

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6661533号
(P6661533)

(45) 発行日 令和2年3月11日 (2020.3.11)

(24) 登録日 令和2年2月14日 (2020.2.14)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 F	9/54	(2006.01)	C O 7 F	9/54	C S P
A 6 1 K	31/66	(2006.01)	A 6 1 K	31/66	
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 O 5
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	

請求項の数 18 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-528880 (P2016-528880)
 (86) (22) 出願日 平成26年11月21日 (2014.11.21)
 (65) 公表番号 特表2017-504561 (P2017-504561A)
 (43) 公表日 平成29年2月9日 (2017.2.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/075323
 (87) 国際公開番号 W02015/075200
 (87) 国際公開日 平成27年5月28日 (2015.5.28)
 審査請求日 平成29年11月15日 (2017.11.15)
 (31) 優先権主張番号 1320636.2
 (32) 優先日 平成25年11月22日 (2013.11.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 518160355
 ユナイテッド キングダム リサーチ ア
 ンド イノベーション
 英国 スウィンドン ノース スター ア
 ベニユー ポラリス ハウス
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74) 代理人 100188352
 弁理士 松田 一弘
 (74) 代理人 100113860
 弁理士 松橋 泰典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミトコンドリアを標的とするジカルボニル捕捉化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 1 の化合物：

A - L - B

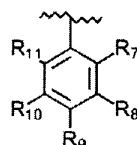
式 1

又は薬学的に許容されるその塩。

(式中、

A は、式 3 の置換アリール基であるジカルボニル捕捉部分であり、

【化 1】



式 3

式中、 $R_7 \sim R_{11}$ の 2 個又は 3 個以上は、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NH_1R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NH_1R_1$ 、 $-NHCO R_1$ 、 $-NR' -NHR'$ 及び $-C_{1-6}$ アルキレン $-NR' -NHR'$ から独

立に選択され、

残りの基 $R_7 \sim R_{11}$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- OH 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- $O-R_1$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- CO_2H 、 $-CO_2R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- CO_2R_1 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- $O-C(O)-R_1$ 、 $-CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- $CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-CHO$ 、 $-C(O)-R_1$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR_1$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHR_1$ から独立に選択され、

L は、式 6 のリンカー部分であり、

$-(Z_1)_m-X_1-(Z_2)_t-$

式 6

(式中、 Z_1 及び Z_2 は、 O 、 NR_{12} 、 $NR_{12}-C(O)$ 、 $C(O)NR_{12}$ 、 $O-C(O)$ 、 $C(O)-O$ 及び S から独立に選択され、

R_{12} は、 $-H$ 、及び $-C_{1-6}$ アルキルから選択され、

X_1 は、 C_{1-30} アルキレン、 C_{2-30} アルケニレン、 C_{2-30} アルキニレン及び C_{3-30} シクロアルキレンから選択され、

m 及び t のそれぞれは、0 又は 1 から独立に選択され、

X_1 は、水素、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アミノアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、カルボキシアルキル、シアノ、オキシ、アミノ、アルキルアミノ、アミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アラールキルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、アラールキルカルボニルアミノ、アルキルカルボニル、ヘテロシクロカルボニル、アミノスルホニル、アルキルアミノスルホニル、アルキルスルホニル、及びヘテロシクロスルホニルからなる群から独立に選択される 1 個若しくは 2 個以上の官能基で置換されていてもよい。) 20

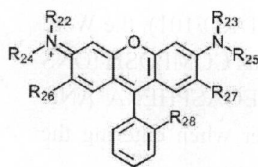
B は、

(i) 第四級ホスホニウムカチオンからなるカチオン性ミトコンドリア標的化部分；

(ii) 1, 4a, 8 - トリアザ - 2, 3, 4, 5, 6, 7 - ヘキサヒドロ - 1H - ナフタレン化合物からなるカチオン性ミトコンドリア標的化部分；及び 30

(iii) 式 13 のローダミン化合物からなるカチオン性ミトコンドリア標的化部分から選択されるミトコンドリア標的化部分である。

【化 2】



式 13

(式中、 R_{22} 、 R_{23} 及び R_{24} は、 $-H$ 及び $-C_{1-6}$ アルキルから独立に選択され、 40

R_{26} 及び R_{27} は、 $-H$ 又は $-CH_3$ から独立に選択され、

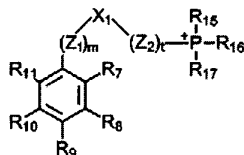
R_{28} は、 $-CO_2R_{29}$ 、 $-O-C(O)-R_{29}$ 、 $-C(O)-NHR_{29}$ 及び $-NH-C(O)-R_{29}$ から選択され、

R_{25} 及び R_{29} の一方は、リンカー L への結合であり、 R_{25} 及び R_{28} の他方は、 $-H$ 及び $-C_{1-6}$ アルキルから選択される。) 40

【請求項 2】

式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩が、式 15

【化 3】



式 1 5

(式中、 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} のそれぞれは、置換又は非置換アルキル、ベンジル、アリール及びヘテロアリールから独立に選択され、前記化合物は、薬学的に許容されるアニオンを含んでいてもよい。) の化合物の塩である請求項 1 に記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

10

【請求項 3】

$R_7 \sim R_{11}$ の 1 個 ~ 3 個は、 $-H$ である請求項 1 又は 2 に記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 4】

$R_7 = -H$ であり、 $R_{10} = -H$ であり、 $R_{11} = -H$ であり、 R_8 及び R_9 は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NHR_1$ 、 $-NHCOR_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される請求項 1、2 又は 3 に記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

20

【請求項 5】

$-L-$ が、式 7
 $-(Z_1)_m - (C_{1-30})$ アルキレン -
 式 7

のリンカー部分である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 6】

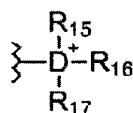
m は、1 であり、 Z_1 は、 O 及び $C(O)NR_{12}$ から選択され、 C_{1-30} アルキレンは、 $C_3 - C_6$ アルキレンから選択される請求項 5 に記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

30

【請求項 7】

B が、

【化 4】



式 1 0

を含む式 1 0 のミトコンドリア標的化部分であり、
 式中、

40

D は、リンであり、

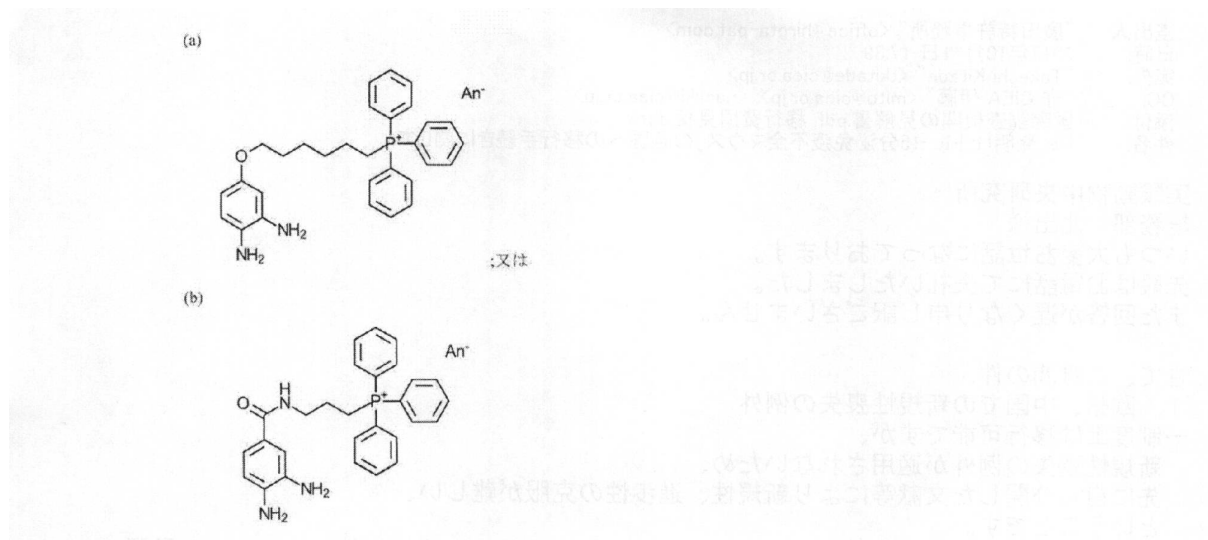
R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} のそれぞれは、置換又は非置換アルキル、ベンジル、アリール及びヘテロアリールから独立に選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 8】

B が、トリフェニルホスホニウムカチオンである、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 9】

【化 5】



10

(式中、 An^- は、任意選択の薬学的に許容されるアニオンを表す)である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩、及び薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤を含む医薬組成物。

20

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含む医薬。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含む、糖尿病の治療剤。

【請求項 13】

糖尿病が、高血糖性糖尿病である、請求項 12 に記載の治療剤。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含む、外科移植のための器官及び組織の保存剤、又は血液の貯蔵剤。

30

【請求項 15】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の上記に定義されているような式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含む、高血糖の予防又は処置剤。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含む、質量分析プローブ剤。

【請求項 17】

質量分析検出のために生物学的分子を標識化する方法であって、前記分子と請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の化合物とを接触させることを含む、前記方法。

40

【請求項 18】

生物学的分子が、ジカルボニル基を含む、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジカルボニル捕捉部分；任意選択のリンカー部分；及びミトコンドリア標的化部分を含む化合物並びに薬学的に許容されるその塩に関する。本発明はまた、このような化合物及び塩を含有する医薬組成物、並びに糖尿病、好ましくは、高血糖性糖尿病を治療するためのこのような化合物及び塩の使用に関する。本発明はまた、質量分析プローブ

50

の提供、及び質量分析検出のために生物学的分子を標識化する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

高血糖は、損傷を与える医学的状態である。高血糖は、細胞内の分子の不適當な糖化反応によってその影響を与える。この糖化反応は、反応性 1, 2 - ジカルボニル、例えば、グリオキサル及びメチルグリオキサールの産生に続いて起こる。これらの反応種は細胞中の分子を修飾し、ネガティブな病態をもたらす。

【0003】

糖タンパク質及び糖ヌクレオチド付加体の非酵素的形成である糖化反応は、細胞機能を攪乱し、一連の病態、例えば、糖尿病、老化及び神経変性における組織の損傷をもたらすことにおいて主要な役割を果たす (Brownlee, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism-Clin. Experiment.* 49:9-13; 2000、Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008、Pun, P. B.; Murphy, M. P. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int. J. Cell Biol.* 2012:843505; 2012)。糖化反応は、制御されていない糖尿病において起こるグルコースの上昇に応じて上昇し、糖尿病性合併症の主要な原因である (Brownlee, M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* Nature 414:813-820; 2001、Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22:309-317; 2011)。細胞内で、過剰なグルコースは、解糖のトリオースリン酸中間体 (Brownlee, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism-Clin. Experiment.* 49:9-13; 2000、Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of methylglyoxal from triose phosphates - investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 212:101-105; 1993) から、又はケトースの間に生じるアセトンの代謝 (Casazza, J. P.; Felver, M. E.; Veech, R. L. The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259:231-236; 1984) からの 1, 2 - ジカルボニル化合物、例えば、メチルグリオキサールの形成によって分子の損傷をもたらす。これらの反応性 1, 2 - ジカルボニルは、小生体分子、並びにタンパク質及び核酸上の反応性部分を伴う可逆的なヘミアセタール、ヘミチオアセタール及びヘミアミナルを含めて、インサイチュで修飾した化学的形態で存在することが多い (Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; Mclellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions - a kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N-alpha-acetyllysine, and bovine serum-albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994、Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5533-5538; 1998)。加えて、これらはタンパク質及び核酸上の遊離アミン官能基と直接反応して、それによって実質的な持続的修飾、例えば、アルギニンに由来するヒドロイミダゾロン、及びタンパク質上のリシン架橋 (Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* 375:581-592; 2003)、及び DNA 上のグアニンに由来するイミダゾプリノン (Thornalley, P. J.; Waris, S.; Fleming, T.; Santarius, T.; Larkin, S. J.; Winkhofer-Roob, B. M.; Stratton, M. R.; Rabbani, N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucl. Acids Res.* 38:5432-5442; 2010) を生じさせることができる。このような修飾は、タンパク質の構造及び活性を変化させることによって、並びにゲノムの変異を誘発することによって、生化学的な機能障害をもたらすと考えられる (Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing

10

20

30

40

50

and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008)。糖化反応による損傷のこれらのマーカーは、糖尿病患者からの多くの臨床試料において、及びまた糖尿病及び老化の動物モデルにおいて上昇し (Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008、Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820; 2001、Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5533-5538; 1998、Kingkeohoi, S.; Chaplen, F. W. R. Analysis of methylglyoxal metabolism in CHO cells grown in culture. *Cytotechnology* 48:1-13; 2005、Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J. H.; Wu, L. Y. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatog. B* 877:1093-1100; 2009)、これは細胞損傷及び病態に対するこれらの反応からの寄与と一致する。病態におけるメチルグリオキサル及びグリオキサルが果たす重要な役割は、これらの2種のジカルボニルを特異的に分解するグリオキサラーゼ酵素系の存在によってさらに支持される (Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269:1-11; 1990)。グリオキサラーゼ分解経路の喪失は、生物を糖化反応及びそれに続く損傷に対してより影響されやすくし、一方、その過剰発現はエレガンス線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において寿命を延ばす (Morcos, M.; Du, X.; Pfisterer, F.; Hutter, H.; Sayed, A. A.; Thornalley, P.; Ahmed, N.; Baynes, J.; Thorpe, S.; Kukudov, G.; Schlotterer, A.; Bozorgmehr, F.; El Baki, R. A.; Stern, D.; Moehrlen, F.; Ibrahim, Y.; Oikonomou, D.; Hamann, A.; Becker, C.; Zeier, M.; Schwenger, V.; Miftari, N.; Humper, t, P.; Hammes, H. P.; Buechler, M.; Bierhaus, A.; Brownlee, M.; Nawroth, P. P. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260-269; 2008)。このように、タンパク質及び核酸のジカルボニルが関連する糖化反応は、一連の病態、特に、糖尿病又は老化と関連するものにおいて重要な要因である。

【 0 0 0 4 】

高血糖において、病態の一因となるミトコンドリアの損傷及び酸化ストレスの上昇についてのかかなりの証拠が存在し、これは部分的にメチルグリオキサル及びグリオキサルによるミトコンドリアの糖化反応のためとされてきた (Green, K.; Brand, M. D.; Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S110-118; 2004、Yoon, Y.; Galloway, C. A.; Jhun, B. S.; Yu, T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14:439-457; 2011、Newsholme, P.; Gaudel, C.; Krause, M. Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942:235-247; 2012、Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9; 1999、Rosca, M. G.; Mustata, T. G.; Kinter, M. T.; Ozdemir, A. M.; Kern, T. S.; Szweda, L. I.; Brownlee, M.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Amer. J. Physiol.* 289:F420-F430; 2005、Ceriello, A.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E. The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:410-415; 2009)。さらに、これらの反応性ジカルボニルは、ミトコンドリア機能をインビトロで攪乱する (Ray, S.; Dutta, S.; Halder, J.; Ray, M. Inhibition of electron flow-through complex I of the mitochondrial respiratory-chain of Ehrlich ascites-carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochem. J.* 303:69-72; 1994、Biswas, S.; Ray, M.; Misra, S.; Dutta, D. P.; Ray, S. Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic l

euocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* 323 (Pt 2):343-348; 1997、Rosca, M. G.; Monnier, V. M.; Szveda, L. I.; Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am. J. Physiol.* 283:F52-59; 2002)。したがって、反応性ジカルボニルによる糖化反応の損傷が及ぼすミトコンドリア機能障害への寄与を理解することは、高血糖と関連する病態を分析及び理解するために重要である。しかし、機構的な詳細は不確定であり、これらのプロセスの重要性を特に評価することは困難であることが証明されてきた。これは部分的に、細胞質ゾル及びミトコンドリアの間のメチルグリオキサル及びグリオキサールの分布に関する不確実性によるものである。高血糖の影響を抑制する公知のアプローチにおいて、反応性グアニジン基を使用することが試みられてきた。これは、一般化された「モッピング」アプローチを形成する。グアニジン基は、グリオキサル/メチルグリオキサル基と反応する。しかし、このグアニジンアプローチは完全に標的とされていない。これは当技術分野において欠点である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Brownlee, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism-Clin. Experiment.* 49:9-13; 2000

【非特許文献2】Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008

【非特許文献3】Pun, P. B.; Murphy, M. P. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int. J. Cell Biol.* 2012:843505; 2012

【非特許文献4】Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820; 2001

【非特許文献5】Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22:309-317; 2011

【非特許文献6】Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of methylglyoxal from triose phosphates - investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 212:101-105; 1993

【非特許文献7】Casazza, J. P.; Felver, M. E.; Veech, R. L. The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259:231-236; 1984

【非特許文献8】Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; Mclellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions - a kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N-alpha-acetyllysine, and bovine serum-albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994

【非特許文献9】Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5533-5538; 1998

【非特許文献10】Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* 375:581-592; 2003

【非特許文献11】Thornalley, P. J.; Waris, S.; Fleming, T.; Santarius, T.; Larkin, S. J.; Winklhofer-Roob, B. M.; Stratton, M. R.; Rabbani, N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucl. Acids Res.* 38:5432-5442; 2010

【非特許文献12】Kingkeohoi, S.; Chaplen, F. W. R. Analysis of methylglyoxal me

10

20

30

40

50

tabolism in CHO cells grown in culture. Cytotechnology 48:1-13; 2005

【非特許文献 1 3】Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J. H.; Wu, L. Y. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? J. Chromatogr. B 877:1093-1100; 2009

【非特許文献 1 4】Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochem. J. 269:1-11; 1990

【非特許文献 1 5】Morcos, M.; Du, X.; Pfisterer, F.; Hutter, H.; Sayed, A. A.; Thornalley, P.; Ahmed, N.; Baynes, J.; Thorpe, S.; Kukudov, G.; Schlotterer, A.; Bozorgmehr, F.; El Baki, R. A.; Stern, D.; Moehrlen, F.; Ibrahim, Y.; Oikonomou, D.; Hamann, A.; Becker, C.; Zeier, M.; Schwenger, V.; Miftari, N.; Humpert, P.; Hammes, H. P.; Buechler, M.; Bierhaus, A.; Brownlee, M.; Nawroth, P. P. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell 7:260-269; 2008

【非特許文献 1 6】Green, K.; Brand, M. D.; Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes 53 Suppl 1:S110-118; 2004

【非特許文献 1 7】Yoon, Y.; Galloway, C. A.; Jhun, B. S.; Yu, T. Mitochondrial dynamics in diabetes. Antioxid. Redox Signal. 14:439-457; 2011

【非特許文献 1 8】Newsholme, P.; Gaudel, C.; Krause, M. Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. Adv. Exp. Med. Biol. 942:235-247; 2012

【非特許文献 1 9】Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. Diabetes 48:1-9; 1999

【非特許文献 2 0】Rosca, M. G.; Mustata, T. G.; Kinter, M. T.; Ozdemir, A. M.; Kern, T. S.; Szveda, L. I.; Brownlee, M.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. Amer. J. Physiol. 289:F420-F430; 2005

【非特許文献 2 1】Ceriello, A.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E. The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? J. Clin. Endocrinol. Metab. 94:410-415; 2009

【非特許文献 2 2】Ray, S.; Dutta, S.; Halder, J.; Ray, M. Inhibition of electron flow-through complex I of the mitochondrial respiratory-chain of Ehrlich ascites carcinoma cells by methylglyoxal. Biochem. J. 303:69-72; 1994

【非特許文献 2 3】Biswas, S.; Ray, M.; Misra, S.; Dutta, D. P.; Ray, S. Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. Biochem. J. 323 (Pt 2):343-348; 1997

【非特許文献 2 4】Rosca, M. G.; Monnier, V. M.; Szveda, L. I.; Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. Am. J. Physiol. 283:F52-59; 2002

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従来技術と関連する問題（複数可）の取組みにおいて、本発明者らによって提供される解決策は、高血糖の条件下でミトコンドリア内に見出されるジカルボニルを捕捉することができる分子の群を特異的に標的とする本発明の化合物を含む。

【課題を解決するための手段】

【0007】

これらの化合物は、標的化部分を捕捉部分にカップリングさせ、その結果、化合物はミトコンドリアにおいて優先的に蓄積し、これらの化合物は、反応性ジカルボニルによってもたらされる損傷を低減及び／又は予防することにおいて最大に有効である。任意選択で

10

20

30

40

50

、捕捉部分は、リンカー部分を介して標的化部分に結合し得る。ミトコンドリア内の反応性基を捕捉するアプローチは新規であることに留意すべきである。このアプローチは、任意の公知の治療において意図されてこなかった。ミトコンドリア自体内の反応性基を捕捉するという本発明の基礎をなすアプローチは、公知の技術からの脱却であることに留意すべきである。これら及び他の利点は、下記で例示するように本発明から得られる。

【0008】

このように、広範な態様において、本発明は、式1の化合物：

A - L - B

式1

又は薬学的に許容されるその塩に関し、式中、

Aは、置換アリール基又は置換ヘテロアリール基を含むジカルボニル捕捉部分であり、

Lは、リンカー部分であり、

Bは、ミトコンドリア標的化部分であり、

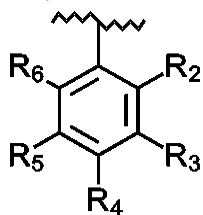
置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-^1X-NH_2$ 、 $-^1X-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-^1X-O-NH_2$ 、 $-^1X-O-NHR_1$ 、 $-NR'-NHR'$ 、 $-^1X-NR'-NHR'$ 、 $-NHCOR_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含み、

置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $-H$ 、 $-^1X-OH$ 、 $-^1X-O-R_1$ 、 $-CO_2H$ 、 $-^1X-CO_2H$ 、 $-CO_2R_1$ 、 $-^1X-CO_2R_1$ 、 $-^1X-O-C(O)-R_1$ 、 $-CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-^1X-NR_1R_1$ 、 $-^1X-CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-CHO$ 、 $-C(O)-R_1$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR_1$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHR_1$ から選択される1個又は2個以上の任意選択の置換基を含んでもよく、

各 R_1 は、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、及び式2

【0009】

【化1】



式2

【0010】

から独立に選択され、

式中、各基 $R_2 \sim R_6$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-^1X-OH$ 、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-^1X-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-NR'R'$ 、 $-^1X-NR'R'$ 、 $-^1X-NH-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NH-C_{1-6}$ アルキル、 $-^1X-O-NH_2$ 、 $-^1X-O-NH-C_{1-6}$ アルキル、 $-NR'-NHR'$ 、 $-^1X-NR'-NHR'$ 、 $-NHC(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-O-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-^1X-CO_2H$ 、 $-CO_2C_{1-6}$ アルキル、 $-^1X-CO_2C_{1-6}$ アルキル、 $-^1X-O-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-CH(OH)-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-CHO$ 、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-^1X-CH(OH)-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHC_{1-6}$ アルキル、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHC_{1-6}$ アルキルから独立に選択され、

各 R' は、-H 及び -C₁₋₆ アルキルから独立に選択され、
各¹X は、C₁₋₆ アルキレン、C₂₋₆ アルケニレン及び C₂₋₆ アルキニレンから独立に選択される。

【0011】

一態様において、本発明は、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩、及び薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤を含む、医薬組成物を提供する。

【0012】

本発明のさらなる態様は、医薬として使用するための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

10

【0013】

本発明のさらなる態様は、糖尿病、好ましくは、高血糖性糖尿病の治療において使用するための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0014】

本発明のさらなる態様は、糖尿病、好ましくは、高血糖性糖尿病の処置のための医薬の調製のための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0015】

本発明のさらなる態様は、対象において疾患又は状態を治療する方法であって、対象に有効量の上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を投与することを含み、疾患又は状態は、糖尿病、好ましくは、高血糖性糖尿病である、方法を提供する。

20

【0016】

本発明のさらなる態様は、外科移植のための器官及び組織の保存において使用するのための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0017】

本発明のさらなる態様は、血液の貯蔵において使用するのための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

30

【0018】

本発明のさらなる態様は、高血糖の予防又は治療において使用するのための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0019】

本発明のさらなる態様は、質量分析プローブとして使用するのための、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【0020】

本発明のさらなる態様は、質量分析検出のための生物学的分子を標識化する方法であって、前記分子と式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩とを接触させることを含む、方法を提供する。

40

【0021】

発明の詳細な説明

「置換された」は、化学的置換基又は部分（例えば、アルキル基）と関連して使用されるとき、置換基又は部分の 1 個又は 2 個以上の水素原子が、1 個又は 2 個以上の非水素原子又は基で置き換えられているが、ただし、原子価の必要条件が満たされており、化学的に安定的な化合物が置換からもたらされることを意味する。

【0022】

「アルキル」は、特定の数の炭素原子を一般に有する直鎖及び分岐状の飽和炭化水素基を指す（例えば、C₁₋₃ アルキルは、1 ~ 3 個の炭素原子を有するアルキル基を指し、C₁₋₆ アルキルは、1 ~ 6 個の炭素原子を有するアルキル基を指す、など）。アルキル

50

基の例には、メチル、エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、*i*-ブチル、*t*-ブチル、ペンタ-1-イル、ペンタ-2-イル、ペンタ-3-イル、3-メチルブタ-1-イル、3-メチルブタ-2-イル、2-メチルブタ-2-イル、2,2,2-トリメチルエタ-1-イル、*n*-ヘキシルなどが含まれる。

【0023】

「アルキレン」は、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ によって例示されるような、直鎖又は分岐状であり得るアルカンに由来する二価ラジカルを指す。

【0024】

用語「シクロアルキル」は、それ自体で又は他の用語と組み合わせて、特に明記しない限り、「アルキル」の環状バージョンを表す。シクロアルキルの例には、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが含まれる。

【0025】

用語「アルケニル」は、本明細書において使用する場合、これらに限定されないが、エテニル、プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルなどを含めた、少なくとも1個の二重結合を有する炭化水素ラジカルを意味する。

【0026】

用語「アルケニレン」は、 $-CH_2CH=CH-$ 、又は $-CH_2CH(CH_3)CH=CH-CH_2-$ によって例示されるような、1個又は2個以上の二重結合を含有する直鎖又は分岐状でよいアルケニルに由来する二価ラジカルを指す。

【0027】

用語「アルキニル」は、本明細書において使用する場合、これらに限定されないが、エチニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニルなどを含めた、少なくとも1個の三重結合を有する炭化水素ラジカルを意味する。

【0028】

用語「アルキニレン」は、エチン-1,2-ジイルによって例示されるような、1個又は2個以上の炭素-炭素三重結合を含有する直鎖状又は分岐状であり得る二価不飽和炭化水素基を指す。

【0029】

「アリール」は、単独で、又は他の用語と組み合わせて用いられて（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）、完全不飽和単環式芳香族炭化水素、及び少なくとも1個の芳香族環を有する多環式炭化水素を指し、単環式及び多環式の両方のアリール基は一般に、これらの環員を構成する特定の数の炭素原子を有する（例えば、 C_{6-14} アリールは、環員として6~14個の炭素原子を有するアリール基を指す）。アリール基は、このような結合又は置換が原子価の必要条件に違反しない限り、親基に、又は任意の環原子における基質に結合してもよく、且つ1個又は2個以上の非水素置換基を含み得る。アリール基の例には、フェニル、ピフェニル、シクロブタベンゼニル、インデニル、ナフタレニル、ベンゾシクロヘプテニル、ピフェニレニル、フルオレニル、シクロヘプタトリエンカチオンに由来する基などが含まれる。

【0030】

「アリーレン」は、アリール基に由来する二価ラジカルを指す。

【0031】

用語「アルコキシ」は、本明細書において使用する場合、O-アルキル基を意味し、「アルキル」は上記で定義する。

【0032】

用語「アラルキル」又は「アリールアルキル」は、アリール-アルキル基を意味し、ここで、アリール及びアルキルは従前に記載した通りである。好ましいアラルキルは、アリール基に結合した低級アルキル基を含む。適切なアラルキル基の非限定的例には、フェニルメチレン、2-フェネチル及びナフタレニルメチルが含まれる。親部分への結合は、アルキルを介してである。

【0033】

「シクロアルキル」は、環（複数可）を構成する特定の数の炭素原子を一般に有する飽和単環式及び二環式炭化水素基を指す（例えば、 $C_3 \sim 8$ シクロアルキルは、環員として3～8個の炭素原子を有するシクロアルキル基を指す）。二環式炭化水素基は、分離した環（炭素原子を共有しない2個の環）、スピロ環（1個の炭素原子を共有する2個の環）、縮合環（2個の炭素原子、及び2個の共通の炭素原子の間の結合を共有する2個の環）、及び架橋環（2個の炭素原子を共有するが、共通の結合を共有しない2個の環）を含み得る。シクロアルキル基は、このような結合が原子価の必要条件に違反しない限り、親基に、又は任意の環原子における基質に結合してもよい。さらに、シクロアルキル基は、このような置換が原子価の必要条件に違反しない限り、1個又は2個以上の非水素置換基を含み得る。

