

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7163375号
(P7163375)

(45)発行日 令和4年10月31日(2022.10.31)

(24)登録日 令和4年10月21日(2022.10.21)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 C 323/54 (2006.01)

C 0 7 C 323/54

C S P

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 27/62 (2021.01)

G 0 1 N 33/53

Y

C 0 7 K 16/44 (2006.01)

G 0 1 N 27/62

V

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

G 0 1 N 27/62

X

請求項の数 18 (全78頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-518089(P2020-518089)

(86)(22)出願日 平成30年9月27日(2018.9.27)

(65)公表番号 特表2020-536071(P2020-536071
A)

(43)公表日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/053091

(87)国際公開番号 WO2019/067699

(87)国際公開日 平成31年4月4日(2019.4.4)

審査請求日 令和3年9月24日(2021.9.24)

(31)優先権主張番号 62/564,558

(32)優先日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 510041197

メタボルン インコーポレーティッド
アメリカ合衆国 2 7 5 6 0 ノースカロ
ライナ州 モリスビル デービス ドライブ
6 1 7 スイート 4 0 0

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

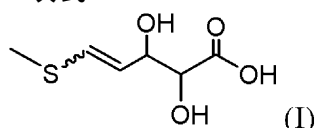
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 化合物、試薬、およびそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

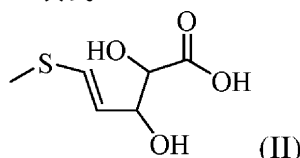
次式：



によって表される化合物またはその塩であって、前記化合物が、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%純粋である、前記化合物またはその塩。

【請求項2】

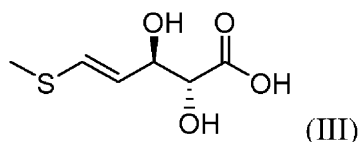
次式：



によって表されるか、またはその塩である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

次式：



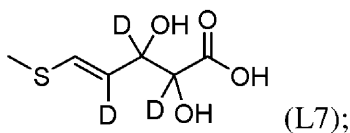
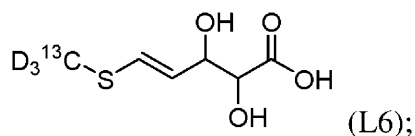
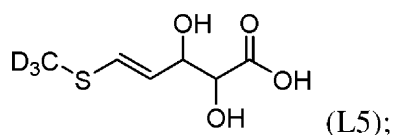
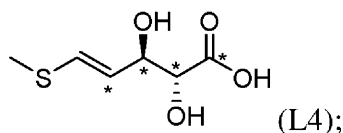
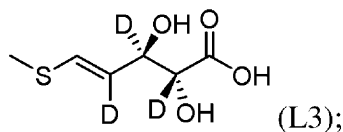
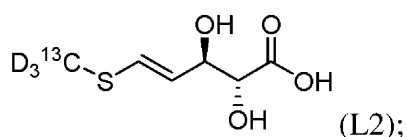
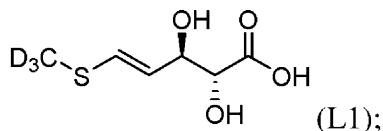
によって表されるか、またはその塩である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

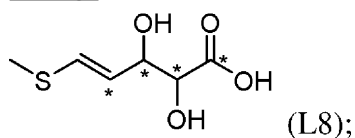
同位体標識されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

以下の式：



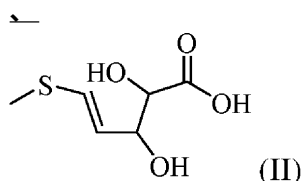
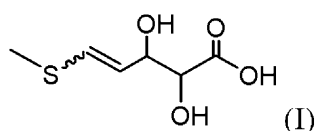
および



(式中、*は、 ^{13}C を示す) からなる群より選択される式によって表されるか、またはその塩である、請求項 4 に記載の化合物。

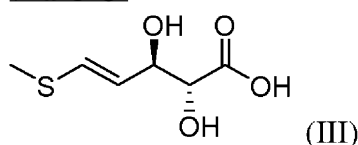
【請求項 6】

対象における、以下の式：



10

、および



からなる群より選択される式によって表される化合物またはその塩のレベルを決定する方法であって、

(1) 前記対象から得られた生体試料から分析用試料を調製することと、

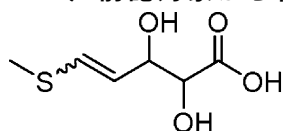
20

(2) クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロッティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して、前記化合物のレベルを決定することを含む、前記方法。

【請求項 7】

対象における推定糸球体濾過量 (eGFR) を計算するための方法であって、

1) 前記対象から得られた生体試料中の、次式：



30

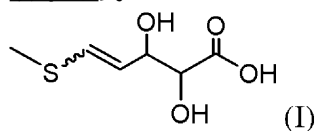
によって表される化合物またはその塩のレベルを、クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロッティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して決定するステップと、

2) 前記化合物の前記決定されたレベルを利用するアルゴリズムを使用して、前記 eGFR を計算するステップとを含む、前記方法。

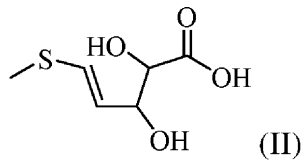
【請求項 8】

40

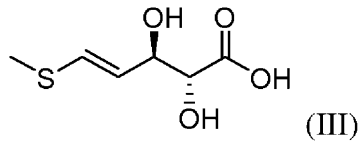
以下の式：



50



、および



10

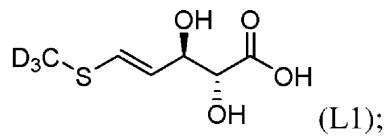
からなる群より選択される式によって表される化合物またはその塩と、対象から得られた生体試料中の前記化合物のレベルを測定するための指示書とを含む、キット。

【請求項 9】

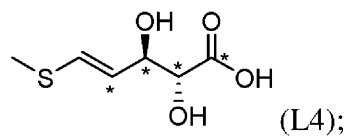
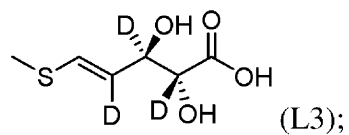
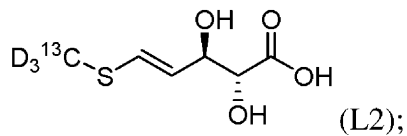
前記化合物が、同位体標識されている、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

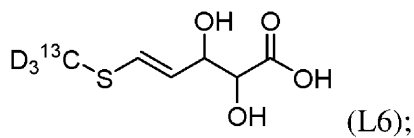
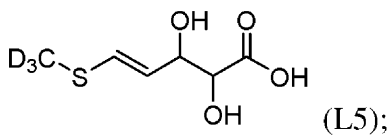
前記化合物が、以下の式：



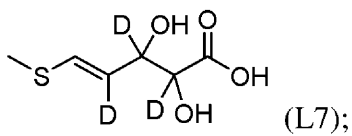
20



30

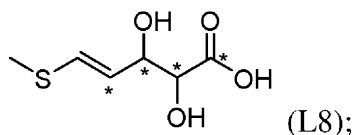


40



および

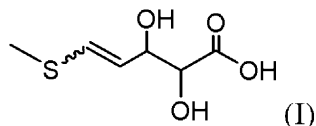
50



(式中、*は、13Cを示す) からなる群より選択される式によって表されるか、またはその塩である、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

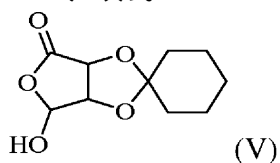
次式：



10

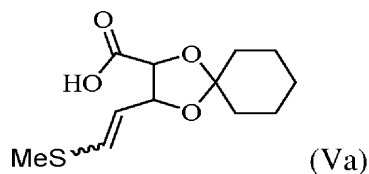
によって表される化合物またはその塩を調製するための方法であって、

a) 次式：



20

によって表される化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'P=CH_2SMe$ (式中、 R' は、Ph または電子求引基である) と反応させて、式 (Va)：



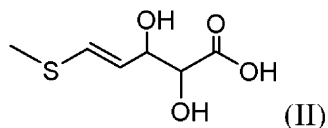
の化合物またはその塩を形成するステップと、

30

b) (Va) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I) の化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

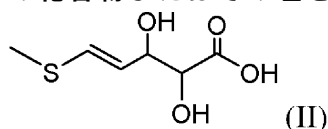
【請求項12】

式 (I) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (II)：



40

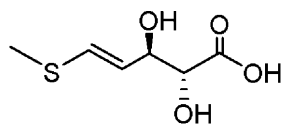
の化合物またはその塩を得ることをさらに含む、請求項11に記載の方法。



【請求項13】

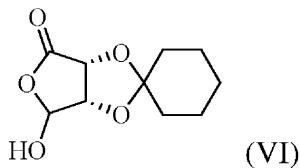
式 (III)：

50



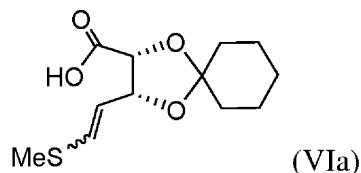
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (V I) :



10

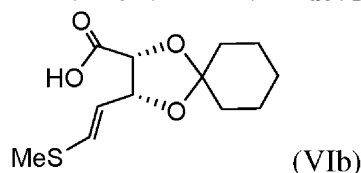
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'P=CH_2SMe$ (式中、 R' は、 Ph または電子求引基である) と反応させて、式 (V I a) :



20

の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V I a) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (V I b) :



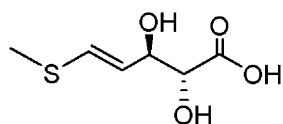
の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (V I b) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の前記化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

30

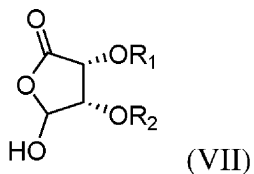
【請求項 14】

式 (I I I) :



の化合物またはその塩を調製する方法であって、

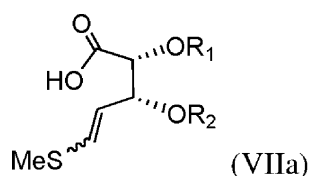
a) 式 (V I I) :



40

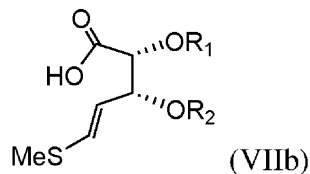
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'P=CH_2SMe$ と反応させて、式 (V I I a) :

50



(式中、 R' は、 Ph または電子吸引基であり、 R_1 および R_2 は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (VIIb) :

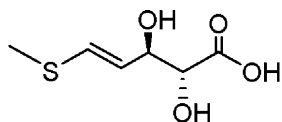


の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (VIIb) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (III) の前記化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

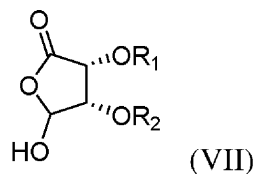
【請求項 15】

式 (III) :

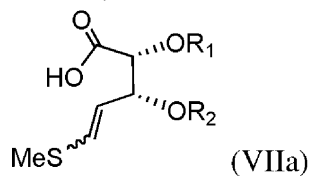


の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (VII) :

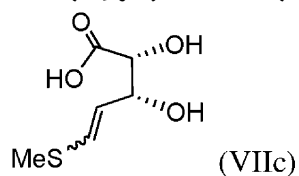


の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'_3P=CH_2SMe$ と反応させて、式 (VIIa)



(式中、 R' は、 Ph または電子吸引基であり、 R_1 および R_2 は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIc) :



10

20

30

40

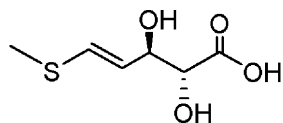
50

の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (V I I c) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (I I I) の前記化合物またはその塩を得るステップとを含む、前記方法。

【請求項 1 6】

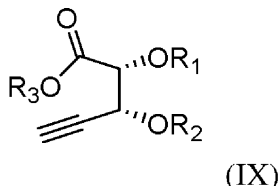
式 (I I I) :



10

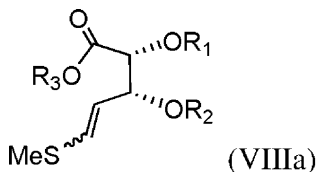
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (I X) :



(IX)

の化合物をメタチオールと反応させて、式 (V I I I a) :

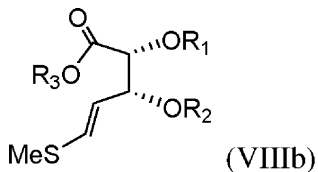


(VIIIa)

20

の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V I I I a) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (V I I I b) :



(VIIIb)

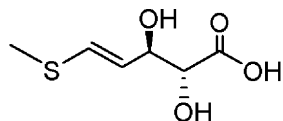
30

の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (V I I I b) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の前記化合物またはその塩を形成するステップとを含む、式中、 R_1 および R_2 が、各々独立してシリル基であり、 R_3 が t -ブチル基またはシリル基である、前記方法。

【請求項 1 7】

式 (I I I) :

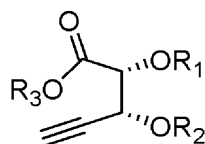


40

の化合物またはその塩を調製する方法であって、

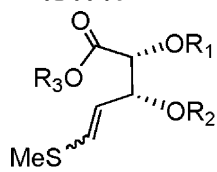
a) 式 (I X) :

50



(IX)

の化合物をメタチオールと反応させて、式 (VIIIa) :

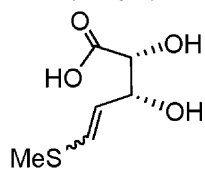


(VIIIa)

10

の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIIa) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIIb) :



(VIIIb)

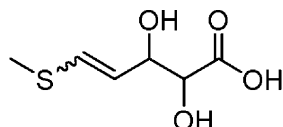
20

の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (VIIIb) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (III) の前記化合物またはその塩を得るステップと
を含み、式中、 R_1 および R_2 が、各々独立してシリル基であり、 R_3 がtert-ブチル基またはシリル基である、前記方法。

【請求項 18】

次式：



30

によって表される化合物またはその塩に結合する、抗体または抗体断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2017 年 9 月 28 日出願の米国仮出願第 62/564,558 号の出願日の利益を主張し、すべての図面、式、仕様、および特許請求の範囲を含むその全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本発明の背景を説明する次の情報は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の先行技術を構成または説明することを認めるものではない。

【0003】

腎臓機能は、従来、糸球体濾過量 (GFR) を使用して評価されている。黄金律の方法論であり、測定 GFR (mGFR) は正確かつ精密であるが、試験の複雑で時間のかかる侵襲的な性質に起因して、その有用性は限定される。また、実施に費用のかかる試験であ

50

る。その結果、GFRは、血清中で測定された内因性濾過マーカ、クレアチニン、およびシスタチンCの濃度に基づく等式を使用して臨床的に推定される。GFR（eGFR）を推定するために現在使用されている等式（MDRD、CKD-EPI）には、クレアチニンおよびシスタチンCの血清レベルに影響を与える腎臓機能／GFRとは無関係の因子の代用物として、人口統計学的変数（年齢、性別、人種）が含まれている。しかしながら、これらのeGFR等式は、mGFRに対して限定的な精密性および正確性を示す。

【0004】

人口統計学的変数は、非GFR決定因子の代用物（例えば、クレアチニンでは筋肉量、シスタチンCでは脂肪症）として優良ではなく、ある特定の患者は、不適切に分類され（例えば混血、トランスジェンダー、間性）、報告するには地域的に（例えば人種的に）デリケートであるので、現在のマーカは限定的な有用性を有し得る。現在のeGFRマーカの制限に起因して、糸球体によって自由に濾過され、非GFR決定因子によって影響を受けない（または最小限に抑える）低分子量を有する代替内因性濾過マーカが同定されている。これらの代替マーカは、人口統計学的変数からも独立することができ、それによりこれらの変数の使用に関連する制限を克服することができる。

【0005】

本明細書に記載されているのは、生体試料中の内因性小分子濾過マーカ（（2R, 3R）-2, 3-ジヒドロキシ-5-メチルチオトランス-4-ペンテン酸、DMTPA）の合成、単離、検出、および定量的方法である。以前、GFRおよび腎臓機能に関連するマーカとしての分析物／マーカX-11564が発見されたが、構造が不明であり、その有用性は限定的であった。本明細書では、この分子の構造を報告し、化合物を合成する方法、測定する方法（個々に、またはマーカのパネルの一部としての測定を含む）、測定用試薬（例えば内部標準、抗体）、およびそれらを使用するキットを提供する。

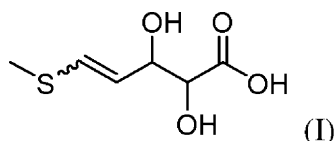
【発明の概要】

【0006】

本発明は、腎臓機能の評価およびモニタリング、ならびに腎臓疾患の診断方法において有用であり得る、新規の化合物および組成物、生体試料中の化合物の合成方法および量を検出するための方法を提供する。

【0007】

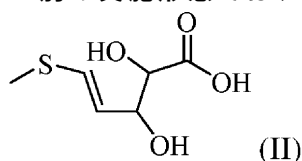
一実施形態では、本発明は、式（I）：



によって表される化合物またはその塩であって、化合物が、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%純粋である、化合物またはその塩を提供する。

【0008】

別の実施形態では、本発明は、式（II）：



によって表される化合物またはその塩であって、化合物が、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%純粋である、化合物またはその塩を提供する。

【0009】

別の実施形態では、本発明は、アッセイを使用して、式Iもしくは式IIの化合物また

はそれらの塩のレベルを決定するための方法を提供する。

【0010】

別の実施形態では、本発明は、対象における式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物、またはそれらの塩のレベルを決定するための方法であって、(1) 対象から得られた生体試料から分析用試料を調製することと、(2) クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロットティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して、化合物のレベルを決定することと、を含む方法を提供する。

【0011】

本発明の一態様では、方法は、試料中の式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩の量を質量分析法によって検出および決定することを含む。別の態様では、方法は、試料中の式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩と、シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、フェニルアセチルグルタミン、トリプトファン、N, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンペタイン (TMAP)、クレアチニン、メソ-エリトリール、アラビトール、myo-イノシトール、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、3-メチルヒスチジン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、キヌレニン、尿素、3-インドキシル硫酸、およびそれらの組み合わせからなる群から選択された1つ以上の分析物で構成される分析物のパネルのうちの1つ以上との量を、質量分析法によって検出および決定することを含む。生体試料から分析物を抽出する方法、および質量分析法による検出の前に分析物をクロマトグラフィーで分離する方法も提供される。

【0012】

方法が試料中の化合物Aの量を質量分析法によって検出および決定することを含む本発明の一態様では、化合物Aの質量スペクトルは、約177、159、133、131、129、115、113、111、101、100、99、89、85、83、75、73、57.03、57.00、97、87、74、84、および67からなる群から選択される1つ以上のピーク（すなわち、質量対電荷比 (m/z)）を含み得る。

【0013】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、値±0.5を意味する。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、対象における推定糸球体濾過量 (eGFR) を計算するための方法であって、

1) クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロットティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して、対象から得られた生体試料中の式Ⅰもしくは式ⅠⅠによって表される化合物またはそれらの塩のレベルを決定するステップと、

2) 化合物の決定されたレベルを利用するアルゴリズムを使用して、eGFRを計算するステップとを含む方法を提供する。

【0015】

他の実施形態では、本発明は、対象から得られた生体試料中で検出された式Ⅰまたは式ⅠⅠによって表される化合物のレベルに基づいて、対象の腎臓機能低下を発症する素因を決定するための、腎臓機能のレベル（またはステージ）に従って対象を分類（またはステージ分類）するための、対象における腎臓機能をモニタリングするための、慢性腎臓疾患 (CKD) を診断するための、対象におけるCKDの進行または後退をモニタリングするための、急性腎臓傷害 (AKI) を診断するための、AKIの進行または後退をモニタリングするための、組成物への応答で対象の腎臓機能を評価するための、CKDを有する対象を治療するための、およびAKIを有する対象を治療するための、方法を提供する。

【0016】

本発明はまた、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩を含むキットを提供する。

【0017】

別の実施形態では、本発明のキットは、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩と、生体試料中の式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩のレベルを測定するための指示書とを含む。

【0018】

別の実施形態では、キットは、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの標識化合物またはそれらの塩を含む内部標準と、生体試料中の式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩のレベルを測定するための指示書とを含む。

【0019】

さらに別の実施形態では、キットは、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩と、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの標識化合物またはそれらの塩と、生体試料中の式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物のレベルを測定するための指示書とを含む。

10

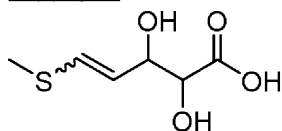
【0020】

一実施形態では、本発明のキットは、式Ⅰもしくは式ⅠⅠの化合物またはそれらの塩と、対象から得られた生体試料中で検出された化合物のレベルに基づいて、対象におけるGFRを推定するための、対象の腎臓機能低下を発症する素因を決定するための、腎臓機能のレベル（またはステージ）に従って対象を分類（またはステージ分類）するための、対象における腎臓機能をモニタリングするための、慢性腎臓疾患（CKD）を診断するための、対象におけるCKDの進行または後退をモニタリングするための、急性腎臓傷害（AKI）を診断するための、AKIの進行または後退をモニタリングするための、組成物への応答で対象の腎臓機能を評価するための、CKDを有する対象を治療するための、およびAKIを有する対象を治療するための指示書とを含む。

20

[本発明1001]

次式：

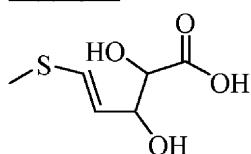


によって表される化合物またはその塩であって、前記化合物が、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%純粋である、前記化合物またはその塩。

30

[本発明1002]

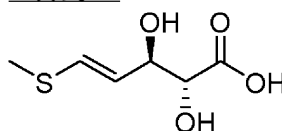
次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1001の化合物。

[本発明1003]

次式：



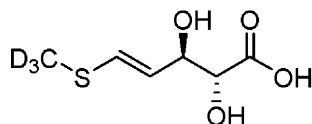
によって表されるか、またはその塩である、本発明1001の化合物。

[本発明1004]

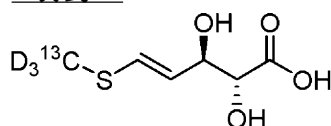
少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%光学的に純粋である、本発明1001~1003のいずれかの化合物。

40

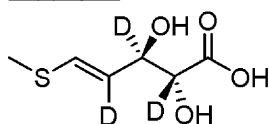
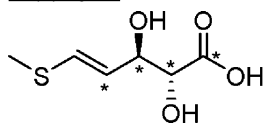
50

[本発明1005]同位体標識されている、本発明1001～1004のいずれかの化合物。[本発明1006]重水素化され、炭素13 (^{13}C)、酸素17 (^{17}O)、酸素18 (^{18}O)、硫黄33 (^{33}S)、硫黄34 (^{34}S)、もしくは任意の他の既知の硫黄同位体、またはそれらの組み合わせで標識されている、本発明1001～1005のいずれかの化合物。[本発明1007]次式：

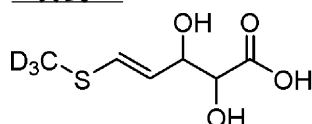
10

によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1008]次式：

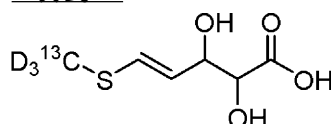
20

によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1009]次式：によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1010]次式：

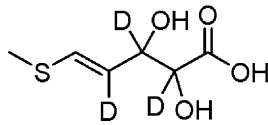
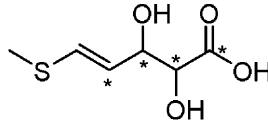
30

(式中、*は、 ^{13}C を示す) によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1011]次式：

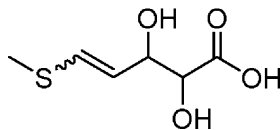
40

によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1012]次式：によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。

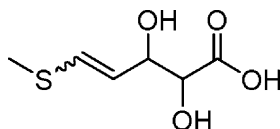
50

[本発明1013]次式：によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1014]次式：

10

(式中、*は、¹³Cを示す) によって表されるか、またはその塩である、本発明1006の化合物。[本発明1015]対象における、次式：

20

によって表される化合物またはその塩のレベルを決定する方法であって、(1) 前記対象から得られた生体試料から分析用試料を調製することと、(2) クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロットティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して、前記化合物のレベルを決定することとを含む、前記方法。[本発明1016]対象における推定糸球体濾過量 (eGFR) を計算するための方法であって、1) 前記対象から得られた生体試料中の、次式：

30

によって表される化合物またはその塩のレベルを、クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロットティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して決定するステップと、

40

2) 前記化合物の前記決定されたレベルを利用するアルゴリズムを使用して、前記 eGFR を計算するステップとを含む、前記方法。[本発明1017]前記計算された eGFR が、前記対象における腎臓機能を評価するために使用される、本発明1016の方法。[本発明1018]前記計算された eGFR が、前記対象における腎臓機能低下を発症する素因を決定するために使用される、本発明1016の方法。[本発明1019]

50

前記計算された e G F R が、腎臓機能のレベルに従って前記対象を分類するために使用される、本発明1016の方法。

[本発明1020]

前記計算された e G F R が、前記対象における腎臓機能をモニタリングするために使用される、本発明1016の方法。

[本発明1021]

前記計算された e G F R が、前記対象における慢性腎臓疾患（C K D）、または急性腎臓傷害（A K I）を診断するために使用される、本発明1016の方法。

[本発明1022]

前記計算された e G F R が、C K D または A K I の進行または後退をモニタリングするために使用される、本発明1016の方法。

[本発明1023]

前記 e G F R が、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノアート、エリトリトール、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカルニチン、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、キヌレニン、アラボナート、スクシニルカルニチン、リボース、キシロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカテコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2, N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、p-クレゾールスルフェート、および N, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン（TMAP）から選択される1つ以上の追加の化合物を利用して計算される、本発明1016~1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

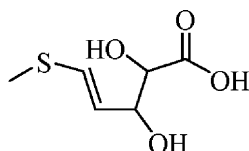
前記 e G F R アルゴリズムが、血清シスタチンCレベルをさらに利用する、本発明1016~1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記 e G F R アルゴリズムが、年齢、性別、および人種からなる群から選択される1つ以上の人口統計学的パラメータをさらに利用する、本発明1016~1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

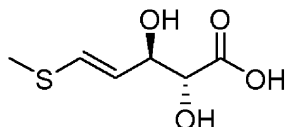
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1015~1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1015~1025のいずれかの方法。

[本発明1028]

前記化合物のレベルが、タンデム液体クロマトグラフィー-質量分析法（L C - M S / M S）によって決定される、本発明1015~1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

前記生体試料が、血液、血漿、血清、唾液、または尿である、本発明1015～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

前記生体試料が、血清または血漿である、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記対象が、ヒトである、本発明1015～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

前記対象が、腎臓機能障害の症状を有さない、本発明1031の方法。

[本発明1033]

前記対象が、慢性腎臓疾患を発症するリスク因子を呈する、本発明1031の方法。

10

[本発明1034]

前記対象が、高血圧と以前に診断されている、本発明1031の方法。

[本発明1035]

前記対象が、糖尿病と以前に診断されている、本発明1031の方法。

[本発明1036]

前記対象が、慢性腎臓疾患の家族歴を有する、本発明1031の方法。

[本発明1037]

前記対象が、腎臓機能障害の症状を有する、本発明1031の方法。

[本発明1038]

前記対象が、従来の方法を使用した腎臓機能評価が困難である対象である、本発明1031の方法。

20

[本発明1039]

前記対象が、肥満、痩せすぎ、菜食主義者、慢性の病気、および高齢者からなる群から選択される、本発明1031の方法。

[本発明1040]

前記対象が、腎臓ドナーになる候補者である、本発明1031の方法。

[本発明1041]

前記対象が、腎臓に毒性作用を有し得る薬剤を用いて治療されたか、または該薬剤を用いる治療が検討されている、本発明1031の方法。

[本発明1042]

前記薬剤が、造影剤である、本発明1041の方法。

30

[本発明1043]

前記薬剤が、治療剤である、本発明1041の方法。

[本発明1044]

前記薬剤が、化学療法剤である、本発明1041の方法。

[本発明1045]

前記薬剤が、抗生物質である、本発明1041の方法。

[本発明1046]

前記対象が、腎臓機能障害の既知のリスク因子を有さない、本発明1031の方法。

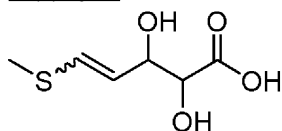
[本発明1047]

前記試料が、糸球体濾過量の直接測定を可能にする薬剤を用いる治療の前に、前記対象から得られる、本発明1015～1046のいずれかの方法。

40

[本発明1048]

