

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-510676

(P2006-510676A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 333/38 (2006.01)	C O 7 D 333/38 C S P	4 C O 2 3
A 6 1 K 31/381 (2006.01)	A 6 1 K 31/381	4 C O 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 I O 5	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-559435 (P2004-559435)	(71) 出願人	591002957
(86) (22) 出願日	平成15年12月5日 (2003.12.5)		スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月5日 (2005.8.5)		S M I T H K L I N E B E E C H A M C O R P O R A T I O N
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/038970		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1940 6-0939、キング・オブ・プルシア、 スウェードランド・ロード709番
(87) 国際公開番号	W02004/053087	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成16年6月24日 (2004.6.24)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/431,496	(74) 代理人	100116311
(32) 優先日	平成14年12月6日 (2002.12.6)		弁理士 元山 忠行
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 NF-κB阻害剤

(57) 【要約】

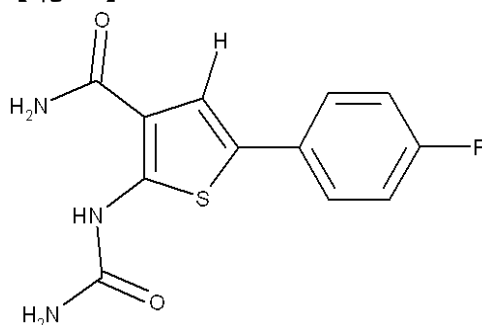
本発明は、I B の I K K - リン酸化の阻害に関連する疾患を治療するための特定の化合物および方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造式：

【化 1】



10

を有する 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 2 - ウレイド - チオフェン - 3 - カルボン酸アミド。

【請求項 2】

病的 NF - B 活性化により特徴づけられる疾患の治療法であって、それを必要とする患者に有効量の請求項 1 記載の化合物を投与することにより病的活性化を阻害することを含む方法。

【請求項 3】

20

疾患が炎症または組織修復障害である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

疾患が、炎症および組織修復障害、特に関節リウマチ、炎症性腸管疾患、喘息および COPD (慢性閉塞性肺疾患)、骨関節炎、骨粗鬆症および線維症、乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射 (UV) 誘発の皮膚損傷を含む皮膚病、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎を含む自己免疫疾患、組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を含む癌、カヘキシー、感染および後天性免疫不全症候群 (AIDS) を含むある種のウイルス感染に伴う炎症、成人呼吸窮迫症候群および毛細血管拡張失調症からなる群から選択される請求項 3 記載の方法。

30

【請求項 5】

前記疾患が皮膚病である請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

疾患が、乾癬、アトピー性皮膚炎、および UV により誘発される皮膚損傷からなる群から選択される請求項 3 記載の方法。

【請求項 7】

疾患が、自己免疫疾患；組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、骨関節炎、骨粗鬆症、および毛細血管拡張失調症からなる群から選択される請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】

40

前記疾患が自己免疫疾患である請求項 3 記載の方法。

【請求項 9】

自己免疫疾患が全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、または強直性脊椎炎、糖尿病である請求項 3 記載の方法。

【請求項 10】

疾患が癌および / またはカヘキシーである請求項 3 記載の方法。

【請求項 11】

癌がホジキン病である請求項 3 記載の方法。

【請求項 12】

疾患が感染および後天性免疫不全症候群 (AIDS) を含むある種のウイルス感染症に

50

付随する炎症である請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 3】

疾患が A I D S である請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 4】

疾患が成人呼吸窮迫症候群である請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記疾患が C O P D である請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記疾患が喘息である請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 7】

前記疾患が関節リウマチである請求項 3 記載の方法。

【請求項 1 8】

N F - B およびチェックポイントキナーゼの二重阻害がある請求項 3 記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は一般に、アミノチオフェン化合物を用いた転写因子 N F - B (核因子 - B) の病的活性化を阻害する方法に関する。かかる方法は、N F - B の活性化が関与する疾患の治療において特に有用である。さらに詳細には、これらの方法は、N F - B 二量体のその後の分解および活性化を防止する I B (阻害タンパク質 B) の I K K - (I B キナーゼ - 、I K K - 2 としても知られる) リン酸化の阻害に用いることができる。かかる方法は、炎症および組織修復障害；特に関節リウマチ、炎症性腸管疾患、喘息および C O P D (慢性閉塞性肺疾患)、骨関節炎；骨粗鬆症および線維症；乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線 (U V) により引き起こされる皮膚損傷をはじめとする皮膚病；全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎をはじめとする自己免疫疾患、組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病をはじめとする癌、カヘキシー、感染および後天性免疫不全症候群 (A I D S) をはじめとするある種のウイルス感染症に伴う炎症、成人呼吸窮迫症候群および毛細血管拡張失調症をはじめとする N F - B 活性化に関連する様々な疾患の治療において有用である。

20

30

【0002】

(従来技術)

急性および慢性炎症性疾患に関与するメディエーターの科学的理解における最近の進歩は、効果的な治療法の探索において新しい方法をもたらした。伝統的な方法は、特異的抗体、レセプター拮抗物質、または酵素阻害剤の使用など直接標的介入を包含する。様々なメディエーターの転写および翻訳に関与する調節機構の解明における最近の飛躍的前進は、遺伝子転写のレベルでの治療法への関心の増大につながっている。

核因子 B (N F - B) は、ポリペプチドの R e l / N F - B ファミリーの様々な組み合わせからなる密接に関連した二量体転写因子複合体のファミリーに属する。このファミリーは哺乳動物における 5 の別個の遺伝子産物：R e l A (p 6 5)、N F - B 1 (p 5 0 / p 1 0 5)、N F - B 2 (p 4 9 / p 1 0 0)、c - R e l、および R e l B からなり、その全てが異種または同種二量体を形成できる。これらのタンパク質は、D N A 結合ドメインおよび二量化ドメインを含有する、極めて相同的な 3 0 0 個のアミノ酸「R e l 相同性ドメイン」を共有する。その先端にある、R e l 相同性ドメインの C - 末端は、N F - B の細胞質から核への輸送に重要な核転座配列である。加えて、p 6 5 および c R e l は、その C - 末端に強力なトランス活性化ドメインを有する。

40

【0003】

N F - B の活性は、タンパク質の阻害剤 I B ファミリーのメンバーとの相互作用に

50

より調節される。この相互作用は、NF- κ Bタンパク質上の核局在化配列を効率よくブロックし、二量体の核への移動を防止する。様々な刺激が複数のシグナル変換経路であるらしいものによりNF- κ Bを活性化する。バクテリア産物(LPS)、ある種のウイルス(HIV-1、HTLV-1)、炎症性サイトカイン(TNF、IL-1)、環境および酸化ストレスおよびDNA損傷剤が含まれる。しかしながら、全ての刺激に明らかに共通するのは、I κ Bのリン酸化およびその後の分解である。I κ Bは最近同定されたI κ Bキナーゼ(IKK-およびIKK-)により2つのN-末端セリンでリン酸化される。部位特異的突然変異誘発の研究は、一旦リン酸化されるとタンパク質はユビキチン-プロテアソーム経路により分解されるようになる点で、これらのリン酸化はNF- κ Bのその後の活性化に重要であることを示している。I κ Bなしで、活性NF- κ B複合体は核へ転位することができ、ここでこれらは選択的に好ましい遺伝子特異性エンハンサー配列と結合する。NF- κ Bにより調節される遺伝子には、多くのサイトカインおよびケモカイン、細胞接着分子、急性期タンパク質、免疫制御タンパク質、エイコサノイド代謝酵素および抗アポトーシス遺伝子が含まれる。

