

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6000985号  
(P6000985)

(45) 発行日 平成28年10月5日(2016.10.5)

(24) 登録日 平成28年9月9日(2016.9.9)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 31/145	(2006.01)	A 6 1 K	31/145
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 K 31/198	(2006.01)	A 6 1 K	31/198
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1

請求項の数 14 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2013-554768 (P2013-554768)	(73) 特許権者	508063989 ユニバルシテ ラバル
(86) (22) 出願日	平成24年2月23日 (2012.2.23)		カナダ国 ジー1ヴィ Oエイ6 ケベック、リュ デ ビプリオテークス、232 O、パヴィリオン デ サイエンス ド レデュカシオン、ヴィスーレクトラ フォー リサーチ アンド イノベーション
(65) 公表番号	特表2014-508758 (P2014-508758A)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(43) 公表日	平成26年4月10日 (2014.4.10)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/050106	(72) 発明者	チケッティ、フランチェスカ
(87) 国際公開番号	W02012/113079		カナダ国 ジー2シー Oシー6 ケベック、ケベック、リュ デ バッフアロー、7309
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012.8.30)		最終頁に続く
審査請求日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		
(31) 優先権主張番号	2,732,440		
(32) 優先日	平成23年2月23日 (2011.2.23)		
(33) 優先権主張国	カナダ (CA)		
(31) 優先権主張番号	61/445,577		
(32) 優先日	平成23年2月23日 (2011.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病を治療するためのシスタミン類似体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

損傷した神経細胞を回復又は再生させることによって、患者におけるパーキンソン病の進行を改善するための医薬であって、

治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩を含み、

患者がHoehn及びYahrの評価に従ったステージII、III又はIVのパーキンソン病患者であり、

少なくともひとつのシスタミン類似物がシステアミン、シスタミン又はその薬剂的に許容される塩である、

上記の医薬。

【請求項2】

患者がHoehn及びYahrの評価に従ったステージII、III又はIVのパーキンソン病患者である、請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

パーキンソン病患者がHoehn及びYahrの評価に従ったステージIIの患者である、請求項1に記載の医薬。

【請求項4】

パーキンソン病患者がHoehn及びYahrの評価に従ったステージIIIの患者である、請求項1に記載の医薬。

## 【請求項 5】

パーキンソン病患者がHoehn及びYahrの評価に従ったステージIVの患者である、請求項1に記載の医薬。

## 【請求項 6】

少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩の治療上有効な量が体重あたり1日に約0.1ないし約750mg/kgの範囲、約0.5ないし約60mg/kgの範囲又は約1ないし約20mg/kgの範囲である、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬。

## 【請求項 7】

少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩の治療上有効な量が、一単位剤形あたり5ないし2000mgの有効成分を含む単位剤形、10ないし1500mgの有効成分を含む単位剤形、20ないし1000mgの有効成分を含む単位剤形又は50ないし700mgの有効成分を含む単位剤形によって投与されるように適合される、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬。

10

## 【請求項 8】

さらにシステインを含む請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬。

## 【請求項 9】

シスタミン類似体及びシステインそれぞれが10:1ないし1:10の比で存在する、請求項8に記載の医薬。

## 【請求項 10】

シスタミン類似体及びシステインが1:1の比で存在する、請求項9に記載の医薬。

20

## 【請求項 11】

シスタミン類似体及びシステインが連続的に使用されるように適合される、請求項8～10のいずれか一項に記載の医薬。

## 【請求項 12】

シスタミン類似体及びシステインが同時に使用されるように適合される、請求項8～10のいずれか一項に記載の医薬。

## 【請求項 13】

シスタミン類似体がシスタミン又は薬剂的に許容されるその塩である、請求項1～12のいずれか一項に記載の医薬。

30

## 【請求項 14】

シスタミン類似体がシステアミン又は薬剂的に許容されるその塩である、請求項1～12のいずれか一項に記載の医薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

今日、パーキンソン病(PD)の治療の大半は対症療法的なものであり、疾病の進行の元となる神経細胞の変性を阻止するものではない。パーキンソン病及びハンチントン病におけるシスタミンの特性が、様々な動物モデルによって研究されてきた。ハンチントン病(HD)の動物モデルにおいて、シスタミンは、ハンチントン病遺伝子を保有するマウスの寿命の延長や運動系の症状の軽減といった神経保護効果を示している(Dedeoglu et al. 2002; Karpuj et al. 2002)。ハンチントン病タンパク質の変異型のような、タンパク質の凝集に關与する酵素であるトランスグルタミナーゼに対するシスタミンの阻害能が、*in vitro*及び*in vivo*で証明されている(Green 1993; Jeitner et al. 2005; Wang et al. 2005)。脳内における脳由来神経栄養因子(BDNF)の濃度の上昇もまた、このような神経細胞の保護効果の鍵となる要素の一つとして特定されてきた(Borrelli - Pages et al. 2006)。飲用水を通して投与された高用量のシスタミンは、ミトコンドリア機能に対する1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)の酸化ストレス及び有害効果を軽減する(Stack 40

40

50

et al. 2008)。シスタミン及び/又はシステアミンの効果は、パーキンソン病のMPTPマウスモデルにおいて報告されている(Sun et al. 2010, Tremblay et al. 2006; Stack et al. 2008; Gibrat et al. 2010)。

#### 【0002】

シスタミンの代謝により、システアミンのみならず、ヒポタウリン及びタウリンも含む幾つかの中間体が産生される。シスタミン及びシステアミンはどちらも有機化合物であり、最初は放射線防護物質として記述された(Bacq and Beaumariage 1965)。システアミンはシステインの脱炭酸型であるが、代謝過程、特にクレブス回路でのATPの生成(Leonardi et al. 2005)に關与するコエンザイムAの分解を通じた、全ての組織による恒常的な産生が主な供給源である(Pitarri et al. 1992)。システインはほとんどのタンパク質の共通成分であるが(Lee et al. 2004)、そのチオールが酸化されやすく、ジスルフィド誘導体であるシスチンが誘導されるため、通常は血漿中のシステインの基礎濃度は低い。

10

#### 【0003】

シスタミンの還元型であるシステアミン(2-アミノエタンチオール)は、シスチンの細胞内への蓄積による腎不全を引き起こす幼児期の疾患である、シスチン蓄積症の治療用に承認された(Dohil et al. 2009)。システアミンはハンチントン病のマウスモデルにおいて著しい有効性を示し(Borrelli-Pages et al. 2006)、かつその安全性が実証されていることから、その分子はこの疾患を患う患者のために開発が進められている(Dubinsky and Gray 2006)。

20

#### 【0004】

最近、システアミン酒石酸水素塩(CYSTAGON(登録商標))による予備試験が、安全な治療用の用量を確立するため、ハンチントン病患者に対して行われた(Dubinsky and Gray, 2006)。ハンチントン病患者9名が、単一施設における非盲検の第I相臨床試験に登録された。被験者は、1日あたり10mg/kg、かつ1週間ごとにさらに10mg/kgずつ増加させたシステアミンによる治療を、最大用量70mg/kgまで、又は許容不可能な副作用(悪心及び運動障害)が出現するまで受けた。この臨床試験により、ハンチントン病患者には1日あたり20mg/kg用量のシステアミンが許容されると結論付けられた(Dubinsky and Gray, 2006)。しかし、臨床的な有効性は示されなかった。このことが全てヒトに取り入れられるものではないとしても、ハンチントン病の動物モデルによって行われた研究により、有意な治療上の効果を達成するにはかなり高い用量のシスタミン又はシステアミンを要することが示された。さらに、システアミンは血液脳関門(BBB)を通過できるが、脳におけるシステアミン又はその代謝産物の変動を検出するためにはより高用量のシスタミン又はシステアミン(i.p.又はp.o.)が必要となる(Bousquet et al., 2010)。パーキンソン病の進行を改善するシスタミン及びシステアミンの有効性、及びそれらの脳への輸送特性については不明である。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

40

#### 【0005】

現存するパーキンソン病の治療法は主に症状への対応のために意図されており、これまでに疾病の進行を軽減させるための治療は得られていない。従って、パーキンソン病の進行率を改善できる治療薬の開発が必要とされている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明者らは、パーキンソン病の進行を改善するためにシスタミン類似体を使用できることを初めて示した。

#### 【0007】

本発明はパーキンソン病の進行を改善するための方法を提供するものであり、その方法

50

は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体、薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物を、必要としている患者に対して投与することを含んでいる。

【0008】

本発明は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体、薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物を、必要としている患者に対してパーキンソン病の進行を改善するために使用することを提供するものである。

【0009】

本発明は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を、神経救出剤及び/又は神経修復剤として、患者に対してパーキンソン病の進行を改善するために使用することを提供するものである。

10

【0010】

本発明は、少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつシステイン又は薬剂的に許容されるその塩を含む、パーキンソン病の進行を改善するための配合物又は医薬組成物を提供するものである。

【0011】

本発明は、神経救出剤及び/又は神経修復剤として少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつシステイン又は薬剂的に許容されるその塩を含む、パーキンソン病の進行を改善するための配合物又は医薬組成物を提供するものである。

20

【0012】

さらに別の態様によれば、本明細書に記載する薬剤を製造するための、シスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】黒質チロシン水酸化酵素陽性神経細胞におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。a) 黒質緻密部(SNpc)におけるチロシン水酸化酵素(TH)陽性神経細胞の立体的細胞計数により、生理食塩水で処置したMPTPマウスにおけるTH陽性神経細胞の総数が、生理食塩水+生理食塩水で処置した動物に比較して有意に減少することが明らかとなった( $p < 0.001$ )。a) MPTP及びシスタミンによる前及び後処置マウスでは、生理食塩水処置動物と同等数のTH陽性神経細胞が示された。b) SNpcの顕微鏡写真は、生理食塩水、ならびにMPTP及びシスタミンによる後処置マウスにおけるクレシル染色されたTH陽性神経細胞の数が、MPTP及び生理食塩水による処置マウスに比較して増加している(生理食塩水に対して同程度である)ことを示す。c)の表に、クレシル及びTH陽性神経細胞の立体的細胞計数を要約する。下部のパネルに、前及び後処置のスケジュールを時系列で示す。値は平均 $\pm$ S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水+生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.001$ 。MPTP+生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ ； $\#\#\# = p < 0.001$ 。b)のスケールバー=400 $\mu$ m、挿入図=25 $\mu$ m。略語：Pre-Tx(MPTP及びシスタミンによる前処置)；Post-Tx(MPTP及びシスタミンによる後処置)。

30

40

【図2】黒質におけるNurr1 mRNAの発現におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。a) SNpcにおけるNurr1 mRNAレベル(ドーパミン(DA)表現型の発現及び維持に関与する遺伝子)のデンシトメトリーを用いた測定により、3つの対照群(生理食塩水+生理食塩水；生理食塩水+シスタミン Pre-Tx、生理食塩水+シスタミン Post-Tx)及びシスタミンにより処置したMPTP動物は同様の結果を示したが、生理食塩水により処置したMPTP動物のNurr1 mRNAレベルは有意に減少することが明らかとなった( $p < 0.01$ )。b) SNpcにおけるレベルを示す顕微鏡写真(矢印を参照)は、対照ならびにMPTP及びシスタミンによる後処置

50

マウスの *Nurr1* mRNA レベルが、MPTP 及び生理食塩水により処置されたマウス b) に比較して正常レベルにあることを示す。値は平均  $\pm$  S.E.M. として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水 + 生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.01$ 。MPTP + 生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ 。b) のスケールバー = 1 mm。

【図3】黒質 DAT 陽性細胞におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。DAT 輸送体 (DAT) mRNA の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーションにおいても明らかにした。a) SNpc における DAT 発現細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置した MPTP マウスにおける神経細胞の総数が、生理食塩水 + 生理食塩水で処置した動物と比較して有意に減少することが示された ( $p < 0.001$ )。a) MPTP 及びシスタミンによる前及び後処置マウスでは、生理食塩水処置動物と同程度の DAT 陽性細胞が示された。b) SNpc の顕微鏡写真は DAT mRNA 発現細胞を示す。挿入図は、感光乳剤前の、DAT mRNA のオートラジオグラフィを表す (デンシトメトリーにより測定)。c) の表に、立体的細胞計数、及び SNpc における DAT mRNA 発現のデンシトメトリーによる測定を要約する。値は平均  $\pm$  S.E.M. として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水 + 生理食塩水群との有意差： $* = p < 0.05$ ； $*** = p < 0.001$ 。MPTP + 生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ 。b) のスケールバー = 400  $\mu$ m、挿入図 = 500  $\mu$ m。

【図4】亜急性 MPTP モデルにおける、黒質 TH 陽性細胞の減少の時間経過を示した図である。a) SNpc における TH 陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、最終の MPTP 注射後 7 及び 14 日の TH 陽性神経細胞の総数が、生理食塩水 ( $p < 0.01$ ) 及び MPTP 処置後 1 日の群と比較して有意に減少することが明らかとなった ( $p < 0.001$ )、MPTP 処置後 1 日の群に対しては神経細胞数の減少傾向のみが示された ( $p = 0.063$ )。b) SNpc の顕微鏡写真は、MPTP 処置後 7 及び 14 日の群における、クレシル染色された TH 陽性神経細胞数の減少を表す。c) の表に、クレシル及び TH 陽性神経細胞の立体的細胞計数を要約する。値は平均  $\pm$  S.E.M. として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.01$ 。b) のスケールバー = 400  $\mu$ m。

【図5】亜急性 MPTP モデルにおける、*Nurr1* 及び DAT mRNA 発現の減少の時間経過を示した図である。デンシトメトリーを用いた a) *Nurr1* 及び b) DAT mRNA 発現の測定により、両 DAT マーカーの SNpc におけるレベルが、MPTP による処置後 24 時間から有意に減少を始めていることが示された (それぞれ  $p < 0.01$  及び  $p < 0.05$ )。値は平均  $\pm$  S.E.M. として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。対照群との有意差： $** = p < 0.01$ 、 $* = p < 0.05$ 。

【図6】亜急性 MPTP モデルにおける、黒質 DA のアポトーシス過程の時間経過を示した図である。腹側中脳における a) BAX 及び b) Bcl-2 タンパク質レベルのウェスタンブロット分析。c) BAX/Bcl-2 の比は、最終の MPTP 注射後 24 時間に有意に増大したことから ( $p < 0.05$ )、MPTP 送達のためのこの特定の投与計画では、この時点でアポトーシス過程は既に開始されていたことが示唆される。値は平均  $\pm$  S.E.M. として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。対照群との有意差： $* = p < 0.05$ 。

【図7】脳のシステアミンのレベルの増大を示した図である。大脳のシステアミン b) 及びシステイン c) のレベルを、蛍光検出を組み合わせた HPLC によって測定した。システアミン (2) ならびにシステイン (1) の標準溶液の分子構造及び HPLC 溶出特性を A に示す。マウスに 50 mg/kg のシスタミンを単回で i.p. 注射して 1 時間後に屠殺すると、システアミンはこれに应答し、同時点で屠殺したピヒクルマウスと比較して有意に増大した ( $p < 0.05$ ) B。200 mg/kg の用量によってもまた、シスタミン注射後 1 時間及び 3 時間にシステアミンの有意な増大が引き起こされる ( $p < 0.01$ ) B。大脳におけるシステインのレベルは、用量及び灌流時間に関わらず安定で

