

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年7月31日 (31.07.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/090749 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 19/167 (2006.01) C07K 1/13 (2006.01)
A61K 31/708 (2006.01) C12N 1/04 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
C07H 19/173 (2006.01)

18-6 Miyagi (JP). 澤智裕 (SAWA, Tomohiro)
[JP/JP]; 〒8608556 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号
国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号
京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/000090

(22) 国際出願日: 2008年1月25日 (25.01.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2007-015727 2007年1月26日 (26.01.2007) JP
特願2007-252877 2007年9月28日 (28.09.2007) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学
法人熊本大学 (KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号 Ku-
mamoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 赤池孝章
(AKAIKE, Takaaki) [JP/JP]; 〒8608556 熊本県熊本
市本荘1丁目1番1号 国立大学法人熊本大学内
Kumamoto (JP). 有本博一 (ARIMOTO, Hirokazu)
[JP/JP]; 〒9830838 宮城県仙台市宮城野区二の森

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: AGENT FOR MODIFICATION OF SH GROUP

(54) 発明の名称: SH基修飾剤

(57) Abstract: Disclosed is an agent for the modification of an SH group or a cell-protecting agent, which can selectively react particularly with a highly reactive SH group in an intracellular environment where SH-containing proteins having various types of reactivities are present in a mixed state. Specifically disclosed is an agent for the modification of an SH group or a cell-protecting agent, which comprises a 8-nitroguanosine derivative.

(57) 要約: 本発明の課題は、様々な反応性を示すSH基含有蛋白質が混在する細胞内環境において、特に反応性の高いSH基に対して選択的に反応するSH基修飾剤及び細胞保護剤を提供することである。本発明によれば、8-ニトログアノシン誘導体を含むSH基修飾剤及び細胞保護剤が提供される。

WO 2008/090749 A1

明 細 書

S H基修飾剤

技術分野

- [0001] 本発明等は、基礎生物学・医学、バイオテクノロジー分野等においてSH基の生化学的特性解明の研究試薬としての利用することが可能なS H基修飾剤、及び細胞保護剤に関する。

背景技術

- [0002] 蛋白質分子内にはシステインに由来するチオール基（SH基）が存在する。生理活性蛋白質（リン酸化・脱リン酸化酵素、プロテアーゼ、転写因子など）の中には、高反応性のSH基を持つものが多く、また、そのSH基が化学修飾を受けると蛋白質機能の変化（増強あるいは減弱・失活）がもたらされる例が数多く報告されている。
- [0003] 既にN-エチルマレイミドなどの化合物がSH基修飾剤として知られている。しかしながら、それら化合物は基本的に系に存在するすべてのSH基を修飾することを目的としているために、蛋白質に固有のSH基反応性に対する選択性は全くない。また、それら修飾剤は、SH基以外にもアミノ基や水酸基にも反応性を示すことから、SH基に選択的に反応させるには条件設定が難しいなどの問題もある。さらに細胞毒性が高く、生きた細胞に直接作用させてSH基の生化学的な特性を調べる用途には用いることができない。
- [0004] 一方、国際公開WO 2006/093110号公報には、グアノシン-3' , 5' -サイクリック1リン酸のアゴニストであり、グアノシン-3' , 5' -サイクリック1リン酸依存的蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼG）活性化作用を有する新規な8-ニトログアノシン-3' , 5' -サイクリック1リン酸化合物、および該化合物を有効成分として含有するプロテインキナーゼG活性化剤が記載されている。
- [0005] 特許文献1：国際公開WO 2006/093110号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、様々な反応性を示すSH基含有蛋白質が混在する細胞内環境において、特に反応性の高いSH基に対して選択的に反応するSH基修飾剤、及びそれを用いた細胞保護剤を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、8-ニトログアノシンを基本骨格とした化合物がSH基に対して非常に選択的に反応することを見だし、さらに種々の8-ニトログアノシン誘導体、ニトロアデノシン誘導体を合成し、SH基に対する反応性を明らかにした。また、本発明者らは、8-ニトログアノシン-3'，5'-サイクリック1リン酸（8-NO₂-cGMP）が、細胞内蛋白質のS-グアニル化をもたらすことを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。
- [0008] 即ち、本発明によれば、8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'，5'-サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'，5'-サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'，5'-サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'，5'-サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'，5'-サイクリック1リン酸から選択される化合物、又は上記化合物をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を含む、SH基修飾剤が提供される。
- [0009] 本発明によればさらに、8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'，5'-サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'，5'-サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'，5'-サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'，5'-サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'，5'-サイクリック1リン酸から選択される化合物、又は上記化合物

をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を、S H基を含む物質に接触させてS H基と反応させることを含む、S H基を修飾する方法が提供される。

[0010] 本発明によればさらに、8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3', 5'-サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3', 5'-サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3', 5'-サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3', 5'-サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3', 5'-サイクリック1リン酸から選択される化合物を含む細胞保護剤が提供される。

[0011] 本発明によればさらに、8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3', 5'-サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3', 5'-サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3', 5'-サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3', 5'-サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3', 5'-サイクリック1リン酸から選択される化合物を細胞に投与することを含む、細胞を保護する方法が提供される。

発明の効果

[0012] 本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、SH基に対して非常に選択的に反応し、アミノ基や水酸基にはほとんど反応せず、高反応性のSH基に対する選択的な修飾が可能となる。また、本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、細胞毒性は見かけ上、ほとんど無いことから生細胞内SH基修飾への展開も可能となる。さらに本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、細胞保護剤としても有用である。

発明を実施するための最良の形態

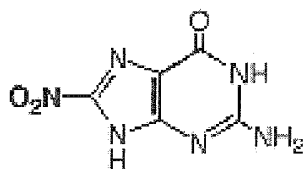
[0013] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明のSH基修飾剤及び細胞保護剤は、8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'，5'サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'，5'サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'，5'サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'，5'サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'，5'サイクリック1リン酸から選択される化合物、又は上記化合物をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を用いることを特徴とする。本発明で用いることができる化合物、及び8-ニトログアノシンとチオール化合物との反応式を以下に示す。

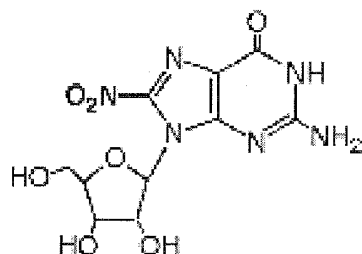
[0014]

[化1]

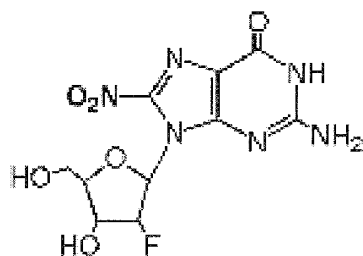
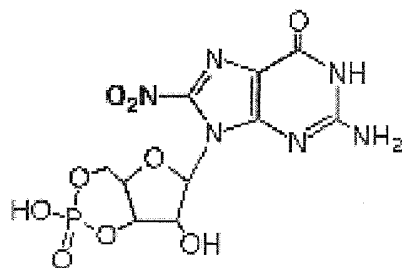
8-ニトログアノシン関連化合物の構造式



8-Nitroguanine (8-Nitro-Gua)



8-Nitroguanosine (8-Nitro-Guo)

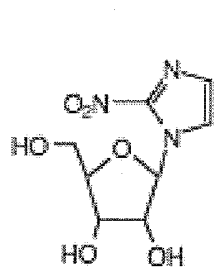
2'-Fluoro-8-nitroguanosine
(2'-Fluoro-8-nitro-Guo)8-Nitroguanosine-3',5'-cyclic
monophosphate (8-Nitro-cGMP)

8-ニトログアノシンとチオール化合物との反応式

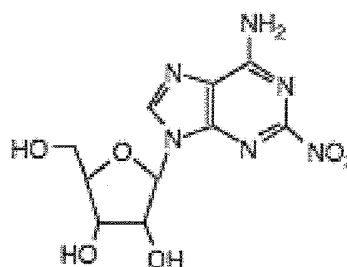


[0015]

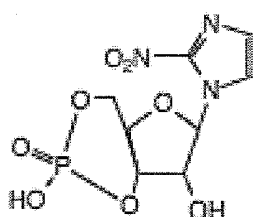
[化2]



