

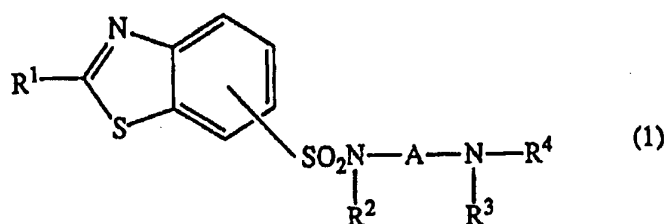


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07D 277/80, 417/12, A61K 31/425	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/19336 (43) 国際公開日 1994年9月1日(01.09.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00071 (22) 国際出願日 1994年1月20日(20. 01. 94) (30) 優先権データ 特願平 5/30007 1993年2月19日(19. 02. 93) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 梶原明朗(KAJIHARA, Akiro)[JP/JP] 〒882 宮崎県延岡市緑ヶ岡2丁目4-3-401 Miyazaki, (JP) 土屋昌彦(TSUCHIYA, Masahiko)[JP/JP] 〒882 宮崎県延岡市緑ヶ岡2丁目4-2-102 Miyazaki, (JP) (81) 指定国 CA, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書		

(54) Title: BENZOTHAZOLESULFONAMIDE DERIVATIVE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 ベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体、その製造法およびその用途



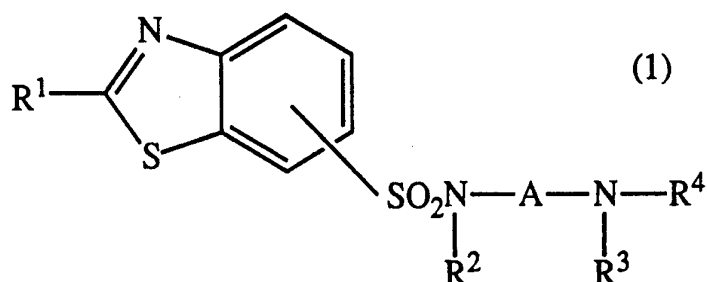
(57) Abstract

A benzothiazolesulfonamide derivative represented by general formula (1) and having the activity of inhibiting protein phosphorylases such as protein kinase C and myosin light-chain kinase, a pharmaceutically acceptable acid-addition salt thereof, a process for producing the same, a medicinal composition containing the same, and a drug containing the same as the active ingredient for treating or preventing asthma on the basis of the protein phosphorylase inhibitor activity. In formula (1) A represents lower alkylene; R¹ represents hydrogen or lower alkyl; R² and R³ represent each independently hydrogen or lower alkyl, or they are combined together to represent lower alkylene; and R⁴ represents hydrogen, lower alkyl, amidino or phenyl-lower alkyl, wherein the phenyl group is mono- or disubstituted by lower alkyl, lower alkoxy, halogen or methylenedioxy.

(57) 要約

プロテインキナーゼC、ミオシン軽鎖キナーゼ等の蛋白質リン酸化酵素阻害活性を有するベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその酸付加塩、その製造法、それらを含有する医薬組成物ならびにそれらを有効成分とする蛋白質リン酸化酵素阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤を提供するものである。

本発明は、一般式(1)



〔式中、Aは低級アルキレン基、R¹は水素原子または低級アルキル基、R²およびR³は各々独立に水素原子もしくは低級アルキル基か、または一緒に低級アルキレン基、R⁴は水素原子、低級アルキル基、アミノ基または置換フェニル基(1~2個の水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基もしくはハロゲン原子、またはメチレンジオキシ基で置換された) -低級アルキル基を示す)で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩、それらの製造法、それらを含有する医薬組成物ならびにそれらを有効成分とする蛋白質リン酸化酵素阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤である。

本発明化合物(1)およびその酸付加塩はならびにそれらの医薬組成物は、プロテインキナーゼC、ミオシン軽鎖キナーゼ等の蛋白質リン酸化酵素阻害活性を有し、蛋白質リン酸化酵素阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア	CZ チェッコ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュー・ジージーランド
AT オーストリア	DE ドイツ	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	DK デンマーク	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバドス	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	ES スペイン	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	FI フィンランド	LT リトアニア	SD スーダン
BG ブルガリア	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SE スウェーデン
BJ ベナン	GA ガボン	LV ラトヴィア	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GB イギリス	MC モナコ	SK スロヴァキア共和国
BY ベラルーシ	GE グルジア	MD モルドバ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MG マダガスカル	TD チャード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	ML マリ	TG トーゴ
CG コンゴ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TJ タジキスタン
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CI コート・ジボアール	IT イタリア	MW マラウイ	UA ウクライナ
CM カメルーン	JP 日本	NE ニジェール	US 米国
CN 中国	KE ケニア	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CS チェコスロヴァキア	KG キルギスタン	NO ノルウェー	VN ヴィエトナム

明 細 書

ベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体、その製造法およびその用途

技術分野

本発明は、蛋白質リン酸化酵素阻害活性を有するベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体、その製造法およびその医薬用途に関するものである。

