

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-227357

(P2013-227357A)

(43) 公開日 平成25年11月7日(2013.11.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 209/40 (2006.01)	C O 7 D 209/40	4 C O 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 2 0 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-168863 (P2013-168863)	(71) 出願人	508171860
(22) 出願日	平成25年8月15日 (2013. 8. 15)		ヘリコン セラピューティクス, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2009-518522 (P2009-518522) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1 サンディエゴ, ラスク ブールバール 7 4 7 3
原出願日	平成19年6月26日 (2007. 6. 26)	(74) 代理人	100095832
(31) 優先権主張番号	60/816, 682		弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成18年6月26日 (2006. 6. 26)	(72) 発明者	ブラックバーン, トーマス, ピー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 3 0 ホーボーケン, アパートメント 4 1 2, 1 1 4 ティーエイチ ストリート
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ガラニン-3 レセプターアンタゴニストの使用による神経突起伸長の調節方法

(57) 【要約】

【課題】ガラニン-3レセプターアンタゴニストの使用による神経突起伸長の調節方法を提供すること。

【解決手段】ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、動物の神経突起伸長を調節するための医薬組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、動物の神経突起伸長を調節するための医薬組成物。

【請求項 2】

前記動物がヒトである、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記動物が、神経変性疾患または状態を有する、請求項 2 記載の組成物。

【請求項 4】

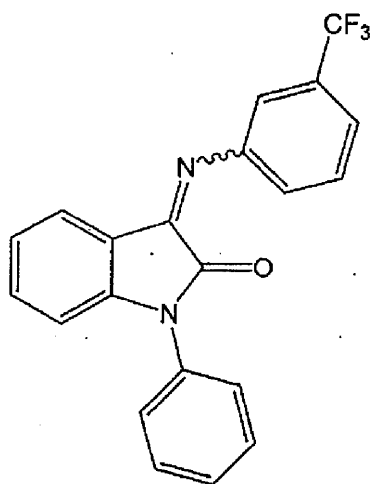
前記動物が神経幹細胞操作を有する、請求項 2 記載の組成物。

10

【請求項 5】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、HT-2157

【化 1】



20

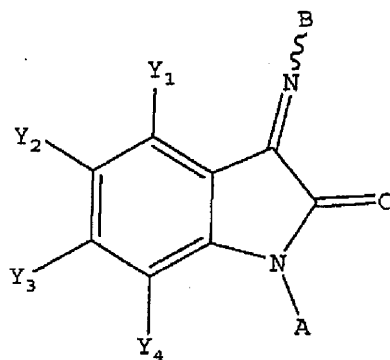
、そのE/Z異性体または混合物である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

30

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

【化 2】



40

(式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のそれぞれは独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、または-I；-NO₂；-N₃；-CN；-OR₄、-SR₄、-OCOR₄、-COR₄、-NCOR₄、-N(R₄)₂、-CON(R₄)₂、または-COOR₄；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接

50

する炭素原子上に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のいずれか2つはメチレンジオキシ基を構成し得る；

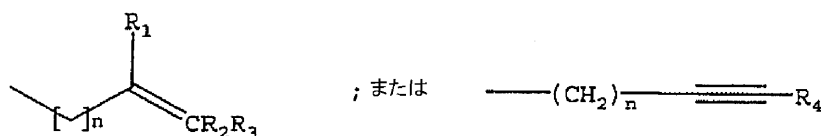
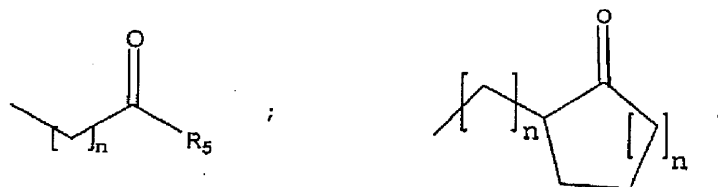
R_4 はそれぞれ独立して、 $-H$ ；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1 \sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

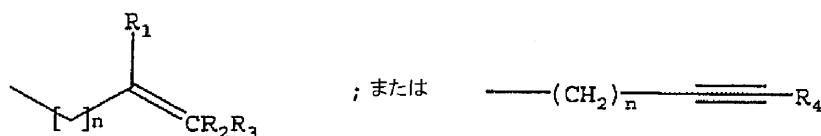
A'は

【化3】

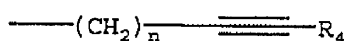
10



20



；または



である；

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 $-H$ 、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NO_2$ 、または $-CN$ である；

R_3 は、 $-H$ 、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR_6$ 、アリールまたはヘテロアリールである；

R_5 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-N(R_4)_2$ 、 $-OR_6$ またはアリールである；

30

R_6 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキルまたはアリールである；

Bは、アリール、またはヘテロアリールである；ただしBがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの1つまたは複数の炭素原子のみが、以下： $-H$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CN$ 、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上で置換され得る；

n はそれぞれ独立して1～4までの整数である)

を有し、該化合物は、純粋なZイミン異性体、純粋なEイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、請求項1記載の組成物

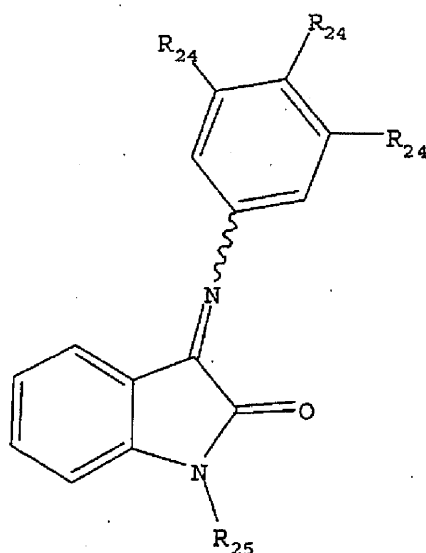
。

【請求項7】

40

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

【化 4】



10

20

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは、任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 はそれぞれ独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する、請求項1記載の組成物。

30

【請求項8】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、神経細胞損傷および／または外傷について治療の必要がある動物を治療するための医薬組成物。

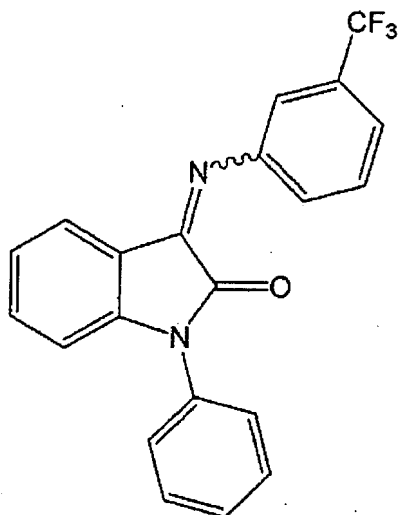
【請求項9】

前記動物が神経幹細胞操作を有する、請求項8記載の組成物。

【請求項10】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、HT-2157

【化 5】



10

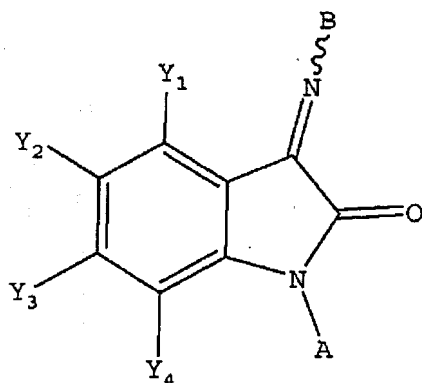
、そのE/Z異性体または混合物である、請求項 8 記載の組成物。

【請求項 11】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

20

【化 6】



30

(式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のそれぞれは独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、または-I；-NO₂；-N₃；-CN；-OR₄、-SR₄、-OCOR₄、-COR₄、-NCOR₄、-N(R₄)₂、-CON(R₄)₂、または-COOR₄；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接する炭素原子上に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のいずれか2つは、メチレンジオキシ基を構成し得る；

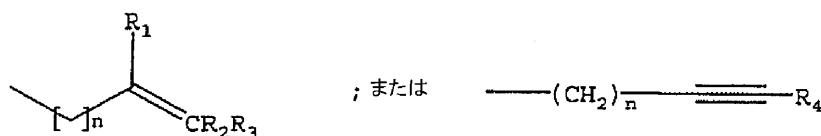
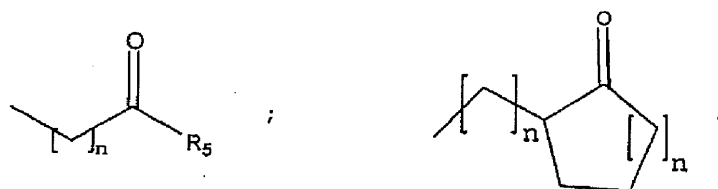
40

R_4 はそれぞれ独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1\sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

50

A'は
【化7】



10

である；

R₁およびR₂はそれぞれ独立して、-H、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、または-CNである；

R₃は、-H、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、-OR₆、アリールまたはヘテロアリールである；

20

R₅は、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-N(R₄)₂、-OR₆またはアリールである；

R₆は、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキルまたはアリールである；

Bは、アリール、またはヘテロアリールである；ただしBがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの1つまたは複数の炭素原子のみが、以下：-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上で置換され得る；

nはそれぞれ独立して1~4までの整数である)

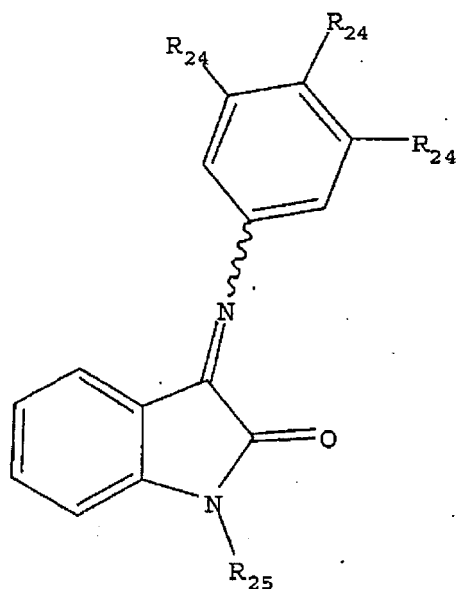
を有し、該化合物は、純粋なZイミン異性体、純粋なEイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、請求項8記載の組成物

30

【請求項12】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

【化 8】



10

20

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは、任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 は、それぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する、請求項8記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ガラニン-3レセプターアンタゴニストの使用による神経突起伸長の調節方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ガラニンは、29～30個のアミノ酸を含有し、種々の末梢および中枢の生理学および病理学的プロセス、例えば、胃腸の運動性、心臓血管の収縮、神経内分泌機能、食物摂取行動、痛みの知覚、学習、記憶、不安および鬱に参与する神経ペプチドである。神経ペプチドガラニンは、その効果が3種類の公知のG-タンパク質共役型レセプター亜型GalR1、GalR2およびGalR3によって媒介され、多くの生理学のプロセス、例えば、食物摂取行動、痛みおよび鬱に参与している。中枢ガラニン-3レセプター(GalR3)mRNAの分布は、不連続であり、視床下部において顕著な提示を有し、いくつかの脳辺縁系領域、例えば、青斑(locus coeruleus)、背面縫線(dorsal raphe)および中脳中心灰白質では、低レベルである。

40

【0003】

50

いくつかの研究により、中枢5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)機能を調節するガラニンの能力が示された(非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3)。選択的GalR3アンタゴニストであるHT-2157は、5-HT伝達に対するガラニンの阻害効果を拮抗し(非特許文献4)、したがって、種々の脳領域において5-HTの細胞外レベルを増大させることが示された(非特許文献5)。

【0004】

任意の文献の引用は、直接関係のある先行技術であることの容認を意図しない。これらの文献の日付に関するすべての記載または内容に関する表示は、本出願人に利用可能な情報に基づき、該文献の日付または内容の正確さに関するいかなる容認をも構成しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Fuxe et al. Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 21;863:274-90

【非特許文献2】Kehr et al. Neuropsychopharmacology. 2002 Sep;27(3):341-56

【非特許文献3】Yoshitake et al. Neurosci Lett. 2003 Mar 27;339(3):239-42

【非特許文献4】Rowley et al. Br J Pharmacol 2005, Winter Meeting, P125

【非特許文献5】Rowley et al. Br J Pharmacol 2005, Winter Meeting, P 127

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、ガラニン-3レセプターアンタゴニストの使用による神経突起伸長の調節方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

即ち、本発明の要旨は、

〔1〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、動物の神経突起伸長を調節するための医薬組成物、

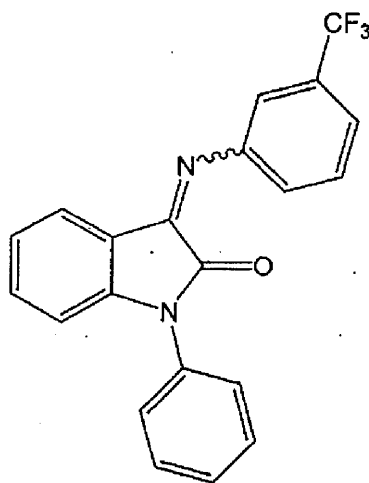
〔2〕前記動物がヒトである、〔1〕記載の組成物、

〔3〕前記動物が、神経変性疾患または状態を有する、〔2〕記載の組成物、

〔4〕前記動物が神経幹細胞操作を有する、〔2〕記載の組成物、

〔5〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、HT-2157

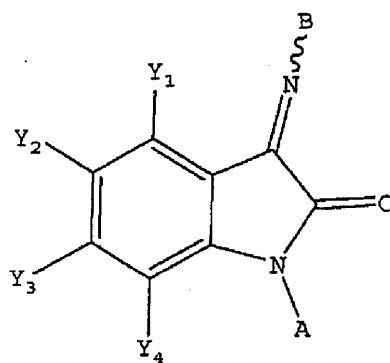
【化1-1】



、そのE/Z異性体または混合物である、〔1〕記載の組成物、

〔6〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

【化 1 - 2】



10

(式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のそれぞれは独立して、 $-H$ ；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル； $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ ； $-NO_2$ ； $-N_3$ ； $-CN$ ； $-OR_4$ 、 $-SR_4$ 、 $-OCOR_4$ 、 $-COR_4$ 、 $-NCOR_4$ 、 $-N(R_4)_2$ 、 $-CON(R_4)_2$ 、または $-COOR_4$ ；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接する炭素原子上に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のいずれか2つはメチレンジオキシ基を構成し得る；

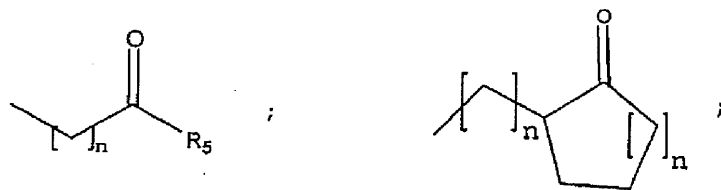
20

R_4 はそれぞれ独立して、 $-H$ ；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

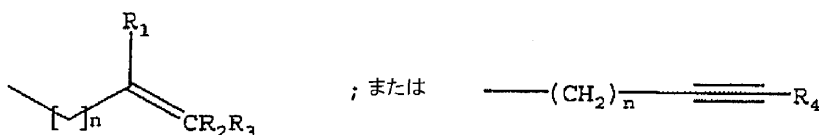
A は、 A' 、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1 \sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

A' は

【化 1 - 3】



30



40

である；

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、 $-H$ 、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NO_2$ 、または $-CN$ である；

R_3 は、 $-H$ 、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR_6$ 、アリールまたはヘテロアリールである；

R_5 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $-N(R_4)_2$ 、 $-OR_6$ またはアリールである；

R_6 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキルまたはアリールである；

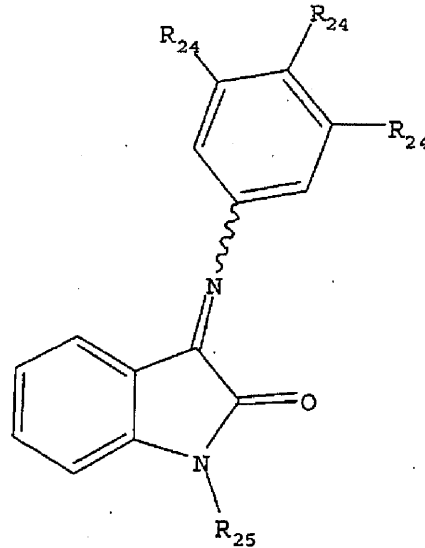
50

Bは、アリール、またはヘテロアリールである；ただしBがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの1つまたは複数の炭素原子のみが、以下：-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上で置換され得る；

nはそれぞれ独立して1～4までの整数である)

を有し、該化合物は、純粋なZイミン異性体、純粋なEイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、〔1〕記載の組成物、〔7〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：

【化1-4】



(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは、任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 はそれぞれ独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

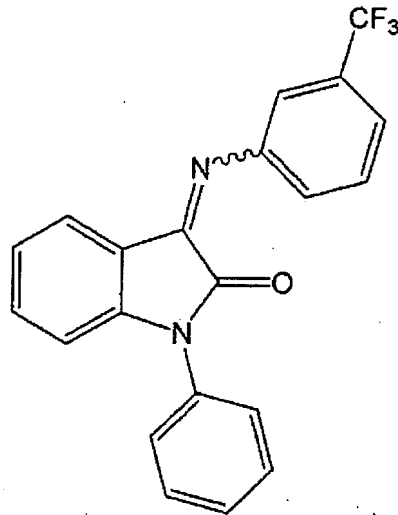
を有する、〔1〕記載の組成物、

〔8〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、神経細胞損傷および／または外傷について治療の必要がある動物を治療するための医薬組成物、

〔9〕前記動物が神経幹細胞操作を有する、〔8〕記載の組成物、

〔10〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、HT-2157

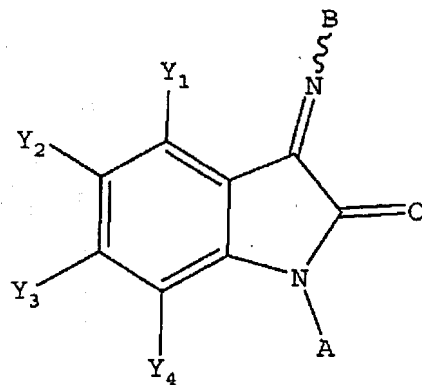
【化 1 - 5】



10

、そのE/Z異性体または混合物である、〔8〕記載の組成物、
〔11〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが、構造：
【化 1 - 6】

20



30

（式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のそれぞれは独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、または-I；-NO₂；-N₃；-CN；-OR₄、-SR₄、-OCOR₄、-COR₄、-NCOR₄、-N(R₄)₂、-CON(R₄)₂、または-COOR₄；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接する炭素原子上に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のいずれか2つは、メチレンジオキシ基を構成し得る；

40

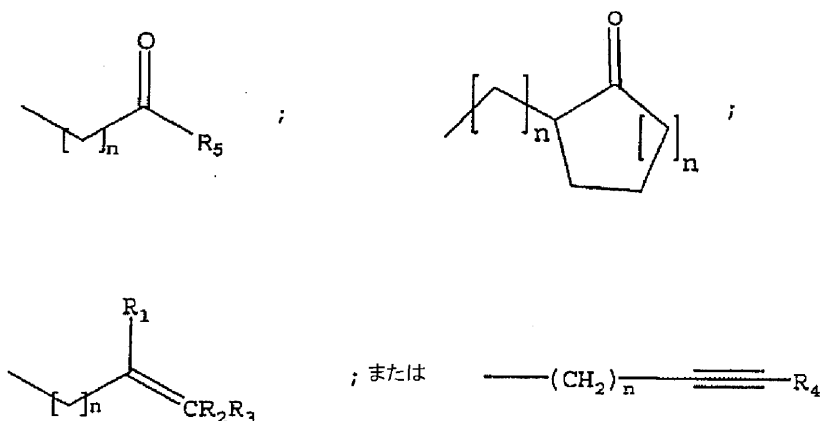
R_4 はそれぞれ独立して、-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1 \sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

A'は

50

【化 1 - 7】



10

である；

R_1 および R_2 はそれぞれ独立して、-H、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、または -CN である；