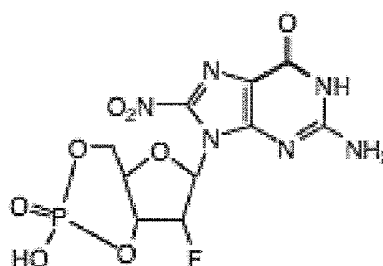
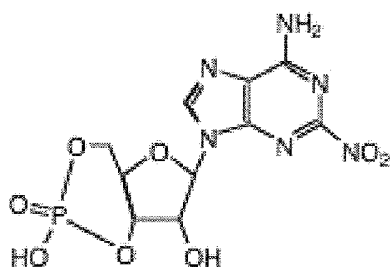
Azomycin riboside



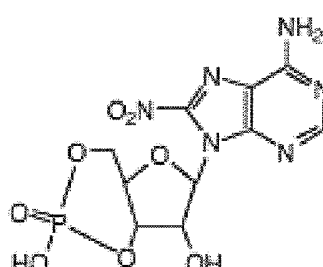
2-Nitroadenosine



Azomycin riboside 3',5'-cyclic monophosphate

2'-Fluoro-8-nitroguanosine
3',5'-cyclic monophosphate

2-Nitroadenosine 3',5'-cyclic monophosphate



8-Nitroadenosine 3',5'-cyclic monophosphate

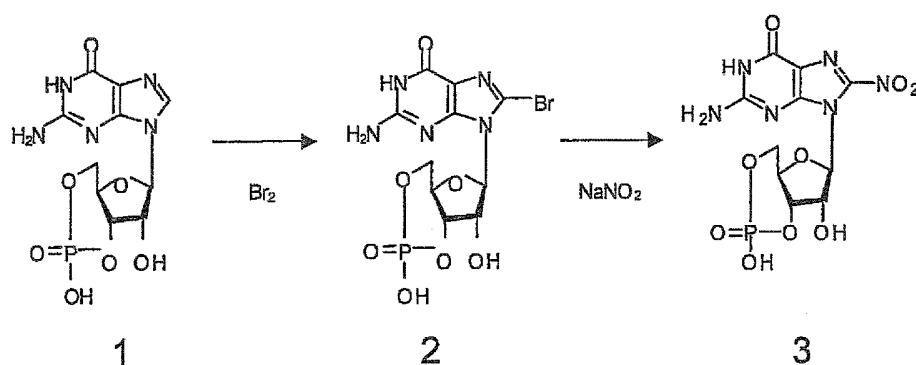
[0016] 本発明で用いる化合物は、遊離型、塩型、水和物型（含水塩も含む）又は溶媒和物型のいずれの形態であってよい。たとえば、塩型としては、塩酸塩、硝酸塩又は硫酸塩などの無機酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、ギ酸塩、乳酸塩又はコハク酸塩などのなどの有機酸塩、もしくはアンモニウム塩などを例示することができ、特に薬学的に許容される塩が好ましい。また、溶媒和物を形成する有機溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、エーテル、ジオキサン、テトラヒドロフランなどが挙げられる。

[0017] 一般的製造法

以下に代表的なSH基修飾剤及び細胞保護剤の製造法を記載するが、特にこれらの製法に限定する意味ではなく、他の製造法によっても本発明化合物を製造することができる。本発明化合物は以下に示す反応にしたがって製造することができる。

[0018] 例えば、8-ニトログアノシン-3', 5'-サイクリック1リン酸は、国際公開WO 2006/093110号公報の記載に従って、次に示すフローチャートに従って合成することができる。

[0019] [化3]



[0020] 上記のフローチャートにおいて、出発原料である化合物（1）は公知化合物であるN-ベンゾイルグアノシン-5'リン酸1水和物カルシウム塩と4-モルホリン-N,N'-ジシクロヘキシルカルボキサミジンとピリジン中で100°Cで数時間反応させることにより容易に合成することができる（J. Am. Chem. Soc., 83, 698-706, 1961）。なお、原料のN-ベンゾイルグアノシン-5'リン酸1水和物カルシウム塩は溶媒に溶けにくいいため、カルボキサミジンと塩交換を行い、溶媒に溶けやすくし、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（縮合剤）で縮合することができる。

[0021] このようにして調製した化合物（1）とブロミンとをホルムアミドなどの溶媒中で氷中で0.5時間程度反応させることにより化合物（2）を得、化合物（2）と亜硝酸を70°Cで5日間程度反応させることにより化合物（3）を得ることができる。化合物（3）および合成中間体の単離精製は、通常の有機化合物の単離精製手段を採用すればよく、例えば、再結晶、各種クロマトグラ

フィーなどを用いて行うことができる。

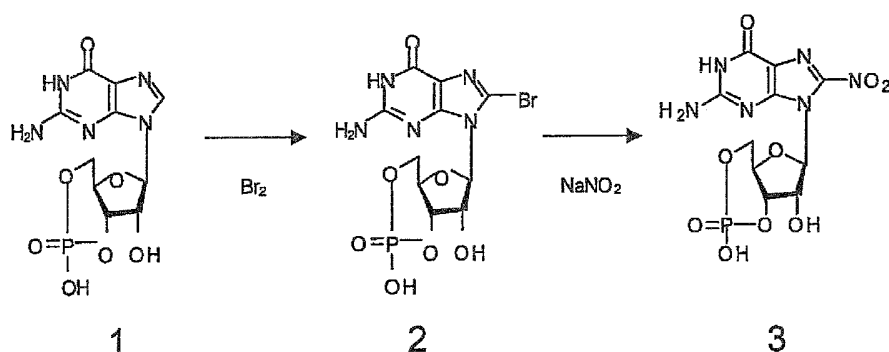
- [0022] 即ち、本発明で用いる化合物は、プリン塩基、または、イミダゾール塩基の炭素原子がハロゲン原子で置換されている公知の核酸化合物を出発物質として用い、これを亜硝酸塩の存在下で反応させることにより製造することができる。当該反応は、例えば、「T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto, H. Maeda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100, 685-690 (2003).」等に記載の方法に準じて行えばよい。
- [0023] 通常、反応温度は室温～約100℃、好ましくは40～80℃である。反応溶媒としては、水、有機溶媒またはそれらの混合溶媒が使用できるが、好ましくはジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドである。
- [0024] 8-ニトログアニンは、N.Y. Tretyakova, S. Burney, B. Pamir, J.S. Wishnok, P.C. Dedon, G.N. Wogan, S.R. Tannenbaum, Mutation Res., 447, 287-303 (2000)に記載されている。
- [0025] 8-ニトログアノシンは、T. Akaike, S. Okamoto, T. Sawa, J. Yoshitake, F. Tamura, K. Ichimori, K. Miyazaki, K. Sasamoto, H. Maeda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100, 685-690 (2003)に記載されている。
- [0026] 2'-フルオロ-8-ニトログアノシンの合成の一例は、本明細書の以下の実施例の合成例2に示す。
- [0027] アゾマイシンリボシドの製法は、R. J. Rousseau, R. K. Robins, L. B. Townsend, J. Heterocyclic Chem., 4, 311 (1967)もしくは、E. J. Priske, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, J. Org. Chem. 43, 1784-4794 (1978)に記載されている。
- [0028] 2-ニトロアデノシンの製法は、P. Y. F. Deghati, M. J. Wanner., G.-J. Koomen, Tetrahedron Lett., 41, 1291-1295 (2000)もしくは、M. J. Wanner, J. K.V. F. D. Kunzel, A. P. IJzerman, G.-J. Koomen, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 2142-2144 (2000)に記載されている。

