

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6846052号  
(P6846052)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C07F</b>	<b>5/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C07F</b>	<b>5/02</b>	<b>CSPC</b>
<b>A61K</b>	<b>31/69</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61K</b>	<b>31/69</b>	
<b>A61P</b>	<b>25/28</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P</b>	<b>25/28</b>	
<b>A61P</b>	<b>25/16</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P</b>	<b>25/16</b>	
<b>A61P</b>	<b>25/14</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P</b>	<b>25/14</b>	

請求項の数 8 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-507334 (P2018-507334)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月21日(2017.3.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2017/011232  
 (87) 国際公開番号 W02017/164172  
 (87) 国際公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)  
 審査請求日 令和2年3月6日(2020.3.6)  
 (31) 優先権主張番号 特願2016-56615 (P2016-56615)  
 (32) 優先日 平成28年3月22日(2016.3.22)  
 (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 東京大  
 学大学院薬学系研究科内  
 (72) 発明者 相馬 洋平  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大  
 学大学院薬学系研究科内  
 (72) 発明者 倪 積智  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大  
 学大学院薬学系研究科内

最終頁に続く

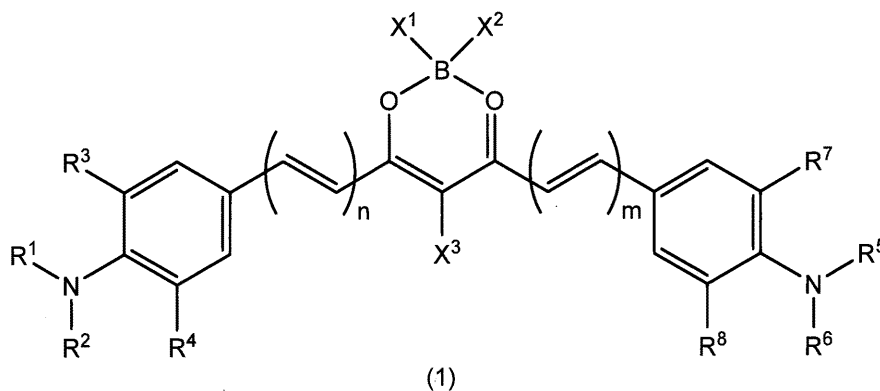
(54) 【発明の名称】 クルクミンホウ素錯体及びこれを含有する医薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の一般式(1)

【化1】



(式中、 $X^1$  及び  $X^2$  は、同一又は異なって、ハロゲンアルキル基又はハロゲン原子を示し；

$X^3$  は、臭素原子、ヨウ素原子又はセレン原子を示し；

$R^1$  及び  $R^2$  は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示し；

$R^3$  及び  $R^4$  は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^1$  と  $R^3$ 、又は  $R^2$  と  $R^4$  が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよく；

$R^5$  及び  $R^6$  は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示し；

$R^7$  及び  $R^8$  は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^5$  と  $R^7$ 、又は  $R^6$  と  $R^8$  が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよく；

$m$  及び  $n$  は、1 ~ 3 の整数を示す)  
で表されるクルクミンホウ素錯体又はその塩。

【請求項 2】

$X^1$  がハロゲノアルキル基であり、 $X^2$  がハロゲン原子である請求項 1 記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

【請求項 3】

$m$  及び  $n$  が 1 である請求項 1 又は 2 記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

【請求項 4】

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$  及び  $R^8$  が示す置換基を有していてもよいアルキル基が、カルボキシ基、スルホン酸基、ヒドロキシ基、アミノ基、 $-CO-$ 、 $-CONH-$  及びトリアゾール基から選ばれる 1 種以上の置換基を有していてもよいアルキル基である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

【請求項 5】

$R^1$  と  $R^3$ 、 $R^2$  と  $R^4$ 、 $R^5$  と  $R^7$ 、又は  $R^6$  と  $R^8$  が一緒になって形成されるアルキレン基又はアルケニレン基の炭素数が 2 又は 3 である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩を有効成分とする医薬。

【請求項 7】

病原性アミロイドが関連する疾患の予防又は治療薬である請求項 6 記載の医薬。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、種々の病原性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、タウ蛋白質、パーキンソン病のシヌクレイン、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。

10

20

30

40

50

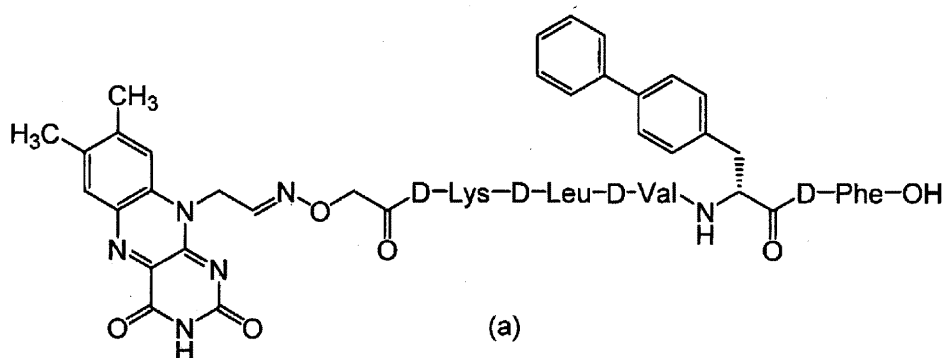
## 【 0 0 0 3 】

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（A と略す）に対しては、前駆体蛋白質から A を産生する酵素の阻害剤、A の分解酵素促進剤、免疫療法、A の凝集阻害剤等が知られている。

一方、A に関しては、A ペプチドの Met 酸素化体（A ペプチドの Met 残基の硫黄原子が酸素化（O）された酸素化体）が生体内に少量残存すること、及び当該 Met 酸素化体は A 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 A 結合部位を有するフラビン光触媒を用いて A ペプチドを酸素化すると A ペプチド酸素化体が得られ、当該 A ペプチド酸素化体は A の凝集を抑制することを報告した（非特許文献 4）。

## 【 0 0 0 4 】

## 【 化 1 】



## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 5 】

【 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. et al. Biochemistry, 2011, 50, p10687-10697

【 非特許文献 4 】 A. Taniguchi et al. 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 】

## 【 0 0 0 6 】

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 A 非存在下においても酸素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、A 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、アミロイドに選択的であって、A 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素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 】

## 【 0 0 0 7 】

そこで本発明者は、アミロイドに対する選択的な酸素化活性を有し、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、 $X^3$ が臭素原子、ヨウ素原子又はセレン原子であるという特徴を有する下記一般式（1）で表されるクルクミンホウ素錯体が、長波長側の光照射により A ペプチド及び他のアミロイドに対する酸素化活性が強く、毒性が強い A ペプチド凝集体に対する酸素化活性が特に強く、アミロイド以外のペプチドに対しては酸素化活性を有さず、かつ水中や光照射に対する安定性が高いことから、凝集性を有しな

いアミロイド酸素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】

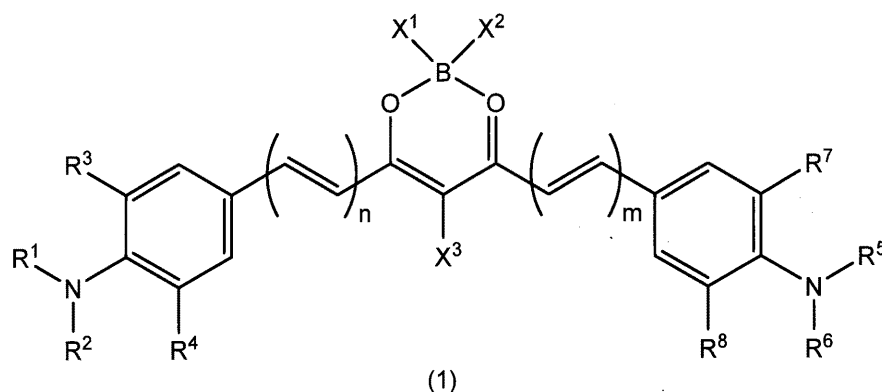
すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔11〕を提供するものである。

【0009】

次の一般式(1)

【0010】

【化2】



20

【0011】

(式中、 $X^1$ 及び $X^2$ は、同一又は異なって、ハロゲノアルキル基又はハロゲン原子を示し；

$X^3$ は、臭素原子、ヨウ素原子又はセレン原子を示し；

$R^1$ 及び $R^2$ は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示し；

$R^3$ 及び $R^4$ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^1$ と $R^3$ 、又は $R^2$ と $R^4$ が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよく；

$R^5$ 及び $R^6$ は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示し；

30

$R^7$ 及び $R^8$ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^5$ と $R^7$ 、又は $R^6$ と $R^8$ が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよく；

$m$ 及び $n$ は、1～3の整数を示す)

で表されるクルクミンホウ素錯体又はその塩。

〔2〕 $X^1$ がハロゲノアルキル基であり、 $X^2$ がハロゲン原子である〔1〕記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

〔3〕 $m$ 及び $n$ が1である〔1〕又は〔2〕記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

〔4〕 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ が示す置換基を有していてもよいアルキル基が、カルボキシ基、スルホン酸基、ヒドロキシ基、アミノ基、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 及びトリアゾール基から選ばれる1種以上の置換基を有していてもよいアルキル基である〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

40

〔5〕 $R^1$ と $R^3$ 、 $R^2$ と $R^4$ 、 $R^5$ と $R^7$ 、又は $R^6$ と $R^8$ が一緒になって形成されるアルキレン基又はアルケニレン基の炭素数が2又は3である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

〔6〕〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩を有効成分とする医薬。

〔7〕病原性アミロイドが関連する疾患の予防又は治療薬である〔6〕記載の医薬。

〔 8 〕〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

〔 9 〕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 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩の使用。

〔 10 〕病原性アミロイドが関与する疾患を予防又は治療するための、〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩。

〔 11 〕〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のクルクミンホウ素錯体又はその塩の有効量を投与することを特徴とする病原性アミロイドが関連する疾患を予防又は治療する方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明のクルクミンホウ素錯体 ( 1 ) は、長波長側の光照射により A ペプチド等の病原性アミロイドを酸素化する触媒活性が高く、生体内でアミロイドを酸素化することによりアミロイドの凝集を抑制し、また凝集したアミロイドに対する酸素化活性が高く、アミロイド以外のペプチドに対しては酸素化活性を有さず、かつ水に対する安定性や光照射条件下での安定性が高いことから、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。本明細書では、酸素化 ( oxygenation ) は、酸化 ( oxidation ) のうち、特に酸素原子を結合させる反応を意味する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】A ペプチド酸素化活性を示す。

