

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7007292号

(P7007292)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 C 235/66 (2006.01)

C 0 7 C 235/66

C S P

A 6 1 K 31/166 (2006.01)

A 6 1 K 31/166

A 6 1 P 25/16 (2006.01)

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 31/06 (2006.01)

A 6 1 P 31/06

請求項の数 13 (全39頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-551505(P2018-551505)

(86)(22)出願日 平成28年12月19日(2016.12.19)

(65)公表番号 特表2019-505573(P2019-505573
A)

(43)公表日 平成31年2月28日(2019.2.28)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/081792

(87)国際公開番号 WO2017/103278

(87)国際公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

審査請求日 令和1年12月6日(2019.12.6)

(31)優先権主張番号 15201180.5

(32)優先日 平成27年12月18日(2015.12.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 16174650.8

(32)優先日 平成28年6月15日(2016.6.15)

最終頁に続く

(73)特許権者 518213318

ケスター、ヒューバート

スイス国 ツェーハー - 6 9 2 2 モル
コテ、ストラーダ コンス . アキーレ イ
セラ 3

(74)代理人 110000855

特許業務法人浅村特許事務所

(72)発明者 フォン クレイスト、リサ

ドイツ連邦共和国 1 4 1 9 5 ベルリン
、ティールアレー 6 3

(72)発明者 ミカエリス、シモン

ドイツ連邦共和国 1 0 9 9 7 ベルリン
、ヘックマンウーファ 6

(72)発明者 バルトー、キャスリン

ドイツ連邦共和国 6 3 3 0 3 ドライア

最終頁に続く

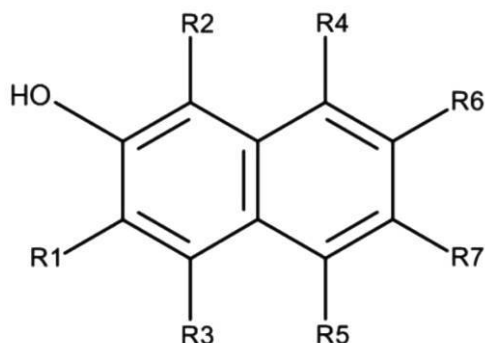
(54)【発明の名称】 薬剤としての使用のため、特にパーキンソン病の治療のための新規二環式化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式(A)、

【化1】



(A)、

[式中、

- R¹が-OHであり、- R²が-NO₂であり、R³がHであり、- R⁴およびR⁵がHであり、

- R⁶ が、H、- CONH₂ および - CONR⁹₂ から選択され、R⁷ が、- CONR⁹₂ および - CONR¹¹₂ R⁹ から選択されるか、
 R⁶ が - CONR¹¹₂ であり、R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であるか、
 R⁶ および R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であるか、又は
 R⁶ が H であり、R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であり；

ここで、

- R⁹ は R¹⁰ - (Y - R¹⁰)_n 又は R¹¹ - (Y - R¹⁰)_n であり；
 - Y は、- CONR¹¹ -、- CO -、- COO -、- SO₃ -、- SO₂ NH -、- NR¹¹ -、- O -、- NR¹¹ CO -、- OCO -、- NR¹¹ COO -、- NR¹¹ CONR¹¹ -、- OCONR¹¹ - および - OCOO - から選択され；

10

- n は、0、1、2、3 および 4 から選択される整数であり、
 - それぞれの R¹⁰ は、他の R¹⁰ とは独立して、置換基 A で置換されたまたは非置換 C₁ - C₈ アルキル、置換 A で置換されたまたは非置換 C₂ - C₈ アルケニル、置換 A で置換されたまたは非置換 C₂ - C₈ アルキニル、置換 A で置換されたまたは非置換 C₃ - C₁₀ シクロアルキルおよび置換 A で置換されたまたは非置換 5 ~ 10 員アリールまたはヘテロアリールから選択され；ならびに

- それぞれの R¹¹ は、他の R¹¹ とは独立して、H または非置換 C₁ - C₆ アルキルであり、

- 置換基 A は、- D (重水素)、- F、- Cl、- Br、- I、= O、- OH、- OR、= S、- SH、- OSO₃ H、- OSO₃ R、- SO₃ H、- SO₂ R、- SO₂ NH₂、- SO₂ NHR、- SO₂ NR₂、- OPO₃²⁻、- NH₂、- NHR、- COOH、- CONH₂、- OCOOH、- NHCONH₂、- CN、- NC、- NCO、- SCN、CF₃、CHF₂、又は CH₂F [式中、R は、C₁ - C₈ アルキル、C₂ - C₈ アルケニル、C₂ - C₈ アルキニル、C₃ - C₁₀ シクロアルキル、5 ~ 10 員のアリールもしくはヘテロアリールである] である]

20

によって特徴付けられる化合物。

【請求項 2】

n が 0 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

n が 1 である、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 4】

n が 2 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

R⁶ が - CONR¹¹ R¹¹ であり、R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であり、ここで、

- それぞれの R¹¹ が、他の R¹¹ とは独立して、H または非置換 C₁ - C₄ アルキルであり、および

- R⁹ が上記で定義したのと同じ意味を有する、

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

R⁶ および R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であり、ならびにここで、

40

- R⁹ が R¹¹ - (Y - R¹⁰)_n であり、

- Y が、- CONR¹¹ -、- NR¹¹ CO -、- NR¹¹ COO - および - NR¹¹ CONR¹¹ - から選択され、

- n が 1 または 2 であり、

- R¹⁰ が、非置換または一つの置換 A で置換された C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、および

- R¹¹ が、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである、

請求項 1、3、及び 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

R⁶ が - CONR¹¹₂ であり、R⁷ が - CONR⁹ R¹¹ であり、ここで、

50

- R⁹がR¹¹ - (Y - R¹⁰)_nであり、
 - Yが、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
 - nが1または2であり、
 - R¹⁰が、非置換または一つの置換Aで置換されたC₁ -、C₂ -、C₃ - またはC₄アルキルであり、ならびに
 - R¹¹が、非置換C₁ -、C₂ -、C₃ - またはC₄アルキルである、
 請求項1、3、4、及び5のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項8】

R⁶がHであり、R⁷が- CONR⁹R¹¹であり、ここで、
 - R⁹がR¹¹ - (Y - R¹⁰)_nであり、
 - Yが、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
 - nが1または2であり、
 - R¹⁰が、非置換または一つの置換Aで置換されたC₁ -、C₂ -、C₃ - またはC₄アルキルであり、ならびに
 - R¹¹が、非置換C₁ -、C₂ -、C₃ - またはC₄アルキルである、
 請求項1、3、及び4のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項9】

R⁷が- CONR⁹R¹¹であり、ここで、
 - R⁹が(CH₂)₄ - (Y - R¹⁰)_nであり、
 - Yが、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
 - nが1または2であり、
 - R¹⁰が、非置換または一つの置換Aで置換されたC₁ -、C₂ -、C₃ - またはC₄アルキルであり、
 - R¹¹が、非置換メチルまたはエチルである、
 請求項1及び3～8のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項10】

以下の式：

・ N², N², N³, N³ - テトラエチル - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2, 3 - ジカルボキサミド (A¹)、
 ・ (3 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] プロピルアセタート) (A²)、
 ・ N² - (6 - アミノヘキシル) - N², N³, N³ - トリエチル - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2, 3 - ジカルボキサミド (A⁴)、
 ・ N², N³, N³ - トリエチル - 6, 7 - ジヒドロキシ - N² - [4 - [メチル (ペンタノイル) アミノ] ブチル] - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2, 3 - ジカルボキサミド (A⁵)、
 ・ tert - ブチル N - [6 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] ヘキシル] カルバマート (A⁶)、
 ・ 4 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] ブチル - メチル - アミノ] - 4 - オキソ - ブタン酸 (A⁸)、
 ・ N² - [4 - [4 - アミノブタノイル (メチル) アミノ] ブチル] - N², N³, N³ - トリエチル - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2, 3 - ジカルボキサミド (A⁹)、
 ・ tert - ブチル N - [4 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] ブチル - メチ

ル - アミノ] - 4 - オキソ - ブチル] カルバマート (A 1 0) 、
 ・ N 2 , N 3 , N 3 - トリエチル - 6 , 7 - ジヒドロキシ - N 2 - [4 - [[6 - (2 -
 メトキシフェニル) - 6 - オキソ - ヘキサノイル] - メチル - アミノ] ブチル] - 5 - ニ
 トロ - ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキサミド (A 1 1) および
 ・ t e r t - ブチル N - [1 - シクロヘキシル - 2 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモ
 イル) - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル -
 アミノ] ブチル - メチル - アミノ] - 2 - オキソ - エチル] カルバマート (A 1 3)
 から選択される化合物。

【請求項 1 1】

請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の化合物を含有する医薬組成物。

10

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の化合物を含有する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の化合物を含有する、パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療のための医薬組成物であって、剤形が、錠剤、カプセル、ロゼンジ、粉末、溶液、懸濁液またはシロップである、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬剤としての使用のため、特にパーキンソン病の予防または治療における使用のための新規小分子化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

過去 5 0 年間にわたって、脳における神経伝達物質の分解に関与するマグネシウム依存性酵素であるカテコール - O - メチルトランスフェラーゼ (C O M T) は、様々な末梢および中枢神経系障害の治療のための魅力的な標的となってきた。この酵素は、2 つの形態、すなわち可溶性形態 (S - C O M T) および膜結合形態 (M B - C O M T) で存在し、普遍的に発現される。

30

【0003】

ドーパミンの前駆体であるレボドパ (L - D O P A) および芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (A A D C) 阻害剤と C O M T 阻害剤との同時投与は、インビボでの L - D O P A の半減期を増加させる。したがって、C O M T 阻害剤はパーキンソン病の補助療法の候補物質である。臨床的に関連する C O M T 阻害剤は、ニテカポン (O R - 4 6 2) 、エンタカポン (O R - 6 1 1) 、トルカポン (R o 4 0 - 7 5 9 2) 、ネビカポン (B I A 3 - 2 0 2) およびオピカポン (B I A 9 - 1 9 6 7) に例示される。これまでのところ、C O M T 阻害剤の唯一の臨床応用は、第 I I I 相臨床試験中であるエンタカポンおよびオピカポンを使用した L - D O P A および A A D C 阻害剤との同時投与である。他の阻害剤は、効果の欠如または安全性の懸念のいずれかのために中止されたかまたは市場から撤収された。

40

【発明の概要】

【0004】

中枢および末梢の両方に作用するトルカポンの使用は、いくつかの症例で重篤な肝毒性を引き起こした。主として末梢に作用するエンタカポンは、より好ましい毒性プロファイルを有するが、バイオアベイラビリティの問題を抱える。

【0005】

本発明の目的は、副作用 (肝毒性) が減少し、効力が増大した新規 C O M T 阻害剤を提供することである。この目的は、独立請求項の主題によって達成される。

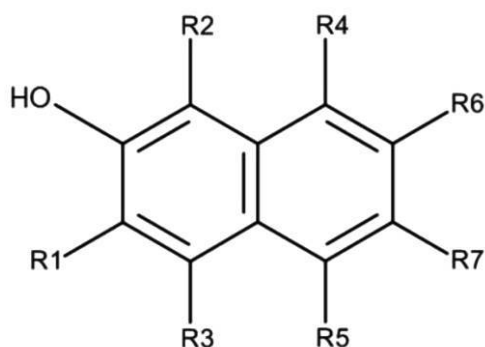
50

他の記載と重複するが、本発明を以下に示す。

[発明 1]

一般式 (A)、

[化 1]



10

(A)、

[式中、

- R₁ は、- OH、- SH および - NH₂ から選択され；

- R₂ は、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹₁、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹₁、- SO₂-NR¹¹_{1,2}、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹₁、- CN、- COR¹¹₁、- CO₂R¹¹₁、- CONHR¹¹₁、- CONR¹¹_{1,2}、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

20

- R₃ は、H、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹₁、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹₁、- SO₂-NR¹¹_{1,2}、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹₁、- CN、- COR¹¹₁、- CO₂R¹¹₁、- CONHR¹¹₁、- CONR¹¹_{1,2}、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

- R₄ および R₅ は、- H、置換 C₁-C₆ アルキル、非置換 C₁-C₆ アルキル、置換または非置換 C₂-C₆ アルケニル、置換または非置換 C₃-C₆ シクロアルキル、ハロゲン、- CN および - NO₂ から独立して選択され；

- R₆ および R₇ の一方は、- CONR⁹₁R¹¹₁、- CONR⁹₂、- COR⁹、- COOR⁹、- SO₂-OH、- SO₂R⁹、- SO₂-OR⁹、- SO₂-OR¹¹₁、- SO₂NHR¹¹₁、- SO₂NR⁹₁R¹¹₁、- NO₂、- CN、- CF₃ および - SO₂NR⁹₂ から選択され；

30

- R₆ および R₇ の他方は、H、- CONH₂、COOH、- SO₂-OH、- SO₂NH₂、- Y-R⁹、- Y-R⁹₂ および - R⁹ から選択され、

ここで、

- R⁹ は R¹⁰ - (Y - R¹⁰)_n であり；

- Y は、- CONR¹¹₁ -、- CO -、- COO -、- SO₃ -、- SO₂NH -、- NR¹¹₁ -、- O -、- NR¹¹₁CO -、- OCO -、- NR¹¹₁COO -、- NR¹¹₁CONR¹¹₁ -、- OCONR¹¹₁ - および - OCOO - から選択され；

40

- n は、0、1、2、3 および 4 から選択される整数であり、

- それぞれの R¹⁰ は、他の R¹⁰ とは独立して、置換または非置換 C₁-C₈ アルキル、置換または非置換 C₂-C₈ アルケニル、置換または非置換 C₂-C₈ アルキニル、置換または非置換 C₃-C₁₀ シクロアルキルおよび置換または非置換 5 ~ 10 員アリールまたはヘテロアリールから選択され；ならびに

- それぞれの R¹¹ は、他の R¹¹ とは独立して、H または非置換 C₁-C₆ アルキルである]

によって特徴付けられる化合物。

[発明 2]

R₇ が、- CONR¹¹₁R⁹、- CONR⁹₂、- COR⁹、- COOR⁹、- SO₂

50

- OH 、- SO_2R^9 、- $\text{SO}_2\text{-OR}^{11}$ 、- SO_2NH_2 、- $\text{SO}_2\text{-NHR}^{11}$ 、
- $\text{SO}_2\text{NR}^{11}\text{R}^9$ および - SO_2NR^9_2 から選択され、 R^9 が上記で定義したのと同じ意味を有する、発明 1 に記載の化合物。

[発明 3]

- R^1 が - OH であり、
- R^2 が - NO_2 であり、 R^3 が H であり、
- R^4 および R^5 が H であり、
- R^6 が、 H 、- CONH_2 および - CONR^9_2 から選択され、
- R^7 が、- CONR^9_2 および - $\text{CONR}^{11}\text{R}^9$ から選択され、
 R^9 および R^{11} が上記で定義したのと同じ意味を有する、
発明 1 または 2 のいずれか一項に記載の化合物。

10

[発明 4]

n が 0 である、発明 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

[発明 5]

n が 1 である、発明 1 から 4 のいずれか一項に記載の化合物。

[発明 6]

n が 2 である、発明 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物。

[発明 7]

R^6 が - $\text{CONR}^{11}\text{R}^{11}$ であり、 R^7 が - $\text{CONR}^9\text{R}^{11}$ であり、ここで、
- それぞれの R^{11} が、他の R^{11} とは独立して、 H または非置換 C_1 - C_4 アルキル
であり、および
- R^9 が上記で定義したのと同じ意味を有する、
発明 1 から 6 のいずれか一項に記載の化合物。

20

[発明 8]