次式：



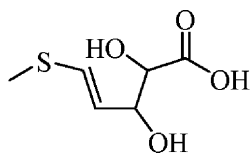
によって表される化合物またはその塩と、対象から得られた生体試料中の前記化合物のレ

50

ベルを測定するための指示書とを含む、キット。

[本発明1049]

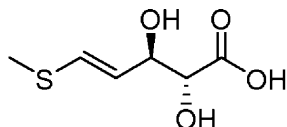
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1048のキット。

[本発明1050]

前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1048のキット。

[本発明1051]

前記生体試料中で測定された前記化合物のレベルに基づいて、前記生体試料中の推定系球体濾過量（e G F R）を計算するための指示書をさらに含む、本発明1048～1050のいずれかのキット。

[本発明1052]

前記化合物が、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%、または99.9%純粋である、本発明1048～1051のいずれかのキット。

[本発明1053]

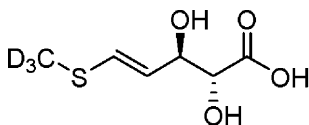
前記化合物が、同位体標識されている、本発明1048～1052のいずれかのキット。

[本発明1054]

前記化合物が、重水素化され、炭素13 (^{13}C)、酸素17 (^{17}O)、酸素18 (^{18}O)、硫黄33 (^{33}S)、硫黄34 (^{34}S)、もしくは任意の他の既知の硫黄同位体、またはそれらの組み合わせで標識されている、本発明1048～1053のいずれかのキット。

[本発明1055]

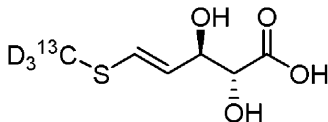
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1056]

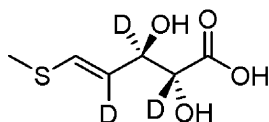
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1057]

前記化合物が、次式：



10

20

30

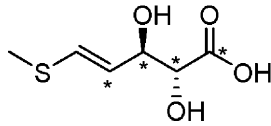
40

50

によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1058]

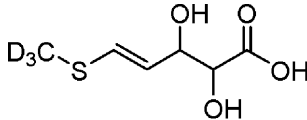
前記化合物が、次式：



(式中、*は、¹³Cを示す) によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1059]

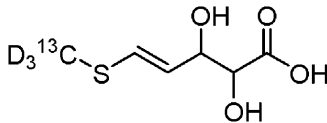
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1060]

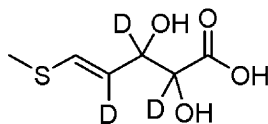
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1061]

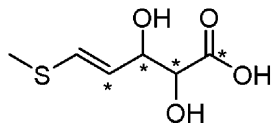
前記化合物が、次式：



によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1062]

前記化合物が、次式：



(式中、*は、¹³Cを示す) によって表されるか、またはその塩である、本発明1054のキット。

[本発明1063]

腎臓機能の評価に関連する1つ以上の追加の化合物をさらに含む、本発明1048~1062のいずれかのキット。

[本発明1064]

前記追加の化合物が、シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノート、エリトリートル、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカルニチン、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、キヌレニン、アラボナート、スクシニルカルニチン、リボース、キシロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカタコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2,

10

20

30

40

50

N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、p-クレゾールスルフェート、およびN, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン (TMAP) からなる群から選択される、本発明1063のキット。

[本発明1065]

前記追加の化合物が、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、キヌレニン、myo-イノシトール、N, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン (TMAP)、およびクレアチニンからなる群から選択される、本発明1064のキット。

[本発明1066]

前記追加の化合物が、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンからなる群から選択される、本発明1064のキット。

[本発明1067]

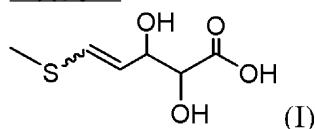
シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、およびフェニルアセチルグルタミンをさらに含む、本発明1064のキット。

[本発明1068]

シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンをさらに含む、本発明1064のキット。

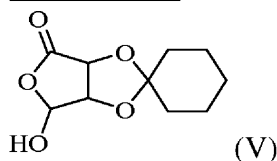
[本発明1069]

次式：

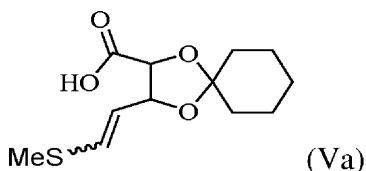


によって表される化合物またはその塩を調製するための方法であって、

a) 次式：



によって表される化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'_3P=CH_2SMe$ (式中、 R' は、Phまたは電子求引基である) と反応させて、式 (Va)：



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) (Va) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I) の化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

[本発明1070]

式 (I) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (II)：

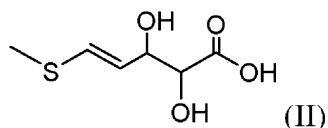
10

20

30

40

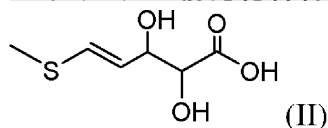
50



の化合物またはその塩を得ることをさらに含む、本発明1069の方法。

[本発明1071]

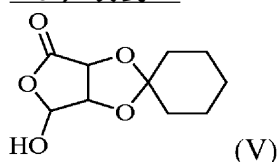
式 (I) の前記化合物またはその塩が、次式：



10

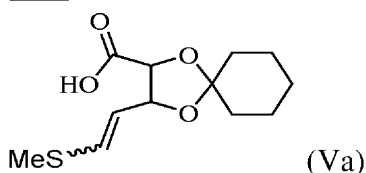
によって表されるか、またはその塩であり、前記方法が、

a) 次式：



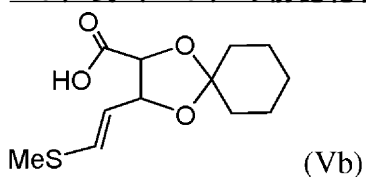
20

によって表される化合物またはその塩を、前記ウィッティヒ試薬と反応させて、式 (V a))：



の化合物またはその塩を形成することと、

b) 式 (V a) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (V b))：



30

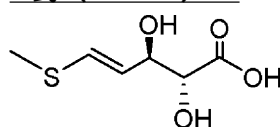
の化合物またはその塩を得ることと、

c) 式 (V b) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I) の前記化合物またはその塩を形成することとを含む、本発明1069の方法。

40

[本発明1072]

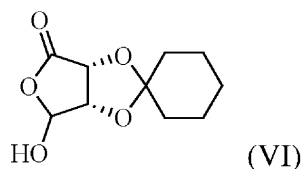
式 (I I I)：



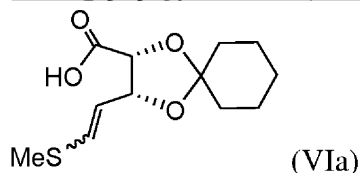
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (V I)：

50



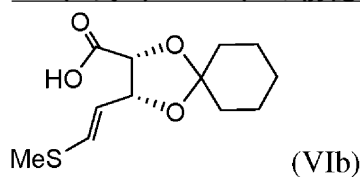
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'_3P=CH_2SMe$ (式中、 R' は、 Ph または電子求引基である) と反応させて、式 (V Ia) :



10

の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V Ia) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (V Ib) :



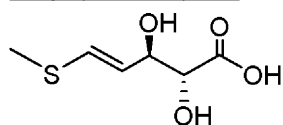
20

の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (V Ib) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の前記化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

[本発明1073]

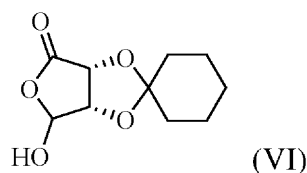
式 (I I I) :



30

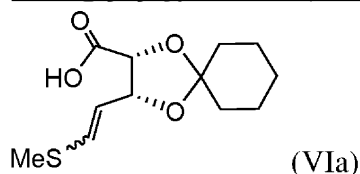
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (V I) :



40

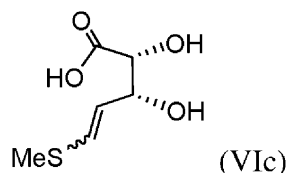
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'_3P=CH_2SMe$ (式中、 R' は、 Ph または電子求引基である) と反応させて、式 (V Ia) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V Ia) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (V I c) :

50



の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (VIc) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (III) の前記化合物またはその塩を得るステップとを含む、前記方法。

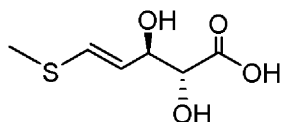
10

[本発明1074]

前記脱保護ステップが、酸の存在下で行われる、本発明1069～1073のいずれかの方法。

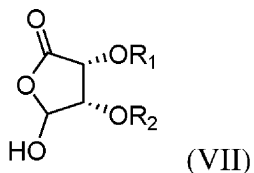
[本発明1075]

式 (III) :



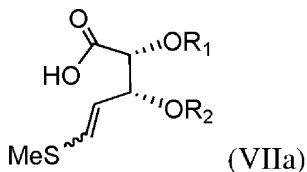
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (VII) :



20

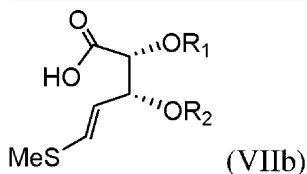
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R_3P=CH_2SMe$ と反応させて、式 (VIIa) :



30

(式中、R' は、Ph または電子吸引基であり、R および R2 は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (VIIb) :



40

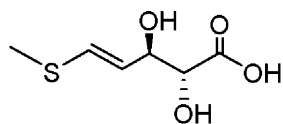
の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (VIIb) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (III) の前記化合物またはその塩を形成するステップとを含む、前記方法。

[本発明1076]

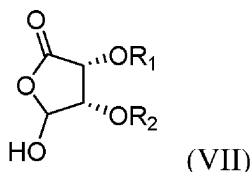
式 (III) :

50



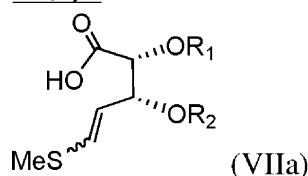
の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (VII) :



10

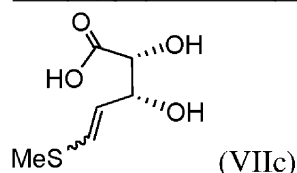
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R_3P=CH_2SMe$ と反応させて、式 (VIIa)



20

(式中、 R' は、 Ph または電子吸引基であり、 R および R_2 は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIc) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (VIIc) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (III) の前記化合物またはその塩を得るステップとを含む、前記方法。

[本発明1077]

前記脱保護ステップが、フッ化テトラ- n -ブチルアンモニウム、トリス(ジメチルアミノ)スルホニウムジフルオロトリメチルシリケート、フッ化水素もしくはその溶媒和物、フッ化水素ピリジン、四フッ化ケイ素、ヘキサフルオロケイ酸、フッ化セシウム、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、 p -トルエンスルホン酸ピリジニウム、 p -トルエンスルホン酸($p-TsOH$)、ギ酸、および過ヨウ素酸から選択される脱保護試薬の存在下で行われる、本発明1075または1076の方法。

[本発明1078]

前記ウィッティヒ試薬が、メチルチオメチルトリフェニルホスホニウムイリド($Ph_3P=CH_2SMe$)である、本発明1069~1077のいずれかの方法。

[本発明1079]

前記ウィッティヒ反応が、ナトリウムビス(トリメチルシリル)アミドの存在下で行われる、本発明1069~1078のいずれかの方法。

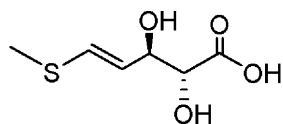
[本発明1080]

前記ウィッティヒ反応が、テトラヒドロフランの溶媒中で行われる、本発明1069~1079のいずれかの方法。

[本発明1081]

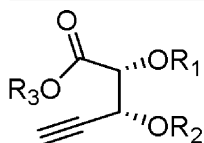
50

式 (I I I) :



の化合物またはその塩を調製する方法であって、

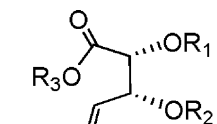
a) 式 (I X) :



(IX)

10

の化合物をメタントオールと反応させて、式 (V I I I a) :

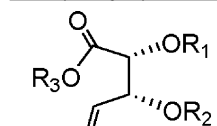


(VIIIa)

20

の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V I I I a) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (V I I I b) :



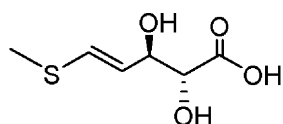
(VIIIb)

の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (V I I I b) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の前記化合物またはその塩を形成するステップと
を含み、式中、R₁およびR₂が、各々独立してシリル基であり、R₃がtert-ブチル基またはシリル基である、前記方法。

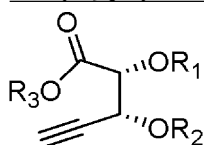
[本発明1082]

式 (I I I) :



の化合物またはその塩を調製する方法であって、

a) 式 (I X) :

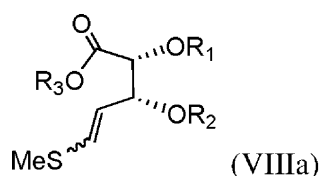


(IX)

40

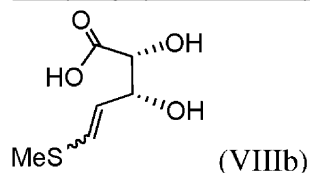
の化合物をメタントオールと反応させて、式 (V I I I a) :

50



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIIa) の前記化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIIb) :



10

の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (VIIIb) の前記化合物またはその塩を精製して、式 (III) の前記化合物またはその塩を得るステップと

を含み、式中、R₁およびR₂が、各々独立してシリル基であり、R₃がtert-ブチル基またはシリル基である、前記方法。

[本発明1083]

20

前記シリル基が、トリメチルシリルまたはトリス(トリメチルシリル)シリルである、本発明1081または1082の方法。

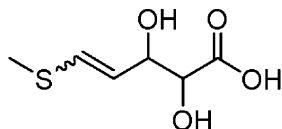
[本発明1084]

前記脱保護反応が、フッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム、トリス(ジメチルアミノ)スルホニウムジフルオロトリメチルシリケート、フッ化水素もしくはその溶媒和物、フッ化水素ピリジン、四フッ化ケイ素、ヘキサフルオロケイ酸、フッ化セシウム、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム、p-トルエンスルホン酸(p-TsOH)、ギ酸、および過ヨウ素酸から選択される脱保護試薬の存在下で行われる、本発明1081~1083のいずれかの方法。

[本発明1085]

30

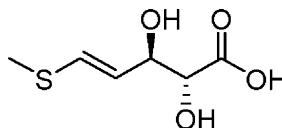
次式:



によって表される化合物またはその塩に結合する、抗体または抗体断片。

[本発明1086]

前記化合物が、次式:



40

によって表されるか、またはその塩である、本発明1085の抗体または抗体断片。

[本発明1087]

本発明1069または1070の抗体のV_HおよびV_L配列を含む、ポリペプチド。

[本発明1088]

融合タンパク質である、本発明1087のポリペプチド。

[本発明1089]

50

本発明1085もしくは1086の抗体もしくは抗体断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドを生産する、細胞。

[本発明1090]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドを生成する方法であって、

(1) 本発明1089の細胞を培養することと、

(2) 前記培養細胞から前記抗体もしくはその抗原結合断片、またはポリペプチドを単離することと

を含む、前記方法。

[本発明1091]

前記細胞が、真核細胞である、本発明1090の方法。

[本発明1092]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドと、前記対象から得られた生体試料中で検出された前記化合物のレベルを決定するための指示書とを含む、キット。

[本発明1093]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドと、前記対象から得られた生体試料中で検出された前記化合物のレベルに基づいて対象における腎臓機能を評価またはモニタリングするための指示書とを含む、キット。

[本発明1094]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドと、前記対象から得られた生体試料中で検出された前記化合物のレベルに基づいて対象における腎臓機能低下を発症する素因を決定するための指示書とを含む、キット。

[本発明1095]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドと、前記対象から得られた生体試料中で検出された前記化合物のレベルに基づいて腎臓機能のレベルに従って対象を分類するための指示書とを含む、キット。

[本発明1096]

本発明1085もしくは1086の抗体もしくはその抗原結合断片、または本発明1087もしくは1088のポリペプチドと、前記対象から得られた生体試料中で検出された前記化合物のレベルに基づいて対象における慢性腎臓疾患（CKD）を診断またはモニタリングするための指示書とを含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】塩基性クロマトグラフ条件下でのヒトの血漿試料中の化合物AのLC/MSクロマトグラムおよびスペクトルを示す。

【図2】血漿試料中の化合物Aのプロダクトイオンスペクトル（MS²）を、拡大図とともに示す。

【図3】酸性クロマトグラフ条件下でのヒト血漿試料（A）、ヒト尿試料（B）中、およびヒト血漿と尿との混合物（C）中の化合物AのLC/MSクロマトグラムを示す。

【図4A】衝突誘起解離（CID）を使用して生成された、尿試料中の化合物Aのプロダクトイオンスペクトル（MS²）を、拡大図とともに示す。

【図4B】衝突誘起解離（CID）を使用して生成された、尿試料中の化合物Aのプロダクトイオンスペクトル（MS²）を、拡大図とともに示す。

【図5A】高エネルギー衝突誘起解離（HCD）を使用して生成された、尿試料中の化合物Aのプロダクトイオンスペクトル（MS²）を、拡大図とともに示す。

【図5B】高エネルギー衝突誘起解離（HCD）を使用して生成された、尿試料中の化合

10

20

30

40

50

物Aのプロダクトイオンスペクトル (MS^2) を、拡大図とともに示す。

【図6】図6A、図6B、図6C、図6E、図6D、および図6Fは、尿試料中の、CIDを使用した m/z 85 (A)、115 (B)、129 (C)、159 (D)、およびHCDを使用した m/z 85 (E)、159 (F)の化合物Aの MS^3 スペクトルを示す。

【図7】早期の溶出ピークの収集画分の濃縮残留物の ^1H NMR (700 MHz)を示し、スルホキシドを示している。

【図8】回収画分の濃縮残留物のLC/MS/MSクロマトグラムおよびスペクトルを示し、2.42および2.53分でスルホキシド、ならびにそれらに対応する MS^2 スペクトルを示している。

【図9】ウィッティヒ生成物の混合物のLC/MSクロマトグラムを示し、2.14、2.32、2.42、および2.53分で微量成分としてのスルホキシドの存在、ならびにそれぞれ4.45および4.49分で保護トランスおよびシスチオエノールエーテルを示している。

【図10】収集画分の濃縮残留物のLC/MSクロマトグラムおよびスペクトルを示し、それぞれ2.42および2.53分で m/z 273.08049および273.08046を有するスルホキシド、ならびに微量成分として4.45分で m/z 257.08545を有する保護トランスチオエノールエーテルを示している。

【図11】トランスDMTPA (2.54分、上)、シスおよびトランスDMTPAの混合物 (それぞれ2.21分および2.53分、中央)、ならびにそれらの同時注入 (下)のLC/MSクロマトグラムを示す。

【図12】尿試料中の重水素交換化合物AのフルスキャンLC/MSクロマトグラムおよび質量スペクトルを示す。

【図13A】CIDを使用した、尿試料中の重水素交換化合物Aの MS^2 スペクトルを、拡大図とともに示す。

【図13B】CIDを使用した、尿試料中の重水素交換化合物Aの MS^2 スペクトルを、拡大図とともに示す。

【図14】図14Aおよび図14Bは、CIDを使用した、尿試料中の重水素交換化合物Aの m/z 160の MS^3 スペクトル (A) を、拡大図 (B) とともに示す。

【図15】図15Aおよび図15Bは、CIDを使用した、尿試料中の重水素交換化合物Aの m/z 161の MS^3 スペクトル (A) を、拡大図 (B) とともに示す。

【図16】図16A、図16B、図16C、図16D、および図16Eは、CIDを使用した、尿試料中の重水素交換化合物Aの m/z 130 (A)、131 (B)、86 (C)、87 (D)、および116 (E)の MS^3 スペクトルを示す。

【図17】図17A、図17B、図17C、および図17Dは、尿試料中の水素化化合物AのLC/MS質量スペクトル (A~B) およびクロマトグラム (D) を示す。パネルCは、水素化後に存在しない元の化合物A (約2.5分)の抽出イオンクロマトグラムを示す。

【図18A】CIDを使用した、尿試料中の水素化化合物Aのプロダクトイオンスペクトル (MS^2) を、拡大図とともに示す。

【図18B】CIDを使用した、尿試料中の水素化化合物Aのプロダクトイオンスペクトル (MS^2) を、拡大図とともに示す。

【図19】図19Aおよび図19Bは、CID (A)、またはHCD (B)を使用した、尿試料中の水素化化合物Aの m/z 131の MS^3 スペクトルを示す。

【図20】尿試料中の水素化化合物Aの重水素化種のLC/MSクロマトグラムおよび質量スペクトルを示す。

【図21A】CIDを使用した、尿試料中の水素化化合物Aの重水素化種のプロダクトイオンスペクトル (MS^2) を、拡大図とともに示す。

【図21B】CIDを使用した、尿試料中の水素化化合物Aの重水素化種のプロダクトイオンスペクトル (MS^2) を、拡大図とともに示す。

【図22】CIDを使用した、尿試料中の水素化化合物Aの重水素化種の m/z 132の

10

20

30

40

50

MS³ スペクトルを示す。

【図 23】CID を使用した、尿試料中の水素化化合物 A の重水素化種の m/z 133 の MS³ スペクトルを示す。

【図 24】合成シスおよびトランスDMTPA の LC/MS クロマトグラムおよび質量スペクトルを示す。

【図 25】図 25A、図 25B、および図 25C は、尿試料中の化合物 A (2.53 分) (A)、合成シスおよびトランスDMTPA、それぞれ 2.20 および 2.53 分 (B)、ならびにそれらの同時注入 (C) の LC-MS クロマトグラム) を示す。

【図 26A】CID を使用した、合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 26B】CID を使用した、合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 27A】HCD を使用した、合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 27B】HCD を使用した、合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 28】図 28A、図 28B、図 28C、および図 28D は、CID を使用した、合成トランスDMTPA の m/z 115 (A)、129 (B)、159 (C)、および 85 (D) の MS³ スペクトルを示す。

【図 29】図 29A および図 29B は、HCD を使用した、合成トランスDMTPA の m/z 159 (A) および 85 (B) の MS³ スペクトルを示す。

【図 30】図 30A および図 30B は、合成トランスDMTPA の重水素種 (A) および尿試料中の重水素種化合物 A (B) のフルスキャン質量スペクトルを示す。

【図 31A】CID を使用した、重水素化合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 31B】CID を使用した、重水素化合成トランスDMTPA のプロダクトイオンスペクトル (MS²) を、拡大図とともに示す。

【図 32】CID を使用した、重水素化合成トランスDMTPA の m/z 160 の MS³ スペクトルを、拡大図とともに示す。

【図 33】CID を使用した、重水素化合成トランスDMTPA の m/z 161 の MS³ スペクトルを、拡大図とともに示す。

【図 34】精製したウィッティヒ反応生成物 (保護シスおよびトランスチオエノールエーテルの混合物) の ¹³C NMR スペクトルを示す。

【図 35】精製したウィッティヒ反応生成物 (保護シスおよびトランスチオエノールエーテルの混合物) の LC/MS クロマトグラムおよび質量スペクトルを示す。

【図 36】CID を使用した、精製したウィッティヒ反応生成物のプロダクトイオンスペクトル (MS²) (室温、2.81 分) を、拡大図とともに示す。

【図 37】CID を使用した、精製したウィッティヒ反応生成物のプロダクトイオンスペクトル (MS²) (室温、2.98 分) を、拡大図とともに示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語は、次のように定義される。

【0023】

本発明の化合物は、塩の形態で存在し得る。本発明には、任意の好適な有機または無機塩が含まれる。ある特定の実施形態では、本発明の化合物の塩は、非毒性の「薬学的に許容可能な塩」を指す。「薬学的に許容可能な」という語句は、本明細書では、信頼できる医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わず、妥当な利益/リスク比に見合う、人間および動物の組織と接触して使用す

10

20

30

40

50

るのに好適な化合物、材料、組成物、および／または剤型を指すために用いられる。

【0024】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な塩」とは、親化合物がその酸性塩または塩基塩を作製することによって修飾されている、開示の化合物の誘導体を指す。薬学的に許容可能な塩の形態としては、薬学的に許容可能な酸性／アニオン性または塩基性／カチオン性の塩が挙げられる。薬学的に許容可能な塩の例としては、限定されないが、アミンなどの塩基性残基の鉱酸塩または有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられる。

【0025】

例えば、かかる塩としては、酢酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、ベンジル酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、二塩酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エタンジスルホン酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グリセプテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコール酸塩、グリコリルアルサニル酸塩 (glycollylarsanilate)、ヘキシルレゾルシン酸塩 (hexylresorcinate)、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メタンスルホン酸塩、メシル酸塩、臭化メチル、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムチン酸、ナプシル酸塩、硝酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩、パントテン酸塩、フェニル酢酸塩、リン酸塩／ニリン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、プロピオン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、亜酢酸塩、コハク酸塩、スルファミド、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクル酸塩、トシル酸塩、トリエチオダイド、アンモニウム、ベンザチン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン、およびプロカイン塩が挙げられる。さらなる薬学的に許容可能な塩は、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛などのような金属からのカチオンで形成することができる。(Pharmaceutical salts, Birge, S. M. et al., J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19も参照されたい)。

【0026】

本発明の薬学的に許容可能な塩は、従来の化学的方法によって、塩基性または酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。一般に、かかる塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基の形態を、水中、またはエーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール、もしくはアセトニトリル、もしくはそれらの混合物のような有機希釈剤中で十分な量の適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができる。

【0027】

例えば、本発明の化合物を精製または単離するために有用である、上記のもの以外の酸の塩（例えば、トリフルオロ酢酸塩）もまた、本発明の一部を構成する。

【0028】

本発明の化合物は、異性体の特異的合成または異性体混合物からの分解のいずれかによって、個々の異性体として調製してもよい。従来の分解技法としては、光学活性酸を使用して異性体対の各異性体の遊離塩基の塩の形成（続いて分別結晶化および遊離塩基の再生成）、光学活性アミンを使用して異性体対の酸の形態の各異性体の塩の形成（続いて分別結晶化および遊離酸の再生成）、光学的に純粋な酸、アミン、もしくはアルコールを使用して異性体対の各異性体のエステルもしくはアミドの形成（続いてキラル補助剤のクロマトグラフィー分離および除去）、または様々な周知のクロマトグラフィー方法を使用して、出発物質または最終生成物のいずれかの異性体混合物を分解することが挙げられる。

【0029】

開示の化合物の立体化学が構造によって命名または描写されるとき、その命名または描写された立体異性体は、他の立体異性体と比較して、重量で少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、または99.9%純粋である。単一のエナンチオマー

10

20

30

40

50

が構造によって命名または描写されるとき、その描写または命名されたエナンチオマーは、重量で少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、または99.9%光学的に純粋である。重量での光学純度パーセントは、エナンチオマーの重量とその光学異性体の重量との合計に対するエナンチオマーの重量の比である。

【0030】

開示の化合物が立体化学を示さずに構造によって命名または描写され、化合物が少なくとも1つのキラル中心を有するとき、その名称または構造は、対応する光学異性体を含まない化合物のうちの1つのエナンチオマー、化合物のラセミ体混合物、およびその対応する光学異性体と比較して1つのエナンチオマーが豊富な混合物を包含すると理解されるべきである。

10

【0031】

開示の化合物が立体化学を示さずに構造によって命名または描写され、少なくとも2つのキラル中心を有するとき、その名称または構造は、他のジアステレオマーを含まないジアステレオマー、他のジアステレオマー対を含まないジアステレオマー対、ジアステレオマーの混合物、ジアステレオマー対の混合物、1つのジアステレオマーが他のジアステレオマー（複数可）と比較して豊富であるジアステレオマーの混合物、および1つのジアステレオマー対が他のジアステレオマー対（複数可）と比較して豊富であるジアステレオマー対の混合物、を包含すると理解されるべきである。

【0032】

1つ以上の立体中心を有する化合物が、少なくとも1つの立体中心に対して特定の立体化学を用いて描写されるとき、本発明はまた、対応する立体中心（複数可）で反対の立体化学を有する化合物、および対応する立体中心（複数可）で特定の立体化学を有さない化合物も含む。

20

【0033】

状態または疾患を「治療すること」とは、状態または疾患の少なくとも1つの症状を治癒、ならびに寛解することを指す。

【0034】

本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、任意の動物を意味するが、好ましくは、例えば、ヒト、サル、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、またはウサギなどの哺乳動物である。さらに好ましくは、対象はヒトである。

