

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6480340号
(P6480340)

(45) 発行日 平成31年3月6日(2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int. Cl.		F I	
C 0 7 K	1/02	(2006.01)	C O 7 K 1/02
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N 9/02
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K 38/02
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00

請求項の数 3 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-542801 (P2015-542801)	(73) 特許権者	504238057 ブランダイズ ユニバーシティー アメリカ合衆国 02454-9110 マサチューセッツ州, ウォルサム, サウス ストリート 415
(86) (22) 出願日	平成25年11月15日(2013.11.15)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(65) 公表番号	特表2015-536346 (P2015-536346A)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(43) 公表日	平成27年12月21日(2015.12.21)	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/070239	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開番号	W02014/078623	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(87) 国際公開日	平成26年5月22日(2014.5.22)		
審査請求日	平成28年11月9日(2016.11.9)		
(31) 優先権主張番号	61/726,776		
(32) 優先日	平成24年11月15日(2012.11.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環状ジスルフィドを用いるシステイン残基のテザリング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

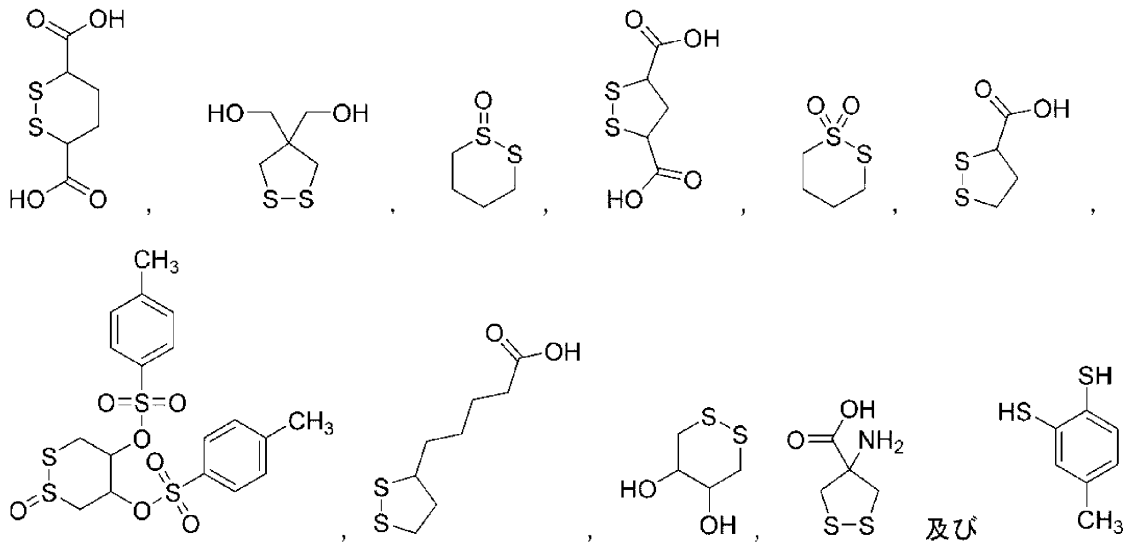
化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列同一性を有し、

第1のタンパク質及び第2のタンパク質がSOD1であり、且つ

前記化合物が、

【化1】



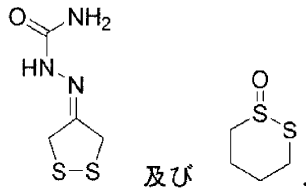
10

からなる群から選択されるか、又は

第1のタンパク質及び第2のタンパク質がDJ-1であり、且つ前記化合物が、

20

【化2】



からなる群から選択される、方法。

30

【請求項2】

第1のタンパク質又は第2のタンパク質の活性を上昇させる方法である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

第1のタンパク質又は第2のタンパク質を安定化させる方法である、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

40

本出願は、2012年11月15日に出願された米国仮特許出願第61/726,776号の優先権を主張するものであり、この出願の内容は参照することによって本願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

多くの治療分子は、その標的タンパク質上のシステイン残基と共有結合を形成する。これらの分子の大多数の機構は、開発のずっと後に解明されたか又は完全には理解されていない。しかしながら、最近成功した創薬活動は、構造ベースの設計に移動した。これらは、標的タンパク質の正確な構造モデルと高特異性リガンドを必要とする。

【0003】

多くのブロックバスター薬を含む治療分子の3分の1は、その標的と共有結合を形成する

50

。これらの求電子性薬物は、一般に、標的タンパク質上の求核アミノ酸、しばしばセリン又はシステインと結合する。アスピリン及びペニシリン(及びそれらの多くの誘導体)はセリンをアシル化し、多くの薬物は特異的なシステインと共有結合を形成する。これらの治療薬は、何百もの高反応性の求核残基とオフターゲット反応する潜在的可能性があるにもかかわらず、効果的であり、これらの残基は必須のタンパク質の機能のためにしばしば必要とされる。「間違っただけ」求核剤との反応の最悪の例のシナリオは、神経ガス(例えばサリン、静脈LD₅₀約30 µg/kg)であり、この神経ガスはアセチルコリンエステラーゼの活性部位セリンを共有結合により変更する。一方、対応する毒性は、がん細胞を選択的に抑止した。ボルテゾミブ/Velcade(LD₁₀₀<250 µg/kg)はプロテアソームの活性部位スレオニンを選択的に変更する。反応性の高い求核剤との予想外の反応は必ずしも悲惨なわけではない。それは薬物を導いたことがある。ジスルフィド含有物質ジスルフィラムは、寄生虫感染を治療することを目的としたが、ヒトで試験したところ、飲酒の際に重度の「二日酔い」症状が生じた。その治療への使用が始まった数年後に、アンタビユースと呼ばれるこの化合物がアルコールデヒドロゲナーゼの高度に反応性の活性部位システインと結合することがわかった。それにもかかわらず、(ウイルスプロテアーゼと異なり)同一のオフターゲット触媒部位を有する多数の類似体がある多くのヒトプロテアーゼに対する治療用自殺阻害剤(不活性化剤)の不足は、オフターゲット求核剤に起因していた。

10

【0004】

有効な共有結合薬物を用いると、オフターゲット結合は標的に対する選択性及び不可逆阻害に固有の増強された効力によって相殺される傾向がある。システイン結合性治療剤の尋常ではない特異性には、洗練された、通常は偶発的な化学が関与する。胃食道逆流症薬(GERD、例えばオメプラゾール/PriLOSEC(商標)、ランソプラゾール/Prevacid(商標)、他)は、環状スルフェンアミドを使用して、腸管腔のプロトンポンプのシステイン残基に不可逆的に結合する。これらのベンゾールアミド誘導体プロドラッグは、活性化及び隔離のために、pKaの低いピリジン窒素(pKa <4.5)のプロトン化を必要とする。それらは中性で、不活性で及び浸透性であるが、その標的(すなわちプロトンポンプ)を含むpH約0.8の壁細胞の細管に遭遇すると活性化される。ここで、それらは1000倍高い濃度で蓄積する。プロトンで媒介されたオメプラゾールの蓄積の化学的基礎が理解されたが、そのように設計されなかった場合も、標的システインの活性化及び結合の背景にある洗練された硫黄ベースの化学は偶然であった。

20

30

【0005】

抗血栓因子であるクロピドグレル/Plavix(商標)、チクロピド/Ticlopidなどもまたプロドラッグである。チクロロームP450酵素による活性化によって、環の炭素-硫黄結合が切断され、スルフヒドリル基を生成し、次いで、この基はアデノシン二リン酸(ADP)化学受容体P2Y₁₂の上でその標的のシステインとジスルフィド結合を形成し得る。永久に不活性化その標的に対する上昇した特異性に加えて、活性代謝産物は、改良された血漿タンパク質結合特性を有している。血栓用薬物は、機能アッセイから始まり、ほとんどの細胞ベース分析において活性代謝産物が生じなかったため、幸いにも動物試験が始まった。その作用機序と標的のいずれも、発見時には知られていなかった。

