

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年3月16日(16.03.2023)



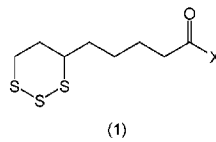
(10) 国際公開番号

WO 2023/038088 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/385 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/033764
- (22) 国際出願日: 2022年9月8日(08.09.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-146753 2021年9月9日(09.09.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 Fukuoka (JP). 協和発酵
- バイオ株式会社 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 辰 巳 隆 一 (TATSUMI Ryuichi); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 中村 真子 (NAKAMURA Mako); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 大島 悦男 (OHSHIMA Etsuo); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING NITRATION OF TYROSINE RESIDUES IN HEPATOCYTE GROWTH FACTOR USING TRISULFIDE COMPOUND

(54) 発明の名称: トリスルフィド化合物を用いる、肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化を防止する方法

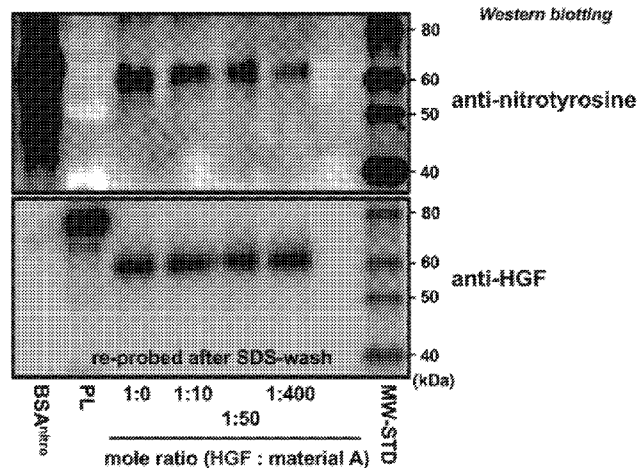


[図1]

ONOO⁻-treatment
1:500 (mole ratio, HGF : ONOO⁻)
at pH 7.2, 37°C, for 30 min

rmHGF

rmHGF: recombinant
mouse HGF



(57) Abstract: The present invention provides a trisulfide-compound-containing agent for inhibiting nitration of tyrosine residues in hepatocyte growth factor, the trisulfide compound being: glutathione trisulfide or a pharmaceutically acceptable salt thereof; or a compound represented by formula (1) (wherein X represents -OR¹ or -NR²R³, R¹ represents a hydrogen atom or an alkyl group containing 1 to 6 carbon atoms, R² and R³ independently represent



WO 2023/038088 A1

(明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

a hydrogen atom or an alkyl group containing 1 to 6 carbon atoms, and the alkyl group may have one or more substituents selected from the group consisting of amino groups and carboxy groups), a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a cyclodextrin clathrate thereof.

(57) 要約: トリスルフィド化合物を含有する肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制剤であって、上記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は式(1)で表される化合物[式中、Xは、 $-OR^1$ 又は $-NR^2R^3$ を示し、 R^1 は水素原子又は炭素数1~6のアルキル基を示し、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立に、水素原子又は炭素数1~6のアルキル基を示し、上記アルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基からなる群より選択される1以上の置換基を有してよい。]、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、ニトロ化抑制剤。

明 細 書

発明の名称：

トリスルフィド化合物を用いる、肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化を防止する方法

技術分野

[0001] 本発明は、トリスルフィド化合物を用いる、肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化を防止する方法に関する。

背景技術

[0002] 肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor；以下、「HGF」ともいう。）は、成熟肝細胞の増殖を促進する生体内タンパク質として発見されたが、その後の研究から、HGFは細胞増殖に加えて細胞運動促進、細胞死抑制、形態形成誘導、抗線維化、血管新生など多彩な生理活性を有し、肝臓のみならず、消化管粘膜、神経、肺、腎臓、心臓、皮膚など様々な組織及び臓器の再生と保護を担うことが明らかになっている（非特許文献5～7）。

[0003] HGFは、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化因子であることが更に報告されており、衛星細胞は、筋線維の再生等に寄与することが知られている（非特許文献1）。

[0004] 近年、HGFのタンパク質中にあるチロシン残基がニトロ化されると、HGFの生理活性が消失することが報告された（非特許文献2、8）（辰巳隆一、「筋幹細胞の基礎科学とその健康・医療応用」、『九州大学』産・学・官交流促進シーズ発表会 in 東京2019、2019年3月14日）（A. Elgaabariら、「Insight linking between nitration and myogenic dysfunction of HGF/NK1 domain」日本畜産学会第128回大会）。同報告において、HGFの機能不全が、衛星細胞の活性化阻害や増殖低下の原因となることが示唆されている。従って、HGFのタンパク質中にあるチロシン残基のニトロ化により、筋の成長、肥大、再生又は維持が阻害され、結果として、

筋萎縮、筋再生不全、筋成長阻害等を招くと考えられる。

[0005] グルタチオントリスルフィドのようなトリスルフィド化合物は、生体内でグルタチオンパースルフィドのような活性イオウ分子種に転換される。活性イオウ分子種は、強力な抗酸化作用を有し、老化防止等の生理機能を有する可能性が報告されている（例えば非特許文献3，4）。また、トリスルフィド化合物の製造方法として、特許文献1に記載された方法等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2018/117186号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：R.Tatsumi, “Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells”, *Animal Science Journal* 81(1), 11-20(2010).

非特許文献2：今富菜々ら、「筋幹細胞活性化因子HGFのニトロ化による不活化の生理学的意義：加齢性筋萎縮・再生不全の主要因のブレイクスルー」、日本畜産学会第128回大会要旨

非特許文献3：T.Ida, et al., “Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling”, *PNAS*, May 27, 2014, 111(21)7606-7611

非特許文献4：T.Akaike, et al., “Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics”, *Nature Communications*, 2017, Oct 27; 8(1):1177

非特許文献5：坪内博仁、「HGFの発見と臨床応用への展開」、日本消化器病学会雑誌、第110巻第12号2033-2041頁（2013年）

非特許文献6：水野信哉及び中村敏一、「再生因子HGFの臨床応用」、*Drug Delivery System*, 16-6（2001年）

非特許文献7 : C. Desole, et al., “HGF and MET: From Brain Development to Neurological Disorders”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 9 (published 09 June 2021, Article 683609) .

非特許文献8 : A. Elgaabari, et. al., “A pilot study on nitration/dysfunction of NK1 segment of myogenic stem cell activator HGF”, *Biochemistry and Biophysics Reports* Vol. 31, 101295 (2022) (published June 11, 2022)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、HGF中のチロシン残基のニトロ化抑制剤を提供することを目的とする。

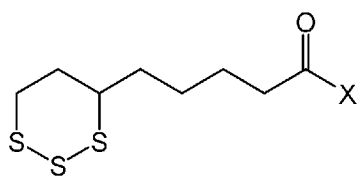
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、細胞増殖因子の中でHGFだけがチロシン残基のニトロ化を受けることを見出し、このHGFにおけるチロシン残基のニトロ化が、生理学的に重要な意義を有するものと考えた。そして、本発明者らは、グルタチオントリスルフィド及びリポ酸トリスルフィド（後述する式（4）で表される化合物）が、このように重要と考えられるHGFのチロシン残基のニトロ化を濃度依存的に抑制することを見出して、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔30〕を提供する。

〔1〕 トリスルフィド化合物を含有する肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制剤であって、上記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は式（1）

〔化1〕



(1)

で表される化合物〔式中、Xは、 $-OR^1$ 又は $-NR^2R^3$ を示し、 R^1 は水素

原子又は炭素数 1～6 のアルキル基を示し、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立に、水素原子又は炭素数 1～6 のアルキル基を示し、上記アルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基からなる群より選択される 1 以上の置換基を有している。] (以下、「化合物 (1)」ともいう。)、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、ニトロ化抑制剤。

