

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4590523号
(P4590523)

(45) 発行日 平成22年12月1日(2010. 12. 1)

(24) 登録日 平成22年9月24日(2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 F 9/655 (2006. 01)	C O 7 F 9/655 C S P
A 6 1 K 31/665 (2006. 01)	A 6 1 K 31/665
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00
	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 10 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2000-522111 (P2000-522111)	(73) 特許権者	510221342
(86) (22) 出願日	平成10年11月25日(1998. 11. 25)		アンティボディーン ファーマシューティ
(65) 公表番号	特表2001-524483 (P2001-524483A)		カルズ インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成13年12月4日(2001. 12. 4)		ニュー・ジーランド国 オークランド ヴ
(86) 国際出願番号	PCT/NZ1998/000173		ィアダクト ハーバー アベニュー 1 6
(87) 国際公開番号	W01999/026954		レベル 2
(87) 国際公開日	平成11年6月3日(1999. 6. 3)	(74) 代理人	100083149
審査請求日	平成17年11月18日(2005. 11. 18)		弁理士 日比 紀彦
(31) 優先権主張番号	329255	(72) 発明者	マーフィー マイケル パトリック
(32) 優先日	平成9年11月25日(1997. 11. 25)		ニュー・ジーランド国 ダニーディン モ
(33) 優先権主張国	ニュージーランド (NZ)		ールバーン ストリート 2 5 1
		(72) 発明者	スミス ロビン エイ ジュエイ
			ニュー・ジーランド国 ダニーディン フ
			ォークランド ストリート 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗酸化部分と共有結合した親油性のカチオンから成る、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤化合物であって、

該抗酸化部分は、(i) ブチル化ヒドロキシアニソールおよびブチル化ヒドロキシトルエンから成る鎖切断抗酸化剤、(ii) キノール、(iii) フラーレンを含むラジカル捕捉剤および(iv) 5, 5-ジメチルピロリン-N-オキサイド、tert-ブチルニトロソベンゼン、ニトロソベンゼンまたはα-フェニル-tert-ブチルニトロソニンから成るスピントラップから選択される、抗酸化剤化合物。

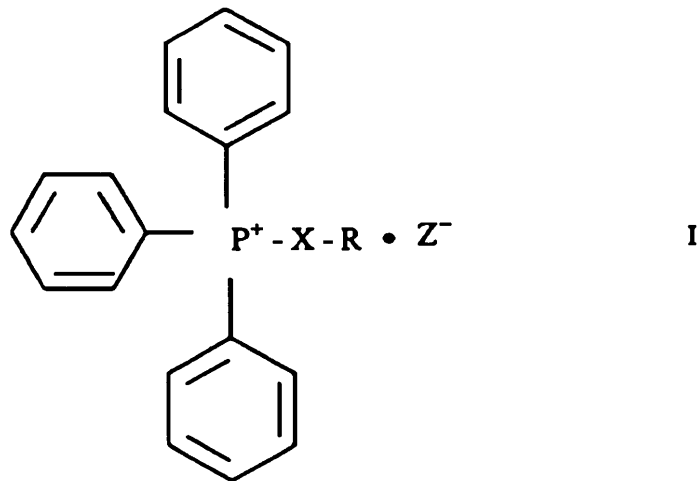
【請求項 2】

親油性のカチオンがトリフェニルホスフォニウムカチオンである、請求項第1項に記載の化合物。

【請求項 3】

該化合物が次の一般式

【化 1】



10

(式中、ここでXは結合基であり、Zはアニオンであり、そしてRは前記抗酸化部分である)

で示される、請求項第1項に記載のミトコンドリアを標的とする抗酸化剤化合物。

【請求項4】

20

Xが $(CH_2)_n$ でありnが1から6までの整数である、請求項第3項に記載の化合物。

【請求項5】

Xがエチレン、プロピレンまたはブチレン基である、請求項第4項に記載の化合物。

【請求項6】

Xがエチレン基である、請求項第5項に記載の化合物。

【請求項7】

Rが、ミトコンドリア膜を通して輸送可能で、手を加えられていない (intact) 細胞のミトコンドリア内に蓄積可能である、請求項第1項から第6項までのいずれかに記載の化合物。

【請求項8】

30

1つまたはそれより多い医薬的に許容される担体または希釈剤との組合わせによる、請求項第1項から第7項までのいずれかで定義された、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤の効果的な量から成るところの、酸化ストレスの減少による利益をうける患者の治療に適した医薬組成物。

【請求項9】

酸化ストレス治療用医薬の製造のための請求項第1項から第7項までのいずれかで定義された抗酸化剤化合物の使用。

【請求項10】

請求項第1項から第7項までのいずれかで定義された、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤をインビトロの細胞に投与する工程から成るところの、インビトロの細胞における酸化ストレスを減少させる方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、親油性のカチオン基をもつ抗酸化剤、およびこれらの抗酸化剤の例えば医薬としての用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

酸化的なストレスは、ハンチントン舞踏病およびフリードライヒ失調症と同様に、たとえばパーキンソン病およびアルツハイマー病のような老化に関連する多くのヒトの消耗性疾

50

患、ならびに老化と共に蓄積する非特異的傷害に寄与している。それはまた、脳卒中および心臓発作における、ならびに臓器移植および外科手術に際しての、炎症および虚血性再灌流組織傷害に寄与している。酸化的ストレスに起因する障害を防ぐために、多くの抗酸化治療法が開発されてきた。しかしながら、それらの殆どは細胞内を標的としておらず、従って最適な効果よりも低いものであった。

【0003】

ミトコンドリアは、エネルギー代謝にかかわる細胞内の細胞小器官である。したがってミトコンドリアに欠陥が生じると、特に神経や筋肉組織のような高いエネルギーを要求するものに損傷を与える。それらはまた、殆どの細胞内部で酸化的ストレスを引き起こす遊離ラジカルや反応性酸素種の主要な根源となる。そのために本出願人は、抗酸化剤のミトコンドリアへの選択的伝達は、非標的抗酸化剤を用いるよりも一段と効果的であると考え

10

【0004】

親油性のカチオンは、それが正の荷電であるのでミトコンドリアのマトリックスの中に蓄積されうる(Rottenberg, (1979) Methods Enzymol., 55, 547-560; Chen, (1988) Annu. Rev. Cell Biol. 4, 155-181)。かかるイオンは、もし正の荷電を選別するか又は広い表面積にわたって正の電荷を非局所化する程十分に親油性であるか、そしてもし活性な流出経路がなくてカチオンが代謝されたり直ちに細胞に毒性を示さないならば、蓄積される。

【0005】

したがって本発明の焦点は、抗酸化剤を、酸化的ストレスを引き起こす反応性の酸素種や遊離のラジカルの主たる根源を標的とするために、結合した抗酸化剤を取り込む特定の親油性カチオンを濃縮するというミトコンドリアの能力の使用が可能であるような方法である。

20

【0006】

【発明の要約】

本発明は、その最も広範な観点においては、抗酸化部分と共有結合した親油性のカチオンから成るところの、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤を提供するものである。

