

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-522295

(P2021-522295A)

(43) 公表日 令和3年8月30日 (2021. 8. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 231/14 (2006.01)	C O 7 D 231/14	4 C O 6 3
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/20 Z N A	4 C O 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-561004 (P2020-561004)	(71) 出願人	506217667
(86) (22) 出願日	平成31年4月30日 (2019. 4. 30)		スクオラ・インテルナツィオナーレ・スー
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月25日 (2020. 12. 25)		ペリオーレ・ディ・ステュディ・アヴァン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/061014		ツァーティーシッサ
(87) 国際公開番号	W02019/211265		イタリア・34136・トリエステ・ヴィ
(87) 国際公開日	令和1年11月7日 (2019. 11. 7)		ア・ボノメア・エヌ・265
(31) 優先権主張番号	18170092.3	(71) 出願人	510121547
(32) 優先日	平成30年4月30日 (2018. 4. 30)		フォンダツィオーネ・イステイトゥート・
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		イタリアーノ・ディ・テクノロジー
			FONDAZIONE ISTITUTO
			ITALIANO DI TECNOLOGIA
			イタリア、イー16163ジェノヴァ、ヴ
			ィア・モレゴ30番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンおよびプリオン様疾患の治療のためのSERPIN阻害剤

(57) 【要約】

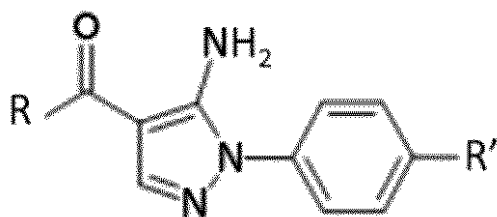
本発明は、プリオンおよびプリオン様疾患の治療的処置の分野に関する。SERINA3阻害化合物およびそれを含有する医薬組成物を記載する。本発明の化合物は、プリオンおよびプリオン様障害に関連する神経病理学的プロセスの発症および／または進行に対して有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の予防および／または治療的処置に使用するための、一般式 (I) :

【化 1】



10

(I)

[式中、

R は、少なくとも 1 つのヘテロ原子を含む飽和または不飽和の 5 員または 6 員環であり

；
R' は、ハロゲン原子または少なくとも 1 つのハロゲン原子で置換された C₁ - C₄ アルキルオキシ基である]

20

を有する SERPINA3 阻害化合物。

【請求項 2】

前記ヘテロ原子が窒素である、請求項 1 に記載の使用のための SERPINA3 阻害化合物。

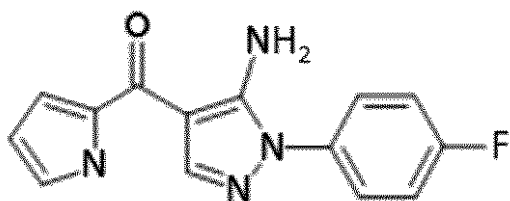
【請求項 3】

R がピペリジンまたはピロール環であり、および／または R' がフッ素原子またはトリフルオロメトキシ基である、請求項 1 または 2 に記載の使用のための SERPINA3 阻害化合物。

【請求項 4】

式 (II) :

【化 2】



30

(II)

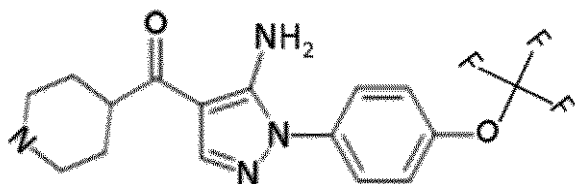
を有する、請求項 3 に記載の使用のための SERPINA3 阻害化合物。

40

【請求項 5】

式 (III) :

【化 3】



(III)

10

を有する、請求項 3 に記載の使用のためのSERPINA3阻害化合物。

【請求項 6】

処置が前記プリオンまたはプリオン様疾患の発症および／または進行に影響を与える、請求項 1～5 のいずれかに記載の使用のためのSERPINA3阻害化合物。

【請求項 7】

対象がヒトである、請求項 1～6 のいずれかに記載の使用のためのSERPINA3阻害化合物。

【請求項 8】

プリオンまたはプリオン様疾患が、クロイツフェルト・ヤコブ病（C J D）、致死性家族性不眠症（F F I）、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー症候群（G S S）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症（A L S）および前頭側頭型認知症（F T D）からなる群から選択される、請求項 7 記載の使用のためのSERPINA3阻害化合物。

20

【請求項 9】

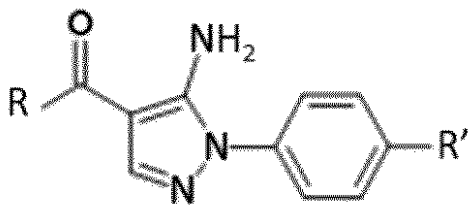
プリオンまたはプリオン様疾患が、ヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症（B S E）、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症、外来性有蹄類海綿状脳症、シカ科の慢性消耗病および霊長類の海綿状脳症からなる群から選択される、請求項 6 に記載の使用のためのSERPINA3阻害化合物。

【請求項 10】

治療有効量のSERPINA3阻害化合物と、薬学的に許容されるビヒクル、賦形剤および／または希釈剤とを含有する、それを必要とする対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の予防および／または治療的処置における使用のための医薬組成物であって、該SERPINA3阻害化合物が一般式（I）：

30

【化 4】



(I)

40

〔式中、

R は、少なくとも 1 つのヘテロ原子を含む飽和または不飽和の 5 員または 6 員環であり；

R' は、ハロゲン原子または少なくとも 1 つのハロゲン原子で置換された C₁ - C₄ アルキルオキシ基である〕

を有する、医薬組成物。

50

【請求項 11】

前記ヘテロ原子が窒素である、請求項 10 に記載の使用のための医薬組成物。

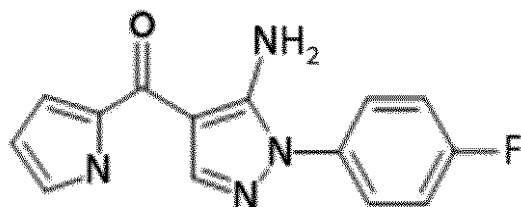
【請求項 12】

R がピペリジンまたはピロール環であり、および／または R' がフッ素原子またはトリフルオロメトキシ基である、請求項 10 または 11 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 13】

SERPINA3 阻害化合物が式 (II) :

【化 5】



10

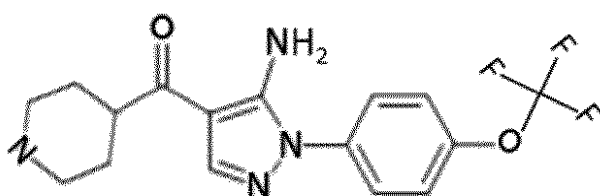
(II)

を有する、請求項 12 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 14】

SERPINA3 阻害化合物が式 (III) :

【化 6】



20

(III)

を有する、請求項 12 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 15】

処置が、プリオンまたはプリオン様疾患の発症および／または進行に影響を与える、請求項 10～14 のいずれかに記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 16】

対象がヒトである、請求項 10～15 のいずれかに記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 17】

プリオンまたはプリオン様疾患が、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、致死性家族性不眠症 (FFI)、ゲルストマン・シュトラウスラー・シャインカー症候群 (GSS)、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および前頭側頭型認知症 (FTD) からなる群から選択される、請求項 16 に記載の使用のための医薬組成物。

40

【請求項 18】

プリオンまたはプリオン様疾患が、ヒツジスクレイピー、ウシ海綿状脳症 (BSE)、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症、外来性有蹄類海綿状脳症、シカ科の慢性消耗病および霊長類の海綿状脳症からなる群から選択される、請求項 15 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 19】

局所、経口、経腸、非経口、髄腔内、硬膜外または鼻腔内投与に適した剤形である、請

50

求項 10～18 のいずれかに記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 20】

注射による投与に適した剤形である、請求項 19 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、プリオンまたはプリオン様疾患の治療的処置に使用するための化合物、およびこれらの化合物を含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

過去数十年にわたり、生物医学的知識の目覚ましい進歩は、健康状態の大幅な改善につながった。この事実は結果として平均余命の延長につながった。2050年までに、ほぼ4億人が80歳以上になるであろう。その結果、神経変性疾患の有病率は急速に増加している。この増加の事実は、高所得国だけでなく、低中所得国にとっても、近い将来、大きな社会的・経済的問題となる可能性がある。

【0003】

長年にわたって多大な努力が研究に費やされてきたが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、クロイツフェルト・ヤコブ病などの病理学における神経変性につながる正確な分子メカニズムは解明されていない。一般に、これらの障害は、誤った折り畳み（ミスフォールディング）が起きると凝集しやすくなり、ひいては神経毒性が高くなるという、個別のタンパク質の異常な折り畳みの共通のメカニズムを共有している。このメカニズムは「プリオンパラダイム」と呼ばれる。

【0004】

生理的な細胞プリオンタンパク質（PrP^C）は、主に神経組織で発現する膜結合タンパク質であり、おそらく神経の発達と機能に役割を果たしている。異常な誤った折り畳み状態にある場合、細胞のプリオンタンパク質は互いに結合し、タンパク質の凝集を引き起こし、良性のPrP分子をそれらの異常な構造にする。このように、プリオンは、PrPの誤った折り畳みと凝集の連鎖反応を開始する破壊的なテンプレート（シード）として作用する。プリオンが増殖、断片化し、広がると、それらはニューロンの喪失を引き起こし、それによって神経系の機能を混乱させ、最終的にはその人を死に至らせる。

【0005】

プリオン病または伝達性海綿状脳症（TSE）は、その病因メカニズムが完全には解明されていない致命的な感染性神経変性疾患である。プリオン病は、これらの病気に名前にもなっている特徴的な海綿状変化、すなわち脳の空洞化につながる脳内ニューロンの空胞化と細胞喪失を特徴とする。これらの疾患は、散发性、遺伝性、または後天性として現れる。これまでのところ、早期診断のための特定のバイオマーカーも効果的な治療標的も特定されていない。

【0006】

PrP^CはPRNP遺伝子によってコードされている。それぞれ異なるプリオン病ではこのタンパク質の病原性PrP^Sへの誤った折り畳みが生じており、ヒトのそれぞれ異なるプリオン病が、多様なPrP^SアイソフォームとPRNPコドン129に存在する多型によって特徴付けられる。PrP（PRNP）をコードする遺伝子に加え、他の遺伝子がTSEの遺伝的感受性に寄与し得ることを示唆する多くの証拠が存在する。

