(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6562361号
(P6562361)
(45)発行日　令和1年8月21日(2019.8.21)　(24)登録日　令和1年8月2日(2019.8.2)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C07D 417/04 | (2006.01) | C07D | 417/04 | CSP |
| C07D 471/06 | (2006.01) | C07D | 471/06 | ZNA |
| C07K 7/02 | (2006.01) | C07K | 7/02 | |
| A61K 31/4745 | (2006.01) | A61K | 31/4745 | |
| A61K 31/4709 | (2006.01) | A61K | 31/4709 | |

請求項の数 10　(全 32 頁)　最終頁に続く

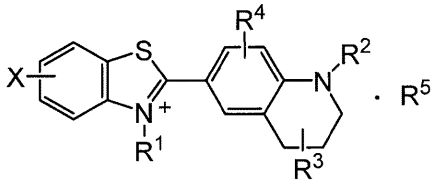
(21)出願番号　特願2016-534476(P2016-534476)
(86)(22)出願日　平成27年7月15日(2015.7.15)
(86)国際出願番号　PCT/JP2015/070317
(87)国際公開番号　WO2016/010092
(87)国際公開日　平成28年1月21日(2016.1.21)
審査請求日　平成30年7月11日(2018.7.11)
(31)優先権主張番号　特願2014-145736(P2014-145736)
(32)優先日　平成26年7月16日(2014.7.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　503360115
国立研究開発法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町四丁目１番８号
(74)代理人　110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(72)発明者　金井　求
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　相馬　洋平
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　谷口　敦彦
東京都八王子市堀之内１４３２－１　東京薬科大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ベンゾチアゾール化合物及びこれを含有する医薬

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
次の一般式（１）
【化１】



(1)

（式中、Ｘはハロゲン原子を示し；
$R^1$は、置換基を有していてもよい炭化水素基を示し；
$R^2$は水素原子、又は置換基を有していてもよい炭化水素基を示し；
$R^3$及び$R^4$は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、又はシアノ基を示し；
$R^2$と$R^4$は一緒になってアルキレン基を形成してもよく、
$R^5$はアニオンを示す）
で表されるベンゾチアゾール化合物。
【請求項２】

$R^1$、$R^2$、$R^3$及び$R^4$における炭化水素基に置換し得る基が、同一又は異なって、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、アルコキシ基、アシル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、芳香族炭化水素基及び複素環式基から選ばれる１～３個である請求項１記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項３】

$R^1$が、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基である請求項１又は２記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項４】

$R^1$が、炭素数１～１２のアルキル基である請求項１～３のいずれか１項に記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項５】

$R^3$が、水素原子又は炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基である請求項１～４のいずれか１項に記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項６】

$R^3$が、水素原子である請求項１～５のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項７】

$R^2$が、$R^4$と一緒になって$C_2$－$C_4$アルキレン基を形成するか、あるいは炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基（このアルキル又はアルケニル基には、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ－ＣＯ基又はジペプチド－ヘキサペプチド－ＣＯ－基が置換し、このアミノ酸、ジペプチド～ヘキサペプチドにはさらに$C_{6-14}$アリール基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい。）である請求項１～６のいずれか１項に記載のベンゾチアゾール化合物。

【請求項８】

請求項１～７のいずれにか１項に記載のベンゾチアゾール化合物を有効成分とする医薬。

【請求項９】

病原性アミロイドが関与する疾患の予防又は治療薬である請求項８記載の医薬。

【請求項１０】

請求項１～７のいずれか１項に記載のベンゾチアゾール化合物及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、種々のアミロイドが関与する疾患を予防又は治療するための医薬に関する。

【背景技術】

【０００２】

通常、タンパク質はフォールディングすることにより、特異的なネイティブ構造を形成して生命機能を担うが、一方でミスフォールディングすることでβシート構造に富んだ線維へと凝集（アミロイド化）することがある。このアミロイド化の過程で産生する凝集体（オリゴマー、プロトフィブリル、線維）は様々な機能障害を引き起こすことが知られており、（このような疾患は「アミロイド病」と総称される）２０種類以上のタンパク質がアミロイド病の原因物質として同定されている。そのようなアミロイドとしては、例えば、アルツハイマー病のアミロイドβ、タウ蛋白質、パーキンソン病のαシヌクレイン、糖尿病のアミリン、全身性アミロイド－シスのトランスサイレチン、ハンチントン病のハンチンチン等が知られている。

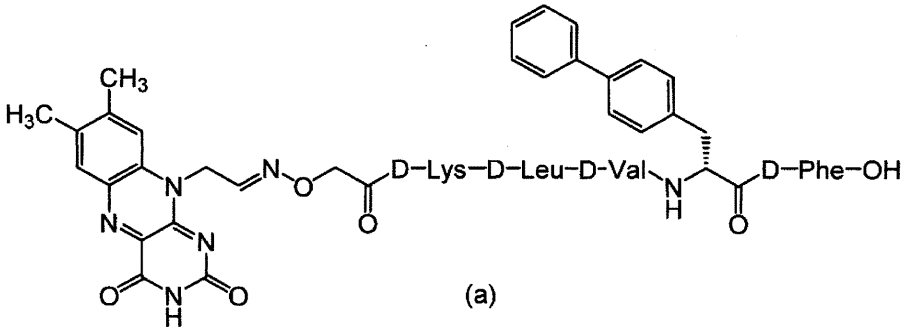
【０００３】

これらの病原性アミロイドを標的とした治療薬の開発戦略としては、例えばアルツハイマー病の原因アミロイドであるアミロイドβ（Ａβと略す）に対しては、前駆体蛋白質からＡβを産生する酵素阻害剤、Ａβの分解酵素促進剤、免疫療法、Ａβの凝集阻害剤等が知られている。

一方、Ａβに関しては、ＡβペプチドのＭｅｔ酸化体（ＡβペプチドのＭｅｔ残基の硫黄原子が酸化（Ｏ）された酸化体）が生体内に少量残存すること、及び当該Ｍｅｔ酸化体はＡβペプチドに比べて凝集性が低いことが報告されている（非特許文献１～３）。かかる観点から、本発明者は、式（ａ）で表されるＡβ結合部位を有するフラビン光触媒を用いてＡβペプチドを酸化するとＡβペプチド酸化体が得られ、当該Ａβペプチド酸化体はＡβの凝集を抑制することを報告した（非特許文献４）。

【０００４】

【化１】




【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Hou, L. et al.J. Biol. Chem., 2002, Vol.277, No.43, p40173-40176

【非特許文献２】Bitan, G. et al.J. Am. Chem. Soc., 2003, Vol.125, No.50, p15359-15365

【非特許文献３】Moskovitz, J. etal. Biochemistrym, 2011, 50, p10687-10697

【非特許文献４】A. Taniguchi etal. Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53, 1382-1385

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

しかしながら、前記非特許文献４で用いたフラビン光触媒はＡβ非存在下においても酸化活性を有するため、インビトロでは適用可能であるが、生体内では非特異的に反応する可能性があり、生体内への適用は困難であった。また、Ａβペプチドにしか適用できないものであった。

従って、本発明の課題は、生体内に適用可能で、Ａβペプチドだけでなく他のアミロイドにも適用可能なアミロイド酸化触媒として有用な化合物及びこれを用いたアミロイド関連疾患予防治療薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

そこで本発明者は、アミロイドに対する酸化活性を有し、生体内に適用可能な触媒を開発すべく種々検討した結果、下記一般式（１）で表されるベンゾチアゾール化合物がＡβペプチド及び他のアミロイドに対する酸化活性が強く、凝集性を有しないアミロイド酸化体を生成する生体内触媒として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【０００８】

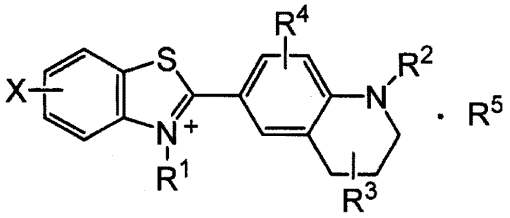
すなわち、本発明は、次の〔１〕～〔１３〕を提供するものである。

【０００９】

〔１〕次の一般式（１）

【００１０】

【化２】



(1)

【００１１】

（式中、Ｘはハロゲン原子を示し；

$R^1$は、置換基を有していてもよい炭化水素基を示し；

$R^2$は水素原子、又は置換基を有していてもよい炭化水素基を示し；

$R^3$及び$R^4$は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、又はシアノ基を示し；

$R^2$と$R^4$は一緒になってアルキレン基を形成してもよく、

$R^5$はアニオンを示す）

で表されるベンゾチアゾール化合物。

〔２〕$R^1$、$R^2$、$R^3$及び$R^4$における炭化水素基に置換し得る基が、同一又は異なって、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、アルコキシ基、アシル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、芳香族炭化水素基及び複素環式基から選ばれる１～３個である〔１〕記載のベンゾチアゾール化合物。

〔３〕$R^1$が、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基である〔１〕又は〔２〕記載のベンゾチアゾール化合物。

〔４〕$R^1$が、炭素数１～１２のアルキル基である〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物。

〔５〕$R^3$が、水素原子又は炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基である〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物。

〔６〕$R^3$が、水素原子である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物。

〔７〕$R^2$が、$R^4$と一緒になって$C_2$－$C_4$アルキレン基を形成するか、あるいは炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基（このアルキル又はアルケニル基には、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ－ＣＯ基又はジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基が置換し、このアミノ酸、ジペプチド～ヘキサペプチドにはさらに$C_{6-14}$アリール基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい。）である〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物。

〔８〕〔１〕～〔７〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物を有効成分とする医薬。

〔９〕病原性アミロイドが関与する疾患の予防又は治療薬である〔８〕記載の医薬。

〔10〕〔１〕～〔７〕のいずれかに記載のベンゾチアゾール化合物及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

〔11〕病原性アミロイドが関与する疾患の予防又は治療に使用するための〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の化合物。

〔12〕病原性アミロイドが関与する疾患の予防又は治療薬製造のための〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の化合物の使用。

〔13〕〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の化合物を投与することを特徴とする病原性アミロイドが関与する疾患の予防又は治療方法。

【発明の効果】

【００１２】

本発明のベンゾチアゾール化合物（１）は、Ａβペプチド等の病原性アミロイドを酸化

する触媒活性が高く、生体内でアミロイドを酸化することによりアミロイドの凝集を抑制し、病原性アミロイドが関与する疾患の予防治療薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】Ａβ１-４２存在下また非存在下におけるチオフラビンＴおよび化合物（１ａ）の吸光スペクトル（左）および蛍光スペクトル（右）（ｂ）凝集Ａβ１-４２（３７℃にて３時間インキュベートして調製）共存下におけるチオフラビンＴおよび化合物（１ａ）の濃度-蛍光強度プロットを示す。

【図２ａ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるＡβ１-４２の酸素化反応の解析を示す。

【図２ｂ】アミノ酸分析を用いたＡβ１-４２の酸素化部位の解析（ｄａｒｋ：ネイティブＡβに相当、ｌｉｇｈｔ：酸素化Ａβに相当）を示す。

【図２ｃ】エンドペプチダーゼＬｙｓ－Ｃによる酵素消化を用いたＡβ１-４２の酸素化部位の解析を示す。上から、消化混合物のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトル、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによるＡβ１－１６フラグメント酸素化体のＭＳスペクトルを示す。

【図２ｄ】エンドペプチダーゼＬｙｓ－Ｃによる酵素消化を用いたＡβ１－４２の酸素化部位の解析を示す。Ａβ１－１６＋１４Ｄａ誘導体（保持時間＝１２．１および１３．２分）のＭＳ／ＭＳスペクトルを示す。

【図３ａ】Ａβ１-４２のアミノ酸配列（酸素化同定部位を下線で示す。）を示す。

【図３ｂ】チオフラビンＴおよび化合物（１ａ）によるＡβ１-４２の酸素化反応を示す。

【図３ｃ】リボフラビン、化合物（ａ）、化合物（１ａ）によるＡβ１-４２、アンギオテンシンＩＶおよびメチオニンエンケファリンに対する酸素化反応を示す。

【図３ｄ】化合物（１ａ）のＡβ選択的酸素化の想定メカニズムを示す。Ａ，基底状態（$S_0$）および励起状態（$S_1$）における化合物（１ａ）のポテンシャルエネルギー（横軸：ベンゾチアゾール部位とジュロリジン部位の二面角、縦軸：基底状態の最低エネルギーを０とする。）Ｂ－Ｄ，グリセロール／水混合溶媒中における化合物（１ａ）の蛍光スペクトル（Ｂ）、フルフリルアルコールに対する反応（Ｃ）、ベンゾイルメチオニンに対する反応（Ｄ）

【図４】ネイティブＡβ１-４２と酸素化Ａβ１-４２の凝集性および細胞毒性（ｄａｒｋ：ネイティブＡβに相当、ｌｉｇｈｔ：酸素化Ａβに相当）を示す。（ａ）ナイルレッド蛍光アッセイ（ｂ）原子間力顕微鏡分析（インキュベート時間：６時間）（ｃ）円二色性分光分析（インキュベート時間：６時間）（ｄ）ＰＣ１２細胞を用いた細胞生存率の評価。

【図５】細胞培養培地中（０．１％ウマ血清を含む）における化合物（１ｅ）によるＡβ１-４２の酸素化反応の解析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトルを表記）を示す。

【図６ａ】アミリンのアミノ酸配列（酸素化同定部位を赤字下線で示す）を示す。

【図６ｂ】リボフラビンおよび化合物（１ａ）によるアミリン（pre-incubation time＝０ｈ：モノマー状態、１ｈ：中程度に凝集、２ｈ：高度に凝集）に対する酸素化反応を示す。

【図６ｃ】ネイティブアミリンと酸素化アミリンの凝集性（ナイルレッド蛍光アッセイ）を示す。

【図６ｄ】ネイティブアミリンと酸素化アミリンの凝集性（円二色性分光分析（インキュベート時間：１時間）（ｄａｒｋ：ネイティブアミリンに相当、ｌｉｇｈｔ：酸素化アミリンに相当）を示す。

