

(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2009-523157

(P2009-523157A)

(43) 公表日 平成21年6月18日 (2009.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
C 0 7 K 5/08 (2006.01)	C 0 7 K 5/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-549887 (P2008-549887)
 (86) (22) 出願日 平成19年1月15日 (2007.1.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月28日 (2008.8.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/050364
 (87) 国際公開番号 W02007/088099
 (87) 国際公開日 平成19年8月9日 (2007.8.9)
 (31) 優先権主張番号 60/759,088
 (32) 優先日 平成18年1月13日 (2006.1.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508198007
 オンコレー アーベ
 スウェーデン国 エスー171 77 ス
 トックホルム フォグデブレテン 2ペ
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 グラス リカルド
 スウェーデン国 エスー112 38 ス
 トックホルム クロノベルグスヤタン 1
 5
 (72) 発明者 シュー ホン
 スウェーデン国 エスー174 44 サ
 ンドビーバーリ 1 ティアアル リッス
 ネレデン 89

最終頁に続く

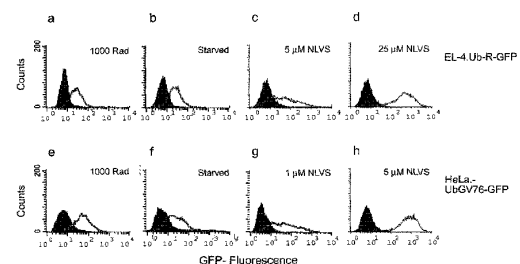
(54) 【発明の名称】 虚血および神経変性の処置のための化合物

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 TPP II (トリペプチジルペプチダーゼ II) 阻害剤は、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病もしくはハンチントン舞踊病、または虚血性状態、例えば脳卒中および心筋梗塞の処置に役立つ。適当な化合物には、一般式 $R^{N1}R^{N2}N-A^1-A^2-A^3-CO-R^{C1}$ のトリペプチド化合物が含まれ、上式で、 R^{N1} 、 R^{N2} 、 A^1 、 A^2 、 A^3 および R^{C1} は本明細書で定義される通りであり、上の例としては、例えばトリペプチド配列 GLA および GPG が含まれる。

【選択図】 図 1



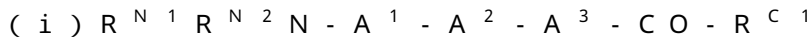
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経変性疾患または虚血性状態の処置における使用のための、TPPI阻害剤である化合物。

【請求項 2】

前記化合物が、式(i)から選択されるか、その薬学的に許容される塩である、請求項1に記載の使用のための化合物



[式中、 A^1 、 A^2 および A^3 は、標準の1文字略語または名称に従う以下の定義を有するアミノ酸残基であり、即ち、

A^1 は、G、A、V、L、I、P、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたはtert-ブチルグリシンであり、

A^2 は、G、A、V、L、I、P、F、W、C、S、K、R、2-アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert-ブチルアラニン、-メチルロイシン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、-メチルバリン、tert-ブチルグリシン、2-アシルグリシン、オルニチンまたは、-ジアミノ酪酸であり、

A^3 は、G、A、V、L、I、P、F、W、D、E、Y、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたはtert-ブチルグリシンであり、

R^{N1} および R^{N2} は、それぞれペプチドのN末端に結合し、同じであるかまたは異なり、それぞれ独立して

R^{N3} 、

(リンカー1) - R^{N3} 、

CO - (リンカー1) - R^{N3} 、

CO - O - (リンカー1) - R^{N3} 、

CO - N - ((リンカー1) - R^{N3}) R^{N4} 、または

SO₂ - (リンカー1) - R^{N3}

であり、(リンカー1)は存在しなくてもよく、即ち単結合でもよく、またはCH₂、CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂CH₂もしくはCH=CHであることができ、

R^{N3} および R^{N4} は、同じであるかまたは異なり、水素または以下の必要に応じて置換された基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝C₁₋₆アルキル、

飽和または不飽和で分枝または非分枝C₃₋₁₂シクロアルキル、

ベンジル、

フェニル、

ナフチル、

単環式または二環式C₁₋₁₀ヘテロアリール、または

非芳香族C₁₋₁₀ヘテロシクリル

のいずれかであり、 R^{N3} および/または R^{N4} には、0、1または2個(同じかまたは異なる)の必要に応じた置換基があり得、該置換基は、

ヒドロキシ-

チオ-

アミノ-

カルボン酸、

飽和または不飽和で分枝または非分枝C₁₋₆アルキルオキシ、

飽和または不飽和で分枝または非分枝C₃₋₁₂シクロアルキル、

N-、O-またはS-アセチル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝C₁₋₆アルキルエステル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝C₃₋₁₂シクロアルキルエス

テル

10

20

30

40

50

フェニル、
 単環式または二環式 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロアリール、
 非芳香族 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロシクリル、または
 ハロゲン

でよく、 R^{C1} は、トリペプチドの C 末端に結合し、
 $O - R^{C2}$ 、

$O - (\text{リンカー} - 2) - R^{C2}$ 、
 $N((\text{リンカー} - 2) R^{C2}) R^{C3}$ 、または
 $N(\text{リンカー} - 2) R^{C2} - NR^{C3} R^{C4}$ 、

であり、(リンカー - 2) は存在しない、即ち単結合、または $C_{1 \sim 6}$ アルキルもしくは
 $C_{2 \sim 4}$ アルケニル、好ましくは単結合、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、
 $CH_2CH_2CH_2CH_2$ もしくは $CH=CH$ であってもよく、
 R^{C2} 、 R^{C3} および R^{C4} は、同じであるかまたは異なり、水素または以下の必要に
 応じて置換された基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{1 \sim 6}$ アルキル、
 飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{3 \sim 12}$ シクロアルキル、
 ベンジル、
 フェニル、
 ナフチル、

単環式または二環式 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロアリール、または
 非芳香族 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロシクリル

のいずれかであり、 R^{C2} および / または R^{C3} および / または R^{C4} のそれぞれには
 、0、1 または 2 個 (同じかまたは異なる) の必要に応じた置換基があり得、該置換基は
 、

ヒドロキシ - 、
 チオ - 、
 アミノ - 、
 カルボン酸、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{1 \sim 6}$ アルキルオキシ、
 飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{3 \sim 12}$ シクロアルキル、
 N - 、O - または S - アセチル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{1 \sim 6}$ アルキルエステル、
 カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_{3 \sim 12}$ シクロアルキルエス

テル

フェニル、
 ハロゲン、
 単環式または二環式 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロアリール、または
 非芳香族 $C_{1 \sim 10}$ ヘテロシクリル

の 1 つまたは複数でよい]。

【請求項 3】

式 (i) の前記化合物が、

R^{N1} は水素であり、

R^{N2} は、水素、 $C(=O) - O -$ 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 $C_{1 \sim 4}$
 アルキルであり、フェニルもしくは 2 - フリルで必要に応じた置換されており、または C
 $(=O) -$ 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 $C_{1 \sim 4}$ アルキルであり、フェニル
 もしくは 2 - フリルで必要に応じた置換されており、

R^{C1} は、OH、 $O - C_{1 \sim 6}$ アルキル、 $O - C_{1 \sim 6}$ アルキル - フェニル、 $NH - C_{1 \sim 6}$
 アルキルまたは $NH - C_{1 \sim 6}$ アルキルフェニルである、請求項 2 に記載の使用の
 ための化合物。

【請求項 4】

10

20

30

40

50

式 (i) の前記化合物が、

A^1 は、G、A または 2 - アミノ酪酸であり、

A^2 は、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert - ブチルアラニン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、2 - アリルグリシン、P、2 - アミノ酪酸、
- メチルロイシン、- メチルバリンまたは tert - ブチルグリシンであり、

A^3 は、G、A、V、P、2 - アミノ酪酸またはノルバリンであり、

R^{N1} は H であり、

R^{N2} は、水素、C (= O) - O - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニルもしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、または C (= O) - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニル
もしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1} は、OH、O - C_{1-6} アルキル、O - C_{1-6} アルキルフェニル、NH - C_{1-6} アルキルまたは NH - C_{1-6} アルキルフェニルである、請求項 3 に記載の使用のための化合物。

10

【請求項 5】

式 (i) の前記化合物が、

A^1 は、G、A または 2 - アミノ酪酸であり、

A^2 は、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert - ブチルアラニン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシンまたは 2 - アリルグリシンであり、

A^3 は、G、A、V、P、2 - アミノ酪酸またはノルバリンであり、

20

R^{N1} は H であり、

R^{N2} は、水素、C (= O) - O - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニルもしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、または C (= O) - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニル
もしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1} は、OH、O - C_{1-6} アルキル、O - C_{1-6} アルキル - フェニル、NH - C_{1-6} アルキルまたは NH - C_{1-6} アルキル - フェニルである、請求項 4 に記載の使用のための化合物。

【請求項 6】

式 (i) の前記化合物が、

30

A^1 は、G または A であり、

A^2 は、L、I または ノルロイシン であり、

A^3 は、G または A であり、

R^{N1} は水素であり、

R^{N2} は、水素、C (= O) - O - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニルもしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、または C (= O) - 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニル
もしくは 2 - フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1} は、OH、O - C_{1-6} アルキル、O - C_{1-6} アルキル - フェニル、NH - C_{1-6} アルキルまたは NH - C_{1-6} アルキル - フェニルである、請求項 5 に記載の使用のための化合物。

40

【請求項 7】

R^{N1} は水素であり、

R^{N2} は、水素、C (= O) - OCH₂Ph または C (= O) - CH = CH - (2 - フリル) であり、

R^{C1} は、OH、O - C_{1-6} アルキルまたは NH - C_{1-6} アルキルである、

請求項 2 から 6 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項 8】

式 (i) の前記化合物が、Z - GLA - OH、Bn - GLA - OH、FA - GLA - OH または H - GLA - OH である、請求項 7 に記載の使用のための化合物。

50

【請求項 9】

式 (i) の前記化合物が Z - G L A - O H である、請求項 8 に記載の使用のための化合物。

【請求項 10】

A¹ が、G、A または 2 - アミノ酪酸である、請求項 2 に記載の使用のための化合物。

【請求項 11】

A¹ が G または A である、請求項 10 に記載の使用のための化合物。

【請求項 12】

A² が、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert - ブチルアラニン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、2 - アリルグリシン、P、K、2 - アミノ酪酸、
- メチルロイシン、
- メチルバリンまたは tert - ブチルグリシンである、
請求項 2、10 または 11 のいずれかに記載の使用のための化合物。

10

【請求項 13】

A² が、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert - ブチルアラニン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、2 - アリルグリシン、P または K である、
請求項 12 に記載の使用のための化合物。

【請求項 14】

A² が L、I、ノルロイシン、P または K である、請求項 13 に記載の使用のための化合物。

20

【請求項 15】

A² が L または P である、請求項 14 に記載の使用のための化合物。

【請求項 16】

A² が P である、請求項 15 に記載の使用のための化合物。

【請求項 17】

A³ が、G、A、V、P、2 - アミノ酪酸またはノルバリンである、請求項 2 または 10 から 16 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項 18】

A³ が G または A である、請求項 17 に記載の使用のための化合物。

【請求項 19】

R^{N1} が水素である、請求項 2 または 10 から 18 のいずれかに記載の使用のための化合物。

30

【請求項 20】

R^{N2} が、

R^{N3}、

(リンカー 1) - R^{N3}、

CO - (リンカー 1) - R^{N3}、または

CO - O - (リンカー 1) - R^{N3}

であり、上式で、

(リンカー 1) は存在しなくてもよく、即ち単結合でもよく、または CH₂、CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂CH₂ もしくは CH = CH であることが
でき、

40

R^{N3} は、水素または以下の置換されていない基

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₁ ~ 4 アルキル、

ベンジル、

フェニル、または

単環式ヘテロアリアル

のいずれかである、請求項 2 または 10 から 19 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項 21】

R^{N2} が、水素、ベンジロキシカルボニル、ベンジル、ベンゾイル、tert - ブチ

50

ルオキシカルボニル、9 - フルオレニルメトキシカルボニルまたはFAである、請求項20に記載の使用のための化合物。

【請求項22】

R^{N2} が、水素、ベンジルオキシカルボニルまたはFAである、請求項21に記載の使用のための化合物。

【請求項23】

R^{C1} が、

$O - R^{C2}$ 、

$O - (\text{リンカー} - 2) - R^{C2}$ 、または

$NH - (\text{リンカー} - 2) R^{C2}$

10

であり、上式で、

(リンカー - 2) は存在しない、即ち単結合、 C_{1-6} アルキルもしくは C_{2-4} アルケニル、好ましくは単結合、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2$ もしくは $CH=CH$ であってもよく、

R^{C2} は、水素または以下の置換されていない基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C_{1-5} アルキル、

ベンジル、

フェニル、または

単環式 C_{1-10} ヘテロアリール

のいずれかである、請求項2または10から22のいずれかに記載の使用のための化合物

20

【請求項24】

R^{C1} が、OH、 $O - C_{1-6}$ アルキル、 $O - C_{1-6}$ アルキル - フェニル、 NH_2 、 $NH - C_{1-6}$ アルキルまたは $NH - C_{1-6}$ アルキル - フェニルである、請求項23に記載の使用のための化合物。

【請求項25】

R^{C1} が、OH、 $O - C_{1-6}$ アルキル、 NH_2 または $NH - C_{1-6}$ アルキルである、請求項24に記載の使用のための化合物。

