

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7511564号
(P7511564)

(45)発行日 令和6年7月5日(2024.7.5)

(24)登録日 令和6年6月27日(2024.6.27)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	31/404 (2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04

請求項の数 13 (全76頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-538362(P2021-538362)	(73)特許権者	515158308 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8 , スタンフォード, メイン クワッド ピー . オー . ボックス 2 0 3 8 6 , オフィス オブ ザ セネラル カウンセル ビルディング 1 7 0 , サード フロア
(86)(22)出願日	令和1年12月31日(2019.12.31)	(74)代理人	110000338 弁理士法人 HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(65)公表番号	特表2022-516537(P2022-516537 A)	(72)発明者	ムーア, テレザ
(43)公表日	令和4年2月28日(2022.2.28)		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/069145		
(87)国際公開番号	WO2020/142547		
(87)国際公開日	令和2年7月9日(2020.7.9)		
審査請求日	令和4年12月21日(2022.12.21)		
(31)優先権主張番号	62/786,970		
(32)優先日	平成30年12月31日(2018.12.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

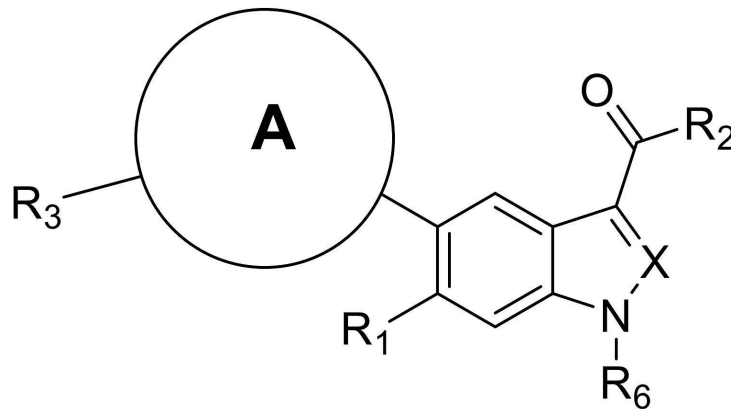
(54)【発明の名称】 ミトコンドリア機能不全を治療する方法及び配合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式の分子：

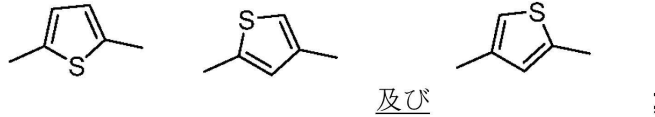
【化1】



式中：

A は、以下：

【化2】



から選択され、

Xは、 CR_5 であり、

R_1 は、八口であり、

R_2 は、 OR_5 、 $NHOH$ 、または $NHSO_2R_4$ であるか、または COR_2 がCで結合したテトラゾールとなり、

R_3 は、 C_{1-10} アルキル、 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{4-12} アルキルシクロアルキル、 C_{4-10} シクロアルキルアルキル、 C_{3-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{4-12} アルキルヘテロシクロアルキル、 C_{4-10} ヘテロシクロアルキルアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、これらは無置換であるか、または八口、OH、及び $OCOR_7$ から選択される1~3つの置換基で置換されており、

R_4 は、 C_{1-10} アルキルであり、

R_5 は、Hであり、

R_6 は、Hであり、ならびに

R_7 は、 C_{1-10} アルキル、 C_{3-7} シクロアルキル、または C_{4-12} アルキルシクロアルキルである、

の、AMPKアゴニスト。

【請求項2】

XはCHである、請求項1に記載のAMPKアゴニスト。

【請求項3】

R_1 はC1である、請求項1または2に記載のAMPKアゴニスト。

【請求項4】

R_2 はOHである、請求項1~3の何れか1項に記載のAMPKアゴニスト。

【請求項5】

R_1 はC1であり、及び R_2 はOHである、請求項1に記載のAMPKアゴニスト。

【請求項6】

前記AMPKアゴニストは、以下：

10

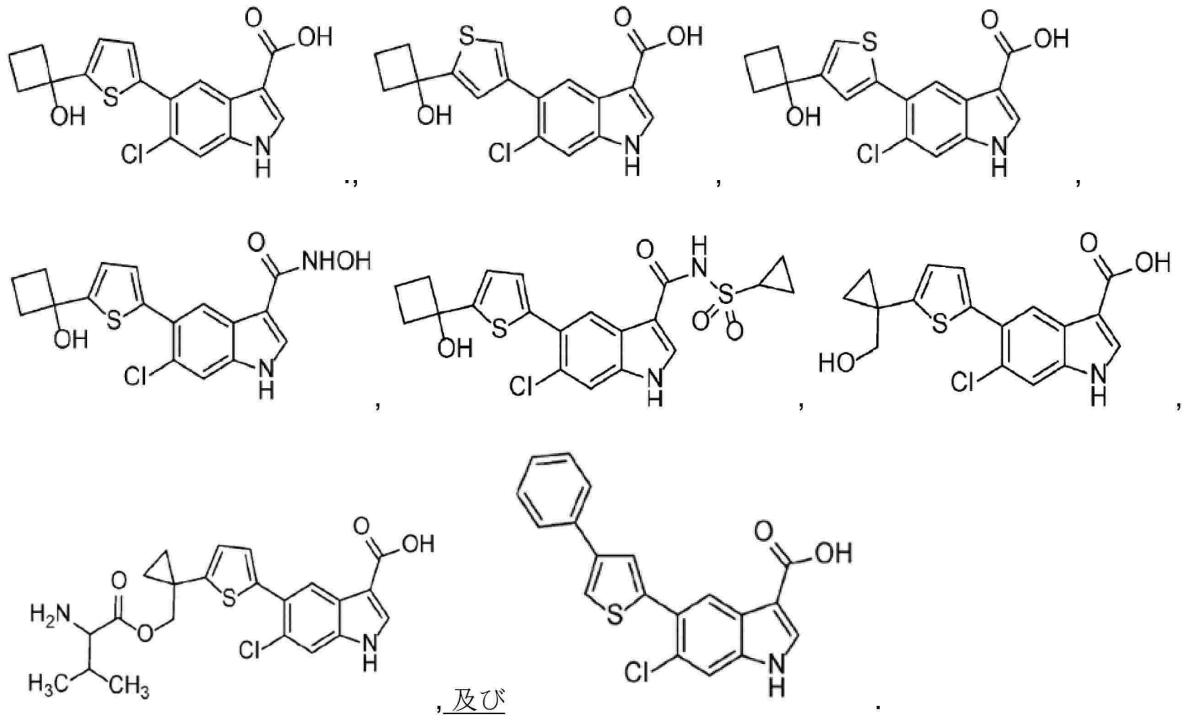
20

30

40

50

【化 3】

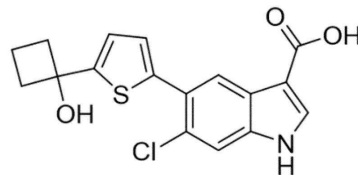


から選択される、請求項 1 に記載の AMPK アゴニスト。

【請求項 7】

前記 AMPK アゴニストは、以下の式を有する、請求項 1 に記載の AMPK アゴニスト。

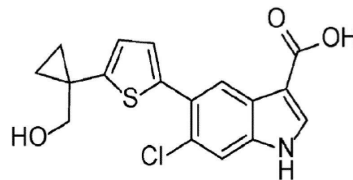
【化 4】



【請求項 8】

前記 AMPK アゴニストは、以下の式を有する、請求項 1 に記載の AMPK アゴニスト。

【化 5】



【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の AMPK アゴニストと、結合剤、潤滑剤、緩衝剤、及び被覆剤からなる群のうち少なくとも 1 種と、を含む、医薬配合物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の AMPK アゴニストを含む、ミトコンドリア機能不全の治療用の医薬配合物。

【請求項 11】

前記ミトコンドリア機能不全は、常染色体優性視神経萎縮症 (ADOA)、アルパーズ・フッテンロッハー症候群 (nDNA 欠陥)、運動失調性ニューロパチー症候群、(nDNA 欠陥)、バース症候群 / 致死性乳児心筋症 (LIC)、補酵素 Q 欠損症、複合体 I、複合体 II、複合体 III、複合体 IV、及び複合体 V 欠損症 (単一の欠損症または任意

50

の欠損症の組み合わせのいずれか)、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)、真性糖尿病及び聴覚消失、カーズ・セイヤー症候群(mtDNA欠陥)、脳幹及び脊髄の障害と高乳酸を伴う白質脳症(LBSL-白質ジストロフィー)、リー症候群(mtDNA欠陥及びnDNA欠陥)、レーベル遺伝性視神経症(LHON)、ルフト病、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群(MELAS)(mtDNA欠陥)、ミトコンドリアエノイルCoAレダクターゼタンパク質関連神経変性(MEPAN)、赤色ぼろ線維・ミオクロオヌステんかん症候群(MERRF)、ミトコンドリア劣性運動失調症候群(MIRAS)、mtDNA欠失症候群、mtDNA枯渇症候群、mtDNA維持障害、mtDNA/RNA翻訳欠陥、ミトコンドリアtRNA合成酵素欠損症、ミトコンドリア筋症、ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症症候群(MNGIE)、神経原性筋力低下・運動失調・網膜色素変性症(NARP)、ピアソン症候群、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症(PDCD/PDH)、DNAポリメラーゼガンマ欠損症(POLG)、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症、及びチミジンキナーゼ2欠損症(TK2)からなる群より選択される原発性ミトコンドリア機能不全である、請求項10に記載の医薬配合物。

10

【請求項12】

前記ミトコンドリア機能不全は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病(AD)及び他の認知症、フリードライヒ運動失調(FA)、ハンチントン病(HD)、運動ニューロン疾患(MND)、N-グリカナーゼ欠損症(NGLY1)、有機酸代謝異常症、パーキンソン病(PD)及びPD関連障害、プリオン病、脊髄性筋萎縮症(SMA)、脊髄小脳失調症(SCA)、ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、シャルコー・マリー・トゥース病、先天性ミオパチー、遠位型ミオパチー、内分泌性ミオパチー(甲状腺機能亢進性ミオパチー、甲状腺機能低下性ミオパチー)、巨大軸索ニューロパチー、遺伝性痙攣性対麻痺、炎症性ミオパチー(皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎)、代謝性ミオパチー、神経筋接合部疾患、自閉症、がん、糖尿病、代謝症候群、慢性疲労症候群、炎症性障害、関節炎、ならびに加齢からなる群より選択される続発性ミトコンドリア機能不全である、請求項10に記載の医薬配合物。

20

【請求項13】

請求項1~8の何れか1項に記載のAMPKアゴニストを含む、加齢黄斑変性症の治療用の医薬配合物。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本出願は、2018年12月31日出願の、Mooreらの米国仮出願第62/786,970号、名称「Methods and Formulations to Treat Mitochondrial Dysfunction」の優先権を主張する。この開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、原発性及び続発性ミトコンドリア機能不全を治療するための治療法及び医薬配合物に関する。

40

【0003】

〔背景技術〕

過去に研究されてきた医薬品候補は、従来型のAMP依存性AMPKアクチベータであり、これらの作用機序は、RC阻害(例えば、メトホルミン、レスベラトロール)によるかAMP模倣物への変換により(例えば、AICAR)引き起こされるAMPの上昇を必要とする。RC阻害が関与する間接的機構は、ミトコンドリア機能不全が原因となっている症例には適切ではなく、またAMPKのAMP依存性活性化は、他のAMP制御型酵素の活性化をもたらし、そのため多面的効果を構成する。さらに、先行研究により、糖尿病

50

、肥満、及び代謝症候群を治療する目的で、直接型AMP非依存性AMPKアゴニストが同定されている。

【0004】

原発性ミトコンドリア病は、通常、進行性、多システム性、及び小児で高い死亡率を伴う、臨床的には異種の障害群である。原発性ミトコンドリア病は、ミトコンドリア呼吸鎖(RC)に遺伝性欠損があることにより引き起こされ、それにより活性酸素種及び活性窒素種(ROS及びRNS)の発生の増加ならびに総合的なエネルギー産生の欠乏がもたらされる。その結果生じる代謝の不均衡は、細胞の損傷を招き、最終的には細胞死を招く。

【0005】

現在、原発性ミトコンドリア病の根治的治療は存在しない。支持療法のみが利用可能であるが、そのような支持療法は、特定症候(例えば、糖尿病、心疾患、及び下垂)の治療に関するものであり、ビタミン補因子及び抗酸化剤からなる「ミトコンドリアカクテル」を使用する。残念ながら、メタ解析から、利用可能な支持的治療介入には有効性が欠けていることが示されており、新規治療の必要性が強調される。(例えば、Pfeffer et al, Cochrane Database Sys Rev, 2012 Apr 18; 4; Chinnery et al, 2006, Cochrane Database Sys Rev, 2006 Jan 25; (1)を参照、これらの開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される)。

10

【0006】

続発性ミトコンドリア病も、ミトコンドリア機能不全を示すものであるが、原発性ミトコンドリア病とは異なり、ミトコンドリア呼吸鎖に関する遺伝子により引き起こされるのではない。続発性ミトコンドリア病、例えば、パーキンソン病またはアルツハイマー病などは、ミトコンドリアに間接的に損傷を与える他の疾患、症状、または環境要因により引き起こされる後天性ミトコンドリア異常によるものである。それゆえ、原発性ミトコンドリア病用と認識される治療はどれも、神経変性、神経筋、及び筋肉消耗性障害をはじめとする続発性ミトコンドリア機能不全に関連する障害及び症状にも効果をもたらすことが予想される。

20

【0007】

〔発明の概要〕

本発明の実施形態に従ってミトコンドリア機能不全を治療する方法及び配合物が、開示される。

30

【0008】

1つの実施形態において、ミトコンドリア機能不全である患者の治療法は、個体のミトコンドリア機能不全を同定すること、及びその個体にAMPKアゴニストを提供することを含む。

【0009】

別の実施形態において、ミトコンドリア機能不全は、原発性ミトコンドリア機能不全である。

【0010】

さらなる実施形態において、原発性ミトコンドリア機能不全は、常染色体優性視神経萎縮症(ADOA)、アルパーズ・フッテンロッハー症候群(Alpers-Huttenlocher syndrome、nDNA欠陥)、運動失調性ニューロパチー症候群、(nDNA欠陥)、パース症候群/致死性乳児心筋症(LIC)、補酵素Q欠損症、複合体I、複合体II、複合体III、複合体IV、及び複合体V欠損症(単一の欠損症または任意の欠損症の組み合わせのいずれか)、慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)、真性糖尿病及び聴覚消失、カーズ・セイヤー症候群(mtDNA欠陥)、脳幹及び脊髄の障害と高乳酸を伴う白質脳症(LBSL-白質ジストロフィー)、リー症候群(mtDNA欠陥及びnDNA欠陥)、レーベル遺伝性視神経症(LHON)、ルフト病、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群(MELAS)(mtDNA欠陥)、ミトコンドリアエノイルCoAレダクターゼタンパク質関連神経変性(Mitochon

40

50

drial Enoyl CoA Reductase Protein - Associated Neurodegeneration、MEPAN)、赤色ぼろ線維・ミオクローヌステんかん症候群(MERRF)、ミトコンドリア劣性運動失調症候群(MIRAS)、mtDNA欠失症候群、mtDNA枯渇症候群、mtDNA維持障害、mtDNA/RNA翻訳欠陥、ミトコンドリアtRNA合成酵素欠損症、ミトコンドリア筋症、ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症症候群(MNGIE)、神経原性筋力低下・運動失調・網膜色素変性症(Neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa、NARP)、ピアソン症候群、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症(PDCD/PDH)、DNAポリメラーゼガンマ欠損症(POLG)、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症、及びチミジンキナーゼ2欠損症(TK2)からなる群より選択される。

10

【0011】

なおさらなる実施形態において、ミトコンドリア機能不全は、続発性ミトコンドリア機能不全である。

【0012】

さらに別の実施形態において、続発性ミトコンドリア機能不全は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病(AD)及び他の認知症、フリードライヒ運動失調(FA)、ハンチントン病(HD)、運動ニューロン疾患(MND)、N-グリカナーゼ欠損症(NGLY1)、有機酸代謝異常症、パーキンソン病(PD)及びPD関連障害、プリオン病、脊髄性筋萎縮症(SMA)、脊髄小脳失調症(SCA)、ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、エメリ・ドレフュス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、シャルコー・マリー・トゥース病、先天性ミオパチー、遠位型ミオパチー、内分泌性ミオパチー(甲状腺機能亢進性ミオパチー、甲状腺機能低下性ミオパチー)、巨大軸索ニューロパチー、遺伝性痙性対麻痺、炎症性ミオパチー(皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎)、代謝性ミオパチー、神経筋接合部疾患、自閉症、がん、糖尿病、代謝症候群、慢性疲労症候群、炎症性障害、関節炎、及び加齢からなる群より選択される。

20

【0013】

さらに別の実施形態において、AMPKアゴニストは、直接型AMPKアゴニストである。

30

【0014】

またさらなる実施形態において、直接型AMPKアゴニストは、PT1、ETC-1002、サリチル酸化合物、C991、C13、D561-0775、MT63-78、A-769662、ZLN024、C24、MK-8722、PF-739、及びPF-06409577からなる群より選択される。

【0015】

また別の実施形態において、AMPKアゴニストは、AMP依存性アゴニストである。

【0016】

さらに追加の実施形態において、AMP依存性アゴニストは、メトホルミン、レスベラトロール、及びAICARからなる群より選択される。

40

【0017】

別の追加の実施形態において、AMPKアゴニストは、医薬配合物に含まれて提供される。

【0018】

なおさらなる実施形態において、医薬配合物は、AMPKアゴニストと、結合剤、潤滑剤、緩衝剤、及び被覆剤からなる群のうち少なくとも1種とを含む。

【0019】

なおさらなる別の実施形態において、提供する工程は、個体に、AMPKアゴニストを経口投与することを含む。

50

【0020】

またなおさらなる実施形態において、提供する工程は、少なくとも1週間、毎日AMPKアゴニストを投与することを含む。

【0021】

またさらに別の実施形態において、本方法は、さらに、個体におけるAMPKアゴニストの有効性を評価することを含む。

【0022】

なおさらなる追加の実施形態において、提供する工程は、経口投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、経皮投与、及び吸入からなる群のうち少なくとも1種により、AMPKアゴニストを投与することにより達成される。

10

【0023】

さらに別の追加の実施形態において、ミトコンドリア機能障害の治療法は、個体における障害を同定すること、及び個体においてAMPK活性を調節することを含む。

【0024】

またなおさらなる実施形態において、調節する工程は、個体においてAMPKを活性化することにより達成される。

【0025】

またさらに別の実施形態において、活性化する工程は、AMPKをリン酸化することにより、またはAMPKに対するアゴニストを提供することにより達成される。

【0026】

なおさらに追加の実施形態において、調節する工程は、個体においてAMPKを阻害することにより達成される。

20

【0027】

さらに別の追加の実施形態において、障害は、ミトコンドリア機能不全に関連している。

【0028】

またさらに追加の実施形態において、ミトコンドリア機能不全は、原発性ミトコンドリア機能不全である。

【0029】

また別の追加の実施形態において、ミトコンドリア機能不全は、続発性ミトコンドリア機能不全である。

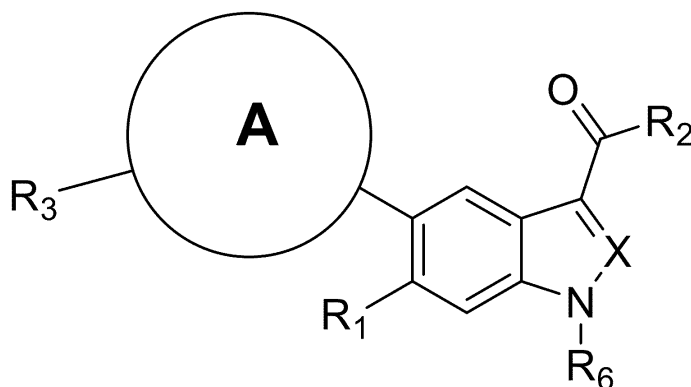
30

【0030】

またなおさらなる実施形態において、AMPKアゴニストは、以下の式の分子を含み、

【0031】

【化1】



40

【0032】

式中：

Aは、五員複素環から選択され、無置換であるか、1つまたは複数のC₁₋₆アルキルもしくはフルオロ置換基で置換されているかのいずれかであり、

Xは、CR₅またはNであり、

50

R₁は、H、CF₃、またはハロゲンであり、

R₂は、OR₅、NHOH、NH₂SO₂R₄、OCH₂OCOR₄であるか、またはCO
R₂がCで結合したテトラゾールとなり、

R₃は、C₁-10アルキル、C₃-7シクロアルキル、C₄-12アルキルシクロアルキル、C₄-10シクロアルキルアルキル、C₃-7ヘテロシクロアルキル、C₄-12アルキルヘテロシクロアルキル、C₄-10ヘテロシクロアルキルアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、これらは無置換であるか、またはハロゲン、OH、及びOCOR₇から選択される1~3つの置換基で置換されており、

R₄は、C₁-10アルキル、C₃-7シクロアルキル、C₄-12アルキルシクロアルキル、C₄-10シクロアルキルアルキルであり、これらは無置換であるか、または1~3つのハロゲン置換基で置換されており、

R₅は、R₄またはHであり、

R₆は、H、C₁-6アルキル、C₃-6シクロアルキルであるか、または2つのR₆基が、それらの結合した窒素原子と一緒に、四員~七員のヘテロシクロアルキル環を形成することができ、これらは全て、任意選択で、1~3個のフッ素原子で置換可能であり、ならびに

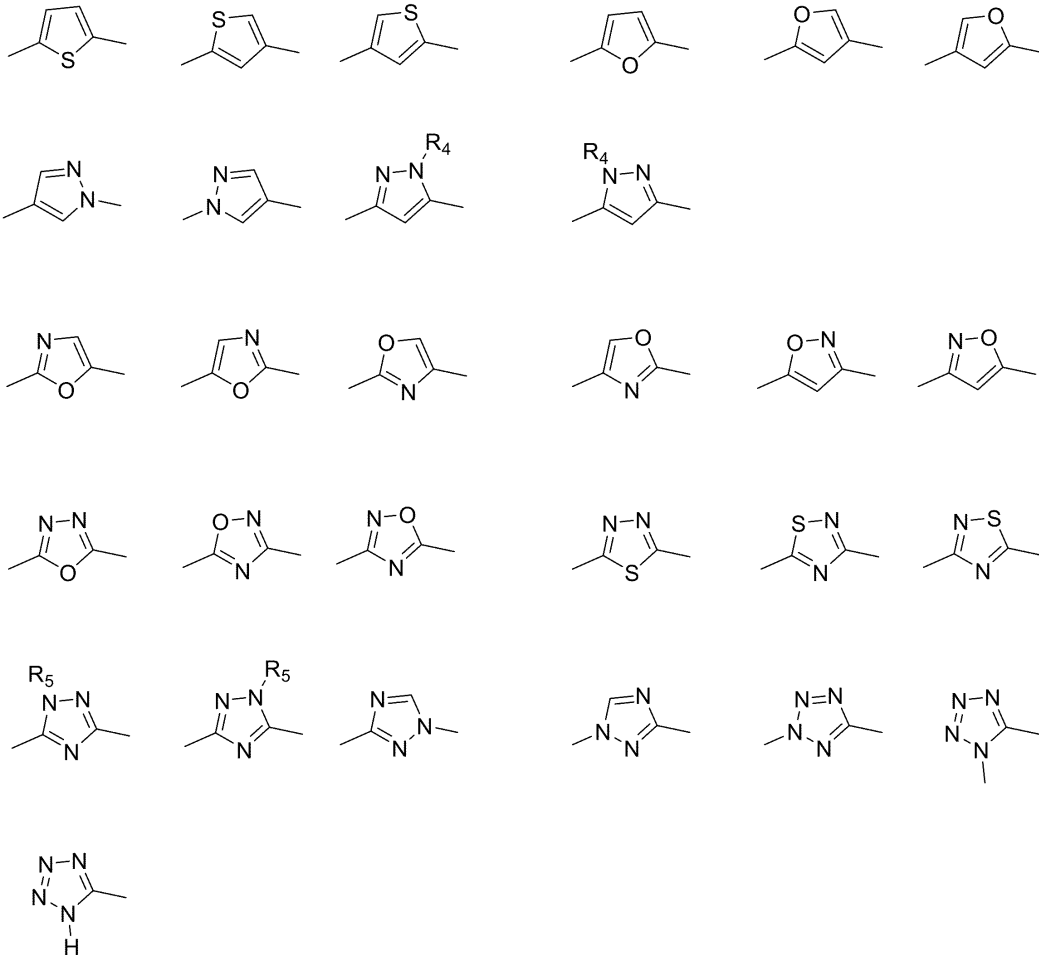
R₇は、C₁-10アルキル、C₃-7シクロアルキル、C₄-12アルキルシクロアルキルであり、これらは無置換であるか、またはフルオロ、C₁-10アルキル、及びNR₆、R₆から選択される1~3つの置換基で置換されている。

【0033】

またさらに別の実施形態において、Aは、以下からなる群より選択される。

【0034】

【化2】



【0035】

10

20

30

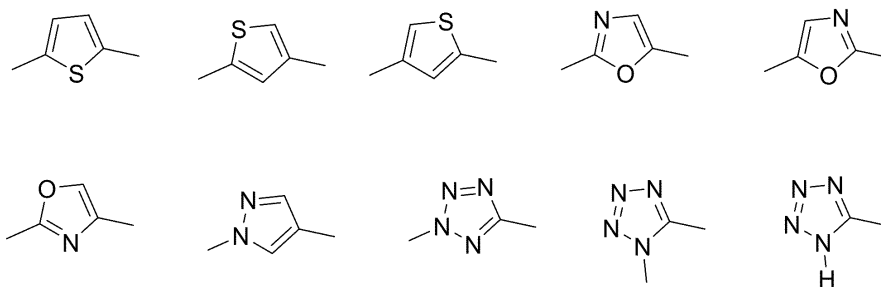
40

50

なおさらに追加の実施形態において、Aは、以下からなる群より選択される。

【0036】

【化3】



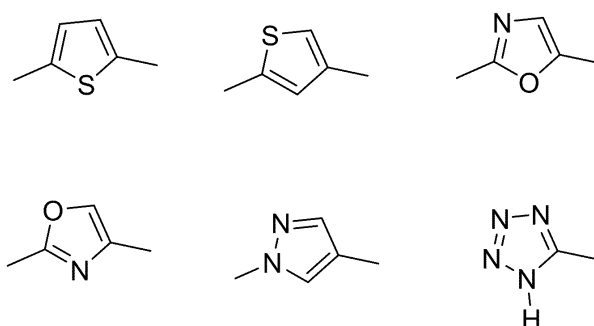
10

【0037】

なおさらに別の追加の実施形態において、Aは、以下からなる群より選択される。

【0038】

【化4】



20

【0039】

またなおさらに追加の実施形態において、XはCHであり、R₆はHであり、R₁はC₁であり、及びR₂はOHである。

【0040】

またさらに別の追加の実施形態において、分子は、図13A～図13Z及び図14A～図14Oのうち1つに示されるとおりの式を有する。

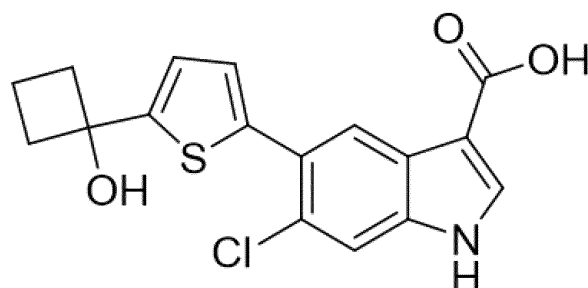
30

【0041】

またなおさらに別の追加の実施形態において、分子は、以下の式を有する。

【0042】

【化5】



40

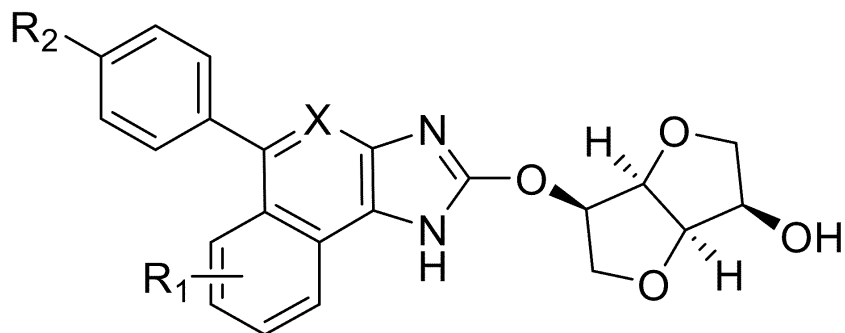
【0043】

またなおさらに別の追加の実施形態において、AMPKアゴニストは、以下の式の子を含み：

【0044】

50

【化6】



10

【0045】

式中：

Xは、CHまたはNであり、

R₁は、低級アルキル(C₁-C₄)またはハロゲン(例えば、Cl、Br、もしくはF)であり、

R₂は、フェニル、アルキル(C₁-C₁₀)、シクロアルキル(C₃-C₁₀)、ヒドロキシアルキル(C₁-C₆)、複素芳香族(例えば、ピリジル、ピラゾリル、ピロリル、ピリミジル、チオフェニル、フラニル、もしくはトリアゾール)、または複素環C₄-C₆であり、

