

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-545598

(P2009-545598A)

(43) 公表日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 251/70 (2006.01)	C O 7 D 251/70	C S P F
A 6 1 K 31/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/53	4 B O 5 O
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 6 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 C O 8 6
C O 7 D 471/04 (2006.01)	C O 7 D 471/04	1 O 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2009-522869 (P2009-522869)
 (86) (22) 出願日 平成19年8月1日(2007.8.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月30日(2009.3.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/017244
 (87) 国際公開番号 W02008/016675
 (87) 国際公開日 平成20年2月7日(2008.2.7)
 (31) 優先権主張番号 60/821,116
 (32) 優先日 平成18年8月1日(2006.8.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

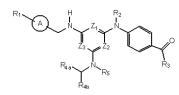
(71) 出願人 399043691
 プリーシス・ファーマシューティカルズ・
 インコーポレイテッド
 P R A E C I S P H A R M A C E U T I
 C A L S, I N C.
 アメリカ合衆国 02451-1420
 マサチューセッツ州ウォルサム、ウィンタ
 ー・ストリート830番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行

最終頁に続く

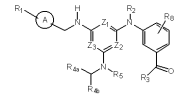
(54) 【発明の名称】 P 3 8 キナーゼ阻害剤

(57) 【要約】

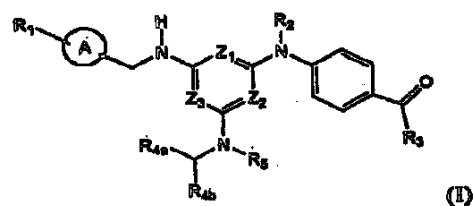
式 (I) および (I I) で示される化合物、ならびにそれらの同定方法、それらの製造方法、それらを含む医薬組成物、および疾患の治療におけるそれらの使用が開示される。該化合物は、p 3 8 キナーゼの阻害により T N F - およびインターロイキン (I L) の生産を阻害する。それらは、炎症および関節炎の治療に有用である。



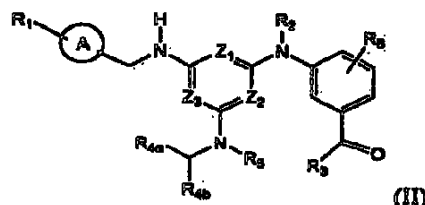
(I)



(I I)



(I)



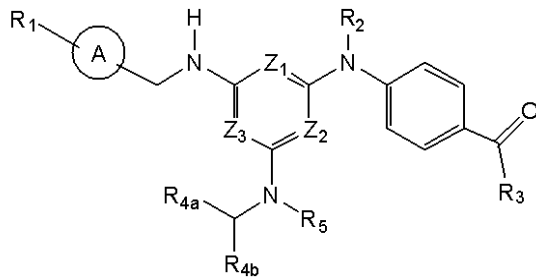
(I I)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1】



(I)

10

[式中、

Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立して、C - RまたはNであり、ここで、Rは、H、($C_1 \sim C_6$)アルキル、ハロ、CN、または($C_1 \sim C_6$)アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて - OH、ハロまたは($C_1 \sim C_6$)アルキルで置換されていてもよく；

R_1 は、1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

【化 2】



20

は、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または1、2または3

【化 3】



がN - Hを含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は($C_1 \sim C_6$)アルキルと置き換わっていてもよく；

R_2 は、水素、または炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

30

R_3 は、- OH、- O - ($C_1 \sim C_6$)アルキル、- NH₂、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH(O - $C_1 \sim C_6$)アルキル)、- O - アラルキルであり、これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよく；

R_{4a} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル(炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)であり；

R_{4b} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)；または

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)；

40

R_5 は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキルであり；

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、アリール、ヘテロアリール、($C_3 \sim C_7$)シクロアルキル、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、($C_2 \sim C_6$)アルケニルオキシ、($C_2 \sim C_6$)アルキニルオキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキルチオ、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルフィニル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニル、アミノ、($C_1 \sim C_6$)アルキルアミノ、ジ - [($C_1 \sim C_6$)アルキル]アミノ、ホルミル、- C(=O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- C(=N)($C_1 \sim C_6$)

50

)アルキル、カルボキシ、 $-CO_2(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-C(=N)NH_2$ 、 $-C(=N)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-C(=N)N(C_1 \sim C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-CON((C_1 \sim C_6)$ アルキル $)_2$ 、 $-OC(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-OC(O)NH_2$ 、 $-OC(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-OC(O)NH((C_1 \sim C_6)$ アルキル $)_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-NH-C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-NH-C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-NH-(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルファモイル、 N,N -ジ- $[(C_1 \sim C_6)$ アルキル]スルファモイル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルホニルアミノ、または $-N-(C_1 \sim C_6)$ アルキル $-(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルホニルアミノであり、これらは、炭素上にて R_7 で置換されていてもよく；

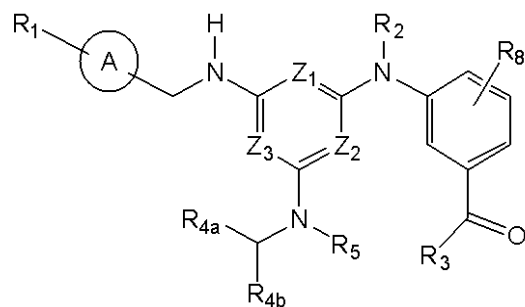
10

R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルである]
で示される化合物またはその医薬上許容される塩。

【請求項 2】

式 I I :

【化 4】



(I I)

20

[式中、

Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立して、 $C-R$ または N であり、ここで、 R は、 H 、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、ハロ、 CN 、または $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて $-OH$ 、ハロまたは $(C_1 \sim C_6)$ アルキルで置換されていてもよく；

30

R_1 は、1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい $(C_1 \sim C_6)$ アルキルであり；

【化 5】



は、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい、 $(C_3 \sim C_6)$ シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または1、2または3

40

【化 6】



が $N-H$ を含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は $(C_1 \sim C_6)$ アルキルと置き換わっていてもよく；

R_2 は、水素、または炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい $(C_1 \sim C_6)$ アルキルであり；

R_3 は、 $-OH$ 、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル)、 $-N((C_1 \sim C_6)$ アルキル $)_2$ 、 $-NH(O-C_1 \sim C_6)$ アルキル)、 $-O$ -アラルキルであり、これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよく；

R_{4a} は、水素、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、または $(C_3 \sim C_6)$ シクロアルキル（炭素上にて1

50

、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)であり;

R_{4b} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい);または

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい);

R_5 は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキルであり;

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、 $-NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N((C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、アリール、ヘテロアリール、($C_3 \sim C_7$)シクロアルキル、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、($C_2 \sim C_6$)アルケニルオキシ、($C_2 \sim C_6$)アルキニルオキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキルチオ、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルフィニル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニル、アミノ、($C_1 \sim C_6$)アルキルアミノ、ジ-[($C_1 \sim C_6$)アルキル]アミノ、ホルミル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-C(=N)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、カルボキシ、 $-CO_2(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-CONH_2$ 、 $-C(=N)NH_2$ 、 $-C(=N)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-C(=N)N(C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-CON((C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-OC(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-OC(O)NH_2$ 、

$-OC(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-OC(O)NH((C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル- $C(O)(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-NH-C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル- $C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル- $C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N(C_1 \sim C_6)$ アルキル- $C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-NH-C(O)NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-NH-(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルファモイル、 N,N -ジ-[($C_1 \sim C_6$)アルキル]スルファモイル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニルアミノ、または $-N-(C_1 \sim C_6)$ アルキル-($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニルアミノであり、これらは、炭素上にて R_7 で置換されていてもよく;

R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルであり;

R_8 は、水素、ハロゲン、($C_1 \sim C_6$)アルキルおよび($C_1 \sim C_6$)アルコキシから選択される]

で示される化合物またはその医薬上許容される塩。

【請求項3】

R_1 が、1個または2個のアミノ、ハロゲンまたはアルコキシで置換されていてもよいメチルからなる群から選択される、請求項1または2記載の化合物。

【請求項4】

【化7】

(A)

が、シクロヘキシル、シクロペンチル、シクロブチル、シクロプロピル、フェニルおよびピリジルからなる群から選択される、請求項1～3いずれか1項記載の化合物。

【請求項5】

R_2 が水素またはメチルである、請求項1～4いずれか1項記載の化合物。

【請求項6】

R_3 が、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-OEt$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ および $-NH-OMe$ からなる群から選択される、請求項1～5いずれか1項記載の化合物。

【請求項7】

R_5 が、水素、メチルおよびシクロヘキシルからなる群から選択される、請求項1～6いずれか1項記載の化合物。

【請求項8】

10

20

30

40

50

R₆が、クロロ、フルオロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、アミノおよびメチルからなる群から選択される、請求項1～7いずれか1項記載の化合物。

【請求項9】

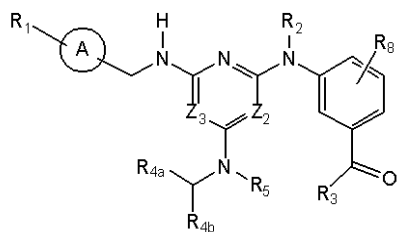
R₇が、クロロ、フルオロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロおよびヒドロキシルからなる群から選択される、請求項1～8いずれか1項記載の化合物。

【請求項10】

式II-1:

【化8】

10



II-1

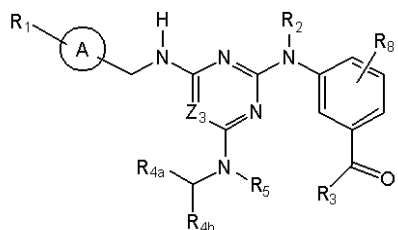
で示される化合物である請求項1～9いずれか1項記載の化合物またはその医薬上許容される塩。

20

【請求項11】

式II-2:

【化9】



II-2

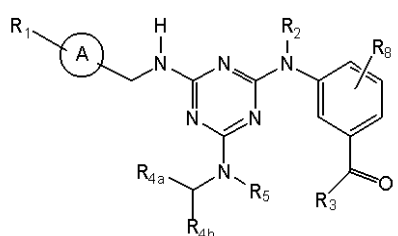
30

で示される化合物である請求項1～10いずれか1項記載の化合物またはその医薬上許容される塩。

【請求項12】

式II-3:

【化10】



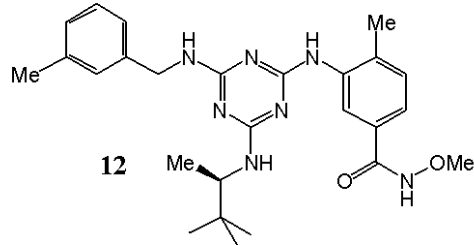
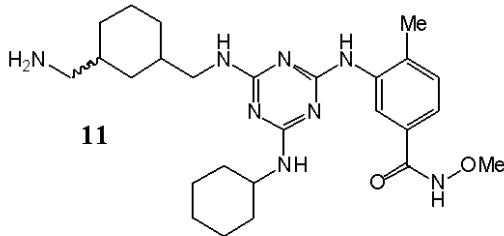
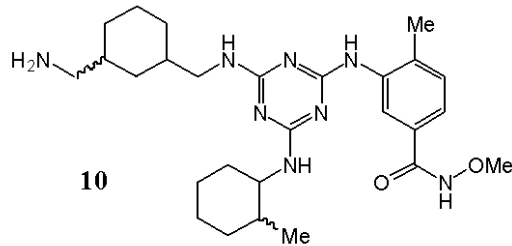
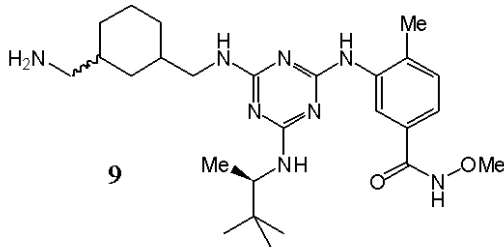
II-3

40

で示される化合物である請求項1～11いずれか1項記載の化合物またはその医薬上許容される塩。

【請求項13】

【化 1 1】



10

およびそれらの医薬上許容される塩からなる群から選択される化合物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

20

【請求項 1 5】

対象体または生物学的試料中における p 3 8 キナーゼ活性の阻害方法であって、請求項 1 4 記載の組成物または請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物を該対象体に投与して、または、該生物学的試料に接触させて、結果として p 3 8 キナーゼ活性が阻害されることを含む方法。

【請求項 1 6】

対象体における炎症の治療方法であって、該対象体に請求項 1 4 記載の組成物または請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物の有効量を投与して、結果として炎症が治療されることを含む方法。

30

【請求項 1 7】

対象体における関節炎の治療方法であって、該対象体に請求項 1 4 記載の組成物または請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物の有効量を投与して、結果として関節炎が治療されることを含む方法。

【請求項 1 8】

p 3 8 媒介状態の治療を必要とする対象体における p 3 8 媒介状態を治療するための薬剤の製造のための請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物または請求項 1 4 記載の組成物の使用。

【請求項 1 9】

炎症の治療を必要とする対象体における炎症を治療するための薬剤の製造のための請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物または請求項 1 4 記載の組成物の使用。

40

【請求項 2 0】

関節炎の治療を必要とする対象体における関節炎を治療するための薬剤の製造のための請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物または請求項 1 4 記載の組成物の使用。

【請求項 2 1】

治療における請求項 1 4 記載の組成物または請求項 1 ~ 1 3 いずれか 1 項記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

(関連出願)

本願は、2006年8月1日に出願された米国仮出願番号第60/821,116号に関するものであって、その優先権を主張するものであり、その内容は全体としてこの言及をもって本明細書の記載とする。

【背景技術】

【0002】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAP)は、二重リン酸化によってそれらの基質を活性化するプロリン指向性セリン/スレオニンキナーゼのファミリーを形成する。該キナーゼは、栄養的および浸透圧的ストレス、UV光、成長因子、エンドトキシンおよび炎症性サイトカインを含む様々なシグナルによって活性化される。MAPキナーゼの1つのグループであるp38キナーゼは、転写因子および他のキナーゼのリン酸化および活性化に関与しており、自身は、物理的および化学的ストレス、炎症誘発性サイトカインおよび細菌性リポ多糖によって活性化される。

10

【0003】

p38リン酸化の生産物は、TNF、IL-1およびIL-6、ならびにシクロオキシゲナーゼ-2を含む炎症性サイトカインの生産を媒介することが示されている。これらのサイトカインの各々は、多くの病態および状態に関与している。例えば、TNFは、主に活性単球およびマクロファージによって生産されるサイトカインである。その過剰なまたは未制御の生産は、関節リウマチの発病に関与している。さらに最近では、TNF生産の阻害が、とりわけ、炎症、炎症性腸疾患、アルツハイマー病、クローン病、多発性硬化症および喘息の治療において幅広い用途を有することが示された。

20

【0004】

TNFはまた、ウイルス感染症、例えば、HIV、インフルエンザウイルス、およびヘルペスウイルス、とりわけ、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)、サイトメガロウイルス(CMV)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、エプスタイン・バーウイルス、ヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス-7(HHV-7)、ヒトヘルペスウイルス-8(HHV-8)、仮性狂犬病および鼻気管炎にも関与している。同様に、IL-1は、活性単球およびマクロファージによって生産され、関節リウマチ、発熱および骨吸収の低下を含む多くの病態生理学的応答において役割を果たす。かくして、p38キナーゼを阻害することによってTNFおよびILを阻害する化合物が必要とされている。

30

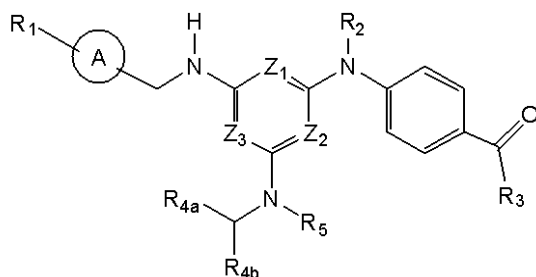
【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一の実施態様では、本発明は、式I:

【化1】



(I)

40

[式中、

Z₁、Z₂およびZ₃は、各々独立して、C-RまたはNであり、ここで、Rは、H、(C₁~C₆)アルキル、ハロ、CN、または(C₁~C₆)アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて-OH、ハロまたは(C₁~C₆)アルキルで置換されていてもよく;

R₁は、1、2または3個のR₆で置換されていてもよい(C₁~C₆)アルキルであり;

50

【化 2】

A

は、炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または 1、2 または 3

【化 3】

A

が N - H を含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は($C_1 \sim C_6$)アルキルと置き換わっていてもよく； 10

R_2 は、水素、または炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

R_3 は、- OH、- O - ($C_1 \sim C_6$)アルキル、- NH₂、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH(O - $C_1 \sim C_6$)アルキル)、- O - アラルキルであり、これらは、炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよく；

R_{4a} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル(炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい)であり；

R_{4b} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか(これらは、炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい)；または 20

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒にあって、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し(これらは、炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい)；