【請求項26】

R^{C1} がOHまたは NH_2 である、請求項25に記載の使用のための化合物。

30

【請求項27】

R^{C1} が NH_2 である、請求項26に記載の使用のための化合物。

【請求項28】

前記化合物が、 $GPG - NH_2$ 、 $Z - GPG - NH_2$ 、 $Bn - GPG - NH_2$ 、 $FA - GPG - NH_2$ 、 $GPG - OH$ 、 $Z - GPG - OH$ 、 $Bn - GPG - OH$ または $FA - GPG - OH$ である、請求項2に記載の使用のための化合物。

【請求項29】

前記化合物が $GPG - NH_2$ である、請求項28に記載の使用のための化合物。

【請求項30】

前記化合物が、 $ALG - NH_2$ 、 $Z - ALG - NH_2$ 、 $Bn - ALG - NH_2$ 、 $FA - ALG - NH_2$ 、 $ALG - OH$ 、 $Z - ALG - OH$ 、 $Bn - ALG - OH$ または $FA - ALG - OH$ である、請求項2に記載の使用のための化合物。

40

【請求項31】

前記化合物が $ALG - NH_2$ である、請求項30に記載の使用のための化合物。

【請求項32】

A^3 が、F、W、D、E または Y ではない、請求項2から31のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項33】

A^3 が P ではない、請求項2から32のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項34】

50

A³ が E ではない、請求項 2 から 3 3 のいずれかに記載の使用のための化合物。

【請求項 3 5】

神経変性疾患の処置で使用するための、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 6】

アルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン舞踊病から選択される神経変性疾患の処置で使用するための、請求項 3 5 に記載の化合物。

【請求項 3 7】

虚血性状態の処置で使用するための、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 3 8】

脳卒中および心筋梗塞から選択される虚血性状態の処置で使用するための、請求項 3 7 に記載の化合物。 10

【請求項 3 9】

神経変性疾患または虚血性状態の処置方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 4 0】

神経変性疾患の処置方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 4 1】

アルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン舞踊病から選択される神経変性疾患の処置方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の治療有効量を投与することを含む方法。 20

【請求項 4 2】

虚血性状態の処置方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 4 3】

脳卒中および心筋梗塞から選択される虚血性状態の処置方法であって、それを必要とする患者に請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 4 4】

神経変性疾患または虚血性状態の処置のための医薬品の製造における、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の使用。 30

【請求項 4 5】

神経変性疾患の処置のための医薬品の製造における、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 4 6】

アルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン舞踊病から選択される神経変性疾患の処置のための医薬品の製造における、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 4 7】

虚血性状態の処置のための医薬品の製造における、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の使用。 40

【請求項 4 8】

脳卒中および心筋梗塞から選択される虚血性状態の処置のための医薬品の製造における、請求項 1 から 3 4 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 4 9】

神経変性疾患または虚血性状態の処置に適当な化合物を同定する方法であって、T P P I I をスクリーニングする化合物と接触させ、その化合物が T P P I I の活性を阻害するか否かを同定することを含む、方法。

【請求項 5 0】

神経変性疾患の処置に適当な化合物を同定する方法であって、T P P I I をスクリーニ 50

ングする化合物と接触させ、その化合物が T P P I I の活性を阻害するか否かを同定することを含む方法。

【請求項 5 1】

アルツハイマー病、パーキンソン病またはハンチントン舞踊病から選択される神経変性疾患の処置に適当な化合物を同定する方法であって、T P P I I をスクリーニングする化合物と接触させ、その化合物が T P P I I の活性を阻害するか否かを同定することを含む方法。

【請求項 5 2】

虚血性状態の処置に適当な化合物を同定する方法であって、T P P I I をスクリーニングする化合物と接触させ、その化合物が T P P I I の活性を阻害するか否かを同定することを含む方法。

10

【請求項 5 3】

脳卒中および心筋梗塞から選択される虚血性状態の処置に適当な化合物を同定する方法であって、T P P I I をスクリーニングする化合物と接触させ、その化合物が T P P I I の活性を阻害するか否かを同定することを含む方法。

【請求項 5 4】

請求項 2 から 3 4 のいずれかに記載の式 (i) の構造を有する化合物、および薬学的に許容される希釈剤または担体を含む医薬組成物。

【請求項 5 5】

請求項 2 から 3 4 のいずれかに記載の構造を有する化合物、および薬学的に許容される希釈剤または担体を含む医薬組成物であって、前記化合物が、シンナモイル - I F P - エチルアミド、G P E - O H、G G F - O H、G V F - O H、A A A - O H または I P I - O H ではない、医薬組成物。

20

【請求項 5 6】

A³ がプロリンではない、請求項 5 4 または 5 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

化合物が G P E - O H ではない、請求項 5 4 から 5 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

R^{C 1} が N H₂ ではない、請求項 5 4 から 5 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5 9】

医薬として使用するための、請求項 5 4 から 5 8 のいずれかに記載の化合物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、虚血および神経変性の処置における化合物の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

アルツハイマー病、パーキンソン病およびハンチントン舞踊病などの神経変性疾患は、数年かけて徐々に進行し、最後に、入院および 2 4 時間の世話が必要になり莫大な医療費を伴う。それらは分解されないタンパク質集合体の沈着によって起こる可能性があり、それは究極的に、脳のある領域における細胞死に至る。これらの疾患を効果的に治療する薬剤の必要性がある。

40

【0 0 0 3】

虚血を治療する効果的な方法のさらなる必要性がある。詳細には、脳卒中および心筋梗塞の急性相の間、脳および心筋の患部に大量の細胞死がある。多くの研究者が、虚血組織の細胞を保護する方法を発明し、この目的のために有効な薬剤を発見しようと努力している。

【0 0 0 4】

2 6 S プロテアソームは、それらのユビキチンとのコンジュゲーションに基づいて基質を認識し、サイトゾルタンパク質分解の大半を担う。この過程は、細胞分割、シグナル伝

50

達、アポトーシスおよび多細胞生物に不可欠な他の多くの過程を制御する制御因子の分解で重要である。これらの制御因子をプロテアソーム分解の標的にすることは、それらのユビキチンコンジュガーゼとの相互作用で決定される。プロテアソーム サブユニットの薬理的抑制は、以降のアポトーシスを伴う細胞周期の進行を阻止し、さらに、プロテアソームの新合成を増加させる。しかし、プロテアソーム活性のレベルは、通常、基質分解におけるおよび細胞経路の制御のための律速段階ではない。プロテアソーム生合成のいくつかの内因性モジュレーター、例えば P I 3 1 および P A 2 8 は、プロテアソーム性切断の特異性に影響を及ぼすが、それらはプロテアソーム性タンパク質分解の速度を変化させないようである。プロテアソーム 2 6 S 複合体はサイトゾル内で合成されて組み立てられ、1 9 S および 2 0 S サブ複合体は、核局在化シグナル (N L S) 誘発輸送によって核孔を通して核コンパートメントに移入される。プロテアソーム複合体は核およびサイトゾル全体に分散されるが、プロテアソームの核内蓄積はストレスにさらされた細胞で起こることができ、ストレスは基質のプロテアソーム性分解を変化させる可能性がある。プロテアソーム複合体の細胞内分布のそのような変化を引き起こすものが何かは、わかっていない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

細胞のストレス応答経路の始動は、ホスホイノシチド - 3 - O H - キナーゼ関連キナーゼ (P I K K) による活性化を必要とし、これらの中には、DNA 損傷へのストレス応答に必須の A T M / A T R キナーゼがある。さらに、A T M キナーゼは、栄養飢餓に応じる A R K 5 シグナル伝達を通して活性化される。障害のあるプロテアソーム活性および細胞ストレスは、T P P I I (トリペプチジルペプチダーゼ I I) およびイソペプチダーゼなどの相補性のサイトゾルペプチダーゼの誘導と関連する。

【 0 0 0 6 】

いくつかの形態のストレスはユビキチン - プロテアソーム経路を妨害し、これには、線照射、E R ストレス (E R = 小胞体) および飢餓が含まれる。抑制のレベルは部分的であり、生理作用を引き起こすことができるが、これらの現象の多くの機構は未知である。

【 発明の開示 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

今では、虚血および神経変性は、下でさらに説明されるように、P I K K の下流側の経路へのそれらの依存という点に関連し、共通の機構を標的にすることによって治療することができると考えている。本発明者らは、有効な治療剤である、一群のペプチドおよびペプチド関連化合物を発見した。本発明は、T P P I I (トリペプチジル - ペプチダーゼ I I) の役割に関する本発明者らの研究に由来する。T P P I I は、ショウジョウバエからヒトまでの多細胞生物で発現される、独特の 1 3 8 k D a サブユニットで構築される。ショウジョウバエからのデータは、T P P I I 複合体が、約 6 M D a の本来の構造物と 2 つのねじれた鎖を形成する、反復サブユニットからなることを示唆する。T P P I I は、唯一の既知のサイトゾルサブチリシン様セリンペプチダーゼである。細菌のサブチリシンは完全に研究された酵素であり、結晶構造および酵素機能に関する多数の報告がある (G u p t a , R . , B e g , Q . K . および L o r e n z , P . , 2 0 0 2 , 「 B a c t e r i a l a l k a l i n e p r o t e a s e s : m o l e c u l a r a p p r o a c h e s a n d i n d u s t r i a l a p p l i c a t i o n s 」 , A p p l M i c r o b i o l B i o t e c h n o l . 5 9 : 1 5 ~ 3 2) 。

【 0 0 0 8 】

ゆえに、第 1 の態様から、本発明は神経変性疾患または虚血性状態の処置での使用のための化合物を提供し、前記化合物は T P P I I 阻害剤である。

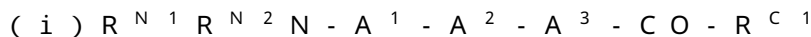
【 0 0 0 9 】

本明細書で用いるように、用語処置は、確定された神経変性疾患または虚血性状態の治療、ならびに予防療法および前神経変性または前虚血性状態の治療を含む。

【 0 0 1 0 】

さらなる態様から、本発明は、神経変性疾患または虚血性状態の処置における使用のた

めの化合物を提供し、前記化合物は下記式 (i)



から選択されるか、その薬学的に許容される塩であり、上式で、 A^1 、 A^2 および A^3 は、標準の 1 文字略語または名称に従う以下の定義を有するアミノ酸残基であり、即ち

A^1 は、G、A、V、L、I、P、2 - アミノ酪酸、ノルバリンまたは *tert* - ブチルグリシンであり、

A^2 は、G、A、V、L、I、P、F、W、C、S、K、R、2 - アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、*tert* - ブチルアラニン、 α - メチルロイシン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、 β - メチルバリン、*tert* - ブチルグリシン、2 - アリルグリシン、オルニチンまたは γ - ジアミノ酪酸であり、

A^3 は、G、A、V、L、I、P、F、W、D、E、Y、2 - アミノ酪酸、ノルバリンまたは *tert* - ブチルグリシンであり、

R^{N1} および R^{N2} は、それぞれペプチドの N 末端に結合し、同じであるかまたは異なり、それぞれ独立して

R^{N3} 、

(リンカー 1) - R^{N3} 、

CO - (リンカー 1) - R^{N3} 、

CO - O - (リンカー 1) - R^{N3} 、

CO - N - ((リンカー 1) - R^{N3}) R^{N4} 、または

SO₂ - (リンカー 1) - R^{N3}

であり、

(リンカー 1) は存在しなくてもよく、即ち単結合でもよく、または CH₂、CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂、CH₂CH₂CH₂CH₂ もしくは CH = CH であることができ、

R^{N3} および R^{N4} は、同じであるかまたは異なり、水素または以下の必要に応じて置換された基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₁ ~ 6 アルキル、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₃ ~ 12 シクロアルキル、

ベンジル、

フェニル、

ナフチル、

単環式または二環式 C₁ ~ 10 ヘテロアリール、または

非芳香族 C₁ ~ 10 ヘテロシクリル

のいずれかであり、 R^{N3} および / または R^{N4} には、0、1 または 2 個 (同じかまたは異なる) の必要に応じた置換基があり得、該置換基は、

ヒドロキシ -、

チオ -、

アミノ -、

カルボン酸、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₁ ~ 6 アルキルオキシ、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₃ ~ 12 シクロアルキル、

N -、O - または S - アセチル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₁ ~ 6 アルキルエステル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 C₃ ~ 12 シクロアルキルエス

テル

フェニル、

単環式または二環式 C₁ ~ 10 ヘテロアリール、

非芳香族 C₁ ~ 10 ヘテロシクリル、または

ハロゲン

でよく、 R^{C1} はトリペプチドの C 末端に結合され、

10

20

30

40

50

$O - R^{C2}$ 、
 $O - (\text{リンカー} - 2) - R^{C2}$ 、
 $N((\text{リンカー} - 2) R^{C2}) R^{C3}$ 、または
 $N(\text{リンカー} - 2) R^{C2} - NR^{C3} R^{C4}$

であり、(リンカー - 2) は存在しない、即ち単結合、または $C_1 \sim 6$ アルキルもしくは $C_2 \sim 4$ アルケニル、好ましくは単結合、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_2$ もしくは $CH=CH$ であってもよく、