20

ただし、フェニルは、任意選択で、ハロゲン(例えば、Cl、Br、もしくはF)で置換され、

ただし、アルキルは、直鎖または分岐鎖であり、任意選択で、OH、OMe、OEtで置換され、

ただし、シクロアルキルは、任意選択で、1つまたは複数のOHで置換され、

ただし、ヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素芳香族は、任意選択で、低級アルキル(C₁-C₆)またはヒドロキシアルキル(C₁-C₆)で置換され、これらアルキル及びヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素環中のヘテロ原子は、任意選択で、O、S、またはNR₄であり、このR₄は、直鎖または分岐鎖のC₁-C₆アルキルまたはヒドロキシアルキルであり、ならびにR₄は、直鎖または分岐鎖のC₁-C₆アルキルまたはヒドロキシアルキルである。

30

【0046】

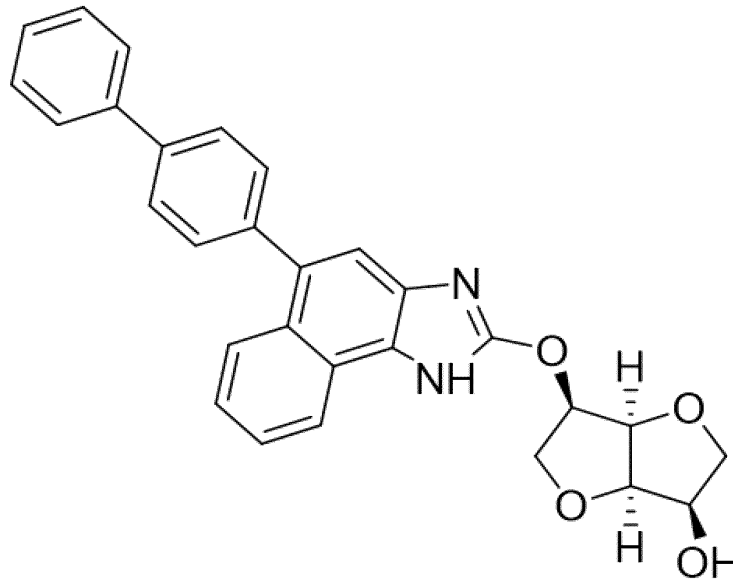
別のさらなる実施形態において、分子は、以下の式を有する。

【0047】

40

50

【化7】



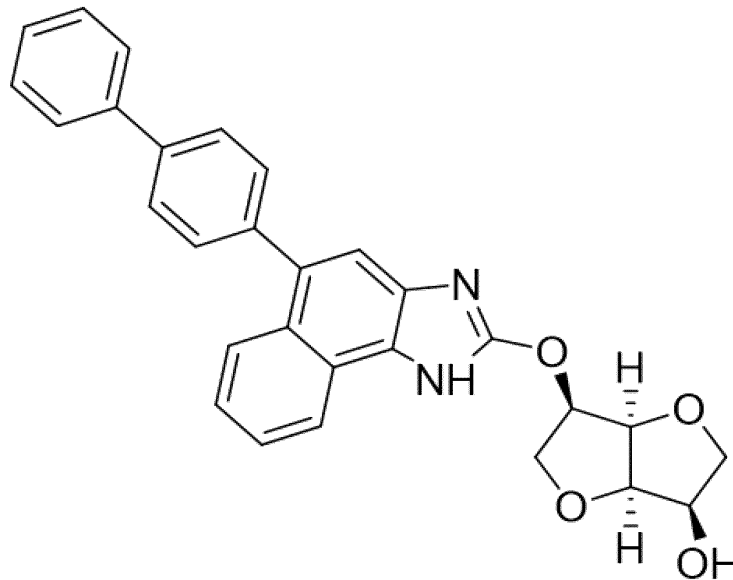
10

【0048】

なお別のさらなる実施形態において、AMPKアゴニストは、以下の式の分子を含み：

【0049】

【化8】



20

30

【0050】

式中：

Aは、縮合環（例えば、C3 - C10シクロアルキル）であり、

Xは、CHまたはNであり、

Yは、O、S、NH、NR₃であり、

R₁は、低級アルキル（C1 - C4）またはハロゲン（例えば、Cl、Br、もしくはF）であり、

R₂は、フェニル、アルキルC1 - C10、シクロアルキル（C3 - C10）、ヒドロキシアルキル（C1 - C6）、複素芳香族（例えば、ピリジル、ピラゾリル、ピロリル、ピリミジル、チオフェニル、フラニル、もしくはトリアゾール）、または複素環C4 - C6であり、

ただし、フェニルは、任意選択で、ハロゲン（例えば、Cl、Br、またはF）で置換され、

40

50

ただし、アルキルは、直鎖または分岐鎖であり、任意選択で、OH、OMe、OEtで置換され、

ただし、シクロアルキルは、任意選択で、1つまたは複数のOHで置換され、

ただし、ヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素芳香族は、任意選択で、低級アルキル(C1 - C6)またはヒドロキシアルキル(C1 - C6)で置換され、これらアルキル及びヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素環中のヘテロ原子は、任意選択で、O、S、またはNR₄であり、R₃は、C1 - C6アルキル(直鎖または分岐鎖)であり、ならびにR₄は、直鎖または分岐鎖のC1 - C6アルキルまたはヒドロキシアルキルである。

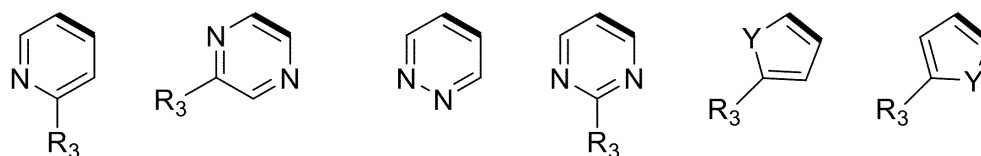
10

【0051】

なお別のさらなる実施形態において、Aは、C6フェニル環または以下の式のいずれか1種から選択される。

【0052】

【化9】



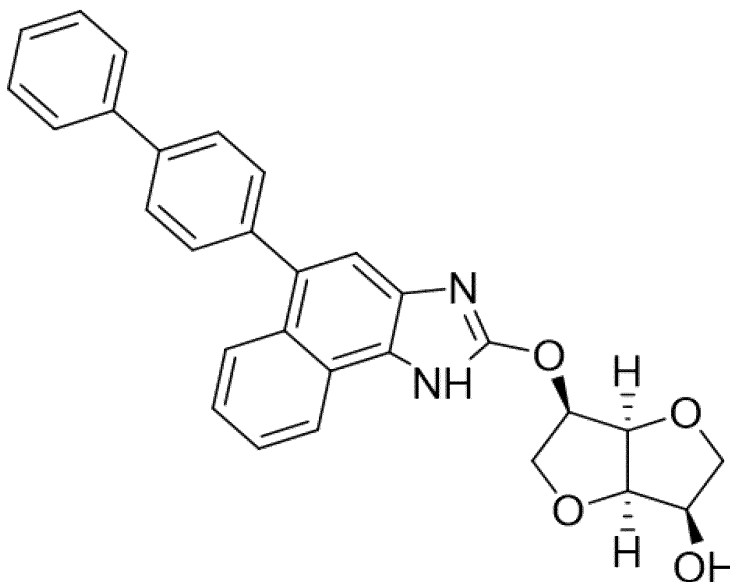
20

【0053】

また別のさらなる実施形態において、分子は以下の式を有する。

【0054】

【化10】



30

【0055】

本発明のこれら及び他の特長及び利点は、以下の詳細な説明を参照し、添付の図面と合わせて検討した場合により深く理解されるだろう。図中：

〔図面の簡単な説明〕

<図1A> 様々な実施形態に従いAMPKにより活性化及び阻害される経路を示す。

【0056】

<図1B> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0057】

<図1C> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0058】

50

- < 図 1 D > 様々な実施形態に従う AMPK アゴニストの構造を示す。
【 0 0 5 9 】
- < 図 2 A > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 0 】
- < 図 2 B > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 1 】
- < 図 2 C > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 2 】
- < 図 2 D > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 3 】
- < 図 2 E > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 4 】
- < 図 2 F > 様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。
【 0 0 6 5 】
- < 図 3 A > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 6 6 】
- < 図 3 B > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 6 7 】
- < 図 3 C > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 6 8 】
- < 図 3 D > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 6 9 】
- < 図 3 E > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 0 】
- < 図 3 F > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 1 】
- < 図 3 G > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 2 】
- < 図 3 H > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 3 】
- < 図 3 I > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 4 】
- < 図 3 J > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 5 】
- < 図 3 K > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 6 】
- < 図 3 L > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 7 】
- < 図 3 M > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 8 】
- < 図 3 N > 様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。
【 0 0 7 9 】
- < 図 4 A > 様々な実施形態に従って、ノックダウンアッセイにおける p AMPK 濃度を
示す。
【 0 0 8 0 】
- < 図 4 B > 様々な実施形態に従う様々な処理下でのノックダウン試験における細胞生存
度の結果を示す。
【 0 0 8 1 】
- < 図 4 C > 様々な実施形態に従う様々な処理下でのノックダウン試験における細胞形態
の結果を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

< 図 4 D > 様々な実施形態に従う様々な処理下でのノックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【 0 0 8 3 】

< 図 4 E > 様々な実施形態に従う様々な処理下でのノックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【 0 0 8 4 】

< 図 4 F > 様々な実施形態に従う様々な処理下でのノックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【 0 0 8 5 】

< 図 5 A > 様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の p A M P K 濃度を示す。

【 0 0 8 6 】

< 図 5 B > 様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。

【 0 0 8 7 】

< 図 5 C > 様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。

【 0 0 8 8 】

< 図 5 D > 様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。

【 0 0 8 9 】

< 図 6 A > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 0 】

< 図 6 B > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 1 】

< 図 6 C > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 2 】

< 図 6 D > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 3 】

< 図 6 E > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 4 】

< 図 6 F > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 5 】

< 図 6 G > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 6 】

< 図 6 H > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。

【 0 0 9 7 】

< 図 7 A > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。

【 0 0 9 8 】

< 図 7 B > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。

【 0 0 9 9 】

< 図 7 C > 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。

10

20

30

40

50

【0100】

<図7D> 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種(ROS)濃度を示す。

【0101】

<図7E> 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種(ROS)濃度を示す。

【0102】

<図7F> 様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種(ROS)濃度を示す。

【0103】

<図8A> は、様々な実施形態に従って、対照及びNGLY1欠損線維芽細胞株でのリポフスチンレベルを示す。

10

【0104】

<図8B> は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでのNGLY1欠損線維芽細胞株でのリポフスチンレベルを示す。

【0105】

<図9A> は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導AMDモデルでの網膜の眼底検査画像を示す。

【0106】

<図9B> は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導AMDモデルでの網膜の網膜切片画像を示す。

20

【0107】

<図9C> は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導AMDモデルでの網膜のONL厚さ測定を示す。

【0108】

<図9D> は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導AMDモデルでの網膜の網膜電図検査画像を示す。

【0109】

<図9E> は、様々な実施形態に従いAMPKアゴニストを用いた処理後の網膜分解の減少を示す。

30

【0110】

<図10A> は、様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織のパーセントを示す。

【0111】

<図10B> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織を含む脳切片を示す。

【0112】

<図10C> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織を含む脳切片を示す。

【0113】

<図11A> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

40

【0114】

<図11B> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

【0115】

<図11C> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

【0116】

<図11D> 様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおけるミトコンド

50

リア機能及びグリコーゲン貯蔵を示す。

【0117】

<図11E>様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおけるミトコンドリア機能及びグリコーゲン貯蔵を示す。

【0118】

<図11F>様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスで行われたACCリン酸化アッセイの結果を示す。

【0119】

<図11G>様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスで行われたACCリン酸化アッセイの結果を示す。

10

【0120】

<図12A>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの一般構造を示す。

【0121】

<図12B>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの合成法のスキームを示す。

【0122】

<図12C>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの合成法のスキームを示す。

【0123】

<図12D>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの合成法のスキームを示す。

【0124】

<図13A>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

20

【0125】

<図13B>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0126】

<図13C>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0127】

<図13D>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0128】

<図13E>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0129】

<図13F>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

30

【0130】

<図13G>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0131】

<図13H>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0132】

<図13I>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0133】

<図13J>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0134】

<図13K>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

40

【0135】

<図13L>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0136】

<図13M>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0137】

<図13N>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0138】

<図13O>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0139】

<図13P>様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

50

- 【 0 1 4 0 】
 < 図 1 3 Q > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 1 】
 < 図 1 3 R > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 2 】
 < 図 1 3 S > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 3 】
 < 図 1 3 T > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 4 】
 < 図 1 3 U > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。 10
- 【 0 1 4 5 】
 < 図 1 3 V > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 6 】
 < 図 1 3 W > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 7 】
 < 図 1 3 X > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 8 】
 < 図 1 3 Y > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 4 9 】
 < 図 1 3 Z > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。 20
- 【 0 1 5 0 】
 < 図 1 4 A > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 1 】
 < 図 1 4 B > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 2 】
 < 図 1 4 C > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 3 】
 < 図 1 4 D > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 4 】
 < 図 1 4 E > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。 30
- 【 0 1 5 5 】
 < 図 1 4 F > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 6 】
 < 図 1 4 G > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 7 】
 < 図 1 4 H > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 8 】
 < 図 1 4 I > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 5 9 】
 < 図 1 4 J > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。 40
- 【 0 1 6 0 】
 < 図 1 4 K > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 6 1 】
 < 図 1 4 L > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 6 2 】
 < 図 1 4 M > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 6 3 】
 < 図 1 4 N > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。
- 【 0 1 6 4 】
 < 図 1 4 O > 様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。 50

【0165】

<図15A> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの一般構造を示す。

【0166】

<図15B> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの一般構造を示す。

【0167】

<図15C> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの合成法のスキームを示す。

【0168】

<図15D> 様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【0169】

<図16A> 様々な実施形態に従って、ミトコンドリア欠損細胞で行われたACCリン酸化アッセイの結果を示す。

10

【0170】

<図16B> 様々な実施形態に従って、EC50を特定するのに使用されたAMPKアゴニストのAMPK活性を示す。

【0171】

<図17> 様々な実施形態に従う、個体の治療法を示す。

【0172】

<図18> 様々な実施形態に従う、個体のAMPK活性の調節法を示す。

【0173】

〔発明を実施するための形態〕

20

ここでデータ及び説明に基づき、ミトコンドリア機能障害、疾患、及び/または機能不全を治療するように構成された、治療法及び医薬配合物を記載する。様々な実施形態において、これらの方法及び配合物は、AMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)のアゴニストを使用する。AMPKは、細胞エネルギー恒常性の主要レギュレータであり、エネルギー欠乏中に活性化されて、アデノシン三リン酸(ATP)レベルを回復させる。一般に、AMPKは、ATP産生経路(例えば、解糖、ミトコンドリア新生)を活性化し、及びATP消費経路(例えば、糖新生及び脂肪酸合成)を阻害することにより、エネルギー恒常性を回復させる。AMPKが促進するさらなる経路または過程として、抗酸化酵素、オートファジー、脂肪酸代謝、及び筋再生が挙げられる。図1は、AMPKが活性化または阻害する様々な経路を示す。グルコース及び脂肪酸経路がAMPKにより調節されることから、AMPKは、糖尿病、肥満、及び代謝症候群の治療標的として魅力的なものとなっており、これを目的とするAMPKアゴニストが同定されてきた。

30

【0174】

間接型AMPKアゴニストの欠陥に対抗するため、ある特定の実施形態は、ミトコンドリア機能不全が原因である障害及び症状を治療するための直接型、AMP非依存性AMPKアゴニストに関する。直接型AMPK活性化化合物として、PT1、ETC-1002、サリチル酸化合物、C991、C13、D561-0775、MT63-78、A-769662、ZLN024、C24、MK-8722(図1B)、PF-739(図1C)、及びPF-06409577(図1D)が挙げられるが、これらは、アルファまたはベータサブユニットいずれかに直接結合することにより、アロステリックにAMPKを活性化する。これらは、場合によっては、*in vivo*で脂質及びグルコースプロファイルを改善することが示された。(例えば、Cool et al, Cell Metab. 2006 Jun; 3(6): 403-16; Pang et al, J Biol Chem. 2008 Jun 6; 283(23): 16051-60; Hawley et al, Science. 2012 May 18; 336(6083): 918-22; Li et al, Toxicol Appl Pharmacol. 2013 Dec 1; 273(2): 325-34; Zhang et al, PLoS One. 2013 Aug 20; 8(8); Xiao et al, Nat Commun. 2013; 4: 3017; Zadra et al, EMBO Mol Med. 2014 Apr; 6(4): 519-38; Hunter et al, Chem

40

50

Biol. 2014 Jul 17; 21(7): 866-79; Pinkosky et al, Nat Commun. 2016 Nov 28; 7: 13457; Cameron et al, 2016 Sep 8; 59(17): 8068-81; Myers et al, Science. 2017 Aug 4; 357(6350): 507-511; Cokorinos et al, Cell Metab. 2017 May 2; 25(5): 1147-1159; Xi et al, Oncotarget. 2017 Nov 10; 8(56): 96089-96102を参照、これらの開示はそのまま全体が本明細書中参照として援用される。)

様々な実施形態の直接型AMPKアゴニストを用いた治療は、細胞呼吸を増加及びATPレベルを上昇させるとともに、酸化ストレスを減少させ、その結果、原発性及び続発性ミトコンドリア病の両方で、続発性ミトコンドリア機能不全に関連した広範囲にわたる障害及び症状も含めて、それらの患者由来の細胞の生存度に一貫して効果的な改善をもたらす。原発性及び続発性ミトコンドリア機能不全に関連した疾患及び障害を、それぞれ、表1及び表2に示す。また、直接型AMPKアゴニストは、加齢黄斑変性症(AMD)の網膜変性に対する保護、虚血性脳卒中の神経保護を提供し、及び運動能力を向上させるのに十分である。さらに、直接型AMPKアゴニストは、原発性及び続発性ミトコンドリア機能障害の両方でミトコンドリア機能不全に関連した既知の負の効果、例えば、網膜損傷、ニューロン変性、及び筋消耗を軽減する。そのため、ある特定の実施形態は、N-グリカナーゼ(NGLY1)欠損症、加齢黄斑変性症(AMD)、虚血性脳卒中、筋ジストロフィー(例えば、デュシェンヌ型及びベッカー型)、フリードライヒ運動失調症(FA)、筋肉が関与する自己免疫障害(例えば、封入体筋炎、多発性筋炎、及び皮膚筋炎)、及び/または神経変性疾患(例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、及びアルツハイマー病)の治療に関する。また、心臓組織でのAMPK活性化は、可逆的心肥大をもたらす可能性があり、したがって、様々な実施形態が、拡張型心筋症に関連した疾患の治療に関する。(例えば、Arad et al, Circ Res. 2007 Mar 2; 100(4): 474-88; Myers et al, Science. 2017 Aug 4; 357(6350): 507-511を参照、これらの開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。)

【0175】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 : 原発性ミトコンドリア機能不全に関連した疾患及び障害	
常染色体優性視神経萎縮症 (ADOA)	
アルパーズ・フッテンロッハー症候群 (nDNA欠陥)	
運動失調性ニューロパチー症候群 (nDNA欠陥)	
バース症候群/致死性乳児心筋症 (LIC)	
補酵素Q欠損症	
複合体I、複合体II、複合体III、複合体IV、及び複合体V欠損症 (単一の欠損または任意の欠損組み合わせいずれか)	10
慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO)	
真性糖尿病及び聴覚消失	
カーンズ・セイヤー症候群 (mtDNA欠陥)	
脳幹及び脊髄の障害と高乳酸を伴う白質脳症 (LBSL-白質ジストロフィー)	
リー症候群 (mtDNA欠陥及びnDNA欠陥)	
レーベル遺伝性視神経症 (LHON)	
ルフト病	
ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (MELAS) (mtDNA欠陥)	20
ミトコンドリアエノイルCoAレダクターゼタンパク質関連神経変性 (MEPAN)	
赤色ぼろ線維・ミオクロームスてんかん症候群 (MERRF)	
ミトコンドリア劣性運動失調症候群 (MIRAS)	
mtDNA欠失症候群	
mtDNA枯渇症候群	
mtDNA維持障害	
mtDNA/RNA翻訳欠陥	
ミトコンドリアtRNA合成酵素欠損症	30
ミトコンドリア筋症	
ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症症候群 (MNGIE)	
神経原性筋力低下・運動失調・網膜色素変性症 (NARP)	
ピアソン症候群	
ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症 (PDCC/PDH)	
DNAポリメラーゼガンマ欠損症 (POLG)	
ビルビン酸カルボキシラーゼ欠損症	
チミジンキナーゼ2欠損症 (TK2)	40

【0176】

【表 2】

表 2 : 続発性ミトコンドリア機能不全に関連した疾患及び障害		
神経変性性	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	10
	アルツハイマー病 (AD) 及び他の認知症	
	フリードライヒ運動失調 (FA)	
	ハンチントン病 (HD)	
	運動ニューロン疾患 (MND)	
	N-グリカナールゼ欠損症 (NGLY1)	
	有機酸代謝異常症	
	パーキンソン病 (PD) 及びPD関連障害	
	プリオン病	
	脊髄性筋萎縮症 (SMA)	
	脊髄小脳失調症 (SCA)	
筋ジストロフィー	ベッカー型筋ジストロフィー	20
	先天性筋ジストロフィー	
	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	
	エメリ・ドレフェス型筋ジストロフィー	
	顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	
	筋緊張性ジストロフィー	
	眼咽頭型筋ジストロフィー	
ミオパチー	シャルコー・マリー・トゥース病	30
	先天性ミオパチー	
	遠位型ミオパチー	
	内分泌性ミオパチー (甲状腺機能亢進性ミオパチー、甲状腺機能低下性ミオパチー)	
	巨大軸索ニューロパチー	
	遺伝性痙性対麻痺	
	炎症性ミオパチー (皮膚筋炎、封入体筋炎、多発性筋炎)	
	代謝性ミオパチー	
	神経筋接合部疾患	
その他	自閉症	40
	がん	
	糖尿病	
	代謝症候群	
	慢性疲労症候群	
	炎症性障害 (例えば、関節炎)	
	加齢 (例えば、生涯期間)	

【0177】

< AMPKアゴニスト特性の特性決定 >

本発明の例示実施形態の能力を描写するために、選択したAMPKアゴニストの特性を以下に提示する。特定アゴニストの一部について検討するものの、当然のことながら、これらの結果は、アゴニスト機能の概要を提供するにすぎず、制限をかけるものではない。

【0178】

< 細胞生存度及び形態に対する直接型AMPKアゴニストの効果 >

様々な実施形態で、ミトコンドリア機能不全である個体における細胞生存度及び形態の改善に直接型AMPKアゴニストを用いた。図2A～図2Fは、一部の実施形態による直

接型AMPKアゴニストの細胞生存度に対する効果を示す。図2A~図2Dは、4種の線維芽細胞株での細胞生存度を示し、線維芽細胞株は、シトクロムCオキシダーゼアセンブリ因子(SURF1、図2A)、ヘムA:ファルネシルトランスフェラーゼシトクロムCオキシダーゼアセンブリ因子(COX10、図2B)、ミトコンドリア複合体I(CI、図2C)、及びミトコンドリア1DNAポリメラーゼガンマ(POLG、図2D)が欠損している。図2Aでは、様々な実施形態による4種の直接型AMPKアゴニスト、PT1、A-769662、ZLN024、及びC24が、未処理の細胞(例えば、ビヒクル、DMSOで処理された細胞)と比べて、生存度を35~55%上昇させることを実証する。図2B~図2Dは、呼吸鎖及びミトコンドリアDNA(mtDNA)複製機構の構成要素を包含するミトコンドリア機能不全の場合の細胞生存度に対する効果を示す。図2B~図2Dを見ると、直接型AMPKアゴニストであるPT1は、遺伝子欠損による発症機序が異なるにも関わらずこれら変異株の生存度を改善する。さらに、その他の化合物は、変異株の間で様々な反応を示した。A-769662は、CI及びPOLG欠損細胞の生存度を改善し、ZLN024は、CI欠損細胞の生存度を改善し、C24は、SURF1欠損細胞では生存度を改善したが、その他の細胞株ではどれ1つとして改善しなかった。さらに、間接型AMPKアゴニストであるAICARは、SURF1以外の細胞株の細胞生存度をどれ1つとして改善しなかった(図2A)。このことは、AICARが直接型AMPKアゴニストほど有効ではないことを示す。直接型AMPKアゴニストであるPT1は、図2Eに見られるとおり、NGLY-1欠損症を呈する線維芽細胞で同様な結果を示した。図2Eは、3個体から単離したNGLY-1欠損型の線維芽細胞を示す。この線維芽細胞をPT1で処理した場合(+PT1)、未処理(-PT1)細胞に比べて最大60%の生存度の改善を示す。さらに、図2Fは、様々な実施形態による3種の新規AMPKアゴニストの細胞生存度に対する効果を示す。図2F中、AMPKアゴニスト、MK-8722、PF-739、及びPF-06409577は、用量依存様式で、SURF1欠損線維芽細胞の細胞生存度のレベル上昇を示す。すなわち、様々な実施形態の直接型AMPKアゴニストは、広範囲の原発性及び続発性ミトコンドリア病の病因にまたがり、細胞生存度を改善する。

【0179】

図3A~図3Nを見ると、多くの実施形態に従って、各種欠損型の線維芽細胞の細胞形態が示されている。具体的には、図3A及び図3Bは、SURF1欠損型の線維芽細胞を示し、図3Aは、処理なし(DMSOのみ)での細胞形態を示し、一方で図3Bは、PT1で処理したSURF1欠損線維芽細胞を示し、図3Aの未処理細胞よりも改善された細胞形態であることを示す。同様に、図3C~図3Jは、PT1で処理した場合に、同様な細胞形態の結果になることを示し、図3C及び図3Dは、COX10欠損型の線維芽細胞を示し、図3E及び図3Fは、CI欠損型の線維芽細胞を示し、図3G及び図3Hは、POLG欠損型の線維芽細胞を示し、図3I及び図3Jは、NGLY-1欠損型の線維芽細胞を示す。同様に、図3C、図3E、図3G、及び図3Iは、未処理の欠損線維芽細胞を示し、一方で図3D、図3F、図3H、及び図3Jは、PT1で処理した線維芽細胞を示す。さらに、図3K~図3Nは、SURF1欠損線維芽細胞に対する、新規開発AMPKアゴニスト、MK-8722、PF-739、及びPF-06409577の効果を示す。詳細には、図3Kは、ビヒクルであるDMSOのみで処理したSURF1欠損線維芽細胞を示し、一方で図3Lは、MK-8722処理後の細胞形態の改善を示し、図3Mは、PF-739処理後の細胞形態の改善を示し、図3Nは、PF-06409577処理後の細胞形態の改善を示す。すなわち、様々な実施形態の直接型AMPKアゴニストは、広範囲の原発性及び続発性ミトコンドリア病の病因にまたがり、細胞形態を改善する。

【0180】

ここで図4A~図4Fを見ると、ある特定の実施形態による直接型AMPKアゴニストは、AMPK活性化に対して特異的であり、非特異的相互作用ではない。図4Aは、リン酸化AMPK(pAMPK)のタンパク質プロット(ウエスタンプロット)を示し、これは、COX10欠損線維芽細胞に低分子干渉RNA(sRNA)を形質移入した後の処

10

20

30

40

50

理後の、チューブリンに対する pAMPK の相対レベルを示す。AMPK アルファサブユニット遺伝子に特異的な siRNA である PRKAA1 は、対照として用いた非特異的 siRNA (siCNT) を形質移入した細胞よりも、pAMPK レベルが低下する結果となった。図 4 B は、siRNA 形質移入ありまたはなしで PT1 処理をした場合としなかった場合の COX10 欠損線維芽細胞の細胞生存度を示し、PT1 処理のみ (PT1) 及び非特異的 siCNT と合わせて PT1 処理 (siCNT + PT1) した場合、未処理細胞 (DMSO) 及び siAMPK を形質移入して PT1 で処理した細胞 (siAMPK + PT1) よりも生存度が上昇したことを示す。さらに、AMPK の選択的ノックダウンと合わせて PT1 処理 (siAMPK + PT1) した場合、対照条件 (siCNT + PT1) に比べて、pAMPK レベルが 63% 低下及び細胞生存度が 41% 低下する結果となり、この結果は、PT1 に対する細胞反応には AMPK 活性化が介在するという概念と一致する。図 4 C ~ 図 4 F は、図 4 B に示すものと同じ条件下での細胞形態を示す。具体的には、図 4 C は、未処理の COX10 欠損線維芽細胞を示し、図 4 D は、PT1 で処理した COX10 欠損線維芽細胞を示し、図 4 E は、siAMPK を形質移入して PT1 で処理した COX10 欠損線維芽細胞を示し、図 4 F は、対照 siCNT を形質移入して PT1 で処理した COX10 欠損線維芽細胞を示す。