【0007】

神経系内の特定のタンパク質の誤った折り畳みと凝集は、現在プリオン様疾患と呼ばれている、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病（HD）、前頭側頭型認知症（FTD）などの神経変性疾患でも発生する。これらの障害では、Tau、β-アミロイド、およびα-シヌクレインが最も一般的な誤って折り畳まれたタン

10

20

30

40

50

パク質であり、クロス- β -コンフォメーションのコア領域を持つ高度に秩序化された糸状封入体 (filamentous inclusions) を形成している。これらのタンパク質は「プリオノイド」とも呼ばれ、プリオン様の特性を示すことを示している。

【0008】

プリオン病は、様々な動物種、特に反芻動物にも影響を及ぼす。羊の伝染性海綿状脳症 (TSE) であるスクレイピーは18世紀に最初に報告され、狂牛病としてよく知られている牛海綿状脳症 (BSE) は、最近発見された多くの人畜共通感染症の1つである。動物における大半のプリオン病は、基本的に、汚染された飼料からの感染の獲得または汚染された環境への曝露によって発生した。BSEがヒトにおける新しい形態のTSE (変異型クロイツフェルトヤコブ病、vCJD) の原因である可能性が高く、それがプリオン病が動物からヒトへの種の壁を越えることができることを示しているという理解によって、人間の健康に重大な脅威がもたらされた。したがって、これら障害の抑制には、感染性の細胞の拡散またはプリオンの増殖をブロックするための効果的な治療法の開発を必要とする。

【0009】

プリオンおよびプリオン様疾患の診断における最近の進歩は、主に疾患に特異的なバイオマーカーの同定と検証に依存している。科学論文Barbisin, M. et al. “Gene expression profiling of brains from bovine spongiform encephalopathy (BSE)-infected cynomolgus macaques” BMC Genomics 2014 15, 434は、BSEに感染させたカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の最初の大規模トランスクリプトーム遺伝子発現解析について記載されており、頭蓋内に感染させたサルの前頭皮質におけるSERPINA3タンパク質の顕著なアップレギュレーションが明らかとなった。

【0010】

Vanni S. et al “Differential overexpression of SERPINA3 in human prion diseases” Sci Rep. 2017 Nov 15;7(1):15637に記載されている、異なるプリオン病患者の脳組織サンプルに関する研究は、対照被験者と比較して、mRNAレベルとタンパク質レベルの両方で、セリンプロテアーゼ阻害剤SERPINA3の発現が大きく増加していることを明らかにした。この研究によってさらに、さまざまなヒトプリオン障害において、既にサルで明らかにされていたSERPINA3調節不全パターンが確認された。この文献の著者は、SERPINA3をヒトプリオン病の潜在的なバイオマーカーとして、特にこれらの障害の種々の形態を区別するためのツールとして、使用することを示唆している。

【0011】

これまで、多くの積極的な努力にもかかわらず、プリオンおよびプリオン様障害と総称される神経変性疾患の治療に利用できる薬はない。ミオクロノスを治療するためのクエチアピンやクロナゼパムなどの抗精神病薬の患者への投与や、うつ病を治療するための選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) の投与などの対症療法が唯一の利用可能な選択肢である。現在、プリオン病の治療的処置のための化合物の同定を目的とした創薬の取り組みは、いわゆる「小分子設計」アプローチに従っており、その理論的根拠は、 $P r P^C$ の $P r P^{Sc}$ への変換を妨害し、誤って折り畳まれたタンパク質の自己増幅をブロックし、その結果、病状の拡大を阻止する、特定の化合物の能力に依存している。しかし、多くの化合物ライブラリーが作製されているにもかかわらず、試験されたすべての分子はいずれも、ヒトに投与した場合に有効であることが証明されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明の目的は、ヒトまたは動物の対象においてプリオンまたはプリオン様疾患に対して活性を有する医薬を提供することである。

【0013】

本発明の別の目的は、プリオンまたはプリオン様疾患の初期段階から有効な医薬を提供することである。

【0014】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の目的は、プリオンまたはプリオン様疾患の発症を予防または遅延させるのに有効な医薬を提供することである。

【0015】

本発明のさらに別の目的は、すでに確立されたプリオンまたはプリオン様疾患に関連する神経変性プロセスの進行を阻害するのに有効な医薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

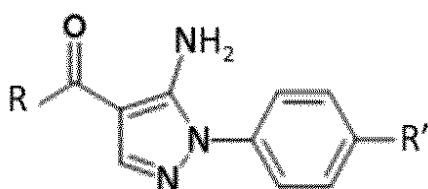
本発明は、それを必要とする対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の予防および／または治療的処置における使用のためのSERPINA3阻害化合物を提供する。

【0017】

10

本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、一般式（I）：

【化1】



(I)

20

[式中、

Rは、少なくとも1つのヘテロ原子を含む飽和または不飽和の5員または6員環であり；

R'は、ハロゲン原子または少なくとも1つのハロゲン原子で置換されたC₁ - C₄ アルキルオキシ基である]

を有する。

【0018】

好ましくは、ヘテロ原子は窒素である。

【0019】

ハロゲン原子は、フッ素（F）、ヨウ素（I）、塩素（Cl）および臭素（Br）からなる群から選択される。より好ましくは、ハロゲン原子はフッ素である。

30

【0020】

C₁ - C₄ アルキルオキシ基は、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、イソープロピルオキシ、n-ブチルオキシ、イソブチルオキシ、sec-ブチルオキシおよびterz-ブチルオキシからなる群から選択される。

【0021】

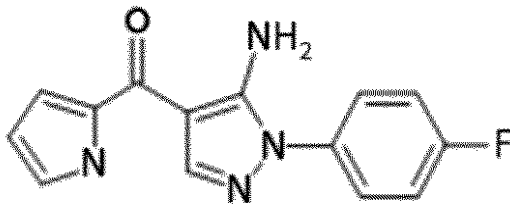
特に好ましい実施形態では、一般式（I）中のRは、ピペリジンまたはピロール環であり、および／またはR'はフッ素原子またはトリフルオロメトキシ基である。

【0022】

より好ましい実施形態では、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、式（II）：

40

【化 2】



(II)

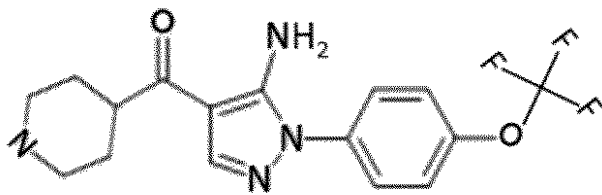
10

を有する。

【0023】

別のより好ましい実施形態では、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、式 (I I) :

【化 3】



(III)

20

を有する。

【0024】

一実施形態では、本発明は、プリオンまたはプリオン様疾患の発症および／または進行に影響を与えるための、上で定義した一般式 (I) で示されるSERPINA3阻害化合物の使用を提供する。

【0025】

30

本発明はさらに、それを必要とする対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の予防および／または治療的処置における使用のための医薬組成物を提供する。本医薬組成物は、薬学的に許容されるビヒクル、賦形剤および／または希釈剤と組み合わせて、上で定義した一般式 (I) で示されるSERPINA3阻害化合物を含有する。

【0026】

本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物の他の特徴および利点は、本記載の不可欠な部分を構成する添付の特許請求の範囲において定義されている。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図 1】図 1 は、プリオン株RML (ScGT1およびScN2a) に感染させたGT1およびN2a細胞株におけるSerpina3n mRNAの変化 (相対的な倍率) を、それぞれ非感染GT1およびN2a細胞と比較して示したグラフである (各群n=5)。変化 (倍) は、gapdh、tubb3およびactbで正規化した。*** p < 0.00000005; ** p < 0.00001; * p < 0.005

40

【図 2】図 2 は、慢性的にRMLに感染させたa) GT1 (ScGT1) およびb) N2a (ScN2a) 細胞の細胞溶解物中のSerpina3nおよびPrP^{Sc}のウェスタンブロッティング分析の結果を示す。β-アクチンをタンパク質ローディングの対照として使用した。分子量 (kDa) を右側に表す。

【図 3】図 3 は、親GT1細胞およびde novo RML感染細胞 (ScGT1、継代 #1~#8) の細胞溶解物のウェスタンブロッティング分析の結果を示す。β-アクチンをタンパク質ローディングの対照として使用した。分子量 (kDa) を右側に表す。

50

【図4】図4は、SERPINA3nを安定して過剰発現するN2aクローン1~3のリアルタイムPCR (a) およびウエスタンブロッティング (b) 分析結果を示す。a) 親N2a細胞と比較した、プリオン感染N2aクローン1~3におけるSerpina3n mRNAの相対的な変化(倍)を示すグラフ。b) N2aクローン1~3および親N2a細胞の細胞溶解物中のSerpina3nのウエスタンブロッティング分析の結果を示す画像。β-アクチンをタンパク質ローディングの対照として使用した。分子量 (kDa) を右側に表す。

【図5】図5は、Serpina3nを過剰発現しているde novoプリオン感染細胞におけるPrP^{Sc}の蓄積を示す。a) de novoプリオンに感染させた親N2a細胞 (継代#1~#4) およびSerpina3nを安定して過剰発現しているN2aクローン2 (継代#1~#4) の細胞溶解物のウエスタンブロッティング分析。分子量 (kDa) を右側に表す。b) デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。 10

【図6】図6は、プリオンによるde novo感染時のSerpina3nノックアウト細胞のPrP^{Sc}の減少を示す。a) de novoプリオンに感染させた親GT1細胞 (継代#1~#5) およびSerpina3n発現が安定してノックアウトされているGT1クローン2 (継代#1~#5) の細胞溶解物のウエスタンブロッティング分析。分子量 (kDa) を右側に表す。b) デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。

【図7】図7は、プリオンに慢性的に感染させたSerpina3nノックアウトN2a細胞 (ScN2a) で実施された実験の結果を示す。a) 親ScN2a細胞およびSerpina3nノックアウトN2aクローン1~6の細胞溶解物中のSerpina3nのウエスタンブロッティング分析。分子量 (kDa) を右側に表す。b) Serpina3nノックアウトN2aクローン由来のmRNAサンプルにおけるSerpina3n発現のPCR分析。Serpina3nコード配列=1256bp。c) 親ScN2a細胞およびSerpina3nノックアウトN2aクローン1~6の細胞溶解物中のPrP^{Sc}のウエスタンブロッティング分析。分子量 (kDa) を右側に表す。d) PrP^{Sc}デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。 20

