(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7531379号
(P7531379)

(45)発行日　令和6年8月9日(2024.8.9)

(24)登録日　令和6年8月1日(2024.8.1)

(51)国際特許分類

C07D 231/12 (2006.01)	C07D	231/12	ACSP
A61P 43/00 (2006.01)	A61P	43/00	111
A61P 27/02 (2006.01)	A61P	27/02	
A61P 27/06 (2006.01)	A61P	27/06	
A61K 31/415 (2006.01)	A61K	31/415	

FI

請求項の数　15　外国語出願　（全77頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-204848(P2020-204848)
(22)出願日　令和2年12月10日(2020.12.10)
(65)公開番号　特開2021-113185(P2021-113185A)
(43)公開日　令和3年8月5日(2021.8.5)
審査請求日　令和4年4月7日(2022.4.7)
(31)優先権主張番号　62/955,683
(32)優先日　令和1年12月31日(2019.12.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

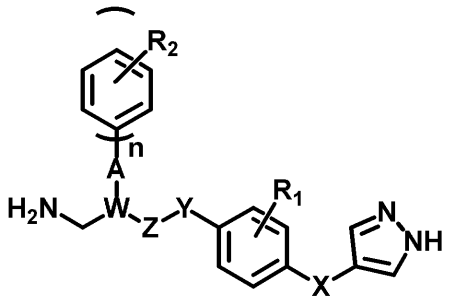
(73)特許権者　390023582
財團法人工業技術研究院
INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
台湾新竹縣竹東鎮中興路四段１９５號
No. 195, Sec. 4, Chung HsingRd., Chutung, Hsinchu, Taiwan 31040
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　βアミノ酸誘導体、これを含むキナーゼ阻害剤および医薬組成物ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

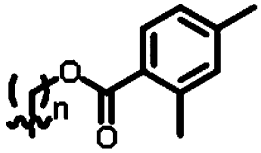
式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物：



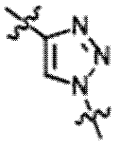
式（Ｉ）；

（前記式（Ｉ）で示される化合物は、βアミノ酸誘導体であり、前記式（Ｉ）中：
Ｘは単結合またはＯであり；
ＹはＮＨであり；
ＺはＣ＝Ｏまたは<u>Ｃ＝Ｓ</u>であり；
ＷはＣＨであり；
R_1はＨまたはＦであり；

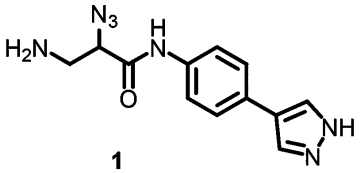
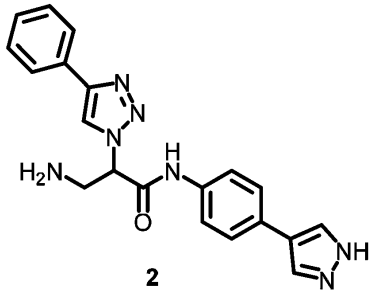
Ｒ２はＨ、Ｆ、ＯＨ、ＣＦ３、ＣＨ２ＯＨ、ＣＨＯまたは

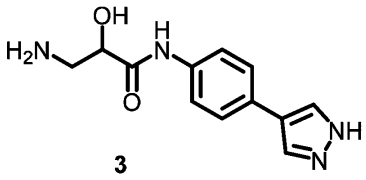
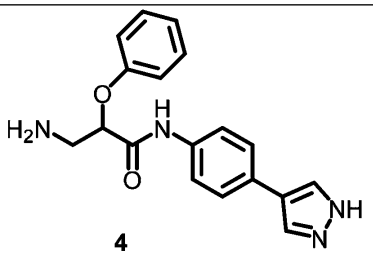
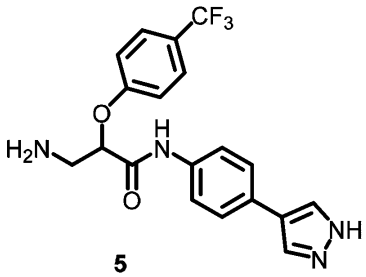
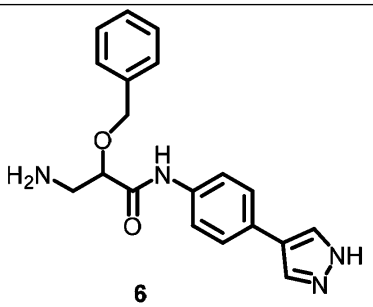
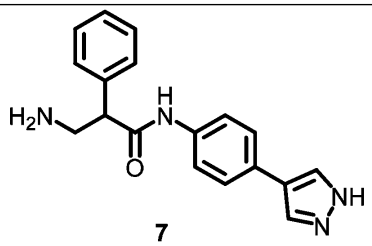
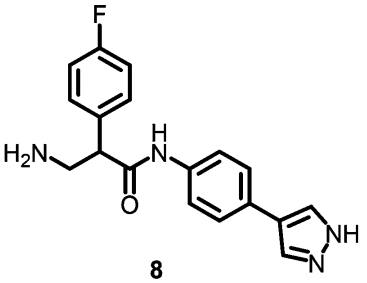
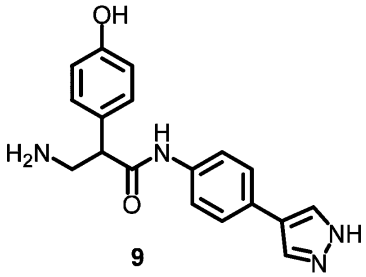
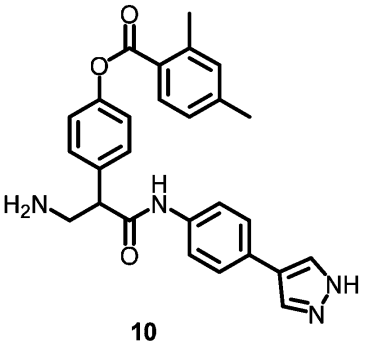


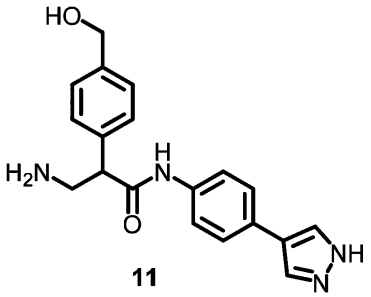
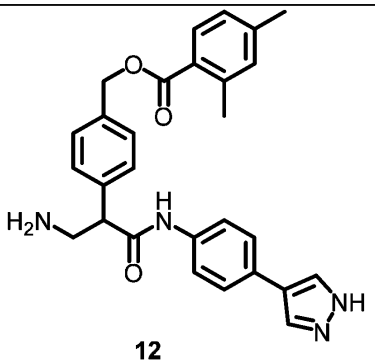
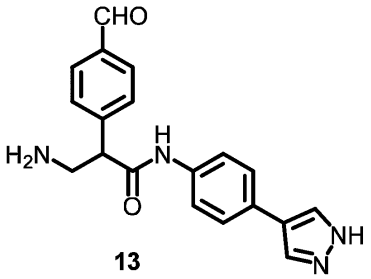
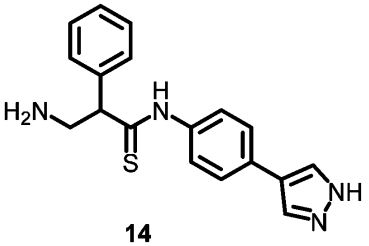
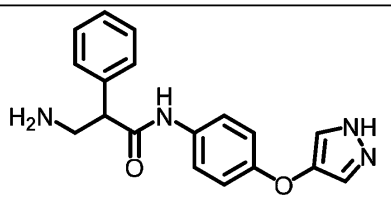
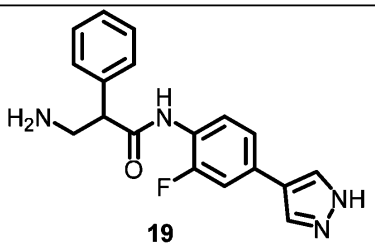
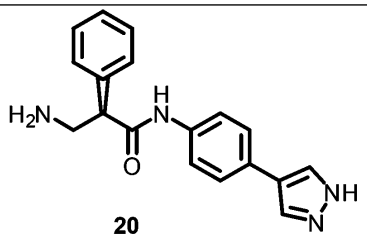
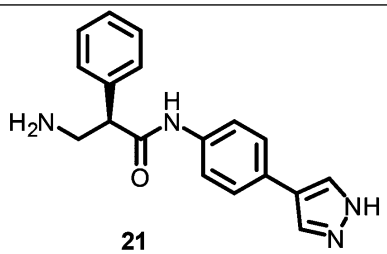
であり；かつ
ｎは０または１であり、ここで
ｎが０である場合、ＡはＯＨ、またはＮ３であり；
ｎが１である場合、Ａは単結合、Ｏ、ＯＣＨ２、または



である）。
【請求項２】
式（Ｉ）で示される化合物が、以下：

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物18	化合物19
構造式	 18	 19
化合物コード	化合物20	化合物21
構造式	 20	 21

に示される、化合物１～化合物１４および化合物１８～化合物２１からなる群より選択される、請求項１に記載の式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物。

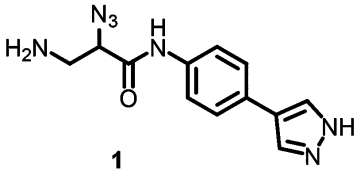
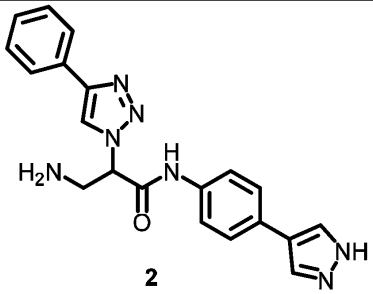
【請求項３】

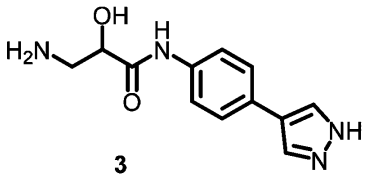
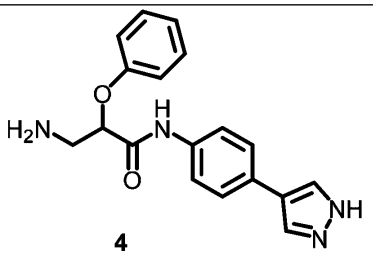
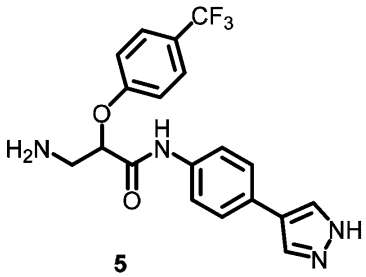
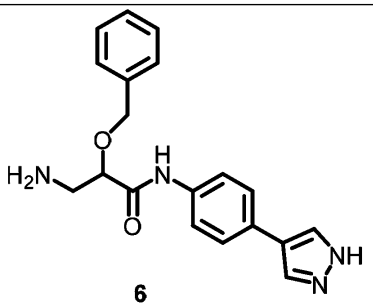
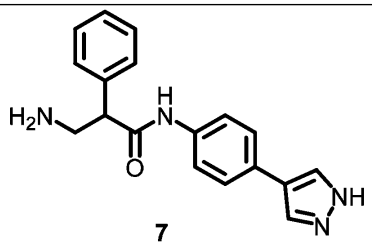
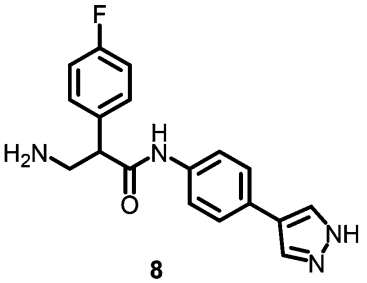
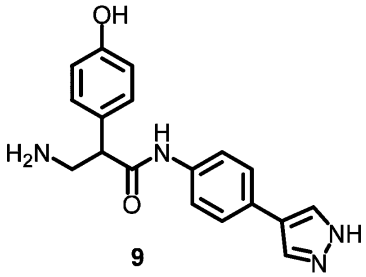
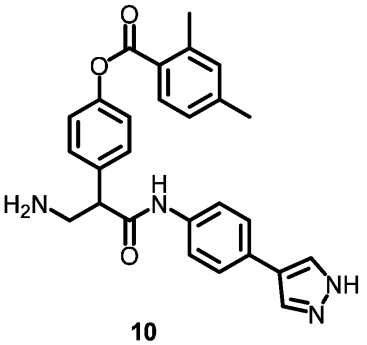
請求項１に記載の式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物を含む、キナーゼ阻害剤であって、式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物が、ミオシン軽鎖キナーゼ－４（myosin light chain kinase 4, ＭＹＬ

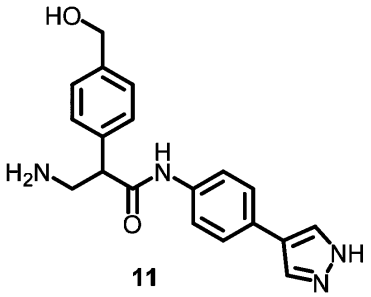
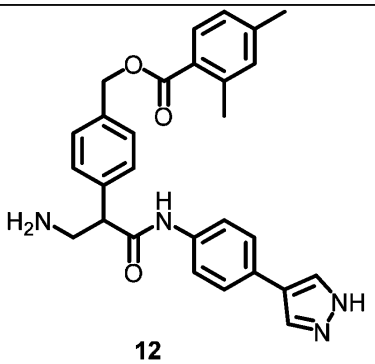
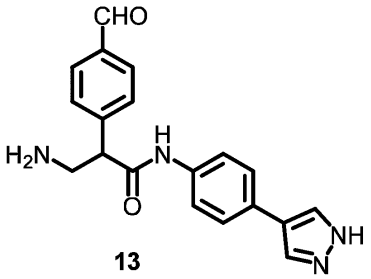
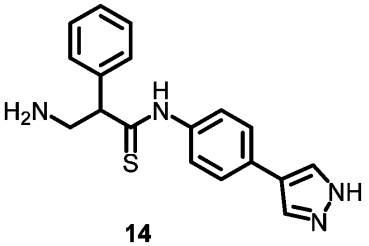
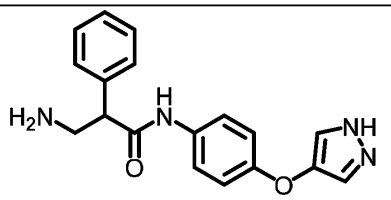
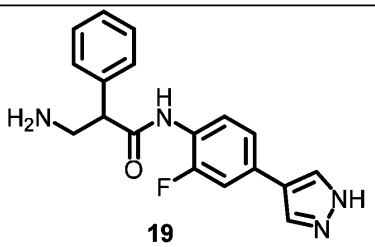
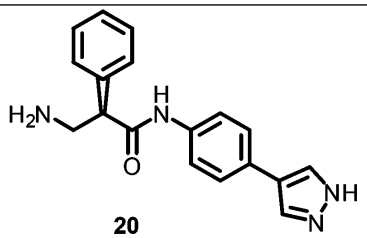
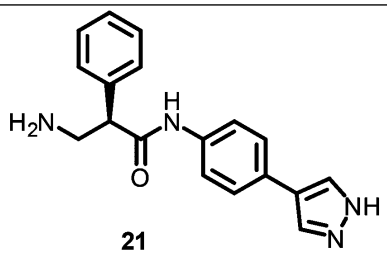
Ｋ－４）、および/または分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９（mitogen-activated protein kinase 19, ＭＡＰＫ１９，ＹＳＫ－４）を抑制できる、キナーゼ阻害剤。

【請求項４】

式（Ｉ）で示される化合物が、以下：

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物18	化合物19
構造式	 18	 19
化合物コード	化合物20	化合物21
構造式	 20	 21

に示される、化合物１～化合物１４および化合物１８～化合物２１からなる群より選択される、請求項３に記載のキナーゼ阻害剤。

【請求項５】

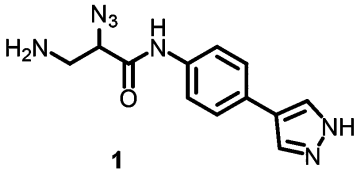
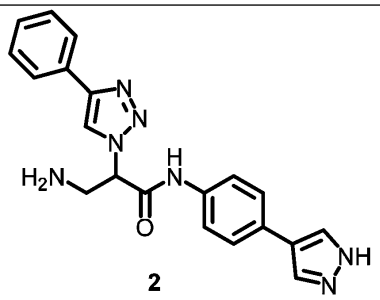
式（Ｉ）で示される化合物が、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Rho-associated protein kinase, ＲＯＣＫ）をさらに抑制できる、請求項３に記載のキナーゼ阻害剤。

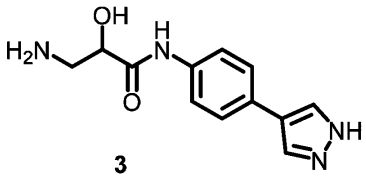
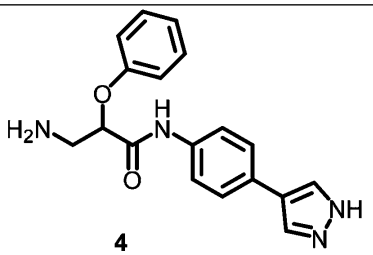
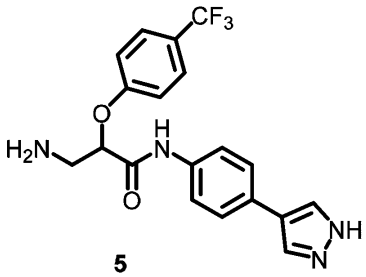
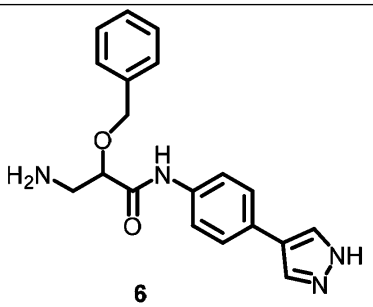
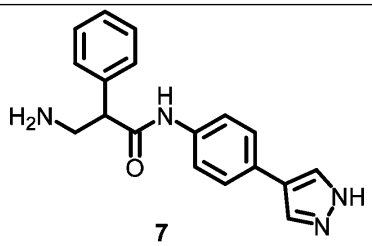
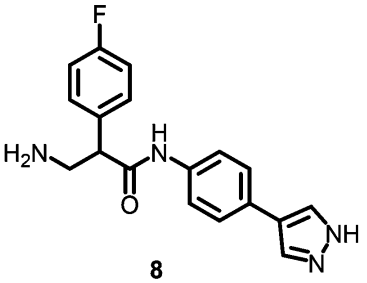
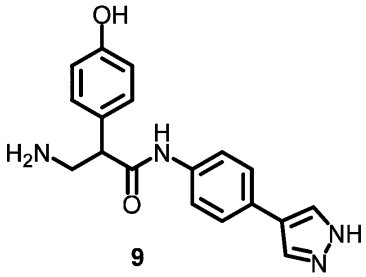
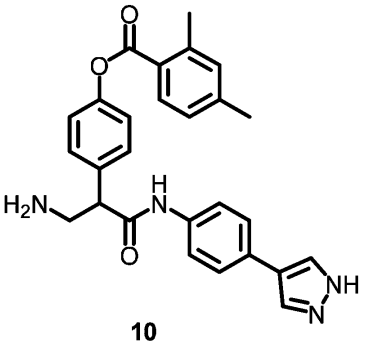
【請求項６】

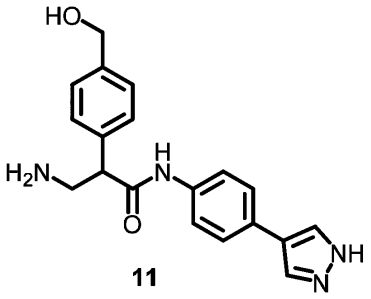
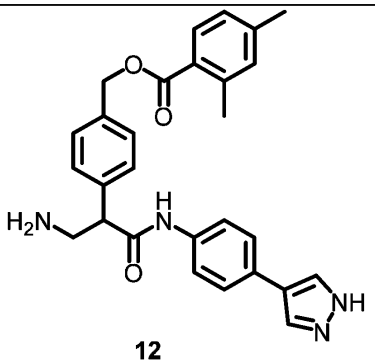
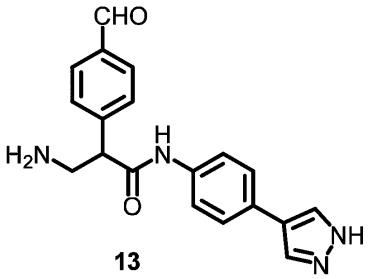
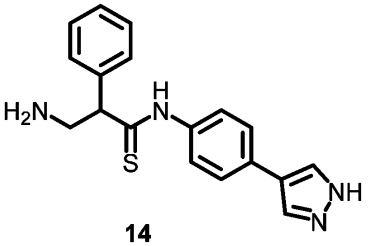
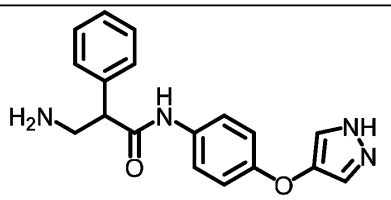
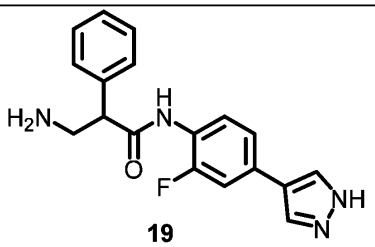
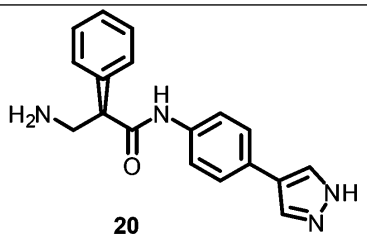
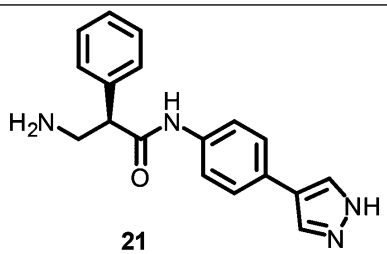
請求項１に記載の式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物を含む、医薬組成物。

【請求項７】

式（Ｉ）で示される化合物が、以下：

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物18	化合物19
構造式	 18	 19
化合物コード	化合物20	化合物21
構造式	 20	 21

に示される、化合物１～化合物１４および化合物１８～化合物２１からなる群より選択される、請求項６に記載の医薬組成物。

【請求項８】

請求項１に記載の式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物を含む、キナーゼ抑制により利益を受ける生体内（in vivo）に関する応用における使用のための医薬組成物であって、該キナーゼが

ミオシン軽鎖キナーゼ－４、

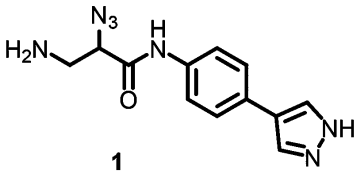
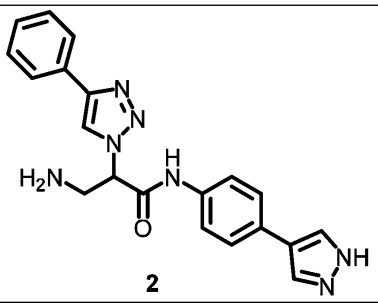
分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９、および

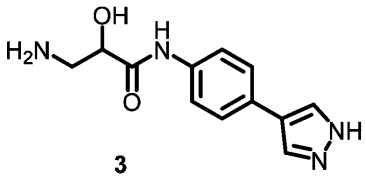
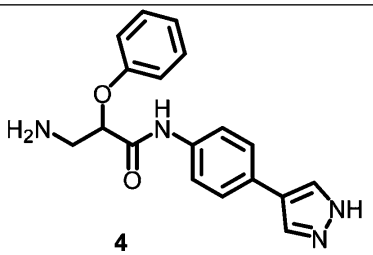
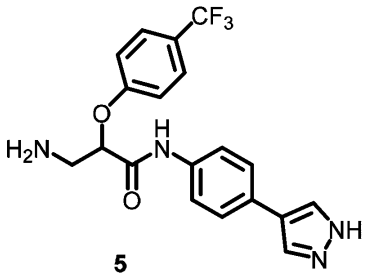
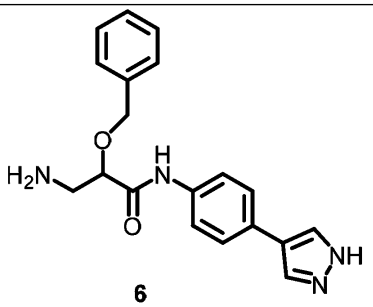
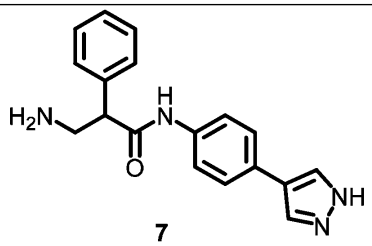
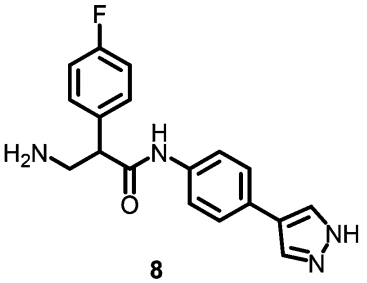
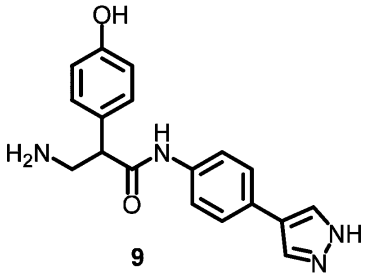
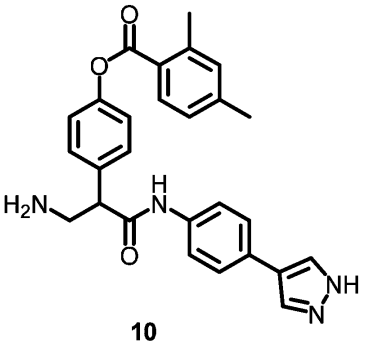
Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ

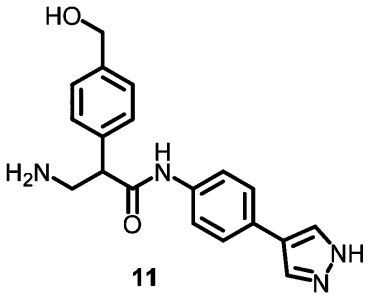
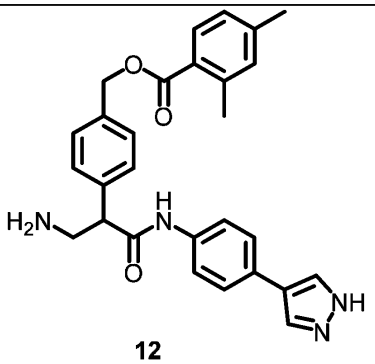
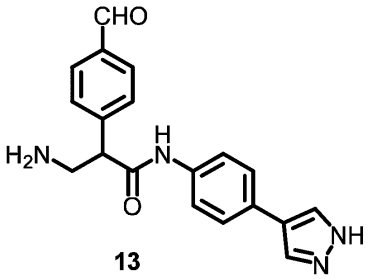
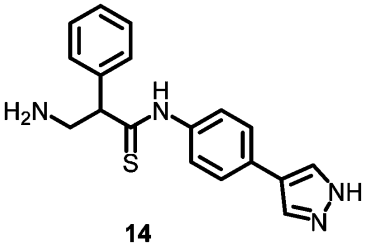
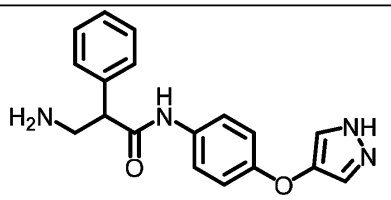
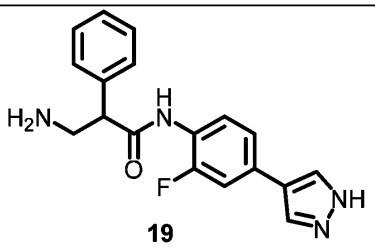
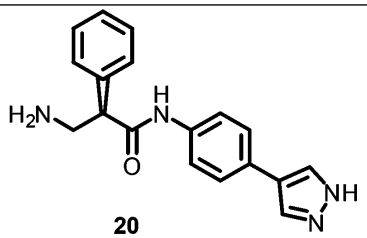
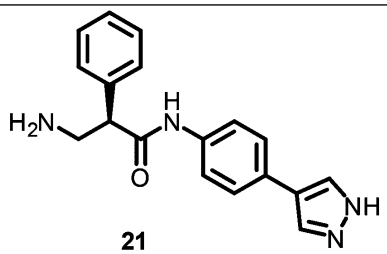
からなる群より選択される少なくとも１つである、医薬組成物。

【請求項９】

式（Ｉ）で示される化合物が、以下：

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物18	化合物19
構造式	 18	 19
化合物コード	化合物20	化合物21
構造式	 20	 21