【0006】

スルフヒドリル部分を用いるより最近の化合物は、合理的に設計された。ダコミチニブ、アフチニブ及びネラチニブは、多数のキナーゼのATP結合ポケットに可逆的に結合する高親和性ヌクレオチドアナログ部分と、非保存システイン(EGFR中に存在するが、そのホモログ中には存在しない)と共有結合するように設計された第2の部分とを有するEGFRキナーゼ阻害剤である。求電子性部分は、オフターゲット反応を最小にするために、意図的に低反応性アクリルアミドになっている。関連する化学的方法は、反応性の低いアクリルアミド系親電子剤を使用して、HCV NS3/4Aウイルスプロテアーゼ(HCV)の非保存(ヒトで)、非触媒残基システインを標的とした。

40

【0007】

要約すると、全ての周知の方法は、高反応性の親電子剤の露出を最小にする(ジスルフ

50

イド又は環中の反応性硫黄を「隠す」)か、又は(アクリルアミド付加物を使用して)露出した親電子剤の反応性を最小にするかのいずれかである。しかしながら、残念なことには、スルフェンアミドの特異性は、腸管腔だけで見られる酸性環境(pH<4.5)に依存しており、反応性スルフヒドリル基を使用する治療薬の特異性は十分理解されていない。2~3種の治療分子が、高い親和性及び特異性の部分に低反応性親電子剤を合理的に結合させることによって得られた。残念なことには、高い親和性及び特異性を有する化合物は、薬剤開発努力の最終段階で現れる傾向があり、そのためこの方法は既存の特異性を改善するために最適である。

【0008】

一般にシステイン、特にシステインの対を標的とする医薬に特異性を与える戦略の必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【0009】

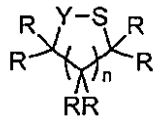
発明の代表的な方法

ある実施形態では、本発明は、式Iの化合物又は式IIの化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質は第1のシステイン残基を含み、
第2のタンパク質は第2のシステイン残基を含み、
式Iの化合物は、

20

【化1】



I

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

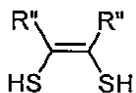
30

R'はアルキル又はアリアルである)

であり、

式IIの化合物は、

【化2】



II

(式中、R''は-H、アルキル又はアリアルであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリアル、又は環は、-OH、アルキル、又はハロで置換されていてもよい)

である、方法に関する。

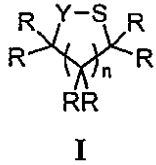
【0010】

ある実施形態では、本発明は、化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによ

50

て第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、
第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、
第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、
化合物は、式Iの化合物

【化3】



10

(式中、Yは、S、S=O、又はS(=O)₂であり、
nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に環を形成し、任意のアルキル又はイミンは、カルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリアルである)

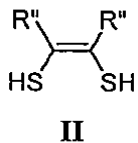
である、方法に関する。

【0011】

20

ある実施形態では、本発明は、化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、
化合物は、式IIの化合物

【化4】



30

(式中、R''は、-H、アルキル又はアリアルであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリアル又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)

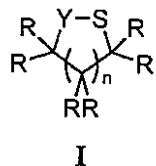
である、方法に関する。

【0012】

ある実施形態では、本発明は、必要とする対象に、治療有効量の式Iの化合物又は式IIの化合物を投与する工程を含む、状態を処置又は予防するための方法であって、式Iの化合物は、

40

【化5】



(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミ

50

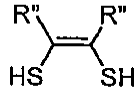
ンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R' はアルキル又はアリールである)

であり、

式IIの化合物は、

【化6】



II

10

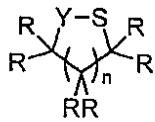
(式中、R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロゲンで置換されていてもよい)

である、方法に関する。

【0013】

ある実施形態では、本発明は、式Iの化合物

【化7】



I

20

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

30

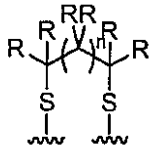
R' はアルキル又はアリールである)

に関する。

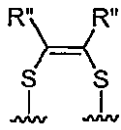
【0014】

本発明の一態様は、安定化スーパーオキシドジスムターゼ類似体であって、類似体は三次構造を有し、且つ第1のSOD1モノマー及び第2のSOD1モノマーを含み、第1のSOD1モノマーは第1のシステイン残基を含み、第2のSOD1モノマーは第2のシステイン残基を含み、第1のシステイン残基は第2のシステイン残基と接続部によって接続され、接続部は式III又は式IVの接続部

【化8】



III



IV

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

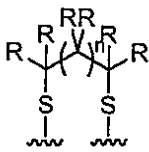
R'はアルキル又はアリールであり、

R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)である、類似体である。

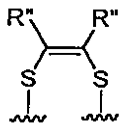
【0015】

本発明の一態様は、安定化DJ-1類似体であって、類似体は三次構造を有し、且つ第1のDJ-1モノマー及び第2のDJ-1モノマーを含み、第1のDJ-1モノマーは第1のシステイン残基を含み、第2のDJ-1モノマーは第2のシステイン残基を含み、第1のシステイン残基は第2のシステイン残基と接続部によって接続され、接続部は式III又は式IV

【化9】



III



IV

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールであり、

R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)

10

20

30

40

50

の接続部である、類似体である。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】a)可能な反応機構であって、環状ジスルフィドが1つのモノマーのシステインと反応し、得られたチオレートが次いで、例えば、別のモノマー上の過酸化水素変性チオレートと反応することができる(Isaac, et al. Chemical Science 2012)反応機構、b)それらの密接した間隔(close spacing)を示す、DJ-1(PDB:3SF8)のダイマー界面のCys53の側鎖を表す(Premkumar, et al. J. Struct. Biol. 2011, 176, 414)図である。SOD1のダイマー界面におけるCys111の外観は非常に類似している。

【図2】共有結合SOD1ダイマーを形成する複数の化合物を同定する、環状ジスルフィドの予備的LC-ESI-IonTrap-MSスクリーンを表す図である。a)共有結合でリンクされたSOD1ダイマーを形成する、我々の予備スクリーンで同定された環状ジスルフィド。b)化合物が存在しないSOD1(上部)及び1-オキソ-1,2-ジチアンが共存するSOD1(下部)のノイズを除去した(Deconvoluted)LC-MSスペクトル。

【図3】Cys53で共有結合DJ-1ダイマーを形成して、DJ-1の熱的安定性を増加させる化合物を同定する環状ジスルフィドの予備LC-ESI-IonTrap-MSスクリーンを表す図である。a)NSC72268はDJ-1の特定の共有結合二量化剤と確認された。b)未処理のDJ-1(上部)及びNSC72268で処理されたDJ-1のノイズを除去したスペクトル。c)NSC56224でリンクされたCys53(下線付)を含むDJ-1の2つのトリプシン分解フラグメントに対応するNSC56224処理DJ-1に特有の検出イオンを示すMALDI-TOF-MSスペクトル。d)NSC56224及びNSC72268は、未処理のDJ-1と比べて、測定された変性温度を増加させる(N=3、エラーバーは示されていないが、標準誤差が線の厚みより小さい)。

【図4】SOD1の共有結合ダイマーを形成させ得る、環状ジスルフィド化合物の例を表す図である。

【図5】SOD1の共有結合ダイマーを形成させ得る、ジチオールを表す図である。

【図6】DJ-1の共有結合ダイマーを形成させ得る、環状ジスルフィド化合物の例を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

概要

分子の共有結合を使用して、タンパク質構造及び機能に影響を及ぼすことができる。共有結合した分子を使用して、タンパク質及びペプチドを阻害、活性促進、安定化及び不安定化することができる。1つの課題は、意図した標的に対する共有型結合剤に適切な特異性をエンコード化することである。ある種の実施形態では、本発明は、システイン残基の対を標的とし、孤立システイン残基よりシステイン対に対する特異性を著しく高める化学ツール、すなわち環状ジスルフィドに関する。合理的な設計への現在のアプローチを増やすことに加えて、環状ジスルフィドは、新規な標的に対する化合物最適化のための着手点を提供する。共有結合修飾への従前のアプローチが酵素の不活性化に充てられる傾向があったのに対し、環状ジスルフィドは(酵素を含む)タンパク質の安定化にも適応できる。我々は、筋萎縮性側索硬化症並びに潜在的にパーキンソン病及びアルツハイマー病に關与するCu/Zn-SOD1、及びパーキンソン病に關与するDJ-1の、2つの神経変性疾患關与するタンパク質の安定化に環状ジスルフィドを適用する。