- [0029] 本発明においては、上記化合物をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を用いることもできる。即ち、上記化合物にビオチン基を導入することによって、S H基が修飾された蛋白質を選択的に細胞から抽出することができる。これにより細胞内でのS H基修飾反応の解析や、標的蛋白質の同定に活用することができる。また、上記化合物に蛍光発色団を導入することによって、S H基が修飾された蛋白質やペプチド・アミノ酸の網羅的解析（プロテオソームおよびメタボローム）へ展開することが可能である。
- [0030] また、本発明においては、8-ニトログアノシン-3', 5' サイクリック1リン酸などの8-ニトログアノシン誘導体及びニトロアデノシン誘導体が、細胞内蛋白質のS-グアニル化をもたらすことが明らかになった。このS-グアニル化の標的蛋白質として、転写制御因子であるKeap1が効率よくS-グアニル化を受けることも明らかになった。一般に、Keap1のSH基を修飾する薬剤は、抗酸化酵素や解毒酵素を誘導し、細胞をストレスから保護する作用があることが知られている。上記の通り、本発明においては、8-ニトログアノシン-3', 5' サイクリック1リン酸などの8-ニトログアノシン誘導体及びニトロアデノシン誘導体は、細胞保護作用を有することが実証された。
- [0031] 本発明のS H基修飾剤及び細胞保護剤においては、上記化合物をそのまま使用してもよいし、あるいは製剤化して使用してもよい。製剤化に際しては、通常使用される製剤用担体、賦形剤、その他の添加剤を含む組成物として使用することができる。担体としては、乳糖、カオリン、ショ糖、結晶セルロース、コーンスターチ、タルク、寒天、ペクチン、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、レシチン、塩化ナトリウムなどの固体状担体、グリセリン、落花生油、ポリビニルピロリドン、オリーブ油、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、水などの液状担体を例示することができる。好ましくは液状担体を用いることができる。
- [0032] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0033] 合成例 1 : 8-ニトログアノシン-3'、5'-サイクリック1リン酸 (8-NO₂-cGMP)

[0034] [化4]



[0035] 8-NO₂-cGMPの合成は、国際公開WO 2 0 0 6 / 0 9 3 1 1 0号公報に記載と同様に、Kapuler, A. Mらの方法 (Biochemistry 10, 4050-4061, 1971) を一部改変しておこなった。すなわち、cGMPを出発材料として、第1段階としてブロモ化反応により8-ブロモグアノシン-3'、5'-サイクリック1リン酸 (8-Br-cGMP) を合成し、続いて第二段階としてニトロ化反応により8-NO₂-cGMPを合成した。なお、有機溶媒試薬は、特別な場合を除き、和光特級試薬を用いた。化合物(1)であるグアノシン-3'、5'-サイクリック1リン酸 (cGMP、MP Biomedicals社製) 150 mgをホルムアミド5 mlに溶解し、氷中にてブロミン0.5 mlを添加し30分間の反応によりブロモ化をおこなった。これにアニリン2 mlを添加し反応を停止させ、続いて反応体積の3倍量のジエチルエーテルを加えることでアニリンを上層のエーテル層に抽出し除去した。この抽出操作は、3回繰り返し行い、完全にアニリン除去した。続いて、ホルムアミド層に1M NaOHを添加し、pH 9.0に調整した後、20 mlのブタノールおよび純水5 mlを添加し、よく攪拌し8-Br-cGMPを下層の水層に回収した。これをロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、さらに4 °Cで一晩静置することで、8-Br-cGMPを沈殿として析出させた。遠心 (15,000 rpm, 30 min, 4°C) により回収した沈殿に再び純水4 mlを加えて溶解した。これを0.45 μmフィルターでろ過後、TSK gel ODS-80Ts (21.5 x 300 mm) (東ソー社製) を用いた逆相クロマトグラフィー (移動相: 0.02 %トリフルオロ酢酸、20%メタノール、流速3.5 ml/min) に

て8-Br-cGMPを精製した。保持時間35～65分間の約30分間のピーク100 mlを回収し、ロータリーエバポレーターにて1 mlまで濃縮し、凍結乾燥により化合物(2)の粉末53.4 mg (収率35.6 %)を得た。

[0036] 化合物(2)の粉末をDMSOに溶解し終濃度83 mMとし、これに5 M塩酸を終濃度34.5 mMになるように添加した。ただちにDMSOに溶解した1 M亜硝酸ナトリウムを添加し終濃度333 mMとし、70℃で5日間反応させることによりニトロ化反応をおこなった。反応終了後、2.3倍量の純水を加え、1 M NaOHによりpH 8.5-9.0に調整した後、2倍量の体積になるように1-ブタノールを添加・攪拌し、得られた水層をロータリーエバポレーターにて濃縮した。

[0037] 濃縮した試料は、0.45 mmフィルターでろ過後、TSKgel ODT-80Ts (21.5 x 300 mm)を用い、移動相の条件の異なる3回の逆相クロマトグラフィーにより高純度の8-NO₂-cGMPを得た。逆相クロマトグラフィーの1回目は、移動相として10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 16%メタノールを用い、流速3.5 ml/minにて保持時間55～58分間の約3分間のピークを回収した。これをロータリーエバポレーターにて濃縮し、-20℃に冷却した100 %エタノールを添加し、析出する塩を遠心により除去した。回収したエタノール上清には、再度100%エタノールを加えて遠心し、エタノール層を回収した。エタノールをロータリーエバポレーターにて加熱濃縮により気相に除去した後、水溶液の試料を回収した。逆相クロマトグラフィーの2回目は、移動相として10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, 16%メタノールを用い、流速3.5 ml/minにて保持時間59～67分間の約8分間のピークを回収し、これをロータリーエバポレーターにて濃縮し、エタノールを用いて脱塩操作を行った。逆相クロマトグラフィーの3回目は、移動相として0.02%トリフルオロ酢酸、20%メタノールを用い、流速3.5 ml/minにて保持時間50～65分間の約15分間のピークを回収し、ロータリーエバポレーターにて濃縮した後、凍結乾燥により化合物(3)の粉末11.1 mg (収率20.8 %)を得た。

[0038] 得られた化合物(3)の粉末に純水を加えて溶解し、LC-MS (LCMS-QP8000 α) (Shimadzu社製)を用いて質量分析を行った。その結果、保持時間15-18分のピ

ークと一致して、 $[M+H]^+$ 390のピークが検出され、理論値と一致した。得られた化合物(3)の 1H NMR、MSおよびUVのスペクトルデータを下記に示す。

[0039] 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$):

δ : 4.06 (1H, ddd, $J=4.9, 10, 10$ Hz), 4.28 (1H, ddd, $J=1.7, 10, 10$ Hz), 4.43 (1H, ddd, $J=20, 10, 4.9$ Hz), 4.83 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 5.02 (1H, ddd, $J=10, 5.4, 1.7$ Hz), 6.00 (1H, br s), 6.33 (1H, s), 7.05 (2H, br s), 11.3 (1H, s)

[0040] MS (ESI, negative):

Calculated for $C_{10}H_{11}N_6O_9P$ ($[M-H]^-$): 389.02

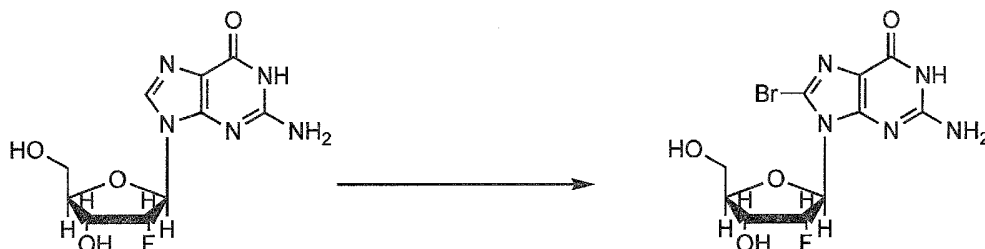
Found: 389.10

[0041] UV spectrum:

λ_{max} = 253, 275, 390 nm (solvent: CH_3OH)

[0042] 合成例 2: 2'-フルオロ-8-ニトログアノシンの合成

[化5]

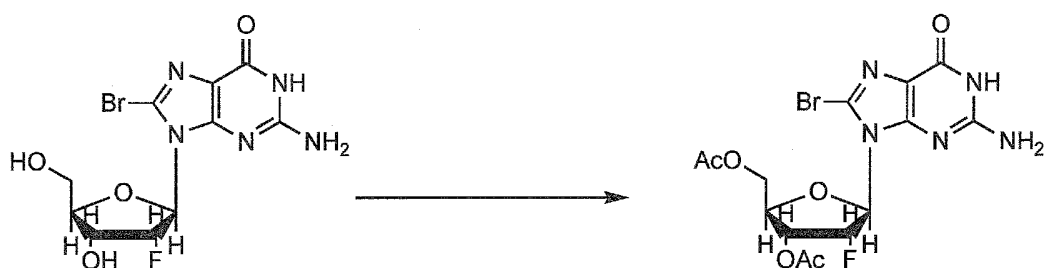


[0043] 市販の2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン(10 mg)を水(1 mL)に懸濁させ、0°CにてN-ブロモコハク酸イミド(9.4 mg)を加えて2時間20分攪拌した。固体をろ取して、8-ブromo-2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン(6 mg, 収率47%)を得た。