に示される、化合物１～化合物１４および化合物１８～化合物２１からなる群より選択される、請求項８に記載のキナーゼ抑制により利益を受ける生体内（in vivo）に関する応用における使用のための医薬組成物。

【請求項１０】

生体内（in vivo）に関する応用が、眼科に関する応用または肺に関する応用を含む、請求項８または９に記載のキナーゼ抑制により利益を受ける生体内（in vivo）に関する応用における使用のための医薬組成物。

【請求項１１】

眼科に関する応用が、視神経の保護、並びに/または高眼圧、緑内障、網膜血管閉塞症、黄斑変性、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、角膜内皮細胞損傷（FECD）、および/もしくは角膜

繊維症の予防および/または治療を含む、請求項１０に記載のキナーゼ抑制により利益を受ける生体内（in vivo）に関する応用における使用のための医薬組成物。

【請求項１２】

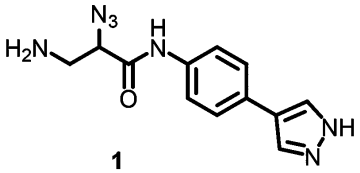
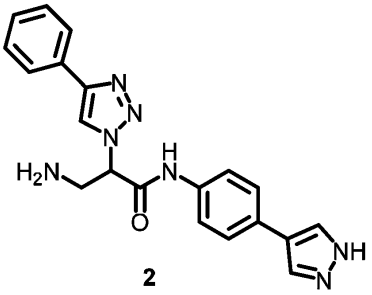
肺関連の応用が、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、特発性肺線維症（ＩＰＦ）、肺気腫、および/または肺がんの予防および／または治療を含む、請求項１０に記載のキナーゼ抑制により利益を受ける生体内（in vivo）に関する応用における使用のための医薬組成物。

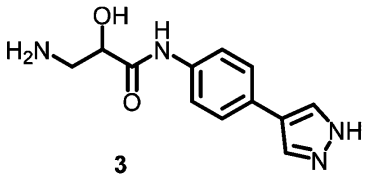
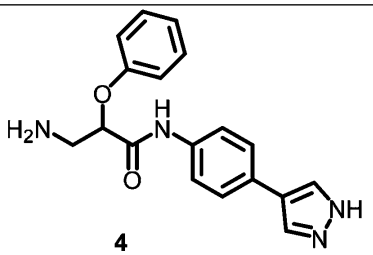
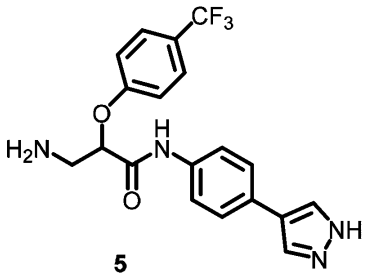
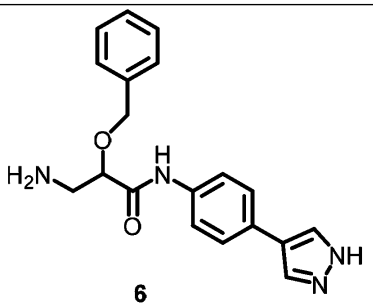
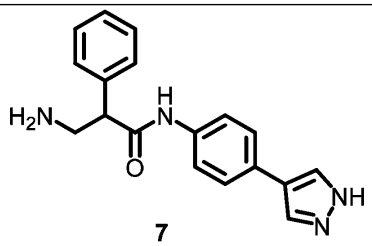
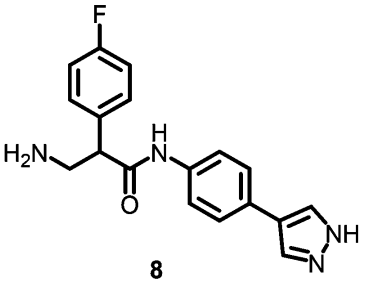
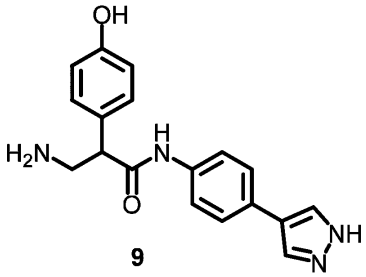
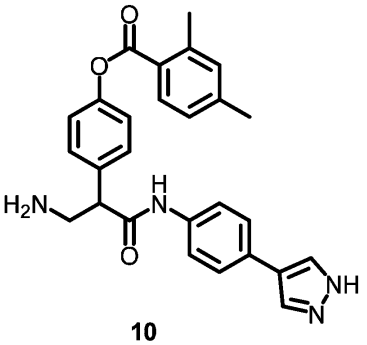
【請求項１３】

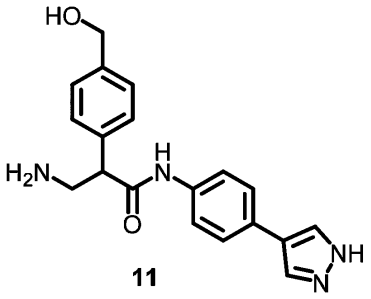
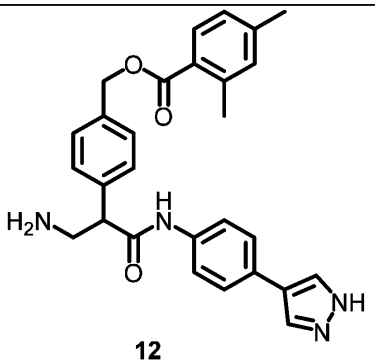
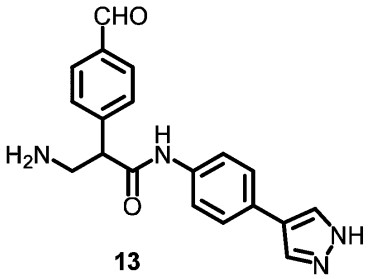
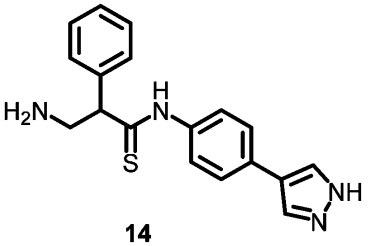
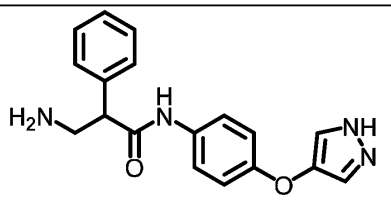
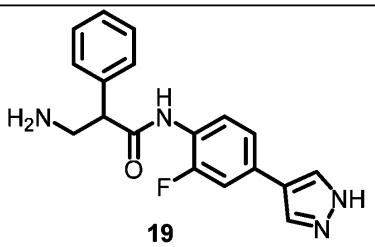
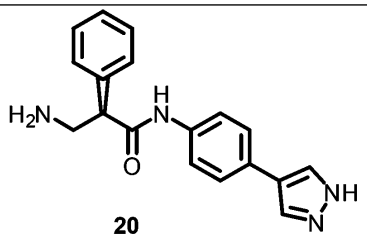
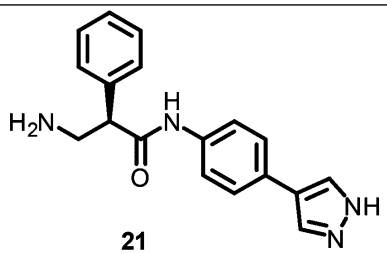
請求項１に記載の式（Ｉ）で示される化合物、またはその薬学的に許容される塩、水和物、もしくは個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物、もしくはラセミ化合物を含む、眼圧下降における使用のための医薬組成物。

【請求項１４】

式（Ｉ）で示される化合物が、以下：

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物18	化合物19
構造式	 18	 19
化合物コード	化合物20	化合物21
構造式	 20	 21

に示される、化合物１～化合物１４および化合物１８～化合物２１からなる群より選択される、請求項１３に記載の眼圧下降における使用のための医薬組成物。

【請求項１５】

緑内障の治療薬である、請求項１３または１４に記載の眼圧下降における使用のための医薬組成物。

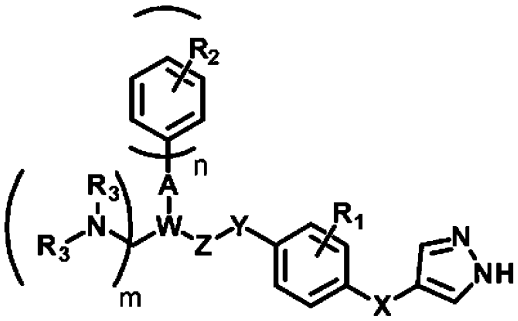
【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

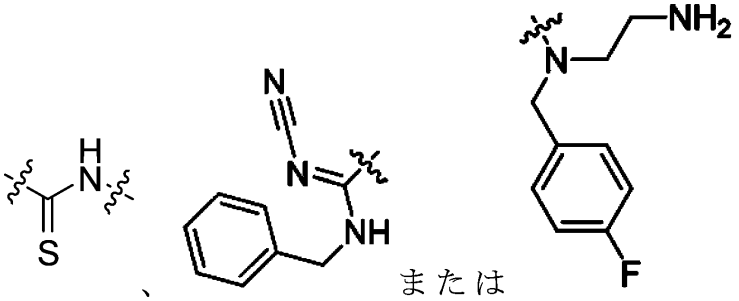
本開示は新規な化合物に関し、特に新規なβアミノ酸誘導体、これを含むキナーゼ阻害剤および医薬組成物ならびにその使用に関する。

【背景技術】
【０００２】
眼球を一定の形状に維持して眼の光学機能および新陳代謝を保つため、毛様体は房水を分泌することでこの任務を遂行している。房水が排出される通路がふさがれ、蓄積すると、眼圧が上がってしまうが、眼圧は緑内障の最も主要なリスクファクターである。
【０００３】
房水は主に次の３つの経路を通って流れることが現在既知となっている：（１）シュレム（Schlemm）管経路（最主要（conventional pathway））；（２）ぶどう膜強膜経路（少量）、約１０％～２０％；（３）虹彩表面の吸収（微量）。現在よく用いられている緑内障の薬の眼圧下降機序は：（ａ）例えばβ受容体遮断薬、炭酸脱水酵素阻害剤、α受容体アゴニスト等のような房水産生を抑えるもの；（ｂ）例えばプロスタグランジンアナログ、α受容体アゴニスト等のような房水の排出を増やすもの（ぶどう膜強膜経路）である。
【０００４】
Ｒｈｏ／ＲＯＣＫ経路は、細胞骨格の調節において重要な役割を果たす。Ｒｈｏ／ＲＯＣＫ阻害剤は、線維柱帯組織中のアクチン細胞骨格、細胞外マトリックスおよびシュレム管内皮細胞の機能を調節することによって、眼圧を下げる目的を達成することができる。
【０００５】
目下、数社の製薬会社が、ＲＯＣＫ阻害剤の人体における眼圧下降に対する影響について探索し始め、新たな薬剤を次々と研究開発している。人体の臨床における安全性と有効性が評価された後、現在市販されているＲＯＣＫ阻害剤である眼圧下降剤には、Ｒｉｐａｓｕｄｉｌ（Ｋ－１１５）およびＮｅｔａｒｓｕｄｉｌ（ＡＲ－１３３２４）等がある。Ｒｉｐａｓｕｄｉｌの第ＩＩＩ相臨床試験において、最もよく見られる副反応は軽度の結膜充血で、その発生率は７５％と高く、かつ結膜炎、点状角膜炎等も発生することが見い出された。Ｎｅｔａｒｓｕｄｉｌ（ＡＲ－１３３２４）はＲＯＣＫ／ノルエピネフリントランスポーター（norepinephrine transporter, NET）阻害化合物であり、ＲＯＣＫ阻害剤としての作用の他、ノルエピネフリンを抑制する作用もあって、持続的に眼圧を下げる作用を備え、かつ局部の耐性もよいが、やはり結膜充血の反応はある。また、Ｎｅｔａｒｓｕｄｉｌ（ＡＲ－１３３２４）の第ＩＩＩ相臨床試験におけるＲＯＣＫＥＴ１、ＲＯＣＫＥＴ２（合計１１６７人の患者）の眼圧＞２５ｍｍＨｇである緑内障患者に対する薬効は、緑内障の従来の治療薬であるＴｉｍｏｌｏｌに及ばず、＜２５ｍｍＨｇの患者では薬効がＴｉｍｏｌｏｌと同等である。
【０００６】
ＲＯＣＫ阻害剤の眼圧下降への応用には各種の異なる副作用が依然存在することが現在すでに知られており、かつ単一機序の薬剤の長期使用は薬効の低下を生じ得るため患者は単一の薬剤を長期使用できないということを考えれば、眼圧を有効に下げると共に副作用を減らす効果を達成させるために、新たなターゲットまたは複数のターゲットを有する新規の眼圧下降剤を開発することが求められる。
【発明の概要】
【０００７】
本開示は、式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル（ester）、水和物（hydrate）、溶媒和物（solvate）または結晶形（crystalline form）を提供する：

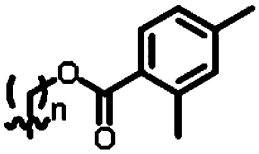


式（Ｉ）

該式（Ｉ）で示される化合物はβアミノ酸誘導体であり、また該式（Ｉ）中：Ｘは単結合またはＯであり；ＹはＮＨまたはＣ＝Ｏであり；ＺはＣ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓ、ＮＨ、



であり；ＷはＣまたはＮであり；Ａは単結合、Ｏ、ＯＨ、ＯＣＨ$_2$、複素環またはＮ$_3$であり；Ｒ$_1$はＨまたはＦであり；Ｒ$_2$はＨ、Ｆ、ＯＨ、ＣＦ$_3$、ＣＨ$_2$ＯＨ、ＣＨＯまたは



であり；Ｒ$_3$はＨであり；ｎは０または１であり；かつｍは０または１である。

【０００８】

本開示は、上記式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形を含むキナーゼ阻害剤も提供する。

【０００９】

本開示はさらに、有効量の上記式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形を含む医薬組成物を提供する。

【００１０】

また本開示は、上記式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、キナーゼ阻害剤としての使用をも提供する。

【００１１】

本開示は、上記式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、薬剤を作製するための使用をも提供し、このうち、該薬剤は、キナーゼ抑制の利益を受ける生体内に関する応用に用いられ、かつ該キナーゼは下記からなる群より選ばれる少なくとも１つである：Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Rho-associated protein kinase, ＲＯＣＫ）、ミオシン軽鎖キナーゼ－４（myosin light chain kinase 4, ＭＹＬＫ－４）、および分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９（mitogen-activated protein kinase 19, ＭＡＰＫ１９，ＹＳＫ－４）。

【００１２】

さらにまた、本開示は、上記式（Ｉ）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、眼圧下降薬を作製するための

使用を提供する。

【００１３】

本発明の上述したおよびその他の目的、特徴ならびに利点をより明らかにかつ分かり易くするため、以下に好ましい実施形態を挙げると共に、添付の図面と対応させながら、詳細に説明していく。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１Ａ】正常な眼圧のウサギの眼における、異なる濃度の本開示化合物の投与１日目における眼圧測定結果を示している。

【図１Ｂ】正常な眼圧のウサギの眼における、異なる濃度の本開示化合物の投与３日目における眼圧測定結果を示している。

【図２】正常な眼圧のウサギの眼における、本開示の化合物と市販の薬剤の眼圧下降効果を示している。

【図３Ａ】本開示の化合物と市販の薬剤の眼刺激性評価のスコアを示している。

【図３Ｂ】眼刺激性評価において、本開示の化合物と市販の薬剤で処理したウサギの眼の写真を示している。

【図３Ｃ】眼刺激性評価において、本開示の化合物を連続７日間投与したウサギの眼の角膜に混濁・損傷が無いことを示す写真である。

【図４】正常な眼圧のウサギの眼において、ターゲット組織が８時間以内にいずれもターゲット効果ＩＣ$_{90}$以上に達した本開示の化合物の薬物濃度の試験結果を示している。虹彩および毛様体に対し、化合物２０の濃度は単位ｎｇ／ｇで測定した：房水に対し、化合物２０の濃度は単位ｎｇ／ｍＬで測定した。

【図５】正常な眼圧のウサギの眼における、本開示の化合物の安全マージン（safety margin）試験の結果を示している。

【図６】正常な眼圧のマカクザルにおける、本開示の化合物と市販の薬剤の眼圧下降効果を示している。

【図７】高張食塩水誘発高眼圧ウサギ眼における、本開示の化合物と市販の薬剤の眼圧下降効果を示している。＊：ｔ－ｔｅｓｔ、ｐ－ｖａｌｕｅ＜０．０５（生理食塩水に対して）；＃：ｔ－ｔｅｓｔ，ｐ－ｖａｌｕｅ＜０．０５（ビヒクルに対して）；φ：ｔ－ｔｅｓｔ，ｐ－ｖａｌｕｅ＜０．０５（市販の薬剤（ＡＲ－１３３２４）に対して）。

【図８】磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギ眼における、本開示の化合物と市販の薬剤の眼圧下降効果を示している。

【図９】磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギ眼における、ミオシン軽鎖キナーゼ－４（myosin light chain kinase 4, ＭＹＬＫ－４）の発現を示している。

【図１０】磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギ眼の組織切片の免疫組織化学染色を示している。

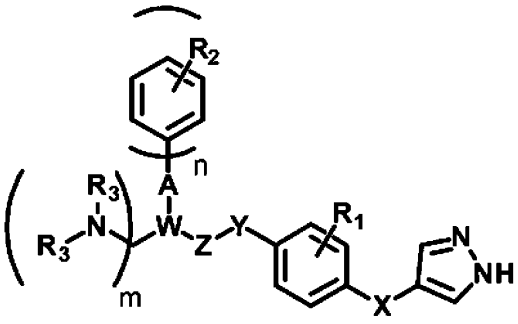
【発明を実施するための形態】

【００１５】

本開示は、新規なβアミノ酸誘導体を提供すると同時に、この新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形を提供する。

【００１６】

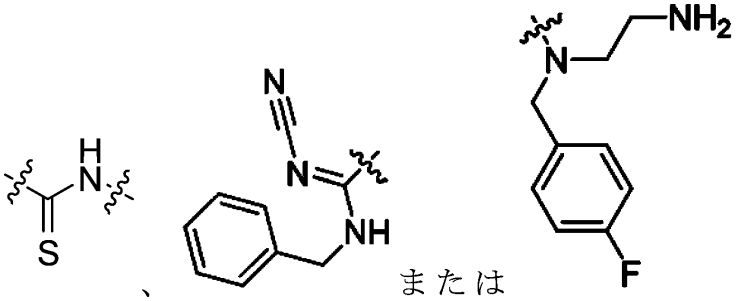
上記本開示の新規なβアミノ酸誘導体は下式（Ｉ）で示される化合物を含み得るが、これに限定はされない。



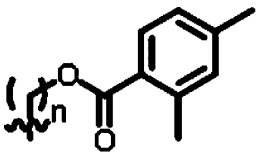
式（Ｉ）

【００１７】

上に示した式（Ｉ）中、Ｘは単結合またはＯであってよく；ＹはＮＨまたはＣ＝Ｏであってよく；ＺはＣ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓ、ＮＨ、



であってよく；ＷはＣまたはＮであってよく；Ａは単結合、Ｏ、ＯＨ、ＯＣＨ$_2$、複素環またはN_3であってよく；R_1はＨまたはＦであってよく；R_2はＨ、Ｆ、ＯＨ、CF_3、CH_2OH、ＣＨＯまたは



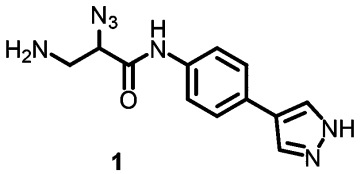
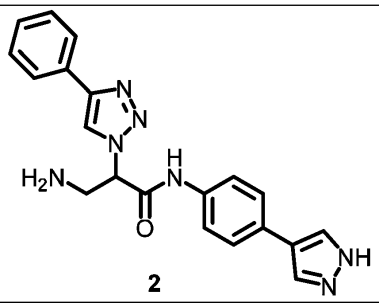
であってよく；R_3はＨであってよく；ｎは０または１であってよく；かつｍは０または１であってよい。

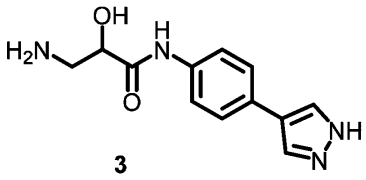
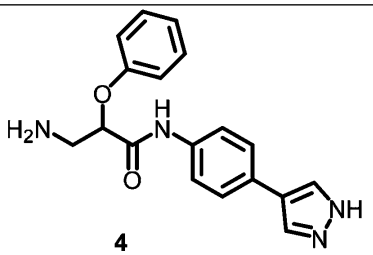
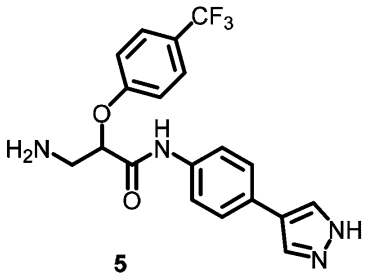
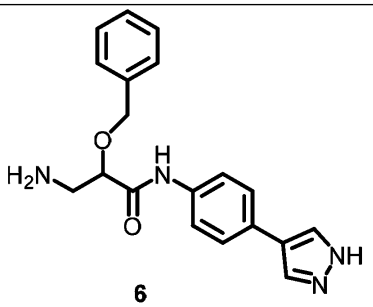
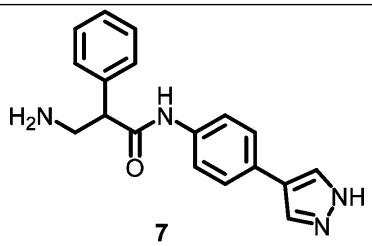
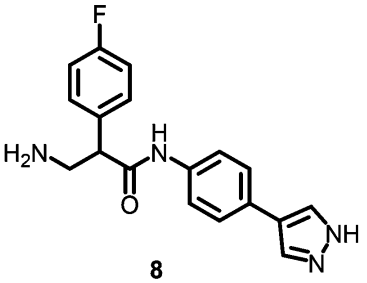
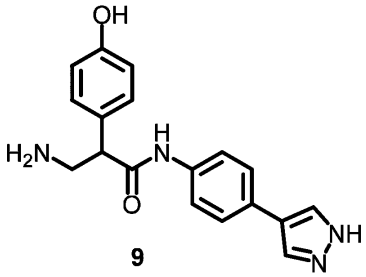
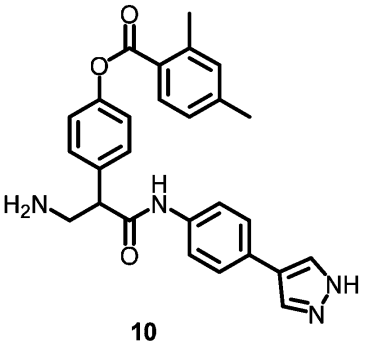
【００１８】

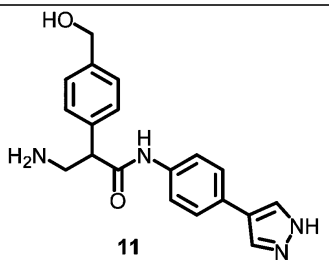
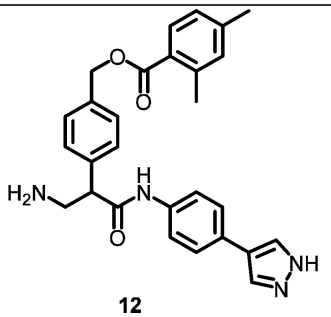
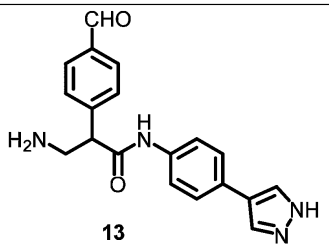
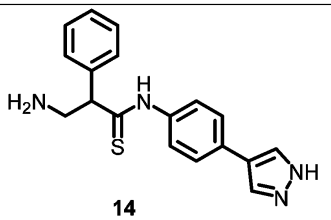
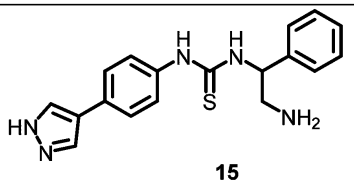
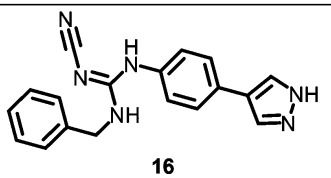
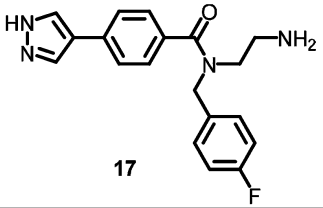
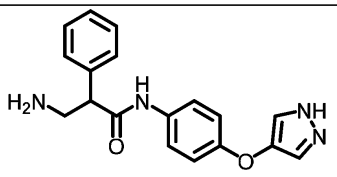
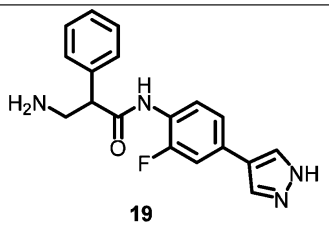
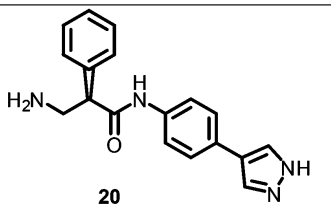
本開示において、上式（Ｉ）で示される化合物は、個別の光学異性体、個別のエナンチオマーの混合物またはラセミ化合物の形式で存在していてよく、かつ、限定はされないが、下表１で示される化合物を含み得る。

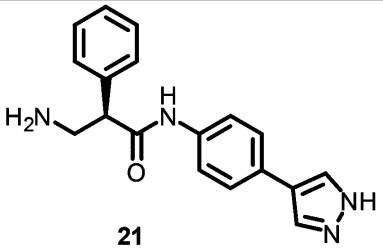
【００１９】

（表１）式（Ｉ）で示される化合物の例

化合物コード	化合物1	化合物2
構造式	 1	 2

化合物コード	化合物3	化合物4
構造式	 3	 4
化合物コード	化合物5	化合物6
構造式	 5	 6
化合物コード	化合物7	化合物8
構造式	 7	 8
化合物コード	化合物9	化合物10
構造式	 9	 10

化合物コード	化合物11	化合物12
構造式	 11	 12
化合物コード	化合物13	化合物14
構造式	 13	 14
化合物コード	化合物15	化合物16
構造式	 15	 16
化合物コード	化合物17	化合物18
構造式	 17	 18
化合物コード	化合物19	化合物20
構造式	 19	 20

化合物コード	化合物21	
構造式	 21	

【００２０】
１実施形態において、本開示の式（Ｉ）で示される化合物は、上述した化合物７であってよく、それはラセミ化合物（racemic compound）である。別の実施形態では、本開示の式（Ｉ）で示される化合物は上述した化合物２０であってよく、それはＳ型化合物、より詳細にはＳエナンチオマー（S-Enantiomer）であってよい。
【００２１】
１実施形態において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、キナーゼを抑制する効果を有し得るが、これに限定はされない。上述したキナーゼの例には、限定はされないが、ミオシン軽鎖キナーゼ－４（myosin light chain kinase 4, ＭＹＬＫ－４）、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９（mitogen-activated protein kinase 19, ＭＡＰＫ１９，ＹＳＫ－４）、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Rho-associated protein kinase, ＲＯＣＫ）またはこれらの任意の組み合わせが含まれ得る。Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼには、限定はされないが、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ－１（Rho-associated protein kinase-1, ROCK-1）が含まれ得る。
【００２２】
１実施形態において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４を抑制する効果を有し得る。
【００２３】
また、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、相乗的なターゲット抑制作用も有し得る。よって、別の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９を抑制する効果を有し得る。
【００２４】
また、別の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４およびＲｈｏ関連タンパク質キナーゼを同時に抑制する効果を有し得る。
【００２５】
また別の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９およびＲｈｏ関連タンパク質キナーゼを同時に抑制する効果を有し得る。
【００２６】
また別の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９およびＲｈｏ関連タンパク質キナーゼを同時に抑制する効果を有し得る。
【００２７】
別の実施形態において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、眼圧を下げる効果を有し得る。特定の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼまたはこれらの任意の組み合わせによって、眼圧下降効果を達成することができる。
【００２８】

上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、眼圧を下げる効果を有し得るため、高眼圧症（ocular hypertension）または高眼圧症のある疾病の治療および／または予防に用いることができる。上述した高眼圧症とは、眼圧が正常の範囲より高い症状のことを指す。例えば、ヒトの正常な眼圧は約１０～２１ｍｍＨｇであり、高眼圧症は眼圧が約２１ｍｍＨｇよりも大きい症状、例えば約２２ｍｍＨｇよりも大きい、約２５ｍｍＨｇよりも大きい、約３０ｍｍＨｇよりも大きい等の症状であるが、これに限定はされない。