R_3 は、-H、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、-OR₆、アリールまたはヘテロアリールである；

20

R_5 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-N(R_4)₂、-OR₆ またはアリールである；

R_6 は、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキルまたはアリールである；

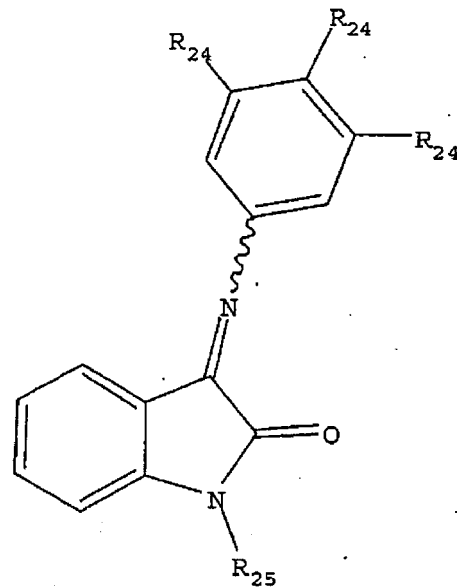
B は、アリール、またはヘテロアリールである；ただし B がアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの 1 つまたは複数の炭素原子のみが、以下：-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの 1 つ以上で置換され得る；

n はそれぞれ独立して 1 ～ 4 までの整数である）

を有し、該化合物は、純粋な Z イミン異性体、純粋な E イミン異性体、もしくは Z および E イミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、〔 8 〕記載の組成物、〔 1 2 〕ガラニン-3 レセプターアンタゴニストが、構造：

30

【化 1 - 8】



10

20

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは、任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 は、それぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐の $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐の $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する、〔8〕記載の組成物に関する。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、ガラニン-3レセプターアンタゴニストの使用による神経突起伸長の調節方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、Extended Neurite Outgrowth Bio ApplicationによるNS-I細胞の画像の定量的解析から得られた4つの出力の特徴のプロットを示す。プロットされたデータは、化合物の濃度あたり2ウェルの各特徴の平均値±標準偏差である。出力の特徴の定義は以下のとおりである。神経突起数：選択されたニューロンに関連する神経突起の数。神経突起全長：選択されたニューロンの神経突起の全長。平均神経突起長：神経突起全長を選択されたニューロンの神経突起数で割ったもの。分岐点：3つの神経突起セグメントの接合点。

40

【図2】図2は、NS-I細胞におけるHT-2157治療によるHes5発現に対する効果のqPCR解析を示す。プロットされたデータは、2ウェルでの細胞の相対RNAレベルの平均値±標準偏差である。

【図3】図3は、マウス海馬ニューロンの画像からNeurite Outgrowth BioApplicationに

50

よって解析された平均神経突起長を示す。プロットされたデータは、化合物の濃度あたり2ウェルの平均値±標準偏差である。

【図4】図4は、NS1細胞におけるGalR3発現のウェスタンブロット解析が行なわれたときの、ビヒクル(V)、HT-2157での処置24時間後のNeuroscreen 1 (NS1)細胞におけるGalR3発現に対するHT-2157の効果を示すウェスタンブロットの写真である。

【図5】図5は、NS1細胞におけるHes5発現のqPCR解析による、NS1細胞におけるHes5の発現に対するHT-2157処置の効果を示すチャートである。NS1細胞は、ビヒクル(Veh)またはHT-2157で2時間、4時間または24時間処置した。

【図6】図6Aは、NS1細胞における神経突起伸長に対するsiRNAによるHes5ノックダウンの効果を示す。未処理NS1細胞、およびビヒクル、対照siRNA、Hes5 siRNAで処置したNS1細胞における神経突起長。図6Bは、未処理NS1細胞、およびビヒクル、対照siRNA、Hes5 siRNAで処置したNS1細胞における神経突起分岐点を示す。

【図7】図7は、NS1細胞における神経突起伸長に対するHT-2157の効果を示す。データは、2つの実験の平均+/-標準偏差の代表である。各実験では、最低100細胞の神経突起伸長を測定した。NS1細胞における神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量。3 μ Mおよび10 μ MのHT-2157は、i)細胞(神経突起数)あたりの神経突起の数、ii)細胞あたりの神経突起の全長、iii)細胞あたりの平均神経突起長、iv)細胞あたりの神経突起分岐点の数の増加によって示されるように、神経突起伸長を助長する。

【図8】図8は、ならびに培養マウス海馬ニューロン中のニューロトロフィン(neurotrophin)脳由来神経栄養因子(BDNF)および神経成長因子 β (NGF β)のmRNA発現に対する、Hes5の発現に対するHT-2157の効果を示す。2つの複製実験の平均±標準偏差を示す。図8Aは、BDNF発現に対する10 μ M HT-2157の効果を示す。図8Bは、NGF β 発現に対する10 μ M HT-2157の効果を示す。図8Cは、Hes5発現に対する10 μ M HT-2157の効果を示す。

【図9】図9は、培養マウス海馬ニューロン中の神経突起伸長に対するNGF β の効果を示す。8つの複製実験の平均±semを示す。各実験では、最低100細胞における神経突起伸長を測定した。海馬ニューロンを、100ng/ml NGF β で24時間処置し、神経突起生長をCellomics Arrayscan IIにおいて測定した。NGF β は、細胞あたりの神経突起数の増加、神経突起長の増大、および分岐点の増大によって示されるように、神経突起伸長を増強する。

【図10】図10は、培養海馬ニューロン中の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。薬物用量あたりの8つの複製実験(96ウェル)およびビヒクルあたりの16の複製実験の平均±semを示す。各実験では、最低100細胞における神経突起伸長を測定した。図10Aは、細胞あたりの神経突起数に対する効果によって測定される海馬ニューロンにおける神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。図10Bは、細胞あたりの神経突起全長に対する効果によって測定される海馬ニューロンにおける神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。図10Cは、細胞あたりの神経突起分岐点に対する効果によって測定される海馬ニューロンにおける神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、神経突起伸長を調節するためのガラニン-3レセプター(GalR3)アンタゴニストの投与に関する。

【0011】

一態様において、該方法は、動物へのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与による神経突起伸長の調節に関する。一態様において、神経突起伸長は、動物へのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与により、ガラニン-3レセプターアンタゴニストの非存在下での通常の成長と比べて増強または増大される。

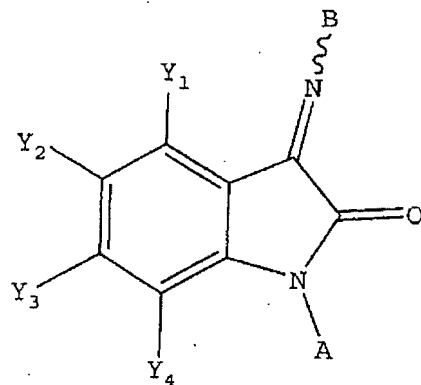
【0012】

別の態様において、該方法は、ガラニン-3レセプターアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および/または損傷の治療を必要とする被験体の治療に関する。

【0013】

一態様において、該方法は、被験体の神経の損傷または損傷を治療するのに有効な量のガラニン-3レセプターアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療を必要とする被験体の治療に関し、ここで、ガラニン-3レセプターアンタゴニストは、構造：

【化2】



10

(式中、各 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、もしくは $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、もしくは-I；-NO₂；-N₃；-CN；-OR₄、-SR₄、-OCOR₄、-COR₄、-NCOR₄、-N(R₄)₂、-CON(R₄)₂、もしくは-COOR₄；アリールもしくはヘテロアリールである；または隣接する炭素原子に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 の任意の2つがメチレンジオキシ基を構成し得る；

20

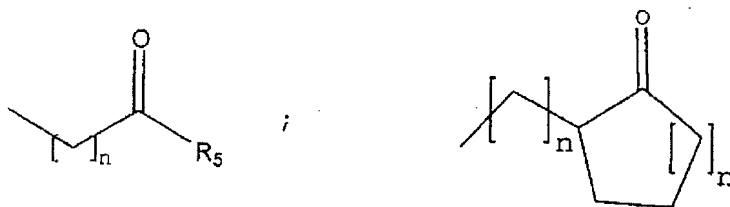
各 R_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

30

Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1\sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

A'は、

【化3】

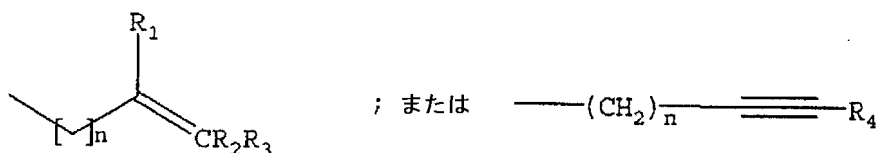


40

である；

R_1 および R_2 は、各々独立して、-H、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、もしくは-CN；

【化 4】



である；

10

R_3 は、-H、直鎖もしくは分岐 $\text{C}_1\sim\text{C}_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、- NO_2 、-CN、- OR_6 、アリールまたはヘテロアリールである；

R_5 は、直鎖もしくは分岐 $\text{C}_1\sim\text{C}_7$ アルキル、- $\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、- OR_6 またはアリールである；

R_6 は、直鎖もしくは分岐 $\text{C}_1\sim\text{C}_7$ アルキルまたはアリールである；

Bは、アリールまたはヘテロアリールである；しかしながら、Bがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの1つ以上の炭素原子のみが以下：-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上で置換され得るものとする；

各 n は、独立して、1～4までの整数である）

を有し、

20

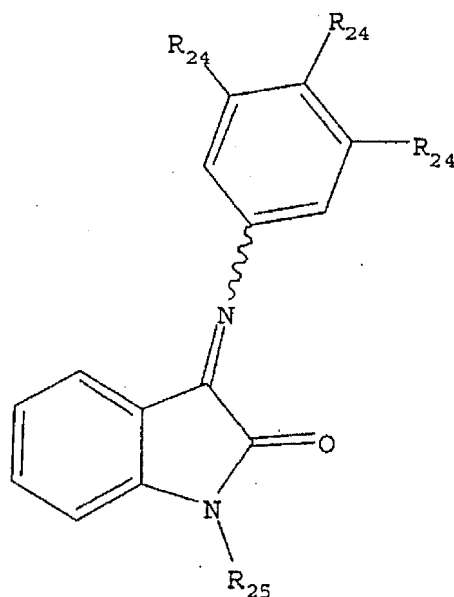
該化合物は、純粋なZイミン異性体、純粋なEイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物；またはその薬学的に許容され得る塩である。

【0014】

また、本発明は、有効量のガラニン-3レセプターアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または神経損傷の治療を必要とする被験体の治療方法を提供し、ここで、

ガラニン-3レセプターアンタゴニストは、構造：

【化 5】



30

40

(式中、各 R_{24} は、独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 または OR_4 で置換されている；ならびに

各 R_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $\text{C}_1\sim\text{C}_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $\text{C}_2\sim\text{C}_7$ アルケニルもしくはアルキニル； C_3

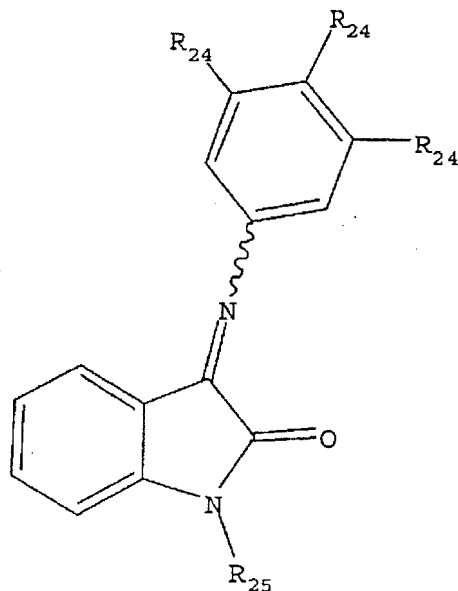
50

～C₇シクロアルキル、C₅～C₇シクロアルケニル、アリールまたはアリール(C₁～C₆)アルキルである)
を有する。

【0015】

また、本発明は、有効量のガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物を被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療を必要とする被験体の治療方法を提供し、ここで、ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物は、構造：

【化6】



10

20

(各R₂₄は、独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、CF₃またはOCH₃の1つ以上である；

R₂₅は、メチル、エチル、アリールまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、CF₃またはOR₄で置換されている；ならびに

各R₄は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルケニルもしくはアルキニル；C₃～C₇シクロアルキル、C₅～C₇シクロアルケニル、アリールまたはアリール(C₁～C₆)アルキルである)
を有する。

30

【0016】

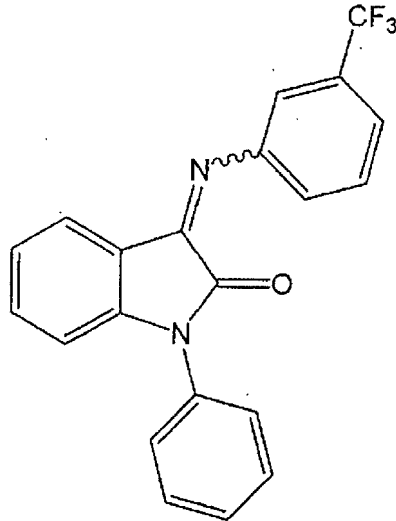
本明細書において上記のように、ガラニン-3レセプター(Gal3R)アンタゴニスト化合物の投与は、単独または他の化合物、例えばベンゾジアゼピンまたは選択的セロトニン再取り込みインヒビター(SSRI)の投与とともに行なわれ得る。

【0017】

種々の態様において、Gal-3レセプターアンタゴニストは、HT-2157 (1,3-ジヒドロ-1-フェニル-3[[3-トリフルオロメチル]フェニル]イミノ]-2H-インドール-2-オン；CAS No.3 03149-14-6

40

【化 7】



10

、そのE/Z異性体または混合物であることが構想される。

【0018】

本発明は、ニューロン変性をもたらす損傷または疾患の影響を治療、阻害または改善する方法または神経発生を促進する方法を提供する。これらの方法は、有効量の少なくとも1種類のインドロンを、その必要がある患者に投与する工程を含む。本発明のインドロンは神経突起伸長および神経発生を促進することがわかった。

20

【0019】

代替的に、本発明の少なくとも1種類のインドロンは、細胞が移植によって患者のニューロン変性の部位に投与される前に幹細胞またはニューロン前駆祖細胞を処置するために使用される。神経発生を促進する本発明の方法は、中枢神経系(CNS)における細胞再生に関与し、すべての型のCNS細胞を含む。

【0020】

本発明のある態様は、一次神経系損傷、例えば、閉鎖性頭部損傷および閉塞性(blunt)損傷、例えば限定されないが、危険なスポーツへの関与によって引き起こされるもの、貫通性損傷、例えば限定されないが、銃創によって引き起こされるもの、出血性脳卒中、虚血性脳卒中、緑内障、脳虚血、または例えば限定されないが、腫瘍切除などの手術によって引き起こされるものなどの損傷を治療するために使用される。本発明の化合物は、かかる損傷の治癒を増強または加速するために神経再生を促進し得る。また、該方法は、変性プロセスをもたらす疾患または障害の影響を治療、阻害または改善するために使用され得る。

30

【0021】

本発明のある態様は、抑制しなければ(otherwise)一次神経系損傷後に起こり得る二次変性を抑制するためのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与方法である。

【0022】

本発明の化合物は、中枢または末梢神経系の種々の疾患または障害、例えば限定されないが、糖尿病性神経障害、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を治療するために使用され得る。本発明の化合物は、末梢神経損傷および末梢または局所神経障害を治療するために使用され得、例えば限定されないが、ポルフィリン症、急性感覚神経障害、慢性運動失調性神経障害、種々の薬物および毒素の合併症、アミロイド多発性神経障害、副腎脊髄神経障害、巨大軸索神経障害がこの方法によって治療され得る。

40

【0023】

また、該化合物は、CNSからの腫瘍除去およびCNSに対する他の形態の手術などの術後治療に使用され得る。該化合物は脊髄損傷の治療に使用され得る。

【0024】

50

別の態様において、本発明は、ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療のためのキットに関する。

【0025】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストの他の例は、米国特許公開公報番号US2003/078271A1；および国際特許公開公報WO2004/093789に見られ得、これらは参照により援用される。

【0026】

(発明の詳細な説明)

一連の証拠の増加により、ニューロンは、成体脳において増殖し続けることが示唆されている(Arsenijevic, Y. et al., *Exp. Neurol.*, 170:48-62 (2001); Vescovi, A. L. et al., *Biomed. Pharmacother.*, 55:201-205 (2001); Cameron, H. A. および McKay, R. D., *J. Comp. Neurol.*, 435:406-417 (2001); ならびに Geuna, S. et al., *Anat. Rec.*, 265:132-141 (2001))。種々の治療適応症のためにニューロン幹を成体脳に移植する実験ストラテジーが、現在、進行中である(Kurimoto, Y. et al., *Neurosci. Lett.*, 306:57-60 (2001); Singh, G., *Neuropathology*, 21:110-114 (2001); および Cameron, H. A. and McKay, R. D., *Nat. Neurosci.*, 2:894-897 (1999))。胚発生段階における神経発生に関して多くが既に知られている(Saitoe, M. および Tully, T., 「Making connections between synaptic and behavioral plasticity in *Drosophila*」, In *Toward a Theory of Neuroplasticity*, J. McEachem and C. Shaw, Eds. (New York: Psychology Press.), pp. 193-220 (2000))。ニューロンの分化、神経突起伸長および初期シナプス標的認識はすべて、活性非依存的に起こるようである。

【0027】

最近の研究で、5-HT1Aレセプターの活性化は、海馬神経発生(Santarelli et al. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9.) および神経突起伸長(Fricker et al. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Aug 18;138(2):228-35)を増大させることが示されている。この研究では、神経突起伸長の増強に対するHT-2157の効果が調べられ、神経突起伸長の調節の基礎となる機構がPC12サブクローンおよび一次マウスニューロン培養物の両方において調査された。結果は、HT-2157が、PC12細胞と一次マウスニューロンの神経突起伸長を有意に増強することを示した。また、HT-2157は、ショウジョウバエの基本ヘリックス-ループ-ヘリックス(bHLH)タンパク質Hairyの脊椎動物ホモログであり、ニューロン分化を負に調節する転写リプレッサーであることが知られたHes5の発現を下方調節した。総合すると、これらの所見は、HT-2157による神経突起伸長の増強が、ニューロン分化進行の制御により媒介されることを示す。

【0028】

本明細書で使用されるように、用語「動物」または「被験体」は、哺乳動物、ならびに他の動物、脊椎動物および無脊椎動物(例えば、鳥類、魚類、爬虫類、昆虫(例えば、ショウジョウバエ種)、軟体動物(例えば、アメフラシ))を含む。用語「哺乳動物」および「哺乳動物の」は、本明細書で使用されるように、任意の脊椎動物、例えば、子供に授乳し、子供を出産するか(真獣類もしくは胎盤哺乳動物)または卵を産む(後獣類もしくは非胎盤哺乳動物)のいずれかである単孔類、有袋類および胎盤類をいう。哺乳動物種の例としては、ヒトおよび霊長類(例えば、サル、チンパンジー)、齧歯類(例えば、ラット、マウス、モルモット)ならびに反芻動物(ruminant)(例えば、ウシ、ブタ、ウマ)が挙げられる。

【0029】

動物または被験体は、なんらかの形態およびある程度の神経突起障害を有する動物であり得る。

【0030】

用語「幹細胞」または神経幹細胞(NSC))は、本明細書で使用されるように、自己再生能ならびにニューロン、星状細胞および／または希突起神経膠細胞への分化能を有する未分化細胞をいう。

【0031】

10

20

30

40

50

用語「前駆祖細胞」(例えば、神経前駆祖細胞)は、本明細書で使用されるように、幹細胞に由来し、それ自体は幹細胞でない細胞をいう。いくつかの前駆祖細胞は、1つより多くの細胞型への分化能を有する子孫をもたらし得る。