【図 2】本発明化合物の A ペプチド酸素化活性を示す。

【図 3】本発明化合物の光照射条件下における細胞毒性を示す。

【図 4】本発明化合物の A<sub>1-42</sub> 選択的酸素化による細胞に対する作用を示す。

【図 5】本発明化合物のベンゾイルメチオニンに対する酸素化活性を示す。

【図 6】本発明化合物の光照射条件下での安定性を示す。

【図 7】本発明化合物の A ペプチド酸素化活性を示す。

【図 8】本発明化合物による A ペプチドおよび非標的分子の酸素化活性を示す。

【図 9】対象化合物による A ペプチドおよび非標的分子の酸素化活性を示す。

【図 10】実験の様子を表す写真である。

【図 11】A ペプチドにおいて、対照群 ( マウス体外照射 ) に対するマウス皮下照射群の酸素化の比を示す。

【図 12】本発明化合物のフルフリルアルコールに対する酸素化活性を示す。

【図 13】本発明化合物の N - ベンゾイル - Met に対する酸素化活性を示す。

【図 14】本発明化合物の酸素化についての A ペプチドへの選択性を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

一般式 ( 1 ) 中、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同一又は異なって、ハロゲノアルキル基又はハロゲン原子を示す。ハロゲノアルキル基としては、直鎖又は分岐鎖のハロゲノC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基が好ましく、直鎖又は分岐鎖のハロゲノC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル基がより好ましい。ハロゲノアルキル基の具体例としては、トリフルオロメチル基、ペンタフルオロエチル基等のパーフルオロC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基が挙げられ、パーフルオロC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル基がより好ましい。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。

【 0 0 1 5 】

X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は両者がハロゲン原子又はハロゲノアルキル基であってもよいが、アミロイドに対する酸素化活性の選択性の点から、X<sup>1</sup>がハロゲノアルキル基であり、X<sup>2</sup>がハロゲン原子であるのが好ましく、X<sup>1</sup>がパーフルオロC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基であり、X<sup>2</sup>がフッ素原子であるのがより好ましく、X<sup>1</sup>がトリフルオロメチル基又はペンタフルオロエチル基であり、X<sup>2</sup>がフッ素原子であるのがさらに好ましい。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

$X^3$ は、臭素原子、ヨウ素原子又はセレン原子を示す。 $X^3$ がこれらの重原子であることにより、アミロイドに対する強い酸素化活性が得られる。

## 【0017】

$R^1$ 及び $R^2$ は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す。 $R^3$ 及び $R^4$ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^1$ と $R^3$ 、又は $R^2$ と $R^4$ が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよい。 $R^5$ 及び $R^6$ は、同一又は異なって、水素原子又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す。 $R^7$ 及び $R^8$ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示すか、 $R^5$ と $R^7$ 、又は $R^6$ と $R^8$ が一緒になって、置換基を有していてもよいアルキレン基又はアルケニレン基を形成してもよい。

10

## 【0018】

$R^1 \sim R^8$ におけるアルキル基としては、直鎖又は分岐鎖の $C_1 - C_6$ アルキル基が好ましく、直鎖又は分岐鎖の $C_1 - C_4$ アルキル基がさらに好ましい。当該アルキル基の例としては、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、イソブチル基、*tert*-ブチル基等が挙げられる。これらのアルキル基に置換し得る基としては、カルボキシ基、スルホン酸基、ヒドロキシ基、アミノ基、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 、及びトリアゾール基から選ばれる1~3個が好ましい。このうち、カルボキシ基、スルホン酸基、ヒドロキシ基、アミノ基が水溶性を高める点で好ましい。

## 【0019】

好ましい置換基の例としては、 $-(CH_2)_1-(Y)_0-(CH_2)_p-Z$ が挙げられる。ここで、 $Y$ は、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ 又はトリアゾール環を示す。また、 $o$ は0又は1の数を示す。トリアゾール環としては、1,2,3-トリアゾール-1,4-ジイル基、1,2,4-トリアゾール-1,3-ジイル基が挙げられる。

20

$l$ 及び $p$ は、同一又は異なって、1~6の整数を示す。 $l$ は1~6の整数が好ましく、1~4の整数がより好ましい。 $p$ は1~6の整数が好ましく、1~4の整数がより好ましい。

$Z$ は、ヒドロキシ基、アミノ基、カルボキシル基( $-COOH$ )又はスルホン酸基( $-SO_3H$ )を示す。

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^7$ 及び $R^8$ で示されるアルコキシ基としては、直鎖又は分岐鎖の $C_1 - C_6$ アルコキシ基が好ましく、 $C_1 - C_4$ アルコキシ基がさらに好ましい。具体的には、メトキシ基、エトキシ基、プロピルオキシ基等が挙げられる。また、ハロゲン原子としては、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、フッ素原子が挙げられる。

30

## 【0020】

$R^1$ と $R^3$ 、 $R^2$ と $R^4$ 、 $R^5$ と $R^7$ 、又は $R^6$ と $R^8$ が一緒になって形成するアルキレン基としては、 $C_2 \sim C_4$ 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。アルケニレン基としては、ビニレン基、プロペニレン基が挙げられる。

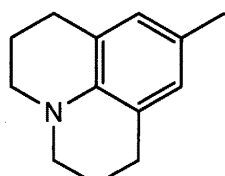
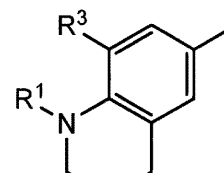
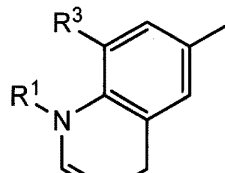
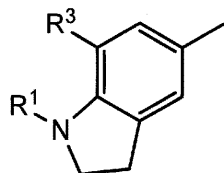
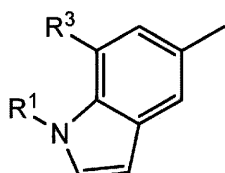
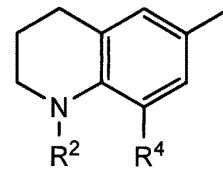
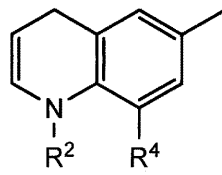
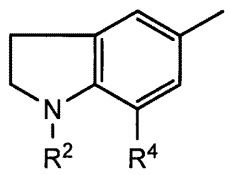
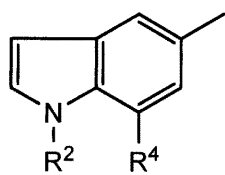
## 【0021】

これらの基が一緒になって形成する環構造としては、以下のものが挙げられる。

40

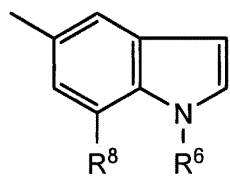
## 【0022】

## 【化 3】

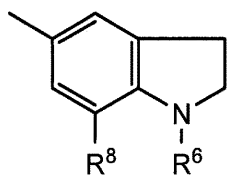


## 【 0 0 2 3 】

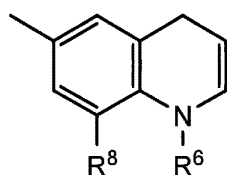
## 【化 4】



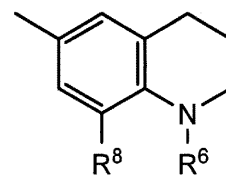
(j)



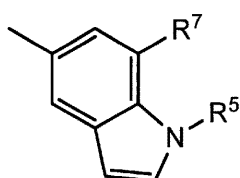
(k)



(l)



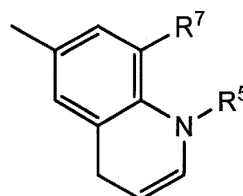
(m)



(n)



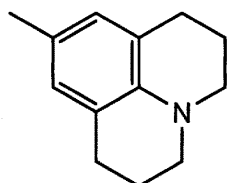
(o)



(p)



(q)



(r)

## 【 0 0 2 4 】

( a ) ~ ( r ) の構造中、 $R^1 \sim R^8$  はアルキレン基やアルケニレン基を形成する場合以外の基を示す。

## 【 0 0 2 5 】

m 及び n は、1 ~ 3 の整数を示すが、1 又は 2 が好ましく、1 がより好ましい。

## 【 0 0 2 6 】

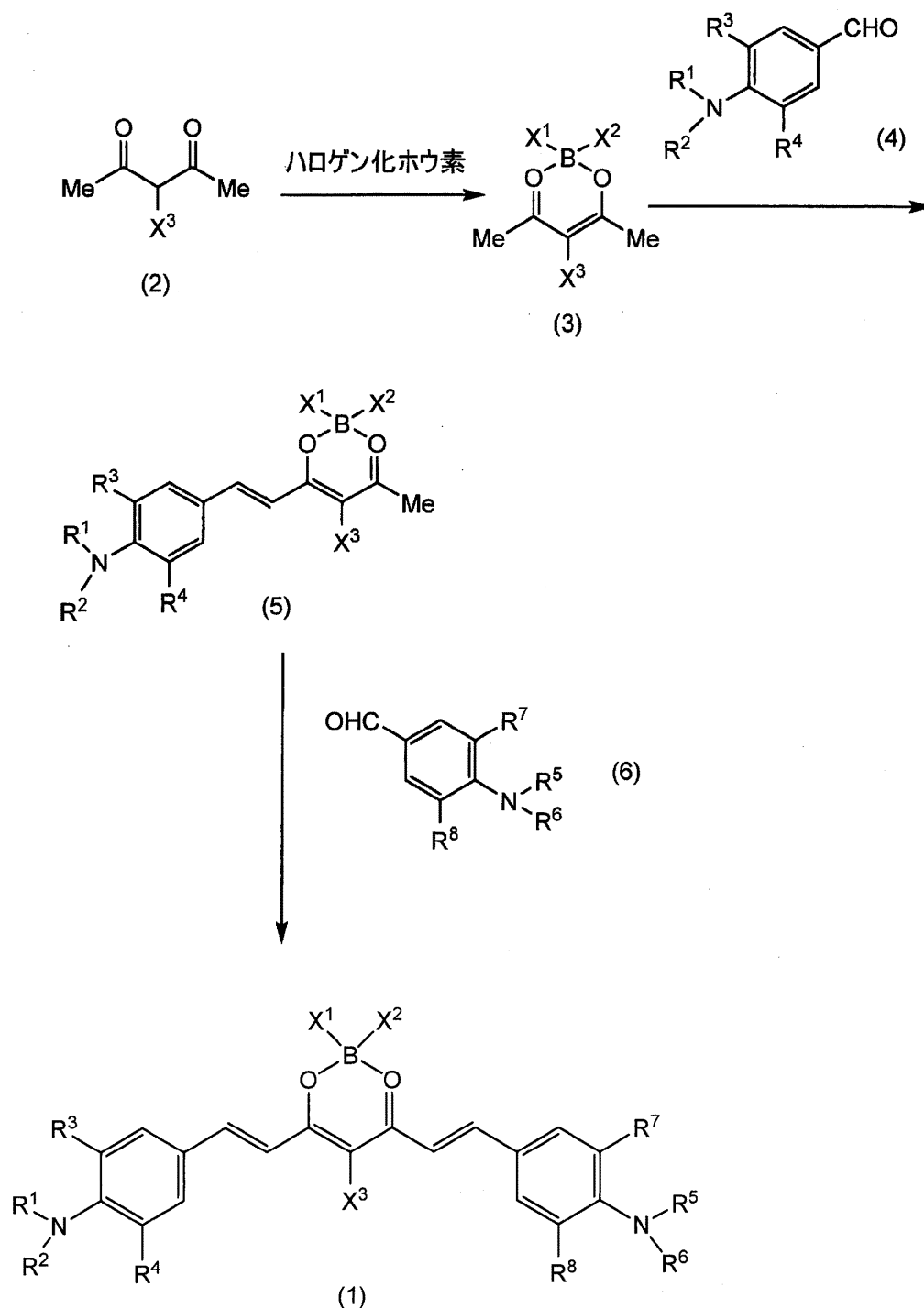
本発明化合物 ( 1 ) が不斉炭素原子を有する場合、本発明には光学異性体が存在するが、光学異性体及びラセミ体のいずれも含まれる。