R^{C2} 、 R^{C3} および R^{C4} は、同じであるかまたは異なり、水素または以下の必要に応じて置換された基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_1 \sim 6$ アルキル、
 飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_3 \sim 12$ シクロアルキル、
 ベンジル、
 フェニル、
 ナフチル、
 単環式または二環式 $C_1 \sim 10$ ヘテロアリール、または
 非芳香族 $C_1 \sim 10$ ヘテロシクリル

のいずれかであり、 R^{C2} および / または R^{C3} および / または R^{C4} には、0、1 または 2 個 (同じかまたは異なる) の必要に応じた置換基があり得、該置換基は、

ヒドロキシ -、

チオ -、

アミノ -、

カルボン酸、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_1 \sim 6$ アルキルオキシ、

飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_3 \sim 12$ シクロアルキル、

N -、O - または S - アセチル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_1 \sim 6$ アルキルエステル、

カルボン酸の飽和または不飽和で分枝または非分枝 $C_3 \sim 12$ シクロアルキルエス

テル

フェニル、

ハロゲン、

単環式または二環式 $C_1 \sim 10$ ヘテロアリール、または

非芳香族 $C_1 \sim 10$ ヘテロシクリル

の 1 つまたは複数でよい。

【0011】

式 (i) の一般式で示される N および CO は、それぞれアミノ酸残基 A^1 の窒素原子およびアミノ酸残基 A^3 のカルボニル基である。

【0012】

さらに態様から、本発明は、神経変性疾患または虚血性状態の処置方法であって、それを必要とする患者に TPP II 阻害剤または式 (i) から選択される化合物もしくはその薬学的に許容される塩の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0013】

同様に、さらに態様から、本発明は、神経変性疾患または虚血性状態の処置のための医薬品の製造における、TPP II 阻害剤または式 (i) から選択される化合物もしくはその薬学的に許容される塩の使用を提供する。

【0014】

理論によって束縛されることを望むものではないが、本発明は、神経変性疾患または虚血性状態の処置において TPP II 阻害剤が有用であることを認識するものと考えることができる。

【0015】

さらに態様から、本発明は、式 (i) の化合物またはその薬学的に許容される塩、お

10

20

30

40

50

よび薬学的に許容される希釈剤または担体を含む医薬組成物を提供する。

【0016】

さらなる態様から、本発明は、医薬品として使用するための式(i)の化合物またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【0017】

さらなる態様から、本発明は、神経変性疾患または虚血性状態の処置に適切な化合物を同定する方法であって、TPPIIをスクリーニングする化合物と接触させ、その化合物がTPPIIの活性を阻害するか否かを同定することを含む方法を提供する。

【0018】

本出願は、発明者Rickard GlasおよびHong Xuによる「Use of peptides and peptidomimetic compounds」という名称の2006年1月13日に出願の米国特許仮出願60/759088の優先権を主張し、その内容は、その出願が虚血および神経変性の処置に関する限り、本明細書に完全に組み込まれる。

【0019】

本発明は、ストレスに応じたプロテアソーム基質分解の下方制御における、TPPIIの必須の役割を認識する。以下に詳述されるように、プロテアソーム複合体は、TPPII依存性の機構を通して核に移行したが、PIKKファミリーキナーゼの活性も必要とした。PIKKファミリーキナーゼの遮断は、サイトゾルへのプロテアソーム複合体の再分配をもたらした。in vitro細胞系で発現される、さもないと分解耐性のポリグルタミン基質の分解を増加させるために、TPPII阻害剤を応用した。さらに、p53の飢餓依存性蓄積および細胞周期停止が、TPPIIの発現および活性に依存することを示した。

【0020】

本発明者らのデータは、神経変性および虚血性の疾患の処置での、TPPII阻害剤の使用を支持する。

【0021】

TPPIIは基質のタンパク質ターンオーバーに寄与し、15個のアミノ酸より長いサイトゾルポリペプチドを分解する主なペプチダーゼであることが最近わかった(Reits, E.ら. 2004. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. Immunity 20:495~506)。さらに、TPPIIはプロテアソーム活性が抑制されたリンパ腫細胞の生存を可能にすることができ、それは細胞タンパク質ターンオーバーへのかなりの寄与を示唆した。プロテアソーム基質分解がTPPIIによって抑制されたので、PIKKファミリーキナーゼ活性の伝達におけるTPPIIの関与は、サイトゾルタンパク質分解の特異性の変化をもたらすことを本発明者らの研究は示す。したがって、正常なプロテアソーム活性を有する細胞において、TPPIIは、見かけ上、ユビキチン-プロテアソーム経路による基質分解を制約する働きをする。プロテアソーム活性の細胞レベルがどのように制御されるかは現在明らかではなく、いくつかの報告は、19Sプロテアソームのサブユニットの修飾がこの役割を果たすことができるであろうことを示唆する。ユビキチン結合タンパク質をプロテアソームへ運ぶことが示唆されるRad23は、そのユビキチン様(Ubl)ドメインを通してS2(Rpn1)と相互作用する(Elssasser Sら. 2002. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. Nat Cell Biol. 4:725~30)(Zhang Xら. 2004. The targeting of the proteasomal regulatory subunit S2 by adenovirus E1A causes inhibition of proteasomal activity and increased p53 expression. J Biol Chem. 279:25122~3

10

20

30

40

50

3)。さらに、最近のデータは、各触媒回路の間の19Sおよび20Sの複合体のATP誘発解離を示唆し、19S-20S再結合も調節されることを示す(Babbitt, S. E.ら、2005、ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. Cell 121:553~65)。

【0022】

低下したプロテアソーム基質分解速度は、プロテアソーム複合体の再局在化と関連したが、本発明者らのデータは他の機構を排除しない。他の可能性のある機構は、プロテアソームサブユニット、例えばRpn10/S5aまたはユビキチン結合基質と直接接触する調節複合体の他のサブユニットのPIKKファミリーメンバーによる直接調節である。核プロテアソームサブ複合体はそれらの活性に関与するので、ここで研究する機構は、DNA転写およびDNA修復でも役割を果たす可能性がある。TPPIIのサブセットは核に存在するので、PIKKファミリーキナーゼ-TPPII依存機構によって、プロテアソーム複合体がこのコンパートメントで保持される可能性がある。細胞のAMP/ATPレベルを感知するmTORまたはARK5、即ちAMPKファミリーの新規Akt活性化メンバーなどの下流エフェクターが、これらの事象を調節することも排除することができない。

10

【0023】

神経変性疾患の療法を考慮すると、プロテアソーム活性のレベルが重要であるが、p53もニューロンのアポトーシスを引き起こす際に重要である。それにより、PIKK活性化の他の結果もこの状況の間重要であり、これらは、例えば虚血の間など、p53が患部組織でのアポトーシスのために重要となる可能性のある場合にも重要である。したがって、TPPII阻害剤は、プロテアソーム分解の増加が有益な場合、例えば神経変性疾患において、疾患の療法を改善するために用いることができる。さらに、アポトーシスに導くストレスシグナルの伝達を一時的に妨げるためにp53の発現を抑制することは、虚血の処置を可能にする。

20

【0024】

TPPIIは、比較的広い範囲の基質を受け入れる。式(i)に該当するすべての化合物は、ペプチドまたはペプチド類似体である。式(i)の化合物は、当技術分野で公知の方法によって、容易に合成することができる(例えばGanellinら、J. Med. Chem. 2000、43、664~674を参照)か、市販品を容易に得ることができる(例えばBachem AGから)。好ましい態様では、化合物は式(i)から選択することができる。そのようなトリペプチドおよび誘導体は、特に有効な治療剤である。

30

【0025】

本発明に従い、神経変性疾患または虚血性状態の処置で使用するための化合物は、in vivoでTPPII阻害剤であることが知られている化合物でよい。

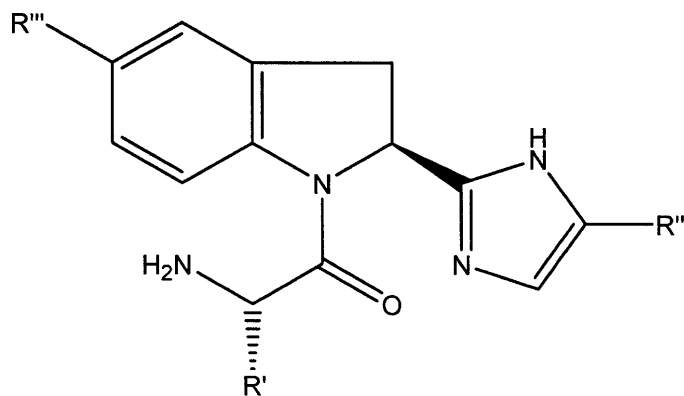
【0026】

例えば、化合物は、Winterら、Journal of Molecular Graphics and Modelling 2005、23、409~418においてTPPII阻害剤として特定された化合物から選択することができる。それらの化合物は特にTPPIIファルマコフォアに適しているので、化合物は以下の式(ii)：

40

【0027】

【化 1】



10

【0028】

から選択することができ、上式で、 R' は H 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH_2CH_2CH_3$ または $CH(CH_3)_2$ であり、

R'' は、 H 、 CH_2CH_3 、 $CH_2CH_2CH_3$ 、 $CH(CH_3)_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ または $C(CH_3)_3$ であり、

R''' は、 H 、 CH_3 、 OCH_3 、 F 、 Cl または Br である。

20

【0029】

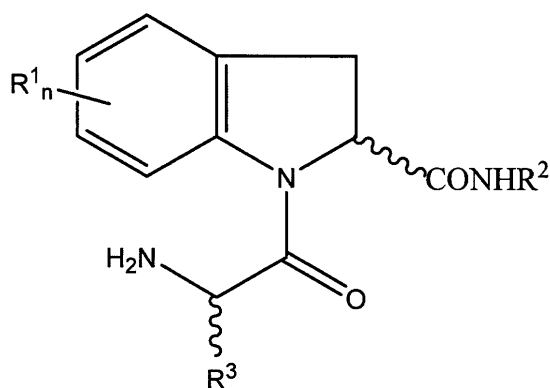
式 (ii) の化合物は、公知の方法によって合成可能である (例えば、Winterら、Journal of Molecular Graphics and Modeling 2005、23、409~418 および Breslinら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003、13、4467~4471 を参照)。

【0030】

また、例として、化合物は、Schwartzらの米国特許第6335360号でTPPI阻害剤として特定された化合物から選択することができる。そのような化合物は、以下の式 (iii) のものを含む。

【0031】

【化 2】



30

40

【0032】

上式で、

各 R^1 は同じであるか、異なることができ、ハロゲン、 OH ；ハロゲンおよび OH からなる群から選択される1つまたは複数の基で必要に応じて置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル；ハロゲンおよび OH からなる群から選択される1つまたは複数の基で必要に応じて置換された $(C_1 \sim C_6)$ アルケニル；ハロゲンおよび OH 、 X ($C_1 \sim C_6$) アルキルからなる群から選択される1つまたは複数の基で必要に応じて置換された $(C_1 \sim C_6)$ アルキニル (X が S 、 O または OCO であり、アルキルがハロゲンおよび OH からなる群から選択される1つまたは複数の基で必要に応じて置換される)；少なくとも1つのハロゲン

50

で必要に応じて置換された SO_2 ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) アルキル、 YSO_3H 、 YSO_2 ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) アルキルであって、Y が O または NH であり、アルキルが少なくとも 1 つのハロゲン、ジラジカル - X_1 - ($\text{C}_1 \sim \text{C}_2$) アルキレン - X_1 - で必要に応じて置換されており、 X_1 が O または S であり；インドリン環と縮合したベンゼン環；

からなる群から選択され、n は、0 ~ 4 であり、

R^2 は、 R^4 がハロゲンおよび OH からなる群から選択される 1 つまたは複数の基によって置換された $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルである CH_2R^4 ；Z が O もしくは S であり、p が 0 ~ 5 であり、q が 0 ~ 5 であり、ただし $p + q$ が 0 ~ 5 である $(\text{CH}_2)_p\text{Z}(\text{CH}_2)_q\text{CH}_3$ ；($\text{C}_2 \sim \text{C}_6$) 不飽和アルキル；または ($\text{C}_3 \sim \text{C}_6$) シクロアルキルであり、

あるいは、 R^2 は ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) アルキルまたは O ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) アルキルであり、それぞれは少なくとも 1 つのハロゲンで必要に応じて置換されており、

R^3 は H；少なくとも 1 つのハロゲンで必要に応じて置換された ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$) アルキル； $(\text{CH}_2)_p\text{ZR}^5$ (式中、p が 1 ~ 3 であり、Z が O または S であり、 R^5 が H または ($\text{C}_1 \sim \text{C}_3$) アルキルである)；ベンジルである。

【0033】

式 (iii) の化合物は、公知の方法によって容易に合成が可能である (例えば、Schwartz らの米国特許第 6335360 号を参照)。

【0034】

しかし、化合物は、式 (i) および (ii)、より好ましくは式 (i) から選択することが好ましい。

【0035】

化合物が、 $\text{R}^{\text{N}1}$ 、 $\text{R}^{\text{N}2}$ および $\text{R}^{\text{C}1}$ が上でまたは下の好ましい実施形態のいずれかで定義された通りであり、

A^1 は、G、A、V、L、I、P、S、T、C、N、Q、2 - アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert - ブチルアラニン、- メチルロイシン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、- メチルバリン、tert - ブチルグリシンまたは 2 - アリルグリシンであり、