10

【0034】

単環式シクロアルキル基の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが含まれる。縮合二環式シクロアルキル基の例には、ビスクロ[2.1.0]ペンタニル（すなわち、ビスクロ[2.1.0]ペンタン-1-イル、ビスクロ[2.1.0]ペンタン-2-イル、及びビスクロ[2.1.0]ペンタン-5-イル）、ビスクロ[3.1.0]ヘキサニル、ビスクロ[3.2.0]ヘプタニル、ビスクロ[4.1.0]ヘプタニル、ビスクロ[3.3.0]オクタニル、ビスクロ[4.2.0]オクタニル、ビスクロ[4.3.0]ノナニル、ビスクロ[4.4.0]デカニルなどが含まれる。架橋シクロアルキル基の例には、ビスクロ[2.1.1]ヘキサニル、ビスクロ[2.2.1]ヘプタニル、ビスクロ[3.1.1]ヘプタニル、ビスクロ[2.2.2]オクタニル、ビスクロ[3.2.1]オクタニル、ビスクロ[4.1.1]オクタニル、ビスクロ[3.3.1]ノナニル、ビスクロ[4.2.1]ノナニル、ビスクロ[3.3.2]デカニル、ビスクロ[4.2.2]デカニル、ビスクロ[4.3.1]デカニル、ビスクロ[3.3.3]ウンデカニル、ビスクロ[4.3.2]ウンデカニル、ビスクロ[4.3.3]ドデカニルなどが含まれる。スピロシクロアルキル基の例には、スピロ[3.3]ヘプタニル、スピロ[2.4]ヘプタニル、スピロ[3.4]オクタニル、スピロ[2.5]オクタニル、スピロ[3.5]ノナニルなどが含まれる。単離した二環式シクロアルキル基の例には、ビ（シクロブタン）、シクロブタンシクロペンタン、ビ（シクロペンタン）、シクロブタンシクロヘキサン、シクロペンタンシクロヘキサン、ビ（シクロヘキサン）などに由来するものが含まれる。

20

30

【0035】

「薬物」、「薬物物質」、「活性医薬成分」などは、治療を必要とする対象を治療するために使用し得る化合物（例えば、式1の化合物及び上で特に名前を挙げた化合物）を指す。

【0036】

「賦形剤」は、薬物の生物学的利用能に影響を与え得るが、その他の点で薬理学的に不活性である任意の物質を指す。

【0037】

「ハロ」、「ハロゲン」及び「ハロゲノ」は互換的に使用されてもよく、フルオロ、クロロ、プロモ、及びヨードを指す。さらに、「フルオロアルキル」などの用語は、モノフルオロアルキル及びポリフルオロアルキルを含むことを意味する。

40

【0038】

「ヘテロアリール」は、不飽和単環式芳香族基、及び少なくとも1個の芳香族環を有する多環式基を指し、基のそれぞれは、炭素原子、並びに窒素、酸素、及び硫黄から独立に選択される1～4個のヘテロ原子からなる環原子を有する。単環式及び多環式基の両方は一般に、環員として特定の数の炭素原子を有し（例えば、 $C_1 \sim 9$ ヘテロアリールは、環員として1～9個の炭素原子及び1～4個のヘテロ原子を有するヘテロアリール基を指す）、且つ任意の二環式基を含んでもよく、ここでは上で挙げた単環式複素環のいずれかがベンゼン環に縮合している。ヘテロアリール基は、このような結合又は置換が、原子価の

50

必要条件に違反し、又は化学的に不安定な化合物をもたらさない限り、親基に、又は任意の環原子における基質に結合してもよく、且つ1個又は2個以上の非水素置換基を含み得る。ヘテロアリアル基の例には、単環式基、例えば、ピロリル（例えば、ピロール - 1 - イル、ピロール - 2 - イル、及びピロール - 3 - イル）、フラニル、チオフェニル、ピラゾリル、イミダゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、1, 2, 3 - トリアゾリル、1, 3, 4 - トリアゾリル、1 - オキサ - 2, 3 - ジアゾリル、1 - オキサ - 2, 4 - ジアゾリル、1 - オキサ - 2, 5 - ジアゾリル、1 - オキサ - 3, 4 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 3 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 4 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 5 - ジアゾリル、1 - チア - 3, 4 - ジアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、及びピラジニルが含まれる。

10

【0039】

ヘテロアリアル基の例にはまた、二環式基、例えば、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾ[*c*]チオフェニル、インドリル、3H - インドリル、イソインドリル、1H - イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、クロマニル、2 - フェニルクロマニル、3 - フェニルクロマニル、4 - フェニルクロマニル、クロメン - 4 - オニル、2 - フェニルクロメン - 4 - オニル、3 - フェニルクロメン - 4 - オニル、クマリニル、3 - フェニルクマリニル、4 - フェニルクマリニル、1, 8 - ビス[2 - クロマニル] - 6 - ベンゾ[7]アヌレオニル、1H - ピロロ[2, 3 - *b*]ピリジニル、1H - ピロロ[2, 3 - *c*]ピリジニル、1H - ピロロ[3, 2 - *c*]ピリジニル、1H - ピロロ[3, 2 - *b*]ピリジニル、3H - イミダゾ[4, 5 - *b*]ピリジニル、3H - イミダゾ[4, 5 - *c*]ピリジニル、1H - ピラゾロ[4, 3 - *b*]ピリジニル、1H - ピラゾロ[4, 3 - *c*]ピリジニル、1H - ピラゾロ[3, 4 - *c*]ピリジニル、1H - ピラゾロ[3, 4 - *b*]ピリジニル、7H - プリニル、インドリジニル、イミダゾ[1, 2 - *c*]ピリジニル、イミダゾ[1, 5 - *c*]ピリジニル、ピラゾロ[1, 5 - *c*]ピリジニル、ピロロ[1, 2 - *b*]ピリダジニル、イミダゾ[1, 2 - *c*]ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、フタラジニル、1, 6 - ナフチリジニル、1, 7 - ナフチリジニル、1, 8 - ナフチリジニル、1, 5 - ナフチリジニル、2, 6 - ナフチリジニル、2, 7 - ナフチリジニル、ピリド[3, 2 - *c*]ピリミジニル、ピリド[4, 3 - *c*]ピリミジニル、ピリド[3, 4 - *c*]ピリミジニル、ピリド[2, 3 - *c*]ピリミジニル、ピリド[2, 3 - *b*]ピラジニル、ピリド[3, 4 - *b*]ピラジニル、ピリミド[5, 4 - *c*]ピリミジニル、ピラジノ[2, 3 - *b*]ピラジニル、及びピリミド[4, 5 - *c*]ピリミジニルが含まれる。

20

30

【0040】

「複素環」及び「ヘテロシクリル」は、互換的に使用してもよく、炭素原子、並びに窒素、酸素、及び硫黄から独立に選択される1~4個のヘテロ原子からなる環原子を有する、飽和又は部分不飽和の単環式又は二環式基を指す。単環式及び二環式基の両方は一般に、これらの環（複数可）中に特定の数の炭素原子を有する（例えば、 C_{2-5} ヘテロシクリルは、環員として2~5個の炭素原子及び1~4個のヘテロ原子を有するヘテロシクリル基を指す）。二環式シクロアルキル基と同様に、二環式ヘテロシクリル基は、分離した環、スピロ環、縮合環、及び架橋環を含み得る。ヘテロシクリル基は、このような結合又は置換が原子価の必要条件に違反しない限り、又は化学的に不安定な化合物をもたらさない限り、親基に、又は任意の環原子における基質に結合してもよく、且つ1個又は2個以上の非水素置換基を含み得る。単環式ヘテロシクリル基の例には、オキシラニル、チアラニル、アジリジニル（例えば、アジリジン - 1 - イル及びアジリジン - 2 - イル）、オキセタニル、チアタニル、アゼチジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、1, 4 - ジオキサニル、1, 4 - オキサチアニル、モルホリニル、1, 4 - ジチアニル、ピペラジニル、1, 4 - アザチアニル、オキセパニル、チエパニル、アゼパニル、1, 4 - ジオキセパニル、1, 4 - オキサチエパニル、1, 4 - オキサアゼパニル、1, 4 - ジ

40

50

チエパニル、1, 4 - チアゼパニル、1, 4 - ジアゼパニル、3, 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラニル、5, 6 - ジヒドロ - 2 H - ピラニル、2 H - ピラニル、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロピリジニル、及び 1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジニルが含まれる。

【0041】

「薬学的に許容される」物質は、過度の毒性、刺激作用、アレルギー反応などを伴わず、合理的な利益対リスク比と釣り合っており、且つこれらの使用目的のために有効である、対象の組織と接触させて使用するのに適した正しい医学的判断の範囲内であるこれらの物質を指す。

【0042】

「医薬組成物」は、1 種又は 2 種以上の薬物物質及び 1 種又は 2 種以上の賦形剤の組合

10

せを指す。

【0043】

用語「スルホニル」は、ラジカル - S (O)₂ R を指し、R は、本明細書に定義されているようなアルキル、置換アルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、又は置換ヘテロアリール基である。代表的な例には、これらに限定されないが、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、ブチルスルホニルなどが含まれる。

【0044】

用語「スルフィニル」は、ラジカル - S (O) R を指し、R は、本明細書に定義されているようなアルキル、置換アルキル、置換シクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、置換アリール、又は置換ヘテロアリール基である。代表的な例には、これらに限定されないが、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、プロピルスルフィニル、ブチルスルフィニルなどが含まれる。

20

【0045】

用語「対象」は、本明細書において使用する場合、ヒト又は非ヒト哺乳動物を指す。非ヒト哺乳動物の例には、家畜動物、例えば、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウサギ、シカ、ダチョウ及びエミュー；並びにペット動物、例えば、ネコ、イヌ、げっ歯類、及びウマが含まれる。

【0046】

薬物の「治療有効量」は、対象を治療するために使用し得る薬物の量を指し、他の事項

30

の中でも対象の体重及び年齢、並びに投与経路によって決まり得る。

【0047】

「治療する」は、このような用語に適用する障害、疾患若しくは状態を回復させるか、軽減するか、その進行を阻害するか、又は予防するか、或いはこのような障害、疾患若しくは状態の 1 つ若しくは 2 以上の症状を回復させるか、軽減するか、その進行を阻害するか、又は予防することを指す。

【0048】

「治療」は、直前に定義したような「治療する」行為を指す。

【0049】

本明細書において使用する場合、用語「含むこと」は、「から少なくとも部分的になること」を意味する。用語「含むこと」を含む本明細書における各記述を解釈するとき、この用語が前置きされたもの（複数可）以外の特徴がまた存在し得る。関連する用語、例えば、「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」は、同じ様式で解釈される。

40

【0050】

ジカルボニル捕捉部分

ジカルボニル捕捉部分 A は、置換アリール基又は置換ヘテロアリール基を含む。ジカルボニル捕捉部分は、ジカルボニル分子、適切には、1, 2 - ジカルボニル分子と安定的な化合物、例えば、キノキサリン化合物を形成する部分である。ジカルボニル捕捉部分を使用して、生物系、例えば、細胞中に見出される希薄溶液中のジカルボニル分子を捕捉する。ジカルボニル捕捉部分が細胞中に見出される条件下でジカルボニル分子と安定的な化合

50

物を形成するために、ジカルボニル捕捉部分は、水中において体温で低濃度にてジカルボニル分子と自然発生的に付加体を形成するように十分に求核性でなければならない。生物系の希薄溶液、例えば、細胞中に見出されるものにおいて、ジカルボニル化合物と安定的な化合物を生成する第1のステップは、ヘミアセタール、ヘミアミナール又はヘミチオアセタールを形成することであり、これは平衡状態が出発材料を優先する可逆反応である。

【0051】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-^1X-NH_2$ 、 $-^1X-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-^1X-O-NH_2$ 、 $-^1X-O-NHR_1$ 、 $-NR'-NHR'$ 、 $-^1X-NR'-NHR'$ 及び $-NHCOR_1$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

10

【0052】

適切には、置換アリール基又は置換ヘテロアリール基は、2～9個の置換基を含む。さらに適切には、置換アリール基又は置換ヘテロアリール基は、2～8個の置換基；2～7個の置換基；2～6個の置換基；又は2～5個の置換基を含む。

【0053】

適切には、置換アリール基又は置換ヘテロアリール基は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-^1X-NH_2$ 、 $-^1X-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-^1X-O-NH_2$ 、 $-^1X-O-NHR_1$ 、 $-NR'-NHR'$ 、 $-^1X-NR'-NHR'$ 、 $-NHCOR_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される2～9個の置換基を含む。

20

【0054】

このように、置換基は、ヒドラジン誘導体、例えば、 $-NH-NH_2$ 、 $-NH-NH(C_{1-6} \text{ アルキル})$ 、 $-N(C_{1-6} \text{ アルキル})-NH_2$ 、 $-N(C_{1-6} \text{ アルキル})-NH(C_{1-6} \text{ アルキル})$ 、 $-^1X-NH-NH_2$ 、 $-^1X-NH-NH(C_{1-6} \text{ アルキル})$ 、 $-^1X-N(C_{1-6} \text{ アルキル})-NH_2$ 及び $-^1X-N(C_{1-6} \text{ アルキル})-NH(C_{1-6} \text{ アルキル})$ を含み得る。

【0055】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-^1X-NH_2$ 、 $-^1X-NHR_1$ 、 $-NHCOR_1$ 、及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

30

【0056】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-^1X-NH_2$ 、 $-^1X-NHR_1$ 及び $-NHCOR_1$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

【0057】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-C_{1-6} \text{ アルキレン}-NH_2$ 、 $-C_{1-6} \text{ アルキレン}-NHR_1$ 、 $-NHCOR_1$ 、及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

【0058】

より適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 及び $-C_{1-6} \text{ アルキレン}-NH_2$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

40

【0059】

より適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-NH_2$ 及び $-C_{1-6} \text{ アルキレン}-NH_2$ から独立に選択される2個又は3個以上の置換基を含む。

【0060】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、任意選択の置換基の1～7個；任意選択の置換基の1～6個；任意選択の置換基の1～5個；任意選択の置換基の1～4個；任意選択の置換基の1～3個を含む。

50

【0061】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-^1X-OH$ 、 $-^1X-O-R_1$ 、 $-CO_2H$ 、 $-^1X-CO_2H$ 、 $-CO_2R_1$ 、 $-^1X-CO_2R_1$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR_1$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHR_1$ から選択される任意選択の置換基の1個又は2個以上を含む。

【0062】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-ハロゲン$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン-OH、 $-C_{1-6}$ アルキレン-O- R_1 、 $-CO_2H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- CO_2H 、 $-CO_2R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン- CO_2R_1 、 $-C_{1-6}$ アルキレン-O-C(O)- R_1 、 $-CHO$ 及び $-C(O)-R_1$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR_1$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHR_1$ から選択される任意選択の置換基の1個又は2個以上を含む。

10

【0063】

適切には、置換アリール基、又は置換ヘテロアリール基は、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-ハロゲン$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン-OH、 $-C_{1-6}$ アルキレン-O- R_1 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R_1$ から選択される任意選択の置換基の1個又は2個以上を含む。

【0064】

さらに適切には、 R_1 は、 $-C_{1-6}$ アルキルである。さらに適切には、 R_1 は、メチル、エチル、 n -プロピル、 i -プロピル、 n -ブチル、 s -ブチル、 i -ブチル及び t -ブチルから選択される。

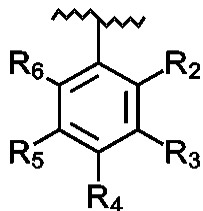
20

【0065】

さらに適切には、 R_1 は、式2の構造を有し、

【0066】

【化2】



30

式2

【0067】

式中、各基 $R_2 \sim R_6$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-ハロゲン$ 、 $-OH$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン-OH、 $-O-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{1-6}$ アルキレン-O- C_{1-6} アルキル、 $-NH_2$ 、 $-(C_{1-6})$ アルキレン- NH_2 、 $-CO_2H$ 及び $-CO_2C_{1-6}$ アルキルから独立に選択される。

【0068】

さらに適切には、 $R_2 \sim R_6$ の2個又は3個以上は、 $-H$ である。

40

【0069】

さらに適切には、 R_2 及び R_6 は、 $-H$ である。

【0070】

さらに適切には、 R_2 及び R_6 は、 $-H$ であり、 R_3 、 R_4 及び R_5 は、 $-OH$ である。

【0071】

適切には、Aは、置換フェニル、ビフェニル及びナフタレニルから選択される置換アリール基；又は置換ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピラゾリル、イミダゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、クロマニル、2-フェニルクロマニル、3-フェニルクロマニル、4-フェニルクロマニル、クロメン-4-オンリ、2-フェニルクロメ

50

ン - 4 - オンリ、3 - フェニルクロメン - 4 - オンリ、クマリニル、3 - フェニルクマリニル、4 - フェニルクマリニル及び 1, 8 - ビス [2 - クロマニル] - 6 - ベンゾ [7] アンヌレオニルから選択される置換ヘテロアリール基を含むジカルボニル捕捉部分である。

【 0 0 7 2 】

さらに適切には、A は、置換フェニル及びナフタレニルから選択される置換アリール基；又は置換ピリジニル、クロマニル、2 - フェニルクロマニル、3 - フェニルクロマニル、4 - フェニルクロマニル、クロメン - 4 - オンリ、2 - フェニルクロメン - 4 - オンリ、3 - フェニルクロメン - 4 - オンリ、クマリニル、3 - フェニルクマリニル、4 - フェニルクマリニル及び 1, 8 - ビス [2 - クロマニル] - 6 - ベンゾ [7] アンヌレオニルから選択される置換ヘテロアリール基を含むジカルボニル捕捉部分である。

10

【 0 0 7 3 】

さらに適切には、A は、置換フェニル及びナフタレニルから選択される置換アリール基；又は置換ピリジニルから選択される置換ヘテロアリール基を含むジカルボニル捕捉部分である。

【 0 0 7 4 】

さらに適切には、ジカルボニル捕捉部分 A は、置換フェニルである。

【 0 0 7 5 】

さらに適切には、ジカルボニル捕捉部分 A は、2 ~ 5 個の置換基；さらに適切には、2 ~ 4 個の置換基；さらに適切には、2 ~ 3 個の置換基を含む置換フェニルである。

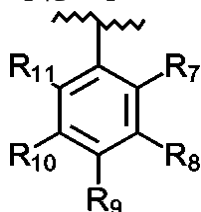
20

【 0 0 7 6 】

さらに適切には、ジカルボニル捕捉部分 A は、式 3 を含む置換アリール基であり、

【 0 0 7 7 】

【 化 3 】



30

式3

【 0 0 7 8 】

式中、 $R_7 \sim R_{11}$ の 2 個又は 3 個以上は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-NR_1R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NHR_1$ 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-NHR_1$ 、 $-NHCOR_1$ 、 $-O-C(O)-R_1$ 、 $-NR'-NHR'$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NR'-NHR'$ から独立に選択され、

残りの基 $R_7 \sim R_{11}$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{2-6}$ アルケニル、 $-C_{2-6}$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-OH$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-OR_1$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-CO_2H$ 、 $-CO_2R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-CO_2R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-C(O)-R_1$ 、 $-CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-CH(OH)-C(O)-R_1$ 、 $-CHO$ 、 $-C(O)-R_1$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR_1$ 、 $-SO_2NH_2$ 及び $-SO_2NHR_1$ から独立に選択される。

40

【 0 0 7 9 】

より適切には、 $R_7 \sim R_{11}$ の 2 個又は 3 個以上は、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OC_{1-6}$ アルキル、 $-NH(C_{1-6}$ アルキル)、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NH_2$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-NH(C_{1-6}$ アルキル) から独立に選択される。

【 0 0 8 0 】

50

より適切には、 $R_7 \sim R_{11}$ の 2 個又は 3 個以上は、 $-OH$ 、 $-OC_1-C_6$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_6$ アルキル)、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NH_2 及び $-C_1-C_6$ アルキレン- $NH(C_1-C_6$ アルキル) から独立に選択され、残りの基 $R_7 \sim R_{11}$ は、 $-H$ 、 $-C_1-C_6$ アルキル、 $-C_1-C_6$ アルキレン- OH 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- $O-C_1-C_6$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2C_1-C_6$ アルキル、 $-CH(OH)$ 、 $-C(O)-C_1-C_6$ アルキル 及び $-CHO$ から独立に選択される。

【0081】

適切には、 $R_7 \sim R_{11}$ の 1 個～3 個は、 $-H$ である。

【0082】

より適切には、 $R_7 \sim R_{11}$ の 2 個又は 3 個以上は、 $-OH$ 、 $-OC_1-C_6$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_6$ アルキル)、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NH_2 及び $-C_1-C_6$ アルキレン- $NH(C_1-C_6$ アルキル) から独立に選択され、残りの基 $R_7 \sim R_{11}$ は、 $-H$ 、 $-C_1-C_6$ アルキル、 $-C_1-C_6$ アルキレン- OH 及び $-C_1-C_6$ アルキレン- OC_1-C_6 アルキル から独立に選択される。

【0083】

さらに適切には、 $R_7 = -H$ であり、 $R_{10} = -H$ であり、 $R_{11} = -H$ であり、 R_8 及び R_9 は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR_1$ 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NH_2 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NHR_1 、 $-O-NH_2$ 、 $-O-NHR_1$ 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- $O-NH_2$ 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- $O-NHR_1$ 、 $-NHCOR_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される。

【0084】

さらに適切には、 $R_7 = -H$ であり、 $R_{10} = -H$ であり、 $R_{11} = -H$ であり、 R_8 及び R_9 は、 OH 、 $-OC_1-C_6$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_6$ アルキル)、 $-C_1-C_6$ アルキレン- NH_2 及び $-C_1-C_6$ アルキレン- $NH(C_1-C_6$ アルキル) から独立に選択される。

【0085】

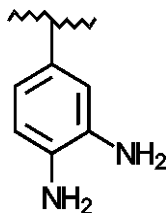
さらに適切には、 $R_7 = -H$ であり、 $R_{10} = -H$ であり、 $R_{11} = -H$ であり、 R_8 及び R_9 は、 $-OH$ 、 $-C_1-C_6$ アルキレン- OH 、 $-NH_2$ 及び $-C_1-C_6$ アルキレン- NH_2 から独立に選択される。

【0086】

さらに適切には、 $R_7 = -H$ であり、 $R_8 = -NH_2$ であり、 $R_9 = -NH_2$ であり、 $R_{10} = -H$ であり、 $R_{11} = -H$ である。これは、式 4 のジカルボニル捕捉部分 A をもたらす。

【0087】

【化 4】



式4

【0088】

一態様において、ジカルボニル捕捉部分 A は、置換クロマニル、2-フェニルクロマニル、3-フェニルクロマニル、4-フェニルクロマニル、クロメン-4-オンリ、2-フェニルクロメン-4-オンリ、3-フェニルクロメン-4-オンリ、クマリニル、3-フェニルクマリニル、4-フェニルクマリニル及び 1,8-ビス[2-クロマニル]-6-ベンゾ[7]アンヌレオニルから選択されるヘテロアリール基を含む、置換フラボノイド又はテアフラビン化合物を含む。

【 0 0 8 9 】

様々なフラボノイド又はテアフラビン化合物による、グリオキサル及びメチルグリオキサルなどの種のトラップが記載されてきた (Wu C.H.; Yen G.C.; Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. J Agric Food Chem., 53, 3167-73; 2005、Lo C.T.; Li S.; Tan D.; Pan M.H.; Ho C.T.; Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. Mol Nutr Food Res., 50, 1118-28; 2006.、Tan D.; Wang Y.; Lo C.Y.; Ho C.T.; Methylglyoxal: its presence and potential scavengers)。

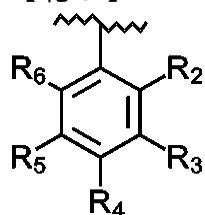
【 0 0 9 0 】

10

さらに適切には、置換フラボノイド又はテアフラビン化合物は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 、 $-NHCO R_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される 1 個又は 2 個以上の置換基を含み、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-OH$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-R_1$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R_1$ 、 $-CH(OH)-C(O)-R_1$ 及び $-CHO$ から選択される 1 個又は 2 個以上の置換基を含んでいてもよく、 R_1 は、 $-C_{1-6}$ アルキルであるか、又は式 2 を有し、

【 0 0 9 1 】

【 化 5 】



20

式 2

【 0 0 9 2 】

式中、各基 $R_2 \sim R_6$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-OH$ 及び $-O-C_{1-6}$ アルキルから独立に選択される。

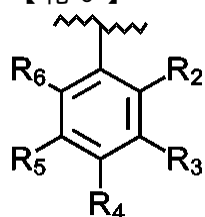
【 0 0 9 3 】

30

さらに適切には、置換フラボノイド化合物は、 $-OH$ 、 $-OR_1$ 及び $-O-C(O)-R_1$ から独立に選択される 1 個又は 2 個以上の置換基を含み、 $-C_{1-6}$ アルキル、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-OH$ 、 $-C_{1-6}$ アルキレン $-O-R_1$ 、 $-CO_2H$ 及び $-CO_2R_1$ から選択される 1 個又は 2 個以上の置換基を含んでいてもよく、 R_1 は、 $-C_{1-6}$ アルキルであるか、又は式 2 を有し、

【 0 0 9 4 】

【 化 6 】



40

式 2

【 0 0 9 5 】

式中、各基 $R_2 \sim R_6$ は、 $-H$ 、 $-C_{1-6}$ アルキル及び $-OH$ から独立に選択される。

【 0 0 9 6 】

いくつかの態様において、A は、ベンゾキノン部分を含まないジカルボニル捕捉部分である。

50

【0097】

適切には、¹Xは、C₁ - C₆ アルキレン及びC₂ - C₆ アルケニレンから選択される。

【0098】

さらに適切には、¹Xは、C₁ - C₆ アルキレンである。

【0099】

ジカルボニル捕捉部分がジカルボニル分子、例えば、メチルグリオキサルと安定的な化合物を形成する能力は、検出システムによる競合アッセイを行うことによって試験することができ (Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. Anal. Biochem. 238:171-178; 1996)、メチルグリオキサルは、HPLCによって検出することができる蛍光性産物を生成する。

10

【0100】

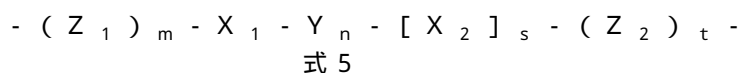
リンカー部分

リンカー部分 - L - は、二価であり、任意の化学的に非活性の間隔を生じさせる基 (スパーサー) でよく、これは、ミトコンドリア標的化部分をジカルボニル捕捉部分に接合し、且つ2つの部分が、形質膜及びミトコンドリア膜を通過するとき、一緒に結合し続けることを可能とする。特に、- L - は、生理学的条件下で安定的であり、薬学的に許容されなければならない。

【0101】

適切には、- L - は、式5

20



のリンカー部分であり、

式中、

Z₁ 及び Z₂ は、O、NR₁₂、NR₁₂ - C(O)、C(O)NR₁₂、O - C(O)、C(O) - O 及び S から独立に選択され、

Y は、O、NR₁₂、NR₁₂ - C(O)、C(O)NR₁₂、O - C(O)、C(O) - O、S 及びアリーレンから選択され、

R₁₂ は、- H、- C₁ - C₆ アルキル及び - アリールから選択され、

X₁ は、C₁ - C_p アルキレン、C₂ - C_p アルケニレン、C₂ - C_p アルキニレン及び C₃ - C_p シクロアルキレンから選択され、

30

X₂ は、C₁ - C_q アルキレン、C₂ - C_q アルケニレン、C₂ - C_q アルキニレン及び C₃ - C_q シクロアルキレンから選択され、

m、n、s 及び t のそれぞれは、0 又は 1 から独立に選択され、

p + q = 30 であり、X₁ 及び X₂ は、水素、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アミノアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、カルボキシアルキル、シアノ、オキシ、アミノ、アルキルアミノ、アミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アラールキルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、アラールキルカルボニルアミノ、アルキルカルボニル、ヘテロシクロカルボニル、アミノスルホニル、アルキルアミノスルホニル、アルキルスルホニル、及びヘテロシクロスルホニルからなる群から独立に選択される 1 個若しくは 2 個以上の官能基で置換されていてもよいが、又はリンカー基中の隣接する炭素原子の置換基は、それらが結合している炭素原子と一緒にあって、炭素環又は複素環を形成することができる。

40

【0102】

適切には、Z₁ は、ジカルボニル捕捉部分に隣接しており、Z₂ は、ミトコンドリア標的化部分に隣接している。

【0103】

さらに適切には、X₁ は、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキ

50

シカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリアルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ及びアリアルカルボニルアミノからなる群から独立に選択される 1 個又は 2 個以上の官能基で置換されている。

【0104】

さらに適切には、 X_2 は、アルキル、アリアル、アルコキシカルボニル、アリアルオキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリアルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ及びアリアルカルボニルアミノからなる群から独立に選択される 1 個又は 2 個以上の官能基で置換されている。

【0105】

さらに適切には、リンカー部分は、式 5 のものであり、
 Z_1 及び Z_2 は、上記の通りであり、
 X_1 及び X_2 は、上記の通りであり、
 Y は、 $NR_{12} - C(O)$ 、 $C(O)NR_{12}$ 及び $O - C(O)$ から選択され、
 R_{12} は、上記の通りであり、
 $p = 12$ であり、
 $q = 5$ であり、
 m 、 n 、 s 及び t は、上記の通りであり、
 X_1 及び X_2 は、アルキル、アリアル、アルコキシカルボニル、アリアルオキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリアルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ及びアリアルカルボニルアミノからなる群から独立に選択される 1 個又は 2 個以上の官能基で置換されていてもよい。

【0106】

さらに適切には、 X_1 は、 $C_1 - C_p$ アルキレンから選択される。

【0107】

さらに適切には、 X_2 は、 $C_1 - C_p$ アルキレンから選択される。

【0108】

さらに適切には、 m は、1 である。

【0109】

さらに適切には、 $-L-$ は、式 6
 $-(Z_1)_m - X_1 - (Z_2)_t -$
 式 6

のリンカー部分であり、

式中、 Z_1 、 m 、 Z_2 及び t は、上記に定義されているのと同じ意味を有し、 X_1 は、 $C_1 - C_p$ アルキレン、 $C_2 - C_p$ アルケニレン、 $C_2 - C_p$ アルキニレン及び $C_3 - C_p$ シクロアルキレンから選択され、 $C_p = 30$ である。

