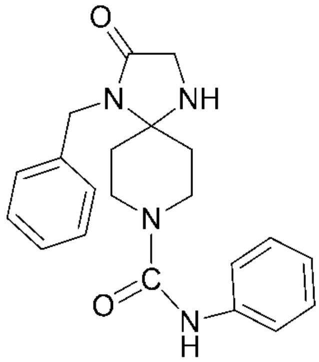
前記化合物は、以下に式を示す化合物と構造が一致する系列Ｂの化合物である、請求項１又は２に記載の方法。



【請求項１４】

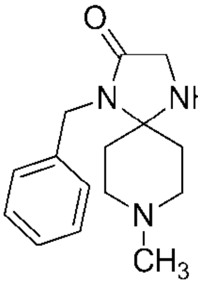
前記化合物は、以下に式を示す化合物と構造が一致する系列Ｃ－１の化合物である、請求項１又は２に記載の方法。

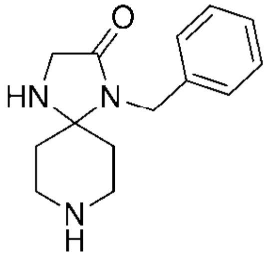
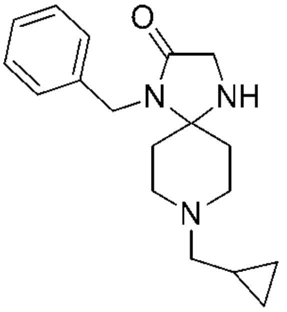

，

，


及び

．

【請求項１５】

前記化合物は、以下の構造を有する、請求項１又は２に記載の方法。




又は

．

【請求項１６】

前記化合物は、μオピオイド受容体（ＭＯＲ）アンタゴニスト化合物である、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項１７】

前記化合物は、ナロキソン、ナルトレキソン、ジプレノルフィン、ナロキソナジン、ノルビナルトルフィミン(nor-binaltrophimine)、ビナルトルフィミン（binaltrophimine）、ナルトリンドール、ナロキソンベンゾイルヒドラゾン、ナルブフィン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、エチルケトシクラゾシン（ketocyclazcine）、ナロルフィン、及びシプロダイムからなる群より選択される、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項１８】

アルツハイマー病（ＡＤ）であると思われる生きている患者における治療処置の有効性を測定する方法であって、以下の工程：

ａ）該生きている患者を治療する前に、該患者由来の身体標本調製物に存在する、ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量又は１種又は複数のタンパク質タンパク質複合体ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡの量について最初の量を測定する工程；

ｂ）治療処置を受けた前記患者から得られた第二の身体標本調製物中の、該ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量又はタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡの量について改めて値を測定する工程；及び

ｃ）工程（ａ）及び工程（ｂ）のそれぞれで測定した該１種又は複数の比の量を比較する工程、

を含み、２番目の測定量が該最初の測定値より有意に小さい場合は、該患者の疾患症状の改善を提供するという点において該治療処置が有効であることを示すことを特徴とする方法。

【請求項１９】

前記α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量を測定する、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

タンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡを測定する、請求項１８に記載の方法。

【請求項２１】

前記身体標本は、リンパ球である、請求項１８に記載の方法。

【請求項２２】

前記測定は、固相アッセイとして行われる、請求項１８に記載の方法。

【請求項２３】

前記身体標本調製物は、水性組成物中で、複合体を構成する該タンパク質のうちの１つに特異的に結合し、該複合体が存在する場合にそれを捕獲する第一の受容体と接触させられる、請求項１８に記載の方法。

【請求項２４】

前記第一の受容体は、アッセイプレートのウェルに固定されている、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

固相支持体に固定された第二の受容体が、前記第一の受容体に特異的に結合する、請求項２３に記載の方法。

【請求項２６】

前記第一の受容体は、パラトープ含有分子である、請求項２３に記載の方法。

【請求項２７】

前記第一の受容体は、水不溶性粒子に固定されている、請求項２３に記載の方法。

【請求項２８】

以下の工程：

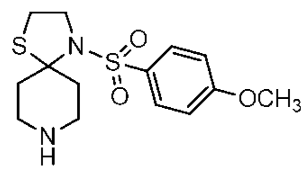
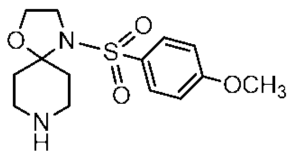
１つ又は複数のさらなる身体標本調製物中の、前記ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量又はタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡの量について、経時的に複数回測定を行う工程、及び

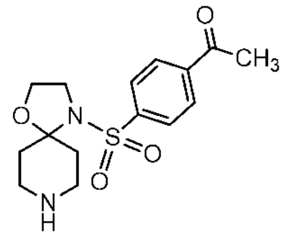
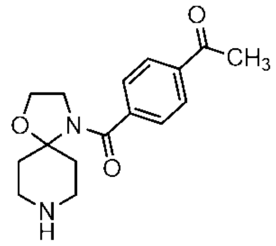
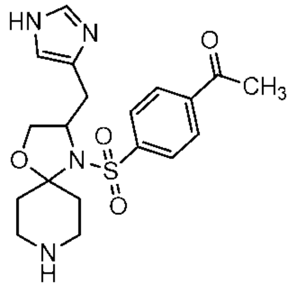
前記ＦＬＮＡ捕獲型タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量又はタンパク質タンパク質複合体として存在する１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡの量について、該測定された量を、先に測定された量と比較する工程、

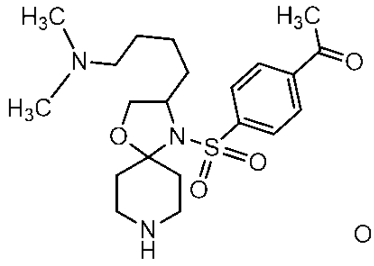
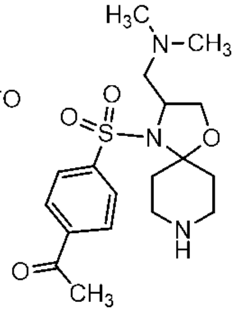
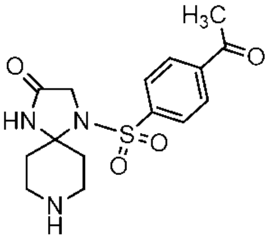
を更に含み、後から測定された量が、先に測定された量より有意に少ない場合は、該患者の疾患症状の改善を提供するという点において該治療処置が有効であることを示す請求項１８に記載の方法。

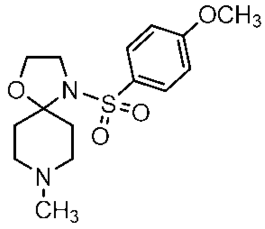
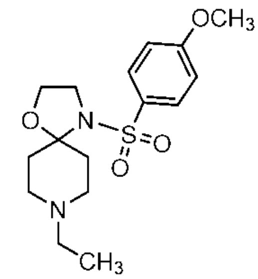
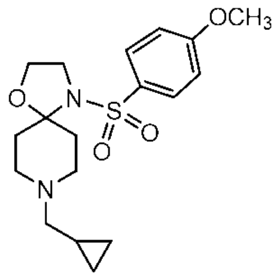
【請求項２９】

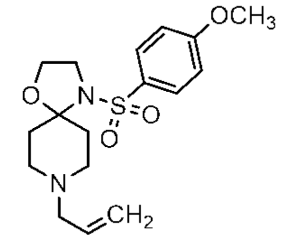
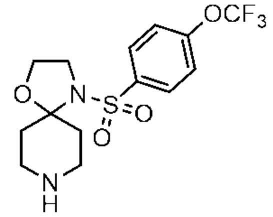
前記化合物が、以下の１以上の化合物からなる群から選択される構造を有する請求項１又は２に記載の方法。

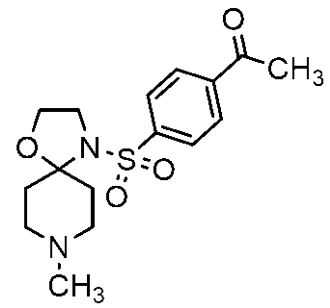
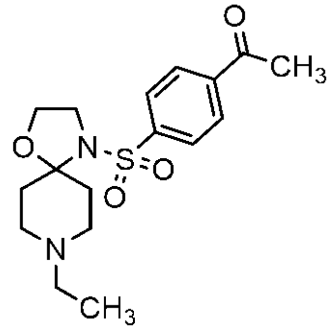
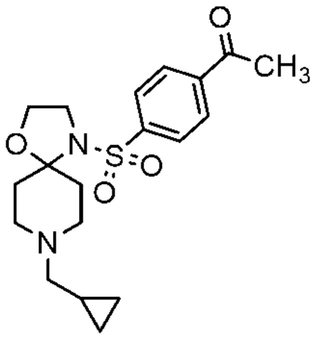



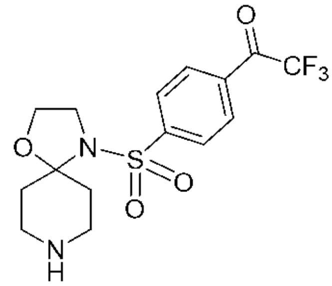
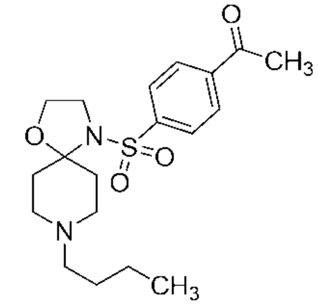
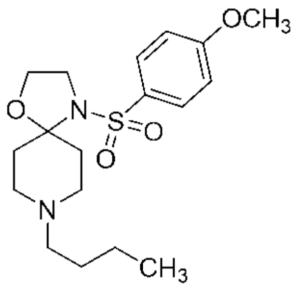




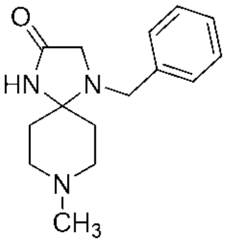
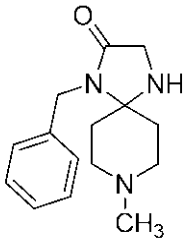
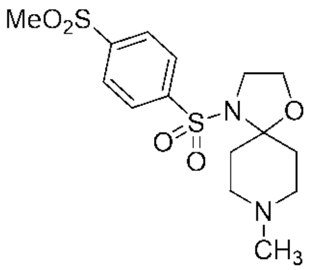




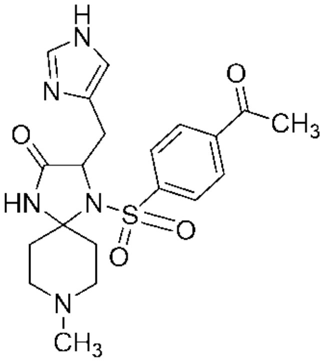
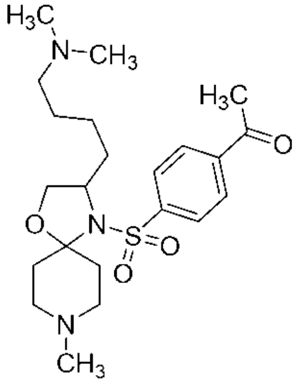
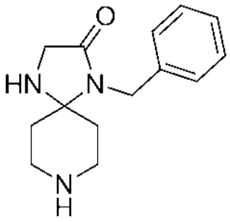




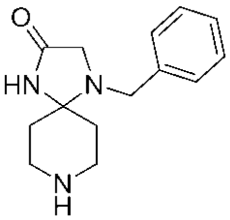
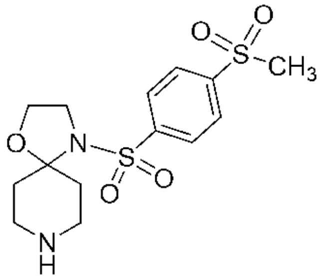
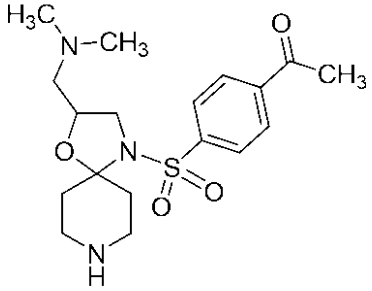



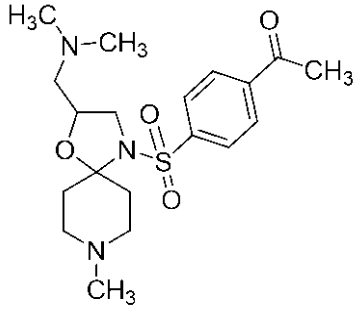
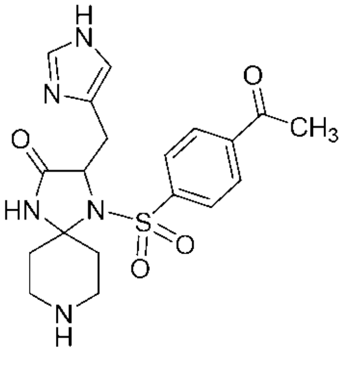
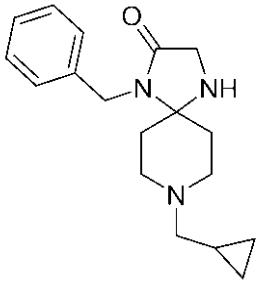




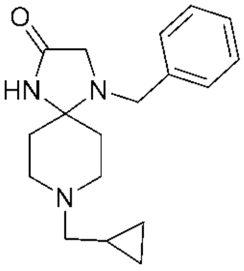
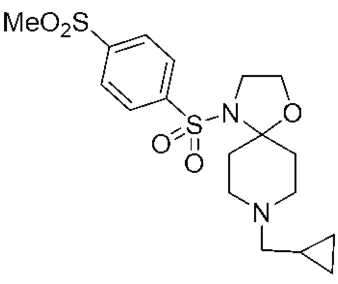
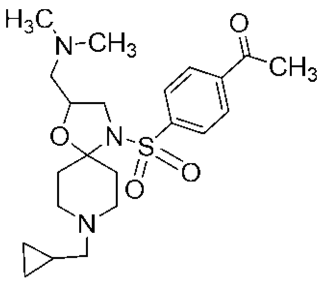




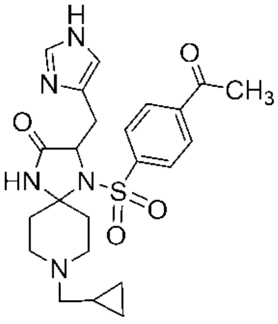
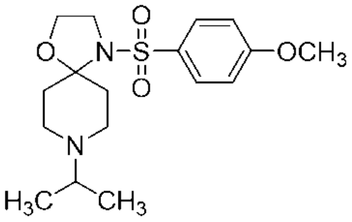
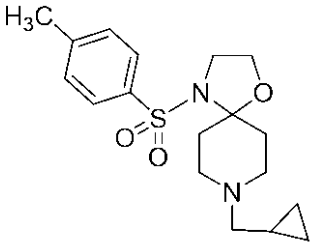




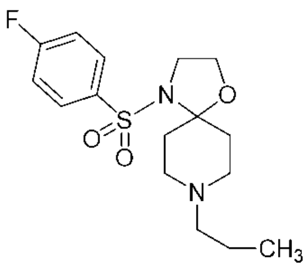
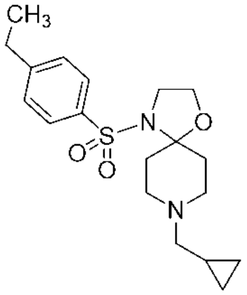
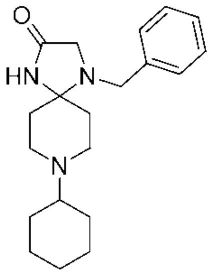




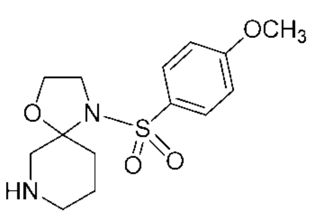
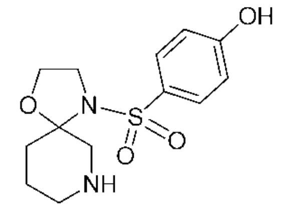




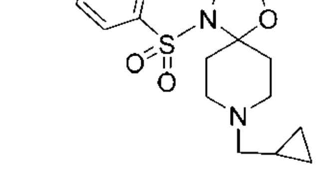
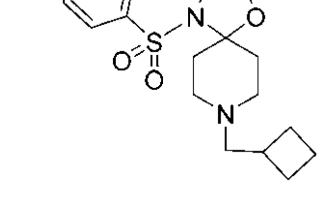
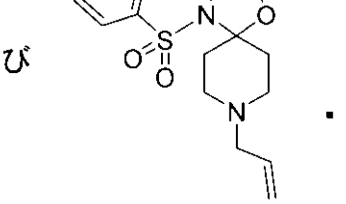






及び

．

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１３年３月１５日出願の出願番号第６１／７８９，１８０号、及び２０

１２年７月１３日出願の出願番号第６１／６７１，４４５号の優先権を主張する。これらの開示は、本明細書中参考として援用される。

【０００２】

本発明は、アルツハイマー病（ＡＤ）に関するものであり、より詳細には、１つの態様においては、生きている患者でこの疾患（ＡＤ病理）を検出可能であるアッセイに、また別の態様においては、ＡＤの症候を呈示している患者で特定の種類の薬物を用いた治療について予後を予測することを目論んでいるアッセイに、更に別の態様では、そのような患者に対する治療の有効性を示すことを目論んでいるアッセイに関する。

【背景技術】

【０００３】

アルツハイマー病（ＡＤ）は、最も大きな医療負担の１つであり、世界中で３５００万人の患者がいるが、その患者数は２０５０年までに１１５００万人に増加すると見積もられている。［Ｗｉｍｏ，Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ'ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｗｏｒｌｄ Ｒｅｐｏｒｔ ２０１０．Ｔｈｅ Ｇｌｏｂａｌ Ｅｃｏｎｏｍｉｃ Ｉｍｐａｃｔ ｏｆ Ｄｅｍｅｎｔｉａ，Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ'ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ （２０１０）］。ＡＤは、初めに進行性の記憶喪失として現れ、後に精神神経症候、例えばうつ状態、妄想性障害、激越、及び更には攻撃性さえも併発する恐れのある壊滅的な痴呆である。現在、利用可能なＡＤ治療は、向知性薬に限られており、しかもその有効性は限定的で短寿命である。

【０００４】

以前は、ＡＤの診断は、死体解剖でアミロイド沈着物及び微小管結合タンパク質τを含有する神経原線維タングル（ＮＦＴ）が存在することによってのみ確定することができた。現在のＡＤの臨床診断は、ＤＳＭ－ＩＶ－ＴＲ及びＮＩＮＣＤＳ－ＡＤＲＤＡ作業グループによる診断基準を満たすとＡＤの可能性が高いと診断するものである（ＭｃＫｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ３４（７）：９３９－９４４ （１９８４）。ＭｃＫｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．に記載される初期診断基準は主に主観評価に基づくため、ＡＤの可能性がある又は可能性が高いという臨床診断を下すためには、認知障害及び痴呆症候群の疑いのあることが、神経心理学的検査により確認されることが必要である；とはいえ、これらの診断基準は、確定診断を下すために病理組織学的確認（脳組織の顕微鏡検査）を要する。

【０００５】

しかも、これらの診断基準は、ＡＤで障害を受ける可能性がある８つの認知分野を規定する。ＡＤで障害を受ける可能性がある認知分野とは以下のものである：記憶、言語、知覚能力、注意力、構成力、見当識、問題解決能力、及び機能的能力。これらの診断基準は、良好な信頼性及び妥当性を示してきており、本明細書中、ＡＤの臨床診断の断定基準として用いられるものである。

【０００６】

アルツハイマー病の診断を下す臨床診断基準は、記憶及び他の認知機能における障害の潜行性発症及び進行を含む。この疾患の初期には、運動障害も、感覚障害も、協調障害も存在しない。これまで、検査機関でのアッセイでは診断を下すことができなかった。検査機関でのアッセイの重要性は、主として、アルツハイマー病の診断が自信を持ってできるように予め排除しておかねばならない、痴呆の他の考えられる原因を同定することにある。神経心理学的検査は、痴呆の診断の補強証拠を提供し、治療の課程及び反応を評価する助けとなる。ＭｃＫｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．が提案した診断基準は、アルツハイマー病の可能性が高い、可能性がある、及びアルツハイマー病と確定される診断への指針となることを意図している；これらの診断基準は、より確実な情報が利用できるようになることで、改訂されるだろう。

【０００７】

より最近になって、診断基準は改良されて、「ＡＤによる軽度認知機能障害（ＭＣＩ）」と呼ばれる前駆期（疾患の末期症候に到達する前に生じる初期症候）を含むようになっ

た。この新規診断は、より早く疾患を治療したいとう要望を反映している。なぜなら、神経病理は、症候が出現する１０年前に始まると見積もられているからである。［Ｔｒｏｊａｎｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｌｚｈｅｉｍｅｒｓ　Ｄｅｍｅｎｔ　６，　２３０－２３８　（２０１０）］。疾患修飾治療になると見込まれていた方法の臨床試験は、極めて期待はずれになったが、おそらくその理由は一部には、たとえ「早期」患者であってもすでに多大なアミロイドβ（Ａβ）負荷がかかっており、顕著なシナプス欠損及び炎症を伴う実質的病理を有するからと思われる。

【０００８】

Ｐｅｔｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｒｃｈ　Ｎｅｕｒｏｌ　５６（３）：３０３－３０８　（１９９９）によれば、対照者とＭＣＩの被験者との主な違いは、記憶の領域にあり、一方他の認知機能は同等である。しかしながら、ＭＣＩの被験者を最軽度ＡＤの患者と比較した場合、記憶力は同様であったが、ＡＤの患者は他の認知分野でもより損傷があった。長期調査の結果、ＭＣＩの被験者は対照者よりも速い速度で、しかし軽度ＡＤの患者ほどは速くなく衰えていったことが実証された。

【０００９】

ＭＣＩの診断基準を満たす患者は、健常対照者とも、最軽度ＡＤの患者とも区別することができる。ＭＣＩの診断基準を満たす患者は、治療介入のための特徴となり得る臨床実体を構成するように思われる。

【００１０】

アミロイドβ（Ａβ）は３９～４２個のアミノ酸からなるペプチドであり、このペプチドは、βセクレターゼ及びγセクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）の特定タンパク質切断によりｉｎ　ｖｉｖｏで産生される。Ａ$β_{42}$は、ＡＰＰタンパク質の６７７－７１３番アミノ酸残基で構成されるが、ＡＰＰタンパク質自身は、７７０個の残基からなる膜貫通タンパク質であり、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔシステムにおいて Ｐ０５０６７という番号を有する。Ａβ、特にＡ$β_{42}$は、ＡＤの主原因物質であると一般に考えられているが、ＡＤの神経病理の基礎となるその機構は討議中である。

【００１１】

ＡＤの脳における認知障害及びシナプス欠損程度は、アミロイドプラークの存在量とよりも溶解性Ａβとのほうが関連性が高く、このことは、活動性の障害を引き起こしているのが溶解性Ａβであることを示唆している［Ｎａｓｌｕｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，　ＪＡＭＡ　２８３，　１５７１－１５７７（２０００）］。強力な証拠から、溶解性Ａβは、α７ｎＡＣｈＲを介した毒性のシグナル伝達カスケードを誘発し、シナプス活動の障害及びそれに続くＡ$β_{42}$ニューロン内凝集及び認知障害を導く可能性があることが実証されている。［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　３５，　１０９６１－１０９７３　（２００９）；　Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＮＡＳ　９８，　４７３４－４７３９　（２００１）；　Ｐｅｔｔｉｔ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　２１，　ＲＣ１２０－ＲＣ１２５　（２００１）；　Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎｅｕｒｏｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　５０，　２５４－２６８　（２００６）；及びＤｚｉｅｗｃｚａｐｏｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　２９，　８８０５－８８１５　（２００９）］。Ａ$β_{42}$は、並外れて高い（フェムトモルもの高さの）親和性で、α７ｎＡＣｈＲと結合し［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７５，　５６２６－５６３２　（２０００）；及びＷａｎｇ，　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ　７５，　１１５５－１１６１　（２０００）］、この相互作用が、キナーゼＥＲＫ２及びＪＮＫ１を活性化させ、これらの酵素がτタンパク質をホスホリル化して、神経原線維タングル（ＮＦＴ）の形成をもたらす。［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７８，　３１５４７－３１５５３　（２００３）］。

【００１２】

Ａ$β_{42}$がα７ｎＡＣｈＲと結合するのを防ぐことにより、Ａ$β_{42}$が誘発する毒性シグナル伝達を妨害する薬物療法が試みられてきたが、これは２つの理由から困難な課題である

：第一に、サブピコモルの親和性で起こる相互作用を抑制するために、それより更に高い親和性が必要であること、そして第二に、慢性的に受容体アゴニスト又はアンタゴニストを用いて受容体を直接標的とすることは、受容体の感受性又は細胞表面発現レベルを変化させる可能性があること、である。事実、唯一の承認されたＡＤ治療法である、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の投与により、強化された刺激を長期間受けると、アセチルコリン受容体は脱感作し、このことが、このクラスの薬物が短期間の認知性向上しかもたらさないことの主な理由であると思われる。

【００１３】

本発明は、目論んでいる客観アッセイの基盤として、Ａβ_{42}とα７ｎＡＣｈＲのサブピコモル濃度での相互作用（タンパク質タンパク質複合体形成）、ならびにα７ｎＡＣｈＲとＦＬＮＡで、同じくＴＬＲ４とＦＬＮＡで新たに発見された同様なタンパク質会合（複合体）を利用する。この客観アッセイは、比較的非侵襲的な身体標本採取技法を用いて、生きている個人におけるＡＤの存在を診断することができる。別の態様において、同じくこれらのＡβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ、α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、及びＴＬＲ４－ＦＬＮＡという相互作用を、目論んでいる客観的予後アッセイ及びバイオマーカーアッセイの基盤として利用する。これらのアッセイは、比較的非侵襲的な身体標本採取技法及び治療に用いた化合物の結合活性と同様な特定の結合活性を示す化合物を用いて、生きている推定ＡＤ患者において、治療の予後を示すことができるとともに、疾患の進行及び治療有効性を追跡することができる。

【発明の概要】

【００１４】

１つの態様において、本発明は、生きている患者におけるアルツハイマー病（ＡＤ）又は「ＡＤによる軽度認知機能障害」の存在する見込みを測定する方法を目論む。本方法は、ＡＤの存在についてアッセイしようとする生きている、典型的には成人の、典型的には認知障害の患者由来の標準身体標本調製物において、ＦＬＮＡ捕獲又は捕獲型（captured）タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４量又はＡβ捕獲又は捕獲型（captured）タンパク質複合体中のα７ｎＡＣｈＲ量［本明細書中、ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質比とも称する］を測定する工程を含む。そのようにして測定した値（量又はレベル）を、ＡＤ病理のない個人由来の標準身体標本調製物で同じ測定により得られた値と比較する。そのようにして測定した値（量又はレベル）を、ＡＤ病理のない個人由来の標準身体標本調製物で同じ測定により得られた確立されている値と比較する。

【００１５】

ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡタンパク質複合体比、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡタンパク質複合体比、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質複合体比のうち１つ又は複数の比を利用することが好ましい。しかしながら、正確性及び／又は精度がいくらか落ちる可能性はあるものの、これらの複合体のうち１つから得られるα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量を利用することもできる。アッセイした患者で得られるタンパク質の量又は比の値が、ＡＤ病理のない個人由来の標準身体標本調製物で得られる値より顕著に大きいことは、ＡＤ病理の存在と一致するものであり、従ってＡＤ病理の存在を示すものである。

【００１６】

身体標本は、好ましくは、嗅覚神経上皮細胞、リンパ球、又は脳生検による細胞である。リンパ球を得ることは容易であることから、このアッセイにはリンパ球が特に好適な身体標本であり、本明細書中実例として使用されている。

【００１７】

より好ましくは、本アッセイは、２段階で行われるが、その順序は問わない。記載の都合上、第一とする段階において、上記のとおりの身体標本調製物の第一の部分又は取分け分(portion)を、上記のとおりにアッセイして、捕獲型複合体（抗ＦＬＮＡ免疫沈降物の１種もしくは両方、又は（ｉｉｉ）の場合は抗Ａβ免疫沈降物など）中に存在する、α７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４の１つ又は複数の量あるいはｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ

タンパク質比、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡタンパク質比、及びｉｉｉ）及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質比のうち１つ又は複数の大きさを測定する。ＡＤ病理のない患者から調製した身体標本に通常存在する量を超える、複合化タンパク質を含まないＡβを、身体標本の第二の部分又は取分け分(portion)と混合し（外部から供給されたＡβ）、そしてα７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４の１つ又は複数の量又はｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比、及びｉｉｉ）及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比のうち１つ又は複数の大きさ(amount)を、好ましくは第一の測定と同じ様式でそれぞれ抗ＦＬＮＡ又は抗Ａβ免疫沈降物で測定する。過剰なＡβは、Ａβの「α７ｎＡＣｈＲを飽和させる量」とも称することができる。その量では、α７ｎＡＣｈＲは、そのＡβ結合部位が全て埋められてしまう受容体、すなわち飽和し得る受容体である。

【００１８】

複合化タンパク質を含まないＡβの過剰量の例として、標本調製物の部分中約１ｎＭ以上の濃度を提供するのに十分な量が挙げられる。少なくとも約１００ｎＭの濃度を提供するのに十分な量の混合が好ましい。第一の身体標本調製物の部分に存在するα７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４量又は複合体比について測定された値が、ＡＤ病理のない個人の身体標本で確立された値より有意に大きい値及び／又は第二の標本（添加されたＡβを含有する標本）で示される値と匹敵する場合は、ＡＤ病理又は「ＡＤによる軽度認知機能障害」の存在と一致し、従って、その存在を示唆している。「複合化タンパク質を含まないＡβ」は、混合前のＡβの状態であって、混合するとタンパク質タンパク質複合体を形成することができる状態を記載していることが理解されるはずである。

【００１９】

本発明のより好適な態様の別の実施形態において、身体標本調製物の第一の部分を、上記のとおりアッセイする。身体標本調製物の第二の部分を、上記のとおりＡβと混合するのではなく、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドと結合する化合物とＦＬＮＡ結合の有効量で混合する。目論んでいるＦＬＮＡ結合化合物は、その化合物が１０μＭ濃度で存在し、同濃度で対照阻害剤として未標識のナロキソンを用いた場合に、ＦＩＴＣ標識化ナロキソン結合を少なくとも約６０％阻害し、好ましくは約７０％阻害する。ＦＬＮＡ結合の有効量は、典型的には、約０．１ｎＭ～約１０ｎＭの化合物濃度をもたらす量である。ＦＬＮＡ結合化合物は、好ましくは、図７～図１２の６つのファルマコフォアのうち少なくとも４つを有し、好ましくはこれら６つのファルマコフォアのうち少なくとも５つを有し、かつ好ましくは、オピオイド受容体アンタゴニスト又は混合アゴニスト／アンタゴニスト（まとめてアンタゴニスト化合物と称する）又は本明細書中以下に記載される系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、Ｃ－２、Ｄ、もしくはＥの化合物の１種以上、あるいはその薬学的に許容可能な塩である。

【００２０】

そのＦＬＮＡ結合化合物の存在下で測定されたα７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４の値又はタンパク質複合体比の値が、化合物の不在下で測定された量(amount)と比べて有意に減少することは、標本を採取した患者がＡＤ病理又は「ＡＤによる軽度認知機能障害」を有することと一致する。一方、ＡＤ病理症候のない通常の患者から得られるタンパク質比の値は、目論んでいる化合物の不在下で測定さる量から実質的に変化しない（有意差がない）。

【００２１】

本発明の別の実施形態は、上記のとおり、水性組成物中、配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）のペンタペプチドに結合し、かつ図７～図１２の６つのファルマコフォアのうち少なくとも４つを有する化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効量で持ちいて、ＡＤの可能性がある生きている、典型的には成人の、認知障害の患者に行った治療の予後を測定する方法を目論んでいる。

【００２２】

本方法は、以下の工程を含む：ａ）生きている患者由来の身体標本調製物の第一の部分中の、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮ

Ａ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβの量［あるいは、抗ＦＬＮＡ又は抗Ａβ免疫沈降物中に存在するものなどのタンパク質タンパク質複合体中のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡタンパク質比、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡタンパク質比、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質比］を測定する工程；ｂ）生きている患者から調製した身体標本の第二の部分に、上記のとおりのアンタゴニスト化合物又は系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、Ｃ－２、Ｄ、もしくはＥの化合物の１種又は複数又はその塩を結合有効量で外部から添加したものを用意し、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の値あるいはα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡタンパク質会合比、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡタンパク質会合比、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβタンパク質会合比の１種又は複数の値のうち第一の部分で測定したのと同じものについて、用意した第二の身体標本で値を測定する工程；ｃ）工程ａ）及び工程（ｂ）で測定された値を比較する工程。そのＦＬＮＡ結合化合物の存在下で測定された量が、化合物の不在下で測定された量と比べて有意に減少することは、標本を採取した患者にとって治療を行ったことによる恩恵があるという予後と一致する。

【００２３】

更に別の目論んでいるアッセイは、生きている、典型的には成人の、認知障害の患者に提供された治療が持つ、症状改善の有効性を示す。その方法は、以下の工程を含む：ａ）その生きている患者由来の身体標本調製物におけるα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の値あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡタンパク質会合比、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡタンパク質会合比、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβタンパク質会合比の値について、最初の値を求める工程。ｂ）患者を、治療用組成物、例えば、本明細書中以下に記載されるとおりに配列番号１のＦＬＮＡペプチドに結合するアンタゴニスト化合物又は系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、Ｃ－２、Ｄ、もしくはＥの化合物又はその薬学的に許容可能な塩、コリンエステラーゼ阻害剤（ドネペジル、リバスチグミン酒石酸塩、ガランタミン臭化水素酸塩、又はタクリンの名前で販売されているもの１種以上など）、又はＮＭＤＡ受容体遮断薬（メマンチンなど）、又は治験のもしくは市販されている治療薬でその作用機序が脳のアミロイド沈着物の減少をもたらすもの、を有効量で含有する組成物で治療する工程。ｃ）その後、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の値あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ会合比、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ会合比、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβタンパク質会合比の値のうち工程ａ）で求めたのと同じものについて、身体標本調製物中の第二の値を求める工程。ｄ）治療前、治療中周期的に、及び治療後に測定した、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４あるいは１種又は複数のタンパク質会合比のレベルを比較する工程。その比較において、後に求められた値が最初に求められた値より有意に小さい（治療した場合が治療していない場合より小さい）場合は、患者の疾患症状の改善を提供するという点において治療処置が有効であることと一致する。あるいは、上記の実施形態で測定されるとおり、治療を受けている患者で、その患者のリンパ球がＦＬＮＡ結合化合物に対して反応性が弱まる又はＡβに対して反応性が高まることは、患者の疾患症状の改善を提供するという点において治療処置が有効であることと一致する。

【００２４】

実施形態によっては、目論んでいるアッセイは、固相アッセイとして行われる。１つの実施形態において、本アッセイは、第一の捕獲受容体をアッセイプレートのウェルに貼付けて行われる。別の実施形態において、本アッセイは、第一の捕獲受容体を水不溶性表面又は粒子に貼付けて行われる。

本開示の一部をなす図面において、

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】３枚のパネルにて、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合（図１Ａ）ならびにＡβ_{42}とα７ｎＡＣｈＲの連接（図１Ｂ）が、ＡＤ患者由来のリンパ球及びＡβ_{42}を用いてインキュベートした対照者由来のリンパ球において、同年齢の対照者由来のリンパ球をクレブス（Kreb's）・リンゲル（Ｋ－Ｒ）ビヒクルで処理したものと比較して、著しく増加することを示す。更に、リンパ球調製物に化合物Ｃ０１０５を加えて３０分間

インキュベートしてから存在する複合体の量を求めると、ＡＤリンパ球及び外部からのＡ$β_{42}$と一緒にインキュベートした対照リンパ球において、こうした会合が顕著に減少した。ウエスタンブロット（図１Ａ及び図１Ｂ）を、比重走査測定により定量した（図１Ｃ）。データは、抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４のレベル、又は抗Ａβ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲレベルの平均±ＳＥＭである。ｎ＝２。**ｐ＜０．０５、*ｐ＜０．０１は、ビヒクル処理した対照に対して；＃＃ｐ＜０．０５、＃ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$処理した対照又はビヒクル処理したＡＤに対して。この図及び残りの図のブロットの外側左にある数値は、ブロット内の分子量の位置である。

【図２】ＡＤ患者由来のリンパ球及び対照者由来のリンパ球における、１）ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ会合レベル２）ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４会合レベル、及び３）α７ｎＡＣｈＲ－Ａ$β_{42}$複合体レベルを評価する９６ウェルＦＩＴＣ固相アッセイ方法の有用性を示す。上の２枚のパネルは、マイクロタイター固相プレートに塗布した抗ＦＬＮＡ抗体で、それぞれα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とカップリングしたＦＬＮＡを捕獲した後、それぞれＦＩＴＣ－抗α７ｎＡＣｈＲ又はＦＩＴＣ－抗ＴＬＲ４抗体を用いて検出した、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４レベルを示す。下のパネルは、マイクロタイター固相プレートに塗布した抗Ａ$β_{42}$抗体でα７ｎＡＣｈＲに結合したＡ$β_{42}$を捕獲し、このα７ｎＡＣｈＲにＦＩＴＣ－α７ｎＡＣｈＲ抗体が結合することで検出された、α７ｎＡＣｈＲ－Ａ$β_{42}$複合体を示す。図２は、化合物Ｃ０１０５がＡＤリンパ球において、又は外部からのＡ$β_{42}$で処理した対照リンパ球において、これら３種の会合全てを減少させ得ることも実証している。化合物Ｃ０１０５の治療効果を示すために、外部からのＡ$β_{42}$を対照リンパ球とともに用いたことから、Ａ$β_{42}$のレベルはβ－アクチンに対して規格化した。*ｐ＜０．０１は、ビヒクル処理した対照と比較して；＃ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$処理した対照又はビヒクル処理したＡＤと比較して。

【図３】５枚のパネルにて、化合物Ｃ０１０５が、ヒト死後ＡＤ脳組織及び対照脳組織において、Ａ$β_{42}$が誘導するＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合両方を減少させたことを示す。ＡＤ及び同年齢の対照の脳切片を、０．１ｎＭ濃度又は１ｎＭ濃度の化合物Ｃ０１０５で処理し、対照脳切片は同時にＡ$β_{42}$でも処理した。可溶化シナプトソーム中で、固定化抗ＦＬＮＡで免疫沈降させ、複合体のもう一方の(second)タンパク質のそれぞれに特異的な抗体を用いてウエスタンブロットで検出する（図３Ａ）ことにより、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４との会合の度合いを評価した。ブロットを、濃度測定定量により分析した（図３Ｂ及び図３Ｄ）。ＡＤ組織及びＡ$β_{42}$処理した対照組織は、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの会合の著しい増加を示したが、化合物Ｃ０１０５はそれらの会合を減少させた。阻害パーセントを図３Ｃ及び図３Ｅに示す。ｎ＝１１。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、ビヒクル処理した対照に対して、＃ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$処理した対照又はビヒクル処理したＡＤに対して。

【図４】３部構成にて、化合物Ｃ０１０５をマウスに全身投与すると、Ａ$β_{42}$に誘導されるＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びトール様受容体４（ＴＬＲ４）との会合両方が減少したことを示す。すなわち、Ａ$β_{42}$又はビヒクルの脳室内（ＩＣＶ）輸液を継続的に受け、加えて化合物Ｃ０１０５又はビヒクルを１日２回注射されたマウスの前頭前皮質及び海馬から調製したシナプトソームを、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ及びＦＬＮＡ－ＴＬＲ４相互作用について分析した。可溶化シナプトソーム中で、固定化抗ＦＬＮＡで免疫沈降させ、各受容体に特異的な抗体を用いてウエスタンブロットで検出する（図４Ａ）ことにより、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４との会合の度合いを評価した。ブロットを、濃度測定定量により分析した（図４Ｂ）。Ａ$β_{42}$は、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの会合を大きく増加させたが、化合物Ｃ０１０５は、これらのＡ$β_{42}$に誘導される増加を減少させた。図４Ｃに、阻害パーセントを示す。ｎ＝３。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、偽、ビヒクルに対して；＃ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$、ビヒクルに対して。

【図５】３部構成にて、化合物Ｃ０１０５をマウスに投与すると、Ａ$β_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体が減少することを示す。マウスを１日２回化合物Ｃ０１０５で処置すると、ＩＣ

ＶでＡβ$_{42}$輸液を受けたマウスの前頭前皮質及び海馬の両方で、Ａβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体のレベルが大きく減少した；ｎ＝７又はｎ＝８。ウエスタンブロット（図５Ａ）を、濃度測定定量により分析した（図５Ｂ）。図５Ｃに、阻害パーセントを示す。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、偽、ビヒクルに対して；＃ｐ＜０．０１は、Ａβ$_{42}$、ビヒクルに対して。

【図６】マウスを化合物Ｃ０１０５で処置すると、Ａβ$_{42}$に誘導されるサイトカイン産生がほぼ消滅することを示す。ＦＩＴＣを用いた蛍光ＥＬＩＳＡアッセイで測定すると、Ａβ$_{42}$は、サイトカインＩＬ－６、ＴＮＦα、及びＩＬ－１βのレベルを増加させた。化合物Ｃ０１０５は、これら３種のサイトカインの産生をほぼ消滅させた。ｎ＝７又はｎ＝８。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、偽、ビヒクル群における各サイトカインレベルに対して；＃ｐ＜０．０１は、ＩＣＶでのＡβ$_{42}$、ビヒクル群における各サイトカインレベルに対して。

【図７】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア１を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図８】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア２を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図９】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア３を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図１０】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア４を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図１１】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア５を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図１２】配列番号１のＦＬＮＡの五量体ペプチドに結合する化合物について、ファルマコフォア６を模式的に表したものであり、化学的特色（水素結合受容体（ＨＢＡ）、芳香族性／疎水性（ＡＲＯ／ＨＹＤ）中心など）の相対配置、及びそれらの間の分子内距離（オングストローム単位）を示す。

【図１３】５枚のパネルにて、化合物Ｃ０１０５が、ヒト死後ＡＤ脳組織及び対照脳組織において、Ａβ$_{42}$に誘導されるＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合両方を減少させたことを示す。ＡＤ及び同年齢の対照の脳切片を、０．１ｎＭ濃度又は１ｎＭ濃度の化合物Ｃ０１０５で処理し、対照脳切片は同時にＡβ$_{42}$でも処理した。可溶化シナプトソーム中で、固定化抗ＦＬＮＡで免疫沈降させ、各受容体に特異的な抗体を用いてウエスタンブロットで検出する（図１３Ａ）ことにより、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４との会合の度合いを査定した。ブロットの外側左にある数値は、上記のとおりである。ブロットを、濃度測定定量により分析した（図１３Ｂ及び図１３Ｄ）。ＡＤ組織及びＡβ$_{42}$処理した対照組織は、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの会合の著しい増加を示したが、化合物Ｃ０１０５はそれらの会合を減少させた。図１３Ｃ及び図１３Ｅに、阻害パーセントを示す。ｎ＝１１。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、ビヒクル処理した対照に対して、＃ｐ＜０．０１は、Ａβ$_{42}$処理した対照又はビヒクル処理したＡＤに対して。

【図１４】３枚のパネル、図１４Ａ、図１４Ｂ、及び図１４Ｃにて、高親和性ＦＬＮＡ結

合化合物がα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ会合を減少させることを示す。２ヶ月齢のラット（ｎ＝４）由来の前頭皮質のシナプトソームを、Ａ$β_{42}$と同時（Ｓｉｍ）に又はそれより１０分前（１０’ｐｒ）にのいずれかで、０．１ｎＭ濃度又は１ｎＭ濃度の化合物［Ａ００３３、Ａ００４０、Ａ００５３、Ａ００６８、Ｂ００５５、Ｃ０１０５Ｍ、Ｃ０１１４Ｍ、Ｃ０１３７Ｍ、Ｃ０１３８Ｍ、及び（＋）ナロキソン（（＋）ＮＬＸ）］で処理し、それらのα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体含有量を分析した。可溶化シナプトソーム中のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体を、固定化抗ＦＬＮＡで免疫沈降させ、抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲ及びＦＬＮＡレベルを、ウエスタンブロット法で求め（図１４Ａ）、例示化合物ごとに濃度測定法により定量した（図１４Ｂ）。ｎ＝３。データは、平均±ＳＥＭである。**ｐ＜０．０５、*ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$単独に対して。図１４Ｃは、別々に行われた、しかし同様な研究による、図１４Ａ及び図１４Ｂのものと同様な結果を示す。データは、平均±ＳＥＭである。**ｐ＜０．０５、*ｐ＜０．０１は、Ａ$β_{42}$単独に対して。「Ｃ系列」化合物の多くに付随する文字記号「Ｍ」は、表示を見やすくするため、図１４、残りの図、及び本明細書中以下の図面及び化合物の説明の大部分において、省略してある。この図及びその他の図に用いられている化合物の構造式は、本明細書中以下で提供する。

【図１５】２枚のパネル、図１５Ａ及び図１５Ｂにて、図１４と同じようにアッセイした、α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ会合を減少させるさらなる高親和性ＦＬＮＡ結合化合物を示す。２ヶ月齢のラット由来の前頭皮質のシナプトソームを、Ａ$β_{42}$（０．１μＭ）と同時（Ｓｉｍ）に又はそれより１０分前（１０’ｐｒ）にのいずれかで、１ｎＭ濃度又は１０ｎＭ濃度の化合物Ｃ０１２４で処理し、化合物Ｃ０１０５は対照として用いた。そして、固定化抗ＦＬＮＡで免疫沈降させた。可溶化シナプトソーム中の複合体、ならびに抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲ、ＴＬＲ４、及びＦＬＮＡのレベルを、ウエスタンブロット法で求めた（図１５Ａ）。ブロットの外側左にある数値は、上記のとおりである。ブロットに存在する量を、濃度測定法により定量した（図１５Ｂ）。α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ及びＴＬＲ４／ＦＬＮＡの比は、化合物についてダネット検定で示されるとおりの**ｐ＜０．０５、*ｐ＜０．０１で、Ａ$β_{42}$単独の場合に対し統計上有意差があった。この図及び他の図に用いられている化合物の構造式は、本明細書中以下で提供する。

【図１６】４部構成、図１６Ａ、図１６Ｂ、図１６Ｃ、及び図１６Ｄにて、ナルトレキソン（ＮＴＸ）又は化合物Ｃ０１０５の存在下での、フィラミンＡ（ＦＬＮＡ）又は配列番号１のフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）五量体に対する放射標識化ナロキソン［^{3}Ｈ］ＮＬＸの結合を示し、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．３（２）：ｅ１５５４　（２００８）で報告されたとおりの置換アッセイにより求めたものである。図１６Ａは、示される量でのナルトレキソン（ＮＴＸ）の存在下における、Ａ７細胞の膜に存在するＦＬＮＡに対する結合を示し、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．３（２）：ｅ１５５４　（２００８）の図３から引用したものである；図１６Ｂは、示される量での化合物Ｃ０１０５の存在下における、Ａ７細胞の膜でのＦＬＮＡに対する、化合物Ｃ０１０５の存在下での、［^{3}Ｈ］ＮＬＸの結合を示す；図１６Ｃは、示される量での化合物Ｃ０１０５の存在下における、ＳＫ－Ｎ－ＭＣ細胞の膜でのＦＬＮＡに対する［^{3}Ｈ］ＮＬＸの結合を示す；及び図１６Ｄは、示される量での化合物Ｃ０１０５の存在下における、配列番号１のＦＬＮＡ五量体に対する［^{3}Ｈ］ＮＬＸの結合を示す。

【図１７】２枚のパネル、図１７Ａ及び図１７Ｂにて、様々な量のリンパ球溶解液に存在するα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡタンパク質タンパク質複合体として吸光度（ＯＤ$_{450}$）を測定することによるＥＬＩＳＡでアッセイされたα７ｎＡＣｈＲの量を示すグラフである。図１７Ａは、ＡＤ患者由来の溶解液（塗りつぶした四角）及び同じリンパ球溶解液に十分な化合物Ｃ０１０５を加えて１０μＭ濃度としたもの（塗りつぶした丸）から得られたデータのグラフである。図１７Ｂは、アルツハイマー病（ＡＤ）の患者及び若年で認知機能に障害のない個人（ＹＣＩ）由来の溶解液に何も加えずに得られたデータを示すグラフである。

【図１８】５枚のパネル、図１８Ａ、図１８Ｂ、図１８Ｃ、及び図１８Ｄにて、図１７と

同様なＥＬＩＳＡアッセイの結果を示し、ＥＬＩＳＡアッセイでは、アルツハイマー病患者から得られたリンパ球の溶解液（図１８ＡのＸ）及びその患者由来のリンパ球溶解液に対して十分な化合物Ｃ０１０５を加えて１０μＭ濃度としたもの（塗りつぶした丸）を、１ウェルあたり示される量で用いた。図１８Ｂは、若年で認知機能に障害のない（ＹＣＩ）被検体のリンパ球の溶解液を用いて行った同様な試験について、この溶解液に化合物Ｃ０１０５を加えて１０μＭ濃度としたもの（塗りつぶした丸）及び化合物を加えなかった溶解液（塗りつぶした三角）を示す。図１８Ｃは、図１７と同様なＥＬＩＳＡアッセイの結果を示し、図１８Ｃは同様に実施されたもので、ＹＣＩ被検体由来のリンパ球溶解液（Ｘ）及び同じ溶解液に飽和量のＡβ$_{42}$（最終濃度１００ｎＭ）を加えたもの（塗りつぶした丸）を用いている。図１８Ｄは、ＡＤ患者由来のリンパ球溶解液（Ｘ）及び同じ標本に更に飽和量のＡβ$_{42}$が含まれているもの（塗りつぶした丸）を用いて得られた同様な結果を示す。

【図１９】５枚のパネル、図１９Ａ、図１９Ｂ、図１９Ｃ、図１９Ｄ、及び図１９Ｅにて、Ｅ１２９マウス及びＡＤ遺伝子導入（ｔａｕ／ＡＰＰ６９５ｓｗ（－９Ｅ０／ＰＳ１）マウスに対し、４ヶ月齢及び８ヶ月齢から投与を開始して、化合物Ｃ０１０５を３０ｍｇ／ｋｇで２ヶ月間経口投与した効果を示す。マウスをと殺して、その脳を取り出し／解剖して、病理を確認した。体躯血液を収集し、リンパ球溶解液調製物を、抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４含有量についてウエスタンブロット法により測定し、ＦＩＴＣで視覚化することで、α７ｎＡＣｈＲとＦＬＮＡのレベルならびにＴＬＲ４とＦＬＮＡのレベルを分析した。データは、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡの光強度比（図１９Ｂ及び図１９Ｃ）及びＴＬＲ４対ＦＬＮＡの光強度比（図１９Ｄ及び図１９Ｅ）として表す。ｎ＝５。データは、平均±ＳＥＭである。*ｐ＜０．０１は、ビヒクル処理した４ヶ月齢の野生型（ＷＴ）群と比較して、及び＃ｐ＜０．０１は、多重比較のためのニューマン・クールズ検定を用いた、各群における、化合物Ｃ０１０５対ビヒクル処理と比較して。

【図２０】２枚のパネル、図２０Ａ及び図２０Ｂにて、抗体結合したタンパク質タンパク質複合体である、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質のそれぞれの存在について、市販されているタンパク質Ａ及びタンパク質Ｇで被覆した９６ウェルマイクロタイタープレートを用いて行ったアッセイの結果を示す。アッセイされる各複合体の量は、各リンパ球溶解液を１ｎＭの化合物Ｃ０１０５（斜線棒）、１００μＭのＡβ$_{42}$（黒棒）、及びクレブス（Kreb's）・リンガー液（白抜き棒）とともにインキュベートしてから測定した。タンパク質量は、抗タンパク質抗体、次にＦＩＴＣが結合した生物種特異的抗体を用いて免疫反応を行うことで測定した。

【図２１】５枚のパネル、図２１Ａ～図２１Ｅにて、若年で認知機能に障害のない（ＹＣＩ）被験者由来のリンパ球調製物中に存在する、タンパク質タンパク質複合体である、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$の量に対して１ｎＭの例示化合物Ｃ０１０５が及ぼす効果又はその効果がないことを示す。図２１Ａ及び、図２１Ｂは、リンパ球を調べたＹＣＩ被験者１０人のうち代表的なＹＣＩ被験者５人で得られたデータを示す。図２１Ｃ及び図２１Ｄは、調べたＡＤ患者２０人のうち代表的な患者５人のリンパ球で得られたデータを示す。図２１Ｅは、各群の患者全てで得られたデータを合成したものを示す。*ｐ＜０．００００１。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

略号及び短略形

以下の略号及び短略形を、本明細書中で使用する。

「Ａβ」は、アミロイドβを意味し、７７０の残基からなるアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）タンパク質の３９～４２の残基の配列を示す（Ａβ$_{39}$＝６７２番－７１０番の位置、Ａβ$_{40}$＝６７２番－７１１番の位置、Ａβ．．＝６７２番－７１２番の位置）

「Ａβ$_{42}$」は、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）タンパク質の６７７番－７１３番の位置の配列を有する、４２の残基からなるペプチドを意味する

「α７ｎＡｃｈＲ」は、α－７ニコチン性アセチルコリン受容体を意味する
「ＤＡＭＧＯ」は、［Ｄ－Ａｌａ２，Ｎ－ＭｅＰｈｅ４，Ｇｌｙ－ｏｌ］－エンケファリンを意味する
「ＥＲＫ２」は、細胞外シグナル制御キナーゼ２を意味する
「ＦＣＸ」は、前頭皮質又は前頭前皮質を意味する
「ＦＬＮＡ」は、フィラミンＡを意味する
「ＦＩＴＣ」は、フルオレセインイソチオシアネートを意味する
「Ｇｓ」は、Ｇタンパク質刺激型サブタイプを意味し、アデニリルシクラーゼを刺激する
「ＨＰ」は、海馬を意味する
「ＩＨＣ」は、免疫組織化学を意味する
「ＩＲ」は、インシュリン受容体を意味する
「ＭＯＲ」は、μオピオイド受容体を意味する
「ＮＬＸ」は、ナロキソンを意味する
「ＮＴＸ」は、ナルトレキソンを意味する
「ＮＦＴ」は、神経原線維タングルを意味する
「ＮＭＤＡ」は、Ｎ－メチル－Ｄ－アスパラギン酸を意味する
「ＮＭＤＡＲ」は、ＮＭＤＡ受容体を意味する
「ｐＥＲＫ２」は、リン酸化型ＥＲＫ２を意味する
「ｐＴａｕ」は、高リン酸化型τタンパク質を意味する
「ＴＬＲ４」は、トール様受容体４を意味する

【００２７】
定義
本発明の文脈及び添付の請求項において、以下の用語は以下の意味を有する：

【００２８】
「ａ」及び「ａｎ」という冠詞は、本明細書中、その冠詞の文法上の目的語が１つ又は１つより多い（すなわち少なくとも１つである）ことを示すとして用いられる。例として、「ａｎ要素」は、１つの要素又は１つより多い要素を意味する。

【００２９】
本明細書中使用される場合、「ヒドロカルビル」という用語は、非芳香族基についての略語であり、この用語は、炭素及び水素のみを有する、直鎖及び分岐鎖の脂肪族基ならびに脂環式の基又はラジカルを含む。脂環式基は環状の脂肪族基であるため、そのような置換基は、本明細書中以下、脂肪族基に組み込まれると見なされる。つまり、アルキル基、アルケニル基、及びアルキニル基を考慮に入れており、一方、芳香族炭化水素（フェニル基及びナフチル基など）は、厳密に言えばそれらもヒドロカルビル基ではあるが、本明細書中では、以下に説明するとおり、アリール基、アリール置換基、アリール部分、又はアリールラジカルと示す。アラルキル置換基（ベンジルなど）は、Ｘ基（ベンジルならＸはCH_2である）に結合した芳香環であるため、芳香族基と見なされる。テトラリン（テトラヒドロナフタレン）などの、脂肪族環及び芳香環部分の両方を有する置換基で、脂肪族部分を介して直接、Ｗ基を含む示されている環に連結しているものは、非芳香族ヒドロカルビル基と見なす。一方で、同様な基でも芳香族部分を介して直接結合するものは、置換芳香族基と見なす。具体的な脂肪族ヒドロカルビル置換基が意図されている場合、そのような基は記述される；すなわち、C_1－C_4アルキル、メチル、又はドデセニルである。ヒドロカルビル基の例として、１～約１２個の炭素原子、好ましくは１～約８個の炭素原子、より好ましくは１～６個の炭素原子からなる鎖が挙げられる。

【００３０】
特に好適なヒドロカルビル基は、アルキル基である。結果として、本明細書中列挙される置換基のいずれであっても「ヒドロカルビル」という記述語を「アルキル」で置き換えることで、置換基を、より一般化された、しかしより好適な置換基として、記述することができる。

【００３１】
　アルキルラジカルの例として、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、イソアミル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシルなどが挙げられる。環状アルキルラジカル（シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、及びシクロヘプチルなど）も考慮に入っており、それらの対応するアルケニルラジカル及びアルキニルラジカルも同様である。適切な直鎖及び分岐鎖のアルケニルラジカルの例として、エテニル（ビニル）、２－プロペニル、３－プロペニル、１，４－ペンタジエニル、１，４－ブタジエニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、デセニルなどが挙げられる。直鎖及び分岐鎖のアルキニルラジカルの例として、エチニル、２－プロピニル、３－プロピニル、デシニル、１－ブチニル、２－ブチニル、３－ブチニルなどが挙げられる。

【００３２】
　「ヒドロカルビル」という言葉を用いる場合、通常の化学接尾語式命名に従うが、ただし、常に語尾の「イル」を外して適切な接尾語を付け足す常套手段に従うとは限らない。なぜなら、そうして得られる名前が１つ以上の置換基に対して類似する可能性があるからである。従って、ヒドロカルビルエーテルは、化学命名法の通常規則に従った場合に、「ヒドロカルボキシ」ではなくて「ヒドロカルビルオキシ」基とした方がより好ましいかもしれないのであれば、「ヒドロカルビルオキシ」基と称される。例示のヒドロカルビルオキシ基として、メトキシ、エトキシ、及びシクロヘキセニルオキシ基が挙げられる。一方、－Ｃ（Ｏ）－官能基を含有するヒドロカルビル基は、ヒドロカルボイル（アシル）基と称され、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－を含有するヒドロカルビル基は、まったく曖昧なところがないため、ヒドロカルボイルオキシ基である。ヒドロカルボイル基及びヒドロカルボイルオキシ基の例として、アシル基及びアシルオキシ基、例えば、それぞれ、アセチル及びアセトキシ、アクリロイル及びアクリロイルオキシが挙げられる。

【００３３】
　中心スピロ環系と、芳香環又はヘテロ芳香環系である環Ａとの間のカルボキシルが関係する連結基として、複数の種類のエステル結合及びアミド結合が挙げられる。そのような結合の例として、スルホンアミド、スルホン酸エステル、及びチオスルホン酸エステルが挙げられるが、これらはそれぞれ、SO_2含有基［Ｓ（＝Ｏ）$_2$基と示されることもある］とアミン、酸素、又は硫黄原子との間で形成され得る。アミド結合、エステル結合、及びチオエステル結合は、それぞれ、Ｃ（Ｏ）［（Ｃ＝Ｏ）と示されることもある］基を含有する芳香環又はヘテロ芳香環と、窒素、酸素、又は硫黄原子との間で形成され得る。同様に、グアニジノ連結部は、ＮＨＣ（ＮＨ）［ＮＨＣ（＝ＮＨ）］基を含有する芳香環又はヘテロ芳香環と、窒素との間で形成され得る。ウレタン、炭酸エステル、又はチオ炭酸エステルは、それぞれ、ＯＣ（Ｏ）［すなわちＯＣ（＝Ｏ）］基を含有する芳香環又はヘテロ芳香環と、窒素、酸素、又は硫黄との間で形成され得る。尿素連結部、ウレタン連結部、又はイソチオ尿素連結部［ＮＨＣ（Ｏ）Ｓ］｛すなわち［ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｓ］｝を有する化合物は、それぞれ、ＮＨＣ（Ｏ）基を含有する芳香環又はヘテロ芳香環と、窒素、酸素、又は硫黄との間で形成され得る。チオ尿素連結部も考慮に入っている。

【００３４】
　「カルボキシル」置換基とは、－Ｃ（Ｏ）ＯＨ基である。C_1－C_6ヒドロカルビルカルボキシラートは、カルボキシル基のC_1－C_6ヒドロカルビルエステルである。カルボキサミドは－Ｃ（Ｏ）NR^3R^4置換基であり、式中、Ｒ基は、どこかで定義されており、ここではさらなる説明での簡単のため３及び４と番号が付けられているが、必ずしも以下の化学式においてそのように番号が付くわけではない。同様に、スルホンアミドは－Ｓ（Ｏ）$_2NR^3R^4$置換基であり、式中、Ｒ基は、本明細書中以下で定義されている。R^3基及びR^4基が、カルボキサミドの示されている窒素と一緒になって五員～七員の環を形成し、形成された環は随意に１～２個の追加のヘテロ原子を含有し、含有されるヘテロ原子は独立して窒素、酸素、又は硫黄である場合の例として、モルホリニル基、ピペラジニル基、オキサチアゾリル基、１，２，３－トリアゾリル基、１，２，４－トリアゾリル基、ピラゾ

リル基、１，２，４－オキサジアジニル基、及びアゼピニル基が挙げられる。

【００３５】

当業者には当然のことながら、２個以上の炭素原子を持つアルケニル又はアルキニルなどの置換基は、「ヒドロカルビル」という用語に包含することを意図しているが、C_1アルケニル又はアルキニルなどの存在し得ない置換基は、意図していない。

【００３６】

「アリール」という用語は、単独でも組み合わせでも、本明細書中以下で記述されるとおりのフェニル、ナフチル、又は他のラジカルを意味し、アリールは、随意に、ヒドロカルビル、ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、ニトロなどから選択される置換基を１つ又は複数有する（フェニル、ｐ－トルイル、４－メトキシフェニル、４－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）フェニル、４－フルオロフェニル、４－クロロフェニル、４－ヒドロキシフェニルなど）。「アリールヒドロカルビル」という用語は、単独でも組み合わせでも、上記で定義されるとおりのヒドロカルビルラジカルであって、ラジカル中、１個の水素原子が上記で定義されるとおりのアリールラジカルで置換されているものを意味する（ベンジル、２－フェニルエチルなど）。「アリールヒドロカルビルオキシカルボニル」という用語は、単独でも組み合わせでも、式－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－アリールヒドロカルビルのラジカルを意味し、式中、「アリールヒドロカルビル」という用語は上記で与えられる通りの意味を有する。アリールヒドロカルビルオキシカルボニルラジカルの例としてベンジルオキシカルボニルがある。「アリールオキシ」という用語は、式アリール－Ｏ－のラジカルを意味し、式中、アリールという用語は上記で与えられる通りの意味を有する。組み合わせで用いられる「芳香環」という用語（置換芳香環スルホンアミド、置換芳香環スルフィンアミド、又は置換芳香環スルフェンアミドなど）は、上記で定義されるとおりのアリール又はヘテロアリールを意味する。

【００３７】

本明細書中使用される場合、「結合する」という用語は、分子同士が互いに接着することを示し、例えば、リガンドとその受容体との相互作用、又は配列番号１のポリペプチドと本明細書中開示される化合物などの小分子との相互作用が挙げられるが、それらに限定されない。

【００３８】

本明細書中使用される場合、「ＦＬＮＡ結合化合物」という用語は、足場タンパク質フィラミンＡと、より好ましくはＦＬＮＡ配列の残基－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ－（配列番号１）を含むポリペプチドと結合する化合物を示し、この配列は、ウェブ・アドレス：ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ　ｅｎｔｒｙ　Ｐ２１３３３，　ＦＬＮＡ－ＨＵＭＡＮ，　Ｆｉｌａｍｉｎ－Ａ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅに提示される配列に記載されるとおりのＦＬＮＡタンパク質配列の中の２５６１番－２５６５番のアミノ酸残基に相当する。ＦＬＮＡ結合化合物は、好ましくは２４番目の繰返し領域での、フィラミンＡとの相互作用を介して、μオピオイド受容体のアゴニスト刺激により引き起こされるＭＯＲ－Ｇｓ結合を阻害することができる。

【００３９】

本明細書中使用される場合、「オピオイド受容体」という用語は、オピオイドと相互作用するＣＮＳ中に位置するＧタンパク質結合型受容体を示す。より詳細には、μオピオイド受容体は、モルヒネにより活性化されて、当業者に既知の、痛覚消失、鎮静、悪心、及び他にも多くの副作用を引き起こす。

【００４０】

本明細書中使用される場合、「オピオイドアゴニスト」という用語は、オピオイド受容体と結合すると、受容体を刺激し、Ｇタンパク質結合を誘導し、生理反応の引き金を引くことができる物質を示す。より詳細には、オピオイドアゴニストは、ＭＯＲと相互作用して痛覚消失をもたらすモルヒネ様物質である。

【００４１】

本明細書中使用される場合、「オピオイドアンタゴニスト」という用語は、オピオイド

受容体と結合すると、オピオイドアゴニストと受容体の結合に干渉することでオピオイドアゴニストの機能を阻害する物質を示す。

【００４２】

本明細書中使用される場合、「超低用量」又は「超少量」という用語は、化合物がその量でオピオイドアゴニストと併用投与された場合にオピオイドアゴニストの鎮痛効力を向上するのに十分な量であることを示す。より詳細には、超低用量のオピオイドアンタゴニストは、オピオイドアゴニストの約１０００分の１～約１０，０００，０００分の１、好ましくは約１０，０００分の１～約１，０００，０００分の１の量で、オピオイドアゴニストと混合される。

【００４３】

本明細書中使用される場合、「ＦＬＮＡ結合有効量」又は、もっと簡単に「有効量」は、目論んでいる化合物の量が、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドに結合し、かつ本明細書中記載される機能（化合物が１０μＭ濃度で存在し、対照阻害剤として同濃度の未標識ナロキソンを使用する場合に、ＦＩＴＣ標識化ナロキソンの結合の少なくとも約６％、好ましくは約７０％を阻害するなど）を発揮するのに十分であることを示す。目論んでいる化合物の有効量は、実施例１のｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイを用いると特に簡単に決定できる。その定義を用いると、目論んでいる化合物は、有効量で、目論んでいる化合物と同濃度の未標識ナロキソンを対照阻害剤として使用した場合に得られる値の少なくとも約６０パーセントから、上限は対照としてナロキソンを用いて得られる値の約２倍（２００％）までで、配列番号１のペンタペプチドと結合する。

【００４４】

本明細書中使用される場合、「ファルマコフォア」という用語は、何かしらの薬理活性を暗示するものではない。ファルマコフォアは、分子にある、受容体と相互作用し、かつ化合物の活性の一因となっている関連基と定義することができる。［Ｒ．　Ｂ．　Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ，　<u>Ｔｈｅ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｃｔｉｏｎ</u>，　2^{nd}　ｅｄ．，　Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，　（２００４），　ｐ．１７。］この用語は、分子が受容体と相互作用するための好適な前提条件を構成する、化学的特徴及びその三次元空間配置を示す（米国特許第６，０３４，０６６号を参照）。ファルマコフォアは、特定受容体（ここでは、配列番号１のペンタペプチド）と同様に結合する化合物の群で共有される芳香族性／疎水性及び水素結合アクセプター官能基及びそれらの距離を求めることで、計算される。

【００４５】

本明細書中使用される場合、「受容体」という用語は、自身と別の実体、すなわちリガンドと、特異的に結合するある実体を示すのに広義で用いられる。受容体は、概して、巨大分子であり、リガンドは概して、それより小さく、分子量のより小さい分子であるが、そのような特徴は必ずしも必要ではない。本明細書中説明される受容体のいくつかは、特異的タンパク質（トール様受容体４、ＭＯＲ、及びα７ｎＡｃｈＲなど）であり、それらの受容体は、それら自身が他の受容体（抗体など）のリガンドである。他の受容体として、特定のエピトープリガンドと免疫相互作用する全抗体及び抗体結合部位の部分（パラトープ）、ならびにブドウ球菌及び連鎖球菌のタンパク質Ａ及びＧ（それぞれ、Ｆａｂ及びＦｃ抗体部分と結合する）などのタンパク質が挙げられる。ビオチン及びアビジン（ストレプトアビジン）もリガンド受容体対として、つまりアプタマーとして見ることができる。

【００４６】

本明細書中使用される場合、「有意に異なる」及び「有意差」ならびに同様な用語及び語句は、アッセイを繰り返した場合に、結果を比較すると、いずれかの測定の標準偏差で１、好ましくは標準偏差で２、より好ましくは標準偏差で３より大きく異なることを意味する。

【００４７】

発明の詳細な説明

本発明は、生きている患者におけるアルツハイマー病の病理（ＡＤ病理）の存在の可能性を測定するアッセイ方法を目論んでいるが、もっとも、このアッセイは体外で実行される。目論んでいるアッセイ方法は、以下の工程を含む：ａ）ＡＤの存在についてアッセイしようとしている生きている（典型的には成人で典型的には認知障害のある）患者由来の身体標本調製物に存在するタンパク質タンパク質複合体中の、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１つ又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβ［本明細書中、ｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβとも称する］タンパク質比の大きさを求める工程；ならびにｂ）その（それらの）量又は大きさを、ＡＤ病理のない個人由来の標準身体標本における、同じタンパク質の量又は１種もしくは複数の同じタンパク質比の大きさと比較する工程。

【００４８】

タンパク質比は、身体標本調製物に含まれるタンパク質タンパク質複合体中に存在する、一方のタンパク質に会合（結合）したもう一方のタンパク質のレベルを示す。通常、これらのタンパク質は、アッセイしようとしている２種のタンパク質のうち一方又は他方に対する抗体との免疫反応により形成された免疫沈降物に含まれる形で共沈する。存在するタンパク質量を、免疫共沈したタンパク質を探索するウエスタンブロットにより、あるいは互いに接着したタンパク質を検出するＥＬＩＳＡ又はＦＩＴＣなどにより、測定する。個別のタンパク質又はタンパク質複合体は、カラムで行う、又はビーズに結合させた抗体結合部位含有分子で行う親和性技法を用いて得ることもできる。

【００４９】

アッセイした患者で測定された量が、標準標本に存在する量よりも統計上有意に大きい場合は、標本を採取した（標本が患者から得られた）時点で患者にＡＤ病理又は「ＡＤによる軽度認知機能障害」が存在することと一致し、その存在を示す。

【００５０】

すなわち、ウエスタンブロット分析により測定した場合、ＡＤ病理を有すると臨床上確定している個人由来のリンパ球身体標本調製物におけるα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比の大きさは、約０．４～約１．４で平均値は約０．８であるが、一方、健常者におけるα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比は、典型的には約０．１～約０．８で平均値は約０．４である。ＡＤ病理を有すると臨床上確定している個人由来のリンパ球身体標本調製物におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、約０．５～約１．０で平均値は約０．７であるが、一方、健常者におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、典型的には約０．４５～約１．０で平均値は約０．８である。ＡＤ病理を有すると臨床上確定している個人由来のリンパ球身体標本調製物におけるα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比は、約０．２～約１．０で平均値は約０．６であるが、一方、健常者におけるα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比は、典型的には約０．１～約０．８で平均値は約０．４である。好ましくは、比の大きさの差は、標準偏差で少なくとも１異なり（有意に異なる）、より好ましくは標準偏差で２異なる。

【００５１】

身体標本調製物（リンパ球身体標本調製物など）を少なくとも２つに分割し、部分の１つに、複合体を形成したタンパク質を含まない過剰量のＡβ（α７ｎＡＣｈＲ飽和量のＡβ）を外部から加えて混合し、もう一方の部分には加えず混合しない場合、臨床上確定しているＡＤ患者については、過剰Ａβを混合した場合としない場合とでは、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比が有意に異なる大きさまでは変化しなかった。一方、正常患者については、α７ｎＡＣｈＲ飽和量のＡβを外部から加えて混合しなかった場合とした場合で測定したα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比における差は、有意に大きいものである。α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４を単独でアッセイする場合には同様な変化が見られるが、ＦＬＮＡとの比では見られない。

【００５２】

本明細書中記載されるアッセイで用いられる、外部から添加される、α７ｎＡＣｈＲ飽

和量の、複合体を形成したタンパク質を含まないＡβは、４種のＡβ$_{39-42}$ペプチドのうちのどれでも可能である。Ａβ$_{42}$ペプチドはもっとも強力であるので、本明細書中記載されるアッセイに好適であり、また概して用いられる。例えば、Ａβ$_{42}$誘導型のα７ｎＡＣｈＲに対するＦＬＮＡ補充は、１０倍高い濃度のＡβ$_{40}$で模倣することができた。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ，３２（２９）：９７７３－９７８４（２０１２年7月１８日）を参照。

【００５３】

リンパ球標本調製物にＡβを混合する前後でのタンパク質比における変化パーセンテージのこうした差は、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比の測定又はＴＬＲ４もしくはα７ｎＡＣｈＲの個々のタンパク質量の測定から得られるデータでそうであるように、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比のデータも、患者がＡＤ病理を有するか有さないかと一致する（患者がＡＤ病理を有するか有さないかを結論づける）という点で、さらなる好適な診断基準を提供する。

【００５４】

すなわち、身体標本調製物を少なくとも２つに分ける工程及び飽和量のＡβ（これらの細胞中に通常存在する量を超える、複合体を形成したタンパク質を含まない過剰なＡβ）を部分の１つと混合し、他方とは混合しない工程を含む上記の手順に従うと、臨床診断がついているＡＤ患者については、過剰Ａβと混合しなかった場合とした場合とで、観測されるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比に有意な変化が生じない。一方、正常な患者では、過剰Ａβと混合しなかった場合とした場合とで、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の差が有意差より大きくなる。

【００５５】

複合体を形成していない過剰な遊離Ａβとリンパ球標本調製物とを混合する前後でのタンパク質比における変化パーセンテージのこうした差は、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比のデータが、患者がＡＤ病理を有するか有さないかと一致する（患者がＡＤ病理を有するか有さないかを結論づける）という点で、診断基準を提供する。

【００５６】

繰り返しになるが、身体標本調製物を少なくとも２つに分ける工程及び飽和量のＡβ（これらの細胞中に通常存在する量を超える過剰なＡβ）を部分の１つと混合し、他方とは混合しない工程を含む上記の手順に従うと、臨床診断がついているＡＤ患者については、過剰Ａβと混合しなかった場合とした場合とで、観測されるα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比の変化は有意な大きさにはならない。一方、正常な患者では、過剰Ａβと混合しなかった場合とした場合とで、α７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比の差が有意差より大きくなる。

【００５７】

Ａβとリンパ球標本調製物とを混合する前後でのタンパク質複合体量における変化パーセンテージのこうした差も、α７ｎＡＣｈＲ／Ａβ比のデータが、患者がＡＤ病理を有するか有さないかと一致する（患者がＡＤ病理を有するか有さないかを結論づける）という点で、診断基準を提供する。

【００５８】

従って、この実施形態のより好適な態様において、本アッセイは２段階で行われるが、その順序は問わない。記載の都合上、第一とする段階において、身体標本調製物の第一の部分を、上記のとおりにアッセイして、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１つ又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβの量を測定する。第二段階では、飽和量のＡβ（ＡＤ病理のない患者由来の身体標本に通常存在する量を超える、過剰なＡβ）を、身体標本調製物の第二の部分と混合し、そして同じα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１つ又は複数の同じｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質比について値を測定する。飽和量のＡβ（ＡＤ病理のない患者由来の身体標本に通常存在する量を超える、外部から供給された過剰なＡβ）は、１ｎＭ以上の濃度をもたらすのに十分な量のＡβを混合することで、提供することができる。少なくとも約

