

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6887389号
(P6887389)

(45) 発行日 令和3年6月16日(2021.6.16)

(24) 登録日 令和3年5月20日(2021.5.20)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K 31/44	(2006.01)	A 6 1 K 31/44
A 6 1 K 31/4164	(2006.01)	A 6 1 K 31/4164
A 6 1 K 31/381	(2006.01)	A 6 1 K 31/381
A 6 1 K 31/40	(2006.01)	A 6 1 K 31/40
A 6 1 K 31/415	(2006.01)	A 6 1 K 31/415

請求項の数 11 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-560888 (P2017-560888)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月11日 (2016.2.11)
 (65) 公表番号 特表2018-510904 (P2018-510904A)
 (43) 公表日 平成30年4月19日 (2018.4.19)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/017504
 (87) 國際公開番号 WO2016/130774
 (87) 國際公開日 平成28年8月18日 (2016.8.18)
 審査請求日 平成31年2月8日 (2019.2.8)
 (31) 優先権主張番号 62/114,840
 (32) 優先日 平成27年2月11日 (2015.2.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 514038856
 アイカーン スクール オブ メディスン
 アット マウント サイナイ
 Icahn School of Medicine at Mt. Sinai
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100
 29, ニューヨーク、ワン ギュスター
 ヴエル、レヴィ プレイス、ボックス
 1675

最終頁に続く

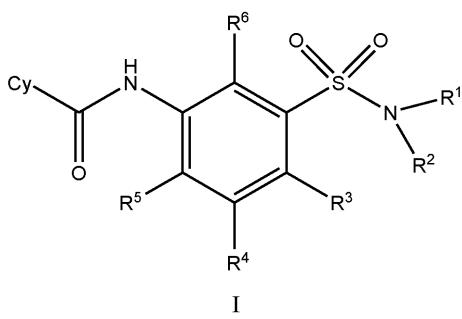
(54) 【発明の名称】ニーマン・ピック病および他のリソソーム蓄積障害のための n p c 1 のベンゼンスルホンアミド上方制御剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I

【化 1】



10

(式中、

R¹ は、水素原子および(C₁ - C₆)アルキル基から選択され、R² は、メタ置換フェニル基およびパラ置換フェニル基から選択され、ここで、前記フェニル基上の置換基は、(C₁ - C₆)アルキル基、ハロゲン基、ハロ(C₁ - C₆)アルキル基、及び(C₁ - C₆)アルコキシ基から選択され、またはR¹ およびR² は、これらが結合している窒素原子と共に、場合により置換されることがある单環式複素環を形成し、R³、R⁴、R⁵ およびR⁶ は、独立して、水素原子、(C₁ - C₆)アルキル基、ハロ

20

ゲン基、ヒドロキシ基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、ハロ($C_1 - C_6$)アルキル基、($C_1 - C_6$)アルコキシ基、および、アミン基または飽和窒素複素環で置換された($C_1 - C_6$)アルコキシ基から選択され、

Cyは、場合により置換されることがあるピラゾール基、ピロール基、チアゾール基、イミダゾール基、オキサゾール基、ピリジン基、ピリダジン基、ピリミジン基、及びチオフェン基から選択される。)の化合物を含む、リソソーム蓄積障害の治療用医薬組成物。

【請求項 2】

前記障害が、スフィンゴリピドーシスおよびムコ多糖症から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記障害が、ニーマン・ピックC、ニーマン・ピックA/B、ファブリー病、ファーバー病、ウォルマン病、ゴーシエ病、クラッペ病、MPS VII(ムコ多糖症VII)、神経セロイドリポフスチン症2型(CLN 2)および糖原病I型(ポンペ病)から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

Cyが、置換ピロール基、および場合により置換されることがあるピリジン基またはイミダゾール基から選択される環であり、ここで、前記環上の前記置換基が、($C_1 - C_7$)炭化水素基、($C_1 - C_6$)アシル基、ハロ($C_1 - C_6$)アルキル基、($C_1 - C_{10}$)オキサアルキル基およびハロゲン基から選択される、請求項1~3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

R¹およびR²が、これらが結合している窒素原子と共に、場合により置換されることがある複素環を形成し、前記複素環が、ピロリジン、ピペリジン、アゼピン、モルホリンおよびピペラジンから選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

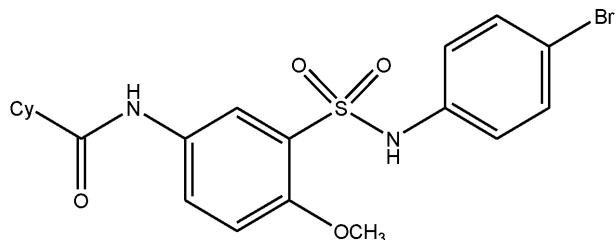
【請求項 6】

R³が、水素原子、メチル基、エチル基、メトキシ基、ジメチルアミノプロポキシ基およびヒドロキシ基から選択され、R⁴およびR⁶が水素原子であり、かつR⁵が水素原子またはフッ素原子である、請求項1~5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

式：

【化2】



(式中、Cyはメチル置換ピリジン環、イミダゾール、又は置換イミダゾールである。)の化合物。

【請求項 8】

Cyの置換基が($C_1 - C_7$)炭化水素基、($C_1 - C_6$)アシル基、ハロ($C_1 - C_6$)アルキル基、($C_1 - C_{10}$)オキサアルキル基およびハロゲン基から選択される、請求項7に記載の化合物。

【請求項 9】

Cyが、4-メチルピリジン-3-イル、イミダゾール-4-イルおよび2-フェニルイミダゾール-4-イルから選択される、請求項7又は8に記載の化合物。

【請求項 10】

医薬として許容される担体、および式：

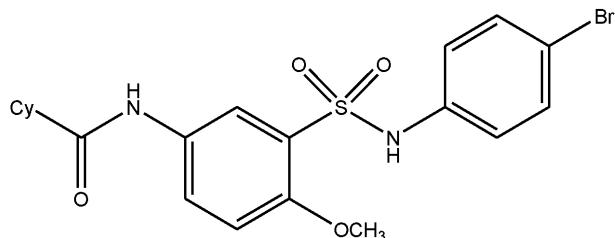
10

20

30

40

【化3】



(式中、Cyは、メチル置換ピリジン環、イミダゾール基または置換イミダゾール基である。)の化合物を含む医薬組成物。

10

【請求項11】

Cyが、4-メチルピリジン-3-イル、イミダゾール-4-イルおよび2-フェニルイミダゾール-4-イルから選択される、請求項10に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2015年2月11日に出願された米国特許仮出願第62/114566号からの優先権を主張し、その内容の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【政府の権利に関する記載】

【0002】

本発明は、国立衛生研究所から受けたMHO89537の下で政府の支援によってなされた。政府は、本発明にある一定の権利を有する。

20

【技術分野】

【0003】

本出願は概して、リソソーム蓄積障害を治療するための方法および組成物に関する。本方法は、ベンゼンスルホンアミドの属、特にN-[3-(アミノスルホニル)フェニル]ベンズアミドおよびヘテロアリールアミドを投与するステップを含む。

【背景技術】

【0004】

リソソーム蓄積症(LSD)としても知られているリソソーム蓄積障害は、特定のリソソームタンパク質の欠乏に起因する、約60の比較的まれな遺伝性代謝異常のグループである。ほとんどのリソソーム加水分解酵素は連続的に働いて、それらの基質から末端残基を除去するため、1つの酵素の欠乏が異化経路全体の成分を蓄積させる原因となるが、その理由は、経路下流のリソソーム酵素による加水分解のための基質がもはや利用できないからである。未消化物質はリソソームに閉じ込められたままであり、肥大した区画内の沈着物として見える。このグループの障害は、蓄積した基質：ムコ多糖、糖タンパク質、グリコーゲンまたはスフィンゴリピドにしたがって分類される。個別には、LSDは1:100,000未満の発生率で起こる。しかし、グループとしては、発生率は約1:5,000~1:10,000である。これらの障害のほとんどは、ニーマン・ピック病、C型(NPC)などの常染色体劣性遺伝性であるが、少数はファブリー病およびハンター症候群(MPS II)などのX連鎖劣性遺伝性である。

30

【0005】

最近の総説[Nature Reviews Neurology 9, 583 (2013)]は、現在リソソーム蓄積症と見なされている60程度の障害について述べている。それらのうちのいくつかを、以下でさらに詳細に説明する。

40

【0006】

ニーマン・ピック病は、コレステロール、スフィンゴミエリンおよび他の脂質がリソソーム内に蓄積する遺伝性の重度の代謝障害のグループを指す。重度の形態は、幼児期には致死的である。より軽度の形態の人々は、10代または青年期まで生存する場合がある。ニーマン・ピックC型は、生化学的、遺伝的および臨床的にニーマン・ピックA型および