A^2 は、G、A、V、L、I、P、S、T、C、N、Q、F、Y、W、K、R、ヒスチジン、2 - アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert - ブチルアラニン、- メチルロイシン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、- メチルバリン、tert - ブチルグリシン、2 - アリルグリシン、オルニチン、- ジアミノ酪酸または 4, 5 - デヒドロ - リジンであり、

A^3 は、G、A、V、L、I、P、S、T、C、N、Q、D、E、F、Y、W、2 - アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert - ブチルアラニン、- メチルロイシン、4, 5 - デヒドロ - ロイシン、アロ - イソロイシン、- メチルバリン、tert - ブチルグリシンまたは 2 - アリルグリシンである、

式 (i) の化合物であることも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

式 (i) の好ましい化合物

式 (i) の化合物の様々なグループおよび特定の例が好ましい。

【0037】

一般に、特に A^2 位置が天然 (L) 立体配置のアミノ酸が好ましい。

【0038】

一般に、 $\text{R}^{\text{N}1}$ が水素であり、

$\text{R}^{\text{N}2}$ が、

$\text{R}^{\text{N}3}$ 、

(リンカー 1) - $\text{R}^{\text{N}3}$ 、

CO - (リンカー 1) - $\text{R}^{\text{N}3}$ 、または

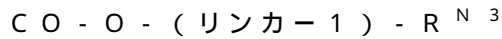
10

20

30

40

50



であり、上式で、

(リンカー - 1) は存在しなくてもよく、即ち単結合でもよく、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ もしくは $\text{CH}=\text{CH}$ であることができ、

$\text{R}^{\text{N} 3}$ は、水素または以下の置換されていない基：

飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキル、
ベンジル、
フェニル、または
単環式ヘテロアリール
のいずれかであることが好ましい。

10

【0039】

一般に、 $\text{R}^{\text{C} 1}$ は、

$\text{O} - \text{R}^{\text{C} 2}$ 、

$\text{O} - (\text{リンカー} - 2) - \text{R}^{\text{C} 2}$ 、または

$\text{NH} - (\text{リンカー} - 2) \text{R}^{\text{C} 2}$

であり、上式で、

(リンカー - 2) は存在しない、即ち単結合、 C_{1-6} アルキルもしくは C_{2-4} アルケニル、好ましくは単結合、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ もしくは $\text{CH}=\text{CH}$ であってもよく、

20

$\text{R}^{\text{C} 2}$ は水素または以下の置換されていない基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C_{1-5} アルキル、
ベンジル、
フェニル、または
単環式 C_{1-10} ヘテロアリール
のいずれかであることが好ましい。

【0040】

一般には、N末端の置換基に関して、

$\text{R}^{\text{N} 1}$ は水素であり、

$\text{R}^{\text{N} 2}$ は、水素、 $\text{C}(=\text{O}) - \text{O} - (\text{リンカー} - 1) - \text{R}^{\text{N} 3}$ または $\text{C}(=\text{O}) - (\text{リンカー} - 1) - \text{R}^{\text{N} 3}$ であり、

30

(リンカー - 1) は、 CH_2 または $\text{CH}=\text{CH}$ であり、

$\text{R}^{\text{N} 3}$ は、フェニルまたは 2 - フリルであることがさらに好ましい。

【0041】

さらに、

$\text{R}^{\text{N} 1}$ は水素であり、

$\text{R}^{\text{N} 2}$ は、水素、 $\text{C}(=\text{O}) - \text{OCH}_2\text{Ph}$ または $\text{C}(=\text{O}) - \text{CH}=\text{CH} - (2 - \text{フリル})$ であることが好ましい。

【0042】

N末端置換基のための他の好ましいグループは、

40

$\text{R}^{\text{N} 1}$ が水素であり、

$\text{R}^{\text{N} 2}$ が、ベンジルオキシカルボニル、ベンジル、ベンゾイル、tert - ブチルオキシカルボニル、9 - フルオレニルメトキシカルボニルまたは FA であり、より好ましくはベンジルオキシカルボニルまたは FA であるものである。

【0043】

一般には、C末端の置換基に関して、

$\text{R}^{\text{C} 1}$ は、OH、 $\text{O} - \text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{O} - \text{C}_{1-6}$ アルキルフェニル、 $\text{NH} - \text{C}_{1-6}$ アルキルまたは $\text{NH} - \text{C}_{1-6}$ アルキル - フェニル、より好ましくは OH であることが好ましい。

【0044】

50

いくつかの好ましいグループは、以下の通りである。

【0045】

グループ(i)(a)：

A¹は、G、A、V、L、I、P、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたはtert-ブチルグリシンであり、

A²は、G、A、V、L、I、P、F、W、C、S、K、R、2-アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert-ブチルアラニン、-メチルロイシン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、-メチルバリン、tert-ブチルグリシン、2-アリルグリシン、オルニチンまたは、-ジアミノ酪酸であり、

A³は、G、A、V、L、I、P、F、W、D、E、Y、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたはtert-ブチルグリシンであり、

R^{N1}はHであり、

R^{N2}は、水素、C(=O)-O-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、またはC(=O)-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1}は、OH、O-C₁₋₆アルキル、O-C₁₋₆アルキルフェニル、NH-C₁₋₆アルキルまたはNH-C₁₋₆アルキルフェニルである。

【0046】

グループ(i)(b)：

A¹は、G、Aまたは2-アミノ酪酸であり、

A²は、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、2-アリルグリシン、P、2-アミノ酪酸、-メチルロイシン、-メチルバリンまたはtert-ブチルグリシンであり、

A³は、G、A、V、P、2-アミノ酪酸またはノルバリンであり、

R^{N1}はHであり、

R^{N2}は、水素、C(=O)-O-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、またはC(=O)-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1}は、OH、O-C₁₋₆アルキル、O-C₁₋₆アルキル-フェニル、NH-C₁₋₆アルキルまたはNH-C₁₋₆アルキル-フェニルである。

【0047】

グループ(i)(c)：

A¹は、G、Aまたは2-アミノ酪酸であり、

A²は、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシンまたは2-アリルグリシンであり、

A³は、G、A、V、P、2-アミノ酪酸またはノルバリンであり、

R^{N1}はHであり、

R^{N2}は、水素、C(=O)-O-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、またはC(=O)-飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝C₁₋₄アルキルであり、フェニルもしくは2-フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1}は、OH、O-C₁₋₆アルキル、O-C₁₋₆アルキルフェニル、NH-C₁₋₆アルキルまたはNH-C₁₋₆アルキル-フェニルである。

【0048】

グループ(i)(d)：

A¹は、GまたはAであり、

A²は、L、Iまたはノルロイシンであり、

A³は、GまたはAであり、

R^{N1} は H であり、

R^{N2} は、水素、 $C(=O)-O$ -飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニルもしくは 2-フリルで必要に応じて置換されており、または $C(=O)-$ 飽和もしくは不飽和で分枝もしくは非分枝 C_{1-4} アルキルであり、フェニルもしくは 2-フリルで必要に応じて置換されており、

R^{C1} は、OH、 $O-C_{1-6}$ アルキル、 $O-C_{1-6}$ アルキル-フェニル、 $NH-C_{1-6}$ アルキルまたは $NH-C_{1-6}$ アルキル-フェニルである。

【0049】

特定の好ましい化合物の第1セットは、

A^1 が G であり、

A^2 が L であり、

A^3 が、G、A、V、L、I、P、F、W、D、E、Y、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたは tert-ブチルグリシン、より好ましくは G、A、V、P、2-アミノ酪酸またはノルバリン、より好ましくは G または A であり、

R^{N1} が水素であり、

R^{N2} がベンジルオキシカルボニルであり、

R^{C1} が OH である化合物である。

【0050】

特定の好ましい化合物の第2セットは、

A^1 が G であり、

A^2 が G、A、V、L、I、P、F、W、C、S、2-アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、tert-ブチルアラニン、-メチルロイシン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、-メチルバリン、tert-ブチルグリシンまたは 2-アリルグリシン、より好ましくは、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、2-アリルグリシン、P、2-アミノ酪酸、-メチルロイシン、-メチルバリンまたは tert-ブチルグリシン、より好ましくは、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシンまたは 2-アリルグリシン、より好ましくは、L、I または ノルロイシンであり、

A^3 が A であり、

R^{N1} が水素であり、

R^{N2} がベンジルオキシカルボニルであり、

R^{C1} が OH である化合物である。

【0051】

特定の好ましい化合物の第3セットは、

A^1 が、G、A、V、L、I、P、2-アミノ酪酸、ノルバリンまたは tert-ブチルグリシン、より好ましくは G、A または 2-アミノ酪酸、より好ましくは G または A であり、

A^2 が L であり、

A^3 が A であり、

R^{N1} が水素であり、

R^{N2} がベンジルオキシカルボニルであり、

R^{C1} が OH である化合物である。

【0052】

好ましくは、配列 $A^1-A^2-A^3$ は、GLA、GLF、GVA、GIA、GPA または ALA、最も好ましくは GLA であり、

R^{N1} は水素であり、

R^{N2} はベンジルオキシカルボニルであり、

R^{C1} は OH である。

【0053】

アルキル基が飽和または不飽和と記載される場合、これはアルキル、アルケニルおよびアルキニル炭化水素部分を包含する。

【 0 0 5 4 】

C_{1-6} アルキルは、好ましくは C_{1-4} アルキル、より好ましくはメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルまたはブチル（分枝または非分枝）、最も好ましくはメチルである。

【 0 0 5 5 】

C_{3-12} シクロアルキルは、好ましくは C_{5-10} シクロアルキル、より好ましくは C_{5-7} シクロアルキルである。

【 0 0 5 6 】

「アリール」は、芳香族基、好ましくはフェニルまたはナフチルである。

【 0 0 5 7 】

語の一部としての「ヘテロ」は、1つまたは複数の、好ましくはN、OおよびSから選択されるヘテロ原子を含むことを意味する。

【 0 0 5 8 】

「ヘテロアリール」は、好ましくはピリジル、ピロリル、キノリニル、フラニル、チエニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、イミダゾリル、ピリミジニル、インドリル、ピラジニル、インダゾリル、ピリミジニル、チオフェネチル、ピラニル、カルバゾリル、アクリジニル、キノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、プリニル、シノリニルまたはプテリジニルである。

【 0 0 5 9 】

「非芳香族のヘテロシクリル」は、好ましくはピロリジニル、ピペリジル、ピペラジニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニルまたは単糖である。

【 0 0 6 0 】

「ハロゲン」は、好ましくはClまたはF、より好ましくはClである。

【 0 0 6 1 】

さらなる好ましい式 (i) の化合物

一般に、 A^1 は、好ましくは、G、Aまたは2-アミノ酪酸、より好ましくはGまたはAから選択することができる。

【 0 0 6 2 】

一般に、 A^2 は、好ましくは、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、2-アリルグリシン、P、K、2-アミノ酪酸、-メチルロイシン、-メチルバリンまたはtert-ブチルグリシン、より好ましくは、L、I、ノルロイシン、V、ノルバリン、tert-ブチルアラニン、4,5-デヒドロ-ロイシン、アロ-イソロイシン、2-アリルグリシン、PまたはK、より好ましくは、L、I、ノルロイシン、PまたはK、より好ましくはLまたはPから選択することができる。

【 0 0 6 3 】

一般に、 A^3 は、好ましくは、G、A、V、P、2-アミノ酪酸またはノルバリン、より好ましくはGまたはAから選択することができる。

【 0 0 6 4 】

一般に、 R^{N1} は水素であることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

一般に、 R^{N2} は、好ましくは、

R^{N3} 、

(リンカー1) - R^{N3} 、

CO - (リンカー1) - R^{N3} 、または

CO - O - (リンカー1) - R^{N3}

であり、上式で、

10

20

30

40

50

(リンカー 1) は存在しなくてもよく、即ち単結合でもよく、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ もしくは $\text{CH}=\text{CH}$ であることができ、

R^{N^3} は、水素または以下の置換されていない基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C_{1-4} アルキル、

ベンジル、

フェニル、もしくは

単環式ヘテロアリアル

のいずれかである。

【0066】

10

一般に、 R^{N^2} は、より好ましくは、水素、ベンジルオキシカルボニル、ベンジル、ベンゾイル、tert-ブチルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニルまたは FA であり、より好ましくは、水素、ベンジルオキシカルボニルまたは FA である。

【0067】

一般に、 R^{C^1} が

$\text{O}-\text{R}^{\text{C}^2}$ 、

$\text{O}-(\text{リンカー } 2)-\text{R}^{\text{C}^2}$ 、または

$\text{NH}-(\text{リンカー } 2)-\text{R}^{\text{C}^2}$

であり、上式で、

(リンカー 2) は存在しない、即ち単結合、 C_{1-6} アルキルもしくは C_{2-4} アルケニル、好ましくは単結合、または CH_2 、 CH_2CH_2 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ もしくは $\text{CH}=\text{CH}$ であってもよく、

20

R^{C^2} は水素または以下の置換されていない基：

飽和または不飽和で分枝または非分枝 C_{1-5} アルキル、

ベンジル、

フェニル、もしくは

単環式 C_{1-10} ヘテロアリアル

のいずれかであることが好ましい。

【0068】

一般に、 R^{C^1} は、より好ましくは、OH、 $\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル-フェニル、 NH_2 、 $\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ アルキルまたは $\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ アルキル-フェニル、より好ましくは、OH、 $\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 NH_2 または $\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、より好ましくは、OH または NH_2 である。

