

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5845263号
(P5845263)

(45) 発行日 平成28年1月20日 (2016. 1. 20)

(24) 登録日 平成27年11月27日 (2015. 11. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 211/58 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4468 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 9/12 (2006. 01)

A 6 1 P 11/00 (2006. 01)

C O 7 D 211/58 C S P

A 6 1 K 31/4468

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 9/12

A 6 1 P 11/00

請求項の数 7 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-526445 (P2013-526445)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月30日 (2011. 8. 30)
 (65) 公表番号 特表2013-536823 (P2013-536823A)
 (43) 公表日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/064906
 (87) 国際公開番号 W02012/028614
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日 (2012. 3. 8)
 審査請求日 平成26年8月28日 (2014. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 10174880.4
 (32) 優先日 平成22年9月1日 (2010. 9. 1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 390033008
 ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム
 ローゼ・フエンノートシャツプ
 JANSSEN PHARMACEUTI
 CA NAAMLOZE VENNOOT
 SCHAP
 ベルギー・ビー-2340-ビーエルセ・ト
 ウルンホウトセベーク30
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所

最終頁に続く

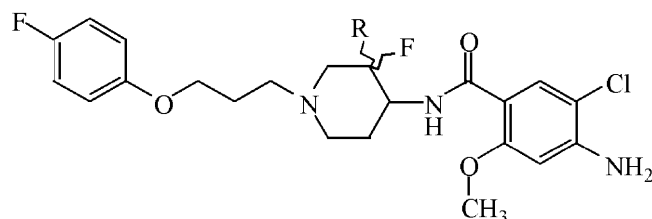
(54) 【発明の名称】 5-HT_{2B}受容体アンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I)

【化 1】



[式中、R は水素またはフルオロを表す]

の化合物、またはその立体化学的異性体、付加塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】

R がフルオロであり、かつ、化合物がラセミ混合物である請求項 1 に記載の化合物、またはその付加塩もしくは溶媒和物。

【請求項 3】

R がフルオロであり、かつ、化合物が旋光度 [α] = -14.4° (c = 0.3、MeOH, λ = 598 nm; 20°C) を有する請求項 1 に記載の化合物、またはその付加塩も

しくは溶媒和物。

【請求項 4】

治療に有効な量の請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の化合物、および製薬学的に許容され得る担体を含んでなる製薬学的組成物。

【請求項 5】

製薬学的に許容され得る担体を、治療に有効な量の請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の化合物と完全に混合することを特徴とする、請求項 4 に記載の製薬学的組成物の調製方法。

【請求項 6】

肺動脈性高血圧症、肺線維症または過敏性腸症候群の処置または防止に使用するための請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 7】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の化合物を有効成分として含んでなる、肺動脈性高血圧症、肺線維症または過敏性腸症候群の処置または防止用の製薬学的製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は 5 - H T ₂ B 受容体でアンタゴニスト活性を有する新規フッ素化ピペリジン誘導体、このような化合物を含んでなる製薬学的組成物およびそれらの薬剤としての使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

シサプリド (c i s a p r i d) は、消化管運動改善薬として有用なセロトニン 5 - H T ₄ 受容体アゴニストである。シサプリドは 5 - H T ₂ A および 5 - H T ₂ C ; D ₂ L ; 5 - H T ₃ A / B ; アルファ ₁ A 、 アルファ ₂ A 、 アルファ ₂ B および アルファ ₂ C のような数種の他の受容体と有意に相互作用する。シサプリドは急な不整脈の報告により 2000 年に幾つかの市場から撤退した。この副作用の原因は、h E R G カリウムチャンネル (ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子 : h u m a n e t h e r - a - g o - g o r e l a t e d g e n e) の遮断により薬物誘発性 Q T 延長である。h E R G チャンネル遮断薬の既知の薬理原子団の 1 つは、塩基性窒素原子を有する中央部により連結された親水性部分および疎水性部分を含んでなる。生理学的 p H で、塩基性窒素はプロトン化され、そして h E R G チャンネルポア内の T y r 6 5 2 残基とのカチオン - 相互作用に関与している。ピペリジンの窒素原子の p K a 値を下げるために、そしてそれにより h E R G チャンネルの遮断の確率を下げるために、3 - メトキシ - ピペリジンが 3 - フルオロピペリジンおよび 3 , 3 - ジフルオロピペリジンに置き換えられたシサプリドの誘導体が調製された。

30

【発明の概要】

【0003】

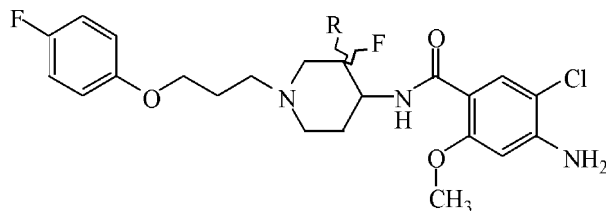
発明の要約

本発明は、式 (I)

【0004】

40

【化 1】



【 0 0 0 5 】

[式中、R は水素またはフルオロを表す]

の化合物またはその立体化学的異性体、あるいはそれらの付加塩または溶媒和物に関する。

10

【 0 0 0 6 】

本発明の具体例は、製薬学的に許容され得る担体および上記任意の化合物を含んでなる製薬学的組成物である。本発明の具体例は、上記任意の化合物および製薬学的に許容され得る担体を混合することにより作製される製薬学的組成物である。本発明の具体例は、上記任意の化合物および製薬学的に許容され得る担体を混合することを含んでなる製薬学的組成物の調製方法である。

【 0 0 0 7 】

本発明の例は、5-HT_{2B} 受容体が介在する障害の処置方法であり、この方法は処置が必要な個体に治療に有効な量の上記任意の化合物または製薬学的組成物を投与することを含んでなる。

20

【 0 0 0 8 】

さらに本発明の例は、5-HT_{2B} 受容体の阻害方法であり、この方法は阻害が必要な個体に治療に有効な量の上記任意の化合物または製薬学的組成物を投与することを含んでなる。

【 0 0 0 9 】

本発明の一例は、肺動脈性高血圧、肺線維症、過敏性腸症候群、心血管障害、例えば慢性心疾患、うっ血性心不全および高血圧からなる群から選択される障害の処置方法であり、この方法は処置が必要な個体に治療に有効な量の上記任意の化合物または製薬学的組成物を投与することを含んでなる。

30

【 0 0 1 0 】

本発明の別の例は、処置が必要な患者において、肺動脈性高血圧、肺線維症、過敏性腸症候群、心血管障害、例えば慢性心疾患、うっ血性心不全および高血圧の処置に使用するための上記の任意の化合物である。

【 0 0 1 1 】

発明の詳細な説明

本発明は、これまでに定義した式 (I) の化合物、およびその製薬学的に許容され得る塩を対象とする。式 (I) の化合物は 5-HT_{2B} 受容体での選択的アンタゴニストである。

40

【 0 0 1 2 】

本発明の一態様では、R はフルオロであり、そして化合物はラセミ混合物またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の態様では、R はフルオロであり、そして化合物は旋光度 [α]_D²⁰ = +14.1° (c = 0.3, MeOH, λ = 598 nm) を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の態様では、R はフルオロであり、そして化合物は旋光度 [α]_D²⁰ = -14.4° (c = 0.3, MeOH, λ = 598 nm) を有するか、またはそれらの付

50

加塩または溶媒和物である。

【0015】

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がシス配向を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【0016】

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がシス配向を有し、そして化合物が旋光度 $[\alpha] = +39.8^\circ$ ($c = 0.2$ 、MeOH, $\lambda = 598\text{ nm}$; 20°) を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【0017】

10

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がシス配向を有し、そして化合物は旋光度 $[\alpha] = -45.5^\circ$ ($c = 0.2$ 、MeOH, $\lambda = 598\text{ nm}$; 20°) を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【0018】

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がトランス配向を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【0019】

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がトランス配向を有し、そして化合物は旋光度 $[\alpha] = +19.2^\circ$ ($c = 0.4$ 、MeOH, $\lambda = 598\text{ nm}$; 20°) を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

20

【0020】

本発明の別の態様では、Rは水素であり、そしてピペリジン部分の3および4位置の置換基がトランス配向を有し、そして化合物は旋光度 $[\alpha] = -22.8^\circ$ ($c = 0.3$ 、MeOH, $\lambda = 598\text{ nm}$; 20°) を有するか、またはそれらの付加塩または溶媒和物である。

【0021】

予想されるように、フッ素化シサブリド誘導体はシサブリドよりも有意に効力が低い hERG チャンネル遮断薬であり、したがって薬剤誘発性 QT 延長を引き起こす確率は大変低い。ところが意外にも、受容体の親和性は様々に変化して、より選択的プロファイルを有する化合物を生じるようになる。5-HT_{2A} および D_{2L} 受容体に対する親和性はかなり減少し、そして 5-HT_{3A/B}、5-HT_{4B}、アルファ_{1A}、アルファ_{2A}、アルファ_{2B} およびアルファ_{2C} 受容体に対しては減少傾向にあることを示す。唯一の例外は有意に上昇する 5-HT_{2B} 受容体に対する親和性である。

30

【0022】

5-HT_{2B} 受容体アンタゴニストは、肺動脈性高血圧症、肺線維症または過敏性腸症候群の処置または防止について示されている。肺動脈性高血圧症は突発性、家族性または HIV 感染のような他の疾患または特定の薬剤の使用に関連する可能性がある。また肺動脈性高血圧症は、心臓または肺の疾患、例えば慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、間質性肺疾患または高い高度に対する慢性的な暴露とも関係する可能性がある。肺線維症は肺胞壁の慢性的炎症と進行性の線維症を特徴とし、確実に呼吸困難が進行し、最終的には酸素不足から、または右心不全から死亡する。過敏性腸症候群は腹痛、下痢または便秘または両方からなる便通異常を特徴とし、そして病理学的な変化が無い慢性的な非炎症性疾患である。これは精神的な原因が元にある一般的疾患である。また 5-HT_{2B} 受容体アンタゴニストは、心血管障害、例えば慢性心疾患、うっ血性心不全および高血圧の処置にも使用することができる。

40

【0023】

定義

本明細書で使用する用語「個体」は、処置、観察または実験の対象である、または対象

50

であった動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを指す。

【0024】

本明細書で使用する用語「治療に有効な量」とは、研究者、獣医師、医師または他の臨床医が調査する組織系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を発現する活性化化合物または薬剤の量を意味し、その応答には処置する疾患または障害の症状の軽減を含む。

【0025】

本明細書で使用する用語「組成物」は、特定の成分を特定の量で含んでなる生成物、ならびに特定量の特定成分の組み合わせから直接的または間接的にもたらされる生成物を包含することを意図している。

【0026】

式(I)の化合物およびその付加塩、水和物および溶媒和物の幾つかは、1もしくは複数のキラル中心を含み、そして立体異性体として存在できると考えられる。

【0027】

これまで、またはこれから使用する「立体異性体」という用語は、式(I)の化合物およびその付加塩が有することのできるすべての可能な立体異性体と定義する。他に言及または示さない限り、化合物の化学的表示は、全ての可能な立体化学的異性体の混合物(該混合物は基本分子構造のすべてのジアステレオマーおよびエナンチオマーを含む)、ならびに他の異性体を実質的に含まず、すなわち10%未満、好ましくは5%未満、特に2%未満、そして最も好ましくは1%未満で随伴する式(I)の各個別の異性体およびそれらの塩、溶媒和物を表す。

【0028】

本発明の化合物が少なくとも1つのキラル中心を有する場合、それらは、適宜エナンチオマーとして存在し得る。化合物が2以上のキラル中心を有する場合、それらはさらにジアステレオマーとして存在することができる。すべてのそのような異性体およびそれらの混合物は、本発明の範囲内に包含されると解される。好ましくは化合物がエナンチオマーとして存在する場合、このエナンチオマーは約80%以上のエナンチオマー過剰、より好ましくは約90%以上のエナンチオマー過剰、さらにより好ましくは約95%以上のエナンチオマー過剰、より一層好ましくは約98%以上のエナンチオマー過剰、最も好ましくは99%以上のエナンチオマー過剰で存在する。同様に、化合物がジアステレオマーとして存在する場合、このジアステレオマーは約80%以上のジアステレオマー過剰、より好ましくは約90%以上のジアステレオマー過剰、さらにより好ましくは約95%以上のジアステレオマー過剰、より一層好ましくは約98%以上のジアステレオマー過剰、最も好ましくは99%以上のジアステレオマー過剰で存在する。