10

【0181】

図 5 A ~ 図 5 D を見ると、ある特定の実施形態による直接型 AMPK アゴニストは、ミトコンドリア機能不全が原因である代謝崩壊に対処する。図 5 A は、PT1 で 0 時間、2 時間、24 時間、及び 48 時間処理した SURF1 欠損線維芽細胞における pAMPK レベルをアクチンに対して正規化したものを示す。図 5 A は、pAMPK レベルが PT1 処理後 2 時間以内に上昇し、PT1 処理後 24 時間でピークに達することを示す。さらに、pAMPK レベルは、PT1 処理から 48 時間後にベースライン位置まで戻る。図 5 B ~ 図 5 D 中、様々な実施形態に従う PT1 処理の効果は、ミトコンドリア生合成及び抗酸化物質遺伝子の遺伝子発現を増大させる。図 5 B は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベータ 1 - アルファ (PGC-1) の発現が 2.4 倍増大することを示し、一方で図 5 C 及び図 5 D は、それぞれ、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) 発現の 1.3 倍増大及びカタラーゼ発現の 1.5 倍増大を示す。

20

【0182】

<細胞呼吸に対する直接型 AMPK アゴニストの効果>

30

様々な実施形態で、ミトコンドリア機能不全である個体における細胞呼吸が改善される。上記のとおり、ある特定の実施形態は、PGC-1 発現を増大させる。PGC-1 は、二次的 mtDNA 変異及び活性酸素種 (ROS) が蓄積された老化ミトコンドリアと比較した場合に呼吸機能が上昇している新規ミトコンドリアの新生を刺激する。図 6 A ~ 図 6 H を見ると、一部の実施形態による直接型 AMPK アゴニストにより引き起こされた呼吸機能の改善が、示されている。図 6 A ~ 図 6 C は、それぞれ、SURF1、POLG、及び NGLY1 欠損線維芽細胞の基礎酸素消費速度 (OCR) を示す。各遺伝子の病原的欠損に関係なく、SURF1、POLG、及び NGLY1 欠損線維芽細胞は、様々な実施形態に従って、PT1 で処理した場合、未処理 (DMSO) に対して、基礎呼吸において、SURF1 及び POLG 欠損線維芽細胞で約 30% の改善及び NGLY1 欠損線維芽細胞で 16% の改善を示した。さらに、図 6 D 及び図 6 E は、SURF1 欠損線維芽細胞 (図 6 D) 及び POLG 欠損線維芽細胞 (図 6 E) において、ATP 合成に使用される基礎ミトコンドリア酸素消費 (ATP 共役呼吸) の割合を示す。この場合、PT1 での処理は、未処理 (DMSO) 線維芽細胞に対して、SURF1 欠損線維芽細胞で約 40% の改善 (図 6 D) 及び POLG 欠損線維芽細胞で 30% の改善 (図 6 E) を示し、ある特定の実施形態と一致する。さらに、一部の実施形態に従う PT1 での処理は、最大呼吸能を改善し、このことは、図 6 F ~ 図 6 H に示すとおり、細胞の、ATP 需要の上昇に反応する能力を反映している。図 6 F では、SURF1 欠損線維芽細胞は、直接型 AMPK アゴニストである PT1 で処理された細胞において未処理 (DMSO) 線維芽細胞よりも最大呼吸が約 50% 改善することを示す。同様に、図 6 G は、POLG 欠損線維芽細胞が、直接

40

50

型AMPKアゴニストであるPT1で処理された細胞において未処理(DMSO)線維芽細胞よりも最大呼吸を約20%改善することを示す。そして、図6Hは、NGLY1欠損線維芽細胞が、直接型AMPKアゴニストであるPT1で処理された場合、未処理(DMSO)線維芽細胞よりも最大呼吸を約40%改善することを示す。

【0183】

<酸化ストレス及びエネルギー状態に対する直接型AMPKアゴニストの効果>

ここで図7A~図7Fを見ると、様々な実施形態で、ミトコンドリア機能不全におけるATP産生が改善され、活性酸素種(ROS)レベルが低下する。具体的には、図7A、図7B、及び図7Cは、それぞれ、直接型AMPKアゴニストであるPT1で処理した場合に、未処理(DMSO)線維芽細胞よりも、ATP産生が、SURF1欠損線維芽細胞で35%、POLG欠損線維芽細胞で36%、NGLY1欠損線維芽細胞で40%増加したことを示す。さらに、図7D、図7E、及び図7Fは、それぞれ、直接型AMPKアゴニストであるPT1で処理した場合に、未処理(DMSO)線維芽細胞よりも、ROSレベルが、SURF1欠損線維芽細胞で10%、POLG欠損線維芽細胞で15%、NGLY1欠損線維芽細胞で18%低下したことを示す。ミトコンドリア機能不全は、呼吸鎖(RC)を通じた電子移動の不全を引き起こし、ATP合成の減少及び活性酸素種(ROS)の過剰生成を招く。(例えば、Atkuri et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2009 Mar 10; 106(10): 3941-5; Enns et al, PLoS One, 2014 Jun 18; 9(6)を参照、これらの開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。)ATP及びROS含有量は、細胞エネルギー及び酸化状態を反映しており、これらは両方とも、有効ATP共役呼吸及び全ミトコンドリア機能に依存する。これら代謝破壊に対する細胞反応には、細胞呼吸(例えば、ミトコンドリア新生)を改善する経路の活性化ならびにROSを中和し及び酸化ストレスを低下させる内因性抗酸化物質の発現の増加が関与する。すなわち、図7A~図7Fに示すとおり、ATP産生及びROSレベル低下の改善は、様々な実施形態の、ミトコンドリア機能不全による酸化ストレス及びエネルギー状態を改善する能力を示す。

【0184】

<リポフスチンレベルに対する直接型AMPKアゴニストの効果>

一部の実施形態は、図8A~図8Bに見られるとおり、異所性糖タンパク質の蓄積を減少させる。NGLY1欠損症を原因とするものを含むある特定のミトコンドリア機能不全は、タンパク質及びリポフスチンと称する脂質の蓄積をもたらす。(例えば、Jobst, et al., J Clin Pathol, 1991 May; 44(5): 437-438を参照、この開示はそのまま全体が本明細書中参照として援用される。)図8Aに見られるとおり、NGLY1欠損線維芽細胞は、正常線維芽細胞(対照)より約60%高いレベルのリポフスチンを呈する。図8Bは、様々な実施形態に従う直接型AMPKアゴニストであるPT1での処理が、NGLY1欠損線維芽細胞でリポフスチンレベルを約36%低下させることを示す。

【0185】

<AMPK活性化は、AMDにおいて網膜変性を軽減する>

図9A~図9Eを見ると、様々な実施形態で、ミトコンドリア機能不全が原因である網膜損傷が軽減される。詳細には、図9Aは、ある特定の実施形態に従って、ヨウ素酸ナトリウム(SI)あり及びなしならびに直接型AMPKアゴニストPT1あり及びなしで処理した網膜の眼底検査画像を示す。SIは、網膜色素上皮(RPE)で酸化ストレス及びミトコンドリア機能不全を選択的に誘導する毒素である。そのため、SI処理された組織は、ミトコンドリア機能不全が原因である網膜障害、例えばAMDなどを模擬する。図9Aに見られるとおり、SIなし(-SI)ならびにPT1あり及びなし(+PT1及び-PT1)で処理した組織は、同様な正常組織を有する。しかしながら、SIあり及びPT1なしで処理された(+SI; -PT1)組織は、白色斑を含む網膜変性の兆候を示す。しかしながら、SI及びPT1両方ともあり(+SI; +PT1)で処理された組織は、網膜変性の兆候に改善を示す。すなわち、様々な実施形態による直接型AMPKアゴニス

10

20

30

40

50

トが、網膜変性を軽減することを示す。同様に、図9Bは、網膜切片のH&E染色から同様な結果を示す。示すとおり、SI処理なしの組織(-SI; -PT1及び-SI; +PT1)は、同様な外観を有する。しかしながら、-SI; +PT1組織は、光受容体外核層(ONL)の菲薄化、内部と視細胞外節内節(IS/OIS)の組織崩壊、及びメラニンデブリの存在を含む、網膜変性の兆候を示す。SI処理した組織でPT1処理を行うと、これらの疾患症状が減少し、ONL菲薄化に対する保護(白色バー)、光受容体形態の変化、及びメラニンデブリの減少(黒色矢印)などが生じる。測定したONL厚さを図9Cに示すが、図中、SI処理しなかった組織(SI-; PT1-及びSI-; PT1+)ならびにSI及びPT1処理した組織(SI+; PT1+)は、SI処理したがPT1処理しなかった組織(SI+; PT1-)より厚さが増大したことを示す。さらに、図9Dは、SI及びPT1の両方で処理した網膜組織(PT1+; SI+)の電気反応が、SI処理したがPT1処理しなかった組織(PT1-; SI+)よりも改善され、正常組織(PT1-; SI-及びPT1+; SI-)と同様なレベルまで達することを示す。

10

【0186】

さらに、図9Eは、シトクロムCオキシダーゼアセンブリタンパク質、SCO2のアレルにロックアウト及び/またはロックインを保有する野生型マウス(WT/WT)の網膜厚さを示し、ロックインアレルは、SCO2タンパク質のE129K変異で表される。詳細には、マウスは、ヘテロ接合型ロックイン及び野生型(KI/WT)またはヘテロ接合型ロックアウト及びロックイン(KO/KI)マウスである。図9Eは、どのように処置した(MK8722)マウスが、ビヒクル(VEH)のみで処置されたマウスよりも少ない変性を示すかを示す。

20

【0187】

ミトコンドリア病である患者の眼におけるミトコンドリア機能不全は、網膜症及び視神経萎縮などの眼性症状をもたらし、また損傷したミトコンドリア機能が、加齢黄斑変性症(AMD)と関連することも示されてきている。眼が身体で最もエネルギーを消費する組織の1つであることを考えると、眼科的所見を伴う原発性及び続発性ミトコンドリア病は両方とも、AMPK活性化の恩恵を受けることが予想される。(例えば、Calaza, et al, Neurobiol Aging, 2015 Oct; 36(10): 2869-76を参照、この開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される)。すなわち、様々な実施形態による直接型AMPKアゴニストは、ミトコンドリア機能不全に関連した眼科疾患の患者を治療するのに使用できる。

30

【0188】

<虚血性脳卒中における神経保護>

一部の実施形態は、虚血性脳卒中の個体における神経保護を提供する。ニューロンにおけるミトコンドリアエネルギー代謝の損傷は、虚血性脳卒中及び複数の神経変性疾患の重大な病原性因子であり、そのような神経変性疾患として、ある種の原発性ミトコンドリア病、AD、PD、及びALSが挙げられる(Schon et al, J Clin Invest, 2003 Feb 1; 111(3): 303-312を参照、この開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される)。図10A~図10Cは、虚血性脳卒中を起こした個体に対する直接型AMPKの神経保護効果を実証する。詳細には、図10Aは、虚血性脳卒中を起こした脳組織中の梗塞組織のパーセントを示す。図10Aに見られるとおり、PT1での処置は、ビヒクルDMSOのみ(ビヒクル)で処理された個体よりも顕著な改善を示す。TCC染色した脳切片を示す図10B及び図10Cを見ると、ビヒクルのみで処置された個体(図10B)は、白色の虚血組織を高レベルで示すが、様々な実施形態に従って、PT1で処理された個体(図10C)は、それよりはるかに少ない量の白色の虚血組織を示す。

40

【0189】

<運動能力及び骨格筋に対するAMPKアゴニストの効果>

ミトコンドリア機能不全ならびに筋消耗疾患、例えば、筋ジストロフィー及び自己免疫性筋炎障害などである個体における運動能力を改善するのに、様々な実施形態を用いるこ

50

とができる。図 1 1 A ~ 図 1 1 C は、様々な実施形態に従って、AMPK アゴニスト MK - 8 7 2 2 を用いた筋肉性能の改善を示す。図 1 1 A は、SCO2 遺伝子に様々な遺伝子型を持つマウスを AMPK アゴニストで及び送達ビヒクルのみで処置した場合の、マウスの活動測定チャンパー中移動距離を示す。具体的には、図 1 1 A は、ヘテロ接合型ノックイン及び野生型マウスをビヒクルのみで処置した場合 (1 1 0 2)、ヘテロ接合型ノックイン及びノックアウトマウスをビヒクルのみで処置した場合 (1 1 0 4)、ヘテロ接合型ノックイン及び野生型マウスを AMPK アゴニストで処置した場合 (1 1 0 6)、ならびにヘテロ接合型ノックイン及びノックアウトマウスを AMPK アゴニストで処置した場合 (1 1 0 8) を示す。図 1 1 A に示すとおり、ヘテロ接合型ノックイン及び野生型マウスは、AMPK アゴニスト処置 (1 1 0 6) なのかビヒクルのみの処置 (1 1 0 2) なのかに関わらず、同様な活動レベルを示し、アレルにノックアウト及びノックインのあるヘテロ接合型マウスは、ビヒクルのみの処置 (1 1 0 4) の場合は活動低下を示すが、AMPK アゴニストで処置された (1 1 0 8) ノックアウト/ノックインマウスの活動性は、ノックイン/野生型マウスに匹敵するレベルに戻る。

10

【 0 1 9 0 】

図 1 1 B は、AMPK アゴニストを使用したノックアウト/ノックインマウス (1 1 0 8) では、ビヒクルのみで処置されたノックアウト/ノックインマウス (1 1 0 4) よりもロータロッド成績が改善することを示す。さらに、AMPK アゴニストを使用したノックアウト/ノックインマウス (1 1 0 8) は、AMPK アゴニスト処置 (1 1 0 6) またはビヒクル処置 (1 1 0 2) されたノックイン/野生型マウスよりも高いレベルを示す。同様に、図 1 1 C は、ハンギングワイヤーアッセイの結果を示すが、これらの結果は、多くの実施形態による AMPK アゴニストが筋肉能力を改善することを示す。詳細には、AMPK アゴニストは、ノックアウト/ノックインマウス (1 1 0 8) のワイヤーぶら下がり時間を、ノックイン/野生型 (1 1 0 2、1 1 0 6) ならびにビヒクル処置したノックアウト/ノックイン (1 1 0 4) よりも高いレベルに改善することができる。まとめると、図 1 1 A ~ 図 1 1 C は、多くの実施形態の AMPK アゴニストによる AMPK 活性化が、ミトコンドリア機能不全に関連した筋肉変性疾患において、強度、持久性、及び総合的な自発運動機能を向上させる可能性があることを示す。

20

【 0 1 9 1 】

図 1 1 D ~ 図 1 1 E に示すとおり、多くの実施形態は、さらに、骨格筋におけるミトコンドリア機能及び/またはグリコーゲン貯蔵を上昇させることができる。図 1 1 D は、ミトコンドリアシトクロム C オキシダーゼ (C t y o C) 及びコハク酸デヒドロゲナーゼ (S D H) 活性を示す組織染色を示す。AMPK アゴニストで処理する実施形態において、染色が濃いほど、ビヒクルのみで処理した試料の薄い染色よりも活性が上昇したことを示す。同様に、図 1 1 E 中、グリコーゲンの染色が濃いほど、AMPK アゴニストの実施形態で処理した試料中の貯蔵グリコーゲンの存在が増加したことを示す。ミトコンドリア機能の上昇とグリコーゲン含有量の増加の組み合わせは、その実施形態が、骨格筋内でエネルギーレベルを正常化することができる、それにより変性及び脱力を防ぐことができることを示す。

30

【 0 1 9 2 】

図 1 1 F ~ 図 1 1 G を見ると、骨格筋において ACC のリン酸化が増加している。詳細には、図 1 1 F は、ビヒクルのみで処置されたマウス (K I / K O V e h) ならびに多くの実施形態による AMPK アゴニストで処置されたマウス (K I / K O M K 8 7 2 2) におけるリン酸化 ACC (p A C C) のウエスタンブロットを示す。図 1 1 G は、ビヒクルのみで処置されたマウス (K I / K O V e h) ならびに多くの実施形態による AMPK アゴニストで処置されたマウス (K I / K O M K 8 7 2 2) における p A C C を 1 に正規化することにより、ウエスタンブロットを集約したものである。このように、図 1 1 F ~ 図 1 1 G は、多くの実施形態による AMPK アゴニストが、骨格筋において AMPK を活性化できることを示す。

40

【 0 1 9 3 】

50

< AMPK アゴニストの実施形態 >

多くの実施形態は、AMPKの高度に強力、選択的、かつ安定な小分子アゴニストに関する。当該実施形態の多くは、図12Aに示すとおり的一般式を有する分子に関する。複数の実施形態で、図12Aの一般構造を修飾して、図12Aの構造に基づく誘導体分子を生成することができる。誘導体分子は、当該分野で既知であるまたは本明細書に記載される複数の方法で活性を試験することができ、例えば、AMPK活性の上昇の指標として試料中のpACCを測定することができる。ある特定の断片、R基などを変更することにより、各断片がどのようにAMPK活性に影響を及ぼすかについての系統だった知見を得ることができる。

【0194】

ある特定の実施形態による誘導体分子は、図12Aの構造から開発される。多くの実施形態において、各部分、R基、または他の断片が、以下のうちの1つまたは複数により置き換え可能である：

- ・ A は、五員複素環から選択され、無置換であるか、1つまたは複数のC₁₋₆アルキルもしくはフルオロ置換基で置換されているかのいずれかであり、
- ・ X は、CR₅またはNであり、
- ・ R₁ は、H、CF₃、またはハロゲンであり、
- ・ R₂ は、OR₅、NHOH、NH₂SO₂R₄、OCH₂OCOR₄であるか、またはCOR₂がCで結合したテトラゾールとなり、
- ・ R₃ は、C₁₋₁₀アルキル、C₃₋₇シクロアルキル、C₄₋₁₂アルキルシクロアルキル、C₄₋₁₀シクロアルキルアルキル、C₃₋₇ヘテロシクロアルキル、C₄₋₁₂アルキルヘテロシクロアルキル、C₄₋₁₀ヘテロシクロアルキルアルキル、アリール、またはヘテロアリールであり、これらは無置換であるか、またはハロゲン、OH、及びOCOR₇から選択される1~3つの置換基で置換されており、
- ・ R₄ は、C₁₋₁₀アルキル、C₃₋₇シクロアルキル、C₄₋₁₂アルキルシクロアルキル、C₄₋₁₀シクロアルキルアルキルであり、これらは無置換であるか、または1~3つのハロゲン置換基で置換されており、
- ・ R₅ は、R₄またはHであり、
- ・ R₆ は、H、C₁₋₆アルキル、C₃₋₆シクロアルキルであるか、または2つのR₆基が、それらの結合した窒素原子と一緒にあって、四員~七員のヘテロシクロアルキル環を形成することができ、これらは全て、任意選択で、1~3個のフッ素原子で置換可能であり、
- ・ R₇ は、C₁₋₁₀アルキル、C₃₋₇シクロアルキル、C₄₋₁₂アルキルシクロアルキルであり、これらは無置換であるか、またはフルオロ、C₁₋₁₀アルキル、及びNR₆、R₆から選択される1~3つの置換基で置換されている。

【0195】

多くの実施形態において、Aは、以下からなる群より選択される。

【0196】

10

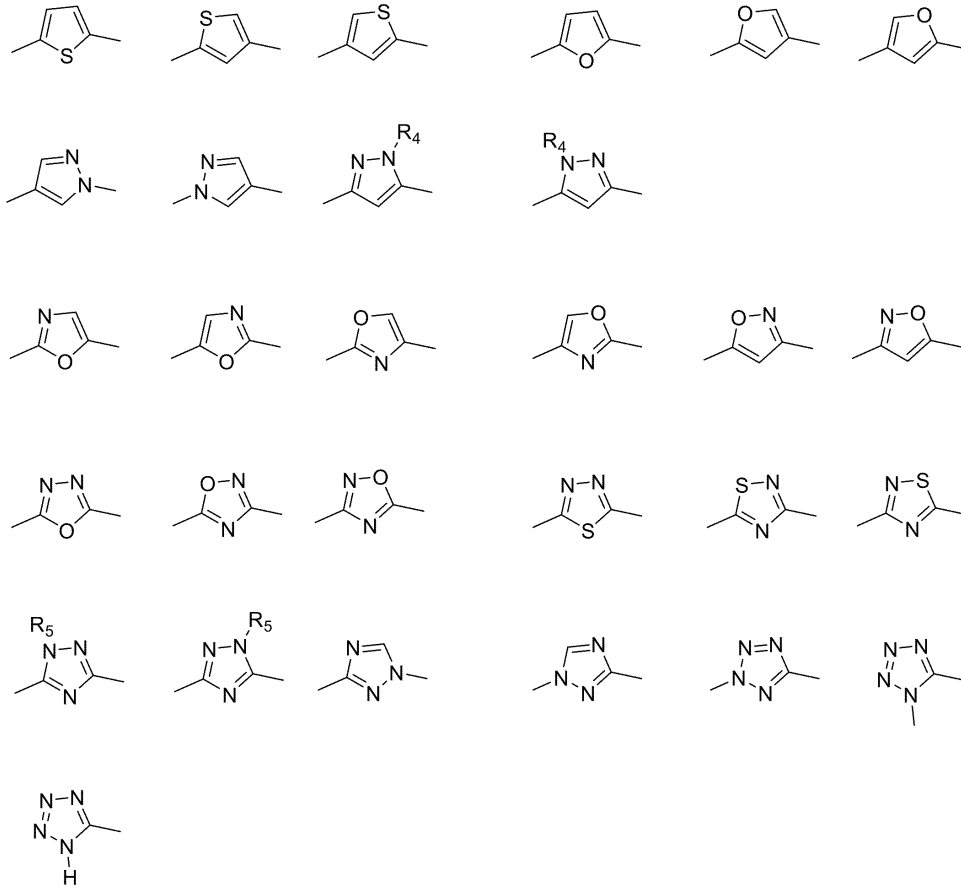
20

30

40

50

【化 1 1】



10

20

【0 1 9 7】

複数の実施形態が、図 1 2 B ~ 図 1 2 D に示すとおりの方法を用いるなどにより、製造または合成可能である。図 1 2 B は、図 1 3 A に示される化合物の合成法を示す。詳細には、図 1 2 B は、シクロブタノンと 2, 5 - ジプロモチオフェンを混合して、1 - (5 - プロモチオフェン - 2 - イル) シクロブタン - 1 - オールを生成させる工程 1 を示す。工程 2 では、工程 1 の生成物にビス (ピナコラト) ジボロンを加え、1 - [5 - (4 , 4 , 5 , 5 - テトラメチル - 1 , 3 , 2 - ジオキサボロラン - 2 - イル) チオフェン - 2 - イル] シクロブタン - 1 - オールを生成させる。工程 3 で、この生成物と、メチル = 5 - プロモ - 6 - クロロ - 1 H - インドール - 3 - カルボキシラート及び K_2CO_3 を混合して、メチル = 6 - クロロ - 5 - [5 - (1 - ヒドロキシシクロブチル) チオフェン - 2 - イル] - 1 H - インドール - 3 - カルボキシラートを生成させる。最後に、工程 4 で、工程 3 の生成物と $NaOH$ 及びエタノールを混合することにより、6 - クロロ - 5 - [5 - (1 - ヒドロキシシクロブチル) チオフェン - 2 - イル] - 1 H - インドール - 3 - カルボン酸を生成させる (図 1 3 A)。図 1 2 B のプロセスは、図 1 3 A に示す化合物を生成させるものの、注記すべきは、さらなる化合物、例えば、図 1 3 B ~ 図 1 3 Z 及び図 1 4 A ~ 図 1 4 O に示す化合物が同様な様式 (例えば、図 1 2 C ~ 図 1 2 D に示すプロセス) で生成可能だということである。

30

40

【0 1 9 8】

さらなる実施形態は、図 1 2 C に示す方法により調製することになり、例えば、当該実施形態のインドール環に最初にホウ素基を結合させ、次いで A 環とカップリングさせる (図 1 2 A に示すとおり)。

【0 1 9 9】

さらなる実施形態は、図 1 2 D の方法により調製することになり、この場合、A 環は、4 個の窒素原子を有する。

【0 2 0 0】

50

さらなる実施形態は、AMPKを活性化する能力を維持したままで、異なる構造を有することができる。一部の実施形態は、図15A～図15Bに示すものなどの一般構造を有することになる。

【0201】

ある特定の実施形態の誘導体分子は、図15Aの構造から派生する。多くの実施形態において、各部分、R基、または他の断片が、以下のうちの1つまたは複数により置き換え可能である：

- ・ Xは、CHまたはNであり、
- ・ R₁は、低級アルキル(C₁ - C₄)またはハロゲン(例えば、Cl、Br、もしくはF)であり、
- ・ R₂は、フェニル、アルキルC₁ - C₁₀、シクロアルキル(C₃ - C₁₀)、ヒドロキシアルキル(C₁ - C₆)、複素芳香族(例えば、ピリジル、ピラゾリル、ピロリル、ピリミジル、チオフェニル、フラニル、もしくはトリアゾール)、または複素環C₄ - C₆であり、

ただし、フェニルは、任意選択で、ハロゲン(例えば、Cl、Br、またはF)で置換され、

ただし、アルキルは、直鎖または分岐鎖であり、任意選択で、OH、OMe、OEtで置換され、

ただし、シクロアルキルは、任意選択で、1つまたは複数のOHで置換され、

ただし、ヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素芳香族は、任意選択で、低級アルキル(C₁ - C₆)またはヒドロキシアルキル(C₁ - C₆)で置換され、これらアルキル及びヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素環中のヘテロ原子は、任意選択で、O、S、またはNR₄であり、このR₄は、直鎖または分岐鎖のC₁ - C₆アルキルまたはヒドロキシアルキルであり、ならびに

- ・ R₄は、直鎖または分岐鎖のC₁ - C₆アルキルまたはヒドロキシアルキルである。

【0202】

ある特定の実施形態の誘導体分子は、図15Bの構造から派生する。多くの実施形態において、各部分、R基、または他の断片が、以下のうちの1つまたは複数により置き換え可能である：

- ・ Aは、縮合環(例えば、C₃ - C₁₀シクロアルキル)であり、
- ・ Xは、CHまたはNであり、
- ・ Yは、O、S、NH、NR₃であり、
- ・ R₁は、低級アルキル(C₁ - C₄)またはハロゲン(例えば、Cl、Br、もしくはF)であり、
- ・ R₂は、フェニル、アルキルC₁ - C₁₀、シクロアルキル(C₃ - C₁₀)、ヒドロキシアルキル(C₁ - C₆)、複素芳香族(例えば、ピリジル、ピラゾリル、ピロリル、ピリミジル、チオフェニル、フラニル、もしくはトリアゾール)、または複素環C₄ - C₆であり、

ただし、フェニルは、任意選択で、ハロゲン(例えば、Cl、Br、またはF)で置換され、

ただし、アルキルは、直鎖または分岐鎖であり、任意選択で、OH、OMe、OEtで置換され、

ただし、シクロアルキルは、任意選択で、1つまたは複数のOHで置換され、

ただし、ヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素芳香族は、任意選択で、低級アルキル(C₁ - C₆)またはヒドロキシアルキル(C₁ - C₆)で置換され、これらアルキル及びヒドロキシアルキルは、直鎖または分岐鎖であり、

ただし、複素環中のヘテロ原子は、任意選択で、O、S、またはNR₄であり、

- ・ R₃は、C₁ - C₆アルキル(直鎖または分岐鎖)であり、ならびに

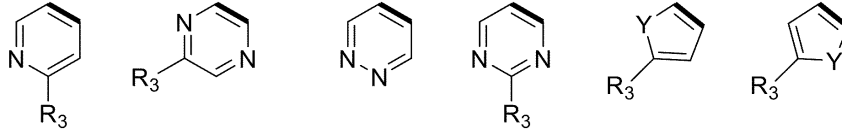
・ R₄ は、直鎖または分岐鎖の C 1 - C 6 アルキルまたはヒドロキシアルキルである。

【 0 2 0 3 】

複数の実施形態において、A は、C 6 フェニル環である。多くの実施形態において、A は、以下からなる群より選択される。

【 0 2 0 4 】

【 化 1 2 】



10

【 0 2 0 5 】

図 1 5 C を見ると、実施形態の合成法が示されている。具体的には、図 1 5 C は、図 1 5 D に示す実施形態 (E V 8 0 1 7 とも称する) の合成法を示す。図 1 5 C のプロセスは、図 1 5 D に示す化合物を生成させるものの、注記すべきは、さらなる化合物が同様な様式で生成可能ということである。