【図６ｅ】凝集アミリン選択的な触媒的酸素化の概念図を示す。

【図７ａ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるアミリンの酸素化反応解析を示す。

【図７ｂ】アミノ酸分析によるアミリンの酸素化部位の解析を示す（ｄａｒｋ：ネイティブアミリンに相当、ｌｉｇｈｔ：酸素化アミリンに相当）。

【図７ｃ】（ｃ）キモトリプシンによる酵素消化を用いたアミリンの酸素化部位の解析を示す。酵素消化混合物のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトルを表記。
【図８】リボフラビン、化合物（ａ）、化合物（１ａ）によるＡβ１－４２、アンギオテンシンＩＶ、メチオニンエンケファリン、デスアシルグレリン又はソマトスタチンに対する酸素化反応を示す。
【図９ａ】（ａ）蛍光アッセイを用いた凝集Ａβ１－４２（オリゴマー及び線維）のクロスβシート量解析および原子間力顕微鏡分析を用いた形状解析を示す。
【図９ｂ】（ｂ）蛍光アッセイを用いた化合物（１ａ）の凝集Ａβ１－４２（オリゴマー及び線維）に対する結合解析を示す。
【図９ｃ】（ｃ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いたリボフラビン及び化合物（１ａ）による凝集Ａβ１－４２（オリゴマー及び線維）の酸素化強度率（％）の増加を示す。
【図１０ａ】（ａ）原子間力顕微鏡分析を用いたＡβ１－４２オリゴマーのサイズ分布解析を示す。
【図１０ｂ】（ｂ）蛍光アッセイを用いた化合物（１ａ）のＡβ１－４２オリゴマーに対する結合解析を示す。
【図１０ｃ】（ｃ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるＡβ１－４２オリゴマーの酸素化強度率（％）の増加を示す。
【図１０ｄ】（ｄ）蛍光アッセイ及び原子間力顕微鏡を用いた化合物（１ａ）による酸素化Ａβ１－４２オリゴマーの凝集性（非酸素化Ａβ１－４２（Ｎａｔｉｖｅ）との比較）を示す。
【図１１ａ】（ａ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるインスリンの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｂ】（ｂ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるβ２－ミクログロブリンの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｃ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるトランスサイレチンの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｄ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるトランスサイレチンの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｅ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるトランスサイレチンの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｆ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるα－シヌクレインの酸素化反応解析を示す。
【図１１ｇ】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）によるα－シヌクレインの酸素化反応解析を示す。
【図１２ａ】（ａ）蛍光アッセイを用いたヌクレオシドホスホリラーゼの熱凝集解析を示す。
【図１２ｂ】（ｂ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）及びリボフラビンによる凝集及び非凝集Ａβ１－４２、凝集及び非凝集ヌクレオシドホスホリラーゼの酸素化率（％）を示す。
【図１３】ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ分析を用いた化合物（１ａ）及びリボフラビンによるＬ－アスコルビン酸の酸素化反応解析を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
一般式（１）中、Ｘはハロゲン原子を示す。ここで、ハロゲン原子としては、塩素原子、臭素原子、フッ素原子又はヨウ素原子が挙げられ、このうち塩素原子又は臭素原子がより好ましく、臭素原子がさらに好ましい。
【００１５】
$R^1$、$R^2$、$R^3$及び$R^4$は、置換基を有していてもよい炭化水素基を示すことがある。ここで、炭化水素基としては、直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、芳香族炭化水素基が挙げられる。

直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基としては、炭素数１～１２の直鎖又は分岐鎖のアルキル基、炭素数２～１２の直鎖又は分岐鎖のアルケニル基が好ましく、炭素数１～６の直鎖又は分岐鎖のアルキル基、炭素数２～６の直鎖又は分岐鎖のアルケニル基がより好ましい。これらのアルキル基又はアルケニル基の具体例としては、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｎ－ペンチル基、ｎ－ヘキシル基、ビニル基、アリル基等が挙げられる。

【００１６】

シクロアルキル基、シクロアルケニル基としては、炭素数３～８のシクロアルキル基、炭素数３～８のシクロアルケニル基が挙げられ、炭素数３～６のシクロアルキル基、炭素数３～６のシクロアルケニル基が好ましい。これらのシクロアルキル基、シクロアルケニル基の具体例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等が挙げられる。

【００１７】

芳香族炭化水素基としては、炭素数６～１４の芳香族炭化水素基が好ましく、具体例としては、フェニル基、インデニル基、ナフチル基、ビフェニル基等が挙げられる。

【００１８】

前記$R^1$～$R^4$で示される炭化水素基のうち、直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基が好ましく、直鎖又は分岐鎖のアルキル基がより好ましく、炭素数１～１２の直鎖又は分岐鎖のアルキル基がさらに好ましく、炭素数１～６の直鎖又は分岐鎖のアルキル基がさらに好ましい。

【００１９】

前記の炭化水素基に置換し得る基としては、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、アルコキシ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アシル基、芳香族炭化水素基及び複素環式基から選ばれる１～３個が挙げられる。

ここで、ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。アルコキシ基としては、炭素数１～１２のアルコキシ基が挙げられ、炭素数１～６のアルコキシ基が好ましく、メトキシ基、エトキシ基、ｎ－プロピルオキシ基、イソプロピルオキシ基、ｎ－ブチルオキシ基等がより好ましい。アルコキシカルボニル基としては、$C_{1-6}$アルコキシカルボニル基が挙げられる。アシル基としては、アルカノイル基、アロイル基、カルボキシアルキルカルボニル基、アルコキシカルボニルアルキルカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、ペプチド－ＣＯ－基等が挙げられ、炭素数１～１２のアルカノイル基、$C_{6-14}$－アロイル基、カルボキシ$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、$C_{1-12}$アルコキシカルボニル$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、ジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基が挙げられる。芳香族炭化水素基としては、炭素数６～１４の芳香族炭化水素基が好ましく、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。複素環式基としては、Ｎ、Ｏ又はＳから選ばれるヘテロ原子を１～３個有する５員～１０員の複素環式基が挙げられ、具体的にはピロリル基、チエニル基、フラニル基、イミダゾリル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基等が挙げられる。

【００２０】

これらの炭化水素基上の置換基としては、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、$C_{1-12}$アルコキシ基、$C_{1-12}$アルカノイル基、$C_{6-14}$アロイル基、カルボキシ$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、$C_{1-12}$アルコキシカルボニル$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、ジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基、$C_{6-14}$アリール基、及びＮ、Ｏ又はＳから選ばれるヘテロ原子を１～３個有する５員～１０員の複素環式基から選ばれる１～３個が好ましい。

【００２１】

$R^3$及び$R^4$で示されるアルコキシ基としては、炭素数１～１２のアルコキシ基が好ましく、炭素数１～６のアルコキシ基がより好ましく、具体例としてはメトキシ基、エトキシ基、ｎ－プロピルオキシ基、イソプロピルオキシ基、ｎ－ブチルオキシ基が挙げられる。

【００２２】

$R^1$としては、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基が好ましい。また、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基がより好ましく、炭素数１～１２のアルキル基がさらに好ましく、炭素数１～６のアルキル基がさらに好ましく、炭素数１～４のアルキル基がさらに好ましい。

【００２３】

$R^3$としては、水素原子、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基が好ましく、水素原子又は炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基がより好ましく、水素原子がさらに好ましい。

【００２４】

$R^2$としては、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基が好ましく、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基がより好ましく、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基がさらに好ましい（これらは置換基を有していてもよい）。ここで置換基としては、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、$C_{1-12}$アルコキシ基、$C_{1-12}$アルカノイル基、$C_{6-14}$アロイル基、カルボキシ$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、$C_{1-12}$アルコキシカルボニル$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、ジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基、$C_{6-14}$アリール基、及びＮ、Ｏ又はＳから選ばれるヘテロ原子を１～３個有する５員～１０員の複素環式基から選ばれる１～３個であるのが好ましい。さらに、置換基としては、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、又はジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ基が好ましく、これらのアミノ酸、ジペプチド～ヘキサペプチドには、$C_{6-14}$アリール基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい。

【００２５】

$R^2$と$R^4$が一緒になって形成するアルキレン基としては、炭素数２～４のアルキレン基が好ましく、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基が挙げられる。なお、$R^2$と$R^4$が一緒になってアルキレン基を形成する場合、$R^4$はテトラヒドロキノリン環上の８位に置換しているのが好ましい。

【００２６】

$R^5$で示されるアニオンとしては、ハロゲンアニオン、スルホナートアニオン、トリフラートアニオンが好ましい。

【００２７】

前記一般式（１）において、$R^1$が炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基であり、これらの基は置換基を有していてもよく；

$R^2$が水素原子、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基であり、これらの基は置換を有していてもよく；

$R^3$及び$R^4$が同一又は異なって、水素原子、炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～８のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、炭素数６～１４の芳香族炭化水素基（これらの基は置換基を有していてもよい）、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はシアノ基であり；

$R^2$及び$R^4$が一緒になって$C_2$－$C_4$アルキレン基を形成してもよく；

$R^5$がアニオンであり；

前記の置換基が、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシ基、アシル基、芳香族炭化水素基及び複素環式基から選ばれる１～３個であるのが好ましい。

【００２８】

また、前記一般式（１）において、$R^1$が炭素数１～６のアルキル又はアルケニル基、

炭素数３～６のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基であり、これらの基は置換基を有していてもよく；

$R^2$が水素原子、炭素数１～６のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～６のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、又は炭素数６～１４の芳香族炭化水素基であり、これらの基は置換を有していてもよく；

$R^3$及び$R^4$が同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル又はアルケニル基、炭素数３～６のシクロアルキル又はシクロアルケニル基、炭素数６～１４の芳香族炭化水素基（これらの基は置換基を有していてもよい）、$C_{1-6}$アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はシアノ基であり；

$R^2$及び$R^4$が一緒になって$C_2$－$C_4$アルキレン基を形成してもよく；

$R^5$がアニオンであり；

前記の置換基が、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、$C_{1-12}$アルコキシ基、$C_{1-12}$アルカノイル基、$C_{6-14}$アロイル基、カルボキシ$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、$C_{1-12}$アルコキシカルボニル$C_{1-12}$アルキルカルボニル基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ酸－ＣＯ－基、ジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基、$C_{6-14}$アリール基、及びＮ、Ｏ又はＳから選ばれるヘテロ原子を１～３個有する５員～１０員の複素環式基から選ばれる１～３個であるのがより好ましい。

【００２９】

また、一般式（１）において、

$R^1$が炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基であり、より好ましくは炭素数１～１２のアルキル基であり；

$R^3$が水素原子又は炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基であり、より好ましくは水素原子であり；

$R^2$が、$R^4$と一緒になって$C_2$－$C_4$アルキレン基を形成するか、あるいは炭素数１～１２のアルキル又はアルケニル基（このアルキル又はアルケニル基には、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アミノ－ＣＯ基又はジペプチド～ヘキサペプチド－ＣＯ－基が置換し、このアミノ酸、ジペプチド～ヘキサペプチドにはさらに$C_{6-14}$アリール基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい。）であり；

$R^5$がアニオンであるのがさらに好ましい。

【００３０】

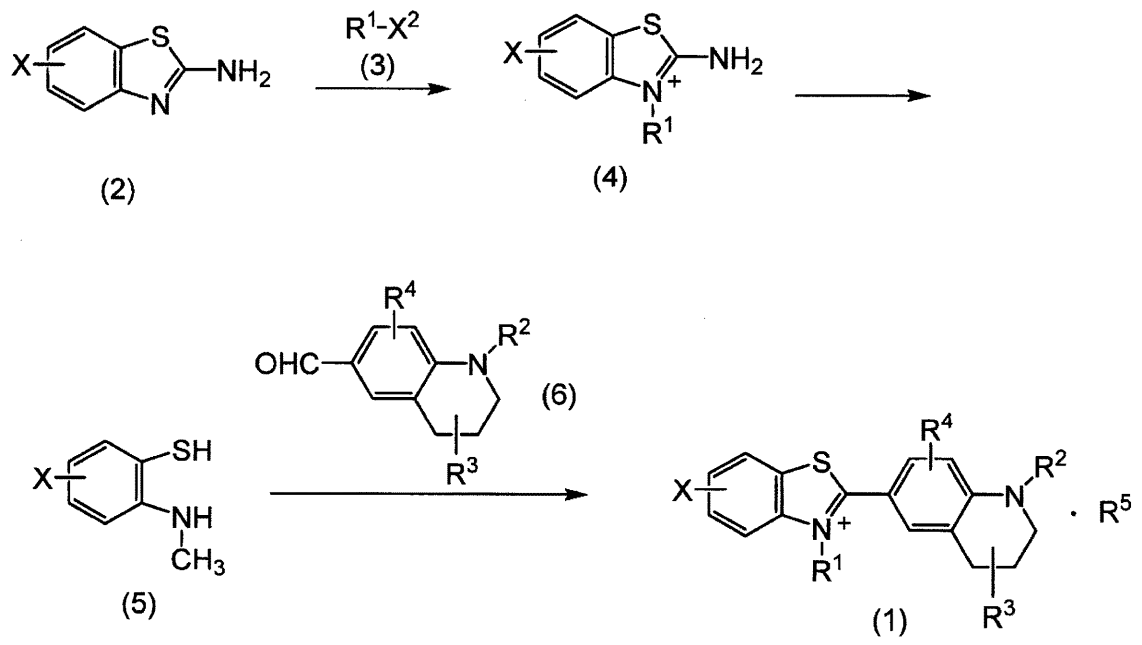
本発明化合物（１）が不斉炭素原子を有する場合、本発明には光学異性体が存在するが、光学異性体及びラセミ体のいずれも含まれる。