背景技術

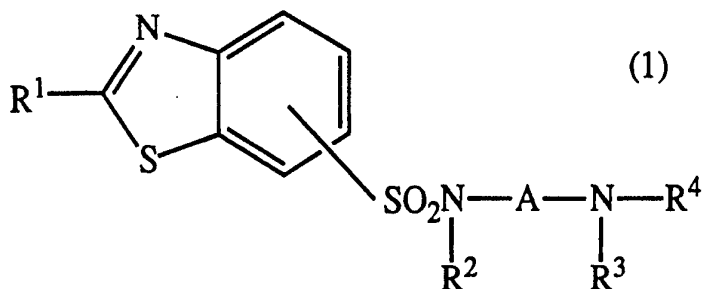
WO 92-14712号国際公開明細書には、抗ヒスタミン作用に基づく気管支平滑筋弛緩作用を有するベンゾチアゾールスルホニルアミノエチル誘導体、具体的には1-[2-(6-ベンゾチアゾールスルホニルアミノ)エチル]-4-[3-(フェノキシ)プロピル]ピペラジンが開示されているが、蛋白質リン酸化酵素阻害作用を有することについては記載はない。

発明の開示

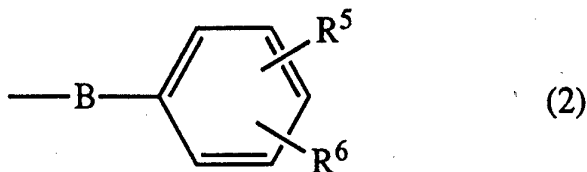
生体内には種々の蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼC、cAMP依存性キナーゼ、cGMP依存性キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼなど）が存在し、それらに対する阻害剤は循環器系医薬品、制癌剤などへの幅広い用途が考えられている。このような状況下で、より優れた上記の薬理作用を有する新規化合物を提供することが望まれている。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究した結果、新規化合物である後記一般式で示されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体が優れたプロテインキナーゼCおよびミオシン軽鎖キナーゼ阻害活性を有することを見出し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は、一般式（1）

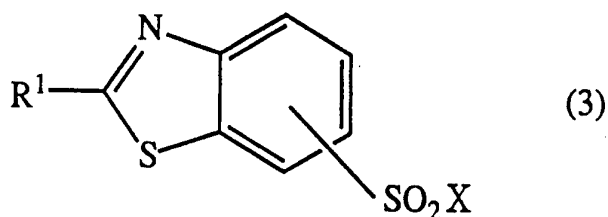


〔式中、Aは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数2～6個のアルキレン基を示し、R¹ は水素原子または炭素数1～4個のアルキル基を示し、R² およびR³ は各々独立に水素原子もしくは炭素数1～6個のアルキル基を示すか、またはR² およびR³ は一緒に炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～4個のアルキレン基を示し、R⁴ は水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、アミノ基または式

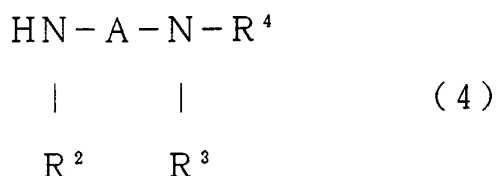


（式中、Bは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～6個のアルキレン基を示し、R⁵ およびR⁶ は各々独立に水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、炭素数1～6個のアルコキシ基もしくはハロゲン原子を示すか、またはR⁵ およびR⁶ は一緒にメチレンジオキシ基を形成する）〕で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、一般式（3）



(式中、Xはハロゲン原子を示し、R¹ は前記と同じ意味を有する) で表される化合物を不活性溶媒中一般式(4)



(式中、R²、R³ およびR⁴ は前記と同じ意味を有する) で表されるアミンを反応させることと特徴とする前記一般式(1)で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩を提供することを目的とするものである。

さらに、本発明は、前記一般式(1)で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩を有効成分として含有することを特徴とする蛋白質リン酸化酵素阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤を提供することを目的とするものである。

さらにまた、本発明は、前記一般式(1)で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩とされる酸付加塩と薬学的に投与可能な担体および希釈液の少なくとも1種とを含有してなる医薬組成物を提供することを目的とするものである。

前記一般式(1)における基Aは、炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数2～6個のアルキレン基として定義される。炭素数2～6個のアルキレン基としては、例えばエチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレンが挙げられるが、エチレン基が特に好ましい。このアルキレン基はそのいずれかの置換位置に直鎖または分鎖の炭素数1～4個のアルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、t-ブチル基等で置換されていてもよい。

基R¹ において定義される炭素数1～4個のアルキル基としては、分鎖を有していてもよく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソ

ブチル、1-メチルプロピル、*t*-ブチル基等が挙げられるが、メチル、エチル基が好ましい。

基 R^2 および R^3 において定義される炭素数1～6個のアルキル基としては、分鎖を有していてもよく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル基等が挙げられるが、メチル、エチル、プロピル基等が好ましい。また、基 R^2 および R^3 は一緒に炭素数1～4個のアルキレン基として定義される。このアルキレン基としては、例えばメチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレンが挙げられるが、エチレン、トリメチレン等が好ましい。このアルキレン基はそのいずれかの置換位置に直鎖または分鎖の炭素数1～4個のアルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、*t*-ブチル基等で置換されていてもよく、メチルエチレンが好ましい一例である。

基 R^4 において定義される炭素数1～6個のアルキル基としては、分鎖を有していてもよく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル基等が挙げられる。

また、基 R^4 において定義される一般式(2)で表される基において、ベンゼン環は1～2個のいずれかの置換位置に同じかまたは異なって炭素数1～6個のアルキル基、炭素数1～6個のアルコキシ基またはハロゲン原子で置換されていてもよく、また、メチレンジオキシ基で置換されていてもよい。上記の炭素数1～6個のアルキル基としては、分鎖を有していてもよく、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、*t*-ブチル、ペンチル、ヘキシル基等が挙げられる。炭素数1～6個のアルコキシ基としては分鎖を有していてもよく、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、1-メチルプロポキシ、*t*-ブトキシ、

ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ基等が挙げられる。ハロゲン原子としては、例えば塩素原子、臭素原子、弗素原子等が挙げられる。

さらに、一般式(2)で表される基における基Bは、炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～6個のアルキレン基として定義される。炭素数2～6個のアルキレン基としては、例えばメチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレンが挙げられるが、エチレン基が特に好ましい。このアルキレン基はそのいずれかの置換位置に直鎖または分鎖の炭素数1～4個のアルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、1-メチルプロピル、t-ブチル基等で置換されていてもよい。

上記で示される一般式(2)で表される基のうち、無置換、ハロゲン原子またはメチレンジオキシ基で置換されたベンジル、フェニルエチル基が好ましい一例である。

一般式(1)で表される本発明のベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体(1)の具体例として、以下化合物を挙げることができる。

- (1) 1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)ホモピペラジン
- (2) 1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)ピペラジン
- (3) 1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)-2-メチルピペラジン
- (4) 1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)エチレンジアミン
- (5) 1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)-4-メチルエチレンジアミン
- (6) 1-(6-ベンゾチアゾールスルホニル)ピペラジン
- (7) N-[2-(3, 4-メチレンジオキシベンジルアミノ)エチル]-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド
- (8) N-[2-(3-クロロベンジルアミノ)エチル]-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド
- (9) N-[2-[1-(3-クロロフェニル)エチル]アミノエチル]-7-

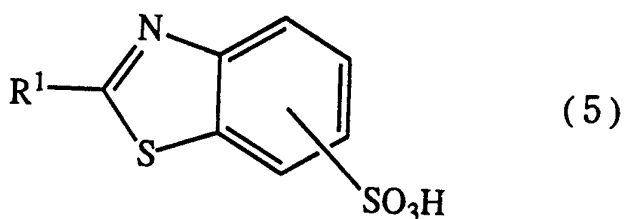
ベンゾチアゾールスルホンアミド

(10) N- [2- (3-フルオロベンジルアミノ) エチル] -7-ベンゾチアゾールスルホンアミド

ベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体(1)の酸付加塩としては、薬学上許容される非毒性の塩であって、例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸等の無機酸との酸付加塩、酢酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸などの有機酸との酸付加塩を挙げることができる。他の公知の酸との付加塩も包含されることは言うまでもない。

本発明のベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体(1)の製造は種々の方法で製造することができる。例えば、前記一般式(3)で表される化合物を不活性溶媒中前記一般式(4)で表されるアミンを反応させることにより得られる。

上記化合物(3)は、一般式(5)



(式中、R¹は前記と同じ意味を有する)で表されるスルホン酸を公知の方法によりスルホニルハロゲナイドに変換することにより得られる。例えば、塩化チオニルでクロル化する方法は好適な一例である。

化合物(3)とアミン(4)との反応で使用される不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテルなどのエーテル類、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル等が挙げられる。これらは単独、あるいは混合溶媒として用いることができる。

上記の反応においては、酸受容体の存在下で行うのが好ましい。用いられる酸

受容体としては、例えば、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメチラートのようなアルカリ金属化合物、ピリジン、トリメチルアミン、トリエチルアミンのような有機第3級アミンが挙げられる。

上記反応における化合物(3)の使用量は、アミン(4)に対し、1～20倍モル、好ましくは1～10倍モルである。酸受容体の非存在下では2.5～5倍モルであることが特に好ましく、酸受容体の存在下では1～3倍モルであることが特に好ましい。

反応温度は、一般的には $-30\sim 120^{\circ}\text{C}$ であり、好ましくは $-20\sim 50^{\circ}\text{C}$ 程度である。反応時間は、一般的には0.5～48時間であり、好ましくは0.5～6時間であるが、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等により反応経過を追跡することが可能であるから、アミン(4)の消失を待って適宜反応を終了させればよい。

このようにして得られた目的化合物(1)を遊離塩基の状態で反応液から採取するには、反応溶媒が親水性溶媒である場合には、該溶媒を留去し、残渣を非親水性溶媒に溶解した後、弱アルカリ水溶液、水等で洗浄して、溶媒を留去することにより行われる。反応溶媒が非親水性溶媒である場合には、そのまま弱アルカリ水溶液、水等で洗浄した後、溶媒を留去することにより行われる。

本発明の目的化合物(1)は公知の方法により酸付加塩を形成することができる。例えば、目的化合物(1)をメタノール、エタノールなどのアルコール類に溶解し、当量もしくは数倍量の酸を加えることにより、それらの酸付加塩を得ることができる。用いられる酸としては、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸等の無機酸、酢酸、クエン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸等などの有機酸を挙げることができる。勿論、他の公知の酸も使用できることは言うまでもない。さらに、上記酸付加塩から、公知の方法によりアルカリ処理することにより目的化合物(1

）を得ることができる。

上記で得られた目的化合物（１）またはその酸付加塩をさらに精製する場合には、公知の方法、例えば、再結晶化、シリカゲル等の公知の担体を用いるカラムクロマトグラフィーにより行うことができる。

本発明のベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体（１）およびその薬学的に許容される酸付加塩（以下、単に「本発明化合物」ということがある）は、強い蛋白質リン酸化阻害作用を示し、ラットに 300 mg/kg 経口投与しても、死亡例は認められなかったことから、医薬として使用しても安全な化合物であり、医薬品の活性成分として有用な物質である。