R_5 は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキルであり；

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、アリール、ヘテロアリール、($C_3 \sim C_7$)シクロアルキル、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、($C_2 \sim C_6$)アルケニルオキシ、($C_2 \sim C_6$)アルキニルオキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキルチオ、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルフィニル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニル、アミノ、($C_1 \sim C_6$)アルキルアミノ、ジ - [($C_1 \sim C_6$)アルキル]アミノ、ホルミル、- C(=O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- C(=N)($C_1 \sim C_6$)アルキル、カルボキシ、- CO₂($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CONH₂、- C(=N)NH₂、- C(=N)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- C(=N)N($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- CONH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CON(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- OC(O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- OC(O)NH₂、- OC(O)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- OC(O)NH(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NHC(O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N($C_1 \sim C_6$)アルキル - C(O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- NH - C(O)NH₂、- N($C_1 \sim C_6$)アルキル - C(O)NH₂、- N($C_1 \sim C_6$)アルキル - C(O)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N($C_1 \sim C_6$)アルキル - C(O)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH - C(O)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH - ($C_1 \sim C_6$)アルキルスルファモイル、N, N - ジ - [($C_1 \sim C_6$)アルキル]スルファモイル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニルアミノ、または - N - ($C_1 \sim C_6$)アルキル - ($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニルアミノであり、これらは、炭素上にて R_7 で置換されていてもよく； 30 40

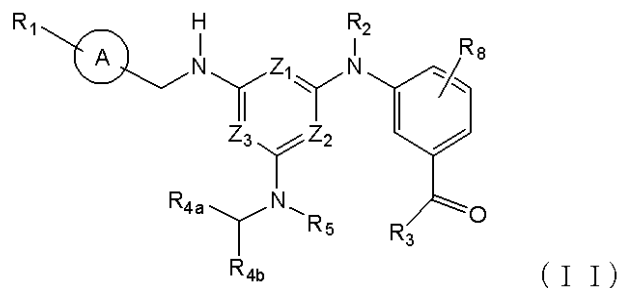
R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルである]

で示される化合物またはその医薬上許容される塩を対象とする。

【0006】

一の実施態様では、本発明は、式 I I :

【化 4】



10

[式中、

Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立して、C - RまたはNであり、ここで、Rは、H、($C_1 \sim C_6$)アルキル、ハロ、CN、または($C_1 \sim C_6$)アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて - OH、ハロまたは($C_1 \sim C_6$)アルキルで置換されていてもよく；

R_1 は、1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

【化 5】



は、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または1、2または3

20

【化 6】



がN - Hを含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は($C_1 \sim C_6$)アルキルと置き換わっていてもよく；

R_2 は、水素、または炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

R_3 は、- OH、- O - ($C_1 \sim C_6$)アルキル、- NH₂、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH(O - $C_1 \sim C_6$)アルキル)、- O - アラルキルであり、これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよく；

30

R_{4a} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル（炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい）であり；

R_{4b} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか（これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい）；または

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し（これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい）；

R_5 は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキルであり；

40

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、アリール、ヘテロアリール、($C_3 \sim C_7$)シクロアルキル、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、($C_2 \sim C_6$)アルケニルオキシ、($C_2 \sim C_6$)アルキニルオキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキルチオ、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルフィニル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニル、アミノ、($C_1 \sim C_6$)アルキルアミノ、ジ - [($C_1 \sim C_6$)アルキル]アミノ、ホルミル、- C(=O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- C(=N)($C_1 \sim C_6$)アルキル、カルボキシ、- CO₂($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CONH₂、- C(=N)NH₂、- C(=N)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- C(=N)N($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- CONH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CON(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- OC(O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、

50

- OC(O)NH_2 、- $\text{OC(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{OC(O)NH}((\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NHC(O)}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{NH} - \text{C(O)NH}_2$ 、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - C(O)NH_2 、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NH} - \text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NH} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルファモイル、 $\text{N}, \text{N} - \text{ジ} - [(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル]スルファモイル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルホニルアミノ、または - $\text{N} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルホニルアミノであり、これらは、炭素上に R_7 で置換されていてもよく；

R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルであり；

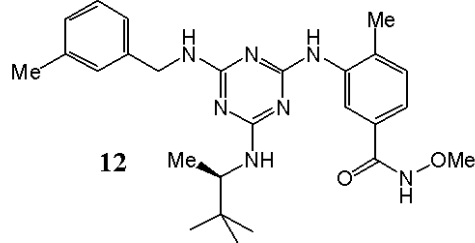
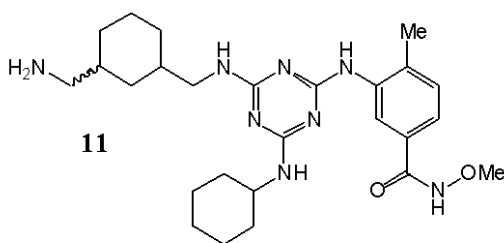
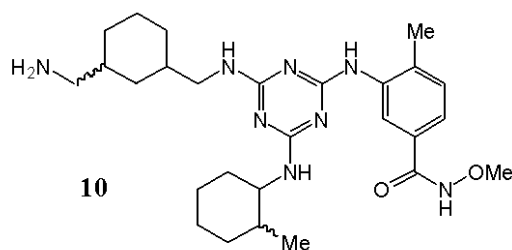
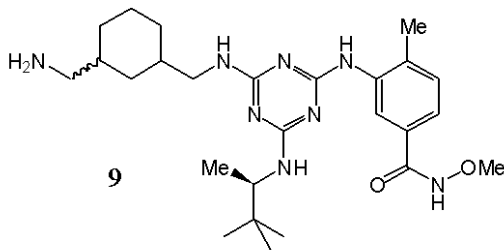
R_8 は、水素、ハロゲン、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルおよび $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルコキシから選択される]

で示される化合物またはその医薬上許容される塩を対象とする。

【0007】

本発明はまた、

【化7】



である化合物またはその医薬上許容される塩を対象とする。

【0008】

いくつかの態様では、本発明また、式 I または式 II で示される化合物および医薬上許容される担体を含む医薬組成物を対象とする。

【0009】

いくつかの態様では、本発明はまた、対象体または生物学的試料における p38 キナーゼ活性の阻害方法であって、式 I または式 II で示される化合物を該対象体に投与するかまたは生物学的試料に接触させて、結果として p38 キナーゼ活性が阻害されることを含む方法を対象とする。いくつかの態様では、本発明はまた、対象体における p38 キナーゼ媒介状態の治療方法であって、式 I または式 II で示される化合物を含む組成物を該対象体に投与して、結果として p38 キナーゼ媒介状態が治療されることを含む方法を対象とする。

【0010】

いくつかの態様では、本発明はまた、患者における p38 キナーゼ媒介状態を治療するための薬剤の製造のための式 I または式 II で示される化合物の使用を対象とする。いくつかの態様では、本発明はまた、患者における p38 媒介状態を治療するための薬剤の製造のための、式 I または式 II で示される化合物またはその医薬上許容される塩、および医薬上許容される担体を含む組成物の使用を対象とする。

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様では、本発明はまた、本明細書に、例えばスキーム 1 において、記載されるような化合物および組成物の製造方法を対象とする。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 】 図 1 は、(A) 化学的エラボレーションのための DNA 鎖とペンダントアミンとの間の共有結合を示す「ヘッドピース」の化学構造；(B) ケミカルディスプレイライブラリーの合成スキーム；(C) ヘッドピース、スパーサー、コード領域およびプライマーの略図；ならびに(D) ライブラリー分子の空間充填モデルを示す。「小分子」は、全分子量の 2 % 未満を占める。

10

【 図 2 】 図 2 は、ケミカルディスプレイライブラリーを照合する方法を示す。

【 図 3 】 図 3 は、以下のものを示す。(A) Spotfire (登録商標) Decision Site 8.1.1 (Spotfire U.S.、マサチューセッツ州サマービル) を使用して三次元で視たライブラリー集団。立方体の各軸は所定の合成サイクルで使用されるシントンを表している 9 1 2 個の位置からなっている；その結果として、7, 0 7 7, 0 8 8 個の成分の各々が立方体スペースにおける単一の点によって一意的に同定され得る；(B) ノー・ターゲット (No Target) 選択により得られた未選別集団；(C) 発生率が低い分子について選別した後の同集団。ランダムノイズが残っているだけである；(D) 方法 A を使用したオーロラ A キナーゼに対する選択により得られた未選別集団；(E) 発生率が低い分子について選別した後の同集団。6 - アミノキノリン・ファミリーが線で表される (上向き矢印)。7 - アザトリプトファン・ファミリーは、同平面を占めている一連の点によって表される (左向きの矢印)；(F) 方法 A を使用したオーロラ A キナーゼに対する独立的選択により得られた選別集団；(G) 方法 B を使用してオーロラ A キナーゼに対して濃縮された集団；(H) V X - 6 8 0 の存在下でオーロラ A に対する方法 A 選択により得られた集団；(I) 方法 A および B を使用した選択の結果を合わせたもの。合成され、試験された分子は、黒っぽく表示されており、数字を付して示されている；(J) p 3 8 M A P キナーゼに対する選択により濃縮された集団。選択された化合物は全て、サイクル 2 において公知の阻害剤の下部構造を共有する；(K) オーロラ A キナーゼ (薄いグレー) および p 3 8 M A P キナーゼ (濃いグレー) により選択された集団のオーバーレイ。

20

30

【 図 4 】 図 4 は、オーロラ A 選択 (1 ~ 8) および p 3 8 選択 (9 ~ 1 2) により得られた代表的な化合物の化学構造を示す。表は、2 つのキナーゼに対する化合物の IC_{50} 値を示す。プロットは、オーロラ A キナーゼに対する化合物 1 ~ 8 の阻害曲線を示す。

【 図 5 】 図 5 A ~ B は、本発明の代表的な実施態様の主要ピークの UV トレースおよびマススペクトルを示すグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、本発明の一の実施態様の精製ライブラリーの UV トレースである。

【 図 7 】 図 7 は、本発明の一の実施態様のライブラリーの生マススペクトログラムである。

【 図 8 】 図 8 は、本発明の一の実施態様のライブラリーのデコンボリュートされた質量である。

40

【 図 9 】 図 9 は、本発明の代表的な組成物の阻害パーセント対濃度を示すグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 3 】

(発明の詳細な説明)

定義

他に特記しない限り、以下の定義を使用する。

【 0 0 1 4 】

「ハロゲン」または「ハロ」は、フルオロ (F)、クロロ (Cl)、ブロモ (Br)、またはヨード (I) を意味する。

【 0 0 1 5 】

50

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「炭化水素」なる用語は、炭素原子 14 個までの炭素原子および水素原子だけを含む構造をいう。

【0016】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「炭化水素基」または「ヒドロカルビル」なる用語は、炭化水素から 1 個またはそれ以上の水素を取り除いた結果としての構造をいう。

【0017】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アルキル」なる用語は、1 ~ 約 12 個の炭素原子を含む一価の直鎖または分枝鎖炭化水素基をいう。

【0018】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アルキレン」なる用語は、2 つの構造と一緒に連結する役割を果たす、1 ~ 約 12 個の炭素原子を含む二価の直鎖または分枝鎖炭化水素基をいう。

【0019】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「シクロアルキル」なる用語は、少なくとも 3 個であって約 12 個までの炭素原子を含む飽和もしくは部分不飽和の一価の環含有炭化水素基をいう。

【0020】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アリール」なる用語は、芳香族性を有する 1 個またはそれ以上の多不飽和炭素環を有しており、5 個 ~ 約 14 個までの炭素原子を含む一価の炭化水素基をいう。

【0021】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「ヘテロサイクル」なる用語は、環構造の一部として N、O および S から独立して選択される 1 個またはそれ以上の多価ヘテロ原子を有しており、環中に少なくとも 3 個であって約 20 個までの原子を含む環含有構造または分子をいう。ヘテロサイクルは、飽和であっても、1 個またはそれ以上の二重結合を含有する不飽和であってもよく、また、ヘテロサイクルは、2 個以上の環を含有していてもよい。ヘテロサイクルが 2 個以上の環を含有する場合、これらの環は、縮合されていても、縮合されていなくてもよい。縮合環とは、一般的に、それらの間で 2 個の原子を共有する少なくとも 2 個の環をいう。ヘテロサイクルは、芳香族性を有していても、有していなくてもよい。

【0022】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「ヘテロサイクリック基」、「ヘテロサイクリック部分」、「ヘテロサイクリック」または「ヘテロシクロ」なる用語は、1 個またはそれ以上の水素を取り除くことによりヘテロサイクルから誘導された基をいう。

【0023】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「ヘテロサイクリル」なる用語は、1 個の水素を取り除くことによりヘテロサイクルから誘導された一価の基をいう。

【0024】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「ヘテロアリール」なる用語は、芳香族性を有するヘテロサイクリルをいう。

【0025】

ヘテロサイクルは、例えば、単環式ヘテロサイクル、例えば、アジリジン、オキシラン、チイラン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、ピロリジン、ピロリン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ジオキサラン、スルホラン、2,3 - ジヒドロフラン、2,5 - ジヒドロフラン、テトラヒドロフラン、チオファン、ピペリジン、1,2,3,6 - テトラヒドロ - ピリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ピラン、チオピラン、2,3 - ジヒドロピラン、テトラヒドロピラン、1,4 - ジヒドロピリジン、1,4 - ジオキサン、1,3 - ジオキサン、ジオキサン、ホモピペリジン、2,3,4,7 - テトラヒ

10

20

30

40

50

ドロ - 1 H - アゼピン、ホモピペラジン、1, 3 - ジオキセパン、4, 7 - ジヒドロ - 1, 3 - ジオキセピン、およびヘキサメチレンオキシドを包含する。

【0026】

さらに、ヘテロサイクルは、芳香族ヘテロサイクル（ヘテロアリアル基）、例えば、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、チオフエン、フラン、フラザン、ピロール、イミダゾール、チアゾール、オキサゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソオキサゾール、1, 2, 3 - トリアゾール、テトラゾール、1, 2, 3 - チアジアゾール、1, 2, 3 - オキサジアゾール、1, 2, 4 - トリアゾール、1, 2, 4 - チアジアゾール、1, 2, 4 - オキサジアゾール、1, 3, 4 - トリアゾール、1, 3, 4 - チアジアゾール、および1, 3, 4 - オキサジアゾールを包含する。

10

【0027】

さらに、ヘテロサイクルは、多環式ヘテロサイクル、例えば、インドール、インドリン、イソインドリン、キノリン、テトラヒドロキノリン、イソキノリン、テトラヒドロイソキノリン、1, 4 - ベンゾジオキサン、クマリン、ジヒドロクマリン、ベンゾフラン、2, 3 - ジヒドロベンゾフラン、イソベンゾフラン、クロメン、クロマン、イソクロマン、キサンテン、フェノキサチン、チアントレン、インドリジン、イソインドール、インダゾール、プリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、フェナントリジン、ペリミジン、フェナントロリン、フェナジン、フェノチアジン、フェノキサジン、1, 2 - ベンゾイソオキサゾール、ベンゾチオフエン、ベンゾオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾイミダゾール、ベンゾトリアゾール、チオキサンチン、カルバゾール、カルボリン、アクリジン、ピロリジジン、およびキノリジジンを包含する。

20

【0028】

上記多環式ヘテロサイクルに加えて、ヘテロサイクルは、2個またはそれ以上の環の間の環縮合が両方の環に共通している2つ以上の結合および両方の環に共通している3個以上の原子を含む多環式ヘテロサイクルを含む。かかる架橋ヘテロサイクルの例としては、キヌクリジン、ジアザビシクロ[2.2.1]ヘプタンおよび7 - オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンが挙げられる。

【0029】

ヘテロサイクリルは、例えば、単環式ヘテロサイクリル、例えば、アジリジニル、オキシラニル、チイラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ジオキサラニル、スルホラニル、2, 3 - ジヒドロフラニル、2, 5 - ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、チオフアニル、ペペリジニル、1, 2, 3, 6 - テトラヒドロ - ピリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピラニル、チオピラニル、2, 3 - ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、1, 4 - ジヒドロピリジニル、1, 4 - ジオキサニル、1, 3 - ジオキサニル、ジオキサニル、ホモピペリジニル、2, 3, 4, 7 - テトラヒドロ - 1 H - アゼピニル、ホモピペラジニル、1, 3 - ジオキセバニル、4, 7 - ジヒドロ - 1, 3 - ジオキセピニル、およびヘキサメチレンオキシジンを包含する。

30

【0030】

さらに、ヘテロサイクリルは、芳香族ヘテロサイクリルまたはヘテロアリアル、例えば、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、チエニル、フリル、フラザニル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、1, 2, 3 - トリアゾリル、テトラゾリル、1, 2, 3 - チアジアゾリル、1, 2, 3 - オキサジアゾリル、1, 2, 4 - トリアゾリル、1, 2, 4 - チアジアゾリル、1, 2, 4 - オキサジアゾリル、1, 3, 4 - トリアゾリル、1, 3, 4 - チアジアゾリル、および1, 3, 4 - オキサジアゾリルを包含する。

40

【0031】

さらに、ヘテロサイクリルは、多環式ヘテロサイクリル（芳香族または非芳香族の両方を含む）、例えば、インドリル、インドリニル、イソインドリニル、キノリニル、テトラ

50

ヒドロキノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、1,4-ベンゾジオキサニル、クマリニル、ジヒドロクマリニル、ベンゾフラニル、2,3-ジヒドロベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、クロマニル、イソクロマニル、キサンテニル、フェノキサチニル、チアントレニル、インドリジニル、イソインドリル、インダゾリル、プリニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、フェナントリジニル、ペリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、1,2-ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、チオキサントニル、カルバゾリル、カルボリニル、アクリジニル、ピロリジニル、およびキノリジニルを包含する。