R^6 および R^7 が - $\text{CONR}^9\text{R}^{11}$ であり、ならびにここで、
- R^9 が $\text{R}^{11} - (\text{Y} - \text{R}^{10})_n$ であり、
- Y が、- CONR^{11} -、- NR^{11}CO -、- NR^{11}COO - および - $\text{NR}^{11}\text{CONR}^{11}$ - から選択され、
- n が 1 または 2 であり、
- R^{10} が、非置換または一置換 C_1 -、 C_2 -、 C_3 - または C_4 アルキルであり、
および
- R^{11} が、非置換 C_1 -、 C_2 -、 C_3 - または C_4 アルキルである、
発明 1 から 7 のいずれか一項に記載の化合物。

30

[発明 9]

R^6 が - CONR^{11}_2 であり、 R^7 が - $\text{CONR}^9\text{R}^{11}$ であり、ここで、
- R^9 が $\text{R}^{11} - (\text{Y} - \text{R}^{10})_n$ であり、
- Y が、- CONR^{11} -、- NR^{11}CO -、- NR^{11}COO - および - $\text{NR}^{11}\text{CONR}^{11}$ - から選択され、
- n が 1 または 2 であり、
- R^{10} が、非置換または一置換 C_1 -、 C_2 -、 C_3 - または C_4 アルキルであり、
ならびに
- R^{11} が、非置換 C_1 -、 C_2 -、 C_3 - または C_4 アルキルである、
発明 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物。

40

[発明 10]

R^6 が H であり、 R^7 が - $\text{CONR}^9\text{R}^{11}$ であり、ここで、
- R^9 が $\text{R}^{11} - (\text{Y} - \text{R}^{10})_n$ であり、
- Y が、- CONR^{11} -、- NR^{11}CO -、- NR^{11}COO - および - $\text{NR}^{11}\text{CONR}^{11}$ - から選択され、
- n が 1 または 2 であり、
- R^{10} が、非置換または一置換 C_1 -、 C_2 -、 C_3 - または C_4 アルキルであり、

50

ならびに

- R¹¹が、非置換C₁-、C₂-、C₃-またはC₄アルキルである、
 発明1から9のいずれか一項に記載の化合物。

[発明11]

R⁷が-CONR⁹R¹¹であり、ここで、

- R⁹が(CH₂)₄-(Y-R¹⁰)_nであり、

- Yが、-CONR¹¹-、-NR¹¹CO-、-NR¹¹COO-および-NR¹¹CONR¹¹-から選択され、

- nが1または2であり、

- R¹⁰が、非置換または一置換C₁-、C₂-、C₃-またはC₄アルキルであり、

- R¹¹が、非置換メチルまたはエチルである、

発明1から10のいずれか一項に記載の化合物。

[発明12]

以下の式：

・ N₂, N₂, N₃, N₃-テトラエチル-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2, 3-ジカルボキサミド(A1)、

・ (3-[3-(ジエチルカルバモイル)-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2-カルボニル]-エチル-アミノ]プロピルアセタート)(A2)、

・ N₂-(6-アミノヘキシル)-N₂, N₃, N₃-トリエチル-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2, 3-ジカルボキサミド(A4)、

・ N₂, N₃, N₃-トリエチル-6, 7-ジヒドロキシ-N₂-[4-[メチル(ペンタノイル)アミノ]ブチル]-5-ニトロ-ナフタレン-2, 3-ジカルボキサミド(A5)、

・ tert-ブチルN-[6-[3-(ジエチルカルバモイル)-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2-カルボニル]-エチル-アミノ]ヘキシル]カルバマート(A6)、

・ 4-[4-[3-(ジエチルカルバモイル)-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2-カルボニル]-エチル-アミノ]ブチル-メチル-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸(A8)、

・ N₂-[4-[4-アミノブタノイル(メチル)アミノ]ブチル]-N₂, N₃, N₃-トリエチル-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2, 3-ジカルボキサミド(A9)、

・ tert-ブチルN-[4-[4-[3-(ジエチルカルバモイル)-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2-カルボニル]-エチル-アミノ]ブチル-メチル-アミノ]-4-オキソ-ブチル]カルバマート(A10)、

・ N₂, N₃, N₃-トリエチル-6, 7-ジヒドロキシ-N₂-[4-[6-(2-メトキシフェニル)-6-オキソ-ヘキサノイル]-メチル-アミノ]ブチル]-5-ニトロ-ナフタレン-2, 3-ジカルボキサミド(A11)および

・ tert-ブチルN-[1-シクロヘキシル-2-[4-[3-(ジエチルカルバモイル)-6, 7-ジヒドロキシ-5-ニトロ-ナフタレン-2-カルボニル]-エチル-アミノ]ブチル-メチル-アミノ]-2-オキソ-エチル]カルバマート(A13)

から選択される化合物。

[発明13]

薬剤として使用するための、発明1から12のいずれか一項に記載の化合物。

[発明14]

パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療において使用する薬剤としての使用のための、発明1から12のいずれか一項に記載の化合物。

[発明15]

パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選

10

20

30

40

50

扱われる状態の予防または治療に使用するための、発明 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の化合物を含有する剤形であって、吸入または経口投与に適しており、特に錠剤、カプセル、ロゼンジ、粉末、溶液、懸濁液またはシロップである、剤形。

【発明を実施するための形態】

【0006】

用語および定義

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「置換された」という用語は、化学的部分に関連して使用される場合、化学的部分の 1 または数個の水素原子が、水素以外の置換原子または - D (重水素)、- F、- Cl、- Br、- I、= O、- OH、- OR、= S、- SH、- OSO₃H、- OSO₃R、- SO₃H、- SO₂R、- SO₂NH₂、- SO₂NHR、- SO₂NR₂、- OPO₃²⁻、- NH₂、- NHR、- COOH、- CONH₂、- OCOOH、- NHCONH₂、- CN、- NC、- CNO、- NCO、- CNS、- SCN、CF₃、CHF₂、CH₂F [式中、R は、C₁-C₈ アルキル、C₂-C₈ アルケニル、C₂-C₈ アルキニル、C₃-C₁₀ シクロアルキル、5 ~ 10 員のアリールもしくはヘテロアリールである]、ならびに C、N、O、S および F から選択される 2 ~ 25 個の原子と任意の適切な量の H 原子から成る置換基部分 [ここで置換基部分は 29 ~ 400 g/mol の分子量を有する] から選択される置換基部分で置換されていることを意味する。

10

【0007】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「アルキル」という用語は、直鎖状または分枝状の飽和炭化水素置換基を指す。アルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、n-ブチル、イソブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2,2-メチルペンチル、2,3-メチルペンチル等が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0008】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「アルケニル」という用語は、少なくとも 1 つの炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素置換基を指す。アルケニルは、直鎖状であっても分枝状であってもよい。

【0009】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「アルキニル」という用語は、少なくとも 1 つの炭素-炭素三重結合を含む不飽和炭化水素置換基を指す。アルキニルは、直鎖状であっても分枝状であってもよい。一例は、エチニル (CCH) 基である。

30

【0010】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「ヘテロアルキル」という用語は、少なくとも 1 つの炭素が酸素原子、硫黄原子または窒素原子で置換された、直鎖状または分枝状の飽和炭化水素置換基を指す。

【0011】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「シクロアルキル」という用語は、飽和環状炭化水素置換基を指す。

【0012】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「複素環式アルキル」という用語は、少なくとも 1 つの炭素が酸素、窒素または硫黄原子で置換された飽和環式基を指す。飽和複素環置換基の例には、モルホリン、ピペラジン、ピロリジン、チオラン、テトラヒドロフラン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、オキサゾリジン、チアゾリジン、ペリジン、オキサン基等が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0013】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「アリール」という用語は、環状芳香族炭化水素置換基を指す。

【0014】

「ヘテロアリール」という用語は、少なくとも 1 つの炭素原子が酸素、窒素または硫黄原

50

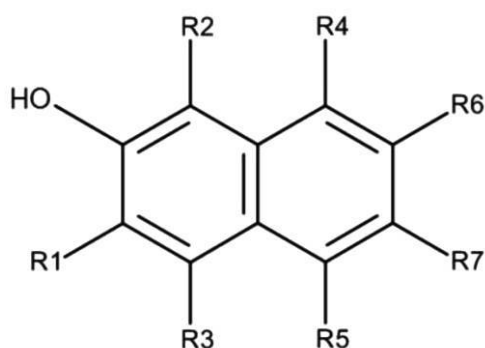
子で置換されたアリール化合物を指す。アリールまたはヘテロアリール置換基の例には、ベンゼン、ピリジン、ピロール、キノロン、イミダゾール、トリアジン、ピラジン、ピリミジン、ピラダジン、チアジン、ジオキシン、テトラゾール、トリアゾール、チアジアゾール、ピラゾール、オキサゾール、チアゾール、フラン等が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 5 】

発明の説明

本発明の第一の態様によれば、一般式 (A) :

【 化 1 】



10

20

(A)、

[式中、

- R¹ は、- OH、- SH および - NH₂ から選択され；

- R² は、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹、- SO₂-NR¹¹₂、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹、- CN、- COR¹¹、- CO₂R¹¹、- CONHR¹¹、- CONR¹¹₂、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

- R³ は、H、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹、- SO₂-NR¹¹₂、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹、- CN、- COR¹¹、- CO₂R¹¹、- CONHR¹¹、- CONR¹¹₂、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

30

- R⁴ および R⁵ は、- H、置換 C₁-C₆ アルキル、非置換 C₁-C₆ アルキル、置換または非置換 C₂-C₆ アルケニル、置換または非置換 C₃-C₆ シクロアルキル、ハロゲン、- CN および - NO₂ から独立して選択され；

- R⁶ および R⁷ の一方は、- CONR⁹R¹¹、- CONR⁹₂、- COR⁹、- COOR⁹、- SO₂-OH、- SO₂R⁹、- SO₂-OR⁹、- SO₂-OR¹¹、- SO₂NHR¹¹、- SO₂NR⁹R¹¹、- NO₂、- CN、- CF₃ および - SO₂NR⁹₂ から選択され；

- R⁶ および R⁷ の他方は、H、- CONH₂、COOH、- SO₂-OH、- SO₂NH₂、- Y-R⁹、- Y-R⁹₂ および - R⁹ から選択され、

40

ここで、

- R⁹ は R¹⁰ - (Y - R¹⁰)_n であり；

- Y は、- CONR¹¹ -、- CO -、- COO -、- SO₃ -、- SO₂NH -、- NR¹¹ -、- O -、- NR¹¹CO -、- OCO -、- NR¹¹COO -、- NR¹¹CONR¹¹ -、- OCONR¹¹ - および - OCOO - から選択され；

- n は、0、1、2、3 および 4 から選択される整数であり、

- それぞれの R¹⁰ は、他の R¹⁰ とは独立して、置換または非置換 C₁-C₈ アルキル、置換または非置換 C₂-C₈ アルケニル、置換または非置換 C₂-C₈ アルキニル、置換または非置換 C₃-C₁₀ シクロアルキルおよび置換または非置換 5 ~ 10 員アリールまたはヘテロアリールから選択され；ならびに

50

- それぞれの R^{11} は、他の R^{11} とは独立して、Hまたは非置換 $C_1 - C_6$ アルキルである]

によって特徴付けられる化合物が提供される。

【0016】

特定の実施形態では、 R^7 は、 $-CONR^{11}R^9$ 、 $-CONR^9$ 、 $-COR^9$ 、 $-COOR^9$ 、 $-SO_2-OH$ 、 $-SO_2R^9$ 、 $-SO_2-OR^9$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-SO_2-NHR^9$ 、 $-SO_2NR^{11}R^9$ および $-SO_2NR^9$ から選択される電気陰性の電子求引性基であり、 R^9 は、式の描画に見られるように分子の「右側」部分に立体障害を与え、したがって、上記の R^9 について定義した任意の形態を自由にとることができる。

【0017】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H である。

【0018】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H である。

【0019】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 は H、 $-CONH_2$ および $-CONR^9$ から選択され、ここで R^9 は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0020】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^7 は $-CONR^9$ および $-CONR^{11}R^9$ から選択され、ここで R^9 および R^{11} は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0021】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 は H、 $-CONH_2$ および $-CONR^9$ から選択され、 R^7 は $-CONR^9$ および $-CONR^{11}R^9$ から選択され、ここで R^9 および R^{11} は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0022】

特定の実施形態では、 n は 0 である。

【0023】

特定の実施形態では、 n は 1 である。

【0024】

特定の実施形態では、 n は 2 である。

【0025】

特定の実施形態では、 R^6 は $-CONR^{11}R^{11}$ であり、 R^7 は $-CONR^9R^{11}$ であり、ここでそれぞれの R^{11} は、他の R^{11} とは独立して、Hまたは非置換 $C_1 - C_4$ アルキルであり、 R^9 は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0026】

特定の実施形態では、 R^1 は $-OH$ であり、 R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 は $-CONR^{11}R^{11}$ であり、 R^7 は $-CONR^9R^{11}$ であり、ここでそれぞれの R^{11} は、他の R^{11} とは独立して、Hまたは非置換 $C_1 - C_4$ アルキルであり、 R^9 は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0027】

特定の実施形態では、 R^6 および R^7 は $-CONR^9R^{11}$ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、 $-CONR^{11}-$ 、 $-NR^{11}CO-$ 、 $-NR^{11}COO-$ および $-NR^{11}CONR^{11}-$ から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C_1- 、 C_2- 、 C_3- または C_4 アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C_1- 、 C_2- 、 C_3- または C_4 アルキルである。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態では、 R^1 は - OH であり、 R^2 は - NO₂ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 および R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである。

【 0 0 2 9 】

特定の実施形態では、 R^6 は - CONR¹¹₂ であり、 R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである。

【 0 0 3 0 】

特定の実施形態では、 R^1 は - OH であり、 R^2 は - NO₂ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 は - CONR¹¹₂ であり、 R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである。

【 0 0 3 1 】

特定の実施形態では、 R^6 は H であり、 R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである。

【 0 0 3 2 】

特定の実施形態では、 R^1 は - OH であり、 R^2 は - NO₂ であり、 R^3 は H であり、 R^4 および R^5 は H であり、 R^6 は H であり、 R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルである。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態では、 R^7 は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R^9 は $(CH_2)_4 - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、

10

20

30

40

50

- n は 1 または 2 であり、
- R¹⁰ は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R¹¹ は、非置換メチルまたはエチルである。

【0034】

特定の実施形態では、R¹ は - OH であり、R² は - NO₂ であり、R³ は H であり、R⁴ および R⁵ は H であり、R⁶ は H であり、R⁷ は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R⁹ は (CH₂)₄ - (Y - R¹⁰)_n であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R¹⁰ は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R¹¹ は、非置換メチルまたはエチルである。

10

【0035】

特定の実施形態では、R¹ は - OH であり、R² は - NO₂ であり、R³ は H であり、R⁴ および R⁵ は H であり、R⁶ は - CONEt₂ であり、R⁷ は - CONR⁹R¹¹ であり、ならびに

- R⁹ は (CH₂)₄ - (Y - R¹⁰)_n であり、
- Y は、- CONR¹¹ -、- NR¹¹CO -、- NR¹¹COO - および - NR¹¹CONR¹¹ - から選択され、
- n は 1 または 2 であり、
- R¹⁰ は、非置換または一置換 C₁ -、C₂ -、C₃ - または C₄ アルキルであり、
- R¹¹ は、非置換メチルまたはエチルである。

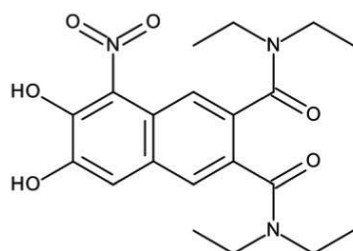
20

【0036】

特定の実施形態では、化合物は、

- ・ N², N², N³, N³ - テトラエチル - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2, 3 - ジカルボキサミド (A₁)

【化2】

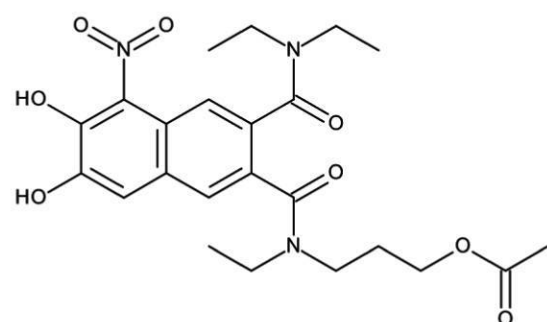


30

(A₁)、

- ・ (3 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6, 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] プロピルアセタート) (A₂)