10

20

30

40

50

あるC。 データは平均 (nmol / mg タンパク質)  $\pm$  S . E . M . として表す。 \*  $p < 0 . 05$  ; \*\*  $p < 0 . 01$ 。

【図8】脳のヒポタウリン及びタウリンのレベルが一定であることを示した図である。 大脳のヒポタウリン (2) 及びタウリン (1) の濃度を、UV検出を組み合わせたHPLCによって測定した。 1 ng / mLのタウリン (1) 又はヒポタウリン (2) を含む標準溶液の分子構造及びHPLC溶出特性をAに示す。 脳において、ヒポタウリン (2) 及びタウリン (1) は安定した量で観察された。 データは平均 (nmol / mg タンパク質)  $\pm$  S . E . M . として表す。

【図9】システイン存在下での、システアミンの脳への取り込みの増大を示した図である。 *in situ*での大脳灌流技術を用いたシステアミン及びシステインの脳への取り込み、及びHPLC法による定量化を示す。 Aは、*in situ*大脳灌流法の模式図である。適切な連結 (青色の導管) 後に100%の灌流液が右半球に到達するように、カテーテルは直接右内頸動脈に挿入するA。各分子のクリアランス係数 ( $\mu\text{L} / \text{g} / \text{s}$ ) が示すように、システイン (1) 及びシステアミン (2) の両方はBBBを通過できる。共灌流の際、システイン及びシステアミンクリアランス係数は有意に増大する。 データは平均  $\pm$  S . E . M . として表す ( $\mu\text{L} / \text{g} / \text{s}$ )。 \*  $p < 0 . 05$ 。

【図10】シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいてドーパミン作動性神経細胞を救出することを示した図である。 パネル (E) に実験の時間経過を示す。全てのマウスに対し、一側性線条体内への6-OHDA (4  $\mu\text{g}$ ) 又は同量のビヒクル (偽物質) の注射を行った。3日後、DA作動性の変性過程の進行中に、マウスを毎日10 mg / kgのシスタミン (又は生理食塩水) によって14日間処置した。最終のシスタミン注射後に、マウスに経心腔的灌流を24時間行い、死後の分析のために脳を処理した。 (A) SNpcにおけるTH陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数が、偽物質 + 生理食塩水で処置した動物に比較して有意に72%減少することが明らかとなった ( $p < 0 . 001$ )。シスタミンで処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数は、偽物質 + シスタミンで処置した動物に比較して27%のみ減少することが示される ( $p < 0 . 05$ )。6-OHDA + 生理食塩水群は、6-OHDA + シスタミン群とは有意に異なっていた ( $p < 0 . 001$ )。 (B) 及び (C) それぞれ、デンシトメトリーを用いたSNpcにおけるNurr1及びDAT mRNAレベルの測定。完全なDA作動性を示すこれら2つのさらなるマーカーでは、(A)におけるTHの染色で見られたものと同様のパターンが明らかとなり、シスタミンの神経救出特性が確認された。 (D) HPLCによって行った線条体DAの含有量の測定は、対照マウスに比較して、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスにおいてのみDAのレベルが有意に減少していることを示した ( $p < 0 . 01$ )。 値は平均  $\pm$  S . E . M . として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。 \* =  $p < 0 . 05$  ; \*\* =  $p < 0 . 01$  ; \*\*\* =  $p < 0 . 001$ 。

【図11】マウスにおける6-OHDAを用いた線条体の損傷による行動障害を、シスタミンが逆転させることを示した図である。 パネル (D) に実験の時間経過を示す。全てのマウスに対し、一側性線条体内への6-OHDA (4  $\mu\text{g}$ ) 又は同量のビヒクル (偽物質) の注射を行った。3週間後、損傷が安定して変性が最大に達した際に、マウスを毎日10 mg / kgのシスタミン (又は生理食塩水) によって6週間処置した。実験の間を通し、3つの異なる時点、すなわちシスタミン処置開始前 (手術後3週)、損傷発生後6週及び9週に、3つの異なる行動試験によってマウスを評価した。行動試験は、一側性のDA作動性の損傷範囲を示す、感覚運動の非対称性を評価するために選択した。 (A) 蓄積したアポモルヒネにより誘導される対側性回転を、ロータメーター装置によって測定した。6-OHDAによる一側性の損傷によって誘導された損傷後3、6及び9週の対側性回転の増加は、手術後6及び9週間のシスタミン処置によって有意に減少した ( $p < 0 . 05$ )。 (B) ステップ試験により、歩みを調節するパーセンテージが、対側の前足において減少 (同側に比較して) することが明らかとなった。 (C) 円筒試験では肢の非対称的な使用もまた示され、ここでは6-OHDA損傷マウスが、偽物質により処置した

10

20

30

40

50

マウスに比較して、手術後3週、6週及び9週に対側性接触の有意な減少を示した。この非対称性は、6-OHDA損傷マウスを、損傷後6及び9週にシスタミンで処置した場合には観察されなかった。値は平均±S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ 。

【図12】シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいて、ドーパミン作動性の黒質系の幾つかの状況を回復させ、かつ線条体のカテコールアミン作動性の量及び動態を変化させることを示した図である。パネル(D)に実験の時間経過を示す。図11に示すように、全てのマウスに対して一側性線条体内への6-OHDA(4µg)又は同量のピヒクル(偽物質)の注射を行い、かつ3週間後に開始したシスタミン(又は生理食塩水)による処置を6週間行った。最終のシスタミン注射後に、マウスに経心腔的灌流を24時間行い、死後の分析のために脳を処理した。(A)SNpcにおけるTH陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数が、偽物質+生理食塩水で処置した動物に比較して有意に93%減少することが明らかとなった( $p < 0.001$ )。シスタミンで処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数は、偽物質+シスタミンで処置した動物に比較して65%のみ減少することが示される( $p < 0.001$ )。6-OHDA+生理食塩水群は、6-OHDA+シスタミン群とは有意に異なる( $p < 0.01$ )。(B)HPLCによって測定した、6-OHDA損傷マウスにおけるDAレベルは、生理食塩水及びシスタミンで処理した動物について、それぞれ88%及び84%減少した( $p < 0.001$ )。シスタミンは、破壊された線条体のDA量を有意に回復させなかった。(C)しかしながらシスタミンは、行動による損傷評価試験と有意に関連する(データ未提示)生理食塩水によって処置した6-OHDAマウスと比較して、DAの代謝回転を正常化する強い傾向を発揮した。値は平均±S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ 。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0014】

#### 使用及び方法

一実施形態によれば、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるその塩は神経救出及び/又は神経回復剤として使用できる。この神経救出/神経回復活性は、神経保護剤の活性とは区別できる。

##### 【0015】

本明細書で用いられる「神経保護剤」により、変性過程で残された「健常」神経細胞を保護できる。従って、神経保護剤は診断時に投与され得ることが理解される。

##### 【0016】

本明細書で用いられる「神経救出剤」により、損傷したが死んではいない神経細胞の神経変性過程を、機能的回復を有するか又は有さない状態で停止できる。従って、神経救出剤は可能な限り早期に投与する必要があるが、PDの診断後であっても投与できることが理解される。

##### 【0017】

本明細書で用いられる「神経回復剤」により、損傷した神経細胞の機能的及び/又は構造的回復ならびに再生によって機能を再確立できる。従って、神経回復剤は診断後に最大の有効性を示し得ることから、PDに対する臨床での使用に大きく関連することが理解される。

##### 【0018】

さらなる実施形態によれば、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるその塩は、パーキンソン病の進行を改善するために使用できる。

##### 【0019】

一実施形態によれば、「パーキンソン病の進行を改善する」ことはa)損傷したが死ん

10

20

30

40

50

ではない神経細胞における抗アポトーシス作用による、機能的回復を有するか又は有さない状態での神経変性過程の減少；及び/又はb)機能的及び/又は構造的回復ならびに再生により特徴付けられる。

【0020】

さらなる実施形態によれば、「パーキンソン病の進行を改善する」ことは以下の機構の一つによって特徴付けられる：

- a) 損傷したが死んでいない神経細胞における抗アポトーシス作用による、機能的回復を有するか又は有さない状態での神経変性過程の減少；及び/又は
- b) 損傷した神経細胞の機能的及び/又は構造的回復ならびに再生、及び/又は
- c) 神経発生の促進。

10

【0021】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病の進行は総パーキンソン病統一スケール(総UPDRS)スコアによって定量化され、総UPDRSスコアの増加はパーキンソン病の症状の進行を表し、かつ期間を通しての総UPDRSスコアの増加はパーキンソン病の進行率を表す。例えば、Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R et al. (2008) Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 23: 2129-2170を参照されたい。

20

この方法のさらに別の実施形態によれば、該期間はシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩の投与開始後12、24、又は36週である。

【0022】

本明細書で用いられるパーキンソン病患者のステージは、Hoehn及びYahrによって記載された、症状に従った以下の5段階の異なるステージである(Hoehn MM, Yahr MD, Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967, 17: 427-42)

30

ステージI：(軽度又は早期の疾病)：症状は身体の片側のみに影響する。

ステージII：身体の両側が影響されるが、姿勢は正常を保つ。

ステージIII：(中程度の疾病)：身体の両側が影響され、かつ起立及び歩行の間に軽度の不均衡がみられるが、患者はなお自立している。

ステージIV：(進行した疾病)：身体の両側が影響され、かつ起立及び歩行の間に無力な不安定性が見られる。このステージの患者は相当な援助を必要とする。

ステージV：重篤かつ完全に進行した疾病。患者はベッド又は椅子で過ごすように制限される。

【0023】

本明細書で用いられる、「早期ステージのパーキンソン病患者」は、Hoehn及びYahrによって定義されたパーキンソン病のステージI又はIIにあり、かつ対症的な抗パーキンソン病療法を必要としないパーキンソン病患者である。一実施形態によれば、このようなパーキンソン病患者は対症的な治療を少なくとも次の9か月間必要としない。早期ステージのパーキンソン病患者は、関連する試験の実施などにより同定され得る。

40

【0024】

一実施形態によれば、患者は早期ステージのパーキンソン病患者である。

【0025】

さらに別の実施形態によれば、早期ステージのパーキンソン病患者は、Hoehn及びYahrの評価に従ったステージIの患者である。

【0026】

50

さらに別の実施形態によれば、早期ステージのパーキンソン病患者は、30未満、25未満、23未満、21未満、又は20未満のUPDRS総スコアを有する患者である。

【0027】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoehn及びYahrの評価に従ったステージI、II、III、IV又はVの患者である。

【0028】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoehn及びYahrの評価に従ったステージIII、IV又はVの患者である。

【0029】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoehn及びYahrの評価に従ったステージIII又はIVの患者である。

10

【0030】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoehn及びYahrの評価に従ったステージIIIの患者である。

【0031】

本発明は、

パーキンソン病患者の疲労を減少させるための；

パーキンソン病患者の非運動系症状の重症度を低下させるための；

パーキンソン病患者の機能低下を減少させるための；

疾病の臨床的進行を低減させるための；もしくは

20

疾病の臨床的進行を遅延させるための使用又は方法に関する。

【0032】

対象の発明はさらにパーキンソン病を呈する患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0033】

本発明は、患者におけるパーキンソン病の進行を遅延させるか又は低減するための方法に関し、該方法は、患者に治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物を投与することを含む。

30

【0034】

本発明は、患者におけるパーキンソン病の進行を遅延させるか又は低減するための、治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物の使用に関する。

【0035】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【0036】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための方法を提供し、該方法は、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を患者に投与することを含む。

40

【0037】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【0038】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための方法を提供し、該方法は、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許

50

容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を患者に投与することを含む。

【0039】

対象の発明はさらに、ステージI、II、III、IV又はV（Hoehn及びYahrの評価に従う）のパーキンソン病患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0040】

対象の発明はさらに、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者の治療のために使用する、シタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

10

【0041】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者におけるパーキンソン病の進行率低下のために使用する、薬剤的に有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を含む医薬組成物を提供する。

【0042】

対象の発明はさらに、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者を治療するための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【0043】

20

対象の発明はさらにパーキンソン病の初期兆候を呈する患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0044】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるために使用する、シタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を提供する。

【0045】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

30

【0046】

対象の発明はさらに初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための方法を提供し、該方法は、患者を初期ステージのパーキンソン病患者であると同定すること、及びそのように同定された患者に、疲労を減少させるために有効な量のシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩を定期的に投与することを含む。

【0047】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための方法を提供し、該方法は、患者を初期ステージのパーキンソン病患者であると同定すること、及びそのように同定された患者に、非運動系症状の重症度を低下させるために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

40

【0048】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための方法を提供し、該方法は、初期ステージのパーキンソン病患者に、疲労を減少させるために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0049】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における非運動系症状の重症

50

度を低下させるための方法を提供し、該方法は、初期ステージのパーキンソン病患者に、非運動系症状の重症度を低下させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0050】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病患者に、該患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0051】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者におけるパーキンソン病の進行率低下のために使用する、シスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

10

【0052】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における機能低下を減少させるために使用する、シスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

【0053】

医薬組成物及びシスタミン類似体

一態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン、シスタミン、タウリン若しくはヒポタウリン、又は薬剤的に許容されるそれらの塩である。

20

【0054】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシスタミン若しくはシステアミン、又は薬剤的に許容されるそれらの塩である。

【0055】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン酒石酸水素塩である。

【0056】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン塩酸塩である。

【0057】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシスタミン二塩酸塩である。

【0058】

別の態様によれば、少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、及び少なくともひとつの薬剤的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

30

【0059】

別の態様によれば、シスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩及び1以上の追加の薬剤、例えばプロモクリプチン、ベンゾトロピン、レボドパ、ロビニロール、プラミペキソール、ロチゴチン、カベルゴリン、エンタカポン、トルカポン、アマンタジン、セレギリン及びラサギリンを含む配合物が提供される。

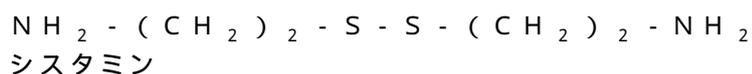
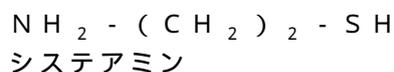
【0060】

さらに別の態様によれば、患者におけるパーキンソン病の進行を改善する薬剤を製造するための、シスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物の使用が提供される。

40

【0061】

さらなる実施形態によれば、本発明の化合物は以下の式：

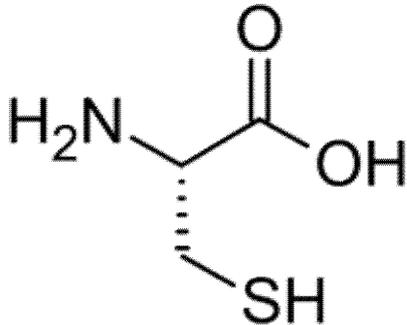


50

$\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{S}(\text{O}_2) - \text{OH}$   
 タウリン