[2] 上記トリスルフィド化合物が、グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[1] に記載のニトロ化抑制剤。

[3] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアミノ酸塩及びグルタチオントリスルフィドのアルカリ金属塩からなる群から選択される少なくとも 1 種を含む、[2] に記載のニトロ化抑制剤。

[4] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアルギニン塩及びグルタチオントリスルフィドのナトリウム塩からなる群から選択される少なくとも 1 種を含む、[2] に記載のニトロ化抑制剤。

[5] 上記トリスルフィド化合物が、リポ酸トリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[1] に記載のニトロ化抑制剤。

[6] [1]～[5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を含有する、筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療剤。

[7] [1]～[5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を、それを必要とする対象に投与する、筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療方法。

[8] [1]～[5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を愛玩動物に投与することを含む、愛玩動物の筋萎縮及び／又は筋再生不全を予防又は治療する方法。

[9] 筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療における使用のための、[1]～[5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤。

[10] 筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療剤の製造のための、[1]～[5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤の使用。

[11] [1] ~ [5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を含有する、家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善剤。

[12] [1] ~ [5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を、それを必要とする家畜又は家禽に投与する、暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善方法。

[13] [1] ~ [5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤を家畜又は家禽に投与することを含む、家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）を抑制又は改善する方法。

[14] 家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善における使用のための、[1] ~ [5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤。

[15] 家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善剤の製造のための、[1] ~ [5] のいずれかに記載のニトロ化抑制剤の使用。

[16] トリスルフィド化合物を、それを必要とする対象に投与する、肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制方法であって、上記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、方法。

[17] 上記トリスルフィド化合物が、グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[16] に記載の方法。

[18] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアミノ酸塩及びグルタチオントリスルフィドのアルカリ金属塩からなる群から選択される少なくとも1種を含む、[17] に記載の方法。

[19] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩

が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアルギニン塩及びグルタチオントリスルフィドのナトリウム塩からなる群から選択される少なくとも1種を含む、[17]に記載の方法。

[20] 上記トリスルフィド化合物が、リポ酸トリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[16]に記載の方法。

[21] 肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制における使用のための、トリスルフィド化合物であって、上記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物(1)、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、トリスルフィド化合物。

[22] 上記トリスルフィド化合物が、グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[21]に記載の使用のためのトリスルフィド化合物。

[23] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアミノ酸塩及びグルタチオントリスルフィドのアルカリ金属塩からなる群から選択される少なくとも1種を含む、[22]に記載の使用のためのトリスルフィド化合物。

[24] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアルギニン塩及びグルタチオントリスルフィドのナトリウム塩からなる群から選択される少なくとも1種を含む、[22]に記載の使用のためのトリスルフィド化合物。

[25] 上記トリスルフィド化合物が、リポ酸トリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[21]に記載の使用のためのトリスルフィド化合物。

[26] 肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制剤の製造のための

、トリスルフィド化合物の使用であって、上記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（１）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、使用。

[27] 上記トリスルフィド化合物が、グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[26]に記載の使用。

[28] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアミノ酸塩及びグルタチオントリスルフィドのアルカリ金属塩からなる群から選択される少なくとも１種を含む、[27]に記載の使用。

[29] 上記グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩が、グルタチオントリスルフィド、グルタチオントリスルフィドのアルギニン塩及びグルタチオントリスルフィドのナトリウム塩からなる群から選択される少なくとも１種を含む、[27]に記載の使用。

[30] 上記トリスルフィド化合物が、リポ酸トリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、[26]に記載の使用。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、HGF中のチロシン残基のニトロ化抑制剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、グルタチオントリスルフィドによる、リコンビナントHGFのニトロ化の抑制効果をウエスタンブロットで解析したものである。

[図2]図2は、リポ酸トリスルフィドによる、リコンビナントHGFのニトロ化の抑制効果をウエスタンブロットで解析したものである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の内容について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。なお、本明細書では、「筋成長阻害及び／又は

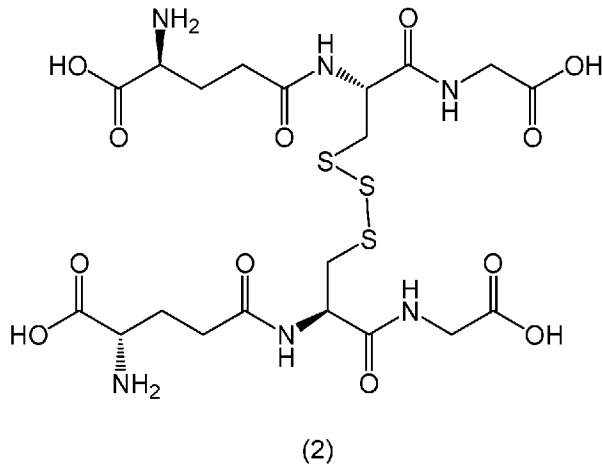
食肉生産性の低下」を「筋成長阻害（食肉生産性の低下）」と表すことができる。

[0014] 本発明のニトロ化抑制剤、筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療剤、及び、同予防又は治療方法は、ヒト又は愛玩動物に対して投与又は適用されることができる。また、本発明のニトロ化抑制剤、暑熱ストレスによる筋成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善剤、及び、同抑制又は改善方法は、家畜又は家禽に対して投与又は適用されることができる。

[0015] ヒトHGFにおいては、198番目及び250番目のチロシン残基がニトロ化され得る。後述する愛玩動物及び家畜のうち、哺乳類のHGFにおいては、ヒトHGFの198番目及び250番目のチロシン残基に対応するチロシン残基がニトロ化され得る。後述する愛玩動物及び家畜又は家禽のうち、鳥類のHGFにおいては、ヒトHGFの250番目のチロシン残基に対応するチロシン残基がニトロ化され得る。ヒトHGFにおける198番目及び／又は250番目のチロシン残基、並びに、それに対応する位置の非ヒト由来HGF中のチロシン残基のニトロ化が、HGFの活性を消失させる。HGFの機能不全は、筋の成長、肥大、再生又は維持の阻害を招き、筋萎縮や筋再生不全などの原因となると考えられる。本発明のニトロ化抑制剤は、上述した特定の位置のチロシン残基のニトロ化を抑制することが可能である。

[0016] 本発明のニトロ化抑制剤に用いられるトリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である。グルタチオントリスルフィドは式（2）で表される。

[化2]



[0017] 本発明において、製剤学的に許容される塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩；酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との塩；ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属との塩；カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属との塩；アンモニウム塩；アルギニンなどのアミノ酸との塩などを挙げることができる。

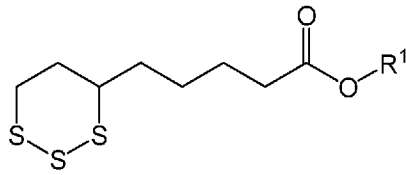
[0018] グルタチオントリスルフィドの製剤学的に許容される塩としては、アミノ酸塩又はアルカリ金属塩であることが好ましく、アルギニン塩又はナトリウム塩であることがより好ましい。化合物（1）の製剤学的に許容される塩としては、アルカリ金属との塩であることが好ましく、ナトリウム塩であることがより好ましい。

[0019] グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）若しくはその製剤学的に許容される塩には、結晶多形が存在することもあるが、いずれの結晶形にも限定されず、いずれかの結晶形の単一物であっても混合物であってもよい。また、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）若しくはその製剤学的に許容される塩には、非晶質体も含まれる。グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）若しくはその製剤学的に

許容される塩には、無水物と溶媒和物（特に水和物）とが含まれる。

[0020] 化合物（１）は、一実施形態において、式（３）

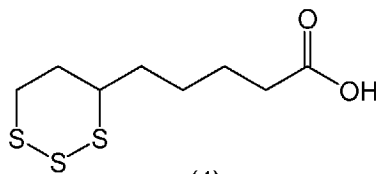
[化3]