【0029】

さらに本発明の化合物について幾つかの結晶形が多形として存在でき、そしてそのまま本発明に含まれることを意図している。さらに本発明の化合物の幾つかは水との(すなわち水和物)、または一般的な有機溶媒との溶媒和物を形成することができ、そしてそのような溶媒和物も本発明の範囲内に包含されることを意図している。

【0030】

薬剤に使用するために、本発明の化合物の塩とは非毒性の「製薬学的に許容され得る塩」を指す。しかし他の塩も、本発明の化合物、またはそれらの製薬学的に許容され得る塩を調製するために有用となり得る。化合物の適切な製薬学的に許容され得る塩には酸付加塩があり、これは例えば化合物の溶液を製薬学的に許容され得る酸、例えば塩酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酢酸、安息香酸、クエン酸、酒石酸、炭酸またはリン酸の溶液と混合することにより形成することができる。さらに本発明の化合物が酸性部分を持つ場合には、それらの適切な製薬学的に許容され得る塩には、アルカリ金属塩、例えばナトリウムまたはカリウム塩；アルカリ土類金属塩、例えばカルシウムまたはマグネシウム塩；および適切な有機リガンドを用いて形成される塩、例えば4級アンモニウム塩を含むことができる。

【 0 0 3 1 】

製薬学的に許容され得る塩の調製に使用され得る代表的酸には、限定するわけではないが以下のものがある；酢酸、2 - ジクロロ酢酸、アシル化アミノ酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、L - アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4 - アセトアミド安息香酸、(+) - 樟脳酸、カンファースルホン酸、カブリン酸、カプロン酸、カプリル酸、桂皮酸、クエン酸、シクラミン酸、エタン - 1 , 2 - ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、グルコヘプトン酸、D - グルコン酸、D - グルクロン酸、L - グルタミン酸、ベータ - オキシ - グルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、臭化水素酸、塩酸、(+) - L - 乳酸、(±) - D L - 乳酸、ラクトビオン酸、マレイン酸、(-) - L - リンゴ酸、マロン酸、(±) - D L - マンデル酸、メグルミン酸、メタンスルホン酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸、ナフタレン - 1 , 5 - ジスルホン酸、1 - ヒドロキシ - 2 - ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロチン酸、蔞酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、L - ピログルタミン酸、サリチル酸、4 - アミノ - サリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+) - L - 酒石酸、チオシアン酸、p - トルエンスルホン酸、トリフルオロメチルスルホン酸およびウンデシレン酸。

10

【 0 0 3 2 】

式 (I) の化合物の幾つかは、それらの互変異性体で存在することができる。上記式では明確に示さないが、そのような形態も本発明の範囲内に含まれる。

20

【 0 0 3 3 】

製薬学的組成物

また本発明は、肺動脈性高血圧症または肺線維症の抑制が有益となる疾患の防止または処置のための組成物を提供する。

【 0 0 3 4 】

該組成物は治療に有効な量の式 (I) の化合物および製薬学的に許容され得る担体または希釈剤を含んでなる。

【 0 0 3 5 】

有効成分は単独で投与することが可能であるが、それは製薬学的組成物として与えることが好ましい。したがって本発明はさらに本発明の化合物を、製薬学的に許容され得る担体または希釈剤と一緒に含んでなる製薬学的組成物を提供する。この担体または希釈剤は、組成物の他の成分と適合性があるという意味で「許容できる」ものでなければならず、しかもその受容者に有害であってはならない。

30

【 0 0 3 6 】

本発明の製薬学的組成物は、製薬分野で周知な方法により調製できる。有効成分として治療に有効な量の特定化合物を塩基形または付加塩形で、製薬学的に許容され得る担体と完全な混合物に合わせ、これは投与に望ましい調製の形態に依存して広い様々な形態をとることができる。これらの製薬学的組成物は、全身投与用、例えば経口、経皮または非経口投与用に；あるいは吸入または通気のような局所投与用に適する単位剤形が望ましい。例えば経口剤形の組成物の調製では、例えば水、グリコール、油、アルコール等のような任意の通例の製薬学的媒体を、懸濁液、シロップ、エリキシルおよび溶液のような経口液体調製物の場合に使用でき；あるいは澱粉、糖、カオリン、潤滑剤、結合剤、崩壊剤等のような固体担体を、散剤、ピル、カプセルおよび錠剤に使用できる。投与の容易さから、錠剤およびカプセルが最も有利な経口単位剤形を表し、この場合、固体の製薬学的担体が明らかに使用される。非経口組成物には、この担体は通常、滅菌水を少なくとも大部分で含んでなることができるが、他の成分を例えば溶解性を補助するために加えてもよい。注入可能な溶液は、例えば担体が塩溶液、グルコース溶液または塩とグルコース溶液の混合物を含んでなるように調製することができる。注入可能な懸濁液も調製することができ、この場合は適切な液体担体、懸濁剤等を使用することができる。経皮投与に適する組成物では、担体は場合により浸透強化剤および/または適切な湿潤剤を、場合により任意の性質の適切な添加剤をわずかな比率で組み合わせて含んでなり、この添加剤は皮膚に重大な

40

50

有害効果を引き起こさない。該添加剤は皮膚への投与を促進でき、かつ／または所望の組成物を調製するために役立つ可能性がある。これらの組成物は様々な方法で投与でき、例えば経皮パッチとして、スポットオンとして、または軟膏として投与できる。

【 0 0 3 7 】

前記の製薬学的組成物は、投与の容易さおよび投薬用量の均一性から単位剤形に配合することが特に有利である。本明細書および特許請求の範囲で使用する単位剤形は、単位投薬用量として適する物理的に分かれた単位を指し、各単位が所望する治療効果を、必要な製薬学的担体と関連して生じるように算出された予め定めた量の有効成分を含有する。そのような単位剤形の例は錠剤（刻み目付きまたはコート錠剤を含む）、カプセル、ピル、散剤小包、座薬、カシェ剤、注入用溶液または懸濁液、吸入用粉剤、茶さじ一杯分、テ

10

【 0 0 3 8 】

投与の正確な投薬用量および頻度は、当業者には周知であるように使用する式（Ⅰ）の特定化合物、処置する特定の状態、処置する状態の重篤度、特定患者の年齢、体重、性別、障害の程度および全般的な健康状態、ならびに個人が摂取している可能性がある他の薬物に依存する。さらにそのような毎日の有効量は、処置する個体の応答に依存して、かつ／または本発明の化合物を処方する内科医の評価に依存して減らしたり増やしたりすることができることが明らかである。

【 0 0 3 9 】

投与の様式に依存して、製薬学的組成物は 0 . 0 5 ~ 9 9 重量%、好ましくは 0 . 1 ~ 7 0 重量%、より好ましくは 0 . 1 ~ 5 0 重量%の有効成分、および 1 ~ 9 9 . 9 5 重量%、好ましくは 3 0 ~ 9 9 . 9 重量%、より好ましくは 5 0 ~ 9 9 . 9 重量%の製薬学的に許容され得る担体を含んでなり、すべての重量は組成物の総重量に基づく。

20

【 0 0 4 0 】

本化合物は、経口、経皮または非経口投与のような全身投与に；あるいは吸入、鼻スプレー、点眼またはクリーム、ゲル、シャンプー等を介するような局所投与に使用することができる。化合物は経口投与されることが好ましい。正確な投薬用量および投与頻度は、当業者に周知であるように、使用する特定の式（Ⅰ）の化合物、処置する特定の状態、処置する状態の重篤度、特定患者の年齢、体重、性別、障害の程度および全般的な健康状態、ならびに個人が摂取している可能性がある他の薬物に依存する。さらにそのような毎日の有効量は、処置する個体の応答に依存して、かつ／または本発明の化合物を処方する内科医の評価に依存して減らしたり増やしたりすることができることが明らかである。

30

【 0 0 4 1 】

単位剤形を生成するために担体材料と合わせることができる式（Ⅰ）の化合物の量は、処置する疾患、哺乳動物の種、および投与の特定の様式に依存して変動する。しかし一般的指針として、本発明の化合物に適する単位用量は、例えば好ましくは 0 . 1 m g から約 1 0 0 0 m g の間の活性化合物を含むことができる。好適な単位用量は、1 m g から約 5 0 0 m g の間である。より好適な単位用量は、1 m g から約 3 0 0 m g の間である。さらに一層好ましい単位用量は、1 m g から約 1 0 0 m g の間である。そのような単位用量は、1 日に 1 回より多く、例えば 1 日に 2 , 3 , 4 , 5 または 6 回、投与することができるが、好ましくは 1 日に 1 または 2 回の投与であるので、体重 7 0 k g の成人の総投薬用量は、投与あたり個体の体重 1 k g につき 0 . 0 0 1 m g から約 1 5 m g の間の範囲である。好適な投薬用量は、投与あたり個体の体重 1 k g につき 0 . 0 1 から約 1 . 5 m g であり、そしてそのような治療は数週間から数か月、場合によっては数年間に及ぶことになる。しかし特定の患者の関する具体的な用量レベルは、この分野の当業者に周知であるように、使用する具体的化合物の活性；処置する個人の年齢、体重、一般的健康状態、性別および食事；投与の時期および経路；排泄頻度；これまでに投与されていた他の薬剤；および治療を行っている特定疾患の重篤度を含む様々な因子に依存すると理解されるだろう。

40

【 0 0 4 2 】

一般的な投薬用量は、1 日に 1 回または 1 日に多数回、1 錠の 1 m g ~ 約 1 0 0 m g の

50

錠剤または1mg～約300mgを摂取するか、あるいは1日に1回、1錠の適時-放出 (time-release) カプセルもしくは錠剤を摂取し、そして比例してより高い有効成分含量を含む。この適時放出効果は、異なるpH値で溶解するカプセル材料により、浸透圧によりゆっくり放出するカプセルにより、または放出を制御する他の既知の手段により得ることができる。

【0043】

当業者には明白であるように、場合によってはこれらの範囲外の投薬用量を使用することが必要になる可能性がある。さらに臨床医または処置する医師は、個々の患者の応答に関連して治療をどのようにそしていつ開始し、中断し、調整し、または終了するかを知ることにより留意されたい。

【0044】

以下の実施例は本発明の範囲を具体的に説明するものであり、限定するものではない。

【実施例】

【0045】

実験の部

合成例

今後、用語“M.P.”は融点を意味し、“THF”はテトラヒドロフランを意味し、“DMF”はジメチルホルムアミドを意味し、“DCM”はジクロロメタンを意味し、“EtOAc”は酢酸エチルを意味し、“AcOH”は酢酸を意味し、“MeOH”はメタノールを意味し、“rac”はラセミを意味し、“Et₂O”はジエチルエーテルを意味し、“DMAc”はジメチルアミノピリジンを意味し、“DMSO”はジメチルスルホキシドを意味し、“hex”はヘキサンを意味し、そして“TFA”はトリフルオロ酢酸を意味し、DEAはジエチルアミンを意味する。