50

B型とは異なる。A型およびB型では、酸性スフィンゴミエリナーゼの完全または部分的欠乏が存在する。ニーマン・ピックC型では、主要な変異遺伝子N P C 1のタンパク質産物は酵素ではなく、エンドソーム・リソソーム系の輸送体として機能するようであり、その欠乏は、コレステロール、スフィンゴリビド、ガングリオシドおよび脂肪酸のエンドソーム・リソソーム系内での蓄積につながる。N P Cは常に致命的である。N P Cの小児の大半は20歳前に死亡する（多くは10歳前に死亡する）。N P Cの人が40歳に達することは極めてまれである。進行性の神経疾患は、ニーマン・ピック病C型の特徴であり、幼児期を超えたすべての症例において能力障害および早死の原因となる。古典的には、N P Cの小児は、認知低下が顕在化する前に、正常な発達マイルストーンスキルへの到達の遅れが最初に生じる場合がある。神経学的徴候および症状には、非協調的な四肢運動、不明瞭発語、嚥下困難、振戦、癲癇、垂直性核上麻痺、ジストニア、下垂、小頭症、精神障害、進行性認知症、進行性難聴、双極性障害、幻覚、妄想、緘黙または昏迷を含み得る精神病性大うつ病が含まれるニーマン・ピック病C型の末期では、患者は、完全な眼筋麻痺、重度の認知症および随意運動の消失を伴う寝たきりになる。

【0007】

ファブリー病は、X連鎖的に遺伝するリソソーム蓄積症である。ファブリー病は広範囲の全身症状を引き起こす可能性がある。-ガラクトシダーゼA活性があったとしてもほとんどの古典的に罹患した男性は、主として心臓、肝臓、腎臓、皮膚および脳の血管内皮細胞のリソソーム内に中性スフィンゴ糖脂質、グロボトリニアオシルセラミド（G L - 3）を進行性に蓄積する。古典的な疾患表現型の発症は小児期または青年期に起こり、重度の肢端感覚異常、被角血管腫、角膜および水晶体混濁ならびに発汗低下を特徴とする。加齢と共に、心臓、腎臓および脳の血管疾患は、40歳代または50歳代の早死につながる。

【0008】

ファーバー病（ファーバーの脂肪肉芽腫症、セラミダーゼ欠損、「線維芽細胞性ムコ多糖異常症」および「脂肪肉芽腫症」としても知られる。）は、関節、肝臓、咽頭、組織および中枢神経系の異常につながるセラミドの蓄積の原因となる酸性セラミダーゼの欠乏が顕著な、まれな常染色体劣性障害である。疾患発症は、典型的には早期乳児期に起こるが、後年に起こる場合もある。古典的形態のファーバー病を患う小児は、生後数カ月以内に症状を発症する。これらの症状には、発達遅延ならびに声、関節および皮膚の問題が含まれる場合がある。肝臓、心臓、肺および腎臓にも影響が出る場合がある。呼吸困難の患者には、呼吸管が必要な場合がある。ファーバー病の小児のほとんどは、2歳までに、通常肺疾患で死亡する。この疾患の最も重度の形態のうちの1つでは、肝脾腫を出生直後に診断することができる。この形態の疾患を持って生まれた小児は、通常6カ月以内に死亡する。

【0009】

ゴーシェ病は、リソソーム蓄積症の最も一般的なものであり、酵素グルコセレブロシダーゼの遺伝的欠損によって引き起こされ、これはグルコシルセラミドの蓄積をもたらし、最も一般的には骨髄および特定の器官のマクロファージ内に蓄積する。I型（または非神経障害性ゴーシェ）は、この疾患の最も一般的な形態であり、中枢神経系に影響を与えない。これはアシュケナージ系ユダヤ人の遺伝形質の中で最も一般的である。症状の発症はさまざまであり、肝脾腫、骨格虚弱および骨疾患、血小板減少、貧血ならびに疲労を含む場合がある。疾患の発症および重症度に応じて、I型の患者は成人期まで健康に生きる場合もある。II型（または急性乳児神経障害性ゴーシェ病）は、典型的には生後6カ月以内に始まる。I型疾患に伴う症状に加えて、II型の患者は、広範かつ進行性の脳損傷、眼球運動障害、発作、四肢硬直ならびに不十分な吸引および嚥下能力を示すこともある。罹患した小児は、通常2歳までに死亡する。III型（慢性神経障害性ゴーシェ）は、小児期または成人期においても、いつでも始まり得る。IIII型疾患は神経系にも影響を及ぼすが、神経性成分は急性またはII型のバージョンに比べて、より緩徐進行性であり、患者は10代前半および成人期まで生存し得る。

10

20

30

40

50

【0010】

クラッペ病（グロボイド細胞白質ジストロフィーまたはガラクトシルセラミドリピドーシスとしても知られている。）は、神経系のミエリン鞘に影響を及ぼす、まれな、しばしば致命的な変性障害である。これはガラクトシルセラミダーゼの欠乏をもたらすG A L C 遺伝子の突然変異によって引き起こされるスフィンゴリピドーシスの一形態である。この状態は、常染色体劣性様式で遺伝する。クラッペ病を患う乳児は出生時は正常である。症状は月齢3～6ヶ月の間に始まり、この疾患は一般に2歳までには致命的になる。遅発性のクラッペ病患者は、疾患の進行がより遅い傾向がある。米国住民では、クラッペ病は出生10万件に約1件発生する。しかし、1,000件に約6件のさらに高い発生率がイスラエルの特定の地域で報告されており、スカンジナビア諸国では比較的疾患率が高く、出生50,000件に1件と報告されている。

10

【0011】

L S D は、遺伝性代謝疾患のための治療様式の開発のモデルとして長い間役立ってきた。非常に低い正常な酵素レベルでも、さまざまなL S D に罹患した患者由来の培養線維芽細胞の代謝欠損を矯正し得るという観察は、とりわけ、ゴーシェ病1型およびファブリー病の酵素補充療法の開発を成功に導いた。しかし、現在、タンパク質または遺伝子を有する中枢神経系にアクセスすることに伴う重大な問題のために、N P C 1 または神経病理を呈する他の蓄積障害の患者には治療選択肢がない。

20

【発明の概要】

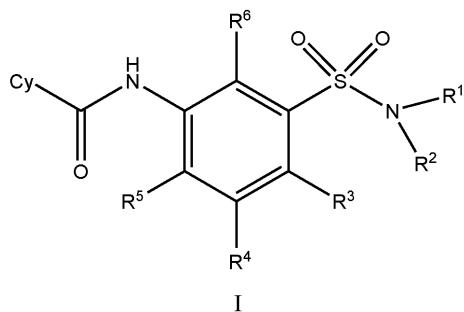
【0012】

本発明は、N P C 1 プロモーターを上方制御し、それによってリソソーム蓄積障害を治療するための医薬組成物および方法を対象とする。

【0013】

本発明は、第1の態様において、式I

【化1】



30

（式中、

R¹ は、水素原子および（C₁ - C₆）アルキル基から選択され、

R² は、（C₁ - C₆）アルキル基、場合により置換されることがあるベンジル基、メタ置換フェニル基およびパラ置換フェニル基から選択され、ここで、ベンジル基またはフェニル基上の置換基は、（C₁ - C₆）アルキル基、ハロゲン基、ハロ（C₁ - C₆）アルキル基、（C₁ - C₆）アルコキシ基およびシアノ基から選択され、または

R¹ およびR² は、これらが結合している窒素原子と共に、場合により置換および/または縮合置換があることがある複素環を形成し、

40

R³、R⁴、R⁵ およびR⁶ は、独立して、水素原子、（C₁ - C₆）アルキル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、ハロ（C₁ - C₆）アルキル基、（C₁ - C₆）アルコキシ基、およびアミン基または飽和窒素複素環で置換された（C₁ - C₆）アルコキシ基から選択され、

Cy は、アダマンチル基、場合により置換されることがある単環式アリール基および場合により置換されることがある単環式ヘテロアリール基から選択され、ただし、R² が（C₁ - C₆）アルキル基であるとき、Cy は、非置換のアリール基またはヘテロアリール基ではない。）の化合物を投与するステップを含む、リソソーム蓄積障害を治療する方法を提供する。

50

【0014】

本発明は、第2の態様において、以下で説明する式Iの化合物の医薬製剤を提供する。

【0015】

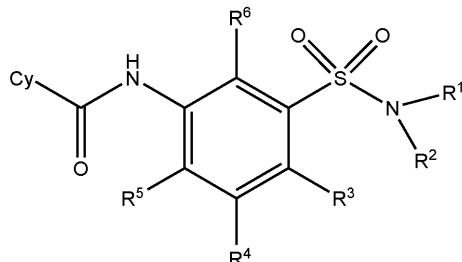
本発明は、第3の態様において、以下で説明する属I内の特定の化合物を提供する。

【発明の詳細な説明】

【0016】

式I

【化2】



10

I

の化合物がリソソーム蓄積障害の治療に有用であることが明らかになっている。

【0017】

式Iのいくつかの実施形態において、Cyは、場合により置換があることがあるピラゾール基、ピロール基、チアゾール基、イミダゾール基、オキサゾール基、ピリジン基、ピリダジン基、ピリミジン基、チオフェン基、フラン基またはフェニル基である。いくつかの実施形態において、Cyは、場合により置換があることがあるピロール基、オルト置換フェニル基、メタ置換フェニル基、または場合により置換があるピリジン基であり、ここで、ピロール基、フェニル基またはピリジン環上の置換基は、(C₁ - C₆)アルキル基、(C₁ - C₆)アシル基、ハロ(C₁ - C₆)アルキル基、(C₁ - C₁₀)オキサアルキル基およびハロゲン基から選択される。オルト置換、メタ置換および(他の文脈では)パラ置換の記載は、置換基が示した位置に見出されることを意味すると理解されるべきである。さらに明示的に限定されない限り(例えば、「オルト位で一置換された」)、環上の他の場所に他の置換基が見出されないことを意味するものではない。