【００２９】

１実施形態において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、眼圧が約２５ｍｍＨｇよりも大きい、例えば約３０ｍｍＨｇよりも大きい高眼圧症の治療および／または予防に用いることができる。

【００３０】

前述に基づいて、本開示はキナーゼ阻害剤も提供し、それは、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形を含み得るが、これに限定はされない。

【００３１】

本開示のキナーゼ阻害剤において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、キナーゼを抑制する効果を有しており、ここに述べるキナーゼには、限定はされないが、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼまたはこれらの任意の組み合わせが含まれ得る。Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼには、限定はされないが、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ－１が含まれ得る。

【００３２】

本開示のキナーゼ阻害剤において、１実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４および／または分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９を抑制する効果を有し得る。本開示のキナーゼ阻害剤において、別の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４および／または分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９を抑制する効果の他、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼを抑制する効果も備え得る。

【００３３】

１実施形態において、本開示のキナーゼ阻害剤は、上述した化合物７（ラセミ化合物）または化合物２０（Ｓ型化合物）を含んでいてよい。この特定の実施形態では、本開示のキナーゼ阻害剤は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９およびＲｈｏ関連タンパク質キナーゼを同時に抑制する効果を有し得る。

【００３４】

また、前述に基づき、本開示は、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、キナーゼ阻害剤としての使用も提供することができる。

【００３５】

本開示のこの用途において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形のキナーゼ抑制効果に関する説明は前述したものと同じであるため、ここで繰り返すことはしない。

【００３６】

本開示のこの用途において、特定の実施形態では、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体は、上述した化合物７（ラセミ化合物）または化合物２０（Ｓ型化合物）であってよい。この特定の実施形態において、前述のキナーゼ阻害剤は、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９およびＲｈｏ関連タンパク質キナーゼを同時に抑制する効果を有し得る。

【００３７】

また、本開示は医薬組成物をさらに提供し、それは、限定はされないが、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形を含み得る。

【００３８】

本開示の医薬組成物において、上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形に関するすべての記述は前述と同様であるため、ここで繰り返すことはしない。

【００３９】

１実施形態において、本開示の医薬組成物は上述した化合物７を含んでいてよく、それはラセミ化合物である。別の実施形態では、本開示の医薬組成物は上述した化合物２０を含んでいてよく、それはＳ型化合物である。

【００４０】

また、１実施形態において、上述した本開示の医薬組成物は、薬学的に許容される担体または塩をさらに含み得るが、これに限定はされない。

【００４１】

上述した薬学的に許容される担体には、限定はされないが、溶媒、分散媒（dispersion medium）、コーティング（coating）、抗菌および抗真菌剤ならびに等張性吸収遅延（absorption delaying）剤等の薬学的投与適合性を有するものが含まれ得る。異なる投薬方式に対し、一般的な方式を用いて薬学組成物を剤形（dosage form）に製剤化することができる。

【００４２】

また、上述した薬学的に許容される塩には、限定はされないが、無機カチオンを含む塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩またはアミン塩のようなアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、亜鉛塩、アルミニウム塩、またはジルコニウム塩のような二価または四価カチオンを含む塩が含まれ得る。また、ジシクロヘキシルアミン塩、メチル－Ｄ－グルカミンのような有機塩、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミンのようなアミノ酸塩であってもよい。

【００４３】

さらに、本開示の医薬組成物は、この医薬組成物を必要とする個体に投与され得るが、これに限定はされない。本開示の医薬組成物の投与経路には、非経口、経口、吸入噴霧（inhalation spray）による、または埋込型リザーバー（implanted reservoir）を介する方式が含まれ得るが、これに限定はされない。非経口には、限定はされないが、患部への塗布、皮下（subcutaneous）、皮内（intracutaneous）、静脈内（intravenous）、筋肉内（intramuscular）、関節内（intraarticular）動脈内（intraarterial）、関節滑液嚢内（intrasynovial）、胸骨内（intrasternal）、くも膜下腔内（intrathecal）、病巣内（intralesional）注射、眼部外用（external ophthalmic use）、眼内注射（intraocular）および注入技術等が含まれ得る。

【００４４】

塗布による局部への使用形式には、軟膏、乳剤、液剤、ゲル等が含まれ得るが、これに限定はされない。また、眼部外用の使用形式には、限定はされないが、点眼剤、眼軟膏、眼用ゲル等が含まれ得る。

【００４５】

また、上述したこの医薬組成物が投与される必要のある個体には、限定はされないが、脊椎動物が含まれ得る。また、上述した脊椎動物には、魚類、両生類、爬虫類、鳥類また

は哺乳類が含まれ得るが、これに限定はされない。哺乳類の例には、限定はされないが、ヒト、オラウータン、サル、ウマ、ロバ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウスが含まれ得る。１実施形態において、上述の個体はヒトである。

【００４６】

１実施形態において、上述した本開示の医薬組成物は、任意のキナーゼ抑制により利益を受ける任意の生体内（in vivo）に関する応用、例えば、任意のキナーゼ抑制の利益を受ける任意の疾病または病徴の治療および／または予防に用いることができ、ここに述べるキナーゼの例には、限定はされないが、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼまたはこれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【００４７】

また、上述した生体内に関する応用には、限定はされないが、眼科に関する応用および／または肺に関する応用等が含まれ得る。眼科に関する応用の例には、視神経の保護、および／または高眼圧、緑内障、網膜血管閉塞症、黄斑変性、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、角膜内皮細胞損傷、角膜繊維症もしくはこれらの任意の組み合わせの予防および／または治療等が含まれ得るが、これに限定はされない。このうち、緑内障には、落屑緑内障（exfoliation glaucoma, ＸＦＧ）、開放隅角緑内障（open angle glaucoma）、閉塞隅角緑内障（angle-closure glaucoma）、続発性緑内障（secondary glaucoma）、先天性緑内障（congenital glaucoma）等が含まれ得るが、これに限定はされない。また、上述した肺関連の応用の例には、限定はされないが、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease, ＣＯＰＤ）、特発性肺線維症、肺気腫、肺がんもしくはこれらの任意の組み合わせ等の予防および／または治療が含まれ得る。

【００４８】

また、本開示の医薬組成物は医薬製剤に調製されてよいが、これに限定はされない。１実施形態において、本開示の医薬組成物は眼用製剤に調製されてよいが、これに限定はされない。上述した眼用製剤の例には、限定はされないが、点眼剤、眼軟膏、眼用ゲル、眼内注射剤等が含まれ得る。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は点眼剤に調製されてよい。

【００４９】

また、本開示は、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、薬剤を作製するための使用をも提供することができ、このうち、上述した薬剤は、キナーゼ抑制の利益を受ける生体内に関する応用に用いられる。上に述べたキナーゼの例には、限定はされないが、ミオシン軽鎖キナーゼ－４、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ－１９、Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼまたはこれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

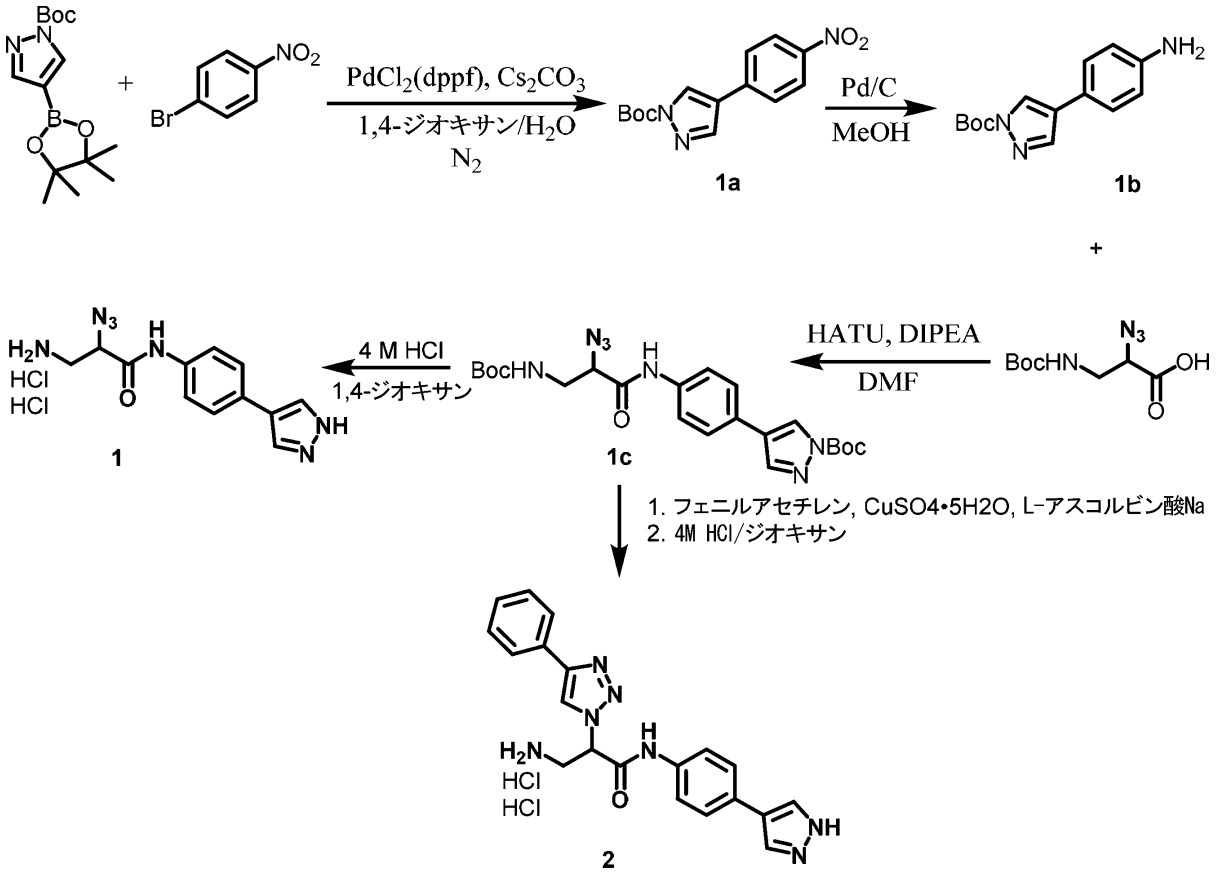
【００５０】

１実施形態では、本開示の上述した用途において用いるのは化合物７であり、それはラセミ化合物である。１実施形態では、本開示の上述した用途において用いるのは化合物２０であり、それはＳ型化合物である。

【００５１】

また、本開示の上述した用途において、上述した生体内に関する応用には、限定はされないが、眼科に関する応用および／または肺に関する応用等が含まれ得る。眼科に関する応用の例には、視神経の保護、および／または高眼圧、緑内障、網膜血管閉塞症、黄斑変性、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、角膜内皮細胞損傷、角膜繊維症もしくはこれらの任意の組み合わせの予防および／または治療等が含まれ得るが、これに限定はされない。緑内障には、落屑緑内障、開放隅角緑内障、閉塞隅角緑内障、続発性緑内障、先天性緑内障等が含まれ得るが、これに限定はされない。また、上述した肺に関する応用の例には、限定はされないが、肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、肺気腫、肺がんもしくはこれらの任意の組み合わせ等の予防および／または治療が含まれ得る。

【００５２】
１実施形態では、本開示の上述した用途において、上に述べた生体内に関する応用は、緑内障的予防および／または治療であり得る。
【００５３】
本開示の上述した用途において、別の実施形態では、薬学的に許容される担体または塩は，任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形と共に、上述の薬剤を作製することができるものである。
【００５４】
かかる薬学的に許容される担体または塩については、前述した本開示の医薬組成物中の薬学的に許容される担体または塩に関する説明を参照することができるため、ここでは繰り返さない。
【００５５】
さらに、本開示は、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形の、眼圧下降薬を作製するための使用をも提供する。
【００５６】
１実施形態では、本開示の上述した用途において用いるのは化合物７であり、それはラセミ化合物である。１実施形態では、本開示の上述した用途において用いるのは化合物２０であり、それはＳ型化合物である。
【００５７】
また、１実施形態では、上述した本開示の用途において、上述した眼圧下降薬を、高眼圧症または高眼圧症を伴う疾病の治療および／または予防に用いることができる。かかる高眼圧症または高眼圧症を伴う疾病に関する説明および記述については前述を参照にすることができるため、ここでは繰り返さない。
【００５８】
１実施形態では、上述した本開示の用途において、上述した眼圧下降薬は緑内障の治療薬であってよい。上述した緑内障には、限定はされないが、落屑緑内障、開放隅角緑内障、閉塞隅角緑内障、続発性緑内障、先天性緑内障等が含まれ得る。
【００５９】
また、１実施形態では、上述した本開示の用途において、上述した眼圧下降薬は眼用製剤であってよい。眼用製剤には、限定はされないが、点眼剤、眼軟膏、眼用ゲル、眼内注射剤等が含まれ得る。特定の実施形態において、上述した眼圧下降薬は点眼剤であり得る。
【００６０】
本開示の上述した用途において、別の実施形態では、薬学的に許容される担体または塩は、任意の上述した本開示の新規なβアミノ酸誘導体またはこの新規なβアミノ酸誘導体の薬学的に許容される塩もしくはエステル、水和物、溶媒和物もしくは結晶形と共に、上述した眼圧下降薬を作製することができるものである。
【００６１】
かかる薬学的に許容される担体または塩については、前述した本開示の医薬組成物中の薬学的に許容される担体または塩に関する説明を参照することができるため、ここでは繰り返さない。
【実施例】
【００６２】
実施例１
βアミノ酸誘導体の合成
１．化合物１と化合物２の合成
化合物１と化合物２の合成スキームは以下のスキーム１に示すとおりである。
【００６３】
スキーム１



【００６４】

（１）合成例１

アルゴン下、密閉管中の１－ブロモ－４－ニトロベンゼン（1-bromo-4-nitrobenzene）（２１０ｍｇ，１．０４ｍｍｏｌ）、１－Ｂｏｃ－４－ピラゾールボロン酸ピナコールエステル（1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester）（３０５ｍｇ，１．０４ｍｍｏｌ）、ＰｄＣｌ$_2$（ｄｐｐｆ）（７６ｍｇ，１０３．７６μｍｏｌ）およびＣｓ$_2$ＣＯ$_3$（６７６ｍｇ，２．０８ｍｍｏｌ）の混合物に、混合溶媒（ジオキサン（dioxane）／Ｈ$_2$Ｏ＝１０／１，６ｍＬ）を注入してから、その混合物を９０℃で６時間撹拌した。室温まで冷却した後、回転蒸発によりで溶媒を除去し、残留物に水を加えると共に、ＥｔＯＡｃ（１５ｍＬ×３）で抽出を行った。合わせた有機層を塩水で洗浄し、無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、ろ過した。ろ液を濃縮し、残留物をフラッシュクロマトグラフィー（flash chromatography）（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝１５％）を用いシリカゲルで精製し、ｔｅｒｔ－ブチル４－（３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）－４－ニトロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール（tert-butyl 4-(3-(2-(dimethylamino) ethoxy) -4-nitrophenyl) -1H-pyrazole）（１ａ）を白色の固体として得た（２４９ｍｇ，６４％）。

【００６５】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）－４－ニトロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール（１ａ）（３６０ｍｇ）がＭｅＯＨ（８ｍＬ）に入った溶液に１０％　Ｐｄ／Ｃを加え、前述の反応の混合物をＨ$_2$雰囲気（H_2 balloon atmosphere）の室温下で１時間撹拌した。混合物をろ過し、ろ液を回転により蒸発させて、ｔｅｒｔ－ブチル－（４－アミノ－３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール（tert-butyl -(4-amino-3-(2-(dimethylamino) ethoxy) phenyl) -1H-pyrazole）（１ｂ）を茶色の固体として得た（３２０ｍｇ，９７％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：８．４４（ｓ，１Ｈ），８．２７（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），８．０６（ｓ，１Ｈ），７．６９－７．６８（ｍ，４Ｈ），１．６８（ｓ，９Ｈ），１．５９（ｓ，９Ｈ）。

【００６６】
２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸（2-azido-3-（(tert-butoxycarbonyl) amino) propanoic acid）（１．２ｅｑ）、ＨＡＴＵ（１．５ｅｑ）およびＤＩＰＥＡ（２ｅｑ）をＤＭＦ（０．１Ｍ）中に溶解し、さらにｔｅｒｔ－ブチル－（４－アミノ－３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール（１ｂ）（１．０ｅｑ）を加えて混合物を作り、室温で１時間撹拌した。水で反応を促して起こし、ＥｔＯＡｃで抽出した。有機層を収集し、Na_2SO_4で乾燥し、抽出液を減圧下で濃縮した。残留物をシリカゲル（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝２０％）で精製し、所望の化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（２－（２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（2-azido-3-（(tert-butoxycarbonyl) amino) propanamido) phenyl) -1H-pyrazole-1-carboxylate）（１ｃ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：８．４１（ｓ，１Ｈ），８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４７（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），５．０７（ｓ，１Ｈ），４．２７（ｍ，１Ｈ），３．７２（ｍ，１Ｈ），３．６０（ｍ，１Ｈ），１．６５（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。
【００６７】
１，４－ジオキサン中の４Ｍ　ＨＣｌ（２０ｅｑ）および４－（４－（２－（２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１ｃ）（１ｅｑ）を室温下で１時間撹拌した。ろ過により白色の固体を収集し、それを１，４－ジオキサンとＤＣＭで洗浄した。白色の固体を真空乾燥し、Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－アジドプロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl) phenyl）-3-amino-2-azidopropanamide dihydrochloride）（１）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，Ｄ２Ｏ）δ：８．３０（ｓ，２Ｈ），７．６７（ｍ，２Ｈ），７．５５（ｍ，２Ｈ），４．７６（ｍ，１Ｈ），３．５７（ｄｄ，Ｊ＝１３．５，４．５Ｈｚ，１Ｈ），３．４４（ｄｄ，Ｊ＝１３．５，７．５Ｈｚ，１Ｈ），３．６０（ｍ，１Ｈ）。
【００６８】
（２）合成例２
ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（２－（２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１ｃ）（１ｅｑ）、フェニルアセチレン（phenyl acetylene）（１．１ｅｑ）、硫酸銅（ＩＩ）（０．２ｅｑ）および（＋）－Ｎａ－Ｌ－アスコルビン酸塩（(+)-Na-L-ascorbate）（０．２ｅｑ）を、ＴＨＦおよび２～３滴のH_2O中で撹拌した。その混合物を室温下で一晩撹拌した後、溶媒を除去した。残留物をシリカゲル（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝２０％）で精製し、所望の化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－フェニル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－１－イル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（(tert-butoxycarbonyl) amino) -2-（4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl) propanamido) phenyl) -1H-pyrazole-1-carboxylate）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：８．９８（ｓ，１Ｈ），８．２４（ｓ，１Ｈ），８．１１（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．８３（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４６（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３４（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），５．６１（ｓ，１Ｈ），５．１５（ｓ，１Ｈ），４．１０－４．０６（ｍ，１Ｈ），３．９６－３．９５（ｍ，１Ｈ），１．６５（ｓ，９Ｈ），１．４０（ｓ，９Ｈ）。
【００６９】
化合物２の作製方法は化合物１の作製方法と類似する。差異は、化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（２－（２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレートが、化合物ｔｅｒ

ｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－フェニル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－１－イル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレートに置き換えられて、生成物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－フェニル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾール－１－イル）プロペンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl） propenamide dihydrochloride）（２）が得られた点である。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤ$_{3}$ＯＤ）δ：８．６３（ｓ，１Ｈ），８．６１（ｓ，１Ｈ），７．８８（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．７４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．６７（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４５（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３７（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），５．９７（ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，１Ｈ），５．５４（ｓ，１Ｈ），３．９２（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，２Ｈ），３．３４（ｓ，２Ｈ）。

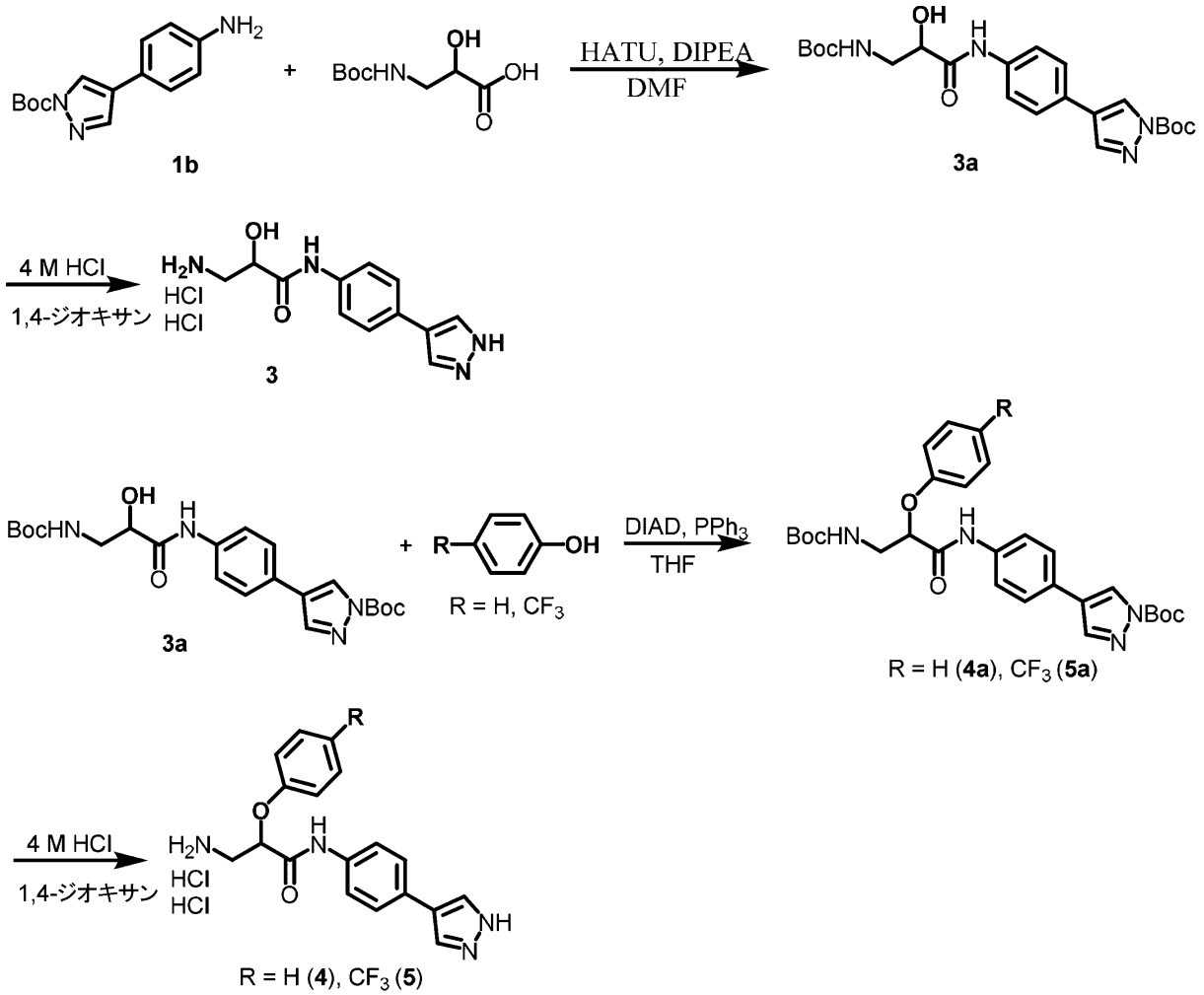
【００７０】

２．化合物３から化合物５の合成

化合物３から化合物５の合成スキームは以下のスキーム２に示すとおりである。

【００７１】

スキーム２



【００７２】

（３）合成例３

化合物３ａの作製方法は化合物１ｃの作製方法と類似する。差異は、化合物２－アジド－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパン酸が、化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－ヒドロキシ

プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-hydroxypropanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（３ａ）に置換された点である。最終生成物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－ヒドロキシプロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-hydroxypropanamide dihydrochloride）（３）の合成方法は化合物１と類似する。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，D_2O）δ：８．２０（ｓ，２Ｈ），７．７０（ｄ，Ｊ＝８．０，２Ｈ），７．５６（ｄ，Ｊ＝８．０，２Ｈ），４．６４（ｄｄ，Ｊ＝８．５，４．５Ｈｚ，１Ｈ），３．５１（ｄｄ，Ｊ＝１３．５，４．５Ｈｚ，１Ｈ），３．３６－３．３１（ｍ，１Ｈ）。

【００７３】

（４）合成例４

１０ｍＬＴＨＦ中の化合物３ａ（１ｅｑ）、フェノール（１ｅｑ）およびＰＰｈ$_3$（２ｅｑ）の０℃の溶液に、ＤＩＡＤ（１．５ｅｑ）を滴下して加えた。その混合物を室温で２時間撹拌した。減圧により溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィー（column chromatography）（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝１０％）で粗生成物を精製して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェノキシプロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-phenoxypropanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（４ａ）を油状物として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCI_3$）δ：８．２６（ｓ，２Ｈ），７．９６（ｓ，１Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４８（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３５（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．０９－６．９９（ｍ，３Ｈ），５．０３（ｂｒｓ，１Ｈ），４．７６（ｔ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），３．８１－３．７８（ｍ，１Ｈ），３．７３－３．７０（ｍ，１Ｈ），１．６８（ｓ，９Ｈ），１．４５（ｓ，９Ｈ）。最終生成物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェノキシプロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-phenoxypropanamide dihydrochloride）（４）の合成方法は化合物１と類似する。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：８．３０（ｓ，２Ｈ），７．６６（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．５９（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３６（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．１２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），７．０７（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），７．０１－６．９８（ｍ，１Ｈ），３．７５－３．６６（ｍ，１Ｈ），３．６０－３．５０（ｍ，２Ｈ）。

【００７４】

（５）合成例５

化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－（トリフルオロメチル）フェノキシ）プロペンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（4-（trifluoromethyl） phenoxy）propenamide dihydrochloride）（５）の合成方法は化合物４と類似する。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：８．１４（ｂｒ，２Ｈ），７．６８（ｄ，Ｊ＝９．０，２Ｈ），７．６３（ｄ，Ｊ＝６．５，２Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝６．５，２Ｈ），７．２６（ｄ，Ｊ＝９．０，２Ｈ），５．２１（ｍ，１Ｈ），３．６０－３．５８（ｍ，２Ｈ）。

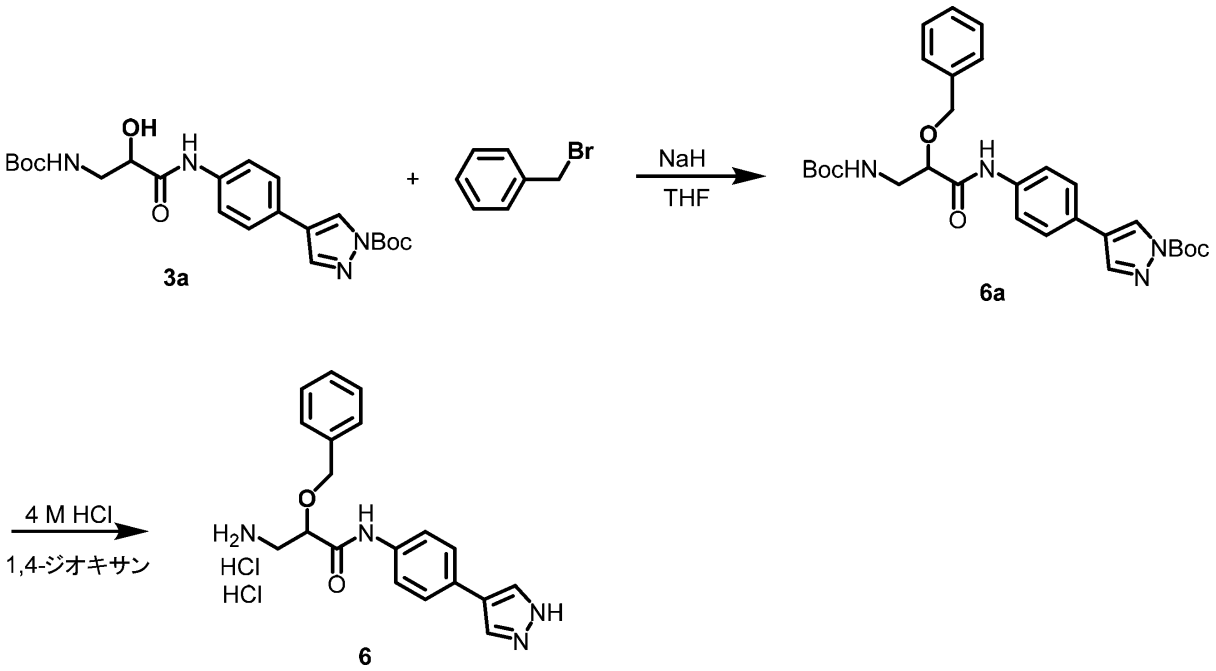
【００７５】

３．化合物６の合成

化合物６の合成スキームは以下のスキーム３に示すとおりである。

【００７６】

スキーム３



【００７７】

（６）合成例６

化合物３ａ（１ｅｑ）が１０ｍＬのＴＨＦに入った０℃の溶液に、ＮａＨ（１．５ｅｑ）を加えた。その混合物を０℃で１時間撹拌してから、ＢｎＢｒ（１．５ｅｑ）を滴下して加えた。その反応混合物を室温で６時間撹拌した。水で反応を促して起こし、ＥｔＯＡｃで抽出を行った。有機層を収集し、Na_2SO_4で乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去した。残留物をシリカゲル（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝５％から１５％）で精製し、所望の化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（２－（ベンジルオキシ）－３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（2-（benzyloxy）-3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（６ａ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：８．４４（ｓ，１Ｈ），８．２７（ｓ，１Ｈ），７．９７（ｓ，１Ｈ），７．５６（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４８（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４１－７．３５（ｍ，５Ｈ），４．９３（ｂｒｓ，１Ｈ），４．８２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），４．６６（ｄ，Ｊ＝１１．０Ｈｚ，１Ｈ），４．０６（ｔ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），３．６５－３．６１（ｍ，２Ｈ），１．６８（ｓ，９Ｈ），１．４４（ｓ，９Ｈ）。