$\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \text{S}(\text{O}) - \text{OH}$   
 ヒポタウリン

【化1】



L-システイン

10

により表されるか、又は薬剂的に許容されるそれらの塩である。

20

【0062】

シスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩は、当該技術分野において公知の方法によって得ることができる。化合物は様々な供給源、例えばSigma-Aldrich、米国ミズーリ州セントルイスから市販されている。

【0063】

一実施形態によれば本発明は、本明細書に記載する少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつ少なくともひとつの追加の薬剂をさらに含む医薬組成物を提供し、ここで該追加の薬剂とはシステインである。

【0064】

一実施形態によれば本発明は、本明細書に記載する少なくともシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつ少なくともひとつの追加の薬剂をさらに含む医薬組成物を提供し、ここで該追加の薬剂とはL-システインである。

30

【0065】

別の実施形態によれば、本明細書に記載する少なくともひとつのシスタミン類似体、及び1以上の追加の薬剂を含む配合物が提供される。

【0066】

一実施形態によれば、該追加の薬剂とはシステインである。

【0067】

一実施形態によれば、該追加の薬剂とはL-システインである。

【0068】

一実施形態によれば、シスタミン類似体及びシステインは、シスタミン類似体及びシステインそれぞれが10:1ないし1:10の比で存在する。さらなる実施形態によれば、シスタミン類似体及びシステインが1:1の比で存在する。

40

【0069】

配合物の一実施形態によれば、シスタミン類似体及び追加の薬剂は、連続的に使用されるように適合される。

【0070】

配合物の別の実施形態によれば、シスタミン類似体及び追加の薬剂は、同時に使用されるように適合される。

【0071】

50

上記の配合物は、医薬製剤の形態で使用するために都合のよいものであってよく、従って上記の配合物を薬剂的に許容される担体と共に含む医薬製剤が、本発明のさらなる態様を構成する。

【0072】

本発明の方法又は本発明の配合物において使用する個々の成分は、別々又は組み合わせた医薬製剤によって、連続的又は同時に投与されてよい。

【0073】

一実施形態によれば本発明は、薬剤を製造するための、本明細書に記載した化合物、組成物又は配合物の使用を提供する。

【0074】

他に記載のない限り、本明細書に示される構造は、該構造の全ての異性体（例えば鏡像異性体、ジアステレオマー、及び幾何異性体（又は配座異性体））；例えば各不斉中心のR及びS立体配置、（Z）及び（E）二重結合異性体、ならびに（Z）及び（E）配座異性体を含むことも意図される。従って、本化合物の単一の立体化学異性体、ならびに鏡像異性体、ジアステレオマー、及び幾何異性体（又は配座異性体）の混合物も本発明の範囲内である。単一の光学異性体又は鏡像異性体は、キラルHPLC、酵素による変換、及びキラル補助剤のような当該技術分野において公知の方法によって得ることができる。

【0075】

一実施形態によれば、適用可能な場合に、シスタミン類似体又はシステインは、対応する立体異性体を少なくとも75%、85%、90%、95%、97%及び99%含まない、単一の立体異性体の形態で提供される。

【0076】

薬剂的に許容されるシスタミン類似体又はシステインの塩もまた提供される。薬剂的に許容される化合物の塩とは、薬剂的に許容される無機及び有機の酸ならびに塩基に由来するものを意味する。適切な酸として、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、2-ナフタレンスルホン酸及びベンゼンスルホン酸が挙げられる。その他の酸、例えばシュウ酸はそれ自体が薬剂的に許容されるものではないが、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるそれらの酸付加塩を得るための中間体として有用であり得る。

【0077】

アミノ酸に由来する塩もまた含まれる（例えばL-アルギニン、L-リジン）。

【0078】

塩基に由来する塩には、アルカリ金属類（例えばナトリウム、リチウム、カリウム）及びアルカリ土類金属類（例えばカルシウム、マグネシウム）が挙げられる。

【0079】

以下、シスタミン類似体又はシステインに言及する際には、化合物及び薬剂的に許容されるその塩も含む。

【0080】

一実施形態によれば、塩は酒石酸水素塩である。

【0081】

一実施形態によれば、塩は塩酸塩である。

【0082】

薬剂的に許容される塩に関しては、その開示が参照により本明細書に取り込まれる、Berget al., Pharmaceutical Salts, J. of Phar. Sci., vol. 66, no. 1, January 1977, pp. 1-19、の表1に示される、FDAに承認された市販の塩のリストも参照されたい。

【0083】

当業者は、化合物は異なった多形として存在し得ることを理解するであろう。当該技術

10

20

30

40

50

分野において公知であるように、多形性は、1を超えて異なる結晶へと結晶化する化合物の能力、又は「多形性の」種である。多形は少なくとも2の異なる配置による化合物の固体の結晶相、又はその化合物分子の固体の状態での多形である。いずれかの所定の化合物の多形は同一の化学式又は組成物によって定義されるが、2つの異なる化学化合物の結晶構造としての化学構造において異なる。

【0084】

当業者はさらに、本発明に従った化合物が、異なる溶媒和物の形態、例えば水和物として存在し得ることを理解するであろう。シスタミン類似体又はシステインの溶媒和物は、結晶化過程の間に、溶媒分子が化合物分子の結晶性の格子構造内に取り込まれる際にも形成され得る。

10

【0085】

他に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。加えて、材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定を意図するものではない。

【0086】

本発明の目的のために、化学元素は、元素周期表、CAS版、Handbook of Chemistry and Physics, 75th Edに従って同定した。さらに、有機化学の一般的原理は"Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999,及び"March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York:2001に記載される。

20

【0087】

加えて、他に記載のない限り、本明細書に示されるシスタミン類似体又はシステインは、同位体が濃縮された1以上の原子の存在下においてのみ異なる化合物を含むことも意図される。例えば、1以上の水素原子が重水素もしくはトリチウムによって置換されているか、又は1以上の炭素原子が、 $^{13}\text{C}$ もしくは $^{14}\text{C}$ が濃縮された炭素によって置換されているシスタミン類似体又はシステインは、本発明の範囲内である。このような化合物は、例えば分析用ツール、生物学的アッセイのプロープ、又は改良された治療用の特性を有する化合物として有用である。

30

【0088】

治療に用いるために必要とされるシスタミン類似体の量は、選択される特定の化合物によってのみではなく、投与経路、治療が必要とされる状態の性質、ならびに患者の年齢及び状態によっても異なる可能性があり、最終的には担当医師の決定によるであろうことが理解され得る。しかしながら一般的に適切な用量は、体重あたり1日に約0.1ないし約750mg/kgの範囲、例えば0.5ないし60mg/kgの範囲、又は例えば1ないし20mg/kgの範囲であり得る。

【0089】

所望の用量は、単一用量、又は適切な間隔で投与される分割用量、例えば1日あたり2, 3, 4、又はそれ以上の用量によって好都合に提供されてよい。

40

【0090】

シスタミン類似体は単位剤形によって好都合に投与され、例えば一単位剤形あたり5ないし2000mg、10ないし1500mg、好都合には20ないし1000mg、最も好都合には50ないし700mgの有効成分が含まれる。一実施形態によればシスタミン類似体は、600mgの単位剤形によって1日あたり2回、好都合に投与される。

【0091】

シスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を、パーキンソン病に対して有効な第2の治療薬と併用する場合、各化合物の用量は、該化合物を単独で用いる際と同じか、又は異なってよい。当業者は適切な用量を容易に理解するであろう。

50

## 【 0 0 9 2 】

治療法において使用する際、シスタミン類似体は未精製の化学物質として投与されてもよいが、有効成分は医薬組成物として提供されることが好ましい。従って本発明はさらに、シスタミン類似体又は薬剤的に許容される本発明の塩を含む医薬組成物を、1以上の薬剤的に許容される担体と共に、かつ任意にその他の治療用及び/又は予防用成分と共に提供する。単数又は複数の担体は、製剤のその他の成分と適合し、かつそのレシピエントに対して有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。

## 【 0 0 9 3 】

医薬組成物として、経口、経直腸、経鼻、局所（経頬及び舌下を含む）、経皮、経膈、又は非経口（筋肉内、皮下、及び静脈内を含む）投与に適したものの、又は吸入もしくは吹送による投与に適した形態が挙げられる。適切な場合には、組成物は別々の用量単位で好都合に投与されてよく、かつ薬学の技術分野において公知であるいずれかの方法によって調製されてよい。全ての方法は、有効成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体又は両方と合わせる工程、及び次に必要に応じて産物を所望の組成物に成形する工程を含む。

10

## 【 0 0 9 4 】

経口投与に適した医薬組成物は、それぞれが所定量の有効成分を粉末又は顆粒として、溶液として、懸濁液又はエマルションとして含む、カプセル、カシェ剤又は錠剤のような別々の単位として好都合に提供されてよい。有効成分はまた、ポーション、舐剤又はペーストとして提供されてもよい。経口投与のための錠剤及びカプセルは、結合剤、注入剤、潤滑剤、崩壊剤、又は湿潤剤のような従来の賦形剤を含んでよい。錠剤は、当該技術分野において公知の方法によってコートされてもよい。経口用液剤は、例えば水性又は油性の懸濁液、溶液、エマルション、シロップもしくはエリキシル剤の形態であってよいが、又は使用前に水もしくはその他の適したビヒクルによって構成するための乾燥製品として提供されてもよい。このような液剤は、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油を含み得る）、又は保存料のような従来の添加物を含んでもよい。

20

## 【 0 0 9 5 】

シスタミン類似体は非経口投与（例えば注射、例えばポーション投与又は持続点滴による）のために処方されてよく、かつ保存料を添加したアンプル、プレフィルドシリンジ、少量点滴、又は複数回用量用容器内での単位用量の形態として提供されてよい。組成物は油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、又はエマルションのような形態であってよく、かつ懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤のような処方用薬剤を含んでよい。あるいは有効成分は、無菌固体の無菌的な分離によって、又は使用前に適切なビヒクル、例えば発熱物質を含まない無菌水によって構成するための、溶液からの凍結乾燥によって得た粉末の形態であってよい。

30

## 【 0 0 9 6 】

表皮への局所投与のために、シスタミン類似体は軟膏、クリームもしくはローション、又は経皮パッチとして処方されてよい。このような経皮パッチは、リナロール、カルバクロール、チモール、シトラール、メントール及び $\epsilon$ -アネトールのような浸透促進剤を含んでよい。軟膏及びクリームは、例えば適切な増粘剤及び/又はゲル化剤を添加した水性又は油性の基剤と共に処方されてよい。ローションは水性又は油性の基剤と共に処方されてよく、かつ一般的には1以上の乳化剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、又は着色料も含み得る。

40

## 【 0 0 9 7 】

口中への局所投与に適した組成物として、通常はスクロース及びアカシア又はトラガカントである、香味の付いた基剤中の有効成分を含む舐剤；ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシアのような不活性基剤中の有効成分を含むトローチ；及び適切な液体担体中の有効成分を含む口腔洗浄薬が挙げられる。

## 【 0 0 9 8 】

直腸内投与に適した、担体が固体である医薬組成物は、例えば単位用量坐薬として提供される。適切な担体として、ココアバター及び当該技術分野で通常用いられるその他の材

50

料が挙げられ、坐薬は、有効化合物を軟化もしくは融解した単数又は複数の担体と混合し、続いて冷却後に鑄型で成形することによって、好都合に形成されてよい。

【0099】

腔内投与に適した組成物は、有効成分に加えて、その適切性が当該技術分野において公知であるような担体を含むベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレーとして提供されてよい。

【0100】

経鼻投与のために、化合物又は配合物は液体スプレーもしくは分散性の粉末として、又は液滴の形態で使用してよい。液滴は、1以上の分散剤、可溶化剤又は懸濁剤を含む、水性又は非水性の基剤と共に処方されてよい。液体スプレーは、加圧バックから好都合に送達される。

10

【0101】

吸入による投与のために、化合物又は配合物は、吹送器 (insufflator)、噴霧器もしくは加圧バック、又はエアロゾルスプレー送達用のその他の好都合な手段から好都合に送達される。加圧バックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又はその他の適切なガスのような、適切な噴霧剤を含んでよい。加圧エアロゾルの場合に、投与量単位は、定量を送達するためのバルブを用いた調節によって決定されてよい。

【0102】

あるいは、吸入又は吹送による投与のために、化合物又は配合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物とラクトース又はデンプンのような適切な粉末基剤との粉末混合物の形態であってよい。粉末組成物は、例えば、吸入器又は吹送器 (insufflator) を用いてそこから粉末が投与され得る、カプセルもしくはカートリッジ、又は例えばゼラチンもしくはプリスターパックによる単位剤形として提供されてよい。

20

【0103】

所望により、有効成分の持続性又は改変された放出が為されるように適合させた上記組成物を用いてよい。システアミン製剤の例は、例えば米国特許出願公開第20090076166号に記載されている。

【0104】

驚くべきことに本発明者らは、病変を引き起こす毒素であるMPTPよりも前及び後にシスタミンを投与した際、パーキンソン病の動物において有益な効果をもたらすことを見出した。本発明者らは、開始された神経変性過程がシスタミンによって覆されることを見出した。

30

実施例に記載するように、MPTP 20 mg/kgの7回 i.p. 注射による5日投与計画に従ってマウスに亜急性中毒を起こし、シスタミン 10 mg/kgを、1) MPTP注射開始の2日前、又は2) 最終のMPTP投与の24時間後のいずれかから、毎日 i.p. 投与して、傷害後14日間これを続けた。

試験終了時に死後の分析を行って、ドーパミン作動性 (DA作動性) の系の状態、さらに詳細にはパーキンソン病を標的とし系の状態について評価した。驚くべきことに本発明者らは、黒質線条体系の障害後に開始した (MPTP処置後24時間) MPTP処置マウスへのシスタミンの i.p. 投与 (10 mg/kg/日) が、TH免疫反応性細胞 ( $p < 0.05$ )、DAT mRNA発現細胞 ( $p < 0.05$ ) の数の立体的計数、及び黒質Nurr1 mRNAレベル ( $p < 0.05$ ) によって評価したように、黒質のDA作動性神経細胞数を有意に回復させたことを見出した。

40

【0105】

本発明者らはまた、シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいてドーパミン作動性神経細胞を救出することも見出した。

本明細書の実施例にさらに示すように、シスタミンは、マウスにおける6-OHDAを用いた線条体の損傷による行動障害を逆転させ、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいて、ドーパミン作動性の黒質系の幾つかの状況を回復させ、かつ

50

線条体のカテコールアミン作動性の量及び動態を変化させる。本発明者らは、シスタミン化合物の役割が、既存の神経細胞を保存することのみに限定されるものではないことを見出した。化合物はまた、促進されたアポトーシス過程を逆転させることで、損傷した神経細胞を、起こりつつある変性から救出することもできる。