20

【0018】

30

式Iのいくつかの実施形態において、一緒になったR¹およびR²は環を形成しない。これらの実施形態において、R¹は、水素原子および(C₁ - C₆)アルキル基から選択から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、R²は、メタまたはパラ置換フェニル基であってもよく、メタおよびパラ置換基は、プロモ基、シアノ基およびアセチル基から選択されてもよい。いくつかの実施形態において、R¹は(C₁ - C₆)アルキル基であり、R²は(C₁ - C₆)アルキル基である。

【0019】

30

式Iのいくつかの実施形態において、R¹およびR²は、これらが結合している窒素原子と共に、場合により置換および/または縮合があることがある複素環を形成する。これらの実施形態において、環は、飽和窒素複素環、例えば、ピロリジン、ピペリジン、アゼピン、モルホリンまたはピペラジンでもよく、あるいは環は、テトラヒドロベンゾアゼピン、テトラヒドロキノリン、テトラヒドロイソキノリン、インドリンまたはイソインドリンなどの縮合複素環でもよい。

40

【0020】

式Iのいくつかの実施形態において、R³は、水素原子、(C₁ - C₆)アルキル基、ハロゲン基、ヒドロキシ基、シアノ基、ニトロ基、アミノ基、ハロ(C₁ - C₆)アルキル基、(C₁ - C₆)アルコキシ基、およびアミン基または飽和窒素複素環で置換された(C₁ - C₆)アルコキシ基から選択され、R⁴、R⁵およびR⁶は、独立して、水素原子およびフッ素原子から選択される。アミン基または飽和窒素複素環で置換された(C₁ - C₆)アルコキシ基の例は、ジメチルアミノプロポキシ基および2-(ピロリジン-1-

50

-イル)エトキシであろう。通常、(C₁-C₁₀)オキサアルキル基、およびアミン基または飽和窒素複素環で置換された(C₁-C₆)アルコキシ基のアルキル部分は直鎖状になるであろう。いくつかの実施形態において、R³は、水素原子、メチル基、エチル基、メトキシ基およびヒドロキシ基から選択され、R⁴およびR⁶は水素原子であり、かつR⁵は水素原子またはフッ素原子である。

【0021】

本明細書において用いられるとき、用語「場合により置換されることがある」は、「非置換または置換された」と同義で用いられてもよい。用語「置換された」は、指定された基による、指定された基内の1つまたは複数の水素原子の交換を指す。例えば、置換されたアリール基、ヘテロシクリル基などは、各残基内の1つまたは複数の水素原子が、ハロゲン基、ハロアルキル基、アルキル基、アシル基、アルコキシアルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、カルボニル基、フェニル基、ヘテロアリール基、ベンゼンスルホニル基、ヒドロキシ基、低級アルコキシ基、ハロアルコキシ基、オキサアルキル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基[-C(=O)O-アルキル基]、カルボキサミド基[-C(=O)NH₂]、アルキルアミノカルボニル基[-C(=O)NH-アルキル基]、シアノ基、アセトキシ基、ニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、ジアルキルアミノアルキル基、ジアルキルアミノアルコキシ基、ヘテロシクリルアルコキシ基、メルカプト基、アルキルチオ基、スルホキシド基、スルホン基、スルホニルアミノ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルホニル基、ベンジル基、ヘテロシクリル基、フェノキシ基、ベンジルオキシ基、ヘテロアリールオキシ基、アミノスルホニル基、アミジノ基、グアニジノ基およびウレイド基で置き換えられているアリール基またはヘテロシクリル基を指す。

【0022】

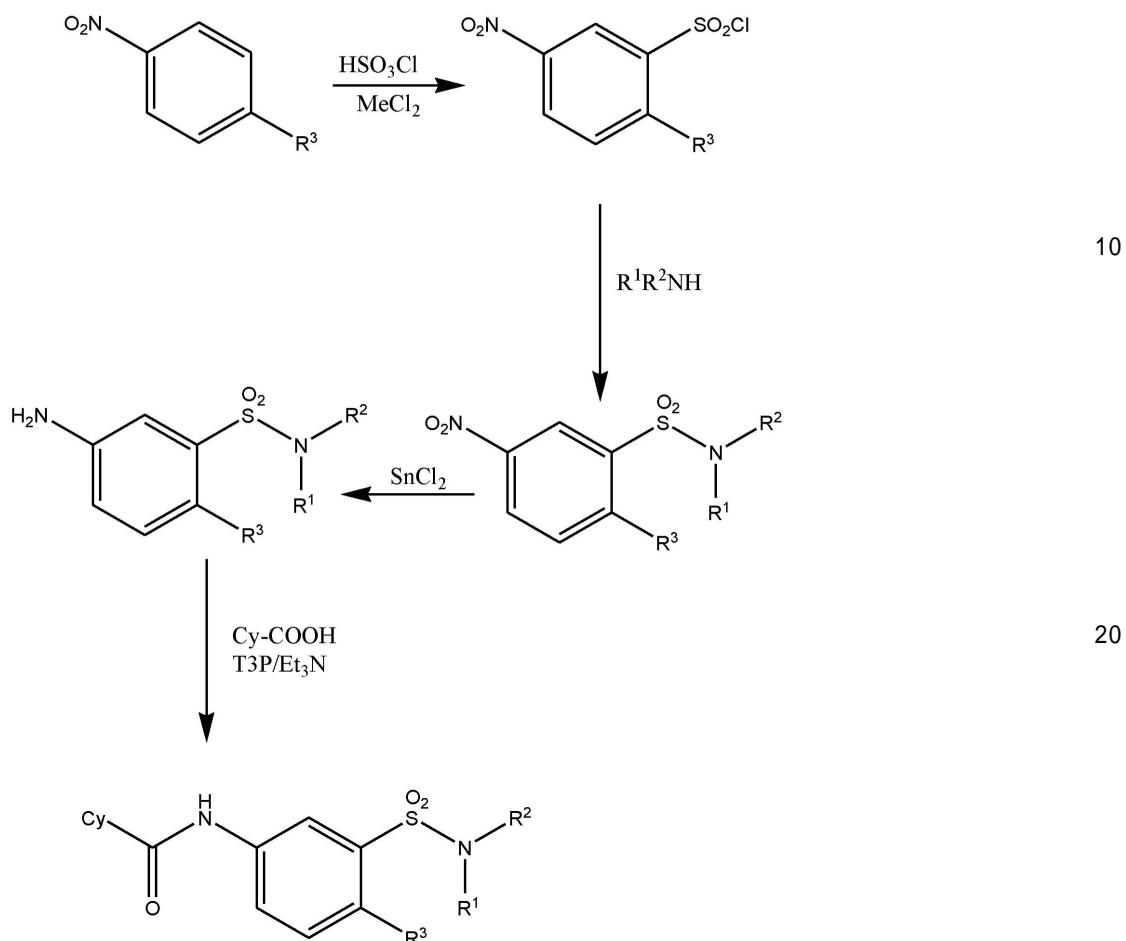
本明細書に記載の化合物の多くは文献において既知であり、商業的供給元から購入されてもよい。市販されていない化合物は、以下の経路で合成されてもよい：

10

20

【化3】

スキーム 1



上に示した試薬は例示であり、同じ変換を達成するために当技術分野において周知の類似の試薬で置き換えることができるこことを当業者は理解されよう。例えば、Cy-COOH は、アミドおよびペプチド合成において使用される一般的な試薬のいずれかによってアニリンと縮合させることができる。同様に、ニトロ基は、水素原子および触媒または別の金属 / 酸の組み合わせを用いて還元することができる。例示的な合成は以下の通りである。

N - (3 - (N - (4 - ブロモフェニル)スルファモイル) - 4 - メトキシフェニル) - 4 - メチルニコチニアミドの調製：

ステップ1 $\text{C}_1\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2\text{Cl}_2$ (5 mL) 中の 1 - メトキシ - 4 - ニトロベンゼン A (6.2 g, 41 mmol) の溶液を 0 $^{\circ}\text{C}$ まで冷却し、クロロスルホン酸 (4 mL, 6 mmol) を滴加して処理した。反応物を室温まで加温し、2 時間還流し、次いで冷却した。水を注意深く加えて過剰のクロロスルホン酸を失活させた。固体の沈殿が観察され、これは、クロロホルムを加えて混合物を攪拌すると再び溶解した。有機層を分離して乾燥 (MgSO_4) させ、濾過して濃縮し、2 - メトキシ - 5 - ニトロベンゼン - 1 - スルホニルクロリド B (1.78 g, 7.07 mmol, 収率 17.5%) を得た。

ステップ2 B (1.7 g, 6.8 mmol) をピリジン (10 mL) 中の 4 - ブロモアニリン (1.7 g, 10 mmol) で処理した。反応物に還流冷却器を取り付け、90 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間攪拌した。ピリジンの大部分を回転蒸発により除去した。残留物を EtOA_c で希釈して、水、次いで塩水で洗った。有機層を分離して (MgSO_4) で乾燥させ、濾過して濃縮し、精製して 1.7 g (65%) の C を得た。LC/MS (Agilent システム) 保持時間 t_1 (ショート) = 3.50 min, C₂₆H₂₂Br₂N₄NaO₁₀S₂ [2M + Na]⁺ の MS (ESI) m/z 計算値 796.9、測定値 796.8。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 8 ppm 10.54 (br. s.,