高分解能質量スペクトル(FAB法、マトリックス NBA) m/z 364.0063 ($M+H^+$, calc. for $C_{10}H_{12}O_4N_5BrF$ 364.0057)

[0044]

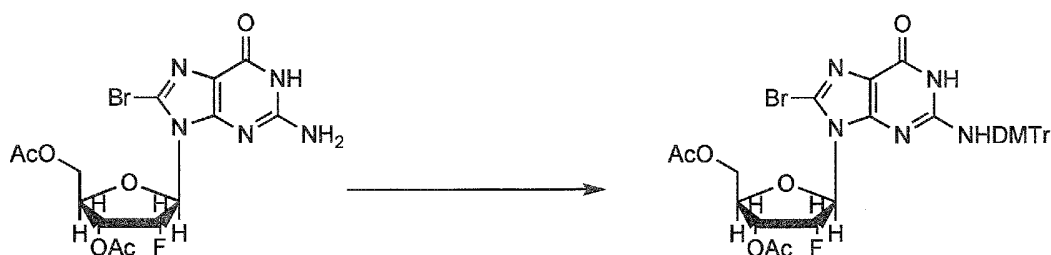
[化6]



[0045] 得られた8-ブロモ-2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン(5 mg)をピリジン(0.5 mL)に懸濁し、0℃にて無水酢酸(7 mg)を加えて2時間攪拌した。この時点で4-ジメチルアミノピリジン(0.2 mg)を加えて、さらに1時間30分攪拌した。反応混合物を氷温の塩化アンモニウム水溶液(10mL)で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して粗固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して8-ブロモ-3', 5'-O-ジアセチル-2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン(4.1 mg, 収率67%)を得た。

[0046] 高分解能質量スペクトル(FAB法、マトリックス NBA) m/z 448.0271 ($M+H^+$, calc. for $C_{14}H_{16}O_6N_5BrF$ 448.0268)

[0047] [化7]

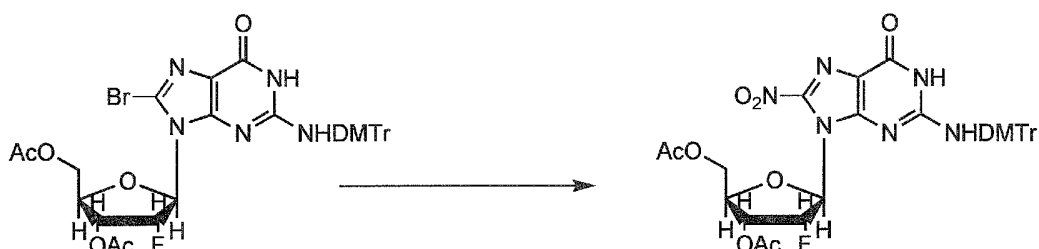


[0048] 得られた8-ブロモ-3', 5'-O-ジアセチル-2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン(36.5 mg)、および、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(137 mg)の混合物に乾燥したピリジン(0.5 mL)を加えて、室温で16時間攪拌した。反応混合物を氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(5 mL)で希釈したのちに酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して粗固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して8-ブ

ロモ-2-N-ジメトキシトリチル-3' , 5' -0-ジアセチル-2' -デオキシ-2' -フルオログアノシン(48 mg, 収率 79%)を得た。

[0049] 高分解能質量スペクトル(FAB法、マトリックス NBA) m/z 750.1577 ($M+H^+$, calc. for $C_{35}H_{34}O_8N_5BrF$ 750.1575)

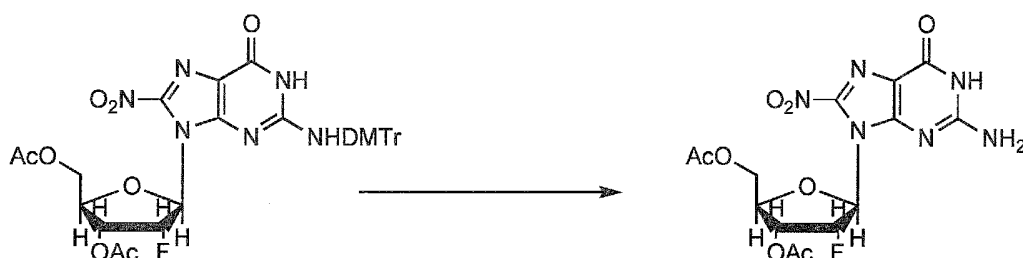
[0050] [化8]



[0051] 得られた8-ブロモ-2-N-ジメトキシトリチル-3' , 5' -0-ジアセチル-2' -デオキシ-2' -フルオログアノシン(17 mg)、亜硝酸カリウム(19 mg)、18-クラウン-6からなる混合物に乾燥したジメチルホルムアミド(1.6 mL)を加えて100°Cで6時間攪拌した。反応混合物を放冷し、酢酸エチル(20 mL)で希釈した。これを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄して得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して粗固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して黄色固体の8-ニトロ-2-N-ジメトキシトリチル-3' , 5' -0-ジアセチル-2' -デオキシ-2' -フルオログアノシン(10 mg, 収率 66%)を得た。

[0052] 高分解能質量スペクトル(FAB法、マトリックス NBA) m/z 717.2325 ($M+H^+$, calc. for $C_{35}H_{34}O_{10}N_6F$ 717.2321)

[0053] [化9]



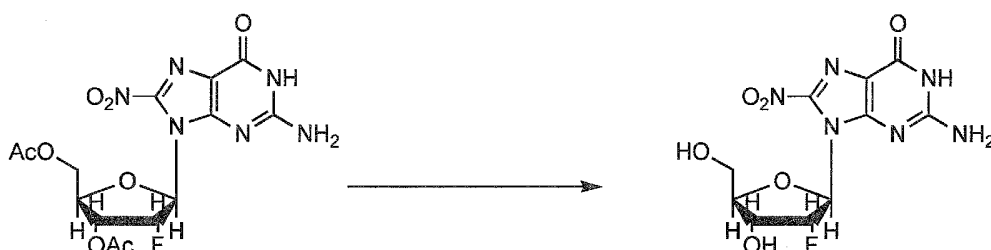
[0054] 得られた8-ニトロ-2-N-ジメトキシトリチル-3' , 5' -0-ジアセチル-2' -

デオキシ-2' -フルオログアノシン (10.6 mg) をクロロホルム (1 mL) に溶解し、
 トルエンスルホン酸 (2 mg) を加えて 20 分間攪拌した。反応混合物をシリカゲ
 ルカラムクロマトグラフィーにより精製し、黄色固体の 8-ニトロ-3', 5' -O
 -ジアセチル-2' -デオキシ-2' -フルオログアノシン (5.3 mg, 収率 86%) を
 得た。

[0055] 高分解能質量スペクトル (FAB法、マトリックス NBA) m/z 415.1014 ($M+H^+$, c
 alc. for $C_{14}H_{16}O_8N_6F$ 415.1014)

1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.75 (1H, dd, $J=1.8, 24.0$ Hz), 5.95 (1
 H, ddd, $J=1.8, 5.7, 53.1$ Hz), 5.75 (1H, ddd, $J=5.7, 8.7, 18.0$ Hz),
 4.48 (1H, dd, $J=3.0, 12.0$ Hz), 4.39 (1H, ddd, $J=3.0, 5.4, 8.4$ Hz),
 4.27 (1H, dd, $J=5.1, 12.0$ Hz)

[0056] [化10]



[0057] 得られた 8-ニトロ-3', 5' -O-ジアセチル-2' -デオキシ-2' -フルオログ
 アノシン (5.3 mg) をメタノール (0.5 mL) に溶解し、 $0^\circ C$ で 40% メチルアミン
 ・メタノール溶液を滴下した。室温に昇温して 2 時間攪拌を続けたのち、反応
 液を減圧濃縮した。残さを ODS クロマトグラフィー (aq. MeOH) にて精製し、
 8-ニトロ-2' -デオキシ-2' -フルオログアノシン (2.5 mg, 60%) を橙色の
 固体として得た。

[0058] 高分解能質量スペクトル (FAB法、マトリックス NBA+NaI) m/z 353.0624 ($M+$
 Na^+ , calc. for $C_{10}H_{11}O_6N_6NaF$ 353.0622)

1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.74 (1H, dd, $J=2.4, 22.5$ Hz), 5.73 (1
 H, ddd, $J=2.4, 5.4, 54.0$ Hz), 4.01 (1H, m), 3.90 (1H, dd, $J=2.7$ Hz,
 12.3 Hz), 3.73 (1H, dd, $J=4.8, 12.3$ Hz)