【 0 2 0 6 】

図 1 6 A を見ると、図 1 3 A に示す新規 AMPK アゴニストの生物学的効果である。詳細には、図 1 6 A は、ミトコンドリア欠損患者細胞を図 1 3 A に示す実施形態で処理した場合 (E V 8 0 1 6 と標識) 及びピヒクルのみで処理した場合 (D M S O と標識) の細胞中のリン酸化 ACC (p A C C) のウエスタンブロットを示す。図 1 1 F に関連して上記したとおり、ACC のリン酸化は、AMPK 活性化の指標であり、したがって、多くの実施形態に従う化合物が、AMPK を活性化することができることを示す。

20

【 0 2 0 7 】

図 1 6 B を見ると、様々な実施形態による AMPK アゴニストの EC 5 0 が特定可能である。例示の実施形態 E V 8 0 1 6 において (図 1 3 A) 、 EC 5 0 は、232 nM と特定されたが、PF - 0 6 4 0 9 5 7 7 実施形態 (図 1 D) は、96 nM と特定された。当業者なら、さらなる実施形態の EC 5 0 をどのように特定するか当然のようにわかるだろう。

【 0 2 0 8 】

< AMPK アゴニストを用いた個体の治療法 >

30

ここで図 1 7 を見ると、様々な実施形態が、プロセス 1 7 0 0 において、個体のミトコンドリア機能不全の治療に関する。実施形態によっては、ミトコンドリア機能不全は、工程 1 7 0 2 で、個体において同定される。ある特定の実施形態において、機能不全である個体は、症候、例えば、N - グリカナーゼ (N G L Y 1) 欠損症、加齢黄斑変性症 (A M D) 、虚血性脳卒中、筋ジストロフィー (例えば、デュシェンヌ型及びベッカー型) 、フリードライヒ運動失調症 (F A) 、筋肉が関与する自己免疫障害 (例えば、封入体筋炎、多発性筋炎、及び皮膚筋炎) 、神経変性疾患 (例えば、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 、パーキンソン病、及びアルツハイマー病) 、糖尿病、代謝障害、及びノまたは肥満などを呈することにより発見される。他の実施形態において、ミトコンドリア機能不全は、疾患または機能不全の分子シグネチャに基づいて同定されることになり、例えば、タンパク質ブロット (ウエスタンブロット) 、ポリメラーゼ連鎖反応法 (P C R) 、遺伝子マーカーを用いた遺伝子型判定 (例えば、一塩基多型 (S N P) 、発現遺伝子配列断片 (E S T) 、単純反復配列 (S S R) など) により、個体に存在する特定の疾患または機能不全が同定されることになる。

40

【 0 2 0 9 】

工程 1 7 0 4 で、個体は、様々な実施形態における AMPK アゴニストで治療される。実施形態によっては、AMPK アゴニストは、直接型 (または AMP 非依存性) アゴニストであり、一方、他の実施形態において、AMPK アゴニストは、AMP 依存性アゴニストである。直接型アゴニストの例として、PT 1、ETC - 1 0 0 2、サリチル酸化合物、C 9 9 1、C 1 3、D 5 6 1 - 0 7 7 5、MT 6 3 - 7 8、A - 7 6 9 6 6 2、Z L N

50

024、C24、MK-8722、PF-739、及びPF-06409577が挙げられる。ATP依存性アゴニストの例として、メトホルミン、レスベラトロール、及びAICARが挙げられる。ある特定の実施形態において、AMPKアゴニストは、治療有効量で個体に供給され、治療有効量は、治療中及び/または治療開始後に、ミトコンドリア機能不全の帰結を、減少させ、排除し、または緩和する。実施形態によっては、AMPKアゴニストは、経口、皮下、静脈内、腹腔内注射、鼻腔内投与、経皮投与、吸入を介して、眼内（硝子体内を含む）、及び/または治療効果をもたらす任意の方法により提供される。ある特定の実施形態において、AMPKアゴニストは、治療効果をもたらすように配合される。実施形態によっては、AMPK配合物は、結合剤、潤滑剤、緩衝剤、及び/または被覆剤を含み、被覆剤は、AMPKアゴニストが治療効果をもたらすように薬物動態学的に放出されることを可能にする。

10

【0210】

さらに、AMPKアゴニスト及び/または配合物は、治療効果をもたらすのに適切な用量及び投薬スケジュールで提供されることになる。実施形態によっては、AMPKアゴニストは、単回用量で提供されることになり、一方で一部の実施形態は、一定時間をかけて複数用量を提供することになる。様々な実施形態において、投薬は、合計体積の濃度として達成されることになり、例えば、治療効果に応じて用量が10 nM、30 nM、100 nM、1 µM、100 µM、またはそれ以上になる。さらなる実施形態において、投薬は、AMPKアゴニストの質量対治療される個体の質量の比になり、例えば、治療効果に応じて用量が1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg、またはそれ以上となる。複数用量の実施形態において、投薬スケジュールは、1回用量/日、2回用量/日、3回用量/日、またはそれ以上が可能であるとともにより必要な限り継続可能であり、例えば、投薬を、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、10週間、20週間、または、個体の生涯にわたり永久に行うことが可能である。

20

【0211】

さらなる実施形態において、用量及び/または投薬レジメンは、酵素活性の閾値達成をはじめとする様々な要因に応じて治療過程にわたり変更可能である。実施形態によっては、高めの用量が個体の治療に使用され、一定時間後に減量されることになり、例えば、様々な実施形態において、100 µMという一日量が1週間、2週間、4週間、またはそれ以上などの一定時間使用され、その後、個体の治療を継続するために用量が減少されることになる。ある特定の実施形態において、投薬レジメンは変更されることがあり、例えば、治療過程にわたり用量の間隔が変更されることになる。例えば、ある特定の実施形態は、一日量のAMPKアゴニストを、一定時間（例えば、1週間、2週間、4週間など）個体に提供し、その後、用量の間隔を引き伸ばし、例えば、残りの治療の間、後続の投薬が半週間ごと、毎週、または毎月行われることになる。

30

【0212】

工程1706では、様々な実施形態が、個体を、AMPKアゴニストの有効性について評価することになる。ある特定の実施形態において、この工程は、疾患の症候、例えば工程1702に関して列挙されたものなどを評価することにより達成され、一方、他の実施形態において、この工程は、分子プロファイルを調べることにより、例えば、遺伝子型判定、遺伝子発現、及び工程1702に関して開示されるとおりの他の方法などにより、達成されることになる。

40

【0213】

< AMPK活性の調節法 >

ここで図18を見ると、様々な実施形態が、プロセス1800で示されるとおり、個体の疾患または障害を治療するためのAMPK活性の調節に関する。実施形態によっては、障害または疾患は、工程1802で、ミトコンドリア機能不全に関連していると同定される。これら疾患及び/または障害の例として、表1~2で同定される障害及び疾患が挙げられ、例えば、疾患及び/または障害は、ミトコンドリア機能不全、例えば、原発性ミト

50

コンドリア機能不全及び/または続発性ミトコンドリア機能不全に関連している。様々な実施形態において、疾患及び障害は、個体が呈する症候に基づいて同定され、一方で実施形態によっては、疾患及び障害は、疾患または機能不全の分子シグネチャ、例えばタンパク質プロット（ウエスタンプロット）、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）、遺伝子マーカーを用いた遺伝子型判定（例えば、一塩基多型（SNP）、発現遺伝子配列断片（EST）、単純反復配列（SSR）など）に基づいて同定されることになる。

【0214】

工程1804では、様々な実施形態が、AMPK活性を調節することになる。AMPK活性の調節は、AMPKの活性化であることも、AMPK活性の阻害であることも可能である。ある特定の実施形態において、AMPK活性は、AMPKをリン酸化することにより、またはAMPKアゴニストを提供することにより、活性化させることになる。ある特定の実施形態において、調節は、AMPK活性を阻害することにより達成される。AMPKの阻害は、競合阻害剤またはアロステリック阻害剤を用いて達成することができ、阻害剤は、AMPKが反応を触媒することを阻止する。

10

【0215】

工程1806では、様々な実施形態が、個体を、治療効果について評価することになる。ある特定の実施形態において、この工程は、疾患症候、例えば、工程1802で列挙されたものなどを評価することにより達成され、一方、他の実施形態において、この工程は、分子プロファイルを調べることにより、例えば遺伝子型判定、遺伝子発現、及び工程1802に関して開示されるとおりの他の方法により、達成されることになる。

20

【実施例】

【0216】

実施形態に従うアッセイ及び阻害剤の能力を実証するため実験を行った。これらの結果及び考察は、制限をかけることを意味せず、単に操作装置及びそれらの特長の例を提供するにすぎない。

【0217】

<材料及び方法>

原発性ミトコンドリア病（Surf1、複合体I、Cox10、Polg）である患者4人、NGLY1欠損症である患者3人、及び正常な対照4人から予め得られた線維芽細胞を研究に使用した。全ての試料は、説明同意に基づいて得られたものであり、Stanford IRBにより認可されたものであった。線維芽細胞を、DMEM培地中、37、5%CO₂で維持した。DMEM培地は、8.3mMのグルコースを含有し、また10%ウシ胎児血清（FBS）（Fisher Scientific）、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（10,000U/mL）（Life Technologies）、1%glutamax（Life Technologies）、1%ウリジン（5mg/mL）及び1%ピルビン酸化合物（11mg/mL）が補充されていた。

30

【0218】

様々な化合物をスクリーニングするため、24ウェルマイクロタイタープレートに、4つ組で、 1.5×10^3 細胞/500ul培地で播種した。翌日、培地を除去し、ウェルをPBSで洗い、ミトコンドリアストレス培地に交換した。ストレス培地は、DMEM、1%ペニシリン-ストレプトマイシン（10,000U/mL）（Life Technologies）、10%FCS（Fisher Scientific）、1mMガラクトース（Sigma Aldrich）、及び25µMアジ化ナトリウムを含有するとともに、以下の化合物を含むものと含まないものがあつた：1mMのAICAR（Medchem Express）、1mMのメトホルミン（Sigma Aldrich）、100µMのPT1（Santa Cruz Biotechnology）、100µMのA-769662（Medchem Express）、100µMのC24（Medchem Express）。各種化合物を用いた処理後、組織培養物を、成長、酸素消費速度、及びATPレベルについて分析した。

40

【0219】

50

<実施例1：細胞増殖及び生存度>

方法：細胞増殖は、カルセインAM (Anaspec)を用いる蛍光定量法により測定した。ミトコンドリアストレス培地を除去し、ウェルをPBSで洗い、次いで800 nMカルセインAMのPBS溶液500ul/ウェルとともに、37、5%CO₂で30分間インキュベートした。細胞生存度は、Flouroskan Ascentマイクロプレート蛍光光度計(Thermo Scientific)で485nm励起波長を用いて得られた値により測定した。

【0220】

細胞ATP含有量は、LC-MSにより測定した。細胞をトリプシン処理し、冷PBSで洗い、NH₄AC(0.05M、pH6)を用いて溶解した。ライセートを分子量カットオフフィルター(Chromsystems)に移し、4、800xgで20分間回転させた。遠心後、上清を、DNAの定量にNanoDrop ND-1000(Nanodrop Technologies)を用い、ATPの定量に6400 Series Triple Quad LC/MS System(Agilent Technologies)を用いて分析した。

10

【0221】

組織培養物中の線維芽細胞を、Leica DM IRB顕微鏡を倍率10倍で用いて位相差顕微鏡観察により可視化し、Hamamatsu ORCA-ERカメラで画像を撮影した。

【0222】

統計上の有意性($p < 0.05$)は、両側ステューデントt検定により計算した。

20

【0223】

結果：AMPK、PT1、A-769662、ZLN024、及びC24という4種の直接型アクチベータを、SURF1欠損線維芽細胞で試験した。AMP類似体AICARは、以前に、*in vitro*でミトコンドリア機能を改善することが示されており(Golubitzky, et al, PLoS One, 2011; 6(10)、この開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される)、陽性対照として試験計画に含まれた。直接型AMPKアゴニストで処理した変異細胞は、未処理の細胞(すなわち、ピヒクルDMSOで処理した細胞)に比べて、生存度が35~55%上昇することを示し(図2A)、PT1が最大の改善を示した。それより低いながらも依然有意である効果が、AICARで処理したSURF1細胞において、対応する未処理対照(すなわち、PBSで処理した細胞)と比較した場合にも見られ、細胞生存度の平均は、57%上昇した。

30

【0224】

これらの知見が、SURF1欠損以外のミトコンドリア機能障害に拡張できるかどうかを評価するため、ミトコンドリア複合体I(CI)、ヘムA：ファルネシルトランスフェラーゼシクロムcオキシダーゼアセンブリ因子(COX10)、及びミトコンドリアDNAポリメラーゼガンマ(POLG)の欠損症である患者由来の線維芽細胞を用いて、同様な試験を行った。したがって、これらの試験は、呼吸鎖及びmtDNA複製機構の異なる構成要素を包含する広範囲のミトコンドリア崩壊を評価するものであった。1種類の化合物、PT1は、一貫して及び有意に、全ての変異株で、それらの発症機序が異なるにも関わらず、生存度を改善した(図2B~図2D)。残りの化合物は、変異株の間で様々な反応を示した。A-769662は、CI及びPOLG欠損細胞の生存度を改善し、ZLN024は、CI欠損細胞の生存度を改善し、C24は、SURF1欠損細胞の生存度を改善したが、その他の株ではどれも改善しなかった。興味深いことに、AICAR処置も、SURF1以外のその他の株ではどれも改善しなかった。同様な結果は、NLGY-1欠損症である患者由来の線維芽細胞でも観察され、生存度が最大60%改善した(図2E)。さらに、新規開発されたAMPKアゴニストである、MK-8722、PF-739、及びPF-04609577を試験したところ、これらは、PT1と同様にsurf1患者細胞の生存度を改善すること、及びこの改善が用量依存様式で生じることを示した(図2E)。さらに、細胞形態が、PT1での処理により、SURF1(図3B)、COX

40

50

10 (図3D)、CI (図3F)、POLG (図3H)、及びNGLY1 (図3J) 欠損線維芽細胞で、未処理の細胞 (図3A、図3C、図3E、図3G、及び図3I) よりも改善され、未処理の細胞は、明るいアポトーシス細胞を呈することを示す。さらに、MK-8722 (図3L)、PF-739 (図3M)、及びPF-04609577 (図3N) は、SURF1 欠損線維芽細胞の細胞形態を、未処理の線維芽細胞 (図3K) より改善し、未処理の細胞は、明るいアポトーシス細胞を呈することを示すことが示される。

【0225】

結論：これらの結果は、直接のAMPK活性化が、広範囲の原発性及び続発性ミトコンドリア病の原因にまたがり細胞生存度を改善することを示し、このことは、PT1で処理した変異細胞では、DMSOで処理した細胞に比べて細胞形態の改善が見られることにより支持される。

10

【0226】

<実施例2：AMPKに対するAMPKアゴニストの測定>

方法：ウエスタンブロット法を行って、PT1で処理した細胞中のpAMPKレベルを同定した。細胞を、RIPA緩衝剤にオルトバナジン酸ナトリウム、PMSF、及びプロテアーゼ阻害剤カクテルを補充したものをを用いて溶解した。全細胞抽出物を、SDS-PAGEにより分画し、移送装置 (Bio-Rad) を取扱説明書に従って用いてポリビニリデンジフルオリド膜に移した。5%脱脂乳含有TBST (10mMのトリス、pH8.0、150mMのNaCl、0.5%Tween20) を用いて60分間インキュベーション後、膜をTBSTで1回洗い、AMPK (1:1,000)、pAMPK (1:1,000)、アクチン (1:10,000) に対する抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。膜の5分間洗浄を3回行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスまたは抗ウサギ抗体の1:10,000希釈液とともに2時間インキュベートした。ブロットをTBSTで3回洗い、ECLシステム (Thermo Scientific) を取扱説明書に従って用いて、現像した。

20

【0227】

PT1に対する細胞反応がAMPK活性化そのものの結果であるのか、それとも非特異的相互作用の結果にすぎないのかを試験するため、siRNAノックダウン戦略を用いた。PRKAA1 (s101) のsiRNA及び陰性対象 (Life Technologies) を、培地中、Hiperfect試薬 (Qiagen) とともにインキュベートし、室温で10分間複合体を形成させた。培地は、DMEM、1%ペニシリン-ストレプトマイシン (10,000U/mL) (Life Technologies)、1%glutamax (Life Technologies) を含有していたが、血清は含んでいなかった。次いで、複合体を、6ウェルマイクロタイタープレートのCOX10患者組織培養物に加え (各siRNAの最終siRNA濃度10nM) 37℃、5%CO₂ で72時間インキュベートした。インキュベーション期間の終了時、細胞は、ウエスタンブロット分析 (上記プロトコル参照) によりAMPK及びpAMPKのレベルについて分析するか、またはPT1 (または未処理対照としてDMSO) とともに追加の6日間インキュベートし、カルセインAMで生存度を評価した。COX10欠損線維芽細胞は、PT1と、siAMPKまたはsiCNTのいずれかとともに処理し、反応を、ウエスタンブロット法によりpAMPKタンパク質発現について (図4A)、カルセインAM蛍光アッセイにより細胞生存度について (図4B)、及び位相差顕微鏡観察により細胞形態について (図4C~図4F) 評価した。

30

40

【0228】

結果：SURF1欠損患者細胞由来の培養線維芽細胞を、PT1で0時間、2時間、24時間、及び48時間処理し、pAMPKレベルを測定した。pAMPKレベルは、PT1処理から2時間後、上昇し、24時間でピークに達し、48時間後にベースラインに戻った (図5A)。PT1での処理とAMPKの選択的ノックダウンとの組み合わせ (PT1 + siAMPK) は、対照条件 (PT1 + siCNT) と比較してpAMPKレベルの63%低下及び細胞生存度の41%低下をもたらし、PT1に対する細胞反応には、AM

50

P K 活性化が介在するという概念と一致する。P T 1 での 4 8 時間処理後、ミトコンドリア新生の主要レギュレータであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベータ 1 - アルファ (P G C - 1) は、2 . 4 倍増加した (図 5 B) 。同様に、A M P K が制御する主要抗酸化物質遺伝子の 2 種であるカタラーゼ及びマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (S O D 2) は、それぞれ、1 . 3 倍及び 1 . 5 倍増加した (図 5 C ~ 図 5 D) 。

【 0 2 2 9 】

結論：P T 1 の作用機序は、ミトコンドリア機能不全が原因である代謝崩壊に対処する。したがって、A M P K 活性化を通じてミトコンドリア新生を刺激し及び酸化ストレス反応のきっかけとなる。

10

【 0 2 3 0 】

< 実施例 3 : 酸素消費及び細胞呼吸 >

背景：P G C - 1 を P T 1 処理により上方制御することが、ミトコンドリア呼吸の改善と関連するのかどうかを判定するため、酸素消費速度 (O C R) を、S U R F 1 患者及び P O L G 患者両方の線維芽細胞で評価した。

【 0 2 3 1 】

方法：酸素消費速度 (O C R) は、X F 9 6 細胞外流動分析装置 (S e a h o r s e B i o s c i e n c e s) を用いて測定した。線維芽細胞を、3 7 ° C 、5 % C O 2 で、X F 9 6 ウェルプレートの培地 1 0 0 μ l に 1 0 \times 1 0 3 細胞 / ウェルで播種した。培地は、8 . 3 m M グルコースを含有し、1 0 % ウシ胎児血清 (F B S) (F i s h e r S c i e n t i f i c) 、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン (1 0 , 0 0 0 U / m l) (L i f e T e c h n o l o g i e s) 、1 % g l u t a M A X (L i f e T e c h n o l o g i e s) 、1 % ウリジン (5 m g / m l) 、及び 1 % ピルビン酸化合物 (1 1 m g / m l) が補充されていた。翌日、培地をミトコンドリアストレス培地 (詳細は上記) に交換した。培地は、P T 1 、A - 7 6 9 6 6 2 、及び A I C A R を含むものと含まないものがあった。4 8 時間後、ストレス培地を、ミトコンドリアストレス培地と同じ成分を持つ非緩衝 X F 塩基 D M E M 培地 (F i s h e r S c i e n t i f i c) 1 7 5 μ l に交換し、平衡化のため 3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートしてから測定した。O C R ベースライン測定値は、5 分ごとに 1 回、3 回測定した。実験後、細胞量を、カルセイン A M 蛍光強度 (F I) により見積り、O C R を F I で除することにより O C R を計算した。

20

30

【 0 2 3 2 】

結果：病因が明確に異なるにも関わらず、P T 1 処理された S u r f 1 患者細胞及び P O L G 患者細胞は両方とも、基礎呼吸のおおよそ 3 0 % 改善を示し (図 6 A ~ 図 6 B) 、一方で P T 1 は、N G L Y 1 患者細胞では基礎 O C R の 1 6 % 上昇を示した (図 6 C) 。

【 0 2 3 3 】

A T P 合成に使用される基礎ミトコンドリア酸素消費 (A T P 共役呼吸) の割合も、S u r f 1 で 4 0 % 及び P O L G で 3 0 % 改善し、酸化的リン酸化のカップリング効率に対する P T 1 のプラスの効果を実証した (図 6 D ~ 図 6 E) 。

【 0 2 3 4 】

最大呼吸能は、A T P 需要の増加に反応する細胞の能力を反映するものであるが、これは、S u r f 1 細胞及び P O L G 細胞の両方で、それぞれ 5 0 % 及び 2 0 % 増加し (図 6 F ~ 図 6 G) 、一方で、P T 1 は、N G L Y 1 患者細胞で最大 O C R の 4 0 % 上昇を示した (図 6 H) 。

40

【 0 2 3 5 】

結論：A M P 非依存性機序を通じた A M P K 活性化は、ミトコンドリア機能不全を標的とする機構としてより適切である可能性がある。

【 0 2 3 6 】

< 実施例 4 : 酸化ストレス及びエネルギー状態の測定 >

背景：A T P 及び R O S 含有量は、細胞エネルギー及び酸化状態を反映し、これらは両

50

方とも、有効ATP共役呼吸及び全ミトコンドリア機能に依存する。ミトコンドリア機能不全は、RCを通じた電子移動を不完全にし、ATP合成の減少及び活性酸素種(ROS)の過剰産生を招く。(Atkuri et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Mar 10; 106(10): 3941-5; Enns et al, PLoS One. 2014 Jun 18; 9(6)、これらの開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。)

【0237】

方法：SURF1、POLG、及びNGLY1患者細胞に、PT1またはDMSO(未処理対照)を48時間補充し(n=3)、ATPレベルをCellTiter-Glo ATPアッセイにより測定、または72時間補充し(n=3)ROSレベルをCellROX Deep Redフローサイトメトリーアッセイにより測定した。結果を、総タンパク質濃度に対して正規化した。データは、平均値±平均値の標準偏差で表す。統計上の有意性は、 $p < 0.05$ に対して測定した。

10

【0238】

結果：ATP含有量は、処理により、Surf1患者細胞で35%、POLG患者細胞で36%、及びNGLY1患者細胞で40%増加し、またDMSO処理した細胞と比較すると、ROSレベルは、それぞれ、10%、15%、及び18%低下した(図7A~図7F)。

【0239】

結論：ATP共役呼吸ならびに抗酸化物質カタラーゼ及びSOD2発現で観察されていた上方制御と一致して(実施例2、図5C~図5D)、エネルギー欠乏及び酸化ストレスの両方が、原発性または続発性ミトコンドリア機能不全いずれかである患者由来の細胞において、PT1処理により改善した。

20

【0240】

<実施例5：AMDに対する効果の測定>

方法：AMDモデルを作製するため、マウスを、SI(またはビヒクル)処置の24時間前及び12時間前に、100mg/kgのPT1(またはビヒクル)で処置し、次いで、SI後の3日間、24時間ごとに処置した。PT1及びSIは両方とも、腹腔内(IP)注射により送達し、動物は、SI投与から3日後に表現型を決定した。

【0241】

マウスを麻酔し、1%アトロピン硫酸塩、2.5%フェニレフリン塩酸塩、及び0.5%プロパラカイン塩酸塩を用いてマウスの瞳孔を散大させた。Micron III小動物網膜撮影用ADカメラ(Phoenix Research Laboratories, INC)を用いて、眼底検査を行った。

30

【0242】

暗順応及び明順応ERGを記録することにより(Espion E2 System, Diagnosys LLC)網膜機能を評価した。マウスを一晩、暗順応させてからERGを記録した。すべての手順は、暗中でまたは暗赤色灯下で行った。マウスを麻酔し、マウスの瞳孔を上記のとおり散大させた。ERGを記録するため、角膜中心に電極を設置した。接地針電極を尾の付け根に設置し、参照針電極を眼の間の皮下に設置した。a波振幅は、ベースラインからa波トラフまでを測定し、b波振幅は、a波トラフからb波ピークまでを測定した。

40

【0243】

結果：PT1処置したマウス(+SI; +PT1)では、未処置マウス(+SI; -PT1)に比べて白色斑が少ないことが観察される(1群あたりマウス数n=5)。PT1処置単独(-SI; +PT1)では、眼底検査結果に変化はなく、対照マウス(-SI; -PT1)によく似ている(図9A)。網膜切片のH&E染色から、未処置マウス(+SI; -PT1)に比べてPT1処置(+SI; +PT1)することで、ONL菲薄化(白色バー)から保護され、光受容体IS/OS形態の変化が阻止され、メラニンデブリ(黒矢印)が減少することが示される(1群あたりマウス数n=5)(図9B)。PT1処置

50

したマウス (+ S I ; + P T 1) の O N L 厚さは、対照マウス (- S I ; - P T 1) と類似しており、未処置マウス (+ S I ; - P T 1) に比べて有意に改善されている。P T 1 処置単独では、O N L 厚さに変化はない (- S I ; + P T 1 対 - S I ; - P T 1) (1 群あたりマウス数 $n = 3 \sim 4$) (図 9 C)。網膜電図検査は、未処置マウス (+ S I ; - P T 1) に比べて P T 1 処置したマウス (+ S I ; + P T 1) でロッド反応 (暗順応 a 波及び b 反応) が有意に上昇することを示す (1 群あたりマウス数 $n = 3 \sim 4$) (図 9 D)。

【 0 2 4 4 】

結論：P T 1 は、A M D を呈する網膜において改善を実証し、したがって、A M D の治療薬として A M P K アゴニストが積極的に使用されることを示す。

【 0 2 4 5 】

< 実施例 6 : 虚血性脳卒中における神経保護 >

方法：虚血性脳卒中モデル作製のため、中大脳動脈を、4 5 分間、一時的に閉塞させ、続いて血流再開させることにより、虚血病変を誘導した。次いで、マウスに、1 0 0 m g / k g の P T 1 またはピヒクルを、閉塞から 1 時間後及び 2 4 時間後の 2 回の用量で腹腔内注射し、1 時間後にと殺して最終組織を収集した。

【 0 2 4 6 】

単離した脳を、2 0 分間、冷生理食塩水に入れておき、スライスして 7 枚の冠状切片にし (厚さ 2 m m)、1 . 0 % 2 , 3 , 5 - トリフェニルテトラゾリウムクロリド (T T C) の生理食塩水溶液に入れて、3 7 ° C で 3 0 分間染色した。染色した脳組織を 1 0 % ホルマリン含有リン酸緩衝食塩水で固定した。C C D カメラ (P a n a s o n i c C o r p o r a t i o n , J a p a n) を用いて画像を撮影し、染色されていない損傷範囲を梗塞組織と定義して、I m a g e P r o P l u s 4 . 1 ソフトウェア (M e d i a C y b e r n e t i c s , S i l v e r S p r i n g , M D) を用いて定量した。

【 0 2 4 7 】

結果：P T 1 処置したマウスの T T C 染色した脳切片は、ピヒクルで処置したマウスに比べて、梗塞領域 (白色) の寸法の減少を示した (図 1 0 B ~ 図 1 0 C)。

【 0 2 4 8 】

結論：P T 1 処置は、未処置の対照に比べて P T 1 処置したマウスの脳切片中の虚血 (脳卒中) 範囲に著しい軽減を示した。

【 0 2 4 9 】

< 実施例 7 : 運動能力の向上 >

背景：大量のエネルギーを必要とする臓器として、眼は、特にミトコンドリア損傷の帰結に影響されやすい。同様に、骨格筋も、大量のエネルギーを必要とする臓器であり、エネルギー産生のため酸化的リン酸化及び解糖の両方に依存する。

