

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4824268号
(P4824268)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int. Cl. F I

A 6 1 K 31/137 (2006.01)	A 6 1 K 31/137
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198
A 6 1 K 31/4164 (2006.01)	A 6 1 K 31/4164
A 6 1 K 31/417 (2006.01)	A 6 1 K 31/417
A 6 1 K 31/4178 (2006.01)	A 6 1 K 31/4178

請求項の数 14 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-584781 (P2002-584781)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月2日(2002.5.2)
 (65) 公表番号 特表2004-535386 (P2004-535386A)
 (43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/013784
 (87) 国際公開番号 W02002/087423
 (87) 国際公開日 平成14年11月7日(2002.11.7)
 審査請求日 平成17年4月6日(2005.4.6)
 (31) 優先権主張番号 60/287,721
 (32) 優先日 平成13年5月2日(2001.5.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 503310224
 ブランシェット・ロックフェラー・ニュー
 ロサイエンス・インスティテュート
 アメリカ合衆国、ウェスト・バージニア州
 26505、モーガンタウン、エイト・
 メディカル・センター・ドライブ (番地
 なし)
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 学習および記憶を増強させるためのカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤

(57) 【特許請求の範囲】

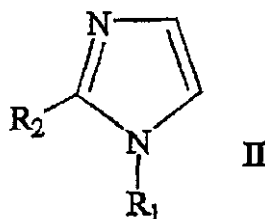
【請求項1】

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物の学習または注意を改善するために効果的な用量の医薬の製造における使用であって、前記カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物は以下の群から選択される使用：

(1) フェニルアラニンまたはフェネチラアミン；

(2) 構造 I I の化合物：

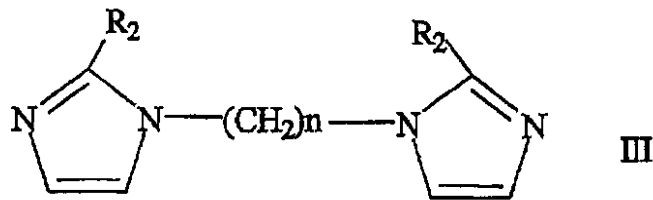
【化2】



式中でR¹はH、メチルまたはエチル、R²はHまたはメチルである；

(3) 構造 I I I の化合物：

【化3】



式中で n は1または2、 R^2 はHまたは低級アルキル、直鎖状、分枝状もしくは環状の C_1 - C_6 アルキルまたは C_1 - C_4 アルキルである；及び
その塩。

【請求項2】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物がニューロン内のカルボニックアンヒドラーゼ活性を増強する使用。

【請求項3】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物が構造IIIを有し、式中で n は1または2であり；および R^2 はHまたはメチルである使用。

【請求項4】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物が、イミダゾール、フェニルアラニン、またはフェネチラアミンである使用。

【請求項5】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物が薬学的組成物として又は薬学的に許容される担体中に投与される使用。

【請求項6】

請求項1または4に記載の使用であって、前記患者が神経変性疾患を有する使用。

【請求項7】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物がバイカルボネート (bicarbonate) 媒介性GABA作用性の脱分極が作用することを介したシータリズムの樹立を促進する使用。

【請求項8】

請求項7に記載の使用であって、前記化合物がシータリズムに作用する細胞内のシグナリングカスケードに介入し、この介入が HCO_3^- コンダクタンスをニューロン内カルボニックアンヒドラーゼ活性を直接変化させることによって調節することを含む使用。

【請求項9】

請求項8に記載の使用であって、前記介入が Cl^- および K^+ 電流に関連して HCO_3^- 電流を調節する使用。

【請求項10】

請求項6に記載の使用であって、前記神経変性疾患がアルツハイマー病、発作 (stroke)、低酸素症 (hypoxia)、および/または虚血 (ischemia) である使用。

【請求項11】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物がカルボニックアンヒドラーゼ活性を、インビトロでアラニンの少なくとも150%の活性で提供する化合物である使用。

【請求項12】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物がカルボニックアンヒドラーゼ活性を、インビトロでアラニンの少なくとも200%の活性で提供する化合物である使用。

【請求項13】

請求項1に記載の使用であって、前記化合物がカルボニックアンヒドラーゼ活性を、インビトロでアラニンの少なくとも250%の活性で提供する化合物である使用。

【請求項14】

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物の学習または注意を改善するための医薬の

製造における使用であって、前記カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物はイミダゾールおよびフェニルアラニンである使用。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、2001年5月2日に出願された仮出願番号USSN60/287,721の優先権を主張するものであり、この仮出願は本明細書中に参照によって援用される。

【背景技術】

【0002】

本発明は、注意、学習、および記憶をカルボニックアンヒドラーゼを活性化することによって改善するための方法および組成物に関する。連想記憶 (associative memory) の獲得 (acquisition) および/または想起 (recall) を増強する薬物は、認知疾患 (cognitive disorders) の治療の重要なゴールを代表するものである。かかる治療の有効性は、標的にされた機構が記憶それ自身に実際に関与しているかどうかによって依存する。学習および記憶は、複数の求心性経路 (afferent pathways) およびシグナル分子を介した、ネットワーク中の関連性のあるニューロン間のシナプス強度 (synaptic strength) の修飾を必要とすると考えられている。複数のシナプス相互作用 (1つのグルタミン酸作用性経路に対して度々実験的に研究される) の必要性は、アルツハイマー病を含む記憶障害における神経伝達物質の複数の欠損の特徴と実際に一貫している。それゆえ、記憶痕跡 (memory traces) 内の関連するシナプス/シグナル相互作用をターゲティングすることは、学習および記憶に対する特異的な効果を薬理的に達成するための有効な方法であろう。

【0003】

哺乳類において、空間記憶 (spatial memory) における海馬のCA1錐体細胞の必須な役割に関しては、よく研究されている。CA1錐体細胞は、(CA3錐体ニューロンからのグルタミン酸作用性のインプットに加えて) 豊富なコリン作用性およびGABA作用性のインプットを受容する。パーフォラント (perforant) 経路内のメディカルセプタルアファレント (medial septal afferents) の活性化 [海馬への主なコリン作用性インプット (Cooper and Sofroniew, 1996)] は、連想的学習 (associative learning) に必要であると信じられており (Dickinson-Anson et al., 1998; Perry et al., 1999)、なぜならその崩壊が空間記憶を無効にするからである (Winson, 1978; Winkler et al., 1995)。他方、GABA作用性の介在ニューロンは、海馬のネットワーク活動をコントロールし、また錐体細胞の発火を同調 (synchronize) させる (Buhl et al., 1995; Cobb et al., 1995; Banks et al., 2000)。1つのGABA作用性介在ニューロンは、およそ1000の錐体細胞を刺激して、介在ニューロンがアクティブな時にシグナル流出を効果的に終了させる (Sun et al., 2000)。従って、これらの主なインプット間の機能的な相互作用は、海馬依存性記憶に重要な役割を演じており (Bartus et al., 1982; Winkler et al., 1995; Paulsen and Moser, 1998)、そしてその相互作用には記憶痕跡の「切断 (dissect)」に関する多くの興味ある事象が存在している。

【0004】

GABA作用性シナプス応答が抑制性から興奮性へとスイッチされ得るという観察 (Alkon et al., 1992; Collin et al., 1995; Kaila et al., 1997; Taira et al., 1997; Sun et al., 2000, 2001b) と一致して、かかるシナプス・スイッチがGABA_A受容体チャンネル複合体を介して増加したHCO₃コンダクタンスに依存し、海馬のネットワークを介してシグナル転移の作業を劇的に変化させる (Sun et al., 1999, 2000) との証拠が提出されている。シナプス・スイッチは、カルボニックアンヒドラーゼ (二酸化炭素の可逆的な水和を触媒する亜鉛含有酵素) に依存しているように思われる。カルボニックアンヒドラーゼは、錐体細胞の細胞内区画 (intracellular compartments) 内に存在する (Pasternack et al., 1993)。膜不透過性のカルボニックアンヒドラーゼ阻害剤であるベンゾールアミド (benzamide) は測定される錐体細胞に導入された際にシナプス・スイッチを効果的にブロッキングしたが、細胞外に適用された際には効果的ではなく (Sun et al., 1999)、こ

10

20

30

40

50

のことは対象となる酵素が細胞内のものであることを示唆している。

【0005】

カルボニックアンヒドラーゼ活性に依存する急速な HCO_3 形成のブロッキングは、このようにしてインピトロのシナプス・スイッチを阻止し、そしてラットの空間的な可塑性 (plasticity) および記憶を損傷させる。

【0006】

アセタゾールアミド (Acetazolamide; カルボニックアンヒドラーゼ活性の既知の阻害剤) は、シータリズム、学習、および記憶を阻害する、Sun MK, Zhao WQ, Nelson TJ, Alkon DL., "Theta Rhythm of Hippocampal CA1 Neuron Activity: Gating by GABAergic Synaptic Depolarization," J Neurophysiol 2001 Jan; 85 (1) : 269-79. カルボニックアンヒドラーゼ活性の阻害が記憶形成を損傷させたことを示している以前のデータは、その活性が記憶形成を増強すると予測するものではなかった。例えば、前記酵素が学習に参与するニューロンにおいて最大レベルで既に作用しているのであれば、それは更に活性化されないことについては知られていなかった。また、本発明の化合物の投与による任意の活性化を中和する恒常性機構がかかる細胞に存在するかどうかについても知られていなかった。

10

【0007】

国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により 2001年6月7日に出願された係属中の特許出願PCT/US01/18329は、カルボニックアンヒドラーゼの活性化により学習および記憶を改善することが可能であることを開示しており、この出願は参照によって本明細書中に援用される。哺乳類のカルボニックアンヒドラーゼを活性化し、学習および記憶を改善する化合物並びに薬学的な薬剤が長く要望されていた。