【図8】図8は、RMLプリオンに慢性的に感染させたGT1細胞 (ScGT1) を、最初のライブラリーのSERPINA3阻害化合物で処理したPrP^{Sc}レベルの結果を示す。a) 最初のライブラリーからのSERPINA3阻害化合物 (化合物A~U) または対照としてのビヒクル (CTRL) で処理されたScGT1の細胞溶解物中のPrP^{Sc}のウエスタンブロッティング分析。分子量 (kDa) を右側に表す。b) PrP^{Sc}デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。 30

【図9】図9は、RMLプリオンに慢性的に感染させたGT1細胞 (ScGT1) を第2のライブラリーのSERPINA3阻害化合物で処理したPrP^{Sc}レベルの結果を示す。a) 第2のライブラリーのSERPINA3阻害化合物 (化合物1~8) または対照としてのビヒクル (CTRL) で処理したScGT1の細胞溶解物中のPrP^{Sc}のウエスタンブロッティング分析。実験は3回行った。分子量 (kDa) を右側に表す。b) PrP^{Sc}デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。 40

【図10】図10は、式 (I I I) の化合物5が22Lプリオン株に慢性的に感染させたGT1細胞 (ScGT1 22L) に有効であることを示している。a) 第2ライブラリーの式 (I I I) の化合物5または対照としてのビヒクル (CTRL) で処理したScGT1 22L細胞の細胞溶解物中のPrP^{Sc}のウエスタンブロッティング分析。実験は3回行った。分子量 (kDa) を右側に表す。b) PrP^{Sc}デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。β-アクチンは、タンパク質ローディングの対照として、また、デンシトメトリー分析でPrP^{Sc}の発現レベルを正規化するために使用した。

【図11】図11は、式 (I I I) の化合物5が、RMLプリオン株に慢性的に感染させたN2a細胞 (ScN2a) に有効であることを示している。a) 第2ライブラリーの式 (I I I) の 50

化合物 5 または対照としてのビヒクル (CTRL) で処理した ScN2a 細胞の細胞溶解物中の P r P^S c のウェスタンブロッティング分析。実験は 3 回行った。分子量 (kDa) を右側に表す。b) P r P^S c デンシトメトリー分析の結果を示すグラフ。タンパク質として β -アクチンを使用した。

【図 1 2】図 1 2 は、未処理 (培地のみ) の ScN2a 細胞、ビヒクル (DMSO、PBS、H₂O、NaCl) のみまたは各ビヒクルに溶解した式 (I I I) の化合物 5 で処理した、ScN2a 細胞の細胞溶解物中の P r P^S c のウェスタンブロッティング分析の結果を示す。分子量 (kDa) を右側に表す。

【図 1 3】図 1 3 は、CDE-096 (PDB ID: 4G80) と複合体を形成したヒトプラスミノゲンアクチベーター阻害剤 PAI-1、クエン酸と複合体を形成した α -1-アンチトリプシン S ERPINA1 (PDB ID: 3CWM) およびヒト抗キモトリプシン SERPINA3 (1QMN) のアミノ酸配列のマルチプルアラインメントを示す。アラインメントは、リガンド相互作用部位である sB /sC ポケット (黒い四角) が、試験したタンパク質で最も保存されていない領域の 1 つであることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

発明の詳細な説明

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明確に指定しない限り、複数形の参照を含むことに留意されたい。同様に、「a」(または「an」)、「1 つ以上の」および「少なくとも 1 つ」という用語は、本明細書では交換可能に使用することができる。「含んでなる」、「含む」、「によって特徴付けられる」および「有する」という用語は、交換可能に使用することにも留意されたい。

【0029】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0030】

本明細書で使用される、「対象」という用語は、動物を指すことを意味する。対象は脊椎動物、より好ましくは哺乳動物であり得る。哺乳動物には、霊長類、ウシ科、ヒツジ科、有蹄動物、ネコ科、シカ科が挙げられるが、これらに限定されない。哺乳動物は、例えば、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ミンク、シカ、ヘラジカ、ブタ、マウス、ラットであり得る。本発明によれば、対象は、軽度から重度まで変化し得る症状を示す、プリオンまたはプリオン様疾患に罹患し得る。あるいは、本発明によれば、対象は、プリオンまたはプリオン様疾患を発症するリスクがあり得る。

【0031】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「処置」という用語は、プリオンまたはプリオン様疾患の症状の発症後の本発明の化合物の投与を指し、「予防」は、プリオンの発症前の症状、特に病気のリスクのある被験者への投与を指す。

【0032】

本明細書で使用される、「影響を与える」という用語は、プリオンまたはプリオン様障害に関連する病理学的プロセスを遮断または遅らせることを指す。

【0033】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、検出可能な治療効果を示すのに十分な、本発明の使用のための化合物の量を指す。対象の正確な有効量は、対象のサイズと健康状態、治療される状態の性質と重症度によって異なる。

【0034】

本発明者らは、プリオン感染時に、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質 P r P^S c の蓄積が、SERPINA3 タンパク質の発現が安定してノックアウトされた神経細胞において有意に減少することを見出した (図 6 および図 7)。これらの発見は、SERPINA3 を安定して過剰発現するように改変された神経細胞について本発明者らが行った実験の結果と一致し

、プリオン感染によって誘導される細胞 PrP^{Sc} の量は、経時的なSERPINA3発現レベルの増加と高度に相関する（図5）。

【0035】

SERPINA3は、セリンプロテアーゼ阻害剤ファミリーのメンバーである α グロブリン糖タンパク質であり、肥満細胞キモトリプシン、膵臓キモトリプシン、ヒト腺カリクレイン2、カリクレイン3（前立腺特異的抗原）、膵臓カチオン性エラスターゼなどのプロテアーゼを阻害することが可能である。これは、急性および慢性の炎症時に循環系に分泌される典型的な急性期タンパク質である。高レベルのSERPINA3は、アポトーシスと浸潤性の調節に役割を果たし得るいくつかの悪性黒色腫や癌腫でも報告されている。

【0036】

これらの発見に基づいて、本発明者らは、プリオンおよびプリオン様障害の一般的な特徴である神経変性プロセスを対比させることを目的とする治療アプローチにおけるドラッグデザインの有望な標的としてSERPINA3タンパク質の役割を活用するため実験を行った。最初のステップとして、SERPINA3活性の阻害剤として作用する可能性のある化合物を、タンパク質構造と相互作用する能力について、いくつかの化合物ライブラリーでin silicoスクリーニングを実行することにより選択した。簡単に説明すると、それぞれの阻害剤で結晶化されたセルピファミリーに属する他の2つの分子の既知の構造とタンパク質構造を重ね合わせることで、SERPINA3上の薬物標的部を特定した。このスクリーニングに続いて、このように選択された化合物の効果を、プリオン病のin vitro細胞モデルで試験した。図8に示すように、プリオンに感染させた神経細胞に投与されたSERPINA3阻害剤のうちの1つのみが、ビヒクル単独と比較して、誤って折り畳まれた形態のプリオンタンパク質のレベルを大幅に低下させることにより、プリオン負荷の劇的な減少を達成した。このSERPINA3阻害剤によって示される強力な治療の可能性のために、以下では化合物Gと呼ばれるこの化合物を、さらなる分析のために選択した。

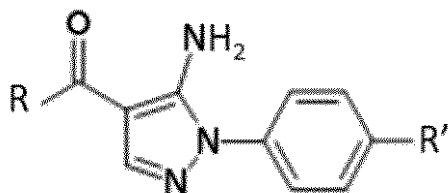
【0037】

薬効をさらに改善するために、化合物Gの化学構造をモデルとして使用して、構造が類似する化合物のライブラリーを作製した。これらの構造類似体の活性は、異なるプリオン株に感染させた神経細胞でin vitroでアッセイされ、それらのうちの1つ（以下、化合物番号5と呼ぶ）が、試験したプリオン株の範囲全体で PrP^{Sc} の形成および蓄積に対して有効であり、それによってプリオン量の大幅な減少につながるということが明らかとなった（図9～11）。

【0038】

意外にも、本発明者らは、誤って折り畳まれたタンパク質の形成および蓄積に対してin vitroで治療効果が証明されたSERPINA3阻害化合物が一般式（I）：

【化4】



(I)

[式中、

Rは、少なくとも1つのヘテロ原子を含む飽和または不飽和の5員または6員環であり；

R'は、ハロゲン原子または少なくとも1つのハロゲン原子で置換された $\text{C}_1 - \text{C}_4$ アルキルオキシ基である]

によって示されることを見出した。

【0039】

したがって、本発明の一態様は、それを必要とする対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の治療的処置に使用するためのSERPINA3阻害化合物であり、該化合物は、上で定義された一般式（I）を有する。

【0040】

好ましくは、一般式（I）において、ヘテロ原子は窒素である。

【0041】

ハロゲン原子は、フッ素（F）、ヨウ素（I）、塩素（Cl）および臭素（Br）からなる群から選択される。より好ましくは、ハロゲン原子はフッ素である。

【0042】

C₁–C₄アルキルオキシ基は、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、n-ブチルオキシ、イソブチルオキシ、sec-ブチルオキシおよびterz-ブチルオキシからなる群から選択される。

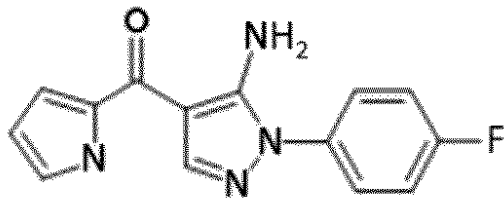
【0043】

特に好ましい実施形態では、一般式（I）中のRは、ピペリジンまたはピロール環であり、および／またはR'はフッ素原子またはトリフルオロメトキシ基である。

【0044】

より好ましい実施形態では、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、式（I I）：

【化5】



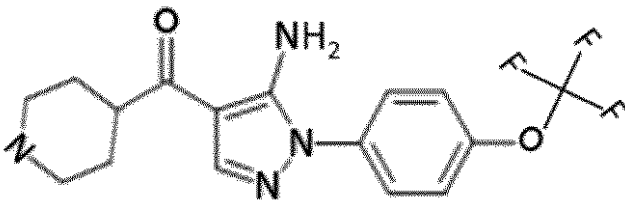
(II)