10

20

30

40

50

1 H) , 8.49 (d, J = 2.7 Hz, 1 H) , 8.45 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.8 Hz, 1 H) , 7.38 - 7.43 (m, 3 H) , 7.09 - 7.02 (m, 2 H) , 4.01 (s, 3 H)。

ステップ3 C (0.90 g, 2.30 mmol) を EtOH (24 mL) に溶解し、塩化スズ(II)二水和物 (2.1 g, 9.3 mmol) で処理した。反応物を1時間還流して冷却し、約pH6まで1N NaOHで処理した。おそらくスズ塩からなる白色懸濁液が観察された。EtOAcを加え、混合物を一晩激しく攪拌した。水層は依然として白色懸濁液であった。混合物をセライトに通して濾過し、有機層を分離して乾燥 (MgSO₄) させ、濾過して濃縮した。アイソクラティック35%EtOAc/ヘキサン溶媒系を用いたフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーによる精製により、接近して溶出する非極性化合物を分離し、純粋なアニリンD (0.56 g, 1.57 mmol、収率67%)を得た。LC/MS (Agilentシステム) 保持時間 t_1 (ショート) = 2.78 min、C₁₃H₁₄BrN₂O₃S [M+H]⁺ のMS (ESI) m/z 計算値 357.0、測定値 356.9。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.96 (s, 1 H), 7.42 - 7.33 (m, 8 H), 7.09 - 6.97 (m, 12 H), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 4 H), 6.72 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 4 H), 5.02 (s, 10 H), 4.03 (q, J = 7.1 Hz, 1 H), 3.71 (s, 12 H), 1.99 (s, 1 H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 1 H)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.96 (s, 1 H), 7.42 - 7.33 (m, 8 H), 7.09 - 6.97 (m, 12 H), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 4 H), 6.72 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 4 H), 5.02 (s, 2 H), 3.71 (s, 311)。

ステップ4 5-アミノ-N-(4-プロモフェニル)-2-メトキシベンゼンスルホニアミドD (70 mg, 0.20 mmol) をDMFに溶解し、4-メチルニコチン酸 (81 mg、0.59 mmol)、2,4,6-トリプロピル-1,3,5,2,4,6-トリオキサトリホスフィナン2,4,6-トリオキシド (0.37 g, 0.59 mmol) (T3P (登録商標)) およびトリエチルアミン (0.11 mL、0.78 mmol) で処理した。反応物を60で48時間攪拌した。冷却後、混合物(これはゲルになっていた。)を水で希釈し、EtOAcで抽出した。有機層を分離して濃縮し、C18逆相カラムクロマトグラフィーにより精製して、N-(3-(N-(4-プロモフェニルスルfonyl)-4-メトキシフェニル)-4-メチルニコチニアミド: 32 mg (0.07 mmol、34%)を得た: LC/MS (Agilentシステム) 保持時間 t_1 (ロング) = 4.13 min、C₂₀H₁₉BrN₃O₄S [M+H]¹ のMS (ESI) m/z 計算値 476.0 測定値 476.0; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.58 (s, 1 H), 10.17 (s, 1 H), 8.72 (s, 1 H), 8.58 (d, J = 5.1 Hz, 1 H), 8.25 (d, J = 2.6 Hz, 1 H), 7.88 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1 H), 7.45 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 7.43 - 7.37 (m, 2 H), 7.19 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 7.10 - 7.03 (m, 2 H), 3.86 (s, 3 H), 2.44 (s, 311); C₂₀H₁₉BrN₃O₄S [M+H]⁺ のHRMS (ESI) m/z 計算値 476.0274 測定値 476.0284。

【0023】

本明細書において用いられるとき、「治療(treatment)」または「を治療する(treating)」、あるいは「を緩和する(palliating)」または「を寛解する(ameliorating)」は、同義で用いられる。これらの用語は、治療上の利益を含むがこれに限定されない有益な結果または所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療上の利益とは、根底にある障害の寛解を意味する。また、患者が依然として基礎疾患に罹患している可能性があるにも関わらず、患者に改善が観察されるよう、基礎疾患に関連する1つまたは複数の生理的症状の寛解により治療上の利益が達成される。例えば、「NPCを治療する」とは、NPCに関連する少なくとも1つの症状を軽減

することを意味する。患者がもはやN P Cの何らかの症状を示さないこと、またはリソソーム機能が正常な状態にされることには必要ではない。組成物は、特定の疾患を発症するリスクのある患者に、あるいはこの疾患の診断がなされていなくても、疾患の1つまたは複数の生理系を報告する患者に投与されてもよい。

【0024】

本明細書において用いられるとき、用語「を含む (comprising)」および「を含む (including)」またはこれらの文法上の変形は、記載の特徴、整数、ステップまたは構成要素を特定するが、1つまたは複数の別の特徴、整数、ステップ、構成要素あるいはこれらの群の追加を除外しないと見なされるべきである。この用語は、用語「からなる (consisting of)」および「実質的に～からなる (consisting essentially of)」を包含する。語句「実質的に～からなる」またはこの文法上の変形は、本明細書において用いられるとき、記載の特徴、整数、ステップまたは構成要素を特定するが、別の特徴、整数、ステップ、構成要素またはこれらの群が記載の組成物または方法の基本かつ新規の特性を実質的に変えない場合にのみ、1つまたは複数の別の特徴、整数、ステップ、構成要素あるいはこれらの群の追加を除外しないと見なされるべきである。本明細書において用いられるとき、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈により特に明確に示されていない限り、複数形も含むことを意図している。用語「を含む (comprise)」(ならびに「comprises」および「comprising」などのcompriseの任意の形態)、「を有する (have)」(ならびに「has」および「having」などのhaveの任意の形態)、「を含む (include)」(ならびに「includes」および「including」などのincludeの任意の形態)および「を含む (contain)」(ならびに「contains」および「containing」などの任意の形態のcontain)は制約のない連結動詞であることがさらに理解されるであろう。結果として、1つまたは複数のステップあるいは要素を「含む (comprises)」、「有する (has)」、「含む (includes)」または「含む (contains)」方法は、それら1つまたは複数のステップあるいは要素を持つが、それら1つまたは複数のステップあるいは要素のみを持つことに限定されない。

【0025】

本発明に関連する製剤には、経口、非経口(皮下、皮内、筋肉内、静脈内および関節内を含む。)、直腸および局所(皮膚、頬側、舌下および眼内を含む。)投与に適した製剤が含まれる。最も適した経路は、レシピエントの状態および障害に依存し得る。製剤は、単位投薬形態で好都合に提供されてもよく、薬学の技術分野で周知の方法のいずれかによつて調製されてもよい。経口投与に適した本発明の製剤は、それぞれが所定量の活性成分を含むカプセル、カシェ剤または錠剤などの別個のユニットとして、粉末または顆粒として、水性液または非水性液中の溶液または懸濁液として、あるいは水中油型液体乳剤または油中水型液体乳剤として提供されてもよい。活性成分はまた、ボーラス、舐剤またはペーストとして提供されてもよい。好ましい単位投与製剤は、有効量またはその適切な割合の活性成分を含む経口の単位投与形態である。

【0026】

非経口投与のための製剤には、水性および非水性滅菌注射液が含まれ、これらには、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を所期のレシピエントの血液と等張にする溶質が含まれてもよい。非経口投与のための製剤には、水性および非水性滅菌懸濁液も含まれ、これらには、懸濁剤および粘稠化剤が含まれてもよい。製剤は、複数用量容器、例えば密封されたアンプルおよびバイアルの単位用量で提供されてもよく、滅菌液体担体、例えば食塩水、リン酸緩衝食塩水(P B S)などの添加のみを使用直前に必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)条件で保管されてもよい。即時注射液および懸濁液は、先述した種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製されてもよい。

【0027】

特に前述の成分に加えて、本発明に関連する製剤は、当該技術分野において通常の他の

10

20

30

40

50

薬剤を含んでもよいと理解されるべきである。例えば、経口投与に適したものには、他の治療成分、固結防止剤、保存料、甘味料、着色料、香料、乾燥剤、可塑剤、色素、崩壊剤、潤滑剤などが含まれてもよい。

【0028】

リソソーム蓄積障害には以下が含まれる：（1）スフィンゴリピドーシス、例えば、ファブリー病；ファーバー脂肪肉芽腫症；ゴーシェ病I型、II型およびIII型；ニーマン・ピック病A型およびB型；GM1ガングリオシドーシス；GM2-ガングリオシドーシス（サンドホフ）；GM2-ガングリオシドーシス（ティ・サックス）；GM2-ガングリオシドーシス（GM2活性化因子欠損）；GM3-ガングリオシドーシス；異染性白質ジストロフィー；およびスフィンゴリピド活性化因子欠損；（2）ムコ多糖症、例えば、MPS I（シーリー（Schele）、ハーラー-シーリーおよびハーラー病）；MPS II（ハンター）；MPS IIIA（サンフィリポA）；MPS IIB（サンフィリポB）；MPS IIIC（サンフィリポC）；MPS IID（サンフィリポD）；MPS IV A（モルキオ症候群A）；MPS IV B（モルキオ症候群B）；MPS VI（マロトー・ラミー）；MPS VII（スライ病）；およびMPS IX；（3）オリゴ糖代謝異常、例えば、-マンノシドーシス；-マンノシドーシス；フコシドーシス；アスパルチルグルコサミン尿症；シンドラー病；シリドーシス；ガラクトシアリドーシス；ムコリピドーシスII型（I細胞病）；およびムコリピドーシスII型；（4）糖原病、例えば、ポンペ病；ならびに（5）膜内在性タンパク質障害、例えば、シスチン症；ダノン病；動作性ミオクローヌス-腎不全症候群；サイリア（Sailia）病；ニーマン・ピック病C1型；ならびにムコリピドーシスIV型。また、しばしばリソソーム蓄積障害のクラスに含まれるのは、Haitia-Santavuori；ヤンスキ-・ビールショースキー；シュピールマイヤー-シェーグレン；パリー；ヘルマンスキ-・パドラック病1～8型；Griscelli 1、2および3；ならびにチエディック・東病である。