【化3】



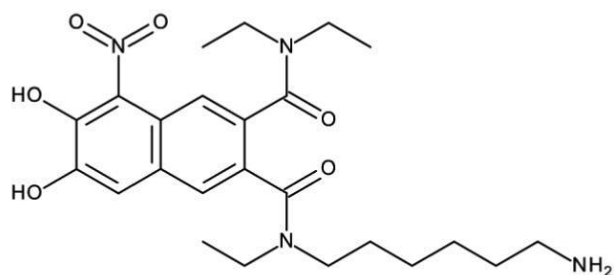
40

(A₂)、

50

・ N 2 - (6 - アミノヘキシル) - N 2 , N 3 , N 3 - トリエチル - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキサミド (A 4)

【化 4】

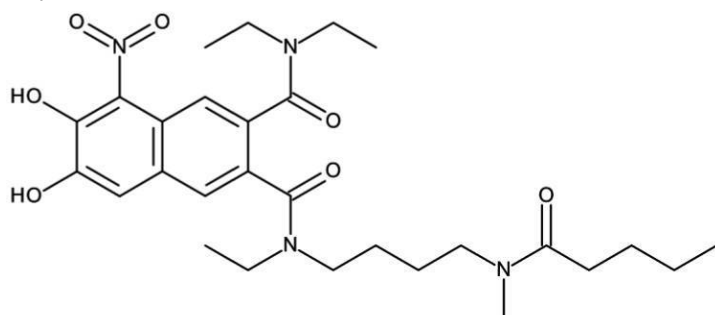


10

(A 4) 、

・ N 2 , N 3 , N 3 - トリエチル - 6 , 7 - ジヒドロキシ - N 2 - [4 - [メチル (ペンタノイル) アミノ] ブチル] - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキサミド (A 5)

【化 5】

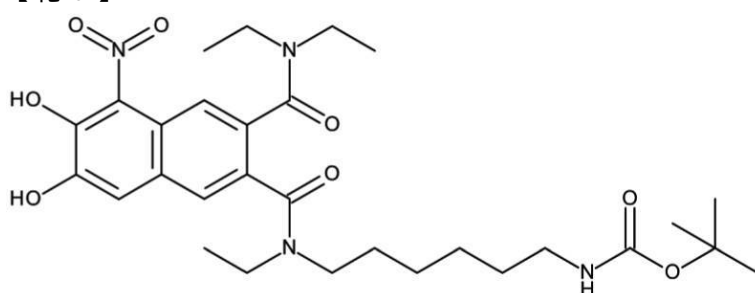


20

(A 5) 、

・ tert - ブチル N - [6 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 -

【化 6】



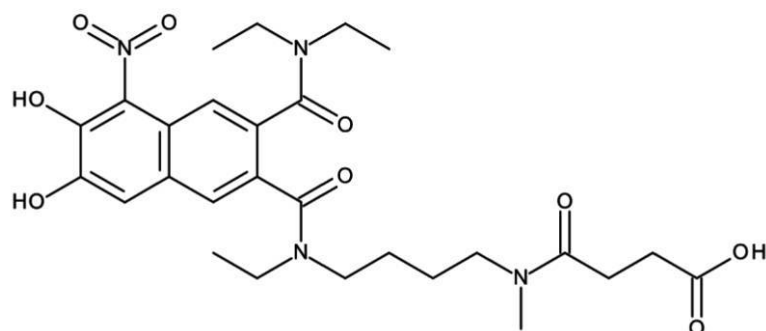
30

(A 6) 、

・ 4 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] ブチル - メチル - アミノ] - 4 - オキソ - ブタン酸 (A 8)

40

【化 7】

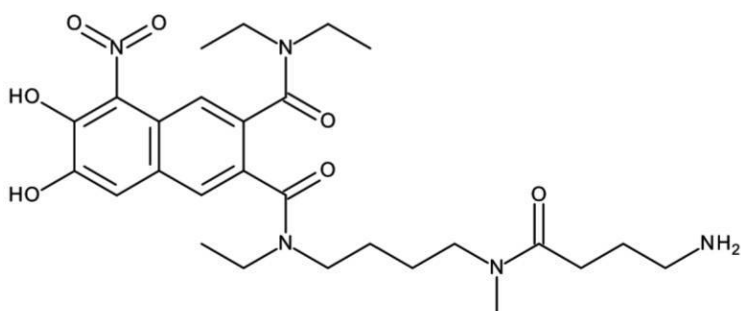


10

(A 8)、

・ N 2 - [4 - [4 - アミノブタノイル (メチル) アミノ] ブチル] - N 2 , N 3 , N 3 - トリエチル - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキサミド (A 9)

【化 8】

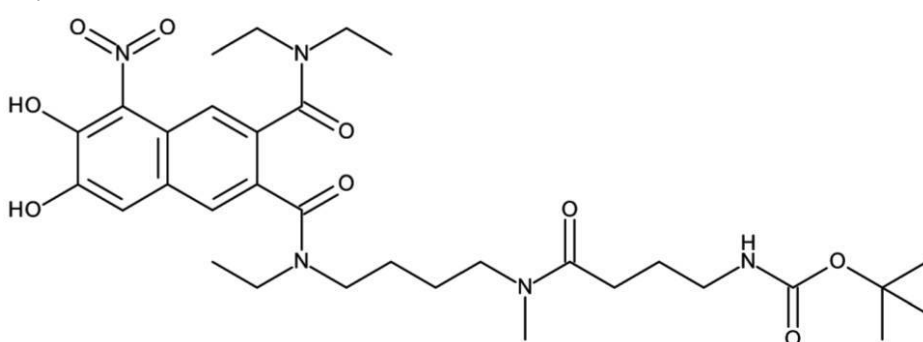


20

(A 9)、

・ tert - ブチル N - [4 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 -

【化 9】



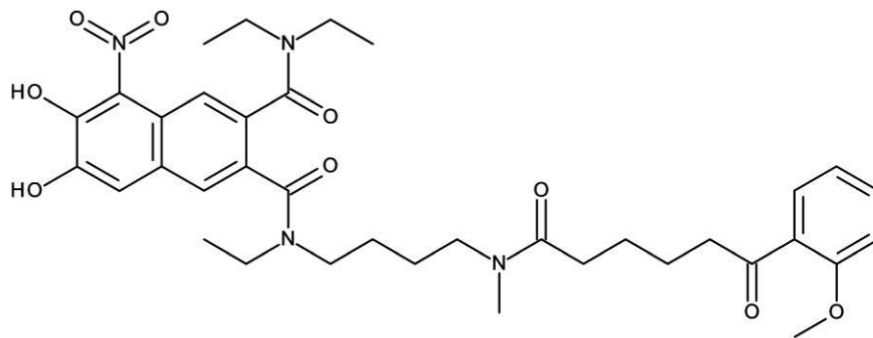
30

(A 1 0)、

・ N 2 , N 3 , N 3 - トリエチル - 6 , 7 - ジヒドロキシ - N 2 - [4 - [[6 - (2 - メトキシフェニル) - 6 - オキソ - ヘキサノイル] - メチル - アミノ] ブチル] - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキサミド (A 1 1)

40

【化 1 0】

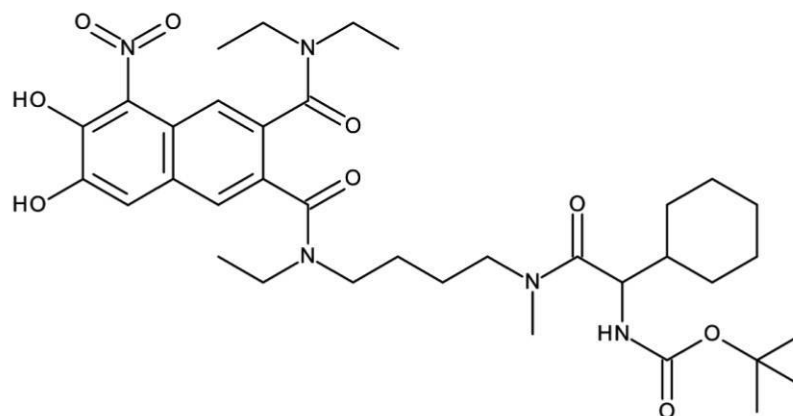


10

(A 1 1) および

・tert - ブチル N - [1 - シクロヘキシル - 2 - [4 - [[3 - (ジエチルカルバモイル) - 6 , 7 - ジヒドロキシ - 5 - ニトロ - ナフタレン - 2 - カルボニル] - エチル - アミノ] ブチル - メチル - アミノ] - 2 - オキソ - エチル] カルバマート (A 1 3)

【化 1 1】



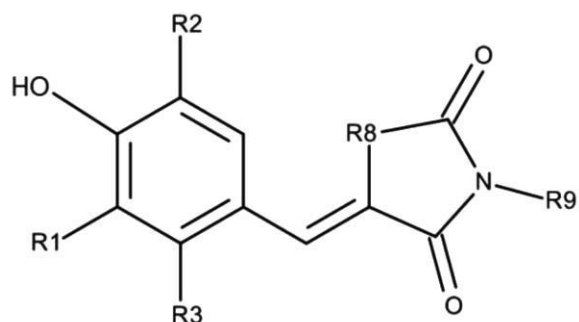
20

(A 1 3) から選択されて提供される。

【0 0 3 7】

本発明の別の態様によれば、一般式 (B)

【化 1 2】



40

(B)、

[式中、

- R 8 は、C、S、N、O、NR 1 1 および CR 1 1 から選択され；
- R 1、R 2、R 3、R 9 および R 1 1 は、上記で定義したのと同じ意味を有する]

によって特徴付けられる化合物が提供される。

【0 0 3 8】

特定の実施形態では、

- R 1 は - OH であり、

50

- R² は - NO₂ であり、R³ は H であり、および
- R⁸ は S であり；

ならびに R⁹ は上記で定義したのと同じ意味を有する。

【0039】

特定の実施形態は、式 (B2)、(B4)、(B5)、(B6)、(B8)、(B9)、(B10)、(B11) または (B13) のいずれか1つを特徴とする。

【0040】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の上記で開示した態様および実施形態のいずれか1つに従う化合物は、薬剤としての使用のために提供される。

【0041】

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の上記で開示した態様および実施形態のいずれか1つに従う化合物は、パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療において使用する薬剤としての使用のために提供される。

【0042】

本発明のさらに別の態様によれば、パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療における使用のための、本発明の上記で開示した態様および実施形態のいずれか1つに従う化合物を含有する剤形が提供され、ここで前記剤形は吸入または経口投与に適し、特に、前記剤形は、錠剤、カプセル、ロゼンジ、粉末、溶液、懸濁液またはシロップである。

【0043】

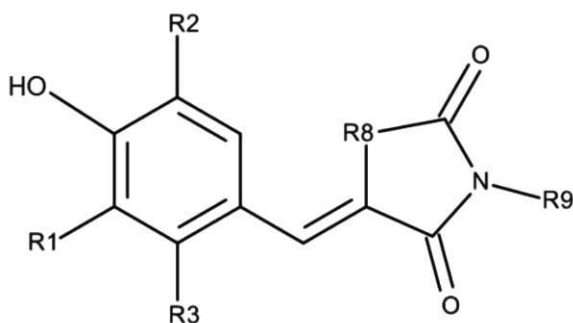
本発明のさらに別の態様によれば、パーキンソン病、アルツハイマー病、多剤耐性結核および肥満関連障害を含む群から選択される状態の予防または治療における使用のための、HIBCHに結合しないことを特徴とする、COMTの阻害剤が提供される。

【0044】

本発明のさらなる態様および実施形態は、以下の項目に開示される：

項目1：一般式(B)：

【化13】



(B)、

[式中、

- R¹ は、- OH、- SH および - NH₂ から選択され；

- R² は、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹、- SO₂-NR¹¹₂、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹、- CN、- COR¹¹、- CO₂R¹¹、- CONHR¹¹、- CONR¹¹₂、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

- R³ は、H、- NO₂、- SO₃H、- SO₂-OR¹¹、- SO₂-NH₂、- SO₂-NHR¹¹、- SO₂-NR¹¹₂、- PO₃H、- PO₂-OR¹¹、- CN、- COR¹¹、- CO₂R¹¹、- CONHR¹¹、- CONR¹¹₂、- CF₃ およびハロゲンから選択され；

- R⁸ は、C、S、N、O、NR¹¹ および CR¹¹ から選択され；

10

20

30

40

50

- R^9 は $R^{10} - (Y - R^{10})_n$ であり；
 - Y は、 $-CONR^{11}-$ 、 $-CO-$ 、 $-COO-$ 、 $-SO_3-$ 、 $-SO_2NH-$ 、 $-NR^{11}-$ 、 $-O-$ 、 $-NR^{11}CO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-NR^{11}COO-$ 、 $-NR^{11}CONR^{11}-$ 、 $-OCONR^{11}-$ および $-OCCO-$ から選択され；
 - n は、0、1、2、3 および 4 から選択される整数であり、
 - それぞれの R^{10} は、他の R^{10} とは独立して、置換または非置換 $C_1 - C_8$ アルキル、置換または非置換 $C_2 - C_8$ アルケニル、置換または非置換 $C_2 - C_8$ アルキニル、置換または非置換 $C_3 - C_{10}$ シクロアルキルおよび置換または非置換 5 ~ 10 員アリールまたはヘテロアリールから選択され；ならびにそれぞれの R^{11} は、他の R^{11} とは独立して、 H または非置換 $C_1 - C_6$ アルキルである]
 によって特徴付けられる化合物。

10

【0045】

項目2：項目1の一般式(B)によって特徴付けられる化合物であって、式中、

- R^1 は $-OH$ であり、
- R^2 は $-NO_2$ であり、 R^3 は H であり、
- R^8 は S であり、

および R^9 は項目1で定義したのと同じ意味を有する、化合物。

【0046】

項目3： n が0である、項目1または2に記載の化合物。

20

【0047】

項目4： n が1である、項目1または2に記載の化合物。

【0048】

項目5： n が2である、項目1または2に記載の化合物。

【0049】

項目6： n が3である、項目1または2に記載の化合物。

【0050】

項目7：項目1～6のいずれか1つに記載の化合物であって、式中、

- R^9 は $R^{11} - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、 $-CONR^{11}-$ 、 $-NR^{11}CO-$ 、 $-NR^{11}COO-$ および $-NR^{11}CONR^{11}-$ から選択され、
- n は1または2であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C_1- 、 C_2- 、 C_3- または C_4 アルキルであり、
- R^{11} は、非置換 C_1- 、 C_2- 、 C_3- または C_4 アルキルである、

化合物。

30

【0051】

項目8：項目1～7のいずれか1つに記載の化合物であって、式中、

- R^9 は $(CH_2)_4 - (Y - R^{10})_n$ であり、
- Y は、 $-CONR^{11}-$ 、 $-NR^{11}CO-$ 、 $-NR^{11}COO-$ および $-NR^{11}CONR^{11}-$ から選択され、
- n は1または2であり、
- R^{10} は、非置換または一置換 C_1- 、 C_2- 、 C_3- または C_4 アルキルであり、
- R^{11} は、非置換メチルまたはエチルである、