(3)

で表される化合物 [式中、R¹は水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を示す。] であり、R¹は、例えば水素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基であってよい。好ましくは、R¹は水素原子であり、この場合、式（３）で表される化合物は式（４）で表されるリポ酸トリスルフィドである。

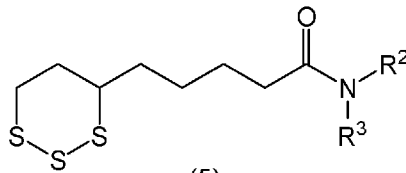
[化4]



(4)

[0021] 化合物（１）は、別の実施形態において、式（５）

[化5]

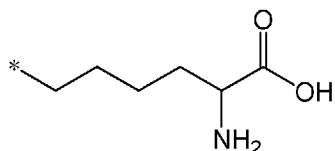


(5)

で表される化合物 [式中、R²及びR³はそれぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を示し、前記アルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基からなる群より選択される1以上の置換基を有してよい。] である。R²及びR³は、水素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のアルキル基であってよい。これらのアルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基の一方又は両方の置換基を有してよい。R²

及び R^3 は、例えば、式(6)で表される基であってよい(式中、*は結合手を示す。)。式(5)で表される化合物の具体例として、例えば、 R^2 及び R^3 はともに水素原子である化合物、 R^2 が水素原子であり R^3 が式(6)で表される基である化合物が挙げられる。

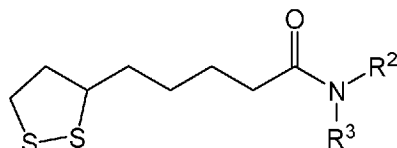
[化6]



(6)

[0022] 式(5)で表される化合物は、式(5a)で表される化合物を酸化剤により酸化させてスルホキシド化合物を得る工程(工程1)、及び、得られたスルホキシド化合物を硫黄源と反応させる工程(工程2)によって製造することができる。

[化7]



(5a)

[式中、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立に、水素原子又は炭素数1~6のアルキル基であり、前記アルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基からなる群より選択される1以上の置換基を有してよい。]

[0023] 上記製造方法は、スルホキシド化合物を単離することなく、工程1及び工程2をワンポットで反応を行ってもよい。

[0024] 工程1に用いられる溶媒は、式(5a)で表される化合物及び酸化剤を溶解し、酸化反応を阻害しないものであれば、特に限定されない。このような溶媒としては、例えば、水、硫酸水溶液、エタノール水溶液及びアセトニトリル水溶液が挙げられ、好ましくは、水である。工程1に用いられる溶媒の量は、式(5a)で表される化合物1gに対して1mL~500mLとすることができ、好ましくは、10mL~20mLである。

- [0025] 工程1に用いられる酸化剤として、ペルオキシ―硫酸カリウム（Oxone（登録商標）などの商品名で販売される）、過酢酸、過酸化水素及び過ヨウ素酸ナトリウムが挙げられる。過酸化水素は触媒量のメチルトリオキシソレニウムとともに使用してもよい。安全性及びコストの観点から、ペルオキシ―硫酸カリウムが好ましい酸化剤である。使用される酸化剤の量は、式（5a）で表される化合物1当量に対して、0.8当量～2.0当量とすることができ、好ましくは、1.0当量～1.3当量である。
- [0026] 工程1の反応温度は、 -20°C ～ 30°C とすることができ、好ましくは、 -5°C ～ 5°C である。
- [0027] 工程1の反応時間は、5分間～24時間とすることができ、好ましくは、0.5時間～2時間である。
- [0028] 工程2に用いられる溶媒は、スルホキシド化合物及び硫黄源を溶解し、その後の反応を阻害しないものであれば、特に限定されない。このような溶媒としては、例えば、水、硫酸水溶液、エタノール水溶液及びアセトニトリル水溶液が挙げられ、好ましくは、水である。工程2に用いられる溶媒の量は、スルホキシド化合物1gに対して1mL～500mLとすることができ、好ましくは、10mL～20mLである。
- [0029] 工程2に用いられる硫黄源として、硫化ナトリウム、硫化カリウム、硫化水素ナトリウム、硫化水素カリウム及び硫化水素が挙げられる。使用される硫黄源の量は、スルホキシド化合物1当量に対して、0.5当量～4.0当量とすることができ、好ましくは、0.9当量～1.2当量である。
- [0030] 工程2の反応温度は、 -20°C ～ 30°C とすることができ、好ましくは、 -5°C ～ 25°C である。
- [0031] 工程2の反応時間は、10分間～2日間とすることができ、好ましくは、0.5時間～2時間である。
- [0032] 工程1及び工程2をワンポットで行う場合、反応溶媒としては、例えば、水、硫酸水溶液、エタノール水溶液及びアセトニトリル水溶液が挙げられ、好ましくは、水であり、溶媒の量は、式（5a）で表される化合物1gに対

して1 mL~500 mLとすることができ、好ましくは、10 mL~20 mLである。使用される酸化剤としては、ペルオキシ硫酸カリウム、過酢酸、過酸化水素（触媒量のメチルトリオキソレニウムとともに使用してもよい）及び過ヨウ素酸ナトリウムが挙げられ、好ましくは、ペルオキシ硫酸カリウムであり、使用される酸化剤の量は、式（5 a）で表される化合物1当量に対して、0.8当量~2.0当量とすることができ、好ましくは、1.0当量~1.3当量である。使用される硫黄源としては、硫化ナトリウム、硫化カリウム、硫化水素ナトリウム、硫化水素カリウム及び硫化水素が挙げられ、使用される硫黄源の量は、式（5 a）で表される化合物1当量に対して、0.5当量~4.0当量とすることができ、好ましくは、0.9当量~1.2当量である。反応温度は、-20℃~30℃とすることができ、好ましくは、-5℃~25℃である。反応時間は、15分間~2日間とすることができ、好ましくは、1時間~4時間である。

[0033] 工程1及び工程2の他に、必要に応じて、ヒドロキシ基、カルボニル基、アミノ基、カルボキシ基などの官能基を保護する工程及び保護された官能基を脱保護する工程を含んでもよい。これらの官能基の保護基、保護/脱保護反応は当業者にとって周知であり、“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis”などを参照して、適切な保護基、保護/脱保護反応を選択することができる。

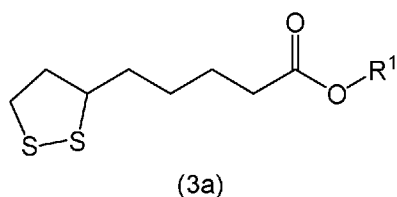
[0034] 式（5 a）で表される化合物は、リポ酸と NHR^2R^3 を縮合することで製造することができる。縮合反応の溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフランが挙げられ、好ましくは、テトラヒドロフランである。溶媒の量は、式（5 a）で表される化合物1 gに対して1 mL~200 mLとすることができ、好ましくは、3 mL~35 mLである。使用する縮合剤としては、例えば1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド（EDC）及びその塩、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、ジソプロピルカルボジイミド（DIC）（N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾ-

ル (HOBt) を添加剤として用いてもよい。) が挙げられる。使用される縮合剤の量は、式 (5a) で表される化合物 1 当量に対して、0.8 当量～2.0 当量とすることができ、好ましくは、1.0 当量～1.5 当量である。反応の温度は、 -10°C ～ 40°C とすることができ、好ましくは、 15°C ～ 25°C である。反応の時間は、1 時間～3 日間とすることができ、好ましくは、1 時間～24 時間である。