【0029】

特に興味深いリソソーム蓄積障害は、ニーマン・ピックC、ファブリー病、ファーバー病、ゴーシェ病、サンフィリポおよび他のムコ多糖症である。

【0030】

ニーマン・ピックCを見ると、患者の95%がNPC1遺伝子内に突然変異を有しており、これは、大部分がRab9-GTPアーゼ陽性である後期エンドソーム小胞の膜内に存在する大きな膜貫通糖タンパク質をコードしている。NPC1タンパク質は、「多剤」膜貫通流出ポンプ機能を有する原核生物のパーミアーゼの耐性-結節形成-分裂（resistance-nodulation-division, RND）ファミリーの類似の真核生物メンバーとして確立されている。13の膜貫通ドメイン、3つの大きな重度にグリコシル化されたエンドソームループ、いくつかのより小さい細胞質ループおよびC末端の細胞質尾部と共に、このタンパク質は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル補酵素A還元酵素（HMG-R）のステロール感知ドメイン（SSD）に形態上よく似たドメイン、およびタンパク質切断-活性化タンパク質（SCAP）を結合するステロール調節エレメントも有し、これらはいずれもコレステロール恒常性において重要な役割を果たす。この構造的相同性は、NPC疾患の生化学的特徴および診断マーカー：後期エンドソームから放出される異常な（impaired）コレステロールと一致しており、これは、遊離の非エステル化コレステロールを結合する蛍光プローブフィリピンを用いて評価することができる。（本発明者らが束縛されることを望まない）可能性のある機構の提案は、LDLに関連する、または形質膜からのエステル化または遊離コレステロールが、受容体介在性エンドサイトーシスによって細胞に入るというものである。続いて、リソソーム酸リパーゼがエステル化コレステロールを加水分解して遊離コレステロールを放出する後期エンドソーム/リソソームオルガネラ内に送達される。遊離コレステロールのサイトゾル内への放出は、まず、リソソームタンパク質HE1（NPC疾患の突然変異の5%を占めるNPC2遺伝子によってコードされる可溶性タンパク質）と結合し、続いて、そのコレ

10

20

30

40

50

ステロールカーゴを後期エンドソーム膜内のN P C 1タンパク質に輸送する二段階機構によって行われる。

【0031】

N P C疾患を引き起こす約200の突然変異のうち、その大部分は、N P C 1タンパク質の全長にわたって分布するミスセンス突然変異である。最も一般的な突然変異の1つはI 1 0 6 1 T対立遺伝子であり、これは、機能タンパク質をコードするが、それ自体が小胞体関連分解の標的にされることになるミスフォールディングの傾向を有する。

【0032】

ここで、本発明者らは、内因性変異N P C 1および/または後期エンドソーム輸送タンパク質R a b 9の全体的な細胞レベルを上方制御して、N P C疾患表現型を改善することができる小分子の属を見出した。観察された結果の合理的な説明は、内因性変異N P C 1タンパク質の上方制御が、小胞体から逃れることができ、かつ後期エンドソーム/リソソーム系を標的とすることができる適切に折りたたまれたN P C 1タンパク質の割合を増加させるというものである。これは、分解のためにタグ付けされた全変異タンパク質の割合を減少させる。後期エンドソームへのN P C 1タンパク質の輸送増加は、その区画からの遮断された脂質の放出を改善し、疾患表現型を正常化する。低分子量G T PアーゼR a b 9は、N P C 1疾患の欠陥経路である後期エンドソームからT G Nへの逆行輸送のモジュレーターである。N P C 1疾患線維芽細胞におけるR a b 9の過剰発現は、N P C 1タンパク質機能の必要性を回避し、後期エンドソームからT G Nへの輸送を回復させ、N P C 1脂質輸送遮断表現型を実際上「抑制」する。

【0033】

R a b 9プロモーターまたはN P C 1レポーターコンストラクトのいずれも安定して発現させるH u h 7ヒト肝癌細胞株を用いて、本発明者らは、式Iの化合物が、N P C 1患者の線維芽細胞株からのコレステロールおよびスフィンゴ糖脂質グロボトリアオシルセラミド(G L - 3)の除去において優れた活性を示すことを見出した。N P C 1またはR a b 9の上方制御は、ニーマン・ピック病C型ならびに以下で述べる他のリソソーム蓄積症を治療するためのアプローチを提供する。

【0034】

使用した試薬および溶媒は無水の市販グレードであり、さらに精製することなく使用した。シリカゲル(100~200メッシュ)上でカラムクロマトグラフィーを実施した。
¹H N M Rスペクトルは、V a r i a n 4 0 0 M H z分光装置を用いて、C D C 1₃およびD M S O - d₆中の溶液から記録した。¹H N M Rスペクトルの化学シフトは、内部として溶媒ピークを用いて百万分率(p p m)で報告される。分子量の確認は、A g i l e n t 6 2 2 4飛行時間型質量分析計(T O F、A g i l e n t T e c h n o l o g i e s(カリフォルニア州サンタクララ))を使用して行った。水中の5~100%アセトニトリル(0.03%ギ酸)の3分間の勾配を運転時間5.1分、流量0.4m L / m i nで使用した。W a t e r s A t l a n t i s T 3 C 1 8カラム(1.8ミクロン、2.1×50mm)を25°の温度で使用した。分子式の確認は、正モードでエレクトロスプレーイオン化を利用し、A g i l e n t M a s s h u n t e rソフトウェア(バージョンB.02)を使用して確認した。

【0035】

アッセイ

【0036】

R a b 9プロモーター-ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイのq H T S。一次スクリーニングの目的で、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現させるために約1.5k bのR a b 9プロモーターを用いてベクターを操作することによりプロモーターアッセイを開発した。したがって、R a b 9プロモーターの活性化は、ルシフェラーゼ発現をもたらす。このベクターを用いて、R a b 9ルシフェラーゼベクターを安定して発現させるH u h 7細胞株を作製した。これらの細胞を、10% F B S、2m M L-グルタミンおよび50 μ g / m Lペニシリン/ストレプトマイシンを追加したR P M I - 1 6 4

10

20

30

40

50

0を含む培地内で増殖させ、維持した。10% FBSを追加したOPTI-MEM I還元血清培地中のアッセイのために、DMSO溶液中の23nL/ウェルの試験化合物を含む1,536ウェル白色不透明プレートに、5µL中1,500細胞/ウェルで細胞を播種した。アッセイプレートを37℃で24時間インキュベートし、その後、3µL/ウェルのBrighte Liteおよびルシフェラーゼ検出試薬混合物(Perkin Elmer)を加えた。室温で10分間インキュベートした後、ViewLuxプレートリーダー(Perkin Elmer)で発光シグナルを測定した。

【0037】

NPC1プロモーター-ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイのqHTS。第2の一次スクリーニングの目的で、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現させるために約1.5kbのNPC1プロモーターを用いてベクターを操作することによりプロモーターアッセイを開発した。したがって、NPC1プロモーターの活性化は、ルシフェラーゼ発現をもたらす。このベクターを用いて、NPC1-ルシフェラーゼベクターを安定して発現させるHu h 7細胞株を作製した。これらの細胞を、10% FBS、2mM L-グルタミンおよび50µg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを追加したRPMI-1640を含む培地内で維持した。10% FBSを追加したOPTI-MEM I還元血清培地中のアッセイのために、DMSO溶液中の23nL/ウェルの試験化合物を含む1,536ウェル白色不透明プレートに、5µL中1,500細胞/ウェルで細胞を播種した。アッセイプレートを37℃で24時間インキュベートし、その後、3µL/ウェルのBrighte Liteおよびルシフェラーゼ検出試薬混合物(Perkin Elmer)を加えた。室温で10分間インキュベートした後、ViewLuxプレートリーダー(Perkin Elmer)で発光シグナルを測定した。

【0038】

Rab9プロモーター活性化因子の確認アッセイ：ウミシイタケルシフェラーゼ。確認アッセイは、一次スクリーニングで使用したものとは異なるルシフェラーゼタンパク質をRab9プロモーターが発現させるアッセイを用いて行った。Rab9プロモーターはウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子の前にクローン化されており、したがって、Rab9プロモーター活性化はウミシイタケルシフェラーゼ発現をもたらす。このベクターを用いて、Rab9ウミシイタケルシフェラーゼベクターを安定して発現させるHu h 7細胞株を作製した。これらの細胞を、10% FBS、2mM L-グルタミンおよび50µg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを追加したRPMI-1640を含む培地内で増殖させ、維持した。10% FBSを追加したOPTI-MEM I還元血清培地中のアッセイのために、1,536ウェル不透明プレートに、5µL中1,500細胞/ウェルで細胞を播種し、次いで、DMSO溶液中の23nL/ウェルの化合物をピン転写により加えた。アッセイプレートを37℃で24時間インキュベートした。Amp1i t eルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイキットをABD Bioquestから購入し、メーカーの推奨にしたがって調製/保管した。室温で10分間インキュベートした後、ViewLuxプレートリーダー(Perkin Elmer)で発光シグナルを測定した。