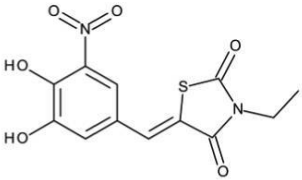
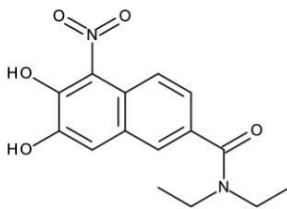
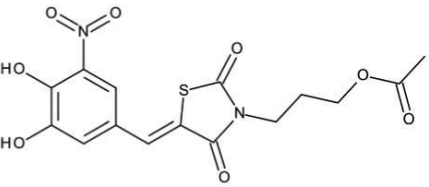
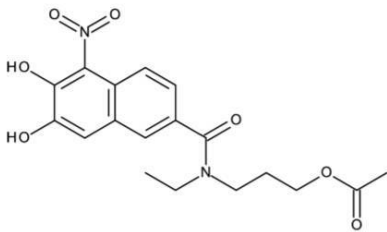
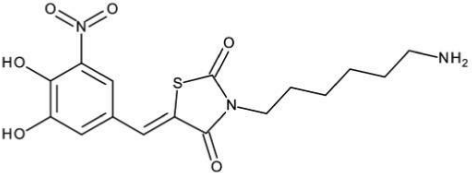
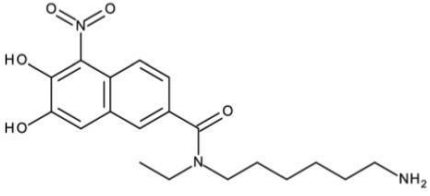
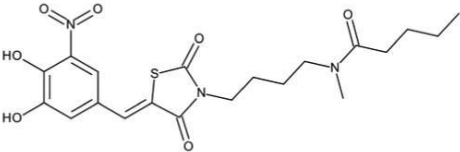
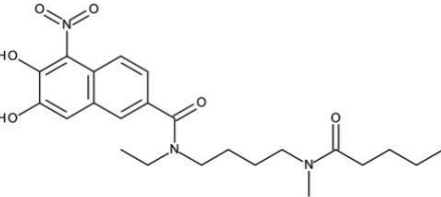
化合物。

40

【0052】

さらなる実施形態は以下の式である：

【表 1 - 1】

 CPT-212(B1) (5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-3-エチルチアゾリジン-2,4-ジオン	 (A1. 2) N,N-ジエチル-6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボキサミド
 (B2) 3-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソチアゾリジン-3-イル]プロピルアセタート	 (A2. 2) 3-[(6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボニル)-エチルアミノ]プロピルアセタート
 (B4) (5Z)-3-(6-アミノヘキシル)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]チアゾリジン-2,4-ジオン	 (A4. 2) N-(6-アミノヘキシル)-N-エチル-6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボキサミド
 (B5) N-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソチアゾリジン-3-イル]ブチル]-N-メチルペンタンアミド	 (A5. 2) N-エチル-6,7-ジヒドロキシ-N-[4-[メチル(ペンタノイル)アミノ]ブチル]-5-ニトロナフタレン-2-カルボキサミド

10

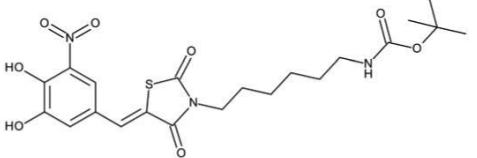
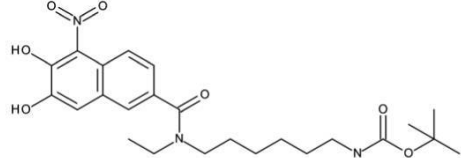
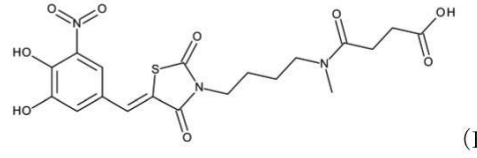
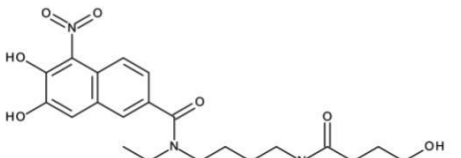
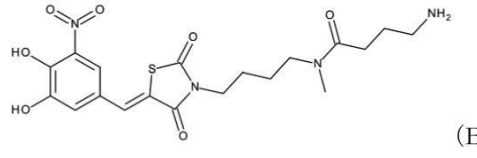
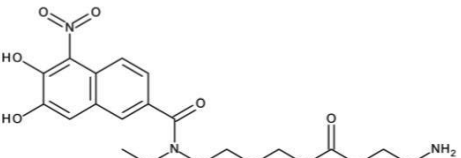
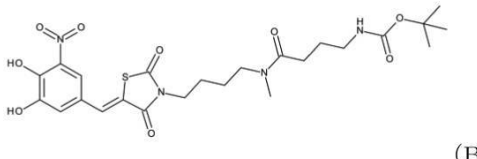
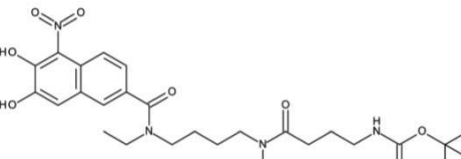
20

30

40

50

【表 1 - 2】

 (B6) tert-ブチルN-[6-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-3-イル]ヘキシル]カルバマート	 (A6.2) tert-ブチルN-[6-[(6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボニル)-エチル-アミノ]ヘキシル]カルバマート
 (B8) 4-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-3-イル]ブチル-メチル-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸	 (A8.2) 4-[4-[(6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボニル)-エチル-アミノ]ブチル-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸
 (B9) 4-アミノ-N-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-3-イル]ブチル]-N-メチル-ブタンアミド	 (A9.2) N-[4-[4-アミノブタノイル(メチル)アミノ]ブチル]-N-エチル-6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボキサミド
 (B10) tert-ブチルN-[4-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-3-イル]ブチル-メチル-アミノ]-4-オキソ-ブチル]カルバマート	 (A10.2) tert-ブチルN-[4-[4-[(6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボニル)-エチル-アミノ]ブチル-メチル-アミノ]-4-オキソ-ブチル]カルバマート

10

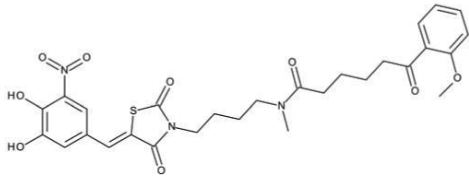
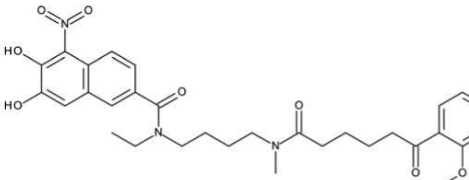
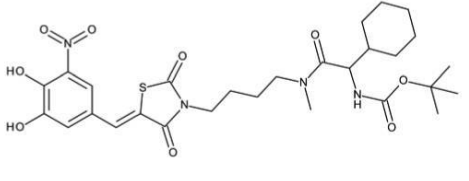
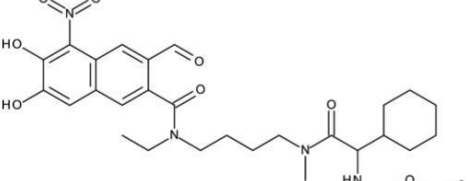
20

30

40

50

【表 1 - 3】

 (B11) N-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソチアゾリジン-3-イル]ブチル]-6-(2-メトキシフェニル)-N-メチル-6-オキソヘキサンアミド	 (A11. 2) N-エチル-6,7-ジヒドロキシ-N-[4-[[6-(2-メトキシフェニル)-6-オキソヘキサノイル]-メチル-アミノ]ブチル]-5-ニトロナフタレン-2-カルボキサミド
 (B13) tert-ブチルN-[1-シクロヘキシル-2-[4-[(5Z)-5-[(3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロフェニル)メチレン]-2,4-ジオキソチアゾリジン-3-イル]ブチル-メチル-アミノ]-2-オキソエチル]カルバマート	 (A13. 2) tert-ブチルN-[1-シクロヘキシル-2-[4-[エチル(3-ホルミル-6,7-ジヒドロキシ-5-ニトロナフタレン-2-カルボニル)アミノ]ブチル-メチル-アミノ]-2-オキソエチル]カルバマート

10

20

【 0 0 5 3 】

本発明につながる実験作業において、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)の2つの小分子を、トルカポンおよびエンタカポンと比較するためのリードCOMT阻害剤として合成した(図1)。本発明者らは、トルカポン、エンタカポンならびにCPT-401(A1)およびCPT-212(B1)の誘導体によるCOMTの阻害を比較した(図9)。結果は、側鎖が、COMT阻害を損なうことなく変化し得ることを示す。

30

【 0 0 5 4 】

続いて、トルカポン、エンタカポン、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)の4つの化合物をオフターゲット結合に関して比較した。

【 0 0 5 5 】

共通の治療標的を持つ構造的に関連する阻害剤は、オフターゲット結合の差異によって引き起こされる潜在的な毒性の問題に関して異なり得る。トルカポンの肝毒性作用の根底にある原因は、酵素3-ヒドロキシイソブチリル-CoA加水分解酵素(HIBCH、CAS NO 9025-88-1)へのそのオフターゲット結合であり得る。HIBCH酵素は、バリンの異化経路において3-ヒドロキシイソブチリル-CoAからCoAを除去することによって毒性のメタクリリル-CoAの蓄積を防止するために重要であり、ヒト肝臓における酵素活性の低下は肝硬変および肝細胞癌と相関しており、メタクリリル-CoAを処理する能力の低下は肝不全を導き得ることを示唆する。したがって、HIBCHの阻害は、細胞毒性であるメタクリリル-CoAの蓄積をもたらす。トルカポン特異的なオフターゲットとしてのこのタンパク質の同定は、肝臓におけるトルカポン誘導性毒性作用についての新規な可能性のある説明を提供する。HIBCHに結合する場合、トルカポンは、2つの芳香族部分が互いに傾斜した立体配座をとる。対照的に、CPT-401およびエンタカポンは相対的な平面性を特徴とする。したがって、これらのHIBCHへの結合が防止される。

40

【 0 0 5 6 】

50

カテコールO - メチルトランスフェラーゼ (COMT、EC 2.1.1.6) は、可溶性形態 (S - COMT) および膜結合形態 (MB - COMT) の2つの形態で存在する。サイトゾルタンパク質として、S - COMTはほとんどの組織で主要な形態であり、内在性および生体異物性カテコールの不活性化においてより重要な役割を果たす。ラットとヒトのCOMTは81%の配列同一性を共有し、どちらも構造的に高度に保存されたSAM依存性メチルトランスフェラーゼフォールドファミリーに属する。本発明の主な焦点はヒトにおける新規COMT阻害剤の効力であるので、組織内で過剰発現させた組換えヒトCOMTタンパク質 (実験手順参照) を阻害アッセイで使用した。以前に記述されているアッセイ法 (Kurkela, Anal Biochem, 2004. 331 (1): 198 - 200) を適用し、S - (5 - アデノシル) - L - メチオニン (AdoMet) の存在下での反応混合物中の基質エスクレチンのスコブレチンへのメチル化を蛍光定量的に測定した。

【0057】

図2は、化合物CPT - 401 (A1)、CPT - 212 (B1)のCOMT阻害曲線を示す。トルカポンおよびエンタカポンを参照として阻害アッセイに含めた。ラット肝ホモジネートにおいてエンタカポンは160 nMのIC₅₀を有し、トルカポンは36 nMのIC₅₀を有することが報告された (Kiss, J Med Chem, 2014. 57 (21): 8692 - 717)。使用されたアッセイでは、トルカポンは、やはり、ヒト組換えCOMTに関してインビトロ実験条件下でエンタカポンより強力であることが認められ、IC₅₀値はそれぞれ、トルカポンについては53 nMおよびエンタカポンについては386 nMであった。アッセイにおいて、リード化合物CPT - 401 (A1)はトルカポンと類似の活性を示し、IC₅₀は54 nMであり、CPT - 212 (B1)は179 nMのIC₅₀を示した。したがって、CPT - 401 (A1)によるCOMTの阻害は、トルカポンの阻害と同様であった。CPT - 212 (B1)は、エンタカポンより高いが、CPT - 401 (A1)およびトルカポンより有意に低いCOMT阻害を示した (図2参照)。

【0058】

副作用は、多くの場合、薬剤の他のタンパク質へのオフターゲット結合によって引き起こされる。エンタカポンと比較してトルカポンの重篤な副作用は、トルカポンと特定のタンパク質との相互作用に起因する可能性が高いが、エンタカポンは相互作用しない。したがって、本発明者らは、示差競合捕獲化合物質量分析 (dCCMS) を用いて、トルカポンと相互作用するがエンタカポンとは相互作用しないタンパク質を同定した。詳細については実験項を参照されたい。

【0059】

酵素3 - ヒドロキシイソブチリル - CoA加水分解酵素 (HIBCH) は、トルカポンおよびCPT - 212 (B1)に結合するが、エンタカポンおよびCPT - 401 (A1)には結合しないことが同定された (図5、図6)。これは、2つの分子対の共通の構造的な特徴によって説明することができる：トルカポンおよびCPT - 212 (B1)は、2つの芳香族部分が互いに傾斜した立体配座をとる。この立体配座はHIBCH結合ポケットにきっちりと適合する (データは示していない)。エンタカポン、さらにそれ以上にCPT - 401 (A1)は、全体的な平面立体配座をとる傾向があるか、またはこれに限定される。

【0060】

本発明者らは、トルカポン、エンタカポン、CPT - 401 (A1)およびCPT - 212 (B1)のミトコンドリア細胞毒性を比較した。トルカポンおよびCPT - 212 (B1)のミトコンドリア細胞毒性は、エンタカポンおよびCPT - 401 (A1)の細胞毒性よりも有意に高いことが実証された (図7)。

【0061】

本発明の化合物である新規COMT阻害剤CPT - 401 (A1)は、トルカポンと比較して低いオフターゲット結合およびエンタカポンと比較して高い効力を示す。したがって

10

20

30

40

50

、これは、低いミトコンドリア細胞毒性を有する強力な新規COMT阻害剤であり、パーキンソン病の治療のための有望な化合物である。

【0062】

本発明の化合物の他の適応症は、アルツハイマー病、多剤耐性結核ならびに肥満および代謝疾患である。

【0063】

COMTの阻害に加えて、エンタカポンおよびトルカポンは、 α -シヌクレインモノマーの凝集を阻害することが示されている。これは、パーキンソン病の治療における第二の有益な効果を構成する。

【0064】

COMT阻害剤であるエンタカポンおよびトルカポンは、 $A\beta 42$ プロトフィブリルの成熟アミロイドフィブリルへの凝集を、おそらくプロトフィブリルとの直接相互作用によって、阻害することも示されている(Di Giovanni, J Biol Chem. 2010 May 14; 285(20): 14941-54)。したがって、CPT-401(A1)は、アルツハイマー病の治療および予防のために使用し得る。

【0065】

COMT阻害剤であるトルカポンおよびエンタカポンは、既存の結核薬が標的とする酵素、エノイル-アシル輸送タンパク質レダクターゼ(InhA)に結合し、これを阻害することが示されている(Kinnings, PLoS Comput Biol. 2009 Jul; 5(7): e1000423)。InhAは、II型脂肪酸の生合成およびその後の細菌細胞壁の構築に必須である。イソニアジドおよびエチオナミドのような既存の結核薬は、同じ標的に結合するが、全く異なる化学構造を有し、重篤な副作用を引き起こし得る。さらに、これらの薬剤に対する細菌耐性機構がますます観察されている。したがって、CPT-401(A1)は、多剤耐性(MDR)および超多剤耐性(XDR)結核の治療に使用し得る。

【0066】

COMT阻害剤であるエンタカポンは、脂肪塊および肥満関連遺伝子産物(FTO)に結合し、これを阻害することが示されている。エンタカポンの投与は、トリグリセリド合成の減少、体重減少および血清コレステロールレベルの低下をもたらす(国際公開第2014/082544号)。したがって、CPT-401(A1)は肥満治療に使用し得る。