【0110】

さらに適切には、 $-L-$ は、式 6 のリンカー部分であり、 Z_1 及び Z_2 は、 O 、 NR_{12} 、 $NR_{12} - C(=O)$ 及び $C(=O)NR_{12}$ から独立に選択される。

【0111】

さらに適切には、 X_1 は、 $C_1 - C_p$ アルキレンから選択される。

【0112】

さらに適切には、 $-L-$ は、式 6 のリンカー部分であり、 $C_p = 25$ であり、さらに適切には、 $C_p = 20$ であり、さらに適切には、 $C_p = 15$ であり、さらに適切には、 $C_p = 12$ であり、さらに適切には、 $C_p = 10$ であり、さらに適切には、 $C_p = 9$ であり、さらに適切には、 $C_p = 8$ であり、さらに適切には、 $C_p = 7$ であり、さらに適切には、 $C_p = 6$ である。

【0113】

より適切には、 $-L-$ は、式 7
 $-(Z_1)_m - (C_1 - C_p)$ アルキレン -
 式 7

10

20

30

40

50

のリンカー部分であり、

式中、 Z_1 及び m は、上記に定義されているのと同じ意味を有し、 $C_p = 30$ である。

【0114】

適切には、 Z_1 は、ジカルボニル捕捉部分に隣接しており、 $C_1 - C_p$ アルキレンは、ミトコンドリア標的化部分に隣接している。

【0115】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、 m は、1であり、 Z_1 は、O及び $C(O)NR_{12}$ から選択される。

【0116】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、 R_{12} は、 $-H$ 及び $-C_1 - C_6$ アルキルから選択される。

【0117】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、 m は、1であり、 Z_1 は、 $C(O)NH$ である。

【0118】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、 $C_p = 25$ であり、さらに適切には、 $C_p = 20$ であり、さらに適切には、 $C_p = 15$ であり、さらに適切には、 $C_p = 10$ であり、さらに適切には、 $C_p = 9$ であり、さらに適切には、 $C_p = 8$ であり、さらに適切には、 $C_p = 7$ であり、さらに適切には、 $C_p = 6$ である。

【0119】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、 $C_1 - C_p$ アルキレンは、 $C_3 - C_6$ アルキレンである。

【0120】

さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、式中、 m は、1であり、 Z_1 は、O及び $C(O)NR_{12}$ から選択され、 $C_1 - C_p$ アルキレンは、 $C_3 - C_6$ アルキレンから選択される。

【0121】

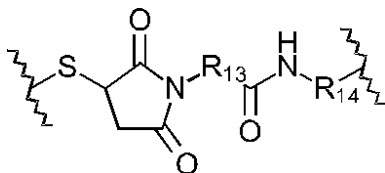
さらに適切には、 $-L-$ は、式7のリンカー部分であり、式中、 m は、1であり、 Z_1 は、 $C(O)NH$ であり、 $C_1 - C_p$ アルキレンは、 $C_3 - C_6$ アルキレンから選択される。

【0122】

一態様において、 $-L-$ は、式8

【0123】

【化7】



式8

【0124】

のリンカー部分であり、

式中、 R_{13} は、 $C_1 - C_6$ アルキレンであり、 R_{14} は、 $C_1 - C_6$ アルキレンである。

【0125】

一態様において、 $-L-$ は、式9

【0126】

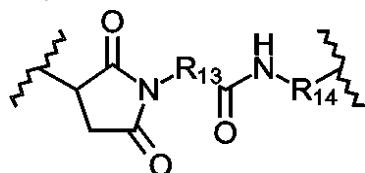
10

20

30

40

【化 8】



式9

【 0 1 2 7 】

のリンカー部分であり、

式中、 R_{13} は、 $C_1 - C_6$ アルキレンであり、 R_{14} は、 $C_1 - C_6$ アルキレンである。

10

【 0 1 2 8 】

さらに適切には、式 8 又は 9 について、 R_{13} は、 $-CH_2 - CH_2 - CH_2 -$ である。

【 0 1 2 9 】

さらに適切には、式 8 又は 9 について、 R_{14} は、 $-CH_2 - CH_2 - CH_2 -$ である。

【 0 1 3 0 】

式 8 又は 9 のリンカー部分は、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 9 0 8 0 号明細書に記載されている。

20

【 0 1 3 1 】

ミトコンドリア標的化部分

多くのミトコンドリア標的化部分は、当技術分野において公知である。ミトコンドリア標的化部分を含む化合物は、投与に続いて、高濃度でミトコンドリア内に蓄積する。

【 0 1 3 2 】

ミトコンドリア標的化部分を含む化合物のミトコンドリア内の蓄積は、例えば、形質膜電位及び/又はミトコンドリア膜電位によって推進し得る。このような蓄積は、ネルンスト式によって適正に説明することができることが多く、例えば、トリフェニルホスホニウムカチオンを含む化合物について、典型的な生物学的条件下で、60 mV の膜電位毎に 10 倍であり得る (Murphy, M. P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. Expert Opin. Biol. Ther. 1:753-764; 2001、Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cocheme, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 33:341-352; 2012、Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5407-5412; 2003)。その結果、ミトコンドリア標的化部分、例えば、トリフェニルホスホニウムカチオンを含む化合物は、それぞれ、30 mV 及び 160 mV の形質膜及びミトコンドリア膜の電位であると仮定すると、ミトコンドリア内でインビボにて数百倍又はそれ超蓄積し得る (Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. Anal. Biochem. 238:171-178; 1996、Yamaguchi, M.; Hara, S.; Nakamura, M. Determination of methylglyoxal in mouse blood by liquid chromatography with fluorescence detection Anal. Chim. Acta 221:163-166; 1989)。

30

40

【 0 1 3 3 】

適切には、ミトコンドリア標的化部分 B は、カチオン性ミトコンドリア標的化部分又はミトコンドリア標的化ペプチドである。

【 0 1 3 4 】

一連のミトコンドリア標的化ペプチドは当技術分野において公知である。適切な例は、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 9 0 8 0 号明細書に開示されている。

50

【 0 1 3 5 】

適切には、ミトコンドリア標的化部分 B は、カチオン性ミトコンドリア標的化部分である。カチオン性ミトコンドリア標的化部分はまた、薬学的に許容されるアニオンと会合している。

【 0 1 3 6 】

適切には、アニオンは、酢酸塩、塩酸塩 / クロリド、臭化水素酸塩 / ブロミド、ヨウ化水素酸塩 / ヨーゾド、重硫酸塩、硫酸塩、メチルスルホン酸塩、硝酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩及びトリフルオロ酢酸塩から選択される。

【 0 1 3 7 】

適切には、ミトコンドリア標的化部分 B は、親油性カチオンである。

10

【 0 1 3 8 】

親油性カチオンは、大きなエネルギー障壁を克服する必要があるか、又は特異的な取込み機序を必要とすることなしに、リン脂質二重層を容易に直接通過することができ、且つ大きな膜電位によってミトコンドリア内に実質的に蓄積するため、適切なミトコンドリア標的化部分である。

【 0 1 3 9 】

1つの理論に束縛されるものではないが、親油性カチオンは、十分に大きな濃度勾配が積み重なり、2つのコンパートメント中の分子の電気化学ポテンシャルが同じになるまで、正に帯電している細胞のコンパートメントから負に帯電しているコンパートメント中に取り込まれると考えられる。膜電位が 60 mV 増加する毎に、ミトコンドリア内の親油性カチオンは概ね 10 倍蓄積する。形質膜は内側で 30 ~ 60 mV の負電位を有するため、親油性カチオンは、細胞質ゾル中で 5 ~ 10 倍蓄積する。ミトコンドリア膜電位は典型的には約 140 ~ 180 mV であるため、細胞質ゾル内の親油性カチオンは、ミトコンドリア中に蓄積する。

20

【 0 1 4 0 】

適切には、ミトコンドリア標的化部分 B は、

(i) 第四級アンモニウム又はホスホニウムカチオンを含むカチオン性ミトコンドリア標的化部分；

(ii) 1 , 4 a , 8 - トリアザ - 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 - ヘキサヒドロ - 1 H - ナフタレン化合物を含むカチオン性ミトコンドリア標的化部分；及び

30

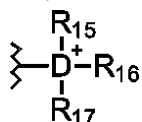
(iii) ローダミン化合物を含むカチオン性ミトコンドリア標的化部分から選択される。

【 0 1 4 1 】

より適切には、B は、式 10 の第四級アンモニウム又はホスホニウムカチオンを含む (i) カチオン性ミトコンドリア標的化部分であり、

【 0 1 4 2 】

【 化 9 】



40

式 10

【 0 1 4 3 】

式中、

D は、リン、窒素又はヒ素であり、

R₁₅、R₁₆ 及び R₁₇ のそれぞれは、置換又は非置換アルキル、ベンジル、アリール及びヘテロアリールから独立に選択される。

【 0 1 4 4 】

より適切には、D は、リンである。

【 0 1 4 5 】

50

さらに適切には、 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} のそれぞれは、置換又は非置換アルキル、ベンジル、フェニル、ナフチル、フラニル、ピリジル及びチオフェニルから独立に選択される。

【0146】

さらに適切には、 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} のいずれかが置換されている場合、置換アルキル、ベンジル、アリール又はヘテロアリールは、-ハロゲン、-OH、-SH、-OC₁₋₆アルキル、-SC₁₋₆アルキル、-SPh、-C₁₋₆アルキル、-C₂₋₆アルケニル、-C₁₋₆アルキニル、-C₁₋₆ヒドロキシアルキル、-C₁₋₆アミノアルキル、-C₆₋₁₈アラルキル、-C₆₋₁₂アリール、-C₃₋₈シクロアルキル、-C₁₋₁₂ヘテロアリール及び-C₁₋₁₂ヘテロシクリルからなる群から選択される1~3個の置換基で置換されている。

10

【0147】

適切には、 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} の1個又は2個以上が、置換又は非置換アルキルから独立に選択される場合、各アルキル基は、置換又は非置換C₁₋₃₀アルキルから独立に選択される。さらに適切には、各アルキル基は、置換又は非置換C₁₋₂₅アルキル；置換又は非置換C₁₋₂₀アルキル；置換又は非置換C₁₋₁₅アルキル；置換又は非置換C₁₋₁₀アルキルから独立に選択される。

【0148】

より適切には、 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} のそれぞれは、同じである。

【0149】

より適切には、各 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} は、非置換又は置換アリール基である。

20

【0150】

より適切には、各 R_{15} 、 R_{16} 及び R_{17} は、非置換アリール基である。

【0151】

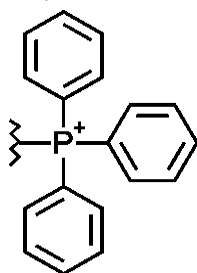
より適切には、各アリール基は、フェニルである。

【0152】

最も適切には、Bは、式11を有するトリフェニルホスホニウム(TPP)カチオンである。

【0153】

【化10】



30

式11

【0154】

TPPカチオンの疎水性の大きな半径によって、これは他のカチオンに対してリン脂質二重層を容易に通過することが可能となる。

40

【0155】

親油性トリフェニルホスホニウム(TPP、triphenylphosphonium)カチオン官能基は、ミトコンドリアを標的とするのに適しており、静脈内、経口又は腹腔内投与に続いて、細胞、動物モデル及び患者におけるミトコンドリアへと多種多様の抗酸化剤、プローブ及び生理活性分子を方向付けることが示されてきた(Murphy, M. P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. Expert Opin. Biol. Ther. 1:753-764; 2001, Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cocheme, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. Trends Pharmacol. Sci. 33:341-352;

50

2012、Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:5407-5412; 2003)。取込みはリン脂質二重層を通して直接起こり、タンパク質担体を必要とせず、一方、ミトコンドリア中への蓄積の程度は膜電位によって決定される。

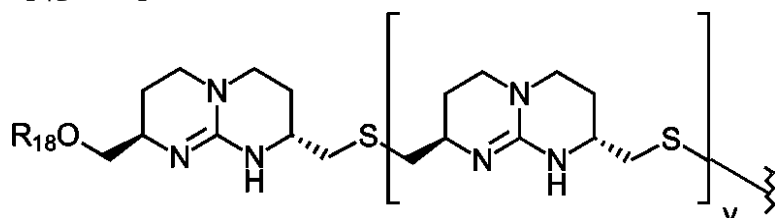
【0156】

さらに適切には、Bは、(ii)式12の1,4a,8-トリアザ-2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-1H-ナフタレン化合物を含むカチオン性ミトコンドリア標的化部分であり、

【0157】

【化11】

10



式12

【0158】

式中、 R_{18} は、-H、- C_1 - C_6 アルキル、- C_1 - C_6 アルケニル、- C_1 - C_6 アルキニル、- C_1 - C_6 アルキレン-ハロゲン、-アリール、-アリール- C_1 - C_6 アルキル又は $R_{19}R_{20}R_{21}Si$ であり、 R_{19} 、 R_{20} 及び R_{21} は、- C_1 - C_6 アルキル及び-アリールから独立に選択され、 v は、1、2又は3である。このようなカチオン性ミトコンドリア標的化部分は、米国特許出願公開第2009/099080号明細書に記載されている。

20

【0159】

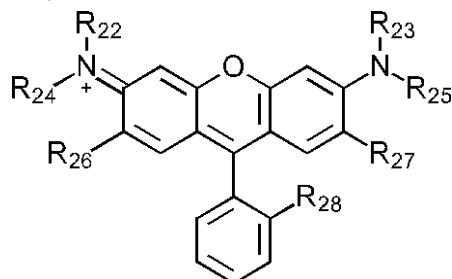
米国特許出願公開第2009/099080号明細書において開示されるように、式9のリンカー部分は、式12のカチオン性ミトコンドリア標的化部分と共に使用するのに適している。

【0160】

さらに適切には、Bは、(iii)式13のローダミン化合物を含むカチオン性ミトコンドリア標的化部分であり、

【0161】

【化12】



30

40

式13

【0162】

式中、 R_{22} 、 R_{23} 及び R_{24} は、-H及び- C_1 - C_6 アルキルから独立に選択され、

R_{26} 及び R_{27} は、-H又は- CH_3 から独立に選択され、

R_{28} は、- CO_2R_{29} 、- $O-C(O)-R_{29}$ 、- $C(O)-NHR_{29}$ 及び- $NH-C(O)-R_{29}$ から選択され、

50

R_{25} 及び R_{29} の一方は、リンカー L への結合であり、 R_{25} 及び R_{28} の他方は、 $-H$ 及び $-C_1 - C_6$ アルキルから選択される。

【0163】

多数のローダミン誘導体、例えば、ローダミン123、ローダミンB、ローダミン6G、ローダミン19、ローダミン110、及びローダミン116は、供給業者、例えば、Ac os Organics社、Aldrich社及びFluka社から市販されている。ローダミン誘導体の合成はまた概説されてきた (Beia, M; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G.; Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. Chem. Soc. Rev., 38, 2410-2433, 2009)。

【0164】

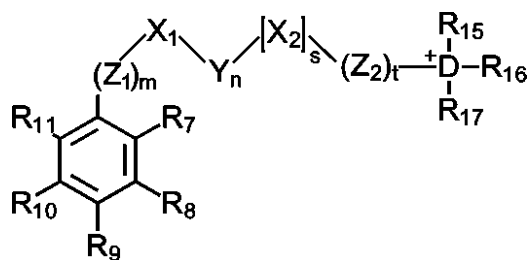
10

さらなる式1の化合物

適切には、式1の化合物又は薬学的に許容される塩は、式14の塩であり、

【0165】

【化13】



20

式14

【0166】

式中、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 、 Z_1 、 X_1 、 Y 、 X_2 、 Z_2 、 D 、 m 、 n 、 s 及び t は、上記と同じ意味を有する。式14の塩は、薬学的に許容されるアニオンをさらに含んでもよい。

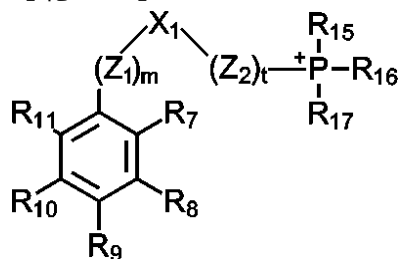
【0167】

さらに適切には、式1の化合物又は薬学的に許容される塩は、式15の塩であり、

【0168】

30

【化14】



式15

40

【0169】

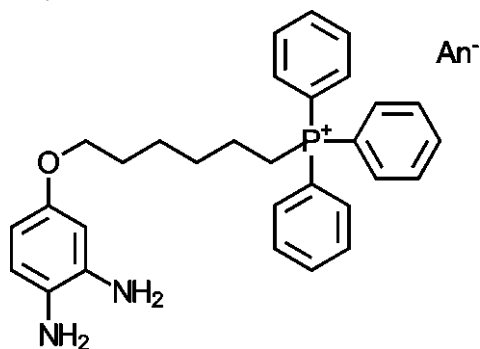
式中、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 、 Z_1 、 X_1 、 Z_2 、 m 及び t は、上記と同じ意味を有する。式15の塩は、薬学的に許容されるアニオンをさらに含んでもよい。

【0170】

さらに適切には、式1の化合物は、式16に示される構造を有するMitoGであり、

【0171】

【化 1 5】



式16

【0 1 7 2】

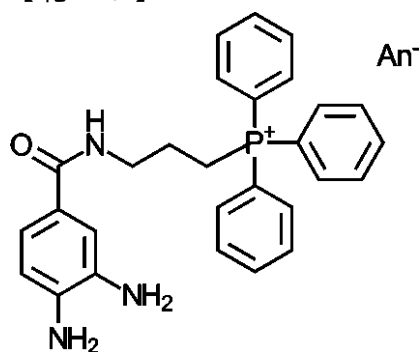
式中、 An^- は、任意選択の薬学的に許容されるアニオンを表す。

【0 1 7 3】

式 1 の化合物の別の例は、式 1 7 に示される構造を有する M i t o G アミド、(3 - (3 , 4 - ジアミノベノイルアミノ) プロピル) トリフェニルホスホニウム塩であり、

【0 1 7 4】

【化 1 6】



式17

【0 1 7 5】

式中、 An^- は、任意選択の薬学的に許容されるアニオンを表す。

【0 1 7 6】

適切には、アニオン An^- は、酢酸塩、塩酸塩 / クロリド、臭化水素酸塩 / ブロミド、ヨウ化水素酸塩 / ヨージド、重硫酸塩、硫酸塩、メチルスルホン酸塩、硝酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩及びトリフルオロ酢酸塩から選択される。

【0 1 7 7】

さらに適切には、アニオン An^- は、塩化物塩である。

【0 1 7 8】

これらの分子は、捕捉基、例えば、メチルグリオキサル及びグリオキサルと選択的に反応する、*o*-フェニレンジアミンへ酸素原子を介して連結しているミトコンドリア標的化基、例えば、トリフェニルホスホニウムイオン (T P P) を含む。アルコキシ - 置換フェニレンジアミンは、電子供与アルコキシ置換基による増強された反応性のために、1 , 2 - ジカルボニルを検出するために使用されてきた (Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. Anal. Biochem. 238:171-178; 1996、Yamaguchi, M.; Hara, S.; Nakamura, M. Determination of methylglyoxal in mouse blood by liquid chromatography with fluorescence detection Anal. Chim. Acta 221: 163-166; 1989)。これらは、反応して安定的なキノキサリン産物を形成するジカルボニルの検出のための誘導体化剤として使用されてきた (Kingkeohoi, S.; Chaplen, F. W. R

10

20

30

40

50

. Analysis of methylglyoxal metabolism in CHO cells grown in culture. Cytotechnology 48:1-13; 2005、Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J. H.; Wu, L. Y. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? J. Chromatog. B 877:1093-1100; 2009、Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. Anal. Biochem. 238:171-178; 1996)。

【0179】

化合物、例えば、MitoGは、実施例セクションにおいて示されるように、保護的であることが示される。

【0180】

化合物、例えば、MitoGアミドはまた保護的であり、増加した安定性を示す。

【0181】

MitoG化合物、例えば、MitoGアミドの設計において、本発明の治療上の利点を引き起こすのに必要とされる特徴を考察した。電子を分子構造の別々の部分中に引き寄せる必要性を特定した。本発明者らは、ジアミン基の反応性を調節するために置換することができる分子の群を特定した。この問題への解決策は、式1の化合物によって実現される。好ましい解決策は、増強された安定性を含めた利益を実現するMitoGアミド分子を含む。

【0182】

上記で特に名前を挙げた化合物を含む式1の化合物は、薬学的に許容される塩を形成し得る。これらの塩は、酸付加塩（二酸を含めた）及び塩基性塩を含む。薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、フッ化水素酸、及び亜リン酸に由来する無毒性の塩、並びに有機酸、例えば、脂肪族モノ及びジカルボン酸、フェニル-置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、アルカン二酸、芳香族酸、脂肪族及び芳香族スルホン酸に由来する無毒性の塩などを含む。このような塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、炭酸水素塩、炭酸塩、重硫酸塩、硫酸塩、ホウ酸塩、カンシル酸塩、クエン酸塩、シクラミン酸塩、エジシル酸塩、エシル酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヒベンズ酸塩、塩酸塩/クロリド、臭化水素酸塩/ブロミド、ヨウ化水素酸塩/ヨージド、イセチオン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メシル酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフチル酸塩、2-ナブシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オロト酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩、ピログルタミン酸塩、糖酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩及びキシナホ酸塩が含まれる。

【0183】

薬学的に許容される塩基性塩は、金属カチオン、例えば、アルカリ又はアルカリ土類金属カチオン、及びアミンを含めた、塩基に由来する無毒性の塩を含む。適切な金属カチオンの例には、ナトリウム(Na^+)カリウム(K^+)、マグネシウム(Mg^{2+})、カルシウム(Ca^{2+})、亜鉛(Zn^{2+})、及びアルミニウム(Al^{3+})が含まれる。適切なアミンの例には、アルギニン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、グリシン、リシン、N-メチルグルカミン、オラミン、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-プロパン-1,3-ジオール、及びプロカインが含まれる。有用な酸付加塩及び塩基性塩の考察について、S. M. Berge et al., J. Pharm. Sci. (1977) 66:1-19を参照されたい。またStahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (2002)を参照されたい。

【0184】

薬学的に許容される塩は、様々な方法を使用して調製し得る。例えば、式1の化合物と適当な酸又は塩基とを反応させて、所望の塩を得てもよい。式1の化合物の前駆体と、酸

10

20

30

40

50

又は塩基とをまた反応させて、酸若しくは塩基に不安定な保護基を除去するか、又は前駆体のラクトン若しくはラクタム基を開環し得る。さらに、適当な酸若しくは塩基による処理によって、又はイオン交換樹脂との接触によって、式1の化合物の塩を別の塩に変換し得る。次いで、反応に続いて、溶液から沈殿させる場合、濾過によって、又は蒸発によって塩を単離して、塩を回収し得る。塩の電離の程度は、完全に電離されているものから殆ど電離されていないものまで変化し得る。

【0185】

式1の化合物はまた、非溶媒和及び溶媒和形態で存在し得る。用語「溶媒和物」は、化合物及び1個又は2個以上の薬学的に許容される溶媒分子（例えば、EtOH）を含む分子錯体を説明する。用語「水和物」は、溶媒が水である溶媒和物である。薬学的に許容される溶媒和物は、溶媒が同位体的に置換し得るものを含む（例えば、D₂O、アセトン-d₆、DMSO-d₆）。

10

【0186】

有機化合物の溶媒和物及び水和物についての現在一般に認められている分類体系は、単離部位、チャンネル、及び金属イオン配位溶媒和物及び水和物を区別するものである。例えば、K. R. Morris (H. G. Brittain ed.) Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1995)を参照されたい。単離部位溶媒和物及び水和物は、溶媒（例えば、水）分子が有機化合物の介在する分子によって互いに直接接触することから分離されているものである。チャンネル溶媒和物において、溶媒分子は格子チャンネルにおいて存在し、ここで溶媒分子は他の溶媒分子の隣にある。金属イオン配位溶媒和物において、溶媒分子は、金属イオンに結合している。

20

【0187】

溶媒又は水が密接に結合しているとき、錯体は、湿度と無関係に、詳細に明らかにされた化学量を有する。しかし、チャンネル溶媒和物及び吸湿性化合物におけるように、溶媒又は水が弱く結合しているとき、水又は溶媒含量は、湿度及び乾燥条件によって決まる。このような場合において、非化学量が典型的には観察される。

【0188】

式1の化合物はまた、（塩及び溶媒和物以外の）多構成要素錯体として存在してもよく、ここでは化合物（薬物）及び少なくとも1種の他の構成要素が化学量論量又は非化学量論量で存在する。このタイプの錯体は、クラスレート（薬物-ホスト包接錯体）及び共結晶を含む。後者は典型的には、非共有結合性相互作用を介して一緒に結合している中性分子構成物の結晶錯体として定義されるが、また中性分子と塩との錯体でよい。共結晶は、溶融結晶化によって、溶媒からの再結晶化によって、又は構成要素と一緒に物理的に摩砕することによって調製し得る。例えば、O. Almarsson and M. J. Zaworotko, Chem. Commun. (2004) 17:1889-1896を参照されたい。多構成要素錯体の一般の概説について、J. K. Halebian, J. Pharm. Sci. (1975) 64(8):1269-88を参照されたい。

30

【0189】

合成法

本発明の化合物の化学合成のための方法は、本明細書に記載されている。これらの方法は、本発明の範囲内のさらなる化合物の合成を促進するために、公知の方法で修飾及び/又は適応し得る。所与の反応物の量は、ガイダンスのためである。本発明の化合物の調製のために有用な一般の実験室的方法及び手順の記載は、Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5th edition, Ed. Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G., Tatchell, A. R., Longmann, UK)に記載されている。

40

【0190】

本発明の化合物の合成は、3つの重要なステップ：

(i) ジカルボニル捕捉部分の形成；

(ii) ジカルボニル捕捉部分への連結基の結合；及び

(iii) ミトコンドリア標的化部分への連結基の結合

を有し得る。

50

【0191】

場合によって、ジカルボニル捕捉部分の形成のための出発材料は、連結基の部分又は全てを既に含み得る。連結基の全てが含まれている場合、ステップ (ii) は省略される。

【0192】

これらの3つのステップは任意の順序で行うことができ、これは使用される方法及び3つの基のそれぞれの性質によって決まる。ジカルボニル捕捉部分の形成は、前駆体を連結基に連結することによって阻止され得る。必要に応じて、保護基を用いて、合成の間に起こる任意の望まれない反応を回避することができる。

【0193】

ジカルボニル捕捉部分の形成：これは、ジカルボニル捕捉部分の性質によって決まり、通常、その部分を形成するための開示されている経路に基づくことができる。ジカルボニル捕捉部分がリンカー部分に結合するのに望ましい位置においてジカルボニル捕捉部分に既に結合しているヘテロ原子 (O、S 又は NH) を有するジカルボニル捕捉部分を合成することが都合がよいことがある。このようなヘテロ原子は、ジカルボニル捕捉部分への連結基の接合を助けることができる。ジカルボニル捕捉部分はまた、さらなる官能基化に適している存在する官能基、例えば、カルボン酸と共に合成し得る。

【0194】

ミトコンドリア標的化部分への連結基の連結：時折、適当な溶媒中で2～3当量のミトコンドリア標的化部分前駆体と共にアルゴン下で数日まで、ハロゲン化前駆体、好ましくはヨウ化若しくはブロム化前駆体 (RBr 若しくは RI)、又は強力な脱離基、例えば、メシレート基を有する前駆体を加熱することによって、このステップを行うことが一般に好ましい。Rは、連結基、ジカルボニル捕捉部分に既に結合した連結基、又はジカルボニル捕捉部分の前駆体に結合した連結基でよい。ハロゲン化前駆体が反応において使用される場合、次いで、生成化合物を、そのブロミド又はヨージド塩として単離する。これを行うために、(必要に応じて) 溶媒を除去し、次いで、生成物を、固体が残るまで化合物、例えば、ジエチルエーテルで繰り返し粉碎する。次いで、これを溶媒、例えば、ジクロロメタンに溶解し、ジエチルエーテルで沈殿させ、過剰な未反応の材料を除去することができる。これは繰り返すことができる。精製は、例えば、塩化メチレン/ジエチルエーテルからの再結晶化、又はジクロロメタン/エタノール混合物で溶出するシリカゲル上のクロマトグラフィーが関与し得る。

【0195】

ジカルボニル捕捉部分への連結基の連結：これはジカルボニル捕捉部分の性質によって決まる。この連結を達成する1つの方法は、ジカルボニル捕捉部分の部分として連結基を合成することである。この場合、連結基は、ミトコンドリア標的化部分に結合する連結基の末端において官能基を適切に有する。このような官能基は、例えば、良好な脱離基、例えば、メシレート基でよく、これは次いで、ミトコンドリア標的化部分の前駆体と反応することができる。代わりに、ジカルボニル捕捉部分が代わりに適切な官能基と共に合成された場合 (上記を参照されたい)、これは、カップリング剤を使用するか、又はハロゲン化スルホニル若しくは酸ハロゲン化物として1つのパートナーの活性化に続いて、合わせたミトコンドリア標的化 - リンカー前駆体部分と反応し得る。合わせたミトコンドリア標的化 - リンカー前駆体部分は、リンカー上の適当な官能基、例えば、アミンを有する。このように、カルボジイミド又は他のカップリング剤を使用して、これらの部分からアミドを形成し得る。例えば、Mitogアミドの合成において、カルボン酸を備えているジカルボニル捕捉基は、カップリング剤を使用してTPP - リンカー - アミンと反応させ、アミドを形成することができる。理論的には、ジカルボニル捕捉基 - アミンは、カップリング剤を使用してTPP - リンカー - カルボン酸と反応させることができるが、ただし、反応アミンは、ジカルボニル捕捉単位より求核性であるか、又は後者は保護されている。同様に、塩化スルホニルは、アミンと急速に反応し、相対的に弱い塩基の存在下でスルホンアミドを形成してHClを除去し、再び捕捉基は、塩化スルホニルと反応することを回避するための保護を必要とし得る。