10

【0032】

上記多環式ヘテロサイクリルに加えて、ヘテロサイクリルは、2個またはそれ以上の環の間の環縮合が両方の環に共通している2つ以上の結合および両方の環に共通している3個以上の原子を含む多環式ヘテロサイクリルを包含する。かかる架橋ヘテロサイクリルの例としては、キヌクリジニル、ジアザピシクロ[2.2.1]ヘプチル；および7-オキサピシクロ[2.2.1]ヘプチルが挙げられる。

【0033】

接頭辞として使用される「6員」なる用語は、6個の環原子を含有する環を有する基をいう。

20

【0034】

接頭辞として使用される「5員」なる用語は、5個の環原子を含有する環を有する基をいう。

【0035】

5員ヘテロアリアル環は、5個の環原子（ここで、1、2または3個の環原子は、独立して、N、OおよびSから選択される）を有する環を有するヘテロアリアルである。代表的な5員環ヘテロアリアルは、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、1,2,3-トリアゾリル、テトラゾリル、1,2,3-チアジアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,3,4-トリアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、および1,3,4-オキサジアゾリルである。

30

【0036】

6員環ヘテロアリアルは、6個の環原子（ここで、1、2または3個の環原子は、独立して、N、OおよびSから選択される）を有する環を有するヘテロアリアルである。代表的な6員環ヘテロアリアルは、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、トリアジニルおよびピリダジニルである。

【0037】

「アラルキル」なる用語は、アリアル基で置換されているアルキル基をいう。

【0038】

「ヘテロアラルキル」なる用語は、ヘテロアリアル基で置換されているアルキル基をいう。

40

【0039】

他に特記しない限り、「置換されている」なる用語は、接頭辞として用いられる場合には、1個またはそれ以上の水素が1個またはそれ以上のアルキル基、またはN、O、S、F、Cl、Br、I、およびPから選択される1個またはそれ以上のヘテロ原子を含有する1個またはそれ以上の化学基と置き換わっている、構造、分子または基をいう。1個またはそれ以上のヘテロ原子を含有する代表的な化学基としては、ヘテロサイクリル、-NO₂、-O-アルキル、ハロ、-CF₃、-CO₂H、-CO₂R、-NH₂、-SH、-NHR、-NR₂、-SR、-SO₃H、-SO₂R、-S(O)R、-CN、-OH、-C(O)NR₂、-NRC(O)R、オキソ(=O)、イミノ(=NR)、チオ(=S)、およ

50

び オキシイミノ (= N - O R) (ここで、各「R」は、上記で定義したアルキルである) が挙げられる。例えば、置換フェニルは、ニトロフェニル、ピリジルフェニル、メトキシフェニル、クロロフェニル、アミノフェニルなどを行うことができる(ここで、該ニトロ、ピリジル、メトキシ、クロロ、およびアミノ基は、フェニル環上の適当な水素と置き換わることができる)。

【0040】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アルコキシ」なる用語は、一般的な - O - アルキルで示される基をいう。代表的なアルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、*t*-ブトキシ、イソブトキシ、シクロプロピルメトキシ、アリルオキシ、およびプロパルギルオキシが挙げられる。

10

【0041】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アミン」または「アミノ」なる用語は、- NH₂をいう

【0042】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アルキルアミノ」なる用語は、- NH(アルキル)をいう。

【0043】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「ジアルキルアミノ」なる用語は、- NH(アルキル)₂をいう。

【0044】

単独でまたは接尾辞もしくは接頭辞として使用される「アシル」は、- C(O) - R (ここで、Rは、水素、ヒドロキシル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、またはアルコキシであり、これらは、上記「置換されている」の定義によって規定されているように置換されていてもよい)を意味する。アシル基としては、例えば、アセチル、プロピオニル、ベンゾイル、フェニルアセチル、カルボエトキシ、およびジメチルカルバモイルが挙げられる。

20

【0045】

本発明の化合物には、エナンチオマー、ジアステレオマーおよび幾何異性体を包含する立体異性体として存在するものがある。(R)、(S)、エピマー、ジアステレオマー、シス、トランス、syn、anti、溶媒和物(水和物を含む)、互変異性体、およびその混合物を包含するこれらの形態はすべて、本発明の化合物において意図される。

30

【0046】

本発明はまた、本発明の化合物の塩、特に、医薬上許容される塩に関する。「医薬上許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、かつ、望ましくない毒物学的効果をもたらさない塩である。該塩は、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸および同類のもの；酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、安息香酸、パモン酸、アルギン酸、メタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸および同類のもののような適当な酸との塩であり得る。また、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、リチウム、亜鉛、銅、バリウム、ビスマス、カルシウムおよび同類のもののような陽イオンの塩；またはテトラアルキルアンモニウム陽イオンおよびトリアルキルアンモニウム陽イオンのような有機陽イオンの塩が挙げられる。

40

【0047】

上記の塩の組合せもまた有用である。トリフルオロ酢酸、クロロ酢酸、およびトリクロロ酢酸との塩のような他の酸および/または陽イオンの塩もまた包含される。

【0048】

本発明はまた、本発明の化合物の種々の結晶形態、水和物、および溶媒和物にも関する。

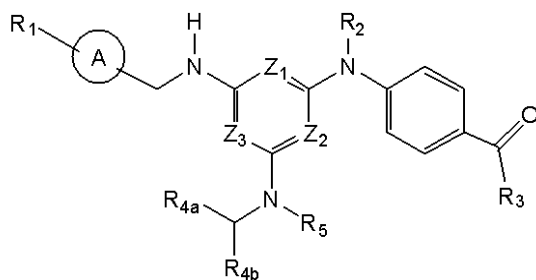
【0049】

本発明の化合物

一の実施態様では、本発明は、式 I :

50

【化 8】



(I)

10

[式中、

Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立して、C - RまたはNであり、ここで、Rは、H、($C_1 \sim C_6$)アルキル、ハロ、CN、または($C_1 \sim C_6$)アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて - OH、ハロまたは($C_1 \sim C_6$)アルキルで置換されていてもよく；

R_1 は、1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

【化 9】



は、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または1、2または3

20

【化 10】



がN - Hを含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は($C_1 \sim C_6$)アルキルと置き換わっていてもよく；

R_2 は、水素、または炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい($C_1 \sim C_6$)アルキルであり；

R_3 は、- OH、- O - ($C_1 \sim C_6$)アルキル、- NH₂、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- NH(O - $C_1 \sim C_6$)アルキル)、- O - アラルキルであり、これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよく；

30

R_{4a} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル(炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)であり；

R_{4b} は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)；または

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、($C_3 \sim C_6$)シクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し(これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい)；

R_5 は、水素、($C_1 \sim C_6$)アルキル、または($C_3 \sim C_6$)シクロアルキルであり；

40

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、- NH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- N(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、アリール、ヘテロアリール、($C_3 \sim C_7$)シクロアルキル、($C_1 \sim C_6$)アルキル、($C_2 \sim C_6$)アルケニル、($C_2 \sim C_6$)アルキニル、($C_1 \sim C_6$)アルコキシ、($C_2 \sim C_6$)アルケニルオキシ、($C_2 \sim C_6$)アルキニルオキシ、($C_1 \sim C_6$)アルキルチオ、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルフィニル、($C_1 \sim C_6$)アルキルスルホニル、アミノ、($C_1 \sim C_6$)アルキルアミノ、ジ - [($C_1 \sim C_6$)アルキル]アミノ、ホルミル、- C(=O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、- C(=N)($C_1 \sim C_6$)アルキル、カルボキシ、- CO₂($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CONH₂、- C(=N)NH₂、- C(=N)NH($C_1 \sim C_6$)アルキル)、- C(=N)N($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- CONH($C_1 \sim C_6$)アルキル、- CON(($C_1 \sim C_6$)アルキル)₂、- OC(O)($C_1 \sim C_6$)アルキル、

50

- OC(O)NH_2 、- $\text{OC(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{OC(O)NH}((\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NHC(O)}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{NH} - \text{C(O)NH}_2$ 、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - C(O)NH_2 、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、- $\text{N}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $\text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NH} - \text{C(O)NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、- $\text{NH} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルファモイル、 $\text{N}, \text{N} - \text{ジ} - [(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル]スルファモイル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルホニルアミノ、または - $\text{N} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル - $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルスルホニルアミノであり、これらは、炭素上にて R_7 で置換されていてもよく；

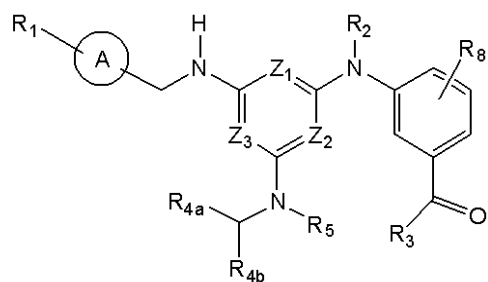
R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルである]
で示される化合物またはその医薬上許容される塩を対象とする。

10

【0050】

いくつかの実施態様では、本発明は、式 I I :

【化11】



(I I)

20

[式中、

Z_1 、 Z_2 および Z_3 は、各々独立して、 $\text{C} - \text{R}$ または N であり、ここで、 R は、 H 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、ハロ、 CN 、または $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルコキシであり、これらは各々、炭素上にて $-\text{OH}$ 、ハロまたは $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルで置換されていてもよく；

R_1 は、1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルであり；

【化12】

30



は、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい、 $(\text{C}_3 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル、アリール、ヘテロサイクリル、またはヘテロアリールであるか；または1、2または3

【化13】



が $\text{N} - \text{H}$ を含有するヘテロサイクリルまたはヘテロアリールである場合、この水素は $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルと置き換わっていてもよく；

R_2 は、水素、または炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキルであり；

40

R_3 は、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{O} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル)、 $-\text{N}((\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{NH}(\text{O} - \text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル)、 $-\text{O} - \text{アラルキル}$ であり、これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよく；

R_{4a} は、水素、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、または $(\text{C}_3 \sim \text{C}_6)$ シクロアルキル（炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい）であり；

R_{4b} は、水素、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6)$ アルキル、 $(\text{C}_2 \sim \text{C}_6)$ アルケニル、 $(\text{C}_2 \sim \text{C}_6)$ アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、またはヘテロアラルキルであるか（これらは、炭素上にて1、2または3個の R_6 で置換されていてもよい）；または

R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、 $(\text{C}_3 \sim \text{C}_6)$ シクロアル

50

キル、アリールまたはヘテロアリール基を形成し（これらは、炭素上にて 1、2 または 3 個の R_6 で置換されていてもよい）；

R_5 は、水素、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、または $(C_3 \sim C_6)$ シクロアルキルであり；

R_6 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、アミノ、 $-NH(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $-N((C_1 \sim C_6) \text{ アルキル})_2$ 、アリール、ヘテロアリール、 $(C_3 \sim C_7)$ シクロアルキル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $(C_2 \sim C_6)$ アルケニル、 $(C_2 \sim C_6)$ アルキニル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシ、 $(C_2 \sim C_6)$ アルケニルオキシ、 $(C_2 \sim C_6)$ アルキニルオキシ、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルチオ、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルフィニル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルスルホニル、アミノ、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ、ジ- $[(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}]$ アミノ、ホルミル、 $-C(=O)(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-C(=N)(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、カルボキシ、 $-CO_2(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-CONH_2$ 、 $-C(=N)NH_2$ 、 $-C(=N)NH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-C(=N)N(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}_2$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-CON((C_1 \sim C_6) \text{ アルキル})_2$ 、 $-OC(O)(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-OC(O)NH_2$ 、 $-OC(O)NH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-OC(O)NH((C_1 \sim C_6) \text{ アルキル})_2$ 、 $-NHC(O)(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-N(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}-C(O)(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-NH-C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}-C(O)NH_2$ 、 $-N(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}-C(O)NH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}$ 、 $-N(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}-C(O)NH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}_2$ 、 $-NH-C(O)NH(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}_2$ 、 $-NH-(C_1 \sim C_6) \text{ アルキルスルファモイル}$ 、 N,N -ジ- $[(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}]$ スルファモイル、 $(C_1 \sim C_6) \text{ アルキルスルホニルアミノ}$ 、または $-N-(C_1 \sim C_6) \text{ アルキル}-(C_1 \sim C_6) \text{ アルキルスルホニルアミノ}$ であり、これらは、炭素上にて R_7 で置換されていてもよく；

R_7 は、ハロゲン、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシ、シアノ、ニトロ、またはヒドロキシルであり；

R_8 は、水素、ハロゲン、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルおよび $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシから選択される]

で示される化合物またはその医薬上許容される塩を対象とする。

【0051】

いくつかの実施態様では、 Z_1 は N である。他の実施態様では、 Z_1 は C - H である。

【0052】

いくつかの実施態様では、 Z_2 は N である。他の実施態様では、 Z_1 は C - H である。

【0053】

いくつかの実施態様では、 Z_3 は N である。他の実施態様では、 Z_1 は C - H である。

【0054】

いくつかの実施態様では、 R_1 はメチルである。他の実施態様では、 R_1 は $NH_2 - CH_2$ である。

【0055】

いくつかの実施態様では、

【化14】



はシクロヘキシルである。他の実施態様では、

【化15】



はシクロペンチルである。他の実施態様では、

【化16】



はシクロブチルである。他の実施態様では、

10

20

30

40

【化 17】

(A)

はシクロプロピルである。他の実施態様では、

【化 18】

(A)

はフェニルである。他の実施態様では、

【化 19】

(A)

はピリジルである。

10

【0056】

いくつかの実施態様では、 R_2 は水素である。他の実施態様では、 R_2 はメチルである。

【0057】

いくつかの実施態様では、 R_3 は - OH である。他の実施態様では、 R_3 は - OMe である。他の実施態様では、 R_3 は - OEt である。他の実施態様では、 R_3 は - NH₂ である。他の実施態様では、 R_3 は - NHMe である。他の実施態様では、 R_3 は - NMe₂ である。他の実施態様では、 R_3 は - NH - OMe である。

20

【0058】

いくつかの実施態様では、 R_{4a} は水素である。他の実施態様では、 R_{4a} はメチルである。他の実施態様では、 R_{4b} は水素である。他の実施態様では、 R_{4b} はメチルである。他の実施態様では、 R_{4b} はエチルである。他の実施態様では、 R_{4b} は、n - プロピルおよびイソプロピルを包含するプロピルである。他の実施態様では、 R_{4b} は、n - ブチル、sec - ブチル、tert - ブチルを包含するブチルである。他の実施態様では、 R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、シクロヘキシルおよびメチル - 置換シクロヘキシルである。他の実施態様では、 R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、シクロペンチルである。他の実施態様では、 R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、シクロブチルである。他の実施態様では、 R_{4a} および R_{4b} は、それらが結合している炭素と一緒に、シクロプロピルである。

30

【0059】

いくつかの実施態様では、 R_5 は水素である。他の実施態様では、 R_5 はメチルである。他の実施態様では、 R_5 はシクロヘキシルである。

【0060】

いくつかの実施態様では、 R_6 はクロロである。他の実施態様では、 R_6 はフルオロである。他の実施態様では、 R_6 はトリフルオロメチルである。他の実施態様では、 R_6 はトリフルオロメトキシである。他の実施態様では、 R_6 はシアノである。他の実施態様では、 R_6 はニトロである。他の実施態様では、 R_6 はヒドロキシルである。他の実施態様では、 R_6 はアミノである。他の実施態様では、 R_6 はメチルである。

40

【0061】

いくつかの実施態様では、 R_7 はクロロである。他の実施態様では、 R_7 はフルオロである。他の実施態様では、 R_7 はトリフルオロメチルである。他の実施態様では、 R_7 はトリフルオロメトキシである。他の実施態様では、 R_7 はシアノである。他の実施態様では、 R_7 はニトロである。他の実施態様では、 R_7 はヒドロキシルである。

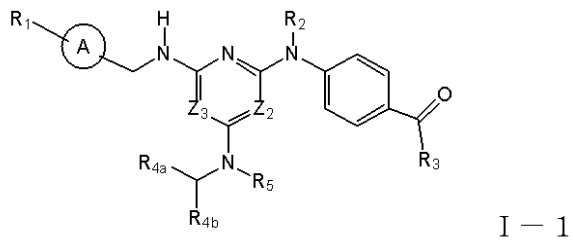
【0062】

いくつかの実施態様では、 R_8 はメチルである。いくつかの実施態様では、 R_8 は水素である。

【0063】

いくつかの実施態様では、本発明の化合物は、式 I - 1 :

【化 2 0】



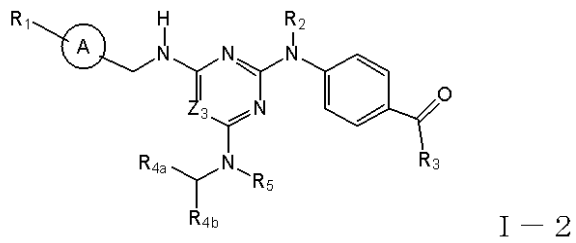
で示される化合物である。

10

【 0 0 6 4】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I - 2 :