【0106】

いずれの特定の理論にも制約されるものではないが、本発明者らはシステアミンが、シスタミンの全身投与後の鍵となる向神経活性化化合物であると考え。システアミン、システイン、ヒポタウリン及びタウリンを含む、HPLC測定を通して検討した分子の中で、システアミンは、未処置マウスへの50mg/kg及び200mg/kgの単回i.p.注射後に唯一、脳において有意に増加したことが見出された。対照的に、システイン、ヒポタウリン及びタウリンのレベルは未変化のままであるか、又は検出閾値未満であった。加えて本発明者らは、*in vivo*にて著しい量のシステアミンがBBBを横断することを示した。これらの知見は、システアミンの神経薬理学及びその臨床的関連性へのさらなる支持に関する重要な情報を提供する。

10

【0107】

BBBは大多数の潜在的向神経活性化化合物の臨床応用に対する主要な障壁であり、シスタミンのどの代謝産物が治療上の効果を発揮するかを決定する際に考慮されなければならない。アミノ酸輸送体は十分に研究されたBBBの構成要素であり、ロイシン、アラニン、セリン又はシステイン選択性の系を含む(Wade and Katzman 1975; Sershen and Lajtha 1979)。

20

システインは、BBBを横断するためにロイシン選択性の系を使用することが認識されている(Wade and Brady 1981)。タウリンがBBBを横断する能力もまた、ラットにおいてISCPを用いることにより記載されているが、これには内皮細胞のナトリウム及び塩素依存性の流入系が関与することが示唆される(Benrabbet et al. 1995)。一方、システアミンがBBBを横断できる機構についてはさらなる研究が必要である。

ここでは、システアミン及びシステインのBBB輸送について研究するため、定量的かつ高度に鋭敏な技術を用いた。これは、BBBの物理的又は機能的な完全性を損なうことなく、全身投与に関与する末梢代謝過程をバイパスすることによって行われた。本発明者らは、有意な量のシステアミン及びシステインが脳に到達する能力を示した。システアミンの脳への取り込みは、灌流液へのシステインの添加によってさらに促進された。

30

【0108】

前述の、及び以下の実施例において、全ての温度は摂氏度により未修正で示され、かつ、他に記載のない限り、全ての部及びパーセンテージは重量による。

【0109】

以下の実施例では、先行する実施例において使用した本発明の反応物及び/又は操作条件の代わりに、一般的又は特異的に記載した本発明の反応物及び/又は操作条件を用いて反復することで、同様の成功を得ることができる。

【実施例1】

【0110】

げっ歯類におけるMPTPを用いたパーキンソニズム誘導後のシスタミンの効果

40

【0111】

・動物

若齢成体(9週齢、25グラム)雄C57BL/6マウスを、Charles River Laboratories(モントリオール、ケベック州、カナダ)から購入した。動物は1ケージあたり4匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care)に従い、かつラバル大学中央病院(Centre Hospitalier de l'Uni

50

versite Laval : CHUL、ケベック州、カナダ)の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を、体重減少又はその他の健康に関わる問題の徴候について綿密にモニターした。動物の疼痛及び不快感を最少にするための全ての努力を行った。

#### 【0112】

##### ・MPTPの投与

マウスは、0.9%生理食塩水又は0.9%生理食塩水に溶解して都度調製したMPTP-HCl (20 mg/kg 遊離塩基; Sigma、セントルイス、ミズーリ州)のいずれかによる7回のi.p.注射を、実験プロトコルの最初の2日間に12時間おきに受け、3日目以降には1日に1回受けた(Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2007; Gibrat et al., 2010)。

10

#### 【0113】

##### ・シスタミンによる処置

パーキンソン病マウスにおけるシスタミン(シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州)の有益な効果を、0.9%無菌生理食塩水に都度溶解して調製したシスタミンを、10 mg/kgの用量で、毎日MPTP投与前1時間にi.p.注射することによって評価した。用量及び投与計画の選択は、本発明者らの以前の知見(Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2010)に基づく。シスタミンの初回の注射は、1)MPTP注射開始の2日前(前処置)、又は2)最終のMPTP投与後24時間(後処置)に行い、該処置は傷害後14日間毎日続けた。

20

本研究は別々の2回の実験に分けて行った。

#### 【0114】

##### ・実験番号1. MPTP損傷マウスにおけるシスタミンの神経救出特性

MPTPの毒性に対するシスタミンの効果を次の実験群によって試験した: グループI、生理食塩水+生理食塩水; グループII、生理食塩水+シスタミン後処置; グループIII、生理食塩水+シスタミン前処置; グループIV、MPTP+生理食塩水; グループV、MPTP+シスタミン後処置、グループVI、MPTP+シスタミン前処置。総計96マウスを用いて(1群あたり、n=16)体重の変動を毎日モニターし、最終のシスタミン(又はピヒクル)注射後24時間に、灌流によって最終的に屠殺した。

30

#### 【0115】

##### ・実験番号2. 亜急性のMPTP処置によって誘導される黒質のDA作動性神経細胞死の時間経過

この実験のために総計72マウスを用い、6群に分けた(1群あたり、n=12)。グループI、II及びIIIにはMPTPによる亜急性処置を施したが、グループIV、V及びVIには0.9%生理食塩水を投与した。最終のMPTP(又は生理食塩水)注射後、グループI及びIVは24時間、グループII及びVは7日、ならびにグループIII及びVIは14日に屠殺した。

#### 【0116】

##### ・灌流及び組織処理

動物をケタミン/キシラジン(Vetalar、Bioniche、ベルビル、オンタリオ州/Rompun、Bayer、トロント、オンタリオ州)による深い麻酔下で屠殺し、RNA分解酵素を含まない状態で2つの方法に従って灌流した。

40

#### 【0117】

・実験1. 全てのマウスを、RNA分解酵素を含まない0.1Mリン酸緩衝食塩水(PBS)による心臓灌流に供した。心臓灌流後、脳を回収して2つの半球を分離した。左半球の後固定を4%パラホルムアルデヒド(PFA)中で48時間行い、凍結保護のため、0.1M PBS中の20%スクロースへ移した。凍結マイクローム(Leica Microsystems、モントリオール、ケベック州)にて冠状の脳切片を25µmの厚さに切り出し、不凍液(0.2M第一リン酸ナトリウム、0.2M第二リン酸ナトリウム、30%エチレングリコール、20%グリセロール)中に連続的に回収し、使用時まで

50

で - 20 にて保存した。左半球の切片はさらなる免疫組織化学、及び *in situ* ハイブリダイゼーションプロトコルに使用した。右半球は 2 - メチルブタン中で急速凍結し、HPLC 及びウェスタンブロット (WB) 分析のためにクリオスタットで切り出しを行うまで - 80 に保管した。

#### 【0118】

・実験 2 . この実験では、各動物の 2 つの半球をそれぞれ急速凍結して HPLC 及び WB 分析に使用した。各群の残りの 5 匹のマウスは、RNA 分解酵素を含まない生理食塩水 (0.9%) 及びそれに続く 4% PFA、pH 7.4 によって心臓灌流を行った。心臓灌流後に脳を回収して 4% PFA 中で後固定を 24 時間行い、凍結保護のため、0.1M PBS 中の 20% スクロースへ移した。脳を 25  $\mu$ m の厚さの冠状切片に切り出した。実験 2 を完了するため、これらの切片を免疫組織化学及び *in situ* ハイブリダイゼーションに使用した。

10

#### 【0119】

・HPLC によるカテコールアミンの定量化

線条体 DA、3, 4 - ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) 及びホモバニリン酸 (HVA) の濃度を、電気化学的検出を組み合わせた HPLC によって測定した (Calon et al., 2001; Calon et al., 2003)。

各線条体サンプルは、レベルが +1.145 ないし +1.345 の範囲の構造の、20  $\mu$ m の厚さのクリオスタット切片を構成した (Allen, 2008; Lein et al., 2007)。各サンプルに 200  $\mu$ l の過塩素酸 (0.1N; J. T. Baker) を加え、ホモジナイズ後に遠心分離して (13000  $\times$  g) 上清を得た。線条体組織由来の上清 50  $\mu$ l を、Waters 717 plus オートサンプラー自動インジェクター、Atlantis dC18 (3  $\mu$ l) カラムを備えた Waters 1525 バイナリポンプ、Waters 2465 電気化学検出器、及びガラス状炭素電極 (Waters Limited、ラシーヌ、ケベック州、カナダ) からなるクロマトグラフ系に直接注入した。電気化学ポテンシャルは 10 nA に設定した。47.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.9 mM オクチル硫酸ナトリウム (J. T. Baker)、0.4 mM EDTA、2 mM NaCl、及び 8% メタノール (J. T. Baker) からなる pH 2.9 の移動相を 1.0 ml / 分にて送達した。ピークは Breeze ソフトウェア (Waters) を用いて同定した。HPLC の定量化は、ピシンコニン酸 (BCA) プロテインアッセイキット (Pierce、ロックフォード、イリノイ州、米国) を用いて決定したタンパク質濃度に対して標準化した。

20

30

#### 【0120】

・TH 免疫組織化学

DA 作動性神経細胞の減少を評価するため、酵素 TH に対する免疫組織化学を以前に記載されたように行った (Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2009)。簡単に述べると、数回の洗浄及びブロッキングプレインキュベーションを行った後の浮遊切片を、ウサギ抗 TH 抗体 (Pel-Freez、ロジャーズ、アーカンソー州; 1:5000) と共に 4 にて一晚インキュベートした。次に切片を、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (Vector Laboratories、バーリントン、オンタリオ州; 1:1500) を含む溶液中で、室温 (RT) にて 1 時間インキュベートした後、続いてアビジン - ビオチンペルオキシダーゼ複合体 (ABC Elite kit; Vector Laboratories、バーリントン、オンタリオ州) を含む溶液中に配置し、室温にて 1 時間インキュベートした。最終的に、反応を 3, 3' - ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) 溶液 (Sigma、セントルイス、ミズーリ州) 及び 0.1% の 30% 過酸化水素 (Sigma、セントルイス、ミズーリ州) 中で室温にて現像した。その他の切片は、インキュベーション溶液から一次抗体を省略した他は、上記のように処理した。これらの切片に対して実質的に免疫染色は行われていないため、陰性コントロールとして使用した。DAB 反応に続いて、切片をゼラチンコートされたスライドに乗せ、クレシルバイオレット (Sigma、セントルイス、ミズーリ州) によって対

40

50

比染色した。最終的に全ての切片を風乾させ、上昇するエタノールの勾配中で脱水させ、キシレン中で透徹させ、DPX封入剤 (Electron Microscopy Science、ハットフィールド、ペンシルベニア州) を用いてカバースリップによる封入を行った。

#### 【0121】

・Nurr1及びDATに対する*in situ*ハイブリダイゼーション

特定の $[^3\text{S}]$ UTP標識された相補的RNA (cRNA) プロブを用いて、DA作動性の系 (Zetterstrom et al., 1997) に関連する核内受容体であるNurr1の組織mRNAレベルを評価した。Nurr1に対するcRNAプロブは、pBluescript SK+内にサブクローン化し、XbaIによって直線化した完全長のマウスNurr1 cDNAの、403bp (gene bank受入番号: 1504-1907 NM\_013613) のEcoRI-BamHI断片に由来する。

10

#### 【0122】

長さ2238bpの断片であるDATプロブは、pBluescript IISK+プラスミド内にクローン化した。NotI酵素を用いて直線化を行った。 $[^3\text{S}]$ UTP及びT7 RNAポリメラーゼを用いてアンチセンスプロブを合成した。

#### 【0123】

これらのマーカーに対するセンスプロブもまた作製したが、特異的なシグナルは得られなかった (データ未提示)。以下に記載する手順、及び以前に公表したプロトコルに従って脳の切片をハイブリダイズした (Beaudry et al., 2000; Cossette et al., 2004; Lapointe et al., 2004)。

20

#### 【0124】

この*in situ*プロトコルはRNA分解酵素を含まない状態で行った。薄片はSnowcoat X-tra (商標) スライド (Surgipath、ウィニペグ、カナダ) に載せ、使用前に真空下で一晩保管した。脳切片を4% PFA pH7.4中で、室温にて20分固定した。様々な連続浴 (0.1M PBS 5分を2回、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  プロテイナーゼK 37にて10分、アセチル化浴 (0.25% 無水酢酸、0.1M トリエタノールアミン) 10分、標準的なクエン酸生理食塩水 (SSC) (0.3M NaCl、30mM クエン酸ナトリウム) 5分を2回) によって前処理を行った。脱水のために、エタノール溶液の連続浴 (30%、60%、100%、100%; 各3分) を行った。組織切片におけるリボプロブの*in situ*ハイブリダイゼーションを、58にて一晩、標準的なハイブリダイゼーション緩衝液 (50% 脱イオン化ホルムアミド、5M 塩化ナトリウム、1M Tris、0.5M EDTA、50xデンハルト液、50% デキストラン硫酸、10mg/mL tRNA、1M DTT、 $2 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{l}$   $^3\text{S}$  結合プロブ) 中で行った。異なる連続浴 (4xSSC (30分)、カバースリップの除去、2xSSC 2回 (5分)、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A (1時間) 37にて、ミリQ水 2回 (15秒)、2xSSC (15分)、0.5xSSC (30分) 60にて、0.1xSSC (30分) 60にて、0.1xSSC (5分) 室温にて) を用いて後処理を行った。さらなる脱水のために、エタノール溶液の反復浴 (30%、60%、100%、100%; 各3分) を用いた。次に組織切片を、放射性物質感受性フィルムであるBiomax MR (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) に対して配置した。Nurr1に対しては72時間、及びDATに対しては5時間の曝露後、オートラジオグラムを現像した。

30

40

#### 【0125】

脱脂はエタノールの4浴、キシレンの2浴、及びエタノールの3浴によって行った。これらの工程に続き、スライドを42にて溶解したNTB乳剤 (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) に浸し、4時間風乾した後、暗所にて4で5日間保管した。次にこの乳剤をD-19現像液 (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) 中で現像し (

50

3.5分)、脱イオン水ですすいだ後、Kodakから入手したRapid Fixer 溶液中で固定した(5分)。スライドを脱イオン水で1時間すすいだ後発色させた。発色は、チオニン(1分)、続いて水及びエタノールに浸し、次に3エタノール(1分)及び3キシレン浴(3分)を用いて行った。スライドは、DPX封入剤を用いてカバースリッパにより封入した。