【 0 1 9 6 】

式 1 の化合物は、下記の技術を使用して調製し得る。スキーム及び実施例のいくつかは、有機化学の当業者には公知の、酸化、還元など、分離技術（抽出、蒸発、沈殿、クロマトグラフィー、濾過、粉碎、結晶化など）、及び分析手順を含めた、一般の反応の詳細を省略し得る。このような反応及び技術の詳細は、Richard Larock, *Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations*, 2nd Ed (2010)、及び Michael B. Smith 及びその他により編集された数巻からなるシリーズである *Compendium of Organic Synthetic Methods* (1974 et seq.) を含めていくつかの専門書に見出すことができる。出発材料及び試薬は、市販の源から得てもよいが、又は文献の方法を使用して調製し得る。反応スキームのいくつかは、化学変換から生じる微量の生成物（例えば、エステルの加水分解からのアルコール、二酸の脱カルボキシル化からの CO_2 など）を省略し得る。さらに、場合によって、反応中間体は、単離又は精製をせずにそれに続くステップにおいて使用し得る（すなわち、インサイチュ）。

10

【 0 1 9 7 】

下記の反応スキーム及び実施例のいくつかにおいて、特定の化合物は、さもなければ反応部位において望ましくない化学反応を防止する保護基を使用して調製することができる。保護基をまた使用して、溶解性を増強するか、又は化合物の物理的特性をその他の点で修飾し得る。保護基戦略の考察、保護基を組み込み及び除去するための材料及び方法、並びにアミン、カルボン酸、アルコール、ケトン、アルデヒドなどを含めた一般の官能基のための有用な保護基の編集の説明について、T. W. Greene and P. G. Wuts, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, 4th Edition, (2006) 及び P. Kocienski, *Protective Groups*, 3rd Edition (2005) を参照されたい。

20

【 0 1 9 8 】

一般に、明細書を通して記載する化学変換は、実質的に化学量論量の反応物を使用して行い得るが、特定の反応は、過剰な反応物の 1 つ又は 2 つ以上を使用することから利益を受け得る。さらに、明細書を通して開示する反応の多くは、概ね室温（RT、room temperature）及び周囲圧力で行い得るが、反応動態学、収率などによって、いくつかの反応は高圧で行われるか、又はより高い温度（例えば、還流条件）若しくはより低い温度（例えば、 $-78 \sim 0$ ）を用いてもよい。開示において化学量論的範囲、温度範囲、pH 範囲などへの参照はまた、単語「範囲」を明確に使用していても、又は使用していなくても、示したエンドポイントを含む。

30

【 0 1 9 9 】

化学変換の多くはまた、反応速度及び収率に影響を与え得る、1 種又は 2 種以上の適合性の溶媒を用い得る。反応物の性質によって、1 種又は 2 種以上の溶媒は、極性プロトン性溶媒（水を含めた）、極性非プロトン性溶媒、無極性溶媒、又はいくつかの組合せでよい。代表的な溶媒は、飽和脂肪族炭化水素（例えば、n - ペンタン、n - ヘキサン、n - ヘプタン、n - オクタン）；芳香族炭化水素（例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン）；ハロゲン化炭化水素（例えば、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素）；脂肪族アルコール（例えば、メタノール、エタノール、プロパン - 1 - オール、プロパン - 2 - オール、ブタン - 1 - オール、2 - メチル - プロパン - 1 - オール、ブタン - 2 - オール、2 - メチル - プロパン - 2 - オール、ペンタン - 1 - オール、3 - メチル - ブタン - 1 - オール、ヘキサン - 1 - オール、2 - メトキシ - エタノール、2 - エトキシ - エタノール、2 - ブトキシ - エタノール、2 - (2 - メトキシ - エトキシ) - エタノール、2 - (2 - エトキシ - エトキシ) - エタノール、2 - (2 - ブトキシ - エトキシ) - エタノール）；エーテル（例えば、ジエチルエーテル、ジ - イソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、1, 2 - ジメトキシ - エタン、1, 2 - ジエトキシ - エタン、1 - メトキシ - 2 - (2 - メトキシ - エトキシ) - エタン、1 - エトキシ - 2 - (2 - エトキシ - エトキシ) - エタン、テトラヒドロフラン、1, 4 - ジオキサン）；ケトン（例えば、アセトン、メチルエチルケトン）；エステル（酢酸メチル、酢酸エチル）；窒素含有溶媒（例えば、ホルムアミド、N, N - ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、N - メチル - ピロリドン、ピ

40

50

リジン、キノリン、ニトロベンゼン)；硫黄含有溶媒(例えば、二硫化炭素、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロ-チオフェン-1,1-ジオキシド)；及びリン含有溶媒(例えば、ヘキサメチルリン酸トリアミド)を含む。

【0200】

用途

本発明の重要な態様は、高血糖によってもたらされる損傷の遮断又は寛解である。本発明は、高血糖の下流の帰結の治療又は予防において用途を見出す。

【0201】

上記に定義されているような式1の化合物、又は薬学的に許容されるその塩についての1つの用途は、高血糖の予防又は治療における使用のためである。

10

【0202】

高血糖は、年齢が関連する症候群として起こり得る。高血糖は、敗血症において、及び/又は集中治療/救急治療室への入院において起こり得る。高血糖は、妊娠の合併症として起こり得る。

【0203】

このように、高血糖の予防は、高血糖の危険性を増加させる健康状態を有さない正常な健康の対象と比較して、この健康状態を有する対象のために重要であり得る。適切には、敗血症、妊娠又は救命医療を必要とする健康状態から選択される健康状態を有する対象において高血糖の予防又は治療において使用するための、上記に定義されているような式1の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供し得る。

20

【0204】

最も具体的には、本発明は、糖尿病、例えば、高血糖性糖尿病において適用される。本発明は、例えば、任意の適切な器官及び組織、例えば、目、心臓、腎臓、神経系及び/又は脾臓への損傷を予防又は低減させる、高血糖及び糖尿病(例えば、高血糖性糖尿病)の下流の帰結の治療又は予防において用途を見出す。

【0205】

本発明は、血糖コントロールの機能障害又は調節不全と関連するミトコンドリアの損傷、例えば、高血糖と関連するミトコンドリアの損傷の治療又は予防に適用される。

【0206】

最も適切には、本発明は、高血糖の分子の帰結の治療又は予防に適用される。

30

【0207】

一態様において、本発明は、対象における老化の有害作用を遅延させることにおける使用のための、式1の化合物又はその医薬塩に関する。

【0208】

別の態様において、本発明は、糖化反応によって誘発される毒性の予防又は低減において使用するための、式1の化合物又はその医薬塩に関する。

【0209】

別の態様において、本発明は、呼吸抑制、特に、ジカルボニルによって誘発される呼吸抑制の予防又は低減において使用するための、式1の化合物又はその医薬塩に関する。

【0210】

別の態様において、本発明は、細胞死から保護し、特に、糖化反応により誘発される細胞死から保護する使用のための、式1の化合物又はその医薬塩に関する。

40

【0211】

本発明のさらなる態様は、外科移植のための器官及び組織の保存において使用するための、上記に定義されているような式1の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。このような用途において、式1の化合物又は薬学的に許容されるその塩は、組織保存液の構成要素として適切に投与し得る。この態様において、外科移植のための任意の適切な器官及び組織は、保存し得る。例示的な器官移植は、目(例えば、角膜)、心臓、腎臓、神経細胞及び脾臓を含む。

【0212】

50

本発明のさらなる態様は、血液の貯蔵における使用のために、上記に定義されているような式 1 の化合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。このような用途において、式 1 の化合物又は薬学的に許容されるその塩は、保存液の構成要素として適切に投与し得る。

【0213】

適切には、本発明は、哺乳動物、最も適切にはヒトに適用される。

【0214】

本発明は、網膜変性に適用し得る。網膜変性は、糖尿病性合併症の関連物である。本発明は、糖尿病、特に、高血糖性糖尿病の任意の他の合併症に有用に適用し得る。

【0215】

投与

本発明の化合物は、固体又は液体形態、例えば、錠剤、散剤、カプセル剤、ペレット剤、液剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、又は直腸及び尿道の坐剤を含めた坐剤で投与することができる。

【0216】

適切には、本発明の化合物は、ヒトを治療するために使用し得る。

【0217】

適切には、ヒトのための用量は、経口投与される。

【0218】

適切には、ヒトのための用量は、1日1回である。

【0219】

適切には、ヒトのための用量は、錠剤形態で提供される。

【0220】

本発明の化合物又は組成物は、非経口投与によって投与し得る。

【0221】

本発明の化合物は、静脈内に投与し得る。

【0222】

本発明の化合物は、1日当たり概ね20～40mgの用量で投与することができる。適切には、ヒトのための用量は、1日当たり概ね80mgである。

【0223】

投与情報は、特に明記しない限り、平均の成人のヒトについて提供する。治療される患者の特徴、例えば、年齢、体重、性別などによって用量を変化させるのは、十分に医師の技量の範囲内である。

【0224】

本発明の化合物は、眼球内に投与し得る。

【0225】

本発明の化合物は、静脈内に投与し得る。

【0226】

本発明の化合物は、腹腔内に投与し得る。

【0227】

本発明の化合物は、点眼薬として投与し得る。

【0228】

投与は、任意の適切な組織又は器官に対してよく、例えば、本発明の化合物又は組成物は、目、心臓、腎臓、神経系及びノ又は脾臓に投与し得る。

【0229】

本発明の化合物は、1種又は2種以上の薬学的に許容される賦形剤、担体又は希釈剤と組み合わせて投与し得る。

【0230】

適切な賦形剤、担体及び希釈剤は、標準的な医薬のテキストにおいて見出すことができる。例えば、参照により本明細書中に組み込まれている、Handbook for Pharmaceutical

10

20

30

40

50

Additives, 3rd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2007 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA)及びRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (ed. D. B. Troy) 2006 (Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, USA)を参照されたい。

【0231】

本発明の組成物において使用するための賦形剤には、これらに限定されないが、微結晶性セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、第二リン酸カルシウム及びグリシンが含まれ、顆粒化結合剤、例えば、ポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチン及びアカシアと一緒に、様々な崩壊剤、例えば、デンプン（好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカデンプン）、アルギン酸及び特定の複合ケイ酸塩と共に用いてもよい。さらに、滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルクは、打錠の目的のために非常に有用であることが多い。同様のタイプの固体組成物はまた、ゼラチンカプセル中の充填剤として用いてもよい。この関連における好ましい材料はまた、ラクトース又は乳糖及び高分子量ポリエチレングリコールを含む。水性懸濁液及び／又はエリキシル剤が経口投与のために望ましいとき、活性成分は、希釈剤、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン及び様々な同様のこれらの組合せと一緒に、様々な甘味剤又は香味剤、着色剤又は色素、並びに、そのように所望である場合、同様に乳化剤及び／又は懸濁化剤と合わせてもよい。

10

【0232】

医薬担体には、固体希釈剤又は充填剤、無菌の水性媒体及び様々な無毒性の有機溶媒などが含まれる。

20

【0233】

薬学的に許容される担体には、ガム、デンプン、糖、セルロース系材料、及びこれらの混合物が含まれる。化合物は、例えば、ペレットの皮下移植によって対象に投与することができる。調製物はまた、液体調製物の静脈内、動脈内、若しくは筋肉内注射、液体若しくは固体調製物の経口投与によって、又は局所適用によって投与することができる。投与はまた、直腸の坐剤又は尿道の坐剤を使用することによって達成することができる。

【0234】

さらに、本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体」は当業者には周知であり、これらに限定されないが、0.01～0.1M、好ましくは0.05Mのリン酸緩衝液又は0.9%食塩水が含まれる。さらに、このような薬学的に許容される担体は、水溶液又は非水溶液、懸濁液、及びエマルジョンであり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物性油、例えば、オリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルである。水性担体には、食塩水及び緩衝化した媒体を含めた、水、アルコール溶液／水溶液、エマルジョン又は懸濁液が含まれる。

30

【0235】

薬学的に許容される非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル及び不揮発性油が含まれる。静脈内媒体には、体液及び栄養素補充液、電解質補充液、例えば、リンゲルのデキストロースをベースとするものなどが含まれる。例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、照合剤、不活性ガスなど保存剤及び他の添加物がまた存在し得る。

40

【0236】

本発明によって投与可能な制御放出組成物又は持続放出組成物のための薬学的に許容される担体は、親油性デポー中の配合物（例えば、脂肪酸、ワックス、油）を含む。本発明によってまた包含されるのは、ポリマー（例えば、ポロキサマー又はポロキサミン）でコーティングされた粒状の組成物、及び組織特異的受容体、リガンド若しくは抗原を対象とする抗体にカップリングした、又は組織特異的受容体のリガンドにカップリングした化合物である。

【0237】

50

薬学的に許容される担体は、静脈内注射に続いて、対応する未修飾の化合物より血液中の実質的により長い半減期を示すことが知られる、水溶性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン又はポリプロリンの共有結合的結合によって修飾される化合物を含む (Abuchowski and Davis, Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., (1981), pp 367-383; 及び (Katre, N. V.; Knauf, M. J.; Laird, W. J.; Chemical Modification of Recombinant Interleukin 2 by Polyethylene Glycol Increases its Potency in the Murine Meth A Sarcoma Model, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 1487-1491; 1987))。このような修飾はまた、水溶液中の化合物の溶解性を増加させ、凝集を排除し、化合物の物理的及び化学的安定性を増強し、化合物の免疫原性及び反応性を非常に低減し得る。その結果、所望のインビボでの生物活性は、未修飾の化合物によるよりも、より頻繁ではなく又はより低い用量でのこのようなポリマー - 化合物付加体の投与によって達成し得る。

【 0 2 3 8 】

質量分析法

本発明はまた、反応性ジカルボニルの検出のための質量分析プローブとしての用途を見出す。

【 0 2 3 9 】

これらの質量分析方法は、メチルグリオキサール及びグリオキサールによってもたらされるミトコンドリアの損傷の重大さのアセスメントを可能とする。したがって、式 1 の化合物、例えば、ミトコンドリア選択的分子である M i t o G を使用して、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内のこれらの損傷を与える種のレベルの相対的变化を評価し得る。

【 0 2 4 0 】

M i t o G の作用様式を、図 1 B において示す。M i t o G とメチルグリオキサール及びグリオキサールとのインサイチュでの反応からのキノキサリン産物の蓄積を定量化する能力は、細胞中及びインビボでのミトコンドリア中のこれらの化合物のレベルの変化を評価する機会を提供する。これは最近開発されたアプローチの延長によって行って、ミトコンドリアを標的とするペルオキシド反応性化合物である M i t o B の使用によって、インビボでのミトコンドリアの過酸化水素のレベルを評価することができる (Cocheme, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living Drosophila. Nat. Protocols 7:946-958; 2012, Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H₂O₂ within living Drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. Cell Metab. 13:340-350; 2011))。この方法論において、診断用のエキソマー産物である M i t o P は M i t o B から形成され、そのレベルは、組織ホモジネートの液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法 (L C - M S / M S , liquid chromatography-tandem mass spectrometry) によって重水素化された内部標準に対してエキソビボで決定した (Cocheme, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living Drosophila. Nat. Protocols 7:946-958; 2012, Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel,

J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H_2O_2 within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011)。このようなアプローチの感受性は、質量分析法 (MS、mass spectrometry) による検出についての閾値を減少させ、化合物のフェムトモル / 組織湿重量の g の分析を可能とする、T P P 部分の固有の正の電荷によって非常に増強される (Cocheme, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H_2O_2 in living *Drosophila*. *Nat. Protocols* 7:946-958; 2012、Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H_2O_2 within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011)。このように、ミトコンドリア内のメチルグリオキサール及びグリオキサールレベルの相対的变化は、M i t o G - ジカルボニルキノキサリン反応産物の蓄積の程度に基づいて評価することができる (図 1 B)。したがって、化合物、例えば、M i t o G は、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内の 1, 2 - ジカルボニルの産生の評価のために使用することができる、メチルグリオキサール及びグリオキサールのためのミトコンドリアを標的としたプローブを実現する。これらの知見は、糖尿病及び関連する障害における高血糖の根底にある病態の一因となるミトコンドリアの糖化反応と一致する。

【0241】

さらなる特定及び好ましい態様を、添付の独立請求項及び従属請求項において示す。従属請求項の特徴は、必要に応じて独立請求項の特徴と合わせてもよく、特許請求の範囲において明確に示すものの以外の組合せであり得る。

【0242】

装置の特徴がある機能を実現するように作動すると記載されている場合、これは、その機能を実現するか、又はその機能を実現するように適応若しくは構成されている装置の特徴を含むことを認識されたい。

【図面の簡単な説明】

【0243】

本発明の実施形態を、添付図面を参照してこれからさらに記載する。

【図1】ミトコンドリア内のジカルボニルの検出についての理論的根拠及び機序を示す。(A)ミトコンドリア標的化T P P部分、及び1, 2 - ジカルボニルと反応するフェニレンジアミン基からなる、ミトコンドリアを標的とするグリオキサール及びメチルグリオキサールのトラップであるM i t o G。M i t o GのT P P部分は、組織中へのその取込みをもたらす、これは形質膜及びミトコンドリア膜の電位の両方によって駆動されてミトコンドリア内で蓄積する。(B)次いでミトコンドリア内で、M i t o Gは、グリオキサール又はメチルグリオキサールと反応して、キノキサリン産物であるキノキサリンエーテル (Q E、quinoxaline ether) 及びメチルキノキサリンエーテル (M Q E、methylquinoxaline ether) (2種の異性体であるM Q E₁及びM Q E₂として存在)を形成することができる。次いで、これらの産物は、L C - M S / M Sによって重水素化された内部標準 (I S、internal standard) に対して定量化することができ、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内に存在する遊離グリオキサール及びメチルグリオキサールの量の尺度を提供する。

【図2】M i t o G、M Q E及びQ Eの合成を示す。

【図3】M i t o G、M Q E及びQ Eのインビトロでの特性決定を示す。(A) 100 μ

MのM i t o Gの紫外線/可視(U V / V、Ultra Violet/ Visible) 走査スペクトルは、その構成要素であるT P P及び4 - ヘキシロキシフェニレン - 1 , 2 - ジアミン(H P、4-hexyloxyphenylene-1,2-diamine) 部分の特徴を示す。(B) 1 0 0 μ MのM i t o G、M Q E 及びQ E のU V / V i s 走査スペクトル。(C) 1 0 μ MのM i t o G、M Q E 及びQ E の蛍光励起スペクトル(発光4 3 3 n m) 及び発光スペクトル(励起3 4 4 n m)。M i t o Gは蛍光性でなかった。M Q E 及びQ E は、それぞれ、3 4 4 n m 及び4 3 3 n m のピーク励起波長及び発光波長を有した。(D) それぞれ1 0 n m o l のM i t o G、M Q E 及びQ E の逆相 - 高速液体クロマトグラフィー(R P - H P L C、Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) プロファイル。2 2 0 n m での吸光度(赤色)、蛍光(青色) を、それぞれ、3 4 4 n m 及び4 3 3 n m の励起波長及び発光波長で観察した。(E) 3 7 で2時間のインキュベーション後の、K C l 緩衝液中の1 0 0 μ MのM i t o G 及び1 m M のメチルグリオキサール又はグリオキサールのU V / V i s 走査スペクトル。(F) 3 7 で2時間のインキュベーション後の、K C l 緩衝液中の1 0 μ MのM i t o G 及び2 0 μ M のメチルグリオキサール、又は2 0 μ M のM i t o G 及び4 0 μ M のグリオキサールの蛍光励起及び発光スペクトル。(G) M i t o G (5 m M) 及び1 0 m M のメチルグリオキサールを、1 0 μ l のK C l 緩衝液中で3 7 にて2時間インキュベートし、次いで、1 μ l の混合物をR P - H P L C によって評価した。(H) 産物ピークのアイデンティティーを、反応混合物を1 0 n m o l のM Q E 標準でスパイクすることによって確認した。グリオキサールによる実験によって、同様の結果を得た(データは示さず)。

【図4】M i t o Gとメチルグリオキサール及びグリオキサールとのインビトロでの反応を示す。(A) 3 7 でのM i t o G (1 0 0 μ M) 及び1 , 2 - ジカルボニル(2 5 μ M) の間の反応は、3 4 5 n m でのキノキサリン産物の形成からフォローした。(B) M i t o G 及びメチルグリオキサール(それぞれ、4 0 μ M) の間、及びM i t o G 及びグリオキサール(それぞれ、2 0 0 μ M) の間の反応の蛍光定量的検出を、それぞれ、3 4 4 及び4 3 3 n m の励起波長及び発光波長でキノキサリン産物をモニターすることによって観察した。M Q E 及びQ E 形成によってもたらされる蛍光の変化を、既知の量のいずれかのキノキサリンに対して蛍光(それぞれ、3 4 4 及び4 3 3 n m の励起波長及び発光波長) をプロットすることによって構築した較正曲線から定量化したが、少なくとも2 0 μ M まで直線状であった。

【図5】単離したミトコンドリアによるM i t o G の取込みを示す。T P P - 選択的電極を、3 7 にて4 μ g / m l のロテノンを補充した1 m l のK C l 緩衝液を含有する撹拌したチャンバー中に置いた。1 μ M のM i t o G の5 回の添加(矢印) による較正に続いて、R L M (1 m g のタンパク質/ m l)、それに続いて示した場所で、1 0 m M のコハク酸及び5 0 0 n M のF C C P (カルボニルシアニドp - トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン) を加えた。このトレースは、3 つの独立した実験の典型的なものである。

【図6】ミトコンドリア及び細胞機能に対するM i t o G の効果を示す。(A、B) 3 7 にてグルタミン酸/ リンゴ酸上で呼吸するR L M を、酸素電極中で様々な濃度のM i t o G と共に7 分間インキュベートし、共役呼吸を測定し(A)、その後、A D P を加えてリン酸化呼吸を測定した(B)。データは、未処理対照の呼吸数の百分率である(破線)。(C 及びD) C 2 C 1 2 細胞(C) 又はウシ大動脈内皮細胞[B A E C、Bovine Aortic Endothelial Cell ; Cell Applications Inc社、S a n D i e g o、C A] (D) を、M i t o G と共に2 4 時間インキュベートし、次いで、M T S アッセイを使用して細胞生存を決定した。データは、未処理の対照の百分率として表す(破線)。(E ~ H) B A E C を、3 7 にてM i t o G と共に2 時間インキュベートし、次いで、Seahorse XF24 分析計を使用してオリゴマイシン、F C C P 及びアンチマイシンA / ロテノンの逐次的添加の後の細胞の酸素消費速度(O C R、oxygen consumption rate) を測定した。(E) A T P 合成によるO C R、(F) プロトンリークによるO C R、(G) 予備容量及び(H) 非ミトコンドリアの酸素消費。結果は、3 つの独立した実験の平均 \pm S . E . である。未処置の対照に対して、* は、P が0 . 0 5 未満、又は* * は、P が0 . 0 1 未満。

【図 7】タンデム質量分析法による MQE 及び QE のフラグメンテーションを示す。化合物 (20 % アセトニトリル中 1 μ M) を、2 μ l / 分でトリプル四重極型質量分析計中に注入した。MQE 及び QE 並びにこれらの対応する d_{15} - バリエーションの示した親イオンをフラグメント化し、示した娘イオンを生じさせた。

【図 8】MQE 及び QE の LC - MS / MS 分析を示す。(A) QE、及び MQE の両方のアイソフォームは、フラグメント化して特徴的な娘イオンを形成する、特有の m/z 比を有する親イオンを有する。(B) 対応する重水素化された IS に対する、LC - MS / MS 分析による MQE 及び QE の分析に基づいた標準曲線。

【図 9】細胞における MQE 及び QE の定量化を示す。(A) 及び (B) B A E C を、2 μ M の M i t o G と共に 1 時間インキュベートし、時折 10 mM の A G 又は 2 μ M の F C C P を補充した。次いで、メチルグリオキサール (A) 又はグリオキサール (B) を加え、さらなる 3 時間のインキュベーション後、細胞層中の MQE 及び QE のレベルを、LC - MS / MS によって重水素化された IS に対して決定した。(C、D) B A E C を、2 μ M の M i t o G を有する低 (5 mM) 又は高 (30 mM) D - グルコースを含有する媒体中で示した時間インキュベートした。細胞層における MQE (C) 及び QE (D) のレベルを、LC - MS / MS によって重水素化された IS に対して決定した。結果は、4 つの独立した実験の平均 \pm S . E . である。(E) B A E C を、5 mM の D - グルコース (低)、30 mM の D - グルコース (高)、5 mM の D - グルコース / 25 mM の L - グルコース (L - グルコース)、又は 30 mM の D - グルコース / 10 mM のアミノグアニジニウムを含有する媒体中の 2 μ M の M i t o G の存在下で 4 時間インキュベートした。細胞層中の MQE のレベルは、重水素化された IS に対して LC - MS / MS によって決定した。細胞層中の MQE のレベルを、重水素化された IS に対して LC - MS / MS によって決定した。(F) B A E C を、2 μ M の M i t o G を有する高 (30 mM) D - グルコースを含有する媒体中で、示した濃度のグリオキサラゼ I 阻害剤であるプロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステルと共に 4 時間インキュベートした。次いで、細胞層中の MQE 及び QE のレベルを、重水素化された IS に対して LC - MS / MS によって決定した。結果は、3 つの決定の平均 \pm S . E . である。結果は、3 つ (A、B) 又は 4 つ (C ~ E) の独立した実験の平均 \pm S . E . である。未処理 (A、B) 又は示した (C ~ E) 対照に対して、* は、P が 0 . 05 未満、又は * * は、P が 0 . 01 未満；250 μ M の 1 , 2 - ジカルボニルで処理された細胞に対して、# # は、P が 0 . 01 未満。

【図 10】インビボでのミトコンドリアのジカルボニルの定量化を示す。MQE (A) 及び QE (B) のレベルを、野性型及び A k i t a マウスの尿中でクレアチニンに対して定量化し、これらのマウスの血中グルコースレベルと比較した。プロットの右側のデータは、2 つの条件の平均 \pm S . E . である。* * は、P が 0 . 01 未満。

【図 11】酸化的条件下での M i t o G の安定性を示す。

【図 12】ジカルボニルによって誘発される呼吸抑制及び細胞死に対する M i t o G の保護を示す。

【図 13】心臓における糖尿病性合併症に対する M i t o G - アミドの効果を研究するために使用される I 型真性糖尿病の実験用マウスモデルの図を示す。

【図 14】マウス心臓の典型的な磁気共鳴イメージング (M R I、magnetic resonance i maging) 像を示す。

【図 15】マウス心臓の典型的な圧力 [mm H G] / 容量 [μ l] (P / V) ループ測定を示す。

【図 16】体重、血中グルコース及び心拍数に対するストレプトゾトシン (S T Z、streptozotocin) 及び M i t o G アミドの効果を示す。

【図 17】平均 P V - ループの結果に対するストレプトゾトシン (S T Z) ; 並びに S T Z 及び M i t o G アミドの効果を示す。

【図 18】拡張末期容量 (μ l) ; 駆出分画 (%) ; 左心室拡張期時定数 (T a u W e i s s、ms)、拡張期スティフネス (1 / μ l) 及び拡張末期圧 (mm H g) に対する

10

20

30

40

50

ストレプトゾトシン (STZ) ; 及び STZ 及び M i t o G アミドの効果を示す。

【図 19】酸化ストレスマーカーである 4 - ヒドロキシノネナール (4 H N E、4-hydroxynonenal) に対する M i t o G アミドの効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 2 4 4 】

本発明の例示的实施形態を本明細書において添付図面を参照して詳細に開示してきたが、本発明は正確な実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲及びこれらの同等物によって定義されるような本発明の範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更及び修正をその中で行うことができることが理解される。

【 0 2 4 5 】

実験

材料及び方法

化学合成

M i t o G、キノキサリンエーテル (Q E) 並びにメチルキノキサリンエーテル 1 及び 2 (M Q E 1 / M Q E 2) の合成の略図を図 2 に示す。要約すれば、6 - (4 - アミノフェノキシ) ヘキサノール (1) を、報告されている方法を使用して合成した (Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongcharoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. J. Med. Chem. 45:2260-2276; 2002)。1 のニトロ化は記載されているように達成され (Fanta, P. E.; Tarbell, D. S. 2-Nitro-4-methoxyaniline. Organic Synth. 25:78-80; 1945)、アセトアミドへの 1 の変換、それに続く、濃硝酸によるニトロ化が関与し、2 が得られた。次いで、脱保護によって、ニトロアニリン (3) を 48 % 全収率で 1 から得た。基本的な o - フェニレンジアミン骨格は、パラジウム担持カーボン上のニトロアニリン 3 の接触水素化によって得た。空気及び光に感受性のジアミン (4) を、テトラヒドロフラン中のジ - t e r t - ブチルジカーボネートによる処理によって t e r t - ブチルオキシカルボニル (B o c) 基で直ちに保護した (Barton, J. K.; Shao, F.; Elias, B.; Lu, W. Synthesis and characterization of iridium(III) cyclometalated complexes with oligonucleotides: insights into redox reactions with DNA. Inorg. Chem. 46:10187-10199; 2007)。5 中の第一級アルコールをメシル化して 6 を得て、次いで、アセトニトリル中のトリフェニルホスフィン及びヨウ化ナトリウムとの反応によってホスホニウム官能基に変換した。生成物 7 は、エーテルからの沈殿及びカラムクロマトグラフィーによって得て、白色の固体を 80 % 収率で得た。ロバストな分析試料を得るために、テトラフェニルボレートへの陰イオン交換は、ジクロロメタン中のナトリウムテトラフェニルボレートによる 7 の処理によって行った。M i t o G を得るアミノ基の脱保護は、9 . 8 M の塩酸による 1 , 4 - ジオキサン中の 7 の処理によって達成された。次いで、M i t o G を、グリオキサールと反応させて、キノキサリン Q E を得るか、又はメチルグリオキサールと反応させて、2 種のメチルキノキサリン産物である M Q E 1 及び M Q E 2 (これらは単一の H P L C ピークを得たが、10 : 1 の比で形成された (¹ H N M R による)) を得た。データは、主要な異性体について引用する。