20

【発明の概要】

【0008】

本発明は注意および/または記憶の獲得を改善するための方法を提供し、該方法はニューロン内のカルボニックアンヒドラーゼ活性を刺激することを含む方法である。前記刺激は、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤を投与することによって達成される。前記方法は、神経変性疾患 (neurodegenerative disorders) を治療して認識能力を増強すること、痴呆を治療すること、並びに健常個体の注意および学習を増強すること、をも可能にする。

30

【0009】

本発明は、注意認知 (attentive cognition) を改善するための方法を提供し、該方法はニューロン内のカルボニックアンヒドラーゼ活性を増大する化合物を投与することを含み、それによってシータリズムの樹立を改善する方法である。

【0010】

本発明は、注意認知を改善する必要がある被験者の脳に、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物を注意認知を改善するために効果的な用量で投与することを含む方法を提供し、前記カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤化合物は以下に記載される構造I、II、またはIIIからなる群から選択される。前記化合物は、ニューロン内のカルボニックアンヒドラーゼ活性を増強し得る。前記化合物は構造Iであってもよく、その構造式中 R^1 はHまたはOH; R^2 はH、 CH_3 または COOH ; R^3 はHまたは CH_3 ; およびArはH、フェニル、4-ヒドロキシフェニル、4-フルオロフェニル、4-アミノフェニル、3-アミノ-4-ヒドロキシフェニル、3,4-ジヒドロキシフェニル、イミダゾール、イミダゾール-4-イル-、または5-メチルイミダゾール-4-イル-である。前記活性化剤は構造IIを具備していてもよく、その構造式中 R^1 はH、メチルまたはエチル; および R^2 はHまたはメチルである。前記活性化剤は構造IIIを具備していてもよく、その構造式中でnは1または2; および R^2 はHまたはメチルである。前記活性化剤は、イミダゾール、アラニン、フェニルアラニン、置換されたエチルアミン、フェネチラアミン (phenethylamine)、ヒスタミン、ヒスチジン、連結したジイミダゾール、トリアゾール、および/またはその塩であってもよい。

40

【0011】

50

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤は、薬学的組成物として又は薬学的に許容される担体中に投与し得る、或いはプロドラッグ（代謝されて、本発明の化合物を形成し且つ前記ドラッグが被験者の脳へと配送される）として投与されてもよい。

【0012】

前記患者は神経変性疾患を有する患者であってもよく又は前記方法は神経変性疾患を有さない個体の認識能力、注意、学習、および/または記憶を増強する。

【0013】

前記方法は、バイカルボネート (bicarbonate) 媒介性GABA作用性の脱分極を介したシータリズムの樹立を促進し得る。前記方法は、記憶形成、学習、空間記憶、および/または注意を改善し得る。前記方法は、シータリズムに作用する細胞内のシグナリングカスケードに介入でき、この介入は HCO_3^- コンダクタンスをニューロン内カルボニックアンヒドラーゼ活性を直接変化させることによって調節することを含む。前記介入は、 Cl^- および K^+ 電流に関連して HCO_3^- 電流を調節し得る。

10

【0014】

前記方法は、アルツハイマー病、発作 (stroke)、低酸素症 (hypoxia)、および/または虚血 (ischemia) を有する被験者における注意認知を改善し得る。

【0015】

前記方法は、カルボニックアンヒドラーゼ活性を、インビトロにおいてアラニンの少なくとも約150%、200%、または250%で提供する化合物を採用してもよい。

【0016】

20

本発明は製造物の物品 (article) に関し、該物品は薬学的組成物を含み、該薬学的組成物は注意認知を改善するための用途を示したラベリングと共に梱包された活性化剤化合物又はそのプロドラッグを含み、該活性化剤化合物は脳のカルボニックアンヒドラーゼ活性の増強に効果的であり且つ構造I、IIもしくはIII、またはその塩から選択される。

【0017】

更なる課題および利点は、本願の記載、図面、および実施例を考慮することにより明らかとなる。

【0018】

本発明は、以下の詳細な記載を本願に添付される図面を参照して読解することにより更に理解される。

30

【0019】

技術は実施例に記載される。

【好適な態様の詳細な記載】

【0020】

本願の図面に説明される本発明の好適な態様の記載において、明確な記載のために特定の用語が使用される。しかしながら、本発明は、選択されたそのような特定の用語に限定されない。それぞれの特定の構成要素には、類似する目的を達成するために類似する様式で実行される全ての技術的に均等な要素が含まれる。本明細書中に参照される各文献は、各々があたかも個別に参照によって援用されたかのように参照によって援用される。

【0021】

40

本発明によって、薬物を、患者に特定の時間に認知効果（注意認知として言及される）（例えば、学習、学習関連の注意、連想学習 (associative learning)、および記憶獲得、および記憶連結 (memory consolidation)（記憶の保存および想起に影響することなく））をニューロンのカルボニックアンヒドラーゼを活性化（例えば、カルボニックアンヒドラーゼ活性を増強させる化合物により）することによって生じさせるために投与でき、そして、これによりGABA作用性活性を顕著に過分極している Cl^- コンダクタンスから脱分極（主に HCO_3^- コンダクタンス）へとスイッチし、錐体細胞をシータリズムへと同期 (entraining) させる。

【0022】

本発明の主要な側面は、(1) 特定の認知効果、(2) シータリズム効果、および特に

50

、(3) 学習を、カルボニックアンヒドラーゼ活性を標準コントロールレベルを超えて刺激することによって増強する方法、を含む。カルボニックアンヒドラーゼが、興奮性シナプス後電位 (excitatory post synaptic potential) を刺激することとシータリズムを刺激することとの間の共通のリンクであるという事実は、神経疾患の治療 (認知の治療を含む) を可能とする。

【0023】

本発明は注意認知を改善するための方法を提供し、該方法はニューロン内のカルボニックアンヒドラーゼ活性を増強する化合物を投与することを含み、それによってシータリズムの樹立に影響する方法である。前記化合物の代謝経路は、好ましくはバイカルボネート媒介性GABA作用性脱分極に関与する。「注意認知」の用語は、記憶形成、学習、空間記憶、および注意を含む用語である。注意認知は、1以上の注意、学習、および/または記憶獲得および/または保持 (retention) を含み得る。本発明によると、シータリズムをカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤により増強して、神経疾患 [例えば、発作 (stroke)、低酸素症 (hypoxia)、および虚血 (ischemia)] を治療することが可能である。

10

【0024】

本発明の化合物を脳に投与することは、かかる化合物を脳に配送するために、前記化合物自身 (これは効果的な量で血液脳関門を通過する) を投与すること、またはプロドラッグ (これは本発明の化合物へと脳に侵入する前に又は脳内で代謝される) を投与することの何れかを意味する。

【0025】

ラットにおけるカルボニックアンヒドラーゼ活性および注意認知を測定する方法は、以前から公開されている。Sun MK, Zhao WQ, Nelson TJ, Alkon DL., "Theta Rhythm of Hippocampal CA1 Neuron Activity: Gating by GABAergic Synaptic Depolarization," J Neurophysiol 2001 Jan; 85 (1) : 269-79.

20

【0026】

本発明は、文献 [Sun MK, Alkon DL., "Pharmacological Enhancement of Synaptic Efficacy, Spatial Learning, and Memory Through Carbonic anhydrase Activation in Rats," J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics 297 (3): 961-967] に記載され、本明細書中に参照によって援用された方法および化合物を含む。カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の存在下における、多形細胞層 (stratum oriens) からのコリン作用性インプットおよび錐体細胞層 (stratum pyramidale) からのガンマアミノ酪酸 (GABA) 作用性インプットの低強度の共微小刺激 (co-microstimulation) は、過分極しているGABA媒介性の抑制性シナプス後電位 (inhibitory postsynaptic potentials) を脱分極反応へとスイッチした。

30

【0027】

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤は、モリスの水迷路課題 (Morris water maze task) に関してラットに優れた学習効果を生じさせ、このことはGABA作用性のシナプススイッチが空間記憶形成の基礎に存在するシナプス可塑性のゲーティングに重要であることを示唆している。増加したカルボニックアンヒドラーゼ活性は、時間的に関係する関連シグナルの知覚 (perception)、処理 (processing) および保存 (storing) を増強し、学習および記憶の薬理学に関する重要な療法を提示する。

40

【0028】

本発明のカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤には、例えば、イミダゾール、フェニルアラニン、並びに、その構造的なアナログ、誘導体および塩が含まれ、以下に記載される例示的な態様に更に示される。表1、2および3は、本発明の典型的な (exemplary) 化合物を示している。また、CA-IIアイソザイムのコントロールレベルの活性に対する、これらの化合物の活性も提示される。

【0029】

カルボニックアンヒドラーゼ活性を測定するための適切な活性化剤および方法は、Clarke, B. W. : and Supuran, C. T., "Carbonic anhydrase activators: 3: Structureactivit

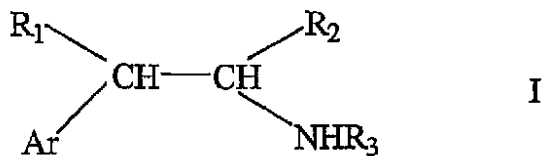
50

y correlations for a series of isozyme II activators", J. Pharmaceut. Sci. 83: 768-773,1994; Supuran, C. T., et al., "Carbonic anhydrase activators. Part 7. Isozyme II activation with bisazolylmethanes,-ethanes and related azoles.", Biol. Pharm. Bull. 16: 1236-1239,1993; and Supuran, C. T., et al., "Carbonic anhydrase activators: XV. A kinetic study of the interaction of bovine isozyme II with pyrazoles, bis-and tris-azoly-methanes.", Biol. Pharm. Bull. 19: 1417-1422,1996、の記載中に見つけることができる。これらの文献は、本明細書中に参照によって援用される。