【0007】

好ましくは、その親油性カチオンはトリフェニルホスフォニウムカチオンである。

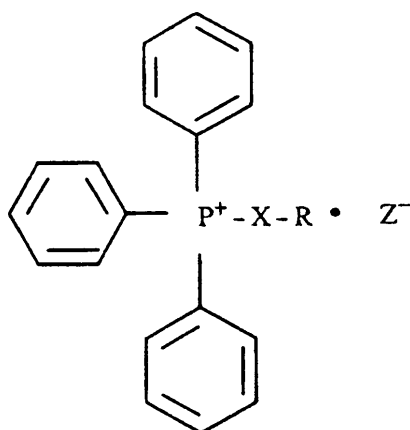
30

【0008】

別の観点において、本発明は、次の一般式の、ミトコンドリアを標的とする抗酸化剤を提供する。

【0009】

【化3】



40

I

【0010】

50

ここでZはアニオンであり、Xは結合基であり、そしてRは抗酸化剤部分である。

【0011】

好ましくは、Xは $(\text{CH}_2)_n$ であり、ここでnは1から6までの整数である。

【0012】

更に好ましくは、Xはエチレン、プロピレンまたはブチレン基である。

【0013】

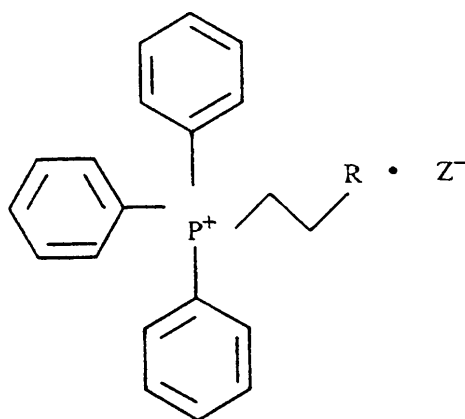
好ましくは、Zは医薬的に許容されるアニオンである。

【0014】

最も好ましくは、ミトコンドリアを標的とする本発明抗酸化剤は、次の一般式をもつ。

【0015】

【化4】



【0016】

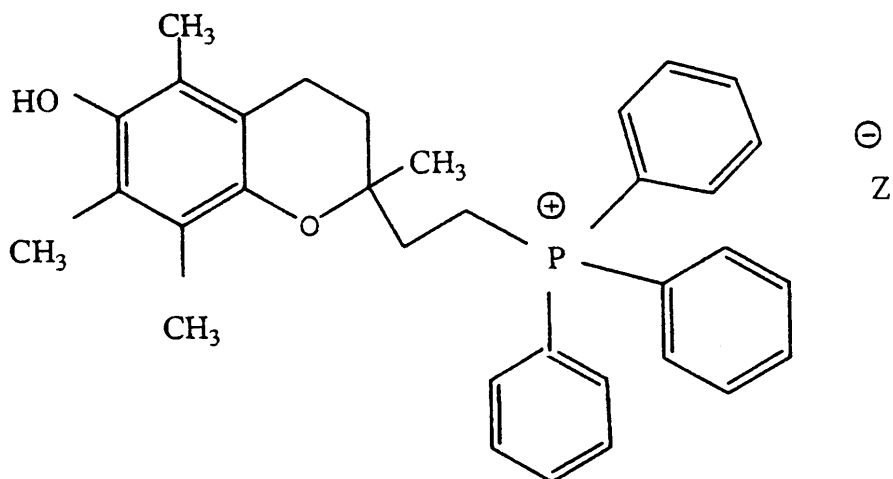
好ましくは、Rはミトコンドリア膜を通して輸送され、そして完全な細胞のミトコンドリア内に蓄積される能力をもつ抗酸化剤から選ばれる。

【0017】

1つの特に好ましい実施態様において、ミトコンドリアを標的とする本発明抗酸化剤は次の一般式をもっている。

【0018】

【化5】



【0019】

好ましくは、ZはBrである。

【0020】

別の観点において、本発明は、1つまたはそれ以上の医薬的に許容される担体または希釈剤と共に本発明のミトコンドリア標的抗酸化剤の効果的な量から成るところの、酸化ストレスの減少による利益をうける患者の治療に適した医薬組成物を提供する。

【0021】

さらに別の観点において、本発明は、上で定義したミトコンドリア標的抗酸化剤を細胞に投与する工程から成るところの、細胞における酸化ストレスを減少させる方法を提供する。

【0022】

なおも別の観点において、本発明は、上で定義したミトコンドリア標的抗酸化剤を患者に投与する工程から成るところの、酸化ストレスの減少による利益をうける患者の治療または予防方法を提供する。

10

【0023】

上で広範に定義したけれど、本発明はそれらに限定されるものではなく、例を提供する以下の記載の実施態様をもまた含むものである。

【0024】

【発明の要約】

上述のように、本発明の焦点は、まずは酸化ストレスを減少させる治療及び/又は予防を目的とする化合物のミトコンドリアへの標的化に関するものである。

【0025】

ミトコンドリアは、その内部の膜(負の内側)にまたがる180mVに達する実質的な膜電位をもっている。この電位のある浸透性の膜のため、親油性カチオンがミトコンドリアマトリックスの中に何百倍にも蓄積される。

20

【0026】

さて本出願人は、親油性のカチオン(好ましくは、親油性のトリフェニルホスフォニウムカチオン)を抗酸化剤と共有結合させると、その化合物は手を加えられていない細胞中のミトコンドリアマトリックスに到達できることを見出した。次いで抗酸化剤は、無秩序に分散されるのではなく、細胞の中で遊離ラジカルや反応性酸素種の一次的生産部位へと標的化される。

【0027】

原則として、いかなる親油性カチオンも、またいかなる抗酸化剤も本発明の化合物を生成するのに用いることができる。しかしながら、親油性カチオンとしてはここに例示したトリフェニルホスフォニウムカチオンであることが好ましく、また親油性カチオンは1コから6コの炭素原子をもつ直鎖のアルキレン基、更に好ましくはエチレン、プロピレンまたはブチレン基によって抗酸化部分と結合していることが好ましい。本発明による抗酸化剤と共有的に結合できる他の親油性カチオンとしては、トリベンジルアンモニウムおよびホスフォニウムカチオンがある。