【 0 2 4 6 】

N - (4 - (6 - ヒドロキシヘキシルオキシ) - 2 - ニトロフェニル) アセトアミド (2)

氷 (3 . 70 g) を有する 6 - (4 - アミノフェノキシ) ヘキサン - 1 - オール 1 (2 . 12 g、10 . 0 m m o l) の氷酢酸 (3 . 20 m L) 及び水 (2 . 40 m L) 溶液に、0 ~ 5 にて無水酢酸 (1 . 20 m L) を急速に攪拌しながら加えた。このように得られた結晶性混合物を、水浴中で加熱することによって溶解した。次いで、反応混合物を約 45 に冷却し、その後濃硝酸 (1 . 10 m L) を攪拌しながら加えた。反応混合物を 65 にて 10 分間加熱し、室温に冷却し、氷浴中に 18 時間置き、水で希釈し、ジクロロメタン中に抽出した。有機相を乾燥させ (M g S O ₄)、真空中で蒸発させ、中間体アセ

10

20

30

40

50

テートと一緒に2の混合物を黄色の油として得た(2.98 g)。ジエチルエーテルで溶出するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、2を黄色の結晶性固体として得た(1.279 g、43%)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 10.03 (1H, bs, NH)、8.61 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、7.64 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、7.21 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、3.99 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.67 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2OH)、2.26 (3H, s, Ac)、1.79 - 1.82 (2H, m)、1.58 - 1.64 (2H, m)、1.41 - 1.54 (4H, m)、1.30 (1H, bs, OH) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 168.8、154.5、137.1、128.4、123.9、123.8、109.2、68.7 (CH_2O)、62.9 (CH_2OH)、32.7、29.0、25.9、25.6、25.5 ppm; MS m/z 実測値: 319.1261、 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{Na}^+$ の計算値、319.1264。

【0247】

6 - (4 - アミノ - 3 - ニトロフェノキシ)ヘキサン - 1 - オール (3)

クライゼンアルカリ(0.45 mL)を、2からの総粗生成物(0.527 g、1.78 mmol)に加え、攪拌しながら15分間70 に加熱した。次いで、熱水(0.45 mL)を攪拌しながら反応混合物に加え、これをさらに15分間加熱した。反応混合物を氷浴中で0 ~ 5 に冷却し、水で希釈し、ジクロロメタン中に抽出した。有機相を乾燥させ(MgSO_4)、真空中で蒸発させ、オレンジ色/赤色の固体を得た(0.390 g)。ジエチルエーテルで溶出するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、3をオレンジ色/赤色の固体として得た(0.236 g、52%)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.53 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、7.06 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、6.75 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、5.88 (2H, bs, NH_2)、3.92 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.66 (2H, bt, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2OH)、1.76 - 1.81 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)、1.58 - 1.65 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、1.40 - 1.52 (4H, m)、1.30 (1H, bs, OH); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 150.3、139.9、131.6、127.1、120.1、107.2、68.7 (CH_2O)、62.9 (CH_2OH)、32.7、29.1、25.9、25.6; MS m/z 実測値: 277.1161、 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{Na}^+$ の計算値: 277.1159; 微量分析実測値: C、56.83、H、6.94、N、10.99、 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ の計算値: C、56.68、H、7.13、N、11.02。

【0248】

6 - (3, 4 - ジアミノフェノキシ)ヘキサン - 1 - オール (4)

パラジウム担持カーボン(0.20 g)を、ニトロアニリン(3)(2.22 g、8.7 mmol)の乾燥エタノール(200 mL)溶液に加え、混合物を水素雰囲気下にて18時間攪拌した。Celite(登録商標)を通して反応混合物を濾過し、真空中で蒸発させ、4を赤色の固体として得た(1.83 g、93%)。粗生成物をそれ以上精製することなく使用した。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 6.62 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、6.32 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、6.25 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、3.87 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.65 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2OH)、1.72 - 1.77 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)、1.55 - 1.65 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、1.38 - 1.51 (4H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 154.0、137.1、127.3、118.4、105.1、103.8、68.3 (CH_2O)、63.0 (CH_2OH)、32.8、29.4、26.0、25.6; MS m/z 実測値: 225.1592、 $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2^+$ の計算値、225.1596; 微量分析実測値: C、64.15、H、8.94、12.29、 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ の計算値: C、64.26、H、8.99、N、12.49。

【0249】

tert - ブチル - 4 - (6 - ヒドロキシヘキシルオキシ) - 1 , 2 - フェニレンジカルバメート (5)

ジ - tert - ブチルジカーボネート (0 . 48 g、2 . 2 mmol) を 4 (0 . 16 g、0 . 73 mmol) のテトラヒドロフラン (5 mL) 溶液に加え、アルゴン雰囲気下で室温にて 18 時間撹拌した。炭酸水素ナトリウム (0 . 31 g、3 . 6 mmol) を反応混合物に加え、これをさらに 30 分間撹拌した。反応混合物を濾過し、真空中で蒸発させ、黄色の油を得た (0 . 621 g)。ジエチルエーテル中の 1 % トリエチルアミンで溶出するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、5 を黄色の油として得た (0 . 228 g、74 %)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : 7 . 29 (1H, bs)、7 . 14 (1H, m)、6 . 91 (1H, bs, NH)、6 . 59 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz)、6 . 35 (1H, bs, NH)、3 . 93 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O)、3 . 63 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2OH)、1 . 72 - 1 . 78 (2H, m)、1 . 54 - 1 . 63 (2H, m)、1 . 50 (9H, s)、1 . 49 (9H, s)、1 . 36 - 1 . 47 (4H, m) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : 157 . 6 (C4)、154 . 6、153 . 3、133 . 6 (C2)、126 . 7 (C6)、121 . 0 (C1)、110 . 8 (C5)、108 . 4 (C3)、80 . 8、80 . 7、68 . 1 (CH_2O)、62 . 9 (CH_2OH)、32 . 7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)、29 . 2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)、28 . 4、28 . 3、25 . 9、25 . 5; MS m/z 実測値 : 447 . 2451、 $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot \text{Na}^+$ の計算値 : 447 . 2466; 微量分析実測値 : C、62 . 50、H、8 . 86、N、6 . 35、 $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$ の計算値 : C、62 . 24、H、8 . 86、N、6 . 35。

【0250】

6 - (3 , 4 - ビス (tert - ブトキシカルボニルアミノ) フェノキシ) ヘキシルメタンスルホネート (6)

5 (0 . 23 g、0 . 53 mmol) 及び トリエチルアミン (150 μL 、0 . 110 g、1 . 06 mmol) の溶液を、無水ジクロロメタン (10 mL) 中で室温にて撹拌した。メタンスルホニルクロリド (50 μL 、0 . 074 g、0 . 64 mmol) を加え、反応物を 1 時間撹拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、水及び炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥させ (MgSO_4)、真空中で蒸発させ、6 を黄色の油として得た (0 . 213 g、80 %)。粗生成物をそれ以上精製することなく使用した。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : 7 . 31 (1H, bs)、7 . 15 (1H, m)、6 . 89 (1H, bs, NH)、6 . 59 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz)、6 . 29 (1H, bs, NH)、4 . 23 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2OMs)、3 . 94 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O)、2 . 99 (3H, s, Ms)、1 . 74 - 1 . 80 (4H, m)、1 . 46 - 1 . 51 (22H, m) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) : 157 . 6、154 . 6、153 . 3、133 . 6、126 . 8、121 . 0、110 . 8、108 . 3、80 . 8、80 . 7、70 . 0 (CH_2OMs)、67 . 9 (CH_2O)、37 . 4、29 . 1、29 . 0、28 . 4、28 . 3、25 . 6、25 . 3 ppm; MS m/z 実測値 : 525 . 2240、 $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{S} \cdot \text{Na}^+$ の計算値 : 525 . 2241。

【0251】

(6 - (3 , 4 - ビス (tert - ブトキシカルボニルアミノ) フェノキシ) ヘキシル) トリフェニルホスホニウムヨード (7)

メシレート 6 (0 . 59 g、1 . 17 mmol) 及び トリフェニルホスフィン (0 . 34 g、1 . 29 mmol) 及び ヨウ化ナトリウム (0 . 260 g、1 . 76 mmol) の乾燥アセトニトリル (100 mL) 溶液を、撹拌しながら 80 に 48 時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、白色の固体を濾過によって除去し、アセトニトリルで洗浄した。次いで、溶媒を約 30 mL に減少させ、エーテル (400 mL) を撹拌しながらゆっく

りと加え、産物が沈殿した。エーテルを油状固体からデカントし、プロセスを繰り返した。油状固体を0.5 mm Hg未満で1時間乾燥させ、黄色の固体を得た(0.680 g)。クロロホルム中の5~15%メタノールで溶出するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、7を白色の固体として得た(0.585 g、63%)。

^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): 7.84 - 7.80 (3H, m, Ar)、7.73 - 7.67 (12H, m, Ar)、7.54 (1H, bs, NH)、7.25 (1H, bs)、7.19 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、6.94 (1H, bs, NH)、6.55 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、3.91 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.31 (2H, m, CH_2P)、1.59 - 1.72 (6H, m)、1.26 - 1.47 (20H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 157.3、154.8、153.8、135.6 (d, $J_{\text{C}_4\text{P}} = 3\text{ Hz}$, p-Ph)、133.9 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 10\text{ Hz}$, o-Ph)、130.9 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 13\text{ Hz}$, m-Ph)、126.9、122.4、118.5 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 86\text{ Hz}$, i-Ph)、110.7、109.0、80.5、80.4、68.1 (CH_2O)、30.2 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 16\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、28.9、28.4、28.3、25.6、22.7 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 4\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、22.6 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 51\text{ Hz}$, CH_2P); ^{31}P NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): 24.4 ppm; MS m/z 実測値: 669.3506、 $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{H}_5\text{P}^+$ の計算値: 669.3452;

【0252】

分析のための7のテトラフェニルホウ酸塩の試料を、ジクロロメタン中のナトリウムテトラフェニルボレートによる陰イオン交換によって調製した。生成物をエタノールから-78にて再結晶化し、濾過し、真空中で40にて4日間乾燥させ、(6-(3,4-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)フェノキシ)ヘキシル)トリフェニルホスホニウムテトラフェニルボレートを白色の結晶として得た。

微量分析実測値: C、77.43、H、7.35、N、2.80、 $\text{C}_{64}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_5\text{BP}$ の計算値: C、77.72、H、7.13、N、2.83; MS m/z 実測値: 669.3442、 $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{H}_5\text{P}^+$ の計算値: 669.3452, 実測値: 319.1680、 $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B}^-$ の計算値: 319.1664。 ^1H 及び ^{31}P NMR スペクトルが7と一致していた。

【0253】

(6-(3,4-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)フェノキシ)ヘキシル)- D_{15} -トリフェニルホスホニウムヨージド(d_{15} -7)

同様に、メシレート(6)(290 mg)とヨウ化ナトリウム(110 mg)及び d_{15} 標識化されたトリフェニルホスフィン(100 mg)とによって、 d_{15} -7をオフホワイト色のガムとして得た(0.274 g、90%)。

HPLC 13.24分、99+%純度。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7.25 (1H, bs)、7.16 (1H, bd, $J = 8\text{ Hz}$)、6.96 (1H, bs, NH)、6.57 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、6.38 (1H, bs, NH)、3.89 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.74 (2H, m, CH_2P)、1.59 - 1.72 (6H, m)、1.55 (6H, s)及び1.38 - 1.48 (14H, m)。MS m/z 実測値: 684.396、 $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{D}_{15}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}^+$ の計算値: 684.4393。

【0254】

(6-(3,4-ジアミノフェノキシ)ヘキシル)トリフェニルホスホニウムクロリド(Mitog)

塩酸(9.8 M、1.0 mL)を7(0.050 g、0.065 mmol)の1,4-ジオキサン(1 mL)溶液に加え、室温にてアルゴン下で1時間静置した。反応混合物を減圧下(0.5 mmHg未満)で濃縮し、Mitogを淡黄色の固体として得た(0.035 g、98%)。

HPLC 8.9分、95%純度、 ^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): 7.86 - 7.90 (3H, m, Ar)、7.73 - 7.80 (12H, m, Ar)、6.39 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、6.12 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、5.92 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、4.47 (4H, bs, NH_2)、3.70 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.57 (2H, m, CH_2P)、1.45 - 1.58 (6H, m)、1.34 - 1.40 (2H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): 151.6、136.7、134.8 (d, $J_{\text{C}_4\text{P}} = 3\text{ Hz}$, p-Ph)、133.5 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 10\text{ Hz}$, o-Ph)、130.2 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 12\text{ Hz}$, m-Ph)、127.8、118.5 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 86\text{ Hz}$, i-Ph)、115.5、102.4、101.9、67.2 (CH_2O)、29.6 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 17\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、28.6、24.8、21.7 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 4\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、20.2 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 50\text{ Hz}$, CH_2P) ppm; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): 23.8 ppm; MS m/z 実測値: 469.2404、 $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 469.2403。

【0255】

(6 - (3, 4 - ジアミノフェノキシ)ヘキシル) - D_{15} - トリフェニルホスホニウムクロリド (d_{15} - Mitog)

同様に、(6 - (3, 4 - ビス(tert - ブトキシカルボニルアミノ)フェノキシ)ヘキシル)トリフェニルホスホニウムヨード (d_{15} - 7) (0.021 g、0.026 mmol) によって、 d_{15} - Mitog を淡黄色の固体として得た。粗生成物をそれ以上精製することなく使用した。

HPLC: 9.0分、89%純度。MS m/z 実測値: 484.3332、 $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{D}_{15}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 484.3345。

【0256】

(6 - (6 - キノキサリニルオキシ)ヘキシル)トリフェニルホスホニウムトリフルオロアセテート (QE)

トリエチルアミン (50 μL) を、攪拌した 8 (0.007 g、14 μmol) のエタノール (96%、1 mL) 溶液にアルゴン下で室温にて加えた。5分後、グリオキサール (40%、50 μL) のエタノール (96%、0.5 mL) 溶液を加え、混合物をアルゴン下で2時間攪拌した。反応混合物を真空中で蒸発させ、産物を淡黄色のガムとして得た。水 (0.1% TFA) 中の10~100%アセトニトリルで段階的に溶出するSPE C18シリカカラム (10 g) 上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、QE を50%画分で茶色のガムとして得た (5 mg、68%)。

HPLC 11.2分、99+%純度; ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): 8.72 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、8.68 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、7.96 (1H, d, $J = 8\text{ Hz}$)、7.77 - 7.84 (3H, m, Ar)、7.69 - 7.76 (12H, m, Ar)、7.40 (1H, dd, $J = 2, 8\text{ Hz}$)、7.38 (1H, d, $J = 2\text{ Hz}$)、4.12 (2H, t, $J = 6\text{ Hz}$, CH_2O)、3.48 (2H, m, CH_2P)、1.85 (2H, m)、1.72 (4H, m)、1.56 (2H, m) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2): 160.6、144.9、144.6、142.7、139.6、135.6 (d, $J_{\text{C}_4\text{P}} = 3\text{ Hz}$, p-Ph)、134.0 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 10\text{ Hz}$, o-Ph)、130.9 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 13\text{ Hz}$, m-Ph)、130.7、123.9、118.4 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 86\text{ Hz}$, i-Ph)、107.5、68.8 (CH_2O)、30.6 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 16\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、29.0、25.9、23.5 (d, $J_{\text{C}_\text{P}} = 51\text{ Hz}$, CH_2P)、22.9 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 4\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$) ppm; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): 23.8 ppm; MS m/z 実測値: 491.2238、 $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 491.2247。

【0257】

6 - (6 - キノキサリニルオキシ)ヘキシル) - d_{15} - トリフェニルホスホニウムトリ

フルオロアセテート (d_{15} - QE)

同様に、ジアミン (d_{15} - MitOG) (0.036 g、71 μ mol) とグリオキサール (40%、200 μ L) とによって、 d_{15} - QE を 50% 画分で茶色のガムとして得た (14 mg、37%)。

HPLC 11.0 分、99% 純度; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 8.79 (1H, d, $J = 2$ Hz)、8.74 (1H, d, $J = 2$ Hz)、8.05 (1H, d, $J = 8$ Hz)、7.43 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz)、7.38 (1H, d, $J = 2$ Hz)、4.12 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O)、3.38 (2H, m, CH_2P)、1.82 (2H, m)、1.66 (4H, m)、1.53 (2H, m) ppm; MS m/z 実測値: 506.3201、 $\text{C}_{32}\text{H}_{17}\text{D}_{15}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 506.3188。

【0258】

(6 - (6 - (2 - メチル - キノキサリニルオキシ))ヘキシル)トリフェニルホスホニウムトリフルオロアセテート (MQE1 / MQE2)

同様に、MitOG (0.007 g、14 μ mol) とメチルグリオキサール (40%、50 μ L) との反応によって、メチルキノキサリン (MQE1 / MQE2) を 50% 画分で茶色のガムとして得た (5 mg、68%)。

HPLC: 11.1 分。 ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): 8.78 (1H, s)、8.04 (1H, d, $J = 8$ Hz)、7.77 - 7.84 (3H, m, Ar)、7.69 - 7.76 (12H, m, Ar)、7.55 (1H, d, $J = 2$ Hz)、7.44 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz)、4.16 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O)、3.14 (2H, m, CH_2P)、2.83 (3H, s, C-Me)、1.88 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)、1.75 (2H, m)、1.67 (2H, m) 及び 1.58 (2H, m) ppm; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2): 161.91、160.25 (q, $J_{\text{CF}} = 30$ Hz, CF_3CO)、152.74、143.20、141.10、137.43、135.80 (d, $J_{\text{C}_4\text{P}} = 3$ Hz, p-Ph)、133.58 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 10$ Hz, o-Ph)、130.92 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 13$ Hz, m-Ph)、130.08、123.83、117.88 (d, $J_{\text{CP}} = 86$ Hz, i-Ph)、116.21 (d, $J_{\text{CF}} = 230$ Hz, CF_3) 105.01、68.88 (CH_2O)、30.50 (d, $J_{\text{C}_3\text{P}} = 16.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、28.71、25.58、23.20 (d, $J_{\text{CP}} = 51$ Hz, CH_2P)、22.69 (d, $J_{\text{C}_2\text{P}} = 4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$)、21.06 (CMe) ppm; ^{31}P NMR (162 MHz, CD_2Cl_2): 23.8 ppm。MS m/z 実測値: 505.2419、 $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 505.2403。

【0259】

(6 - (6 - (2 - メチル - キノキサリニルオキシ))ヘキシル) - d_{15} - トリフェニルホスホニウムトリフルオロアセテート (d_{15} - MQE1 / MQE2)

同様に、 d_{15} - MitOG (0.036 g、71 μ mol) とメチルグリオキサール (40%、200 μ L) とによって、 d_{15} - MQE1 / MQE2 を 50% 画分で茶色のガムとして得た (16 mg、43%)。

HPLC: 11.1 分 99%。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 8.61 (2H, bs)、7.93 (1H, d, $J = 8$ Hz)、7.32 (1H, dd, $J = 2, 8$ Hz)、7.31 (1H, s)、4.07 (2H, t, $J = 6$ Hz, CH_2O)、3.50 (2H, m, CH_2O)、2.75 (3H, s, CMe)、1.82 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)、1.66 (4H, m)、1.51 (2H, m) ppm; MS m/z 実測値: 520.3366、 $\text{C}_{33}\text{H}_{19}\text{D}_{15}\text{N}_2\text{OP}^+$ の計算値: 520.3345。

【0260】

4 - ヘキシルオキシベンゼン - 1, 2 - ジアミン (HP)

対照化合物 (HP) を、MitOG のために上記のように作製した。化合物は、文字 b

10

20

30

40

50

を加えることによって、図2において使用される付番したスキームに関連している。手短に言えば、N-(4-(6-ヘキシルオキシ)-2-ニトロフェニル)アセトアミド(2b)(Adachi, K.; Shishido, T.; Hirose, T. Benzotriazole derivatives. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 1977. Japanese Patent JP 52093771 A 19770806)は、アミン4-(ヘキシルオキシ)アニリン1b(Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongcharoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. J. Med. Chem. 45:2260-2276; 2002)(1.57g、0.12mmol)から作製し、2bを黄色の油として得た(2.05g)。ジクロロメタン/ジエチルエーテルで溶出するシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによる精製によって、2bを黄色の固体として得た(1.56g、75%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): 10.04(1H, bs)、8.62(1H, d, J=8Hz)、7.65(1H, d, J=2Hz)、7.22(1H, dd, J=2, 8Hz)、3.99(2H, t, J=6Hz, CH₂O)、2.26(3H, s, Ac)、1.80(2H, m, CH₂CH₂O)、1.46(2H, m)、1.35(4H, m)及び0.91(3H, t, J=6Hz, CH₃)ppm。次いで、2b(0.42g、1.5mmol)の反応によって、4-(ヘキシルオキシ)-2-ニトロアニリン3bを、次いで、4-ヘキシルオキシ-1,2-フェニレンジアミン4b(Tetraazaannulene cobalt complexes. In: Koho, J. K. T., ed.; 1983)を赤色の固体として得た(0.224g、72%)。これを下記の反応において直接使用した。このために、ジアミン4b(0.34g、1.5mmol)から、3,4-ビス tert-ブチル-4-(ヘキシルオキシ)-1,2-フェニレンジカルバメート5bを黄色の油として得た(0.430g、71%)。HPLC: 17.7分、>99%純度。¹H NMR(500MHz, CDCl₃): 7.31(1H, bs)、7.16(1H, m)、6.84(1H, bs, NH)、6.62(1H, dd, J=2, 8Hz)、6.25(1H, bs, NH)、3.93(2H, t, J=6Hz, CH₂O)、1.75(2H, m, CH₂CH₂O)、1.52(9H, s)、1.50(9H, s)、1.46(2H, m)、1.33(4H, m)及び0.90(3H, t, J=6Hz, CH₃); MS m/z 実測値: 407.2618、C₂₂H₃₅N₂O₅⁻の計算値: 407.2546。

【0261】

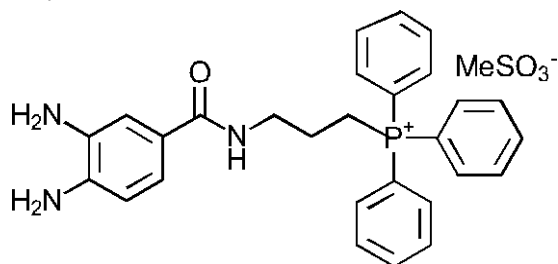
4-ヘキシルオキシベンゼン-1,2-ジアミン(HP)を作製するために、5b(0.022g、0.054mmol)を塩酸と反応させ、HPを淡黄色の固体として得た。HPLC: 9.67分、>99%純度。¹H NMR(500MHz, (CD₃)₂SO): 7.19(1H, d, J=8Hz)、6.54(1H, d, J=2Hz)、6.37(1H, dd, J=2, 8Hz)、5.60(4H, bs, NH₂)、3.95(2H, t, J=6Hz, CH₂O)、1.79(2H, m, CH₂CH₂O)、1.50(2H, m)、1.41(4H, m)、1.51(3H, t, J=6Hz, CH₃)ppm。¹³C NMR(125MHz, (CD₃)₂SO): 159.24、142.83、125.17、111.50、104.30、103.01、67.87(CH₂O)、31.44、29.04、25.61、22.52及び14.36(CH₃)ppm; MS m/z 実測値: 209.1701、C₁₂H₂₁N₂O⁺の計算値: 209.1654。

【0262】

[3-(3',4'-ジアミノベンゾイルアミノ)-プロパ-1-イル]トリフェニルホスホニウムメシレート(MitoG-アミド)

【0263】

【化 17】



【0264】

(3-アミノプロピル)トリフェニルホスホニウムヨージド(1.34 g、3.0 mmol)、2,4-ジアミノ安息香酸(445 mg、2.9 mmol)、及びジイソプロピルカルボジイミド(400 μ l、2.6 mmol)の乾燥MeCN(10 mL)溶液を、35 にてAr下で48時間撹拌した。この後、沈殿物をMeCNで洗浄した(3 \times 10 mL)。固体を集め、残留溶媒を高真空下にて除去した。このように得られた茶色の固体(1.25 g)をエタノールから2回再結晶化し、ヨージド塩を茶色の粉末として得た(790 mg、53%)。ヨージドの試料をMeOH-H₂O(50:50)に溶解し、イオン交換カラム(アンバーライトIRA-400、メシレート対イオン)を2回通過させた。溶媒を真空下で除去し、ホスホニウムメシレートをアモルファスの茶色の固体として得た(238 mg、44%)。 ¹H (CD₃OD, 400 MHz): 7.92 - 7.87 (m, 3 \times p-H PPh₃)、7.82 - 7.71 (12 H, m, 6 \times o-H PPh₃, 6 \times m-H PPh₃)、7.21 (1 H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 7.14 (1 H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-6'), 6.68 (1 H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 3.53 (2 H, t, J = 6.4 Hz, NCH₂), 3.50 - 3.44 (2 H, m, PCH₂), 2.70 (3 H, s, CH₃SO₃) 2.02 - 1.92 (2 H, m, CH₂CH₂CH₂)。 ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): 170.99 (C)、141.14 (C)、136.34 (d, J = 4 Hz, CH)、134.80 (d, J = 10 Hz, CH)、131.59 (d, J = 12 Hz, CH)、124.42 (C)、120.52 (CH)、119.78 (d, J = 86 Hz, C)、116.44 (CH)、115.55 (CH)、40.81 (d, J = 18 Hz, CH₂)、39.55 (CH₃)、24.03 (d, J = 4 Hz, CH₂)、20.68 (d, J = 52 Hz, CH₂) (1つのCは推定するところ、別のシグナルと一致する)。

【0265】

グリオキサラーゼI阻害剤であるプロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステルを、グルタチオンのアルキル化Thornalley, P. J.; Edwards, L. G.; Kang, Y.; Wyatt, C.; Davies, N.; Ladan, M. J.; Double, J. Antitumour activity of S-p-bromobenzy lglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. Biochem. Pharmacol. 51:1365-1372; 1996、それに続く、標準的なBoc-保護、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレートを使用したシクロペンタノールとのカップリングTwibanire, J. D.; Grindley, T. B. Efficient and controllably selective preparation of esters using uronium-based coupling agents. Org. Lett. 13:2988-2991; 2011、トリフルオロ酢酸(TFA、trifluoroacetic acid)によるBoc基の除去、及び炭酸水素ナトリウムによる処理によって合成し、遊離塩基を得た。他の試薬は、特に明記しない限り、Sigma-Aldrich社から得た。¹H、¹³C及び³¹Pのスペクトルは、Varian INOVA-400又はVarian INOVA-500分光計で得た。化学シフトは、溶媒の残留シグナルに対してTMSより低磁場で報告する。この研究の化学合成の構成要素について、高分解能質量スペクトルをBruker microTOFエレクトロスプレー質量分析計で記録し、HPLC分析は、Agilent HP1100: カラムPhenomenex Prodigy、250 \times 3 mmで行った。0.5 mL min⁻¹で210及び254 nmで検出を行う12.5分に亘る10%アセトニトリル/水(0.1% TFA)から100%アセトニトリルの勾配溶離。

【0266】

化合物特性のアセスメント

T P P コンジュゲート化合物を D M S O 中の 1 0 m M のストック溶液として作製し、アルゴンでフラッシュし、一定分量として - 2 0 ℃ にて貯蔵した。U V / 可視スペクトル及び動態学的分析を、K C l 緩衝液 [1 2 0 m M の K C l 、 1 0 m M の H E P E S 及び 1 m M の E G T A 、 p H 7 . 2 (K O H)] を含有する 1 m l - キュベットにおいて Shimadzu UV-2501PC 分光光度計を使用して行った。公知の濃度の溶液についての化合物について、モル吸光係数は、最大吸収 (λ_{max}) における吸光度から計算した。M i t o G 及び 1 , 2 - ジカルボニルの間の反応速度は、関連性のあるキノキサリンの形成について λ_{max} にて最初の 3 0 秒に亘り最初の直線状スロープから決定した。蛍光スペクトルは、3 n m のスリット幅を有する Shimadzu RF-301PC 蛍光計を使用して 2 . 5 m l の K C l 緩衝液中で得た。動態学的アッセイは、それぞれ、3 4 4 及び 4 3 3 n m の励起波長及び発光波長を使用し、発光スペクトルは、3 4 4 n m の励起波長を使用し、励起スペクトルは、4 3 3 n m の発光波長を使用した。R P - H P L C を、Widapore C18 ガードカラム (Phenomenex 社) を有する C 1 8 カラム (Jupiter300 、 Phenomenex 社) を伴う Gilson321 ポンプを使用して行った。試料 (1 m l) を、0 . 2 2 μ m の P V D F フィルター (Millex 、 Millipore 社) を通して注入した。H P L C 緩衝液 A [水中 0 . 1 % T F A] 及び H P L C 緩衝液 B (9 0 % アセトニトリル及び 0 . 1 % T F A) を使用し、勾配は 1 m l / 分で室温にて下記のように行った。0 ~ 2 分 - 5 % B ; 2 ~ 1 7 分 - 5 ~ 1 0 0 % B ; 1 7 ~ 1 9 分 - 1 0 0 % B ; 1 9 ~ 2 2 分 - 1 0 0 ~ 5 % B 。 2 2 0 n m での吸光度 (U V / V i s 1 5 1 、 Gilson 社) によって、並びに蛍光 (3 4 4 及び 4 3 3 n m の励起波長及び発光波長 ; RF-10AXL 、 Shimadzu 社) によってピークを検出した。P B S 及びオクタン - 1 - オールの間の分配係数は、従前に記載されているように決定した (Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells - Antioxidant and antiapoptotic properties. J. Biol. Chem. 276:4588-4596; 2001) 。