## 【 0 0 2 7 】

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。

## 【 0 0 2 8 】

## 【化5】



【0029】

(式中、 $X^1 \sim X^3$ 、 $R^1 \sim R^8$ は前記と同じ)

【0030】

すなわち、ハロゲノアセチルアセトン(2)にハロゲン化ホウ酸化合物を反応させ化合物(3)を得、これにベンズアルデヒド化合物(4)を縮合させて化合物(5)を得、次いで化合物(5)と化合物(6)とをさらに縮合させることにより化合物(1)が得られる。

【0031】

ハロゲノアセチルアセトン(2)に反応させるハロゲン化ホウ酸としては、例えば、 $B F_3 \cdot E t_2 O$ 、 $C F_3 B F_3 K$ 、 $C F_3 C F_2 B F_3 K$ 等が用いられる。ハロゲノアセチルア

セトン(2)とハロゲン化ホウ酸との反応は、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル等の酸の存在下、アセトニトリル等の極性溶媒中、0 ~ 室温で行うことができる。

【0032】

化合物(3)とベンズアルデヒド化合物(4)との縮合反応は、アルドール縮合反応である。トリメトキシボラン、トリエトキシボラン、トリプトキシボラン等のホウ酸エステル、アミン等の塩基の存在下に行うことができる。反応は、トルエン等の不活性溶媒中、室温 ~ 80 程度の温度で行うことができる。

【0033】

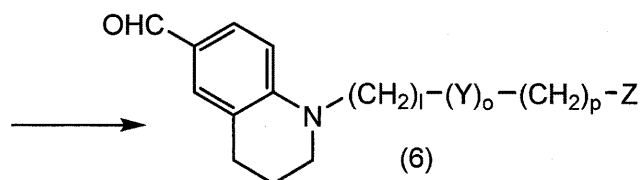
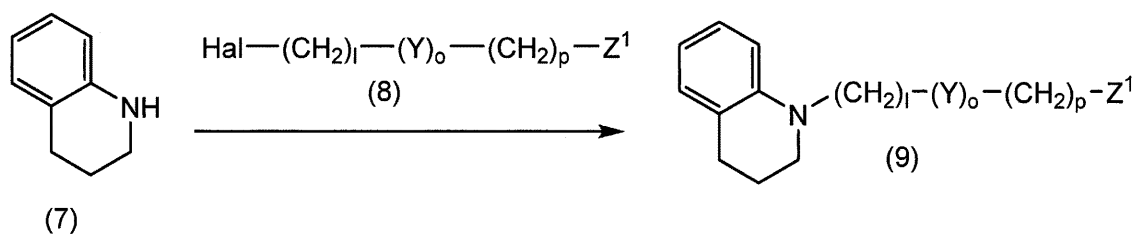
得られた化合物(5)に化合物(6)を縮合させることにより、本発明化合物(1)が得られる。化合物(5)と化合物(6)の縮合反応も、アルドール縮合反応である。前記化合物(3)とベンズアルデヒド化合物(4)との縮合反応と同様に行うことができる。

【0034】

$R^5$ 又は $R^6$ が、 $-(CH_2)_l-(Y)_o-(CH_2)_p-Z$ を示す場合、化合物(6)は、例えば次の反応式に従って製造できる。

【0035】

【化6】



【0036】

(式中、Halはハロゲン原子を示し、 $Z^1$ はアルコキシカルボニル基又はアルキルスルホニル基を示し、Z、Y、l、o及びpは前記と同じ)

【0037】

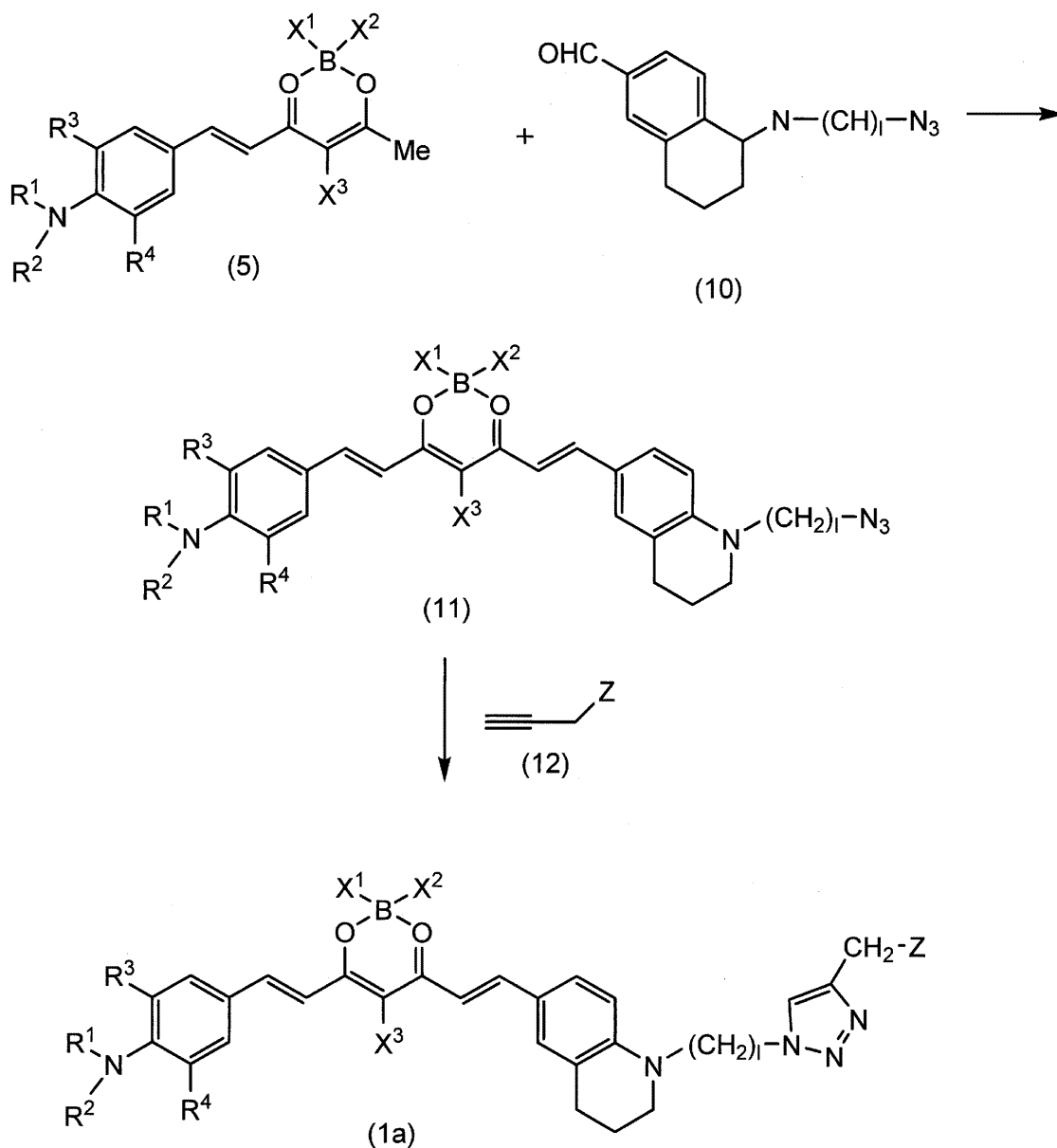
テトラヒドロキノリン(7)に化合物(8)を反応させ、得られた化合物(9)にジメチルホルムアミド等のホルミル化剤を反応させ、加水分解することにより化合物(6)が得られる。ここで、テトラヒドロキノリン(7)と化合物(8)の反応は、ヨウ化カリウム、炭酸カリウム等の塩基の存在下に、アセトニトリル中で80 ~ 100 で行えばよい。また、化合物(9)のホルミル化反応は、オキシ塩化リン等の酸触媒の存在下、ジメチルホルムアミド等を室温下で反応させればよい。 $Z^1$ 部分の加水分解は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の塩基を反応させればよい。

【0038】

また、前記中のYがトリアゾールのような複素環である場合は、次の反応式に従って製造することもできる。

【0039】

## 【化7】



## 【0040】

(式中、 $X^1 \sim X^3$ 、 $R^1 \sim R^4$ 、 $l$  及び  $Z$  は前記と同じ)

## 【0041】

化合物(5)と化合物(10)を縮合させて化合物(11)を得、次いで化合物(11)に化合物(12)を反応させることにより化合物(1a)が得られる。

40

## 【0042】

化合物(5)と化合物(10)の縮合反応は、アルドール縮合反応であり、前記化合物(3)とアルデヒド化合物(4)との反応と同様に行うことができる。

## 【0043】

化合物(11)と化合物(12)の反応は、アルキンとアジドの1,3-双極子付加反応であり、硫酸銅等の銅触媒の存在下、ジメチルホルムアミド、水等の極性溶媒中、室温で容易に進行する。

## 【0044】

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的手段により、反応混合物から単離、精製することができる。

50

## 【0045】

本発明化合物(1)の最大吸光波長は、チオフラビンTに比べて長波長側にシフトしている。

また、Aに本発明化合物(1)を添加し、生理的条件下で660nm以上の光を照射すると、経時的にネイティブAが減少するとともに、酸素原子が1~4個付加した酸素化Aが増加した。その酸素化効率は、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)による酸素化反応は、アンギオテンシンIVやメチオニンエンケファリン等の非アミロイド性のペプチドに対しては極めて弱く、Aに選択的である。

さらに、本発明化合物(1)は、単量体のAペプチドに対する酸素化活性よりも、毒性が強い凝集Aペプチドに対する酸素化活性が高かった。また、本発明化合物(1)は、水に対する安定性及び光照射条件下での安定性も優れている。

従って、本発明化合物(1)は、Aペプチド、アミリン、トランスサイレチン、シヌクレイン、タウ蛋白質、ハンチンチン等の病原性アミロイドを選択的に酸素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、酸素化されると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。

## 【0046】

本発明化合物(1)は、病原性アミロイドの酸素化反応を触媒する。この酸素化反応は、光によって本発明化合物(1)が励起状態となり、アミロイドを酸素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660nm以上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。