【００３１】

本発明化合物（１）は、例えば次の反応式に従って製造することができる。

【００３２】

【化３】




【００３３】
（式中、$X^2$はヨウ素原子を示し、Ｘ及び$R^1$～$R^5$は前記と同じ）
【００３４】
２－アミノベンゾチアゾール類（２）にヨウ化物$R^1$－$X^2$（３）を反応させて第４級アンモニウム塩（４）を得、当該第４級アンモニウム塩にアルカリを反応させて化合物（５）を得、次いで当該化合物（５）に化合物（６）を反応させて本発明化合物（１）を製造する。
【００３５】
まず、２－アミノベンゾチアゾール類（２）とヨウ化物（３）との反応は、ジメチルホルムアミド等のアミド系溶媒中、室温から還流温度で５分から５時間行えばよい。
【００３６】
第４級アンモニウム塩（４）に反応させるアルカリとしては、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等を挙げることができる。第４級アンモニウム塩（４）とアルカリとの反応は、例えばエチレングリコール等の溶媒中、室温から還流温度で５時間～４８時間行えばよい。
【００３７】
化合物（５）と化合物（６）の反応は、まず、化合物（５）にトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩等の還元剤を反応させ、次いで化合物（６）を反応させるのが好ましい。
化合物（５）と還元剤との反応は、水、アルコール等の溶媒中、室温で１０分～２時間行えばよい。また、化合物（４）と化合物（６）の反応は、室温から１００℃で３０分～１２時間行えばよい。
【００３８】
なお、化合物（６）は、例えば、テトラヒドロキノリン類にジメチルホルムアミド及びリン酸トリクロリドを反応させるビルスマイヤー・ハック反応を行うことにより、テトラヒドロキノリン類の６位をホルミル化して製造することができる。
【００３９】
なお、$R^1$の炭化水素基上の置換基については、化合物（５）と化合物（６）の反応を行った後に、$R^2$の炭化水素基上に導入してもよい。
【００４０】

得られる本発明の化合物（１）は、洗浄、結晶化、再結晶、クロマトグラフィー等の通常の手段により、反応混合物から単離、精製することができる。

【００４１】

本発明化合物（１）の最大吸光波長は、チオフラビンＴに比べて５０nm程度長波長にシフトしており、本発明化合物（１）は、Ａβ存在下では、Ａβ非存在下の場合と比べて、吸光波長のわずかな長波長化が観察されるとともに、顕著に高い蛍光が観察された。この結果から、本発明化合物は、チオフラビンＴと同様に、Ａβと結合して分子内のねじれが阻害される結果、蛍光を放出することがわかる。

また、Ａβに本発明化合物（１）を添加し、生理的条件下で光照射すると、経時的にネイティブＡβが減少するとともに、酸素原子が１～４個付加した酸素化Ａβが増加した。その酸化効率は、チオフラビンＴに比べて顕著に高かった。また、本発明化合物（１）は、Ａβ１－４２（非凝集体）に対する酸化力に比べてクロスβ－シート構造を有するＡβオリゴマー及びＡβ凝集体に対する酸化力が顕著に強く、Ａβオリゴマー及びＡβ凝集体のクロスβシート構造特異的に酸化することにより、Ａβの神経毒性を抑制するものと考えられる。また、本発明化合物（１）による酸素化反応は、アンギオテンシンⅣ、メチオニンエンケファリン、デスアシルグレリン、ソマトスタチン等の非アミロイド性タンパクに対しては極めて弱く、アミロイドタンパクに選択的である。さらに、本発明化合物（１）のアミロイド酸素化反応は、細胞存在下でも確認された。従って、本発明化合物（１）は、Ａβペプチド、アミリン、トランスサイレチン、αシアヌクレイン、タウ蛋白質、ハンチントン等の病原性アミロイドを選択的に酸化する触媒として作用する。これらの病原性アミロイドは、酸化されるとβ－シート構造の積層体を形成しなくなるため、病原性を生じなくなる。従って、本発明化合物（１）は、ヒトを含む動物のアルツハイマー病、パーキンソン病、糖尿病、ハンチントン病、全身性アミロイド－シス等の病原性アミロイドが関与する疾患の予防治療薬として有用である。

【００４２】

本発明化合物（１）は、病原性アミロイドの酸化反応を触媒する。この酸化反応は、光によって本発明化合物（１）が励起状態となり、アミロイドを酸化することにより進行する。従って、本発明化合物（１）を医薬として使用する場合には、本発明化合物（１）を投与後、患者に光を照射するのが好ましい。また、本発明化合物（１）を励起状態とするための光の波長は６００～１２００nmと長波長であるから、生体を透過しやすいという特徴を有する。

【００４３】

また、本発明化合物（１）の作用により酸化（酸素化）されるアミロイド中のアミノ酸残基としては、メチオニン残基の硫黄原子、ヒスチジン残基のイミダゾール環等が挙げられる。

【００４４】

本発明化合物（１）を含有する医薬組成物は投与法に応じ適当な製剤を選択し、薬学的に許容される担体を用いて各種製剤の調製法にて調製できる。本発明化合物（１）を主剤とする医薬組成物の剤形としては例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤や、液剤、シロップ剤、エリキシル剤、油性ないし水性の懸濁液等を経口用製剤として例示できる。

【００４５】

注射剤としては製剤中に安定剤、防腐剤、溶解補助剤を使用することもあり、これらの補助剤を含むこともある溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって固形製剤として用時調製の製剤としてもよい。また一回投与量を一の容器に収納してもよく、また多投与量を一の容器に収納してもよい。

【００４６】

また外用製剤として液剤、懸濁液、乳濁液、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、スプレー、貼付剤等を例示できる。

【００４７】

固形製剤としては本発明化合物（１）とともに薬学上許容されている添加物を含み、例

えば充填剤類や増量剤類、結合剤類、崩壊剤類、溶解促進剤類、湿潤剤類、潤滑剤類等を必要に応じて選択して混合し、製剤化することができる。

液体製剤としては溶液、懸濁液、乳液剤等を挙げることができるが添加剤として懸濁化剤、乳化剤等を含むこともある。

【００４８】

本発明化合物（１）を人体用の医薬として使用する場合、投与量は成人１日あたり１ｍｇ～１ｇ、好ましくは１ｍｇ～３００ｍｇの範囲が好ましい。

【実施例】

【００４９】

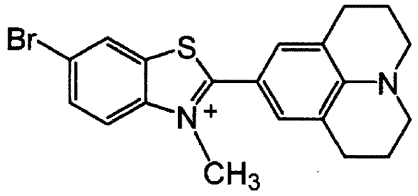
以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明の範囲は下記実施例に限定されることはない。

【００５０】

実施例１（化合物（１ａ）の合成）

【００５１】

【化４】




(1a)

【００５２】

（１）２－アミノ－６－ブロモベンゾチアゾール（前記反応式中（２）、１．３９ｇ，６．０７ｍｍｏｌ）を溶解したジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）にヨードメタン（１．９６ｍＬ，３１．４８ｍｍｏｌ）を加え、８０℃で１５時間撹拌した。その反応液を室温に冷却後、冷ジエチルエーテルで希釈し、懸濁液をろ過した。得た析出物を冷ジエチルエーテルで洗浄、減圧下乾燥することで、Ｎ－メチル－２－アミノ－６－ブロモベンゾチアゾリウムヨード塩（反応式中（４））（２．１９ｇ，９７％）を得た。白色固体；$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ）δ：１０．０８（ｂｒ，２Ｈ），８．２３（ｄ，Ｊ＝２．３Ｈｚ，１Ｈ），７．７６（ｄｄ，Ｊ＝９．２，２．３Ｈｚ，１Ｈ），７．６２（ｄ，Ｊ＝９．２Ｈｚ，１Ｈ），３．６８（ｓ，３Ｈ）；ＬＲＭＳ（ＥＳＩ）：ｍ／ｚｃａｌｃｄ［Ｍ］$^{+}$２４３．０，ｆｏｕｎｄ２４２．９．

【００５３】

（２）Ｎ－メチル－２－アミノ－６－ブロモベンゾチアゾリウムヨード塩（２．１９ｇ，５．９０ｍｍｏｌ）に１０Ｍ　ＫＯＨ水溶液（２９ｍＬ）とエチレングリコール（７．３ｍＬ）を加え、１４時間還流した。その反応液を室温に冷却後、塩酸で中和し、クロロホルムで抽出した。その有機相を飽和食塩水で洗浄、$Na_2SO_4$で乾燥、減圧下乾燥することで、５－ブロモ－２－メチルアミノ－チオフェノール（反応式中（５））（１．２６ｇ）を得た。

【００５４】

（３）５－ブロモ－２－メチルアミノ－チオフェノール（１０ｍｇ）を溶解したエタノール（４ｍＬ）に対し、水（２０μＬ）に溶解したトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（６．６ｍｇ，０．０２３ｍｍｏｌ）を加え、アルゴン雰囲気下、室温で３０分間撹拌した。その混合液に９－ジュロリジンカルボキサルデヒド（１０．２ｍｇ，０．０５１ｍｍｏｌ）を加え、８０℃で２時間撹拌した。その反応液を室温に冷却後、冷ジエチルエーテルで希釈し、懸濁液をろ過した。得た析出物を冷ジエチルエーテルで洗浄、減圧下乾燥することで、化合物（１ａ）（７．５ｍｇ，３７％　ｆｒｏｍ　８）を得た。黄色固体；$^{1}$Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCL_3$）δ：８．２１（ｄ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ），８．１８（ｄ，Ｊ＝９．２Ｈｚ，１Ｈ），７．８３（ｄｄ，Ｊ＝９．２，１．８

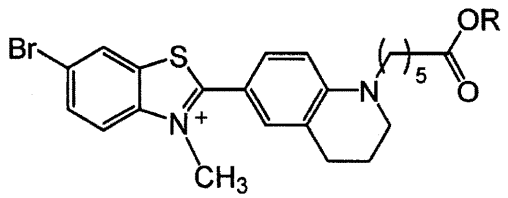
Ｈｚ，１Ｈ），７．４１（ｓ，２Ｈ），４．５９（ｓ，３Ｈ），３．３７－３．３９（ｍ，４Ｈ），２．８３－２．８５（ｍ，４Ｈ），１．９７－２．００（ｍ，４Ｈ）；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：ｍ／ｚ ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $C_{20}H_{20}BrN_2S^+$［Ｍ］$^+$３９９．０５２５，ｆｏｕｎｄ ３９９．０５１１；ＨＰＬＣ：$t_R$＝２７．８分（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ ＯＤＳ－ＡＭ）；純度：＞９５％（ＨＰＬＣ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｔ ２３０ｎｍ）．

【００５５】

実施例２（化合物（１ｂ）、（１ｃ）、（１ｄ）、（１ｅ）の合成）

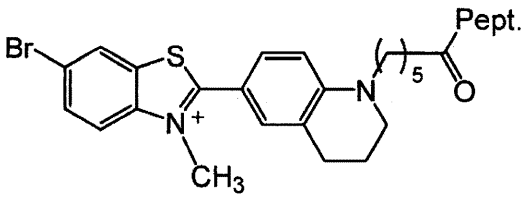
【００５６】

【化５】




R=$CH_3$(1b)

R=H(1c)




(1d)

Pept.:D-[K(Boc)LVF(4-Ph)F] (1d)

Pept.:D-[KLVF(4Ph)F] (1e)

【００５７】

（１）１，２，３，４－テトラヒドロキノリン（０．５０ｍＬ，３．９８ｍｍｏｌ）とメチル ６－ブロモヘキサノエート（０．７６ｍＬ，４．７８ｍｍｏｌ）を、ＫＩ（１．５９ｇ，９．５８ｍｍｏｌ）と$K_2CO_3$（１．１０ｇ，７．９６ｍｍｏｌ）を溶解したＭｅＣＮ（３０ｍＬ）に加え、その懸濁液をアルゴン雰囲気下、１００℃で２１時間撹拌した。その反応液を室温に冷却後、水で希釈して酢酸エチルで抽出した。その有機相を飽和食塩水で洗浄、$Na_2SO_4$で乾燥、減圧下乾燥した。その残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー（ｈｅｘａｎｅ／ＥｔＯＡｃ＝１００／０ ｔｏ ８０／２０）により精製してＮ－メトキシカルボニルペンチル－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン（１．１０ｇ，１００％）を得た。無色油状物；$^1$Ｈ ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCL_3$）δ：７．０２（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），６．９１（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），６．５１－６．５４（ｍ，２Ｈ），３．６６（ｓ，３Ｈ），３．２０－３．２６（ｍ，４Ｈ），２．７３（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，２Ｈ），２．３１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．９０－１．９４（ｍ，２Ｈ），１．６３－１．６９（ｍ，２Ｈ），１．５６－１．６２（ｍ，２Ｈ），１．３２－１．３８（ｍ，２Ｈ）；ＬＲＭＳ（ＥＳＩ）：ｍ／ｚ ｃａｌｃｄ［Ｍ＋Ｈ］$^+$ ２６２．２，ｆｏｕｎｄ ２６２．０．

【００５８】

（２）Ｎ－メトキシカルボニルペンチル－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン（１．１０ｇ，４．２ｍｍｏｌ）を溶解した無水ジクロロメタン（４０ｍＬ）に対し、無水ＤＭＦ（３．３ｍＬ，４２ｍｍｏｌ）および$POCl_3$（１．３ｍＬ，１４ｍｍｏｌ）を加え、アルゴン雰囲気下、室温で９０分間撹拌した。その反応液を水で希釈、ＮａＯＨ水溶液で中和、減圧下濃縮し、酢酸エチルで抽出した。その有機相を水で洗浄、飽和食塩水で洗浄、$Na_2SO_4$で乾燥、減圧下乾燥した。その残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー（ｈｅｘａｎｅ／ＥｔＯＡｃ＝７５／２５ ｔｏ ５５／４５）により精製してＮ－メトキシカルボニルペンチル－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン－６－カルボキサルデヒド（８８７．４ｍｇ，７３％）を得た。淡黄色油状物；$^1$Ｈ ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCL_3$）δ：９．６３（ｓ，１Ｈ），７．５１（ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），７．４３（ｓ，１Ｈ），６．５３（ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），３．６５（ｓ，３Ｈ），

３．３５（ｔ，Ｊ＝５．８Ｈｚ，２Ｈ），３．３０（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．７５（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，２Ｈ），２．３２（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），１．９０－１．９５（ｍ，２Ｈ），１．５９－１．７０（ｍ，４Ｈ），１．３３－１．４０（ｍ，２Ｈ）；ＬＲＭＳ（ＥＳＩ）：ｍ／ｚｃａｌｃｄ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ２９０．２，ｆｏｕｎｄ ２９０．２．