【0018】

SOD1及び筋萎縮性側索硬化症(ALS)

筋萎縮性側索硬化症は、脳及び脊髄の運動ニューロンの死によって生じる進行性の神経変性疾患である。症状発現からの全生存期間の中央値は、延髄発症の症例の2~3年から肢発症の症例の3~5年の範囲にわたる。ALSの生涯リスクは1/400から1/1000であり、年間発症率の中央値が1.89であり、毎年100,000人当たりの有病率の中央値が5.2である。ALSの治療法は存在せず、ALSに対する唯一のFDA認可の治療であるリルゾール(Rilutek)は、18カ月投与したとき、生存期間の中央値をわずか2~3カ月延長するだけである。このように

10

20

30

40

50

、ALSの新規な治療戦略は、依然として重要である。ALSのほぼ10%は家族性(fALS)であり、fALS症例のほぼ20%はユビキタスに発現されるタンパク質SOD1の常染色体優位突然変異によって生じる。fALSと関連づけられる100を超えるSOD1の突然変異が確認されており、それらが毒性獲得(toxic gain of function)を与えらると思われる。様々なfALS SOD1に関連した突然変異を有する患者の臨床表現型は、異なるよりもむしろ類似しており、全て運動ニューロンの死を起こすように思われるので、突然変異が細胞毒性の共通した特性及び機構を有すると仮定されている。SOD1は、fALSの20%を引き起こすことに加えて、孤発性ALSで役割を果たしている可能性がある。孤発性ALSのサブセットがフォールディングされていないWT SOD1を特徴とし、酸化的に修飾されたSOD1はG93A SOD1バリエーションと同程度に軸索輸送を遅らせるという明らかなエビデンスがある。多数の他の報告は、酸化された/ミスフォールディングされたWT SOD1が細胞毒性であり、及び/又は孤発性ALSに関連があるとしている。

10

【0019】

ALSに関連するSOD1バリエーションの毒性の機構についての1つの支配的な仮説は、ダイマーの不安定化及びモノマーへの解離を含み、次いでそれが高次の凝集体形成の核となる。SOD1のALSに関連するバリエーション、例えばG85Rは、ALS患者でモノマーとして認められ、Cu又はZnの損失、天然の分子内ジスルフィドの開裂、酸化、グルタチオニレート化及びfALSに関連する突然変異を含むいくつかの修飾は、SOD1ダイマーを解離させやすくする。A4V及びより小さい程度でのI113Tの両方のX線結晶構造、H46R、A4V及びH48Qの酵母2-ハイブリッド分析、カオトロフ(chaotroph)によるG85R、G93R、E100G及びI113Tの解離、及び分子動力学のシミュレーションは全てこの仮説と整合しており、突然変異及び修飾はダイマー形成を不安定にする。更にまた、遺伝子操作したサブユニット間ジスルフィドでサブユニットをテザリングすることと、小分子を使用することの両者により、ダイマー形成の不安定化は可逆的であることがわかり、これがタンパク質の凝集を予防している。このように、ダイマーの安定化は治療の戦略として実行されている。

20

【0020】

SOD1ダイマーは、スルフヒドリル基同士がほぼ9オングストローム離れているダイマー界面に2つのシステイン残基を含む。これらのスルフヒドリル基は、ALSに関連するSOD1ダイマーの強い安定化を導くマレイミド架橋剤によって標的とされ得る。驚くべきことには、マレイミドジチオビスマレイミドエタン(DTME)については、マレイミドによるスルフヒドリル基での架橋が、予測されたマレイミド媒介の機構によって生じる一方、1つのSOD1モノマー上のCys111のスルフヒドリル基とのマレイミドの相互作用と、DTMEのジスルフィドスパーサーと第2のSOD1モノマー上のCys111のスルフヒドリル基との間のチオール-ジスルフィド交換との両者を介して、SOD1ダイマーの安定化が生じるであろうことが判明した。残念なことに、マレイミドは、非常に局所刺激性であり、マウスでのLD₅₀は9mg/kgであり、この種の医薬の主要な作用として、腎臓、肝、神経学的及び血液学的な毒性を有する。したがって、特定の実施形態で、本発明は、ALSの治療戦略として、小分子によって媒介され、SOD1の共有結合ダイマーの形成を完全に評価するために、SOD1ダイマーを架橋結合することができる分子の発見に関する。

30

【0021】

DJ-1及びパーキンソン病(PD)

進行性の神経変性疾患PDは、黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンの損失及びレヴィー小体として知られる α -シヌクレインの豊富なタンパク質の蓄積によって特徴付けられる。患者が機能的に損なわれるに従い、PDの初期症状のための様々な薬理的治療の選択肢がある。しかしながら、疾患が進行すると、ドーパミン作動性ニューロンの残存が少なくなるため、主にPDの症状を治療するこれらの薬剤の全ては無効となる。したがって、疾患の進行を遅延させる能力は依然としてわかっていないので、PDとの更なる戦いのために治療開発における新規な方向が必要である。

40

【0022】

PD症例の大多数(>90%)が突発性である一方、189アミノ酸ホモ二量化タンパク質DJ-1を

50

コードするPARK7の突然変異は、常染色体劣性初期の発症パーキンソン病のまれな原因であることが知られている。PARK7の多型が孤発性PD患者に危険を与えるというエビデンスもある。DJ-1のPDに関連づけられたバリエーションの生化学及び細胞培養分析は、安定性及びダイマー形成の消失を含む構造欠陥がPD病因と関係している可能性のある機能の喪失 (loss-of-function)、例えば、 α -シヌクレイン凝集を予防する能力の低下、酸化ストレス依存RNA結合活性の不足、神経保護転写活性化補助剤として作用する能力の低下、及び酸化ストレス誘発性細胞死に対する増加した感度に至る多くの機構を示唆している。疾患に関係したDJ-1の退行性PD関連変異体に追加するものとして、孤発性PD及びアルツハイマー病の患者の前頭皮質のDJ-1の分析は、モノマーDJ-1の酸性イソフォームとSDS耐性DJ-1ダイマーの塩基性イソフォームがこれらの疾患では選択的に蓄積し、DJ-1はカルボニル化及びメチオニンスルホンへのメチオニン酸化によって不可逆的に酸化されることを明らかにしている。DJ-1の過酸化がPD関連の突然変異と類似の構造不安定化を生じることがわかり、異常修飾による機能障害性DJ-1が孤発的な神経変性の症例の原因になり得ることを示唆した。

10

【 0 0 2 3 】

DJ-1機能の喪失がPDの病因に関与するようにみえるのと丁度同じように、エビデンスはDJ-1機能の強化がPDの他の原因を補償できることを示唆する。DJ-1は、6-ヒドロキシドーパミン及びロテノン治療の両方を伴うPDラットモデルの黒質ドーパミン作動性ニューロンの変性から防御する。MPTPマウスモデルのウイルス介在性DJ-1過剰発現が黒質ドーパミン神経単位損失を減らすのに有効であることも証明された。同様に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤フェニルブチレートによるDJ-1の薬理的アップレギュレーションは、酸化ストレス及び変異体 α -シヌクレイン毒性から細胞を救い、また、びまん性レビー小体病を有するマウスにおいてドーパミン作動性ニューロンをMPTP誘発性神経毒性から保護し、年齢に関連する運動及び認識低下を予防する。したがって、DJ-1活性の強化は、恐らく広範なPD症例において、治療戦略として役立つ可能性がある。先に、*in silico*法を使用して、DJ-1上の潜在的小分子結合部位を確認し、*in vivo*で神経保護効果を有する、DJ-1と相互作用し、その酸化状態を調整できる小分枝を同定した。驚くべきことには、DJ-1ダイマーはSOD1と類似のダイマー界面の周辺で、密接した間隔の一組のシステイン、Cys53を有し、このことは、これらのシステインでの共有結合二量化も可能であり得ることを示唆する。これらのシステインでのDJ-1のダイマー形成を強化することは、DJ-1のV51C突然変異によって生じる操作されたジスルフィド結合を経て、概念的には示されてきた。そして、それは修飾及び突然変異により構造及び機能的な欠陥を救う。興味深いことには、非常に反応性のドーパミンキノン、DJ-1の共有結合ダイマー安定化の自然の機構であるCys53を介して、DJ-1の共有結合ダイマーを形成するのが認められた。しかしながら、DJ-1中のCys53はSOD1中のCys111よりも密接した間隔に置かれ、それによってマレイミド架橋剤を用いてDJ-1を共有結合二量化する従前の試みは妨げられた。