## 【0047】

また、本発明化合物(1)の作用により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。

## 【0048】

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。

## 【0049】

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。

## 【0050】

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。

## 【0051】

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。

## 【0052】

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】

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

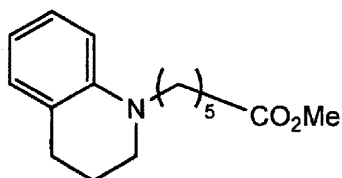
以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明の範囲は下記実施例に限定されることはない。

【 0 0 5 4 】

合成例 1

【 0 0 5 5 】

【 化 8 】



(A)

【 0 0 5 6 】

ヨウ化カリウム ( 1 5 . 9 g , 9 5 . 6 m m o l ) および炭酸カリウム ( 1 1 . 0 g , 7 9 . 7 m m o l ) が溶解したアセトニトリル ( 4 0 m L ) に対し、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキノリン ( 5 . 0 m L , 3 9 . 8 m m o l ) およびメチル 6 - プロモヘキサノエート ( 7 . 3 m L , 4 7 . 8 m m o l ) を室温で加え、反応懸濁液をアルゴン雰囲気下、1 0 0 で 3 0 時間撹拌した。反応液を室温まで冷やし、濾過後、減圧濃縮し、水による希釈、酢酸エチルによる抽出を行った。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、有機溶媒を減圧除去した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し ( h e x a n e / E t O A c = 1 0 0 / 0 t o 8 0 / 2 0 ) 化合物 A を得た ( 7 . 9 5 g , 7 6 % ) 。

20

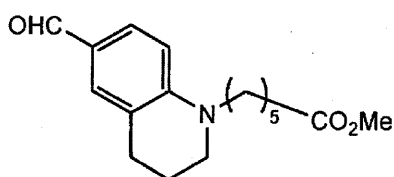
$^1\text{H NMR}$  ( 5 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) 7.02 ( t ,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.91 ( d ,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.51-6.54 ( m , 2H), 3.66 ( s , 3H), 3.20-3.26 ( m , 4H), 2.73 ( t ,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.31 ( t ,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 1.90-1.94 ( m , 2H), 1.63-1.69 ( m , 2H), 1.56-1.62 ( m , 2H), 1.32-1.38 ( m , 2H); LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 262; found: 262.

【 0 0 5 7 】

合成例 2

【 0 0 5 8 】

【 化 9 】



(B)

【 0 0 5 9 】

化合物 A ( 3 . 3 g , 1 2 . 6 m m o l ) が溶解したジクロロメタン ( 2 0 m L ) に対し、DMF ( 9 . 8 m L , 1 2 6 m m o l ) および塩化ホスホリル ( 3 . 5 m L , 3 7 . 8 m m o l ) を加え、アルゴン雰囲気下、混合液を室温で 1 日撹拌した。反応混合液を、水で希釈し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和し、減圧濃縮後、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムによって乾燥させた。有機溶媒を減圧除去したのち、得られた残渣をメタノール ( 2 0 m L ) に溶解し、5 規定水酸化カリウム ( 6 m L ) を 0 にてゆっくりと加えた。反応混合液を 6 時間室温で撹拌した。反応混合液を水で希釈後、塩酸水溶液を 0 にて加えることにより pH を 1 にし、その後酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムによって乾燥させた。有機溶媒を減圧除去したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 展開溶媒比

40

50

ヘキサン：酢酸エチル = 10 : 1) によって精製を行い、化合物 B を薄い緑色の固体として得た (2.4 g, 69%)。

$^1\text{H NMR}$  (392 MHz, DMSO- $d_6$ ) 12.03 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.64 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.49 - 3.18 (m, 4H), 2.83 - 2.56 (m, 2H), 2.35 - 2.06 (m, 2H), 1.93 - 1.66 (m, 2H), 1.63 - 1.41 (m, 4H), 1.41 - 1.12 (m, 2H); LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 276; found: 276.

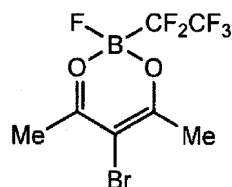
【0060】

合成例 3

【0061】

【化10】

10



(C)

【0062】

0 に氷冷したトリフルオロ (ペンタフルオロエチル) ホウ酸カリウム ( $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{BF}_3\text{K}$ , 0.86 g, 3.8 mmol) のアセトニトリル懸濁液にトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMS-OTf, 1.03 mL, 5.7 mmol) を滴下し 0 度で 30 分間攪拌した。本反応液に対し、3-プロモペンタン-2,4-ジオン (0.34 g, 1.9 mmol) を加え、室温に昇温して終夜攪拌した。有機溶媒を減圧除去したのちフラッシュカラムクロマトグラフィー (展開溶媒比 ヘキサン：酢酸エチル = 90 / 10 to 70 / 30) によって精製を行い、化合物 C を薄い黄色の結晶として得た (0.33 g, 53%)。

20

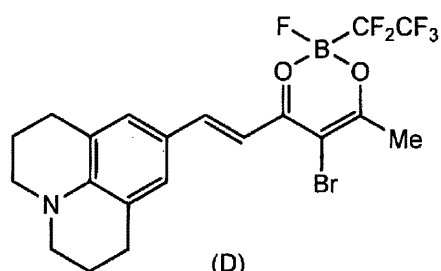
【0063】

合成例 4

【0064】

【化11】

30



(D)

【0065】

化合物 C (163 mg, 0.5 mmol)、9-ジユロリジンカルボアルデヒド (100.7 mg, 0.5 mmol)、ノルマル-ブチルアミン (10  $\mu\text{L}$ , 0.1 mmol) が溶解したトルエン (3 mL) 溶液に対し、ほう酸トリブチル (160.5  $\mu\text{L}$ , 0.6 mmol) を加え、アルゴンで封入した。反応混合液を 60 で 2 時間おき、反応液を室温に冷ました後、トルエンを減圧除去し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (展開溶媒比 ヘキサン：酢酸エチル = 90 / 10 to 70 / 30) によって精製することで化合物 D を濃い紫色の固体として得た (148 mg, 58%)。

40

$^1\text{H NMR}$  (392 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.03 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H), 7.19 (s, 2H), 6.91 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1H), 3.45 - 3.31 (m, 4H), 2.80 - 2.69 (m, 4H), 2.45 (s, 3H), 1.98 (dd,  $J = 11.2, 5.7$  Hz, 4H); LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 510; found: 510.

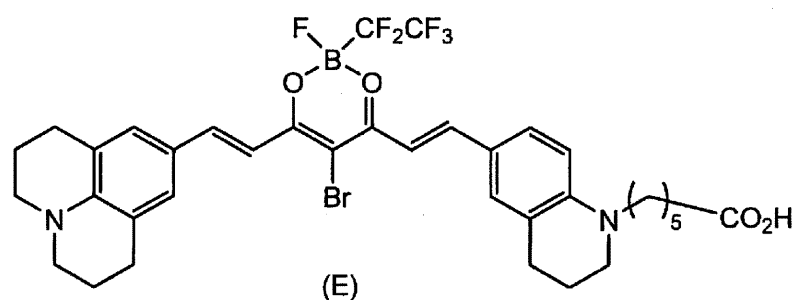
50

【 0 0 6 6 】

合成例 5

【 0 0 6 7 】

【 化 1 2 】



【 0 0 6 8 】

化合物 D ( 1 5 . 3 m g , 0 . 0 3 m m o l )、化合物 B ( 1 6 . 5 m g , 0 . 0 6 m m o l )、ノルマル - ブチルアミン ( 1 . 2  $\mu$  L , 0 . 0 1 2 m m o l ) が溶解したトルエン ( 0 . 5 m L ) 溶液に対し、ほう酸トリブチル ( 8 0  $\mu$  L , 0 . 3 m m o l ) を加え、アルゴンで封入した。反応混合液を 7 0  $^{\circ}$ C で 1 2 時間おき、反応液を室温に冷ました後、トルエンを減圧除去し、HPLC ( MeCN / 0 . 1 % TFA = 1 0 / 9 0 t o 1 0 0 / 0 ) によって精製することで、化合物 E を濃い紫色の固体として得た。 ( 1 5 . 8 m g , 6 9 % ) .

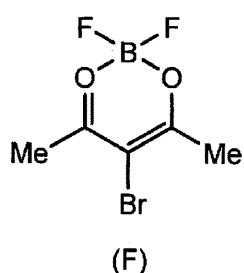
$^1$ H NMR ( 392 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 7.66 (dd, J = 14.5, 9.1 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.01 (dd, J = 17.4, 14.6 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.45 - 3.30 (m, 8H), 2.75 - 2.67 (m, 6H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.92 - 1.78 (m, 6H), 1.52 (dd, J = 15.1, 7.4 Hz, 4H), 1.32 (dd, J = 15.1, 8.1 Hz, 2H); LRMS (ESI): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 767; found: 767.

【 0 0 6 9 】

合成例 6

【 0 0 7 0 】

【 化 1 3 】



【 0 0 7 1 】

3 - ブロモペンタン - 2 , 4 - ジオン ( 0 . 9 g , 5 m m o l ) と三フッ化ホウ素のジエチルエーテル錯体 ( B F <sub>3</sub> · E t <sub>2</sub> O , 0 . 9 4 m L , 7 . 5 m m o l ) を含むアセトニトリル溶液を、アルゴン雰囲気下、0  $^{\circ}$ C で攪拌した。減圧濃縮し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー ( 展開溶媒比 ヘキサン : 酢酸エチル = 9 0 / 1 0 t o 6 0 / 4 0 ) によって精製することで、化合物 F を薄い黄色の固体として得た ( 0 . 4 8 g , 4 2 % ) .

【 0 0 7 2 】

合成例 7

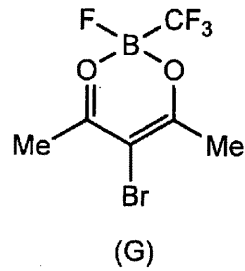
【 0 0 7 3 】

20

30

40

## 【化 1 4】



## 【0074】

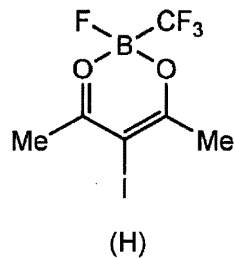
3 - プロモペンタン - 2 , 4 - ジオンおよびトリフルオロ (トリフルオロメチル) ホウ酸カリウム (  $\text{CF}_3\text{BF}_3\text{K}$  ) を用いて、化合物 C と同様の方法により化合物 G を合成した。薄い茶色のオイル状物質 ( 0 . 8 5 g , 6 2 % ) 。

## 【0075】

合成例 8

## 【0076】

## 【化 1 5】



## 【0077】

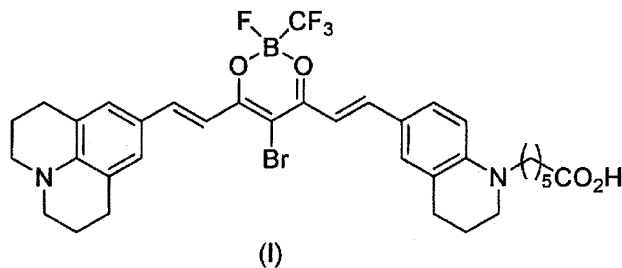
3 - ヨードペンタン - 2 , 4 - ジオンおよびトリフルオロ (トリフルオロメチル) ホウ酸カリウム (  $\text{CF}_3\text{BF}_3\text{K}$  ) を用いて、化合物 C と同様の方法により化合物 H を合成した。薄い茶色のオイル状物質 ( 0 . 3 4 g , 5 1 % ) 。

## 【0078】

合成例 9

## 【0079】

## 【化 1 6】



## 【0080】

化合物 G と 9 - ジュロリジンカルボアルデヒドを用いて、化合物 E と同様の方法により化合物 I を合成した。濃い青色の固体 ( 2 段階で 4 5 % ) 。

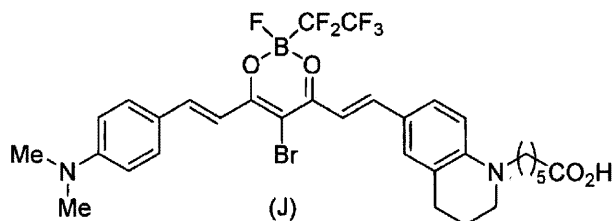
LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 717; found: 717.