【００７８】

最終生成物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（ベンジルオキシ）プロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（benzyloxy） propanamidedihydrochloride）（６）の合成方法は化合物１と類似する。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤ$_3$ＯＤ）δ：８．４６（ｓ，２Ｈ），７．６９－７．６６（ｍ，４Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３８（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３４－７．３１（ｍ，１Ｈ），４．７８（ｄ，Ｊ＝１１．５Ｈｚ，１Ｈ），４．７５（ｄ，Ｊ＝１１．５Ｈｚ，１Ｈ），４．３６－４．３４（ｍ，１Ｈ），３．３６－３．３１（ｍ，２Ｈ）。

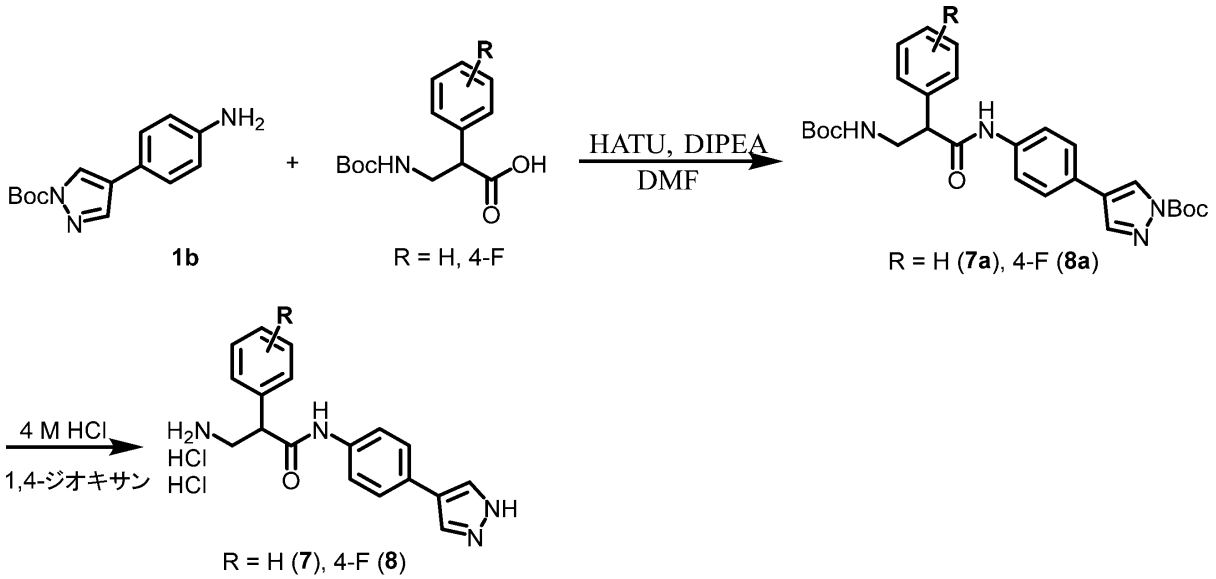
【００７９】

４．化合物７および化合物８の合成

化合物７の合成スキームは以下のスキーム４に示すとおりである。

【００８０】

スキーム４



【００８１】

（７）合成例７

中間化合物７ａおよび８ａの作製方法は化合物１ｃの作製方法に類似する。

【００８２】

中間化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（７ａ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）δ：８．２２（ｓ，１Ｈ），７．９２（ｓ，１Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），５．１４（ｓ，１Ｈ），３．９０（ｍ，１Ｈ），３．６５（ｍ，１Ｈ），３．５５（ｍ，１Ｈ），１．６４（ｓ，９Ｈ），１．４０（ｓ，９Ｈ）。

【００８３】

中間化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－フルオロフェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-fluorophenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（８ａ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$，５００ＭＨｚ）８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．５３－７．５１（ｍ，３Ｈ），７．４５（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３４（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．０５（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），５．１３（ｂｒｓ，ＮＨ，１Ｈ），３．９２（ｓ，１Ｈ），３．６５－３．６４（ｍ，１Ｈ），３．５４－３．５１（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４７（ｓ，９Ｈ）。

【００８４】

最終化合物７および８の作製方法は化合物１の作製方法と類似する。

【００８５】

最終化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドジヒドロクロリド（N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride）（７）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤ$_{3}$ＯＤ）δ：８．５５（ｂｒ，２Ｈ），７．６９（ｄ，Ｊ＝８．５，２Ｈ），７．６３（ｄ，Ｊ＝８．５，２Ｈ），７．４７－７．３４（ｍ，５Ｈ），４．１５－４．１７（ｍ，１Ｈ），３．６１（ｄｄ，Ｊ＝１２．５，９．５Ｈｚ，１Ｈ），３．２５（ｄｄ，Ｊ＝１２．５，５．５Ｈｚ，１Ｈ），３．６０（ｍ，１Ｈ）。

【００８６】

最終化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－フルオロフェニル）プロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（4-fluorophenyl） propanamide dihydrochloride）（８）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，D_2O）δ：８．０７（ｓ，２Ｈ），７．４２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３４（ｄｄ，Ｊ＝５．５，８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２６（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．０８（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），４．０６（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），３．５２（ｄｄ，Ｊ＝７．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ），３．３３（ｄｄ，Ｊ＝７．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ）。

【００８７】

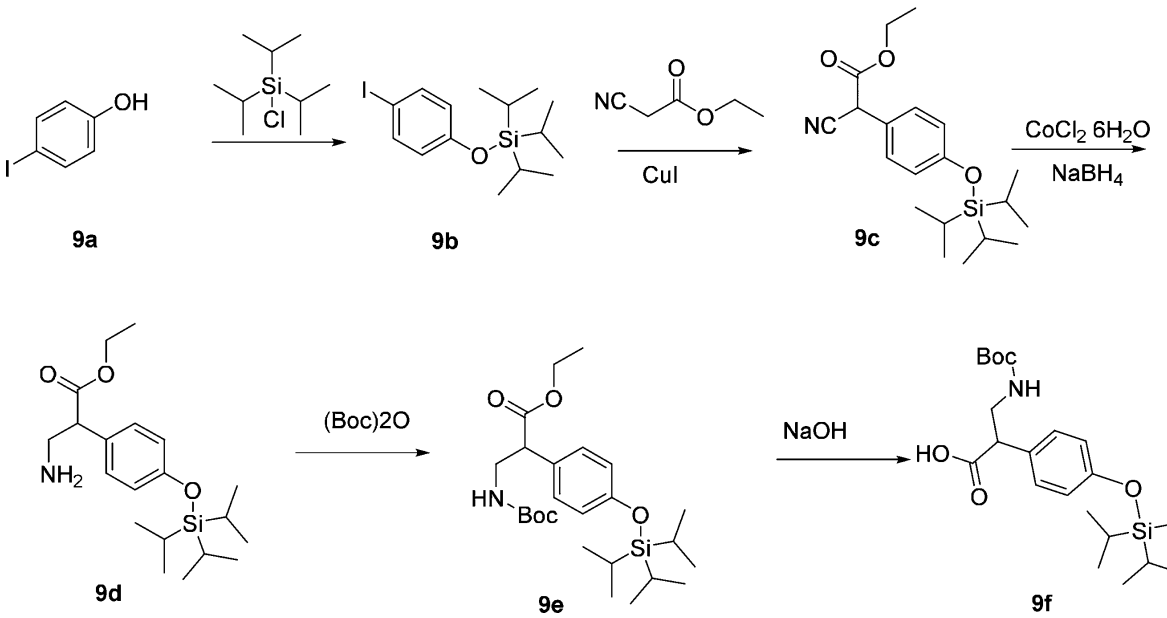
５．化合物９の合成

（８）合成例８

化合物９ｆの合成スキームは以下スキーム５に示すとおりである。

【００８８】

スキーム５



【００８９】

ヨードフェノール（９ａ）（１００ｇ，４５４．５ｍｍｏｌ）がＤＣＭ（１０００ｍＬ）に入った溶液にイミダゾール（imidazole）（６８ｇ，９９９．９ｍｍｏｌ）を加えてから、ＴＩＰＳＣ１（８７．３ｇ，４５４．５ｍｍｏｌ）を滴下して加えた。その混合物を１６時間撹拌した後、氷／水中に注ぎ入れ、ＤＣＭで抽出を行った。塩水で有機層を洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（溶離液：酢酸エチル／石油エーテル＝１／５０）、化合物９ｂを得た（１７０ｇ，９９．１％）。それは無色の油であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（$CDCl_3$，４００ＭＨｚ）：δ：１．０５－１．０８（ｄ，１８Ｈ），１．２０－１．２８（ｍ，３Ｈ），６．６４－６．６６（ｍ，２Ｈ），７．４７－７．４９（ｍ，２Ｈ）。

【００９０】

化合物９ｂ（１４０ｇ，３７２．３ｍｍｏｌ）がジオキサン（１５００ｍＬ）中に入った溶液に、２－シアノ酢酸エチル（ethyl2-cyanoacetate）（６３．１ｇ，５５８．８ｍｍｏｌ）、ピコリン酸（picolinic acid）（１３．８ｇ，１１１．７ｍｍｏｌ）、Cs_2CO_3（２４２ｇ，７４４．６ｍｍｏｌ）およびＣｕＩ（２１．２ｇ，１１１．７ｍｍｏｌ）を加えた。その混合物を９０℃で２時間撹拌し、ろ過した。有機層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（溶離液：酢酸エチル／石油エーテル＝１／２０）化合物９ｃ（４４ｇ，３２．７％）を白色の固体として得た。

【００９１】

化合物９ｃ（２２ｇ，６０．９ｍｍｏｌ）がＭｅＯＨ／ＴＨＦ（２：１，６６０ｍＬ）に入った溶液に、－２０℃で$CoCl_2 6H_2O$（４４ｇ，１８４．９ｍｍｏｌ）および$NaBH_4$（３３ｇ，８６８．４ｍｍｏｌ）を加えた。その混合物を３０分撹拌し、ろ過してろ液を得た。そのろ液を有機物$(Boc)_2O$（４０ｇ，１８３．５ｍｍｏｌ）に加え、室温で０．５時間撹拌した。次いで、その混合物を氷／水中に注ぎ入れ、ＥｔＯＡｃで抽出を行った。塩水で有機層を洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（溶離液：酢酸エチル／石油エーテル＝１／３０）、化合物９ｅを得た（１０．５ｇ，３５．９％）。それは黄色の油であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（$CDCl_3$，４００ＭＨｚ）：δ：１．５３－１．０９（ｔ，１８Ｈ），１．１７－１．２８（ｍ，６Ｈ），１．４２（ｓ，９Ｈ），３．４６－３．５６（ｍ，２Ｈ），３．７７－３．８０（ｔ，１Ｈ），４．１１－４．１８（ｍ，２Ｈ），４．８２（ｓ，１Ｈ），６．８１－６．８３（ｄ，２Ｈ），７．０９－７．１１（ｄ，２Ｈ）。

【００９２】

化合物９ｅ（１０ｇ，２１．５ｍｍｏｌ）がＥｔＯＨ／H_2O（１０：１，２２０ｍＬ）に入った溶液にＮａＯＨ（２ｇ，４９．５ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間撹拌した。その混合物を１Ｎ　ＨＣｌで中和し、ＥｔＯＡｃで抽出を行った。塩水で有機層を洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（溶離液：酢酸エチル／石油エーテル＝１／１０）、化合物９ｆを得た（２．５ｇ，２６．６％）。それは白色の固体であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ６，４００ＭＨｚ）：δ：１．０８－１．１０（ｄ，１８Ｈ），１．２２－１．３２（ｍ，３Ｈ），１．３７（ｓ，９Ｈ），３．２３－３．２８（ｍ，１Ｈ），３．４２－３．４６（ｔ，１Ｈ），３．６９－３．７３（ｔ，１Ｈ），６．８５－６．８７（ｄ，３Ｈ），７．１６－７．１８（ｄ，２Ｈ）。

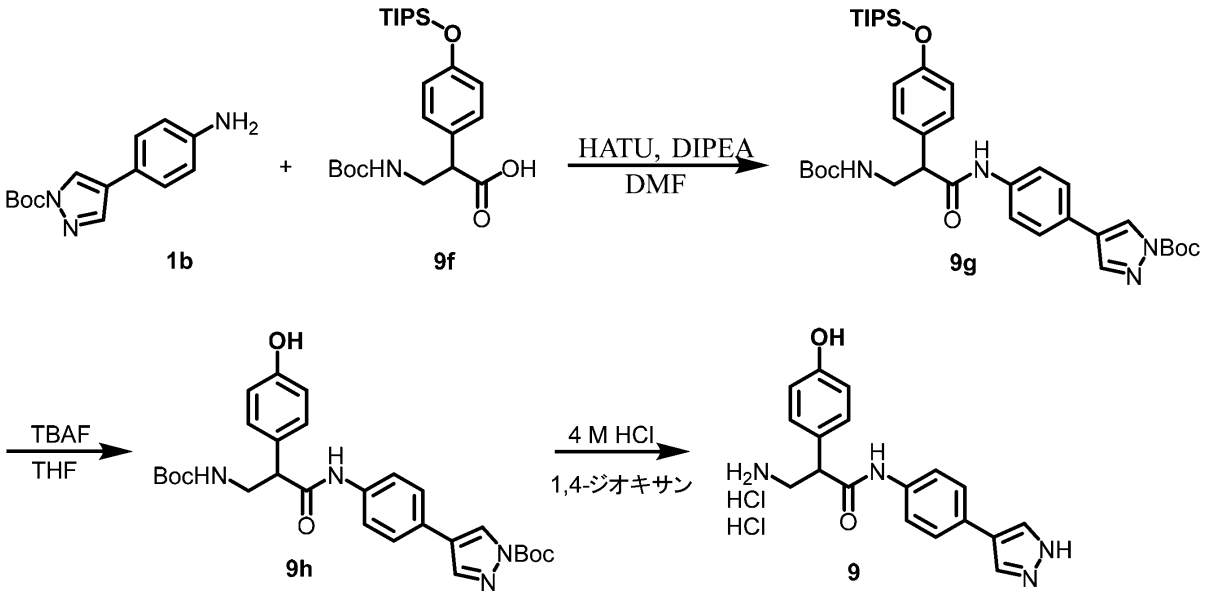
【００９３】

（９）合成例９

化合物９の合成スキームはスキーム６に示すとおりである。

【００９４】

スキーム６



【００９５】

中間化合物９ｇの作製方法は化合物１ｃの作製方法と類似する。

【００９６】

中間化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（トリイソプロピルシリル）オキシ）フェニル）プロパンアミド）

フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-（（triisopropylsilyl）oxy）phenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（９ｇ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$，５００ＭＨｚ）８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３０（ｂｒｓ，ＮＨ，１Ｈ），７．１９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），６．８７（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），５．１７（ｂｒｓ，ＮＨ，１Ｈ），３．８２（ｓ，１Ｈ），３．６４－３．６２（ｍ，１Ｈ），３．５６－３．５３（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ），１．３０－１．２０（ｍ，３Ｈ），１．０９（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１８Ｈ）。

【００９７】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（トリイソプロピルシリル）オキシ）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（９ｇ）（１０３０ｍｇ，１．５２ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１０ｍＬ）中に入れて撹拌した溶液に、ＴＨＦ溶液に入った１Ｍ　ＴＢＡＦ（３．０３ｍＬ，３．０３ｍｍｏｌ）を加えた。生成された混合物を室温で１時間撹拌した。水で反応を促して起こし、ＥｔＯＡｃで抽出を行った。有機層を収集し、Na_2SO_4で乾燥させ、抽出物を減圧下で濃縮した。残留物を逆相高速液体クロマトグラフィー（preparative reverse　ＨＰＬＣ）（８０％　ＡＣＮ，　２０％　H_2O）で精製し、次いで凍結乾燥して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－ヒドロキシフェニル）プロパンアミド）フェニル）－１－Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-hydroxyphenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（９ｈ）（６００ｍｇ，７６％）を白色の粉末として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$，５００ＭＨｚ）８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４５－７．４３（ｍ，３Ｈ），７．１５（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），６．８１（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），５．２６（ｂｒｓ，ＮＨ，１Ｈ），３．８０（ｓ，１Ｈ），３．６２（ｓ，１Ｈ），３．５５－３．５３（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．６２（ｂｒｓ，ＯＨ，１Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。

【００９８】

最終化合物９の作製方法は化合物１の作製方法と類似する。

【００９９】

最終化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－ヒドロキシフェニル）プロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（4-hydroxyphenyl）　propanamide dihydrochloride）（９）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，D_2O）δ：８．０６（ｓ，２Ｈ），７．３９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２０（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），３．９７（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），３．４９（ｄｄ，Ｊ＝７．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ），３．３０（ｄｄ，Ｊ＝７．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ）。

【０１００】

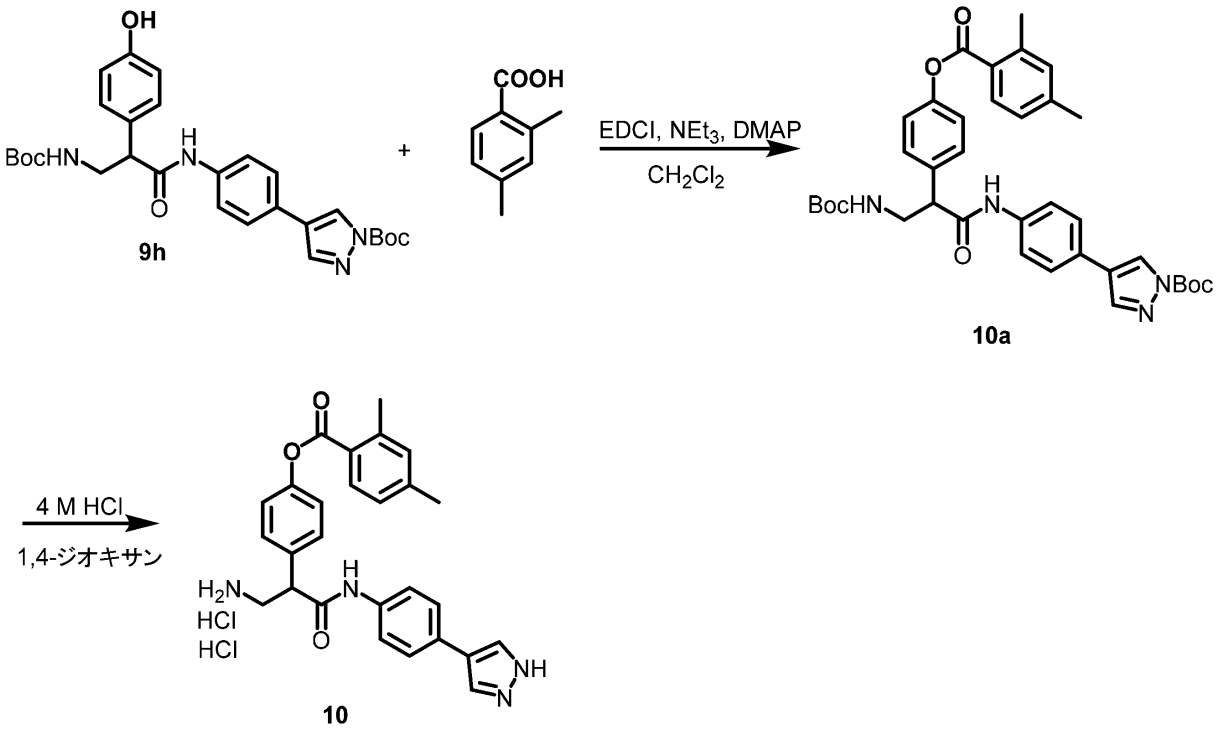
６．化合物１０の合成

（１０）合成例１０

化合物１０の合成スキームは以下のスキーム７に示すとおりである。

【０１０１】

スキーム７



【０１０２】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－ヒドロキシフェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-hydroxyphenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（９ｈ）（３５６ｍｇ，０．６８ｍｍｏｌ）、２，４－ジメチル安息香酸（2,4-dimethylbenzoic acid）（１０３ｍｇ，０．６８ｍｍｏｌ）およびＮＥｔ$_3$（１４３μＬ，１．０２ｍｍｏｌ）をＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（２０ｍＬ）に入れて撹拌した溶液に、ＥＤＣＩ（１９６ｍｇ，１．０２ｍｍｏｌ）およびＤＭＡＰ（２５ｍｇ，０．２１ｍｍｏｌ）を加えた。生成された混合物を１６時間撹拌した。飽和クエン酸で反応を促して起こし、ＥｔＯＡｃで抽出を行った。有機層を収集し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、減圧下で溶媒を除去した。残留物を逆相高速液体クロマトグラフィー（１００％ＡＣＮ）で精製し、次いで凍結乾燥して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（２，４－ジメチルベンゾイル）オキシ）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-（（2,4-dimethylbenzoyl）oxy）phenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１０ａ）（３５５ｍｇ，８０％）を白色の粉末として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$，５００ＭＨｚ）８．２６（ｓ，１Ｈ），８．０６（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），７．９６（ｓ，１Ｈ），７．５３（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５２－７．４２（ｍ，５Ｈ），７．２１（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），５．１５（ｂｒｓ，ＮＨ，１Ｈ），３．９５（ｓ，１Ｈ），３．６８－３．６７（ｍ，１Ｈ），３．５８－３．５５（ｍ，１Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），２．４０（ｓ，３Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４４（ｓ，９Ｈ）。

【０１０３】

２０ｍＬの瓶に、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（２，４－ジメチルベンゾイル）オキシ）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-（（2,4-dimethylbenzoyl）oxy）phenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１０ａ）（３５０ｍｇ，０．５４ｍｍｏｌ）、およびジオキサンに入った４Ｍ　ＨＣｌ溶液（２．７ｍＬ）を

入れた。生成された混合物を室温で１時間撹拌した。減圧下で溶媒を除去し、所望の化合物４－（１－（（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）アミノ）－３－アミノ－１－オキソプロパン－２－イル）フェニル２，４－ジメチル安息香酸エステルジヒドロクロリド（4-（1-（（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）amino）-3-amino-1-oxopropan-2-yl）phenyl 2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride）（１０）を白色の粉末として得た（２７１ｍｇ，９６％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ）δ：１０．４７（ｓ，１Ｈ），８．０８（ｂｒｓ，３Ｈ），８．０２（ｓ，２Ｈ），７．９４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），７．６１（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．５３（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２８（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．１９（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），４．１８（ｄｄ，Ｊ＝５．５，８．５Ｈｚ，１Ｈ），３．１５－３．０６（ｍ，１Ｈ），２．５２（ｓ，３Ｈ），２．３４（ｓ，３Ｈ）。

【０１０４】

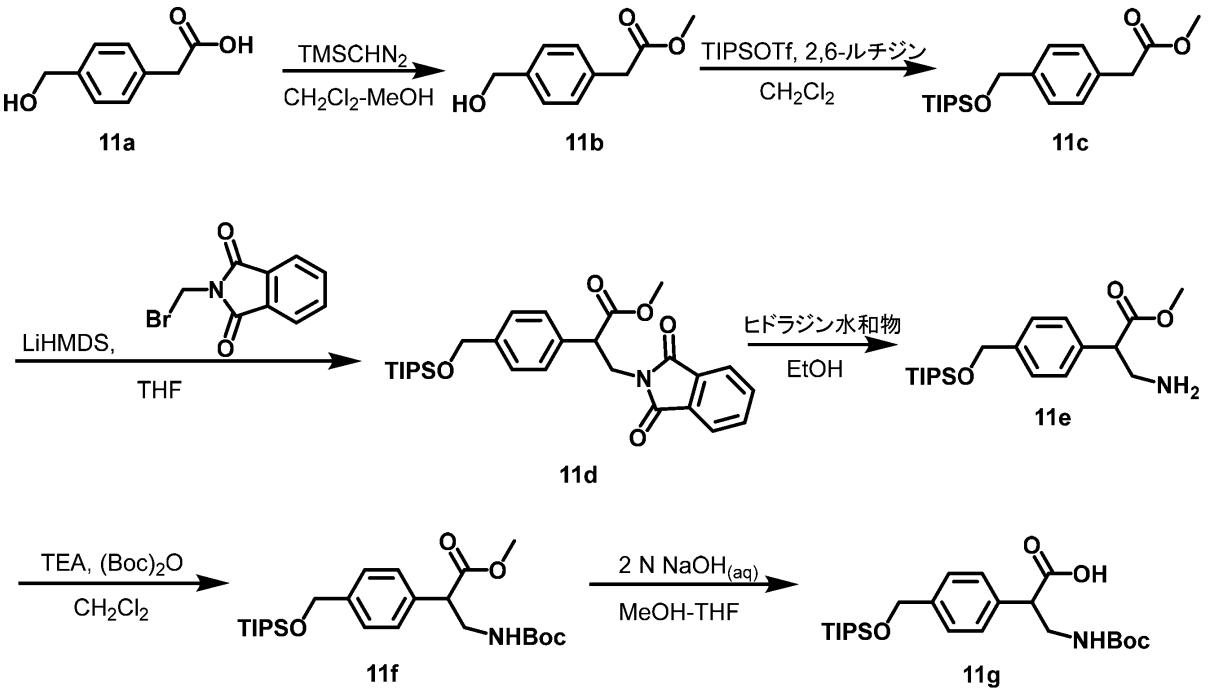
７．化合物１１の合成

（１１）合成例１１

化合物１１ｇの合成スキームは以下のスキーム８に示すとおりである。

【０１０５】

スキーム８



【０１０６】

２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）酢酸（2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetic acid）（５２３３ｍｇ，３１．４９ｍｍｏｌ）がCH_2Cl_2（２５ｍＬ）およびＭｅＯＨ（６ｍＬ）に入った０℃の溶液に、ＴＭＳジアゾメタン（diazomethane）（２３．６ｍＬのヘキサン中の２Ｍ溶液，４７．２３ｍｍｏｌ）を滴下して加えた。１５分後、ＨＯＡｃ（１ｍＬ）を加えることにより反応をクエンチした（quenched）。その反応混合物をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で希釈し、飽和$NaHCO_3$（２×２５ｍＬ）および塩水（２５ｍＬ）で洗浄した。有機層を乾燥させ（Na_2SO_4）、ろ過および濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー（０から３３パーセントＥｔＯＡｃ／ヘキサン）により残留物を精製して、メチル２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）アセテート（methyl 2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)acetate）（１１ｂ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ：７．３３（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２７（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），４．６８（ｓ，２Ｈ），３．６９（ｓ，３Ｈ），３．６３（ｓ，２Ｈ

）。

【０１０７】

メチル２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）アセテート（１１ｂ）（５６７４ｍｇ，３１．４９ｍｍｏｌ）がCH_2Cl_2（５０ｍＬ）に入った０℃の溶液に、２，６－ルチジン（2,6-lutidine）（５．４７ｍＬ，４７．２３ｍｍｏｌ）およびＴＩＰＳ－ＯＴｆ（１４．４８ｇ，４７．２３ｍｍｏｌ）を加えた。氷浴を取り除き、溶液を室温まで戻して撹拌した。２時間後、$NH_4Cl_{(aq)}$（５０ｍＬ）を加えることにより反応をクエンチした。その反応混合物をCH_2Cl_2（１００ｍＬ）で希釈し、H_2O（２×５０ｍＬ）および塩水（５０ｍＬ）で洗浄した。有機層を乾燥させ（Na_2SO_4）、ろ過および濃縮をした。フラッシュクロマトグラフィー（０から５パーセントＥｔＯＡｃ／ヘキサン）で残留物を精製し、メチル２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）アセテート（methyl 2-（4-（（（triisopropylsilyl）oxy）methyl）phenyl）acetate）（１１ｃ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ７．３１（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．２４（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），４．８２（ｓ，２Ｈ），３．６９（ｓ，３Ｈ），３．６２（ｓ，２Ｈ），１．２１－１．１５（ｍ，３Ｈ），１．１０－１．０６（ｍ，１８Ｈ）。