従って、本発明の他の態様によれば、本発明化合物と薬学的に投与可能な担体および希釈液の少なくとも１種とを含有する医薬組成物が提供される。

上記医薬組成物の製剤化のための剤形としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、懸濁剤、カプセル剤、注射剤等が挙げられるが、その製造のためには、これらの製剤に応じた各種担体が使用される。例えば、経口剤の担体としては、乳糖、白糖、ブドウ糖、でんぷん、結晶セルロース等の賦形剤；ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、でんぷん、アラビアゴム、ゼラチン、ブドウ糖、白糖、トラガント、アルギン酸ナトリウム等の結合剤；カルボキシメチルセルロース、でんぷん炭酸カルシウム等の崩壊剤；ステアリン酸、精製タルク、蔗糖脂肪酸エステル、水素添加植物油、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム等の滑沢剤；ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、蔗糖脂肪酸エステル、ポリソルベート 80 等の界面活性剤；レシチン、大豆油、グリセリン等の添加剤、流動性促進剤、着色剤等を挙げることができる。また吸入剤の調製の際には、ポリクロロモノフルオロメタン等の溶媒として用いることができる。

本発明化合物を注射剤等の非経口剤とする場合には、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、プロピレングリコール

、ポリエチレングリコール等を使用することができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えてもよい。

本発明化合物（１）またはその薬学上許容される酸付加塩をヒトに投与する際は、錠剤、散剤、顆粒剤、剤、懸濁剤、カプセル剤等の形で経口投与することができ、また、点滴を含む注射剤、さらにクリームまたはスプレーの形で非経口投与することができる。その投与量は、投与形態、患者の年齢、体重、症状の度合い等によって異なるが、一般には成人１日当たり３～３００ｍｇを１～３回に分けて投与される。投与期間は数日～２ヵ月の連日投与が一般的であるが、患者の症状により、１日投与量、投与期間共に増減することができる。

発明の効果

本発明のベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体（１）およびその薬学上許容される酸付加塩は、プロテインキナーゼＣ、ミオシン軽鎖キナーゼ等の蛋白質リン酸化酵素阻害活性を有し、モルモット摘出気管標本におけるＫＣ１収縮に対する気管平滑筋弛緩作用を有するので、蛋白質リン酸化酵素阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤として有用である。

実施例

次に、実施例を挙げて本発明化合物の製造例について更に詳細に説明する。

尚、各実施例で得られた目的物の核磁気共鳴スペクトル（ＮＭＲ）および質量分析スペクトル（ＭＳ）は後記の第３表に記載する。

実施例１

１－（７－ベンゾチアゾールスルホニル）ホモピペラジン塩酸塩（化合物１）

７－ベンゾチアゾールスルホン酸１２ｇに塩化チオニル１２０ｍｌとジメチルホルムアミド１．２ｍｌを加え３時間加熱還流後、減圧下、塩化チオニルを留去

した。残渣を氷水100mlで溶解し、飽和炭酸ナトリウム水溶液でpH6に調整し、ジクロロメタン100mlで抽出した。このジクロロメタン層を氷冷下、ホモピペラジン16.8gを含むジクロロメタン100mlの溶液に30分で滴下し、0～5℃で1時間攪拌した。反応終了後、反応液を水200mlで洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲル（和光ゲルC-200、和光純薬社製、日本国、600g）カラムにチャージし、溶出溶媒としてメタノール-クロロホルム混合溶媒（5～10%メタノール）を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製し、1-（7-ベンゾチアゾールスルホニル）ホモピペラジン10.8g（収率65%）を得た。

得られた1-（7-ベンゾチアゾールスルホニル）ホモピペラジン2.8gをメタノール20mlに溶解し、当量の塩酸水を加え、10分間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残渣をエタノール-水より再結晶して表題の化合物を得た。収量2.7（収率86%）

実施例2

1-（7-ベンゾチアゾールスルホニル）ピペラジン塩酸塩（化合物2）

実施例1において、ホモピペラジン16.8gの代わりにピペラジン14.4gを用いて同様に行い、表題の化合物を得た。

実施例3

1-（7-ベンゾチアゾールスルホニル）-2-メチルピペラジン塩酸塩（化合物3）

実施例1において、ホモピペラジン16.8gの代わりに2-メチルピペラジン16.8gを用いて同様に行い、表題の化合物を得た。

実施例4

1-（7-ベンゾチアゾールスルホニル）エチレンジアミン塩酸塩（化合物4）

7-ベンゾチアゾールスルホン酸12gに塩化チオニル120mlとジメチル

ホルムアミド 1.2 ml を加え 3 時間加熱還流後、減圧下、塩化チオニルを留去した。残渣を氷水 100 ml で溶解し、飽和炭酸ナトリウム水溶液で pH 6 に調整し、ジクロロメタン 100 ml で抽出した。このジクロロメタン層を氷冷下、エチレンジアミン 10.1 g を含むジクロロメタン 100 ml の溶液に 30 分で滴下し、0～5℃で 1 時間攪拌した。反応終了後、反応液に水 200 ml を加え、pH 4～6 に調整した後、分液した。水層を減圧乾固し、残渣を水から再結晶して表題の化合物を得た。収量 8.8 g (収率 54%)

実施例 5

1-(7-ベンゾチアゾールスルホニル)-4-メチルエチレンジアミン塩酸塩 (化合物 5)

実施例 4 において、エチレンジアミン 10.1 g の代わりに 1-メチルエチレンジアミン 12.4 g を用いて同様に行い、表題の化合物を得た。

実施例 6

1-(6-ベンゾチアゾールスルホニル)ピペラジン塩酸塩 (化合物 6)

実施例 1 において、7-ベンゾチアゾールスルホン酸 12 g の代わりに 6-ベンゾチアゾールスルホン酸、ホモピペラジン 16.8 g の代わりにピペラジン 14.4 g を用いて同様に行い、表題の化合物を得た。