## 【0081】

合成例 10

## 【0082】

## 【化 1 7】



## 【0083】

化合物 C と 4 - ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いて、化合物 E と同様の方法により化合物 J を合成した。濃い青色の固体 ( 2 段階で 8 % ) 。

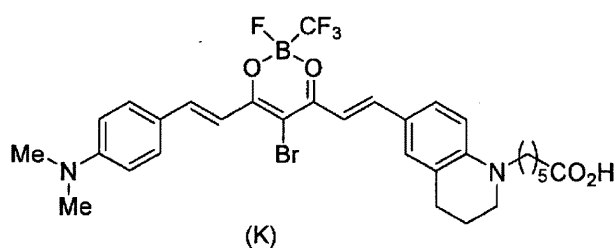
LRMS (ESI): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 715; found: 715.

## 【0084】

合成例 1 1

## 【0085】

## 【化 1 8】



## 【0086】

化合物 G と 4 - ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いて、化合物 E と同様の方法により化合物 K を合成した。濃い青色の固体 ( 2 段階で 1 5 % ) 。

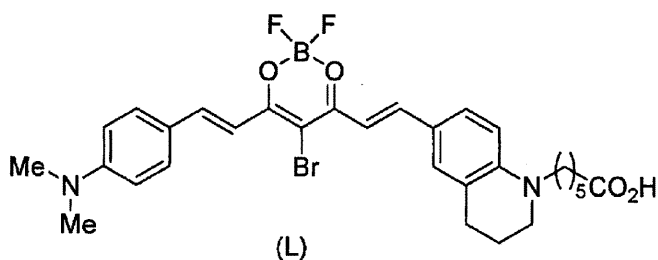
LRMS (ESI): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 665; found: 665.

## 【0087】

合成例 1 2

## 【0088】

## 【化 1 9】



## 【0089】

化合物 F と 4 - ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いて、化合物 E と同様の方法により化合物 L を合成した。濃い青色の固体 ( 2 段階で 8 % ) 。

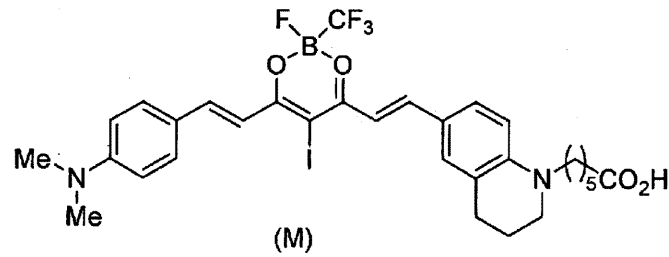
LRMS (ESI): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 615; found: 615.

## 【0090】

合成例 1 3

## 【0091】

【化20】



【0092】

10

化合物Hと4-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いて、化合物Eと同様の方法により化合物Mを合成した。濃い青色の固体（2段階で13%）。

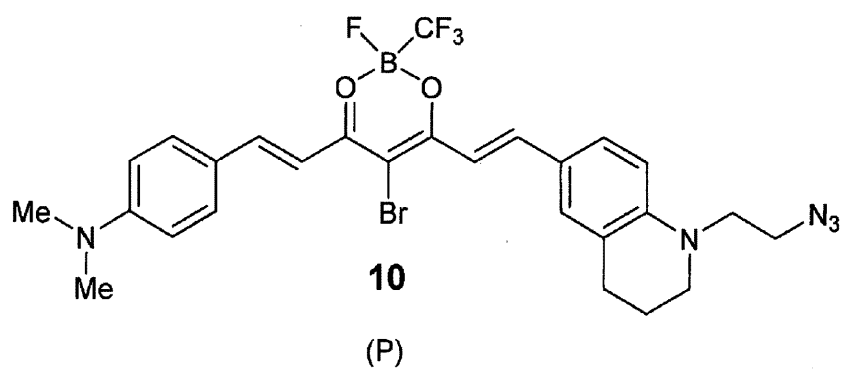
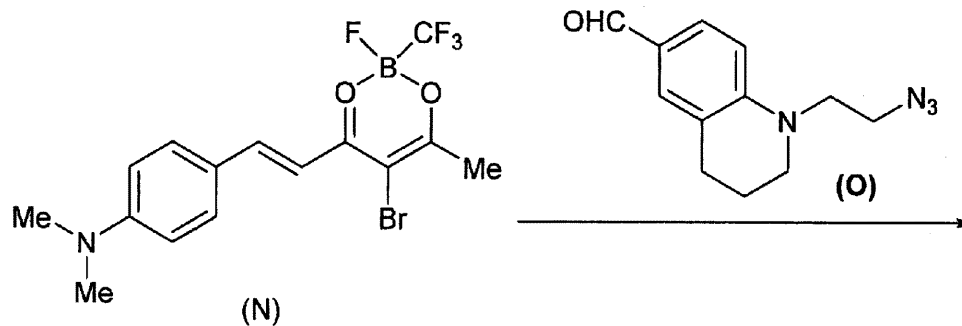
LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[M+H]^+$ : 713; found: 713.

【0093】

合成例14

【0094】

【化21】



【0095】

化合物Gと4-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いて、化合物Dと同様の方法により化合物Nを合成した。その後、化合物Nと化合物Oを用いて、化合物Eと同様の方法により化合物Pを合成した。濃い青色の固体（2段階で24%）。

LRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $[M+H]^+$ : 620; found: 620.

【0096】

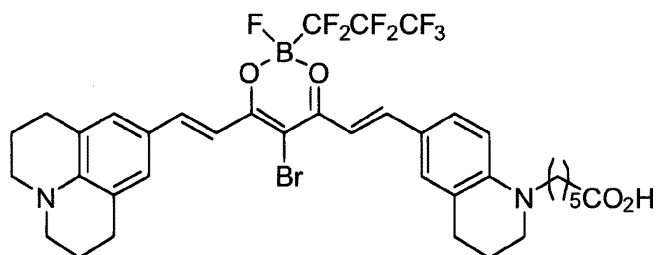
合成例15

【0097】

50



## 【化 2 4】



## 【 0 1 0 4】

10

化合物 D の代わりに化合物 R ( 1 6 . 8 m g 、 0 . 0 3 m m o l ) 、 および化合物 A の代わりに化合物 B ( 1 6 . 5 m g 、 0 . 0 4 m m o l ) を用いて合成例 5 と同様の方法により、化合物 S を濃青色の固体として得た ( 2 0 . 8 m g 、 8 5 % ) 。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-d6) 7.63 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.22 (s, 2H), 6.95 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.74 - 3.12 (m, 8H), 2.94 - 2.56 (m, 6H), 2.17 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.03 - 1.69 (m, 6H), 1.63 - 1.39 (m, 4H), 1.39 - 1.19 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO-d6) 174.41, 169.03, 168.39, 149.74, 149.05, 148.40, 147.74, 132.38, 130.69, 122.84, 121.79, 121.43, 121.12, 110.94, 110.78, 109.57, 94.61, 50.60, 49.84, 49.35, 33.61, 27.16, 26.75, 25.93, 25.85, 24.34, 20.90, 20.51;  $^{19}\text{F}$  NMR (369 MHz, DMSO-d6) -81.38 (3F), -128.29 (2F), -135.73 (2F), -154.02 (1F);  $^{11}\text{B}$  NMR (126 MHz, DMSO-d6) -1.22 (s); LRMS (ESI): m/z calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$  817.2, found 817.2.

20

## 【 0 1 0 5】

## 試験例 1

本発明は化合物が実際に A 酸化活性を有することを確認するべく A<sub>1-42</sub> を基質として *in vitro* 酸化実験を行った。A<sub>1-42</sub> ( 1 0 μ M ) を含むリン酸緩衝液 ( pH 7 . 4 / 細胞培養液 ( 0 . 1 % 馬血清を含む ) ( 1 : 3 ) に、被検化合物 ( それぞれ 1 μ M ) を加え、LED 照射下 ( 波長 6 6 0 n m 、 7 3 0 n m ) 、 3 7 ° C で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。光照射前はネイティブ A<sub>1-42</sub> および Na<sup>+</sup> 付加体が主に観測されるが、光照射を行うと経時的に酸化体の存在を示唆するイオンピークが観測されるようになった ( 図 1 、 図 2 ) 。

その結果、化合物 E 及び化合物 I は、6 6 0 n m 及び 7 3 0 n m の光照射の両条件において A<sub>1-42</sub> の酸化が進行した ( 図 1 ) 。また、化合物 K 及び化合物 M は、7 3 0 n m の光照射条件において A<sub>1-42</sub> の酸化が進行した ( 図 2 ) 。

## 【 0 1 0 6】

## 試験例 2

ポリ D - リジンコート 9 6 穴プレートに播種したラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC 1 2 細胞 ( 理化学研究所から購入 ) の培養培地を、0 . 1 % ウマ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 7 5 μ L に置換し、5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下、3 7 ° C で 1 日間インキュベートした後、そこへ化合物を含むリン酸緩衝生理食塩水 ( pH 7 . 4 ) 2 5 μ L を加えた。その後、本混合液を、LED 照射下 ( 波長 6 6 0 n m , 1 0 m W ) ( dark では光非照射 ) 、3 7 ° C で 5 分間インキュベートした。さらに、その反応液を含む細胞培養プレートを 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下、3 7 ° C で 4 8 時間インキュベートした。最後に、WST - 8 を含む生細胞数測定試薬 SF ( 1 0 μ L : ナカライから購入 ) を加え、5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気下、3 7 ° C で 3 時間インキュベートした後、4 5 0 n m ( 参照波長 : 6 5 5 n m ) における吸光度から細胞生存率を測定した。

その結果、図 3 に示すように、光照射条件において、化合物 E の毒性が最も低く、化合物 J 、化合物 K 、化合物 L の順に高くなった。この結果から、ホウ素中心が BF<sub>2</sub> の場合に毒性が最も高く、BF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> > BF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> の順で低くなることが示唆された。また化合