#### 【0126】

##### ウェスタンブロット分析

プロテアーゼ阻害剤(Roche、ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ)及びホスファターゼ阻害剤(Sigma、セントルイス、ミズーリ州、米国)の混合物を含む、8容積の溶解緩衝液(150mM NaCl、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1%(v/v) Triton X-100、0.5% SDS、及び0.5%デオキシコール酸ナトリウム)中でサンプルをホモジナイズした。サンプルを超音波処理し(3×10秒)、100,000gにて4で20分遠心分離した。上清を回収し、-80で保管した。各分画のタンパク質濃度を、ピシンコニン酸タンパク質アッセイキットによって決定した。一サンプルあたり20µgの総タンパク質をLaemmliローディング緩衝液に加え、95で5分加熱した。次にサンプルを負荷し、SDSポリアクリルアミド(12%)ゲル電気泳動に供した。タンパク質を0.45µm Immobilon PVDFメンブレン(Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ州、米国)上に電氣的にプロットし、1×PBS中の5%無脂肪ドライミルク及び1%BSA中で1時間ブロックした。メンブレンは、一時抗体としてウサギ抗TH(Pel-Freez; 1:5,000)、ウサギ抗BAX(Cell signalling technology; ダンバース、マサチューセッツ州; 1:1,000)、ウサギ抗Bcl2(Cell signalling technology; 1:1,000)、マウス抗アクチン(ABM Inc、リッチモンド、プリティッシュ・コロンビア州、カナダ; 1:10,000)、及び適切な二次抗体としてヤギ抗ウサギ又は抗マウス(Jackson Immunoresearch、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州; 1:100,000)によって免疫プロットを行い、続いて化学発光試薬(KPL、Mandel Scientific、ゲルフ、オンタリオ州、カナダ)を添加した。バンドの強度を、ImageQuant Las 4000 デジタルイメージングシステム(Science Lab 2003 Image Gauge ソフトウェア バージョン4.2、富士フィルム、ニューヘブン、コネチカット州)を用いて定量化した。

#### 【0127】

・デンシトメトリーを用いたNurr1及びDAT mRNAレベルの測定

オートラジオグラフィーの標識のレベルをコンピュータ化されたデンシトメトリーによって定量化した。デジタル化した脳画像及びそれらの分析は上述の同じ機器を用いて行った。オートラジオグラムの光学密度を、<sup>14</sup>C放射活性標準物質(ARC146-<sup>14</sup>C標準物質、American Radiolabeled Chemicals Inc.、セントルイス、ミズーリ州)を用いて組織のµCi/gに変換した。黒質緻密部(SNc)におけるNurr1及びDAT mRNAレベルを、全ての切片に対して同様な前後方向面を用いて測定した。各SNc面の平均標識値を、同じマウスの隣り合う3枚の切片から算出した。バックグラウンド強度は、Nurr1又はDAT mRNAレベルを欠く黒質網様部(SNr)の白い領域から取得し、これを全ての測定から差し引いた。

#### 【0128】

・TH免疫反応性神経細胞の立体的定量化

DA作動性神経細胞の減少を、明視野の照明下でのTH免疫反応性細胞(同定可能な体細胞)の立体的計数によって決定した。SNcを通して、E800 Nikon顕微鏡(Nikon Canada Inc.、ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ)に取り付けたStereo investigatorソフトウェア(MicroBrightfield、コルチェスター、バーモント州、米国)を用いて、切片を10枚おきに分析した。低倍率での(4×対物レンズ)SNcの描写後、各切片上にポイントグリッドを置いた

。分析するSNcの最も頭側の面(ブregマ-3.08mm)のために、内側終止核による目に見える境界によってSNcを描写した。分析するSNcの中間部(ブregマ-3.28mm)及び最も尾側の面(ブregマ-3.58mm)のために、第3脳神経の出口によって構造の境界を決定した。免疫染色された細胞は、より高倍率(20×対物レンズ)で、光学フラクショネーター法によって計数した。計数の変数は以下の通りである:計数枠間の距離(150µm×150µm)、計数枠の大きさ(75µm)及び保護領域の厚さ(1µm)。禁止線と交差していない細胞のみを計数した。光学フラクショネーター(Glaser and Glaser, 2000)法を用いて、TH陽性(TH及びクレシルバイオレット陽性)及びTH陰性(クレシルバイオレットのみ陽性)細胞を計数した。立体的細胞計数は、別々の研究者2名によって盲検的に行った。なお、TH免疫反応特性の分析はSNcに限定したことから、腹側被蓋野(VTA)は除外されることに留意されたい。

10

#### 【0129】

##### ・統計解析及び画像の準備

全ての解析は群平均±S.E.Mとして表す。実験番号1及び2に関連するデータは二元配置分散分析法によって評価した。二元配置分散分析法によって有意ではない交互作用項がもたらされた場合、チューキーポストホック多重比較検定を用い、データの有意性についてさらに解析した。全ての事例で、P値が0.05未満のときに有意であるとみなした。顕微鏡写真は、E800 Nikon顕微鏡(Nikon Instruments、トロント、オンタリオ州)に取り付けたPicture Frameソフトウェア(Microbrightfield)によって撮影した。画像は、図解のためにAdobe Photoshop CS3を用いて整えた。

20

#### 【0130】

##### 結果

- ・DA作動系におけるシスタミンの効果
- ・亜急性MPTPマウスモデルにおけるシスタミンの神経保護効果

#### 【0131】

シスタミンの有益な効果を調査するために、DA系に関連する幾つかの特異的なマーカーを用いて、本研究で使用した全てのマウスにおいてエンドポイントでの組織学的評価を行った。THはDAの生合成における律速酵素で、かつDA神経細胞のマーカーである。Nurr1はDA作動性表現型及びドーパミン輸送体の維持に関与する転写因子であり、DATはプロDA作動性黒質線条体神経細胞の高度に特異的なマーカーであることから、これらの発現はDA作動性神経細胞の健全な状態を反映する。

30

#### 【0132】

MPTP処理により、SNpcにおけるニッスル染色神経細胞の減少を伴うTH免疫反応性神経細胞の有意な減少がみられたが、これはTH発現の低下によるDA神経細胞の変性と一致した( $p < 0.001$ 、図1)。これにはSNpcにおける黒質Nurr1及びDAT mRNAレベルの有意な減少が伴った( $p < 0.01$ 、図2;  $p < 0.001$ 、図3)。MPTPによる中毒の2日前に開始した、10mg/kgシスタミンの毎日の薬物投与によってシスタミンの神経保護作用が確認されたが、これはSNpcにおけるTH免疫反応性細胞密度が、MPTPによって処置されていない動物に比較して増加したことによって明らかにされた( $p < 0.001$ 、図1)。シスタミン前処置マウスにおける死後のDA系の分析により、Nurr1 mRNAレベル( $p < 0.01$ 、図2)及びDATを発現するSNpc神経細胞の密度の正常化( $p < 0.01$ 、図3)がさらに示された。

40

#### 【0133】

- ・亜急性MPTPマウスモデルにおけるシスタミンによる神経救出の可能性

シスタミン処置の神経救出特性の評価を、最終のMPTP注射後24時間に開始した。10mg/kgシスタミンによる後処置を行ったマウスでは、MPTPにより誘導されたDA作動性神経細胞の神経毒性もまた有意に低下した。MPTPによる傷害後にシスタミ

50

ンで処置したマウスは、MPTPによって処置されていないマウスに匹敵する、著しく多数のTH陽性及びニッスル陽性神経細胞 ( $p < 0.01$ 、図1)、ならびに高レベルのNurr1 ( $p < 0.5$ 、図2)及びDAT ( $p < 0.5$ 、図3)mRNAを示した。

#### 【0134】

概して、DA系に関連するこれら3つの特異的マーカーの評価は同様なパターンを示し、かつ、シスタミンによる神経保護を裏付けるものではなく、シスタミンの神経救出特性に及ぶ、シスタミンによるMPTP後処置の有益な効果が示された。

#### 【0135】

神経変性過程を阻止する(神経保護)のみではなく、これを停止する(神経救出)シスタミンの能力を結論付けるため、本発明者らは、これらの実験で用いたMPTPモデルにおけるDA関連変性の時間経過を定義するための試験を行った。

#### 【0136】

・亜急性のMPTP投与によって誘導された、黒質DA作動性細胞の変性の時間経過

TH陽性及びニッスル陽性神経細胞の減少は、最終のMPTP注射後1日から14日に屠殺したMPTP群で20%ないし27%変動したが、7日及び14日においてのみ、対応する生理食塩水群に比較して統計学的に有意であった( $p < 0.01$ 、図4)。1日目には有意なTH陽性細胞の減少は見られなかったにもかかわらず、SNpcにおけるNurr1及びDAT mRNAレベルの有意な低下が観察されたことから( $p < 0.05$ 、図5)、DA神経細胞の幾らかの脆弱性が示唆される。さらに、ウェスタンブロット分析により、プロ及び抗アポトーシス性タンパク質であるBAX及びBcl2は、最終のMPTP注射後24時間にそれぞれ増加及び減少したことが示された( $p < 0.05$ 、図6)。まとめると、これらの知見は、最終のMPTP注射後24時間にDA作動性神経細胞はまだ変性を始めていないが、これらはアポトーシス経路に導かれていることを示唆する。重要なことに、これはシスタミンの有益な効果が神経救出特性であることを裏付けている。

#### 【0137】

結果

・DA作動系におけるシスタミンの効果

#### 【実施例2】

#### 【0138】

シスタミンの代謝及び脳への輸送特性

#### 【0139】

・動物及びシスタミン投与

若齢成体(9週齢、25g)雄C57BL/6マウスを、Charles River Laboratories(モントリオール、ケベック州、カナダ)から購入した。動物は1ケージあたり4匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care)に従い、かつラバル大学中央病院(Centre Hospitalier de l'Université Laval: CHUL、ケベック州、カナダ)の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を綿密にモニターした。シスタミン注射後に明らかに活性のある中間体を同定し、かつ全身及び大脳でのその代謝を理解するため、正常成体C57BL/6雄マウスに単回のシスタミンの腹腔内(ip)注射を行った。以前の文献で決定したように、3つの異なる用量:10、50、及び200mg/kgを用いた(Tremblay et al. 2006; Gibrait et al. 2010)。最終的にこれらの用量を生理食塩水の注射と比較した。シスタミンを無菌生理食塩水(0.9%)に溶解し、屠殺の1、3、12、24及び48時間前に注射した。動物をケタミン/キシラジンによる深い麻酔下で屠殺し、0.1Mリン酸緩衝食塩水の心臓内注入によって灌流した。心臓灌流後に脳を回収し、2-メチルブタン中で急速凍結し、HPLC分析のためにクリオスタットで切り出しを行うまで-80

10

20

30

40

50

に保管した。この試験には総計200マウスを用いた(1群あたりn=10)。

【0140】

・システイン及びシステアミンのHPLCによる測定

蛍光検出を組み合わせたHPLCを、用量応答試験及び*in situ*大脳灌流(I SCP)の手順の両方の実験セットによるシステイン及びシステアミンの定量化において使用した。前頭皮質を200 $\mu$ LのNaHCO<sub>3</sub>中でホモジナイズし、続いて15700g(4)にて20分遠心分離した。30 $\mu$ Lの4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABD-F)試薬を用いて、50 $\mu$ Lの上清に直接誘導体化を行った。アルキル化反応は55、15分で完了し、4.9 $\mu$ Lの12N HClを用いて停止させた。7500g(4)での10分の遠心分離後、上清を、4に設定したWaters 717 plus オートサンプラー自動インジェクター、Atlantis dC18(3 $\mu$ L; 3.9 $\times$ 150mm)カラムを備えたWaters 1525バイナリポンプ、及びWaters 2487二波長吸光度検出器(Waters Limited、ラシーヌ、ケベック州、カナダ)からなるクロマトグラフに直ちに注入した。励起波長を385nm、発光波長を515nmに設定した。2.5%メタノール及びpH4.0に調整した0.1M 酢酸アンモニウムからなる移動相を1ml/分にて送達した(Santa et al. 2006)。ピークはBreezeソフトウェア(Waters limited)を用いて同定及び定量した。HPLCの定量化は、タンパク質濃度に対して標準化した。タンパク質測定は、製造者によるプロトコルの記載に従い、ピシンコニン酸プロテインアッセイキット(Pierce、ロックフォード、イリノイ州、米国)を用いて決定した。

10

20

【0141】

・タウリン及びヒポタウリンのHPLCによる測定

タウリン及びヒポタウリンを、UV検出を組み合わせたHPLCによって測定した。NaHCO<sub>3</sub>中の脳の上清(ブレグマ1.54ないし-0.58mm)の抽出物(詳細は上記の項を参照のこと)を、公表した方法を改変したものに基づき(Saller and Czupryna 1989; Calon et al. 1999)、試薬である塩化ダンシル(Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)を用いて直接誘導体化した。簡単に述べると、50 $\mu$ Lの塩化ダンシル(1.2mg/mL)及び50 $\mu$ Lのサンプル又は標準溶液を混合し、次に30分90にてインキュベートした。7500g(4)での10分の遠心分離後、上清を上記のクロマトグラフに直ちに注入した。吸光度を337nmに設定し、かつ0.5吸光度単位の感度をフルスケールに設定した。移動相は、0.15%(v/v)リン酸を含む水-アセトニトリルの混合物(88.5~11.35%v/v)からなり、0.8mL/分の速度で送達した。結果は上記と同じ方法を用いて得た。

30

【0142】

・In situでの大脳灌流

In situでの大脳灌流(I SCP)は、以前に記載されたように(Dagenais et al. 2000; Ouellet et al. 2009)、ケタミン/キシラジンの混合物(140/8mg/kg)のi.p.注射によって促進される深い麻酔下で行った。100%の灌流液がBBBに確実に到達するように、外枝の結紮に続いて右総頸動脈にカテーテルを挿入した(模式図として、図3aを参照)。次に胸部を開き、心臓を除去後、灌流を直ちに流速2.5mL/分で開始した。灌流液は、炭酸水素緩衝生理食塩水:128mM NaCl、24mM NaHCO<sub>3</sub>、4.2mM KCl、2.4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.5mM CaCl<sub>2</sub>、0.9mM MgCl<sub>2</sub>及び9mM D-グルコースからなるものであった。溶液に95%O<sub>2</sub>及び5%CO<sub>2</sub>のガスを吹き込んでpH7.4とした後、37で加温した。全ての試験において、BBBの完全性及び血管容積のマーカーとして放射性トレーサー(0.3 $\mu$ Ci/mL <sup>14</sup>C-スクロース)をシステアミン(259 $\mu$ M)及びシステイン(165 $\mu$ M)と共灌流した。この試験では、未処置マウスの4つの異なる群(n=3)を評価し、これらはシステイン、シス

40

50

テアミンの両分子、又は対照として  $^{14}\text{C}$ -スクロースのみによって灌流した。

【0143】

60秒の灌流後、マウスの断頭によってこの手順を終了した。右大脳半球を回収し、前頭皮質を切り出して、システイン及びシステアミンのHPLCによる測定のためにドライアイス上で急速に冷凍した。