【0004】

NF- κ Bは、TNF、IL-1、IL-6およびIL-8などのサイトカイン、ICAMおよびVCAMなどの細胞接着分子、および誘導型酸化窒素シンターゼ(iNOS)をはじめとする多数の前炎症性メディエーターの制御された発現において重要な役割を果たすことは周知である。このようなメディエーターは、炎症部位での白血球の補充に参与することが知られており、iNOSの場合、ある種の炎症性および自己免疫疾患における器官破壊につながり得る。

NF- κ Bの炎症性障害における重要性は、NF- κ Bが活性化されることが証明されている喘息をはじめとする気道炎症の研究によりさらに強固にされる。この活性化は、これらの障害に特徴的な増大したサイトカイン産生および白血球浸潤の根底にある。加えて、吸入されたステロイドは気道過剰反応性を減少させ、喘息性気道における炎症性応答を抑制する。NF- κ Bのグルココルチコイド阻害に関する最近の知見を考慮して、これらの効果はNF- κ Bの阻害により媒介されると推測することができる。

【0005】

さらに、炎症性障害におけるNF- κ Bの役割については、リウマチ様滑膜の研究から明らかにされる。NF- κ Bは通常、不活性な細胞質複合体として存在するが、最近の免疫組織化学的研究により、NF- κ Bは核において存在し、従ってリウマチ様滑膜を含む細胞においては活性であることが示されている。さらに、NF- κ Bはヒト滑膜細胞においてTNF- α またはIL-1 β での刺激に応答して活性化されることが示されている。かかる分布はこの組織に特徴的な増大したサイトカインおよびエイコサノイド産生の基礎になるメカニズムである。Rosshak、A.K.,ら、J. Biol. Chem., 271、31496-31501(1996)参照。IKK- γ の発現は、関節リウマチの患者の滑膜細胞において示され、遺伝子移入研究により、これらの細胞における刺激された炎症性メディエーター産生におけるIKK- γ の中心的役割が示されている。Apperleら、J. Immunology 1999、163:427-433およびApperleら、J. Immunology 2001、166:2705-11参照。ごく最近、野生型IKK- γ アデノウイルス構築物の関節内投与は足の腫脹を引き起こすことが示されているが、主要な負のIKK- γ の関節内投与はラットにおいてアジュバントにより誘発された関節炎を阻害した。Takら、Arthritis and Rheumatism 2001、44:1897-1907参照。

【0006】

NF- κ B/RelおよびI κ Bタンパク質は、腫瘍形質転換および転移においても重要な役割を果たすようである。ファミリーメンバーは、過剰発現、遺伝子増幅、遺伝子再配列または転座の結果としてインビトロおよびインビボの細胞形質転換と関連する。加えて、これらのタンパク質をコード化する遺伝子の再配列および/または増幅は、あるヒトリンパ性腫瘍の20~25%において見られる。さらに、NF- κ Bは、腫瘍形成ラシに

より活性化され、ヒト腫瘍における最も一般的な異常およびNF- κ Bの活性化の阻害は、ラズによる細胞形質転換を阻害する。加えて、アポトーシスの制御におけるNF- κ Bの役割が報告されており、腫瘍細胞増殖の制御におけるこの転写因子の役割を強化する。TNF、電離放射線およびDNA損傷剤はすべてNF- κ Bを活性化することが示されており、これはいくつかの抗アポトーシスタンパク質の増加調節された発現につながる。反対に、NF- κ Bの阻害は、数種の腫瘍細胞においてこれらの物質によるアポトーシスキリングを向上させることが示されている。このことは、化学療法に対して耐性の腫瘍細胞の主なメカニズムを表すようであるので、NF- κ B活性化の阻害剤は単独の薬剤または補助治療のいずれかとして有用な化学療法剤である。最近の報告では、骨格細胞分化の阻害剤ならびにサイトカインにより誘発される筋肉消耗の調節剤としてNF- κ Bが関与するとされ(Guttridgeら、Science; 2000; 289: 2363-2365)、このことは新規癌治療法としてのNF- κ B阻害剤の可能性を支持する。

【0007】

いくつかのNF- κ B阻害剤は、C. Wahlら、J. Clin. Invest. 101(5), 1163-1174(1998)、R. W. Sullivanら、J. Med. Chem. 41, 413-419(1998)、J. W. Pierceら、J. Biol. Chem. 272, 21096-21103(1997)に記載されている。

海洋天然産物であるヒメニアルジシンはNF- κ Bを阻害することが知られている。Roshak, A., ら、J. PET, 283, 955-961(1997)。Bretton, J. J.およびChabot-Fletcher, M. C., J. PET, 282, 459-466(1997)。

【0008】

さらに、特許出願は、IKK-2またはIKK複合体の阻害剤を開示している。WO 2002 46171、WO 2001 98290、WO 2001 68648、EP 1134221、DE 19807993、EP 1209158、WO 2001 30774、DE 19928424、WO 2001 00610、WO 2002 24679、WO 2002 24693、WO 2002 44153、WO 2002 28860、WO 2002 60386、WO 2002 41843、およびWO 2002 62804参照。ウレイドチオフエンを包含する特許出願はWO 2001 58890およびWO 2002 30353を包含する。PS-1145はIKK-2阻害剤であることが証明された。JBC 2002, 19, 16639-16647参照。スタウロスポリン、クエルセチン、K252aおよびK252bなどの天然産物は、IKK-2阻害剤であることが示されている。Peeet, G. W. およびLi, J. J. Biol. Chem., 274, 32655-32661(1999)およびWisniewski, D. ら、Analytical Biochem. 274, 220-228(1999)参照。

【0009】

(発明の要約)

本発明は、新規化合物および活性化転写因子NF- κ Bを阻害するためのその使用を含む。

本発明の一の目的は、転写因子NF- κ Bの活性を変更することにより治療的に緩和される疾患の治療法を提供することである。

従って、第一の態様において、本発明は、本発明の化合物を含む医薬組成物を提供する。

もう一つ別の態様において、本発明は疾患の治療法であって、IKK-2によりI κ Bのリン酸化およびその後の分解を阻害することにより病状を治療的に緩和することができる方法を提供する。

さらにもう一つ別の態様において、本発明は疾患の治療法であって、NF- κ Bの病的活性化を阻害することにより病状を治療的に緩和できる方法を提供する。

【0010】

特定の態様において、本発明は、炎症および組織修復障害、特に関節リウマチ、炎症性

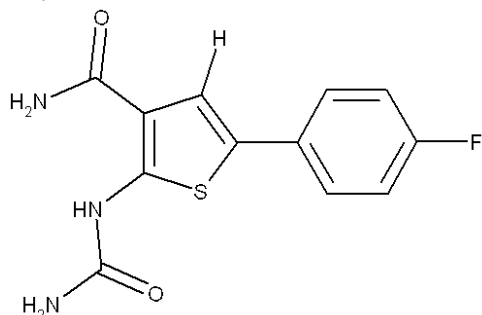
腸管疾患、喘息およびＣＯＰＤ（慢性閉塞性肺疾患）、骨関節炎、骨粗鬆症および線維症、乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線（ＵＶ）により引き起こされる皮膚損傷をはじめとする皮膚病、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎をはじめとする自己免疫疾患、組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病をはじめとする癌、カヘキシー、感染および後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）をはじめとするある種のウイルス感染症に伴う炎症、成人呼吸窮迫症候群および毛細血管拡張失調症をはじめとするＮＦ－Ｂの活性化に関連する様々な疾患の治療法を提供する。