50

物 J と化合物 E の比較から、ジメチルアラニンを経路変換することによって、毒性が軽減されることが示唆された。

また、図示していないが、化合物 K と化合物 M の比較から、ヨウ素の方が臭素の場合と比べて、毒性が軽減することが示唆されている。

#### 【 0 1 0 7 】

##### 試験例 3

A (40  $\mu$ M) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) を 37 °C にて 3 時間インキュベートした。次に、化合物 E を加えた (4 又は 12  $\mu$ M)。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) の培養培地を、0.1% ウマ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 75  $\mu$ L に置換し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 1 日間インキュベートした後、そこへ A と化合物 E を含む上記リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) 25  $\mu$ L を加えた。(最終ボリューム: 100  $\mu$ L, 最終 A 濃度: 10  $\mu$ M, 最終化合物 E の濃度: 1 又は 3  $\mu$ M) その後、本混合液を、LED 照射下 (波長 660 nm, 10 mW) (dark では光非照射)、37 °C で 5 分間インキュベートした。さらに、その反応液を含む細胞培養プレートを 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 48 時間インキュベートした。最後に、WST-8 を含む生細胞数測定試薬 SF (10  $\mu$ L: ナカライから購入) を加え、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 3 時間インキュベートした後、450 nm (参照波長: 655 nm) における吸光度から細胞生存率を測定した。

その結果、図 4 に示すように、細胞存在下 A<sub>1-42</sub> を酸素化することでその毒性を低減することができるか否か検証することとした。細胞にはラット副腎髄質由来の神経モデル細胞 PC12 を用い、触媒としては化合物 E を用いた。細胞生存率は WST-8 による 450 nm の吸光をプレートリーダーにて測定することで得た。A<sub>1-42</sub> と化合物 E を添加した場合、光を照射しない条件では A<sub>1-42</sub> のみを添加した場合と同様に顕著な細胞死が見られた一方で、光照射を行った場合には細胞生存率が有意に向上した。この結果から、触媒が A<sub>1-42</sub> を選択的に酸素化することによって細胞毒性を低減していることが示唆された。

#### 【 0 1 0 8 】

##### 試験例 4

ベンゾイルメチオニン (2000  $\mu$ M) を溶解したグリセロール/水 (0:100、100:90、30:70、50:50) に化合物 K (2  $\mu$ M) を加え、室温で LED 照射 (波長 730 nm) した後、LC/MS (ESI-Q) にて反応を追跡した。

その結果、図 5 に示すように、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、ベンゾイルメチオニン酸素化体比 (%) が増大したことから、化合物 K の分子内回転運動が抑えられることによって、一重項酸素の産生を経て、酸素化活性を発現していることが示唆された。

#### 【 0 1 0 9 】

##### 試験例 5

触媒を含む中性のリン酸緩衝液を、光非照射または光照射条件 (660 nm) にてインキュベートし、その後ベンジルアルコール (内部標準として) を含むエタノールを加え、HPLC により分析した。

光非照射条件においては、いずれの触媒も 1 日後安定であった。

また、光照射条件においては、図 6 に示すように、ホウ素中心が BF<sub>2</sub> (化合物 L) の場合最も安定性が低く、BF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (化合物 K) < BF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (化合物 J) の順で安定性が増大した。また、ドナー部位にジユロリジンを経路変換する化合物 (化合物 E、化合物 I) は、相当するジメチルアニリン体 (化合物 K、化合物 J) と比べて安定性が増大した。

#### 【 0 1 1 0 】

##### 試験例 6 マウス脳抽出物での酸素化反応

8 月齢の App knock-in (App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>) マウス (アルツハイマー型モデルマウス) から抽出した脳を大脳皮質、海馬、および残りの脳組織に分離した。大

脳皮質と海馬は合わせてリン酸緩衝液生理食塩水中でホモジナイズし、懸濁物を - 80 で保管した。化合物 E またはリボフラビン溶解物の懸濁液にそれぞれ最終濃度が 100  $\mu$ M 又は 50  $\mu$ M になるように加え、光照射 (780 nm の波長で) を行うか、または室温で暗所に保管した。任意の時点で、任意の反応混合物の分割量をギ酸で最終濃度が 70 % になるように希釈し、濃縮し、6 M の尿素水溶液に再溶解した。内部標準 (A<sub>1-40</sub>、ペプチド研究所、日本) を加え、残りの混合物を ZipTip にて処理し、Arctic タイプ A<sub>1-38</sub> および A<sub>1-42</sub> を MALDI-TOF MS で分析した。

A ペプチドの変換は MALDI-TOF MS 分析によってピーク強度が低下することにより裏付けられた。反応の 30 分後、60 分後、150 分後においてそれぞれ Arctic タイプ A<sub>1-38</sub> では 36 % / 53 % / 74 %、Arctic タイプ A<sub>1-42</sub> では 43 % / 60 % / 83 % のピーク強度が低下した (図 7)。

暗室において行われた対照実験により、光照射は A ペプチドの低下にとって重要であることが確認された。

A<sub>1-38</sub> と A<sub>1-42</sub> が化合物 E によってそれぞれ 53 %、60 % の収率で変換されるとき (60 分経過時)、非 A の内因性物質であってその質量スペクトル値が A の値に近いペプチド A、B、C (分子量がそれぞれ 3770、4286、4968 のペプチド) は、0 分時と比較すると、変換されていなかった (図 8)。

対照的に、リボフラビンを用いると、A<sub>1-38</sub> と A<sub>1-42</sub> だけでなく、非 A のペプチドである A、B、C も相当程度消費される (図 9)。これらの結果より、A の濃度が低く標的外の分子が大量に含まれている脳溶解物であっても、化合物 E が A ペプチドを選択的に酸素化することを示す。

#### 【0111】

##### 試験例 7 マウス皮下での酸素化

生体内におけるアミロイドタンパクの酸素化への化合物 E の有用性を証明するために、マウス皮下 (末梢アミロイド疾患の治療モデル) での反応を検証した。A<sub>1-42</sub> (20  $\mu$ M、3 時間事前に凝集したもの) および化合物 E または化合物 3 [9 - (6 - プロモ - 3 - メチル - 1,3 - ベンゾトリアゾール - 3 - イウム - 2 - イル) - ジュロリジン] を含むリン酸緩衝液を入れたマイクロチューブを野生マウスの背中の皮内に埋め込み、LED ランプを用いて 780 nm の波長でマウスの体外より 30 分間光照射を行った (図 10)。対照実験として、同じ成分 (A<sub>1-42</sub> (20  $\mu$ M、3 時間事前に凝集したもの) および化合物 E または化合物 3) を含む別のマイクロチューブに対し、マウス体外にて直接光照射を行った。反応混合物を MALDI-TOF MS で分析後、ZipTip 処理を行って解析を行った。酸素化比は、皮膚内部と皮膚外部の酸素化の比率「[マウス皮膚内部での酸素化比 / マウス皮膚外部の酸素化比]  $\times$  100」から計算した。

図 11 に示すように、化合物 E を用いた酸素化率の比 (体外での酸素化率に対して生体内での酸素化率) は、65 % であったが、それに対して、化合物 3 (10  $\mu$ M) では酸素化率の比は 12 % であった。化合物 E と化合物 3 による結果の違いは、皮膚を透過した後の光強度の違いである。これらの結果は、NIR 光活性化可能な酸素化触媒である化合物 E が、生体内で、毒性のある凝集アミロイドタンパクを酸素化するのに適していることを示す。

#### 【0112】

##### 試験例 8 グリセロール濃度を変化させた条件でのフルフリルアルコールまたは N - ベンゾイル - Met の変換

グリセロール - メタノール混合溶媒 (グリセロール : 0、10、30、または 50 %) にフルフリルアルコールまたは N - ベンゾイル - Met (それぞれ 2 mM) および化合物 E (2  $\mu$ M) を加え、混合物に室温で光照射 (波長 780 nm) を行い、開始後 10 分、20 分、30 分の時点でのフルフリルアルコールまたは N - ベンゾイル - Met の濃度を LC/MS を用いた UV 吸光計で定量化した。

結果を図 12 および 13 に示す。化合物 E が触媒するフルフリルアルコール (特異的に <sup>1</sup>O<sub>2</sub> と反応する) の酸素化反応速度が、溶媒の粘度が上がるにつれて増加した。化合物 E

が触媒するN - ベンゾイル - Met の酸素化もまた、溶媒の粘度が高くなるにつれて加速した。これらの観察は、ドナーとアクセプターの間の単結合の自由回転を妨害することで化合物Eの活性化状態の寿命を延ばすと<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の量子収率が高められることを示唆する。

#### 【0113】

##### 試験例9 酸素化のA 選択性

凝集前のA ペプチド(37 で1時間インキュベートして調製)、アンギオテンシン - IV(AT4)、Met - エンケファリン(ME)、又はソマトスタチン(Sst)(それぞれ20 μM)を含有するリン酸緩衝液(pH7.4)を、化合物E(5 μM)存在下で780 nm(7 mW)またはリポフラビン(5 μM)存在下で500 nmの光照射を37 で30分間行った。

10

化合物E(25 mol%)はプレ凝集したA ペプチドを44%酸素化した(図14)。A ペプチド以外のペプチドでは、同じ反応条件であったが、5%未満の酸素化率であった。クロス シート認識機能を有しない触媒であるリポフラビンは非選択的であり、酸素化A の収率(43%)は、標的外の基質を用いて得られた収率(アンギオテンシン - IV:35%、Met - エンケファリン:50%、ソマトスタチン:60%)とほぼ同一であった。この標的の選択性は、細胞の存在下、脳溶解物において、凝集A の選択的酸素化にとって重要である。

#### 【0114】

##### 試験例10 各光触媒のA<sub>1-42</sub>に対する酸素化活性および毒性の比較

###### (1) 酸素化

20

A<sub>1-42</sub>イソペプチド(0.1%トリフルオロ酢酸水溶液中に250 μMの濃度)、アンギオテンシンIV(200 μM水溶液)、Met - エンケファリン(200 μM水溶液)、およびソマトスタチン(200 μM水溶液)をリン酸緩衝液またはリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を加えて最終ペプチド濃度が20 μMまたは40 μM(pH7.4)となるように調整した(必要に応じて、0.1Mの水酸化ナトリウム水溶液を用いた)。A<sub>1-42</sub>溶液を酸素化反応に付す前に、37 で1~3時間インキュベートした。40 μMのA<sub>1-42</sub>を含むリン酸緩衝液を25 mMの4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)で緩衝した0.1%ウマ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、ライフテクノロジーズ社)で希釈した。