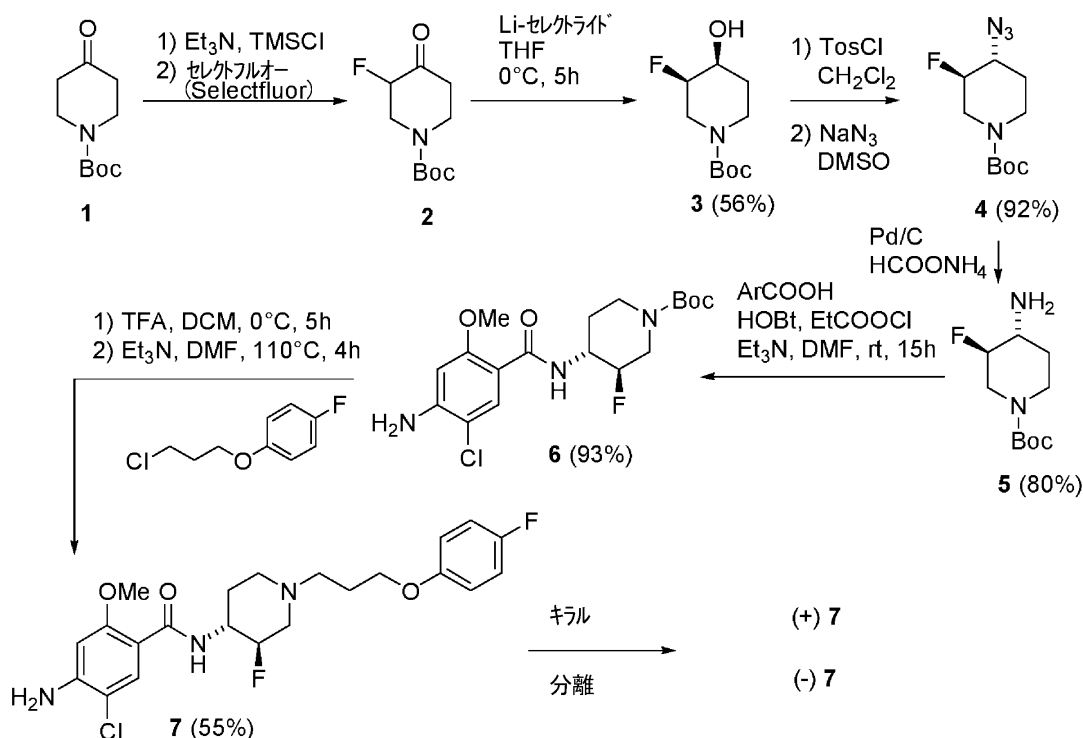
【実施例1】

【0046】

トランス-4-アミノ-5-クロロ-N-{3-フルオロ-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)-プロピル]-ピペリジン-4-イル}-2-メトキシベンズアミド7の合成

【0047】

【化2】



【0048】

シス - 1 - Boc - 3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシピペリジン 3 の合成

0.5 g (2.3 mmol) の N - Boc - 3 - フルオロ - 4 - ピペリジノン 2 (J. Med. Chem. 1999, 42, 2087-2104) の溶液 (10 mL の乾燥 THF 中) に、2.8 mL (2.76 mmol) の 1 M Li - セレクトライド (selectride) 溶液 (THF 中) を、N₂ 雰囲気下、0 °C で滴下した。溶液を 0 °C で 4 時間攪拌し、次いで 10 mL の 2 M NaOH を 0 °C で加え、そして混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を Et₂O で抽出し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (hex/EtOAc/Et₃N 1:1:0.1)、0.27 g (56%) の純粋なシス - 1 - Boc - 3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシピペリジン 3 を無色の油として得、これは -20 °C に (冷凍庫) 置くと固化した。Mp 48 °C。 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.46 (9H, s, 3 x CH₃), 1.67 - 1.91 (2H, m, CH₂), 2.40 - 2.65 (1H, m, OH), 2.92 - 3.35 (2H, m, CH₂CH_aH_bN および CH_aH_bCHF), 3.55 - 3.94 (3H, m, CH₂CH_aH_bN および CHOH および CH_aH_bCHF), 4.52 (1H, dm, J = 4.8 Hz, CHF). ¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃): -201.9 および -203.1 (1F, 2 x m). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 28.4 (3 x), 29.2, 40.4, 44.8, 68.0 (d, J = 17.3 Hz), 80.2, 88.6 (d, J = 177.7 Hz), 155.1. IR (KBr): 3413, 1674, 1429, 1167 cm⁻¹. GC - MS (EI): m/z (%): 219 (M⁺, 4), 164 (46), 146 (50), 57 (C₄H₉⁺, 100).

10

20

【0049】

トランス - 4 - アジド - 1 - Boc - 3 - フルオロピペリジン 4 の合成

0.60 g (2.74 mmol) のシス - 1 - Boc - 3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシピペリジン 3 の溶液 (15 mL の DCM 中) に、0.42 g (4.11 mmol) のトリエチルアミンおよび 37 mg (0.3 mmol) の 4 - (N, N - ジメチルアミノ)ピリジン (DMAPI) を、室温で加えた。次いで 0.57 g (3.01 mmol) の p - トルエンシルホニルクロライド溶液 (2 mL の DCM 中) を乾燥雰囲気下 (CaCl₂ 管)、室温で加えた。室温で 15 時間攪拌した後、溶液をブライン (20 mL) に注ぎ、そして DCM (3 x 25 mL) で抽出した。MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして溶媒を蒸発させた後、粗混合物をさらに精製せずにそのまま次の工程に使用した。得られたトシラートを 5 mL の乾燥 DMSO に溶解し、そして 0.36 g (5.48 mmol) の NaN₃ を加えた。混合物を N₂ 雰囲気下で 90 °C にて 15 時間攪拌した。冷却後、混合物をブライン (10 mL) に注ぎ、そして EtOAc で抽出した。合わせた抽出物をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして真空下で蒸発させた。トランス - 4 - アジド - 1 - Boc - 3 - フルオロピペリジン 4 は、4 - ヒドロキシピペリジン 3 から無色の油として 92% の収率で得られ、そしてさらに使用するに十分な純度であった。 ¹H NMR (CDCl₃): 1.43 (9H, s); 1.44 - 1.64 (1H, m); 1.97 (1H, ddd, J = 4.3 Hz, 8.4 Hz, 18.0 Hz); 2.99 (1H, ddd, J = 3.3 Hz, 10.5 Hz, 13.8 Hz); 3.00 - 3.15 (2H, m); 3.57 - 3.68 (1H, m); 3.79 (1H, dt, J = 13.8 Hz, J = 4.4 Hz); 4.00 - 4.19 (1H, m); 4.33 (td, J = 47.9 Hz, J = 8.3 Hz, J = 4.4 Hz). ¹⁹F NMR (CDCl₃): -188.1 (1F, d (br), J = 47.4 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 28.3 (4 x), 41.2 (br), 45.5 (br), 61.4 (d, J = 20.7 Hz), 80.6, 88.9 (d, J = 182.3 Hz), 154.4. IR (ATR, cm⁻¹): 2099, 1693, 1417, 1236, 1161, 1141. MS (ESI) m/z (%): 227 (M + H⁺, 100).

30

40

【0050】

50

トランス - 4 - アミノ - 1 - Boc - 3 - フルオロピペリジン 5 の合成

0.59 g (2.42 mmol) のトランス - 4 - アジド - 1 - Boc - 3 - フルオロピペリジン 4 の溶液 (10 mL の MeOH 中) に、0.61 g (9.67 mmol) のギ酸アンモニウムおよび 0.25 g (0.24 mmol Pd) の炭素担持 10% Pd を加えた。反応混合物は N₂ 雰囲気下で 50 °C にて 5 時間攪拌した。冷却後、混合物を珪藻土で濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (EtOAc 中の 5% / Et₃N、短路カラム)、0.42 g (80%) のトランス - 4 - アミノ - 1 - Boc - 3 - フルオロピペリジン 5 を油として得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.39 (9H, s); 1.60 (2H, s (br)); 1.76 - 1.86 (1H, m); 2.65 - 2.76 (2H, m); 2.78 - 2.90 (2H, m); 3.89 - 3.97 (1H, m); 4.01 (1H, dm, J = 48.5 Hz); 4.15 - 4.30 (1H, m). ¹⁹F NMR (CDCl₃): -191.0 ~ -190.3 (1F, m). ¹³C NMR (CDCl₃): 28.4 (3x), 31.8, 41.9 (br), 46.2 (br), 53.5 (d, J = 18.5 Hz), 80.3, 93.0 (d, J = 177.7 Hz), 154.6. IR (ATR, cm⁻¹): = 1685, 1415, 1244, 1152, 1028. MS (ES+) m/z (%): 204 (M - CH₃ + H⁺), 163 (M - 3CH₃ + 2H⁺, 100).

【0051】

トランス - tert - ブチル - 4 (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシベンゾイルアミノ) - 3 - フルオロピペリジン - 1 - カルボキシレート 6 の合成

0.41 g (2.02 mmol) の 4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシ安息香酸の溶液 (10 mL の乾燥 DMF 中) に、0.29 g (2.89 mmol) のトリエチルアミンを室温で N₂ 雰囲気下にて加えた。室温で 10 分間攪拌した後、0.22 g (2.02 mmol) のクロロギ酸エチル溶液 (2 mL の DMF 中) を室温で滴下し、そして攪拌を 30 分間続行し、この間、温度を室温に維持した (水浴で室温に冷却した)。次いで 0.27 g (2.02 mmol) の固体のヒドロキシベンゾトリアゾールを室温にて 1 回で加え、そして攪拌を 30 分間続行した。引き続き 0.42 g (1.93 mmol) のアミン 5 の溶液 (3 mL の DMF 中) を、室温で滴下し、そして反応混合物を室温で一晩攪拌した。その後、混合物を 20 mL のブラインに注ぎ、そして EtOAc で抽出した (3 x 25 mL)。合わせた有機画分をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (hex / EtOAc / Et₃N 1:1:0.1)、0.72 g (93%) の純粋なトランス - tert - ブチル 4 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシベンゾイルアミノ) - 3 - フルオロピペリジン - 1 - カルボキシレート 6 を固体として得た。¹H NMR (CDCl₃): 1.47 (9H, s); 2.17 - 2.28 (1H, m); 2.96 - 3.19 (2H, m); 3.74 (1H, dm, J = 13.7 Hz); 3.90 (3H, s); 3.92 - 4.40 (3H, m); 4.45 (1H, ddt, J = 4.4 Hz, 8.3 Hz, J = 48.4 Hz); 6.30 (1H, s); 7.82 (1H, d, J = 7.2 Hz); 8.08 (1H, s). ¹⁹F NMR (CDCl₃): -189.0 (d, J = 44.7 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 28.4 (3x), 29.1 (br), 41.5 (br), 45.6 (br), 50.1 (br), 56.4, 80.4, 88.2 (d, J = 182.3 Hz), 97.9, 111.8, 112.1, 133.2, 147.1, 154.7, 157.6; 164.5. IR (ATR, cm⁻¹): = 3478, 3378, 1683, 1619, 1593, 1420, 1247, 1146. MS (ES+) m/z (%): 346 / 48 (M + H⁺, 100); 402 / 404 (M + H⁺, 60).

【0052】

トランス - 4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3 - フルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル } - 2 - メトキシベンズアミド 7 の合成

0.14 g (0.34 mmol) の tert - ブチル 4 - 4 - アミノ - 5 - クロロ - 2

- メトキシベンゾイルアミノ) - 3 - フルオロピペリジン - 1 - カルボキシレート 6 の溶液 (5 mL の DCM 中) に、0.39 g (3.4 mmol) のトリフルオロ酢酸を 0 で乾燥雰囲気下 (CaCl₂ 管) で加えた。0 で 5 時間攪拌した後、混合物を減圧下で蒸発させた。この油状残渣を 10 mL の乾燥ジエチルエーテルに溶解し、0 に冷却し、そして形成した結晶 TFA 塩を単離した (フィルターまたは Et₂O デカント)。乾燥そしてさらに蒸発させた後、4 - アミノ - 5 - クロロ - N - (3 - フルオロピペリジン - 4 - イル) - 2 - メトキシベンズアミドの白色の結晶 TFA - 塩を、5 mL の乾燥 DMF に溶解した。この溶液に、0.17 g (1.70 mmol) のトリエチルアミン、55 mg (0.34 mmol) のヨウ化ナトリウムおよび 65 mg (0.34 mmol) の 3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル - 1 - クロライドを室温にて乾燥雰囲気下で加えた。混合物を 4 時間で 110 ~ 120 に加熱した。冷却後、混合物を 25 mL の EtOAc で希釈し、ブライン (25 mL) に注ぎ、そして EtOAc (3 x 25 mL) で抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物を勾配フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (EtOAc / hex / Et₃N 3 : 2 : 0.1 ~ EtOAc 中の 1% Et₃N)、85 mg (55%) のトランス - 4 - アミノ - 5 - クロロ - N - {3 - フルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル} 2 - メトキシベンズアミド 7 を淡い黄色の固体として得た。Mp 125。任意に EtOAc / EtOH から再結晶化。¹H NMR (CDCl₃) : 1.46 - 1.59 (1H, m); 1.94 (2H, 五重線, J = 6.6 Hz); 2.18 - 2.34 (3H, m); 2.58 (2H, t, J = 6.6 Hz); 2.76 (1H, dm, J = 11.6 Hz); 3.13 (1H, td (br), J = 4.4 Hz, 9.9 Hz); 3.87 (3H, s); 3.96 (2H, t, J = 6.6 Hz); 4.09 - 4.23 (1H, m); 4.47 (1H, ddt, J = 4.4 Hz, J = 9.4 Hz, J = 49.5 Hz); 4.48 (2H, s (br)); 6.02 (1H, s); 6.79 - 6.86 (2H, m); 6.92 - 7.00 (2H, m); 7.79 (1H, d, J = 7.7 Hz), 8.09 (1H, s). ¹⁹F NMR (CDCl₃) : -187.6 (d, J = 51.3 Hz); -124.0 (tt, J = 3.9 Hz, J = 9.2 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃) : 27.0, 29.9 (d, J = 6.9 Hz), 51.0 (d, J = 18.5 Hz), 51.5, 54.6, 56.2, 56.3 (d, J = 24.2 Hz), 66.7, 89.0, 90.2 (d, J = 178.8 Hz), 97.9, 111.7, 112.3, 2 x 115.5 (d, J = 8.0 Hz), 2 x 115.8 (d, J = 23.0 Hz), 133.2, 147.0, 155.2, 157.3 (d, J = 238.9 Hz), 157.6, 164.6. IR (ATR, cm⁻¹) : = 3453, 3370, 3317, 3194, 1631, 1584, 1537, 1508, 1250, 1200. MS (ES+) m/z (%): 454 / 456 (M + H⁺, 100).