【００１１】

（発明の開示）

本発明の化合物は以下の式（Ｉ）で示される：

【化１】



式１の化合物は５－（４－フルオロ－フェニル）－２－ウレイド－チオフェン－３－カルボン酸アミドとして表すこともできる。

【００１２】

本発明はさらに、ＮＦ－Ｂの活性化と関連する疾患の治療法であって、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

本発明は、炎症性および組織修復障害をはじめとするＮＦ－Ｂの活性化に関連する様々な疾患、特に関節リウマチ、炎症性腸管疾患、喘息およびＣＯＰＤ（慢性閉塞性肺疾患）、骨関節炎、骨粗鬆症および線維症、乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線（ＵＶ）により引き起こされる皮膚損傷をはじめとする皮膚病；全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎をはじめとする自己免疫疾患、組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病をはじめとする癌、カヘキシー、感染および後天性免疫不全症候群（ＡＩＤＳ）をはじめとするある種のウイルス感染症に伴う炎症、成人呼吸窮迫症候群、および毛細血管拡張失調症の治療法を提供する。

【００１３】

定義

本発明は、本発明の化合物の全ての水和物、溶媒和物、複合体およびプロドラッグを包含する。プロドラッグは、式Ｉの活性な親医薬をインビボで放出する任意の共有結合した化合物である。

【００１４】

調製法

本発明の式Ｉの化合物は、以下のスキーム１に示す方法により都合よく調製することができる：

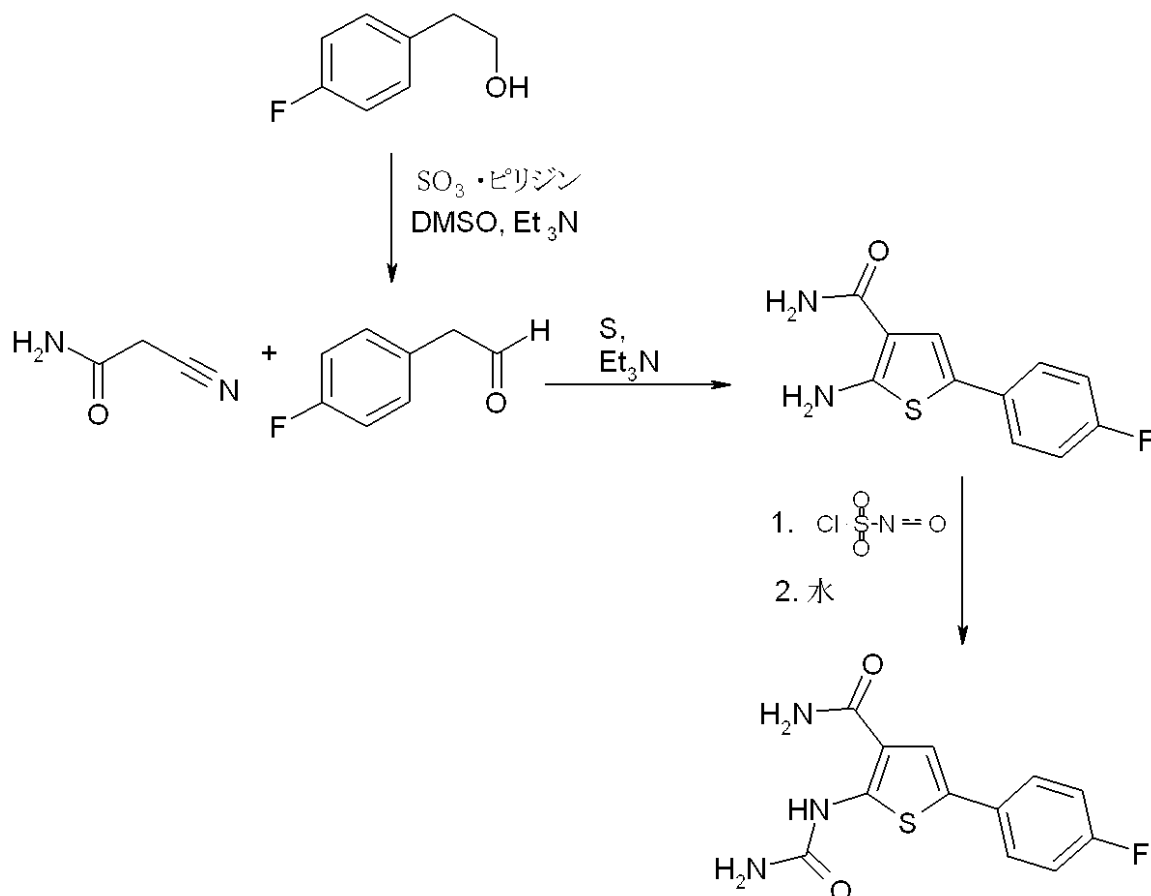
10

20

30

40

【化 2】



10

20

30

40

50

【0015】

本発明において用いられる出発物質は、商業的に入手可能であるか、または当業者に周知の慣例法により調製され、標準的参考文献、例えば the COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS、第I-VI巻(Wiley-Interscience出版)において見いだすことができる。

本発明は、式Iの化合物および医薬的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。従って、式Iの化合物は医薬の製造において用いることができる。以下に記載するようにして調製される式Iの化合物の医薬組成物は、非経口投与用溶液または凍結乾燥粉末として処方することができる。粉末は、使用前に適当な希釈剤または他の医薬的に許容される担体を添加することにより復元することができる。液体処方では緩衝化等張水溶液であってもよい。適当な希釈剤の例は、等張生理食塩水、標準的水中5%デキストロースまたは緩衝化酢酸ナトリウムまたはアンモニウム溶液である。このような処方では非経口投与に特に適しているが、経口投与に使用することもでき、または吸入用計量吸入器またはネブライザー中に含めることもできる。ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ヒドロキシセルロース、アカシア、ポリエチレングリコール、マンニトール、塩化ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムなどの賦形剤を添加することが望ましい。

【0016】

別法として、本発明の化合物は経口投与用にカプセル化、錠剤化あるいはエマルジョンまたはシロップに調製することができる。組成物を促進または安定化するために、あるいは組成物の調製を促進するために、医薬的に許容される固体または液体担体を添加することができる。固体担体は、デンプン、ラクトース、硫酸カルシウム二水和物、白土、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸、タルク、ペクチン、アカシア、寒天またはゼラチンを包含する。液体担体は、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、食塩水および水を包含する。担体は、徐放性物質、例えばグリセリルモノステラレートまたはグリセリルジステラートを単独またはワックスと共に含むことができる。固体担体の量は様々であ

るが、好ましくは投与単位あたり約 20 mg から約 1 g の間である。医薬製剤は、錠剤形については、粉碎、混合、顆粒化、および必要ならば圧縮；またはハードゼラチンカプセル形については粉碎、混合および充填を含む慣例の製薬技術にしたがって製造される。液体担体を用いる場合、製剤はシロップ、エリキシル、エマルジョンあるいは水性または非水性懸濁液の形態である。このような液体処方は、直接経口投与してもよいし、あるいはソフトゼラチンカプセル中に充填してもよい。