30

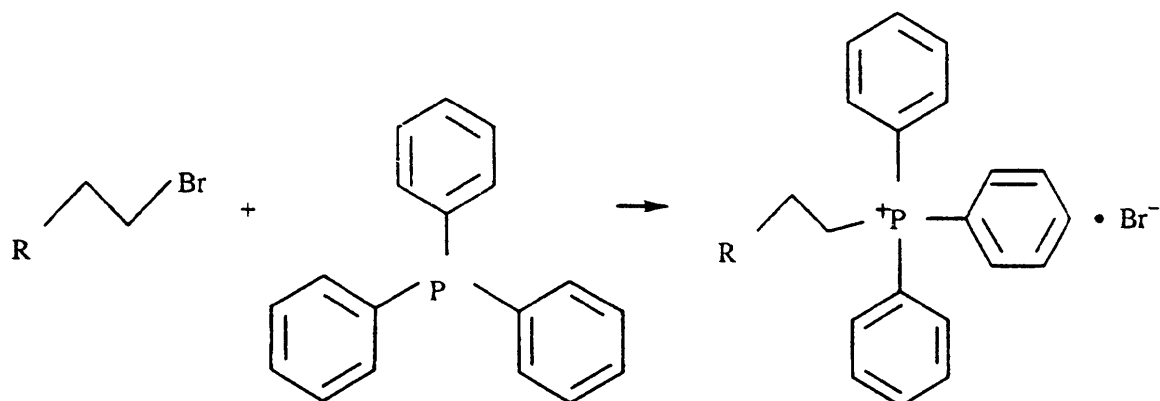
【0028】

そのような好ましい抗酸化剤化合物は、たとえば次の反応によって容易に調製することができる。

【0029】

40

【化6】



10

【0030】

一般的な合成方法は、ハロゲン化した前駆物質、好ましくはブロム化またはヨード化した前駆物質(RBrまたはRI)を、適当な溶媒の中で、2-3当量のトリフェニルホスフィンと共に数日間にわたりアルゴン中において加熱することである。次いでこのホスフォニウム化合物を、そのブロマイドまたはアイオダイド塩として単離する。これを行なうために溶媒を除去し、得られたものを、灰色がかった白色の固体が残るまでジエチルエーテルで繰り返し粉碎する。次いでこれをクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテルで沈殿化して、過剰

20

【0031】

また次のように行なうのも好ましい。すなわち、この合成方法を用いたときのハロゲンであるところの上記のように調製した抗酸化剤化合物のアニオンを、もし所望であるか又は必要とあれば、イオン交換、クロマトグラフィー又はその他の公知の技術を用いて他の医薬的または薬理的に許容されるアニオンと容易に交換することもできる。

【0032】

同様の一般的な製法を用いて、トリフェニルホスフォニウム（またはその他の親油性カチオン）塩に付着する異なった抗酸化部分Rをもつ広範なミトコンドリア標的化合物を作ることができる。これらは、ビタミンE機能とトリフェニルホスフォニウム塩の架橋結合の長さが異なる一連のビタミンE誘導体を含むであろう。Rとして使用可能なその他の抗酸化剤には、たとえばブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、キノール類および誘導体化されたフラーレン（fullerene）類のような一般的なラジカル捕捉剤といった鎖切断抗酸化剤がある。さらに、遊離ラジカルと反応して安定な遊離ラジカルを生成するスピントラップ(spin traps)もまた合成することができる。これらには5,5-ジメチルピロリン-N-オキサイド、tert-ブチルニトロソベンゼン、tert-ニトロソベンゼン、 α -フェニル-tert-ブチルニトロソおよび関連化合物の誘導体が含まれる。

30

【0033】

いったん調製されると、医薬的に許容される担体または添加物を場合によっては含む本発明の抗酸化剤化合物のいかなる医薬的に適切な形態も、治療及び/又は予防を必要とする患者に投与される。いったん投与されると、その化合物は細胞内でミトコンドリアを標的とする。

40

【0034】

本発明によるいくつかの他の特定のミトコンドリア標的抗酸化剤化合物、すなわち(1)バックミニスターフラーレン(buckminsterfullerene)のミトコンドリア標的物、(2)ミトコンドリア標的スピントラップ化合物、および(3)ミトコンドリア標的スピントラップ化合物の別の合成ルート、を調製するのに使用され得る合成機構を、以下に示す。