30

【0069】

特に興味がある化合物には、 A^2 が P であるものが含まれる。

【0070】

特に興味がある化合物には、 R^{C^1} が NH_2 であるものが含まれる。

【0071】

一般に、以下のアミノ酸、F、W、D、E および Y は、 A^3 により不適当である。同様に、一般に、 A^3 は、P および / または E でないものが選択されることがあるが、それは、これらを含む化合物はより低い活性を示すからである。

40

【0072】

好ましい式 (ii) の化合物

式 (ii) の化合物は、好ましくは、

R' が、 CH_2CH_3 または $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ であり、

R'' が、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ であり、

R''' が、H または Cl である化合物である。

【0073】

好ましい式 (iii) の化合物

式 (iii) の化合物の様々な好ましいグループおよび特定の例は、別にとられた Sc

50

h w a r t zらのUS 6 , 3 3 5 , 3 6 0 B 1の請求項のいずれかに規定される通りである。

【 0 0 7 4 】

式 (i) の治療化合物の一例は、Z - G L A - O H、即ち、N末端がZ基で誘導体化され、C末端が誘導体化されないトリペプチドG L Aである。Zは、ベンジルオキシカルボニルを表す。これは、 R^{N1} がH、 R^{N2} がZ、 A^1 がG、 A^2 がL、 A^3 がA、 R^{C1} がOHである、式 (i) の化合物である。この化合物はB a c h e m A Gから市販され、真核生物T P P I Iの細菌同族体、サブチリシンを抑制することが発見された。Z - G L A - O Hは低コストであり、実験的にはよく働く。

【 0 0 7 5 】

好ましい化合物には、G L Aを含むもの、例えば、Z - G L A - O H、B n - G L A - O H、F A - G L A - O HおよびH - G L A - O H、例えばZ - G L A - O Hが含まれるが、本発明に従い、本明細書での任意の化合物または化合物群のいかなる開示も、配列 $A^1 A^2 A^3$ はG L Aではないとのただし書き、または化合物はZ - G L A - O H、B n - G L A - O H、F A - G L A - O HまたはH - G L A - O Hからなる群から選択されないとのただし書き、または化合物はZ - G L A - O Hではないとのただし書きに必要に応じて従うことができる。

【 0 0 7 6 】

神経変性疾患または虚血性状態の処置では、Z - G L A - O Hまたは本明細書で記載される他の化合物を投与することができる。

【 0 0 7 7 】

他の好ましい化合物には、 $A^1 A^2 A^3$ がG P Gであるもの、例えばG P G - N H₂またはZ - G P G - N H₂が含まれる。

【 0 0 7 8 】

当業者は、本明細書で記載される化合物は、任意の適当な方法で投与することができることがわらう。例えば、投与は、非経口的、例えば静脈内もしくは皮下、経口、経皮、鼻腔内、吸入、または経直腸であることができる。好ましい一実施形態では、化合物は注射によって投与される。

【 0 0 7 9 】

本発明の医薬組成物に用いる薬学的に許容される付加塩の例には、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸および硫酸などの無機酸、ならびに、酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸およびアリアルスルホン酸などの有機酸に由来するものが含まれる。本明細書で記載される薬学的に許容される賦形剤、例えば、媒体、アジュバント、担体または希釈剤は、当技術分野の技術者に周知であり、容易に入手できる。薬学的に許容される担体は、活性化合物に対して化学的に不活性であり、使用条件下で有害な副作用および毒性を及ぼさないものでよい。医薬製剤は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、19th ed.、Mack Printing Company、Easton、Pennsylvania (1 9 9 5)で見られる。

【 0 0 8 0 】

組成物は任意の投与経路、例えば経口、静脈内、経皮または皮下、経鼻、筋肉内または腹腔内投与のために調製することができる。担体または他の材料の正確な性質は、投与経路によって決まる。非経口投与のためには、非経口的に許容される水溶液を使用し、それは発熱物質を含まず、必要なpH、等張性および安定性を有する。当業者は適当な溶液を調製する能力が十分あり、多数の方法が文献で記載されている。薬剤送達方法の簡単な総説は、例えば、Langer、Science 249: 1527 ~ 1533 (1 9 9 0)でも見られる。

【 0 0 8 1 】

本発明との関連で、哺乳動物、特にヒトに投与する用量は、相応な時間枠の間哺乳動物で治療反応を実現するのに十分であるべきである。当業者は、投薬量が、患者の年齢、状

10

20

30

40

50

態および体重、ならびに、疾患の段階 / 重症度を含めて、様々な因子によって決まることを理解するであろう。用量は、投与の経路（投与形態）、タイミングおよび頻度によっても決まる。経口投与の場合、投薬量は、例えば約 0.01 mg ~ 約 10 g、好ましくは約 0.01 mg ~ 約 1000 mg、より好ましくは約 10 mg ~ 約 1000 mg / 日の化合物、またはその薬学的に許容される塩の対応量でよい。

【0082】

治療薬は、単一用量で、または治療クールとして定期的に使用することができる。

【0083】

TPPII 活性の抑制についてどのように化合物をスクリーニングするべきかは、当業者に明白である。TPPII タンパク質は第 1 段階で精製することができ、TPPII に好ましい蛍光原基質を第 2 の段階で用いることができる。これは、TPPII 活性を測定する効果的な方法になる。

10

【0084】

特に高レベルの精製を達成する必要はなく、スクリーニング法で用いるのに十分な品質の TPPII を得るために、従来の単純な技術を用いることができる。TPPII の精製の一つの非限定的な例では、 100×10^6 個の細胞（例えば EL-4 細胞）を沈殿させ、ガラスビーズおよびホモジナイゼーション緩衝液（50 mM トリス塩基 pH 7.5、250 mM ショ糖、5 mM $MgCl_2$ 、1 mM DTT）中でボルテックスすることによって溶解した。細胞溶解物を分画遠心分離にかけた。最初に、細胞のホモジネートを 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、次に、上清を超遠心管へ移した。次に、試料を 100,000 × g で 1 時間超遠心分離し、上清（ほとんどの生化学文献ではサイトゾルと表される）を 100,000 × g で 5 時間遠心分離すると、高分子量サイトゾルタンパク質 / タンパク質複合体が沈殿した。生じたペレットを 50 mM トリス塩基 pH 7.5、30% グリセロール、5 mM $MgCl_2$ および 1 mM DTT に溶解し、1 μg の高分子量タンパク質をペプチダーゼアッセイの酵素として用いた。

20

【0085】

TPPII の活性は、例えば基質 AAF-AMC（Sigma, St. Louis, MO）を用いて試験することが可能である。これは、例えば、50 mM トリス塩基 pH 7.5、5 mM $MgCl_2$ および 1 mM DTT で構成される 100 μl の試験緩衝液中で、100 μm の濃度で用いることができる。900 μl の 1% SDS 溶液による希釈を用いて、反応を停止することが可能である。切断活性は、例えば、LS50B Luminescence Spectrometer（Perkin Elmer, Boston, MA）における、460 nm での発光で測定することができる。

30

【0086】

本発明で有用な化合物は、in vivo で虚血または神経変性の部分的または好ましくは完全な治療をもたらすものと定義することができる。

【0087】

本発明で用いる化合物は、十分に血清安定性であり、即ち in vivo で、それらは所望の治療効果を発揮するのに十分長い期間、それらの同一性を保持する。

【0088】

いくつかの形態のストレスのシグナル伝達は、PI3K 様キナーゼファミリーの酵素（PIKK）に依存する。これらには、核酵素 ATM、ATR および DNA-PKcs、さらにはサイトゾル内の mTOR が含まれる。本発明者らのデータは、PIKK がサイトゾル内の高分子量ペプチダーゼであるトリペプチジル-ペプチダーゼ II（TPPII）の安定化に寄与することを裏付けた。さらに、TPPII は、PIKK の下流側経路のいくつか、例えば p53 安定化および in vivo で線照射耐性に必要のようである。いくつかの形態のストレスはユビキチン-プロテアソーム経路（UPP）の活性を抑制し、本発明者らの結果は、細胞のストレスの間、トリペプチジル-ペプチダーゼ II（TPPII、大きなサイトゾルペプチダーゼ）が UPP の抑制を引き起こしたことを示す。UPP 活性の低下は核内へのプロテアソーム複合体の移行と同時に起こり、プロテアソーム

40

50

の核移行は、P I 3 K 様キナーゼ (P I K K) の活性に依存した。プロテアソーム分解から T P P I I を保護するために P I K K 活性が必要とされ、T P P I I の発現または活性の抑制は、プロテアソームのストレス誘発性核局在化を阻止した。T P P I I 阻害剤は、さもなければ分解耐性のポリグルタミン基質のプロテアソーム性分解を促進した。本発明者らのデータは、T P P I I がプロテアソーム基質分解の抑制を媒介したこと、および、プロテアソーム複合体の再局在化は、細胞のストレスに応じての P I K K 活性化の結果であることを示唆する。このことから、神経変性疾患の処置における T P P I I 阻害剤の使用が導かれる。

【 0 0 8 9 】

さらに、本発明者らの結果は、T P P I I が、P I K K の活性に同じく依存する事象である飢餓に応じて、強く上方制御されることを示す。線照射への応答で見られるように、T P P I I は、飢餓に応じる p 5 3 の蓄積にとっても重要であった。p 5 3 はある虚血性疾患の病理の強い決定因子であり、それにより、虚血性疾患を処置するために、T P P I I の抑制を用いることができる。

【 0 0 9 0 】

本発明は、これから要約する添付図面に関して、下記のそれには限定されない実施例でさらに詳細に記載される。

[実施例]

【 0 0 9 1 】

用いた材料および方法は、以下の通りであった。

【 0 0 9 2 】

細胞および培養条件。E L - 4 は、C 5 7 B I / 6 マウス系統に由来する、ベンツピレンによって誘導されたリンパ腫細胞系統である。E L - 4 . w t および E L - 4 . T P P I I ⁱ は、p S U P E R ベクターでトランスフェクトされた E L - 4 細胞であり (B r u m m e l k a m p , T R , B e r n a r d s , R , A g a m i , R . A s y s t e m f o r s t a b l e e x p r e s s i o n o f s h o r t i n t e r f e r i n g R N A s i n m a m m a l i a n c e l l s . S c i e n c e 2 0 0 2 ; 2 9 6 : 5 5 0 ~ 3) 、空に対して T P P I I に対する s i R N A を含有する。H e L a 細胞は、ヒト子宮頸癌細胞である。ストレスを誘導するために、細胞を 5 0 % ~ 7 5 % リン酸緩衝食塩水 (P B S) 中で増殖させて飢えさせるか、2 5 0 ~ 2 0 0 0 ラドで線照射し、3 7 °C および 5 . 3 % C O ₂ でインキュベートした。本発明者らのフローサイトメトリーデータは、ヨウ化プロピジウム (P I) によるフローサイトメトリーゲーティングで判定した、生細胞を表す。安定したトランスフェクタントの生成のために、5 × 1 0 ⁶ 個の細胞を P B S で洗浄し、次に、B i o - R a d 遺伝子バルサー内の 5 0 0 μ l の P B S に再懸濁し、1 0 μ g の DNA と 9 6 0 μ F で 2 5 0 V でパルスし、G 4 1 8 に対する耐性によって選択した。U b G V 7 6 - G F P は、フローサイトメトリーを通して生細胞で 2 6 S プロテアソーム活性を監視するための迅速に分解する G F P 分子を形成する、ユビキチン融合構築物である (D a n t u m a , N . P . , L i n d s t e n , K . , G l a s , R . , J e l l n e , M . および M a s u c c i , M . G . 2 0 0 0 . S h o r t - l i v e d g r e e n f l u o r e s c e n t p r o t e i n s f o r q u a n t i f y i n g u b i q u i t i n / p r o t e a s o m e - d e p e n d e n t p r o t e o l y s i s i n l i v i n g c e l l s . N a t B i o t e c h n o l . 1 8 : 5 3 8 ~ 4 3) 。U b - R - G F P は、ユビキチン - プロテアソーム経路を通して分解される非常に不安定な G F P 分子もコードする、類似したベクターである。U b - R - G F P - Q 1 1 2 は同じ基質であるが、1 1 2 個のグルタミンを有する拡張 C 末端を有する (V e r h o e f , L . G . , L i n d s t e n , K . , M a s u c c i , M . G . および D a n t u m a , N . P . 2 0 0 2 . A g g r e g a t e f o r m a t i o n i n h i b i t s p r o t e a s o m a l d e g r a d a t i o n o f p o l y g l u t a m i n e p r o t e i n s . H u m M o l G e n e t . 1 1 : 2 6 8 9 ~ 7 0 0) 。

10

20

30

40

50

【0093】

酵素阻害剤。NLVSはキモトリプシンのペプチダーゼ活性を優先的に標的とするプロテアソーム阻害剤であって、生細胞でのプロテアソーム分解を効率的に抑制する。ブタビンゲイドは文献で記載される(Rose, C、Vargas, F、Facchinetti, P、Bourgeat, P、Bambal, RB、Bishop, PBら。Characterization and inhibition of a cholecystokinin-inactivating serine peptidase. Nature 1996; 380: 403~9)。Z-Gly-Leu-Ala-OH (Z-GLA-OH)は、TPPIIのそれと相同である活性部位を有する細菌酵素、サブチリシン(Bachem、Weil am Rhein、Germany)の阻害剤である。ワートマニン(Wortmannin)は、PIKK (PI3-キナーゼ関連)-ファミリーキナーゼ(Sigma、St. Louis、MO)の阻害剤である。すべての阻害剤はDMSOで溶解し、使用時まで-20 で保存した。