20

30

【 0 0 2 4 】

共有結合二量化剤及び治療薬としてのジチオール及び環状ジスルフィド

DTMEが、部分的にチオール-ジスルフィド交換を介してSOD1モノマーを架橋結合できたという観察に関しては、我々は、環状ジスルフィドが、それぞれが密接した間隔に置かれたダイマー界面システインを介して、SOD1及びDJ-1の両方を共有結合二量化する代替法を提供し得ることを提案した。理論的には、環状ジスルフィドは、1つのSOD1/DJ-1モノマーのシステインとのチオール-ジスルフィド交換を受け、遊離チオレートと残留モノマーを反応させることができる(図1)。チオール基が適切に間隔を置かれ適切に反応性であれば、ジチオールも共有結合ダイマーを形成し得る。この仮説と一致して、我々は、予備スクリーニングにおいて発見されたSOD1及び/又はDJ-1を共有結合二量化できるいくつかの環状ジスルフィドとジチオールを示す。いくつかの環状ジスルフィドは、ヒトの摂取に安全であることが既に知られており、及び/又は4,5-ジヒドロキシ-1,2-ジチアン及び α -リポ酸(ALA)を含む潜在的治療剤であり、更なる環状ジスルフィドが実現可能性の高い医薬開発候補を作り得ることを示唆している。更にまた、無差別の反応性を恐れて共有結合の働

40

50

きをする医薬の開発についての一般的な懸念が残る一方で、選択性に基づいて系統的にリード化合物にランク付けする実証された技術を伴う、優れた安全記録を有するような多数の医薬の例が存在する。

【0025】

発明の代表的な方法

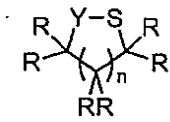
ある実施形態では、本発明は、式Iの化合物又は式IIの化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質は第1のシステイン残基を含み、

第2のタンパク質は第2のシステイン残基を含み、

式Iの化合物は、

【化10】



I

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

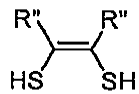
Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリアルである)

であり、

式IIの化合物は、

【化11】



II

(式中、R''は-H、アルキル又はアリアルであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリアル、又は環は、-OH、アルキル、又はハロで置換されていてもよい)

である、方法に関する。

【0026】

ある実施形態では、本発明は、化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、

第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、

化合物は、式Iの化合物

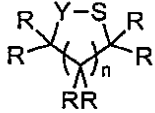
10

20

30

40

【化12】



I

(式中、Yは、S、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に環を形成し、任意のアルキル又はイミンは、カルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリアルである)

である、方法に関する。

【0027】

ある実施形態では、本発明は、YがSである、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0028】

ある実施形態では、本発明は、YがS=Oである、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0029】

ある実施形態では、本発明は、YがS(=O)₂である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0030】

ある実施形態では、本発明は、nが1又は2である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0031】

ある実施形態では、本発明は、nが1である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0032】

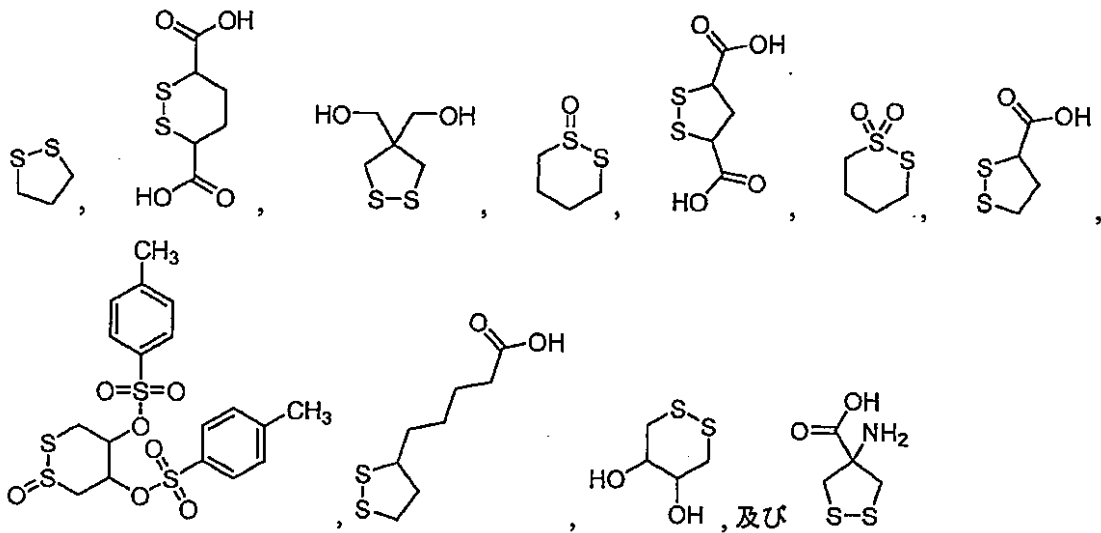
ある実施形態では、本発明は、nが2である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0033】

ある実施形態では、本発明は、化合物が

【0034】

【化13】



からなる群から選択される、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0035】

ある実施形態では、本発明は、化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによ

10

20

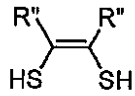
30

40

50

て第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、化合物は、式IIの化合物

【化14】



II

10

(式中、R''は、-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''が一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)

である、方法に関する。

【0036】

ある実施形態では、本発明は、R''が6員環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。ある実施形態では、本発明は、R''が芳香族環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。ある実施形態では、本発明は、R''が芳香族6員環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。

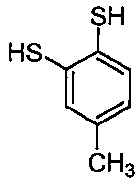
【0037】

20

ある実施形態では、本発明は、化合物が

【0038】

【化15】



である、前述の方法のいずれか1つに関する。

30

【0039】

ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質と第2のタンパク質が少なくとも95%の配列相同性を有する、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0040】

ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質と第2のタンパク質が少なくとも98%の配列相同性を有する、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0041】

ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質と第2のタンパク質が少なくとも99%の配列相同性を有する、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0042】

40

ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質及び第2タンパク質が野生型SOD1である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0043】

ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質及び第2タンパク質が野生型DJ-1である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0044】

ある実施形態では、本発明は、方法がin vitroである、前述の方法のいずれか1つに関する。ある実施形態では、本発明は、第1のタンパク質及び第2のタンパク質が細胞内にある、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0045】

50

ある実施形態では、本発明は、方法が第1のタンパク質又は第2のタンパク質の活性を阻害する方法である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0046】

ある実施形態では、本発明は、方法が第1のタンパク質又は第2のタンパク質の活性を上昇させる方法である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0047】

ある実施形態では、本発明は、方法が第1のタンパク質又は第2のタンパク質を安定化させる方法である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0048】

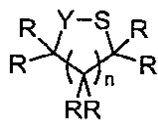
ある実施形態では、本発明は、方法が第1のタンパク質又は第2のタンパク質を不安定化させる方法である、前述の方法のいずれか1つに関する。

10

【0049】

ある実施形態では、本発明は、必要とする対象に、治療有効量の式Iの化合物又は式IIの化合物を投与する工程を含む、状態を処置又は予防するための方法であって、式Iの化合物は、