[0035] 式 (5) で表される化合物は、リポ酸トリスルフィドと NHR^2R^3 を縮合することによっても製造することができる。縮合の条件は上記と同様である。

[0036] R^1 が炭素数 1～6 のアルキル基である式 (3) で表される化合物は、式 (3a) で表される化合物を酸化剤により酸化させてスルホキシド化合物を得る工程 (工程 1)、及び、得られたスルホキシド化合物を硫黄源と反応させる工程 (工程 2) によって製造することができる。反応条件は上記と同様である。

[化8]



[式中、 R^1 は、水素原子又は炭素数 1～6 のアルキル基を示す。]

[0037] 式 (3a) で表される化合物は、リポ酸と R^1OH を縮合することで製造することができる。上記と同様である。

[0038] R^1 が炭素数 1～6 のアルキル基である式 (3) で表される化合物は、リポ酸トリスルフィドと R^1OH を縮合することによっても製造することができる。縮合の条件は上記と同様である。

[0039] シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン又はそれらの誘導体であってよい。ここで、「誘導体」とは、各シクロデキストリンが有する少なくとも 1 つの水酸基の水素原子が、置換基を有してよいアルキル基又は糖によって置換されてい

ることを意味する。シクロデキストリン誘導体は、例えば、メチル- α -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、メチル- γ -シクロデキストリン、ジメチル- α -シクロデキストリン、ジメチル- β -シクロデキストリン、ジメチル- γ -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- α -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- β -シクロデキストリン、ヒドロキシエチル- γ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- α -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン、グルコシル- α -シクロデキストリン、グルコシル- β -シクロデキストリン、グルコシル- γ -シクロデキストリン、マルトシル- α -シクロデキストリン、マルトシル- β -シクロデキストリン、マルトシル- γ -シクロデキストリン、スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン等を用いることができる。

[0040] シクロデキストリン包接体は、シクロデキストリンを溶媒に溶解させる工程（工程 a）と、得られた溶解液に化合物（1）又はその製剤学的に許容される塩を添加して攪拌する工程（工程 b）と、攪拌後の液を濾過し、工程 a で用いた溶媒と同一の溶媒で洗浄し、濾液を凍結させ、凍結乾燥させる工程（工程 c）によって製造することができる。なお、工程 c の濾過及び洗浄操作は省略してもよい。

[0041] 工程 a に用いられる溶媒としては、好ましくは水である。

[0042] 工程 a に用いられる溶媒の量は、シクロデキストリン 1 g に対して 1 ~ 350 ml とすることができ、好ましくは 1 ~ 80 ml である。

[0043] 工程 b において、化合物（1）又はその製剤学的に許容される塩に対するシクロデキストリンの質量比は 2 ~ 20 とすることができ、好ましくは 5 ~ 16.5 である。

[0044] 工程 b の攪拌温度は 20 ~ 50 °C とすることができ、室温であってよい。

[0045] 工程 b の攪拌時間は 0.25 ~ 40 時間とすることができ、好ましくは 2 ~ 35 時間である。

[0046] 工程 b では、化合物（1）又はその製剤学的に許容される塩を添加した後

- 、攪拌する前に、工程 a で用いた溶媒と同一の溶媒を加えもよい。このとき、溶媒の量は、シクロデキストリン 1 g に対して 0～30 ml とすることができ、好ましくは、0～20 ml である。
- [0047] 工程 c に用いられる溶媒の量は、シクロデキストリン 1 g に対して 0～150 ml とすることができ、好ましくは 0～20 ml である。
- [0048] 工程 c の凍結温度は、 $-30\sim-20^{\circ}\text{C}$ とすることができ、好ましくは -20°C である。
- [0049] 工程 c の凍結時間は、10～50 時間とすることができる。
- [0050] 工程 c の凍結乾燥は、絶対圧力で 20～100 Pa、外温を 10～40 $^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは外温 20 $^{\circ}\text{C}$ として行うことができる。
- [0051] 工程 c の凍結乾燥期間は、1～5 日とすることができる。
- [0052] 本発明の筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療剤は、上記ニトロ化抑制剤を含有する。
- [0053] 本発明における筋萎縮としては、加齢、寝たきり、外傷、術後固定、無重力、何らかの疾患への罹患等により、永らく筋肉を使用しない状態あるいは使用頻度や強度が低下した状態から生じるものが挙げられる。本発明における筋萎縮又は筋再生不全は、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化阻害や増殖低下を端緒とする、筋の成長、肥大、再生又は維持の不調に関連するもので、加齢性サルコペニア、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、筋ジストロフィー症をその代表として例示できる。
- [0054] 愛玩動物としては、例えば、イヌ、ネコ、ハムスター、ウサギ、フェレット、インコ、ブンチョウ、オウム等が挙げられる。
- [0055] 本発明のニトロ化抑制剤、筋萎縮及び筋再生不全の予防又は治療剤の投与量は、治療的に有効な量であって、症状、年齢、投与方法、剤型等により異なる。通常の場合には、成人に対し、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体として、1日当たり 0.5～2000 mg 投与することができ、1～800 mg を 1日当たり 1回又は数回

に分けて、連日投与するのが好ましい。上記の化合物の投与量がこの範囲にあると、筋萎縮及び筋再生不全に対する予防効果又は治療効果が示されると考えられる。

[0056] 本発明のニトロ化抑制剤、筋萎縮及び筋再生不全の予防又は治療剤の投与量は、治療的に有効な量であって、症状、年齢、投与方法、剤型等により異なる。通常の場合には、愛玩動物に対し、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体として、1日当たり0.1～400mg/kg投与することができ、0.1～400mg/kgを1日当たり1回又は数回に分けて、連日投与するのが好ましい。上記の化合物の投与量がこの範囲にあると、筋萎縮及び筋再生不全に対する予防効果又は治療効果が示されると考えられる。

[0057] 本発明の別の実施形態に係る家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋の成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善剤は、上記ニトロ化抑制剤を含有する。

[0058] 本発明における家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋の成長阻害（食肉生産性の低下）の原因としては、夏季の暑熱による家畜又は家禽の飼育環境の外気温上昇、家畜又は家禽の飼育管理区域における温度管理の異常・逸脱等が挙げられる。これらの原因により、家畜又は家禽の体内における、呼吸性アルカローシス、甲状腺ホルモンの低下、コルチコステロンの増加、免疫応答の変化及びミトコンドリア活性酸素（reactive oxygen species、ROS）の過剰産生が引き起こされると考えられる。その結果、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化阻害や増殖低下を端緒として、筋の成長、肥大、再生又は維持の不調を引き起こし、食肉生産性が低下する。

[0059] 家畜又は家禽としては、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ロバ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ダチョウ、シチメンチョウ、カモ、ウズラ等が挙げられる。

[0060] 本発明のニトロ化抑制剤、家畜又は家禽に対する筋の成長阻害（食肉生産

性の低下) 抑制又は改善剤の投与量は、治療的に有効な量であって、症状、投与法等により異なる。通常の場合には、家畜又は家禽に対し、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物(1)、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体として、1日当たり0.1~400mg/kg投与することができ、0.1~400mg/kgを1日当たり1回又は数回に分けて、連日投与するのが好ましい。上記の化合物の投与量がこの範囲にあると、家畜又は家禽に対する筋の成長阻害(食肉生産性の低下)抑制又は改善効果が示されると考えられる。

[0061] 本発明のニトロ化抑制剤、筋萎縮及び/又は筋再生不全の予防又は治療剤並びに筋の成長阻害(食肉生産性の低下)抑制又は改善剤は、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤若しくはシロップ剤として経口的に、又は、注射剤、輸液、若しくは坐剤として非経口的に投与することが出来る。公知の製剤技術によってこれらの剤型に製剤化することができる。固形剤の場合には、製剤化に際して製剤学的に認容し得る賦形剤、例えば澱粉、乳糖、精製白糖、グルコース、結晶セルロース、カルボキシセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、燐酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、アラビアゴム等を配合することができ、必要であれば滑沢剤、結合剤、崩壊剤、被覆剤、着色剤等を配合することができる。また、液剤の場合には、安定剤、溶解助剤、懸濁化剤、乳化剤、緩衝剤、保存剤等を配合することができる。