【０１０８】

メチル２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）アセテート（１１ｃ）（１０．６０ｇ，３１．４９ｍｍｏｌ）がＴＨＦ（５０ｍＬ）に入った－７８℃の溶液に、ＬｉＨＭＤＳ（４７．３０ｍＬ，４７．２３ｍｍｏｌ）を滴下して加えた。３０分後、同じ温度で、ＴＨＦ（５０ｍＬ）に入ったブロモメチルフタルイミド（bromo-methylphthalimide）（１１．３４ｇ，４７．２３ｍｍｏｌ）を滴下して加えた。－７８℃の氷浴を取り除き、溶液を室温まで戻して撹拌した。２時間後、$NH_4Cl_{(aq)}$（４０ｍＬ）を加えることにより反応をクエンチし、ＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ）で抽出を行った。有機層を乾燥させ（Na_2SO_4）、ろ過および濃縮をした。フラッシュクロマトグラフィー（０から１０パーセントＥｔＯＡｃ／ヘキサン）により残留物を精製し、メチル３－（１，３－ジオキソイソインドリン－２－イル）－２－（４－（（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（methyl 3-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)-2-(4-(((triisopropylsilyl)oxy)methyl)phenyl) propanoate）（１１ｄ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）：δ７．７９－７．７６（ｍ，２Ｈ），７．６９－７．６７（ｍ，２Ｈ），７．３０－７．２８（ｍ，４Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），４．３１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），４．２６－４．１５（ｍ，２Ｈ），３．６６（ｓ，３Ｈ），１．１７－１．０６（ｍ，３Ｈ），１．０５－１．０２（ｍ，１８Ｈ）。

【０１０９】

メチル３－（１，３－ジオキソイソインドリン－２－イル）－２－（４－（（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（１１ｄ）（４．３９ｇ，８．８６ｍｍｏｌ）の入ったＭｅＯＨ（３０ｍＬ）およびＥｔＯＨ（５０ｍＬ）の撹拌溶液に、ヒドラジン水和物（hydrazine hydrate）（２．２２ｇ，４４．２９ｍｍｏｌ）を加え、溶液を２時間還流させた。固体をろ過し、溶媒を蒸発させた。フラッシュクロマトグラフィー（０から５０パーセントＥｔＯＡｃ／ヘキサン）により残留物を精製し、メチル３－アミノ－２－（４－（（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（methyl 3-amino-2-（4-（（（triisopropylsilyl）oxy）methyl）phenyl）propanoate）（１１ｅ）を得た。

【０１１０】

メチル３－アミノ－２－（４－（（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（１１ｅ）（３．１９ｇ，８．７４ｍｍｏｌ）の入ったCH_2Cl_2（５０ｍＬ）の撹拌した溶液に、ＴＥＡ（２．４４ｍＬ，１７．４７ｍｍｏｌ）および$(Boc)_2O$（１７．４７ｍｍｏｌ）を加えた。その溶液を室温で４時間撹拌してから、CH_2Cl_2／$NaHCO_{3(aq)}$中に注ぎ入れた。水層をCH_2Cl_2でさらに抽

出し、乾燥させ（Na_2SO_4）、ろ過し、蒸発させた。フラッシュクロマトグラフィー（０から４パーセントＥｔＯＡｃ／ヘキサン）で残留物を精製し、メチル３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（methyl 3-（(tert-butoxycarbonyl) amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl) oxy) methyl) phenyl) propanoate）（１１ｆ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ７．３２（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２２（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），４．８６－４．８２（ｍ，１Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），３．８８－３．８３（ｍ，１Ｈ），３．６８（ｓ，３Ｈ），３．６３－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．５１－３．４８（ｍ，１Ｈ），１．４２（ｓ，９Ｈ），１．２１－１．１４（ｍ，３Ｈ），１．１０－１．０８（ｍ，１８Ｈ）。

【０１１１】

メチル３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパノエート（１１ｆ）（２．０７ｇ，４．４４ｍｍｏｌ）の入ったＴＨＦ／ＭｅＯＨ（１：１，４０ｍＬ）の溶液にＮａＯＨ（８．８８ｍＬ，１７．７６ｍｍｏｌ）を加え、室温で２時間撹拌した。混合物を１Ｎ ＨＣｌで中和し、ＥｔＯＡｃで抽出した。有機層を塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ＥｔＯＡｃ／ヘキサン＝１／３）、化合物３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパン酸（3-（(tert-butoxycarbonyl) amino)-2-(4-(((triisopropylsilyl) oxy) methyl) phenyl) propanoic acid）（１１ｇ）（１．８４ｇ，９２％）を白色の固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）：δ７．３５（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２８（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），６．７７（ｂｒｓ，０．５Ｈ），４．９２（ｂｒｓ，０．５Ｈ），４．８２（ｓ，２Ｈ），３．９１－３．８０（ｍ，１Ｈ），３．５９－３．５０（ｍ，２Ｈ），１．４６－１．４２（ｍ，９Ｈ），１．２１－１．１４（ｍ，３Ｈ），１．１０－１．０８（ｍ，１８Ｈ）。

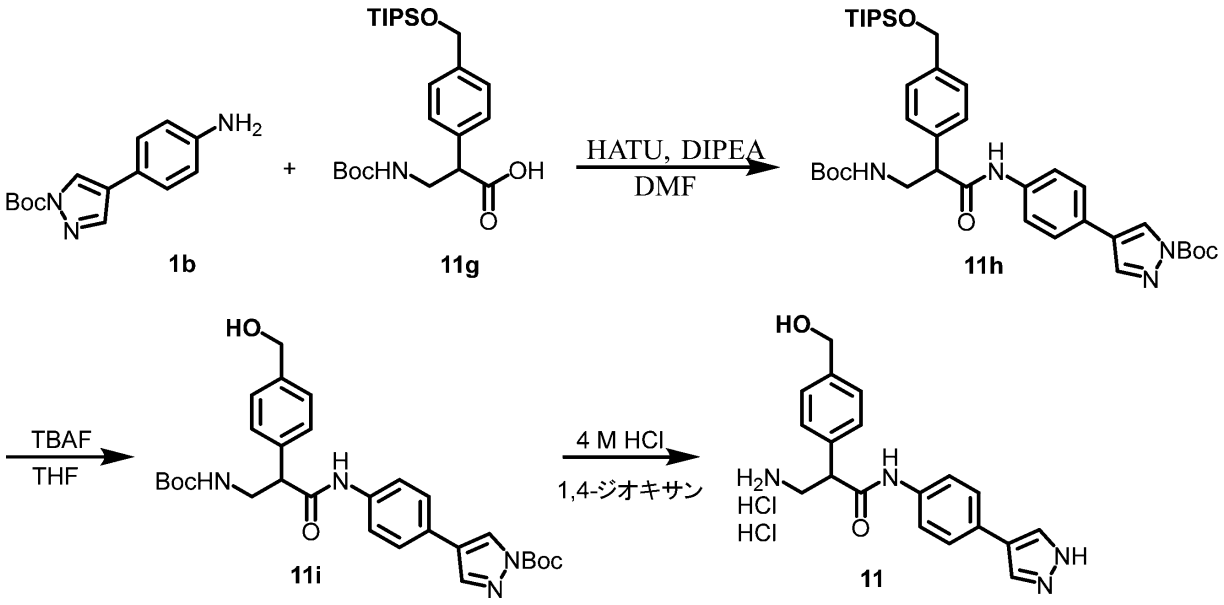
【０１１２】

（１２）合成例１２

化合物１１の合成スキームは以下のスキーム９に示されるとおりである。

【０１１３】

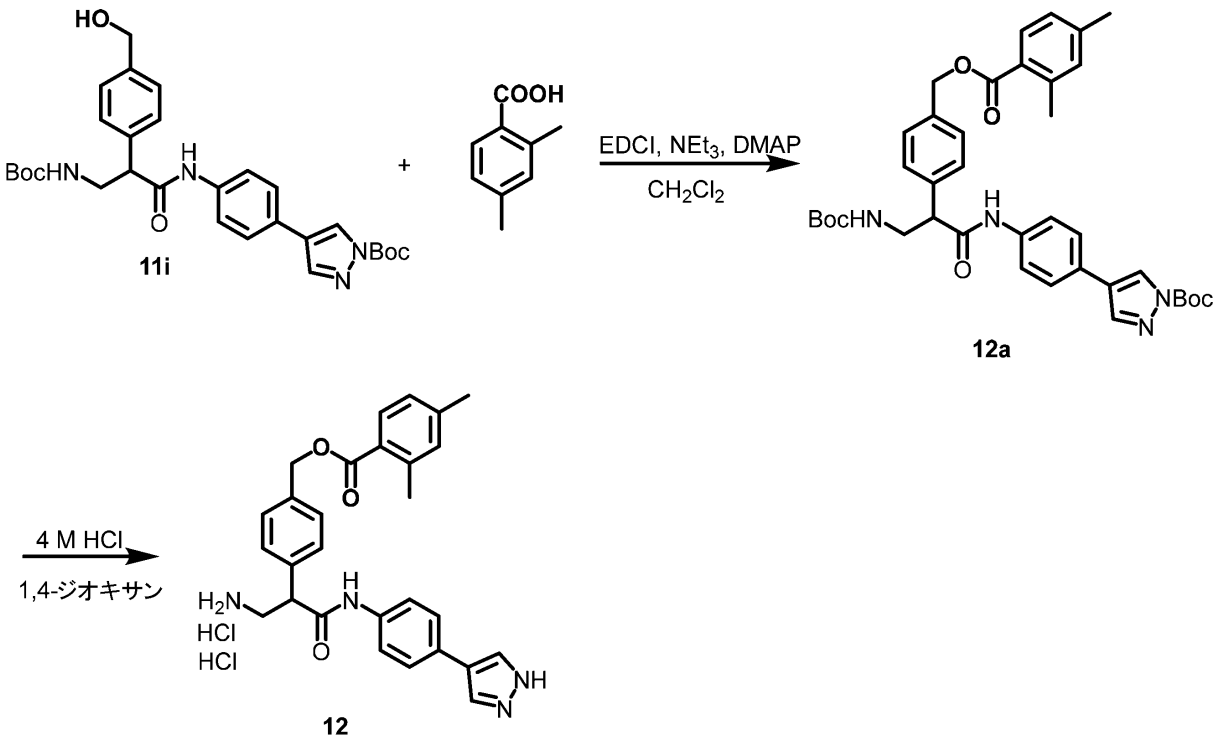
スキーム９



【０１１４】

最終化合物１１の合成方法は化合物９と類似する。

【０１１５】
化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（トリイソプロピルシリル）オキシ）メチル）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-（（（triisopropylsilyl）oxy）methyl）phenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１１ｈ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９５（ｓ，１Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４５（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３７（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３３－７．３１（ｍ，３Ｈ），５．１５（ｂｒｓ，１Ｈ），４．８３（ｓ，２Ｈ），３．９０（ｂｒｓ，１Ｈ），３．６８（ｂｒｓ，１Ｈ），３．５８－３．５５（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ），１．２６－１．１４（ｍ，３Ｈ），１．１０－１．０８（ｍ，１８Ｈ）。
【０１１６】
化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-（4-（hydroxymethyl）phenyl）propanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１１ｉ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．５１（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４６－７．４４（ｍ，３Ｈ），７．３９－７．３７（ｍ，４Ｈ），５．１５（ｂｒｓ，１Ｈ），３．９２（ｂｒｓ，１Ｈ），３．６７－３．６６（ｍ，１Ｈ），３．５６－３．５４（ｍ，１Ｈ），１．６７－１．６４（ｍ，１０Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。
【０１１７】
最終化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）プロペンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-（4-（hydroxymethyl） phenyl）propenamide dihydrochloride）（１１）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，Ｄ$_{2}$Ｏ）δ：８．０５（ｓ，２Ｈ），７．４４（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３５（ｓ，４Ｈ），７．２７（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），４．５３（ｓ，２Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１Ｈ），３．５６（ｄｄ，Ｊ＝６．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ），３．３６（ｄｄ，Ｊ＝６．５，１３．０Ｈｚ，１Ｈ）。
【０１１８】
８．化合物１２の合成
（１３）合成例１３
化合物１２の合成スキームは以下のスキーム１０に示されるとおりである。
【０１１９】
スキーム１０



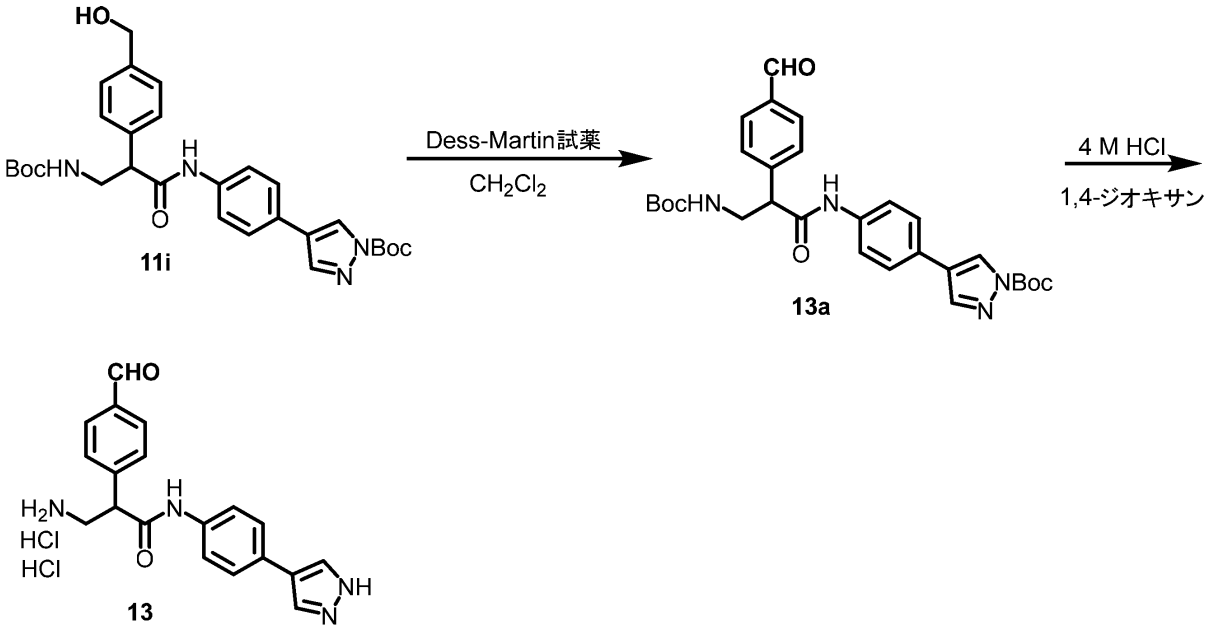
【０１２０】
最終化合物１２の合成方法は化合物１０と類似する。
【０１２１】
化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（（（（２，４－ジメチルベンゾイル）オキシ）メチル）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(((2,4-dimethylbenzoyl)oxy)methyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１２ａ）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$，５００ＭＨｚ）８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９４（ｓ，１Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），７．５２（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４６－７．４４（ｍ，４Ｈ），７．４１－７．３７（ｍ，３Ｈ），７．０６－７．０３（ｍ，３Ｈ），５．３１（ｓ，２Ｈ），５．１４（ｂｒｓ，１Ｈ），３．９３（ｂｒｓ，１Ｈ），３．６８－３．６７（ｍ，１Ｈ），３．５９－３．５５（ｍ，１Ｈ），２．６０（ｓ，３Ｈ），２．３７（ｓ，３Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。
【０１２２】
化合物２－（４－（１－（（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）アミノ）－３－アミノ－１－オキソプロパン－２－イル）ベンジル２，４－ジメチル安息香酸エステルジヒドロクロリド（4-(1-((4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-yl) benzyl 2,4-dimethylbenzoate dihydrochloride）（１２）は白色の粉末であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ）δ：１０．４０（ｓ，ＮＨ，１Ｈ），８．０３（ｂｒｓ，ＮＨ，３Ｈ），８．００（ｓ，２Ｈ），７．７５（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），７．５８（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．５１（ｄ，Ｊ＝９．０Ｈｚ，２Ｈ），７．４７－７．４４（ｍ，４Ｈ），７．１２（ｓ，１Ｈ），７．０９（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），５．２６（ｓ，２Ｈ），４．１３（ｄｄ，Ｊ＝５．５，９．０Ｈｚ，１Ｈ），３．０７－３．０２（ｍ，１Ｈ），２．４７（ｓ，３Ｈ），２．２９（ｓ，３Ｈ）。
【０１２３】
９．化合物１３の合成

（１４）合成例１４

化合物１３の合成スキームは以下のスキーム１１に示されるとおりである。

【０１２４】

スキーム１１



【０１２５】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－（ヒドロキシメチル）フェニル）プロパンアミド）フェニル）－１－Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-(hydroxymethyl)phenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１１ｉ）（１００ｍｇ，０．１９ｍｍｏｌ）の入ったCH_2Cl_2（１０ｍＬ）の撹拌した溶液に、Ｄｅｓｓ－Ｍａｒｔｉｎ試薬（１６６ｍｇ，０．３７ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。減圧下で溶媒を蒸発させ、カラムクロマトグラフィー（ＥｔＯＡｃ／ヘキサン＝２５％から５０％）で粗生成物を精製し、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－ホルミルフェニル）プロパンアミド）フェニル）－１－Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(4-formylphenyl)propanamido)phenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１３ａ）を白色の粉末として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$，５００ＭＨｚ）１０．０１（ｓ，ＣＨＯ，１Ｈ），８．２６（ｓ，１Ｈ），７．９５（ｓ，１Ｈ），７．８８（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．６２（ｂｒｓ，１Ｈ），７．５８－７．５３（ｍ，４Ｈ），７．４６（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），５．１２（ｂｒｓ，１Ｈ），４．１３－４．０５（ｍ，１Ｈ），３．７４－３．７０（ｍ，１Ｈ），３．６０－３．５６（ｍ，１Ｈ），１．６６（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。

【０１２６】

４ｍＬの瓶に、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－（４－ホルミルフェニル）プロパンアミド）フェニル）－１－Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１３ａ）（５２ｍｇ，０．１０ｍｍｏｌ）、およびジオキサン（１．０ｍＬ）に入った４Ｍ　ＨＣｌを入れた。得られた混合物を室温で１時間撹拌した。減圧下で溶媒を除去し、所望の化合物Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－（４－ホルミルフェニル）プロパンアミドジヒドロクロリド（N-(4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-3-amino-2-(4-formylphenyl)propanamide dihydrochloride）（１３）（４４ｍｇ，９０％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５

００ＭＨｚ，D_2O）δ：９．７９（ｓ，ＣＨＯ，１Ｈ），７．９４（ｓ，２Ｈ），７．８４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５３（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．３９（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．２５（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），４．１９（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），３．６０（ｄｄ，Ｊ＝７．０，１２．５Ｈｚ，１Ｈ），３．３８（ｄｄ，Ｊ＝７．０，１２．５Ｈｚ，１Ｈ）。

【０１２７】

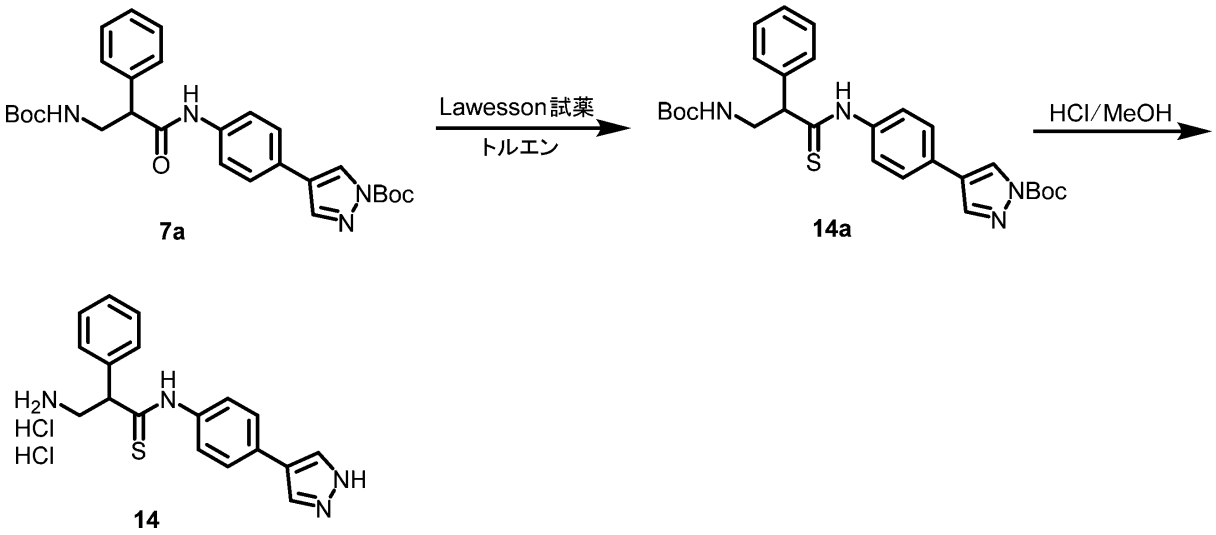
１０．化合物１４の合成

（１５）合成例１５

化合物１４の合成スキームは以下のスキーム１２に示されるとおりである。

【０１２８】

スキーム１２



【０１２９】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（７ａ）（５０６ｍｇ，１．０ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）およびＬａｗｅｓｓｏｎ試薬（８０８ｍｇ，２．０ｍｍｏｌ，２．０ｅｑ）をトルエン（５ｍＬ）中に入れた混合物を、N_2雰囲気（N_2 atmosphere）下で１２０℃に加温し１６時間加熱を続けた。その反応混合物を冷却して濃縮し、粗化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンチオアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl） amino）-2-phenylpropanethioamido） phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１４ａ）を得た（５２０ｍｇ，収率：１００％）。さらなる精製はせずに次のステップに用いることができた。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ＋Ｈ］＋＝５２３．３。

【０１３０】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンチオアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１４ａ）（５２０ｍｇ，１．０ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）を１ｍＬ ＭｅＯＨに溶解し、ＨＣｌ／ＭｅＯＨ（３Ｍ，５ｍＬ）を加え、室温で３時間撹拌した。その反応混合物を濃縮した。残留物をフラッシュクロマトグラフィー（ＤＣＭ／ＭｅＯＨ、１００％から１０％まで）で精製し、粗生成物（１１０ｍｇ）を得た。それをＤＣＭおよびＭｅＯＨで結晶化させ、１Ｎ ＨＣｌでｐＨ値を５．０に調製して、Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンチオアミドジヒドロクロリド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl） phenyl）-3-amino-2-phenylpropanethioamide dihydrochloride）（化合物１４）を得た（７５ｍｇ，収率：２ステップ２３％）。それは黄色の固体であった。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ＋Ｈ］$^+$＝３２３．２。^{1}Ｈ－

ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ$_6$）：１２．０８（ｓ，１Ｈ），８．０６－７．９９（ｍ，５Ｈ），７．７７（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），７．６３－７．５９（ｍ，４Ｈ），７．４１－７．３１（ｍ，３Ｈ），４．５４－４．５０（ｍ，１Ｈ），３．８８－３．７８（ｍ，１Ｈ），３．３１－３．２４（ｍ，１Ｈ）。

【０１３１】

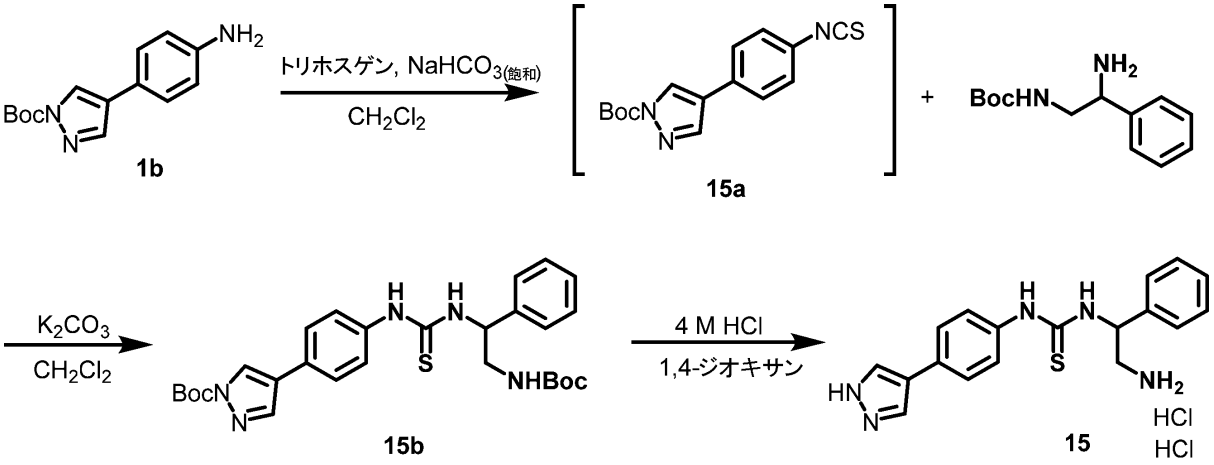
１１．化合物１５の合成

（１６）合成例１６

化合物１５の合成スキームは以下のスキーム１３に示されるとおりである。

【０１３２】

スキーム１３



【０１３３】

ｔｅｒｔ－ブチル－（４－アミノ－３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール（tert-butyl-（4-amino-3-（2-（dimethylamino）ethoxy）phenyl）-1H-pyrazole）（２００ｍｇ，０．８５ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）が入ったＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（４ｍＬ）の溶液にＮａＨＣＯ$_3$飽和溶液（２ｍＬ，０．４Ｍ）を加えた。次いで、チオホスゲン（thiophosgene）（９７ｍｇ，０．８５ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）をゆっくり加え、３時間撹拌した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で溶媒を除去して、粗生成物１５ａを得た。残留物１５ａ中に、ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$（４．０ｍＬ）に入ったｔｅｒｔ－ブチル（２－アミノ－２－フェニルエチル）カルバメート（tert-butyl（2-amino-2-phenylethyl）carbamate）（２２０ｍｇ，０．８５ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）およびＫ$_2$ＣＯ$_3$（２３５ｍｇ，１．７０ｍｍｏｌ，２．０ｅｑ）を加えた。水で反応を促して起こし、ＣＨ$_2$Ｃｌ$_2$で抽出した。有機層を収集し、Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、抽出液を減圧下で濃縮した。残留物をシリカゲルで精製し（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝２０％）、化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（２－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－フェニルエチル）チオウレイド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（2-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-1-phenylethyl）thioureido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１５ｂ）を得た（３５３ｍｇ，８５％）。それは淡黄色の固体であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ：８．３０（ｓ，１Ｈ），８．０２（ｓ，１Ｈ），７．９８（ｓ，１Ｈ），７．６３（ｓ，１Ｈ），７．５７（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３８－７．３４（ｍ，４Ｈ），７．３０－７．２４（ｍ，３Ｈ），５．６３（ｓ，１Ｈ），４．８５（ｓ，１Ｈ），３．５５－３．４４（ｍ，２Ｈ），１．６８（ｓ，９Ｈ），１．３１（ｓ，９Ｈ）。

【０１３４】

２０ｍＬの瓶に、化合物ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（２－（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－フェニルエチル）チオウレイド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１５ｂ）（３５３ｍｇ，０．６６ｍｍｏｌ）お

よび４Ｍ　ＨＣｌの入ったジオキサン（３．３ｍＬ）を入れた。得られた混合物を室温で１時間撹拌した。減圧下で溶媒を除去し、化合物１－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－（２－アミノ－１－フェニルエチル）チオウレアジヒドロクロリド（1-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-（2-amino-1-phenylethyl）thiourea dihydrochloride）（１５）を得た（２４４ｍｇ，９０％）。それは淡黄色の粉末状であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：８．５６（ｂｒｓ，２Ｈ），７．６５（ｄ，Ｊ＝８．０，２Ｈ），７．６０－７．５８（ｍ，２Ｈ），７．４８－７．３９（ｍ，４Ｈ），７．３８－７．３７（ｍ，１Ｈ），６．０８（ｄｄ，Ｊ＝９．０，５．０Ｈｚ，１Ｈ），３．４９（ｄｄ，Ｊ＝１３．０，９．０Ｈｚ，１Ｈ），３．３６（ｄｄ，Ｊ＝１３．０，５．０Ｈｚ，１Ｈ）。