１００ｎＭの濃度を提供するのに十分な量での混合が好適である。
【００５９】
α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、又はα７ｎＡＣｈＲ／Ａβについて測定された量が、第一の部分のアッセイと第二の部分のアッセイの間で異なっているがその差が有意ではない場合は、患者がＡＤ病理を有することを示している。一方、これら３種のタンパク質比のいずれかについて測定された２つの値の間の差が有意に大きい場合、患者はアッセイの時点ではＡＤ病理がないということである。α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４を単独でアッセイした場合、同等な変化度合いが見られる。これらの差の大きさは、容易に区別できる。
【００６０】
この実施形態の別のより好適な態様において、身体標本調製物の第一の部分を上記のとおりにアッセイして、上記の２種の個々のタンパク質又は３種のタンパク質比の１つ又は複数を測定する。身体標本調製物の第二の部分に、上記のとおりＡβを混合するのではなく、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドに結合する化合物（１種又は複数の化合物）をＦＬＮＡ結合有効量で外部から提供し、混合する。配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドに結合する化合物は、図７～図１２の６つのファルマコフォアのうち少なくとも４つを有し、好ましくはこれら６つのファルマコフォアのうち少なくとも５つを有するもので、例えば、オピオイド受容体アンタゴニスト又は混合アゴニスト／アンタゴニスト化合物（まとめてアンタゴニスト化合物と称する）又は本明細書中以下に説明される系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、Ｃ－２、Ｄ、もしくはＥの化合物、あるいはそれら化合物のいずれかの薬学的に許容可能な塩である。本明細書中以下に記載される混合及び平衡化時間後に、同じ個々のタンパク質量又はタンパク質比を測定する。
【００６１】
そのようなＦＬＮＡ結合化合物の存在下で求められたタンパク質比の大きさが、化合物の不在下で測定された大きさと比較して有意に減少していることは、標本を採取した患者がＡＤ病理を有することと一致する。一方で、正常な患者（ＡＤ病理がない）で得られるタンパク質比の値は、目論んでいる化合物の不在下で測定された値との実質的に変わらない。見方を変えると、目論んでいるＦＬＮＡ結合化合物の存在下及び不在下で測定された個々のタンパク質量又はタンパク質複合体量は、標本を採取した患者がＡＤ病理を有する場合には有意差があり、正常な患者から得た標本の場合は有意差がないので、これにより２種類の患者を区別できる。
【００６２】
更に別の目論んでいるアッセイは、生きている、典型的には成人の、認知障害の患者に提供された治療が持つ認知改善の有効性を示す。その方法は、以下の工程を含む：ａ）その生きている患者由来の身体標本調製物における、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質複合体の量の一方又は両方について、最初の量を測定する工程。ｂ）患者を、オピオイド受容体アンタゴニスト、又は混合アゴニスト／アンタゴニスト化合物（アンタゴニスト化合物）、又は本明細書中以下に記載されるとおり、配列番号１のＦＬＮＡペプチド（Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ）に結合する系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、Ｃ－２、ＤもしくはＥの化合物、又はその薬学的に許容可能な塩で治療する工程、好ましくは１種以上の化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、治療用組成物に含有されている。ｃ）その治療（化合物又は化合物塩の投与）後、個々のタンパク質あるいは１種又は複数のｉ）α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ｉｉ）ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びｉｉｉ）α７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質複合体量のうち工程ａ）で測定したのと同じものについて同じように、第二の身体標本調製物中の第二の量を測定する工程。ｄ）治療前後に測定した、個々のタンパク質量あるいは１種又は複数のタンパク質複合体比の大きさを比較する工程。その比較において、後から測定された（治療後の）値が最初に測定された値より有意に小さい場合は、治療処置が、患者の認知の改善を提供し、及び疾患の進行を遅らせる又は阻害するという点において有効であることと一致する。タンパク質

又は複合体量の有意な増加は、治療が有効ではないことを示し、一方、先に測定された量から変化しない量は、アッセイの時点で認識できる変化がないことを示す。
【００６３】
α７ｎＡＣｈＲもしくはＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数のタンパク質複合体の量を１回又は複数回連続して測定することも可能であり、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数の複合体の量を測定するごとに、先に測定した量と比較することができる。ＡＤ及び他の認知喪失疾患は進行性の疾患であるため、リンパ球、嗅覚神経上皮細胞、及び未処置の脳における２種の個々のタンパク質又は３種のタンパク質複合体比のそれぞれのレベルは、疾患の過程全体にわたって、特に初期の段階において、顕著に増加する可能性がある。
【００６４】
２種のタンパク質及び上記３種のタンパク質複合体のいずれか又は両方についてのアッセイを用いて、ＡＤ病理を有するヒト患者又はＡＤ関連病理を持つ下等動物患者であることと一致する証拠を提供することができる。３種についてアッセイを行ってうち少なくとも２種で同じ結果が得られることが好ましい。３種のアッセイ全てを行うことが、適切な診断であることのさらなる保証を提供し得る。
【００６５】
本発明の別の実施形態は、特定の結合特質及び構造的特質を有する化合物又はその化合物の薬学的に許容可能な塩を用いて、アルツハイマー病の病理（ＡＤ病理）を有すると推定される生きている患者の治療の予後（治療成績）を測定する方法を目論んでいる。目論んでいる化合物又はその塩は、水性組成物中、本明細書中以下で説明するとおりの配列番号１を有するフィラミンＡ（ＦＬＮＡ）ペンタペプチド（Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｌｅｕ）と結合し、図７～図１２の６つのファルマコフォアのうち少なくとも４つを有する。現在のところ特に好適な化合物はまた、その化合物が１０μＭ濃度で存在し、同濃度で対照阻害剤として未標識のナロキソンを用いた場合に、ＦＩＴＣ標識化ナロキソンと配列番号１のペンタペプチドとの結合を少なくとも約６０％阻害するものでもある。
【００６６】
本方法は以下の工程を含む：ａ）生きている患者由来の身体標本調製物中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβタンパク質複合体の量の一方又は両方を測定する工程、ここで使用される「身体標本調製物」及び「患者」という言葉は、既に定義された。ｂ）同じ生きている患者由来の身体標本調製物の第二の部分で、７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４の量あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Аβタンパク質複合体の量の一方又は両方について、同じものの量を測定する工程。これらの測定は、どちらを先に行うことも、同時に行うことも可能である。この第二の身体標本調製物は更に、本明細書中以下で説明するとおり、外部から提供されたＦＬＮＡ結合有効量（典型的には約０．１ｎＭ～約１０ｎＭ）の上記化合物又はその塩を含有する。ｃ）工程ａ）及び工程ｂ）で測定された量を比較し、工程ｂ）で測定された量が工程ａ）で測定された値より統計上有意に少なければ、その化合物又は塩を用いた患者の治療について予後は好ましいものとなる。更に、患者に化合物又はその塩を一定期間投与した後に採取した身体標本中の、α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４あるいは１種又は複数のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβ複合体の一方又は両方の測定値も、工程ａ）で最初に測定した量より有意に少なければ、それらの測定値は、以下で説明するとおり、治療の有効性を示すバイオマーカーの役割を果たす。
【００６７】
「患者」という言葉は、ヒト患者ならびにＡＤを研究するのに有用な下等動物モデルを含むものとする。下等動物モデルの例として、本明細書中以下で例示するとおりＡＤ関連病理を誘導させせることができる実験動物（マウス及びラットなど）が挙げられる。イヌ及びネコなどのペットも考慮に入っている。イヌは、加齢性の認知機能不全症候群を患う可能性があり、この認知機能不全症候群も当然ながらＡＤの重要な態様（Ａβの皮質病理、

ニューロン変性、ならびに学習障害及び記憶障害を含む）を再現するが、有芯老人斑及び神経原線維タングルは、イヌでは、常に現れるわけではなかった。Ｓａｒａｓａ ｅｔ ａｌ．， Ｃｕｒｒｅｎｔ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ Ｒｅｓ．， ６：１７１－１７８ （２００９）に記載されるとおりの他の動物も考慮に入っている。

【００６８】

アッセイ手順

目論んでいる方法に用いることを目論んでいる身体標本として、リンパ球、嗅覚神経上皮細胞、ならびに脳の生検、特に海馬及び前頭前皮質の生検で得られる細胞が挙げられる。リンパ球は、本明細書中以下で説明するとおり、有用な身体標本調製物を調製することができるので、好適な身体標本である。

【００６９】

好適に実施される場合、有用な身体標本調製物は、細胞溶解液、例えば本明細書中以下で説明するとおりに調製したリンパ球溶解液などである。典型的には、アッセイ１回あたり約１～約５０μｇのリンパ球溶解液が使用され、より好ましくは約５～約２０μｇが使用される。

【００７０】

目論んでいる身体標本調製物は、アッセイで実際に用いられる材料であり、アッセイしようとするタンパク質を含有する身体標本から調製された水性組成物である。例として、ある身体標本調製物は、アッセイしようとするタンパク質又はタンパク質タンパク質複合体を含む溶解性もしくは可溶化細胞の溶解液を含有する水性組成物である。身体標本調製物の例は、本明細書中以下に例示されるものであり、典型的には、緩衝塩、１種また複数の界面活性剤、及び浸透圧を調節する溶質（塩及び糖類など）を含有する。

【００７１】

リンパ球調製物は、血小板を含有することが多い。本明細書中用いられるリンパ球アッセイは、血小板を含まないリンパ球調製物を用いて行われた。しかしながら、血小板は本明細書中アッセイされるタンパク質複合体を含有せず、かつ血小板は、通常のリンパ球調製物中に少量で存在するのが普通なので、有用なリンパ球調製物は、血小板を含まないものである必要はない。

【００７２】

嗅覚機能障害は、様々な神経変性疾患において初期に共通してみられる徴候である。嗅覚減弱（Microsmia）又は嗅覚脱失は、アルツハイマー病患者の約９０％に存在し、累積証拠は、この心理物理的バイオマーカーが、付帯する軽度認知機能障害を予言するとともに、痴呆の重篤度及び脳の神経変性疾患病理の存在量と相関することを示唆する。［Ａｒｎｏｌｄ ｅｔ ａｌ．， Ａｎｎ Ｎｅｕｒｏｌ．， ６７（４）：４６２－４６９ （２０１０）。］

【００７３】

Ｂｏｒｇｍａｎｎ－Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ， Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ １５８：６４２－６５３ （２００９）による指摘のとおり、嗅覚上皮は、生きているヒトから得ることが可能な、再生中の神経細胞の提供源となる。そうであるので、ヒト嗅覚上皮生検材料由来の初代培養物を用いて、様々な身体状況及び疾患状態にある個々人の神経生物学的特徴を調べることができる。嗅覚上皮は前脳に位置する嗅球に神経情報を入力する。

【００７４】

生きている患者、特にヒトの脳からの生検材料は、得ることがあまり容易ではなく、繰返し行われるアッセイで用いるのにあまり望ましくない。そうであっても、そのような生検材料を生きている患者から得ることは可能であり、本明細書中以下で死後組織を用いて例示するとおり、脳組織は、目論んでいるアッセイを行うのに有用な細胞を提供することができる。

【００７５】

おそらく驚くだろうが、脳脊髄液（ＣＳＦ）は、目論んでいる方法でアッセイされるタンパク質又はタンパク質複合体の提供源とならない。目論んでいるアッセイにとってＣＳ

Ｆが有用ではない最大の理由は、その後の分析用に全タンパク質が脳そのものからＣＳＦへ流出するためには血液脳関門（ＢＢＢ）の機能に障害が起こらなければならないからである。

【００７６】

むしろ、ＣＳＦは、現在のＡＤ用臨床アッセイに用いられているτタンパク質及びＡβの提供源として、本発明でも用いられる。疾患が進行するにつれて、ＢＢＢは抜け穴が増えて、全τ（ホスホリル化τ＋非ホスホリル化τ）対Ａβの比は増加する。Ａβは、骨髄、膵臓、及び腸など全身で産生される。

【００７７】

ＡＤ症候のない個人由来の標準身体標本調製物は、当業者に既知の数多くの方法で調製することができる。測定される標準物質は同じ標本提供源由来であることが好ましく、例えば、アッセイで用いられるリンパ球の標準物質はリンパ球由来であるといったことである。そうした標準物質は容易に調製できる。標準標本は同年齢の個人に由来するものであることも同じく好ましく、標準群の年齢は、アッセイされる患者の年齢から約５歳（約±５年）の範囲内にある。実験動物が患者である場合、同年齢であることはそれほど重要ではない。

【００７８】

所定のタンパク質比についての標準値は、様々な年齢群及び標本組織について既知の値であってもよい。しかしながら、標準物質由来の標本とアッセイ標本を一緒に測定する、あるいは複合体の標準量と相関させることができるある種の他の規格化標準物質を外部から供給してアッセイに一緒に用いて、得られる結果の正確性を保証することが好ましい。

【００７９】

目論んでいる方法を行うのに、様々なアッセイ手順を利用することができる。濃度測定分析によるなどの定量を伴う又は伴わないウエスタンブロット、及び固相アッセイ（マルチウェルプレートの壁面（wall）を固相として用いるプレート型アッセイなど）を、例として本明細書中以下で説明する。タンパク質又はタンパク質複合体の量を求める技法のさらなる例として、以下のものが挙げられるが、それらに限定されない：Ｂｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．， Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ Ａｃｔａ ２２：５１－６９ （１９６８）及びＷａｌｓｈ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ １２１：５５０－５５４ （１９７０）で説明されるような放射免疫アッセイ；Ｌｉｓｉ ｅｔ ａｌ．， Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ Ａｃｔａ １２０：１７１－１７９ （１９８２）に記載されるようなフローサイトメトリー；Ａｌ－Ｈａｋｉｅｍ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ３：９１－１１０ （１９８２）で説明されるような微粒子分析；Ｅｎｇｖａｌｌ ｅｔ ａｌ．， （１９７６）；ｅｎｚｙｍｅ－ｌｉｎｋｅｄ ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ ａｓｓａｙ （ＥＬＩＳＡ）， ｐ１３５－１４７， Ｉｎ Ｘ． Ｆｅｌｄｍａｒｒ （ｅｄ．）， Ｆｉｒｓｔ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ ｏｎ ｉｍｍｕｎｏｅｎｚｙｍａｔｉｃ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ （１９７６）；Ｐｏｒｓｔｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １５０：５－２１ （１９９２）；及びＷｏｌｔｅｒｓ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｃｌｉｎ Ｐａｔｈｏｌ ２９：８７３－８７９ （１９７６）のようなＥＬＩＳＡアッセイ；Ｗｏｌｆ－Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １３３：１９１－１９８ （１９９０）で説明されるような化学発光微粒子法；Ｅａｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．， Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ ５０：２３９－２４２ （２００２）で説明されるような多成分分析微粒子法；Ａｔｍａｎｅｎ ｅｔ ａｌ．， Ａｎａｌ． Ｃｈｅｍ． ８１ （１５）：６３６４－６３７３ （２００９）；Ｐａｎｄｙｅｙ ｅｔ ａｌ．， Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ， ＵＳＡ ９７：１７９－１８４ （２０００）；及びＮｅｄｅｌｋｏｖ， Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｄｉａｇｎ． １２（３）： ２３５－２３９ （２０１２）で説明されるような質量スペクトル分析。

【００８０】

より詳細には、固相プレート型アッセイでは、複合体に含まれるタンパク質の一方に特

異的に結合する第一の捕獲受容体を用いて、タンパク質複合体を捕獲し、その複合体に含まれる第二のタンパク質と特異的に結合する第二の受容体を用いて、捕獲された複合体の量を測定する。例えば、ＦＬＮＡに特異的に結合するビオチン化パラトープ含有分子（第一、すなわち捕獲受容体）を、アッセイプレートのウェルに付着、例えば、ストレプトアビジンで被覆したプレートウェルに結合させ、ＦＬＮＡ含有複合体を捕獲することができる。

【００８１】

次いで、複合体の第二のタンパク質に又は第一のタンパク質の非干渉エピトープ（例えば、ＴＬＲ４など）に特異的に結合する第二のパラトープ含有分子（第二受容）を用いて、ＦＬＮＡと複合体を形成したＴＬＲ４分子に結合させることができる。その第二のパラトープ含有分子は、それ自身、指標基（酵素、ＦＩＴＣ、又は放射性同位体など）を有することができ、この指標基を用いて、結合した量を求めることも可能であるし、結合量は他の手段によって求めることも可能である。

【００８２】

別の例示では、第一の受容体を、水不溶性粒子（樹脂ビーズ又は磁気粒子など）に付着させる（化学的又は物理的に結合させる）ことができる。身体標本調製物と混合し、そして結合させるのに適切な保持時間経過後（約０．５～約２４時間）、アッセイされる複合体と特異的に結合した、粒子に結合した第一の捕獲受容体を、物理的手段（遠心分離又は磁気誘引など）により水性組成物の残部から分離することができる。複合体及びその構成要素は、それら自身、緩衝液に入れて沸騰させ、続いてクロマトグラフィー又は電気泳動により分離することができ、適切な第二の受容体と結合させて成分同定を行い、所望であれば定量し、そうすることでタンパク質及び複合体の両方、又はどちらか片方を定量することができる。

【００８３】

本明細書中用いられる好適な受容体の１種は、アッセイされるタンパク質又はタンパク質複合体のタンパク質に結合する抗体の、少なくともパラトープを含有するポリアミド部分である。無傷の抗体が、好適な受容体である。

【００８４】

抗体のパラトープ含有ポリアミド部分（抗体結合部位）とは、抗体分子の、パラトープ（結合部位）を含む、リガンドと結合する部分である。そのような部分として、周知の酵素切断技法により抗体から調製された、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ'断片、Ｆｖ断片、及びＦ（ａｂ'）$_2$断片が挙げられる。例えば、一般論はＴｈｅｏｆｉｌｏｐｏｕｌｏｓ及びＤｉｘｏｎの米国特許第４，３４２，５６６号を、具体的にはＰｏｌｌａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，［Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２３４：１５７０－１５７３　（１９８７）］を参照のこと。Ｐｏｌｌａｃｋ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｆａｂ断片についての急速加水分解速度が未変性免疫グロブリンのものと同じであったことを報告した。

【００８５】

パラトープすなわち抗体結合部位含有ポリアミドが得られる抗体は、それ自身が、免疫原に対して産生される又は誘導されると述べることができるので、パラトープ含有ポリアミド受容体は、「産生された」又は「誘導された」と説明されるが、このとき、抗体からパラトープ含有ポリアミドを得るためには、切断工程が必要であるのが普通であるという認識に基づいている。しかしながら、無傷の抗体が好適であり、本発明の受容体分子の実例として利用される。

【００８６】

本発明で有用な抗体受容体は、好ましくはモノクローナル抗体であるが、もっともポリクローナル抗体も使用できる。「モノクローナル抗体」は、１種類の受容体分子のみを分泌する、ハイブリドーマと呼ばれる単細胞のクローンにより産生される受容体である。ハイブリドーマ細胞は、抗体産生細胞と骨髄腫細胞又は他の自己永続細胞株とを融合させたものである。

【００８７】

モノクローナル抗体を調製する技法は周知である。そのような受容体は、Ｋｏｈｌｅｒ　ａｎｄ　Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，　Ｎａｔｕｒｅ，　２５６：４９５－４９７　（１９７５）で初めて記載された。モノクローナル抗体は、典型的には、ハイブリドーマ組織培養物から、又はハイブリドーマ組織を導入した哺乳類から得られた腹水から、得られる。

【００８８】

受容体分子の生物活性は、水性媒体中、少なくとも生理学的ｐＨ値及びイオン強度にて、受容体をそのリガンドと混合した際に結合することで証明される。好ましくは、受容体は、約５～９の範囲内のｐＨ値で、蒸留水～約１モル濃度の塩化ナトリウムのイオン強度ぐらいのイオン強度でもリガンドと結合する。

【００８９】

受容体、及び他の結合試薬は、指標標識手段又は「指標基」又は「標識」と一緒に用いることができる。指標基又は標識は、特定のリガンド（例えば、ＴＬＲ４）が、受容体に結合した又は結合されたという信号を発し（結合を確定させ）そしてそのように結合した量を定量する手段として、受容体と併用される。

【００９０】

「指標標識手段」又は「指標基」又は「標識」という用語は、本明細書中、受容体と連結した、又は別々に用いられる、単独原子及び分子を含むものとして用いられ、そうした原子又は分子は、単独で用いられても、さらなる試薬と併用されてもよい。そのような指標基又は標識は、それら自身、生化学及び特に免疫化学で周知である。

【００９１】

信号を発する標識として利用されるものは、典型的には、別の分子又は分子の一部と連結している。そうであるので、標識が連結された分子の結合が、標識により実質的に損なわれることがなく、標識による所望の信号発信も実質的に損なわれることがないように、標識は、そのような他の分子又は分子の一部（受容体など）と操作可能に連結される。

【００９２】

指標標識手段は、受容体又はリガンドを変性させることなくそれらと化学的に結合（反応）して蛍光色素（色素）を形成する反応性蛍光標識試薬が可能であり、形成された蛍光色素（色素）は、有用な免疫蛍光トレーサーとなる。適切な反応性蛍光標識試薬は、蛍光色素、例えば、フルオレセインイソシアネート（ＦＩＣ）、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、ジメチルアミノーナフタレンーＳースルホニルクロリド（ＤＡＮＳＣ）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、リサミンローダミンＢ２００スルホニルクロリド（ＲＢ２００ＳＣ）などである。免疫蛍光分析技法の説明は、ＤｅＬｕｃａ，"Ｉｍｍｕｎｏｆｌｏｕｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，"　ｉｎ　<u>Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｓ　Ａ　Ｔｏｏｌ</u>，　Ｍａｒｃｈａｌｏｎｉｓ　ｅｔ　ａｌ．　ｅｄｓ．，　Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ　Ｌｔｄ．，　ｐ．１８９－２３１（１９８２）に見られる。

【００９３】

指標標識手段は、受容体と直接連結させることもできるし、独立した分子を構成することもできる。指標標識手段は、本明細書中説明される複合体のタンパク質と結合する受容体など独立した分子の一部であることが特に好ましい。

【００９４】

スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）Ｃｏｗａｎ株タンパク質Ａ（当該分野では、タンパク質Ａと称されることもある）、及び／又は連鎖球菌タンパク質Ｇも、独立した分子指標又は標識手段として用いることができ、この場合、無傷の又は実質的に無傷の抗体が受容体として利用される。それらを用いる場合、タンパク質Ａ自身が、放射性元素又は蛍光色素などの標識を含有する。あるいは、タンパク質Ａ及びタンパク質Ｇの一方又は両方を、本明細書中以下で示すとおり、捕獲受容体として用いることができる。

【００９５】

指標基としては、生物活性酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）又は

グルコースオキシダーゼなども可能である。主指標基が、ＨＲＰ又はグルコースオキシダーゼなどの酵素である場合、受容体リガンド複合体が形成された、すなわち、受容体が複合体のタンパク質（ＴＬＲ４など）と結合したという事実を視覚化するために、追加試薬が必要である。そのようなＨＲＰ用の追加試薬として、過酸化水素及び酸化色素前駆体（ジアミノベンジジンなど）が挙げられる。グルコースオキシダーゼと一緒に用いられる追加試薬は、２，２’－アジノージー（３－エチルベンツチアゾリン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）である。

【００９６】

放射性元素は、別のクラスの標識を与えるもので、本明細書中、有用な標識の例として用いられる。本発明で使用可能な放射標識試薬の例は、ガンマ線放出をもたらす放射性元素である。それ自身ガンマ線を放出する元素（^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{128}Ｉ、^{131}Ｉ、^{132}Ｉ、及び^{51}Ｃｒなど）は、ガンマ線放出をもたらす放射性元素による指標基の１つのクラスを表している。特に好適なのは、^{125}Ｉである。

【００９７】

有用な指標基の別のクラスは、それ自身でポジトロンを放出する元素（^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{15}Ｏ、及び^{13}Ｎなど）である。それらから放出されるポジトロンは、分析媒体に存在する電子と衝突するとガンマ線を発する。同じく有用であるのは、β線放出体、例えば１１１－インジウム（^{111}Ｉｎ）などである。

【００９８】

放射性モノクローナル受容体は、周知のとおりに、適切なハイブリドーマを、放射性アミノ酸含有培地で培養することで作ることができる。モノクローナル受容体及びポリクローナル受容体の両方とも、受容体を単離し、次いでそれらを上記の放射性元素の１種で標識することにより、調製することができる。タンパク質の放射標識化は、当該分野で周知であるので、本明細書中ではこれ以上説明しない。

【００９９】

「リガンド」は、本明細書中、受容体に特異的に結合する分子又はその分子の一部分と定義される。受容体が抗体結合部位（パラトープ）含有分子である場合、その結合は、免疫反応である。従って、目論んでいるリガンドの１種は、アッセイされる複合体のタンパク質から提供されるエピトープである。

【０１００】

さらなる有用なアッセイ及びその方法又は実施については、以下に見ることができる：米国特許第４，７６１，３８２号；米国特許第４，９４６，９５８号；米国特許第５，６５６，２０７号；欧州特許第５７０５１８号；欧州特許第４，０１６，０４３号；及び欧州特許第２９６３号。さらなる開示は，以下の発表論文に見ることができる：Ｌｉ ｅｔ ａｌ．， ＪＡＬＡ （Ａｐｒｉｌ ２０１０） １０７－１１３； Ｍｅｎｄｏｚａ ｅｔ ａｌ．， ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２７：７７８－７８８ （１９９９）； Ｃａｉ ｅｔ ａｌ．， Ａｎａｌ． Ｃｈｅｍ． ８３（１５）：５８４４－５８５０ （２０１１）；及びＲｏｓｉ ｅｔ ａｌ．， Ｃｈｅｍ． Ｒｅｖ． １０５：１５４７－１５６２ （２００５）。

【０１０１】

ＦＬＮＡ結合及びファルマコフォアの決定

本発明の１つの態様は、実施例１に記載のとおりの配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドに結合する化合物を用いて、対照としてアッセイされる複合体の形成を阻害するものである。目論んでいる化合物は、その化合物が１０μＭ濃度で存在し、同濃度で対照阻害剤として未標識のナロキソンを用いた場合に、ＦＩＴＣ標識化ナロキソンとＦＬＮＡペンタペプチドとの結合を少なくとも約６０％阻害し、好ましくは約７０％阻害する。この態様において、配列番号１のペンタペプチドに有効に結合する化合物の構造は、大きく変化するが、そのように結合するそれら化合物が共有するファルマコフォアのグループを計算することで統合することができる。

【０１０２】

本発明の方法のこの態様で有用な目論んでいる化合物は、図７〜図１２の６つのファルマコフォアのうち少なくとも４つを有する。好適に実施される場合、目論んでいる化合物は、これらの図の６つのファルマコフォアのうち５つを有し、より好ましくは、目論んでいる化合物は、６つのファルマコフォア全てを有する。ＮＬＸ、ＮＴＸだけでなく、他にも複数のモルフィナン環化合物（ナロルフィン、ナルブフィン、及びブプレノルフィンなど）が、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチド（ＶＡＫＧＬ）によく結合する。同様に有用なモルフィナン環化合物例の一覧を、本明細書中以下、特に好適な４種の構造系列の化合物の記載と合わせて提供する。

【０１０３】

アンサンブルファルマコフォアモデルは、トレーニングセットに含まれる化合物の三次元立体構造を用いて組み立てた。実施例１で得られた０．１μＭでのデータを出発点に用いると、実施例１の各表にある化合物の一覧のうち１５３種の化合物は、ＦＬＮＡペンタペプチドへの結合活性が平均値の４５．５４％より小さい。「結合が弱い」化合物又は「弱い結合剤」は、実施例１で行われたとおりのアッセイにおいて結合阻害が平均値の４５．５４％に等しいかそれより小さい化合物として定義される。そうした化合物での結果は、実施例１の各表に示される。トレーニングセットは、ＦＬＮＡペンタペプチドに結合することが既知の１０種の化合物、上記の結合が弱い１５３種の化合物、及びＺＩＮＣデータベース（ｚｉｎｃ．ｄｏｃｋｉｎｇ．ｏｒｇ．）から無作為に選択された約１０００種の化合物で構成される。

【０１０４】

ファルマコフォアの選択は、以下の工程を含む：１）全ての化合物について、最初に、コンピューターで発生させた三次元立体構造を用意した。２）既知の活性化合物の大部分に存在する４点ファルマコフォアの組を派生させた。３）既知の不活性化合物及び無作為に選択した化合物を参照化合物として用いて、参照化合物の大部分に存在しない４点ファルマコフォアだけを、ＦＬＮＡ結合活性と関連するものとして同定した。４）上記で求められたものから最終的に６つの４点ファルマコフォアを、１０種の活性化合物を最もよく表すものとして同定した。

【０１０５】

本明細書中以下に示す４つの化合物構造式（すなわち、系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、又は系列Ｃ－２）のうちいずれか１つの構造を有さない化合物は試験しなかったが、そのような化合物で６つのファルマコフォアのうち４つを有するものは、ＦＬＮＡペンタペプチドに対して活性な結合剤である可能性は約２０％である。６つのファルマコフォアのうち５つを有する化合物は、ＦＬＮＡペンタペプチドに対して活性な結合剤である可能性は約３２％であり、６つのファルマコフォアのうち６つを有する場合は約６０％である。

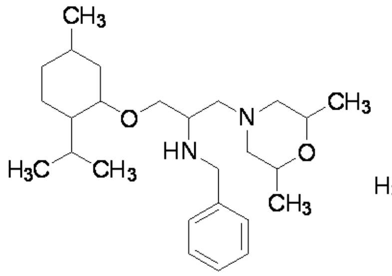
【０１０６】

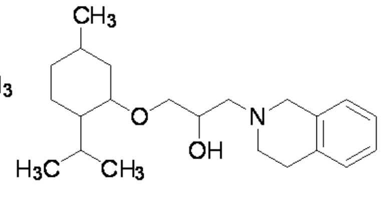
Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ（Ｍｏｎｔｒｅａｌ、Ｑｕｅｂｅｃ、Ｃａｎａｄａ）製のＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ（ＭＯＥ）ソフトウェアを用いて、汎用コンピューターをプログラムして三次元立体構造を発生させ、活性化合物から４点ファルマコフォアを派生させ、これらのファルマコフォアを既知の不活性化合物及び無作為に選択した化合物に対して試験した。本明細書中使用されるとおりのファルマコフォアモデル計算は、Ｐｅｎｚｏｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２００２，４５（９）：１７３７－１７４０（２００２）；Ｓｉｅｗ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２１（１０）：２８９８－２９０５（２０１１年5月15日）；Ｌｅｏｎｇ，Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．，２０（２）：２１７－２２６（２００７）；及びＬｉｎ，ｃｈｅｍｃｏｍｐ．ｃｏｍ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｐｈ４．ｈｔｍ．に記載よび説明されるとおりに行われる。

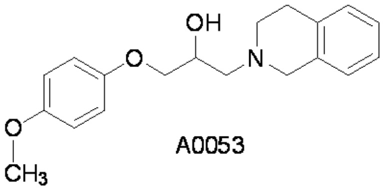
【０１０７】

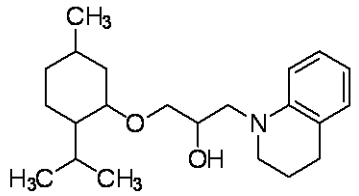
トレーニングセットに含まれる１０種の既知のＦＬＮＡペンタペプチド結合化合物を、本明細書中それらに使用されるアルファベット数字表記と合わせて示す。

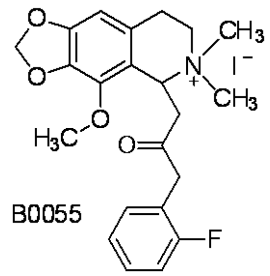
【０１０８】
【化１】

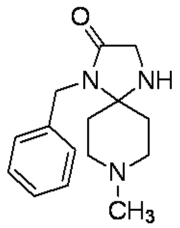

A0033

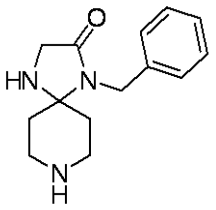

A0040

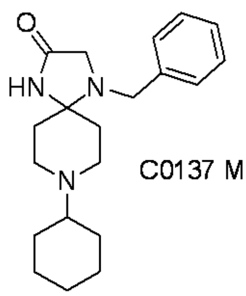

A0053

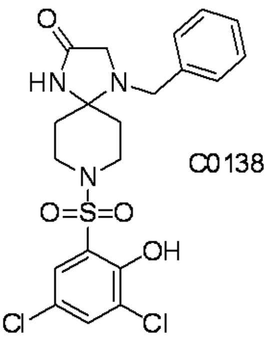

A0068

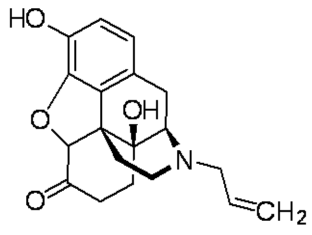

B0055


C0105 M


C0114M


C0137 M


C0138 M


ナロキソン

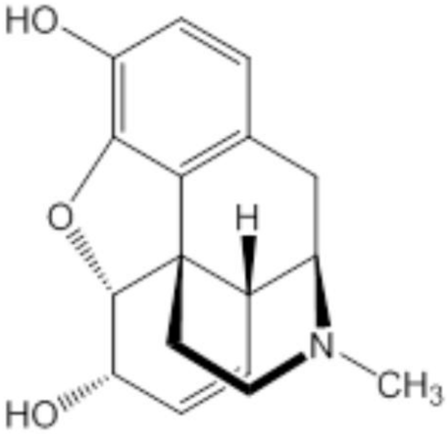
【０１０９】
ファルマコフォアを求めるためのトレーニングセットに用いられる上記の１０種の化合物のうち、９種は６つのファルマコフォア全てを有していた。ナロキソンは、６つのうち５つを有していた。本明細書中以下の実施例１で各表に示されるアッセイされた４つの群（系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、及び系列Ｃ－２）の化合物の構造のいくつかを更に調べたところ、更に２０種の化合物が６つのファルマコフォアのうち５つを有しており、更に別の２０種は６つのうち４つを有していた。

【０１１０】
具体的に目論んでいるＦＬＮＡ結合化合物

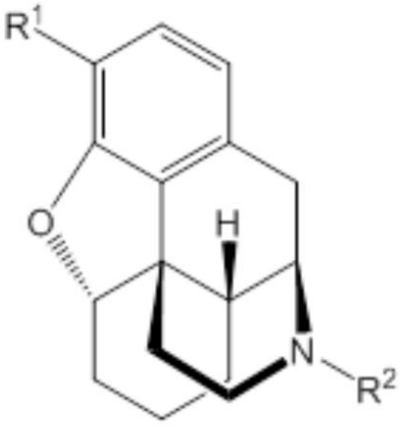
目論んでいる方法で使用することを目論んでいる化合物は、先に述べたとおり、また本明細書中以下で示すとおり、様々な構造を有することが可能である。そのような構造多様性にも関わらず、目論んでいる化合物は、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドに結合し、標識化ナロキソン（ＦＩＴＣ－ＮＬＸ）の、被覆ストレプトアビジンプレートに結合したビオチン化ＶＡＫＧＬペンタペプチド（Ｂｎ－ＶＡＫＧＬ；配列番号１）への結合を、本明細書中以下の実施例１に定義される条件下で、同濃度でナロキソンを阻害剤として用いた場合に得られる値の少なくとも約６０％、好ましくは約７０％の度合いで阻害し、同濃度でナロキソンについての値の約２倍となり得る。

【０１１１】
いくつかの実施形態において、ＦＬＮＡ結合化合物は、オピオイド受容体アンタゴニスト又は混合アゴニスト／アンタゴニスト、特にμオピオイド受容体（ＭＯＲ）のアンタゴニストでもあることが好ましい。化合物がＭＯＲアゴニストではないことが特に好ましい。化合物の有するＭＯＲアゴニスト活性が、実施例２の表で用いられる２種の濃度のいずれかで、［Ｄ－Ａｌａ２、Ｎ－ＭｅＰｈｅ４、Ｇｌｙ－ｏｌ］－エンケファリン（ＤＡＭＧＯ）のＭＯＲアゴニスト活性の約８０％未満であるかぎり、その化合物は、本明細書中、ＭＯＲアゴニストではないと定義される。
【０１１２】
開示を簡潔かつ明瞭にする目的で、オピオイド受容体アンタゴニスト又は混合オピオイド受容体アゴニスト／アンタゴニストである化合物は、特に記載がないか、具体的に命名されないかぎり、本明細書中以下、まとめて「アンタゴニスト化合物」と称する。目論んでいるアンタゴニスト化合物は、オピオイド受容体に対して可逆的なアンタゴニストである。
【０１１３】
トリチウム標識化ナロキソン、すなわち［^{3}Ｈ］ＮＬＸの、ＦＬＮＡ発現Ａ７細胞（ＳＶ４０大型Ｔ抗原を持つＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット胎児由来の視神経星状細胞を不死化することで作り出された星状細胞細胞株）由来の膜への結合に対するナルトレキソン阻害についての結合研究から、ＦＬＮＡに２つの親和性部位が存在することがわかった；３．９４ピコモル濃度というＩＣ$_{50}$－Ｈの高親和性部位（Ｈ）及び８３４ピコモル濃度というＩＣ$_{50}$－Ｌの低親和性部位（Ｌ）である。［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．　３（２）：ｅ１５５４　（２００８）；　Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．　４（１）：ｅ４２８２　（２００９）。］高親和性部位は、その後、配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドと同定されたが（米国特許出願公開第２００９／０１９１５７９号、及びその前身である２００７年１１月２日出願の出願番号第６０／９８５，０８６号）、一方、低親和性部位は未だに同定されていない。２つのＦＬＮＡタンパク質結合部位が存在することを、図１６のグラフに示す。
【０１１４】
本発明で使用することを目論んでいる化合物は、本明細書中以下の実施例１に定義される条件下で、フルオレセインイソチオシアネート標識化ナロキソン（ＦＩＴＣ－ＮＬＸ）の、被覆ストレプトアビジンプレートに結合したビオチン連結配列番号１（Ｂｎ－ＶＡＫＧＬ）への結合を、ＦＩＴＣ標識化ナロキソンを１０μＭ濃度で用いかつ同濃度で未標識ナロキソンを対照阻害剤として用いた場合に得られる値の少なくとも約６０％、好ましくは約７０％の度合いで阻害し、対照としてナロキソンで得られる値の約２倍までなり得る。
【０１１５】
好適な阻害剤化合物のグループの１つは、モルフィナン環化合物である。モルフィナン環化合物は、モルヒネの類似体である。モルヒネ及び典型的なモルフィナン環化合物の構造式を以下に示す（式中、Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、置換基である）。
【０１１６】

【化２】



モルヒネ



モルフィナン

【０１１７】

好ましくは、アンタゴナイズされるオピオイド受容体は、少なくともμオピオイド受容体（ＭＯＲ）であるが、δ及びκ受容体の一方又は両方もアンタゴナイズされ得る。モルフィナン環化合物の多くは、μオピオイド受容体（ＭＯＲ）に結合する鎮痛薬である。以下の表に、いくつかのアンタゴニスト化合物、それら化合物がアンタゴナイズするオピオイド受容体、及び拮抗作用の相対効力をまとめるが、その内容は、大部分の化合物について、Ｇｏｏｄｍａｎ ＆ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ, １１th ｅｄ．, Ｂｒｕｎｔｏｎ ｅｄ．, ＭｃＧｒａｗ−Ｈｉｌｌ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ, Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｔａｂｌｅ ２１−３, ｐａｇｅ ５５２ （２０１１）で報告されたものである。

【０１１８】

【表１】

オピオイドリガンド	オピオイド受容体*		
	μ	δ	κ
ナロキソン	−−−	−	−−
ナルトレキソン	−−−	−	−−−
ジプレノルフィン	−−−	−−	−−−
ナロキソナジン	−−−	−	−
ノルビナルトルフィミン（nor−Binaltrophimine）	−	−	−−−
ビナルトルフィミン（Binaltrophimine）ＮＲ			−−
ナルトリンドール	−	−−−	−
ナロキソンベンゾイルヒドラゾン	−−−	−	−
ナルブフィン	−−	ＮＲ	＋＋
ブプレノルフィン	Ｐ	ＮＲ	−−
ブトルファノール	Ｐ	ＮＲ	＋＋＋
エチルケトシクラゾシン（Ketocyclazcine）	Ｐ	＋	＋＋＋
ナロルフィン	−−−	ＮＲ	＋
シプロダイムＮＲ	−−		

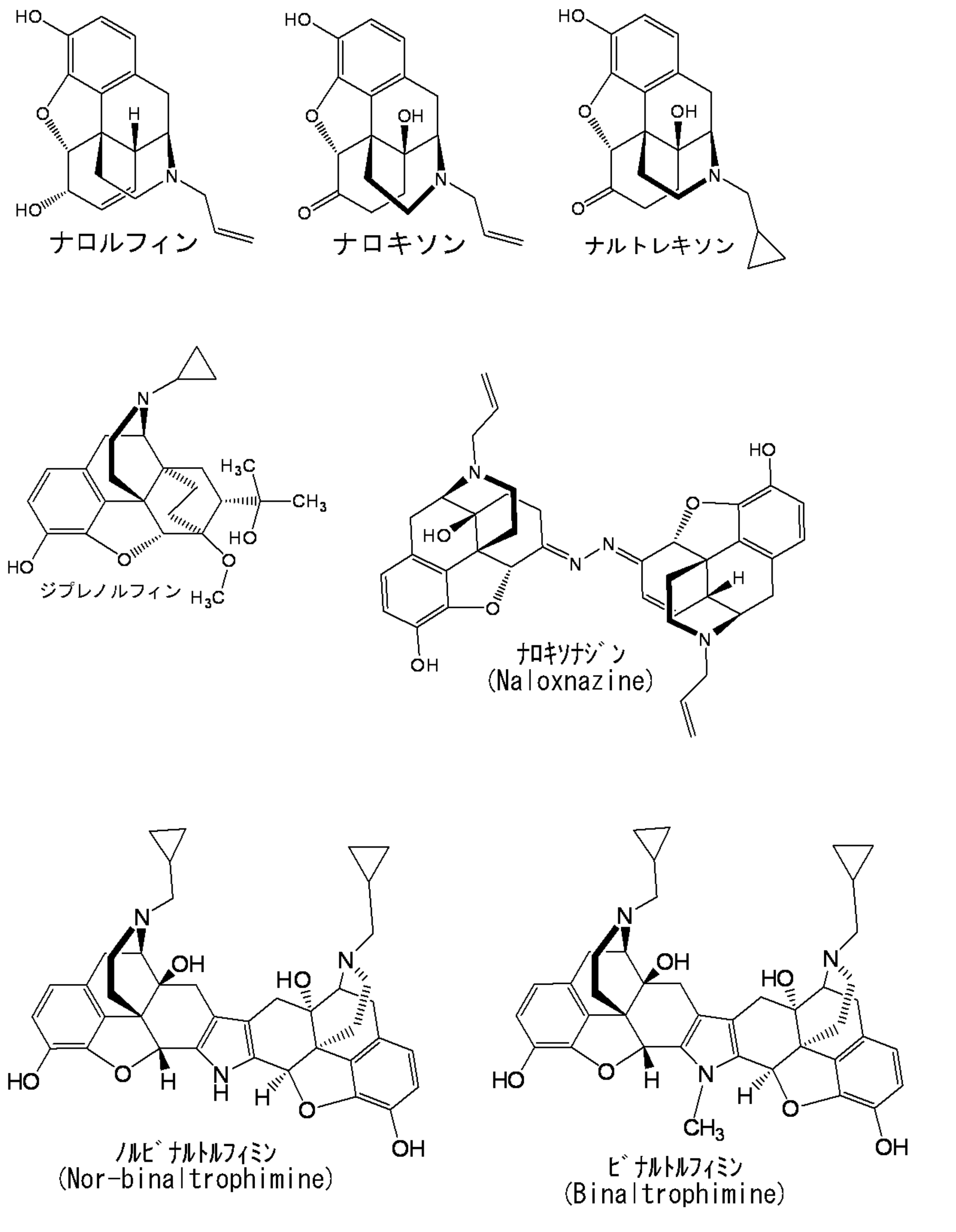
【０１１９】

*「−」＝アンタゴニスト；「＋」＝アゴニスト；「ＮＲ」＝文献中の表に記載なし；Ｐ

＝部分アゴニスト；記号の個数は相対効力を示す；「＃」＝文献中の表には記載されていないが、他所でアンタゴニスト活性およびアゴニスト活性の両方を有すると報告されている。

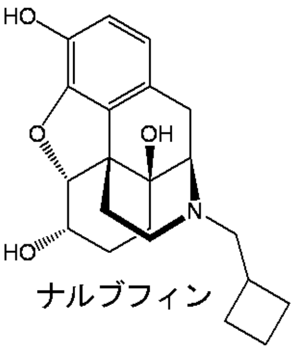
【０１２０】

【化３】

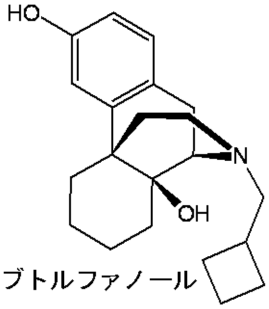


【０１２１】

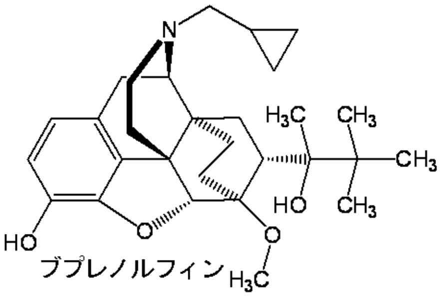
【化４】



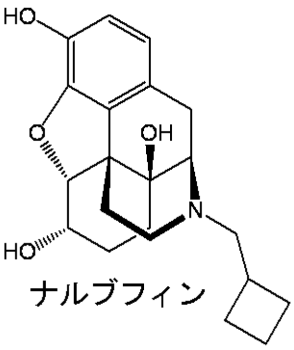
ナルブフィン



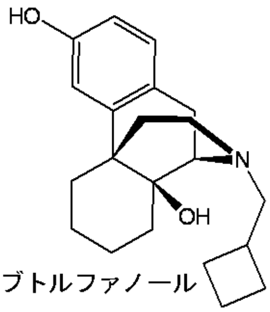
ブトルファノール



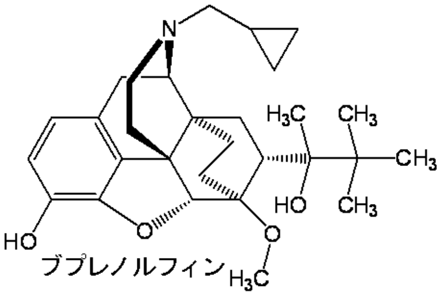
ブプレノルフィン



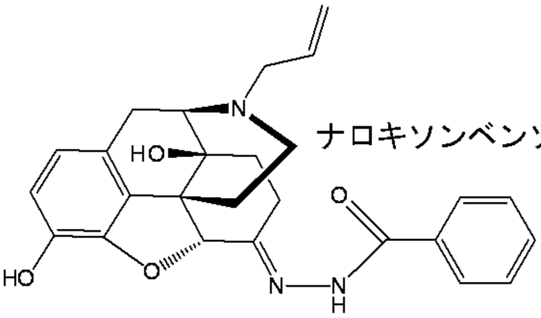
ナルブフィン



ブトルファノール



ブプレノルフィン



ナロキソンベンゾイルヒドラゾン

【０１２２】

ナロキソン（ＮＬＸ）、ナルトレキソン（ＮＴＸ）、ナロルフィン、ナルブフィン、及びブプレノルフィンなどのモルフィナン環化合物は、配列番号１の高親和性ＦＬＮＡペンタペプチド（ＶＡＫＧＬ）によく結合する。しかしながら、市販品のラベルに記載されている用量で使用される場合、これらの化合物は、ＦＬＮＡの低親和性部位にも結合し、また典型的にはＭＯＲにも結合する。これらの化合物のいくつかは、ＭＯＲアンタゴニストであり（ナロキソン、ナルトレキソン、ナルブフィンなど）、一方他の化合物（ブプレノルフィンなど）は、ＭＯＲの完全アゴニスト又は部分アゴニストである。低親和性ＦＬＮＡ部位への結合は、本明細書中説明し、利用し、例示する活性を配列番号１のＦＬＮＡペンタペプチドが発揮するというその発揮活性を損なう。結論として、ＦＬＮＡタンパク質の低親和性部位にも結合するオピオイドアンタゴニスト化合物（ナロキソン、ナルトレキソン、メサドン、フェンタニル、ナロルフィン、ナルブフィン、ブプレノルフィン、及び類似化合物など）は、通常の使用量の約１００分の１～約１０００分の１、又はそれ以下の量で使用される。

【０１２３】

　また、オピオイドアゴニスト（モルヒネ自身など）は、ＦＬＮＡペンタペプチドに結合しない。従って、オピオイドアゴニストでしかない化合物は、本明細書中で考慮に入っていない。

【０１２４】

　ナルトレキソン（ＮＴＸ）も、対照阻害剤として使用できる。ＮＬＸではなくＮＴＸを用いて得られる平均阻害値は、絶対値で、ＮＬＸで得られる値よりも１～２％低い傾向にある。つまり、例えば、ある具体的なＮＬＸ濃度での平均阻害値が４０％の場合、ＮＴＸで得られる値は約３８又は３９％になると予想することができる。目論んでいる化合物についての結合阻害値は、予想されるＮＬＸ／ＮＴＸ値の差を考慮に入れて測定される。

【０１２５】

　上記のアンタゴニスト化合物のほとんどは、キラルであるか又はキラルとなり得るもので、それぞれに互いの鏡像異性体が存在し得る。沈痛効力が強い方の鏡像異性体よりも沈痛活性が弱い方の鏡像異性体化合物を、本方法に使用することが、本発明では好適である。

【０１２６】

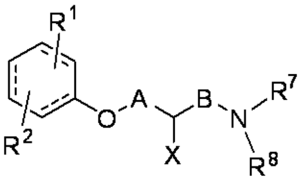
　有用なオピオイド化合物の別の関連クラスはベンゾモルファンであり、このクラスには、ペンタゾシン、フェナゾシン、デゾシン、及びシクラゾシンが含まれる。これらの化合物は、オピオイド受容体の部分アゴニストであり、上記の表に記載される化合物ほどは好ましくない。

【０１２７】

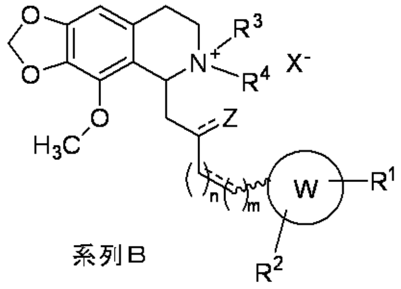
　更に、４種の模範構造を有する化合物は、配列番号１のペンタペプチドによく結合することがわかっている。これらの化合物を、本明細書中、系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、系列Ｃ－２、系列Ｄ、及び系列Ｅと称する。化合物Ａ、化合物Ｂ、化合物Ｃ、及び系列Ｄによるτリン酸化の阻害を、本明細書中例示するが、そのような阻害は、これらの構造系列を代表するものである。系列Ｅの化合物は、系列Ｃ－１及びＣ－２の化合物と重複し、従って、それらも本発明に含まれる。各系列の化合物の一般構造を、以下に示し、続いてより具体的に説明する。

【０１２８】

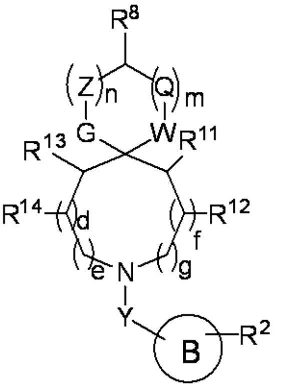
【化５】



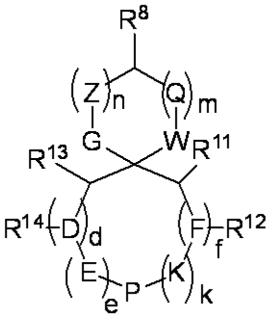
系列Ａ



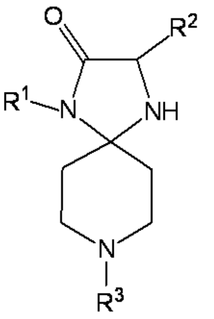
系列Ｂ



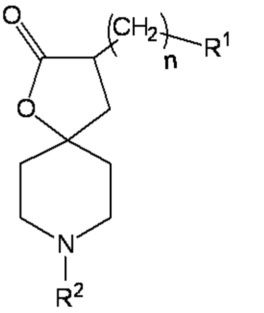
系列Ｃ－１



系列Ｃ－２



系列Ｄ



系列Ｅ

【０１２９】

上記式のそれぞれの化合物の薬学的に許容可能な塩も、考慮に入っている。非対称（キラル）炭素を有する化合物、又はそのような化合物の塩は、立体異性体の形で存在し得る、すなわち２種の鏡像異性体が存在する。本発明は、個別の各鏡像異性体及びそれらの混合物の両方に関連する；すなわち、鏡像異性体型（ｄ型及びｌ型、又はＲ型及びＳ型）の両方及びそれらの混合物に関連する。更に、２つ以上のキラル中心が存在する場合、ジアステレオマーと呼ばれる立体異性体が形成され得るが、ジアステレオマーも考慮に入っている。

【０１３０】

以下の定義からわかるとおり、目論んでいる化合物は、１つ又は複数の重水素化炭素を有することができ、その場合重水素は、その通常の化学表記であるＤで指定される。重水素化化合物は、代謝経路及び生合成経路を解明するために生きている生命体での薬物相互作用の機構を研究するのに有用となり得る。重水素化は、目論んでいる化合物のｉｎ ｖｉｖｏでの半減期も延長することができる。なぜなら、炭素重水素（Ｃ－Ｄ）結合は、炭素水素（Ｃ－Ｈ）結合よりも強く、そのため結合切断により大きなエネルギーを投入する必要があるからである。Ｂｌａｋｅ ｅｔ ａｌ．， １９７５ Ｊ． Ｐｈａｒｍ．

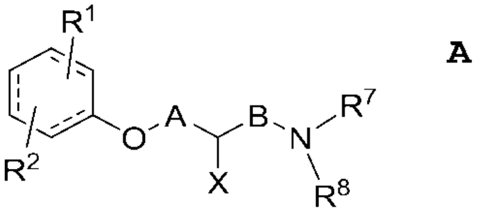
Ｓｃｉ．６４（３）：３６７－３９１；及びＮｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３ Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓｐｏｓ．３１（１２）：１４８１－１４９８、ならびにそのなかの引用文献を参照。目論んでいる重水素化化合物は、周知の反応を用いて調製される。

【０１３１】

より詳細には、系列Ａの化合物は、以下の式Ａの構造に一致する：

【０１３２】

【化６】



【０１３３】

式中

R^1及びR^2は、同じであるか異なっていて、それぞれ独立して、Ｈ、ハロゲン、C_1－C_{12}ヒドロカルビル、C_1－C_6アシル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、CF_3、又はNR^3R^4であり、

【０１３４】

NR^3R^4中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビル、C_1－C_4アシル、C_1－C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^3とR^4は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子（hetero atom）を含有し、追加のヘテロ原子（hetero atom）はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

【０１３５】

Ａ及びＢは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＤＨ、又はCD_2であり（式中、Ｄは重水素であり）；

【０１３６】

Ｘは、ＯＨ又はNR^5R^6であり

【０１３７】

NR^5R^6中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビル、C_1－C_4アシル、C_1－C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり；

【０１３８】

NR^7R^8中、R^7及びR^8は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6アシル、C_1－C_6ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^7とR^8は、示されている窒素と一緒になって環構造Ｗを形成し；

【０１３９】

Ｗは、示されている窒素を含めて５～１４個の原子を、好ましくは上限１２個の原子を環構造中に有する。Ｗは、随意に以下を有することができる：

ａ）１又は２個のさらなるヘテロ原子、さらなるヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、又は硫黄である、及びｂ）１つ又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基、この場合１つ又は複数の置換基は、合計で上限８個まで、好ましくは上限６個まで原子を有し、原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。

【０１４０】

点線（－－－－）は、随意の二重結合を表す。

【０１４１】

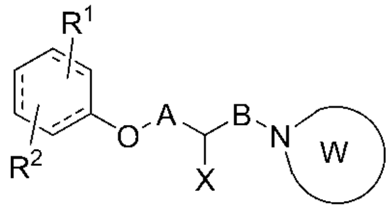
目論んでいる化合物に関して、ＷがＮ－モルホリニル又はジメチル－Ｎ－モルホリニルであり、かつ随意の二重結合が存在しない場合、好ましくは、R^1はメチルではなく、かつR^2はイソプロピルではない。

【０１４２】

式Ａの化合物で好適なものは、以下の式Ｉの化合物である（式中、Ａ、Ｂ、Ｘ、Ｗ、ならびにR^1及びR^2は、上記で定義されるとおりである）。

【０１４３】

【化７】



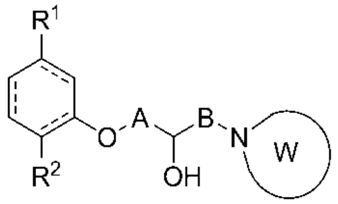
I

【０１４４】

１つの好適な実施形態において、目論んでいる化合物は、式Ｉａの構造に一致する。

【０１４５】

【化８】



Ia

【０１４６】

この場合、R^1及びR^2は、同じであるか異なっていて、それぞれ独立してＨ、又はC_1-C_6ヒドロカルビルであり；Ａ及びＢは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＤＨ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；Ｗは、環構造体で、示されている窒素を含む５～１４個の原子を環構造中に有し、随意に以下を有することができ：ａ）１、２、又は３個のさらなるヘテロ原子、さらなるヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、又は硫黄である、及びｂ）１つ又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基、この場合１つ又は複数の置換基は、合計で上限１４個まで、好ましくは上限１２個まで、より好ましくは上限８個まで原子を有し、原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。点線（－－－－）は、１、２、又は３本の随意の二重結合を表す。好ましくは、ＷがＮ－モルホリニル又はジメチル－Ｎ－モルホリニルであり、かつ随意の二重結合が存在しない場合、R^1はメチルではなく、かつR^2はイソプロピルではない。

【０１４７】

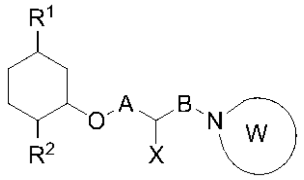
式Ｉ又は式Ｉａいずれかの化合物の実施形態のいくつかが好適に実施される場合、Ｗは更に、１つ又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基を含み、この場合１つ又は複数の置換基は、合計で上限８個まで原子を有し、原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。これらの原子に結合した水素原子は数えない。

【０１４８】

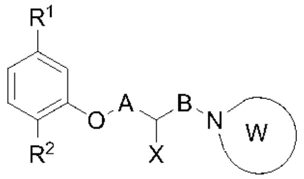
１つの好適な実施形態において、式Ｉ及び式Ｉａの化合物は、式ＩＩの構造を有するが、一方別の好適な実施形態では、式Ｉ及び式Ｉａの化合物は、式ＩＩＩの構造を有する。

【０１４９】

【化９】

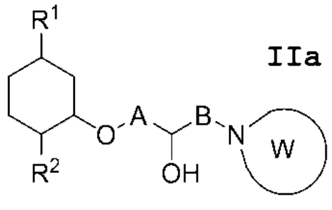


II

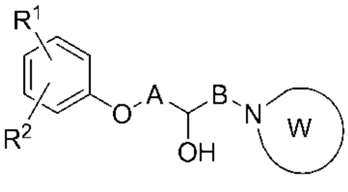


III

【０１５０】
式ＩＩ及び式ＩＩＩの化合物両方において、Ａ、Ｂ、Ｗ、及びＸは、上記の式Ｉ及び式Ｉａの化合物について先に定義したとおりである。式ＩＩの化合物の場合、R^1及びR^2は、式Ｉａの化合物についてR^1及びR^2が定義されるとおりに定義されるが、式ＩＩＩの化合物の場合、R^1及びR^2は、式Ｉの化合物についてR^1及びR^2が定義されるとおりに定義される。
【０１５１】
より好ましくは、式ＩＩの化合物のR^1基及びR^2基は、３～５個の炭素原子を有する。式ＩＩＩの化合物のうちいくつかについては、R^1はＨであり、R^2はハロゲン、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6アシル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、又はNR^3R^4であり、一方他のものについては、２つのＲ基両方ともＨではなくて、上記で定義されるとおりに選択される。
【０１５２】
式ＩＩ又は式ＩＩＩいずれかである化合物において、Ｗは、１又は２個のさらなるヘテロ原子を随意に有することができ、さらなるヘテロ原子はそれぞれ独立して酸素、窒素、又は硫黄であり、より好ましくは、そのようなヘテロ原子を少なくとも１個、常に有する。Ｗが更に、１個又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基を含むことも好適であり、この場合１つ又は複数の置換基は、合計で上限８個まで原子を有し、原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択され、これらの原子に結合した水素原子は数えない。
【０１５３】
式ＩＩ及び式ＩＩＩの化合物で特に好適なものは、式ＩＩａ及び式ＩＩＩａの構造を有し、式中その他の基Ａ、Ｂ、Ｗ、R^1及びR^2は、上記で定義されるとおりである。
【０１５４】
【化１０】



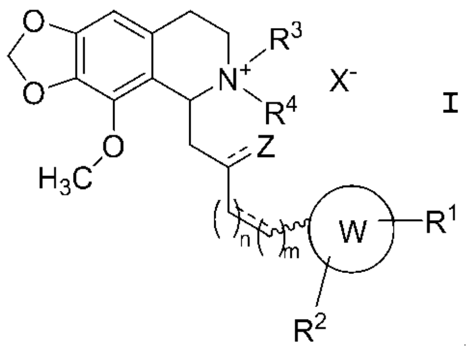
IIa



IIIa

【０１５５】
系列Ｂの化合物は、概して以下の式Ｉに一致する：
【０１５６】

【化１１】



Ｉ

【０１５７】

式中

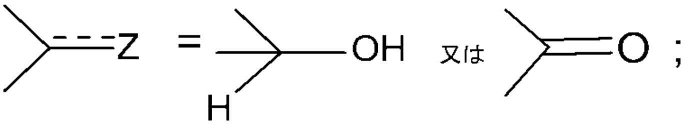
ｎ＝０又は１であり；

ｍ＝０又は１であり；

ｍ＋ｎ＝０、１、又は２であり；

【０１５８】

【化１２】



【０１５９】

Ｗは、芳香環であり、環中に０、１、又は２個のヘテロ原子を有し、ヘテロ原子は、その環において、窒素、酸素、又は硫黄、あるいはそれらの混合物が可能であり；

【０１６０】

R^1は、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、シアノ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、トリフルオロメチル、及びヒドロキシルからなる群より選択され；

【０１６１】

R^2は、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、及びハロゲンからなる群より選択され；

【０１６２】

R^3は、存在しないか、又はC_1－C_6ヒドロカルビルであり；

【０１６３】

R^4は、C_1－C_6ヒドロカルビルであり；

【０１６４】

X^-＝アニオンであるか、又はR^3が存在しない場合は存在せず；

【０１６５】

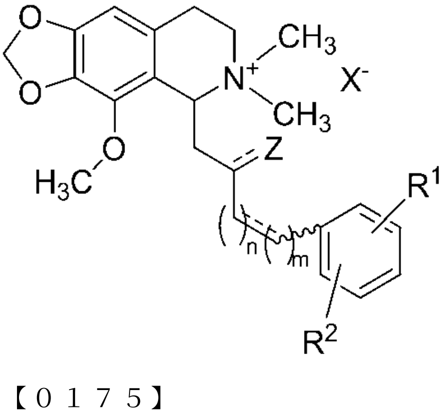
点線は、示されている炭素原子間の随意の二重結合を示し；かつ

【０１６６】

波線は、随意の二重結合が存在する場合に、示されているフェニル置換基がＺ配置にあることもＥ配置にあることも可能であることを示す。

【０１６７】

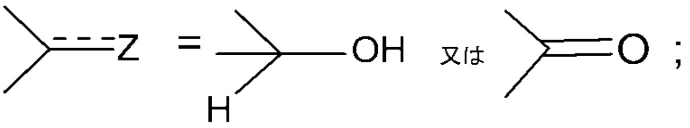
アニオンの例としては、一価でも多価でも可能である。目論んでいるアニオンは、薬学的に許容可能なものであり、リン酸イオン、リン酸水素イオン、リン酸二水素イオン、硫酸イオン、重硫酸イオン、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオン、酢酸イオン、ギ酸イオン、ベンゼンンスルホン酸イオン、メタンスルホン酸イオン、トルエンスルホン酸イオンなどが挙げられ、周知である。これら、及び他のアニオンは、Ｂｅｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，　１９７７　Ｊ．　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ．　６８（１）：１－１９に記載されている。

【０１６８】
ｍ＋ｎ＝１又は２であり、かつ随意の二重結合は存在せず、むしろ飽和の単結合であることが好ましい。
【０１６９】
好適に実施される場合、Ｗは六員環であるが、しかし五員環も考慮に入っている。すなわち、目論んでいる芳香環は、０、１、又は２個のヘテロ原子を有することができ、ヘテロ原子は、窒素、酸素、又は硫黄、あるいはそれらの混合物であって、そのような芳香環として、フェニル、ピリジル、フラニル、イミダジル、オキサゾリルなどが挙げられる。いくつかの好適な実施形態において、Ｗは環窒素原子を含まない（０個有する）。他の実施形態において、好適な化合物は、環ヘテロ原子を含まず、環炭素原子のみを有するＷ基を有する。
【０１７０】
Ｗは、好ましくは、１個又は複数の環原子に結合した１つ又は複数の置換基（$Ｒ^1$及び$Ｒ^2$）を有し、この場合１つ又は複数の置換基は、合計で上限１２個まで原子を有し、原子は、炭素、窒素、酸素、及び硫黄、ならびにそれらの混合物から成る群より選択され、ただし水素原子は数えない。環Ｗにあって好適な置換基は、Ｗ環に結合した酸素原子を有する。そのような化合物は、好ましくは、$Ｃ_1$－$Ｃ_6$ヒドロカルビルオキシ基（メトキシ基など）である。
【０１７１】
Ｚ含有基は、ケト基が可能であるが、還元されてヒドロキシル基になることも可能である。どちらの基も好適である。
【０１７２】
いくつかの実施形態において、$Ｒ^3$及び$Ｒ^4$の両方が、$Ｃ_1$－$Ｃ_6$ヒドロカルビル基であり、その両方がメチルである。他の実施形態において、一方はエチル基であり、他方はメチルであるか、存在しない。$Ｒ^3$が存在しない場合、系列Ｂの化合物は、第三級アミンである。
【０１７３】
１つの好適な実施形態において、式Ｉの系列Ｂの化合物は、式ＩＩの構造を有する：
【０１７４】
【化１３】


II

【０１７５】
式中
ｎ＝０又は１であり；
ｍ＝０又は１であり；
ｍ＋ｎ＝０、１、又は２であり；
【０１７６】

【化１４】



【０１７７】

Ｘ$^{-}$＝アニオンであり；

【０１７８】

Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、シアノ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、トリフルオロメチル、及びヒドロキシルからなる群より選択され；

【０１７９】

Ｒ^{2}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、及びハロゲンからなる群より選択され；

【０１８０】

点線は、示されている炭素原子間の随意の二重結合を示し；かつ

【０１８１】

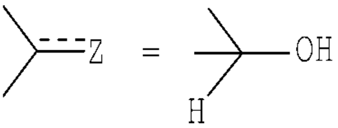
波線は、随意の二重結合が存在する場合に、示されているフェニル置換基がＺ配置にあることもＥ配置にあることも可能であることを示す。

【０１８２】

いくつかの好適な実施形態において、Ｒ^{2}＝Ｈである。いくつかのそのような実施形態において、Ｒ^{1}は、示されているフェニル環に結合した酸素原子を含み、その酸素は好ましくはＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ヒドロカルビルオキシ基の一部である。多くの化合物について、以下のとおりであることが好ましい：

【０１８３】

【化１５】

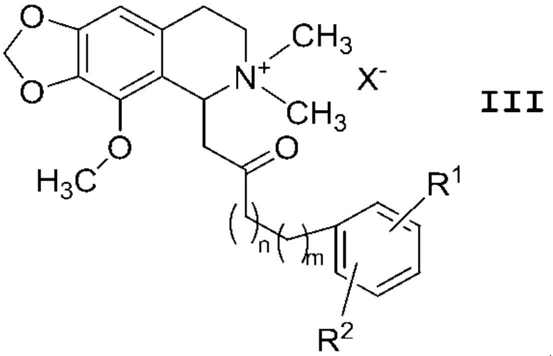


【０１８４】

更に別の好適な実施形態において、目論んでいる系列Ｂの化合物は、以下の式ＩＩＩに一致する構造を有する：

【０１８５】

【化１６】



III

【０１８６】

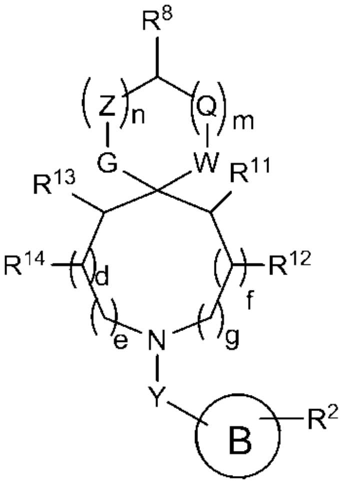
式中、

ｎ＝０又は１であり；

ｍ＝０又は１であり；

ｍ＋ｎ＝０、１、又は２であり；

【０１８７】
X^-＝アニオンであり；
【０１８８】
R^1は、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、ハロゲン、シアノ、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、トリフルオロメチル、及びヒドロキシルからなる群より選択され；かつ
【０１８９】
R^2は、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシヒドロカルボキシレン、及びハロゲンからなる群より選択される。
【０１９０】
他の系列Ｂの化合物の実施形態についてそうであったとおり、R^2は、場合によりＨであり、R^1及びR^2の一方又は両方は、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ基（メトキシなど）である。式Ｉ、式ＩＩ、及び式ＩＩＩ、ならびに本明細書中開示される残りの系列Ｂの式全ての化合物の薬学的に許容可能な塩も考慮に入っている。
【０１９１】
系列Ｃ－１の化合物は、概して、以下の式Ａに一致する。
【０１９２】
【化１７】



A

【０１９３】
式系列Ｃ－１式Ａ中、Ｇ及びＷは、NR^{20}、NR^7、CH_2、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、式中、R^7は、Ｈ、C_1-C_{12}ヒドロカルビル、又はC_1-C_{12}ヒドロカルボイル（アシル）であり、かつR^{20}は、本明細書中以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－R^1基であり、Ｇ及びＷは、好ましくはNR^{20}及びNR^7である。１つの好適な実施形態において、Ｇ及びＷの１つだけがNR^7であり、かつＧ及びＷの１つは、NR^7又はNR^{20}でなければばならない；
【０１９４】
Ｘ及びＹは、同じであるか異なっていて、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2（式中、Ｄは重水素であり）、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり；
【０１９５】
Ｑは、CHR^9又はＣ（Ｏ）であり；Ｚは、CHR^{10}又はＣ（Ｏ）であり；
【０１９６】
ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれ、０又は１いずれかであり、かつ合計（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）＝２である。いくつかの実施形態において、ｄが０の場合、ｅは０であり、及びｆが０の場合、ｇは０である。他の実施形態において、ｆが０の場合、ｄは０であり、又はｇが０の場合、ｅは０である。
【０１９７】

ｍ、ｎ、及びｐは、それぞれ、０又は１であり、かつ全ての実施形態において、ｍ＋ｎ＋ｐの合計は、２又は３である。m及びｎは、それぞれ、好ましくは１であり、かつｐは、ｍ＋ｎ＋ｐの合計が好ましくは２であるように、好ましくは０である。

【０１９８】

環Ａ及び環Ｂは、同じであるか異なっていて、芳香環系又はヘテロ芳香環系である。基R^1及び基R^2は、同じであるか異なっていて、それぞれが、水素であることも可能であるし、水素以外の上限３個までの置換基を表すことも可能であり（すなわち、R^{1a}、R^{1b}、及びR^{1c}、ならびにR^{2a}、R^{2b}、及びR^{2c}）、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよい。これら６つの基R^{1a-c}及びR^{2a-c}は、それぞれ個別に、Ｈ、C_1－C_6ヒドロカルビル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、C_1－C_7ヒドロカルボイル（アシル）、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル（－CF_3）置換、もしくはハロゲン置換のC_1－C_7ヒドロカルボイル、C_1－C_6ヒドロカルビルスルホニル、C_1－C_6ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、C_1－C_7ヒドロカルビルカルボキシラート［Ｃ（Ｏ）Ｏ－C_1－C_7ヒドロカルビル］、カルボキサミド［Ｃ（Ｏ）NR^3R^4］もしくはスルホンアミド［$S(O)_2NR^3R^4$］（式中、アミド窒素は、いずれの基に含まれていても式NR^3R^4を有し、式中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビルであるか、又はR^3とR^4は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、

【０１９９】

ＭＡｒ（既に記載したとおり、式中、Ｍは、－CH_2－、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは単環のアリール基である）、及びNR^5R^6（式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、かつＨ、C_1－C_4ヒドロカルビル、C_1－C_4アシル、C_1－C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）からなる群より選択され；

【０２００】

R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであるか、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1－C_8ヒドロカルビル基であって、このC_1－C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；

【０２０１】

R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、あるいはR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、本明細書中（このサブ段落において）記述されるとおりＨ及びＤである。

【０２０２】

上記の好適な実施形態においてはまた、Ｘ及びＹが両方ともSO_2であり、ＷがＯであり、かつｐがゼロの場合、R^1及びR^2が両方ともメトキシであることはない。

【０２０３】

別の好適な実施形態において、

ｉ）Ｇ及びＷのうち１つだけがNR^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ及びＷのうち１つは必ずNR^{20}であり、

ｉｉｉ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ（ｂ）Ｇ及びＷのうち１つが、対応するＺ又はＱに結合したNR^{20}であり、そのＺ又はＱがＣ（Ｏ）である場合、Ｇ及びＷの他方はNR^7（式中、R^7はＨ又は脂肪族C_1ヒドロカルビル（すなわち、メチル）である）以外であり；及び

ｉｖ）Ｘ及びＹが両方ともSO_2であり、ＷがＯであり、ＱがCH_2であり、ｐが０であ

り、かつｄ及びｆが両方とも１である場合、R^1及びR^2は、（ａ）両方ともＨ、メトキシ、又はC_1-C_3－ヒドロカルビルである、（ｂ）Ｈ、ハロゲン、及びC_1-C_3－ヒドロカルビルである、（ｃ）Ｈ及びC_1-C_3－ヒドロカルビルである、（ｄ）ハロゲン及びC_1-C_3－ヒドロカルビルである、及び（ｅ）Ｈ及びハロゲンである、のどれでもない。

【０２０４】

上記の好適な実施形態において、Ｘ及びＹが両方ともSO_2であり、ＷがＯであり、かつｐが０の場合、R^1及びR^2はまた、好ましくは、両方ともがメトキシであることはない。

【０２０５】

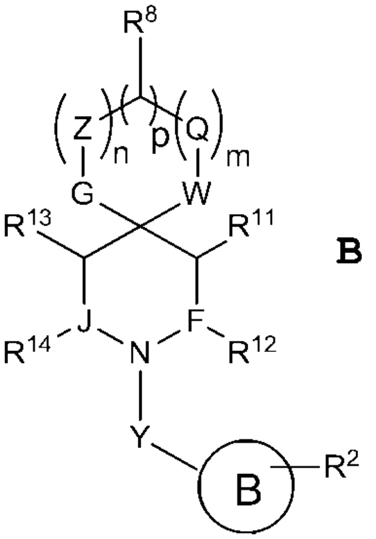
系列Ｃ－１の式Ａ及び本明細書中開示される残りの系列Ｃ－１の式全ての化合物の薬学的に許容可能な塩も考慮に入っている。