【0017】

吸入用の典型的な組成物は、乾燥粉末、溶液、懸濁液またはエマルジョンの形態である。投与は、例えば、乾燥粉末吸入器（例えば、単位用量または多剤吸入器、例えば米国特許第 5590645 号に記載されているもの）によるか、または噴霧によるか、または加圧エアゾルの形態であってもよい。乾燥粉末組成物は、典型的には担体、例えばラクトース、トレハロースまたはデンプンを用いる。噴霧用組成物は典型的にはビヒクルとして水を使用する。加圧エアゾルは典型的にはプロペラント、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタンまたはさらに好ましくは 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、1, 1, 1, 2, 3, 3, 3 - ヘプタフルオロ - n - プロパンまたはその混合物を使用する。加圧エアゾル処方は、賦形剤を含まないか、または界面活性剤および/または補助溶剤（例えばエタノール）を包含する賦形剤を使用してもよい溶液（おそらくはエタノールなどの可溶化剤を使用する）または懸濁液の形態であってもよい。乾燥粉末組成物および懸濁液エアゾル組成物において、活性成分は好ましくは吸入に適した大きさのものである（典型的には 20 ミクロン未満、例えば 1 ~ 10、特に 1 ~ 5 ミクロンの質量中央径（MMD）を有する）。例えばマイクロ化により活性成分のサイズを減少させることが必要である可能性がある。

10

20

【0018】

加圧エアゾル組成物は一般にバルブ、特に計量バルブを備えた容器中に充填される。容器は所望によりプラスチック材料、例えば WO 96 / 32150 に記載されているようなフルオロカーボンポリマーでコートしてもよい。容器は、口腔送達に適用されるアクチュエーター中に取り付けられる。

鼻送達用の典型的な組成物は、吸入について既に記載したもの、および水などの不活性ビヒクル（所望により緩衝液、抗菌剤、等張性調整剤および粘度調整剤との組み合わせ）中溶液または懸濁液の形態であって、鼻ポンプにより投与することができる形態の非加圧組成物をさらに包含する。

30

直腸投与に関して、本発明の化合物はカカオ脂、グリセリン、ゼラチンまたはポリエチレングリコールなどの賦形剤と組み合わせ、坐剤に成形することもできる。

【0019】

本発明の方法は、式 I の化合物の局所、吸入および結腸内投与を包含する。局所投与とは、本発明の化合物の、表皮、口腔への外部投与、およびかかる化合物を耳、眼および鼻中に滴下することをはじめとする非全身性投与を意味し、ここにおいて該化合物は著しく血流中に侵入しない。全身性投与とは、経口、静脈内、腹腔内および筋肉内投与を意味する。局所投与で治療または予防効果を得るのに必要な本発明の化合物（以下、活性成分と称する）の量は、もちろん選択された化合物、治療される状態の性質および重さ、および治療を受けている動物によって変わるが、最終的に医師の判断による。

40

活性成分を原料化学物質として単独で投与することが可能であるが、医薬処方として提供することが好ましい。活性成分は局所投与については処方の 0.01 ~ 5.0 重量% を構成する。

【0020】

獣医学的および人間の医学的用途の両方について、本発明の局所処方は 1 以上の許容できる担体および所望により任意の他の治療成分と共に活性成分を含む。担体は、処方の他の成分と適合性であり、受容者に対して有害でないという意味で「許容でき」なければならない。

局所投与に適した処方、リニメント、ローション、クリーム、軟膏またはペーストな

50

どの、治療が必要な部位へ皮膚を介して浸透するために適した液体または半液体製剤、および眼、耳または鼻への投与に適した滴剤を包含する。

【0021】

本発明の滴剤は、無菌水性または油性溶液または懸濁液を含み、殺菌剤および/または殺真菌剤および/または他の適当な保存料の適当な水溶液（好ましくは界面活性剤を含む）中に活性成分を溶解させることにより調製することができる。結果として得られる溶液は次いで濾過により清澄化し、適当な容器に移し、これを次いで密封し、加圧滅菌または90～100℃で半時間維持することにより殺菌する。別法として、濾過により溶液を殺菌し、無菌技術により容器に移すことができる。滴剤に含めるのに適した殺菌および殺真菌剤の例は、硝酸または酢酸フェニル水銀（0.002%）、ベンザルコニウムクロリド（0.01%）および酢酸クロルヘキシジン（0.01%）である。油性溶液の調製に適した溶媒は、グリセロール、希釈アルコールおよびプロピレングリコールを含んでもよい。

10

【0022】

本発明のローションは、皮膚または眼への適用に適したものを包含する。眼用ローションは、所望により殺菌剤を含んでもよい無菌水性溶液を含むことができ、滴剤の調製法と類似した方法により調製することができる。皮膚への適用に適したローションまたはリニメントは、乾燥を促進し、皮膚を冷却するための薬剤、例えばアルコールまたはアセトン、および/または保湿剤、例えばグリセロールまたは油、例えばヒマシ油または落花生油を含むこともできる。

20

本発明のクリーム、軟膏またはペーストは外部適用のための活性成分の半固体処方である。これらは、活性成分を微粉砕または粉末化された形態において、単独あるいは水性または非水性流体中溶液または懸濁液の形態で、適当な機械の助けを借りて、グリースまたは非グリース基剤と混合することにより製造できる。基剤は、炭化水素、例えば固形、軟質または流動パラフィン、グリセロール、ミツロウ、金属石鹸、粘漿剤、アーモンド油、トウモロコシ油、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油などの天然源の油、羊毛脂またはその誘導体、または脂肪酸、例えばステアリン酸またはオレイン酸を、プロピレングリコールまたはマクロゴールなどのアルコールと共に含むことができる。処方は、任意の適当な界面活性剤、例えばアニオン性、カチオン性または非イオン性界面活性剤、例えばソルビタンエステルまたはそのポリオキシエチレン誘導体を組み入れることができる。懸濁化剤、例えば天然ゴム、セルロース誘導体または無機物質、例えば珪質性シリカ、および他の成分、例えばラノリンを含むこともできる。

30

【0023】

（発明の有用性）

式Iの化合物は、I-BのIKK-ベータキナーゼリン酸化の阻害剤として有用であり、したがってNF- κ Bの活性化の阻害剤である。本発明の方法は、前記化合物の医薬組成物および処方を包含する前記化合物の組成物および処方を利用する。

本発明は特に不適当なNF- κ B活性化に関連する疾患の治療法であって、それを必要とする動物、特に哺乳動物、最も詳細にはヒトに式Iの化合物を投与することを含む方法を提供する。本発明は特に、炎症性および組織修復障害、特に関節リウマチ、炎症性腸管疾患、喘息およびCOPD（慢性閉塞性肺疾患）、骨関節炎、骨粗鬆症および線維症；乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線（UV）により引き起こされる皮膚損傷をはじめとする皮膚病、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎をはじめとする自己免疫疾患、組織および器官拒絶反応、アルツハイマー病、発作、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病をはじめとする癌、カヘキシー、感染および後天性免疫不全症候群（AIDS）をはじめとするある種のウイルス感染症に伴う炎症、成人呼吸窮迫症候群および毛細血管拡張失調症の治療法を提供する。