【化 2 1】



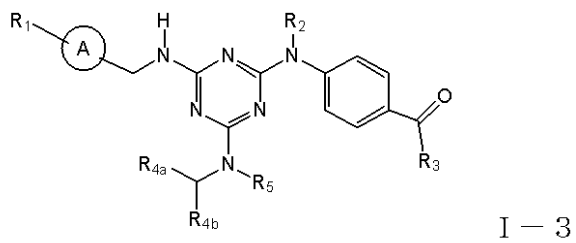
20

で示される化合物である。

【 0 0 6 5】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I - 3 :

【化 2 2】



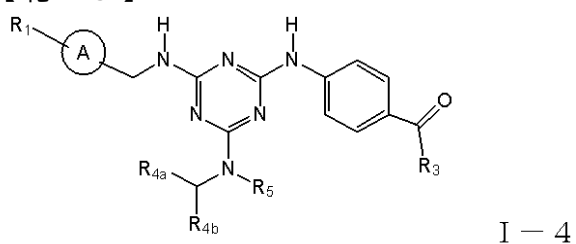
30

で示される化合物である。

【 0 0 6 6】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I - 4 :

【化 2 3】



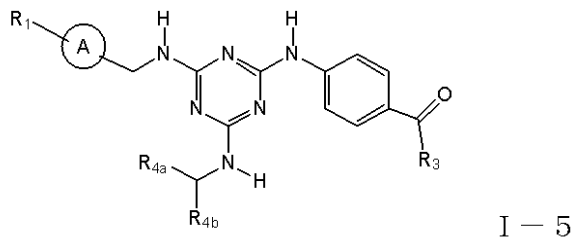
40

で示される化合物である。

【 0 0 6 7】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I - 5 :

【化 2 4】



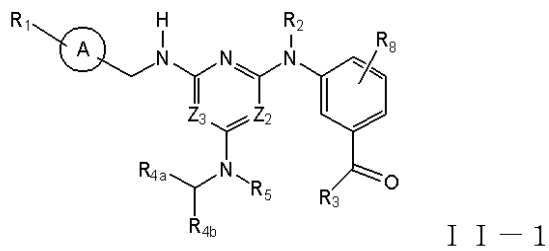
で示される化合物である。

10

【0068】

いくつかの実施態様では、本発明の化合物は、式 I I - 1 :

【化 2 5】



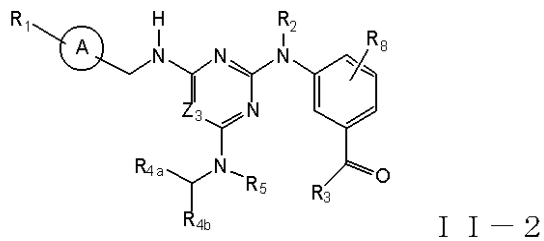
20

で示される化合物である。

【0069】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I I - 2 :

【化 2 6】



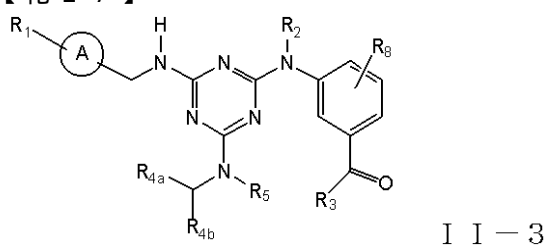
30

で示される化合物である。

【0070】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I I - 3 :

【化 2 7】



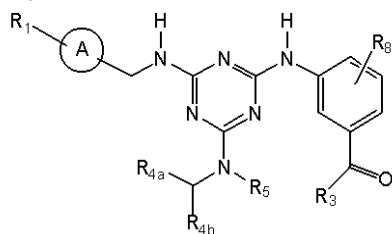
40

で示される化合物である。

【0071】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 I I - 4 :

【化 28】



II - 4

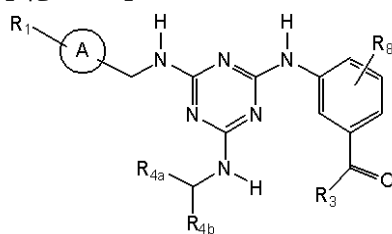
で示される化合物である。

10

【0072】

他の実施態様では、本発明の化合物は、式 II - 5 :

【化 29】



II - 5

20

で示される化合物である。

【0073】

本発明の化合物の同定および製造

7,000,000を超えるメンバーを含むDNAコード化小分子ライブラリーから本発明の化合物を同定した。概括的な注釈として、極めて大規模な小分子のライブラリーを創造しスクリーンする能力は、新しい化合物の同定に関する念願の目標であった。この構想を達成する方法として、1980年代および1990年代初期にコンビナトリアル・ケミストリーが開発され受け入れられたが、小さい混合物からでさえ活性成分を同定するのに利用可能な無益な方法が大いに起因して支持が減った (P. Landers, "Drug Industry's Big Push Into Technology Falls Short," Wall Street Journal, Feb. 24, 2004)。一方、同じ時代に、ペプチドおよびタンパク質に由来する療法の発見へのロバストでかつ有益な取り組みとしてコンビナトリアル生物学的方法が現れた (N. Scheinfeld, J. Drugs Dermatol. 2, 375 (2003); J.-H. Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 18902 (2005))。これらの生化学的技術の成功は、複雑な混合物をデコンボリユートするための核酸ベースのコード化スキームの顕著な使用が大いに起因した。

30

【0074】

コンビナトリアル・ケミストリーに関するデコンボリューション問題に取り組むために、ペプチドライブラリーに関するいくつかのグループによって、核酸をベースとする標識法が開発された (S. Brenner, R. A. Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5381 (1992); S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378 (1990); D. R. Halpin, J. A. Lee, S. J. Wrenn, P. B. Harbury, PLoS Biology, 2, 1031 (2004); S. Wilson, A. D. Keefe, J. W. Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750 (2001); A. Frankel, S. Li, S. R. Starck, R. W. Roberts, Curr. Opin. Struct. Biol. 13, 506 (2003))。最近では、化学反応を駆動するための鋳型としてDNAを利用する方法が開発されており、その結果、DNAで標識される小分子ライブラリーを生成することができるようになった (X. Li, D. R. Liu, Angew. Chem. Int. Ed. 43, 4848 (2004))。これらの進歩にもかかわらず、核酸標識化を使用して大規模な小分子のライブラリーを創造し、スクリーンし、デコンボリユートする能力は制限されていた。

40

50

【 0 0 7 5 】

核酸コード化スキームを使用して、7,077,888個の成分からなる小分子ライブラリーが開発された（以下、「ケミカルディスプレイライブラリー」と呼ぶ）。該ライブラリーは、化学的合成法と酵素的合成法を組み合わせ使用して構築されており、図2に示すように、アフィニティーに基づく捕獲を使用して、オーロラAキナーゼおよびp38MAPキナーゼ（医薬的に重要なターゲット）に対してスクリーンされた。該アフィニティー工程の後に、結合分子をコードする核酸をPCRにより増幅した。ウルトラハイスループットDNA配列決定法を用いてデコンボリューションが行われた。配列決定データの解析および翻訳は、ターゲット酵素と結合した推定構造体のファミリーを同定した。これらの分子は、DNA標識を用いずに合成され、慣用の生化学的および細胞ベースの方法を使用して試験された。これらの研究は、ケミカルディスプレイライブラリーが2つのキナーゼの新規な阻害剤を同定する能力を立証した。特に、該ライブラリースクリーンから直接、構造活性相関（SAR）が得られた。

10

【 0 0 7 6 】

ケミカルディスプレイライブラリーの構築

ケミカルディスプレイライブラリーの作成のためのスキームを図2に示す。ライブラリー合成のための前駆体（「ヘッドピース」と称される）は、短い共有結合DNA二本鎖であった（アイオワ州コーラルビルIDT, Inc.から購入）（ここで、共有結合性リンカーは、スパーサー鎖にぶら下がっている第一級アミンを含んでいた）。相補DNA鎖間の共有結合は、鎖交換を伴わずにライブラリー合成の間に用いられる高温化学反応を可能にするように特異的に選択された。ヘッドピースは、6組の塩基対および二塩基不對3'オーバーハングを含有していた。該オーバーハングは、さらなるDNAコード種のライゲーションのための基質を提供する（Y. Kinoshita K. Nishigaki. Nucleic Acids Symposium Series No. 34, Oxford University Press, 1995, pp 201-202）。DNAから距離を置いて化学合成の位置を定めるために、さらなる16原子スパーサー鎖をもって該ヘッドピースを付加した。さらに、ライブラリー合成の前に、PCRのためのプライマー配列としての役割を果たすために20bp配列を該ヘッドピースにライゲートした。

20

【 0 0 7 7 】

該ライブラリーの作成に用いたDNA標識は、合成、選択および配列決定の間に最適な特性を有するように設計された。該標識は、一定のG/C含量を含有しており、その結果、全てのライブラリーメンバーは、同様の融解温度を有した。オーバーハング配列は、各サイクルに特有のものであって、その結果、各標識セットは、先行サイクルからのセットとだけライゲートすることができ、切断配列とはライゲートすることができなかった。

30

【 0 0 7 8 】

該ライブラリーの化学的多様性要素（本明細書では、「シントロン」という）は、いくつかの基準を念頭に置いて選択された。サイクル1で使用されるFmoc-アミノ酸ならびにサイクル2および3で使用されるアミンは、全て、商業的に入手可能であり、ニトロ基のような毒性または変異原性官能基を含まなかった。該ライブラリーにおいては、高収率で反応することが立証されたシントロンだけが許された。各潜在的シントロンを1種類またはそれ以上の代表的な反応で試験し、実施例のセクションに示されるように80%またはそれ以上の変換をもたらしたもののだけが含まれた。400種類を超えるFmoc-アミノ酸を求電子試薬および求核試薬として試験して、サイクル1で192個のシントロンを得た。1000種類を超えるアミンを試験して、サイクル2およびサイクル3のアミンセットを得た。p38MAPキナーゼの阻害剤がライブラリー中に存在する可能性を増加させるために、サイクル2では3-アミノ-4-メチル-N-メトキシベンズアミドを含んだ（K. Leftheris, et. al. J. Med. Chem. 47, 6283 (2004)）。

40

【 0 0 7 9 】

該合成を行うためにスプリット・アンド・プール法の溶液変種を用いた。かくして、合成の第一サイクルを以下のとおり行った：修飾ヘッドピース20μmolをライゲーション・バッファーに溶解し、4つの96ウェルプレート中に整列させた。各ウェルに384

50

個の特有の二本鎖DNA標識の1つを移した(各々、出発二本鎖に対して相補的な二塩基3'オーバーハング、および次の標識とアニール化するための別の3'オーバーハングを含有していた)。各標識をヘッドピースの2倍過剰で加えた。酵素的ライゲーションを行い、ゲル電気泳動法によって確認した。次いで、伸長したDNAをエタノールの添加によって沈殿させた。遠心分離後、整列したDNAペレットを反応バッファー(pH 9.5、15 mM ボラート)に溶解した。次いで、各ウェルに50倍過剰の192種類のFmoc保護アミノ酸の1つ(1つのシントンのにつき2つのウェル)およびカップリング試薬を添加した。逆相HPLC/エレクトロスプレー質量分析法により、該化学反応をモニターした(Y. Kinoshita K. Nishigaki. Nucleic Acids Symposium Series No. 34, Oxford University Press, 1995, pp 201-202; M. Hail, B. Elliot, K. Anderson, Amer. Biotech. Laboratory, January 2004, p.12)。

10

【0080】

完了後、ウェルをプールし、逆相液体クロマトグラフィーによりライブラリーを精製した。この方法で、コード化標識配列とシントンの間で特有の一致が確立された。各シントンは、2つの標識配列によってコードされた;かかる二重標識化は、その後のPCRバイアスをモニターする一手段として用いられた。その後の2回の合成サイクルは、異なる合成化学を用いるが、操作的には最初の合成サイクルと同様であった。該合成の注目すべき一の様態は、サイクル3の反応が80%で行われたことである。実施例に示すように、比較的厳しい反応条件下でもDNA損傷は観察されなかった。

【0081】

20

図1Bにまとめて記載するように、合成の各サイクルで192個のシントンの使用し、最終収量3.9 μmol (19%)を得た(260 nmで光学密度により測定した)。7, 077, 888成分ライブラリーにおいて得られた小分子は、各々、特有の53 bp DNA二本鎖に結合していた。アフィニティー選択の前に、該ライブラリーのアリコートに密接なプライマー配列とライゲートした。該プライマーは、縮重領域を含有しており、その後の増幅および配列決定の間にPCR複製を評価するために用いられた。

【0082】

P38に対するアフィニティー選択

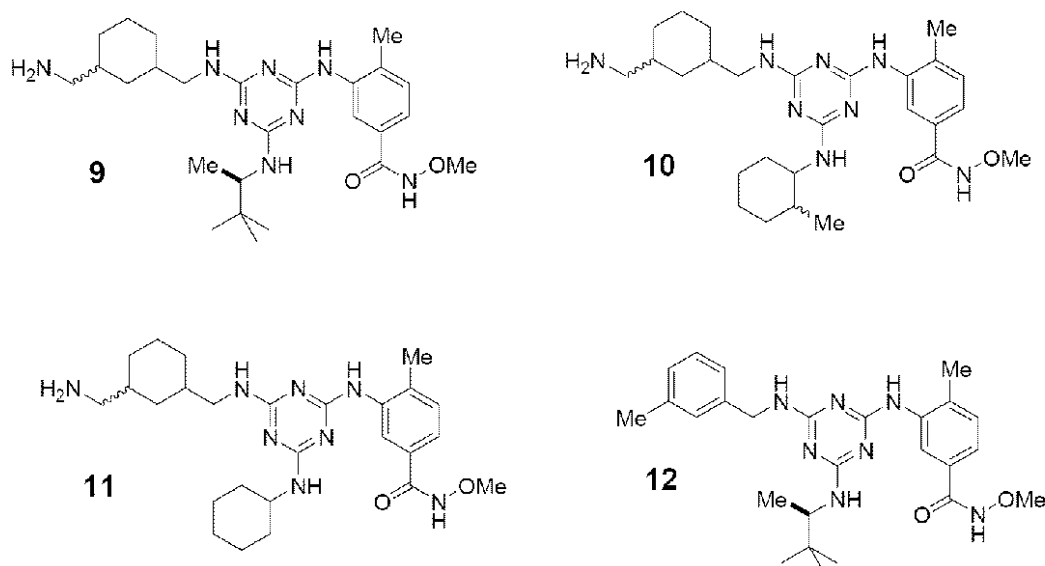
本明細書に記載のケミカルディスプレイライブラリー法を使用してp38 MAPキナーゼの阻害物質を同定した。トリアジン骨格に基づくp38 MAPキナーゼの阻害剤は記載されている(K. Leftheris, et. al. J. Med. Chem. 47, 6283 (2004))。6His標識p38 MAPキナーゼに対する該ライブラリーの選択、次いで、PCRおよびDNA配列決定により、ファミリー内に属する数千個の分子を同定した(図3J)。該方法を使用して同定されたP38 MAPキナーゼ阻害剤は、スキーム1に記載する化合物を包含する。

30

【0083】

【化 3 0】

スキーム 1



10

【 0 0 8 4】

20

トリアジン上における 3 - アミノベンズアミド誘導体での置換は、阻害にとって非常に重大であることは従前に分かっており、実際に、選択された集団は、サイクル 2 におけるシントン、3 - アミノ - 4 - メチル - N - メトキシベンズアミドに支配されていた。加えて、トリアジン上での第 2 の置換基としては短い分枝アルキルアミンが好ましく、第 3 の置換基としてはジアミンが好ましいことが分かった。

【 0 0 8 5】

このファミリーのいくつかのメンバーの合成によって、p 3 8 M A P キナーゼの強力な阻害剤であり ($IC_{50} = 4 \sim 10 \text{ nM}$ 、図 4)、L P S 刺激ヒト単球からの T N F - の分泌を阻害した化合物が得られた。例えば、化合物 9 は 33 nM の EC_{50} を有しており、一方、化合物 10、11 および 12 は、それぞれ、 22 nM 、 11 nM および 122 nM の EC_{50} 値を有していた。ライブラリー選択によって定義された S A R は、概して先の報告と一致した。加えて、選択された化合物の効力は、慣用的な医薬化学法によって得られたものと比べて遜色なかった (K. Leftheris, et. al. J. Med. Chem. 47, 6283 (2004))。

30

【 0 0 8 6】

オーロラ A キナーゼに対するアフィニティー選択

ケミカルディスプレイライブラリーにオーロラ A キナーゼに対するアフィニティー選択を行った (E. Harrington, et. al., Nature Med. 10, 262 (2004))。選択条件を実証するために、オーロラ A の公知の阻害剤である V X - 6 8 0 の誘導体を合成し、特異的標識化 D N A 二本鎖と結合させた (J.-D. Charrier, F. Mazzei, D. Kay, A. Miller, W O 2 0 0 4 / 0 0 0 8 3)。コード化したポジティブコントロール分子は、ターゲットキナーゼに対するアフィニティーを保持することが立証され (データは示さない)、他の 7 0 0 万個の分子の濃度と同等の濃度にてケミカルディスプレイライブラリーで希釈された。