【 0 2 5 0 】

方法：ミトコンドリア機能不全である *i n v i v o* 系で A M P K アゴニストの効果を調べるため、M K 8 7 2 2 を用いてミトコンドリア病のマウスモデルを処置した。これらのマウスは、シトクロム C オキシダーゼアセンブリタンパク質 S C O 2 の欠損が原因であるミトコンドリア複合体 I V 欠損症であり、1 2 9 位に E K 変異 (E 1 2 9 K) を示す S c o 2 ノックアウト (K O) アレル及び S c o 2 ノックイン (K I) アレルを有している。E 1 2 9 K 変異は、ヒト S C O 2 変異患者の大部分で見られる E 1 4 0 K 変異に相当する。(例えば、Y a n g e t a l , A n a l y s i s o f m o u s e m o d e l s o f c y t o c h r o m e c o x i d a s e d e f i c i e n c y o w i n g t o m u t a t i o n s i n S c o 2 . H u m M o l G e n e t . 2 0 1 0 J a n 1 ; 1 9 (1) : 1 7 0 - 8 0、この開示は、そのまま全体が本明細書中参照として援用される。) S c o 2 欠損マウスの優性表現型は、低下した自発運動機能及び眼球欠陥であり、両方とも、原発性ミトコンドリア病である患者と共通する所見である。S c o 2 マウスを 4 つの処置群に分けた：S c o 2 K I / K O + M K 8 7 2 2、S c o 2 K I / K O + D M S O (ピヒクル)、対照 K I / W T + M K 8 7 2 2、対照 K I / W T + D M S O、1 群あたり 7 ~ 9 匹のマウス。1 . 5 ヶ月齢の S c o 2 マウスに、M K 8 7 2

10

20

30

40

50

2 (10 mg/kg) またはビヒクル (DMSO) を14週間、1日1回強制経口投与することにより、処置した。自発運動機能は、活動測定チャンパー、ロータロッド、及びハンギングワイヤー試験を用いて評価し、眼球構造は、光干渉断層法 (OCT) を用いて評価した。

【0251】

結果：ミトコンドリア機能不全に対するこの感受性の結果として、Sco2 KI/KOならびにヘテロ接合型KI/WT同腹仔の両方で、光干渉断層法 (OCT) により *in vivo* で測定した眼球構造から網膜欠陥が明らかになった。網膜神経線維層 (RNFL) の厚さは、WT/WT対照に比べてSco2 KI/KOマウス及びKI/WTマウスで減少していた (WT/WT Veh: 76.2 μ m に対して、KI/KO Veh: 74.1 μ m 及び KI/WT Veh: 72.7 μ m)。対照的に、MK8722処置したマウスのRNFLは、ビヒクル処置したSco2 KO/KIマウス及びKI/WTマウスより厚かった (KI/KO Veh: 74.1 μ m 対 KI/KO MK8722: 77 μ m、及び KI/WT Veh: 72.7 μ m 対 KI/WT MK8722: 74.7 μ m) (図9Eを参照)。

10

【0252】

筋肉性能を評価する自発運動機能試験において、MK8722処置したSco2 KI/KO変異型マウスは、活動測定チャンパー (図11A参照)、ロータロッド走行試験 (図11B参照)、及び前肢ワイヤーぶら下がり試験 (図11C参照) において、ビヒクル処置したSco2 KI/KO変異型マウスよりも優れた成績であった。図11Aに示すとおり、ビヒクル処置したSco2 KI/KOマウスは、KI/WT同腹仔の対照に比べて活動測定チャンパー中の移動距離が少なかったが、8週間のMK8722処置は、これらマウスの活動性を対照レベルまで回復させた (KO/KI Veh: 1516.7 cm; KO/KI MK8722: 2337.8 cm; KI/WT Veh: 2337 cm)。図11Bは、MK8722処置が、KI/KO変異型マウスのロータロッド走行時間も、ビヒクル処置したマウスに比べて、対照と同様なレベルまで改善したことを示す (KO/KI Veh: 176.1秒; KO/KI MK8722: 248.1秒; KI/WT Veh: 235.7秒)。ワイヤーハンギング試験については、図11Cに示すとおり、MK8722処置は、Sco2 KO/KI変異型マウスがその四肢でぶら下がっている時間の長さを、KI/WT対照さえも超えるレベルまで延長させた (KO/KI Veh: 173.2秒; KO/KI MK8722: 312.5秒; KI/WT Veh: 145.5秒)。

20

30

【0253】

図11Dは、組織染色強度を示し、これらは、ミトコンドリアシトクロムCオキシダーゼ (CytoC) 及びコハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) 活性が、MK8722処置したSco2 KI/KO変異型マウスの骨格筋組織において、ビヒクル処置した変異型マウスに比べて上昇していることを示す。同様に、図11Eは、MK8722処置したSco2 KI/KO変異型マウスの骨格筋を組織学的評価すると未処置のマウスに比べてグリコーゲン含有量が増加していたことを示す。自発運動機能の上昇 (図11A~図11C) 及びミトコンドリア機能の上昇 (図11D~図11E) は、図11Fに見られるとおり、ACCリン酸化の増加と関連していた。

40

【0254】

結論：網膜試験 (図9E) は、AMPKの活性化が、ミトコンドリア機能不全に関連した眼球損傷を改善及び/または予防する可能性があることを実証する。さらに、自発運動試験 (図11A~図11C) は、AMPK活性化が、ミトコンドリア機能不全に関連した筋肉変性疾患において強度、持久性、及び総合的な自発運動機能を向上させる可能性があることを実証する。さらに、ミトコンドリア機能の上昇 (図11D) 及びグリコーゲン含有量の増加 (図11E) は、骨格筋内でエネルギーレベルを正常化し、それにより変性及び脱力を防ぐ作用機序において不可欠な役割を担っている可能性がある。AMPK活性化の上昇を示すACCリン酸化の増加と合わせて、これらの結果は、多くの実施形態による

50

AMPKアゴニストが多くの特効効果を持つことを実証する。

【0255】

<実施例8：6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸及びその類似体の合成>

背景：図12Aは、AMPKを活性化することができる化合物の一般式を示す。4種の誘導体の合成(図13A~図13B及び図14J~図14K)を、この実施例で説明する。

【0256】

方法：この実施例の図解を、図12Bに示す。この実施例は、図13Aに示す化合物の合成を解説するものであるが、当業者なら、異なる試薬、反応体、条件などを用いて図13B~図13Z及び図14A~図14Oに示すものをはじめとする誘導体化合物を生成できることがわかるだろう。

10

【0257】

工程1：1-(5-ブromoチオフェン-2-イル)シクロブタン-1-オール-78で、2,5-ジブromoチオフェン(0.95g、3.922mmol)の乾燥THF溶液を攪拌しながら、そこに、-78で、n-ブチルリチウム(2.69ml、4.314mmol)を滴下し、混合物を同温度でさらに30分間攪拌放置した。次いで、シクロブタノン溶液(0.27g、3.922mmol)を2分かけてゆっくりと加え、反応混合物を、-78で1時間攪拌放置し、次いで、塩化アンモニウムでクエンチした。生成物を酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧エバポレートし、次いでフラッシュクロマトグラフィー(230~400メッシュ、10%EA含有PE)により精製して、1-(5-ブromoチオフェン-2-イル)シクロブタン-1-オール(0.6g;66%)を無色液体として得た。

20

【0258】

工程2：1-[5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)チオフェン-2-イル]シクロブタン-1-オール
工程1の生成物(2.0g、8.579mmol)、ビス(ピナコラート)ジボロン(3.2g、12.87mmol)、及びKOAc(2.25g、25.7mmol)を1,4-ジオキサン(20ml)に加えた混合物を、N₂ガスで5分間パージし、次いでPd(dppf)Cl₂(0.32g、0.429mmol)を加えた。90で16時間攪拌した後、溶媒を減圧エバポレーションにより除去し、残渣を、フロリジルを用いて0-10%EA/PEで溶出させるカラムクロマトグラフィーにより精製して、1-[5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)チオフェン-2-イル]シクロブタン-1-オール(0.6g;25%)をガム状固体として得た。

30

【0259】

工程3：メチル=6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボキシラート
工程2の生成物(0.275g、0.977mmol)、メチル=5-ブromo-6-クロロ-1H-インドール-3-カルボキシラート(0.282g、0.977mmol)、K₂CO₃(0.40g、2.931mmol)を、1,4-ジオキサン(5ml)及び水(1ml)に加えた混合物を、N₂ガスで5分間パージした。次いでPd(dppf)Cl₂·DCM(0.04g、0.048mmol)を加え、得られる溶液を、100で16時間攪拌した。溶媒を減圧エバポレーションにより除去し、残渣を、フロリジルを用いて0-10%EA/PEで溶出させるカラムクロマトグラフィーにより精製して、メチル=6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボキシラート(0.15g;91%)をオフホワイト色固体として得た。

40

【0260】

工程4：6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸

工程3の生成物(0.150g、0.414mmol)のエタノール溶液を攪拌しながら

50

ら、そこに、6 NのNaOH溶液(10 ml)を加え、80 で16時間攪拌した。溶媒を減圧エバポレーションにより除去し、残渣をクエン酸で酸性にし、生成物を酢酸エチルで抽出した。抽出物を水で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧除去し、粗残渣を分取HPLCにより精製して、6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸(0.06 g; 4.2%)をオフホワイト粉末として得た。

【0261】

特定の試薬を変更することにより、図12Bに関して上記に記載された方法を、6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-3-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸(図13B)、6-クロロ-5-(1-メチル-1H-ピラゾール4-イル)-1H-インドール-3-カルボン酸(図14J)、及び6-クロロ-5-(1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-インドール-3-カルボン酸(図14K)の生成にも使用した。

10

【0262】

結果：工程1により、以下の特性を持つ1-(5-ブロモチオフェン-2-イル)シクロブタン-1-オールが生成した：¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): 6.91 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 2.49 - 2.36 (m, 4H), 2.21 (s, 1H), 1.96 - 1.91 (m, 1H), 1.76 - 1.69 (m, 1H). LCMS: 97.6% (217.07, M - 18)。

20

【0263】

工程3により、以下の特性を持つメチル=6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボキシレートが生成した：¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): 8.56 (bs, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.16 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.65 - 2.58 (m, 2H), 2.51 - 2.44 (m, 2H), 2.31 (s, 1H), 1.99 - 1.91 (m, 1H), 1.84 - 1.80 (m, 1H). LCMS: 95.63% (344.23, M - 18)。

30

【0264】

工程4により、以下の特性を持つ6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-2-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸が生成した：¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): 12 (br s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.12 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 2.45 - 2.31 (m, 4H), 1.91 - 1.82 (m, 1H), 1.78 - 1.68 (m, 1H). LCMS: 99.06% (465.30 [M+H]⁺)、融点範囲: 228 - 232 。

【0265】

図13Bは、6-クロロ-5-[5-(1-ヒドロキシシクロブチル)チオフェン-3-イル]-1H-インドール-3-カルボン酸を示し、これは、¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆): 11.90 (bs, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.42 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 5.96 (s, 1H), 2.44 - 2.32 (m, 4H), 1.91 - 1.82 (m, 1H), 1.77 - 1.70 (m, 1H), LCMS: 97.92% (346.51 [M+H]⁺)、及び融点範囲: 248 - 252 を有する。

40

【0266】

図14Jは、6-クロロ-5-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-

50

インドール - 3 - カルボン酸を示し、これは、 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d₆): 12.09 (s, 1H), 11.87 (s, 1H), 8.04 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 3.90 (s, 1H), LCMS: 99.32% (276.31 [M+H]⁺)、及び融点範囲: 241 - 245 を有する。

【0267】

図14Kは、6 - クロロ - 5 - (1 - フェニル - 1H - ピラゾール - 4 - イル) - 1H - インドール - 3 - カルボン酸を示し、これは、 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d₆): 11.86 (br s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.20 (br s, 1H), 8.00 (s, 2H), 7.93 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.52 (t, 2H), 7.33 (t, 1H), LCMS: 97.20% (338.13 [M+H]⁺)、及び融点範囲: 245 - 249 を有する。

10

【0268】

結論: これら実施形態は、図13B ~ 図13Z及び図14A ~ 図14Oに示すものなど、新規AMPKアゴニスト及びそれらの誘導体を合成することができる。

【0269】

<実施例9: EV8016 (図13A)の類似体の合成>

背景: 図12Aは、AMPKを活性化することができる化合物の一般式を示す。さらなる誘導体の合成 (図13F及び図14L ~ 図14M) を、この実施例で説明する。

20

【0270】

方法: この実施例の図解を、図12Cに示す。この実施例は、図14Lに示す化合物の合成を解説するものであるが、当業者なら、異なる試薬、反応体、条件などを用いて図13A ~ 図13Z及び図14A ~ 図14Oに示すものをはじめとする誘導体化合物を生成することができるだろう。

【0271】

結果: 図13Fは、6 - クロロ - 5 - {5 - [1 - (ヒドロキシメチル)シクロプロピル]チオフェン - 2 - イル} - 1H - インドール - 3 - カルボン酸を示し、これは、 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d₆): 11.65 (bs, 1H), 8.24 (bs, 1H), 7.89 (bs, 1H), 7.55 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.88 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 3.57 (s, 2H), 1.00 - 0.87 (m, 4H)、及びLCMS: 99.06% (465.30 [M+H]⁺) を有する。

30

【0272】

図14Lは、6 - クロロ - 5 - (2 - フェニルオキサゾール - 5 - イル) - 1H - インドール - 3 - カルボン酸を示し、これは、 ^1H NMR (400 MHz, DMSO): 12.08 (s, 2H), 8.53 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.06 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.59 (t, J = 7.1 Hz, 3H), LCMS: 91.95% (339.35 [M+H]⁺)、及び融点範囲: 261 - 265 を有する。

40

【0273】

図14Mは、6 - クロロ - 5 - (4 - フェニルチオフェン - 2 - イル) - 1H - インドール - 3 - カルボン酸を示し、これは、 ^1H NMR (400 MHz, DMSO - d₆): 11.77 (bs, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.76 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.43 (t, 2H), 7.31 (t, 1H), LCMS: 99.55% (354.10 [M+H]⁺)、及び融点範囲: 195 - 199 を有する。

【0274】

結論: これら実施形態は、図13A ~ 図13Z及び図14A ~ 図14Oに示すものなど

50

、新規AMPKアゴニスト及びそれらの誘導体を合成することができる。

【0275】

<実施例10：EV8016（図13A）のさらなる類似体の合成>

背景：図12Aは、AMPKを活性化することができる化合物の一般式を示す。さらなる誘導体（図14N～図14O）の合成を、この実施例で説明する。

【0276】

方法：この実施例の図解を、図12Dに示す。この実施例は、図14N～図14Oに示す化合物の合成を解説するものであるが、当業者なら、異なる試薬、反応体、条件などを用いて図13A～図13Z及び図14A～図14Oに示すものをはじめとする誘導体化合物を生成できることがわかるだろう。

10

【0277】

結果：図14Nは、メチル=6-クロロ-5-(1H-テトラゾール-5-イル)-1H-インドール-3-カルボキシラートを示し、これは、図12Dの工程2後の生成物である。この化合物は、¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 12.03 (br s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.01-7.00 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H)、及び LCMS: 93.9% (278.07 [M+H]⁺) を有する。

【0278】

図14Oは、6-クロロ-5-(1H-テトラゾール-5-イル)-1H-インドール-3-カルボン酸を示し、これは、図12Dの工程3後の生成物である。この化合物は、¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 16.73 (s, 1H), 12.34 (s, 1H), 12.21 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.19 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H)、及び融点範囲: 268-272 を有する。

20

【0279】

結論：これら実施形態は、図13A～図13Z及び図14A～図14Oに示すものなど、新規AMPKアゴニスト及びそれらの誘導体を合成することができる。

【0280】

<実施例11：(3R, 3aR, 6R, 6aR)-6-{[5-([1, 1'-ピフェニル]-4-イル)-1H-ナフト[1, 2-d]イミダゾール-2-イル]オキシ}ヘキサヒドロフロ[3, 2-b]フラン-3-オール合成>

30

方法：この実施例の図解を、図15Aに示す。さらに、この実施例は、図15Bに示す化合物の合成を解説するものであるが、当業者なら、異なる試薬、反応体、条件などを用い誘導体化合物を生成できることがわかるだろう。

【0281】

工程1：N-(4-プロモナフタレン-1-イル)アセトアミド（化合物2）の合成
化合物1（5.0 g、22.520 mmol）のメタノール溶液を攪拌しながら、そこに、室温で、酢酸（4.2 mL、45.040 mmol）を加え、反応混合物を70 で2時間、攪拌放置した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。完了したら、反応混合物を氷冷水に注ぎ、沈殿した固体をろ別し、真空乾燥させて、化合物2を黄色固体として得た（4.5 g、75%）。

40

【0282】

工程2：N-(4-プロモ-2-ニトロナフタレン-1-イル)アセトアミド（化合物3）の合成

化合物2（4.0 g、15.150 mmol）の酢酸（40 mL）溶液を攪拌しながら、そこに、室温で、発煙HNO₃（0.72 mL、16.660 mmol）を加え、反応混合物を75 で2時間、攪拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。完了したら、反応混合物を氷冷水に注ぎ、沈殿した固体をろ別し、大量の水で洗い、真空乾燥させて、化合物3を黄色固体として得た（3.52 g、72%）。

【0283】

50

工程3：N-[4-([1,1'-ビフェニル]-4-イル)-2-ニトロナフタレン-1-イル]アセトアミド(化合物5)の合成：

化合物3(20.0g、64.720mmol)及び化合物4(19.2g、97.080mmol)を、ジオキサン及び水(9:1)に加えた溶液を撹拌しながら、そこに、 K_2CO_3 (22.30g、161.800mmol)を加え、反応混合物を窒素で15分間パージし、次いでPd(PPh₃)₄(3.73g、3.230mmol)を加え、再度窒素で10分間パージし、次いで反応混合物を90℃で2時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、反応混合物をセライトで濾過し、濾液を減圧濃縮し、残渣を水と混合して(triturated)、沈殿した固体を濾過した。固体を2-プロパノールで再結晶させ、得られた固体をろ過し、真空乾燥させて、化合物5を黄色固体として得た(11.1g、40%)。化合物5は、そのまま工程6に用いた。

10

【0284】

工程4：4-([1,1'-ビフェニル]-4-イル)-2-ニトロナフタレン-1-アミン(化合物6)の合成

化合物5(5.0g、13.089mmol)の1,4-ジオキサン(500mL)溶液を撹拌しながら、そこに、濃HCl(50mL)を加え、反応混合物を100℃で48時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、ジオキサンを減圧エバポレートし、水性残渣を氷冷水で希釈し、沈殿した固体をろ過した。固体を大量の水で洗い、真空乾燥させて、化合物6(4.05g、91.0%)を黄色固体として得た。この化合物は、それ以上精製することなく次の工程に用いた。

20

【0285】

工程5：4-([1,1'-ビフェニル]-4-イル)ナフタレン-1,2-ジアミン(化合物7)の合成

化合物6(5.0g、14.662mmol)をTHF(400mL)とエタノール(100mL)の混合液に加えた溶液に、10%w/w湿式Pd-C(1.0g)を加え、得られる反応混合物を、Parr装置中、80psiの水素圧下、室温で16時間、水素化した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応完了後、セライトでろ過し、濾液を減圧濃縮した。粗生成物をn-ペンタンと混合して(triturated)、沈殿した固体を濾過し、真空乾燥させて、化合物7を黄色固体として得た(粗生成物3.5g)。

30

【0286】

工程6：5-([1,1'-ビフェニル]-4-イル)-1,3-ジヒドロ-2H-ナフト[1,2-d]イミダゾール-2-チオン(化合物8)の合成

化合物7(3.5g、11.290mmol)のTHF(70mL)溶液を撹拌しながら、そこに、0℃で、DMAp(2.75g、22.80mmol)を加え、続いてチオホスゲン(0.89mL、11.290mmol)を加え、得られる反応混合物を室温で3時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、溶媒を減圧エバポレートし、残渣を酢酸エチルと水で分配した。有機層をブラインで洗い、無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮して、粗化合物8(3.2g)を黄色固体として得た。

40

【0287】

工程7：5-([1,1'-ビフェニル]-4-イル)-2-(メチルチオ)-1H-ナフト[1,2-d]イミダゾール(化合物9)の合成

化合物8(3.0g、8.522mmol)のアセトン(100mL)溶液を撹拌しながら、そこに、0℃で、 K_2CO_3 (1.41g、10.226mmol)を加え、10~15分間撹拌し、ヨウ化メチル(0.55mL、8.522mmol)を加え、得られる反応混合物を室温で3時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、溶媒を減圧エバポレートし、残渣を酢酸エチルと水で分配した。有機層をブラインで洗い、無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮して、粗生成物を得た

40

。粗生成物を、フラッシュクロマトグラフィー（230×400メッシュ、15-20% EA含有PE）により精製して、1.1g（35.3%）の化合物9を黄色固体として得た。

【0288】

工程8：5-（[1,1'-ピフェニル]-4-イル）-2-（メチルスルホニル）-1H-ナフト[1,2-d]イミダゾール（化合物10）の合成

化合物9（1.0g、2.732mmol）のジクロロメタン（30mL）溶液を撹拌しながら、そこに、0℃で、3-クロロ過安息香酸（1.41g、8.196mmol）を加え、得られる反応混合物を室温で2時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、反応混合物をジクロロメタンで希釈し、10%NaHCO₃水溶液、10%チオ硫酸ナトリウム溶液、続いてブラインで洗った。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮して、3.5gの粗黄色固体化合物10を得た。

10

【0289】

工程9：5-（[1,1'-ピフェニル]-4-イル）-2-（メチルスルホニル）-1-（[2-（トリメチルシリル）エトキシ]メチル）-1H-ナフト[1,2-d]イミダゾール（化合物11）の合成

化合物10（1.3g、3.266mmol）のジクロロメタン（50mL）溶液を撹拌しながら、そこに、0℃で、トリエチルアミン（0.68mL、4.899mmol）を加え、続いてSEMクロリド（0.65g、3.919mmol）を加え、得られる反応混合物を室温で2時間撹拌した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、ジクロロメタンで希釈し、10%NaHCO₃水溶液、続いてブラインで洗った。有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮した。粗生成物を、フラッシュクロマトグラフィー（230×400メッシュ、10-15% EA含有PE）により精製して、化合物11（0.35g、20%）を得た。

20

【0290】

工程10：5-（[1,1'-ピフェニル]-4-イル）-2-（（3R,3aR,6R,6aS）-6-（tert-ブチルジメチルシリル）オキシ）ヘキサヒドロフロ[3,2-b]フラン-3-イル）オキシ）-1-（[2-（トリメチルシリル）エトキシ]メチル）-1H-ナフト[1,2-d]イミダゾール（13）の合成

化合物12（0.34g、1.325mmol）のテトラヒドロフラン（5mL）溶液を撹拌しながら、そこに、0℃で、カリウムtert-ブトキシド（0.15g、1.325mmol）を加え、得られる反応混合物を0℃で1時間撹拌した。この反応混合物に、0℃で、化合物11のテトラヒドロフラン溶液を加え、得られる反応混合物を、室温で2時間撹拌放置した。反応の進行は、TLCでモニタリングした。反応が完了したら、溶媒を減圧エバポレートし、残渣を酢酸エチルと水で分配した。有機層をブラインで洗い、無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮して、粗化合物13（0.6g）を褐色ガム状固体として得た。

30

【0291】

工程11：（3R,3aR,6R,6aR）-6-（[5-（[1,1'-ピフェニル]-4-イル）-1H-ナフト[1,2-d]イミダゾール-2-イル）オキシ）ヘキサヒドロフロ[3,2-b]フラン-3-オール（化合物EV8017）の合成

化合物13（0.6g、0.846mmol）のギ酸（12mL）溶液を撹拌しながら、そこに、KHSO₄（0.11g、0.846mmol）の水（1.0mL）溶液を加え、得られる反応混合物を60℃で16時間撹拌した。反応の進行は、TLC及びLCMSでモニタリングした。反応が完了したら、0℃に冷却し、2NのNaOH水溶液でpHを12~13に調整することにより塩基性にし、溶液を0℃でさらに1時間撹拌し、2NのHClで中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を1つにまとめ、ブラインで洗い、無水Na₂SO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮した。粗生成物を、フラッシュクロマトグラフィー（C-18カラム、80%MeOH含有水）により精製して、化合物EV8017をオフホワイト色固体として得た（0.14g、35.7%）。

40

50

【0292】

結果：工程1により、以下の特性を持つ化合物2が生成した：LCMS：98.8% (266.06 M + H⁺ & 264.06 M - H⁺)；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)：8.31 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.82 - 7.80 (m, 2H), 7.67 - 7.61 (m, 2H), 7.47 (br s, 1H), 2.36 (s, 3H)。

【0293】

工程2により、以下の特性を持つ化合物3が生成した：LCMS：94.0% (309.12 M - H⁺)；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)：8.72 (br s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.30 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.82 - 7.78 (m, 1H), 7.71 - 7.67 (m, 1H), 2.37 (s, 3H)。

10

【0294】

工程3により、以下の特性を持つ化合物5が生成した：LCMS：91.85% (381.31 M - H⁺)。

【0295】

工程4により、以下の特性を持つ化合物6が生成した：LCMS：90.48% (341.29 M + H⁺)。

【0296】

工程5により、以下の特性を持つ化合物7が生成した：LCMS：52.0% (311.3 [M + H]⁺)。

20

【0297】

工程6により、以下の特性を持つ化合物8が生成した：LCMS：52.0% (353.2 [M + H]⁺)。

【0298】

工程7により、以下の特性を持つ化合物9が生成した：LCMS：77.6.0% (367.29 [M + H]⁺)。

【0299】

工程8により、以下の特性を持つ化合物10が生成した：LCMS：76.9% (397.29 [M - H]⁺)。

30

【0300】

工程9により、以下の特性を持つ化合物11が生成した：LCMS：88.0% (529.40 [M + H]⁺)；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)：8.75 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.75 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.71 (m, 3H), 7.67 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.54 - 7.40 (m, 4H), 6.04 (s, 2H), 3.70 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 0.93 (t, J = 8.0 Hz, 2H), -0.47 (s, 9H)。

【0301】

工程10により、以下の特性を持つ化合物13が生成した：LCMS：84.8% (709.70 [M + H]⁺)。

40

【0302】

工程11により、以下の特性を持つ化合物EV8017が生成した：LCMS：99.89% (465.30 [M + H]⁺)；HPLC：99.86%；m.p.；158 - 162；¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆)：13 - 12 (br s, 1H), 8.29 (br s, 1H), 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.83 - 7.77 (m, 4H), 7.59 - 7.50 (m, 6H), 7.42 - 7.35 (m, 2H), 5.52 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.89 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.23 - 4.16 (m, 2H), 3.88 (

50

q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.82 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.48 (t, J = 8.4 Hz, 1H)。

【0303】

結論：これら実施形態は、図15Bに示すものなど、新規AMPKアゴニスト及びそれらの誘導体を合成することができる。

【0304】

〔均等論〕

上記の説明は、本発明の多くの具体的な実施形態を含むものの、それらは、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではなく、本発明の1つの実施形態の例として解釈されるべきである。したがって、本発明の範囲は、例示される実施形態によってではなく、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物により決定されるべきである。

10

【図面の簡単な説明】

【0305】

【図1A】様々な実施形態に従いAMPKにより活性化及び阻害される経路を示す。

【図1B】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図1C】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図1D】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図2A】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

【図2B】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

【図2C】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

20

【図2D】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

【図2E】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

【図2F】様々な実施形態に従う様々な処理下での細胞生存度アッセイの結果を示す。

【図3A】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3B】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3C】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3D】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3E】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3F】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3G】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

30

【図3H】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3I】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3J】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3K】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3L】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3M】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図3N】様々な実施形態に従う様々な処理下での線維芽細胞の細胞形態を示す。

【図4A】様々な実施形態に従って、ロックダウンアッセイにおけるpAMPK濃度を示す。

【図4B】様々な実施形態に従う様々な処理下でのロックダウン試験における細胞生存度の結果を示す。

40

【図4C】様々な実施形態に従う様々な処理下でのロックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【図4D】様々な実施形態に従う様々な処理下でのロックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【図4E】様々な実施形態に従う様々な処理下でのロックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【図4F】様々な実施形態に従う様々な処理下でのロックダウン試験における細胞形態の結果を示す。

【図5A】様々な実施形態に従って、処理アッセイ後のpAMPK濃度を示す。

50

- 【図 5 B】様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。
- 【図 5 C】様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。
- 【図 5 D】様々な実施形態に従って、処理アッセイ後の遺伝子発現レベルを示す。
- 【図 6 A】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 B】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 C】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 D】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。 10
- 【図 6 E】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 F】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 G】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 6 H】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での細胞呼吸結果を示す。
- 【図 7 A】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。 20
- 【図 7 B】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。
- 【図 7 C】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での A T P 濃度を示す。
- 【図 7 D】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種 (R O S) 濃度を示す。
- 【図 7 E】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種 (R O S) 濃度を示す。
- 【図 7 F】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしの各種欠損線維芽細胞株での活性酸素種 (R O S) 濃度を示す。 30
- 【図 8 A】様々な実施形態に従って、対照及び N G L Y 1 欠損線維芽細胞株でのリポフスチンレベルを示す。
- 【図 8 B】は、様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの N G L Y 1 欠損線維芽細胞株でのリポフスチンレベルを示す。
- 【図 9 A】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導 A M D モデルでの網膜の眼底検査画像を示す。
- 【図 9 B】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導 A M D モデルでの網膜の網膜切片画像を示す。
- 【図 9 C】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導 A M D モデルでの網膜の O N L 厚さ測定を示す。 40
- 【図 9 D】様々な実施形態に従う処理ありまたはなしでの対照及び誘導 A M D モデルでの網膜の網膜電図検査画像を示す。
- 【図 9 E】様々な実施形態に従い A M P K アゴニストを用いた処理後の網膜分解の減少を示す。
- 【図 1 0 A】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織のパーセントを示す。
- 【図 1 0 B】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織を含む脳切片を示す。
- 【図 1 0 C】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理の虚血組織中の梗塞組織を含む 50