40

【0024】

急性治療のために、式Iの化合物の非経口投与が有用である。化合物の5%水または標準塩溶液中デキストロス中の静脈内注入液、または適当な賦形剤を含む類似の処方が最

50

も有効であるが、筋肉内ボラス注射も有用である。典型的には、非経口投与量は、I K K - ベータ、従ってNF - Bの活性化を阻害するために有効な濃度に血漿中薬剤の濃度を維持するように、約0.01 ~ 約50 mg / kg ; 好ましくは0.1から20 mg / kgの間である。化合物は、約0.4 ~ 約80 mg / kg / 日の合計一日量を達成するための量で一日につき1 ~ 4回投与される。治療上有効な本発明の方法において用いられる化合物の正確な量およびかかる化合物が最もよく投与される経路は、薬剤の血中濃度と治療効果を得るために必要な濃度を比較することにより当業者によって容易に決定される。

【0025】

式Iの化合物は、薬剤濃度が、I K K - ベータおよびNF - Bの活性化を阻害するため、または本明細書において開示されている任意の他の治療効果を達成するために十分であるように患者に経口投与することもできる。典型的には、化合物を含有する医薬組成物は、患者の状態と一致した方法で約0.1 ~ 約50 mg / kgの間の経口用量で投与される。好ましくは、経口投与量は約0.5 ~ 約20 mg / kgである。

10

式Iの化合物は、薬剤の濃度がI K K - ベータおよびNF - Bの活性化を阻害するかまたは本明細書において開示される任意の他の治療効果を達成するために十分である様な方法で患者に局所投与することもできる。典型的には、化合物を含有する医薬組成物は約0.01% ~ 約5% w / wの間の局所処方投与される。

本発明の化合物を本発明に従って投与した場合に許容できない毒物学的作用は予想されない。

【0026】

20

本明細書において記載される化合物がNF - Bの活性化を阻害する能力は、I K K - によるI B - のN - 末端フラグメントのリン酸化を阻害する能力において明らかに証明される。この化合物は、前炎症刺激（例えば、TNF - 、LPS等）での細胞の活性化によりヒト単球および他の哺乳動物細胞におけるI B - の分解およびNF - Bの核転座もブロックする。加えて、この化合物は、LPS - 刺激されたヒト単球および刺激されたヒト一次滑膜線維芽細胞からの前炎症メディエーター産生を阻害する。疾患の治療における本発明のNF - B阻害剤の有用性は、様々な疾患におけるNF - B活性化の重要性に基づく。加えて、式Iの化合物はラットおよびマウスなどの臨床前種において経口的に生物利用可能であることが証明されている。式Iの化合物のインビボ特性は、匹敵するI K K - 2阻害活性を保持しつつ、4' - F基が欠失した類似体よりも試験された臨床前種において著しく向上されたDMPK特性を示した。

30

【0027】

NF - Bは、TNF、IL - 1、IL - 6およびIL - 8などのサイトカイン（Mukai *et al.*, 1990; Liberman *et al.*, 1990; Matsusaka *et al.*, 1993）、ICAMおよびVCAMなどの細胞接着分子（Marui *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1995; Ledebur *et al.*, 1995）および誘導型酸化窒素シンターゼ（iNOS）（Xie *et al.*, 1994; Adcock *et al.*, 1994）（完全な文献の引用箇所はこの節の最後に記載）をはじめとする多数の前炎症性メディエーターの制御された発現において重要な役割を果たす。このようなメディエーターは炎症の部位での白血球の補充に関与することが知られており、iNOSの場合にはある種の炎症性および自己免疫疾患における器官破壊に至る可能性がある（McCartney - Francis *et al.*, 1993; Kleemann *et al.*, 1993）。

40

【0028】

炎症性障害におけるNF - Bの重要な役割についての証拠は、喘息患者の研究において得られる。軽症のアトピー性喘息患者から得た気管支バイオプシーは、健常な非アトピー対照からのバイオプシーと比較すると、活性化されたNF - B、全NF - B、およびNF - B調節サイトカイン、例えばGM - CSFおよびTNF についての粘膜下組織染色において細胞数の有意な増大を示す。さらに、NF - B免疫反応性を発現する血管の割合（%）は、バイオプシー検体の上皮におけるIL - 8免疫活性と同様に増大する（Wilson *et al.*, 1998）。したがって、NF - Bの阻害によるIL - 8産生の阻

50

害は、この化合物により示されているように、気道炎症において有用であることが予想される。

【0029】

最近の研究は、NF- κ Bが炎症性腸管疾患（IBD）の病理発生においても重要な役割を果たし得ることを示唆している。クローン病および潰瘍性結腸炎の患者からの結腸バイオプシー検体において活性化されたNF- κ Bがみられる（Arditeら、1998；Roglerら、1998；Schreiberら、1998）。活性化は、炎症を起こしている粘膜で顕著であるが、炎症を起こしていない粘膜においては顕著でなく（Arditeら、1998；Roglerら、1998）、同じ部位における増大したIL-8 mRNA発現と関連する（Arditeら、1998）。さらに、コルチコステロイド治療は腸管NF- κ B活性化を強力に阻害し、結腸炎症を軽減する（Arditeら、1998；Schreiberら、1998）。ここでも、NF- κ Bの阻害によるIL-8産生の阻害は、この化合物により示されるように炎症性腸管疾患において有用であることが予想される。

10

【0030】

胃腸管炎症の動物モデルは、NF- κ Bが結腸炎症の重要なレギュレーターであることをさらに支持する。p65が活性化複合体の主成分であるマウスにおいて2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発性大腸炎における粘膜固有層マクロファージにおいて、増大したNF- κ B活性が観察される（Neurathら、1996；NeurathおよびPettersson、1997）。p65アンチセンスの局所投与は、毒性の徴候がない治療された動物において確立された結腸炎の徴候を排除する（Neurathら、1996；NeurathおよびPettersson、1997）。従って、NF- κ Bの小分子阻害剤はIBDの治療において有用であることが予想される。

20

【0031】

炎症性障害におけるNF- κ Bの役割は、リウマチ様滑膜の研究から明らかになる。NF- κ Bは通常、不活性な細胞質複合体として存在するが、最近の免疫組織化学的研究により、NF- κ Bは核において存在し、従ってヒトリウマチ様滑膜を含む細胞（Handelら、1995；Marokら、1996；Sioudら、1998）および疾患の動物モデル（Tsaoら、1997）において活性であることが示されている。染色はA型滑膜細胞および血管内皮細胞と関連する（Marokら、1996）。さらに、NF- κ Bの構成的活性化が、培養された滑膜細胞（Roshakら、1996；Miyazawaraら、1998）およびIL-1またはTNFで刺激された滑膜細胞培養物（Roshakら、1996；Fujisawaraら、1996；Roshakら、1997）においてみられる。したがって、NF- κ Bの活性化は、炎症を起こした滑膜に特徴的な増大したサイトカイン産生および白血球浸潤の根底にある。この化合物がNF- κ Bを阻害し、従って、これらの細胞による前炎症性メディエーター（例えばサイトカインおよびプロスタノイド）の産生を阻害する能力は、関節リウマチにおいて有用であることが予想される。

30

【0032】

生物学的検定

所定の薬理学的効果を得るために必要な化合物の濃度を決定するためのいくつかの生物学的検定のうちの一つにおいて本発明の化合物を試験することができる。

40

NF- κ B活性は、核におけるNF- κ Bタンパク質の存在を評価するために電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）において測定することもできる。興味のある細胞を 1×10^6 / mLの密度まで培養する。細胞を遠心分離により収穫し、 Ca^{2+} および Mg^{2+} のないPBS中で洗浄し、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含むPBS中に 1×10^7 細胞/mLで再懸濁させる。化合物のNF- κ Bの活性化に対する効果を調べるために、細胞懸濁液を様々な濃度の薬剤またはビヒクル（DMSO、0.1%）で、30分間37℃で処理した後、TNF- α （5.0 ng/mL）でさらに15分間刺激する。細胞および核抽出物を次のようにして調製する。簡単にいうと、インキュベーション期間の最後に細胞