【化16】



I

20

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

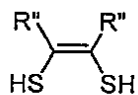
R'はアルキル又はアリールである)

であり、

30

式IIの化合物は、

【化17】



II

(式中、R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)である、方法に関する。

40

【0050】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、YがSである、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0051】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、YがS=Oである、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0052】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、YがS(=O)₂である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0053】

50

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、nが1又は2である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0054】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、nが1である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0055】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、nが2である、前述の方法のいずれか1つに関する。

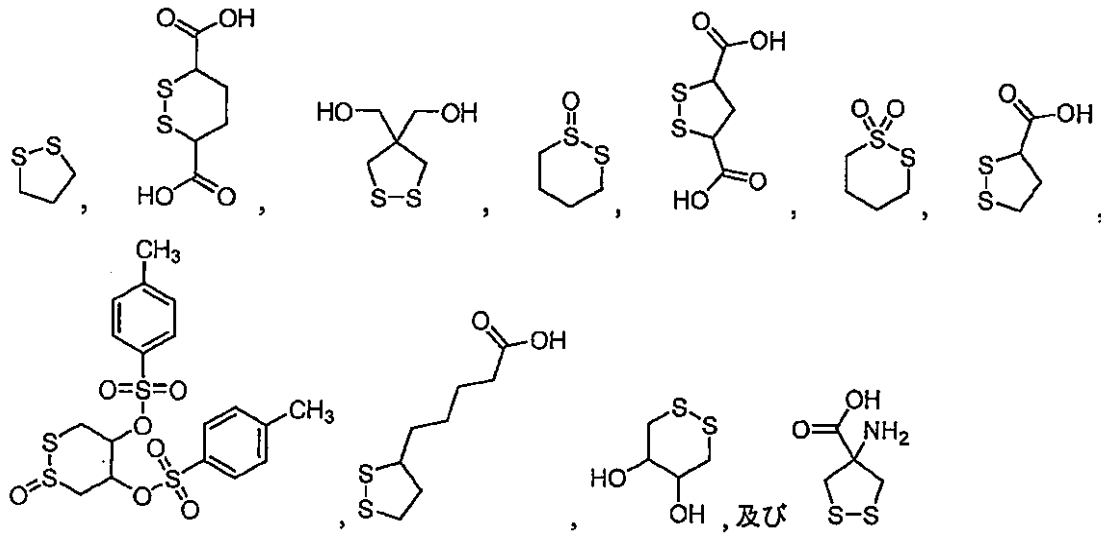
【0056】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式Iの化合物であり、化合物が

10

【0057】

【化18】



20

からなる群から選択される、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0058】

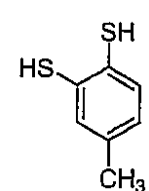
ある実施形態では、本発明は、化合物が式IIの化合物であり、R"が6員環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。ある実施形態では、本発明は、化合物が式IIの化合物であり、R"が芳香族環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。ある実施形態では、本発明は、化合物が式IIの化合物であり、R"が芳香族6員環を形成する、前述の方法のいずれか1つに関する。

30

【0059】

ある実施形態では、本発明は、化合物が式IIの化合物であり、化合物が

【化19】



40

である、前述の方法のいずれか1つに関する。

【0060】

ある実施形態では、本発明は、状態が、ALS、パーキンソン病又はアルツハイマー病である、前述の方法のいずれか1つに関する。

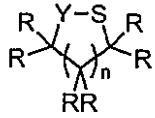
【0061】

発明の代表的な化合物

ある実施形態では、本発明は、式Iの化合物

50

【化20】



I

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールである)

に関する。

【0062】

ある実施形態では、本発明は、YがSである、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0063】

ある実施形態では、本発明は、YがS=Oである、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0064】

ある実施形態では、本発明は、YがS(=O)₂である、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0065】

ある実施形態では、本発明は、nが1又は2である、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0066】

ある実施形態では、本発明は、nが1である、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0067】

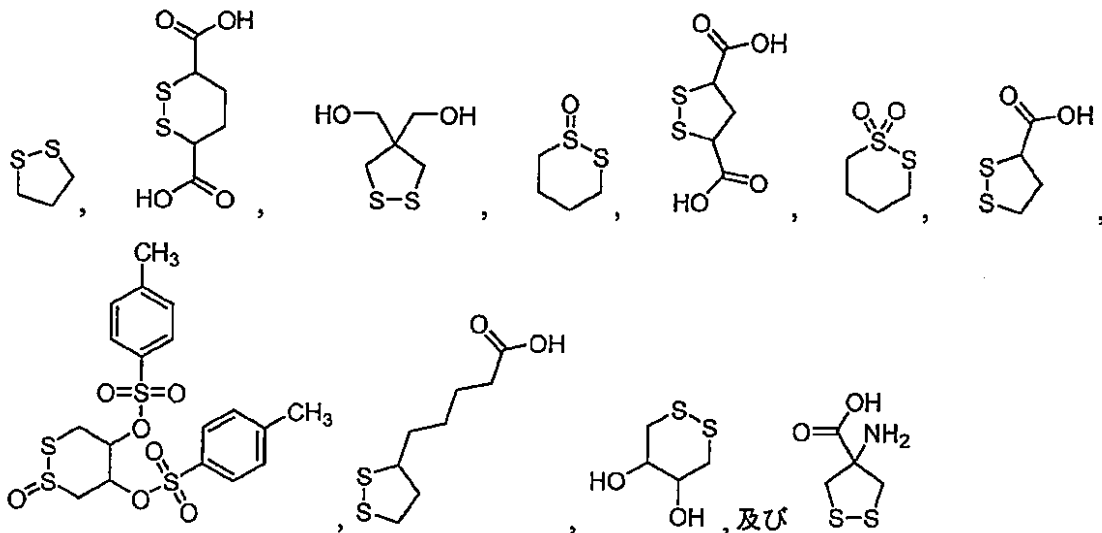
ある実施形態では、本発明は、nが2である、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0068】

ある実施形態では、本発明は、

【0069】

【化21】



からなる群から選択されない、前述の化合物のいずれか1つに関する。

【0070】

10

20

30

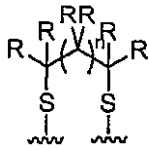
40

50

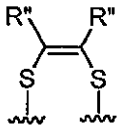
本発明の代表的な類似体

本発明の一態様は、安定化スーパーオキシドジスムターゼ類似体であって、類似体は三次構造を有し、且つ第1のSOD1モノマー及び第2のSOD1モノマーを含み、第1のSOD1モノマーは第1のシステイン残基を含み、第2のSOD1モノマーは第2のシステイン残基を含み、第1のシステイン残基は第2のシステイン残基と接続部によって接続され、接続部は式III又は式IVの接続部

【化22】



III



IV

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリアルであり、

R''は-H、アルキル又はアリアルであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリアル又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい

である、類似体である。

【0071】

ある実施形態では、本発明は、三次構造が野生型スーパーオキシドジスムターゼ酵素と実質的に同じである、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0072】

ある実施形態では、本発明は、第1のSOD1モノマーと第2のSOD1モノマーの配列相同性が約85%以上である、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0073】

ある実施形態では、本発明は、第1のSOD1モノマーと第2のSOD1モノマーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0074】

ある実施形態では、本発明は、類似体の第1のSOD1モノマーが野生型配列であるか、又は、G93A、G85R、D90A、A4V、E100G、H46R、C6G及びI113Tからなる群から選択される突然変異を含む、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0075】

ある実施形態では、本発明は、類似体の第2のSOD1モノマーが野生型配列であるか、又は、G93A、G85R、D90A、A4V、E100G、H46R、C6G及びI113Tからなる群から選択される突然変異を含む、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0076】

ある実施形態では、本発明は、最高約75 °Cの温度まで、野生型スーパーオキシドジスムターゼ酵素の少なくとも90%の活性を保持する、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0077】