実施例 7～10

N-[2-(3,4-メチレンジオキシベンジルアミノ)エチル]-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド塩酸塩 (化合物 7)、

N-[2-(3-クロロベンジルアミノ)エチル]-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド塩酸塩 (化合物 8)、

N-[2-[1-(3-クロロフェニル)エチル]アミノエチル]-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド塩酸塩 (化合物 9) および

N-(2-(3-フルオロベンジルアミノ)エチル)-7-ベンゾチアゾールスルホンアミド塩酸塩 (化合物 10)

実施例1において、ホモピペラジン16.8gの代わりに各々1-(3,4-メチレンジオキシベンジル)-エチレンジアミン32.6g、1-(3-クロロベンジル)-エチレンジアミン31.0g、1-(1-(3-クロロフェニル)エチル)-エチレンジアミン33.3gおよび1-(3-フルオロベンジル)-エチレンジアミン28.2gを用いて同様に行い、各々表題の化合物を得た。

実施例11

ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の阻害作用

被験薬である各阻害剤は、本発明品については実施例に記載の化合物番号で表示した。対照品として1-[2-(6-ベンゾチアゾールスルホニルアミノ)エチル]-4-(3-(フェノキシ)プロピル)ピペラジン二塩酸を用いた。

(1) 阻害活性測定法

各阻害剤の阻害活性測定にはリン酸化されたミオシン軽鎖(MLC)を特異的に認識する抗体(MLCP抗体)を用いたMLCK活性測定系を用いた。MLCはニワトリ砂嚢よりペリーらの方法〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー, 211巻, 267-272頁(1983年)〕に従って、分子量20kDaのMLCを精製した。MLCKはウォルシュらの方法〔メソッズ・イン・エンザイモロジー, 99巻, 279-288頁(1983年)〕の方法に従って精製した。カルモジュリンは豚脳よりヤザワの方法〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー, 87巻, 1313-1320頁(1980年)〕に従って精製したものをを用いた。MLCP抗体は、MLCのリン酸化部位のセリンを含む前後12残基の配列を持った合成ペプチドを抗原として用い作成した。まず、MLCのN末端を基準として11番目のリジンから22番目のフェニルアラニンまでの配列にシステインをC末端に加えたペプチドを合成した(KKRPQRATSNVFC)。この合成ペプチドに対してATP存在下でMLCKによるリン酸化を行い、高速液体クロマトグラフィーにて精製した。このペプチドをシャミセン貝ヘモシアニン(KLH)とコンジュゲートした。このときのコンジュゲート効率は110-1

48 nmol ペプチド/mg KLHであった。このコンジュゲート体をウサギ1羽当たり1回につき0.2 mgをアジュバントと混合してウサギに免疫させた。5回の免疫の後、MLCP抗体の抗体価が十分に上昇したのを確認し、IgG画分として精製し、保存した。

MLCK活性測定は以下のように行なった。

MLCをリン酸バッファー(PBS)で希釈して5 μ g/mlに調製し、96穴イムノプレートに一穴あたり100 μ l分注し、吸着させた。4℃で1晩放置後、未吸着のMLCをPBSにて洗浄した。各穴に25 mMトリス緩衝液(pH 7.5)、3 mM塩化マグネシウム、1 mM塩化カルシウム、0.1% 2-メルカプトエタノール、1 mg/ml牛血清アルブミン、20 μ g/mlカルモジュリン、0.1 μ g/ml MLCKおよび20, 30, 50, 100 μ MのATPを含む反応混液を加え、反応を開始した。3分後に100 μ lの20%リン酸を加え反応を停止し、0.2%トライトンX-100を含むPBS(TrPBS)でプレートを3回洗浄した。洗浄した各穴に0.05%トゥイーン20を含むPBS(TwPBS)で500倍希釈したMLCP抗体を一次抗体として各穴に100 μ l加え、1時間室温で放置した。TrPBSで3回洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識したヤギの抗ウサギIgG抗体(カッセル社)をTwPBSで1000倍希釈した溶液を各穴100 μ l加え、室温で1時間放置した。TrPBSで3回洗浄後、2 mg/mlオルトフェニレンジアミン、0.04%過酸化水素水を含む発色液を各穴100 μ l加え、十分発色後4.5 M硫酸を30 μ l加えて発色を停止し、バイオラッド社製のマイクロプレートリーダーで吸光度を測定する。この吸光度はリン酸化を受けたMLC量に比例するので、MLCK活性とすることができる。

阻害剤の阻害活性測定時には反応混液中に適当な濃度の阻害剤を加え、その際の反応活性を測定し、二重逆数プロットにより阻害活性を求めた。

(2) 測定結果

後記の表 1 の通りである。

実施例 1 2

プロテインキナーゼ C (PKC) の阻害作用

被験薬である各阻害剤は、本発明品については実施例に記載の化合物番号で表示した。対照品として 1 - [2 - (6 - ベンゾチアゾールスルホニルアミノ) エチル] - 4 - (3 - (フェノキシ) プロピル) ピペラジン二塩酸を用いた。