【０２０６】

１つの好適な系列Ｃ－１の実施形態において、ｅ及びｇは両方とも０であり、そうすると系列Ｃ－１の式Ａの化合物は、以下の系列Ｃ－１の式Ｂの化合物になる。

【０２０７】

【化１８】



B

【０２０８】

式Ｂ中、式に使用される文字Ｇ、Ｊ、Ｅ、Ｆ、Ｋ、Ｗ、Ｑ、Ｚ、ｄ、ｅ、ｆ、ｋ、ｎ、ｍ、ｐ、Ｘ、Ｙ、環Ａ及び環Ｂ、ならびに全てのＲ基は、系列Ｃ－１の式Ａの化合物について既に定義したとおりである。好ましくは、Ｘ及びＹが両方ともSO_2であり、ＷがＯであり、かつｐが０の場合、R^1及びR^2は、両方ともがメトキシであることはない。

【０２０９】

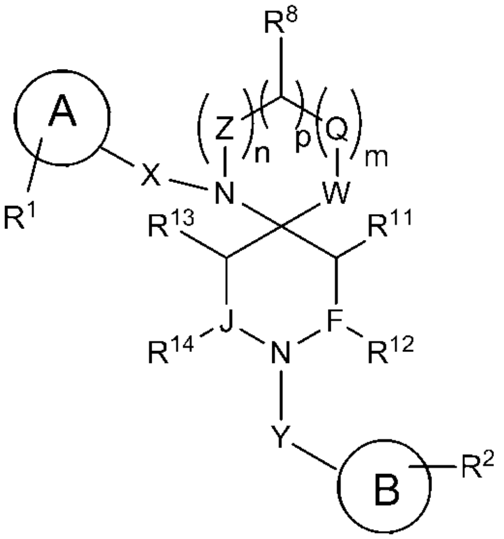
系列Ｃ－１の化合物の以下のサブ一般式全てにおいて、式に使用される文字Ｇ、Ｊ、Ｅ、Ｆ、Ｋ、Ｗ、Ｑ、Ｚ、ｄ、ｅ、ｆ、ｋ、ｎ、ｍ、ｐ、Ｘ、Ｙ、環Ａ及び環Ｂ、ならびに全てのＲ基は、特に他の定義がないかぎり、系列Ｃ－１の式Ａの化合物について既に定義したとおりである。更に、既に記述した内容は、示されている構造式がそのような内容を不可能にするものでないかぎり、同様に当てはまる。

【０２１０】

より好ましくは、系列Ｃ－１の式Ｂの化合物は、以下の系列Ｃ－１の式Ｉの構造に一致する。

【０２１１】

【化１９】



Ｉ

【０２１２】
系列Ｃ－１の式Ｉ中、Ｘ及びＹは、同じであるか異なっていて、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり；
【０２１３】
Ｗは、NR^7、CH_2、Ｓ、又はＯ（式中、R^7は、Ｈ、C_1-C_{12}ヒドロカルビル、又はC_1-C_{12}ヒドロカルボイル（アシル）である）であり、好ましくはNR^7であり；
【０２１４】
Ｑは、CHR^9又はＣ（Ｏ）であり；
【０２１５】
Ｚは、CHR^{10}又はＣ（Ｏ）であり；
【０２１６】
Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、ＣＨ又はＣＤ（式中、Ｄは重水素である）であり；
【０２１７】
ｍ、ｎ、及びｐはそれぞれ、０又は１であり、かつｍ＋ｎ＋ｐの合計は、２又は３、このましくは２であり；かつ
【０２１８】
環Ａ及び環Ｂは、同じであるか異なっていて、１つの環又は縮合した２つの環を含む芳香環系又はヘテロ芳香環系である。基R^1及び基R^2は、同じであるか異なっていて、それぞれが、水素であることも可能であるし、水素以外の上限３個までの置換基を表すことも可能であり（すなわち、R^{1a}、R^{1b}、及びR^{1c}、ならびにR^{2a}、R^{2b}、及びR^{2c}）、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよい。これら６つの基R^{1a-c}及びR^{2a-c}は、それぞれ個別に、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、C_1-C_7ヒドロカルボイル（アシル）、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル－（$-CF_3$）置換、もしくはハロゲン置換のC_1-C_7ヒドロカルボイル、C_1-C_6ヒドロカルビルスルホニル、ハロゲン（Ｆ、Ｃｌ、又はＢｒ、好ましくはＣｌ）、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、C_1-C_7ヒドロカルビルカルボキシラート［Ｃ（Ｏ）$O-C_1-C_7$ヒドロカルビル］、カルボキサミド［Ｃ（Ｏ）NR^3R^4］もしくはスルホンアミド［$SO_2NR^3R^4$］（式中、アミド窒素は、いずれの基（カルボキサミド又はスルホンアミド）に含まれていても式NR^3R^4を有し、式中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビルであるか、又はR^3とR^4は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、ＭＡｒ（式中、Ｍは、$-CH_2-$、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは単環のアリール基である）、及びNR^5R^6（式中、R^5

及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1－C_4ヒドロカルビル、C_1－C_4アシル、C_1－C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）からなる群より選択され；

【０２１９】

R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであるか、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1－C_8ヒドロカルビル基であって、このC_1－C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子であり；かつ

【０２２０】

R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、又はR^{11}及びR^{13}はＨでありかつR^{12}及びR^{14}はＨ又はＤであるか、又はR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が、示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、本明細書中（このサブ段落において）記述されるとおりＨ及びＤである。

【０２２１】

Ｘ及びＹが両方ともSO_2であり、ＷがＯであり、かつｐが０の場合、R^1及びR^2は、好ましくは、両方ともがメトキシであることはない。

【０２２２】

他の好適な実施形態において、ＸとＹは同じものである。Ｘ及びＹは、好ましくは、両方ともＣ（Ｏ）又は両方ともSO_2であり、より好ましくは両方ともSO_2である。これら及び他の実施形態において、Ｗは、好ましくはＯである。ｐが０であることも好ましい。

【０２２３】

環Ａ又は環Ｂの芳香環系又はヘテロ芳香環系として目論んでいる環系は、１つの環又は縮合した２つの環を含むことが可能であり、好ましくは単独の芳香環を含む。芳香環系又はヘテロ芳香環系の例は、フェニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル（１，３，５－トリアジニル、１，２，４－トリアジニル、及び１，２，３－トリアジニル）、フラニル、チエニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ナフチル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、イソベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンズイソキサゾール、キノリル、イソキノリル、キナゾリル、シンノリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、ベンゾピリミジニル、及びそれらの混合物からなる群より選択される。環Ａの芳香環系又はヘテロ芳香環系と環Ｂの芳香環系又はヘテロ芳香環系が異なる場合、上記文の混合物が生じる。

【０２２４】

置換基ＭＡｒの単環のアリール基の例は、フェニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル（１，３，５－トリアジニル、１，２，４－トリアジニル、及び１，２，３－トリアジニル）、フラニル、チエニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、及びイソチアゾリルからなる群より選択される。

【０２２５】

フェニルは、環Ａ及び環Ｂの芳香環系又はヘテロ芳香環系に好適である。フェニル、ピリジニル、及びフラニルは、ＭＡｒ置換基の単環のアリール基、Ａｒに好適であり、フェニルが特に好適である。

【０２２６】

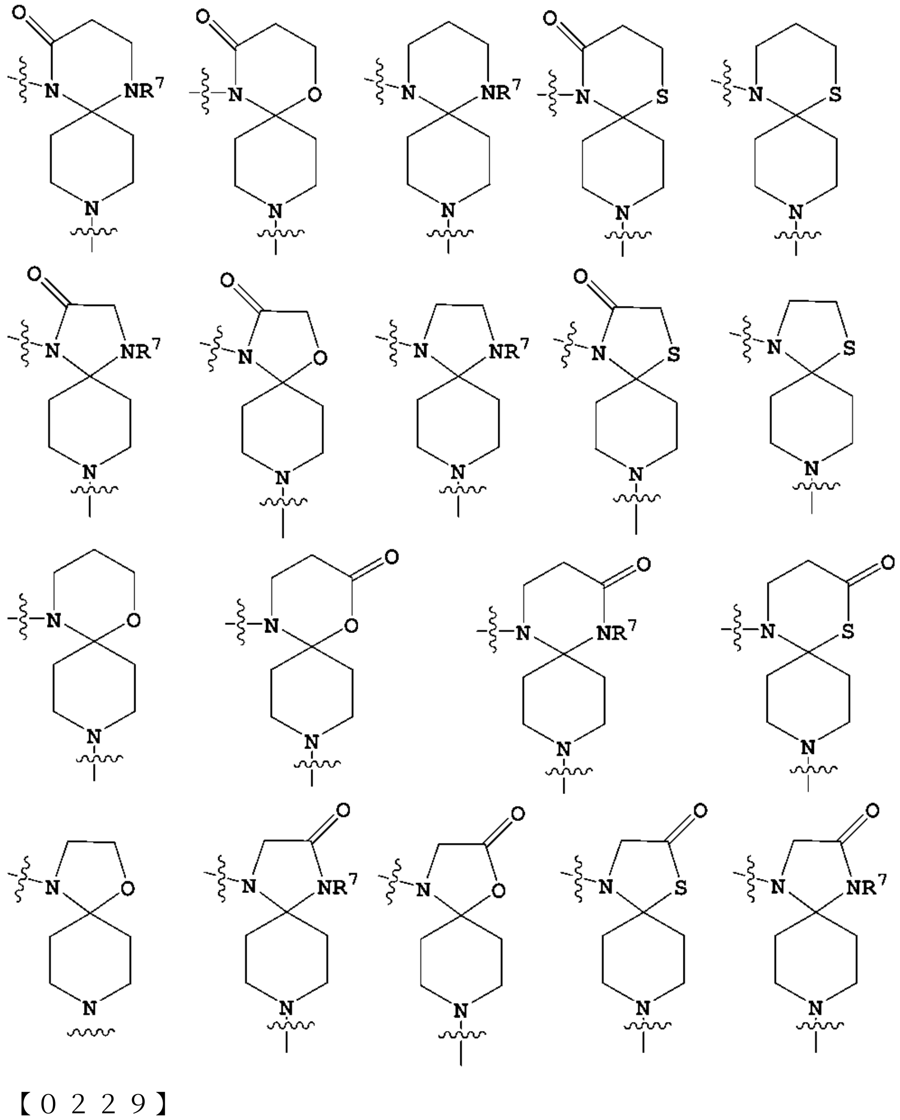
置換基Ｒ基に関していくつかのそれぞれ独立した別々な優先性が存在する。すなわち、環Ａ及び環Ｂが両方とも水素以外の単独置換基を有するためには、R^1及びR^2は、好ましくは水素以外の同じ単独置換基である。単独置換基であるR^1及びR^2は、好ましくはそれぞれの含まれる環系において同じ相対位置に配置される。

【０２２７】

こうして、Ｘ及びＹは、環Ａ又は環Ｂの環系から中心スピロ環の示されている窒素原子への、スルホンアミド連結部、カルボキサミド連結部、尿素連結部、チオ尿素連結部、グアニジノ連結部、又はメチレン連結部を形成することができる。スピロ６，６－環系又はスピロ５，６－環系である中心環を、１つの窒素及び１つの酸素と、又は２つの窒素原子と合わせて有する化合物を目論んでいる。中心スピロ環の例を以下に示すが、式中、波線は、他の実体との共有結合が存在することを示すために用いられており、かつR^7は上記で定義され、R^8はＨである。

【０２２８】

【化２０】

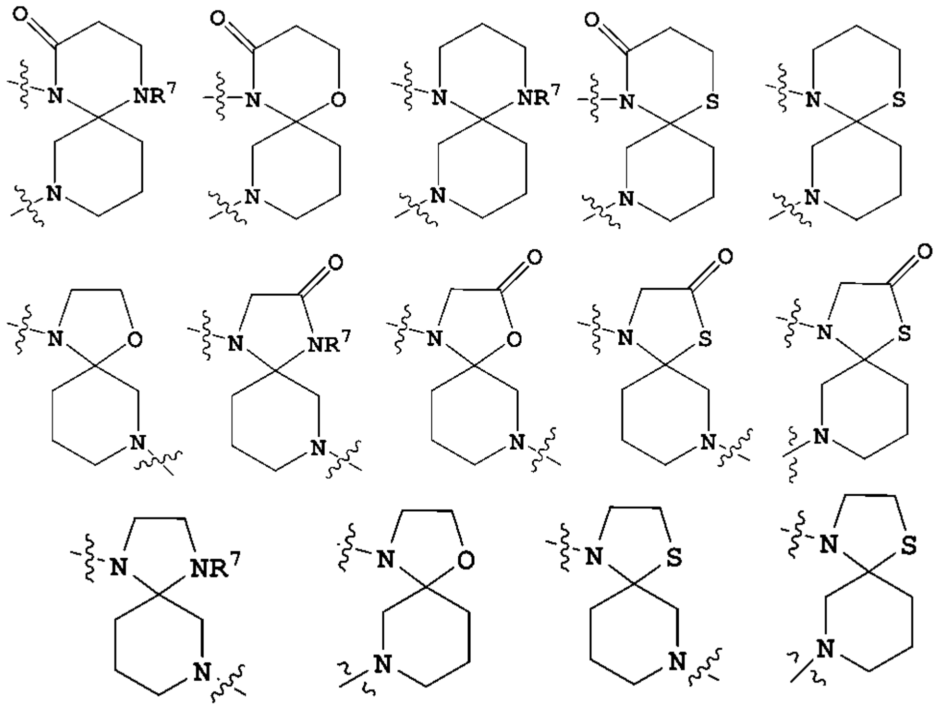


【０２２９】

式Ａの例示化合物のうち、式中、ｄ及びｅがそれぞれ０であり、かつR^{11}、R^{12}、及びR^{13}がそれぞれＨであるものは、非対称スピロ環構造を有し、そのうちのいくつかを以下に示す。式中、波線は、他の実体との共有結合が存在することを示し、かつR^7は上記で定義され、R^8はＨである。

【０２３０】

【化２１】



【０２３１】

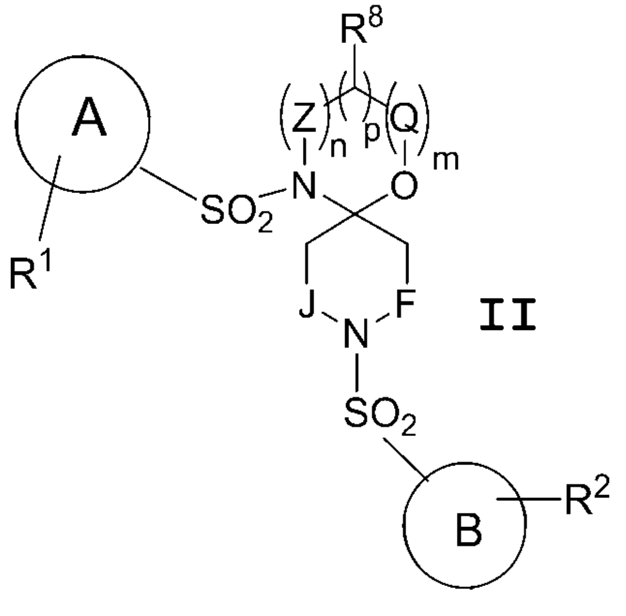
好適に実施される場合、中心環がスピロ５，６－環系であり、その環系の六員環が無置換かつスピロ結合が六員環の窒素に対して４位にあるようにするためには、ｐは０であり、ｅ及びｇは両方とも０であり、かつR^{11}、R^{12}、及びR^{13}は全てＨである。これとは別に、ＷがＯであることが好ましい。式中、ＸとＹが同じである化合物が好ましい。これとは別に、Ｘ及びＹが両方ともSO_2（スルホニル）であることも好ましい。

【０２３２】

系列Ｃ－１式Ａの化合物で上記のそれぞれ別個の優先性を具体化した特に好適なものは、系列Ｃ－１式ＩＩの化合物である：

【０２３３】

【化２２】



【０２３４】

式中

環Ａ及び環Ｂ、Ｚ、Ｑ、ｍ、ｎ、ｐ、$Ｒ^1$、$Ｒ^2$、及び$Ｒ^8$は、示されるとおりの式において、式Ａの化合物に対してなされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－１の化合物について上記で記載されるとおりであり；かつＪ及びＦは、同じであるか異なっていて、$ＣＨ_2$、ＣＨＤ、又は$ＣＤ_2$（式中、Ｄは重水素である）である。

【０２３５】

環Ａ及び環Ｂは、それぞれ、フェニル、フラニル、又はピリジルであり、かつ$Ｒ^1$及び$Ｒ^2$は、それぞれ、単独の置換基であることがより好ましい。置換基Ｒ基に関していくつかの独立した別個の優先性が存在する。すなわち、$Ｒ^1$及び$Ｒ^2$は、好ましくは同じである。$Ｒ^1$及び$Ｒ^2$はまた好ましくは、それぞれの含まれる環において同じ相対位置に配置される。つまり、$Ｒ^1$が４－シアノならば、$Ｒ^2$も４－シアノである。スピロで示される上の環が環原子を５個有するように、ｍ＋ｎ＋ｐの合計＝２であることも好ましい。

【０２３６】

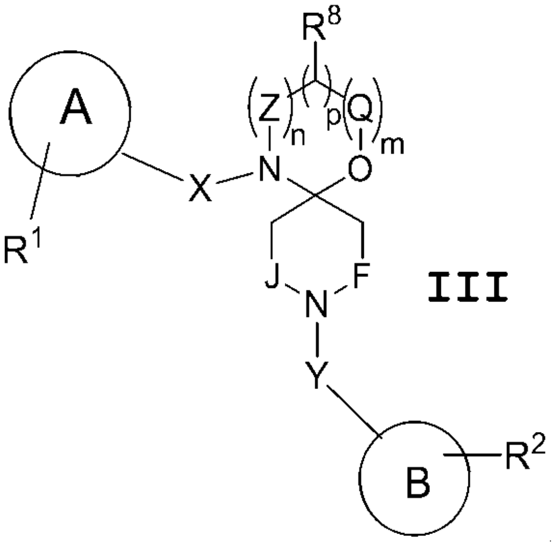
好適な$Ｒ^1$置換基及び$Ｒ^2$置換基は、約７．２～７．４のｐＨ値において、それら自身は化合物に正電荷も負電荷も与えない。

【０２３７】

他の実施形態において、系列Ｃ－１式Ａの化合物で特に好適なものは、系列Ｃ－１式ＩＩＩの化合物である：

【０２３８】

【化２３】



III

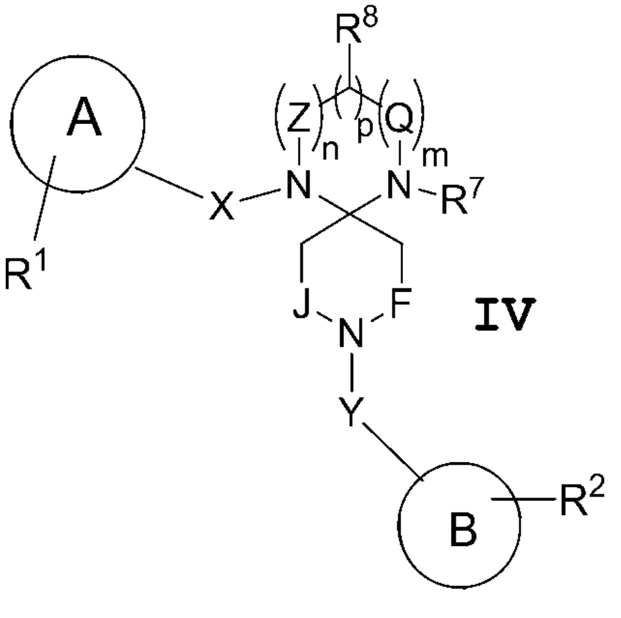
【０２３９】

式中

環Ａ及び環Ｂ、Ｚ、Ｑ、ｍ、ｎ、ｐ、$Ｒ^1$、$Ｒ^2$、及び$Ｒ^8$は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－１の化合物について既に記載されたとおりであり；Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、$ＣＨ_2$、ＣＨＤ、又は$ＣＤ_2$（式中、Ｄは重水素である）であり；かつＸ及びＹは、両方ともＣＯであるか、又はＸとＹは異なっていて、$ＳＯ_2$、Ｃ（Ｏ）、$ＣＨ_2$、$ＣＤ_2$（式中、Ｄは重水素である）、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）である。既出の優先性は、上記の構造式で不可能でないかぎり、同じく当てはまる。

【０２４０】

より好ましくは、環Ａ及び環Ｂは、それぞれ、フェニル、フラニル、又はピリジルである。$Ｒ^1$及び$Ｒ^2$は、同じであって、トリフルオロメチル、$Ｃ_1－Ｃ_6$アシル、$Ｃ_1－Ｃ_4$アルキルスルホニル、ハロゲン、ニトロ、シアノ、カルボキシル、$Ｃ_1－Ｃ_4$アルキルカルボキシラート、カルボキサミドからなる群より選択され、この群において、アミド窒素は式$ＮＲ^3Ｒ^4$を有し、式中、$Ｒ^3$及び$Ｒ^4$は、同じであるか異なっていて、Ｈ、$Ｃ_1－Ｃ_4$アルキル、又は$ＮＲ^5Ｒ^6$であり、式中、$Ｒ^5$及び$Ｒ^6$は、同じであるか異なっていて、Ｈ、$Ｃ_1－Ｃ_4$アルキル、$Ｃ_1－Ｃ_4$アシル、$Ｃ_1－Ｃ_4$アルキルスルホニルである。

【０２４１】
　R^1及びR^2は、それぞれ、単独の置換基であることが、更により好ましい。置換基Ｒ基に関していくつかの独立した別個の優先性が存在する。R^1及びR^2は、好ましくは同じである。R^1及びR^2はまた好ましくは、それぞれの含まれる環において同じ相対位置に配置される。すなわち、R^1が４－シアノならば、R^2も４－シアノである。スピロで示される上の環が環原子を５個有するように、ｐ＝０かつｍ＋ｎ＋ｐの合計＝２であることも好ましい。
【０２４２】
　更に他の実施形態において、系列Ｃ－１式Ａの化合物で特に好適なものは、系列Ｃ－１式ＩＶの化合物である：
【０２４３】
【化２４】


【０２４４】
　式中
　環Ａ及び環Ｂ、Ｚ、Ｑ、ｍ、ｎ、ｐ、R^1、R^2、R^7、及びR^8は、示されるとおりの式において、系列Ｃ－１の化合物について先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－１の化合物について既に記載されたとおりであり；Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつＸ及びＹは、同じであるか異なっていて、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2（式中、Ｄは重水素である）、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）である。既出の優先性は、上記の構造式で不可能でないかぎり、同じく当てはまる。
【０２４５】
　より好ましくは、環Ａ及び環Ｂは、それぞれ、フェニル、フラニル、又はピリジルである。R^1及びR^2は、同じであって、トリフルオロメチル、C_1-C_6アシル、C_1-C_4アルキルスルホニル、ハロゲン、ニトロ、シアノ、カルボキシル、C_1-C_4アルキルカルボキシラート、カルボキサミドからなる群より選択され、この群において、アミド窒素は式NR^3R^4を有し、式中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4アルキル、又はNR^5R^6であり、式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4アルキル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4アルキルスルホニルである。
【０２４６】
　R^1及びR^2は、それぞれ、単独の置換基であることが更により好ましい。置換基Ｒ基に関していくつかの独立した別個の優先性が存在する。R^1及びR^2は、好ましくは同じである。R^1及びR^2はまた好ましくは、それぞれの含まれる環において同じ相対位置に配置される。すなわち、R^1が４－シアノならば、R^2も４－シアノである。スピロで示される上

の環が環原子を５個有するように、ｍ＋ｎの合計＝１であることも好ましい。

【０２４７】

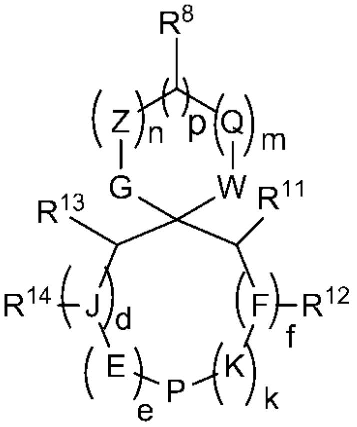
なお、Ｅ、Ｊ、Ｆ、Ｇ、Ｋ、Ｑ、Ｗ、Ｘ、Ｙ、Ｚ、ｄ、ｅ、ｆ、ｋ、ｎ、ｍ、ｐ、環Ａ、及び環Ｂ、ならびにＲ基の全てに関して既に述べられた優先性は、特定の式に対して適切であるとおりに、系列Ｃ－１式Ａ、Ｂ、及びＩ～ＩＶの化合物に当てはまる。

【０２４８】

系列Ｃ－２の化合物は、概して、以下の式Ａに一致する。

【０２４９】

【化２５】



A

【０２５０】

系列Ｃ－２式Ａ中、

Ｑは、ＣＨＲ^{9}又はＣ（Ｏ）であり、Ｚは、ＣＨＲ^{10}又はＣ（Ｏ）であり、かつＱ及びＺのうち１つだけがＣ（Ｏ）であり；

【０２５１】

ｍ及びｎ及びｐは、それぞれが０また１であり、かつｍ＋ｎ＋ｐの合計は、２又は３、好ましくは２であり；

【０２５２】

Ｇ、Ｐ、及びＷは、それぞれが、ＮＲ^{20}、ＮＲ^{2}、ＮＲ^{7}、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、式中、Ｒ^{7}及びＲ^{2}は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ（Ｈ）$_{v}$（Ｄ）$_{h}$（式中、ｖ及びｈは、それぞれが、０、１、２、又は３であり、かつｖ＋ｈ＝３）、Ｃ（Ｈ）$_{q}$（Ｄ）$_{r}$－脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{11}$ヒドロカルビル（式中、ｑ及びｒは、それぞれが、０、１、又は２であり、かつｑ＋ｒ＝０、１又は２であり、ｑ＋ｒ＝０の場合の脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビルを含む）、脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビルスルホニル、又は脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルボイル（アシル）であり、かつＲ^{20}は、本明細書中以下で定義されるとおりのＸ－環Ａ－Ｒ^{1}である。

【０２５３】

好ましくは、１つの実施形態において、

ｉ）Ｇ、Ｐ、及びＷのうち１つだけがＮＲ^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ、Ｐ、及びＷのうち１つは必ずＮＲ^{20}であり、

ｉｉｉ）Ｐは、ＮＲ^{20}でなければＮＲ^{2}であり、

ｉｖ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ（ｂ）Ｇ及びＷのうち１つが、対応するＺ又はＱに結合したＮＲ^{20}、ＮＲ^{2}、又はＮＲ^{7}であり、そのＺ又はＱがＣ（Ｏ）である場合、Ｇ及びＷの他方はＮＲ^{2}でもＮＲ^{7}でもなく（式中、Ｒ^{2}及びＲ^{7}はＨ又は脂肪族Ｃ$_{1}$ヒドロカルビルである）；及び

ｖ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ存在するＱ又はＺがＣＨ$_{2}$であり、（ｂ）ＮＲ^{20}でないＧ又はＷがＯであり、かつ（ｃ）Ｒ^{20}が－Ｓ（Ｏ）$_{2}$フェニル－Ｒ^{1}（式中、Ｒ^{1}は、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$－ヒドロカルビル又はハロゲンである）である場合、ＰはＮＲ^{2}であり、式中、Ｒ^{2}は、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$－ヒドロカルビル以外である。

【０２５４】
ｄ、ｅ、ｆ、及びｋは、それぞれが、０又は１いずれかであり、（ｄ＋ｅ＋ｆ＋ｋ）の合計＝２である。いくつかの実施形態において、ｄが０の場合、ｅは０であり、及びｆが０の場合、ｋは０である。他の実施形態において、ｋが０の場合、ｅは０であり、及びｄが０の場合、ｆは０である。

【０２５５】
Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、ＣＨ又はＣＤ（式中、Ｄは重水素である）である。

【０２５６】
Ｅ及びＫは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）である。

【０２５７】
Ｘは、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり、好ましくは、SO_2、Ｃ（Ｏ）、又はCH_2である。いくつかの実施形態において、Ｘは、より好ましくは、CH_2又はSO_2である。他の実施形態において、Ｘは、好ましくは、SO_2、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）である。

【０２５８】
環Ａは、芳香環系又はヘテロ芳香環系であり、この環系は、好ましくは単環を含むが、縮合した２つの環を含むこともできる。R^1は、Ｈであるか、又は上限３個までの置換基（R^{1a}、R^{1b}、及びR^{1c}）を表し、上限３個までの置換基自身は、同じであっても異なっていてもよく、これら３つの基、R^{1a-c}は、それぞれが個別に、Ｈ、C_1-C_6ヒドロカルビル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシ、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシカルボニル、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、C_1-C_7ヒドロカルボイル、ヒドロキシ置換、トリフルオロメチル（$-CF_3$）置換、又はハロゲン置換C_1-C_7ヒドロカルボイル、C_1-C_6ヒドロカルビルスルホニル、C_1-C_6ヒドロカルビルオキシスルホニル、ハロゲン（Ｆ、Ｃｌ、又はＢｒ、好ましくはＣｌ）、ニトロ、フェニル、シアノ、カルボキシル、C_1-C_7ヒドロカルビルカルボキシラート［Ｃ（Ｏ）$O-C_1-C_7$ヒドロカルビル］、カルボキサミド［Ｃ（Ｏ）NR^3R^4］又はスルホンアミド［Ｓ（Ｏ）$_2NR^3R^4$］（式中、アミド窒素は、いずれのアミド基に含まれていても式NR^3R^4を有し、式中、R^3及びR^4は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビルであるか、又はR^3とR^4は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄である）、
ＭＡｒ（式中、Ｍは、$-CH_2-$、－Ｏ－、又は－Ｎ＝Ｎ－であり、かつＡｒは、単環のアリール基又はヘテロアリール基である）、及びNR^5R^6（式中、R^5及びR^6は、同じであるか異なっていて、Ｈ、C_1-C_4ヒドロカルビル、C_1-C_4アシル、C_1-C_4ヒドロカルビルスルホニルであるか、又はR^5とR^6は、示されている窒素と一緒になって五員～七員環を形成し、形成された環は随意に１又は２個の追加のヘテロ原子を含有し、追加のヘテロ原子はそれぞれ独立して窒素、酸素、又は硫黄であり）からなる群より選択される。

【０２５９】
R^8、R^9、及びR^{10}は、それぞれＨであることが好ましいが、又はR^8、R^9、及びR^{10}のうち２つがＨであり、１つがC_1-C_8ヒドロカルビル基であって、このC_1-C_8ヒドロカルビル基は、無置換であるか、又は上限３個までの原子で置換され、原子は、同じであるか異なっていて、酸素又は窒素原子（適切であれば、水素を含む）である。

【０２６０】
R^{11}、R^{12}、R^{13}、及びR^{14}は、全てＨであるか、又はR^{11}及びR^{13}はＨであり、かつR^{12}及びR^{14}はＨ又はＤであるか、又はR^{11}とR^{12}の対又はR^{13}とR^{14}の対のうち一方が、示されている環と一緒になって飽和又は不飽和の六員環を形成し、他方の対がそれぞれＨであるか、あるいは他方の対は、本明細書中（このサブ段落において）記載されるとお

りＨ及びＤである。

【０２６１】

上記の式Ａの化合物の別の好適な実施形態において、

ｉ）Ｇ、Ｐ、及びＷのうち１つだけがＮＲ^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ、Ｐ、及びＷのうち１つは必ずＮＲ^{20}であり、及び

ｉｉｉ）Ｐは、ＮＲ^{20}でなければＮＲ^{2}である。

【０２６２】

更に、ＱはＣＨＲ^{9}又はＣ（Ｏ）であり；かつ

Ｚは、ＣＨＲ^{10}又はＣ（Ｏ）であり、ただし、その他のＪ、Ｅ、Ｆ、Ｋ、Ｘ、Ｚ、ｄ、ｅ、ｆ、ｋ、ｎ、ｍ、ｐ、環Ａ、及びＲ基の全ては、構造式において不可能でないかぎり、上記のとおりに定義される。

【０２６３】

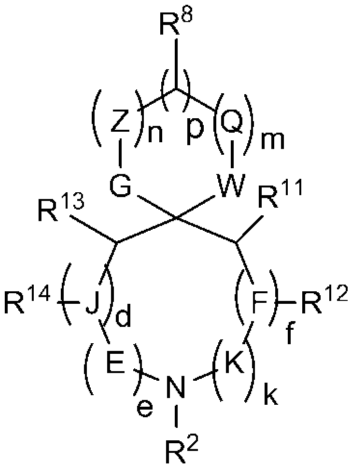
系列Ｃ－２の式Ａ及び本明細書中開示される残りの式全ての化合物の薬学的に許容可能な塩も考慮に入っている。

【０２６４】

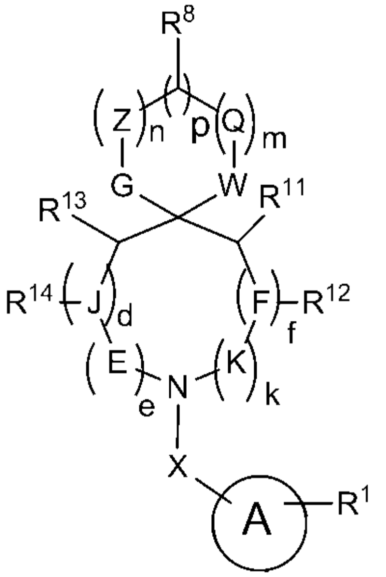
好適な実施形態において、系列Ｃ－２式Ａの化合物は、式Ｂ又は式Ｃいずれかの構造に一致し、薬学的に許容可能な塩として存在することが可能であり、随意に、個々の鏡像異性体型の両方を含んで（すなわちラセミ体）、ジアステレオマーを含んで、及びそれらの混合物を含んで存在することができる。

【０２６５】

【化２６】



B



C

【０２６６】

系列Ｃ－２式Ｂの構造に一致する系列Ｃ－２の化合物において、Ｇ及びＷは、ＮＲ^{20}、ＮＲ^{7}、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、式中、Ｒ^{2}及びＲ^{7}は、同じであるか異なっていて、Ｃ（Ｈ）$_{v}$（Ｄ）$_{h}$（式中、Ｄは重水素であり、ｖ及びｈは、それぞれ、０、１、２、又は３であり、かつｖ＋ｈ＝３である）、Ｃ（Ｈ）$_{q}$（Ｄ）$_{r}$－脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{11}$ヒドロカルビル（式中、Ｄは重水素であり、ｑ及びｒは、それぞれ、０、１、又は２であり、かつｑ＋ｒ＝０、１、又は２である）、脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルビルスルホニル、又は脂肪族Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$ヒドロカルボイルであるか、又はＲ^{2}及びＲ^{20}は、同じであるか異なっていて、かつＲ^{20}は、Ｘ－環Ａ－Ｒ^{1}である。

【０２６７】

好ましくは、１つの実施形態において、

ｉ）Ｇ及びＷのうち１つだけがＮＲ^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ及びＷのうち１つは必ずＮＲ^{20}であり、

ｉｉｉ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ（ｂ）ＮＲ^{20}であるＧ又はＷが、対

応するＺ又はＱに結合していて、そのＺ又はＱがＣ（Ｏ）である場合、NR^{20}ではないＧ又はＷは、NR^2でもNR^7でもなく（式中、R^2又はR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）；及び

ｉｖ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ存在するＱ又はＺがCH_2であり、（ｂ）NR^{20}でないＧ又はＷがＯであり、かつ（ｃ）R^{20}が－Ｓ（Ｏ）$_2$フェニル－R^1（式中、R^1は、Ｈ、C_1－C_3－ヒドロカルビル又はハロゲンである）である場合、示されるNR^2のR^2は、－Ｓ（Ｏ）$_2C_1$－C_3－ヒドロカルビル以外である。

【０２６８】

別の好適な実施形態において、：

ｉ）Ｇ及びＷのうち１つだけがNR^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ及びＷのうち１つは必ずNR^{20}であり、

ｉｉｉ）NR^{20}ではないＧ又はＷは、NR^2又はNR^7であり（式中、R^2又はR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）、

（ｉｖ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計は２であり、及び

（ｖ）NR^{20}であるＧ又はＷは、対応するＺ又はＱに結合していて、そのＺ又はＱはＣ（Ｏ）である。

【０２６９】

更に別の好適な実施形態において：

ｉ）Ｇ及びＷのうち１つだけがNR^{20}であり、

ｉｉ）Ｇ及びＷのうち１つは必ずNR^{20}であり、

ｉｉｉ）NR^{20}ではないＧ又はＷは、NR^7であり（式中、R^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）、

（ｉｖ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計は２であり、

（ｖ）NR^{20}であるＧ又はＷは、対応するＺ又はＱに結合していて、そのＺ又はＱはＣ（Ｏ）であり、

（ｖｉ）示されるNR^2のR^2は、同じ又は異なるR^{20}であり、及び

（ｖｉｉ）R^{20}は、Ｘ－環Ａ－R^1である。

【０２７０】

式Ｃの化合物の場合、Ｇ及びＷは、NR^2、NR^7、Ｓ、及びＯからなる群より選択され、式中、R^2及びR^7は、同じであるか異なっていて、Ｈ、Ｃ（Ｈ）$_v$（Ｄ）$_h$（式中、Ｄは重水素であり、ｖ及びｈは、それぞれ、０、１、２、又は３であり、かつｖ＋ｈ＝３である）、Ｃ（Ｈ）$_q$（Ｄ）$_r$－脂肪族C_1－C_{11}ヒドロカルビル（式中、ｑ及びｒは、それぞれが、０、１、又は２であり、かつｑ＋ｒ＝０、１又は２である）、脂肪族C_1－C_{12}ヒドロカルビルスルホニル、又は脂肪族C_1－C_{12}ヒドロカルボイルである。

【０２７１】

好ましくは、別の実施形態において：

ｉ）Ｇ及びＷのうち１つは必ずNR^2又はNR^7であり、及び

ｉｉ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ（ｂ）Ｇ及びＷのうち１つが、対応するＺ又はＱに結合したNR^2又はNR^7であり、そのＺ又はＱがＣ（Ｏ）である場合、Ｇ及びＷの他方はNR^2でもNR^7でもない（式中、R^2又はR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）。

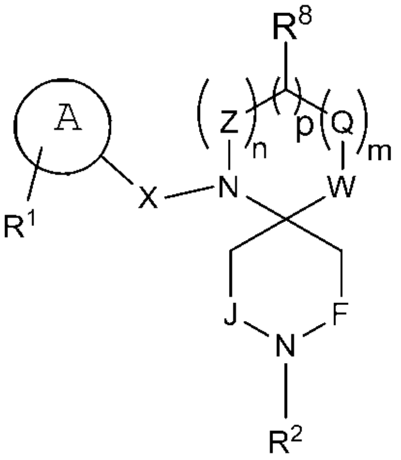
【０２７２】

系列Ｃ－２の式Ｂ及び式Ｃ両方において、それらの構造式に続く段落で特に定義されていない記号Ｘ、Ｚ、Ｑ、ｄ、ｅ、ｆ、ｇ、ｎ、ｍ、環Ａ、及びＲ基の全ては、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２式Ａの化合物について既に定義されたとおりである。既に記載された優先性も、示されるとおりの式において、先になされた優先性が不可能でないかぎり、同じく先に記載したとおりである。

【０２７３】

１つの実施形態において、系列Ｃ－２の式Ａ及び式Ｂの化合物で好適なものは、式Ｉの構造を有する：

【０２７４】
【化２７】

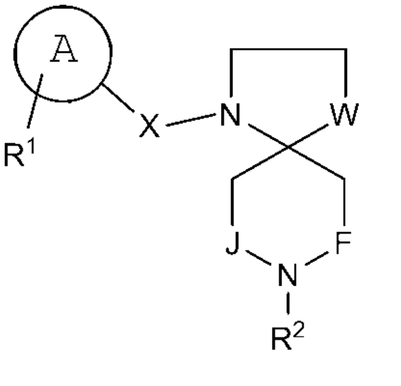


Ｉ

【０２７５】
式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつ、式中で定義されるＷ、Ｘ、Ｚ、Ｑ、ｎ、ｍ、ｐ、環Ａ、R^1、R^2、R^8、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２式Ａの化合物について既に記載されたとおりである。好ましくは、ｉ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ存在するＱ又はＺがCH_2であり、（ｂ）NR^{20}ではないＧ又はＷが、Ｏであり、かつ（ｃ）R^{20}が、－Ｓ（Ｏ）$_2$フェニル－R^1（式中、R^1は、Ｈ、C_1－C_3－ヒドロカルビル、又はハロゲンである）である場合、示されているNR^2のR^2は、－Ｓ（Ｏ）$_2C_1$－C_3－ヒドロカルビル以外であり、かつｉｉ）（ａ）ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつ（ｂ）ＺがＣ（Ｏ）である場合、Ｗは、NR^2でもNR^7でもない（式中、R^2又はR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）。

【０２７６】
R^8がＨであり、ｎ及びｍのうち１つが０であり、残りのＺ又はＱがCH_2である別の好適な実施形態において、系列Ｃ－２の式Ａ、式Ｂ、及び式Ｉの化合物は、系列Ｃ－２式ＩＩの構造を有する：

【０２７７】
【化２８】



ＩＩ

【０２７８】
式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつ

【０２７９】
式中で定義されるＸ、Ｗ、環Ａ、R^1、R^2、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２式Ａの化合物について既に記載されたとおりである。ＷがＯであり、かつＸ－環Ａ－R^1が－Ｓ（Ｏ）$_2$フェニル－R^1（式中、R^1は、Ｈ、C_1－C_3－ヒドロカルビル、又はハロゲンである）である場合、好まし

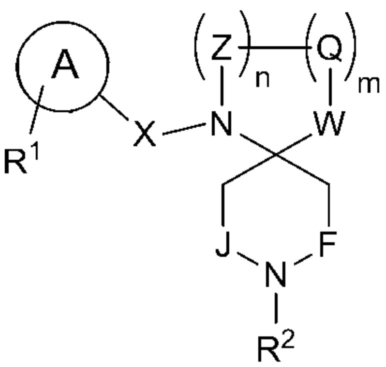
くは、示されているＮＲ^{2}のＲ^{2}は、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｃ$_1$－Ｃ$_3$－ヒドロカルビル以外である。

【０２８０】

Ｒ^{8}がＨである更に好適な実施形態において、系列Ｃ－２の式Ａ、式Ｂ、及び式Ｉの化合物は、系列Ｃ－２式ＩＩＩの構造を有する：

【０２８１】

【化２９】



III

【０２８２】

式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、ＣＨ$_2$、ＣＨＤ、又はＣＤ$_2$（式中、Ｄは重水素である）であり；

【０２８３】

ｍ及びｎは、それぞれ、１であり；かつ

【０２８４】

式中で定義されるＷ、Ｘ、Ｚ、Ｑ、環Ａ、Ｒ^1、Ｒ^2、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２式Ａの化合物について既に記載されたとおりである。

【０２８５】

１つの好適な実施形態において、ｉ）ＺはＣ（Ｏ）であり、ｉｉ）ＱはＣＨ$_2$であり、ｉｉｉ）ＷはＮＨであり、かつＲ^{2}はＨ又は直鎖、分岐鎖、もしくは環状のＣ$_1$－Ｃ$_{12}$脂肪族ヒドロカルビルであり、ｉｖ）Ｘは好ましくはＣＨ$_2$、ＳＯ$_2$、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり、より好ましくはＣＨ$_2$である。別の好適な実施形態において、ｉ）Ｚ及びＱの１つはＣ（Ｏ）であり、かつｉｉ）ＺがＣ（Ｏ）の場合、Ｗは、ＮＲ^{2}でもＮＲ^{7}でもなく（式中、Ｒ^{2}及びＲ^{7}は、Ｈ又は脂肪族Ｃ$_1$ヒドロカルビルである）、かつｉｉｉ）Ｘは好ましくは、ＣＨ$_2$、ＳＯ$_2$、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）である。

【０２８６】

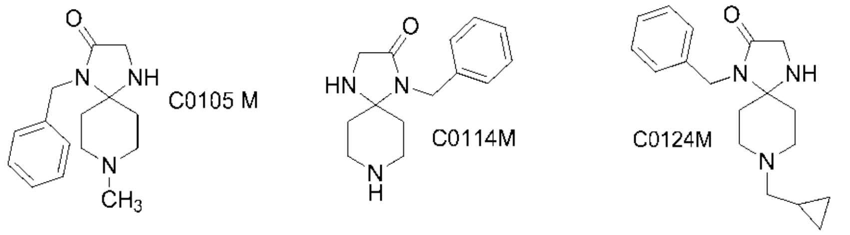
更に他の好適な実施形態において、ｉ）ＺはＣ（Ｏ）であり、ｉｉ）ＱはＣＨ$_2$であり、ｉｉｉ）ＷはＮＨであり、（ｖｉ）Ｒ^{2}は同じ又は異なるＲ^{20}であり、及び（ｖｉｉ）Ｒ^{20}は、Ｘ－環Ａ－Ｒ^{1}である。この実施形態において、Ｘは、好ましくは、ＣＨ$_2$、ＳＯ$_2$、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）であり、より好ましくはＣＨ$_2$である。

【０２８７】

目論んでいる方法を行うために本発明で最も好適な化合物は、構造が、上記の式ＩＩＩに一致し、式中、ｉ）ＺはＣ（Ｏ）であり、ｉｉ）ＱはＣＨ$_2$であり、ｉｉｉ）ＷはＮＨであり、かつＲ^{2}はＨ又は直鎖、分岐鎖、もしくは環状の、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$、好ましくはＣ$_1$－Ｃ$_8$、より好ましくはＣ$_1$－Ｃ$_6$の、脂肪族ヒドロカルビル基であり、ｉｖ）ＸはＣＨ$_2$であり、かつ環Ａ－Ｒ^{1}は、置換基Ｘ－環Ａ－Ｒ^{1}がベンジル基となるように、無置換フェニルである。本発明で特に好適な化合物の例として、化合物Ｃ０１０５Ｍ、Ｃ０１１５Ｍ、及びＣ０１２４Ｍが挙げられ、それらの構造式を以下に示す。

【０２８８】

【化３０】

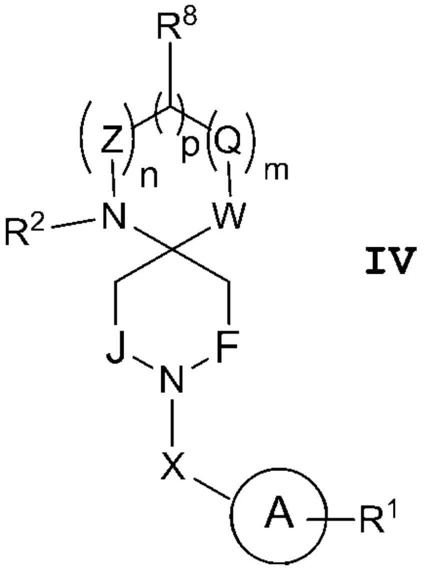


【０２８９】

更に他の好適な実施形態において、系列Ｃ－２の式Ａ及び式Ｃの化合物は、系列Ｃ－２式ＩＶの構造を有する：

【０２９０】

【化３１】



【０２９１】

式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつ

【０２９２】

式中で定義されるＷ、Ｘ、Ｚ、Ｑ、環Ａ、R^1、R^2、R^8、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２式Ａの化合物について先に記載されたとおりである。

【０２９３】

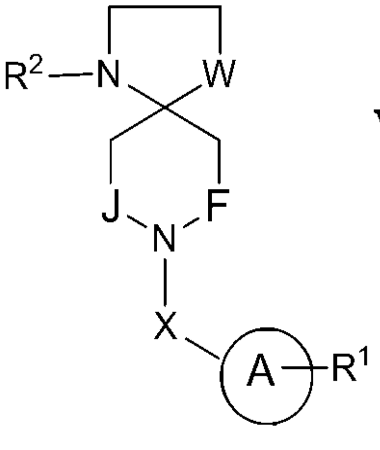
１つの好適な実施形態において、、ｉ）ｐが０であり、ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、かつＺがＣ（Ｏ）である場合、Ｗは、NR^2でもNR^7でもなく（式中、R^2及びR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）、及びｉｉ）ｐが０であり、ｍ＋ｎ＋ｐの合計が２であり、ＷがNR^2又はNR^7であり、かつＱがＣ（Ｏ）である場合、示されているNR^2のR^2は、Ｈでも脂肪族C_1ヒドロカルビルでもない。

【０２９４】

R^8がＨであり、ｎ及びｍの１つが０であり、残っているＺ又はＱがCH_2である更に別の好適な実施形態において、式Ａ、式Ｃ、及び式ＩＶの化合物は、系列Ｃ－２式Ｖの構造を有する：

【０２９５】

【化３２】



V

【０２９６】

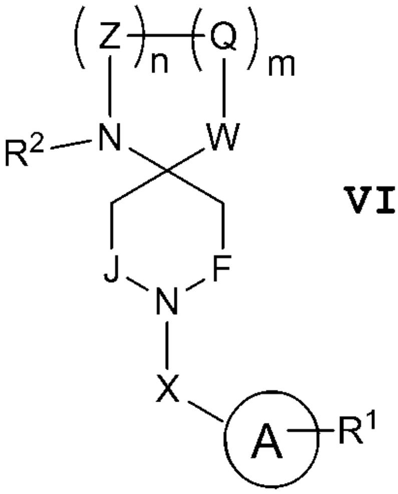
式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつ、式中で定義されるＸ、Ｗ、環Ａ、R^1、R^2、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２の化合物について既に記載されたとおりである。

【０２９７】

R^8がＨである更に別の好適な実施形態において、式Ａ、式Ｃ、及び式Ｉの化合物は、系列Ｃ－２式ＶＩの構造を有する：

【０２９８】

【化３３】



VI

【０２９９】

式中、Ｊ及びＦは、同じであるか異なっていて、CH_2、ＣＨＤ、又はCD_2（式中、Ｄは重水素である）であり；かつ

【０３００】

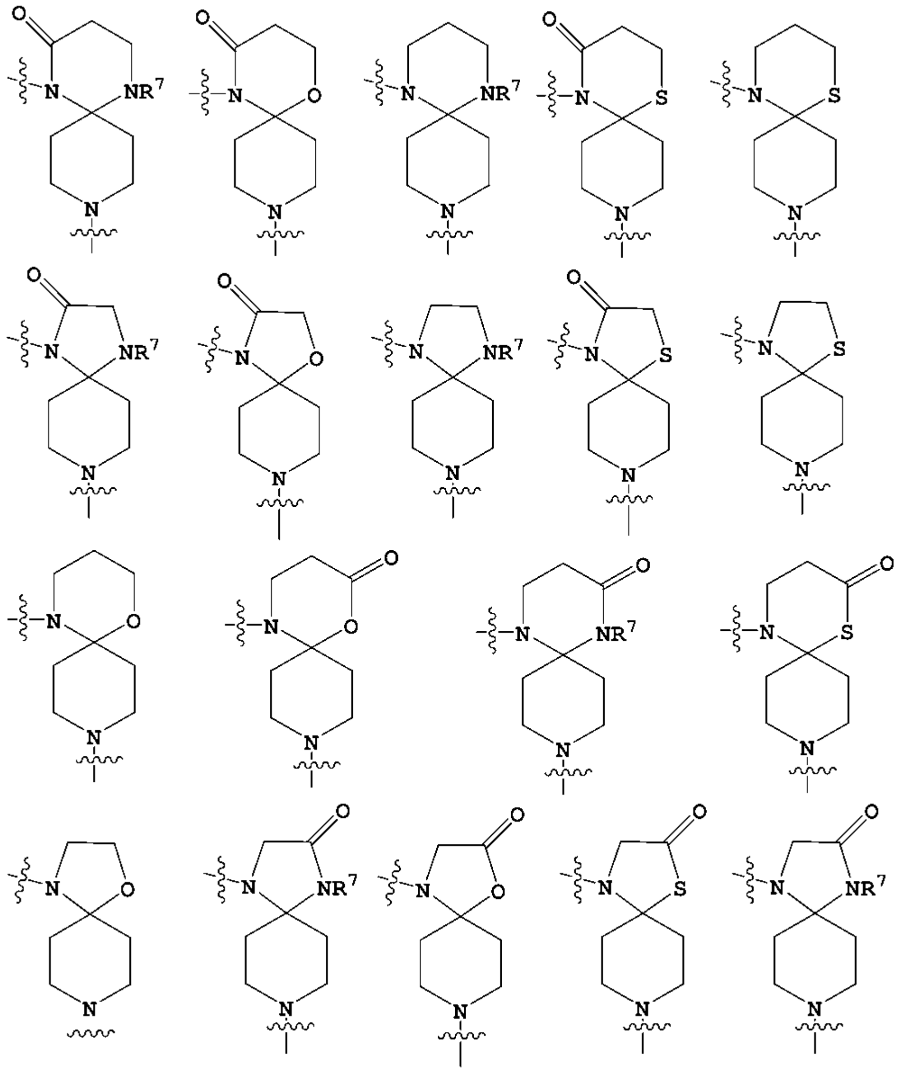
ｍ及びｎは、それぞれ１であり；式中で定義されるＷ、Ｘ、Ｚ、Ｑ、環Ａ、R^1、R^2、及びＲ基は、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２の化合物について既に記載されたとおりである。

【０３０１】

好ましくは、ｉ）Ｚ及びＱの１つは、Ｃ（Ｏ）であり、ｉｉ）ＺがＣ（Ｏ）である場合、Ｗは、NR^2でもNR^7でもなく（式中、R^2又はR^7は、Ｈ又は脂肪族C_1ヒドロカルビルである）、及びｉｉｉ）ＷがNR^2又はNR^7であり、かつＱがＣ（Ｏ）である場合、示されているNR^2のR^2は、Ｈでも脂肪族C_1ヒドロカルビルでもない。上記式の化合物において、Ｘは、好ましくは、SO_2、ＮＨＣ（ＮＨ）、ＮＨＣ（Ｓ）、又はＮＨＣ（Ｏ）である。

【０３０２】
　なお、Ｘ、Ｗ、Ｚ、Ｑ、ｄ、ｅ、ｆ、ｋ、ｎ、ｍ、環Ａ、及びＲ基の全てに当てはまるとして先に記載された優先性も、示されるとおりの式において、先になされた定義が不可能でないかぎり、系列Ｃ－２の式Ａ、式Ｂ、式Ｃ、及び式Ｉ～ＶＩの化合物に当てはまる。
【０３０３】
　目論んでいる化合物の１つが有する環Ａの芳香環（アリール）系として目論んでいるものは、好ましくは、単独の芳香環を含むが、縮合した２つの環を含むこともできる。環Ａの芳香環系の例は、フェニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル（１，３，５－トリアジニル、１，２，４－トリアジニル、及び１，２，３－トリアジニル）、フラニル、チエニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ナフチル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、イソベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンズイソキサゾール、キノリル、イソキノリル、キナゾリル（quinazolyl）、シンノリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びベンゾピリミジニルからなる群より選択される。
【０３０４】
　環Ａ基又は環Ａの置換基ＭＡｒの中の単環のアリール又はヘテロアリール基の例は、フェニル基、ピリジル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、トリアジニル基（１，３，５－トリアジニル、１，２，４－トリアジニル、及び１，２，３－トリアジニル）、フラニル基、チエニル基、オキサゾリル基、イソオキサゾリル基、チアゾリル基、及びイソチアゾリル基からなる群より選択される。
【０３０５】
　フェニル、ピリジニル、及びフラニルが、環Ａの芳香環系又はヘテロ芳香環系として好適であるが、フェニルがより好適である。フェニル、ピリジニル、及びフラニルは、ＭＡｒ置換基の中の単環のアリール基又はヘテロアリール基Ａｒとしても好適であるが、フェニルが特に好適である。
【０３０６】
　Ｘ及びＹは、中心スピロ環の示されている窒素原子から環Ａ環系までをつなぐ、スルホンアミド（Ｎ－SO_2－環Ａ）連結部、カルボキサミド［Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－環Ａ）連結部、尿素［カルボニルジイミノ；Ｎ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－環Ａ］連結部、チオ尿素［チオカルボニルジイミノ；Ｎ－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－環Ａ］連結部、グアニジノ［Ｎ－Ｃ（＝ＮＨ）－ＮＨ－環Ａ］連結部、又はアミノメチレン（Ｎ－CH_2－環Ａ）連結部を形成することができる。
【０３０７】
　上記系列Ｃ－２の各式の化合物をより綿密に調べると、この式は、２つの環を有する置換スピロ化合物を定義するものであり、化合物は、２つの六員環、又は１つの六員環と１つの五員環を有することが可能である（「ｍ」及び「ｎ」の一方が１であり他方が０である場合にそうなる）ことがわかる。２つの環の１つ（式中、下側の環）は、六員環中に１つの窒素原子を有し、残りの環原子は炭素である。環原子を５個又は６個有することができる環（式中、上側の環）は、１個の環窒素原子と４個もしくは５個の炭素原子、又は２個の窒素原子、１個の窒素原子と１個の硫黄原子、もしくは１個の窒素原子と１個の酸素原子を、３個もしくは４個の環炭素と合わせて有することができる。中心スピロ環の例を、以下に示すが、式中、波線は、他の実体との共有結合が存在することを示し、及びR^7は上記で定義され、及び明確にするため、R^8はＨである。
【０３０８】

【化３４】

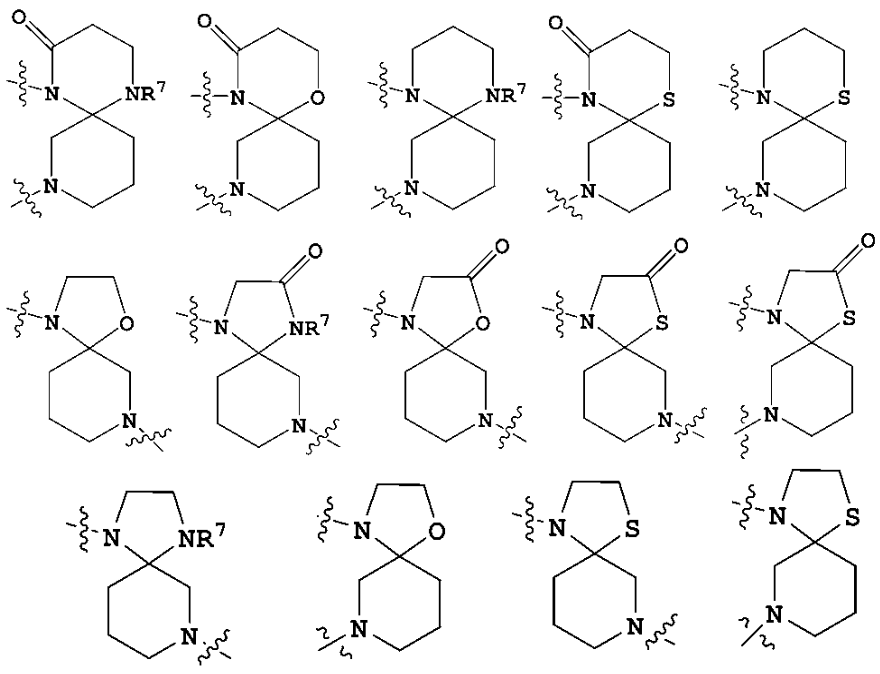


【０３０９】

系列Ｃ－２式Ａの化合物で、式中、ｄ及びｅがそれぞれ０であり、かつＲ^{11}、Ｒ^{12}、及びＲ^{13}がそれぞれＨであるものは非対称スピロ環構造を有し、そのような化合物の例として、いくつかを以下に示す。ただし、波線は、他の実体との共有結合が存在することを示し、及びＲ^{7}は上記で定義され、及び明確にするため、Ｒ^{8}はＨである。

【０３１０】

【化３５】



【０３１１】

系列Ｃ－２の式Ａ、式Ｂ、及び式Ｃの化合物が好適に実施される場合、ｐは０であり、ｅ及びｇは、両方とも０であり、かつR^{11}、R^{12}、及びR^{13}は全てＨであり、そうすると、中心環はスピロ５，６－環系になり、その環系の六員環が無置換で、かつその環系のスピロ結合が六員環の窒素に対して４－位にあるようになる。これとは別に、ＷがＯ、Ｓ、又はNR^7であることが好ましい。ＸがSO_2（スルホニル）であることも好ましい。

【０３１２】

芳香族置換基、すなわち環Ａは、スピロ環の１つの窒素原子と、Ｘ基を介して結合しており、Ｘ基は、SO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、CD_2、ＯＣ（＝Ｏ）、ＮＨＣ（＝ＮＨ）、ＮＨＣ（＝Ｓ）、又はＮＨＣ（＝Ｏ）、好ましくはSO_2、Ｃ（Ｏ）、CH_2、又はCD_2、特に好ましくはCH_2又はSO_2である。その結果、芳香族置換基は、スピロ環部分に、スルホンアミド連結部、アミド連結部、メチレン連結部、尿素連結部、チオ尿素連結部、又はグアニジノ連結部を介して結合している。アリールスルホンアミド架橋、アリールアミド架橋、及びフェニルメチレン架橋（ベンジル化合物）が好ましいが、アリールスルホンアミド及びフェニルメチレンが特に好ましい。

【０３１３】

系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、及び系列Ｃ－２の化合物の多く、ならびにナロキソン及びナルトレキソンなどの化合物は、配列番号１のペプチドに結合するだけではなく、ＭＯＲにも結合してその受容体を活性化又は刺激する。ナロキソン及びナルトレキソンのＭＯＲとの結合は、配列番号１のペンタペプチドにそれらが結合する場合の約２００分の１の弱い結合である。実施例２の表は、系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、及び系列Ｃ－２の例示化合物について、ＭＯＲ刺激活性に基づいた相対結合能力を示す。

【０３１４】

いくつかの実施形態において、目論んでいる方法に有用な化合物は、ＭＯＲによく結合してＭＯＲを活性化することが好ましい。そのような場合、その化合物は、表に示す濃度において、ＤＡＭＧＯの結合度合いの少なくとも約±２０％でＭＯＲに結合することが好ましく、そのような結合は、化合物がその受容体にとって完全アゴニストであることを示す。他の実施形態において、本発明に有用な化合物は、ＭＯＲにあまりよく結合しないことが好ましい。そのような実施形態の場合、その化合物は、同濃度においてＤＡＭＧＯがもたらすＭＯＲ刺激の約８０％未満しかＭＯＲ刺激を示さず、更に下限はゼロ結合／刺激までであることが好ましい。系列Ａ、系列Ｂ、系列Ｃ－１、及び系列Ｃ－２の例示化合物に

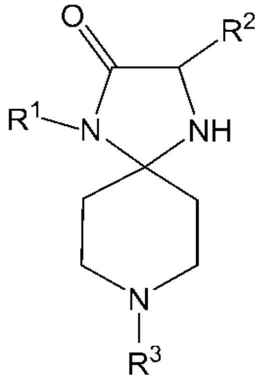
ついて、本明細書中以下の実施例２の表に、ＤＡＭＧＯが記載される濃度で存在する場合の代表的な結合パーセンテージを示す。

【０３１５】

系列Ｄの１，４，８－トリアザスピロ［４，５］－デカン－２－オン化合物は、構造が以下の式又はそれらの生理学的に許容可能な塩に一致する：

【０３１６】

【化３６】



【０３１７】

式中、R^1は、水素；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換もしくは少なくとも１置換のアリール基又は無置換もしくは少なくとも１置換のヘテロアリール基、このアリール基及びヘテロアリール基は、直鎖もしくは分岐鎖のアルキレン基を介して結合してもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；あるいは、－Ｃ（＝Ｏ）ＯR^7基、この基は直鎖もしくは分岐鎖のアルキレン基を介して結合することができる、を表し；

【０３１８】

R^2は、水素；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換もしくは少なくとも１置換のアリール基又は無置換もしくは少なくとも１置換のヘテロアリール基、このアリール基及びヘテロアリール基は、直鎖もしくは分岐鎖のアルキレン基を介して結合してもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる、を表し；

【０３１９】

R^3は、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－R^4基；－Ｃ（＝Ｓ）ＮＨ－R^5基；又は－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－R^6基；を表し；

【０３２０】

R^4は、－Ｎ$R^{10}R^{11}$基；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換もしくは少なくとも１置換のアリール基又は無置換もしくは少なくとも１置換のヘテロアリール基、これらの基は直鎖もしくは分岐鎖の

、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合してもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、更に無置換もしくは少なくとも１置換の単環式環系と縮合してもよい；無置換もしくは少なくとも１置換のシクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、かつこの基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、かつアルキレン基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基により架橋されることができる、を表し；

【０３２１】

$Ｒ^5$は、直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換もしくは少なくとも１置換のアリール基又は無置換もしくは少なくとも１置換のヘテロアリール基、この基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合してもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換もしくは少なくとも１置換のシクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができるか、又はこの基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；－Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^8$基又は－Ｃ（＝Ｏ）$ＯＲ^9$基、いずれの場合にしろ、この基は直鎖もしくは分岐鎖のアルキレン基を介して結合することができる、を表し；

【０３２２】

$Ｒ^6$は、無置換もしくは少なくとも１置換のアリール基又は無置換もしくは少なくとも１置換のヘテロアリール基、これらのアリール基及びヘテロアリール基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合してもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；あるいは、無置換もしくは少なくとも１置換のシクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができるか、又はこの基は直鎖もしくは分岐鎖の、無置換もしくは少なくとも１置換のアルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる、を表し；

【０３２３】

$Ｒ^7$、$Ｒ^8$、$Ｒ^9$、$Ｒ^{10}$、及び$Ｒ^{11}$は、それぞれ独立して、直鎖又は分岐鎖のアルキル基、直鎖又は分岐鎖のアルケニル基、あるいは直鎖又は分岐鎖のアルキニル基を表す。

【０３２４】

上記の式と一致する１，４，８－トリアザスピロ［４，５］－デカン－２－オン化合物にとって好ましくは、$Ｒ^1$は、水素；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換の$Ｃ_{1-10}$アルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換の$Ｃ_{2-10}$アルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換の$Ｃ_{2-10}$アルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換の五員～十四員のアリール基又はヘテロアリール基、この基は直鎖又は分岐鎖の$Ｃ_{1-5}$アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；－Ｃ＝Ｏ）$ＯＲ^7$基、この基は直鎖又は分岐鎖の$Ｃ_{1-5}$アルキレン基を介して結合することができる、を表し；

【０３２５】

$Ｒ^2$は、水素；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換の$Ｃ_{1-10}$アルキル基、

この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換の五員の～十四員のアリール又はヘテロアリール基、この基は直鎖又は分岐鎖のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる、を表し；

【０３２６】

R^4は、$NR^{10}R^{11}$基；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-10}アルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換の五員～十四員のアリール基又はヘテロアリール基、この基は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、更に五員～六員の単環式環系と縮合してもよい；無置換又は少なくとも１置換のC_{3-8}－シクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができるか、又は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、かつアルキレン基は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができる、を表し；

【０３２７】

R^5は、直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-10}アルキル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルケニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{2-10}アルキニル基、この基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換の五員～十四員のアリール又はヘテロアリール基、この基は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換のC_{3-8}－シクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができ、かつ直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；－Ｃ（＝Ｏ）OR^8基又は－Ｃ（＝Ｏ）OR^9基、これらの基のいずれも、直鎖又は分岐鎖のC_{1-10}アルキレン基を介して結合することができる、を表し；

【０３２８】

R^6は、無置換又は少なくとも１置換の五員～十四員のアリール又はヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合していてもよく、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる；無置換又は少なくとも１置換のC_{3-8}－シクロ脂肪族基、この基は環員として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができるか、又はこの基は直鎖又は分岐鎖の、無置換又は少なくとも１置換のC_{1-5}アルキレン基を介して結合することができ、アルキレン基は連結部として少なくとも１個のヘテロ原子を有することができる、を表し；かつ

【０３２９】

R^7、R^8、R^9、R^{10}、及びR^{11}は、それぞれ独立して、直鎖又は分岐鎖のC_{1-5}アルキ

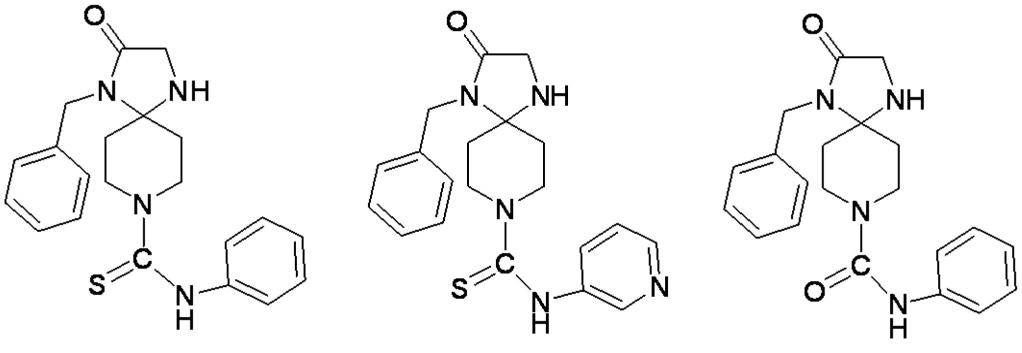
ル基、直鎖又は分岐鎖のC_{2-5}アルケニル基、あるいは直鎖又は分岐鎖のC_{2-5}アルキニル基を表す。

【０３３０】

以下に構造式を示す化合物Ａ、化合物Ｂ、及び化合物Ｃは、系列Ｄの好適な化合物の例である。

【０３３１】

【化３７】



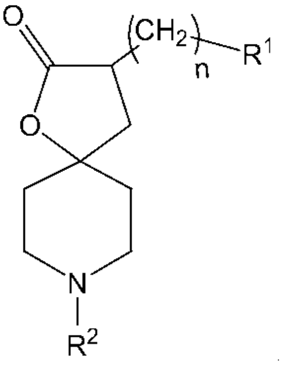
化合物Ａ　化合物Ｂ　化合物Ｃ

【０３３２】

系列Ｅの置換１－オキサ－３，８－ジアザスピロ［４．５］－デカン－２－オン化合物は、構造が、以下の式又はその薬学的に許容可能な塩又は溶媒和物に一致する：

【０３３３】

【化３８】



【０３３４】

式中

ｎは、１、２、３、４、又は５であり；

【０３３５】

R^1は、以下を示し：

随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３３６】

R^2は、以下を示し：

$-C(=S)-NH-R^3$；$-C(=O)-NH-R^4$；$-S(=O)_2-R^5$；$-(CH_2)-C(=O)-NH-R^6$；$-(CH_2)-D_{aa}-(CH_2)_{bb}-E_{cc}-(CH_2)_{dd}-R^7$（式中

ａａ＝０又は１であり；

ｂｂ＝０、１、又は２であり；

ｃｃ＝０又は１であり；ｄｄ＝０又は１であり；かつ

ａａとｃｃの合計は０にはならず；かつ
Ｄ及びＥは、それぞれ独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、Ｎ（CH_3）、Ｎ（C_2H_5）、又はＮ［ＣＨ（CH_3）$_2$］を示す）；
－Ｃ（＝Ｏ）－R^8；又は－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮR^9R^{10}；

【０３３７】
R^3は、以下を示し：
－（ＣＨR^{11}）－（CH_2）$_w$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－R^{12}（式中、ｗ＝０又は１である）；
－（ＣＨR^{13}）－（CH_2）$_a$－K_b－（CH_2）$_c$－L_d－R^{14}（式中、ａ＝０、１、又は２であり；ｂ＝０又は１であり；ｃ＝０、１、又は２であり；ｄ＝０又は１であり、かつＫ及びＬは、それぞれ独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、Ｎ（CH_3）、Ｎ（C_2H_5）、又はＮ［ＣＨ（CH_3）$_2$］を示す）；
直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；
不飽和もしくは飽和の、随意置換の、三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の、単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは随意置換の六員又は十員のアリール基；又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３３８】
R^4は、以下を示し：
－（ＣＨR^{15}）－（CH_2）$_e$－M_f－（CH_2）$_g$－P_h－R^{16}（式中、ｅ＝０、１、又は２であり；ｆ＝０又は１であり；ｇ＝０、１、又は２であり；ｈ＝０又は１であり；かつＭ及びＰは、それぞれ独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、Ｎ（CH_3）、Ｎ（C_2H_5）、又はＮ［ＣＨ（CH_3）$_2$］を示す）；
直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；
不飽和もしくは飽和の、随意置換の、三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；
あるいは随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３３９】
R^5は、以下を示し：
－（ＣＨR^{17}）－（CH_2）$_k$－Q_l－（CH_2）$_m$－T_o－R^{18}（式中、ｋ＝０、１、又は２であり；ｌ＝０又は１であり；ｍ＝０、１、又は２であり；ｏ＝０又は１であり；かつＱ及びＴは、それぞれ独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、Ｎ（CH_3）、Ｎ（C_2H_5）、又はＮ［ＣＨ（CH_3）$_2$］を示す）；
直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；
不飽和もしくは飽和の、随意置換の三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３４０】
R^6は、以下を示し：
直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；

不飽和もしくは飽和の、随意置換の三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のＣ$_{1-5}$アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３４１】

Ｒ^{7}は、以下を示し：

シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、イミダゾリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、チオモルホリニル、テトラヒドロピラニル、アゼパニル、ジアゼパニル、及びジチオラニルからなる群より選択される基、この基は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、オキソ（＝Ｏ）、チオキソ（＝Ｓ）、－ＯＨ、－Ｏ－ＣＨ$_3$、－Ｏ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｏ－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｏ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_2$Ｈ、－Ｓ－ＣＦＨ$_2$、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＦ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_2$Ｆ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｃ$_2$Ｈ$_5$）$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_3$－ＣＨ$_3$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－ＣＨ$_3$、及び－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ$_2$からなる群より選択される；

又は、フェニル、ナフチル、及び［１，２，３，４］－テトラヒドロナフチルからなる群より選択される基、この基は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、－ＣＦ$_3$、－ＳＦ$_5$、－ＯＨ、－Ｏ－ＣＨ$_3$、－Ｏ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｏ－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－ＮＯ$_2$、－Ｏ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_2$Ｈ、－Ｓ－ＣＦＨ$_2$、ＳＨ、－Ｓ－ＣＨ$_3$、－Ｓ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｓ－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｓ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｓ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_2$－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_3$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_3$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－（ＣＨ$_2$）－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－ＮＨ－ＣＨ$_3$、－ＮＨ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－ＮＨ－ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$、－ＮＨ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｎ（Ｃ$_2$Ｈ$_5$）$_2$、－Ｎ（ＣＨ$_3$）（Ｃ$_2$Ｈ$_5$）、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＦ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_2$Ｆ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（ＣＨ$_3$）$_3$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｃ$_2$Ｈ$_5$）$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_2$Ｈ$_5$、－ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＣＨ$_3$、－Ｓ（＝Ｏ）$_3$－ＮＨ－ＣＨ$_3$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル、フェニル、及びベンジルからなる群より選択され、群中、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル基、フェニル基、及びベンジル基の環状部分は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、－ＯＨ、－ＣＦ$_3$、－ＳＦ$_5$、－ＮＯ$_2$、メチル

、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、－Ｏ－CH_3、－Ｏ－C_2H_5、－Ｏ－ＣＨ（CH_3）$_3$、－Ｏ－CH_2－CH_3－CH_3、－Ｏ－Ｃ（CH_3）$_3$、－Ｏ－CH_2－CH_2－CH_2－CH_3、－Ｏ－CF_3、－Ｓ－CF_3、フェニル、及び－Ｏ－ベンジルからなる群より選択される；