を有する。

【0045】

別のより好ましい実施形態では、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、式（I I I）：

【化6】



(III)

を有する。

【0046】

本発明によれば、化合物Gは構造式（I I）で示され、化合物5は構造式（I I I）で示される。

【0047】

したがって、本明細書では、式（I I）の化合物を化合物Gとも表記し、式（I I I）の化合物を化合物5とも表記する。

【0048】

有利なことに、プリオン病に対するSERPINA3阻害化合物の治療的使用は、細胞のPrP^Cアイソフォームの活性を妨害することなく、誤って折り畳まれたプリオンタンパク質の変換および/または蓄積の有意な減少を達成することを可能にする。このタンパク質は、中枢神経系で重要な生理学的役割を果たすことが知られている。

【0049】

さらに、本発明の使用のための化合物は、欠陥のある誤って折り畳まれたタンパク質の排除に参与し得るプロテアーゼ阻害剤を標的とし、誤って折り畳まれたタンパク質の特定の構造とは独立して作用するので、この化合物の使用に基づく治療戦略は、同じタンパク質の誤った折り畳みメカニズムを共有するプリオン様神経変性疾患の治療にも効果的である。

【0050】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、罹患した対象の脳組織に存在するSERPINA3タンパク質は、生理学的条件において、プリオン病におけるPrP^Sなどの異常な誤って折り畳まれたタンパク質を分解する標的プロテアーゼの阻害につながると考えている。SERPINA3プロテアーゼ阻害剤の活性を低下させることにより、標的プロテアーゼの生理学的細胞内機能が回復し、再び活性化すると、誤って折り畳まれたタンパク質を効果的に分解し、それによってプリオンまたはプリオン様疾患の進行を遅らせることができる。

【0051】

以下の実験のセクションでさらに説明されるように、本発明者らは、誤って折り畳まれたタンパク質の発生と蓄積は、プリオン感染後の非常に早い継代からの神経細胞におけるタンパク質SERPINA3の発現レベルの急速な増加と強く相関している。これらの発見は、プリオンおよびプリオン様障害への早期介入の治療標的としてのSERPINA3の役割を強く示しており、疾患の初期段階での本発明の化合物の投与が、疾患の発症の遅延を達成するために、または病気自体を予防することを示している。

【0052】

本発明の好ましい実施形態は、対象におけるプリオンまたはプリオン様疾患の発症および/または進行に影響を与えることを目的とする治療方法に関する。

【0053】

本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物で治療することができる、異常なタンパク質の誤った折り畳みに関連するヒトプリオンまたはプリオン様疾患としては、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、致死性家族性不眠症（FFI）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（GSS）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側頭硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

動物のプリオンまたはプリオン様疾患の例としては、動物および飼い猫のネコ海綿状脳症（FSE）、反芻動物および非ヒト霊長類の伝達性海綿状脳症（TSE）、ならびにシカとエルクの慢性消耗病（CWD）および家畜ミンクの伝達性ミンク脳症（TME）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物の正確な用量は、標的となる疾患ならびに対象の特徴（例えば、性別、年齢、体重など）に応じて変わる。所定の状況に対する有効量は、常套的な実験によって決定することができる。

【0056】

本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物はまた、医薬組成物の形態で効果的に投与さ

10

20

30

40

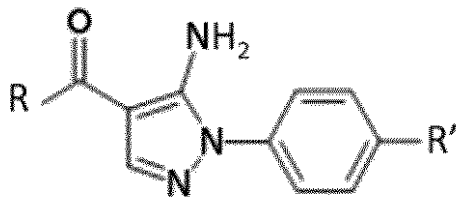
50

れ得る。

【0057】

したがって、本発明の第2の態様は、治療有効量のSERPINA3阻害化合物および薬学的に許容されるビヒクル、賦形剤および／または希釈剤を含有する、プリオンまたはプリオン様疾患の治療的処置に使用するための医薬組成物であり、該SERPINA3阻害化合物は式(I)：

【化7】



10

(I)

[式中、

Rは、少なくとも1つのヘテロ原子を含む飽和または不飽和の5員または6員環であり；

R'は、ハロゲン原子または少なくとも1つのハロゲン原子で置換されたC₁－C₄アルキルオキシ基である]

を有する。

【0058】

好ましくは、ヘテロ原子は窒素である。

【0059】

ハロゲン原子は、フッ素(F)、ヨウ素(I)、塩素(Cl)および臭素(Br)からなる群から選択される。より好ましくは、ハロゲン原子はフッ素である。

【0060】

C₁－C₄アルキルオキシ基は、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、n-ブチルオキシ、イソブチルオキシ、sec-ブチルオキシおよびterz-ブチルオキシからなる群から選択される。

30

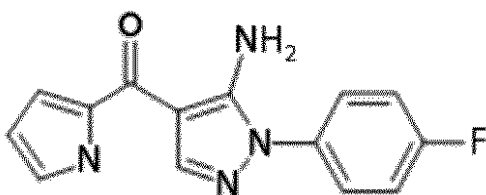
【0061】

特に好ましい実施形態では、一般式(I)中のRはピペリジンまたはピロール環であり、および／またはR'はフッ素原子またはトリフルオロメトキシ基である。

【0062】

より好ましい実施形態では、本発明の使用のための医薬組成物におけるSERPINA3阻害化合物は、式(II)：

【化8】



40

(II)

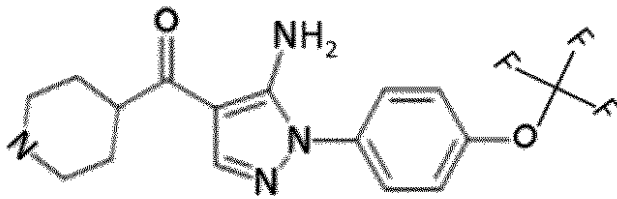
を有する。

【0063】

別のより好ましい実施形態では、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、式(I

50

II) :
【化 9】



(III)

10

を有する。

【0064】

医薬組成物において、投与される有効成分の量は、使用される特定の化合物および投与単位、投与様式および時間、治療期間、治療対象の年齢、性別および一般的な状態、治療される状態の性質と程度、薬物代謝と排出の速度、潜在的な薬物の組み合わせおよび薬物間相互作用などの考慮事項に応じて大きく変わる。

【0065】

本発明の使用のための医薬組成物は、ヒトを含む任意の脊椎動物へのプリオンまたはプリオン様疾患に対する治療として投与するのに適している。様々な動物への投与に適した組成物にするためのヒトへの投与に適した医薬組成物の改変は周知であり、当業者は、彼／彼女の通常の知識を使用することによってそのような改変を設計および実施することができる。

20

【0066】

「薬学的に許容される」という用語は、有効成分の有効な活性に合致する濃度で過度の毒性なしに哺乳動物に投与することができる化合物や組成物を指す。薬学的に許容される担体（賦形剤）は、例えば、充填剤、崩壊剤、流動促進剤および潤滑剤であり得る。崩壊剤は、液体、好ましくは水と接触したときに、錠剤などの剤形がより小さな断片に分解する能力を高める化合物である。流動促進剤は、薬物の流動性を改善するために使用することができる。適切な流動促進剤は、例えば、コロイド状二酸化ケイ素、タルカム、またはそれらの混合物である。潤滑剤は、一般に、静摩擦、滑り摩擦、転がり摩擦などの摩擦を低減するのに適した物質と見なすことができる。薬学的に許容される塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩および硫酸塩などの鉱酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩が挙げられる。

30

【0067】

好ましくは、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、水溶液、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液またはジメチルスルホキシド（DMSO）溶液から選択される液体ビヒクル中で溶解される。

【0068】

本発明の医薬組成物に適したビヒクル、賦形剤および／または希釈剤の選択は、当業者が通常の知識を用いて決定することができる。

40

【0069】

本発明の使用のための医薬組成物は、既知の投与経路（例えば局所、経口、経腸、非経口、髄腔内、硬膜外および鼻腔内）のいずれかを介した投与に適している。

【0070】

本明細書で使用する場合、非経口投与としては、皮下および筋肉内注射、徐放性デポの移植、静脈内注射投与による医薬組成物の投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

くも膜下腔内投与は、一般に、脊柱のくも膜下腔内の脳脊髄液（CSF）への薬物の直接

50

注射によって特徴付けられる。

【0072】

注射剤は、液体の溶液または懸濁液として、注射前に溶液または懸濁液に再構成することができる固体の形態、またはエマルジョンとして調製することができる。本発明の使用のための医薬組成物は、無菌の注射可能な懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用する既知の方法に従って処方することができる。無菌の注射可能な調製物はまた、毒性のない非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の無菌の注射可能な溶液または懸濁液であり得る。無菌の固定油は、慣用的に溶媒または懸濁媒体として使用される。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリド、脂肪酸（オレイン酸を含む）、ゴマ油、ココナッツ油、ピーナッツ油、綿実油などの天然に存在する植物油、またはオレイン酸エチルなどの合成脂肪ビヒクルを含む任意の刺激の少ない固定油を使用することができる。必要に応じて、緩衝液、防腐剤、酸化防止剤等を配合することができる。

10

【0073】

本発明の使用のための医薬組成物は、溶液、軟膏、ゲル、クリームまたは任意の局所適用製剤として局所適用によって投与することができる。本発明の使用のための医薬組成物はまた、ガーゼ、パッチ、パッドまたはスポンジなどの薬剤溶出デバイスによって経皮的に投与され得る。

【0074】

消化管経路の例としては、経口、粘膜、バツカル、直腸および胃内経路が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0075】

本発明の使用のための医薬組成物は、錠剤、液体、カプセル、粉末、シロップなどの任意の許容可能な形態での経口使用に適した形態であり得る。経口使用を目的とする医薬組成物は、ショ糖、乳糖、またはサッカリンなどの甘味料、ペパーミントなどの香料、ウィンターグリーンまたはチェリーの油、着色料および保存料からなる群から選択される1つまたは複数の試薬を薬学的に審美的で口当たりの良い製剤を提供するために含有し得る。錠剤は、非毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合して本発明の使用のための化合物を含有する。使用される賦形剤は、例えば、（1）炭酸カルシウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウムなどの不活性な希釈剤；（2）コーンスターチ、馬鈴薯澱粉またはアルギン酸などの造粒および崩壊剤；（3）トラガカント、コーンスターチ、ゼラチン、アカシアなどの結合剤、および（4）ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、タルクなどの潤滑剤であり得る。錠剤は、コーティングされていなくても、既知の技術によってコーティングして胃腸管での崩壊および吸収を遅らせ、それによって長期間にわたって持続的な作用を提供するようにしてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの放出遅延材料を使用することができる。