30

【0035】

本明細書で使用される場合、「有効量」とは、対象に所望の生体応答を誘発する活性化化合物薬剤の量を意味する。かかる応答は、治療されている疾患または障害の症状の緩和を含む。かかる療法的な方法における本発明の化合物の有効量は、約0.01mg/kg/日～約1000mg/kg/日、または約0.1mg/kg/日～約100mg/kg/日である。

【0036】

本発明の化合物または1つ以上の追加の化合物の「レベル」とは、試料中で測定された化合物の絶対もしくは相対量、または濃度を意味する。

【0037】

40

「試料」または「生体試料」とは、対象から単離された生体物質を意味する。生体試料は、所望の化合物を検出するのに好適な任意の生体物質を含有し得、対象からの細胞性および/または非細胞性物質を含み得る。試料は、例えば、腎臓組織、血液、血漿（blood plasma）（血漿（plasma））、血清（blood serum）（血清（serum））、尿、唾液、または脳脊髄液（CSF）などの任意の好適な生体組織または体液から単離してもよい。好ましくは、生体試料は、血液、血漿、血清、唾液、または尿である。別の好ましい実施形態では、生体試料は、血清または血漿である。

【0038】

「参照レベル」とは、特定の病状、表現型、またはそれらの欠如、ならびに病状、表現型、またはそれらの欠如の組み合わせを示す、本発明の化合物または追加の化合物（複数

50

可)のレベルを意味する。「参照レベル」は、本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の絶対もしくは相対量もしくは濃度、本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の存在もしくは不在、本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の量もしくは濃度の範囲、本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の最小および／もしくは最大の量もしくは濃度、本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の平均量もしくは濃度、ならびに／または本発明の化合物もしくは追加の化合物(複数可)の中央量もしくは濃度であってもよく、加えて、本発明の化合物と追加の化合物(複数可)との組み合わせの「参照レベル」はまた、2つ以上の化合物の互いに対する絶対もしくは相対量または濃度の比であってもよい。特定の病状、表現型、またはその欠如に対する本発明の化合物または追加の化合物(複数可)の適切な参照レベルは、1人以上の適切な対象における本発明の化合物または所望の化合物のレベルを測定することによって決定することができる。「正の」参照レベルとは、特定の病状または表現型を示すレベルを意味する。「負の」参照レベルとは、特定の病状または表現型の欠如を示すレベルを意味する。

【0039】

本明細書で使用される場合、「参照試料」とは、参照レベルの化合物を含有する試料を指す。例えば、参照試料は、CKDまたは急性腎臓傷害などの特定の疾患、病状、または表現型を有さない対象から得ることができる。

【0040】

「糸球体濾過量」または「GFR」は、単位時間あたりに腎糸球体毛細血管からボーマン嚢に濾過される体液の体積である。GFRは、ある特定の閾値以上のGFRが正常な腎臓機能を示し、閾値未満のGFRが腎臓機能の弱まりまたは障害を示す、腎臓機能の測定基準である。一般に、高いGFR値は良好な腎臓機能を示し、低いGFRは腎臓機能障害(例えば、慢性腎臓疾患、急性腎臓傷害)を示す。

【0041】

「測定糸球体濾過量」または「mGFR」とは、イヌリン、イオタラミック酸塩またはイオヘキソールなどの濾過マーカを使用して決定される実際の糸球体濾過量を意味し、mGFRは、臨床環境で実施され、腎機能の最も正確な測定値である。

【0042】

「推定糸球体濾過量」または「eGFR」とは、実際の糸球体濾過量の計算された推定値を意味する。計算値は、1つ以上の化合物またはバイオマーカのレベルに基づく場合があり、人口統計学的情報(例えば、年齢または性別)などの他の変数を含み得る。eGFRを計算するための現在の1つの方法は、血清クレアチニン濃度に基づく。eGFRを計算するための他の現在の方法は、シスタチンCの量を単独で、または血清クレアチニンの量と組み合わせて使用する。GFRを推定するための現在使用されている等式としては、「慢性腎臓病疫学共同研究」(CKD-EPI)および「腎疾患eGFRの食事療法の変更(Modification of Diet in Renal Disease eGFR)」(MDRD)が挙げられる。一般に、低いeGFR値は、腎臓機能の低下と関連している。

【0043】

「尿アルブミン」は、尿中のアルブミン量を測定する試験であり、腎臓疾患の検出にも使用される。

【0044】

「血清クレアチニン」または「SCr」とは、血清中のクレアチニンの測定値を指し、GFRの推定に通常使用される。

【0045】

「血中尿素窒素」または「BUN」とは、血液中の尿素の形態の窒素量の測定値を指す。BUNは、腎臓機能を測定するために使用される試験である。

【0046】

「慢性腎臓疾患」または「CKD」は、腎臓に損傷を与え、腎臓が身体から老廃物を除去する能力の低下を生じ、身体内に高レベルの老廃物を生じ、病気のリスクの増加、なら

10

20

30

40

50

びに高血圧、貧血、栄養健康不良、および神経損傷などの合併症の発症に至る、状態を含む。少なくとも3か月間腎臓機能に異常がある患者は、CKDと診断することができる。CKDに起因する腎臓損傷は永続的である。

【0047】

「急性腎臓傷害」または「AKI」とは、腎臓機能の急速な喪失がある状態を指す。AKIに起因する腎臓損傷は可逆的な場合がある。

【0048】

「慢性腎臓疾患ステージ」または「CKDステージ」とは、測定または推定糸球体濾過量(mGFR、eGFR)を使用して現在評価されている腎臓損傷の程度を意味する。臨床的には、ステージ1(GFR>90)で正常、ステージ2(GFR60~89)で最小限の低下、ステージ3Aおよび3B(GFR30~59)で中程度の低下、ステージ4(GFR15~29)で重度の低下、ステージ5(GFR<15、または透析中)で確立された腎不全とも称される非常に重度または末期の腎臓不全とみなされる腎臓機能を用いる、5つのステージのCKDが一般に認識されている。腎臓機能ステージは、任意の時間量の間存在する腎臓損傷(すなわち、AKIまたはCKDに起因する腎臓損傷)を指すために使用することができる。

【0049】

本発明は、本発明の非限定的な実施形態を例示することを目的とする次の詳細な説明および実施例を参照することにより、より完全に理解することができる。

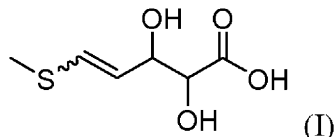
【0050】

化合物および組成物

本発明は、新規化合物、組成物、合成する方法、検出方法、ならびに診断方法および治療方法におけるそれらの使用を提供する。

【0051】

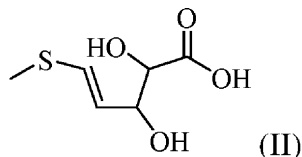
第1の実施形態では、本発明は、次式：



によって表される化合物またはその塩を提供する。

【0052】

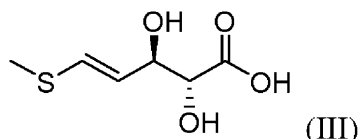
ある特定の実施形態では、第1の実施形態における式(I)の化合物は、次式：



によって表されるか、またはその塩である。

【0053】

ある特定の実施形態では、第1の実施形態における式(I)または式(II)の化合物は、次式：

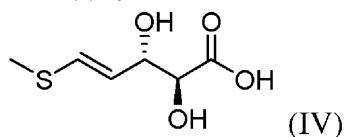


によって表されるか、またはそれらの塩である。

【0054】

ある特定の実施形態では、第1の実施形態における式(I)または式(II)の化合物

は、次式：



によって表されるか、またはそれらの塩である。

【0055】

一実施形態では、式 (I I)、(I I I)、もしくは (I V) の化合物またはそれらの塩は、少なくとも 60 % 光学的に純粋、少なくとも 70 % 光学的に純粋、少なくとも 80 % 光学的に純粋、少なくとも 90 % 光学的に純粋、少なくとも 95 % 光学的に純粋、または少なくとも 99 % 光学的に純粋である。

10

【0056】

様々な実施形態では、本明細書に記載の本発明の化合物 (例えば、式 (I)、(I I)、(I I I)、もしくは (I V) によって表される化合物またはそれらの塩) は、実質的に不純物を含まない。

【0057】

様々な実施形態では、本明細書に記載の本発明の化合物 (例えば、式 (I)、(I I)、(I I I)、もしくは (I V) によって表される化合物またはそれらの塩) は、少なくとも 60 % 純粋、少なくとも 70 % 純粋、少なくとも 80 % 純粋、少なくとも 90 % 純粋、少なくとも 95 % 純粋、または少なくとも 99 % 純粋である。

20

【0058】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本発明の化合物 (例えば、式 (I)、(I I)、(I I I)、もしくは (I V) によって表される化合物またはそれらの塩) は、同位体標識されている。一実施形態では、式 (I)、(I I)、(I I I)、もしくは (I V) の化合物またはそれらの塩は、トリチウム (³H)、または炭素 14 (¹⁴C) などで放射性標識されている。別の実施形態では、式 (I)、(I I)、(I I I)、もしくは (I V) の化合物またはそれらの塩は、重水素、炭素 13 (¹³C)、酸素 17 (¹⁷O)、酸素 18 (¹⁸O)、硫黄 33 (³³S)、硫黄 34 (³⁴S)、または他の既知の硫黄同位体、またはそれらの組み合わせで標識されている。本発明の化合物の同位体標識のための任意の好適な方法を使用することができる。

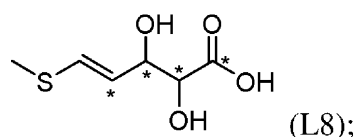
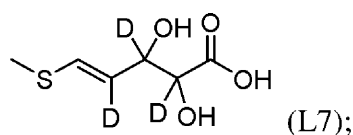
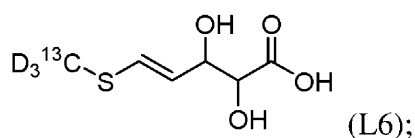
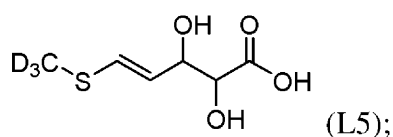
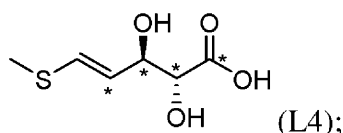
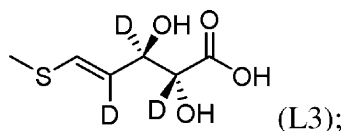
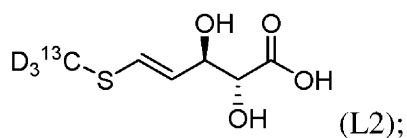
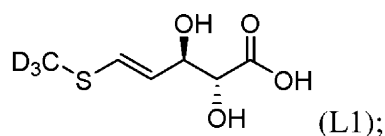
30

【0059】

ある特定の実施形態では、本発明の同位体標識化合物は、次式：

40

50



(式中、*は、 ^{13}C を示す) によって表されるか、または薬学的に許容可能なその塩である。

【0060】

式(I)、(II)、(III)、(IV)、(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、もしくは(L8)の化合物またはそれらの塩(例えば、薬学的に許容可能な塩)などの上記の化合物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかで使用することができる。例えば、本発明の化合物を使用して、対象における腎臓機能を評価し、対象における糸球体濾過量の推定値を計算し、対象をモニタリングして腎臓機能の変化(例えば、急性腎臓傷害または初期のCKDを示し得る機能低下)を検出し、腎臓機能の程度(例えば、正常、軽度の低下、中程度の低下、重度の低下、末期腎臓不全)に従って対象を分類し、CKDと診断されていない対照対象に対してCKDを有する対象を区別することができる。さらに、化合物を使用して、経時的な腎臓機能の変化、または薬物治療への応答、疾患(例えば、II型糖尿病)、または生活習慣介入(例えば、食事、運動)をモニタリングし、薬物療法および／または腎臓移植に好適な候補者として対象を特定または除外することができる。

【0061】

10

20

30

40

50

また本発明には、本明細書に記載の化合物（例えば、式（Ⅰ）、（ⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ）、もしくは（ⅠⅤ）の化合物またはそれらの塩（例えば、薬学的に許容可能な塩））に特異的に結合する抗体または抗体断片も含まれる。小分子に特異的に結合する抗体を生成するための方法は、当技術分野で既知である。上記の抗体のV_HおよびV_L配列を含むポリペプチドなどの抗体誘導体も含まれる。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、融合タンパク質である。本発明はまた、本明細書に記載の抗体または抗体断片、および抗体誘導体を生成するための細胞を含む。一実施形態では、細胞は、真核細胞である。

【0062】

方法

第2の実施形態では、本発明は、対象における本発明の化合物（例えば、式（Ⅰ）、（ⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ）、もしくは（ⅠⅤ）の化合物またはそれらの塩）のレベルを決定するための方法であって、（1）対象から得られた生体試料から分析用試料を調製することと、（2）化合物のレベルを決定することと、を含む、方法を提供する。

10

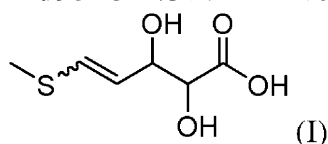
【0063】

生体試料は、試料中の本発明の化合物（例えば、式（Ⅰ）、（ⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ）、もしくは（ⅠⅤ）の化合物またはそれらの塩）のレベルを決定するために分析される。試料を分析する方法としては、クロマトグラフィー（例えば、HPLC、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー）、質量分析法（例えば、MS、MS-MS）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、抗体結合、イムノブロットイング、免疫組織化学（IHC）、他の免疫化学的手法、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

20

【0064】

例示的な方法では、対象から得られた生体試料中の式（Ⅰ）：



の化合物またはその塩のレベルを決定することは、質量分析法を使用して、式（Ⅰ）の化合物のレベルを決定することを含む。

【0065】

一実施例では、生体試料は、質量分析法の前に液体クロマトグラフィー（LC）を施してもよい。LC方法としては、例えば、高速LC（HPLC）、または超高速LC（UHPLCまたはUPLC）を挙げることができる。いくつかの実施例では、HPLCまたはUPLCは、逆相カラムクロマトグラフィーシステム、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、イオン交換クロマトグラフィー、または混合相カラムクロマトグラフィーシステムを使用して行うことができる。

30

【0066】

質量分析法は、断片化された試料をイオン化し、さらに分析するために荷電分子を作り出すためのイオン源を含む質量分析器を使用して実施される。試料のイオン化は、例えば、加熱エレクトロスプレーイオン化（HESI-ESI）によって実施することができる。試料は、ポジティブモードまたはネガティブモードでイオン化してもよい。

40

【0067】

試料がイオン化された後、正または負に帯電したイオンを分析して、質量電荷比を決定することができる。質量電荷比を決定するための例示的な好適な分析器としては、四重極分析器、イオントラップ分析器、フーリエ変換質量分析法（FTMS）分析器、および飛行時間分析器が挙げられる。

【0068】

いくつかの実施形態では、質量分析法によって試料中の化合物Aのレベルを決定するための方法は、約177、159、133、131、129、115、113、111、101、100、99、89、85、83、75、73、57.03、57.00、56、

50

97、87、74、84、および67の質量電荷比 (m/z) を有するイオンからなる群から選択される、1つ以上のイオンを検出することを含む。

【0069】

分析結果は、タンデムMSによって生成されたデータを含み得る。いくつかの実施例では、タンデムMSは、精密質量タンデムMSであってもよい。例えば、精密質量タンデム質量分析法は、四重極飛行時間型 (Q-TOF) 分析器を使用してもよい。他の実施例では、タンデムMSは、FTMSであってもよい。タンデムMSは、複雑な混合物中の化学成分の親娘の関係性を表すデータ構造を作成することを可能にする。この関係は、娘イオンが親イオンのサブコンポーネントを表す、親イオンと娘イオンとの互いに対する関係性を示すツリー様の構造によって表すことができる。

10

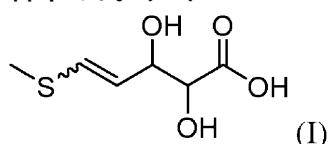
【0070】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物 (例えば、式 (I)、(II)、(III)、もしくは (IV)) の化合物またはそれらの塩 (例えば、薬学的に許容可能な塩) のレベルを使用して、例えば、対象における腎臓機能を評価し、対象における糸球体濾過量の推定値を計算し、対象をモニタリングして腎臓機能の変化 (例えば、急性腎臓傷害または初期のCKDを示し得る機能低下) を検出し、腎臓機能の程度 (例えば、正常、軽度の低下、中程度の低下、重度の低下、末期腎臓不全) に従って対象を分類し、CKDと診断されていない対照対象に対してCKDを有する対象を区別することができる。さらに、化合物を使用して、経時的な腎臓機能の変化、または薬物治療への応答、疾患 (例えば、II型糖尿病)、または生活習慣介入 (例えば、食事、運動) をモニタリングし、薬物療法および/または腎臓移植に好適な候補者として対象を特定または除外することができる。

20

【0071】

例示的な方法では、対象における腎臓機能を評価することは、対象から得られた生体試料中の式 (I) :



の化合物またはその塩のレベルを決定することを含み、基準レベルと比較して生体試料中の化合物の上昇したレベルが、対象における腎臓機能の低下を示す。

30

【0072】

第3の実施形態では、本発明は、患者における推定糸球体濾過量 (eGFR) を計算するための方法であって、(1) 対象から得られた生体試料中の式 (I) の化合物またはその塩のレベルを決定するステップと、(2) 化合物の測定されたレベルを利用するアルゴリズムを使用して eGFR を計算するステップであって、アルゴリズムが外因性濾過マーカーを使用して測定された GFR を使用して展開される、ステップと、を含む方法を提供する。化合物のレベルを決定するために、任意の好適な方法を使用することができる。一実施形態では、化合物のレベルは、クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、抗体結合、イムノブロットティング、免疫組織化学 (IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせを使用して決定される。

40

【0073】

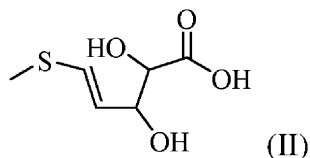
ある特定の実施形態では、eGFRは、腎臓機能の評価に関連する1つ以上の追加の化合物を使用して計算される。一実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノアート、エリトリトール、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカルニチン、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、キヌレニン、アラボナート、スクシニルカルニチン、リボース、キ

50

シロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカテコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2, N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、p-クレゾールスルフェート、およびN, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン (TMAP) から選択される。別の実施形態では、eGFRアルゴリズムは、血清シスタチンCレベルをさらに利用する。さらに別の実施形態では、eGFRアルゴリズムは、年齢、性別、および人種からなる群から選択される1つ以上の人口統計学的パラメータをさらに利用する。

【0074】

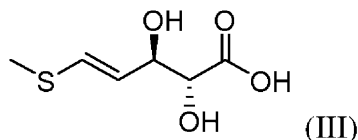
第4の実施形態では、第2および第3の実施形態に記載の方法のための式(I)の化合物は、式(II)：



によって表されるか、またはその塩である。

【0075】

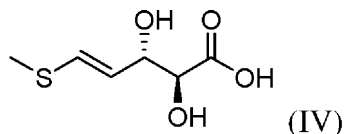
第5の実施形態では、第2および第3の実施形態に記載の方法のための式(I)または式(II)の化合物は、式(III)：



によって表されるか、またはそれらの塩である。

【0076】

第6の実施形態では、第2および第3の実施形態に記載の方法のための式(I)または式(II)の化合物は、式(IV)：



によって表されるか、あるいはそれらの塩である。

【0077】

第7の実施形態では、第2～第6の実施形態に記載の方法の化合物のレベルが、タンデム液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS/MS)によって決定される。

【0078】

第8の実施形態では、第2～第7の実施形態に記載の方法が、化合物の決定されたレベルを数学的モデルに使用して腎臓機能を評価することをさらに含む。

【0079】

第9の実施形態では、第2～第8の実施形態に記載の方法が、生体試料を分析して腎臓機能の評価に関連する1つ以上の追加の化合物のレベルを決定することをさらに含む。1つ以上の化合物は、次の化合物：シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノアート、エリトリール、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカミチン(camitine)、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、

10

20

30

40

50

キヌレニン、アラボナート、スクシニルカルニチン、リボース、キシロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカテコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2, N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、およびp-クレゾールスルフェート、およびN, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン (TMAP)、およびそれらの組み合わせからなる群から選択され得る。一実施形態では、追加の化合物は、シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、キヌレニン、myo-イノシトール、N, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン (TMAP)、およびクレアチニンからなる群から選択される。別の実施形態では、追加の化合物は、シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンからなる群から選択される。

10

【0080】

ある特定の実施形態では、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ以上の追加の化合物のレベルは、第9の実施形態に記載の方法で決定される。

【0081】

ある特定の実施形態では、第9の実施形態に記載の方法は、生体試料を分析してシュドウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、およびフェニルアセチルグルタミンのレベルを決定することをさらに含む。

20

【0082】

ある特定の実施形態では、第9の実施形態に記載の方法は、生体試料を分析してシュドウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンのレベルを決定することをさらに含む。

【0083】

本発明の化合物および1つ以上の追加の化合物のレベルを決定することは、記載の方法により高い感度および特異性を可能にすることができる。例えば、生体試料中の、2つの化合物またはある特定の化合物のレベルの比率を対で分析することによって、腎臓機能の評価におけるより高い感度および特異性、ならびに腎臓機能の評価の支援を可能にすることができる。

【0084】

式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物、および／または1つ以上の追加の化合物のレベル(複数可)は、単純な比較(例えば、手作業での比較)を含む、様々な技法を使用して腎臓機能の参照レベルと比較してもよい。生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物、および／または1つ以上の追加の化合物のレベル(複数可)はまた、1つ以上の統計的分析(例えば、t検定、ウェルチのT検定、ウィルコクソンの順位和検定、相関分析、ランダムフォレスト、Tスコア、Zスコア)を使用するか、あるいは数学的モデル(例えば、アルゴリズム、統計モデル)を使用して、参照レベルと比較してもよい。例えば、単一のアルゴリズムまたは多数のアルゴリズムを含む数学的モデルを使用して、対象における腎臓機能を評価してもよい。

30

【0085】

方法の結果は、対象における腎臓機能の評価に有用な他の方法および測定(またはそれらの結果)とともに使用することができる。例えば、BUN、Scr、および／または尿アルブミン測定値などの臨床パラメータ、β-2ミクログロブリン、β-TRACE、2-C-マンノピラノシルトリプトファンなどの腎臓機能のマーカー、ならびに例えばCKDの家族歴または他のリスク因子などの患者情報を化合物とともに使用することができる。

40

【0086】

ある特定の実施形態では、本発明の化合物および／または1つ以上の追加の化合物のレベルを、数学的または統計的モデルまたは式に使用して、腎臓機能のレベルおよび／または対象がAKIもしくはCKDを示し得る腎臓機能の弱まりを有する可能性を示す数値スコア(「腎臓機能スコア」)を医師に提供することができる。スコアは、化合物および／

50

または化合物の組み合わせの、臨床的に有意に変化した参照レベル（複数可）に基づく。参照レベルは、アルゴリズムから導出するか、あるいは障害のあるGFRのインデックスから算出することができる。対象の腎臓機能スコアを決定するための方法は、対象の腎臓機能スコアを決定するために、試料中の1つ以上の腎臓機能化合物のレベル（複数可）を1つ以上の化合物の腎臓機能参照レベルと比較することを含み得る。方法は、次のリスト：シュドウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノアート、エリトリトール、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカルニチン、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、キヌレニン、アラボナート、スクシニルカミチン（camitine）、リボース、キシロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカタコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2, N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、p-クレゾールスルフェート、およびN, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン（TMAP）から選択される任意の数の化合物を用いてもよい。複数の化合物は、回帰分析などの統計的方法を含む任意の方法によって、腎臓機能と相関させることができる。

【0087】

腎臓機能スコアを使用して、正常（すなわち腎臓機能障害がない）から軽度の低下、中程度の低下、重度の低下、または末期腎臓不全までの腎臓機能の範囲に対象を定めることができる。腎臓機能スコアの非限定的な使用例としては、腎臓機能の評価、GFRの推定、腎臓機能の分類、CKDの発症に対する感受性、AKI発症に対する感受性、CKDの診断およびステージ、定期的な決定および腎臓機能スコアのモニタリングによるCKD進行のモニタリング、腎臓移植レシピエントの腎臓機能状態のモニタリング、療法的介入に対する応答の決定、薬効の評価、ならびに治療剤および／または造影剤の耐性の決定が挙げられる。

【0088】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本発明の方法のための生体試料は、血液、血漿、血清、唾液、または尿である。一実施形態では、生体試料は、血漿である。別の実施形態では、生体試料は、血清である。

【0089】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本発明の方法のための生体試料は、糸球体濾過量の直接測定を可能にする薬剤を用いる治療の前に、対象から得られる。

【0090】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本発明の方法のための対象は、ヒトである。

【0091】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の本発明の方法のための対象は、腎臓機能障害の症状を有さないか、あるいは腎臓機能障害の既知のリスク因子を有さない。他の実施形態では、対象は、慢性腎臓疾患を発症するリスク因子（例えば、60歳以上、高血圧、糖尿病、心血管疾患、CKDの家族歴）を呈する。ある特定の実施形態では、対象は、高血圧または糖尿病と以前に診断されている。ある特定の実施形態では、対象の慢性腎臓疾患の家族歴。ある特定の実施形態では、対象は、腎臓機能障害の症状を有する。ある特定の実施形態では、対象は、従来の方法を使用した腎臓機能評価が困難である対象である。

【0092】

ある特定の実施形態では、対象は、肥満、痩せすぎ、菜食主義者、慢性の病気、および高齢者からなる群から選択される。

【0093】

ある特定の実施形態では、対象は、腎臓ドナーになる候補者である。

【0094】

ある特定の実施形態では、対象は、腎臓に毒性作用を有し得る薬剤を用いて治療されたか、あるいは該薬剤を用いる治療が検討されている。一実施形態では、薬剤は、造影剤である。別の実施形態では、薬剤は、化学療法剤などの、疾患または状態を治療するための治療剤である。さらに別の実施形態では、薬剤は、抗生物質である。

【0095】

ある特定の実施形態では、方法を使用して、CKDを有する対象またはCKDを発症する素因があると疑われる対象（例えば、CKDの家族歴、薬物療法、慢性の病気などに起因するリスクのある対象）における腎臓機能をモニタリングすることができる。一実施例では、本発明の化合物を使用して、CKDを有さない対象における腎臓機能をモニタリングしてもよい。例えば、CKDを発症する素因があると疑われる対象において、本明細書に記載の化合物を使用して、CKDの発症をモニタリングすることができる。

10

【0096】

キット

本発明は、生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩のレベルを測定するためのキットを含む。

【0097】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩を含む。

【0098】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩と、生体試料中の式(I)、(II)、(III)、または(IV)の化合物のレベルを測定するための指示書とを含む。

20

【0099】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、標識化合物（例えば、内部標準）、または生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩を検出することが可能な薬剤を含むことができる。

【0100】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、標識化合物（例えば、内部標準）、または生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物もしくはそれらの塩を検出することが可能な薬剤と、生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩のレベルを測定するための指示書とを含むことができる。

30

【0101】

一実施形態では、上記のキットの内部標準は、式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の標識化合物またはそれらの塩（例えば、式(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、もしくは(L8)の化合物またはそれらの塩）である。

【0102】

一実施形態では、本発明のキットは、式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の非標識化合物またはそれらの塩と、内部標準として式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の標識化合物またはその塩（例えば、式(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、もしくは(L8)の化合物、またはそれらの塩）と、生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩のレベルを測定するための指示書とを含む。

40

【0103】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、標識化合物（例えば、式(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、もしくは(L8)の化合物またはそれらの塩などの内部標準）を含むことができる。他の実施形態では、キットは、生体試料中の式(I)、(II)、(III)、もしくは(IV)の化合物またはそれらの塩を検出することが可能な薬剤と、試料中の化合物（例えば、式(I)、(II)、(

50

ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩に対する抗体)の量を決定するための手段と、を含んでもよい。

【0104】

ある特定の実施形態では、生体試料中の式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩の量は、本明細書に記載の本発明のキットを使用して、クロマトグラフィー、質量分析法、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、抗体結合、イムノブロットング、免疫組織化学(IHC)、他の免疫化学的方法、またはそれらの組み合わせによって決定することができる。ある特定の実施形態では、生体試料中の式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩の量は、クロマトグラフィー、質量分析法、またはそれらの組み合わせによって決定することができる。ある特定の実施形態では、生体試料中の式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩の量は、本発明のキットを使用して、LC-MSによって決定することができる。

10

【0105】

キットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤、または安定剤を含んでもよい。キットはまた、アッセイされ試験試料と比較することができる対照試料または一連の対照試料を含んでもよい。キットの各構成要素は通常、個々の容器内に封入され、すべての様々な容器は、試験対象が関連化合物に関連する障害を患っているか、あるいは発症するリスクがあるかどうかを決定するための指示書とともに単一のパッケージ内にある。