【0144】

この半球の残りの脳組織を2mLのSolvable (Perkin-Elmer Life Sciences、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国)により50にて48時間消化し、次に9mLのHisafeshinチレーションカクテル (Perkin-Elmer Life Sciences) と混合した。各実験終了時に、脳輸送係数 (以下の方程式を参照) を算出するため、HPLC定量化のために放射性標識マーカを添加する前、かつ、シンチレーション計数のためにシリンジ及びカテーテルを通過した後の灌流液を一定分量採取した。脳の消化物及び還流液中の  $^{14}\text{C}$  同位元素を、Wallacシンチレーションカウンター (Perkin-Elmer Life Sciences) によって計数した。  $^{14}\text{C}$ -スクロースを用いて決定した血管空間によって補正したシステイン又はシステアミンの分布の測定量から、システイン及びシステアミン取り込みのクリアランス係数 (Clup;  $\mu\text{L}/\text{g}/\text{秒}$ ) を算出した。血管空間は一定であり、 $20\mu\text{L}/\text{g}$  未満であった。前記したように、以下の方程式を用いて最終的に算出した (Dagenais et al. 2000)。

【0145】

【数1】

$$\text{Clup} (\mu\text{L g}^{-1} \text{s}^{-1}) = \frac{V_d}{T}, \text{ 式中 } V_d = \frac{X_{\text{システイン}}}{C_{\text{システイン灌流液}}} \cdot \frac{X_{\text{スクロース}}}{C_{\text{スクロース灌流液}}}$$

$V_d (\mu\text{L}/\text{g})$  は試験化合物の分布量を表し、 $T$  (秒) は灌流時間であり、 $X_{\text{システイン}}$  ( $\text{ng}/\text{mg}$  組織) 又は  $X_{\text{スクロース}}$  ( $\text{dpm}/\text{g}$ ) はそれぞれ、該半球の前頭皮質もしくは残りの組織中に見出されたシステイン又はスクロースの量である。 $C$  は灌流液中の濃度 ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ;  $\text{dpm}/\text{mL}$ ) (上記方程式の例ではシステイン) である。

【0146】

・データ及び統計解析

全てのデータは群平均  $\pm$  S.E.M. によって表す。データは二元配置分散分析法によって評価し、スチューデント  $t$  検定を用いて有意性を解析した。各群は、対応する時点 (1、3、12、24、又は48時間) における  $0\text{mg}/\text{kg}$  群と比較した。ISCP実験のため、有意性の解析にはスチューデント  $t$  検定を用いた。全ての事例で、 $p$  値が  $0.05$  未満の際に有意であるとみなした。

【0147】

結果

・シスタミン投与の一般的効果

【0148】

用量応答試験を通して死亡はみられず、 $200\text{mg}/\text{kg}$  シスタミン群のマウスが以前に報告されたように (Gibrat et al. 2010) 低体温 (震え) 及び傾眠 (眼瞼を閉じる) の徴候をおおよそ2時間呈した以外は、全てのマウスは良好な健康状態を示した。

【0149】

・シスタミン投与後の、血漿及び脳のシステインならびにシステアミンのレベル

シスタミンの単回用量を  $i.p.$  注射したマウスの血漿及び脳中に見出される代謝産物を調べるため、高感度のHPLC法を用い、ABD-F化合物を用いたチオール (-SH) 誘導体化を通して、蛍光検出の前にシステアミン及びシステインを特異的に測定することが可能であった (図7a)。シスタミン処置マウスの血漿中にシステアミンは検出され

10

20

30

40

50

なかった。全身の発現とは反対に、大脳のシステアミン及びシステイン濃度の分析によって脳システアミンの著しい増加が明らかになった(図7b)。この増加は、本用量応答試験で用いた、シスタミンの3つの投与用量の全て及び各時点において観察された。二元配置分散分析法によって、用量及び時間の2つの因子についての有意差、及びこれら2つの因子の間の有意な相互作用( $p < 0.0001$ )が明らかとなった。ポストホック解析によって、50 mg/kg ( $p < 0.05$ )及び200 mg/kg ( $p < 0.01$ )用量の注射の、特に1時間後に有意な増加が明らかになった。システアミンのレベルは、生理食塩水群に比較してシスタミン投与後3時間もなお有意に増大し( $p < 0.01$ )、48時間かけて次第に減少した。シスタミン投与は、最も高い200 mg/kgの用量においてもシステインの血漿(データ未提示)又は脳のレベルには影響を与えなかった(図7c)。

10

#### 【0150】

・シスタミン投与後の、血漿及び脳のヒポタウリンならびにタウリンのレベル

ヒポタウリンはシステアミンの主要な代謝産物であり、これは部分的にタウリンを産生し得る。これら2つの分子の濃度を決定するため、UV検出前の、一級アミノ基の塩化タンシルによる誘導体化を利用した(図8a)。この反応は芳香族及び脂肪族アミンの両方に起こって安定なスルホンアミド付加体を産生し、同じ方法によるヒポタウリン(図8a; 化合物2)及びタウリン(図8a; 化合物1)両方の検出を可能にする。群の間で幾らかの変動はみられたが、3通りの用量(10、50又は200 mg/kg)のいずれも、対照群に比較して、脳のヒポタウリン及びタウリンに有意な変化は観察されなかった(図8b及びc)。屠殺のいずれの時点(1、3、12、24及び48時間)においても、ヒポタウリン及びタウリンが脳に蓄積する徴候はみられなかった。血漿濃度は検出閾値未満か又はそれに近いままであった。

20

#### 【0151】

・システインはシステアミンの脳輸送を促進する

大多数の内在性及び外来性の化合物はBBBを横断しないためにCNSでは不活性であることから、本発明者らはシステアミン及びシステインの脳への取り込みについて調べた。本発明者らはISCPを用い、頸動脈を通した脳への直接注入によって、システアミン及びシステインの血液-脳輸送パラメータを測定した(Dagenais et al. 2000; Ouellet et al. 2009)(図9a)。システイン及びシステアミンは、それぞれ $4.39 \pm 0.47$ 及び $0.15 \pm 0.02 \mu\text{L/g/s}$ であるそれらの脳輸送係数(Clup)にみられるように、両方がBBBを横断する(図9b及びc)。比較として、モルヒネのような日常的に用いられるCNSへの薬物は、 $0.3 \mu\text{L/g/秒}$ のClupを示すが、ジアゼパム又は脂肪酸のような高度に拡散性の薬物は、 $40 \mu\text{L/g/秒}$ にまで達するClupを示す(Bourasset et al. 2003; Ouellet et al. 2009)。興味深いことに、システイン及びシステアミンの共灌流はそれらの脳への取り込みを促進した。実際に両化合物を同時に注入した際には、システアミン(+133%;  $p < 0.05$ )及びシステイン(+59%;  $p < 0.05$ )のClupの有意な増大が測定された。BBBを横断することが示されているヒポタウリン及びタウリンについては再評価しなかった(Benrabh et al. 1995)。

30

40

#### 【実施例3】

#### 【0152】

6-OHDAの線条体内投与に続くシスタミンの神経救出及び神経回復特性

#### 【0153】

・材料及び方法

・動物

若齢成体(9週齢、25グラム)雄C57BL/6マウスを、Charles River Laboratories(モンリオール、ケベック州、カナダ)から購入した

50

。動物は1ケージあたり4匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care)に従い、かつラバル大学中央病院(Centre Hospitalier de l'Université Laval: CHUL)の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を、体重減少又はその他の健康に関わる問題の徴候について綿密にモニターした。動物の疼痛及び不快感を最少にするための全ての努力を行った。

#### 【0154】

##### ・6-OHDA及びシスタミンによる処理

このプロトコルは、6-ヒドロキドーパミン(6-OHDA)の一側性定位固定線条体内注射に基づくものであった。6-OHDAの線条体内投与は、黒質のDA神経細胞に進行性及び逆行性の変性による変化を生じさせる(Bjorklund et al., 1997; Costantini et al., 2001)。マウスをイソフルランによって麻酔し、マウスに適合させた定位固定用の枠に配置した。6-OHDAを2µg/µlの濃度で0.9%生理食塩水及び0.02%アスコルビン酸に溶解し、2µlを右線条体に0.5µl/分の速度で注射した。注射後、針を後退させる前に、定位置に3分間置いた。注射はハミルトンシリンジを用いて、定位固定座標、すなわちAP: +0.04cm、ML: -0.18cm、DV: -0.31cm(Allan P. 2008のアトラスに対応する)に従って行った。

#### 【0155】

対照としてその他のマウスを同一の外科的手順に供し、2µlの溶媒のみ(0.9%生理食塩水及び0.02%アスコルビン酸)を同一の座標に注射した。この試験はさらに2つの異なる実験に分けた。

1) 6-OHDA損傷マウスにおけるシスタミン(シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州)の神経救出効果。この実験では、10mg/kgシスタミンの初回のi.p.注射を手術後3日目に行い、該処置は14日間毎日続けた。

2) 6-OHDA損傷マウスにおけるシスタミン(シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州)の神経回復効果。シスタミンによる処置は、ドーパミン作動性(DA作動性)の損傷が安定し、ピークに達した手術後3週間目に開始した。該処置は6週間毎日続けた。

#### 【0156】

6-OHDAの毒性に対するシスタミンの効果を次の実験群によって試験した: グループI、偽物質+生理食塩水; グループII、6-OHDA+生理食塩水; グループIII、偽物質+シスタミン; グループIV、6-OHDA+シスタミン。各実験に総計40マウスを用いて(1群あたり、n=10)体重の変動を毎日モニターし、最終のシスタミン(又はピヒクル)注射後24時間に、灌流によって最終的に屠殺した。結果を図10、11及び12に示す。

#### 【0157】

##### ・灌流及び組織処理

動物をケタミン/キシラジン(Vetalar, Bioniche、ベルビル、オンタリオ州/Rompun, Bayer、トロント、オンタリオ州)による深い麻酔下で屠殺した。全てのマウスを、RNA分解酵素を含まない0.1Mリン酸緩衝食塩水(PBS)による心臓灌流に供した。心臓灌流後に脳を回収し、各マウスにおける中脳全体を含む後脳部を、さらなる免疫組織化学及びin situハイブリダイゼーション分析のために4%PFA中で後固定を行った。右及び左線条体を含む前脳部は急速凍結してHPLC及びWB分析に使用した。

#### 【0158】

Nurr1及びDATに対する、HPLCによるカテコールアミンの定量化、TH免疫組織化学及びin situハイブリダイゼーションは、実施例1の記載に従って行った

10

20

30

40

50

## 【0159】

・デンシトメトリーを用いたNurr1及びDAT mRNAレベルの測定

オートラジオグラフィの標識のレベルをコンピュータ化されたデンシトメトリーによって定量化した。デジタル化した脳画像及びそれらの分析は上述の同じ機器を用いて行った。オートラジオグラム光学密度を、 $^{14}\text{C}$ 放射活性標準物質 (ARC146- $^{14}\text{C}$ 標準物質、American Radiolabeled Chemicals Inc., セントルイス、ミズーリ州) を用いて組織の $\mu\text{Ci/g}$ に変換した。黒質緻密部 (SNc) におけるNurr1及びDAT mRNAレベルを、全ての切片に対して同様な前後方向面を用いて測定した。各SNc面の平均標識値を、同じマウスの隣り合う3枚の切片から算出した。バックグラウンド強度は、Nurr1又はDAT mRNAレベルを欠く黒質網様部 (SNr) の白い領域から取得し、これを全ての測定から差し引いた。

10

## 【0160】

・TH免疫反応性神経細胞の立体的定量化

DA作動性神経細胞の減少を、明視野の照明下でのTH免疫反応性細胞 (同定可能な体細胞) の立体的計数によって決定した。SNcを通して、E800 Nikon顕微鏡 (Nikon Canada Inc., ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ) に取り付けられたStereo Investigatorソフトウェア (MicroBrightfield、コルチェスター、バーモント州、米国) を用いて、切片を10枚おきに分析した。低倍率での (4×対物レンズ) SNcの描写後、各切片上にポイントグリッドを置いた。分析するSNcの最も頭側の面 (ブレグマ-3.08mm) のために、内側終止核による目に見える境界によってSNcを描写した。分析するSNcの中間部 (ブレグマ-3.28mm) 及び最も尾側の面 (ブレグマ-3.58mm) のために、第3脳神経の出口によって構造の境界を決定した。免疫染色された細胞は、より高倍率 (20×対物レンズ) で、光学フラクショネーター法によって計数した。

20

計数の変数は以下の通りである: 計数枠間の距離 (150 $\mu\text{m}$ ×150 $\mu\text{m}$ )、計数枠の大きさ (75 $\mu\text{m}$ ) 及び保護領域の厚さ (1 $\mu\text{m}$ )。禁止線と交差していない細胞のみを計数した。光学フラクショネーター (Glaser and Glaser, 2000) 法を用いて、TH陽性 (TH及びクレシルバイオレット陽性) 及びTH陰性 (クレシルバイオレットのみ陽性) の発現細胞を計数した。立体的細胞計数は、別々の研究者2名によって盲検的に行った。なお、TH免疫反応特性の分析はSNcに限定したことから、腹側被蓋野 (VTA) は除外されることに留意されたい。

30

## 【0161】

・アポモルヒネにより誘導される回転

回転行動は、DAの欠乏及びDA受容体に対する非対称性の刺激の、信頼できる生理的基準を表すと考えられている。アポモルヒネ (Anden et al., 1966; Ungerstedt et al., 1968) のようなDAアゴニストの適用により、DA受容体は直接刺激されてDAの欠乏した半球に対する対側性の回転を導く。損傷後3、6、及び9週間にマウスにアポモルヒネ (0.5mg/kg, Sigma-Aldrich) を投与し、自動ロータメーターシステムを用いて回転行動を45分間評価した。以前に記載されたように (Metz 2002)、結果を平均して有効回転数 (= 対側性の回転数 - 同側性の回転数) で表した。注射後、回転の記録を開始する前に、動物を5分間慣らすようにした。

40

## 【0162】

・ステップ試験

歩みの調節についての試験を、ラット (Lindner et al., 1995) 及びMPTP処置マウス (Blume et al., 2009) における試験を改変して行った。マウスの後肢を台上に載せた状態で、その尾の基部を保持し、マウスが3~4秒かけて1メートルの距離を横断するように一定の速度で後方へ移動した。デジタルビデオカメラ (Sony Handcam、DCR-HC90E PAL) を用いてマウスをピ

50

ビデオに記録し、ビデオをオフラインにして、全距離にわたり、損傷のある半球に対して対側又は同側の足によって為された歩みの調節回数を数えることによって解析した。マウスの手術後3週、6週、及び9週目に3回の試行を行い、これらの試行を通した中央値データを算出した。

#### 【0163】

##### ・円筒試験

後肢で立つ間に体重を支える前肢の運動を測定する、肢の非対称使用（円筒）試験は、一側性に6-OHDAを注射したラット及びマウスにおける黒質線条体細胞減少の良好な指標であることが示されてきた（Schallert et al., 2000; Tilleron et al., 2001; Lundblad et al., 2004; Lancu et al., 2005）。探索行動の間の、自発性の前肢の使用における側面への偏りを試験するために、全角度からマウスを観察できるように2つの垂直な鏡の前に配置したガラス円筒（直径10cm、高さ14cm）の中にマウスを個別に入れた。マウスを直ちに3分間ビデオ記録した。ビデオ記録の前に、試験に用いる円筒への動物の慣らしは行わなかった。損傷に対して同側又は対側の前肢により独立して行われた、支持のための壁へのタッチ（十分に伸ばした指による接触）の数を数えるために、ビデオ記録を行った。前肢の非対称使用の程度は、損傷に対する対側の足（右足）によって行われたタッチを、各セッションにおけるタッチの総数のパーセンテージとして表すことによって得た。