それぞれの溶液に対し、リポフラビン(0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル(1:1)水溶液中に1 mM)、化合物3(アセトニトリルに1 mM)、CRANAD - 2 [(T - 4) - [(1E, 6E) - 1, 7 - ビス[4 - (ジメチルアミノ)フェニル] - 1, 6 - ヘプタジエン - 3, 5 - ジオナト - O<sup>3</sup>, O<sup>5</sup>]ジフルオロボロン)(200 μMジメチルスルホキシド溶液)又は化合物E、化合物I、化合物J、化合物L、化合物K、もしくは化合物Sの5~10(200 μMジメチルスルホキシド溶液)を加えた。化合物の最終濃度を2 μMにしたものを、A<sub>1-42</sub>の酸素化の評価に用いた。最終濃度を5 μMにしたものを、ペプチド選択性評価に用いた。混合物を室温にてLED(波長500、660、又は780 nm)で約5~10 cmの距離で光照射を行った。光照射を行わない非対照群も用意した。反応はMALDI - TOF MSを用いてモニター分析を行った。酸素化度は酸素化度(%) = (n[O]付加物のMS強度の合計) / (ネイティブのMS強度 + n[O]付加物のMS強度の合計) × 100の比で求めた。必要に応じて、反応溶液の分配量はZipTip U - C18(メルク・ミリポア)で質量分析前に脱塩処理を行った。結果を以下の表1および2に示す。

30

40

#### 【0115】

###### (2) 細胞アッセイ

ラット褐色細胞腫PC12細胞を5%ウマ血清および10%胎児ウシ血清をポリ - D - リジンコート96穴プレートに1穴あたり10,000細胞の濃度で播種したDMEMに懸濁し、5%二酸化炭素雰囲気下37 で3日間インキュベートした。溶媒を除去後、細胞を150 μLの血清フリーのDMEMで洗浄し、0.1%馬血清を含有するDMEM(75 μL)を加えた。その後、96穴プレートを5%二酸化炭素雰囲気下37 で1日間

50

インキュベートし、酸素化反応に用いた。酸素化反応において、化合物 E ( ( 1 0 0 μ M ジメチルスルホキシド溶液 ) ) を A ( 事前に 3 時間凝集したもの、 4 0 μ M )、上記の 2 5 μ L の本溶液を含むリン酸緩衝液生理食塩水に加えた ( A の最終濃度は 1 0 μ M、化合物 E の最終濃度は 1 μ M )。混合物を LED ( 波長 7 8 0 n m ) で約 5 c m の距離から 3 7 で 5 分間照射した。細胞を 3 7 の 5 % 二酸化炭素雰囲気下で 4 8 時間インキュベートした。細胞生存率は細胞カウント試薬 S F ( ナカライテスク、京都、日本 ) を用いて W S T - 8 ( 2 - ( 2 - メトキシ - 4 - ニトロフェニル ) - 3 - ( 4 - ニトロフェニル ) - 5 - ( 2 , 4 - ジスルホフェニル ) - 2 H - テトラゾリウム ) で測定した。結果を以下の表 1 および表 2 に示す。

【 0 1 1 6 】

10

【表 1】

番号	光触媒	最大波長 λ <sub>max</sub> (nm)	a	b	
			Aβ <sub>42</sub> の酸素化度 (%) (λ = 660 nm)	LC <sub>50</sub> (暗所) (μM)	LC <sub>50</sub> (明所) (μM)
1	化合物 3	456	trace	-	-
2	CRANAD-2	579	trace	-	-
3	化合物 L (合成例 1 2)	623	73	6.27 ± 1.79	0.024 ± 0.004
4	化合物 K (合成例 1 1)	620	86	1.89 ± 0.28	0.143 ± 0.035
5	化合物 J (合成例 1 0)	622	79	3.65 ± 0.35	1.49 ± 0.59 <sup>c</sup>

【 0 1 1 7 】

a : プレ凝集した A<sub>1-42</sub> ( 2 0 μ M、 3 7 で 3 時間インキュベート ) および各触媒 ( 2 μ M ) を含むリン酸緩衝液 ( p H 7 . 4 ) 溶液を 3 7 で 3 0 分間光照射 ( 波長 6 6 0 n m ) を行った。その後、反応混合物を M A L D I - T O F M S にて分析した。

30

b : L C<sub>50</sub> ( 暗所 ) が化合物自身の毒性、 L C<sub>50</sub> ( 明所 ) が化合物の光毒性を表す。 P C 1 2 細胞を暗所または光照射下 ( 波長 6 6 0 n m ) 光触媒処理し、 3 7 で 5 分間、そして 5 % 二酸化炭素雰囲気下 3 7 で 4 8 時間インキュベートし、細胞生存率を分析した ( n = 5、平均 ± S E M )。

c : 化合物 J は、光照射下 ( T u k e y 試験 ) で化合物 L および化合物 K に対して p < 0 . 0 5 であった。

【 0 1 1 8 】

【表 2】

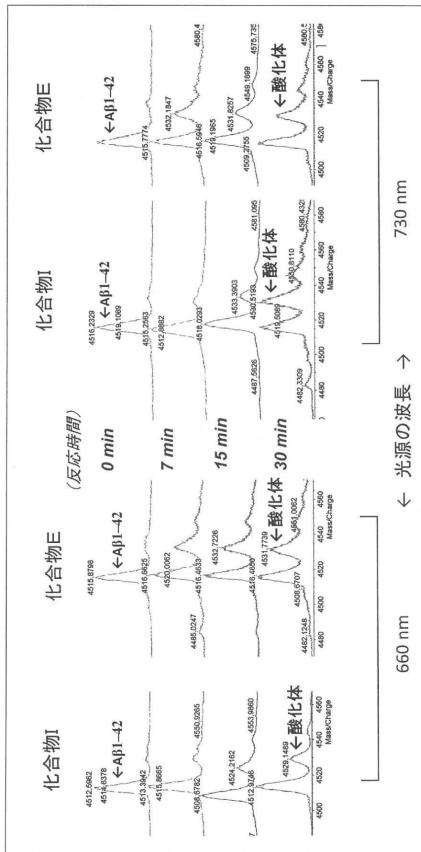
番号	光触媒	最大波長 $\lambda_{max}$ (nm)	a	b	
			A $\beta$ <sub>42</sub> の酸素化度 (%) ( $\lambda = 780$ nm)	LC <sub>50</sub> (暗所) ( $\mu$ M)	LC <sub>50</sub> (明所) ( $\mu$ M)
1	化合物 J (合成例 10)	620	41	3.90 ± 1.34	2.91 ± 0.47
2	化合物 I (合成例 9)	645	52	>10	1.67 ± 0.19
3	化合物 E (合成例 5)	639	58	>10	>10
4	化合物 S (合成例 17)	633	37	>10	>10

【0119】

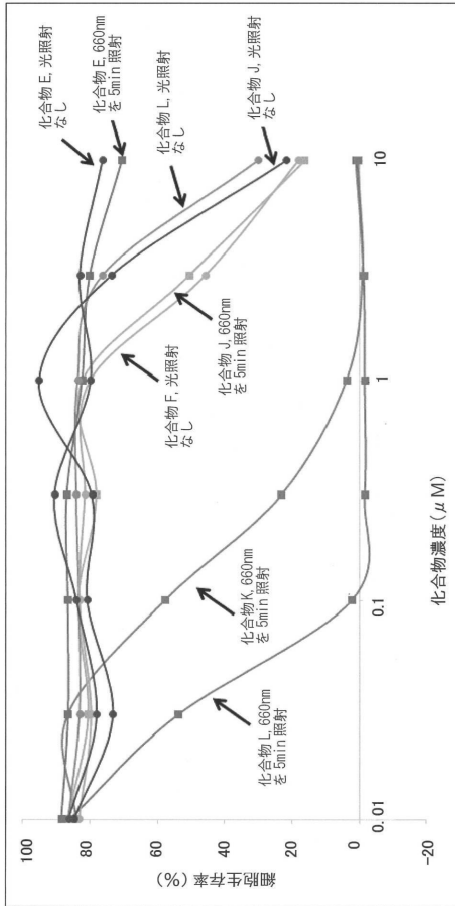
a : 事前に凝集した A<sub>1-42</sub> (20  $\mu$ M、37 °C で3時間インキュベーションして得た) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) および触媒 (2  $\mu$ M) を37 °C で780 nm (14 mW) で30分間照射を行った。反応混合物をMALDI-TOF MSにて分析した 20

b : PC12細胞を光触媒 (1  $\mu$ M) と暗所または光照射 (波長780 nm) 条件で37 °C で5分間処置を行った後、細胞生存率を分析した (n = 3、平均値 ± SEM)。