50

(1×10^7 細胞) を Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない PBS 中で 2 回洗浄する。得られる細胞ペレットを 20 μL の緩衝液 A (10 mM Hepes (pH 7.9)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl_2 、0.5 mM ジチオトレイトール (DTT) および 0.1 % NP-40) 中に再懸濁させ、氷上で 10 分間インキュベートする。3500 rpm で 10 分間 4 でミクロ遠心分離することにより核をペレット化する。得られる上清を細胞抽出物として集め、核ペレットを 15 μL の緩衝液 C (20 mM Hepes (pH 7.9)、0.42 M NaCl、1.5 mM MgCl_2 、25 % グリセロール、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、および 0.5 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)) 中に再懸濁させる。懸濁液を 4 で 20 分間穏やかに攪拌し、次いで 14000 rpm で 10 分間 4 でミクロ遠心分離する。上清を集め、緩衝液 D (20 mM Hepes (pH 7.9)、50 mM KCl、20 % グリセロール、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、および 0.5 mM PMSF) で 60 μL に希釈する。全てのサンプルを分析するまで -80 で保存する。抽出物のタンパク質濃度を Bradford の方法 (Bradford, 1976) にしたがって BioRad 試薬を用いて測定する。

10

【0033】

化合物の転写因子活性化に対する効果を、前記のような処置された細胞から得られる核抽出物を用いて電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) において評価する。二本鎖 NF- κ B コンセンサスオリゴヌクレオチド (5' - AGTTGAGGGGACTTTCC CAGGC - 3') を T_4 ポリヌクレオチドキナーゼおよび [γ - 32] ATP で標識する。結合混合物 (25 μL) は、10 mM Hepes - NaOH (pH 7.9)、4 mM Tris - HCl (pH 7.9)、60 mM KCl、1 mM EDTA、1 mM ジチオトレイトール、10 % グリセロール、0.3 mg/mL ウシ血清アルブミン、および 1 μg ポリ (dI-dC) \cdot ポリ (dI-dC) を含有する。結合混合物 (10 μg 核抽出タンパク質) を 20 分間室温で 0.5 ng の 32 P 標識されたオリゴヌクレオチド (50000 ~ 100000 cpm) と共に、標識されていない拮抗物質の存在下または不在下でインキュベートし、その後、1X Tris - ボレート / EDTA 中で調製された 4 % ポリアクリルアミドゲル上に混合物をロードし、200 V で 2 時間電気泳動させる。電気泳動後、ゲルを乾燥させ、結合反応の検出のためにフィルムに暴露する。

20

【0034】

I κ B のリン酸化に対する化合物の効果をウェスタンブロットにおいてモニターすることができる。細胞抽出物を、10 % ゲル (BioRad、Hercules、CA) 上ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) に付し、タンパク質をニトロセルロースシート (Hybondtm - ECL、Amersham Corp.、Arlington Heights、IL) に移す。I κ B または I κ B に対するポリクローナルウサギ抗体を用い、続いてペルオキシダーゼ接合ロバ抗ウサギ二次抗体 (Amersham Corp.、Arlington Heights、IL) を用いてイムノブロット検定を行う。エンハンスト・ケミルミネッセンス (ECL) アッセイシステム (Amersham Corp.、Arlington Heights、IL) を用いて免疫反応性バンドを検出する。

30

40

【0035】

I κ B キナーゼについてのアッセイを次のようにして行う：IKK- γ をヘキサヒスチジン標識されたタンパク質としてバクテリオファグに感染した昆虫細胞において発現させ、Ni-NTA アフィニティーカラム上で精製した。様々な濃度の化合物または DMSO ビヒクルおよび必要ならば ATP (Pharmacia Biotech Inc.、Piscataway, NJ) を含有するアッセイ緩衝液 (20 mM Hepes、pH 7.7、2 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2 、10 mM - グリセロールホスフェート、10 mM NaF、10 mM PNPP、0.3 mM Na_3VO_4 、1 mM ベンズアミン、2 μM PMSF、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニン、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペプスタチン、1 mM DTT) 中 50 ng の精製されたタンパク質を用いて

50

キナーゼ活性を評価した。200 ngのI B - G S T (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , I n c . , S a n t a C r u z , C A) を合計体積50 μ Lで添加することにより反応を開始させた。反応を1時間、30 で進行させ、その後、E D T Aを最終濃度20 mMになるように添加することにより反応を停止させた。ホスホ - I B - (S e r 3 2) 抗体 (N e w E n g l a n d B i o l a b s , I n c . , B e v e r l y , M A) およびE u ^{3 +} - 標識抗ウサギI g G (W a l l a c O y , T u r k u , F i n l a n d) を用いた解離強化ランタニド蛍光イムノアッセイ (W a l l a c O y , T u r k u , F i n l a n d) によりキナーゼ活性を決定した。V I C T O R 1 4 2 0 マルチラベルカウンター (W a l l a c) で、標準的ヨーロピウムプロトコル (励起340 nm、発光615 nm ; 400 usecの遅延後400 μ s間蛍光を測定) を用いてプレートを読みとった。データは蛍光 (c p s) 単位として表す。 10

【0036】

I K K - をG S T - 標識タンパク質として発現させ、その活性を96穴シンチレーションプロキシミティーアッセイ (S P A) において評価した。簡単に説明すると、I K K - を、様々な濃度の化合物またはDMSOビヒクル、240 nM A T Pおよび200 nCi [- ³³P] - A T P (10 mCi / mL、2000 Ci / ミリモル ; N E N L i f e S c i e n c e P r o d u c t s , B o s t o n , M A) で前記のようなアッセイ緩衝液中で希釈した (最終濃度20 nM) 。15 ~ 46のI B - (A m e r i c a n P e p t i d e) を含むビオチニル化ペプチドを最終濃度2.4 μ M、最終体積50 μ Lになるように添加することにより反応を開始した。サンプルを1時間30 でインキュベートし、続いて0.2 mgのストレプトアビジン - コートされたS P A P V T ビーズ (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h , P i s c a t a w a y , N J) を含有する150 μ Lのストップ緩衝液 (P B S w / o C a ^{2 +}、M g ^{2 +}、0.1% T r i t o n X - 100 (v / v)、10 mM E D T A) を添加した。サンプルを混合し、10分間室温でインキュベートし、遠心分離し (1000 x g、2分)、H e w l e t t - P a c k a r d T o p C o u n t で測定した。 20