10

【0094】

タンパク質精製、ペプチダーゼアッセイおよびDNA断片の分析。100×10⁶個の細胞を沈殿させ、ガラスビーズおよびホモジナイゼーション緩衝液(50 mMトリス塩基 pH 7.5、250 mMショ糖、5 mM MgCl₂、1 mM DTT)中でボルテックスすることによって溶解した。細胞溶解物を分画遠心分離にかけ、そこでは、100,000×gで1時間の遠心分離からの上清(サイトゾル)を100,000×gの遠心分離に3~5時間かけ、高分子量サイトゾルタンパク質/タンパク質複合体を沈殿させた。生じたペレットを50 mMトリス塩基 pH 7.5、30%グリセロール、5 mM MgCl₂および1 mM DTTに溶解し、1 μgの高分子量タンパク質を、TPPII発現のためのペプチダーゼアッセイまたはウェスタンブロットの酵素として用いた。TPPIIの活性を試験するために、50 mMトリ塩基 pH 7.5、5 mM MgCl₂および1 mM DTTで構成される100 μlの試験緩衝液中で、基質AAF-AMC (Sigma、St. Louis、MO)を100 μMの濃度で用いた。切断活性は、LS50B Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer、Boston、MA)における、460 nmでの発光により測定した。DNA断片の分析のために、細胞を12穴プレートに10⁶細胞数/mlで播種し、アポトーシス誘導剤として通常用いられるDNAトポイソメラーゼII阻害剤である、25 μMのエトポシドに、飢餓(50% PBS)まで曝露させた。細胞を12穴プレートに10⁶細胞/mlで播種し、示した時間、通常18~24時間インキュベートした。EL-4対照および適応細胞からのDNAを標準のクロロホルム抽出によって精製し、アポトーシス細胞からDNAを検出するために、2.5 μgのDNAを1.8%アガロースゲルにロードした。

20

30

【0095】

抗体および抗血清。以下の分子を、指定した抗体によって検出した。GFPをウサギ抗GFP血清(Molecular Probes Europe、Breda、The Netherlands)により; 19Sプロテアソーム複合体を抗Rpt6 (19S塩基ATPアーゼサブユニット)により、20Sプロテアソーム複合体を(Affinity、Exeter、UK)により; TPPIIの検出のために、ニワトリ抗TPPII血清(Immunsystem、Uppsala、Sweden)を用いた。TPPIIのウェスタンブロット法のために完全細胞溶解物を用いた実験では、即ち分画をTPPIIについて濃縮しなかった場合、ストレスに曝露させなかった細胞で、TPPIIは検出限界未満であった。ウェスタンブロット法は、標準の技術によって実施した。タンパク質濃度は、BCAタンパク質検定用試薬(Pierce Chemical Co.)で測定した。特記されていない場合は、SDS/PAGEによる分離のために、レーンにつき5 μgのタンパク質をロードした。

40

【0096】

免疫組織化学。細胞を、サイトスピン(cytospin)を通してガラスカバースリップに付着させ、アセトン:メタノール(1:1)で1時間固定させ、次に、スライドを

50

B S S 緩衝液中で 1 時間再水和させた。第 1 の抗体を加え、B S S で短時間洗浄するまで 1 時間そのままにし、その後、二次コンジュゲート体（抗ウサギ F I T C ）を加えて 1 時間インキュベートした。次に、スライドを洗浄し、H o e s c h t 3 3 3 2 5 8 で 3 0 分間染色した。最後に、スライドに D A B C O マウント緩衝液をマウントし、分析まで 4 に保った。

【 0 0 9 7 】

フローサイトメトリー。蛍光は、F A C S c a l i b u r によって定量化した。生細胞のフローサイトメトリー細胞選別は、細胞と $2 \mu\text{g/ml}$ のヨウ化プロピジウム（P I ）との 5 分間のインキュベーション、ならびに、以降の F A C S v a n t a g e による P I ⁺ および P I ⁻ 集団への選別によって実施した。P I は、飢餓または 線照射によって細胞のストレスを誘導した実験で、死細胞を排除するためにも用いた。

10

【 0 0 9 8 】

略語リスト。A T M、突然変異毛細血管拡張性運動失調；B R C T、B R C A の C 末端リピート；N L V S、4 - ヒドロキシ - 5 - ヨード - 3 - ニトロフェニルアセチル - L e u - L e u - L e u - ビニルスルホン；P I、ヨウ化プロピジウム；P I K K、ホスホイノシチド - 3 - O H - キナーゼ関連キナーゼ；T P P I I、トリペプチジル - ペプチダーゼ I I；F A、3 - (2 - フリル) アクリロイル。

【 0 0 9 9 】

本明細書では、化学物質およびアミノ酸のために標準の略語を用いる。

20

【 0 1 0 0 】

略語	代替略語
A	アラニン
R	アルギニン
N	アスパラギン
D	アスパラギン酸
C	システイン
E	グルタミン酸
Q	グルタミン
G	グリシン
H	ヒスチジン
I	イソロイシン
L	ロイシン
K	リジン
M	メチオニン
F	フェニルアラニン
P	プロリン
S	セリン
T	スレオニン
W	トリプトファン
Y	チロシン
V	バリン

30

40

本発明は、いくつかの非天然 アミノ酸も利用する。

【 0 1 0 1 】

略語	側鎖
A b u	2 - アミノ酪酸
N v a	ノルバリン
N l e	ノルロイシン
t e r t -	ブチルアラニン
-	メチルロイシン
4 , 5 -	デヒドロ - ロイシン
	CH_2CH_3
	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
	$\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$
	$(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3)$
	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CH}_3$

50

	アロ - イソロイシン	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
	- メチルバリン	$(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)$
	tert - ブチルグリシン	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$
	2 - アリルグリシン	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
Orn	オルニチン	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Dab	, - ジアミノ酪酸	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
	4, 5 - デヒドロ - リジン	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{NH}_2$

【実施例 1】

【0102】

TPPII は、プロテアソーム基質分解のストレス誘発性抑制を媒介する。
細胞のストレスの間のプロテアソーム分解速度を試験するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) リポーター基質で安定してトランスフェクトされた、EL-4・Ub-R-GFP および HeLa・UbGV76-GFP 細胞を用いた (Dantuma, N. P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M. および Masucci, M. G. 2000. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. Nat Biotechnol. 18: 538~43)。これらの GFP ベースの基質は、N 末端が迅速にユビキチン化されてプロテアソームによって分解されるように修飾される。生細胞のフローサイトメトリー分析により、プロテアソーム阻害剤 NLVS で処理した EL-4・Ub-R-GFP および HeLa・UbGV76-GFP における GFP 蛍光の定常レベルの強い増加を観察した (図 1)。さらに、本発明者は EL-4・Ub-R-GFP および HeLa・UbGV76-GFP 細胞の飢餓ならびに 線照射への曝露は、GFP 蛍光の蓄積をもたらし、低濃度の NLVS で処理したときに観察されるレベルに到達することがわかった (図 1)。本発明者らのデータは、したがって、細胞のストレスの間、ユビキチン - プロテアソーム経路の活性が低下することを示唆する。

【実施例 2】

【0103】

大きなサイトゾルペプチダーゼ、トリペプチジル - ペプチダーゼ II (TPPII) は、PI3K 様キナーゼ (PIKK) のファミリーの活性化メンバーからのシグナルの伝達にとって重要であると考えられている。PIKK は飢餓および 線照射への応答にとって重要であるので、TPPII がユビキチン - プロテアソーム経路の阻害にとって重要か否か試験した。したがって、TPPII 発現の siRNA 媒介性抑制を得るために前に用いたベクター pSUPER-TPPIIⁱ で同時トランスフェクトした、EL-4・UbGV76-GFP 細胞を作製した。EL-4・UbGV76-GFP および EL-4・UbGV76-GFP/TPPIIⁱ 細胞 (TPPIIⁱ siRNA をコードするプラスミドで同時トランスフェクトした) の 線照射への曝露によって、GFP 蛍光の誘導は、少なくとも一部、TPPII の発現に依存することがわかった (図 2a)。さらに、EL-4・TPPIIⁱ 細胞は、EL-4・wt 細胞 (空の pSUPER ベクターを発現する、図 2b) と比較して、より高い濃度のプロテアソーム阻害剤の存在下で増殖する能力がかなり高かった。これは、TPPIIⁱ siRNA プラスミドで同時トランスフェクトした EL-4・UbGV76-GFP 細胞における、蛍光リポーター基質 UbGV76-GFP を分解する能力の増加と相関し (図 2c)、TPPII がプロテアソーム基質の分解を抑制することをさらに示唆する。

【0104】

TPPII がプロテアソーム基質分解を低減させるということをさらに実証するために、プロテアソームによる分解にしばしば抵抗する基質の分解を研究した。前に用いたものに類似するが、C 末端のポリグルタミンリピートを含むリポーター基質である、Ub-R-GFP-Q112 を用いた (Verhoeff, L. G., Lindsten, K., Masucci, M. G. および Dantuma, N. P. 2002. Aggrega

10

20

30

40

50

te formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. Hum Mol Genet. 11:2689~700)。そのようなポリグルタミン配列は、プロテアソームタンパク質分解を抑制し、細胞内封入体に集積し、神経変性疾患を引き起こす (Zoghbi, H. Y. および Orr, H. T. 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. Annu Rev Neurosci. 23:217~47) (Bence, N. F., Sampat, R. M. および Kopito, R. R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science 292:1552~5) (Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. および Goldberg, A. L. 2004. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. Mol Cell. 14:95~104)。本発明者らは安定して発現する EL-4 細胞が Ub-R-GFP-Q112 を効率的に分解することに失敗したこと、および、NLVS による処理は、EL-4 細胞で分解されない基質の蓄積をさらに増加させることを見出した (図 2d)。しかし、pSUPER-TPPIIⁱ siRNA プラスミドによる同時トランスフェクションは集積した Ub-R-GFP-Q112 基質の完全な除去を可能にし、それは、20S プロテアソームの触媒活性に依存した (図 2d)。さらに、TPPII の 2 つの異なる触媒性阻害剤ブタピンダイドおよび Z-Gly-Leu-Ala-OH (Z-GLA-OH) を用い、それらが、EL-4 細胞で R-GFP-Q112 基質の安定性に影響を及ぼすか否か調べた。Z-GLA-OH は、TPPII と触媒機構を共有する酵素である、その細菌同族体サブチリシンを標的とするように設計された阻害剤である (Tomkinson, B. 1999. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. Trends Biochem Sci. 24:355~9) (Bryan, P. N. 2000. Protein engineering of subtilisin. Biochim Biophys Acta. 1543:203~222)。EL-4. Ub-R-GFP-Q112 細胞を 100 μM ブタピンダイドまたは 25 μM の Z-GLA-OH で処理したとき、EL-4. Ub-R-GFP-Q112 基質の段階的減少が観察され、TPPII の活性がそれらの分解を抑制することが示唆された (図 2e)。ペプチダーゼ阻害剤によるこれらの *in vitro* 実験において、本発明者らの阻害剤の血清誘発不安定化を回避するために、無血清 AIM-V 培地を用いた (Reits, E. ら. 2004. A major role for TPP II in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. Immunity 20:495~506)。これらの観察から、本発明者らは TPP II が UPP のストレス誘発性抑制を媒介したと結論する。

【実施例 3】

【0105】

プロテアソーム複合体の飢餓誘発性核局在は、TPPII の発現および活性を必要とする。TPPII がプロテアソーム基質分解を制御した機構をさらに特徴付けるために、TPPII が 19S 調節プロテアソーム複合体の細胞下局在化を調節するか否か試験した。19S 塩基複合体の成分である Rpt6 ATPアーゼサブユニットに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。未処理の EL-4. wt および EL-4. TPP IIⁱ 細胞で、サイトゾルおよび核で均質の 19S プロテアソーム染色が明白であった (図 3a、b、上パネル)。さらに、飢餓 EL-4. wt 細胞は細胞量が減少し、特徴的に染色された核を有する Hoechst 33258 対照との比較から明白なように、核において Rpt6 の強い染色が検出可能であった (図 3a、下方パネル)。対照的に、TPPII 発

現が抑制された E L - 4 細胞、E L - 4 . T P P I I ⁱ は、飢餓の間、19S プロテアソームをそれらの核に局在化することに失敗したことを見出した (図 3 b、下方パネル)。細胞サイズの減少は、細胞のストレス感知と同時に起こり、類似したデータが線照射曝露の間に得られた。飢餓からの解放は、ほとんどの E L - 4 . w t および E L - 4 . T P P I I ⁱ 細胞の増殖を可能にし、これらの細胞がアポトーシス性でないことを示した (図 3 c)。

【0106】

さらに、対照のおよびストレス下にある E L - 4 . w t および E L - 4 . T P P I I ⁱ 細胞のサイトゾルを精製し、サイトゾルの高分子量分画を生化学的に分析した。ウェスタンブロット法による検出で、E L - 4 . w t および E L - 4 . T P P I I ⁱ 細胞のサイトゾルでプロテアソーム - 3 サブユニットの強い発現を本発明者らは見出した (図 3 d)。しかし、飢餓の後、E L - 4 . w t からサイトゾルではプロテアソームを生化学的に検出することは実質的にまったくできなかったが、サイトゾル - 3 サブユニットの類似した検出が E L - 4 . T P P I I ⁱ 細胞で検出された。