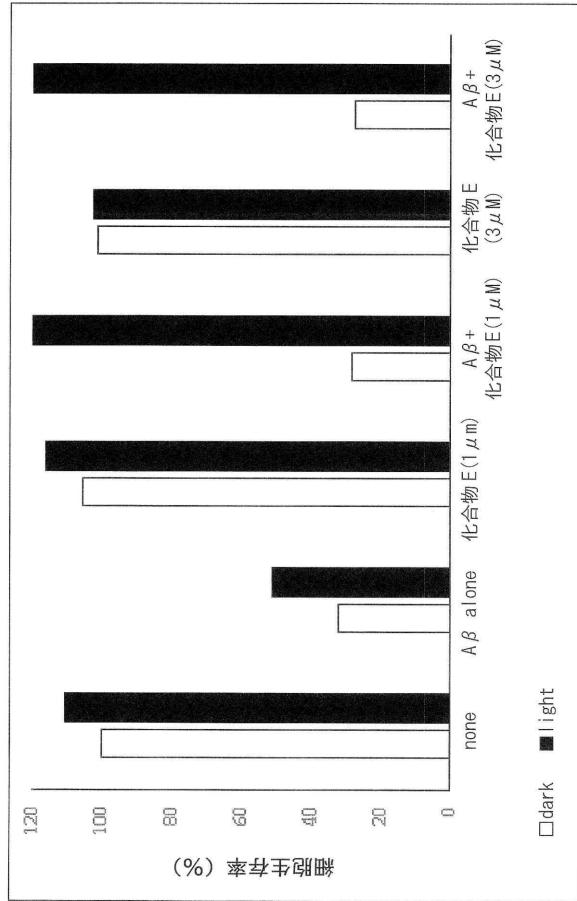
【図 1】



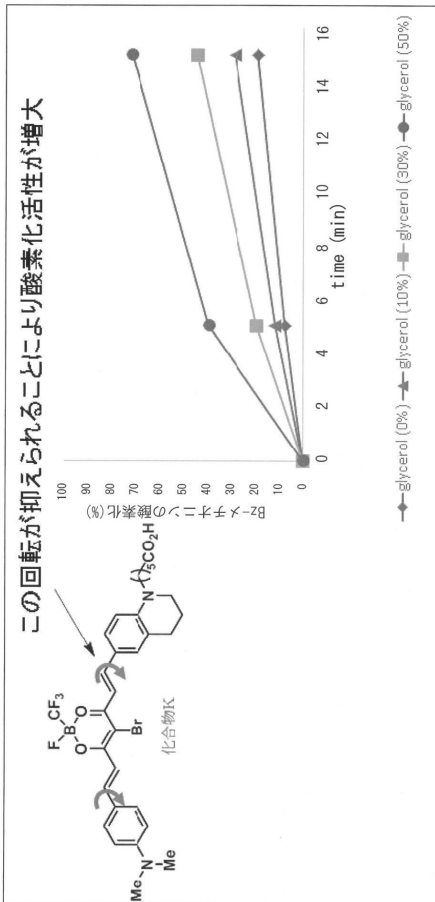
【 図 3 】



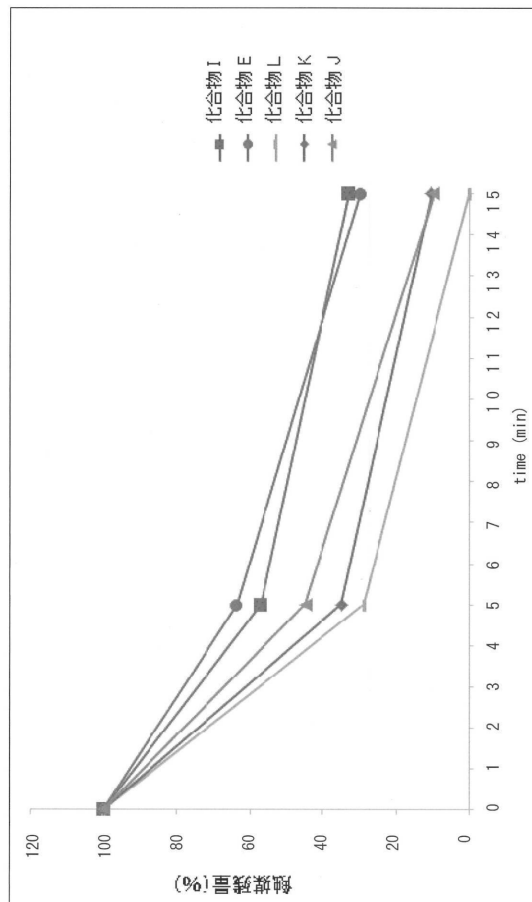
【 図 4 】



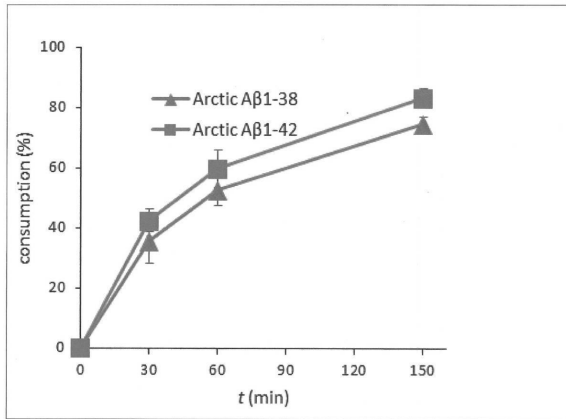
【 図 5 】



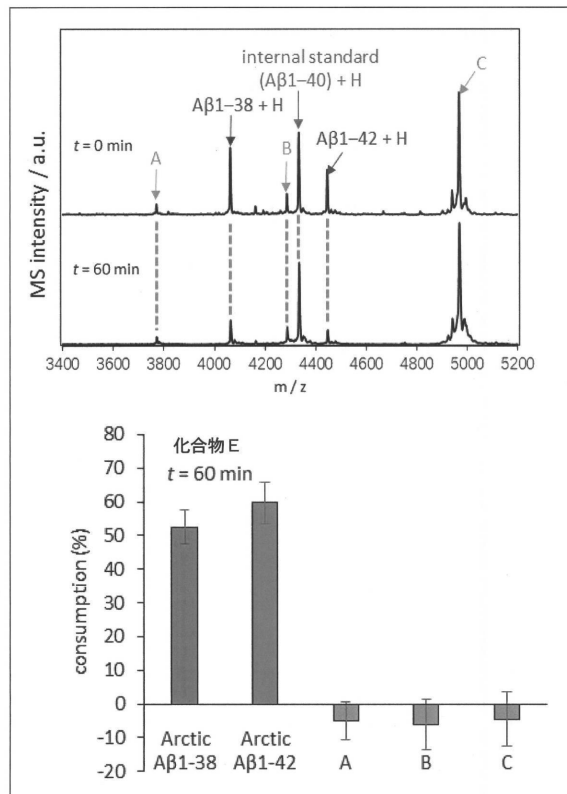
【 図 6 】



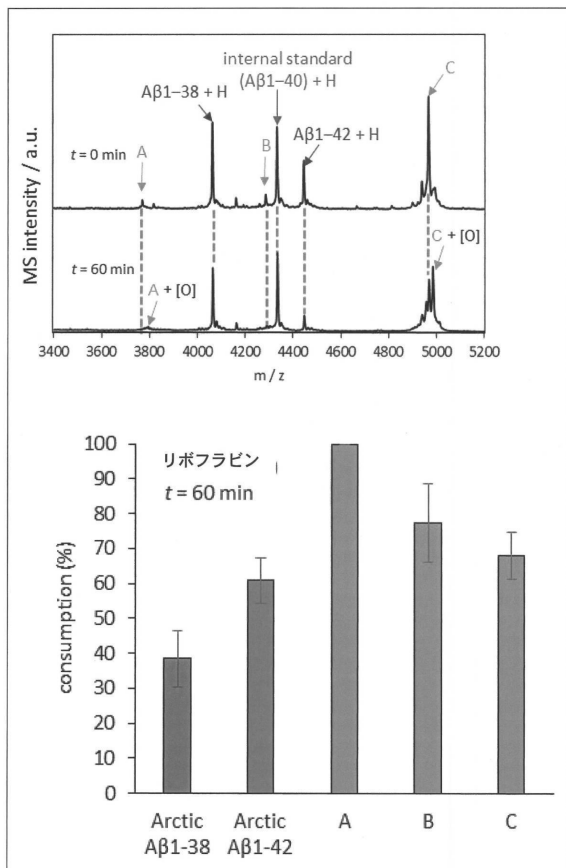
【 図 7 】



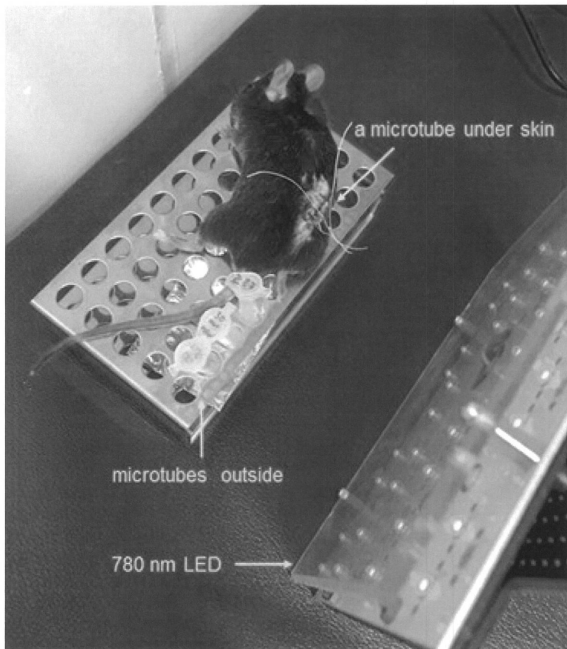
【 図 8 】



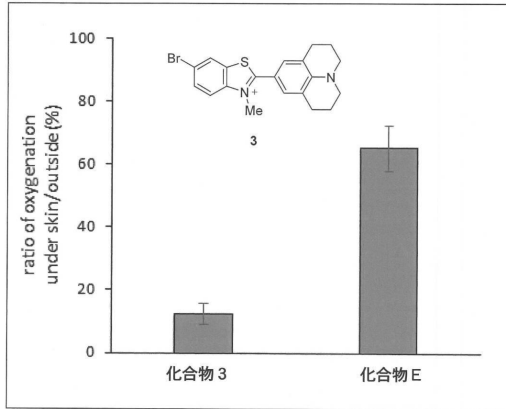
【 図 9 】



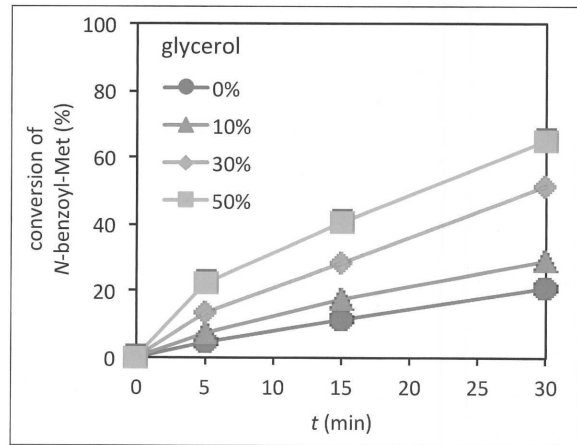
【 図 10 】



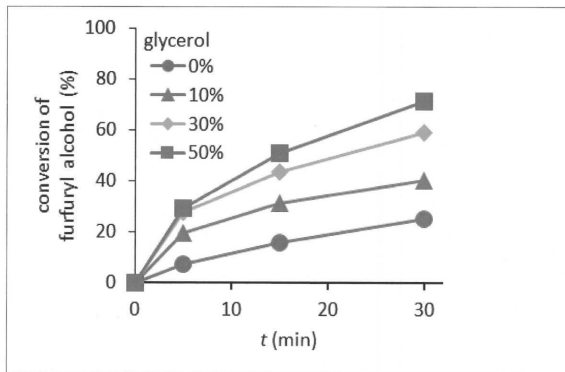
【 図 1 1 】



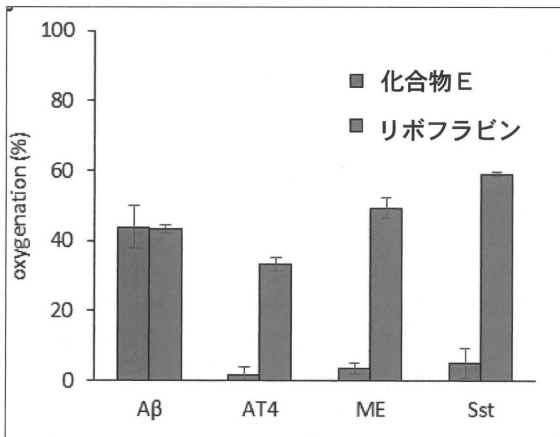
【 図 1 3 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10

(72)発明者 谷口 敦彦  
東京都八王子市堀之内 1 4 3 2 - 1 東京薬科大学薬学部内

審査官 佐溝 茂良

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 5 8 8 4 1 ( U S , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 0 0 9 2 ( W O , A 1 )  
第 3 2 回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集, 2 0 1 4 年 1 1 月 7 日, p.87,  
1P-24  
第 4 0 回反応と合成の進歩シンポジウム講演要旨集, 2 0 1 4 年 1 0 月 2 2 日, p.19, 10-17

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 0 7 F 5 / 0 2  
A 6 1 K 3 1 / 6 9  
A 6 1 P 3 / 1 0  
A 6 1 P 2 5 / 1 4  
A 6 1 P 2 5 / 1 6  
A 6 1 P 2 5 / 2 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )