

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-519020

(P2017-519020A)

(43) 公表日 平成29年7月13日 (2017.7.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/225 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/225	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
	A 6 1 P 43/00 1 2 3	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2016-574359 (P2016-574359)  
 (86) (22) 出願日 平成27年7月3日 (2015.7.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月7日 (2017.2.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/051949  
 (87) 国際公開番号 WO2016/001686  
 (87) 国際公開日 平成28年1月7日 (2016.1.7)  
 (31) 優先権主張番号 1411937.4  
 (32) 優先日 平成26年7月3日 (2014.7.3)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 597166578  
 メディカル リサーチ カウンシル  
 Medical Research Co  
 uncil  
 イギリス国 スウィンドン ウィルトシャ  
 ー エスエヌ2 1エフエル、ノース ス  
 ター アベニュー、ポラリスハウス、デビ  
 ッド フィリップス ビルディング、2階  
 2nd Floor David Phi  
 llips Building, Pola  
 ris House, North Sta  
 r Avenue Swindon, Wi  
 ltshire SN2 1FL Uni  
 ted Kingdom

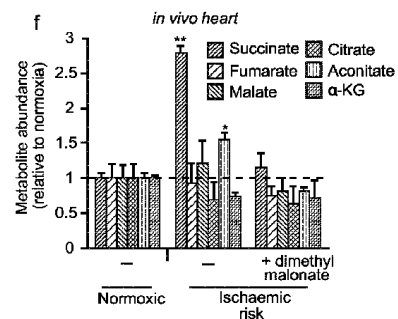
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コハク酸脱水素酵素阻害剤 (SDHi's)

## (57) 【要約】

本発明は、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる、虚血性再灌流傷害などの再灌流傷害の治療又は予防における使用のための、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び/又は薬学的に許容されるその塩に関する。

Figure 2 continued



## 【特許請求の範囲】

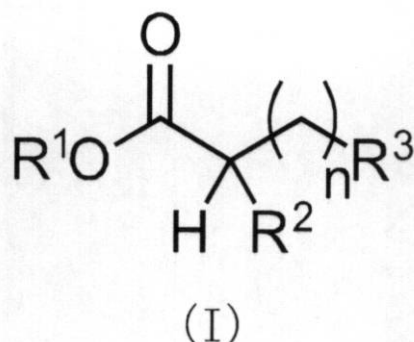
## 【請求項 1】

コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のための、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

## 【請求項 2】

一般式 (I) :

## 【化 1】



10

20

(式中、

$n$  は、0 又は 1 であり ;

$R^1$  は、 $C_{1-12}$  アルキルから選択され ;

$R^2$  は、H 及び OH から選択され ;

$R^3$  は、 $CO_2R^4$  及び  $C(O)-CO_2R^4$  から選択され ;

$R^4$  は、 $C_{1-12}$  アルキルから選択される )

を有する、請求項 1 に記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

30

## 【請求項 3】

$R^1O_2C-CH_2-CO_2R^4$ 、 $R^1O_2C-CH(OH)-CH_2-CO_2R^4$ 、及び  $R^1O_2C-CH_2-C(O)-CO_2R^4$  から選択される、請求項 2 に記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

## 【請求項 4】

$R^1O_2C-CH_2-CO_2R^4$  (式中、 $R^1$  及び  $R^4$  は独立に、メチル、エチル、プロピル、及びブチルから選択される) から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

40

## 【請求項 5】

ジメチルマロン酸である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

## 【請求項 6】

再灌流傷害が虚血性再灌流傷害である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

## 【請求項 7】

再灌流傷害が、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化、動脈疾患、火傷、がん、心停止

50

、脳血管疾患、脳卒中に続発する脳浮腫、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心臓病、経皮経管冠動脈形成後の狭窄、冠疾患、糖尿病、高血圧、挫滅又は外科手術から生じる機械的外傷、偏頭痛、心筋梗塞、末梢血管疾患、肺血管疾患、心臓外科手術後の再灌流、脳卒中後の再灌流、網膜の血管疾患、脳卒中、及び外科的な組織の再灌流傷害から選択される障害の結果である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 8】

コハク酸の蓄積を阻害することによる待機的外科手術での再灌流傷害の治療又は予防における使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

10

【請求項 9】

保存する臓器での再灌流傷害の治療又は予防における使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 10】

臓器移植での再灌流傷害の治療又は予防における使用のための、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 11】

コハク酸脱水素酵素阻害剤が、血流の閉塞を取り除くために使用した、或いはそれを意図した治療と組み合わせて投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

20

【請求項 12】

血流の閉塞を取り除くために使用した、或いはそれを意図した治療が、血液希釈剤、溶解剤、MitoSNO及びステントから選択される、請求項 11 に記載の細胞透過性及び可逆性コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 13】

コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害を治療する又は予防する薬品の製造のための、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩の使用。

30

【請求項 14】

対象において再灌流傷害を治療する又は予防する方法であって、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、有効量のコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる、再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩に関する。

40

【背景技術】

【0002】

コハク酸は、嫌気性条件で産生されることが公知である。例えば、潜水する動物、腫瘍の中心の低酸素領域、及び特定の寄生生物が、低酸素の状態のコハク酸の増加を示すことが観察され得る。しかし、これらの研究は、典型的には、細胞を死滅させる、又は研究下のシステムから細胞をブロック若しくは取り除こうとする試みに関連する。さらに、これらのシステムは、低酸素下の哺乳動物細胞が経験する状態にいつも相当するとは限らない。例えば、バクテリアにおいて、コハク酸代謝に含まれる 2 つの酵素活性は、[ 哺乳動物

50

細胞における同じ単一の酵素、コハク酸脱水素酵素 (SDH) にではなく] 2つの別々の酵素にある。

【0003】

コハク酸は、特定のインビトロでのシステムにおいて研究されてきた。特定のインビトロでのシステムにおいて観察されてきたコハク酸を介する活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) 生成が可能である。しかし、このような観察は、インビボでの可能な条件の純粋な反映というよりはむしろ、インビトロでの珍しい存在として主にみなされてきた。

【0004】

コハク酸は酸素検知適用について研究されてきた。先行技術における抗炎症効果を達成するために、コハク酸をブロックする試みがなされてきた。

10

【0005】

インビボでのコハク酸蓄積を、再灌流時のコハク酸の酸化に起因するミトコンドリア複合体IによるROS産生と関連付ける、先行技術における公知の実験的な関連はない。

【0006】

Hu et al, Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medical Sciences, vol. 25, 2005, pages 439-441及びHirata et al, Transplantation, vol. 71, 2001, pages 352-359はともに、3 - ニトロプロピオン酸を用いる化学的プレコンディショニングがラットの虚血再灌流傷害を減らしたことを示している。化合物3 - ニトロプロピオン酸はミトコンドリア複合体IIの阻害剤である。Wojtovich et al, Basic Research in Cardiology, vol. 104, 2009, pages 121-129は、複合体II阻害剤であるアトペニンA5 (atpennin A5) が、mK<sub>ATP</sub>チャネル依存性機構を介して、シミュレートした虚血再灌流傷害から心臓を保護すると報告している。しかし、3 - ニトロプロピオン酸及びアトペニンA5などの阻害剤は、不可逆性であるという不都合がある。結果として、そのような不可逆性阻害剤と結合するいずれの複合体IIも、その正常な機能を永久に実行できない。

20

【0007】

Drose et al, Molecular Pharmacology, vol. 79, 2011, pages 814-822は、2 - テノイルトリフルオロアセトン (TTF A, thenoyltrifluoroacetone)、3 - ニトロプロピオン酸、アトペニンA5、及びマロン酸を含むいくつかの心臓保護的な複合体II阻害剤を研究した。試験した阻害剤のうち、マロン酸は、アトペニンA5 (atepennin A5) に必要なナノモル濃度レベルと比較して、最大半量の阻害を達成するためにミリモル濃度レベルの最も高濃度を必要とした。さらに、マロン酸は、細胞透過性でないという不都合がある。他の阻害剤であるTTF A、3 - ニトロプロピオン酸、及びアトペニンA5は、不可逆性であるという不都合がある。

30

【0008】

ジメチルマロン酸は、公知の化合物である。マロン酸及びその誘導体は、ポリマー形成の供給原料として使用される工業的化合物である。ジメチルマロン酸など、SDHの阻害剤のプロドラッグとしてのマロン酸誘導体の使用のための先行技術における公知の教示はない。プロドラッグであるジメチルマロン酸は、SDHの阻害剤であるマロン酸へとインビボで加水分解される。

40

【0009】

本発明は先行技術に係る問題点を克服するために探求する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Hu et al, Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medical Sciences, vol. 25, 2005, pages 439-441

【非特許文献2】Hirata et al, Transplantation, vol. 71, 2001, pages 352-359

【非特許文献3】Wojtovich et al, Basic Research in Cardiology, vol. 104, 2009, pages 121-129

50

【非特許文献4】Drose et al, Molecular Pharmacology, vol. 79, 2011, pages 814-822

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、広範なメタボロミック調査を実施し、虚血時に蓄積される代謝物を同定した。注意深く制御された研究の一部として、このメタボロミック分析を広範囲の組織型で並行して行った。多くの代謝物は、異なる組織の虚血状態で変わることが観察された。しかし、この発見にも関わらず、本発明者らは、それらの分析に固執し、組織研究のフルスペクトルにわたって同様に影響されるそれらの代謝物のみ選択した。このようにして、本発明者らは、虚血の効果に共通である可能性がより高い代謝物を巧妙に選択することができた。

10

【0012】

さらに、本発明者らは、分析物における再灌流の効果の分析を続けた。これにより、本発明者らは、虚血時の蓄積において、組織型の範囲にわたって同様に作用する、わずか3つの代謝物（ヒポキサンチン、キサンチン、及びコハク酸）を選択した。最も驚くことに、本発明者らは、これら3つのうち、コハク酸のみが再灌流後の活性酸素種の生成にまことしやかに役割を果たし得るであろうことを観察した。虚血時に蓄積する、並びに急速に代謝される及び再灌流後の活性酸素種の産生に含まれるコハク酸を選び抜くこれらのドラマチックな洞察に、本発明は基づく。

20

【0013】

コハク酸が、再灌流時にそんなに早く消滅するということは、本発明者らにとって驚きであった。コハク酸が、正常酸素圧状態で代謝機能の回復後の活性酸素種の供給源であるという発見も驚きであった。複数の臓器が同じ代謝シグネチャーを共有することは、さらに驚きであり、コハク酸代謝が、虚血状態への哺乳動物細胞の応答において広く適用可能な事象であることを実証した。

【0014】

したがって、一態様において、本発明は、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

30

【0015】

さらなる態様において、本発明は、対象において再灌流傷害を治療する又は予防する方法であって、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、有効量のコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

40

【0017】

さらなる態様において、本発明は、コハク酸脱水素酵素の細胞透過性及び可逆性阻害剤である、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0018】

定義

C<sub>1-12</sub> アルキルは、一般に1～12個の炭素原子を有する直鎖状及び分岐状の飽和炭化水素基を指す。アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、ペンタ-1-イル、ペンタ-

50

2 - イル、ペンタ - 3 - イル、3 - メチルブタ - 1 - イル、3 - メチルブタ - 2 - イル、2 - メチルブタ - 2 - イル、2, 2, 2 - トリメチルエタ - 1 - イル、n - ヘキシル、n - オクチル、n - ノナン、n - デカン、n - ウンデカン、n - ドデカンなどが挙げられる。

【0019】

「薬剤」、「原薬」、「有効活性成分」などは、治療を必要とする対象を治療するために使用され得る化合物（例えば、式（I）の化合物及び以下に具体的に命名した化合物）を指す。

【0020】

「賦形剤」は、薬剤の生物学的利用能に影響を及ぼし得るが、薬理学的に不活性であり得る任意の物質を指す。

10

【0021】

「薬学的に許容される」物質は、過度の毒性、刺激性、アレルギー応答などなく、対象の組織と接触する使用に適し、妥当なリスク対効果比に見合い、それらの意図された使用に有効な、堅実な医学的判断の範囲内である物質を指す。

【0022】

「医薬組成物」は、1又は2以上の原薬及び1又は2以上の賦形剤の組合せを指す。

【0023】

本明細書で使用する場合、用語「対象」は、ヒト又は非ヒト動物を指す。非ヒト動物の例としては、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウサギ及びシカなどの家畜動物、並びにネコ、イヌ、ネズミ、及びウマなどのコンパニオンアニマルが挙げられる。

20

【0024】

薬剤の「治療上有効な量」は、対象の治療に有効であり、所望の治療上の、寛解性の、阻害性の、又は予防する効果を生み出す、薬剤又は組成物の量を指す。治療上有効な量は、特に対象の体重及び年齢、並びに投与の経路に依存し得る。

【0025】

「治療すること（treating）」は、そのような用語が適用される障害、疾患、又は状態を回復すること、緩和すること、そのような用語が適用される障害、疾患、又は状態の進行を阻害すること、又はそのような用語が適用される障害、疾患、又は状態を予防すること、あるいはそのような障害、疾患又は状態の1又は2以上の症状を回復すること、緩和すること、そのような障害、疾患又は状態の1又は2以上の症状の進行を阻害すること、又はそのような障害、疾患又は状態の1又は2以上の症状を予防することを指す。

30

【0026】

「治療（treatment）」は、直前に定義したように「治療すること（treating）」の作用を指す。

【0027】

「予防する」は、所与の疾患又は障害を得るリスクの低減、すなわち臨床症状を発生しないようにすることを指す。それゆえ、「予防する」は、それを必要とする対象の予防的治療を指す。予防的治療は、障害の症状がない若しくは最小限であるが、障害にかかりやすい傾向又は障害を発生するリスクがある対象に、適切な投与量の治療剤を投与し、それにより障害の発症を実質的に防ぐことにより達成され得る。

40

【0028】

用語「プロドラッグ」は、対象への投与後、インビボ、好ましくは血中での加水分解などの構造変化に供され、SDHi又はその塩を生成する化合物を意味する。例えば、カルボン酸、アミノ基、ヒドロキシル基などを有する薬学的化合物からプロドラッグを生成する様々な手段が公知であり、当業者は適切な手段を選択できる。SDHi又はその塩のプロドラッグの型は特に限定されない。例えば、SDHiが1又は2以上のカルボン酸を有する場合、例は1又は2以上のカルボン酸がエステルに変換されるプロドラッグを含む。好ましい例は、メチルエステル又はジメチルエステルなどのエステル化合物を含む。

【0029】

50

「コハク酸脱水素酵素阻害剤」又は「SDHi」は、コハク酸脱水素酵素の作用を阻害する化合物を指す。

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「含む (comprising)」は「少なくとも～の一部からなる」を意味する。用語「含む (comprising)」を含む本明細書の各記載を説明する場合、それ以外の特徴又は該用語で始まるものも存在し得る。「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」などの関連用語は同様に説明される。

【0031】

コハク酸脱水素酵素阻害剤 (SDHi's) 又はそのプロドラッグ

SDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防において有用である。したがって、SDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩の投与は、SDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩を投与しない再灌流において観察されるコハク酸の量と比較して、組織における再灌流において観察されるコハク酸の量を減らすことにより、虚血心筋層などの対象の組織における再灌流傷害を治療又は予防する。

10

【0032】

SDHi はSDHの可逆性阻害剤である。SDHiの可逆性は、競合的結合により阻害剤を経時的にミトコンドリア複合体から離すことができ、その効果が一過性であるため重要である。結果として、複合体はその正常な機能の実施に戻り得る。

【0033】

コハク酸部位を介して作用するSDHiに関して、SDHiの可逆性は、(1) SDHiで治療した心臓、(2) 治療していない心臓、及び(3) SDHi + ジメチルコハク酸で治療した心臓の梗塞サイズを測定及び比較することにより決定され得る。SDHiで治療した心臓における梗塞サイズが、治療していない心臓の梗塞サイズと比較して減少する場合、心臓保護が示される。SDHiの可逆性は、SDHiで治療した心臓によって示される心臓保護が、ジメチルコハク酸を戻すことにより抑制される場合、実証される。この手順は、トリフェニルテトラゾリウムクロリド染色を用い、心臓の梗塞サイズを決定する実施例において述べる (図4b & cも参照)。

20

【0034】

SDHiの有効性は、虚血時のコハク酸蓄積を予防するSDHiの能力を決定することにより評価され得る。虚血時のコハク酸蓄積を予防するSDHiの能力は、実施例のメタボロミック分析において詳述されるように、液体クロマトグラフィー / 質量分析 (LC / MS) により組織におけるコハク酸レベルを測定することによって決定され得る。SDHiの可逆性は、SDHiでの治療後のコハク酸レベルを、SDHi + ジメチルコハク酸での治療後のコハク酸レベルと比較することによって示され得る。

30

【0035】

SDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、膜透過性である。この膜透過性により、化合物は細胞に入り、蓄積することができる。

【0036】

膜透過性は、酸素消費率 (OCR, oxygen consumption rate) の測定、ジメチルコハク酸によるこの駆動、次いでSDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩 (例えば、ジメチルマロン酸) の添加によるこの阻害によって、細胞実験において分析することができ、有効性及び取り込みの時間尺度及びSDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩の加水分解を評価できる。さらに、図5aに示したように、化合物の細胞透過性は、処置していない細胞における化合物のレベルを処置した細胞の化合物のレベルと比較することにより決定され得る。典型的には、化合物のレベルは、実施例のメタボロミック分析において詳述されるようにLC / MSを用いて決定され得る。

40

【0037】

より好適には、SDHi 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、SDHiのプロドラッグ又は薬学的に許容されるその塩である。

50

## 【 0 0 3 8 】

最も好適には、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、プロドラッグである。

## 【 0 0 3 9 】

好適には、S D H i は S D H に結合する。

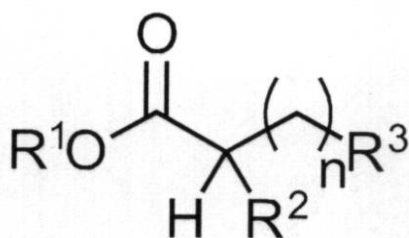
## 【 0 0 4 0 】

好適には、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、一般式 ( I ) :

## 【 0 0 4 1 】

## 【 化 1 】

10



(I)

20

## 【 0 0 4 2 】

( 式中、

n は、0 又は 1 であり ;

R<sup>1</sup> は、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキルから選択され ;

R<sup>2</sup> は、H 及び OH から選択され ;

R<sup>3</sup> は、CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup> 及び C(O) - CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup> から選択され ;

R<sup>4</sup> は、C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> アルキルから選択される )

を有する。

## 【 0 0 4 3 】

好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、R<sup>1</sup>O<sub>2</sub>C - CH<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>、R<sup>1</sup>O<sub>2</sub>C - CH(OH) - CH<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>、及び R<sup>1</sup>O<sub>2</sub>C - CH<sub>2</sub> - C(O) - CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup> から選択される。

## 【 0 0 4 4 】

より好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、R<sup>1</sup>O<sub>2</sub>C - CH<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub>R<sup>4</sup> ( 式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>4</sup> は独立に、メチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、s - ブチル、及び t - ブチルから選択される ) から選択される。

## 【 0 0 4 5 】

最も好適には、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、マロン酸化合物である。

## 【 0 0 4 6 】

好適には、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、細胞透過性マロン酸を含んでよい。

## 【 0 0 4 7 】

好適には、本発明のマロン酸 S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容される

50



その塩は、エチルエステルマロン酸である。

【0048】

最も好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、ジメチルマロン酸である。

【0049】

ジメチルマロン酸は、きわめて毒性が低いため有利である。例えば、ジメチルマロン酸のLD<sub>50</sub>は、経口投与する場合、キログラムあたりおよそ5グラムである。

【0050】

好適には、SDHiのSDHへの結合は、コハク酸結合部位においてである。好適には、これはコハク酸との競合的結合である。

10

【0051】

好適には、コハク酸結合部位においてSDHと結合するSDHi、又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、 $R^1O_2C-CH_2-CO_2R^4$ 、 $R^1O_2C-CH(OH)-CH_2-CO_2R^4$ 、及び $R^1O_2C-CH_2-C(O)-CO_2R^4$ から選択される。

【0052】

好適には、SDHiはユビキノン結合部位においてSDHに結合する。好適には、この結合はキノンとの競合的結合である。

【0053】

最も好適には、SDHは本発明において有用であり、正常酸素圧状態でコハク酸の再酸化を阻害する。

20

【0054】

好適には、本発明のSDHiは「複合体II」阻害剤である。

【0055】

本発明のSDHiは、可逆性阻害剤である。

【0056】

好適には、本発明のSDHiは可逆性SDHiである。

【0057】

R<sup>1</sup>

好適には、R<sup>1</sup>は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル及びヘキシルから選択される。

30

【0058】

より好適には、R<sup>1</sup>は、メチル及びエチルから選択される。

【0059】

R<sup>2</sup>

好適には、R<sup>2</sup>はHである。

【0060】

R<sup>3</sup>

好適には、R<sup>3</sup>はCO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>である。

【0061】

R<sup>4</sup>

好適には、R<sup>4</sup>は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、及びヘキシルから選択される。

40

【0062】

より好適には、R<sup>4</sup>は、メチル及びエチルから選択される。

【0063】

投与及びタイミング

好適には、SDHi又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、経口的に、局所的に、皮下に、非経口的に、筋肉内に、動脈内に、及び／又は静脈内に投与される。

50

## 【 0 0 6 4 】

より好適には、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、静脈内に投与される。

## 【 0 0 6 5 】

S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、冠動脈への直接注射により投与され得る。

## 【 0 0 6 6 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、虚血の前に投与される。そのような状況において、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、虚血のリスクのある対象に投与される。

10

## 【 0 0 6 7 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、虚血後に投与される。

## 【 0 0 6 8 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流の前に投与される。

## 【 0 0 6 9 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流の開始後できるだけ早く投与される。

## 【 0 0 7 0 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流開始の 5 分以内に投与される。好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流開始の 4 分以内、再灌流開始の 3 分以内、再灌流開始の 2 分以内、又は再灌流開始の 1 分以内に投与される。

20

## 【 0 0 7 1 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、外科手術前に投与される。

## 【 0 0 7 2 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、外科手術中に投与される。

30

## 【 0 0 7 3 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、虚血前に保存することが意図される臓器に投与される。

## 【 0 0 7 4 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、虚血後できるだけ早く、保存する臓器に投与される。

## 【 0 0 7 5 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流後できるだけ早く、保存する臓器に投与される。

## 【 0 0 7 6 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流の 5 分以内に、保存する臓器に投与される。好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、再灌流開始の 4 分以内、再灌流開始の 3 分以内、再灌流開始の 2 分以内、又は再灌流開始の 1 分以内に投与される。

40

## 【 0 0 7 7 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、臓器移植における適用を見出す。

## 【 0 0 7 8 】

保護的な治療が提供されることは、本発明の利点である。現在、認可された保護的な化合物は市場にない。

50

## 【 0 0 7 9 】

好適には、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、哺乳動物においてすぐに代謝される。

## 【 0 0 8 0 】

哺乳動物細胞内で代謝されることは、マロン酸 S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩の利点である。細胞透過性マロン酸誘導体は、マロン酸を一度細胞内へ放出するために好適に代謝される。マロン酸自体は、細胞内の自然の代謝経路により有利に代謝される。より特異的には、マロン酸は、哺乳動物細胞に自然に存在する脂肪分解経路の一部に代謝される。このことは、S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩がマロン酸化合物である場合、本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩の代謝物の副作用又は副産物がないという利点を提供する。

10

## 【 0 0 8 1 】

好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、1 ~ 3 0 分間、0 . 1 ~ 5 0 m g / 対象の k g / 分の用量で投与され得る。より好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、1 ~ 3 0 分間、0 . 5 ~ 2 0 m g / 対象の k g / 分の用量で投与され得る。より好適には、コハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩は、1 ~ 3 0 分間、1 ~ 1 0 m g / 対象の k g / 分の用量で投与され得る。

## 【 0 0 8 2 】

20

発明の詳細な説明

分析した候補代謝物から、本発明者らは、異なる組織で異なって変わるものを除外した。例えば、虚血状態後、いくつかの代謝物はある組織で上昇したが、別の組織では減少した。いくつかの代謝物は、異なるレベルで影響を受けた。他の代謝物は、影響を受けるようには全く見えなかった。さらなる代謝物は、研究した全ての組織型において、影響を受けるようには見えなかった。本発明者らは、系統的にデータを調べ、これらの多様な基準を持つそれぞれの代謝物を除き、研究したある範囲の異なる組織の虚血にわたって共通の性質を示す代謝物のみを選択した。

## 【 0 0 8 3 】

本発明が基づく重要な発見は、再灌流後、コハク酸を正常レベルに急速に戻すことである。これは、例えば、コハク酸レベルが、再灌流のわずか5分以内に正常に急速に減少することがみられる図 1 E に例示する。この応答の速さは注目すべきである。これは、コハク酸が、虚血状態時に生み出された電子のリザーバーを形成しているという、本発明者らによって蓄積された証拠に寄与する。さらに、タイミングは、再灌流により組織に与えた損傷のタイムコースと正確にオーバーラップするため驚きである。それは、その間にほとんどの損傷が引き起こされ、再灌流後のコハク酸代謝のタイムコースにも正確に従う、本発明者らによって観察された、この同じ5分ウィンドウである。

30

## 【 0 0 8 4 】

適用

好適には、本発明は、コハク酸の蓄積を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩に関する。

40

## 【 0 0 8 5 】

好適には、本発明は、コハク酸の輸送を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩に関する。

## 【 0 0 8 6 】

好適には、本発明は、コハク酸の酸化を阻害することによる再灌流傷害の治療又は予防における使用のためのコハク酸脱水素酵素阻害剤又はプロドラッグ及び / 又は薬学的に許容されるその塩に関する。

50

## 【 0 0 8 7 】

本発明は、外科手術における適用を見出す。

## 【 0 0 8 8 】

本発明は、臓器保存における適用を見出す。

## 【 0 0 8 9 】

本発明は、R O S 産生の低減又は阻害における適用を見出す。

## 【 0 0 9 0 】

本発明は、コハク酸蓄積の阻害又は予防における適用を見出す。

## 【 0 0 9 1 】

本発明は、再灌流後の R O S の放出の緩徐化における適用を見出す。

10

## 【 0 0 9 2 】

本発明は、待機的外科手術の全ての形態における適用を見出す。本発明のこれらの適用において、治療は予防的、すなわち、再灌流後の R O S の産生に対して予防的であってよい。

## 【 0 0 9 3 】

再灌流傷害

好適には、再灌流傷害は虚血再灌流傷害である。

## 【 0 0 9 4 】

好適には、再灌流傷害は、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化、動脈疾患、火傷、がん、心停止、脳血管疾患、脳卒中に続発する脳浮腫、脳損傷、慢性閉塞性肺疾患、うっ血性心臓病、経皮経管冠動脈形成後の狭窄、冠疾患、糖尿病、高血圧、出産中 / 後の低酸素症、挫滅又は外科手術から生じる機械的外傷、偏頭痛、心筋梗塞、（非致死性の）溺水、末梢血管疾患、肺血管疾患、再生医療、心臓外科手術後の再灌流、脳卒中後の再灌流、網膜の血管疾患、脳卒中、及び外科的な組織の再灌流傷害から選択される障害の結果である。

20

## 【 0 0 9 5 】

好適には、外科的な組織の再灌流傷害は、肝臓、腎臓、又は腸の外科手術の結果であり得る。

## 【 0 0 9 6 】

外科的な組織の再灌流傷害は、臓器が、肝臓外科手術（肝臓への血液の供給が一時的に止められ、切開 / 部分切除を可能にする場合）及び腎臓外科手術（例えば、腫瘍の部分切除）を含む虚血の期間にさらされる、待機的外科手術の結果であり得る。

30

## 【 0 0 9 7 】

脳損傷の一般的な原因は、外科手術中の全身性低血圧であり、脳の一時的な低灌流をもたらす。

## 【 0 0 9 8 】

より好適には、再灌流傷害は、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化、動脈疾患、心停止、脳血管疾患、脳卒中に続発する脳浮腫、うっ血性心臓病、経皮経管冠動脈形成後の狭窄、冠疾患、挫滅又は外科手術から生じる機械的外傷、心筋梗塞、末梢血管疾患、肺血管疾患、心臓外科手術後の再灌流、脳卒中後の再灌流、網膜の血管疾患、脳卒中、及び外科的な組織の再灌流傷害から選択される障害の結果である。

40

## 【 0 0 9 9 】

好適には、外科手術は、血管外科手術、心臓バイパス外科手術、又は移植外科手術である。

## 【 0 1 0 0 】

より好適には、再灌流傷害は、脳卒中後の再灌流、脳卒中、及び心筋梗塞から選択される障害の結果である。

## 【 0 1 0 1 】

好適には、再灌流傷害は、保存する臓器における再灌流傷害である。好適には、保存される臓器は、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、脾臓、及び皮膚から選択され得る。

50

## 【 0 1 0 2 】

臓器は、移植のため、又は再生医療における使用のための細胞及び組織の供給源（例えば、幹細胞の単離）として保存され得る。

## 【 0 1 0 3 】

より好適には、再灌流傷害は、再生医療における再灌流傷害である。再生医療の未来は、適当な酸素欠乏状態下での（冷凍）保存幹細胞並びに幹細胞由来細胞及び組織の原理に基づき、続く酸素化したレシピエントへの養子移植及び／又は移植を伴う。

## 【 0 1 0 4 】

組合せ

本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、血流の閉塞を取り除くために使用した、或いはそれを意図した治療と組み合わせて投与され得る。

## 【 0 1 0 5 】

本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、1又は2以上のステント、MitoSNO、血液希釈剤、溶解剤、血液保存液、臓器保存液、又は血流の閉塞を取り除くために使用した、或いはそれを意図した任意の他の治療と組み合わせて投与され得る。

## 【 0 1 0 6 】

好適には、血液又は臓器保存液は、晶質液及び非晶質液を含んでよく、これらに限定されないが、生理食塩水、ヒトアルブミン液、ハルトマン液、及びゲロフシンを含む。

## 【 0 1 0 7 】

MitoSNOはW O 2 0 0 8 0 3 9 0 8 5 に記載のように調製され得る。

## 【 0 1 0 8 】

好適には、血液希釈剤は、Coumadin（商標）（ワルファリン）、Pradaxa（商標）（ダビガトラン）、Xarelto（商標）（リバーロキサバン）、及びEliquis（商標）（アピキサバン）、フォンダパリヌクス、未分画ヘパリン、これらに限定されないが、エノキサパリン及びデルタパリン（deltaparin）を含む低分子ヘパリン、これらに限定されないが、ストレプトキナーゼ（SK, Streptokinase）、ウロキナーゼ、ラノテプラーゼ、レテプラーゼ、スタフィロキナーゼ、及びテネクテプラーゼを含む血栓溶解剤から選択されてよい。

## 【 0 1 0 9 】

本発明の S D H i 又はプロドラッグ及び／又は薬学的に許容されるその塩は、S D H i 及び薬学的に許容される賦形剤、担体、又は希釈剤を含む医薬組成物として投与され得る。

## 【 0 1 1 0 】

好適な賦形剤、担体、及び希釈剤は標準的な薬学文書において見つけれられる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Handbook for Pharmaceutical Additives, 3rd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2007 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA)及びRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (ed. D. B. Troy) 2006 (Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA)を参照。

## 【 0 1 1 1 】

本発明の組成物における使用のための賦形剤は、これらに限定されないが、微結晶セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二カルシウム及びグリシンを含み、デンプン（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ、又はタピオカデンプン）、アルギン酸、及び特定の複雑ケイ酸塩などの様々な崩壊剤、並びにポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチン、及びアカシアのような造粒結合剤と一緒に用いてよい。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、及びタルクなどの潤滑剤は、打錠工程に非常に有用であることが多い。同様の型の固体組成物は、ゼラチンカプセルの充填剤としても用いられ得る。この結合の好ましい材料は、ラクトース又は乳糖並びに高分子ポリエチレングリコールも含む。水性懸濁液及び／又はエリキシル剤は、経口投与が望ましい場合、有効成分は様々な甘味料又は香味料、着色剤又は色素と、並びに、所望される場合

10

20

30

40

50

、乳化剤及び／又は懸濁剤も、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン及びそれらのあり得る様々な組合せなどの希釈剤と共に、組み合わせられ得る。

【0112】

医薬担体は、固体希釈剤又は充填剤、滅菌水性培地及び様々な非毒性有機溶媒などを含む。

【0113】

薬学的に許容される担体は、ゴム、デンプン、糖、セルロース系材料、及びその混合物を含む。化合物は、例えば、ペレット剤の皮下埋め込みによって対象に投与され得る。製剤は、液体製剤の静脈内、動脈内、又は筋肉内注射によって、液体又は固体製剤の経口投与によって、又は局所適用によっても投与され得る。投与は、肛門坐剤又は尿道坐剤の使用によっても達成され得る。

10

【0114】

さらに、本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」は当業者に周知であり、これらに限定されないが、0.01～0.1M及び好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液、又は0.9%の生理食塩水を含む。さらに、そのような薬学的に許容される担体は、水溶液又は非水溶液、懸濁液、及び乳状液であってよい。非水溶液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用の有機エステルである。水性担体は、生理食塩水及び緩衝化培地を含む、水、アルコール／水溶液、乳状液又は懸濁液を含む。

【0115】

薬学的に許容される非経口媒体は、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液及び不揮発性油を含む。静脈内媒体は、ブドウ糖リンゲル液に基づくものなどの、流体及び栄養補充液、電解質補充液などを含む。例えば抗菌剤、抗酸化剤、照合剤(collating agents)、不活性ガスなど、防腐剤及び他の添加剤も存在し得る。

20

【0116】

本発明に従って投与可能な制御放出組成物又は徐放性組成物の薬学的に許容される担体は、親油性デポー(例えば、脂肪酸、ワックス、オイル)中製剤を含む。ポリマー(例えば、ポロキサマー又はポロキサミン)で被覆された微粒子組成物及び組織特異的受容体、リガンド若しくは抗原に対する抗体に結合した化合物、又は組織特異的受容体のリガンドに結合した化合物もまた、本発明に包含される。

30

【0117】

薬学的に許容される担体は、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、又はポリプロリンなどの水溶性ポリマーの共有結合によって修飾された化合物を含み、相当する未修飾の化合物よりも、静脈内注射後、血液中で実質的に長い半減期を示すことが公知である(Abuchowski and Davis, Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs, Hoenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., (1981), pp 367-383; 及び[65])。そのような修飾により、水溶液中での化合物の可溶性を増加し、凝集を除去し、化合物の物理的及び化学的安定性を増強し、化合物の免疫原性及び反応性を大幅に減少することもできる。結果として、所望のインビボでの生物活性は、未修飾の化合物を用いるよりも低い頻度又は低用量で、そのようなポリマー化合物付加物(abducts)の投与により達成することができる。

40

【0118】

さらに、特定の及び好ましい態様は、添付の独立請求項及び従属請求項において述べられる。従属請求項の特徴は、必要に応じて独立請求項の特徴と組み合わせることができ、請求項にはっきりと述べたもの以外の組合せである。

【0119】

異性体、塩、及び溶媒和物

50

特定の化合物は、1又は2以上の特定の幾何学異性体、光学異性体、鏡像異性体、ジアステレオ異性体、エピマー、アトロプ、立体異性体、互変異性体、配座異性体、又はアノマーの形態で存在することができ、シス - 及びトランス - 形；E - 及びZ - 形；c - 、t - 、及びr - 形；エンド及びエキソ形；R - 、S - 、及びメソ - 形；D - 及びL - 形；d - 及びl - 形；( + ) 及び( - ) 形；ケト - 、エノール - 、及びエノラート - 形；シン - 及びアンチ - 形；シンクリナル - 及びアンチクリナル - 形；アルファ - 及びベータ - 形；アキシアル及びエクアトリアル形；舟形、いす形、ねじれ形、エンベロープ形、及び半いす形；並びにこれらの組合せを含むが、これらに限定されず、以降、まとめて「異性体」（又は「異性体形態」）と呼ぶ。

#### 【0120】

互変異性体形態について下記で述べることを除いて、本明細書で使用する場合、用語「異性体」から特に除外されるものは、構造的（又は構成的）異性体（すなわち、単に空間における原子の位置が異なっているのではなく、原子間の結合が異なる異性体）であることに留意されたい。例えば、メトキシ基、 $-\text{OCH}_3$ への言及は、その構造異性体であるヒドロキシメチル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ への言及と解釈されない。

#### 【0121】

構造のクラスへの言及は、そのクラスに分類される構造異性体形態を含むことができる（例えば、 $\text{C}_{1-67}$ アルキルはn - プロピル及びイソ - プロピルを含み；ブチルはn - 、iso - 、sec - 、及びtert - ブチルを含み；メトキシフェニルはオルト - 、メタ - 、及びパラ - メトキシフェニルを含む）。

#### 【0122】

上記の除外は、例えば、下記の互変異性体のペア：ケト/エノール、イミン/エナミン、アミド/イミノアルコール、アミジン/アミジン、ニトロソ/オキシム、チオケトン/エンチオール、N - ニトロソ/ヒドロキシアゾ（hyroxyazo）、及びニトロ/a c i - ニトロのように、例えば、ケト - 、エノール - 、及びエノラート形態などの互変異性体形態には適用しない。

#### 【0123】

用語「異性体」には、1又は2以上の同位体置換を有する化合物が特に含まれることに留意されたい。例えば、Hは $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ （D）、及び $^3\text{H}$ （T）を含む、いかなる同位体の形態であってもよい；Cは $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、及び $^{14}\text{C}$ を含む、いかなる同位体の形態であってもよい；Oは $^{16}\text{O}$ 及び $^{18}\text{O}$ を含む、いかなる同位体の形態であってもよい。

#### 【0124】

特別の定めのない限り、特定の化合物への言及は、その（全体的に又は部分的に）ラセミ体及びその他の混合物を含む、そのような全ての異性体形態を含む。

#### 【0125】

そのような異性体形態の調製（例えば、不斉合成）及び分離（例えば、分別結晶及びクロマトグラフ手段）の方法は、当技術分野において公知であり、又は本明細書において教示される方法、若しくは公知の方法を、公知の様式で適合させることによって容易に得られる。

#### 【0126】

特別の定めのない限り、特定の化合物への言及は、例えば下記で述べるように、そのイオン形態、互変異性体形態、塩形態、溶媒和物形態、保護形態、及びそれらの組合せも含む。

#### 【0127】

それらの組合せの例としては、SDHiへ言及する場合、互変異性体の塩を含む。例えば、化合物リンゴ酸ジエチルへの言及は、下記に示すようにエノラート形態のナトリウム塩を含む。

#### 【0128】

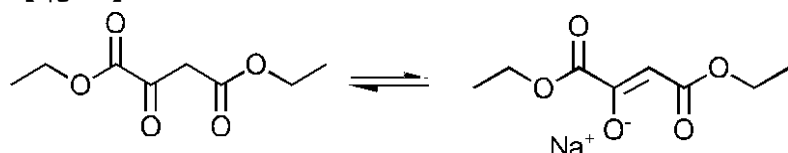
10

20

30

40

## 【化 2】



## 【 0 1 2 9 】

上記で特別に名付けた化合物を含む S D H i は、薬学的に許容される複合体、塩、溶媒和物、及び水和物を形成することができる。これらの塩は、非毒性酸付加塩（二酸を含む）及び塩基性塩を含む。

## 【 0 1 3 0 】

化合物が陽イオンである場合、又は陽イオンとなり得る官能基を有している場合（例えば、 $-NH_2$  は  $-NH_3^+$  となり得る）、好適な陰イオンと酸付加塩を形成することができる。好適な無機陰イオンの例としては、これらに限定されないが、以下の無機酸：塩酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、硫酸、亜硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、フッ化水素酸、リン酸、及び亜リン酸に由来するものが挙げられる。好適な有機陰イオンの例としては、これらに限定されないが、以下の有機酸：2 - アセトキシ安息香酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、ケイ皮酸、クエン酸、エデト酸、エタンジスルホン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸 (glucheptonic)、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフタレンカルボン酸、イセチオン酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、オレイン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモン酸、パントテン酸、フェニル酢酸、フェニルスルホン酸、プロピオン酸、ビルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、及び吉草酸に由来するものが挙げられる。好適なポリマー性有機陰イオンの例としては、これらに限定されないが、以下のポリマー酸：タンニン酸、カルボキシメチルセルロースに由来するものが挙げられる。そのような塩は、酢酸塩、アジピン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、重炭酸塩、炭酸塩、重硫酸塩、硫酸塩、ホウ酸塩、カンシル酸塩、クエン酸塩、シクラミン酸塩、エジシル酸塩、エシル酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヒベンズ酸塩、塩酸塩 / 塩化物、臭化水素酸塩 / 臭化物、ヨウ化水素酸塩 / ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メシル酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフチル酸塩、2 - ナブシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オロト酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩、ピログルタミン酸塩、糖酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、トリシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩、及びキシナホ酸塩に由来するものが挙げられる。

## 【 0 1 3 1 】

例えば、化合物が陰イオンである場合、又は陰イオンになり得る官能基を有している場合（例えば、 $-COOH$  は  $-COO^-$  になり得る）、好適な陽イオンと塩基性塩を形成することができる。好適な無機陽イオンの例としては、これらに限定されないが、アルカリ又はアルカリ土類金属陽イオン、アンモニウム及び置換されたアンモニウム陽イオン、並びにアミンなどの金属陽イオンが挙げられる。好適な金属陽イオンの例としては、ナトリウム ( $Na^+$ )、カリウム ( $K^+$ )、マグネシウム ( $Mg^{2+}$ )、カルシウム ( $Ca^{2+}$ )、亜鉛 ( $Zn^{2+}$ ) 及びアルミニウム ( $Al^{3+}$ ) が挙げられる。好適な有機陽イオンの例としては、これらに限定されないが、アンモニウムイオン（すなわち  $NH_4^+$ ）及び置換されたアンモニウムイオン（例えば  $NH_3R^+$ 、 $NH_2R_2^+$ 、 $NHR_3^+$ 、 $NR_4^+$ ）が挙げられる。いくつかの好適な置換されたアンモニウムイオンの例は、エチルアミン、ジエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミン、及びトロメタミン、並びに、リシン及びアルギニンなどのアミノ酸に由来するものである。一般的な第四級アンモニウムイオンの



例は、 $N(CH_3)_4^+$ である。好適なアミンの例としては、アルギニン、 $N, N'$ -ジベンジルエチレンジアミン、塩化プロカイン、コリン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、グリシン、リシン、 $N$ -メチルグルカミン、オラミン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1, 3-ジオール、及びプロカインが挙げられる。有用な酸付加塩及び塩基性塩の議論は、S. M. Berge et al., J. Pharm. Sci. (1977) 66: 1-19を参照されたい。また、Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (2011)も参照されたい。

#### 【0132】

薬学的に許容される塩は、様々な方法を用いて調製され得る。例えば、SDHiを適切な酸又は塩基と反応させ、所望の塩を得ることができる。SDHiの化合物の前駆体を酸又は塩基と反応させ、酸又は塩基不安定保護基を取り除く、若しくは前駆体のラクトン又はラクタム基を開くこともできる。さらに、SDHiの化合物の塩を、適切な酸又は塩基による治療を介して、若しくはイオン交換樹脂との接触を介して別の塩に変換することができる。反応後、溶液から沈殿する場合は濾過により、又は塩を回収する蒸発により、塩を単離することができる。塩のイオン化の程度は、完全なイオン化からほとんど非イオン化まで多様であり得る。

10

#### 【0133】

活性化化合物の対応する溶媒和物を調製し、精製し、及び/又は取り扱うことが都合の良い又は望ましい場合がある。用語「溶媒和物」は、化合物及び1又は2以上の薬学的に許容される溶媒分子（例えば、EtOH）を含む分子複合体を記載する。用語「水和物」は、溶媒が水である溶媒和物である。薬学的に許容される溶媒和物は、溶媒が同位体的に置換され得るものを含む（例えば、 $D_2O$ 、アセトン- $d_6$ 、 $DMSO-d_6$ ）。

20

#### 【0134】

現在、有機化合物の溶媒和物及び水和物に関して許容されている分類システムは、単離部位、チャネル、及び金属イオン配位溶媒和物及び水和物の間を区別するものである。例えば、K. R. Morris (H. G. Brittain ed.) Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1995)を参照されたい。単離部位溶媒和物及び水和物は、有機化合物の妨害分子によって溶媒（例えば、水）分子が互いの直接接触から単離されているものである。チャネル溶媒和物では、溶媒分子は格子チャネルに存在し、ここで他の溶媒分子と隣接している。金属イオン配位溶媒和物では、溶媒分子は金属イオンに結合している。

30

#### 【0135】

溶媒又は水が強く結合している場合、複合体は湿度と無関係に明確な化学量論を有するであろう。しかし、チャネル溶媒和物及び吸湿性化合物のように、溶媒又は水が弱く結合している場合、水又は溶媒含量は、湿度及び乾燥条件に依存するであろう。そのような場合、非化学量論が典型的に観察されるであろう。

#### 【0136】

さらに、特定の及び好ましい態様は、添付の独立請求項及び従属請求項において述べられる。従属請求項の特徴は、必要に応じて独立請求項の特徴と組み合わせることができ、請求項にはっきりと述べたもの以外の組合せである。

40

#### 【0137】

広範なSDHiの化合物は、市販されている。そのような市販の化合物の誘導体は、当技術分野において公知のように、官能基の相互変換の実行、又は置換及び一般的な反応の実行により調製され得る。一般的な技術及び反応は、酸化、還元などを含み、分離技術（抽出、蒸発、沈殿、クロマトグラフィー、濾過、研和、結晶化など）並びに分析手順が、有機化学の当業者に公知である。そのような反応及び技術の詳細は、Richard Larock, Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations, 2nd Ed (2010), and the multi-volume series edited by Michael B. Smith and others, Compendium of Organic Synthetic Methods (1974 et seq.)を含む、いくつかの論文において見つけることができる。出発材料及び試薬は、市販の原料から得ることができ、文

50

献の方法を用いて調製することができる。さらに、いくつかの例では、反応中間体は、単離又は精製しない続くステップにおいて使用され得る（例えば、インサイチュ）。

#### 【0138】

ある化合物は、他の反応部位での望ましくない化学反応を防ぐ保護基を使用して調製され得る。保護基はまた、化合物の可溶性の増強又は他の物理的性質の改変にも使用され得る。保護基戦略の議論に関して、保護基の導入及び除去のための材料及び方法の記載、並びにアミン、カルボン酸、アルコール、ケトン、アルデヒドなどを含む一般的な官能基の有用な保護基の編集は、T. W. Greene and P. G. Wuts, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, 4th Edition, (2006) and P. Kocienski, *Protective Groups*, 3rd Edition (2005)を参照されたい。

10

#### 【0139】

一般に、ある反応は過剰な1又は2以上の反応物質を用いることから利益を得ることができるが、化学的変換は反応物質の実質的に化学量論的な量を用いて実行できる。さらに、多くの好適な反応が約室温（RT, room temperature）及び大気圧で実行され得るが、反応速度論、収率などに依存し、いくつかの反応は、高圧下、又は高温（例えば、還流状態）若しくは低温（例えば、 $-78 \sim 0$ ）を用いて行われ得る。化学量論的な範囲、温度範囲、pH範囲などに対する本開示におけるいかなる参照も、単語「範囲」を明確に用いるかどうかに関わらず、示した終点も含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0140】

20

本発明の実施形態を添付の図面を参照してここでさらに記載する。

【図1】比較メタボロミクスは、再灌流ROS産生を駆動する潜在的なミトコンドリアの代謝物としてコハク酸を同定する。

【図1a】虚血状態下、インビボで蓄積する代謝物の同定のための比較メタボロミクス戦略の概要を示す図である。

【図1b】インビボでの全ての虚血組織にわたって著しく蓄積した代謝物のHIVEプロット比較分析を示す図である。全ての組織にわたって共通に蓄積した代謝物をハイライトした。

【図1c】虚血時のマウス組織における代謝物の蓄積の出現率を示す図である。

【図1d】5つの虚血組織状態にわたる虚血後の、ミトコンドリアのクエン酸回路（CAC, citric acid cycle）代謝物レベルのプロファイルを示す図である。n = 群につき、組織あたり3～4匹のマウス。

30

【図1e】心筋虚血及びエクスピボでの心臓における5分間の再灌流時のCAC代謝物レベルのタイムコースを示す図である。n = 群につき、4つのマウス心臓。

【図1f】リスクがあるインビボでの心筋IR時、並びに虚血後及び5分間再灌流後の末梢心臓組織のCAC代謝物レベルを示す図である。n = 群につき、3～5匹のマウス。

【図1g】虚血後及び5分間再灌流後すぐのインビボでの脳IR時のCAC代謝レベルを示す図である。n = 群につき、3匹のラット。

【図1h】虚血後及び5分間再灌流後すぐのインビボでの腎臓IR時のCAC代謝レベルを示す図である。n = 群につき、3匹のマウス。

40

【図1i】IR時の成体の初代心筋細胞におけるジヒドロエチジウム（DHE, dihydroethidium）酸化によって評価したROS産生におけるコハク酸の効果を示す図である。n = 群につき、3回の独立した心筋細胞調製。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。データは、少なくとも3回の反復の平均  $\pm$  s.e.m.として示される。

【図2】逆SDH活性は、リンゴ酸 - アスパラギン酸シャトル及びプリンヌクレオチドサイクルによって産生されるフマル酸の還元によって虚血性コハク酸蓄積を駆動する。

【図2a】コハク酸による虚血性フラックスへの潜在的なインプットを示す図である。

【図2b】 $^{13}\text{C}$  - グルコースの代謝標識戦略を示す図である。

【図2c】正常酸素圧及び虚血心筋層におけるコハク酸の $^{13}\text{C}$ 同位体標識プロファイルを示す図である。n = 群につき、4つの心臓。

50

【図 2 d】 - アミノ酪酸 ( G A B A , -aminobutyric acid ) におけるピガバトリンでの G A B A シャントの阻害効果及び虚血心筋層におけるコハク酸レベルを示す図である。n = 群につき、3 つの心臓。

【図 2 e】逆 S D H 操作によって駆動される虚血性コハク酸蓄積の潜在的な駆動体の、インシリコでの代謝性モデリングの要約；虚血性コハク酸蓄積におけるリンゴ酸及びアデニロコハク酸連結経路の寄与を決定する  $^{13}\text{C}$  - アスパラギン酸の代謝標識戦略を示す図である。

【図 2 f】コハク酸蓄積におけるジメチルマロン酸による S D H 阻害の効果及びインビボでの虚血心筋層における C A C 代謝物存在量を示す図である。n = 群につき、3 匹のマウス。

【図 2 g】正常酸素圧及び虚血心筋層における、示した C A C 代謝物への  $^{13}\text{C}$  - アスパラギン酸の相対的な虚血性フラックスを示す図である。n = 群につき、4 つの心臓。

【図 2 h】アスパラギン酸アミノ基転移酵素のアミノオキシ酢酸 ( A O A , aminooxyacetate ) 媒介性阻害、又は A I C A R でのアデニロコハク酸リアーゼの阻害による P N C のブロッキングを介して、N A D H 依存性アスパラギン酸の C A C への参加をブロッキングしたインビボでの虚血心筋層における C A C 代謝物存在量への効果を示す図である。n = 群につき、3 匹のマウス。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。データは、少なくとも 3 回の反復の平均  $\pm$  s . e . m として示される。

【図 3】成人の初代心筋細胞における再灌流時に、虚血性コハク酸レベルは、R O S 産生、ミトコンドリアの膜の分極、及び N A D ( P ) H 減少状態を制御する。

【図 3 a】後期の虚血及び初期の再灌流時に D H E 酸化として測定した R O S 産生における虚血性コハク酸レベルの操作の効果を示す図である。n = 群につき、3 回の独立した心筋細胞調製。

【図 3 b】MitoSNO による選択的阻害を介して、ミトコンドリア複合体 I である R E T の再灌流時のコハク酸駆動の R O S 産生への寄与の測定を示す図である。n = 群につき、3 回の独立した心筋細胞調製。

【図 3 c】後期の虚血及び初期の再灌流時に N A D ( P ) H 酸化への、虚血性コハク酸レベルの操作の効果を示す図である。n = 群につき、3 回の独立した心筋細胞調製。

【図 3 d】非クエンチモードでの T M R M 蛍光を用いて、後期の虚血 ( 左のパネル ) 及び初期の再灌流 ( 右のパネル ) 後のミトコンドリアの膜電位への、虚血性コハク酸レベルの操作の効果を示す図である ( 高蛍光 = 低膜電位 ) 。

【図 3 e】再灌流時の T M R M クエンチング速度により決定した、40 分虚血後の内膜の再分極の初速度における虚血性コハク酸レベルの操作の効果を示す図である。n = 群につき、3 回の独立した心筋細胞調製。

【図 3 f】好気性  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  筋芽細胞におけるジメチルコハク酸及びオリゴマイシンのミトコンドリアの R O S への効果を示す図である。正常酸素圧インキュベーション下の筋芽細胞内のミトコンドリアは、オリゴマイシン及びジメチルコハク酸により過分極され、MitoSOX 酸化の速度を評価し、ミトコンドリアの R O S 産生を測定した。n = 試験につき、10 ~ 12 個の筋芽細胞の 4 回の独立した実験。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 。データは、少なくとも 3 回の反復の平均  $\pm$  s . e . m として示される。

【図 4】N A D H 及び A M P センシング経路は虚血性コハク酸蓄積を駆動し、ミトコンドリアの R O S 産生を介して、インビボでの再灌流の病理を制御する。

【図 4 a】虚血時のコハク酸蓄積及び再灌流時の逆電子伝達 ( R E T , reverse electron transport ) によるスーパーオキシド形成のモデルを示す図である。

【図 4 b】心筋梗塞  $\pm$  ジメチルマロン酸の i . v . 注射による虚血性コハク酸蓄積の阻害、又はジメチルマロン酸及びジメチルコハク酸の i . v . 注射による虚血性コハク酸の再導入後の、マウス心臓の横断面の代表的な画像である。梗塞した組織は白、リスクのある残りの領域は赤、及びリスクのない組織は濃青色である。

【図 4 c】図 4 b に記載したように実行した、心筋梗塞サイズの定量を示す図である。各白丸は、一匹のマウスからのデータを表し、黒丸は特定の状態の全てのマウスの平均値を

10

20

30

40

50

表す。n = 群につき、6匹のマウス。

【図4d】インビボでの脳IR傷害に対するジメチルマロン酸による保護を示す図である。ジメチルマロン酸による治療あり又はなしのインビボでのtMCAOが起こった後のラットの脳の横断面の代表的な画像である。脳をヘマトキシリン及びエオシンで処理し、梗塞した組織を描写した。脳の梗塞体積の定量

【図4e】吻側尾側の梗塞分布を示す図である。

【図4f】インビボでのtMCAOによる脳のIR傷害後の±ジメチルマロン酸を示す図である。n = 群につき、3～6匹のラット。

【図4g】tMCAO後±ジメチルマロン酸のラットの神経学的スコアを示す図である。n = 群につき、3～6匹のマウス。\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。データは、データが中央値±C.I.である図4gを除き、平均±s.e.mとして示される。

【図5】細胞及びインビボでのジメチルマロン酸及びジメチルコハク酸処置は、マロン酸及びコハク酸の細胞内の蓄積をもたらす。(a)インビボでのジメチルマロン酸の静脈内注入によりもたらされる、虚血心筋層におけるマロン酸の蓄積を示す図である。(b)C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞を、無添加、グルコース、5mMジメチルコハク酸、5mMジメチルマロン酸、又は5mMジメチルマロン酸及び5mMジメチルコハク酸とインキュベートした。ATP合成による細胞の酸素消費率を示す図である。(c)Seahorse XF96 analyserを用いて決定した、細胞の最大酸素消費率を示す図である。n = 3～4、\*、 $p < 0.05$ ；\*\*、 $p < 0.001$ 。

【図6】コハク酸による虚血性フラックスのための3つの潜在的な代謝インプットの要約を示す図である。虚血下でのコハク酸産生に寄与し得る代謝経路を理解するため、心臓代謝のiAS253モデルの最新版を用いて、フラックスバランス分析を使用して虚血をシミュレートした。モデルは、コハク酸を産生する3つの可能な機構を示した：CACによって産生され、解糖系及びグルタミンオリシス由来のアルファケトグルタル酸から（灰色のボックス）、GABAシャントから産生されたコハク酸セミアルデヒドから（青色のボックス）、SDHの逆転を介したリンゴ酸-アスパラギン酸シャトル及びプリンヌクレオチドサイクルによって産生されるフマル酸から（赤色のボックス）。

【図7】虚血及び正常酸素圧心筋層における、<sup>13</sup>CグルコースによるCAC及び近位の代謝物の代謝標識を示す図である。正常酸素圧及び虚血心筋層呼吸時のCAC及び近位の代謝物の比例の同位体標識プロファイルを示す図である。マウスの心臓を11mM <sup>13</sup>Cグルコースで10分間灌流し、続いて30分間の無フロー虚血又は30分間の正常酸素圧呼吸のいずれか、続いて急速凍結し、LC-MS代謝物分析した。n = 4、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 。

【図8】虚血及び正常酸素圧心筋層における、<sup>13</sup>CグルタミンによるCAC及び近位の代謝物の代謝標識を示す図である。正常酸素圧及び虚血心筋層呼吸時のCAC及び近位の代謝物へのグルタミンからの同位体フラックスを示す図である。マウスの心臓を4mM <sup>13</sup>Cグルタミン（+5標識）で10分間灌流し、続いて30分間の無フロー虚血又は30分間の正常酸素圧呼吸のいずれか、続いて急速凍結し、代謝物分析した。

【図8a】それぞれの代謝物の同位体プロファイルを全プールの割合として表した図である。

【図8b】さらに、心臓における+5グルタミンプールの割合に対して決定した、KGへのフラックスを示す図である。n = 4、\*  $p < 0.05$ 。

【図9】虚血心筋層におけるGABAシャント及びCAC代謝物へのピガバトリンによるGABAアミノ基転移酵素阻害の効果を示す図である。灌流したマウスの心臓を30分間、無フロー虚血±虚血10分前のピガバトリンの連続的な注入（Vig；100、300及び700μM）に供した。心臓組織を急速凍結し、(a)GABA及び(b)コハク酸存在量をLC-MSによる正常酸素圧レベルに対して定量した。n = 3、\*  $p < 0.05$ 。

【図10】コハク酸蓄積を駆動する組織虚血により活性化され得る経路を同定する完全な

代謝モデルを示す図である。虚血下のコハク酸産生に寄与し得る代謝経路を同定するために、中心的な心臓代謝のiAS253ミトコンドリアモデルの拡大版と合わせてフラックスバランス分析を用いてこれらの状態をシミュレートした。コハク酸蓄積に寄与する主な経路（太い赤線）は、SDHの逆活性へのフマル酸の供給を介した。フマル酸は、プリンヌクレオチドサイクル（PNC, purine nucleotide cycle）及びリンゴ酸 - アスパラギン酸シャトル（MAS, malate-aspartate shuttle）によって産生され、グルコース及びアスパラギン酸を消費し、乳酸及びアラニンの著しい産生をもたらす。コハク酸の少ない供給源（細い赤線）は、解糖系及びグルタミンオリシスを含むが、このルートはNADHの過剰産生により抑圧されるため、相対的に少なかった。さらに、少量のフマル酸はピルビン酸カルボキシラーゼ活性により生成される。GABAシャントは寄与しない（黒い点線）。

【図11】コハク酸への $^{13}\text{C}$ 虚血代謝物フラックスの同位体プールに対する比較を示す図である。マウスの心臓を $^{13}\text{C}$ -グルコース（+6標識）、 $^{13}\text{C}$ -グルタミン（+5標識）、又は $^{13}\text{C}$ -アスパラギン酸（+1標識）で10分間灌流し、続いて30分間の無フロー虚血又は30分間の正常酸素圧呼吸、及び急速凍結、並びに代謝物分析した。各炭素源からの代謝物フラックスの相対振幅を比較するため、未標識のコハク酸プールと比較した、コハク酸への虚血性 $^{13}\text{C}$ の取り込みは、正常酸素圧と比較して決定され、 $^{13}\text{C}$ 注入前駆体の全標識プールに対して表した。データは直線（左）上に、対数（右）スケールでプロットした。

【図12】虚血及びその後の再灌流時の、コハク酸及びOXPHOS代謝経路における予想される変化を示す図である。虚血、再灌流及び正常酸素圧時のコハク酸代謝における可能な変化を決定するために、フラックスバランス分析を伴うiAS253モデルの拡大版を用いて、これらの状態の心臓代謝をシミュレートした。シミュレーションにより、以下の通り予想された。

【図12a】虚血下、複合体Iによって産生されたユビキノールを用いることによって複合体IIは逆に作用し、フマル酸をコハク酸に還元し、それにより酸素の代わりに最終電子受容体として作用する。フマル酸はプリンヌクレオチドサイクル（PNC）及びクエン酸回路（CAC）の逆転により産生される。他の呼吸鎖を介するフラックスは減少し、AMPは不十分なATP産生によりADPから産生された。

【図12b】酸素が回復した複合体IIにより、過剰なコハク酸を代謝した。再灌流の最初の数分において典型的であるように、AMPからADPへの再生の遅延は、ATP合成酵素を介するフラックスを制限した。これは次に、膜が過分極になるため、複合体IIにより生成された全てのユビキノールを消費する複合体IIIを妨げる。ユビキノール及びプロトンの過剰なフラックスにより複合体Iは逆に作用し、ROSを生成する。

【図12c】一度、コハク酸のフラックスが正常レベルまで減少すると、後期再灌流から正常酸素圧への移行のように、呼吸鎖及びクエン酸回路を介したフラックスは正常に戻った。

【図13】インサイチュでのIR時の初代心筋細胞における心筋細胞のROSレベルの追跡を示す図である。初代ラット心筋細胞を40分間虚血に供し、ジヒドロエチジウム（DHE）酸化の供給電圧に比例した測定による実験を通して、ROSレベルでの再酸素負荷を追跡した。虚血性緩衝液は、無添加、4 mMジメチルマロン酸、又は4 mMジメチルコハク酸のいずれかを含有した。各状態の代表的な結果を示す。ハイライトしたウィンドウは、図3aに詳細に記載した実験の期間を示す。

【図14】インサイチュでのIR時の初代心筋細胞におけるNADH還元状態の追跡を示す図である。初代ラット心筋細胞を40分間虚血に供し、再酸素負荷及びNADH還元状態をNAD(P)H自発蛍光の測定による実験を通して追跡した。虚血緩衝液は、無添加、4 mMジメチルマロン酸、又は4 mMジメチルコハク酸のいずれかを含有した。各状態の代表的な結果を示す。ハイライトしたウィンドウは、図3cにおいて詳細に記載した実験の期間を示す。

【図15】インサイチュでのIR時の初代心筋細胞におけるミトコンドリアの膜電位の追跡を示す図である。初代ラット心筋細胞を40分間虚血に供し、再酸素負荷及びミトコン

10

20

30

40

50

ドリアの膜電位をテトラメチルローダミン ( T M R M ) 蛍光の測定による実験を通して追跡した。虚血緩衝液は、無添加、又は 4 m M ジメチルマロン酸のいずれかを含有した。少なくとも 3 回の反復実験の結果の平均を示す。

【図 1 5 a】全体の実験を通して、T M R M シグナルを示す図である。

【図 1 5 b】虚血から再酸素負荷への移行時の T M R M シグナルを示す図である。n = 群につき、別に単離した初代ラット心筋細胞から 3 ~ 4 回の実験。

【発明を実施するための形態】

【0 1 4 1】

ミトコンドリアの R O S 産生は、虚血再灌流 ( I R , ischaemia-reperfusion ) 傷害の重要な初期の駆動体であるが、再灌流時に機能障害性の呼吸鎖の酸素との相互作用の非特異的な結果であると考えられてきた ( Murphy, E. & Steenbergen, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* 88 , 581-609, (2007)、Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121-1135, (2007)、Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M. & Brookes, P. S. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 804-810, (2009)、Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* 17, 1391-1401, (2011) )。本発明者らは、I R 時のミトコンドリアの R O S は、特異的な代謝工程によって生成されるという別の仮説を調べた。これを行うため、本発明者らは、I R 時の組織において保存された代謝シグネチャーを同定する比較メタボロミクス手法を開発し、それはミトコンドリアの R O S の供給源を示すであろう ( 図 1 a )。インビボでの虚血に供したマウスの脳、腎臓、肝臓及び心臓の液体クロマトグラフィー - 質量分析装置 ( L C - M S ) に基づくメタボロミック分析 ( 図 1 a ) により、いくつかの代謝物における変化を明らかにした。しかし、3 つのみが全ての組織にわたって上昇した ( 図 1 b 及び表 1 )。

【0 1 4 2】

再灌流 R O S 産生を刺激するのに十分な期間虚血にさらされた様々なマウスの組織を、メタボロミック分析及び比較に供した。

【0 1 4 3】

10

20

【表 1】

蓄積の出現率(組織数)	虚血性 pro-ROS 状態において 著しく蓄積した代謝物 (>2 倍、 $p<0.05$ )	組織
5	コハク酸	全て
5	キサンチン	全て
5	ヒポキサンチン	全て
4	アデニン	B,L,K,H
4	プロピオニルカルニチン	B,L,H,HL
4	グアニン	L,K,H,HL
3	乳酸	L,K,H
3	コリン	L,K,HL
3	プロリン	L,K,H
2	アロプリノール	B,H
2	ウラシル	B,H
2	アデニロコハク酸	B,H
2	システイン	B,L
2	シトシン	B,H
2	クレアチニン	B,L
2	ステアロイルカルニチン	L,K
2	フェニルアラニン	L,K
2	リシン	L,K
2	オルニチン	L,K
2	トリプトファン	L,K
2	ロイシン	L,K
2	AMP	L,H
2	アスパラギン	L,K
2	アルギニン	L,K
2	パルミトイルカルニチン	L,HL
2	アデノシン	L,HL
1	ウリジン	L
1	N-アセチルアスパラギン酸	L
1	チロシン	L
1	ホスホリルコリン	L
1	酢酸	L
1	メチオニン	L
1	オレイルカルニチン	L
1	トレオニン	L
1	2-ヒドロキシグルタル酸	L
1	バリン	L
1	グルコース	L
1	アラニン	L
1	グリセロールリン酸	L

10

20

30

40

1	グリセリルホスホリルコリン	L
1	アセチルコリン	L
1	カルニチン	L

表1 虚血性pro-ROS状態において著しく蓄積した代謝物の完全比較分析。B=脳、H=エクスビボでの全心臓虚血、HL=インビボでのLAD虚血、K=腎臓、L=肝臓

10

#### 【 0 1 4 4 】

2つの代謝物は、虚血性プリンヌクレオチド破壊の特徴がはっきりした副生成物、キサンチン及びヒポキサンチンであり (Harmsen, E., de Jong, J. W. & Serruys, P. W. Hypoxanthine production by ischemic heart demonstrated by high pressure liquid chromatography of blood purine nucleosides and oxypurines. Clin. Chim. Acta 115, 73-84 (1981))、我々の手法の正当性を確証している。キサンチン及びヒポキサンチンは、細胞基質のキサンチン酸化還元酵素によって代謝され、ミトコンドリアの代謝には寄与しない (Pacher, P., Nivorozhkin, A. & Szabo, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol. Revs. 58, 87-114, (2006))。第3の代謝物、ミトコンドリアのクエン酸回路 (CAC) 中間物であるコハク酸は、試験した組織にわたって3倍から19倍に増加し (図1d)、ある範囲の代謝的に異なる組織で普遍的に起こる、たった1つの虚血のミトコンドリアの代謝特徴であった。したがって、本発明者らは、IR時のミトコンドリアのROS産生におけるコハク酸の潜在的役割に注目した。

20

#### 【 0 1 4 5 】

ミトコンドリアのROS産生は再灌流の初期に起こるため (Murphy, E. & Steenbergen, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. Physiol. Rev. 88, 581-609, (2007)、Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. N. Engl. J. Med. 357, 1121-1135, (2007)、Burwell, L. S., Nadeau, S. M. & Brookes, P. S. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. J. Mol. Cell. Cardiol. 46, 804-810, (2009)、Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat. Med. 17, 1391-1401, (2011)、Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. Nat. Med. 19, 753-759, (2013)、Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1404-1407 (1987))、ROSをアおる代謝物は素早く酸化されるべきであるということになる。際立ったことに、虚血時に蓄積されたコハク酸は、心臓におけるエクスビボでの5分間再灌流によって正常酸素圧レベルに回復され (図1e)、これは心臓、脳及び腎臓においてもインビボで観察された (図1f~h)。さらに、これらのコハク酸変化は、インビボでのIR傷害が起こった組織の領域に局在し、他のCAC代謝物の蓄積がない状態で起こる (図1d、f)。ROS産生の駆動におけるコハク酸の役割をさらに評価するため、本発明者らはコハク酸の細胞透過性誘導体、ジメチルコハク酸 (図5) を虚血性初代心筋細胞 (Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. Nat. Med. 19, 753-759, (2013)) に投与し、これが再灌流時のミトコンドリアのROS産生を著しく増加することを見出した (図1i)。これらのデータは虚血時にコハク酸が蓄積し、次いで再灌流時のROS産生をアおることを示唆した。

30

40

50



## 【 0 1 4 6 】

虚血時のコハク酸蓄積の原因である機構を決定するため、及び I R 傷害におけるその役割を探索するため、多くの実験的及び理論的な供給源が入手可能であることから、本発明者らは心臓に注目した。哺乳動物組織において、コハク酸はピルビン酸若しくはグルタミン酸、又は  $\alpha$ -アミノ酪酸 (GABA) シャントから、 $\alpha$ -ケトグルタル酸 - 依存性 CAC フラックスを介して生成され得る (図 2 a 及び 6) (Tannahill, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . Nature 496, 238-242, (2013)、Smith, A. C. & Robinson, A. J. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. BMC Syst. Biol. 5, 102, (2011))。  $\alpha$ -ケトグルタル酸を介するコハク酸への虚血性 CAC フラックスは、それぞれピルビン酸及びグルタミン酸から CAC に入る  $^{13}\text{C}$ -標識グルコース又はグルタミンの注入に続く、その同位体置換体分配を測定することによって調べた。U- $^{13}\text{C}$ -グルコースでの、灌流時のコハク酸の  $^{13}\text{C}$ -同位体置換体分配は、虚血心臓において著しく減少し、ピルビン酸及びコハク酸への  $\alpha$ -ケトグルタル酸連結 CAC フラックスが虚血時に減少したことを示している (図 2 b、c、及び 7)。グルタミンは、正常酸素圧又は虚血における CAC 代謝物の主要な炭素供給源ではない (図 8 a)。さらに、観察された  $\alpha$ -ケトグルタル酸への最少の  $^{13}\text{C}$ -グルタミンの取り込みが、虚血において減少し (図 8 b)、ピガバトリン (Tannahill, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . Nature 496, 238-242, (2013)) での GABA シャントの障害は虚血性コハク酸蓄積を低減しなかった (図 2 d 及び 9)。したがって、虚血時のコハク酸の増加は、心臓代謝の従来の手術によって引き起こされない。

## 【 0 1 4 7 】

虚血時にコハク酸蓄積をもたらし得る他の機構を探索するため、本発明者らは、嫌気性代謝時に SDH が逆に作用しフマル酸をコハク酸に還元するかどうか調べた (Pisarenko, O. I. et al. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. Basic Res. Cardiol. 80, 126-134 (1985)、Taegtmeyer, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. Circ. Res. 43, 808-815 (1978)、Hochachka, P. W. & Storey, K. B. Metabolic consequences of diving in animals and man. Science 187, 613-621 (1975))。SDH の逆転は虚血組織において実証されていないが、インシリコでのフラックス分析により、虚血時の SDH 逆転によるコハク酸産生を最適解として決定した (図 2 e 及び 10)。この手法はまた、SDH へのフマル酸の供給は 2 つの収束する経路：高 NADH / NAD 比が、フマル酸に変換されるリンゴ酸形成を駆動するリンゴ酸 / アスパラギン酸シャトル (MAS) (Hochachka, P. W. & Storey, K. B. Metabolic consequences of diving in animals and man. Science 187, 613-621 (1975)、Easlon, E., Tsang, F., Skinner, C., Wang, C. & Lin, S. J. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. Genes Dev. 22, 931-944, (2008)、Barron, J. T., Gu, L. & Parrillo, J. E. Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle. J. Mol. Cell. Cardiol. 30, 1571-1579, (1998))；フマル酸産生を駆動するプリンヌクレオチドサイクル (PNC) の AMP 依存性活性化 (Van den Berghe, G., Vincent, M. F. & Jaeken, J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. J. Inher. Metab. Dis. 20, 193-202 (1997)、Sridharan, V. et al. O<sub>2</sub>-sensing signal cascade: clamping of O<sub>2</sub> respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. Amer. J. Physiol. 295, C29-37, (2008)) に由来し得ることを示唆した (図 2 e 及び 10)。この予測を実験的に試験するために、本発明者らはマウスにジメチルマロン酸、SDH の競合的阻害剤であるマロン酸の膜透過性前駆体を注入した (図 5) (Dervartanian, D. V. & Veeger, C. Studies on succinate dehydrogenase. I. spectral properties

ies of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 92, 233-247 (1964)、Gutman, M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function. *Mol. Cell. Biochem.* 20, 41-60 (1978) )。驚くことに、ジメチルマロン酸注入により虚血心筋層におけるコハク酸蓄積が著しく減少した(図2f)。この結果は、その従来の方角でのSDH操作の阻害として、虚血心臓においてSDHが逆に操作し、さらにコハク酸を増加することを示している(図2a及び10)。したがって、SDHの逆転によるフマル酸還元から、虚血時にコハク酸が蓄積した。

#### 【0148】

アスパラギン酸が、PNC及びMAS経路の両方において、フマル酸の共通の炭素供給源であるため(図2e)、本発明者らは $^{13}\text{C}$ -標識アスパラギン酸を使用し、これらの経路の虚血時のコハク酸産生への寄与を評価した(図6及び10)。 $^{13}\text{C}$ -アスパラギン酸の注入により、正常酸素圧と比較して虚血心筋層の $^{13}\text{C}$ -コハク酸含量が著しく増加した(図2g)。実際、 $^{13}\text{C}$ -アスパラギン酸は、虚血時にコハク酸へと著しく取り込まれる唯一の $^{13}\text{C}$ -炭素供給源であった(図11)。虚血性コハク酸蓄積へのMAS及びPNCの相対的寄与を特徴づけるため、本発明者らは、MASにおけるアスパラギン酸アミノ基転移酵素を阻害するアミノオキシ酢酸(AOA)(Bunger, R., Glanert, S., Sommer, O. & Gerlach, E. Inhibition by (aminoxy)acetate of the malate-aspartate cycle in the isolated working guinea pig heart. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 361, 907-914 (1980)) (図2e)、及びPNCにおけるアデニロコハク酸リアーゼを阻害する5-アミノ-1-D-リボフラノシル-イミダゾール-4-カルボキサミド(AICAR)(Sridharan, V. et al.  $\text{O}_2$ -sensing signal cascade: clamping of  $\text{O}_2$  respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. *Amer. J. Physiol.* 295, C29-37, (2008)、Swain, J. L., Hines, J. J., Sabina, R. L., Harbury, O. L. & Holmes, E. W. Disruption of the purine nucleotide cycle by inhibition of adenylosuccinate lyase produces skeletal muscle dysfunction. *J. Clin. Invest.* 74, 1422-1427, (1984)) (図2e)を使用した。両阻害剤は虚血性コハク酸レベルを減少した(図2h)。したがって、これらの結果は、虚血時にMAS及びPNCの両経路がフマル酸産生を増加し、次いでSDH逆転によりコハク酸に変換されることを示した。

#### 【0149】

コハク酸駆動性のミトコンドリアのROS産生の根底にある潜在的な機構を調べるため、本発明者らは、再灌流時に虚血性心臓代謝をどのように変えるかをモデル化した(図12)。この分析によって、SDHが蓄積したコハク酸を酸化し、それにより、ミトコンドリア複合体Iを介して逆電子伝達(RET)を駆動するであろうことを示唆した(Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 976-980 (2008)、Kussmaul, L. & Hirst, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7607-7612 (2006)、Pryde, K. R. & Hirst, J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J. Biol. Chem.* 286, 18056-18065, (2011)、Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13, (2009))。興味深いことに、コハク酸はインビトロでのRETによる複合体Iからの広範なスーパーオキシド形成を駆動し、それをIR時のミトコンドリアのROSの強制的な潜在的供給源にする(Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13, (2009))。しかし、IR傷害における複合体I RETの役割は調べられてこなかった。虚血時に蓄積したコハク酸が、再灌流時に複合体I RETを駆動できるか試験するため、本発明者らは、IR傷害の心筋細胞モデルにおいて、蛍光プローブであるジヒドロエチジン(DHE)及びテトラメチルローダミン(TMRE)の電位感受性蛍光からミトコンドリアの膜電位によってミトコンドリアのROSを追

跡した (Davidson, S. M., Yellon, D. & Duchon, M. R. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol. Biol.* 372, 421-430, (2007))。DHEの酸化率は、虚血時に安定なままであったが、再灌流時に急速に上昇し、スーパーオキシド産生の増加と一致している (図3a及び13) (Davidson, S. M., Yellon, D. & Duchon, M. R. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol. Biol.* 372, 421-430, (2007))。ジメチルマロン酸によるSDH媒介虚血性コハク酸蓄積の障害は、再灌流時のDHE酸化を低減し (図3a)、一方でジメチルコハク酸により虚血時にさらにコハク酸を増加することは、再灌流DHE酸化を増幅し、コハク酸レベルが再灌流ROSの程度を制御することを示している (図3b)。重要なことに、MitoSNOによる複合体I R E Tの選択的ブロッキングは (Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753-759, (2013))、再灌流時のジメチルコハク酸駆動DHE酸化を廃止し (図3b)、虚血性コハク酸レベルが複合体I R E Tを介してスーパーオキシドの産生を駆動したことを示している。コハク酸依存性R E Tは、ジメチルコハク酸によりコハク酸レベルを増加することによって再灌流時のNAD(P)H酸化が抑制された観察によって、さらに支持された (図3c及び14)。ミトコンドリアの膜電位の追跡により、虚血性コハク酸蓄積の障害が再灌流時のミトコンドリアの分極率を減らすことが明らかになり (図3d、e及び15)、コハク酸依存性の増強した複合体I R E Tと一致した。最後に、C<sub>2</sub>C<sub>1</sub><sub>2</sub>マウス筋芽細胞においてジメチルコハク酸によりコハク酸を増加することは、オリゴマイシンによるミトコンドリアの過分極はI R とは無関係にMitoSOX酸化を増加するが (図3f)、高レベルのコハク酸を大きなプロトン推進力と組み合わせることが、R E Tにより複合体IのROS産生を駆動するのに十分であることを示唆している。

10

20

30

40

50

#### 【0150】

本発明者らの発見は以下のモデルによって説明され得る (図4a)：虚血時に、MAS及びPNCの活性化を介してフマル酸産生が増加し、次いでSDH逆転によりコハク酸に還元される。再灌流時、蓄積したコハク酸は急速に酸化され、それにより大きなプロトン推進力を維持し、複合体IにおけるR E Tを駆動し、I R 傷害を開始するミトコンドリアのROSを産生する (Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13, (2009))。このモデルは、虚血時に、再灌流時のROSを誘導する初回刺激の必要性、複合体I (Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753-759, (2013)) 及びII (Wojtovich, A. P., Smith, C. O., Haynes, C. M., Nehrke, K. W. & Brookes, P. S. Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 598-611, (2013)) の障害並びに軽度の非共役 (Brennan, J. P. et al. Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovas. Res.* 72, 313-321, (2006)) によるI R 傷害に対する保護など、多くの今までは関係のないI R 傷害の態様を統一する構成を提供する。

#### 【0151】

興味深いことに、本発明者らのモデルは、予期しないが試験可能な予測も生み出す。虚血時にコハク酸を増加する及び再灌流においてそれを酸化する経路の操作は、I R 傷害の程度を決定する。SDHの可逆性障害は、虚血時のコハク酸蓄積 (図2b) 及び再灌流時のその酸化の両方をブロックするので、インビボでのI R 傷害に対して保護する。ジメチルマロン酸、SDH障害剤であるマロン酸の前駆体の静脈内 (i.v.) 注入は、心臓のI R 傷害のインビボモデルでは保護的であった (図4b、c)。重要なことに、この心臓保護は、ジメチルコハク酸を添加し戻すことによって抑制され (図4b、c)、保護が単なるコハク酸蓄積の軽減によりもたらされることを示している。最後に、ラット脳の一過性中大脳動脈閉塞 (tMCAO, transient middle cerebral artery occlusion) 時のジ

メチルマロン酸の i . v . 注入、脳卒中時の脳の I R 傷害のインビボモデルは、保護的であり、核濃縮した核の形態及び神経網の空胞形成を減らし（図 4 d ）、I R 傷害によって引き起こされる梗塞性の脳組織の体積を減らし（図 4 e、f ）、脳卒中に関係する神経機能の低下を防ぐ（図 4 g 及び表 2 ）。

【 0 1 5 2 】

【表 2】

MCAO 対照	ベースライン	1 日目	2 日目	3 日目
神経学的スコアの中央値	31	16	19	20
神経学的スコアの平均値	30.67	16.33	19.00	20.33
アルファ	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>n</i>	6.00	6.00	6.00	6.00
標準偏差	0.82	2.25	2.37	2.34
信頼区間	0.29	1.10	1.06	1.02
標準誤差	0.33	0.92	0.97	0.95

MCAO+ジメチルマロン酸	ベースライン	1 日目	2 日目	3 日目
神経学的スコアの中央値	32.00	22.00	24.00	25.00
神経学的スコアの平均値	31.67	22.67	24.00	24.33
アルファ	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>n</i>	3.00	3.00	3.00	3.00
標準偏差	0.58	2.08	2.00	1.15
信頼区間	0.20	0.87	0.80	0.45
標準誤差	0.33	1.20	1.15	0.67

表2:インビボでのtMCAO IR±ジメチルマロン酸注入に供したラットの神経学的スコアの広範な要約。図4gに記載したtMCAO IR±ジメチルマロン酸後3日目の神経学的スコアの中央値の広範なデータの要約。

【 0 1 5 3 】

これらの発見は、コハク酸駆動性 I R 傷害の本発明者らのモデルを評価し、コハク酸蓄積が心臓及び脳における I R 傷害の根底にあることを実証し、コハク酸蓄積及び I R 傷害を治療するための酸化を減少する治療手法を評価する。

【 0 1 5 4 】

本発明者らは、フマル酸産生及び S D H の逆転を介して、コハク酸の蓄積が、インビボでの虚血の普遍的な代謝シグネチャーであることを実証した。次に、コハク酸はある範囲の組織における I R 傷害の根底にある再灌流時のミトコンドリアの R O S 産生の初代駆動

体である。虚血性コハク酸蓄積は、炎症性の及び低酸素のシグナル伝達におけるその役割を介してさらに適切であり得る (Tannahill, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 496, 238-242, (2013))。したがって、コハク酸は、ミトコンドリアのROSによるIR傷害の急性の原因、並びに次いで分泌時にも炎症及び血管新生の誘引の両方となり得る (Hamel, D. et al. G-Protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 285-293, (2014))。IR傷害の根底にある代謝応答を説明する他にも、本発明者らは虚血時のコハク酸蓄積を予防することは、インビボでのIR傷害に対して保護的であることを実証し、したがって、心臓発作及び脳卒中などの病理においてIR傷害の新規の治療標的を提供する。

10

#### 【0155】

##### 方法の要約

以下の温虚血及び/又はIR傷害のマウスモデルを使用した：エクスビボでの灌流したマウス心臓の全虚血；インビボでのマウス左冠動脈下行枝(LAD)結紮；インビボでのラット脳の一過性中大脳動脈閉塞(tMCAO)；腎門の片側閉塞によるインビボでのマウス腎臓の虚血；インビボでの頸椎脱臼後の肝臓の全虚血。虚血心筋層における代謝経路のモデリングは、先に記載したように実施した (Smith, A. C. & Robinson, A. J. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst. Biol.* 5, 102, (2011))。使用したIR傷害の細胞モデルは、成体の単離した初代ラット心筋細胞及びマウスC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>筋芽細胞株である。心筋細胞内の蛍光をレーザー走査型共焦点顕微鏡によって評価した。DHE蛍光を使用して、ROS産生を測定し、ミトコンドリア膜電位に関しては非クエンチモードでTMRM蛍光を使用し、NAD(P)H自発蛍光を使用してNAD(P)Hプールの還元電位を評価した (Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753-759, (2013))。エクスビボでの灌流したマウス心臓における代謝経路を評価するため、<sup>13</sup>C-標識グルコース、グルタミン、又はアスパラギン酸を単離した心臓に注入し、次いでCAC代謝物の<sup>13</sup>C同位体置換体をLC-MSによって定量した。虚血代謝物蓄積における代謝阻害剤の効果及び<sup>13</sup>C-標識の分布を、代謝阻害剤のi.v.注入に続く組織代謝物のLC-MS分析によって評価した。心臓のCoQプールの酸化還元状態をLCによって評価した。代謝阻害剤によるインビボでのIR傷害の改良は、阻害剤のi.v.投与に続くトリフェニルテトラゾリウム塩化物染色による心臓の梗塞サイズの測定、脳において組織学による神経機能及び梗塞サイズの決定によって評価した。

20

30

#### 【実施例】

#### 【0156】

##### 方法

インビボでのマウス心筋実験。使用したマウスはC57BL/6Jだった。

インビボでのマウス心筋実験。インビボでの心臓IRモデルについては、開胸、インサイチュでの心臓モデルを使用した (Schmidt, K. et al. Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. *Eur. Heart J.* 31, 1655-1662, (2010)、Methner, C. et al. Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res. Cardiol.* 108, 337, (2013))。雄のマウス(8~10週齢；Charles River Laboratories, UK)をペントバルビタールナトリウム(70mg/kg腹腔内(i.p.))で麻酔し、気管内挿管及び3cmH<sub>2</sub>O呼吸終末陽圧呼吸で人工呼吸した。麻酔の妥当性は、角膜及び引込め反射を用いてモニターした。呼吸数を、125~150 $\mu$ Lの間の一回呼吸量で1分あたり110呼吸に維持した。開胸を実施し、心膜をはぐことにより心臓を露出した。左冠動脈前下行枝(LAD)の卓越した枝を、7~0のProlene縫合によって囲み、次いで小さなプラスチックチューブに通した。心臓表

40

50

面に対して管を締めることにより虚血を誘導した。インビボでの I R 時の代謝物を評価するため、マウスを 3 つの群に分けた：30 分間虚血、30 分間虚血 + 5 分間再灌流、及び 30 分間偽手術、偽手術では縫合は配置するが L A D はふさがない。各プロトコルの終わりに、組織をリスクのある状態及び心臓の末梢領域から取り除き、白対赤組織を比較することによって視覚的に選択し、液体窒素中で急速凍結した。偽手術した組織を、仮定したリスクゾーンから取り除いた。

#### 【0157】

梗塞サイズは 30 分間の虚血、続いて 120 分間の再灌流後に 2 % トリフェニルテトラゾリウム塩化物染色を用いて評価し、リスクゾーンの百分率として表した (Nadtochiy, S. M., Redman, E., Rahman, I. & Brookes, P. S. Lysine deacetylation in ischaemic preconditioning: the role of SIRT1. *Cardiovasc. Res.* 89, 643-649, (2011))。滅菌生理食塩水中の代謝阻害剤 (全て Sigma 社製) を以下の用量で虚血 10 分前及び虚血中を通して尾静脈を介して i. v. 注入した：ジメチルマロン酸塩 (4 mg / kg / 分)、A O A (50 µg / kg / 分; Fluorochem 社) 及び A I C A R 10 mg / kg / 分)。ジメチルコハク酸 (8 mg / kg / 分) は、ジメチルマロン酸と組み合わせて注入した。対照のマウスには滅菌生理食塩水を注入した。投与した総容量は 200 µL / マウスを超えないようにした。

#### 【0158】

代謝分析のためのエクスビボでのランゲンドルフ心臓実験。マウスは、ヘパリン添加し (200 U i. p.)、ペントバルビタールナトリウム (100 mg / kg i. p.) で麻酔した。次いで、胸を開き、心臓を素早く切除し、冷 Krebs-Henseleit (KH) 緩衝液 (0.5 mM EDTA、118 mM NaCl、4.7 mM KCl、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、11 mM グルコース、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、及び 2 mM CaCl<sub>2</sub>)、pH 7.4 で停止した。次いで、大動脈を 22 G の鈍針でカニユーレ処置し、灌流装置に移した。心臓を、37 °C の KH 緩衝液 (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>)、80 mmHg の定圧で灌流した。20 分平衡化後の心臓を 4 つの群に分けた：60 分間正常酸素圧灌流、30 分間全虚血、30 分間全虚血 + 5 分間再灌流、及び 30 分間全虚血 + 30 分間再灌流。代謝阻害剤は、冠動脈血流量の 1 % で大動脈カニユーレ上のサイドポートを通して、虚血前に 10 分間注入した。実験の終わりには心臓は液体窒素中で急速凍結し、-80 °C で保存した。

#### 【0159】

エクスビボでのランゲンドルフ心臓実験における <sup>13</sup>C 代謝物標識。マウスは、ペントバルビタールナトリウム (約 140 mg / kg) で麻酔した。心臓を素早く切除し、カニユーレ処置し、等容性のランゲンドルフモード、80 mmHg 灌流圧、37 °C、95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> (pH 7.4) で連続的にガスを供給した KH 緩衝液で灌流した (Ashrafian, H. et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab.* 15, 361-371, (2012))。左心室 (LV, left ventricle) に挿入した流体充填のバルーンを用いて、圧力変換機及び PowerLab (商標) システム (ADInstruments 社, UK) につないで心臓機能の評価した。バルーン体積を、最初の LV 拡張期圧 4 ~ 9 mmHg に合わせ (Ashrafian, H. et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab.* 15, 361-371, (2012))、全心臓を 550 bpm にペース調整した。最大左心室圧 (LVDP, left ventricular developed pressure) を収縮期圧 (SP, systolic pressure) と拡張期圧 (DP, diastolic pressure) の間の差から計算した。関数引数 (SP、拡張末気圧、心拍数、LVDP、冠動脈血流量、灌流圧) を、LabChart (商標) ソフトウェア v.7 (ADInstruments 社, UK) を連続的に用いて記録した。

#### 【0160】

標準的な KH 緩衝液で 20 分間平衡化後、心臓を以下の群に分けた：11 mM U - <sup>13</sup>C グルコースを含有する KH 緩衝液で灌流、続いて 30 分間正常酸素圧呼吸 (n = 4 / 群)；11 mM U - <sup>13</sup>C グルコースを含有する KH 緩衝液で 10 分間灌流、次いで 3

10

20

30

40

50

0 分間全正常温虚血に供した (  $n = 4$  / 群 ) ;  $1 \text{ mM } 5 - ^{13}\text{C}$  L グルタミンを含有する K H 緩衝液の 10 分間灌流、続いて未標識の K H 緩衝液で標準的な正常酸素圧灌流 30 分 (  $n = 4$  ) ;  $1 \text{ mM } ^{13}\text{C}_5$  L グルタミンで 10 分間灌流、続いて 30 分間全虚血 (  $n = 4$  ) ;  $1 \text{ mM } 1 - ^{13}\text{C}$  L アスパラギン酸の 10 分間灌流、続いて未標識の K H 緩衝液で 30 分間正常酸素圧灌流 ;  $1 \text{ mM } 1 - ^{13}\text{C}$  L アスパラギン酸で 10 分間灌流、続いて 30 分間全虚血。終わりに、心臓を液体窒素中で急速凍結し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 【0161】

インビボでのラット脳虚血及び再灌流。Glasgow 大学が維持するコロニーからの雄の脳卒中易発症高血圧自然発症 ( S H R S P , spontaneously hypertensive stroke prone ) ラット (  $270 \sim 310 \text{ g}$  ) を、酸素中 5 % イソフルランで麻酔し、外科手術中を通して挿管及び人工呼吸した ( 約 2 . 5 % イソフルラン / 酸素 ) 。体温は  $37 \pm 0.5$  に維持した。動物は一過性中大脳動脈閉塞 ( t M C A O 、 45 分 ) 前に、前脳卒中穿頭孔手術を行った ( Ord, E.N.J., Shirley, R., van Kralingen, J.C., Graves, A., McClure, J.D., Wilkinson, M., McCabe, C., Macrae, I.M. & Work, L.M. Positive impact of pre-stroke surgery on survival following transient focal ischemia in hypertensive rats . J. Neurosci. Methods 211, 305-308, (2012) ) 。手短に言えば、シリコーン被覆モノフィラメント ( Doccol Corporation 社 , USA ) を総頸動脈を通して進め、M C A の原因をブロックした ( Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T. & Ooneda, G. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn. J. Stroke 8, 1-8 (1986) ) 。動物は虚血時、麻酔下で維持した。フィラメントの除去後すぐに、又は再灌流の 5 分後に、頸椎脱臼後脳を取り除き、同側の周辺組織から梗塞組織を分離し、代謝分析のために液体窒素中で急速凍結した。相当する領域を対側から取り出した。別の群にジメチルマロン酸 (  $6 \text{ mg} / \text{kg} / \text{分}$  ) t M C A O の 10 分前及び t M C A O 時に i . v . 注入により ) 又は担体を注入し、3 日間回復させ、その期間にわたり、改変したように ( Ord, E. N. J. et al., Combined antiapoptotic and antioxidant approach to acute neuroprotection for stroke in hypertensive rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 1215-1224, (2013) ) 神経機能を記録した ( Hunter, A. J., et al., Functional assessments in mice and rats after focal stroke. Neuropharmacology. 39, 806-816, (2000) ) 。これらのラットは、次いで経心臓の灌流固定法によって屠殺し、梗塞領域をヘマトキシリン及びエオシン染色後、7 つの冠側位にわたって評価した ( Osborne, K. A. et al. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 50, 402-410 (1987) ) 。

#### 【0162】

インビボでのマウス腎臓虚血及び再灌流。イソフルオラン全身麻酔下で、マウスの開腹術及び両側の腎門の露出を行った。血管クリップ (  $8 \text{ mm}$ 、InterFocus Fine Science Tools 社、Cambridge、UK ) を 1 つの腎門上に置き、片側の腎臓虚血を誘導した。45 分間虚血の終わりに、クリップを取り除き、腎臓の再灌流は、紅潮した色の戻り及び腎静脈からの流れの可視化により明らかであった。腎臓を虚血の終わり又は 5 分間再灌流後に取り出し、代謝分析のために液体窒素中で急速凍結した。