【０１３５】

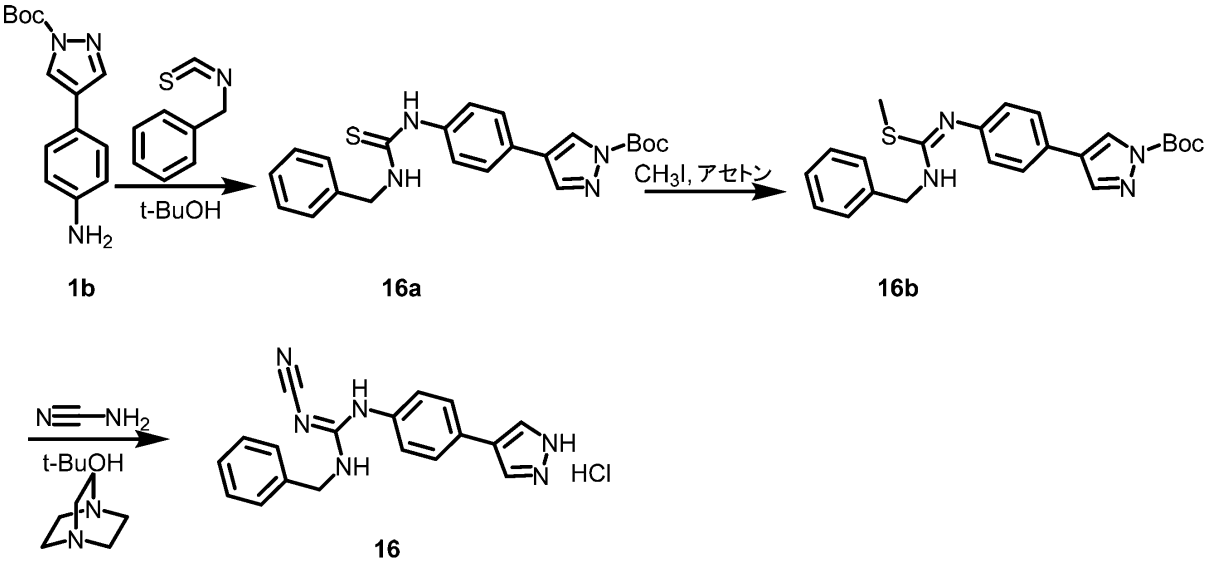
１２．化合物１６の合成

（１７）合成例１７

化合物１６の合成スキームは以下のスキーム１４に示されるとおりである。

【０１３６】

スキーム１４



【０１３７】

ｔｅｒｔ－ブチル－（４－アミノ－３－（２－（ジメチルアミノ）エトキシ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール（１ｂ）（４００ｍｇ，１．５４ｍｍｏｌ，１．０ｅｑｕｉｖ）および（イソチオシアナトメチル）ベンゼン（（isothiocyanatomethyl）benzene）（２７６ｍｇ，１．８５ｍｍｏｌ，１．２ｅｑ）がｔｅｒｔ－ブタノール（ｔ－ＢｕＯＨ）（１０ｍＬ）に入った混合物をN_2雰囲気にて８５℃で一晩撹拌した。その混合物を冷却し、濃縮した。残留物をシリカゲルカラムで精製し、酢酸エチル／石油エーテル（１：１）で活性化して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－ベンジルチオウレイド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-benzylthioureido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１６ａ）を得た（４１０ｍｇ、収率：６５％）。それは黄色の固体であった。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$＝４０９．３。

【０１３８】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－ベンジルチオウレイド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１６ａ）（４１０ｍｇ，１．００ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）およびCH_3I（２１４ｍｇ，１．５１ｍｍｏｌ，１．５ｅｑ）がアセトン（１５ｍＬ）に入った混合物をN_2雰囲気にて３０℃で３時間撹拌した。その反応混合物をろ過した。ろ過ケーク（filtercake）を収集し、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（（（（ベンジルアミ

ノ）（メチルチオ）メチレン）アミノ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（（（benzylamino）（methylthio）methylene）amino）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１６ｂ）を得た（３７０ｍｇ，収率：８７％）。それは白色の固体であった。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$＝４２３．３。

【０１３９】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（（（（ベンジルアミノ）（メチルチオ）メチレン）アミノ）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１６ｂ）（３７０ｍｇ，０．８８ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）、シアナミド（cyanamide）（１１０ｍｇ，２．６３ｍｍｏｌ，３．０ｅｑ）および１，４－ジアザビシクロ［２．２．２］オクタン（1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane）（９８ｍｇ，０．８８ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）がｔｅｒｔ－ブタノール（１０ ｍＬ）中に入った混合物をN_2雰囲気にて９０℃で一晩撹拌し、次いで１３０℃で３時間撹拌した。その反応混合物を冷却し、濃縮した。残留物をジクロロメタン（１０ｍＬ）で処理し、ろ過した。Ｐｒｅｐ－ＨＰＬＣ（H_2O：CH_3CN＝７：３）によりろ過ケークを精製して、１－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－ベンジル－２－シアノグアニジン塩酸塩（1-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-benzyl-2-cyanoguanidine hydrochloride）（１６）（５３ｍｇ，収率：１９％）を得た。それは白色の固体であった。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$＝３１７．２。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：９．０８（ｓ，１Ｈ），８．０３（ｓ，２Ｈ），７．６４－７．６２（ｍ，１Ｈ），７．５７（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），７．３２（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．２８－７．２３（ｍ，３Ｈ），７．１７（ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，２Ｈ），４．３６（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，２Ｈ）。

【０１４０】

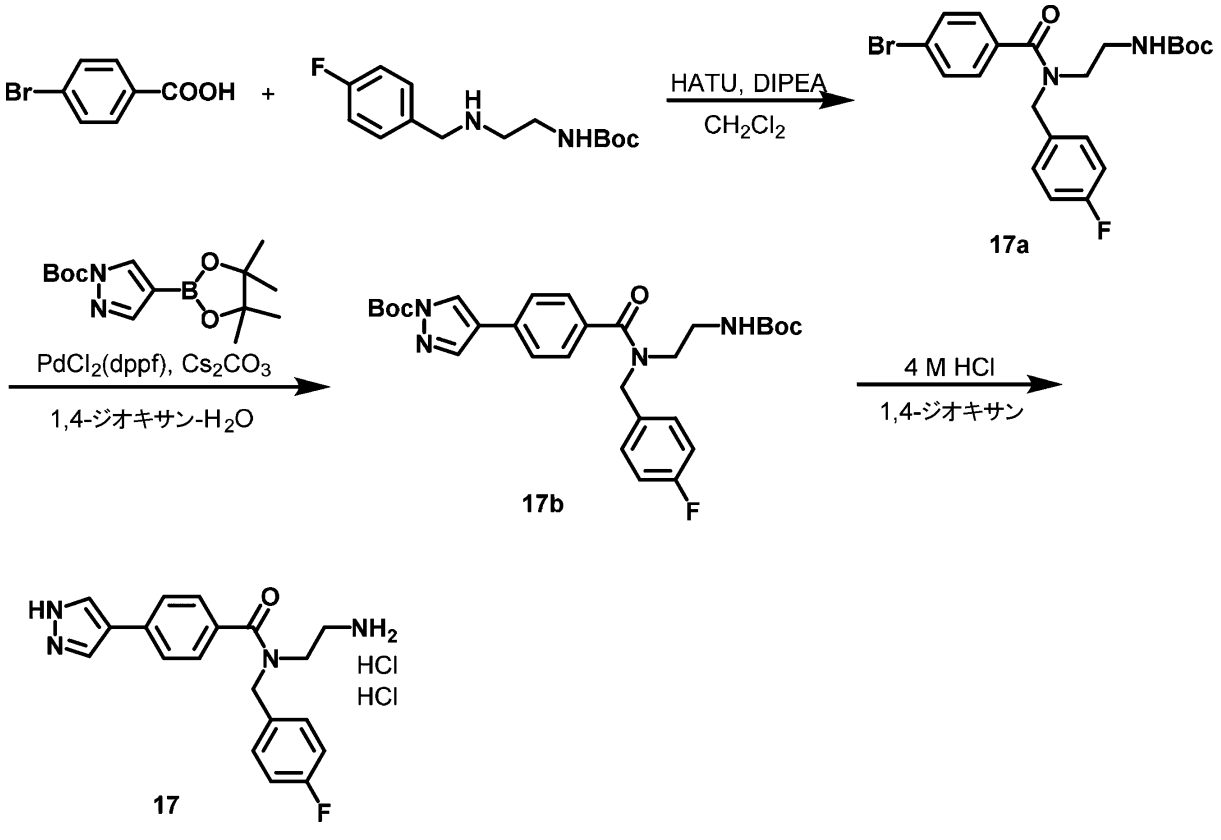
１３．化合物１７の合成

（１８）合成例１８

化合物１７の合成スキームは以下のスキーム１５に示されるとおりである。

【０１４１】

スキーム１５



【０１４２】
４－ブロモ安息香酸（4-bromobenzoic acid）（３２２ｍｇ，１．６０ｍｍｏｌ）およびｔｅｒｔ－ブチル（２－（（４－フルオロベンジル）アミノ）エチル）カルバメート（tert-butyl (2-((4-fluorobenzyl) amino) ethyl) carbamate）（４３０ｍｇ，１．６０ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2（５ｍＬ）中に入れ撹拌した溶液に、ＤＩＰＥＡ（６９８μＬ，４．０１ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（７３２ｍｇ，１．９２ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を室温で２時間撹拌した。減圧により溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーにより残留物を精製して、ｔｅｒｔ－ブチル（２－（４－ブロモ－Ｎ－（４－フルオロベンジル）ベンズアミド）エチル）カルバメート（tert-butyl (2-(4-bromo-N-(4-fluorobenzyl)benzamido)ethyl)carbamate）（１７ａ）（５３７ｍｇ，７５％）を油として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（$CDCl_3$，５００ＭＨｚ）７．５３（ｓ，１Ｈ），７．３１－７．２９（ｍ，２Ｈ），７．１０－７．０４（ｍ，４Ｈ），５．０１－４．７５（ｍ，１Ｈ），４．５３（ｓ，２Ｈ），３．５８－３．１９（ｍ，４Ｈ），１．４４（ｓ，９Ｈ）。

【０１４３】
ｔｅｒｔ－ブチル（２－（４－ブロモ－Ｎ－（４－フルオロベンジル）ベンズアミド）エチル）カルバメート（１７ａ）（５３７ｍｇ，１．１９ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４，４１，５，５－テトラメチル－１，３，２－ジオキサボロラン－２－イル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl) -1H-pyrazole-1-carboxylate）（３５０ｍｇ，１．１９ｍｍｏｌ）、$PdCl_2$（ｄｐｐｆ）（８７ｍｇ，０．１２ｍｍｏｌ）およびCs_2CO_3（７７５ｍｇ，２．３８ｍｍｏｌ）の混合物を密封試験管に入れてから、アルゴン下で混合溶媒（ジオキサン／H_2O＝１０／１，６ｍＬ）を注入し、混合物を９０℃で２時間撹拌した。室温まで冷却した後、回転蒸発により溶媒を除去し、残留物に水を加え、ＥｔＯＡｃ（１５ｍＬ×３）で抽出した。有機層を合わせたものを塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、ろ過した。ろ液を濃縮し、フラッシュクロマトグラフィー（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝２５％から６７％）を用いてシリカゲルで残留物を精製して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）エチル）（４－フルオロベンジルカルバモイル）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-((2-((tert-butoxycarbonyl) amino) ethyl) (4-fluorobenzyl) carbamoyl) phenyl) -1H-pyrazole-1-carboxylate）（１７ｂ）を白色の粉末状で得た（３８５ｍｇ，６０％）。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（$CDCl_3$，５００ＭＨｚ）８．３２（ｓ，１Ｈ），７．５９（ｓ，１Ｈ），７．５３（ｓ，１Ｈ），７．４７（ｓ，２Ｈ），７．１４－７．０４（ｍ，４Ｈ），５．０７－４．７８（ｍ，１Ｈ），４．５８（ｓ，２Ｈ），３．６０－３．３３（ｍ，４Ｈ），１．６８（ｓ，９Ｈ），１．４５（ｓ，９Ｈ）。

【０１４４】
ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（（２－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）エチル）（４－フルオロベンジルカルバモイル）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１７ｂ）（３００ｍｇ，０．５６ｍｍｏｌ）および１，４－ジオキサン（１ｍＬ）の混合物に、１，４－ジオキサン（２．７８ｍＬ）に入った４Ｍ ＨＣｌを加えた。その反応混合物を室温で１時間撹拌した。反応混合物を濃縮した。残留物をＤＣＭ（６ｍＬ）で処理し、ろ過した。ろ過ケークを収集して、Ｎ－（２－アミノエチル）－Ｎ－（４－フルオロベンジル）－４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）ベンズアミドジヒドロクロリド（N-(2-aminoethyl) -N-(4-fluorobenzyl) -4-(1H-pyrazol-4-yl) benzamide dihydrochloride）（１７，２００ｍｇ，８７％）を淡黄色の固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，D_2O）δ：７．９９（ｓ，２Ｈ），７．４０－７．３２（ｍ，４Ｈ），７．０４－６．９７（ｍ，４Ｈ），４．４１（ｓ，２Ｈ），３．６４（ｓ，２Ｈ），３．０６（ｓ，２Ｈ）。

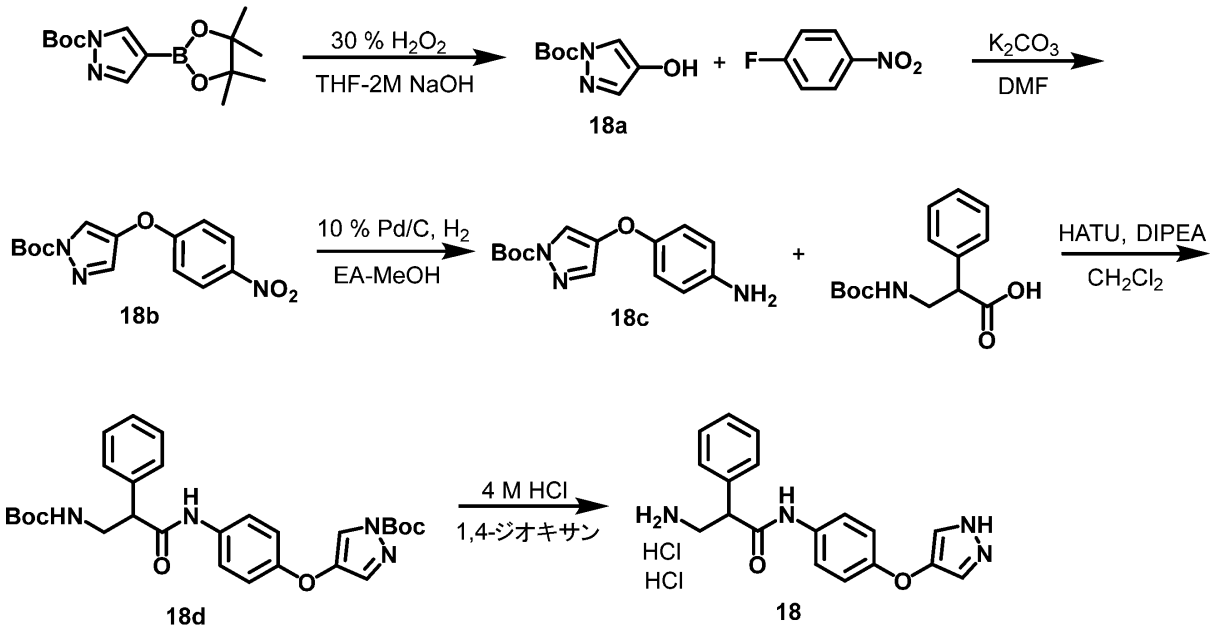
【０１４５】
１４．化合物１８の合成

（１９）合成例１９

化合物１８の合成スキームは以下のスキーム１６に示されるとおりである。

【０１４６】

スキーム１６



【０１４７】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４，４，５，５－テトラメチル－１，３，２－ジオキサボロラン－２－イル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１５４０ｍｇ，５．２４ｍｍｏｌ）をＴＨＦ（１５ｍＬ）に入れ０℃で撹拌した溶液に、２Ｍ ＮａＯＨ（ｅｑ）（５．２４ｍＬ，１０．４７ｍｍｏｌ）を加えてから、３０％過酸化水素（１．１９ｍＬ，１０．４７ｍｍｏｌ）を加え、その反応混合物を先ずは０℃で３０分撹拌してから、室温で１時間撹拌した。反応混合物を０℃まで冷却し、ＤＣＭで希釈し、ｐＨ値が２になるまで２Ｍ ＨＣｌ（ｅｑ）を加えた。有機層を収集し、乾燥させ、減圧下で溶媒を除去して、ｔｅｒｔ－ブチル４－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-hydroxy-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１８ａ）（９６５ｍｇ，１００％）を黄色の固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）δ：９．２８（ｓ，ＯＨ，１Ｈ），７．５１（ｓ，１Ｈ），７．４５（ｓ，１Ｈ），１．５２（ｓ，９Ｈ）。

【０１４８】

ｔｅｒｔ－ブチル４－ヒドロキシ－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１８ａ）（９６５ｍｇ，５．２４ｍｍｏｌ）および１－フルオロ－４－ニトロベンゼン（1-fluoro-4-nitrobenzene）（７３９ｍｇ，５．２４）をＤＭＦ（１０ｍＬ）中に入れ撹拌した溶液にＫ$_2$ＣＯ$_3$（１４４７ｍｇ，１０．４７ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を９０℃で１２時間撹拌した。減圧下で溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィー（ＥｔＯＡｃ／ヘキサン＝１０％）で残留物を精製して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－ニトロフェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-nitrophenoxy)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１８ｂ）を得た（４７９ｍｇ，３０％）。それは黄色の固体であった。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ：８．２２（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），８．０１（ｓ，１Ｈ），７．６５（ｓ，１Ｈ），７．１０（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ）。

【０１４９】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－ニトロフェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシ

レート（１８ｂ）（１４０ｍｇ，０．４６ｍｍｏｌ）の入ったＭｅＯＨ（５ｍＬ）およびＥｔＯＡｃ（５ｍＬ）の溶液に、１０％Ｐｄ／Ｃ（４９ｍｇ，０．０４６ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物をH_2雰囲気にて室温で２時間撹拌した。混合物をろ過し、回転によりろ液を蒸発させて、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アミノフェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-aminophenoxy）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１８ｃ）（１１８ｍｇ，９３％）を茶色の固体として得た。

【０１５０】

３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパン酸（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-phenylpropanoic acid）（１１４ｍｇ，０．４３ｍｍｏｌ）およびｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アミノフェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１１８ｍｇ，０．４３ｍｍｏｌ）をCH_2Cl_2（２５ｍＬ）に入れて撹拌した溶液に、ＤＩＰＥＡ（１８７μＬ，１．０７ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（１９６ｍｇ，０．５１ｍｍｏｌ）を加えた。。その反応混合物を室温で２時間撹拌した。減圧により溶媒を除去してから、残留物を分取逆相高速液体クロマトグラフィー（８０％ＡＣＮ，２０％H_2O）で精製し、次いで凍結乾燥して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）フェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-phenylpropanamido）phenoxy）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１８ｄ）（１１０ｍｇ，４９％）を白色の粉末として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ：７．７９（ｓ，１Ｈ），７．５６（ｓ，１Ｈ），７．４２（ｄ，＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），７．３９－７．２９（ｍ，５Ｈ），６．９８（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），５．１５（ｂｒｓ，１Ｈ），３．８９（ｔ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），３．７０－３．５８（ｍ，１Ｈ），３．５６－３．５４（ｍ，１Ｈ），１．６４（ｓ，９Ｈ），１．５１（ｓ，９Ｈ）。

【０１５１】

ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）フェノキシ）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１８ｄ）（１１０ｍｇ，０．２１ｍｍｏｌ）および１，４－ジオキサン（１ｍＬ）の混合物に、１，４－ジオキサン（１．０５ｍＬ）に入った４Ｍ ＨＣｌを加えた。その反応混合物を室温で１時間撹拌した。反応混合物を濃縮した。残留物をＤＣＭ（５ｍＬ）で処理し、ろ過した。ろ過ケークを収集して、Ｎ－（４－（（（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）オキシ）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドジヒドロクロリド（N-（4-（（1H-pyrazol-4-yl）oxy）phenyl）-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride）（１８）（８２ｍｇ，２２％）を白色の固体として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，CD_3OD）δ：７．８４（ｓ，２Ｈ），７．５４（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５３－７．４０（ｍ，４Ｈ），７．３７－７．３４（ｍ，１Ｈ），７．０２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），４．１３－４．１０（ｍ，１Ｈ），３．６２－３．５７（ｍ，１Ｈ），３．２４（ｄｄ，Ｊ＝５．５，１２．５Ｈｚ，１Ｈ）。

【０１５２】

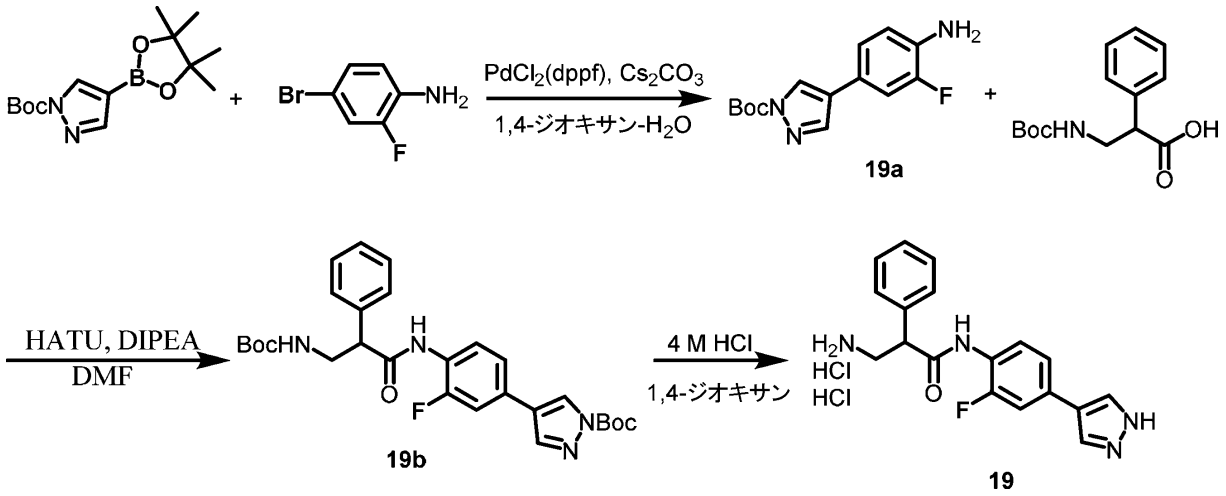
１５．化合物１９の合成

（２０）合成例２０

化合物１９の合成スキームは以下のスキーム１７に示されるとおりである。

【０１５３】

スキーム１７



【０１５４】

密封管に入った４－ブロモ－２－フルオロアニリン（4-bromo-2-fluoroaniline）（１２１１ｍｇ，６．３７ｍｍｏｌ）、１－Ｂｏｃ－４－ピラゾールボロン酸ピナコールエステル（1-Boc-4-pyrazoleboronic acid pinacol ester）（１８７５ｍｇ，６．３７ｍｍｏｌ）、$PdCl_2$（ｄｐｐｆ）（４６７ｍｇ，０．６４ｍｍｏｌ）およびCs_2CO_3（４１５３ｍｇ，１２．７５ｍｍｏｌ）の混合物に、アルゴン下で混合溶媒（ジオキサン／H_2O＝９／１，３６ｍＬ）を注入し、次いで混合物を８０℃で２時間撹拌した。室温まで冷却した後、回転蒸発により溶媒を除去し、残留物に水を加え、ＥｔＯＡｃ（３０ｍＬ×３）で抽出を行った。有機層を合わせたものを塩水で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、ろ過した。ろ液を濃縮し、残留物をフラッシュクロマトグラフィー（ＥｔＯＡｃ／Ｈｅｘ＝１５％から１７％）を用いてシリカゲルで精製し、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アミノ－３－フルオロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-amino-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１９ａ）（１３６２ｍｇ，７７％）を油として得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ：８．１７（ｓ，１Ｈ），７．８９（ｓ，１Ｈ），７．１５（ｄｄ，Ｊ＝２．０，１２．０Ｈｚ，１Ｈ），７．１１（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），６．８０（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ）。

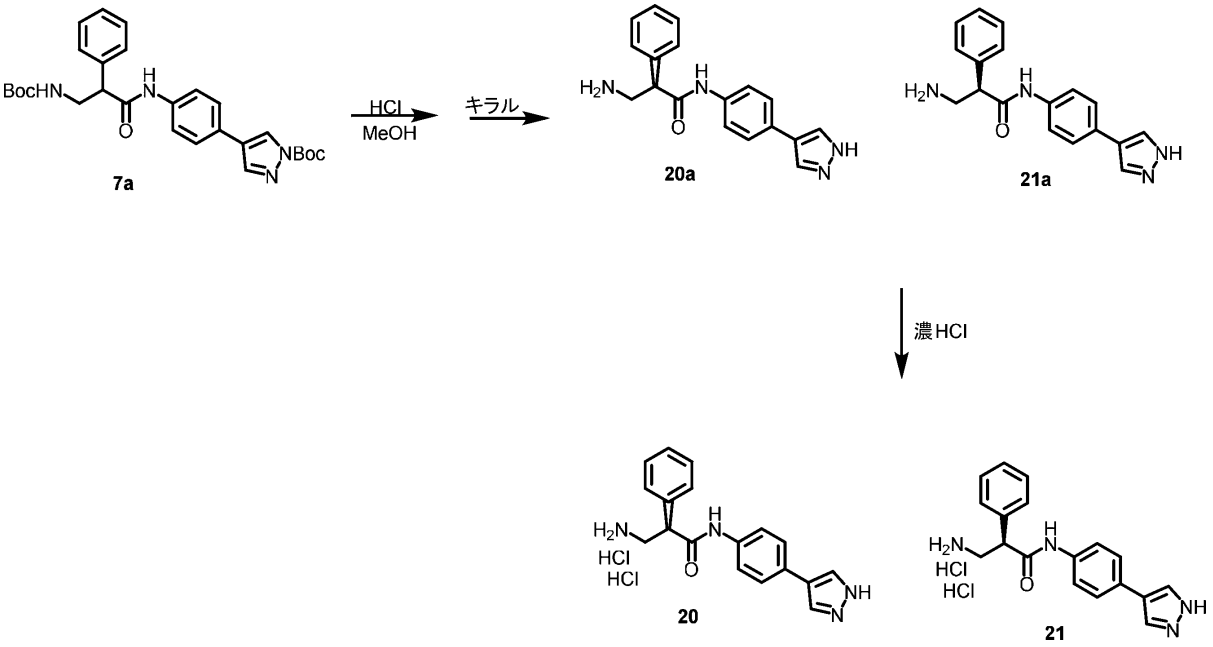
【０１５５】

３－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパン酸（3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanoic acid）（３４６ｍｇ，１．３１ｍｍｏｌ）およびｔｅｒｔ－ブチル４－（４－アミノ－３－フルオロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１９ａ）（３６２ｍｇ，１．３１ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（２ｍＬ）中に入れて撹拌した溶液に、ＤＩＰＥＡ（５６９μＬ，３．２６ｍｍｏｌ）およびＨＡＴＵ（５９６ｍｇ，１．５７ｍｍｏｌ）を加えた。その反応混合物を室温で２時間撹拌した。減圧により溶媒を除去してから、残留物を分取逆相高速液体クロマトグラフィー（８０％ＡＣＮ，２０％H_2O）で精製し、次いで凍結乾燥して、ｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）－３－フルオロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-phenylpropanamido)-3-fluorophenyl)-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１９ｂ）（３２１ｍｇ，４７％）を白色の粉末状で得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ：８．３２（ｔ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），８．２５（ｓ，１Ｈ），７．９２（ｓ，１Ｈ），７．４２－７．３３（ｍ，５Ｈ），７．２９－７．２６（ｍ，１Ｈ），７．１９（ｄ，Ｊ＝１１．５Ｈｚ，１Ｈ），５．１２（ｂｒｓ，１Ｈ），３．９６（ｓ，１Ｈ），３．７１－３．６８（ｍ，１Ｈ），３．６０－３．５８（ｍ，１Ｈ），１．６７（ｓ，９Ｈ），１．４３（ｓ，９Ｈ）。

【０１５６】
１，４－ジオキサン（１ｍＬ）に溶かしたｔｅｒｔ－ブチル４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）－３－フルオロフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（１９ｂ）（３１５ｍｇ，０．６０ｍｍｏｌ）に、１，４－ジオキサン（４．０ｍＬ）に入った４Ｍ ＨＣｌを加えた。その反応混合物を室温で３０分超音波処理した。ろ過により白色の粉末を収集し、ＤＣＭで洗浄し、乾燥させて、３－アミノ－Ｎ－（２－フルオロ－４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－２－フェニルプロパンアミドジヒドロクロリド（3-amino-N-（2-fluoro-4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-2-phenylpropanamide dihydrochloride）（１９）（２３０ｍｇ，９６％）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，D_2O）δ：８．０５（ｓ，２Ｈ），７．４２－７．３８（ｍ，６Ｈ），７．２８（ｔ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，２Ｈ），４．１８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），３．５８（ｄｄ，Ｊ＝７．０，１３．０Ｈｚ，１Ｈ），３．３９（ｄｄ，Ｊ＝７．０，１３．０Ｈｚ，１Ｈ）。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：［Ｍ－２ＨＣｌ＋Ｈ］$^{+}$＝３２６．１，［Ｍ－２ＨＣｌ＋Ｎａ］$^{+}$＝３４８．１。