実施例

[0062] 以下に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。なお、GSSSGはグルタチオントリスルフィドを意味する。

[0063] 実験例 1

<ペルオキシナイトライト(ONOO⁻)によるリコンビナントHGFタンパク質のニトロ化に対するGSSSGの抑制効果>

PBSに溶解したリコンビナントマウスHGF精製標品（2207-HG-025/CF、R&D Systems社製、キャリアタンパク質不含）に、HGF：GSSSGのモル比が1：10、1：50又は1：400となるように、特許文献1に記載された方法で製造したGSSSG二水和物を添加及び混和したサンプルを作製した。GSSSG二水和物を添加せず、HGF：GSSSGのモル比を1：0としたサンプルも作製した。各サンプルに直ちに、ペルオキシナイトライト（ONOO⁻）を、HGF：ONOO⁻のモル比が1：500となるように添加した。pH7.2～7.4、25～37℃で30分保持し（ニトロ化処理）、ニトロ化サンプルを得た。

[0064] 得られたニトロ化サンプルを用いて、常法に従いウエスタンブロットを行った。ニトロ化サンプルをSDSとβ-メルカプトエタノールを含む溶液で処理し、還元型SDS-PAGE用試料とした。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。使用した転写膜の材質はニトロセルロースであった。HRP標識抗ニトロチロシンモノクローナル抗体（カタログ番号：sc-32757 HRP、Santa Cruz Biotechnology社製）及びHRP標識抗HGFモノクローナル抗体（カタログ番号：sc-374422 HRP、Santa Cruz Biotechnology社製）を使用した。ECL試薬を用いて免疫反応を画像撮影装置に記録した。陽性コントロール試料としてニトロ化ウシ血清アルブミン（BSAnitro）を使用した。なお、図1中のPL（Protein Ladder）およびMW-STD（Molecular Weight-Standard）は分子量マーカである。また、図1中のmaterial AはGSSSGを意味する。

[0065] 抗HGF抗体での反応強度が各レーンで概ね同じであることを確認した後（図1の下枠）、抗ニトロチロシン抗体との反応強度が、GSSSGの添加モル比の増加に伴い減少することを確認した（図1の上枠）。すなわち、GSSSGによる、HGF中のチロシン残基のニトロ化抑制効果を可視化した。

[0066] 実験例 2

＜ペルオキシナイトライト（ ONOO^- ）によるリコンビナントHGFタンパク質のニトロ化に対するリポ酸トリスルフィドの抑制効果＞

GSSSGの代わりにリポ酸トリスルフィドを用いたこと、HGF： ONOO^- のモル比を1：4000としたこと以外は実験例1と同様にして、ニトロ化処理及びウエスタンブロットを行った。なお、図1中のmaterial Bはリポ酸トリスルフィドを意味する。

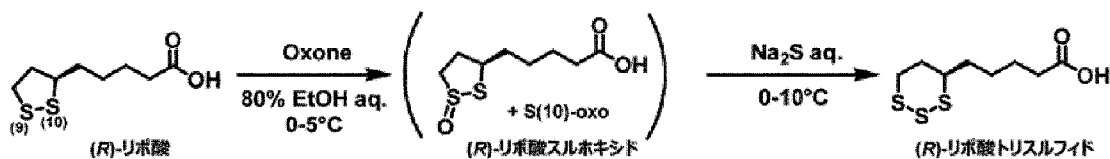
[0067] 実験例1と同様、抗HGF抗体での反応強度が各レーンで概ね同じであることを確認した後（図2の下枠）、抗ニトロチロシン抗体との反応強度が、リポ酸トリスルフィドの添加モル比の増加に伴い減少することを確認した（図2の上枠）。すなわち、リポ酸トリスルフィドによる、HGF中のチロシン残基のニトロ化抑制効果を可視化した。

[0068] GSSSG若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体は、ペルオキシナイトライト（ ONOO^- ）によるHGFのチロシン残基のニトロ化を抑制することができると考えられることから、生体内で生じる様々な酸化ストレスに起因するHGFの機能不全をも抑制することが期待される。GSSSG若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体は、HGF中のチロシン残基のニトロ化が原因となる、筋萎縮及び筋再生不全に対する予防又は治療効果を奏すると考えられる。また、GSSSG若しくはその製剤学的に許容される塩又は化合物（1）、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体は、暑熱ストレスによるHGFのチロシン残基のニトロ化が原因となる、筋の成長阻害（食肉生産性の低下）を抑制又は改善することができると考えられる。

[0069] 参考例 1

＜（R）-リポ酸トリスルフィドの製造＞

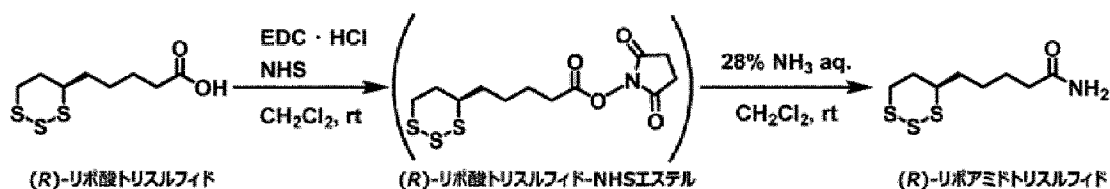
[化9]



200 mL 四径フラスコに、(R)- α -リポ酸 24.38 g (118.17 mmol)、75%エタノール水溶液 488 mL (20.0 v/w) を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、内温 0°C まで冷却した。ここに、Oxone (登録商標) (41.40 g、124.20 mmol、1.05 当量) を 2 分割して添加した後、約 50 分間反応させた。反応液中の不溶物をろ去後、エタノール 65 mL (2.67 v/w) で洗浄した。ろ洗液に内温 2~6°C で、Na₂S 水溶液 (Na₂S · 9H₂O 70.70 g を水 569 mL に溶解) 400 mL (206.93 mmol、1.75 当量) を約 2.5 時間かけて滴下した (滴下及び反応中は、3 mol/L 硫酸水溶液を用い、pH 6-7 に制御、総使用量 14 mL)。内温 3°C、pH 7 にて、約 50 分間反応させた後、3 mol/L 硫酸水溶液 41 mL (1.7 v/w) を滴下し、pH 1.3 とした。次に、水 320 mL (13.1 v/w) 及び酢酸エチル 320 mL (13.1 v/w) を添加し、酢酸エチルで抽出した。水層を酢酸エチル 160 mL (6.6 v/w) で 4 回抽出し、有機層を合わせ、外温 30°C で減圧濃縮した。濃縮物にエタノールを加え溶解させた後、ODS でカラム精製した。フラクションを外温 30°C で減圧濃縮後、オイルポンプで乾燥し、(R)-リポ酸トリスルフィド 10.69 g (44.84 mmol、収率 38%、HPLC 純度 99.7%、白色固体) を得た。

[0070] <(R)-リポアミドトリスルフィドの製造>

[化10]