【００５９】

（３）メタノール（５４ｍＬ）中の５－ブロモ－２－メチルアミノ－チオフェノール（３０８．０ｍｇ）に、水（１．９ｍＬ）に溶解したトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（２７０．０ｍｇ，０．９４ｍｍｏｌ）を加え、アルゴン雰囲気下、室温で６０分間撹拌した。その混合液に、メタノール（５ｍＬ）に溶解したＮ－メトキシカルボニルペンチル－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン－６－カルボキサルデヒド（３４０．７ｍｇ，１．１８ｍｍｏｌ）を加え、７０℃で７時間撹拌した。その反応液を室温に冷却後、減圧下濃縮、水で希釈、酢酸エチルで洗浄、ＮａＣｌで飽和させ、クロロホルムで抽出した。その有機相を$Na_2SO_4$で乾燥、減圧下乾燥して化合物（１ｂ）（２８８．９ｍｇ）を得た。

（４）化合物（１ｂ）（２８８．９ｍｇ）を溶解したメタノール（５０ｍＬ）に、１ＭＮａＯＨ水溶液（８．２８ｍＬ）を氷浴中でゆっくりと加え、室温で１０時間撹拌した。その反応液を２Ｍ塩酸で中和、減圧下濃縮、ＮａＣｌで飽和させ、酢酸エチルで抽出した。その有機相を$Na_2SO_4$で乾燥、減圧下乾燥した。その残渣を分取用ＨＰＬＣ（０．１％ ａｑｕｅｏｕｓ ＴＦＡ／ＭｅＣＮ＝８０／２０ ｔｏ ３０／７０，５０分間）により精製して化合物（１ｃ）（４８．６ｍｇ，エステル体から７％）を得た。黄色固体；$^{1}$Ｈ ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCL_3$）δ：８．０６（ｄ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ），７．８６（ｄｄ，Ｊ＝８．６，１．７Ｈｚ，１Ｈ），７．８０（ｄ，Ｊ＝９．２Ｈｚ，１Ｈ），７．６０（ｄｄ，Ｊ＝９．２，２．３Ｈｚ，１Ｈ），７．３５（ｄ，Ｊ＝２．３Ｈｚ，１Ｈ），６．７５（ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），４．３１（ｓ，３Ｈ），３．４６（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，２Ｈ），３．４１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），２．８１（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，２Ｈ），２．３７（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），１．９７－１．９９（ｍ，２Ｈ），１．６５－１．７１（ｍ，４Ｈ），１．３９－１．４５（ｍ，２Ｈ）；ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）：ｍ／ｚ ｃａｌｃｄ ｆｏｒ $C_{23}H_{26}BrN_2O_2S^{+}$ ［Ｍ］$^{+}$ ４７３．０８９３，ｆｏｕｎｄ ４７３．０９０４．

【００６０】

（５）化合物（１ｃ）（１３．５ｍｇ，０．０２３ｍｍｏｌ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（９．６ｍｇ，０．０８３ｍｍｏｌ）及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（１０．６ｍｇ，０．０５５ｍｍｏｌ）を溶解したＤＭＦ／ＤＣＭ（１：１，４ｍＬ）に、トリエチルアミン（１５μＬ，０．１０８ｍｍｏｌ）を加え、室温で４日間撹拌した。その混合液にＤ－［Ｋ（Ｂｏｃ）ＬＶＦ（４－ｐｈｅｎｙｌ）Ｆ］〔ＴＦＡ塩，２５ｍｇ，０．０２７ｍｍｏｌ：Ｆｍｏｃ固相ペプチド合成法によって得た。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳ：ｍ／ｚ ｃａｌｃｄ［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$ ８５１．５，ｆｏｕｎｄ ８５１．７．〕とトリエチルアミン（２０μＬ，０．１４３５ｍｍｏｌ）を加え、室温で２日間撹拌した。その反応液（化合物（１ｄ））を減圧下濃縮した後、４Ｍ ＨＣｌ／ｄｉｏｘａｎｅを加え、室温で９時間撹拌した。その反応液を分取用ＨＰＬＣ（０．１％ ａｑｕｅｏｕｓ ＴＦＡ／ＭｅＣＮ＝８０／２０ ｔｏ ３０／７０，５０分間）により精製して化合物（１ｅ）（Pept.=D-[KLVF(4-Ph)F(配列番号１)]）（２．０ｍｇ，６％化合物（１ｃ）から）をＴＦＡ塩として得た。黄色固体；ＭＡＬＤ－ＴＯＦ ＭＳ：ｍ／ｚ ｃａｌｃｄ ［Ｍ］$^{+}$ １１８５．５，ｆｏｕｎｄ １１８６．７；ＨＰＬＣ：$t_R$＝２７．７ｍｉｎ（ＹＭＣ－Ｐａｃｋ ＯＤＳ－ＡＭ）；純度：＞９５％（ＨＰＬＣ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｔ ２３０ｎｍ）．

【００６１】

実施例３（本発明化合物の特性、薬理試験１）

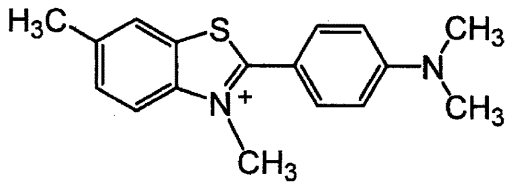
Ａ．方法

（１）酸化反応

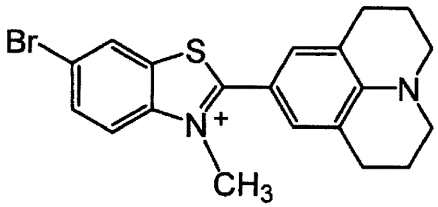
Ａβ１－４２（２０μＭ）、アミリン（５μＭ）、アンジオテンシンⅣ（３０μＭ）又はメチオニンエンケファリン（３０μＭ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）に、チオフラビンＴ（２０μＭ）、リボフラビン（４μＭ）、化合物ａ（２０μＭ）又は化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃でインキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）又はＬＣ／ＭＳ（ＥＳＩ－Ｑ）にて反応を追跡した。

【００６２】

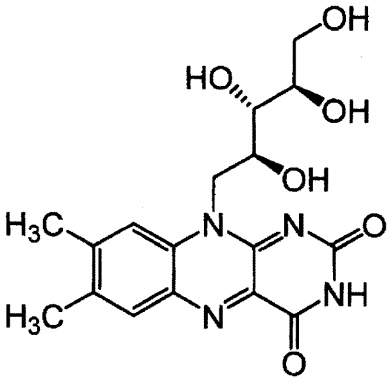
【化６】



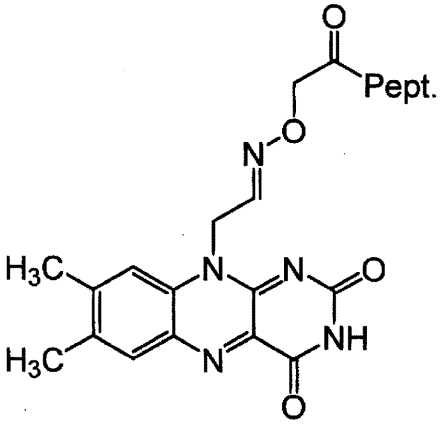
thioflavin T(ThT : 1)



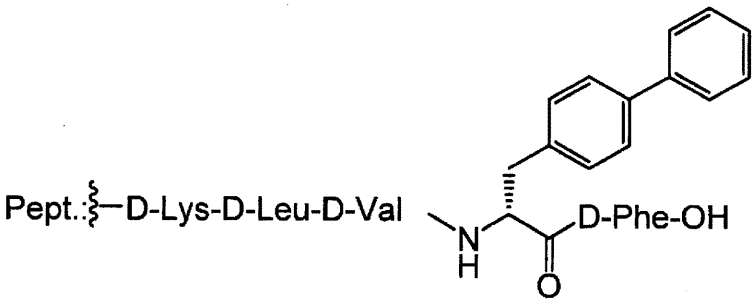
化合物(1a)



riboflavin



(a)



【００６３】

（２）Ａβ１－４２及びアミリンにおける酸素化部位の同定

酸化Ａβ１－４２及び酸化アミリンのアミノ酸分析（ペプチド研究所によって実施）を行った。また、酸化Ａβ１－４２及び酸化アミリンをそれぞれエンドペプチダーゼＬｙｓ－Ｃ及びキモトリプシンで酵素消化し、得られた消化物を質量分析装置（ＭＡＬＤ－ＴＯＦ　ＭＳ）及びＬＣ／ＭＳ／ＭＳ（ＥＳＩ－Ｑ－ＴＯＦ）にて分析した。

【００６４】

（３）吸光及び蛍光スペクトル

リン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）中、Ａβ１－４２（２０μＭ）共存下又は非共存下でチオフラビンＴ（２０μＭ）又は化合物（１ａ）（２０μＭ）を溶解し、３７℃にて３時間インキュベートした後、吸光及び蛍光スペクトルを測定した。チオフラビンＴ及び化合物（１ａ）の励起波長はそれぞれ４２０及び４６０ｎｍとした。

【００６５】

（４）Ａβ親和性

予め凝集させたＡβ１－４２（凝集条件：２０μＭ、リン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）、３７℃、３時間）を、チオフラビンＴ又は化合物（１ａ）を含むリン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）に加え（Ａβの最終濃度：０．５μＭ、チオフラビンＴ又は化合物（１ａ）の最終濃度：０～２０μＭ）、室温で１時間インキュベート後に蛍光強度を測定した。チオフラビンＴについては励起波長４２０ｎｍ、蛍光波長４８５ｎｍとし、化合物（１ａ）については励起波長４６０ｎｍ、蛍光波長５１５ｎｍとした。蛍光強度からＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ　４．５（Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，　Ｒｅａｄｉｎｇ，　ＰＡ）を用いてＫｄ結合曲線を得た。

【００６６】

（５）計算

チオフラビンＴ及び化合物（１ａ）について、基底状態の各二面角における構造最適化及びエネルギー計算はＢ３ＬＹＰ／ＬＡＶ３Ｐ＊（Ｍａｅｓｔｒｏ　９．３／Ｊａｇｕａｒ　７．９；Schrodinger，ＬＬＣ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹ，２０１２）を用いたＤＦＴ計算によって行った。励起状態の各二面角におけるエネルギー計算は、Ｂ３ＬＹＰ／ＬＡＶ３Ｐ＊を用いたＴＤＤＦＴ計算によって行った。励起状態（$S_1$）のエネルギーは、基底状態（$S_0$）のエネルギーと遷移エネルギーの和として算出した。

【００６７】

（６）グリセロール／水混合溶媒系における蛍光、一重項酸素産生及び酸化反応

グリセロール／水（０：１００、１２．５：８７．５、５０：５０、６２．５：３７．５又は７５：２５）にチオフラビンＴ（２０μＭ）又は化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、蛍光スペクトルを測定した。チオフラビンＴ及び化合物（１ａ）の励起波長はそれぞれ４２０及び４６０ｎｍとした。

また、フルフリルアルコール（２００μＭ）またはベンゾイルメチオニン（２００μＭ）を溶解した上記グリセロール／水の溶液に、リボフラビン（４μＭ）又は化合物ａ（２０μＭ）を加え、室温でＬＥＤ照射（波長５００ｎｍ）した後、ＬＣ／ＭＳ（ＥＳＩ－Ｑ）にて反応を追跡した。

【００６８】

（７）ナイルレッド蛍光アッセイの実験

Ａβ１－４２（２０μＭ）又はアミリン（５μＭ）が溶解したリン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）に化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃でインキュベートした。その溶液の一部を、ナイルレッドを含むリン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）に加え（Ａβ１－４２又はアミリンの最終濃度：０．５μＭ、ナイルレッドの最終濃度：５μＭ）、室温で１時間インキュベート後、ナイルレッドの蛍光強度（励起波長：５３０ｎｍ、蛍光波長：６１０ｎｍ）を測定した。

【００６９】

（８）原子間力顕微鏡分析の実験

Ａβ１－４２（２０μＭ）が溶解したリン酸緩衝液（１０mM，ｐＨ７．４）に化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃でインキュベートした。その溶液の一部をマイカ上にのせ、室温で３分間インキュベートした後、水（２０μＬ）で洗浄し、風乾した。測定は、Ｎａｎｏ　Ｗｉｚａｒｄ　ＩＩ（ＪＰＫ　ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　ＡＧ，Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用し、空気中室温でタッピングモードにより行った。

【００７０】

（９）円二色性分光分析の実験

Ａβ１－４２（２０μＭ）又はアミリン（５μＭ）が溶解したリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）に化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃でインキュベートした。その溶液の一部を、Ｍｏｄｅｌ　２０２ＳＦ（ＡＶＩＶ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ，Ｉｎｃ．，Ｌａｋｅｗｏｏｄ，ＮＪ）を使用して分析した。

【００７１】

（10）細胞実験

Ａβ１－４２（２０μＭ）が溶解した０．１％ウマ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地に化合物（１ｅ）（１０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分間インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。

ポリＤリジンコート９６穴プレートに播種したラット副腎髄質由来褐色細胞腫ＰＣ１２細胞（理化学研究所から購入）に、５０μＬの上記溶液を加えて同様に反応させた。５０μＬの０．１％ウマ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で希釈した後（Ａβ最終濃度：１０μＭ）、５％$CO_2$雰囲気下、３７℃で４８時間インキュベートした。ＷＳＴ－８を含む生細胞数測定試薬ＳＦ（１０μＬ：ナカライから購入）を加え、５％$CO_2$雰囲気下、３７℃で３時間インキュベートした後、４５０ｎｍ（参照波長：６５５ｎｍ）における吸光度から細胞生存率を測定した。

【００７２】

Ｂ．結果

（１）合成した化合物（１ａ）の最大吸光波長（４５６ｎｍ）は、ジュロリジンのより強い電子供与性に起因して、チオフラビンＴと比べて５０ｎｍ程度長波長シフトしていた（図１ａ左）。Ａβ存在下では、Ａβ非存在下の場合と比べて、吸光波長のわずかな長波長化が観察されるとともに、顕著に高い蛍光が観測された（図１ａ）。本結果より、化合物（１ａ）はチオフラビンＴと同様、Ａβと結合して分子内のねじれが阻害される結果、蛍光を放出することが示唆された。蛍光強度に基づく結合曲線より、化合物（１ａ）がＡβに対してチオフラビンＴと同程度のＫｄ値（１：２．９μＭ，４：１．１μＭ）を有することも明らかとなった（図１ｂ）。