【０１５７】
１６．化合物２０および化合物２１の合成
（２１）合成例２１
化合物２０および化合物２１の合成スキームは以下のスキーム１８に示されるとおりである。

【０１５８】
スキーム１８



【０１５９】
４－（４－（３－（（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－２－フェニルプロパンアミド）フェニル）－１Ｈ－ピラゾール－１－カルボキシレート（tert-butyl 4-（4-（3-（（tert-butoxycarbonyl）amino）-2-phenylpropanamido）phenyl）-1H-pyrazole-1-carboxylate）（１５ｇ，２９．６ｍｍｏｌ，１．０ｅｑ）の入ったＭｅＯＨ（１５０ｍＬ）の溶液にＨＣｌ／ＭｅＯＨ（１５０ｍＬ）を加えた。その混合物を室温で一晩撹拌した。混合物を濃縮し、残留物をH_2O（５０ｍＬ）中に溶かし、$NaHCO_3$水溶液でｐＨ値を９に調整した。混合物をろ過し、ろ過ケークを真空乾燥して、Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミド（N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-phenylpropanamide）（１０ｇ

，１００％）を白色の固体として得た。キラル分割（chiral resolution）により固体を精製して、（Ｓ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミド（２０ａ）および（Ｒ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミド（２１ａ）を得た。

【０１６０】

分離条件:

カラム：ChiralPak AD-H Daicel chemical Industries, Ltd, ２５０＊３０ｍｍ Ｉ．Ｄ．，１０μｍ

移動相Ａ：Supercritical CO_2、移動相Ｂ：ＭｅＯＨ（０．１％NH_3H_2O）

Ａ：Ｂ＝６０：４０、５０ｍＬ／分

カラム温度：３８℃

ノズル圧力：１００Ｂａｒ；ノズル温度：６０℃；蒸発温度：２０℃；微調整温度（TrimmerTemp）：２５℃；波長：２２０ｎｍ

【０１６１】

H_2O溶液（１０ｍＬ）に入った（Ｓ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドに濃ＨＣｌ（２ｍＬ）を加え、濃縮して（Ｓ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドジヒドロクロリド（（S）-N-（4-（1H-pyrazol-4-yl）phenyl）-3-amino-2-phenylpropanamide dihydrochloride）（２０）（２．１ｇ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：１０．５５（ｓ，１Ｈ），８．２０（ｓ，３Ｈ），８．１３（ｓ，２Ｈ），７．６５－７．２９（ｍ，９Ｈ），４．２２－４．１９（ｍ，１Ｈ），３．５１（ｓ，１Ｈ），３．０４－３．０１（ｍ，１Ｈ）。ＬＣＭＳ：［Ｍ＋Ｈ］$^+$＝３０７．１。

【０１６２】

H_2O溶液（１０ｍＬ）に入った（Ｒ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドに濃ＨＣｌ（２ｍＬ）を加え、濃縮して（Ｒ）－Ｎ－（４－（１Ｈ－ピラゾール－４－イル）フェニル）－３－アミノ－２－フェニルプロパンアミドジヒドロクロリド（２１）（２．１ｇ）を得た。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：１０．５０（ｓ，１Ｈ），８．１６（ｓ，３Ｈ），８．１１（ｓ，２Ｈ），７．６４－７．２９（ｍ，９Ｈ），４．２０－４．１６（ｍ，１Ｈ），３．５３－３．４８（ｍ，１Ｈ），３．０６－３．００（ｍ，１Ｈ）。ＬＣＭＳ：［Ｍ＋Ｈ］$^+$＝３０７．１。

【０１６３】

実施例２

生体外効果テスト

Ａ．Ｒｈｏ関連タンパク質キナーゼ（Rho-associated protein kinase, ＲＯＣＫ）に対する抑制効果テスト

上において合成された各化合物のＲＯＣＫに対する抑制効果をテストした。

【０１６４】

Ａ－１．方法

１．ＤＭＳＯで１０ｍＭのテスト化合物を１ｍＭに希釈してから、さらに３００ｎＭに希釈した。Ｎｅｔａｒｓｕｄｉｌ（ＡＲ－１３３２４）は市販の眼圧下降薬であり、ＡＲ－１３５０３はＡＲ－１３３２４の活性代謝物である。

【０１６５】

２．上述した３００ｎＭのテスト化合物を段階希釈し、濃度１００ｎＭ、３３ｎＭ、１１ｎＭ、３．７ｎＭ、１．２ｎＭおよび０．４ｎＭのテスト化合物をそれぞれ得た。

【０１６６】

３．上述の段階希釈したテスト化合物１μＬを、４９μＬの調整ＲＯＣＫ反応緩衝溶液（Modified ROCK reaction buffer）（０．１Ｍ ＫＣｌ、０．０１Ｍ $MgCl_2$、０．１ｍＭ ＥＧＴＡおよび２．２５μｇ／ｍＬ ＲＯＣＫ１を含む０．０５Ｍ Ｔｒｉｚｍ

ａ（登録商標）ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ７．５））に加えて実験群サンプルを得た。ＤＭＳＯを１μＬ取り、４９μＬの調整ＲＯＣＫ反応緩衝溶液に加えて、陽性対照群サンプルを得た（最大値＝１００％）。ＤＭＳＯを１μＬ取り、４９μＬの緩衝溶液（０．１Ｍ ＫＣｌ、０．０１Ｍ $MgCl_2$および０．１ｍＭ ＥＧＴＡを含む０．０５Ｍ Ｔｒｉｚｍａ（登録商標） ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ７．５））に加えて、ビヒクル対照群サンプルを得た（最小値＝０％）。

【０１６７】

４．上述にて作製したサンプル２０μＬを平底の９６ウェルプレートに加え、かつ各ウェル中にＲＯＣＫ ＡＴＰ緩衝溶液２０μＬを加えた。

【０１６８】

５．上記９６ウェルプレートをオービタルシェーカー上に置き、室温で９０分反応させた。

【０１６９】

６．次いで、４０μＬのＫｉｎａｓｅ－Ｇｌｏ ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ ｋｉｎａｓｅ ａｓｓａｙ ｓｏｌｕｔｉｏｎ （Promega, RV6712）を、上述した９６ウェルプレートに加え、９６ウェルプレートをオービタルシェーカー上に置いて室温で１０分反応させた。

【０１７０】

７．ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５ ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ ｒｅａｄｅｒで９６ウェルプレートの各ウェルの冷光値を測定し、以下の式でＲＯＣＫ抑制率（％）を算出した。

最大値＝テスト化合物の非存在下、上記方法により測定された値（酵素と基質とが完全に反応した状況下で測定された値を最大値とする）

最小値＝酵素の非存在下、上記方法により測定された値（酵素と基質との反応なしに測定された値を最小値とする）

抑制率（％）＝（実験群（テスト化合物を加えた群で測定された値）－最小値）/（最大値－最小値）＊１００％

【０１７１】

Ａ－２．結果

結果は表２に示されるとおりである。

【０１７２】

（表２）

化合物	ROCK1 IC_{50}(nM)
AR-13324	+++++
AR-13503（AR-13324の活性代謝物）	++++++
化合物1	+++
化合物2	++++
化合物3	+++
化合物4	+++++
化合物5	+++++
化合物6	++++
化合物7	+++++
化合物8	+++++
化合物9	+++++
化合物10	+++
化合物11	+++++
化合物12	++++
化合物13	++++++
化合物14	+++++
化合物15	+++
化合物16	+
化合物17	+++
化合物18	+

化合物19	++++
化合物20	+++++
化合物21	+++

注：＋＋＋＋＋＋はＩＣ$_{50}$＜１ｎＭを表し；＋＋＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１－１０ｎＭを表し；＋＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１０～１００ｎＭを表し；＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１００－１０００ｎ

Ｍを表し；＋＋はＩＣ$_{50}$＞１０００ｎＭを表し；＋はＩＣ$_{50}$＞１００００ｎＭを表す。
【０１７３】
Ｂ．ミオシン軽鎖キナーゼ－４（myosin light chain kinase 4，ＭＹＬＫ－４）に対する抑制効果テスト
実験の流れはThermoFisher Scientificにより提示されているLanthaScreen Eu Kinase Binding Assay Screening Protocol and Assay Conditionsを参考にした。
【０１７４】
Ｂ－１．材料の作製
１００％ＤＭＳＯ中で調製したテスト化合物保存溶液（１ｍＭ）に対し３倍段階希釈を１０回行って、そのＭＹＬＫ－４に対するＩＣ$_{50}$の測定に備えた。
【０１７５】
キナーゼ／抗体混合物（Kinase/Antibody Mixture）を予めキナーゼ緩衝液（Kinase Buffer）で２×作用濃度に希釈しておいた。
【０１７６】
Ｂ－２．分析方法
１．白色３８４マイクロウェルフラットプレート（Greiner, Cat. No. 784207）にキナーゼ緩衝液３．８４μＬを加えてから、上述したキナーゼ／抗体混合物８．０μＬを加え、次いで、トレーサー剤（AlexaFluor labeled Tracer）４．０μＬを加えた後、上述の希釈した適度な濃度のテスト化合物１６０ｎＬを加え、培養プレートを３０秒振とうさせた。
【０１７７】
２．次いで、培養プレートを室温に静置し６０分培養してから、蛍光プレートリーダー（fluorescence plate reader）で読み取ってデータを分析した。下式で各ウェルの反応液の発光比を算出した。
発光比（emission eatio，ＥＲ）＝ＡＦ６４７発光（６６５ｎｍ）／ユーロピウム発光（europium emission）（６１５ｎｍ）
【０１７８】
また、上記分析において、ＬａｎｔｈａＳｃｒｅｅｎ　Ｅｕキナーゼの結合分析の対照群も同時に準備した：抑制０％対照群（0% displacement control）―反応中に既知の阻害剤を含まず、最大発光比（maximum emission ratio）となる；抑制１００％対照群（100% displacement control）―最高濃度の既知の阻害剤を含み、最小発光比（minimum emission ratio）となる；ここで既知の阻害剤はＳｕｎｉｔｉｎｉｂである。
【０１７９】
ＬａｎｔｈａＳｃｒｅｅｎ　Ｅｕ　Ｋｉｎａｓｅの結合分析の反応成分は表３に示されるとおりである。既知の阻害剤ＳｕｎｉｔｉｎｉｂのＩＣ$_{50}$は１９．０ｎＭであり、所期のＩＣ$_{50}$の範囲を満たしている。
【０１８０】
（表３）ＬａｎｔｈａＳｃｒｅｅｎ　Ｅｕキナーゼの結合分析の反応成分

反応成分	濃度(nM)/IC_{50} (nM)
キナーゼ(MYLK4)	5
抗体(Eu-anti-GST)	2
トレーサー(Tracer 222)	100 (Kdは173 nM)
緩衝溶液A (HEPES、BRIJ-35、$MgCl_2$およびEGTAを含む)	50 mM HEPES (pH 7.5)、0.01% BRIJ-35、10 mM $MgCl_2$および1 mM EGTA

【０１８１】
３．テスト化合物の異なる濃度におけるＭＹＬＫ－４に対する抑制率は下式により求めることができる：
抑制％＝［（ＥＲ抑制０％対照群－ＥＲサンプル）／（ＥＲ抑制０％対照群－ＥＲ抑制１００％対照群）］＊１００
【０１８２】
４．上において得られたテストの異なる濃度におけるＭＹＬＫ－４に対する抑制率に基づいて、テスト化合物のＭＹＬＫ－４におけるIC_{50}を算出した。
【０１８３】
Ｂ－３．結果
結果は表４に示されるとおりである。
【０１８４】
（表４）テスト化合物のＭＹＬＫ－４　IC_{50}

化合物	MYLK4 IC_{50}(nM)
AR-13324	++
AR-13503	+++
化合物1	+++
化合物2	+++
化合物5	+++
化合物6	+++
化合物7	++++
化合物8	++++
化合物10	++
化合物11	+++
化合物12	+++
化合物13	+++
化合物14	+++
化合物15	+++
化合物16	+
化合物17	+
化合物19	+++
化合物20	++++
化合物21	+++

注：＋＋＋＋＋＋はIC_{50}＜１ｎＭを表し；＋＋＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１－１０ｎＭを表し；＋＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１０－１００ｎＭを表し；＋＋＋はＩＣ$_{50}$＝１００－１０００ｎＭを表し；＋＋はＩＣ$_{50}$＞１０００ｎＭを表し；＋はＩＣ$_{50}$＞１００００ｎＭを表す。

【０１８５】

Ｃ．ＹＳＫ－４に対する抑制効果テスト

実験の流れはThermoFisher Scientificにより提示されているZ’-LYTE Screening Protocol and Assay Conditionsを参考にした。

【０１８６】

Ｃ－１．材料の作製

１００％ＤＭＳＯ中で調製したテスト化合物保存溶液（１ｍＭ）に対し、３倍段階希釈を１０回行って、テスト化合物のＹＳＫ－４に対するＩＣ$_{50}$の測定に供した。

【０１８７】

ペプチド／キナーゼ混合物（Peptide/Kinase Mixture）を予めキナーゼ緩衝液（Kinase Buffer）で２×作用濃度に希釈しておいた。

【０１８８】

ＡＴＰ溶液を予めキナーゼ緩衝液（５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５，０．０１％ＢＲＩＪ－３５，１０ｍＭ $MgCl_2$，１ｍＭ ＥＧＴＡ）で４×作用濃度に希釈しておいた。

【０１８９】

現像剤溶液（development reagent solution）は新規ＰＫＣ脂質混合物（Novel PKC Lipid Mix）であり、それは２ｍｇ／ｍＬ Ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌ Ｓｅｒｉｎｅ、０．２ｍｇ／ｍＬ ＤＡＧの入った２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、 ｐＨ ７．４、および０．３％ＣＨＡＰＳを含有している。予め現像緩衝液で１０倍に希釈しておいた。

【０１９０】

Ｃ－２．分析方法

１．黒色３８４ウェルプレート（Corning, Cat. No. 4514）に、上述の希釈した適度な濃度のテスト化合物１００ｎＬ、キナーゼ緩衝液２．４μＬを加えてから、上述のペプチド／キナーゼ混合物５μＬを加え、次いでＡＴＰ溶液２．５μＬを加えて、培養プレートを３０秒振とうさせた。

【０１９１】

２．次いで、培養プレートを室温に静置し６０分培養した。

【０１９２】

３．次いで、現像剤溶液５μＬを加え、暗所で培養プレートを３０秒振とうさせた後、蛍光プレートリーダー（fluorescence plate reader）で読み取ってデータを分析した。

【０１９３】

また、キナーゼに対して以下の対照群を作製し、それとキナーゼを同一の培養プレートに置いた。

【０１９４】

（１）０％リン酸化対照群（１００％抑制対照群）

最大発光比を０％リン酸化対照群（１００％抑制対照群）により確立した。それはＡＴＰを含まないため、キナーゼ活性を示さない。当該対照群は現像反応において１００％開裂したペプチドを生成した。

【０１９５】

（２）１００％リン酸化対照群

ペプチド基質の配列と同じ合成リン酸化ペプチドを１００％リン酸化対照群とした。この対照群は、現像反応において非常に低い割合の開裂したペプチドを生成した。

【０１９６】

０％リン酸化対照群と１００％リン酸化対照群に基づいて、特定の反応ウェル（実験群）で達したリン酸化の割合（％）を算出した。

【０１９７】

Ｚ’－ＬＹＴＥ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ Ｋｉｎａｓｅの結合分析反応に使用したＺ’－ＬＹＴＥ基質のタイプはＳｅｒ／Ｔｈｒ ０７ペプチドであり、ＡＴＰ反応濃度は５μＭ（ＹＳＫ４のＫｍ）とした。本分析において対照として用いた既知の阻害剤はスタウロスポリンである。系におけるＩＣ$_{50}$は１２．７ｎＭであり、所期のＩＣ$_{50}$範囲を満たしていた。各ウェルで測定された数値に基づき、下式によりテスト化合物の異なる濃度におけるＹＳＫ－４に対する抑制率を算出すると共に、これに基づいてテスト化合物のＹＳＫ－４におけるＩＣ$_{50}$を算出した。

【０１９８】

背景蛍光に対する補正＝蛍光強度$_{サンプル}$－蛍光強度$_{ＴＣＦＩコントロール群}$

【０１９９】

発光比＝クマリン（Coumarin）発光（４４５ｎｍ）／フルオレセイン発光（５２０ｎｍ）（背景蛍光に対する補正値を使用）
％リン酸化＝１－（発光比×Ｆ$_{１００％}$－Ｃ$_{１００％}$）／｛（Ｃ$_{０％}$－Ｃ$_{１００％}$）＋［発光比×（Ｆ$_{１００％}$－Ｆ$_{０％}$）］｝＊１００
％抑制＝（１－％リン酸化$_{サンプル}$／％リン酸化$_{０％抑制対照群}$）＊１００
Ｃ１００％：１００％リン酸化対照群の平均クマリン発光シグナル
Ｃ０％：０％リン酸化対照群の平均クマリン発光シグナル
Ｆ１００％：１００％リン酸化対照群の平均フルオレセイン発光シグナル
Ｆ０％：０％リン酸化対照群の平均フルオレセイン発光シグナル
ＤＲＩ：現像反応干渉（Development Reaction Interference）
ＴＣＦＩ：テスト化合物の蛍光干渉（Test Compound Fluorescence Interference）

【０２００】

Ｃ－３．結果

結果は表５に示されるとおりである。

【０２０１】

（表５）テスト化合物のＹＳＫ４　ＩＣ$_{５０}$

化合物	YSK4 IC_{50}（nM）
AR-13324	n.a.
AR-13503	n.a.
化合物1	+
化合物2	+
化合物5	+
化合物6	+
化合物7	++
化合物8	++
化合物10	+
化合物11	++
化合物12	++
化合物13	++
化合物14	++
化合物15	+
化合物16	+
化合物17	+
化合物19	++

注：＋＋＋＋＋＋はIC_{50}＜１ｎＭを表し；＋＋＋＋＋はIC_{50}＝１－１０ｎＭを表し；＋＋＋＋はIC_{50}＝１０－１００ｎＭを表し；＋＋＋はIC_{50}＝１００－１０００ｎＭを表し；＋＋はIC_{50}＞１０００ｎＭを表し；＋はIC_{50}＞１００００ｎＭを表す。

【０２０２】

前述の結果をまとめるとわかるように、本開示の上述の合成された化合物はＲＯＣＫ、ＭＹＬＫ－４およびＹＳＫ４のいずれに対しても抑制効果を備えており、かつ相乗的なターゲット抑制効果を備え、特に化合物７および化合物２０において顕著であった。

【０２０３】

また、現在すでに、抑制されたＲＯＣＫの発現により、視神経の保護（例えば、Rothschild et al., ROCK-1 mediates diabetesinduced retinal pigment epithelial and endothelial cell blebbing: Contribution to diabetic retinopathy. Scientific Reports. （2017） 7: 8834.およびTanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. （2018） 125

:1741-1756.参照）、ならびに高眼圧（例えば、Tanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. （2018） 125:1741-1756参照）、緑内障（例えば、Tanna et al., Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. Ophthalmology. （2018） 125:1741-1756参照）、網膜血管閉塞症（例えば、Yi et al., Protective Effects of Intravitreal Injection of the Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 in a Rodent Model of Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy （rAION）. J Ophthalmol. （2020） 2020: 1485425.およびNourinia R et al., ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. Br J Ophthalmol 2018;102:1-5.参照）、黄斑変性（例えば、Sadiq et al., Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr （2020） 6:29.参照）、黄斑浮腫（例えば、Sadiq et al., Pharmacological agents in development for diabetic macular edema Int J Retin Vitr （2020） 6:29.参照）、糖尿病網膜症（例えば、Nourinia R et al., ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. Br J Ophthalmol 2018;102:1-5参照）、角膜内皮細胞損傷（Fuchs endothelial corneal dystrophy, FECD）（例えば、Okumura et al., The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing Invest Ophthalmol Vis Sci. （2013） 54:2439-2502.参照）、角膜繊維症（例えば、Sloniecka et al., Substance P induces fibrotic changes through activation of the RhoA/ROCK pathway in an in vitro human corneal fibrosis model. J Mol Med （Berl）. 2019; 97（10）: 1477-1489参照）の軽減または治療等の効果が達成され得ることがわかっているため、ＲＯＣＫを抑制する効果を備える本開示の上述の合成された化合物は、眼科関連の応用、例えば視神経の保護、ならびに／または高眼圧、緑内障、網膜血管閉塞症、黄斑変性、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、角膜内皮細胞損傷および／もしくは角膜繊維症の予防ならびに／または治療等にも適用可能である。

【０２０４】

また、現在すでに、抑制されたＲＯＣＫの発現により、肺高血圧症（例えば、Zhang et al., Effects of Fasudil on Patients with Pulmonary Hypertension Associated with Left Ventricular Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Prospective Intervention Study. Can Respir J. （2018） 2018: 314825参照）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）（例えば、Liu et al., Influence of Rho kinase inhibitor Fasudil on late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients with pulmonary artery hypertension. Bosn J Basic Med Sci. （2014） 14（1）: 40-4参照）、特発性肺線維症（例えば、Knipe et al., The Rho Kinase Isoforms ROCK1 and ROCK2 Each Contribute to the Development of Experimental Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. （2018） 58（4）: 471-481.参照）、肺気腫（例えば、Bewley et al., Differential Effects of p38, MAPK, PI3K or Rho Kinase Inhibitors on Bacterial Phagocytosis and Efferocytosis by Macrophages in COPD. PLoS One. （2016） 11（9）: e0163139.参照）、肺がん（例えば、Vigil et al., ROCK1 and ROCK2 are Required for Non-Small Cell Lung Cancer Anchorage-Independent Growth and Invasion. Cancer Res. （2012） 15: 72（20）.参照）の軽減または治療等の効果が達成され得ることもわかっているため、ＲＯＣＫを抑制する効果を備える本開示の上述の合成された化合物は、肺に関連する疾病または症状、例えば肺高血圧症、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、肺気腫および／もしくは肺がんの予防ならびに／または治療等に適用可能である。

【０２０５】

実施例３

正常なウサギの眼圧下降モデルにおける最大効果（maximal effect, Ｅｍａｘ）投与量の評価

Ａ．化合物２０

１．方法
動物：オスのニュージーランド白ウサギ（ｎ＝７／各群）；
テスト化合物の処方：０．０１％化合物２０；０．０３％化合物２０；０．１％化合物２０；
投薬：各実験動物の右眼（投与眼）にテスト化合物５０μＬを滴下し、左眼（対照眼）にビヒクル（vehicle）（テスト化合物を含まない）５０μＬを滴下した。上述した３種の処方を毎日１回、連続３日投与した。
【０２０６】
１日目および３日目の投与前（０時間目）および投与２、４、６および８時間後にＴｏｎｏ－Ｖｅｔ（iCare）で各動物の眼圧を測定した。
【０２０７】
２．結果
結果は図１Ａおよび図１Ｂ、ならびに表６および表７に示されとおりである。
【０２０８】
（表６）投与１日目の眼圧測定結果

化合物20の濃度	眼圧下降度（ΔIOP）（mmHg）	最大眼圧下降度	T_{max}（時間）
0.10%	−5.3±0.6	32.2%	8
0.03%	−4.3±1.2	28.3%	8
0.01%	−2.9±1.1	18.7%	6

最大眼圧下降度％＝（対照眼の眼圧－投薬眼の眼圧）／対照眼の眼圧＊１００
【０２０９】
（表７）投与３日目の眼圧測定結果

化合物20の濃度	眼圧下降度（ΔIOP）（mmHg）	最大眼圧下降度	Tmax（時間）
0.10%	−5.2±1.3	32.6%	6
0.03%	−5.1±1.2	30.5%	8
0.01%	−2.7±0.8	15.4%	6

最大眼圧下降度％＝（対照眼の眼圧－投薬眼の眼圧）／対照眼の眼圧＊１００
【０２１０】
図１Ａおよび表６は投与１日目の眼圧測定結果を示している。図１Ｂおよび表７は投与３日目の眼圧測定結果を示している。
【０２１１】
結果より、化合物２０は眼圧下降効果の面で用量依存作用（dose dependent effect）

を示し、０．０３％化合物２０を投与した群と０．１％化合物２０を投与した群との眼圧下降度および傾向が近いことがわかった。

【０２１２】

また、３日連続で０．０３％化合物２０を投与した群では、薬効の蓄積の現象がわずかにあった（３日目は１日目の眼圧下降度に比べて平均およそ１ｍｍＨｇ増加した）（表６および表７参照）が、０．０３％化合物２０を投与した群の眼圧下降度と０．１％化合物２０を投与した群の眼圧下降度とは近いものであった（表７参照）。この結果に示されるように、化合物２０は濃度０．０３％ですでにこのモデルの眼圧テストの限界に近付くはずであるため、それが示す薬効（Ｅｍａｘ）の蓄積の差は大したものではない。

【０２１３】

本実験で示されたデータは、すでに不合格のデータを除き（１日目の両眼の眼圧差≧２ｍｍＨｇ（ｎ＝１）および３日目投薬前の両眼の眼圧差＞５ｍｍＨｇであるウサギ（ｎ＝１）は除いている）、かつ反跳的な高眼圧のデータ（ｎ＝３）を除いたものである。各群のｎ値≧３であり；０．０１％化合物２０を投与した群のｎ値は６であった。

【０２１４】

上述した結果からわかるように、濃度０．０３％がすでに、化合物２０の正常眼圧ウサギモデルにおける最大効果（maximal effect, Emax）投与量であると思われる。

【０２１５】

Ｂ．化合物４、５、７、８、１１、１２および１４

化合物２０に対するのと類似の方法で、化合物４、５、７、８、１１、１２および１４の正常眼圧ウサギモデルにおける最大効果投与量を確認した。

【０２１６】

結果より、化合物４、５、７および８の最大効果投与量はいずれも１％であり、化合物１１、１２および１４の最大効果投与量はそれぞれ０．５％、０．２５％および０．５％であることがわかった。

【０２１７】

実施例４

正常眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降効果の評価

Ａ．化合物２０

１．材料および方法

実験動物：ニュージーランド白ウサギ、オス、体重約２キロ。ニュージーランド白ウサギは恵鈞養殖場から購入した。１週間の検疫期間の後、温度１６～２２℃および相対湿度３０～７０％（Relative Humidity,RH）、昼８時間／夜１６時間の環境条件で、瑞徳生物科技社にて飼育した。

【０２１８】

実験方法：

（１）眼圧下降効果の評価

１２匹のニュージーランド白ウサギ（２．０～４．０ｋｇ）の体重を量り、グループ分けした後（各グループｎ＝３～６）、ウサギを布で包んで固定した。ウサギが落ち着いたら、その右眼の下瞼を下に引き、テストサンプル５０μＬ（０．１％または０．０３％化合物２０を含む点眼薬）をウサギの右眼結膜嚢内に滴下し、瞼を閉じ、少なくとも２分ウサギを安定状態に保って、頭を振り点眼薬が眼から流れ出してしまわないようにし；左眼にはビヒクル（テスト化合物を含まない）を投与して対照群とした。０．０２％ＡＲ－１３３２４をベンチマーク（benchmark）とし、テスト化合物の薬効の競合性を評価した。眼圧検出の時点は投薬前（０時間）および投薬後１、２、４、６および８時間の時点とした。

【０２１９】

（２）刺激性の評価

眼圧の測定が完了したら、ウサギの眼の外観の写真を撮影し、経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development, ＯＥＣＤ）の定める眼刺激

性試験ガイドライン（ＯＥＣＤ／ＯＣＤＥ　４０５）に従って、テスト物質がウサギの眼の角膜、虹彩または結膜に対して引き起こす刺激状態（adverse event）を評価した。

【０２２０】

ＯＥＣＤ／ＯＣＤＥ　４０５の角膜、虹彩または結膜に対する採点方式は表８に示されるとおりである。

【０２２１】

（表８）眼の刺激のグレード

不透明度	密度の程度（Degree of density） （最も濃い部分から読み取る）＊
潰瘍または混濁なし	0
散在性またはびまん性の不透明部分 （正常な光沢の軽度な曇りを除く）； 虹彩細部は明瞭；	1
半透明で容易に識別可能な；虹彩細部 はやや不明瞭	2
真珠様光沢部位（角膜が真珠のような 光沢を呈する）；虹彩細部は不明；瞳 孔の大きさはほぼ識別不可	3
角膜不透明；不透明のため虹彩の識別 不可	4

可能性としての最大値：４

*角膜混濁のエリアに注意

【０２２２】

（３）角膜の観察

０．１％化合物２０の点眼薬をテストサンプルとし、実験方法は上の「（１）眼圧下降効果の評価」で記載した実験方法と同じとした。７日連続で投薬（１日１回）した後、細隙灯で角膜の状態を観察した。