【０３４２】

R^8は、以下を示し

－（CHR^{19}）－V_p－（CH_2）$_q$－（CH_2）$_r$－W_s－R^{20}

（式中

ｐ＝０又は１であり；

ｑ＝０、１、又は２であり；

ｒ＝０、１、又は２であり；

ｓ＝０又は１であり；かつ

Ｖ及びＷは、それぞれ独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、－ＮＨ－CH_3、－ＮＨ－C_2H_5、－ＮＨ－ＣＨ（CH_3）$_2$を示す）；

－（ＣＨ＝ＣＨ）－R^{21}；

－（$CR^{22}R^{23}$）－Y_t－（$CR^{24}R^{25}$）$_u$－（CH_2）$_v$－Ｃ（＝Ｏ）－OR^{26}（式中

ｔ＝０又は１であり、ｕ＝０又は１であり；

ｖ＝０又は１であり、かつＹは、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、－ＮＨ－CH_3、－ＮＨ－C_2H_5、－ＮＨ－ＣＨ（CH_3）$_2$を示す）；

－（CHR^{27}）－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－R^{28}；

－ＣＨ［（CH_2）R^{29}］［ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－R^{30}］；

－ＣＨ［（CH_2）R^{31}］［ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－R^{32}］；

メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｓｅｃ－ペンチル、３－ペンチル、－（CH_2）－（CH_2）－（Ｃ（CH_3）$_3$）、ｎ－ヘキシル、２－ヘキシル、３－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、２－ヘプチル、３－ヘプチル、４－ヘプチル、ｎ－オクチル、－（CH_2）－（ＣＨ）（C_2H_5）－（CH_2）－（CH_2）－（CH_2）－（CH_3）、ビニル、１－プロペニル、２－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、及び３－ブテニルからなる群より選択される、直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；

不飽和もしくは飽和の、随意置換の三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる；

【０３４３】

R^9及びR^{10}は、それぞれ独立して、直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基を示し；

【０３４４】

R^{11}、R^{13}、R^{15}、R^{17}、R^{19}、R^{22}、R^{23}、R^{24}、R^{25}、及びR^{26}は、それぞれ独立して、水素、あるいは直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基を示し；

【０３４５】

R^{12}、R^{28}、及びR^{32}は、それぞれ独立して、直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基を示し；

【０３４６】

R^{14}、R^{16}、R^{18}、及びR^{20}は、それぞれ独立して、直鎖又は分岐鎖の、飽和もしくは不飽和の、随意置換のC_{1-10}脂肪族基；

不飽和もしくは飽和の、随意置換の三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基で架橋されるか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは

随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる、を示し；かつ

【０３４７】

R^{21}、R^{27}、R^{29}、R^{30}、及びR^{31}は、それぞれ独立して、不飽和もしくは飽和の、随意置換の三員、四員、五員、六員、七員、八員、もしくは九員のシクロ脂肪族基、この基は、随意に、１つ又は２つの直鎖又は分岐鎖の、随意置換のC_{1-5}アルキレン基と架橋するか、又は飽和、不飽和、もしくは芳香族の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合するか、又はその両方を起こすことができる；あるいは、随意置換の六員又は十員のアリール基又は随意置換の五員～十四員のヘテロアリール基、このアリール又はヘテロアリール基は、随意に、飽和もしくは不飽和の、随意置換の単環もしくは二環式環系と縮合することができる、を示し；式中、上記のC_{1-10}脂肪族基は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換されてもよく、置換基は、それぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、$-NO_2$、－ＯＨ、－ＳＨ、及び$-NH_2$からなる群より選択され；

【０３４８】

上記のシクロ脂肪族基は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、オキソ（＝Ｏ）、チオキソ（＝Ｓ）、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、$-CF_3$、$-SF_5$、－ＯＨ、$-O-C_{1-5}$アルキル、$-NH_2$、$-NO_2$、$-O-CF_3$、$-S-CF_3$、$-S-CF_2H$、$-S-CFH_2$、－ＳＨ、$-S-C_{1-5}$アルキル、$-C_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、$-(CH_2)-C(=O)-OH$、$-C(=O)-O-C_{1-5}$アルキル、$-(CH_2)-C(=O)-O-C_{1-5}$アルキル、$-O-C(=O)-C_{1-5}$アルキル、$-NH-C_{1-5}$アルキル、$-N(C_{1-5}$アルキル$)_2$、－ＮＨ－フェニル、－ＮＨ－ピリジニル、$-N(C_{1-5}$アルキル$)$－フェニル、$-N(C_{1-5}$アルキル$)$－ピリジニル、$-NH-C(=O)-O-C_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ、$-C(=O)-C_{1-5}$アルキル、$-C(=O)-C_{1-5}$－パーフルオロアルキル、$-C(=O)-NH_2$、$-C(=O)-NH-C_{1-5}$アルキル、$C(=O)-N-(C_{1-5}$アルキル$)_2$、$-S(=O)_2-C_{1-5}$アルキル、$-S(=O)_2$－フェニル、$-NH-S(=O)_2-C_{1-5}$アルキル、$-S(=O)_2-NH-C_{1-5}$アルキル、$-S(=O)_2-NH_2$、$-S(=O)_2-NH$－フェニル、シクロヘキシル、シクロペンチル、ピリジニル、［１，２，５］－チアジアゾリル、ピリダジニル、$-(CH_2)$－ベンゾ［ｂ］フラニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、及びベンジルからなる群より選択され、群中、$-S(=O)_2-NH$－フェニル、－ＮＨ－フェニル、－ＮＨ－ピリジニル、$-N(C_{1-5}$アルキル$)$フェニル、$-N(C_{1-5}$アルキル$)$ピリジニル、ピリジニル、シクロペンチル、［１，２，５］－チアジアゾリル、シクロヘキシル、ピリダジニル、$-S(=O)_2$－フェニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、$-(CH_2)$－ベンゾ［ｂ］フラニル、及びベンジル各基の環状部分は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、－ＯＨ、$-CF_3$、$-SF_5$、－ＣＮ、$-NO_2$、$-C_{1-5}$アルキル、$-O-C_{1-5}$アルキル、$-O-CF_3$、$-S-CF_3$、フェニル、及び－Ｏ－ベンジルからなる群より選択され、かつシクロ脂肪族基は、１個、２個、３個、４個、又は５個のヘテロ原子を含むことができ、ヘテロ原子は相互に独立して、酸素、窒素、及び硫黄からなる群より選択され；

【０３４９】

上記のC_{1-5}－アルキレン基は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換されてもよく、置換基は、それぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ

、Ｉ、－ＣＮ、－ＮＯ$_2$、－ＯＨ、－ＳＨ、及び－ＮＨ$_2$からなる群より選択され；

【０３５０】

上記の単環式又は多環式環系に含まれる環は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換されてもよく、置換基は、それぞれ独立して、オキソ（＝Ｏ）、チオキソ（＝Ｓ）、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、－ＣＦ$_3$、－ＳＦ$_5$、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル－ＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－Ｏ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_2$Ｈ、－Ｓ－ＣＦＨ$_2$、－ＳＨ、－Ｓ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－（ＣＨ$_2$）－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－（ＣＨ$_2$）－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）$_2$、－ＮＨ－フェニル、－ＮＨ－ピリジニル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）－フェニル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）－ピリジニル、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$－パーフルオロアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ－（Ｃ$_{1-5}$アルキル）$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－フェニル、－ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル、シクロヘキシル、シクロペンチル、ピリジニル、［１，２，５］－チアジアゾリル、ピリダジニル、－（ＣＨ$_2$）－ベンゾ［ｂ］フラニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、及びベンジルからなる群より選択され、

群中、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル、－ＮＨ－フェニル、－ＮＨ－ピリジニル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）フェニル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）ピリジニル、ピリジニル、シクロペンチル、［１，２，５］－チアジアゾリル、シクロヘキシル、ピリダジニル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－フェニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、－（ＣＨ$_2$）－ベンゾ［ｂ］フラニル、及びベンジル各基の環状部分は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、－ＯＨ、－ＣＦ$_3$、－ＳＦ$_5$、－ＣＮ、－ＮＯ$_2$、Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－ＮＨ$_2$、－Ｏ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_3$、フェニル、及び－Ｏ－ベンジルからなる群より選択され；

【０３５１】

上記の単環式又は多環式環系に含まれる環は、それぞれ独立して、五員、六員、又は七員環であり、かつそれぞれ独立して、随意に、環員として１個、２個、３個、４個、又は５個のヘテロ原子を含んでもよく、ヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、及び硫黄からなる群より選択され；上記のアリール又はヘテロアリール基は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換されてもよく、置換基は、それぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、－ＣＦ$_3$、－ＳＦ$_5$、－ＯＨ、－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル－ＮＨ$_2$、－ＮＯ$_2$、－Ｏ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_3$、－Ｓ－ＣＦ$_2$Ｈ、－Ｓ－ＣＦＨ$_2$、－ＳＨ、－Ｓ－Ｃ$_{1-5}$－アルキル、－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－（ＣＨ$_2$）－Ｃ（＝Ｏ）－ＯＨ、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－（ＣＨ$_2$）－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｎ（Ｃ$_{1-5}$アルキル）$_2$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{1-5}$－パーフルオロアルキル、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_2$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ－（Ｃ$_{1-5}$アルキル）$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－フェニル、－ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ$_2$、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル、シクロヘキシル、シクロペンチル、ピリジニル、－（ＣＨ$_2$）－ベンゾ［ｂ］フラニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、及びベンジルからなる群より選択され、群中、ピリジニル、シクロペンチル、シクロヘキシル、ピリダジニル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－フェニル、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＨ－フェニル、－Ｏ－フェニル、－Ｏ－ベンジル、フェニル、－（ＣＨ$_2$）－ベンゾ［ｂ］フラニル各基の環状部分は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置

換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、－ＯＨ、－ＣＦ$_{3}$、－ＳＦ$_{5}$、－ＮＯ$_{2}$、Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｏ－Ｃ$_{1-5}$アルキル、－Ｏ－ＣＦ$_{3}$、－Ｓ－ＣＦ$_{3}$、フェニル、及び－Ｏ－ベンジルからなる群より選択され；

【０３５２】

かつ上記のヘテロアリール基は、それぞれ独立して、随意に、環員として１個、２個、３個、４個、又は５個のヘテロ原子を含んでもよく、ヘテロ原子はそれぞれ独立して、酸素、窒素、及び硫黄からなる群より選択される。

【０３５３】

好ましくは、目論んでいる化合物において、Ｒ^{1}は、以下からなる群より選択される基を示す：フェニル、ナフチル、（１，３）－ベンゾジオキソリル、（１，４）－ベンゾジオキサニル、２Ｈ－クロメニル、チオフェニル、フラニル、ピロリル、ピラゾリル、ピラジニル、ピラニル、トリアゾリル、ピリジニル、イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、ベンゾ［ｂ］フラニル、ベンゾ［ｂ］チオフェニル、チアゾリル、［１，２，３］－チアジアゾリル、［１，２，４］－オキサジアゾリル、ベンゾ［２，１，３］チアジアゾリル、［１，２，３］－ベンゾチアジアゾリル、［２，１，３］－ベンゾオキサジアゾリル、［１，２，３］－ベンゾオキサジアゾリル、［１，２，３，４］－テトラヒドロナフチル、［１，２，３，４］－テトラヒドロキノリニル、［１，２，３，４］－テトラヒドロイソキノリニル、［１，２，３，４］－テトラヒドロキナゾリニル、［３，４］－ジヒドロ－２Ｈ－１，４－ベンゾオキサジニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピリダジニル、ピラジニル、ピリミジニル、インダゾリル、キナゾリニル、キノリニル、及びイソキノリニル。そのようなＲ^{1}基は、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、－ＣＮ、－ＣＦ$_{3}$、－ＳＦ$_{5}$、－ＯＨ、－Ｏ－ＣＨ$_{3}$、－Ｏ－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－Ｏ－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－ＮＯ$_{2}$、－Ｏ－ＣＦ$_{3}$、－Ｓ－ＣＦ$_{3}$、－Ｓ－ＣＦ$_{2}$Ｈ、－Ｓ－ＣＦＨ$_{2}$、－ＳＨ、－Ｓ－ＣＨ$_{3}$、－Ｓ－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－Ｓ－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$、－Ｓ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｓ－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－ＣＨ$_{3}$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{3}$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＨ$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＣＦ$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｃ$_{2}$Ｆ$_{5}$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－ＣＨ$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$）$_{2}$、－Ｓ（＝Ｏ）$_{3}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｓ（＝Ｏ）$_{3}$－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－ＮＨ－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｓ（＝Ｏ）$_{3}$－ＮＨ－ＣＨ$_{3}$、－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$－ＮＨ$_{2}$、－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$－ＮＨ－フェニル、及び－ベンジルからなる群より選択され、群中、フェニル又はベンジル各基の環状部分は、それぞれ独立して、随意に、１つ、２つ、３つ、４つ、又は５つの置換基で置換することができ、置換基はそれぞれ独立して、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、－ＣＦ$_{3}$、－ＳＦ$_{5}$、－ＮＯ$_{2}$、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、－Ｏ－ＣＨ$_{3}$、－Ｏ－Ｃ$_{2}$Ｈ$_{5}$、－Ｏ－ＣＨ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｏ－Ｃ（ＣＨ$_{3}$）$_{3}$、－Ｏ－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{3}$、－Ｏ－ＣＦ$_{3}$、－Ｓ－ＣＦ$_{3}$、フェニル、及び－Ｏ－ベンジルからなる群より選択される。

【０３５４】

目論んでいる化合物のＲ^{2}基が、Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－Ｒ^{3}；－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｒ^{4}；－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$Ｒ^{5}；－（ＣＨ$_{2}$）－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｒ^{6}；－（ＣＨ$_{2}$）－Ｏ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－Ｓ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－ＮＨ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－（ＣＨ$_{2}$）－Ｏ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－（ＣＨ$_{2}$）－Ｓ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－ＮＨ－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－Ｎ（ＣＨ$_{3}$）－Ｒ^{7}、－（ＣＨ$_{2}$）－（ＣＨ$_{2}$）－（ＣＨ$_{2}$）－Ｏ－Ｒ^{7}、

－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－Ｓ－Ｒ^7、－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－ＮＨ－Ｒ^7、－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－（ＣＨ$_2$）－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｒ^7、－（ＣＨ$_2$）－Ｏ－（ＣＨ$_2$）－Ｒ^7、－（ＣＨ$_2$）－Ｓ－（ＣＨ$_2$）－Ｒ^7、－（ＣＨ$_2$）－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）－Ｒ^7、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｒ^8、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－ＮＲ^{9}Ｒ^{10}を示すことも好ましい。

【０３５５】

α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体を阻害する化合物の例

本明細書中以下で説明するある特定の化合物は、ピコモル濃度～ナノモル濃度で、ＦＬＮＡの配列ＶＡＫＧＬ（配列番号１）を有するペンタペプチド領域に結合し、ＭＯＲを活性化させることができるということがわかっている。そうした化合物は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４との複合体形成を、阻害又は反転させることもできる。一方、Ａβ$_{42}$の存在は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＦＬＮＡとＴＬＲ４を含む複合体の量の増加を誘導する可能性があり、ならびにサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦα、及びＩＬ－１βのレベルを上げる可能性がある。

【０３５６】

ＦＬＮＡ結合量のＦＬＮＡ結合化合物を、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４の一方又は他方との複合体を含有する水性組成物に混合すると、これらのＦＬＮＡ含有複合体のＡβ$_{42}$に誘導された増加を減少させることができる。この混合により上記３種のサイトカインの産生がほとんど消滅し得ることも、ＦＩＴＣを用いる蛍光ＥＬＩＳＡアッセイで測定される。

【０３５７】

いくつかの実施形態において、ＦＬＮＡ結合化合物は、ＭＯＲアゴニストでもあることが好ましい。他の実施形態において、ＦＬＮＡ結合化合物は、ＭＯＲアゴニストではないことが好ましい。ある化合物の有するＭＯＲ活性化作用が、実施例２の表で用いられる２種の濃度のいずれかにおいて、［Ｄ－Ａｌａ２、Ｎ－ＭｅＰｈｅ４、Ｇｌｙ－ｏｌ］－エンケファリン（ＤＡＭＧＯ）が持つＭＯＲ活性化作用の約８０％未満であるかぎり、その化合物は、本明細書中、ＭＯＲアゴニストではないと定義される。

【０３５８】

考察

多くのＡＤ研究がα７ｎＡＣｈＲを介したＡβ$_{42}$シグナル伝達に注目してきたなかで、本発明は初めて、このシグナル伝達が、α・ｎＡＣｈＲと結合するＦＬＮＡ補充を必要とするという事実、及び下等動物モデル系のＡＤリンパ球、ＡＤ死後組織、又はＡβ$_{42}$治療後においてα７ｎＡＣｈＲと結合するＦＬＮＡが大きく増加するという事実（図１）を利用する。化合物Ｃ０１０５は、受容体ではなくＦＬＮＡに結合することで、アセチルコリンによるα７ｎＡＣｈＲの生理的活性化を妨害することも、α７ｎＡＣｈＲの感受性又は細胞表面発現を変化させることもなく、Ａβ$_{42}$の毒性シグナル伝達を遮断する。マウスモデルにおける、ならびにヒトＡＤリンパ球、ヒト死後ＡＤ、及びＡβ$_{42}$処理した対照組織における、多数のＡＤ関連神経病理に対する化合物Ｃ０１０５の効力は、ＦＬＮＡペンタペプチド標的の正当性を立証するとともに、Ａβ$_{42}$のα７ｎＡＣｈＲを介した異常シグナル伝達がＡＤ病理の主な機構であるとする見方を強くさせる。

【０３５９】

ＡＤリンパ球、ＡＤ死後の脳組織、又はＡβ$_{42}$治療は、ＦＬＮＡと、炎症性サイトカイン放出の原因となる自然免疫受容体であるＴＬＲ４との会合の劇的な増加も示す。マウスの脳にＡβ$_{42}$のＩＣＶ輸液を行うと、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、及びＩＬ－１βの産生が増加する。ＦＬＮＡ補充はＴＬＲ４のシグナル伝達を同様に助けるため、化合物Ｃ０１０５は、このＦＬＮＡ－ＴＬＲ４会合及びＡβ$_{42}$に誘導される炎症性サイトカイン放出も遮断する。すなわち、化合物Ｃ０１０５による治療は、Ａβ$_{42}$に誘導されるＩＬ－６産生を完全に消滅させ、ＴＮＦ－αレベル及びＩＬ－１βレベルを、それぞれ８６％及び８０％抑制した（図６）。Ａβ$_{42}$は、それ自身はＴＬＲ４と相互作用しないものの、ＣＤ１４と結合し、次いでＣＤ１４がＴＬＲ４と結合して、ＡＤで見られる炎症を起こす。［Ｒｅｅｄ

－Ｇｅａｇｈａｎ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２９：１１９８２－１１９９２ （２００９）。］

【０３６０】

（ＩＣＶ）輸液

マウスにＡβ$_{42}$をＩＣＶ輸液するアルツハイマー病モデルにおいて、Ａβ$_{42}$は、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４の両方に対するＦＬＮＡの強固な会合を誘導したが、それらの会合は、化合物Ｃ０１０５によりほぼ完全に遮断された。注目すべきことに、化合物Ｃ０１０５は、死後ＡＤ脳切片において、ならびにＡβ$_{42}$とともにインキュベートした同年齢の対照脳組織において、このＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ会合の反転も起こした。ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４会合がＡβ$_{42}$に誘導されるＴＬＲ４シグナル伝達に絶対不可欠であるという証拠は、化合物Ｃ０１０５が、このＦＬＮＡ－ＴＬＲ４会合を妨害することで、Ａβ$_{42}$のＩＣＶ輸液を受けたマウスにおいて、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１β放出をほぼ完全に遮断するというとおりである。

【０３６１】

具体的なＦＬＮＡ結合化合物

化合物は、Ｍｅｄｉｃｉｌｏｎ（Ｓｈａｎｇｈａｉ）が合成し提供した。本明細書中記載される３つの合成の他に、より詳細な合成が、米国特許出願公開第２００９／０１９１５７９号、第２０１０／０２７９９９６号、第２０１０／０２７９９９７号、第２０１０／０２８００６１号、第２０１１／０１０５４８１号、第２０１１／０１０５４８４号、第２０１１／０１０５４８７号、及び第２０１１／０１０５５４７号の１つ又は複数に記載され、これらの開示は参照として援用される。

【０３６２】

非対称（キラル）炭素を有する化合物又はその塩は、２つの鏡像異性体の形で存在し得る。本発明は、各鏡像異性体の両方に、及びそれらの混合物に関する；すなわち、両方の鏡像異性体形及びそれらの混合物に関する。更に、２つ以上のキラル中心が存在する場合、ジアステレオマーが形成され得る。

【０３６３】

系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、又はＣ－２、又は本明細書中のその他の式のいずれかの化合物について、目論んでいる化合物又は薬学的に許容可能な塩が、立体異性体の混合物として、好ましくはラセミ体又は他の様々な鏡像異性体及び／又はジアステレオ異性体混合物として得られる場合、そのような混合物は、当業者に既知の従来方法により分離させ、随意に単離することが可能である。実例として、例えば、クロマトグラフィーによる分離プロセスが有用であり、特に標準圧又は加圧下での液体クロマトグラフィープロセス、好ましくはＭＰＬＣ法およびＨＰＬＣ法が有用であり、ならびに分別再結晶を含む方法も有用である。分離は、特に個々の鏡像異性体の分離を含むことができ、例えば、ジアステレオ異性体塩を、キラルＨＰＬＣにより、又はキラル酸（例えば、（＋）－酒石酸、（－）－酒石酸、又は（＋）－１０－カンファースルホン酸）を用いた結晶化により分離するものである。キラル塩形成により分離した鏡像異性体は、使用時に光学不活性又はラセミの薬学的に許容可能な塩に容易に変換することができる。

【０３６４】

系列Ａ、Ｂ、Ｃ－１、又はＣ－２の化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、本発明のプロセスにおいて、鏡像異性体として純粋な形、すなわち、（Ｓ）もしくは（Ｒ）配置又はｄ及びｌ型で、あるいは（Ｓ，Ｒ）又は（ｄ，ｌ）配置で示されるラセミ混合物の形で、あるいは１種又は複数のジアステレオマーとして、及びそれらの混合物の形で、随意に使用されるものとする。

【０３６５】

すなわち、目論んでいる化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、随意に１種又は複数の形で存在することができる。例として、化合物又はその塩は、個々の鏡像異性体又はジアステレオ異性体であることが可能である。目論んでいる化合物又はその塩は、立体異性体の混合物として存在することもできる。目論んでいる化合物又は塩は、ラセミ混合物と

して存在することもできる。

【０３６６】

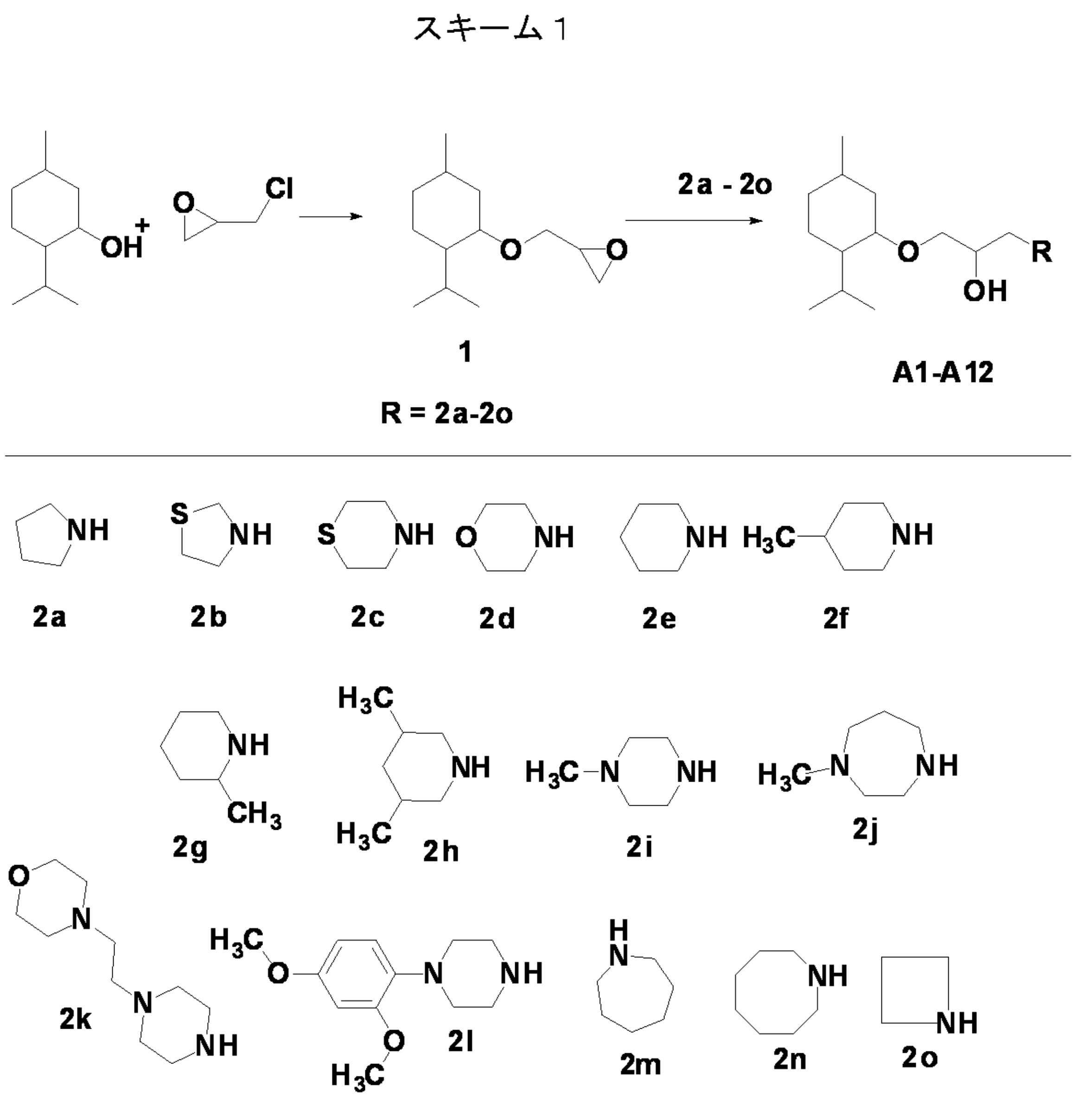
目論んでいる方法における活性成分として有用な化合物は、容易に合成できる。系列Ａの化合物について、合成スキームの例（スキーム１）を以下に示す。好適な種類の化合物について同様なスキームを、本明細書中以下に示す。

【０３６７】

スキーム１に示すＤ－メントールの代わりにフェノール又は置換フェノールを出発物質に用いることで、フェノール化合物で同様な合成を行うことができる。別のシクロヘキサノール又はシクロヘキセノールも、Ｄ－メントールの代わりに用いることができる。化合物１とアミンの反応で形成されるアルコールは、既知の方法により容易に酸化させることができる。

【０３６８】

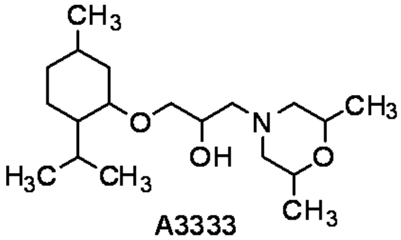
【化３９】

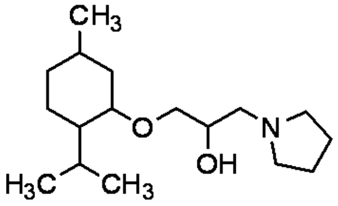


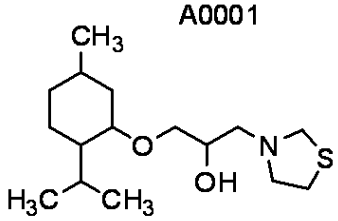
【０３６９】

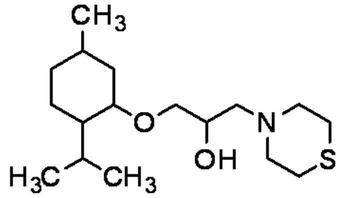
【表２】

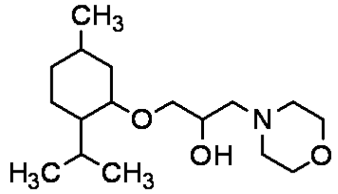
系列Ａの化合物の表

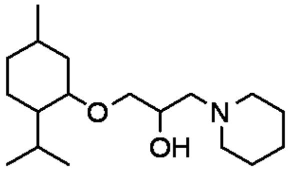

A3333

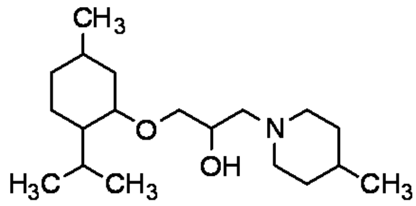

A0001

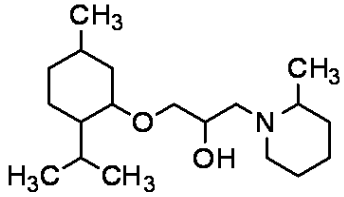

A0002

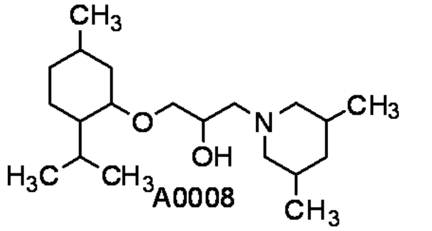

A0003

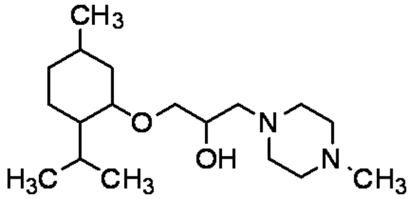

AOOO4

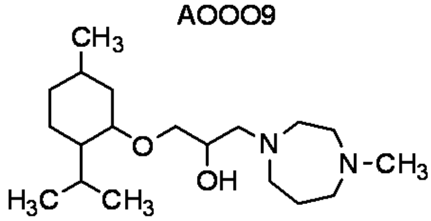

A0005

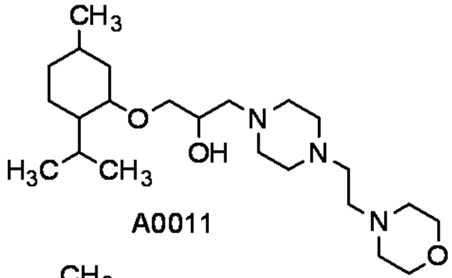

A0006

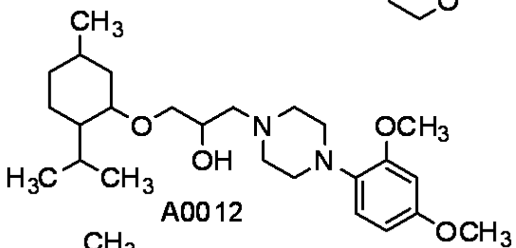

A0007

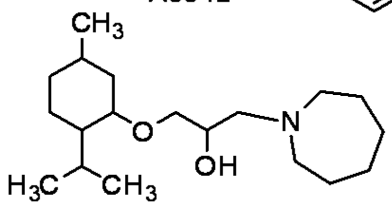

A0008


AOOO9

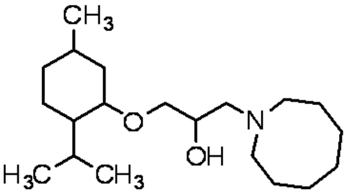

A0010


A0011

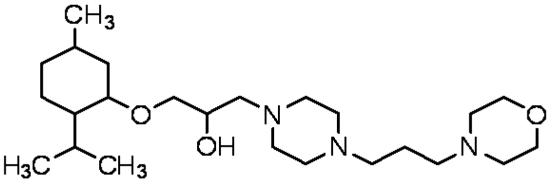

A0012


A0013

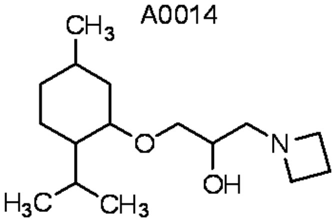
系列Ａの化合物の表（続き）



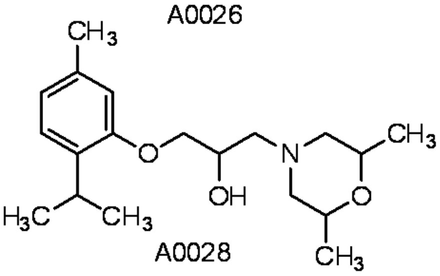
A0014



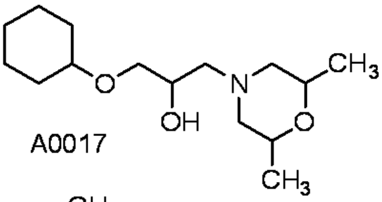
A0026



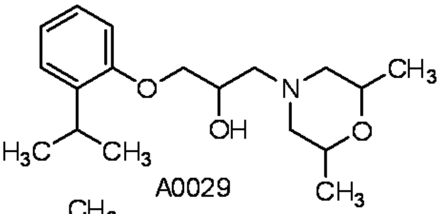
A0015



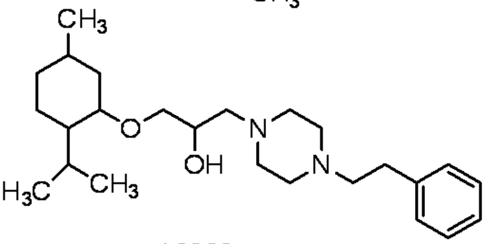
A0028



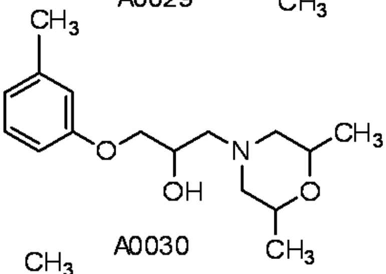
A0017



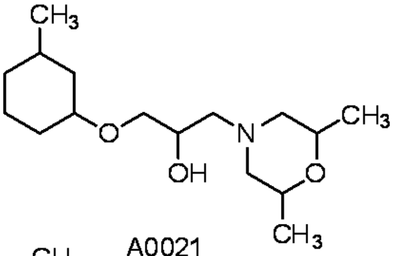
A0029



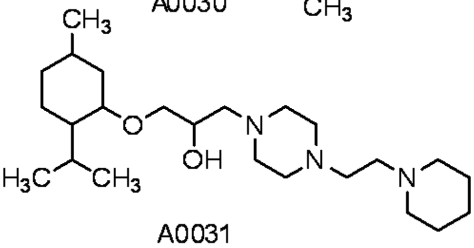
A0020



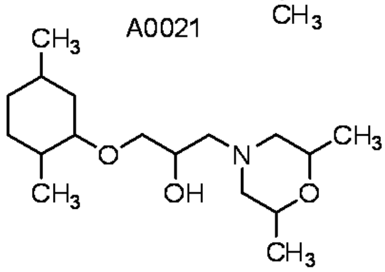
A0030



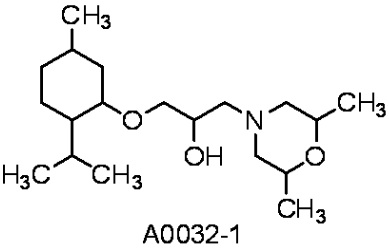
A0021



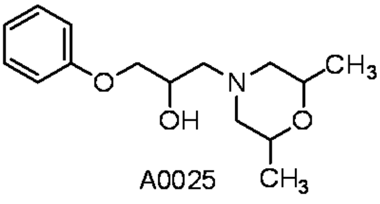
A0031



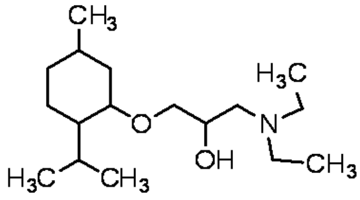
A0022



A0032-1

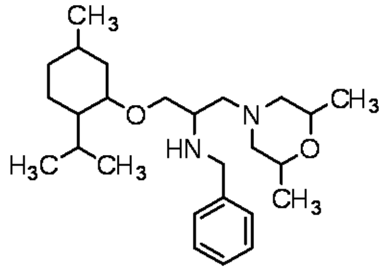


A0025

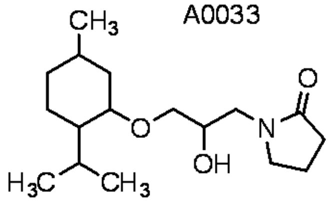


A0032

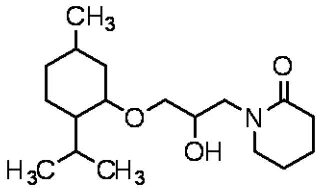
系列Ａの化合物の表（続き）



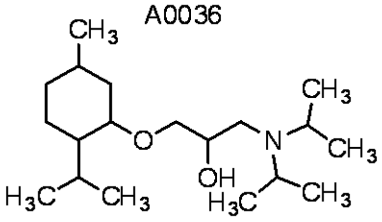
A0033



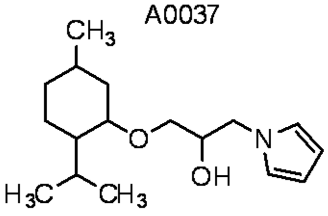
A0035



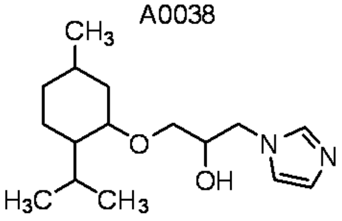
A0036



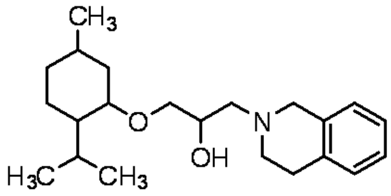
A0037



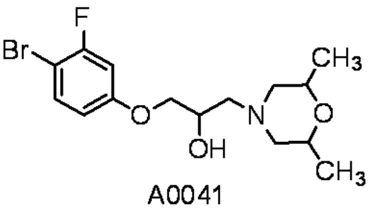
A0038



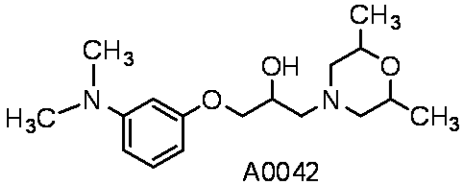
A0039



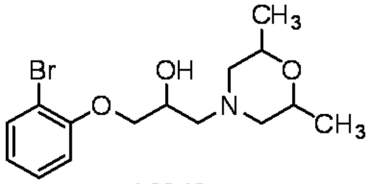
A0040



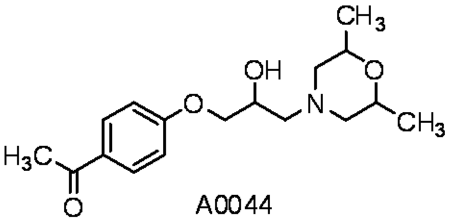
A0041



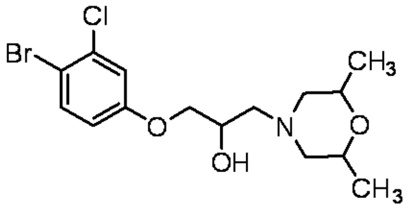
A0042



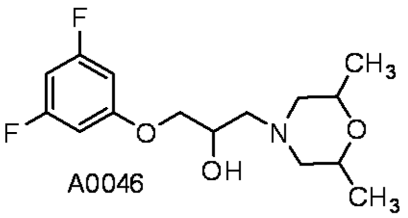
A0043



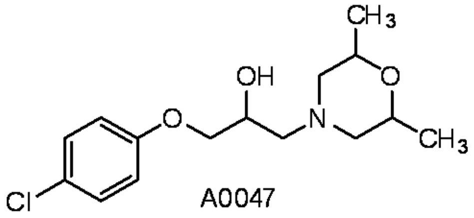
A0044



A0045

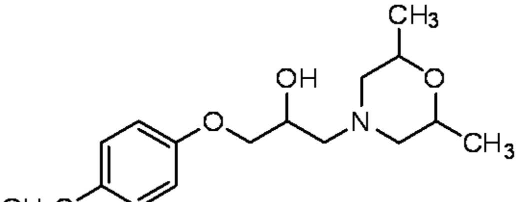


A0046

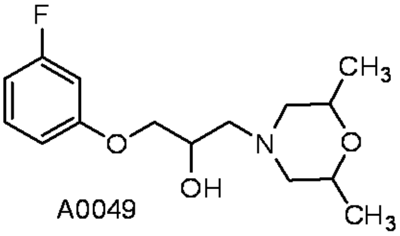


A0047

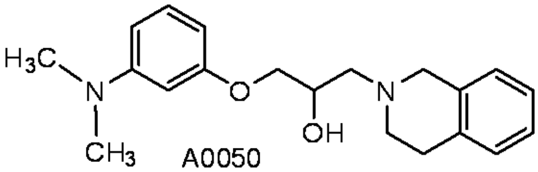
系列Ａの化合物の表（続き）



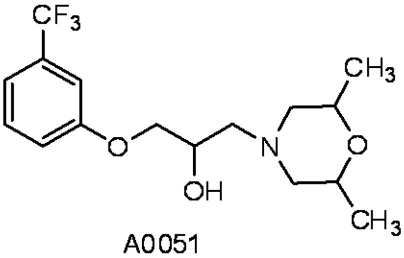
A0048



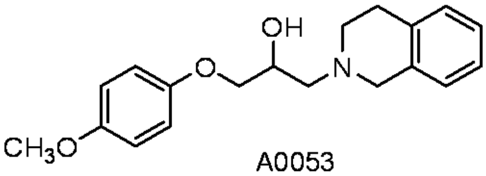
A0049



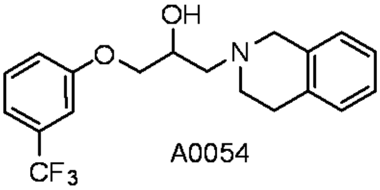
A0050



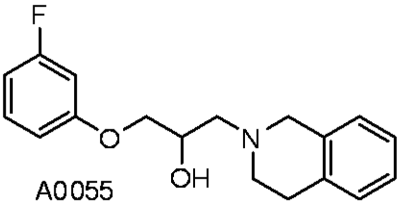
A0051



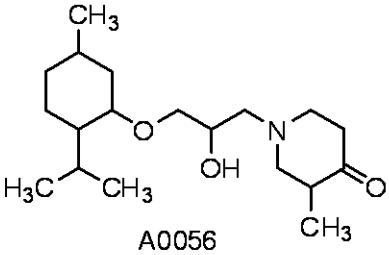
A0053



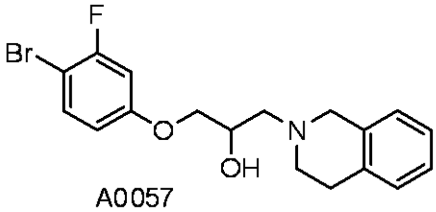
A0054



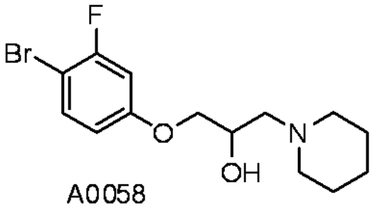
A0055



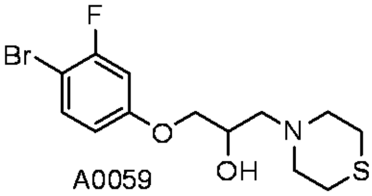
A0056



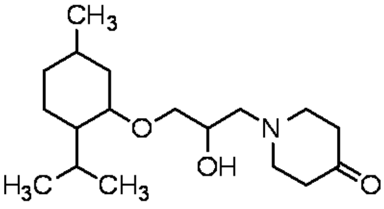
A0057



A0058

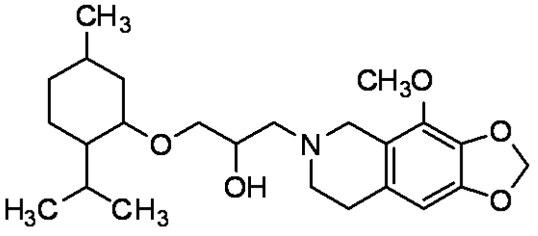


A0059

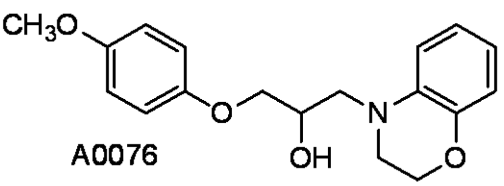


A0060

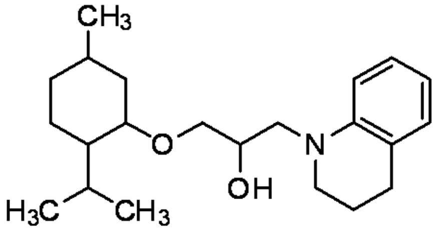
系列Ａの化合物の表（続き）



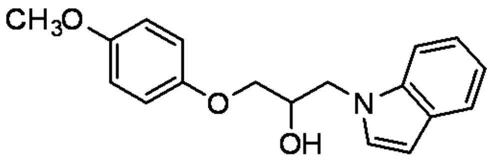
A0061



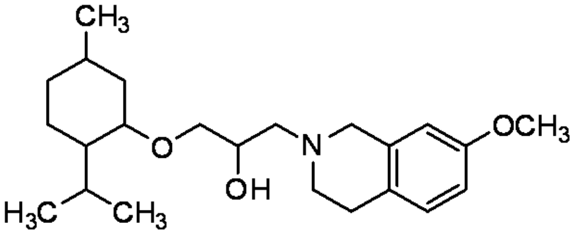
A0076



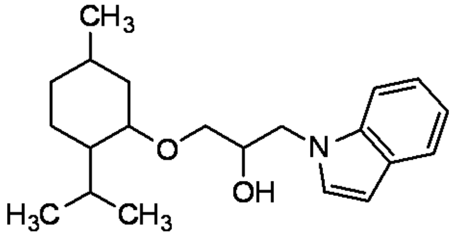
A0068



A0077



A0075



A0078

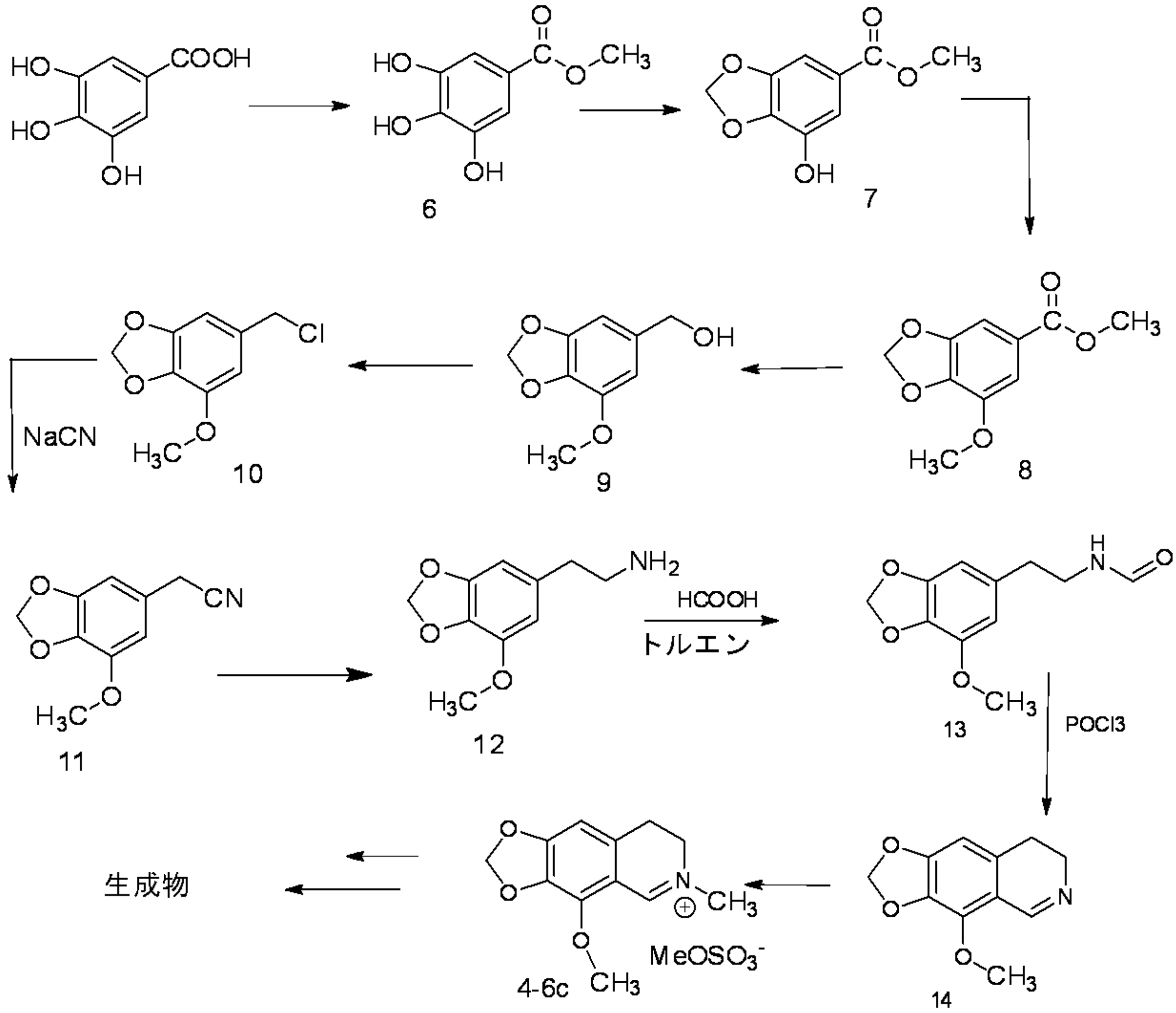
【０３７０】

系列Ｂの化合物は、以下のスキーム２に示す合成経路に従って調製することができる。以下に示す例示の合成スキームは、目論んでいる化合物の第一の部分を調製するためのものであり、強塩基（ナトリウムエトキシドなど）の存在下で適切な置換メチルケトン化合物と反応させることにより、第二の部分を付加させる。得られるケトン体は、水素化ホウ素ナトリウムを用いるなどの穏やかな還元により、対応するアルコール体に変換することができる。ケトン体又はアルコール体は、アルキル化剤（ヨウ化メチルなど）を用いて、第四級窒素原子含有化合物に変換することができる。

【０３７１】

【化４０】

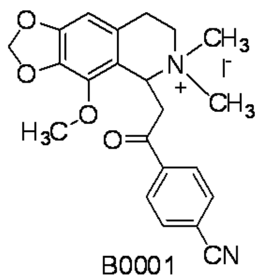
スキーム２

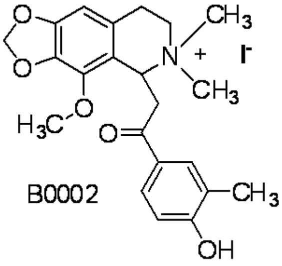


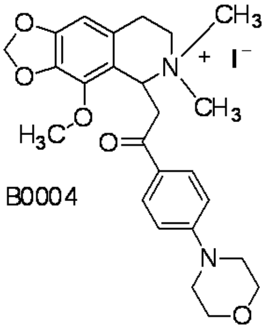
【０３７２】

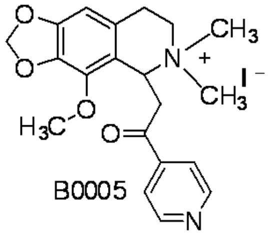
【表３】

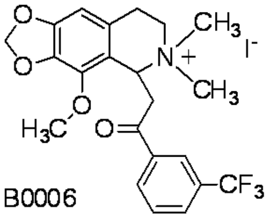
系列Ｂの化合物の表

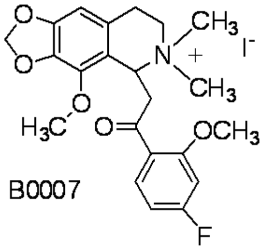

B0001

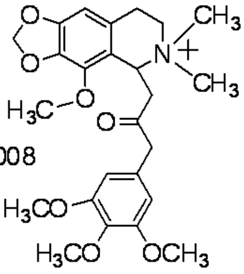

B0002

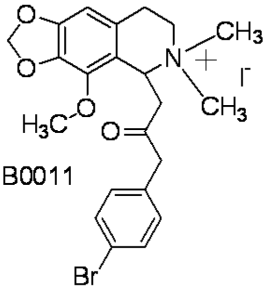

B0004

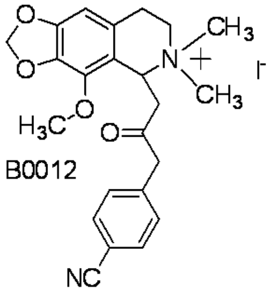

B0005

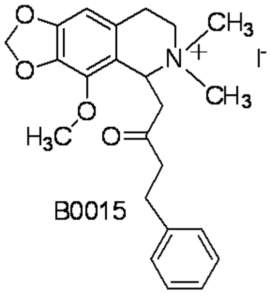

B0006

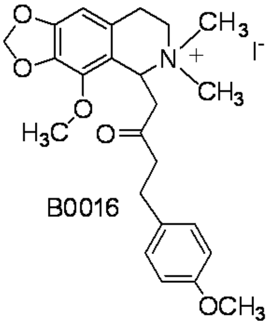

B0007

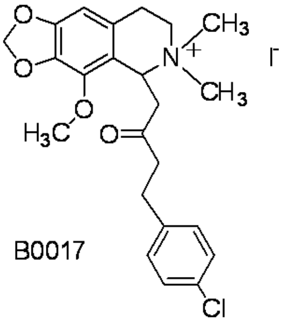

B0008

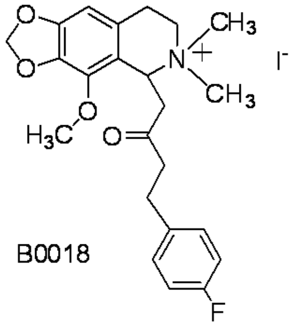

B0011

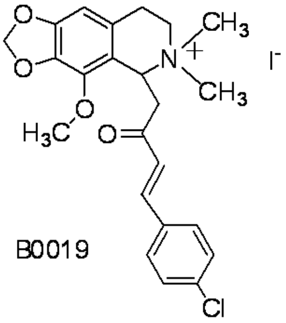

B0012

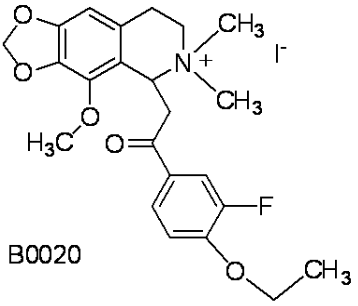

B0015


B0016

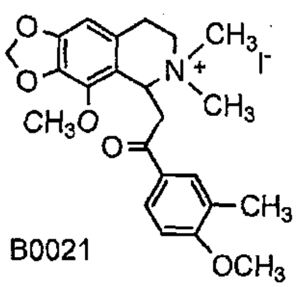

B0017

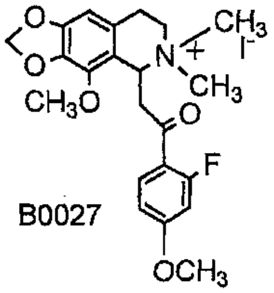

B0018

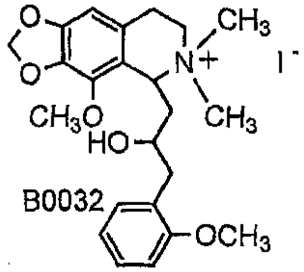

B0019

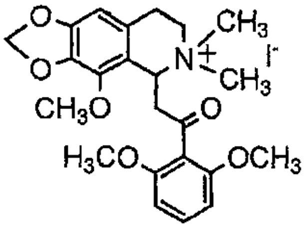

B0020

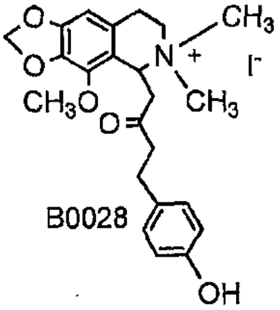
系列Ｂの化合物の表（続き）

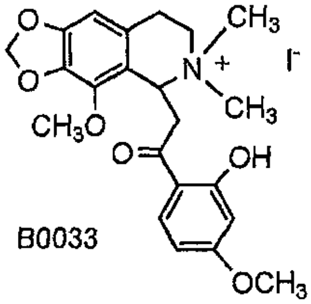

B0021

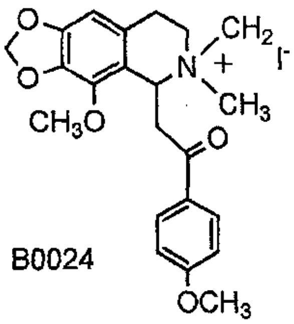

B0027

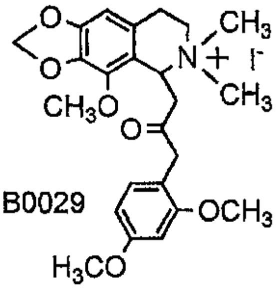

B0032

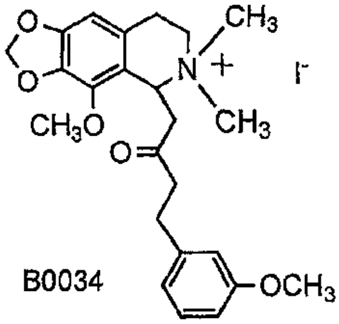

B0023

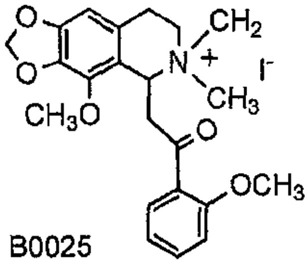

B0028

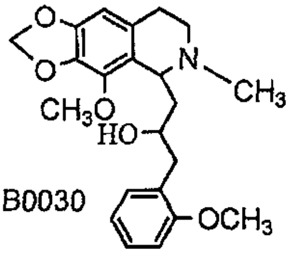

B0033

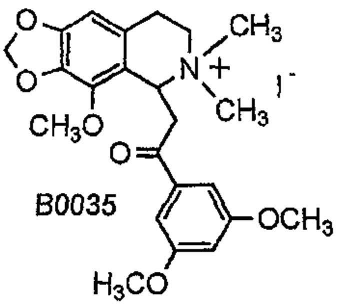

B0024

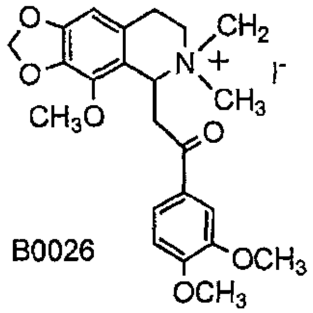

B0029

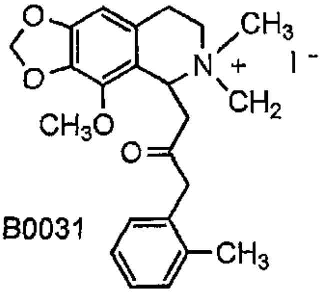

B0034

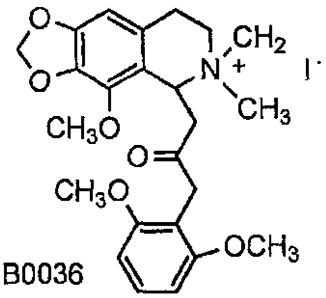

B0025


B0030

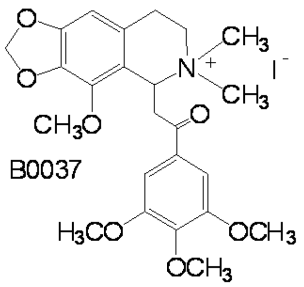

B0035


B0026

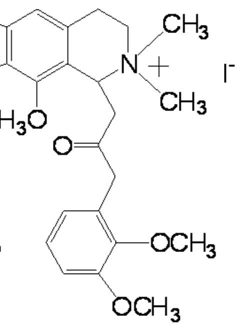

B0031


B0036

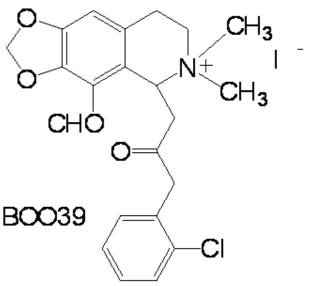
系列Ｂの化合物の表（続き）



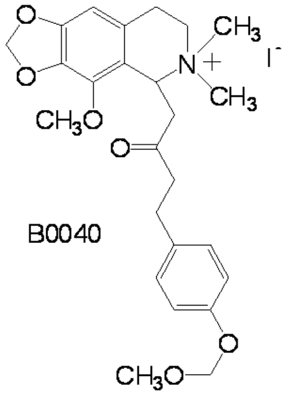
B0037



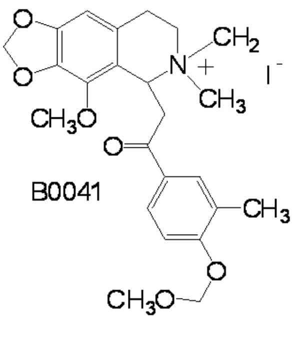
B0038



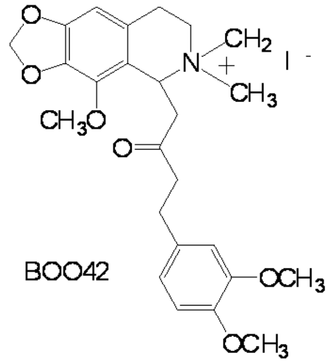
BOO39



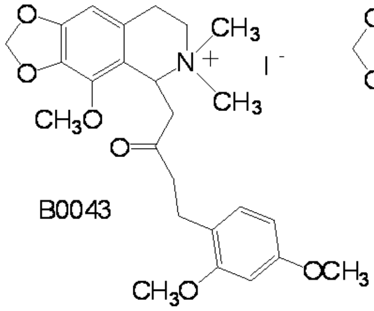
B0040



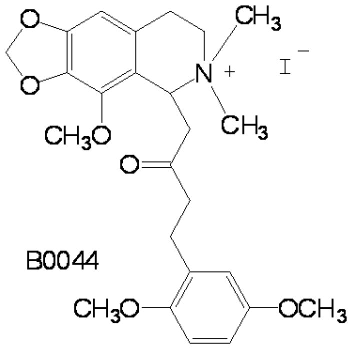
B0041



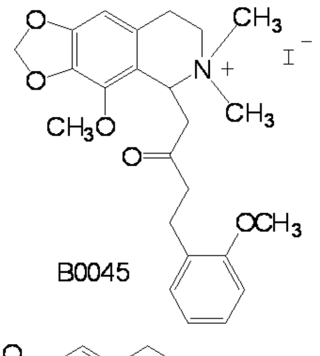
BOO42



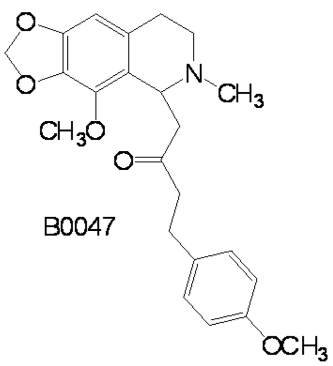
B0043



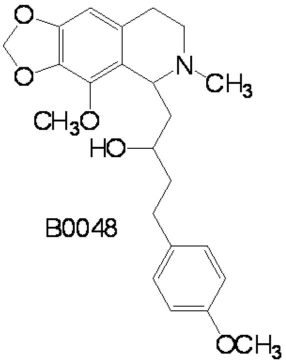
B0044



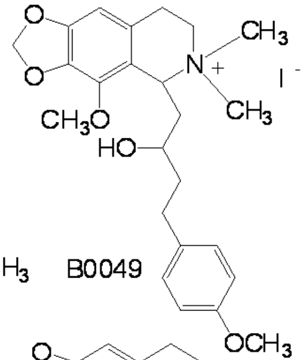
B0045



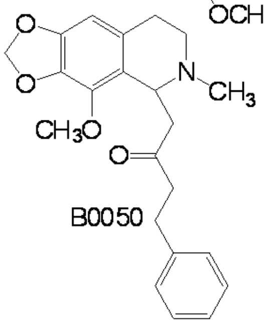
B0047



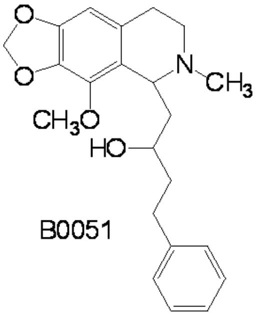
B0048



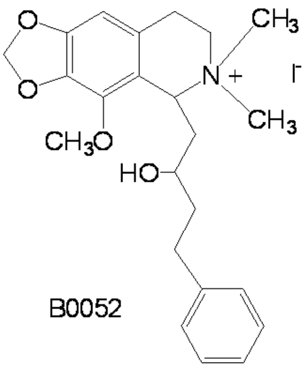
B0049



B0050

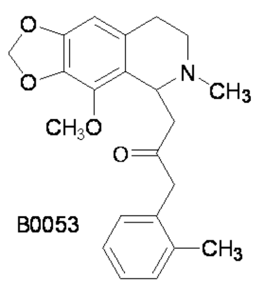


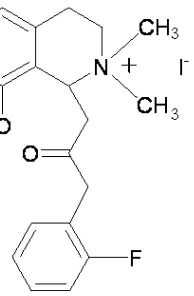
B0051

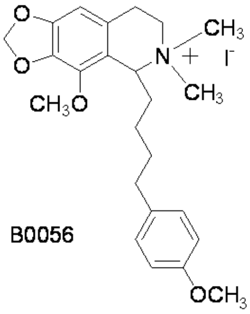


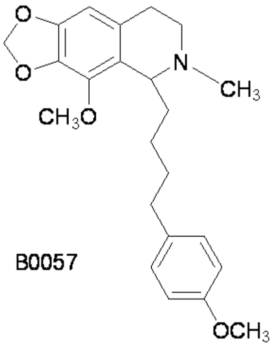
B0052

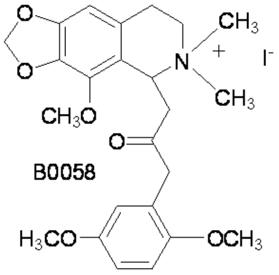
系列Ｂの化合物の表（続き）

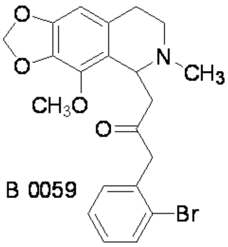

B0053

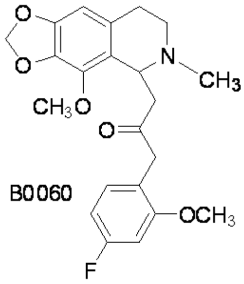

B0055

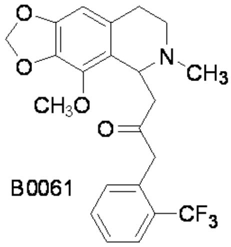

B0056

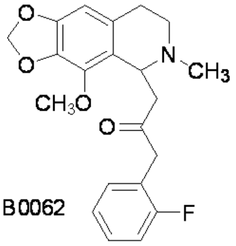

B0057

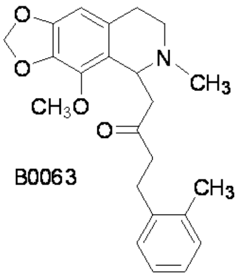

B0058

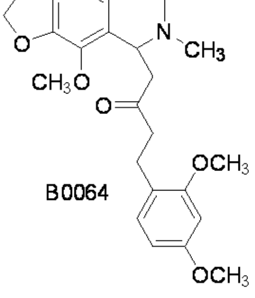

B 0059

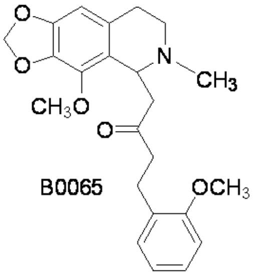

B0060

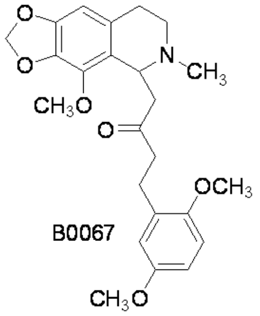

B0061

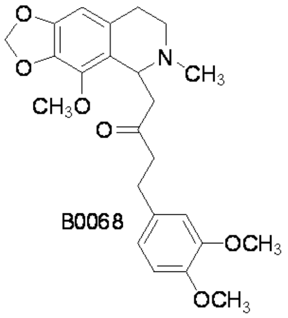

B0062

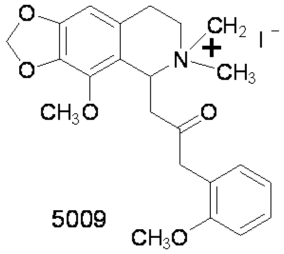

B0063

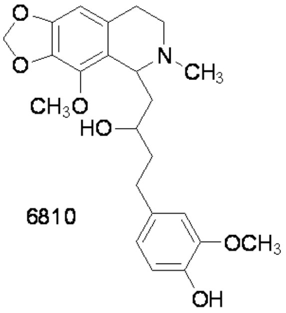

B0064


B0065


B0067


B0068


5009


6810

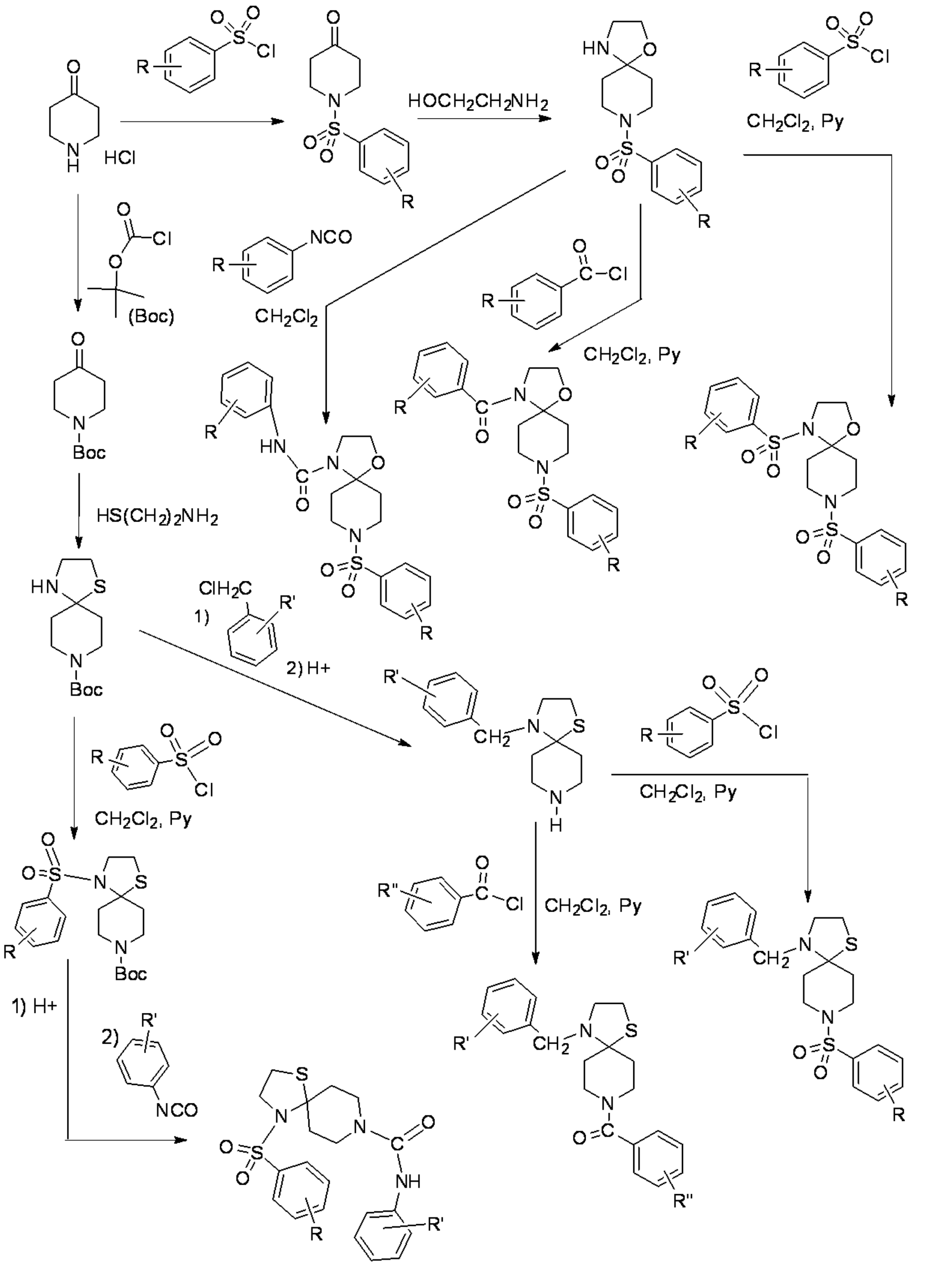
【０３７３】

様々な置換基及び環原子を有する系列Ｃ（Ｃ－１及びＣ－２両方）の化合物を調製するための合成スキームの例を以下に示す。このスキームは、２つのカルボニル連結部を有する化合物の調製、及び示されているものとは反対の配置で１つのカルボニル連結部と１つのスルホニル連結部を有する化合物の調製にも容易に適合させることができる。エタノールアミン又はチオエタノールアミンをエチレンジアミン又はＮ－メチルエチレンジアミンに置き換えて、対応する二窒素化合物を調製することができる。２－アミノアセトアミド又はＮ－置換アセトアミド又はプロピオンアミドを用いた同様な置き換えにより、対応するアミノアミド含有環系が得られる。