【００７３】

次に、Ａβに化合物（１ａ）（１００ｍｍｏｌ％）を添加し、生理的条件下（ｐＨ７．４，３７℃）光照射（波長：５００ｎｍ）を行ったところ、経時的にネイティブＡβが減少するとともに、酸素原子が１～４個付加した酸素化Ａβが増加した（図２ａ）。化合物（１ａ）によるＡβの酸化効率はチオフラビンＴと比べて顕著に高かった（図３ｂ）。アミノ酸分析およびＬＣ／ＭＳ／ＭＳ解析の結果、化合物（１ａ）による酸素化反応においては、１３位および１４位Ｈｉｓ残基において顕著に酸素化が進行し、３５位Ｍｅｔ残基においても若干酸素化が進行していることが明らかとなった（図２ａ～図２ｄ、図３ａ）。尚、リボフラビンを用いた酸素化とは異なり、１０位Ｔｙｒ残基での酸化は認められなかった。

【００７４】

（２）次に、酸素化反応のＡβ選択性について検討を行った（図３ｃ）。リボフラビン（２０ｍｍｏｌ％）、化合物ａ（１００ｍｍｏｌ％）、化合物（１ａ）（１００ｍｍｏｌ％）は、中性緩衝液中（３７℃）１．５時間の光照射条件にてＡβを同程度（６５～７０％）酸素化した。一方、同条件において、リボフラビン及び化合物ａはアンギオテンシンＩＶ（ＶＹＩＨＰＦ（配列番号２））およびメチオニンエンケファリン（ＹＧＧＦＭ（配列番号３））をそれぞれ４０％、６０％程度酸素化（アンギオテンシンＩにおいてはＨｉｓ，Ｔｙｒ残基、メチオニンエンケファリンにおいてはＭｅｔ，Ｔｙｒ残基が酸素化）したのに対し、化合物（１ａ）を用いた反応においては酸素化体の生成はそれぞれ５％以下に抑えられた。本結果より、リボフラビン及び化合物（ａ）は光照射によって、アミロイド性・非アミロイド性に関わらず様々な基質を酸素化するのに対し、化合物（１ａ）は、通常の基質に対しては酸化活性をほとんど有さず、アミロイド分子に対して選択的に酸素

化することが示唆された。Ａβ、アンギオテンシンＩＶおよびメチオニンエンケファリンを共存させた反応条件においても、リボフラビン及び化合物（ａ）は全ての基質を非選択的に酸素化したのに対し、化合物（１ａ）を用いた場合は、依然としてＡβに対する高選択的な酸素化が観察された（図３ｃ）。

【００７５】

このように高いアミロイド選択性を発現する理由として、ＴＩＣＴと項間交差に基づく図３ｄの機構を想定している。すなわち、化合物（１ａ）が吸光（図１ａ左）により$S_1$ ｓｔａｔｅに励起された際、Ａβ非存在下においては$S_1$' ｓｔａｔｅへの分子内の回転（ＴＩＣＴ）を経由して基底状態（$S_0$ ｓｔａｔｅ）に戻る。実際、計算科学に基づいて、基底状態と励起状態のポテンシャルエネルギーを、ベンゾチアゾール部位とジュロリジン部位の二面角について算出したところ（図３ｄのＡ）、基底状態では約３０度が最安定なのに対して、励起状態では約９０度が最安定であることから、励起直後の$S_1$ ｓｔａｔｅ（二面角：約３０度）は$S_1$' ｓｔａｔｅ（二面角：約９０度）へと自発的に分子内ねじれを起こすことが示唆された。また９０度における$S_1$'ｓｔａｔｅと$S_0$'ｓｔａｔｅのエネルギーギャップは小さいことから、$S_1$'ｓｔａｔｅは容易に基底状態$S_0$'ｓｔａｔｅに緩和することが示唆された。一方、Ａβ存在下においては、Ａβとの結合（図１ｂ）によって分子内の回転が阻害されるためにＴＩＣＴが起こらないと考えられる。グリセロール／水混合溶媒において、粘度の高いグリセロールの濃度増加にしたがって、化合物（１ａ）による蛍光強度が増大したことから、化合物（１ａ）の分子内回転運動の低下によってＴＩＣＴが抑制されたことが実験的にも支持された（図３ｄのＢ）。ＴＩＣＴが起こらない場合、一部の$S_1$ ｓｔａｔｅは$T_1$ ｓｔａｔｅへの遷移（項間交差）を起こし、$T_1$ ｓｔａｔｅは分子酸素を一重項酸素に変換すると考えられる。グリセロールを含む水液中、化合物（１ａ）およびフルフリルアルコール（一重項酸素と特異的に反応することが知られている）存在下、光照射したところ、グリセロールの濃度増加にしたがったフルフリルアルコールの減少、すなわち一重項酸素の産生が認められた（グリセロールが一重項酸素産生に関与しないことはコントロール実験により確認した。）（図３ｄのＣ）。さらに、同様の反応条件においてグリセロール濃度依存的にベンゾイルメチオニンが酸化されることを確認した（グリセロールが酸化反応を促進しないことはコントロール実験により確認した。）（図３ｄのＤ）。

以上の結果より、Ａβ非存在下においては、ＴＩＣＴが進行して酸素化が起こらない一方、Ａβ結合時においては、$S_1$ ｓｔａｔｅから$T_1$ ｓｔａｔｅへの項間交差が進み、$T_1$ ｓｔａｔｅによる一重項酸素の産生と、続く一重項酸素によるＡβの酸素化が進行した結果、高いＡβ選択的酸素化が実現できたものと考えられる（図３ｄ）。

【００７６】

（３）さらに、本酸素化Ａβの凝集性はネイティブＡβと比べて顕著に低いことが明らかとなった。すなわち、生理条件下（ｐＨ７．４，３７℃）にてインキュベートし、経時的にナイルレッド蛍光アッセイ（凝集の程度と相関）（図４ａ）、原子間力顕微鏡分析（図４ｂ）、円偏光二色性スペクトル分析（図４ｃ）をそれぞれ行ったところ、ネイティブＡβにおいては凝集による蛍光強度の上昇、線維形成およびβシートへの二次構造変化が観察された一方、酸素化Ａβではほとんど変化が認められなかった。本結果より、１３位Ｈｉｓ、１４位Ｈｉｓ、３５位Ｍｅｔ残基（Ｄ．Ａ．Ｂｕｔｔｅｒｆｉｅｌｄ，Ｄ．Ｂｏｙｄ Ｋｉｍｂａｌｌ，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ ２００４，１７０３，１４９－１５６．）のいずれかが酸素化されることによりＡβの凝集性が著しく低下することが示された。

【００７７】

（４）次に細胞存在下でのＡβ酸素化について検討を行った。化合物（１ａ）のジュロリジン構造を１，２，３，４－テトラヒドロキノリン構造に置換し、さらにＮアルキルリンカーを経てＡβ親和性ペプチド、Ｄ－［Ｌｙｓ－Ｌｅｕ－Ｖａｌ－Ｐｈｅ（４－ｐｈｅｎｙｌ）－Ｐｈｅ］（Ａ．Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ，Ｄ．Ｓａｓａｋｉ，Ａ．Ｓｈｉｏｈａｒａ，Ｔ．Ｉｗａｔｓｕｂｏ，Ｔ．Ｔｏｍｉｔａ，Ｙ．Ｓｏｈｍａ，Ｍ．Ｋａｎａｉ，Ａｎ

ｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．，２０１４，５３，１３８２－１３８５．）を結合した化合物（１ｅ）を設計した。化合物（１ｅ）（５０ｍｍｏｌ％）は細胞培地中、３０分の光照射（波長：５００ｎｍ）にて４０％程度Ａβを酸素化する活性を有していた（図５）。化合物ａは培地を含む同一の条件においてＡβをほとんど酸素化することができなかったが（Ａ．Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ，Ｄ．Ｓａｓａｋｉ，Ａ．Ｓｈｉｏｈａｒａ，Ｔ．Ｉｗａｔｓｕｂｏ，Ｔ．Ｔｏｍｉｔａ，Ｙ．Ｓｏｈｍａ，Ｍ．Ｋａｎａｉ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．，２０１４，５３，１３８２－１３８５．）、化合物（１ｅ）は、よりＡβに近いところで一重項酸素を産生するために、培地中の成分に干渉されることなく効率的にＡβを酸素化できたものと考えられる。細胞存在下酸素化反応を行い、二日間インキュベートした後の細胞生存率を調べたところ、化合物（１ｅ）による光毒性は観察されず（図４ｄ，Ｆ）、これはＡβ非存在下において酸化活性を有しない性質に由来するものと考えられる。一方、Ａβ存在下では（図４ｄのＧとＨとの比較）、光照射した場合、光がない時と比べ細胞生存率が有意に上昇した。これは、Ａβが酸素化反応を受けて低毒性化したために、細胞死が回避されたと考えられる。

【００７８】

（５）ミスフォールディングによりアミロイド化するタンパク質も、ほとんどの場合、本来の正しいフォールディングにより生理的な役割を担う。例えば、アミリンは血糖維持に必須のホルモンであるが、アミロイド化することにより膵β細胞の破壊と糖尿病の発症に関与する。したがって、病原性アミロイドに対する酸素化改変を行う場合、生理機能を担う機能性タンパク質には影響を与えないことが肝になる。一方、ＴＩＣＴと項間交差の機構に基づく今回の酸素化触媒戦略は、アミロイドに特徴的なβシート構造との結合によって酸化活性が誘起されるため、機能性タンパク質には反応せずアミロイドのみを酸素化する性質を持ち合わせていると考えられた。アミリンに化合物（１ａ）（１００ｍｍｏｌ％）を添加し、生理的条件下（ｐＨ７．４，３７℃）光照射を行ったところ、１８位Ｈｉｓ残基における経時的な酸素化が観察された（図６ａ，図７ａ～ｃ）。そこで次にアミロイド選択性について検討を行った（図６ｂ）。主にモノマー状態のアミリンからなるサンプル（ｐｒｅ－ｉｎｃｕｂａｔｉｏｎ＝０ｈ）においてはｔｒａｃｅ量の酸素化体しか検出されなかった。一方、酸素化反応前にあらかじめｐｒｅ－ｉｎｃｕｂａｔｉｏｎによって凝集したアミリンを使用した際、ｐｒｅ－ｉｎｃｕｂａｔｉｏｎ時間を１時間、２時間と延長するのにしたがって、化合物（１ａ）による反応後、酸素化アミリンの割合が上昇した。本結果より、化合物（１ａ）はモノマーのアミリンには作用せず、凝集したアミリンに対して選択的に反応することが示唆された。対照的に、リボフラビンを用いた際は、選択性はなく、むしろモノマーのアミリンに対して高い酸化活性を有していた。さらに、ナイルレッドを用いた蛍光アッセイより、Ｈｉｓ[18]酸素化アミリンは、ネイティブのアミリンと比べて凝集性は顕著に低かった（図６ｃ）。また、ネイティブアミリンと比べてβシート構造への転移も抑えられた（図６ｄ）。これらの結果より、化合物（１ａ）は生理的役割を有するタンパク質へ作用することなく、病的なアミロイドタンパク質に対して選択的に酸素化できることが明らかとなり（図６ｅ）、本発明化合物がアミロイド全般に対して広く適用できることが示された。

【００７９】

実施例４（本発明化合物による酸素化反応の選択性）

予め３７℃で６時間インキュベートさせたＡβ１－４２（２０μＭ）、アンジオテンシンＩＶ（２０μＭ）、メチオニンエンケファリン（２０μＭ）、デスアシルグレリン（２０μＭ）又はソマトスタチン（２０μＭ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）に、リボフラビン（４μＭ）、化合物（ａ）（２０μＭ）又は化合物（１ａ）（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で６０分インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）又はＬＣ／ＭＳ（ＥＳＩ－Ｑ）にて反応を追跡した。

【００８０】

酸素化反応のＡβ選択性について検討を行った結果を図８に示す。リボフラビン（２０

ｍｍｏｌ％）、化合物（ａ）（１００ｍｍｏｌ％）、化合物（１ａ）（２０ｍｍｏｌ％）は、中性緩衝液中（３７℃）１時間の光照射条件にてＡβを同程度（５０～７０％）酸素化した。一方、同条件において、リボフラビン及び化合物（ａ）はアンギオテンシンＩＶ（ＶＹＩＨＰＦ（配列番号２））、メチオニンエンケファリン（ＹＧＧＦＭ（配列番号３））、デスアシルグレリン（ＧＳＳＦＬＳＰＥＨＱＲＶＱＱＲＫＥＳＫＫＰＰＡＫＬＱＰＲ（配列番号４））、ソマトスタチン（ＡＧＣＫＮＦＦＷＫＴＦＴＳＣ（配列番号５））をそれぞれ２０～３５％、４０～７０％、１５～３０％、６０～８０％程度酸素化したのに対し、化合物（１ａ）を用いた反応においては酸素化体の生成はそれぞれ２％以下に抑えられた。本結果より、リボフラビン及び化合物（ａ）は光照射によって、アミロイド性・非アミロイド性に関わらず様々な基質を酸素化するのに対し、化合物（１ａ）は、通常の基質に対しては酸化活性をほとんど有さず、凝集したＡβに対して選択的に酸素化することが示唆された。

【００８１】

実施例５（本発明化合物が、クロスβシート構造に選択的に結合して酸素化すること）

（１）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を３７℃で０、１、３、６時間インキュベートして調製した４種類の凝集Ａβ１－４２それぞれにチオフラビンＴを加え、この蛍光強度を測定した。また、原子間力顕微鏡を用いて形状を解析した。

その結果、図９ａに示すように、インキュベートしなかったもの（０時間）に対しては蛍光を示さなかったが、１、３、６時間インキュベートしたものに対してはいずれについても蛍光を示し、インキュベート時間が長いほうがより強い蛍光を示した。また、インキュベートしなかったもの（０時間）は凝集が観測されなかったが、１、３、６時間インキュベートしたものについてはそれぞれオリゴマー（１時間）、前原線維（３時間）及び強硬な線維（６時間）が観測された。