[0059] 試験例 1 : グルタチオンのSH基に対するS-グアニル化修飾

システインを含むトリペプチドであるグルタチオンのSH基に対する8-NO₂-cGMPによる修飾反応を解析した。リン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.4) に8-NO₂-cGMP (10 μM) とグルタチオン (10 mM) を溶解し、37°Cにて反応させた。一定時間ごとに、反応溶液の一部を採取し、HPLC-UVならびにMS (LCMS-Q P8000a、Shimadzu社製) にて反応産物を解析した。すなわち、STR ODS-II (2 x 150 mm) (信和化工社製) を用いた逆相クロマトグラフィーを行った。移動相は0.2 ml/minの流速で、A液として0.02%トリフルオロ酢酸、2%アセトニトリル、B液として0.02%トリフルオロ酢酸、15%アセトニトリルを用い、100% A液から100%B液へ20分のリニアグラジエントにて行った。この条件では、8-NO₂-cGMPは21.8分に溶出する。反応が進むに従って、8-NO₂-cGMPのピークが減少し、かわって20.9分に新規なピークが出現した。反応3時間後には8-NO₂-cGMPのピークはほぼ完全に消失し、かわって21.8分のピークが増加した。この20.9分のピークの分子量を測定した結果、651と決定された。この分子量は、グルタチオンに一分子のcGMP構造が付加したものに一致していた。さらに20.9分のピークを分取し、溶媒を凍結乾燥にて除去したものを、NMR測定に供した。その結果、8-NO₂-cGMPとグルタチオンとの反応から生成した新規な化合物の構造が、図1に示すようなグルタチオンのSH基に対して、cGMPのC8位が付加 (S-グアニル化) したものであることが示された。具体的な測定値を以下に示す。

[0060] ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 2.10 (1H, dt, J= 7.2, 7.2 Hz: Glu Hβ), 2.46 (1H, t, J= 7.2 Hz: Glu Hγ), 3.36 (1H, m: Cys Hβ), 3.65 (1H, m: Cys Hβ), 4.00 (1H, t, J= 7.2 Hz: Glu Hα), 3.91 (2H, s: Gly Hα), 4.12 (1H, m: H4'), 4.25 (1H, dd, J= 9.6, 9.6 Hz: H5'), 4.43 (1H, ddd, J=4.2, 9.6, 21.6 Hz), 4.67 (1H, dd, J= 4.8, 7.2 Hz: Cys Hα), 4.79 (overlapped with residual H₂O: H2'), 5.17 (1H, m: H3'), 5.98 (1H, s, H1')

[0061] ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 25.5 (Glu Cβ), 31.0 (Glu Cγ), 35.1 (Cys Cβ)

, 41.2 (Gly C α), 52.2 (Glu C α), 53.1 (Cys C α), 67.3 (d, J_{CP} = 6.75 Hz: C5'), 71.4 (d, J_{CP} =7.95 Hz: C2'), 72.0 (d, J_{CP} =3.75Hz:C4'), 77.0 (d, J_{CP} =4.20 Hz: C3'), 92.3 (C1'), 116.5 (C5), 143.9 (C8), 152.8 (C4), 153.8 (C2), 157.8 (C6), 171.5 (Glu carboxylate), 171.9 (Cys amide-carbonyl), 172.9 (Gly carboxylate), 174.1 (Glu amide-carbonyl).

[0062] 反応産物の解析結果から、8-NO₂-cGMPとグルタチオンとの反応では、ニトロ基が脱離していることが推察された。反応液中に生成する亜硝酸イオンをAka ikeらの方法 (J. Biochem. 122, 459-466, 1997) に従ってHPLC-Griess法によって定量した。反応溶液 (5 μ l) を逆相クロマトグラフィー (4.6 x 30 mm、CA-ODS、エイコム社製) にて分離した。移動相は流速0.55 ml/minの10 mM酢酸ナトリウム (pH 5.5)、0.1 M NaCl、0.5 mMエチレンジアミン4酢酸を用いた。分離された亜硝酸イオンを0.1 ml/minの流速で混合したGriess試薬と反応させ、生成したジアゾ化合物の540 nmの吸収を測定した。その結果、8-NO₂-cGMPとグルタチオンとの反応中に生成する亜硝酸イオンと、グルタチオンのcGMP付加体の生成量は完全に一致することが示された。以上の結果より、生理的条件下 (pH7.4, 37°C) では、8-NO₂-cGMPはシステインのSH基に対してcGMPのC8位を付加するS-グアニル化修飾反応をもたらすことが示された。さらに、このとき、ニトロ基を脱離することが示された。

[0063] 試験例2 : 8-NO₂-cGMPによるアミノ酸のSH基選択的修飾

8-NO₂-cGMPがSH基に対して選択的に反応していることを示すため、種々のアミノ酸と8-NO₂-cGMPとの反応を解析した。8-NO₂-cGMPを終濃度20 μ Mとなるように200 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) に溶解し、37°Cにて保温した。そこへ、終濃度が10 mMとなるように各種アミノ酸を添加し、速やかに混合した。その後、直ちにその溶液を37°Cに保った分光光度計 (U-2810、日立製) へセットし、400 nmにおける吸収を経時的に測定した。上記試験例1にて述べたように、NO₂-cGMPがSH基のような求核体と反応すると、脱ニトロ化を起こして、その結果、400 nmにおける8-NO₂-cGMP特有の吸収が減少する。これを指

標として、8-NO₂-cGMPとアミノ酸との反応を解析した。アミノ酸として、グルタミン酸、アスパラギン酸、メチオニン、スレオニン、セリン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、システインを用いた。400 nmにおける吸収の減少を、反応時間に対してプロットし、反応速度を算出した。8-NO₂-cGMPと各種アミノ酸との反応速度を求めた結果を図2に示す。これより明らかのように、8-NO₂-cGMPは、システインとのみ反応し、他のアミノ酸とは全く反応しないことが示された。従って、本実験条件下で、8-NO₂-cGMPは、SH基に対する選択的な反応試薬で、その他の官能基、すなわち、アミノ基、アミド基、水酸基、カルボキシル基、チオエーテル基とは全く反応しないことが示された。

[0064] 試験例3：8-NO₂-cGMPによる蛋白質SH基に対するS-グアニル化修飾

ウシ血清アルブミン（BSA）およびヒト α_1 -プロテアーゼインヒビター（ α_1 -PI）は、いずれも分子内に遊離のSH基を1つだけ有する蛋白質であり、これらをモデル蛋白質として用いて、8-NO₂-cGMPによる蛋白質SH基へのS-グアニル化修飾を解析した。BSAあるいは α_1 -PIを終濃度0.1 mMとなるように100 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）に溶解した。この溶液に、終濃度1 mMとなるように8-NO₂-cGMPを添加し、37°Cにて反応させた。反応溶液の一部を経時的に採取し、その反応液中に生成した亜硝酸イオンを、上記試験例1にて述べたHPLC-Griess法によって定量した。亜硝酸イオンの生成を、8-NO₂-cGMPによるSH基修飾の指標とした。結果を図3に示す。反応24時間後には、0.1 mMの α_1 -PIに対して0.055 mMの亜硝酸イオンが生成しており、 α_1 -PIのSH基の55%程度がS-グアニル化されていることが示された。一方、BSAの場合は、反応24時間後においても、わずかに0.007 mMの亜硝酸イオンしか生成していなかった。すなわち、8-NO₂-cGMPによる蛋白質のS-グアニル化は、それぞれの蛋白質に特有のSH基の反応性に大きく依存し、8-NO₂-cGMPは、反応性の高いSH基に対する選択的なS-グアニル化修飾剤として機能することが示された。

[0065] 試験例4：8-NO₂-cGMPによる組換えKeap1蛋白質のS-グアニル化

Keap1蛋白質は、転写因子Nrf2の制御因子である。通常、Keap1はNrf2と結

合して、Nrf2の転写活性を抑制しているが、Keap1のSH基が化学修飾を受けるとNrf2から脱離し、Nrf2の転写活性が発現する。その結果、ヘムオキシゲナーゼー1やグルタチオンS-トランスフェラーゼなどの抗酸化酵素・細胞保護作用酵素が誘導され、細胞が酸化ストレスなどに対して耐性になる。8-NO₂-cGMPがKeap1のSH基をS-グアニル化するかどうかを組換えKeap1蛋白質を用いてWestern blot法により解析した。