【実施例 4】

【0107】

プロテアソーム分布の T P P I I 依存性シフトは、H e L a 細胞 (ヒト子宮頸癌、図 4 a) の飢餓の後にも見られた。この過程における T P P I I の関与は、E L - 4 , H e L a 細胞でプロテアソームの核局在を抑制した T P P I I 特異阻害剤ブタビндаイドの使用によって支持された (図 4 a、b)。

【実施例 5】

【0108】

ストレス誘発性キナーゼは、プロテアソーム分布および T P P I I 発現を制御する。D N A 損傷に対する応答の間、T P P I I の発現は、P I K K ファミリーのメンバーによって制御される。P I K K シグナル伝達が飢餓に応じるプロテアソームの核局在のためにも必要とされるか否か試験するために、本発明者らの飢餓 E L - 4 細胞を、P I K K ファミリーキナーゼの阻害剤ワートマニンの 1 μ M で処理した。その処理はプロテアソーム複合体をサイトゾルに向け直したことから、E L - 4 細胞におけるプロテアソームのストレス誘発性移行は、1 μ M ワートマニンによって抑制されることがわかった (図 5 a、b)。さらに、1 μ M ワートマニンとのインキュベーションが 6 ~ 9 時間後にすべての検出可能な T P P I I タンパク質の分解を誘発したのに対して、プロテアソーム - 3 サブユニットの発現は同期間の間に一定に保たれたので、ストレス誘発性 T P P I I 発現も P I K K キナーゼ活性を必要とすることを本発明者らはさらに見出した (図 5 c)。しかし、N L V S でプロテアソームをブロックすることは、ワートマニン処理の間の急速な T P P I I 下方制御を阻止したことから、ストレスシグナル伝達が抑制されるとき T P P I I のプロテアソーム性分解が示唆された (図 5 c)。これらのデータは、T P P I I が、細胞の飢餓の間プロテアソームの核局在のために必要とされるストレスシグナルの P I K K 誘発性媒介物質であることを示唆する。

【0109】

本発明者らのデータは、細胞のストレスの間の P I K K によるシグナル伝達は、プロテアソーム基質分解を抑制することを示した。T P P I I の抑制は、i n v i t r o で安定してトランスフェクトされた細胞での、ポリグルタミン基質の分解を可能にする。したがって、本発明者らは、病原性の、疾患誘発性タンパク質の負荷を除去するために、神経変性疾患患者の、おそらく定期的な、処置を提案する。さらに、本発明者らの実験は、特にトリペプチド T P P I I 阻害剤が、この状況で分配すべき化合物であることを明らかにする。

【実施例 6】

【0110】

飢餓誘発性の p 5 3 蓄積および増殖停止における T P P I I の必要条件。T P P I I が飢餓に対する応答で重要であるか否か試験したが、その訳は、この種のストレスが P I K

10

20

30

40

50

Kによって制御され、虚血性疾患などの疾患発生病理に非常に重要であるからである。本発明者らはE L - 4細胞の増殖培養物中のT P P I Iの発現を試験し、4～5日間の増殖の後に高密度に到達した細胞培養は、細胞密度のピークに到達する間に、徐々に高いT P P I I発現を獲得したことを観察した(図6 aおよびb)。これらの細胞培養物へ新しい培地を添加すると、T P P I I発現の急速な下方制御が起きた(矢印で示す、図6 a)。これらのデータは、T P P I Iの発現が飢餓によって上方制御されることをさらに支持する。

【0111】

飢餓に対する応答における、T P P I Iの機能的役割を調査した。最大細胞密度に接近するE L - 4 . w t対照細胞の培養物で、³Hトリチウムの取り込みによって検出されたDNA合成の下方制御を観察したが、これは、E L - 4 . T P P I Iⁱ細胞では観察されなかった(図6 c)。これらのデータと同調して、本発明者らは飢餓E L - 4 . T P P I Iⁱ細胞で、E L - 4 . w t細胞と比較して減少したp 5 3の蓄積を認める(図6 d)。飢餓に瀕するE L - 4 . w tおよびE L - 4 . T P P I Iⁱ細胞での増殖停止の存在をさらに試験するために、2～5日間飢餓を生き延びた生細胞(即ちP I^{n e g}細胞)のフローサイトメトリ選別を実施し、新鮮培地でのそれらの増殖を測定した。2日後、これらの細胞の約50%はP I^{n e g}であったが、飢餓の5日後には3～5%だけがP I^{n e g}であった。飢餓させたP I^{n e g} E L - 4 . w t細胞の培養は、増殖が再開するまでにかなりの遅れがあることがわかり、このことは、飢餓を5日間生き延びたE L - 4 . w t細胞のマイナー分画の間で特に明らかであった(図6 e)。対照的に、5日間の飢餓を生き延びたE L - 4 . T P P I Iⁱ細胞は、ほとんど直後に急速な増殖を再開した。それにより、P I K Kによって制御される数種類のストレスへの応答は、T P P I Iを必要とする。飢餓細胞で観察されたT P P I Iの強い発現は、明らかに細胞周期停止およびp 5 3の蓄積に寄与した。

【0112】

脳卒中の動物マウスモデルは、p 5 3 - / - 動物でニューロン死の大きな低下を示す(Yonekura I、Takai K、Asai A、Kawahara N、Kirino T. p 5 3 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2006、26:1332～40)。本発明者らのデータは、T P P I Iの抑制は、いくつかの形態のストレス、例えば飢餓に応じる、p 5 3の蓄積を減少させることを示す。したがって、本発明者らは、虚血性疾患の処置のための標的として、T P P I Iを提案する。例えば、トリペプチドT P P I I阻害剤は、例えば急性の全身病の患者へ注射により投与し、虚血組織でのp 5 3の蓄積を減少させ、それによって組織生存を延長させることができる。十分な時間が提供される場合、血流の副行路が形成され、p 5 3蓄積の抑制は、したがって、例えば脳卒中の間の、梗塞のサイズを低減させることができる。

【実施例7】

【0113】

重要なことに、本発明者らは、p 5 3の蓄積がT P P I I活性に依存することを示した(図7 a)。さらに、Z - G L A - O H処理がT P P I I発現の大きな減少をもたらすことを発見し(図7 b)、どのように活性部位のプロッキングが、ほとんどの場合、分子の発現を妨げるためにs i R N Aを用いたときに観察されるものに類似した結果を与えるのかについての理論的根拠を提供する。

【実施例8】

【0114】

ジ - ペプチド、トリ - ペプチドおよび誘導体のi n v i t r o試験。

【0115】

表1は、任意であるが相対的である蛍光定量的ユニットにおける、A A F - A M C (H - A l a - A l a - 7 - アミド - 4 - メチルクマリン)のいくつかの濃度の化合物による

切断の抑制に関する *in vitro* データを含む。試験した大部分の化合物で、多少の有益効果が見られる。

【0116】

T P P I I タンパク質を濃縮し、次に、T P P I I に好ましい蛍光原基質 A A F - A M C を用いた。 100×10^6 個の細胞を沈殿させ、ガラスビーズおよびホモジナイゼーション緩衝液 (50 mM トリス塩基 pH 7.5、250 mM ショ糖、5 mM $MgCl_2$ 、1 mM D T T) 中でボルテックスすることによって溶解した。細胞溶解物を、分画遠心分離にかけた。最初に、細胞のホモジネートを 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、次に、上清を超遠心管へ移した。次に、試料を 100,000 × g で 1 時間超遠心分離し、上清 (ほとんどの生化学文献ではサイトゾルと表される) を 100,000 × g で 5 時間遠心分離すると、高分子量サイトゾルタンパク質 / タンパク質複合体が沈殿した。生じたペレットを 50 mM トリス塩基 pH 7.5、30% グリセロール、5 mM $MgCl_2$ および 1 mM D T T に溶解し、1 μg の高分子量タンパク質をペプチダーゼアッセイの酵素として用いた。

10

【0117】

T P P I I の活性を試験するために、本発明者らは 50 mM トリス塩基 pH 7.5、5 mM $MgCl_2$ および 1 mM D T T で構成される 100 μl の試験緩衝液中で、基質および A A F - A M C (Sigma、St. Louis、MO) を 100 μM の濃度で用いた。反応を停止するために、900 μl の 1% SDS 溶液で希釈した。切断活性は、LS 50 B Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer、Boston、MA) における、460 nm での発光により測定した。

20

【0118】

F A = 3 - (2 - フリル) アクリロイル ; P B S = リン酸緩衝食塩水。各化合物名の最初のテキスト (Z、F A、H、その他) は、N 末端の置換基である ; H は、N 末端が遊離の NH_2 であることを示す。各化合物名の終わりのテキスト (O H、N B u、その他) は、C 末端の置換基である ; O H は、C 末端が遊離の CO_2H であることを示す。

【0119】

【表 1 - 1】

化合物	100 uM	10 uM	1 uM	100 nM	10 nM	1 nM	0
Z-GL-OH	23,14	23,60	24,18	34,6	34,07	44,53	49,55
(比較)	24,99	24,72	24,4	33,02	33,85	44,21	49,82
	23,69	24,59	24,29	34,6	34,38	43,62	49,51
平均	23,94	24,30	24,29	34,07	34,1	44,12	49,63
Z-GLG-OH	14,44	17,49	23,79	31,49	34,4	43,42	48,58
	15,02	17,58	24,85	28,64	34,16	44,02	49,03
	15,8	17,44	24,63	26,13	34,27	43,73	49,2
平均	15,09	17,50	24,42	28,75	34,28	43,72	48,94
Z-GGA-OH	15,5	16,65	21,37	24,27	36,01	43,42	51,19
	15,27	17,27	22,14	31,54	36,59	43,87	48,44
	15,78	17,18	22,62	31,61	36,73	44,14	48,48
平均	15,52	17,03	22,04	29,14	36,44	43,81	49,37
FA-GLA-OH	6,34	14,35	19,99	23,33	31,19	43,18	49,96
	4,05	8,14	16,21	23,87	33,88	43,49	48,4
	4,69	9,44	14,78	24,09	33,9	43,68	49,43
平均	5,03	10,64	16,99	23,76	32,99	43,45	49,26
H-APA-OH	13,55	14,35	23,94	24,26	28,85	44,05	48,84
	8,46	14,64	24,49	24,48	29,39	41,76	49,32
	7,65	14,91	25,04	28,44	29,44	43,84	49,16
平均	9,89	14,63	24,49	25,73	29,23	43,22	49,11
H-GLA-OH	8,37	12,4	15,53	17,58	22,67	36,63	48,16
	7,42	12,53	19,03	17,94	23,33	38,42	49,91
	7,12	14,66	18,34	17,53	22,93	39,4	48,18
平均	7,64	13,20	17,63	17,68	22,98	38,15	48,75
Bn-GLA-OH	12,92	17,74	21,14	23,01	33,30	43,67	48,53
	11,17	14,86	21,54	22,71	33,45	42,91	47,02
	9,65	13,38	22,01	22,90	33,40	41,17	49,55
平均	11,25	15,33	21,56	22,87	33,38	42,58	48,37

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

化合物	100 uM	10 uM	1 uM	100 nM	10 nM	1 nM	0
Z-GKA-OH	8,17	12,48	14,49	21,62	23,57	42,13	49,82
	9,44	14,52	16,43	21,98	23,95	42,02	49
	9,44	14,82	15,03	21,52	24,36	42,51	47,7
平均	9,02	13,94	15,32	21,71	23,96	42,22	48,84
Z-GLA-Nbu	11,16	13,06	23,89	32,24	34,06	38,14	47,34
	13,86	14,73	23,71	32,41	33,89	38,31	47
	14,05	14,34	24,13	32,63	34,85	36,63	48
平均	13,02	14,04	23,91	32,43	34,27	37,69	47,45
Z-GLA-OH	1,14	6,47	11,43	14,43	21,74	32,54	49
	1,44	7,66	11,9	14,26	21,93	32,61	49,4
	1,55	7,49	11,46	14,37	24,44	33,41	49,5
平均	1,38	7,21	11,60	14,35	22,70	32,85	49,30

10

【0121】

20

GPG-NH₂ および Z-GPG-NH₂ を含めて、他の化合物も上の *in vitro* 試験で高い能力を発揮した。

【図面の簡単な説明】

【0122】

30

【図1】細胞のストレスの間のプロテアソーム基質分解の抑制。(a~h) 示すように、線照射、飢餓またはプロテアソーム阻害剤による処理に曝露させた EL-4、UbGV76-GFP 細胞 (a~d) および HeLa、UbGV76-GFP 細胞 (e~h) の、フローサイトメトリーによって定量化された GFP 蛍光。線照射した細胞は 1000 ラドに曝露させ、3~4 日間 *in vitro* でインキュベートした。飢餓細胞は、5~7 日間培地を補充することなく、高密度の標準 *in vitro* 培養で増殖させた。死細胞は、ヨウ化プロピジウム (PI) によるゲーティングで排除した。