【０２２３】

（４）投薬後に房水（aqueous humor，ＡＨ）中に存在する候補薬剤の含量の分析

正常なウサギに化合物２０を投与し、異なる時点にそれぞれ化合物の房水中における含量を確認した。

【０２２４】

２．結果

眼圧下降効果の評価の結果は図２に示されるとおりである。

【０２２５】
図２からわかるように、０．１％化合物２０を含む点眼薬および０．０３％化合物２０を含む点眼薬の最大効果（Ｅｍａｘ）は投薬から６～８時間後に現れ、その最大眼圧下降度は約４．４～４．９ｍｍＨｇであり、眼刺激性は軽微なものであった。
【０２２６】
また、この結果は、正常眼圧ウサギモデルにおいて、０．０３％化合物２０を含む点眼液で、すでに最大眼圧下降作用に達することも示した。
【０２２７】
眼刺激性評価の結果は図３Ａ、図３Ｂおよび図３Ｃに示されるとおりである。
【０２２８】
図３Ａおよび図３Ｂからわかるように、化合物２０は、最大効果投与量（０．１％）での眼刺激性がＡＲ－１３３２４（０．０２％）より低かった。
【０２２９】
また、図３Ｃに示されるように、連続７日間投薬しても、角膜には依然として損傷および混濁はなかった。
【０２３０】
化合物２０の投薬後に虹彩および毛様体ならびに房水中に存在する含量の分析結果は図４に示されるとおりである。虹彩および毛様体については、化合物２０の濃度を単位ｎｇ／ｇで測定し；房水については、化合物２０の濃度を単位ｎｇ／ｍＬで測定した。
【０２３１】
図４からわかるように、投薬後、化合物２０の房水における含量はＲＯＣＫ抑制に必要な含量に達していた。
【０２３２】
Ｂ．化合物４、５、７、８、１１、１２および１４
１．方法
（１）眼圧下降効果の評価
化合物２０に対するのと類似する方法で、化合物４、５、７、８、１１、１２、１４、２０および２１（最大効果投与量を使用）の正常眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降効果を確認した。
【０２３３】
（２）安全マージン（safety margin）テスト
化合物７を代表として用い、２％化合物７を含む点眼薬をウサギの眼に投与した（１日３回、１回ごとに３時間の間隔をあける。投薬前および１回ごとの投薬１時間後に観察）。また、０．０４％化合物７を含む点眼薬をウサギの眼に投与した（１日１回。投薬前ならびに投薬１時間後および６時間後に観察）。上述した経済協力開発機構の定める眼刺激性試験ガイドラインＯＥＣＤ／ＯＣＤＥ　４０５に従って、化合物７の眼刺激性に対して評価を行った。
【０２３４】
２．結果
眼圧下降効果の評価の結果は表９に示されるとおりである。
【０２３５】
（表９）眼圧下降効果の評価の結果

化合物	眼圧差(mmHg)/投与量/最大効果に達した時点
AR-13324	4.5/1%/6時間
化合物4	4.2/1%/2時間
化合物5	1.5/1%/6時間
化合物7	5.1/1%/4時間
化合物8	5.2/1%/6時間
化合物11	2.0/0.5%/1時間
化合物12	2.0/0.25%/6時間
化合物14	2.5/0.5%/6時間
化合物20	4.9/0.03%/8時間
化合物21	1.3/0.03%/8時間

【0236】
安全マージン（safety margin）テスト結果は図5および表10に示されるとおりである。
【0237】
（表10）安全マージンテスト結果

安全マージン	AR-13324	化合物7
治療指数（therapeutic index, TI）	2	3
OECDスコア		
	AR-13324（治療指数：2）	化合物7（治療指数：3）
発赤	1	1
結膜浮腫	1	0
過度の分泌（Discharge）	2	1
合計	4	2

【０２３８】
図５および表１０からわかるように、ＡＲ－１３３２４７は、治療指数が２であるとき、ＯＥＣＤ４０５の合計スコアは４であり、一方、化合物７は、治療指数が３であるときに、ＯＥＣＤ４０５の合計スコアは２であり、よって化合物７の安全マージンはＡＲ－１３３２４よりも優れている。
【０２３９】
実施例５
マカクザル動物モデル
１．材料および方法
０．１％または０．０３％化合物２０を含む点眼薬を正常なマカクザルに投与した。０．０２％ＡＲ－１３３２４を基準とし、テスト化合物の薬効の競合性を評価した。気動眼圧計（Model 30（商標） Pneumatonometer）で動物の眼圧を測定した。眼圧測定前に動物に麻酔をかけた。それぞれ局部（topical）に投与した後（１日１回）、所定の時間に動物の眼圧を測定した。
【０２４０】
２．結果
結果は図６に示されるとおりである。
【０２４１】
図６からわかるように、化合物２０は、正常な眼圧のマカクザルにおいて、ＡＲ－１３３２４と同等またはより優れた眼圧下降作用を示し、かつピンクアイ等の明らかな副作用はなかった。
【０２４２】
実施例６

高張食塩水（hypertonic saline）で誘発した高眼圧ウサギモデル（急性高眼圧モデル）における眼圧下降効果の評価

１．材料および方法

実験動物：ニュージーランド白ウサギ、オス、体重２．０～３．０ｋｇ。試験に先立ち、ニュージーランド白ウサギを台湾で承認を受けた実験動物ウサギ飼育場から購入し、国立交通大学動物センターにて飼育した。

テストサンプル：０．１％化合物２０を含む点眼薬

陰性対照群（negative control）１：生理食塩水

陰性対照群２：テスト物質を含まないビヒクル（５％マンニトール（mannitol）、２０ｍＭホウ酸（boric acid）および０．１２５％ノノキシノール－９（nonoxynol-9）含有）

【０２４３】

実験方法：オスのニュージーランド白ウサギの体重を量りグループ分けした後、麻酔をかけた。１６０μＬの高張食塩水（５％　ＮａＣｌ）を麻酔状態にあるウサギの左右の眼の硝子体に注入し、ウサギの眼を高眼圧状態とした。次いで、５０μＬの生理塩水（０．９％　ＮａＣｌ）、０．１％化合物２０を含む点眼薬、化合物２０の点眼薬を調製するのに用いるビヒクル（化合物２０を含まない）および０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬を各群のウサギの左右の眼にそれぞれ滴下した。眼圧検出（ＩＯＰ）時点を、麻酔前（０時間）および投与０．５、１、１．５、３および５時間後の時点とした。生理食塩水およびテスト物質を含まないビヒクルを陰性対照群とし、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬をベンチマーク（benchmark）として、化合物２０の高張食塩水誘発高眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降効果を評価した。

【０２４４】

２．結果

結果は図７および表１１に示されるとおりである。

【０２４５】

（表１１）高眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降テストの結果

一過性の高眼圧のウサギ				
	投与量	最大眼圧差（mm Hg）	最大眼圧差（%）	AUC
生理食塩水	-	-	-	139.7
AR-13324	0.02%	-7.7±4.2	-20.8%	132.9
化合物20の点眼薬を調製するのに用いるビヒクル	-	+7.2±5.2	+16.2%	NA
化合物20	0.1%	-18.0±6.8	-40.4%	99.1

最大眼圧差：最大反応を記録した時点における個体の眼圧の示度と陰性対照群1（生理食塩水）の平均眼圧の示度との差（J Ocul Pharmacol Ther. 2010 Apr;26（2）:125-132）

【０２４６】
高張食塩水誘発高眼圧ウサギモデルにおいて、０．１％化合物２０を含む点眼薬は眼圧を約１８．０±６．８ｍｍＨｇ下げることができ、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬は眼圧を約７．７±４．２ｍｍＨｇ下げたことが、結果により示された。化合物２０の眼圧下降効果が、ＡＲ－１３３２４に比べて明らかに優れていることがわかる（ｔ－ｔｅｓｔ，ｐ＜０．０５）。ビヒクルは生理食塩水に比べ、明らかな統計的差異（ｔ－ｔｅｓｔ）はなかった。またＡＲ－１３３２４も、生理食塩水またはビヒクルに比べ、明らかな統計的差異（ｔ－ｔｅｓｔ）はなかった。
【０２４７】
実施例７
磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデル（眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧モデル）における眼圧下降効果の評価
落屑緑内障（exfoliation glaucoma，ＸＦＧ）は原発開放隅角緑内障（primary open angle glaucoma）よりも重度であると認められている。落屑緑内障と原発開放隅角緑内障の最大眼圧（３８．２ｍｍＨｇ　ｖｓ　２６．９ｍｍＨｇ）、最小眼圧（２４．７ｍｍＨｇ　ｖｓ　１８．４ｍｍＨｇ）および平均眼圧変化（１３．５ｍｍＨｇ　ｖｓ　８．５ｍｍＨｇ）には、統計学上明らかな差異がある。また、落屑症候群（exfoliation syndrome）の発症を防止する、またはその進行を遅らせることのできる食事療法、薬剤またはその他の介入処置で知られているものは現在まだ無い（Progress in Retinal and Eye Research Vol. 19, No. 3, pp. 345 to 368, 2000）。上述からわかるように、落屑緑内障の眼圧は＞３０ｍｍＨｇにも達し得るが、目下のところこれに対する有効な薬剤は無い。よって、ここに眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧モデルを提供し、本開示の化合物の落屑緑内障および眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧の治療における使用の可能性について評価する。
【０２４８】
Ａ．化合物２０
１．材料および方法
実験動物：ニュージーランド白ウサギ、オス、体重２．０～３．０ｋｇ。試験に先立ち、ニュージーランド白ウサギを恵鈞養殖場から購入し、国立交通大学動物センターにて飼育した。
テストサンプル：０．０３％または０．１％化合物２０を含む点眼薬
陰性対照群１：テスト化合物２０を含まないビヒクル（５％マンニトール、２０ｍＭホウ酸および０．１２５％ノノキシノール－９含有）
陰性対照群２：テスト化合物ＡＲ－１３３２４を含まないビヒクル（４．７％　Ｄ－マンニトールおよび０．０５％ホウ酸を含む）
【０２４９】
実験方法：オスニュージーランド白ウサギの体重を量り、グループ分けした後、Ｚｏｌｅｔｉｌ　５０　０．２ｍＬ／ｋｇで麻酔をかけた。５０μＬの磁気ビーズ溶液（５０ｍｇ／ｍＬ、磁気ビーズ粒径１０μｍ）を麻酔状態にあるウサギの左右の眼の前眼房中に注入し、ウサギの眼を高眼圧状態とした。前房注射が完了したら即、眼の周囲に強力ルビジウム鉄マグネットリングをはめて１０～２０分処理し、磁気ビーズで房水の排出組織を完全に塞ぐようにした。抗生物質で眼球を消毒した後、保湿用の眼軟膏で眼球を回復させ、眼圧が上昇するのを待った。約３日後、眼圧は＞３０ｍｍＨｇの高眼圧に達し、少なくとも１０日間持続した。目標の眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧に達した後、０．０３％または０．１％化合物２０を含む点眼薬（右眼）、化合物２０の点眼薬を調製するのに用いるビヒクル（化合物２０を含まない）（左眼）、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬（右眼）、およびＡＲ－１３３２４の点眼薬を調製するのに用いるビヒクル（ＡＲ－１３３２４を含まない）（左眼）をそれぞれ一滴（約３５μＬ）ずつ各群のウサギの左右の眼にさした。眼圧検出（ＩＯＰ）の時点は、投与前（０時間）および投与２、４、６および８時間後の時点とし、連続２日間実験を行った。０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬をベンチマークとし、化合物２０の磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデル（眼圧＞３０ｍ

ｍＨｇの高眼圧モデル）における眼圧下降効果を評価した。
【０２５０】
２．結果
結果は表１２および図８に示されるとおりである。
【０２５１】
（表１２）化合物２０の磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降のテスト結果

化合物	投与量	最大眼圧差(mmHg)
AR-13324	0.02%	4.3±1.4
化合物20	0.03%	5.7±0.6
	0.1%	12.1±1.4

【０２５２】
結果より、磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデル（眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧モデル）において、０．０３％化合物２０を含む点眼薬は眼圧を約５．７±０．６ｍｍＨｇ下げることができ（約１５．３％下降）、０．１％化合物２０を含む点眼薬は眼圧を約１２．１±１．４ｍｍＨｇ下げることができた（約２８．８％下降）ことがわかった。つまり、０．０３％化合物２０を含む点眼薬および０．１％化合物２０を含む点眼薬の眼圧下降効果はいずれも、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬（眼圧を約４．３±１．４ｍｍＨｇ下げた（約１１．０％下降））よりも優れ、かつ０．１％化合物２０を含む点眼薬の眼圧下降効果は、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬の２倍以上にもなった。
【０２５３】
Ｂ．化合物７
化合物２０に対するのと類似する方法で、化合物７（最大効果投与量０．５％および１％を使用）の正常眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降効果を確認した。
【０２５４】
結果は表１３に示されるとおりである。
【０２５５】
（表１３）化合物７の磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデルにおける眼圧下降テスト結果

化合物	投与量	最大眼圧差(mmHg)
AR-13324	0.02%	3.6±2.1
化合物7	0.5%	6.7±1.6
	1%	11.8±0.8

【０２５６】
表１３からわかるように、磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデル（眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧モデル）において、０．５％化合物７を含む点眼薬および１％化合物７を含む点眼薬の眼圧下降効果も、０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬よりも優れており、このうち１％化合物７を含む点眼薬の眼圧下降効果は０．０２％　ＡＲ－１３３２４を含む点眼薬の３倍以上にもなった。
【０２５７】
実施例８
１．ＭＹＬＫ－４の細胞における発現

（１）方法
ヒト線維柱帯（Human Trabecular Meshwork,ＨＴＭ）細胞（Cat. No. 6590）をScienCell Research Laboratoriesから入手した。ＨＴＭ細胞を線維柱帯細胞培地（Trabecular Meshwork Cell Medium, ＴＭＣＭ）（Cat. No. 6591）中に維持した。ＴＭＣＭは、５００ｍＬ基礎培地、１０ｍＬ　ＦＢＳ（Cat. No. 0010）、５ｍＬ線維柱帯細胞増殖添加剤（TMCGS，Cat. No. 6592）および５ｍＬペニシリン／ストレプトマイシン溶液（P/S，Cat. No. 503）を配合してなる。細胞増殖が７０～８０％の飽和に達した後、５０μｇ／ｍＬのデキサメタゾン（dexamethasone）（Cat. No. 4902, Sigma）でＨＴＭ細胞を一晩処理した。

【０２５８】
ウエスタンブロッティングにより細胞溶解物中のＭＹＬＫ４およびＧＡＰＤＨの発現を分析した。先ず、細胞を収集し、１×ＲＩＰＡ（５０mM　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．４、１５０mM　ＮａＣｌ、０．２５％デオキシコール酸、０．１％ＮＰ－４０、１mM　ＥＤＴＡ，ホスファターゼ阻害剤とプロテアーゼ阻害剤との混合物）で洗浄した。次いで、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動）で細胞溶解物を分離し、ＰＶＤＦメンブレン（iBlot（商標）2 Transfer Stacks，ポリフッ化ビニリデンメンブレン，Invitrogen）に転写した。メンブレンに対し、１次抗体（マウス抗ＭＹＬＫ４抗体（１：１０００、Cat. No. SAB1412951）およびマウス抗ＧＡＰＤＨ抗体（１：１０００、Cat. No. G8795））で免疫ブロットを行った。ＧＡＰＤＨをローディング対照群（loading control）とした。次いで、メンブレンを１Ｘ　ＴＢＳＴで３回洗い流した。次いで、メンブレンを２次抗体（Cat. No. 111-0350003, Cat. No. 111-035-164）と室温で１時間培養した。増強された化学発光（WBKLS0500, Millipore）検出システム（Fisher Scientific, US）により、メンブレンを可視化した。

【０２５９】
（２）結果
結果は図９に示されるとおりである。

【０２６０】
図９からわかるように、デキサメタゾンで処理したＨＴＭ細胞（疾患状態の細胞）のＭＹＬＫ－４発現量は正常なＨＴＭ細胞に比べて高かった。

【０２６１】
２．ＭＹＬＫ－４の磁気ビーズ誘発疾病ターゲット組織における発現
（１）方法
５０μＬの磁気ビーズ溶液（５０ｍｇ／ｍＬ、磁気ビーズ粒径１０μｍ）を麻酔状態下のウサギの左右の眼の前房に注入し、ウサギの眼を高眼圧状態とした。磁気ビーズ溶液で処理していないウサギを対照群とした。後にウサギを犠牲死させ、眼球を取り出し、組織病理分析を行った。

【０２６２】
組織病理の判読法：
顕微鏡：ＭｏｔｉｃＥａｓｙＳｃａｎ
顕微撮影システム：ＭｏｔｉｃＥａｓｙＳｃａｎ

【０２６３】
判読法：
ウサギ眼球パラフィン組織切片の免疫組織化学染色（immunohistochemical, IHC staining）を行って、眼球線維柱帯（trabecular meshwork）に対し結果判読をした上で、判読結果スコアシートおよび異なる倍率の顕微鏡写真を提供するよう、遠見生物科技社に委託した。

【０２６４】
取り出した眼球組織をホルマリン固定した後、脱水し、パラフィン包埋を行ってから、３μm厚のパラフィン組織切片を作った。ＩＨＣ染色のバイオマーカーはＭＹＬＫ－４お

よびＭＬＣ－２とした。

【０２６５】

検体所で作製された組織病理切片に基づいて、それぞれ２０倍、４０倍、１００倍、２００倍および４００倍の顕微鏡で組織の病巣観察および記録を行った。病巣の重症度、分布範囲およびそれが占める組織の割合に基づいて、ＩＮＨＡＮＤ（International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria）により推奨される５段階の評定法を参照に病巣の採点を行った：グレード０は明らかな病理変化が無く、病巣が組織全体の１％以下を占めることを表し；グレード１は疾病が極微（minimal,１～５％）であることを表し；グレード２は疾病が軽い（mild, ６～２５％）であることを表し；グレード３は疾病が中度（moderate, ２６～５０％）であることを表し；グレード４は疾病が中重度（moderately severe, ５１～７５％）であることを表し；グレード５は疾病が重度（severe/high, ＞７６％）であることを表す。

【０２６６】

（２）結果

免疫組織化学染色の結果は図１０に示すとおりであり、採点結果は表１４に示されるとおりである。

【０２６７】

（表１４）免疫組織化学染色の採点結果

群	スコア
対照群	0
高眼圧群	3．3±0．6

【０２６８】

図１０および表１４からわかるように、疾病状態の細胞（デキサメタゾンで処理したＨＴＭ細胞）または疾病動物ターゲット組織（磁気ビーズ誘発ウサギ眼）のいずれにおいても、ＭＹＬＫ－４の発現量は正常細胞および組織よりも高く、よって、ＭＹＬＫ－４抑制効果を有する本開示化合物は、ＲＯＣＫ抑制作用によるだけでなく、ＭＹＬＫ－４を抑制することによっても有効に眼圧を下降させ得ることが推測される。

【０２６９】

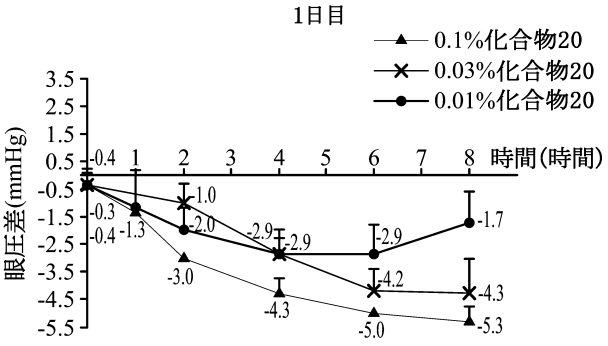
前述した実験結果をまとめるとわかるように、ＡＲ－１３３２４がＲＯＣＫのみをターゲットするのに比して、本開示の化合物２０はＲＯＣＫ、ＭＹＬＫ－４およびＹＳＫ－４を同時にターゲットとすることができる。また、高張食塩水誘発高眼圧ウサギモデル（急性高眼圧モデル）および磁気ビーズ誘発高眼圧ウサギモデル（眼圧＞３０ｍｍＨｇの高眼圧モデル）において、本開示の化合物２０の眼圧下降効果はいずれもＡＲ－１３３２４より優れていた。また、本開示の化合物２０は、最大効果投与量において、ＡＲ－１３３２４に比べ刺激性が低かった。

【０２７０】

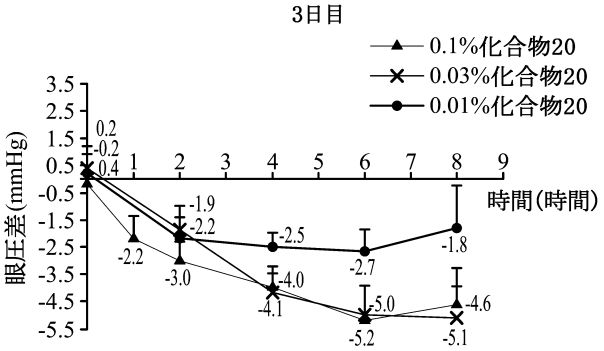
好ましい実施形態により本発明を上のように開示したが、それらは本発明を限定するものではなく、任意の当業者は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、いくらかの変更および修飾を加えることができる。よって、本発明の保護範囲は、添付の特許請求の範囲で定義したものを基準とすべきである。

【図面】

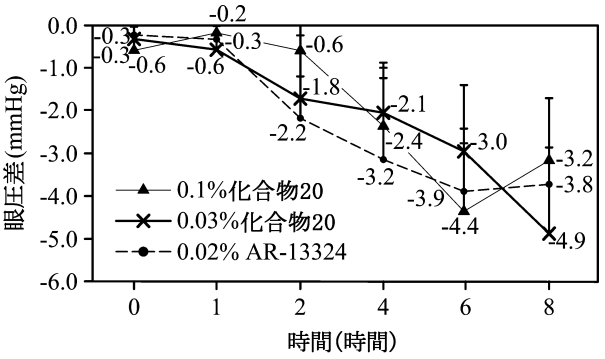
【図１Ａ】



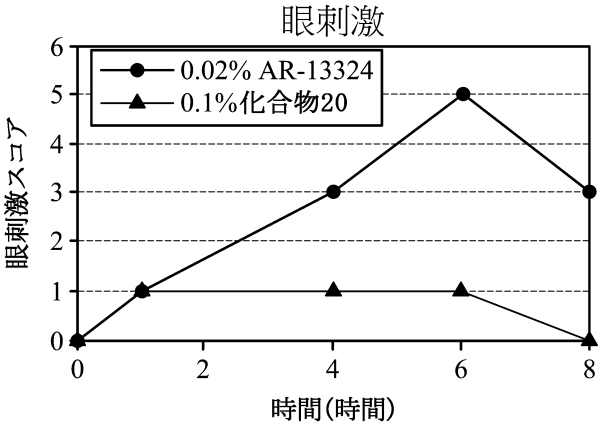
【図１Ｂ】



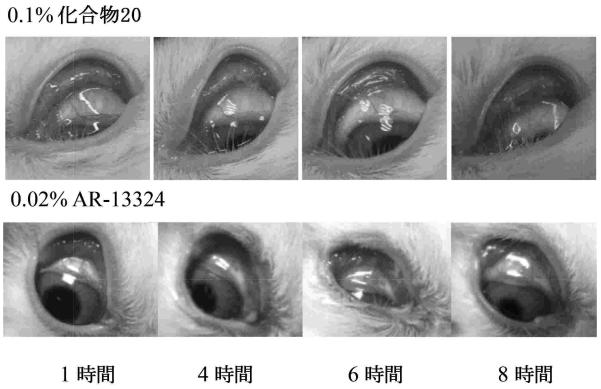
【図２】



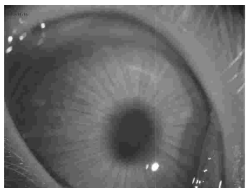
【図３Ａ】



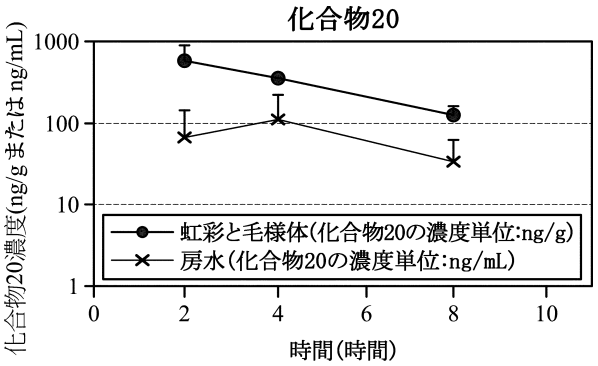
【図３Ｂ】



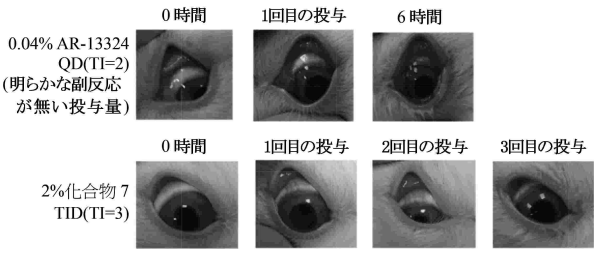
【図３Ｃ】



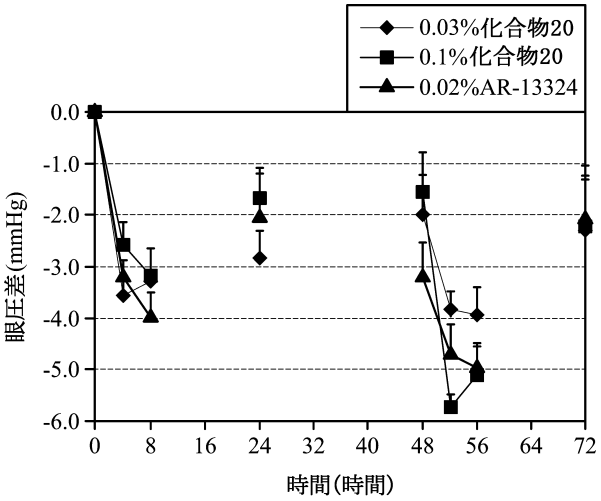
【図４】



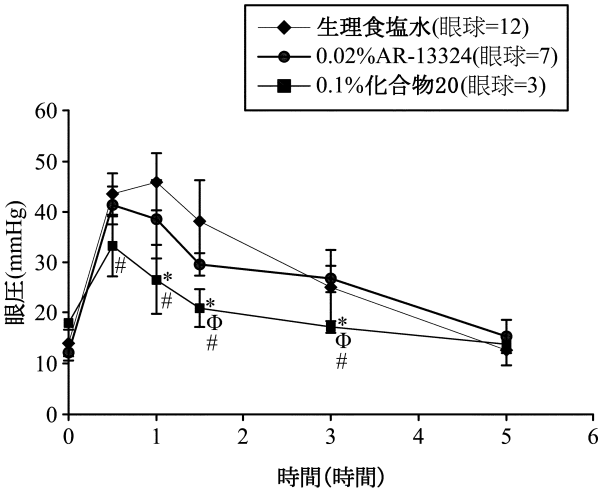
【図５】



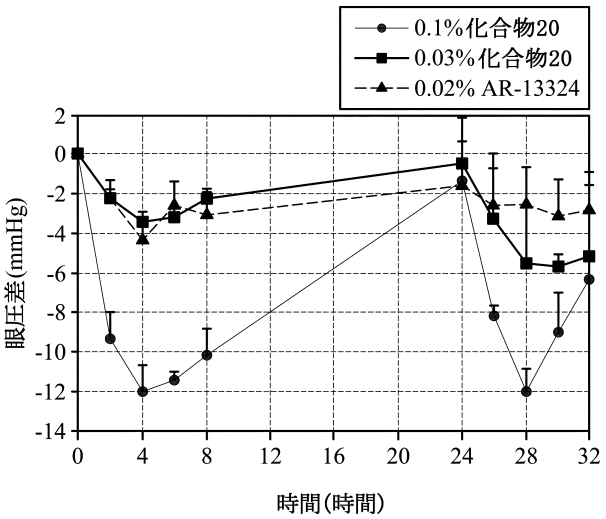
【図６】



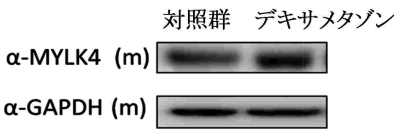
【図７】



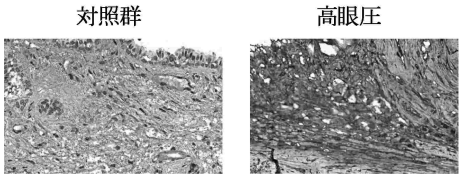
【図８】



【図９】



【図１０】



フロントページの続き

(51)国際特許分類	FI
A61K 31/4192(2006.01)	A61K 31/4192
C07D 231/18 (2006.01)	C07D 231/18
C07D 403/12 (2006.01)	C07D 403/12
A01P 11/00 (2006.01)	A01P 11/00

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 傅 志偉
台湾桃園市平鎮區義民里２１鄰延平路二段２３９巷１９號１４樓
(72)発明者 劉 志鵬
台湾新竹市東區東園里１９鄰鐵道路１段２８巷５７號１１樓
(72)発明者 陳 翊▲員▼
台湾新竹市香山區中埔里１鄰牛埔東路１８５巷３號
(72)発明者 杜 佳穆
台湾台北市文山區景慶里１９鄰景福街２１３號２樓
(72)発明者 洪 秋蓮
台湾高雄市鳳山區南成里２５鄰保安一街３１巷１８號

審査官 早川 裕之

(56)参考文献
特表２０１６－５１００３３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５０７８５０（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５０６９７９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１９－５２９３５９（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５２４６３１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５２５３８６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１９／０１８８５５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１９／１７８３２４（WO，Ａ１）
REGISTRY（STN）［online］，2013年，CAS 登録番号：1506916-17-1

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｄ
Ａ６１Ｐ
Ａ６１Ｋ ３１／
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）