[0066] Tongらの方法 (Mol. Cell. Biol. 26, 2887-2900, 2006) に従って調製した組換えKeap1蛋白質 (分子内に25残基のシステインを持つ) を、SH基濃度が3.2 μ Mとなるように0.1 mMエチレンジアミン4酢酸、0.5 mMジチオスレイトールを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。ある実験では、ここにさらに10 mMのグルタチオンを添加した。このKeap1蛋白質溶液に、種々の濃度の8-NO₂-cGMPを添加し、37°Cで3時間反応を行った。対照として、試験例3にて用いた α_1 -PIを用いた。反応後、蛋白質量として1レーンあたり70 ngを加えて、SDS-7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ポリビニリデンジフルオリド膜 (Millipore社製) へ転写後、5%スキムミルク (Becton Dickinson社)、0.1% Tween20、0.9% NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) (ブロッキングバッファー) を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。続いて、ブロッキングバッファーで1000倍希釈したポリクローナル抗S-グアニル化抗体 (特願2007-015728) と4°Cで一晩反応した。反応後、ブロッキングバッファーで3回洗浄し、同バッファーで1000倍希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Santa Cruz Biotechnology社製) と室温で1時間反応した後、膜をブロッキングバッファーで2回、さらに0.1% Tween 20、0.9% NaCl、100 mM Tris-HCl (pH 7.5) で3回洗浄した。検出はECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences社) を用いた化学発光法により行った。検出にはFuji Film社製のLAS1000UV miniを用いた。

[0067] 結果を図5に示す。大過剰の低分子SH化合物であるグルタチオンの共存下でも、明らかにS-グアニル化されたKeap1のバンドが検出できた。このS-グアニル化の効率、対照として用いた α_1 -PIと比べても、顕著に高く、Keap1蛋

白質が8-NO₂-cGMPによって効率よくS-グアニル化されることが示された。

[0068] 試験例 5 : 8-NO₂-cGMPによる細胞内Keap1蛋白質のS-グアニル化

ヒト肝癌細胞株HepG2細胞を8-NO₂-cGMPで処理し、細胞内のKeap1蛋白質に対するS-グアニル化を解析した。HepG2細胞は10%ウシ血清を含むDulbecco's Eagle MEM中にて培養した。あらかじめグルタチオン合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン (1 mM) で11時間処理したHepG2細胞に対し、0.5 mMの8-NO₂-cGMPを添加してさらに1時間培養を行った。その後、細胞をリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) で2回洗浄し、続いて蛋白分解酵素阻害剤入りRIPAバッファ (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40, 0.1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、150 mM NaCl、1 mM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride hydrochloride、0.1 mM E-64、0.5 mg/mlロイペプチン) を加え細胞溶解液を調製した。氷上で5分間静置したあと、セルスクレーパーにて回収した。これを遠心 (15,000 rpm、10分、4°C) し、上清の可溶性画分の蛋白質濃度をBCA protein assay (Pierce社) を用いて定量した。この細胞溶解液よりKeap1蛋白質を免疫沈降法により精製した。具体的には、蛋白質0.1 mgに対して、抗Keap1抗体 (ヒツジモノクローナル、Santa Cruz社) を2 µg加え、穏やかに攪拌しながら4°Cで1晩インキュベーションした。その後、10 mlのプロテインA/Gアガロースゲル (Santa Cruz社) を加えて、4°Cで2時間インキュベーションした。その後、アガロースゲルをRIPAバッファで5回洗浄し、遠心 (5,000 rpm、3分) し、ゲルを回収した。このゲルに対し、SDSバッファ (20 µl, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20%グリセロール、4% SDS、10 mM ジチオスレイトール) を加えて、99°Cで3分間加熱処理した。遠心 (5,000 rpm、3分) した上清をサンプルとし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、その後、Western blot解析を上記の追加試験例 1 と同様の方法により行った。ただし、ブロッキングバッファとしてReliaBL0TTM (コスモ・バイオ社) を用いた。また、1次抗体として、ウサギポリクローナル抗S-グアニル化抗体、およびラットモノクローナル抗Keap1抗体 (Kobayashi らから供与、Mol. Cell. Biol. 26, 221-229, 2006) を用いた。

[0069] 図6に示すように、8-NO₂-cGMP処理したHepG2細胞より得られたKeap1蛋白質が著しくS-グアニル化を受けていることが明らかとなった。従って、8-NO₂-cGMPは、細胞内のKeap1を効率よくS-グアニル化する活性があることが示された。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、SH基に対して非常に選択的に反応し、アミノ基や水酸基にはほとんど反応せず、高反応性のSH基に対する選択的な修飾が可能となる。また、本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、細胞毒性は見かけ上、ほとんど無いことから生細胞内SH基修飾への展開も可能となる。さらに本発明で用いる8-ニトログアノシン誘導体は、細胞保護剤としても有用である。

図面の簡単な説明

[0071] [図1] 図1は、分子量測定ならびにNMR測定により決定されたグルタチオン-cGMP付加体の構造を示す。図中の矢印は、HMBC実験において観測される相関を示す。

[図2] 図2は、各種アミノ酸と8-NO₂-cGMPの反応速度を示す。

[図3] 図3は、8-NO₂-cGMPによるウシ血清アルブミン（BSA）あるいはヒト α_1 -プロテアーゼインヒビター（ α_1 -PI）のSH基に対する反応過程で生成する亜硝酸イオンの放出を測定した結果を示す。

[図4] 図4は、グルタチオンのSH基に対する8-ニトログアノシン関連化合物の反応速度を示す。図中に示した化合物の略称は、8-NO₂-Guo（8-ニトログアノシン）、2'-F-8-NO₂-Guo（2'-フルオロ-8-ニトログアノシン）、および8-NO₂-cGMP（8-ニトログアノシン-3', 5'-サイクリックリン酸）。

[図5] 図5は、タンパク質S-グアニル化をWestern blot法にて解析した結果を示す。組換えKeap1タンパク質あるいはヒト α_1 -プロテアーゼインヒビター（ α_1 -PI）を各種濃度の8-NO₂-cGMPおよびグルタチオン（GSH）の存在下で、3時間あるいは20時間反応させた後、抗S-グアニル化抗体を用いたWestern blotを行った。図の上段には抗S-グアニル化抗体と反応するバンドの像を、また

、下段にはそのバンドの濃さをデンストメーターにて定量した数値をグラフ化したものを示す。

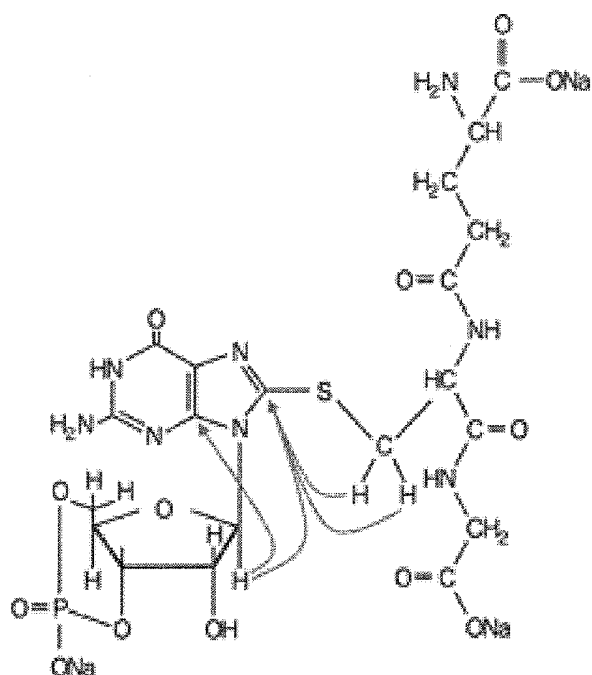
[図6] 図6は、8-NO₂-cGMPで処理したHepG2細胞より、抗Keap1抗体を用いて免疫沈降で回収したKeap1タンパク質について、抗S-グアニル化抗体を用いたWestern blotにてS-グアニル化を解析した結果を示す。