【0039】

NPC1プロモーター活性化因子の確認アッセイ：ウミシイタケルシフェラーゼ。確認アッセイは、一次スクリーニングで使用したものとは異なるルシフェラーゼタンパク質をNPC1プロモーターが発現させるアッセイを用いて行った。ウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子の前にNPC1プロモーターをクローン化した。NPC1プロモーター活性化はウミシイタケルシフェラーゼ発現をもたらす。このベクターを用いて、NPC1ウミシイタケルシフェラーゼベクターを安定して発現させるHu h 7細胞株を作製した。これらの細胞を、10% FBS、2mM L-グルタミンおよび50µg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを追加したRPMI-1640を含む培地内で増殖させ、維持した。10% FBSを追加したOPTI-MEM I還元血清培地中のアッセイのために、1,536ウェル不透明プレートに、5µL中1,500細胞/ウェルで細胞を播

10

20

30

40

50

種し、次いで、DMSO溶液中の23nL / ウェルの化合物をピン転写により加えた。アッセイプレートを37で24時間インキュベートした。Ampliteルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイキットをABD Bioquestから購入し、メーカーの推奨にしたがって調製/保管した。室温で10分間インキュベートした後、ViewLuxプレートリーダー(Perkin Elmer)で発光シグナルを測定した。

【0040】

細胞毒性アッセイ。NPC1-ホタルルシフェラーゼの細胞に対して毒性を示した化合物を区別するために、細胞毒性アッセイを行った。細胞を、10% FBS、2mM L-グルタミンおよび50μg / mLペニシリン/ストレプトマイシンを追加した RPMI-1640を含む培地内で増殖させ、維持した。10% FBSを追加したOPTI-MEM I還元血清培地中のアッセイのために細胞を播種した。1,536ウェル白色不透明プレートに3μLを加えて細胞を4,000細胞 / ウェルで播種し、次いで、DMSO溶液中の23nL / ウェルの試験化合物をピン転写により加えた。アッセイプレートを37で48時間インキュベートし、その後、3μL / ウェルのCellTiter Glo(Perkin Elmer)を加えた。室温で5分間インキュベートした後、ViewLuxプレートリーダー(Perkin Elmer)で発光シグナルを測定した。

【0041】

生化学的ウミシイタケルシフェラーゼカウンターアッセイ。ウミシイタケのタンパク質を安定化することによってウミシイタケルシフェラーゼのシグナルを促進する任意の化合物を排除するために直交分析を行った。簡潔には、3μLの0.01mM D-ルシフェリンおよび0.01mM ATPを1536ウェルの白色の固いボトムプレートに分注した。ピンニングにより、23nLの化合物を加えた。PTC124(3-[5-(2-フルオロフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル]安息香酸)が対照として役目を果たした。室温で10分間インキュベートした後、1μLのルシフェラーゼを加え、その後、ViewLuxでプレートの発光読み取り値を直ちに読み取った。すべての成分の最終濃度は以下の通りであった: 0.01mM D-ルシフェリン、0.01mM ATP、10nM P. pyr al i sルシフェラーゼ、1M Mgアセテート、0.01% Tween-20および0.05% BSA。

【0042】

VTB-GL-3アッセイ。リソソーム中の中性スフィンゴ糖脂質グロボトリアオシルセラミド(GL-3)の蓄積はファブリー病の特徴であるが、NPC疾患を含む他のリソソーム蓄積障害においても観察されている。腎臓および肝臓などの器官からのGL-3の除去は、ファブリー病の予後の改善に対応する。脂質は大腸菌ベロ毒素(VTB)のBサブユニットを用いて検出することができて、これは、GL-3のオリゴ糖部分およびセラミド部分の両方に対して高い特異性および結合活性を有する。精製した組換えVTBを細菌から産生させ、細胞検出検査のために蛍光色素Alexa594に結合させた。試験化合物で48~72時間処理した後、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗い、リン酸緩衝ホルマリンを用いて4で30分間固定し、食塩水で2回×5分間洗浄して、PBS中の1mg / mL Alexa594-VTBと共に45分間インキュベートした。次いで、細胞を食塩水2回×5分間で洗い、fluoromountでマウントし、Metavueプログラム(Molecular Devices)に内蔵された形態計測機能を使用して40倍フィルターで採点した。

【0043】

一例として、VTBを使用して、本明細書に記載のさまざまな化合物で処理した後のNPC細胞における脂質蓄積の矯正のレベルを評価することができる。野生型(Wt)およびNPC3細胞を2つの化合物で3日間処理し、次いで、上述の通りVTB染色のために処理した。未処理のNPC3細胞は強い染色を示すが、Wt細胞は、予想される通り物質の最小限の蓄積を示す。実施例1および実施例36の化合物で処理すると、NPC3細胞における脂質物質の蓄積は、Wt細胞に影響を与えることなく大幅に減少する。VTB染色の蛍光強度の定量化は、2つの化合物がNPC3細胞における脂質蓄積を90%を超える。

10

20

30

40

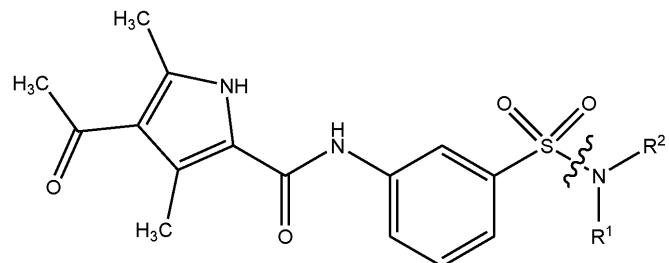
50

て減少させることができることを示す。

【0044】

式Iの化合物を上述のスクリーニングで試験し、以下の結果を得た：

【化4】



10

【表1】

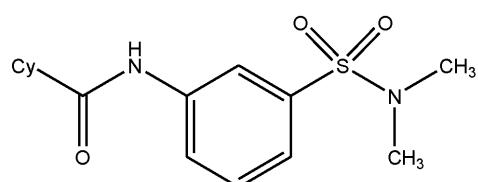
#	NR ¹ R ²	NPC1		Rab9	
		EC50	Eff.	EC50	Eff.
		μM	%	μM	%
1	-N(CH ₃) ₂	6.6-7.7	68-83	6.1	148
2	-NEt ₂	7.7	155	8.7	181
3		6.1	112	7.7	149
4		2.7	163	1.7	134
5		2.7-2.9	196-205	2.0	153
6		活性なし		10.9	82
7		8.3	84	12.2	122

20

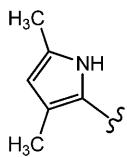
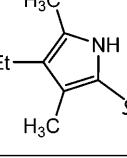
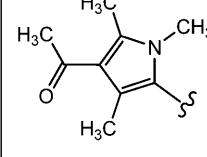
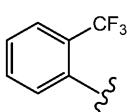
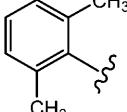
30

【化5】

40



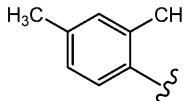
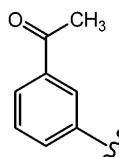
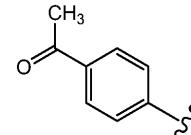
【表2】

#	Cy	NPC1		Rab9	
		EC50	Eff.	EC50	Eff.
		μM	%	μM	%
8		17.2 ^b	48	38.7 ^a	82
9		8.6 ^a	47	活性なし	
10		21.6 ^a	83	活性なし	
13	p-トリル基	活性なし		6.9	54
14	o-トリル基	4.8	51	17.3	114
15	m-トリル基	6.1	81	19.4 ^b	75
16		1.2	125	1.4	155
17		5.4	127	5.5	131

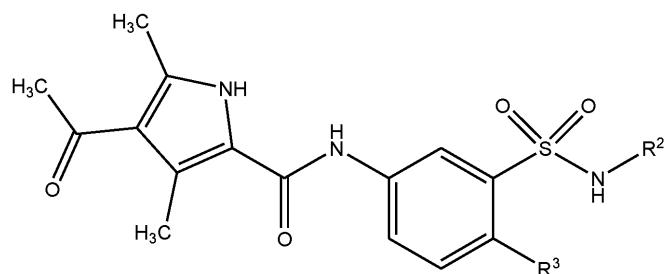
10

20

30

18		5.4	79	12.2	97
19		8.6 ^b	40	19.4 ^b	94
20		活性なし		10.9	110

【化6】



【表3】

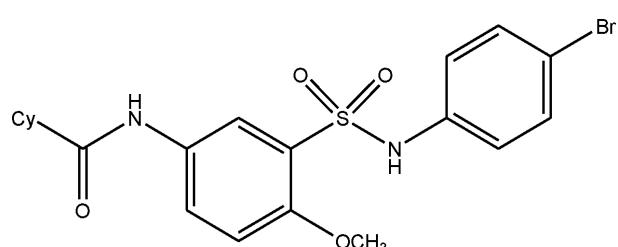
NPC1				
#	R ³	R ²	EC50 μM	Eff. %
23	H	p-Br, m-F Ph	15.4	71 ^a
31	H	m-CN Ph		活性なし
32	H	p-Br Ph	4.3	80
33	Et	m-CN Ph	2.7	140
34	Me	p-Br Ph	1.7	248
35	Et	p-Br Ph	0.7	208
36	OMe	p-Br Ph	0.7	150
38	Et	p-CN Ph	3.4	259
40	OMe	m-CN Ph	0.9	129
41	OMe	p-CN Ph	8.7	100
54	O(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	p-Br Ph		
58	OMe	p-Cl Ph		