脳切片を示す。

【図 1 1 A】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

【図 1 1 B】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

【図 1 1 C】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおける自発運動能力を示す。

【図 1 1 D】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおけるミトコンドリア機能及びグリコーゲン貯蔵を示す。

【図 1 1 E】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスにおけるミトコンドリア機能及びグリコーゲン貯蔵を示す。

10

【図 1 1 F】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスで行われた A C C リン酸化アッセイの結果を示す。

【図 1 1 G】様々な実施形態に従い処理したまたは未処理のマウスで行われた A C C リン酸化アッセイの結果を示す。

【図 1 2 A】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの一般構造を示す。

【図 1 2 B】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの合成法のスキームを示す。

【図 1 2 C】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの合成法のスキームを示す。

【図 1 2 D】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの合成法のスキームを示す。

【図 1 3 A】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

20

【図 1 3 B】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 C】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 D】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 E】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 F】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 G】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 H】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 I】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 J】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 K】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

30

【図 1 3 L】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 M】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 N】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 O】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 P】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 Q】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 R】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 S】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 T】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 U】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

40

【図 1 3 V】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 W】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 X】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 Y】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 3 Z】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 4 A】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 4 B】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 4 C】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 4 D】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

【図 1 4 E】様々な実施形態に従う A M P K アゴニストの構造を示す。

50

【図 1 4 F】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 G】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 H】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 I】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 J】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 K】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 L】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 M】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 N】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 4 O】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

10

【図 1 5 A】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの一般構造を示す。

【図 1 5 B】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの一般構造を示す。

【図 1 5 C】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの合成法のスキームを示す。

【図 1 5 D】様々な実施形態に従うAMPKアゴニストの構造を示す。

【図 1 6 A】様々な実施形態に従って、ミトコンドリア欠損細胞で行われたACCリン酸化アッセイの結果を示す。

【図 1 6 B】様々な実施形態に従って、EC50を特定するのに使用されたAMPKアゴニストのAMPK活性を示す。

【図 1 7】様々な実施形態に従う、個体の治療法を示す。

【図 1 8】様々な実施形態に従う、個体のAMPK活性の調節法を示す。

20

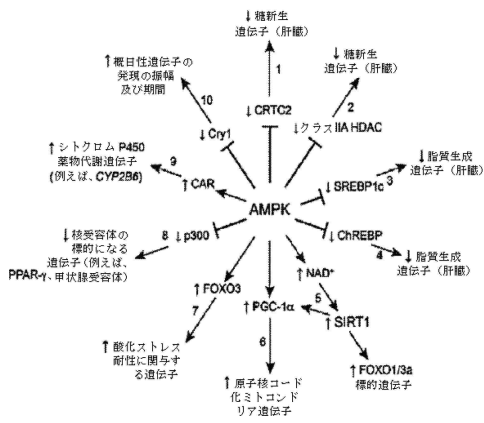
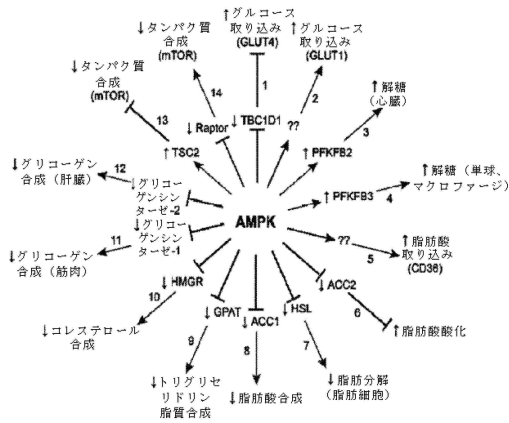
30

40

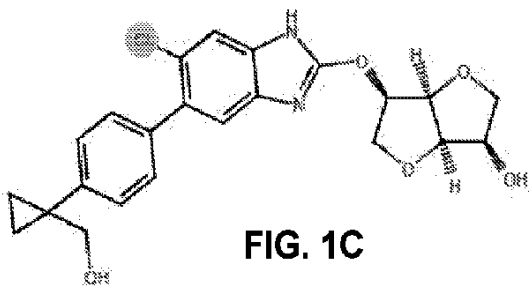
50

【図面】

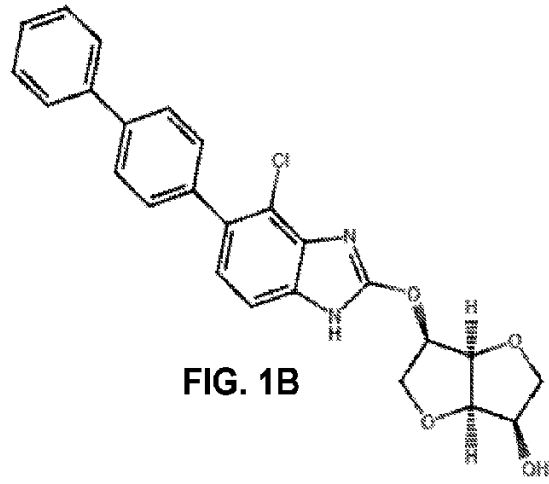
【図 1 A】



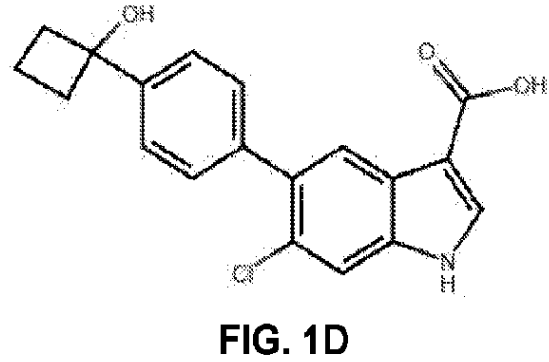
【図 1 C】



【図 1 B】



【図 1 D】



10

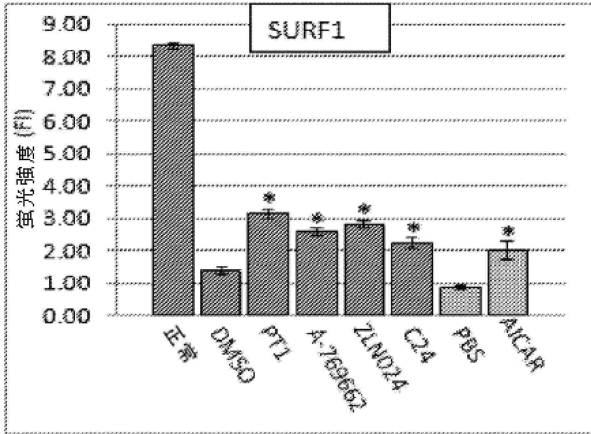
20

30

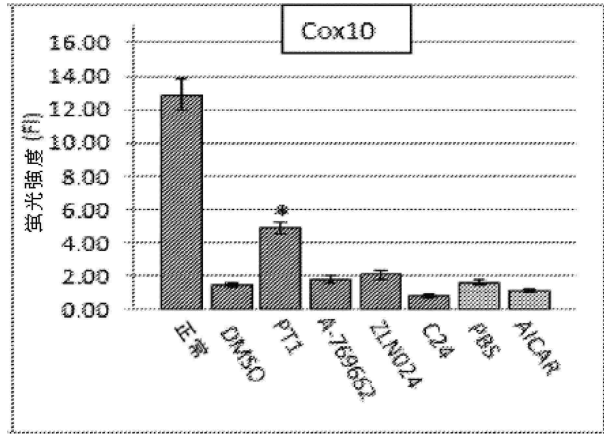
40

50

【图 2 A】

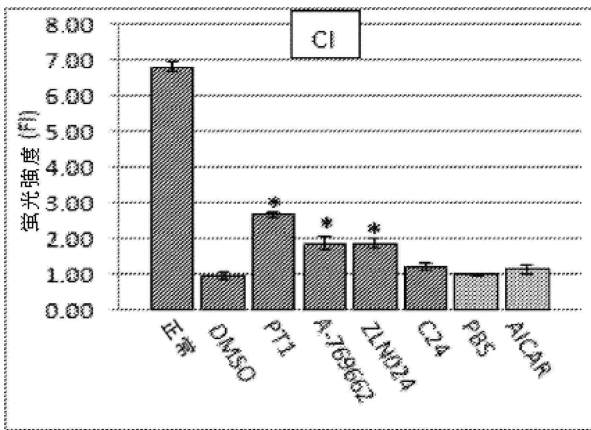


【图 2 B】

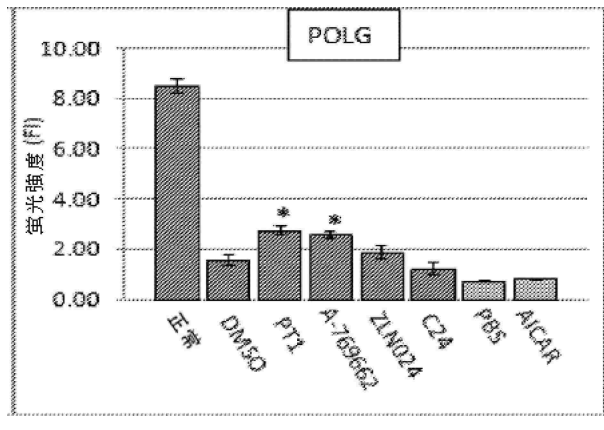


10

【图 2 C】

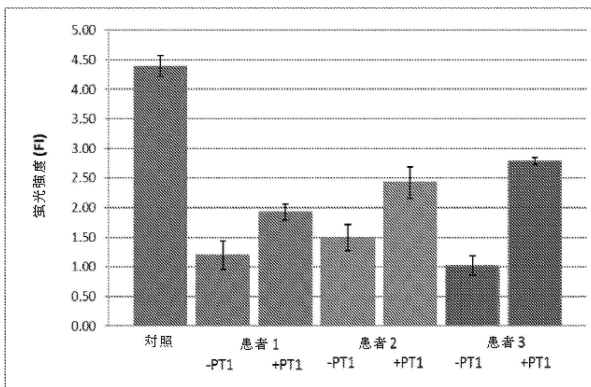


【图 2 D】

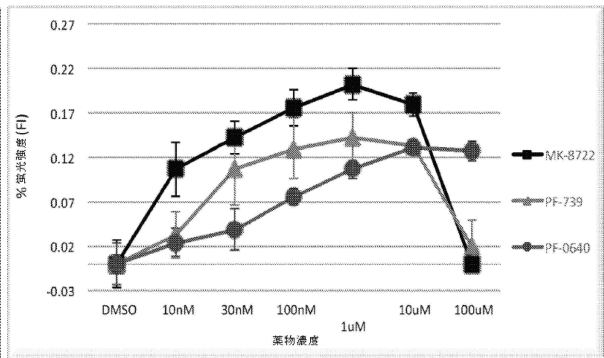


20

【图 2 E】



【图 2 F】



30

40

50

【 3 A 】

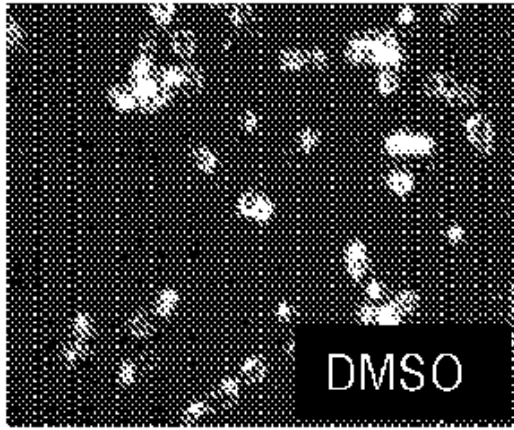


Fig. 3A

【 3 B 】

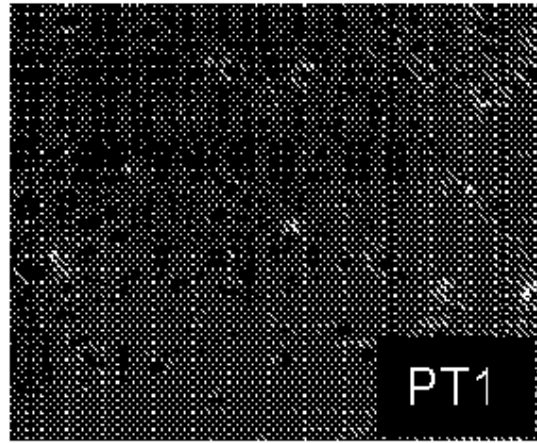


Fig. 3B

10

【 3 C 】

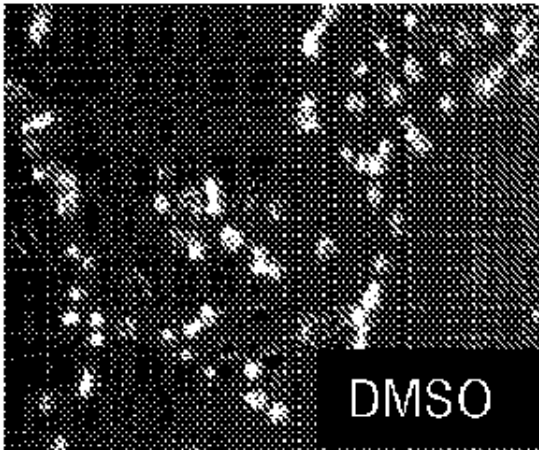


Fig. 3C

【 3 D 】

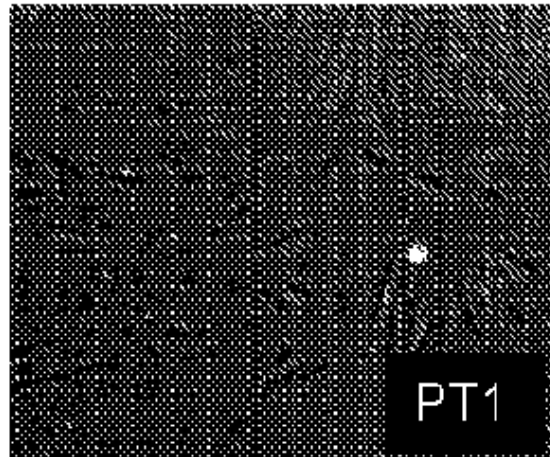


FIG. 3D

20

30

40

50

【 3 E 】

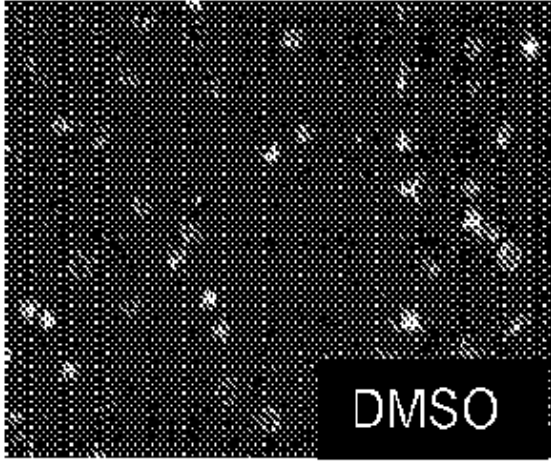


Fig. 3E

【 3 F 】

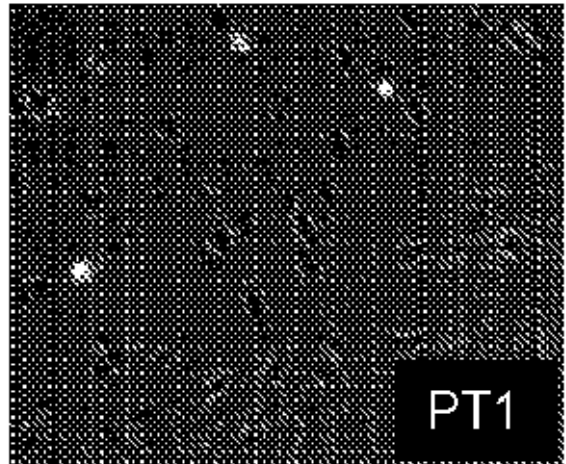


Fig. 3F

10

20

【 3 G 】

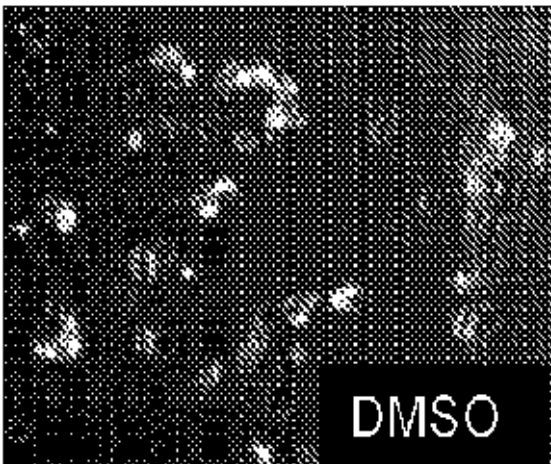


Fig. 3G

【 3 H 】

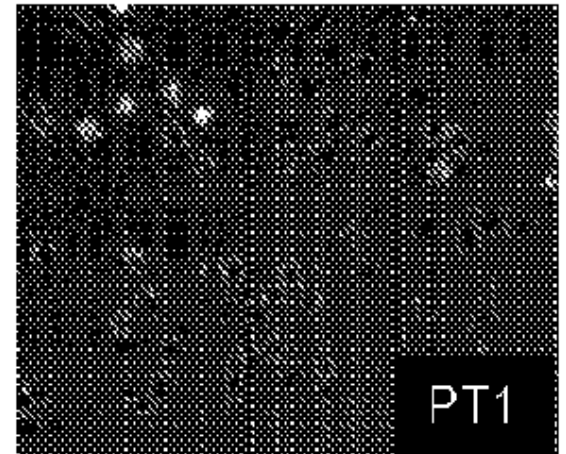


FIG. 3H

30

40

50

【 3 I 】

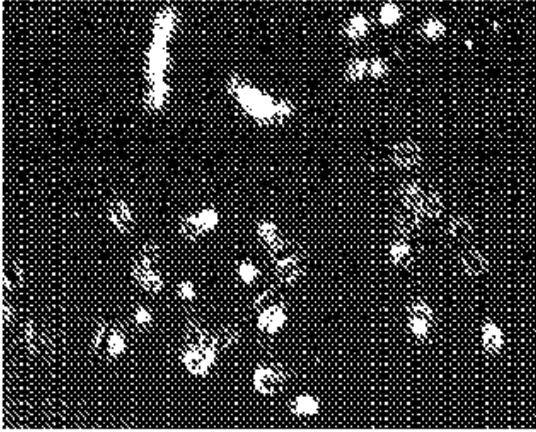


Fig. 3I

【 3 J 】

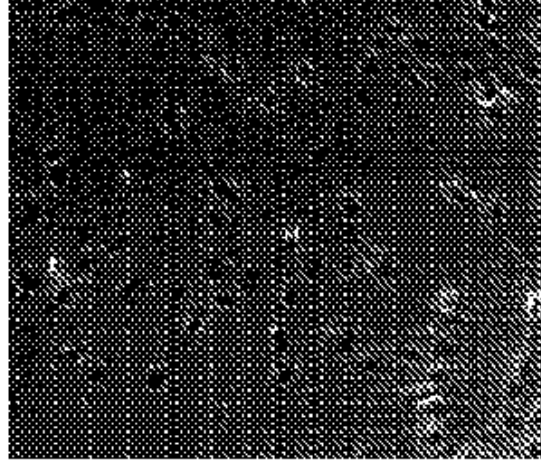


Fig. 3J

10

20

【 3 K 】

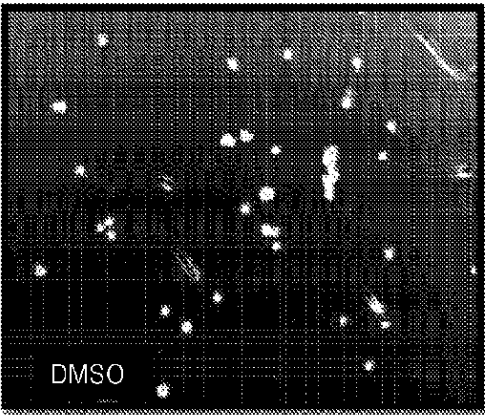


Fig. 3K

【 3 L 】

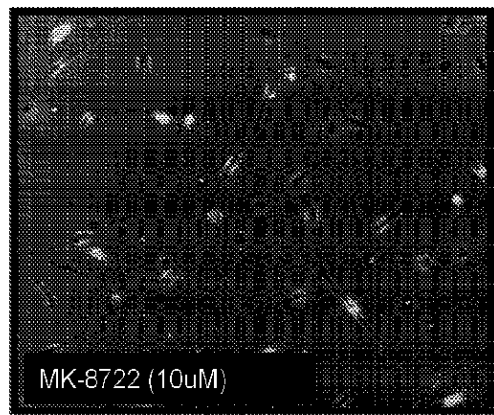


Fig. 3L

30

40

50

【 図 3 M 】

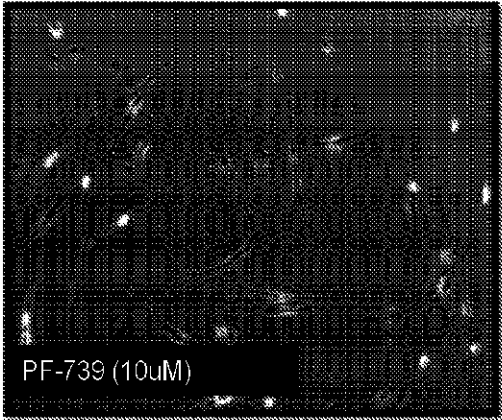


Fig. 3M

【 図 3 N 】

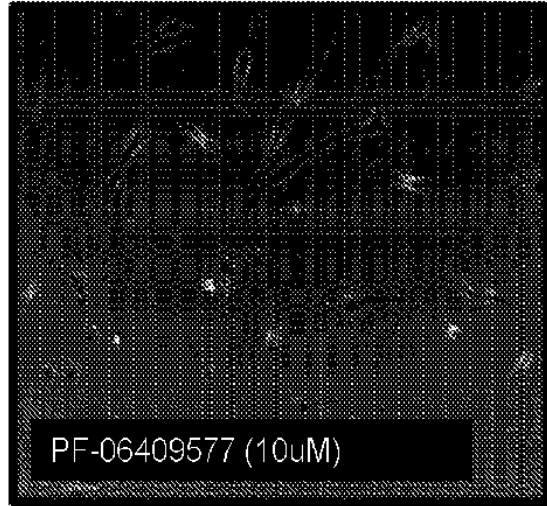
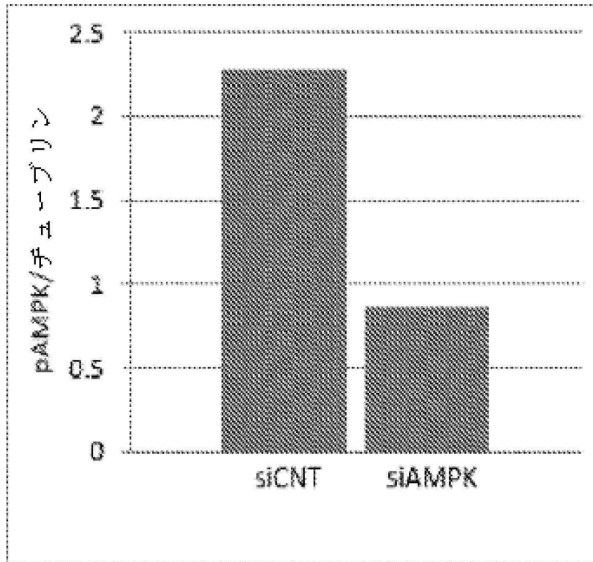