【0032】

本明細書で使用されるように、「治療すること」は、治療される疾患、障害または状態あるいは治療される疾患、障害または状態の1つ以上の症状の予防、改善、軽減および／または排除ならびに客観的および／または主観的基準によって決定される患者の全体的な健康状態における改善を含む。いくつかの態様において、治療は、中枢および／または末梢神経系の疾患、障害または状態の望ましくないまたは有害な影響またはその進行に由来するを逆転、減衰、最小化、抑制または停止するために使用される。他の態様において、治療方法は、さらなる神経発生または神経突起伸長によって損傷または疾患により失われた細胞の数が置き換えられ得る、補充され得る、または増大され得る場合に有利に使用され得る。

10

【0033】

本発明は、神経突起伸長を調節するためのガラニン-3レセプター(GalR3)アンタゴニストの投与に関する。

【0034】

一態様において、該方法は、動物へのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与による神経突起伸長の調節に関する。一態様において、神経突起伸長は、動物へのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与により、ガラニン-3レセプターアンタゴニストの非存在下での通常の成長と比べて増強または増大される。

20

【0035】

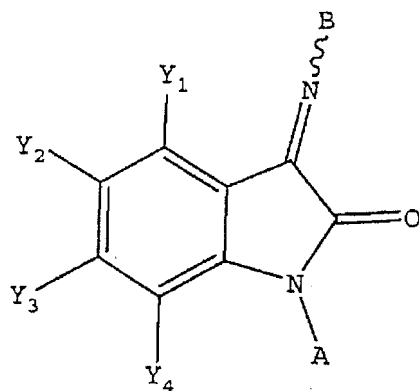
別の態様において、該方法は、ガラニン-3レセプターアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療を必要とする被験体の治療に関する。

【0036】

一態様において、該方法は、被験体の神経の損傷または損傷を治療するのに有効な量のガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物を被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療を必要とする被験体の治療に関し、ここで、ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物は、構造：

30

【化8】



40

(式中、各 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、もしくは $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、もしくは-I；- NO_2 ；- N_3 ；-CN；- OR_4 、- SR_4 、- $OCOR_4$ 、- COR_4 、- $NCOR_4$ 、- $N(R_4)_2$ 、- $CON(R_4)_2$ 、もしくは- $COOR_4$ ；アリールもしくはヘテロアリールである；または隣接する炭素原子に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 の任意の2つが、メチレンジオキシ基を構成し得

50

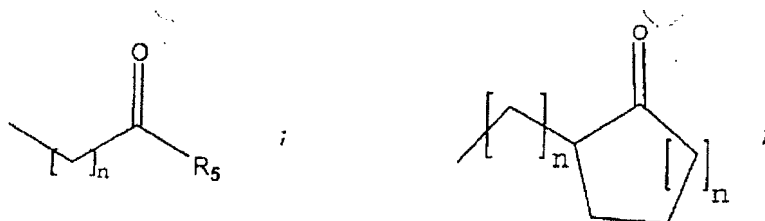
る；

各 R_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2\sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5\sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

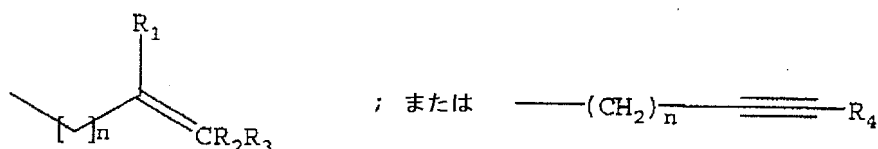
Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1\sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；

A'は、

【化9】



10



20

である；

R_1 および R_2 は、各々独立して、H、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、または-CNである；

R_3 は、H、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、-OR₆、アリールまたはヘテロアリールである；

R_5 は、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、-N(R_4)₂、-OR₆またはアリールである；

30

R_6 は、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキルまたはアリールである；

Bは、アリールまたはヘテロアリールである；しかしながら、Bがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対してオルトの1つ以上の炭素原子のみが以下：-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上で置換され得るものとする；

各 n は、独立して、1～4までの整数である)

を有し、

該化合物は、純粋なZイミン異性体、純粋なEイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物である。

【0037】

40

本発明において、用語「直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル」は、1～7個までの炭素原子を有する飽和炭化水素部分をいう。かかる置換基の例としては、限定されないが、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピルおよび2-メチル-1-プロピルが挙げられる。用語「 $C_2\sim C_7$ アルケニル」は、2～7個までの炭素原子を有するモノ-不飽和炭化水素部分をいう。かかる置換基の例としては、限定されないが、エテニル、プロプ-1-エン-1-イル、プロプ-1-エン-2-イル、プロプ-2-エン-1-イル、ブト-3-エン-2-イルおよびヘプト-2-エン-1-イルが挙げられる。用語「 $C_3\sim C_7$ アルキニル」は、3～7個の炭素原子を有し、1つの炭素-炭素三重結合を含む炭化水素部分をいう。かかる置換基の例としては、限定されないが、プロプ-1-イニル、プロプ-2-イニル、ペント-2-イニル、4,4-ジメチルペント-2-イニル、5-メチルヘキソ-3-イン-2-イルおよ

50

びヘプト-3-イニルが挙げられる。

【0038】

本発明において使用される場合、用語「シクロアルキル」は、以下：-F、-NO₂、-CN、直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇モノフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇ポリフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルケニル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルキニル、C₃～C₇シクロアルキル、C₃～C₇モノフルオロシクロアルキル、C₃～C₇ポリフルオロシクロアルキル、C₅～C₇シクロアルケニル、-N(R₄)₂、-OR₄、-COR₄、-NCOR₄、-CO₂R₄、-CON(R₄)₂または(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-CH₃（式中、各mは、独立して、0～2までの整数である）の1つ以上で置換されていてもよいC₃～C₇シクロアルキル部分を含む。

10

【0039】

本発明において使用される場合、用語「シクロアルケニル」は、以下：-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇モノフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇ポリフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルケニル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルキニル、C₃～C₇シクロアルキル、C₃～C₇モノフルオロシクロアルキル、C₃～C₇ポリフルオロシクロアルキル、C₅～C₇シクロアルケニル、-N(R₄)₂、-OR₄、-COR₄、-NCOR₄、-CO₂R₄、-CON(R₄)₂または(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-CH₃（式中、各mは、独立して、0～2までの整数である）の1つ以上で置換されていてもよいC₅～C₇シクロアルケニル部分を含む。

20

【0040】

本発明において、用語「ヘテロアリール」は、1つ以上の酸素、イオウまたは窒素原子を含有し得る5および6員の不飽和環を含むために使用される。ヘテロアリール基の例としては、限定されないが、フラニル、チエニル、ピロリル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イソキサゾリル、イソチアゾリル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、およびトリアジニルが挙げられる。

【0041】

また、用語「ヘテロアリール」は、酸素、イオウおよび窒素などの1つ以上のヘテロ原子を含有し得る縮合二環系を含むために使用される。かかるヘテロアリール基の例としては、限定されないが、インドリジニル、インドリル、イソインドリル、ベンゾ[b]フラニル、ベンゾ[b]チオフェニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、プリニル、ベンズオキサゾリル、ベンズイソキサゾリル、ベンゾ[b]チアゾリル、イミダゾ[2,1-b]チアゾリル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、1,8-ナフチリジニル、プテリジニル、キノリニル、イソキノリニル、フタルイミジルおよび2,1,3-ベンゾチアゾリルが挙げられる。

30

【0042】

また、用語「ヘテロアリール」は、以下：-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇モノフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇ポリフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルケニル、直鎖もしくは分岐C₂～C₇アルキニル、C₃～C₇シクロアルキル、C₃～C₇モノフルオロシクロアルキル、C₃～C₇ポリフルオロシクロアルキル、C₅～C₇シクロアルケニル、-N(R₄)₂、-OR₄、-COR₄、-NCOR₄、-CO₂R₄、-CON(R₄)₂または(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-CH₃（式中、各mは、独立して、0～2までの整数である）の1つ以上で置換されていてもよい上記の化学的部分を含む。

40

【0043】

用語「ヘテロアリール」は、少なくとも1個の窒素原子を含む上記の化学的部分のN-オキシドをさらに含む。

【0044】

本発明において、用語「アリール」はフェニルまたはナフチルである。また、用語「アリール」は、以下：-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇モノフルオロアルキル、直鎖もしくは分岐C₁～C₇ポリフルオロア

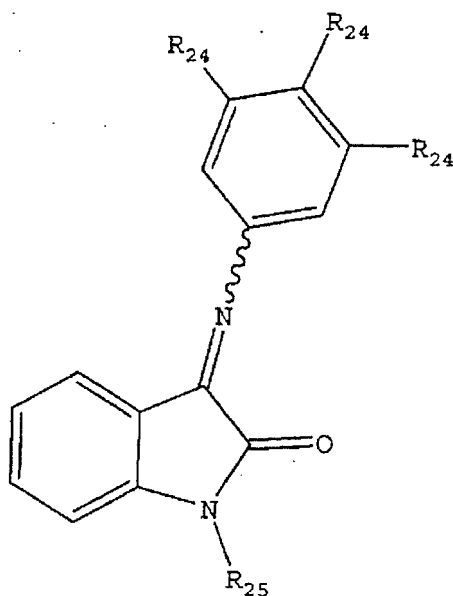
50

ルキル、直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニル、直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_3 \sim C_7$ モノフルオロシクロアルキル、 $C_3 \sim C_7$ ポリフルオロシクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、 $-N(R_4)_2$ 、 $-OR_4$ 、 $-SR_4$ 、 $-OCOR_4$ 、 $-COR_4$ 、 $-NCOR_4$ 、 $-CO_2R_4$ 、 $-CON(R_4)_2$ または $(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-CH_3$ （式中、各 m は、独立して、0～2までの整数である）の1つ以上で置換されていてもよいフェニルおよびナフチルも含む。

【0045】

また、本発明は、有効量のガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物を被験体に投与する工程を含む、神経細胞の損傷および／または損傷の治療を必要とする被験体の治療方法を提供し、ここで、ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物は、構造：

【化10】



（式中、各 R_{24} は、独立して、以下：H、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} は、メチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 または OR_4 で置換されている；および

各 R_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルもしくはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルもしくはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する。

【0046】

本明細書に記載の方法において、該化合物は、潜在的にZまたはE立体配置を有し得るイミン結合を含む。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は純粋なZイミン異性体である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は純粋なEイミン異性体である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、Zイミン異性体とEイミン異性体の混合物である。

【0047】

本明細書に記載の方法において、該化合物は、潜在的にZまたはE立体配置を有し得るアルケン結合を含み得る。例えば、該化合物は、インドロン環系の5位に結合された Y_2 基を含み得、ここで、 Y_2 はブト-2-エン-1-イルである。かかるブテニル基は潜在的にZまたはE立体配置を有し得る。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は純粋なZアルケン異性体である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は純粋なEアルケン異性体である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、Zアルケン異性体とEアルケン異性体の混合物である。

【0048】

本明細書に記載の方法において、該化合物は、キラリティーを有し得る1つ以上の部分を含み得る。かかる部分としては、限定されないが、回転が制限され、垂直な非対称面をもたらす四価のキラル原子または環系が挙げられ得る。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、エナンチオマー的またはジアステレオマー的に純粋である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、エナンチオマー的およびジアステレオマー的に純粋である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、エナンチオマーの混合物である。本明細書に記載の任意の方法の一態様において、該化合物は、ジアステレオマーの混合物である。

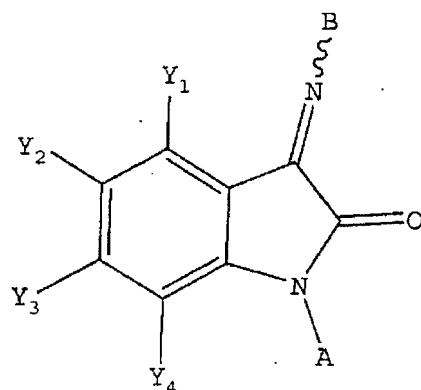
【0049】

一態様において、該化合物は経口投与される。

【0050】

一態様において、該化合物は、構造：

【化11】



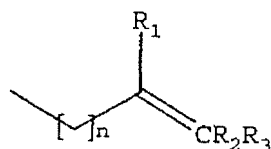
(式中、各 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、- CF_3 、-F、-Cl、-Br、-I、- OR_4 、- $N(R_4)_2$ 、または- $CON(R_4)_2$ である；

各 R_4 は、独立して、-H；直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、- CF_3 、またはフェニルである；

Aは、A'、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1\sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1\sim C_6$)アルキルである；ならびに

A'は、

【化12】



である)

を有する。

【0051】

一態様において、Bはヘテロアリールである。別の態様において、Bはアリールである。

【0052】

一態様において、Bはフェニルであり、フェニルは任意に以下：-H、-F、-Cl、-Br、- CF_3 、直鎖もしくは分岐 $C_1\sim C_7$ アルキル、- $N(R_4)_2$ 、- OR_4 、- COR_4 、- $NCOR_4$ 、- CO_2R_4 、または- $CON(R_4)_2$ の1つ以上で置換されている。

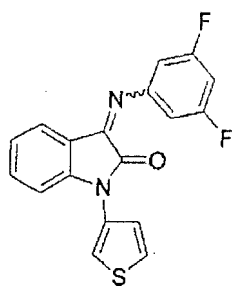
【0053】

一態様において、Aはアリールである。別の態様において、Aはヘテロアリールである。

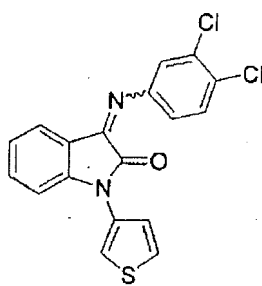
【0054】

一態様において、該化合物は、

【化13】

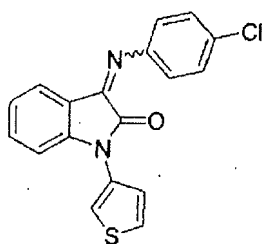


;



; および

10



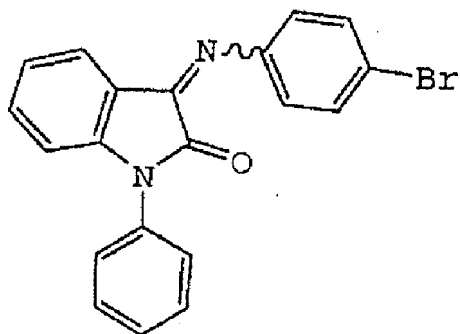
20

からなる群より選択される。

【0055】

一態様において、該化合物は、

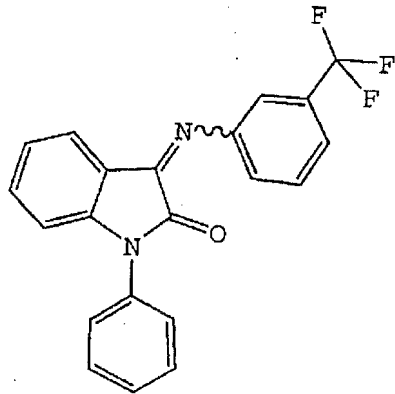
【化14】



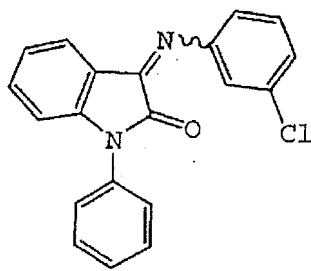
;

30

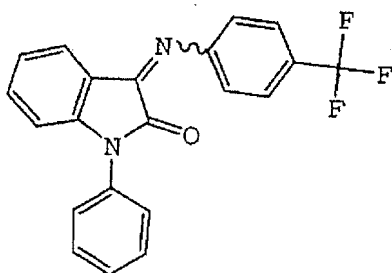
【化 1 5】



10

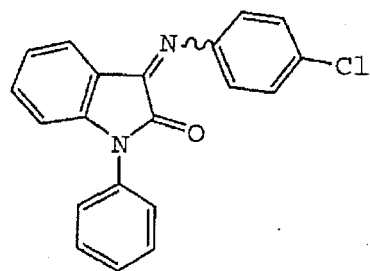


20



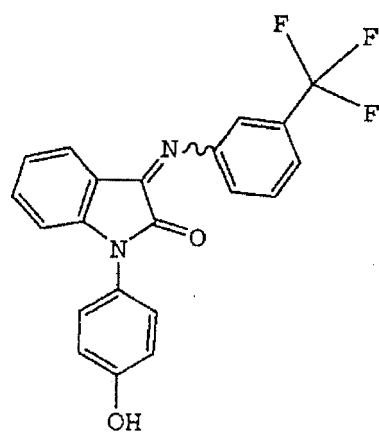
30

【化 1 6 - 1】



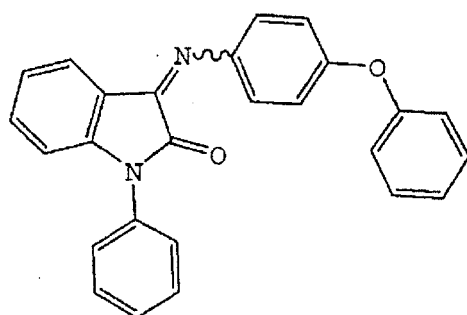
;

10



;

20

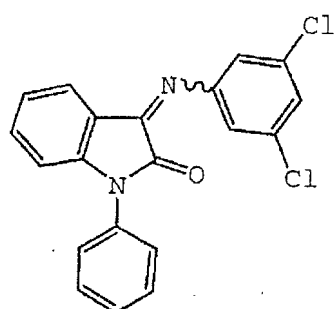


; および

30

40

【化 1 6 - 2】

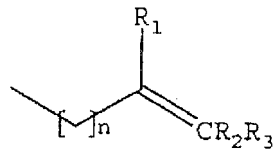


50

からなる群より選択される。

【0056】

一態様において、AはA'であり、A'は
【化17】

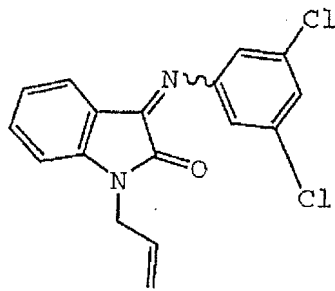


10

である。

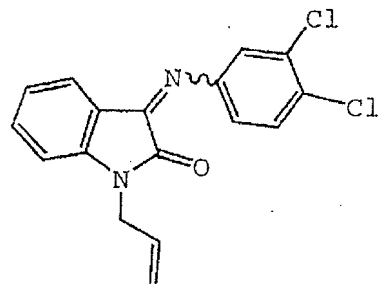
【0057】

一態様において、該化合物は、
【化18】



; または

20



30

である。

【0058】

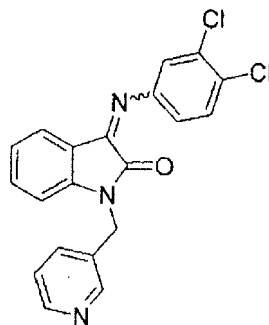
一態様において、Aはアリールである。別の態様において、Bがアリールである。

【0059】

一態様において、Aはヘテロアリール(C₁~C₆)アルキルである。

【0060】

一態様において、該化合物は、
【化19】



40

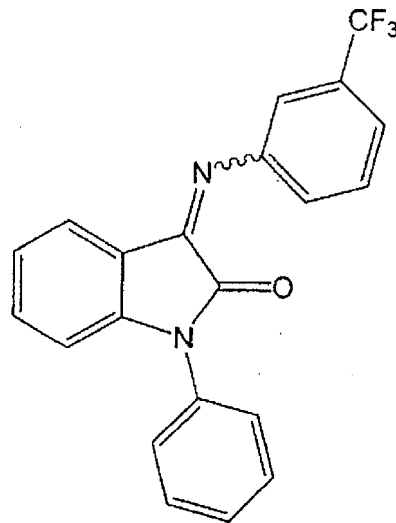
50

である。

【0061】

特別な態様において、ガラニン-3レセプターアンタゴニストは、HT-2157(1,3-ジヒドロ-1-フェニル-3[[3-トリフルオロメチル)フェニル]イミノ]-2H-インドール-2-オン；CAS番号303149-14-6である。