【０３７４】

【化４１】

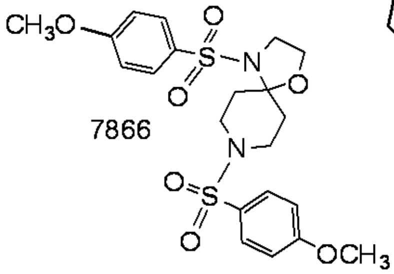
スキーム３



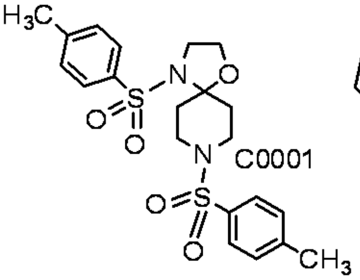
【０３７５】

【表４】

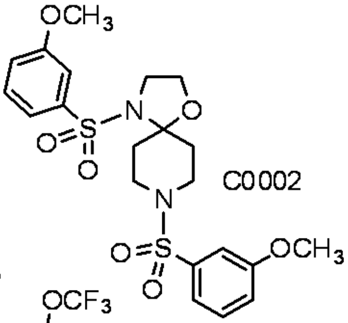
系列Ｃ－１の化合物の表



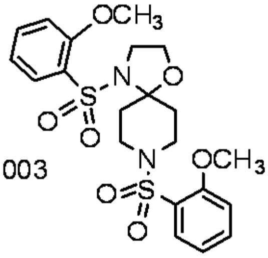
7866



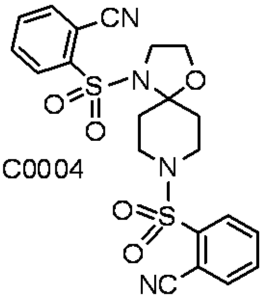
C0001



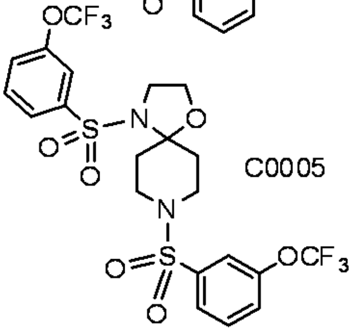
C0002



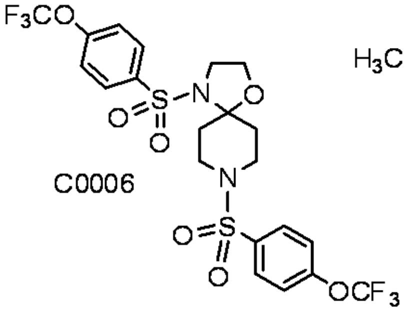
C0003



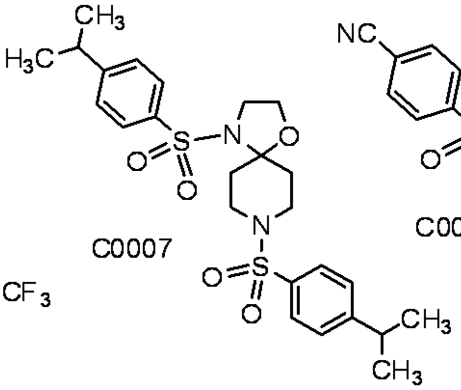
C0004



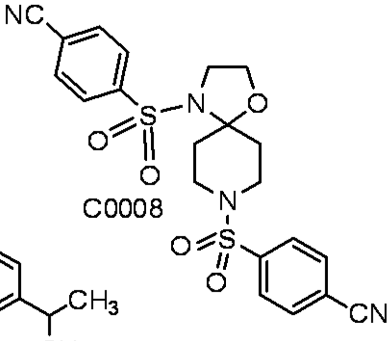
C0005



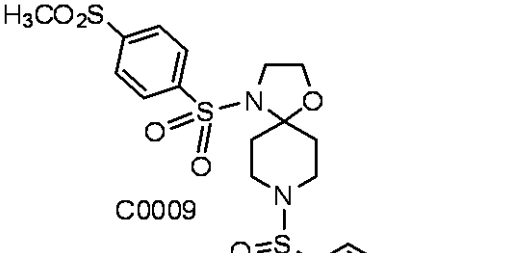
C0006



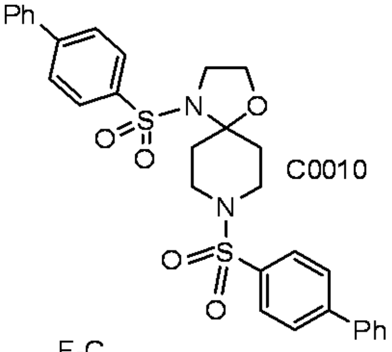
C0007



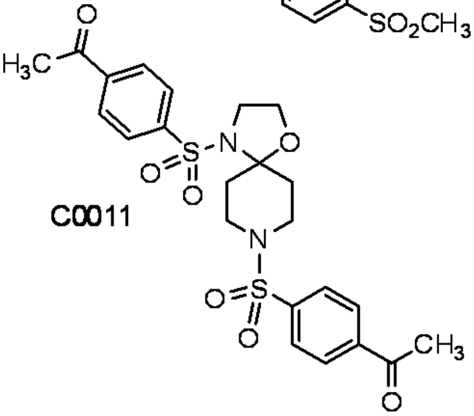
C0008



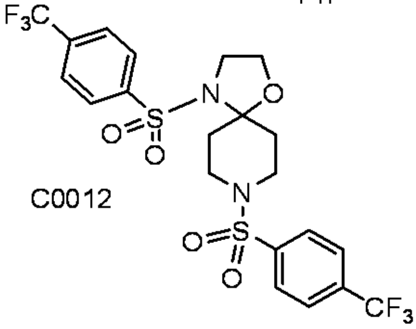
C0009



C0010

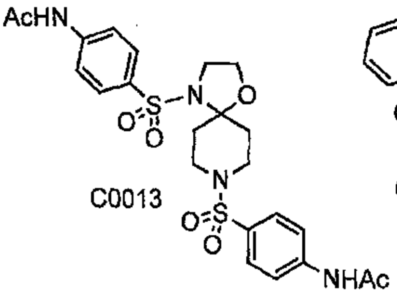


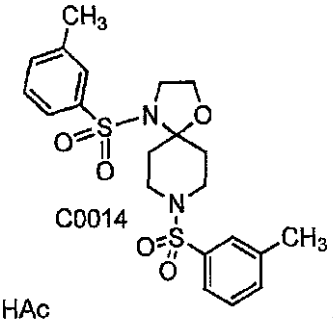
C0011

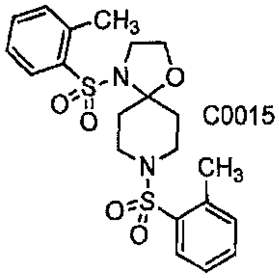


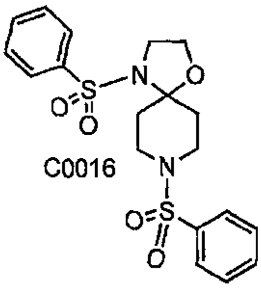
C0012

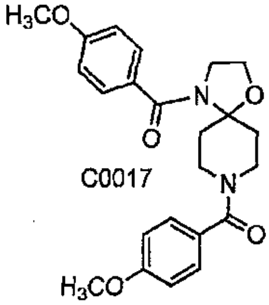
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）

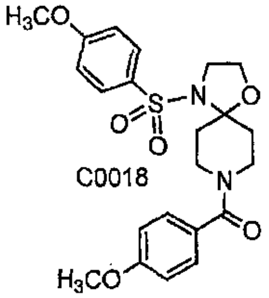

C0013

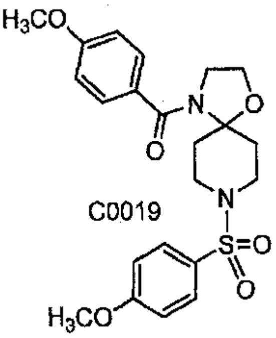

C0014

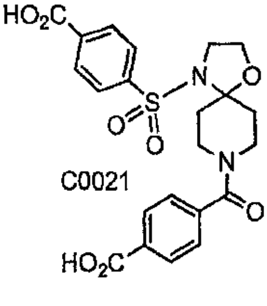

C0015

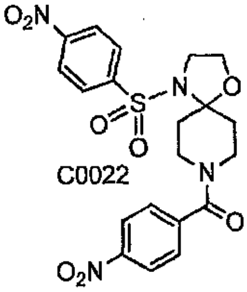

C0016

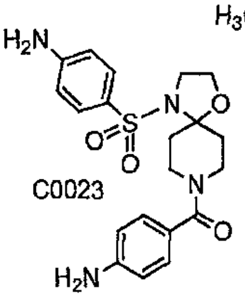

C0017

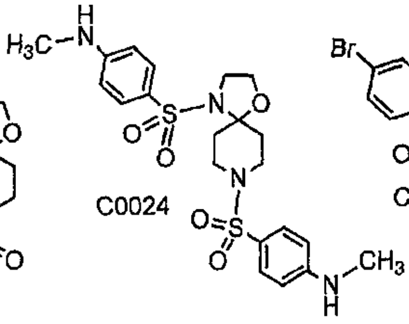

C0018

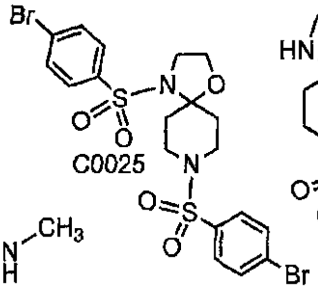

C0019

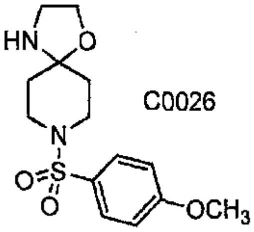

C0021

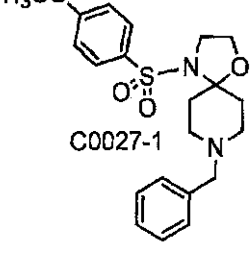

C0022

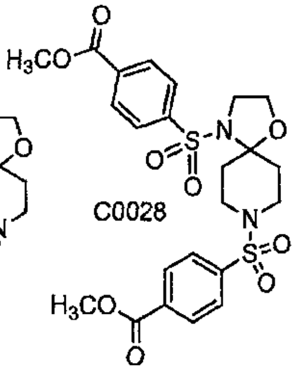

C0023

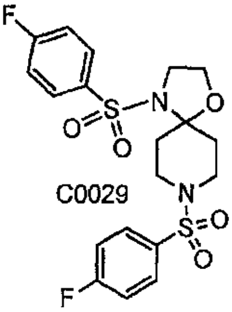

C0024

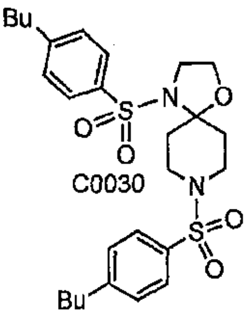

C0025


C0026

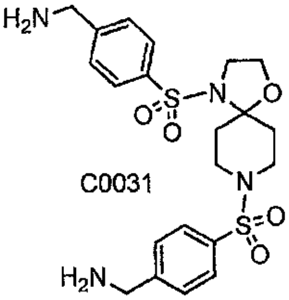

C0027-1


C0028

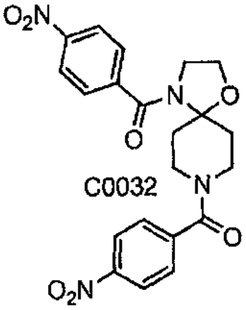

C0029


C0030

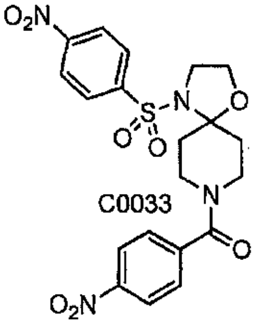
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）



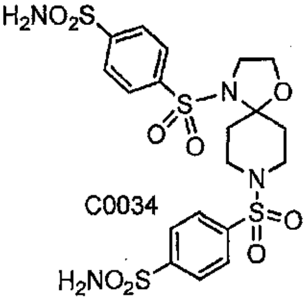
C0031



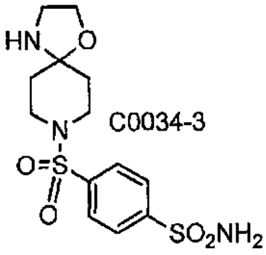
C0032



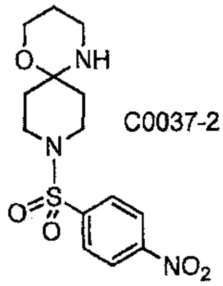
C0033



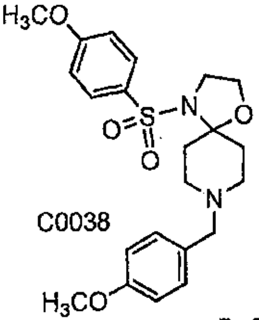
C0034



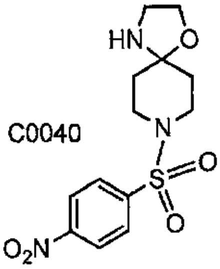
C0034-3



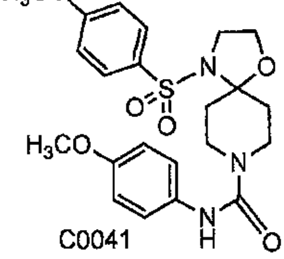
C0037-2



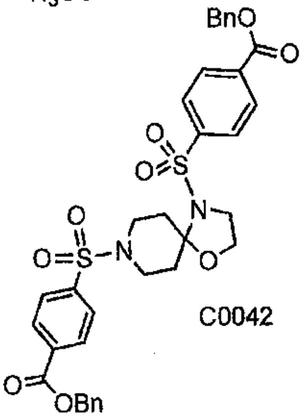
C0038



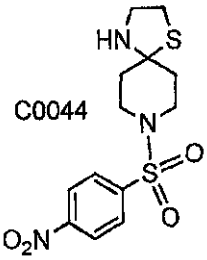
C0040



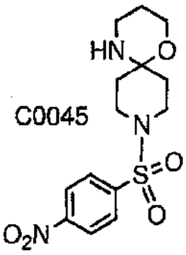
C0041



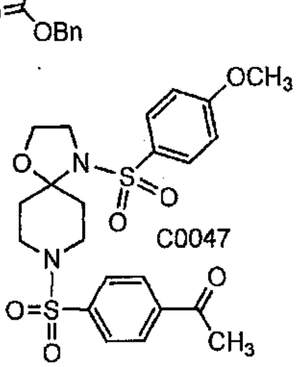
C0042



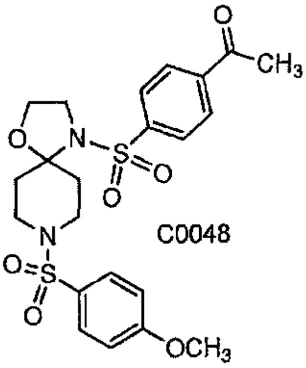
C0044



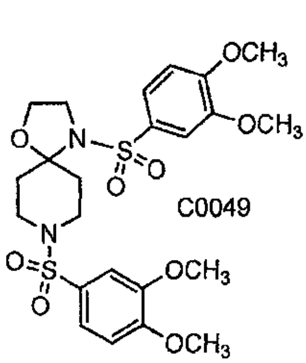
C0045



C0047

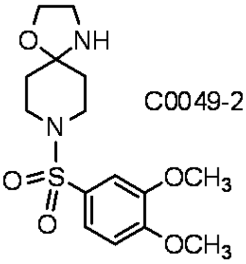


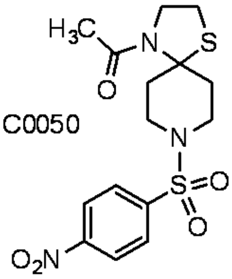
C0048

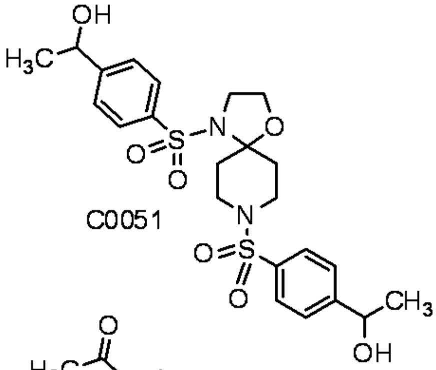


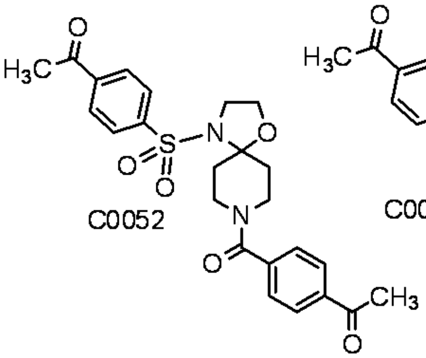
C0049

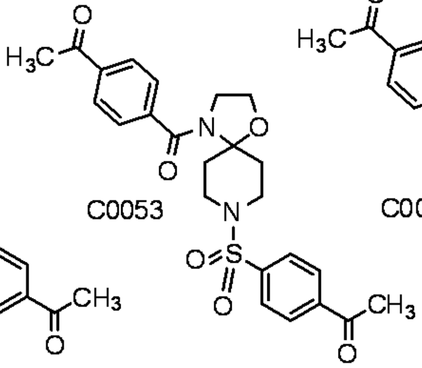
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）

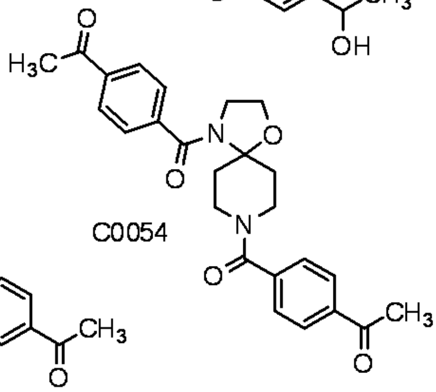

C0049-2

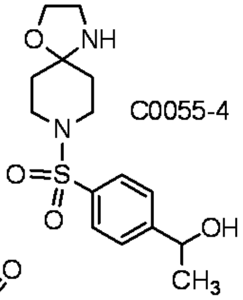

C0050

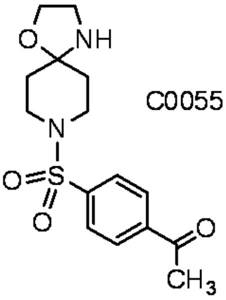

C0051

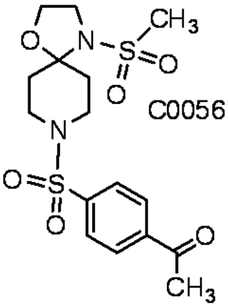

C0052

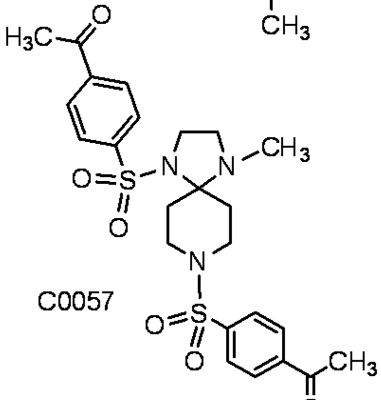

C0053

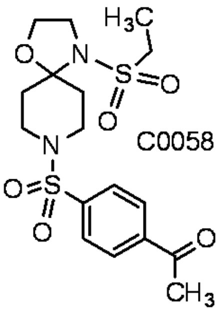

C0054

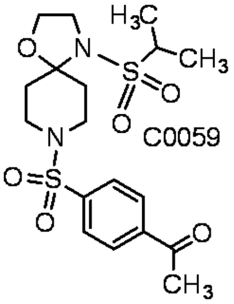

C0055-4

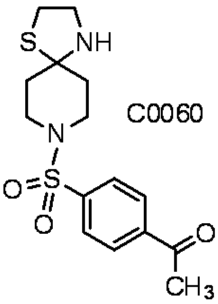

C0055

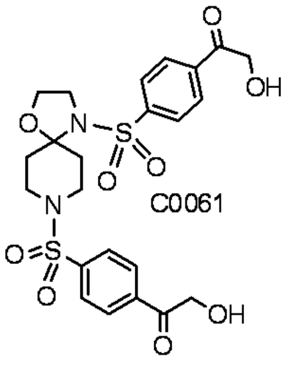

C0056

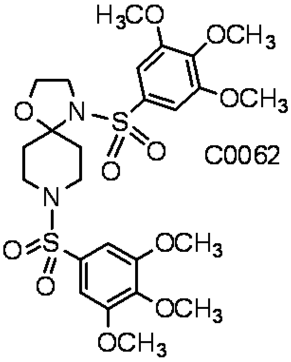

C0057


C0058

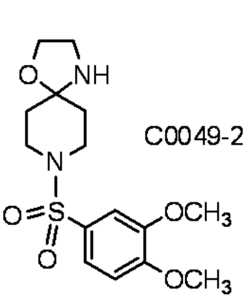

C0059


C0060

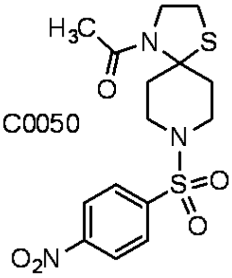

C0061


C0062

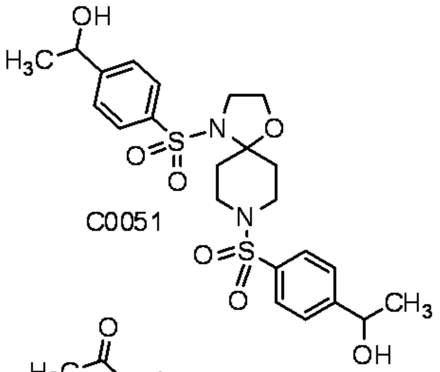
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）



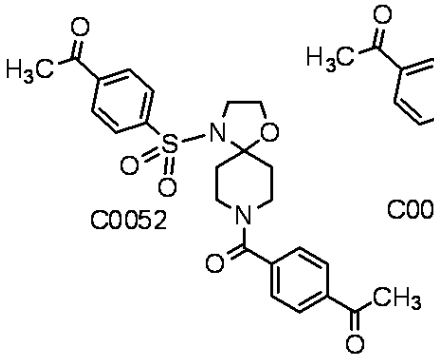
C0049-2



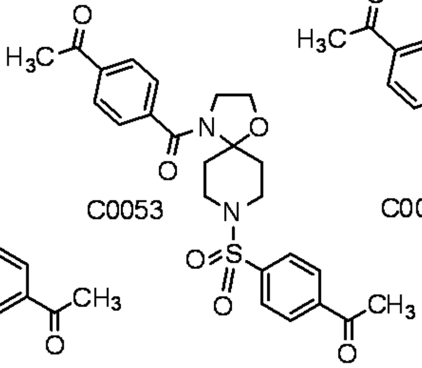
C0050



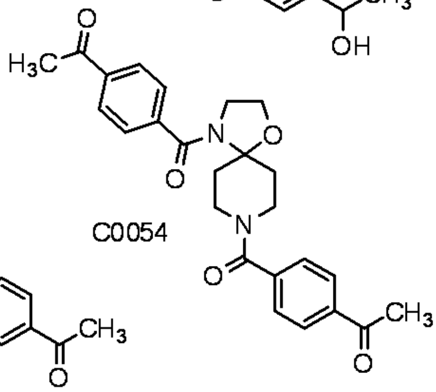
C0051



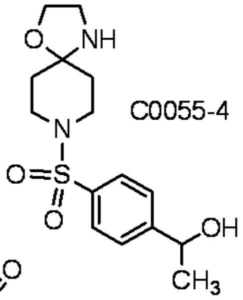
C0052



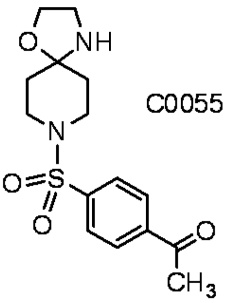
C0053



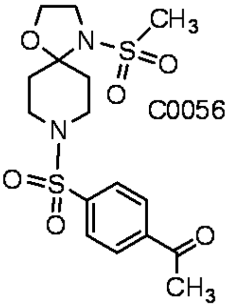
C0054



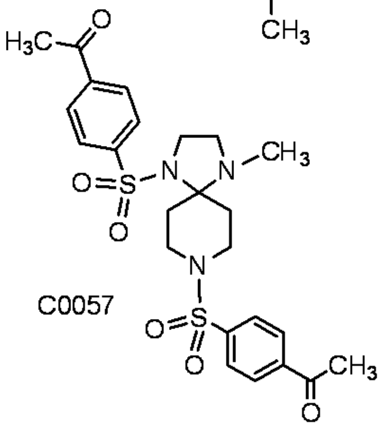
C0055-4



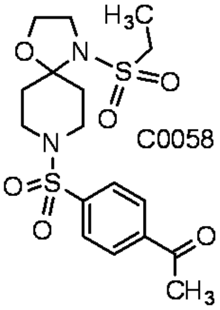
C0055



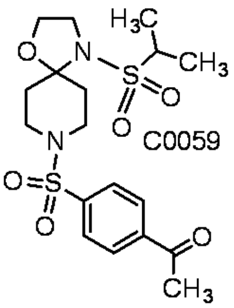
C0056



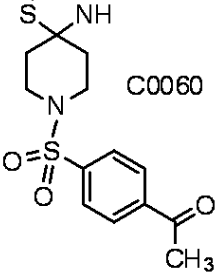
C0057



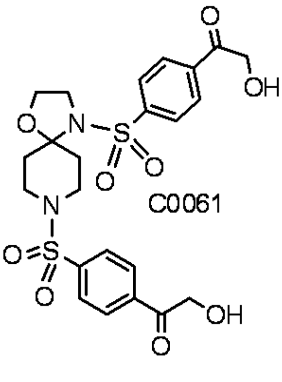
C0058



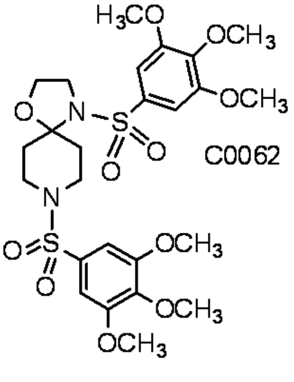
C0059



C0060

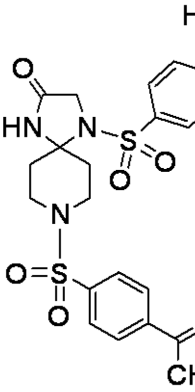


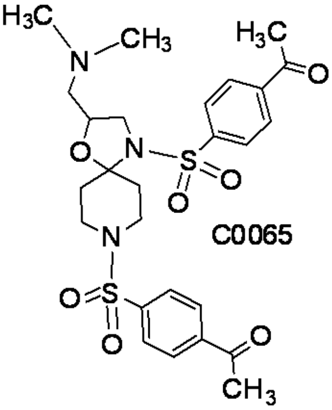
C0061

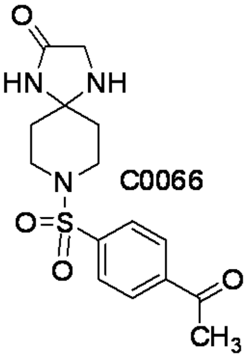


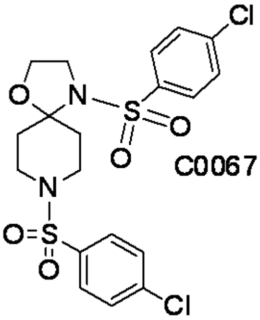
C0062

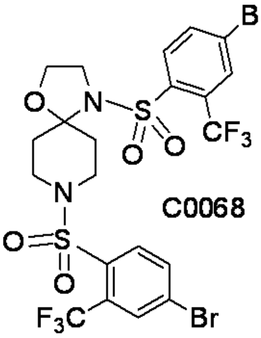
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）

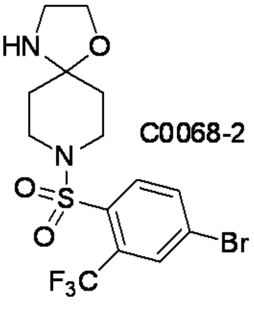

C0064

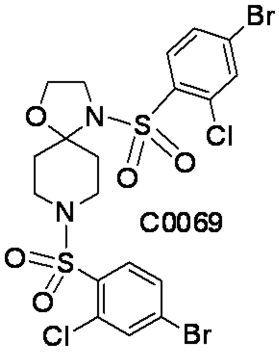

C0065

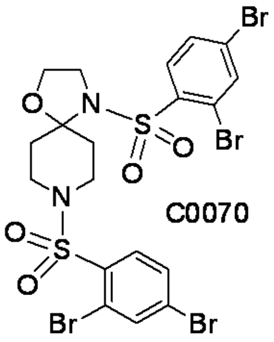

C0066

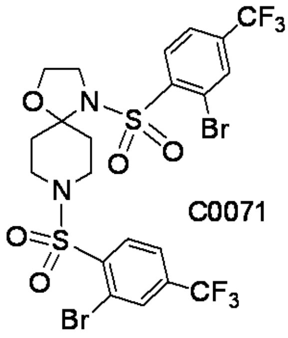

C0067

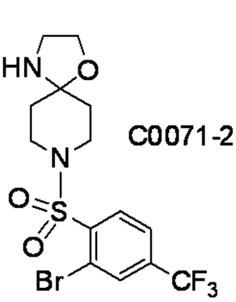

C0068

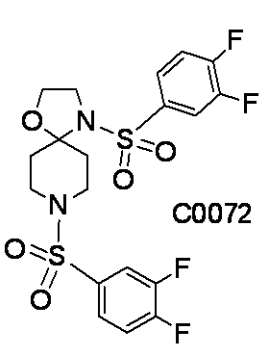

C0068-2

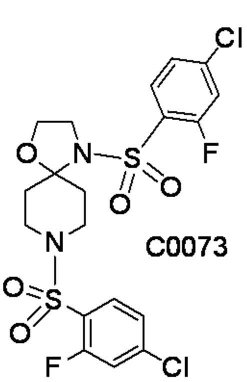

C0069


C0070

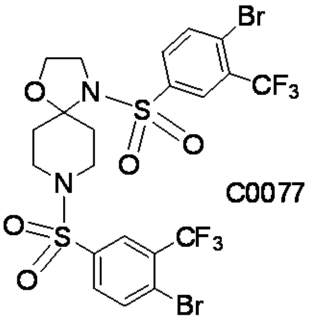

C0071

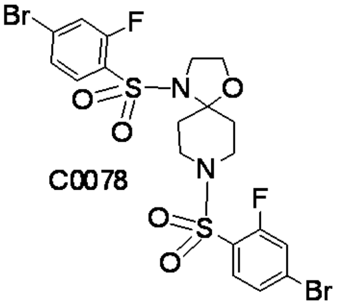

C0071-2

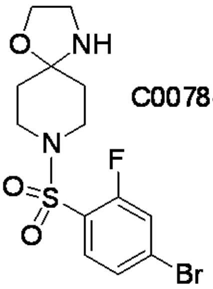

C0072

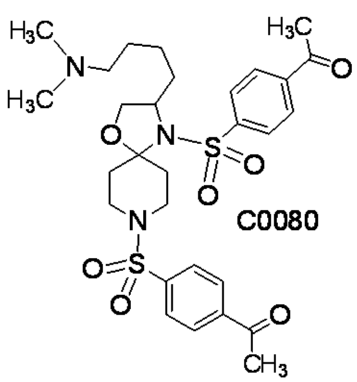

C0073

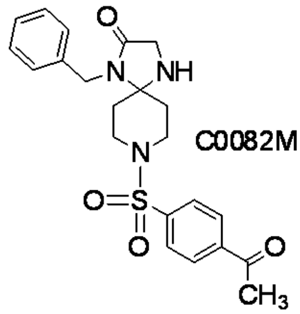
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）

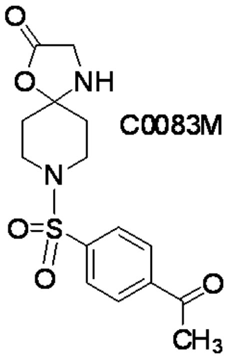

C0077

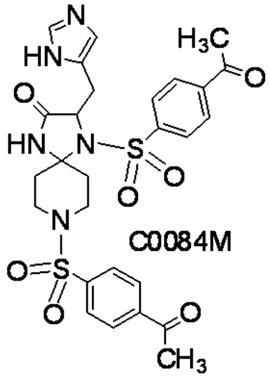

C0078

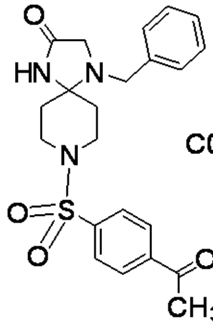

C0078-2

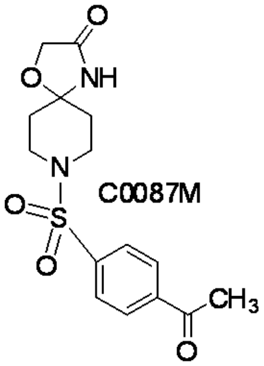

C0080

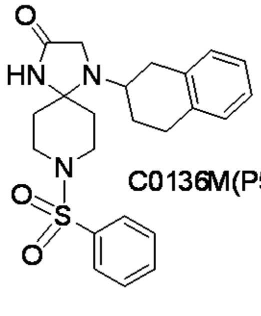

C0082M

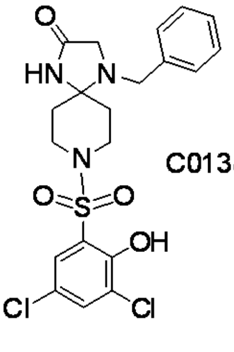

C0083M

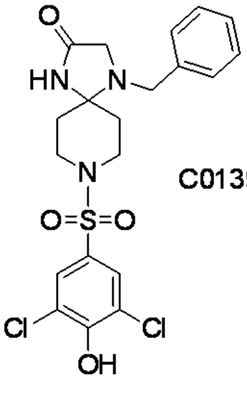

C0084M


C0085M

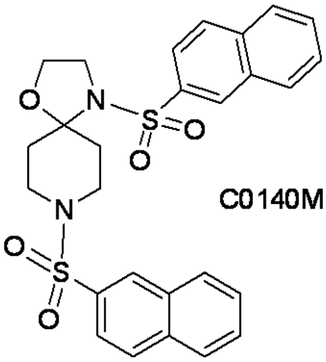

C0087M


C0136M(P5)

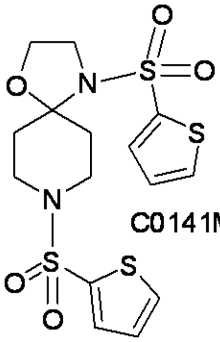

C0138M


C0139M

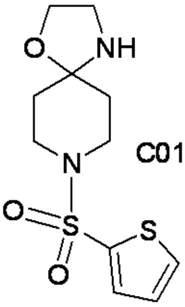
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）



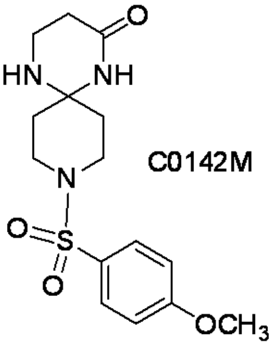
C0140M



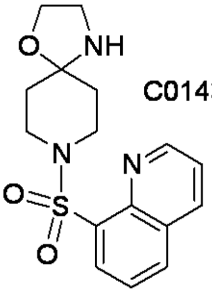
C0141M



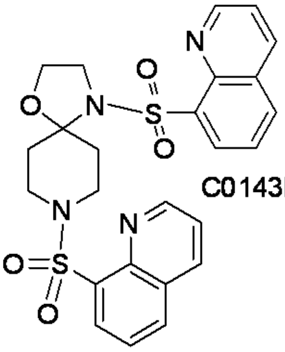
C0141M-2



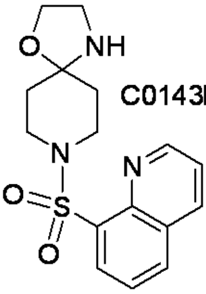
C0142M



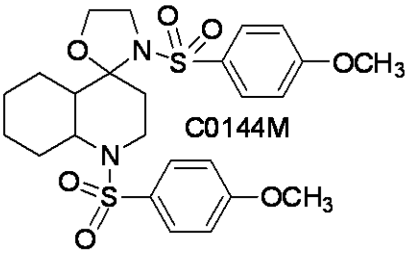
C0143M-2



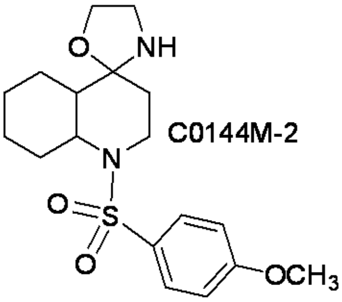
C0143M



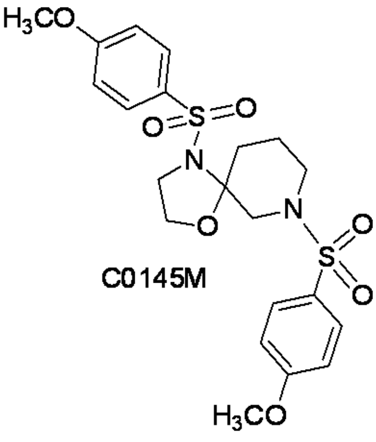
C0143M-2



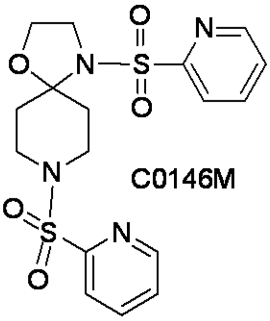
C0144M



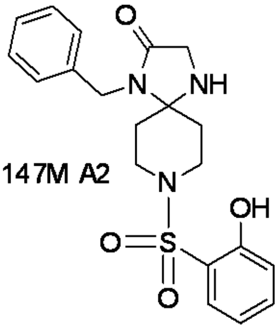
C0144M-2



C0145M

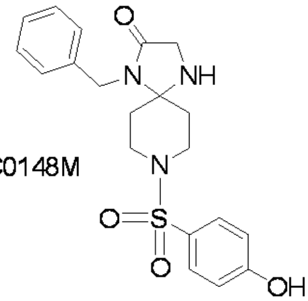


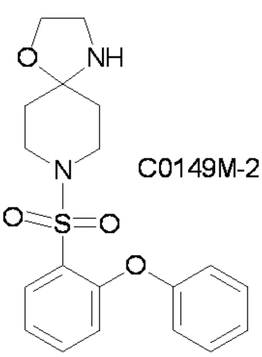
C0146M

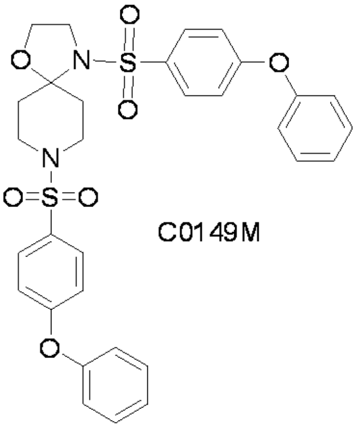


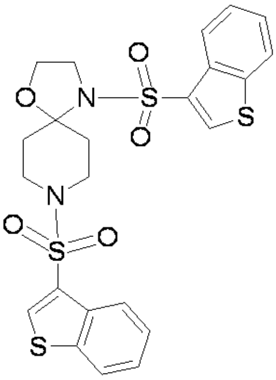
C0147M A2

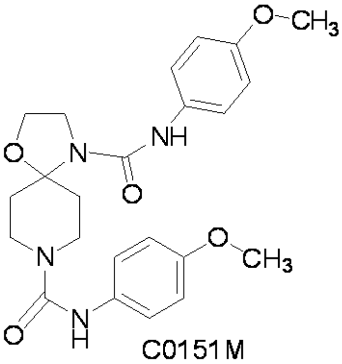
系列Ｃ－１の化合物の表（続き）

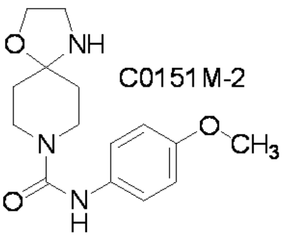

C0148M

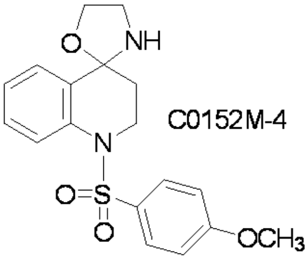

C0149M-2

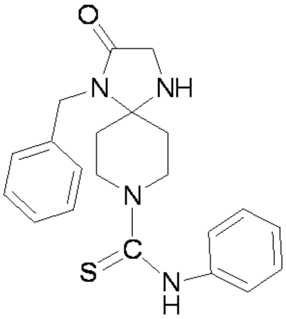

C0149M

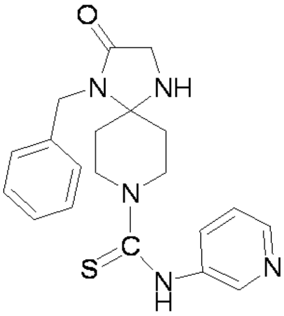

C0150M

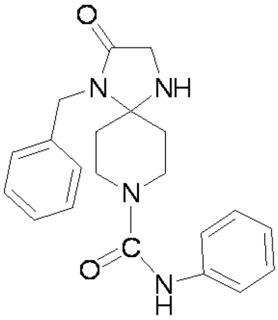

C0151M


C0151M-2


C0152M-4

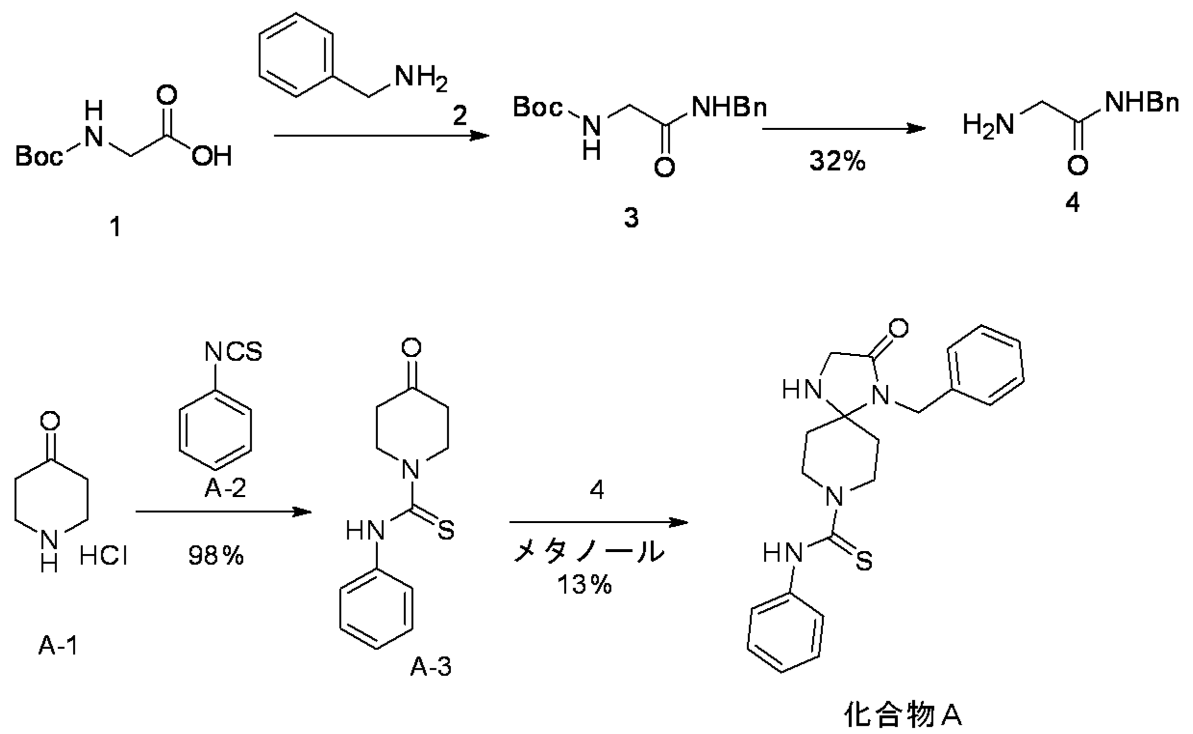

化合物Ａ


化合物Ｂ


化合物Ｃ

【０３７６】
化合物Ａ、Ｂ、及びＣの調製

化合物Ａ
【０３７７】
【化４２】



【０３７８】
化合物４
化合物１（１０ｇ、５７ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１００ｍＬ）に溶解させ、この溶液に、室温で、１，１’－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）（１１．１ｇ、６８．５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を、３０分間撹拌した。次いで、化合物２（７．３４ｇ、６８．５ｍｍｏｌ）を加え、一晩（約１８時間）撹拌した。溶媒をエバポレートし、残基を酢酸エチル（ＥＡ；４００ｍＬ）に溶解させ、そこに４ＭのＨＣｌ／ＭｅＯＨ（５０ｍＬ）を加え、得られる混合物を一晩（約１８時間）撹拌した。得られる白色固体を濾過し、ＥＡに懸濁させ、$ＮａＨＣＯ_3$水溶液で洗い、濃縮して、生成物を白色固体として得た（３．２ｇ、収率３４％、ＮＭＲでの確認による）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：３．４１（ｓ，３Ｈ）；４．４８（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；７．２６～７．３６（ｍ，５Ｈ）；７．５７（ｂｒ，ｓ，１Ｈ）。
【０３７９】
化合物Ａ－３
化合物Ａ－１（３．７５ｇ、２４ｍｍｏｌ）、Ａ－２（１．５ｇ、１１ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（ＴＥＡ）（４．５ｇ、４４．３８ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（ＤＣＭ）（５０ｍＬ）に加え、この混合物を、室温で、一晩（約１８時間）撹拌した。反応混合物を水で洗い、$Ｎａ_2ＳＯ_4$で乾燥させ、濃縮して、生成物を白色固体として得た（２．５５ｇ、収率９８％、ＮＭＲでの確認による）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：２．５３（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；４．０１（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；７．１０～７．３０（ｍ，５Ｈ）。
【０３８０】
化合物Ａ
化合物Ａ－３（４００ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）及び化合物４（２８０ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）をメタノール（６０ｍＬ）に加え、この混合物を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を薄白色固体として得

た（８４ｍｇ、収率１３％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９８％）。

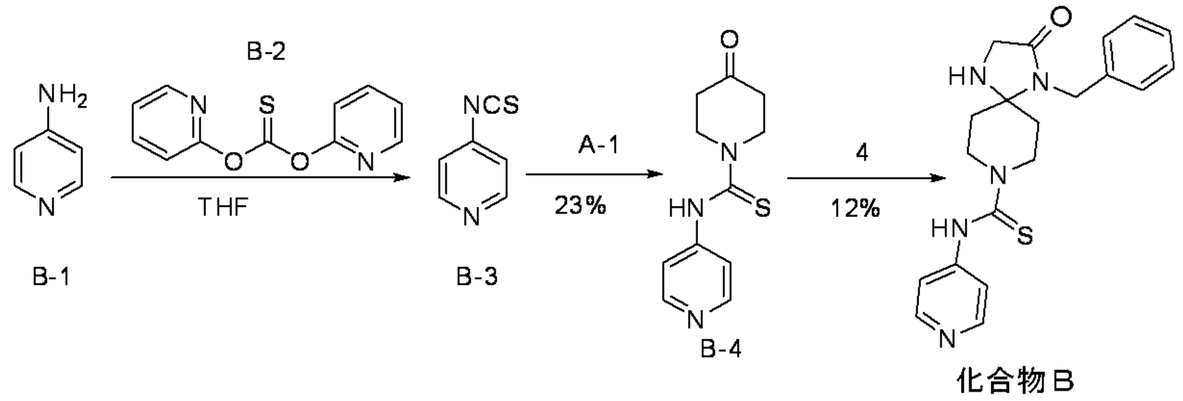
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１．４２（ｄ，Ｊ＝１２．４Ｈｚ，２Ｈ）；１．９２（ｄｔ，Ｊ＝４．４，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．３２（ｄｔ，Ｊ＝２．０，１２．８Ｈｚ，２Ｈ）；３．５２（ｓ，２Ｈ）；４．４２（ｓ，２Ｈ）；４．４７（ｓ，２Ｈ）；７．０６（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ）；７．１４（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ）；７．２４～７．３３（ｍ，９Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）のＣ$_{21}$Ｈ$_{24}$Ｎ$_4$ＯＳ（ｍ／ｚ）計算値：３８０．１７，実測値：３８１．２［Ｍ＋１］$^+$。

【０３８１】

化合物Ｂ

【０３８２】

【化４３】



【０３８３】

化合物Ｂ－４

ピリジン－４－アミン（４００ｍｇ、４．２５ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３５ｍＬ）溶液を、氷浴に入れ、そこに６０％ＮａＨ（３４０ｍｇ、８．５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を１時間撹拌した。化合物Ｂ－２（０．９９ｇ、４．２５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を徐々に昇温させて室温に戻し、３時間撹拌した。化合物Ａ－１（０．７８ｇ、５．１ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ；１ｍＬ）を加え、混合物を室温で一晩（約１８時間）撹拌した。水を加え、得られる組成物をＥＡで抽出し、ブラインで洗い、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製して、油状物を得た（０．２３ｇ、収率２３％、ＮＭＲは純物質のものではなかったが、主成分は表題化合物であった）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：２．６６（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；４．１２（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；７．１１～７．１２（ｄ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，２Ｈ）；８．５０～８．５２（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，２Ｈ）。

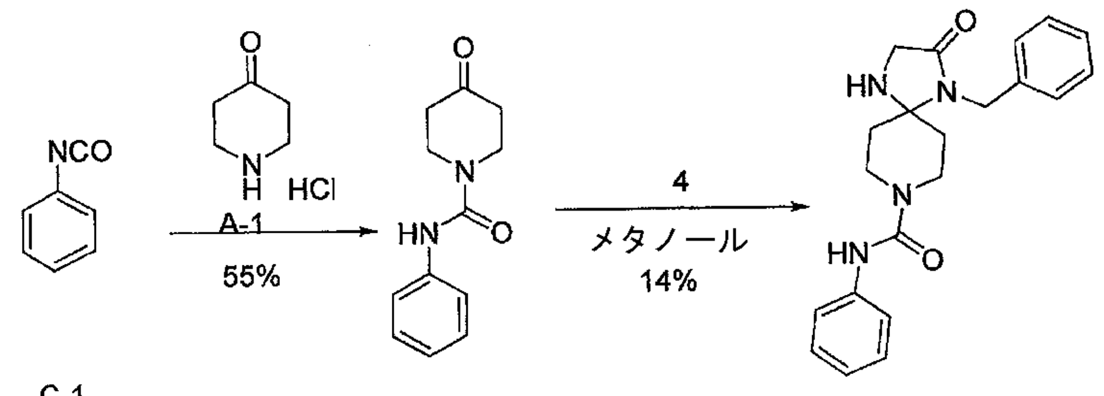
【０３８４】

化合物Ｂ

化合物Ｂ－４（２３０ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）及び化合物４（２２５ｍｇ、１．３７ｍｍｏｌ）をメタノール（２５ｍＬ）に溶解させ、この溶液を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を黄色固体として得た（４５ｍｇ、収率１２％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９６％）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１．４７（ｄ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；１．９２～１．９８（ｍ，２Ｈ）；３．４１（ｔ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．５４（ｓ，２Ｈ）；４．４４（ｓ，４Ｈ）；６．９５（ｄ，Ｊ＝４．４Ｈｚ，２Ｈ）；７．２６～７．３１（ｍ，５Ｈ）；８．４５（ｄ，Ｊ＝４．０Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）のＣ$_{20}$Ｈ$_{23}$Ｎ$_5$ＯＳ（ｍ／ｚ）計算値：３８１．１６，実測値：３８２．４［Ｍ＋１］$^+$

。
【０３８５】
化合物Ｃ
【０３８６】
【化４４】

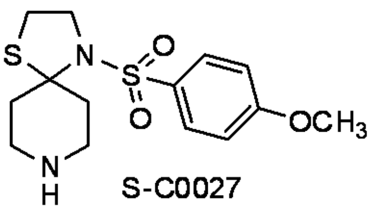


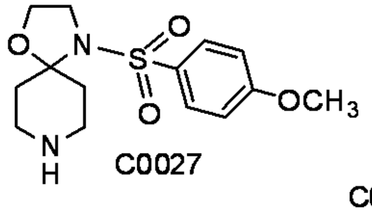
C-1　C-2　化合物C

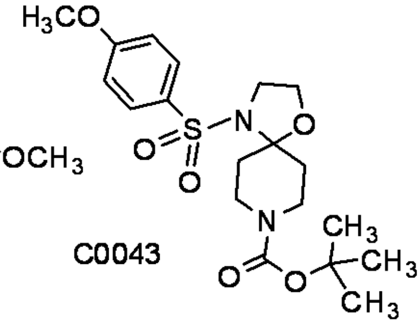
【０３８７】
化合物Ｃ－２
化合物Ｃ－１（１．０ｇ、８．３９ｍｍｏｌ）、化合物Ａ－１（２．８３ｇ、１８．４５ｍｍｏｌ）、及び炭酸カリウム（４．６４ｇ、３３．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）に加え、この混合物を周辺温度で１８時間撹拌した。混合物を、水、１ＮのＨＣｌ（水溶液）で洗い、$Ｎａ_2ＳＯ_4$で乾燥させ、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し（ＰＥ／ＥＡ＝３：１）、生成物を白色個体として得た（１．０ｇ、収率５５％、ＮＭＲにより表題化合物であることを確認）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：２．５６（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；３．８１（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；６．５０（ｂｒｓ，１Ｈ）；７．０７（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ）；７．２８～７．３７（ｍ，４Ｈ）。
【０３８８】
化合物Ｃ
化合物Ｃ－２（４００ｍｇ、１．８４ｍｍｏｌ）及び化合物４（４００ｍｇ、２．４４ｍｍｏｌ）をメタノール（４０ｍＬ）に加え、この混合物を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を白色個体として得た（９６ｍｇ、収率１４％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９８％）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：１．４５（ｄ，Ｊ＝１２．０Ｈｚ，２Ｈ）；１．８５（ｄｔ，Ｊ＝４．４，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．１９（ｄｔ，Ｊ＝２．０，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．５５（ｓ，２Ｈ）；３．９６（ｄｔ，Ｊ＝１３．６，２．０Ｈｚ，２Ｈ）；４．４４（ｓ，２Ｈ）；６．２９（ｓ，１Ｈ）；７．０２～７．０６（ｍ，１Ｈ）；７．２２～７．３３（ｍ，１０Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{21}H_{24}N_4O_2$（ｍ／ｚ）計算値：３６４．１９，実測値：３６５．２［Ｍ＋１］$^+$。
【０３８９】

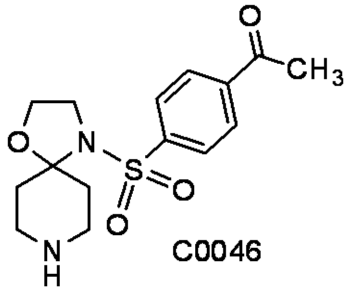
【表５】

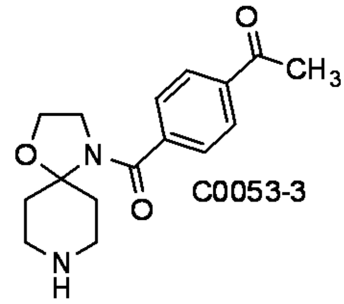
系列Ｃ－２の化合物の表

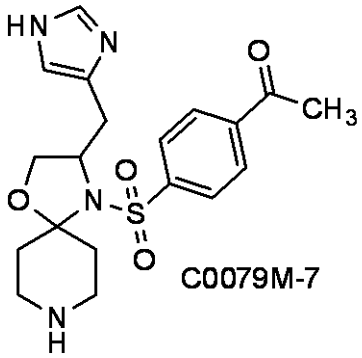

S-C0027

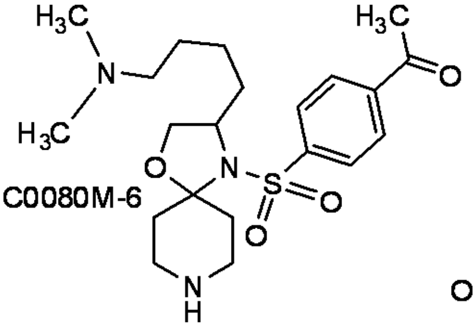

C0027

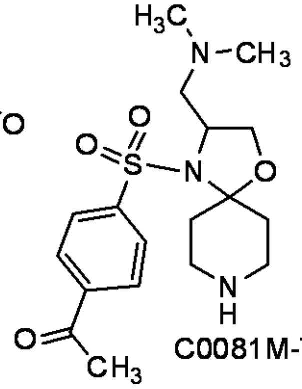

C0043

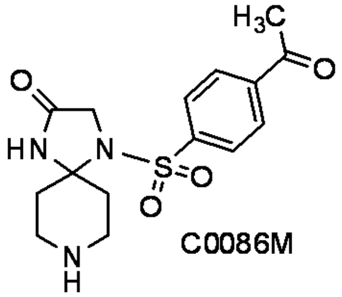

C0046

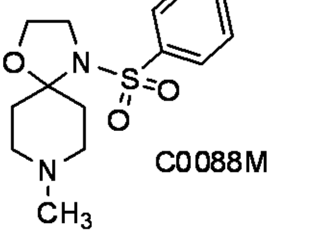

C0053-3

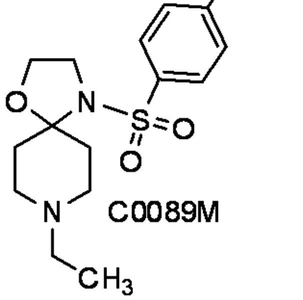

C0079M-7

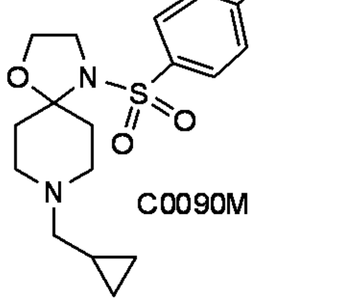

C0080M-6


C0081M-7

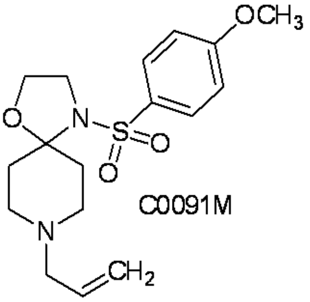

C0086M

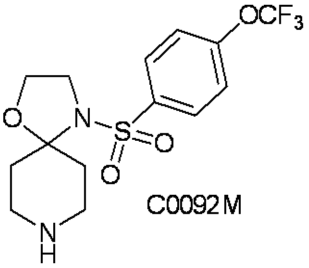

C0088M

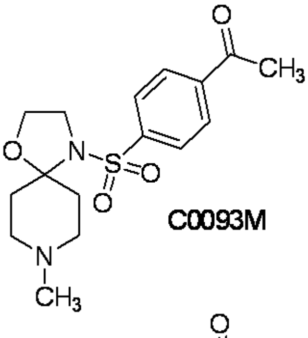

C0089M

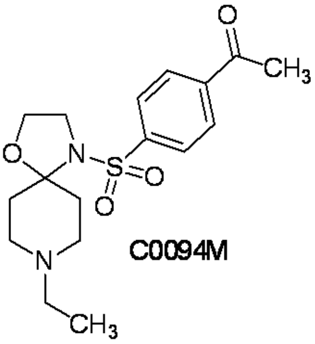

C0090M

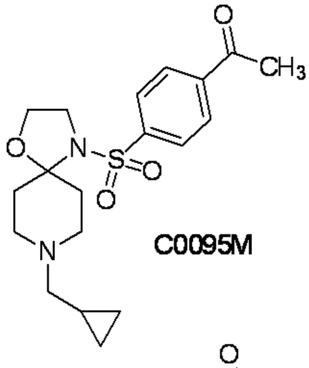
系列Ｃ－２の化合物の表（続き）

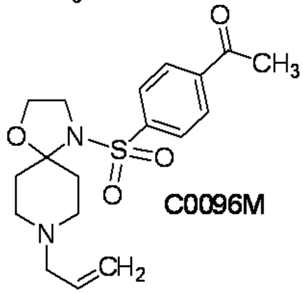

C0091M

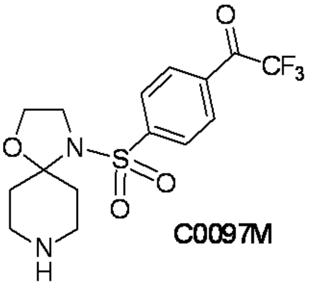

C0092M

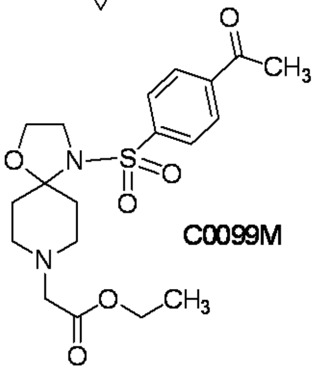

C0093M

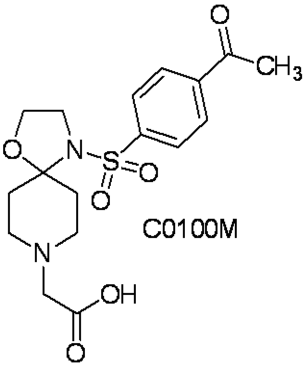

C0094M

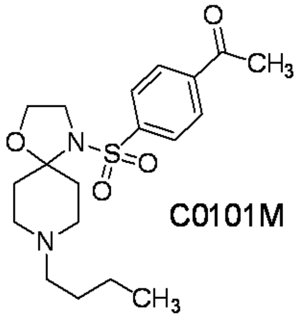

C0095M

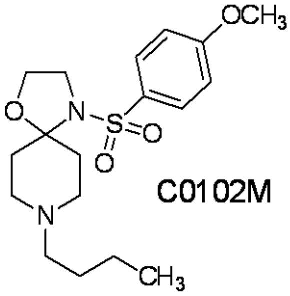

C0096M

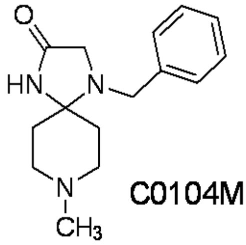

C0097M


C0099M

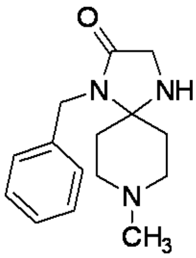

C0100M

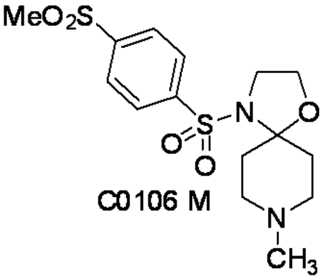

C0101M

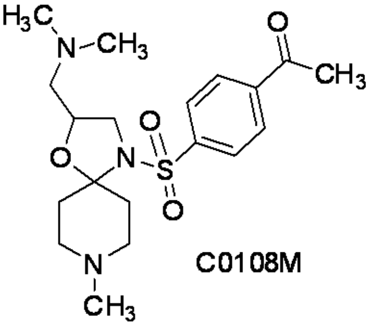

C0102M

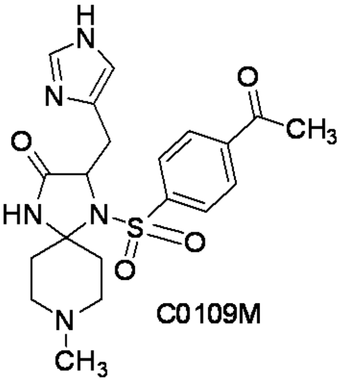

C0104M

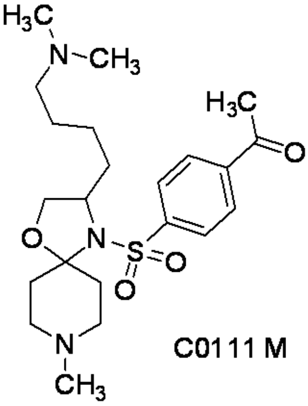
系列Ｃ－２の化合物の表（続き）

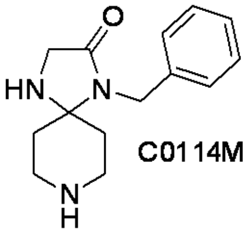

C0105 M

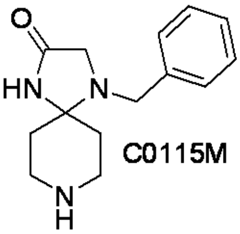

C0106 M

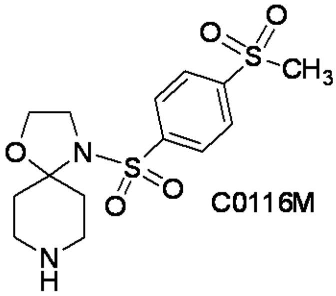

C0108M

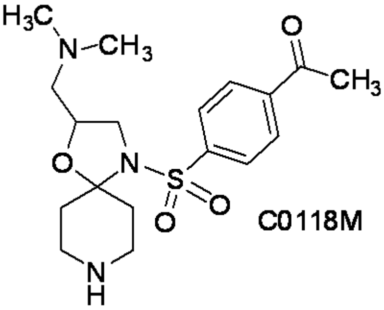

C0109M

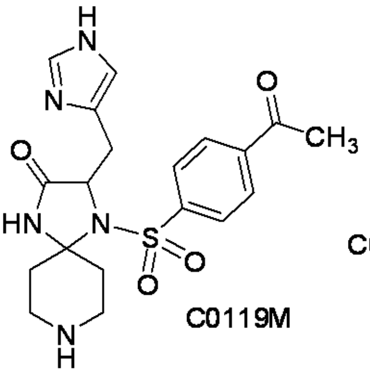

C0111 M

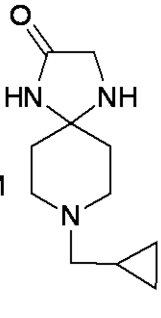

C0114M

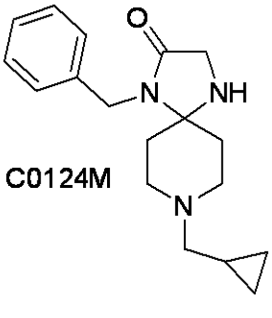

C0115M


C0116M

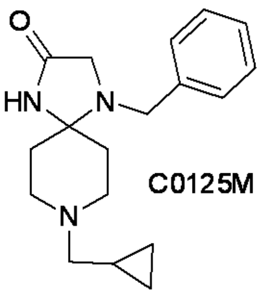

C0118M

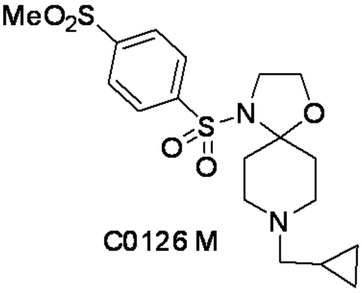

C0119M

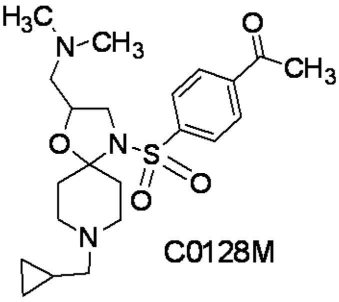

C0123 M

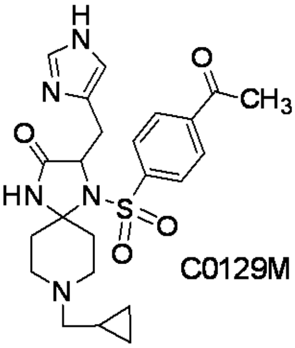

C0124M

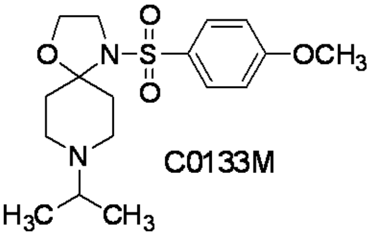
<u>系列Ｃ－２の化合物の表（続き）</u>

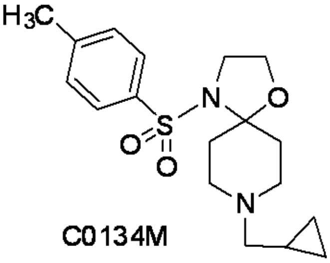

C0125M

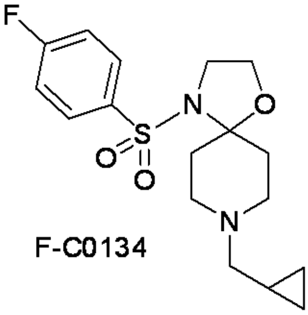

C0126 M

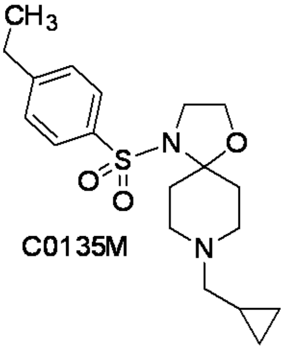

C0128M

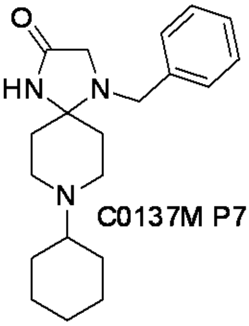

C0129M

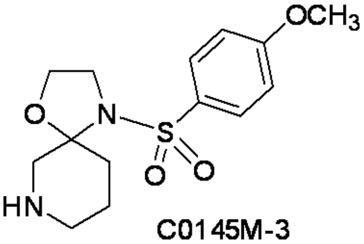

C0133M

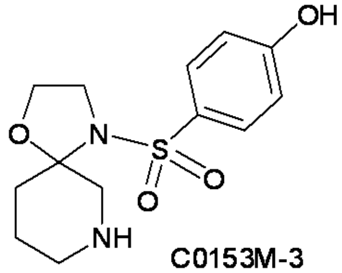

C0134M

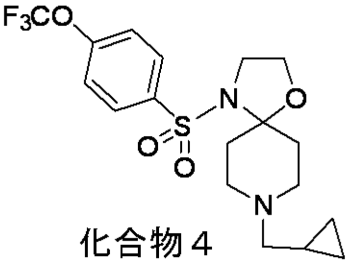

F-C0134

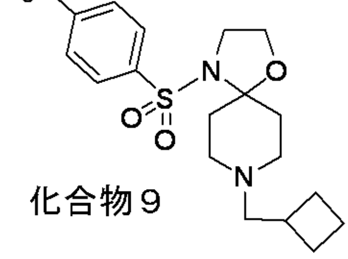

C0135M

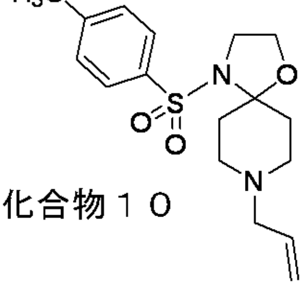

C0137M P7


C0145M-3


C0153M-3


化合物４

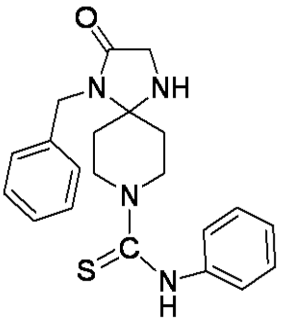

化合物９


化合物１０

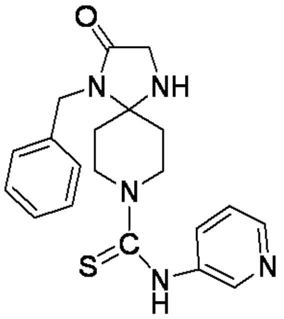
【０３９０】

【表６】

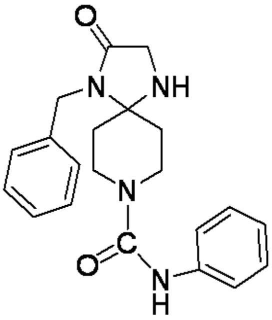
系列Ｄの化合物の表



化合物Ａ



化合物Ｂ



化合物Ｃ

【０３９１】

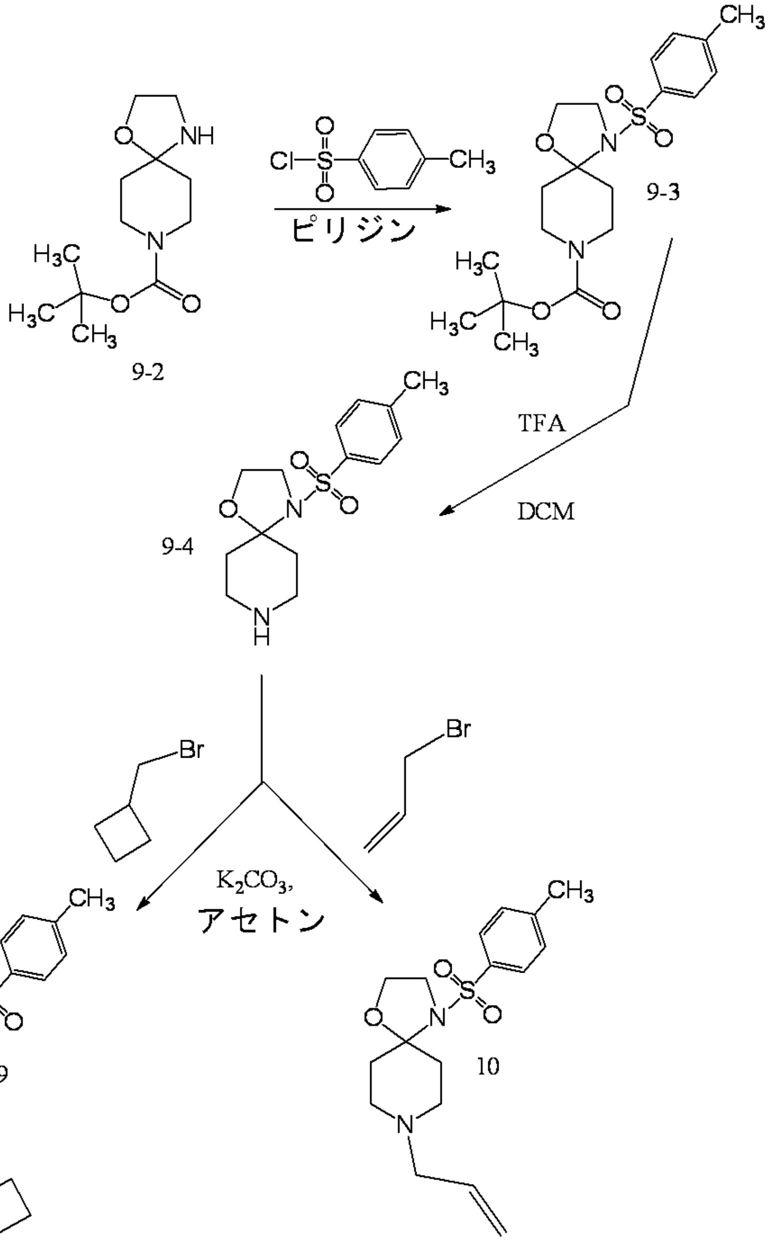
系列Ｃ－２の化合物４、９、及び１０の調製

これらの化合物は、本明細書中９－２と指定する共通の中間体から調製した。この中間体は、出願番号第１２／５６１０，０９１号（米国特許出願第２０１１０１０５４８７号、２０１１年５月５日提出；国際公開第２０１０／０５１４９７号）に記載の化合物Ｃ０１１６Ｍの合成中に調製されたもので、その明細書中では、化合物Ｃ０１１６Ｍ－１と示されている。

化合物９－２を調製してから、以下に示すとおり、最初にピリジン中で五員環の窒素にトシル基を付加し、続いてジクロロメタン中でトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を用いてｔ－ＢＯＣ基を外すことにより化合物９－４を形成することで、化合物９及び１０の合成を通常手順で進めた。合成の詳細を、本明細書中以下に提供する。

【０３９２】

【化４５】

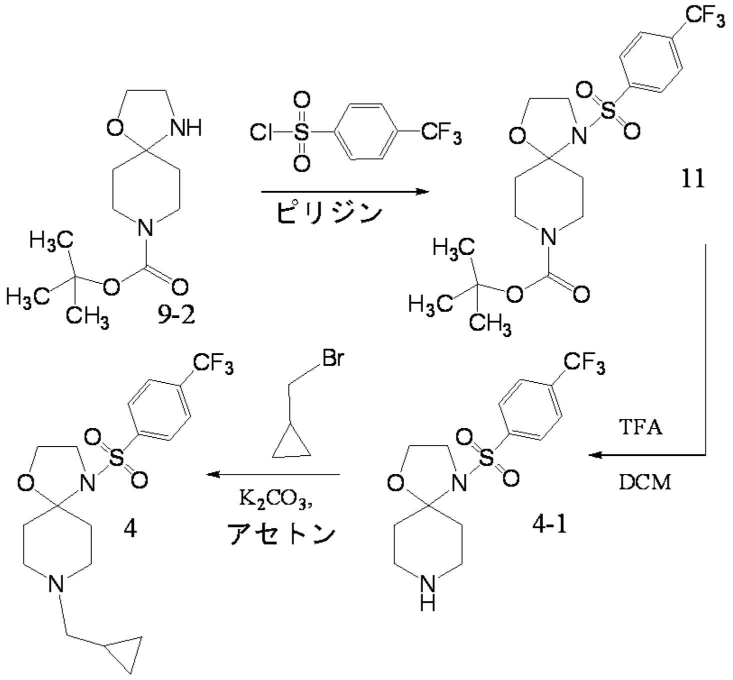


【０３９３】

化合物９－２は、化合物４を調製するための基礎ともなる。今回は、以下に示すとおり、ピリジン中で五員環のアミンに４－トリフルオロメトキシフェニルスルホニルクロリドを反応させ、上記のとおりＴＦＡ／ＤＣＭ中でｔ－ＢＯＣ基を外して、化合物４－１を形成した。次いで、化合物４－１の六員環のアミン窒素を（ブロモメチル）シクロプロパンと反応させて、Ｎ－アルキル化生成物を形成した。これが化合物４である。