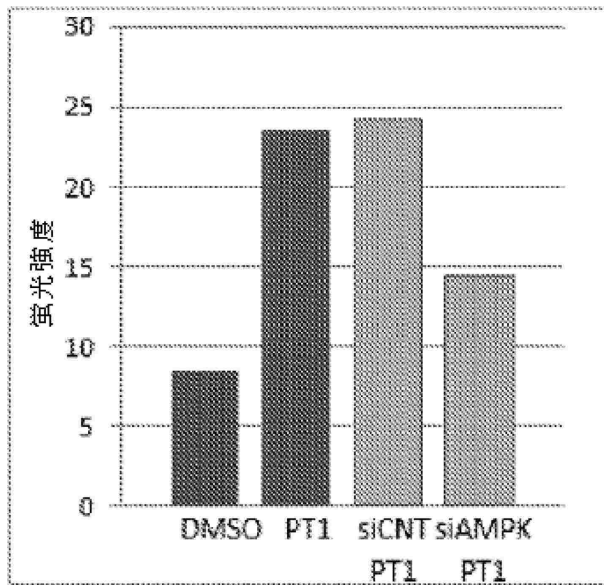
FIG. 3N

10

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



20

30

40

50

【 4 C 】

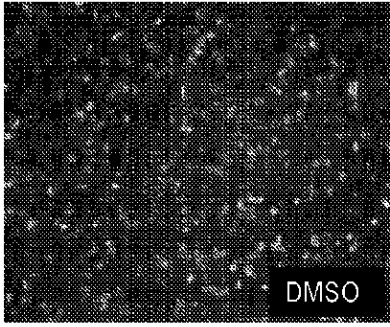


Fig. 4C

【 4 D 】

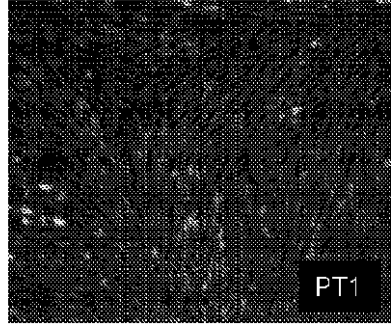


Fig. 4D

10

【 4 E 】

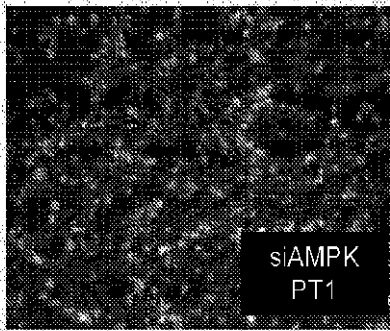


Fig. 4E

【 4 F 】

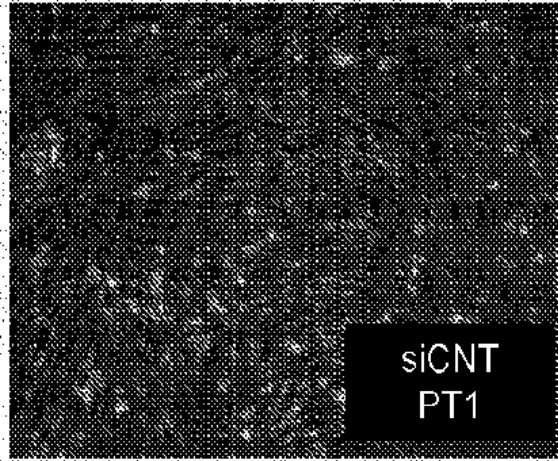


Fig. 4F

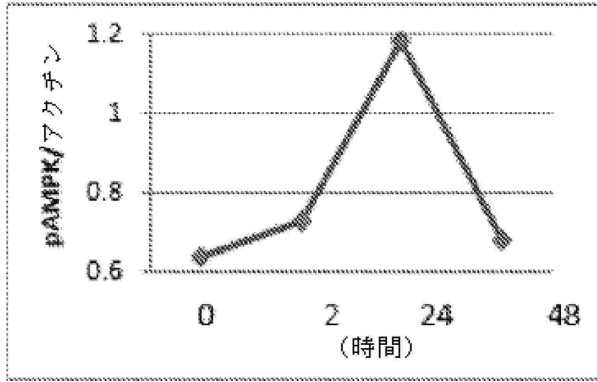
20

30

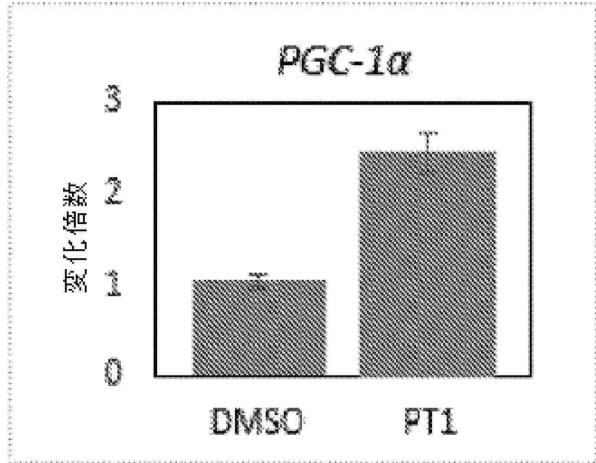
40

50

【図 5 A】

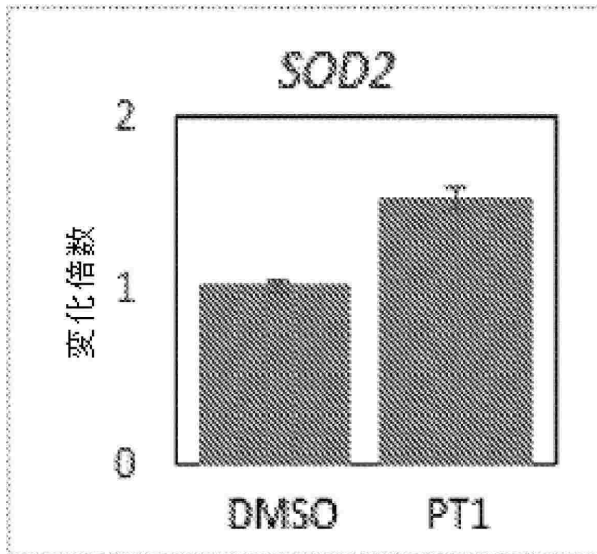


【図 5 B】

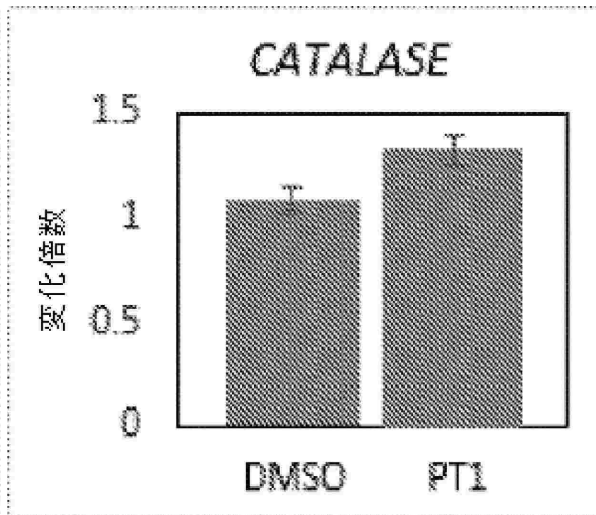


10

【図 5 C】



【図 5 D】



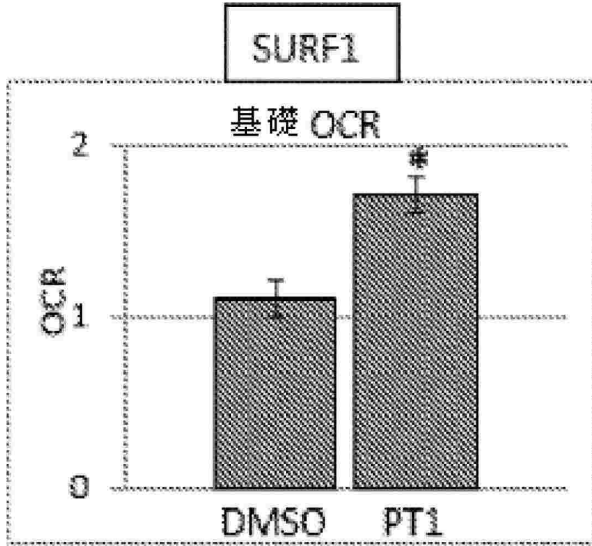
20

30

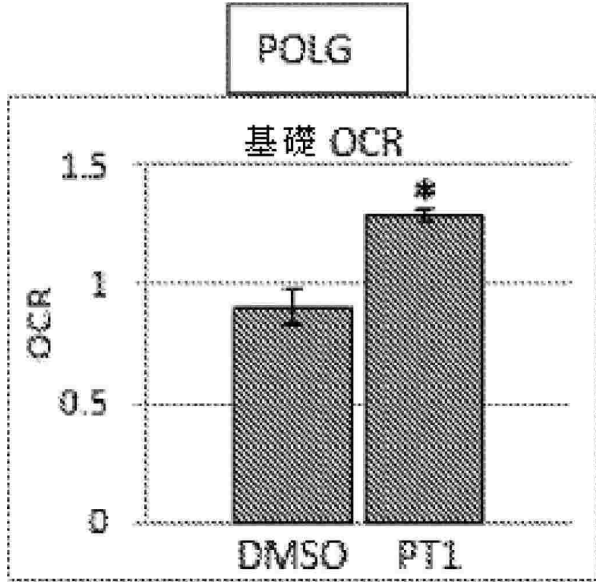
40

50

【図 6 A】

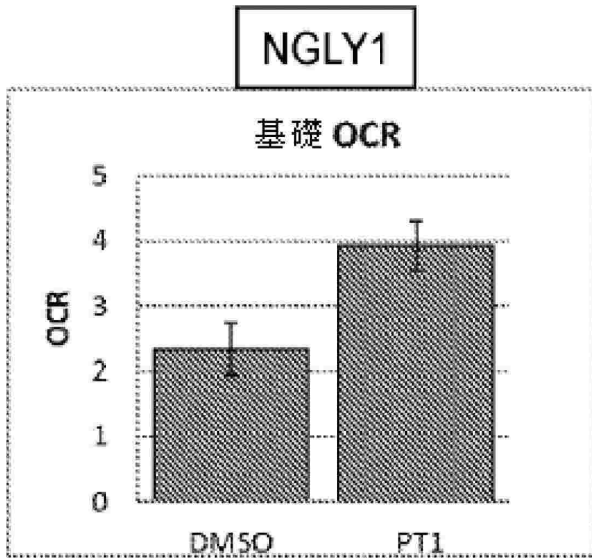


【図 6 B】

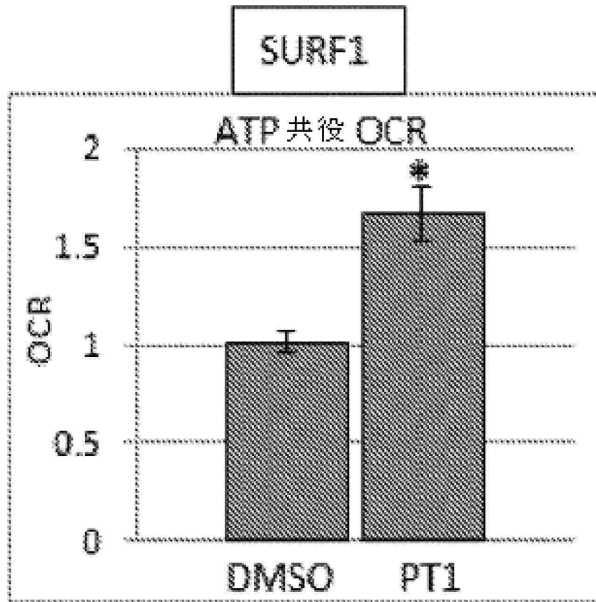


10

【図 6 C】



【図 6 D】



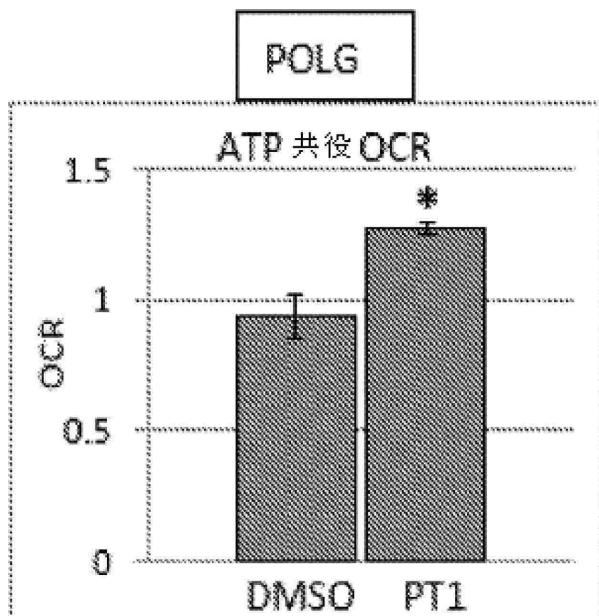
20

30

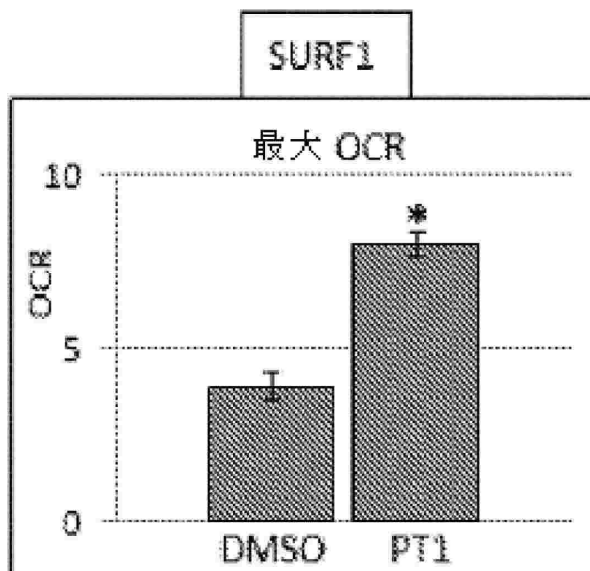
40

50

【図 6 E】

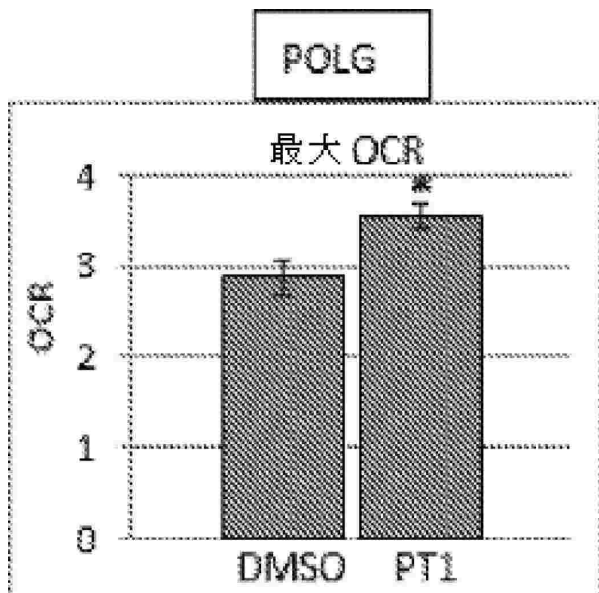


【図 6 F】

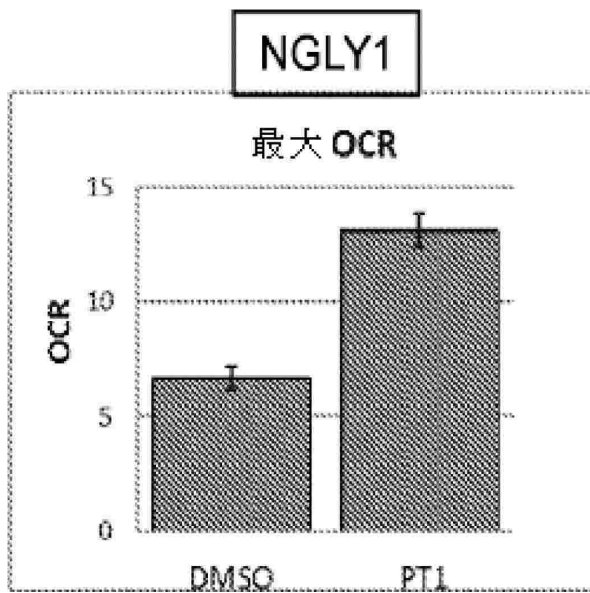


10

【図 6 G】



【図 6 H】



20

30

40

50

【 7 A 】

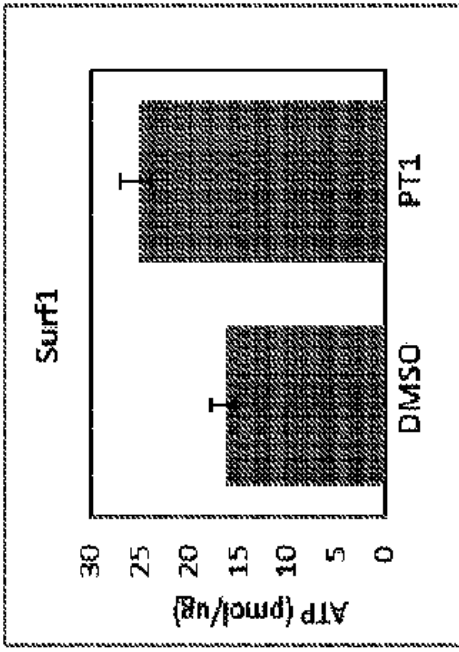


Fig. 7A

【 7 B 】

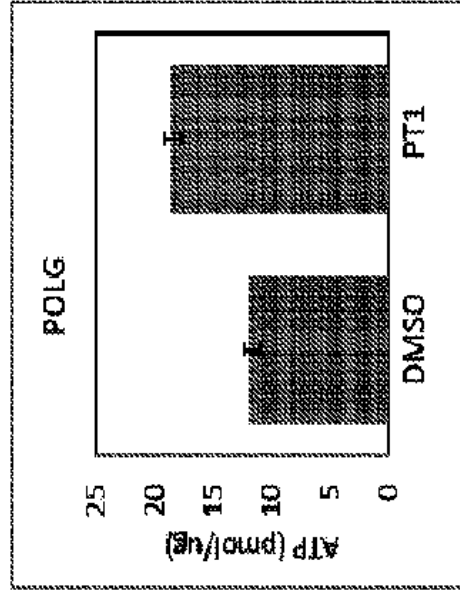


Fig. 7B

10

20

【 7 C 】

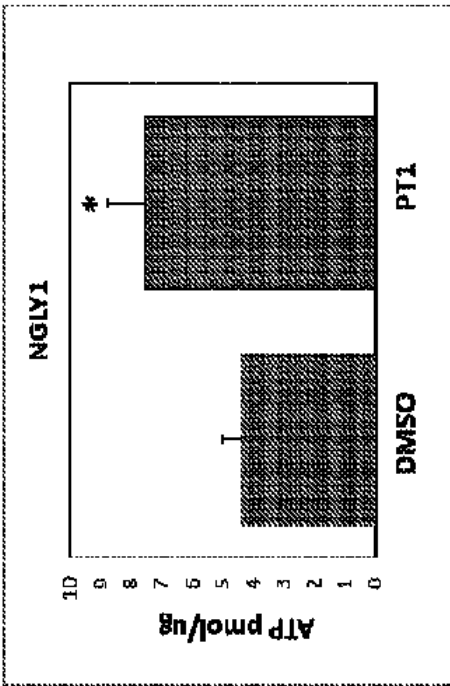


Fig. 7C

【 7 D 】

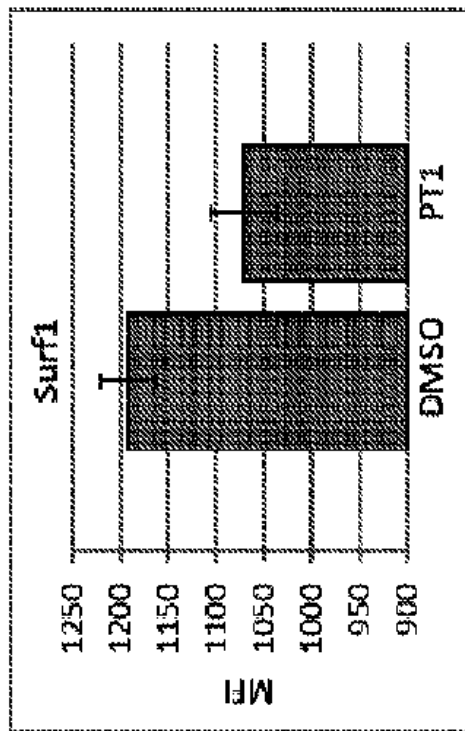


Fig. 7D

30

40

50

【 7 E 】

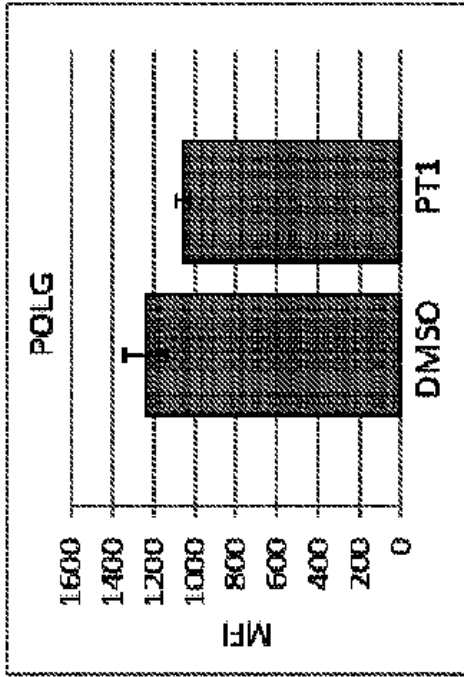


Fig. 7E

【 7 F 】

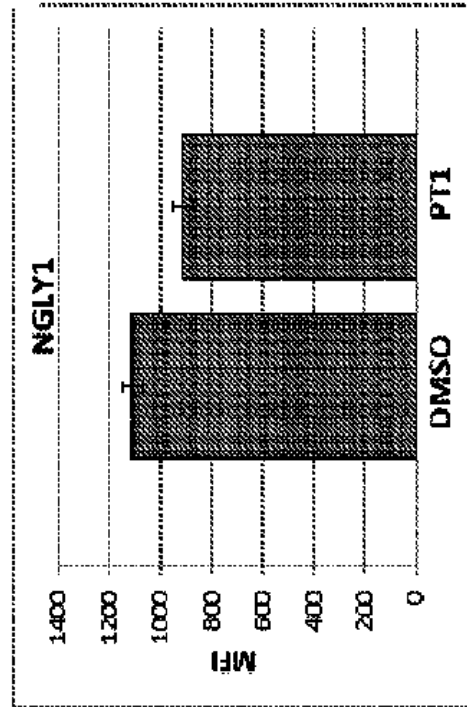
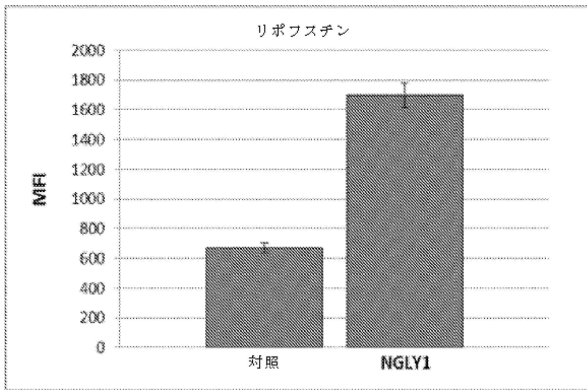


Fig. 7F

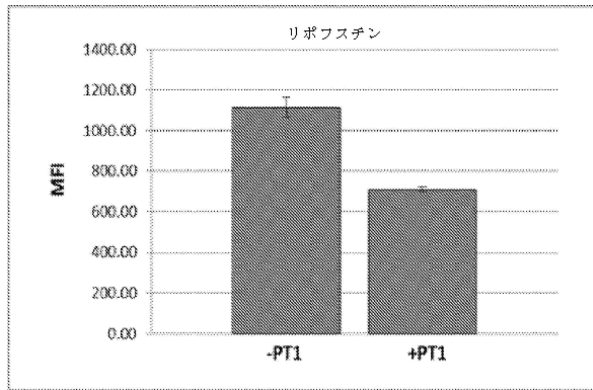
10

20

【 8 A 】



【 8 B 】



30

40

50

【 9 A 】

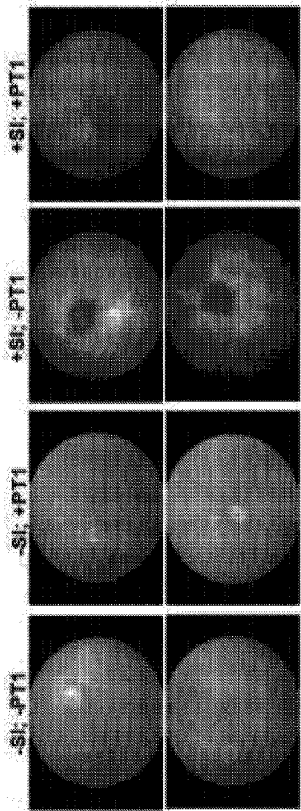


Fig. 9A

【 9 B 】

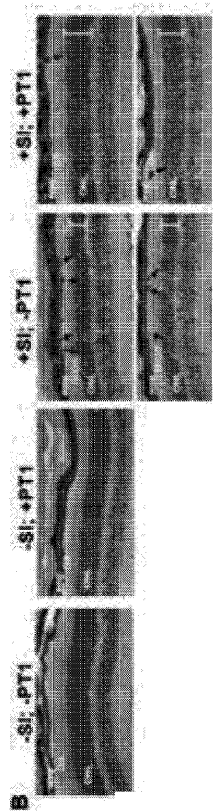
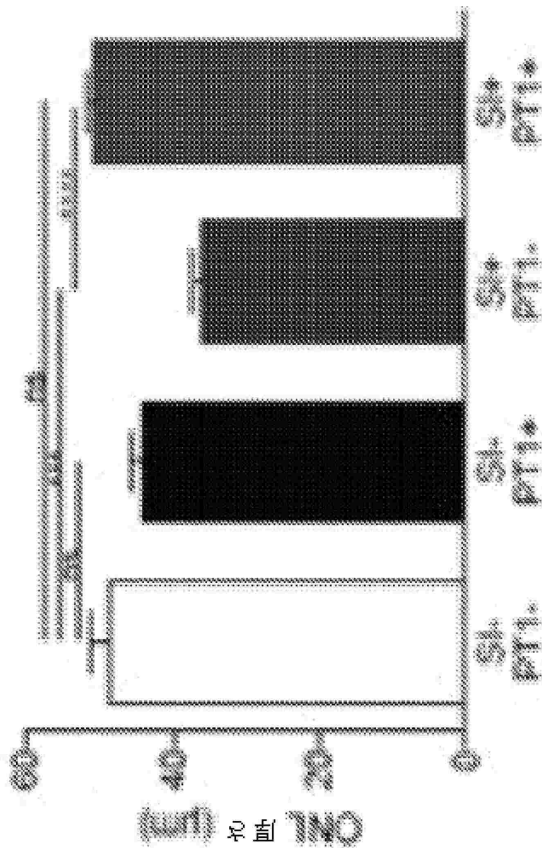
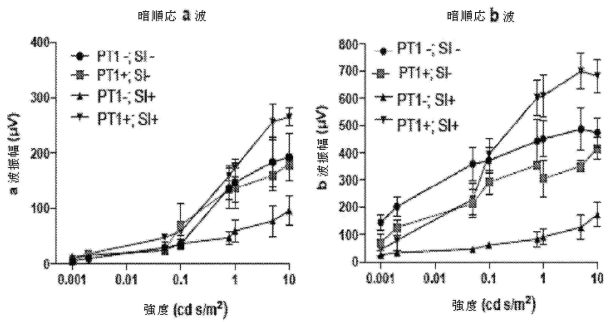


Fig. 9B

【 9 C 】



【 9 D 】



光強度 (cd s/m ²)	PT1-, SI-	PT1-, SI-	PT1-, SI-	PT1-, SI+
	対 PT1+, SI-	対 PT1+, SI+	対 PT1+, SI+	対 PT1+, SI+
暗期応答 a 波振幅 (μV)				
0.001	n.s	n.s	n.s	n.s
0.002	n.s	n.s	n.s	n.s
0.05	n.s	n.s	n.s	n.s
0.1	n.s	n.s	n.s	n.s
0.78	n.s	*	n.s	****
1	n.s	*	n.s	****
5	n.s	**	n.s	****
10	n.s	**	n.s	****
暗期応答 b 波振幅 (μV)				
0.001	n.s	n.s	n.s	n.s
0.002	n.s	n.s	n.s	n.s
0.05	n.s	**	n.s	n.s
0.1	n.s	**	n.s	****
0.78	n.s	***	n.s	****
1	n.s	***	n.s	****
5	n.s	***	n.s	****
10	n.s	*	n.s	****