【0035】

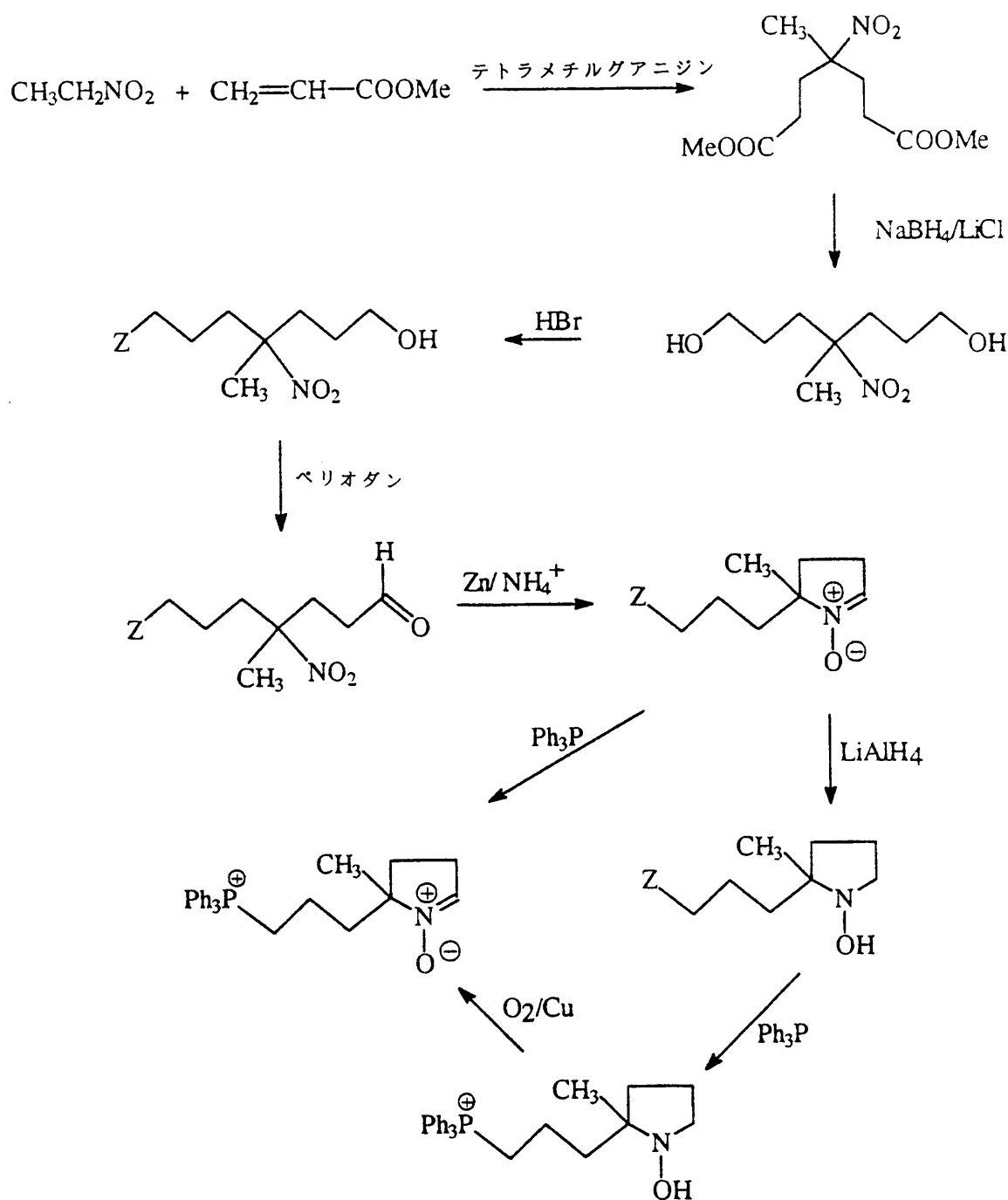
50

【化 7】



30

【化 8】



【 0 0 3 7 】

スピントラップの合成 II

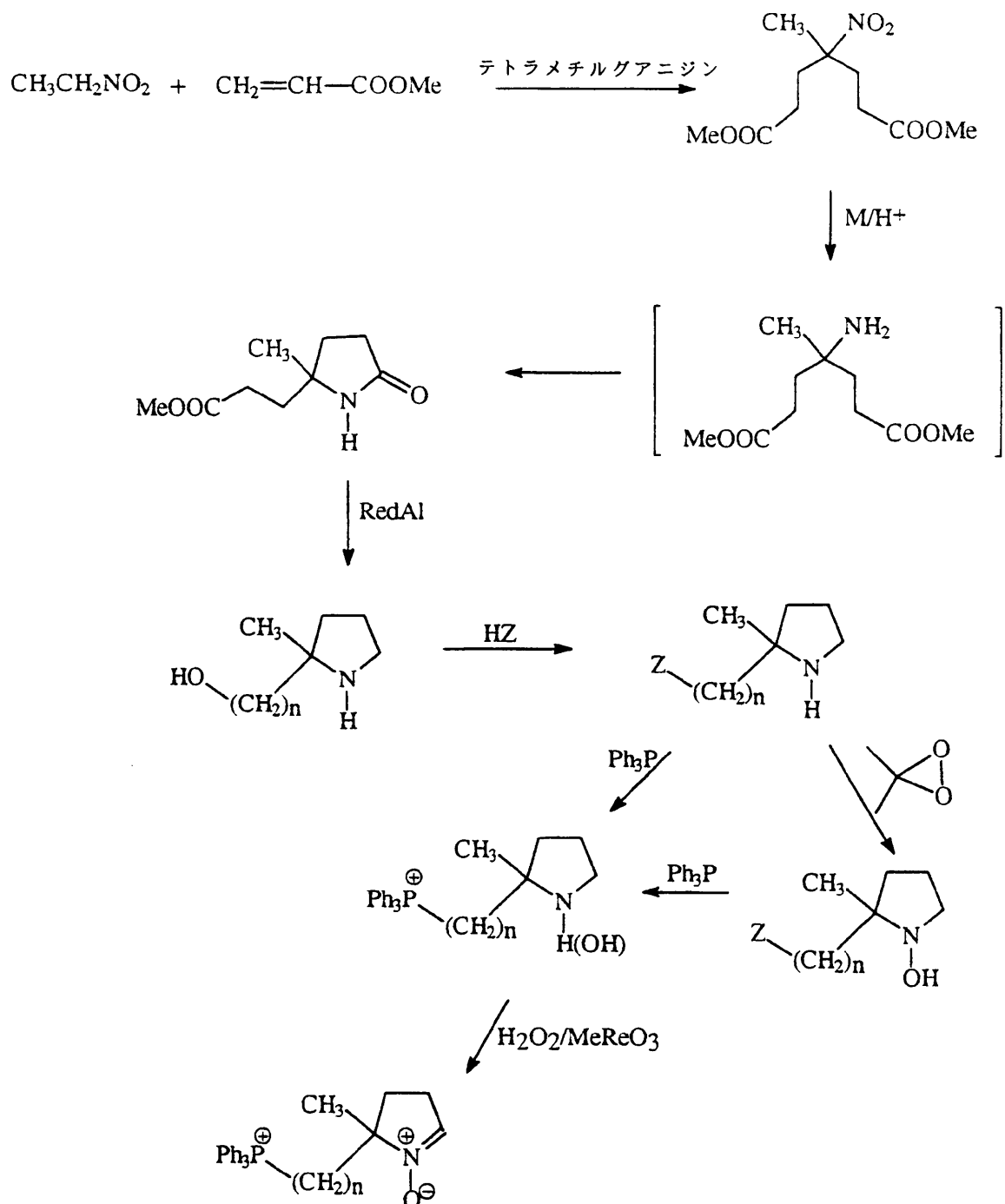
【化 9】

10

20

30

40



【0038】

以下の非限定的な実験の部を参照しながら、本発明を詳細に説明する。

【0039】

【実験】

1. ミトコンドリアを標的とするビタミンE誘導体(化合物1)の合成

ミトコンドリア標的ビタミンE誘導体(化合物1)の合成方法は次のとおりである。ブロム化された前駆物質(化合物2)、すなわち2-(2-ブロモエチル)-3,4-ジヒドロ-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピランを、Grisar et al. (1995) (J. Med. Chem. 38, 2880-2886)の記載のように、対応するアルコールのブロム化により合成した。このアルコールは、Cohen et al. (1979) (J. Amer. Chem. Soc. 101, 6710-6716)の記載のように、対応するカルボン酸の還元により合成した。このカルボン酸誘導体は、Scott et al. (19

10

20

30

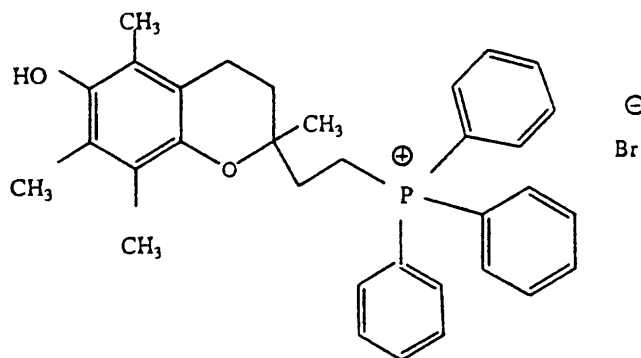
40

50

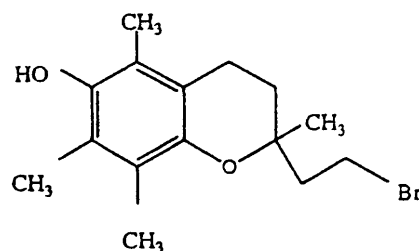
74) (J. Amer. Oil Chem. Soc. 101, 6710-6716)の記載のようにして合成した2,6-ジヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマンから、Cohen et al. (1982) (Syn. Commun. 12, 57-65)の記載のようにして合成した。