10

20

30

【化7】



40

【表4】

NPC1-ウミシイタケ ウミシイタケ				
#	Cy	EC ₅₀	Eff.	酵素
		μM	%	IC ₅₀ μM
42		2.7	119	活性なし
43		4.3	88	活性なし
44		0.5	245	19.40
45	フェニル基	1.1	223	活性なし
46		1.1	192	54.68 ^a
47	アダマンチル基	2.7	80	活性なし
49		5.5	395	活性なし
50		1.1	195	活性なし

10

20

30

40

51		2.7	257	54.68 ^a
55				
56				
57				

^aこれらの化合物は、高濃度において、部分的な活性及び／又は低い活性を示す。

【 0 0 4 5 】

N P C 細胞における遊離コレステロール蓄積を検出するフィリピン染色アッセイ。遊離の非エステル化コレステロールを認識するフィリピンで処理したN P C 1 患者の細胞の線維芽細胞を染色することにより、化合物をN P C 1 細胞表現型に対するそれらの効果について評価した。N P C 1 プロモーターを上方制御する化合物は、未処理のN P C 1 線維芽細胞と比べて、処理されたN P C 1 線維芽細胞におけるフィリピン染色を減少させると予想された。これは、非エステル化コレステロールの除去を示す。反対に、N P C 1 プロモーターの阻害剤は、野生型線維芽細胞におけるフィリピン染色を増加させると予想された。これは、したがって、N P C 様表現型の出現を示す。簡潔には、細胞をリポタンパク質欠乏培地で3～4日間増殖させ、次いで培地を交換し、試験化合物および50 μg / mL の低密度リポタンパク質 (L D L) を追加した。24～48時間後、細胞をフィリピンで染色し、Metavueプログラム (Molecular Devices) に内蔵された形態計測機能を使用して40倍フィルターで採点した。フィリピン蛍光の強度を未処理の細胞の50%未満に減少させた試験化合物が特に重要であると考えられる。

【 0 0 4 6 】

10

20

30

【表 5】

実施例 #	1 μM での増殖 (%)	0.1 μM での増殖 (%)	
41	58		10
38	62		
31	56		
33	35	43	
45	60		
42	47	49	
46	46	26	
53	24	55	
47	33		
51	29		
40	29		20
49	30		
1	22	40	
36	25	50	
50	25	37	
54	60		
55	30		
56	48	50	
57	41	70	30
58	58		
59	40		

上記の表には記載されていないが、表 5 に示した追加の化合物は以下の通り：

【化 8】



【0047】

NPC 細胞内のスフィンゴリピド輸送をモニターするためのラクトシルセラミド染色。

10

20

30

40

50

蛍光プローブ B O D I P Y - ラクトシルセラミド (L a c C e r) を用いて、化合物で 48 ~ 72 時間処理した細胞において、N P C 1 線維芽細胞に見られるスフィンゴリピド輸送欠陥に対する各化合物の影響を評価した。この糖脂質は、1 時間後に W t 細胞のゴルジ装置に完全に局在するが、N P C 1 細胞ではエンドソーム染色のみを示す。この誤った局在は修正することができ、W t N P C 1 タンパク質または R a b 9 の発現によってゴルジ局在が回復するため、エンドサイトーシス輸送経路の動的観察が実現する。細胞を、1 % F B S を含む培養培地で 5 μ M B O D I P Y - L a c C e r / B S A を用いて 37 で 45 分間インキュベートし、洗浄して、さらに 1 % F B S を含む培地内で 37 で 1 時間インキュベートした。形質膜に存在する蛍光脂質を、脂肪酸を含まない 5 % B S A を用いた逆交換により除去した。細胞を 3 % パラホルムアルデヒドを用いて室温で 20 分間固定し、次いで、電荷結合素子カメラを備えた N i k o n E c l i p s e 顕微鏡で可視化した。M e t a V u e ソフトウェアで画像を取得し、次いで、A u t o D e b l u r ソフトウェアを使用してデコンボリューションした。 10

【 0 0 4 8 】

脂質蓄積の静的レベルを検出する上述の V T B アッセイとは異なり、B o d i p y L a c C e r プローブは、形質膜からゴルジ装置への脂質輸送の回復 / 矯正の検出を可能にする。この動的アッセイは、さまざまな化合物が N P C 輸送遮断に対して有する矯正のレベルを決定するために使用することができる。実施例 1 および 36 の化合物で処理した N P C 3 細胞は、未処理の N P C 3 細胞と比べた、プローブのゴルジへの蓄積によって示されるそれらの遮断の矯正を示す。1 μ M の実施例 1 の化合物は、ゴルジの位置のパーセントを統計的に有意な量だけ減少させる。10 または 100 n M の実施例 36 の化合物は、ゴルジの位置のパーセントを統計的に有意な量だけ減少させる。 20

【 0 0 4 9 】

ファブリー病の治療における化合物の有効性は、I o a n n o u r a [A m . J . H u m . G e n e t . 6 8 , 1 4 - 2 5 (2 0 0 1)] によって記述されているように、ファブリー病マウスの肝臓および脾臓における G L 3 の蓄積の減少を測定することによって決定した。年齢および性別を一致させた N P C 1 マウス 20 匹を、それぞれ 10 匹のマウスの 2 つの群に分けた。各マウスに、合計 200 μ L の D M A / s o l u t o l / 食塩溶液を与えた。実施例 50 の化合物を D M A / s o l u t o l / 食塩水に溶解し、30 mg / K g = 750 μ g / マウスで与えた。各マウスに、1 週間に 3 回の腹腔内注射を 3 週間行った。3 週間の最後にマウスを屠殺し、臓器を採取した。ファブリー糖脂質 G L - 3 を各組織から抽出し、G L - 3 E L I S A アッセイを用いて定量した [Z e i d n e r ら、A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y 2 6 7 , 1 0 4 - 1 1 3 (1 9 9 9)]。処置したマウスの肝臓、心臓および腎臓は、G L - 3 レベルの 50 % 超の減少を示した。血漿レベルも低下したが、それほど多くはなかった (30 %)。 30

【 0 0 5 0 】

異なるリソソーム蓄積症におけるリソソームの蓄積量を定量化するために、本発明者らは、特定のタイプの脂質に結合するいくつかの毒素を開発した。その受容体、グロボトリニアオシルセラミド (G L 3) の検出および定量化のための組換え大腸菌ペロ毒素サブユニット B (V T B) の使用は上述した。本発明者らは、C 末端にステップタグ I I 配列を含むように V T B を再設計し、したがって、これは、さまざまなストレプトアビジン標識プローブと共に使用できる。本発明者らは、異なるレポーター； G F P 、 R F P 、 ルシフェラーゼ、 S t r e p T a g に融合したオステロリシン (o s t e r o l y s i n) A (O l y A) の 4 つの異なるバージョンを設計した。さらに、本発明者らは、ガングリオシド G T 1 b に結合する破傷風毒素断片 C (T T C) と、コレステロールを認識する p e r f r i n g o l y s i n O (P F O) とに基づくプローブを構築した。上述の毒素プローブのそれを大腸菌で発現させ、均一になるまで精製した。各リソソーム蓄積症に適切なプローブの組み合わせを決定するために、本発明者らは、異なるリソソーム蓄積障害の患者の細胞株をいくつか用いて、これらのプローブの評価を実施した。いくつかのリソソーム蓄積症は、特定の染色パターンを共有し、それらのエンドソーム / リソソーム内に類 40

似の脂質が蓄積していることを示唆した。リソソーム蓄積症の大部分について最も強いシグナルを有する毒素は、O1yAプローブおよびVTBプローブである。したがって、それらをほとんどの検討で使用した。

【0051】

示したさまざまなリソソーム蓄積障害を伴う患者の線維芽細胞株は、Coriell Institute for Medical Researchから入手した。細胞を、10%ウシ胎児血清および抗生物質を含む提案された細胞培養培地内で維持した。完全増殖培地内の6ウェルディッシュ中のガラスカバースリップ上で細胞を増殖させた。毎日、3日間、細胞には、1 μMの試験化合物またはDMSO(対照)を含む新鮮な培地が与えられるであろう。続いて、細胞単層をPBSですすぎ、リン酸緩衝ホルマリンを用いて4で30分間固定し、PBS中の0.1% Triton X-100で透過処理した。細胞をO1yA-GFPと共にインキュベートし、洗浄して、蛍光顕微鏡用に処理した。電荷結合素子カメラ(Nikon(ニューヨーク州メルビル))を備えたNikon Eclipse顕微鏡で、すべてのサンプルについて同じ露光時間を使用して画像を取得した。MetaVueソフトウェアの積分強度機能を使用して蛍光強度を決定した。それについて少なくとも100個の細胞を定量化した。

【0052】

染色およびスフィンゴ糖脂質GL-3レベルの定量化：細胞および処置は、細胞をVTB-strepタグでインキュベートし、続いてStrep-tactin chromeo 488(Iba Lifesciences)でインキュベートし、その後、蛍光顕微鏡観察が続いたことを除いて上述の通りであった。画像化および蛍光定量は上述の通りであった。