【0037】

加えて、I K K - またはI K K - 活性は、384穴マイクロタイタープレートにおいて時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (T R - F R E T) を用いた組み換えG S T - I B のリン酸化により測定される。簡単に説明すると、I K K - またはI K K - をアッセイ緩衝液 (50 mM H E P E S p H 7.4、10 mM塩化マグネシウム、1 mM C H A P S、1 mM D T Tおよび0.01% w / v B S Aを含有) 中で最終濃度5 nMまで希釈する。これを様々な濃度の化合物またはDMSOビヒクルに添加し、25 nMのG S T - I B および1 μ MのA T Pのアッセイ緩衝液中溶液を添加して体積を30 μ Lにすることにより、反応を開始する。30分間周囲温度でインキュベートした後、50 mM p H 7.4のE D T A (15 μ L) を添加することにより反応を停止させる。L A N C Eヨーロピウムキレート標識された特異的抗ホスホセリンモノクローナル抗体を最終濃度0.5 nMで (P e r k i n E l m e r による細胞シグナル化技術)、およびアロフィコシアニン標識された抗G S T抗体 (P r o z y m e) を最終濃度0.5 nMで添加して、最終体積60 μ Lにすることによりリン酸化生成物の検出を行った。少なくとも30分間周囲温度でさらにインキュベートした後、P e r k i n E l m e r D i s c o v e r y 蛍光光度計でシグナルを読みとった。 30 40

【0038】

I K K - 阻害剤の一次滑膜繊維芽細胞メディエーター産生に対する影響を次のようにして評価した。ヒトR S Fの一次培養物を、前記のような関節リウマチの成人患者から得た滑膜の酵素消化により得た (R o s h a k ら、1996b)。10%ウシ胎児血清 (F B S)、100単位 / mLのペニシリンおよび100 μ g / mLのストレプトマイシン (G I B C O , G r a n d I s l a n d , N Y) を含有するアール (E a r l) の最小必須培地 (E M E M) 中で37、5% C O ₂ で細胞を培養した。さらに均一なB型繊維芽細胞集団を得るために4 ~ 9継代で培養物を使用した。一部の実験については、繊維芽細胞 50

胞を 5×10^4 細胞/mL で 16 mm (直径) 24 穴プレート (Costar, Cambridge, MA) 中に 5×10^4 細胞/mL でプレートした。細胞 (70 - 80% コンフルエンス) を IL-1 (1 ng/mL) (Genzyme, Cambridge, MA) に表示された時間暴露した。DMSO ビヒクル (1%) 中薬剤を、IL-1 の添加の 15 分前に細胞培養物に添加した。異なるドナーから得た滑膜細胞を用いて実験を 3 ~ 4 回行った。RSF 細胞抽出物を既に記載されているようにして処理された細胞から調製した。簡単に説明すると、ヒト RSF をトリプシン/EDTA により除去し、洗浄し、遠心分離により収獲した。細胞抽出物を前記のようにして調製した (Digman ら、1983; Osborn ら、1989)。簡単にいうと、インキュベーション期間の最後に、細胞 (1×10^7 細胞) を Ca^{2+} および Mg^{2+} のない PBS 中で 2 回洗浄した。得られる細胞ペレットを 20 μL の緩衝液 A (10 mM HEPES ($\text{pH } 7.9$), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM) 中に再懸濁させた。

10

【0039】

IKK - 阻害のヒト単球刺激エイコサノイドおよびサイトカイン産生に対する効果を次のようにして評価した。単球をヘパリン化全血から既に記載されているような二重勾配遠心法により単離した。単離された単球リッチな PBMC を次いで 24 穴培養プレートに 2×10^6 細胞/mL で RPMI 1640 10% FBS (Hyclone, Logan, Utah) 中 2 時間接着させて、単球集団をさらに濃縮した。培地を次いで除去し、細胞を RPMI 1640 で 1 回洗浄し、1 mL の RPMI 1640 10% FBS を穴に添加した。試験化合物を穴に添加し、最終ビヒクル濃度を 0.05% DMSO にした。200 ng/mL のエンドトキシン (LPS; イー・コリ血清型 026:B6) (Sigma, St. Louis, MO.) の添加により単球を活性化し、24 時間インキュベートした。無細胞上清を ELISA により TNF- (SB で EIA を展開)、 PGE_2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) ならびに IL-8 および IL-6 (Biosource International, Camarillo, CA) について分析した。細胞の生存可能性をトリパンブルー排除法により決定した。

20

【0040】

IKK - 阻害剤のホルボールエステルにより誘発された炎症に対する影響を次のようにして評価した。ホルボールエステル (PMA) を Balb/c マウスの外耳に経皮適用することにより誘発される炎症性応答は、多因子炎症性細胞浸潤および表皮の炎症性変化を調べるための有用なモデルであることが証明された。炎症病巣の強度は、好中球浸潤により支配され、これはミエロペルオキシダーゼ、好中球中に存在するアズール顆粒酵素の組織濃度の測定により容易に定量化できる。加えて、炎症性反応の全体的な強度は、耳の厚さの測定により測定することができる。Balb/c マウス ($n = 6$ 匹/群) に治療薬またはビヒクルを投与し、続いて PMA ($4 \mu\text{g/耳}$) を投与した。マウスを 4 時間後に殺し、耳の熱さを測定し、NF- κB の活性化を I κB ウェスタンまたは EMSA 分析によりモニターした。

30

【0041】

ラットのカラギーナンにより誘発される足浮腫に対する IKK - 阻害剤の効果を次のようにして評価した：オス Lewis ラット (Charles River - Raleigh, NC) を飼育し、食餌および水を自由に取らせ、各実験について 200 - 275 g の間の体重であった。化合物またはビヒクル (0.5% トラガカント (経口) または 10% DMSO、5% DMA、30% Cremophor (腹腔内)) をカラギーナン注射の 30 分 ~ 1 時間前に投与した。浮腫は、1% カラギーナンの無菌 dH₂O 中溶液 (0.05 mL/足) を右後足の足底表面に注射することにより誘発した。化合物またはビヒクルの投与前に足の太さを測定し、再び 3 時間測定して、足体積の変化を測定した。ラットを CO₂ 吸入により安楽死させ、右後足を除去し、直ちに液体窒素中で凍結させ、分析のために -80 °C で保存した。

40

【0042】

IKK - 2 阻害剤のマウスコラーゲン誘発性関節炎 (CIA) モデルにおける効果を決

50

定するために、処置群あたり12匹のオスDBA/1マウス(20~22グラム)を0日に、200ugのウシII型コラーゲンを含有する合計体積100uLの完全フロインドアジュバント(CFA)で免疫化した。21日に、マウスを、200ugのウシII型コラーゲンを含有する100uLのリン酸塩緩衝塩溶液(PBS)で追加免疫した(100uLのコラーゲン/CFAまたはコラーゲン/PBSを尾に皮下注射した)。ビヒクル中IKK-2阻害剤、またはビヒクル単独を1日から40日まで、1日に2回、腹腔内投与した(症状は25~28日に始まって、顕著である)。2つの追加の処置群は正の対照etanercept(Enbrel)(4mg/kg、腹腔内、1日おき)、およびetanerceptビヒクル(PBS)を含んでいた。マウスを50日間ずっと臨床症状について毎日採点し(以下参照)、足の太さを測定した。実験期間中採点した処置群あたり12匹のマウスに加えて、疾患中の数時点で、前記のように処置されたサテライトマウス(処置群あたり3~5匹)を用いて足におけるサイトカイノケモカインレベルおよびp65レベル、リンパ節を抜き取ることによりリンパ節抗原リコール反応を枯渇させることによりエクスビポ抗原リコール反応を測定した。

10

【0043】

関節炎の誘発

パラフィン油中に懸濁させた0.75mgのマイコバクテリウム・ブチリカム(Mycobacterium butyricum)(Difco, Detroit, MI)を6~8週令のオスLewisラット(160~180g)の尾の根元に1回注射することによりAIAを誘発する。16および/または20日に後足体積を水置換法により測定する。試験化合物を適当なビヒクル中で均質化させ、適当な経路で投与する。対照動物にはビヒクル単独を投与した。2回投与プロトコル:アジュバント注射の日に開始される予防投与および炎症が確立して10日に開始される治療投与を通常使用する。