【0030】

本発明の例示となる態様は活性化剤化合物を含み、その化合物は次の構造を有するように一般的に記載される、即ち：

【化7】



【0031】

式中でR¹はHまたはOHであり；R²およびR³は独立にH、COOHまたは低級アルキル（例えば、直鎖状、分枝状もしくは環状のC₁-C₆アルキルまたはC₁-C₄アルキル）であり；並びにArはフェニル、イミダゾール、或いは1以上の八口、ヒドロキシ、アミノもしくは低級アルキル（例えば、直鎖状、分枝状または環状のC₁-C₆アルキルもしくはC₁-C₄アルキル）で置換されたフェニルまたはイミダゾールである。R²およびR³に対するアルキル基の例はメチルである。Arの例には、フェニル、4-ヒドロキシフェニル、4-フルオロフェニル、4-アミノフェニル、3-アミノ-4-ヒドロキシフェニル、3,4-ジヒドロキシフェニル、イミダゾール、イミダゾール-4-イル、または5-メチルイミダゾール-4-イル-が含まれる。特定の例を表1に提供する。これらの化合物には、置換されたエチルアミンが含まれ、芳香族または脂肪族の部分が置換されたフェネチラアミンが含まれる。アラニンは、コントロールとして100%活性を有していると定義される。フェニルアラニン、ヒスタミン、ヒスチジン、および他のアラニン誘導体も、表1（化合物1～17）にリストされる。

10

20

30

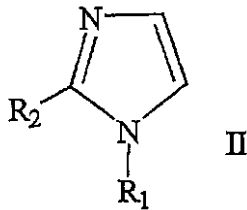
【表 1】

表 1

エフェクター	Ar	R1	R2	R3	%活性/ コントロール CAII 活性	コメント
1	H	H	COOH	H	100	アラニン, 0.2mM で効果無し
2	フェニル	H	COOH	H	186.7	フェニルアラニン
3	フェニル	H	H	H	109.5	COOH はより効果的
4	4-ヒドロキシフェニル	H	COOH	H	189.1	4-ヒドロキシ, フェニルアラニンと比較して改善無し
5	4-フルオロフェニル	H	COOH	H	167.7	4-フルオロ, 低効果 [4-フルオロフェニルアラニン]
6	4-アミノフェニル	H	COOH	H	159.4	4-アミノ, 低効果 [4-アミノフェニルアラニン]
7	3-アミノ-4-ヒドロキシフェニル	H	COOH	H	176.3	3-アミノ, 低効果 [3-アミノ-4-ヒドロキシフェニルアラニン]
8	3,4,-ジヒドロキシフェニル	H	COOH	H	134.3	2-OH で低効果
9	3,4,-ジヒドロキシフェニル	OH	H	H	137.5	低効果 2-OH [2-(3,4,-ジヒドロキシフェニル)エタンアミン]
10	3,4,-ジヒドロキシフェニル	OH	H	H	115.5	2-OH で低効果 [2-ヒドロキシ-2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エタンアミン]
11	3,4,-ジヒドロキシフェニル	OH	H	CH ₃	135.0	R3 で若干増加 [2-ヒドロキシ-2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-N-メチル-エタンアミン]
12	3,4,-ジヒドロキシフェニル	OH	CH ₃	H	129.0	R ₂ -CH ₃ で若干増加 [1-ヒドロキシ-1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-2-プロパンアミン]
13	フェニル	OH	CH ₃	CH ₃	134.5	追加的な-CH ₃ で増加無し
14	イミダゾール	Ar のみ, 残りの C-C 鎖無し			230.0	0.1mM で
15	イミダゾール-4-イル-	H	H	H	150.0	ヒスタミン
16	イミダゾール-4-イル-	H	COOH	H	170.0	ヒスチジン; 効果において若干増加
17	5-メチルイミダゾール-4-イル-	H	H	H	130.5	5-メチル, 低効果

本発明のもう1つの典型的な態様において、前記活性化剤化合物はイミダゾール化合物並びにそれらの構造的なアナログ、誘導体および塩であってもよく、次ぎの一般的な構造を有しており：

【化8】



10

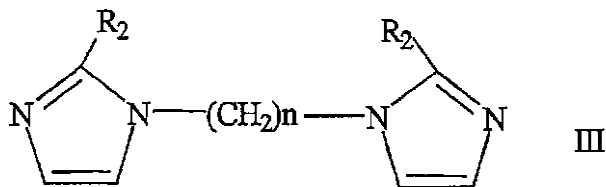
【0033】

式中でR¹およびR²は、独立にHまたは低級アルキル（例えば、直鎖状、分枝状もしくは環状のC₁-C₆アルキルまたはC₁-C₄アルキル）である。メチルおよびエチルは、ポジションR¹に存在し得る低級アルキル基の例である。メチルは、R²の例である。

【0034】

本発明のもう1つの典型的な態様において、前記活性化剤化合物は連結したジイミダゾール化合物、誘導体および塩であって、次ぎの一般的な構造を有している：

【化9】



20

【0035】

式中でnは1または2及びR²はHまたは低級アルキル（例えば、直鎖状、分枝状もしくは環状のC₁-C₆アルキルまたはC₁-C₄アルキル）である。

【0036】

異なるR基は、活性化剤の効果を及び関連する認識増強を高め（heighten）得る。かかる増強した効果は、ルーチンの実験によって容易に決定される。本発明のイミダゾール化合物（構造II、化合物18～21）および本発明の連結されたジイミダゾール（構造III、化合物22～25）を、表2および3にそれぞれ示す。また、トリアゾールおよび置換されたトリアゾールを、一般的な構造I、IIおよびIIIの何れかにおけるイミダゾールおよび置換されたイミダゾールの代替物として使用してもよい。

30

【表2】

表2

エフェクター	R ₁	R ₂	%活性
18	H	H	190
19	CH ₃	H	194
20	C ₂ H ₅	H	203
21	CH ₃	C ₂ H ₅	247

40

【表3】

表3

エフェクター	N	R ₁	%活性
22	1	H	140 [ジ(1-イミダゾリール)メタン]
23	1	CH ₃	169 [ジ(2-メチル-1-イミダゾリール)メタン]
24	2	H	154 [1,2-ジ(1-イミダゾリール)エタン]
25	2	CH ₃	131 [1,2-ジ(2-メチル-1-イミダゾリール)エタン]

10

【0037】

これらの化合物のいくつかは、ラットの学習および記憶の実験で検査された。

【0038】

結果を図4aおよび4bにグラフ化した。カルボニックアンヒドラーゼの活性化が、哺乳類における学習および記憶の効果と直接的に関連することが示されている。減少した活性は、学習および記憶を阻害する。増加した活性は、学習および記憶を直線的に比例する様式で改善する。

20

【0039】

本発明の化合物は、上記の表1、2および3に記載されている。

【0040】

これらの化合物の多くは既に公知であり、それらを取得するための方法は当業者に公知である。前記化合物は、組み合わされてもよく、薬学的に許容される担体中に投与されてもよく、認識効果を指示するラベリングと共に梱包されてもよい。

【0041】

本発明はこれらの化合物の誘導体およびアナログを含む。これらはカルボニックアンヒドラーゼを活性効果度を増加させ、他の標的と比較してカルボニックアンヒドラーゼに対する特異性を増加させ、毒性を減少させ、経口製剤形態における安定性を改善させ、および/または前記化合物の血液脳関門を通過する能力を増強させる(プロドラッグ)。

30

【0042】

誘導体は、リストされた化合物の側鎖を付加すること又は除去することによって形成される。アナログは、カルボニックアンヒドラーゼの結合サイトに関して、増強された類似の物理的および/または化学的な特性を有している化合物の構造的なバリエーションである。本発明による誘導体およびアナログは、本発明の前記活性化剤化合物を被験者の脳へと配送することが可能なものである。

【0043】

本発明の化合物は、アラニンの活性の少なくとも約110、115、125、135、150、170、180、190、200、210、220、230、240および250%のニューロンのカルボニックアンヒドラーゼ活性を提供し得る。

40

【0044】

前記化合物の投与における効果的な用量は、特定の課題の学習、注意、および記憶に関連する、細胞のニューロンのシグナリング経路のカルボニックアンヒドラーゼ活性を増強する用量である。前記活性化剤化合物が本発明による効果的な用量で投与された場合、それらはカルボニックアンヒドラーゼ活性を、カルボニックアンヒドラーゼを直接的に活性化すること又はカルシウムシグナリングの細胞内ニューロン経路を誘導してカルボニックアンヒドラーゼを活性化することの何れかによって増強する。仮に用量が高すぎる場合、有益な学習効果は生じず、そして実際には被験者は学習の障害を呈するであろう。このよ

50

うに、多用量はニューロン経路を圧倒 (overwhelm) し得る、また少用量は所望の酵素活性化および学習効果を達成し得ない。規定量 (dosage) は、所望の結果を得られるように調整されるべきである。

【 0 0 4 5 】

ラットの用量設定 (dosing) から外挿 (ヒトの用量設定の予測) した、ヒトを治療するためのフェニルアラニン (50mM) またはイミダゾール (0.5M) 薬剤の効果的な用量は、0.1、0.3、1、3又は10ml/kg体重 (1日に2回摂取) と同等物を含み得る。望ましい投与処方 (dosing regimen) は、前記化合物を所望の注意認知活動の約30分前に投与することを含む。

【 0 0 4 6 】

本発明に有用な化学的組成物は、適切な、薬学的に許容される担体または希釈剤、に溶解、および/または、の添加により薬学的組成物へと「転換」することが可能である。従って、前記組成物を、固体状、半固体状、液体状、またはガス状の製剤 (例えば、錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、軟膏、溶液剤、坐剤、注射可能剤、吸入剤、およびエアロゾル) に通常の手段を用いて処方してもよい。既知の方法が、活性のある成分または薬剤の放出または吸収を、標的である細胞または器官に達するまで阻止するために使用される、或いは前記薬剤の徐放性放出 (time-release) を達成するために使用される。薬学的に許容される形態は、活性のある薬剤を不活性化または変性しない形態である。