【0067】

実験項：

合成：

別段の記載がない限り、すべての反応は、アルゴン下に乾燥ガラス器具中で実施した。市販の高品位試薬および溶媒を、受領したままでそれ以上精製することなく使用した。カラムクロマトグラフィは、予め充填された「Grace Resolve(商標)シリカ」カラムを固定相として使用して、Teledyne Isco.の「CombiFlash」Companionシステムで実施した。MPLC精製は、Buechiシステム(BuechiコントロールユニットC-620; 2つのBuechiポンプモジュールC-605; カラム-オムニフィット(230×15mm); 固定相-LiChroprep RP-select B 25-40 μ m; Buechi UV光度計C-635; BuechiフラクションコレクターC-660; 移動相A: 0.1% AcOH(ミリポアグレード); 移動相B: MeCN(prepsolvグレード)で実施した。LC-MSは、ESIイオン源を介してBruker amaZon Speedイオントラップに接続されたDionex Ultimate 3000 RS HPLCで行った。LC法: 化合物を20% MeCN中で約5 μ Mに希釈し、その50 μ Lを注入した。試料をPhenomenex Luna PFPカラム(50×2mm、3 μ m、100 $\text{\AA}$)上で、5.5分で10%~100%Bの直線勾配で分離した。移動相A: 0.1% HCOOH(ミリポアグレード); 移動相B: MeCN(LC MSグレード)。BrukerのAdvance 400(400MHz)で、プロトン核磁気共鳴(^1H NMR)スペクトルおよび炭素核

10

20

30

40

50

磁気共鳴 (^{13}C NMR) スペクトルを記録した。化学シフトは、 ^1H NMR について $d\text{-DMSO}$ ($\delta 2.50$) および CDCl_3 ($\delta 7.27$) に対して ppm で報告する。

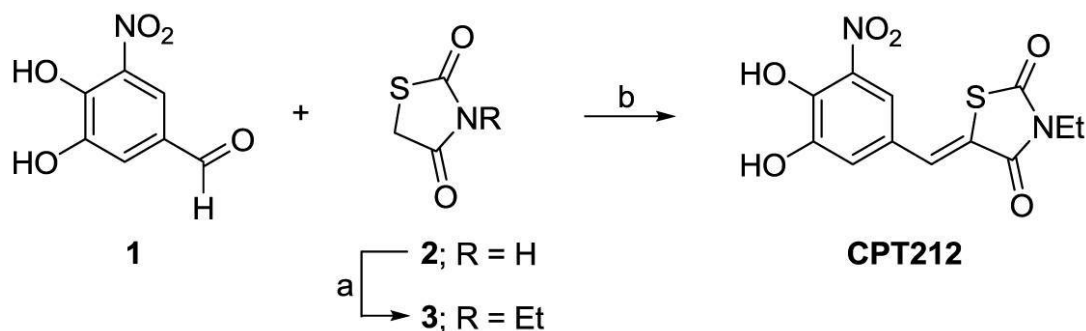
【0068】

2つの新規阻害剤 CPT-401 (A1) および CPT-212 (B1) の合成を、それぞれスキーム1および2に示す。

【0069】

化合物 CPT-212 (B1) は、市販の 3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロベンズアルデヒド 1 を用いたアルキルチアゾリジン-2,4-ジオン誘導体 3 のピペリジン促進縮合反応 (参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2006/142303 号) によって入手可能であった (スキーム1)。

【化14】



【0070】

スキーム1 新規 COMT 阻害剤 CPT-212 の合成。試薬および条件: (a) 臭化エチル、DIPEA、DMF、23、4日間、89%; (b) ピペリジン、MeOH、80、17時間、66%。

【0071】

二環式ニトロカテコール CPT-401 (A1) は、市販の 3,4-ジメトキシ安息香酸 4 から出発する 8つの合成工程で合成した (スキーム2)。

【0072】

化合物 4 を、その後の酸性条件下でのホルムアルデヒドとの環化反応および還元的開環によってビスアルコール 6 に変換した (Maziane, Tetrahedron Letters, 2001, 42(6), 1017-1020)。1,2-ビス(クロロメチル)-4,5-ジメトキシベンゼンから出発し、続いて酢酸で二重置換し、けん化する代替的な経路は、より実用的であるように思われるが、収率がより低かった。ビスアルコール 6 のスワーン酸化は良好な収率でビスアルデヒド 7 を生じたが、二酸化マンガン促進酸化は主にラクトン 5 を生成した。次いで、ビスアルデヒド 7 を、テトラブロミド 8 および無水マレイン酸との環化反応を介して三環式化合物 9 に変換した (McOmie, Synthesis, 1973, 416-417)。無水物 9 をジメチルアミンで開環してモノアミド中間体を形成し、潜在的なカップリング試薬のスクリーニングにより、HATU が両方の合成工程にわたって 62% でビスアミド 10 を生成し、優れていることが示された。三臭化ホウ素促進二重エーテル開裂は 11 を生成し (Naito, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1991, 39(7), 1736-1745)、これを、1つのニトロ基の選択的導入によってニトロカテコール CPT-401 (A1) に変換した (Lemaire, Tetrahedron, 43(5), 835-844)。後者の変換では、硝酸と ACN の両方が予想されたように作用しないと思われ、2,3,5,6-テトラブロモ-4-メチル-4-ニトロシクロヘキサ-2,5-ジエノン は主に二重ニトロ副生成物を生じた。試薬の量を慎重に滴定すると、最終的には適度の収率で所望の生成物が得られた。CPT-401 (A1) の構造は、二次元 NMR 分光法および質量分析法によって確認することができた。

10

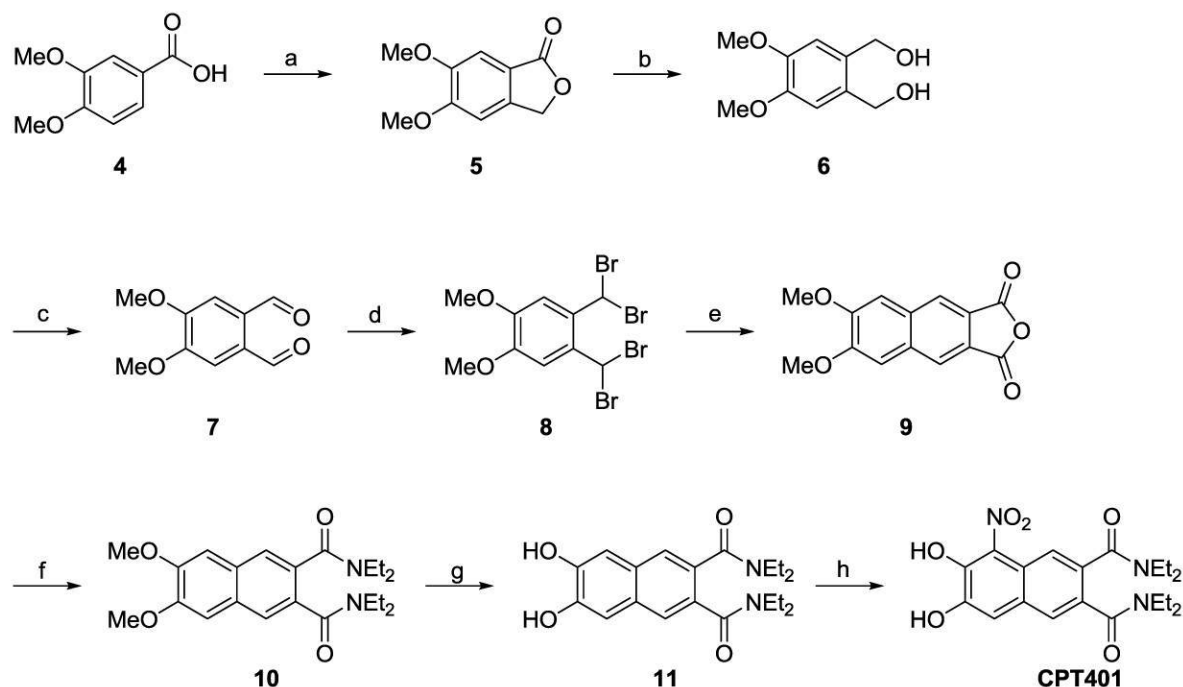
20

30

40

50

【化 15】



【0073】

スキーム2 新規COMT阻害剤CPT-401(A1)の合成。試薬および条件：(a)ホルムアルデヒド、HCl(ガス)、70℃、4日間、93%；(b)LiAlH₄、THF、66℃、4時間、77%；(c)塩化オキサリル、DMSO、TEA、DCM、-78℃、105分→23℃、60分、75%；(d)PBr₅、ベンゼン、23℃、17時間、41%；(e)無水マレイン酸、NaI、DMF、70℃、48時間、69%；(f)ジエチルアミン、HATU、DIPEA、DMF、23℃、48時間、62%；(g)BBr₃、DCM、0℃、20分→23℃、60分、98%；(h)2,3,5,6-テトラブromo-4-メチル-4-ニトロシクロヘキサ-2,5-ジエノン、ジエチルエーテル、23℃、60分、55%。

【0074】

化合物3 乾燥DMF(11.4mL)中のチアゾリジン-2,4-ジオン2(500mg；4.27mmol)および臭化エチル(465mg；4.27mmol)の溶液をDIPEA(2.23mL；12.81mmol)で処理し、23℃で17時間撹拌した。TLCは不完全な変換を示したので、別のバッチの臭化エチル(465mg；4.27mmol)を添加し、反応混合物を23℃でさらに3日間撹拌した。すべての揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をCombiFlash(シクロヘキサン/EtOAc、99/1~3/1)で精製して化合物3(550mg；3.79mmol；89%)を無色液体として得た。¹H NMR(CDCl₃)：δ 3.94(s, 2H), 3.69(q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.20(t, J = 7.1 Hz, 3H)。

【0075】

化合物CPT-212(B1) 乾燥MeOH(2.5mL)中の3,4-ジヒドロキシ-5-ニトロベンズアルデヒド1(185mg；1.01mmol)および化合物3(148mg；1.02mmol)の溶液をピペリジン(155μL；1.57mmol)で処理し、80℃で17時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、0.5M HCl溶液で2回洗浄した。有機層をMg₂SO₄で乾燥し、すべての溶媒を減圧下で除去した。粗生成物をMeOHから再結晶化させて、ニトロカテコールCPT-212(207mg；0.67mmol；66%)を黄色固体として得た。¹H NMR(CDCl₃)：δ 10.85(s, 1H), 7.84(s, 1H), 7.76(s, 1H), 7.38(s, 1H), 6.09(s, 1H), 3.83(q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.2

8 (t , J = 7 . 1 H z , 3 H) 。 L C - M S : r _t = 3 . 2 7 m i n ; 3 0 8 . 8 3 [M - H] ⁻ ; 6 4 0 . 9 2 [2 M + N a - 2 H] ⁻ 。

【 0 0 7 6 】

化合物 5 0 で、H C l ガスをホルムアルデヒド (水中 3 7 % ; 9 0 m L ; 1 . 2 m o l) の溶液に 3 0 分間通気し、3 , 4 - ジメトキシ安息香酸 4 (1 0 g ; 5 4 . 9 m m o l) を添加して、H C l ガスを懸濁液に通気し続けながら、反応混合物を 7 0 に加熱した。3 日後、すべての揮発性物質を減圧下で除去し、水 (2 0 0 m L) を添加した。N H ₃ 水溶液の添加によって p H を p H = 7 に調整した。固体生成物を濾過によって分離し、減圧下で乾燥して、ラクトン 5 (9 . 8 8 g ; 5 0 . 9 m m o l ; 9 3 %) をオフホワイト色固体として得た。¹ H N M R (d - D M S O) : δ 7 . 2 6 (s , 1 H) , 7 . 2 3 (s , 1 H) , 5 . 2 7 (s , 2 H) , 3 . 8 7 (s , 3 H) , 3 . 8 4 (s , 3 H) 。

10

【 0 0 7 7 】

化合物 6 乾燥 T H F (1 7 0 m L) 中のラクトン 5 (7 . 0 g ; 3 6 . 0 m m o l) の溶液を、乾燥 T H F (5 0 m L) 中の水素化アルミニウムリチウム (3 . 6 7 g ; 1 0 8 m m o l) の懸濁液に滴下した。反応混合物を 6 6 で 4 時間攪拌した。0 に冷却した後、引き続いて水 (7 m L) および 5 M N a O H 溶液 (7 m L) を添加して、反応を注意深く停止させた。濾過後に固体を廃棄し、すべての溶媒を減圧下で除去した。水を添加し、生成物を D C M で十分に抽出した。合わせた有機層を M g ₂ S O ₄ で乾燥し、D C M を減圧下で除去して、アルコール 6 (5 . 5 g ; 2 7 . 7 m m o l ; 7 7 %) を得た。¹ H N M R (d - D M S O) : δ 6 . 9 8 (s , 2 H) , 4 . 9 9 (b r , s , 2 H) , 4 . 4 7 (s , 4 H) , 3 . 7 4 (s , 6 H) 。

20

【 0 0 7 8 】

化合物 7 - 7 8 で、乾燥 D C M (2 5 m L) 中のアルコール 6 (2 . 2 g ; 1 1 . 1 m m o l) の溶液を、乾燥 D C M (5 5 m L) 中の塩化オキサリル (1 . 9 4 m L ; 2 2 . 2 m m o l) および D M S O (3 . 4 7 m L ; 4 8 . 8 m m o l) の予め攪拌した溶液に添加し、- 7 8 で 4 5 分間攪拌した。トリエチルアミン (2 1 . 8 4 m L ; 1 5 5 m m o l) を滴下し、反応混合物を - 7 8 でさらに 6 0 分間攪拌し、次いで 2 3 に温め、さらに 6 0 分間攪拌した。水 (2 0 0 m L) の添加によって反応を注意深く停止させ、生成物を D C M で抽出した。合わせた有機層を塩化アンモニウム溶液で洗浄し、M g ₂ S O ₄ で乾燥し、溶媒を減圧下で除去して、アルデヒド 7 (1 . 6 2 g ; 8 . 3 6 m m o l ; 7 5 %) を得た。¹ H N M R (d - D M S O) : δ 1 0 . 5 2 (s , 2 H) , 7 . 5 4 (s , 2 H) , 3 . 9 4 (s , 6 H) 。

30

【 0 0 7 9 】

化合物 8 乾燥ベンゼン (5 5 m L) 中のアルデヒド 7 (1 . 6 g ; 8 . 2 4 m m o l) の溶液をペンタブromoホスホラン (8 . 8 7 g ; 2 0 . 6 m m o l) で処理し、2 3 で 1 7 時間攪拌した。1 % K O H 溶液 (5 0 m L) の添加によって反応を注意深く停止させた。層を分離し、水層を D C M で 2 回抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、M g ₂ S O ₄ で乾燥して、すべての溶媒を減圧下で除去した。粗生成物を C o m b i F l a s h (シクロヘキサン / E t O A c 、 9 / 1 ~ 1 / 1) によって精製して、臭化物 8 (1 . 6 1 g ; 3 . 3 4 m m o l ; 4 1 %) を得た。¹ H N M R (C D C l ₃) : δ 7 . 1 0 (b r , s , 4 H) , 3 . 9 3 (s , 6 H) 。

40

【 0 0 8 0 】

化合物 9 乾燥 D M F (2 0 m L) 中の臭化物 8 (1 . 6 g ; 3 . 3 2 m m o l) および無水マレイン酸 (0 . 7 8 g ; 7 . 9 7 m m o l) の溶液をヨウ化ナトリウム (2 . 3 4 g ; 1 5 . 6 1 m m o l) で処理し、7 0 で 4 8 時間攪拌した。水 (1 0 0 m L) および飽和 N a ₂ S O ₃ 溶液 (2 0 m L) の添加によって反応を停止させた。濾過および減圧下での乾燥後、固体生成物 9 (5 9 1 m g ; 2 . 2 9 m m o l ; 6 9 %) を得た。¹ H N M R (d - D M S O) : δ 8 . 5 2 (s , 2 H) , 7 . 7 6 (s , 2 H) , 3 . 9 7 (s , 6 H) 。