【0040】

【化10】



化合物1



化合物2

【0041】

化合物1の合成に際しては、1gの化合物2を、2.5モル当量のトリフェニルホスフィンを含む8mlのブタノンに加え、7-8日の間アルゴン下100℃で、密封したカイマクス(Kimax)管の中で加熱した。溶媒を室温において真空下で除去し、黄色の油分を、灰色がかった白色の固体となるまでジエチルエーテルで粉碎した。次いでこれをクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテルで沈殿させた。この固体がクロロホルムに不溶となるまで上記を反覆し、次いで塩化メチレン/ジエチルエーテルで数回再結晶し、真空下に乾燥して、白色で吸湿性の粉末を得た。

【0042】

2. 化合物1のミトコンドリアへの取り込み

この標的化が効果的であることを示すために、例としてビタミンE化合物1を、単離したミトコンドリアおよび単離した細胞の両方に関して試験した。これを行なうために、 $[^3\text{H}]$ -トリフェニルホスフィンを用いて化合物1の $[^3\text{H}]$ バージョンを合成し、そして化合物1のミトコンドリア蓄積をシンチレーションカウンティングで定量した (図1)(Burns et al., 1995, Arch. Biochem. Biophys. 332, 60-68; Burns and Murphy, 1997, Arch. Biochem. Biophys. 339, 33-39)。これを行なうために、ラット肝臓ミトコンドリアを公知の条件で培養して、約180mVのミトコンドリア膜電位を得た(Burns et al., 1995; Burns and Murphy, 1997)。これらの条件下で、化合物1は約5,000の蓄積比でミトコンドリアの内部へ迅速に(<10s)取り込まれた。化合物1のミトコンドリア内へのこの蓄積は、ミトコンドリアが膜電位を確立するのを妨げる脱共役剤FCCP(カルボニルシアナイド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン)の添加によりブロックされた(図1および図2)(Burns et al., 1995)。したがって化合物1は、ミトコンドリア膜電位によって駆動されるミトコンドリア内へ迅速かつ選択的に蓄積されたが、この蓄積は外部の媒体におけるよりも数千倍も高いミトコンドリア内の化合物濃度をもたらす。この蓄積は、ミトコンドリア内の化合物1の蓄積後のミトコンドリア膜電位を消散させる(dissipate)ために脱共役剤のFCCPを添加することによって迅速に(<10s)逆転する。したがって、ミトコンドリアの特定の蓄積は、専らミトコンドリア膜電位に起因するものであって、特定の結合や共有相互作用に起因するものではない。

【0043】

化合物1のミトコンドリア特定蓄積はまた、完全な細胞においても起こる。これは1997年

にBurnsおよびMurphyが述べているようにして測定され、その蓄積は、ミトコンドリア膜電位およびプラズマ膜電位の両方を消散させることにより防御された。さらに化合物1は、欠陥ミトコンドリアを含有する細胞、すなわちミトコンドリア膜電位をもっていない細胞によっては蓄積されなかった。したがって、化合物1の細胞内への蓄積は、ミトコンドリア膜電位により駆動される。

【0044】

この蓄積比は化合物1の一定の濃度範囲にわたって類似しており、ミトコンドリアの内側に取り込まれた化合物1の量は4-8mMのミトコンドリア内濃度に対応している(図2)。この取り込みは完全に膜電位によるものであって、一定の膜電位範囲にわたって単なるトリフェニルホスフォニウムカチオンTPMPのそれと平行していた(図3)。同じ膜電位におけるTPMPと化合物1の取り込みの比較から、ミトコンドリア内部においては化合物1の約84%が膜と結合していると推論される(因みに、疎水性の低い化合物のTPMPでは約60%である)。

10

【0045】

以下に実験手順とその結果について更に詳細に述べる。

【0046】

図1は、賦活したラット肝臓ミトコンドリアによる10 μ Mの 3 H化合物1の取り込みを示す(連続線と黒ベタ記号)。点線と白抜きの記号は、3分の時点での333nMのFCCPの添加の効果を示す。培養の開始からのFCCPによる培養は、3分の時点でのFCCPの添加におけると同様の取り込みをもたらし(図示してない)。肝臓ミトコンドリアを、メスのウイスターラットをホモジナイズし、次いで250mMの蔗糖、10mMのトリス-HCl(pH7.4)および1mMのEGTAを含む培地内で分画遠心分離することによって調製し、BSAを標準に用いるビウレット試験によって蛋白の濃度を測定した。 3 H化合物1の取り込みを測定するために、ミトコンドリア(2mg蛋白/ml)を、0.5-1mlの110mM KCl、40mM Hepes-KOH、pH7.2、0.1mM EDTA(ただしナイジェリシン(1 μ g/ml)、10mMのコハク酸塩、1.33 μ g/mlのロテノン、60nCi/mlの 3 H化合物1および10 μ Mの化合物1を補足)に25°Cで懸濁させた。培養後、ミトコンドリアを遠心分離してペレット化し、上澄み液とペレット内の 3 H化合物1をシンチレーションカウンティングで定量した。

20

【0047】

図2は、賦活したラット肝臓ミトコンドリアをいろんな濃度の化合物1で3分間培養して得られたミトコンドリア蓄積比[(化合物1/mg蛋白)/(化合物1/ μ l)](黒ベタの棒)、およびこれらに対する333nMのFCCPの効果(白抜きの棒)を示す。点線と白抜きの丸印は、FCCP感受性結合に対して補正した、ミトコンドリアによる化合物1の取り込みを示す。 3 H化合物1の取り込み比率を測定するために、ミトコンドリア(2mg蛋白/ml)を0.5-1mlの110mM KCl、40mM Hepes-KOH、pH7.2、0.1mM EDTA(ただしナイジェリシン(1 μ g/ml)、10mMのコハク酸塩、1.33 μ g/mlのロテノン、6-60nCi/mlの 3 H化合物1および1-50 μ Mの化合物1を補足)に25°Cで懸濁させた。培養後、ミトコンドリアを遠心分離してペレット化し、上澄み液とペレット内の 3 H化合物1をシンチレーションカウンティングで定量した。

30

【0048】

図3は、ミトコンドリアの一定の膜電位範囲における、化合物1の取り込みとTPMPの取り込みの比較を示す。賦活したラット肝臓ミトコンドリアを10 μ Mの化合物1と1 μ MのTPMPで3分間培養し、異なる膜電位を0-8mMのマロン酸塩または333nMのFCCPで設定した。60nCi/mlの 3 H化合物1または50nCi/mlの 3 HTPMPによる平行培養の蓄積比率を測定し、化合物1に対する蓄積比率を、同じ膜電位(傾斜 = 2.472、y切片 = 319、 $r = 0.97$)でのTPMPのそれと関連させてプロットした。ミトコンドリア(2mg蛋白/ml)を0.5-1mlの110mM KCl、40mM Hepes-KOH、pH7.2、0.1mM EDTA(ただしナイジェリシン(1 μ g/ml)、10mMのコハク酸塩、1.33 μ g/mlのロテノンを補足)に25°Cで懸濁させた。