【0267】

ミトコンドリアの調製及びインキュベーション

ラット肝臓ミトコンドリア (R L M 、 Rat liver mitochondria) は、均質化及び分画遠心分離によって 4 ℃ にて S T E 緩衝液 [2 5 0 m M のスクロース、5 m M の T r i s 及び 1 m M の E G T A 、 p H 7 . 4 (H C l)] 中で調製した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン (B S A 、 bovine serum albumin) に対してビウレットアッセイを使用して決定し、典型的には 4 0 ~ 6 0 m g / m l であった。P o w e r l a b 2 / 2 0 データ収集システム (AD Instruments 社、A u s t r a l i a) に接続したクラーク型酸素電極 (Rank Brothers 社、B o t t i s h a m 、 C a m b r i d g e 、 U K) を使用して呼吸数を測定し、空気飽和水 (2 1 0 n m o l の O_2 / m l 、 3 7 ℃) で校正した。R L M (2 m g のタンパク質 / m l) を、恒温装置のある 1 m l - 電極チャンバー中で攪拌しながら 1 2 0 m M の K C l 、 1 0 m M の H E P E S 、 1 m M の E G T A 、 1 m M の $MgCl_2$ 及び 5 m M の KH_2PO_4 、 p H 7 . 2 (K O H) に懸濁させた。次いで、M i t o G を加え、5 分後、グルタミン酸及びリンゴ酸 (それぞれ 5 m M) を、3 分後に 4 0 0 μ M の A D P を加えた。酸素消費速度は、M a c 用 Chart v5.5.6. (AD Instruments 社、A u s t r a l i a) を使用してスロープから決定した。M i t o G の T P P 部分について選択性の電極を、従前に記載されているように構築し、使用した (Asin-Cayuela, J.; Manas, A. R.; James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. FEBS Lett. 571:9-16; 2004) 。

【0268】

細胞培養

全ての細胞を 3 7 ℃ にて 9 5 % 空気及び 5 % CO_2 の加湿雰囲気下インキュベートし、使用した培養培地は 1 0 % (v / v) ウシ胎仔血清 (F C S 、 fetal calf serum) 、 1 0

10

20

30

40

50

0 U / m l のペニシリン及び 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシンで補充した。C 2 C 1 2 細胞 (マウス筋芽細胞株 ; European Collection of Animal Cell Cultures) を、低グルコース (1 0 0 0 m g / l の D - グルコース) ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M , Dulbecco ' s modified Eagle ' s medium ; Invitrogen 社) 中で培養した。細胞をサブコンフルエンス (8 0 % 未満) に維持し、分化を防止した。B A E C (ウシ大動脈内皮細胞 ; Cell Applications Inc 社、S a n D i e g o , C A) を、5 m M の D - グルコースを含有する - 最小必須培地 (M E M 、 - minimum essential medium ; Invitrogen 社) 中に維持した。実験のために使用した全ての培養フラスコ及びアッセイプレートは、ハanks平衡塩類溶液 (H B S S , Hank ' s balanced salt solution ; Cell Applications 社) 中のフィブロネクチン ((2 5 μ g / m l : Sigma 社) で 1 ~ 4 μ g のフィブロネクチン / c m ² にて事前コーティングした。1 時間後、R T で、過剰なコーティング溶液を除去し、次いで、フラスコ及びプレートに実験のための細胞を播種した。B A E C を、4 ~ 6 代継代で実験のために使用した。

【 0 2 6 9 】

細胞生存率を評価するために、C 2 C 1 2 細胞又は B A E C を、9 6 ウェルプレートにおいて、それぞれ、1 0 , 0 0 0 個の細胞 / ウェル及び 4 0 , 0 0 0 個の細胞 / ウェルの密度で播種した。一晩のインキュベーション後、媒体を、試験化合物を含有する新鮮な媒体で置き換え、2 4 時間インキュベートした。細胞生存を決定するために、細胞を媒体で 2 回洗浄し、次いで、新鮮な媒体 (ウェル毎に 1 0 0 μ l) を加え、2 0 μ l の [3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 5 - (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム] / フェナジンメトスルフェート (M T S / P M S) (Promega 社、U S A) と混合した。2 時間後、プレートリーダー (SpectraMax Plus384 , Molecular Devices 社) で吸光度を 4 9 0 n m にて読み取った。全ての処置は三連ウェルにおいて行った。

【 0 2 7 0 】

Seahorse XF24細胞外流動分析計を使用して、細胞の酸素消費速度 (O C R) を評価した (Choi , S . W . ; Gerencser , A . A . ; Nicholls , D . G . Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. J. Neurochem. 109:1179-1191; 2009、Dranka , B . P . ; Benavides , G . A . ; Diers , A . R . ; Giordano , S . ; Zelickson , B . R . ; R e i l y , C . ; Zou , L . ; Chatham , J . C . ; Hill , B . G . ; Zhang , J . ; Landar , A . ; Darley-Usmar , V . M . Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. Free Radic. Biol. Med. 51:1621-1635; 2011、Hill , B . G . ; Benavides , G . A . ; Lancaster , J . R . , Jr . ; Ballinger , S . ; Dell'Italia , L . ; Jianhua , Z . ; Darley-Usmar , V . M . Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. Biol. Chem. 393:1485-1512; 2012) 。細胞 (4 0 , 0 0 0 個の B A E C / ウェル) を培養し、上記のようなフィブロネクチンでコーティングした Seahorse XF24V7アッセイプレートにおいて実験的処理に供した。O C R は下記のように決定した。細胞をアッセイ培地 [4 . 1 5 g / l の D M E M 塩基、1 . 8 5 g / l の N a C l 、1 \times glutamax (Invitrogen 社) 、1 m M のピルビン酸ナトリウム、5 m M の D - グルコース、1 5 m g / l のフェノールレッド、2 0 m M の H E P E S 及び 0 . 4 % (v / v) F C S 、p H 7 . 4] 中で 2 回洗浄し、3 7 $^{\circ}$ にて空気中 6 3 0 μ l のアッセイ培地中で 1 時間インキュベートした。2 0 分の平衡化後、基本的 O C R を決定し、M i t o G との 3 時間のインキュベーション後、オリゴマイシン (1 μ g / m l) 、F C C P (2 μ M) 及びロテノン / アンチマイシン A (それぞれ、4 μ g / m l 及び 5 μ M) を逐次で注射した。O C R は、下記のようなスルホローダミン B (S R B , sulphorhodamine B) アッセイを使用して測定するように、細胞数に規準化した。細胞を固定し (2 0 0 μ l の 5 % トリクロロ酢酸、4 $^{\circ}$ にて 1 時間) 、水で洗浄し (\times 3) 、1 % (v / v) 酢酸中の 5 0 μ l の 0 . 4 % (w / v) S R B で 2 0 分間染色し、洗浄し (3 \times 1 % 酢酸) 、組み込まれている S R B 色素を 1 0 0 μ l の 1 0 m M の T r i s 塩基に 5 分間可溶化させた。次

いで、50 μ l の各試料を2連で96ウェルプレートに移し、50 μ l の10 mMの緩衝化していないT r i s 塩基と混合し、吸光度をプレートリーダー (SpectraMax Plus384、Molecular Devices社) で565 nmにて読み取った。標準曲線を、四連ウェル中に既知の数の細胞を播種し、固定し、これらを染色することによって試料ウェルと平行して構築した。プロトンリーク及び予備容量に起因する酸素消費の割合を計算するために、オリゴマイシン、F C C P 及びロテノン/アンチマイシンAの注射に続くO C Rは、基本的総O C Rの百分率として表した (Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435:297-312; 2011、Dranka, B. P.; Benavides, G. A.; Diers, A. R.; Giordano, S.; Zelickson, B. R.; Reily, C.; Zou, L.; Chatham, J. C.; Hill, B. G.; Zhang, J.; Landar, A.; Darley-Usmar, V. M. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1621-1635; 2011)。

10

【0271】

R P - H P L C による細胞中の総メチルグリオキサル形成を評価するために、細胞層を、P B S (1 ml) 中で洗浄し、1.5 ml のP B S 中にこすり取り、遠心分離 (16,000 g、2分間) によってペレット化した。細胞ペレットを500 μ l のK C L 緩衝液に再懸濁し、500 μ l の0.1%ギ酸を加え、タンパク質を上記のように遠心分離によってペレット化し、上清を集めた。次いで、100 μ M のo - フェニレンジアミンを加えることによってメチルグリオキサルを2 - メチルキノキサリンに誘導体化し、それに続いて37 $^{\circ}$ Cにて4時間インキュベートした。試料を真空下で乾燥し、従前に記載されているように2 - メチルキノキサリンについて評価した (Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal. Biochem.* 238:171-178; 1996)。

手短に言えば、乾燥した試料を、1 ml のH P L C 緩衝液 [68% (v/v) 10 mMのK H ₂ P O ₄、p H 2.5 及び32%アセトニトリル] に再懸濁し、濾過し (0.22 μ m のP V D F ; Millex、Millipore社)、C 18 カラム (Jupiter300、Phenomenex社) 及びWidopore C18ガードカラム (Phenomenex社) を有するG i l s o n 321 ポンプを使用して2 ml / 分の流量で室温にて上記のH P L C 緩衝液中の定組成R P - H P L C によって分離した。ピークを蛍光定量的に検出した (それぞれ、352 及び385 nmの励起波長及び発光波長; RF-10AXL、Shimadzu)。

20

30

【0272】

M i t o G 反応産物のL C - M S / M S 分析のために、細胞を、2 μ M のM i t o G を有するT 25 フラスコ (N u n c) 中で37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。細胞単層を洗浄し (1 ml のP B S)、1.5 ml のP B S 中にこすり取り、遠心分離 (16,000 g、2分間) によってペレット化した。ペレットを重水素化された内部標準 (I S) (それぞれ100 pmol のd ₁₅ - M Q E 及びd ₁₅ - Q E) でスパイクした250 μ l の100%アセトニトリル/0.1%に再懸濁し、ボルテックスし、遠心分離した (15分間2 \times 16,000 g)。

試料を真空下で乾燥させ (Savant SpeedVac)、100 μ l の20%アセトニトリル/0.1%ギ酸に再懸濁し、ボルテックスし、遠心分離し (10分間16,000 g)、シラン処理したオートサンプラーバイアル [Chromacol#1.5HRRV(S)] に移し、フラッシュし、アルゴン下で密封し、次いで、L C - M S / M S 分析まで - 80 $^{\circ}$ Cにて貯蔵した。特定される場合、細胞を急性の血糖処理に供し、低グルコース (5 mM のD - グルコース)、高グルコース (30 mM のD - グルコース)、又は浸透圧制御媒体 (5 mM のD - グルコース + 25 mM のL - グルコース) 中で4時間インキュベートした。

40

【0273】

マウス実験

I 型糖尿病のA k i t a マウスモデル (I n s 2 ^{+/ -} A k i t a ^J) (Yoshioka, M.; Kayo, T.; Ikeda, T.; Koizumi, A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice

50

. Diabetes 46:887-894; 1997、Izumi, T.; Yokota-Hashimoto, H.; Zhao, S.; Wang, J.; Halban, P. A.; Takeuchi, T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. Diabetes 52:409-416; 2003、Chacko, B. K.; Reilly, C.; Srivastava, A.; Johnson, M. S.; Ye, Y.; Ulasova, E.; Agarwal, A.; Zinn, K. R.; Murphy, M. P.; Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V. Prevention of diabetic nephropathy in Ins2(+/-)(AkitaJ) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. Biochem. J. 432:9-19; 2010) を、アラバマ大学、USAにおいて評価した。全ての手順は「The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」によって行い、アラバマ大学、バーミングハムの動物実験委員会によって承認された。Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) からの雄性 Ins2^{+/+}-Akita^a J 及び野性型 (C57BL/6) マウス (4~8週齢) を、実験のために使用するとき 10
に 14週齢まで実験室用固形飼料及び水を自由に摂取させた。このために、Mitog (100 µl の食塩水中 100 nmol) を尾静脈注射によって投与した。4~6時間後、マウスを屠殺し、尿試料を採取し、MQE/QE 含量のそれに続く分析のために急速冷凍した。血中グルコース値を、Accu-Chek Advantage 血中グルコースメーター (Roche Diagnostics 社) を使用して測定した。尿クレアチニンレベルを、Core Biochemical アッセイ実験室 (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK) において決定した。MQE 及び QE を抽出するために、20 µl の尿を 500 µl の 60% アセトニトリル / 0.1% ギ酸と混合し、氷上で 30 分間インキュベートした。次いで、抽出物を重水素化された IS (それぞれ 100 pmol の d₁₅-MQE 及び d₁₅-QE) でスパイクし、30 秒間ボルテックスし、氷上で 30 分間 10 分毎にボルテックスしながらインキュベートし、次いで、遠心分離した (10 分間 16,000 g)。上清を集め、濾過し (0.22 µm の PVDF, Millex, Millipore 社)、真空下で乾燥させた (Savant SpeedVac)。乾燥した試料を、5 分間ボルテックスすることによって 150 µl の 20% アセトニトリル / 0.1% ギ酸に再懸濁させ、それに続いて 16,000 g にて 10 分間遠心分離した。次いで、試料をシラン処理したオートサンプラーバイアル [Chromacol #1.5HRRV(S)] に移し、フラッシュし、アルゴン下で密封し、LC-MS/MS 分析まで -80 にて貯蔵した。

【0274】

LC-MS/MS 分析

TPP 化合物の MS フラグメンテーションパターンは、トリプル四重極型質量分析計 (Waters Quattro Ultima) 中への 2 µl / 分での化合物 [20% アセトニトリル (v/v) 中 1 µM] の直接の注入によって決定した。陽イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化を下記の設定で使用した。ソーススプレー電圧 - 3 kV; コーン電圧 - 100 V; イオンソース温度 - 80 ; 衝突エネルギー - 50 V。窒素及びアルゴンを、それぞれ、カーテンガス及び衝突ガスとして使用した。

【0275】

LC-MS/MS 分析は、結合した I-class Aquity LC システム (Waters 社) を有するトリプル四重極型質量分析計 (Waters Xevo TQ-S) を使用して行った。15 µl のフロースルーニードル中への 10 µl のオートサンプラーによる注射、及びフェニル - ヘキシルガードカラム (2 x 4 mm; Phenomenex 社) を有する Luna 5 µm フェニル - ヘキシルカラム (1 x 50 mm, 5 µm; Phenomenex 社) を使用した 30 での RP-HPLC の前に、試料は 4 にて保持した。使用した緩衝液は、MS 緩衝液 A [水中の 0.1% (v/v) ギ酸] 及び MS 緩衝液 B [95% アセトニトリル / 0.1% ギ酸 (両方とも v/v)] であった。勾配は下記のように 50 µl / 分で操作した。0~2 分 - 5% B; 2~3 分 - 5~25% B; 3~5 分 - 25~75% B; 5~7 分 - 75~100% B; 7~10 分 - 100% B; 10~12 分 - 100~5% B; 12~20 分 - 5% B。溶離液を、0~5 分及び 16~20 分の獲得時間においてインライン流路切替バルブを使用して、質量分析計からの廃物に流路切替した。MS 分析のために、陽イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化を使用した。ソーススプレー電圧 - 2.5 kV; コーン電圧 - 25 V; イオ 40
50

ンソース温度 - 100 ; 衝突エネルギー - 38 V。窒素及びアルゴンを、それぞれ、カーテングス及び衝突ガスとして使用した。陽イオンモードでの複数の反応モニタリングを、化合物検出のために使用した。定量化のために使用する転移は下記の通りであった。MQE、506は262を超える; d₁₅ - MQE、521は277を超える; QE、492は262を超え、及びd₁₅ - QE、507は277を超える。各実験について、標準曲線を、ISでスパイクし、試料と並行して抽出した既知の量のMQE及びQEを使用して調製した。標準物質及び試料は、Masslynx 4.1ソフトウェアを使用して定量化し、MQE、QE及びISについてのピーク面積を決定し、標準曲線を使用して、試料中に存在するMQE及びQEの量を決定した。

【0276】

10

統計

データ分析は、統計学的計算及びグラフィックスのためのRソフトウェア環境(R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria)で行った。全てのデータはt検定又は一元配置分散分析(ANOVA, analysis of variance)、それに続いて必要に応じて事後ダネット検定を使用して分析し、平均±平均の標準誤差(S.E.)として表した。0.05と等しい、又はこれ未満のP値は、統計的に有意であると受け取った。

【0277】

結果及び考察

Mitog及びその反応産物の合成及び特性決定

20

Mitog、メチルグリオキサール及びグリオキサールとの反応によるその予想されるキノキサリン産物、並びにこれらの重水素化されたバージョンの合成を、図2において要約する。Mitog及びその構成要素であるTPP及びフェニレンジアミン部分のUV/VIS吸収スペクトルを、図3Aにおいて示す。予想どおりに、Mitogのスペクトルは、フェニレンジアミン、ヘキシルオキシフェニレンジアミン(HP)、及び単純なアルキルTPP塩のスペクトルの合計であった。o-フェニレンジアミンは酸化的分解を受けるため(Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. Drug Metabol. Drug Interact. 23:125-150; 2008)、及びアルコキシ-置換フェニレンジアミンのさらなる反応性についての文献の先例が存在したため、RP-HPLCによるMitogの安定性を評価し、ストック溶液は-20での貯蔵下で安定的であったことが見出された。生物学的に関連性のある条件下でのその安定性を評価するために、37でのMitogの希薄溶液の分解を測定し、4時間まで最小の喪失、及び24時間まで有意な喪失が観察されたが、したがって、Mitogは、生物学的実験について、約4時間まで持続して十分に安定的である。

30

【0278】

Mitogとメチルグリオキサール(MQE)及びグリオキサール(QE)との反応の予想される産物を合成したが、MitogのUV/VIS吸収スペクトルとは別個のUV/VIS吸収スペクトルを有する(図3B)。QE及びMQEの両方は蛍光性であり、一方、Mitogはそうでなかった(図3C)。3種の化合物をRP-HPLC(図3D)によって分解したが、MQEの位置異性体(MQE1、MQE2; 図1B)は区別されなかった。MQE及びQEの両方は、RP-HPLCによって評価するように、1週間後に37にて安定的であった(データは示さず)。Mitog、MQE及びQEの特性を表1に要約する。Mitogは、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内のグリオキサール及びメチルグリオキサールのトラップが関与する生物学的実験について十分に安定的であり、反応産物であるMQE及びQEは、化学的単離及びそれに続くLC-MS/MS分析について両方とも口バストに安定的であったと結論付けた。

40

【0279】

【表 1】

表1

化合物	波長 λ でのモル吸光係数($M^{-1}cm^{-1}$)				分配係数
	$\lambda = 267$ nm	$\lambda = 274$ nm	$\lambda = 299$ nm	$\lambda = 345$ nm	
MitoG	4069 \pm 206	3721 \pm 193	3679 \pm 188		2.4 \pm 0.1
MQE	6463 \pm 139	5509 \pm 127		7466 \pm 158	12.3 \pm 0.5
QE	5275 \pm 293	4557 \pm 245		6901 \pm 375	13.6 \pm 0.9

表1:MitoG、MQE及びQEのモル吸光係数及び分配係数。データは、3つの決定の平均 \pm SEである。

【 0 2 8 0 】

グリオキサル及びメチルグリオキサルとM i t o Gの反応性

M i t o Gは、メチルグリオキサル及びグリオキサルと反応して、独立して合成及び特性決定されたM Q E又はQ Eの吸収、蛍光及びR P - H P L C特性(図3 B、C及びD)と同一の吸収、蛍光及びR P - H P L C特性(図3 E、F、G及びH)を有する産物を形成する。生物学的に重要で反応性のアルデヒドである4 - ヒドロキシノネナル(H N E)又はアクロレインとのM i t o Gのインキュベーション、それに続く、R P - H P L C分析は、M i t o Gが反応した一方で、いくつかの産物が形成され、これらのいくつかは不安定であった(データは示さず)ことを示した。このように、安定的な主要な産物を生じさせるM i t o Gと1, 2 - ジカルボニルとの反応と対照的に、M i t o Gとこれらのアルデヒドとの反応は診断的に有用ではない。

【 0 2 8 1 】

M i t o G及びメチルグリオキサールの間の反応の進行は、U V / V i s分光光度法によって観察することができたが、M i t o Gとグリオキサルとの反応は遅すぎた(図4 A)。しかし、両方の反応は、より感受性である蛍光定量的方法を使用して評価することができた(図4 B)。o - フェニレンジアミンとの、グリオキサルを超えるメチルグリオキサールのより大きな反応性は、メチルグリオキサールの増強された毒性と一致する(Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H. Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. Nucl. Acids Res. 29:3433-3438; 2001、Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Kaji, H.; Kasai, H. Mutations induced by glyoxal and methylglyoxal in mammalian cells. Nucl. Acids Symp. Ser:3-4; 2000、Pampati, P. K.; Suravajjala, S.; Dain, J. A. Monitoring nonenzymatic glycation of human immunoglobulin G by methylglyoxal and glyoxal: A spectroscopic study. Anal. Biochem. 408:59-63; 2011)。水性グリオキサルは、非反応性テトラオールである二水和物として主に存在し、一方では、メチルグリオキサルは、主に一水和物であり、アルデヒドのみが1, 1 - ジオールに変換される。これは、高度に反応性のジカルボニルを生じさせるために単一の脱水のみを必要とするメチルグリオキサールのより大きな反応性を説明する(Lo, T. W.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. J. Biol. Chem. 269:3299-32305; 1994)。M i t o G - メチルグリオキサル及びM i t o G - グリオキサー

ル反応についての速度定数は、25 °Cでのメチルグリオキサルとo-フェニレンジアミンとの反応についての $1.7 \pm 0.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の報告された値と比較して、それぞれ、37 °Cにて $1.9 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 及び $0.6 \pm 0.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (平均 \pm SE、n = 3)であった (Fedoronko, M.; Konigstein, J.; Linek, K. Determination of dl-glyceraldehyde, dihydroxyacetone and methylglyoxal in a mixture. J. Electroanalytical Chem. Interfacial Electrochem. 14:357-367; 1967)。¹H NMR (0.12 mM、DMSO、25 °C)によってモニターしたMitog及びo-フェニレンジアミンの間のメチルグリオキサルについての競合速度実験は、Mitogが、o-フェニレンジアミンより約1.8倍反応性であったことを示し、一方、4-メトキシ-フェニレン-1,2-ジアミン及びo-フェニレンジアミンの間のグリオキサルについての同様の競合は、4-メトキシ-置換が反応性を約3.8倍に増強したことを示した。一緒に、これらのデータは、Mitogが1,2-ジカルボニルと反応して、安定的な診断用産物を形成し、且つMitog中の電子供与エーテル連結が、非置換o-フェニレンジアミンと比較して反応性を増強させることが確認される。

【0282】

エネルギー付与ミトコンドリア内のMitogの蓄積

細胞内及びインビボで1,2-ジカルボニルにつてのミトコンドリア選択的プローブとなるために、MitogのTPP部分はミトコンドリア内のその取込みを促進するはずである。MitogのTPP部分について選択的な電極を使用した単離したミトコンドリアによるMitogの取込みを測定した (図5)。電極反応を較正するためのMitogの添加の後、ミトコンドリアのそれに続く添加は、エネルギー付与されていないミトコンドリアへのMitogの予想される吸着によって、Mitog濃度の小さな減少をもたらした (Asin-Cayuela, J.; Manas, A. R.; James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. FEBS Lett. 571:9-16; 2004)。呼吸基質であるコハク酸の添加は、膜電位を生じさせ、外側の濃度の減少によって示されるように、Mitogのかんりの取込みをもたらした。脱共役剤であるカルボニルシアニド (FCCP) による膜電位の散逸は、ミトコンドリアからのMitogの放出をもたらした。ミトコンドリアへのMitogの膜電位依存的な取込みは、約2 nmol/mgのタンパク質であったが、これは0.5 µl/mgのタンパク質のミトコンドリアのマトリックス容量と仮定すれば (Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H₂O₂ within living Drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. Cell Metab. 13:340-350; 2011)、約4 mMのミトコンドリア内のMitogの濃度を与え、一方、外側のMitog濃度は約2 µMであった。Mitogのこの約2000倍の蓄積は、Mitogが、他のTPPコンジュゲート化合物と同様に、膜電位依存的な様式でミトコンドリアによって選択的に蓄積されることを示す。

【0283】

Mitogが有用であるために、これは使用する濃度で、ミトコンドリア機能を攪乱するか、又は細胞毒性をもたらすべきではない。これを試験するために、Mitogを、単離したミトコンドリアと共にインキュベートし、異なる条件下での呼吸に対するその効果を評価した。共役呼吸の増加によって示されるように、5 µMのMitogで、プロトンリークにおける僅かな増加があった (図6A)。生体膜内の高レベルのTPPカチオンがプロトンリークの増加を最終的にもたらしため、これは予想される。対照的に、酸化リン酸化錯体自体は、リン酸化呼吸に対して効果がなかったため、Mitogに対して5 µMまで非感受性であった (図6B)。Mitogのみは、それぞれ、10及び50 µM超の濃度においてC2C12及びBAEC細胞の生存率を減少させた (図6C、D)。細胞内のミトコンドリア機能に対するMitogの効果を評価するために、酸素消費速度 (O

C R) を Seahorse XF24 流動分析計を使用して測定した (図 6 E ~ H) 。 $10 \mu\text{M}$ 超の M i t o G の濃度は、A T P 合成によって O C R を僅かに減少させ、 $2 \sim 5 \mu\text{M}$ の範囲のより低い濃度は、プロトンリーク及び呼吸の予備容量の減少によって O C R の増加へのトレンドを示した。したがって、 $2 \mu\text{M}$ の M i t o G 濃度は、大部分の細胞実験のために通常使用した。

【 0 2 8 4 】

L C - M S / M S による M i t o G と 1 , 2 - ジカルボニルとの反応の定量化

M i t o G を使用して、メチルグリオキサル及びグリオキサールの局所濃度をプローブするために、反応産物 (M Q E 、 Q E) の量を重水素化された内部標準に対して L C - M S / M S によって測定することが必要であった (Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H_2O_2 within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011) 。 タンデム M S の間に M Q E 及び Q E 並びにこれらの重水素化されたバージョンのフラグメンテーションを決定した (図 7) が、T P P 化合物について予想される通りであった (Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H_2O_2 within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011) 。 トリフェニルリンカチオンに対する (図 8 A) このフラグメンテーションパターンを使用して、M i t o G と 1 , 2 - ジカルボニルとの反応の産物についての L C - M S / M S アッセイを確立したが、典型的な標準曲線を図 8 B において示す。M i t o G 反応産物は非常に感度良く検出することができ、細胞中及びインビボでのミトコンドリアのメチルグリオキサル及びグリオキサールを評価する M i t o G の使用を促進することが結論付けられた。

【 0 2 8 5 】

細胞中のミトコンドリアのメチルグリオキサル及びグリオキサールのためのプローブとしての M i t o G

M i t o G が有効なプローブであるために、これは生物系内のメチルグリオキサル及びグリオキサルと反応して、診断用産物である M Q E 及び Q E を生じるべきであり、これを次いで抽出し、L C - M S / M S によって分析することができる。これが細胞において可能であったかを評価するために、B A E C を M i t o G と共に 1 時間ブレインキュベートし、次いで、メチルグリオキサル又はグリオキサールを加え、さらに 3 時間後、細胞層を抽出し、L C - M S / M S によって分析し、M Q E (図 9 A) 及び Q E (図 9 B) の量を評価した。M i t o G に由来する産物である M Q E 及び Q E の両方のレベルは、外来性 1 , 2 - ジカルボニルの濃度が加えられると超生理学的な 1 , 2 - ジカルボニル濃度で飽和を示す前に最初は増加したが、M i t o G が律速となった (図 9 A 及び B) 。 1 , 2 - ジカルボニルのスカベンジャーであるアミノグアニジン (A G 、 aminoguanidine) による処置、又は脱共役剤である F C C P を使用した M i t o G のミトコンドリアの取込みの減少は、検出した M Q E 及び Q E の量を低減させた (図 9 A 及び B) 。 いくつかの M i t o G が培養培地中に存在するため、上清中の M Q E / Q E 形成からの寄与がまた存在し、これはそれに続いて細胞によって蓄積される。これらの知見は、M Q E / Q E を形成させる M i t o G と細胞内のメチルグリオキサル及びグリオキサールとの反応と一致し、この反応は、A G によって、又は膜電位を散逸させることによって細胞内のミトコンドリア中への M i t o G 取込みの程度を低下させることによって減少する。M i t o G は、生物学的状況中のメチルグリオキサル又はグリオキサールと反応して M Q E 及び Q E を形成し、これらの産物は、細胞から抽出し、L C - M S / M S によって定量化することがで