10

20

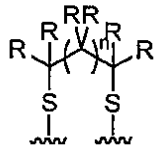
30

40

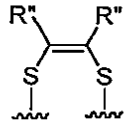
50

本発明の一態様は、安定化DJ-1類似体であって、類似体は三次構造を有し、且つ第1のDJ-1モノマー及び第2のDJ-1モノマーを含み、第1のDJ-1モノマーは第1のシステイン残基を含み、第2のDJ-1モノマーは第2のシステイン残基を含み、第1のシステイン残基は第2のシステイン残基と接続部によって接続され、接続部は式III又は式IV

【化23】



III



IV

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールであり、

R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)

の接続部である、類似体である。

【0078】

ある実施形態では、本発明は、三次構造が野生型DJ-1と実質的に同じである、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0079】

ある実施形態では、本発明は、第1のDJ-1モノマーと第2のDJ-1モノマーの配列相同性が約85%以上である、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0080】

ある実施形態では、本発明は、第1のDJ-1モノマーと第2のDJ-1モノマーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0081】

ある実施形態では、本発明は、最高約75 °Cの温度まで、野生型DJ-1の少なくとも90%の活性を保持する、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0082】

ある実施形態では、本発明は、約10 °Cから約60 °Cでの安定化が増大している、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0083】

ある実施形態では、本発明は、約20 °Cから約40 °Cでの安定化が増大している、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0084】

ある実施形態では、本発明は、約15 °Cから約25 °Cでの安定化が増大している、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0085】

ある実施形態では、本発明は、約30 °Cから約50 °Cでの安定化が増大している、前述の類

10

20

30

40

50

似体のいずれか1つに関する。

【0086】

ある実施形態では、本発明は、約20 での安定化が増大している、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0087】

ある実施形態では、本発明は、約40 での安定化が増大している、前述の類似体のいずれか1つに関する。

【0088】

定義

「類似体」という用語は、SOD1タンパク質又はそのフラグメントと機能の点で実質的に類似する分子を指す。

10

【0089】

参照ポリペプチドに対して、本明細書で用いられる用語「パーセント(%)アミノ酸配列同一性(identity)」又は「パーセントアミノ酸配列相同性(homology)」又は「パーセント(%)同一(identical)」は、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せずに、配列を整列させ、必要に応じて最大パーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である、候補ポリペプチド配列のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するために、整列はこの分野で既知の様々な技術、例えば一般に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えばALIGN又はMegalign(DNASTAR)によって達成され得る。当業者は、配列を判断する適切なパラメータを決めることができ、これは比較に用いられているペプチド配列の完全長の上の最大配列を成し遂げるために必要ないかなるアルゴリズムも含む。例えば、本発明の内容において、類似体のアミノ酸配列は野生型が少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%同一のときは、SOD1の類似体がSOD1の「実質的な相同性」を有すると言われる。

20

【0090】

「医薬として許容される」という表現は、本明細書において、これらは堅実な医学判断の範囲内で、ヒト及び動物の組織と接触しての使用に適しており、実質的に非発熱性で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症のない、妥当な便益/危険率に見合う、リガンド、材料、組成物及び/又は剤形を意味するよう使用されている。

30

【0091】

本明細書で用いられる「医薬として許容される担体」という表現は、1つの器官又は身体の一部から他の器官又は身体の部分に運ぶか又は輸送することに関与している、医薬として許容される材料、組成物又は担体、例えば液体又は固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒又は封入材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と相溶性を有し、患者に有害でなく、実質的に非発熱性であるという意味において「許容される」でなければならぬ。医薬として許容される担体として役に立ち得る材料のいくつかの例は、(1)糖、例えばラクトース、グルコース及び蔗糖、(2)デンプン、例えばコーンスターチ及びポテトスターチ、(3)セルロース及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース、(4)トラガント粉末、(5)モルト、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)賦形剤、例えばカカオ脂及び座薬ワックス、(9)油、例えば落花生油、綿実油、サフラワー油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油、(10)グリコール、例えばプロピレングリコール、(11)ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール、(12)エステル、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチル、(13)寒天、(14)緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、(15)アルギン酸、(16)発熱物質を含まない水、(17)均等緊張食塩水(18)リンガー液、(19)エチルアルコール、(20)リン酸緩衝液、及び(21)医薬製剤に使用される他の非毒性の相溶性物質を含む。ある実施形態では、本発明の医薬組成物は非発熱性で、すなわち患者に投与されたときに有意の温度上昇を誘発しない。

40

50

【 0 0 9 2 】

「予防する」(preventing)という用語は、技術分野で認められており、状態例えば局所再発(例えば痛み)、疾患例えば癌、複合性症候群例えば心不全又は他の医学的状态に関して使用されるとき、当技術分野で十分理解されており、組成物を受けない対象と比して、対象の医学的状态の症状の頻度を減らし又は開始を遅らせる組成物の投与を含む。このように、癌の予防は例えば、対照の無治療個体群に比して予防的療法を受けている患者の集団での検出可能な癌腫の数を減らし及び/又は対照の無治療個体群に比して治療を受けている個体群での検出可能な癌腫の出現を、例えば統計的に及び/又は臨床的に有意な量、遅延させることを含む。痛みの予防は、例えば対照の無治療個体群に比して治療を受けている個体群の対象が経験する痛覚の大きさを低下させ、又は痛覚を遅延させることを含む。感染の予防は、例えば対照の無治療個体群に比して治療を受けている個体群の感染の診断数を減らし及び/又は無治療の個体群に比して治療を受けている個体群の感染の症状発現を遅延させることを含む。

10

【 0 0 9 3 】

治療での使用に関して、本発明の化合物例えばポリペプチド又はペプチド類似体の「治療有効量」は、(哺乳類、好ましくはヒトへの)所望の投与計画の一部として投与されると、処置される障害又は臨床的に許容される基準又は美容上の目的のため、例えばいかなる医療処置にも適用できる妥当な便益/危険率で、症状を軽減するか、状態を改善するか又は疾患状態の開始を遅らせる製剤中のポリペプチド又はペプチドの量を意味する。

【 0 0 9 4 】

用語「予防的」又は「治療的」処置は技術分野で認められており、1種以上の本発明の組成物の宿主への投与を含む。望まれない状態(例えば宿主動物の疾患又は他の望まれない状態)の臨床的発現の前に投与された場合、処置は予防的(すなわち、それは望まない状態に発展することから宿主を保護する)になるが、望まれない状態の発現後に投与された場合、処置は治療的(すなわち、既存の望まない状態又はその副作用を減少させるか、改善するか、又は安定化させることを目的とする)になる。

20

【 0 0 9 5 】

[実施例]

本発明は一般的に記載されており、本発明は以下の実施例を参照することにより、更に容易に理解されるであろう。実施例は、本発明のある態様又は実施形態を説明する目的だけのために含まれるもので、本発明を制限する意図はない。

30

【 0 0 9 6 】

[実施例 1]

一般的材料及び方法

架橋及びウェスタンブロット

wtSOD1又はwtDJ-1を5~25mM DTTと共に、約20分インキュベートし、Amicon Ultra-4遠心沈降回転濃縮器(MWCo 10K)を使用するか、又は逆相クロマトグラフィー(ZIPTIP, Millipore, Inc)を使用してバッファー交換した。ZIPTIPによって清浄化したサンプルも5mMのEDTAと共にインキュベートした。Amicon濃縮器を使用してバッファー交換したSOD1サンプルはHPLC水の中で交換させたが、ZIPTIPサンプルはZIPTIPの後に更にpH7.4のPBS中又はHPLC水で交換させた。DTTで還元したSOD1又はDJ-1を、タンパク質と架橋剤の比1:1(20 μ M:20 μ M若しくは10 μ M:10 μ M)又は1:3(20 μ M:60 μ M若しくは10 μ M:30 μ M)でインキュベートした。