40

【 0 0 8 7】

2 つのアフィニティー選択法を調べた。方法 A では、ライブラリーのアリコート (5 nM の全ライブラリー、またはライブラリーメンバー 1 つにつき 700 aM 、ポジティブコントロールを含む) を選択バッファー $60 \mu\text{L}$ 中にて 6 Hi s 標識化オーロラ A キナーゼタンパク質 (30 pM) と一緒にインキュベートした。該 D N A のターゲットとの非特異的会合を最小限にするために、該バッファー中には遮断薬 (剪断されたサケ精子 D N A、ウシ血清アルブミン) が含まれていた。次いで、ターゲットおよびターゲ

50

ット結合ライブラリーメンバーを磁気 I M A C (固定化金属アフィニティークロマトグラフィー) ピーズ上で捕獲した。方法 B では、まず、該タンパク質を飽和濃度 (理論値約 9 0 0 p m o l) で I M A C ピペットチップ (5 μ L、Phynexus, Inc.) 上に固定化した。次いで、捕獲されたターゲットを選択バッファー中にてライブラリーと一緒にインキュベートした。両方の方法では、洗浄により非結合ライブラリーメンバーを取り除き、結合した集団をタンパク質ターゲットの熱変性によって回収した。次いで、回収した集団に対してさらに 2 回のアフィニティー選択のサイクルを行った。アフィニティー選択のサイクルの回数は、P C R および配列決定のための分子の産出量、ならびに潜在的 S A R 分析のための低および高アフィニティー分子を保持するという要求に基づいて経験的に決定した。対照として、対応する選択をオーロラ A キナーゼの存在無しで行った (ノー・ターゲット・コントロール) 。最終的な濃縮集団に P C R を行い、増幅したアウトプットを配列決定した (M. Margulies, et. al., Nature 437, 26(2005)) 。

10

【 0 0 8 8 】

3 回のアフィニティー選択サイクルの後に得られた濃縮ライブラリー集団は、典型的には、選択のストリンジェンシーに依存して、 $10^4 \sim 10^6$ 個のメンバーからなっていた。慣用の配列決定技術は、かかる多量の D N A 配列を調査することはできない。したがって、ウルトラハイスループット配列決定技術を使用した；選択試料 1 つにつき約 5 0 , 0 0 0 個の独立した配列を評価した。

【 0 0 8 9 】

未選択ライブラリーとオーロラ A 選択による増幅したアウトプットとの比較により、方法 A を用いて選択を 3 回行った後、ポジティブコントロールの 1 0 0 , 0 0 0 倍の濃縮が明らかになった。ポジティブコントロールは $1 : 7 \times 10^6$ の割合でスパイクされた。選択を 3 回行った後、ポジティブコントロールは、6 6 , 2 0 1 個の配列中に 9 7 1 回、または $1 : 70$ の割合で観察された。これは、1 0 0 , 0 0 0 倍の濃縮に想到する。この結果は、酵素が選択の間にその活性コンフォメーションを保持していることを示した；その結果として、次に、濃縮ライブラリー集団を試験した。

20

【 0 0 9 0 】

これらの実験からそれらのコード化分子への配列の翻訳は、多くの濃縮分子が構造的に関連しており、しばしば 1 または 2 個のシント (図 3 におけるグラフにて面または線として表されている) を享有することを示した。図 3 E および 3 F は、方法 A を用いる 2 つの独立した選択の後のライブラリー集団を示す。選択された集団の分析は、ノー・ターゲット・コントロールと比べて高い頻度で生じた分子のファミリーを明らかにした。2 つの実験の間に良好な再現性があり、選択された分子の 6 3 % が両方の集団において生じた。方法 B を用いて得られた濃縮集団が図 3 G に示される。図 3 E および 3 F に示されるものと構造的に酷似しているものがある化合物のファミリーを再び選択した。別の実験では、V X - 6 8 0 ($10 \sim 50 \mu$ M、D N A と共有結合していない) の存在下でオーロラキナーゼと一緒にアフィニティー選択を繰り返した (方法 A を使用) 。この集団の P C R、配列決定およびデータ解析は、濃縮ファミリーが識別できなかったことを示した (図 3 H) 。この実験は、選択されたファミリーの構造が V X - 6 8 0 としてオーロラキナーゼの同様の部位と結合することができることを示した。

30

40

【 0 0 9 1 】

P 3 8 阻害剤とオーロラキナーゼ阻害剤との比較

p 3 8 M A P およびオーロラ A キナーゼの両方に対するケミカルディスプレイライブラリーの選択による結果は、図 3 K に重ねて示される。これらのデータは、各キナーゼに関して選択されたファミリーが重複しなかったことを示しており、選択性についての可能性を示唆している。各ファミリーのメンバーについてのキナーゼ阻害能を表 1 に示しており、アッセイの濃度範囲内では、阻害活性の重複がないことが明らかである。p 3 8 阻害剤は、オーロラ A の阻害を示さず ($> 10,000$ の選択性比)、オーロラ阻害剤は、p 3 8 を阻害しない (少なくとも $10 \sim 200$ の選択性比) 。

【 0 0 9 2 】

50

医薬製剤

本発明のさらなる態様によると、式（Ⅰ）で示される化合物またはその医薬上許容される塩を医薬上許容される希釈剤または担体と一緒に含む医薬組成物が提供される。

【0093】

本発明の組成物は、経口使用に適した剤形（例えば、錠剤、ロゼンジ剤、ハードもしくはソフトカプセル剤、水性もしくは油性懸濁剤、乳剤、分散可能な散剤もしくは顆粒剤、シロップ剤、またはエリキシル剤）、局所使用に適した剤形（例えば、クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤、または水性もしくは油性液剤もしくは懸濁剤）、吸入による投与に適した製剤（例えば、微粉または液体エアゾール剤）、インサフレーションによる投与に適した剤形（例えば、微粉）または非経口投与に適した剤形（例えば、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与もしくは筋肉内投与用の滅菌水性もしくは油性液剤、または直腸投与用の坐剤）であり得る。

10

【0094】

本発明の組成物は、当該技術分野で周知の慣用の医薬賦形剤を使用して慣用の方法によって得ることができる。かくして、経口使用のための組成物は、例えば、１種類またはそれ以上の着色剤、甘味剤、香味剤、および／または保存剤を含有することができる。

【0095】

錠剤のための適当な医薬上許容される賦形剤としては、例えば、ラクトース、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウムまたは炭酸カルシウムのような不活性希釈剤；コーンスターチまたはアルギン酸のような顆粒化剤および崩壊剤；デンプンのような結合剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクのような滑沢剤；p - ヒドロキシ安息香酸エチルもしくはプロピルのような保存剤；およびアスコルビン酸のような抗酸化剤が挙げられる。錠剤は、被覆されていなくてもよいが、または、消化器官内でのそれらの崩壊および活性成分の次なる吸収を改変するために、または、それらの安定性および／または外観を改良するために、どちらの場合にも当該技術分野で周知の慣用的なコーティング剤およびコーティング方法を使用して被覆されていてもよい。

20

【0096】

経口使用のための組成物は、活性成分を不活性固体希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリン）と混合したハードゼラチンカプセル剤の剤形であり得るか、または、活性成分を水または油（例えば、落花生油、流動パラフィン、大豆油、ヤシ油、または好ましくはオリーブ油）または他の許容されるビヒクルと混合したソフトゼラチンカプセル剤としてであり得る。

30

【0097】

水性懸濁剤は、一般的に、微粉形態の活性成分を、１種類またはそれ以上の懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル - ピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガム；分散剤または湿潤剤、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導した部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導した部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導した部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート）と一緒に含有する。該水性懸濁剤はまた、１種類またはそれ以上の保存剤（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸エチルまたはプロピル）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、着色剤、香味剤、および／または甘味剤（例えば、シュクロース、サッカリンまたはアスパルテーム）を含有することもできる。

40

50

【0098】

油性懸濁剤は、植物油（例えば、アラキス油、オリーブ油、ゴマ油またはヤシ油）または鉱油（例えば、流動パラフィン）に活性成分を懸濁することによって製剤化することができる。該油性懸濁剤はまた、蜜蝋、固形パラフィンまたはセチルアルコールのような増粘剤を含有することもできる。上記したような甘味剤、および香味剤を加えて美味な経口製剤を提供することができる。これらの組成物は、アスコルビン酸のような抗酸化剤の添加によって保存され得る。

【0099】

水の添加による水性懸濁剤または液剤の製剤化に適した分散可能なまたは凍結乾燥した粉末および顆粒剤は、一般的に、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤および1種類またはそれ以上の保存剤と一緒に活性成分を含有する。適当な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤は、上記したものによって例示される。甘味剤、香味剤および着色剤のようなさらなる賦形剤が存在してもよい。

10

【0100】

本発明の医薬組成物は、水中油滴型エマルジョンの形態であってもよい。油性相は、植物油、例えば、オリーブ油またはアラキス油、または鉱油、例えば、流動パラフィンまたはこれらの混合物であり得る。適当な乳化剤は、例えば、天然ガム、例えば、アカシアガムまたはトラガカントガム、天然リン脂質、例えば、大豆、レシチン、脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導したエステルまたは部分エステル（例えば、ソルビタンモノオレエート）および該部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。該乳剤はまた、甘味剤、香味剤および保存剤を含有することもできる。

20

【0101】

シロップ剤およびエリキシル剤は、グリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、アスパルテムまたはシュクロースのような甘味剤を用いて製剤化することができ、粘滑薬、保存剤、香味剤および/または着色剤を含有することもできる。

【0102】

該医薬組成物はまた、滅菌注射用水性または油性懸濁剤、液剤、乳剤または特定の系の剤形であり得、上記した1種類またはそれ以上の適当な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して公知の方法に従って製剤化され得る。滅菌注射用製剤はまた、無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液、例えば、ポリエチレングリコール中溶液であり得る。

30

【0103】

坐剤製剤は、活性成分を、常温で固体であるが直腸温度で液体であり、したがって、直腸で融解して薬物を放出するであろう適当な非刺激性賦形剤と混合することによって調製することができる。適当な賦形剤としては、例えば、カカオ脂およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0104】

クリーム剤、軟膏剤、ゲル剤および水性または油性液剤または懸濁剤のような局所製剤は、一般的に、当該技術分野に周知の慣用の方法を用いて慣用の局所的に許容されるビヒクルまたは希釈剤で活性成分を製剤化することによって得られる。

40

【0105】

インサフレーションによる投与のための組成物は、活性成分を単独でまたは1種類またはそれ以上の生理学的に許容される担体（例えば、ラクトース）で希釈して含む微粉の形態であり得る。次いで、インサフレーション用の粉末は、好都合には、例えば、公知の剤であるクロモグリク酸ナトリウムのインサフレーションのために使用されるようなターボ吸入装置と一緒に用いるために活性成分1～50mgを含有するカプセル中に保持される。

【0106】

吸入による投与のための組成物は、微細な固体または液滴を含有するエアゾールとして

50

活性成分を投薬するようにアレンジされた慣用の加圧式エアゾールの剤形であり得る。揮発性フッ化炭化水素または炭化水素のような慣用のエアゾール噴射剤を使用することができ、エアゾール装置は、好都合には、定量した量の活性成分を投薬するようにアレンジされている。

【0107】

製剤についてさらなる情報について、読者は、Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990の第5巻の第25.2章を参照する。

【0108】

したがって、本発明のさらなる態様では、治療において用いるための式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩が提供される。

10

【0109】

用途

また、薬剤として用いるための式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩が提供される。本発明の別の態様は、ヒトまたは他の哺乳動物における障害または病態(かかる哺乳動物による過剰なまたは未制御のTNFまたはp38キナーゼ生産によって悪化するかまたは引き起こされる)の治療のための薬剤として用いるための式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩を提供する。式Iで示される化合物は、インビトロ・アッセイでp38キナーゼを阻害する。したがって、本発明は、式Iで示される化合物またはその医薬上許容される塩またはその互変異性体の有効なサイトカイン干渉量を投与することを含むサイトカイン媒介疾患の治療方法を提供する。

20

【0110】

さらに、式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩は、治療によるヒトのような温血動物の治療方法において用いるために提供される。本発明の別の態様は、対象体における炎症の治療のための、および、発熱の治療のための解熱剤として用いるための、式(I)で示される化合物またはその医薬上許容される塩を提供する。本発明の化合物はまた、関節リウマチ、脊椎関節症、痛風関節炎、変形性関節症、全身性紅斑性狼瘡および若年性関節炎を包含するがこれらに限定されない関節炎、ならびに他の関節炎状態の治療に有用である。また、本発明の化合物は、成人呼吸窮迫症候群、肺サルコイドーシス、喘息、珪肺症、および慢性肺炎症性疾患を包含する肺障害または肺炎症の治療に有用である。さらにまた、本発明の化合物はまた、敗血症、敗血症性ショック、グラム陰性菌敗血症、マラリア、髄膜炎、感染症または悪性腫瘍に続発する悪液質、後天性免疫不全症候群(AIDS)に続発する悪液質、AIDS、ARC(AIDS関連症候群)、肺炎およびヘルペスウイルスを包含するウイルスおよび細菌感染症の治療に有用である。さらにまた、本発明の化合物はまた、骨吸収疾患、例えば骨粗鬆症、エンドトキシンショック、トキシックショック症候群、再灌流傷害、移植片対宿主反応および同種移植片拒絶を包含する自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、血栓、うっ血性心不全、および心臓再灌流傷害、腎再灌流傷害、肝疾患および腎炎を包含する心血管疾患、ならびに感染症に起因する筋肉痛の治療に有用である。

30

【0111】

本発明の化合物はまた、インフルエンザ、多発性硬化症、癌、糖尿病、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、皮膚関連状態、例えば乾癬、湿疹、火傷、皮膚炎、ケロイド形成、および瘢痕組織形成の治療に有用である。本発明の化合物はまた、胃腸障害、例えば、炎症性腸疾患、クローン病、胃炎、過敏性腸症候群および潰瘍性大腸炎の治療に有用である。本発明の化合物はまた、眼疾患、例えば、網膜炎、網膜炎、ブドウ膜炎、眼羞明、および眼組織の急性損傷の治療に用いることができる。本発明の化合物はまた、新生物を含む血管新生; 転移; 眼科的状态、例えば、角膜移植片拒絶反応、眼血管新生、損傷または感染後血管新生を含む網膜血管新生、糖尿病性網膜症、後水晶体線維増殖症および血管新生緑内障; 潰瘍性疾患、例えば、胃潰瘍; 病理的であるが非悪性の状態、例えば、小児血管腫を包含する血管腫、上咽頭の血管線維腫および無血管性骨壊死; 糖尿病性腎症および心筋症;

40

50

ならびに子宮内膜症のような女性の生殖系の障害の治療に有用であろう。さらに、本発明の化合物は、シクロオキシゲナーゼ - 2 の生産を予防するのに有用である。

【 0 1 1 2 】

上記治療用途のために、投与量は、用いられる化合物、投与形態、望ましい治療、所定の障害、ならびに動物または患者の年齢および性別に応じて異なるであろう。かくして、投薬のサイズは、周知の医薬原理に従って算出されるであろう。

【 0 1 1 3 】

本明細書で定義した治療は、単独の療法として施されてもよいが、または、本発明の化合物に加えて、慣用の外科手術または放射線療法もしくは化学療法を含むことができる。かかる化学療法は、以下のカテゴリーの抗腫瘍剤の 1 つまたはそれ以上を含むことができる。

10

【 0 1 1 4 】

治療薬におけるそれらの用途に加えて、式 (I) で示される化合物およびその医薬上許容される塩はまた、新しい治療薬の探索の一環としての、ネコ、イヌ、ウサギ、サル、ラットおよびマウスのような研究動物における細胞周期活性の阻害剤の効果の評価のためのインビトロおよびインビボ試験システムの開発および標準化における薬理学的ツールとして有用である。上記の他の医薬組成物、プロセス、方法、使用および薬剤製造特性には、本明細書に記載した本発明の化合物の別の好ましい実施態様もまた当てはまる。

【 0 1 1 5 】

ヒト治療に有用であることに加えて、本発明の化合物はまた、哺乳動物、齧歯類、およびその類のものを包含する、コンパニオンアニマル、珍しい動物および家畜の獣医学的治療にも有用である。さらに好ましい動物としては、ウマ、イヌおよびネコが挙げられる。

20

【 0 1 1 6 】

本発明の化合物の特性は、例えば、以下に記載する方法の 1 つまたはそれ以上を使用して評価することができる。

【 0 1 1 7 】

参照による援用

本願の全体にわたって引用される全て文献、特許および特許出願の内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【 実施例 】

30

【 0 1 1 8 】

本発明の化合物およびそれらの製造は、これらの化合物が製造または使用される方法のいくつかを例示する実施例によってさらに理解され得る。しかしながら、当然のことながら、これらの実施例は本発明を限定するものではない。現在知られているかまたはこれから生じる本発明の変更は、本明細書および特許請求の範囲に記載されるように本発明の範囲内となるとみなされる。

【 0 1 1 9 】

本明細書に記載のスキームは、本発明の化合物を合成することができるいくつかの方法の単なる例示であり、これらのスキームの対する様々な変更を行うことができると解すべきである。

40

【 0 1 2 0 】

シントンの検証

ライブラリー様条件を使用して 96 ウェルプレートにて全てのシントンを検証した。分析は、HPLC / ESM (陰イオン) を使用して行った。一例として、単一ウェル分析法を下記スキーム 2 に示す：