【００８２】

（２）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を３７℃で０、１、３、６時間インキュベートして調製した４種類の凝集Ａβ１－４２（０．５μＭ）を含む溶液それぞれに、化合物（１ａ）（１０μＭ）を加え、化合物（１ａ）の蛍光強度を測定した。

【００８３】

その結果、図９ｂに示すように、インキュベートしなかったもの（０時間）に対しては蛍光を示さなかったが、１、３、６時間インキュベートしたものに対してはいずれについても蛍光を示し、インキュベート時間が長いほうがより強い蛍光を示した。化合物（１ａ）が凝集したＡβ１－４２のクロスβシート構造に結合していることが明らかとなった。

【００８４】

（３）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を３７℃で０、１、３、６時間インキュベートして調製した４種類の凝集Ａβ１－４２（０．５μＭ）を含む溶液それぞれに、リボフラビン（４μＭ）及び化合物（１ａ）（１０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、室温で１０分インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。また、調製したそれぞれの凝集Ａβ１－４２にチオフラビンＴを加え、この蛍光強度を測定した。

酸素化強度率（％）の増加は、（凝集Ａβ１－４２の酸素化強度率（３７℃、所定時間インキュベート））－（凝集Ａβ１－４２の酸素化強度率（３７℃、０時間インキュベート））で算出した。

酸素化強度率（％）は、（酸素付加体の強度の合計）／（（非酸素付加体（Ｎａｔｉｖｅ）の強度）＋（酸素付加体の強度の合計））で算出した。

【００８５】

その結果、図９ｃに示すように、化合物（１ａ）を用いた場合には、チオフラビンＴの蛍光強度（クロスβ構造の含有度に相当）が増加するにともない酸素化強度率の増大が観測された。リボフラビンを用いた場合には、酸素化強度率の増加は観測されなかった。

【００８６】
以上の結果（１）～（３）より、化合物（１ａ）は、クロスβ構造の含有度の増加にともない酸素化効率が増加していることが明らかとなり、このような特性はリボフラビンにはない化合物（１ａ）に特有の機能であることが裏付けられた。
【００８７】
実施例６（Ａβオリゴマー及びＡβ凝集体への選択的酸素化）
（１）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を０℃（サンプルＥ）及び室温（サンプルＦ）で２４時間インキュベートして調製した２種類のＡβ１－４２それぞれについて、原子間力顕微鏡を用いてサイズ分布を解析した。
その結果、図１０ａに示すように、０℃及び室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２のいずれについても均一なオリゴマーが観測された。尚、室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのほうがより大きなサイズのオリゴマーが観測された。
【００８８】
（２）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を０℃及び室温で２４時間インキュベートして調製した２種類のＡβ１－４２オリゴマー（０．５μＭ）を含む溶液それぞれに、化合物（１ａ）（１０μＭ）を加え、化合物（１ａ）の蛍光強度を測定した。
その結果、図１０ｂに示すように、０℃及び室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのいずれについても蛍光を示し、化合物（１ａ）がＡβ１－４２オリゴマーに結合していることが明らかとなった。また、室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのほうがより強い蛍光を示した。
【００８９】
（３）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を０℃及び室温で２４時間インキュベートして調製した２種類のＡβ１－４２オリゴマー（０．５μＭ）を含む溶液それぞれに化合物（１ａ）（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、室温で１０分インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。
酸素化強度率（％）は、（酸素付加体の強度の合計）／（（非酸素付加体（Ｎａｔｉｖｅ）の強度）＋（酸素付加体の強度の合計））で算出した。
その結果、図１０ｃに示すように、０℃及び室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのいずれについても、化合物（１ａ）が酸素化できることが明らかとなった。また、室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのほうがより大きな酸素化強度を示した。
【００９０】
（４）リン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）中のＡβ１－４２（２０μＭ）を０℃及び室温で２４時間インキュベートして調製した２種類のＡβ１－４２オリゴマー（０．５μＭ）を含む溶液それぞれに化合物（１ａ）（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、室温で１時間インキュベートした。その後、それぞれの溶液を３７℃でインキュベートし、Ｎｉｌｅ　ｒｅｄを加え、この蛍光強度を測定した。６時間インキュベートしたものについては、原子間力顕微鏡分析による形状も解析した。非酸素化Ａβ１－４２オリゴマー（Ｎａｔｉｖｅ）は光照射しないことで調製した。
その結果、図１０ｄに示すように、０℃及び室温でインキュベートして調製したＡβ１－４２オリゴマーのいずれについてもＮａｔｉｖｅと比較して弱い蛍光強度を示し、化合物（１ａ）がＡβ１－４２オリゴマーのクロスβ構造の増加を抑えていることが明らかとなった。また、線維化も同様に抑えられていた。
【００９１】
以上の結果（１）～（４）より、化合物（１ａ）がＡβ１－４２の線維構造に加えてオリゴマー構造を酸素化し凝集及び線維化を抑えることが明らかとなった。
【００９２】

実施例７（本発明化合物Ａβアミロイド以外のアミロイド凝集に対する酸素化作用）
（１）２５ｍＭ塩酸溶液中のインスリン（４００μＭ）を６０℃で撹拌（１０００ｒｐｍ）しながらインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（１２時間インキュベート）インスリン（１６０μＭ）を含む中性緩衝液に、化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。
　その結果、図１１ａに示すように、非凝集インスリンでは酸素化の進行は認められず、凝集インスリンにおいては酸素化の進行が観察された。尚、光照射を行わなかった場合、凝集インスリンの酸素化は観測されなかった。
【００９３】
（２）１Ｍ塩酸溶液中のβ２－ミクログロブリン（１１４μＭ）を３７℃で撹拌（１０００ｒｐｍ）しながらインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（２４時間インキュベート）β２－ミクログロブリン（８８μＭ）を含む中性緩衝液に、化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分インキュベートした後、エンドプロテイナーゼ（Ｌｙｓ－Ｃ）で消化し、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。
　その結果、図１１ｂに示すように、非凝集β２－ミクログロブリンでは酸素化の進行は認められず、凝集β２－ミクログロブリンの酸素化が観察された。尚、光照射を行わなかった場合は、凝集β２－ミクログロブリンの酸素化は観測されなかった。
【００９４】
（３）１０ｍＭ塩酸溶液中のトランスサイレチン（８０μＭ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ含む）を室温でインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（３時間インキュベート）トランスサイレチン（３６μＭ）を含む中性緩衝液に、化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分インキュベートした後、エンドプロテイナーゼ（Ｌｙｓ－Ｃ）で消化し、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。
　その結果、図１１ｃ～図１１ｅに示すように、非凝集ランスサイレチンでは酸素化の進行は認められず、凝集トランスサイレチンの酸素化が観察された。尚、光照射を行わなかった場合は、凝集トランスサイレチンの酸素化は観測されなかった。
【００９５】
（４）２０ｍＭトリス緩衝液中（ｐＨ７．５，１００ｍＭ　ＮａＣｌ及び１ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$含む）のα－シヌクレイン（６９μＭ）を３７℃で撹拌（１０００ｒｐｍ）しながらインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（２４時間インキュベート）α－シヌクレイン（６９μＭ）を含む本緩衝液に、化合物（１ａ）（２０μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分インキュベートした後、エンドプロテイナーゼ（Ｌｙｓ－Ｃ）で消化し、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。
　その結果、図１１ｆ及び図１１ｇに示すように、非凝集α－シヌクレインでは酸素化の進行は認められず、凝集α－シヌクレインの酸素化が観察された。尚、光照射を行わなかった場合は、凝集α－シヌクレインの酸素化は観測されなかった。
【００９６】
実施例８（本発明化合物がクロスβシート構造の形成を伴うアミロイド凝集に特異的である）
（１）ヌクレオシドホスホリラーゼ（０．１ｍｇ／ｍＬ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）を６０℃でインキュベートし蛍光アッセイキット（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ　ａｎｄ　Ａｇｇｒｅｇａｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（ＰｒｏＦｏｌｄｉｎ、Ｈｕｄｓｏｎ、ＭＯ、ＵＳＡ））を用いて熱凝集度を追跡した。
　その結果、図１２ａに示すように、ヌクレオシドホスホリラーゼを含むリン酸緩衝液をインキュベートしたところ、時間経過に伴いキットの蛍光強度（熱凝集度）の増加が観測された。０時間及び１時間インキュベートして調製したものをそれぞれ非凝集及び凝集ホ

スホリラーゼとして酸素化反応解析に用いた。

【００９７】

（２）予め３７℃でインキュベートさせたＡβ１－４２（２０μＭ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）を３７℃でインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（６時間インキュベート）Ａβ１－４２に、リボフラビン（４μＭ）又は化合物（１ａ）（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、室温で１０分インキュベートした後、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。

ヌクレオシドホスホリラーゼ（０．１ｍｇ／ｍＬ）を含むリン酸緩衝液（１０ｍＭ，ｐＨ７．４）を６０℃でインキュベートして調製した非凝集（０時間インキュベート）及び凝集（１時間インキュベート）ヌクレオシドホスホリラーゼに、リボフラビン（４μＭ）又は化合物（１ａ）（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、室温で１０分インキュベートした後、エンドプロテイナーゼ（Ｌｙｓ－Ｃ）で消化し、質量分析装置（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ）にて反応を追跡した。

それぞれの酸素化率の比は、（凝集Ａβ１－４２の酸素化強度率）／（非凝集Ａβ１－４２の酸素化強度率）及び（凝集ヌクレオシドホスホリラーゼの酸素化強度率）／（非凝集ヌクレオシドホスホリラーゼの酸素化強度率）として算出した。

【００９８】

その結果、図１２ｂに示すように、非凝集及び凝集Ａβ１－４２にリボフラビン（２０．０ｍｍｏｌ％）及び化合物（１ａ）（２０．０ｍｍｏｌ％）を添加し、生理的条件下（ｐＨ７．４、室温）光照射を行ったところ、リボフラビンを用いた場合の酸素化率比は０．８程度であり、化合物（１ａ）を用いた場合の酸素化率比は４．２程度であった。

非凝集及び凝集ヌクレオシドホスホリラーゼにリボフラビン及び化合物（１ａ）を添加し、生理的条件下（ｐＨ７．４、室温）光照射を行ったところ、リボフラビンを用いた場合の酸素化率比は１．４程度であり、化合物（１ａ）を用いた場合の酸素化率比は１．２程度であった。

【００９９】

以上の（１）及び（２）の結果より、化合物（１ａ）は（熱凝集ではなく）クロスβ構造の形成を伴うアミロイド凝集特異的に作用することが明らかとなった。

【０１００】

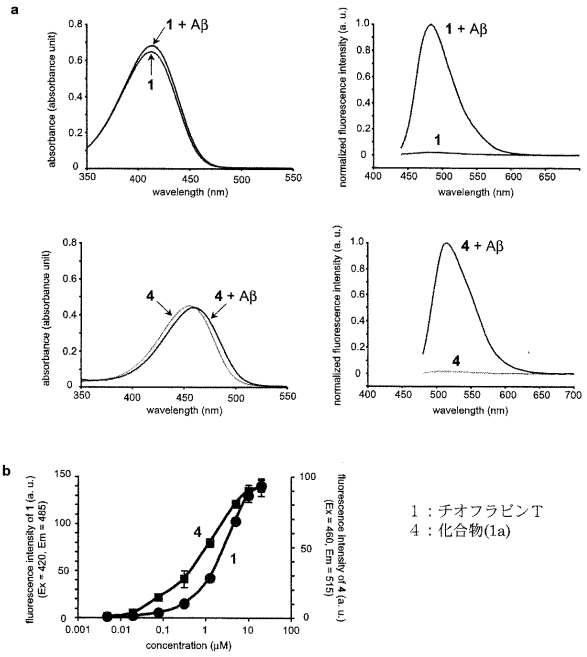
実施例９

Ｌ－アスコルビン酸（５００μＭ）を含む培養培地に、化合物（１ａ）（２０μＭ）又はリボフラビン（４μＭ）を加え、ＬＥＤ照射下（波長５００ｎｍ）、３７℃で３０分インキュベートした後、質量分析装置（ＬＣ－ＭＳＭＳ）にて反応を追跡した。

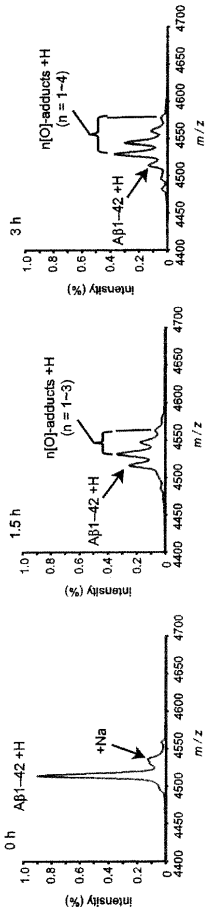
その結果、図１３に示すように、Ｌ－アスコルビン酸に化合物（１ａ）（４．０ｍｍｏｌ％）又はリボフラビン（０．８ｍｍｏｌ％）を添加し、光照射を行ったところ、化合物（１ａ）を用いた場合にＬ－アスコルビン酸は１００％残存していた。一方で、リボフラビンを用いた場合はＬ－アスコルビン酸は完全に消失していた。

この結果から、本発明化合物は、単に光照射を受けただけでは酸化作用を示さず、アミロイド凝集のようなクロスβシート構造に結合して初めて酸化作用を示すことが明らかになった。