【化20】



10

20

【0062】

ガラニン-3レセプターアンタゴニストの他の例は、参照によりその全体が援用される米国特許第7,081,470号、米国特許公開公報番号US2003/078271A1；および国際特許公開公報番号W02004/093789に見られ得る。該化合物は、その教示が参照により本明細書に援用される米国特許第7,081,470号、米国特許公開公報番号US2003/078271 A1；および国際特許公開公報番号W02004/093789に示された方法論を用いて調製され得る。

【0063】

ガラニン-3レセプター(GaBR)アンタゴニスト化合物の投与が、単独または他の化合物、例えば、ベンゾジアゼピンもしくは選択的セロトニン再取り込みインヒビター(SSRI)の投与とともに行なわれ得ることが構想される。

30

【0064】

該方法または治療は、治療の標的である状態(1つまたは複数)に対する一次薬物療法剤とガラニン-3レセプターアンタゴニストの組合せを投与する工程を含み得る。場合によっては、ガラニン-3レセプターアンタゴニストは、治療の標的である疾患の治療において、さらなる治療剤との相乗効果を有する。組合せとして投与される場合、治療化合物は、同時もしくは異なる時点で逐次投与される別々の組成物として製剤化され得るか、または治療化合物は、単一の組成物として与えられ得る。

【0065】

投与様式は、好ましくは、標的細胞位置である。特定の態様において、投与様式はニューロンに対してである。

40

【0066】

本発明は、ニューロン変性をもたらす損傷または疾患の影響を治療、阻害または治療する方法または神経発生もしくは神経突起伸長を促進する方法を提供する。これらの方法は、有効量の少なくとも1種類のガラニン-3レセプターアンタゴニストを、その必要がある患者に投与する工程を含む。本発明のガラニン-3レセプターアンタゴニストは、神経突起伸長および神経発生を促進することがわかった。

【0067】

代替的に、本発明の少なくとも1種類のガラニン-3レセプターアンタゴニストは、細胞が移植によって患者のニューロン変性の部位に投与される前に幹細胞またはニューロン前

50

駆祖細胞を処置するために使用される。いくつかの態様において、本明細書に記載の方法は、疾患または状態を治療するために、神経幹細胞、神経前駆祖細胞および／または分化神経細胞を含む組成物が個体に連続的に投与され得るように、ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物により神経発生または神経突起伸長をエキソビボで調節する工程を含む。いくつかの態様において、該治療方法は、神経突起伸長を調節するために神経幹細胞または神経前駆祖細胞を本発明の1種類以上の化合物と接触させる工程、および治療を必要とする(in need of)患者に細胞を移植する工程を含む。幹細胞および前駆祖細胞を移植する方法は、当該技術分野で公知である。いくつかの態様において、本明細書に記載の方法により、損傷または機能不全のニューロンを直接置き換えること、または補充することによる疾患または状態の治療が可能になる。

10

【0068】

神経発生を促進する本発明の方法は、中枢神経系(CNS)における細胞再生に関与し、すべての型のCNS細胞を含む。

【0069】

本発明のある態様は、一次神経系損傷、例えば、閉鎖性頭部損傷および閉塞性損傷、例えば、危険なスポーツへの関与によって引き起こされるもの、銃創などの貫通性損傷、出血性脳卒中、虚血性脳卒中、緑内障、脳虚血、もしくは腫瘍切除などの手術によって引き起こされる損傷を治療するために使用されるか、またはかかる損傷もしくは後述のものなどの神経変性疾患の治療を増強または加速するために神経再生を促進さえし得る。また、該方法は、変性プロセスをもたらす疾患または障害の影響を治療、阻害または改善するために使用され得る。

20

【0070】

本発明のある態様は、抑制しなければ一次神経系損傷後に起こり得る二次変性を抑制するために使用される。

【0071】

本発明の化合物は、中枢または末梢神経系の種々の疾患または障害、例えば、糖尿病性神経障害、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を治療するために使用され得る。末梢神経損傷および末梢または局所神経障害、例えば限定されないが、ポルフィリン症、急性感覚神経障害、慢性運動失調性神経障害、種々の薬物および毒素の合併症、アミロイド多発性神経障害、副腎脊髄神経障害、巨大軸索神経障害がこの方法によって治療され得る。

30

【0072】

また、該化合物は、CNSからの腫瘍除去およびCNSに対する他の形態の手術などの術後治療に使用され得る。該化合物は脊髄損傷の治療に使用され得る。

【0073】

Gal-3レセプターアンタゴニストは、薬学的に許容され得る界面活性剤(例えば、グリセリド)、賦形剤(例えば、ラクトース)、安定剤、保存剤、加湿剤、エモリエント、抗酸化剤、担体、希釈剤およびビヒクルなどの生物学的に活性な薬剤の他の成分と一緒に投与され得る。所望により、ある種の甘味剤、フレーバーおよび／または着色剤もまた添加され得る。

【0074】

Gal-3レセプターアンタゴニストは、薬学的に許容され得る非経口ビヒクルとともに、溶液、懸濁液、エマルジョンまたは凍結乾燥粉末として製剤化され得る。かかるビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油などの非水性ビヒクルもまた使用され得る。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性(例えば、塩化ナトリウム、マンニトール)ならびに化学安定性(例えば、バッファーおよび保存剤)を維持する添加剤を含有し得る。製剤は、一般に使用される技術によって滅菌され得る。適当な医薬担体は、Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。

40

【0075】

動物に投与されるGal-3レセプターアンタゴニストの用量は、神経突起伸長の変化を起

50

こすのに必要とされる量である。投与頻度を含む動物に投与される用量は、種々の要素、例えば、特定のGal-3レセプターアンタゴニストの薬力学特性、投与の様式および経路；レシピエントの体格、年齢、性別、健康、体重および食事；治療される症状の性質および程度または増強または調節される認知機能(1つまたは複数)の性質および程度、同時治療の種類、治療の頻度、ならびに所望の効果に応じて異なる。主題の適用において、「治療有効量」は、該化合物が有効である疾患に苦しむ被験体に投与された場合、神経突起伸長の調節を引き起こす化合物の任意の量である。

【0076】

Gal-3レセプターアンタゴニストは、症状の性質および程度、同時治療の種類ならびに所望の効果などの要素に応じて、単回もしくは分割用量(例えば、数日、数週間もしくは数ヶ月の間隔で分けられる一連の用量)、または徐放形態で投与され得る。他の治療計画または薬剤が、本発明と合わせて使用され得る。例えば、Gal-3レセプターアンタゴニストは、毎日一定期間投与され得る。

10

【0077】

次に、本発明を、いかなる様式でも限定するものとみなされるべきでない以下の実施例によって示す。

【0078】

実験の詳細

化合物の合成

以下の記載は、本発明のインドロン化合物を合成するために使用され得る方法を示す。該化合物の合成は、2006年12月6日に出願された、参照によりその全体が援用される米国特許出願第11/608,746号に記載されている。

20

【0079】

一般的な方法

すべての反応は、アルゴン雰囲気下で行ない、試薬は、そのまままたは適切な溶媒中で、シリンジおよびカニューレ技術によって反応容器に移した。無水溶媒はAldrich Chemical Companyから購入し、受領したまま使用した。以下に記載する化合物は、ACD/Name Program (バージョン4.01、Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, M5H 2L3, Canada)を用いて命名した。¹H NMRおよび¹³C NMRスペクトルは、特に記載のない限り、溶媒としてのCDCl₃および内部標準としてのテトラメチルシラン中、300 MHz (GEQE Plus)または400 MHz (Bruker Avance)いずれかで記録した。化学シフト(δ)はppmで示し、結合定数(J)はHzで示し、分裂(splitting)パターンは、以下：s = 一重項；d = 二重項；t = 三重項；q = 四重項；五重項；六重項；七重項；br = 広域；m = 多重項；dd = 二重項の二重項；dt = 三重項の二重項で示す。元素分析は、Robertson Microлит Laboratories, Incで行なった。特に記載のない限り、質量スペクトルは、エレクトロスプレーイオン化(ESI、Micromass Platform II)を用いて得、MH⁺を報告する。薄層クロマトグラフィー(TLC)は、シリカゲル60 F₂₅₄ (0.25mm、EM Separations Tech.)をプレコートしたガラスプレートにおいて行なった。分取用TLCは、シリカゲルGF (2mm、Analtech)をプレコートしたガラスシートにおいて行なった。フラッシュカラムクロマトグラフィーは、Merckシリカゲル60 (230~400メッシュ)において行なった。融点(mp)は、Mel-Temp装置の開放毛細管内で測定し、補正していない。

30

40

【0080】

さらに、以下：HOAc、酢酸；DIPEA、ジイソプロピルエチルアミン；DMF、N,N-ジメチルホルムアミド；EtOAc、酢酸エチル；MeOH、メタノール；TEA、トリエチルアミン；THF、テトラヒドロフランの略号を使用し、特に記載のない限り、すべての溶媒比は容量/容量である。

【0081】

I. インドロンの調製のための一般手順

以下の方法は、本発明の化合物の合成に有用な手順を示す(スキーム1~5に示す)。本発明の化合物の合成に有用な置換イサチンは、代替的に、以下の文献：

50

Garden, S. J. ; Da Silva, L. E. ; Pinto, A.C. ; Synthetic Communications, 1998, 28, 1679 - 1689.

Coppola, G.M. ; Journal of Heterocyclic Chemistry, 1987, 24, 1249.

Hess, B. A. Jr ; Corbino, S. ; Journal of Heterocyclic Chemistry, 1971, 8, 161.

Bryant, W. M. III ; Huhn, G.F. ; Jensen, J.H. ; Pierce, M. E. ; Stambach, C ; Synthetic Communications, 1993, 23, 1617 - 1625.

に記載の手順を用いて得られ得る。

【0082】

イミノイサチンの合成の一般手順

適切に置換されたイサチン(10mg~10g)をフラスコに入れ、適切なアニリン(1.0~1.1当量)を添加し、混合物を均一になるまで攪拌した。次いで、混合物を110℃まで2~7時間加熱し、次いで、冷却した。固体を高温メタノールから結晶化させ、濾過し、所望の生成物(通常、分離不可能なE/Z異性体相互転換性混合物として)を得た。

【0083】

手順A:

1-(3-チエニル)-1H-インドール-2,3-ジオン: トリエチルアミン(56.9mL、0.408mol)を、CH₂Cl₂(500mL)中1H-インドール-2,3-ジオン(15.0g、0.102mol)、酢酸銅(II)(46.0g、0.255mol)および3-チエニル硼酸(19.6g、0.153mol)の混合物に添加した。反応混合物を一晩攪拌し、Celite(登録商標)により濾過し、EtOAc/ヘキサン(1:1、300mL)で濯ぎ、真空にて濃縮した。ヘキサン/EtOAc (1:1)を使用するシリカ上でのカラムクロマトグラフィーによって粗生成物を精製し、所望の生成物(1.1g、50%)を得た。

【0084】

手順B:

(3E)-3-[(4-メチルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 1%HOAc/MeOH(8mL)中1-(3-チエニル)-1H-インドール-2,3-ジオン(20mg、0.087mmol)の溶液を、1%HOAc/MeOH(8mL)中p-トルイジン(19mg、0.18mmol)の溶液に添加した。反応混合物を室温で12時間攪拌し、50℃で1時間加熱し、真空にて濃縮した。残渣を、EtOAc/ヘキサン(3:7、0.1%TEA)を使用するシリカ上での分取用TLCによって精製し、所望の生成物(14mg、50%)を得た。

【0085】

手順C:

(3Z)-5-ブロモ-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: メタノール中1%酢酸の溶液中5-ブロモ-1H-インドール-2,3-ジオン(1.0g、0.442mmol)および3-トリフルオロメチルアニリン(0.993g、6.2mmol)の混合物を50℃で12時間攪拌した。粗生成物を真空にて濃縮し、所望の粗生成物(640mg、40%)を得た。

【0086】

手順D:

(3Z)-5-ブロモ-1-フェニル-3-{[3-トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 5mLのCH₂Cl₂中(3Z)-5-ブロモ-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(100mg、0.272mmol)、酢酸銅(II)(54mg、0.33mmol)、トリエチルアミン(82.8mg、0.817mmol)およびベンゼン硼酸(40mg、0.325mmol)の混合物を室温で12時間攪拌した。粗混合物を真空にて濃縮し、EtOAc:ヘキサン(3:7、1%トリエチルアミン)を使用した分取用TLCによって精製し、所望の生成物(22mg、20%)を得た。

【0087】

手順E:

(3Z)-1,5-ジフェニル-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: THF(5mL)中(3Z)-5-ブロモ-1-フェニル-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(22mg、0.05mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)(12.0mg、0.01mmol)、ベンゼン硼酸(10mg、0

10

20

30

40

50

.08mmol)、および水性 Na_2CO_3 (2M、100 μL) の混合物を67°Cで24時間加熱した。粗生成物を真空にて濃縮し、残渣を CH_2Cl_2 (3×1ml) で抽出し、濃縮し、 CHCl_3 中10%メタノールを使用した分取用TLCによって精製し、所望の生成物(4mg、18%)を得た。

【0088】

手順F:

1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-2H-インドール-2,3-ジオン: 無水ジオキサン(10mL)中イサチン(125mg、0.85mmol)の溶液を、無水ジオキサン(10mL)中水素化ナトリウム(鉱油中60%懸濁液、25mg、0.62mmol)の溶液に、アルゴン下0°Cで滴下した。混合物を5分間攪拌し、次いで、ジオキサン(10mL)中3-(プロモメチル)-5-クロロベンゾ[b]チオフェン(267mg、1.02mmol)の溶液を、反応混合物に滴下した。アルゴン下で反応混合物を16時間還流加熱し、真空にて濃縮した。溶出液としてクロロホルム中1:24メタノールを使用した分取用TLCによって粗物質を精製し、黄色固形物として所望の生成物(125mg、0.38mmol、45%)を得た。

10

【0089】

手順G:

1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-2H-インドール-2,3-ジオン(50mg、0.15mmol)および3-トリフルオロメチルアニリン(0.020mL、0.15mmol)の混合物をそのまま140°Cで2時間加熱した。溶出液として1:3の酢酸エチルとヘキサンの混合物を使用した分取用TLCによって粗物質を精製し、黄色固形物として所望の生成物(13mg、0.030mmol、18%)を得た。

20

【0090】

手順H:

6-メトキシ-1-フェニル-1H-インドール-2,3-ジオン: エーテル(3mL)中N-(3-メトキシフェニル)-N-フェニルアミン(1.14g、5.72)の溶液を、塩化オキサリル(728g、5.75mmol)の溶液に添加し、1時間還流加熱した。得られた混合物を室温まで冷却し、濃縮して乾燥させ、ニトロベンゼン(35mL)に再溶解した。溶液を、ニトロベンゼン(0.762g、5.72mmol)中 AlCl_3 の溶液に添加し、得られた混合物を70°Cで16時間加熱した。粗生成物を真空にて濃縮し、 EtOAc /ヘキサン(1:1)を使用するカラムクロマトグラフィーによって精製し、所望の生成物(60mg、50%)を得た。化合物2~17までは、Bionet Research Ltd., 3 Highfield Industrial Estate, Camelford, Cornwall PL32 9QZ, UKから購入した。これらの化合物はまた、上記の一般手順を用いて合成され得る。

30

【0091】

化合物1: 3-[(2-メトキシフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物2: 1-フェニル-3-[[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物3: 3-[(3-メチルフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物4: 3-[(3-クロロフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

40

化合物5: 1-フェニル-3-[[4-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物6: 3-[(4-メチルフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物7: 3-[(4-クロロフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物8: 3-[(4-ブロモフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物9: 3-[(4-フルオロフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-

50

2-オン

化合物10：3-[(4-フェノキシフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物11：3-[(4-エトキシフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物12：3-[(4-メトキシフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物13：3-[(3,5-ジクロロフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物14：3-[(3,5-ジメチルフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物15：1-アリル-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物16：1-アリル-3-[(3,5-ジクロロフェニル)イミノ]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

化合物17：3-[(4-ブロモフェニル)イミノ]-1-イソプロピル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン

【0092】

化合物18：1-[(5-クロロ-2-チエニル)メチル]-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：1-[(5-クロロ-2-チエニル)メチル]-2H-インドール-2,3-ジオン(25mg、0.09mmol)(後述のようにして調製)および3-トリフルオロメチルアニリン(11.3 μ L、0.09mmol)の混合物を、そのまま140℃で2時間加熱した。粗物質を、溶出液として3:7の酢酸エチル:ヘキサンの混合物を使用した分取用TLCによって精製し、所望の生成物(23mg、0.05mmol、61%)を得た。¹H NMR (400 MHz)： δ (主な異性体) 7.57 (t, J = 7.7, 1H)、7.53 (t, J = 7.8, 1H)、7.33 (t, J = 7.8, 1H)、7.28 (s, 1H)、7.19 (d, J = 7.6, 2H)、6.94 - 6.72 (m, 4H)、6.56 (d, J = 7.7, 1H)、5.02 (s, 2H)；ESI-MS m/z 実測421 (MH⁺)。 20

【0093】

1-[(5-クロロ-2-チエニル)メチル]-2H-インドール-2,3-ジオン：無水ジオキサン(10mL)中イサチン(125mg、0.85mmol)溶液を、無水ジオキサン(10mL)中水素化ナトリウム(鉱油中60%懸濁液、24mg、0.62mmol)の溶液にアルゴン下0℃で滴下した。混合物を5分間攪拌し、次いで、得られた混合物にジオキサン(10mL)中2-クロロ-5-(クロロメチル)チオフェン(0.12mL、1.02mmol)を滴下した。反応混合物をアルゴン下で16時間還流加熱し、真空にて濃縮した。粗物質を、溶出液としてクロロホルム中1:24メタノールを使用した分取用TLCによって精製し、黄色固形物として所望の生成物(53mg、0.19mmol、22%)を得た。¹H NMR (400 MHz)： δ 7.62 (d, J = 7.4, 1H)、7.56 (t, J = 7.8, 1H)、7.14 (t, J = 7.7, 1H)、6.94 (d, J = 8.0, 1H)、6.90 (d, J = 3.2, 1H)、6.78 (d, J = 3.7, 1H)、4.90 (s, 2H)。 30

【0094】

化合物19：1-(3-チエニル)-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：1-(3-チエニル)-2H-インドール-2,3-ジオン(25mg、0.11mmol)(後述のようにして調製)および3-トリフルオロメチルアニリン(14 μ L、0.11mmol)の混合物を、そのまま140℃で2時間加熱した。溶出液として3:7の酢酸エチル:ヘキサンの混合物を使用した分取用TLCによって粗物質を精製し、黄色固形物として所望の生成物(7.3mg、0.02mmol、22%)を得た。¹H NMR (400 MHz) δ 7.62 - 7.19 (m, 9H)、6.94 (d, J = 8.0, 1H)、6.76 (t, J = 7.6, 1H)；ESI-MS m/z 実測373 (MH⁺)。 40

【0095】

1-(3-チエニル)-2H-インドール-2,3-ジオン：酢酸銅(II)一水和物(4.25g、23.4mmol)を、無水酢酸(30mL)中で2時間還流加熱した。混合物を濾過し、無水エーテル(500mL)で洗浄した。固体を55℃で16時間真空乾燥した。ジクロロメタン(1mL)を、酢酸銅(II)(62mg、0. 50

34mmol)、イサチン(50mg、0.34mmol)およびチオフェン-3-ボロン酸(87mg、0.68mmol)の混合物に添加した後、トリエチルアミン(0.10mL、0.68mmol)をアルゴン下で添加した。得られた溶液を16時間室温で攪拌した。次いで、反応混合物に、0.10mmolの酢酸銅(II)、0.10mmolの3-チオフェンボロン酸、および1滴のトリエチルアミンを再度添加し、混合物を50℃で6時間加熱した。粗物質を、溶出液として3:97のメタノール:クロロホルムを使用した分取用TLCによって精製し、黄色固形物として所望の生成物(25mg、0.11mmol、33%)を得た。¹H NMR (400 MHz): δ 7.70 (d, J = 7.5, 1H)、7.58 (t, J = 7.8, 1H)、7.50 (d, J = 5.1, 1H)、7.48 (s, 1H)、7.24 (d, J = 5.1, 1H)、7.18 (t, J = 7.51, 1H)、7.05 (d, J = 8.0, 1H)。