【0053】

トランス - 4 - アミノ - 5 - クロロ - N - {3 - フルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル} - 2 - メトキシベンズアミド 7 のキラル分離

化合物 7 をそのエナンチオマーに超臨界流体クロマトグラフィーにより分割した。

量 : 80 mg (添加 : 10 mg / 3.00 mL)

条件 :

カラム : OD 20 x 250 mm (I)

移動相 : 37% MeOH (0.2% iPrNH₂ を含む)、9.00 分維持

パラメーター : 流速 = 50 mL / 分

カラム温度 = 40

ノズル圧 = 10 MPa

注入の種類 : スタック (stacked) 注入 (8 x)

回収法 : 標準的なピーク検出を使用した回収

ピーク 1 は 5 分 20 秒に溶出し、そして左旋性エナンチオマー (-) - 7 [$[\alpha]_D^{25} = -22.8^\circ$ ($c = 0.3$, MeOH, $\lambda = 598 \text{ nm}$; 20)] を得た。

ピーク 2 は 7 分 30 秒に溶出し、そして右旋性エナンチオマー (+) - 7 [] = + 19.2° (c = 0.4、MeOH, λ = 598 nm; 20) を得た。

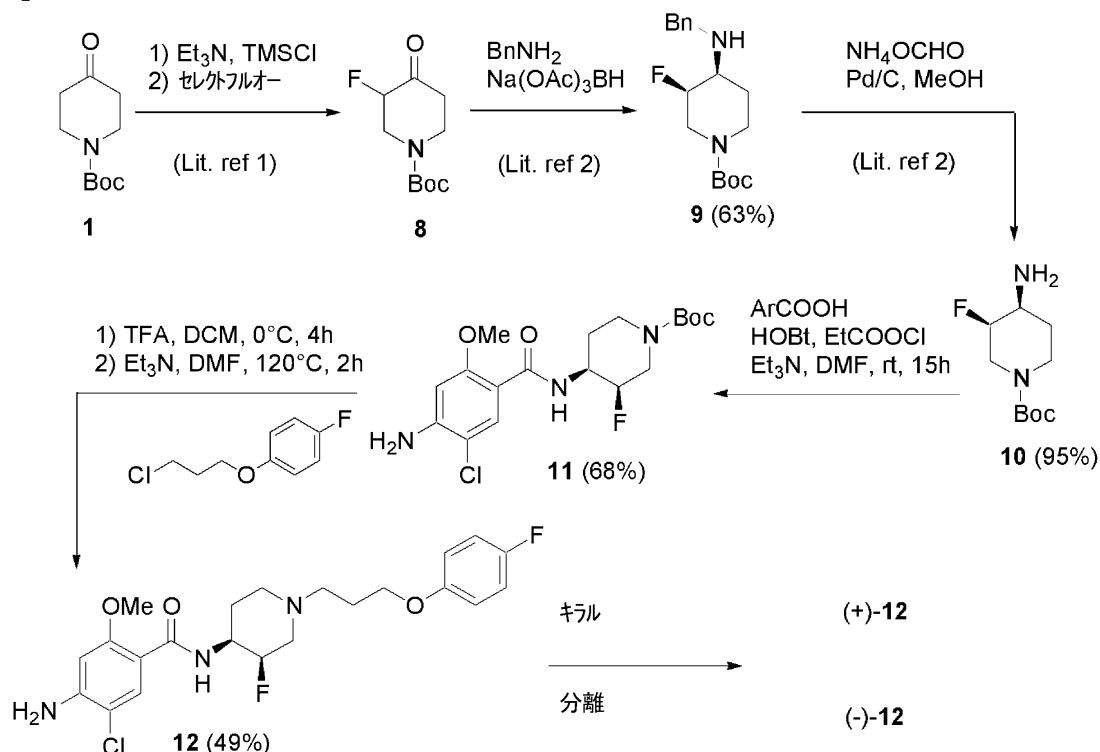
【实施例 2】

【 0 0 5 4 】

シス-4-アミノ-5-クロロ-N-{3-フルオロ-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)プロピル]ピペリジン-4-イル}2-メトキシベンズアミド12の合成

【 0 0 5 5 】

【化 3】



【 0 0 5 6 】

シス - N - (1 - B o c - 3 - フルオロピペリジン - 4 - イル) アミン 1 0 の合成

化合物は文献：

- 1) J. Med. Chem. 1999, 42, 2087-2104, および
2) 国際公開第2007071965号パンフレット

に開示されているように調製した。

【 0 0 5 7 】

シス - t e r t - ブチル 4 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシベンゾイルアミノ) - 3 - フルオロピペリジン - 1 - カルボキシレート 1 1 の合成

0.97 g (4.82 mmol) の 4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシ安息香酸の溶液 (25 mL の乾燥 DMF 中) に、0.70 g (6.88 mmol) のトリエチルアミンを室温で N₂ 雰囲気下にて加えた。室温で 10 分間攪拌した後、0.52 g (4.82 mmol) のクロロギ酸エチル溶液 (1 mL の DMF 中) を室温で滴下し、そして攪拌を 30 分間続行した。次いで 0.65 g (4.82 mmol) の固体のヒドロキシベンゾトリアゾールを室温にて 1 回で加え、そして溶液を 30 分間攪拌した。引き続き 1.0 g (4.59 mmol) のアミン 10 の溶液 (3 mL の DMF 中) を室温で滴下し、そして反応混合物を室温で一晩攪拌した。その後、混合物を 100 mL のブラインに注ぎ、そして EtOAc で抽出した (4 x 30 mL)。合わせた有機画分をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (hex/EtOAc/Et₃N 1:1:0.1; Rf = 0

、0.1)、1.25 g (68%) の純粋な *tert*-ブチル 4-(4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシベンゾイルアミノ)-3-フルオロピペリジン-1-カルボキシレート 11 を固体として得た。Mp 198 - 199。¹HMR (CDCl₃): 1.35 (9H, s); 1.44 - 1.77 (2H, m); 2.77 - 2.98 (1H, m); 3.81 (3H, s); 4.04 - 4.32 (4H, m); 4.42 (2H, s (br)); 4.65 (1H, d, J = 48.9 Hz); 6.23 (1H, s); 7.95 (1H, s (br)); 8.01 (1H, s)。¹⁹FNMR (CDCl₃): -203.5 から -204.5 (1F, m)。¹³CNMR (CDCl₃): 26.6, 28.5 (3x), 42.3 (br), 46.5 (br), 48.6 (d, J = 17.3 Hz), 52.2, 80.1, 87.9 (d, J = 176.5 Hz), 97.9, 111.6, 112.0, 133.1, 147.1, 155.2, 157.7, 164.0。IR (ATR, cm⁻¹): 3470, 3393, 3310, 1697, 1637, 1612, 1534, 1420。MS (ES+) m/z (%): 402 / 404 (M+H⁺, 100)。

【0058】

シス-4-アミノ-5-クロロ-N-{3-フルオロ-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)プロピル]-ピペリジン-4-イル}-2-メトキシベンズアミド 12 の合成。

1.00 g (2.49 mmol) の *tert*-ブチル 4-(4-アミノ-5-クロロ-2-メトキシベンゾイルアミノ)-3-フルオロピペリジン-1-カルボキシレート 11 の溶液 (10 mL の DCM 中) に、2.83 g (24.9 mmol) のトリフルオロ酢酸を 0 で乾燥雰囲気下 (CaCl₂ 管) で加えた。0 で 4 時間攪拌した後、混合物を減圧下で蒸発させた。この油状残渣を 25 mL の乾燥ジエチルエーテルに溶解し、0 に冷却し、そして形成した結晶 TFA 塩を単離した (フィルターまたは Et₂O デカント)。乾燥そしてさらに真空下で蒸発させた後、0.78 g の 4-アミノ-5-クロロ-N-(3-フルオロピペリジン-4-イル)-2-メトキシベンズアミドの TFA-塩を白色固体として得た。得られた塩の 0.78 g の溶液 (10 mL の DMF 中) に、1.26 g (12.45 mmol) のトリエチルアミン、0.37 g (2.49 mmol) のヨウ化ナトリウム、次いで 0.47 g (2.49 mmol) の 3-(4-フルオロフェノキシ)プロピル-1-クロライドを室温にて乾燥雰囲気下で加えた。混合物を 2 時間で 120 で加熱した。冷却後、混合物を 25 mL の EtOAc で希釈し、ブライン (25 mL) に注ぎ、そして EtOAc (3 x 25 mL) で抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、MgSO₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で蒸発させた。粗混合物を勾配フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにかけて (EtOAc / hex / Et₃N 3:1:0.1 ~ EtOAc 中の 1% Et₃N)、49% の 4-アミノ-5-クロロ-N-{3-フルオロ-1-[3-(4-フルオロフェノキシ)プロピル]ピペリジン-4-イル}-2-メトキシベンズアミド 12 を淡い黄色の固体として得た。Mp 137。任意に EtOAc / EtOH から再結晶化。¹HMR (CDCl₃): 1.83 - 1.92 (2H, m); 1.94 (2H, 五重線, J = 6.6 Hz); 2.10 - 2.35 (2H, m); 2.47 - 2.61 (2H, m); 2.94 (1H, d (br), J = 11.6 Hz); 3.24 (1H, t (br), J = 11.3 Hz); 3.85 (3H, s); 3.95 (2H, t, J = 6.6 Hz); 4.08 - 4.27 (1H, m); 4.41 (2H, s (br)); 4.73 (1H, d (br), J = 49.6 Hz); 6.26 (1H, s), 6.76 - 6.84 (2H, m); 6.89 - 6.97 (2H, m); 8.03 (1H, s (br)); 8.06 (1H, s)。¹⁹FNMR (CDCl₃): -199.3 ~ -200.0 (1F, m); -124.1 (1F, tt, J = 7.9 Hz, J = 5.3 Hz)。¹³CNMR (CDCl₃): 26.9, 27.4, 48.3 (d, J = 18.4 Hz), 52.0, 54.7, 56.1 (d, J = 18.3 Hz), 56.2, 66.8, 88.8 (d, J = 175.3 Hz), 97.9 Hz, 111.6, 112.2, 2x 115.6 (d, J = 8.0 Hz), 2x 115.8 (d, J = 23.1 Hz), 133.1, 147.0, 155.2, 157.2 (d, J = 237.7 Hz), 157.7, 164.0。IR (ATR, cm⁻¹): 3477, 3398, 3322, 1636

, 1612, 1583, 1537, 1505, 1247, 1209. MS (ES+) m/z (%): 454 / 456 (M + H⁺, 100).