【０３９４】

【化４６】



【０３９５】

化合物９－２の調製

Ｎ－Ｂｏｃ－ピペリジン－４－オン（５０ｇ、２５１ｍｍｏｌ）のエタノール（５００ｍＬ）溶液に、２－アミノエタノール（４６ｇ）を加えた。混合物を、室温で一晩（約１８時間）撹拌した。次いで、溶媒を減圧除去した。残渣をCH_2Cl_2（ＤＣＭ）で希釈して、飽和Na_2CO_3水溶液で洗った（１００ｍＬ×６）。有機相を無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮して、生成物を黄色油状物として得た（６１ｇ、収率：１００％、ＴＬＣで確認）。

【０３９６】

化合物９－３の調製

化合物９－２（３１．２ｇ、１３０ｍｍｏｌ）のピリジン（３２０ｍＬ）溶液に、トルエンスルホニルクロリド（ＴｓＣｌ；２４．７ｇ、１３０ｍｍｏｌ）を加えた。混合物を、室温で一晩（約１８時間）撹拌した。反応混合物を減圧濃縮してピリジンを除去し、残渣をＤＣＭに溶解させて、飽和$NaHCO_3$で洗った。有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製して、生成物を白色個体として得た（４０ｇ、収率：７８％、１Ｈ　ＮＭＲで確認）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．７４（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ）；７．３１（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；４．１３～４．０３（ｍ，４Ｈ）；３．５６～３．５０（ｍ，２Ｈ）；２．８９（ｂｒｓ，２Ｈ）；２．４６（ｓ，３Ｈ）；２．４３～２．３６（ｍ，２Ｈ）；１．６３（ｂｒｓ，２Ｈ）；１．４７（ｓ，９Ｈ）。

【０３９７】

化合物９－４の調製

化合物９－３（３５．２ｇ、８８．７ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（３５０ｍＬ）溶液に、トリフルオロ酢酸（CF_3COOH；６０ｍＬ）を加えた。混合物を、氷／水浴で、５０分間撹拌した。反応混合物に、ＤＣＭを２００ｍＬ加え、得られる組成物を飽和Na_2CO_3で洗った。有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、減圧濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物をカラムクロマトグラフィーで精製して、所望の生成物を淡黄色油状物として得た（１１．２ｇ、収率：４２％、^{1}Ｈ　ＮＭＲで確認）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．７５（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ）；

７．２９（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．９５（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ）；３．７５（ｂｒｓ，１Ｈ）；３．５１～３．４８（ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，２Ｈ）；３．１６～３．１２（ｄｄ，Ｊ＝１２．４，４．０Ｈｚ，２Ｈ）；２．９２～２．８６（ｔｄ，Ｊ＝１２．８，２．０Ｈｚ，２Ｈ）；２．４８～２．４４（ｍ，２Ｈ）；２．４１（ｓ，３Ｈ）；１．６５（ｄ，Ｊ＝１２．８Ｈｚ，２Ｈ）。

【０３９８】

化合物９の調製

化合物９－４（１．８５ｇ、６．２５ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（３．３９ｇ、１２．５ｍｍｏｌ）をアセトン（４０ｍＬ）に加え、この混合物に（ブロモメチル）シクロブタン（１．８６ｇ、１２．５ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を一晩（約１８時間）還流撹拌した。冷却してから、混合物を濾過して濃縮し、酢酸エチル（ＥＡ）を用いてクロマトグラフィーで精製して、粗生成物を淡黄色固体として得た（１．６ｇ、収率：７０％、ＬＣＭＳで確認、^{1}Ｈ　ＮＭＲは、生成物が純粋ではないことを示した）。粗生成物を、ＥＡを用いてクロマトグラフィーで更に精製して、所望の生成物を白色固体として得た（１．１５ｇ、収率：５０％、ＬＣＭＳ及び^{1}Ｈ　ＮＭＲで確認、ＨＰＬＣ：９９．３％@２５４ｎｍ、９９．５@２１４ｎｍ）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．７７（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；７．３１（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．９５（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．５２（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．７６～２．７３（ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ，２Ｈ）；２．５４～２．３９（ｍ，８Ｈ）；２．２１～２．１５（ｔ，Ｊ＝１１．６Ｈｚ，２Ｈ）；２．０７～２．０５（ｍ，２Ｈ）；１．９３～１．８８（ｍ，２Ｈ）；１．７０～１．６５（ｍ，２Ｈ）；１．５６～１．５３（ｄ，Ｊ＝１２．４Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{19}H_{28}N_2O_3S$（ｍ／ｚ）計算値：３６４．１８，実測値：３６５．１［Ｍ＋１］$^+$。

【０３９９】

化合物１０の調製

化合物９－４（１．７２ｇ、５．８ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（１．６ｇ、１１．６ｍｍｏｌ）をアセトン（３０ｍＬ）に加え、この混合物に３－ブロモプロパ－１－エン（０．７ｇ、５．８ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を４０℃で２時間撹拌した。冷却してから、混合物を濾過して濃縮し、ＥＡを用いてクロマトグラフィーで精製して、所望の生成物を白色固体として得た（１．１ｇ、収率５６％、ＬＣＭＳ及び^{1}Ｈ　ＮＭＲで確認、ＨＰＬＣ：９８．８％@２５４ｎｍ、９８．９@２１４ｎｍ）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．７６～７．７４（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；７．２９～７．２７（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；５．９０～５．８２（ｍ，１Ｈ）；５．１８～５．１１（ｍ，２Ｈ）；３．９５～３．９１（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．５２～３．４９（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．０～２．９８（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．８３～２．８０（ｄｄ，Ｊ＝８．８，２．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．５５～２．４８（ｔｄ，Ｊ＝１３．２，４．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．４１（ｓ，３Ｈ）；２．１９～２．１４（ｔ，Ｊ＝１１．２Ｈｚ，２Ｈ）；１．５８～１．５５（ｄ，Ｊ＝１２．０Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{17}H_{24}N_2O_3S$（ｍ／ｚ）計算値：３３６．４５，実測値：３３７．１［Ｍ＋１］$^+$。

【０４００】

化合物１１の調製

化合物９－２（１４．６ｇ、６０ｍｍｏｌ）のピリジン（１５０ｍＬ）溶液に、４－（トリフルオロメトキシ）ベンゼン－１－スルホニルクロリド（１５．７ｇ、６０ｍｍｏｌ）を加えた。混合物を、室温で一晩（約１８時間）撹拌した。反応混合物を減圧濃縮してピリジンを除去し、残渣をＤＣＭに溶解させ、飽和$NaHCO_3$で洗った。有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製して、生成物を白色固体として得た（２０ｇ、収率：７１％、１Ｈ　ＮＭＲ及びＬＣＭＳで確認）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．９２～７．９０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ

，２Ｈ）；７．３５～７．３２（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ）；４．１３～３．９７（ｍ，４Ｈ）；３．５１（ｂｒｓ，２Ｈ）；２．９０（ｂｒｓ，２Ｈ）；２．４５～２．３５（ｍ，２Ｈ）；１．５８（ｂｒｓ，２Ｈ）；１．４７（ｓ，９Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{19}H_{25}F_3N_2O_6S$（ｍ／ｚ）計算値：４６６．１４，実測値：３６７．０［Ｍ＋１］$^+$。

【０４０１】

化合物４－１の調製

化合物１１（１５ｇ、３２ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（１５０ｍＬ）溶液に、トリフルオロ酢酸（CF_3COOH；２０ｍＬ）を加えた。混合物を、氷／水浴中、５０分間撹拌した。ＤＣＭ２００ｍＬに反応混合物を加え、飽和Na_2CO_3で洗った。有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、減圧濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物を、カラムクロマトグラフィーで精製して、所望の生成物を淡黄色固体として得た（５．９ｇ、収率：５０％、^{1}Ｈ　ＮＭＲで確認）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．９３～７．９１（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ）；７．３４～７．３２（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；４．０～３．９７（ｔ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，２Ｈ）；３．５１～３．４８（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．０６～３．０２（ｄｄ，Ｊ＝１２．４，４．０Ｈｚ，２Ｈ）；２．８６～２．８０（ｔ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；２．３９～２．３１（ｔｄ，Ｊ＝１２．８，４．８Ｈｚ，２Ｈ）；２．４８～２．４４（ｍ，２Ｈ）；１．６４～１．６２（ｄ，Ｊ＝１２．８Ｈｚ，２Ｈ）。

【０４０２】

化合物４の調製

化合物４－１（１．５ｇ、４．１ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（１．１３ｇ、８．２ｍｍｏｌ）をアセトン（１５ｍＬ）に加え、この混合物に（ブロモメチル）シクロブタン（１．５ｇ、４．１ｍｍｏｌ）を加え、反応混合物を４時間還流撹拌した。冷却してから、混合物を濾過して濃縮し、ＥＡを用いてクロマトグラフィーで精製して、所望の生成物をオフホワイト色固体として得た（１．０５ｇ、収率：６１％、ＬＣＭＳ及び^{1}Ｈ　ＮＭＲで確認、ＨＰＬＣ：９６．９％@２５４ｎｍ、９８．４@２１４ｎｍ）。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：７．９１～７．９４（ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，２Ｈ）；７．３４～７．３２（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．９８～３．９５（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；３．５４～３．５１（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．９９～２．９６（ｄｄ，Ｊ＝８．８，２．０Ｈｚ，２Ｈ）；２．５６～２．４９（ｔｄ，Ｊ＝１２．８，４．４Ｈｚ，２Ｈ）；２．２６～２．１７（ｍ，４Ｈ）；１．６０～１．５７（ｄ，Ｊ＝１２．４Ｈｚ，２Ｈ）；０．８７～０．８４（ｍ，１Ｈ）；０．５２～０．４８（ｍ，２Ｈ）；０．１０～０．０７（ｍ，２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{18}H_{23}F_3N_2O_4S$（ｍ／ｚ）計算値：４２０．１３，実測値：４２１．１［Ｍ＋１］$^+$。

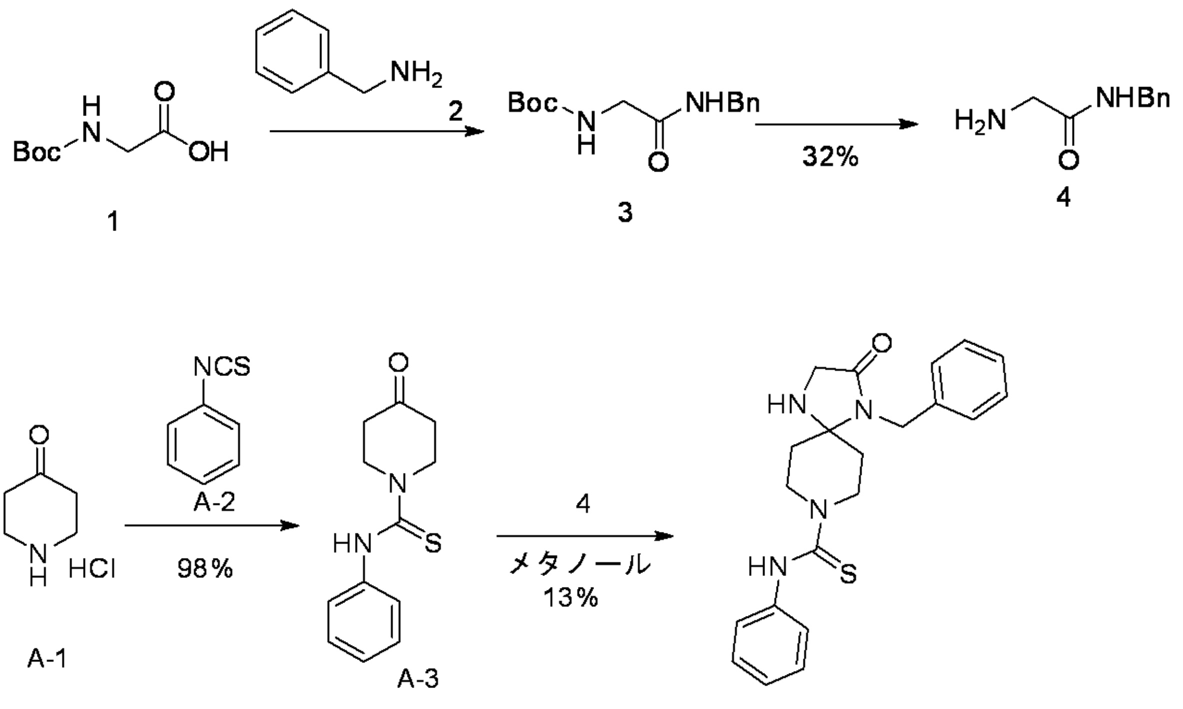
【０４０３】

系列Ｄの化合物Ａ、Ｂ、及びＣの調製

化合物Ａ

【０４０４】

【化４７】



化合物Ａ

【０４０５】

化合物４

化合物１（１０ｇ、５７ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（１００ｍＬ）溶液に、室温で、１，１’－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）（１１．１ｇ、６８．５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を３０分間撹拌した。次いで、化合物２（７．３４ｇ、６８．５ｍｍｏｌ）を加え、一晩（約１８時間）撹拌した。溶媒をエバポレートし、残渣を酢酸エチル（ＥＡ；４００ｍＬ）に溶解させ、これに４ＭのＨＣｌ／ＭｅＯＨ（５０ｍＬ）を加え、得られる混合物を一晩（約１８時間）撹拌した。得られる白色固体を濾過し、ＥＡに懸濁させ、$ＮａＨＣＯ_3$水溶液で洗い、濃縮して、生成物を白色固体として得た（３．２ｇ、収率３４％、ＮＭＲでの確認による）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：３．４１（ｓ，３Ｈ）；４．４８（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ）；７．２６～７．３６（ｍ，５Ｈ）；７．５７（ｂｒ，ｓ，１Ｈ）。

【０４０６】

化合物Ａ－３

化合物Ａ－１（３．７５ｇ、２４ｍｍｏｌ）、Ａ－２（１．５ｇ、１１ｍｍｏｌ）、及びトリエチルアミン（ＴＥＡ）（４．５ｇ、４４．３８ｍｍｏｌ）をジクロロメタン（ＤＣＭ）（５０ｍＬ）に加え、この混合物を室温で一晩（約１８時間）撹拌した。反応混合物を水で洗い、$Ｎａ_2ＳＯ_4$で乾燥させ、濃縮して、生成物を白色固体として得た（２．５５ｇ、収率９８％、ＮＭＲでの確認による）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$ＣＤＣｌ_3$）：２．５３（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；４．０１（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；７．１０～７．３０（ｍ，５Ｈ）。

【０４０７】

化合物Ａ

化合物Ａ－３（４００ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）及び化合物４（２８０ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）をメタノール（６０ｍＬ）に加え、この混合物を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を淡白色固体として得た（８４ｍｇ、収率１３％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９８％）。

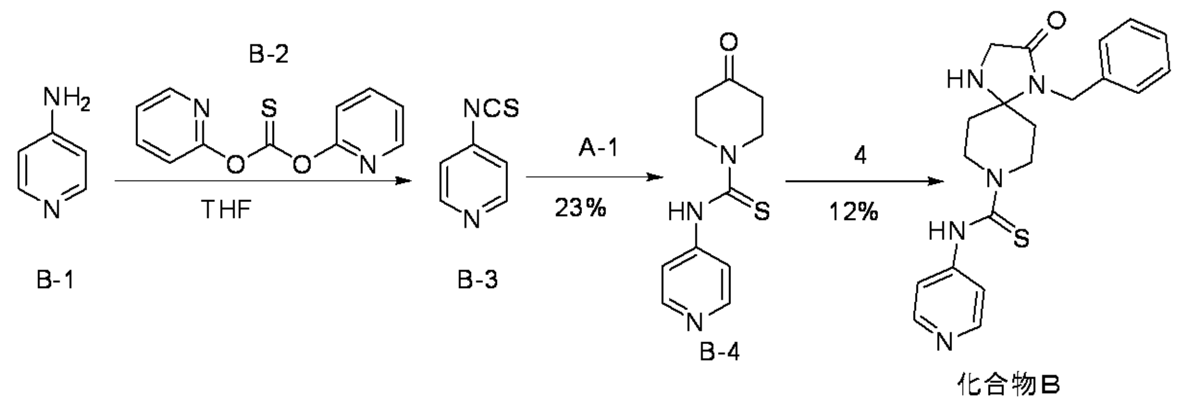
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１．４２（ｄ，Ｊ＝１２．４Ｈｚ，２Ｈ）；１．９２（ｄｔ，Ｊ＝４．４，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．３２（ｄｔ，Ｊ＝２．０，１２．８Ｈｚ，２Ｈ）；３．５２（ｓ，２Ｈ）；４．４２（ｓ，２Ｈ）；４．４７（ｓ，２Ｈ）；７．０６（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ）；７．１４（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ）；７．２４～７．３３（ｍ，９Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）のＣ$_{21}$Ｈ$_{24}$Ｎ$_4$ＯＳ（ｍ／ｚ）計算値：３８０．１７，実測値：３８１．２［Ｍ＋１］$^+$。

【０４０８】

化合物Ｂ

【０４０９】

【化４８】



【０４１０】

化合物Ｂ－４

ピリジン－４－アミン（４００ｍｇ、４．２５ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３５ｍＬ）溶液を、氷浴に入れ、そこに６０％ＮａＨ（３４０ｍｇ、８．５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を１時間撹拌した。化合物Ｂ－２（０．９９ｇ、４．２５ｍｍｏｌ）を加え、混合物を徐々に昇温させて室温に戻し、３時間撹拌した。化合物Ａ－１（０．７８ｇ、５．１ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ；１ｍＬ）を加え、混合物を室温で一晩（約１８時間）撹拌した。水を加え、得られる組成物をＥＡで抽出し、ブラインで洗い、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、濃縮し、カラムクロマトグラフィーで精製して、油状物を得た（０．２３ｇ、収率２３％、ＮＭＲは純物質のものではなかったが、主成分は表題化合物であった）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：２．６６（ｔ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、４Ｈ）；４．１２（ｔ、Ｊ＝６．４Ｈｚ、４Ｈ）；７．１１～７．１２（ｄ、Ｊ＝４．８Ｈｚ、２Ｈ）；８．５０～８．５２（ｄ、Ｊ＝５．６Ｈｚ、２Ｈ）。

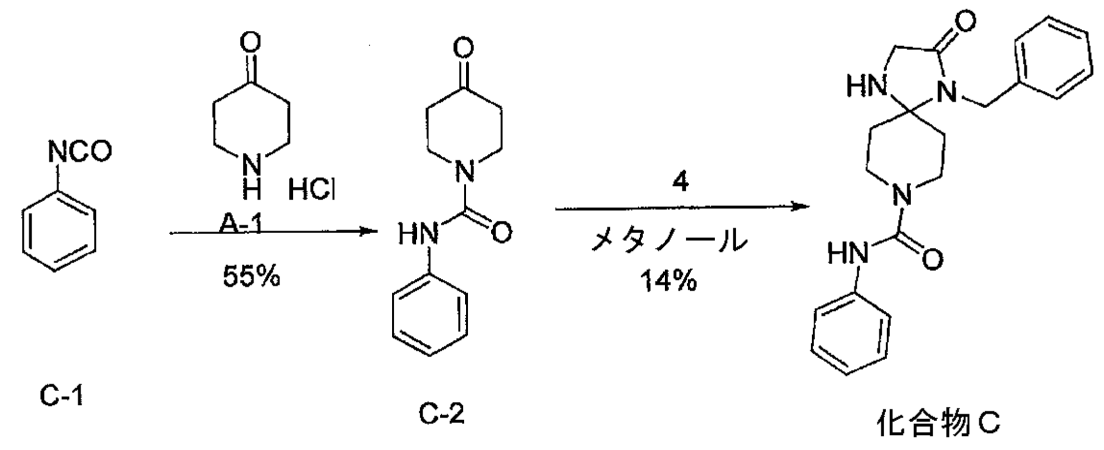
【０４１１】

化合物Ｂ

化合物Ｂ－４（２３０ｍｇ、１．７ｍｍｏｌ）及び化合物４（２２５ｍｇ、１．３７ｍｍｏｌ）をメタノール（２５ｍＬ）に溶解させ、この溶液を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を黄色固体として得た（４５ｍｇ、収率１２％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９６％）。

１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：１．４７（ｄ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；１．９２～１．９８（ｍ，２Ｈ）；３．４１（ｔ，Ｊ＝１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．５４（ｓ，２Ｈ）；４．４４（ｓ，４Ｈ）；６．９５（ｄ，Ｊ＝４．４Ｈｚ，２Ｈ）；７．２６～７．３１（ｍ，５Ｈ）；８．４５（ｄ，Ｊ＝４．０Ｈｚ，２Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）のＣ$_{20}$Ｈ$_{23}$Ｎ$_5$ＯＳ（ｍ／ｚ）計算値：３８１．１６，実測値：３８２．４［Ｍ＋１］$^+$

。
【０４１２】
化合物Ｃ
【０４１３】
【化４９】



【０４１４】
化合物Ｃ－２
化合物Ｃ－１（１．０ｇ、８．３９ｍｍｏｌ）、化合物Ａ－１（２．８３ｇ、１８．４５ｍｍｏｌ）、及び炭酸カリウム（４．６４ｇ、３３．６ｍｍｏｌ）をＤＣＭ（５０ｍＬ）に加え、この混合物を周辺温度で１８時間撹拌した。混合物を水、１ＮのＨＣｌ（水溶液）で洗い、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製し（ＰＥ／ＥＡ＝３：１）、生成物を白色個体として得た（１．０ｇ、収率５５％、ＮＭＲで表題化合物を確認した）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：２．５６（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；３．８１（ｔ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，４Ｈ）；６．５０（ｂｒｓ，１Ｈ）；７．０７（ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，４Ｈ）；７．２８～７．３７（ｍ，４Ｈ）。
【０４１５】
化合物Ｃ
化合物Ｃ－２（４００ｍｇ、１．８４ｍｍｏｌ）及び化合物４（４００ｍｇ、２．４４ｍｍｏｌ）をメタノール（４０ｍＬ）に加え、この混合物を、アルゴン下、一晩（約１８時間）加熱還流した。混合物を濃縮し、分取ＴＬＣで精製して、生成物を白色個体として得た（９６ｍｇ、収率１４％、ＮＭＲ及びＭＳで確認、ＨＰＬＣにより９８％）。
１Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：１．４５（ｄ，Ｊ＝１２．０Ｈｚ，２Ｈ）；１．８５（ｄｔ，Ｊ＝４．４，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．１９（ｄｔ，Ｊ＝２．０，１３．２Ｈｚ，２Ｈ）；３．５５（ｓ，２Ｈ）；３．９６（ｄｔ，Ｊ＝１３．６，２．０Ｈｚ，２Ｈ）；４．４４（ｓ，２Ｈ）；６．２９（ｓ，１Ｈ）；７．０２～７．０６（ｍ，１Ｈ）；７．２２～７．３３（ｍ，１０Ｈ）。ＭＳ（ＥＳＩ）の$C_{21}H_{24}N_4O_2$（ｍ／ｚ）計算値：３６４．１９，実測値：３６５．２［Ｍ＋１］$^+$。
【実施例】
【０４１６】
〔実施例１〕
ＦＩＴＣ－ＮＬＸを利用したＦＬＮＡスクリーニングアッセイ
Ａ．ストレプトアビジンで被覆した９６ウェルプレート
ストレプトアビジンで被覆した９６ウェルプレート（高結合キャパシティのＲｅａｃｔｉ－Ｂｉｎｄ（商標）ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（商標）９６ウェルプレート、Ｐｉｅｒｃｅ－ＥＮＤＯＧＥＮ）を、メーカーの使用説明書に従い、５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐ

Ｈ７．４）２００μｌで３回洗浄する。

【０４１７】

Ｂ．Ｎ－ビオチン化ＶＡＫＧＬペンタペプチド（Ｂｎ－ＶＡＫＧＬ）（配列番号１）

Ｂｎ－ＶＡＫＧＬペプチド（０．５ｍｇ／プレート）を５０μｌのＤＭＳＯに溶解させ、次いで５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４、１００ｍＭのＮａＣｌ及びプロテアーゼ阻害剤を含む）（結合媒体）４４５０μｌに加え、ならびに５００μｌのｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｉｅｒｃｅ－ＥＮＤＯＧＥＮ）含有ＰＢＳを加える［ＤＭＳＯの最終濃度：１％］。

【０４１８】

Ｃ．Ｂｎ－ＶＡＫＧＬペプチドとストレプトアビジンで被覆したプレートの結合

洗浄したストレプトアビジンで被覆したプレートを、５μｇ／ウェルのＢｎ－ＶＡＫＧＬ（１００μｌ）と１時間接触させ（インキュベートし）、その間２５℃で常に震盪撹拌する［Ｂで調製したＢｎ－ＶＡＫＧＬペプチド溶液５０μｌ＋結合媒体５０μｌ、ＤＭＳＯの最終濃度：０．５％］。インキュベーションの最後に、プレートを、氷冷した５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）２００μｌで３回洗浄する。

【０４１９】

Ｄ．ＦＩＴＣ標識化ナロキソン［ＦＩＴＣ－ＮＬＸ］とＶＡＫＧＬの結合

Ｂｎ－ＶＡＫＧＬで被覆されたストレプトアビジンプレートを、１０ｎＭのフルオレセインイソチオシアネート標識化ナロキソン（ＦＩＴＣ－ＮＬＸ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とともに、結合媒体（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１００ｍＭのＮａＣｌ及びプロテアーゼ阻害剤を含有）中、３０℃で３０分間、一定の震盪撹拌を行いながらインキュベートする。最終アッセイ体積は１００μｌである。インキュベーションの最後に、氷冷した５０ｍＭのトリス（ｐＨ７．４）１００μｌで２回洗浄する。結合したＦＩＴＣ－ＮＬＸのシグナルを、ＤＴＸ－８８０マルチモードプレートリーダー（Ｂｅｃｋｍａｎ）で検出する。

【０４２０】

Ｅ．医薬化学物質類似体のスクリーニング

化合物は、最初に、それぞれ個別に２５％ＤＭＳＯを含有する５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）に溶解させて最終濃度１ｍＭとし（必要であれば超音波処理で溶解を促進する）、次いで、９６ウェル化合物プレートに配置する。医薬化学物質類似体（新規化合物）をスクリーニングするため、各化合物溶液（１μｌ）を、Ｂｎ－ＶＡＫＧＬで被覆したストレプトアビジンプレート（結合媒体を５０μｌ／ウェル含有）に添加し、続いてすぐに５０μｌのＦＩＴＣ－ＮＬＸを添加する（合計アッセイ体積／ウェルは、１００μｌ）。各化合物の最終スクリーニング濃度は、初期値１０μＭである。

【０４２１】

各スクリーニングプレートには、ビヒクル対照（全結合）ならびに陽性対照としてナロキソン（ＮＬＸ）及び／又はナルトレキソン（ＮＴＸ）が含まれている。化合物は、３つ組又は４つ組で試験する。各化合物の、ＦＩＴＣ－ＮＬＸ結合阻害パーセントを計算する［（ビヒクル中で結合した全ＦＩＴＣ－ＮＬＸ－化合物存在下で結合したＦＩＴＣ－ＮＬＸ）／ビヒクル中で結合した全ＦＩＴＣ－ＮＬＸ］×１００％］。選択した化合物の有効性及び力価を査定するため、１０μＭで約６０～７０％の阻害をもたらした化合物を、１μＭ及び０．１μＭの濃度で更にスクリーニングする。

【０４２２】

このスクリーニングアッセイの結果を以下の表に示す。

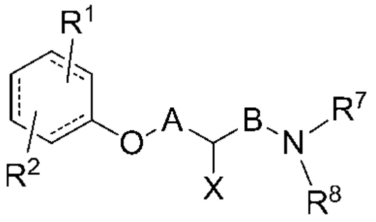
【０４２３】

ＦＬＮＡペプチド結合アッセイ

Ａ－系列の化合物

【０４２４】

【化５０】



【０４２５】

Ｒ^{1}、Ｒ^{2}、Ｒ^{7}及びＲ^{8}、Ａ、Ｂ、及びＸの各基は、本明細書中何処かで定義される。

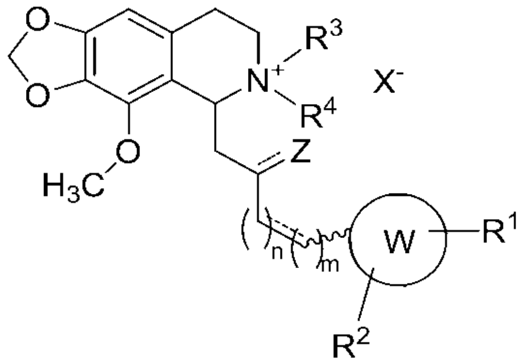
【０４２６】

【表７】

ＦＬＮＡ結合化合物	ＦＬＮＡ結合化合物の濃度		
	０．０１μＭ	０．１μＭ	１μＭ
	結合阻害パーセント		
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％
３３３３	４０．４％	４８．５％	５４．２％
Ａ０００１	３９．７％	４５．６％	５２．４％
Ａ０００２	３８．７％	４３．７％	４９．９％
Ａ０００３	２１．３％	３１．６％	３７．４％
Ａ０００４	４０．０％	４３．７％	４７．６％
Ａ０００５	３４．２％	３８．２％	４３．８％
Ａ０００６	３７．９％	４３．５％	４７．５％
Ａ０００７	３９．２％	４６．２％	５２．９％
Ａ０００８	３４．５％	３３．５％	３９．８％
Ａ０００９	２６．４％	３７．８％	３８．９％
Ａ００１０	３６．０％	３６．５％	３９．０％
Ａ００１１	４５．７％	５１．１％	５２．８％
Ａ００１２	３９．７％	４９．６％	５４．４％
Ａ００１３	３０．２％	４０．２％	４７．７％
Ａ００１４	３３．８％	３９．７％	４４．７％
Ａ００１５	３６．３％	４６．８％	５５．０％
Ａ００１７	２９．８％	３８．６％	４４．０％
Ａ００２０	３７．８％	３８．８％	４５．８％
Ａ００２１	３６．８％	４３．４％	４９．５％
Ａ００２２	４１．９％	４９．７％	５６．８％
Ａ００２５	３９．０％	４９．８％	５３．２％
Ａ００２６	３６．４％	４２．４％	４９．２％
Ａ００２８	３９．５％	４３．８％	５０．５％
Ａ００２９	４４．４％	４４．４％	５０．８％
Ａ００３０	３５．６％	４４．４％	４８．９％
Ａ００３１	４０．８％	４７．６％	５２．９％
Ａ００３２－１	３５．６％	４３．９％	５０．０％

Ａ００３２	４３．０％	５０．３％	５４．５％
Ａ００３３	４６．４％	５１．８％	５６．５％
Ａ００３５	４０．３％	４５．５％	５４．９％
Ａ００３６	４５．６％	５０．１％	５４．４％
Ａ００３７	４９．３％	５１．３％	５６．８％
Ａ００３８	４６．４％	５２．３％	５６．６％
Ａ００３９	４９．０％	５３．５％	６０．３％
Ａ００４０	４５．０％	５０．４％	５６．３％
Ａ００４１	４５．８％	５１．７％	５６．９％
Ａ００４２	４７．２％	４８．３％	５５．８％
ＡＯＯ４３	４６．４％	４８．９％	５１．８％
Ａ００４４	３２．４％	３６．９％	３９．６％
Ａ００４５	２８．１％	３５．０％	３７．８％
Ａ００４６	３４．３％	３８．４％	４０．９％
Ａ００４７	４０．９％	４２．９％	４４．５％
Ａ００４８	３８．５％	４４．０％	４６．９％
Ａ００４９	４６．２％	４９．４％	４９．３％
Ａ００５０	４２．９％	４９．８％	５２．１％
Ａ００５１	４５．９％	４５．４％	５２．１％
Ａ００５３	３４．８％	４０．０％	４６．９％
Ａ００５４	２８．７％	３５．８％	４１．４％
Ａ００５５	２８．１％	３２．４％	４１．８％
Ａ００５６	３４．４％	４０．９％	４１．３％
Ａ００５７	２９．１％	３７．０％	４３．４％
Ａ００５８	２８．９％	３６．６％	４２．１％
Ａ００５９	２７．４％	３６．６％	３８．７％
Ａ００６０	３２．４％	３９．０％	４２．０％
Ａ００６１	２７．５％	３８．９％	４２．８％
Ａ００６２	－－	－－	－－
Ａ００６３	２１．２％	３１．０％	３８．８％
Ａ００６４	４１．８％	４６．２％	５３．６％
Ａ００６５	３８．７％	５０．０％	５０．８％
Ａ００６６	３６．７％	４５．４％	５３．７％
Ａ００６７	３２．７％	３９．１％	４４．３％
Ａ００６８	５１．９％	５４．２％	５８．３％
Ａ００６９	３２．０％	４０．４％	４６．１％
Ａ００７０	３２．９％	３９．１％	４１．７％
Ａ００７１	４４．７％	４６．８％	５３．９％
Ａ００７２	４５．５％	５２．２％	５９．４％

Ａ００７３	４７．３％	５４．８％	５９．７％
Ａ００７４	－－	－－	－－
Ａ００７５	－－	－－	－－
Ａ００７６	３６．１％	４０．０％	４４．９％
Ａ００７７	４１．１％	４８．７％	４９．４％
Ａ００７８	５０．１％	５５．８％	５７．６％
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％

【０４２７】
Ｂ－系列の化合物
【０４２８】
【化５１】


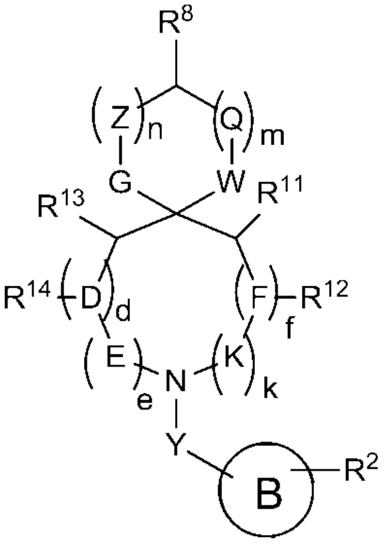
【０４２９】
R^1、R^2、R^3及びR^4、Ｗ、X^-、及びＺの各基、点線、ｎ、及びｍは、本明細書中何処かで定義される。
【０４３０】

【表８】

ＦＬＮＡ結合化合物	ＦＬＮＡ結合化合物の濃度		
	０．０１μＭ	０．１μＭ	１μＭ
	結合阻害パーセント		
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％
５００９	４２．５％	４７．３％	５４．３％
Ｂ０００１	３７．１％	４８．８％	５４．３％
Ｂ０００２	４０．２％	４６．４％	５５．０％
Ｂ０００３	４５．４％	５２．９％	６３．５％
Ｂ０００４	３８．９％	５０．０％	５４．８％
Ｂ０００５	３１．８％	３４．８％	４１．７％
Ｂ０００６	４５．１％	５３．５％	６１．３％
Ｂ０００７	４３．６％	５３．１％	５７．３％
Ｂ０００８	３５．５％	４０．３％	５２．８％
Ｂ０００９	３９．６％	４７．６％	５３．６％
Ｂ００１０	３９．４％	４３．４％	５０．３％
Ｂ００１１	４０．９％	５０．３％	５５．８％
Ｂ００１２	３９．４％	４６．９％	５１．７％
Ｂ００１３	２５．２％	３５．１％	４３．４％
Ｂ００１４	２５．７％	３０．９％	３７．８％
Ｂ００１５	３０．４％	３５．３％	４２．３％
Ｂ００１６	２７．１％	３３．７％	４１．９％
Ｂ００１７	２８．３％	３６．６％	４４．６％
Ｂ００１８	３７．２％	４３．７％	４７．６％
Ｂ００１９	３４．３％	４１．０％	４９．０％
Ｂ００２０	３８．１％	４５．５％	５０．６％
Ｂ００２１	３２．５％	４３．１％	４７．６％
Ｂ００２２	３４．３％	４０．４％	４５．６％
Ｂ００２３	２８．５％	３７．８％	４６．４％
Ｂ００２４	３４．８％	４３．４％	４７．７％
Ｂ００２５	４１．７％	４９．４％	５６．６％
Ｂ００２６	４１．１％	４３．３％	４８．２％
Ｂ００２７	４０．２％	４６．７％	４９．８％
Ｂ００２８	３８．２％	４２．８％	４９．１％
Ｂ００２９	３３．４％	４２．９％	５０．２％
Ｂ００３０	４７．０％	５０．５％	５７．６％
Ｂ００３１	３６．２％	４４．２％	５０．５％
Ｂ００３２	４５．１％	５１．３％	４８．９％
Ｂ００３３	４２．１％	４６．８％	４９．４％

Ｂ００３４	４９．１％	５４．２％	５９．１％
Ｂ００３５	４５．４％	４４．７％	５１．０％
Ｂ００３６	４６．６％	５２．８％	６２．１％
Ｂ００３７	４７．４％	５３．０％	５２．４％
Ｂ００３８	４１．２％	５０．１％	５７．０％
Ｂ００３９	４３．３％	４５．７％	５０．９％
Ｂ００４０	４０．０％	５３．１％	５７．１％
Ｂ００４１	４４．０％	４６．８％	５２．８％
Ｂ００４２	４０．８％	４６．４％	５１．６％
Ｂ００４３	３０．８％	３９．２％	４６．８％
Ｂ００４４	３５．２％	３９．５％	４４．４％
Ｂ００４５	６３．２％	６８．２％	７３．９％
Ｂ００４６	４２．２％	５０．２％	５５．４％
Ｂ００４７	３０．７％	３７．６％	４７．１％
Ｂ００４８	３４．７％	４１．９％	４３．９％
Ｂ００４９	３２．２％	４０．１％	４７．１％
Ｂ００５０	２９．２％	３４．５％	３９．８％
Ｂ００５１	２９．９％	３５．７％	４３．７％
Ｂ００５２	３０．２％	３９．１％	４４．３％
Ｂ００５３	３３．１％	３７．３％	４７．６％
Ｂ００５４	２５．６％	３２．６％	４３．３％
Ｂ００５５	６３．２％	６８．２％	７３．９％
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％

【０４３１】
Ｃ－系列－１の化合物
【０４３２】
【化５２】



【０４３３】
上記式中の各記号は、本明細書中何処かで定義される。
【０４３４】

【表９】

ＦＬＮＡ結合化合物	ＦＬＮＡ結合化合物の濃度		
	０．０１μＭ	０．１μＭ	１μＭ
	結合阻害パーセント		
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％
７８６６	３８．５％	４７．９％	５３．４％
Ｃ０００１	３４．８％	４２．９％	５１．３％
Ｃ０００２	３８．４％	４５．６％	４２．８％
Ｃ０００３	３８．３％	４５．３％	４８．８％
Ｃ０００４	３７．６％	４２．３％	４４．７％
Ｃ０００５	３５．２％	４４．５％	５１．５％
Ｃ０００６	４１．６％	４６．８％	５１．８％
Ｃ０００７	４０．５％	４６．３％	４８．９％
Ｃ０００８	４２．２％	５２．３％	５４．４％
Ｃ０００９	４１．７％	４９．０％	５３．９％
Ｃ００１０	３９．８％	４２．７％	４７．１％
Ｃ００１１	３７．６％	４１．４％	４６．０％
Ｃ００１２	２６．３％	３９．５％	４６．４％
Ｃ００１３	３９．６％	４２．４％	４９．１％
Ｃ００１４	２９．５％	３８．８％	４０．０％
Ｃ００１５	３１．２％	４０．６％	４５．５％
Ｃ００１６	３８．３％	４３．８％	４９．１％
Ｃ００１７	２８．９％	３５．４％	４０．７％
Ｃ００１８	４２．３％	４５．９％	５３．４％
Ｃ００１９	３０．１％	３８．２％	４３．６％
Ｃ００２１	３４．０％	３８．４％	４０．６％
Ｃ００２２	３４．５％	３７．６％	４３．９％
Ｃ００２３	３５．９％	４１．７％	４７．２％
Ｃ００２４	３７．９％	４６．４％	５０．４％
Ｃ００２５	３７．２％	４１．４％	４５．１％
Ｃ００２８	３２．２％	３６．６％	４３．３％
Ｃ００２９	３８．６％	４３．２％	５０．５％
Ｃ００３０	３７．４％	４５．４％	５６．０％
Ｃ００３２	４１．５％	５０．５％	５５．３％
Ｃ００３３	４３．９％	４８．４％	５１．３％
Ｃ００３４	２９．６％	３８．３％	４４．８％
Ｃ００３８	３１．７％	３６．０％	４３．５％
Ｃ００４１	３８．３％	４７．０％	５１．２％
Ｃ００４２	４２．４％	４９．７％	５６．１％

Ｃ００４７	３０．８％	３５．２％	４１．４％
Ｃ００４８	２８．５％	３８．９％	４５．９％
Ｃ００４９	２５．３％	２７．９％	３０．３％
Ｃ００５１	２７．０％	３０．４％	３６．４％
Ｃ００５２	２８．０％	３５．６％	４０．８％
Ｃ００５３	２８．９％	３３．８％	３９．３％
Ｃ００５４	３２．９％	３９．４％	４３．３％
Ｃ００５７	ＮＤ*	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ００６０	６０．３％	６４．０％	６８．０％
Ｃ００６１	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ００６２	３９．５％	４９．５％	４８．０％
Ｃ００６４	３７．３％	４４．４％	４９．２％
Ｃ００６５	３７．１％	４４．０％	４７．０％
Ｃ００６７	３１．３％	３９．７％	４５．０％
Ｃ００６８	５３．７％	５８．６％	６２．２％
Ｃ００６９	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ００７０	４２．６％	５０．６％	５３．６％
Ｃ００７１	３９．１％	４９．６％	５５．２％
Ｃ００７２	２８．４％	３７．４％	４４．０％
Ｃ００７３	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ００７７	４５．７％	４７．７％	５１．０％
Ｃ００７８	４６．６％	４８．０％	５０．５％
Ｃ００８０Ｍ	４６．８％	５３．３％	５４．６％
Ｃ００８４Ｍ	４７．２％	５３．７％	５５．９％
Ｃ００８５Ｍ	４５．７％	５３．７％	６０．７％
Ｃ０１３８Ｍ	５３．０％	５２．０％	５９．５％
Ｃ０１３９Ｍ	４８．９％	５３．１％	６１．６％
Ｃ０１４０Ｍ	４２．３％	４９．２％	５４．４％
Ｃ０１４１Ｍ	３３．１％	３９．０％	４６．９％
Ｃ０１４３Ｍ	４５．３％	４８．４％	５７．８％
Ｃ０１４４Ｍ	４６．４％	５０．７％	５５．７％
Ｃ０１４５Ｍ	４５．１％	５３．７％	５８．３％
Ｃ０１４８Ｍ	４６．２％	５２．０％	５７．０％
Ｃ０１４９Ｍ	４８．５％	５２．３％	６２．０％
Ｃ０１５０Ｍ	４７．３％	５１．８％	６１．４％
Ｃ０１５１Ｍ	４８．３％	５１．７％	５８．７％
Ｃ０１５２Ｍ	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ０１５４Ｍ	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％

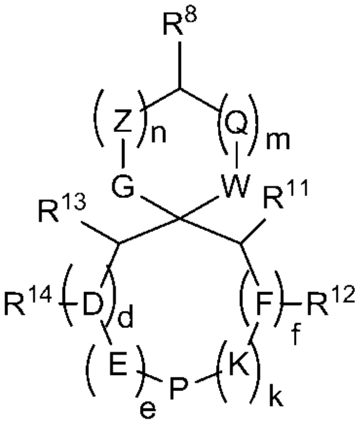
*ＮＤ＝試験せず。

【０４３５】

Ｃ－系列－２の化合物

【０４３６】

【化５３】



【０４３７】
上記式中の各記号は、本明細書中何処かで定義される。
【０４３８】

【表１０】

ＦＬＮＡ結合化合物	ＦＬＮＡ結合化合物の濃度		
	０．０１μＭ	０．１μＭ	１μＭ
	結合阻害パーセント		
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７%	４６．２９%	５０．９１%
Ｃ００１１	３７．６%	４１．４%	４６．０%
Ｃ００２６	４２．３%	４４．８%	４９．０%
Ｃ００２７	５０．８%	６１．２%	６３．８%
Ｓ－Ｃ００２７	３９．１%	４６．５%	５３．６%
Ｃ００３４－３	２９．６%	３８．３%	４４．８%
Ｃ００３７－２	ＮＤ*	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ００４０	３８．４%	４６．３%	５５．９%
Ｃ００４３	４３．９%	５１．３%	５８．０%
Ｃ００４４	３７．３%	４３．９%	５０．６%
Ｃ００４５	３９．１%	４８．９%	５３．７%
Ｃ００４６	３０．８%	３５．７%	４２．２%
Ｃ００５０	２６．７%	３４．５%	３６．４%
Ｃ００５５	２９．０%	３４．９%	３９．５%
Ｃ００５６	３３．７%	３８．９%	４１．４%
Ｃ００６０	６０．３%	６４．０%	６８．０%
Ｃ００８６Ｍ	３７．９%	４８．１%	５３．４%
Ｃ００８７Ｍ	５１．６%	５７．９%	６１．５%
Ｃ００８８Ｍ	４０．１%	５２．４%	５６．１%
Ｃ００８９Ｍ	４０．７%	４６．１%	５１．２%
Ｃ００９０Ｍ	４２．５%	５２．５%	５５．８%
Ｃ００９１Ｍ	３８．１%	３９．８%	４６．３%
Ｃ００９３Ｍ	４４．８%	４９．９%	５３．５%
Ｃ００９４Ｍ	４３．０%	５２．８%	５７．５%
Ｃ００９５Ｍ	４０．１%	４６．６%	５０．５%
Ｃ００９６Ｍ	４３．０%	４８．３%	５５．０%
Ｃ００９９Ｍ	４６．９%	５３．３%	５６．０%
Ｃ０１００Ｍ	５２．２%	５８．２%	６４．５%
Ｃ０１０１Ｍ	５０．５%	５６．４%	５９．０%
Ｃ０１０２Ｍ	５２．３%	５３．１%	５６．６%
Ｃ０１０４Ｍ	５１．４%	５４．１%	５５．２%
Ｃ０１０５Ｍ	５５．７%	６２．０%	６８．８%
Ｃ０１０６Ｍ	４５．８%	５５．６%	５８．９%
Ｃ０１０８Ｍ	５４．６%	６１．４%	６８．７%

Ｃ０１１４Ｍ	５７．１％	６３．２％	６６．７％
Ｃ０１１５Ｍ	４７．８％	５７．８％	５９．９％
Ｃ０１１６Ｍ	５３．９％	６０．０％	６２．９％
Ｃ０１１８Ｍ	５６．６％	６１．４％	６２．４％
Ｃ０１１９Ｍ	４１．６％	５５．５％	６０．０％
Ｃ０１２３Ｍ	５１．９％	６０．５％	６２．９％
Ｃ０１２４Ｍ	４７．７％	５２．２％	５８．７％
Ｃ０１２５Ｍ	５４．２％	５９．７％	６３．３％
Ｃ０１２６Ｍ	５０．７％	５５．４％	６７．３％
Ｃ０１２８Ｍ	４６．５％	５４．４％	５８．２％
Ｃ０１３３Ｍ	４７．８％	５４．９％	５８．５％
Ｃ０１３４Ｍ	５５．７％	６０．５％	６１．９％
Ｆ－Ｃ０１３４	３７．４％	４５．７％	５３．１％
Ｃ０１３５Ｍ	５３．９％	５５．１％	６２．３％
Ｃ０１３６Ｍ（Ｐ５）	４６．７％	５５．２％	５８．２％
Ｃ０１３７Ｍ（Ｐ７）	４２．４％	４９．９％	６１．２％
Ｃ０１４２Ｍ	３５．１％	３９．４％	５６．０％
Ｃ０１４３Ｍ	４５．３％	４８．４％	５７．８％
Ｃ０１４８Ｍ	４６．２％	５２．０％	５７．０％
Ｃ０１４９Ｍ	４８．５％	５２．３％	６２．０％
Ｃ０１５０Ｍ	４７．３％	５１．８％	６１．４％
Ｃ０１５１Ｍ	４８．３％	５１．７％	５８．７％
Ｃ０１５２Ｍ－４	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
Ｃ０１５３Ｍ－３	ＮＤ	ＮＤ	ＮＤ
対照物質ナロキソンの平均	３９．８７％	４６．２９％	５０．９１％

＊ＮＤ＝試験せず。

【０４３９】

化合物４、９、及び１０、ならびに、１０ｎＭのＦＩＴＣ－ＮＬＸの代わりに１００ｎＭの凍結保存したＦＩＴＣ－ＮＬＸを用いて、予備試験を、この真上のものと同様に行った。この試験を２回行った結果の平均を以下に示す。

【０４４０】

【表１１】

化合物	０．１ｎＭ	１ｎＭ	１０ｎＭ	１００ｎＭ	１μＭ
４	１８．８％	２１．３％	１７．９％	２８．８％	４２．９％
９	２２．５％	２４．８％	２７．７％	３５．３％	４９．６％
１０	２７．５％	２７．３％	２６．６％	２７．３％	３４．５％
（＋）ＮＬＸ	２２．７％	２２．８％	２３．１％	２２．８％	３９．８％

【０４４１】

〔実施例２〕

<u>ＧＴＰγＳ結合アッセイを用いたＭＯＲアゴニスト活性測定</u>

ＦＬＮＡスクリーニングの結果が陽性であった化合物のμオピエート受容体（ＭＯＲ）アゴニスト活性を査定するため、化合物を、線条体膜を用いた［^{35}Ｓ］ＧＴＰγＳ結合アッセイで試験した。先の研究から、線条体膜では、ＭＯＲの活性化が、［^{35}Ｓ］ＧＴＰγＳとＧαｏの結合の増加を導くことがわかっている（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　２００

５　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ　１３５：２４７－２６１）。このアッセイは、最初の受容体仲介事象の１つにおいて、受容体の占有により生じる機能上の結果を測定する。このアッセイは、力価、有効性、及びアンタゴニスト親和性という従来の薬理パラメーターの測定が可能であり、合わせて利点として、分析するパラメーターが受容体の更に下流にある場合に起こり得るアゴニストの測定値の増幅又は他の修飾が、このアッセイでは起こらない。

【０４４２】

すなわち、線条体組織を、氷冷した１０倍体積の２５ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．４）に加えてホモジナイズした。この緩衝液には、１ｍＭのＥＧＴＡ、１００ｍＭのスクロース、５０μｇ／ｍｌのロイペプチン、０．０４ｍＭのＰＭＳＦ、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、及び０．２％の２－メルカプトエタノールが含まれていた。ホモジナイズしたものを、８００×ｇで５分間遠心し、上清を、４９，０００×ｇで２０分間遠心した。得られるペレットを、１０倍体積の反応用緩衝液に懸濁させた。反応用緩衝液には、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１００ｍＭのＮａＣｌ、５０μｇ／ｍｌのロイペプチン、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、０．０４ｍＭのＰＭＳＦ、及び０．０２％の２－メルカプトメタノールが含まれていた。

【０４４３】

得られる線条体膜調製物（２００μｇ）を、反応用緩衝液に混合し、３０℃で５分間その状態に維持した（インキュベートした）。反応用緩衝液は上記のとおりのものに、２５０μｌの合計体積中、追加で１ｍＭの$ＭｇＣｌ_2$及び０．５ｎＭの［^{35}Ｓ］ＧＴＰγＳ（０．１μＣｉ／アッセイ、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　Ｌｉｆｅ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）が含まれていた。注目しているアッセイ化合物を０．１～１０μＭで添加して、又は添加せずに、混合物を更に５分間、維持した。氷冷した反応用緩衝液（２０ｍＭの$ＭｇＣｌ_2$及び１ｍＭのＥＧＴＡを含む）７５０μｌで希釈し、直ちに１６，０００×ｇで５分間遠心することで、反応を終了させた。

【０４４４】

得られるペレットを、免疫沈降用緩衝液（０．５％ジギトニン、０．２％コール酸ナトリウム、及び０．５％ＮＰ－４０を含有）０．５ｍｌに入れて１０秒間超音波処理することで溶解させた。正常ウサギ血清（１μｌ）を溶解液１ｍｌに添加し、２５℃で３０分間インキュベートした。２５℃で３０分間、タンパク質Ａ／Ｇ結合アガロースビーズ２５μｌとともにインキュベートし、続いて４℃で５分間、５，０００×ｇで遠心分離することで、非特異的免疫複合体を除去した。上清を分割して、別々に、２５℃で３０分間、Ｇαｏタンパク質に対して産生された抗体とともにインキュベートした（１：１，０００の希釈）。

【０４４５】

２５℃で３０分間、アガロース結合タンパク質Ａ／Ｇビーズ４０μｌとともにインキュベートし、４℃で５分間、５，０００×ｇで遠心分離することで、そのようにして形成された免疫複合体を収集した。ペレットを洗浄し、緩衝液（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ８．０）及び１％ＮＰ－４０を含有）に懸濁させた。液体シンチレーション分光測定により、懸濁液の放射能を測定した。選択化合物により誘導された、［^{35}Ｓ］ＧＴＰγＳとＧαｏの結合によるＭＯＲ活性化の特異性は、１μＭのβ－フナルトレキサミン（β－ＦＮＡ；ナルトレキソンのアルキル化誘導体であり、選択的ＭＯＲアンタゴニストである）の包含により確定させた。陽性対照として、ＤＡＭＧＯ（１μＭ又は１０μＭ）を用いた。

【０４４６】

この試験の結果を以下の表に示す。

【０４４７】

【表１２】

ＦＬＮＡ結合化合物のＭＯＲアゴニスト活性

ＦＬＮＡ結合化合物	アゴニストとしてのＦＬＮＡ結合化合物の濃度					
	0.1μM	1μM	1μM +BFNA	%DAMGO (0.1μM)	%DAMGO（1μM)	%DAMGO+ BFNA
A3333	170.7%	328.3%	65.9%	88.9%	101.0%	136.7%
A0001	94.3%	181.7%	22.2%	63.1%	78.9%	83.8%
A0002	155.6%	199.4%	6.5%	104.1%	86.6%	24.5%
A0003	176.8%	276.0%	17.1%	118.3%	119.9%	64.5%
A0004	97.4%	144.2%	86.0%	55.2%	55.6%	130.9%
A0005	179.7%	239.2%	23.5%	105.0%	89.6%	45.1%
A0006	170.0%	190.9%	18.2%	113.8%	82.9%	68.7%
A0007	102.0%	221.9%	40.4%	68.3%	96.4%	152.5%
A0008	163.8%	235.0%	133.9%	109.6%	102.1%	505.3%
A0009	70.2%	126.4%	93.9%	39.8%	48.7%	142.9%
A0010	277.2%	319.0%	190.3%	161.9%	119.5%	365.3%
A0011	236.3%	287.5%	47.0%	158.2%	124.9%	177.4%
A0012	149.3%	185.7%	122.4%	99.9%	80.7%	461.9%
A0013	102.1%	164.8%	86.1%	57.8%	63.6%	131.1%
A0014	147.0%	174.9%	140.8%	83.2%	67.5%	214.3%
A0015	110.9%	150.1%	62.5%	64.8%	56.2%	120.0%
A0017	161.9%	246.0%	65.2%	96.9%	100.4%	187.9%
A0020	168.6%	217.4%	67.4%	100.9%	88.7%	194.2%
A0021	133.3%	275.3%	12.1%	79.8%	112.4%	34.9%
A0022	154.1%	216.0%	28.0%	90.0%	80.9%	53.7%
A0025	58.6%	138.7%	52.2%	33.2%	54.5%	198.5%
A0026	140.7%	179.8%	120.8%	79.7%	70.7%	459.3%
A0028	143.6%	187.7%	116.7%	81.3%	73.8%	443.7%
A0029	173.8%	206.5%	22.3%	98.4%	81.2%	84.8%
A0030	133.4%	287.8%	165.2%	75.5%	113.2%	628.1%
A0031	178.2%	297.0%	150.9%	100.9%	116.8%	573.8%
A0032-1	187.4%	324.5%	224.5%	95.5%	117.6%	303.8%
A0032	226.9%	257.8%	133.0%	115.6%	93.4%	180.0%
A0033	155.8%	254.6%	118.2%	79.4%	92.2%	159.9%
A0035	120.6%	158.8%	88.6%	61.5%	57.5%	119.9%
A0036	144.1%	167.5%	63.2%	73.4%	60.7%	85.5%
A0037	177.9%	236.2%	104.6%	90.7%	85.6%	141.5%
A0038	176.7%	234.5%	107.0%	90.1%	85.0%	144.8%
A0039	267.8%	339.6%	173.5%	136.5%	123.0%	234.8%
A0040	46.1%	149.0%	16.7%	23.5%	54.0%	22.6%

A0041	212.7%	283.6%	50.6%	108.4%	102.8%	68.5%
A0042	147.5%	233.1%	89.5%	75.2%	84.5%	121.1%
AOO43	183.3%	223.8%	89.1%	93.4%	81.1%	120.6%
A0044	176.2%	209.1%	134.7%	89.8%	75.8%	182.3%
A0045	143.9%	274.2%	99.2%	73.3%	99.3%	134.2%
A0046	257.5%	354.1%	140.0%	131.2%	128.3%	189.4%
A0047	233.0%	255.0%	116.5%	118.8%	92.4%	157.6%
A0048	233.7%	302.9%	167.2%	119.1%	109.7%	226.3%
A0049	232.3%	370.3%	107.1%	118.4%	134.2%	144.9%
A0050	151.0%	189.3%	81.0%	77.0%	68.6%	109.6%
A0051	290.4%	386.6%	211.6%	148.0%	140.1%	286.3%
A0053	78.5%	118.2%	15.1%	46.5%	47.5%	46.2%
A0054	74.9%	159.2%	114.1%	44.4%	63.9%	348.9%
A0055	89.8%	195.2%	33.5%	53.2%	78.4%	102.4%
A0056	115.6%	129.6%	17.4%	74.1%	56.2%	43.6%
A0057	124.2%	192.1%	44.8%	79.6%	83.3%	112.3%
A0058	70.7%	244.3%	59.9%	45.3%	106.0%	150.1%
A0059	99.2%	129.9%	85.7%	63.5%	56.4%	214.8%
A0060	99.7%	158.2%	14.3%	63.9%	68.6%	35.8%
A0061	110.3%	197.1%	10.7%	70.7%	85.5%	26.8%
A0062	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A0063	122.8%	245.8%	310%	78.7%	106.6%	77.7%
A0064	219.2%	262.9%	43.7%	127.4%	119.7%	126.7%
A0065	197.6%	266.8%	44.9%	126.6%	115.7%	112.5%
A0066	151.9%	195.6%	59.2%	88.3%	89.0%	171.6%
A0067	170.8%	254.4%	33.9%	99.2%	115.8%	98.3%
A0068	73.9%	110.4%	98.1%	36.8%	35.2%	182.0%
A0069	122.7%	244.2%	29.5%	71.3%	111.2%	85.5%
A0070	128.6%	195.3%	80.3%	74.7%	88.9%	232.8%
A0071	225.7%	310.9%	239.4%	128.2%	122.9%	1088.2%
A0072	254.3%	305.1%	171.8%	126.8%	97.2%	318.7%
A0073	201.7%	325.7%	185.8%	100.5%	103.7%	344.7%
A0074	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A0075	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A0076	79.8%	172.6%	41.2%	46.4%	78.6%	119.4%
A0077	300.1%	334.7%	103.5%	170.5%	132.3%	470.5%
A0078	250.5%	289.9%	147.8%	124.9%	92.3%	274.2%

【０４４８】

【表１３】

系列ＢのＦＬＮＡ結合化合物のＭＯＲアゴニスト活性

ＦＬＮＡ結合化合物	アゴニストとしてのＦＬＮＡ結合化合物の濃度					
	0.1μM	1μM	1μM +BFNA	%DAMGO (0.1μM)	%DAMGO（1μM)	%DAMGO+ BFNA
5009	128.5%	270.4%	87.5%	66.9%	83.2%	181.5%
B0001	128.2%	202.3%	28.0%	77.4%	74.9%	43.1%
B0002	165.7%	219.0%	101.4%	100.0%	81.1%	156.0%
B0003	103.0%	131.1%	18.6%	59.9%	47.4%	29.0%
B0004	170.3%	231.7%	72.0%	102.8%	85.8%	110.8%
B0005	89.2%	110.4%	45.1%	50.5%	42.6%	68.6%
B0006	77.0%	131.3%	18.6%	44.8%	47.5%	29.0%
B0007	168.3%	223.3%	64.5%	95.3%	86.1%	98.2%
B0008	148.3%	264.1%	46.0%	84.0%	101.9%	70.0%
B0009	144.4%	219.9%	119.4%	81.8%	84.8%	181.7%
B0010	132.9%	184.4%	152.0%	75.3%	71.1%	231.4%
B0011	158.6%	212.6%	78.0%	95.7%	78.7%	120.0%
B0012	167.4%	212.0%	145.1%	97.8%	79.4%	278.5%
B0013	51.4%	154.1%	34.4%	29.1%	59.4%	52.4%
B0014	166.6%	250.5%	44.3%	98.5%	93.7%	67.1%
B0016	167.7%	213.6%	72.2%	99.2%	79.9%	109.4%
B0017	99.6%	122.0%	49.6%	58.9%	45.6%	75.2%
B0018	118.8%	143.0%	45.6%	70.3%	53.5%	69.1%
B0019	101.0%	256.5%	81.4%	59.7%	96.0%	123.3%
B0020	51.6%	181.6%	24.9%	30.1%	68.0%	47.8%
B0021	126.9%	256.4%	42.9%	75.9%	104.7%	123.6%
B0022	131.9%	182.7%	45.8%	78.9%	74.6%	132.0%
B0023	166.1%	245.3%	28.4%	99.4%	100.1%	81.8%
B0024	155.8%	285.9%	20.2%	93.2%	116.7%	58.2%
B0025	159.6%	234.6%	137.7%	96.3%	86.8%	211.8%
B0026	152.0%	233.3%	28.8%	88.8%	87.4%	55.3%
B0027	140.9%	266.9%	21.6%	82.3%	100.0%	41.5%
B0028	199.1%	357.7%	55.0%	103.5%	131.0%	125.3%
B0029	171.9%	210.3%	17.6%	89.4%	77.0%	40.1%
B0030	107.2%	276.1%	90.1%	62.6%	103.4%	172.9%
B0031	210.8%	272.0%	28.8%	109.6%	99.6%	65.6%
B0032	221.1%	297.7%	15.6%	115.0%	109.0%	35.5%
B0033	149.3%	188.9%	41.9%	77.6%	69.2%	95.4%
B0034	122.5%	235.2%	41.8%	71.6%	88.1%	80.2%

B0035	188.0%	248.7%	74.2%	109.8%	93.2%	142.4%
B0036	61.4%	120.6%	65.1%	39.2%	52.1%	199.7%
B0037	119.8%	186.0%	106.2%	76.5%	80.4%	325.8%
B0038	147.5%	205.3%	117.1%	94.2%	88.7%	359.2%
B0039	171.8%	290.5%	78.3%	100.4%	108.8%	150.3%
B0040	146.0%	243.3%	55.3%	93.2%	105.1%	169.6%
B0041	61.6%	109.3%	41.9%	39.3%	47.2%	128.5%
B0042	69.9%	107.5%	43.1%	39.6%	42.3%	163.9%
B0043	74.8%	248.1%	166.4%	42.4%	97.6%	632.7%
B0044	87.3%	170.0%	134.6%	49.4%	66.9%	511.8%
B0045	129.3%	193.1%	83.8%	82.6%	83.4%	257.1%
B0046	99.9%	141.9%	90.5%	63.8%	61.3%	277.6%
B0047	187.8%	235.6%	68.4%	106.3%	92.6%	260.1%
B0048	185.1%	223.4%	78.5%	104.8%	87.8%	298.5%
B0049	181.6%	364.0%	133.2%	102.8%	143.1%	506.5%
B0050	98.2%	211.0%	48.8%	58.1%	96.4%	294.0%
B0051	115.6%	167.9%	43.8%	68.4%	76.7%	263.9%
B0052	98.2%	151.7%	40.9%	58.1%	69.3%	246.4%
B0053	160.2%	299.8%	134.3%	94.8%	137.0%	809.0%
B0054	157.8%	186.7%	111.0%	93.4%	85.3%	668.7%
B0055	162.1%	338.5%	117.5%	91.8%	133.1%	446.8%
B0056	174.7%	288.8%	41.8%	98.9%	113.6%	158.9%

【０４４９】

【表１４】

系列Ｃ－１のＦＬＮＡ結合化合物のＭＯＲアゴニスト活性

ＦＬＮＡ結合化合物	アゴニストとしてのＦＬＮＡ結合化合物の濃度					
	0.1μM	1μM	1μM +BFNA	%DAMGO (0.1μM)	%DAMGO（1μM)	%DAMGO+ BFNA
7866	152.3%	308.2%	62.4%	79.3%	94.8%	129.5%
C0001	129.3%	184.3%	33.9%	75.2%	66.6%	52.9%
C0002	88.4%	93.8%	3.9%	51.4%	33.9%	6.1%
C0003	162.3%	215.9%	107.7%	91.9%	83.3%	163.9%
C0004	122.0%	228.4%	65.8%	72.1%	85.4%	99.7%
C0005	180.4%	227.2%	166.4%	105.4%	85.1%	319.4%
C0006	121.5%	204.0%	4.6%	70.6%	73.8%	7.2%
C0007	79.1%	195.0%	10.9%	46.0%	70.5%	17.0%
C0008	71.2%	201.6%	2.8%	41.4%	72.9%	4.4%
C0009	146.3%	256.2%	26.4%	85.1%	92.6%	41.2%
C0010	136.5%	307.0%	89.1%	80.7%	114.9%	135.0%
C0011	217.0%	305.0%	19.0%	126.8%	114.3%	36.5%
C0012	96.8%	224.8%	184.4%	54.8%	86.7%	280.7%
C0013	156.6%	301.2%	39.6%	91.0%	108.9%	61.8%
C0014	144.9%	153.5%	76.3%	82.0%	59.2%	116.1%
C0015	138.7%	204.7%	126.8%	78.5%	78.9%	193.0%
C0016	172.7%	230.5%	96.7%	100.4%	83.3%	150.9%
C0017	153.8%	284.5%	94.1%	87.1%	109.7%	143.2%
C0018	195.5%	247.7%	106.5%	110.7%	95.5%	162.1%
C0019	104.4%	176.6%	52.8%	59.1%	68.1%	80.4%
C0021	159.7%	192.0%	90.7%	94.5%	87.8%	546.4%
C0022	194.3%	328.7%	13.4%	113.5%	123.2%	25.7%
C0023	153.2%	233.7%	23.2%	89.5%	87.6%	44.5%
C0024	178.4%	229.6%	59.3%	92.8%	84.1%	135.1%
C0025	235.7%	320.7%	80.2%	122.6%	117.5%	182.7%
C0028	93.9%	132.4%	78.4%	55.6%	60.5%	472.3%
C0029	175.4%	308.8%	16.6%	91.2%	113.1%	37.8%
C0030	150.3%	226.8%	95.0%	96.0%	98.0%	291.4%
C0032	145.4%	202.0%	80.9%	92.8%	87.3%	248.2%
C0033	134.5%	186.4%	76.6%	85.9%	80.6%	235.0%
C0034	103.6%	167.9%	80.1%	61.3%	76.7%	482.5%
C0041	186.1%	244.4%	95.5%	110.1%	111.7%	575.3%
C0042	167.1%	260.9%	110.6%	98.9%	119.2%	666.3%

C0047	142.2%	206.1%	80.1%	98.1%	88.5%	182.0%
C0048	209.1%	245.3%	89.9%	144.2%	105.3%	204.3%
C0049	106.6%	210.0%	81.0%	73.5%	90.1%	184.1%
C0051	94.4%	170.4%	55.9%	65.1%	73.1%	127.0%
C0052	108.4%	162.8%	42.7%	74.8%	69.9%	97.0%
C0053	104.0%	157.2%	93.1%	71.7%	67.5%	211.6%
C0054	68.2%	127.0%	43.5%	47.0%	54.5%	98.9%
C0057	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
C0061	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0062	127.8%	310.5%	59.8%	81.9%	134.7%	149.9%
C0064	213.8%	349.6%	38.1%	124.2%	159.1%	110.4%
C0065	198.3%	279.5%	47.7%	127.0%	121.3%	119.5%
C0067	142.7%	179.0%	33.5%	82.9%	81.5%	97.1%
C0068	107.2%	263.1%	165.9%	53.4%	83.8%	307.8%
C0069	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0070	165.6%	210.8%	114.2%	96.2%	95.9%	331.0%
C0071	276.3%	355.3%	177.1%	160.5%	161.7%	513.3%
C0072	172.7%	259.1%	67.1%	100.3%	117.9%	194.5%
C0073	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0077	192.7%	265.4%	136.7%	109.5%	104.9%	621.4%
C0078	138.1%	236.6%	170.7%	82.4%	106.4%	359.4%
C0080M	187.9%	205.4%	167.1%	112.1%	92.4%	351.8%
C0082M	228.1%	338.4%	97.6%	113.7%	107.8%	181.1%
C0084M	163.1%	255.5%	133.2%	97.3%	114.9%	280.4%
C0085M	211.6%	246.2%	43.7%	105.5%	78.4%	112.6%
C0138M	126.9%	183.9%	51.5%	86.3%	90.9%	131.0%
C0139M	156.1%	206.6%	51.0%	106.2%	102.2%	129.8%
C0140M	126.1%	215.4%	83.0%	85.8%	106.5%	211.2%
C0141M	161.5%	213.9%	47.9%	109.9%	105.8%	121.9%
C0143M	81.0	193.3	86.5	47.1%	59.3%	94.7%
C0144M	186.3	295.9	125.9	108.3%	90.8%	137.9%
C0145M	193.0	289.2	87.0	112.2%	88.7%	95.3%
C0146M	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0147MA2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0148MA2	181.3	360.6	87.6	105.4%	110.6%	95.9%
C0149M	209.8	406.7	93.4	122.0%	124.8%	102.3%
C0150M	167.1	423.1	93.4	97.2%	129.8%	173.2%
C0151M	346.8	397.6	212.8	201.6%	122.0%	233.1%
C0152M	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DAMGO平均	168.5%	266.1%	53.2%	ND	ND	ND

*ＮＤ＝試験せず。

【０４５０】

【表１５】

系列Ｃ－２のＦＬＮＡ結合化合物のＭＯＲアゴニスト活性

ＦＬＮＡ結合化合物	アゴニストとしてのＦＬＮＡ結合化合物の濃度					
	0.1μM	1μM	1μM +BFNA	%DAMGO (0.1μM)	%DAMGO (1μM)	%DAMGO +BFNA
C0011	217.0%	305.0%	19.0%	126.8%	114.3%	36.5%
C0026	207.2%	288.4%	21.2%	107.7%	105.6%	48.3%
C0027	233.2%	313.9%	72.2%	121.3%	115.0%	164.5%
S-C0027	156.2%	286.8%	56.2%	74.2%	84.4%	98.1%
C0034-3	ND*	ND	ND	ND	ND	ND
C0037-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0040	145.8%	308.3%	90.4%	93.1%	133.2%	277.3%
C0043	175.4%	242.6%	83.3%	103.8%	110.9%	501.8%
C0044	173.7%	280.1%	59.1%	102.8%	128.0%	356.0%
C0045	149.2%	238.8%	105.3%	88.3%	109.1%	634.3%
C0046	286.2%	492.9%	156.8%	197.4%	211.5%	356.4%
C0050	110.3%	127.6%	59.0%	76.1%	54.8%	134.1%
C0055	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0056	98.6%	193.4%	86.3%	68.0%	83.0%	196.1%
C0060	166.5%	218.9%	143.9%	114.8%	93.9%	327.0%
C0086M	206.8%	265.3%	152.3%	117.5%	104.9%	692.3%
C0087M	262.8%	329.6%	142.5%	138.9%	132.8%	293.8%
C0088M	276.3%	355.3%	177.1%	160.5%	161.7%	513.3%
C0089M	234.5%	295.3%	81.9%	136.3%	134.4%	237.4%
C0090M	237.0%	341.0%	41.0%	137.7%	155.2%	118.8%
C0091M	207.9%	274.4%	80.8%	118.1%	108.5%	367.3%
C0093M	140.0%	211.8%	44.0%	81.3%	96.4%	127.5%
C0094M	172.5%	263.5%	115.3%	100.2%	119.9%	334.2%
C0095M	189.1%	224.6%	107.7%	107.4%	88.8%	489.5%
C0096M	186.4%	328.9%	127.1%	105.9%	130.0%	577.7%
C0099M	157.2%	195.7%	114.7%	93.8%	88.0%	241.5%
C0100M	173.6%	245.9%	195.6%	103.6%	110.6%	411.8%
C0101M	138.2%	274.3%	174.8%	82.5%	123.4%	368.0%
C0102M	131.8%	272.0%	150.4%	78.6%	122.4%	316.6%
C0104M	188.2%	238.9%	143.8%	99.5%	96.3%	296.5%
C0105M	198.1%	220.3%	73.1%	104.7%	88.8%	150.7%
C0106M	171.8%	240.7%	117.2%	102.5%	108.3%	246.7%
C0108M	205.6%	258.5%	76.9%	108.7%	104.1%	158.6%
C0114M	114.0%	144.3%	35.9%	77.6%	71.4%	91.3%

C0115M	177.2%	226.8%	118.4%	105.7%	102.0%	249.3%
C0116M	258.4%	302.8%	152.0%	136.6%	122.0%	313.4%
C0118M	166.2%	261.5%	79.2%	87.8%	105.4%	163.3%
C0119M	105.7%	167.8%	35.1%	71.9%	83.0%	89.3%
C0124M	252.0%	305.1%	61.4%	133.2%	122.9%	126.6%
C0125M	168.6%	195.2%	159.7%	89.1%	78.6%	329.3%
C0126M	181.8%	265.3%	108.5%	108.5%	119.3%	228.4%
C0128M	197.8%	286.0%	63.9%	104.5%	115.2%	131.8%
C0133M	139.4%	214.8%	72.4%	83.2%	96.6%	152.4%
C0134M	158.5%	207.3%	46.6%	94.6%	93.3%	98.1%
F-C0134	290.6%	378.9%	66.6%	138.1%	111.4%	116.2%
C0135M	161.3%	310.1%	113.3%	85.3%	124.9%	233.6%
C0136M(P5)	176.8%	237.3%	74.5%	93.4%	95.6%	153.6%
0137M(P7)	180.8%	193.8%	55.8%	95.6%	78.1%	115.1%
C0142M	143.7%	192.5%	98.7%	97.8%	95.2%	251.1%
C0143M	81.0%	193.3%	86.5%	47.1%	59.3%	94.7%
C0144M-2	186.3%	295.9%	125.9%	108.3%	90.8%	137.9%
C0145M-3	193.0%	289.2%	87.0%	112.2%	88.7%	95.3%
C0149M-2	209.8%	406.7%	93.4%	122.0%	124.8%	102.3%
C0150M-2	167.1%	423.1%	158.1%	97.2%	129.8%	173.2%
C0151M-2	346.8%	397.6%	212.8%	201.6%	122.0%	233.1%
C0152M-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C0153M-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DAMGO平均	168.5%	266.1%	53.2%	ND	ND	ND

＊ＮＤ＝試験せず。

【０４５１】

化合物４、９、及び１０、ならびに合成し直した化合物Ｃ０１３４Ｍ及びＤＡＭＧＯを用いて、予備試験を、この真上のものと同様に行った。この試験を２回行った結果の平均を以下に示す。