10

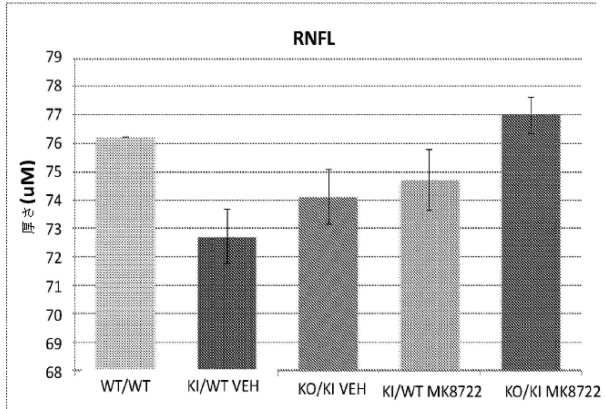
20

30

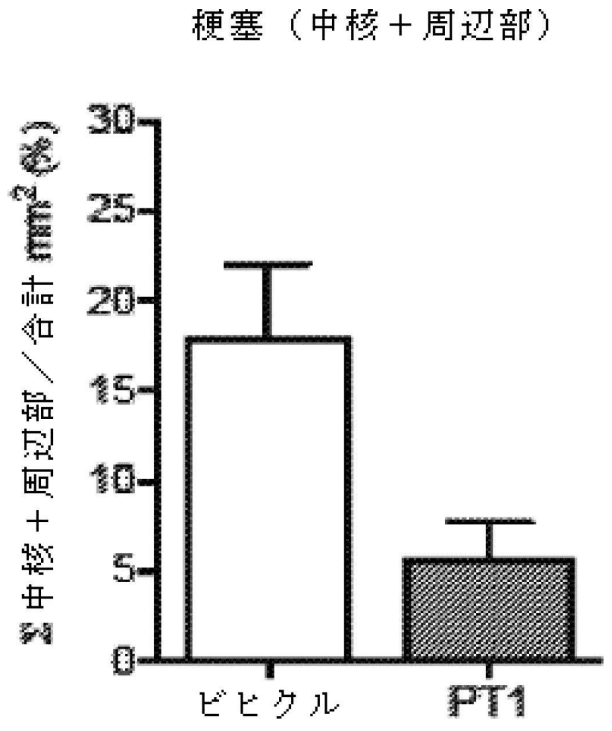
40

50

【図 9 E】



【図 10 A】



【図 10 B】

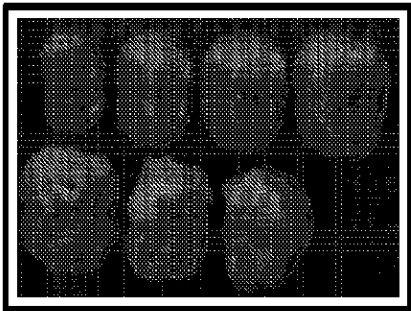


Fig. 10B

【図 10 C】

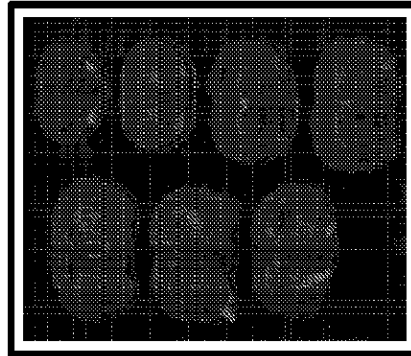


Fig. 10C

10

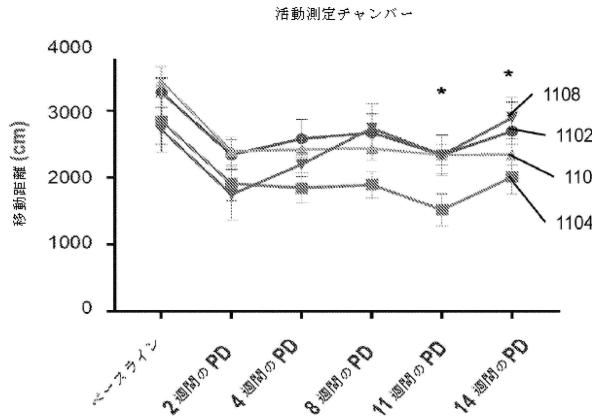
20

30

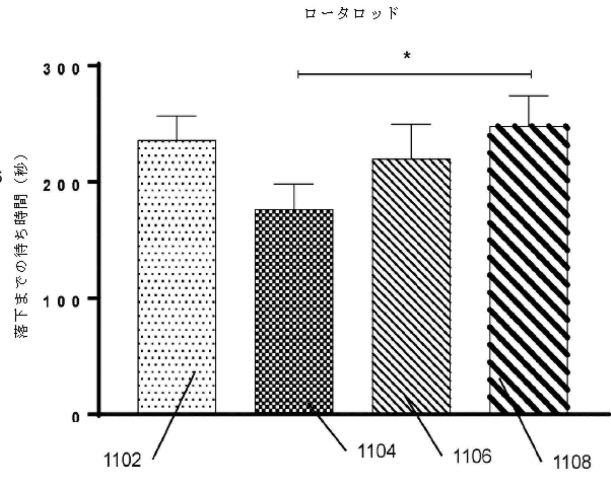
40

50

【図 1 1 A】

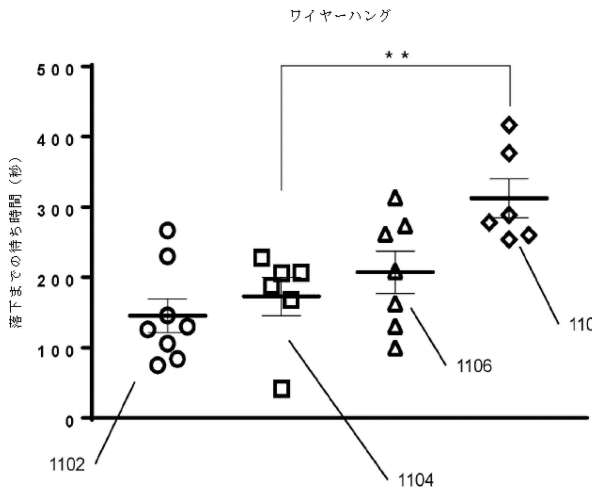


【図 1 1 B】

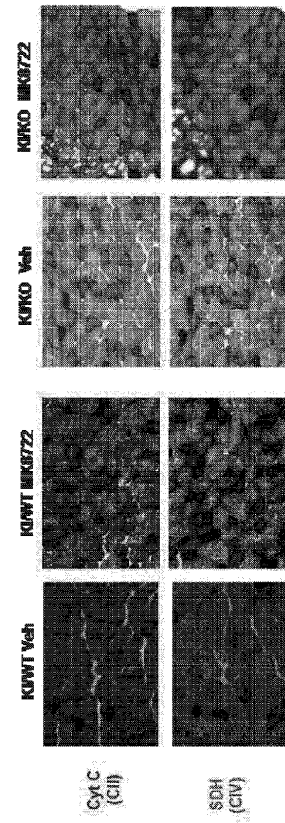


10

【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



20

30

40

50

【 1 1 E 】

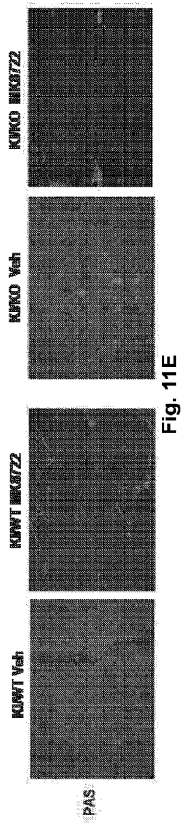


Fig. 11E

【 1 1 F 】

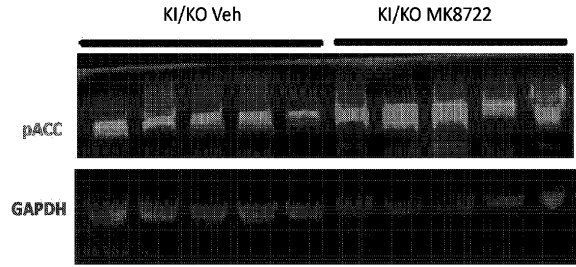


Fig. 11F

10

【 1 1 G 】

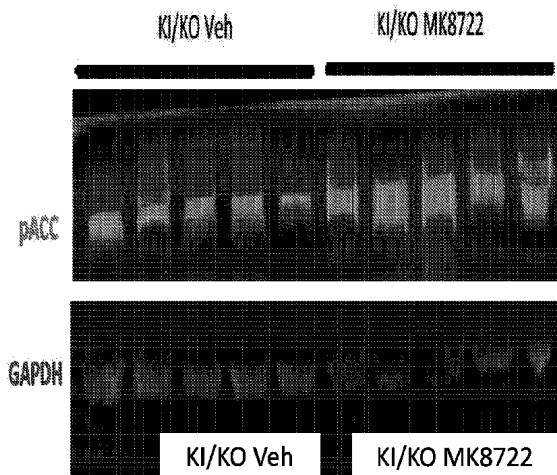


Fig. 11G

【 1 2 A 】

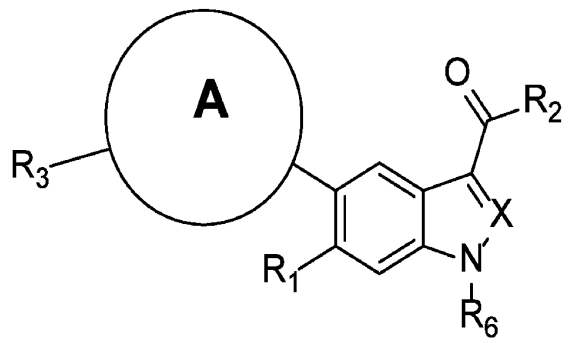


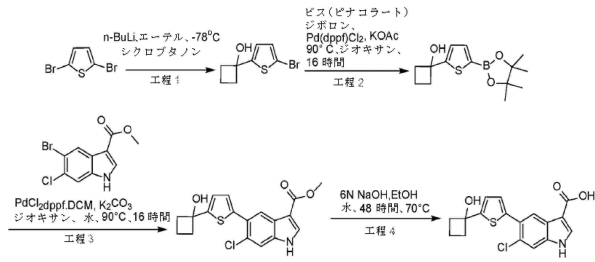
Fig. 12A

30

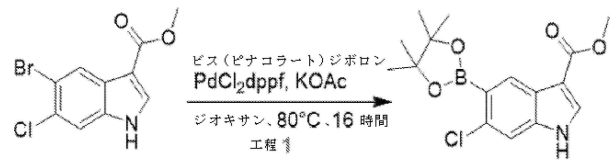
40

50

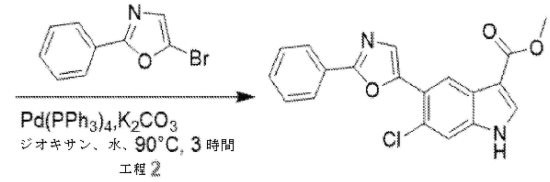
【 図 1 2 B 】



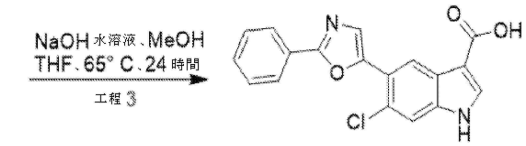
【 図 1 2 C 】



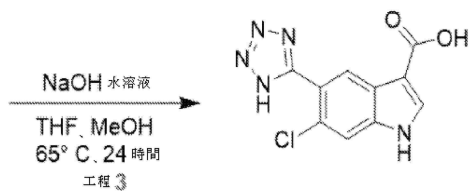
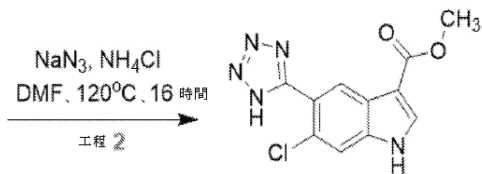
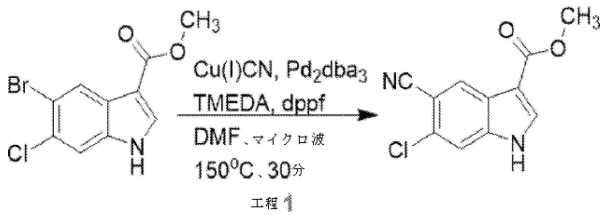
10



20



【 図 1 2 D 】



【 図 1 3 A 】

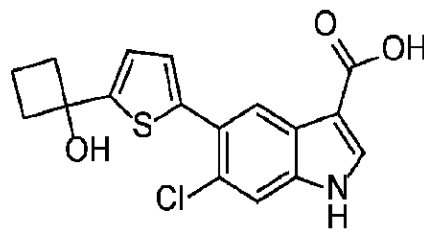


Fig. 13A

30

40

50

【 13 B 】

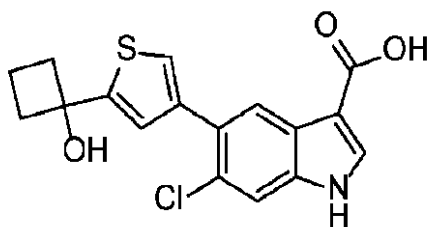


Fig. 13B

【 13 C 】

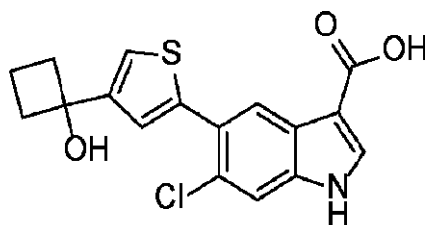


Fig. 13C

10

【 13 D 】

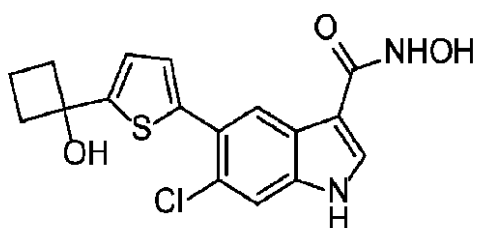


Fig. 13D

【 13 E 】

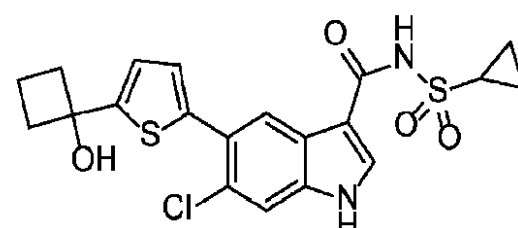


Fig. 13E

20

【 13 F 】

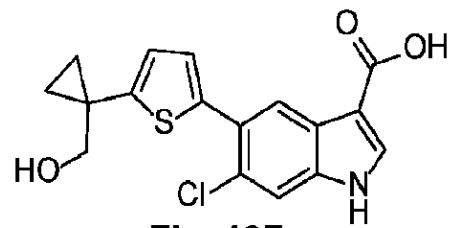


Fig. 13F

【 13 G 】

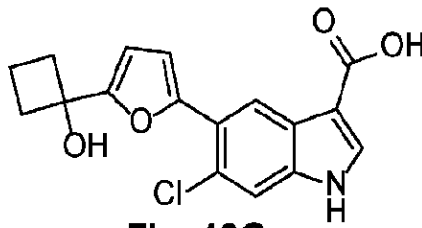


Fig. 13G

30

40

50

【 13 H 】

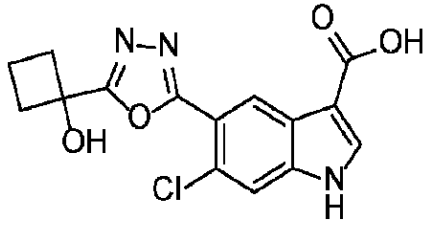


Fig. 13H

【 13 I 】

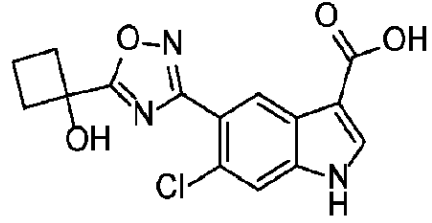


Fig. 13I

10

【 13 J 】

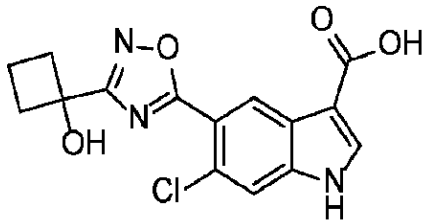


Fig. 13J

【 13 K 】

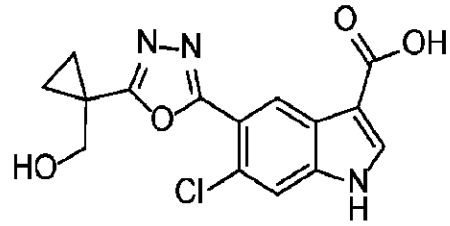


Fig. 13K

20

【 13 L 】

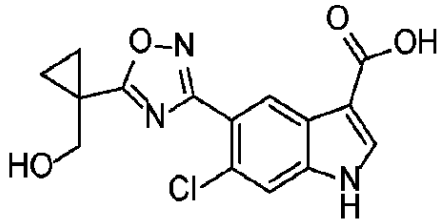


Fig. 13L

【 13 M 】

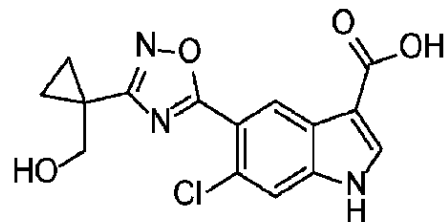


Fig. 13M

30

40

50

【 13 N 】

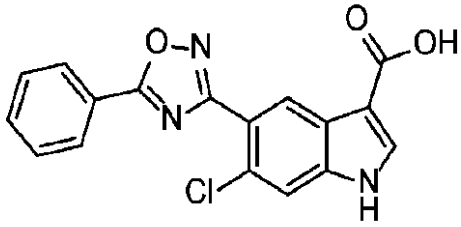


Fig. 13N

【 13 O 】

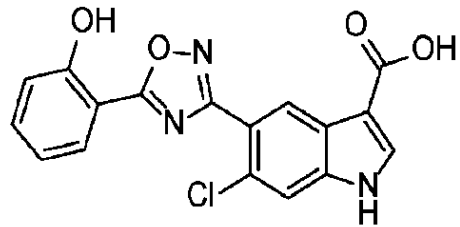


Fig. 13O

10

【 13 P 】

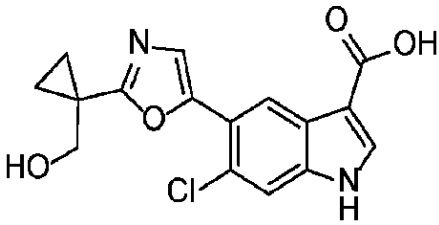


Fig. 13P

【 13 Q 】

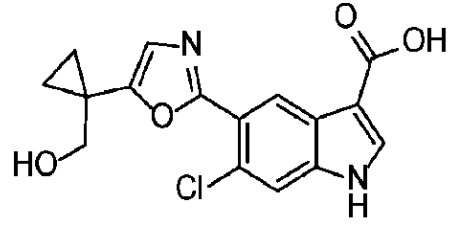


Fig. 13Q

20

【 13 R 】

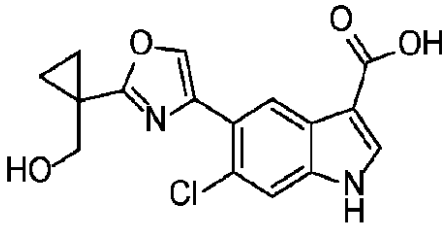


Fig. 13R

【 13 S 】

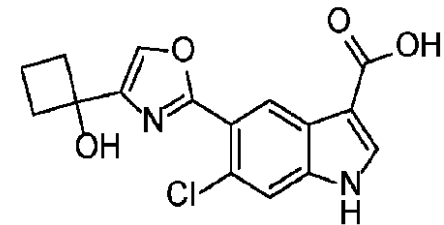


Fig. 13S

30

40

50

【 図 1 3 T 】

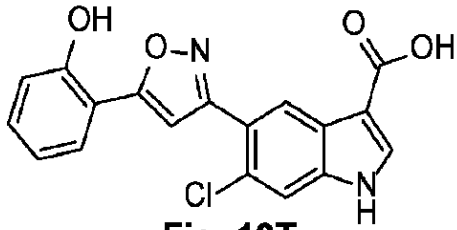


Fig. 13T

【 図 1 3 U 】

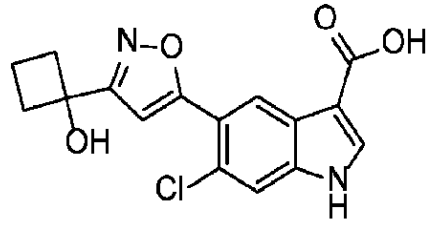


Fig. 13U

10

【 図 1 3 V 】

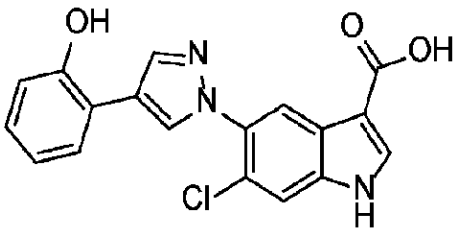


Fig. 13V

【 図 1 3 W 】

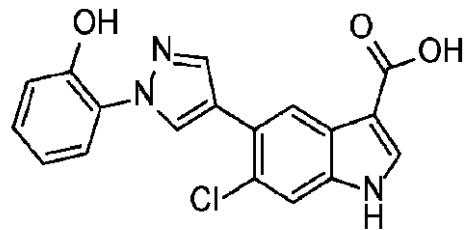


Fig. 13W

20

【 図 1 3 X 】

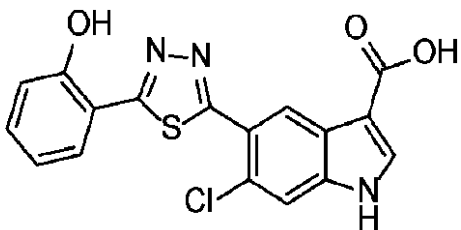


Fig. 13X

【 図 1 3 Y 】

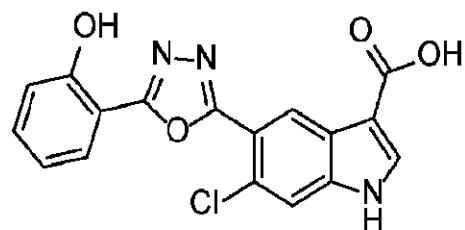


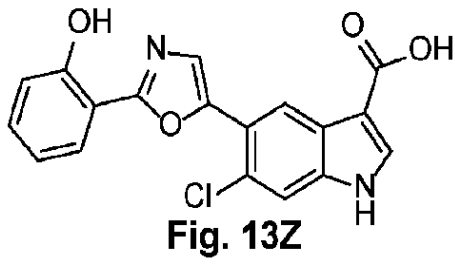
Fig. 13Y

30

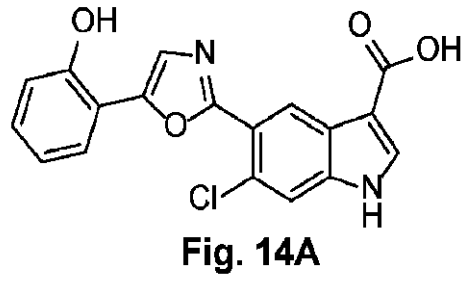
40

50

【 図 1 3 Z 】

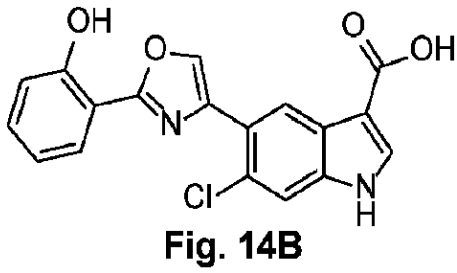


【 図 1 4 A 】

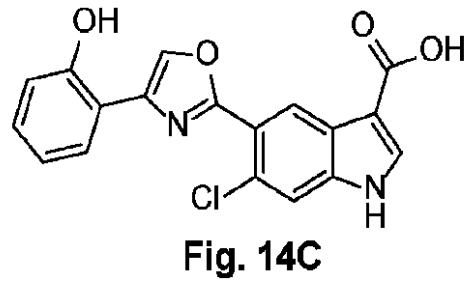


10

【 図 1 4 B 】

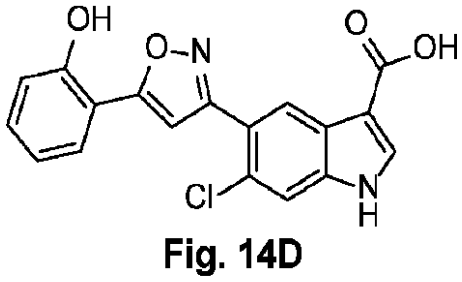


【 図 1 4 C 】

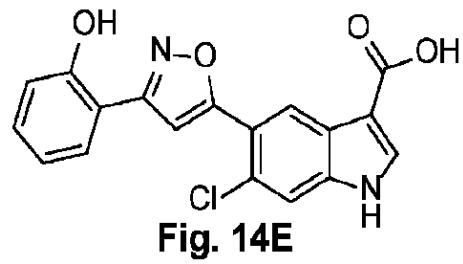


20

【 図 1 4 D 】



【 図 1 4 E 】

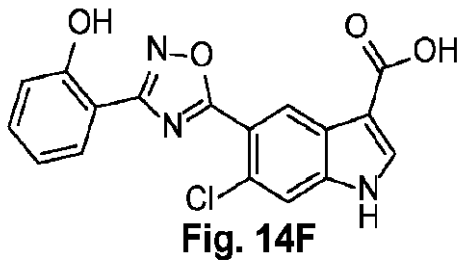


30

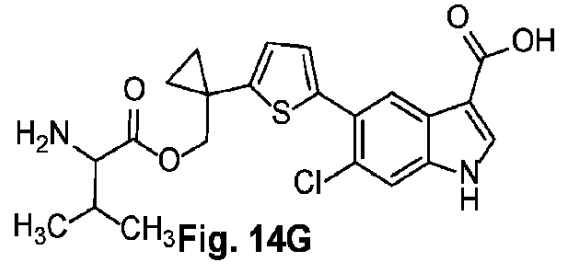
40

50

【 14 F 】

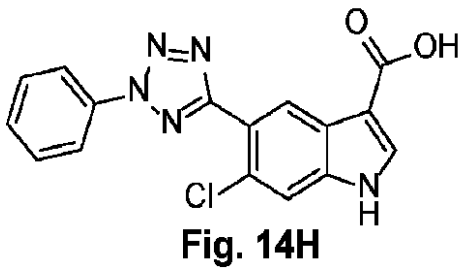


【 14 G 】

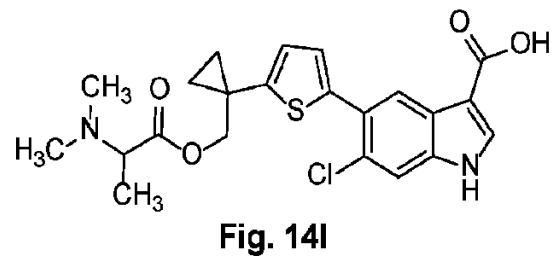


10

【 14 H 】

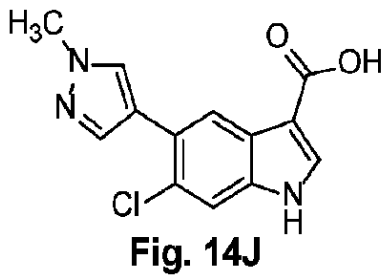


【 14 I 】

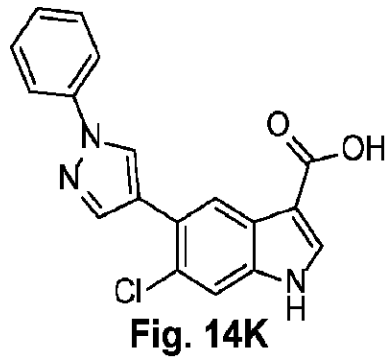


20

【 14 J 】



【 14 K 】



30

40

50

【 14 L 】

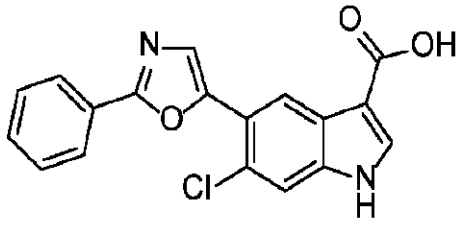


Fig. 14L

【 14 M 】

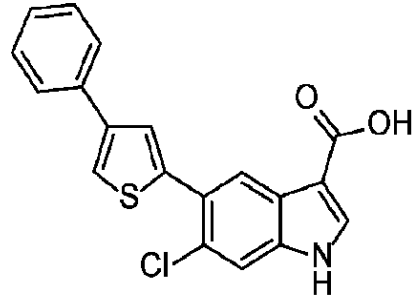


Fig. 14M

10

【 14 N 】

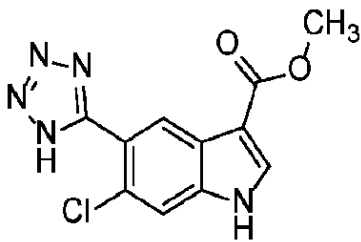


Fig. 14N

【 14 O 】

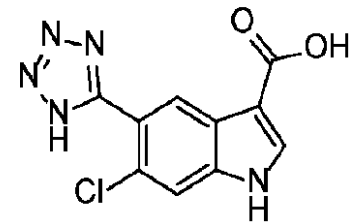


Fig. 14O

20

【 15 A 】

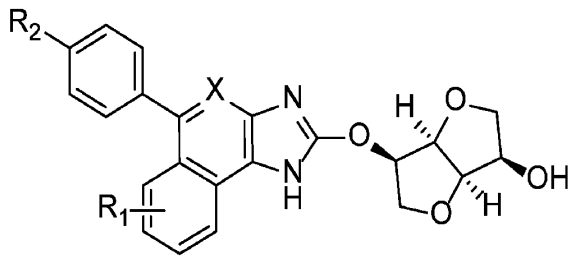


Fig. 15A

【 15 B 】

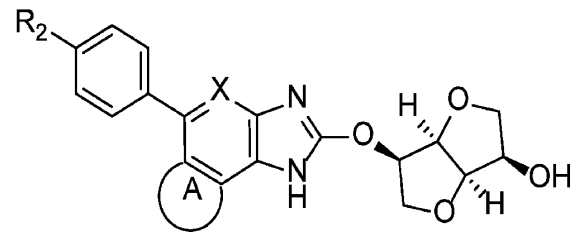


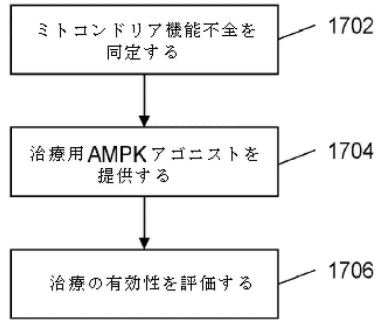
Fig. 15B

30

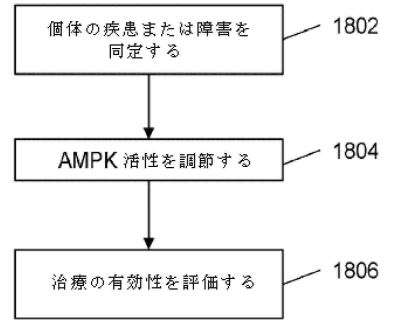
40

50

【 図 1 7 】
1700



【 図 1 8 】
1800



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00

- (72)発明者 アメリカ合衆国, 9 4 3 0 4 カリフォルニア州, パロアルト, ヒルビュー アベニュー 3 3 7 5
コーワン, ティナ, エム.
アメリカ合衆国, 9 4 3 0 4 カリフォルニア州, パロアルト, ヒルビュー アベニュー 3 3 7 5
, ルーム 2 1 0 1, メールコード: 5 3 2 4
- (72)発明者 エンズ, グレゴリー, エム.
アメリカ合衆国, 9 4 3 0 4 カリフォルニア州, パロアルト, パストゥール ドライブ 3 0 0,
スイート エイチ - 3 1 5
- (72)発明者 シャムルー, メアダッド
アメリカ合衆国, 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8 カリフォルニア州, スタンフォード, オフィス オブ ザ
ジェネラル カウンセル ビルディング 1 7 0, サード フロア, メイン クワッド, ピー.オー.
ボックス 2 0 3 8 6
- (72)発明者 グリーン, マイケル ジェイ.
アメリカ合衆国, 9 4 0 1 9 カリフォルニア州, ハーフ ムーン ベイ, バルボア ブールバード
4 0 0
- (72)発明者 ジャハンギール, アラム
アメリカ合衆国, 9 5 1 4 8 カリフォルニア州, サンノゼ, ヴァリー リッジ レーン 3 6 5 5
- (72)発明者 イェインズ, ロナルド イー.
アメリカ合衆国, 9 5 0 5 0 カリフォルニア州, サンタ クララ, ニューホール ストリート 2
6 5 6, アpartment 3 4

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 3 3 3 8 5 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 1 2 9 3 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)