40

【0049】

3. 化合物1の抗酸化効率

本発明の化合物はまた、酸化的ストレスに対して高度に効果的である。これを示すために、例として化合物1をさらにラット脳ホモジネートを用いて試験した。このラット脳ホモ

50

ジネートを、種々の濃度の試験化合物(化合物1;天然のビタミンE(α -トコフェロール)、
ブロモブチルトリフェニルホスフォニウムブロマイド、トロロックス(ビタミンEの水溶性
形態)および化合物2、すなわち化合物1の前駆物質である2-(2-ブロモエチル)-3,4-ジヒド
ロ-2,5,7,8-テトラメチル-2H-1-ベンゾピラン-6-オール(Brom Vit E)と共に又はそれらな
しで培養し、培養中におこる酸化損傷をTBARS試験(Stocks et al., 1974, Clin. Sic.
Mol. Med. 47, 215-222)を用いて定量した。これから、酸化損傷を50%抑制するのに必
要な化合物の濃度を決定した。この系において、210nMの化合物1が酸化ストレスを50%
抑制したが、天然のビタミンEの対応値は36nMであった。トリフェニルホスフォニウム部
分を含むが抗酸化性ビタミンE部分を含まないブロモブチルトリフェニルホスフォニウム
ブロマイドの場合の値は47 μ Mであった。これらのデータは、ビタミンEと同じ程度の効果
で、化合物1が極めて効果的な抗酸化剤であることを示す。ブロモブチルトリフェニルホ
スフォニウムブロマイドとの比較は、抗酸化能力はビタミンEの機能によるものであり、
ホスフォニウム塩によるものでない事を示す。この実験手順とその結果の更に詳細な内容
を、次に述べる。

10

【0050】

脂質過酸化の抑制のためのIC₅₀値をラット脳ホモジネートで測定したが、それは2-3の脳
試料での平均値 $\pm$ SEMまたは測定値範囲である。オクタン-1-オール/PBS分配係数は、3つ
の独立した測定の平均値 $\pm$ SEMである。N.D.は未測定を示す。分配係数は、2mlの水飽和オ
クタノール-1-オール中の化合物200 μ Mを2mlのオクタノール飽和PBSと室温で1時間混合
することによって測定し、次いでこの2つの層を短時間の遠心分離で分離し、それらの濃
度をPBSまたはオクタノールで作製した標準曲線から分光光度計で測定した。抗酸化効力
を測定するために、4つのラット脳を15mlの40mMリン酸カリウム(pH7.4)と140mMのNaCl中
において4°Cでホモジナイズし、粒状体をペレット化し(1,000 $\times$ g、4°Cで15分間)、1回洗
浄し、そして上澄み液を合併したものを冷凍保存した。アリコットを速やかに解凍し、5m
gの蛋白を抗酸化剤またはエタノール担体を含有する800 μ lのPBSに懸濁し、37°Cで30分間
培養した。培養液に200 μ lの濃HClO₄および200 μ lの1%チオバルビツール酸を加え、100°C
で15分間加熱した後、冷却し、遠心(10,000 $\times$ gで2分間)により清澄化して、532nmでのチ
オバルビツール酸反応種(TBARS)を定量した。その結果を下の表1に示す。

20

【0051】**【表1】**

30

化合物 1 および関連化合物の分配係数と抗酸化効率

化合物	脂質過酸化抑制 IC ₅₀ (nM)	オクタノール:PBS 分配係数
化合物 1	210±58	7.37±1.56
ブロモビタミン E	45±26	33.1±4.4
α-トコフェロール	36±22	27.4±1.0
トロロックス	18500±5900	N.D.
BrBTP	47000±13000	3.83±0.22

【0052】

ミトコンドリアを酸化的ストレスに曝したとき、脂質過酸化と蛋白カルボニル形成で測定したところ、化合物1は酸化的損傷からミトコンドリアを保護した(図4)。この抗酸化保護は、化合物1の取り込みを防ぐための脱共役剤FCCPでミトコンドリアを培養することで防御され、そして脂質カチオンだけではミトコンドリアを保護しなかった(図5)。最も重要な事であるが、膜電位を生成する能力で測定したところ化合物1の取り込みは、ビタミンEそれ自体よりも一層効果的にミトコンドリア機能を保護した(図6)。これは、化合物1のミトコンドリア内への蓄積は、それらの機能を酸化的損傷から選択的に保護することを示し

10

20

30

40

50

ている。さらに、化合物1は、保護を与えるような濃度ではミトコンドリアを損傷させないことが分かった(図7)。

【0053】

次の工程は、化合物1が完全な細胞によって蓄積されるかどうかを決定することであった。化合物1は手を加えられていない143B細胞によって迅速に蓄積され、その蓄積量は、143B細胞から誘導した ρ^- 細胞によるものよりも多かった。これは重要なことである。なぜならば、 ρ^- 細胞はミトコンドリアDNAを欠如しており、従って143B細胞よりもはるかに低いミトコンドリア膜電位をもっているが、プラズマ膜電位、細胞量および蛋白含量などのその他の点では同一だからである(図8)。これは、細胞内の化合物1のほとんどがミトコンドリアであることを示唆している。細胞内への化合物1の取り込みの一部分は、プラズマとミトコンドリア膜電位をブロックすることにより抑制された(図9)。この賦活感受性取り込みは、酸化的損傷からミトコンドリアを保護するのに十分な約2-4mMの化合物1のミトコンドリア内濃度に対応している。化合物1のこれらの濃度は、細胞に毒性的ではない(図10)。

10

【0054】

実験手順と結果の更なる詳細を以下に述べる。

【0055】

図4は、酸化的損傷に対する、化合物1によるミトコンドリアの保護を示す。ミトコンドリアを、鉄/アスコルビン酸塩での培養により酸化的ストレスに曝露し、酸化的損傷についての化合物1の効果をTBARS(黒ベタの棒)と蛋白カルボニル(白抜きの棒)の測定によって評価した。ラット肝臓ミトコンドリア(10mg蛋白)を、100mMのKClと10mMのトリス、pH7.7(1.33 μ g/mlのロテノン、10mMのコハク酸塩、500 μ Mのアスコルビン酸塩およびその他の添加物を補足)を含有する2mlの培地の中で振盪水浴中において25°Cで培養した。5分間の前培養の後、100 μ Mの FeSO_4 を加え、そして45-55分後に、2回標本を取出し、TBARSまたは蛋白カルボニルの試験をした。

20

【0056】

図5は、化合物1とビタミンE、ならびに脱共役剤とその他の親油性カチオンの比較を示す。賦活したラット肝臓ミトコンドリアをtert-ブチルヒドロパーオキシドに曝露し、TBARS形成に対する化合物1(黒ベタの棒)、 α -トコフェロール(白抜きの棒)、化合物1と333 nMのFCCP(点彩棒)、または単なる親油性カチオンのブROMOブチルトリフェニルホスフォニウム(ハッチングつき棒)の効果を測定した。ラット肝臓ミトコンドリア(4mg蛋白)を、種々の添加物と共に120mMのKCl、10mMのHepes-HCl pH7.2および1mMのEGTAを含有する2mlの培地内で振盪水浴中において37°Cで5分間培養し、次いでtert-ブチルヒドロパーオキシド(5mM)を加え、ミトコンドリアを更に45分間培養した後TBARSを測定した。