【０４５２】

【表１６】

	アゴニストとしてのＦＬＮＡ結合化合物の濃度		
化合物	０．１μＭ	１μＭ	１μＭ＋βＮＦＡ
４	１３３．９％	１６５．２％	４９．５％
９	１５６．６％	１９７．２％	５６．６％
１０	１６３．１％	１９１．８％	６０．４％
Ｃ０１３４Ｍ	１５０．７％	２２４．０％	５３．２％
ＤＡＭＧＯ	１４４．７％	２３３．４％	５６．８％

【０４５３】

上記の結果は、化合物９及び１０が、ＦＬＮＡによく結合するだけでなく、ＭＯＲアゴニストでもあるのに対して、化合物４は、ＦＬＮＡにはよく結合するものの、他の２種の化合物ほど強力なＭＯＲアゴニストではなかったことを示す。新たに合成した化合物Ｃ０１３４Ｍは、先に示されていたのと同様なＭＯＲアゴニスト活性を示した。

【０４５４】

〔実施例３Ａ〕

パイロット試験：免疫共沈降によるＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４及びＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ会合のウエスタンブロットアッセイによる査定

リンパ球を用意するため、静脈血７ｍｌをＥＤＴＡ含有採血管、すなわちＳ－ｍｏｎｏｖｅｔｔｅ（Ｓａｒｓｔｅｄｔ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＮＣ）に採血した。採血した血液（６ｍｌ）を、２５℃で、６ｍｌのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ－１０７７（Ｓｉｇｍａ、ＳｔＬｏｕｉｓ、ＭＯ）に層状に重ね、抗凝固処理された血液全部を４００×ｇで３０分間（２５℃）遠心して、血漿（表層）及びリンパ球（不透明界面）を得た。リンパ球を、酸素添加クレブス（Kreb's）・リンゲル液６ｍｌと混合し、続いて２５０×ｇで１０分間遠心分離し、再懸濁させることによる洗浄を２回行った。最後にペレットを、酸素添加クレブス（Kreb's）・リンゲル液２５０μｌに再懸濁させてから、ブラッドフォード法によりタンパク質含有量を測定し、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａ$β_{42}$複合体のレベルを査定した。リンパ球を保管するため、リンパ球ペレットを、氷冷した酸素添加クレブス（Kreb's）・リンゲル（１０％グリセロール含有）２５０μｌに再懸濁させ、１時間－２０℃に保管してから、－８０℃で貯蔵した。

【０４５５】

リンパ球中のＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａ$β_{42}$複合体のレベルを測定するため、対照被験者由来のリンパ球（５０μｇ）を、１００ｎＭのＡ$β_{42}$を含む又は含まないクレブス（Kreb's）・リンゲル液０．２５ｍｌ中、３７℃で３０分間、インキュベートし、ＡＤ被験者由来のリンパ球（５０μｇ）を、クレブス（Kreb's）・リンゲル液０．２５ｍｌ中、３７℃で３０分間、インキュベートした。対照被験者及びＡＤ被験者由来のリンパ球のインキュベーションは、同時に、化合物Ｃ０１０５（１ｎＭ）の存在下又は不在下でも行った。インキュベーション混合物には、インキュベーションの間１０分ごとに１分間、９５％O_2／５％CO_2で曝気した。凍結リンパ球標本を用いる場合は、リンパ球懸濁液を－８０℃から取り出した後１時間－２０℃に保管することで徐々に解凍し、次いで４℃で解凍した。

【０４５６】

氷冷した、Ca^{2+}を含まないクレブス（Kreb's）・リンゲル液（０．５ｍＭのＥＧＴＡ／０．１ｍＭのＥＤＴＡ、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を含有）１ｍｌを添加し、続いて遠心分離することで、インキュベーションを終了した。得られるリンパ球ペレットを、氷冷した免疫沈降用緩衝液０．２５ｍｌに加えてホモジナイズした。ホモジナイズしたものを、１０００×ｇで５分間（４℃）遠心し、上清（ミトコンドリアを除いた画分）を氷上で１０秒間超音波処理し、６０分間（４℃）上下左右を完全に回転させて、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ポリオキシエチレン（４０）ノニルフェニルエーテル（ＮＰ－４０）に溶解させた。得られる溶解液を、５０，０００×ｇで５分間遠心することにより清澄させ、免疫沈降用緩衝液０．７５ｍｌで希釈してから、免疫共沈降を行って、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体、α７ｎＡＣｈＲ－Ａ$β_{42}$複合体を査定した。

【０４５７】

溶解液中のＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体、及びＡ$β_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体を、それぞれ、タンパク質Ａ結合アガロースビーズに固定したウサギ抗ＦＬＮＡ（１μｇ）又は抗Ａ$β_{42}$抗体（１μｇ）とともに４℃で１６時間インキュベートすることで、免疫沈降により単離した。得られる免疫複合体を、４℃で遠心してペレットにした。氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．２）１ｍｌ及び遠心分離を用いて３回洗浄してから、単離したＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体、及びＡ$β_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体を、別々に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ標本調製用緩衝液（６２．５ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ６．８；１０％グリセロール、２％ＳＤＳ；５％２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー）１００μｌに入れて５分間煮沸することにより、溶解させた。

【０４５８】

抗ＦＬＮＡ免疫沈降物の５０％に含まれるα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４の含有量ならびに抗Ａ$β_{42}$免疫沈降物の５０％に含まれるα７ｎＡＣｈＲの含有量を、モノクローナル抗α７ｎＡＣｈＲ抗体又は抗ＴＬＲ４抗体を用いたウエスタンブロット法により測定し、濃

度測定法により定量した。ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４複合体のブロットを剥離させて、モノクローナル抗ＦＬＮＡを用いて再探索することにより、免疫沈降効率及び添加を査定した。ブロットの結果を図１Ａに、定量したものを図１Ｃに示す。

【０４５９】

ＦＬＮＡと会合したα７ｎＡＣｈＲの量は、対照リンパ球に比べてＡＤリンパ球の方が多い（ＡＤのＫ－Ｒレーンと対照Ｋ－Ｒレーンの比較より）。対照リンパ球にＡβ$_{42}$を添加すると、α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ会合が増加する（対照のＫ－ＲレーンとＡβ$_{42}$レーンの比較より）。対照リンパ球にＡβ$_{42}$を添加するこの処理は、未処理のＡＤリンパ球でのα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ会合レベルを模倣する（対照のＡβ$_{42}$処理したレーンとＡＤ１及びＡＤ２のＫ－Ｒレーンの比較より）ものであり、そうであることから、ＡＤ代用標準として用いることが可能かもしれない。Ａβ$_{42}$処理した対照リンパ球にＣＯ１０５を添加すると、未処理の場合に比べてα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体の量が減少する（対照のＫ－ＲレーンとＡβ$_{42}$＋ＣＯ１０５処理したレーンの比較より）。この減少は、未処理のＡＤリンパ球にＣＯ１０５を添加する場合もそうである（ＡＤのＫＲレーンとＣＯ１０５レーンの比較より）。

【０４６０】

ＦＬＮＡと会合したＴＬＲ４の量は、対照リンパ球に比べてＡＤリンパ球の方が多い（ＡＤのＫ－Ｒレーンと対照Ｋ－Ｒレーンの比較より）。対照リンパ球にＡβ$_{42}$を添加すると、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ会合が増加する（対照のＫ－ＲレーンとＡβ$_{42}$レーンの比較より）。対照リンパ球にＡβ$_{42}$を添加するこの処理は、未処理のＡＤリンパ球でのＴＬＲ４－ＦＬＮＡ会合レベルを模倣する（対照のＡβ$_{42}$処理したレーンとＡＤ１及びＡＤ２のＫ－Ｒレーンの比較より）。Ａβ$_{42}$処理した対照リンパ球にＣＯ１０５を添加すると、未処理の場合に比べてＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体の量が減少する（対照のＫ－ＲレーンとＡβ$_{42}$＋ＣＯ１０５処理したレーンの比較より）。この減少は、未処理のＡＤリンパ球にＣＯ１０５を添加する場合にも見られる（ＡＤのＫＲレーンとＣＯ１０５レーンの比較より）。

【０４６１】

溶解液中のＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体は、タンパク質Ａ結合アガロースビーズに固定したウサギ抗Ａβ$_{42}$抗体（１μｇ）とともに４℃で１６時間インキュベートすることで、免疫沈降により単離した。得られる免疫複合体を、４℃で遠心してペレットにした。氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．２）１ｍｌ及び遠心分離を用いて３回洗浄してから、単離したＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ標本調製用緩衝液（６２．５ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ６．８；１０％グリセロール、２％ＳＤＳ；５％２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー）１００μｌに入れて５分間煮沸することにより、溶解させた。抗Ａβ$_{42}$免疫沈降物の５０％に含まれるα７ｎＡＣｈＲｓの含有量を、以下の実施例３Ｂの第一部で説明するとおりに、モノクローナル抗α７ｎＡＣｈＲ抗体を用いたウエスタンブロット法により測定し、濃度測定法により定量した。

【０４６２】

Ａβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体レベルを測定するため、免疫共沈降プロセスにおいて、ウサギ抗アクチン（０．５μｇ）を固定したタンパク質Ａ結合アガロースと抗Ａβ$_{42}$を一緒に添加した。得られる疫沈降物のβアクチン含有量を、モノクローナル抗β－アクチンを用いる免疫ブロット法により分析して、免疫沈降効率及び添加までも示した。ブロットの結果を図１Ｂに、定量したものを図１Ｃに示す。α７ｎＡＣｈＲと会合したＡβ$_{42}$の量は、対照リンパ球に比べてＡＤリンパ球の方が多い。対照リンパ球にＡβ$_{42}$を添加すると、Ａβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体が増加する（対照のＫ－ＲレーンとＡβ$_{42}$レーンの比較より）。ＡＤリンパ球にＣＯ１０５を添加すると、未処理の場合に比べてＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体の量が減少する（ＡＤのＫ－ＲレーンとＣＯ１０５レーンの比較より）。

【０４６３】

〔実施例３Ｂ〕

臨床試験：<u>免疫共沈降によるＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４会合及びＡβ$_{42}$－α</u>

７ｎＡＣｈＲ会合のウエスタンブロットアッセイによる査定

以下に説明する手順に従って、拡張試験を行った。この手順には、治療にナイーブな（未処置の）臨床上診断が確定したＡＤ患者、同年齢の対照（ＡＭＣ）被験者、及び若年で認知機能に障害のない（ＹＣＩ）被験者由来のリンパ球調製物の使用が含まれていた。これらの拡張試験の結果を、上記の３種のタンパク質比（α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びＡβ$_{42}$／α７ｎＡＣｈＲ）のそれぞれについて、以下に個別に記載する。

【０４６４】

Ａ．アルツハイマー患者におけるα７ｎＡＣｈＲとＦＬＮＡの会合、ならびに患者由来のリンパ球身体標本調製物と正常被験者由来のリンパ球身体標本調製物とでの、過剰Ａβ$_{42}$処理後のα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ量の比較

未処理のリンパ球身体標本調製物の部分（外部からＡβ$_{42}$添加していないもの）において、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡ比の平均は、アルツハイマー患者（ｎ＝２０）で約０．６、若年で認知機能に障害のない被験者（ｎ＝１１）で約０．２、及び同年齢の対照正常被験者（ｎ＝２４）で０．３であり、これらの値は、ＡＤ患者ではＦＬＮＡが補充されてα７ｎＡＣｈＲと会合し、その結果Ａβ$_{42}$がα７ｎＡＣｈＲと結合するという概念と一致する。会合の値の範囲は、アルツハイマー患者で約０．３～約１．４、若年で認知機能に障害のない被験者で約０．１～約０．４、及び同年齢の対照正常被験者で約０．１～約０．８である。

【０４６５】

Ａβ$_{42}$処理した標本では、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡ比の平均は、アルツハイマー患者（ＡＤ）で約０．８、若年で認知機能に障害のない（ＹＣＩ）被験者で約０．９、及び同年齢の対照（ＡＭＣ）正常被験者で約０．９であり、疾患による（ＡＤ患者の場合）又は添加したＡβ$_{42}$による（若年で認知機能に障害のない被験者及び同年齢の対照正常被験者のリンパ球調製物に過剰Ａβ$_{42}$を添加した場合）結果として、これらの集団全てにおいてα７ｎＡＣｈＲのほぼ完全な占有が生じているという概念と一致する。値の範囲は、試験した２０名のＡＤ患者で約０．５～約１．６、試験した１１名の若年で認知機能に障害のない被験者で約０．５～１．３及び試験した２４名の同年齢の対照正常被験者で約０．５～約１．８であった。

【０４６６】

ＡＤ患者の方がα７ｎＡＣｈＲとＦＬＮＡの会合が多く、未処理の試験標本及びＡβ$_{42}$処理した試験標本の両方において、ＡＤ患者と正常被験者（ＹＣＩ被験者及びＡＭＣ被験者）とを区別するのに値の範囲は有効であるものの、最適ではなかった。未処理のリンパ球で得られた値とそれらを過剰Ａβ$_{42}$処理したもので得られた値との差を比較したほうが、より好適な結果が得られる。

【０４６７】

ＡＤ患者では、Ａβ$_{42}$添加後のＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲの会合増加の平均は、約４５％であった。この値に対して、若年で認知機能に障害のない被験者では、Ａβ$_{42}$処理後のＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲの会合増加の平均は約２９０％であり、同年齢の対照被験者ではＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲの会合増加の平均は約２２０％である。

【０４６８】

大事なことは、ＡＤ患者と若年で認知機能に障害のない被験者とでは、得られる値の範囲にまったく重なるところがなかったことである。ＡＤ患者で得られる値の範囲は、約５～約１３０％であったが、若年で認知機能に障害のない被験者ではその範囲は約１８０～約４７０％であった。同年齢の対照被験者での値の範囲は、約６～約７００であった。ＡＤ患者は全員、約１３０％未満の値を有したが、若年で認知機能に障害のない患者は全員、１８０％超の値を有した。同年齢の対照正常被験者２４名のうち１５名（６３％）は、約１３０％を超える会合値を有した。ＡＤ患者と同年齢の対照正常者との間に、値の重なりがあることは、当然のことである。ＡＤと同年齢の対照正常者の間に統計的な分断はあるものの（ｐ＜０．００１）、同年齢の対照正常者の約３５％は、ＡＤの範囲に値を有し

ており、この数字は、高齢で認知の正常な人々（年齢７０～８５の間）で死体解剖を行った際に、ＡＤ患者にあるものと同様なアミロイドプラークの痕跡を有していた数に一致する［Ｓａｖｖａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　３６０：２３０２－２３０９　（Ｍａｙ２８、２００９）］。これらの理由から、ＡＤ病理を有する被験者に一致する値の範囲及びＡＤ病理がないことに一致する値の範囲を確立する目的で、ＡＤ患者で得られた値を用いてＡＤ病理の範囲を確立し、ＹＣＩ被験者で得られた値を用いてＡＤ病理と一致しない範囲を確立する。

【０４６９】

わずかな例外として、アルツハイマー患者で得られる比の絶対値そのものを、患者がＡＤを有することの指標として用いることができる。しかしながら、最初に測定された（Ａβ_{42}不在下での）比の値とＡβ_{42}存在下で測定された第二の値との差を比較する方が、より好適な結果が得られる。従って、過剰Ａβ_{42}添加前後でのα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ比の増加が約１３０％未満の場合は、ＡＤ病理が存在することを示す。約１８０％を超える値は、根底にＡＤ病理がないことを示す。

【０４７０】

ＡＤ患者と同年齢の正常被験者とで得られる値の範囲に重なりがあるため、ＡＤ病理の有無を確認するのに、他の検査が役立つ可能性がある。そのような検査として、記載されるとおりのＦＬＮＡ／ＴＬＲ４比、記載されるとおりのＡβ_{42}／α７ＡＣｈＲ比、ＣＳＦ中のτタンパク質レベル、ＣＳＦ中のホスホリル化τのレベル、Ａｍｙｖｉｄ（登録商標）（Ｌｉｌｌｙ）もしくは^{18}ＦＤＧもしくはＰＩＢ－４５を用いるＰＥＴ画像法、ＭＲＩ、及びＣＮＳタンパク質に対する自己抗体の存在が挙げられるが、それらに限定されない。

【０４７１】

Ｂ．アルツハイマー患者でのＴＬＲ４とＦＬＮＡの会合、ならびに過剰Ａβ_{42}処理後の各被験者のリンパ球調製物で得られるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の比較

ＴＬＲ４対ＦＬＮＡ比は、ＡＤ患者由来の未処理のリンパ球調製物では平均が約０．５（ｎ＝２０）でその範囲は約０．２～約０．８である。若年で認知機能に障害のない被験者では、未処理のリンパ球調製物におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、平均が約０．１（ｎ＝１１）でその範囲は約０．１～約０．２である。同年齢の対照正常被験者では、未処理のリンパ球調製物におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、平均が約０．４（ｎ＝２４）でその範囲は約０．１～約０．９である。

【０４７２】

Ａβ_{42}処理したリンパ球身体標本調製物におけるＴＬＲ４対ＦＬＮＡ比は、ＡＤ患者由来のものでは、平均が約０．６（ｎ＝２０）でその範囲は約０．４～約１．０である。若年で認知機能に障害のない対照正常被験者では、処理リンパ球調製物におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、平均が約０．１（ｎ＝１１）でその範囲は約０．１～約０．２であった。同年齢の対照正常被験者由来の処理リンパ球調製物におけるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比は、平均が約０．４（ｎ＝２４）でその範囲は約０．１～約０．９であった。

【０４７３】

ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の絶対値の検討から、ＡＤ患者は、平均として、ＴＬＲ４とＦＬＮＡの会合が、若年で認知機能に障害のない被験者の場合より多く、同年齢の対照正常被験者と同様な値であることが示されるものの、値の重なりが広いので、過剰Ａβ_{42}処理前後での会合レベルを比較する方が、これら３集団での違いが際立ち、好ましい。

【０４７４】

過剰Ａβ_{42}処理後、ＡＤ患者由来のリンパ球調製物ではＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の中程度の増加が示され、その増加は平均で約４０％である。過剰Ａβ_{42}処理したＡＤ患者のリンパ球調製物は全て、それらの未処理リンパ球と比較して、約２００％以下のＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の増加を示した。従って、リンパ球身体標本調製物をＡβ_{42}処理した後のＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の増加が約２００％未満であることは、根底にＡＤ病理が存在することを示す。

【０４７５】
一方、同年齢の対照正常被験者由来のリンパ球身体標本調製物を過剰なＡβ$_{42}$で処理すると、ＴＬＲ４とＦＬＮＡの会合に顕著な増加が示され、その平均は約１５０％である。若年で認知機能に障害のない被験者では、ＴＬＲ４とＦＬＮＡの会合に、平均３００％の増加が示された。若年で認知機能に障害のない被験者全てで（ｎ＝１１）、約１８０％を超えるＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の増加が示された。従って、リンパ球身体標本調製物をＡβ$_{42}$処理した後のＴＬＲ４／ＦＬＮＡ比の増加が約２００％超であることは、どのようなＡＤ病理もないことを示す。
【０４７６】
ＡＤ患者で得られる値と若年で認知機能に障害のない被験者で得られる値とでは範囲が重なり、またＡＤ患者で得られる値と同年齢の対照正常被験者で得られる値とで重なる範囲が予想より大きいため、上記に記載される他の検査が、ＡＤ病理の有無を確認するのに、役立つ可能性がある。
【０４７７】
Ｃ．アルツハイマー患者でのＡβ$_{42}$－α７ＡＣｈＲ会合、及び過剰Ａβ$_{42}$処理後の各被験者のリンパ球身体標本調製物で得られるα７ｎＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比の比較
α７ＡＣｈＲ対Ａβ$_{42}$の比は、ＡＤ患者由来の未処理のリンパ球調製物において、平均が約０．５（ｎ＝２０）でその範囲は約０．１～約１．０である。若年で認知機能に障害のない被験者では、α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比は、未処理のリンパ球調製物において、平均が約０．３（ｎ＝１１）でその範囲は約０．２～約０．５である。α７ＡＣｈＲ対Ａβ$_{42}$の比は、同年齢の対照正常被験者由来の未処理のリンパ球調製物において、平均が約０．４（ｎ＝２４）でその範囲は約０．１～約１．１である
【０４７８】
α７ＡＣｈＲ対Ａβ$_{42}$の比は、ＡＤ患者由来のＡβ$_{42}$処理したリンパ球身体標本調製物において、平均が約０．６（ｎ＝２０）でその範囲は約０．２～約１．１である。若年で認知機能に障害のない正常被験者では、α７ＡＣｈＲ対Ａβ$_{42}$の比は、処理したリンパ球調製物において、平均が約０．９（ｎ＝１１）でその範囲は約０．６～約１．４であった。同年齢の対照正常被験者では、α７ＡＣｈＲ対Ａβ$_{42}$の比は、処理したリンパ球調製物において、平均が約０．９（ｎ＝２４）でその範囲は約０．４～約１．２であった。
【０４７９】
α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比の絶対値の検討から、ＡＤ患者は、平均として、Ａβ$_{42}$とα７ＣｈＲの会合が、若年で認知機能に障害のない正常被験者又は同年齢の正常被験者いずれの場合よりも多いことが示されるものの、またしても、過剰Ａβ$_{42}$処理前後での会合レベルを比較する方が、これら３集団での違いが際立ち、好ましい。
【０４８０】
過剰Ａβ$_{42}$（飽和量のＡβ$_{42}$）での処理後、ＡＤ患者由来のリンパ球身体標本調製物は、α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比に中程度の増加を示し、その増加は平均で約６０％である。その値に比べて、若年で認知機能に障害のない被験者では、Ａβ$_{42}$処理後、α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比に約２７０％の増加を示し、同年齢の対照正常被験者では、α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比に約１５０％の増加を示す。
【０４８１】
ＡＤ患者での値の範囲は、約１．７～約２３０％であったが、若年で認知機能に障害のない被験者ではその範囲は、約１６０～約３８０％であった。同年齢の対照正常被験者での値の範囲は、約０（ゼロ）～約４３０であった。Ａβ$_{42}$処理したＡＤ患者のリンパ球調製物は全て、それらの未処理リンパ球と比較して、約２３０％以下のα７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比の増加を示した。ＡＤ患者と正常被験者とでは値の範囲に重なりがあるため、リンパ球調製物をＡβ$_{42}$処理した後の、α７ＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$比の増加が約１００％未満の場合は、根底にＡＤ病理が存在することを示す。
【０４８２】
一方、過剰Ａβ$_{42}$での処理後、若年で認知機能に障害のない正常被験者由来のリンパ球

調製物は、Ａ$β_{42}$とα７ＡＣｈＲの会合に顕著な増加を示し、その平均は約２７０％である。若年で認知機能に障害のない正常被験者１１名のうち９名で、α７ＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$比に約２２０％を超える増加があった。従って、リンパ球調製物をＡ$β_{42}$処理した後の、α７ＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$比の増加が約２５０％超の場合は、ＡＤ病理がないことを示す。

【０４８３】

ＡＤ患者で得られる値と若年で認知機能に障害のない被験者で得られる値とで、及び同年齢の対照正常被験者で得られる値とで範囲に重なりがあるため、既に記載した他の検査が、ＡＤ病理の有無を確認するのに、役立つ可能性がある。

【０４８４】

手順を少し修飾して、更に臨床試験を行った。その手順を以下に記載する。

【０４８５】

リンパ球のＥｘ　ｖｉｖｏインキュベーション

１．検査対象者から採取したリンパ球（５０μｇ）を、ビヒクル（０．１％ＤＭＳＯ含有クレブス（Kreb's）・リンゲル液）、１００ｎＭのＡ$β_{42}$、１ｎＭの化合物ＣＯ１０５、又は１００ｎＭのＡ$β_{42}$＋１ｎＭの化合物ＣＯ１０５（対照のみ）とともにインキュベートした。ＡＤ被験者から採取したリンパ球を、ビヒクル又は１ｎＭの化合物ＣＯ１０５とともにインキュベートした。

【０４８６】

２．インキュベーションは、クレブス（Kreb's）・リンゲル液［２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４；１１８ｍＭのＮａＣｌ、４．８ｍＭのＫＣｌ、２５ｍＭのＮａHCO_3、１．３ｍＭのＣａCl_2、１．２ｍＭのＭｇSO_4、１．２ｍＭのＫH_2PO_4、１０ｍＭのグルコース、１００μＭのアスコルビン酸、プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤（１錠剤／１０ｍｌ、Ｒｏｃｈｅ）］２５０μｌ中、３７℃で３０分間行った。クレブス（Kreb's）・リンゲル液は、９５％O_2／５％CO_2を用いて１０分間曝気した。

【０４８７】

３．インキュベーションの間、インキュベーション混合物を１０分ごとに１分間曝気した。

【０４８８】

４．リンパ球を、遠心で収集し、プロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼを含有する免疫沈降［ＩＰ］用緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５；２００ｍＭのＮａＣｌ、プロテアーゼ阻害剤錠剤（１錠剤／１０ｍｌ）、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、５ｍＭのＮａＦ、１ｍＭのバナジン酸ナトリウム、０．５ｍＭのβ－グリセロリン酸、及び０．１％の２－メルカプトエタノール）１５０μｌに入れて、氷上で１０秒間超音波処理し（５０％出力、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０を加え、合計体積を２００μｌに調整して、４℃で１時間上下左右を完全に回転させて震盪撹拌して、溶解させた。ＩＰ用緩衝液９００μｌを追加してから、内容物を全て４℃で遠心（１３，０００ｇで５分間）して不溶性デブリを除去した。

【０４８９】

ＦＬＮＡ会合複合体の免疫沈降

１．リンパ球中のＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体のレベルを査定するため、得られたリンパ球溶解液（０．５ｍｌ）にＩＰ緩衝液０．５ｍｌを加えて混合し、次いで、抗ＦＬＮＡ（ＳＣ－７５６５、ヤギｐＡｂ、又はＳＣ－２８２８４、ウサギｐＡｂ）１μｇを加えて、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体、ＦＬＮＡ－ＴＬＲ４複合体を免疫沈降させた。

【０４９０】

２．Ａ$β_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体レベルを測定するため、残りのリンパ球溶解液（０．５ｍｌ）にＩＰ用緩衝液０．５ｍｌを加えて混合し、次いで、抗Ａ$β_{42}$（ＡＢ５０７８ｐ－ＣｈｅｍｉｃｏｎウサギｐＡｂ）／抗アクチン（ＳＣ－１６１６－Ｒ、ウサギｐＡｂ）を加えて免疫沈降させた。

【０４９１】
３．インキュベーションは、４℃で３０分間上下左右を完全に回転させて震盪攪拌して、行われる。
【０４９２】
４．タンパク質Ａ／Ｇ結合アガロースビーズ懸濁液（３０μｌ）を加えて混合し、インキュベーションを、４℃で２時間上下左右を完全に回転させて震盪攪拌しながら続けた。なお、インキュベーションは約１６時間（一晩）行うことも可能であり、そうしても結果の品質には影響しない。
【０４９３】
５．免疫複合体を、遠心（１３，０００ｇで５分間）により単離した。
【０４９４】
６．得られた免疫沈降物を、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．２、ＰＢＳ）１ｍｌ及び遠心分離を用いて３回洗浄した。
【０４９５】
７．単離した抗ＦＬＮＡ免疫沈降物及び抗Ａ$β_{42}$／抗アクチン免疫沈降物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ標本調製用緩衝液（６２．５ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ６．８；１０％グリセロール、２％ＳＤＳ；５％２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー）１００μｌに入れて５分間煮沸することにより、溶解させた。
【０４９６】
８．室温まで冷ました後、溶解させた免疫沈降物は、使用するまで－８０℃で保管した。
【０４９７】
ウエスタンブロット法
１．凍結させた免疫沈降物溶液を、－８０℃の冷凍庫から取り出し、完全に溶解するまで実験台に置いておいた。溶解した免疫沈降物を再び５分間煮沸し、次いで室温まで放冷して、１３，０００ｇで１分間遠心してから、添加した。
【０４９８】
２．免疫沈降物溶液をそれぞれ５０μｌずつ（５０％）、分子量マーカー（５μｌ、タンパク質はしご、Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ－Ｔｈｅｒｍｏ製）とともに７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体／－ＴＬＲ４複合体用）又は１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ａ$β_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体及びアクチン用）にロードした。分子量マーカーは、通常左端の第一レーンに添加した。ＦＬＮＡがゲルの下まで移動したことを確認するため、５５ＫＤａ分子量のマーカーが下端から約１．５ｃｍ上に来るまで７．５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動を行う。プレキャスト勾配ゲルも使用することができる。
【０４９９】
３．次いで、メーカーの取扱説明書に従い、変性条件下、タンパク質標本を、分子の大きさによって分画した。
【０５００】
４．十分に分離したタンパク質を、０．２μｍニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に移した。ＦＬＮＡなどの高分子量タンパク質は、通常、半乾式移動では効果的に移されないため、湿式移動が好ましい（移動条件：３００ｍＡ、７．５％の場合は２時間、１０％の場合は１．５時間）。
【０５０１】
５．次いで、得られるニトロセルロース膜を、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．２）で３回洗浄し（毎回２分間）、次いで、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳに１０％脱脂乳を加えたものを用いて、室温で１時間ブロッキングした。
【０５０２】
６．０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで３回洗浄（毎回２分間）した後、抗α７ｎＡＣｈＲ（ＳＣ－５８６０７、ラットｍＡｂ）及び抗ＴＬＲ４（ＳＣ－１３

５９３、マウスｍＡｂ、ＩＰがウサギｐＡｂ抗ＦＬＮＡを含む場合；ＳＣ－３０００２、ウサギｐＡｂ、ＩＰがヤギ抗ＦＬＮＡを含む場合）を用いて、室温で２時間、又は好ましくは４℃で一晩（約１６時間）かけて、ウエスタンブロット法により、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４のレベルを検出した。溶解した抗Ａβ$_{42}$免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲレベルは、抗α７ｎＡＣｈＲ（ＳＣ－５８６０７、ラットｍＡｂ）を用いて、ウエスタンブロット法により検出した。

【０５０３】

７．次いで、膜を０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで３回洗浄（毎回２分間）し、次いで１：７５００のＨＲＰ結合抗動物種（抗ラット、抗ウサギ、又は抗マウス）ＩｇＧ（予め吸着、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ製）とともに室温で１時間インキュベートした。異なる提供源の二次抗体を用いる場合は、二次抗体の希釈度を調整する。

【０５０４】

８．次いで、膜を０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０含有ＰＢＳで３回（毎回１分間）、更に蒸留水で１回（１分間）洗浄した。免疫活性を、化学発光法（Ｓｕｐｅｒｓｉｇｎａｌ化学発光試薬、Ｐｉｅｒｃｅ／Ｔｈｅｒｍｏ）で検出し、直ちにＸ線フィルムに１０～３０秒間（発光の強度に依存して）焼き付けることで視覚化した。特定のタンパク質バンドを、比重走査測定（ＧＳ－８００較正濃度計、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で定量した。

【０５０５】

９．次いで、ブロットを蒸留水で洗浄し、剥離用緩衝液（Ｒｅｓｔｏｒｅウエスタンブロット剥離用緩衝液、Ｔｈｅｒｍｏ＃２１０６３）１０ｍｌを用いて５分間インキュベートすることで剥離させ、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで５回洗浄し、次いで、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳに１０％脱脂乳を加えたものを用いて１時間インキュベートすることで、ブロッキングした。

【０５０６】

１０．ブロットを、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで３回洗浄（毎回２分間）し、抗ＦＬＮＡ（ＳＣ－５８７６４、マウスｍＡｂ、ＩＰがウサギ抗ＦＬＮＡ ｐＡｂを含む場合；ＳＣ－２８２８４、ウサギｐＡｂ、ＩＰがヤギ抗ＦＬＮＡを含む場合）と、室温で２時間接触させることで、ＦＬＮＡのレベルを測定した。β－アクチンのレベルは、抗β－アクチン（ＳＣ－４７７８、マウスｍＡｂ）と接触させることで測定した。

【０５０７】

１１．次いで、膜を０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで３回洗浄（毎回２分間）し、次いで、１：７５００のＨＲＰ結合抗動物種（抗ウサギ又は抗マウス）ＩｇＧ（予め吸着、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ製）とともに室温で１時間インキュベートした。異なる提供源の二次抗体を用いる場合は、二次抗体の希釈度を調整する。

【０５０８】

１２．次いで、膜を、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで３回（毎回１分間）更に蒸留水で１回（１分間）洗浄した。免疫活性を、化学発光法（Ｓｕｐｅｒｓｉｇｎａｌ化学発光試薬、Ｐｉｅｒｃｅ／Ｔｈｅｒｍｏ）で検出し、直ちにＸ線フィルムに１０～３０秒間（発光の強度に依存して）焼き付けることで視覚化した。特定のタンパク質バンドを、比重走査測定（ＧＳ－８００較正濃度計、Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で定量した。データは、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、又はα７ｎＡＣｈＲ／β－アクチンの光強度の比（任意単位）で表される。

【０５０９】

各緩衝液の組成（Ｌ）：

１．測定実行用緩衝液（５倍濃度）：

トリス（塩基）：１５ｇ

グリシン：７２ｇ
ＳＤＳ：５ｇ
使用時に１倍濃度に希釈。
【０５１０】
２．移動用緩衝液：
トリス（塩基）：１４．５ｇ
グリシン：７２．５ｇ
ＳＤＳ：５ｇ
これらを、８００ｍｌの二回蒸留（ＤＤ）H_2Oに加えたもの。移動時に、メタノール（ＨＰＬＣ級）２００ｍｌを加える。移動効率を上げるためには、移動用緩衝液のトリス及びグリシンを２倍にする。
【０５１１】
臨床試験で得られるデータを累積したものを、表１～表６に示す。これらのデータは、リンパ球調製物に外部から過剰のＡβ$_{42}$を供給して混合した後に観測された、基礎比に対する増加パーセンテージで表す。
【０５１２】
【表１７】

表1

アルツハイマー患者

患者標本番号	Aβ42/基礎 増加%	基礎 α7のOD	基礎 FLNAのOD	基礎 α7/FLNA	Aβ42 α7のOD	Aβ42 FLNAのOD	Aβ42 α7/FLNA
78	5.03%	1210	1285	0.94	1618	1636	0.99
67	8.66%	754	1543	0.49	969	1825	0.53
10	7.64%	1214	1267	0.96	1447	1403	1.03
1	15.70%	1074	1102	0.97	1458	1293	1.13
43	11.40%	738	1786	0.41	789	1714	0.46
79	12.32%	1710	1718	1.00	1943	1738	1.12
80U	12.90%	845	1215	0.70	932	1187	0.79
31	13.00%	1703	1197	1.42	1889	1175	1.61
47	20.31%	893	1763	0.51	1092	1792	0.61
77	21.69%	1042	1598	0.65	1299	1637	0.79
60	27.77%	793	1361	0.58	1046	1405	0.74
70	34.14%	1014	1583	0.64	1398	1627	0.86
69	38.38%	1029	1688	0.61	1467	1739	0.84
62	96.05%	425	1631	0.26	1011	1979	0.51
61	41.35%	715	1358	0.53	995	1337	0.74
75	66.99%	788	1636	0.48	1369	1702	0.80
76	98.73%	672	1624	0.41	1407	1711	0.82
74	109.12%	659	1854	0.36	1309	1761	0.74
72	129.91%	587	1679	0.35	1356	1687	0.80
71	131.60%	468	1362	0.34	1255	1577	0.80
平均	45.13%	916.65	1512.50	0.63	1302.45	1596.25	0.84

【０５１３】

【表１８】

表２

若年で認知機能に障害のない被験者

標本番号	Aβ42/基礎増加%	基礎α7のOD	FLNAのOD	α7/FLNA	Aβ42 α7のOD	FLNAのOD	α7/FLNA
YC8	179.05%	661	1765	0.37	1786	1709	1.05
YC1	196.08%	611	1816	0.34	1828	1835	1.00
YC9	200.08%	582	1775	0.33	1714	1742	0.98
YC3	231.84%	432	1922	0.22	1535	2058	0.75
YC7	267.72%	529	1721	0.31	1917	1696	1.13
81U	268.23%	187	1317	0.14	698	1335	0.52
YC10	302.51%	523	1668	0.31	2119	1679	1.26
YC6	330.16%	330	1648	0.20	1429	1659	0.86
YC2	390.61%	257	1653	0.16	1299	1703	0.76
YC5	399.10%	323	1628	0.20	1623	1639	0.99
YC4	467.74%	182	1947	0.09	1158	2182	0.53
平均	293.92%	419.73	1714.55	0.24	1555.09	1748.82	0.89

【０５１４】

【表１９】

表３

アルツハイマー患者

標本番号	TLR4/基礎増加%	基礎			Aβ42		
		TLR4のOD	FLNAのOD	TLR4/FLNA	TLR4のOD	FLNAのOD	TLR4/FLNA
78	33.28%	409	1285	0.32	694	1636	0.42
67	27.31%	522	1543	0.34	786	1825	0.43
10	42.65%	754	1267	0.60	1191	1403	0.85
1	1.17%	759	1102	0.69	901	1293	0.70
43	1.12%	982	1786	0.55	953	1714	0.56
79	10.68%	802	1718	0.47	898	1738	0.52
80	5.42%	467	1215	0.38	483	1192	0.41
31	26.82%	988	1197	0.83	1230	1175	1.05
47	0.19%	1032	1763	0.59	1051	1792	0.59
77	21.27%	1201	1598	0.75	1492	1637	0.91
60	13.18%	689	1361	0.51	805	1405	0.57
70	−4.22%	711	1583	0.45	829	1927	0.43
69	1.47%	903	1688	0.53	944	1739	0.54
62	94.42%	528	1631	0.323728	1238	1967	0.629385
61	12.19%	966	1358	0.71	1067	1337	0.80
75	66.29%	611	1636	0.37	1057	1702	0.62
76	44.41%	813	1624	0.50	1422	1967	0.72
74	120.70%	509	1854	0.27	1067	1761	0.61
72	213.35%	384	1679	0.23	1209	1687	0.72
71	60.49%	656	1362	0.48	1219	1577	0.77
平均	39.61%	734.3	1512.5	0.494409	1026.8	1623.7	0.641809

【０５１５】

【表２０】

表４
若年で認知機能に障害のない被験者

患者標本番号	TLR4/基礎増加%	基礎 TLR4のOD	基礎 FLNAのOD	基礎 TLR4/FLNA	AB42 TLR4のOD	AB42 FLNAのOD	AB42 TLR4/FLNA
YC8	328.04%	249	1765	0.14	1032	1709	0.60
YC1	186.00%	327	1816	0.18	945	1835	0.51
YC9	284.86%	287	1775	0.16	1084	1742	0.62
YC3	184.93%	314	1922	0.16	958	2058	0.47
YC7	355.87%	199	1721	0.12	894	1696	0.53
81U	202.28%	265	1317	0.20	812	1335	0.61
YC10	305.30%	276	1668	0.17	1126	1679	0.67
YC6	391.37%	187	1648	0.11	925	1659	0.56
YC2	316.57%	168	1653	0.10	721	1703	0.42
YC5	482.21%	166	1628	0.10	973	1639	0.59
YC4	294.22%	189	1947	0.10	835	2182	0.38
平均	302.88%	238.82	1714.55	0.14	936.82	1748.82	0.54

【０５１６】

【表２１】

表５
アルツハイマー患者

標本番号	Aβ42/基礎 増加%	基礎 α7のOD	Aβ42のOD	α7/Aβ42	Aβ42 α7のOD	Aβ42のOD	α7/Aβ42
78	2.08%	936	1363	0.69	1273	1816	0.70
67	19.31%	741	1875	0.40	853	1809	0.47
10	1.68%	1017	1719	0.59	1226	2038	0.60
1	6.72%	608	1157	0.53	844	1505	0.56
43	16.88%	981	1171	0.84	1128	1152	0.98
79	13.65%	1226	1489	0.82	1354	1447	0.94
80	16.64%	1180	1491	0.79	1344	1456	0.92
31	15.39%	945	1269	0.74	1276	1485	0.86
47	6.51%	1146	1080	1.06	1163	1029	1.13
77	58.82%	311	1670	0.19	517	1748	0.30
60	25.84%	291	1490	0.20	392	1595	0.25
70	58.77%	481	1793	0.27	759	1782	0.43
69	18.56%	842	1829	0.46	965	1768	0.55
62	56.83%	483	1859	0.26	852	2091	0.41
61	14.37%	466	1517	0.31	579	1648	0.35
75	134.20%	195	1788	0.11	483	1891	0.26
76	125.27%	167	1682	0.10	431	1927	0.22
74	101.21%	563	1681	0.33	1275	1892	0.67
72	208.48%	337	1641	0.21	1089	1719	0.63
71	226.82%	362	1639	0.22	1134	1571	0.72
平均	56.40%	663.9	1560.15	0.46	946.85	1668.45	0.60

【０５１７】

【表２２】

表6
若年で認知機能に障害のない被験者

患者標本番号	Aβ42/基礎増加%	基礎α7OD	Aβ42OD	α7/Aβ42	Aβ42 α7のOD	Aβ42のOD	α7/Aβ42
YC8	262.57%	387	1967	0.20	1834	2571	0.71
YC1	215.23%	755	1660	0.45	2704	1886	1.43
YC9	327.09%	339	1950	0.17	2050	2761	0.74
YC3	163.22%	769	2177	0.35	2145	2307	0.93
YC7	262.73%	478	1958	0.24	2050	2315	0.89
81U	195.12%	356	1721	0.21	1014	1661	0.61
YC10	382.30%	301	2068	0.15	1861	2651	0.70
YC6	259.94%	446	2029	0.22	1834	2318	0.79
YC2	379.63%	274	1225	0.22	1547	1442	1.07
YC5	260.41%	421	1952	0.22	1721	2214	0.78
YC4	222.76%	484	1517	0.32	1798	1746	1.03
平均	70.92%	455.45	1838.55	0.25	1868.91	2170.18	0.88

【０５１８】
〔実施例４〕
リンパ球中のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ－Ａβ_{42}複合体レベルを測定するための９６ウェルＦＩＴＣ固相方法
リンパ球を用意するため、静脈血７ｍｌをＥＤＴＡ含有採血管、すなわちＳ－ｍｏｎｏｖｅｔｔｅ（Ｓａｒｓｔｅｄｔ、Ｎｅｗｔｏｎ、ＮＣ）に採血した。採血した血液（６ｍｌ）を、２５℃で、６ｍｌのＨＩＳＴＯＰＡＱＵＥ（登録商標）－１０７７（Ｓｉｇｍａ）に層状に重ね、抗凝固処理された血液を４００×ｇで３０分間（２５℃）遠心して、血漿（表層）及びリンパ球（不透明界面）を得た。リンパ球を、酸素添加Ｋ－Ｒ液６ｍｌと混合し、続いて２５０×ｇで１０分間遠心し、再懸濁させることによる洗浄を２回行った。
【０５１９】
最後にペレットを、酸素添加Ｋ－Ｒ液２５０μｌに再懸濁させてから、ブラッドフォード法によりタンパク質含有量を測定し、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４複合体、及びＡβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体のレベルを査定した。リンパ球を保管するため、リンパ球ペレットを、氷冷した酸素添加Ｋ－Ｒ液（１０％グリセロール含有）２５０μｌに再懸濁させ、１時間－２０℃に保管してから、－８０℃で貯蔵した。
【０５２０】
この試験の目的は、リンパ球中のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体、ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体、及びＡβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体レベルを、それぞれ、ＡＤの進行及びＡＤ治療の有効性を追跡するバイオマーカーとして用いることであった。これらの結果を図２に示す。
【０５２１】
すなわち、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲの会合及びＦＬＮＡとＴＬＲ４の会合は、ＡＤリンパ球及びＡβ_{42}処理した対照リンパ球で劇的に増加し、Ｃ０１０５とともに３０分間インキュベートすると、それらの会合が減少する。更に、Ａβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体のレベルは、ＡＤリンパ球又はＡβ_{42}処理した対照リンパ球で上昇した。１ｎＭの化合物Ｃ０１０５とともに３０分間インキュベートすると、この上昇したＦＬＮＡとの会合及びＡ

β_{42}処理した対照リンパ球でのレベルが有意に減少した。

【０５２２】

ビオチン化キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ、ＰＡ）を用い、メーカーの使用説明書に従って、抗ＦＬＮＡ（ウサギポリクローナル）抗体、抗Ａβ_{42}（ウサギポリクローナル）抗体、及び抗アクチン（ウサギポリクローナル）抗体をビオチン化した。遊離のビオチンは、１０－ＫＤａカットオフフィルター及び遠心分離で除去した。

【０５２３】

対照被験者由来のリンパ球（５０μｇ）を、ビヒクル（０．１％ＤＭＳＯ含有クレブス（Kreb's）・リンゲル液）、１００ｎＭのＡβ_{42}、又は１００ｎＭのＡβ_{42}＋１ｎＭの化合物Ｃ０１０５とともにインキュベートした。ＡＤ被験者由来のリンパ球は、ビヒクル又は１ｎＭの化合物Ｃ０１０５とともにインキュベートした。インキュベーションは、クレブス（Kreb's）・リンゲル液２５０μｌ中、３７℃で３０分間行い、インキュベーションの間１０分ごとに１分間、９５％O_2／５％CO_2でクレブス（Kreb's）・リンゲル液を曝気した。リンパ球を遠心分離により収集し、手短かに超音波処理して、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ポリオキシエチレン（４０）ノニルフェニルエーテル（ＮＰ－４０）を含む１００μｌのプロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ含有ＰＢＳに加えて、４℃で１時間溶解させた。３００μｌのＰＢＳを追加してから、全内容物を遠心して不溶性デブリを除去した。

【０５２４】

α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体及びＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体のレベルを測定するため、０．５μｇ／ウェルのビオチン化ウサギポリクローナル抗ＦＬＮＡで、ストレプトアビジンで被覆したプレート（高結合キャパシティのＲｅａｃｔｉ－Ｂｉｎｄ（登録商標）ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（登録商標）９６ウェルプレート）を被覆した。Ａβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体のレベルを測定するため、ビオチニン化ウサギポリクローナル抗Ａβ_{42}及び抗アクチン（それぞれ０．２５μｇ／ウェル）を、ストレプトアビジンで被覆したプレート（高結合キャパシティのＲｅａｃｔｉ－Ｂｉｎｄ（登録商標）ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（登録商標）９６ウェルプレート）に添加した。

【０５２５】

プレートを、最初に、氷冷した５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で３回洗浄し、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０及び０．５％ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｔｈｅｒｍｏ）含有リン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．２）１００μｌ中、２５℃で、上記のビオチン化抗体とともにインキュベートした。ウェルを、２００μｌの０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０含有ＰＢＳで２回洗浄した。プレートを、２５℃で１時間、上記条件集団それぞれに由来するリンパ球溶解液１５０μｌとともにインキュベートした（２つ組で行った）。プレートを、氷冷した５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で３回洗浄し、０．５μｇ／ウェルの未結合マウス抗α７ｎＡＣｈＲ（α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体用）、抗α７ｎＡＣｈＲ、又は抗β－アクチン（Ａβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体用）又は抗ＴＬＲ４（ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体用合）とともに、３０℃で１時間インキュベートした。

【０５２６】

５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で２回洗浄（毎回１分間）した後、各ウェルに０．５μｇ／ウェルのＦＩＴＣ結合抗マウスＩｇＧ（ヒト及びマウス吸着）を入れて、２５℃で１時間インキュベートした。プレートを、２００μｌの氷冷したトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で２回洗浄し、残存するＦＩＴＣ－Ａβ_{42}のシグナルを、マルチモードプレートリーダー、ＤＴＸ８８０（Ｂｅｃｋｍａｎ）で検出した。

【０５２７】

プレートの予備アッセイとして、Ａβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体査定を規格化するのにβ－アクチンを用いた。対照標本に外部からＡβ_{42}を添加したため（化合物Ｃ０１０５の効果を査定するために）、Ａβ_{42}－α７ｎＡＣｈＲ複合体を査定する抗Ａβ_{42}抗体だけで

なく抗β－アクチン抗体もプレートに用いた。β－アクチンシグナルに対してタンパク質レベルを規格化することで、各ウェルに同量のタンパク質が存在することを確認した。α７ｎＡＣｈＲ（Ａ$β_{42}$が固着してプレート上の抗Ａ$β_{42}$抗体により捕獲されたα７ｎＡＣｈＲ）は、ＦＩＴＣ標識化抗α７ｎＡＣｈＲ抗体で検出される。抗アクチン抗体は、通常使用しない。

【０５２８】

〔実施例５〕

死後ヒト脳組織での研究

この研究プロトコルは、ニューヨーク市立大学シティカレッジ及びニューヨーク市立大学医学専門学校ヒト研究委員会による事前承認に反映されているとおり、ヘルシンキ宣言：ヒトを対照とする医学研究の倫理的原則（第４修正案）に従うものであった。参加者たちは、一律の臨床評価を受けており、その臨床評価には、病歴、完全な神経学的検査、認知機能試験（ミニメンタルステート検査、ならびにエピソード記憶、意味記憶及び言語、作業記憶、知覚速度、及び視空間能力に対する他の認知機能試験を含む）、ならびに精神医学的評価が含まれていた。この情報に基づき、被験者には、ＮＩＮＣＤＳ－ＡＤＲＤＡ診断基準に基づくＡＤ診断が下された。［ＭｃＫｈａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ　３４，　９３９－９４４　（１９８４）。］

【０５２９】

孤発性ＡＤであると臨床上診断が確定している患者由来の死後脳組織ＦＣＸ及び正常な、同年齢の、神経学的に正常な個人由来の対照組織を、ハーバード脳組織リソースセンター（ＨＢＴＲＣ、Ｂｅｌｍｏｎｔ、ＭＡ）及びＵＣＬＡ脳組織リソースセンター（ＵＢＴＲＣ、ＬｏｓＡｎｇｅｌｅｓ、ＣＡ）から入手した。ＨＢＴＲＣ及びＵＢＴＲＣは、両方とも、国立衛生研究所により一部支援を受けている。死後、これらの脳を採取するまでの時間は、≦１３時間であった（ＡＤ脳標本及び対照脳標本を採取するまでの平均死後経過時間は、それぞれ、６．０±０．９時間及び５．８±０．８時間であった）。固定化切片を、ヘマトキシリン及びエオシンで染色、ならびにビルショウスキー染色を修飾した銀染色法［Ｙａｍａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ　Ａｐｐｌ　Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ　１２，　３－９　（１９８６）］で染色して神経病理学的診断検査を行い、定義された診断基準［Ｈｙｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ　Ｅｘｐ　Ｎｅｕｒｏｌ　５６，　１０９５－１０９７　（１９９７）］に従って、何か疾患があれば診断を確立させ、同年齢の対照由来の脳組織を同様にスクリーニングした。

【０５３０】

老人斑（アミロイドプラーク）及び神経原線維タングル両方の存在を、ＡＤ脳の全てで、ニッスル・ビルショウスキー染色により確認するとともに、既に記載されるとおり、前頭皮質及び嗅内皮質ならびに海馬において、抗Ａ$β_{42}$及び抗ＮＦＴ染色で免疫組織化学的に特性決定した［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ　７５，　１１５５－１１６１　（２０００）］。対照組織は、最小限の局所的な顕微鏡レベルでしか、ＡＤの神経病理を示さなかった（海馬中、０～３の老人斑／１０倍の領域及び０～６のＮＦＴ／１０倍の領域）。－８０℃に凍結保存していた新鮮な脳の冠状切断物を帯のこぎりで解剖して、ＦＣＸのブロードマン野１０及び／又は４６から１グラムの塊を取り出した。死後組織は全て、匿名の同定番号で同定され、実験は、臨床情報を全く知らないまま最適の対を組ませることで行われた。

【０５３１】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ査定の場合、死後組織を、徐々に解凍させ（－８０℃から－２０℃へ）、冷却したＭｃＩｌｗａｉｎ組織チョッパーでスライスし（２００μｍ×２００μｍ×３ｍｍ）、氷冷した酸素添加クレブス（Kreb's）・リンゲル液（Ｋ－Ｒ）に懸濁させた。クレブス（Kreb's）・リンゲル液は、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、１１８ｍＭのＮａＣｌ、４．８ｍＭのＫＣｌ、１．３ｍＭの$CaCl_2$、１．２ｍＭのKH_2PO_4、１．２ｍＭの$MgSO_4$、２５ｍＭの$NaHCO_3$、１０ｍＭのグルコース、１００μＭのアスコルビン酸、５０μｇ／ｍｌのロイペプチン、０．２ｍＭのＰＭＳＦ、２５μｇ／ｍ

ｌのペプスタチンＡ、及び０．０１Ｕ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤（約２０ｍｇ／１ｍｌのＫ－Ｒ）を含有するものであった。遠心分離後、更に１ｍｌの氷冷したＫ－Ｒで２回洗浄して、脳切片を１ｍｌのＫ－Ｒに懸濁させた。

【０５３２】

外部からのＡ$β_{42}$の効果を調べるため、対照被験者由来のＦＣＸ約２０ｍｇを、３７℃で７０分間、０．１μＭのＡ$β_{42}$とともにインキュベートした。Ａ$β_{42}$とともにインキュベートした対照及び本来のＡＤ組織における、化合物Ｃ０１０５の効果を試験するため、０．１μＭのＡ$β_{42}$添加から１０分後、化合物Ｃ０１０５（０．１ｎＭ及び１ｎＭ）を添加した。インキュベーションは、暗中で１時間続けた。合計インキュベーション体積０．５ｍｌのインキュベーション混合物を、１５分ごとに１分間、９５％O_2／５％CO_2で曝気した。１．５ｍｌの氷冷したCa^{2+}を含まないＫ－Ｒ液を添加して反応を停止させ、手短かに遠心分離してスライスを収集した。

【０５３３】

抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４をウエスタンブロットで検出した結果は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合が、対照組織と比べて死後ＡＤの方で多いことを示す。対照組織に外部からＡ$β_{42}$を添加すると、これらの会合が増加し、化合物ＣＯ１０５を添加して１時間インキュベートすると、このｅｘ　ｖｉｖｏ設定では、ＡＤ及びＡ$β_{42}$処理した対照組織の両方で、これらの会合が減少した（図３Ａ～図３Ｅ）。

【０５３４】

〔実施例６〕

<u>Ａ$β_{42}$のＩＣＶ輸液マウスモデルでのＡ$β_{42}$輸液は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合を増加させる</u>

Ｔａｃｏｎｉｃ（Ｇｅｒｍａｎｔｏｗｎ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）から入手した繁殖対の子孫であるオス及びメスの８週齢Ｅ１２９マウス（３０～３５ｇ）を、脳室内（ＩＣＶ）Ａ$β_{42}$試験に用いた。マウスは、１２時間の明暗サイクルで食物及び水がある状態に維持した。動物を扱う手順は全て、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針（Guide for Care Use of Laboratory Animals）に従うものであり、ニューヨーク市立大学シティカレッジ動物管理使用委員会により承認された。

【０５３５】

脳室内Ａ$β_{42}$投与及び化合物処置

Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｉｏｌ　Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ　６７：５２２－５３０（２０１０）に記載のとおり、３０ｍｇ／ｋｇのペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔したマウスを、マウス定位脳手術装置に設置した。マウスには、マウス用ミニポンプ（Ａｌｚｅｔ）を埋め込んで、７日間続けてＡ$β_{42}$のＩＣＶ輸液を行った。このミニポンプは、以下の配置で左心室に手術のりで固定されたカニューレを通じて、０．１μｌ／時間で輸液を送達する：［十時縫合から前後３．０ｍｍ；左右方向、１．０ｍｍ；水平方向、３．０ｍｍ］。凝集を防ぐため、Ａ$β_{42}$（０．２ｎｍｏｌ／μｌ）を、５０ｍＭのトリス（ｐＨ９．０）を含有する１０％ＤＭＳＯに溶解させた。各マウスに、７日間毎日Ａ$β_{42}$を４．８ｎｍｏｌ与えた。対照マウスには、ビヒクルのＩＣＶ輸液を７日間行った。

【０５３６】

Ａ$β_{42}$に誘起される効果に対する化合物Ｃ０１０５のｉｎ　ｖｉｖｏでの効果を査定するため、マウスに、手術の日から開始して２週間毎日１０ｍｇ／ｋｇのＣ０１０５を腹腔内（ｉ．ｐ．）注射して与えた（１日目：手術から回復して２時間後、２～１４日目は１日２回：１０～１１ａ．ｍ．の間及び３～４ｐ．ｍ．の間）。最後の注射から２４時間後、脳の半分から採取した前頭皮質（ＦＣＸ）及び海馬を、文献既知の方法（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　既出）を用いてα７ｎＡＣｈＲ－フィラミンＡ（ＦＬＮＡ）複合体レベルを査定するために、溶解させた。

【０５３７】

処置したマウスを一気に断頭することでと殺し、そのマウスの前頭前皮質及び海馬から、脳シナプトソーム（Ｐ２画分）を調製した。既に記載されている方法（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７８：３１５４７－３１５５３　（２００３））に従って、組織は、採取後直ちに溶解させて、シナプトソームを得た。シナプトソームを、２回洗浄して、氷冷したクレブス（Kreb's）・リンゲル（Ｋ－Ｒ）液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４；１１８ｍＭのＮａＣｌ、４．８ｍＭのＫＣｌ、２５ｍＭのＮａＨCO_3、１．３ｍＭの$CaCl_2$、１．２ｍＭの$MgSO_4$、１．２ｍＭのKH_2PO_4、１０ｍＭのグルコース、１００μＭのアスコルビン酸、プロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ阻害剤の混合物（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ））２ｍｌに懸濁させた。クレブス（Kreb's）・リンゲル（Ｋ－Ｒ）液は、先に９５％O_2／５％CO_2で１０分間曝気しておいた。Ｂｒａｄｆｏｒｄ法（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて、タンパク質濃度を測定した。

【０５３８】

これらの査定には、既に記載された免疫共沈降方法を用いた。［Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　３５，　１０９６１－１０９７３　（２００９）。］。処置したマウスの死後脳切片又は前頭前皮質もしくは海馬いずれか由来のシナプトソーム２００μｇを、遠心分離によりペレットとし、免疫沈降用緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５；２００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、５０μｇ／ｍｌのロイペプチン、１０μｇ／ｍｌのアプロチニン、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、０．０４ｍＭのＰＭＳＦ、５ｍＭのＮａＦ、１ｍＭのバナジン酸ナトリウム、０．５ｍＭのβ－グリセロリン酸、及び０．１％２－メルカプトエタノール、に０．５％ジギトニン、０．２％コール酸ナトリウム、及び０．５％ＮＰ－４０を加えたもの）２５０μｌにいれて手短かに超音波処理することで溶解させ、４℃で１時間、上下左右を完全に回転させて震盪撹拌しながらインキュベートした。

【０５３９】

氷冷した免疫沈降用緩衝液７５０μｌで希釈して遠心分離（４℃）により不溶性デブリを除去した後、溶解液中のα７ｎＡＣｈＲ－／ＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体及び$Aβ_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体を、それぞれタンパク質Ａ結合アガロースビーズに固定されたウサギ抗ＦＬＮＡ抗体（１μｇ）及び抗$Aβ_{42}$抗体（１μｇ）とともに１６時間インキュベートする免疫沈降により、別々に単離した。得られる免疫複合体を、４℃で遠心分離することによりペレットとした。

【０５４０】

氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．２）１ｍｌで３回洗浄し遠心分離した後、単離したα７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４複合体、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体、及び$Aβ_{42}$／α７ｎＡＣｈＲ複合体を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ標本調製用緩衝液（６２．５ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ６．８；１０％グリセロール、２％ＳＤＳ；５％２－メルカプトエタノール、０．１％ブロモフェノールブルー）１００μｌに加えて５分間煮沸することにより、溶解させた。抗ＦＬＮＡ免疫沈降物の５０％中のα７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４含有量及び抗$Aβ_{42}$免疫沈降物の５０％中のα７ｎＡＣｈＲ含有量を、モノクローナル抗α７ｎＡＣｈＲ又はＴＬＲ４抗体を用いてウエスタンブロット法により測定した。

【０５４１】

α７ｎＡＣｈＲ－／ＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体ブロットを剥離させて、モノクローナル抗ＦＬＮＡを用いて再探索し、免疫沈降の有効性及び添加を査定した。$Aβ_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体レベルを測定するため、免疫共沈降プロセスにおいて、固定化ウサギ抗アクチン（０．５μｇ）タンパク質Ａ結合アガロースを抗$Aβ_{42}$と一緒に添加した。得られる免疫沈降物中のβ－アクチン含有量を、モノクローナル抗β－アクチンを用いる免疫ブロット法により分析したところ、同様な免疫沈降の有効性及び添加が示された。

【０５４２】

アルツハイマー病の$Aβ_{42}$のＩＣＶ輸液マウスモデルにおいて、$Aβ_{42}$は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合の両方を劇的に増加させた。１０ｍｇ／ｋｇの化合

物Ｃ０１０５で１日２回毎日処置すると、Ａβ$_{42}$輸液の効果が顕著に減少した。

【０５４３】

化合物Ｃ０１０５は、ＦＬＮＡとα７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４との会合の両方におけるＡβ$_{42}$が誘導する増加を減少させた（図４）。このことは、Ａβ$_{42}$が介在するシグナル伝達が、これらの受容体両方で減少することを示唆する。Ｃ０１０５とＦＬＮＡの高親和性結合は、Ａβ$_{42}$とα７ｎＡＣｈＲの結合を減少させることによりα７ｎＡＣｈＲを介したＡβ$_{42}$シグナル伝達を減少させると思われる：これらＡβ$_{42}$－α７ｎＡＣｈＲ複合体のレベルは、Ｃ０１０５処置した動物で低下する（図５）。

【０５４４】

重要なことに、ＦＬＮＡとＴＬＲ４との会合は、Ａβ$_{42}$により増加し、化合物Ｃ０１０５により正常化されるので、Ａβ$_{42}$のＩＣＶ輸液後の炎症性サイトカイン放出が、化合物Ｃ０１０５処置により抑制されるかどうかを査定した。Ａβ$_{42}$のＩＣＶ輸液は、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１β産生を増加させた。化合物Ｃ０１０５処置は、Ａβ$_{42}$が誘導するＩＬ－６産生を完全に消滅させるとともに、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１βレベルを、それぞれ８６％及び８０％抑制した（図６）。

【０５４５】

〔実施例７〕

α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡのＥＬＩＳＡ

複合体全３種の比又は量ではなくα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡタンパク質の量のみを測定する、更に他の組のＥＬＩＳＡアッセイを、リンパ球溶解液を用いて行った。実験条件は、信号雑音比が最も高くなるように最適化して、直線検出範囲を確立した。

【０５４６】

材料及び方法

捕獲抗体は、マウス抗ヒトフィラミンＡ、ＳＣ－１７７４９（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）であり、検出抗体としてウサギ抗ヒトα７ｎＡＣｈＲ、ＳＣ－５５４４（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）。アッセイは、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ平底プレートで行った。

【０５４７】

溶解用緩衝液は、ＰＢＳに、０．５％ジギトニン＋０．２％コール酸ナトリウム＋０．５％ＮＰ－４０＋１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（ＥＤＴＡを含まず；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を加えたものであった。用いたＰＢＳ緩衝液は、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製の１×ＰＢＳ（ＭｇもＣａも含まず）であり、一方ＰＢＳＴは、１×ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０であった。

【０５４８】

被覆用緩衝液は、１．５９ｇのNa_2CO_3を０．９Ｌの蒸留H_2Oに溶解させ、これに０．１ｇのNaN_3及び３．９３ｇの$NaHCO_3$を加えて調製した。ｐＨ値を９．６に調整し、蒸留H_2Oを追加して体積を１Ｌに調整した。Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ＢＳＡブロッキング緩衝液は、１％ＢＳＡを補充した（ｓｃ－２９３９６５）。

【０５４９】

ＨＲＰ検出試薬（ＴＭＢ）は、１－Ｓｔｅｐ　Ｕｌｔｒａ　ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ、（カタログ番号３４０２８；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて調製した。標準プロトコルは、マイクロプレートの１ウェルあたり１００μｌのＴＭＢ基質溶液を用い、続いて１０～１５分（又は発色するまで）インキュベートし、そして各ウェルに２Ｍ硫酸１００μｌを添加して反応を停止する。吸光度（OD_{450}）は、４５０ｎｍで測定した。１％ＢＳＡを補充したＳａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ＢＳＡブロッキング緩衝液（ＳＣ－２９３９６５）を用い、アッセイは、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ製のＳｐｅｃｔｒａｍａｘ（商標）ＰＬＵＳ　ＥＬＩＳＡプレートリーダーを用いて４５０ｎｍで行った。

【０５５０】

リンパ球の単離及び細胞溶解

ＡＤ患者標本：ＡＤ患者のリンパ球が入った２０本のマイクロチューブ（＃１～＃２０のラベル付き；それぞれ１００μｌ体積）は、ドライアイス上で凍結した状態で受け取った。標本を冷凍庫に入れて１時間－２０℃に維持し、続いて４℃で解凍した。リンパ球を遠心分離により収集し、氷上で１０秒間超音波処理し、６０分間（４℃で）管を回転させることにより、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０に１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（Ｔｈｅｒｍｏ）を補充したものに溶解させた。氷冷したＰＢＳ（３００μｌ）を加え、全内容物を遠心して、不溶性デブリを除去した。

【０５５１】

正常な患者標本を、以下の手順で調製した：静脈血８ｍＬを、カタログ番号３６２７６１のＢＤ Ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ（商標）ＣＰＴ管（クエン酸ナトリウム入り細胞調製用管）に採血し、メーカーの推奨するプロトコルに従って白血球を単離した（２回の遠心分離／ＰＢＳ洗浄工程を含む）。得られる白血球を遠心分離により収集し、氷上、５０Ｗで１０秒間超音波処理し、６０分間（４℃で）管を回転させることにより、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０（最終濃度）に１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（Ｔｈｅｒｍｏ）を補充したものに溶解させた。氷冷したＰＢＳ（３００μｌ）を加え、全内容物を遠心して、不溶性デブリを除去し、「ＮＰ標本」を得た。

【０５５２】

ＡＤ標本＃１～４を１つにまとめてＢｒａｄｆｏｒｄアッセイ法によりアッセイし、全タンパク質濃度を確立した：ＡＤ標本＃１～４＝１．９２μｇ／μｌ。

【０５５３】

ＡＤ標本を２つに分け（＋／－Ｃ０１０５処理）、さらなる分析用に１×ＰＢＳで希釈した。

【０５５４】

<u>Ｃ０１０５処理</u>

ＡＤ患者白血球を、１×ＰＢＳに再懸濁させ、３７℃で６０分間、ａ）１０μＭ（最終濃度）の化合物Ｃ０１０５、及びｂ）対照（ＰＢＳのみ）で処理する（合計体積は各標本４００μｌ）ことで、化合物Ｃ０１０５処理を行った。

【０５５５】

<u>間接ＥＬＩＳＡ研究</u>

抗フィラミンＡ抗体（ＳＣ－１７７４９）を被覆用緩衝液で希釈し（希釈比１：３０）、１ウェルあたり１００μｌの標本を添加して、室温（ＲＴ）で２．５時間インキュベートした。プレートは接着カバーで覆うことで、蒸発を防いだ。続いてマイクロタイタープレートを１５０μｌのブロッキング緩衝液（１％ＢＳＡを補充）で洗い、１００μｌのブロッキング緩衝液をウェルに添加してＲＴで３０分間放置した。

【０５５６】

ＡＤ標本（ＡＤ患者リンパ球、上記のとおり）を用いて、段階希釈系列標本（希釈はＰＢＳで行った）を作成し、１ウェルあたり１００μｌの標本を添加して、ＲＴで１時間インキュベートした（上記のとおりＢｒａｄｆｏｒｄアッセイ法により確立されるとおりの全タンパク質濃度が示される）。プレートは接着カバーで覆うことで、蒸発を防ぎ、続いて各ウェルをＰＢＳＴ緩衝液１６０μｌで２回洗浄した。

【０５５７】

マイクロタイタープレートを洗浄用緩衝液で洗浄した後、１ウェルあたり１００μｌのα７ｎＡＣｈＲ一次抗体（ＳＣ－５５４４）の１×ＰＢＳ溶液を添加し（１：５０の希釈比）、ＲＴで１時間インキュベートした。

【０５５８】

プレートをＰＢＳＴ緩衝液で２回洗浄し、１×ＰＢＳで希釈したＨＲＰ結合二次抗体１００ｍｌを各ウェルに添加して、ＲＴで１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳＴ緩衝液で３回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）酵素検出用のＴＭＢ試薬を添加した（マイクロプレート１ウェルあたり１００ｍｌのＴＭＢ基質溶液、続いて１０～１５分間（又は発色するまで）インキュベートして、そして各ウェルに２Ｍ硫酸１００ｍ

ｌを添加して反応を停止した。吸光度（ＯＤ$_{450}$）を４５０ｎｍで測定した）。
【０５５９】
系列希釈で得られたデータを用い、Ｘ軸に濃度を、Ｙ軸に吸光度値を示すことで、曲線を作成して、定量基準曲線とした。
【０５６０】
４回の反復試験によるデータのまとめを以下の表（及び図１７Ａ）に示す。データは、バックグラウンド差し引き後のものである。
【０５６１】
【表２３】

分析した標本	α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡの吸光度					
	１ウェルあたりの溶解液重量（ｍｇ）					
	0	1.25	2.5	5	10	20
ＡＤ平均	0	0.283725	0.332475	0.420325	0.487425	0.769825
ＡＤ標準偏差	0	0.030384	0.021754	0.05033	0.02996	0.086486
ＡＤ＋Ｃ０１０５平均	0	0.15715	0.226125	0.291025	0.3349	0.4504
ＡＤ＋Ｃ０１０５標準偏差	0	0.050422	0.070406	0.062596	0.025613	0.045808

【０５６２】
ＡＤリンパ球を化合物ＣＯ１０５とともに予めインキュベートしておくと、ＦＬＮＡと会合したα７ｎＡＣｈＲの量が有意に減少した。ＦＬＮＡと会合したα７ｎＡＣｈＲの量は、マイクロタイタープレートのウェルに添加した溶解液の量とともに増加した。
【０５６３】
同様な一連の試験を、ＡＤであると臨床上確定している患者から得られたリンパ球及び若年で認知機能に障害のない（ＹＣＩ）被験者から得られたリンパ球プールで行った。今回は、捕獲モノクローナル抗体は、ＳＣ－２８２８４　Ｈ３００抗ＦＬＮＡであり、抗α７ｎＡＣｈＲ、ＳＣ－３７４２８　８４モノクローナル抗体を検出抗体として用い、続いてＨＲＰ連結抗体を検出抗体に用いた。ウェルに０（ゼロ）～２０００ｎｇの溶解液を添加して検出された結果を、ＹＣＩリンパ球溶解液で得られたデータと合わせて図１７Ｂに示す。ＡＤ及びＹＣＩのリンパ球溶解液をウエスタンブロット分析して得られたデータと一致し、ＹＣＩ被験者と比較して、ＡＤ患者では、ＦＬＮＡと会合したα７ｎＡＣｈＲの量が有意に増加する。
【０５６４】
ＡＤ患者由来の溶解液中に存在するα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ量のプロット（ＡＤ）及び各溶解液に１０μＭの化合物Ｃ０１０５を添加して濃度１０μＭにしてからアッセイを行って明らかになった量のプロット（ＡＤ＋Ｃ０１０５）（図１８Ａ）。ＹＣＩ由来のリンパ球を用いて、化合物Ｃ０１０５を添加して１０μＭにした場合（ＹＣＩ＋Ｃ０１０５）及びしなかった場合（ＹＣＩ）の同様な試験を、図１８Ｂに示す。１ウェルあたり添加する溶解液を２０μｇではなく１０μｇにした。
【０５６５】
図１８Ａからわかるとおり、化合物ＣＯ１０５をＡＤリンパ球調製物に添加すると、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体の量が有意に減少する。図１８Ｂからわかるとおり、ＹＣＩリンパ球調製物にとっては、化合物Ｃ０１０５が存在する場合と存在しない場合とで実質的に差がない。
【０５６６】
図１８Ｃは、Ａβ$_{42}$を１００ｎＭの最終濃度でＹＣＩ被験者のリンパ球溶解液に添加し、３７℃で３０分間維持してからアッセイを行った場合にわずかな変化があったことを示す。図１８Ｄからわかるとおり、同量のＡβ$_{42}$をＡＤ患者のリンパ球溶解液に添加し、上

記と同じく維持した場合、実質的に変化がなかった。

【０５６７】

〔実施例８〕

補佐的ＥＬＩＳＡプロトコル

以下の試験を行って、ヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ／ＴＬＲ４複合体を定量的に検出するＥＬＩＳＡアッセイ法のプロトコルを開発する助けとした。ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体を定量するために、ＥＬＩＳＡ法にまつわる以下の作業を行った：特異性；正確性；精度／繰返し再現性；直線性及び範囲；ならびに検出限界。

【０５６８】

特異性：

ＥＬＩＳＡアッセイがヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体を一意的に同定すること（ヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体に対する交差反応性）を保証するため、リンパ球溶解液調製物に、無関係のヒトタンパク質であるヒトレプチン及びヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈレプチン及びｈＣＧ）を添加して、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。

【０５６９】

正確性：

ＥＬＩＳＡアッセイが「真」の値を代表する値を返すことを保証するため、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体を含む溶解液標本に、組換えヒトレプチンをある濃度範囲で添加した。回収物の濃度パーセントを測定して正確性を計算した。

【０５７０】

精度：繰返し再現性

同一のアッセイで単一の溶解液標本（例えば、ＡＤ標本＃６３）を３回測定すると同一の結果が得られることを保証するため、３つの標本を、ＥＬＩＳＡアッセイにより、同日中に３回同一方法で測定した（繰返し再現性）。同日中のＲＳＤを計算した。

【０５７１】

直線性及び範囲

予想される標本の値の範囲にわたって反応が直線的であることを保証するため、異なる濃度のヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体のＯＤ４５０をＥＬＩＳＡアッセイで検出した。

【０５７２】

検出限界

検出限界（ＬＯＤ）は、ＥＬＩＳＡを利用してＡＤ標本反応対ＮＰ標本反応を差別化できるようにするために必ずロードしなければならない１ウェルあたりの全タンパク質（溶解液）の最少量であるが、これを確定させることで、検出可能な最少反応を確立させた。

【０５７３】

材料及び方法

抗体：

捕獲Ａｂ：ウサギｐＡｂ抗ヒトフィラミンＡ抗体、カタログ番号ＳＣ－２８２８４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ。

検出Ａｂ：ラットｍＡｂ抗ヒトＡＣｈＲ７抗体、カタログ番号ＳＣ－５８６０７、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ。

検出Ａｂ：マウスｍＡｂ抗ヒトフィラミンＡ抗体、カタログ番号ＳＣ－５８７６４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ。

【０５７４】

Ａｂビオチン化：捕獲抗体ビオチン化キット：ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ビオチン化キット、Ｔｈｅｒｍｏカタログ番号２１４２５（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ、ＰＡ）。

【０５７５】

アミロイドβ：アミロイドβペプチドカタログ番号０３１１１、５００μｇ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）。このペプチドは、ＴＦＡ塩であるため、５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐ

Ｈ９．０）を含有する１０％ＤＭＳＯに溶解させる必要があった。ペプチド溶液はｐＨ８であり、－８０℃で保管しなければならなかった。ｐＨ値がこれより低いか、温度がこれより高いと、凝集が実質的に増加して、ペプチドの有効性を低下させる。

【０５７６】

溶解用緩衝液：ＰＢＳに、０．５％ジギトニン＋０．２％コール酸ナトリウム＋０．５％ＮＰ－４０＋１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（ＥＤＴＡを含まず、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、１００倍濃度溶液）を加えたもの。

【０５７７】

ＰＢＳ及びＰＢＳＴ：ＰＢＳ：１×ＰＢＳ（ＭｇもＣａも含まず）、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製；ＰＢＳＴ：１×ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０。