【0059】

シス - 4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3 - フルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ)プロピル]ピペリジン - 4 - イル } - 2 - メトキシベンズアミド 12 のキラル分離

。

化合物 12 をそのエナンチオマーに超臨界流体クロマトグラフィーにより分割した。

量: 152 mg (添加: 8.5 mg / 1.250 ml)

条件:

カラム: OJ 20 × 250 mm (I)

移動相: 19% MeOH (0.2% iPrNH₂ を含む)、14.00 分維持

パラメーター: 流速 = 50 ml / 分

カラム温度 = 40

ノズル圧 = 10 MPa

注入の種類: スタック注入 (18 ×)

回収法: 標準的なピーク検出を使用した回収

ピーク 1 は 10 分 20 秒に溶出し、そして左旋性エナンチオマー (-) - 12 [] = - 45.5° (c = 0.2, MeOH, λ = 598 nm; 20) を得た。

ピーク 2 は 11 分 40 秒に溶出し、そして右旋性エナンチオマー (+) - 12 [] = + 39.8° (c = 0.2, MeOH, λ = 598 nm; 20) を得た。

【実施例 3】

【0060】

4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ)プロピル] - ピペリジン - 4 - イル } - 2 - メトキシベンズアミド 17 の合成
ベンジル - (3, 3 - ジフルオロ - ピペリジン - 4 - イル) アミン 14 の合成

100 mL のフラスコ内で、2.00 g (8.0 mmol) の 3, 3 - ジフルオロ - 4, 4 - ジヒドロキシ - 1 - トリフルオロアセチルピペリジン 13 (J. Org. Chem. 2010, 75, 929 - 932)、および 2.15 g (20.0 mmol; 2.5 当量) のベンジリアミンを 50 mL のトルエンに溶解した。混合物をディーンスタークトラップで 15 時間、加熱還流した。室温に冷却後、溶媒を真空下で除去した。生じた油を 25 mL の無水メタノールに溶解し、そして 0.56 g (8.8 mmol; 1.1 当量) のシアノ水素化ホウ素ナトリウムおよび 0.48 g (8.0 mmol; 1 当量) の酢酸を室温でゆっくり加えた。この溶液を室温で 4 時間攪拌した。溶媒を真空下で除去した後、粗油 (crude oil) を 50 mL のジクロロメタンに再溶解し、そして 50 mL の飽和 NaHCO₃ 水溶液に注ぎ、そして引き続きジクロロメタンで抽出した (3 × 50 mL)。合わせた有機層をブラインで洗浄し、そして MgSO₄ で乾燥した。固体を濾過し、そして溶媒を蒸発させて粗油を得、これをフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (EtOAc, R_f = 0.03), 1.32 g (5.8 mmol; 73% 収率) のベンジル - (3, 3 - ジフルオロ - ピペリジン - 4 - イル) アミン 14 を黄色い油として得た。

¹HMR (CDCl₃): 1.83 - 1.92 (2H, m); 1.94 (2H, 五重線, J = 6.6 Hz); 2.10 - 2.35 (2H, m); 2.47 - 2.61 (2H, m); 2.94 (1H, d (br), J = 11.6 Hz); 3.24 (1H, t (br), J = 11.3 Hz); 3.85 (3H, s); 3.95 (2H, t, J = 6.6 Hz); 4.08 - 4.27 (1H, m); 4.41 (2H, s (br)); 4.73 (1H, d (br), J = 49.6 Hz); 6.26 (1H, s), 6.76 - 6.84 (2H, m); 6.89 - 6.97 (2H, m); 8.03 (1H, s (br)); 8.06 (1H, s). ¹⁹F NMR (CDCl₃): -199.3 から -200.0 (1F, m); -124.1 (1F, tt, J = 7.9 Hz, J = 5.3 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): 26.9, 27.4, 48.3 (d, J = 18.4 Hz), 52.0, 54.7, 56.1 (d, J = 18.3 Hz), 56.2, 66.8, 88.8 (d, J = 17

10

20

30

40

50

5.3 Hz), 97.9 Hz, 111.6, 112.2, 2 × 115.6 (d, J = 8.0 Hz), 2 × 115.8 (d, J = 23.1 Hz), 133.1, 147.0, 155.2, 157.2 (d, J = 237.7 Hz), 157.7, 164.0. IR (ATR, cm^{-1}): = 3477, 3398, 3322, 1636, 1612, 1583, 1537, 1505, 1247, 1209. MS (ES+) m/z (%): 454/456 (M+H⁺, 100).

【0061】

ベンジル - { 3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロ - フェノキシ) プロピル]
ピペリジン - 4 - イル } アミン 15 の合成

100 mL のフラスコ内で、1.22 g (5.4 mmol) のベンジル - (3, 3 - ジフルオロ - ピペリジン - 4 - イル) アミン 14, 0.81 g (5.4 mmol; 1 当量) のヨウ化ナトリウム、2.73 g (27.0 mmol; 5 当量) のトリエチルアミンおよび 1.05 g (5.4 mmol; 1 当量) の 1 - (3 - クロロプロボキシ) - 4 - フルオロベンゼンの混合物 (70 mL) を、120 で 30 時間攪拌した。別に 27.3 g (27.0 mmol; 5 当量) のトリエチルアミンを加え、そして混合物を 120 で 16 時間攪拌した。次いで 1.05 g (5.4 mmol; 1 当量) の 1 - (3 - クロロプロボキシ) - 4 - フルオロベンゼンを加え、そして混合物を 120 で 54 時間、反応が完了するまで攪拌した。溶媒を真空下で除去し、そして粗油を 100 mL の EtOAc に再溶解し、そしてブラインで洗浄し、そして MgSO₄ で乾燥した。固体を濾過し、そして溶媒を蒸発させて粗油を得、これをフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (ヘキサン / EtOAc 1:1, R_f = 0.19 ~ 0.38), 1.00 g (2.6 mmol; 49% 収率) のベンジル - { 3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロ - フェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル } アミン 15 を茶色い油として得た。

¹HMR (CDCl₃): 1.48 - 1.62 (1H, m, CH_aH_b); 1.58 (1H, s (広い), NH); 1.80 - 1.92 (1H, m, CH_aH_b); 1.86 (2H, 五重線, J = 6.9 Hz, CH₂); 2.09 (1H, t, J = 10.7 Hz, NCH_aH_b); 2.26 (1H, ddd, J = 23.8 Hz, 12.3 Hz, 3.4 Hz, NCH_aH_bCF₂); 2.41 - 2.57 (2H, m, NCH₂); 2.68 - 2.82 (2H, m, NCH₂および NCH_aH_b); 2.99 (1H, td, J = 11.3 Hz, 8.8 Hz, NCH_aH_bCF₂); 3.84 (1H, d, J = 14.0 Hz, CH_aH_bPh); 3.89 (2H, t, J = 6.9 Hz, OCH₂); 3.91 (1H, d, 14.0 Hz, CH_aH_bPh); 6.74 (2H, dd, J = 9.4 Hz, 4.4 Hz, 2 × CH_ar); 6.87 (2H, t, J = 9.4 Hz, 2 × CH_ar); 7.14 - 7.30 (5H, m, 5 × CH_ar). ¹⁹FNMR (CDCl₃): -104.9 (1F, d, J = 225.6 Hz, CF_aF_b); -116.9 (1F, d (広い), J = 225.6 Hz, CF_aF_b); -124.0 (1F, tt, J = 7.9 Hz, 4.0 Hz, C_arF). ¹³CNMR (CDCl₃): 26.7 (CH₂, アルキル); 29.2 (d, J = 5.8 Hz, CH₂); 50.8 (NCH₂); 51.5 (NCH₂Ph); 53.9 (NCH₂, アルキル); 57.0 (t, J = 20.8 Hz, NCH); 57.2 (t, J = 27.7 Hz, NCH₂CF₂); 66.4 (OCH₂); 115.4 (d, J = 8.1 Hz, 2 × CH_ar); 115.7 (d, J = 23.1 Hz, 2 × CH_ar); 120.9 (t, J = 245.2 Hz, CF₂); 127.0 (CH_ar); 128.0 (2 × CH_ar); 128.5 (2 × CH_ar); 140.2 (C_ar); 155.0 (d, J = 2.3 Hz, OC_ar); 157.1 (d, J = 238.8 Hz, C_arF). IR (ATR, cm^{-1}): = 3334 (NH); 3062; 3028; 2953; 2823; 1682; 1602; 1505; 1470; 1454; 1388; 1346; 1292; 1247; 1205; 1152; 1118; 1097; 1064; 1028; 987; 912; 828; 736; 699. MS (ES+) m/z (%): 379 (M+H⁺, 100).

【0062】

10

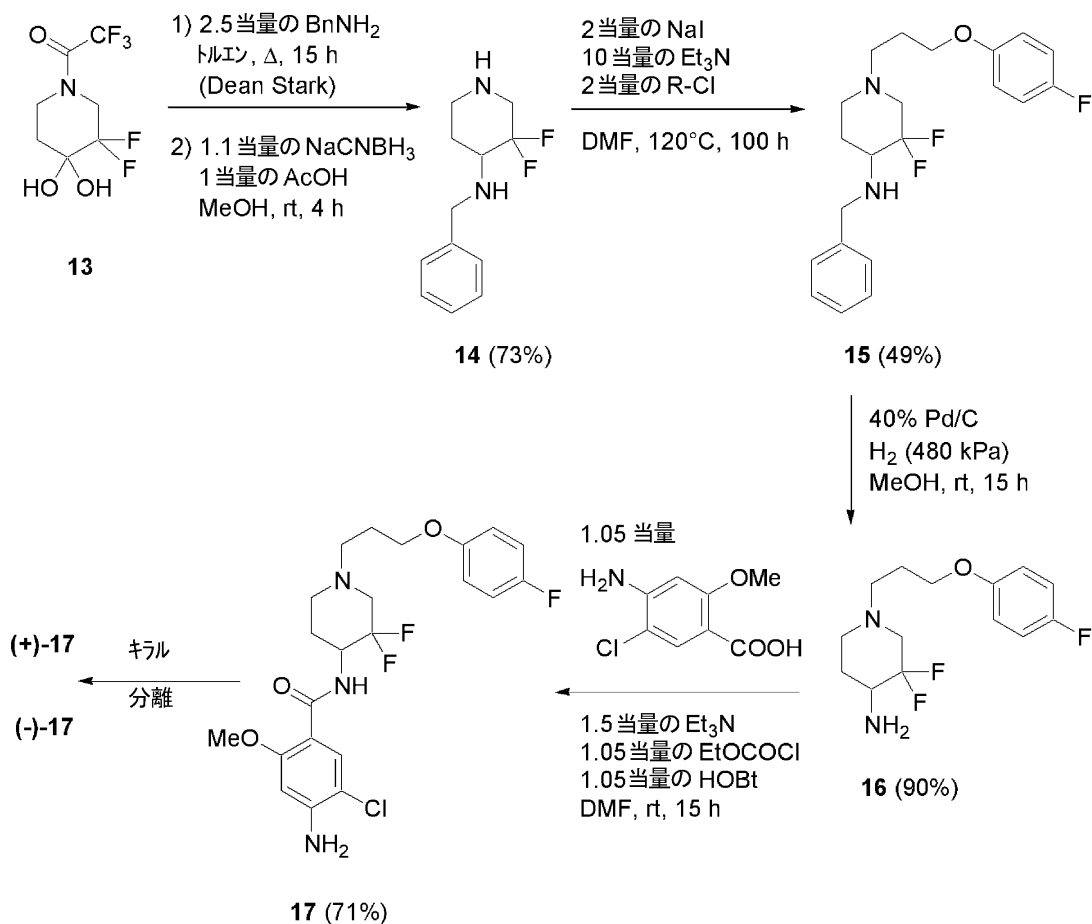
20

30

40

50

【化 4】



10

20

【 0 0 6 3 】

3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - アミン 16 の合成

乾燥した圧力容器内で、0.83 g (2.2 mmol) のベンジル - { 3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル } アミン 15 を 10 mL のメタノールに溶解した。0.33 g (40 重量%) の Pd/C (10%) を 0 で加えた後、この混合物を 480 kPa の水素圧下で室温にて 15 時間攪拌した。混合物を珪藻土で濾過した。溶媒を真空下で蒸発させて 0.57 g (2.0 mmol; 90% 収率) の 3, 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - アミン 16 を黄色い油として得た。 ^1HMR (CDCl_3): 1.54 (1H, ddd, $J = 24.5 \text{ Hz}$, 11.3 Hz, 3.7 Hz, 1.7 Hz, CH_aH_b); 1.80 - 1.99 (1H, m, CH_aH_b); 1.86 (2H, 五重線, $J = 6.7 \text{ Hz}$, CH_2); 2.11 (1H, t, $J = 11.6 \text{ Hz}$, NCH_aH_b); 2.21 (1H, ddd, $J = 26.4 \text{ Hz}$, 12.1 Hz, 2.2 Hz, $\text{NCH}_a\text{H}_b\text{CF}_2$); 1.42 (2H, s (広い), NH_2); 2.44 - 2.61 (2H, m, NCH_2); 2.76 - 2.92 (2H, m, NCH および NCH_aH_b); 3.00 - 3.13 (1H, m, $\text{NCH}_a\text{H}_b\text{CF}_2$); 3.90 (2H, t, $J = 6.7 \text{ Hz}$, OCH_2); 6.75 (2H, dd, $J = 9.4 \text{ Hz}$, 4.4 Hz, $2 \times \text{CH}_a$); 6.88 (2H, t, $J = 9.4 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_a$)。 ^{19}FMR (CDCl_3): -109.6 (1F, d, $J = 239.4 \text{ Hz}$, CF_aF_b); -120.5 (1F, d (広い), $J = 239.4 \text{ Hz}$, CF_aF_b); -124.0 (1F, tt, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 4.0 Hz, C_aF)。 $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3): 26.8 (CH_2 , アルキル); 30.6 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, CH_2); 51.4 (NCH_2); 52.8 (t, $J = 22.5 \text{ Hz}$, NCH); 53.9 (NCH_2 , アルキル); 57.0 (dd, $J = 2$

30

40

50

9.4 Hz, 24.8 Hz, NCH_2CF_2); 66.4 (OCH_2); 115.4 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 115.7 (d, $J = 21.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 119.6 (dd, $J = 245.8 \text{ Hz}$, 241.1 Hz , CF_2); 155.0 (OC_{ar}); 157.2 (d, $J = 237.7 \text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{ar}}\text{F}$). IR (ATR, cm^{-1}): 3384; 2952; 2821; 1601; 1505; 1470; 1390; 1348; 1294; 1247; 1204; 1146; 1078; 915; 828; 757; 735. MS (ESI+) m/z (%): 289 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100).