【0096】

10

化合物20: 2-メチル-5-[(2-オキソ-1-フェニル-1,2-ジヒドロ-3H-インドール-3-イリデン)アミノ]-2H-イソインドール-1,3(2H)-ジオン: 1-フェニルイサチン(50mg、0.22mmol)および4-アミノ-N-メチルフタルイミド(40mg、0.22mmol)の混合物を、そのまま215℃で2時間加熱した。溶出液として3:7の酢酸エチル:ヘキサンの混合物を使用した分取用TLCによって粗物質を精製し、黄色固形物として所望の生成物(8mg、0.02mmol、10%)を得た。¹H NMR (400 MHz): δ 7.88 (d, J = 7.8, 1H)、7.83 - 7.80 (m, 1H)、7.51 (t, J = 7.5, 1H)、7.47 - 7.18 (m, 6H)、7.02 (t, J = 8.0, 1H)、6.91 - 6.79 (m, 2H)、6.58 (d, J = 7.5, 1H)、3.22 (s, 3H); ESI-MS m/z 実測382 (MH⁺)。

【0097】

化合物21: 1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-2H-インドール-2,3-ジオンを、手順Fによって調製した。¹H NMR (400 MHz): δ 7.89 (s, 1H)、7.79 (d, J = 8.5, 1H)、7.65 (d, J = 7.5, 1H)、7.54 (t, J = 8.0, 1H)、7.42 (s, 1H)、7.38 (d, J = 8.5, 1H)、7.14 (t, J = 7.5, 1H)、6.88 (d, J = 7.8, 1H)、5.13 (s, 2H)。この中間体から、1-[(5-クロロ-1-ベンゾチエン-3-イル)メチル]-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを手順Gによって調製した。¹H NMR (400 MHz): δ 7.98 (d, J = 2.0, 1H)、7.80 (d, J = 8.6, 1H)、7.58 (t, J = 7.7, 1H)、7.52 (d, J = 8.1, 1H)、7.43 (s, 1H)、7.38 (dd, J = 8.6, 1.9, 1H)、7.31 (重複一重項およびdt, J = 1.2, 7.8, 2H)、7.24 (d, J = 7.8, 1H)、6.87 (d, J = 7.9, 1H)、6.77 (t, J = 7.7, 1H)、6.59 (d, J = 7.7, 1H)、5.20 (s, 2H)。ESI-MS m/z 実測471 (³⁵Clを用いたMH⁺)、473 (³⁷Clを用いたMH⁺)。

20

30

【0098】

化合物22: 3-(1H-インドール-5-イルイミノ)-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 1-フェニルイサチン(51.8 mg, 0.23 mmol)および5-アミノインドール(31mg, 0.23 mmol)を混合し、140℃で2時間加熱した。得られた粗生成物を溶出液としてエチルアセテート/ヘキサン(6:4)を用いた分取用TLCによって精製し、黄色固形物として所望の生成物を得た(10.8mg, 14%)。¹H NMR(400 MHz): δ 8.28(s, 1H)、7.57(t, J=7.7, 2H)、7.49~7.40(m, 6H)、7.29~7.23(m, 1H)、7.03(dd, J=8.5, 1.7, 1H)、6.98(d, J=7.6, 1H)、6.83(d, J=8.0, 1H)、6.74, J=7.6, 1H)、6.59(s, 1H); ESI-MS m/z 実測338(MH⁺)。

【0099】

40

化合物23: 3-[(6-クロロ-3-ピリジニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 1-フェニルイサチン(23.0mg, 0.10mmol)および5-アミノ-2-クロロピリジン(12.8 mg, 0.10 mmol)を混合し、140℃で7時間加熱した。得られた粗生成物を溶出液としてヘキサン/エチルアセテート(8:2)を用いた分取用TLCによって精製し、黄色固形物として所望の生成物を得た(19.7mg, 59%)。¹H NMR(400 MHz) δ 8.15(d, J=8, 1H)、7.6~7.2(m, 9H)、6.85~6.75(m, 2H); ESI-MS m/z実測334 (MH⁺)。

【0100】

化合物24: 3-[(2-メチル-1,3-ベンゾチアゾール-5-イル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン: 5-アミノ-2-メチルベンゾチアゾール(52.2 mg, 0.31 mmol)を1-フェニルイサチン(69.7 mg, 0.31 mmol)と混合し、140℃で3時間加熱した。得られた粗

50

生成物を溶出液としてエチルアセテート/ヘキサン(6:4)を用いた分取用TLCによって精製し、黄色固形物として所望の生成物を得た(36.9 mg, 32.3 %). ^1H NMR: δ 7.9~6.7(m, 12H)、2.9(s, 3H). ESI-MS m/z 実測 370 (MH^+).

【0101】

化合物25: (3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1-(2-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順F(2-ピコリルクロライドの置換)およびGによって調製した。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.51~8.46(m, 1H)、7.87~7.78(m, 1H)、7.64(d, 1H, $J=7.1$)、7.53~7.31(m, 5H)、7.28(d, 1H, $J=4.1$)、7.12(d, 1H, $J=8.1$)、6.58~6.53(m, 1H)、5.51(s, 2H); ESI-MS m/z 381 (MH^+).

【0102】

化合物26: (3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1-[(3,5-ジメチル-4-イソキサゾリル)メチル]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順F(4-クロロメチル-3,5-ジメチルイソキサゾールの置換)およびB(マイクロ波加熱)によって調製した。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.63(d, 1H, $J=9.1$)、7.46 (dt, 1H, $J=8.1, 2.0$)、7.28(d, 1H, $J=2.1$)、7.02(d, 1H, $J=2.0$)、6.88(dt, 1H, $J=8.0, 2.1$)、6.74~6.72(m, 1H)、6.72~6.70(m, 1H)、5.53(s, 2H)、2.50(s, 3H)、2.24(s, 3H); ESI-MS m/z 399 (MH^+).

【0103】

化合物27: (3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順AおよびBによって調製した。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.90~7.87(m, 1H)、7.83~7.79(m, 1H)、7.67(d, 1H, $J=8$)、7.46~7.40(m, 1H)、7.33(d, 1H, $J=2$)、7.08~7.05(m, 1H)、6.96~6.80(m, 5H); ESI-MS m/z 435 (MH^+).

【0104】

化合物28: (3Z)-1-(3,5-ジクロロフェニル)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順AおよびBによって調製した。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.93(d, 1H, $J=8.1$)、7.79(d, 1H, $J=6.0$)、7.72~7.68(m, 1H)、7.59~7.45(m, 1H)、7.46(d, 1H, $J=8.1$)、7.32(dt, 1H, $J=8.0, 2.1$)、7.23(d, 1H, $J=2.5$)、6.97(dd, 1H, $J=8.0, 2.1$)、6.92~6.87(m, 1H)、6.85~6.81(m, 1H); ESI-MS m/z 435 (MH^+).

【0105】

化合物29: (3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-6-メトキシ-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順HおよびBによって調製した。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.69~7.54(m, 1H)、7.53~7.38(m, 3H)、7.29(d, 1H, $J=2.0$)、7.17(d, 1H, $J=8.1$)、7.12(d, 1H, $J=8.0$)、6.84(d, 1H, $J=2.5$)、6.78(d, 1H, $J=8$)、6.6(dd, 2H, $J=8.0, 2.0$)、6.55(dd, 2H, $J=8.1, 2.5$); ESI-MS m/z (398 MH^+).

【0106】

化合物30: (3Z)-3-[(4-クロロ-3-メチルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順AおよびB(80°C)によって調製した。 ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.69~7.62(m, 2H)、7.49(s, 1H)、7.47(s, 1H)、7.41(dt, 1H, $J=7.1, 1.6$)、7.3(dd, 1H, $J=5.0, 1.6$)、7.05~6.97(m, 1H, 6.93~6.86(m, 1H)、6.77(m, 1H)、6.56(m, 1H)、2.53(s, 3H); ESI-MS m/z 353(MH^+).

【0107】

化合物31: (3Z)-3-(2-ナフチルイミノ)-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順AおよびB(80°C)によって調製した。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.15(d, 1H, $J=9.1$)、8.06~7.99(m, 1H)、7.89~7.80(m, 1H)、7.78~7.71(m, 1H)、7.71~7.47(m, 4H)、7.41~7.35(m, 1H)、7.33(d, 1H, $J=5.2$)、7.28(d, 1H, $J=6.8.1$)、7.00(d, 1H, $J=8.0$)、6.76(t, 1H, $J=7.8$)、6.67(d, 1H, $J=7.9$); ESI-MS m/z 355 (MH^+).

【0108】

化合物32: (3Z)-3-[(4-クロロフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン:手順AおよびB(80°C)によって調製した。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69~7.56(m, 2H)、7.54~7.48(m, 1H)、7.41(dt, 1H, $J=8, 2$)、7.32~7.28(m, 1H)、7.11~6.99(m, 3H)、6.89(dt, 1H, $J=8$)、6.77~6.73(m, 1H)、6.66~6.33(m, 1H); ESI-MS m/z 339 (MH^+)

10

20

30

40

50

【0109】

化合物33：(3Z)-3-[(4-ヨードフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.79~7.74(m, 2H)、7.53~7.48(m, 2H)、7.35(dt, 1H, J=8.0, 1.2)、7.29~7.24(m, 1H)、6.98(d, 1H, J=8.0)、6.89~6.75(m, 4H); ESI-MS m/z 431 (MH⁺).

【0110】

化合物34：(3Z)-3-[(4-メチルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.52~7.44(m, 2H)、7.35~7.22(m, 4H)、6.99~6.93(m, 3H)、6.87~6.78(m, 2H)、2.42(s, 3H); ESI-MS m/z 319 (MH⁺).

10

【0111】

化合物35：(3Z)-3-[(3,5-ジフルオロフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.54~7.16(m, 4H)、6.99(dt, 1H, J=8.2, 0.8)、6.89(dt, 1H, J=7.7, 1.1)、6.76(d, 1H, J=7.5)、6.71(tt, 1H, J=9.3, 2.3)、6.64~6.57(m, 2H); ESI-MS m/z 341 (MH⁺).

【0112】

化合物36：エチル3-{[(3Z)-2-オキソ-1-(3-チエニル)-1,2-ジヒドロ-3H-インドール-3-イルイデン]アミノ}ベンゾエート：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.96(d, 1H, J=7.4)、7.75~7.17(m, 6H)、6.98(d, 1H, J=8.0)、6.87~6.78(m, 2H)、6.63(d, 1H, J=7.8)、4.45~4.32(m, 2H)、1.43~1.33(m, 3H); ESI-MS m/z 377 (MH⁺).

20

【0113】

化合物37：(3Z)-3-[(6-クロロ-3-ピリジニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 8.21~6.81(m, 10H); ESI-MS m/z 340(MH⁺).

【0114】

化合物38：(3Z)-3-[(4-フェノキシフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.85~6.70(m, 16H); ESI-MS m/z 397(MH⁺).

30

【0115】

化合物39：(3Z)-3-[(4-ブロモフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびGによって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.82~6.55(m, 11H); ESI-MS m/z 383(MH⁺).

【0116】

化合物40：(3Z)-3-[(3-クロロフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびGによって調製した。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.55~6.50(m, 11H); ESI-MS m/z 339 (MH⁺).

【0117】

化合物41：(3Z)-3-[(3-メチルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.67~6.78(m, 11H)、2.39(s, 3H); ESI-MS m/z 319(MH⁺).

40

【0118】

化合物42：(3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(MeOH中1% HOAc)によって調製した。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.82~6.80(m, 10H); ESI-MS m/z 373 (MH⁺).

【0119】

化合物43：(3Z)-1-(2-ピリジニルメチル)-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 382(MH⁺).

50

【0120】

化合物44：(3Z)-3-[(3,5-ジクロロフェニル)イミノ]-1-(2-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 382 (MH^+)。

【0121】

化合物45：(3Z)-1-[(3,5-ジメチル-4-イソキサゾリル)メチル]-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 400 (MH^+)。

【0122】

化合物46：(3Z)-3-[(3,4-ジフルオロフェニル)イミノ]-1-(3-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順F(置換体のための3-ピコリルクロライド)およびBによって調製した。ESI-MS m/z 350 (MH^+)。

10

【0123】

化合物47：(3Z)-1-(3-ピリジニルメチル)-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 382 (MH^+)。

【0124】

化合物48：(3Z)-3-[(3,4-ジフルオロフェニル)イミノ]-1-(2-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 350 (MH^+)。

【0125】

化合物49：(3Z)-3-[(3,5-ジクロロフェニル)イミノ]-1-(3-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 384 (MH^+)。

20

【0126】

化合物50：(3Z)-3-[(3,5-ジクロロフェニル)イミノ]-1-[(3,5-ジメチル-4-イソキサゾリル)メチル]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 402 (MH^+)。

【0127】

化合物51：(3Z)-1-フェニル-3-(5-キノリニルイミノ)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Gによって調製した。 1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9.38~9.32(m, 1H)、8.55~8.50(m, 1H)、8.01~6.62(m, 12H)、6.43~6.35(m, 1H)；ESI-MS m/z 350 (MH^+)。

【0128】

化合物52：(3Z)-3-[(4-イオドフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順B(0.1% HOAc, 80°C, 92時間, 4 当量 RNH_2 , 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 425 (MH^+)。

30

【0129】

化合物53：(3Z)-3-[(3,4-ジフルオロフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順B(0.1% HOAc, 80°C, 92時間, 4 当量 RNH_2 , 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 335 (MH^+)。

【0130】

化合物54：(3Z)-3-[(2-クロロ-4-メチルフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順B(0.1% HOAc, 80°C, 92時間, 4 当量 RNH_2 , 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 347 (^{35}Cl を用いた MH^+)、349(^{37}Cl を用いた MH^+)。

40

【0131】

化合物55：(3Z)-3-[(2,4-ジメトキシフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順B(0.1% HOAc, 80°C, 92時間, 4 当量 RNH_2 , 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 359 (MH^+)。

【0132】

化合物56：3-{[(3Z)-2-オキソ-1-フェニル-1,2-ジヒドロ-3H-インドール-3-イリデン]アミノ}ベンゾニトリル：手順B(0.1% HOAc, 80°C, 92時間, 4 当量 RNH_2 , 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 324 (MH^+)。

【0133】

50

化合物57：(3Z)-3-{[2-メチル-5-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順B(0.1% HOAc, 80℃, 92時間, 4 当量 RNH₂, 3 Å 分子ふるい)によって調製した。ESI-MS m/z 381 (MH⁺) .

【0134】

化合物58：(3Z)-3-[(4-クロロ-3-メチルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(80℃)によって調製した。ESI-MS m/z 353(MH⁺) .

【0135】

化合物59：(3Z)-3-(6-キノリニルイミノ)-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(80℃)によって調製した。ESI-MS m/z 356 (MH⁺) .

10

【0136】

化合物60：(3Z)-3-[(4-クロロフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(80℃)によって調製した。ESI-MS m/z 339(MH⁺) .

【0137】

化合物61：(3Z)-3-[(3-イソプロピルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(80℃)によって調製した。ESI-MS m/z 347(MH⁺) .

【0138】

化合物62：(3Z)-3-[(4-シクロヘキシルフェニル)イミノ]-1-(3-チエニル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順AおよびB(80℃)によって調製した。ESI-MS m/z 387(MH⁺) .

20

【0139】

化合物63：(3Z)-3-(1,3-ベンゾチアゾール-6-イルイミノ)-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Gによって調製した。ESI-MS m/z 356(MH⁺) .

【0140】

化合物64：(3Z)-3-(1H-インダゾール-6-イルイミノ)-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Gによって調製した。ESI-MS m/z 339(MH⁺) .

【0141】

化合物65：(3Z)-3-[(3-クロロフェニル)イミノ]-6-メトキシ-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順HおよびGによって調製した。ESI-MS m/z 363 (MH⁺) .

【0142】

30

化合物66：(3Z)-6-メトキシ-1-フェニル-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順HおよびGによって調製した。ESI-MS m/z 397 (MH⁺) .

【0143】

化合物67：(3Z)-3-[(3-ブromoフェニル)イミノ]-1-フェニル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順Bによって調製した。ESI-MS m/z 378(MH⁺) .

【0144】

化合物68：(3Z)-1,5-ジフェニル-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順C、D、およびEによって調製した。ESI-MS m/z 443 (MH⁺) .

40

【0145】

化合物69：(3Z)-1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-{[3-(トリフルオロメチル)フェニル]イミノ}-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順G(6当量のアニリン)およびDによって調製した。ESI-MS m/z 383(MH⁺) .

【0146】

化合物70：(3Z)-3-[(3,4-ジクロロフェニル)イミノ]-1-(3-ピリジニルメチル)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン：手順G(75℃, 2時間)によって調製した。ESI-MS m/z 383 (MH⁺) .

【0147】

上記の化合物1~70は本発明の方法で使用され得るインドロン化合物を単に例示する。

50

さらなるインドロン化合物はスキーム1～5に示される方法および当該分野で一般的に公知の手順を使用して得られ得る。

【0148】

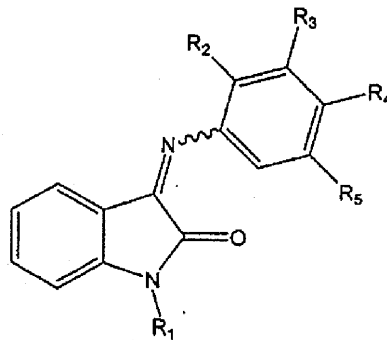
インドロン誘導体を得るために上記の合成方法でアミノ、アミド、カルボン酸、およびヒドロキシル基などの置換基の保護および脱保護戦略を組み込むことは必要であり得る。かかる基の保護および脱保護の方法は、当該技術分野で周知であり、例えばGreen, T. W. および Wuts, P. G. M. (1991) Protection Groups in Organic Synthesis, 第2版 John Wiley & Sons, New Yorkに見られ得る。

【0149】

化合物1～70の構造は表1および1aに示される。

【表1-1A】

表1. 化合物の化学構造



	置換基				
化合物	R1	R2	R3	R4	R5

10

20

30

【表 1 - 1 B】

化合物	置換基				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	Ph	OMe	H	H	H
2	Ph	H	CF ₃	H	H
3	Ph	H	Me	H	H
4	Ph	H	Cl	H	H
5	Ph	H	H	CF ₃	H
6	Ph	H	H	Me	H
7	Ph	H	H	Cl	H
8	Ph	H	H	Br	H
9	Ph	H	H	F	H
10	Ph	H	H	OPh	H
11	Ph	H	H	OEt	H
12	Ph	H	H	OMe	H
13	Ph	H	Cl	H	Cl
14	Ph	H	Me	H	Me
15	アリル	H	Cl	Cl	H
16	アリル	H	Cl	H	Cl
17	イソプロピル	H	H	Br	H

用語:

Ph = フェニル

OMe = メトキシ

OEt = エトキシ

Me = メチル

OPh = フェノキシ

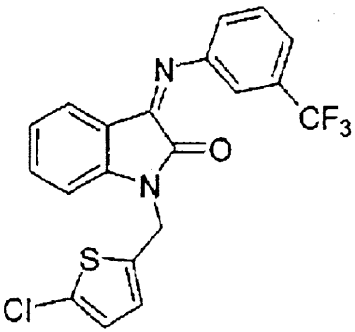
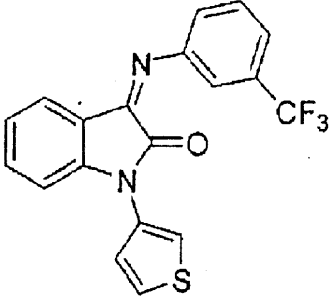
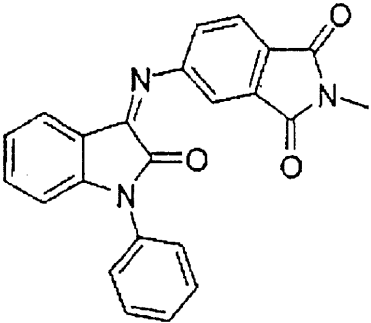
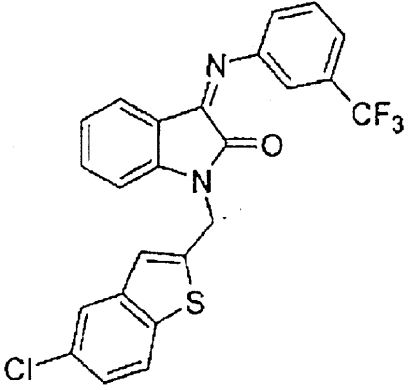
10