請求の範囲

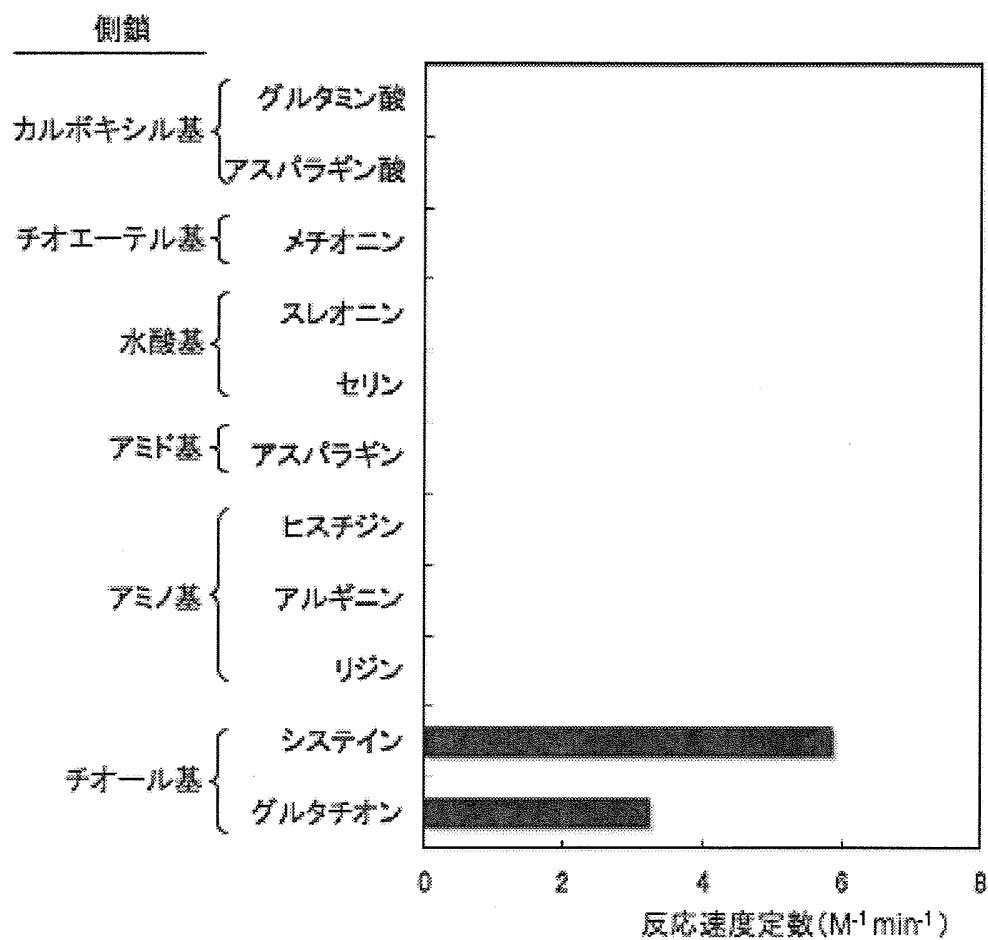
- [1] 8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'、5'サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'、5'サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'、5'サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸から選択される化合物、又は上記化合物をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を含む、SH基修飾剤。
- [2] 8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'、5'サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'、5'サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'、5'サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸から選択される化合物、又は上記化合物をさらにビオチン基又は蛍光発色団で修飾した化合物を、SH基を含む物質に接触させてSH基と反応させることを含む、SH基を修飾する方法。
- [3] 8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'、5'サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマイシンリボシド3'、5'サイクリック1リン酸、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン3'、5'サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3'、5'サイクリック1リン酸から選択される化合物を含む細胞保護剤。
- [4] 8-ニトログアニン、8-ニトログアノシン、2'-フルオロ-8-ニトログアノシン、8-ニトログアノシン-3'、5'サイクリック1リン酸、アゾマイシンリボシド、2-ニトロアデノシン、8-ニトロアデノシン、アゾマ

イシンリボシド3' , 5' サイクリック1リン酸、2' -フルオロー8-ニトログアノシン3' , 5' サイクリック1リン酸、2-ニトロアデノシン3' , 5' サイクリック1リン酸、又は8-ニトロアデノシン3' , 5' サイクリック1リン酸から選択される化合物を細胞に投与することを含む、細胞を保護する方法。

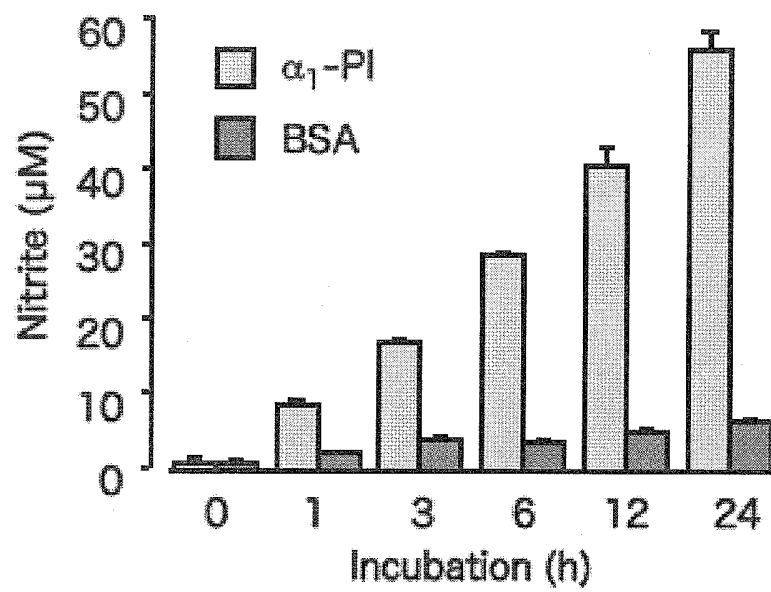
[図1]



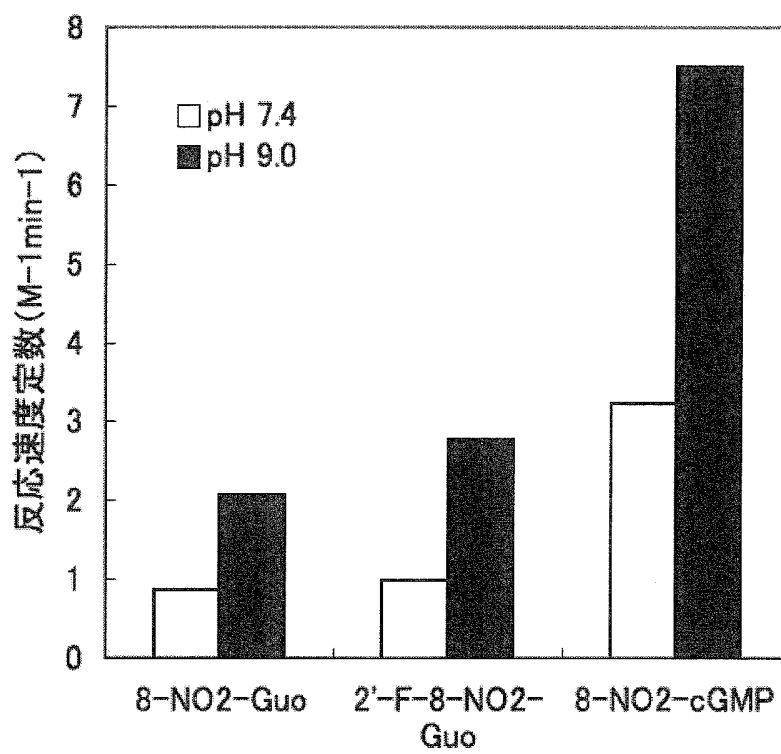
[図2]