【 0 0 8 1 】

50

化合物 10 乾燥 DMF (200 μ L) 中の三環式化合物 9 (171 mg; 0.662 mmol) の溶液をジエチルアミン (152 μ L; 1.46 mmol) で処理し、23 で 1 時間撹拌した。HATU (302 mg; 0.80 mmol) および DIPEA (231 μ L; 1.32 mmol) を添加し、撹拌を 23 で 48 時間続けた。すべての揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物を MPLC (水/アセトニトリル、4/1 ~ 1/1) で精製してビスアミド 10 (158 mg; 0.409 mmol; 62%) を得た。¹H NMR (CDCl₃): δ 7.59 (s, 2H), 7.10 (s, 2H), 4.01 (s, 6H), 3.52 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.31 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.10 (t, J = 7.1 Hz, 6H)。

【0082】

化合物 11 0 で、乾燥 DCM (16 mL) 中のビスアミド 10 (158 mg; 0.409 mmol) の溶液を BBr₃ 溶液 (DCM 中 1 M; 2.04 mL; 2.04 mmol) で処理した。反応混合物を 0 で 20 分間撹拌し、23 に温め、さらに 60 分間撹拌した。すべての揮発性物質を窒素気流によって除去し、粗生成物を MPLC (水/アセトニトリル、4/1 ~ 1/9) で精製してビスアミド 11 (143 mg; 0.399 mmol; 98%) を得た。¹H NMR (d-DMSO): δ 9.73 (br, s, 2H), 7.50 (s, 2H), 7.17 (s, 2H), 3.37 (q, J = 6.8 Hz, 4H), 3.15 (q, J = 6.8 Hz, 4H), 1.09 (t, J = 6.8 Hz, 6H), 1.04 (t, J = 6.8 Hz, 6H)。¹H NMR (CDCl₃): δ 8.11 (br, s, 2H), 6.83 (s, 2H), 3.54 (q, J = 6.4 Hz, 4H), 3.27 (q, J = 6.4 Hz, 4H), 1.25 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 1.07 (t, J = 6.4 Hz, 6H)。

【0083】

化合物 CPT-401 (A1) 続いて、乾燥ジエチルエーテル (2 mL) 中のビスアミド 11 (15.0 mg; 0.042 mmol) の溶液を乾燥ジエチルエーテル (1 mL) 中の 2, 3, 5, 6 - テトラブromo - 4 - メチル - 4 - ニトロシクロヘキサ - 2, 5 - ジエノン (9.81 mg; 0.021 mmol) の溶液で 3 回処理し、23 で 20 分間撹拌した。TLC は完全な変換を示したので、すべての揮発性物質を窒素気流で除去し、粗生成物を MPLC (水/アセトニトリル、9/1 ~ 3/1) で精製してニトロカテコール CPT-401 (9.2 mg; 0.023 mmol; 55%) を得た。¹H NMR (CDCl₃): δ 12.55 (br, s, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 3.55 - 3.32 (m, 4H), 3.29 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.24 (t, J = 6.9 Hz, 6H), 1.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.12 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。LC-MS: r_t = 2.66 min; 330.98 [M-N(CH₂CH₃)₂]⁺; 404.07 [M+H]⁺; 807.15 [2M+H]⁺; 829.27 [2M+Na]⁺。

【0084】

CCMS による COMT 阻害剤のオンターゲットおよびオフターゲットタンパク質の同定洗練された実験設定でのトルカボンの特異的結合剤を、はるかに大きなセットの複製試料にわたる、いわゆる示差競合実験、用量依存性 CCMS 実験および質量分析データの改善された分析を用いて分析した。この試験の焦点は、ヒト肝細胞株 HepG2 由来の全細胞溶解物に関するものであった。先に報告したように、カテコール部分は COMT 結合ポケットを標的とすると予想され、一方、トルカボンのベンジル側はタンパク質の外側に突出し、カテコール基と反対の方向を向いている。

【0085】

薬剤の異なる部分は、細胞タンパク質と異なる相互作用を生じ、異なる応答を誘導し得る。そのため、捕獲化合物骨格に対するトルカボン選択性機能についての 2 つの結合点をこの試験で使用した (CPT-224: 活性 Tc p - CC および CPT-220: 不活性 Tc p - CC、図 3)。活性方向では、捕獲化合物は公知の標的 COMT と特異的に相互作用できるはずであり、他の方向では、まだ一部のオフターゲットタンパク質との相互作用

10

20

30

40

50

が存在し得る。

【 0 0 8 6 】

C O M T に対する捕獲化合物の活性を試験するために、組織内で発現させた組換えヒト C O M T タンパク質に対する C O M T 阻害アッセイを実施した。

【 0 0 8 7 】

予想されたように、トルカボンがカテコール部分を介して連結された反対方向の捕獲化合物 (C P T - 2 2 0) は、C O M T に親和性を有していなかった。標的と自由に相互作用できるにニトロカテコール部分を残して、トルカボンのベンジル部分を介して結合された捕獲化合物 (C P T - 2 2 4) は、組換えヒト C O M T に対して 6 4 8 n M の I C ₅₀ を示し、これは親分子と比較して約 1 0 倍の活性低下に相当する。

10

【 0 0 8 8 】

肝臓癌由来細胞系 H e p G 2 において C C M S 実験を行うことにより、小型 C O M T 阻害剤のタンパク質相互作用プロフィールを検討した。特異的に相互作用するタンパク質の濃縮および単離を、1 μ M の濃度の不活性捕獲化合物 (C P T - 2 2 0) および活性捕獲化合物 (C P T - 2 2 4) を用いて実施した。示差競合対照実験において、過剰の各遊離小型 C O M T 阻害剤 (トルカボン、エンタカボン、C P T - 4 0 1 (A 1) および C P T - 2 1 2 (B 1)) を添加して、5 0 μ M の最終濃度の特異的結合剤に関して捕獲化合物と競合させた。捕獲され、トリプシン処理されたタンパク質を、高分解能 L T Q O r b i t r a p ハイブリッド質量分析計を用いて同定した。9 9 % を超える確率で同定されたタンパク質および 9 5 % の確率を有する少なくとも 2 つのユニークペプチドだけを、十分な信頼度で同定されたと見なした。競合対照実験では、特異的結合部位に関して対応する C C と競合する過剰の各遊離薬剤を添加した。

20

【 0 0 8 9 】

予想されたように、C O M T は不活性捕獲化合物 (C P T - 2 2 0) では同定されず、3 つのタンパク質は本発明者らの基準を満たし、4 つの異なる競合物質すべてと競合し、これらのタンパク質は、ピリドキサルキナーゼ (P D X K)、アルド - ケトレダクターゼファミリー 1 メンバー B 1 0 (A K R 1 B 1 0) およびプロテイン N i p S n a p ホモログ 3 A (N I P S N A P 3 A) である (表 1)。活性捕獲化合物 (C P T - 2 2 4) を適用すると、本発明者らの基準を満たし、4 つの異なる競合物質すべてと競合した他の 3 つのタンパク質 (キヌレニン - オキシグルタル酸トランスアミナーゼ 3 (C C B L 2)、1 , 2 - ジヒドロキシ - 3 - ケト - 5 - メチルチオペンテンジオキシゲナーゼ (A D I 1) およびグルタリル C o A デヒドロゲナーゼ (G C D H)、表 1) と共に、C O M T は最も堅固に同定されたタンパク質であった。

30

【 0 0 9 0 】

主な関心は、活性トルカボン捕獲化合物を使用した場合に異なる競合特異性を示すタンパク質にあり、このいわゆる示差競合 d C C M S は、この小分子 C O M T 阻害剤の毒性を引き起こす潜在的オフターゲットの同定を可能にした。実験において、タンパク質 H I B C H は、本発明者らが 4 つの競合物質を用いて特異的に同定したタンパク質を比較した場合、ユニークな捕獲パターンを示す。H I B C H は、トルカボンを競合物質として使用した場合に特異的に同定されたが、エンタカボンの存在下では競合は観察されなかった。興味深いことに、C P T - 2 1 2 (B 1) を競合物質として使用した場合、H I B C H は特異的に競合し、C P T - 4 0 1 (A 1) を使用した場合は競合が観察されなかった。図 5 A は、4 つの異なる C O M T 阻害剤を用いた H I B C H 強度の捕獲パターンを示す。

40

【表 2】

タンパク質	Uniprot ID	完全な名称	MW [kDa]	アッセイ				CPT-212		
				MS/MS	MS/MS	Fc	P値	MS/MS	Fc	P値
ADI1	Q9BV57	1,2-ジヒドロキシ-3-ケト-5- メチルチオペンテン ジオキシゲナーゼ	21	4,3	0,3	3.67	4.8E-5	0,3	4.29	3.9E-4
CCBL2	Q6YP21	キヌレニン- オキシグルタル酸 トランスアミナーゼ3	51	7,3	2,6	3.05	3.0E-4	2	3.40	3.1E-4
COMT	P21964	カテコール O-メチルトランスフェラーゼ	30	18	3	34.2	3.0E-5	5	10.90	4.1E-5
GCDH	Q92947	グルタリルCoA デヒドロゲナーゼ	48	7,6	2,6	5.90	2.0E-4	2,3	6.34	1.8E-4
PDXK	O00764	ピリドキサルキナーゼ	35	3,25	0	16	0,001	3,75	24,9	0,0009
AKR1B10	O60218	アルド-ケトレダクターゼ ファミリー1メンバーB10	36	6,5	0,5	4,7	0,007	0	3,1	0,015
NIPSNAP3A	Q9UFN0	プロテインNipSnap ホモログ3A	28	1,25	0	7,5	0,001	0,025	3	0,018

表 1：活性捕獲化合物（上の 4 つのパネル）および不活性トルカポン捕獲化合物（下の 3 つのパネル）を用いた C C M S 実験によって有意に濃縮され、4 つの C O M T 阻害剤すべてと競合したタンパク質。

【 0 0 9 1 】

H I B C H に結合する小分子の検証

トルカポンの H I B C H への結合をさらに調べるために、用量依存性捕獲を実施した。5 μ M ~ 4 0 n M の種々の濃度の C P T - 2 2 0 または C P T - 2 2 4 および競合物質としてトルカポンまたは C P T - 4 0 1 (A 1) を使用した用量依存性捕獲実験の結果を図 5 B に示す。予想されたように、C O M T タンパク質は、最高濃度の C P T - 2 2 0 (5 μ M) での弱い非特異的相互作用を除いて、活性方向の捕獲化合物でのみ再び捕獲され、両方の競合物質（トルカポンおよび C P T - 4 0 1 (A 1) ）との完全な競合が観察された。H I B C H タンパク質については異なる方向で同じことが観察され、H I B C H は不活性方向のトルカポン - C C (C P T - 2 2 0) では同定されなかった。対照的に、H I B C H は、活性方向のトルカポン - C C (C P T - 2 2 4) のみと競合し、C P T - 4 0 1 (A 1) とは競合しなかった。この実験における結合強度の明確な用量依存性および一貫した競合パターンは、d C C M S アッセイの妥当性をさらに強化する。

【 0 0 9 2 】

捕獲化合物の独特の特徴は、捕獲化合物と標的タンパク質との間での共有結合の形成であり、標的タンパク質の係合は、標的タンパク質の同じ結合ポケットに結合する小分子の存在下で競合された。本発明者らは、H e p G 2 溶解物における捕獲アッセイ、続いて抗 H I B C H および抗 C O M T ウェスタンブロットを実施し、質量分析非依存性読み取り法によってこれらのタンパク質に対する種々の競合物質の結合プロフィールを調べた。図 6 A は、H I B C H が C P T - 2 2 4 によって捕獲され、トルカポンまたは C P T - 2 1 2 (B 1) を競合物質として使用した場合は捕獲が消失したが、エンタカポンまたは C P T - 4 0 1 (A 1) では消失しなかったことを示す。さらに、C P T - 2 2 4 の H I B C H への直接架橋は、C C の架橋後の標的タンパク質のビオチン化を検出するストレプトアビジンウェスタンブロットによって確認された（図 6 B）。C O M T ウェスタンブロットを用いて同じ実験を行った（図 6 C）。C O M T への結合は、活性捕獲化合物を用いたアッセイでのみ観察され、トルカポン、エンタカポン、C P T - 4 0 1 (A 1)、C P T - 2 1 2 (B 1) の 4 つの小分子のいずれかを競合物質として使用した場合はシグナルが消失し

、また、4つの競合物質の存在下ではCOMTのビオチン化も消失した(図6D)。この観察は、トルカポン、エンタカポン、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)がすべて強力なCOMT阻害剤であり、CPT-212(B1)のHIBCHへの結合がトルカポンのHIBCHへの結合と同じ結合ポケットで起こり得ることを確認する、質量分析データセット(図5Aおよび5B)と非常に良好に相関する。

【0093】

この仮説を検証するために、COMTおよびHIBCHに対する4つの小分子すべてのドッキング実験を行った。2つの新規COMT阻害剤、CPT-212(B1)およびCPT-401(A1)は、COMTの結合ポケット(活性部位)に適合する。対照的に、トルカポンおよびCPT-212(B1)のような屈曲構造だけがHIBCHの提案された小分子結合ポケット内に深く「もぐり込む」ことができ、カテコールが触媒性グルタミン酸側鎖と相互作用するが、エンタカポンおよびCPT-401(A1)は、ドッキングがカテコール部分の位置に関して制限された場合でも、小分子結合ポケットにもぐり込まない。これは、2つの分子対の共通の構造的特徴によって説明することができる:トルカポンおよびCPT-212(B1)は、2つの芳香族部分が、HIBCHの小分子結合ポケットにきっちりと適合する、互いに対して傾斜した立体配座をとる。しかし、他の2つの阻害剤、エンタカポンおよびCPT-401(A1)は、全体的な平面立体配座をとる傾向があるか、さらにはこの立体配座を獲得するように限定される。

【0094】

COMT阻害剤の細胞毒性結果

以前の公表文献において、本発明者らは、エンタカポンのタンパク質結合剤の細胞分布はミトコンドリア機能への関連性を示さないが、トルカポンのタンパク質結合剤の大部分はミトコンドリア起源、特にミトコンドリア膜であると報告した(Fischer, Toxicol Sci, 2010. 113(1): 243-53)。細胞ベースのアッセイにおいて新規COMT阻害剤の可能性のあるミトコンドリア毒性を評価するために、Mitochondrial Tox Glo(商標)アッセイを実施し、HepG2細胞をガラクトース含有培地またはグルコース含有培地で増殖させ、細胞のATP含量の測定に基づいてミトコンドリア毒性を検出した。ATP産生の減少は、ガラクトース含有培地での増殖のみに関連し、したがって、おそらくミトコンドリア機能不全の結果である。トルカポンおよびエンタカポンに加えて、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)の2つの新しい小分子COMT阻害剤を分析に含めた。上記で報告したように、これらは強力なCOMT結合剤であるが、そのオフターゲットプロファイルに関して異なる。CPT-212(B1)のプロファイルはトルカポンのプロファイルに類似し、CPT-401(A1)はエンタカポンのプロファイルに類似していた。

【0095】

このアッセイの結果(図7)は、トルカポンに関して、グルコース培地と比較してガラクトース培地では4倍以上低いIC₅₀値が観察されることを示し、これは、トルカポンがミトコンドリア毒性物質であることを示唆する。対照的に、エンタカポンについてははるかに小さい作用が認められた。これらの結果は、トルカポン標的タンパク質のミトコンドリア局在を明らかにした、本発明者らによって実施された以前の試験の所見をさらに支持する。興味深いことに、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)のミトコンドリア毒性を比較すると、CPT-401(A1)についてのガラクトースおよびグルコース培地のIC₅₀値の変化はCPT-212(B1)についての变化よりはるかに小さく、これは、CPT-401(A1)のミトコンドリア毒性がCPT-212(B1)よりも低いことを示す。

【0096】

COMTおよびHIBCHの過剰発現

HIS-S-COMT発現ベクターをOrigene(NM_007310)から購入し、HIBCHのクローニングのためにRNeasy mini Kit(Qiagen)を用いてRNAをHepG2細胞から単離し、SuperScript III逆転写酵素