20

30

【表 1 - 2】

表 1a. 化合物の化学構造

化 合 物	構 造
18	
19	
20	
21	

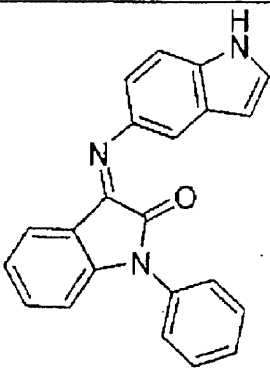
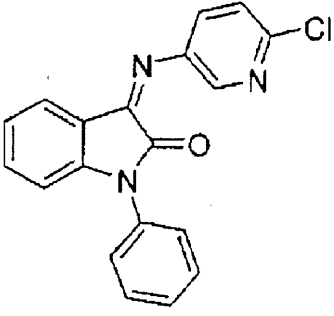
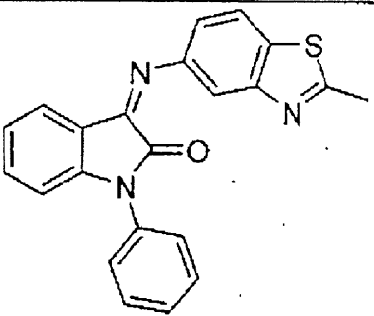
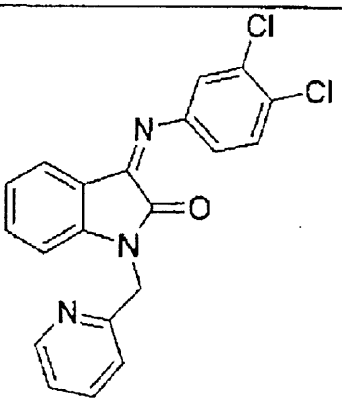
10

20

30

40

【表 1 - 3】

化 合 物	構 造
22	
23	
24	
25	

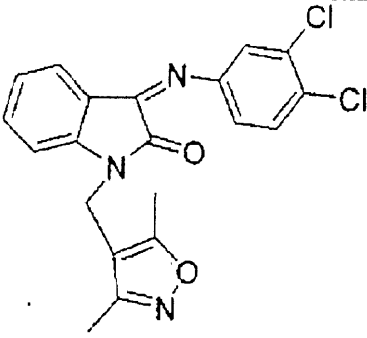
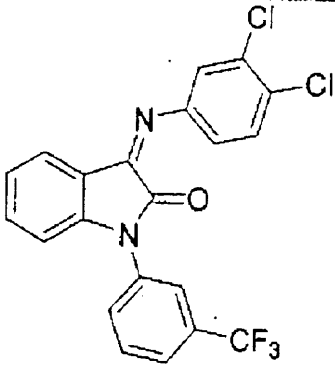
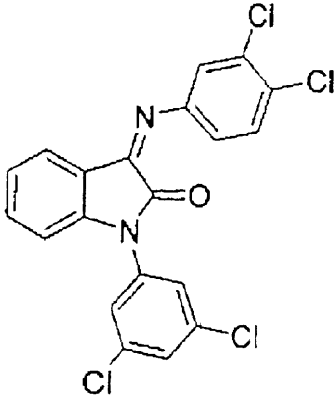
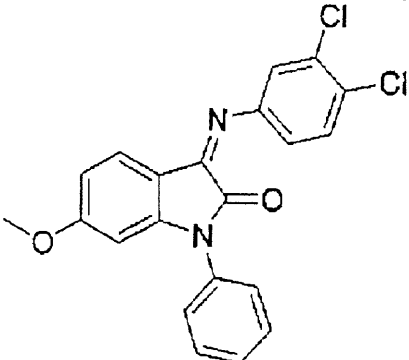
10

20

30

40

【表 1 - 4】

化 合 物	構 造
26	
27	
28	
29	

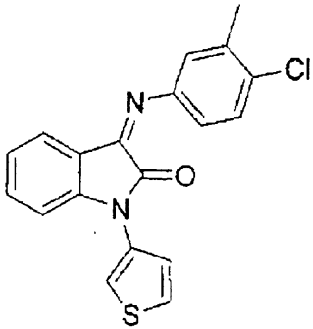
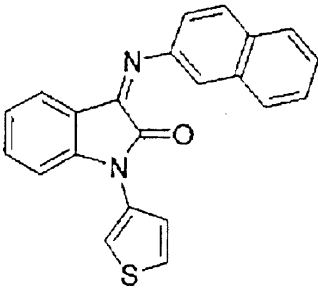
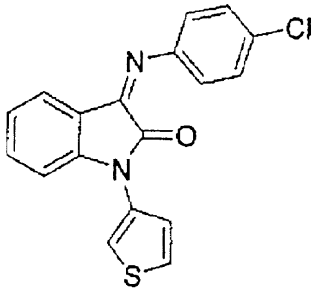
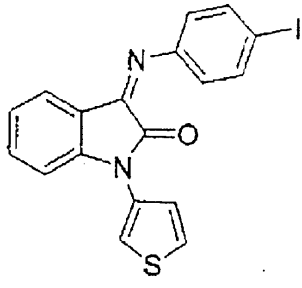
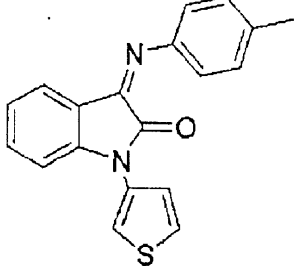
10

20

30

40

【表 1 - 5】

化 合 物	構 造
30	
31	
32	
33	
34	

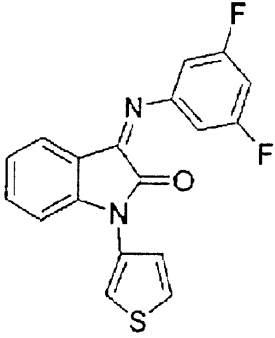
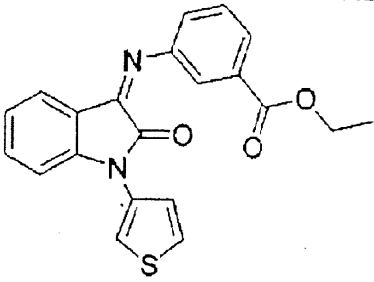
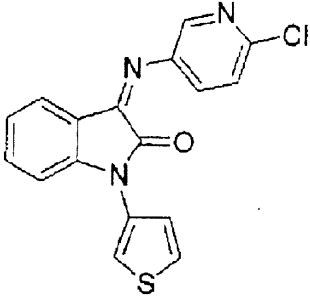
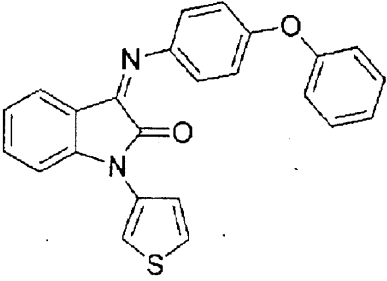
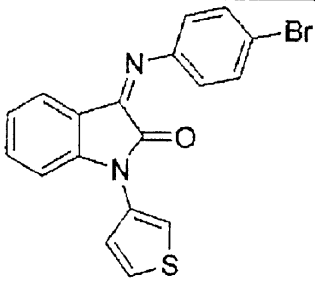
10

20

30

40

【表 1 - 6】

化 合 物	構 造
35	
36	
37	
38	
39	

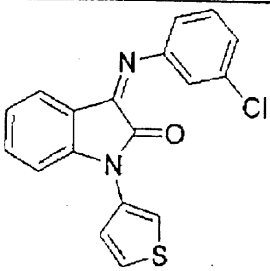
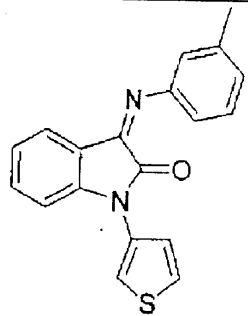
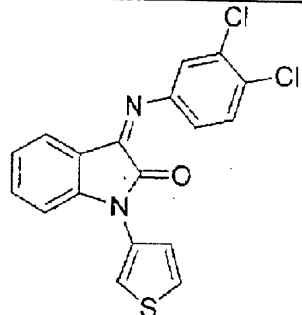
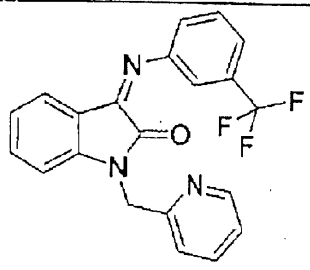
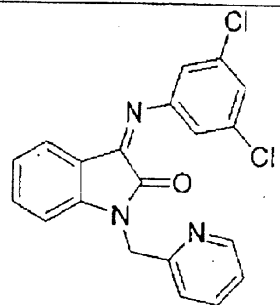
10

20

30

40

【表 1 - 7】

化 合 物	構 造
40	
41	
42	
43	
44	

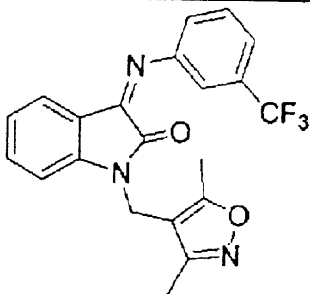
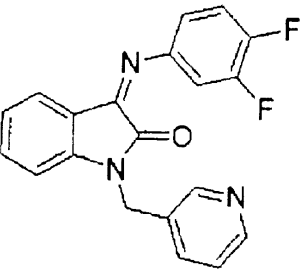
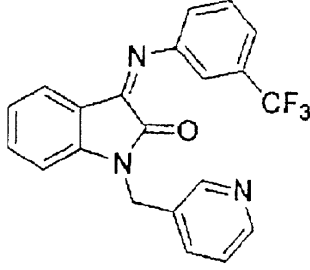
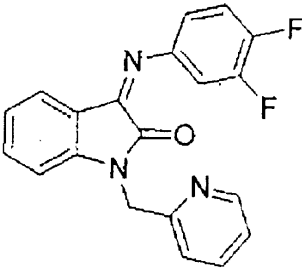
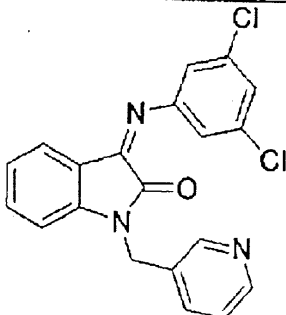
10

20

30

40

【表 1 - 8】

化 合 物	構 造
45	
46	
47	
48	
49	

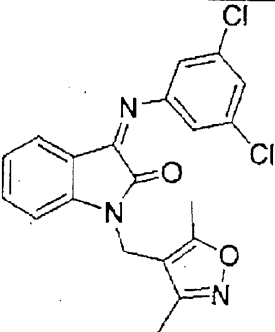
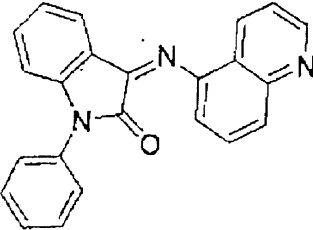
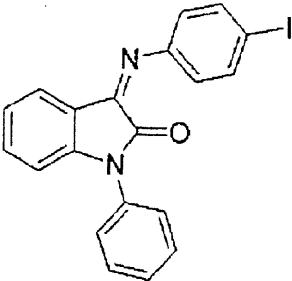
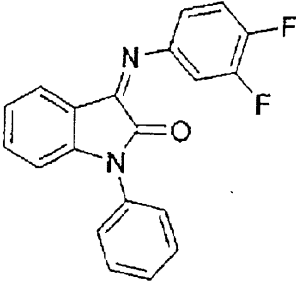
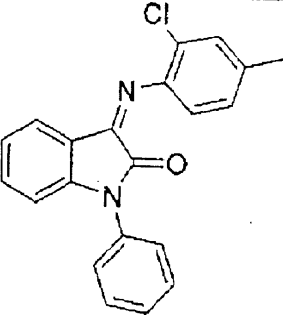
10

20

30

40

【表 1 - 9】

化 合 物	構 造
50	
51	
52	
53	
54	

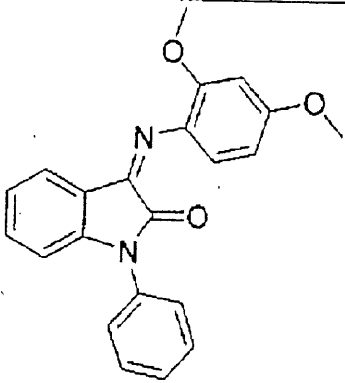
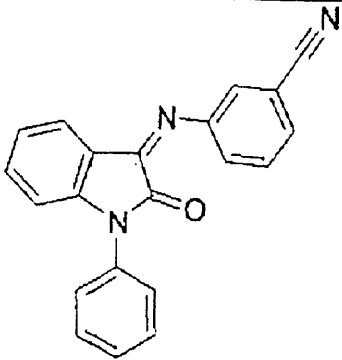
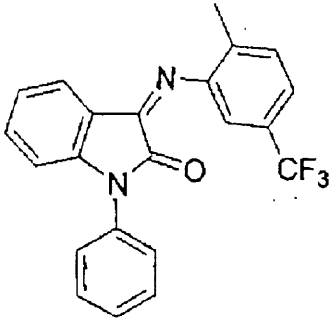
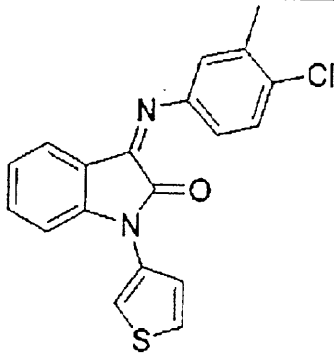
10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

化 合 物	構 造
55	
56	
57	
58	

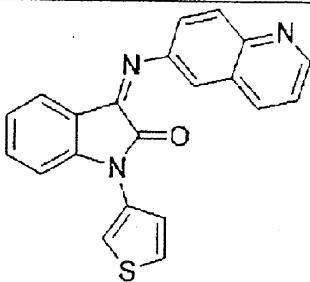
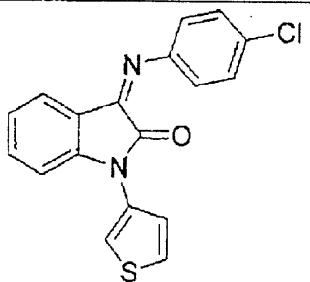
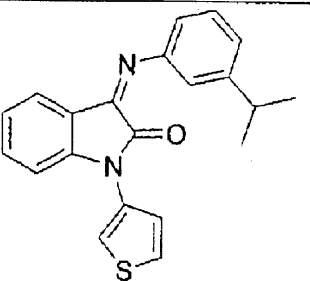
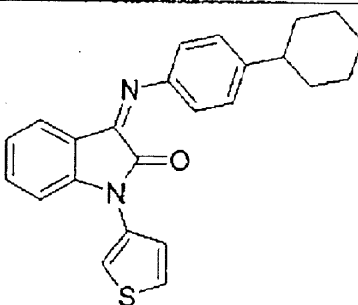
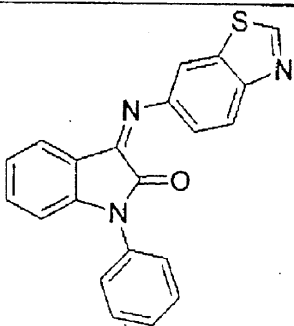
10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

化合物	構造
59	
60	
61	
62	
63	

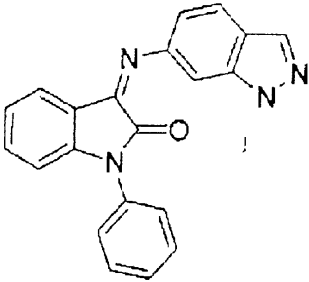
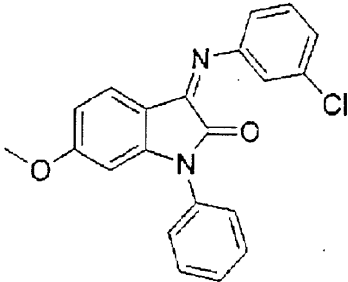
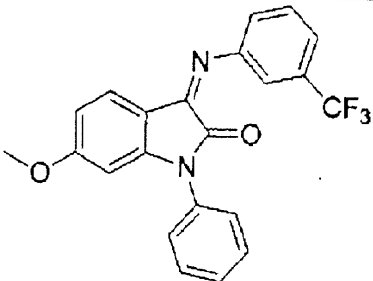
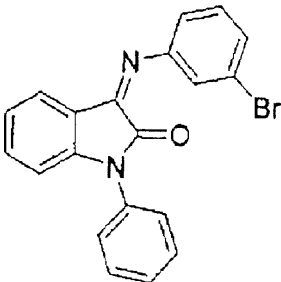
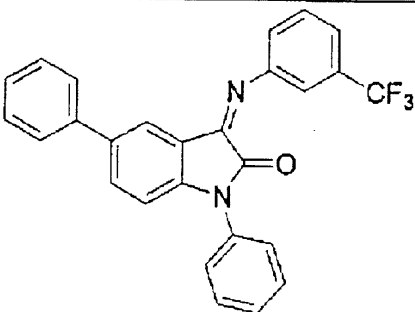
10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

化 合 物	構 造
64	
65	
66	
67	
68	

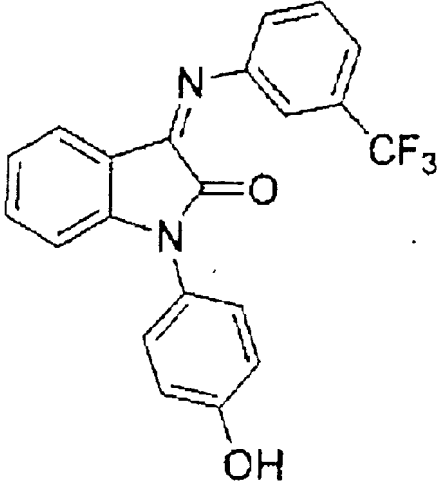
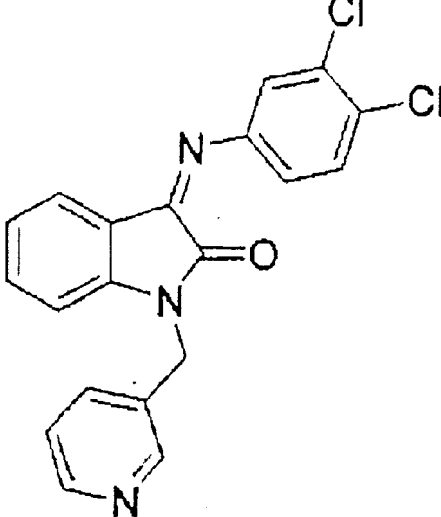
10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

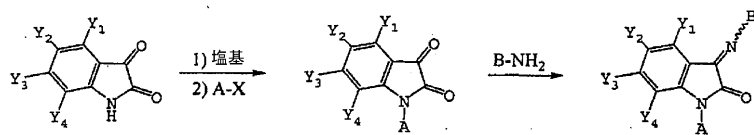
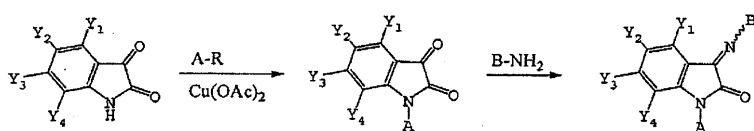
化 合 物	構 造
69	 <chem>Oc1ccc(N2C(=O)c3ccccc3N2=Nc4ccc(C(F)(F)F)cc4)cc1</chem>
70	 <chem>Clc1cc(Cl)ccc1=N2C(=O)c3ccccc3N2CNc4ccccn4</chem>