【 0 0 4 7 】

本発明に有用な薬学的製剤形態において、本組成物は単独で或いは他の薬学的に活性化化合物と適切な関連性又は組み合わせで使用し得る。

【 0 0 4 8 】

従って、本発明の薬学的組成物は、被験者の任意数の部位に投与することが可能であり、そしてこれにより任意数の経路を介して配送され所望の効果を達成することが可能である。局所または全身への配送は、薬学的組成物を、注射、点滴 (infusion) または体の部分もしくは体腔へのシンチレーションを介して、或いは摂取、吸入、またはエアロゾルのガス注入によって投与することで達成される。投与の好適な経路には非経口投与が含まれ、これには筋肉内、頭蓋内、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、または局所的経路が含まれる。

【 0 0 4 9 】

本組成物は、単位製剤形態 (unit dosage form) で供給することが可能である。ここで各製剤単位 (dosage unit) (例えば、茶さじ1杯、1錠、注射可能溶液の1固定容量、または1坐剤) は、前記組成物の既定量を単独で又は他の薬学的に活性化薬剤と適切に組み合わせ含有する。「単位製剤形態 (unit dosage form)」の用語は、ヒトまたは動物の被験者に適切な物理的に別個の単位を意味しており、各単位は (既に述べたように) 既定量の本発明の薬学的組成物または組み合わせを所望の効果を生じさせるために十分な量で含有している。任意の薬学的に許容される希釈剤または担体は、例えば、1溶液担体 (塩類溶液、緩衝液、または他の生理学的に許容される水溶液など)、または1ビヒクルなどの1製剤単位で使用し得る。本発明の新規の単位製剤形態に関する規格 (specifications) は、達成される特定の効果に及び特定の宿主における前記薬学的組成物の特定の薬学特性に依存する。

【 0 0 5 0 】

組成物の「効果的な量 (effective amount)」は、ホストにおいて所望の効果を生じさせる量であり、その効果は当業者に既知の任意のエンドポイントを用いてモニターすることが可能である。

【 0 0 5 1 】

本明細書に記載される方法は、全てを包含するもの (all-inclusive) であることを意図していない、従って、当業者に既知の更なる方法を本発明の記載されている方法の代わりに (in their place) 使用し得る。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

また、本明細書に例示される各々の活性薬剤の量は各コンポーネントの範囲の一般的なガイダンスを提供することを意図している。これはインピトロまたはインピボの何れかにおける実施に関して、これらの方法を至適化することにおいて実施者 (practitioner) により利用され得る。更に、例示された用量範囲は、より高い又はより低い容量の使用を除外するものではなく、特定の適用において保証 (warranted) されるような範囲である。例えば、実際の用量およびスケジューリングは、(a) 組成物が他の薬学的組成物と組み合わせられて投与されるかどうか、または (b) 薬物動態、薬物素質 (drug disposition)、および代謝における個体間の差異、によって変化し得る。同様に、量はインピトロの適用に関して変化し得る。当業者は、特定の状況における必要性に応じて任意の必要な調整を容易になすことができる。

10

【0053】

カルボニックアンヒドラーゼのいくつかのアイソザイムが存在する。Lindskog, "Structure and Function of Carbonic Anhydrase," *Pharmacol. Ther.* Vol. 74 (1), P1-20, 1997を参照のこと。アセタゾールアミド (acetazolamide) および何種かの他の阻害剤に対するCAII結合サイトの構造は、知られている。この知識により、本明細書にリストされた化合物の誘導体およびアナログの合理的な設計が可能である。

【実施例】

【0054】

<イントロダクション>

ラットの海馬のスライスにおいて、CA1錐体細胞が記録された。カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の存在下、多形細胞層からのコリン作用性インプットおよび錐体細胞層からの -アミノ酪酸 (GABA) 作用性インプットの低強度の共微小刺激は、過分極しているGABA媒介性の抑制性シナプス後電位を脱分極する反応へとスイッチした。しかしながら、活性化剤の非存在下において、同じ刺激はシナプス・スイッチを作動するためには不十分であった。このシナプス・スイッチは、GABA作用性シナプスの機能を興奮性フィルター (excitation filter) から増幅器 (amplifier) へと変化させ、またカルボニックアンヒドラーゼ阻害剤によって阻止された、このことは HCO_3^- 依存性を示している。これらの同じカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤のイントララテラル・ベントリキュラー (Intralateral ventricular) 投与は、ラットにモリスの水迷路課題 (Morris water maze task) に関する優れた学習効果を生じさせた、このことはGABA作用性のシナプス・スイッチが空間記憶形成の基礎に存在するシナプス可塑性のゲーティングに重要であることを示唆している。また、増加したカルボニックアンヒドラーゼ活性は、時間的に関係する関連シグナル (relevant signals) の知覚、処理、および保存を増強し、そして学習および記憶の薬理学における重要な治療上の標的を代表するものである。

20

30

【0055】

<材料および方法>

脳スライス。雄のSprague-Dawleyラット (150-180g) をペントバルビタールで麻酔し、そして断頭した。海馬体 (hippocampal formation) を除去し、そしてMcIlwain組織チョッパーでスライス (400 μm) した (Sun et al., 1999)。スライスをインタフェース・チャンパー (Medical systems Corp., Greenvale, NY) 内で31 で人工的な脳脊髄液の連続的な灌流下で維持した。人工的な脳脊髄液は、125mM NaCl、3mM KCl 、1.3mM MgSO_4 、2.4 mM CaCl_2 、26mM NaHCO_3 、1.25mM NaH_2PO_4 、および10mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ からなる。

40

【0056】

電気生理学。細胞内の記録を、CA1錐体ニューロンから2M酢酸カリウム (pH7.25) を充填したガラス・マイクロピペット電極に測定チップ (70から120M の抵抗) を備えたものを用いて取得した。明瞭に順応を示した細胞 (錐体細胞を識別する特徴) を、研究に使用した。この特徴を呈している測定細胞が色素で標識されることが、その測定細胞が本当に錐体細胞であるという証拠であることが以前より示されている (Sun et al., 1999)。シグナルを、AxoClamp-2B増幅器並びにP-クランプ・データ取得および分析ソフトウェア (Axon Instruments, Foster City, CA) を用いて、増幅し、デジタル処理し、および保存し

50

た。錐体細胞層、放線状層、および/または多形細胞層を、テフロン防御されたPtIrワイヤー（直径25 μm 、錐体細胞層の概算上の厚さ；FHC Inc., Bowdoinham, ME）で構築された2極電極を用いて刺激した（記録電極から約200 μm ）。单相性の過分極しているシナプス後電位（PSPs）を、錐体細胞層におけるニューロン間の順方向（orthodromic）の単一パルス刺激により惹起した（Collin et al., 1995）。いくつかの実験においては、刺激電極（2つの刺激電極を配置した際に他の刺激電極から約400 μm ）をも多形細胞層に配置してコリン作用性末端を活性化し、そしてアセチルコリン放出を誘発するか（Cole and Nicoll, 1984）、または放線状層に配置してグルタミン酸作用性PSPsを誘発した。多形細胞層および錐体細胞層の共刺激は、多形細胞層の単一パルス（20-60 μA および50 μs 、1Hzを10s）での刺激、並びに0.5-sのトレイン間インターバル（intertrain interval）での錐体細胞層の4つのトレイン刺激[10パルス/トレインをコントロール強度（30-60） μA および50ms、100Hz）、9番目の多形細胞層刺激から開始]からなるものであった。

【0057】

薬物およびリガンド。ピククリン、アセタゾールアミド（ジメチル・スルホキシドに溶解させた）、キヌレン酸、イミダゾール、フェニルアラニン、およびアトロピンをシグマ（St. Louis, MO）から購入し、そして記載の濃度に溶解し、そして外部リザーバーからスライス・チャンバーへと配送した。フェニルアラニン（50mM）、イミダゾール（0.5M）、および/またはアセタゾールアミド（10mM）のインビボのイントララテラル・ベントリキュラー注射に大しては、薬剤（2 μl /部位/日）を訓練日の間、訓練の約30分前に、1 μl /分のスピードで両側から注射した。コントロールラットに、同じ容量の塩類溶液を投与した。

【0058】

空間迷路課題空間記憶における増大した HCO_3^- 形成の効果を、ラットのモリスの水迷路課題で評価した。雄成熟ウィスターラット（200-250g）を、温度制御された（20-24 $^{\circ}\text{C}$ ）部屋で1週間飼育し、食物および水を自由に摂食させ、12時間の明/暗サイクルで飼育した。ラットをソジウム・ベントバルビタール（60mg/kg i.p）で麻酔し、そして定位固定装置（Kopf Instruments, Tujunga, CA）に配置した。ラットの核心温（core temperature）を、モニターして暖房用ライトと敷物とで一定（ 38.0 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ）に維持した。

【0059】

2つのステンレス・スチール・ガイド・カニューレを、無菌条件下で、チップと共に座標（前方向 後方向、0.5 mm； 横方向、1.5 mm； 水平方向、3.2 mm）に配置した。外科手術の終了時に、適切な麻酔下で、ラットに乳酸/リンゲル溶液中のパナミン（banamine； 1mg/kg）およびケトプロフェン（ketoprofen； 5mg/kg）を投与した。7日間の回復期間を任意の更なる実験の前に設けた。