#### 【0163】

インビボでのマウス肝臓温虚血。マウスを頸椎脱臼により殺し、確実に血流を中断した。肝臓組織は、サーモスタット温熱パッドを使用して  $37^\circ\text{C}$  で 45 分間、体腔内インサイチュで維持し、続いて取り除き、続く代謝分析のために液体窒素中で急速凍結した。

#### 【0164】

代謝分析。等量の湿重量マウス組織を、製造業者の指示に従って、Precellysis 24 バイアル中で、 $10 \text{ mg}$  の組織あたり  $250 \mu\text{L}$  の抽出溶液 ( E S , extraction solution ; 30 % アセトニトリル、50 % メタノール、及び 20 % 水 ) に溶解した。懸濁液をすぐに遠心分離 (  $16,000 \text{ g}$ 、15 分、 $0^\circ\text{C}$  ) し、上澄み液を L C - M S 分析に使用した。

LC分離のため、カラムAはHiChrom, Reading社, UKのガードカラム(20 mm × 2.1 mm 3.5 μm)を備えたSequant Zic-Hilic(150 mm × 4.6 mm、内径3.5 μm)であった。移動相。A: 水中0.1%フマル酸(v/v)。B: アセトニトリル中0.1%フマル酸(v/v)。流速300 μL/分。勾配: 0~3分 80%B、25分 20%B、26分 80%B、36分 80%B。カラムBはHiChrom, Reading社, UKのガードカラム(20 mm × 2.1 mm i.d. 3.5 μm)を備えたsequent Zic-pH ilic(150 mm × 2.1 mm、i.d. 3.5 μm)であった。移動相。C: 水中20 mM炭酸アンモニウム+0.1%水酸化アンモニウム。D: アセトニトリル。流速100 μL/分。勾配: 0分 80%D、28分 20%D、29分 80%D、45分 80%D。質量分析装置(Thermo QExactive Orbitrap)をフルMS及び極性切り替えモードで操作した。機械のドリフトを避けるために試料はランダム化した。標的手法及び非標的手法両方を用いてスペクトルを分析した。標的手法は、化合物の内部ライブラリーを参照することによって、スペクトルをXCalibur Qual Browser及びXCalibur Quan Browserソフトウェア(Thermo Scientific社)を用いて分析した。非標的手法は、スペクトルをSieve(商標)2.0ソフトウェア(Thermo Scientific社)で処理し、スペクトルピークを抽出した。スペクトルのアレイは、Rパッケージmumaの関数explore data及びunivariateを用いて統計的に分析した(Gaude, E. et al. muma, An R Package for metabolomics univariate and multivariate statistical analysis. Current Metabol. 1, 180-189 (2013))。

10

#### 【0165】

20

成体ラットの初代心筋細胞のインサイチュでの虚血及び再灌流。雄のSprague-Dawleyラット(300~370 g)を、ペントバルビトンナトリウム200 mg/kg及びヘパリン330 U/kgのIP注射により終末麻酔した。心臓を切除し、37℃で、13 mL/分で酸素化したKH緩衝液を用いて、ランゲンドルフ灌流システムで逆行性灌流した。細胞は、標準的な方法を用いてコラゲナーゼ消化によって単離した(Davidson, S. M. & Du chen, M. R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. Cardiovasc. Res. 71, 10-21, (2006))。簡単に言えば、心臓をKH緩衝液で5分間、次いで100 μM EGTAを含有するCa<sup>2+</sup>を含まないKH緩衝液で5分間、続いて100 μM CaCl<sub>2</sub>及び0.5 mg/mLコラゲナーゼII(Worthington社)を含有するKH緩衝液で8分灌流した。カニユーレから心臓を取り除き、心室を素早く切り、20 mLの同じコラゲナーゼ緩衝液に15分間漬けた。消化した組織を100 μmの細胞フィルターに通し、細胞を重力によって回収した。上澄み液を取り除き、細胞を初め0.5 mM CaCl<sub>2</sub>を含有するKH緩衝液で、次いで1 mM CaCl<sub>2</sub>を含有するKH緩衝液で洗浄した。典型的な収率は90%生存、桿状細胞で、2 × 10<sup>6</sup>個の細胞/心臓であった。細胞をMedium 199(5 mMクレアチン、2 mMカルニチン、5 mMタウリン、及び100 μg/mL ペニシリン/ストレプトマイシンを補充)に再懸濁し、ラミニン(Sigma社)で被覆したカバーガラス上に置いた。37℃/5%CO<sub>2</sub>で1時間インキュベーション後、接着していない細胞を洗い落とし、新しいMedium 199を少なくとも4時間、37℃/5%CO<sub>2</sub>で各ウェルに添加した。

30

#### 【0166】

40

プレATING後36時間以内に、細胞を画像化した。画像はFluar 20x/0.75NA UV対物レンズを備えたZeiss(商標)LSM 510 META共焦点顕微鏡、又はOrca(商標)ER cooled CCD camera(Hamamatsu社)を装備した顕微鏡、モノクロメーター(Cairn Research社)及びFluar 20x/0.75NA対物レンズを備えたemission filter wheel(Prior社)を用いた。注文製の画像チャンバーの基部を形成するカバーガラスに接着した細胞を、正常酸素圧のレコーディング緩衝液(156 mM NaCl、3 mM KCl、2 mM MgSO<sub>4</sub>、1.25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM Hepes、10 mM D-グルコース; pH 7.4)を用いて、顕微鏡の37℃に加熱したステージ上に置いた。緩衝液を、虚血をシミュレートするガス供給前の低酸素圧レコーディング緩衝液(上記の通りであるが、グルコースを欠き、10 mM 酪酸ナトリウム、14.8 mM KCl

50



を含有する；pH 6.4）で置き換え、透明でガス不透過な蓋で加熱したステージをカバーし、低酸素に維持するようにアルゴンが吹き込まれる小さなチャンバーを形成して、虚血をシミュレートした。シミュレートした虚血の間、 $pO_2$ を $< 2.0$  mmHgになるように常に測定した。再灌流をシミュレートするために、チャンバーから蓋を取り除き、緩衝液を正常酸素圧レコーディング緩衝液で置き換えた。

#### 【0167】

ミトコンドリア膜電位を非クエンチモードでテトラメチルローダミン、メチルエステル（TMRM, Life Technologies社）を用いて測定した。このモードで、ミトコンドリアの脱分極は、ミトコンドリアから細胞質への高濃度のクエンチしたTMRMの再分配を引き起こし、低濃度は非クエンチング及び蛍光の増加をもたらす（Davidson, S. M., Yellon, D. & Duchon, M. R. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol. Biol.* 372, 421-430, (2007)）。 $3 \mu M$  TMRMを含有する正常酸素圧のレコーディング緩衝液を用いて、室温で30分間、細胞をロードした。画像化の前に、ローディング緩衝液を除き、正常酸素圧のレコーディング緩衝液で置き換えた。TMRM蛍光を、543 nmで励起し、発光はLP560フィルターを用いて回収した。

10

#### 【0168】

ROS産生をDHEの酸化により推定した。この細胞を $5 \mu M$ ジヒドロエチジウム（DHE, Invitrogen社）とロードするため、DHEは正常酸素圧及び虚血状態を通して存在したままであった。DHEは351 nmで励起し、発光したシグナルはBP435~485 IRフィルターで得た。酸化したDHEは543 nmで励起し、発光はLP560フィルターで回収した。NADHの自発蛍光は351 nmで励起し、発光したシグナルはBP435~485 IRフィルターを用いて回収した。全ての測定した細胞パラメーターは、Fiji画像処理ソフトウェアで分析した。

20

#### 【0169】

筋芽細胞におけるコハク酸依存性ミトコンドリアスーパーオキシド産生の評価。 $C_2C_{12}$ 筋芽細胞を35 mmガラスボトム培養ディッシュ（MatTek社）に播種し、低グルコース（ $1 g/L$ ）DMEMで24時間インキュベートした。画像化の2時間前に、DMEMを取り除き、Tris baseでpH 7.4に調整し、2 - デオキシグルコース（ $25 \mu M$ ）、及びピルビン酸ナトリウム（ $10 mg/L$ 又は適用があれば $4 \mu M$ オリゴマイシン）を補ったイメージング緩衝液（ $132 mM NaCl$ ； $10 mM HEPES$ ； $4.2 mM KCl$ ； $1 mM MgCl_2$ ； $1 mM CaCl_2$ ）と置き換えた。筋芽細胞は、画像化の前に15分間、 $2 \mu M$  MitoSOXで前もってインキュベートした。MitoSOX蛍光は、Nikon Eclipse Ti共焦点顕微鏡を用いて、30分間温度制御ステージ上で37℃でモニターした。MitoSOXは510 nmで励起し、発光したシグナルは、示した添加後LP560フィルターで回収した。

30

#### 【0170】

虚血及び再灌流時の代謝フラックスのインシリコでの分析。心筋のミトコンドリア代謝モデルiAS253の拡張版を使用してシミュレーションを実施した（Smith, A. C. & Robinson, A. J. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst. Biol.* 5, 102, (2011)）。ミトコンドリアのプロテオミクスデータベースであるMitoMinerの最新版を使用して（Smith, A. C., Blackshaw, J. A. & Robinson, A. J. MitoMiner: a data warehouse for mitochondrial proteomics data. *Nucleic Acids Res.* 40, (2012)）、モデルをさらなるミトコンドリアの反応を含むように拡張した。MitoMinerを使用して、これらのデータをBRENDA（Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. & Schomburg, D. BRENDA, AMENDA and FR ENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* 37, D588-592, (2009)）、HumanCyc（Romero, P. et al. Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome. *Genome Biol.* 6, R2, (2005)）、及び関連文献からの情報と相互参照することによる包含のための新しいミ

40

50

トコンドリアの反応を同定し、新しい反応がヒトにおいて存在し、心臓組織において発現し、ミトコンドリアマトリックスに局在することを確認した。さらに、アミノ酸分解及び転換反応並びにプリンヌクレオチドサイクルなどのエネルギー産生に寄与することができる細胞質反応が含まれる。モデルにおける代謝物のプロトン化状態を、計算化学ソフトウェアのMarvin suite (ChemAxon Ltd社, Budapest, Hungary) を使用して計算した。次いで、反応は、ミトコンドリアマトリックス (Abad, M. F., Di Benedetto, G., Magalhaes, P. J., Filippin, L. & Pozzan, T. Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *J. Biol. Chem.* 279, 11521-11529, (2004)) では  $\text{pH } 8.05$ 、細胞質では  $\text{pH } 7.30$  で見出される主な小種のプロトン化状態によって荷電平衡化した。さらに、不可逆性、熱力学、並びにBRENDA及びHumanCycなど公共の情報源からの情報の通則に基づく方向性の制約が課され、容量の制約は文献 (Smith, A. C. & Robinson, A. J. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst. Biol.* 5, 102, (2011)) から取る。最終モデルは、227のミトコンドリアマトリックス反応、76の細胞質反応、2つの区画間の91の輸送ステップ、及びシステムへのインプット及びアウトプットを表す84の境界条件を含有する。拡張モデルは、手動で精選され、高精度のミトコンドリアのモデルであり、iAS253のように、行き止まりの代謝物は存在せず、全ての反応がフラックスを有することができる。

10

#### 【0171】

虚血を表すために、酸素の最大取り込みを正常状態下で、そのレベルの5%に低減した ( $0.99$  対  $19.8 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{乾燥重量グラム}$ )。再灌流を表すために、酸素レベルをその正常レベルに回復し、コハク酸、乳酸、ピルビン酸、及びNADHの入手可能性は、これらの代謝物の虚血性蓄積を反映するように様々なレベルに増加した。ATP合成酵素のフラックス能は最大50%まで減少し、事実上電子伝達系の他のプロトンポンプ複合体の効率を制約することによって、ATP合成酵素が機能する、またミトコンドリア膜の過分極をモデルするのに必要なAMPからのADP生成の遅延を表した。

20

#### 【0172】

ミトコンドリアネットワークの代謝は、他で詳細に記載された技術であるフラックスバランス分析を用いてシミュレートした (Orth, J. D., Thiele, I. & Palsson, B. O. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28, 245-248, (2010))。反応フラックスを最適化するために使用する目的の機能は、最大ATP産生である。全てのFBAシミュレーションは、COBRA Toolbox (Becker, S. A. et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nat. Prot.* 2, 727-738, (2007))、線形計画解析GLPK (<http://www.gnu.org/software/glpk>) を備えた、MATLAB (商標) R2012b (Math Works, Inc社, Natick, MA) を使用して実行した。

30

#### 【0173】

(参考文献)

1. Murphy, E. & Steenbergen, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* 88, 581-609, (2007)
2. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121-1135, (2007)
3. Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M. & Brookes, P. S. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 804-810, (2009)
4. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* 17, 1391-1401, (2011)
5. Timmers, L. et al. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* 94, 276-283, (2012)
6. Harmsen, E., de Jong, J. W. & Serruys, P. W. Hypoxanthine production by ischemic heart demonstrated by high pressure liquid chromatography of blood purine nucleosides and oxypurines. *Clin. Chim. Acta* 115, 73-84 (1981)

40

50

7. Pacher, P., Nivorozhkin, A. & Szabo, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Revs.* 58, 87-114, (2006)
8. Chouchani, E. T. et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753-759, (2013)
9. Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1404-1407 (1987)
10. Tannahill, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 496, 238-242, (2013) 10
11. Smith, A. C. & Robinson, A. J. A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst. Biol.* 5, 102, (2011)
12. Pisarenko, O. I. et al. On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res. Cardiol.* 80, 126-134 (1985)
13. Taegtmeyer, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ. Res.* 43, 808-815 (1978)
14. Hochachka, P. W. & Storey, K. B. Metabolic consequences of diving in animals and man. *Science* 187, 613-621 (1975)
15. Easlou, E., Tsang, F., Skinner, C., Wang, C. & Lin, S. J. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes Dev.* 22, 931-944, (2008) 20
16. Barron, J. T., Gu, L. & Parrillo, J. E. Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1571-1579, (1998)
17. Van den Berghe, G., Vincent, M. F. & Jaeken, J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20, 193-202 (1997)
18. Sridharan, V. et al. O<sub>2</sub>-sensing signal cascade: clamping of O<sub>2</sub> respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. *Amer. J. Physiol.* 295, C29-37, (2008) 30
19. Dervartanian, D. V. & Veeger, C. Studies on succinate dehydrogenase. I. spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 92, 233-247 (1964)
20. Gutman, M. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function. *Mol. Cell. Biochem.* 20, 41-60 (1978)
21. Bunge, R., Glanert, S., Sommer, O. & Gerlach, E. Inhibition by (aminooxy)acetate of the malate-aspartate cycle in the isolated working guinea pig heart. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 907-914 (1980) 40
22. Swain, J. L., Hines, J. J., Sabina, R. L., Harbury, O. L. & Holmes, E. W. Disruption of the purine nucleotide cycle by inhibition of adenylosuccinate lyase produces skeletal muscle dysfunction. *J. Clin. Invest.* 74, 1422-1427, (1984)
23. Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 976-980 (2008)
24. Kussmaul, L. & Hirst, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7607-7612 (2006)
25. Pryde, K. R. & Hirst, J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward 50

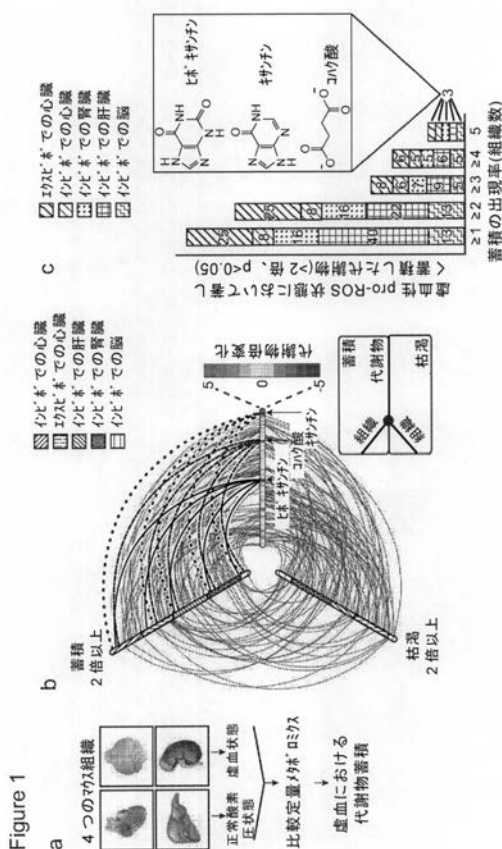
- rd and reverse electron transfer. *J. Biol. Chem.* 286, 18056-18065, (2011)
26. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13, (2009)
27. Davidson, S. M., Yellon, D. & Duchen, M. R. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol. Biol.* 372, 421-430, (2007)
28. Wojtovich, A. P., Smith, C. O., Haynes, C. M., Nehrke, K. W. & Brookes, P. S. . Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 598-611, (2013)
29. Brennan, J. P. et al. Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovas. Res.* 72, 313-321, (2006) 10
30. Hamel, D. et al. G-Protein-coupled receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 285-293, (2014)
31. Schmidt, K. et al. Cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists at reperfusion. *Eur. Heart J.* 31, 1655-1662, (2010)
32. Methner, C. et al. Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res. Cardiol.* 108, 337, (2013) 20
33. Nadtochiy, S. M., Redman, E., Rahman, I. & Brookes, P. S. Lysine deacetylation in ischaemic preconditioning: the role of SIRT1. *Cardiovasc. Res.* 89, 643-649, (2011)
34. Ashrafian, H. et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Cell Metab.* 15, 361-371, (2012)
35. Ord, E.N.J., Shirley, R., van Kralingen, J.C., Graves, A., McClure, J.D., Wilkinson, M., McCabe, C., Macrae, I.M. & Work, L.M. Positive impact of pre-stroke surgery on survival following transient focal ischemia in hypertensive rats. *J. Neurosci. Methods* 211, 305-308, (2012)
36. Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T. & Ooneda, G. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke* 8, 1-8 (1986) 30
37. Hunter, A. J., et al., Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology.* 39, 806-816, (2000)
38. Ord, E. N. J. et al., Combined antiapoptotic and antioxidant approach to acute neuroprotection for stroke in hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1215-1224, (2013)
39. Osborne, K. A. et al. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50, 402-410 (1987) 40
40. Gaude, E. et al. muma, An R Package for metabolomics univariate and multivariate statistical analysis. *Current Metabol.* 1, 180-189 (2013)
41. Davidson, S. M. & Duchen, M. R. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc. Res.* 71, 10-21, (2006)
42. Smith, A. C., Blackshaw, J. A. & Robinson, A. J. MitoMiner: a data warehouse for mitochondrial proteomics data. *Nucleic Acids Res.* 40, (2012)
43. Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. & Schomburg, D. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* 37, D588-592, (2009) 50