反応後、該溶液のアリコートは逆相クロマトグラフィーカラム (Targa C18、5 μ 、2.1 \times 40 mm) 上に注入し、260 nm でモニターしながら溶離した (7 分間にわたって 15 ~ 70 % 溶媒 B、流速 0.36 mL / 分；溶媒 A：脱イオン水中の 0.75 % ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) / 0.38 % トリエチルアンモニウムアセテート (TEAA) / 10 μ M EDTA；溶媒 B：メタノール / 水 (90 / 10) 中の

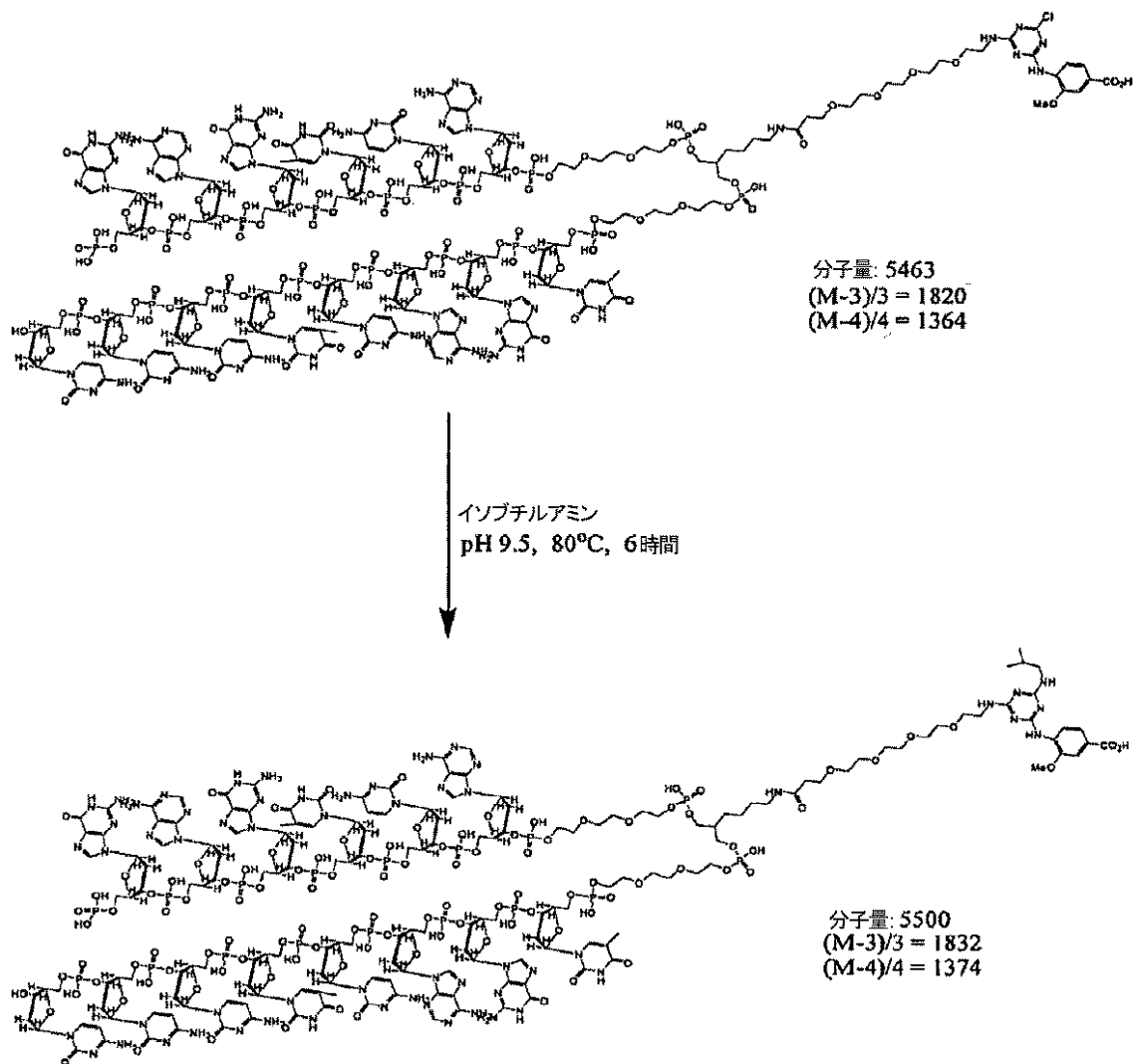
50

0.75% HFIP / 0.38% TEAA / 10 μ M EDTA)。流出液を陰イオンモードでのアトバンテージ・エレクトロスプレー質量分析計にて分析した。UVトレースを図5Aに示し、主要ピークの質量スペクトログラフを図5Bに示す。出発物質に相当する観察可能な質量は観察されなかった。

【0121】

【化31】

スキーム2



10

20

30

【0122】

ライブラリー合成

材料

全ての化学的構成要素 (Fmoc 保護アミノ酸; アミン) は商業的供給源から入手した。DNA ヘッドピースおよび様々な DNA 標識は、アイオワ州コーラルビル IDT, Inc. から入手した。T4 DNA Ligase は、Fermentas から入手した (30 u / ul または 5000 u / 管)。ライブラリー合成前に、DNA ヘッドピースを、標識長ピースの DNA とのライゲーションによって伸長した。この目的は、最終的 3 サイクル生成物の長さを 4 サイクル・ライブラリーを用いて得られたものと同一に保持するためであった。

40

【0123】

DNA 「ヘッドピース」:

配列: 5' - / 5 Phos / GAGTCA / iSp9 / iUniAmM / iSp9 / TGACTCCC - 3'

50

【 0 1 2 4 】

塩基対の観点から：

【 化 3 2 】

TGACTCCC

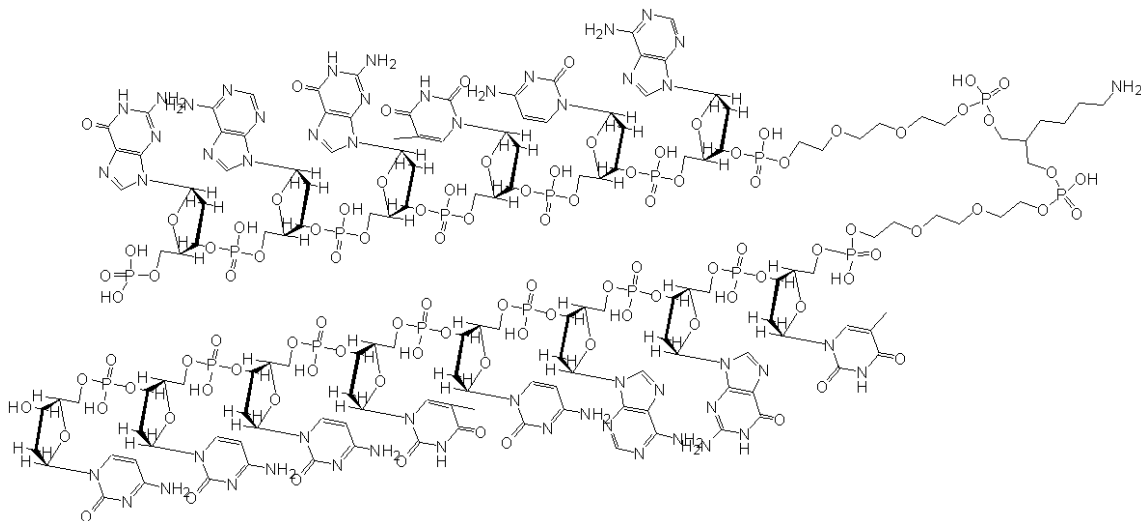
ACTGAG

【 0 1 2 5 】

化学構造：

【 化 3 3 】

10



20

【 0 1 2 6 】

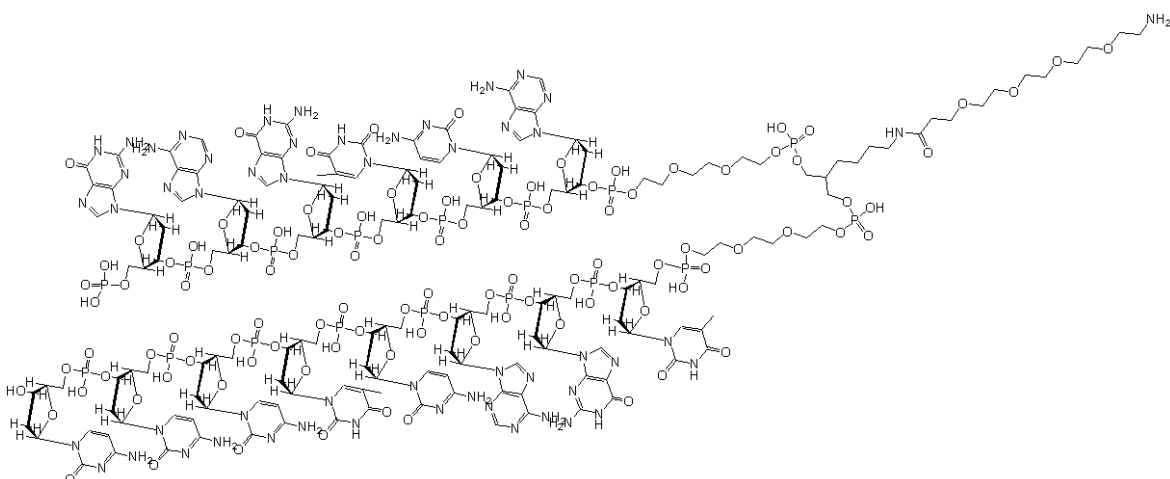
化学的スパーサーの設置

ヘッドピースDNAの1 mM溶液（43 μ mol、43 mL）を、40当量のFmoc-15アミノ-4,7,10,13-テトラオキサペンタデカン酸（200 mM DMF溶液8.6 mL）、次いで、40当量の4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド（DMT-MM、Acros）（200 mM水溶液8.6 mL）でアシル化した。該アシル化反応は、室温で18時間行った。完了後、該反応物をエタノールで沈殿させた。次いで、凍結乾燥ペレットを水中10%ピペリジン20 mLに暴露することにより脱保護した。脱保護生成物をエタノール中にて沈殿させ、逆相HPLCにより精製して、下記化合物を得た。

30

【 0 1 2 7 】

【 化 3 4 】



40

【 0 1 2 8 】

50

ブレライブラリー・プライマー・ライゲーション

ヘッドピース (20 μmol) を水 18 mL に溶解した。伸長配列を加え (水中 1 mM 溶液 28 mL、1.4 当量)、次いで、水 (25 mL) および 10X ライゲーションバッファ (8 mL、2 mM ATP を含有) を添加した。該溶液を 1 分間 95 に加熱し、次いで、10 分間にわたって 16 に冷却した。次いで、T4 DNA リガーゼの溶液 (800 μL 、30 U/ μL) を添加し、該ライゲーションを 16 で 16 時間インキュベートした。DNA 生成物をエタノールで沈殿させ、さらなる精製は行わずにライブラリー合成の第 1 サイクルに用いた。

【0129】

伸長配列の配列：

10

【化35】

5' AAATCGATGTGGTCAGGAAG 3'
3' GGTTTAGCTACACCAGTCCT 5'

【0130】

伸長したヘッドピースの配列：

【化36】

TGACTCCCAAATCGATGTGGTCAGGAAG
ACTGAGGGTTTAGCTACACCAGTCCT

20

【0131】

標識

標識は、2つの2塩基3'オーバーハングが両側にある7塩基対コード領域を含有している：

【化37】

	サイクル1	サイクル2	サイクル3	
5'	XXXXXXXXGT	XXXXXXXXGA	XXXXXXXXTT	3'
3'	TCXXXXXXXX	CAXXXXXXXXX	CTXXXXXXXX	5'

30

【0132】

5'末端はすべてリン酸化された。標識配列は、一定のG/C含量を有し、パリンδροームを有さず、ホモポリマーストレッチを有しないように設計された。

【0133】

化学的構成要素

全ての化学的構成要素を貯蔵溶液として調製した (Fmoc-アミノ酸に対してDMF、アミンに対してMeCN)。貯蔵溶液をバーコード付追跡管 (ペンシルベニア州マクマレーのMicronic North America, LLC) 中にて -20 で貯蔵した。

40

【0134】

サイクル1

伸長ヘッドピースDNAの1 mM 溶液 (19.2 μmol 、19.2 mL) を384個のウェルに分けた (50 nmol/ウェル)。次いで、各ウェルに10xライゲーションバッファ (Roche) 20 μL 、T4 DNA リガーゼ (Roche) 2.0 μL 、および水25 μL を添加した。384個の標識溶液のうち1個のアリコート (水中1 mM 貯蔵溶液100 μL) を各ウェルに添加し、16 で16時間ライゲーションを行った。ライゲーション後、各容器に5 M NaCl (10容量%) および冷エタノール2.5容量を添加して、DNAを沈殿させた。遠心分離後に回収したDNAペレットを各々pH 9.5の150 mM ホウ酸バッファ50 μL に溶解した。該プレートを4 に冷却し、各ウェルに、19

50

2 個の F m o c 保護アミノ酸のうち 1 個の 4 0 当量 (1 5 0 m M D M F 溶液 1 2 . 6 μ L)、次いで、4 0 当量の 4 - (4 , 6 - ジメトキシ - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル) - 4 - メチルモルホリニウムクロリド (D M T - M M 、 Acros) (2 5 0 m M 水溶液 7 . 6 μ L) を添加した。該アシル化反応を 4 で 1 8 時間行った。完了後、該反応物をプールし、エタノールで沈殿させ、逆相 H P L C により精製した。次いで、凍結乾燥した生成物を水中 1 0 % ピペリジン 2 0 m L に暴露させることにより脱保護した。脱保護生成物を沈殿させた。1 9 2 個の化学的構成要素が存在したが 3 8 4 個の標識が使用されたので、各成分は、2 つの別個のウェルに設置され、かくして、2 種類の標識によってコードされた。

【 0 1 3 5 】

サイクル 2

サイクル 1 の生成物 (7 . 4 μ m o l) を水 7 . 4 m L に溶解し、3 8 4 個のウェルに分けた (1 9 . 2 μ L / ウェル)。次いで、各ウェルに 1 0 X ライゲーションバッファー 7 . 8 μ L、T 4 D N A リガーゼ 0 . 7 7 μ L、および水 1 0 . 9 μ L を添加した。次いで、D N A 標識 (水中 1 m M 貯蔵液 3 8 . 4 μ L) を添加し、ライゲーションを 1 6 で 1 6 時間行った。D N A を上記に従って沈殿させ、ペレットをウェルごとに p H 9 . 5 の 1 5 0 m M ホウ酸バッファー 1 9 . 2 μ L に溶解した。ライブラリーを 4 に冷却した。各ウェルに 1 0 当量の塩化シアヌル (アセトニトリル中 2 0 0 m M 貯蔵液 1 μ L) を添加した。1 時間後、各ウェルに 5 0 当量のアミン (アセトニトリルまたはジメチルアセトアミド中 2 0 0 m M 貯蔵液 4 . 8 μ L) を添加した。合計 1 9 2 個のアミノ酸を用い、その結果、各々、2 種類の D N A 標識と対応した。置換を 4 で 1 6 時間行った。次いで、該ライブラリーをプールし、沈殿させた。

【 0 1 3 6 】

サイクル 3

サイクル 2 の生成物 (7 . 4 μ m o l) を水 7 . 4 m L に溶解し、1 9 2 個のウェルに分けた (3 8 . 4 μ L / ウェル)。次いで、各ウェルに 1 0 X ライゲーションバッファー 1 5 μ L、T 4 D N A リガーゼ 1 . 5 μ L、および水 2 1 μ L を添加した。次いで、D N A 標識 (水中 1 m M 貯蔵液 9 5 μ L、2 . 5 当量の標識) を添加し、ライゲーションを 1 6 で 1 6 時間行った。D N A を上記に従って沈殿させ、ウェルごとに p H 9 . 5 の 1 5 0 m M ホウ酸バッファー 3 8 . 4 μ L に溶解した。各ウェルに 4 5 当量のアミン (アセトニトリルまたはジメチルアセトアミド中 2 0 0 m M 貯蔵液 9 μ L) を添加した。合計 1 9 2 個のアミンを使用した。置換を 8 0 で 6 時間行った。次いで、ライブラリーをプールし、沈殿させ、精製して、3 . 9 μ m o l の生成物を得た (最終収率 1 9 %)。

【 0 1 3 7 】

ライブラリーの分析

精製したライブラリーの U V トレース、ライブラリーの正味のマススペクトログラムおよびライブラリーのデコンボリュートされた質量は、それぞれ、図 6、7 および 8 に見ることができる。観察された平均質量は、3 4 , 8 3 5 ダルトンであり、予想された平均質量は、3 4 , 7 9 5 ダルトンであった。