【0064】

4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3 , 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル } - 2 - メトキシベンズアミド 17 の合成

50 mL の乾燥フラスコ内で、0.44 g (2.2 mmol; 1.1 当量) の 4 - アミノ - 5 - クロロ - 2 - メトキシ安息香酸および 0.30 g (3 mmol; 1.5 当量) のトリエチルアミンを、25 mL のジメチルホルムアミドに溶解し、そして室温で 10 分間攪拌した。次いで混合物を 0 に冷却し、そして 0.24 g (2.2 mmol; 1.1 当量) のクロロギ酸エチルを加え、そして室温で 30 分間攪拌した。次いで 0.29 g (2.2 mmol; 1.1 当量) の 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾールを加え、そして室温で 30 分間攪拌した。次いで 0.57 g の 3 , 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - アミン 16 を加え、そして混合物を室温で 15 時間攪拌した。溶媒を真空下で蒸発させた後、粗油を EtOAc に再溶解し、そして 50 mL のブラインに注ぎ、そして EtOAc で抽出した (4 x 50 mL)。有機相をブラインで洗浄し、そして MgSO_4 で乾燥した。固体を濾過し、そして溶媒を真空下で蒸発させた後、粗油をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (ヘキサン / EtOAc 3 : 7, $R_f = 0.35$)、0.66 g (1.4 mmol; 71% 収率) の純粋な 4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3 , 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノキシ) プロピル] ピペリジン - 4 - イル } - 2 - メトキシベンズアミド 17 を白色結晶として得た。M.p. = 125.8 (ヘキサン / EtOH 1 : 1)。 ^1H NMR (CDCl_3): 1.54 (1H, ddd, $J = 24.5 \text{ Hz}$, 11.3 Hz , 3.7 Hz , 1.7 Hz , CH_aH_b); 1.80 - 1.99 (1H, m, CH_aH_b); 1.86 (2H, 五重線, $J = 6.7 \text{ Hz}$, CH_2); 2.11 (1H, t, $J = 11.6 \text{ Hz}$, NCH_aH_b); 2.21 (1H, ddd, $J = 26.4 \text{ Hz}$, 12.1 Hz , 2.2 Hz , $\text{NCH}_a\text{H}_b\text{CF}_2$); 1.42 (2H, s (広い), NH_2); 2.44 - 2.61 (2H, m, NCH_2); 2.76 - 2.92 (2H, m, NCH and NCH_aH_b); 3.00 - 3.13 (1H, m, $\text{NCH}_a\text{H}_b\text{CF}_2$); 3.90 (2H, t, $J = 6.7 \text{ Hz}$, OCH_2); 6.75 (2H, dd, $J = 9.4 \text{ Hz}$, 4.4 Hz , $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 6.88 (2H, t, $J = 9.4 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$). ^{19}F NMR (CDCl_3): -109.6 (1F, d, $J = 239.4 \text{ Hz}$, CF_aF_b); -120.5 (1F, d (広い), $J = 239.4 \text{ Hz}$, CF_aF_b); -124.0 (1F, tt, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 4.0 Hz , $\text{C}_{\text{ar}}\text{F}$). ^{13}C NMR (CDCl_3): 26.8 (CH_2 , アルキル); 30.6 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, CH_2); 51.4 (NCH_2); 52.8 (t, $J = 22.5 \text{ Hz}$, NCH); 53.9 (NCH_2 , アルキル); 57.0 (dd, $J = 29.4 \text{ Hz}$, 24.8 Hz , NCH_2CF_2); 66.4 (OCH_2); 115.4 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 115.7 (d, $J = 21.9 \text{ Hz}$, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 119.6 (dd, $J = 245.8 \text{ Hz}$, 241.1 Hz , CF_2); 155.0 (OC_{ar}); 157.2 (d, $J = 237.7 \text{ Hz}$, $\text{C}_{\text{ar}}\text{F}$). IR (ATR, cm^{-1}): 3384; 2952; 2821; 1601; 1505; 1470; 1390; 1348; 1294; 1247; 1204; 1146; 1078; 915; 828; 757; 735. MS (ESI+) m/z (%): 289 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100).

【0065】

4 - アミノ - 5 - クロロ - N - { 3 , 3 - ジフルオロ - 1 - [3 - (4 - フルオロフェノ

10

20

30

40

50

キシ)プロピル]ピペリジン-4-イル}-2-メトキシベンズアミド17のキラル分離

170 mgの17をそのエナンチオマーに超臨界流体クロマトグラフィーによりBergger Multigram (商標) (Mettler, Toledo Co., Ltd)で、IC250 mm 50 mm、5 mmカラムを用いて分割した。

移動相：超臨界CO₂：0.05% DEAを含むMeOH = 75：25、160 ml / 分で

カラム温度：38

ノズル圧：30 MPa

ノズル温度：20

エバポレーター温度：20

トリマー温度：25

波長：220 nm

ピーク1は7.4分に溶出し、そして右旋性エナンチオマー(+) - 17

e.e% = 100% ; [α]_D = +14.1° (c = 0.3, MeOH, λ = 598 nm ; 20°C)を得た。

ピーク2は8.5分に溶出し、そして左旋性エナンチオマー(-) - 17

e.e% = 98.6% ; [α]_D = -14.4° (c = 0.3, MeOH, λ = 598 nm ; 20°C)を得た。

【0066】

薬理学的実施例

【実施例4】

【0067】

受容体の結合

競合的な放射性リガンド結合アッセイを使用して、試験化合物の特定受容体に対する親和性を測定した。様々な濃度の非標識試験化合物を、目的の受容体を含有する膜画分、および固定の低濃度(nM)放射性リガンドを含むインキュベーション混合物に加えた。このインキュベーション中、放射性リガンドは受容体に結合するが、この結合は非標識試験化合物によりその結合親和性および濃度に比例して阻害される。

【0068】

適切なcDNAでトランスフェクションした後に、調査する条件下で受容体のヒトバリアントを安定に発現する細胞株が樹立された(表1)。トランスフェクトした細胞を標準的な培養条件下で増殖させ、そして膜画分を細胞の遠心および均一化で得た。結合実験に至適な膜の希釈を決定し、そしてアリコートを使用するまで-70°Cで保存した。96ウェルプレートの形式で、適切な放射性リガンドは、受容体を含有する膜調製物に調査下で加えた。化合物溶液をDMSO中に調製し、そして100倍にマルチウェルプレート中で希釈して、最終試験濃度を10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ Mとした。試験化合物とインキュベーションした後、非結合の放射性リガンドはFiltermate 96を用いてG/Fフィルターで濾過することにより除去した。Microscint (商標)を洗浄したフィルタープレートに加え、そして受容体に結合した放射活性をTop Count (Packard)中での液体シンチレーションカウンティングにより測定した。非特異的結合(NSB)を測定するために、高濃度の非放射性リガンドを、膜画分および放射性リガンドを含有するウェルに加えた。

【0069】

10

20

30

40

【表 1】

表1：評価する受容体に対する放射性リガンドの結合の阻害に関するアッセイ条件のまとめ

受容体	細胞株	放射性リガンド	濃度 (nM)	Kd (nM)
5HT _{1A}	HEK293	3H-8-OH-DPAT	0.5	0.557
5HT _{2A}	NIH3T3	3H-ケタンセリン	2	0.628
5HT _{2B}	CHO	3H-5-HT	4	2.312
5HT _{2C}	CHO	3H-メスレルギン	1	1.909
5HT _{3A/B}	HEK293	3H-GR65630	0.5	0.247
5HT _{4B}	HEK293	3H-GR113808	0.1	0.059
Alpha _{1A}	CHO	3H-プラゾシン	0.25	0.226
Alpha _{2A}	CHO	3H-ローウオルシン	1	0.485
Alpha _{2B}	CHO	3H-ローウオルシン	1	0.853
Alpha _{2C}	CHO	3H-ローウオルシン	1	0.100
D _{2L}	CHO	3H-スピペロン	0.2	0.239
hERG	HEK293	3H-ドフェチリド	5	3.66

10

20

【0070】

試験化合物により誘導される受容体への放射性リガンドの結合の阻害%は、式
 効果% = $100 - [(\text{サンプル} - \text{NSB}) / (\text{HC} - \text{NSB}) - 100]$ により算出され、
 式中、サンプル = 薬剤で処理したウェル中の放射能カウント、HC = 放射性リガンドのみとインキュベーションした対照ウェル中の放射能カウント。阻害%対試験化合物濃度をプロットするために、自家製ソフトウェアを使用して、最適な曲線を最小平方和法によりあてはめた。これから pIC₅₀ 値（特異的結合の50%置換を生じる阻害濃度）が決定され、ならびにプロットの傾斜も予測された（ヒル係数）。

【0071】

【表 2】

表2 :pIC₅₀ 値

Co.No. 標的	Ref.	(±)-17	(+)-17	(-)-17	(±)-7	(+)-7	(-)-7	(±)-12	(+)-12	(-)-12	傾向
5HT _{1A}	5.71	5.1	5.25	<5	5.74	6.17	5.96	5.38	6.13	5.73	=
5HT _{2A}	7.84	5.71	5.59	5.76	6.95	7.15	6.12	6.44	6.49	6.31	↓
5HT _{2B}	6.62	7.86	7.29	8.14	6.97	6.89	6.6	7.18	6.83	7.14	↑
5HT _{2C}	5.73	5.33	<5	5.18	5.74	5.91	5.43	5.36	5.3	5.18	=
5HT _{3A/B}	5.94	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5.17	<5	5.56	↘
5HT _{4B}	6.65	<5	<5	<5	6.21	6.06	6.36	6.94	6.9	6.27	↘
Alpha _{1A}	6.39	<5	<5	5.11	<5	6.28	6.4	6.35	6.26	6.48	↘
Alpha _{2A}	6.05	<5	<5	<5	5.44	<5	5.11	5.32	5	5.09	↘
Alpha _{2B}	6.19	<5	<5	<5	5.6	5.58	5.22	5.6	5.47	5.28	↘
Alpha _{2C}	6	<5	<5	<5	6.02	<5	5.93	5.68	5.71	5.23	↘
D _{2L}	6.27	4.98	<5	<5	5.34	5.56	5.10	5.33	5.32	5.32	↓
hERG	7.42	5.12	<5	<5	6.63	6.54	6.5	6.5	6.75	6.72	↓

