

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5847827号
(P5847827)

(45) 発行日 平成28年1月27日 (2016. 1. 27)

(24) 登録日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 213/74 (2006. 01)

A 6 1 K 31/496 (2006. 01)

A 6 1 P 11/06 (2006. 01)

A 6 1 P 25/34 (2006. 01)

A 6 1 P 27/02 (2006. 01)

C O 7 D 213/74 C S P

A 6 1 K 31/496

A 6 1 P 11/06

A 6 1 P 25/34

A 6 1 P 27/02

請求項の数 14 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-533819 (P2013-533819)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月11日 (2011. 10. 11)
 (65) 公表番号 特表2013-539781 (P2013-539781A)
 (43) 公表日 平成25年10月28日 (2013. 10. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2011/051213
 (87) 国際公開番号 W02012/050512
 (87) 国際公開日 平成24年4月19日 (2012. 4. 19)
 審査請求日 平成26年9月3日 (2014. 9. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/392, 130
 (32) 優先日 平成22年10月12日 (2010. 10. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008951
 アストラゼネカ・アクチエボラーグ
 A S T R A Z E N E C A A K T I E B O
 L A G
 スウェーデン国エスエー 1 5 1 8 5 セーデルティエ
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 マッツ・スヴェンソン
 スウェーデン国エスエー 1 5 1 8 5 セーデルティエ、アストラゼネカ・アール・アンド・ディ・セーデルティエ、アストラゼネカ・アクチエボラーグ
 最終頁に続く

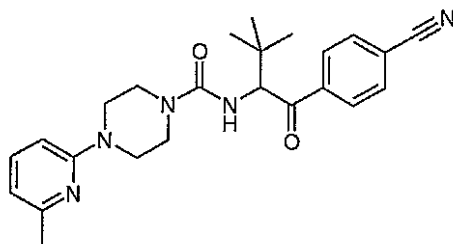
(54) 【発明の名称】 TRPA1 受容体アンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の化合物 N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3 , 3 - ジメチル - 1 - オキシ
 ブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキ
 サミド

【化 1】



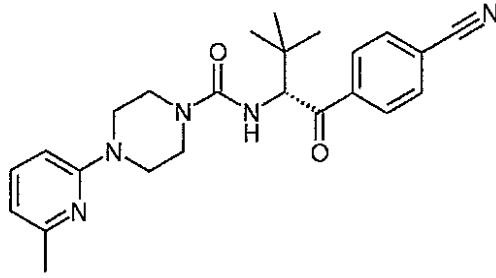
(I)

又は薬学的に許容可能なその塩、エナンチオマー、若しくはそれらの混合物。

【請求項 2】

次式：

【化 2】



を有する (R) - N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3 , 3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキサミド、又は薬学的に許容可能なその塩である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

治療における薬剤としての、請求項 2 に記載の化合物、又は薬学的に許容可能なその塩。

【請求項 4】

喘息、百日咳、ニコチン中毒、及びさまざまな疼痛状態を処置するための薬剤の製造における、請求項 2 に記載の化合物の使用。

【請求項 5】

さまざまな疼痛状態が急性及び慢性疼痛障害である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

さまざまな疼痛状態が広範痛、限局痛、侵害受容性疼痛、中枢及び末梢性神経原性疼痛、炎症性疼痛、及び感覚過敏である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 7】

さまざまな疼痛状態が中枢及び末梢性神経障害性疼痛、慢性腱炎、腰痛、術後疼痛、内臓痛、骨盤痛、異痛症、有痛性感覚麻痺、異常錯感覚、線維筋痛、痛覚過敏、痛感過敏、虚血性疼痛、坐骨神経痛、膀胱炎に関連する疼痛、多発性硬化症に関連する疼痛、関節炎に関連する疼痛、及びがんに関連する疼痛である、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

さまざまな疼痛状態がしゃく熱痛、中枢性疼痛、末梢神経障害である、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 9】

さまざまな疼痛状態が間質性膀胱炎である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 10】

さまざまな疼痛状態が変形性関節症に関連する疼痛、又は関節リウマチに関連する疼痛である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 11】

疼痛を処置するための薬剤の製造における、請求項 2 に記載の化合物の使用。

【請求項 12】

請求項 2 に記載の化合物及び薬学的に許容可能なキャリアを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 13】

糖尿病性網膜症若しくは緑内障を処置するための又は暴動鎮圧剤に対するアンタゴニストとして使用するための薬剤の製造における、請求項 2 に記載の化合物の使用。

【請求項 14】

暴動鎮圧剤が、暴動鎮圧剤 C S 又は暴動鎮圧剤 C R である、請求項 13 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イオンチャネルの一過性受容器電位 (TRP) ファミリーのアンタゴニス

10

20

30

40

50

トに関する。本発明はまた、そのようなアンタゴニストを含む組成物及びそれによるイオンチャンネルの一過性受容器電位 (TRP) ファミリーが介在する病気を処置する方法を提供する。特に、本発明は、疼痛及び他の特異的疾患の処置に有用な非選択性陽イオンチャンネル TRPA1 アンタゴニスト化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

イオンチャンネルの一過性受容器電位 (TRP) ファミリーは、しばしば複数の化学的及び物理的刺激 (温度、嗅覚、味覚及び有害化学物質) のセンサであることが認められる。特に、最初アンキリン様タンパク質としてクローン化された (非特許文献 1) 非選択性陽イオンチャンネル TRPA1 (一過性受容器電位アンキリン反復 1) は、多様な刺激性及び前駆体発痛性の化合物 (非特許文献 2) によって活性化される。製薬を対象とした TRPA1 に関する最近の総説は、Rech ら (非特許文献 3) 及び Baraldi ら (非特許文献 4) によって発表されている。TRPA1 は、末梢神経系の C 繊維性侵害受容器のサブセットで高度に発現される (非特許文献 5)。活性化された場合、TRPA1 は細胞外環境から細胞内にカチオン (主に Ca^{2+} 及び Na^{+}) の伝導を可能にし、それによって膜電位を脱分極させ、一次求心性でカルシウム恒常性に作用する。一次神経末端の脱分極は活動電位を放電させ、その結果、ヒト及びげっ歯類の実験モデルに痛覚の増加及び痛覚過敏をもたらす (非特許文献 6; 非特許文献 7)。からし油中の辛味成分: アリルイソチオシアネート (AITC) は、生体外のナトリウム電流及びカルシウム流入の測定の両者で、濃度依存的に TRPA1 を活性化する。さらに、AITC はまた小径求心線維を興奮させ (非特許文献 8)、そして確かに、AITC の局所適用はヒトに疼痛及び痛覚過敏を誘発する (非特許文献 9)。近年、TRPA1 ノックアウト (KO) マウスは AITC 感受性を欠如しており、ブラジキニン疼痛応答発信の重篤な障害を示すことが記述された (非特許文献 10; 非特許文献 11)。メタノール、水及びホルムアルデヒドの混合物であるホルマリンは、鎮痛化合物を生体内で評価するために広く使用されたげっ歯類モデルである。TRPA1 は、生体外でホルムアルデヒドによって活性化され、そして最近、TRPA1 ノックアウトマウスのほとんどがホルマリン/ホルムアルデヒドに対するそれらの反応が廃止されていることが示された (非特許文献 12)。Hydra Bioscience 社の特許化合物 (HC030031) は、生体外の TRPA1 アンタゴニストであり、ホルマリン誘導の疼痛行動を濃度依存的に軽減することが示されている (非特許文献 13; 特許文献 1)。Glenmark 社の多数の特許化合物 (特許文献 2) が複数の生体内疼痛モデルで示したと同様に、生体外で TRPA1 に作用する Abbott 社の特許化合物 (特許文献 3 及び非特許文献 14) は、ラット変形性関節症の疼痛モデルで生体内効果を有することが示された。また、TRPA1 における突然変異は FEPs (“Familial Episodic Pain Syndrome” (家族性偶発性疼痛症候群)、非特許文献 15) を引き起こすことが示されている。従って、生体外での TRPA1 のカルシウム及びナトリウムの流入阻害が、生体内で化合物の鎮痛剤として働く傾向を決定するだろうことが示唆された。本発明の目的は、従って、新規な、改善された、そして有用な鎮痛剤を提供することである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】国際公開公報第 2007/073505 A2 号

【特許文献 2】米国特許第 2009/0325987 号

【特許文献 3】米国特許第 2009/0176883 号

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Jaquemar et al 1999, J Biol Chem 274 : 7325-7333

【非特許文献 2】Bandell et al 2004, Neuron 41 : 849-857

【非特許文献 3】Rech et al Future Med. Chem. 2010: 843-838

【非特許文献 4】Baraldi et al J. Med. Chem. 2010, 5085-2107

【非特許文献 5】Kobayashi et al 2005, J Comp Neurol 493(4):596-606

【非特許文献 6】Jiang and Gebhart 1998, Pain 77(3):305-13

【非特許文献 7】Cervero and Laird 1996, Pain 68(1):13-23

【非特許文献 8】Reeh 1986, Brain Res 384:42-50

【非特許文献 9】Namer et al 2005, Neuroreport 16(9):955-959

【非特許文献 10】Kwan 2006, Neuron 50(2):277-289

【非特許文献 11】Bautista 2006, Cell 124(6):1269-1282

【非特許文献 12】McNamara et al 2007, Proc Natl Acad Sci USA 104(33):13525-13530

0

【非特許文献 13】McNamara 2007, Proc Natl Acad Sci USA 104(33):13525-13530

10

【非特許文献 14】McGaraughty et al., Molecular Pain 2010 6 : 14

【非特許文献 15】Kremeyer et al, Neuron 2010, 66 : 671-680

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

非選択性陽イオンチャンネル TRPA1 アンタゴニストについて記述する。記載されたアンタゴニストは疼痛及び他の状態を処置するために使用することができる。TRPA1 アンタゴニストが介在する病状としては、喘息、百日咳及びニコチン依存症が挙げられる。