40

【 0 0 9 7 】

様々な架橋剤を用いた。pH7.4のPBS中、又は水中で1時間、室温でインキュベートすることによって架橋を達成した。1時間後に、非架橋結合対照と共に、反応を15%SDS-PAGEゲル上で分析し、ニトロセルロース膜に移し、次いでSOD1又はDJ-1にポリクロナール抗体を用いてウェスタンブロットした。実験は3つ組で繰り返した。

【 0 0 9 8 】

加えて、DTMEは可開裂なスルフヒドリル-スルフヒドリル架橋剤である。wtSOD1又はwtD

50

J-1とDTMEとを1:1モル比で含む架橋反応を室温で1時間行った。架橋後、反応液を半分に分割し、サンプルの半分をDTTを含むバッファーサンプル(還元性)中で、残りの半分はDTTを含まないバッファーサンプル(非還元性)中で実施した。次いでこれらのサンプルと非架橋結合対照を15%SDS PAGEゲル上で分析し上記のようにウェスタンブロットした。

【0099】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-飛行時間(TOF)

wtSOD1又はwtDJ-1を下記のように架橋結合させた。架橋後、1 μ Lのサンプルを、1 μ Lのマトリックス、20mg/mLのシナピン酸を含むMALDI標的の上にスポットティングし、Bruker Daltonics Microflexで分析した。上記MALDIは使用するたびに、高分子量タンパク質較正標準Protein Calibration Standard I(Bruker Daltonics)を使って較正した。MALDI-TOFは72~90%間のレーザー出力光を用いて線形モードで作動させた。MALDI-TOFスペクトルは架橋用であり、非架橋サンプルはFlexAnalysisソフトウェア(Bruker Daltonics)を用いて分析した。実験は3つ組で繰り返した。

10

【0100】

[実施例2]

SOD1に関する環状ジスルフィドのLC-MSスクリーニングによってSOD1ダイマーを共有結合する小分子が明らかとなる。評価される化合物を溶解し、組換えヒトWT SOD1と共にインキュベートした。反応は、HCT Ultraイオントラップ(Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)上のLC-ESI-IonTrap-MSによって分析した。得られたデータは、DataAnalysis 3.4(Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA)を用いて検討した。SOD1の溶出が認められる、対応の保持時間にわたって質量スペクトルを平均し、検出された非荷電の化学種の分子量を決定するために、得られた平均質量スペクトルに最大エントロピーデコンボリューション(Maximum Entropy Deconvolution)を適用した。ジチオール及び環状ジスルフィドを介した有意の共有結合ダイマーの形成が、複数の異なる化合物について観察された。例えば、観察された共有結合SOD1ダイマーの質量の変化は、1,2-ジチオラン-4,4-ジメタノール及び1-オキソ-1,2-ジチアン(図2a)の両方がSOD1を共有結合により二量化できることを示唆している。1-オキソ-1,2-ジチアンがサンプルの中の大部分のSOD1モノマーを架橋結合し得たこと(図2b)と、架橋結合したSOD1ダイマーの質量はSOD1ダイマーに1-オキソ-2-ジチアンを添加した後に1つの水分子が抜けたことに対応することには注目すべきである。1-オキソ-1,2-ジチアン(NSC56224)及びその類似体は、レトロウイルスジンクフィンガーを攻撃する能力について、事前に部分的に特性付けられていた。確認された化合物は図4及び図5に見ることができる。

20

30

【0101】

[実施例3]

DJ-1に関する環状ジスルフィドのLC-MSスクリーニングによってDJ-1ダイマーを共有結合する分子が明らかとなる。SOD1について記載したのと同じ方法を用いて、化合物をWT DJ-1に対してスクリーニングした。ここでもDJ-1の共有結合二量化剤として確認されているNSC56224に加えて、NSC72268が特異的DJ-1共有結合二量化剤(図3a,b)として確認された。NSC56224で結合されたDJ-1をトリプシンで消化し、MALDI-TOF-MSを行ったところ、Cys53においてNSC56224がDJ-1ダイマーと共有結合したことを確認した(図3c)。示差走査蛍光定量で測定してNSC56224及びNSC72268の両方が、DJ-1の変性温度を増加させたこと(図3d)(Niesen et al., 2007)がわかり、これは共有結合二量化がDJ-1の熱安定性を増加させたことを示唆している。NSC72268及びNSC56224を図6に示す。

40

【0102】

参照による取り込み

本明細書で引用した全ての米国特許及び公開された米国特許出願は、参照することにより、本明細書に取り込まれる。

【0103】

均等物

本明細書に記載された発明の特定の実施形態の多くの均等物は、当業者が認識し、又は

50

常套的な試験だけを使用して確認することが可能である。このような均等物は以下の請求項に包含されることを意図している。

以下は、本発明の実施形態の一つである。

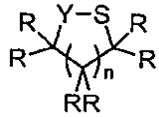
(1) 式Iの化合物又は式IIの化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質は第1のシステイン残基を含み、

第2のタンパク質は第2のシステイン残基を含み、

式Iの化合物は、

【化24】



I

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

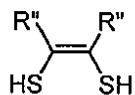
Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールである)

であり、

式IIの化合物は、

【化25】



II

(式中、R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール、又は環は、-OH、アルキル、又はハロで置換されていてもよい)

である、方法。

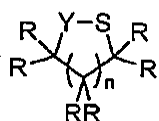
(2) 化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、

第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、

化合物は、式Iの化合物

【化26】



I

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂

10

20

30

40

50

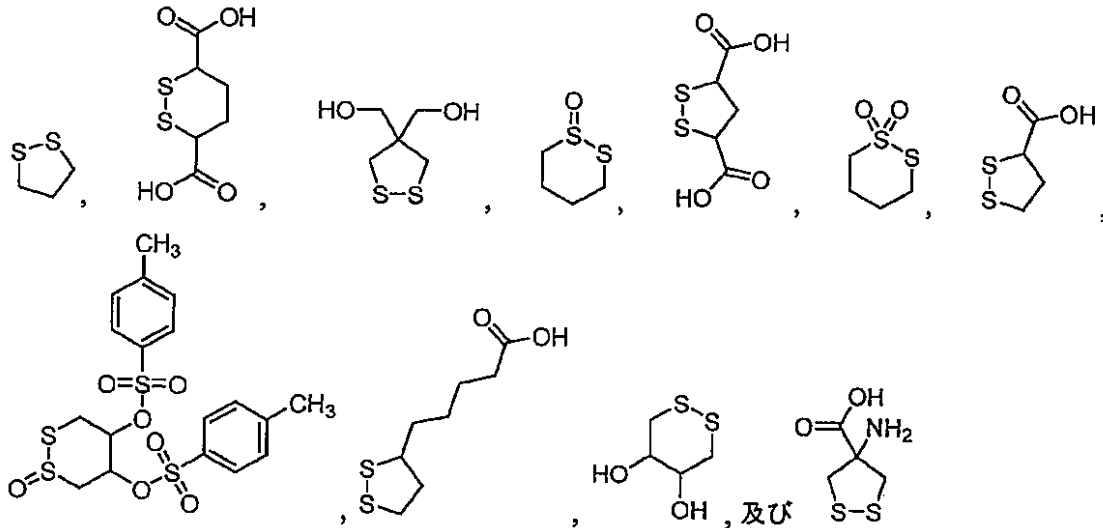
Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に環を形成し、任意のアルキル又はイミンは、カルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールである)

である、方法。

(3) 化合物が、

【化27】



10

20

からなる群から選択される、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 化合物を、第1のタンパク質及び第2のタンパク質と、第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させるのに適した条件下で接触させ、それによって第1のタンパク質を第2のタンパク質に架橋させる工程を含む方法であって、

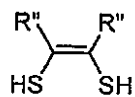
第1のタンパク質と第2のタンパク質は少なくとも90%の配列相同性を有し、

第1のタンパク質及び第2のタンパク質はSOD1又はDJ-1であり、

化合物は、式IIの化合物

30

【化28】



II

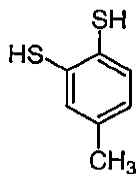
(式中、R''は、-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロゲンで置換されていてもよい)