10

20

30

40

50

(Invitrogen)を用いてこのRNAからcDNAを合成した。HepG2 cDNAを鋳型として使用し、以下のプライマー：5'-gatcgaattcatggggcagcgcgagatg-3' (HIBCH順方向)、5'-gatccttcgagtc aaaaattttcaaatcactgctttcccaaa-3' (HIBCH逆方向)を用いてPCR反応を行い、EcoRIおよびXhoI制限部位を挿入した。以下のプライマー：5'-tgaagggtcggagtc aacggattttggt-3' (G3PDH順方向)および5'-catgtgggccatgaggtccaccac-3' (G3PDH逆方向)を用いたG3PDH PCR反応を、対照として平行して行った。PCR産物および制限産物を、peqGOLD Gel Extraction Kit (peq lab)を用いて精製した。FastDigest制限酵素およびFastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)の存在下に、37℃で2時間、PCRフラグメントおよび標的ベクター (pET28a+, Merck Millipore)の制限を実施した。1時間40分後、CIP酵素をベクター反応に加え、37℃でさらに20分間インキュベートした。連結反応物をT4 DNAリガーゼ (Roche)を用いて16℃で一晩インキュベートした。S-COMTおよびHIBCHを含むDNA構築物500ngをコンピテントBL21大腸菌 (E. coli)細胞の形質転換に使用し、組換えタンパク質の発現をIPTGによって誘導した。遠心分離 (15分、4000g、4℃)によって細胞を回収した。細胞を緩衝液 (COMT: 50mMリン酸塩、300mM NaCl、5mM MgCl₂、pH 7.4、HIBCH: 20mM Tris、500mM NaCl、10mMイミダゾール、0.5% (w/v) Triton X-100、pH 8.0) 5mlに再懸濁し、リゾチームおよびDNアーゼIで処理し、続いて超音波処理することによって破壊した。続く遠心分離からの上清 (サイトゾル画分)を、その後の実験におけるタンパク質源として使用した。

【0097】

COMT活性のマイクロプレートアッセイ

COMT活性測定実験は、基本的に以前に記述されているように実施した (Kurkela, Anal Biochem, 2004, 331(1): 198-200)。手短に述べると、エスクレチン (Sigma-Aldrich) および競合するカテコール基質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、緩衝水溶液 (100mMリン酸塩、5mM MgCl₂、20mM L-システイン、pH 7.4) で反応混合物100μl中2%の最終DMSO濃度に希釈した。すべての試薬を同じ緩衝液に溶解した。各試料について、阻害剤およびエスクレチン溶液を、黒色丸底96ウェルプレートに3組重複してピペットで分注した。阻害剤またはAdoMetを含まない対照を各マイクロプレートに含めた。プレートを氷上に置き、酵素を含むサイトゾル画分を15μg/mlの最終タンパク質濃度になるように添加した。マイクロプレートを37℃に置くことによって5分間のプレインキュベーションを開始し、10μMの最終濃度になるように37℃でAdoMetを添加することによって反応を開始させた。CARY Eclipse 蛍光分光光度計を用いて反応の開始時および60分目に蛍光を測定した。励起波長および発光波長は、それぞれ355nmおよび460nmであった。酵素活性は、60分目の蛍光からアッセイの開始時の蛍光を差し引くことによって評価し、GraphPad Prismを用いて阻害曲線を作成した。

【0098】

捕獲実験

AdoMet 5μM (Sigma-Aldrich)、5×捕獲緩衝液 (caprotec bioanalytics GmbH) 20μlを補充した、HepG2溶解物500μg (InVivo, Germany) またはヒト組換えCOMT 1μgまたはヒト組換えHIBCHタンパク質1μgを用いて捕獲実験を実施し、総容量100μlで4にて30分間、DMSOまたは競合物質50μMと共にインキュベートした。捕獲化合物と共に4にて1時間インキュベートした後、caproBox (Caprotec Bioanalytics GmbH)を用いて試料に10分間照射した。続いて、各々の反

応に5×洗浄緩衝液(WB, caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany) 25 µLを添加することによって緩衝液条件を調整した。次いで、試料をDynabeads MyOne Streptavidin C1 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 50 µLと共に回転ホイール上で4 にて1時間インキュベートした。次いで、磁気ビーズ(caprotec bioanalytics GmbH, Berlin, Germany)を使用する場合に生体分子の便利で効率的な単離のための装置であるcaproMagを使用して、CC-タンパク質コンジュゲートを含むビーズを収集し、1×WB 200 µLで最初に6回洗浄し、次にMSグレードの水で洗浄した。このビーズを、SDS-PAGEまたはタンパク質消化とそれに続くLC-MSによるさらなる分析まで、脱イオン水中に4 で保存した。【0099】

10

タンパク質消化および質量分析

タンパク質捕獲後、ストレプトアビジン磁気ビーズをLC-MSグレードの水(Fluka, St. Louis, MO, USA) 200 µLで2回洗浄した。トリプシン消化のために、ストレプトアビジン磁気ビーズに結合したタンパク質を、50 mM重炭酸アンモニウム9 µLおよびトリプシン1 µL(0.5 µg/µL)(Roche, Germany)と共に温度制御されたシェーカーで37 にて16時間インキュベートした。上清を取り出し、miVac DNA真空遠心機(Genevac, UK)で蒸発乾固させ、質量分析に直接使用した。トリプシン消化物を、Proxeonナノエレクトロスプレーイオン源(Thermo Fisher Scientific, Germany)を介してLTQ-Orbitrap Velos装置(Thermo Fisher Scientific, Germany)に接続されたUltiMate 3000 RSLCnanoシステムで、オンラインナノリットル液体クロマトグラフィタンデム質量分析(nl LC-MS/MS)によって分析した。クロマトグラフィ分離のために、試料を最初に逆相(RP)プレカラム(Acclaim PepMap100)に充填し、RP分析カラム(Acclaim PepMap RSLC C18, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Germany)で分離した。質量分析をデータ依存モードで実施し、その後の衝突誘起解離(CID)フラグメンテーションでのフルスキャンのためにOrbitrap-MSとLTQ-MS/MS取得の間で自動切り替えを可能にした。OrbitrapアナライザでフルスキャンMSスペクトル(m/z 300~2000)を取得した。20個の最も強いイオンを連続的に単離し、CIDを用いて線形イオントラップでフラグメント化した。

20

30

【0100】

MaxQuant(www.maxquant.org, リリース1.4.0.8)で実装された検索エンジンAndromedaを使用して、すべてのMS/MSデータを分析した。6 ppmの前駆体トレランス、0.5 Daのフラグメントイオントレランス、最大2回の切断ミス許容する完全なトリプシン特異性および可変修飾としてメチオニン酸化を用いて、ヒトUniProtKB/Swiss-Protデータベース(リリース2015_02には20203個の検討された配列エントリが含まれる)に対する自動データベース検索を実施した。最大偽発見率は、タンパク質およびペプチドレベルの両方で0.01に設定し、最小ペプチド長として6アミノ酸が必要であった。LC-MS/MS実行間のアライメントのために、ラベルフリー定量オプションを選択した。MaxQuant分析の出力を、caprotec bioanalytics GmbHで実施された標準化された手順に従って後処理してタンパク質強度を正規化し、その後倍数変化およびp値を計算した。

40

【0101】

そのため、捕獲アッセイでLC-MSによって検出され、競合対照実験で有意に減少するタンパク質を特異的であると定義する。特異性は、アッセイと各タンパク質の競合との間の倍数変化によって定量化した。さらに、実験を4回重複して実施し、p値を計算することによって有意性の決定を可能にした。

50

【0102】

ATPlite細胞毒性アッセイ

化合物トルカボン、エンタカボン、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)のミトコンドリア毒性評価(Glu/Gal)はPharmacelecus GmbHによって実施された。簡単に述べると、グルコース培地(22 mMグルコース、1 mMピルビン酸ナトリウム、5 mM Hepes、2 mM L-グルタミン、10 % FCSおよび1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む高グルコースDMEM)またはガラクトース培地(10 mMガラクトース、1 mMピルビン酸ナトリウム、5 mM Hepes、2 mM L-グルタミン、10 % FCSおよび1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む高グルコースDMEM)で培養したHep G2細胞を96ウェルプレートに添加した(100 μ L、 4×10^4 細胞/ウェル)。薬剤処理のために、DMSO中で化合物原液を調製し、ウェルに添加して、示されている最終薬剤濃度を得た。発光ATP検出試薬の添加後の各ウェルの最終DMSO濃度は0.5 %であった。合計100 μ Lの発光ATPlite(PerkinElmer)検出試薬を各ウェルに添加した。プレートシェーカー上で簡単に混合した後、反応物を室温で2分間インキュベートし、2分後にVictor X5プレートリーダーを用いて発光を測定した。

10

【0103】

TMREミトコンドリア膜電位アッセイ

TMREミトコンドリア膜電位アッセイのために、Hep G2細胞を種々の濃度の4つのCOMT阻害剤で処理した。相対的な負電荷のために活性ミトコンドリアに容易に蓄積する、細胞透過性の正に荷電した赤橙色の色素であるTMRE(テトラメチルローダミンエチルエステル)を使用して、活性ミトコンドリアを標識した。4つのCOMT阻害剤間でミトコンドリア膜電位状態の有意差が観察された(図9)。50 μ Mの濃度で、化合物トルカボンおよびCPT212は、膜電位を未処理Hep G2細胞の20 ~ 30 %未満に抑制したが、化合物エンタカボンまたはCPT401を用いると、まだ50 %を超える膜電位が観察された。100 μ Mの濃度のCPT212およびトルカボンは、膜電位を対照の0 ~ 5 %に低下させたが、CPT401およびエンタカボンについては、この濃度で膜電位の40 ~ 50 %が残存した。データは、10 ~ 100 μ Mの濃度でのミトコンドリア膜電位に関して、エンタカボンとCPT401との間、およびトルカボンとCPT212との間の密接な類似性を明らかにする。ミトコンドリア膜電位(MMP)は、活性ミトコンドリアに容易に蓄積する、正に荷電した蛍光色素TMREを用いて測定した。酸化リン酸化のイオノホア脱共役剤であるFCCPを陽性対照として用いた。Hep G2細胞を μ Clear有底黒色96ウェルプレート(約 4×10^4 細胞/ウェル)に播種した。集密に達した後、細胞を個々の規定最終濃度の4つのCOMT阻害剤(トルカボン、エンタカボン、CPT401または3)で、37 °Cおよび5 % CO₂で一晩処理した。培養培地を除去し、新鮮培地と交換し、TMREを200 nMの最終濃度で培地に添加し、細胞を37 °Cおよび5 % CO₂で30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、0.2 % BSAを含むPBSで洗浄し、それぞれ549 nmおよび575 nmの励起フィルタおよび発光フィルタを備えたCary Eclipse蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

20

30

40

【0104】

計算方法

使用されているすべてのソフトウェアツールは、SYBYL x1.2パッケージ(Tripos Inc. St. Louis, MO)に含まれている。分子構造の調製のために、ケルセチン(QUE)および(2R)-3-ヒドロキシ-2-メチルプロパン酸(HIU)との複合体におけるヒト β -ヒドロキシイソブチリルCoA加水分解酵素(HIBCH_HUMAN)の原子座標をPDBファイル3BUTから入手した。構造を、Prepare Proteinツールを使用して前処理し、MMFF力場、MMFF電荷およびPowell勾配アルゴリズム(rmsd 0.5)を用いて最小化した。最小化の間、すべての重原子を凍結した。QUEを除去して触媒部位にアクセスした。配位子構造は、L

50

ig and Toolを用いて2Dスケッチ(ChemDraw)から得た：構造を標準化し、互変異性体を生成した(荷電原子の数=4)。カテコールジアニオンを部分構造SMARTSフィルタ($O[-1]C:CO[-1]$)で除去し、Concord Standaloneを用いて互変異性体当たり1つの3D構造を生成した。カテコールおよびニトロ基上の原子タイプは以下のように設定した：SPLスクリプトを使用して、 $O \rightarrow O.co2$; $N \rightarrow N.pl3$ 。得られた構造を、デフォルト設定(Tripof F、 $rmsd = 0.05$)およびGasteiger-Marsilliの電荷を使用して最小化した。HIBCHと、推定阻害剤であるトルカボン、エンタカボン、CPT-212(B1)およびCPT-401(A1)との間の無制限のフレキシブルドッキングをSurflex-Dockで実施した。共結晶生成物HIUを抽出し、HIUに基づいてプロトモルを生成した。タンパク質の柔軟性(水素および重原子)を許容し、10個の開始立体配座を生成した。それ以外は、デフォルト設定を使用した。ドッキングスコア、カテコール位置およびタンパク質に関して、100ポーズをサンプリングし、検討した。トルカボンの最良ドッキングポーズをカテコールフラグメントの基礎として使用した。弱く制限されたフラグメント配置($cpen = 10$)を用いてドッキングを繰り返した。

【0105】

略語：

CAN、硝酸第二セリウムアンモニウム；CC、捕獲化合物；CCMS、捕獲化合物質量分析法；dCCMS、示差競合捕獲化合物質量分析法；DCM、ジクロロメタン；DIPA、N,N-ジイソプロピルエチルアミン；DMF、N,N-ジメチルホルムアミド；DMSO、ジメチルスルホキシド；HATU、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート；TEA、トリエチルアミン；THF、テトラヒドロフラン。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】トルカボン、エンタカボンおよび2つのリードCOMT阻害剤CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)の化学構造を示す。

【図2】トルカボン、エンタカボン、CPT-401(A1)およびCPT-212(B1)によるヒト組換えCOMTの阻害を示す。

【図3】不活性(カテコール官能基を介した結合、CPT-220)および活性(遊離カテコール官能基を有するベンジル基を介した結合、CPT-224)方向のトルカボン捕獲化合物の化学構造を示す。

【図4】活性トルカボン捕獲化合物(CPT-224)および不活性トルカボン捕獲化合物(CPT-220)によるヒト組換えCOMTの阻害を示す。

【図5A】平均MS/MSおよびdCCMS実験で同定されたHIBCHの正規化強度を含む示差競合捕獲化合物質量分析実験の結果を示す：A：アッセイ；C1：競合物質としてのトルカボン；C2：競合物質としてのエンタカボン；C3：競合物質としてのCPT-401(A1)；C4：競合物質としてのCPT-212(B1)。データは平均プラスSDである($n = 4$)。表は、異なる競合物質(C1：トルカボン、C2：エンタカボン、C3：CPT-401(A1)、C4：CPT-212(B1))とCPT-224を用いた捕獲実験におけるFCおよびHIBCHタンパク質のp値を示す。

【図5B】5 μ M ~ 40 nMの種々の濃度のCPT-220またはCPT-224を用いた用量依存性捕獲実験を示す。左パネル：COMTタンパク質のCCMS結果；右パネル：HIBCHタンパク質のCCMS結果；アッセイ：CPT-220またはCPT-224によるアッセイ；C1/Tcp：CPT-220またはCPT-224の存在下での競合物質としてのトルカボン；C3/CPT-401：競合物質としてのCPT-401(A1)。データは平均プラスSDである($n = 4$)。

【図6】示差競合捕獲化合物架橋後のウェスタンブロットによるCOMTおよびHIBCHの検出を示す：Tcp-CC(CPT-224)は組換えHIBCH(左パネル)および組換えCOMT(右パネル)を捕獲する。(A)、抗HIBCHウェスタンブロットは

10

20

30

40

50

H I B C Hタンパク質の同定を実証する。(B)、抗ストレプトアビジンウェスタンブロットは、C P T - 2 2 4とH I B C Hの架橋を実証する。反応は、T c pおよびC P T - 2 1 2 (B 1)の存在下で競合したが、E c pおよびC P T - 4 0 1 (A 1)の存在下ではH I B C Hの競合は観察されなかった。(C)、抗C O M TウェスタンブロットはC O M Tタンパク質の同定を実証する。(D)、抗ストレプトアビジンウェスタンブロットは、C P T - 2 2 4とC O M Tの架橋を実証する。反応は、T c p、E c p、C P T - 4 0 1 (A 1)およびC P T - 2 1 2 (B 1)の存在下で競合した。