200 mL 四径フラスコに、(R)−リポ酸トリスルフィド 2.00 g (8.39 mmol)、塩化メチレン 65 mL (32.5 v/w) を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、1−(3−ジメチルアミノプロピル)−3−エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl) 2.07 g (10.77 mmol、1.28 当量) 及び N−ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 1.42 g (12.33 mmol、1.47 当量) を添加した。フラスコ内の空気を窒素で置換した後、室温で約 8 時間反応させた。次に、室温で 28% アンモニア水 2.28 mL (33.74 mmol、4.02 当量) を 5 分かけて滴下し、終夜で反応させた。その後、室温で、水 60 mL (30.0 v/w) を添加して分液した後、有機層を 2.5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 60 mL (30.0 v/w) で 3 回洗浄し、さらに、水 60 mL (30.0 v/w) で 4 回洗浄した。その後、洗浄後の有機層を外温 25°C で減圧濃縮後、オイルポンプで乾燥させ、(R)−リポアミドトリスルフィド 1.93 g (8.13 mmol、収率 97%、HPLC 純度 99.6%、白色固体) を得た。

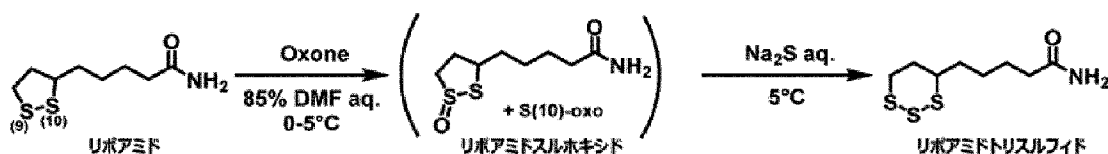
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) = 5.36 (bs, 2H), 3.33 (m, 1H), 3.13 (m, 2H), 2.22 (m, 3H), 1.89 (m, 1H), 1.74–1.42 (m, 6H).

HR-ESI-TOF-MS: m/z 236.0238 ([M-H]⁻), calcd for [C₈H₁₄NOS₃] − 236.0243.

[0071] 参考例 2

<リポアミドトリスルフィド (ラセミ体) の製造>

[化11]



500 mL 四径フラスコに、リポアミド (ラセミ体) 1.00 g (4.87 mmol)、85%ジメチルホルムアミド水溶液 182 mL (182.0

v/w) を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、内温 4℃まで冷却した。同フラスコに、Oxone (登録商標) 1.63 g (4.89 mmol、1.00 当量) を 3 分割して 10 分毎に添加し、約 1 時間反応させた。3 mol/L 硫酸水溶液を用い、反応液の pH を 5-11 に制御しながら、内温 5℃で硫化ナトリウム 9 水和物 1.24 g (5.16 mmol、1.06 当量) を分割して仕込み、約 1.5 時間反応させた。水 180 mL (180.0 v/w) 及び塩化メチレン 50 mL (50.0 v/w) を添加し、塩化メチレンで抽出した後、水層を塩化メチレン 50 mL (50.0 v/w) で 2 回抽出し、有機層を合わせ、外温 30℃以下で減圧濃縮した。濃縮残渣に水 80 mL (80.0 v/w) を室温で 30 分間かけて滴下し、晶出させ、スラリー液をろ過後、水 50 mL (50.0 v/w) で洗浄した。湿晶を 25℃で減圧乾燥し、リポアミドトリスルフィド (ラセミ体) 510 mg (2.15 mmol、収率 44%、HPLC 純度 92%、白色固体) を得た。

[0072] <リポアミドトリスルフィドの純度試験 (HPLC)>

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：220 nm)

カラム：LiChrosorb RP-18 (関東化学、4.0 mm I.D. × 250 mm、5 μm)

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相 A：リン酸水溶液 (pH 3)

移動相 B：メタノール

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御した。

[0073] [表1]

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~5	100	0
5~15	100→25	0→75
15~20	25	75
20~21	25→100	75→0
21~35	100	0

流量：1 mL/min

注入量：10 μ L

面積測定範囲：試料溶液注入後35分間

保持時間：リポアミドスルホキシド（12～13分）、リポアミド（約17分）、

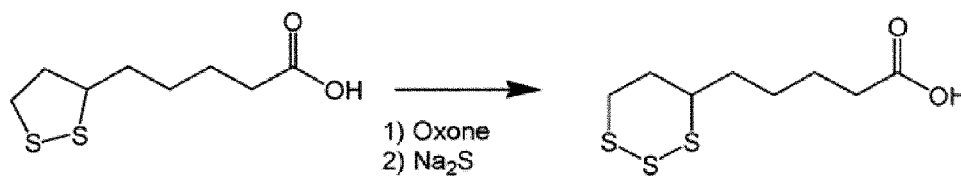
リポアミドトリスルフィド（約19分）

[0074] 参考例3～9

以下、「HP」は「ヒドロキシプロピル」、「Me」は「メチル」、「Mal」は「マルトシル」の略称である。

[0075] <リポ酸トリスルフィドの製造>

[化12]



[0076] リポ酸2.0g（9.02mmol）、75%エタノール水溶液40mLを反応容器に仕込み、内温0℃まで冷却した。ここに、Oxone（登録商標）3.4g（10.20mmol）を添加し、約2時間反応させた。反応液中の無機塩をろ過後、エタノール7mLで洗浄した。ろ液に、硫化ナトリウム九水和物5.8g（24.1mmol）を添加し、約1時間反応させた。この反応液に3mol/L硫酸水溶液を7mL滴下後、続けて、水20mL、酢酸エチル（AcOEt）45mLを添加し、AcOEtで抽出した。水層をAcOEt20mLで2回抽出し、有機層を合わせて減圧濃縮した。濃縮物にエタノール3mLを加えて溶解した後、溶解液をODSカラム（YMC Dispo Pack AT、移動相：アセトニトリル水溶液）により精製し、リポ酸トリスルフィド0.7g（2.39mmol、HPLC純度：100%）を得た。

[0077] <リポ酸トリスルフィドのCD包接体の製造>

参考例3：リポ酸トリスルフィド（ラセミ体）の β -CD包接体

100 mL ナスフラスコに、 β -CD 1020.0 mg (0.899 mmol)、水 80 mL を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、リポ酸トリスルフィド 99.8 mg (0.419 mmol) を添加し、水 20 mL でフラスコ内を洗い込んだ。45°C で 15 分間攪拌後、ろ過し、水 10 mL でフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を -20°C の冷凍庫内で 23 時間凍結した。外温 20°C で約 4.5 日間凍結乾燥し、包接体 980.0 mg (白色固体) を得た。

[0078] 参考例 4 : リポ酸トリスルフィド (ラセミ体) の HP- β -CD 包接体

50 mL ナスフラスコに、HP- β -CD 1291.0 mg、水 16 mL を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、リポ酸トリスルフィド 100.0 mg (0.419 mmol) を添加した。室温で約 28 時間攪拌後、ろ過し、水 10 mL でフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を -20°C の冷凍庫内で約 2 日間凍結した。外温 20°C で約 2 日間凍結乾燥し、包接体 1330.0 mg (白色固体) を得た。

[0079] 参考例 5 : (R)-リポ酸トリスルフィドの HP- β -CD 包接体

50 mL ナスフラスコに、HP- β -CD 969.9 mg、水 10 mL を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、(R)-リポ酸トリスルフィド 100.3 mg (0.421 mmol) を添加し、水 4 mL でフラスコ内を洗い込んだ。室温で約 25 時間攪拌後、ろ過し、水 12 mL でフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を -20°C の冷凍庫内で 15 時間凍結した。外温 20°C で約 2 日間凍結乾燥し、包接体 1040.0 mg (白色固体) を得た。

[0080] 参考例 6 : リポ酸トリスルフィド (ラセミ体) の Me- β -CD 包接体

50 mL ナスフラスコに、Me- β -CD (数メチル化混合物) 1616.0 mg、水 12 mL を仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、リポ酸トリスルフィド 101.0 mg (0.424 mmol) を添加し、水 4 mL でフラスコ内を洗い込んだ。21 時間攪拌後、ろ過し、水 12 mL でフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を -20°C の冷凍庫内