である、方法。

40

(5) 化合物が

【化29】



である、(1)又は(4)に記載の方法。

(6) 第1のタンパク質又は第2のタンパク質の活性を阻害する方法である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

50

(7) 第1のタンパク質又は第2のタンパク質の活性を上昇させる方法である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

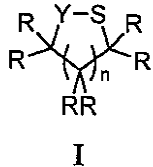
(8) 第1のタンパク質又は第2のタンパク質を安定化させる方法である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

(9) 第1のタンパク質又は第2のタンパク質を不安定化させる方法である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

(10) 必要とする対象に、治療有効量の式Iの化合物又は式IIの化合物を投与する工程を含む、状態を処置又は予防するための方法であって、

式Iの化合物は、

【化30】



(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

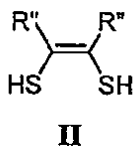
Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールである)

であり、

式IIの化合物は、

【化31】



(式中、R''は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR''と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)

である、方法。

(11) 化合物が式Iの化合物であり、化合物が

10

20

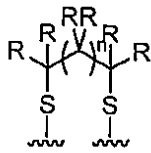
30

R'はアルキル又はアリールであり、

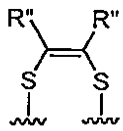
R"は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR"と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)の接続部である、類似体。

(15)安定化DJ-1類似体であって、類似体は三次構造を有し、且つ第1のDJ-1モノマー及び第2のDJ-1モノマーを含み、第1のDJ-1モノマーは第1のシステイン残基を含み、第2のDJ-1モノマーは第2のシステイン残基を含み、第1のシステイン残基は第2のシステイン残基と接続部によって接続され、接続部は式III又は式IV

【化35】



III



IV

(式中、YはS、S=O、又はS(=O)₂であり、

nは0、1、2、3又は4であり、

Rは独立して、-H、-OH、-NH₂、-NHR'、-N(R')₂、アルキル、-OMs、-OTs、-OTf、及び-CO₂Hからなる群から選択されるか、又は任意の2個のジェミナルなR基と一緒に結合してイミンを形成するか、又は任意の2個の隣接したR基と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル又はイミンはカルバミド、カルボキシレート又はヒドロキシルで置換されていてもよく、

R'はアルキル又はアリールであり、

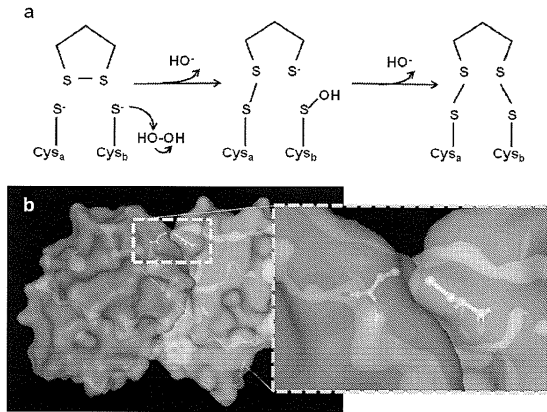
R"は-H、アルキル又はアリールであるか、又は両方のR"と一緒に結合して環を形成し、任意のアルキル、アリール又は環は-OH、アルキル又はハロで置換されていてもよい)の接続部である、類似体。

10

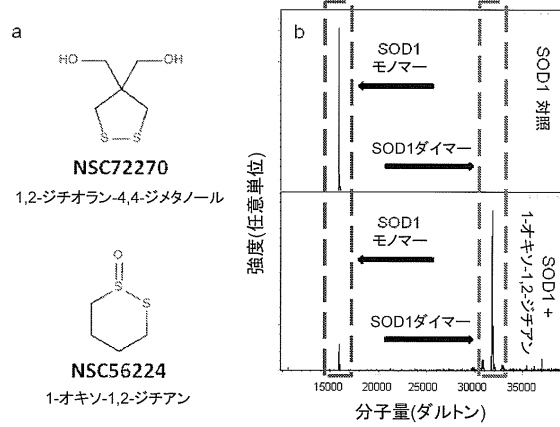
20

30

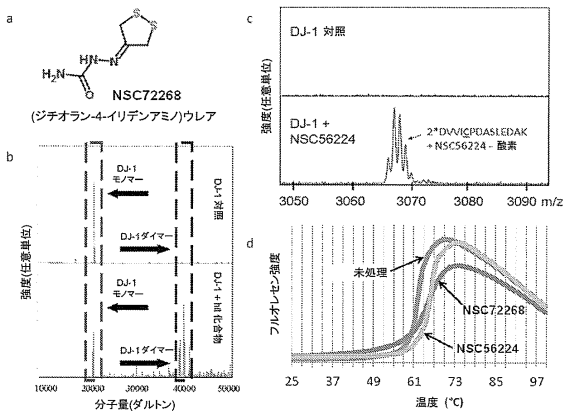
【 図 1 】



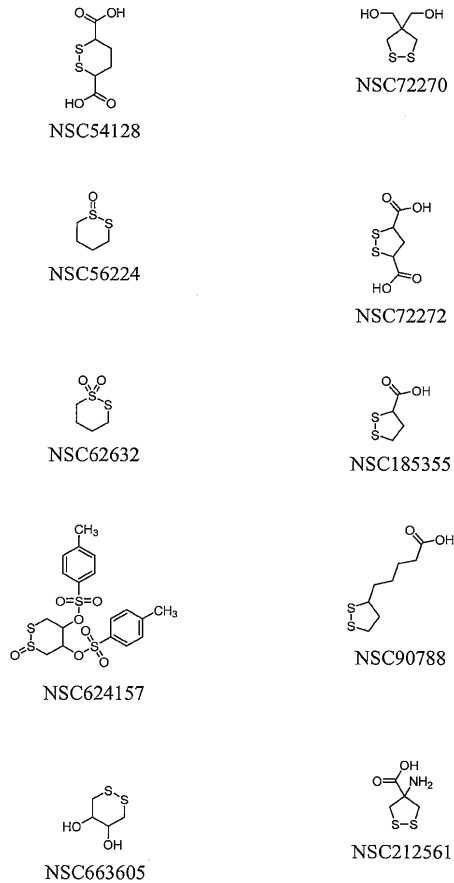
【 図 2 】



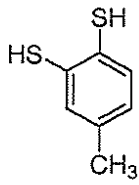
【 図 3 】



【 図 4 】

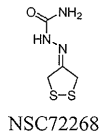


【 5 】

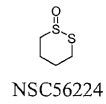


NSC5391

【 6 】



NSC72268



NSC56224

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 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

(74)代理人 100168893

弁理士 岩崎 正路

(72)発明者 エイガー, ジェフリー, エヌ.

アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州, ニュートン, ビーコン ストリート 1 0 4
5

(72)発明者 ソールズベリー, ジョセフ

アメリカ合衆国 0 2 9 2 1 ロードアイランド州, クランストン, フェニックス アベニュー
1 7 2 5

審査官 田名部 拓也

(56)参考文献 米国特許第 0 6 0 4 6 2 2 8 (U S , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 3 4 9 7 8 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 9 3 9 7 7 (U S , A 1)

Williams, B. A. , Disulfide-mediated stabilization of DJ-1, a protein implicated in Parkinson disease, Brandeis University Senior Honors Theses[online], 2 0 1 3 年 5 月, [retrieved on 10.12.2017], URL, <http://bir.brandeis.edu/bitstream/handle/10192/25232/WilliamsThesis2013.pdf?sequence=1>

二量体 S O D 酵素の構造変化と A L S 発症, 西田 雄三, T C I メール, 東京化成工業株式会社, 2 0 0 7 年, Vol. 135, pp. 2-11

Auclair, J. R. et al. , Strategies for stabilizing superoxide dismutase (SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2 0 1 0 年, Vol. 107, pp. 21394-21399

Logan T. et al. , Engineered disulfide bonds restore chaperone-like function of DJ-1 mutants linked to familial Parkinson's disease, Biochemistry, 2 0 1 0 年, Vol. 49, pp. 5624-5633(Page 1-20)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

UniProt/GeneSeq

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

P u b M e d