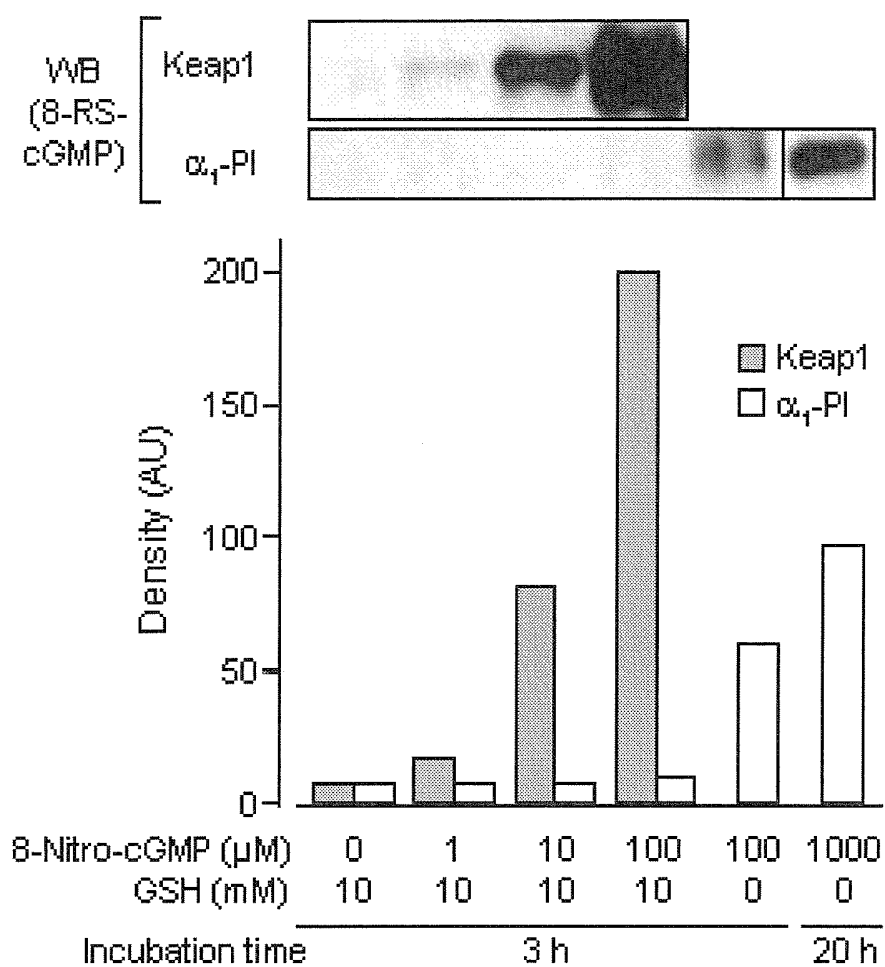
[図3]



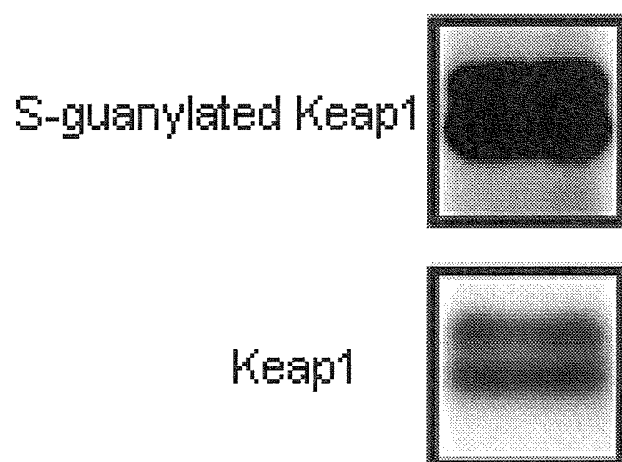
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/000090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H19/167(2006.01)i, A61K31/708(2006.01)i, A61P39/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C07H19/173(2006.01)i, C07K1/13(2006.01)i, C12N1/04
(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H19/167, A61K31/708, A61P39/00, A61P43/00, C07H19/173, C07K1/13,
C12N1/04, G01N33/536, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
EMBASE (STN), JSTPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAWA, Tomohiro et al., Nitritative signal transduction mediated via NO-dependent formation of 8-nitroguanine derivatives: implications for unique cytoprotective action of NO, Seikagaku, 2006, p.A12601(3P-A-196)	3, 4
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect, Nitric Oxide, 2004, Vol.11, No.1, pp.98-99	3, 4
X	Jun YOSHITAKE, "Kansen Byotai ni Okeru NO no 8-Nitroguanosine Seisei o Kaisuru Saibo Hogo Sayo", Japanese journal of bacteriology, 2005, Vol.60, No.1, p.147, P2-91/WS8-8	3, 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 March, 2008 (12.03.08)

Date of mailing of the international search report
25 March, 2008 (25.03.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/000090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Teruo AKUTA, " 8-Nitroguanosine no Seitainai Seisei to Saibo Hogo Sayo", Seikagaku, 2004, Vol.76, No.11, p.1500, B-7	3,4
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect in the cell, Seikagaku, 2003, Vol.75, No.8, p.992, 3P-552	3,4
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect, Seikagaku, 2004, Vol.76, No.8, p.1042, 4P-256 (W79-17)	3,4
X	AKUTA, Teruo et al., NO-induced tumorigenesis mediated by nitrative signal and its cytoprotective effect, Dai 64 Kai Proceedings of the Japanese Cancer Association, 2005, p.544-545, W-910	3,4
A	GOLDMAN, P. et al., Reactions of nitroimidazoles. Nucleophilic substitution of the nitro group, Journal of the American Chemical Society, 1981, Vol.103, pp.6224-6226	1,2
A	JP 6-209736 A (Yoshie KURIHARA), 02 August, 1994 (02.08.94), Full text; particularly, Par. No. [0023] (Family: none)	1,2
A	JP 8-205893 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.), 13 August, 1996 (13.08.96), Full text; particularly, Par. No. [0030] (Family: none)	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/000090

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1 and 2 relate to an SH-modifying agent comprising a compound selected from 8-nitroguanine and the like.
2. Claims 3 and 4 relate to a cell-protecting agent comprising a compound selected from 8-nitroguanine and the like.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07H19/167 (2006.01)i, A61K31/708 (2006.01)i, A61P39/00 (2006.01)i, A61P43/00 (2006.01)i, C07H19/173 (2006.01)i, C07K1/13 (2006.01)i, C12N1/04 (2006.01)i, G01N33/536 (2006.01)i, G01N33/68 (2006.01)i												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07H19/167, A61K31/708, A61P39/00, A61P43/00, C07H19/173, C07K1/13, C12N1/04, G01N33/536, G01N33/68												
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 35%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2008年											
日本国実用新案登録公報	1996-2008年											
日本国登録実用新案公報	1994-2008年											
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JSTPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JMEDPlus (JDream2)												
C. 関連すると認められる文献												
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
X	SAWA, Tomohiro et al., Nitrate signal transduction mediated via NO-dependent formation of 8-nitroguanine derivatives: implications for unique cytoprotective action of NO, 生化学, 2006, p. A12601 (3P-A-196)	3, 4										
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect, Nitric Oxide, 2004, Vol.11, No.1, pp.98-99	3, 4										
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。												
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 </td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献							
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">12.03.2008</div>		国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right;">25.03.2008</div>										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 60%;">特許庁審査官（権限のある職員）</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">4 P</td> <td style="width: 30%; text-align: center;">2939</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">新留 素子</td> </tr> <tr> <td colspan="3">電話番号 03-3581-1101 内線 3492</td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員）	4 P	2939	新留 素子			電話番号 03-3581-1101 内線 3492		
特許庁審査官（権限のある職員）	4 P	2939										
新留 素子												
電話番号 03-3581-1101 内線 3492												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	吉武淳, 感染病態におけるNOの8-ニトログアノシン生成を介する細胞保護作用, 日本細菌学雑誌, 2005, Vol.60, No.1, p.147, P2-91/WS8-8	3, 4
X	芥照夫, 8-ニトログアノシンの生体内生成と細胞保護作用, 生化学, 2004, Vol.76, No.11, p.1500, B-7	3, 4
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect in the cell, 生化学, 2003, Vol.75, No.8, p.992, 3P-552	3, 4
X	AKUTA, Teruo et al., 8-Nitroguanosine formation induced by NO and its potential cytoprotective effect, 生化学, 2004, Vol.76, No.8, p.1042, 4P-256(W79-17)	3, 4
X	AKUTA, Teruo et al., NO-induced tumorigenesis mediated by nitrate signal and its cytoprotective effect, 第64回日本癌学会学術総会記事, 2005, p.544-545, W-910	3, 4
A	GOLDMAN, P. et al., Reactions of nitroimidazoles. Nucleophilic substitution of the nitro group, Journal of the American Chemical Society, 1981, Vol.103, pp.6224-6226	1, 2
A	JP 6-209736 A (栗原良枝) 1994.08.02, 全文、特に【0023】段落 (ファミリーなし)	1, 2
A	JP 8-205893 A (住友金属工業株式会社) 1996.08.13, 全文、特に【0030】段落 (ファミリーなし)	1, 2

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 請求の範囲1, 2は、8-ニトログアニン等から選択される化合物を含むS H修飾剤に関するものである。

2. 請求の範囲3, 4は、8-ニトログアニン等から選択される化合物を含む細胞保護剤に関するものである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。