40

【図2】ユビキチン-プロテアソーム経路のストレス誘発性抑制は、TPPII に依存する。(a) 線照射への曝露から 1~4 日後の EL-4、UbGV76-GFP (左) および EL-4、UbGV76-GFP/TPPIIⁱ 細胞の平均蛍光強度。(b) 0、5 または 25 μM の NLVS の存在下での EL-4、wt および EL-4、TPPIIⁱ 細胞の *in vitro* 細胞増殖。(c) 0、2、4、6、8 または 10 μM の NLVS で一晩処理した EL-4、UbGV76-GFP (空の円) および EL-4、UbGV76-GFP/TPPIIⁱ 細胞 (塗りつぶされた円) の、フローサイトメトリーによって定量化した平均蛍光強度 (MFI)。(d) 未処理のまたは NLVS の示した濃度で処理した、安定してトランスフェクトした EL-4 対 EL-4、TPPIIⁱ 細胞における Ub-R-GFP-Q112 の発現。(e) 最高 72 時間、ブタビンダイドまたは TPPII 阻害剤 Z-GLA-OH で処理した、安定してトランスフェクトした EL-4 細胞における Ub-R-GFP-Q112 の発現。

50

【図3】細胞のストレスの間のプロテアソームの核局在は、TPPII に依存する。(a、b) 抗 Rpt6 (19S 塩基サブユニット) による染色で検出した、EL-4、wt (a) 対 EL-4、TPPIIⁱ (b) における 19S プロテアソームの局在を示し、未処理 (上パネル) 対 飢餓 (下パネル) 細胞を比較した。スケールバー = 5 μm。(c) 示した時間 飢餓にさらした、EL-4、wt (上) 対 EL-4、TPPIIⁱ 細胞 (下) の *in vitro* 増殖。(d) 飢餓にさらしたか、未処理の EL-4、wt および EL-4、TPPIIⁱ 細胞からのサイトゾル分画の、抗 TPPII および抗プロテアソーム

50

3 によるウェスタンブロット法。

【図4】TPPIIの抑制は、ストレスの間のプロテアソームの核局在を阻止する。(a) 未処理(上)、飢餓にさらした(中央)または飢餓および100 μ M ブタビンダイド(Butabindide)にさらした(下)HEL細胞内の19Sプロテアソームの局在。スケールバー=5 μ m。(b) Rpt6染色で検出した、100 μ M ブタビンダイドの存在下での、飢餓EL-4細胞内の19Sプロテアソームの局在。

【図5】PIKKファミリーキナーゼ活性は、TPPII発現およびプロテアソームの核局在を制御する。(a、b)1 μ M ワートマニン(PIKKファミリーキナーゼの阻害剤)の存在下または非存在下で飢餓にさらし、抗Rpt6(19Sプロテアソーム、a)または抗-3(20Sプロテアソーム、b)について染色したEL-4細胞の、免疫組織化学的分析。スケールバー=5 μ m。(c)1 μ M ワートマニンで0、3、6、9および16時間処理した飢餓EL-4細胞における、抗TPPIIおよび抗プロテアソーム-3についてのウェスタンブロット法。

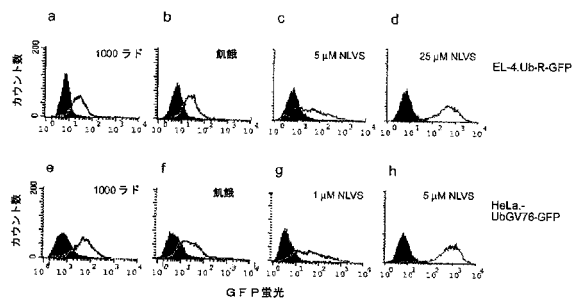
【図6】飢餓誘発性細胞周期停止は、TPPIIの発現を必要とする。(a)1日目に10⁵細胞/mlで播種し、細胞培養培地を交換せずに8日間培養したEL-4.wt対照細胞に由来する細胞溶解物の、抗TPPIIによるウェスタンブロット法。矢印は、新しい細胞培養培地の添加を示す。(b、c)EL-4.wtおよびEL-4.TPPIIⁱ細胞のin vitro培養の間の生細胞(b)およびDNA合成(c)。(d)60% PBS中で0、1または30時間飢餓にさらしたEL-4.wt対照対EL-4.TPPIIⁱ細胞におけるp53の発現。(e)2日間または5日間の飢餓培地での培養後に正常な組織培養培地で生育中の、生きているEL-4.wt(空のバー)およびEL-4.TPPIIⁱ細胞(塗りつぶしたバー)。

【図7】TPPII阻害剤は、TPPIIタンパク質の発現およびp53の安定化を阻止する。(a)実験開始の2時間前から100 μ M ブタビンダイドで処理した、または未処理の線照射(500ラド)EL-4.wt細胞での、p53のウェスタンブロット分析。(b)25 μ MのZ-GLA-OHで処理した、または未処理の線照射(500ラド)EL-4.wt対照細胞での、TPPIIのウェスタンブロット分析。

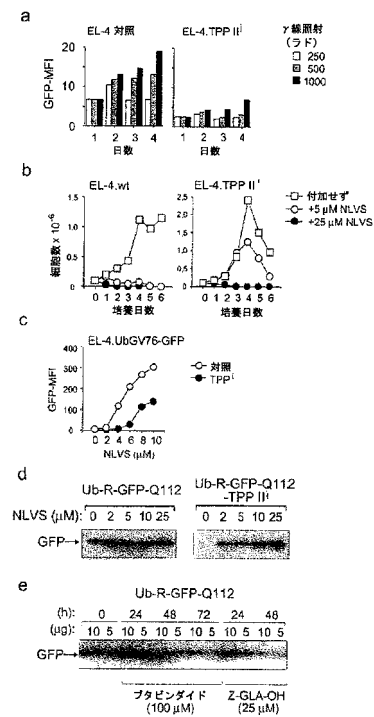
10

20

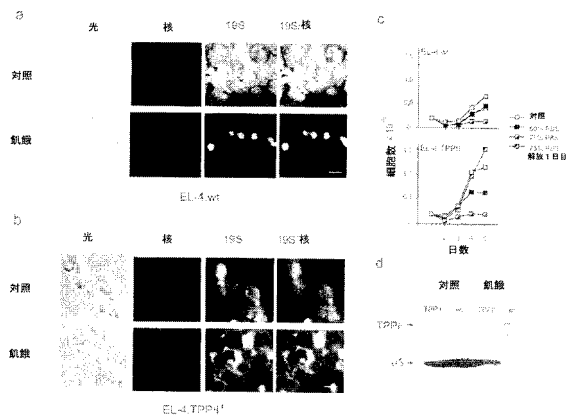
【図 1】



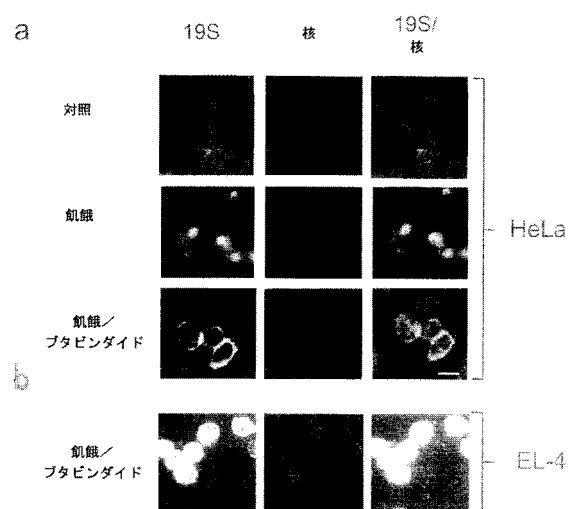
【図 2】



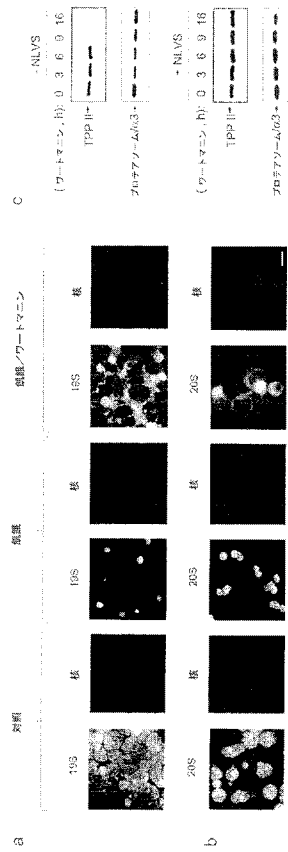
【図 3】



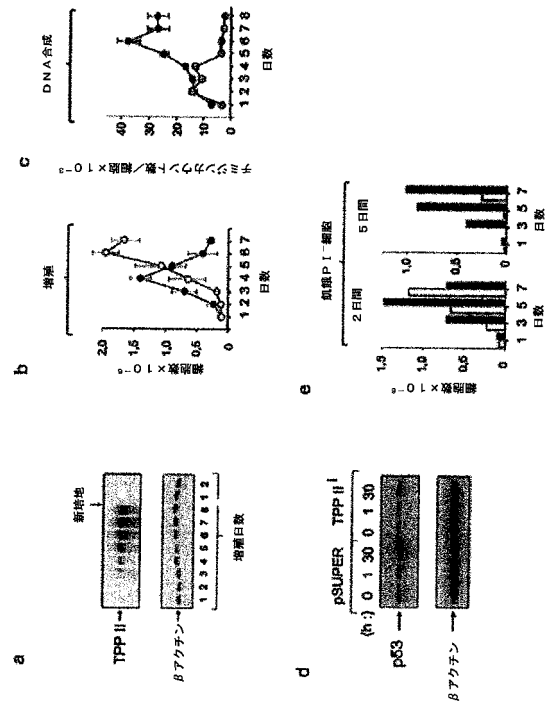
【図 4】



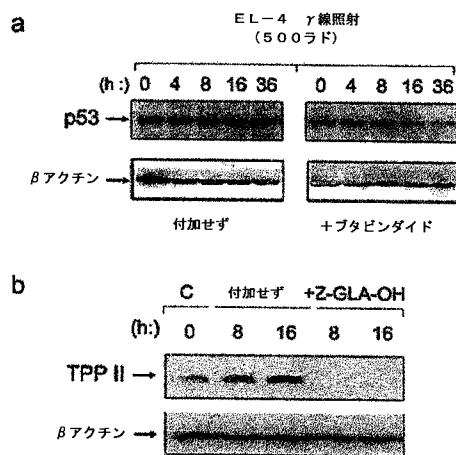
【図5】



【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/050364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K38/06	A61P25/00	A61P9/00
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 practical, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRIS ET AL: "Synthesis of proline-modified analogues of the neuroprotective agent glycyl-L-prolyl-glutamic acid (GPE)" TETRAHEDRON, vol. 61, 2005, pages 10018-10035, XP005060675 * See GPE and uses (the Introduction, second paragraph) *	1-4,7, 10-17, 19-26, 33, 35-48, 54,56,58
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 September 2007		20/09/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016		Authorized officer Korsner, Sven-Erik

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2007/050364

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 02/062830 A (TELL PHARM AG) 15 August 2002 (2002-08-15) * See page 4 (compounds) and page 9 (Alzheimer's) *	1-5, 12-17, 19-27, 32, 34-36, 39-46, 54, 55, 57-59
X	US 5 627 035 A (VAHLNE ET AL) 6 May 1997 (1997-05-06) * See Gly-Pro-Gly *	54-58
X	PASTOROVA ET AL: "Prevention of thrombus formation with glyprolines on various models of prethrombotic state and thrombosis in rats" BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 136, 2003, pages 319-322, XP002448777 * See Pro-Gly-Pro *	54, 55, 57, 58
X	GANELLIN ET AL: "Inhibitors of tripeptidyl peptidase II. 2. Generation of the first novel lead inhibitor of cholecystokinin-8-inactivating peptidase: A strategy for the design of peptidase inhibitors" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 43, 2000, pages 664-674, XP002389454 cited in the application * See Table 5; examples of peptides that fall under the claims *	54-59
A	WO 2005/073397 A (BAYER HEALTHCARE AG) 11 August 2005 (2005-08-11) * See pages 39-42 *	1-59
A	LEI LU: "Alterations in activity and specificity of intracellular proteolysis in disease pathogenesis" THESIS FROM THE DEPARTMENT OF MEDICINE, CENTER FOR INFECTIOUS MEDICINE, KAROLINSKA INSTITUTET, STOCKHOLM, SWEDEN (WITHOUT APPENDIX), 2005, pages 1-28, XP002389626 Retrieved from the Internet: URL: http://diss.kib.ki.se/2005/91-7140-397-3/thesis.pdf [retrieved on 2006-07-10] * See pages 10-11, 15-19 (TPP II); presumed availability in 2005 -> see cover page *	1-59
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/050364

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TOMKINSON ET AL: "Tripeptidyl-peptidase II: A multi-purpose peptidase" THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY, vol. 37, 2005, pages 1933-1937, XP005042269 * See pages 1935-7 (Sections 4 and 5) *</p>	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/050364**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although Claims 39-43 refer to methods of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/050364

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02062830	A	15-08-2002	DE 10105039 A1 EP 1358204 A1 JP 2004531480 T	08-08-2002 05-11-2003 14-10-2004
US 5627035	A	06-05-1997	NONE	
WO 2005073397	A	11-08-2005	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/16 (2006.01)		A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 25/14 (2006.01)		A 6 1 P 25/14		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z	

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

F ターム (参考) 2G045 AA40 BB50 BB51 DA20 FA11 FB12
 4C084 AA02 AA17 BA14 BA15 BA23 CA59 NA14 ZA012 ZA022 ZA162
 ZC202
 4H045 AA30 BA12 BA50 BA51 EA21 EA23 FA51