30

【0057】

図6は、化合物1がどのようにしてミトコンドリアの機能を酸化的損傷から守るかを示すものである。賦活したラット肝臓ミトコンドリアを、添加物なし(点彩棒)、5 μ Mの化合物1添加(黒ベタの棒)、5 μ Mの α -トコフェロール添加(白抜きの棒)または5 μ MのTPMP添加(ハッチングつき棒)の鉄/アスコルビン酸と培養し、次いで単離し、そして呼吸基質によって発生した膜電位を、鉄/アスコルビン酸塩の不存在下で培養した対照と比較測定した。ラット肝臓ミトコンドリアを、100mMのKClと10mMのトリス、pH7.7(1.33 μ g/mlのロテノン、10mMのコハク酸塩、500 μ Mのアスコルビン酸塩およびその他の添加物を補足)を含有する2mlの培地の中で振盪水浴中において25°Cで培養した。5分間の前培養の後、100 μ Mの FeSO_4 を加え、30分後に培養物を6mlの氷冷したSTE、250mMの蔗糖、10mMのトリス-HCl(pH7.4)および1mMのEGTAで希釈し、遠心分離(5,000 $\times$ gで5分間)してペレット化し、そのペレットを200 μ lのSTEに再懸濁し、その20 μ l(=蛋白1mg)を1mlの110mMのKCl、40mMのHEPES、0.1MのEDTA、pH7.2(但し1 μ MのTPMPを含有)、ならびに10mMのグルタミン酸塩およびリンゴ酸塩、10mMのコハク酸塩およびロテノン、又は5mMアスコルビン酸塩/100 μ MのTMPDのいずれかとロテノンと、ミキソチアゾール(2 μ g/ml)との50nCi/ml[3H]TPMP中へ懸濁し、25°Cで3分間培養し、次いでペレット化し、上記のようにして膜電位を測定し、そしてまだ酸化的

40

50

ストレスに曝されていない培養物と比較した。

【0058】

図7は、化合物1の、膜電位(黒ベタの棒)、ならびに結合した(白抜きの棒)、リン酸化した(点彩棒)および結合してない(ハッチングつき棒)ミトコンドリアの呼吸率に対する効果を、化合物1の不存在下での値の百分率で示したものである。単離したミトコンドリアの膜電位に対する化合物1の種々の濃度の影響を、 $1\mu\text{M}$ のTPMPと 50 nCi/ml [^3H]TPMPを含有する上記の培地 0.5ml の中でラット肝臓ミトコンドリア(蛋白 2mg/ml)を 25°C で3分間培養することによって [^3H]TPMPの分布から測定した。培養後に、ミトコンドリアを遠心分離してペレット化し、上澄み液とペレットの中の [^3H]TPMPをシンチレーションカウンティングで定量し、 $0.5\mu\text{l/mg}$ 蛋白の量とミトコンドリア内のTPMPの60%が膜と結合していると仮定して膜電位を計算した。結合した、リン酸化した、および結合してない呼吸率に対する化合物1の効果を測定するために、ミトコンドリア(蛋白 2mg/ml)を、 3ml のクラーク酸素電極の中で 120mM のKCl、 10mM のHepes-HCl pH7.2、 1mM のEGTAおよび 10mM のK Piの中へ懸濁させ、次いで呼吸基質、ADP($200\mu\text{M}$)およびFCCP($333\mu\text{M}$)を電極に逐次添加し、そして呼吸率を測定した。

10

【0059】

図8は、細胞による化合物1の取り込みを示すものである。ここでは、 10^6 コの143B細胞(黒ベタの記号)または ρ^- 細胞(白抜きの記号)を $1\mu\text{M}$ の [^3H]化合物1と培養し、化合物1の蓄積比を測定した。ヒトの骨肉腫143B細胞および誘導された ρ^- 細胞系(ミトコンドリアDNA欠如)を、ウリジンとピルビン酸塩を補足したDMEM/10%FCS(ウシの胎児血清)の中で5%の CO_2 /95%の空気の雰囲気下 37°C で培養し、コンフルエンスとなるまで生育させ、そして実験のためにトリプシン処理によって採取した。 [^3H]化合物1の蓄積を測定するために、細胞(10^6 コ)を 1ml のHEPESで緩衝化したDMEM中で培養した。培養の最後に、細胞を遠心分離してペレット化し、細胞ペレットと上澄み液をシンチレーションカウンティングのために調製し、そして蓄積比 $[(\text{化合物1}/\text{mg蛋白})/(\text{化合物1}/\mu\text{l})]$ を計算した。

20

【0060】

図9は、抑制剤非感受性結合について補正した、1時間の培養での 10^6 コの143B細胞による化合物1の取り込み量を示す。ヒト骨肉腫143B細胞を 1ml のHEPES-緩衝化したDMEMの中で、 $6-60\text{ nCi/ml}$ [^3H]化合物1を補足した $1-50\mu\text{M}$ の化合物1と共に培養した。賦活化依存性の取り込みの測定のために、 $12.5\mu\text{M}$ のオリゴマイシン、 $20\mu\text{M}$ のFCCP、 $10\mu\text{M}$ のミキサチアゾール、 100nM のバリノマイシンおよび 1mM のウアバインでの平行培養を行なった。培養の最後に、細胞を遠心分離してペレット化してシンチレーションカウンティングのために調製し、そして賦活感受性の取り込みを測定した。

30

【0061】

図10は、細胞の生育力に対する化合物1の効果を示す。ここにおいて、24ウェルの組織培養皿でのコンフルエントな143B細胞を、いろんな濃度の化合物1と24時間培養し、細胞の生育力を乳酸脱水素酵素の遊離によって測定した。

【0062】

【産業上の利用性】

本発明の化合物は、ミトコンドリアの損傷を防ぐための、ヒトの患者の選択的抗酸化治療における利用性をもっている。これは、パーキンソン病のような特定の疾患と関連する高められたミトコンドリア酸化性ストレス又はミトコンドリアDNA変異と関連する疾患を防ぐことができる。それらはまた、移植細胞の生存率を増大させるために、神経組織変成疾患のための細胞移植治療と併用して用いることもできる。

40

【0063】

更にこれらの化合物は、移植中の臓器の保護のための、または手術中におこる虚血再灌流傷害を改善するための予防剤として用いることもできる。本発明の化合物はまた、脳卒中や心臓発作に続く細胞傷害を減少させるために使用したり、脳虚血をおこしやすい未熟児へ予防的に投与することができる。本発明の方法は、現在の抗酸化治療よりも大きな利点をもっている。すなわち、最大の酸化的ストレス下にある細胞部分のミトコンドリアへ抗

50

酸化剤を選択的に蓄積することを可能とする。これにより、抗酸化剤治療法の効率が大きいに高まるであろう。関連する親油性カチオンが、可能性のある抗がん剤として試みられており、すべての動物に対して比較的は無毒性であることが知られている。したがってミトコンドリアを標的とするこれらの抗酸化剤は、有害な副作用をもたないと思料される。