【 0 1 3 8 】

ポスライブラリー・プライマー・ライゲーション

プライマーライゲーションを、通常の条件を使用して 1 0 0 n m o l のアリコートに対して行った。

【 0 1 3 9 】

ポジティブコントロール合成

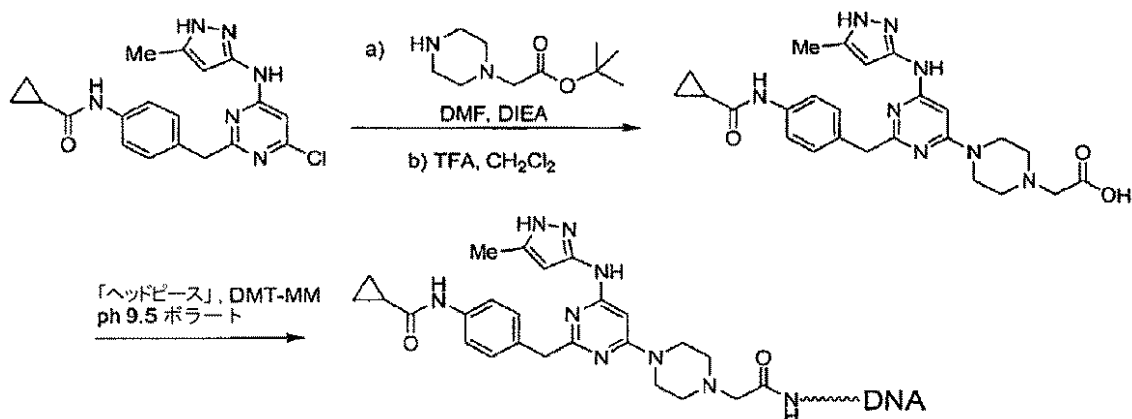
10

20

30

40

【化 3 8】



10

【0140】

最後の工程を除いて文献に従ってポジティブコントロール V X - 6 8 0 を合成した（例えば、J.-D. Charrier, F. Mazzei, D. Kay, A. Miller、WO 2004/00083 を参照）。かくして、シクロプロパンカルボン酸 { 4 - [4 - クロロ - 6 - (5 - メチル - 2 H - ピラゾール - 3 - イルアミノ) - ピリミジン - 2 - イルスルファニル] - フェニル } アミド (2 0 m g) および 2 - (ピペラジン - 1 - イル) 酢酸 t - ブチル (1 0 0 m g) を D M F (1 m l) と混合した。該混合物にジイソプロピルエチルアミン (D I E A) (0 . 4 m l) を添加した。反応混合物を 1 1 0 で 1 時間加熱した後、L C - M S は、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させて、粗生成物を得、さらに、R P - H P L C で精製して、所望の生成物を得た。

20

【0141】

上記生成物を、T I P S (1 4 μ l) の存在下、ジクロロメタン中 5 0 % トリフルオロ酢酸 (2 m l) で室温にて 4 時間処理した。溶媒を蒸発させ、生成物を R P - H P L C で精製して、純粋な生成物を得た。

【0142】

p H 9 . 4 のリン酸バッファー中ヘッドピース溶液 (1 m M 、 1 0 0 μ l 、 1 0 0 n m o l) に D M F (2 0 μ l) 中の小分子阻害剤 (2 m g 、 4 μ m o l 、 4 0 当量) を添加した。該溶液を 0 に冷却し、水 (2 0 μ l) 中 D M T - M M (1 . 2 m g 、 4 μ m o l 、 4 0 当量) を添加した。反応混合物を 4 で一夜撹拌した。エタノールクラッシュにより粗生成物を得、R P - H P L C でさらに精製して、所望の生成物を得た。M S : (M - 3) / 3 = 1 8 8 9 . 9 1 (計算値 1 8 9 0 . 3) 、 (M - 4) / 4 = 1 4 1 7 . 4 5 (計算値 1 4 1 7 . 5) 、 (M - 5) / 5 = 1 1 3 3 . 9 3 (計算値 1 1 3 3 . 8) 、 (M - 6) / 6 = 9 4 4 . 8 7 (計算値 9 4 4 . 7) 。

30

【0143】

アフィニティー選択

オーロラ A キナーゼ選択実験 (方法 A)

適当な選択バッファー [5 0 m M T r i s - H C l 、 p H 7 . 5 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 1 % t w e e n - 2 0 、 1 m g / m L 断片化サケ精子 D N A (Ambion) 、 1 m g / m L ウシ血清アルブミン (Ambion) および 1 0 m M M E] 中にて室温で 1 時間、D N A 上で 1 つのライブラリーメンバーの濃度と同等のライブラリーを 1 μ M の H i s 標識オーロラ A タンパク質 (Upstate) および 1 1 . 7 p M の V X - 6 8 0 と一緒にインキュベートした。V X - 6 8 0 を競争相手として使用した場合の選択では、それは、1 回目には 1 0 μ M の濃度で、2 回目および 3 回目には 5 0 μ M の濃度で選択バッファーに添加した。次いで、該溶液を 2 0 μ L D y n a b e a d s (登録商標) T A L O N TM ビーズ (約 2 6 0 p m o l の H i s 標識タンパク質結合能 ; Dynal Biotech) と一緒に 3 0 分間インキュベートした。このインキュベーションの後、ビーズを捕獲し、選択バッファー 2 0 0 μ L で 8 回洗浄した。タンパク質 / 結合ライブラリー分子をビーズから溶離するために、ビ

40

50

ーズを選択バッファー 30 μ L に再懸濁し、72 で 5 分間加熱した。溶出液をビーズから分取し、新鮮な T A L O NTMビーズ 20 μ L に添加し、室温で 15 分間インキュベートして、変性タンパク質を除去した。新鮮なビーズを用いてこの 2 回目を繰り返し行った。次いで、この回に得られた溶出液を 2 回目の選択において選択バッファー中 500 nM H i s 標識オーロラ A タンパク質 (Upstate) と一緒にインキュベートし、次いで、上記の D y n a b e a d s (登録商標) T A L O NTMビーズ (ビーズ 10 μ L) インキュベーション、洗浄および溶離工程を行った。3 回目については、2 回目の溶出液を選択バッファー中 50 nM、200 nM または 500 nM の H i s 標識オーロラ A タンパク質 (Upstate) と一緒にインキュベートし、再度、次いで、上記の D y n a b e a d s (登録商標) T A L O NTMビーズ (ビーズ 10 μ L) インキュベーション、洗浄および溶離工程を行った。最後の溶出液を選択分子の DNA コードの PCR 増幅のための鋳型として使用した。

10

【0144】

オーロラキナーゼ選択実験 (方法 B)

900 pmol の H i s 標識オーロラキナーゼ A (Upstate) を I M A C 樹脂 (> 20 nmol の H i s 標識タンパク質結合能; Phynexus) 5 μ L に固定した。選択バッファー (50 mM T r i s - H C l、pH 7.5、150 mM N a C l、0.1% t w e e n - 20、1 mg/mL 断片化サケ精子 DNA (Ambion)、1 mg/mL B S A (Ambion)、および 10 mM M E) 中の D E L ライブラリー (7.2 pM 濃度の各ライブラリー分子) を固定化オーロラキナーゼと一緒に室温で 1 時間インキュベートし、次いで、選択バッファー 100 μ L で 10 回洗浄した。タンパク質 / 結合ライブラリー分子を溶離するために、該樹脂をイミダゾール溶離バッファー (50 mM T r i s - H C l、pH 7.5、150 mM N a C l、0.1% t w e e n - 20、1 mg/mL 断片化サケ精子 DNA (Ambion)、1 mg/mL B S A (Ambion)、10 mM M E、および 100 mM イミダゾール) 60 μ L と一緒に 5 分間インキュベートした。溶出液を 72 で 5 分間加熱して、オーロラキナーゼタンパク質を変性させた。I M A C 樹脂上で変性タンパク質を再捕獲するために、該溶出液を選択バッファーで 10 倍希釈して、イミダゾール濃度を 10 mM に低下させた。次いで、希釈した溶出液を I M A C 樹脂 (Phynexus) と一緒に 15 分間インキュベートして、I M A C 樹脂に結合した変性タンパク質およびライブラリー分子を取り出した。後の回の選択は、先行の回からの溶出液を固定化オーロラキナーゼ (Upstate) と一緒にインキュベートし、次いで、上記の洗浄および溶離工程を行った。

20

30

【0145】

p 38 選択実験

選択バッファー (50 mM T r i s - H C l、pH 7.5、150 mM N a C l、0.1% t w e e n - 20、1 mg/mL 断片化サケ精子 DNA (Ambion)、1 mg/mL B S A (Ambion)、and 1 mM M E) 中にて室温で 1 時間、D E L ライブラリー (11.7 pM 濃度の各ライブラリー分子) を 500 nM H i s 標識 p 38 タンパク質 (Roche) と一緒にインキュベートした。該溶液を I M A C 樹脂 (> 20 nmol の H i s 標識タンパク質結合能; Phynexus) 5 μ L と一緒に 5 分間インキュベートし、次いで、選択バッファー 100 μ L で 10 回洗浄した。タンパク質 / 結合ライブラリー分子を溶離するために、該樹脂をイミダゾールバッファー (50 mM T r i s - H C l、pH 7.5、150 mM N a C l、0.1% t w e e n - 20、1 mg/mL 断片化サケ精子 DNA (Ambion)、1 mg/mL B S A (Ambion)、1 mM M E、および 100 mM イミダゾール) 60 μ L と一緒に 5 分間インキュベートした。該溶出液を 72 で 5 分間加熱して、p 38 タンパク質を変性させた。I M A C 樹脂上に変性タンパク質を再捕獲するために、溶出液を選択バッファーで 10 倍希釈して、イミダゾール濃度を 10 mM に低下させた。次いで、希釈溶出液を I M A C 樹脂 (Phynexus) と一緒に 15 分間インキュベートして、I M A C 樹脂に結合した変性タンパク質およびライブラリー分子を取り出した。後の回の選択は、先行の回からの溶出液を、2 回目の選択については選択バッファー中 200 nM H i s 標識 p 38 タンパク質 (Roche) と一緒に、そして、3 回目の選択について

40

50

は選択バッファー中 $0.2 \text{ nM} \sim 200 \text{ nM}$ (10 倍間隔で) の His 標識 p38 タンパク質 (Roche) と一緒にインキュベートし、次いで、上記の洗浄および溶離工程を行うことにより行った。溶出した分子を、選択分子の DNA コードの PCR 増幅のための鋳型として使用した。

【0146】

解読

選択後、プライマー 5' O (5' - GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGACTCCCAAAATCGATGTG - 3' ; 400 nM ; IDT) および 3' O (5' GCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAAGGTGAAGCTTTGTCTG - 3' ; 400 nM ; IDT) を使用して、PCR (95 で 5 分間、次いで、92 で 30 秒間 ; 55 で 15 秒間 ; 72 で 15 秒間のサイクルを 20 回、次いで、72 で 10 分間) によってライブラリー分子を増幅した。PCR 生成物を精製して、プライマーおよびヌクレオチド (Qiagen) を除去し、配列決定した (454 Life Sciences)。

10

【0147】

化合物の合成

小分子の一般的な合成方法

注意：一般に、化合物合成の目的のためにサイクル 1 のアミノ酸をそれらのデス - カルボキシ類似体と交換した。例えば、分子が最初のポジションでフェニルアラニンを用いてライブラリーから選択された場合、それは、フェネチルアミンを使用して合成された。さらに、連結しているカルボキシアミドは、活性について重要であることが観察された。

20

【0148】

1 回目の置換

アセトニトリル：水性バッファー (250 mM ボラート、 $\text{pH } 9.4$) (1 : 1) 中に塩化シアヌルおよびアミン # 1 の 80 mM 貯蔵溶液を新しく調製した。氷上で冷却した後、等量の 2 つの貯蔵溶液を合わせた。混合するとすぐにモノ付加物が沈殿した。得られたコロイド溶液を室温に加温した。

【0149】

2 回目の置換

10 mL 容器中に上記モノ付加物溶液 ($100 \mu\text{mol}$) 1.25 mL 、1 当量のアミン # 2、アセトニトリル 5 mL 、および K_2CO_3 (過剰) 50 mg を合わせた。該混合物を 1 時間撹拌した。

30

【0150】

3 回目の置換

粗ジ付加物反応混合物にアミン # 3 (5 当量) $500 \mu\text{mol}$ を添加した。該反応混合物を室温で一晩放置した。次いで、該溶液を濃縮し、10% アセトニトリル (水溶液) 5 mL 中に復元し、逆相 HPLC により精製して、生成物 18.18 mg (38%) を得た。

【0151】

生化学アッセイ

オーロラキナーゼアッセイ

p38 キナーゼアッセイと同様の 96 ウェルプレート放射測定キナーゼアッセイを使用して、オーロラキナーゼ活性の阻害について化合物をアッセイした。 2 nM 活性 p38 キナーゼ (R&D Systems) を含有するアッセイバッファー (20 mM HEPES 7.4 、 10 mM MgCl_2 、 25 mM - GP、 1 mM DTT、 0.1 mg/mL MBP) でオーロラキナーゼ (Upstate) を予備希釈し、ウェルに添加し、次いで、10% DMSO を含むアッセイバッファー (アッセイにおける DMSO の最終濃度 1%) で予備希釈した化合物を添加した。化合物をキナーゼと一緒に室温で 20 分間予備インキュベートした後、 $10 \mu\text{M}$ ATP / $0.02 \mu\text{Ci} / \mu\text{L}$ [- 33P]ATP の添加により反応を開始させた。反応プレートを 30 で 4 時間インキュベートした。 200 mM リン酸の添加により反応を停止させ、96 ウェル Millipore ホスホセルロース・フィルタープレート

40

50

に移した。該フィルタープレートを100 mMリン酸で繰り返し洗浄して、過剰の[γ -³²P]ATPを除去し、次いで、該フィルターを乾燥させ、各ウェルにシンチレーション液(Microscint 40) 20 μ lを添加した。該フィルタープレートをTop Count-NXTシンチレーションカウンターで計数し、Prism曲線適合ソフトウェアを使用して該データを処理した。

【0152】

P38キナーゼアッセイ

96ウェルプレート放射測定キナーゼアッセイを用いてp38キナーゼ活性の阻害について化合物をアッセイした。2 nM活性p38キナーゼ(R&D Systems)を含有するアッセイバッファー(20 mM HEPES 7.4、10 mM MgCl₂、25 mM β -GP、1 mM DTT、0.1 mg/ml MBP)をウェルに添加し、次いで、10% DMSOを含むアッセイバッファー(アッセイにおけるDMSOの最終濃度1%)で予備希釈した化合物を添加した。化合物をキナーゼと一緒に室温で20分間予備インキュベートした後、10 μ M ATP/0.02 μ Ci/ μ l [γ -³²P]ATPの添加により反応を開始させた。反応プレートを37℃で4時間インキュベートした。200 mMリン酸の添加により反応を停止させ、96ウェルMilliporeホスホセルロース・フィルタープレートに移した。該フィルタープレートを100 mMリン酸で繰り返し洗浄して、過剰の[γ -³²P]ATPを除去し、次いで、該フィルターを乾燥させ、各ウェルにシンチレーション液(Microscint 40) 20 μ lを添加した。該フィルタープレートをTop Count-NXTシンチレーションカウンターで計数し、Prism曲線適合ソフトウェアを使用して該データを処理した。濃度対阻害パーセントのグラフを図9に示す。

【0153】

P38ピアコア・アッセイ

ピアコアCM5チップを使用して、10 μ M SB203580の存在下で、Casper (Analytical Biochem. 2004, 325: 126-136)によって記載されるような標準的なアミンカップリングによりp38a表面を調製し、次いで、続く洗浄工程で除去した。公表されたプロトコールに対して行われた唯一の変更は、活性p38を使用し、10 mM酢酸ナトリウム、pH 5.0を含有するバッファーを用いて固定化したことであった。固定化レベルは、3000~5000共鳴単位(RU)の範囲であった。非誘導化フローセルは、参照表面としての役割を果たした。速度定数および解離定数は、データをLangmuir結合モデルに適合させることによって算出した。使用した異なるチップの各々を、最初に、SB203580の非リン酸化p38への結合について報告された11 nMの数値(Casper)と同様に本願の系ではK_d = 5 nMを有したSB203580を使用してアッセイした。

【0154】

細胞アッセイ

HCT-116 Cell Line HCT116(ヒト結腸直腸癌細胞)を用いるオーロラA化合物についての細胞増殖アッセイをAmerican Type Culture Collectionから入手した(Cat. No. CCL-247、メリーランド州ロックビル)。37℃で95%空気および5%CO₂の加湿インキュベーター中にて、10%ウシ胎仔血清(FBS; Omega Scientific、カリフォルニア州ターザナ)、2 mM L-グルタミン、50 IU/mlペニシリンおよび50 μ g/mlストレプトマイシン(Gibco/Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を補充したMcCoy's 5A中の単層培養物中に細胞を保持した。

【0155】

トリプシン化により単一細胞懸濁液を調製して、それらの各培養培地中にて1 mL当たり1.25E4細胞を得た。96ウェルプレートに200 μ l/ウェルの細胞懸濁液を播種して、初期播種密度2500細胞/ウェルを得た。該プレートを組織培養インキュベーター(5%CO₂、37℃)中に一夜置いて、細胞を付着させた。

【0156】

試験化合物の段階希釈液を10 mM貯蔵溶液から培養培地中にて最終濃度で調製し、三重にアッセイした。試験化合物を有するウェル中のDMSOの濃度に相当する0.1% v/v DMSOに培養培地を調整することによってビヒクルを調製した。次いで、試験プレートを3日間組織培養インキュベーター(5% CO₂、37℃)中に置いた後、MTTアッセイを行った。