10

20

30

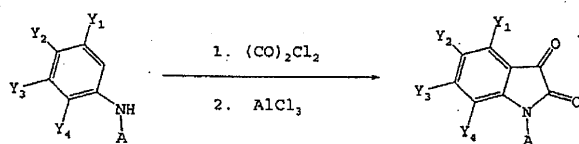
【化 2 1】

スキーム 1^aスキーム 2^a

^aY₁, Y₂, Y₃, Y₄, A および B は明細書に記載される通りに定義される。

Xは Cl, Br, I, または OT などの脱離基である。

R はホウ酸またはジアルキルホウ酸基である。

スキーム 3^a: イサチンの合成

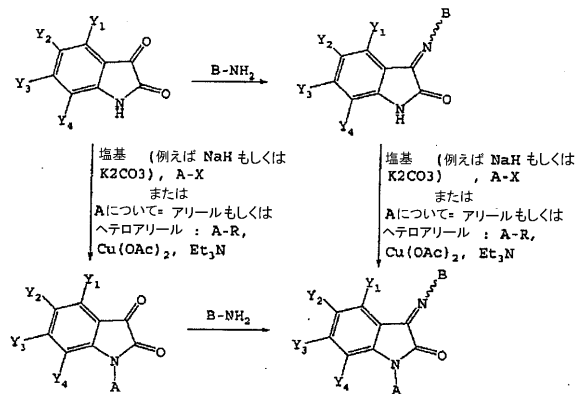
^aY₁, Y₂, Y₃, Y₄ および A は明細書に記載される通りに定義される。

10

20

30

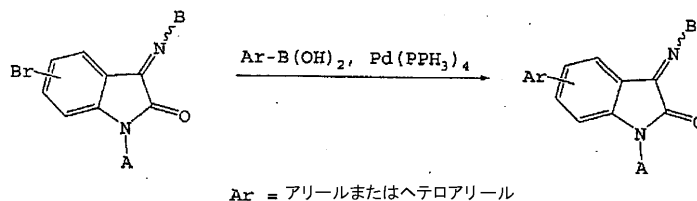
【化 2 2】

スキーム 4^a. 置換イミノインドロンの合成

^a Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , A , および B は明細書に記載される通りに定義される。

X は Cl , Br , I , または OT などの脱離基である。

R はホウ酸またはジアルキルホウ酸基である。

スキーム 5^a. アリールまたはヘテロアリール置換イミノインドロンの合成

^a A および B は明細書に記載される通りに定義される。

【0150】

医薬組成物およびキット

本発明の化合物の経口組成物の具体的な態様として、本明細書に記載される化合物の1つの100mgが、十分に微細なラクトースと配合され、全量580~590mgとし、サイズ0の硬式ゲルカプセルに充填される。

【0151】

ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物は、任意の公知の手段によって投与され得る。例えば、化合物は、カプセル、坐薬、クリーム、吸入物、または経皮パッチとして処方され得る。経口投与に適切な組成物としては、丸薬、カプセル、顆粒、錠剤、および粉末のような固体形態、ならびに溶液、シロップ、エリキシル、および懸濁液のような液体形態が挙げられる。非経口投与に有用な形態としては、滅菌の溶液、エマルジョン、および懸濁液が挙げられる。

【0152】

投与される最適用量は、当業者によって決定され得、使用される特定の化合物、調製物の強度、投与の様式、および疾患状態の進行で変化する。治療される特定の被験体に依存するさらなる因子により、被験体年齢、体重、性別、食事、および投与時間などの用量を調節することが必要である。被験体において、適用「治療有効量」は、化合物が有効である疾患を患う被験体に投与される場合に疾患の減少、軽減または後退を生じる化合物の任意の量である。本発明において、「被験体」は、脊椎動物、哺乳動物、またはヒトである。

【0153】

本発明の方法で使用される物質は、周知の手順に従って作製したキットの調製に最適である。キットは容器を含み得、それぞれは方法に使用される1つ以上の種々の化合物を有する。

【実施例】

【0154】

実施例1：神経突起伸長アッセイ

凍結保存したマウス海馬神経を、ポリ-L-リジン-コート96ウェルプレート(BD BioCoat)に、Neurobasal/B27培地(Invitrogen)のウェル当たり35,000細胞で播種した。24時間後に、神経を様々な濃度のHT-2157で処理し、次に処理48時間後に固定した。

【0155】

PC12サブクローンNeuroscreen-1(NS-1)細胞を、I型コラーゲンコート96ウェルプレート(BD BioCoat)に200ng/mL NGFを有するRPMI完全培地のウェル当たり5,000細胞で播種した。48時間後に、NS-1細胞を様々な濃度のHT-2157で処理し、次に処理24時間後に固定した。

【0156】

固定に続いて、Cellomicsの神経突起伸長試薬キットを用いて、神経特異的一次抗体で細胞を標識した。細胞核をヘキスト33342で標識した。蛍光標識細胞を、次に画像化し、ArrayScan HCSリーダー上でCellomicsの神経突起伸長および拡張神経突起伸長バイオアプリケーションを用いて解析した。定量HCS解析の画像を、10Xまたは20X顕微鏡対物レンズを用いてArrayScan HCSリーダー上で獲得した。

【0157】

定量的リアルタイムPCR(qPCR)

NS-1細胞を、I型コラーゲンコート6ウェルプレート(BD BioCoat)に、ウェル当たり150,000細胞で播種した。200ng/mLのNGF処理48時間後に、NS-1細胞を、示される濃度のHT-2157で2時間、4時間または24時間目に処理し、続いてAmbionのRNAqueous-4PCRキットを用いてRNAを単離した。逆転写反応をTaqman逆転写試薬(Applied Biosystem)で実施した。qPCRを光学96ウェル反応プレート(Applied Biosystem)を用いた7900リアルタイムPCR機器で実施した。発現レベルをマウスのTBP転写レベルに対して標準化した。

【0158】

結果

HT-2157処理NS-1細胞において、神経突起は、用量依存的な様式で、その数、長さおよび分岐点が増加したことを示した。図1Aは、ArrayScan HCSリーダー上で10X対物レンズによって獲得されたNS-1細胞の画像を示す。上部画像は生画像であり、下部画像は拡張神経突起伸長バイオアプリケーションによって同定された種々の特徴を示す色オーバーレイを有する同じ視野である。色オーバーレイ画像において、細胞核は青で標識され、細胞体は赤で標識され、神経突起は緑で標識され、分岐点はマゼンダで標識される。却下された細胞はオレンジで標識される。図1B~1Eは拡張神経突起伸長バイオアプリケーションによるNS-1細胞画像の定量的解析から生じた4つの出力特徴のプロットを示す。プロットデータは、化合物の濃度当たり2ウェルの各特徴の平均値±標準偏差である。出力特徴の定義は、以下：神経突起の数：選択された神経に関連する神経突起の数；神経突起の全長；選択された神経の神経突起の全長；神経突起の平均長；選択された神経の神経突起の数で割った神経突起の全長；および分岐点：3つの神経突起セグメントの結合部分の通りである。神経突起はその長さ、数および分岐点で増加することがわかる。

【0159】

また、HT-2157による神経突起伸長の同様な促進が、凍結保存されたマウス海馬神経で観察された。図3Aは、ArrayScan HCSリーダー上で20X対物レンズで獲得された凍結保存マウスの海馬神経の画像を示す。上部画像は生画像であり、下部画像は神経突起伸長バイオアプリケーションによって同定された神経突起をトレースする緑色オーバーレイを有する同じ視野である。図3Bは、マウス海馬神経の画像の神経突起伸長バイオアプリケーションによって解析された神経突起の平均長を示す。プロットデータは化合物の濃度当たり2ウ

10

20

30

40

50

ェルの平均値±標準偏差である。

【0160】

HT-2157処理によって凍結保存されたマウス海馬神経の神経突起長が有意に増大された。まとめると、HT-2157によってNS-1細胞および一次マウス海馬神経の神経突起伸長の促進がこの研究で示された。

【0161】

また、結果は、HT-2157によって、神経分化をネガティブに制御するHes5転写リプレッサーを介して神経突起伸長を調節する役割が示されたことを示す。Hes5発現は、NS-1細胞における2時間および4時間目のHT-2157処理によって下方制御された。HT-2157で処理されたNS-1細胞を、神経分化をネガティブに制御するHes5転写リプレッサーについて定量的リアルタイムPCR解析に供した。Hes5は、時間および用量依存的様式で、HT-2157処理によって下方制御され、HT-2157による神経突起伸長の促進は神経分化進行の制御によって媒介されることが示唆される。

【0162】

図2はNS-1細胞のHT-2157処理によるHes5発現に対する効果についてのqPCR解析を示す。プロットデータは2つのウェルにおける細胞の相対RNAレベルの平均値±標準偏差である。

【0163】

実施例2－神経突起伸長アッセイ
神経細胞培養

C57Bl/6またはCD1マウス胚性(E17.5)海馬神経をQBM Cell Science(University of Ottawa, Ontario, Canada)から購入した。神経を、ポリ-D-リジンコート96または24ウェルプレート上の2%B27、500 μ M L-グルタミンおよび1mMピルビン酸を添加した血清無しNeurobasal培地で培養した。細胞を(神経突起伸長アッセイのための)96ウェルプレート上にウェル当たり20,000の密度、および(qPCR解析のための)48ウェルプレート上にウェル当たり100,000で播種した。神経突起伸長アッセイについて、神経は2日間培養され、次に24時間刺激された。遺伝子発現アッセイについて、神経は8日間成長させ、次にHT-2157またはビヒクルで刺激された。

【0164】

NS1細胞培養

Neuroscreen1(NS1)細胞(Cellomics Inc.)を、5%CO₂の37℃の加湿インキュベーター中のI型コラーゲンコート75cm²プラスチックフラスコ(Biocoat, Becton Dickinson)上で培養した。細胞を、10%加熱不活性化ウマ血清(Invitrogen)、5%加熱不活性化ウシ胎児血清(Cellgro)および2mM L-グルタミン(Cambrex)を添加したRPMI完全細胞培養培地(Cambrex)中で培養した。拡大について、細胞をトリプシン処理し、80%コンフルエントで分けた。細胞培養培地を2~3日ごとに交換した。

【0165】

NS1細胞を、神経表現型への分化を誘導するために神経成長因子で刺激した。NS1細胞を、継代されているほど回収し、次にCoulter counter(Becton Dickinson Coulter Z1)を用いて計算した。細胞を、96ウェルI型コラーゲンコートプレートに200 μ lの容積のウェル当たり2000細胞の密度で播種した。RPMI培地に、200ng/ml神経成長因子(NGF β , Sigma)を添加した。NS1細胞を72時間インキュベートして神経表現型に分化させた。NGF β を次に50 ng/mlに希釈し、細胞をそれぞれsiRNAまたはHT-2157で処理した。

【0166】

神経突起伸長アッセイ

神経突起伸長アッセイを、Cellomics Arrayscan II Vti HCS スキャナーを用いて実施した。細胞を、製造者の説明書に従って、HitKitTMHCS 試薬キット(Cellomics)を用いて染色した。アッセイは、神経突起および神経細胞体の両方を特異的に標識するように確立された抗体を用いた免疫蛍光に基づいた。要するに、細胞を3.7%ホルムアルデヒドで固定し、ヘキスト色素で核を染色した。次に細胞を神経突起成長バッファで洗浄し、神経突起を、神経突起伸長高含有量スクリーニング用Cellomics専売の一次抗体で染色した。一次

抗体で1時間インキュベーションした後、細胞を、再度洗浄し、次に1時間蛍光標識二次抗体溶液とインキュベートした。抗体染色96ウェルプレートのスキャンニングするまで暗所の4°Cで保存した。プレートをCellomics ArrayScan II Vti HCS スキャナーを用いてスキャンした。神経突起伸長アッセイは2つのチャンネルを使用してスキャンを実施する。チャンネル1はヘキスト色素を検出し、細胞の同定および自動化フォーカスのためのソフトウェアによって用いられる。チャンネル2は二次抗体のFITC蛍光を検出し、神経突起を参照して生じる全てのデータを計算するソフトウェアによって用いられる。

【0167】

図7はNS1細胞の神経突起伸長に対するHT-2157の効果を示す。各実験について、最小100細胞の神経突起伸長を測定した。NS1細胞の神経突起に対するHT-2157の効果を定量する。3 μ Mおよび10 μ M HT-2157は、i)細胞当たりの神経突起の数(神経突起数)、ii)細胞当たりの神経突起の全長、iii)細胞当たりの神経突起の平均長、iv)細胞当たりの神経突起点の数の増加によって示されるように神経突起伸長を促進する。

【0168】

qPCR解析

RNAを、HT-2157処置後の指示された時点での培養神経から単離した。ウェル当たり、1つのRNA調製物を、製造業者の説明書に従ってQIAGEN RNeasy kit(Qiagen)を用いて実施した。cDNAを、TaqMan逆転写酵素キット(Applied Biosystems)を用いて生じた。RNA/cDNA複製当たり2リアルタイムPCR反応を、ABI prismおよびSDS 2.1ソフトウェアを用いて実施した。必要に応じてABIアッセイ(Applied Biosystems)を用いて、BDNF、NGF β 、およびHes5のmRNAレベルを試験した。各cDNA試料の平均CT値を決定した。次にデータをTATA結合タンパク質(TBP)に標準化し、 Δ CT値を決定した。mRNAレベルをビヒクル(0.2%DMSO)処理対照群に対して標準化した。

【0169】

図4は、Neuroscreen 1(NS1)細胞のGalR3発現に対するHT-2157の効果を示す。NS1細胞はGalR3レセプターを発現する。GalR3の発現は、NS1細胞のHT-2157処理による影響を受けなかった。

【0170】

図5は、NS1細胞のHes5の発現の対するHT-2157処理の効果を示す。NS1細胞を2時間、4時間、または24時間でビヒクル(Veh)またはHT-2157で処理した。ビヒクル処理対照と比べて、3または10 μ M HT-2157での処理後、Hes5のmRNAレベルは2時間および4時間で減少した。Hes5 mRNAは、処理24時間後にベースラインレベルに戻った。

【0171】

図8は、培養マウス海馬神経におけるニューロトロフィン脳由来神経栄養因子(BDNF)および神経成長因子 β (NGFb)のmRNA発現、ならびにHes5の発現に対するHT-2157の効果を示す。2つの実験複製の平均 $\pm$ 標準偏差を示す。図8AはBDNF発現に対するHT-2157の効果を示す。海馬神経をビヒクルまたは10 μ M HT-2157で処理し、BDNF mRNAレベルをqPCR解析で決定した。HT-2157は、培養神経のBDNF mRNAレベルを有意に増大した。図8BはNGF β 発現に対するHT-2157の効果を示す。海馬神経をビヒクルまたは10 μ M HT-2157で処理し、NGF β mRNAレベルをqPCR解析で決定した。HT-2157は、培養神経のNGF β mRNAレベルを有意に増大した。図8Cは、Hes5発現に対するHT-2157の効果を示す。海馬神経をビヒクルまたは10 μ M HT-2157で処理し、Hes5 mRNAレベルをqPCR解析で決定した。HT-2157はNS1細胞の効果と同様に、培養神経のHes5 mRNA レベルを有意に低減した(図5参照)。これらの結果は、HT-2157が海馬神経に対して栄養効果があることを示す。BDNFおよびNGF β は、神経生存およびシナプス成長に関わっている。さらに、HT-2157は海馬神経およびNS1細胞の両方でHes5を阻害する。

【0172】

図9は培養マウス海馬神経の神経突起伸長に対するNGF β の効果を示す。8つの実験複製の平均 $\pm$ 標準偏差を示す。各実験について、最小100細胞の神経突起伸長を測定した。海馬神経を100ng/ml NGFbで24時間処理し、神経突起伸長をCellomics Arrayscan IIで測定

した。NGF β は細胞当たりの神経突起の増加、神経突起長の増加、および分岐点の増加によって明白なように神経突起伸長を促進する。

【0173】

図10は培養海馬神経の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量である。薬物用量当たり8の実験複製(96ウェル)およびビヒクル当たり16の複製の平均±標準偏差を示す。各実験について、最小100細胞の神経突起伸長を測定した。図10Aは細胞当たりの神経突起数に対する効果を調べた場合の海馬神経の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。図10Bは、細胞当たりの神経突起の全長に対する効果を決定した場合の海馬神経の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。図10Cは細胞当たりの神経突起分岐点に対する効果を決定した場合の海馬神経の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量を示す。

10

【0174】

Hes5のsiRNAノックダウン

NS1細胞を、NGF β を用いて神経表現型に発生するように72時間刺激し、次に100nMのsiGENOME siRNAおよびDharmafect3を用いてトランスフェクトした。本発明者らは、Hes5に対するsiGENOME siRNAのプールおよび専売非標的対照siRNA(Dharmacon, Lafayette, USA)を使用した。細胞を、48時間siRNAまたはDharmafect3のみ(ビヒクル)とインキュベートし、次に上記のように神経突起伸長アッセイのために染色した。

【0175】

図6はNS1細胞の神経突起伸長に対するsiRNAによるHes5ノックダウンの効果を示す。図6aは、非処置NS1細胞、およびビヒクル、対照siRNA、Hes5 siRNAで処理したNS1細胞の神経突起長を示す。Hes5 siRNAで処理されたNS1細胞は、ビヒクルまたは対照siRNA処理NS1細胞よりも有意に長い神経突起を有した。

20

【0176】

図6bは非処理NS1細胞、ビヒクル、対照siRNA、Hes5 siRNAで処理したNS1細胞の神経突起分岐点を示す。Hes5 siRNAで処置されたNS1細胞は、ビヒクルまたは対照siRNA処理NS1細胞よりも有意に多くの神経突起分岐点を有した。Hes5対対照siRNAについて $p < 0.001$ 。

【0177】

これは、Hes5の阻害がNS1細胞の神経突起伸長を促進するのに十分であることを示す。Hes5の阻害によって神経突起長および神経突起当たりの分岐点の数が増大される。HT-2157は、NS1細胞のHes5を低減させるので、神経突起伸長を促進し得る。

30

【0178】

ウエスタンブロッティング

培養NS1細胞を、プロテインアーゼインヒビター(Roche)を含むRIPAバッファ(Upstate Biotechnology)中でホモゲナイズした。タンパク質濃度をBiorad DC タンパク質アッセイキット(Biarad)を用いて決定した。20 μ gのタンパク質溶解物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、ナイロン膜にブロットした。ウエスタンブロットは0.05% Tween 20を含むTris緩衝生理食塩水(TBS-T)中の5%非脂肪乾燥ミルクでブロッキングし、一次抗体を4°Cで一晩適用した。ブロットは二次抗体と結合したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を用いて室温で1時間ブローブし、SuperSignal (登録商標) West Pico 化学発光基質(Pierce)を用いて発色した。本発明者らは、GalR3に対するポリクローナル抗体(Alpha Diagnostics)を使用した。ブロットを、 β -アクチン(Sigma)に対して標準化した。

40

【0179】

統計解析

いくつかの実験複製(48ウェルまたは96ウェル)の平均および標準偏差を決定した。データをスチューデント t-検定または一方向ANOVAによって解析した。特に記載のない限り、グラフに示される値は、平均±SDを表す。

【0180】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許また

50

は特許出願のそれぞれが参照によって具体的および個々に援用されるのと同じ程度で、参照によって本明細書に援用される。

【0181】

本発明は好ましい態様を参照して具体的に示され、記載されるが、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく形態および詳細の様々な変更が行われ得ることが当業者に理解されよう。