- 【 0 1 7 4 】**

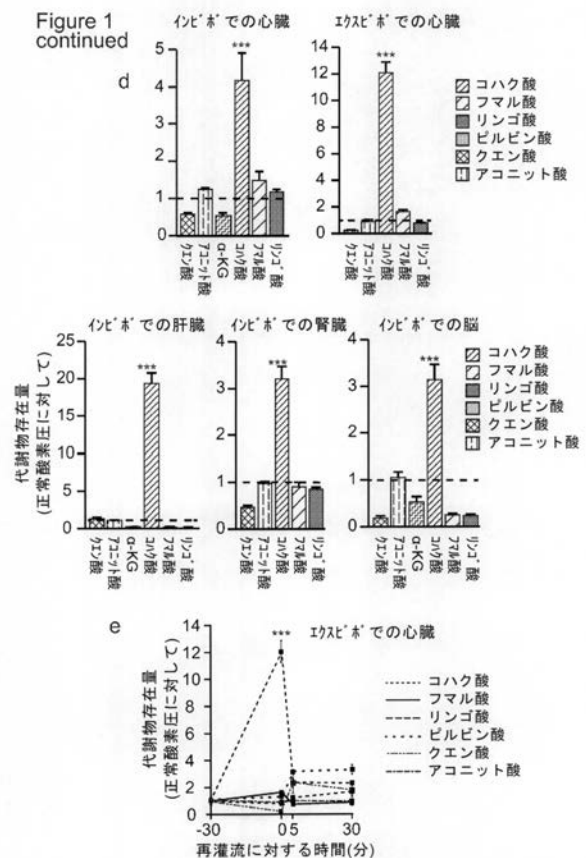
10

上記明細書に記載した全ての文献は、本明細書において参照により組み込まれる。本発明の例示的な実施形態は、本明細書において添付の図面を参照して詳細に開示されるが、本発明は精密な実施形態に限定されず、様々な変更及び改変が、添付の請求項及びその等価物によって定義される本発明の範囲を逸脱しない限り当業者によって達成できることを理解されたい。