【0106】

いくつかの実施形態では、本発明のキットは、対象から得られた生体試料中で検出された化合物のレベルに基づいて、対象における腎臓機能を評価もしくはモニタリングするための、腎臓機能低下を発症する素因を決定するための、腎臓機能のレベルに従って対象を分類するための、CKDを診断もしくはモニタリングするための、AKIを診断もしくはモニタリングするための、または対象におけるGFRを推定するための指示書を含み得る。

20

【0107】

本発明のキットのある特定の実施形態では、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、または(ⅠⅤ)の化合物は、同位体標識されている。一実施形態では、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、または(ⅠⅤ)の化合物は、例えば、トリチウム(^3H)または炭素14(^{14}C)で放射性標識されている。別の実施形態では、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、または(ⅠⅤ)の化合物は、重水素化され、炭素13(^{13}C)、酸素17(^{17}O)、酸素18(^{18}O)、硫黄33(^{33}S)、硫黄34(^{34}S)、もしくは任意の他の既知の硫黄同位体、またはそれらの組み合わせで標識されている。別の実施形態では、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、または(ⅠⅤ)の標識化合物は、上記の式(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、または(L8)によって表される。一実施例では、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、または(ⅠⅤ)の標識化合物(例えば、式(L1)、(L2)、(L3)、(L4)、(L5)、(L6)、(L7)、もしくは(L8)の化合物またはそれらの塩)を、内部標準として使用することができる。

30

【0108】

本発明はまた、上記の式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩(例えば、薬学的に許容可能な塩)に特異的に結合する抗体または抗体断片を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、本発明のキットは、上記の抗体のV_HおよびV_L配列を含むポリペプチドなどの抗体誘導体を含む。一実施形態では、ポリペプチドは、融合タンパク質である。

40

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明のキットは、式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩(例えば、薬学的に許容可能な塩)に特異的に結合する抗体または抗体断片と、生体試料中の式(Ⅰ)、(ⅠⅠ)、(ⅠⅠⅠ)、もしくは(ⅠⅤ)の化合物またはそれらの塩のレベルを測定するための指示書とを含む。

【0110】

50

いくつかの実施形態では、本発明のキットは、上記の抗体、抗体断片、または抗体誘導体と、対象から得られた生体試料中で検出された化合物のレベルに基づいて、腎臓機能を評価もしくはモニタリングするための、GFRを推定するための、腎臓機能低下を発症する素因を決定するための、腎臓機能のレベルに従って対象を分類するための、対象における慢性腎臓疾患（CKD）を診断もしくはモニタリングするための、または急性腎臓傷害（AKI）を診断もしくはモニタリングするための指示書とを含む。

【0111】

ある特定の実施形態では、上記のキットは、1つ以上の追加のバイオマーカを含み、1つ以上の追加のバイオマーカが、腎臓機能の評価に関連している。本明細書に記載のいずれかの化合物は、本発明のキットで使用することができる。

【0112】

様々な実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、N-アセチルセリン、N-アセチルアラニン、N6-カルバモイルトレオニルアデノシン、4-アセトアミドブタノアート、エリトリトール、myo-イノシトール、エリトロナート、尿素、アラビトール、N2, N2-ジメチルグアノシン、N1-メチルアデノシン、3-メチルグルタリルカルニチン、S-アデノシルホモシステイン、N-アセチルメチオニン、N6-アセチルリシン、キヌレニン、アラボナート、スクシニルカルニチン、リボース、キシロナート、N-ホルミルメチオニン、O-メチルカテコールスルフェート、2-メチルブチリルカルニチン、フェニルアセチルグルタミン、N2, N5-ジアセチルオルニチン、トリプトファン、クレアチニン、ウラート、3-インドキシルスルフェート、p-クレゾールスルフェート、およびN, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン（TMAP）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、追加の化合物は、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、2-C-マンノピラノシルトリプトファン、キヌレニン、myo-イノシトール、N, N, N-トリメチル-L-アラニル-L-プロリンベタイン（TMAP）、およびクレアチニンからなる群から選択される。別の実施形態では、追加の化合物は、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンからなる群から選択される。

【0113】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、上記の本発明の化合物（式（I）、（II）、（III）、もしくは（IV）の化合物またはそれらの塩）、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、およびフェニルアセチルグルタミンを含む。

【0114】

ある特定の実施形態では、本発明のキットは、上記の本発明の化合物（式（I）、（II）、（III）、もしくは（IV）の化合物またはそれらの塩）、シュードウリジン、N-アセチルトレオニン、トリプトファン、フェニルアセチルグルタミン、およびクレアチニンを含む。

【0115】

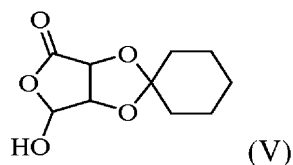
調製する方法

好適な合成する方法については、次のMarch, Advanced Organic Chemistry, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1985、またはWuts Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 5th edition, John Wiley & Sons 2014、およびRichard Larock, Comprehensive Organic transformations, 4th edition, VCH publishers Inc, 1989に記載の参考文献を参照してもよい。

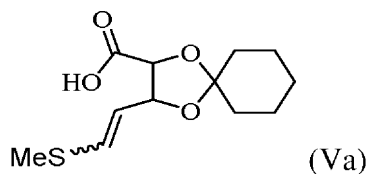
【0116】

第1の実施形態では、式（I）または式（II）の化合物は、

a) 式（V）：



の化合物またはそれらの塩を、 $R'_3P=CHSMe$ （式中、 R' は、 Ph または電子求引基である）（その共鳴構造 $R'_3P^+C^--HSMe$ によって表すこともできる）などのウィッティヒ試薬と反応させて、式（Va）：

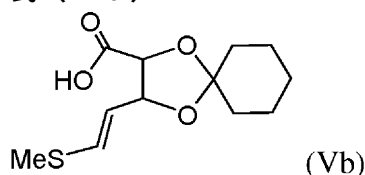


の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式（Va）の化合物またはその塩を脱保護して、式（I）の化合物またはその塩を形成するステップと
を含む方法によって調製することができる。

【0117】

ある特定の実施形態では、第1の実施形態の方法は、式（Va）の化合物を精製して、式（Vb）：



の化合物を得、続いて式（Vb）の化合物を脱保護して式（II）の化合物またはその塩を形成することをさらに含む。

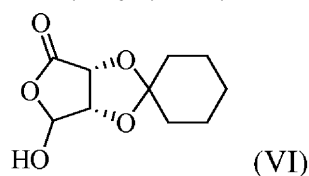
【0118】

ある特定の実施形態では、第1の実施形態の方法は、式（I）の化合物またはその塩を精製して、トランス異性体とシス異性体とを分離して、式（II）の化合物またはその塩を得ることをさらに含む。

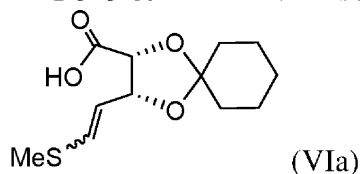
【0119】

第2の実施形態では、本発明は、式（III）の化合物を調製する方法であって、

a) 式（VI）：

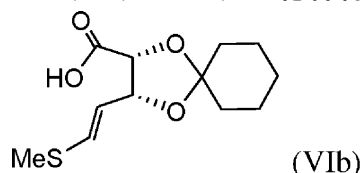


の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'_3P=CHSMe$ （式中、 R' は、 Ph または電子求引基である）と反応させて、式（VIa）：



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) (V I a) の化合物またはその塩を精製して、式 (V I b) :



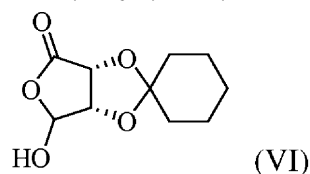
の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (V I b) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の化合物またはその塩を形成するステップと
を含む方法を提供する。

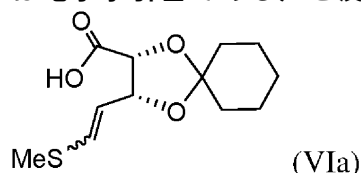
【0120】

あるいは、第3の実施形態では、式 (I I I) の化合物またはその塩は、

a) 式 (V I) :

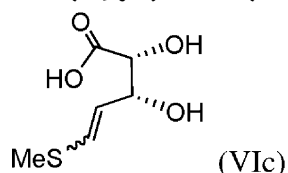


の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R'P=CHSMe$ (式中、 R' は、 Ph または電子求引基である) と反応させて、式 (V I a) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V I a) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (V I c) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (V I c) の化合物またはその塩を精製して、式 (I I I) の化合物またはその塩を得るステップと
を含む方法によって調製することができる。

【0121】

ある特定の実施形態では、第1、第2、または第3の実施形態の方法における脱保護反応は、酸の存在下で行うことができる。任意の好適な酸を使用することができる。例示的な酸としては、限定されないが、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム、p-トルエンスルホン酸 ($p-TsOH$)、ギ酸、または水素の形態の強もしくは弱カチオン交換樹脂が挙げられる。ある特定の実施形態では、酸は、Dowex (登録商標) 50WX8 樹脂である。

【0122】

ある特定の実施形態では、式 (I V) の化合物またはその塩は、式 (V I) の化合物を

10

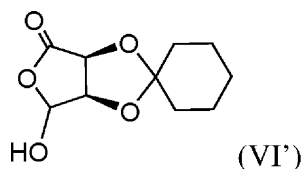
20

30

40

50

式 (VI') の化合物で置き換えた第 2 または第 3 の実施形態に記載の方法に従って調製することができる：



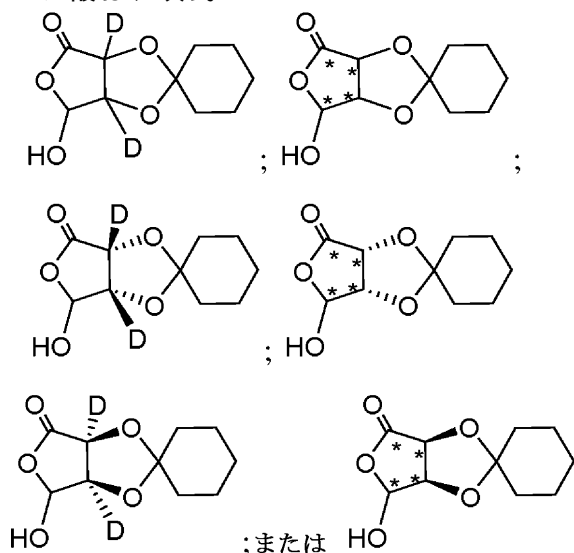
。

【0123】

ある特定の実施形態では、式 (I)、(II)、(III)、または (IV) の同位体標識化合物は、同位体標識出発物質および／または試薬を使用して調製することができる。一実施形態では、同位体標識ウィッティヒ試薬を、第 1、第 2、または第 3 の実施形態に記載の方法で使用して、式 (I)、(II)、(III)、または (IV) の同位体標識化合物を調製することができる。一実施形態では、同位体標識ウィッティヒ試薬は、 $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2\text{SCD}_3$ である（その共鳴構造 $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{C}^-\text{HSCD}_3$ によって表すこともできる）。別の実施形態では、同位体標識ウィッティヒ試薬は、 $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2\text{S}^{13}\text{CD}_3$ である（その共鳴構造 $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{C}^-\text{HS}^{13}\text{CD}_3$ によって表すこともできる）。

【0124】

さらに別の実施形態では、同位体標識 2, 3-シクロヘキシリデン-エリトルロン酸を使用して、式 (I)、(II)、(III)、または (IV) の同位体標識化合物を調製することができる。一実施形態では、同位体標識 2, 3-シクロヘキシリデン-エリトルロン酸は、次式：

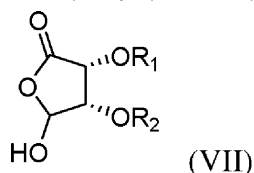


によって表され、式中、* は、 ^{13}C を示す。

【0125】

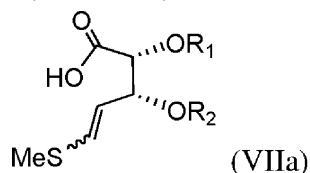
第 4 の実施形態では、式 (III) の化合物は、

a) 式 (VII) :



の化合物またはその塩を、 $\text{R}_3\text{P}=\text{CHSM e}$ などのウィッティヒ試薬と反応させて、式

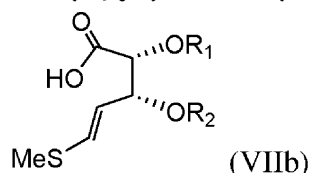
(VIIa)



(式中、R' は、Ph または電子吸引基であり、R₁ および R₂ は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の化合物またはその塩を精製して、式 (VIIb)

10



の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (VIIb) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (III) の化合物を形成するステップと

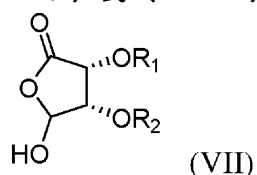
を含む方法によって調製することができる。

20

【0126】

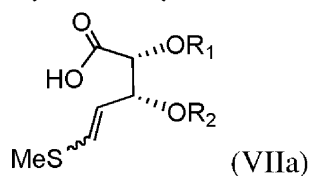
あるいは、第5の実施形態では、式 (III) の化合物は、

a) 式 (VII) :



の化合物またはその塩を、R₃P=CHSM e などのウィッティヒ試薬と反応させて、式 (VIIa)

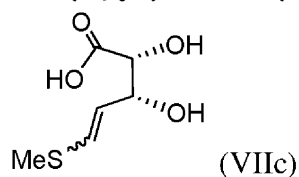
30



(式中、R' は、Ph または電子吸引基であり、R₁ および R₂ は、各々独立してシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (VIIa) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIc) :

40



の化合物またはその塩を形成するステップと、

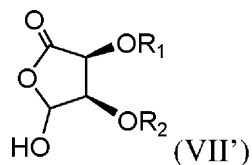
c) 式 (VIIc) の化合物またはその塩を精製して、式 (III) の化合物またはその塩を得るステップと

を含む方法によって調製することができる。

50

【0127】

ある特定の実施形態では、式（ⅠⅤ）の化合物またはその塩は、式（ⅤⅠⅠ）の化合物を式（ⅤⅠⅠ'）の化合物で置き換えた第4または第5の実施形態に記載の方法に従って調製することができる：

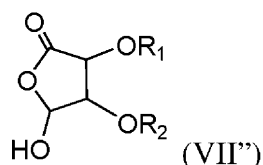


10

。

【0128】

ある特定の実施形態では、式（Ⅰ）、または（ⅠⅠ）の化合物は、式（ⅤⅠⅠ）の化合物を化合物式（ⅤⅠⅠ''）で置き換えた第4または第5の実施形態に記載の方法によって調製することができる：



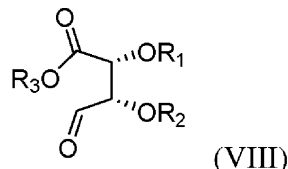
20

。

【0129】

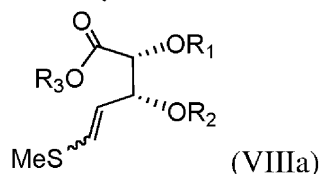
第6の実施形態では、式（ⅠⅠⅠ）の化合物またはその塩は、

a) 式（ⅤⅠⅠⅠ）：



30

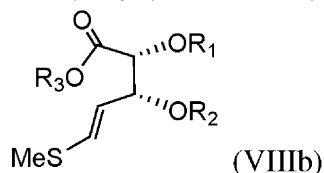
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 R_3PCH_2SMe と反応させて、式（ⅤⅠⅠⅠa）



（式中、 R' は、 Ph または電子求引性基であり、 R_1 および R_2 は、シリル基であり、 R_3 は t -ブチル基であるか、あるいは R_3 はシリル基である）の化合物またはその塩を形成するステップと、

40

b) 式（ⅤⅠⅠⅠa）の化合物またはその塩を精製して、式（ⅤⅠⅠⅠb）：



の化合物またはその塩を得るステップと、

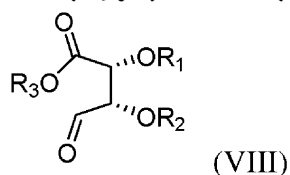
50

c) 式 (V I I I b) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (I I I) の化合物またはその塩を形成するステップと
を含む方法によって調製することができる。

【0130】

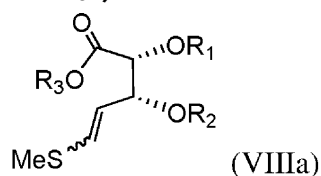
あるいは、第7の実施形態では、式 (I I I) の化合物またはその塩は、

a) 式 (V I I I) :



10

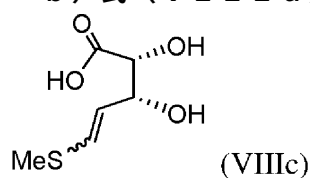
の化合物またはその塩を、ウィッティヒ試薬 $R_3P=CHSMe$ と反応させて、式 (V I I I a)



20

(式中、 R' は、Ph または電子求引性基であり、 R_1 および R_2 は、シリル基であり、 R_3 はtert-ブチル基であるか、あるいは R_3 はシリル基である) の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式 (V I I I a) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (V I I I c) :



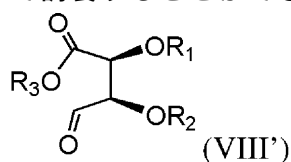
30

の化合物またはその塩を形成するステップと、

c) 式 (V I I I c) の化合物またはその塩を精製して、式 (I I I) の化合物またはその塩を得るステップと
を含む方法によって調製することができる。

【0131】

ある特定の実施形態では、式 (I V) の化合物またはその塩は、式 (V I I I) の化合物を式 (V I I I') の化合物で置き換えた第6または第7の実施形態に記載の方法によって調製することができる：



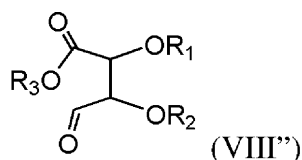
40

。

【0132】

ある特定の実施形態では、式 (I)、または (I I) の化合物は、式 (V I I I) の化合物を化合物式 (V I I I'') で置き換えた第4または第5の実施形態に記載の方法によって調製することができる：

50



。

【0133】

ある特定の実施形態では、上記の方法（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、第6、または第7の実施形態）におけるウィッティヒ試薬は、メチルチオメチルトリフェニルホスホニウムイリド（ $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHSMe}$ （その共鳴構造 $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{C}^-\text{HSMe}$ によって表すこともできる））である。

10

【0134】

ある特定の実施形態では、上記の方法（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、第6、または第7の実施形態）におけるウィッティヒ反応は、塩基の存在下で行われる。任意の適切な塩基を使用することができる。例示的な塩基としては、限定されないが、ナトリウムビス（トリメチルシリル）アミド、カリウムビス（トリメチルシリル）アミド、および *n*-ブチルリチウムが挙げられる。

【0135】

一実施形態では、上記の方法（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、第6、または第7の実施形態）におけるウィッティヒ反応は、ナトリウムビス（トリメチルシリル）アミドの存在下で行われる。

20

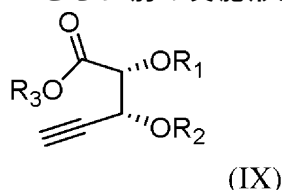
【0136】

ある特定の実施形態では、上記の方法（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、第6、または第7の実施形態）でのウィッティヒ反応は、有機溶媒中で行われる。限定されないが、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ジオキサン、ジエチルエーテル、メチルセーブチルエーテル、ジクロロメタンなどを含み得る、任意の好適な有機溶媒または有機溶媒の混合物を使用することができる。例えば、ウィッティヒ反応は、テトラヒドロフラン中で行われる。

【0137】

さらに別の実施形態では、式（III）の化合物またはその塩は、式（IX）：

30



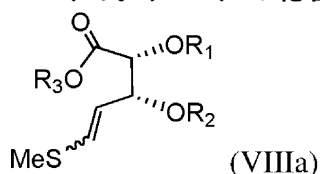
の化合物またはその塩を、メタンチオールまたはその塩と反応させることによって調製することができる（式中、 R_1 および R_2 は、各々独立してシリル基であり、 R_3 はセーブチル基であるか、あるいは R_3 はシリル基である）。

【0138】

40

第8の実施形態では、式（III）の化合物は、

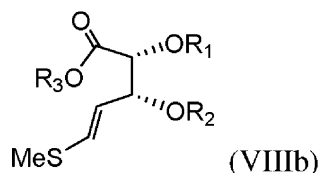
a) 式（IX）の化合物をメタンチオールと反応させて、式（VIIIa）：



の化合物またはその塩を形成するステップと、

b) 式（VIIIa）の化合物またはその塩を精製して、式（VIIIb）：

50



の化合物またはその塩を得るステップと、

c) 式 (VIIIb) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (III) の化合物またはその塩を形成するステップと

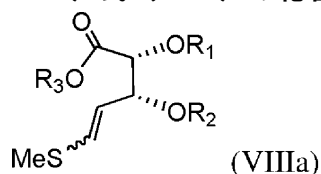
を含む方法によって調製することができる。

10

【0139】

第9の実施形態では、式 (III) の化合物は、

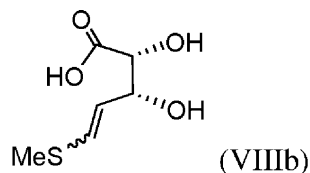
a) 式 (IX) の化合物をメタンチオールと反応させて、式 (VIIIa) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

20

b) 式 (VIIIa) の化合物またはその塩を脱保護して、式 (VIIIb) :



の化合物またはその塩を形成するステップと、

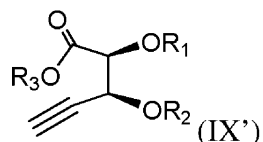
c) 式 (VIIIb) の化合物またはその塩を精製して、式 (III) の化合物またはその塩を得るステップと

30

を含む方法によって調製することができる。

【0140】

ある特定の実施形態では、式 (IV) の化合物またはその塩は、式 (IX) の化合物を式 (IX') の化合物によって置き換えた第7または第8の実施形態に記載の方法によって調製することができる：

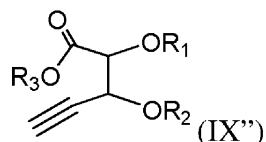


40

。

【0141】

ある特定の実施形態では、式 (I) もしくは (II) の化合物またはそれらの塩は、式 (IX) の化合物を式 (IX'') の化合物によって置き換えた第7または第8の実施形態に記載の方法によって調製することができる：



50

。

【0142】

ある特定の実施形態では、アルキンのヒドロチオール化反応（すなわち、第8または第9の実施形態におけるメタンチオールとの反応）は、合成アプローチに使用され得る。アルキンのヒドロチオール化は、例えば、UV照射、アゾビスイソブチロニトリル（AIBN）、カチオン性ロジウムとイリジウムとの錯体、トリウムとウランとの錯体、ロジウム錯体などのラジカル開始剤、炭酸セシウム、および／または金によって触媒され得る。

【0143】

ある特定の実施形態では（例えば、第4、第5、第6、第7、第8、または第9の実施形態では）、上記のシリル基としては、限定されないが、トリアキシルシリル（例えば、ジメチルイソプロピルシリル、ジエチルイソプロピルシリル、ジメチルヘキシルシリル、トリメチルシリル、またはトリイソプロピルシリル）、トリベンジルシリル、トリフェニルシリル、2-ノルボルニルジメチルシリル、tert-ブチルジメチルシリル、tert-ブチルジフェニルシリル、2-トリメチルエチルシリル（TEOC）、または〔2-（トリメチルシリル）エトキシ〕メチル〕が挙げられる。ある特定の実施形態では、シリル基は、トリアキシルシリル基である。ある特定の実施形態では、シリル基は、トリメチルシリルまたはトリス（トリメチルシリル）シリルである。

【0144】

保護基、R₁、R₂、およびR₃の除去は、保護基の性質に依存する。一実施形態では、保護基は、フッ化物および／または酸である脱保護試薬での処理によって除去することができる。ある特定の実施形態では、脱保護試薬としては、限定されないが、フッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム、トリス（ジメチルアミノ）スルホニウムジフルオロトリメチルシリケート、フッ化水素もしくはその溶媒和物、フッ化水素ピリジン、四フッ化ケイ素、ヘキサフルオロケイ酸、フッ化セシウム、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸ピリジニウム、p-トルエンスルホン酸（p-TsOH）、ギ酸、または過ヨウ素酸が挙げられる。ある特定の実施形態では、脱保護試薬は、塩酸またはフッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム（TBAF）である。ある特定の実施形態では、脱保護試薬は、フッ化水素-ピリジン（HF-ピリジン）である。

【0145】

ある特定の実施形態では（例えば、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、または第9の実施形態では）、上記の方法に記載の精製ステップは、任意の好適な精製方法によって行うことができる。ある特定の実施形態では、精製ステップは、シス異性体から対応するトランス異性体（二重結合のトランス配置）の分離を生じる。ある特定の実施形態では、トランス異性体とシス異性体との分離は、クロマトグラフィーまたは結晶化によって達成することができる。ある特定の実施形態では、トランス異性体とシス異性体との分離は、HPLCによって達成することができる。

【実施例】

【0146】

材料および方法

試薬および機器

質量分析法グレードのギ酸（約98%）、HPLCグレードのトリフルオロ酢酸（≥99.0%）、活性炭担持パラジウム（10%）、（メチルチオメチル）トリフェニルホスホニウムクロリド、無水テトラヒドロフラン、ナトリウムビス（トリメチルシリル）アミド（テトラヒドロフラン中1.0M）、2,3-シクロヘキリデン-*L*-エリトルロン酸、Dowex（登録商標）50WX8（水素形態、100~200メッシュ）、および一塩基性リン酸ナトリウムをSigma-Aldrichから、HPLCグレードのメタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、濃水酸化アンモニウム、および水をFisher Scientificから、酸化重水素（99.8%）をAcrosから入手した。混合にはFisher Scientificのボルテックスミキサーを使用した。50mLチューブの遠心分離にはThermo ScientificのSorvall ST40R遠

10

20

30

40

50

心分離機を、1.5 mLのエッペンドルフチューブの遠心分離にはSorvall Legend Micro 21 R微量遠心分離機を使用した。化学反応の混合には、Corning Laboratoryの磁気スターラを使用した。ヒト血漿 (K_2 -EDTA) は、Bioreclamationから入手し、 -80°C で保存した。ヒトの尿は家庭で収集された。Argonaut SPE DRY (商標) 96 DUAL蒸発器を溶媒の蒸発に使用した。すべてのNMR実験は、Bruker DRX 500または700 MHz機器で行った。

【0147】

クロマトグラフィー

特に明記されない限り、バイナリ溶VENTマネージャー、冷蔵試料マネージャー (12°C に設定)、およびカラムマネージャー (40°C に設定)を装備したWaters Acquity UPLCシステムを、逆相カラム (Waters ACQUITY UPLC (登録商標) BEH C18、 $1.7\mu\text{m}$ 、 $2.1\times 100\text{mm}$)を備えた液体クロマトグラフィーに使用した。最終試料溶液の $5.0\mu\text{L}$ のループ固定アリコートを実験に注入した。溶出液は、質量分析器のエレクトロスプレー源に直接導入した。流量は $350\mu\text{L}/\text{分}$ であり、溶出液は、質量分析器のエレクトロスプレー源に直接導入した。強ニードル洗浄液 ($200\mu\text{L}$)は未希釈のメタノールであり、弱ニードル洗浄液 ($600\mu\text{L}$)は、メタノールと水との混合物 ($0.5:99.5$)であった。シール洗浄液は、メタノールと水との混合物 ($10:90$)であった。

【0148】

クロマトグラフィー：塩基性条件

移動相Aは、水中 6.5mM の重炭酸アンモニウムであり、移動相Bは、メタノール/水 ($95:5$)中 6.5mM の重炭酸アンモニウムであった。線形勾配溶出は、 0% の移動相Bの初期条件で行い、これを 1.50 分間保持した。次いで、移動相Bを 0.50 分で 98% に増加させ、 0.90 分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、 0.10 分で 0% に戻した。合計実行時間は、 4.00 分であった。

【0149】

クロマトグラフィー：水素化生成物の条件、酸性条件

移動相Aは水中 0.1% のギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル中 0.1% のギ酸であった。線形勾配溶出は、 2% の移動相Bの初期条件で行い、これを 3.00 分間保持した。次いで、移動相Bを 0.40 分で 98% に増加させ、 0.50 分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、 0.10 分で 2% に戻した。合計実行時間は、 5.00 分であった。