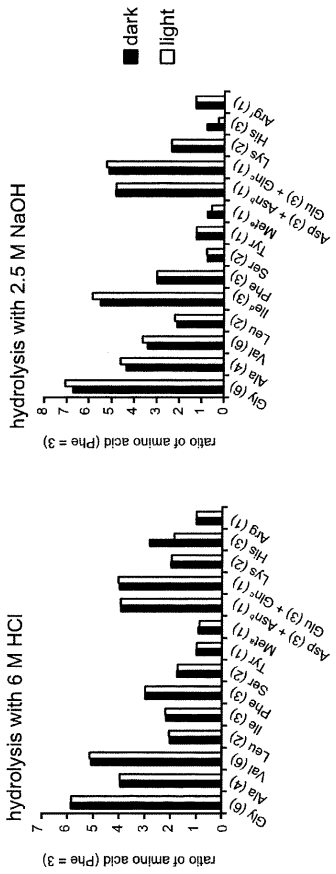
【図１】



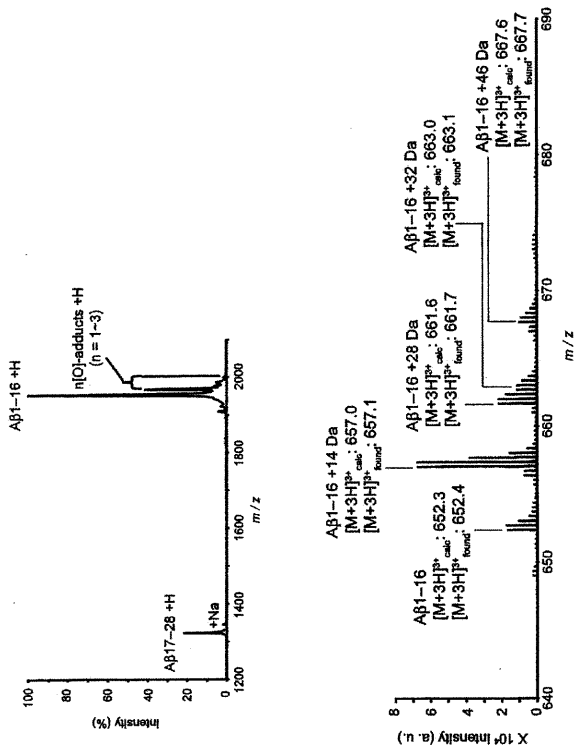

【図２ａ】



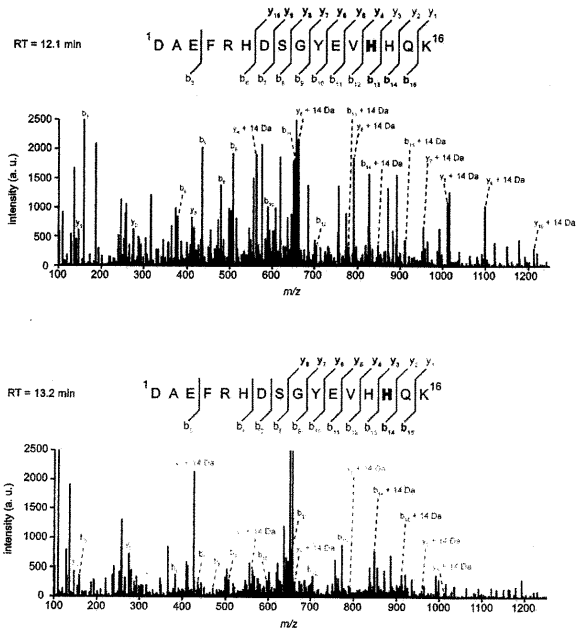

【図２ｂ】




【図２ｃ】



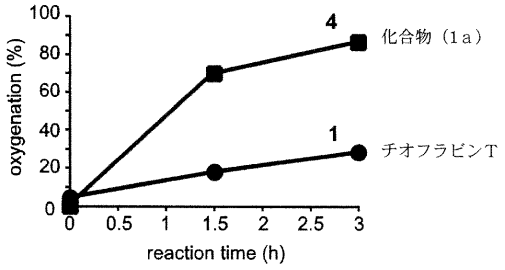
【図２ｄ】



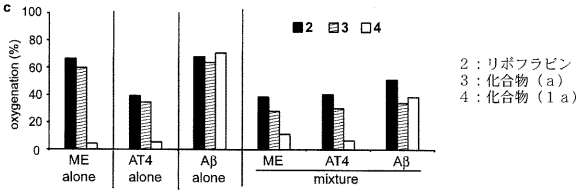

【図３ａ】

amyloid-β peptide 1–42 (Aβ1–42): 1DAEFR HDSGY 10EVHHQ KLVFF 20AEDVG SNKGA 30IIGLM VGGVV 40IA 42