30

【0076】

本発明による医薬組成物はまた、SERPINA3阻害化合物の直腸投与のための坐剤の形態で投与され得る。これらの組成物は、本発明の化合物を、カカオバター、ポリエチレングリコールの合成グリセリドエステルなどの適切な非刺激性の賦形剤と混合することによって調製することができ、常温では固体であるが直腸内で液状化および／または溶解して薬物を放出する。

40

【0077】

固体製剤の場合、本発明の使用のための化合物と混合するための非毒性の固体の賦形剤としては、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、ポリアルキレングリコール、タルカム、セルロース、ブドウ糖、ショ糖および炭酸マグネシウムが挙げられるがこれらに限定されない。固体製剤は、既知の技術において長時間にわたって持続的な作用を提供する目的で胃腸管での崩壊および吸収を遅らせるために利用されるモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの材料でコーティングすることができる。

50

【0078】

薬学的に投与可能な液体製剤は、例えば、本発明の使用のための化合物の溶液または懸濁液と、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの担体中で任意の医薬補助剤を含むことができる。液体製剤はまた、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの非毒性の補助物質を含有し得る。そのような補助物質の例としては、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、トリエタノールアミン、酢酸ナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミンなどが挙げられる。そのような製剤を調製する方法は当業者によく知られている。

【0079】

本発明の使用のための医薬組成物は、所望の効果を達成するために、すなわち、プリオンまたはプリオン様疾患の発症および／または進行に影響を与えるために、必要な頻度および必要な時間投与される。

10

【0080】

さらに、本発明の使用のための医薬組成物の投与様式は、所定の期間にわたって活性化化合物の放出を遅らせるように、または治療期間中の所定の時間に放出される薬物の量を注意深く制御するように設計され得る。

【0081】

当業者は、本発明の使用のための医薬組成物を利用する適切な治療方針を容易に決定することができる。

【0082】

以下の実験セクションは、純粋に例示のために記載するものであり、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

20

【0083】

1. 材料と方法

1.1 セルカルチャーの維持

マウス視床下部細胞株GT1およびRMLプリオン株に感染させたGT1細胞（ScGT1）を、10%のFBSおよび1%のペニシリンーストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で培養した。マウス神経芽細胞腫細胞株N2aおよびRMLプリオン株に感染させたN2a細胞（ScN2a）を、10%ウシ胎児血清（FBS）、1%非必須アミノ酸（NEAA）、1%L-グルタミンおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した最小必須培地（MEM）で培養した。すべての細胞株は5%CO₂雰囲気中で維持した。

30

【0084】

1.2 細胞生存率のMTTアッセイ

細胞を培養中で維持し、コンフルエンスまで増殖させた。細胞を剥がし、培地を交換した。Scepter（商標）2.0 Cell Counter（Millipore）を使用して、MEMで 2×10^4 細胞/mL（N2a、ScN2a）、DMEMで 3×10^4 細胞/mL（GT1、ScGT1）に細胞密度を調整した。細胞を96ウェルプレートに播種し、化合物を添加する前に24時間静置した。DMSOに溶解した各化合物を細胞培地で最終濃度0.1、1、10 μ Mに希釈した。翌日、化合物の添加とともにセルカルチャー培地を交換した。プレートを4日間インキュベートした。3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド粉末（MTT）（SIGMA）をリン酸緩衝液（PBS）で5mg/mLに希釈し、培地に加えた。細胞をMTT溶液とともに37°Cで3時間インキュベートした。インキュベーション後、DMSO/2-プロパノール（1:1）の溶液を各ウェルに添加し、プレートを室温（RT）で30分間保持してから読み取った。発光強度は、Spectramax Gemini EM（SoftMax Pro）プレートリーダー（励起/発光比=570/690nm）を使用して定量化した。MTTアッセイは3回行った。

40

【0085】

1.3 in silicoスクリーニング

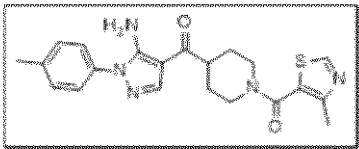
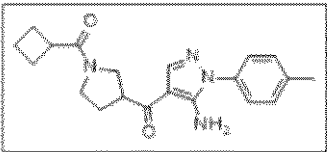
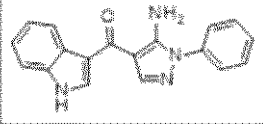
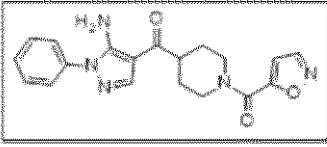
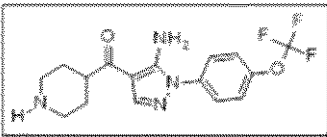
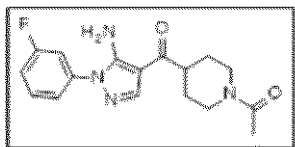
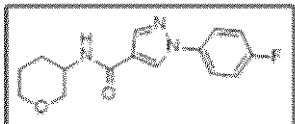
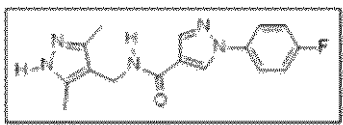
化合物のいくつかのライブラリーは、SERPINA3タンパク質ターゲットとのそれらの可能性のある相互作用についてGlideプログラムを使用して仮想的にスクリーニングが行われた。タンパク質部位は、それぞれの阻害剤で結晶化された同じファミリーの他の2つのタ

50

ンパク質：CDE-096と複合体を形成したヒトプラスミノージェンアクチベーター阻害剤PAI-1（PDB ID：4G80）およびクエン酸塩と複合体を形成した α -1-アンチトリプシンSERPINA1（PDB ID：3CWM）（図13）について自家構築されたSerpinaA3構造モデル（ホモロジーモデリングによって取得）との重ね合わせによって特定した。最初に19個の化合物群（A～Uと称する）を選択し、*in vitro*で試験した。式（II）の化合物Gの8つの構造類似体（1～8と称する）のライブラリーを同定し、*in vitro*で試験した（表I）。

【表1】

Table I

コード	構造	名称
化合物 1		[4-(5-アミノ-1-p-トリル-1H-ピラゾール-4-カルボニル)-ピペリジン-1-イル]-(4-メチル-チアゾール-5-イル)-メタノン
化合物 2		(5-アミノ-1-p-トリル-1H-ピラゾール-4-イル)-(1-シクロブタンカルボニル-ピロリジン-3-イル)-メタノン
化合物 3		(5-アミノ-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-(1H-インドール-3-イル)-メタノン
化合物 4		[4-(5-アミノ-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-カルボニル)-ピペリジン-1-イル]-イソオキサゾール-5-イル-メタノン
化合物 5		[5-アミノ-1-(4-トリフルオロメトキシフェニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-ピペリジン-4-イル-メタノン
化合物 6		1-{4-[5-アミノ-1-(3-フルオロフェニル)-1H-ピラゾール-4-カルボニル]-ピペリジン-1-イル}-エタノン
化合物 7		1-(4-フルオロフェニル)-1H-ピラゾール-4-カルボン酸(テトラヒドロピラン-3-イル)-アミド
化合物 8		N-[(3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル)メチル]-1-(4-フルオロフェニル)-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド

【0086】

1.4薬物処理

試験したすべての化合物を100%ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して10mMの濃度

10

20

30

40

50

にした。この溶液をさらにPBSで希釈して、200 μ Mの最終ストック溶液にした。コンフルエントなGT1細胞とScGT1細胞を1:10に希釈してばらばらにし、翌日に薬物（20 μ M）を培地に添加し4日間インキュベートした。コンフルエントなN2a細胞とScN2a細胞を1:20に希釈してばらばらにし、翌日に薬物（20 μ M）を培地に添加し4日間インキュベートした。対照細胞はビヒクル（ $\leq 0.001\%$ DMSO）で処理した。すべての実験は少なくとも3回繰り返した。

【0087】

1.5 ウェスタンブロット分析

細胞溶解。培地を除去した後、細胞を冷PBSで2回リンスし、300 μ lの溶解緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、0.5% ノニデットP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム塩）を細胞プレートに直接添加した。細胞溶解物をベンチマイクロフュージ（エッペンドルフ）で4℃で10分間2000rpmで遠心分離し、ペレットを廃棄した。総タンパク質濃度は、BCAアッセイ（ピシンコニン酸法、ユーロクロン）で評価した。

【0088】

PK消化。1mg/mlの細胞溶解物（250 μ l）を25 μ g/mlのPKで37℃にて1時間消化した。2 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）で反応を停止し、PK消化した細胞溶解物を超遠心分離機（Beckman Coulter）で4℃、55000rpmで75分間遠心分離した。ペレットを2Xサンプルローディングバッファー（125 mM Tris HCl、pH 6.8、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、0.2% ブロモフェノールブルー、20% グリセロール）に再懸濁した。非PK消化サンプルには、25 μ gの細胞溶解物を使用し、2Xローディングバッファーを添加した。すべてのサンプルを100℃で10分間煮沸した。

【0089】

SDS pageとイムノブロッティング。サンプルを12% Tris-グリシンSDS-PAGEゲルにロードし、タンパク質をPVDFメンブレン（Millipore）に転写した。次に、メンブレンを5% 脱脂乳と共に室温にて1時間連続振とうしながらブロックし、1 μ g/mlモノクローナル抗PrP W226と4℃で一晩インキュベートした。TBS-T（Tris 200mM、NaCl 1.5 mM、1% Tween-20）で3回洗浄した後、メンブレンを西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）とコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG F（Ab）₂と室温にて1時間連続振とうしてインキュベートした。アクチンベータはモノクローナル抗 β -アクチン-ペルオキシダーゼ抗体（1:10,000 Sigma）を使用して検出し、Serpina3nの検出はマウスセルピンA3N抗体（1:500 R&D Systems）およびウサギ抗ヤギHRP二次抗体を使用して行った。ブロットを、強化された化学発光システム（ECL、Amersham Biosciences）で展開し、Uvitec Alliance（Cambridge）で視覚化した。