【0150】

クロマトグラフィー：水素化生成物の条件、重水素化酸性条件

移動相Aは重水素化水中 0.1% のギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル中 0.1% のギ酸であった。線形勾配溶出は、 2% の移動相Bの初期条件で行い、これを 3.00 分間で 7% に増加させた。次いで、移動相Bを 0.40 分で 98% に増加させ、 0.50 分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、 0.10 分で 2% に戻した。合計実行時間は、 5.00 分であった。

【0151】

クロマトグラフィー：ウィッティヒ反応生成物の条件

移動相Aは水中 0.1% のギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル中 0.1% のギ酸であった。線形勾配溶出は、 38% の移動相Bの初期条件で行い、これを 3.00 分間で 45% に増加させた。次いで、移動相Bを 0.40 分で 98% に増加させ、 0.50 分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、 0.10 分で 38% に戻した。合計実行時間は、 5.00 分であった。

【0152】

クロマトグラフィー：二重結合決定の条件 (スルホキシド)

移動相Aは水中 0.1% のギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル中 0.1% のギ酸で

あった。線形勾配溶出は、20%の移動相Bの初期条件で行い、これを3.00分間で30%に増加させた。次いで、移動相Bを1.40分で98%に増加させ、0.50分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、0.10分で20%に戻した。合計実行時間は、6.00分であった。

【0153】

質量分析法

加熱エレクトロスプレーイオン化 (HESI-III) プローブを装備した Thermo Scientific Orbitrap Elite 質量分析器を、ネガティブモードで使用した。機器は、Orbitrap Elite (商標) 2.7、および XCalibur (商標) 2.2 ソフトウェア (後で 3.0 にアップグレード) によって制御した。加熱エレクトロスプレー源は、ヒーター温度 430 °C、シースガス 65、補助ガス流量 15、掃引ガス 0、イオンスプレー電圧 3.25 kV、キャピラリー温度 350 °C、および S レンズ RF レベル 60% に設定した。30,000 の分解能を使用して、質量範囲 m/z 100~600 のフルスキャン FTMS スペクトルを収集した。すべての断片化実験は、スキャン範囲 m/z 50~200、分解能 15,000、単離幅 1.0、活性化 $Q0.250$ 、および活性化時間 10.0 ms に設定した。すべての質量分析データは、ロックマスをなしで取得および処理し、外部質量較正を使用した。

【0154】

MS² 実験の正規化衝突エネルギーは、 m/z 177.02 (または重水素交換では 179.03) の CID MS² 実験では 28.0 eV で、対応する HCD MS² 実験では 100 eV であった。 m/z 177.02/159.01 (または重水素交換では 179.03/160.02 および 179.03/161.02) の CID MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ 26.0 および 25.0 eV であった。 m/z 177.02/159.01 の HCD MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1 (CID) および第2 (HCD) ステージの断片化でそれぞれ 26.0 および 100 eV であった。 m/z 177.02/129.02 (または重水素交換では 179.03/130.03 および 179.03/131.03) の CID MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 25.0 eV であった。 m/z 177.02/115.02 (または重水素交換では 179.03/116.03) の CID MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1ステージおよび第2ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 30.0 eV であった。 m/z 177.02/85.03 (または重水素交換では 179.03/86.04 および 179.03/87.04) の CID MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 21.0 eV であった。 m/z 177.02/85.03 の HCD MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1 (CID) および第2 (HCD) ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 200 eV であった。

【0155】

水素化生成物の場合、 m/z 179.04 (または重水素交換では 181.05) の CID MS² 実験では、正規化衝突エネルギーは、28.0 eV であった。 m/z 179.04/131.03 (または重水素交換では 181.05/132.04 および 181.05/133.05) の CID MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 25.0 eV であった。 m/z 179.04/131.03 の HCD MS³ 実験では、正規化衝突エネルギーは、第1 (CID) および第2 (HCD) ステージの断片化でそれぞれ 28.0 および 120 eV であった。

【0156】

ウィッティヒ反応生成物 (シスおよびトランス保護チオエノールエーテルの混合物) の場合、正規化衝突エネルギーは、 m/z 70~280 のスキャン範囲の m/z 257.09 の CID MS² 実験では、26.0 eV であった。

10

20

30

40

50

【0157】

スルホキシドの場合、シスおよびトランス保護チオエノールエーテルの二重結合配置の決定では、 m/z 75～280のスキャン範囲の m/z 273.08のCID MS²実験では、正規化衝突エネルギーは26.0 eVであった。

【0158】

実施例1．血漿および尿代謝物化合物Aの構造解明

試料前処理

50 mLのプラスチック製遠沈管に、プールした6 mLのヒト血漿および30 mLのメタノールを添加した。混合物を約1分間ボルテックスし、4000 rpmで15分間、4 °Cで遠心分離した。上清を各ウェルに500 μ L入る96ウェルプレートに移し、穏やかな40 °Cの窒素流下で乾燥させた。5つのウェルの残留物を、ボルテックス（各1分）しながら水（200 mL）に順次再溶解した。次いで、混合物を1.5 mLのエッペンドルフチューブに移し、室温で10分間、14,000 rpmで遠心分離した。次いで上清をLC/MS分析用の試料バイアルに移した。尿試料を、室温で10分間14,000 rpmで遠心分離し、上清（必要に応じて水で希釈）をLC/MS分析用の試料バイアルに移した。血漿および尿試料中の化合物Aの保持時間を比較するために、注入溶液を1.0 Nの塩酸でpH約3.0に調節した。

【0159】

化合物Aの水素化

20 mLの反応バイアルに、4 mLの尿、30 mgの活性炭担持パラジウム（10 %）、および磁気攪拌棒を添加した。バイアルを水素でフラッシュし、次いで水素で満たしたバルーンを装備した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、次いでゆっくりとシリンジフィルタ（0.45 μ M）に通した。透明な濾液をLC/MS分析のために試料バイアルに移した。

【0160】

構造解明

Orbitrap Elite質量分析器を使用して、高分解能質量スペクトルを取得した。プロトン化疑似分子イオンの式は、計算した177.02270のモノアイソトピック質量を用いる精密質量測定によって、 $C_6H_9O_4S^-$ であると事前に決定した。現在の研究は、血漿抽出物を使用してクロマトグラフィー条件を最適化することによって開始した。100 %重炭酸アンモニウム水溶液を使用する塩基性移動相条件下の逆相カラム（1.19分、図1）で、化合物Aをわずかのみに保持した。図2に示されるように、疑似分子イオンの衝突誘起解離（CID）によって、質量範囲全体にわたり多くの娘イオンが生成された。酸性移動相条件を使用すると、0.1 %のギ酸を含む98 %水および0.1 %のギ酸を含む2 %アセトニトリルの同じ逆相カラムで、化合物Aをより良好に保持した（2.53分、図3A）。さらなる調査のために、この方法を選択した。

【0161】

化合物Aは血漿中に低レベルで存在することが判明した。尿試料を試験したところ、血漿抽出物中の化合物Aの保持時間と一致するピークは、尿でより強かった（図3B）。尿と血漿抽出物との混合物を注入すると、血漿中の化合物Aとともに尿中の化合物が共溶出した（図3C）。尿中の化合物のプロダクトイオンスペクトル（図4）はまた、血漿抽出物中の化合物Aのスペクトル（図2）とも非常に一致した。これらの結果は、化合物Aが血漿中よりも高濃度で尿中に存在することを確立した。尿試料を使用して、さらなる分析を行った。

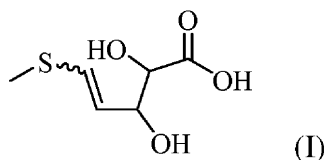
【0162】

疑似分子イオンのCIDプロダクトイオンスペクトルによって、図4に示されるように、 m/z 159、133、131、129、115、113、111、101、100、99、89、85、83、75、73、57.03、および57.00である、異なる強度を有する17の娘イオンが生成された。高エネルギー衝突誘起解離（HCD）による別のプロダクトイオンスペクトル（図5）によって、3つの追加の娘イオン（ m/z 97、

87、および74)が生成された。 m/z 85、115、129、および159イオン(CID MS³、図6A~D)、ならびに m/z 85および159イオン(HCD MS³、図6E~F)のさらなる断片化スペクトルによって、さらに2つのイオン(m/z 84および67)が検出され、ある特定のイオンの関係性が確立された。

【0163】

これらの断片とそれらの形成経路との理論的説明に基づいて、化合物Aの化学構造が提案された。提案された構造は、以下に示されるように、未決定の二重結合配置および未決定の立体化学を有する。

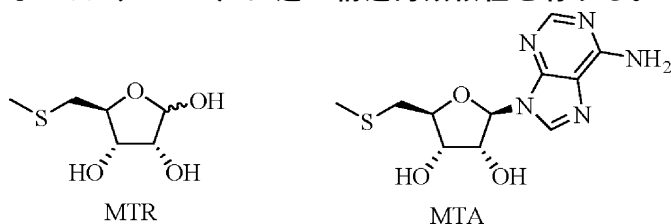


10

。

【0164】

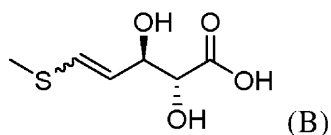
化合物Aは、5'-メチルチオアデノシン(MTA)から生合成される5-メチルチオリボース(MTR)に近い構造的類似性を有する。



20

【0165】

化合物Aの立体化学を、MTRおよびMTAとのその構造的類似性に基づいて割り当て、式は次の構造によって表されると決定した：



30

。

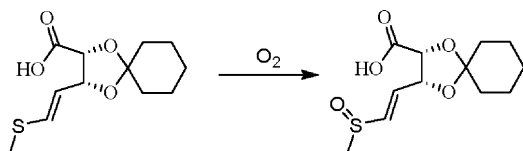
【0166】

二重結合配置の決定

実施例2、方法1で合成された保護トランスおよびシスチオエノールエーテルの混合物の一部を、中性移動相条件下で半分取してクロマトグラフィーにかけ、早期に溶出する異性体の溶出液を収集し、蒸発乾固させた(HPLC精製試料と称される)。得られた残留物を¹H NMR(図7)によって分析すると、スペクトルは、予想外にも、保護チオエノールエーテルの異性体(シスまたはトランス)のいずれのスペクトルとも一致しなかった。COSY、LC/MS、およびLC/MS²スペクトルを使用したさらなる分析によって、早期に溶出する異性体の精製プロセス中に、一対のジアステレオマー型のスルホキシド(2.42および2.53分)が形成されたことが示された(LC/MS²、図8)。¹H NMRスペクトルは、オレフィンのプロトン間に15 Hzのカップリング定数を示し、一対のジアステレオマー型のスルホキシドの二重結合配置がトランスであったことを示している。スルホキシドは、精製プロセス中に早期に溶出した保護チオエノールエーテルから形成されたので、保護チオエノールエーテルの早期に溶出する異性体の二重結合配置はトランスであると決定した。

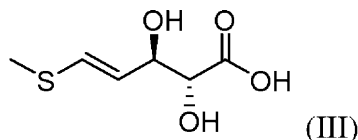
40

50



【 0 1 6 7 】

実施例 2、方法 1 で合成された保護トランスおよびシスチオエノールエーテルの混合物を、LC/MS によって分析した。図 9 に示されるように、LC/MS によって、保護トランスおよびシスチオエノールエーテルがそれぞれ 4.45 および 4.49 分で検出された。保護トランスチオエノールエーテルは、 ^1H NMR による HPLC 精製試料では観察されなかったが、LC/MS 分析 (図 10) によって明らかに 4.45 分で検出され、保護トランスチオエノールエーテルのスルホキシドへの酸化が不完全であることを示している。保護トランスチオエノールエーテルは、HPLC 精製試料中に依然として存在していたが、スルホキシドと比較してはるかに低いレベルであった。HPLC 精製試料をわずかに酸性の条件下で処理すると、保護トランスチオエノールエーテルからの保護基の除去が達成されて、2.54 分で LC/MS で検出されたようにトランス DMTPA を形成した。トランス DMTPA は、シスおよびトランス DMTPA の混合物の後期に溶出する異性体と共溶出した (図 11)。したがって、後期に溶出する DMTPA 異性体は、トランス二重結合配置を有すると決定した。したがって、化合物 A も後期に溶出する異性体と共溶出するため、トランス二重結合配置を有すると決定した。立体化学が割り当てられた化合物 A の構造を、式 (III) として以下に示す。



。

【 0 1 6 8 】

スキーム 1 および 2 に示されるように、化合物 A の脱プロトン化された疑似分子イオンからの可能な断片化経路を提案する。

スキーム 1. 可能な断片化経路

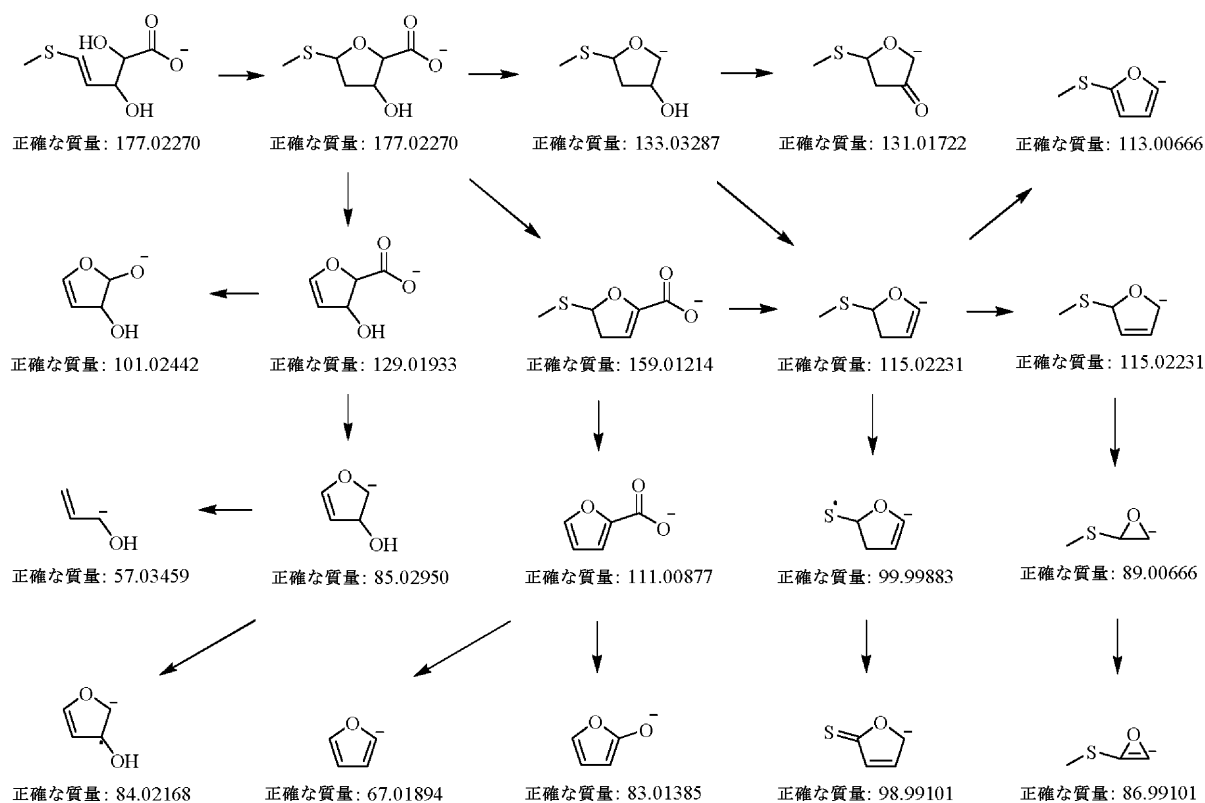
10

20

30

40

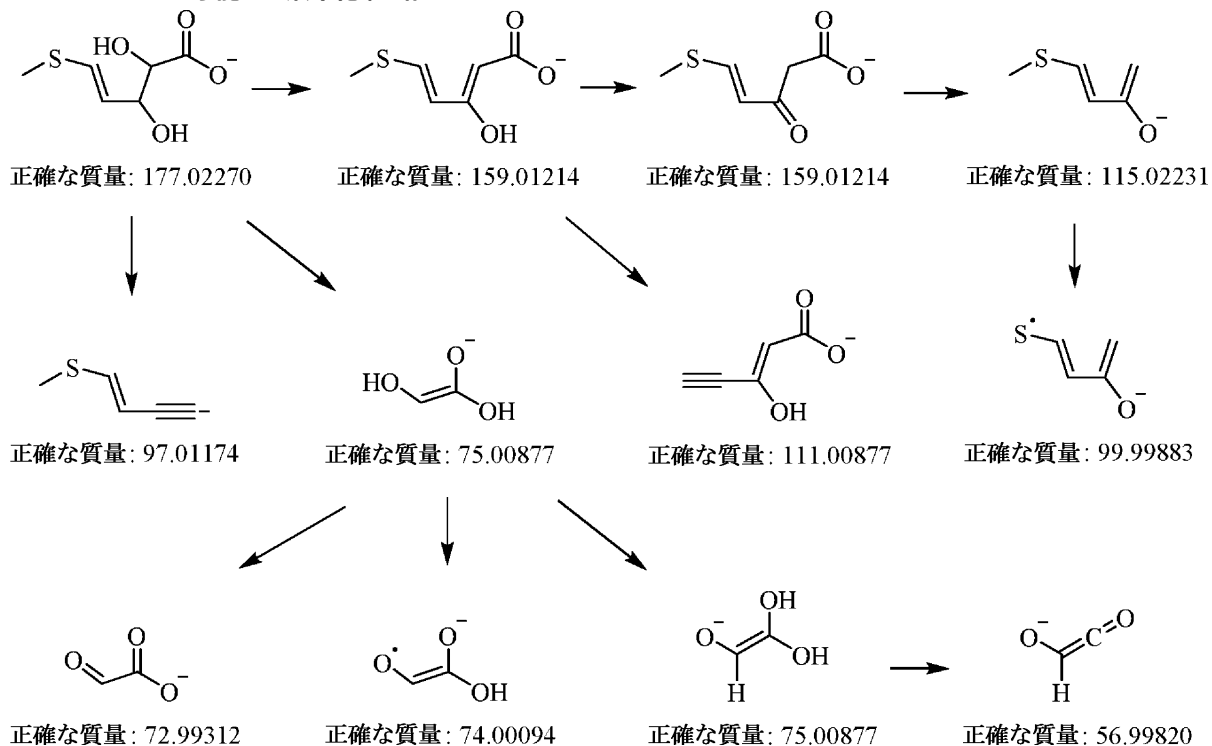
50



10

20

スキーム 2. 可能な断片化経路



30

40

【0169】

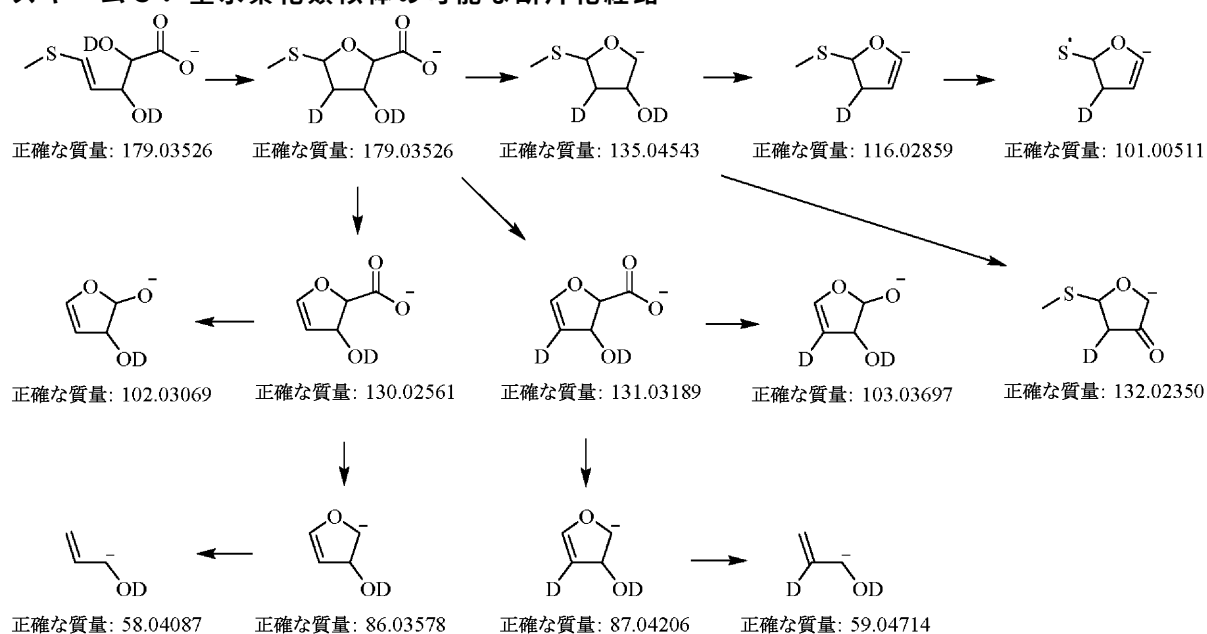
重水素交換による構造検証

提案された化合物 A の構造は、重水素交換実験によって検証した。簡単に言えば、クロマトグラフィーの移動相を重水素化溶媒に変更し、尿抽出物を再度分析した。フルスキャン質量スペクトルを取得し、 m/z 179.03518 イオン ($C_6H_7D_2O_4S^-S$ の計算値から -0.4 PPM 減算) を有する新しいイオンを、提案された構造と一致する、

50

重水素化化合物 A (図 12) の主要な種として検出した。m/z 179 イオンのプロダクトイオンスペクトル (MS²) (図 13) および対応する m/z 160 (図 14)、161 (図 15)、130、131、86、87、および 116 (図 16 A~E) イオンの MS³ スペクトルを示す。二重に重水素化された断片を、m/z 161、135、131、117、103、102、87、77、および 59 で検出したが、m/z 160、132、130、116、114、112、102、101、100、90、86、84、76、および 58 には単一の重水素が組み込まれていた。重水素が組み込まれていない断片を、m/z 113、111、89、83、75、72、および 57 で観察した。m/z 160 および 161 イオンの検出は、二重に重水素化された親イオンからの HOD および H₂O の損失をそれぞれ示している。H₂O の損失前に、酸素上の重陽子の、炭素上のプロトンとの交換に起因して、m/z 161 イオンの形成が生じ得る。これらのすべてのイオンは、本来提案された断片化経路 (スキーム 3~5 を参照) を十分に理論的に説明することができ、化合物 A の提案された構造の有効性について説得力のある証拠を提供している。

スキーム 3. 重水素化類似体の可能な断片化経路



スキーム 4. 重水素化類似体の可能な断片化経路

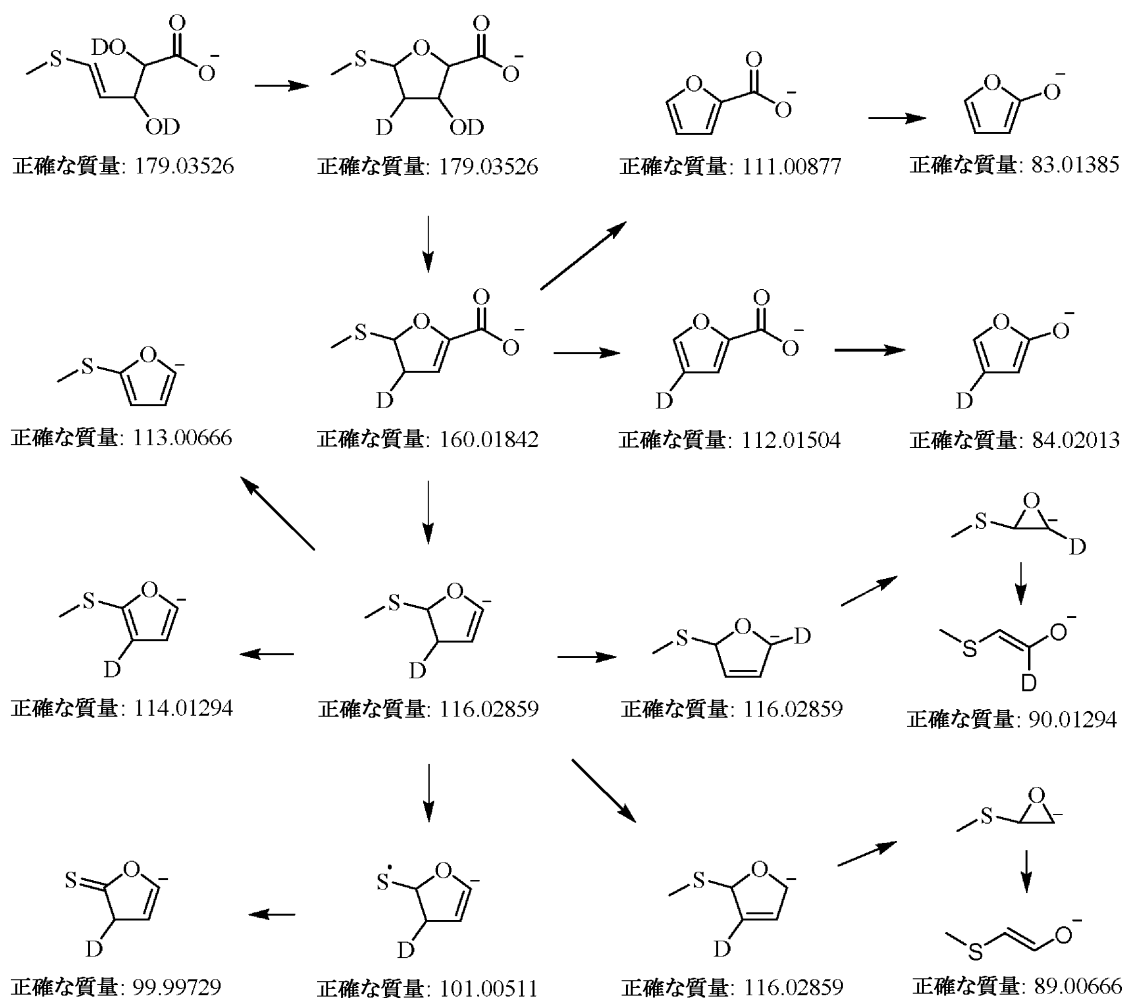
10

20

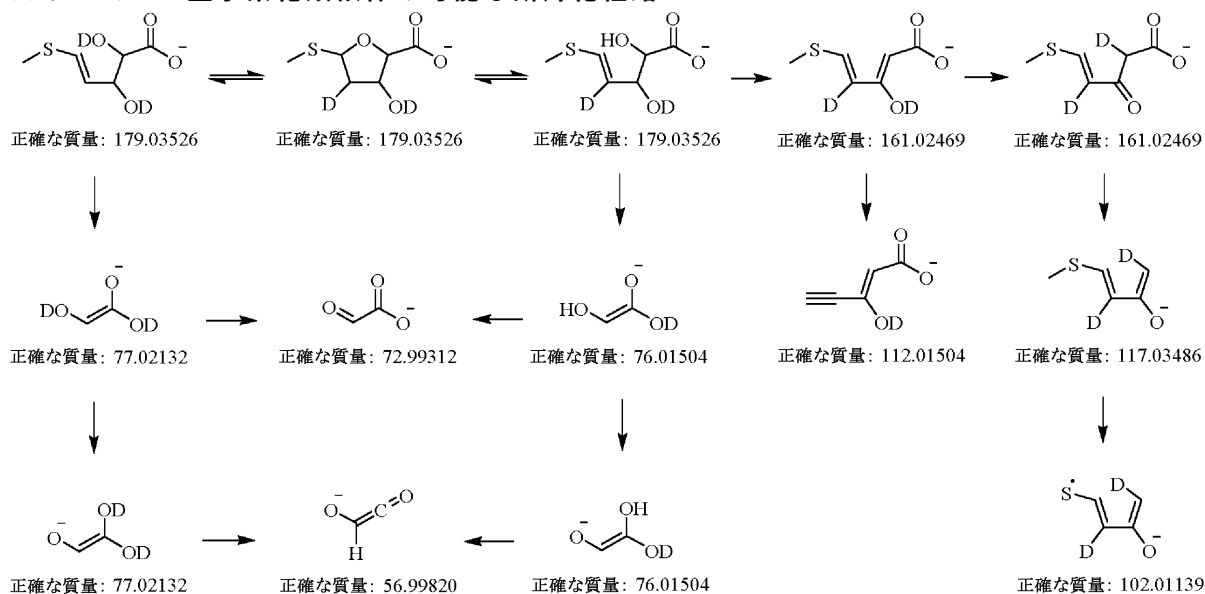
30

40

50



スキーム 5．重水素化類似体の可能な断片化経路

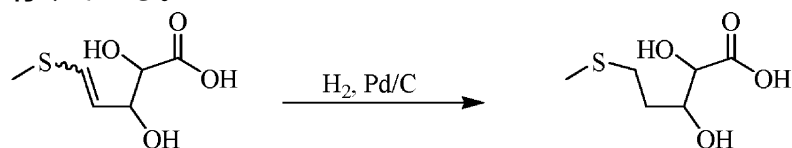


【0170】

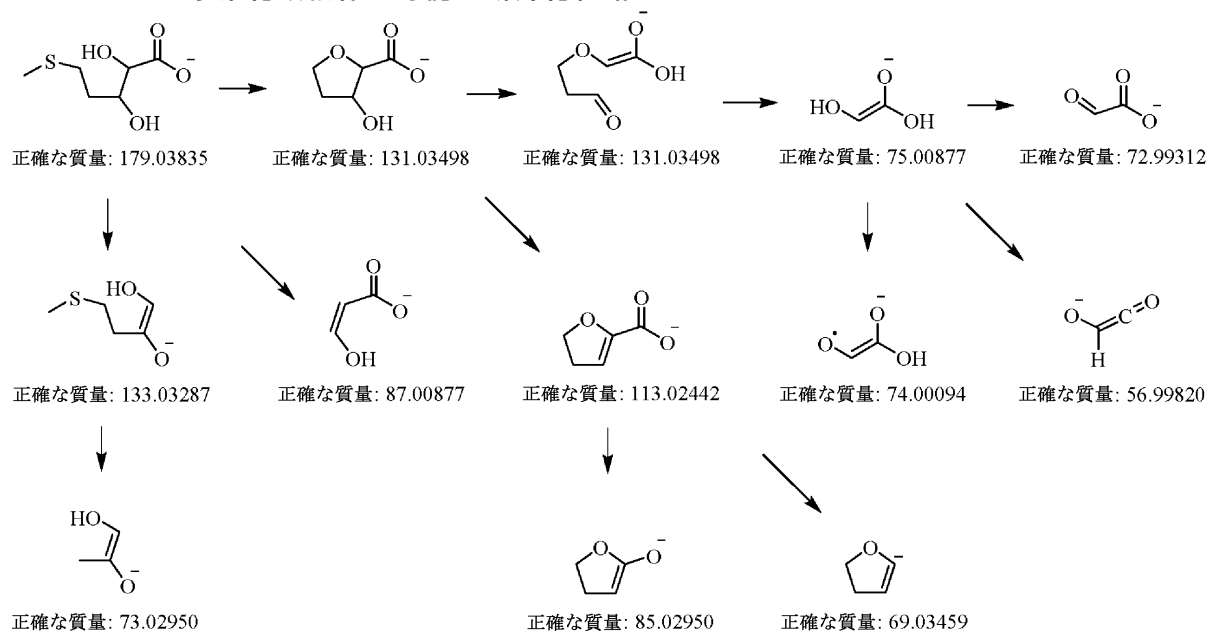
水素化による構造検証

提案された構造は、炭素－炭素二重結合を含有し、飽和実験によってさらに確認した。尿試料に接触水素化を施し、反応混合物の LC／MS 分析によって、化合物 A に対応するピークの消失（約 2.5 分）、および $C_6H_{11}O_4S^-$ （179.03835 の計算値が