【0060】

実験の第1日目に、全てのラットをランダムに異なるグループ（各10）に対して割り当て、そして1.5-(直径) X 0.6-m(深さ)プール（ 22 ± 1 ）において2分間遊泳させた。次の日に、ラットを2試行/日の課題で4日間連続的に訓練した。各々の訓練試行（training trial）を2分間まで持続させ、その間にラットを隠した足場（その足場は固定位置に配置され且つ水面から約1 cm沈めてあった）を発見することにより水から避難することを学習した。ラットの遊泳の跡をビデオカメラで追った。避難潜伏期（escape latency）およびプールを横切ったの足場へのラットの遊泳経路を記録した。クアドラント試験（quadrant test）（1min）を、足場を除いた後、最後の訓練試行の24 h後に実施した。

【0061】

統計学的分析を、ペアードまたはアンペアードのデータ（paired or unpaired data）に対するスチューデントのt検定を用いて或いは適当と認められるときはANOVAを用いて実施した。値は平均 \pm S.E.M.として表され、nは細胞またはラットの数を示している。これらの実験に使用された全ての動物は、実験動物の保護に関する国立衛生研究所ガイドラインに従って処理された。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

< 結 果 >

錐体細胞層の1パルスによる微小刺激は、過分極した抑制性シナプス後電位 (IPSP; 図 1 a) を惹起した。前記 IPSP は、独占的ではないにしても主にバスケット介在ニューロン (Basket interneurons) からの GABA 作用性インプットの活性化に由来するものであった。そのニューロンの細胞体およびアクソンは錐体細胞層に限局されている。以前に文献 (Sun et al., 1999, 2000) に記載されたように、前記 IPSPs は約 -78mV の逆ポテンシャルを呈した。如何なる検出可能な軽微で且つ異なる逆ポテンシャルを呈する P S P 成分も観察されなかった。キヌレン酸 (500 μ M, 20min) のバス適用 (Bath application)、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) および非 NMDA 受容体に対する広範囲の競争的なアンタゴニスト (Collingridge and Lester, 1989) は、Schaffer 側枝の刺激により発現された CA1 錐体細胞の EPSPs を効果的に停止させた (Sch; $96.3 \pm 4.1\%$ まで、6 個体の異なるラットから $n=6$, $p<0.05$)。この濃度でキヌレン酸は IPSP 振幅を増加させなかった (-8.2 \pm 0.6mV キヌレン酸前 対 28.3 \pm 0.7mV 適用期間; 7 個体の異なるラットから $n=7$, $p>0.05$; 図 1a)、このことは単一パルスの錐体細胞層微小刺激が顕著なグルタミン酸作用性 EPSP コンポーネントを発生させなかったことを示唆している。しかしながら、前記 IPSPs はピククリン (選択的な GABA_A 受容体アンタゴニスト) によりブロックされた (平均して $97.9 \pm 4.4\%$ 、6 個体の異なるラットから $n=6$, $p<0.05$; 1 μ M, 30-min 灌流; 図 1b)、このことは前記 IPSPs が GABA_A 受容体活性によって主に媒介されていたことを示しており、それ故に前記 IPSPs がバスケット介在ニューロン - CA1 応答と称されたことを示している。

10

20

【 0 0 6 3 】

錐体細胞層の一連の刺激と一致した (coincident with) 多形細胞層の単一パルス刺激 (1Hz, 10s) は、小さいながらも持続する IPSP 振幅の減少を発生させた (図 1、d および f)。例えば、共刺激の 40 分後にピーク IPSPs は -4.9 \pm 0.7mV であった、これは関連刺激 (associated stimulation) 前の -7.4 \pm 0.9mV よりも有意に小さい値である (7 個体の異なるラットから $n=8$, $p<0.05$; ペアード t 検定)。2つのカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤、イミダゾール (100 μ M, 20min; Parkes および Coleman, 1989) またはフェニルアラニン (100 μ M, 20min; Clare および Supuran, 1994) が適用された。フェニルアラニンの存在下で、錐体細胞層の単一パルス刺激に呼応したピーク IPSPs は、僅かではあるが有意に減少していた (図 1c; フェニルアラニン前 IPSPs の -7.6 \pm 1.2mV からフェニルアラニン存在下の -4.5 \pm 0.8mV まで; 7 個体の異なるラットから $n=7$, $p<0.05$)。カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の存在下、錐体細胞層および多形細胞層の同じ強度の共刺激は、IPSPs の EPSPs への持続性の逆転を発生させ、膜ポテンシャルがそれらのコントロールレベルで維持され時に観察された (図 1、d および e)。また、共刺激の 40 分後 (材料および方法に基づいて) にフェニルアラニンの存在下でピーク PSPs は 6.4 \pm 1.1mV であった、この値はフェニルアラニン前の値 (-7.2 \pm 1.2mV) と又はフェニルアラニン存在下であるが共刺激前の値と有意に異なるものである (8 個体の異なるラットから $n=8$, $p<0.05$) (図 1d)。

30

【 0 0 6 4 】

イミダゾールの存在下において、IPSPs (イミダゾール存在下の -5.3 \pm 0.7mV 対 イミダゾール前の -7.8 \pm 0.6mV; 7 個体の異なるラットから $n=7$, $p<0.05$) における類似する効果及び共刺激 (ピーク PSPs: 4.2 \pm 0.6mV、イミダゾール存在下且つ共刺激 40 分後 対 -7.5 \pm 0.7mV のイミダゾール前の値; 6 個体の異なるラットから $n=6$, $p<0.05$) の類似する効果が観察されたが、概して低い強度であった。従って、イミダゾールによる結果を詳細に説明しなかった。

40

【 0 0 6 5 】

IPSPs におけるカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の減少効果並びにコリン作用性および GABA 作用性インプットの共刺激によるシナプス・スイッチング効果の双方は、カルボニックアンヒドラーゼの活性に依存する。例えば、アセタゾールアミド [カルボニックアンヒドラーゼのプロロッカーであり、従って HCO₃ 合成のプロロッカーである (Staley et al., 1995)] (10 μ M, 20min) の存在下において、フェニルアラニンはピーク IPSPs を有意に

50

減少させなかった ($-7.7 \pm 0.9\text{mV}$ フェニルアラニンの存在下 対 $-7.9 \pm 1.1\text{mV}$ のフェニルアラニン前のピークIPSPs、6個体の異なるラットから $n=6$ 、 $p>0.05$)。イミダゾールも、アセタゾールアミドの存在下において、IPSPsのサイズを有意に変化させなかった ($-7.5 \pm 1.0\text{mV}$ イミダゾールの存在下 対 $-7.4 \pm 0.8\text{mV}$ のイミダゾール前のピークIPSPs、6個体の異なるラットから $n=5$ 、 $p>0.05$)。同強度の共刺激は、アセタゾールアミドおよびフェニルアラニンもしくはイミダゾールの存在下で、シナプス・スイッチ(図1、dおよびg)を誘導しなかった。このように、アセタゾールアミドおよびフェニルアラニンの存在下において、これらのIPSPsは、多形細胞層、錐体細胞層の共刺激によって有意に変化させられることはなかった ($-7.8 \pm 1.3\text{mV}$ 、 $-7.6 \pm 0.9\text{mV}$ コントロール値と比較した40分後、8個体の異なるラットから $n=8$ 、 $p>0.05$)。さらにまた、前記共刺激は、アセタゾールアミドおよびイミダゾールの存在下で前記IPSPsを有意に変化させることはなかった ($-7.7 \pm 1.1\text{mV}$ 、 $-7.5 \pm 0.8\text{mV}$ コントロール値と比較した40分後、6個体の異なるラットから $n=6$ 、 $p>0.05$)。

【0066】

CA1細胞を介したシグナル通過 (signal passage) におけるGABA作用性のシナプス・スイッチの影響を、グルタミン酸作用性のSchインプットを共刺激した時に評価した。8細胞において、単一パルスの錐体細胞層刺激はIPSPを発生させた(図2a)。興奮性Schインプットを、記録された細胞の活動電位閾値を30%超えた強度で刺激した(20試行のうち100%) (図2b)。GABA作用性インプットおよびSchの共刺激は、試験された8つ全ての細胞において活動電位閾値強度を超えて刺激された興奮性Schインプットの効果をブロックした(20試行のうち100%; 8個体の異なるラットから $n=10$ 、 $p>0.05$) (図2c)。各々の単一パルスにより発生した阻害応答における効果的なシグナルフィルタリング期間は、100msであった、この期間の間に如何なる活動電位(20試行のうち0%)もSch刺激により閾値強度を超えて発生させられることはなかった。フェニルアラニンの存在下において、GABA作用性およびコリン作用性インプットの共刺激により誘導されたシナプス・スイッチの後(図2d)、閾値未満のSch刺激[この刺激自身は活動電位を発生させなかった(20試行のうち0%; 図2e)]は、GABA作用性インプットの単一パルス刺激が100ms間に配送された時(図2f; 8個体の異なるラットから $n=8$)の活動電位を発生させるために十分であった(20試行のうち100%; 8個体の異なるラットから $n=8$ 、 $p<0.05$)。前記バスケット介在ニューロン-CA1 PSPが、シナプス・スイッチを誘導後に閾値を超えたSch刺激で共刺激された時に複数のスパイクが発生した。従って、シナプス・スイッチ後、GABA作用性介在ニューロンの活性は興奮性Schインプットを増幅した。従って、弱いシグナルはシナプス・スイッチ後に増幅されて活動電位を作動させるが、強い興奮性シグナルは関連する阻害条件下でネットワークを介して首尾よく通過することができない。