きることが結論付けられた。

【0286】

次に、MitoGを利用して、1, 2 ジカルボニルによる損傷を与える糖化反応が寄与していると考えられる条件である高血糖下でのメチルグリオキサル及びグリオキサールの相対的なミトコンドリアのレベルを決定した。最初に、高血糖が本発明者らの系において細胞のメチルグリオキサールの産生を増加させたことが確認された。これを行うために、BAEC細胞を、高(30 mM)及び低(5 mM)グルコースの条件下で4時間インキュベートし、次いで、o-フェニレンジアミンによる誘導体化によるメチルグリオキサールの形成を測定し、2-メチルキノキサリンを生じさせ、これをRP-HPLCによって評価した。この分析は、BAEC中の高血糖が実際、対照と比較してメチルグリオキサールの形成を約2倍に増加させたことを示した(データは示さず、n=3)。MitoGが高血糖条件下でミトコンドリアのメチルグリオキサル/グリオキサールの変化を評価することができるかを見出すために、低(5 mM)グルコース又は高(25 mM)グルコースとの4時間のインキュベーションに続いて、細胞中のMQE及びQEの形成を次に比較した(図9C及びD)。経時的に検出されるMQEの量が徐々に増加し、これは低グルコースから高グルコースへとなるにつれ実質的に増加し、これは、高血糖の条件下でのミトコンドリア内のメチルグリオキサールの増加と一致した。MQE/QEのこの形成は脱共役剤であるFCCPによってブロックされ(図9C、D)、MQEの形成はまたメチルグリオキサールのトラップであるAGによって減少した(図9E)。高濃度のD-グルコースを、25 mMの非生理学的L-グルコースで置き換えたときに、高血糖によるMQEの増加は起こらなかった(細胞生存率を維持するための5 mMのD-グルコースと共に)。これは、高濃度のD-グルコースによってもたらされるMQEの増加が、メチルグリオキサールを生じさせるグルコースの代謝を必要とし、培養培地中の高い炭水化物濃度の非特異的効果のためではないことを示唆する(図9E)。MitoG及びメチルグリオキサル/グリオキサールの間の反応はまた、ミトコンドリア外で起こり得、それに続いてミトコンドリア内にMQE/QEが取り込まれる。しかし、MitoG及びジカルボニルの間の反応は二次反応であるため、ミトコンドリア内のMQE/QE形成の速度は、メチルグリオキサル及びグリオキサル濃度が同じであったとしても、他のコンパートメント中より約500~1,000倍高いことが予想される。したがって、これらのデータは、ミトコンドリア内で主に起こるMQE/QEの形成と一致している。

【0287】

BAECを、グリオキサル及びメチルグリオキサールの分解を抑制するために高グルコースの条件下でグリオキサラーゼI阻害剤であるプロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステルの存在下でインキュベートしたとき(Thornalley, P. J.; Edwards, L. G.; Kang, Y.; Wyatt, C.; Davies, N.; Ladan, M. J.; Double, J. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. Biochem. Pharmacol. 51:1365-1372; 1996)、MQE及びQEの量は増加した(図9F)。一緒に、これらのデータは、MitoGが、細胞内のミトコンドリアの1, 2-ジカルボニル産生の変化を評価するために有効なプローブであることを示す。さらに、これらの知見は、ミトコンドリアのメチルグリオキサル濃度が、高血糖下で約3倍増加することを示す。したがって、上昇した反応性ジカルボニルによるミトコンドリアの糖化反応は、病的な高血糖の間に起こるミトコンドリア機能への攪乱の一因となる強力な候補である。

【0288】

インビボでのメチルグリオキサル及びグリオキサールのミトコンドリアのレベルについてのプローブとしてのMitoG

従前に、ミトコンドリアを標的とする過酸化水素質量分析法プローブであるMitoBを使用して、生きているショウジョウバエ(Cocheme, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy,

10

20

30

40

50

M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H_2O_2 in living *Drosophila*. *Nat. Protocols* 7:946-958; 2012、Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H_2O_2 within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011)] 及びマウス (Chouchani, E. T.; Methner, C.; Nadtochiy, S. M.; Logan, A.; Pell, V. R.; Ding, S.; James, A. M.; Cocheme, H. M.; Reinhold, J.; Lilley, K. S.; Partridge, L.; Fearnley, I. M.; Robinson, A. J.; Hartley, R. C.; Smith, R. A. J.; Krieg, T.; Brookes, P. S.; Murphy, M. P. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I *Nat. Med.* 19:753-759; 2013) においてミトコンドリア内の過酸化水素の産生を評価することができることが示されてきた。これにおいて、MitoBは、実験動物に投与されたとき、エキソビボで評価することができ、且つ生きている生物内での反応種の産生を推測するために使用することができる診断マーカーに変換される外来性プローブ化合物である、エキソマーカーMitoP (Logan, A.; Cocheme, H. M.; Boon Li Pun, P.; Apostolova, N.; Smith, R. A. J.; Larsen, L.; Larsen, D. S.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Rogatti, S.; Prime, T. A.; Finichiu, P.; Dare, A.; Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Methner, C.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Krieg, T.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* In press; 2013) を生じさせるプローブとしての役割を果たす (Logan, A.; Cocheme, H. M.; Boon Li Pun, P.; Apostolova, N.; Smith, R. A. J.; Larsen, L.; Larsen, D. S.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Rogatti, S.; Prime, T. A.; Finichiu, P.; Dare, A.; Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Methner, C.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Krieg, T.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* In press; 2013)。したがって、次に、研究を行って、インビボでミトコンドリア内のメチルグリオキサール/グリオキサールの形成を評価するために、MitoGをまた使用して、エキソマーカーであるMQE及びQEを生じさせることができるかを理解した。静脈内注射に続いて、TPP化合物は血液から組織内のミトコンドリアに急速に分布し、次いで、ゆっくりと数時間に亘り尿及び胆汁中に排泄されることが公知であるため、MitoGのTPP構成要素は、このゴールを容易にする (Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5407-5412; 2003、Porteous, C. M.; Logan, A.; Evans, C.; Ledgerwood, E. C.; Menon, D. K.; Aigbirhio, F.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1800:1009-1017; 2010、Li, Y.; Zhang, H.; Fawcett, J. P.; Tucker, I. G. Effect of cyclosporin A on the pharmacokinetics of mitoquinone (MitoQ10), a mitochondria-targeted antioxidant, in rat. *Asian J. Pharmaceut. Sci.* 5:106-113; 2010)。したがって、MitoGをマウスに投与し、次いで、特定の条件下でMQE/QE産物の産生が上昇するかを見るために尿を分析し、インビボでのミトコンドリア内の反応性ジカルボニルの上昇を示すことは可能である。

【0289】

これを行うために、Akitaマウスモデル ($Ins2^{+/-}Akita^J$) を使用したが、ここではプロインスリンにおける変異は、慢性高血糖及び結果として起こるI型糖尿病において見出されるものと同様の病理学的合併症をもたらす。(Yoshioka, M.; Kayo, T.; Ikeda, T.; Koizumi, A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diab*

10

20

30

40

50

etes 46:887-894; 1997、Izumi, T.; Yokota-Hashimoto, H.; Zhao, S.; Wang, J.; Halban, P. A.; Takeuchi, T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52:409-416; 2003、Chacko, B. K.; Reilly, C.; Srivastava, A.; Johnson, M. S.; Ye, Y.; Ulasova, E.; Agarwal, A.; Zinn, K. R.; Murphy, M. P.; Kalyanaraman, B.; Darley-USmar, V. Prevention of diabetic nephropathy in *Ins2(+/-)*(AkitaJ) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. *Biochem. J.* 432:9-19; 2010)。野性型マウスと比較して、Akitaマウスにおいてミトコンドリアのメチルグリオキサル/グリオキサルにおける変化が存在するかどうかを評価するために、MitoG (100 nmol) を尾静脈注射として投与し、4～6時間後、尿試料を単離し、MQE及びQE含量をクレアチニンに対して測定した。これらのデータを個々のマウスについての血中グルコース値の関数として示す(図10A及びB)。予想どおり、血中グルコースは野性型マウスにおけるよりAkitaマウスにおいて非常により高く、血中グルコースにおけるこの増加は、クレアチニンに規準化したMQE及びQE両方のMitoG付加体における有意な増加と相関する(図10A及びB)。これらのデータは、MitoGを、インビボでの病理学的に関連性のある高血糖の条件下でのメチルグリオキサル及びグリオキサールの形成についてのプローブとして使用することができることを示唆する。

10

【0290】

MitoGの安定性

100 μ MのMitoGを、室温にて100 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)及び0.5% (w/v) 過酸化水素を含有する1 ml キュベット中で0.07 Uの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と混合した。MitoGの代わりにDMSOと共に、参照キュベット及びブランクを同様に設定した。次いで、分光光度計(Shimadzu UV-2501 PC)を使用して、走査UV/Visスペクトルを混合の1分後、5分後及び10分後に得た。MitoG含有混合物のスペクトルを、ブランクのスペクトルに対して比較した。観察される任意の反応がHRP阻害剤であるNaN₃によって防止することができるかを決定するために(Brill, A.S.; Weinryb, I.; Reactions of horseradish peroxidase with azide. Evidence for a methionine residue at the active site. *Biochemistry*, 6, 3528-3535; 1967、Ortiz de Montellano, P.R.; David, S.K.; Ator, M.A.; Tew, D.; Mechanism-based inactivation of orseradish-peroxidase by sodium azide - Formation of meso-azidoporphyrin-IX; *Biochemistry*, 27, 5470-5476; 1988)、上記のように別々のインキュベーションを設定したが、その上8 mg/mlのNaN₃を含有した。

20

30

【0291】

o-フェニレンジアミンの酸化的分解は、メチルグリオキサル及びグリオキサールの産生をもたらすことは公知である(Thornalley, P.J.; Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - Role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 23, 125-150; 2008)。o-フェニレンジアミンが使用されて、生体試料中のメチルグリオキサル及びグリオキサールのレベルを定量化することが試みられる場合、この酸化的分解は、試料におけるジカルボニルレベルの過剰評価をもたらす得る。MitoGがメチルグリオキサル及びグリオキサルへの同様の酸化的分解を受けることができるかを決定するために、MitoGを、HRP及び過酸化水素と共にインビトロでインキュベートした。反応混合物の走査UV/Visスペクトルを、HRPの添加の前及び後に得た。HRPを、細胞の環境中の酸化的分解を触媒することができる代表的なペルオキシダーゼとして使用した。図11に示すように、MitoGによる $\lambda_{max} = 299$ nmでの吸収ピークは、HRPとのインキュベーション後に消滅し、一方、 $\lambda_{max} = 430$ nmの新規なピークが出現する。これらの変化は、HRP阻害剤であるNaN₃によって防止される。これらの結果は、MitoGがHRPの存在下で分解し、 $\lambda_{max} = 430$ nmで吸収する産物を形成することを示す。

40

【0292】

吸収プロファイルの差異に基づいて(図3Bを図11と比較する)、この産物は、MQ

50

EでもQ Eでもなく、これは、M i t o Gは酸化分解を受けて、メチルグリオキサル及びグリオキサルを形成しないことを示唆する。したがって、M i t o Gとペルオキシダーゼとの反応はメチルグリオキサル及びグリオキサールの形成をもたらさず、M i t o Gがプローブとして使用されるとき、o - フェニレンジアミンとは異なり、生体試料中でミトコンドリアのジカルボニルレベルの人為的な過剰評価をもたらさない。

【0293】

ジカルボニルによって誘発される呼吸抑制及び細胞死に対するM i t o Gによる保護

グルタミン酸/リンゴ酸上で呼吸する単離したR L Mを、M i t o G、メトキシフェニレンジアミン(M P)又はブチルT P Pと共に2分間、それに続いて0.5 mMのメチルグリオキサル又は5 mMのグリオキサルと共に5分間インキュベートした。次いで、A D Pを加え、酸素消費の速度を37℃にてモニターした(図12A及び12Bを参照されたい)。C 2 C 1 2細胞を、1 mMのメチルグリオキサル又は5 mMのグリオキサルへの曝露の前に、M i t o G、メトキシフェニレンジアミン(M P)又はブチルT P Pで1時間事前処理した(図12C及び12Dを参照されたい)。一晚のインキュベーションに続き、M T S アッセイを使用して細胞生存を決定した。M i t o G、M P又はブチルT P Pで事前処理したB A E Cにおいて同様の実験を行った。全ての実験のために、使用するメチルグリオキサル及びグリオキサールの濃度は、保護アッセイの前に行なった研究からの結果に基づいて選択した。これらの従前の研究において、R L M又は細胞を一連のジカルボニル濃度に曝露させ、呼吸又は細胞生存のリン酸化速度を評価した。これらの従前の実験の結果を挿入図において示し、有意な呼吸抑制又は細胞死をもたらしたジカルボニル濃度を保護アッセイにおいて使用するために選択した。全ての群についてのデータは未処置の対照に対して規準化した。R L Mについて、未処置の対照による呼吸の速度は、100%であるとした。細胞について、未処置の対照の細胞生存は、100%であるとした。結果は3つの独立した実験の平均±S.E.として表す。M i t o Gは、C 2 C 1 2細胞及びB A E Cにおいてメチルグリオキサルによって誘発される呼吸抑制、並びにメチルグリオキサル及びグリオキサルによって誘発される細胞死の両方に対して保護的であった。ブチルT P P、M P及びH Pは、全ての実験において有意に保護的ではなかった。図12において、シンボル*、**はそれぞれ、ジカルボニルのみの群に対して、Pは0.05未満又はPは0.01未満を示し、シンボル+、++はそれぞれ、未処置の対照に対してPは0.05未満又はPは0.01未満を示す。

【0294】

糖化反応によって誘発される毒性に対するミトコンドリアを標的とするアプローチの有用性を評価するために、
- ジカルボニル曝露の前にM i t o Gで処理した単離したR L Mによる酸素消費を測定した。図12Aに示すように、M i t o Gは、単離したR L Mにおいて用量依存的様式でメチルグリオキサルによって誘発される呼吸抑制に対して保護したが、この系においてグリオキサル損傷を防止しなかった(図12B)。類似の実験をまた培養細胞において行った。C 2 C 1 2細胞又はB A E CをM i t o Gで1時間事前処理し、次いで、外来性メチルグリオキサル又はグリオキサルに曝露させた。細胞生存を、一晚のインキュベーションの後に評価した。これらの実験において、M i t o Gは、両方の
- ジカルボニルに対して保護的であり、両方の細胞型において細胞生存を有意に増加させた(図12C~F)。ブチルT P Pは、いずれのジカルボニルに対して有意な効果を有さなかったが、これはM i t o Gで観察される保護がT P P部分の非特異的効果によるものではなかったことを示す。等モル濃度の構造的に同様ではあるが標的とされない化合物であるM P及びH Pは、M i t o Gより少ない保護を与えたが、これはミトコンドリア内のジカルボニルの特異的スカベンジングが、これらの糖化剤の無差別の除去より有効な治療戦略であることを示唆する。

【0295】

したがって、M i t o Gは、メチルグリオキサルによって誘発される呼吸抑制、並びにメチルグリオキサル及びグリオキサールの両方によって誘発される細胞毒性を改善することが示されてきた。フェニレンジアミンの標的とされない誘導体であるM P及びH P

は、単離したミトコンドリア及び細胞培養物の両方において有意に保護的ではなかった。このように、M i t o Gによる保護は、これらの反応性カルボニル種の特異的なミトコンドリアのスキャベンジングに関すると思われる。

【0296】

心臓における糖尿病性合併症に対するM i t o G - アミドの効果の研究

心臓における糖尿病性合併症に対するM i t o G - アミドの効果を決するため、ベータ細胞毒素ストレプトゾトシン (S T Z ; Selleck Chemicals社、M u n i c h、G e r m a n y から得ることができる) の投与による膵臓中のベータ細胞の破壊をベースとするI型糖尿病の確立したマウスモデルを使用した。6 ~ 7週齢のC 5 7 B 1 6 / Jマウス (2 0 g 超) であったマウスに、S T Z (腹腔内注射によって5 0 m g / k g) を連続5日 10
で投与した。ベータ細胞の死滅及びI型糖尿病と関連する高血中グルコースの誘発を、血中グルコース試験によってマウス尾静脈血液試料で毎週確認した。血中グルコース値1 7 m m o l / l 超は、糖尿病であると考えた。実験のために、マウスを3つの群に分割した。(a) 対照 ; (b) S T Z によって誘発されるI型糖尿病 ; 及び (c) M i t o G - アミド (1 0 m g / k g 体重、胃管補給によって1日1回) で処置されたS T Z によって誘発されるI型糖尿病動物。これを12週間繰り返した (図13)。プロトコルの終わりに、マウスは心臓の磁気共鳴イメージング (M R I) 測定 (図14)、それに続く左心室カテーテルをベースとする圧力 / 容量 (P / V) 測定 (図15) を受けた。M R I 及びP / Vループ測定を同じ日に行い、M R I 容量測定を、P / Vループについての補正として 20
使用した。

【0297】

心臓の磁気共鳴イメージング (M R I) 測定のために、4.7T Bruker BioSpecシステムによる標準的な心臓のM R I プロトコルを手術の24時間後に行った。麻酔を酸素中の3 % イソフルランで誘発し、酸素中の1 . 2 5 % イソフルランで維持した。温度を直腸のプロープでモニターし、加熱したウォーターブランケットによって一定に維持し、圧電変換器に接続した受け台を使用して呼吸をモニターした。心電図 (E C G、electrocardiogram) シグナルを、左の前足及び右の後足上に置いた新生児用黒鉛 (3 M) 電極でモニター した。

【0298】

12cm直径のバードケージを使用してシグナルを伝達し、4チャンネル心臓用アレイコイルをシグナル受信のために使用した。イメージングプロトコルは、全心臓をカバーする長軸及び短軸における、スカウトスキャン、それに続く、定常状態精度を有するE C G ゲート型高速イメージング (F I S P、fast imaging with steady state precision) スライス (繰返し時間 / エコー時間 T R / T E 6 / 2 . 4 m s 1 3 ~ 2 0 フレーム、3 . 5 c m 視野 (F O V、field of view)、2 5 6 マトリックス、1 m m のスライス厚さ、帯域幅 6 4 . 1 k H z、フリップ角 (F A、flip angle) 2 0 °、2 サンプリング平均 [励起の数、N E X (number of excitation)]) からなった。加工後において、E C G の異なる相の間の容量を、シンプソンの公式を使用して全心臓に亘って概説及び統合した。1 回の心拍動の間に循環中に排出される血液の画分である駆出分画を含めたグローバル機能 30
パラメーターを得た。

【0299】

圧力 / 容量 (P / V) 測定のために、右頸動脈を介した左心室カテーテル法を、1 . 2 F 圧力 - カテーテル (Scisense Inc.社、L o n d o n、C a n a d a) を使用して行った。

【0300】

体重、血中グルコース及び心拍数に対する、M i t o G アミドを投与されたS T Z によって誘発されるI型糖尿病の長期間の処置の結果を、プラセボ処置したS T Z マウス及び対照と比較した (図16)。血中グルコースを、Johnson and Johnson社のO n e T o u c h (登録商標) Ultra Blood Glucose Monitoring Systemを使用して全血で測定した。心拍数を、P / V ループカテーテルの使用の間に測定し、記録した。これは、S T Z 処置 50

が、体重の減少及び血中グルコースの増加をもたらしたが、これらのいずれもMitoGアミド処置によって影響されなかったことを示した。さらに、STZ処置もMitoGアミド処置も、予想されるようにマウスにおいて心拍数に影響を与えなかった。

【0301】

I型糖尿病における高血糖に対するMitoG-アミドの効果の研究

I型糖尿病における長期間の高血糖の周知の有害な影響に対するMitoGアミドの効果の評価するために、心臓機能をMRI及びP/Vループ測定によって測定した(図17)。6~7週齢のC57BL/6Jマウス(20g超)であったマウスに、STZ(腹腔内注射によって50mg/kg)を連続5日で投与した。ベータ細胞の死滅、及びI型糖尿病と関連する高血中グルコースの誘発は、マウス尾静脈血液試料で血中グルコース試験によって毎週確認した。血中グルコース値17mmol/l超は、糖尿病であると考えた。実験のために、マウスを3つの群に分割した。(a)対照；(b)STZによって誘発されるI型糖尿病；及び(c)MitoG-アミド(10mg/kg体重、胃管補給によって1日1回)で処置されたSTZによって誘発されるI型糖尿病動物。プロトコルの終わりに、マウスは、心臓の磁気共鳴イメージング(MRI)測定、それに続く、左心室カテーテルをベースとする圧力/容量(P/V)測定(上記のような)を受けた。

10

【0302】

収縮期駆出分画及び拡張末期容量は、"Functional assessment of the mouse heart by MRI with a 1-min acquisition", Buonincontri, G.; Methner, C.; Krieg, T.; Carpenter, T.A. and Sawiak, S.J.; NMR Biomed (2014), Vol. 27; pages 733-7に示される手順によってMRIで測定した。

20

【0303】

左心室拡張期時定数(Tau Weiss)及び拡張末期圧は、対応するソフトウェアLifeScribe2を伴うTransonic ADV500を使用してP/Vループ系から測定した。

【0304】

拡張期スティフネスは、MRI-補正したP/Vループから測定した。

【0305】

これから、STZとMitoGアミドのどちらも収縮期駆出分画に対していかなる効果を有さなかったことが見出された。予想どおりに、STZ処置は拡張末期容量及び左心室拡張期時定数(Tau Weiss)を損なったが、これらはMitoGアミドによって回復しなかった(図18)。しかし、糖尿病のマウスにおける拡張期スティフネス及び拡張末期圧の予想される増加は、MitoGアミドによって防止された(図18)が、これは化合物の保護効果を示す。MRI容量尺度を、P/Vループについての補正として使用した。MRI-補正した拡張期スティフネスは、指数関数を充填相にフィットさせることによって得るが、容量及び圧力依存的な様式でコンプライアンス曲線を表す。単位は1/μlである。拡張期スティフネス測定は、早期糖尿病によって誘発される心筋損傷を示す最も感受性のパラメーターであり、糖尿病を有する患者に見られる変化の代表的なものである。

30

【0306】

最後に、分析の終わりに、心臓を切除し、ホルマリンで固定し、組織学的検査のために加工し、次いで、10μmのスライスに切断し、Optimal Cutting Temperature(OCT)に包埋した。組織への酸化損傷を評価するために、酸化損傷のマーカーである4-ヒドロキシノネナールに対する抗体(抗体ab48506HNE-J-2、ブロッキング緩衝液中1:5; Abcam plc社から入手可能)を使用した。これらの実験は、二次ABヤギ抗マウス(Invitrogen F2761、Thermo Fischer Scientific Inc.社から入手可能)+フルオレセイン(molecular probes、Sigma-Aldrich社から入手可能)及び10μMのHoechst染色33342(Sigma B2261、Sigma-Aldrich社から入手可能)を室温にて二次抗体溶液として使用したこと以外は、Kaludercic, N.; et al. (2014) "Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts" Antioxidants & Redox Signaling, Vol. 20, pages 267-80に記載されているように行っ

40

50

た。

【0307】

染色の程度を定量化し、データを図19において提示する。これらのデータは、Mitochondriaが、糖尿病性合併症を起こしている心臓において酸化損傷を減少させたことを示す。

【0308】

結論

ミトコンドリア機能への攪乱が、高血糖と関連する病態において役割を果たすことが提唱されてきた。これが起こり得る1つの信憑性のある経路は、反応性1,2-ジカルボニルメチルグリオキサル及びグリオキサルによるミトコンドリアの構成要素への損傷を与える糖化反応を介したものである。しかし、この経路の重要性は、高血糖の間にミトコンドリア内で発生するメチルグリオキサル及びグリオキサールのレベルについての不確実性によって、細胞中及びインビボで評価することが困難であった。これらの問題を軽減するために、質量分析アプローチが開発され、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内のこれらの反応性1,2-ジカルボニルのレベルの変化を測定してきた。

【0309】

特に、o-フェニレンジアミンとTPP部分との組合せが、ミトコンドリア内で蓄積し、ここでメチルグリオキサル及びグリオキサルと反応し、安定的な産物を形成する分子をもたらしたことが見出された。次いで、これらの産物は細胞及び体液から抽出し、LC/MS/MSによって安定的な同位体内部標準に対して分析することができた。メチルグリオキサル及びグリオキサルについてのこのアセスメントの選択性は、タンデム質量分析法による産物の同定に基づいており、これはグリオキサーゼ系の薬理的阻害に対するこれらのレベルにおける変化によって、及びジカルボニルトラップのアミノグアニジンの添加によってさらに示された。TPP部分が細胞中及びインビボでミトコンドリアへと化合物を位置付ける能力は確立されており、これは、MQE/QEの形成がミトコンドリアのマトリックス内のメチルグリオキサル/グリオキサルとの反応によって主に起こることを示唆する。これは、ミトコンドリア中へのMitochondriaの取込みを減少させる脱共役剤であるFCCPの添加によるMQE/QEの形成の阻害によって支持される。さらに、Mitochondria及びメチルグリオキサル/グリオキサールの間の反応は二次反応であるため、ミトコンドリア内の約1,000倍濃度のMitochondriaは、MQE/QEの形成の速度が同様の要因によってミトコンドリアの内側でより大きいことを意味する。このように、細胞又は組織内のMQE/QEの形成は、ミトコンドリア内のメチルグリオキサル/グリオキサールの量の変化に大きく起因する。しかし、生物系内の他の反応種、例えば、一酸化窒素又は反応性アルデヒド、例えば、4-ヒドロキシノネナールはまた、Mitochondriaと反応し、枯渇し得るが、これらの反応はグリオキサル/メチルグリオキサルとの反応から形成される診断用産物を産生しない。さらに、このアプローチはミトコンドリアのジカルボニル曝露について報告する一方で、これはメチルグリオキサル/グリオキサールの細胞の源について示さず、これらは細胞質ゾル中で殆ど産生され、それに続いてミトコンドリア中に拡散し得る。

【0310】

生きているマウス内のMitochondriaを使用し、I型糖尿病のモデル内で起こったジカルボニルの変化を評価するエキソマーカースとしてMQE/QEを生じさせる能力は、重要なステップであった。したがって、このアプローチは、糖尿病と関連するミトコンドリアの損傷における反応性ジカルボニルの役割を評価することにおいて、及び特定の治療を開発することにおいて有用である。

【0311】

図9及び10における知見は、MitochondriaからのMQE及びQEの形成が、細胞中及びインビボでの両方において高血糖の条件下で劇的に増加したことを示し、これはこのような条件下においてミトコンドリア中のメチルグリオキサル/グリオキサールの量が大きく増加することを示す。これは、高血糖において見られるミトコンドリアの攪乱の一因と

なる、マトリックス中のメチルグリオキサル／グリオキサールの蓄積によるミトコンドリアの糖化反応と一致する。結論として、新規なミトコンドリアを標的とする質量分析アプローチを開発して、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内の反応性ジカルボニルのレベルを評価してきた。これは糖尿病及び老化におけるミトコンドリア機能障害に対するこれらの損傷を与える種の寄与を評価することにおいて有用である。さらに、細胞中及びインビボでのミトコンドリア内のメチルグリオキサル／グリオキサルと反応し、メチルグリオキサル／グリオキサルについてのスカベンジャーの機能を果たす化合物が開発されてきた。

【 0 3 1 2 】

糖尿病のマウスにおける拡張期スティフネス及び拡張末期圧について図 1 8 に示す結果は、M i t o G アミドが、保護効果を実現したことを示した。さらに、図 1 9 に示す結果は、M i t o G アミドが、糖尿病性合併症を起こしている心臓において酸化損傷を減少させたことを示した。

【 0 3 1 3 】

(参考文献)

- 1 . Brownlee, M. Negative consequences of glycation. *Metabolism-Clin. Experiment* . 49:9-13; 2000
- 2 . Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol. Drug Interact.* 23:125-150; 2008
- 3 . Pun, P. B.; Murphy, M. P. Pathological significance of mitochondrial glycation. *Int. J. Cell Biol.* 2012:843505; 2012
- 4 . Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820; 2001
- 5 . Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22:309-317; 2011
- 6 . Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of methylglyoxal from triose phosphates - investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 212:101-105; 1993
- 7 . Casazza, J. P.; Felver, M. E.; Veech, R. L. The metabolism of acetone in rat . *J. Biol. Chem.* 259:231-236; 1984
- 8 . Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; Mclellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions - a kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N-alpha-acetyllysine, and bovine serum-albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994
- 9 . Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5533-5538; 1998
- 1 0 . Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* 375:581-592; 2003
- 1 1 . Thornalley, P. J.; Waris, S.; Fleming, T.; Santarius, T.; Larkin, S. J.; Winklhofer-Roob, B. M.; Stratton, M. R.; Rabbani, N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucl. Acids Res.* 38:5432-5442; 2010
- 1 2 . Kingkeohoi, S.; Chaplen, F. W. R. Analysis of methylglyoxal metabolism in CHO cells grown in culture. *Cytotechnology* 48:1-13; 2005
- 1 3 . Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J. H.; Wu, L. Y. Methylglyoxal, protein binding

10

20

30

40

50

and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatog. B* 877:1093-1100; 2009

14 . Thornalley, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269:1-11; 1990

15 . Morcos, M.; Du, X.; Pfisterer, F.; Hutter, H.; Sayed, A. A.; Thornalley, P.; Ahmed, N.; Baynes, J.; Thorpe, S.; Kukudov, G.; Schlotterer, A.; Bozorgmehr, F.; El Baki, R. A.; Stern, D.; Moehrlen, F.; Ibrahim, Y.; Oikonomou, D.; Hamann, A.; Becker, C.; Zeier, M.; Schwenger, V.; Miftari, N.; Humpert, P.; Hammes, H. P.; Buechler, M.; Bierhaus, A.; Brownlee, M.; Nawroth, P. P. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 7:260-269; 2008

16 . Green, K.; Brand, M. D.; Murphy, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S110-118; 2004