ら 0.2 ppm 減算) の式に対応する m/z 179.03839 を有するピークの出現が 3.17 分で示されている (図 17)。 m/z 131 イオンのプロダクトイオンスペクトル (MS^2) (図 18) および MS^3 スペクトル (CID および HCD) (図 19) は、断片の理論的説明としてスキーム 6 に示されるように、化合物 A の飽和構造の同一性を裏付けている。



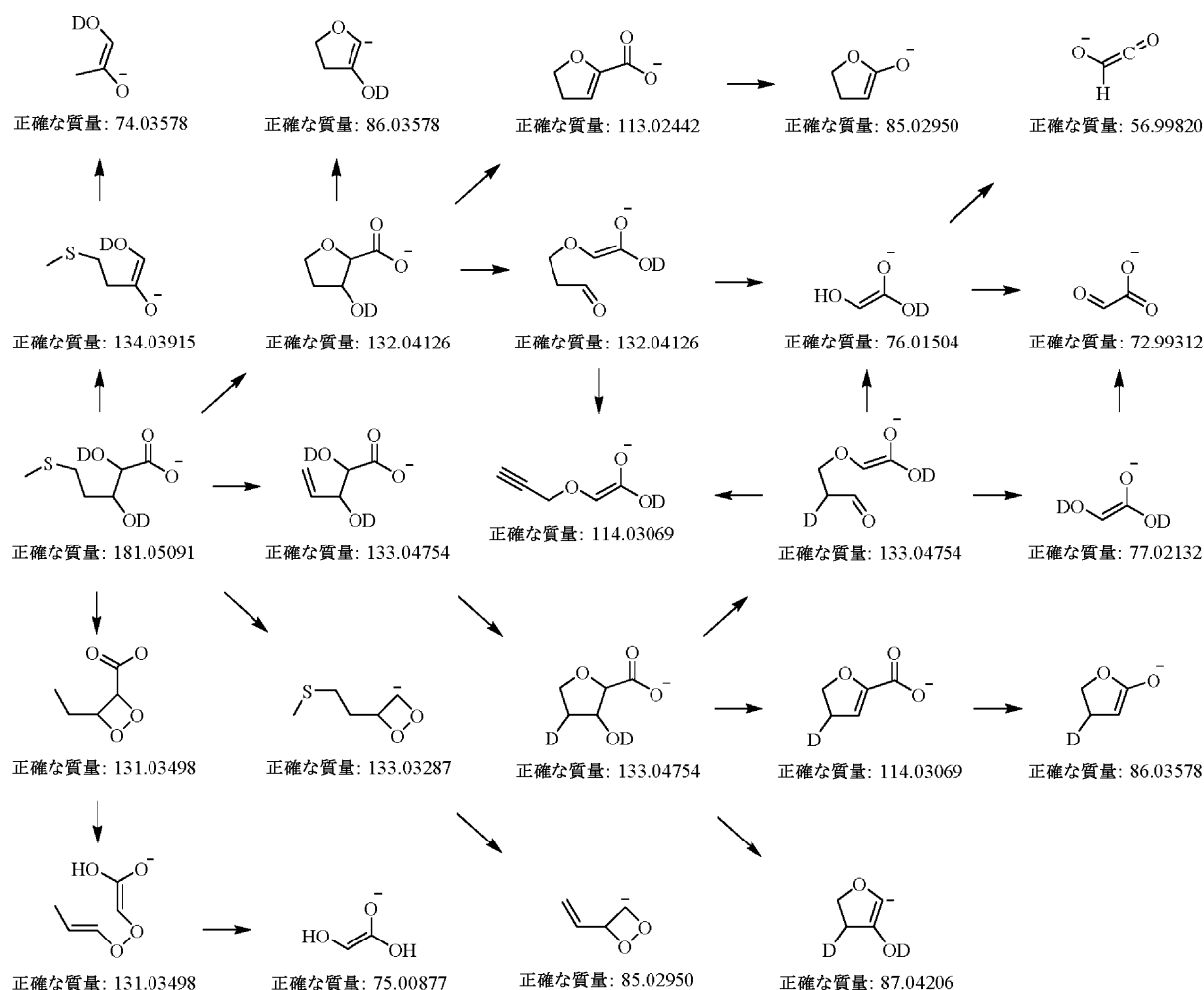
スキーム 6. 水素化類似体の可能な断片化経路



【0171】

重水素化移動相を使用した LC/MS 分析によって、 $C_6H_9D_2O_4S^-$ (181.05191 の計算値から -1.77 ppm 減算) の式に対応する m/z 181.05059 を有する疑似分子イオンに 2 つの重陽子が組み込まれていることが明らかになった (図 20)。重水素化種のプロダクトイオンスペクトル (図 21)、ならびに m/z 132 イオン (図 22) および m/z 133 イオン (図 23) の MS^3 スペクトルは、予想される飽和生成物と一致している。重水素化種の可能な断片化経路を、スキーム 7 に概説する。

スキーム 7. 水素化類似体の二重重水素化種の可能な断片化経路



【0172】

提案された構造は、合成標準との直接比較によってさらに確認した（実施例1を参照）。実施例2、方法1によって調製した合成シスおよびトランスDMTPA混合物は、LC/MSによって、2.19および2.53分で m/z 177.02262の分子イオン（計算値から -0.5 ppm減算）（図24）を含む生成物を生じた。化合物Aとさらに比較するために、方法1によって調製した2.53分で溶出する生成物（後にトランスDMTPAであると決定された）を選択した。

【0173】

合成トランスDMTPAの保持時間（図25B）は、クロマトグラフィー条件下で共溶出（図25C）したため、尿中の化合物Aの保持時間（図25A）と一致した。CID（図26）およびHCD（図27）による合成トランスDMTPAのプロダクトイオンスペクトル（ MS^2 ）は、断片化パターンおよび強度分布によってこれらの化合物A（図4および5）のものと一致した。合成トランスDMTPAの115、129、159、および85娘イオンのCIDによるさらなる断片化によって、 MS^3 スペクトルが生成された（図28A～D）。159および85の娘イオンの MS^3 スペクトルもまた、HCDによって生成された（図29A～B）。得られた合成トランスDMTPAの MS^3 スペクトルは、化合物Aのスペクトルと本質的に同一であった（図6）。さらに、重水素交換後に合成トランスDMTPAを分析したところ、図13～15と比較して、図30～33に示されるように、得られた MS 、 MS^2 、および MS^3 スペクトルはまた、化合物Aのスペクトルと非常によく一致した。これらのすべてのクロマトグラフィーおよび MS スペクトルデータは、化合物AがトランスDMTPAであることを強く裏付けている。

【0174】

実施例2. (2R, 3R) - 2, 3-ジヒドロキシ-5-メチルチオ-トランス-4-ペ

ンテン酸（トランスDMTPA）の合成

方法1.

ウィッティヒ反応

（メチルチオメチル）トリフェニルホスホニウムクロリド（500 mg、1.39ミリモル、2.2当量）を、25 mLの丸底フラスコ内のアルゴン雰囲気下でテトラヒドロフランに懸濁した。混合物を0℃に冷却し、混合物を攪拌しながらナトリウムビス（トリメチルシリル）アミド（テトラヒドロフラン中1.0 M、1.39 mL、1.39ミリモル、2.2当量）をゆっくりと添加した。得られた混合物を0℃でさらに30分間攪拌し、2,3-シクロヘキシリデン-*L*-エリトルロン酸（1.0 mLのテトラヒドロフラン中136 mg、0.633ミリモル、1.0当量）をゆっくりと添加した。5分後、反応混合物を室温に温め、一晩攪拌した。反応混合物をNaH₂PO₄水溶液（1.0 M、25 mL）に移し、得られた混合物（pH約6.0）を酢酸エチル（2 x 40 mL）で抽出した。合わせた有機抽出物を乾燥させ（MgSO₄）、濾過し、蒸発乾固させて、濃厚な油（402 mg）を得た。この粗抽出物を、シリカゲルカラム（2.5 x 18 cm）でのクロマトグラフィーにかけ、酢酸エチル／メタノール（9：1）で溶出した。対応する画分をプールし、濃縮乾固して、褐色がかったワックス様物質（75 mg、46%）として、保護チオエノールエーテルの*E*/*Z*異性体の混合物（約5：4）を得た。

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 6.57 (1H, dd, *J* = 14.9, 0.8 Hz, H-5 *E*),

6.37 (0.6H, dd, *J* = 9.7, 1.0 Hz, H-5 *Z*), 5.49 (0.6H, dd, *J* = 9.6, 8.7 Hz, H-4, *Z*), 5.26 (1H, dd, *J* = 14.9, 8.0 Hz, H-4, *E*), 5.23 (0.8H, ddd, *J* = 8.7, 7.2, 1.0 Hz, H-3, *Z*), 4.95 (1H, オーバーラップ DOH, ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.0 Hz, H-3, *E*), 4.67 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-2, *E*), 4.66 (0.9H, d, *J* = 7.3 Hz, H-2, *Z*), 2.32 (2H, s, CH₃), 2.26 (3H, s, CH₃), 1.35-1.95 (m, 環プロトン). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 173.2, 173.1, 135.1, 132.6, 123.8, 119.9, 112.7, 112.5, 79.5, 78.4, 77.8, 75.6, 37.9, 36.01, 35.96, 26.4, 25.2, 25.0, 17.4, 14.3.

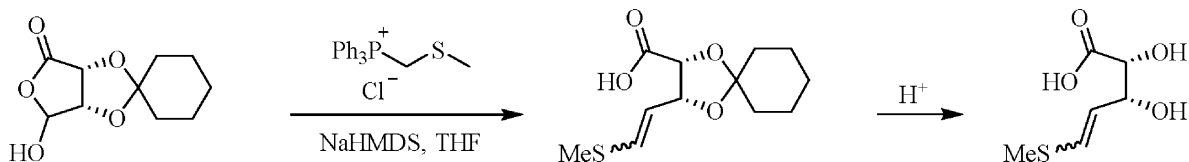
【0175】

構造は、¹H、¹³C、および¹H-¹H COSY NMR分光分析および質量分析法によって特徴付けた。精製したウィッティヒ反応生成物（保護シスおよびトランスチオエノールエーテルの混合物）の¹³C NMRスペクトルを図34に示す。精製したウィッティヒ反応生成物のLC/MSクロマトラムおよび質量スペクトルを図35に示す。精製したウィッティヒ反応生成物の室温での2.81分または2.98分のプロダクトイオンスペクトル（MS²）を、それぞれ図36および37に示す。

【0176】

脱保護

20 mLシンチレーションバイアルに、保護シスおよびトランスチオエノールエーテルの混合物（0.50 mLのアセトニトリル中2.0 mg）、Dowex（登録商標）50 WX8（0.75 g、水（2 x 10 mL）で洗浄）、水（4.5 mL）、および攪拌バーを添加した。室温で20分間攪拌した後、混合物を1.5 mLエッペンドルフチューブに移し、14,000 rpmで5分間遠心分離した。合わせた上清を、希釈した水酸化アンモニウム（水中4%の濃水酸化アンモニウム）でpH約7に調節した。アリコートを手で希釈し、LC/MSによって分析した。



【0177】

脱保護のための第2の方法は、0.1%のギ酸水溶液に出発物質を溶解することによっ

で行った。LC/MS分析の前に、溶液を室温で1時間保持した。

【0178】

ウィッティヒ反応生成物のHPLC精製（保護シスおよびトランスチオエノールエーテルの混合物）

バイナリソルベントポンプユニット、冷蔵オートサンプラ（4°Cに設定）、およびカラムヒーター（50°Cに設定）を装備したAgilent 1290 Infinity UHPLCシステムを、逆相カラム（Waters XBridge（登録商標）C18、3.5 μm、4.6×150 mm）を備えた半分取液体クロマトグラフィーに使用した。移動相Aは、水/アセトニトリル（92：8）であり、移動相Bはアセトニトリルであった。線形勾配溶出は、100%の移動相Aの初期条件で行い、これを10分間維持した。移動相Bを1.0分で90%に増加させ、2.0分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために0.5分で0%に戻し、2.5分間維持した。16分の合計実行時間の間の流量は、900 μL/分であった。溶出液は、AB Sciex QTrap 5500質量分析器のエレクトロスプレー源に直接導入した。ニードル洗浄液には、イソプロパノールを使用した。質量分析器は、ネガティブ多重反応モニタリング（MRM）モードで操作した。イオンスプレー電圧は-4.3 kV、源温度は550°C、カーテングスは30、ならびにネブライザおよび脱溶媒ガスの流量は70、CADガスは中程度に設定した。2つの遷移（257.1/115.0および257.1/100.0）は、-60 Vのデクラスタリングポテンシャル、-10 Vのエントランスポテンシャル、-10 eV（離調）の衝突エネルギー、および-12 Vの衝突セルイグジットポテンシャルでモニタリングした。質量分析器の切り替えバルブを使用して、約400回の実験から（早期の溶出ピークでは）7.0～9.8分の間の溶出液を、自動的に収集フラスコに転用した。収集した画分を、穏やかな窒素流下の室温で2週間乾燥させた。残留物をメタノールに溶解し、溶液を小さなバイアルに移した。溶媒を除去した後、残留物をNMRおよびMSによって分析した。スルホキシドの結果は、

¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ 6.37

(1H, d, *J* = 14.9 Hz, H-5), 5.40 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.9 Hz, H-4), 4.77 (1H, dd, *J* = 7.9, 7.0 Hz, H-3), 4.57 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-2), 2.67 (1H, s, CH₃), 2.22 (2H, s, CH₃), 1.25-1.90 (10H, m, 環プロトン).

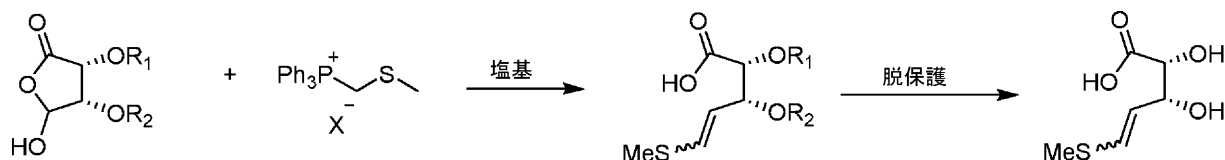
である。2.42分で溶出する異性体では、HRESIMS *m/z* 273.08049 [M-H]⁻ (C₁₂H₁₇O₅S⁻で計算、273.08022)。MS² *m/z* 258.05700、156.99666、131.01737、123.00895、115.99388、113.00681、111.00892、98.99116、97.98334。2.53分で溶出する異性体では、HRESIMS *m/z* 273.08046 [M-H]⁻ (C₁₂H₁₇O₅S⁻で計算、273.08022)。MS² *m/z* 258.05702、156.99670、131.01738、123.00888、115.99389、113.00683、111.00894、98.99114、97.98335。

【0179】

方法2.

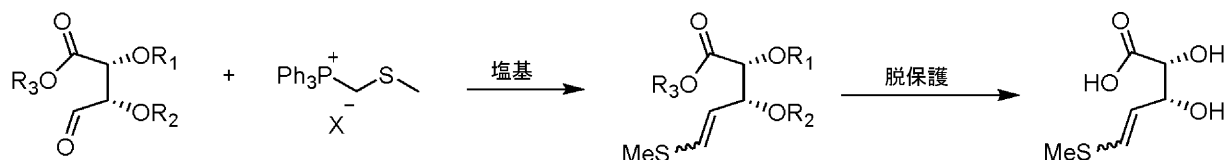
第2の合成アプローチの一般的な戦略を以下に表す。保護L-エリトルロン酸を出発分子として使用することができる。任意の好適なヒドロキシル保護基を使用することができる（P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, 2014）。一実施形態では、保護基R₁およびR₂は、トリアルキルシリル基（例えば、トリメチルシリル）などのシリル基であってもよい。ウィッティヒ試薬は、X⁻が、Cl⁻、Br⁻、I⁻などであり得る任意の塩のものであってもよい。保護基R₁およ

び R_2 の除去は、保護基の性質に依存する。一実施形態では、保護基は、フッ化物を用いる処理によって除去することができる。



【0180】

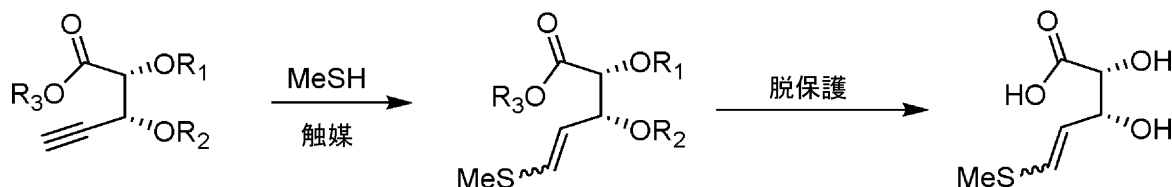
この一般的な戦略の別の実施例では、出発物質は、保護L-エリトルロン酸であってもよい。カルボキシル保護基、 R_3 は、 α -ブチル基またはシリル基（例えば、トリス（トリメチルシリル）シリル）であってもよい。保護基、 R_1 、 R_2 、および R_3 の除去は、保護基の性質に依存する。一実施形態では、保護基は、フッ化物および／または酸を用いる処理によって除去することができる。



【0181】

方法3.

第3の合成アプローチの一般的な戦略を以下に表す。(2R, 3R)-2,3-ジヒドロキシ-4-ペンテン酸またはその保護形態を、出発分子として使用することができる。任意の好適なヒドロキシルおよびカルボキシル保護基を使用することができる (P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, 2014)。一実施形態では、保護基 R_1 および R_2 は、トリアルキルシリル基（例えば、トリメチルシリル）などのシリル基であってもよく、カルボキシル保護基 R_3 は、 α -ブチル基またはシリル基（例えば、トリス（トリメチルシリル）シリル）であってもよい。一実施形態では、アルキンのヒドロチオール化反応を合成アプローチで 사용할 ことができる。アルキンのヒドロチオール化は、例えば、UV照射、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN)、カチオン性ロジウムとイリジウムとの錯体、トリウムとウランとの錯体、ロジウム錯体などのラジカル開始剤、炭酸セシウム、および／または金によって触媒され得る。保護基、 R_1 、 R_2 、および R_3 の除去は、保護基の性質に依存する。一実施形態では、保護基は、フッ化物および／または酸を用いる処理によって除去することができる。



【0182】

実施例3. 化合物AのLC-MS/MS測定

バイナリソルベントマネージャー、冷蔵試料マネージャー (12 °Cに設定)、およびカラムマネージャー (40 °Cに設定) を装備した Waters Acquity UPLC システムを、逆相カラム (Waters ACQUITY UPLC (登録商標) BEH C18、1.7 μ m、2.1 x 100 mm) を備えた液体クロマトグラフィーに使用した。移動相Aは水中0.1%のギ酸であり、移動相Bはアセトニトリル中0.1%のギ酸であった。線形勾配溶出は、2%の移動相Bの初期条件で行い、これを3.00分間保持した。次いで、移動相Bを0.40分で98%に増加させ、0.50分間維持した。移動相Bは、次の注入のための平衡化のために、0.10分で2%に戻した。合計実行時間は5

． 00分であった。最終試料溶液の5．0 μL のループ固定アリコートを各試料に注入した。流量は350 μL ／分であり、溶出液は、質量分析器のエレクトロスプレー源に直接導入した。強ニードル洗浄液（200 μL ）は未希釈のメタノールであり、弱ニードル洗浄液（600 μL ）は、メタノールと水との混合物（0．5：99．5）であった。シール洗浄液は、メタノールと水との混合物（10：90）であった。

【0183】

加熱エレクトロスプレーイオン化（HESI-III）プローブを装備したThermo Scientific Orbitrap Elite質量分析器を使用して、ネガティブモードで操作して、質量分析法を実施した。すべての質量は高分解能で測定したが、明確にするために簡略化して報告されている。機器は、Orbitrap Elite（商標）2．7、およびXCalibur（商標）2．2ソフトウェア（後で3．0にアップグレード）によって制御した。加熱エレクトロスプレー源は、ヒーター温度430°C、シースガス65、補助ガス流量15、掃引ガス0、イオンスプレー電圧3．25 kV、キャピラリー温度350°C、およびSレンズRFレベル60％に設定した。30,000の分解能を使用して、質量範囲 m/z 100～600のフルスキャンFTMSスペクトルを収集した。すべての断片化実験は、スキャン範囲 m/z 50～200、分解能15,000、単離幅1．0、活性化 Q 0．250、および活性化時間10．0 msに設定した。すべての質量分析データは、ロックマスなしで取得および処理し、外部質量較正を使用した。

【0184】

MS²実験の正規化衝突エネルギーは、 m/z 177．02のCID MS²実験では28．0 eVで、対応するHCD MS²実験では100 eVであった。約177．02の m/z を有する親イオンの断片化によって、約159、133、131、129、115、113、111、101、100、99、89、85、83、75、73、57．03、57．00、および56の m/z を有する娘イオンを生じた。HCDによって、約97、87、および74の m/z を有する3つの追加の娘イオンを生じた。 m/z 177．02／159．01のCID MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ26．0および25．0 eVであった。 m/z 177．02／159．01のHCD MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1（CID）および第2（HCD）ステージの断片化でそれぞれ26．0および100 eVであった。 m/z 177．02／129．02のCID MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ28．0および25．0 eVであった。 m/z 177．02／115．02のCID MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ28．0および30．0 eVであった。 m/z 177．02／85．03のCID MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1および第2ステージの断片化でそれぞれ28．0および21．0 eVであった。 m/z 177．02／85．03のHCD MS³実験では、正規化衝突エネルギーは、第1（CID）および第2（HCD）ステージの断片化でそれぞれ28．0および200 eVであった。約177．02／159．01、177．02／129．02、177．02／115．02、および177．02／85．03の m/z のMS³断片化によって、約84および67の m/z を有する2つの追加のイオンが生じた。