【0090】

1.6 De novo プリオン感染

マウスに適応したRMLで慢性的に感染させたScGT1細胞をコンフルエントになるまで増殖させ、細胞（ 20×10^6 ）を新鮮な培地に再懸濁し、70%の振幅で15秒間3回超音波処理した。この溶液を、前日に10 cmベトリ皿に播種したGT1細胞（ 5×10^5 ）とインキュベートした。GT1細胞は培地を交換せずに7日間増殖させた。1週間後、GT1細胞を最初の継代について新鮮な培地で1:5に希釈してばらばらにし、その後の継代について1:10に希釈してばらばらにした。同様に、慢性的にRMLに感染させたScN2a細胞を用いて正常なN2a細胞を感染させた。この場合、最初の継代では、細胞を4日後に1:15に希釈してばらばらにし、馴化培地を細胞に加えてさらに4日間培養した。次に、第2継代から始めて、細胞を新鮮な培地で1:30に希釈してばらばらにした。各継代について、残存した細胞を溶解し、細胞溶解物のアリコートでPK消化およびイムノブロット分析に供して、PrP^{Sc}の存在を確認した。

【0091】

1.7 プラスミドによる安定したトランスフェクション

Lipofectamine 2000を、製造元のプロトコルに従い、すべてのプラスミドトランスフェクション実験に使用した。簡潔に言えば、細胞を96ウェルプレートにプレーティングした

(各実験の細胞密度：1000細胞)。リポフェクタミンとオプティメム培地を混合し、5分間インキュベートした後、プラスミドとオプティメム培地の混合物に加え、室温（RT）で15分間維持した。この溶液を段階的に細胞に加え、穏やかに混合した。細胞を37℃で一晩インキュベートした後、培地を新鮮な完全培地と交換した。翌日、細胞を1:50に希釈し選択培地に継代した。過剰発現用のプラスミドはpcDNA-SERPINA3Nであり、ノックアウト実験用のプラスミドはpSPCas9n-SERPINA3N-A、pSPCas9n-SERPINA3N-Bであった。

【0092】

2. 結果

2.1. GT1、N2a、ScGT1およびScN2a細胞株におけるSerpina3nの発現

本発明者らは、非感染細胞を対照として用い、RMLプリオン株に慢性的に感染させたGT1およびN2a細胞株（それぞれScGT1およびScN2aと称する）における、ヒトSERPINA3のマウス相同体であるSerpina3nの発現を調べた。図1に示すように、Serpina3n mRNAレベルは、非感染GT1細胞と比較してScGT1細胞で、非感染N2aと比較してScN2a細胞で大きく増加している。同様に、Serpina3nタンパク質レベルの増大が、PrP^{Sc}の蓄積と共に両方のRML感染細胞株で観察された（図2）。これらの結果は、Serpina3nとPrP^{Sc}レベルの間に強い相関関係があることを示している。

【0093】

2.2 GT1細胞株のde novoプリオン感染

Serpina3nレベルとPrP^{Sc}タンパク質蓄積との相関関係をさらに調べるために、本発明者らは、GT1細胞のde novoプリオン感染を実施し、両タンパク質のレベルについて各継代をモニターした。図3に示すように、Serpina3nの発現は、PrP^{Sc}の発生と蓄積と共に増加し、プリオンの変換および/または複製におけるSerpina3nの重要な役割を示している。

【0094】

2.3 Serpina3nを過剰発現するN2a細胞株のde novoプリオン感染

Serpina3nレベルとPrP^{Sc}との間の機能における相関関係をさらに調べるため、本発明者らは、Serpina3nを安定して過剰発現するN2a細胞に対してもde novo感染実験を行った。親のN2a細胞と比較して、SERPINA3nを約7000倍過剰発現するN2aクローン2細胞株（図4）は、親N2a細胞株の同じ継代と比較した場合、各継代ではるかに高いレベル（平均4倍）のPrP^{Sc}を示した（図5）。これらの結果は、Serpina3nの過剰発現が、より早いPrP^{Sc}の蓄積と、全体のプリオン量の増加につながることを示している。

【0095】

2.4 Serpina3nノックアウトGT1細胞株のde novoプリオン感染

Serpina3nが安定してノックアウトされたGT1細胞株について、本発明者らはde novo感染実験を実施した。感染後、SERPINA3nノックアウトGT1クローン2細胞株は、親GT1細胞株の同じ継代と比較して、各継代ではるかに低いレベル（平均60%少ない）のPrP^{Sc}を示した（図6）。これらの結果は、細胞内のSerpina3nの除去により、PrP^{Sc}の蓄積が遅くなり、それによって長期間にわたり減少したプリオン量につながることを示している。

【0096】

2.4 Serpina3nノックアウトScN2a細胞株

上記の実験結果に基づいて、本発明者らは、Serpina3nをノックアウトした慢性的にプリオンに感染させたN2a細胞株（ScN2a）を作製した（図7aおよび7b）。特に、このようにして得られた6つの細胞クローンはすべて、培養して数回継代した後、大きく減少した、または検出できないレベルのPrP^{Sc}を示した（図7cおよび7d）。これらの結果は、Serpina3nの発現がプリオンの複製に極めて重要であり、その除去がRML感染細胞株におけるプリオンを矯正できることを強く示している。

【0097】

2.5 Serpina3n阻害化合物によるScGT1細胞株の処理

プリオンまたはプリオン様疾患における可能性のある創薬標的としてSerpina3nの役割

10

20

30

40

50

を活用するために、RML ScGT1細胞を、上記1.3で詳述したようにin silicoで選択されたSERPINA3阻害化合物で処理した。最初のライブラリースクリーニングから選択された19個の分子（A～Uと称する）のうち、2つは高い細胞毒性のために廃棄した。残りの17個の化合物は、in vitro細胞モデルで試験した。式（I I）の化合物Gは、PrP^{S^c}の蓄積の約50%の減少に最も高い効果を示した（図8）。これらのデータはすでに、慢性的なプリオン感染の細胞モデルにおいて、PrP^{S^c}量を減少させるSerpina3n阻害化合物の能力を示している。次に、本発明者らは、第1のライブラリーの化合物の中で最も効果的な、式（I I）の化合物Gの構造類似体である8つの化合物（1～8と称する）の第2のライブラリーを作製した。細胞毒性を評価する際、化合物3を廃棄し、残りの7つの分子をin vitroで試験した（図9）。試験された分子のうち、式（I I I）の化合物5は、PrP^{S^c}レベルを約60%低下させることができた。式（I I I）の化合物5をさらに、22Lプリオン株に感染させたScGT1細胞で試験したところ、PrP^{S^c}レベルが35%減少した（図10）。これらの結果は、式（I I I）の化合物5が、異なるプリオン株に感染させたScGT1細胞株においてプリオン量を減少させることができることを示している。

【0098】

2.6 ScN2a細胞株のSerpina3n阻害化合物による処理

ScGT1細胞でのin vitro試験の結果に従い、さらに式（I I I）の化合物5をRMLに感染させたScN2a細胞株に投与した。図11に示すように、処理により、PrP^{S^c}レベルの60%の低下が観察され、これはアッセイしたSERPINA3阻害化合物が異なる細胞株のRMLプリオンを除去できることを示している。さらに、異なる溶媒、すなわち、PBS、H₂O、NaClおよびDMSOにおけるSERPINA3阻害化合物の溶解度を評価するために、異なる薬物ビヒクルを試験した。図12に示すように、式（I I I）の化合物5は、試験したすべての薬物ビヒクルでPrP^{S^c}を減少させることができた。

【0099】

3. 考察と結論

セリンプロテアーゼ阻害剤SERPINA3nの発現は、mRNAレベルとタンパク質レベルの両方でプリオン感染細胞において大きく増大する。特に、本発明者らは、Serpina3nレベルの増大が、マウスならびにde novoプリオン感染細胞株において前臨床段階から明らかであり、SERPINA3がプリオンまたはプリオン様疾患の進行の支援だけでなく、これらの障害の発症においても中心的な役割を担っていることを示していることを見出した。さらに重要なことに、本発明者らは、Serpina3nタンパク質の除去（またはその活性の阻害）が、PrP^{S^c}の蓄積の有意な減少につながることを観察した。

【0100】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、本発明者らは、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物は、セルピンと標的のプロテアーゼとの非共有結合をもたらすセルピン-プロテアーゼ相互作用の最初のステップを遮断することによって作用すると考える。実際、セルピンおよびプロテアーゼについて記載されている一般的なメカニズムに基づけば、反応は以下の後続のステップを含む：（i）セルピンと標的プロテアーゼとの間の非共有結合ミカエリス-メンテン複合体の形成、（ii）プロテアーゼのセルピンへの触媒結合、（iii）共有結合複合体の形成、（iv）切断されたRCL部位のβ-シートAへの挿入、（v）セルピンの反対の極へのプロテアーゼの移行、（vi）プロテアーゼの解離。

【0101】

ヒトプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤PAI-1と阻害剤分子CDE-096の間で形成される複合体のような、他の同様の複合体の場合、阻害化合物がβシートBとCの間のsB/sCポケットに結合し、それによってセルピンとプロテアーゼ間のミカエリス-メンテン複合体形成が遮断される。このようにして、セルピンのRCL領域はもはやプロテアーゼの活性部位と相互作用できなくなり、したがって、セルピンタンパク質は、RCL領域がβシートAと相互作用できないコンフォメーションに隔離される。一方、α-1-アンチトリプシンSERPINA1とクエン酸塩の間に形成された複合体について行った実験は、クエン酸塩がsB/sCポ

ケットと、重合に必要なコンフォメーション転移をブロックすることにより、セルピンの凝集を防止することができることを示した。

【0102】

最後に、本発明の使用のためのSERPINA3阻害化合物の特異性について考察する。すべてのセルピタンパク質の間で構造相同性が高いにもかかわらず、sB/sCポケットは、それぞれ異なるセルピンの活性を調節するために利用できるタンパク質部位であると考えられる。このようなタンパク質部位は、それぞれのリガンドと相互作用するセルピン領域に対応する。実際、クエン酸塩とCDE-096がそれぞれSERPINA1とヒトプラスミノゲンアクチベーター阻害剤PAI-1と同じように結合したとしても、それらは異なる効果を発揮する（クエン酸塩は凝集の阻害、CDE-096はプロテアーゼ結合の阻害）。さらに、ヒトPAI-1、SERPINA1、およびSERPINA3のアミノ酸配列のアラインメントは、sB/sCポケット、すなわちリガンド結合部位が実際には最も保存されていないアミノ酸部分の1つであることを明らかにしている。

10

【0103】

これまでのところ、SERPINA3またはマウスのオルソログSerpina3nに対する阻害剤は神経変性疾患のために開発されていない。Serpina3n自体を他の酵素の阻害剤として使用することを記載した研究はいくつか存在する。たとえば、Serpina3nは、多発性硬化症のマウスモデルにおいてグランザイムBの活性を阻害するために使用されており、軸索およびニューロン損傷の減少を示す。

【0104】

結論として、本発明者らは、プリオン感染細胞株におけるPrP^{Sc}蓄積を減少させることができ、それによりプリオンおよびプリオン様疾患に対する新しい治療法が提供される、SERPINA3阻害剤として作用する新しいクラスの小分子を見い出した。

20

【0105】

参考文献

1. Barbisin, M. et al. Gene expression profiling of brains from bovine spongiform encephalopathy (BSE)-infected cynomolgus macaques. BMC Genomics 15, 434, doi:10.1186/1471-2164-15-434 (2014).
2. Vanni, S. et al. Differential overexpression of SERPINA3 in human prion diseases. Sci Rep 7, 15637, doi:10.1038/s41598-017-15778-8 (2017).