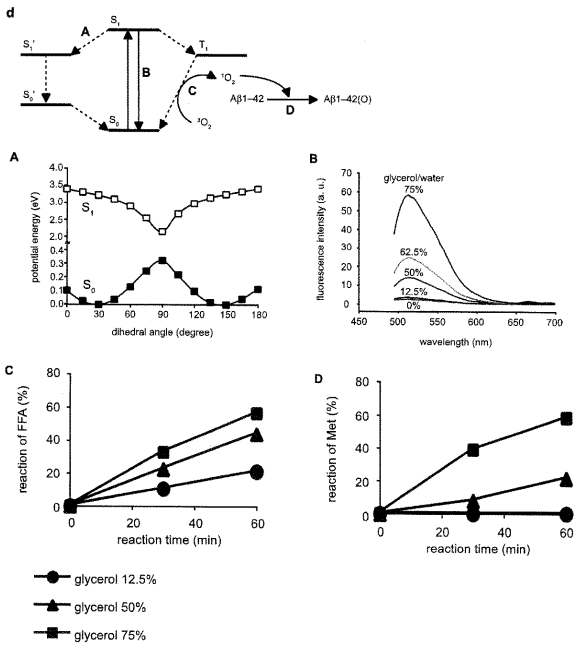
【図３ｂ】



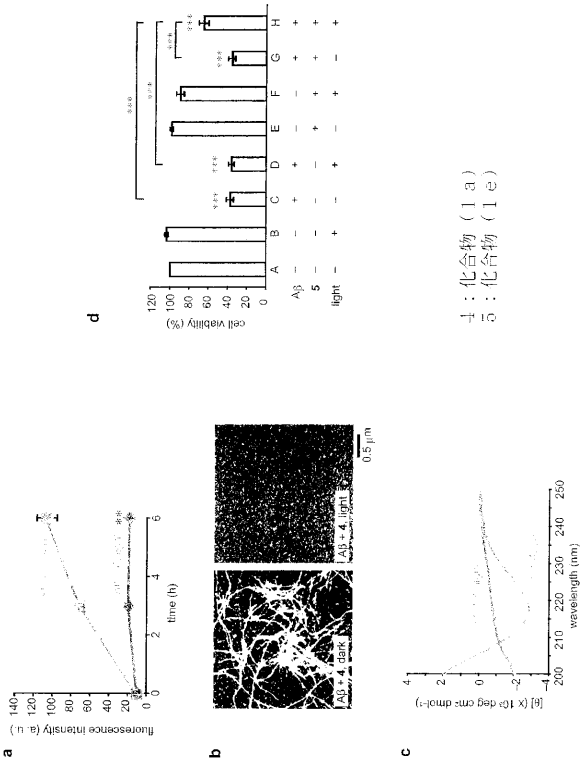

【図３ｃ】



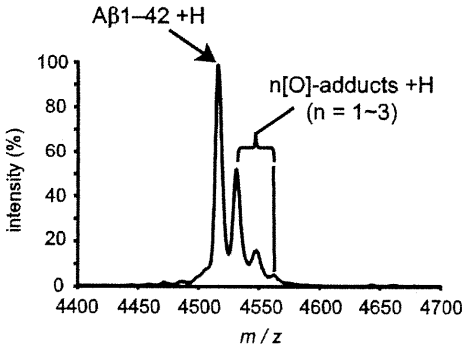

【図３ｄ】



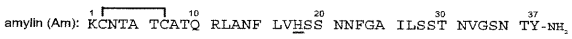

【図４】



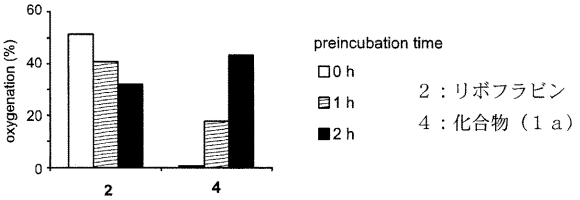
【図５】



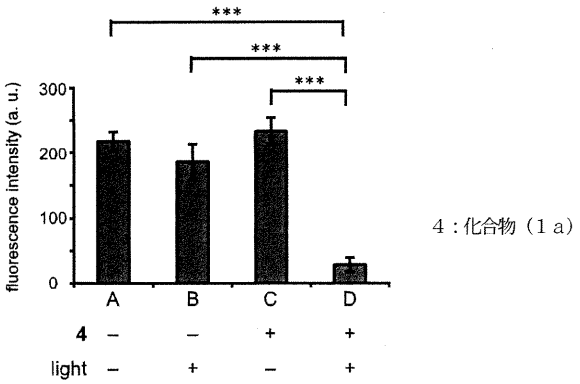

【図６ａ】



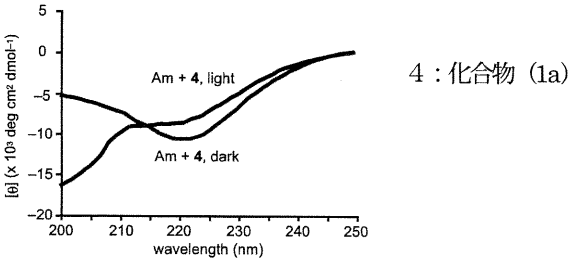

【図６ｂ】



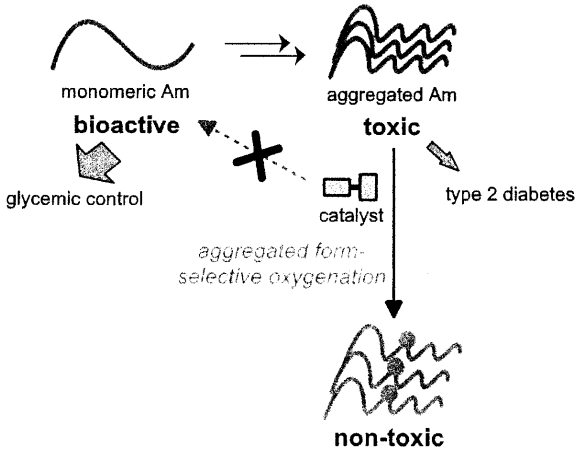

【図６ｃ】



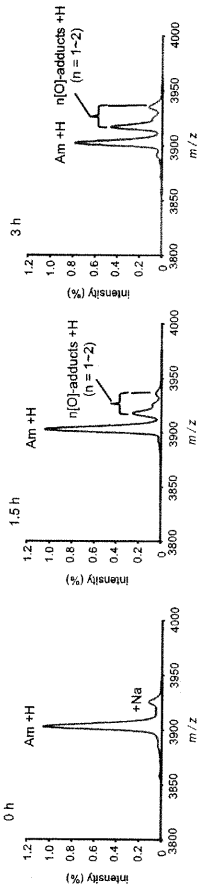

【図６ｄ】



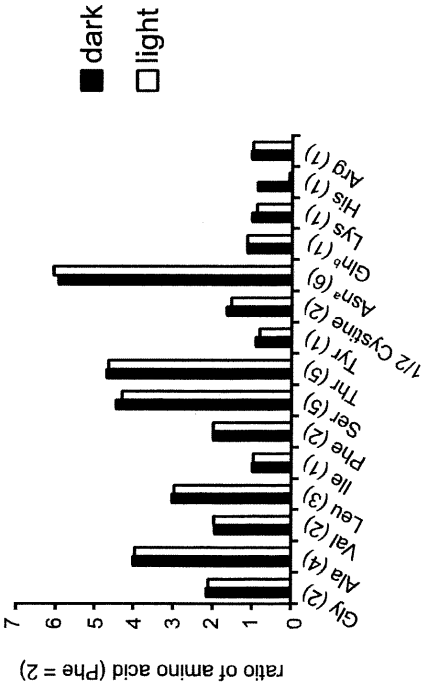

【図６ｅ】



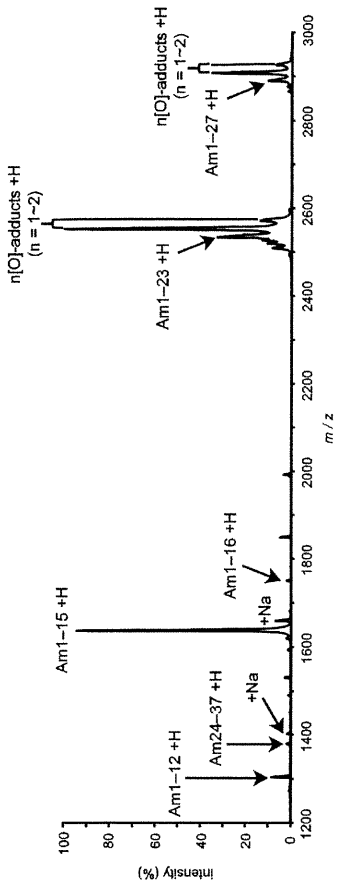

【図７ａ】



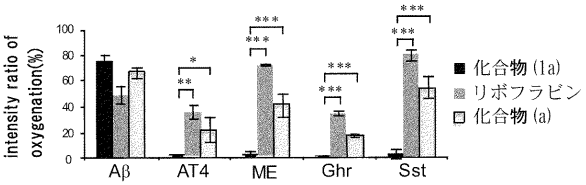
【図７ｂ】



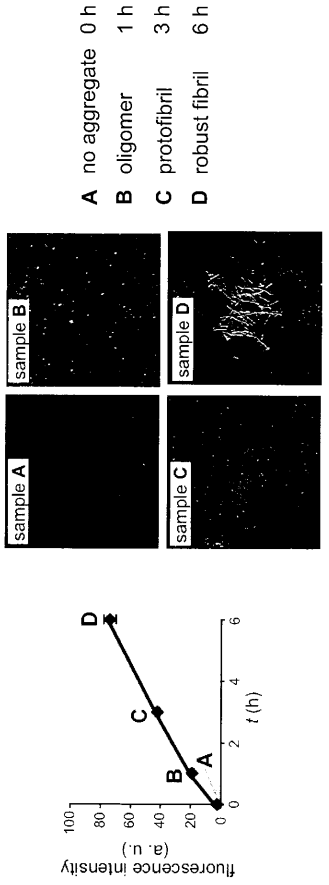

【図７ｃ】



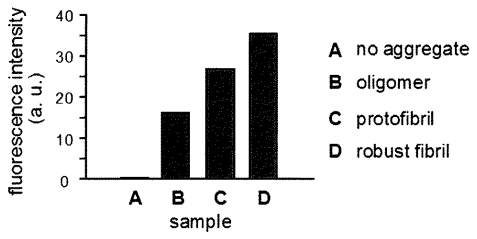

【図８】



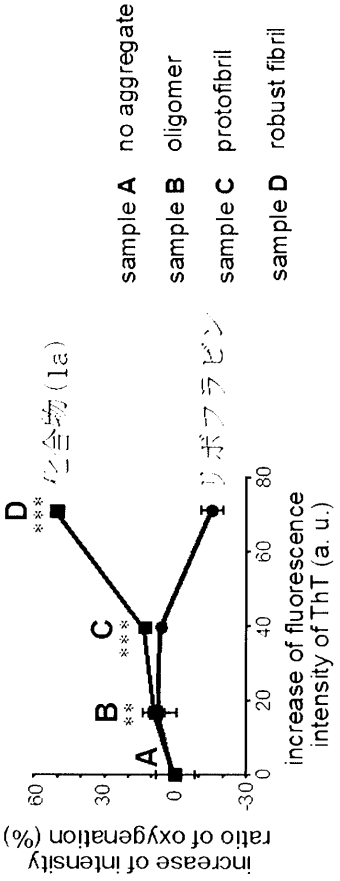

【図９ａ】



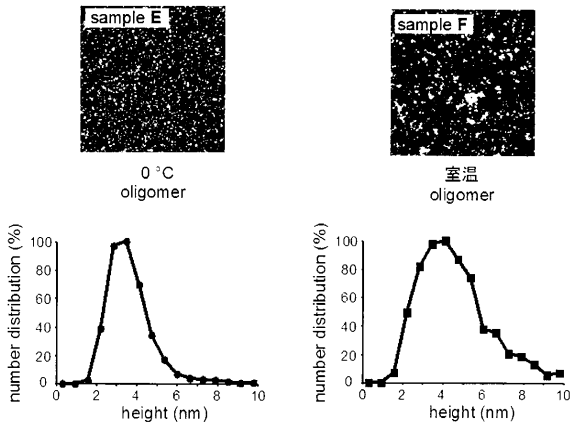
【図９ｂ】



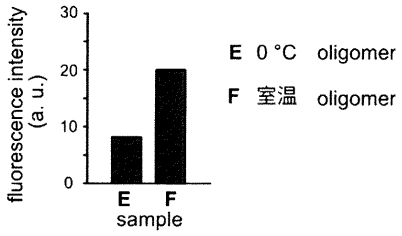

【図９ｃ】



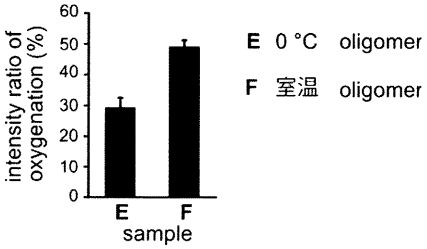

【図１０ａ】



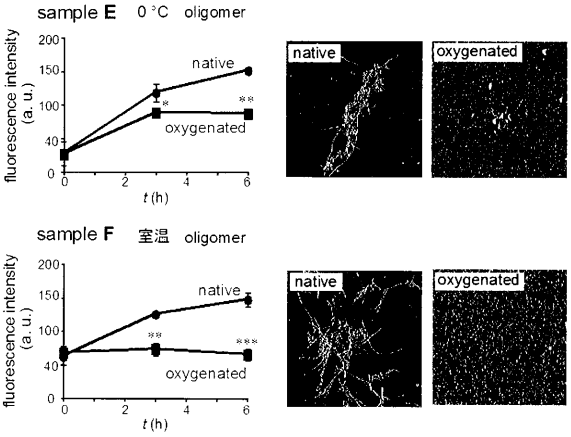

【図１０ｂ】



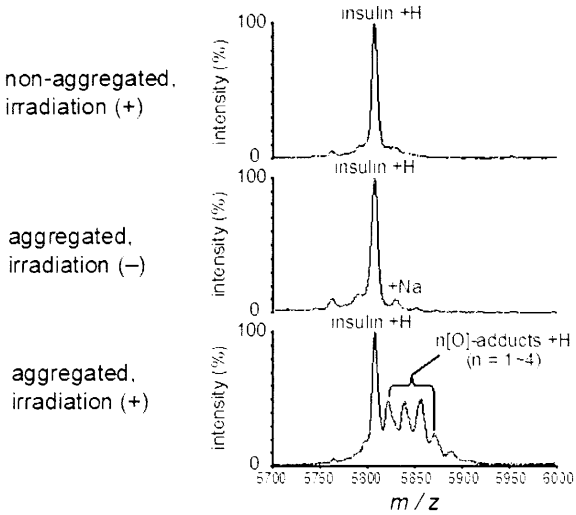

【図１０ｃ】



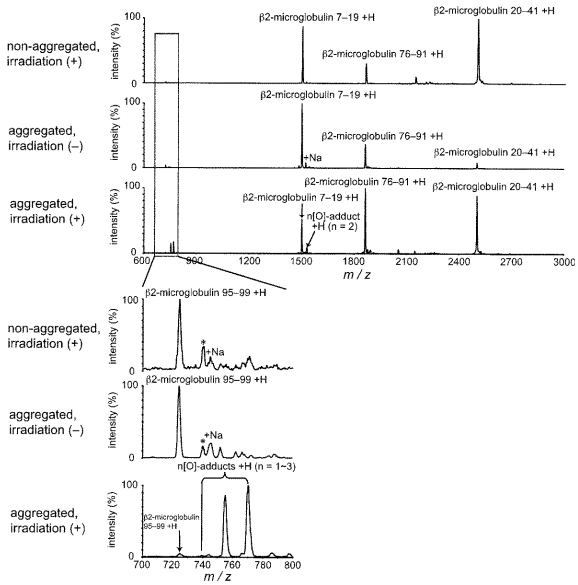

【図１０ｄ】



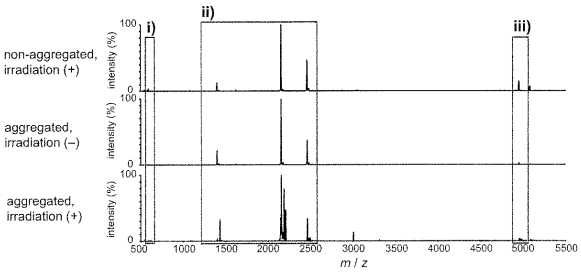
【図１１ａ】



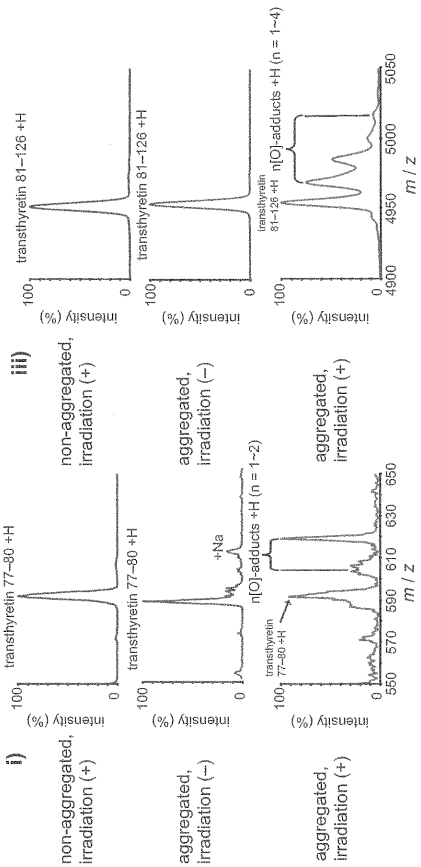

【図１１ｂ】



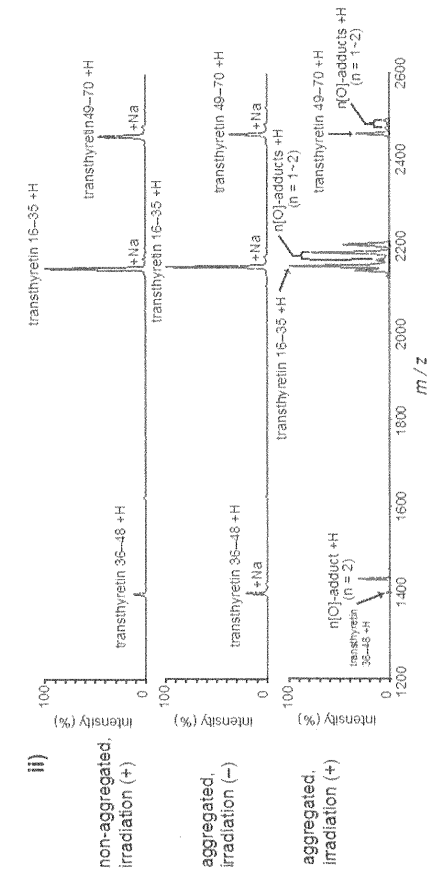

【図１１ｃ】



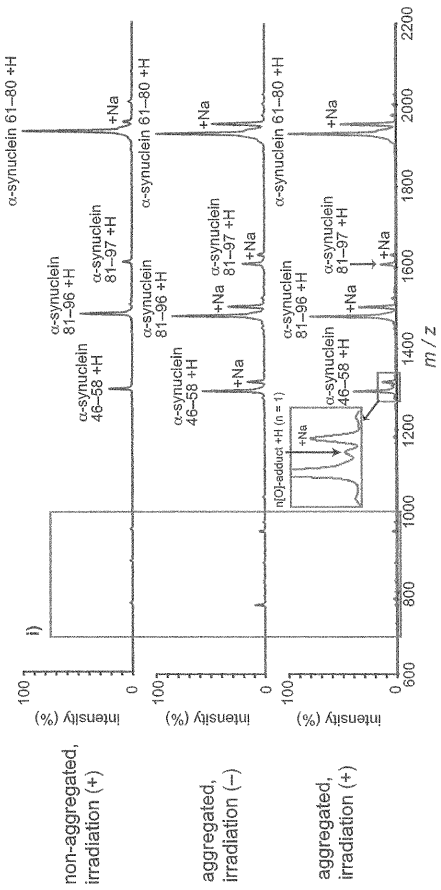

【図１１ｄ】



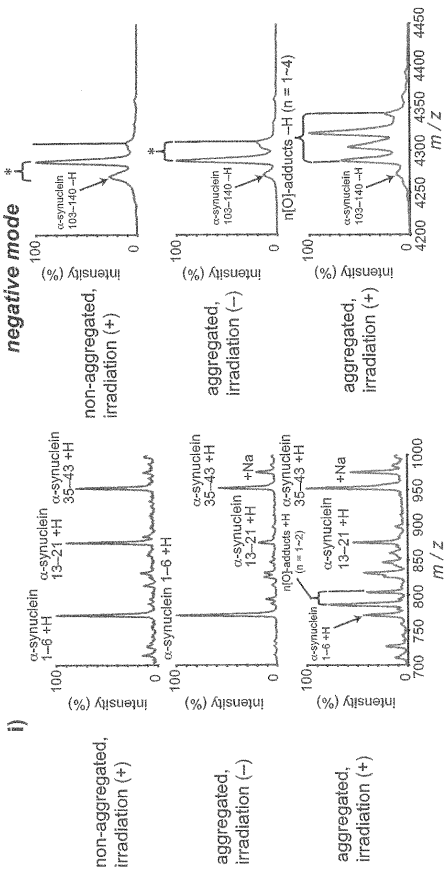
【図１１ｅ】



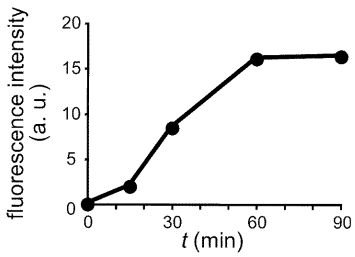

【図１１ｆ】



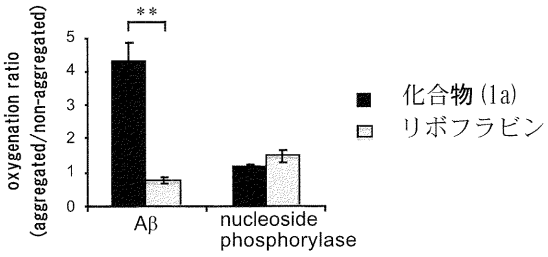

【図１１ｇ】



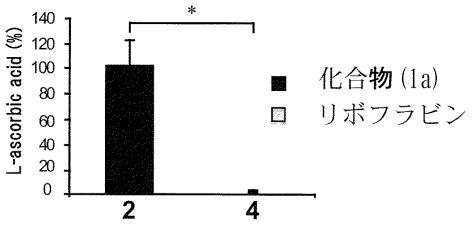

【図１２ａ】




【図１２ｂ】



【図１３】




【配列表】
0006562361000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | ＦＩ | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ａ６１Ｋ | 38/08 | (2019.01) | Ａ６１Ｋ | 38/08 | |
| Ａ６１Ｐ | 43/00 | (2006.01) | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １０５ |
| Ａ６１Ｐ | 25/28 | (2006.01) | Ａ６１Ｐ | 25/28 | |
| Ａ６１Ｐ | 25/16 | (2006.01) | Ａ６１Ｐ | 25/16 | |
| Ａ６１Ｐ | 25/14 | (2006.01) | Ａ６１Ｐ | 25/14 | |

(72)発明者　清水　裕介
東京都中央区日本橋１－１２－１　野村アセットマネジメント株式会社内

審査官　早川　裕之

(56)参考文献　特開２０１０－０８５４６５（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－２０２５９８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５２８０１５（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５１６６８４（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５１４３３０（ＪＰ，Ａ）
SRIVASTAVA,A.，Chemistry - A European Journal，２０１０年，Vol.16，pp.9257-9263，全文
Journal of Medicinal Chemistry，１９６９年，１２，３０－３６，全文

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｄ　４１７／０４
Ｃ０７Ｄ　４７１／０６
Ｃ０７Ｋ　　７／０２
Ａ６１Ｋ　３１／４７０９～４７４５
Ａ６１Ｋ　３８／０８
Ａ６１Ｐ　２５／１４～２８
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）