参照化合物(Ref.)はシサプリドである。

【実施例 5】

【0072】

5-HT_{2B}拮抗作用

CHO-K1(EGACC)細胞は、pCDNA3.1にサブクローン化したヒト5-HT_{2B}受容体のcDNAを用いてリン酸カルシウム法により安定にトランスフェクトした。安定にトランスフェクトした細胞株はG-418を使用して選択し、そしてクローン性細胞株を限界希釈により成長させた。細胞株は10%の熱不活性化透析ウシ胎児血清(FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%L-グルタミンおよび1%非必須アミノ酸を含有するダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)で培養した。

【0073】

透明な底の、黒い96ウェルプレートにまかれたコンフルエントな単層に、4μMのFluo-3-AM(20mM HEPESおよび2.5mM プロベネシッド(probenecid)を補充したハンスバラン塩溶液中)を37℃で90分間乗せた。洗浄後、試験化合物を細胞に加え、そして0.1nMのセロトニンに応答する最大の蛍光を、蛍光撮像プレートリーダー(FLIPR)を使用して記録して細胞内のカルシウムレベルの変化を検出した。

【0074】

試験化合物の存在下で記録された最大の蛍光は、アゴニストであるセロトニン(0.1nM)に対する最大の蛍光応答の割合として表わした。IC₅₀値はヒルの式の曲線あてはめ($Y = D + [(A - D) / (1 + (C / IC_{50})^nH)]$ 、式中、Y = 特異的応答、D = 最小の特異的応答(薬剤またはセロトニンは加えず)、A = 最大の特異的応答(0.1nM セロトニン、薬剤なし)、C = 化合物濃度、および $IC_{50} = IC_{50}$ 、そしてnH = 傾斜因子)(SigmaPlot(商標)4.0、SPSS Inc.)を使用して、平均反復値(mean replicate value)で作成した濃度-応答曲線の非線形回帰分析により決定した。見かけの解離定数(K_B)は改良Cheng-Prusoff式($K_B = IC_{50} / (1 + (A / EC_{50A}))$ 、式中、A = セロトニン濃度、そして EC_{50A} = このアッセイ中のセロトニンのEC₅₀値)を使用して算出した。(Porter et al. (1999), Br. J. Pharmacol., 128:

13 - 20)。

【0075】

【表3】

表3: 5-HT_{2B}拮抗作用

化合物	IC ₅₀	K _B
(±)-7	60 nM	20 nM
(±)-12	12 nM	4.2 nM
(+)-17	33 nM	11 nM
(-)-17	1.6 nM	0.55 nM

10

【実施例6】

【0076】

Patch発現装置を使用したhERG-トランスフェクトHEK293細胞

実験は、hERGカリウムチャンネルを安定に発現しているHEK293細胞を使用して行った。細胞は培養フラスコ中、37 °Cおよび5%CO₂で、10%の熱不活性化ウシ胎児血清、1%のL-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、1%非必須アミノ酸(100x)、1%ピルビン酸ナトリウム(100mM)および0.8%ジェネティシン(50mg/ml)を補充したMEM培地中で成長させた。使用前に細胞は、5mLのL-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシンを含まないMEM培地中で継代培養した。自動化パッチ-クランプシステムのPatchXpress7000A(Axon Instruments)で使用するために、細胞を回収して単一細胞の細胞懸濁液を得た。細胞外溶液は以下を含んだ(mM): 150NaCl、4KCl、1MgCl₂、1.8CaCl₂、10HEPES、5グルコース(pH7.4、NaOHを含む)。ピペット溶液は以下を含んだ(mM): 120KCl、10HEPES、5EGTA、4ATP-Mg₂、2MgCl₂、0.5CaCl₂(pH7.2、KOHを含む)。

20

【0077】

パッチ-クランプ実験は、電圧-クランプ様式で行い、そして全細胞電流をPatchXpress7000Aシステム(Axon Instruments)を使用した自動化パッチ-クランプアッセイで記録した。電流の信号をMulticlamp増幅器で増幅し、そしてPatchXpress、DataXpressソフトウェアおよびIgor5.0(Wavemetrics)を使用することによりデジタル化し、保存し、そして分析した。

30

【0078】

保持電位は-80mVであった。hERG電流(K⁺-選択的外側電流)は、+60mVに対して2秒間脱分極した後、-40mVでの最大テール電流として決定した。パルスサイクル速度は15秒であった。各試験パルスの前に、-60mVに対する保持電位から短いパルス(0.5s)を与えて、(直線状)リーク電流を決定した。

【0079】

全細胞の配置を確立し、そして安定性期間の後、賦形剤(水性DMSO対照)を5分間適用し、続いて試験物質を濃度を上げながら(10⁻⁷M、3×10⁻⁷Mおよび3×10⁻⁶M)適用した。

40

【0080】

各試験物質濃度を2回適用した。各濃度の効果は、5分後に3つの連続電圧パルスの平均電流として決定した。遮断の程度を測定するために、残余電流を賦形剤での前処理と比較した。データは表4に示した濃度での遮断%として表わす。カッコ内の値は賦形剤による遮断%を指す。

【0081】

【表 4】

表4 :hERGチャンネルの遮断%

濃度	100 nM	300 nM	3000 nM
シサプリド	80 (7)	95 (15)	試験せず
(±)-7	35 (7)	62 (15)	94 (21)
(±)-12	40 (7)	73 (15)	96 (21)
(±)-17	9 (7)	17 (15)	58 (21)
(+)-17	14 (7)	21 (10)	52 (11)
(-)-17	3(7)	11 (10)	47 (11)

10

【実施例 7】

【0082】

ラットを対象としたモノクロタリン誘発性肺動脈性高血圧

化合物(-) - 17を、ラットを対象としてモノクロタリン誘発性肺動脈性高血圧で試験した(例えばStenmark et al, 2009, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297, L1013 - L1032参照)。測定には以下を含んだ: インビボでの平均動脈血圧および右室圧、右心室肥大の指数として右心室重量対左心室重量 + 隔膜の比、肺動脈加速時間、および肺動脈の筋層化の組織学的評価。

20

【0083】

モノクロタリンは1N HClに溶解し、次いで蒸留水に入れ、そしてpHをNaOHで7.4に調整した。60mg/kgのモノクロタリンの単回用量を、0日に3群のオスのSprague Dawleyラットに皮下投与した。試験物質の化合物(-) - 17を、発熱物質を含まない水中にNaOH、HClおよびマンニトールと共に含む20%ヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリンに溶解し、そして1日目から21日間、1日1回、10mg/kgおよび50mg/kgで胃管栄養法により経口投与した(10ml/kg)。化合物(-) - 17の血漿濃度は、21日目の最終投与から2時間後に測定した(ラットに経口投与した後の近似 C_{max})。対応する容量の20%ヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリン賦形剤を、第3群の動物に同じプロトコールに従い経口投与した。

30

【0084】

化合物(-) - 17を用いた3週間の、10mg p.o.で1日1回(21日目の投与から2時間後の平均血漿濃度 $\sim 80\text{ ng/ml}$)の、および50mg p.o.で1日1回(平均血漿濃度 $\sim 1000\text{ ng/ml}$)の処置は非毒性であり、そして平均動脈血圧(MAP)に影響はなかったが、右室圧(RVP)、右心室肥大が減少し(右心室/(左心室 + 隔膜); $RV/(LV+S)$)、そして肺動脈加速時間(PAAT)が上昇した(表5)。小さい肺動脈の平均壁厚は、モノクロタリン処置により有意に増加し、そしてこの肥厚化は化合物(-) - 17を50mg/kg p.o. ($P=0.0539$)および10mg p.o. ($P<0.005$)で3週間処理することにより減少した。

40

【0085】

【表 5】

表5:

処置	MAP (mmHg)	RVP (mmHg)	RV/(LV+S)	PAAT (ms)
賦形剤	92.53 ± 20.18	52.45 ± 9.16	0.66 ± 0.16	11.63 ± 2.36
化合物 (-)-17 10 mg/kg p.o.	93.7 ± 14.11	43.18 ± 7.38 *	0.46 ± 0.08 *	15.91 ± 2.76 *
化合物 (-)-17 50 mg/kg p.o.	97.58 ± 9.74	42.85 ± 11.55 *	0.41 ± 0.08 *	15.42 ± 2.62 *

値は21日に測定した平均 ± SD。賦形剤と比べて *p < 0.05

【実施例 8】

【0086】

麻酔をかけたモルモットを対象とした心血管効果

メスのモルモットにペントバルビタールナトリウム (66 mg / kg i . p .) で、続いて 6 mg / h でペントバルビタールナトリウムを連続的に i . v . 注入して麻酔をかけ、そして体表面心電図 (E C G)、心拍および平均動脈血圧を測定する準備をした (De C l e r c k e t a l , F u n d a m . C l i n . P h a r m . ; 2 0 0 2 ; 1 6 : 1 2 5 - 1 4 0 参照)。

【0087】

化合物 (-) - 1 7 は、発熱物質を含まない水中に N a O H、H C l およびマンニトールを共に含む 2 0 % ヒドロキシプロピル - シクロデキストリンに溶解し、そして用量を上げながら (0 . 1 6 , 0 . 3 2 , 0 . 6 4 , 1 . 2 5 , 2 . 5 および 5 m g / k g) 5 分間にわたり 1 5 分間隔で静脈内投与した (0 . 5 m l / k g)。化合物 (-) - 1 7 の血漿濃度は、各注入の終わりに測定した。第二群の動物には対応する容量の賦形剤を同じプロトコールに従い投与した。

【0088】

賦形剤に対して化合物 (-) - 1 7 は、0 . 1 6 から 5 m g / k g まで (全用量 : 9 . 8 7 m g / k g ; C _{m a x} ; 1 1 , 9 5 0 n g / m l)、麻酔をかけたモルモットの心拍、P Q , Q R S , Q T および Q T c B 間隔の期間に関連する効果が無く、または E C G 形態の効果は無かった (表 6)。2 . 5 m g / k g から先に進むと (C _{m a x} : 6 , 3 2 5 n g / m l ; 表 7)、平均動脈血圧が上がり始めた (表 6)。

【0089】

賦形剤を最後に注入してから 1 5 分後に与えた参照化合物ドフェチリド (0 . 0 2 m g / k g i . v . 1 分間) は、心拍を下げ、そして Q T および Q T c B 間隔を延長した。

【0090】

10

20

30

40

【表 6】

表6：麻酔をかけたモルモットを対象として、ベースライン値に対する変化の割合として表した心拍(HR)、平均動脈血圧(MBP)およびECGパラメーターに関する各注入の前および2、5、および15分後の化合物(-)-17の効果。ベースライン値は実際の単位で提示する。

パラメーター	HR b/分	MBP mmHg	PQ ms	QRS ms	QT ms	QTc B ms
ベースライン	230	33	63	31	185	361
0.16 mg/kg @ 2'	-1%	4%	0%	-2%	0%	-1%
0.16 mg/kg @ 5'	0%	13%	1%	-2%	-1%	-1%
0.16 mg/kg @ 15'	-2%	-3%	4%	0%	1%	1%
0.32 mg/kg @ 2'	-1%	6%	2%	-2%	0%	1%
0.32 mg/kg @ 5'	-4%	2%	4%	0%	3%	1%
0.32 mg/kg @ 15'	-4%	-3%	4%	0%	4%	3%
0.64 mg/kg @ 2'	-5%	6%	5%	0%	7%	4%
0.64 mg/kg @ 5'	-2%	13%	5%	-5%	5%	2%
0.64 mg/kg @ 15'	-5%	-5%	4%	-3%	8%	4%
1.25 mg/kg @ 2'	-7%	4%	5%	-2%	8%	4%
1.25 mg/kg @ 5'	-7%	15%	6%	0%	6%	2%
1.25 mg/kg @ 15'	0%	9%	6%	-3%	2%	3%
2.5 mg/kg @ 2'	-5%	17%	7%	-3%	6%	4%
2.5 mg/kg @ 5'	-6%	21%	7%	-3%	6%	3%
2.5 mg/kg @ 15'	-4%	8%	8%	0%	6%	5%
5 mg/kg @ 2'	-3%	36%	6%	-2%	7%	5%
5 mg/kg @ 5'	-3%	34%	6%	0%	3%	2%

値はn=6の中央値である。統計的に有意な差違(p < 0.05)は太字およびイタリックで示し、そして実際の単位のベースラインからの変化で算出した。

【 0 0 9 1 】

【表 7】

表7：15分間隔で5分間にわたり静脈内用量を上げながら(0.16, 0.32, 0.64, 1.25, 2.5 および 5mg/kg)投与した後の化合物(-)-17(ng/ml)の血漿レベル中央値 (n=6)