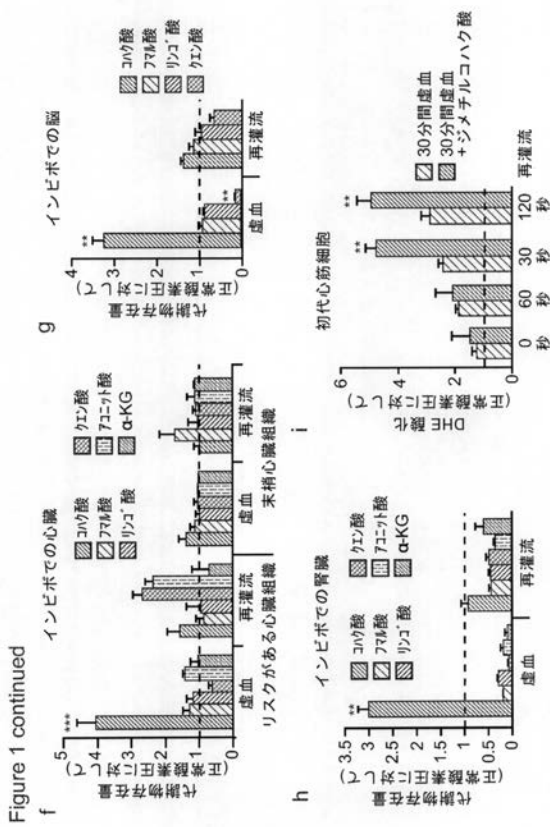
【 図 1 a - c 】



【 図 1 d e 】

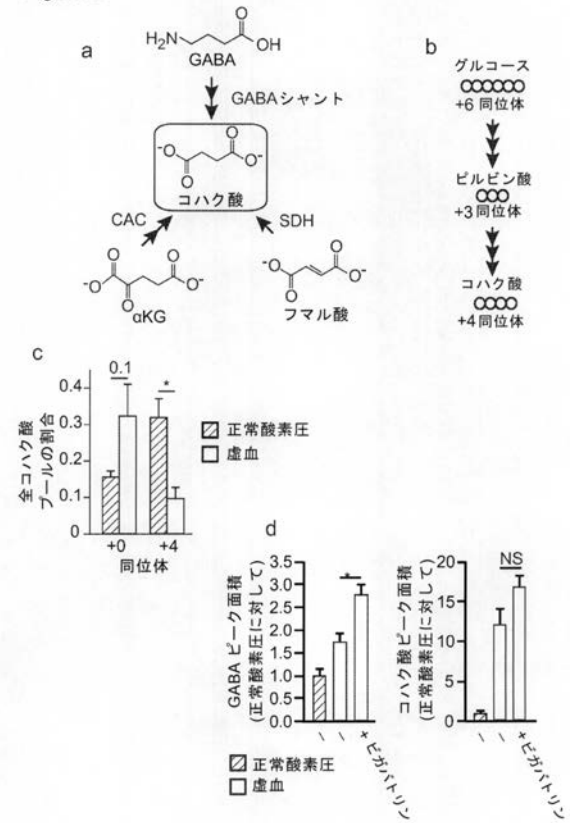


【図 1 f - i】



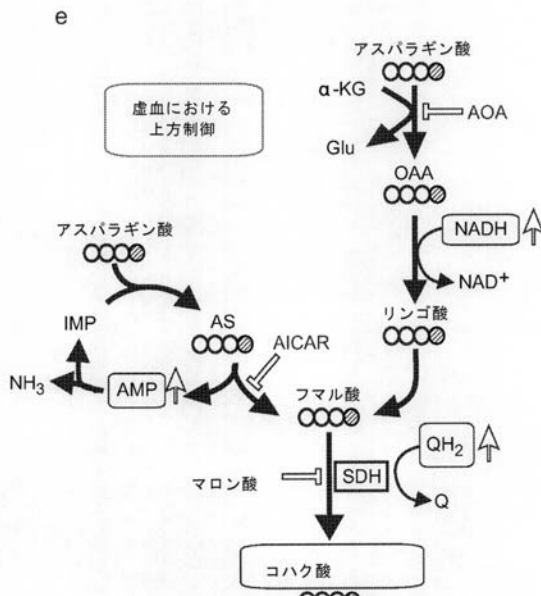
【図 2 a - d】

Figure 2



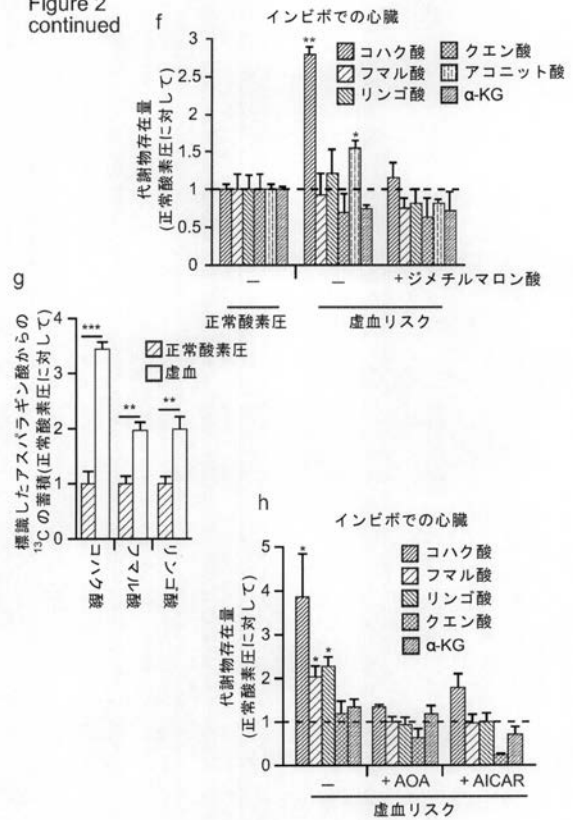
【図 2 e】

Figure 2 continued



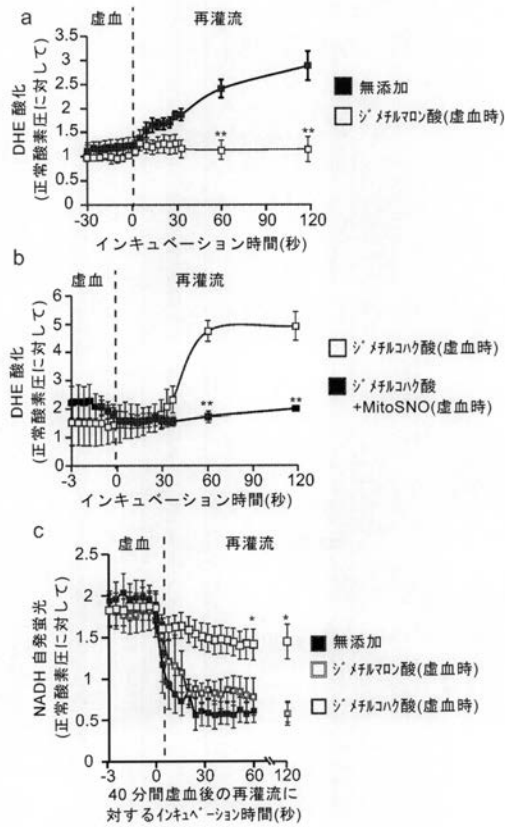
【図 2 f - h】

Figure 2 continued



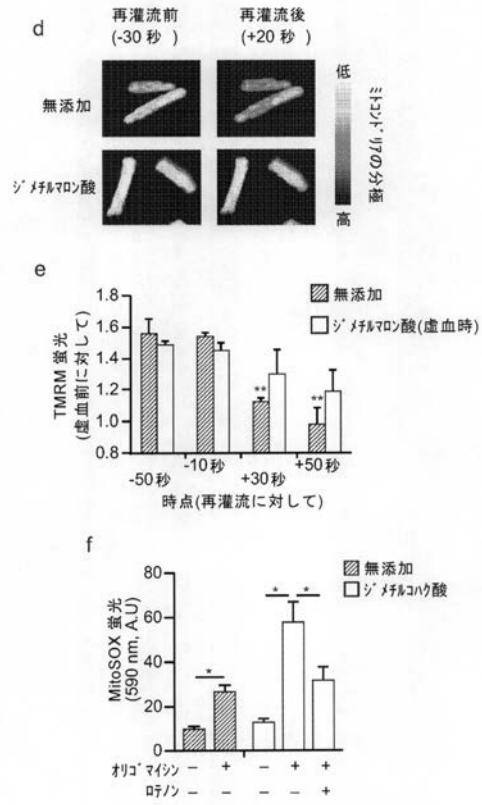
【図 3 a - c】

Figure 3



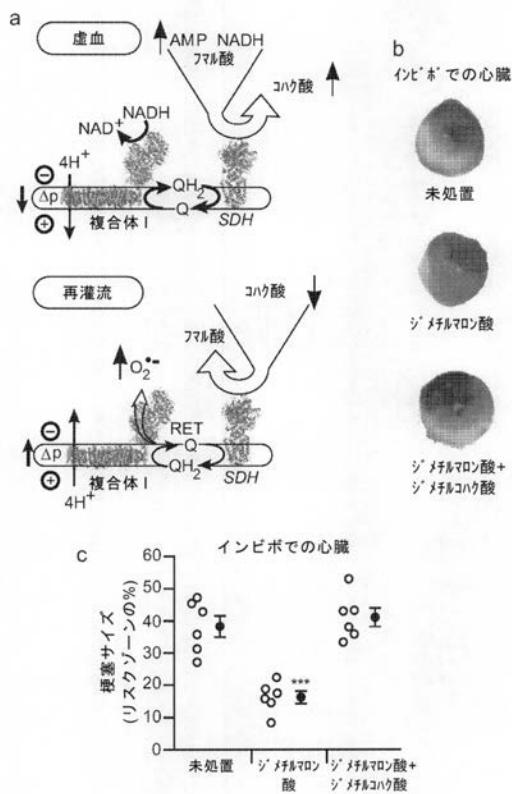
【図 3 d - f】

Figure 3 continued



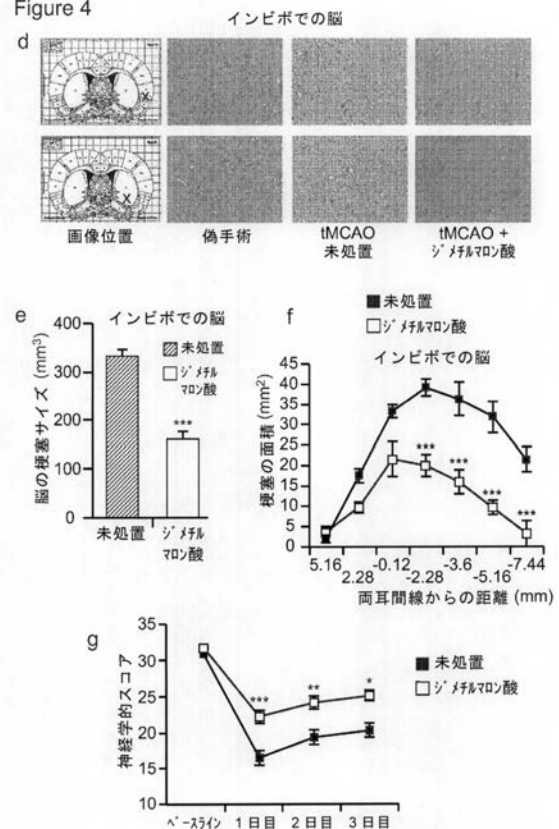
【図 4 a - c】

Figure 4



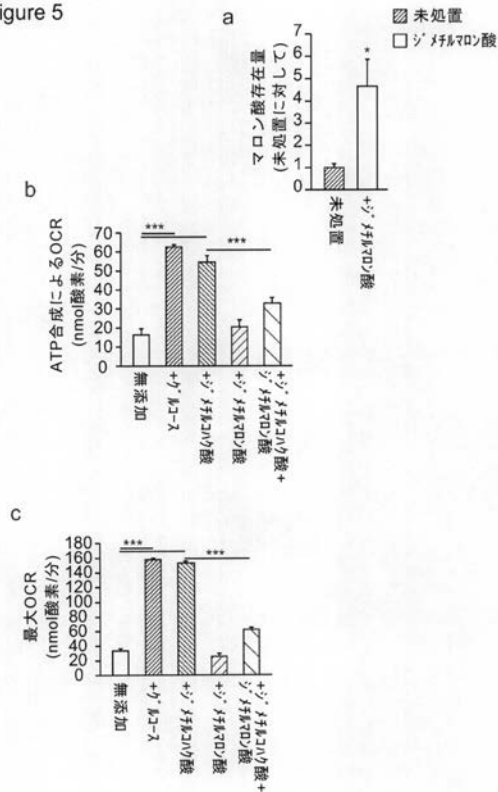
【図 4 d - g】

Figure 4



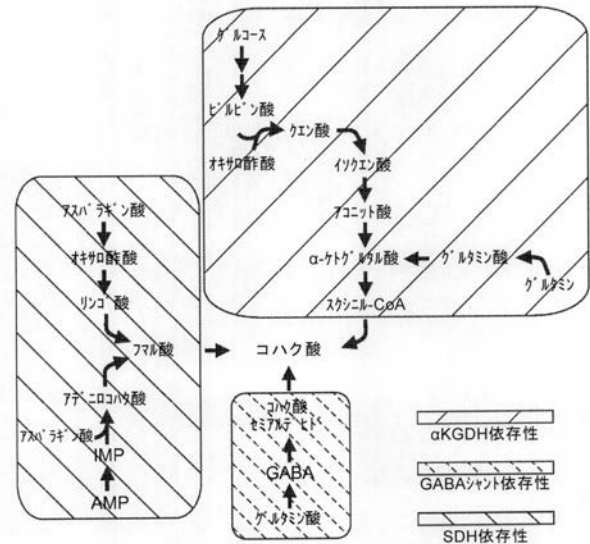
【図 5】

Figure 5



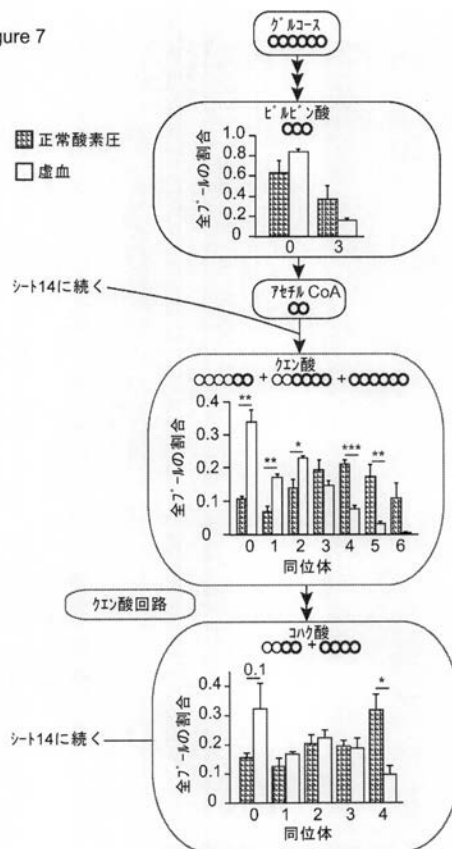
【図 6】

Figure 6



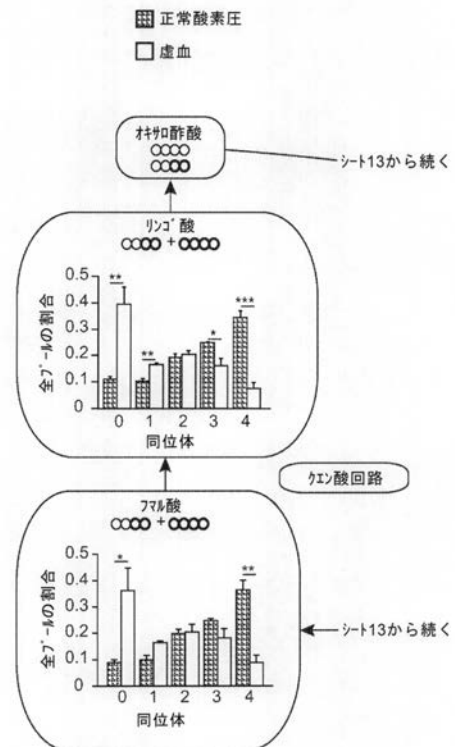
【図 7 - 1】

Figure 7



【図 7 - 2】

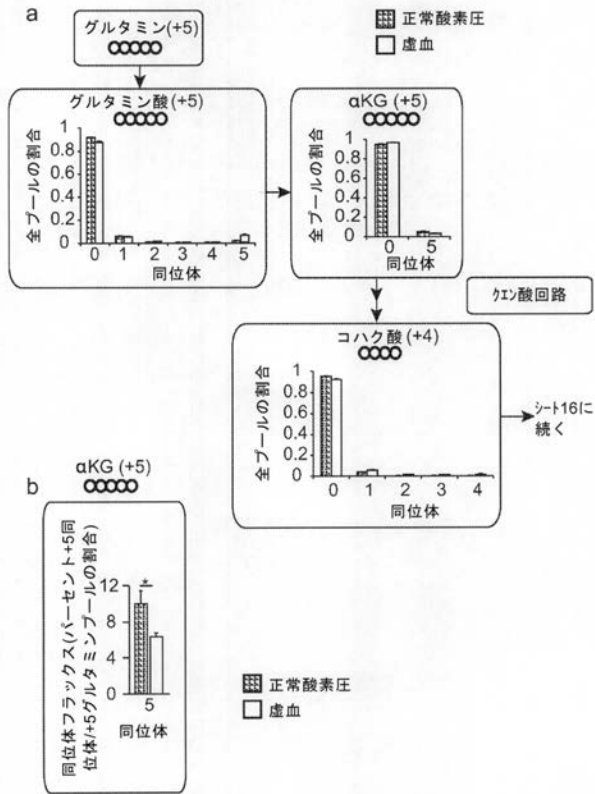
Figure 7 continued





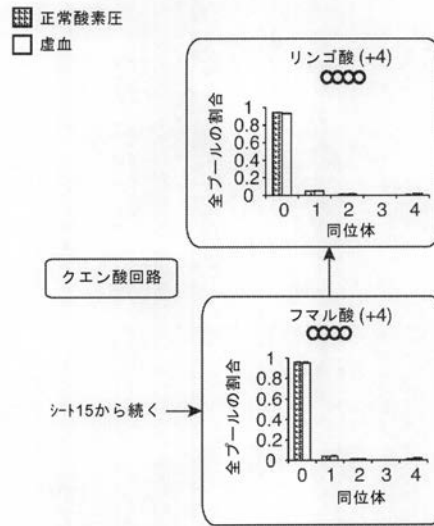
【図 8 - 1】

Figure 8



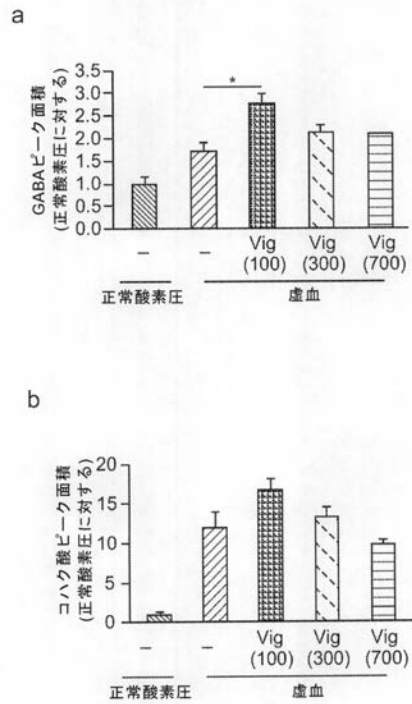
【図 8 - 2】

Figure 8 continued



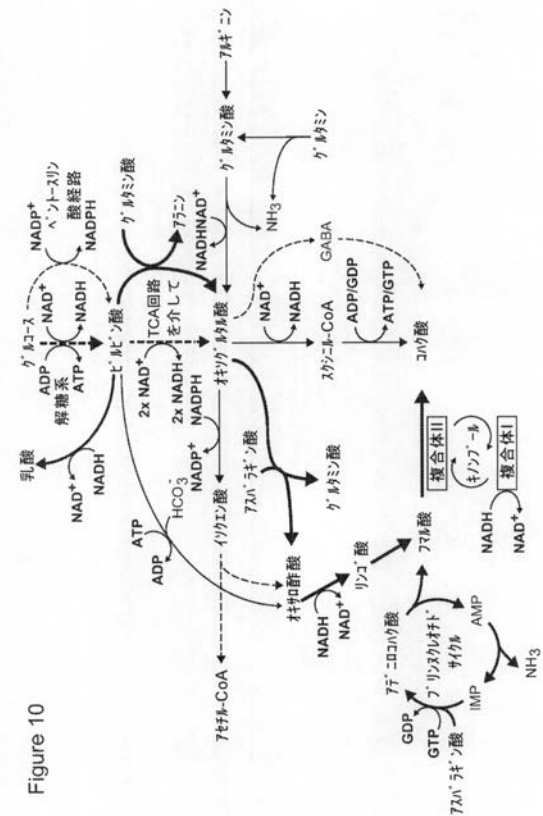
【図 9】

Figure 9



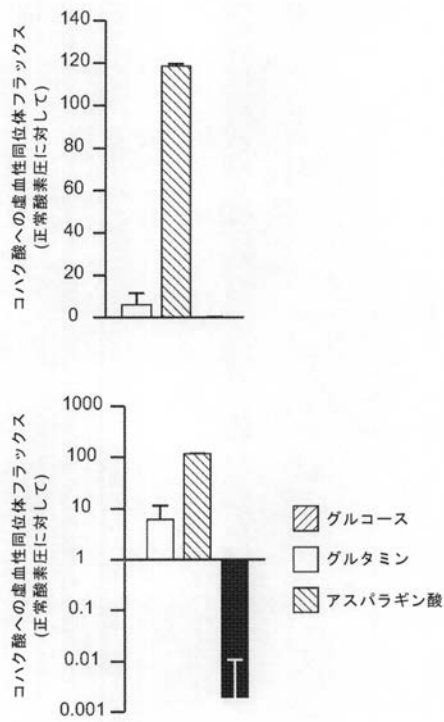
【図 10】

Figure 10



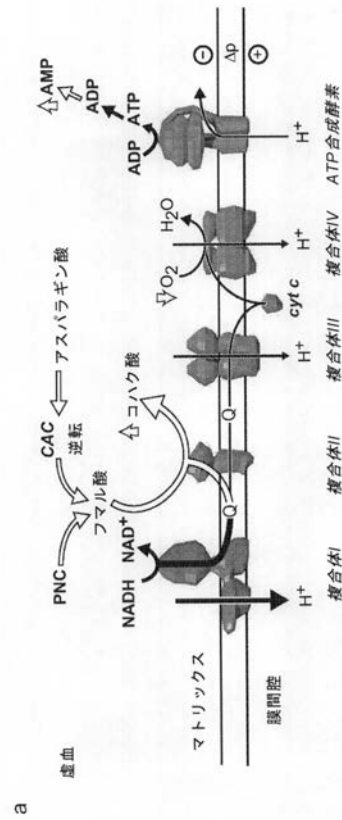
【図 1 1】

Figure 11



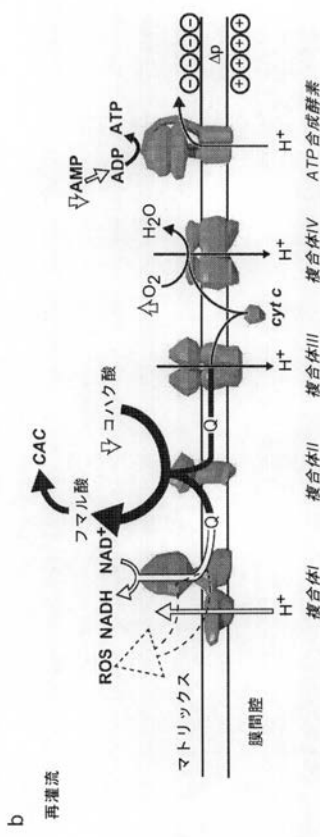
【図 1 2 a】

Figure 12



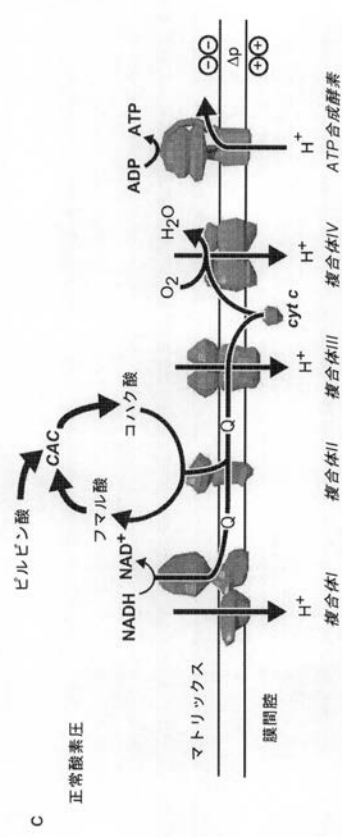
【図 1 2 b】

Figure 12 continued

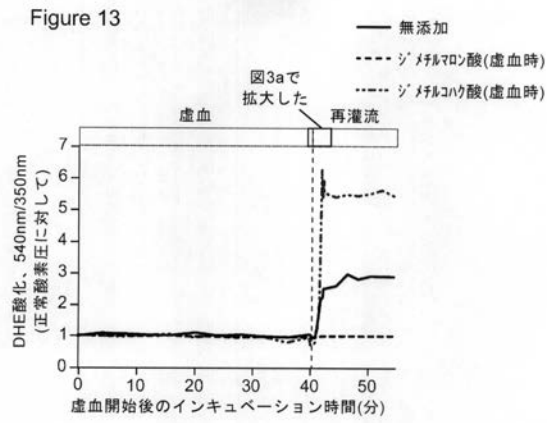


【図 1 2 c】

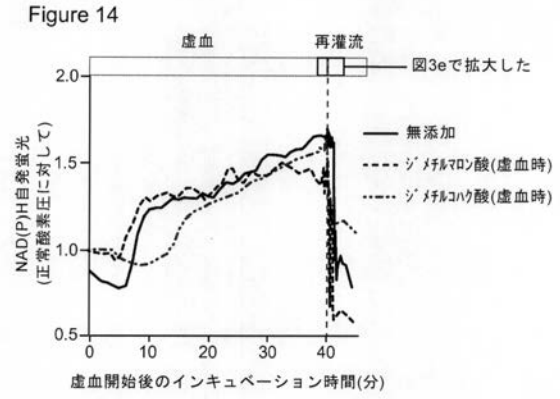
Figure 12 continued



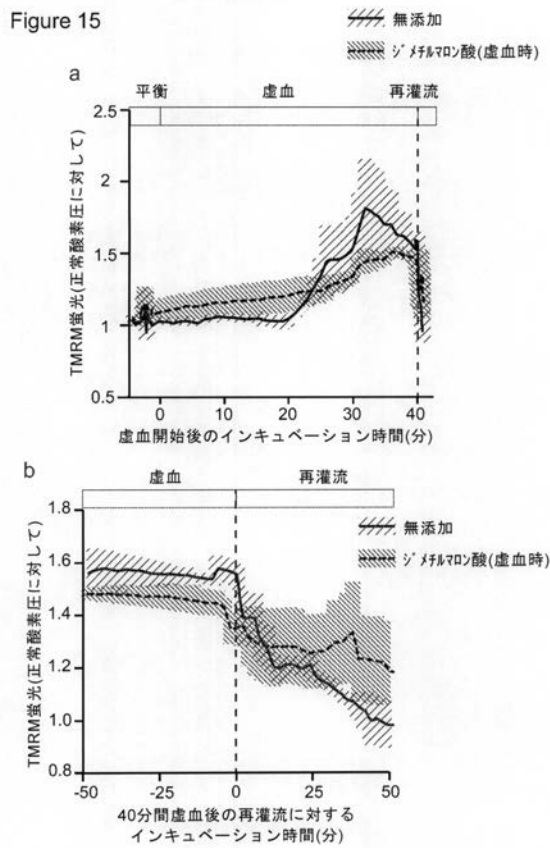
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/051949

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/225 A61P9/10 A61P39/06  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, BEILSTEIN Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2014/128352 A1 (BRAND MARTIN D [US] ET AL) 8 May 2014 (2014-05-08) abstract page 21; table 5 claims 1,22,23,24 ----- -/--	1,6-10, 13,14 1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2015

Date of mailing of the international search report

28/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Garabatos-Perera, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/051949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. DROSE ET AL: "A Common Mechanism Links Differently Acting Complex II Inhibitors to Cardioprotection: Modulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production", MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 79, no. 5, 28 January 2011 (2011-01-28), pages 814-822, XP055205834, ISSN: 0026-895X, DOI: 10.1124/mol.110.070342	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 815; figure 1 page 817; figure 3 page 818; figure 4 page 819; figure 5 -----	1-14
X	ANDREW P WOJTOVICH ET AL: "The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels", BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY, STEINKOPFF-VERLAG, DA, vol. 104, no. 2, 26 February 2009 (2009-02-26), pages 121-129, XP019712695, ISSN: 1435-1803	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 123; figure 1 page 124; figure 2 page 124, right-hand column, paragraph 3-4 page 126; figure 4 page 127; figure 5 page 127, right-hand column, last paragraph -----	1-14
X	DZEJA P P ET AL: "TARGETING NUCLEOTIDE-REQUIRING ENZYMES: IMPLICATIONS FOR DIAZOXIDE-INDUCED CARDIOPROTECTION", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, US, vol. 284, no. 4, PART 02, 1 April 2003 (2003-04-01), pages H1048-H1056, XP009027771, ISSN: 0363-6135	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 1050; figure 1 page 1051; figure 2; table 1 page 1054, right-hand column, last paragraph ----- -/--	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/051949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEPHEN J RALPH ET AL: "Inhibitors of Succinate: Quinone Reductase/Complex II Regulate Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Protect Normal Cells from Ischemic Damage but Induce Specific Cancer Cell Death", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 28, no. 11, 24 August 2011 (2011-08-24), pages 2695-2730, XP019961741, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-011-0566-7	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 2701; figure 2 page 2705, right-hand column, paragraph 3 - page 2708, left-hand column, paragraph 2 -----	1-14
X	XILAN TANG ET AL: "The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury", EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, vol. 104, no. 3, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 330-11, XP055205815, ISSN: 1741-427X, DOI: 10.1152/ajpendo.00623.2009	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 5; figure 2; table 2 page 4, left-hand column, line 8 - page 8, right-hand column, paragraph 1 page 9, right-hand column, last line - page 10, left-hand column, paragraph 1 -----	1-14
X	FRANCISCO CAMPOS ET AL: "Oxaloacetate: A novel neuroprotective for acute ischemic stroke", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 44, no. 2, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 262-265, XP028435678, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2011.11.003 [retrieved on 2011-11-10]	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 264; figure 3 page 265, left-hand column, lines 10-13,24-28 ----- -/--	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/051949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/094236 A2 (HENRY M JACKSON FOUNDATION [US]; VERMA AJAY [US]; LU HUASHENG [US]; F0) 13 October 2005 (2005-10-13)	1,6-10, 13,14
Y	abstract claims figure 7	1-14
X	NAJAT BOUAZIZ ET AL: "Mitochondrial respiratory chain as a new target for anti-ischemic molecules", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 441, no. 1-2, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 35-45, XP055206065, ISSN: 0014-2999, DOI: 10.1016/S0014-2999(02)01490-5	1,6-10, 13,14
Y	abstract page 37; table 1 page 38; figure 1 page 44, left-hand column, paragraph 2	1-14
X	WO 2013/152193 A2 (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]) 10 October 2013 (2013-10-10) abstract claims	1-3,6-10
X	US 2013/116337 A1 (LOPACHIN RICHARD M [US] ET AL) 9 May 2013 (2013-05-09) abstract paragraphs [0030], [0076] claims 10,12,13	1-4,6-10
X	Unep Publications: "OECD SIDS MALONIC ACID DIESTERS", 22 April 2005 (2005-04-22), XP055206273, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.inchem.org/documents/sids/sids/malonates.pdf">http://www.inchem.org/documents/sids/sids/malonates.pdf</a> [retrieved on 2015-08-04] pages 4,6	1-10
Y	CARMEN METHNER ET AL: "Mitochondria selective S -nitrosation by mitochondria-targeted S -nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts", EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE, vol. 16, no. 7, 31 May 2014 (2014-05-31), pages 712-717, XP055206283, ISSN: 1388-9842, DOI: 10.1002/ejhf.100 abstract	11,12
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/051949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	EDWARD T. CHOUGHANI ET AL: "Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS", NATURE, vol. 515, no. 7527, 5 November 2014 (2014-11-05), pages 431-435, XP055205795, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature13909 the whole document -----	1-14
X,P	WO 2014/179187 A1 (MONTEFIORE MEDICAL CT [US]) 6 November 2014 (2014-11-06)  abstract claims 26,31,38 -----	1-4, 6-10,13, 14



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/051949

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014128352	A1	08-05-2014	NONE
WO 2005094236	A2	13-10-2005	AU 2004317897 A1 13-10-2005 CA 2544499 A1 13-10-2005 EP 1686979 A2 09-08-2006 JP 2007510734 A 26-04-2007 US 2007173545 A1 26-07-2007 WO 2005094236 A2 13-10-2005
WO 2013152193	A2	10-10-2013	US 2015056215 A1 26-02-2015 WO 2013152193 A2 10-10-2013
US 2013116337	A1	09-05-2013	US 2013116337 A1 09-05-2013 WO 2011156181 A1 15-12-2011
WO 2014179187	A1	06-11-2014	NONE

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 508106530

ケンブリッジ エンタープライズ リミテッド

C A M B R I D G E E N T E R P R I S E L I M I T E D

イギリス国 シービー 2 1 ティーエス ケンブリッジ トリニティーレーン ジオールドスクールス

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100102255

弁理士 小澤 誠次

(74)代理人 100096482

弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100188352

弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100145920

弁理士 森川 聡

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 チョウチャニ エドワード

イギリス国 シービー 2 0 キューキュー ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバ  
イオメディカルキャンパス レベル 5 ボックス 1 5 7 ディパートメントオブメディシン

(72)発明者 クリーグ トーマス

イギリス国 シービー 2 0 キューキュー ケンブリッジシャー ケンブリッジ ヒルズロード  
アデンプルックズホスピタル ボックス 1 1 0 レベル 6 エーシーシーアイ ディビジョンオブ  
カーディオバスキュラーメディシン ユニバーシティオブケンブリッジ

(72)発明者 サエブ - パーシー コウロッシュ

イギリス国 シービー 2 0 キューキュー ケンブリッジシャー ケンブリッジ ヒルズロード  
アデンプルックズホスピタル レベル 9 ボックス 2 0 2 スクールオブクリニカルメディシ  
ン ディパートメントオブサージャリー ユニバーシティオブケンブリッジ

(72)発明者 マーフィー マイケル パトリック

イギリス国 シービー 8 0 アールディー ケンブリッジシャー ニューマーケット プリンクリ  
ーロード ウェストレットウォーターレス ハイフィールズ

(72)発明者 ワーク ロレーヌ

イギリス国 ジー 1 2 8 ティーエー グラスゴーストラックライド ユニバーシティプレイス 1  
2 6 インスティテュートオブカーディオバスキュラーアンドメディカルサイエンシズ カレッジ  
オブヴェテリナリーアンドライフサイエンシズ ユニバーシティオブグラスゴー エムエイチエフ  
ジーシーアールシー

(72)発明者 フリッツァ クリスチャン

イギリス国 シービー 2 0 エックスゼット ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジ  
バイオメディカルキャンパス ボックス 1 9 7 ハチソン/エムアールシーリサーチセンター ユ  
ニバーシティオブケンブリッジ エムアールシーキャンサーセルユニット

F ターム(参考) 4C206 AA01 AA02 DB29 DB43 MA01 MA04 NA14 NA15 ZA36 ZC20

ZC41