で20時間凍結させた。外温20°Cで約4日間凍結乾燥し、包接体1665.2mg（白色固体）を得た。

[0081] 参考例7：(R)-リポ酸トリスルフィドのMe-β-CD包接体

50mLナスフラスコに、Me-β-CD（数メチル化混合物）1616.0mg、水16mLを仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、(R)-リポ酸トリスルフィド99.9mg（0.420mmol）を添加し、水4mLでフラスコ内を洗い込んだ。室温で6時間攪拌後、ろ過し、水13mLでフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を-20°Cの冷凍庫内で28時間凍結した。外温20°Cで約3日間凍結乾燥し、包接体1610.9mg（白色固体）を得た。

[0082] 参考例8：リポ酸トリスルフィド（ラセミ体）のMaI-β-CD包接体

50mLナスフラスコに、MaI-β-CD1224.2mg（0.839mmol）、水14mLを仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、リポ酸トリスルフィド100.4mg（0.421mmol）を添加し、水2mLでフラスコ内を洗い込んだ。室温で31時間攪拌後、ろ過し、水10mLでフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を-20°Cの冷凍庫内で22時間凍結した。外温20°Cで約46時間凍結乾燥し、包接体1180.0mg（白色固体）を得た。

[0083] 参考例9：(R)-リポ酸トリスルフィドのMaI-β-CD包接体

50mLナスフラスコに、MaI-β-CD1224.2mg（0.839mmol）、水10mLを仕込んだ。フラスコの内容物が溶解したのを確認した後、(R)-リポ酸トリスルフィド100.1mg（0.420mmol）を添加し、水5mLでフラスコ内を洗い込んだ。室温で4.5時間攪拌後、ろ過し、水11mLでフラスコ内及び結晶を洗浄した。得られたろ液を-20°Cの冷凍庫内で24時間凍結した。外温20°Cで約41時間凍結乾燥し、包接体1319.6mg（白色固体）を得た。

[0084] 参考例3～9で得られた包接体の収率及び溶解度を表2に示す。

[0085]

[表2]

実験例	リボ酸トリヌルフィド		R-CD		包接体 (凍結乾燥品)			
	種類	溶解度 (g/L) ¹⁾	修飾	仕込量 (w/w)	収率 (%) ²⁾	含量 (%)		溶解度 (g/L) ³⁾
						実測	理論値	
3	ラセミ体	0.1	なし	10.2	84	8.6	8.9	0.77
4	ラセミ体	0.1	HP	12.9	94	7.1	7.2	≧49
5	R体	0.3		9.7	99	9.6	9.4	≧65
6	ラセミ体	0.1	Me	16.0	96	5.8	5.9	≧50
7	R体	0.3		16.2	99	6.1	5.8	≧41
8	ラセミ体	0.1	Mal	12.2	88	7.3	7.6	≧45
9	R体	0.3			105	8.0	7.6	≧52

¹⁾ 20℃における水への溶解度を示す。

²⁾ 収率 (%) = (収量 × 含量) / 理論収量 × 100

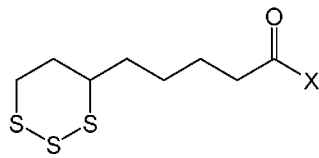
³⁾ 20℃における包接体中のリボ酸トリヌルフィドの水への溶解度を示す。「≧49 g / L」のように記載されている場合、49 g / Lで溶解したことを示している。

請求の範囲

[請求項1] トリスルフィド化合物を含有する肝細胞増殖因子中のチロシン残基のニトロ化抑制剤であって、

前記トリスルフィド化合物は、グルタチオントリスルフィド若しくはその製剤学的に許容される塩又は式(1)

[化1]



(1)

で表される化合物〔式中、Xは、 $-OR^1$ 又は $-NR^2R^3$ を示し、 R^1 は水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を示し、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6のアルキル基を示し、前記アルキル基は、アミノ基及びカルボキシ基からなる群より選択される1以上の置換基を有してよい。〕、その製剤学的に許容される塩若しくはそれらのシクロデキストリン包接体である、ニトロ化抑制剤。

[請求項2] 前記トリスルフィド化合物が、グルタチオントリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、請求項1に記載のニトロ化抑制剤。

[請求項3] 前記トリスルフィド化合物が、リポ酸トリスルフィド又はその製剤学的に許容される塩である、請求項1に記載のニトロ化抑制剤。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載のニトロ化抑制剤を含有する、筋萎縮及び／又は筋再生不全の予防又は治療剤。

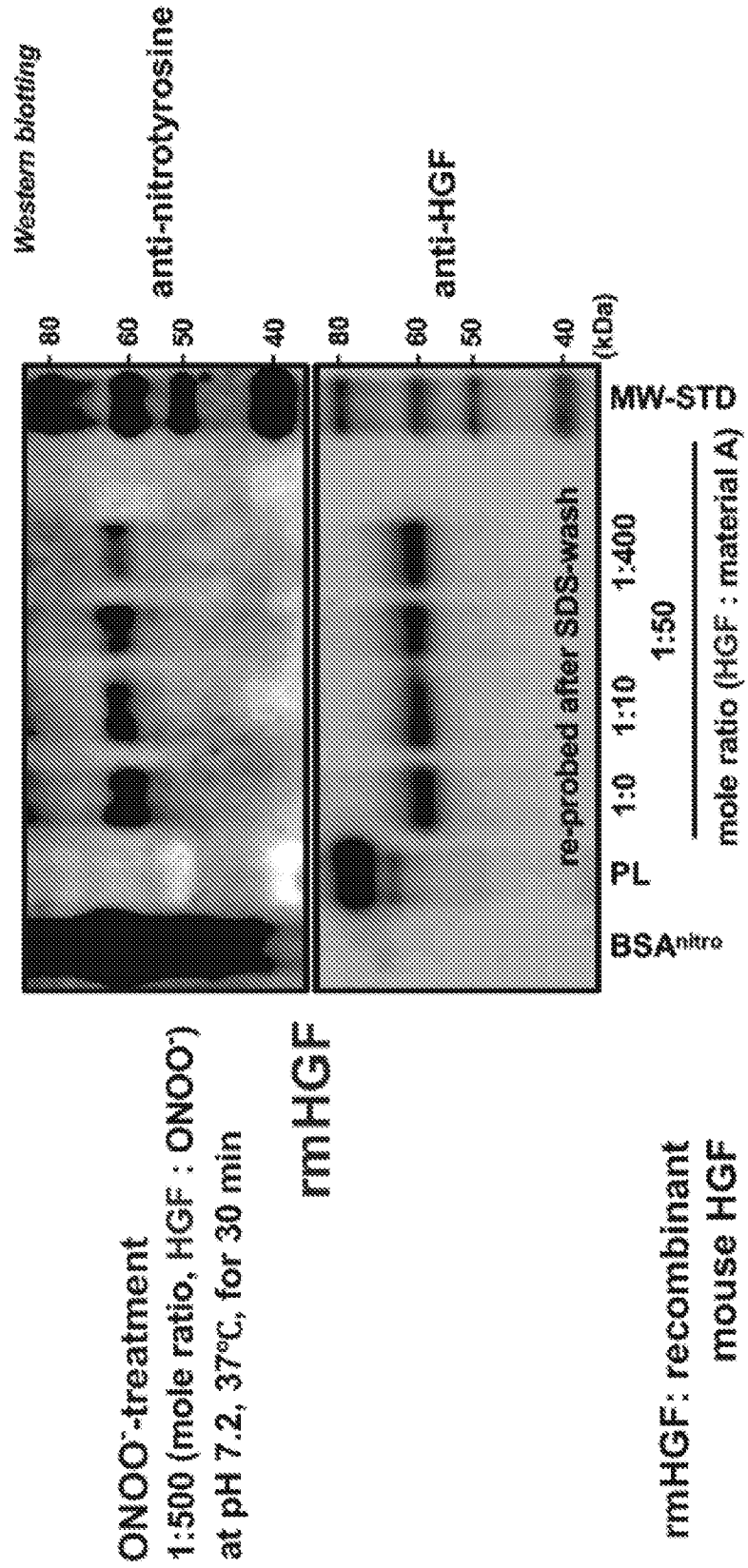
[請求項5] 請求項1～3のいずれか一項に記載のニトロ化抑制剤を愛玩動物に投与することを含む、愛玩動物の筋萎縮及び／又は筋再生不全を予防又は治療する方法。