。

【図面の簡単な説明】

20

【0006】

【図 1】実施例 6 の化合物の X 線粉末回折 (XRPD) パターンを示す。

【図 2】化合物の振動円二色性スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

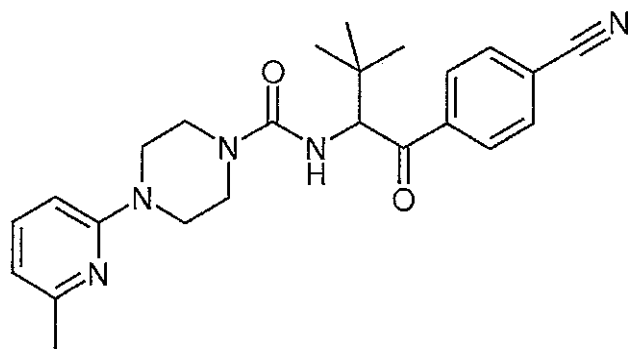
本発明は、従って非選択性陽イオンチャンネル TRPA1 の新規なアンタゴニストを提供する。新規なアンタゴニストは、とりわけ、疼痛を処置するために用いることができる。TRPA1 アンタゴニストによって媒介されるさらなる医学的状態としては、喘息、百日咳及びニコチン依存症がある。

【0008】

30

第 1 の態様では、本発明は、式 (I) の化合物、薬学的に許容可能なその塩、エナンチオマー、又はその混合物を提供する：

【化 1】



(I)

40

【0009】

本発明の化合物は、1つのキラル中心を含むので、その化合物はエナンチオマーの形態で、及び分割されて、又はラセミ混合物として存在してもよいことは、理解されるだろう。本発明は、式 (I) の化合物の任意の可能なエナンチオマー、ラセミ体又はその混合物を包含する。本発明の化合物の光学活性な形態は、例えば、ラセミ体のキラルクロマトグラフィーによる分離によって、光学活性な出発物質からの合成によって、又は後に記述さ

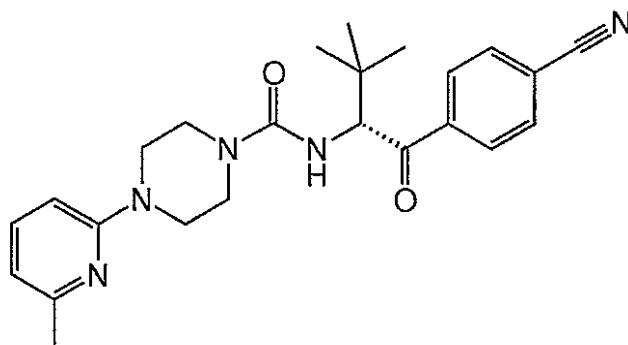
50

れる手順に基づく不斉合成によって製造されればよい。

【0010】

本発明の1つの実施態様は、以下の構造を有する式(I)の化合物の(R)エナンチオマーである：

【化2】



10

【0011】

本発明の化合物は、溶媒和されない形態と同様に溶媒和された、例えば水和した形態で存在してもよいことも、また理解されるだろう。さらに、本発明が式(I)の化合物のそのような溶媒和されたすべての形態を包含することは理解されるだろう。

【0012】

本発明の範囲内には、式(I)の化合物の塩も入る。一般に、本発明の化合物の薬学的に許容可能な塩は、業界に周知の標準的な手法を用いて得られればよく、例えば、十分に塩基性の化合物、例えばアルキルアミンと好適な酸、例えばHCl又は酢酸を反応させて生理学的に許容可能なアニオンを与える。また、カルボン酸又はフェノールのような好適に酸性のプロトンを持つ本発明の化合物を、水性媒体中で、1当量のアルカリ金属又はアルカリ土類金属水酸化物又はアルコキシド(エトキシド又はメトキシドなど)、又は好適に塩基性の有機アミン(コリン又はメグルミンなど)で処理し、続いて従来の精製技術で処理することによって、対応するアルカリ金属(ナトリウム、カリウム又はリチウムなど)又はアルカリ土類金属(カルシウムなど)の塩を作ることが可能であればよい。

20

【0013】

1つの実施態様では、上記式(I)の化合物は、薬学的に許容可能なその塩又は溶媒和物、特に塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、酢酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、又はp-トルエンスルホン酸塩のような酸付加塩に変換してもよい。

30

【0014】

本発明の化合物は、治療に、特に喘息、百日咳(持続性の咳)、ニコチン中毒の治療、及び広範痛、限局痛、侵害受容性疼痛、炎症性痛覚、中枢性疼痛、中枢及び末梢性神経障害性疼痛、中枢及び末梢性神経原性疼痛、中枢及び末梢神経痛、慢性腱炎、腰痛、術後疼痛、末梢神経障害、臓痛、骨盤痛、異痛症、有痛性感覚麻痺、しゃく熱痛、異常錯感覚、線維筋痛、痛覚過敏、感覚過敏、痛感過敏、虚血性疼痛、坐骨神経痛、間質性膀胱炎を含むがこれに限定されない膀胱炎に関連する疼痛、多発性硬化症に関連する疼痛、関節炎に関連する疼痛、変形性関節症に関連する疼痛、関節リウマチに関連する疼痛、及びがんに関連する疼痛を含むがこれらに限定されない急性及び慢性疼痛障害を含むがこれらに限定されないさまざまな疼痛状態の治療のために有用であることが考えられる。

40

【0015】

人間のような温血動物における治療のための使用では、本発明の化合物は、従来の医薬組成物の形態で、経口、筋肉内、皮下、局所、鼻腔内、腹腔内、胸腔内、静脈内、硬膜外、髄腔内、経皮的、脳室内、及び関節内への注射を含む任意の経路によって投与されればよい。

【0016】

50

本発明の１つの実施態様では、投与経路が静脈内、局所、皮内又は筋肉内であればよい。

【００１７】

用量は、投与経路、病気の重症度、患者の年齢及び体重、及び特定の患者に最適な個別の投薬計画及び投与量レベルを決定する場合に通常主治医が考慮する他の要因に依存することになる。

【００１８】

本発明は、上文で治療に使用するための薬剤の製造に定義されたように、式（Ｉ）の化合物又は薬学的に許容可能なその塩又は溶媒和物の使用を提供する。

【００１９】

特に医療適用では、本発明は、喘息、百日咳（持続性の咳）、ニコチン中毒を処置するため、及び広範痛、局所的な疼痛、侵害受容性疼痛、炎症性痛覚、中枢性疼痛、中枢及び末梢性神経障害性疼痛、中枢及び末梢性神経原性疼痛、中枢及び末梢神経痛、慢性腱炎、腰痛、術後疼痛、末梢神経障害、内臓痛、骨盤痛、異痛症、有痛性感覚麻痺、しゃく熱痛、異常錯感覚、線維筋痛、痛覚過敏、感覚過敏、痛感過敏、虚血性疼痛、坐骨神経痛、間質性膀胱炎を含むがこれに限定されない膀胱炎に関連する疼痛、多発性硬化症に関連する疼痛、関節炎に関連する疼痛、変形性関節症に関連する疼痛、関節リウマチに関連する疼痛、及びがんに関連する疼痛を含むがこれらに限定されない急性及び慢性疼痛障害のような、さまざまな疼痛状態を処置するための薬剤を製造するための、式（Ｉ）の化合物の使用を提供する。

【００２０】

本発明はさらに、喘息、百日咳（持続性の咳）、ニコチン中毒を処置するため、及び広範痛、限局痛、侵害受容性疼痛、炎症性痛覚、中枢性疼痛、中枢及び末梢性神経障害性疼痛、中枢及び末梢性神経原性疼痛、中枢及び末梢神経痛、慢性腱炎、腰痛、術後疼痛、末梢神経障害、内臓痛、骨盤痛、異痛症、有痛性感覚麻痺、しゃく熱痛、異常錯感覚、線維筋痛、痛覚過敏、感覚過敏、痛感過敏、虚血性疼痛、坐骨神経痛、間質性膀胱炎を含むがこれに限定されない膀胱炎に関連する疼痛、多発性硬化症に関連する疼痛、関節炎に関連する疼痛、変形性関節症に関連する疼痛、関節リウマチに関連する疼痛、及びがんに関連する疼痛を含むがこれらに限定されない急性及び慢性疼痛障害のような、さまざまな疼痛状態を処置するための式（Ｉ）の化合物を提供する。

【００２１】

本発明のさらなる態様は、上で論じた状態の何れかを患う対象（subject）を処置する方法であり、それによって上記の式（Ｉ）による化合物又は薬学的に許容可能なその塩若しくは溶媒和物の有効量が、そのような処置を必要とする患者に投与される。

【００２２】

従って、本発明は、上に提示した特定の医療適応症を処置する方法を提供し、ここで、式（Ｉ）の化合物又は薬学的に許容可能なその塩若しくは溶媒和物の有効量が、そのような処置を必要とする患者に投与される

【００２３】

本発明はまた、治療における薬剤として使用するための式（Ｉ）の化合物を提供する。

【００２４】

本明細書の関連において、用語の「治療」は、反対する明確な表示が無い限り「予防」も包含する。用語の「治療的」及び「治療的に」も相応に解釈されるべきである。本発明の関連の中の「治療」という用語は、さらに、本発明の化合物の有効量を投与し、既存の病状、急性又は慢性若しくは再発性の状態の何れかを緩和することを包含する。この定義は、また再発性の状態を防止するための予防的な治療及び慢性疾患の継続的治療をも包含する。

【００２５】

式（Ｉ）の化合物は、医薬品として、特にＴＲＰＡ１阻害剤（アンタゴニスト）としての活性を有する。より詳しくは、本発明のＴＲＰＡ１阻害剤は、治療に、特に広範痛、限

10

20

30

40

50

局痛、侵害受容性疼痛、炎症性痛覚、中枢性疼痛、中枢及び末梢性神経障害性疼痛、中枢及び末梢性神経原性疼痛、中枢及び末梢神経痛、慢性腱炎、腰痛、術後疼痛、末梢神経障害、内臓痛、骨盤痛、異痛症、有痛性感覚麻痺、しゃく熱痛、異常錯感覚、線維筋痛、痛覚過敏、感覚過敏、痛感過敏、虚血性疼痛、坐骨神経痛、間質性膀胱炎を含むがこれに限定されない膀胱炎に関連する疼痛、多発性硬化症に関連する疼痛、関節炎に関連する疼痛、変形性関節症に関連する疼痛、関節リウマチに関連する疼痛、及びがんに関連する疼痛を含むがこれらに限定されない急性及び慢性疼痛障害のような、さまざまな疼痛状態を緩和するための治療に有用である。