【0182】

本発明の態様として、以下のものが挙げられる。

〔1〕動物へのガラニン-3レセプターアンタゴニストの投与によって、動物の神経突起伸長を調節する方法。

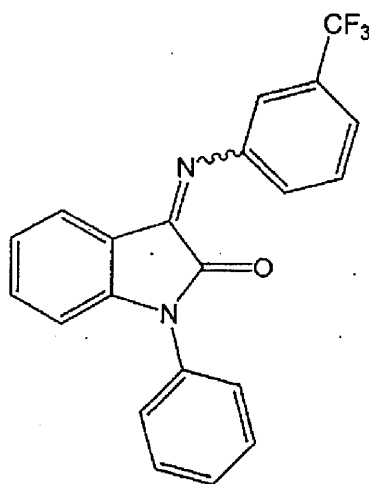
〔2〕前記動物がヒトである、〔1〕記載の方法。

〔3〕前記動物が神経変性疾患または状態を有する、〔2〕記載の方法。

〔4〕前記動物が神経幹細胞操作を有する、〔2〕記載の方法。

〔5〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストインヒビターが、HT-2157

【化23-1】



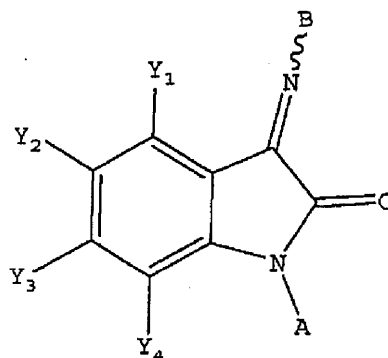
、そのE/Z異性体または混合物である、〔1〕記載の方法。

〔6〕前記ガラニン-3レセプターアンタゴニストが一回投与される、〔1〕記載の方法。

〔7〕前記ガラニン-3レセプターアンタゴニストがある期間にわたって繰り返し投与される、〔1〕記載の方法。

〔8〕ガラニン-3レセプターアンタゴニストが構造：

【化23-2】



(式中、Y₁、Y₂、Y₃およびY₄のそれぞれは独立して-H；直鎖もしくは分岐C₁～C₇アルキル

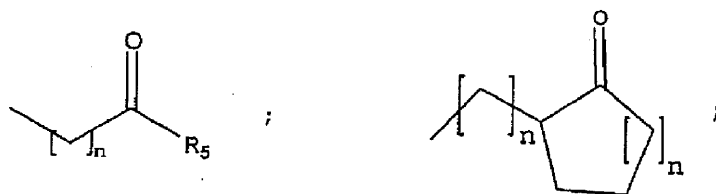
、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、または-I；-NO₂；-N₃；-CN；-OR₄、-SR₄、-OCOR₄、-COR₄、-NCOR₄、-N(R₄)₂、-CON(R₄)₂、または-COOR₄；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接する炭素原子上に存在するY₁、Y₂、Y₃およびY₄のいずれか2つはメチレンジオキシ基を構成し得る；

R₄はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

AはA'、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1 \sim C_6$)アルキルまたはヘテロアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

A'は

【化 2 3 - 3】

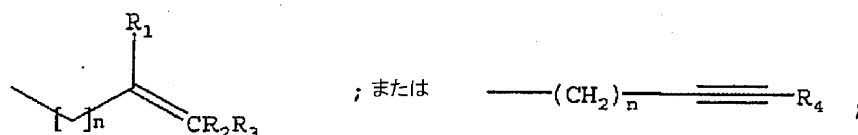


20

である；

R₁およびR₂はそれぞれ独立して-H、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、または-CN；

【化 2 3 - 4】



30

である；

R₃は-H、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、-OR₆、アリールまたはヘテロアリールである；

R₅は直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、-N(R₄)₂、-OR₆またはアリールである；

R₆は直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキルまたはアリールである；

Bはアリール、またはヘテロアリールである；ただしBがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対する炭素原子またはオルト炭素原子は以下の-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上でのみ置換され得る；

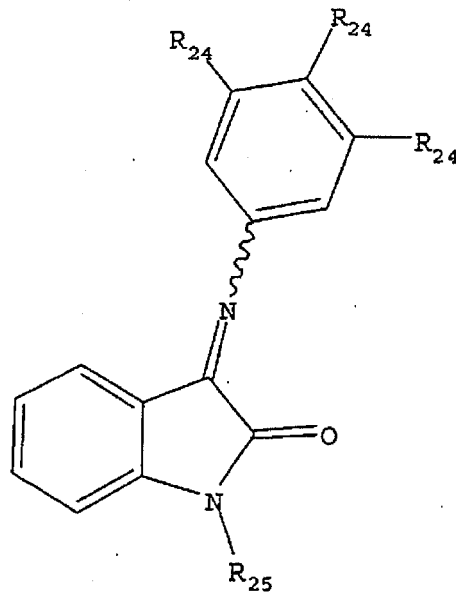
nはそれぞれ独立して1～4までの整数である)

40

を有し、該化合物は純粋Zイミン異性体、純粋Eイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、[1]記載の方法。

[9] ガラニン-3レセプターアンタゴニストが構造：

【化 2 3 - 5】



10

20

30

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して以下のH、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

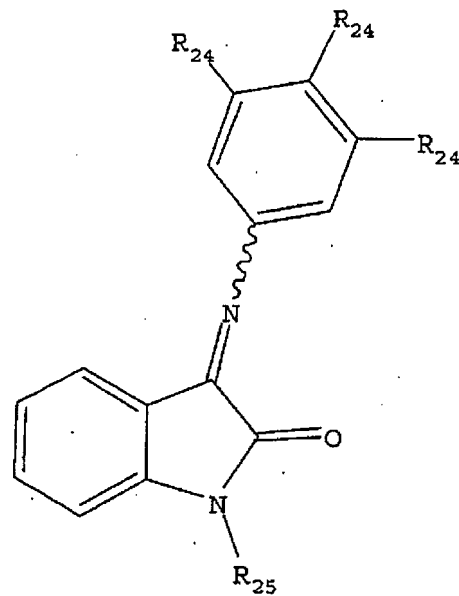
R_{25} はメチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する、[1]記載の方法。

[10] ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物が構造：

【化 2 3 - 6】



10

20

30

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して以下のH、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} はメチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

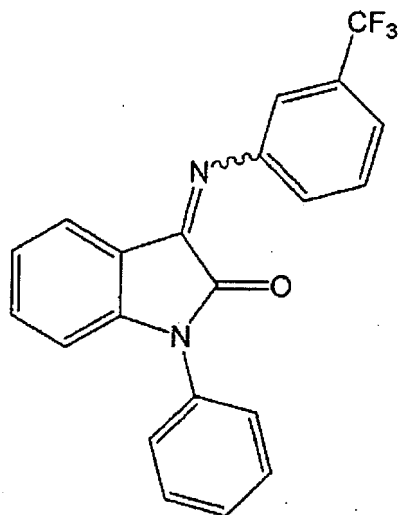
を有する、[1]記載の方法。

[11] ガラニン-3レセプターアンタゴニストを被験体に投与する工程を含む、神経細胞損傷および／または外傷について治療の必要がある被験体を治療する方法。

[12] 前記動物が神経幹細胞操作を有する、[11]記載の方法。

[13] ガラニン-3レセプターアンタゴニストインヒビターがHT-2157

【化 2 3 - 7】



10

、そのE/Z異性体または混合物である、[11]記載の方法。

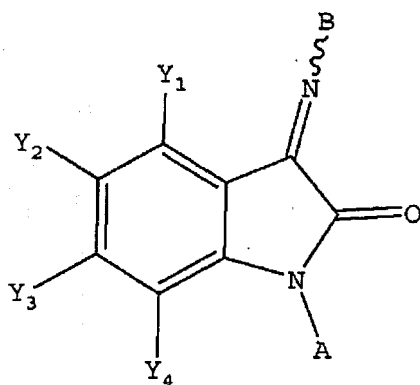
[14] 前記ガラニン-3レセプターアンタゴニストが一回投与される、[11]記載の方法。

[15] 前記ガラニン-3レセプターアンタゴニストがある期間にわたって繰り返し投与される、[11]記載の方法。

20

[16] ガラニン-3レセプターアンタゴニストが構造：

【化 2 3 - 8】



30

(式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のそれぞれは独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル；-F、-Cl、-Br、または-I；- NO_2 ；- N_3 ；-CN；- OR_4 、- SR_4 、- $OCOR_4$ 、- COR_4 、- $NCOR_4$ 、- $N(R_4)_2$ 、-CON(R_4) $_2$ 、または- $COOR_4$ ；アリールまたはヘテロアリールである；あるいは隣接する炭素原子上に存在する Y_1 、 Y_2 、 Y_3 および Y_4 のいずれか2つはメチレンジオキシ基を構成し得る；

40

R_4 はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである；

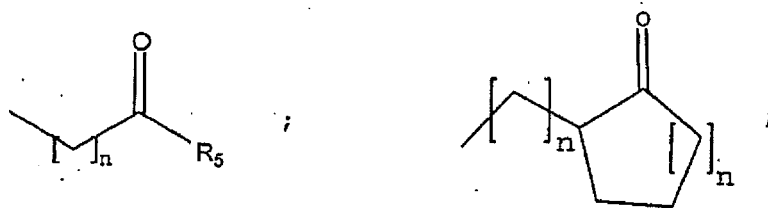
AはA'、直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリール($C_1 \sim$

50

C₆)アルキルまたはヘテロアリール(C₁~C₆)アルキルである；

A'は

【化 2 3 - 9】

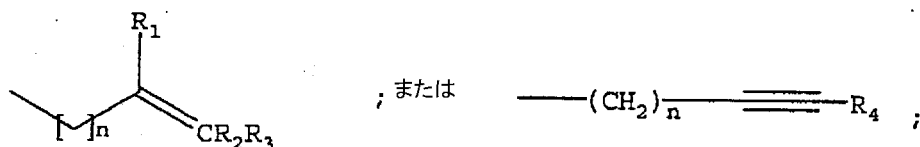


10

である；

R₁およびR₂はそれぞれ独立して-H、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、または-CN；

【化 2 3 - 1 0】



20

である；

R₃は-H、直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-CN、-OR₆、アリールまたはヘテロアリールである；

R₅は直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキル、-N(R₄)₂、-OR₆またはアリールである；

R₆は直鎖もしくは分岐C₁~C₇アルキルまたはアリールである；

Bはアリール、またはヘテロアリールである；ただしBがアリールまたはヘテロアリールである場合、イミン結合の窒素原子に対する炭素原子またはオルト炭素原子は以下の-H、-F、-Cl、-Br、-I、-CN、メチル、エチルまたはメトキシの1つ以上でのみ置換され得る；

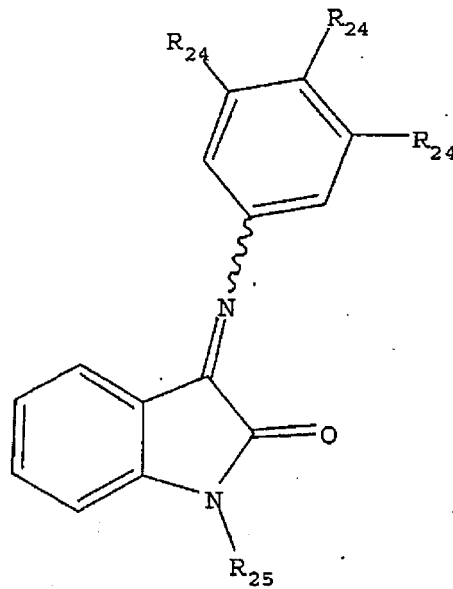
30

nはそれぞれ独立して1~4までの整数である)

を有し、該化合物は純粋Zイミン異性体、純粋Eイミン異性体、もしくはZおよびEイミン異性体の混合物、またはその薬学的に許容され得る塩である、[11]記載の方法。

[17] ガラニン-3レセプターアンタゴニストが構造：

【化 2 3 - 1 1】



10

20

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して以下のH、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} はメチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

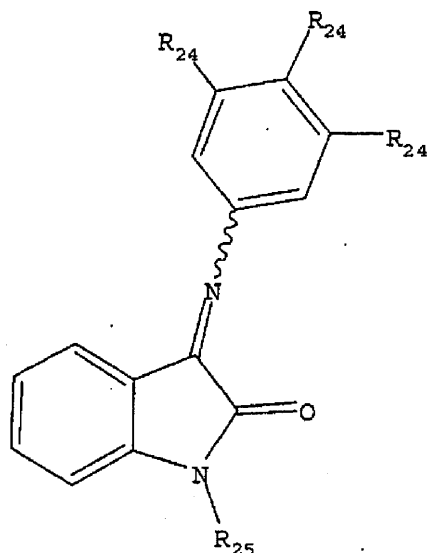
R_4 はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

30

を有する、[11]記載の方法。

[18] ガラニン-3レセプターアンタゴニスト化合物が構造：

【化 2 3 - 1 2】



10

20

(式中、 R_{24} はそれぞれ独立して以下のH、F、Cl、Br、I、 CF_3 または OCH_3 の1つ以上である；

R_{25} はメチル、エチル、アリルまたはフェニルであり、フェニルは任意にF、Cl、Br、 CF_3 、または OR_4 で置換される；

R_4 はそれぞれ独立して-H；直鎖もしくは分岐 $C_1 \sim C_7$ アルキル、モノフルオロアルキルまたはポリフルオロアルキル；直鎖もしくは分岐 $C_2 \sim C_7$ アルケニルまたはアルキニル； $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルケニル、アリールまたはアリール($C_1 \sim C_6$)アルキルである)

を有する、[11]記載の方法。

[19] 神経細胞損傷または外傷が、閉じた頭部損傷および鈍外傷、穿通性外傷、出血性脳卒中、虚血性脳卒中、緑内障、脳虚血、または腫瘍切除のような手術によって生じた損傷からなる群より選択される一次神経系損傷である、[11]記載の方法。

[20] 神経細胞損傷または外傷が、糖尿病神経障害および筋萎縮性側索硬化症(ALS)からなる群より選択される中枢または末梢神経系の一次疾患または障害である、[11]記載の方法。

[21] 神経細胞損傷または外傷が、ポルフィリン症、急性感覚神経障害、慢性運動神経障害、種々の薬物および毒素の合併症、アミロイド多発性神経障害、副腎脊髄神経障害、または巨大軸索神経障害からなる群より選択される末梢神経損傷および末梢または局所神経障害である、[11]記載の方法。

[22] 神経細胞損傷または外傷が脊髄外傷である、[11]記載の方法。

[23] 細胞が神経変性部位での移植によって患者に投与される前に、幹細胞または神経前駆細胞を処理する工程をさらに含む、[11]記載の方法。

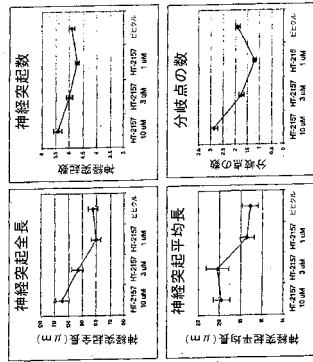
[24] ガラニン-3レセプターアンタゴニストを含む神経細胞損傷および／または外傷の治療用キット。

30

40

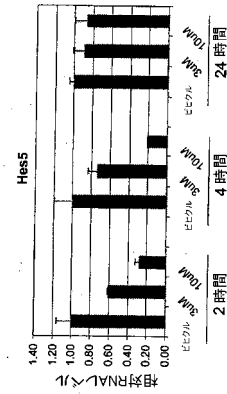
【図 1】

図1: Cellomics ArrayScan VTiを用いたPC12サブクローン、Neuroscreen-1細胞のHT-2157処理による神経突起伸長に対する効果



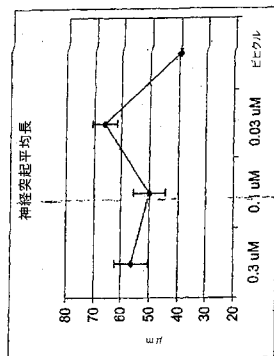
【図 2】

図2: qPCR解析によるNS-1細胞のHT-2157処理によるHes5発現に対する効果



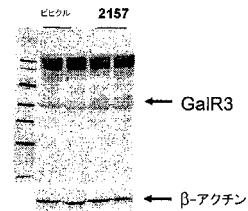
【図 3】

図3: 凍結保存されたマウス海馬神経のHT-2157処理による神経突起伸長に対する効果



【図 4】

図4: ニューロスクリーンI(NSI)細胞のGalR3発現に対するHT-2157の効果



【図 5】

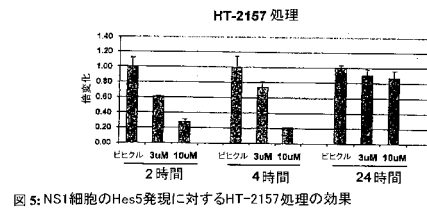


図5: NSI細胞のHes5発現に対するHT-2157処理の効果

【図 6】

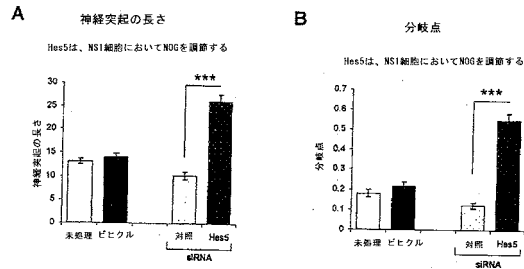


図6: NS1細胞における神経突起伸長に対するsiRNAによるHes5ノックダウンの効果

【図 7】

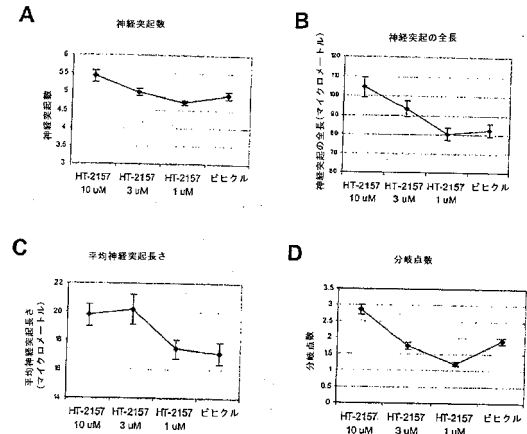


図7: NS1細胞における神経突起伸長に対するHT-2157の効果

【図 8】

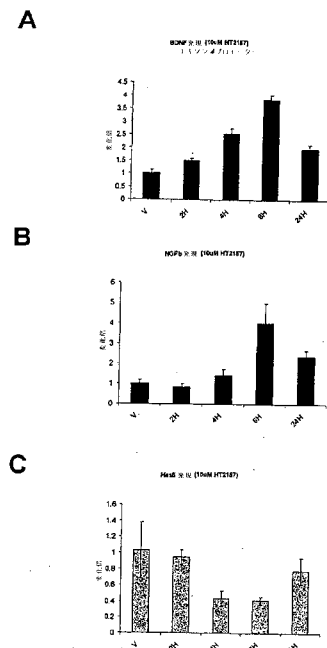


図8: 培養マウス海馬ニューロン中のニューロトロフィン脳由来神経栄養因子(BDNF)および神経成長因子β (NGFβ)のmRNA発現に対する、ならびにHes5の発現に対するHT-2157の効果

【図 9】

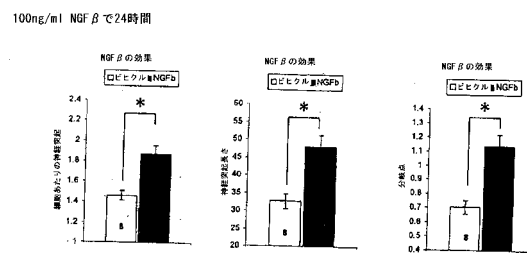
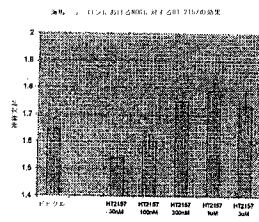


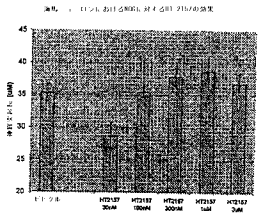
図9: 培養マウス海馬ニューロン中の神経突起伸長に対するNGFβの効果

【図 10】

A



B



C

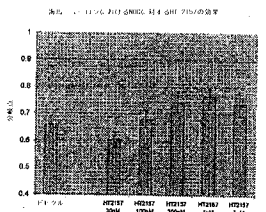


図10: 培養海馬ニューロン中の神経突起伸長に対するHT-2157の効果の定量

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 K 31/404	
		A 6 1 P 17/02	

(72)発明者 スコット, ロデリック, イー. , エム.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 8 0 3 ペラム, プロスペクト アベニュー 1 0 5 5

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC13 MA01 MA04 MA63 NA14 ZA01 ZB22 ZC42

4C204 BB01 CB03 DB30 DB31 EB03 FB08 GB01