[請求項6] 請求項1～3のいずれか一項に記載のニトロ化抑制剤を含有する、

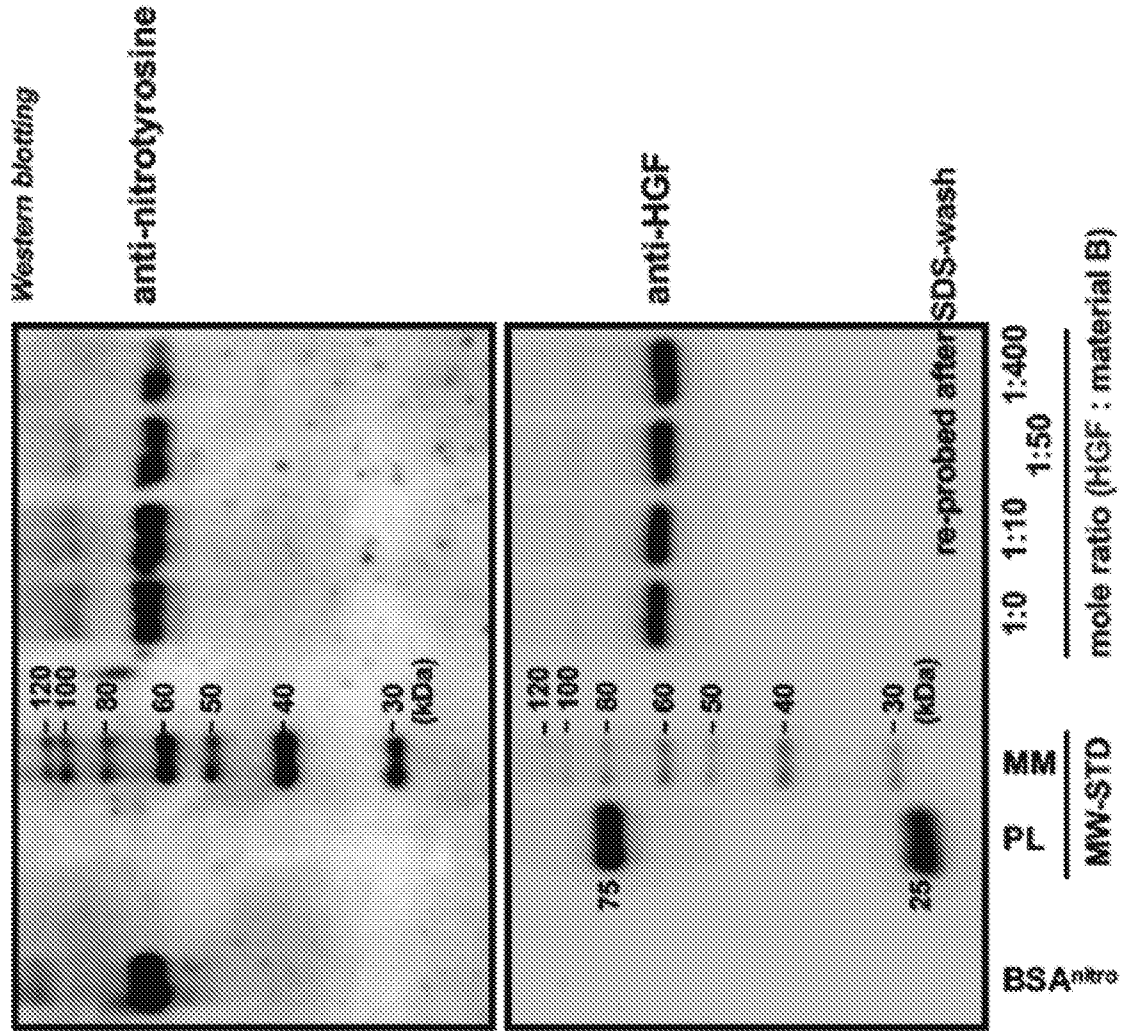
家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋の成長阻害（食肉生産性の低下）の抑制又は改善剤。

[請求項7] 請求項1～3のいずれか一項に記載のニトロ化抑制剤を家畜又は家禽に投与することを含む、家畜又は家禽の暑熱ストレスによる筋の成長阻害（食肉生産性の低下）を抑制又は改善する方法。

[1]



[2]



dose-dependence

ONOO⁻-treatment
1:4000 (mole ratio, HGF : ONOO⁻)
at pH 7.4, 25°C, for 30 min

rmHGF

rmHGF: recombinant mouse HGF

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/033764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 31/385(2006.01)i; A61K 38/06(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i FI: A61K31/385; A61P43/00; A61P21/00; A61K38/06</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/385; A61K38/06; A61P21/00; A61P43/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/117186 A1 (KYOUWA HAKKO BIO CO., LTD.) 28 June 2018 (2018-06-28) entire text	1-7
A	CN 113354615 A (YABAO PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 07 September 2021 (2021-09-07) entire text	1-7
A	JP 2002-87983 A (NAKAMURA, Toshikazu) 27 March 2002 (2002-03-27) entire text	1-7
P, A	WO 2022/045212 A1 (KYOWA PHARMA CHEMICAL CO., LTD.) 03 March 2022 (2022-03-03) entire text	1-7
P, A	WO 2021/231476 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) 18 November 2021 (2021-11-18) entire text	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2022		Date of mailing of the international search report 08 November 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/033764

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/117186	A1	28 June 2018	US 2020/0079818 A1 entire text	
CN	113354615	A	07 September 2021	(Family: none)	
JP	2002-87983	A	27 March 2002	US 2017/0112902 A1 entire text	
WO	2022/045212	A1	03 March 2022	(Family: none)	
WO	2021/231476	A1	18 November 2021	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/385(2006.01)i; A61K 38/06(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i FI: A61K31/385; A61P43/00; A61P21/00; A61K38/06</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K31/385; A61K38/06; A61P21/00; A61P43/00</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
A	WO 2018/117186 A1 (協和発酵バイオ株式会社) 28.06.2018 (2018 - 06 - 28) 全文	1-7								
A	CN 113354615 A (YABAO PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 07.09.2021 (2021 - 09 - 07) 全文	1-7								
A	JP 2002-87983 A (中村 敏一) 27.03.2002 (2002 - 03 - 27) 全文	1-7								
P, A	WO 2022/045212 A1 (協和ファーマケミカル株式会社) 03.03.2022 (2022 - 03 - 03) 全文	1-7								
P, A	WO 2021/231476 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 18.11.2021 (2021 - 11 - 18) 全文	1-7								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	26.09.2022	国際調査報告の発送日 08.11.2022								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 磯部 洋一郎 4C 4432 電話番号 03-3581-1101 内線 3474									

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/033764

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2018/117186	A1	28.06.2018	US 2020/0079818 A1 全文	
CN	113354615	A	07.09.2021	(ファミリーなし)	
JP	2002-87983	A	27.03.2002	US 2017/0112902 A1 全文	
WO	2022/045212	A1	03.03.2022	(ファミリーなし)	
WO	2021/231476	A1	18.11.2021	(ファミリーなし)	