【0067】

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の効果、隠れた足場水迷路 (hidden-platform water maze) を用いたラットの空間学習で試験した。図3aに示したように、3つ全てのラットのグループにおいて、足場に避難する潜伏期 (latency) は、トレーニングセッション後に減少していた。統計学的分析によりグループ ($F_{2,27}=9.192$ 、 $p<0.001$)、試行 ($F_{7,218}=7.83$ 、 $p<0.001$)、およびグループ \times 試行のセッション ($F_{14,218}=3.70$ 、 $p<0.001$)の有意な効果が示され、この結果はフェニルアラニンを注射されたラット (フェニルアラニン・ラット) における空間学習が、塩類溶液を注射されたラット (コントロール・ラット) における空間学習よりも速かったことを指摘している。そのうえ、ポストホック (post hoc) 分析は第2から第6までの試行に有意差 ($p<0.05$) を示しており、この結果はフェニルアラニン・ラットにおけるより良好な学習を確認する結果である。事実、フェニルアラニン・ラットの避難潜伏期は、第5試行でプラトーに達した。コントロール・ラットに関してフェニルアラニン・ラットと同じ避難潜伏期を生じさせるには、3つの付加的な試行が必要とされた (図3a)。

【0068】

コントロール・ラット ($F_{3,36}=159.9$ 、 $p<0.0001$; ANOVA及びNewman-Keulsポストホック

10

20

30

40

50

試験) およびフェニルアラニン・ラット ($F_{3,36}=201.2$, $p<0.0001$) が、足場を以前に配置して除去した標的クアドラント (クアドラント 4) において、探索 (searching) に多くの時間を費やすことを最後の訓練試行の 24 時間後のクアドラント試験は明らかとした。しかしながら、コントロール・ラットとの比較において、フェニルアラニン・ラットは、標的クアドラント ($24.8 \pm 1.8\%$ まで、 $p<0.05$; アンペアード t 検定) に対して明らかにより大きな優先度 (preference) を呈した (図 3、d および e)。フェニルアラニンおよびコントロールのラット間の標的クアドラント比率 (標的 / 非標的の平均 クアドラント; target/average of the nontarget quadrants) に有意な差が認められた ($p<0.001$; 図 3b)。同様に、イミダゾールを注射したラット (イミダゾール・ラット) も、コントロール動物と比較して、より速い学習および有意に短い避難潜伏期を第 3 から第 6 までの試行において示した ($p<0.05$)。イミダゾール・ラットが、コントロール・ラットと比較して、標的クアドラント (target quadrant) に対してより大きな優先度を有していたことをクアドラント試験は明らかとした。従って、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤を注射されたラットは、そのコントロールよりも空間記憶保持課題で良好に行動した。しかしながら、8 つ全ての試行に関して平均遊泳速度は、イミダゾールおよびアセタゾールアミド / イミダゾール群 (データ示さず) を含む全ての群間で差がなかった (図 3c; $p>0.05$)、この結果はカルボニックアンヒドラーゼの活性化剤および阻害剤が彼等の感覚および運動活動に大きく影響しなかったことを示している。実験期間に、ラットは、機能低下または機能亢進 (hyperactivity) などの不快 (discomfort) または異常な行動の如何なる明らかな徴候をも示さなかった。

【 0 0 6 9 】

空間学習へのカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の効果は、カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤に対して感受性であった。アセタゾールアミドの両側イントラベンティキュラー注射は、学習におけるカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の効果を排除したのみならず、記憶障害 (memory impairment) をも生じさせた (図 3a)。アセタゾールアミド / フェニルアラニン群は、訓練試行の間の避難潜伏期においてコントロール群が示したよりも著しく軽微な減少 ($F_{1,18}=40.38$, $p<0.0001$) を示した。アセタゾールアミド / フェニルアラニン・ラットが、特定のクアドラントに関して有意に差のある優先度を示さず ($F_{3,36}=1.43$, $p>0.05$; 図 3f)、またフェニルアラニンおよびコントロール・ラットと有意に差のある ($p<0.001$) 標的クアドラント比率を示したことを、クアドラント試験は明らかにした (図 3b)。同一の結果は、アセタゾールアミドおよびイミダゾールを注射したラットにおいても観察された (データ示さず)。

【 0 0 7 0 】

本発明によると、海馬ネットワークのシグナル処理を制御する GABA 作用性シナプス・スイッチの増強は、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の使用により達成することが可能である。また、これらのカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤は、過分極している GABA 作用性 IPSPs から興奮性 PSPs へのスイッチングにおいて、コリン作用性および GABA 作用性インプットの時間的に関連する活性 (temporally associated activity) の効率を増加させる。連合シナプス後刺激 (associative postsynaptic stimulation) (Collin et al., 1995)、カレキシチン (calexcitin) シグナルカスケードの活性化、或いはコリン作用性および GABA 作用性インプット、のより大きな強度且つより長い刺激期間での刺激 (Sun et al., 2001 a) によって、シナプス・スイッチを誘導できる。上記に示した結果は、酵素活性化剤の存在がシナプス・スイッチの誘導を促進しているため、弱く且つ少数の一連の共刺激が必要とされたことを示している。従って、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の投与は、注意認識に関連する経路のニューロンに発生するカルボニックアンヒドラーゼの自然発生的な活性化を付加的に又は相乗的に補強 (augment) し得る。

【 0 0 7 1 】

異なるクラスの化合物に由来する 2 つの酵素活性化剤 (異なるスペクトラムの生物作用を有する) を本研究に使用した結果、同様の結果が得られた。それらを直接脳に投与することにより、血液脳関門による脳への蓄積の制限を回避した。競争的な輸送および急速な

10

20

30

40

50

末梢のヒドロキシル化が、フェニルアラニン含有物質〔アスパルテーム、その代謝物（5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸を含む）、フェニルアラニルアスパラギン酸（phenylalanyl aspartic acid）、アスパラギニル-フェニルアラニン（asparaginy-phenylalanine）、フェニルアラニンメチルエステル、フェニルアラニン、アスパラギン酸、メタノール、およびホルメートなど〕を全身的に投与された脳内のフェニルアラニン濃度を制限することが知られている。これらの効果は、脳へのフェニルアラニンのアクセスとおそらくはその行動への影響とを制限する。カルボニックアンヒドラーゼの活性化に加えて、脳での高濃度フェニルアラニンは、カテコールアミンの合成およびカテコールアミン作用性の伝達を促進するだろう。

【0072】

10

他方、イミダゾール類似構造は多くの生物学的活性分子と反応し得るものであり、その分子にはモノアミノオキシダーゼ、ヒスタミンH2受容体、アンジオテンシンIIタイプ1受容体、GABA受容体チャンネル複合体におけるエタノール結合サイト、GABA_A受容体、ニコチン-コリン作用性（nicotinic-cholinergic）受容体チャンネル複合体、酸化窒素シンターゼ（nitric-oxide synthase）のヘム補欠分子族（prosthetic heme group）、いくつかのK_{ATP}チャンネル、およびイミダゾール結合サイトが含まれる。脳のイミダゾール濃度増加の生物学的な重要性および特異性は、解明される対象として残された事項である。

【0073】

これらの結果は、他の脳領域におけるシナプス/シグナル相互作用が寄与する可能性を、或いは前記物質及びそれらの代謝物の α -アドレナリン受容体、ドーパミン作用性受容体、および/またはヒスタミン作用性受容体での空間的な学習および記憶の増強に対する作用を除外する結果ではない。2つのカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の共通点（common denominator）（即ち、カルボニックアンヒドラーゼにおける作用）は、観察された効果の基礎に存在すると推定される機構にある。

20

【0074】

カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の観察された効果におけるカルボニックアンヒドラーゼ活性化剤の重要な役割は、シナプス・スイッチのブロックにおけるアセタゾールアミド（カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤）の有効性によって更に直接的に示された。アセタゾールアミドが、脱分極しているPSPの基礎をなす海馬錐体ニューロンにおけるHCO₃の流れを減少または排除できることが示されている（Staley et al., 1995）。CA1錐体細胞中のカルボニックアンヒドラーゼ活性は必須である、なぜならベンゾールアミド（膜不透過型のカルボニックアンヒドラーゼ阻害剤）の細胞内適用がGABA作用性シナプス・スイッチを効果的にブロックすることが以前見出された（Sun et al., 1999）からである。

30

【0075】

カルボニックアンヒドラーゼは、非常に効率的な酵素である。もしその活性が学習した情報をコードすること及び保存することに関して重要であるならば、前記酵素の活性を制御するための細胞機構の存在が期待されるだろう。細胞内Ca²⁺放出がGABA_A受容体媒介性のIPSPsを介してHCO₃伝導を増加させる兆候が存在しており、その効果はカルボニックアンヒドラーゼ阻害に対して感受性がある（Sun et al., 2000）。膜会合（Membrane association）は、カルボニックアンヒドラーゼを活性化するための別の効率的な機構である（Parkes and Coleman, 1989）。サイトゾルのカルボニックアンヒドラーゼのトランスポーションおよび膜会合は、記憶の獲得および/または連結（consolidation）に参与し得る。本発明の方法は、任意の又は全てのかかる機構によってニューロンのカルボニックアンヒドラーゼ活性化を可能とするものである。認知機能におけるカルボニックアンヒドラーゼの関与は、年齢が適合するコントロールと比較してアルツハイマー病において前記酵素の活性が有意に減少しているとの証拠（Meier-Ruge et al., 1984）と及び年齢の増加と一致するものである。

40

【0076】

スイッチされたシナプス応答が、シナプス後の機構を提供して海馬のネットワークを介したシグナルフローを方向付ける又は開く（gate）ことを、本結果は示している。GABA作

50

用性介在ニューロン、特にバスケット介在ニューロン（その細胞体およびアクソンは細胞層に局限している）が、錐体細胞のペリソマティック領域を刺激（innervate）することが知られている。

【0077】

従って、シナプス・スイッチが欠如している条件で介在ニューロンからのバースティング活性（bursting activity）が錐体細胞を阻害し、このことにより海馬回路を介して興奮性シグナル転移が強くブロックされる。