(1) 阻害活性測定法

各阻害剤の阻害能測定には、医学生物研究所のプロテインキナーゼ C 活性測定キットを用いた。PKC はラット脳より稲垣らの方法 [(ジャーナル・オブ・バイオケミストリー, 260 巻, 2922 - 2925 頁 (1985 年))] に従って精製したものをを用いた。測定キットの 96 穴プレートに反応混液 [25 mM トリス緩衝液 (pH 7.5)、3 mM 塩化マグネシウム、1 mM 塩化カルシウム、0.1% 2-メルカプトエタノール、1 mg/ml 牛血清アルブミン、50 μ g/ml ホスファチジルセリン、10 μ g/ml PKC および 1, 3, 5, 10 μ M ATP) を 1 穴あたり 100 μ l 加えた。尚、予め各穴には PKC の基質となるペプチドが吸着させてある。3 分後、100 μ l 20% リン酸で反応を停止した。各穴を TrPBS で 3 回洗浄後、キットに含まれる 1 次抗体を TwPBS で 10 倍希釈したものを各穴 100 μ l 加え、室温で 1 時間放置した。TrPBS で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼで標識した抗マウス IgG (バイオラッド社製) を TwPBS で 1000 倍希釈したものを各穴 100 μ l 加え、室温で 1 時間放置した。TrPBS で 3 回洗浄後、2 mg/ml オルトフェニレンジアミン、0.04% 過酸化水素水を含む発色液を 100 μ l 加え十分に発色した後、4.5 M 硫酸を 30 μ l 加えて発色を停止し、バイオラッド社製マイクロプレートリーダーで発色を定量した。

阻害能測定には反応混液中に適当な濃度の阻害剤を加え、その際の PKC 活性を測定して 2 重逆数プロット法を用いて阻害能を求めた。

(2) 測定結果

第1表の通りである。

第1表

阻害剤	PKC阻害 K _i 値 (μM)	MLCK阻害 K _i 値 (μM)
化合物 1	7	80
化合物 2	5	50
化合物 3	15	90
化合物 4	5	75
化合物 5	35	120
化合物 6	15	25
化合物 7	6	50
化合物 8	5	55
化合物 9	25	90
化合物 10	7	55
対照品	> 200	> 200

上記の結果から明らかな通り、本発明化合物はミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK)、プロテインキナーゼC (PKC) 等の蛋白質リン酸化酵素に対して強い阻害活性を有するのに対し、WO 92-14712号国際公開明細書に記載の対照品は阻害活性を有しないことが認められた。

実施例 13

モルモットより摘出した気管標本におけるKC1収縮に対する気管平滑筋弛

緩作用

(1) KC1収縮に対する阻害試験方法

モルモットの摘出気管標本を用いる方法（高木，小沢；薬物学実験，100－102頁，1960年，南山堂、藤原，柴田；薬理学基礎実験法，131－134頁，1982年，杏林出版）に従って、本発明化合物の気管平滑筋弛緩作用を測定した。

350～500gの雄性モルモット（ハートレート系、黒田純系動物）の摘出気管標本をクレブス・ヘンスライト栄養液（インドメタシン3 μ M含有）を満たしたマグヌス装置（容量20ml）に等尺性（初期負荷1.5g）に吊るし、95%酸素、5%炭酸ガス通気下、液温を37℃に保ちながら、KC1水溶液（終濃度20mM）をマグヌス管内に適用して気管標本を収縮させた。

収縮が安定した後、蒸留水または生理食塩水に溶かした本発明化合物をマグヌス管内に累積的に加え、その弛緩作用を観察し、用量反応曲線を得た。測定終了後、パパベリン100 μ M添加により最大弛緩を求め、その時の弛緩率を100%とした。標本数は全て3とした。

対照品として1－〔2－（6－ベンゾチアゾールスルホニルアミノ）エチル〕－4－（3－（フェノキシ）プロピル）ピペラジン二塩酸を用いた。

(2) 測定結果

第2表の通りである。

第2表

被験薬	弛緩率 (%)	被験薬	弛緩率 (%)
化合物1	30.5	化合物6	27.2
化合物2	24.0	化合物7	96.8
化合物3	21.1	化合物8	85.7
化合物4	33.0	化合物9	74.6
化合物5	22.0	化合物10	78.0
対照品	6.8		

上記の結果から明らかな通り、本発明化合物はモルモット摘出気管標本におけるKC1収縮に対する気管平滑筋弛緩作用を有するのに対し、WO92-14712号国際公開明細書に記載の対照品は殆ど気管平滑筋弛緩作用を有しないことが認められた。

第3表

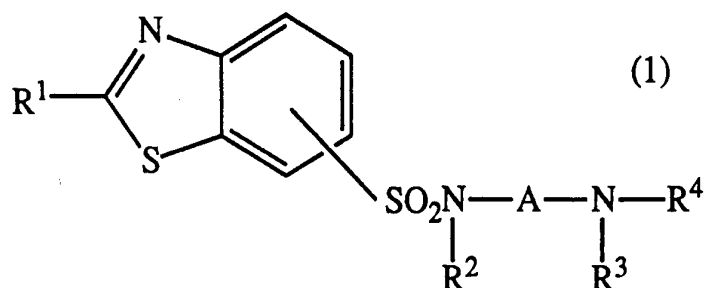
化合物 番号	NMR (δ ppm) (DMSO d_6 / D ₂ O, TMS)	MS (M/E)
1	1.9-2.1 (2H), 3.0-3.8 (8H), 7.7-7.9 (1H), 7.9-8.1 (1H), 8.3-8.5 (1H), 9.5-9.6 (1H)	297
2	3.0-4.1 (8H), 7.7-7.9 (1H), 7.9-8.1 (1H), 8.3-8.5 (1H), 9.5-9.6 (1H)	283
3	2.5-3.8 (10H), 7.7-7.9 (1H) , 7.9-8.1 (1H), 8.3-8.5 (1H) , 9.5-9.6 (1H)	297
4	2.5-3.5 (4H), 7.7-7.9 (1H), 7.9-8.1 (1H), 8.3-8.5 (1H), 9.5-9.6 (1H)	257
5	2.4-3.7 (7H), 7.7-7.9 (1H), 7.9-8.1 (1H), 8.3-8.5 (1H), 9.5-9.6 (1H)	271

(次頁に続く)

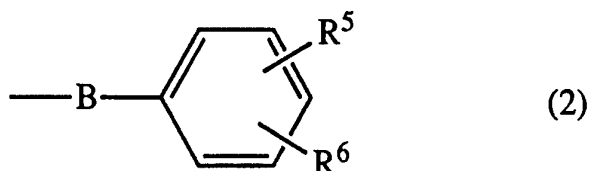
6	3. 0-3. 5 (8H), 7. 8-8. 0 (1H), 8. 2-8. 4 (1H), 8. 6-8. 8 (1H), 9. 6-9. 7 (1H)	2 8 3
7	2. 8-3. 3 (4H), 4. 0-4. 1 (2H), 6. 0-6. 1 (2H), 6. 8-7. 2 (3H), 7. 7-7. 9 (1H), 8. 0-8. 2 (1H), 8. 3-8. 5 (1H), 9. 6-9. 7 (1H)	3 9 1
8	2. 8-3. 3 (4H), 4. 2-4. 4 (2H), 7. 4-7. 6 (4H), 7. 7-7. 9 (1H), 8. 0-8. 2 (1H), 8. 3-8. 5 (1H), 9. 6-9. 7 (1H)	3 8 1
9	1. 4-1. 7 (3H), 2. 5-3. 3 (4H), 4. 3-4. 5 (1H), 7. 4-7. 6 (4H), 7. 7-7. 9 (1H), 8. 0-8. 2 (1H), 8. 3-8. 5 (1H), 9. 6-9. 7 (1H)	3 9 5
10	2. 8-3. 3 (4H), 4. 1-4. 3 (2H), 7. 1-7. 6 (4H), 7. 7-7. 9 (1H), 8. 0-8. 2 (1H), 8. 3-8. 5 (1H), 9. 6-9. 7 (1H)	3 6 5

請 求 の 範 囲

1. 一般式 (1)



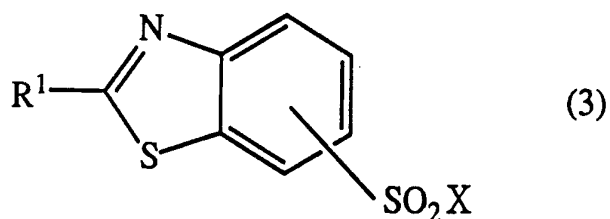
〔式中、Aは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数2～6個のアルキレン基を示し、R¹ は水素原子または炭素数1～4個のアルキル基を示し、R² およびR³ は各々独立に水素原子もしくは炭素数1～6個のアルキル基を示すか、またはR² およびR³ は一緒にて炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～4個のアルキレン基を示し、R⁴ は水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、アミノ基または式



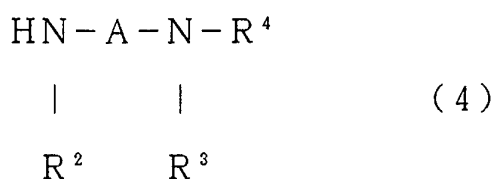
(式中、Bは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～6個のアルキレン基を示し、R⁵ およびR⁶ は各々独立に水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、炭素数1～6個のアルコキシ基もしくはハロゲン原子を示すか、またはR⁵ およびR⁶ は一緒にてメチレンジオキシ基を形成する)〕で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩。

2. 一般式 (3)

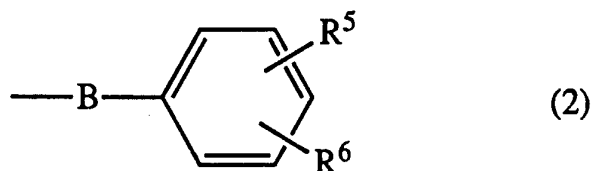
21



(式中、Xはハロゲン原子を示し、R¹ は水素原子または炭素数1～4個のアルキル基を示す) で表される化合物を不活性溶媒中一般式(4)

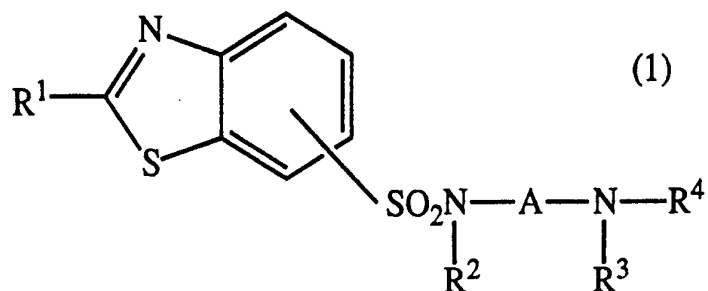


〔式中、Aは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数2～6個のアルキレン基を示し、R² およびR³ は各々独立に水素原子もしくは炭素数1～6個のアルキル基を示すか、またはR² およびR³ は一緒にて炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～4個のアルキレン基を示し、R⁴ は水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、アミノ基または式