10

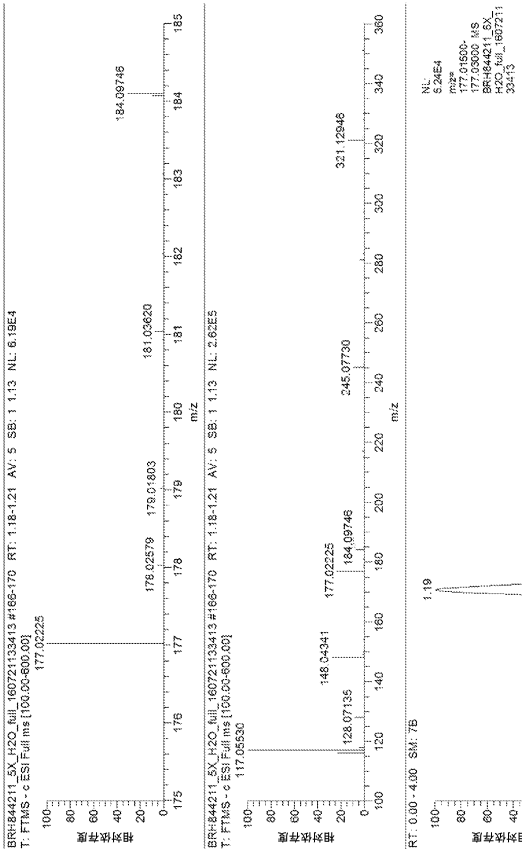
20

30

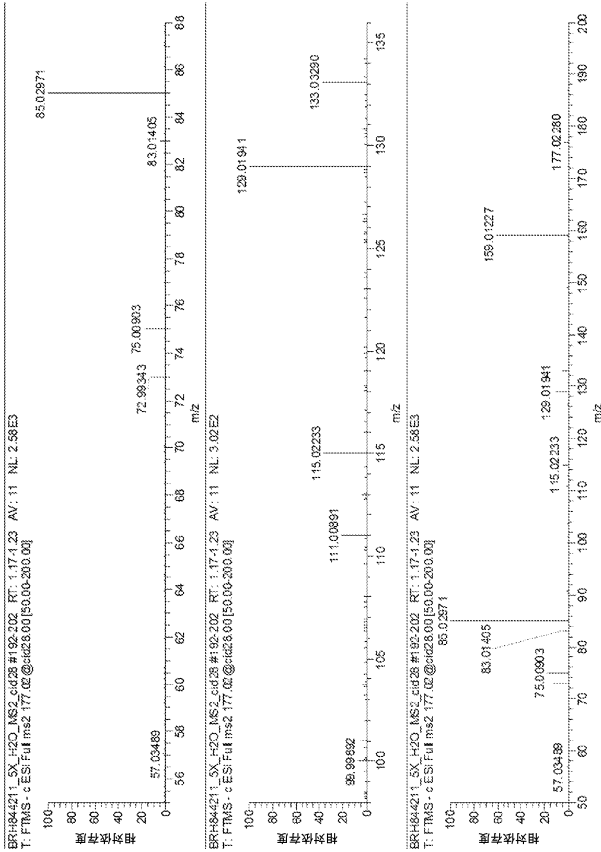
40

50

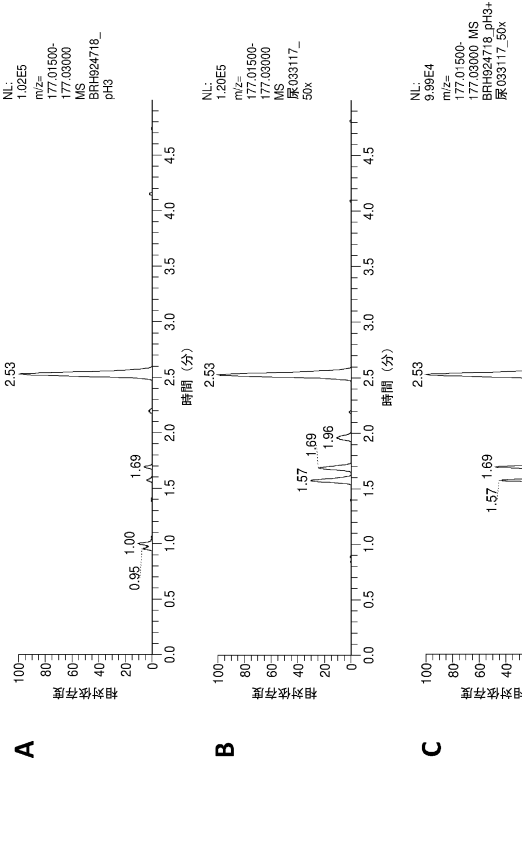
【図面】
【図 1】



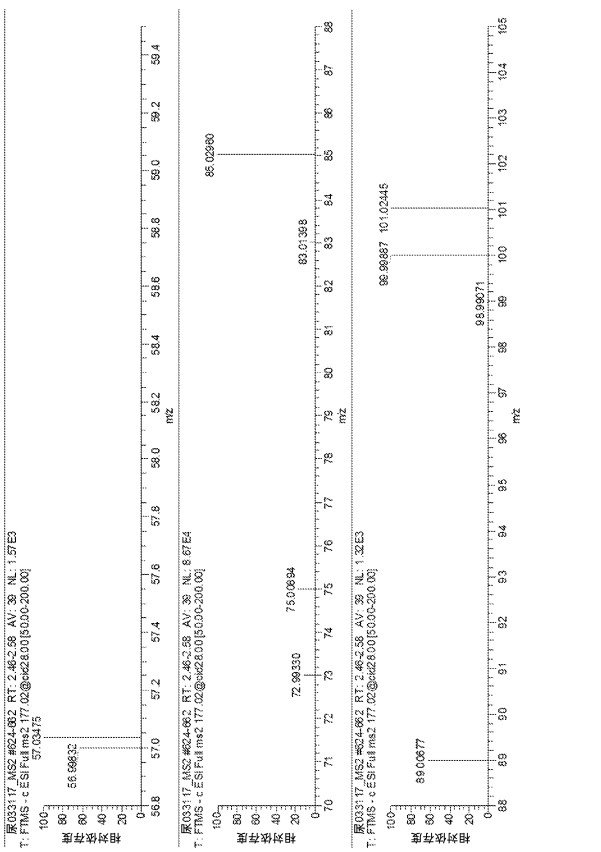
【図 2】



【図 3】



【図 4 A】



10

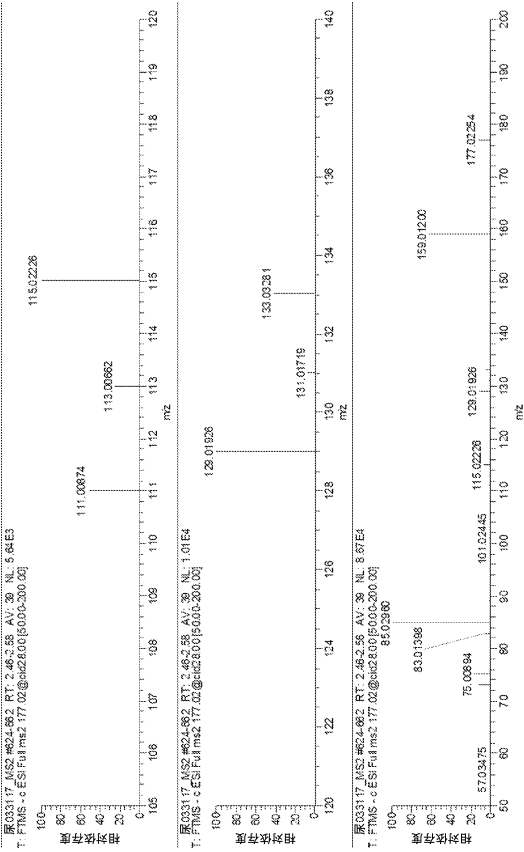
20

30

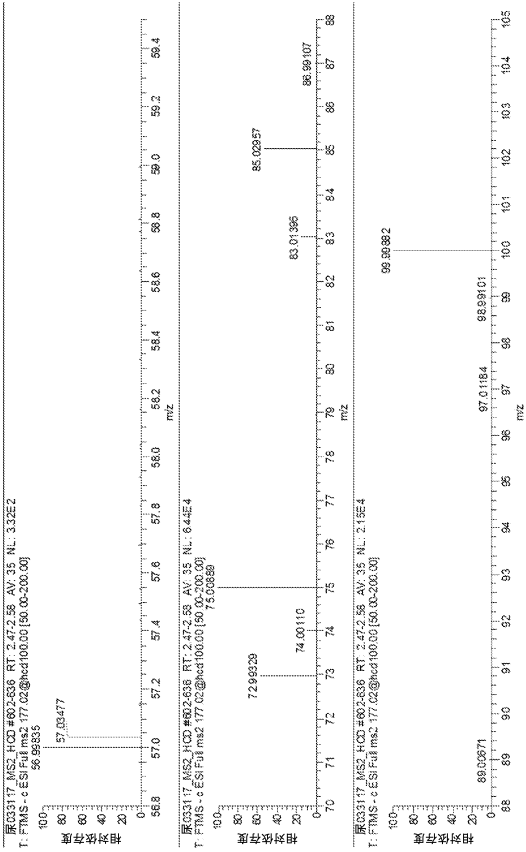
40

50

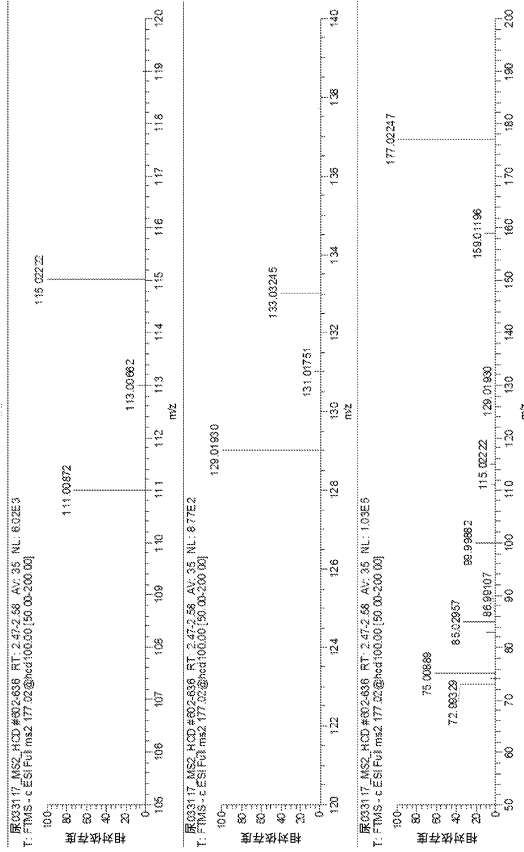
【図 4 B】



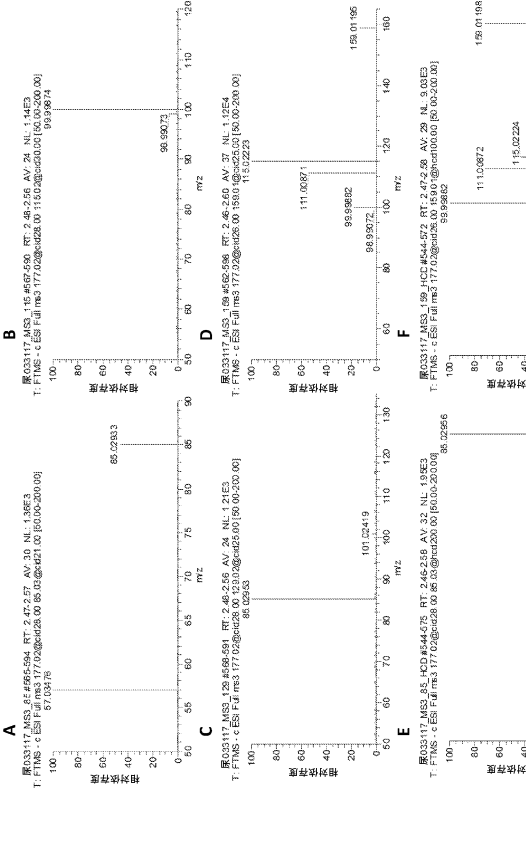
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6】



10

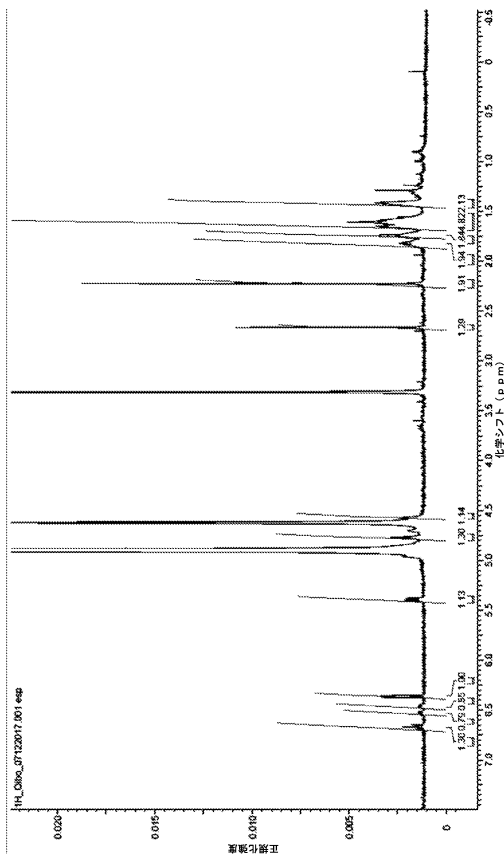
20

30

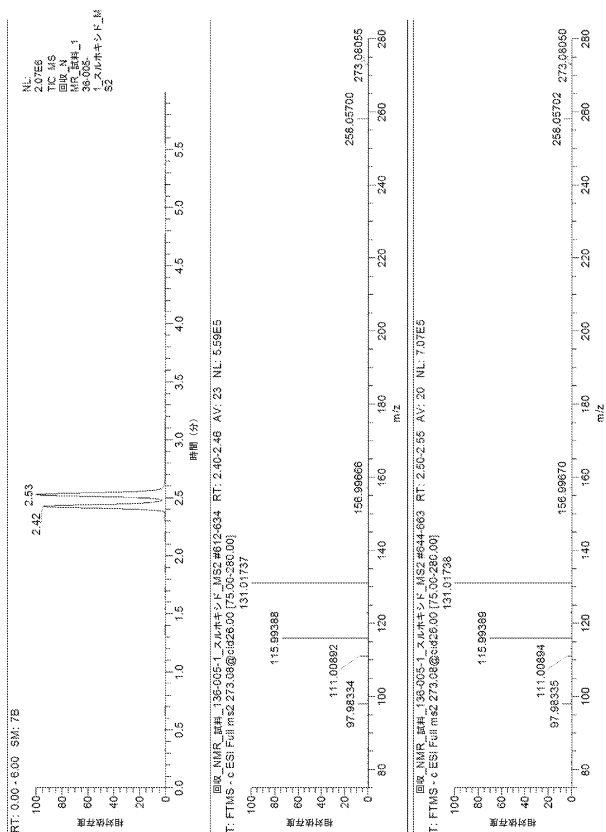
40

50

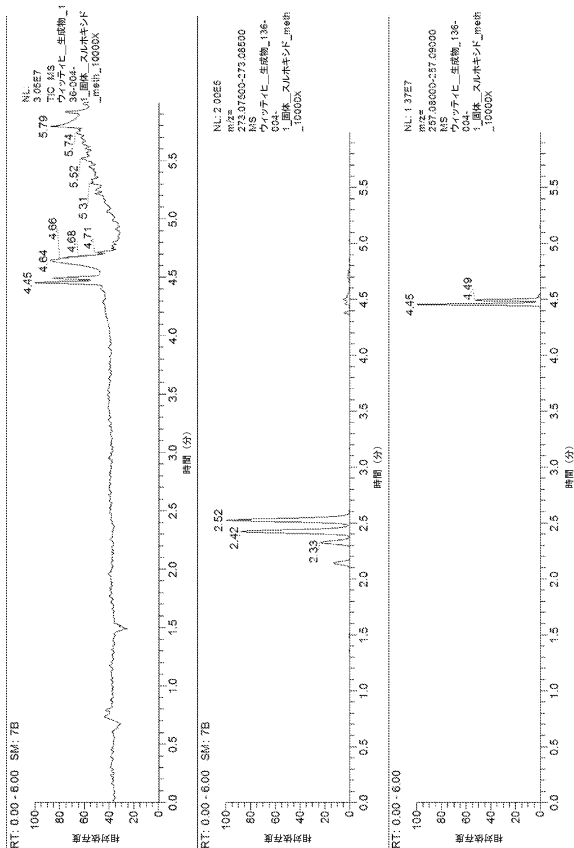
【図 7】



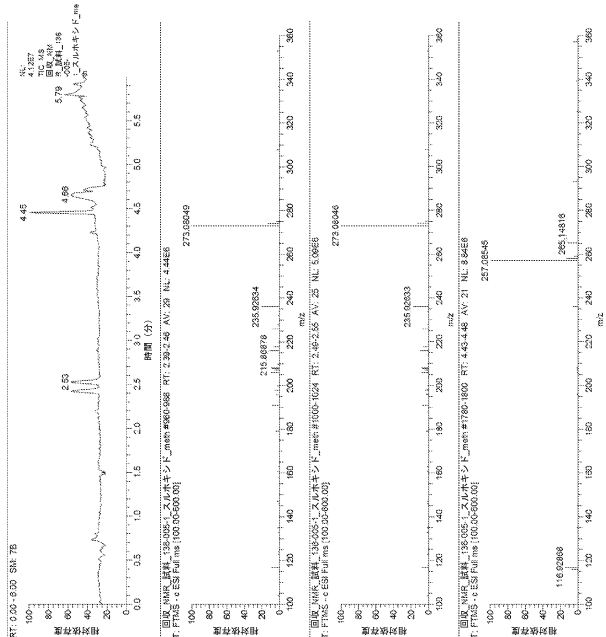
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

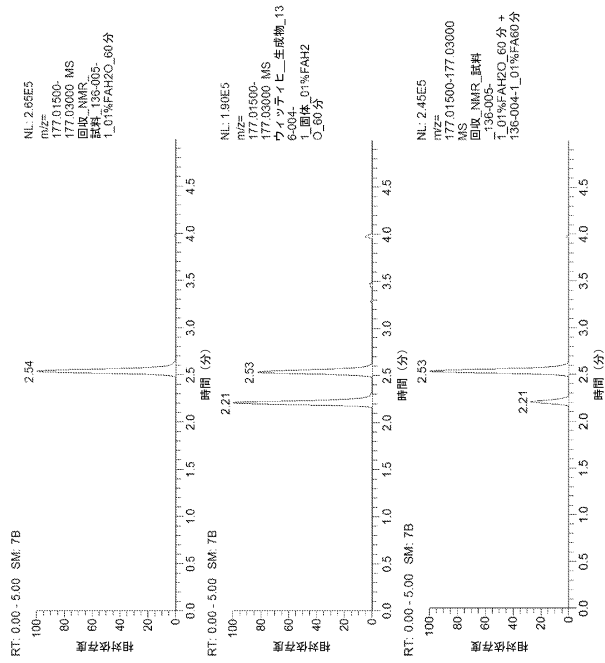
20

30

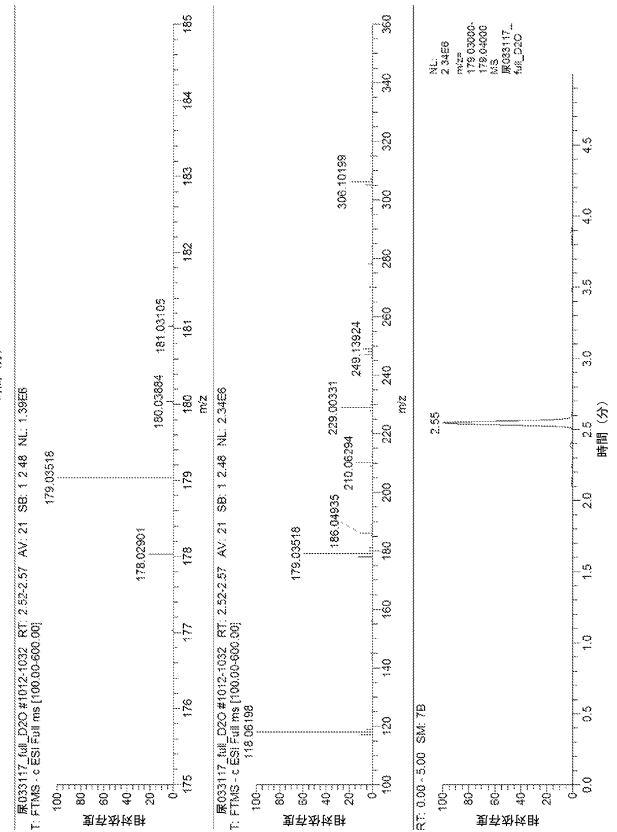
40

50

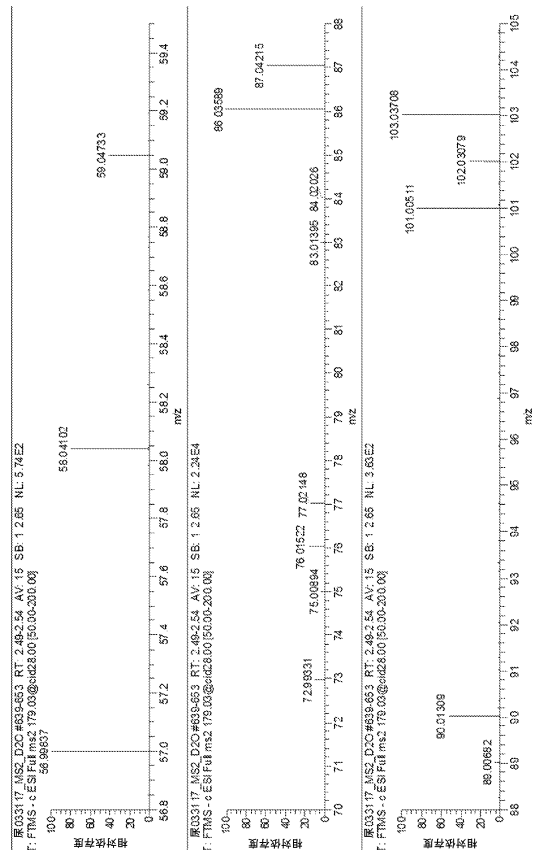
【図 1 1】



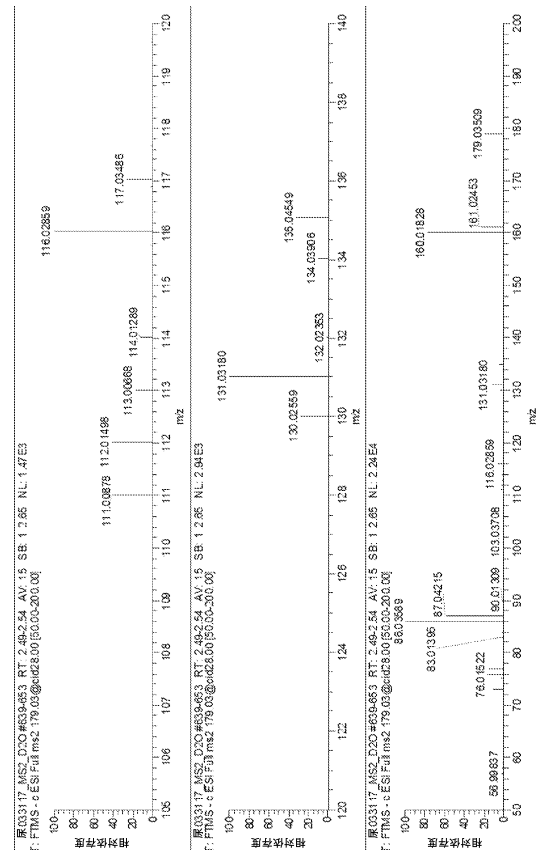
【図 12】



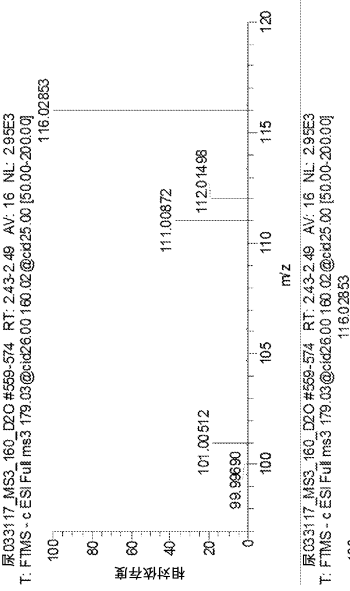
【図 13 A】



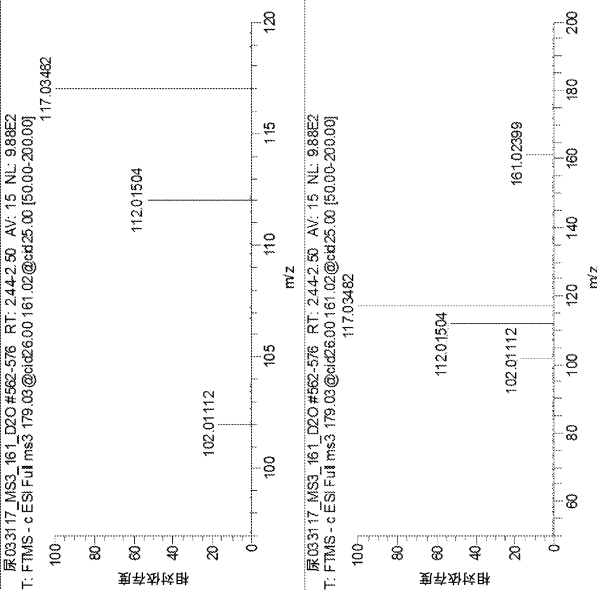
【図 13 B】



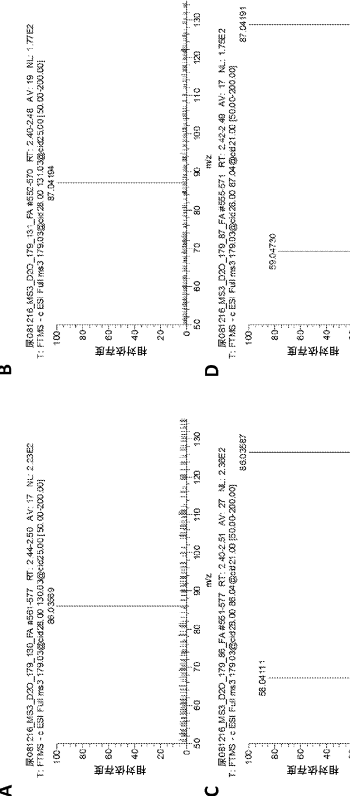
【図 1 4】



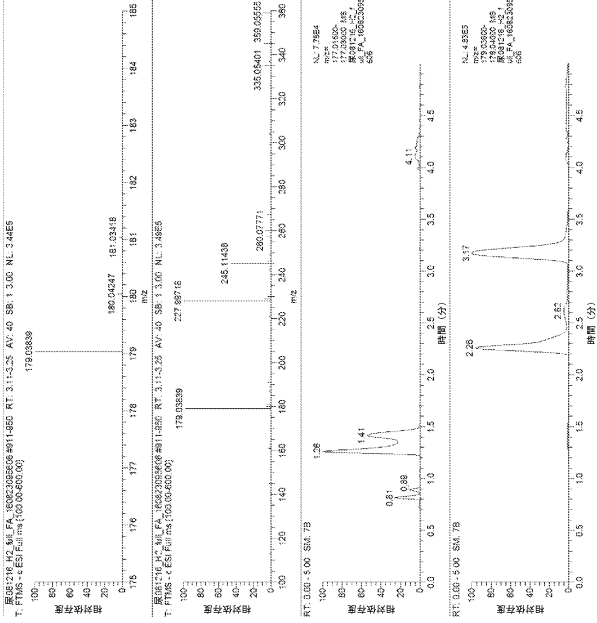
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