【0026】

式(I)による化合物は、網膜症、糖尿病性網膜症及び緑内障のような眼科疾患の処置、及びそのような疾患に関連する疼痛の処置に使用してもよい。

10

【0027】

式(I)による化合物はまた、眼科的処置のために、又はCS若しくはCRのような「暴動鎮圧剤」に対する反作用剤として、及びそのような薬剤の影響に苦しむ対象を式(I)による化合物の治療的に有効な量を投与することによって処置するために使用してもよい。

【0028】

前述の治療的使用のために投与される用量は、もちろん、使用される化合物、投与方法、望まれる処置、及び適応する疾患によって変動することになる。本発明の化合物の1日投与量は、0.05mg/kg～100mg/kgの範囲であればよい。

20

【0029】

式(I)の化合物及び薬学的に許容可能なその塩は、単独で使われてもよいが、一般には式(I)の化合物/塩(活性成分)が薬学的に許容可能なアジュバント、希釈剤又はキャリアに関連した医薬組成物の形で投与されることになる。好適な医薬製剤を選択及び調製するための従来の手順は、例えば“Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs”, M. E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988に記載されている。

【0030】

投与方法によって、医薬組成物は、好ましくは0.05～99%w(重量によるパーセント)、より好ましくは0.05～80%w、さらにより好ましくは0.10～70%w、そしてなおさらに好ましくは0.10～50%wの活性成分を含むことになり、すべての重量パーセントは全組成物を基にする。本発明はまた、式(I)の化合物又は薬学的に許容可能なその塩を上文で定義したように薬学的に許容可能なアジュバント、希釈剤又はキャリアと併せて含む医薬組成物を提供する。

30

【0031】

本発明はさらに、式(I)の化合物又は上文で定義したような薬学的に許容可能なその塩を薬学的に許容可能なアジュバント、希釈剤又はキャリアと混合することを含む本発明の医薬組成物の製造方法を提供する。

【0032】

本医薬組成物は、例えばクリーム、溶液又は懸濁液の形態で局所的に(例えば、皮膚に);又は全身的に、例えば錠剤、カプセル、シロップ、散剤または顆粒剤の形態で経口投与によって;もしくは溶液又は懸濁液の形態で非経口投与によって;もしくは皮下投与によって;もしくは坐薬の形態での直腸投与によって;もしくは経皮的に投与されてもよい。経口投与のためには、本発明の化合物は、アジュバント又はキャリア、例えば乳糖、サッカロース、ソルビトール、マンニトール;デンプン、例えばジャガイモデンプン、コーンスターチ又はアミロペクチン;セルロース誘導体;結合剤、例えばゼラチン又はポリビニルピロリドン;及び/又は滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ポリエチレングリコール、ワックス、パラフィンなどと混合し、次に錠剤に圧縮すればよい。もし被覆錠剤が必要なら、上記のように製造したコアを、例えばアラビアゴム、ゼラチン、滑石及び二酸化チタンを含んでもよい濃縮された糖溶液で被覆すればよい。或いは、錠剤を、揮発し易い有機溶媒に溶解した好適なポリマーで被覆すればよい。

40

50

【 0 0 3 3 】

軟ゼラチンカプセルを製造するために、本発明の化合物は、例えば植物油又はポリエチレングリコールと混合してもよい。硬ゼラチンカプセルは、前述の錠剤用の賦形剤のどれかを用いて本化合物の顆粒を含有させればよい。同様に、本発明の化合物の液体又は半固体の製剤は、硬ゼラチンカプセルに充填されてもよい。

【 0 0 3 4 】

経口適用のための液体製剤は、シロップ又は懸濁液、例えば本発明の化合物を含み、糖とエタノール、水、グリセリン及びプロピレングリコールの混合物とのバランスのとれた溶液、の形態をとってもよい。場合により、そのような液体製剤は、着色材、着香剤、サッカリン及びノ又は増粘剤としてのカルボキシメチルセルロース又は当業者が知る他の賦形剤を含んでもよい。

10

【 0 0 3 5 】

本発明の化合物はまた、上記の状態の処置に使用される他の化合物と併用して投与されてもよい。

【 0 0 3 6 】

更なる実施態様では、本発明の化合物又は式 (I) の化合物を含む医薬組成物又は製剤は、他の薬学的に活性な化合物又は下記より選択される化合物と共に、同時に、逐次的に又は別々に投与される：

(i) 抗うつ薬の、例えば、アゴメラチン、アミトリプチリン、アモキサピン、ブプロピオン、シタロプラム、クロミプラミン、デシプラミン、ドキセチン、デュロキセチン、エルザソナン、エスシタロプラム、フルボキサミン、フルオキセチン、ジェピロン、イミプラミン、イブサピロン、マプロチリン、ノルトリプチリン、ネファゾドン、パロキセチン、フェネルジン、プロトリプチリン、レボキセチン、ロバルゾタン、セルトラリン、シブトラミン、チオニソキセチン、トラニルシプロマイン、トラゾドン、トリミプラミン、ベンラファキシン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

20

(i i) 非定型抗精神病薬の、例えば、クエチアピン及び薬学的に活性なその異性体及び代謝物；

(i i i) 抗精神病薬の、例えば、アミスルピリド、アリピプラゾール、アセナピン、ベンジソキシジル、ピフェブルノックス、カルバマゼピン、クロザピン、クロルプロマジン、デベンザピン、ジバルプロエックス、デュロキセチン、エスゾピクロン、ハロペリドール、イロペリドン、ラモトリジン、ロクサピン、メソリダジン、オランザピン、パリペリドン、ペルラピン、ペルフェナジン、フェノチアジン、フェニルブチルピペリジン、ピモジド、プロクロルペラジン、リスペリドン、セルチンドール、スルピリド、スプロクロン、スリクロン、チオリダジン、トリフルオペラジン、トリメトジン、バルプロアート、バルプロ酸、ゾピクロン、ゾテピン、ジブラシドン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

30

(i v) 抗不安薬の、例えば、アルネスピロン、アザピロン系、ベンゾジアゼピン系、バルピツール酸系の例えば、アジナゾラム、アルブラゾラム、バレゼパム、ベンタゼパム、プロマゼパム、プロチゾラム、ブスピロン、クロナゼパム、クロラゼパート、クロルジアゼポキシド、シブラゼパム、ジアゼパム、ジフェンヒドラミン、エスタゾラム、フェノバム、フルニトラゼパム、フルラゼパム、フォサゼパム、ロラゼパム、ロルメタゼパム、メプロバメート、ミダゾラム、ニトラゼパム、オキサゼパム、プラゼパム、クアゼパム、レクラゼパム、トラカゾレート、トレピパム、テマゼパム、トリアゾラム、ウルダゼパム、ゾラゼパム、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

40

(v) 抗痙攣薬の、例えば、カルバマゼピン、クロナゼパム、エトスクシミド、フェルバメート、ホスフェニトイン、ガバペンチン、ラコサミド、ラモトリギン、レベチラセタム、オキスカルバゼピン、フェノバルピタール、フェニトイン、プレガバリン、ルフィナמיד、トピラメート、バルプロエート、ピガバトリン、ゾニサミド、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

(v i) アルツハイマー病治療薬の、例えば、ドネペジル、リバスティグミン、ガランタ

50

ミン、メマンチン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

【 0 0 3 7 】

(v i i) パーキンソン病治療薬の、例えば、デプレニル、L - ドーパ、レキップ、ミラペックス、M A O B 阻害剤のセレジン及びラサギリンなど、c o m P 阻害剤のタスマー、A - 2 阻害剤、ドーパミン再取り込阻害剤、N M D A アンタゴニスト、ニコチンアゴニスト、ドーパミンアゴニスト、及びニューロンの一酸化窒素シンターゼ阻害剤、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

(v i i i) 片頭痛治療薬の、例えば、アルモトリプタン、アマンタジン、プロモクリプチン、ブタルピタール、カベルゴリン、ジクロラルフェナゾン、ジヒドロエルゴタミン、エレトリプタン、フロパトリプタン、リスリド、ナラトリプタン、ペルゴリド、ピゾチフェン、プラミペキソール、リザトリプタン、ロピニロール、スマトリプタン、ゾルミトリプタン、ゾミトリプタン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

10

(i x) 脳梗塞治療薬、血栓溶解療法用を含む、例えば、アクチパーゼ及びデスモテプラゼ、アブシキシマブ、シチコリン、クロピドグレル、エプチフィバチド、ミノサイクリン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

(x) 尿失禁治療薬の、例えば、ダラフェナシン、ファルボキサート、オキシブチニン、プロピペリン、ロバルゾタン、ソリフェナシン、トルテロジン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

(x i) 神経障害性疼痛治療薬の、例えば、リドカイン、カプサイシン、及び抗痙攣薬の、例えばガバペンチン、プレガバリン、及び抗うつ薬の、例えばデュロキセチン、ベンラファキシン、アミトリプチリン、クロミプラミン、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

20

(x i i) 侵害受容性疼痛治療薬の、例えば、バラセタモール、非ステロイド系消炎物質及びコキシブ系の、例えば、セレコキシブ、エトリコキシブ、ルミラコキシブ、バルデコキシブ、バレコキシブ、ジクロフェナク、ロキソプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、イブプロフェン、ナブメトン、メロキシカム、ピロキシカム、及びオピオイド系の、例えば、モルヒネ、オキシコドン、ブプレノルフィン、トラマドール、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；

(x i i i) 不眠症治療薬の、例えば、アゴメラチン、アロバルピタール、アロニミド、アモバルピタール、ベンゾクタミン、ブタバルピタール、カプリド、クロラル、クロペリドン、クロレタート、デクスクラモール、エトクロルピノール、エトミダート、グルテチミド、ハラゼパム、ヒドロキシジン、メクロカロン、メラトニン、メフォバルピタール、メタカロン、ミダフルール、ニソバメート、ペントバルピタール、フェノバルピタール、プロポフォール、ラメルテオン、ロレタミド、トリクロホス、セコバルピタール、ザレプロン、ゾルピデム、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など；又は

30

(x i v) 気分安定剤の、例えば、カルバマゼピン、ジバルプロエックス、ガバペンチン、ラモトリジン、リチウム、オランザピン、クエチアピン、バルプロアート、バルプロ酸、ベラパミル、及び同等物、並びに薬学的に活性なその異性体及び代謝物など。

40

【 0 0 3 8 】

そのような配合製品には、本明細書に記載の用量範囲の本発明の化合物、及び他の薬学的に活性な化合物又は化合物類が、承認された用量範囲及び / 又は関連する出版物に記載の用量内で使用される。

【 0 0 3 9 】

製造方法、実験作業

一般的方法

使用したすべての溶媒は分析グレードであり、市販の無水溶媒は、日常的に反応に使用した。反応は、通常窒素又はアルゴンの不活性雰囲気で行った。

【 0 0 4 0 】

50

^1H 、 ^{19}F 及び ^{13}C NMR スペクトルは、Z - グラジエントを備えた 5 mm BBO プロ
ーブヘッドを装備した Varian Unity + 400 NMR スペクトロメータ、又
は 5 mm BBI プローブヘッドを装備した Varian Gemini 300 NMR ス
ペクトロメータ、又は Z - グラジエントを備えた 60 μL 二重逆流プローブヘッドを装備
した Bruker Avance 400 NMR スペクトロメータ、又は Varian 4
00 ATB PFG プローブを装備した Varian Mercury Plus 400
NMR スペクトロメータ、又は Z - グラジエントを備えた 4 核プローブヘッドを装備した
Bruker DPX 400 NMR スペクトロメータ、又は Z - グラジエントを備えた 5
mm BBI プローブヘッドを装備した Bruker Avance 600 NMR スペク
トロメータで記録した。実施例の中で特に言及しない限り、スペクトルは、プロトンを 4
00 MHz で、 ^{19}F を 376 MHz で、そして ^{13}C を 100 MHz で記録した。

10

【0041】

或いは、 ^1H 及び ^{13}C の NMR スペクトルは、Varian 400 ATB PFG プロ
ーブを装備した Varian Mercury Plus 400 NMR スペクトロメータ
で、プロトンを 400 MHz で及び ^{13}C を 100 MHz で記録した。

【0042】

次の基準信号を使用した：ジメチルスルホキシド - d_6 の中心線 2.50 (1H)、
39.51 (13C)； CD_3OD の中心線 3.31 (1H) 又は 49.15 (1
3C) (表示されない限り)。NMR スペクトルは、低磁場から高磁場の方向に報告され
る。或いは、全ての重水素化溶媒は、一般に 0.03 体積% ~ 0.05 体積% のテトラメ
チルシランを含んでおり、それを基準信号 (^1H 及び ^{13}C の両者に対して 0.00 が充
てられた) として使用した。

20

【0043】

質量スペクトルは、Alliance 2795 (LC)、Waters PDA 2
996 及び ZQ Single Quadrupole Mass Spectrometer で構成される Waters 液体クロマトグラフィー質量分析 又は Waters Mi
cromass ZQ Detector 上で、120 で記録した。質量スペクトロメー
タは、陽イオン又は陰イオンモードで作動するエレクトロスプレーイオン源 (エレクトロ
スプレーイオン化) を装備した。キャピラリー電圧は 3 kV であり、コーン電圧は 30 V
であった。質量スペクトロメータは、0.3 秒のスキャン時間で、 m/z 100 ~ 700
又は m/z 100 ~ 1000 の間をスキャンした。分離は、Waters X-Terr
a MS C8 (3.5 μm 、50 又は 100 mm \times 2.1 mm 内径) 又は Scantec
Lab 社から得た ACE 3 AQ (100 mm \times 2.1 mm 内径) のいずれかで行った。
流速は、それぞれ 1.0 又は 0.3 mL / 分に調節した。カラム温度は、40 に設定
した。100% A (A: 95:5、10 mM NH_4OAc : MeCN; 又は 95:5、
8 mM HCOOH : MeCN) で開始し 100% B (B: MeCN) で終結する、中性
または酸性移動相システムを用いた直線的勾配を適用した。

30

【0044】

質量スペクトルはまた、Alliance 2690 Separations Mod
ule、Waters 2487 Dual 1 Absorbance Detector (220 及び 254 nm) 及び Waters ZQ Single Quadrupole
Mass Spectrometer で構成される Waters 液体クロマトグラフィー
質量分析上で記録した。質量スペクトロメータは、陽イオン又は陰イオンモードで作動す
るエレクトロスプレーイオン源 (エレクトロスプレーイオン化) を装備した。キャピラリ
ー電圧は 3 kV であり、コーン電圧は 30 V であった。質量スペクトロメータは、0.3
又は 0.8 秒のスキャン時間で、 m/z 97 ~ 800 の間をスキャンした。分離は、Ch
romolith Performance RP-18e (100 \times 4.6 mm) 上で行
った。95% A (A: 0.1% HCOOH (aq.)) で開始し、5 分後に 100% B (B: MeCN) で終結する、直線的勾配を適用した。流速は、2.0 mL / 分であった

40

。

50

【0045】

或いは、Ultra Pressure (UP) 液体クロマトグラフィー質量分析は、Acquity Autosampler、Acquity Sample Organizer、Acquity Column Manager、Acquity Binary Solvent Manager、Acquity UPLC PDA検出器及び Waters SQ Detectorで構成されるWaters Acquity UPLCシステム上で行った。質量スペクトロメータは、陽イオン又は陰イオンモードで作動するエレクトロスプレーイオン源 (ES) を装備した。キャピラリー電圧は3.0 kVに、コーン電圧は30 Vにそれぞれ設定した。質量スペクトロメータは、0.105秒のスキャン時間で、 m/z 100 ~ 600の間をスキャンした。ダイオードアレイ検出器は、200 ~ 400 nmをスキャンした。Column Managerの温度は、60 に設定した。分離は、Acquityカラム、UPLC BEH、C18 1.7 μ M上で、0.5 mL / 分の流速で実施した。100% A (A: 5% MeCN中10 mM NH_4OAc) で開始し、1.3分後に100% B (B: MeCN)、その後100% Bを0.6分で終結する、直線的勾配を適用した。ES pos / ES neg、 m/z 100 ~ 600。

10

【0046】

化合物同定はまた、Agilent Technologiesによって供給され、6890N G1530N GC、G2614a Autosampler、G2613a 注射器及び G2589N質量スペクトロメータで構成されるガスクロマトグラフィー - 質量分析システム上で行った。使用したカラムはVF 5 質量分析、ID0.25 mm \times 30 m、0.25 μ m (Varian社)であった。70 (1分間保持) で開始し300 (1分間保持) で終わる、25 / 分の直線的な温度勾配を適用した。質量スペクトロメータは、化学イオン化 (CI) イオン源を装備し、反応ガスはメタンであった。質量スペクトロメータは、 m/z 50 ~ 500の間をスキャンし、スキャンスピードは3.21スキャン / 秒に設定した。溶媒遅延は、0分から2.0分に設定した。

20

【0047】

高速液体クロマトグラフィー分析は、G1379a Micro Vacuum Degasser、G1312a Binary Pump、G1367a Well plate auto-sampler、G1316a Thermostatted Column Compartment及び G1315B Diode Array Detectorで構成されるAgilent HP1000システム上で行った。カラム: X-Terra 質量分析、Waters、3.0 \times 100 mm、3.5 μ m。カラム温度は40に、流速は1 mL / 分に設定した。Diode Array Detectorは、210 nmから300 nmをスキャンし、ステップ及びピーク幅はそれぞれ2 nm及び0.05分に設定した。100% A (A: 95: 5、10 mM NH_4OAc : MeCN) で開始し、4分後に100% B (B: MeCN) で終結する、直線的勾配を適用した。

30

【0048】

高速液体クロマトグラフィー分析はまた、Chromolith Performance RPカラム (C18、100 mm \times 4.6 mm) を装着したGynkotek UV D 170s UV-vis.検出器を装備した勾配ポンプで構成されたGynkotek P580 HPGを用いて行った。カラム温度は、25 に設定した。MilliQ水中のMeCN / 0.1トリフルオロ酢酸を用い、10%から100% MeCNまで5分で行われる直線的勾配を適用した。流速: 3 mL / 分。

40

【0049】

キラル純度分析は、Agilent 1100 PDA検出器を備えた超臨界液体クロマトグラフィー Berger Analytixシステム上で実施した。カラム温度は、50 に設定した。EtOHとCO₂混合物の定組成条件で、流速2.0 mL / 分を適用した。PDAは、190 ~ 600 nmをスキャンし、220 nmを純度測定用に抽出した。

【0050】

50

キラルHPLC分析は、もう一つの方法として、Gilsonキラルシステム上で、カラム：Chiralpak AD-H; 4.6×250mm; 5μm、移動相：100% EtOH、流速：0.8 mL/分で行った。施光度は、PDR-Chiralレーザー偏光計を用いて測定した。マイクロ波加熱は、2450MHzで連続照射を発生するシングルモードマイクロ波空洞内で行った。

【0051】

薄層クロマトグラフィー（薄層クロマトグラフィー）はMerck TLC-plates (Silica gel 60 F₂₅₄) 上で行い、スポットはUV視覚化した。

【0052】

フラッシュ・クロマトグラフィーは、RediSep（商標）順相フラッシュカラムを使用するか、又はMerck Silica gel 60 (0.040~0.063mm) を使用して、Combi Flash（登録商標）Companion（商標）上で行った。フラッシュ・クロマトグラフィーに使用した代表的な溶媒は、クロロホルム/メタノール、ジクロロメタン/メタノール、ヘプタン/酢酸エチル、クロロホルム/メタノール/アンモニア（水）及びジクロロメタン/メタノール/NH₃（水）の混合物であった。

【0053】

分取クロマトグラフィーは、ダイオードアレイ検出器を備えたWaters auto purification HPLC上で実施した。カラム：XTerra 質量分析 C8、19×300mm、10μm。MeCN/(95:5、0.1M NH₄OAc:MeCN)による狭勾配を、20mL/分の流速で使用した。

【0054】

精製はまた、Waters Symmetry（登録商標）カラム（C18、5μm、100mm×19mm）を装備したShimadzu SPD-10A UV vis.検出器を備えたセミ分取用Shimadzu LC-8A HPLC上で達成した。MeCN/MilliQ水中0.1%トリフルオロ酢酸による狭勾配を、10mL/分の流速で使用した。

【0055】

或いは、精製は、Waters Sunfireカラム（150mm×21.2mm）を装備しGilson 156 UV検出器を備えた分取型Gilson 281（Gilson Pump 322）HPLC上で達成した。MeCN/水中の0.1%ギ酸による狭勾配を、15mL/分の流速で使用した。

【0056】

キラル分取クロマトグラフィーは、Knauer K-2501 UV検出器を備えた超臨界液体クロマトグラフィー Berger Multigramシステム上で実施した。カラム温度は、35℃に設定した。EtOHとCO₂混合物の定組成条件で、流速50.0mL/分を適用した。UV検出器は、220nmでスキャンした。UVシグナルで捕集画分を決定した。

【0057】

化合物名は、Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)社、Toronto ON, Canada、www.acdlabs.comからのソフトウェアACD/Nameバージョン10.06、又はOpenEyeからのLexichem、バージョン1.4、ソフトウェアを使用して命名した。

【0058】

略語：

Ab s	吸収
a q	水
C A S	ケミカルアブストラクトサービス
C D I	1, 1' - カルボニルジイミダゾール
D C M	ジクロロメタン
D I P E A	N, N - ジイソプロピルエチルアミン

10

20

30

40

50

D M F	ジメチルホルムアミド	
D M S O	ジメチルスルホキシド	
E D C I	1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド	
E S	エレクトロスプレー	
E S I	エレクトロスプレーイオン化	
e q	同等物	
G C	ガスクロマトグラフィー	
h	時間	
H C l	塩酸、塩酸塩	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	10
I P C	工程管理	
M	モル (リットル当たりのモル数)	
m i n	分	
M S	質量分析	
N M R	核磁気共鳴	
p r e p .	分取	
r t	室温	
R t	保持時間	
S F C	超臨界液体クロマトグラフィー	
T j	ジャケット温度	20
T i	内部温度	
T E A	トリエチルアミン	
T L C	薄層クロマトグラフィー	
T H F	テトラヒドロフラン	
T L C	薄層クロマトグラフィー	
U V	紫外線	
V C D	振動円二色性	

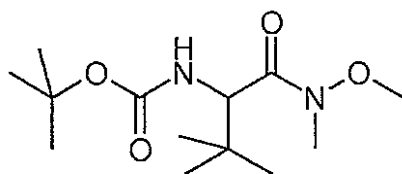
【 0 0 5 9 】

出発物質

実施例 1

第三級ブチル 1 - (メトキシ(メチル)アミノ) - 3 , 3 - ジメチル - 1 - オキシブタン - 2 - イルカルバメート

【 化 3 】



【 0 0 6 0 】

方法 1

2 - (第三級ブトキシカルボニルアミノ) - 3 , 3 - ジメチルブタン酸 (ケミカルアブストラクトサービス 1 0 2 1 8 5 - 3 5 - 3、5 0 0 m g、2 . 1 6 m m o l) のジクロロメタン (5 m L) 溶液に、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (ケミカルアブストラクトサービス 2 5 9 5 2 - 5 3 - 8、4 9 7 m g、2 . 5 9 m m o l) を添加し、1 0 分間室温で撹拌した。N , O - ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩 (ケミカルアブストラクトサービス 6 6 3 8 - 7 9 - 5、2 5 3 m g、2 . 5 9 m m o l) 及び N , N - ジイソプロピルエチルアミン (0 . 4 2 9 m L、2 . 5 9 m m o l) のジクロロメタン (5 m L) 溶液を添加し、反応混合物を撹拌しながら室温で週末にかけて放置した。混合物は、ジクロロメタン (3 0 m L) で希釈し、飽和 N a H C O ₃ 水 (5

0 mL) で抽出した。有機相を、硫酸マグネシウムで乾燥してろ過する前に、水で洗浄した。溶媒を減圧除去し、第三級ブチル 1 - (メトキシ(メチル)アミノ) - 3, 3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメートを得た (466 mg、79%)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.98 (s, 9H) 1.43 (s, 9H) 2.19 - 2.28 (m, 1H) 3.21 (s, 3H) 3.78 (s, 3H) 4.66 (d, 1H)。GC - MS (unprotected amino acid) m/z 130, Rt: 5.82 min。

【0061】

方法 2

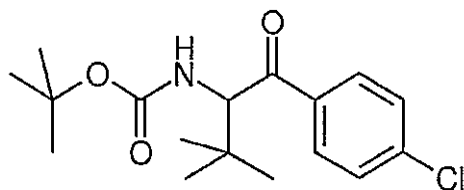
清浄したそして乾燥した 10 L の反応器に、ジャケット温度が 25 で、N - boc - 第三級ブチルグリシン (N-Boc-tert-Leucine, ケミカルアブストラクトサービス 102185 - 35 - 3) (188 g; 0.77 mol; 1.00 eq) 及びジクロロメタン (6.25 L; 35 vol) を入れ、細かいスラリー状にした。1, 1' - カルボニルイミダゾール (208.7 g; 1.3 eq) を、ガス排出のもと約 1 分後に 1 部を攪拌しながら添加し、清澄な淡緑色溶液にした。反応は、ガスクロマトグラフィーでモニターし、ジャケット温度 25 の室温で 1 時間後、第 2 部の 1, 1' - カルボニルイミダゾール (32.1 g; 0.2 eq) を添加し、反応混合物を 1 晩放置した。清澄な反応混合物に、N, O - ジメチルヒドロキシルアミン (153.7 g; 2.0 eq)、続いてトリエチルアミン (215 mL; 2.0 eq) を添加した。ジャケット温度を 50 に設定し、反応の変化はガスクロマトグラフィー分析でフォローした。第 2 部の N, O - ジメチルヒドロキシルアミン (26.9 g; 0.35 eq) 及びトリエチルアミン (37 mL; 0.35 eq) を混合物に添加し、反応はジャケット温度 50 (内部温度 41) で 48 時間継続し、98.7% の変換を生じさせた。反応混合物 (大よそ pH 8) を冷却し、ジャケット温度 20 で、水 (2.82 L; 15 vol) を反応器に加え、生じた混合物を 10 分間攪拌した。有機層を回収し、水 (2 x 2.82 L; 2 x 15 vol)、 NaHCO_3 (2 x 2.3 L; 2 x 12 vol)、最後に水 (2 x 1.88 L; 2 x 10 vol) で 2 回ずつ洗浄した。有機層を 40 で減圧濃縮して黄色の残留油状物を得、そしてそれをトルエン (250 mL) と共蒸発させて 295 g の油状生成物にして一晩放置した。結晶質の混合物が出現した。混合物は、ろ過し (P3 焼結ディスク: 直径 100 mm)、トルエン (75 mL) で洗浄そして乾燥し、白色結晶性物質 138 g を得た。2 番目の収穫 (158 g) を得て、熱 n - ヘプタン (250 mL) に溶解し、外部の氷水浴で冷却して淡色の物質 56 g を得た。分析の結果、それぞれ、1 番目の収穫は 96.8 重量%、2 番目の収穫は 72 重量%であった。NMR アッセイに基づく総収率 (194 g) は 82% であった。

【0062】

実施例 2 a

第三級ブチル 1 - (4 - クロロフェニル) - 3, 3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート

【化 4】



第三級ブチル 1 - (メトキシ(メチル)アミノ) - 3, 3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート (実施例 1、466 mg、1.70 mmol) を、乾燥テトラヒドロフラン (10 mL) に溶解した。次に (4 - クロロフェニル) マグネシウムプロミド (ケミカルアブストラクトサービス 873 - 77 - 8、1.0 M のテトラヒドロフラン溶液、6.79 mL、6.79 mmol) を、室温で滴加した。室温で一晩攪拌した後、反応を NH_4Cl で停止させ、EtOAc (2 x 50 mL) で抽出した。併せた有機相を水

で1回洗浄し、 MgSO_4 で乾燥し、濾過した。溶媒を除去した後、生成物をシリカゲルカラム上で、10～20%のヘプタン： EtOAc で溶出して精製し、第三級ブチル1-(4-クロロフェニル)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イルカルバメート(137mg、25%)を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm 0.93 (s, 9H) 1.44 (s, 9H) 5.12 (d, 1H) 5.40 (d, 1H) 7.46 (d, 2H) 7.95 (d, 2H)。MS (ESI) m/z 325.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

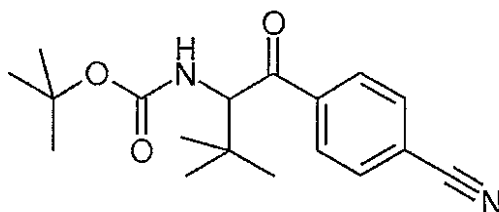
【0063】

実施例 2 b

第三級ブチル1-(4-シアノフェニル)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イルカルバメート

10

【化5】



乾燥した清浄な10L低温反応器に、4-ブロモベンゾニトリル(321g; 1.74 mol; 2.5 eq)及びテトラヒドロフラン(995mL; 5.0 vol)を加えた。20
 攪拌した混合物は、窒素雰囲気のもとで不活性化し、冷却した(ジャケット温度-20)。冷却した混合物に、内部温度-13でターボグリニヤール試薬($i\text{PrMgCl}/\text{LiCl}$ の14重量%テトラヒドロフラン溶液に相当する、Chemetal社のTurbo Grignard Reagent; 1.81L; 2.5 eq)を窒素雰囲気下に加え、1時間14分間約-10

より下の温度に維持した。反応中間物は、約0に3時間放置し、>97%の変換が得られた(分析サンプルは、15重量%の NH_4Cl 水で停止させた)。混合物は、ジャケット温度-20に冷却し、第三級ブチル1-(メトキシ(メチル)アミノ)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イルカルバメート(191g; 0.70 mol; 1.0 eq)のテトラヒドロフラン溶液(496mL; 2.6 vol)を、28分間で、約-10から-6で反応器に加えた(発熱反応)。容器はテトラヒドロフラン(221mL; 1.3 L)ですすぎ、反応混合物を20に温め、1晩放置し、約90%の変換(高速液体クロマトグラフィー)を得た。混合物は0(ジャケット温度-10)に冷却し、酒石酸ナトリウムカリウム(ロッシェル塩)(153g; 1.05 eq)の水溶液(10 vol)を、温度を0から10に保ちながら30分間で滴加し、オレンジ色のスラリーを得た。ジャケット温度を40に設定し、攪拌を内部温度30で止め、相を分離させた。赤色の有機層を回収し、黄色のスラリー様水相は、ジャケット温度30で、 $i\text{PrOAc}$ で2回(2×1.91L; 2×10 vol)抽出した。有機層を併せ(7.5 L)、ジャケット温度30で、かん水混合物で3回(3+3 vol; 5+5 vol; 3+3 vol)洗浄した。洗浄後の有機層をジャケット温度60で約1.5 Lのボリュームに減圧濃縮し、2 Lに希釈した($i\text{PrOAc}$)。生成物溶液は、さらに精製すること無しに次の工程(実施例3、方法2)に進めた。

30

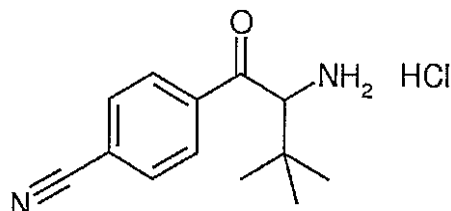
40

【0064】

実施例 3

4-(2-アミノ-3,3-ジメチルブタノイル)ベンゾニトリル塩酸塩

【化 6】



【0065】

方法 1

第三級ブチル 1 - (4 - クロロフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート (実施例 2 a、2.30 g、7.06 mmol) 及び $Zn(CN)_2$ (0.87 g、7.4 mmol) を、 $N_2(g)$ の下でジメチルホルムアミド (20 mL) に溶解した。 $Pd(PPh_3)_4$ (0.86 g、0.74 mmol) を添加し、混合物を 130 で一晩加熱した。混合物は室温に冷却し、水で希釈して EtOAc で抽出した。有機相をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥し、そして蒸発させた。生成物は、シリカカラム (EtOAc : ヘキサン、1 : 10) で精製し、第三級ブチル 1 - (4 - シアノフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート (961 mg、43%) を得た。第三級ブチル 1 - (4 - シアノフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート (961 mg、3.04 mmol) を 0 で 1.2 5 M HCl の MeOH 溶液に溶解しそして混合物を室温で 8 時間撹拌した。溶媒を除去し、残留物を真空乾燥して 4 - (2 - アミノ - 3,3 - ジメチルブタノイル) - ベンゾニトリル塩酸塩 (110 mg、93%) を得た。

1H NMR (400 MHz, MeOD) ppm 1.02 (s, 9 H) 5.05 (s, 1 H) 7.96 (d, 2 H) 8.20 (d, 2 H)。MS (ESI) m/z 217.1 [M + H]⁺。

【0066】

方法 2

清浄にして乾燥した 10 L の反応器に、ジャケット温度 65 で、2 - プロパノール (573 mL) 及び HCl の 2 - プロパノール溶液 (5 M ; 696 mL ; 5 eq) を投入した。混合物に、内部温度 53 で、前段 (上記の実施例 2 b) で得た第三級ブチル 1 - (4 - シアノフェニル - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イルカルバメート) 溶液を一部 (約 150 mL) ずつ 9 分間で添加した (約 600 mL の添加の後、生成物が沈殿し始めた)。スラリーを 1 時間撹拌し、分析の結果、完全な変換が得られた (ガスクロマトグラフィー)。細かい結晶性スラリーを冷却 (ジャケット温度 0) し、一晩放置した。

【0067】

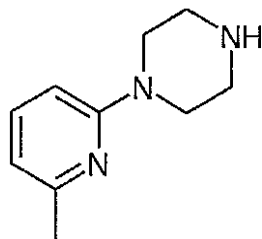
生成物は、減圧してガラスフィルター (2 つのフィルター ; P3 焼結ディスク ; 直径 130 mm) 上で分離した (約 3 時間の緩速ろ過)。生成物は、それぞれのフィルター上で、冷 (0) 2 - プロパノール (496 mL ; 2.6 vol) と iPrOAc (650 mL ; 3.4 vol) の混合物及び MeTHF (2 x 425 mL ; 2 x 3 vol) で変位洗浄した。生成物は、40 で 1 週間にわたって減圧乾燥し、白い細かい結晶性塩酸塩 135 g を得た。分析の結果、99.5 面積% (254 nm) の高速液体クロマトグラフィー純度、及び 94 重量%の NMR アッセイを得た。NMR アッセイに基づいた 2 段にわたる収率は 72% であった。

【0068】

実施例 4

1 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン

【化 7】



清浄にして乾燥した 1 / 2 L の丸底フラスコに、2 - クロロ - 6 - メチルピリジン (8 0 g ; 6 2 0 m m o l ; 1 . 0 e q) 及びピペラジン (4 0 0 g ; 7 . 4 0 e q) を加えた。混合物は、外部のオイル浴を使用して加熱し (ジャケット温度 1 5 4) 、磁氣的に攪拌した。応時間約 6 時間後、反応は完了したと考えられ (ガスクロマトグラフィー分析) 、室温に冷却した。冷混合物に、トルエン (4 7 5 m L ; 6 v o l) 及び水 (6 3 3 m L ; 8 v o l) を添加し、清澄な 2 相にした。水相を回収し、トルエン (1 5 0 m L) で抽出した。トルエン層を併せ、ブライン (1 7 . 5 重量 % ; 1 5 0 m L) で洗浄し、減圧で濃縮して油状残留物を得た (推定量 : 遊離塩基 8 8 g) 。室温の 1 L の反応器に、M e T H F (7 9 0 m L ; 1 0 v o l) に溶解した遊離塩基の溶液を、H C l 水溶液 (1 N ; 3 9 6 m L ; 5 e q) に添加した。黄色の水相を回収し、外部の氷水浴で冷却し、N a O H (5 M ; 9 5 m L) で p H > 1 1 に塩基性化した。塩基性水相は、M e T H F (7 9 2 m L ; 1 0 v o l) で抽出し、水相を回収し、そして有機層は減圧濃縮及び共沸蒸留によって乾燥した。乾燥した生成物含有 M e T H F 層 (4 7 0 m L ; 5 v o l) を外部の氷水浴で冷却し、不透明な溶液を得た。その溶液に、2 - プロパノールに溶解した H C l (3 1 0 m L , 3 . 0 e q) をゆっくり加え、オフホワイトの生成物を析出させた。得られたスラリーを 1 時間冷却し、生成物をガラスフィルター (P 3 焼結ディスク、直径 1 0 0 m m) で分離し、氷冷した M e T H F (1 0 0 m L) で洗浄した。生成物は 4 0 で減圧乾燥し、ジヒドロクロリド塩として 1 0 1 g (6 5 %) を得た。純度は、ガスクロマトグラフィーで測定し 9 6 . 7 面積 % 、N M R アッセイでは、7 1 . 5 重量 % (塩基) であった。収率は、N M R アッセイに基づいて 7 5 % であった。

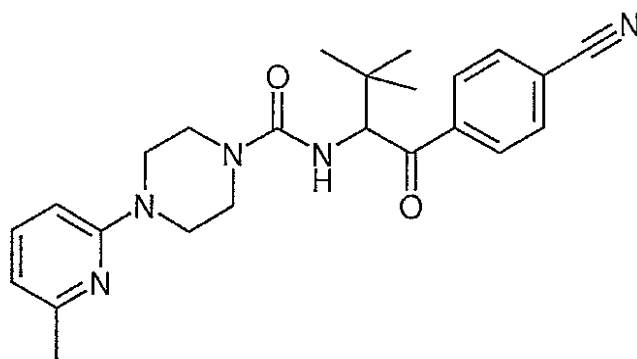
【 0 0 6 9 】

最終化合物

実施例 5

N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3 , 3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキサミド

【化 8】



【 0 0 7 0 】

方法 1

4 - (2 - アミノ - 3 , 3 - ジメチルブタノイル) ベンゾニトリル塩酸塩 (実施例 3 、 5 0 m g 、 0 . 2 3 m m o l) を、1 , 1 ' - カルボニルジイミダゾール (1 1 2 m g 、

0.69 mmol) 及びトリエチルアミン (0.035 mL、0.25 mmol) の MeCN (5 mL) 溶液に添加した。反応混合物は、1 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン (ケミカルアブストラクトサービス 55745 - 89 - 6、205 mg、1.16 mmol) を添加する前に、室温で 90 分間撹拌した。混合物は 1 時間撹拌し、そして溶媒を減圧下でエバポレートした。生成物はメタノールに溶解し、濾過し、そして分取用高速液体クロマトグラフィーで精製し、N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキサミドを取得した (36.3 mg、37%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm 0.94 (s, 9H) 2.40 (s, 3H) 3.48 - 3.68 (m, 8H) 5.25 - 5.31 (m, 1H) 5.33 - 5.39 (m, 1H) 6.43 (d, 1H) 6.53 (d, 1H) 7.40 (dd, 1H) 7.78 (m, 2H) 8.14 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 418.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。

【0071】

方法 2

ビス(トリクロロメチル)カルボネート (60.6 mg、0.20 mmol) を、4 - (2 - アミノ - 3,3 - ジメチルブタノイル) ベンゾニトリル塩酸塩 (実施例 3、129 mg、0.51 mmol) 及びトリエチルアミン (0.285 mL、2.04 mmol) のジクロロメタン (2 mL) 溶液に、室温で、一部ずつ 1 分以内で添加した。20 分間撹拌した後、1 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン (ケミカルアブストラクトサービス 55745 - 89 - 6、90 mg、0.51 mmol) 及びトリエチルアミン (0.142 mL、1.02 mmol) のジクロロメタン (2 mL) 溶液を滴加し、反応物を 90 分間撹拌した。反応混合物を MeOH で希釈する前に、揮発物を除去し、濾過しそして分取用高速液体クロマトグラフィーで精製した。画分をプールし、凍結乾燥して、N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキサミド (76 mg、36%) を得た。

^1H NMR (500 MHz, MeOD) ppm 0.99 (s, 9H) 2.36 (s, 3H) 3.53 (m, 8H) 5.30 (m, 1H) 6.34 (m, 1H) 6.57 (t, 3H) 7.44 (dd, 1H) 7.88 (m, 2H) 8.17 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 420.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

【0072】

方法 3

清浄にして乾燥した 10 L の反応器に、ジャケット温度 22 で、1,1' - カルボニルジイミダゾール (153.7 g; 0.74 mol; 1.5 eq) 続いてジメチルホルムアミド (1 L; 8.0 vol) を加え、清澄な淡黄色の溶液を得た。上記の溶液に、ジャケット温度 22 で、予め作成した 4 - (2 - アミノ - 3,3 - ジメチルブタノイル) ベンゾニトリル・HCl (実施例 3 の方法 2 で製造; 135 g; 0.50 mol; 1.0 eq)、ジメチルホルムアミド (1 L; 8.0 vol) 及びトリエチルアミン (127 g; 1.26 mol) の懸濁液 / 溶液の 10 分轄を、30 分間にわたって添加した。温度を 25 に上げ、生じた混合物を 30 分間撹拌した。出発物質をイミダゾール尿素中間体に完全に変換させるために、工程管理 (ガスクロマトグラフィー) を行った。ジャケット温度を 5 に設定し、トリエチルアミン (247.5 g; 5 eq) を、< 10 で、反応混合物に添加した。混合物に、内部温度を < 30 に維持しながら、1 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン・2 HCl (実施例 4; 184 g; 1.50 eq) を一部ずつ 33 分間で添加した。反応混合物は、ジャケット温度 25 でさらに 30 分間撹拌して工程管理を行い、99.5% (高速液体クロマトグラフィー) の変換を得た。混合物を冷却 (ジャケット温度 5) し、一晩放置した。混合物に、5 で、 NH_4Cl (285 g; 1.0 eq) の水溶液 (2.0 L; 15 vol) を分割して 8 分間で添加した。ジャケット温度を 25 に設定し、生成した混合物にトルエン (2.26 L; 16.7 vol) を添

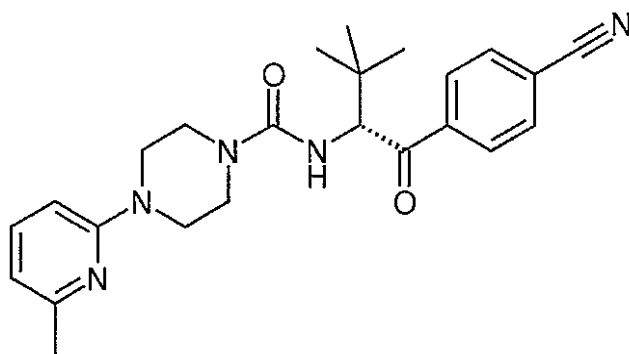
加した。有機相を回収し、水相は、一度トルエン（2.26 L；16.7 vol）で抽出した。有機相を併せ、水（500 mL；3.7 vol）で洗浄し、2 × HCl（30 重量%；127 mL；2 eq）の水溶液（2.5 L；18.5 vol）で2回抽出した。酸性水相は、トルエン（1.1 L；8.1 vol）で洗浄した。有機層を回収し、水相は反応器に再投入し、EtOAc（2.3 L；17 vol）を添加した。混合物に、25 で、予め作成したNaHCO₃（249 g；5.9 eq）の水溶液（pH 8）を撹拌のもとに添加した。塩基性の水相を回収し、EtOAc（2.2 L；16 vol）で洗浄し、有機相を併せてブライン（400 mL）で洗浄し、そして溶液をジャケット温度15 で一晩放置した。有機層（4 L）を、40 で大よそ半量に減圧濃縮し、SiO₂（約250 g）と混合しそして溶媒を除去して、シリカ粉末のカラムヘッドを得た。シリカカラムヘッドは、予めEtOAcで充填されたシリカカラム（120 mm × 400 mm；約4 kgのSiO₂、40～60メッシュ）の上に載せた。フラッシュ・クロマトグラフィー法は約20 LのEtOAcを溶離剤として使用し、進行は薄層クロマトグラフィーでモニターした。薄層クロマトグラフィー分析後の画分（約250 mL）をプールし、40 で減圧濃縮した。得られた生成物を、40 で減圧して乾燥し、191.5 gの純白な物質を得た。分析から、99.7面積%（254 nm）の高速液体クロマトグラフィー純度及び98.5重量%のアッセイ純度を得た。残留溶媒EtOAcは0.1重量%であった。この物質（180 g）は、目的のエナンチオマー、N-（1-（4-シアノフェニル）-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル）-4-（6-メチルピリジン-2-イル）ピペラジン-1-カルボキサミドの製造に使用した。NMRアッセイに基づく収率は90%であった（計算値）。

【0073】

実施例 6

（R）-N-（1-（4-シアノフェニル）-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル）-4-（6-メチルピリジン-2-イル）ピペラジン-1-カルボキサミド

【化9】



【0074】

方法 1

実施例 5 からのラセミ体 19 mg を、キラルクロマトグラフィーによって分離し、（R）-N-（1-（4-シアノフェニル）-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル）-4-（6-メチルピリジン-2-イル）ピペラジン-1-カルボキサミド（5.6 mg、30%）を得た。

キラル純度 100%、次のシステム上での保持時間 4.42 分：SFC Berger Analytix、カラム：Chiralcel OD-H；4.6 × 250 mm；5 μm、移動相：20% EtOH；80% CO₂、流量：2 mL/分。

¹H NMR（500 MHz，DMSO-d₆） ppm 0.93（s，9H） 2.29（s，3H） 3.43（m，8H） 5.11（d，1H） 6.52（d，1H） 6.59（m，2H） 7.42（dd，1H） 7.98（d，2H） 8.14（d，2H）。MS（ESI） m/z 420.3 [M+H]⁺。

【0075】

方法 2

高圧分取クロマトグラフィーシステムを用いて実施例 6 を製造するために、キラル分取クロマトグラフィーを用いた。

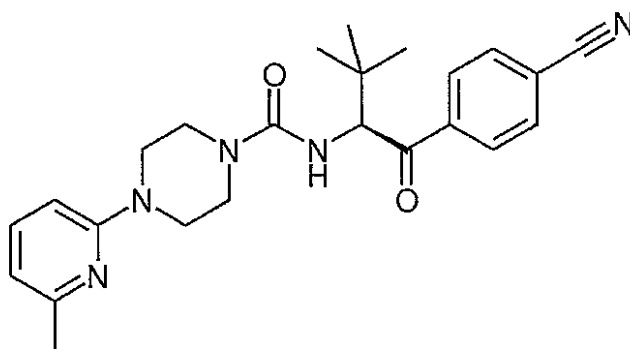
ラセミ体はエタノールに溶解した (25 g/L 供給液)。固定相は Chiralcel OD (20 ミクロン) であり、移動相はイソヘキサン/エタノールの 90:10 であった。分離は 25 の温度で行い、一注入当たり 30 mL の仕込み (0.75 g) をカラムに負荷した。注入は、120 mL/分の流速での分離の効率を高めるため、15 分毎に積み重ねた。320 nm の UV 検出波長を用いた。単一画分 (1 番目の溶出ピーク) を集め、定期的に採取した画分を高速液体クロマトグラフィーで以下の条件を用いて分析した。Chiralcel OD-H: 4.6 × 250 mm: 5 μm、移動相: 60:40 のイソヘキサン/IPA、1 mL/分、保持時間約 8.3 分。最終のキラル純度は 100%。収率は約 45% であった。

【0076】

実施例 7

(S)-N-(1-(4-シアノフェニル)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル)-4-(6-メチルピリジン-2-イル)ピペラジン-1-カルボキサミド

【化 10】



実施例 5 からのラセミ体 19 mg を、キラルクロマトグラフィーによって分離し、(S)-N-(1-(4-シアノフェニル)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル)-4-(6-メチルピリジン-2-イル)ピペラジン-1-カルボキサミド (4.2 mg、22%) を得た。

キラル純度 99.8%、次のシステム上での保持時間 6.34 分: SFC Berger Analytix、カラム: Chiralcel OD-H; 4.6 × 250 mm; 5 μm、移動相: 20% EtOH; 80% CO₂、流量: 2 mL/分。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) ppm 0.94 (s, 9H) 2.29 (s, 3H) 3.42 (m, 8H) 5.12 (d, 1H) 6.52 (d, 1H) 6.60 (dd, 2H) 7.42 (dd, 1H) 7.99 (m, 2H) 8.15 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 420.3 [M+H]⁺。

【0077】

固体特性

(R)-N-(1-(4-シアノフェニル)-3,3-ジメチル-1-オキソブタン-2-イル)-4-(6-メチルピリジン-2-イル)ピペラジン-1-カルボキサミド (実施例 6)

X 線粉末回折 (XRPD) パターンは、45 kV 及び 40 mA で、高精度長焦点 Cu K-線、1.5418 の X 線波長を使用する PANalytical X'PRO MPD システムで収集した。10 mm の照射距離を与えるプログラム可能な発散スリット及びプログラム可能な散乱線除去スリットを使用した。0.02 ラジアンソーラースリットを、入射及び回折ビーム経路に使用した。20 mm の固定マスクを入射ビーム経路に使用し、ニッケルフィルターを 255 のアクティブチャンネルを用いる PIXce

1-検出器の前に置いた。薄い平板試料は、スパチュラを用いて、シリコンの平らなゼロバックグラウンドプレート上に用意した。プレートをサンプルホルダに搭載し、測定する間、水平位置で回転させた。回折パターンは、連続スキャンモードで $2^{\circ} 2^{\circ} \sim 40^{\circ} 2^{\circ}$ の間を収集した。 $2^{\circ} 2^{\circ}$ 及び $40^{\circ} 2^{\circ}$ の間をスキャンするための合計時間は、約 10 分であった。

【0078】

(R) - N - (1 - (4 - シアノフェニル) - 3,3 - ジメチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル) - 4 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキサミドのディフラクトグラムを図 1 に示す。

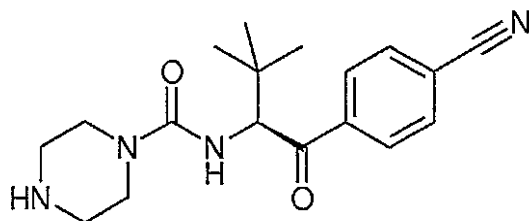
【0079】

振動円二色性

コンピュータスペクトルシミュレーション:

低エネルギー配置を検索する Monte Carlo 分子力学は、S エナンチオマー断片(II)について、Maestroグラフィックインタフェース (Schrodinger社) 内の MacroModel を使用して行った。最も低いエネルギー配座異性体が 5 kcal/mol 以内の全ての配座異性体はすべて、Gaussian 03 の中の密度関数理論 (DFT) 最小化の出発点として使用した。

【化 11】



振動円二色性計算が行われた断片 (II)

【0080】

最適化構造、調和振動周波数/強度、振動円二色性回転力、及び STP (ゼロ点エネルギーを含む) でのフリーエネルギーは、それぞれの配座異性体に対して決定した。これらの計算では、6-31 G*基底関数系と併せて B3PW91 で一般化された密度勾配近似 (GGA) 交換相関密度汎関数を用いた。それぞれの構造に対する振動円二色性スペクトルをシミュレーションし、ローレンツ曲線形 (12 cm^{-1} 線幅) にフィットさせ、シミュレーションと実験スペクトルの間が直接比較出来るように、計算スペクトルをボルツマン加重した。

【0081】

実験に基づく振動円二色性:

実験的なスペクトルは、約 8 mg のサンプルを約 0.15 mL の CDCl_3 に溶解して取得した。分析は、BioTool社の Chiral IR 装置を用い、デュアル線源、デュアル PEM、振動円二色性スキャンプロトコルを使用し、 0.1 mm BaF_2 セル内で 4 cm^{-1} の分解能で行った。装置は、 37.024 kHz で (1/4 遅延の ($約 1300 \text{ cm}^{-1}$ 付近を中心にしたスペクトル領域を取得するために最適化した) 偏光変調させるためのデュアル光弾性変調器セットを内蔵した。 30 (s) の時定数によるロックイン増幅、ならびに 20 kHz 高域フィルター及び 4 kHz ローパスフィルタを用いた。

【0082】

振動円二色性結果:

図 2 は、4 つのスペクトルを示す。スペクトル (1) は、実施例 6 の実験的に収集したスペクトルである。スペクトル (2) は、最初から計算された断片 (II) のスペクトルの反転を経て得られた (R) エナンチオマー振動円二色性スペクトルの計算推定である。スペクトル (3) は、実施例 7 の実験的振動円二色性スペクトルに相当する。スペクトル

10

20

30

40

50

(4)は、(S)エナンチオマーである断片(II)に対して計算されたスペクトルである。図2におけるスペクトル1及び2は、実施例6を(R)エナンチオマーとして割り当てる。スペクトル3及び4の類似性比較は、実施例7が(S)エナンチオマーとして存在していることを示す。

【0083】

生物学的評価

生物学的活性を測定するアッセイ

アッセイは、全細胞で細胞内 Ca^{2+} レベルをモニターすることによってhTRPA1に作用する化合物を検出するように設計した。この目的のために、TRPA1活性をアッセイするための二重添加工程のFLIPR(蛍光画像プレート読み取り装置)を設計した。簡潔に言えば、TRPA1を発現するHEK293細胞を、384ウェルのマイクロタイタープレートで培養し、細胞内カルシウムの変化を報告する蛍光プローブ、Fluo-4、を負荷させる。TRPA1チャンネル活性は、アッセイ緩衝液中でベースライン信号の測定、その後 EC_{80} -濃度のTRPA1-アゴニストである亜鉛を適用することによってアッセイする。その後のTRPA1チャンネルを通過するカルシウムの流入は、細胞質カルシウムの増加として検出され、それは、入れ替わりにFluo-4 蛍光の増加として報告される。試験化合物の活性は、亜鉛を添加する5分前に化合物を加えることによって評価する。TRPA1遮断薬(アンタゴニスト)は亜鉛の添加によって誘発されるカルシウム流入を阻害し、従ってFluo-4 蛍光の増加は起こさない。TRPA1オープナー(アゴニスト)はそれ自身でカルシウム流入を引き起こし、Fluo-4 蛍光の増加は、化合物添加の直後に検出される。

【0084】

アッセイでは、HEK293細胞株のTRPA1の発現は、誘導可能なプロモータの制御下にある。それ故、誘導された細胞と誘導されない細胞について、亜鉛刺激からの信号を比較することによってTRPA1信号の特異性を規定することが可能である。

【0085】

TRPA1は、痛みを引き起こす多くの刺激剤によって活性化される。TRPA1-依存の問題において、亜鉛はマウスの侵害受容感覚ニューロンを活性化させる必須生体微量元素である。亜鉛は、TRPA1チャンネルを通過する亜鉛の流入を必要とし、そして次に特異的細胞内システイン及びヒスチジン残基を経由して活性化する独特のメカニズムを経由してTRPA1を活性化する。

【0086】

hTRPA1-HEK293-TREx細胞は、ポリ-D-リジン被覆プレートに播種し、細胞培地中でコンフルエントな単層に増殖させた。実験の前に培地を廃棄し、アッセイ緩衝液に溶解したFluo-4 NW(Molecular Probe社)を、細胞に室温で1時間負荷させた。化合物を細胞プレートに添加し、 Ca^{2+} 不含のアッセイ緩衝液中で5分間レインキュベートした。次に Ca^{2+} 含有アッセイ緩衝液中200mMの Zn^{2+} を細胞に添加し、生の蛍光カウントを、波長470~495nmの励起LEDバンク及び波長515~575nmの放射フィルターを使用して測定した。一般的なアッセイ条件は、次のとおりである：試験化合物：30 μ M~0.001 μ M、又はポジティブコントロール及びネガティブコントロール中ゼロ；アッセイ緩衝液pH7.4： Ca^{2+} 及び Mg^{2+} の含又は不含のHBSS、10mM HEPES、1mMグルコース、0.4%NaHCO₃、アゴニスト：200 μ M塩化亜鉛。試験する化合物は100%ジメチルスルホキシドで希釈し、そして実験の前に、アッセイ緩衝液でさらに50倍に希釈した。

【0087】

アッセイにおける100%活性は、試験化合物不在で200 μ Mの Zn^{2+} によって起こるピークの蛍光レベルと定義した。IC₅₀は、この反応を50%阻害するのに必要な試験化合物の濃度を表した。

【0088】

代表的な化合物のアッセイデータは、以下の表に示す。力価はIC₅₀(カルシウム緩衝

10

20

30

40

50

液における平均信号に比して 50 % 阻害に要する濃度) として表示され、示された値は少なくとも 2 つの個別実験の平均である。

【 0 0 8 9 】

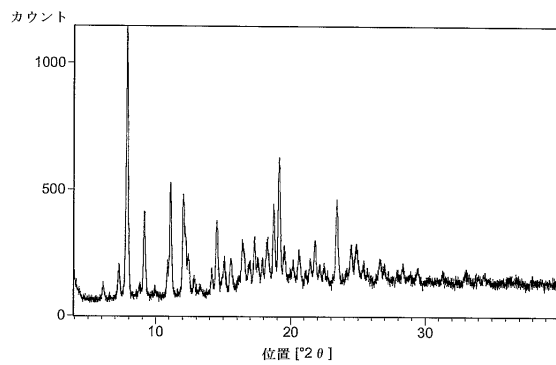
【表 1】

表 1 : 最終化合物の IC_{50}

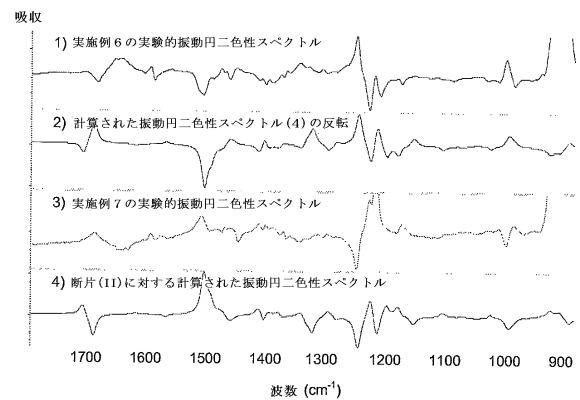
実施例	平均 IC_{50} (μM)
5 (ラセミ体)	0.2
6 (R-エナンチオマー)	0.06
7 (S-エナンチオマー)	6.8

10

【図 1】



【図 2】



実験的及び計算された振動円二色性スペクトル

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/04

(72)発明者 ディルク・ヴァイゲルト
 スウェーデン国エスエー - 1 5 1 8 5 セーデルティエ・アストラゼネカ・アール・アンド・ディ
 ・セーデルティエ・アストラゼネカ・アクチエボラーク

審査官 高橋 直子

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 0 1 2 4 0 (J P , A)
 特表 2 0 0 8 - 5 3 8 2 0 9 (J P , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 2 1 4 8 5 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 0 7 D 2 1 3 / 7 4
 A 6 1 K 3 1 / 4 9 6
 A 6 1 P 1 1 / 0 6
 A 6 1 P 2 5 / 0 4
 A 6 1 P 2 5 / 3 4
 A 6 1 P 2 7 / 0 2
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)