【0157】

MTTアッセイは、生成物を分光光度法で測定するMTTにおけるテトラゾリウム環の細胞デヒドロゲナーゼ酵素開裂に基づく細胞生存率の測定である。PBS中にて調製した5 mg/mL MTT(3' [4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニル-テトラゾリウムプロミド、Sigma Cat. No. M2128)の25 µLアリコートウェルに直接添加した。該プレートを37℃で2時間インキュベートし、MTT溶液を除去し、イソプロパノール150 µLを各ウェルに添加し、プレートを室温で10分間振動させた。Labsystems Multiskanプレート分光光度計で570 nmにてウェルの光学密度を定量化した。二重の測定値の平均値を求めた。結果は、対照からのODシグナルのパーセントとして表される。

10

【0158】

ヒトTHP-1細胞株におけるLPS誘発性TNF-α生産

THP-1(ヒト、単球)細胞株をAmerican Type Culture Collection(ATCC、Cat. No. TIB 202)から購入した。37℃で95%空気および5% CO₂の加湿インキュベーター中にて、10%熱失活ウシ胎仔血清(FBS; Omega Scientific、カリフォルニア州ターザナ)、2 mM L-グルタミン、100 U/mLペニシリンおよび100 µg/mLストレプトマイシン(Gibco/Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を補充したRPMI 1640(GIBCO)中にて1週間に3回、細胞を継代した。

20

【0159】

該アッセイのために、THP-1細胞を収穫し、計数し、培養培地中にて1 mL当たり1 E6細胞で懸濁した。細胞懸濁液200 µLを96ウェルプレートにて各ウェルに添加して、1ウェルにつき2 × 10⁵細胞の密度を得た。10 mM貯蔵溶液から培養培地中にて最終濃度でP38化合物の段階希釈液を調製し、三重にアッセイした。試験化合物を有するウェル中のDMSOの濃度に相当する0.1% v/v DMSOに培養培地を調整することによってビヒクルを調製した。

30

【0160】

P38阻害物質の存在下で30分間、細胞をインキュベートした。その後、5% CO₂-インキュベーター中にて37℃で4時間、細胞をLPS(イー・コリ(E.coli) 026:B6、1 µg/mL)で刺激した。試料を氷上に置き、4℃にて1500 × gで10分間遠心分離することによって反応を停止させた。細胞上清を収穫し、製造者の指示に従ってELISA(BD Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ、Cat. No. 555212)によってTNFの濃度を測定した。分光光度ELISAプレートリーダー(Labsystems Multiskan MCC/340)にて450 nmで吸光度を測定および分析した。二重の測定値の平均値を求めた。結果を対照からのODシグナルのパーセントとして表す。

40

【図 1 - 1】

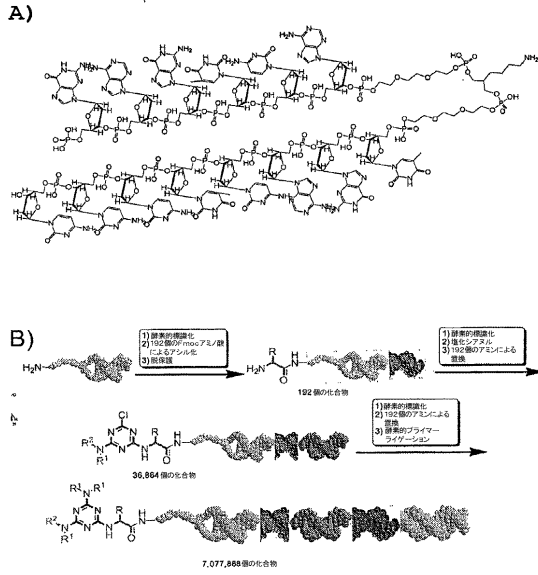
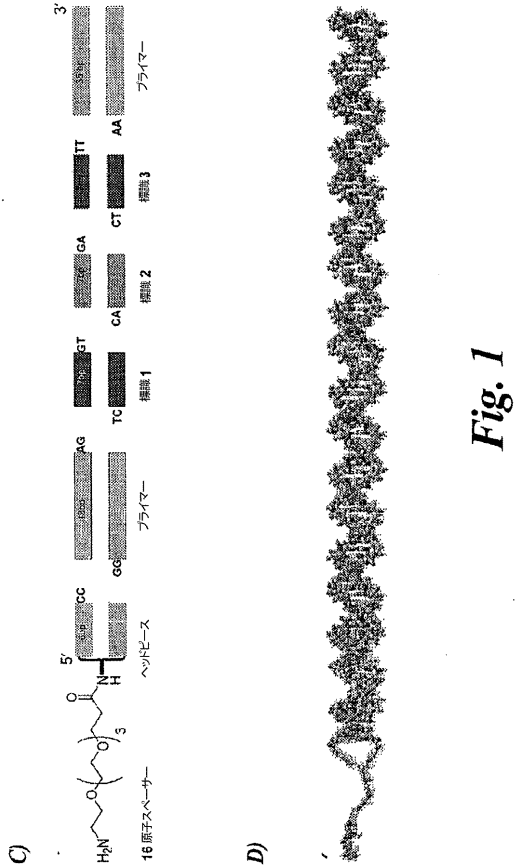


Fig. 1

【図 1 - 2】



【図 2】

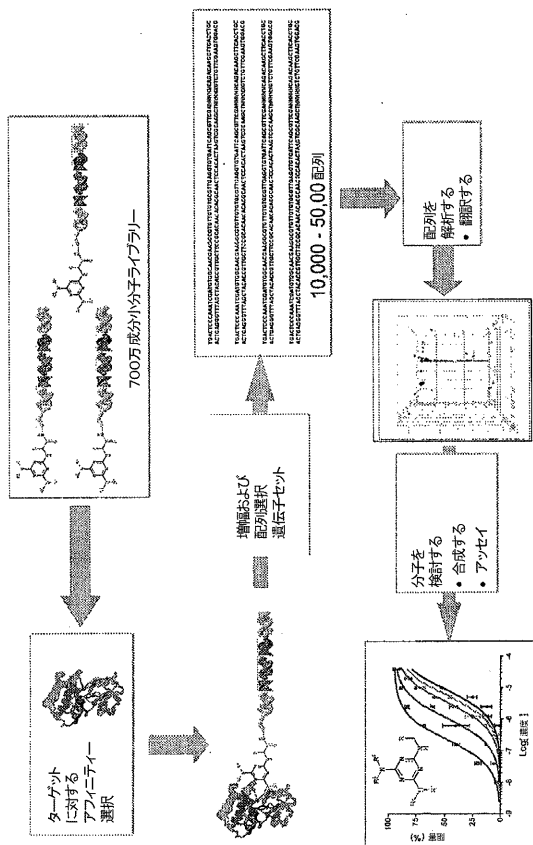


Figure 2

【図 3 - 1】

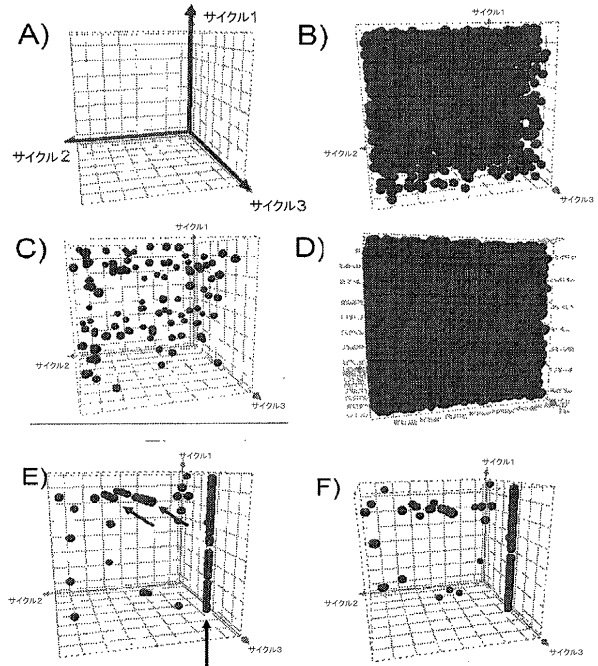


Fig. 3

【図 3 - 2】

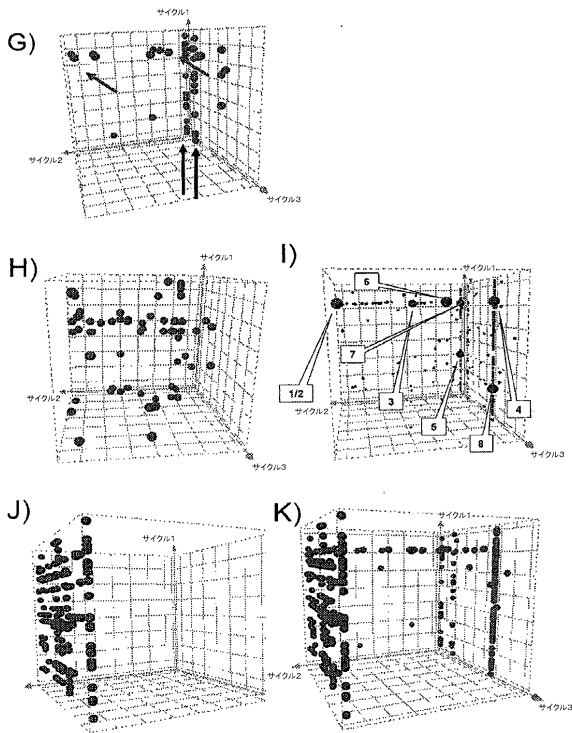


Fig. 3

【図 4】

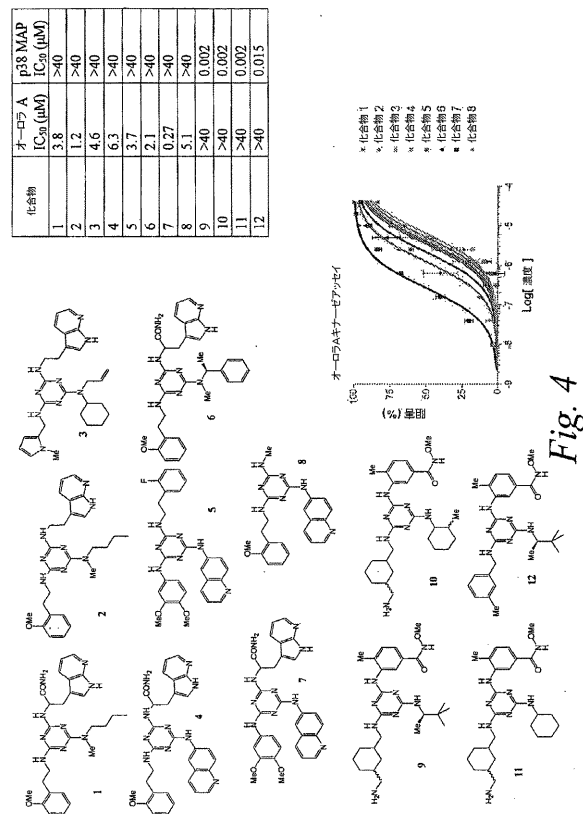


Fig. 4

【図 5】

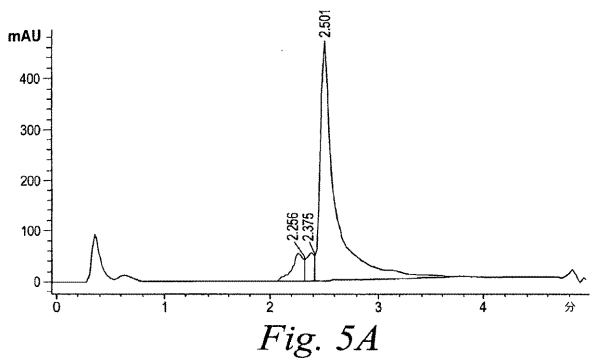


Fig. 5A

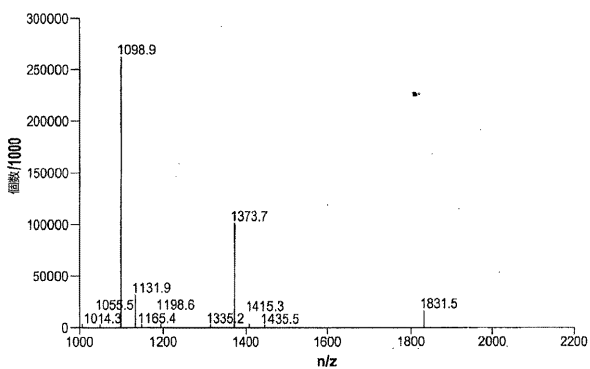


Fig. 5B

【図 6】

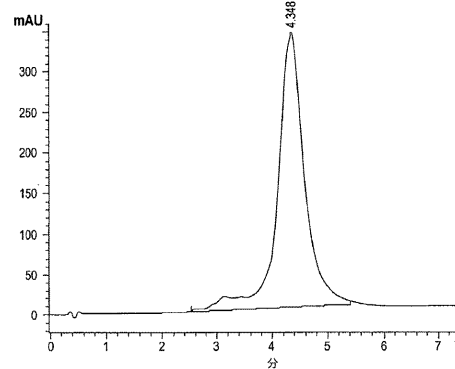


Fig. 6

【図 7】

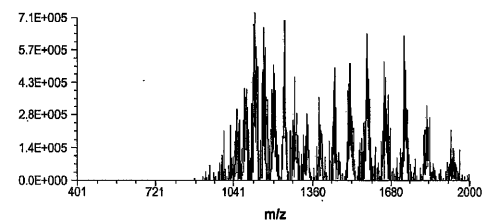


Fig. 7

【 図 8 】

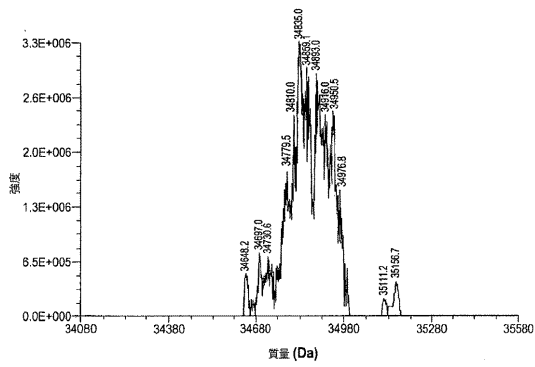


Fig. 8

【 図 9 】

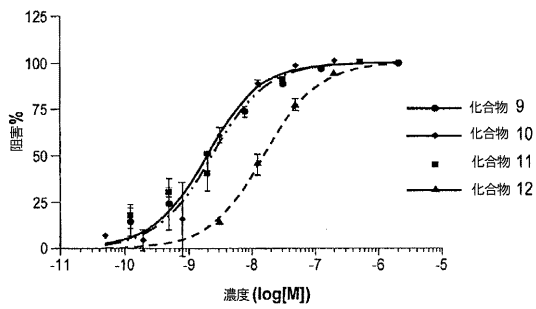


Fig. 9

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成21年4月16日 (2009.4.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2009545598000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/017244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D251/70 A61K31/53 A61P19/02 A61P29/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/026844 A (REDDY US THERAPEUTICS INC [US]; TIMMER RICHARD T [US]; ALEXANDER CHRIS) 1 April 2004 (2004-04-01) claims 1,5 page 524; compounds C133,C134	2,4-7, 10-12, 14-21
X	WO 01/47897 A (PHARMACOPEIA INC [US]; SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 5 July 2001 (2001-07-05) claims page 2 page 78; compound 39 page 80; compound 67 page 85; compound 139 ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 November 2007		Date of mailing of the international search report 12/12/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer KOLLMANNBERGER, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/017244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/002544 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; PHARMACOPEDIA INC [US]; AHMED GULZAR [US]) 9 January 2003 (2003-01-09) claims page P, line 10 - line 15 table 1; compounds 27,30,33,46 -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/017244

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-17,21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/017244

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004026844	A	01-04-2004	AU 2003231975 A1	08-04-2004
			BR 0314670 A	09-08-2005
			CA 2499964 A1	01-04-2004
			EP 1560817 A1	10-08-2005
			JP 2006511476 T	06-04-2006
			JP 2006188533 A	20-07-2006
WO 0147897	A	05-07-2001	AU 2457201 A	09-07-2001
			AU 2735201 A	09-07-2001
			CA 2394727 A1	05-07-2001
			CA 2396693 A1	05-07-2001
			EP 1242385 A1	25-09-2002
			EP 1246823 A1	09-10-2002
			JP 2003519130 T	17-06-2003
			JP 2003519143 T	17-06-2003
			WO 0147921 A1	05-07-2001
WO 03002544	A	09-01-2003	CA 2451128 A1	09-01-2003
			EP 1406875 A1	14-04-2004
			HU 0401711 A2	28-12-2004
			JP 2004535447 T	25-11-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)		A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)		A 6 1 P 31/22	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)		A 6 1 P 19/08	
C 1 2 N 9/12 (2006.01)		C 1 2 N 9/99 Z N A	
		C 1 2 N 9/12	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100156100

弁理士 西野 満

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 マシュー・クラーク

アメリカ合衆国 0 1 7 3 0 マサチューセッツ州ベッドフォード、オータム・ドライブ 5 番

F ターム(参考) 4B050 DD07 LL01

4C065 AA04 BB04 CC01 DD02 EE02 HH01 JJ01 KK08 LL01 PP03
PP11

4C086 AA01 AA02 AA03 BC64 CB05 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA16
ZA59 ZA66 ZA96 ZB11 ZB15 ZB33