30

【図 1】

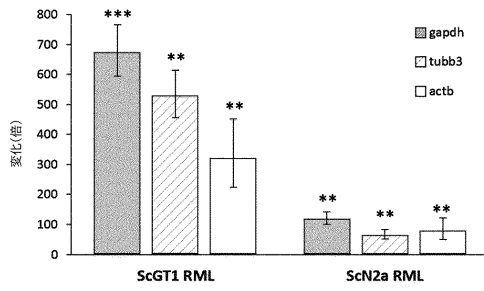


FIG. 1

【図 2】

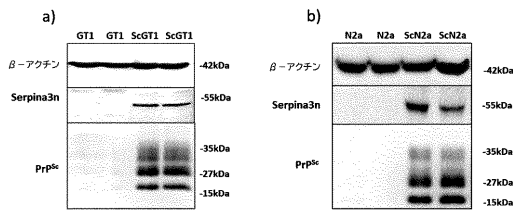


FIG. 2

【図 4】

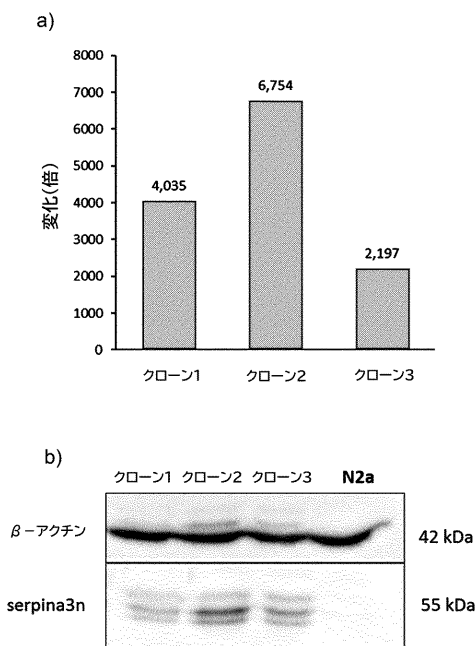


FIG. 4

【図 3】

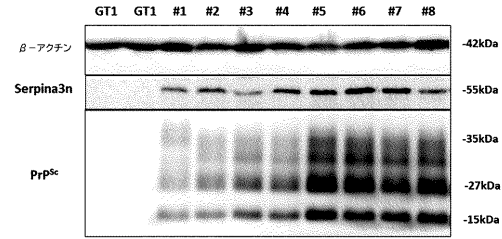


FIG. 3

【図 5】

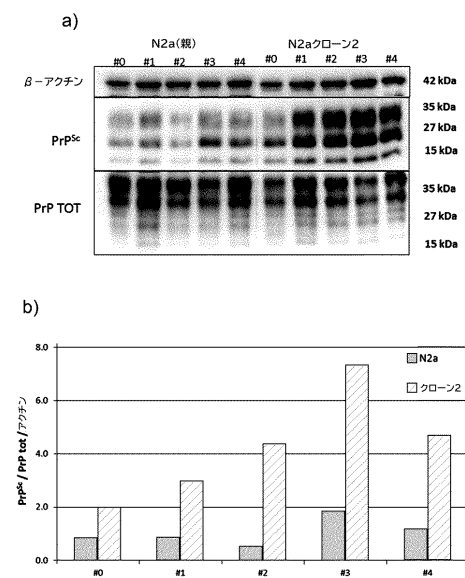


FIG. 5

【 図 6 】

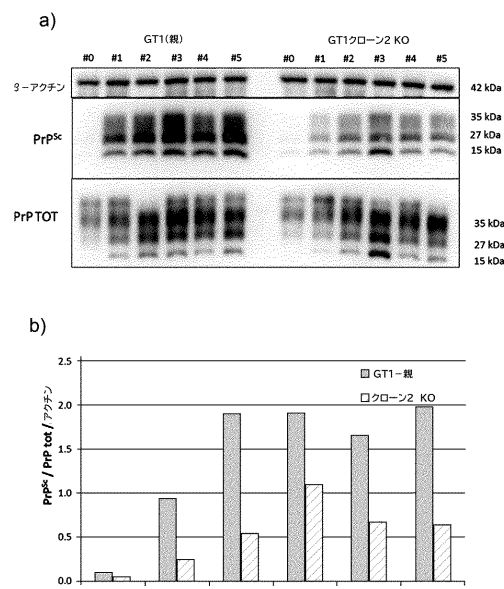


FIG. 6

【 図 7 】

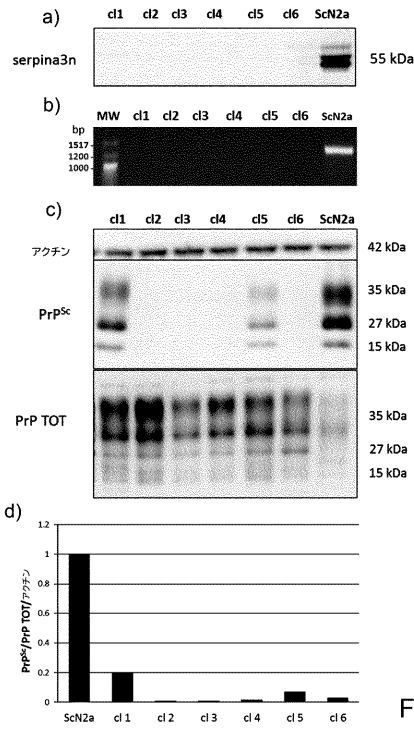


FIG. 7

【 図 8 】

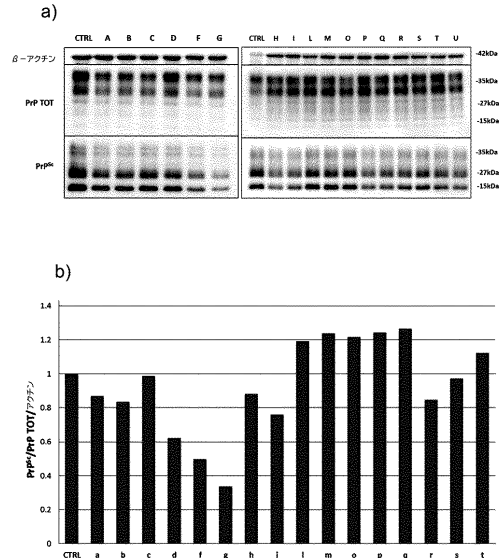


FIG. 8

【 図 9 】

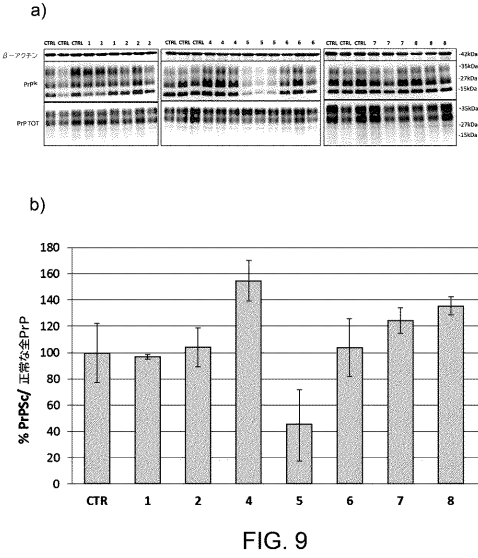


FIG. 9

【図 10】

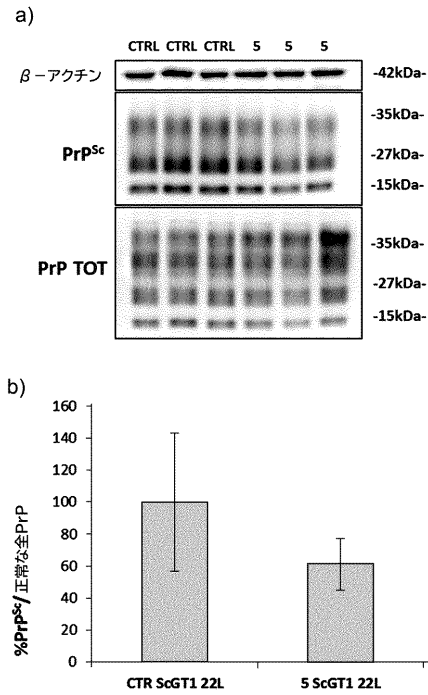


FIG. 10

【図 11】

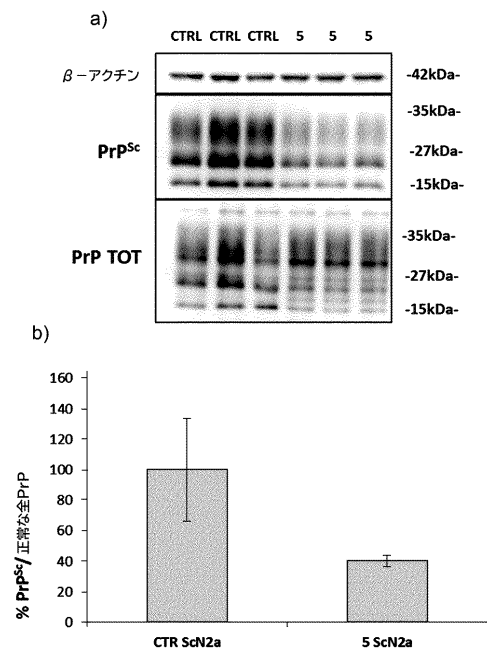


FIG. 11

【図 12】

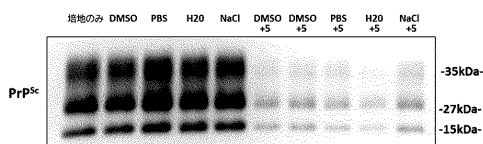


FIG. 12

【図 13】

```

4g80 -----APSTVAHLASDPGVRVQQVAQASKDRNVVFSPIGV
3cvm ---EDPQDAAGTQTSRHQDQHPFFKTFPLASTAFSLYQLASQNSNTHFFSPVSI
1qmn MASHSPLOEEN-LTQ-SNQRDGTHTVDGLASANVDFAFSLYQLVLRAPDKNVFSPFSI
          . 11 1*.. 111*1. 1 . *1.*** .1

4g80 ASVLAMQLTGTGSETQQOIQAMGFRIDRG---NAPALAHLYKELMGFWKDEISTDA
3cvm ATAFAMLLGTTADTDEILLEGALFNLTETPEAQIHGTFQELLTLNQPDQLQLTQNG
1qmn STALAFSLGAMNTTLTEILKGLKFNLTETSEAZIHQSFOHLLRTLMOSSDEQLSMGNA
          11..*1.* 1 * 1* .1 *12 1 1 .11.* 1 * .1 11 1.

4g80 IFVQDLKLWQCPHFFRLFASTVKQVDFSEVERARFIINQWKTTHGMISHLLQDA
3cvm LFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVTFPGDTZEAKKINDYVKGTTQCKIVDLVKE--
1qmn HPVKEQLSLDLRFTDAKKLYGSEAFATPDQSAAKKINDYVKGTRGKITDLIKD--
          1*1.. *.12 . . 1*1 * . 1* 1 * 1*1*1. *1* .1*

4g80 VDQLTRVLVWALYFNGQWTFPFDSSTHRLFLHSDGTSVSVPMQITNKFNYTEFTTP
3cvm LDRDTVFALVNYIFFKAKWERFFEVKDTREDFHVDQVTVKVPMLLGMF-N--IQHC
1qmn LDSQTHVNLVNYIFFKAKWERFFPDQTHQSRTFLSKKKVMVPMQLHHLTIP--YFRD
          1* 1*1.*** 11*1.1*1* ** ..*.. *1 . . . * ****

4g80 DGRHYDLELPYHGOTLSMFIAAPYKEVPLSALTNILSAQLISHWGNM--TRLRLVL
3cvm KKLSSWLLMKYLGNAIAFFLPDEG---KLQHLNELTHDITRELENE--DRRSASLHL
1qmn EELSCVTVELKYTGNASALFILPQD---KMEVEAMLLPETLKRWRDSLEFREIGELYL
          1 * 1*1 11*1 1. 1 1 * 1 1.11 . * 1*

4g80 PKFSLTEVDLKKPLENLGHTDMFRQPADFTSLSDQEPFLVALALQVKIEVNESGTV
3cvm PKLSITGTYDLKSVLQQLGKTVFSN--GADLSGVTEZAPLKLKAVKAVLTIDEKGTEA
1qmn PKFSLISROYHLNDILLQLGIEEAFST--KADLSGITGARNLAVSQVVKAVLVDFEETEA
          **1*1 1*1.. * 1*1 . . * 1*1.12 11 11*1. 1 1 *1*

4g80 SSSTAVIVS-----ARNAPEEIIIDRFPLFVVRNPTGTFLWQGVNEP---
3cvm AGAMFLEAI-----PHSIPFEVKFKPFVFLMLEQWTKSPLFMGKVVRNPTQK
1qmn SAATAVKITLLSALVETRTIVFRNRPFLMIIIVPTDTQNIFFMSKVTVNPRQA
          1.1 1 1 11*1111 1* . 1*1.* 1*

```

FIG. 13

【配列表】

2021522295000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/061014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/4155 A61P25/00 A61P25/16
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/57101 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 11 November 1999 (1999-11-11) compounds 249936-62-7 and 249936-61-6 page 52, line 14 - line 23 -----	1-20
A	WO 01/21591 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 29 March 2001 (2001-03-29) compounds 249936-62-7 and 249936-61-6 page 41, line 1 - line 9 ----- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2019

Date of mailing of the international search report

10/07/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Uryga-Polowy, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/061014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. VANNI ET AL: "Differential overexpression of SERPINA3 in human prion diseases", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 15 November 2017 (2017-11-15), XP055514760, DOI: 10.1038/s41598-017-15778-8 abstract page 5 - page 8 -----	1-20
A	WO 2008/074814 A1 (GLAXO GROUP LTD [GB]; CAMPBELL IAN BAXTER [GB]; COE DIANE MARY [GB]; C) 26 June 2008 (2008-06-26) claims 1, 20, 22 -----	1-20
A	WO 94/13643 A1 (PFIZER [US]; FARACI WILLIAM STEPHEN [US]; WELCH WILLARD MCKOWAN JR [US]) 23 June 1994 (1994-06-23) claims 9, 10 -----	1-20