#### 【0164】

##### ・統計解析

全ての解析は群平均 $\pm$ S.E.Mとして表す。データは二元配置分散分析法によって評価した。二元配置分散分析法によって有意ではない交互作用項がもたらされた場合、チューキーポストホック多重比較検定を用い、データの有意性についてさらに解析した。全ての事例で、P値が0.05未満のときに有意であるとみなした。

#### 【0165】

##### 参考文献：

- ・アレンP. アレンの脳地図。シアトル（ワシントン州）：アレン脳科学研究所；2008. <http://www.brain-map.org> から入手可能。
- ・アンデン, N.E., ダールストローム, A., フクスイ, K., ラルソン, K., 1966. 黒質線条体ドーパミンニューロンの機能的役割。Acta Pharmacol. Toxicol. 24, 236-274.
- ・バックZ.M. 及びボーマリアージュM.L. (1965) 保護物質の注射からX線照射の開始までの時間に応じた、マウスにおけるシステアミン及びシスタミンの放射線防護作用。Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 153, 457-459.
- ・ボードリーG、ラングロアMC、ウェッペI、ロイヤールC、レベスクD. (2000) ラット前脳における、ハロペリドール及びクロザピンによる、核受容体神経成長因子誘導Bの転写調節のパターン及び細胞特異性の対比。J Neurochem 2000; 75: 1694-702.
- ・ベンラH., ブーレJ.M. 及びルフォコニエJ.M. (1995) 血液脳関門におけるタウリン輸送：インピボ脳灌流研究。Brain Res. 692, 57-65.
- ・ビヨルクンド, A., ローゼンブラッド, C., ウィンクラー, C., キリク, D., 1997. パーキンソン病の部分的障害モデルにおけるGDNFの神経保護効果及び再生効果の研究。Neurobiol Dis 4, 186-200.
- ・ブルームSR、カスDK、ツェンKY. マウスにおける足踏み検査：MPTP誘発性パーキンソン病における前肢無動症を判定する信頼性の高い方法。Exp Neurol 2009; 219: 208-11.
- ・ボレル-パジェスM., カナルスJ.M., コルドリエレスF.P. ら(2006) シスタミン及びシステアミンは、ハンチントン病においてH5J1b及びトランスグルタミ

10

20

30

40

50

- ナーゼを介して脳のBDNFレベルを増加させる。J. Clin. Invest 116, 1410 - 1424.
- ・ブーケノーゲT.、レマクルC.及びルーゼンスB. (2006) タウリンは、機能的な栄養素であるか? Curr: Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 9, 728 - 733.
- ・ブーラセットF.、チステルニーノS.、テムサマニJ.及びシエルマンJ.M. (2003) 血液脳関門におけるP-糖タンパク質ではなくモルヒネ-6-β-D-グルクロニドを介した能動輸送の証拠。J. Neurochem. 86, 1564 - 1567.
- ・ブスケM.、ジブラットC.、セイント-ピエールM.、ジュリアンC.、カロンF.、チケッティF. パーキンソン病の動物モデルにおけるβ-3脂肪酸の作用の潜在的な神経防護作用機序としての脳由来神経栄養因子の調節。Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009 Nov 13; 33(8): 1401 - 8. Epub 2009 Jul 24.
- ・ブスケM.、ジブラットC.、ウレットM.、ロイヤールC.、カロンF.及びチケッティF. (2010) シスタミン代謝及び脳輸送特性: 神経変性疾患の臨床的意義。J. Neurochem. (2010) 114, 1651 - 1658.
- ・ブスケM.、グーK.、エモンドV.、ジュリアンP.、カンJX.、チケッティF.、カロンF. パーキンソン病のマウスモデルにおけるβ-6脂肪酸のβ-3脂肪酸へのトランスジェニック変換。J Lipid Res. (2011) Feb; 52(2): 263 - 71. Epub 2010 Nov 29.
- ・カロンF.、モリセッティM.、グーレM.、グロンディンR.、ブランシェットP. J.、ベダルトP. J.及びディ・パオロT. (1999) MPTP除神経サルの長期的なD1及びD2ドーパミン模倣薬治療: 大脳基底核GABA(A)/ベンゾジアゼピン受容体複合体及びGABA含有量に対する効果。Neurochem. Int 35, 81 - 91.
- ・カロンF.ら、大脳基底核GABA(B)受容体に対するMPTP誘発性除神経の効果: ドーパミン濃度及びドーパミン輸送体との相関。Synapse 2001, June 1; 40(3): 225 - 34.
- ・カロンF.ら、レボドパ誘発性運動合併症を伴うパーキンソン病の死後脳におけるGABA受容体及びドーパミン代謝回転の変化。Mov Disord. 2003 Mar; 18(3): 241 - 53.
- ・カバリーニD.、スカンドラR.及びデマルコC. (1963) 硫化物の存在下におけるシステアミンのヒポタウリンへの酵素的酸化。J. Biochem. 238, 2999 - 3005.
- ・コロソR.M.、ヒルシュベルガーL.L.、ドミニーJ.E.、リーJ.I.及びスティパヌクM.H. (2006) システアミンジオキシゲナーゼ: ラット及びマウスの組織におけるシステアミンのヒポタウリンへの生理的変換の証拠。Adv. Exp. Med. Biol. 583, 25 - 36.
- ・コスタンティニLC.、コールD.、シャツールベディP.、イサクソンO.、イムノフィリンリガンドは、パーキンソン病の動物モデルにおける進行性ドーパミン作動性変性を予防できる。Eur J Neurosci. Mar.
- ・コゼットM.、パーレンA.、レベスクD. ヒト線条体に内在するチロシン水酸化酵素-陽性ニューロンは、転写因子Nurr1を発現する。Eur J Neurosci. 2004; 20: 2089 - 95.
- ・ダゲネスC.、ルーゼルC.、ポラックG.M.及びシエルマンJ.M. (2000) インサイチューマウス脳灌流モデルの開発及びそのmdr1a P糖タンパク質欠損マウスへの応用。J. Cereb. Blood Flow Metab. 20, 381 - 386.
- ・デデオグルA.、クビルスJ.K.、サイトナーT.M.ら(2002) ハンチントン病のマウスモデルにおけるシスタミンの治療効果。J. Neurosci. 22, 894

2 - 8950 .

- ・ドヒルR .、フィドラーM .、ガンゴイチJ . A .、カスケルF .、シュナイダーJ . A .及びパーショップB . A . ( 2009 ) シスチン症の子供に対する1日2回の酒石酸水素システアミン治療。J . P e d i a t r . 156 , 71 - 75 .
- ・ドミニーJ .、エラーS .及びドーソンR . Jr ( 2004 ) 生合成スクールの構築：CNSタウリン合成の区画化の検討。N e u r o c h e m . R e s . 29 , 97 - 103 .
- ・ドミニーJ . E . Jr、シモンズC . R .、ヒルシュベルガーL . L .、ウォンJ .、コロソR . M .及びスティパヌクM . H . ( 2007 ) 第2の哺乳類チオールジオキシゲナーゼ、システアミンジオキシゲナーゼの発見及び特性決定。J . B i o l . C h e m . 282 , 25189 - 25198 . 10
- ・ドゥビンスキーR .及びグレイC . ( 2006 ) C Y T E - I - H D : ハンチントン病におけるシステアミン(シスタゴン)の第I相投与量決定及び忍容性試験。M o v . D i s o r d . 21 , 530 - 533 .
- ・エウエズL .及びソルボB . ( 1966 ) ラット肝臓におけるシステインスルフィン酸を形成する酵素系の特性。B i o c h i m . B i o p h y s . A c t a 128 , 296 - 305 .
- ・フォックスJ . H .、バーバーD . S .、シングB . ら ( 2004 ) シスタミンは、ハンチントン病トランスジェニックマウス脳及びポリグルタミン凝集のPC12モデルにおいてLシステインレベルを上昇させる。J . N e u r o c h e m . 91 , 413 - 422 . 20
- ・フレンチE . D .、ヴェッツァーニA .、ウェットセルW . O . Jr .及びシュバルツR . ( 1986 ) インビボ及びインビトロで試験した、ラット海馬におけるタウリンの興奮毒性作用。A d v . E x p . M e d . B i o l . 203 , 349 - 362 .
- ・ジブラットC .、ブスケM .、セイント - ピエールM .、レベスクD .、カロンF .、ロイヤールC .及びチケッティF . ( 2010 ) シスタミンは、脳由来神経栄養因子の上方制御を介して若年成体マウスのMPTP誘発性毒性を予防する。P r o g . N e u r o p s y c h o p h a r m a c o l . B i o l . P s y c h i a t r y 34 , 193 - 203 .
- ・ジブラットC .、セイント - ピエールM .、ロイヤールC .、チケッティF . ( 2007 ) . 30  
パーキンソン病の急性モデル対慢性モデルにおけるシスタミンの神経防護作用特性。T h e C a n a d i a n J o u r n a l o f N e u r o l o g i c a l S c i e n c e s S u p p l . 3 - S 4 2 .
- ・ジブラットC .、ブスケM .、セイント - ピエールM .、レベスクD .、カロンF .、ロイヤールC .、チケッティF . 2009 . パーキンソン病のマウスモデルにおけるシスタミンの神経防護作用機序。P a r k i n s o n i s m a n d R e l a t e d D i s o r d e r s 15S2 , S 2 9 - S 1 9 9 .
- ・ジブラットC .、セイント - ピエールM .、ブスケM .、レベスクD .、ロイヤールC .、チケッティF . 亜急性と慢性のMPTPマウスモデル間の差：ドーパミン作動性ニューロン変性及びシヌクレイン封入体の研究。J N e u r o c h e m ( 2009B ) ; 109 : 1 40  
469 - 82 .
- ・グリーンH . ( 1993 ) コドンの反復によるヒト遺伝子疾患：進化メカニズムとの関連。C e l l 74 , 955 - 956 .
- ・ハックスタブルR . J . ( 1992 ) タウリンの生理作用。P h y s i o l . R e v . 72 , 101 - 163 .
- ・イアंकR .、モハペルP .、ブルンディンP .、ポールG . マウスにおけるパーキンソン病の一側性6 - O H D A - 病変モデルの行動特性決定。B e h a v B r a i n R e s 2005 ; 162 : 1 - 10 .
- ・ヤイトナーT . M .、デリカトニーE . J .、アルクビストJ .、キャパーH .及びクーパA . J . ( 2005 ) シスタミンによるトランスグルタミナーゼ2の阻害機序。B i 50

- ochem. Pharmacol. 69, 961-970.
- ・カープM. V.、ベシュールM. W.、シュプリングーJ. E.、シャバD.、ユーゼフS.、ペドッティR.、ミッチェルD.及びスタインマンL. (2002) トランスグルタミンナーゼ阻害物質であるシスタミン投与による、ハンチントン病のトランスジェニックモデルでの生存期間の延長と異常運動の軽減。Nat. Med. 8, 143-149.
  - ・ラポワントN.、St-ヒレアM.、マルチノリMG.、ブランシェットJ.、グールドP.、ロイヤールCら (2004) ロテノンは、非特異的な中枢神経系毒性及び全身毒性を誘導する。FASEB J. 2004; 18: 717-9.
  - ・リーJ. I.、ロンドーニヨM.、ヒルシュベルガーL. L.及びスティパヌクM. H. (2004) システインジオキシゲナーゼと グルタミルシステインシンセターゼの調節は肝臓システイン濃度と関係がある。J. Nutr. Biochem. 15, 112-122.
  - ・レイNES.、ハブリリクスMJら、成体マウスの脳における遺伝子発現のゲノム全域アトラス。Nature 2007; 445: 168-76.
  - ・レオナルディR.、チャンY. M.、ロックC. O.及びヤコブスキーS. (2005) コエンザイムA: 活動再開。Prog. Lipid Res. 44, 125-153.
  - ・リンドナーMD.、ウィンSR.、ベッジEE.、ハンマンJP.、ジェンティーレFT.、ドハーティEら、一側性ドーパミン枯渇及びパーキンソン病様症状を有するラットにおける封入カテコールアミン及びGDNF産生細胞の移植。Exp Neurol 1995; 132: 62-76. 690.
  - ・ルンドブラッドM.、ピッコニB.、リンドグレーンH.、チェンチMA. 6-ヒドロキシドーパミン障害マウスにおけるL-DOPA誘発性ジスキネジアのモデル: 黒質線条体機能の運動及び細胞パラメータの関係。Neurobiol Dis 2004; 16: 110-23.
  - ・マルチグノリM.、グロータスG. M.及びデカンターR. (2006) CYPを介した薬物の代謝、阻害及び誘導についてのマウス、ラット、イヌ、サルならびにヒトの間の種差。Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2, 875-894.
  - ・ムラマツM.、カキタK.、ナカガワK.及びキリヤマK. (1978) 神経組織からのアセチルコリン及びノルエピネフリンの放出におけるタウリンの調節的役割。Jpn. J. Pharmacol. 28, 259-268.
  - ・オヤS. S.及びサランサーリP. (1996) 脳における浸透圧調節物質及び神経修飾物質としてのタウリン。Metab. Brain Dis. 11, 153-164.
  - ・オルデンドルフW. H.及びサボJ. (1976) 3つの血液脳関門アミノ酸担体のうちの1つへのアミノ酸の割り当て。Am. J. Physiol. 230, 94-98.
  - ・ウェレットM.、エモンドV.、チェンC. T.、ジュリアンC.、ブーラセットF.、オッドS.、ラ・フェルラE.、バジネットR. P.及びカロンF. (2009) 血液脳関門を通したドコサヘキサエン酸及びエイコサペンタエン酸の拡散: ならびにインサイチュー脳灌流研究。Neurochem. Int. 55, 476-482.
  - ・パサンテス-モラレスH.、アルザーテN. E.及びクルスC. (1981) 神経組織におけるタウリンの役割: イオン流動に対するその効果。Adv Exp Med Biol 139, 273-292.
  - ・ピントJ. T.、ヴァン・ラームスドンクJ. M.、リービットB. R.、ハイデンM. R.、ヤイトナーT. M.、セイラーH. T.、クラスニコフB. F.及びクーパA. J. (2005) シスタミンによるYAC128マウスとその野生型同腹子の処置は血しょう又は脳内におけるシスタミン蓄積を誘導しない: ハンチントン病の治療への意味合い。J. Neurochem 94, 1087-1101.
  - ・ピントJ. T.、ホメンコT.、サボS.、マクラーレンG. D.、デントンT. T.、クラスニコフB. F.、ヤイトナーT. M.及びクーパA. J. (2009) システアミン及びシスタミンの代謝ならびに輸送に関する含硫黄化合物の測定。脳代謝の領域差