【0078】

コリン作用性およびGABA作用性インプットの協同した活性化（associated activation）は、特にカルボニックアンヒドラーゼが活性化された時に、シナプス・スイッチを作動させることができる。しかしながら、シナプス・スイッチ後、同じタイプのGABA作用性活性が興奮性シグナルを増幅する。この機構はこのようにして、関連シグナルと神経活動状態との自然で且つ時間的な連関による応答を識別する、この現象は学習および記憶におけるシナプス可塑性の根底に存在するものである（Liu and Cull-Candy, 2000; Shulz et al., 2000）。シナプス・スイッチ機構は、ネットワークを有効にしてシグナル処理およびゲート情報の流れ及び方向付けをしかるべく実行する。

【0079】

以上のように、本発明による、学習が依存する神経活動状態をカルボニックアンヒドラーゼ活性を介して変更することは、記憶療法を達成するための効果的な治療戦略を代表する。本発明によるカルボニックアンヒドラーゼを活性化する薬剤は、記憶の増強に及ぼす空間記憶減退の治療に関して臨床的な価値を有する。

【0080】

フェニルアラニン、フェニルアラニンヒドロキシラーゼの遺伝的な欠損を有さない個体の多くに使用し得るものであり、また、より強力で且つ選択的な非フェニルアラニン活性化剤（イミダゾール-およびヒスタミン-誘導体）は、ヒドロキシラーゼ機能不全を有する個体を助けることが可能である。

【0081】

本明細書中で説明および議論される態様は、当業者に教示することのみを意図しており、そして発明者が知る本発明を作出および使用するための最適な様式である。

【0082】

本明細書は、本発明の範囲を限定しない。上記の本発明の態様は、本発明から離れることなく、上記の教示を考慮して当業者によって解釈されるように修飾し又は変化させ、構成要素を付加もしくは省略し得る。従って、本願の特許請求の範囲の請求項に記載の発明の及びそれと均等な発明の範囲内で、具体的に記載された以外でも本発明を実施し得る。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1-1】図1は、コリン作用性およびGABA作用性インプットの関連する活性化並びにカルボニックアンヒドラーゼが誘導する阻害性から興奮性の応答への長期間のシナプス・スイッチングの関連する活性化を示す図である。

【0084】

錐体細胞層の単一パルス刺激（50 μ A、50 μ s）はIPSP（コントロール）を発生させ、これはバス キヌレン酸（bath kynurenic acid）（KYN；500 μ M、20min；図1a）により変更されない。しかしながら、IPSP（コントロール）は、ピククリン（BIC；1 μ M、30min；図1b）により排除（eliminated）される。フェニルアラニンの適用（100 μ M、dの縦矢印で開始）は単独で適用された時に若干IPSPを減少させるが（図1c）、しかし、多形細胞層および錐体細胞層の共刺激（図1dのアローヘッドで；材料および方法の条件）と関連させた時にはGABA作用性応答の持続性のシナプス逆転（synaptic reversal）を誘導する（Pha1a+Co-stim；図1dおよび図1e）。しかしながら、同じ共刺激はシナプス・スイッチ（Co-stim；図1dおよび図1f）を作動せず、またシナプス・スイッチにおけるフェニルアラニン-共刺激の効果が、アセタゾールアミドの適用（10 μ M、同様に図1dの縦矢印で開始）に

10

20

30

40

50

よって排除された (ACET+PhAla-Co-stim; 図1dおよび図1g)。アローヘッドは、錐体細胞層の単一パルス刺激が配送された時間を示している。dにおいて、データポイントを平均±平均の標準誤差として記載し、明瞭に記載するために1分おきの数値のみを記載している。

【図1-2】図1は、コリン作用性およびGABA作用性インプットの関連する活性化並びにカルボニックアンヒドラーゼが誘導する阻害性から興奮性の応答への長期間のシナプス・スイッチングの関連する活性化を示す図である。

【0085】

錐体細胞層の単一パルス刺激 (50 μ A, 50 μ s) はIPSP (コントロール) を発生させ、これはバス キヌレン酸 (bath kynurenic acid) (KYN; 500 μ M, 20min; 図1a) により変更されない。しかしながら、IPSP (コントロール) は、ピククリン (BIC; 1 μ M, 30min; 図1b) により排除 (eliminated) される。フェニルアラニンの適用 (100 μ M, dの縦矢印で開始) は単独で適用された時に若干IPSPを減少させるが (図1c)、しかし、多形細胞層および錐体細胞層の共刺激 (図1dのアローヘッドで; 材料および方法の条件) と関連させた時にはGABA作用性応答の持続性のシナプス逆転 (synaptic reversal) を誘導する (PhAla+Co-stim; 図1dおよび図1e)。しかしながら、同じ共刺激はシナプス・スイッチ (Co-stim; 図1dおよび図1f) を作動せず、またシナプス・スイッチにおけるフェニルアラニン-共刺激の効果が、アセタゾールアミドの適用 (10 μ M, 同様に図1dの縦矢印で開始) によって排除された (ACET+PhAla-Co-stim; 図1dおよび図1g)。アローヘッドは、錐体細胞層の単一パルス刺激が配送された時間を示している。dにおいて、データポイントを平均±平均の標準誤差として記載し、明瞭に記載するために1分おきの数値のみを記載している。

【図2】図2は、シナプス・スイッチが興奮性インプットフィルターを増幅部 (amplifier) にいかに転換するかを示す図である。

【0086】

錐体細胞層の単一パルス刺激は、IPSPを発生させる (図2a)。閾値を超えた強度でのSchの単一パルス刺激は、活動電位を発生させる (図2b)。錐体細胞層およびSchの共単一パルス刺激 (図2aおよび図2bと同様) はEPSPを排除し、如何なる活動電位も発生させない (図2c)。フェニルアラニンの存在下での錐体細胞層および多形細胞層の関連共刺激 (associated costimulation) (材料および方法の条件) の後、IPSPはEPSPへと逆転され、同じ静止期の膜電位で観察された (図2d)。Schの単一パルス刺激 (閾値未満の強度で) は、EPSPを発生させる (図2e)。錐体細胞層およびSchの共単一パルス刺激 (図2dおよび図2eと同様) は、活動電位を発生させる (図2f)。アローヘッドは、錐体細胞層の単一パルス刺激または共刺激が配送された時間を示している。校正バー単位 (calibration bar units) は、トレースおよび挿入図に関して同様である (図2aと同様) (図2bおよび図2fは除く)。

【図3-1】図3は、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤が足場隠し水迷路課題 (hidden platform water maze task) におけるラットの行動をいかに増強するかを示す図である。

【0087】

本図は、8試行 ($F_{7,105}=55.78, p<0.0001$) にわたる水迷路訓練 (図3a) における避難潜伏期 (平均±平均の標準誤差; 各群に関してn=10)、遊泳速度 (図3c) を示している。標的の比率は、標的クアドラントにおいて探索している時間/非標的クアドラントの平均として定義される (図3b)。

【図3-2】図3は、カルボニックアンヒドラーゼ活性化剤が足場隠し水迷路課題 (hidden platform water maze task) におけるラットの行動をいかに増強するかを示す図である。

【0088】

本図は、8つの訓練セッションの終了時に実施されるクアドラント優先度 (図3d-f) を示している。クアドラント4は、訓練中の標的クアドラントである。挿入図は、代表的な

10

20

30

40

50

ラットが記載のクアドラント番号で辿った経路である。

【図4】図4は、活性化剤化合物の存在下のカルボニックアンヒドラーゼの相対活性と、学習を反映する避難潜伏期との間の線形相関 (linear correlation) (図4a) 及び記憶を反映する標的クアドラント比率との間の線形相関 (図4b) を示す図である。

【参考文献】

【0089】

以下に記載される文献は、参照によって本明細書中に援用される。

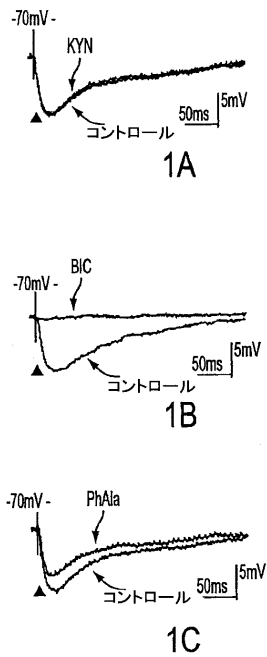
1. Alkon DL, Nelson TJ, Zhao WQ and Cavallaro S (1998) Time domains of neuronal Ca^{2+} signaling and associative memory: steps through a calcitonin, ryanodine receptor, K^+ channel cascade. *Trends Neurosci* 21:529–537. 10
2. Alkon DL, Sanchez-Andres JV, Ito E, Oka K, Yoshioka T and Collin C (1992) Long-term transformation of an inhibitory into an excitatory GABAergic synaptic response. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:11862–11866.
3. Banks M, White JA and Pearce RA (2000) Interactions between distinct GABA_A circuits in hippocampus. *Neuron* 25:449–457.
4. Bartus RT, Reginald L, Dean RL, Beer B and Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (Wash DC)* 217:408–414. 20
5. Buhl EH, Cobb SR, Halasy K and Somogyi P (1995) Properties of unitary IPSPs evoked by anatomically identified basket cells in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 7:1989–2004.
6. Burg M, Heinemann U and Schmitz D (1998) Neuroactive steroids induce GABA_A receptor-mediated depolarizing postsynaptic potentials in hippocampal CA1 pyramidal cells of rats. *Eur J Neurosci* 10:2880–2896.
7. Christie BR, Kerr DS and Abraham WC (1994) Evidence for common expression mechanisms underlying heterosynaptic and associative long-term depression in the dentate gyrus. *Hippocampus* 4:127–135. 30
8. Clare BW and Supuran CT (1994) Carbonic anhydrase activators. 3: Structure-activity correlations for a series of isozyme II activators. *J Pharmacol Sci* 83:768–773.
9. Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O and Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature (Lond)* 378:75–78.
10. Cole AE and Nicoll RA (1984) Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded *in vitro* from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 352:173–188. 40
11. Collin C, Devane WA, Dahl D, Lee C-J, Axelrod J and Alkon DL (1995) Long-term synaptic transmission of hippocampal CA1 γ -aminobutyric acid synapses and the effect of anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10167–10171.