A	MAURA BARBISIN ET AL: "Gene expression profiling of brains from bovine spongiform encephalopathy (BSE)-infected cynomolgus macaques", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL, vol. 15, no. 1, 5 June 2014 (2014-06-05), page 434, XP021187341, ISSN: 1471-2164, DOI: 10.1186/1471-2164-15-434 page 10 - page 11 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/061014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957101	A1	11-11-1999	AT 292118 T 15-04-2005
		AU 765030 B2 04-09-2003	
		BR 9911013 A 06-02-2001	
		CA 2329065 A1 11-11-1999	
		CN 1300282 A 20-06-2001	
		DE 69924480 D1 04-05-2005	
		EP 1075467 A1 14-02-2001	
		HK 1037374 A1 10-12-2004	
		HR P20000724 A2 30-06-2001	
		HU 0101581 A2 28-03-2002	
		ID 27535 A 12-04-2001	
		JP 3590586 B2 17-11-2004	
		JP 2002513784 A 14-05-2002	
		KR 100404256 B1 01-11-2003	
		MA 26627 A1 20-12-2004	
		NO 317985 B1 17-01-2005	
		NZ 507558 A 29-08-2003	
		PL 344004 A1 10-09-2001	
		TR 200003256 T2 20-04-2001	
		TW 593282 B 21-06-2004	
		WO 9957101 A1 11-11-1999	
		YU 67600 A 07-07-2003	
WO 0121591	A1	29-03-2001	AU 777470 B2 21-10-2004
		BR 0014225 A 21-05-2002	
		CA 2385447 A1 29-03-2001	
		EP 1218346 A1 03-07-2002	
		JP 2003509495 A 11-03-2003	
		MX PA02002382 A 20-08-2002	
		TR 200200778 T2 21-06-2002	
		US 6316466 B1 13-11-2001	
		US 2002103245 A1 01-08-2002	
		WO 0121591 A1 29-03-2001	
		ZA 200201559 B 30-07-2003	
WO 2008074814	A1	26-06-2008	EP 2099766 A1 16-09-2009
		JP 2010513394 A 30-04-2010	
		US 2010035926 A1 11-02-2010	
		WO 2008074814 A1 26-06-2008	
WO 9413643	A1	23-06-1994	AT 175961 T 15-02-1999
		AU 690527 B2 30-04-1998	
		BR 9307659 A 29-06-1999	
		CA 2150483 A1 23-06-1994	
		CN 1092768 A 28-09-1994	
		CZ 284157 B6 12-08-1998	
		DE 69323212 D1 04-03-1999	
		DE 69323212 T2 27-05-1999	
		DK 0674624 T3 13-09-1999	
		EG 20397 A 28-02-1999	
		EP 0674624 A1 04-10-1995	
		ES 2126661 T3 01-04-1999	
		FI 935674 A 18-06-1994	
		GR 3029568 T3 30-06-1999	
		IL 107946 A 24-09-1998	
		JP 2862374 B2 03-03-1999	
		JP H07509725 A 26-10-1995	
		KR 0170567 B1 18-02-1999	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/061014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 950704261 A	17-11-1995
		MX PA98005325 A	24-08-2004
		MY 131382 A	30-08-2007
		NO 304831 B1	22-02-1999
		NO 306111 B1	20-09-1999
		NZ 257770 A	24-02-1997
		PL 309356 A1	02-10-1995
		RU 2142946 C1	20-12-1999
		TW 238303 B	11-01-1995
		US 5712303 A	27-01-1998
		WO 9413643 A1	23-06-1994
		ZA 9309404 B	15-06-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 K 31/454 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 31/4155 (2006.01)	A 6 1 K 31/454	
C 0 7 D 417/14 (2006.01)	A 6 1 K 31/4155	
C 0 7 D 403/06 (2006.01)	C 0 7 D 417/14 C S P	
C 0 7 D 413/14 (2006.01)	C 0 7 D 403/06	
C 0 7 D 401/06 (2006.01)	C 0 7 D 413/14	
C 0 7 D 405/12 (2006.01)	C 0 7 D 401/06	
	C 0 7 D 405/12	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (71)出願人 520420713
 フォルシュングスツェントゥルム・ ユーリヒ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
 FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH
 ドイツ、デー５２４２８ユーリヒ、ヴィルヘルム－ヨーネン－シュトラッセ
- (74)代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
- (74)代理人 100150500
 弁理士 森本 靖
- (74)代理人 100176474
 弁理士 秋山 信彦
- (72)発明者 ジュゼッペ・レニャメ
 イタリア３４１５１オピチーナ（トリエステ）、ヴィア・ディ・モンルピーノ７９／７番
- (72)発明者 シルヴィア・ヴァンニ
 イタリア４８０１３ブリジゲッラ（ラヴェンナ）、ヴィア・ストラッダ５０番
- (72)発明者 パオロ・カルローニ
 ドイツ５２４２８ユーリヒ、ヨーゼフ－ホンメン－シュトラッセ１番
- (72)発明者 マルコ・デ・ヴィーヴォ
 イタリア４７９２２リミニ、ヴィア・クーネオ２９番

Fターム(参考) 4C063 AA01 AA03 BB04 BB09 CC22 CC51 CC62 CC78 DD03 DD06
 DD10 DD22 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC36 BC67 BC82 GA02 GA07 GA09 GA10
 MA01 MA04 MA52 MA55 MA59 MA60 MA66 NA14 ZA02 ZA05

ZA15 ZA16 ZA22 ZA94 ZB21 ZC20 ZC41 ZC61