【図7】トルカポン、エンタカポン、C P T - 4 0 1 (A 1)およびC P T - 2 1 2 (B 1)を用いた細胞ベースのミトコンドリア毒性アッセイの結果を示す。ガラクトース含有培地での増殖に関連するA T P産生の減少は、ミトコンドリア機能不全を示す。X軸：A T P濃度；Y軸：試験化合物の濃度。

10

【図8】C O M T阻害剤の化学構造ならびに2 μ Mおよび0 . 1 μ M濃度でのC O M T阻害アッセイの結果を示す。A：トルカポン、エンタカポン。B：C P T - 4 0 1 (A 1)の誘導体。C：C P T - 2 1 2 (B 1)の誘導体。

【図9】T M R Eミトコンドリア膜電位試験を用いた、H e p G 2細胞におけるミトコンドリア膜電位へのトルカポン、エンタカポン、C P T - 2 1 2 (B 1)またはC P T - 4 0 1 (A 1)の用量依存的な作用(対照のパーセント)を示す。データは平均S Dである(n = 6)。

20

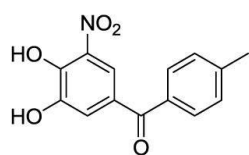
30

40

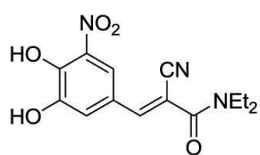
50

【図面】

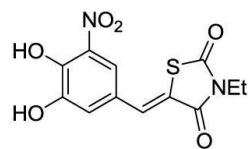
【図 1】



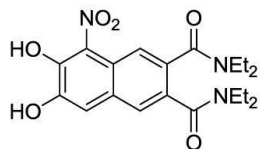
トルカポン



エンタカポン

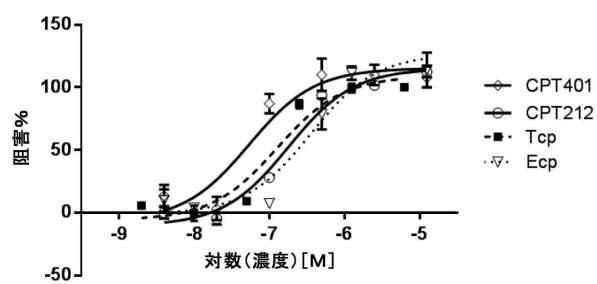


CPT-212



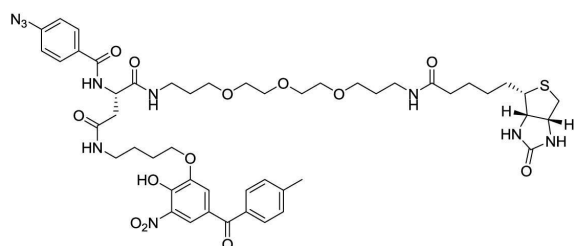
CPT-401

【図 2】

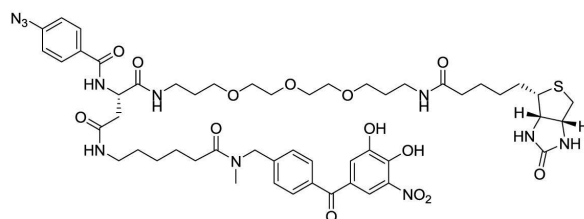


10

【図 3】

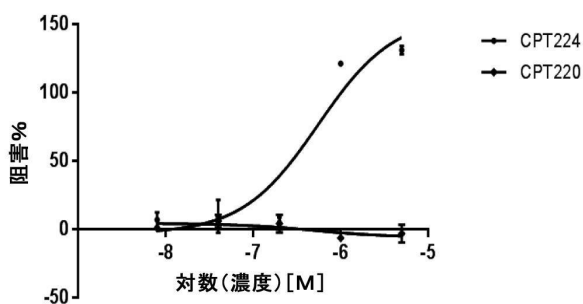


不活性TCP-CC(CPT-220)



活性TCP-CC(CPT-224)

【図 4】



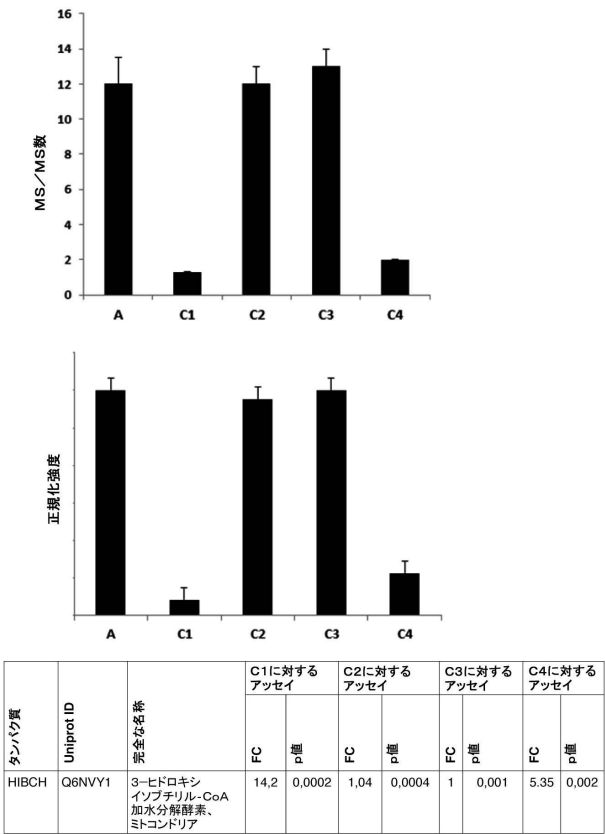
20

30

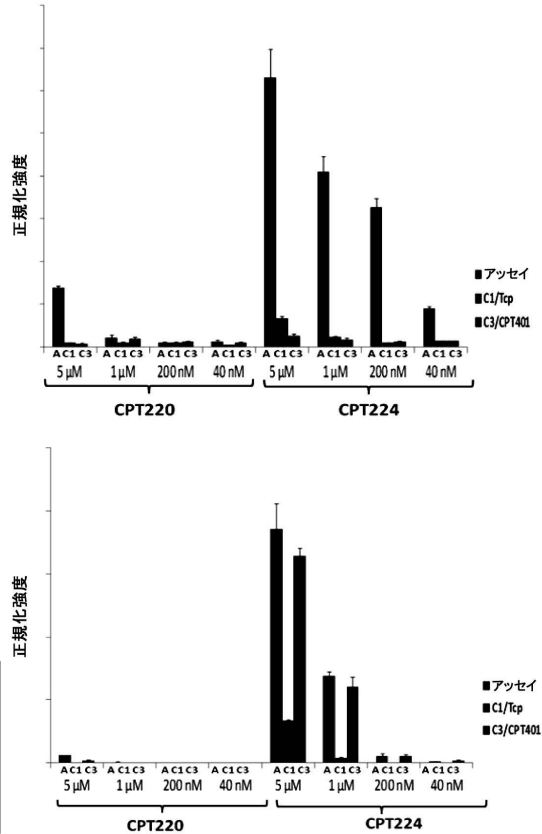
40

50

【図 5 A】



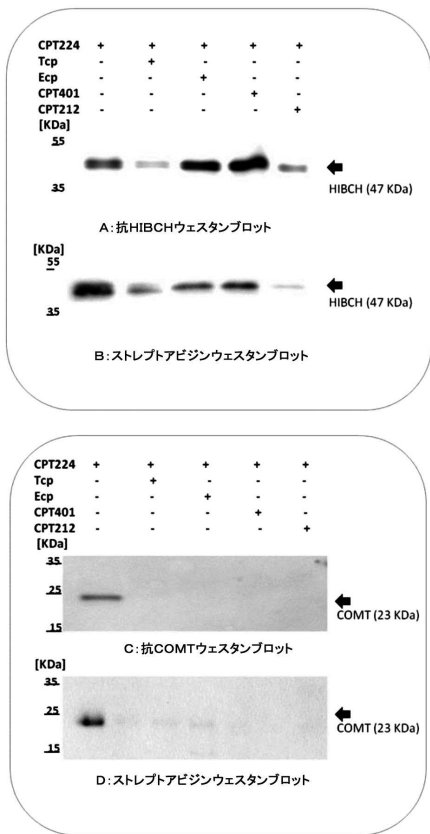
【図 5 B】



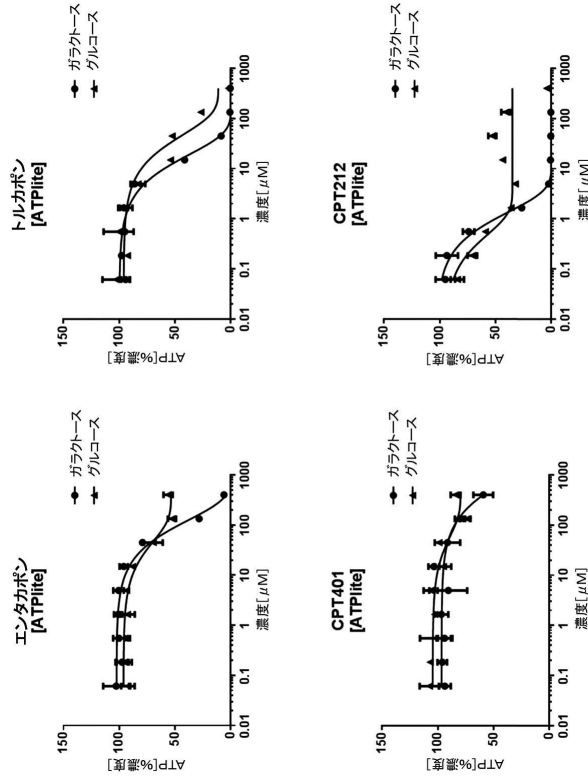
10

20

【図 6】



【図 7】

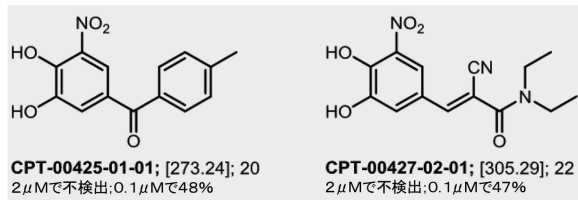


30

40

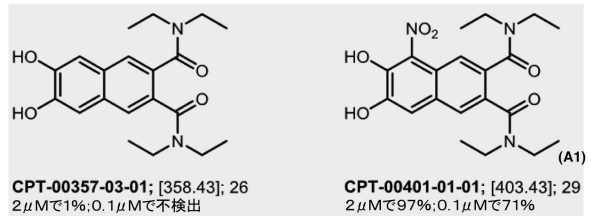
50

【図 8 A】

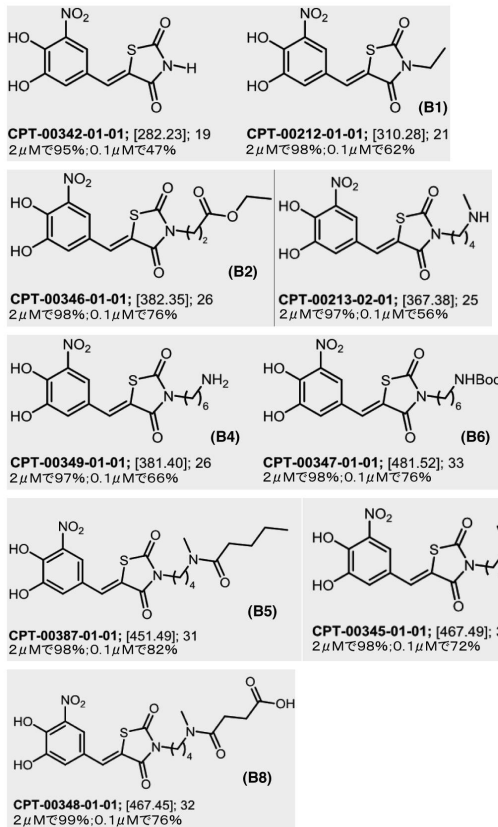


トルカボン(CPT-425)およびエンタカボン(CPT-427)

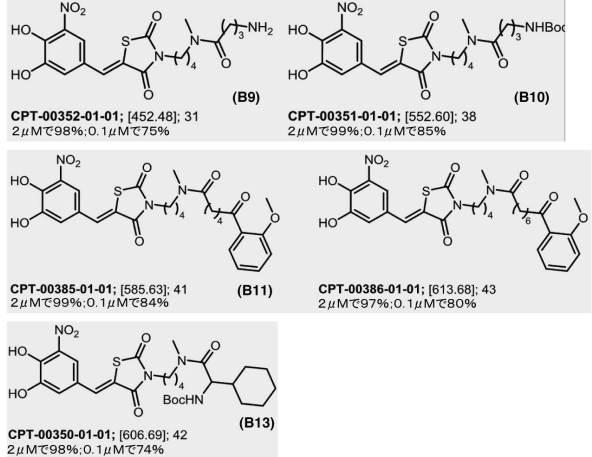
【図 8 B】



【図 8 C - 1】



【図 8 C - 2】



10

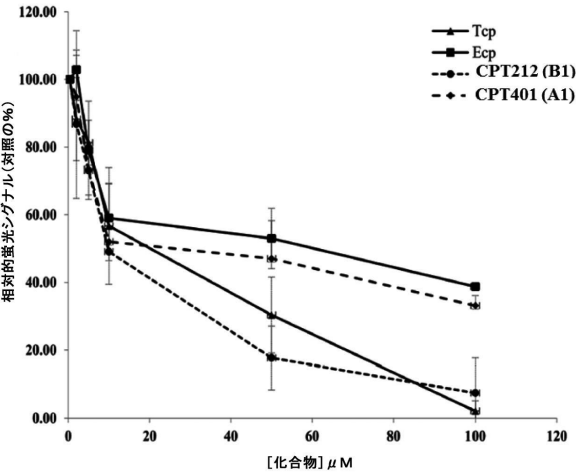
20

30

40

50

【 図 9 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 P	3/04
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	9/107(2006.01)	A 6 1 K	9/107
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 K	9/20 (2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	9/72 (2006.01)	A 6 1 K	9/72
A 6 1 K	31/425 (2006.01)	A 6 1 K	31/425

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

イヒ、イム シュテイングルント 4 - 6

(72)発明者 シュリーフ、マレン

ドイツ連邦共和国 1 0 2 4 7 ベルリン、ミュッゲルシュトラッセ 1 1 アー

(72)発明者 ドレガー、マシアス

ドイツ連邦共和国 1 0 4 0 5 ベルリン、イマニエルキルヒシュトラッセ 2 0

(72)発明者 シュレイ、アンナ カー

ドイツ連邦共和国 1 0 1 7 9 ベルリン、ルンゲシュトラッセ 1 2

(72)発明者 セフコウ、ミハヤエル

ドイツ連邦共和国 1 3 1 2 5 ベルリン、ロベルト - レスレー - シュトラッセ 1 0

(72)発明者 クロル、フリードリッヒ

ドイツ連邦共和国 4 8 2 4 9 デュルメン、ハニングホフ 3 5

(72)発明者 ケスター、ヒューバート

スイス国 ツェハー - 6 9 2 2 モルコテ、ストラダ コンス . アキーレ イセラ 3

(72)発明者 オーレンドルフ、ダニエル

ドイツ連邦共和国 1 2 5 5 5 ベルリン、ファーバーシュトラッセ 3 1

(72)発明者 ルオ、ヤン

ドイツ連邦共和国 1 2 2 0 5 ベルリン、ローザンナー シュトラッセ 3 8

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 3 4 0 1 1 (U S , A 1)

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

特開平 0 2 - 2 6 4 7 4 3 (J P , A)

特開昭 6 3 - 1 1 5 8 3 4 (J P , A)

特開平 0 4 - 1 5 4 7 3 6 (J P , A)

欧州特許出願公開第 0 2 0 1 8 8 4 4 (E P , A 1)

特表 2 0 0 9 - 5 0 1 7 6 9 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 0 2 6 8 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 1 8 9 1 (W O , A 1)

J.Chem.Soc.Perkin Trans.2, 1993年, 4, P.721-727

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 C 2 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0

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