【0064】

以上の記載は単なる例示のために提供されたものであること、そして異なる親油性カチオンと抗酸化剤の組合わせを本発明の範囲を逸脱することなしに用いることができることは、当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 特に本発明のより良き理解は、添付の図面を参照することで得られるであろう 10
。図1は本発明のミトコンドリア標的抗酸化剤である化合物1の単離ミトコンドリアによる取り込みを示すグラフである。

【図2】 図2は単離ミトコンドリアによる化合物1の蓄積を示すグラフである。

【図3】 図3は化合物1の取り込みと、トリフェニルホスフォニウムカチオン(TPMP)のそれとの比較を示すグラフである。

【図4】 図4は酸化的損傷に対し、化合物1がミトコンドリアを防御することを示すグラフである。

【図5】 図5は化合物1と、ビタミンEならびに脱共役剤およびその他の親油性カチオンの効果とを比較したグラフである。

【図6】 図6は化合物1が酸化的損傷からミトコンドリアの機能を防御することを示す 20
グラフである。

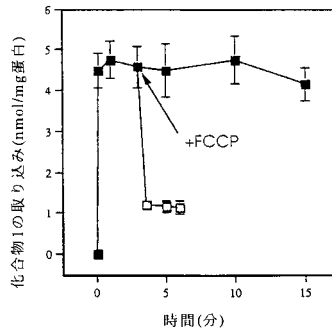
【図7】 図7はミトコンドリアの機能に及ぼす化合物1の効果を示すグラフである。

【図8】 図8は細胞による化合物1の取り込みを示すグラフである。

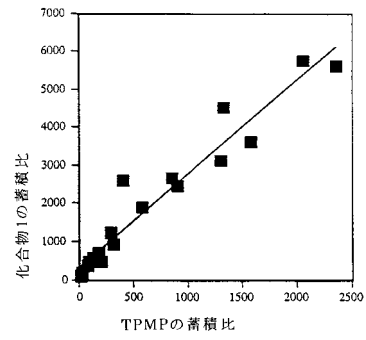
【図9】 図9は細胞による化合物1のエネルギー付与感受性取り込みを示すグラフである。

【図10】 図10は細胞の生存率に対する化合物1の効果を示すグラフである。

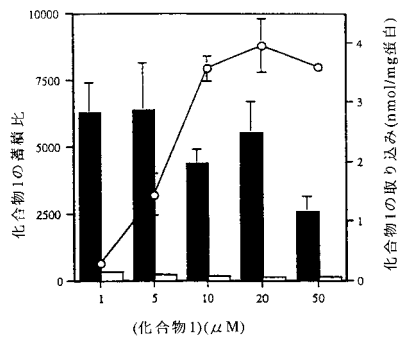
【図 1】



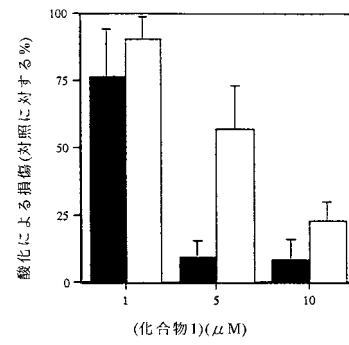
【図 3】



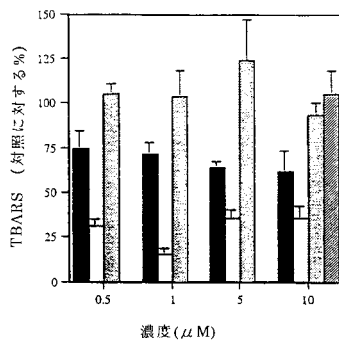
【図 2】



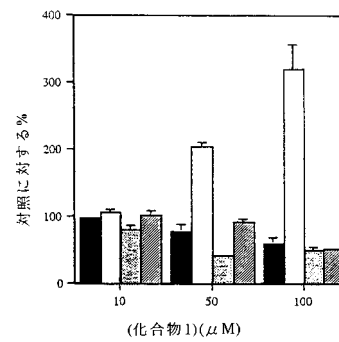
【図 4】



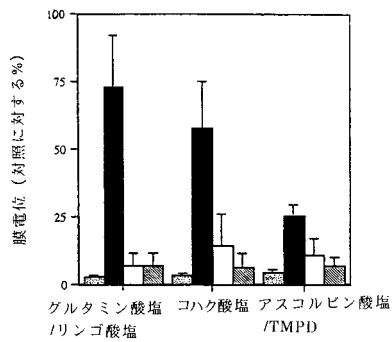
【図 5】



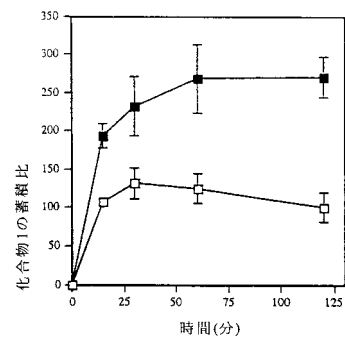
【図 7】



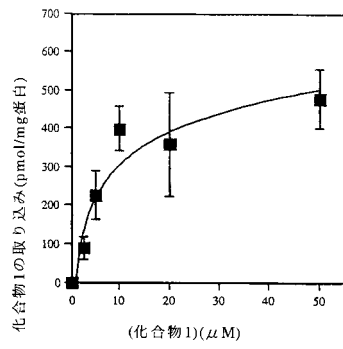
【図 6】



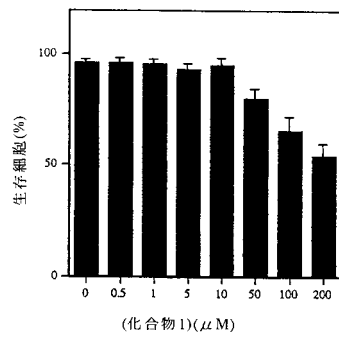
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

審査官 本堂 裕司

(56)参考文献 特開 2 0 0 3 - 0 5 5 2 2 8 (J P, A)

特開平 0 5 - 3 1 0 7 6 3 (J P, A)

KOYAMA, Mayumi et al., Synthesis of fluorine analogs of vitamin E. II. Synthesis of 2-(3-chloropropyl)-2,5,7,8-tetramethyl-6-chromanol and its application for stereocontrolled Wittig reaction with trifluoromethyl ketones, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1 9 8 8 年, 36(8), 2950-4

GRISAR, J. Martin et al., Cardiosselective Ammonium, Phosphonium, and Sulfonium Analogs of α -Tocopherol and Ascorbic Acid That Inhibit in Vitro and ex Vivo Lipid Peroxidation and Scavenge Superoxide Radicals, Journal of Medicinal Chemistry, 1 9 9 5 年, 38(15), 2880-6

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07F 9/655

A61K 31/665

A61P 43/00

CA/REGISTRY(STN)