【０５７８】

ＥＬＩＳＡマイクロプレート（被覆されたもの）：Ｐｉｅｒｃｅ高結合キャパシティのストレプトアビジン被覆９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅカタログ番号１５５００）。

【０５７９】

ブロッキング用緩衝液：１０％ＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ（登録商標）ブロッキング用緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ）。

【０５８０】

ＨＲＰ検出試薬（ＴＭＢ）：１－Ｓｔｅｐ（商標）ＵｌｔｒａＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ、カタログ番号３４０２８（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。標準プロトコルは、マイクロプレートの１ウェルあたり１００μｌのＴＭＢ基質溶液を用い、続いて１０～１５分（又は発色するまで）インキュベートし、そして各ウェルに２Ｍ硫酸１００μｌを添加して反応を停止する。吸光度（$ＯＤ_{450}$）は、４５０ｎｍで測定した。

【０５８１】

ＥＬＩＳＡプレートリーダー：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｓｐｅｃｔｒａｍａｘ（登録商標）ＰＬＵＳ、４５０ｎｍでアッセイ

【０５８２】

リンパ球単離、細胞溶解、$Ａβ_{42}$及びＣ０１０５での処理：

ＡＤ患者標本：＃６３及び＃８０とラベルが貼られた、アルツハイマー病（ＡＤ）患者のリンパ球が入った標本管（各管につき１００μｌ）は、Ｄｒ．Ｈｏａｕ－Ｙａｎ　Ｗａｎｇ（ニューヨーク市立大学）から、ドライアイス上で凍結した状態で受け取った。標本は、－８０℃で保管しておき、研究するときに４℃で解凍し、その後１時間－２０℃に維持した。

【０５８３】

リンパ球を遠心分離により収集し、氷上で１０秒間超音波処理し、６０分間（４℃で）管を回転させながら、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０に１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（Ｔｈｅｒｍｏ）を補充したものに溶解させた。氷冷したＰＢＳ（３００μｌ）を加え、全内容物を遠心して、不溶性デブリを除去した。

【０５８４】

ＮＰ患者標本：＃８１とラベルが貼られた、正常患者（ＮＰ）リンパ球が入った標本管（各管につき体積１００μｌ）も、Ｄｒ．Ｈｏａｕ－Ｙａｎ　Ｗａｎｇから、ドライアイス上で凍結した状態で受け取った。標本は、－８０℃で保管しておき、研究するときに４℃で解凍し、その後１時間－２０℃に維持した。リンパ球を遠心分離により収集し、氷上で１０秒間超音波処理し、６０分間（４℃で）管を回転させながら、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０に１×プロテイナーゼ阻害剤カクテル（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を補充したものに溶解させた。氷冷したＰＢＳ（３００μｌ）を加え、全内容物を遠心して、不溶性デブリを除去した。

全タンパク質濃度：

ＡＤ標本：

＃６３（２．２１ｍｇ／ｍｌ）
＃８０（２．２５ｍｇ／ｍｌ）
ＮＰ標本：
＃８１（３．３８ｍｇ／ｍｌ）
ＮＰ標本（＃８１）及び２つのＡＤ標本（＃６３及び＃８０）を、それぞれ３つの試験標本に分割し（無処理、＋Ｃ０１０５処理、＋Ａβ$_{42}$処理）、さらなる分析用に１×ＰＢＳで希釈した。

【０５８５】
Ｃ０１０５処理：
化合物Ｃ０１０５（Ｐａｉｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）処理は、ＮＰ及びＡＤ患者白血球を１×ＰＢＳに再懸濁させ、ａ）１００ｎＭのＣ０１０５（最終濃度）、及びｂ）対照（ＰＢＳのみ）を用いて（各試験標本につき合計体積は４００μｌ）、３７℃で３０分間処理することで行った。

【０５８６】
Ａβ$_{42}$処理：
Ａβ$_{42}$（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）処理は、プロトコルの最終工程としてＡＤ及び正常患者白血球を１×ＰＢＳに再懸濁させ、ａ）１０μＭのＡβ$_{42}$（最終濃度）、及びｂ）対照（ＰＢＳのみ）を用いて、３７℃で３０分間処理することで行った。

【０５８７】
結果
間接ＥＬＩＳＡ研究
メーカーの使用手順書に従ってビオチン化キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、抗フィラミンＡ抗体（ウサギポリクローナル）をビオチン化した。遊離のビオチンを、１０－ＫＤａカットオフフィルター及び遠心分離を用いて除去した。

【０５８８】
２人のＡＤ患者及び１人の正常な、健常被験者（ＮＰ）由来のリンパ球溶解液（５μｇ）を、それぞれ３つの試験標本に分割して、ａ）ビヒクル（１×ＰＢＳ）、ｂ）１０μＭのＡβ$_{42}$、ｃ）１００ｎＭのＣ０１０５のいずれかとともにインキュベートした。インキュベーションは、２５０μｌの１×ＰＢＳ中、３７℃で３０分間行い、インキュベーションの間、１０分ごとに１分間、９５％O_2で曝気した。

【０５８９】
リンパ球を遠心分離により収集し、手短かに超音波処理し、４℃で１時間、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０を添加したプロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ含有ＰＢＳ１００μｌに溶解させた。３００μｌのＰＢＳを追加してから、全内容物を遠心して、不溶性デブリを除去した。

【０５９０】
ＮＰ及びＡＤの標本（ＡＤ患者のリンパ球、上記のとおり）を用いて、段階希釈系列標本（希釈は１×ＰＢＳで行った）を調製し、標本１５０μｌを、１ウェルあたり上記のとおり添加した。プレートは接着カバーで覆うことで、蒸発を防いだ。

【０５９１】
α７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体のレベルを測定するため、ビオチン化ウサギポリクローナル抗ＦＬＮＡ抗体を、０．５μｇ／ウェルで、ストレプトアビジン被覆したプレート（Ｐｉｅｒｃｅ）に添加した。プレートを、５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で３回洗浄し、上記のビオチン化抗体とともに、２５℃でインキュベートした。インキュベーション後、洗浄してから、プレートを、室温で１時間、１０％ＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でブロッキングした。次いで、ウェルを、５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で３回洗浄した。

【０５９２】
洗浄したプレートに、上記処理条件のそれぞれで得られたリンパ球溶解液１５０μｌを添加して、２５℃で１時間インキュベートした（２つ組で行った）。プレートを、氷冷し

た５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で３回洗浄し、３０℃で１時間、０．５μｇ／ウェルの未結合マウス抗ＦＬＮＡ（フィラミンＡ用）及び未結合ラット抗α７ｎＡＣｈＲと接触させた（インキュベートした）。

【０５９３】

５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）で１分間洗浄することを２回行ってから、各ウェルを、ＨＲＰ結合抗マウスＩｇＧ又は抗ラットＩｇＧを適宜用いて、２５℃で３０分間インキュベートした。プレートを、トリス・ＨＣｌ（ｐＨ７．４）２００μｌで３回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）酵素検出用のＴＭＢ試薬基質を添加した（マイクロプレートの各ウェルあたり、ＴＭＢ基質溶液７５μｌ、続いて１０～１５分間（又は発色するまで）インキュベートして、そして各ウェルに２Ｍ硫酸７５μｌを添加して反応を停止した。吸光度（$ＯＤ_{450}$）を４５０ｎｍで測定した）。

【０５９４】

段階希釈で得られたデータを用いて曲線を作成した。

【０５９５】

特異性

ＥＬＩＳＡアッセイがヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体を一意的に同定することを保証するため、無関係のヒトタンパク質（ｈレプチン及びｈＣＧ）で、ヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体に対する交差反応性を検査した。全リンパ球溶解液を１ウェルあたり５μｇ用いて、標準ＥＬＩＳＡを行った。全リンパ球溶解液５μｇの代わりに、１ウェルあたりヒト組換えレプチン（５μｇ）及びヒト組換えＣＧ（５μｇ）を添加し、ＥＬＩＳＡアッセイを標準条件で行った。以下の表は、交差反応性が、ｈレプチンに対して４．３％、及びｈＣＧに対して３．１％であることを示す。これらのデータは、ＥＬＩＳＡアッセイがＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体に特異的であることを示す。

【０５９６】

表

【表２４】

	ヒトリンパ球溶解液、ＡＤ＃６３（５μｇ）	５μｇのｈレプチン	５μｇのｈＣＧ
規格化ＯＤ、反復１～３	0.52/0.57/0.53	0.02/0.01/0.04	0.01/0.01/0.03
規格化ＯＤ、平均	0.54	0.02	0.01
交差反応%	—	4.3	3.1

【０５９７】

正確性

ＥＬＩＳＡアッセイが「真」の値を代表する値を返すことを保証するため、ＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体を含む溶解液標本に、組換えヒトレプチンをある濃度範囲で添加した。回収物の濃度パーセントを測定して正確性を計算した。これらの結果を以下の表に示す。

【０５９８】

表

【表２５】

	ヒトリンパ球溶解液、AD＃６３（５μg）	添加したｈレプチン（μg）	正確性（回収率）
規格化OD、平均（n＝6）	０．５２８	ｚｅｒｏ	１００．００
	０．５３２	１	１００．７５
	０．５２４	２	９９．２４
	０．５２５	３	９９．４３
	０．５１６	４	９７．７２
	０．５１６	５	９７．７２
	０．５１８	６	９８．１
	０．５０７	７	９６．０２
	０．５０９	８	９６．４０
	０．４９８	９	９４．３１
	０．４９７	１０	９４．１２

【０５９９】
精度／繰返し再現性
同一のアッセイで単一の溶解液標本（ＡＤ標本＃６３）を３回測定し、その３回の測定が同一の結果をもたらすかどうかを明らかにした。３つの標本を、ＥＬＩＳＡアッセイにより、同日中に３回同一方法で測定した（繰返し再現性）。
【０６００】
単離手順がアッセイ結果に干渉しないことを保証するため、同一標本＃６３からの単離を３回行い、これら３つの同一標本の溶解液でＥＬＩＳＡアッセイを行った。溶解液単離は、異なる日付で３回行った。
【０６０１】
各標本につき各日合計で６回のアッセイを行った。これら６回のうち、２回は標本を処理せず行い、２回は標本をＡβ_{42}と混合して１００μＭのＡβ_{42}とし、２回は標本を化合物Ｃ０１０５と混合して濃度１００ｎＭとした。α７ｎＡＣｈＲのレベルを示す（バックグラウンドを差し引いたもの）。
【０６０２】
アッセイ結果は、アッセイを実行した３つの日付の各日において実質的に同一であった。それぞれの場合において、２つの未処理標本及び２つのＡβ_{42}処理標本は、互いに、差があったとしてもわずかな差しか示さず、一方化合物Ｃ０１０５と混合してアッセイした２つの標本は、各日において、ならびに３つの日付全てにわたって、互いにほぼ同一であり、それと同時に各日のその他の４つの標本と実質的に異なっていた。
【０６０３】
同一リンパ球標本（ＡＤ＃６３）を用いて、異なる３つの日付で３回単離を行った。ＡＤ患者標本＃６３を処理したもの（＋／－化合物Ｃ０１０５、＋／－Ａβ_{42}）を用いて間接ＥＬＩＳＡ試験を行った。
【０６０４】
この試験では、未処理の結果及びＡβ_{42}処理の結果は、各日の溶解液ごとでは互いに実質的に同一であったが、日付の異なる溶解液間ではわずかに異なっていた。化合物Ｃ０１０５処理の結果は、各日の溶解液について、未処理又はＡβ_{42}処理と明らかに異なっていたが、３つの日付の溶解液間でも互いに異なっていた。
【０６０５】
直線性及び範囲
予想される標本の値の範囲にわたって反応が直線的であることを保証するため、異なる

濃度のヒトＦＬＮＡ－α７ｎＡＣｈＲ複合体のＯＤ４５０をＥＬＩＳＡアッセイで検出した。

【０６０６】

間接ＥＬＩＳＡ試験は、２つのＡＤ患者標本及び２つのＹＣ対照（＋／－化合物Ｃ０１０５、＋／－Ａβ$_{42}$）を用い、１ウェルあたり５μｇの全タンパク質及び１ウェルあたり１４μｇの全タンパク質で行った。データは、予想どおり、結合の結果が、使用した全タンパク質量の関数ではないことを示した。

【０６０７】

検出限界

検出限界（ＬＯＤ）は、ＥＬＩＳＡを利用してＡＤ標本反応対ＮＰ標本反応を差別化できるようにするために必ずロードしなければならない１ウェルあたりの全タンパク質（溶解液）の最少量であるが、これを確定させることで、検出可能な最少反応を確立させた。

【０６０８】

得られたデータから、１μｇ又は５μｇの全タンパク質を、１０μＭのＡＢ$_{42}$と合わせて、及び１００ｎＭの化合物Ｃ０１０５と合わせて添加することで、適切な結果を得ることが可能であるということが示される。

【０６０９】

〔実施例９〕

ＦＬＮＡ親和性結合試験

リガンドとして多種の化合物及び受容体としてＦＬＮＡ又は配列番号１のＦＬＮＡ五量体を用いる一連の結合試験。これらの試験を、概して同様な様式で、リガンド存在下での［^{3}Ｈ］ＮＬＸ結合の阻害に関する競合（置換）曲線を用いて行った。結果を図１６に示す。各試験の詳細を以下に記載する。

【０６１０】

ＦＬＮＡ発現Ａ７由来の膜に対する［^{3}Ｈ］ＮＬＸ結合のナルトレキソンによる阻害に関する競合（置換）曲線（図１６Ａ）。大部分の受容体、特にμ受容体を有さない細胞（ヒトメラニン細胞性；ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２５００）を用いて曲線を作成した。この曲線は、３．９４ピコモル濃度のＩＣ$_{50\text{-}H}$（高親和性）及び８３４ピコモル濃度のＩＣ$_{50\text{-}L}$（低親和性）を示す２つの親和性部位を示す。２つの飽和可能な部位を仮定する競合方程式を使って、０．１ｐＭ～１μＭの範囲で１６段階の濃度から構成されるナルトレキソンの曲線について非線形カーブフィッティング分析を行った。データは、６回の試験それぞれで異なる組のＡ７細胞を用いて得られたものである。

【０６１１】

ＦＬＮＡに対する化合物Ｃ０１０５の結合親和性を、同様に測定した（図１６Ｂ）。簡単に言うと、Ａ７細胞膜１００μｇを、結合媒体（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ７．５；１００ｍＭのＮａＣｌ；ならびにプロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ阻害剤）２５０ｍｌ中、０．０１ｎＭ～１μＭの化合物Ｃ０１０５の存在下、０．５ｎＭの［^{3}Ｈ］ＮＬＸとともに、３０℃で６０分間インキュベートした。非特異的結合は、１μＭのＮＴＸで確定させた。３％ＢＳＡで処理したマイクログラスファイバー製の無結合剤グレードＢ（ＧＦ／Ｂ）膜を使い吸引して迅速に濾過することで、反応を停止した。フィルターを、氷冷した結合媒体５ｍｌで２回洗浄し、フィルター上に残留する［^{3}Ｈ］ＮＬＸを、液体シンチレーション分光測定により測定した。得られたデータを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）Ｐｒｉｓｍプログラムを用いて分析した。今回は、ＩＣ$_{50\text{-}H}$が０．４３ピコモル濃度及びＩＣ$_{50\text{-}L}$が２２６ピコモル濃度と求められた。Ｎ＝４。

【０６１２】

ＳＫ－Ｎ－ＭＣ膜でのＦＬＮＡに対する化合物Ｃ０１０５の結合親和性を、同様に測定した（図１６Ｃ）。簡単に言うと、α７ｎＡＣｈＲ受容体及びμオピオイド受容体の両方を含有するＳＫ－Ｎ－ＭＣ（ヒト神経上皮腫；ＡＴＣＣ　ＨＴＢ－１０）細胞膜２００μｇを、結合媒体（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ７．５；１００ｍＭのＮａＣｌ；なら

びにプロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ阻害剤）２５０ｍｌ中、１μＭのＤＡＭＧＯ及び０．０１ｎＭ～１μＭの化合物Ｃ０１０５の存在下、０．５ｎＭの［^{3}Ｈ］ＮＬＸとともに、３０℃で６０分間インキュベートした。非特異的結合は、１μＭのＮＴＸで確定させた。３％ＢＳＡで処理したＧＦ／Ｂ膜を使い吸引して迅速に濾過することで、反応を停止した。フィルターを、氷冷した結合媒体５ｍｌで２回洗浄し、フィルター上に残留する［^{3}Ｈ］ＮＬＸを、液体シンチレーション分光測定により測定した。得られたデータを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）Ｐｒｉｓｍプログラムを用いて分析した。今回は、$IC_{50\text{-}H}$が０．２０１ピコモル濃度及び$IC_{50\text{-}L}$が１１１ピコモル濃度と求められた。Ｎ＝４。

【０６１３】

配列番号１のＶＡＫＧＬペプチドに対する化合物Ｃ０１０５の結合親和性も、置換アッセイで測定した（図１６Ｄ）。簡単に言うと、Ｎ末端ビオチン化ＶＡＫＧＬ（配列番号１）ペプチド（Ｂｎ－ＶＡＫＧＬ）１０ｍｇを、結合媒体（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ、ｐＨ７．５；１００ｍＭのＮａＣｌ；ならびにプロテアーゼ及びタンパク質ホスファターゼ阻害剤）２５０ｍｌ中、０．０１ｎＭ～１μＭの化合物Ｃ０１０５の存在下、０．５ｎＭの［^{3}Ｈ］ＮＬＸとともに、３０℃で６０分間インキュベートした。非特異的結合は、１μＭのＮＴＸで確定させた。氷冷した結合媒体１ｍｌを添加することで、反応を停止した。［^{3}Ｈ］ＮＬＸが結合したＢｎ－ＶＡＫＧＬは、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（登録商標）アガロース（Ｔｈｅｒｍｏ）２０ｍｌとともにインキュベートすることで捕獲し、続いて遠心分離した。ＰＢＳ１．５ｍｌで２回洗浄した後、結合した［^{3}Ｈ］ＮＬＸを、液体シンチレーション分光測定により測定した。得られたデータを、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）Ｐｒｉｓｍプログラムを用いて分析した。今回は、配列番号１の五量体ペプチドに予想されたとおり、単独のIC_{50}値が得られ、その値は２．７６ピコモル濃度であった。Ｎ＝４。

【０６１４】

これらの試験で得られたデータから、ナロキソンと例示化合物Ｃ０１０５は、ＦＬＮＡに対して同様な親和性を示すことが示された。これらのデータは、無傷のＦＬＮＡ分子と配列番号１の五量体ＦＬＮＡペプチドが、受容体としての結合親和性において、類似していることも示し、これにより、本明細書中行われるアッセイにおいて完全分子の代替品として五量体ペプチドを使用することの正当性を立証する。

【０６１５】

〔実施例１０〕

化合物Ｃ０１０５によるＡＤマウス処置

Ｃ０１０５のＡＤ治療効果を査定するため、Ｅ１２９マウス及びＡＤ遺伝子導入（ｔａｕ／ＡＰＰ６９５ｓｗ（－９Ｅ）／ＰＳ１）マウスに、４ヶ月齢（プラーク病理が最小限）及び８ヶ月齢（プラーク病理が確立されている）の段階で、３０ｍｇ／ｋｇのＣ０１０５を２ヶ月間経口投与して処置した。処置完了後、マウスをと殺し、脳を取り出し／解剖し、体躯血液を、ＥＤＴＡ含有管に採取した。リンパ球を単離して溶解させ、抗ＦＬＮＡを用いて免疫沈降により精製し、続いて抗ＦＬＮＡ免疫沈降物中のα７ｎＡＣｈＲ含有量及びＴＬＲ４含有量を、ウエスタンブロット法により測定することで、α７ｎＡＣｈＲとＦＬＮＡの複合体ならびにＴＬＲ４とＦＬＮＡの複合体のレベルを求めた。タンパク質バンドを、化学発光法により検出し、Ｘ線フィルムに焼き付けて視覚化し、比重走査測定により定量した。

【０６１６】

データは、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡ及びＴＬＲ４対ＦＬＮＡの光強度比で表した。各データ点は、５匹のマウスで得られた平均±ＳＥＭである。

【０６１７】

データをまとめると、リンパ球中のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体及びＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体は、ＡＤ遺伝子導入マウスでは、年齢に依存した病理関連様式で上昇することが示される。このＡＤ関連の変化は、化合物Ｃ０１０５を２ヶ月経口投与することで確

実に正常化される。つまり、これらのデータは、化合物Ｃ０１０５が、有効なＡＤ治療法であり、リンパ球中のα７ｎＡＣｈＲ－ＦＬＮＡ複合体及びＴＬＲ４－ＦＬＮＡ複合体の減少度合いをバイオマーカーとして用いて、ＡＤ診断を確定させ、ＡＤの重篤度を査定し、及び、ＡＤ治療薬の治療効果を決定することができる、ということを示唆する。

【０６１８】

〔実施例１１〕

タンパク質Ａ及びタンパク質Ｇによる捕獲方法

抗体結合したα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ、及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａβタンパク質タンパク質複合体を捕獲する実体としてタンパク質Ａ又はタンパク質Ｇのいずれかで被覆されている、市販の９６ウェルマイクロタイタープレートを用いて、２名のＡＤ患者由来のリンパ球（＃６３及び＃８０）及びＹＣＩ被験者由来のリンパ球（＃８１）から調製したリンパ球調製物で、以下に説明するとおり、例示アッセイを行った。

【０６１９】

アッセイしようとする被験者由来のリンパ球（２５μｇ）を、ビヒクル（０．１％ＤＭＳＯ含有クレブス（Kreb's）・リンゲル液）、１００ｎＭのＡ$β_{42}$、１ｎＭの化合物ＣＯ１０５とともにインキュベートした。インキュベーションは、クレブス（Kreb's）・リンゲル液［２５mMのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１１８mMのＮａＣｌ、４．８mMのＫＣｌ、２５mMの$NaHCO_3$、１．３mMの$CaCl_2$、１．２mMの$MgSO_4$、１．２mMのKH_2PO_4、１０mMのグルコース、１００mMのアスコルビン酸、プロテアーゼ阻害剤カクテル］２５０μｌ中、３７℃で３０分間行い、クレブス（Kreb's）・リンゲル液は、９５％O_2／５％CO_2で１０分間曝気しておいた。インキュベーション混合物は、インキュベーション中、１０分ごとに１分間曝気した。リンパ球を遠心分離により収集し、免疫沈降［ＩＰ］用緩衝液（２５mMのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５；２００mMのＮａＣｌ、プロテアーゼ阻害剤錠剤（１錠剤／１０ｍｌ）、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、５mMのＮａＦ、１mMのバナジン酸ナトリウム、０．５mMのβ－グリセロリン酸（グリセロホスフェート）及び０．１％２－メルカプトエタノール）１５０μｌに入れて氷上で１０秒間超音波処理し、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ－４０を加えて（合計体積２００μｌに調整）、４℃で１時間、上下左右を完全に回転させて震盪撹拌して溶解させた。遠心して不溶性デブリを除去した後、得られるリンパ球溶解液を、氷冷したＩＰ緩衝液で希釈して１ｍｌにし、次いで１μｇの抗ＦＬＮＡ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）又は１μｇの抗Ａ$β_{42}$＋１μｇの抗アクチンを添加した。次いで、抗体抗原（リンパ球溶解液）混合物を、４℃で１時間、上下左右を完全に回転させて震盪撹拌しながらインキュベートした。

【０６２０】

タンパク質Ａで、又はタンパク質Ｇで被覆された９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ／Ｔｈｅｒｍｏ）を、リン酸緩衝化生理食塩水（ｐＨ７．２）（ＰＢＳ）に０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を添加したもの（０．０５％ＰＢＳＴ）で３回洗浄し、次いでプレートを、１０％ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｉｅｒｃｅ／Ｔｈｅｒｍｏ）を用いて、２５℃で３０分間、ブロッキングした。０．０５％ＰＢＳＴで３回洗浄した後、１００μｌの抗ＦＬＮＡ又は抗Ａ$β_{42}$／抗アクチン免疫複合体懸濁液を各ウェルに添加し、インキュベーションを４℃で１時間、続けた。各標本は、２つ組で査定した。

【０６２１】

プレート上の液をデカンテーションで移し、０．０５％ＰＢＳＴで３回洗浄し、非特異的結合を、２００μｌの１μｇ／ｍｌ正常ヒトＩｇＧ及び１％ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ含有０．０５％ＰＢＳＴを用いて３０分間ブロッキングした。次いで、プレートを０．０５％ＰＢＳＴで３回洗浄した。α７ｎＡＣｈＲ、ＴＬＲ４、ＦＬＮＡ、及びβ－アクチンそれぞれの抗体０．２μｇとともに、４℃で１時間インキュベートすることにより、α７ｎＡＣｈＲ、ＴＬＲ４、ＦＬＮＡ、及びβ－アクチンの含有量を査定した。０．０５％ＰＢＳＴで３回洗浄してから、プレートを、ＦＩＴＣ結合した抗動物種ＩｇＧとともに（１：２５０００）１時間インキュベートした。０．１％ＰＢＳＴで１回洗浄し、０．０５％ＰＢ

ＳＴで２回洗浄し、ＰＢＳで１回洗浄してから残存ＦＩＴＣのシグナルを、マルチモードプレートリーダー（ＤＴＸ８８０、Ｂｅｃｋｍａｎ）で測定した。

【０６２２】

バックグラウンドは、抗体抗原（リンパ球溶解液）混合物を添加しなかったウェルに由来する残存ＦＩＴＣのシグナルにより確定させ、各ウェルから差し引いた。図２０Ａ及び図２０Ｂに示すデータは、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡ（α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体）、ＴＬＲ４対ＦＬＮＡ（ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ複合体）、又はα７ｎＡＣｈＲ対β－アクチン（α７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体）の比で表されている。

【０６２３】

これらのデータは、化合物ＣＯ１０５又はＡβを外部から添加すると、ＡＤリンパ球とＹＣＩリンパ球では異なる形で、α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ複合体、及びα７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体に摂動が起こることを、劇的に実証する。ＡＤリンパ球は、基本的に、Ａ$β_{42}$の添加に無反応であるが、それに対してＹＣＩリンパ球（Ａ$β_{42}$で飽和していないα７ｎＡＣｈ受容体を有する）は、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの複合体の量に、有意な移動（増加）を起こす。Ａ$β_{42}$の添加は、ＹＣＩリンパ球において、α７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体量も増加させる。化合物ＣＯ１０５をＡＤリンパ球に添加すると、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの複合体の量ならびにα７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体の量に、有意な減少（約５０％）をもたらす。

【０６２４】

化合物ＣＯ１０５に対して、ＡＤリンパ球の反応とは著しく対照的に、ＹＣＩリンパ球は、基本的に無反応である。これらの結果は、ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、及びＦＩＴＣを利用したマルチウェルマイクロタイタープレートアッセイにより得られた結果と非常によく一致する。これらの結果は、ＦＬＮＡと会合したα７ｎＡＣｈ及びＴＬＲ４受容体ならびにα７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体の量を査定することで認知障害の患者（そのような患者に限らないが）におけるＡＤ病理の存在を査定する目的で、α７ｎＡＣｈＲ及びＴＬＲ４とＦＬＮＡとの複合体ならびにα７ｎＡＣｈＲ／Ａ$β_{42}$複合体を捕獲するのに、タンパク質Ａ又はタンパク質Ｇ抗体で捕獲するマイクロタイタープレートが有用であることを実証する。

【０６２５】

〔実施例１２〕

<u>ＹＣＩ及びＡＤ患者のリンパ球におけるタンパク質複合体に対する化合物Ｃ０１０５の効果</u>

被験者から採取したリンパ球（２５μｇ）を、ビヒクル（０．１％ＤＭＳＯ含有クレブス（Kreb's）・リンゲル液）又は１ｎＭのＣＯ１０５とともにインキュベートした。インキュベーションは、クレブス（Kreb's）・リンゲル液［２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１１８ｍＭのＮａＣｌ、４．８ｍＭのＫＣｌ、２５ｍＭのＮａＨＣＯ$_3$、１．３ｍＭのＣａＣｌ$_2$、１．２ｍＭのＭｇＳＯ$_4$、１．２ｍＭのＫＨ$_2$ＰＯ$_4$、１０ｍＭのグルコース、１００ｍＭのアスコルビン酸、プロテアーゼ阻害剤カクテル］２５０μｌ中、３７℃で３０分間行い、クレブス（Kreb's）・リンゲル液は、９５％Ｏ$_2$／５％ＣＯ$_2$で１０分間曝気しておいた。インキュベーション混合物は、インキュベーション中、１０分ごとに１分間曝気した。リンパ球を遠心分離により収集し、免疫沈降［ＩＰ］用緩衝液（２５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５；２００ｍＭのＮａＣｌ、プロテアーゼ阻害剤カクテル、２μｇ／ｍｌの大豆トリプシン阻害剤、５ｍＭのＮａＦ、１ｍＭのバナジン酸ナトリウム、０．５ｍＭのβ－グリセロリン酸（グリセロホスフェート）、及び０．１％２－メルカプトエタノール）１５０μｌに入れて氷上で１０秒間超音波処理し、０．５％ジギトニン／０．２％コール酸ナトリウム／０．５％ＮＰ・４０を加えて（合計体積を２００μｌに調整）、４℃で１時間、上下左右を完全に回転させて震盪撹拌して溶解させた。

【０６２６】

遠心して不溶性デブリを除去した後、得られるリンパ球溶解液を、氷冷したＩＰ用緩衝液で希釈して１ｍｌにし、次いで１μｇの抗ＦＬＮＡ又は１μｇの抗Ａ$β_{42}$＋１μｇの抗

アクチンを添加した。次いで、抗体抗原（リンパ球溶解液）混合物を、４℃で３０分間、上下左右を完全に回転させて震盪攪拌しながらインキュベートし、次いで１０％タンパク質Ａ／Ｇ結合アガロースビーズ３０μｌを加えて、インキュベーションを２時間続けた。次いで、遠心分離により免疫複合体をペレットにし、ＰＢＳで２回洗浄し、標本調製用緩衝液に入れて５分間煮沸することにより、溶解させた。溶解した抗ＦＬＮＡ及び抗Ａβ$_{42}$／アクチン免疫沈降物を、それぞれ７．５％及び１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで、分子の大きさにより分画し、ニトロセルロース膜に電気泳動で移動させ、ウエスタンブロット法により、α７ｎＡＣｈＲ、ＴＬＲ４、及びβ－アクチンのレベルを測定した。免疫活性なタンパク質バンドを、化学発光法により検出し、Ｘ線フィルムに焼き付けることで視覚化した。タンパク質バンドを、濃度測定法により定量した。

【０６２７】

　この試験の結果を、図２１に示す。データは、α７ｎＡＣｈＲ対ＦＬＮＡ（α７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体）、ＴＬＲ４対ＦＬＮＡ（ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ複合体）、又はα７ｎＡＣｈＲ対β－アクチン（α７ｎＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$複合体）の光強度比で表す。Ｃ０１０５の効果は、各被験者由来のＣ０１０５処理した標本及びクレブス（Kreb's）・リンゲル処理した標本におけるα７ｎＡＣｈＲ／ＦＬＮＡ複合体、ＴＬＲ４／ＦＬＮＡ複合体、α７ｎＡＣｈＲ／Ａβ$_{42}$複合体のレベルを比較することで、明らかになり、％阻害で表してある。

【０６２８】

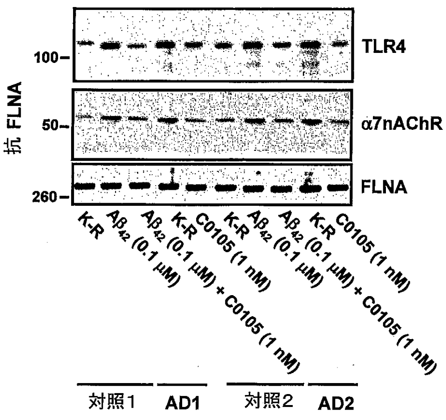
　定量図（図２１Ｅ）には、１０名のＹＣＩ対照及び２０名のＡＤ被験者から得られたデータをまとめた。Ｃ０１０５は、ＡＤ患者で、３種の複合体全てのレベルを約５０％と強くかつ有意に減少させるものの（ｐ＜０．００００１）、化合物Ｃ０１０５は、ＹＣＩ対照に対して目に見える効果を有していない。これらのデータからまたしても、化合物Ｃ０１０５が有効なＡＤ治療薬であること、更に重要なことに、リンパ球中のこれら３種のタンパク質タンパク質複合体に対する化合物Ｃ０１０５の効果が、ＡＤ病理診断及びＡＤ治療効果の追跡用バイオマーカーとして使用できることが示される。

【０６２９】

　上記の説明及び実施例は、例示を意図するものであって、制限と受け取られることを意図しない。更に他の改変が、本発明の精神及び範囲内で可能であり、当業者にとってそのような改変は容易に明らかとなる。

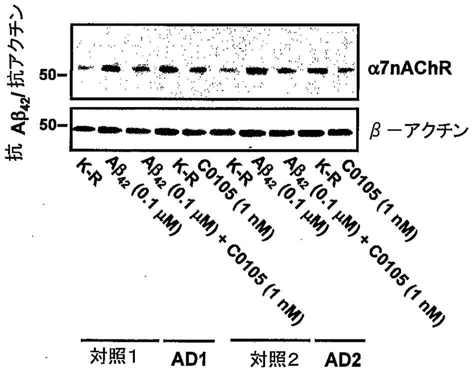
【図１Ａ】

Fig. 1A



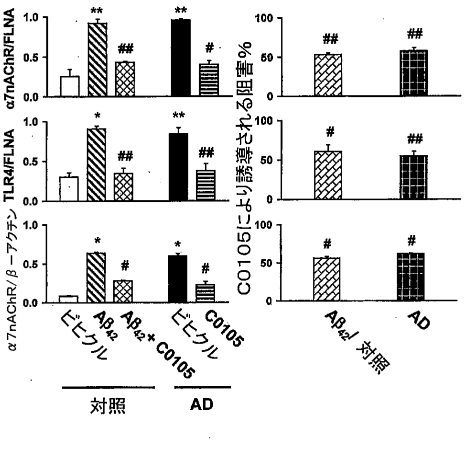
【図１Ｂ】

Fig. 1B



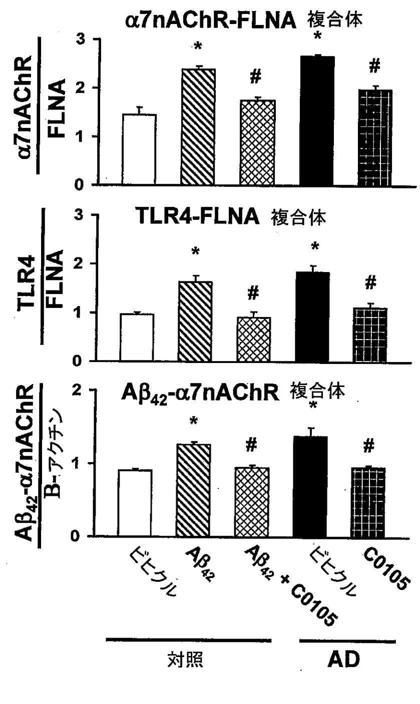
【図１Ｃ】

Fig. 1C



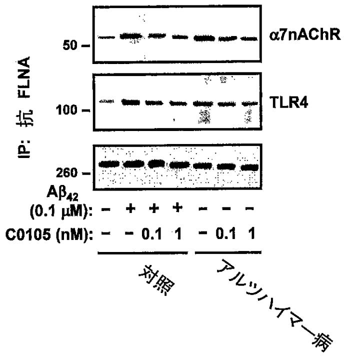
【図２】

Fig. 2



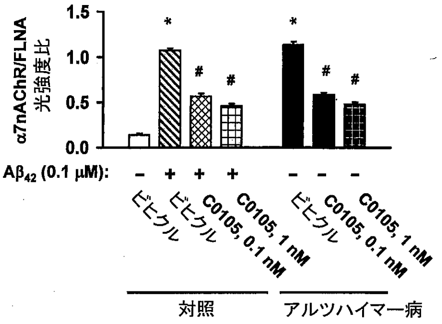
【図３Ａ】

Fig. 3A



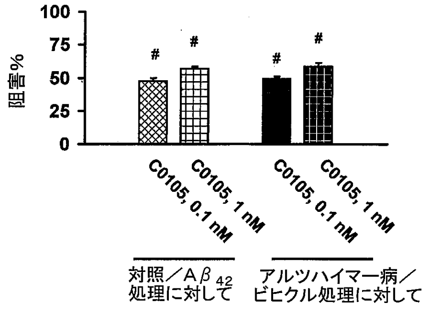
【図３Ｂ】

Fig. 3B



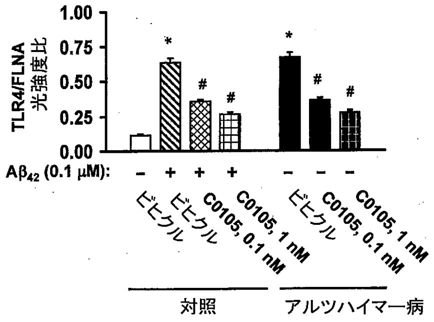
【図３Ｃ】

Fig. 3C



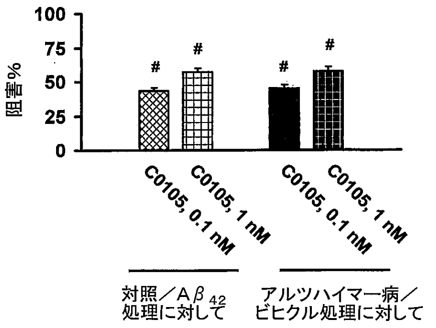
【図３Ｄ】

Fig.3D



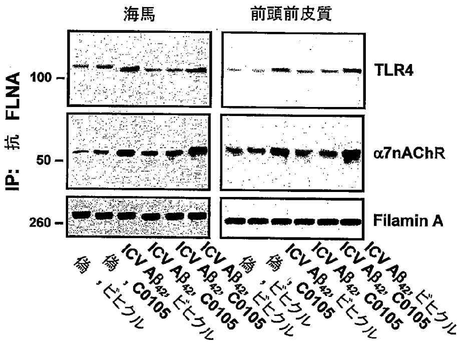
【図３Ｅ】

Fig. 3E



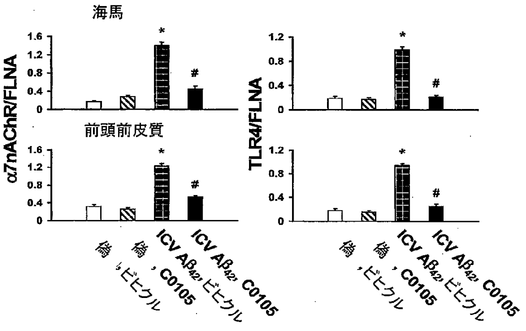
【図４Ａ】

Fig. 4 A



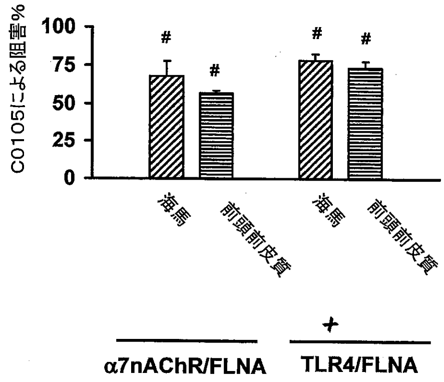
【図４Ｂ】

Fig. 4B



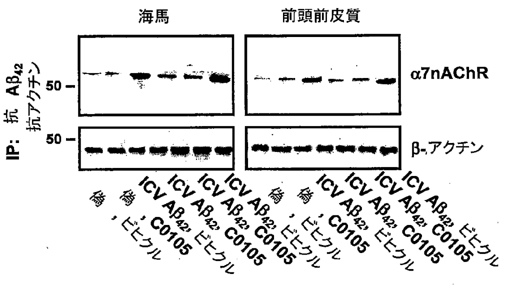
【図４Ｃ】

Fig. 4C



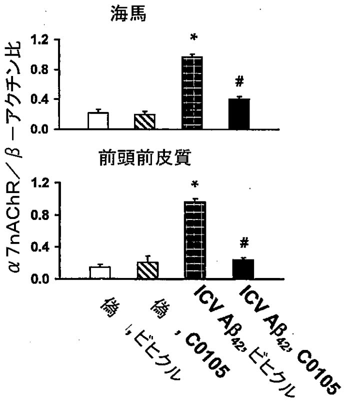
【図５Ａ】

Fig. 5A



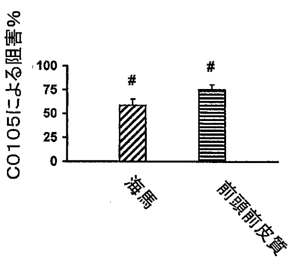
【図５Ｂ】

Fig. 5B



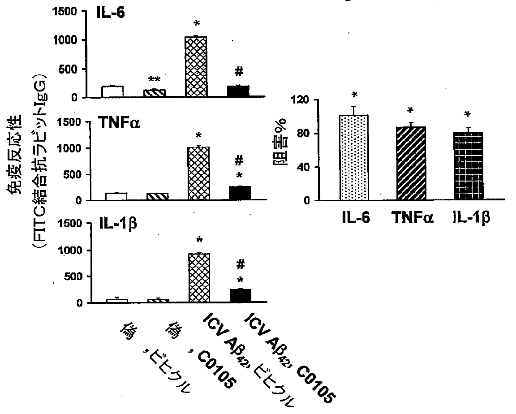
【図５Ｃ】

Fig. 5C



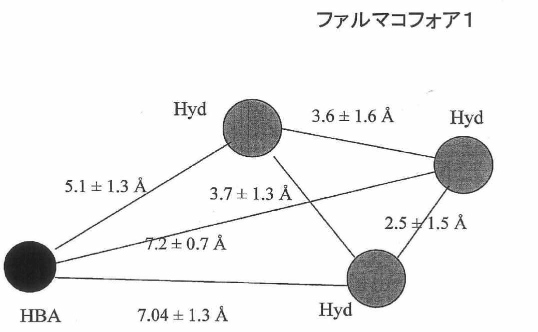
【図６】

Fig. 6



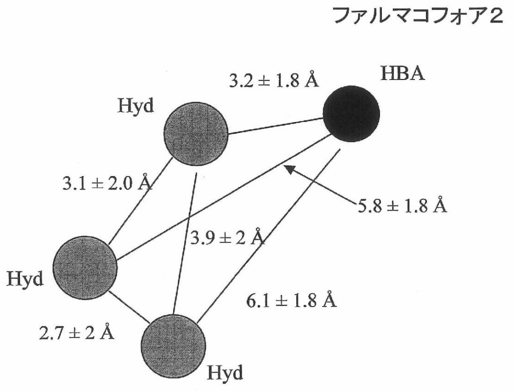
【図７】

Fig. 7



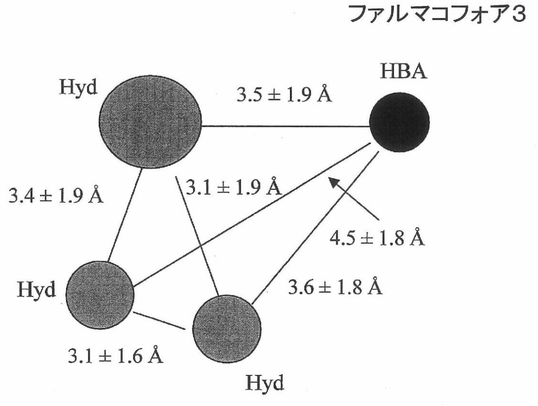
【図８】

Fig. 8



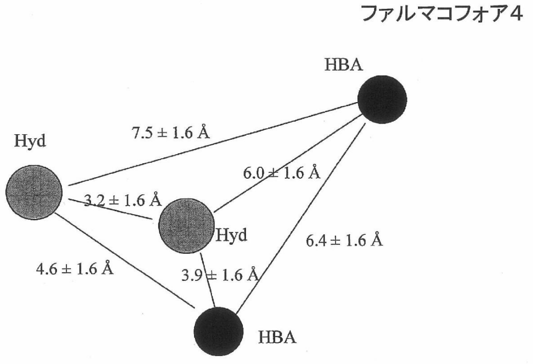
【図９】

Fig. 9

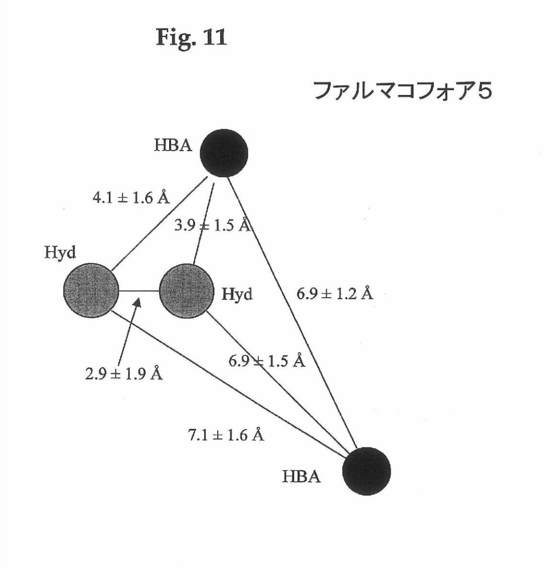


【図１０】

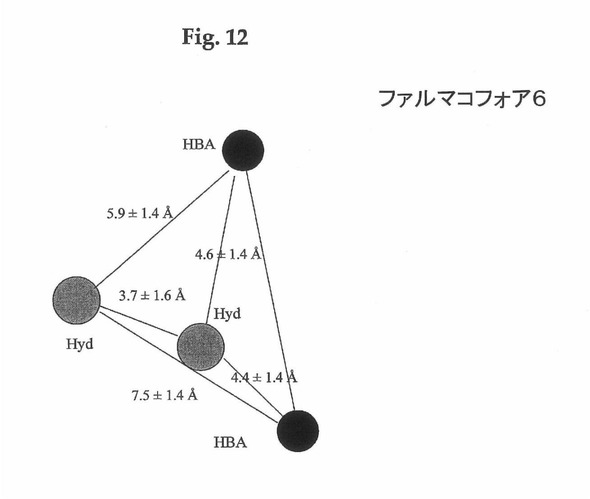
Fig. 10



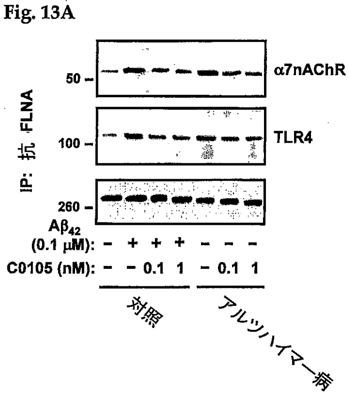
【図１１】



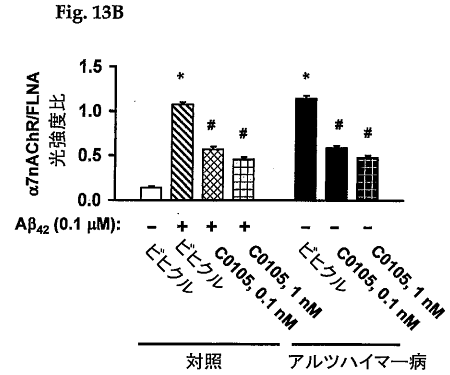
【図１２】



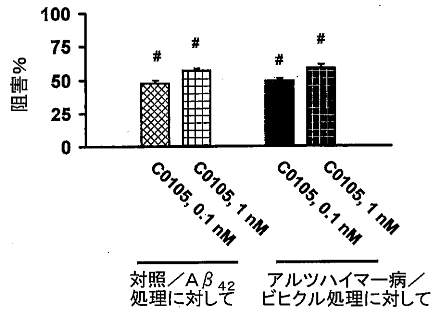
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】

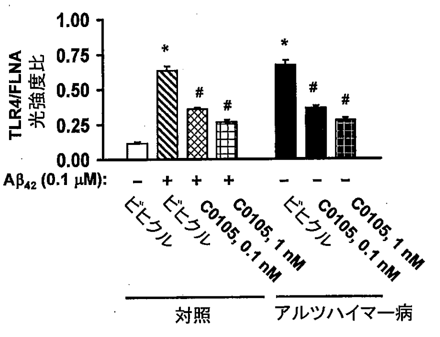


【図１３Ｃ】



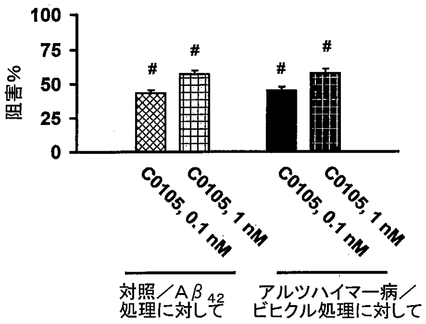
【図１３Ｄ】

Fig. 13D



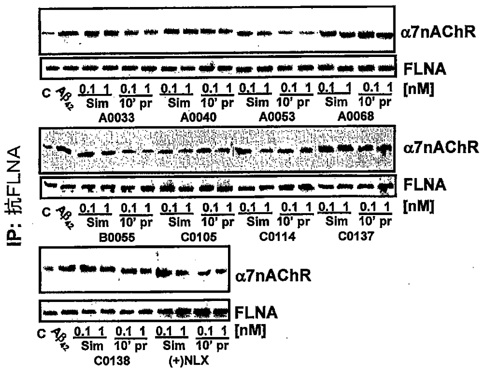
【図１３Ｅ】

Fig. 13E



【図１４Ａ】

Fig. 14A



【図１４Ｂ】

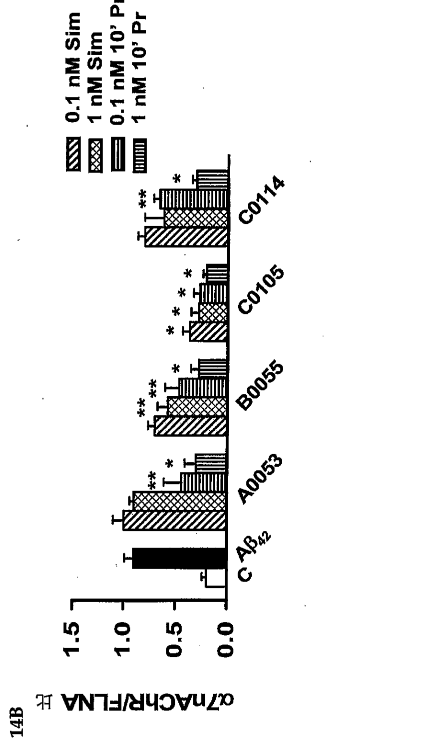
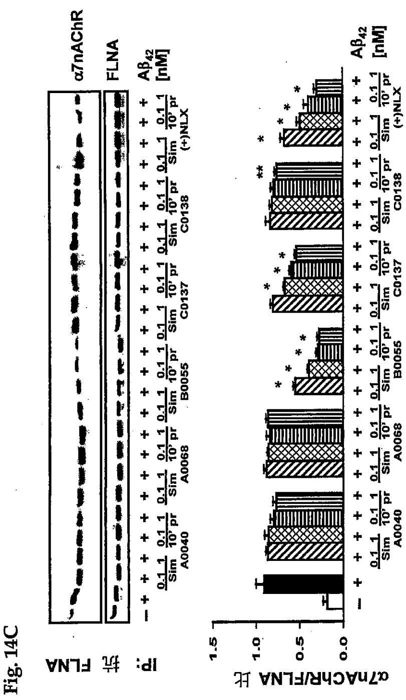
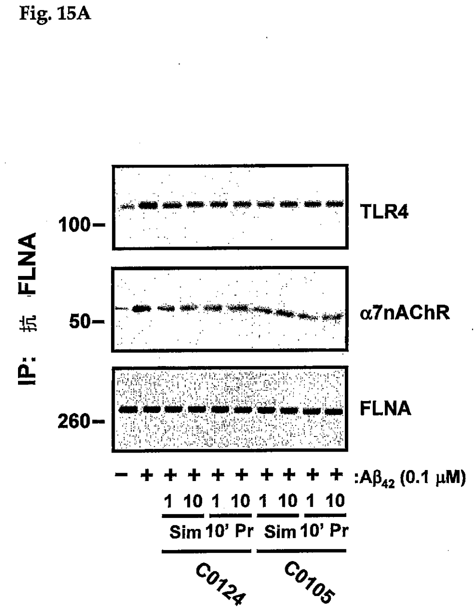


Fig. 14B

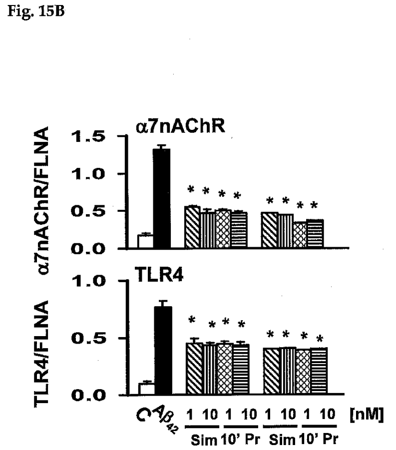
【図１４Ｃ】



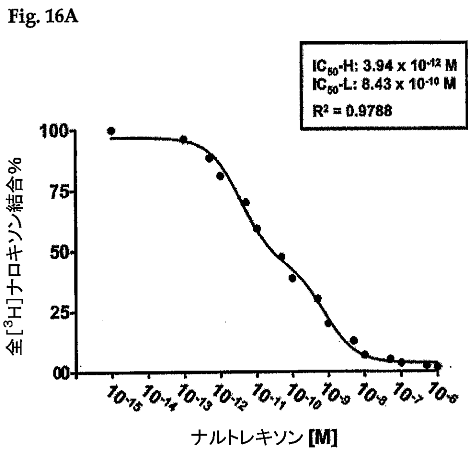
【図１５Ａ】



【図１５Ｂ】

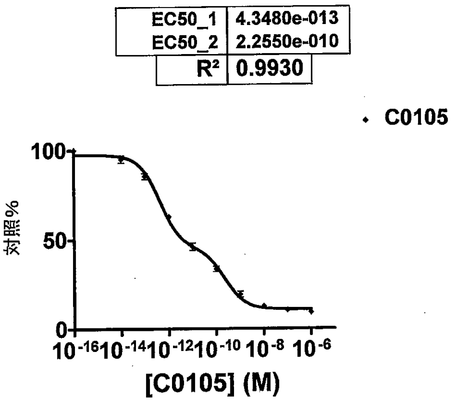


【図１６Ａ】



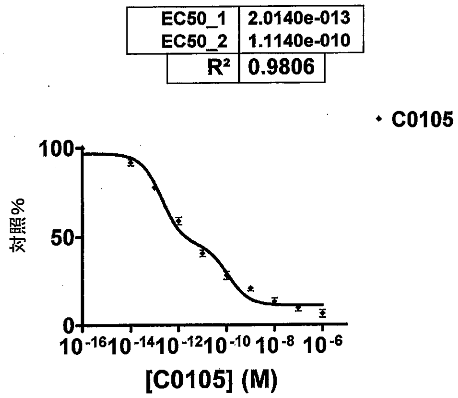
【図１６Ｂ】

Fig. 16B



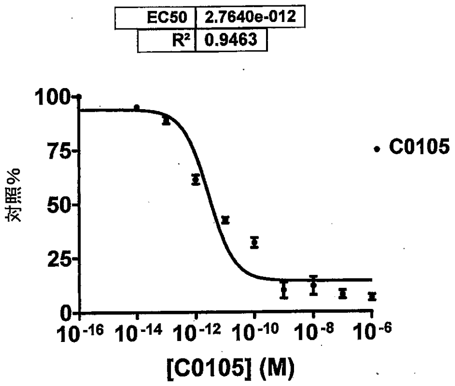
【図１６Ｃ】

Fig. 16C

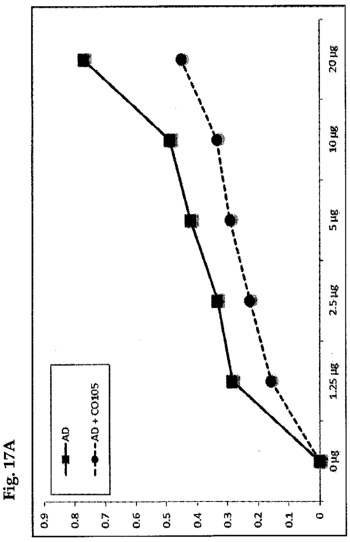


【図１６Ｄ】

Fig. 16D

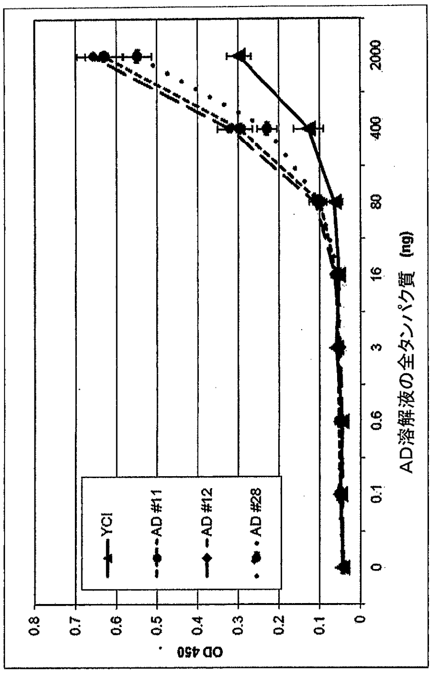


【図１７Ａ】



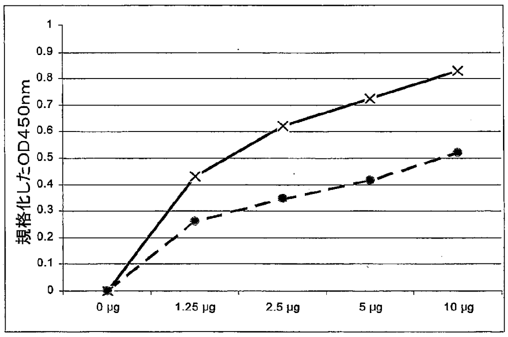
【図１７Ｂ】

Fig. 17B



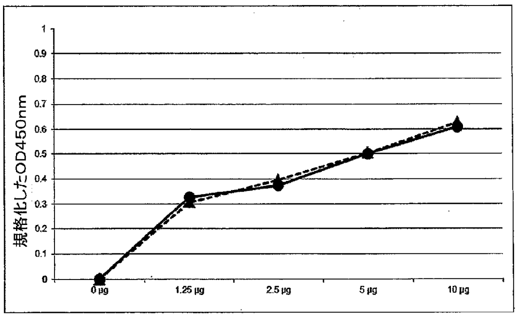
【図１８Ａ】

Fig. 18A



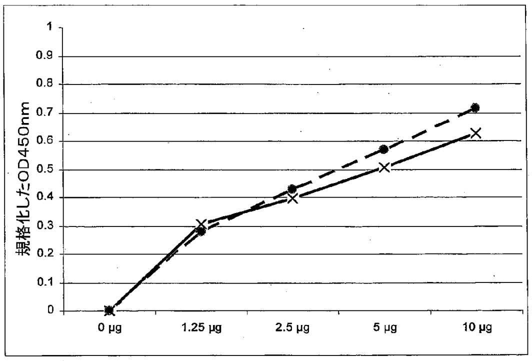
【図１８Ｂ】

Fig. 18B



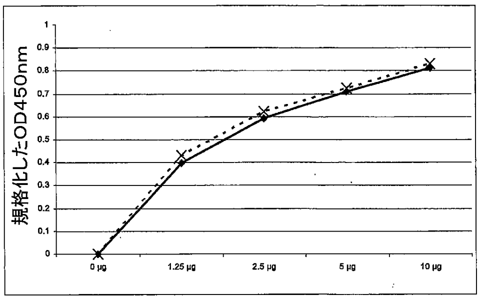
【図１８Ｃ】

Fig. 18C

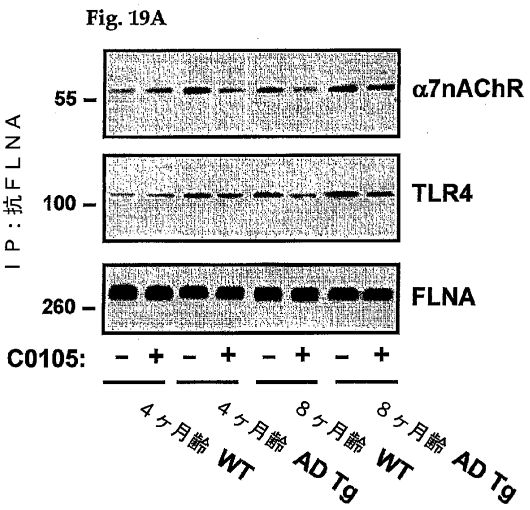


【図１８Ｄ】

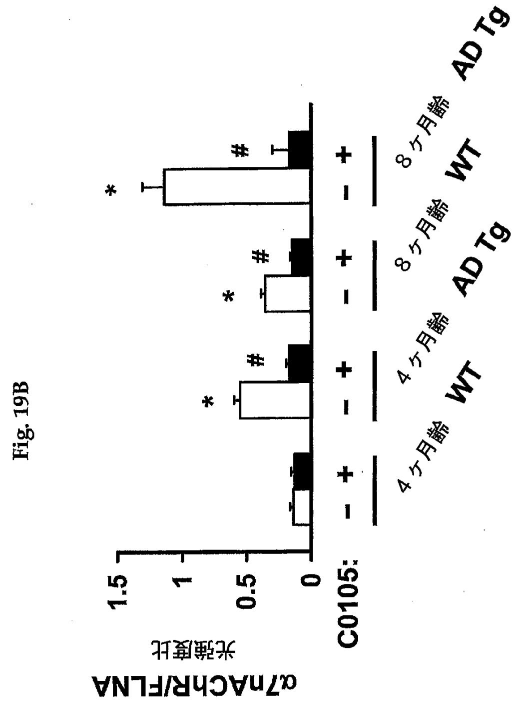
Fig. 18D



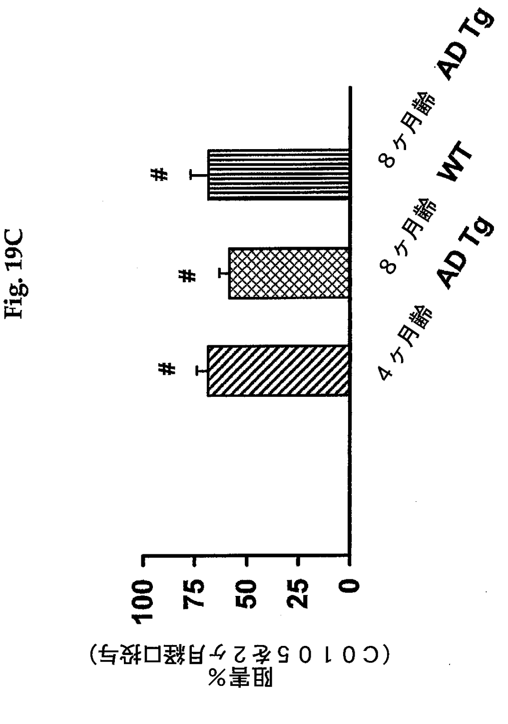
【図１９Ａ】



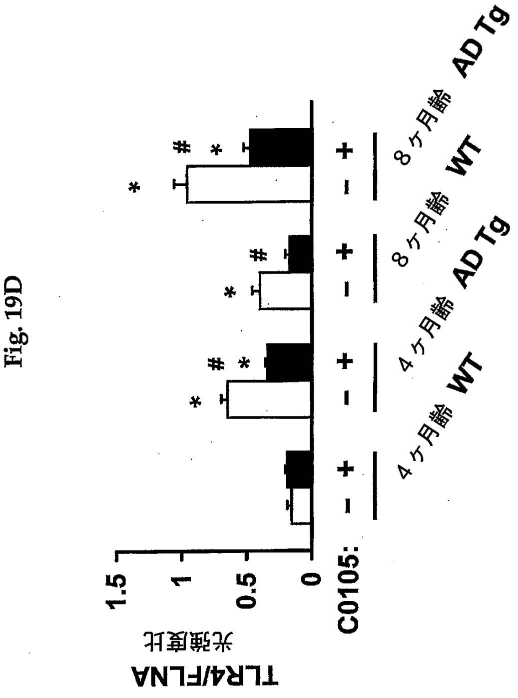
【図１９Ｂ】



【図１９Ｃ】



【図１９Ｄ】



【図１９Ｅ】

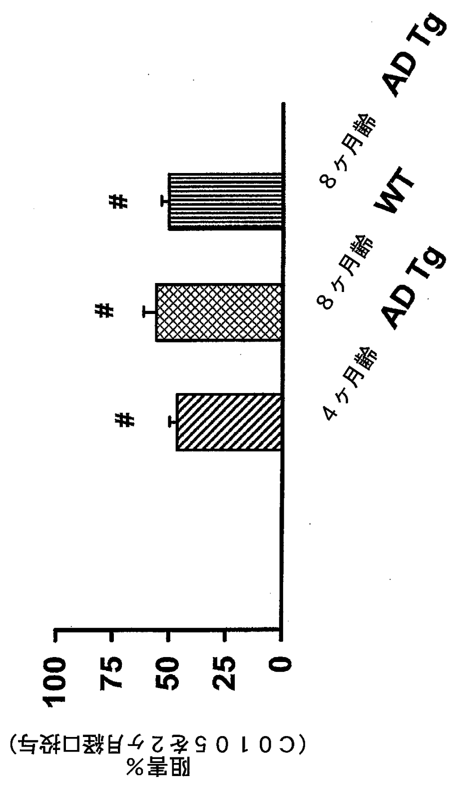


Fig. 19E

【図２０Ａ】

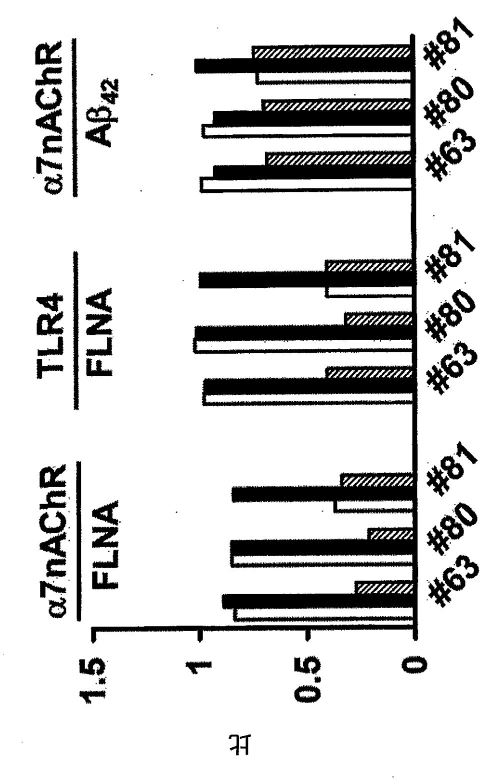


Fig. 20A

【図２０Ｂ】

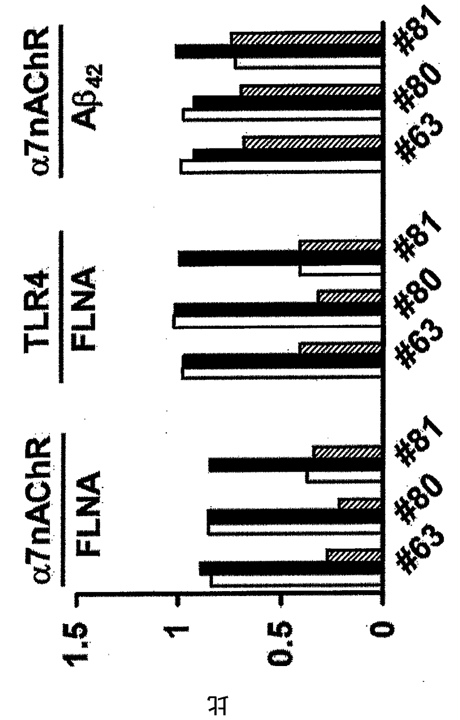


Fig. 20B

【図２１Ａ】

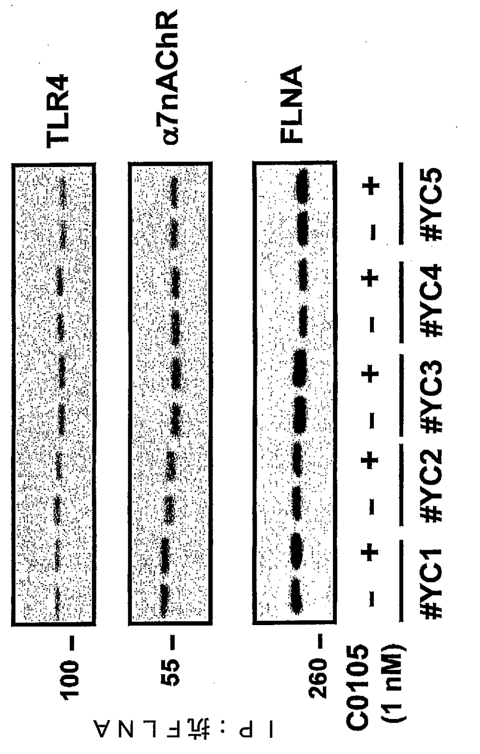


Fig. 21A

【図２１Ｂ】

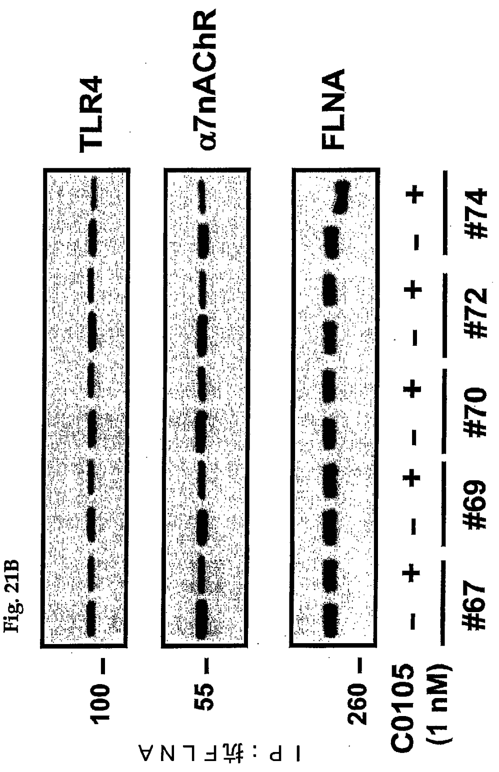


Fig. 21B

【図２１Ｃ】

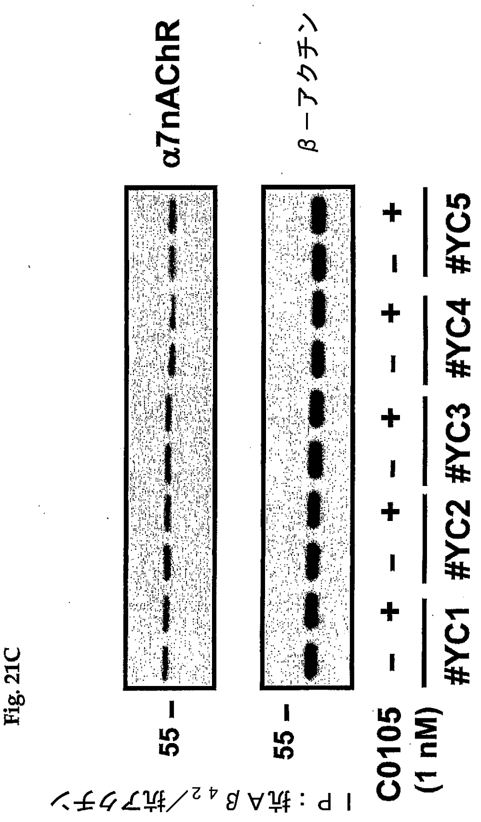


Fig. 21C

【図２１Ｄ】

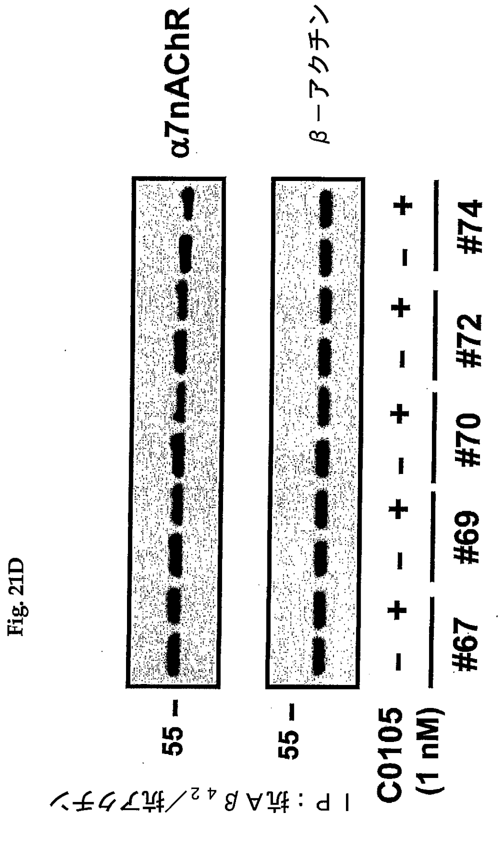


Fig. 21D

【図２１Ｅ】

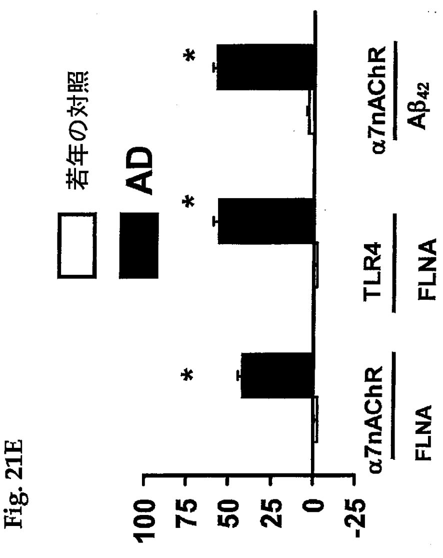


Fig. 21E

【配列表】
0006566867000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
Ｃ０７Ｄ 491/056	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｄ	491/056	
Ｃ０７Ｄ 471/10	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｄ	471/10	１０３
Ｃ０７Ｄ 498/10	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｄ	498/10	Ｊ
Ｃ０７Ｋ 7/06	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/06	
Ｃ０７Ｋ 14/47	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/47	

(74)代理人　100119013
弁理士　山崎　一夫
(74)代理人　100123777
弁理士　市川　さつき
(72)発明者　ワン　ホアウーヤン
アメリカ合衆国　ペンシルベニア州　１９１２８　フィラデルフィア　カロス　ストリート　１４９
(72)発明者　バーンズ　バルビエ　リンジー
アメリカ合衆国　テキサス州　７８７３１　オースティン　マウント　バーカー　ドライブ　３４０９

審査官　大瀧　真理

(56)参考文献　特表２００２－５１６８５３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０５０８９（ＪＰ，Ａ）
WANG, H.-Y. et al., Dissociating β-Amyloid from α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by a Novel Therapeutic Agent, S24795, Normalizes α7 Nicotinic Acetylcholine and NMDA Receptor Function in Alzheimer's Disease Brain, The Journal of Neuroscience, ２００９年, Vol. 29, No. 35, pp.10961-10973
ZHANG, W. et al., Increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease, Journal of the Neurological Sciences, ２０１２年, Vol.315, pp.67-71
WANG, H.-Y. et al., S 24795 Limits β-Amyloid-α7 Nicotinic Receptor Interaction and Reduces Alzheimer’s Disease-LikePathologies, Biological Psychiatry, ２０１０年, Vol.67, No.6, pp.522-530
WANG, H.-Y. et al., Reducing Amyloid-Related Alzheimer’s Disease Pathogenesis by a Small Molecule Targeting Filamin A, The Journal of Neuroscience, ２０１２年　7月１８日, Vol.32, No.29, pp.9773-9784

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　　３３／４８　－　３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）