17 . Yoon, Y.; Galloway, C. A.; Jhun, B. S.; Yu, T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14:439-457; 2011

18 . Newsholme, P.; Gaudel, C.; Krause, M. Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942:235-247; 2012

19 . Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9; 1999

20 . Rosca, M. G.; Mustata, T. G.; Kinter, M. T.; Ozdemir, A. M.; Kern, T. S.; Szveda, L. I.; Brownlee, M.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Amer. J. Physiol.* 289:F420-F430; 2005

21 . Ceriello, A.; Ihnat, M. A.; Thorpe, J. E. The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:410-415; 2009

22 . Ray, S.; Dutta, S.; Halder, J.; Ray, M. Inhibition of electron flow through complex I of the mitochondrial respiratory-chain of Ehrlich ascites-carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochem. J.* 303:69-72; 1994

23 . Biswas, S.; Ray, M.; Misra, S.; Dutta, D. P.; Ray, S. Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* 323 (Pt 2):343-348; 1997

24 . Rosca, M. G.; Monnier, V. M.; Szveda, L. I.; Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *Am. J. Physiol.* 283:F52-59; 2002

25 . Murphy, M. P. Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1:753-764; 2001

26 . Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cocheme, H. M.; Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33:341-352; 2012

27 . Smith, R. A. J.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5407-5412; 2003

28 . Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal. Biochem.* 238:171-178; 1996

29 . Yamaguchi, M.; Hara, S.; Nakamura, M. Determination of methylglyoxal in mouse blood by liquid chromatography with fluorescence detection *Anal. Chim. Acta* 221:163-166; 1989

10

20

30

40

50

- 3 0 . Cocheme, H. M.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living *Drosophila*. *Nat. Protocols* 7:946-958; 2012
- 3 1 . Cocheme, H. M.; Quin, C.; McQuaker, S. J.; Cabreiro, F.; Logan, A.; Prime, T. A.; Abakumova, I.; Patel, J. V.; Fearnley, I. M.; James, A. M.; Porteous, C. M.; Smith, R. A. J.; Saeed, S.; Carre, J. E.; Singer, M.; Gems, D.; Hartley, R. C.; Partridge, L.; Murphy, M. P. Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350; 2011 10
- 3 2 . Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongchaoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. *J. Med. Chem.* 45:2260-2276; 2002
- 3 3 . Fanta, P. E.; Tarbell, D. S. 2-Nitro-4-methoxyaniline. *Organic Synth.* 25:78-80; 1945
- 3 4 . Barton, J. K.; Shao, F.; Elias, B.; Lu, W. Synthesis and characterization of iridium(III) cyclometalated complexes with oligonucleotides: insights into redox reactions with DNA. *Inorg. Chem.* 46:10187-10199; 2007 20
- 3 5 . Thornalley, P. J.; Edwards, L. G.; Kang, Y.; Wyatt, C.; Davies, N.; Ladan, M. J.; Double, J. Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 51:1365-1372; 1996
- 3 6 . Twibanire, J. D.; Grindley, T. B. Efficient and controllably selective preparation of esters using uronium-based coupling agents. *Org. Lett.* 13:2988-2991; 2011
- 3 7 . Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells - Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 276:4588-4596; 2001 30
- 3 8 . Asin-Cayuela, J.; Manas, A. R.; James, A. M.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant. *FEBS Lett.* 571:9-16; 2004
- 3 9 . Choi, S. W.; Gerencser, A. A.; Nicholls, D. G. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J. Neurochem.* 109:1179-1191; 2009
- 4 0 . Dranka, B. P.; Benavides, G. A.; Diers, A. R.; Giordano, S.; Zelickson, B. R.; Reilly, C.; Zou, L.; Chatham, J. C.; Hill, B. G.; Zhang, J.; Landar, A.; Darley-Usmar, V. M. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1621-1635; 2011 40
- 4 1 . Hill, B. G.; Benavides, G. A.; Lancaster, J. R., Jr.; Ballinger, S.; Dell'Italia, L.; Jianhua, Z.; Darley-Usmar, V. M. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol. Chem.* 393:1485-1512; 2012
- 4 2 . Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435:297-312; 2011
- 4 3 . Yoshioka, M.; Kayo, T.; Ikeda, T.; Koizumi, A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46:887-894; 1997 50

- 4 4 . Izumi, T.; Yokota-Hashimoto, H.; Zhao, S.; Wang, J.; Halban, P. A.; Takeuchi, T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52:409-416; 2003
- 4 5 . Chacko, B. K.; Reily, C.; Srivastava, A.; Johnson, M. S.; Ye, Y.; Ulasova, E.; Agarwal, A.; Zinn, K. R.; Murphy, M. P.; Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V. Prevention of diabetic nephropathy in Ins2(+/-)(AkitaJ) mice by the mitochondria-targeted therapy MitoQ. *Biochem. J.* 432:9-19; 2010
- 4 6 . Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H. Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, cross links DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucl. Acids Res.* 29:3433-3438; 2001
- 4 7 . Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Kaji, H.; Kasai, H. Mutations induced by glyoxal and methylglyoxal in mammalian cells. *Nucl. Acids Symp. Ser:*3-4; 2000
- 4 8 . Pampati, P. K.; Suravajjala, S.; Dain, J. A. Monitoring nonenzymatic glycation of human immunoglobulin G by methylglyoxal and glyoxal: A spectroscopic study. *Anal. Biochem.* 408:59-63; 2011
- 4 9 . Fedoronko, M.; Konigstein, J.; Linek, K. Determination of dl-glyceraldehyde, dihydroxyacetone and methylglyoxal in a mixture. *J. Electroanalytical Chem. Interfacial Electrochem.* 14:357-367; 1967
- 5 0 . Chouchani, E. T.; Methner, C.; Nadochiy, S. M.; Logan, A.; Pell, V. R.; Ding, S.; James, A. M.; Cocheme, H. M.; Reinhold, J.; Lilley, K. S.; Partridge, L.; Fearnley, I.M.; Robinson, A. J.; Hartley, R. C.; Smith, R. A. J.; Krieg, T.; Brookes, P.S.; Murphy, M.P. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I *Nat. Med.* 19: 753-759; 2013
- 5 1 . Logan, A.; Cocheme, H. M.; Boon Li Pun, P.; Apostolova, N.; Smith, R. A. J.; Larsen, L.; Larsen, D. S.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Rogatti, S.; Prime, T. A.; Finichiu, P.; Dare, A.; Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Methner, C.; Quinn, C.; McQuaker, S. J.; Krieg, T.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Using exomarkers to assess mitochondrial reactive species in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* In press; 2013
- 5 2 . Porteous, C. M.; Logan, A.; Evans, C.; Ledgerwood, E. C.; Menon, D. K.; Aigbirhio, F.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. Rapid uptake of lipophilic triphenylphosphonium cations by mitochondria in vivo following intravenous injection: implications for mitochondria-specific therapies and probes. *Biochim. Biophys. Acta* 1800:1009-1017; 2010
- 5 3 . Li, Y.; Zhang, H.; Fawcett, J. P.; Tucker, I. G. Effect of cyclosporin A on the pharmacokinetics of mitoquinone (MitoQ10), a mitochondria-targeted antioxidant, in rat. *Asian J. Pharmaceut. Sci.* 5:106-113; 2010
- 5 4 . Beia, M; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G.; Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2410-2433, 2009
- 5 5 . Wu C.H.; Yen G.C.; Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem.*, 53, 3167-73; 2005
- 5 6 . Lo C.T.; Li S.; Tan D.; Pan M.H.; Ho C.T.; Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Mol Nutr Food Res.*, 50, 1118-28; 2006.
- 5 7 . Tan D.; Wang Y.; Lo C.Y.; Ho C.T.; Methylglyoxal: its presence and potential scavengers
- 5 8 . Brill, A.S.; Weinryb, I.; Reactions of horseradish peroxidase with azide. Evidence for a methionine residue at the active site. *Biochemistry*, 6, 3528-3535; 1967

10

20

30

40

50

59 . Ortiz de Montellano, P.R.; David, S.K.; Ator, M.A.; Tew, D.; Mechanism-based inactivation of orseradish-peroxidase by sodium azide - Formation of meso-azidoporphyrin-IX; *Biochemistry*, 27, 5470-5476; 1988

60 . Thornalley, P.J.; Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - Role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 23, 125-150; 2008

61 . Lo, T. W.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. . Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 269:32299-32305; 1994

62 . Adachi, K.; Shishido, T.; Hirose, T. Benzotriazole derivatives. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 1977. Japanese Patent JP 52093771 A 19770806

63 . Tetraazaannulene cobalt complexes. In: Koho, J. K. T., ed.; 1983

64 . Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture. *Anal. Biochem.* 238:171-178; 1996

65 . Katre, N. V.; Knauf, M. J.; Laird, W. J.; Chemical Modification of Recombinant Interleukin 2 by Polyethylene Glycol Increases its Potency in the Murine Meth A Sarcoma Model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 1487-1491; 1987

【 0 3 1 4 】

上記の明細書に記載されている全ての公開資料は、参照により本明細書に組み込まれている。本発明を特定の好ましい実施形態に関連して記載してきたが、特許請求された本発明は、このような特定の実施形態に過度に限定すべきではないことを理解すべきである。実際、化学又は関連する分野における当業者には明らかな本発明を行うための記載したモードの様々な修正は、下記の特許請求の範囲内であることが意図される。

10

20

【図 1】

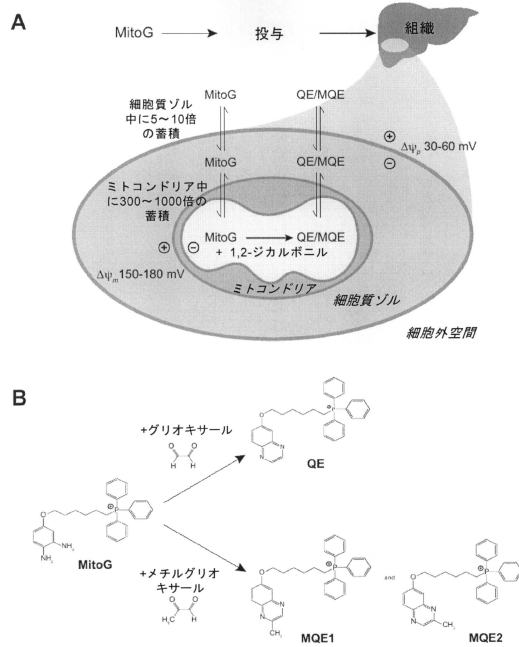


Figure 1

【図 2】

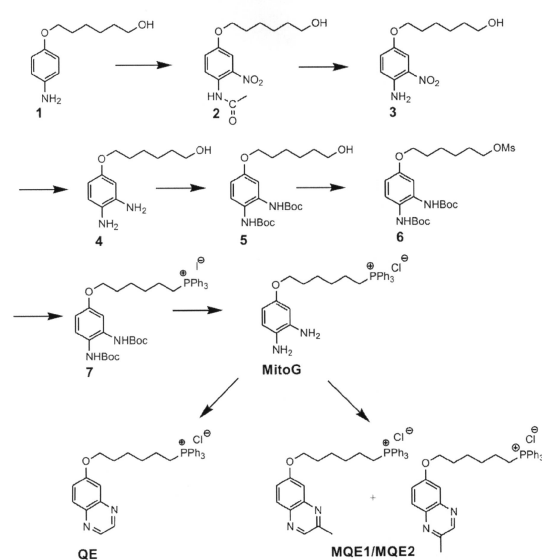


Figure 2

【図 3 A - D】

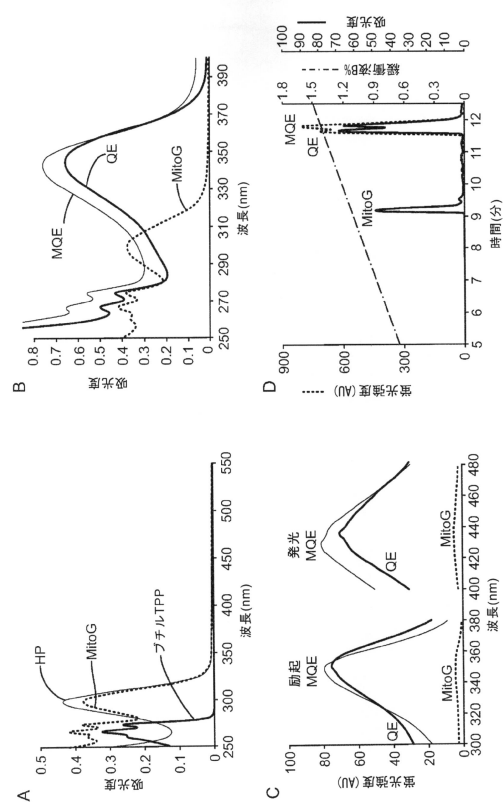


Figure 3

【図 3 E - H】

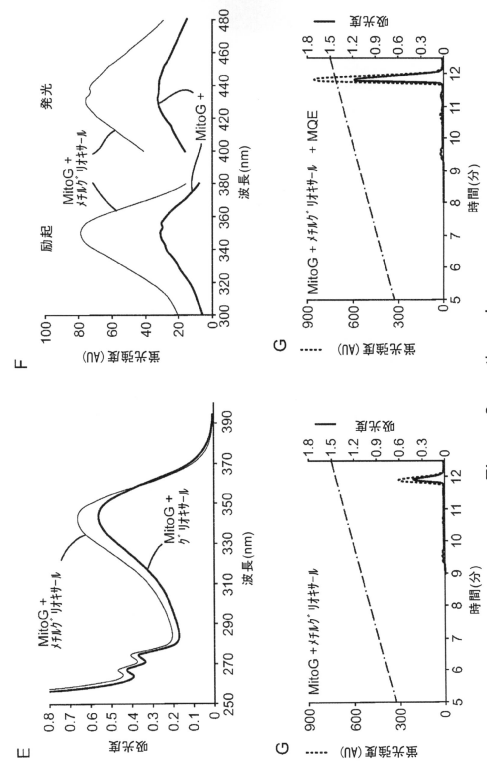


Figure 3 continued

【図 4】

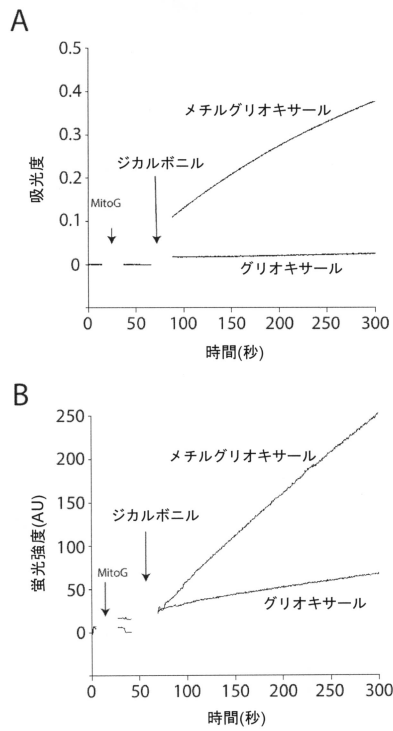


Figure 4

【図 5】

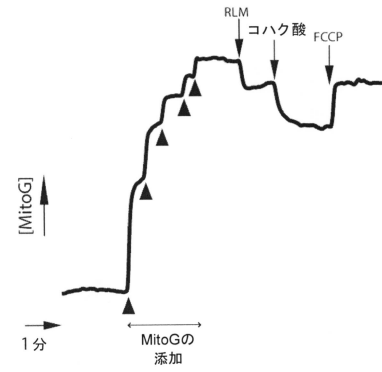


Figure 5

【図 6】

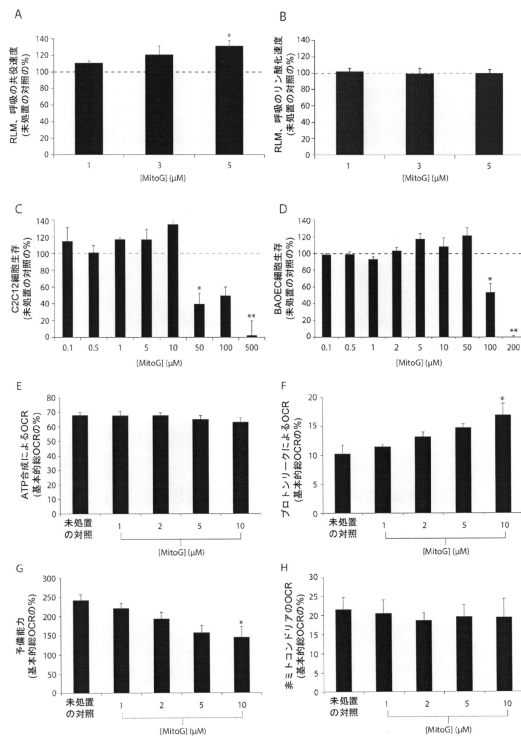


Figure 6

【図 7】

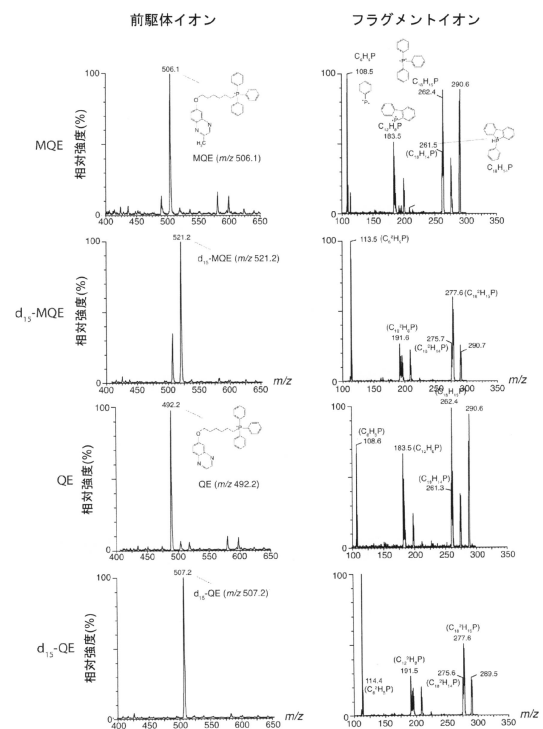
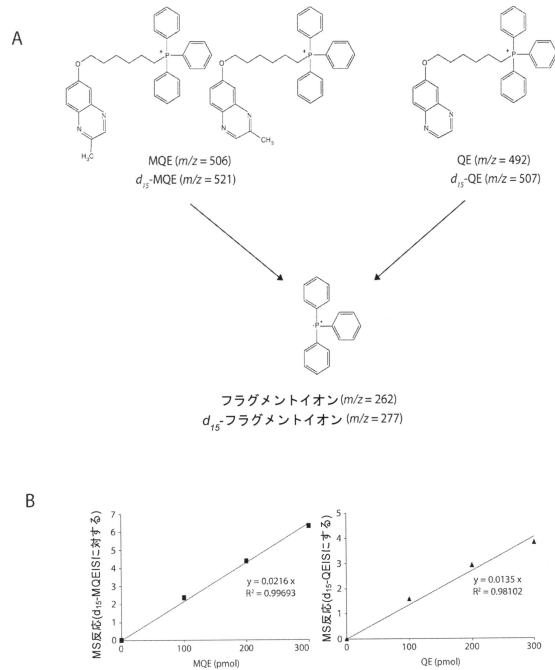


Figure 7

【図 8】



【図 9】

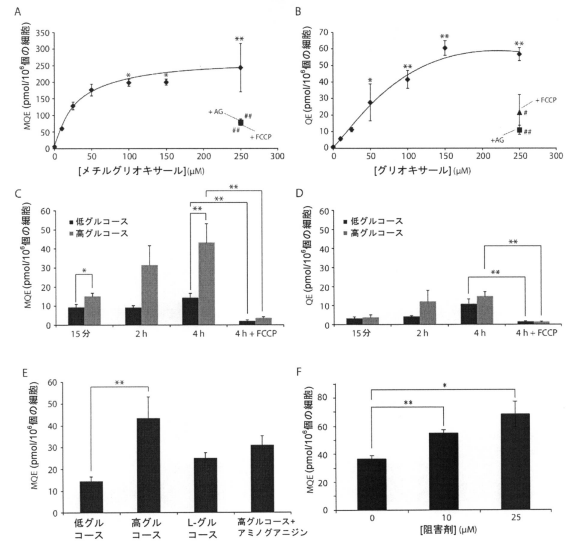


Figure 9

【図 10】

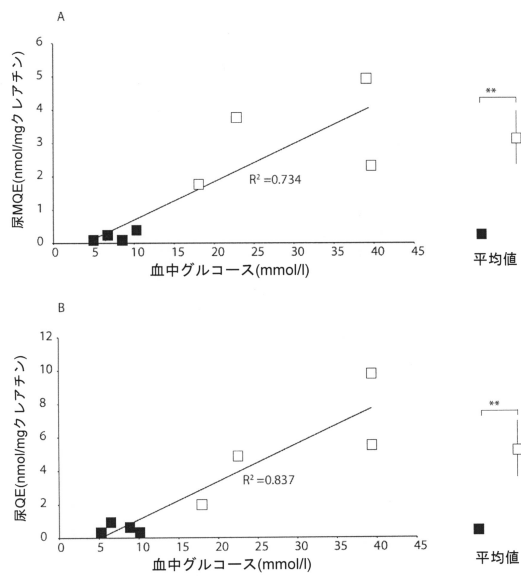


Figure 10

【図 11】

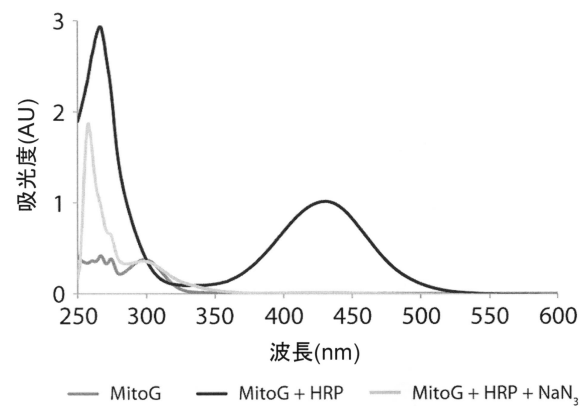


Figure 11

【図 12】

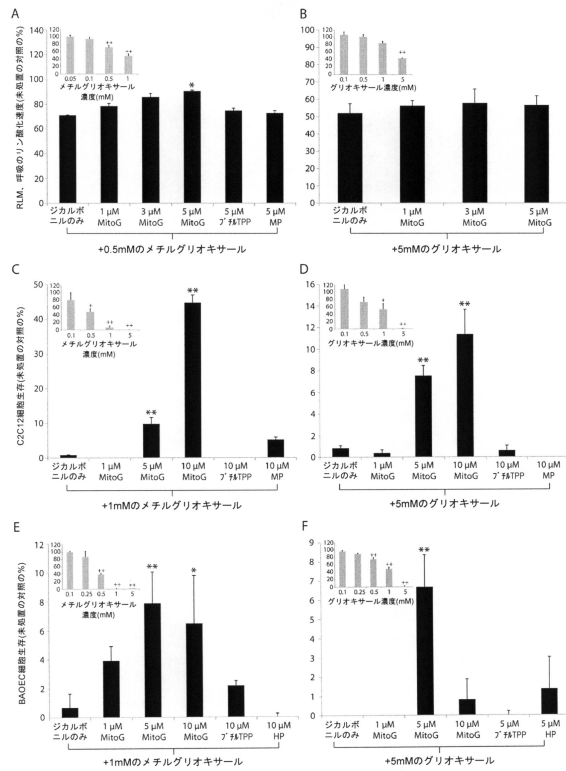


Figure 12

【図 13】

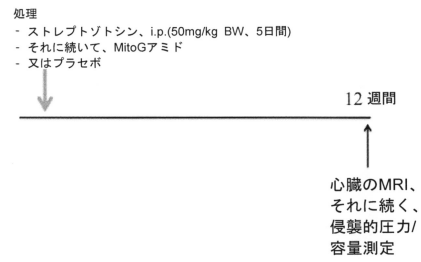


Figure 13

【図 14】



Figure 14

【図 15】

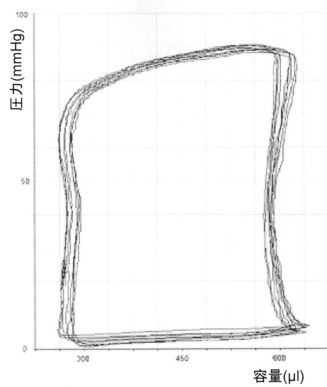


Figure 15

【図 16】

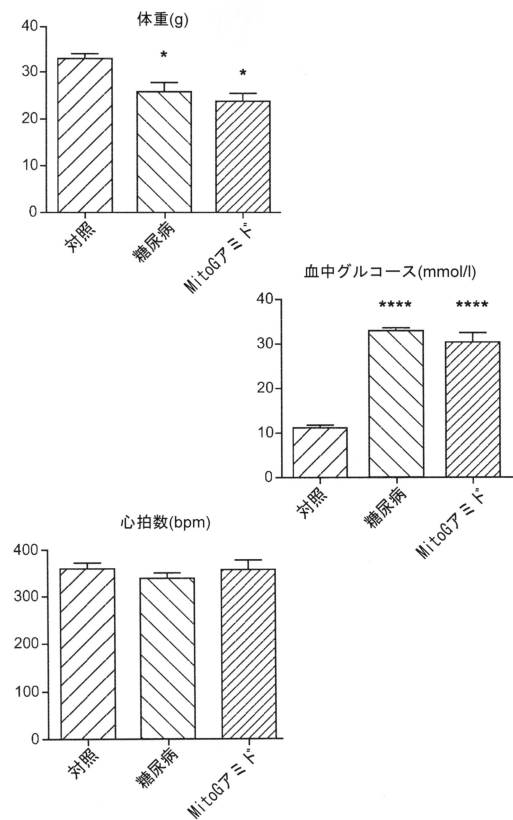


Figure 16

【図 17】

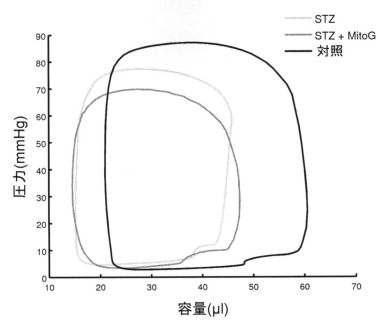


Figure 17

【図 18】

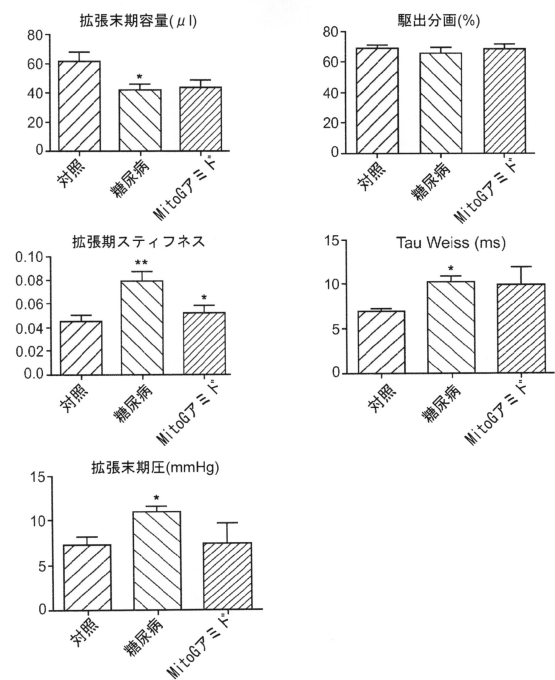


Figure 18

【図 19】

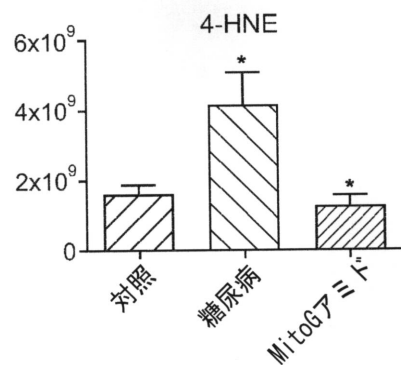


Figure 19

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 27/62 (2006.01) G 0 1 N 27/62 V

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 マーフィー マイケル パトリック

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

(72)発明者 スミス ロビン アンドリュー ジェームズ

ニュージーランド国 ダニーデン リンストリート 2 0

(72)発明者 ハートリー リチャード チャールズ

イギリス国 ジー 1 2 8 キューキュー グラスゴー ユニバーシティオブグラスゴー スクール
 オブケミストリー

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 8 7 9 3 4 (W O , A 1)

中国特許出願公開第 1 0 2 6 1 7 4 6 7 (C N , A)

特開 2 0 0 0 - 2 3 0 1 3 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 9 4 2 3 (W O , A 1)

特表 2 0 0 6 - 5 0 1 2 4 8 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 1 7 9 1 3 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 0 7 6 0 5 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 0 7 5 8 9 (J P , A)

Berth, Peter; Kaiser, Wilhelm J., Nitro, azo, and anthraquinone dyes with quaternary ammonium groups for dyeing human hair, Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1967年, 18(12), 705-13

Michalski, Radoslaw; Zielonka, Jacek; Hardy, Micael; Joseph, Joy; , Hydropropidine: A novel, cell-impermeant fluorogenic probe for detecting extracellular superoxide, Free Radical Biology & Medicine, 2013年, 54, 135-147

Xu, Xin; Arriaga, Edgar A., Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine, Free Radical Biology & Medicine, 2009年, 46(7), 905-913

Robinson, Kristine M.; Janes, Michael S.; Pehar, Mariana; , Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006年, 103(41), 15038-15043

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 0 7 F

C 0 7 C

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)