10

20

30

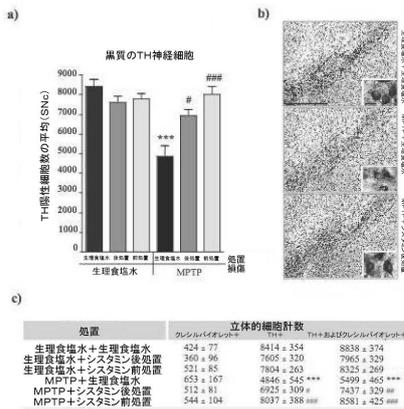
40

50

- 。 J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877, 3434 - 3441 .
- ・ピタリG .、マウリツィG .、フラティV .、ウルシニC . L .、スペラL .、デュブレS . 及びカバリーニD . ( 1992 ) パンテテインからのS アミノエチル L システインの酵素的合成。 Biochim Biophys Acta 1116, 27 - 33 .
- ・セラールC . F . 及びクズピリナM . J . ( 1989 ) ダンシルクロリド誘導体の逆相高速液体クロマトグラフィー及び紫外検出を用いた、アミノ酪酸、グルタミン酸、グリシン及びタウリンの分析。 J Chromatogr 487, 167 - 172 .
- ・サンタT .、アオヤマC .、フクシマT .、イマイK . 及びフナツT . ( 2006 ) ベンゾフラザン蛍光試薬、7 フルオロ 2, 1, 3 ベンゾオキサジアゾール 4 スルホネート及び4 アミノスルホニル 7 フルオロ 2, 1, 3 ベンゾオキサジアゾールによる誘導体化後の蛍光検出を伴う高速液体クロマトグラフィーによる還元型チオールの測定におけるチオール交換反応の抑制。 Biomed Chromatogr 20, 656 - 661 .
- ・シャラートT .、フレミングSM、リージョアJ L、ティラーソンJ L, B1及びST . 脳卒中、皮質切除、パーキンソン病及び脊髄損傷の一側性ラットモデルにおけるCNS可塑性及び前肢感覚運動結果の評価。 Neuropharmacology 2000; 39: 777 - 87 .
- ・サーシェンH . 及びライタA . ( 1979 ) アナログによる阻害パターンは、10個以上のアミノ酸輸送系が脳細胞に存在することを示す。 J Neurochem 32, 719 - 726 .
- ・スタックE . C .、フェロJ . L .、キムJ .、デル・シニョーレS . J .、グッドリッチS .、マトソンS .、ハントB . B .、コーミアK .、スミスK .、マトソンW . R .、リュウH . 及びフェランテR . J . ( 2008 ) パーキンソン病の神経毒モデルにおけるミトコンドリア機能障害及び酸化ストレスの治療減弱化。 Biochim Biophys Acta 1782, 151 - 162 .
- ・ザ・サンL .、スーS .、チョウM .、ワンC .、ウーY . 及びチャンP . ( 2010 ) マウスにおけるMPTP誘発性ドーパミン作動性神経変性に対するシステアミンの効果。 Brain Res 1335, 74 - 82 .
- ・ティラーソンJ L、コーエンAD、フィルハウワーJ、ミラーGW、ジグモンドMJ、シャラートT . 6 ヒドロキシドーパミンによる行動学的及び神経化学的影響に対して、肢の強制使用が与える効果。 J Neurosci 2001; 21: 4427 - 35 .
- ・トランブレームE .、セイント・ピエールM .、ボリースE .、レベスクD .、ロイヤールC . 及びケッティF . ( 2006 ) 加齢パーキンソン病マウスにおけるシスタミンの神経防護作用効果。 Neurobiol Aging 27, 862 - 870 .
- ・ウンゲルステッド, U ., 1968 . 中枢モノアミンニューロンの6 - ヒドロキシドーパミン誘発性変性。 Eur J Pharmacol 5, 5107 - 5110 .
- ・ウェードL . A . 及びカツツマンR . ( 1975 ) 合成アミノ酸及び血液脳関門におけるL - DOPA輸送の性質。 J Neurochem 25, 837 - 842 .
- ・ウェードL . A . 及びブレイディーH . M . ( 1981 ) 血液脳関門におけるシステイン及びシスチンの輸送。 J Neurochem 37, 730 - 734 .
- ・ワンX .、サルカールA .、ケッティF .、ユーM .、チューA .、ヨーキバルシK .、セイント・ピエールM . 及びブラウネルA . L . ( 2005 ) ハンチントン病のトランスジェニックR6 / 2マウスモデルにおけるトランスグルタミナーゼ阻害剤シスタミン誘発性の神経防護作用の脳血管PETイメージング及び組織学的証拠。 J Neurol Sci 231, 57 - 66 .
- ・ゼッターストローム・ロルフH .、ルドミラ・ソローミン、ロッセ・ヤンソン、バリー・J .、ホフナー、ラーズ・オルソン、トマス・パールマン . Nurrl欠損マウスにおけるドーパミンニューロン無形成。 Science 1997 Apr 11; 276 (

5 3 1 0 ) : 2 4 8 - 5 0 .

【 図 1 】



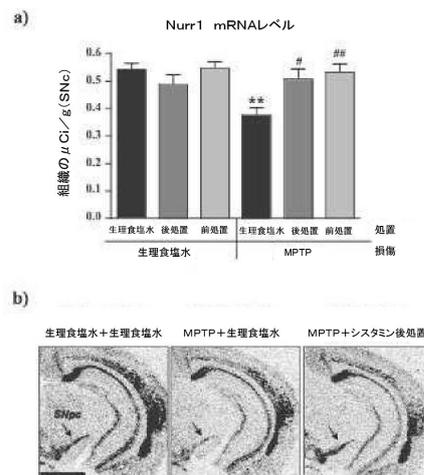
前処置スケジュール



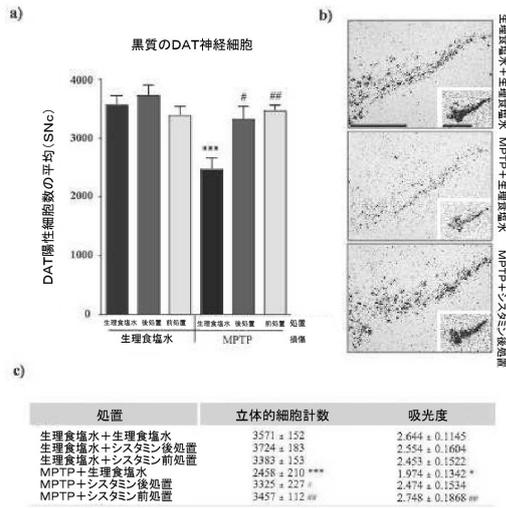
後処置スケジュール



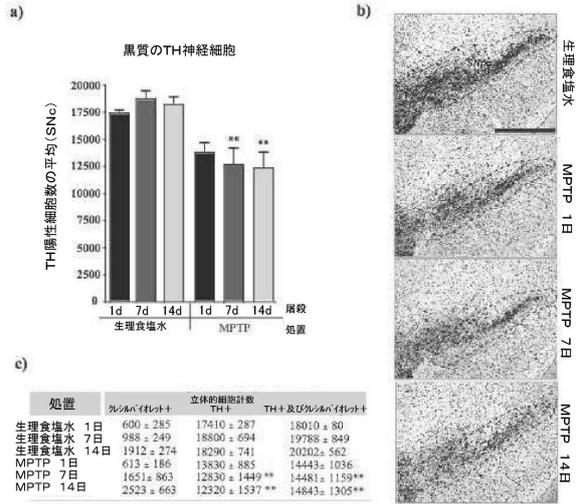
【 図 2 】



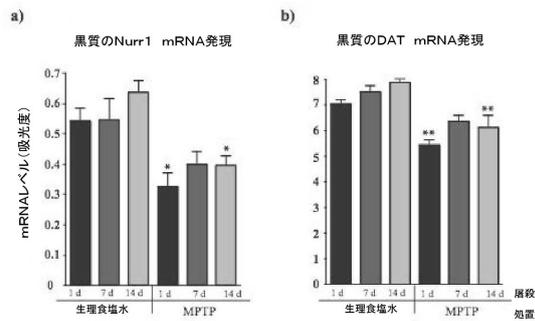
【図3】



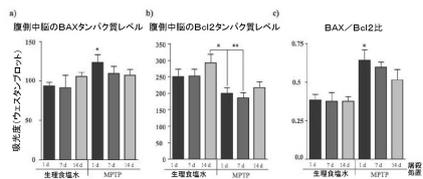
【図4】



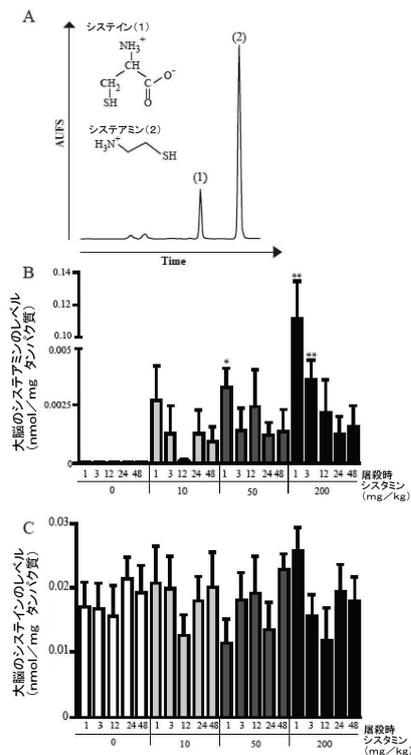
【図5】



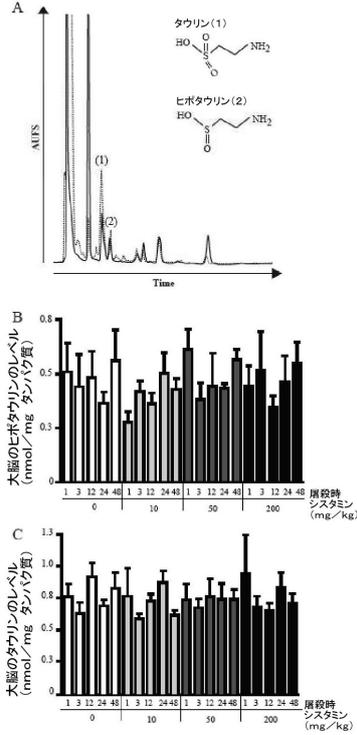
【図6】



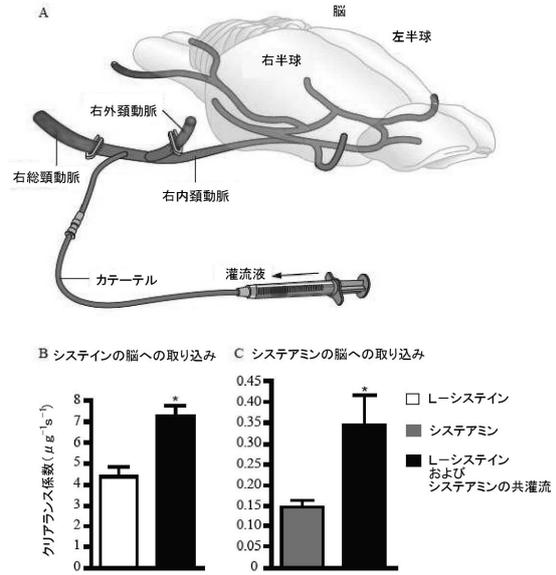
【図7】



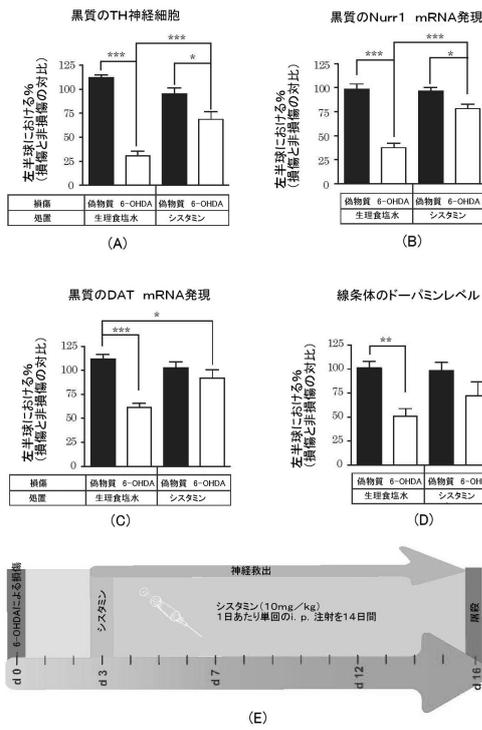
【図 8】



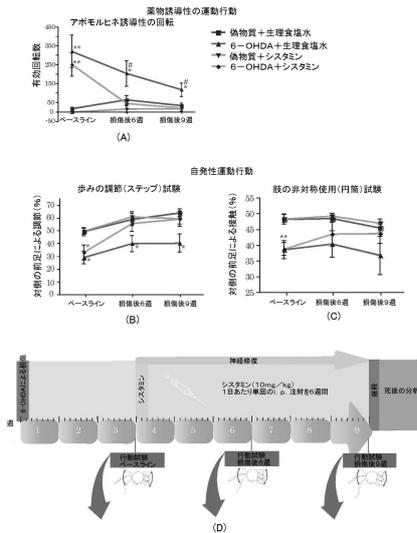
【図 9】



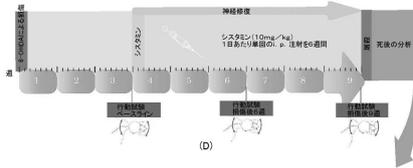
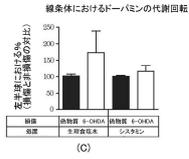
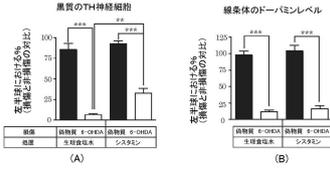
【図 10】



【図 11】



【 12 】



## フロントページの続き

(72)発明者 ルイヤール、クロード

カナダ国 ジー 1 シー 6 アール 3 ケベック、ケベック、リュ フェイド、5 0 9

(72)発明者 カロン、フレデリック

カナダ国 ジー 1 エス 1 エス 6 ケベック、ケベック、ルネ レヴェック ウエスト、5 5 7

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 1 5 1 6 2 5 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 1 - 5 2 2 8 9 2 ( J P , A )

Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 2011 Mar 30, Vol.35, No.2, p.380-389, Available online 2010 Nov 24

Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 2010, Vol.34, No.1, p.193-203

J. Neurochem., 2010, Vol.114, No.6, p.1651-1658

J Biomed. Sci., 2010, Vol.17, Suppl 1, S18

40th Annual Meeting Neuroscience 2010 Abstract, Program#/Poster#:460.8/P12, <http://www.abstractsonline.com/Plan/AbstractPrintView.aspx?mID=2554&sKey=de71d49d-cefe-4af2-8ef4-4c05c2c234d8&cKey=84a7c25d-e4d5-457f-b5b3-b3fdea1a1301>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 1 4 5

A 6 1 K 3 1 / 1 9 8

A 6 1 P 2 5 / 1 6

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )