

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 1 日(01.10.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/147020 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 401/04 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61K 31/4725 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/059026
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 25 日(25.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-064590 2014 年 3 月 26 日(26.03.2014) JP
- (71) 出願人: アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 奥田 崇男(OKUDA, Takao); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 野澤 栄典(NOZAWA, Eisuke); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 鵜川 徹(UGAWA, Tohru); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 溝口 亮(MIZOGUCHI, Ryo); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 森田 拓, 外(MORITA, Hiroshi et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 アステラス製薬株式会社 知的財産部内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: AMIDE COMPOUND

(54) 発明の名称: アミド化合物

(57) Abstract: [Problem] To provide a compound useful as an active ingredient of a pharmaceutical composition, e.g., a pharmaceutical composition for the treatment of chronic renal failure and/or diabetic nephropathy. [Solution] The inventors conducted in-depth studies of compounds having an EP4 receptor-antagonizing effect, discovered an amide compound or salt thereof having an EP4 receptor-antagonizing effect, and perfected the present invention. The amide compound or salt thereof has an EP4 receptor-antagonizing effect and can be used as an active ingredient of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of various diseases in which EP4 is involved, e.g., chronic renal failure and/or diabetic nephropathy.

(57) 要約: 【課題】医薬組成物、例えば慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の治療用医薬組成物の有効成分として有用な化合物を提供する。 【解決手段】本発明者らは、EP4 受容体拮抗作用を有する化合物について鋭意検討し、アミド化合物又はその塩がEP4 受容体拮抗作用を有することを知見し、本発明を完成した。アミド化合物又はその塩はEP4 受容体拮抗作用を有し、EP4 が関与する種々の疾患、例えば、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防及び／又は治療用医薬組成物の有効成分として使用しうる。



WO 2015/147020 A1

明 細 書

発明の名称：アミド化合物

技術分野

[0001] 本発明は医薬組成物、例えば慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の治療用医薬組成物の有効成分として有用な4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸（以下、「化合物A」ということがある。）、又はその塩に関する。

背景技術

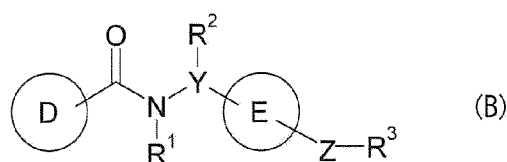
[0002] プロスタグランジンE₂（以下、「PGE₂」と言う。）はアラキドン酸カスケードの代謝産物の一つとして知られている。PGE₂は種々の生理活性を示し、発痛増強作用、炎症促進作用、炎症抑制作用、子宮収縮作用、消化管蠕動運動促進作用、覚醒作用、胃酸分泌抑制作用、血圧降下作用、血小板凝集阻害作用、骨再吸収促進作用、血管新生作用等に関与している。

PGE₂の受容体には、EP₁、EP₂、EP₃及びEP₄の4種類のサブタイプが存在し、これらは種々の組織に広く分布している。EP₁受容体の活性化は細胞内Ca²⁺の増加を引き起こす。EP₃受容体の活性化は細胞内Ca²⁺の増加を引き起こすと共に、アデニル酸シクラーゼの抑制を引き起こし細胞内のcAMPレベルを減少させる。EP₂及びEP₄受容体の活性化はアデニル酸シクラーゼの活性化を引き起こし、細胞内のcAMPレベルを増加させる。特にEP₄受容体は平滑筋の弛緩、炎症反応の促進又は抑制、リンパ球分化、メサングウム細胞の肥大又は増殖、胃腸からの粘液分泌等に関わっているとされている（Pharmacology & Therapeutics 2013、138：485-502；Pharmacological Reviews 2013、65：1010-1052；American Journal of Physiology Renal Physiology 2004、287、F673-F681）。

PGE₂受容体の阻害剤、つまりEP受容体アンタゴニストはEP受容体に対する結合活性を有し、PGE₂のEP受容体を介した作用を阻害する。したがって、EP受容体アンタゴニストはPGE₂に起因する疾患を治療する薬剤として期待されている。中でも、EP₄受容体アンタゴニストはEP₄に関連した疾患、たとえば腎臓病、炎症性疾患、種々の疼痛等に対するヒト及び動物での治療薬として期待されている（Journal of American Society Nephrology 2010、21：1678-1690；Proceedings of the National Academy of Sciences、2010、107：12233-12238；The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2008、325：425-434）。さらに、EP₄受容体選択的アンタゴニストは、他のEP₁、EP₂及びEP₃の拮抗に基づく副作用を回避できる点から望ましい（Physiological Reviews 1999、79：1193-1226；Annual Reviews Physiology 2001、63：579-605）。

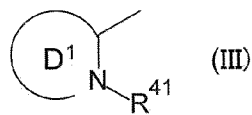
[0003] 特許文献1ではEP₄受容体アンタゴニストとして、下記式（B）で示される化合物が報告されている。

[化1]



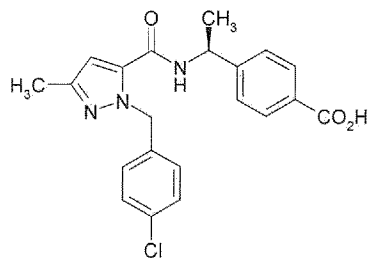
（式中、環Dは次式（I）の基等であり、次式中、環D¹はフェニルで置換されてもよい単環又は二環式の含窒素ヘテロ環を、R⁴¹は-X²-B⁴を、X²はC₁₋₆アルキレン等を、B⁴はR⁴から選択される同一又は異なる1～5個の基でそれぞれ置換されてもよいアリール、ヘテロ環等を表す。他の記号は当該特許文献を参照。）

[化2]



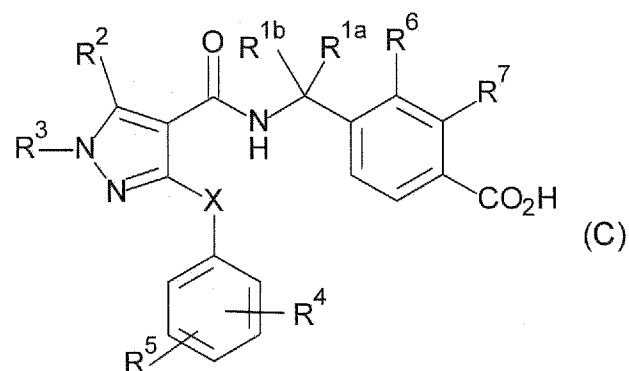
[0004] 当該特許文献の実施例 205 では下記実施例化合物が開示されているが、環 D¹がピラゾールである具体的な化合物としては、当該実施例化合物が開示されている。

[化3]



[0005] 特許文献 2 では E P 4 受容体アンタゴニストとして、下記式 (C) で示される化合物が報告されている。

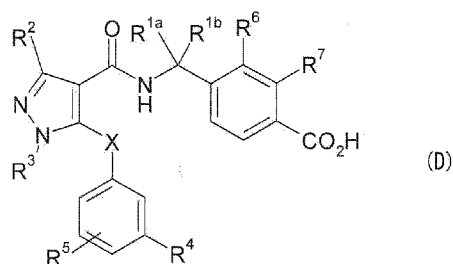
[化4]



(式中、R²はメチル、フルオロメチル等を、R⁴はフルオロメチル、メトキシ等を表す。他の記号は当該特許文献を参照。)

[0006] 特許文献 3 では E P 4 受容体アンタゴニストとして、下記式 (D) で示される化合物が報告されている。

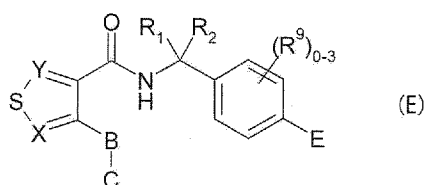
[化5]



(式中、 R^2 はメチル、フルオロメチル（例えば、モノフルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル）等を、 R^4 はフルオロメチル、メトキシ等を表す。他の記号は当該特許文献を参照。)

[0007] 特許文献4ではEP4受容体リガンドとして、下記式(E)で示される化合物が報告されている。

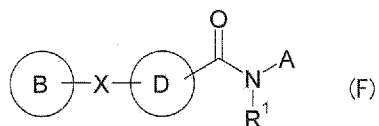
[化6]



(式中の記号は、当該特許文献を参照。)

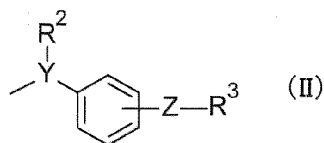
[0008] 特許文献5ではEP4受容体アンタゴニストとして、下記式(F)で示される化合物が報告されている。

[化7]



(式中、環B及び環Dは、同一又は互いに異なって、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロ環を、Xは単結合、 $-R^0-$ 等を、 R^0 は低級アルキレンを、 R^1 はH等を表す。Aは次式(11)の基等であり、次式中、YはCH等を、 R^2 は R^0 等を、 R^0 は低級アルキルを、Zは単結合等を、 R^3 は $-COOH$ 等を表す。他の記号は当該特許文献を参照。)

[化8]



当該特許文献において、環Dがピラゾールである具体的な化合物の開示はない。

[0009] 特許文献1から特許文献5において、具体的に実施例に開示された化合物と化合物Aの構造は異なる。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：国際公開第2009／139373号
 特許文献2：国際公開第2012／103071号
 特許文献3：国際公開第2012／039972号
 特許文献4：国際公開第2008／017164号
 特許文献5：国際公開第2009／005076号

発明の概要

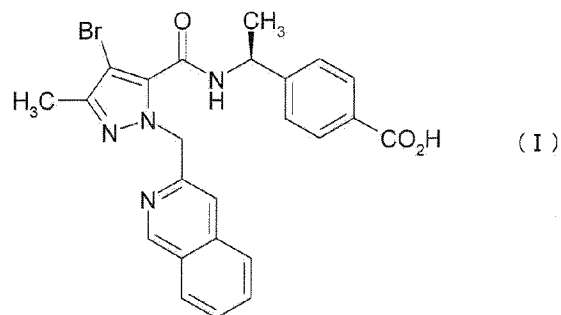
発明が解決しようとする課題

[0011] 医薬組成物、例えば慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の治療用医薬組成物の有効成分として有用な化合物を提供する。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、EP4受容体拮抗作用を有する化合物について鋭意検討し、式(1)で示される、4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸(化合物A)又はその塩が優れたEP4受容体拮抗作用を示すことを知見し、本発明を完成した。

[化9]



即ち、本発明は、化合物A又はその塩、並びに、化合物A又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物に関する。

[0013] また、本発明は、化合物A又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用医薬組成物に関する。なお、当該医薬組成物は、化合物A又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療剤を包含する。

また、本発明は、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用医薬組成物の製造のための化合物A又はその塩の使用、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための化合物A又はその塩の使用、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための化合物A又はその塩、並びに、化合物A又はその塩の有効量を対象に投与することからなる慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療方法に関する。なお、「対象」とは、その予防又は治療を必要とするヒト又はその他の動物であり、ある態様としては、その予防又は治療を必要とするヒトである。

発明の効果

[0014] 化合物A又はその塩は、EP4受容体拮抗作用を有するため、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防及び／又は治療用医薬組成物の有効成分として使用できる。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の化合物A又はその塩のある態様を以下に示す。なお、本明細書中

で単に化合物Aと記載する場合は、塩を形成していない遊離化合物としての化合物Aを意味する。

(1) 化合物A又はその塩。

(1-1) 化合物A。

(1-2) 化合物Aのメタンスルホン酸塩。

(2) (1)に記載された化合物A又はその塩の結晶。

(3) (1-1)に記載された化合物Aの結晶。

(3-1) 示差走査熱量計分析(DSC分析)における吸熱ピークのオンセット温度が253℃付近である(3)に記載の化合物Aの結晶。

(3-2) 管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 5.7$ 付近、 7.9 付近、 11.5 付近、 13.1 付近、及び 17.9 付近にピークを示すことを特徴とする(3)に記載の化合物Aの結晶。

(3-3) 管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 5.7$ 付近、 7.9 付近、 8.3 付近、 8.9 付近、 9.2 付近、 11.5 付近、 12.5 付近、 13.1 付近、 15.8 付近、 16.3 付近、 16.7 付近、 17.2 付近、 17.9 付近、 18.5 付近、及び 19.5 付近にピークを示すことを特徴とする(3)に記載の化合物Aの結晶。

(3-4) DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度が253℃付近であり、管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 5.7$ 付近、 7.9 付近、 11.5 付近、 13.1 付近、及び 17.9 付近にピークを示すことを特徴とする(3)に記載の化合物Aの結晶。

(3-5) DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度が253℃付近であり、管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 5.7$ 付近、 7.9 付近、 8.3 付近、 8.9 付近、 9.2 付近、 11.5 付近、 12.5 付近、 13.1 付近、 15.8 付近、 16.3 付近、 16.7 付近、 17.2 付近、 17.9 付近、 18.5 付近、及び 19.5 付近にピークを示すことを特徴とする(3)に記載の化合物Aの結晶。

(4) (1-2)に記載された化合物Aのメタンスルホン酸塩の結晶。

(4-1) DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度が192℃付近である(4)に記載の化合物Aのメタンスルホン酸塩の結晶。

(4-2) 管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 4.7$ 付近、 9.5 付近、 12.0 付近、 13.2 付近、 13.7 付近、 15.3 付近、 18.8 付近、 20.3 付近、 20.9 付近、及び 22.8 付近にピークを示すことを特徴とする(4)に記載の化合物Aのメタンスルホン酸塩の結晶。

(4-3) DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度が192℃付近であり、管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 4.7$ 付近、 9.5 付近、 12.0 付近、 13.2 付近、 13.7 付近、 15.3 付近、 18.8 付近、 20.3 付近、 20.9 付近、及び 22.8 付近にピークを示すことを特徴とする(4)に記載の化合物Aのメタンスルホン酸塩の結晶。

(5-1) (1) ~ (1-2) のいずれかに記載の化合物、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

(5-2) (2) ~ (4-3) のいずれかに記載の結晶、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

(5-3) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用である(1) ~ (1-2) のいずれかに記載の化合物、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

(5-4) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用である(2) ~ (4-3) のいずれかに記載の結晶、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

(6-1) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用医薬組成物の製造のための(1) ~ (1-2) のいずれかに記載の化合物の使用。

(6-2) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用医薬組成物の製造のための(2) ~ (4-3) のいずれかに記載の結晶の使用。

(7-1) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための(1

) ~ (1 - 2) のいずれかに記載の化合物。

(7 - 2) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための (2) ~ (4 - 3) のいずれかに記載の結晶。

(8 - 1) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための (1) ~ (1 - 2) のいずれかに記載の化合物の使用。

(8 - 2) 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための (2) ~ (4 - 3) のいずれかに記載の結晶の使用。

(9 - 1) (1) ~ (1 - 2) のいずれかに記載の化合物の有効量を対象に投与することからなる慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療方法。

(9 - 2) (2) ~ (4 - 3) のいずれかに記載の結晶の有効量を対象に投与することからなる慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療方法。

[0016] さらに、本発明は、化合物A又はその塩で示される化合物の製薬学的に許容されるプロドラッグも包含する。製薬学的に許容されるプロドラッグとは、加溶媒分解により又は生理学的条件下でカルボキシル基に変換されうる基を有する化合物である。プロドラッグを形成する基としては、例えば、*Prog. Med.*, 5, 2157-2161 (1985) や、「医薬品の開発」(廣川書店、1990年)第7巻 分子設計163-198に記載の基が挙げられる。

[0017] 本発明において、化合物Aの塩とは、製薬学的に許容される塩であり、酸付加塩又は塩基との塩を形成する場合がある。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等

の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リシン、オルニチン等の有機塩基との塩、アセチルロイシン等の各種アミノ酸及びアミノ酸誘導体との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。

[0018] さらに、本発明は、化合物A又はその塩の各種の水和物や溶媒和物、及び結晶多形の物質も包含する。また、本発明は、種々の放射性又は非放射性同位体でラベルされた化合物A又はその塩も包含する。

[0019] 本明細書中、粉末X線回折パターンにおける回折角 (2θ (°)) 及びDSC分析における吸熱ピークのオンセット温度 (°C) の記載に含まれる「付近」は、当該データ測定法において通常許容される誤差範囲を含むことを意味し、およそその回折角及び吸熱ピークのオンセット値であることを意味する。粉末X線回折における回折角 (2θ (°)) の誤差範囲は、ある態様としては $\pm 0.2^\circ$ であり、さらに別の態様としては、 $\pm 0.1^\circ$ である。DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度 (°C) の誤差範囲は、ある態様としては $\pm 2^\circ\text{C}$ であり、さらに別の態様としては、 $\pm 1^\circ\text{C}$ である。

なお、粉末X線回折パターンはデータの性質上、結晶の同一性認定においては、結晶格子間隔や全体的なパターンが重要であり、回折角及び回折強度は結晶成長の方向、粒子の大きさ、測定条件によって多少変わりうるものである。

[0020] (製造法)

化合物A又はその塩は、その基本構造あるいは置換基の種類に基づく特徴を利用し、種々の公知の合成法を適用して製造することができる。その際、官能基の種類によっては、当該官能基を原料から中間体へ至る段階で適当な保護基（容易に当該官能基に転化可能な基）に置き換えておくことが製造技術上効果的な場合がある。このような保護基としては、例えば、ウツツ (P. G. M. Wuts) 及びグリーン (T. W. Greene) 著、「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (第4版、2006年)」に記載の保護基等を挙げることができ、これらの反応条件に応じて適宜選択して用いればよ

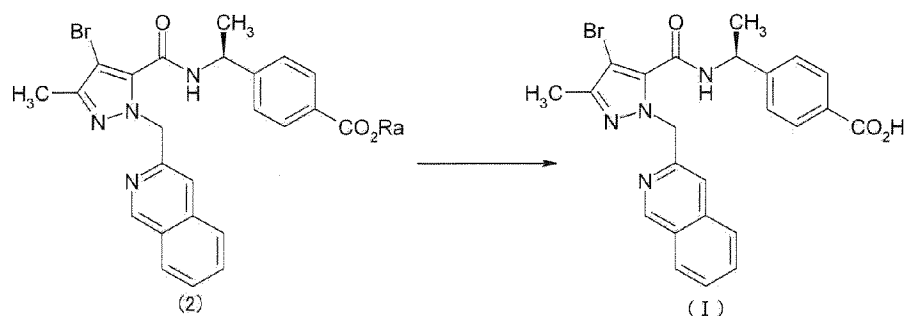
い。このような方法では、当該保護基を導入して反応を行なったあと、必要に応じて保護基を除去することにより、所望の化合物を得ることができる。

また、化合物Aのプロドラッグは、上記保護基と同様、原料から中間体へ至る段階で特定の基を導入、あるいは得られた化合物Aを用いてさらに反応を行なうことで製造できる。反応は通常のエステル化、アミド化、脱水等、当業者に公知の方法を適用することにより行うことができる。

以下、化合物Aの代表的な製造法を説明する。各製法は、当該説明に付した参考文献を参照して行うこともできる。なお、本発明の製造法は以下に示した例には限定されない。また、特に記載がない限り、当該製造法の構造式中に示される記号において、同一の記号は同一の意味を表す。

[0021] (第一製法)

[化10]



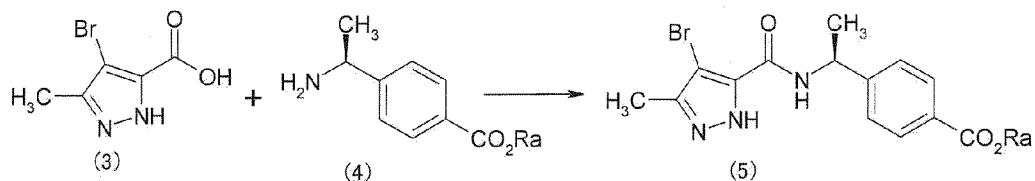
(式中、R a は、直鎖又は分枝状の炭素数が1から6のアルキル、例えばメチル、エチル等である。)

[0022] 式(1)で示される化合物Aは、一般式(2)で表される化合物の加水分解により製造することができる。ここで、加水分解反応は、前記「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (第4版、2006年)」を参照して実施することができる。

[0023] (原料合成)

原料製法1

[化11]



[0024] 原料化合物（５）は、化合物（３）と化合物（４）のアミド化反応により製造する事ができる。

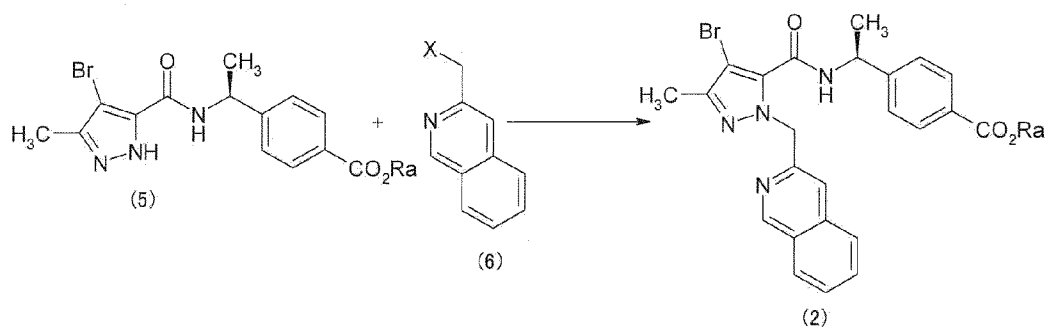
反応は、化合物（３）と化合物（４）とを等量若しくは一方を過剰量用い、縮合剤の存在下、反応に不活性な溶媒中、冷却下から加熱下、好ましくは -20°C ～ 60°C において、通常０．１時間～５日間攪拌することによって行われる。ここに、溶媒としては特に限定はされないが、例えば、ベンゼン、トルエン若しくはキシレン等の芳香族炭化水素類、ジクロロメタン（DCM）、１，２－ジクロロエタン（DCE）若しくはクロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン（THF）、ジオキサン、ジメトキシエタン（DME）等のエーテル類、N，N－ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、酢酸エチル、アセトニトリル又は水、あるいはこれらの混合物が挙げられる。縮合剤としては、１－[ビス（ジメチルアミノ）メチレン]－１H－１，２，３－トリアゾロ[４，５－b]ピリジン－１－ウム－３－オキシド ヘキサフルオロホスファート（HATU）、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド 塩酸塩、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、１，１’－カルボニルジイミダゾール（CDI）、ジフェニルリン酸アジド、オキシ塩化リン、または縮合剤を担持したポリスチレン樹脂、例えばPS－カルボジイミド（PS－Carbodiimide）（アルゴノートテクノロジー（Argonaut Technologies）、米国）等を用いることが好ましい場合があるが、これらに限定されるものではない。また、例えば１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）等の添加剤を用いる

ことが反応に好ましい場合があり、また、例えばトリエチルアミン（TEA）、N，N－ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）若しくはN－メチルモルホリン（NMM）等の有機塩基、又は炭酸カリウム、炭酸ナトリウム若しくは水酸化カリウム等の無機塩基の存在下に反応させるのが、反応を円滑に進行させる上で有利な場合がある。さらに反応終了後の過剰なアミンを除去する目的でイソシアナートを担持したポリスチレン樹脂、例えばPS－イソシアナート（PS－Isocyanate）（アルゴノートテクノロジー、米国）等を用いることができる。さらに反応終了後の過剰なカルボン酸及び前述の添加剤等を除去する目的で四級アンモニウム塩を担持したポリスチレン樹脂、例えばMP－カルボナート（MP－Carbonate）（アルゴノートテクノロジー、米国）等を用いることができる。

また、化合物（3）を反応性誘導体へ導いた後に化合物（4）と反応させる方法も用いることができる。ここに化合物（3）の反応性誘導体としては、オキシ塩化リン、塩化チオニル等のハロゲン化剤と反応して得られる酸ハロゲン化物、クロロギ酸イソブチル等と反応して得られる混合酸無水物、HOBt等と縮合して得られる活性エステル等が挙げられる。これらの反応性誘導体と化合物（4）との反応は、前記ハロゲン化炭化水素類、芳香族炭化水素類、エーテル類等の反応に不活性な溶媒中、冷却下～加熱下、好ましくは、－20℃～60℃で行うことができる。

[0025] 原料製法2

[化12]



（式中、Xは脱離基を示す。）

[0026] 原料化合物（２）は、化合物（５）と化合物（６）のアルキル化反応により製造する事ができる。

Xで示される脱離基の具体例としては、ハロゲン、メタンスルホニルオキシ、p-トルエンスルホニルオキシ、トリフルオロメタンスルホニルオキシ基等が含まれる。

この反応では、化合物（５）と化合物（６）を等量若しくは一方を過剰量用い、これらの混合物を、反応に不活性な溶媒中、又は無溶媒下、冷却下から加熱還流下、好ましくは0℃から80℃において、通常0.1時間～10日間攪拌する。ここで用いられる溶媒の例としては、特に限定はされないが、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、THF、ジオキサン、DME等のエーテル類、DCM、DCE、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、DMF、DMSO、1-メチル-2-ピロリドン、ジメチルアセトアミド、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル及びこれらの混合物が挙げられる。TEA、DIPEA若しくはNMM等の有機塩基、又はカリウムtert-ブトキシド、炭酸セシウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム若しくは水酸化カリウム等の無機塩基の存在下で反応を行うのが、反応を円滑に進行させる上で有利な場合がある。

[0027] 化合物Aは、遊離化合物、その塩、水和物、溶媒和物、あるいは結晶多形の物質として単離され、精製される。化合物Aの塩は、常法の造塩反応に付すことにより製造することもできる。

単離、精製は、抽出、分別結晶化、各種分画クロマトグラフィー等、通常の化学操作を適用して行なわれる。

光学異性体は、ラセミ体の一般的な光学分割法（例えば、光学活性な塩基又は酸とのジアステレオマー塩に導く分別結晶化や、キラルカラム等を用いたクロマトグラフィー等）により得られ、また、適当な光学活性な原料化合物から製造することもできる。

[0028] 化合物Aの薬理活性は、以下の試験により確認した。

[0029] 試験例1：ラットEP4受容体親和性評価試験

ラットEP4受容体発現ベクターの構築：

ラットEP4受容体遺伝子（GenBank登録番号：NM_032076.1）を、発現ベクターpcDNA3.1-V5-His-TOPO（Invitrogen）に導入した。

ラットEP4受容体の一過性発現：

ラットEP4受容体の発現ベクターを、HEK-293細胞（ATCC番号：CRL-1573）に導入した。導入には、Lipofectamine（登録商標）2000試薬（Invitrogen）を用いて、添付説明書に準じて行った。導入後 α -MEM培地にて20-24時間培養した。

膜画分の調製：

培地を吸引除去し、15 cm dishあたり10 mLの冷却リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline（PBS））を加えてセルスクレーパー（Sumitomo Bakelite）を用いて細胞を掻きとった。細胞を回収し遠心（250 x g、4℃、5 min）した後、dishあたり6 mLの冷却20 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4；ナカライテスク、5 mmol/L エチレンジアミン四酢酸（EDTA、ナカライテスク）を含む）に懸濁し、ポリトロン（登録商標）を用いてホモジナイズし、そのホモジネートを遠心（69,000 x g、20 min、4℃）した。得られた沈殿を冷却20 mmol/L Tris-HClに再懸濁させ、再びホモジナイズし、そのホモジネートを遠心（69,000 x g、20 min、4℃）した。得られた沈殿をdishあたり1 mLの50 mmol/L HEPES-NaOH（Dojindo Laboratories）（pH 7.5）に懸濁させたのちホモジナイズし、膜画分として-80℃凍結保存した。この時、一部をタンパク濃度の測定に用いた。タンパク濃度の測定はBio-Rad Protein assay kit（Bio-Rad Laboratories）を用い、添付の標準プロトコールに従ってデュプリケイト（duplicate）で行った。

Binding Assay :

[³H] PGE₂、及び膜画分はアッセイバッファー (50 mmol/L HEPES-NaOH、10 mmol/L MgCl₂、pH 7.5) にて、被験化合物、及び unlabeled PGE₂ (Cayman) は DMSO 及びアッセイバッファーにて希釈した。反応液 (200 μL) の組成は、50 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.5)、10 mmol/L MgCl₂、0.3 nmol/L [³H] PGE₂ (Perkin Elmer) 50 μL、ラット EP4 細胞膜画分 (200 μg protein/mL) 100 μL 及び試験化合物 (最終濃度 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 および 100 nmol/L) 50 μL とした。非特異的結合の測定には最終濃度が 1 μmol/L となるように unlabeled PGE₂ (Cayman) を添加した。DMSO の最終濃度は 1% とした。反応液を 96 well マイクロプレート (Sumitomo Bakelite) で室温にて 1 時間インキュベートした。反応液は FilterMate ハーベスター (Perkin Elmer) を用いて濾紙 UniFilter-96 GF/B (Perkin Elmer) で濾過した。濾過後の濾紙は冷却アッセイバッファー 300 μL/well で 3 回洗浄した後、乾燥機にて一晚乾燥させ、液体シンチレーター MicroScint 20 (Perkin Elmer) 50 μL/well を加えた。放射活性は TopCount (Perkin Elmer) を用いて測定した。測定はすべてデュプリケイト (duplicate) で 1 回実施した。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた。K_i 値は定法に従い算出した。

評価の結果、化合物 A のラット EP4 受容体に対する K_i 値は 0.874 nmol/L であった。なお、特許文献 1 の実施例 205 の化合物のラット EP4 受容体に対する K_i 値は 140 nmol/L であった。

[0030] 試験例 2 : ヒト EP4 受容体親和性評価試験

Binding Assay :

[³H] PGE₂、及びヒト EP4 細胞膜画分 (Chemicon) はアッセ

イバッファー (50 mmol/L HEPES-NaOH、5 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mmol/L $CaCl_2$ (pH 7.4)、0.5% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin (BSA))) にて、被験化合物、及び unlabeled PGE₂ (Sigma) は DMSO 及びアッセイバッファーにて希釈した。反応液 (250 μ L) の組成は、^[3H] PGE₂ (最終濃度 2.9 nmol/L) を含むアッセイバッファー 175 μ L、膜画分 (Chemicon、40 μ g protein/mL) 50 μ L、及び被験化合物 (最終濃度 0.1, 1, 10, 100 および 1000 nmol/L) 25 μ L とした。非特異的結合の測定には最終濃度が 10 μ mol/L となるように unlabeled PGE₂ を添加した。DMSO の最終濃度は 1% とした。反応液を 25°C で 60 分間インキュベートした。その反応液をセルハーベスター (ブランデル) を用いて濾紙 GF/C (Whatman) で濾過した。濾過後の濾紙は 50 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.4)、500 mmol/L NaCl、0.1% BSA を含む溶液 1 mL で 3 回洗浄した。濾紙 GF/C をアッセイバイアルに入れ、液体シンチレーター Atomlight を 5 mL 加えた。放射活性は液体シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いて測定した。測定はすべてデュプリケイト (duplicate) で 1 回実施した。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を差し引いて求めた。K_i 値は定法に従い算出した。

評価の結果、化合物 A のヒト EP4 受容体に対する K_i 値は 1.46 nmol/L であった。

[0031] 試験例 3 : ヒト Jurkat 細胞における cAMP 量測定によるヒト EP4 受容体拮抗作用評価試験

細胞培養 :

Jurkat 細胞 (ヒト白血病 T リンパ腫由来) を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum (FBS)) 添加の RPMI 1640 培地 (品番 11879020、Invitrogen) を用いて 37°C、

5% CO₂の条件下で培養した。コンフルエント (C o n f l u e n t) 前まで増殖させた後、最終濃度 5 μmol/L のインドメタシンを添加しさらに 18 時間培養した。この細胞を 15 mL スピッツ管に回収し、セルバンカー (三菱化学ヤトロン) にて 1 × 10⁶ 個/mL に調製し、-80℃ にて保存した。

化合物処理：

被験化合物は 0.5% BSA を含むアッセイバッファー (1 × HBSS (H a n k s b u f f e r e d s a l t s o l u t i o n、日水製薬)、20 mmol/L HEPES-NaOH (ナカライ) (pH 7.4)、0.5 mmol/L IBMX (3-イソブチル-1-メチルキサンチン、WAKO)、0.02% CHAPS (Sigma)、0.5% BSA (Sigma)、2 μmol/L インドメタシン (Sigma)) にて最終濃度の 3 倍の濃度になるように希釈調整した。PGE2 は 0.5% BSA を含むアッセイバッファーにて 300 nmol/L に調整した。冷凍保存された J u r k a t 細胞は 37℃ にて解凍し 0.5% BSA を含むアッセイバッファーを用い 1 × 10⁶ 個/mL に調製した。384 ウェル U 底型黒色マイクロプレート (コーニング) に試験化合物 (最終濃度 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 および 10 nmol/L)、細胞、PGE2 の順で各 5 μL ずつ添加し、プレートシェイカーにて攪拌後、室温にて 30 分インキュベートした。PGE2 非刺激状態の cAMP 量を求めるため、PGE2 非添加群を設けた。

cAMP 量の測定および解析：

cAMP 測定には cAMP H i R a n g e キット (C i s b i o i n t e r n a t i o n a l) を使用した。インキュベート後、L y s i s バッファー (50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.8 mol/L KF、1% T r i t o n X - 1 0 0、0.2% BSA) にて 0.6 倍に希釈したキットの d 2 試薬を各 w e l l に 5 μL ずつ添加し、プレートシェイカーにて攪拌した。続いて L y s i s バッファーにて 0.6 倍に希釈したキ

ットのユーロピウムクリプテート試薬を各wellに5 μ Lずつ添加し、プレートシェイカーにて攪拌後、遮光下室温にて60分インキュベートした。インキュベート後、ARVO1420 (Perkin Elmer) を用いてクリプテートの蛍光強度を620 nm、d2の蛍光強度を665 nmにて測定した。標準曲線作成用に280、70、17.5、4.38、1.09、0.27、0.068 nmol/LのcAMPをそれぞれwellに入れ、上記と同様に蛍光強度を測定した。測定はすべてトリPLICATE (triplicate) に行った。PGE2添加時のcAMP量を100%、PGE2非添加時のcAMP量を0%とし、化合物処理時のcAMP量から、化合物によるIC₅₀値をLogistic回帰法により算出した。3回の実験結果から平均値を算出した。

評価の結果、ヒトJurkat細胞において、化合物AのPGE2 (100 nmol/L) によるcAMP産生作用に対するIC₅₀値は0.16 nmol/Lであった。

[0032] 試験例4：cAMP量測定によるラットEP4受容体拮抗作用評価試験

ラットEP4受容体発現ベクターの構築：

試験例1と同様に行った。

ラットEP4受容体安定発現細胞の構築：

ラットEP4受容体の発現ベクターを、CHO-K1細胞 (ATCC番号：CCL-61) に導入した。導入には、Lipofectamine (登録商標) 2000試薬 (Invitrogen) を用いて、添付説明書に準じて行った。導入後G418 (ナカライテスク) 含有 α -MEM培地 (品番12571063、Invitrogen) にて培養し、薬剤耐性クローンを取得した。

細胞培養および化合物処理：

ラットEP4を安定的に発現させたCHO-K1細胞を96 well プレートに0.5 $\times$ 10⁴ 個/100 μ Lで蒔き、終夜培養した。培地を2 μ mol/L インドメタシン/ 0.5% BSA/ α -MEM培地に交換し

、さらに60分後、1 mmol/L IBMX / 2 μmol/L インドメタシン / 0.5% BSA / α-MEM培地に交換した。10分後、被験化合物（最終濃度0.1, 0.3, 1, 3および10 nmol/L）を添加し、さらに10分後、最終濃度100 nmol/LになるようにPGE₂を添加した（最終DMSO濃度0.1%）。PGE₂添加によるcAMP産生量を算出するため、PGE₂非添加群を設けた。細胞はCO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）内にて培養、反応させた。30分後に培地を除き、0.2% Triton X-PBS 100 μL/wellを添加し細胞を溶解した。試験はデュプリケイト（duplicate）にて2回実施した。

cAMP量の測定および解析：

細胞溶解液に含まれるcAMP量を cAMP HiRange キットを用いて測定した。各wellの細胞溶解液を384well U底型黒色マイクロプレートに10 μLずつ分注し、d2試薬、ユーロピウムクリプテート試薬の順に各5 μLずつ添加後、遮光下室温にて60分インキュベートした。インキュベート後、ARVO1420を用いてクリプテートの蛍光強度を620 nm、d2の蛍光強度を665 nmにて測定した。標準曲線作成用に280、70、17.5、4.38、1.09、0.27及び0.068 nmol/LのcAMPをそれぞれwellに入れ、上記と同様に蛍光強度を測定した。最終濃度100 nmol/LのPGE₂添加時のcAMP量を100%、PGE₂非添加時のcAMP量を0%とし、被験化合物処理時のcAMP量から、被験化合物のIC₅₀値をLogistic回帰法により算出した。2回の実験結果から平均値を算出した。

評価の結果、ラットEP4受容体発現CHO-K1細胞において、化合物AのPGE₂（100 nmol/L）によるcAMP産生作用に対するIC₅₀値は1.04 nmol/Lであった。

[0033] 試験例5：in vivoラットEP4受容体拮抗作用評価試験

非絶食下SDラット（雄、6週齢）を試験に使用した。PEG400：20% Tween80：1 mol/L NaHCO₃水溶液＝1：4：5の混合

液に溶解させた被験化合物を0.03 mg/kgで経口投与(po)した(5 mL/kg)。1時間後、生理食塩水に溶解したEP4アゴニストONO-4819の活性代謝物(ONO-AE1-437(CAS No. 256382-23-7))を0.01 mg/kgで背部に皮下投与(sc)した(5 mL/kg)。30分後にLipopolysaccharide(LPS、0.01 mg/kg)を尾静脈内投与し(2 mL/kg)、その60分後に麻酔下にてヘパリンを含むチューブに血液を約0.5 mL採取した。遠心操作(1000 x g、10分、4℃)により血液サンプルから血漿を分離した。ELISAキット(DuoSet ELISA、R&D Systems)にて血漿中のラットTNF- α 濃度を測定した。ONO-AE1-437非処置群(n=5)のTNF- α の濃度を阻害率100%、ONO-AE1-437処置群(n=5)のそれを阻害率0%として、EP4アゴニストによるTNF- α 産生阻害作用に対する被験化合物群(n=5)の抑制率を算出した。

評価の結果、化合物A(0.03 mg/kg, po)はEP4アゴニストONO-AE1-437(0.01 mg/kg, sc)のTNF- α 産生阻害作用を38%抑制した。

[0034] 試験例6：ラット血漿中レニン活性に対する作用評価試験

非絶食下SDラット(雄、7週齢)を試験に使用した。PEG400:20% Tween80:1 mol/L NaHCO₃水溶液=1:4:5の混合液に溶解させた被験化合物を0.3 mg/kgで経口投与した(5 mL/kg)。1時間後、生理食塩水に溶解したEP4アゴニストONO-4819の活性代謝物(ONO-AE1-437)を0.01 mg/kgで背部に皮下投与した(5 mL/kg)。その10分後に無麻酔下で断頭しEDTA・2Na 3 mgを含むチューブに血液を約2 mL採取した。遠心操作(1000 x g、10分、4℃)により血液サンプルから血漿を分離した。血漿100 μ Lにアッセイバッファー(2 mol/L NaH₂PO₄ 20.4 mL、1 mol/L Na₂HPO₄ 9.3 mL、0.5 mol/L E

DTA・2Na 15 mL、CHAPS 0.1 gを混合し蒸留水で合わせて50 mLに希釈、pH 5.5) 10 μ Lおよび100 mmol/L 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 1 μ Lを添加した。半量を分取し37℃にて90分間インキュベートした。残りの半量は4℃に保存しブランク反应用とした。両サンプル中のAngiotensin I濃度をELISA法にて測定し、37℃インキュベーションサンプルの値からブランク反応の値を減算した濃度を血漿中レニン活性(plasma renin activity (PRA))とした。ONO-AE1-437非処置群(n=5)のPRAを阻害率100%、ONO-AE1-437処置群(n=4)のそれを阻害率0%として、被験化合物群(n=5)の阻害率を算出した。

評価の結果、化合物A (0.3 mg/kg, po)はEP4アゴニストONO-AE1-437 (0.01 mg/kg, sc)によるPRA上昇を102%抑制した。

[0035] 試験例7：2型糖尿病db/dbマウスの尿中アルブミンに対する効果検討試験

2型糖尿病db/dbマウス(雄、8週齢)を試験に使用した。24時間採尿により得られた尿サンプルのアルブミン濃度を抗マウスアルブミン抗体(RAM/Ab/7S、Nordic Immunology)を用いたELISA法にて、尿中クレアチニン濃度をCRE-ENカイノス(カイノス)を用いて測定した。尿中アルブミン・クレアチニン比(ACR)を算出し、ACRに偏りのないよう被験化合物非処置群(n=12)と被験化合物処置群(n=12)に群分けを行った。被験化合物処置群には0.5%メチルセルロース(MC)溶液に懸濁した被験化合物を0.3 mg/kgで1日1回1週間経口投与した(10 mL/kg)。被験化合物非処置群には0.5%MC溶液を10 mL/kgの投与容量で1日1回1週間経口投与した。最終投与終了後より24時間採尿を実施し、算出したACRを指標にして2型糖尿病マウスの早期腎症に対する被験化合物の改善効果を検討した。被験化

合物非処置群の A C R 値を 1 0 0 % としたときの被験化合物処置群の A C R の抑制率を求めた。

評価の結果、化合物 A (0 . 3 m g / k g , p o) は 1 週間の経口投与により 2 型糖尿病 d b / d b マウスの A C R を 4 4 % 抑制した。

[0036] 試験例 8 : 5 / 6 腎臓摘出 (5 / 6 N x) 慢性腎不全ラットの腎機能に対する効果検討試験

W i s t a r ラット (雄、8 週齢) を試験に使用した。ペントバルビタール麻酔下で左腎の 3 分の 2 を切除し、その 1 週間後に右腎を全摘出した (5 / 6 N x) 。 5 / 6 N x の 2 週間後に、2 4 時間採尿により得られた尿サンプルの尿タンパク濃度を B i o - R a d P r o t e i n a s s a y k i t を用いて、尿中クレアチニン濃度をデタミナー L C R E (協和メデックス) を用いて測定した。尿中タンパク・クレアチニン比 (U P C R) を算出し、U P C R に偏りがないように被験化合物非処置群 (n = 1 2) と被験化合物処置群 (n = 1 2) に群分けを行った。その後、被験化合物処置群には 0 . 5 % M C 溶液に懸濁した被験化合物を 0 . 2 m g / k g で 1 日 1 回 6 週間経口投与した (5 m L / k g) 。被験化合物非処置群には 0 . 5 % M C 溶液を 5 m L / k g の投与容量で 1 日 1 回 6 週間経口投与した。最終投与終了後より 2 4 時間採尿を実施し、算出した U P C R を指標にして慢性腎不全ラットの腎機能に対する被験化合物の改善効果を検討した。被験化合物非処置群の U P C R を 1 0 0 % としたときの被験化合物処置群の U P C R の抑制率を求めた。

評価の結果、化合物 A (0 . 2 m g / k g , p o) は、6 週間の経口投与により 5 / 6 腎臓摘出慢性腎不全ラットの U P C R を 4 7 % 抑制した。

[0037] 試験例 9 : ラット E P 1 / E P 2 / E P 3 受容体に対する受容体拮抗作用評価試験 (選択性試験)

化合物 A のラット由来 P G E 2 受容体の他のサブタイプ (E P 1 、 E P 2 、 E P 3) に対する拮抗作用を評価した。E P 1 および E P 3 については細胞内 C a ²⁺ 量、E P 2 については細胞内 c A M P 量を指標に、被験化合物の作

用を検討した。

ラットEP1、EP2またはEP3受容体発現ベクターの構築：

ラットEP1受容体遺伝子（GenBank登録番号：D88751.1）、ラットEP2受容体遺伝子（GenBank登録番号：NM_031088.1）、またはラットEP3受容体遺伝子（GenBank登録番号：NM_012704.1）を、発現ベクターpCDNA3.1-V5-His-TOPO（Invitrogen）にそれぞれ導入した。

ラットEP1、EP2またはEP3受容体安定発現細胞の構築：

ラットEP1、EP2またはEP3受容体の発現ベクターを、HEK-293細胞（ラットEP1またはEP3受容体安定発現用、ATCC番号：CRL-1573）またはCHO-K1細胞（ラットEP2受容体安定発現用、ATCC番号：CCL-61）に導入した。導入には、Lipofectamine（登録商標）2000試薬（Invitrogen）を用いて、添付説明書に準じて行った。導入後G418（ナカライテスク）含有DMEM培地（ラットEP1またはEP3受容体安定発現用）（品番11885084、Invitrogen）またはG418含有 α -MEM培地（ラットEP2受容体安定発現用）にて細胞を培養し、薬剤耐性クローンを取得した。

EP2受容体安定発現細胞の培養および化合物処理：

ラットEP2を安定的に発現させたCHO-K1細胞を96 well プレートに 1×10^4 個/ $100 \mu\text{L}$ で蒔き、10% FBS添加の α -MEM培地を用いて37℃、5% CO₂の条件下で終夜培養した。培地を2 $\mu\text{mol/L}$ インドメタシン/0.1% BSA/ α -MEM培地に交換し、さらに60分後、1 mmol/L IBMX/2 $\mu\text{mol/L}$ インドメタシン/0.1% BSA/ α -MEM培地（品番12571063、Invitrogen）に交換した。10分後、被験化合物（最終濃度0.01, 0.1, 1および10 $\mu\text{mol/L}$ ）を添加し、さらに10分後、最終濃度100 nmol/L になるようにPGE2を添加した（最終DMSO濃度0.

1%)。PGE₂添加によるcAMP産生量を算出するため、PGE₂非添加群を設けた。細胞はCO₂インキュベーター(37℃、5% CO₂)内にて培養、反応させた。30分後に培地を除き、0.2% Triton X-PBS 100 μL/wellを添加し細胞を溶解した。試験はデュプリケイト(duplicate)にて1回実施した。

EP2受容体安定発現細胞内のcAMP量の測定および解析：

細胞溶解液に含まれるcAMP量を、cAMP HiRangeキットにて試験例4と同様に測定した。最終濃度100 nmol/LのPGE₂添加時のcAMP量を100%、PGE₂非添加時のcAMP量を0%とし、被験化合物処理時のcAMP量の割合を算出した。

評価の結果、化合物AはラットのEP2受容体を介したPGE₂による細胞内cAMP量の増加に対して10,000 nmol/Lまで50%以上の阻害作用を示さなかった。

EP1およびEP3受容体安定発現細胞の培養および化合物処理：

ラットEP1またはラットEP3を安定的に発現させたHEK-293細胞を96 wellプレートに1×10⁴個/100 μLで蒔き、10% FBS添加のD-MEM培地を用いて37℃、5% CO₂の条件下で終夜培養した。アッセイバッファー(1×HBSS、20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.4)、0.6 mg/mL probenecid、0.1% BSA)にCa³アッセイキット(モレキュラーデバイス)の蛍光試薬Dyeを70:1の割合で加えた。培地をこの希釈したDye溶液に交換し、3時間インキュベートした。DMSOおよび上記アッセイバッファーに溶解した化合物(最終濃度1および10 μmol/L)をそこに加えた。5分後に最終濃度100 nmol/LになるようにPGE₂を添加した(最終DMSO濃度1%)。ラットEP1またはラットEP3受容体安定発現細胞を用いた試験は、それぞれデュプリケイト(duplicate)にて1回実施した。

EP1またはEP3受容体安定発現細胞内Ca²⁺濃度の測定および解析：

細胞内 Ca^{2+} 濃度はDyeの蛍光強度を指標としてF L I P R t e t r a (モレキュラーデバイス)を用いて測定した。PGE2添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定するため、PGE2非添加群を設けた。最終濃度100 nmol/L PGE2添加時の Ca^{2+} 濃度を100%、PGE2非添加時の Ca^{2+} 濃度を0%とし、化合物処理時の Ca^{2+} 濃度の割合を算出した。

評価の結果、化合物AはラットのEP1またはEP3受容体を介したPGE2による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に対して10,000 nmol/Lまで50%以上の阻害作用を示さなかった。

[0038] 試験例10：ラット消化管障害に対する評価

SDラット(雄、7週齢)を使用した。PEG400:20% Tween 80:1 mol/L NaHCO_3 水溶液=1:4:5の混合液に溶解した被験化合物を3 mg/kgで7日間経口投与した($n=5$, 5 mL/kg)。被験薬非処置群($n=5$)には上述の混合液を5 mL/kgの投与容量で7日間経口投与した。最終投与の翌日に終夜絶食下で血液学・血液化学的検査用に採血した。採血後に、放血により安楽死させた動物を直ちに剖検し、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓を摘出した。摘出臓器は10%中性緩衝ホルマリン液に固定し、病理組織評価に使用した。

評価の結果、化合物Aは異常を示す所見は認められなかった。

[0039] 上記試験の結果、化合物Aは、EP4受容体親和性を有し、優れたEP4受容体拮抗作用を示すこと(試験例1~5)が確認された。化合物Aは、EP4アゴニスト誘発のPRA上昇を抑制すること(試験例6)が確認された。化合物Aは、2型糖尿病db/dbマウスの尿中アルブミンに対する効果検討試験、及び5/6腎臓摘出(5/6Nx)慢性腎不全ラットの腎機能に対する効果検討試験において改善効果を有すること(試験例7、8)が確認された。

したがって、化合物A又はその塩は、慢性腎不全及び/又は糖尿病性腎症の予防若しくは治療等に使用できる。

[0040] 上記試験例1の結果から、化合物Aは特許文献1の実施例205と比較し

て、E P 4 受容体親和性が優れていることが示された。更に上記試験例 10 の結果から、化合物 A は、消化管障害の惹起の懸念が小さい化合物である事が示された。

[0041] 上記試験の結果、化合物 A 又はその塩は E P 4 受容体拮抗作用を有することが確認され、E P 4 が関与する種々の疾患の予防又は治療用医薬組成物等の有効成分として使用できる。E P 4 が関与する種々の疾患としては、例えば、腎臓病（例えば腎硬化症、痛風腎、多発性嚢胞腎、ネフローゼ症候群、急性腎炎、再発性血尿、持続性血尿、慢性腎炎、急速進行性腎炎、急性腎不全、慢性腎不全、糖尿病性腎症、バーター症候群等）、炎症性皮膚疾患（例えば日焼け、火傷、湿疹、皮膚炎等）、動脈硬化症に起因する虚血性心疾患（例えば心筋梗塞、狭心症等）、動脈硬化症に起因する脳血管障害（例えば脳卒中、ラクナ梗塞も含む脳卒中、脳血栓、脳出血、くも膜下出血、脳梗塞等）、消化性潰瘍（例えば胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、悪性腫瘍及びその転移（例えば結腸癌、乳癌等）、疼痛（例えば術後急性痛、外傷性疼痛、抜糸後疼痛、頸肩腕疼痛、肩関節周囲炎、変形性関節症（O A）、手根管症候群、慢性関節リウマチ（R A）、術後慢性痛、間質性膀胱炎、膀胱痛症候群、非細菌性慢性前立腺炎（C P / C P P S）、脊髄損傷後疼痛、脳梗塞後疼痛、多発性硬化症（疼痛）、パーキンソン病の疼痛、糖尿病性神経因性疼痛、ヘルペス後疼痛、H I V 神経因性疼痛、三叉神経痛、線維筋痛症、腰痛症（侵害受容性、神経因性を含む腰痛全般）、腰部脊柱管狭窄症、脊椎障害の疼痛（腰部脊柱管狭窄症、脊髄損傷を除く）、視床痛、偏頭痛、頭痛、下肢静止不能（むずむず足）症候群、癌性疼痛、過敏性腸症候群）等、特に慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症等の腎臓病を挙げることができる。

また、化合物 A 又はその塩は、種々の浮腫（例えば、心臓性浮腫、脳浮腫等）、悪性高血圧症などのような高血圧症、月経前緊張症、尿路結石、急性又は慢性疾患によって引き起こされるような尿乏症、高リン血症等の治療及び／又は予防する薬剤として使用できる。

さらに、化合物 A 又はその塩は、種々の多尿症（例えば、中枢性尿崩症、

腎性尿崩症、心因性尿崩症、糖尿病、塩化ナトリウム吸収障害、多飲症等）の治療及び／又は予防する薬剤として使用できる。

[0042] 化合物Aまたはその塩を有効成分として含有する医薬組成物は、当分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、又は、関節内、静脈内、筋肉内等の注射剤、坐剤、点眼剤、眼軟膏、経皮用液剤、軟膏剤、経皮用貼付剤、経粘膜液剤、経粘膜貼付剤、吸入剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。

[0043] 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、有効成分を、少なくとも1種の不活性な賦形剤と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な添加剤、例えば滑沢剤や崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剤的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤又はエリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水又はエタノールを含む。当該液体組成物は不活性な希釈剤以外に可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

[0044] 非経口投与のための注射剤は、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤又は乳濁剤を含有する。水性の溶剤としては、例えば注射用蒸留水又は生理食塩液が含まれる。非水性の溶剤としては、例えばエタノールのようなアルコール類がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用することもできる。

- [0045] 外用剤としては、軟膏剤、硬膏剤、クリーム剤、ゼリー剤、パップ剤、噴霧剤、ローション剤、点眼剤、眼軟膏等を包含する。一般に用いられる軟膏基剤、ローション基剤、水性又は非水性の液剤、懸濁剤、乳剤等を含有する。
- [0046] 吸入剤や経鼻剤等の経粘膜剤は固体、液体又は半固体状のものが用いられ、従来公知の方法に従って製造することができる。例えば公知の賦形剤や、更に、pH調整剤、防腐剤、界面活性剤、滑沢剤、安定剤や増粘剤等が適宜添加されていてもよい。投与は、適当な吸入又は吹送のためのデバイスを使用することができる。例えば、計量投与吸入デバイス等の公知のデバイスや噴霧器を使用して、化合物を単独で又は処方された混合物の粉末として、もしくは医薬的に許容し得る担体と組み合わせて溶液又は懸濁液として投与することができる。乾燥粉末吸入器等は、単回又は多数回の投与用のものであってもよく、乾燥粉末又は粉末含有カプセルを利用することができる。あるいは、適当な駆出剤、例えば、クロロフルオロアルカン又は二酸化炭素等の好適な気体を使用した加圧エアゾールスプレー等の形態であってもよい。
- [0047] 通常経口投与の場合、1日の投与量は、体重当たり約0.001~100 mg/kg、好ましくは0.1~30 mg/kg、更に好ましくは0.1~10 mg/kgが適当であり、これを1回あるいは2回~4回に分けて投与する。静脈内投与される場合は、1日の投与量は、体重当たり約0.0001~10 mg/kgが適当で、1日1回~複数回に分けて投与する。また、経粘膜剤としては、体重当たり約0.001~100 mg/kgを1日1回~複数回に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。
- [0048] 投与経路、剤形、投与部位、賦形剤や添加剤の種類によって異なるが、本発明の医薬組成物は0.01~100重量%、ある態様としては0.01~50重量%の有効成分である1種またはそれ以上の化合物Aを含有する。
- [0049] 化合物Aは、化合物Aが有効性を示すと考えられる疾患の種々の治療剤又は予防剤と併用することができる。当該併用は、同時投与、或いは別個に連

続して、若しくは所望の時間間隔をおいて投与してもよい。同時投与製剤は、配合剤であっても別個に製剤化されていてもよい。

実施例

[0050] 以下、実施例に基づき、式(1)で示される化合物A又はその塩の製造法をさらに詳細に説明する。化合物A又はその塩の製造法は、以下に示される具体的実施例の製造法(工程)のみに限定されるものではなく、当業者に自明である方法によっても製造されうる。

なお、DSC分析及び粉末X線回折は以下の方法により行った。

[0051] (1) DSC分析

DSC分析は、TA Instruments製 Q1000およびQ2000を用いて行った。試料およそ2mgを専用のアルミニウム製サンプルパンに充填し、サンプルパンに蓋をしない状態で、窒素雰囲気下(50mL/分)において、測定範囲を室温~300℃とし、昇温速度10℃/分で試料とリファレンス(空のアルミニウム製サンプルパン)との間に発生する熱量変化を連続的に測定し記録した。なお、データ処理を含む装置の取り扱い、各装置で指示された方法及び手順に従った。

(2) 粉末X線回折

粉末X線回折の測定は、RINT-TTRIIを用い、管球:Cu、管電流:300mA、管電圧:50kV、サンプリング幅:0.020°、走査速度:4°/min、波長:1.54056Å、測定回折角範囲(2θ):2.5~40°の条件で測定した。なお、データ処理を含む装置の取り扱い、各装置で指示された方法及び手順に従った。

[0052] また、実施例中、以下の略語を用いる。ESI+:ESI-MASSにおけるm/zの値、NMR-DMSO-d₆:DMSO-d₆中の¹H NMRにおけるピークδ(ppm)。

なお便宜上、濃度mol/LをMとして表す。例えば、1M水酸化ナトリウム水溶液は1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液であることを意味する。

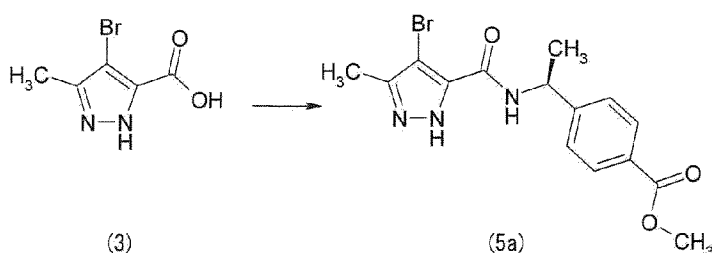
[0053] 実施例 1

4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸 (1) の合成

[0054] 工程 1.

4-[(1S)-1-{[(4-ブロモ-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル)カルボニル]アミノ}エチル]安息香酸メチル (5a) の合成

[化13]



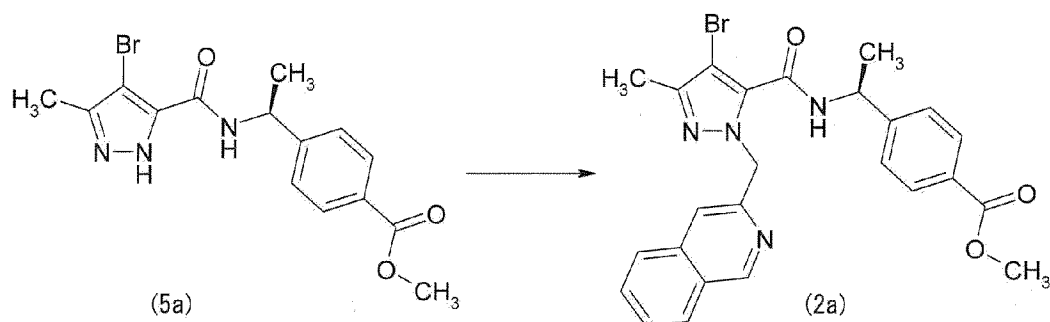
4-ブロモ-3-メチル-1H-ピラゾール-5-カルボン酸 (3) (1.00 g)、DMF (20 mL)、4-[(1S)-1-アミノエチル]安息香酸メチル 塩酸塩 (1.26 g)、HOBt (0.99 g) の混合物に、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (1.2 mL) を加え、室温下終夜撹拌した。混合物に酢酸エチルを加え、氷冷下撹拌した。混合物に10%クエン酸水溶液を加え、有機層及び水層に分離し、水層を酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を合わせて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧下濃縮し、4-[(1S)-1-{[(4-ブロモ-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル)カルボニル]アミノ}エチル]安息香酸メチル (5a) (1.75 g) を得た。

ESI+: 366, 368

[0055] 工程 2.