12. Collingridge GL and Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 40:143–209.
13. Cooper JD and Sofroniew MV (1996) Increased vulnerability of septal cholinergic neurons to partial loss of target neurons in aged rats. *Neuroscience* 75:29–35.
14. Dickinson-Anson H, Aubert I, Gage FH and Fisher LJ (1998) Hippocampal grafts of acetylcholine-producing cells are sufficient to improve behavioral performance following a unilateral fimbria-fornix lesion. *Neuroscience* 84:771–781.
15. Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T and Voipio J (1997) Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K^+ transient. *J Neurosci* 17:7662–7672. 10
16. Kornhauser JM and Greenberg ME (1997) A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* 18:839–842.
17. Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y and Khazi-pov R (1999) GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol* 79:189–201. 20
18. Lindskog, “Structure and Function of Carbonic Anhydrase, “Pharmacol. Ther. Vol.74 (1), P1-20, 1997.
19. Liu S-QJ and Cull-Candy SG (2000) Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature (Lond)* 405:454–458.
20. Meier-Ruge W, Iwangoff P and Reichlmeier K (1984) Neurochemical enzyme changes in Alzheimer’s and Pick’s disease. *Arch Gerontol Geriatr* 3:161–165.
21. Ohno M, Kobayashi M, Kishi A and Watanabe S (1997) Working memory failure by combined blockade of muscarinic and β -adrenergic transmission in the rat hippocampus. *Neuroreport* 8:1571–1575. 30
22. Parkes JL and Coleman PS (1989) Enhancement of carbonic anhydrase activity by erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* 275:459–468.
23. Pasternack M, Voipio J and Kaila K (1993) Intracellular carbonic anhydrase activity and its role in GABA-induced acidosis in isolated rat hippocampal pyramidal neurons. *Acta Physiol Scand* 148:229–231.
24. Paulsen O and Moser EI (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273–278. 40

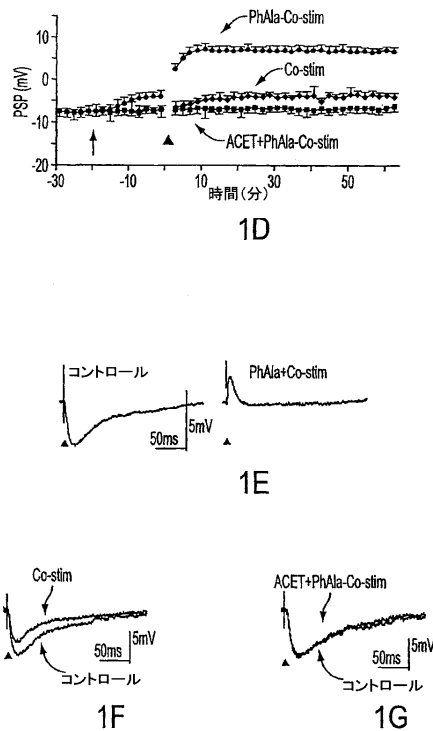
25. Perry E, Walker M, Grace J and Perry R (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22:273–280.
26. Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S and Ahissar E (2000) A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature (Lond)* 403:549–553.
27. Sone M, Sei H, Morita Y, Ogura T and Sone S (1998) The effects of acetazolamide on arterial pressure variability during REM sleep in the rat. *Physiol Behav* 63:213–218.
28. Staley KJ, Soldo BL and Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science (Wash DC)* 269:977–981. 10
29. Steckler T, Sahgal A, Aggleton JP and Drinkenburg WH (1998) Recognition memory in rats. III. Neurochemical substrates. *Prog Neurobiol* 54:333–348.
30. Sun MK, Alkon DL., "Pharmacological Enhancement of Synaptic Efficacy, Spatial Learning, and Memory Through Carbonic anhydrase Activation in Rats," JPET 297:961-967 (2001).
31. Sun M-K, Zhao W-Q, Neslon TJ and Alkon DL (2001b) Theta rhythm of CA1 hippocampal neuron activity: gated by GABAergic synaptic depolarization. *J Neurophysiology* 85:269–279. 20
32. Sun, M.K., Dennis Dahl and Daniel L. Alkon, "Heterosynaptic Transformation of GABAergic Gating in the Hippocampus and Effects of Carbonic Anhydrase Inhibition," JPET 2001;297(3): 811-817, March 2001
33. Sun, M.K., Thomas J. Nelson, and Daniel L. Alkon, "Functional switching of GABAergic synapses by ryanodine receptor activation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 97, pp. 12300-12305 (October 24, 2000).
34. Sun, M.K., Thomas J. Nelson, Hui Xu, and Daniel L. Alkon, "Calcitonin transformation of GABAergic synapses: From excitation filter to amplifier," Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 96, pp. 7023-7028 (June 8, 1999). 30
35. Taira T, Lamsa K and Kaila K (1997) Posttetanic excitation mediated by GABA_A receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77:2213–2218.
36. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G and Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature (Lond)* 401:63–69.
37. Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ and Fisher LJ (1995) Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature (Lond)* 375:484–487. 40

- 38. Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science (Wash DC)* 201:160–163.
- 39. Wong RK and Watkins DJ (1982) Cellular factors influencing GABA response in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol* 48:938–951.
- 40. Wu M, Shanabrough M, Leranath C and Alreja M (2000) Cholinergic excitation of septohippocampal GABA but not cholinergic neurons: implications for learning and memory. *J Neurosci* 20:3900–3908.
- 41. Xiang Z, Huguenard JR and Prince DA (1998) Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science (Wash DC)* 281:985–988.

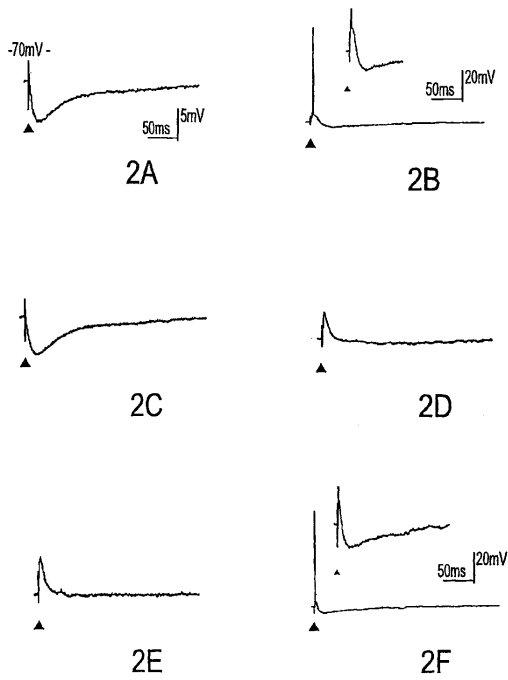
【 図 1 - 1 】



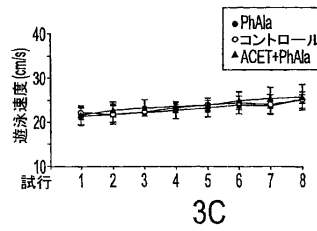
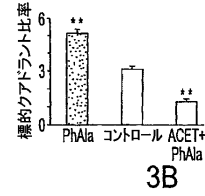
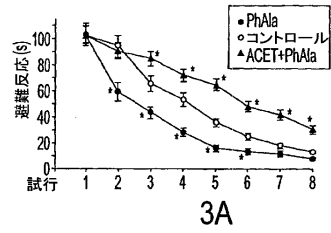
【 図 1 - 2 】



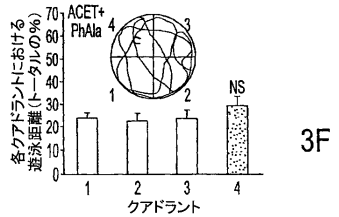
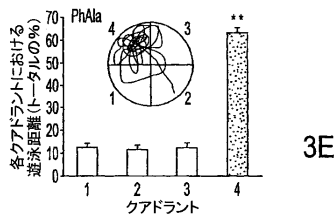
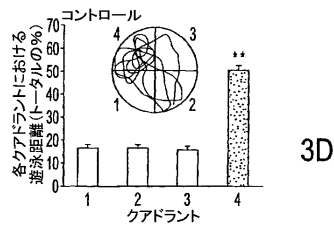
【 図 2 】



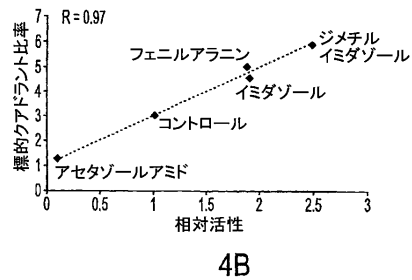
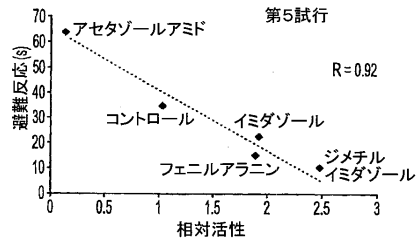
【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
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 2 3

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(72)発明者 アルコン、ダニエル

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 7、ベセスダ、ボナベンチャー・コート 6 7 0 1

(72)発明者 サン、ミャオ・クン

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 7 8、ベセスダ、ハワード・ランディング・ドライブ
1 6 0 1 2

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 特表昭61-501564(JP,A)

国際公開第98/011923(WO,A1)

米国特許第05075338(US,A)

別冊・医学のあゆみ ヒスタミン研究の最近の進歩, 2000年 7月 5日, pp.77-83

J. Nutr., 2000年, 130, pp.1633-1640

Biol. Pharm. Bull., 1993年, 16(2), pp.128-132

Psychopharmacology, 1994年, 114, pp.651-656

Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica, 1976年, 2(2), pp.49-57

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)