20

臨床採点

各脚を次の基準に基づいて0~4の範囲で採点した:

0 = 炎症無し

1 = 1本の足指が膨張

2 = 数本の足指が膨張し、足が軽く膨張

3 = 数本の足指が膨張し、足が中程度に膨張

4 = 全部の足指が膨張し、足がひどく膨張

30

【0044】

総論

それぞれBruker AM250、Bruker ARX300またはBruker AC400分光光度計のいずれかを使用して、250、300または400MHzのいずれかで核磁気共鳴スペクトルを記録した。CDCl₃は重水素化クロロホルムであり、DMSO-d₆は6重水素化ジメチルスルホキシドであり、CD₃ODは四重水素化メタノールである。化学シフトは内部標準のテトラメチルシランから100万分の値でダウンフィールドの値(d)で報告する。NMRデータの略語は次の通りである:s = 一重項、d = 二重項、t = 三重項、q = 四重項、m = 多重項、dd = 二重項の二重項、dt = 三重項の二重項、app = みかけ、br = ブロード。Jはヘルツで測定されたNMRカップリング定数を示す。連続波赤外吸収(IR)スペクトルはPerkin-Elmer 683赤外分光光度計で記録し、フーリエ変換赤外(FTIR)スペクトルをNicolet Impact 400D赤外分光光度計で記録した。IRおよびFTIRスペクトルを透過方式で記録し、バンド位置を波数の逆数(cm⁻¹)で報告する。質量スペクトルは、VG70FE、PE Syx API IIIまたはVG ZAB HF装置で、高速原子衝撃(FAB)またはエレクトロスプレー(ES)イオン化技術を用いて得られた。元素分析は、Perkin-Elmer 240C元素分析器を用いて得られた。融点はThomas-Hoover融点装置を用いて測定し、校正しない。温度はすべて摂氏度で記録する。

40

【0045】

50

薄層クロマトグラフィーにはAnaltechシリカゲルGFおよびE. Merckシリカゲル60F-254薄層プレートを使用した。フラッシュおよび重力クロマトグラフィーはどちらもE. Merck Kieselgel 60 (230~400メッシュ)シリカゲル上で行った。

表示されている場合は、材料をAldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, TCI America, Portland, ORから購入した。

【0046】

実施例

以下の実施例において、温度は摂氏()である。特に記載しない限り、全ての出発物質は商業的供給源から入手した。さらに工夫することなく、当業者らは前記載事項を用いて本発明の最大限活用することができると考えられる。この実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を制限するものではない。請求の範囲には本発明者らに保留されるものを記載する。

【0047】

実施例 1

5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 2 - ウレイド - チオフェン - 3 - カルボン酸アミドの調製

a (4 - フルオロ - フェニル) - アセトアルデヒドの調製

4 - フルオロフェニルエチルアルコール (110 g、184.8ミリモル) の乾燥DM SO (800 mL) 中撹拌溶液に、トリエチルアミン (220 mL、1589.2ミリモル) を滴下した。N₂下撹拌しながら温度を15 に維持した。ピリジン三酸化硫黄 (253 g、1589.2ミリモル) の乾燥DM SO (900 mL) 中溶液を、温度を25より低く維持しながら反応物に滴下した。得られた混合物を15 で1.5時間撹拌した。この後、混合物がpH 4.3になるまで1N HCl (水性) を注意深く添加した。反応混合物をMTBEで抽出し、有機層を乾燥させ、蒸発させて、4 - フルオロフェニルアセトアルデヒド (110.8 g) を黄色油状物として抽出した。

【0048】

b 2 - アミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 3 - カルボン酸アミドの調製

A. C. Goudie、米国特許第3,963,750号に記載されているのと同様の手順で、4 - フルオロフェニルアセトアルデヒド (110.8 g) の乾燥DM F (350 mL) 中溶液を2 - シアノアセトアミド (65.9 g、784.8ミリモル) および硫黄 (25.2 g、784.8ミリモル) で処理した。結果としての発熱を制御するために氷浴を使用して、トリエチルアミン (79.4 g、784.8ミリモル) を反応に滴下した。反応物を室温で22時間 (一夜) 撹拌した。反応混合物を次いで氷水中に注ぎ、酢酸エチルを添加した。形成されたエマルジョンおよび界面の不溶物質を濾過し、一夜乾燥して、黄色固体の2 - アミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 3 - カルボン酸アミドを得た (77.4 g)。LC MS [M + H]⁺ m/e 237。

【0049】

c 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 2 - ウレイド - チオフェン - 3 - カルボン酸アミド

温度を5より低く維持しながら、2 - アミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 3 - カルボン酸アミド (77.4 g、327.5ミリモル) のジクロロメタン (1,300 mL) 中懸濁液に、0 でクロロスルホニルイソシアネート (47.7 g、337ミリモル) を0.5時間かけて滴下した。混合物を0 で1時間撹拌後、温度を室温まで上昇させた (hplc分析は反応の完了を示した)。水 (800 mL) を添加し (温度を20より低く維持)、固体を濾過し、真空下、30 で乾燥させた。エタノールから再結晶して、64.3 gの5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 2 - ウレイド - チオフェン - 3 - カルボン酸アミドを得た。LC MS [M + H]⁺ m/e 280。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

本明細書に記載する特許および特許出願を包含するが、これらに限定されない全ての刊行物を個々の開示がそれぞれ完全に開示されているように本発明の一部として参照する。

前記載事項は好ましい態様を包含する本発明を完全に開示する。本明細書に具体的に開示した態様の修正および改良は請求の範囲内に含まれる。さらに努力することなく、当業者らは前記載事項を用いて本発明を最大限に活用することができる。従って、本明細書の実施例は単に例示的であって、本発明の範囲を何ら制限するものではない。占有権または優先権が主張される本発明の態様は以下のように定義される。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/38970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07D 333/36; A61K 31/38		
US CL : 549/69; 514/447		
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) U.S. : 549/69; 514/447		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE; structure search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,414,013 B1 (Fancelli et al) 02 July 2002 (02.07.2002), columns 1-3.	1-18
Y	Baxter et al, "Preparation of thiophenecarboxamides as inhibitors of the enzyme IKK-2", Chem. Abs. 135:180698, 2001.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 March 2004 (18.03.2004)		14 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Deborah C Lambkin Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/00		
A 6 1 P	19/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/10		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/04		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	17/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/16		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/08		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
			A 6 1 P	31/12		
			A 6 1 P	9/14		
			A 6 1 P	43/00	1 1 1	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AU, BA, BB, BR, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, EG, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, SC, SG, TN, TT, UA, US, VN, YU, ZA

(72) 発明者 ジェイムズ・フランシス・キャラハン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 0 6、キング・オブ・プルシア、スウェードランド・ロード 7 0 9 番

(72) 発明者 リ・ユエ・フ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 2 6、カレッジビル、サウス・カレッジビル・ロード 1 2 5 0 番

F ターム(参考) 4C023 HA05

4C086 AA01 AA02 AA03 BB02 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA06 ZA16
ZA36 ZA44 ZA45 ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97 ZB08
ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB33 ZC20 ZC35 ZC55