4-[(1S)-1-({[4-ブromo-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メチル (2a) の合成

[化14]



4-[(1S)-1-({[4-ブromo-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メチル (5a) (1.72 g)、DMF (20.0 mL) の混合物を氷冷下撹拌した。混合物にカリウム *tert*-ブトキシド (580 mg) を加え、0.5 時間撹拌した。混合物に3-(ブromoメチル)イソキノリン (1.10 g) と DMF (14 mL) の混合物を加え、室温に昇温して10日間撹拌した。得られた混合物を氷冷下撹拌し、酢酸エチル、10%クエン酸水溶液を加え、しばらく撹拌し、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過した。ろ液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ノルマルヘキサン：酢酸エチル=6：4) にて精製し、4-[(1S)-1-({[4-ブromo-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メチル (2a) (518 mg) を得た。

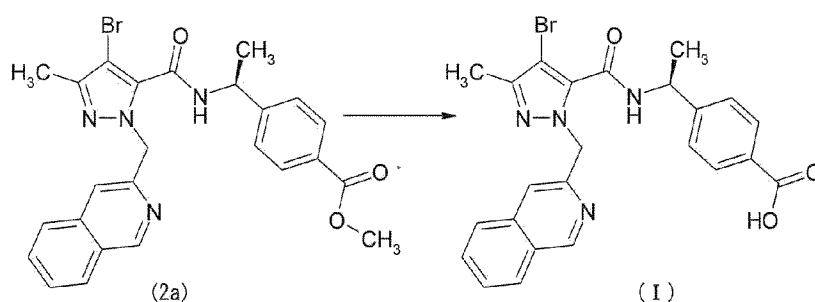
NMR-DMSO- d_6 : 9.28 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 9.23 (1H, s), 8.13 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.81-7.76 (1H, m), 7.72-7.64 (3H

, m), 7.50 (1H, s), 7.38 (2H, d, J = 8.3 Hz), 5.65–5.54 (2H, m), 5.12–5.04 (1H, m), 3.83 (3H, s), 2.17 (3H, s), 1.37 (3H, d, J = 7.0 Hz)

[0056] 工程3.

4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸 (I) の合成

[化15]



4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メチル (2a) (486 mg)、THF (10.0 mL)、メタノール (10.0 mL) の混合物に、氷冷下2M水酸化ナトリウム水溶液 (5.0 mL) を加え、室温下17時間攪拌した。混合物に氷冷下1M塩酸 (10.0 mL) を加え、室温に昇温し、2時間攪拌した。析出した固体を濾取し、水で洗浄して4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸 (I) (411 mg) を結晶として得た。

ESI+: 493, 495

NMR-DMSO- d_6 : 12.9–12.7 (1H, m), 9.30 (1H, d, J = 7.8 Hz), 9.24 (1H, s

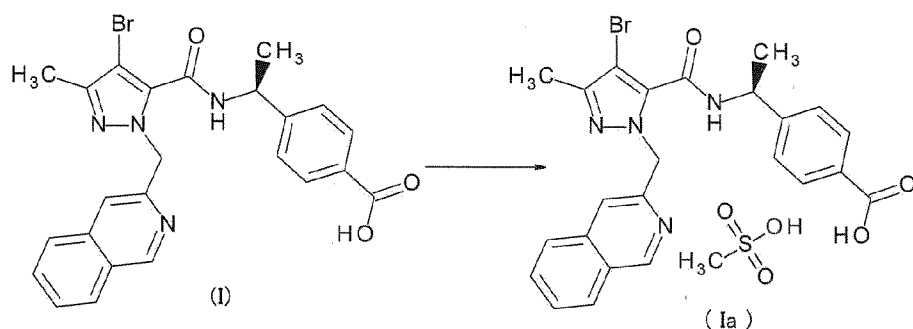
), 8.13 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.91 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.81–7.76 (1H, m), 7.74–7.66 (3H, m), 7.53 (1H, s), 7.40 (2H, d, J = 8.2 Hz), 5.60 (2H, s), 5.14–5.03 (1H, m), 2.16 (3H, s), 1.37 (3H, d, J = 7.0 Hz)
 元素分析: calcd for C₂₄H₂₁BrN₄O₃: C, 58.43; H, 4.29; N, 11.36; Br, 16.20.
 Found: C, 58.33; H, 4.38; N, 11.24; Br, 16.07.

[0057] 実施例1の工程3で得られた結晶の、管球としてCuを用いた粉末X線回折測定を行った結果、 $2\theta (^{\circ}) = 5.7、7.9、8.3、8.9、9.2、11.5、12.5、13.1、15.8、16.3、16.7、17.2、17.9、18.5、$ 及び 19.5 のピークを含むチャートが得られた。

実施例1の工程3で得られた結晶のDSC分析の結果、吸熱ピークのオンセット温度は 253°C であった。

[0058] 実施例2

4-[(1S)-1-({[4-ブromo-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メタンサルホン酸塩 (Ia) の合成
 [化16]



4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸(I) (1000.0 mg)、ジオキサン (30 mL)の混合物に、氷冷下メタンスルホン酸 (140 μ L)を加えた。得られた混合物を90℃に昇温し、1時間攪拌した。室温まで放冷後、析出した固体を濾取し、4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メタンスルホン酸塩 (Ia)を結晶 (1030 mg)として得た。

ESI+: 493、495

NMR-DMSO- d_6 : 9.32 (1H, s), 9.27 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.17 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.95 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.90-7.79 (1H, m), 7.77-7.66 (3H, m), 7.59 (1H, s), 7.40 (2H, d, J = 7.8 Hz), 5.71-5.54 (2H, m), 5.16-5.00 (1H, m), 2.33 (3H, s), 2.17 (3H, s), 1.37 (3H, d, J = 7.1 Hz)

元素分析: calcd for $C_{24}H_{21}BrN_4O_3 \cdot CH_4O_3S$: C, 50.94; H, 4.27; N, 9.50; S, 5.44; Br, 13.56.

Found: C, 50.65; H, 4.25; N, 9.36; S, 5.41; Br, 13.42.

[0059] 実施例2で得られた結晶の、管球としてCuを用いた粉末X線回折測定を行った結果、 $2\theta (^{\circ}) = 4.7$ 、 9.5 、 12.0 、 13.2 、 13.7 、 15.3 、 18.8 、 20.3 、 20.9 、及び 22.8 のピークを含むチャートが得られた。

実施例2で得られた結晶のDSC分析の結果、吸熱ピークのオンセット温

度は 192℃であった。

産業上の利用可能性

[0060] 化合物 A 又はその塩は、EP4 受容体拮抗作用を有し、慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防及び／又は治療用医薬組成物の有効成分として使用できる。

請求の範囲

- [請求項1] 4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸又はその塩。
- [請求項2] 4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メタンスルホン酸塩である、請求項1に記載の化合物。
- [請求項3] 4-[(1S)-1-({[4-ブロモ-1-(イソキノリン-3-イルメチル)-3-メチル-1H-ピラゾール-5-イル]カルボニル}アミノ)エチル]安息香酸メタンスルホン酸塩の結晶である、請求項2に記載の化合物。
- [請求項4] DSC分析における吸熱ピークのオンセット温度が192℃であり、管球としてCuを用いた粉末X線回折において、 $2\theta(^{\circ}) = 4.7$ 、9.5、12.0、13.2、13.7、15.3、18.8、20.3、20.9、及び22.8にピークを有する結晶である、請求項3に記載の化合物。
- [請求項5] 請求項1に記載の化合物又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。
- [請求項6] 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用である請求項5に記載の化合物又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。
- [請求項7] 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療用医薬組成物の製造のための請求項1に記載の化合物又はその塩の使用。
- [請求項8] 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための請求項1に記載の化合物又はその塩。
- [請求項9] 慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療のための請求項1に記載の化合物又はその塩の使用。

- [請求項10] 請求項1に記載の化合物又はその塩の有効量を対象に投与することからなる慢性腎不全及び／又は糖尿病性腎症の予防又は治療方法。
- [請求項11] 請求項3に記載の結晶、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/04(2006.01)i, A61K31/4725(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P13/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D401/04, A61K31/4725, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/139373 A1 (Astellas Pharma Inc.), 19 November 2009 (19.11.2009), claims; page 256; paragraph [0095] & US 2011/0144153 A1 & WO 2009/139373 A1 & EP 2277858 A1	1-8, 11
A	WO 2009/005076 A1 (Astellas Pharma Inc.), 08 January 2009 (08.01.2009), claims; table 1 (paragraphs [0029] to [0030]) & US 2011/0028463 A1 & WO 2009/005076 A1 & EP 2172447 A1	1-8, 11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"I" 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
11 June 2015 (11.06.15)

Date of mailing of the international search report
23 June 2015 (23.06.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059026

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 9–10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9–10 pertain to [methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy] and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07D401/04(2006.01)i, A61K31/4725(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07D401/04, A61K31/4725, A61P3/10, A61P13/12, A61P43/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

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

CPlus/REGISTRY (STN)

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 請求項の番号
A	WO 2009/139373 A1（アステラス製薬株式会社）2009.11.19, 特許請求の範囲、第256頁、段落[0095] & US 2011/0144153 A1 & WO 2009/139373 A1 & EP 2277858 A1	1-8, 11
A	WO 2009/005076 A1（アステラス製薬株式会社）2009.01.08, 特許請求の範囲、表1（段落[0029]-[0030]） & US 2011/0028463 A1 & WO 2009/005076 A1 & EP 2172447 A1	1-8, 11

☐ 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」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 3 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

緒形 友美

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

4 H

5 2 8 0

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 9-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項9-10は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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