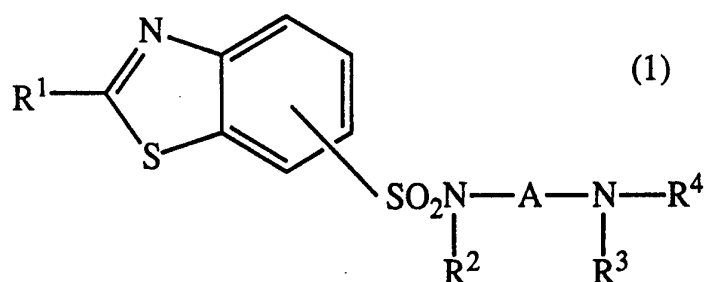
(式中、Bは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～6個のアルキレン基を示し、R⁵ およびR⁶ は各々独立に水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、炭素数1～6個のアルコキシ基もしくはハロゲン原子を示すか、またはR⁵ およびR⁶ は一緒にてメチレンジオキシ基を形成する) で表されるアミンを反応させることを特徴とする一般式(1)

22

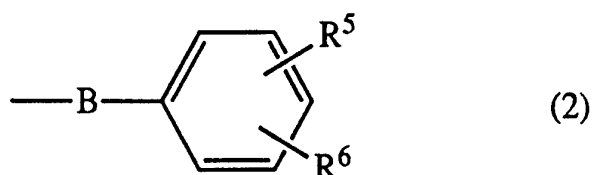


(式中、A、R¹、R²、R³ およびR⁴ は前記と同じ意味を有する) で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩の製造法。

3. 一般式 (1)



〔式中、Aは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数2～6個のアルキレン基を示し、R¹ は水素原子または炭素数1～4個のアルキル基を示し、R² およびR³ は各々独立に水素原子もしくは炭素数1～6個のアルキル基を示すか、またはR² およびR³ は一緒に炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～4個のアルキレン基を示し、R⁴ は水素原子、炭素数1～6個のアルキル基、アミノ基または一般式(2)

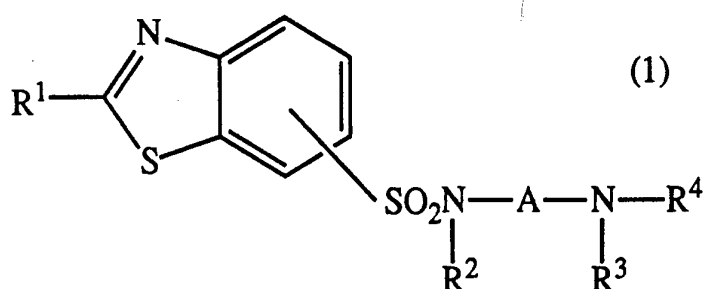


(式中、Bは炭素数1～4個のアルキル基で置換されてもよい炭素数1～6個のアルキレン基を示し、R⁵ およびR⁶ は各々独立に水素原子、炭素数1～6個の

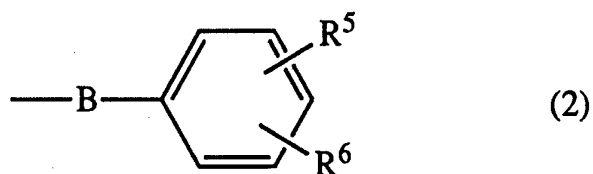
23

アルキル基、炭素数 1～6 個のアルコキシ基もしくはハロゲン原子を示すか、または R^5 および R^6 は一緒にメチレンジオキシ基を形成する) で表される基を示す) で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容される酸付加塩を有効成分として含有することを特徴とする蛋白質リン酸化阻害作用に基づく喘息治療剤または予防剤。

4. 一般式 (1)



〔式中、Aは炭素数 1～4 個のアルキル基で置換されてもよい炭素数 2～6 個のアルキレン基を示し、 R^1 は水素原子または炭素数 1～4 個のアルキル基を示し、 R^2 および R^3 は各々独立に水素原子もしくは炭素数 1～6 個のアルキル基を示すか、または R^2 および R^3 は一緒に炭素数 1～4 個のアルキル基で置換されてもよい炭素数 1～4 個のアルキレン基を示し、 R^4 は水素原子、炭素数 1～6 個のアルキル基、アミジノ基または一般式 (2)



〔式中、Bは炭素数 1～4 個のアルキル基で置換されてもよい炭素数 1～6 個のアルキレン基を示し、 R^5 および R^6 は各々独立に水素原子、炭素数 1～6 個のアルキル基、炭素数 1～6 個のアルコキシ基もしくはハロゲン原子を示すか、または R^5 および R^6 は一緒にメチレンジオキシ基を形成する) で表される基を示す) で表されるベンゾチアゾールスルホンアミド誘導体およびその薬学上許容

される酸付加塩と薬学的に投与可能な担体および希釈液の少なくとも1種とを含有してなる医薬組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C07D277/80, C07D417/12, A61K31/425

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)

Int. Cl⁵ C07D277/80, C07D417/12, A61K31/425

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chemical Abstracts, Vol. 119, No. 19, (1992), Abstract No. 203360r	1
A	JP, A, 1-242574 (UBE INDUSTRIES KK), September 27, 1989 (27. 09. 89) & EP, A, 335586 & US, A, 4929618	1-4



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 document 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

April 1, 1994 (01. 04. 94)

Date of mailing of the international search report

April 19, 1994 (19. 04. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁵ C07D277/80, C07D417/12, A61K31/425

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. Cl⁵ C07D277/80, C07D417/12, A61K31/425

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

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

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
A	Chemical Abstracts, 第119巻, 第19号, (1992), 要約番号 203360r	1
A	JP, A, 1-242574 (UBE INDUSTRIES KK), 27. 9月, 1989 (27. 09. 89) & EP, A, 335586 & US, A, 4929618	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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」 先行文献ではあるが、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

01. 04. 94

国際調査報告の発送日

19.04.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4 C 9 0 5 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3452