用量	0.16	0.32	0.64	1.25	2.5	5
中央値	398	873	1815	3330	6325	11950

【実施例 9】

【 0 0 9 2 】

マウスを対象としたブレオマイシン誘導性の肺線維症（予想）

オスのC57BL/6マウスはイソフルラン吸入麻酔下で硫酸ブレオマイシン（2.5 U/ml水溶液；2 ml/kg BW）を用いて気管内処置する（例えばIshii Y et al, 2006. Am J Respir Crit Care Med, 174 (5)；550-6参照）。その後、化合物(-)-17を2週間にわたり1日1回、10 mg/kgおよび50 mg/kg p.o.で投与する。死後の調査には15日目の肉眼所見、肺重量および肺の組織病理学を含む。肺の組織病理学調査は、ブレオマイシン

10

20

30

40

50

が未処置マウスの肺に炎症、続いて線維症を引き起こすことを示す。

【実施例 10】

【0093】

マウスを対象とした薬物動態学的評価

静脈内 (i.v.) 投与については、化合物 (-) - 17 を 20 (w/v) % のヒドロキシ - プロピル - ベータ - シクロデキストリン (HPβCD) を含有する塩溶液に 0.25 mg/mL の濃度で溶解し、そしてオスの CD1 マウス (n = 3) にボラスとして尾の静脈を介して 2.5 mg/kg の用量レベルで投与した (10 mL/kg)。経口 (p.o.) 投与については、化合物 (-) - 17 を 20 (w/v) % の HPβCD を含有する水に 0.5 mg/mL の濃度で溶解し、そしてオスの CD1 マウス (n = 3) に胃管栄養として 10 mg/kg の用量レベルで投与した (20 mL/kg)。血液サンプルは伏在静脈を介して投与から 24 時間後まで連続する時点で集めた。血漿は遠心により得、そして分析するまで -20 で保存した。分析は、陽イオンモードでタンデム質量分析計の検出 (MS/MS) を用いて、液体クロマトグラフィー (LC) を使用して行った。化合物 (-) - 17 は逆相カラムからアセトニトリルおよび 0.1 (v/v) % ギ酸を含む水の勾配で溶出した。分析の時点で、血漿サンプル (200 μL) を解凍し、そして 200 μL のアセトニトリルで脱プロトン化し、そして遠心した。上清のアリコートは逆相 UPLC カラムに注入し、そしてエレクトロスプレーマススペクトロメトリーを介して分析した。この試験サンプルの前および後に分析するカリブレーション標準および品質対照は、と同時にマウス血漿で調製した。精度 (独立した QC サンプルからの試験 (branch) 間精度) は、全濃度範囲にわたり公称値の 85 % から 115 % の間であった。血漿濃度 - 時間曲線のノンコンパートメント薬物動態学分析 (non-compartmental pharmacokinetic analysis) は WinNonLin を使用して行って、血漿クリアランス (CLp)、定常状態分布容積 (Vss)、終末期における消失半減期 (t_{1/2}) および経口バイオアベイラビリティ (F) の評価を提供し、この結果を表 8 にまとめる。

【実施例 11】

【0094】

ラットを対象とした薬物動態学的評価

静脈内 (i.v.) 投与については、化合物 (-) - 17 を 20 (w/v) % のヒドロキシ - プロピル - ベータ - シクロデキストリン (HPβCD) を含有する塩溶液に 1 mg/mL の濃度で溶解し、そしてオスの Sprague Dawley ラット (n = 1) にボラスとして伏在静脈を介して 2.5 mg/kg の用量レベルで投与した (2.5 mL/kg)。経口 (p.o.) 投与については、化合物 (-) - 17 を 20 (w/v) % の HPβCD を含有する水に 1 mg/mL の濃度で溶解し、そしてオスの Sprague Dawley ラット (n = 3) に胃管栄養として 10 mg/kg の用量レベルで投与した (10 mL/kg)。血液サンプルは尾の静脈を介して投与から 24 時間後まで連続する時点で集めた。血漿は遠心により得、そして分析するまで -20 で保存した。分析は、陽イオンモードでタンデム質量分析計の検出 (MS/MS) を用いて、液体クロマトグラフィー (LC) を使用して行った。化合物 (-) - 17 は逆相カラムからアセトニトリルおよび 0.1 (v/v) % ギ酸を含む水の勾配で溶出した。分析の時点で、血漿サンプル (50 μL) を解凍し、そして少なくとも 3 容量のアセトニトリルで脱プロトン化し、そして遠心した。上清のアリコートは逆相 UPLC カラムに注入し、そしてエレクトロスプレーマススペクトロメトリーを介して分析した。サンプルの前および後に分析するカリブレーション標準および品質対照は、試験サンプルと同時にラット血漿で調製した。精度 (独立した QC サンプルからの試験間精度) は、全濃度範囲にわたり公称値の 85 % から 115 % の間であった。血漿濃度 - 時間曲線のノンコンパートメント薬物動態学分析は WinNonLin を使用して行って、血漿クリアランス (CLp)、定常状態分布容積 (Vss)、終末期における消失半減期 (t_{1/2}) および経口バイオアベイラビリティ (F) の評価を提供し、この結果を表 8 にまとめる。

【 0 0 9 5 】

【 表 8 】

表8：化合物(-)-17-AAA(遊離塩基)のi.v.およびp.o.投与後に、マウスおよびラットで得た化合物(-)-17に関するノンコンパートメント薬物動態学パラメーター

パラメーター	マウス	ラット
CL (mL/min/kg)	20 ± 6	46
Vss (L/kg)	1.9 ± 0.6	3.1
t _{1/2} (h)	1.4 ± 0.2	1.1
Cmax (ng/mL) PO	1580 ± 165	119 ± 37
Tmax (h) PO	0.5 [0.5-1.0]	0.5
AUC(0-t) (ng.h/mL) PO	4443 ± 1093	686 ± 254
F (%)	52	19

10

【 実施例 1 2 】

【 0 0 9 6 】

20

人工的に通気した麻酔をかけたイヌ（ビーグル）を対象とした心臓 - 血行力学的、心臓 - 電気生理学的、電気脳波のおよび肺 / 呼吸効果

動物に、0.015 mg / kg i.v. スコポラミンおよび0.075 mg / kg i.v. ロフェンタニルの混合物で麻酔をかけ、そしてスクシニルコリン (5 mg / kg i.v.) で弛緩させ、続いて1.5 mg / kg / hのエトミデートの連続i.v.注入、そして少量の追加用量のフェンタニル (0.025 mg / kg i.v.) を60分の間隔で与えた。動物に通気し、そして体表面ECG、大動脈 - 、肺 - および左心室血圧、頸動脈血流、単相性活動電位、体温、血中ガスおよびEEGを測定する準備をした (Van Deuren et al, J Pharmacol Toxicol Methods: 2009; 60: 11-23を参照)。化合物(-)-17は、発熱物質を含まない水中にNaOH、HClおよびマンニトールを共に含む20%ヒドロキシプロピル - シクロデキストリンに溶解し、そして用量を上げながら (0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5および5 mg / kg) 5分間にわたり30分間隔で静脈内投与した (1 ml / kg)。化合物(-)-17の血漿濃度は、各注入の前および終わりに測定した。第二群の動物には対応する容量の賦形剤を同じプロトコールに従い投与した。

30

【 0 0 9 7 】

賦形剤に対して、化合物(-)-17は0.16から5 mg / kgまで (全用量: 9.86 mg / kg; 中央値C_{max}: 20, 375 ng / ml)、麻酔をかけたイヌの心拍 (HR)、肺動脈血圧、左心室拡張終期圧、心拍出量、1回拍出量、ダブルプロダクト (pressure rate product)、PQおよびQRS間隔の期間、肺機能 (動的コンプライアンス、C_{dyn}, および気道抵抗、R_{aw})、体温またはEEG (Narcotrend (商標) で測定) について関連する効果は無かった。1.25 mg / kgから先に進むと (C_{max}: 5, 205 ng / ml; 表7)、動脈血圧、血管抵抗 (全身および総頸動脈) およびTau (弛緩の時間定数) が上がり始めた。

40

【 0 0 9 8 】

さらに2.5 mg / kg (C_{max}: 9, 550 ng / ml) で、LV dp / dt_{max} / pdが下がり始め、そして5 mg / kg (C_{max}: 20, 375 ng / ml) で、QTc VD W (HRについて補正されたQT間隔) およびQTc Vc T (HRおよび温度について補正されたQT間隔) の期間がわずかに低下したことが記録された。

【 0 0 9 9 】

50

【表 9】

表9：麻酔をかけたビーグル犬を対象として、心拍 (HR)、平均動脈血圧 (MBP)、収縮期 (SPP)および拡張期 (DPP)肺動脈圧、左心室収縮性 (LV dp/dt_{max})、およびECGパラメーター (PQ, QRS および QTcV) について、賦形剤に対する変化の割合として表した各注入の前および5および 30 分後の化合物 (-)-17の効果。ベースライン値は実際の単位で提示する。

パラメーター 単位	HR b/min	MBP mmHg	SPP mmHg	DPP mmHg	LVdp/dt _{max} mmHg/s	PQ ms	QRS ms	QTcV ms
ベースライン	64	103	29	12	3123	97	46	294
0.16 mg/kg @ 5'	-4%	+2%	+2%	+3%	-1%	-1%	+1%	+2%
0.16 mg/kg @ 30'	-5%	+3%	+5%	-3%	+0%	-0%	+2%	+4%
0.32 mg/kg @ 5'	-5%	+5%	+11%	+0%	+0%	-2%	+3%	+2%
0.32 mg/kg @ 30'	+3%	+2%	-3%	-8%	-4%	-2%	+4%	+1%
0.63 mg/kg @ 5'	-0%	+6%	-2%	+0%	-3%	+3%	+4%	+1%
0.63 mg/kg @ 30'	+4%	+2%	-1%	-9%	-2%	-0%	+1%	+4%
1.25 mg/kg @ 5'	-0%	+10%	-1%	-7%	-1%	+2%	+4%	+2%
1.25 mg/kg @ 30'	-3%	+0%	-9%	-12%	-5%	+2%	+2%	+1%
2.5 mg/kg @ 5'	-5%	+13%	-1%	+1%	-8%	+6%	+2%	-3%
2.5 mg/kg @ 30'	-4%	+0%	-15%	-24%	+2%	+2%	+3%	-1%
5 mg/kg @ 5'	-15%	+17%	-10%	+17%	-11%	+2%	+6%	-3%
5 mg/kg @ 30'	-14%	+0%	-7%	-5%	+2%	+2%	+3%	-2%

値はn=4の中央値である。統計的に有意な差違(p < 0.05)は太字およびイタリックで示し、そして実際の単位のベースラインからの変化で算出した。

【 0 1 0 0 】

【表 10】

表10：30 分間隔で5分間にわたり静脈内用量を上げながら (0.16, 0.32, 0.64, 1.25, 2.5 および5mg/kg) 投与した後の化合物 (-)-17(ng/ml) の血漿レベル中央値 (n=4)

用量 (mg/kg)	0.16	0.32	0.64	1.25	2.5	5
中央値 (ng/ml)	725	1420	2540	5205	9550	20375

10

20

30

フロントページの続き

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

- (72)発明者 トウリング, ヨハネス・ビルヘルムス・ジヨン・エフ
 ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセベーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー
 チカ・ナームローゼ・フエンノートシャツプ
 (72)発明者 ベル・ドンク, リユク・アウグスト・ローレンティウス
 ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセベーク 3 0・ジヤンセン・ファーマシユー
 チカ・ナームローゼ・フエンノートシャツプ

審査官 早川 裕之

- (56)参考文献 特開平 0 1 - 1 2 8 9 6 8 (J P , A)
 特開昭 5 8 - 0 9 0 5 5 2 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 8 / 1 3 9 1 5 2 (W O , A 1)
 国際公開第 0 1 / 0 9 3 8 4 9 (W O , A 1)
 国際公開第 0 2 / 0 5 6 0 1 0 (W O , A 1)
 ChemBioChem, 2 0 0 4 年, 5, 6 3 7 - 6 4 3

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 0 7 D 2 1 1 / 5 8
 A 6 1 K 3 1 / 4 4 6 8
 A 6 1 P 1 / 0 4
 A 6 1 P 9 / 1 2
 A 6 1 P 1 1 / 0 0
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)