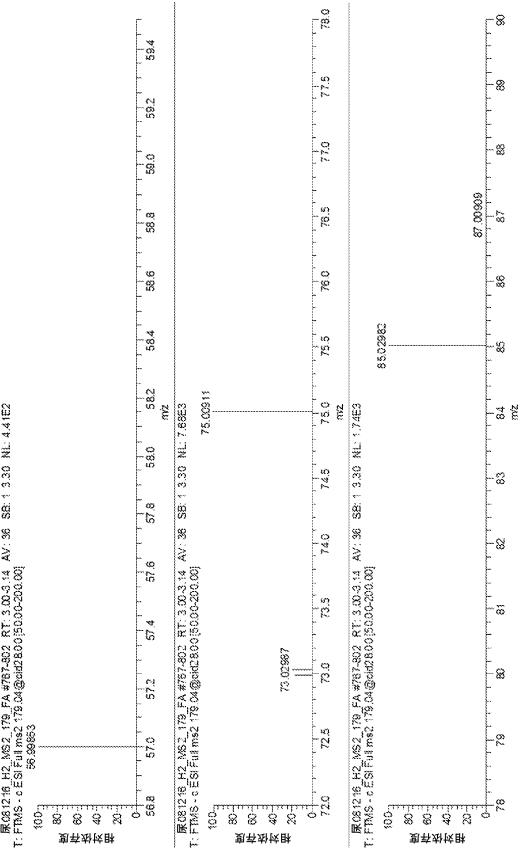
20

30

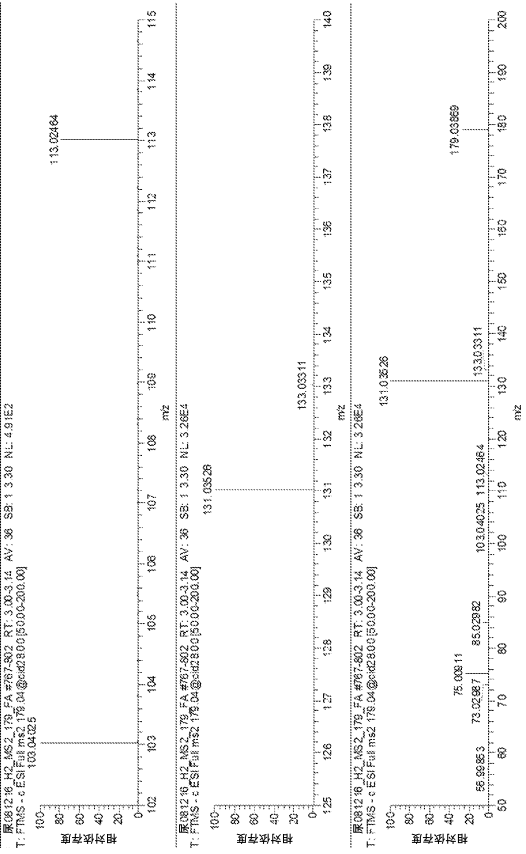
40

50

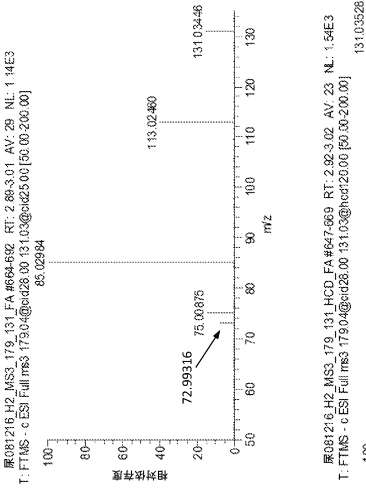
【図 18 A】



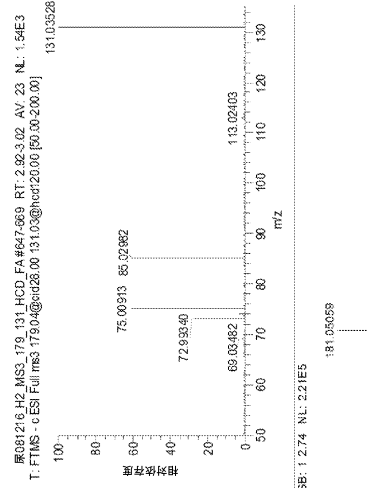
【図 18 B】



【図 19】

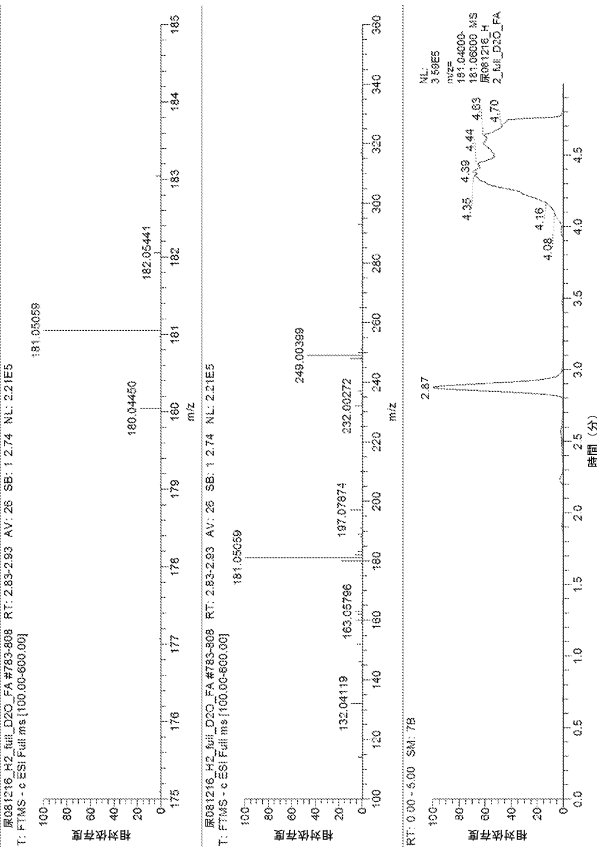


【図 20】



A

B



10

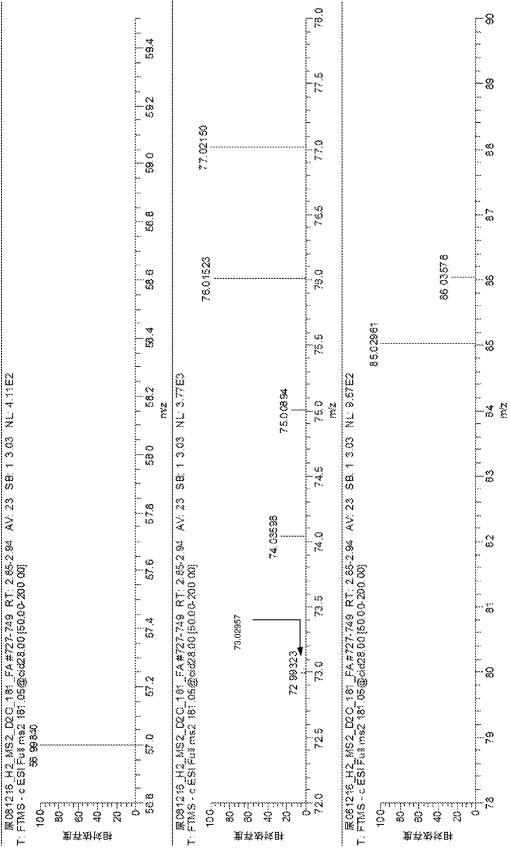
20

30

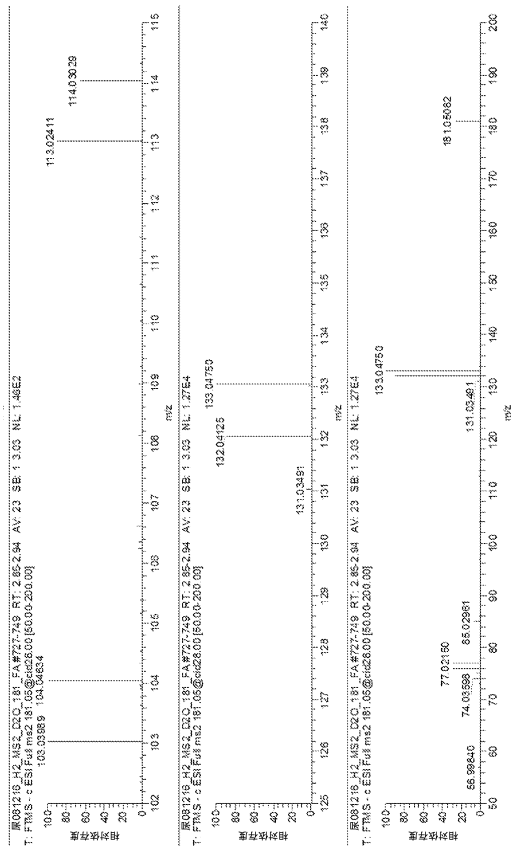
40

50

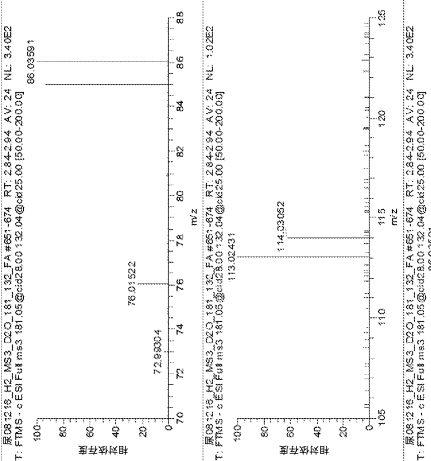
【図 2 1 A】



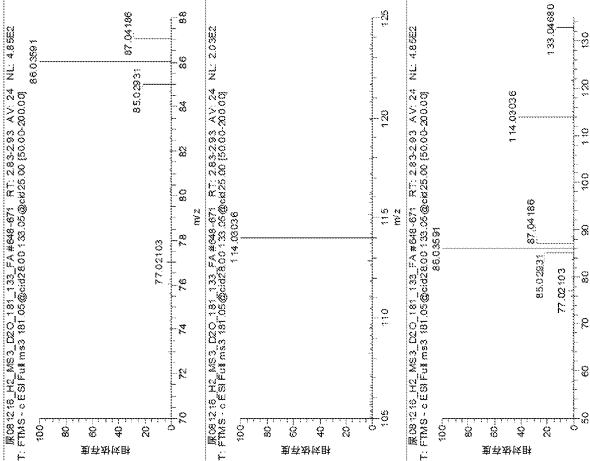
【図 2 1 B】



【図 2 2】



【図 2 3】



10

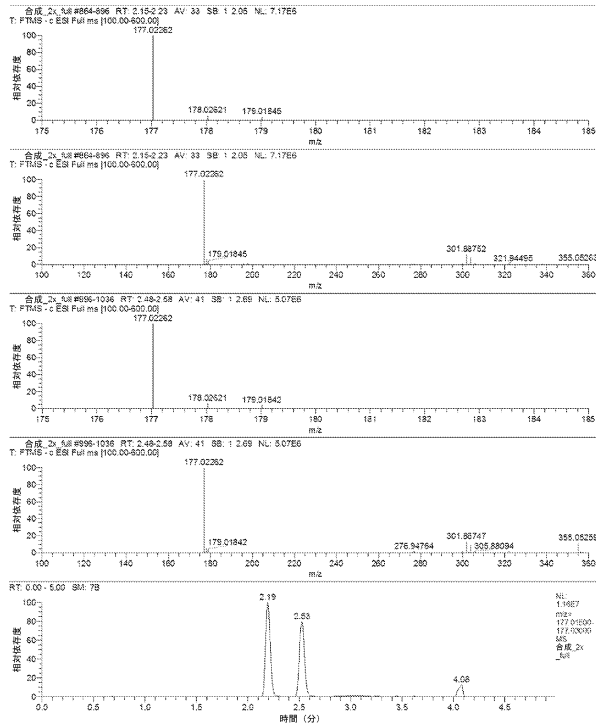
20

30

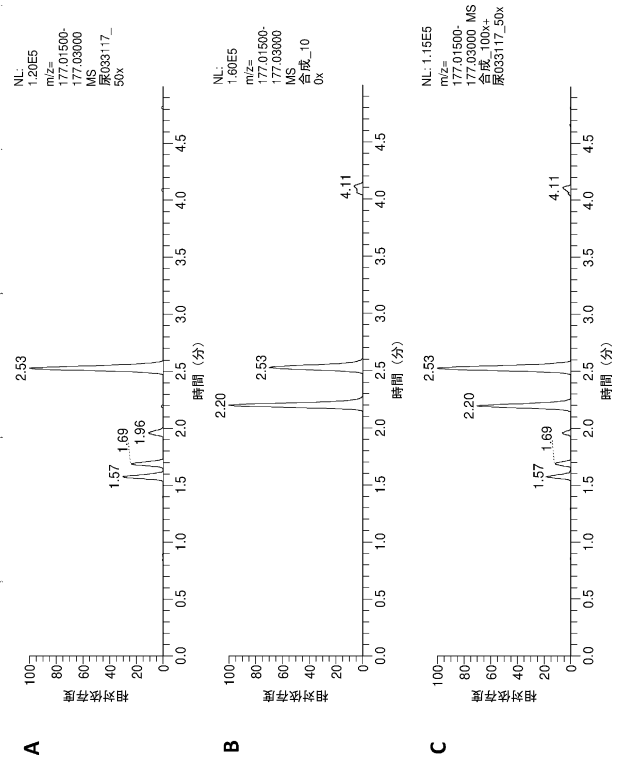
40

50

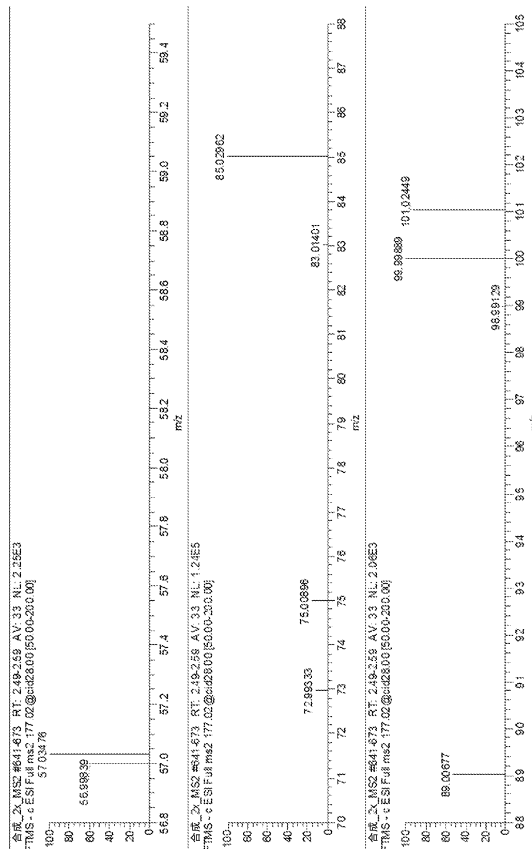
【図 2 4】



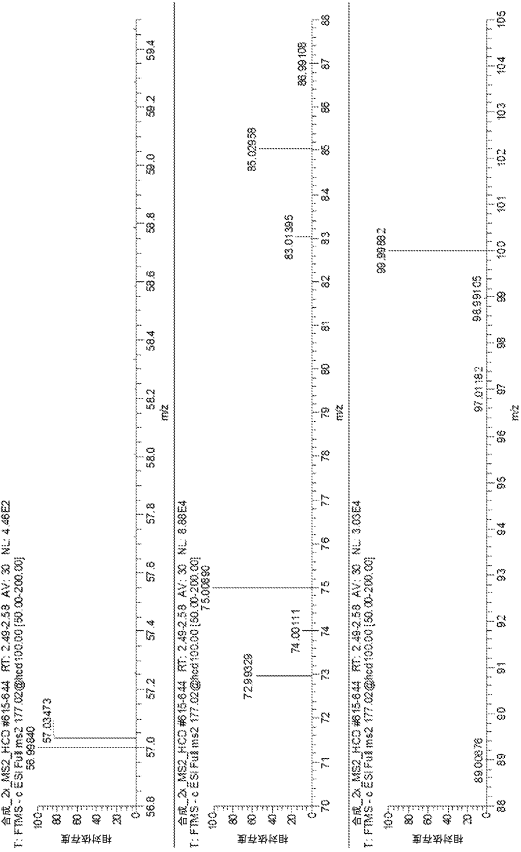
【図 2 5】



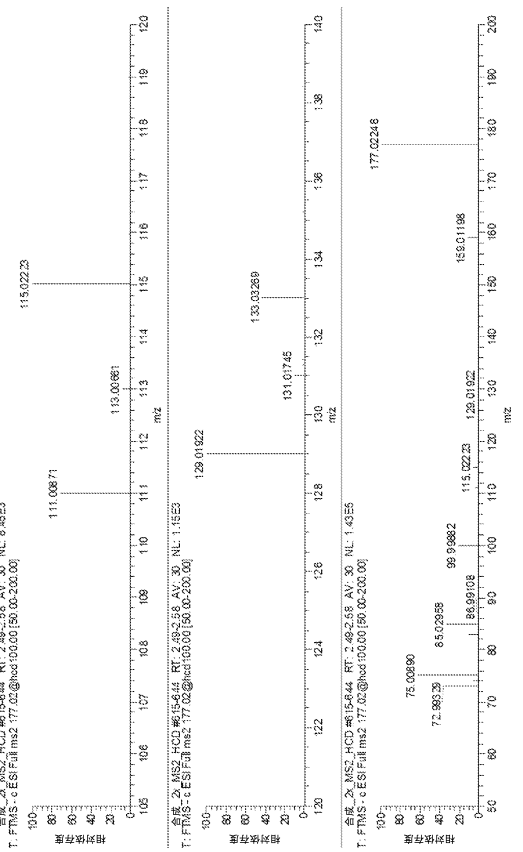
【図 2 6 A】



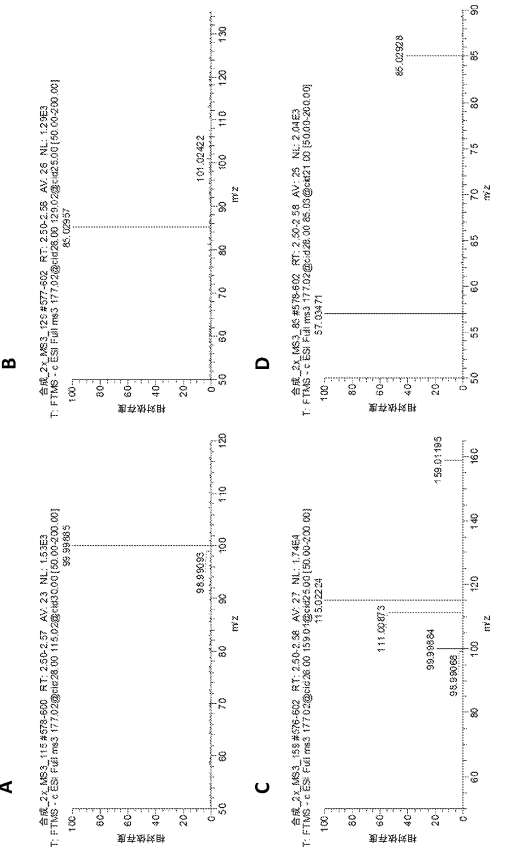
【図 2 7 A】



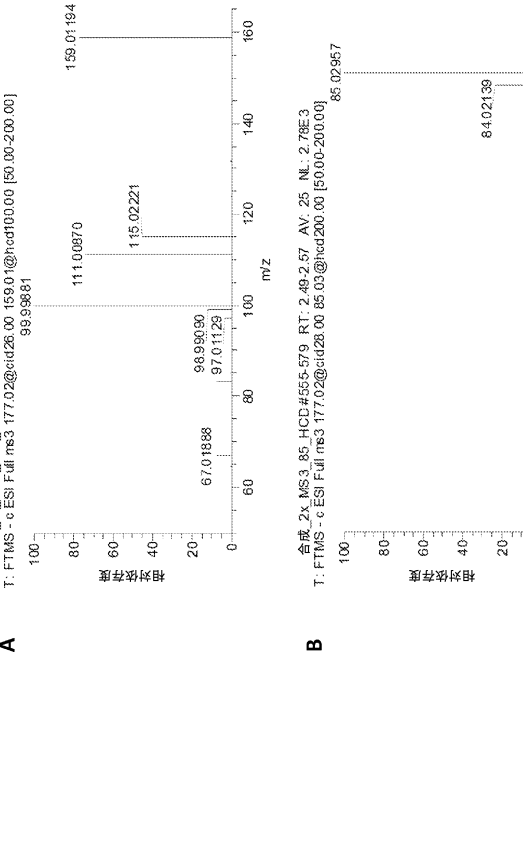
【図 2 7 B】



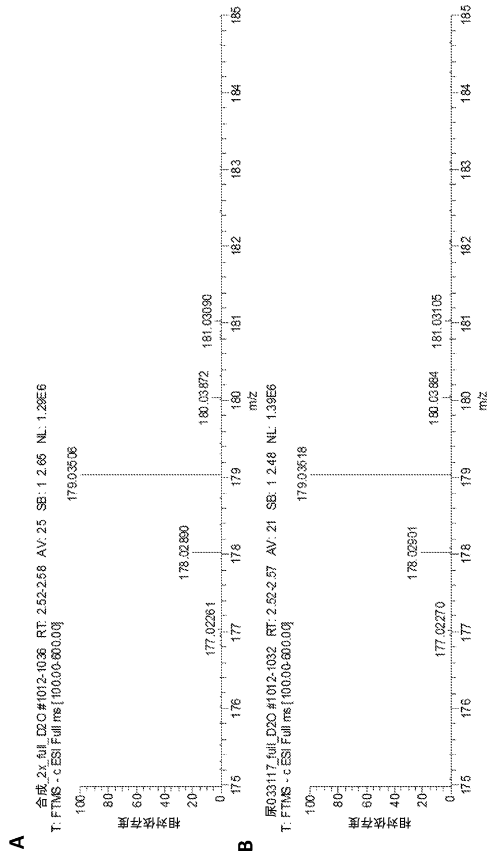
【図 2 8】



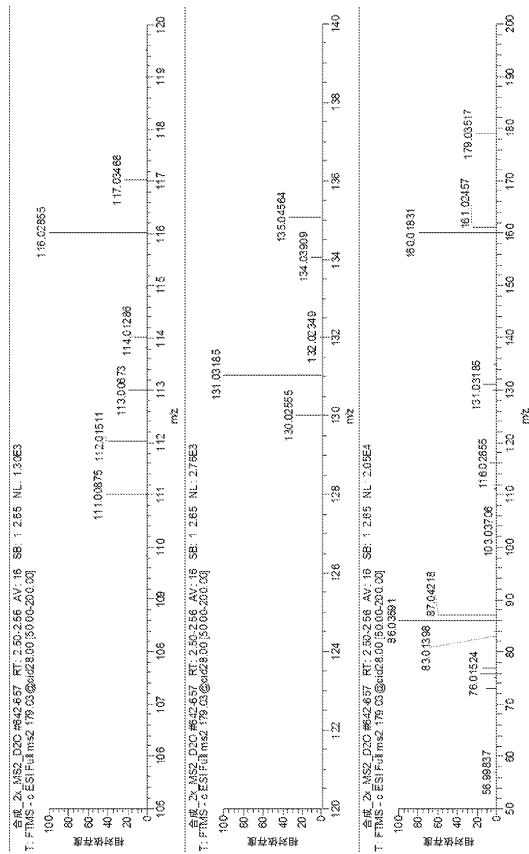
【図 2 9】



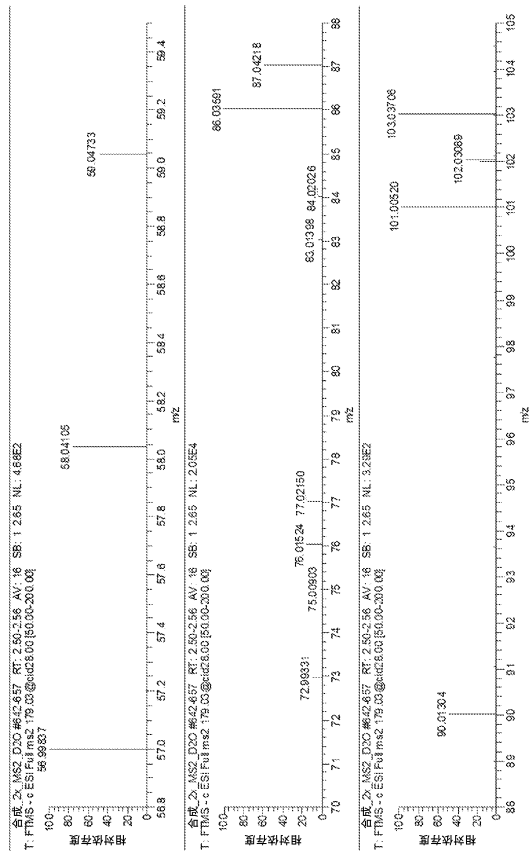
【图 3 0】



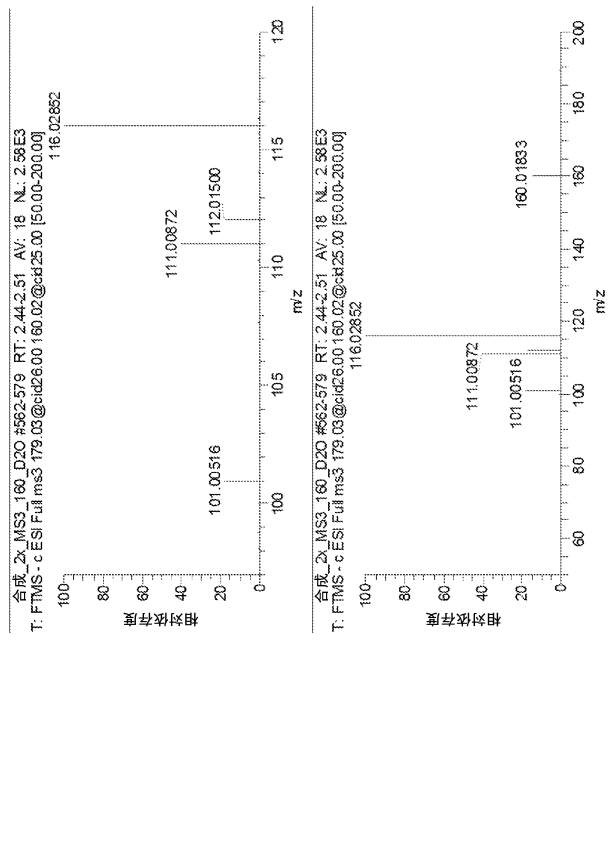
【图 3 1 B】



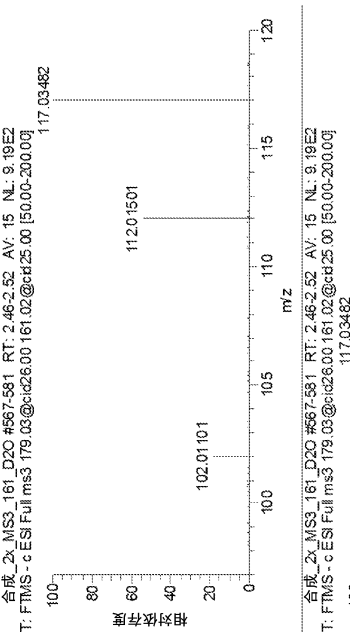
【图 3 1 A】



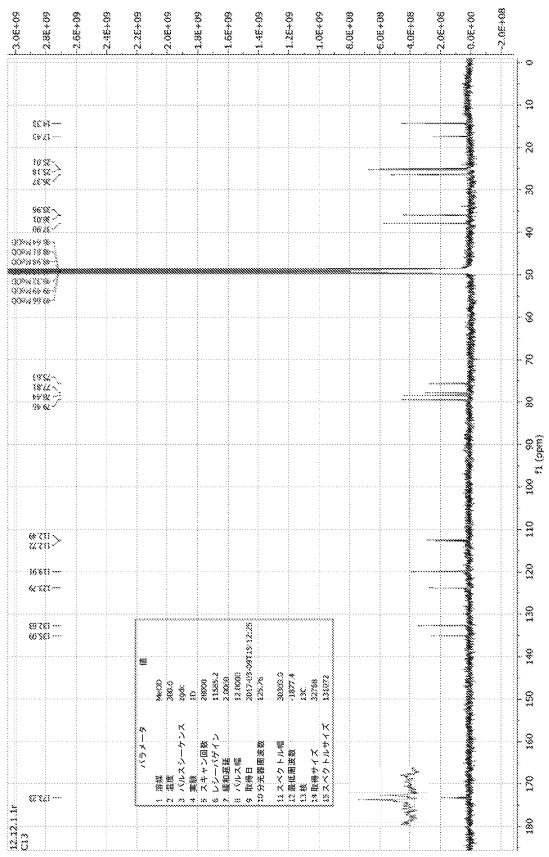
【图 3 2】



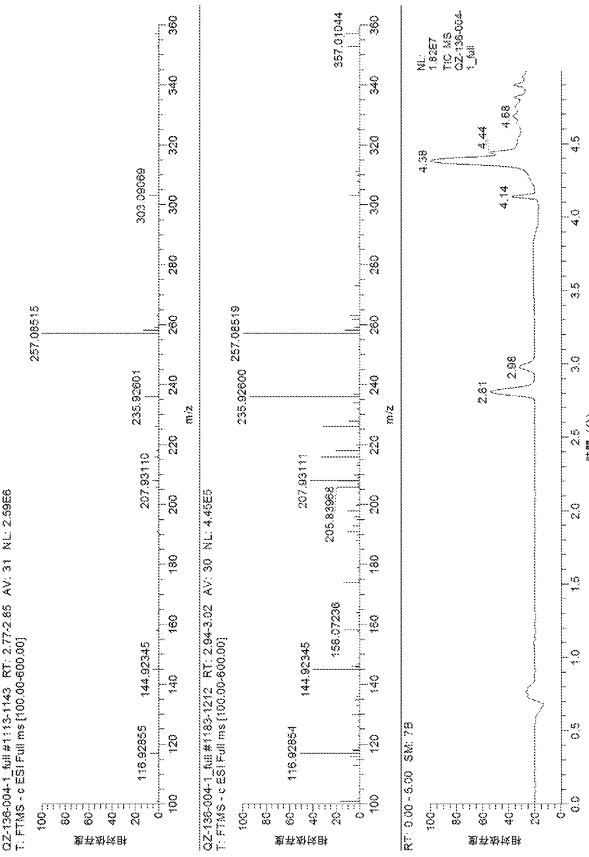
【図 3 3】



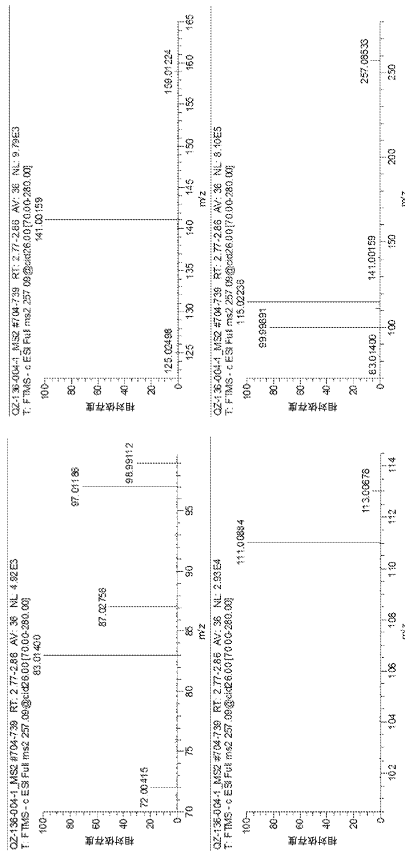
【図 3 4】



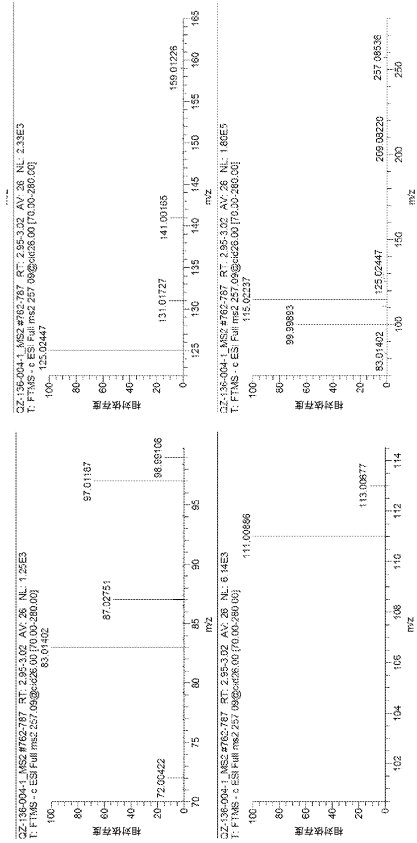
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 37】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/15 (2006.01)**C 1 2 N** 1/19 (2006.01)**C 1 2 N** 5/10 (2006.01)**C 0 7 C** 319/18 (2006.01)**C 1 2 N** 15/13 (2006.01)**C 0 7 B** 59/00 (2006.01)

F I

C 0 7 K 16/44**C 1 2 P** 21/08**C 1 2 N** 1/15**C 1 2 N** 1/19**C 1 2 N** 5/10**C 0 7 C** 319/18**C 1 2 N** 15/13**C 0 7 B** 59/00

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン キボ

アメリカ合衆国 2 7 5 1 9 ノースカロライナ州 ケーリー アイビーショー ロード 6 0 7

審査官 奥谷 暢子

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 2 0 1 9 2 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 4 2 9 (W O, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 0 7 C**G 0 1 N****C 0 7 K****C 1 2 P****C 1 2 N****C 0 7 B****C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)**