【0053】

あるいは、各リソソーム蓄積症について適切な脂質を定量化するために、毒素ELISAを使用した。細胞を96ウェルプレートに5000細胞/ウェルで播種した。1 μMの試験化合物で48~72時間処理した後、細胞を固定して透過処理し、適切な毒素プローブでプローブ検査した。結合した毒素の量を、抗毒素アルカリホスファターゼを用いて定量化した。現像したプレートを、Tecan Infinite F200 Proマシンを用いてOD 600で読み取った。

【0054】

実施例50の化合物で処理した後、リソソーム蓄積物質は以下の通り減少した：ファブリー、51%；ニーマン・ピックA型、50%；ファーバー、48%；バッテン、59%；ゴーシュ、50%；ポンペ、42%；ウォルマン、75%；MPS VI 27%。

【0055】

リソソーム蓄積症酵素アッセイ：適切な患者の細胞株を12ウェルディッシュに播種した。細胞の三つ組のウェルを、1 μMの試験化合物で72時間処理した。毎日培地を除去し、試験化合物を含む新鮮な培地と交換した。続いて、細胞を緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Na₂HPO₄、pH 6.9、1 mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む1% Igепа1)に溶解し、氷上で30分間インキュベートした後、14 k rpm、4で10分間遠心分離した。可溶化物を、疾患特異的な酵素活性について以下の通り37で1時間アッセイした：

【0056】

ウォルマン：細胞可溶化物をクエン酸-リン酸緩衝液(pH 4.4)中の1 mM 4-メチルウンベリフェリオレアートと共にインキュベートすることにより、リボソーム酸リバーゼ活性を測定した。0.1 M トリス-HCl(pH 7.6)を用いて反応を停止させた。

【0057】

クラッベ：細胞可溶化物をクエン酸-リン酸緩衝液(pH 4.6)中の0.4 mM 6-ヘキサデカノイルアミノ-4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシドおよび1 mg/mL タウロコール酸ナトリウムと共にインキュベートすることにより、-ガ

10

20

30

40

50

ラクトセレブロシダーゼ活性を測定した。0.4Mグリシン(pH10.8)を用いて反応を停止させた。

【0058】

バッテン：細胞可溶化物をクエン酸塩-リン酸緩衝液(pH4.4)中の250mM Ala-Ala-Phen-7-アミド-4-メチルクマリンと共にインキュベートすることにより、トリペプチジルペプチダーゼII活性を測定した。0.3%トリフルオロ酢酸を用いて反応を停止させた。

【0059】

ファブリー：可溶化物をPBS/0.2M酢酸(pH4.2)(1:1)中の等容量の4mM 4-メチルウンベリフェリル-D-グルコピラノシドと混合することにより、ガラクトシダーゼA活性を測定した。1Mグリシン/1M NaOH(pH10)を用いて反応を停止させた。

10

【0060】

それぞれの場合で、Tecan Infinite F200 Proにおいて、360/460nm励起/発光対で蛍光シグナルを読み取った。ファブリー病(突然変異P250T、N34S、N215S)の3人の異なる患者由来の細胞において、実施例50の化合物で処理した細胞におけるリソソーム-ガラクトシダーゼAはそれぞれ、対照の122%、180%および129%であった。ウォルマン病患者由来の細胞では、実施例50の化合物で処理した細胞におけるリソソーム酸リバーゼ活性は、対照の180%であった。クラッペ病患者由来の細胞では、実施例50の化合物で処理した細胞におけるリソソーム酸リバーゼ活性は、対照の114%であった。バッテン病患者由来の細胞では、実施例50の化合物で処理した細胞におけるペプチダーゼII活性は、対照の185%であった。

20

【0061】

本発明の化合物が血液脳関門(BBB)を透過する能力は、以下のプロトコルによって評価することができる：C57BL6マウスに30mg/kgの試験化合物を皮下注射した。注射の2時間後、マウスを屠殺し、組織を単離して冷食塩水ですすぎ、濾紙上で乾燥して秤量し、ドライアイスに入れて急速凍結した。サンプルを48ウェルプレート(Whatman (商標) 7701-5500 UNIPLATE (商標) 48ウェル×5mL Assay Collection & Analysis Microplate、Polypropylene with Rectangular Well & Flat Bottom)内で-80で、分析するまで保存した。アッセイのために、3倍の容量の水を各脳サンプルに加え、SPEX Geno/Grinderを用いてサンプルをホモジナイズした。10種類の較正標準(1.0~1000ng/mL)を、対照プランクの脳ホモジネート中で調製した。200μLのIS/アセトニトリル/MeOHを2mL 96ウェルプレートの各ウェルに加え、40μLのホモジネートした組織サンプルを2mL 96ウェルプレートの各ウェルにピペットを入れた。プレートに蓋をして、パルシング(pulsing)ボルテックスミキサーを用いて5分間ボルテックスし、次いで、4および3000rpmで30分間遠心分離した。150μLの上清をTecanを用いて350μL Waters 96ウェルプレートに移し、1.0μLの上清をUPLC-MS/MSに注入した。この試験において、実施例50の化合物は、1.058×10⁻⁴cm/sの透過率を示すことが明らかになった。したがって、実施例50の30mg/kgの注射により、1時間で約3μg/mLの血漿濃度および1時間で約200ng/mLの脳濃度が得られた。したがって、この化合物は、中心成分を有するリソソーム蓄積症、例えば、ニーマン・ピック、バッテン、ゴーシュII型、クラッペおよびムコ多糖症VII (MPS VII) の治療に有用であると予想される。

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4155 (2006.01)	A 6 1 K 31/4155
A 6 1 K 31/4178 (2006.01)	A 6 1 K 31/4178
A 6 1 K 31/42 (2006.01)	A 6 1 K 31/42
A 6 1 K 31/422 (2006.01)	A 6 1 K 31/422
A 6 1 K 31/425 (2006.01)	A 6 1 K 31/425
A 6 1 K 31/427 (2006.01)	A 6 1 K 31/427
A 6 1 K 31/4427 (2006.01)	A 6 1 K 31/4427
A 6 1 K 31/50 (2006.01)	A 6 1 K 31/50
A 6 1 K 31/501 (2006.01)	A 6 1 K 31/501
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/505
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 0 7 D 213/46 (2006.01)	C 0 7 D 213/46 C S P
C 0 7 D 233/64 (2006.01)	C 0 7 D 233/64

(73)特許権者 515037612
ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ・アズ・リプリゼンテッド・バイ・ザ・セクレタリー・デパートメント・オブ・ヘルス・アンド・ヒューマン・サービスズ
The United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services
アメリカ合衆国 20892-7660メリーランド州ベセスタ、エグゼクティブ・ブルバード 6011番、ス威ート325、エムエスシー7660、オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー

(74)代理人 100139594
弁理士 山口 健次郎

(74)代理人 100185915
弁理士 長山 弘典

(74)代理人 100090251
弁理士 森田 憲一

(72)発明者 テイラー, メルセデス
アメリカ合衆国, 94720 カリフォルニア州, デパートメント オブ ケミストリー バークリー, ロング グループ 214 ルイスホール, ユニバーシティ オブ カリフォルニア - デパートメント オブ ケミストリー

(72)発明者 カルボ, ラウル ローランド
アメリカ合衆国, 20850 メリーランド州, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9800, NCATS - NIH

(72)発明者 マルガン, ホワン ホセ
アメリカ合衆国, 20850 メリーランド州, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9800, NCATS - NIH

(72)発明者 サウスオール, ノエル
アメリカ合衆国, 20850 メリーランド州, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9800, NCATS - NIH

(72)発明者 ジャン, ウェイ
アメリカ合衆国, 20850 メリーランド州, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9800, NCATS

(72)発明者 フェレール - アレグレ , マルク
アメリカ合衆国 , 20850 メリーランド州 , ロックビル , メディカル センター ドライブ
9800 , NCATS

(72)発明者 デダスティ , シーミン
アメリカ合衆国 , 20850 メリーランド州 , ロックビル , メディカル センター ドライブ
9800 , NCATS - NIH

(72)発明者 ドランハック , パトリシア
アメリカ合衆国 , 20850 メリーランド州 , ロックビル , メディカル センター ドライブ
9800 , NCATS - NIH

(72)発明者 チエン , ファニー
アメリカ合衆国 , 10029 ニューヨーク州 , ニューヨーク , ワン ギュスター ブエル . レヴィ
プレイス , ボックス 1675 , マウント サイナイ スクール オブ メディスン

(72)発明者 イオアヌ , ヤニス
アメリカ合衆国 , 10029 ニューヨーク州 , ニューヨーク , ワン ギュスター ブエル . レヴィ
プレイス , ボックス 1675 , マウント サイナイ スクール オブ メディスン

(72)発明者 パトナイック , サマルジット
アメリカ合衆国 , 20850 メリーランド州 , ロックビル , メディカル センター ドライブ
9800 , NCATS - NIH

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第2013/192165 (WO , A1)
国際公開第2014/022841 (WO , A1)
特開2010-031062 (JP , A)
DATABASE REGISTRY [online] , 2011年 8月16日 , [Retrieved on 2019.09.27] , Registry No.1318534-42-7
DATABASE REGISTRY [online] , 2011年 8月16日 , [Retrieved on 2019.10.25] , retrieved from STN , Registry No.1318466-69-1

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61 K 31/00 - 31/80
CA / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)