

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-507382
(P2025-507382A)

(43)公表日 令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 D	471/04 (2006.01)	C 0 7 D	471/04	1 0 3	4 B 0 6 5
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00		Z N A 4 C 0 8 6
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全146頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-547761(P2024-547761)			(71)出願人	508057896
(86)(22)出願日	令和5年2月14日(2023.2.14)				コーネル・ユニバーシティー
(85)翻訳文提出日	令和6年10月7日(2024.10.7)				CORNELL UNIVERSITY
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062593				アメリカ合衆国14850ニューヨーク
(87)国際公開番号	WO2023/154962				州イサカ、バイン・トゥリー・ロード3
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)				95番、スウィート310
(31)優先権主張番号	63/309,894			(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和4年2月14日(2022.2.14)				弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100205707
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	弁理士 小寺 秀紀
	最終頁に続く			(74)代理人	100160923
				(74)代理人	弁理士 山口 裕孝
				(74)代理人	100119507
				(74)代理人	弁理士 刑部 俊
				(74)代理人	100142929
					最終頁に続く

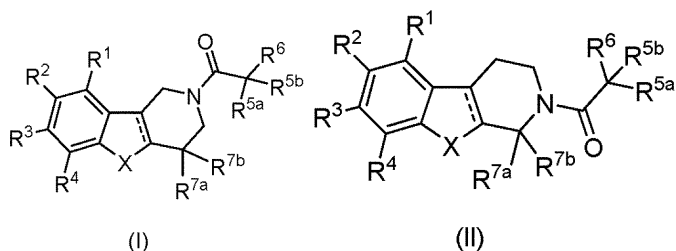
(54)【発明の名称】 c G A S 阻害物質およびその使用法

(57)【要約】
本開示は、全体として、ヒトcGASの新規阻害物質、および患者におけるcGAS関連疾患または障害を処置する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) もしくは (II) :



10

の化合物またはその薬学的に許容される塩であって、
式中、

R¹は、ヘテロアリール、ハロゲン、アリール、環状アミン、ヒドロキシ、-OC(O)アルキル、-NH₂、-N(H)CO-アルキル、またはアルコキシであり；

R²は、H、アルキル、-CHF₂、-CF₃、-CN、-OR^c、ハロゲン、またはヘテロシクリルであり；

R³およびR⁴は、独立して、H、ハロゲン、-CHF₂、-CF₃、-CN、-OR^c、または-OCF₃であり；

R^{5a}およびR^{5b}は、独立して、H、アルキル、アリール、またはシクロアルキルであり；

20

R⁶は、N(H)R^a、O-アルキル、OH、-CO₂R^dであるか；

または、R^{5a}およびR⁶は、一緒になって、5～6員ヘテロシクリルを形成し；

R^{7a}およびR^{7b}は、独立して、Hもしくはアルキルであるか、または、これらが結合している炭素と一緒に3員脂肪族炭素環を形成し；

R^aは、H、アルキル、-COR^b、-CON(H)R^b、または-CO₂R^eであり；

R^bは、アルキルまたはアリールであり；

R^cは、H、アルキル、または-C(O)-アルキルであり；

R^dは、Hまたはアルキルであり；

R^eは、アルキル、またはアリールであり；

30

Xは、NH、NMe、NEt、O、またはSであり；かつ

は、単結合または二重結合である、
該化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

R¹が、ヘテロアリールである、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

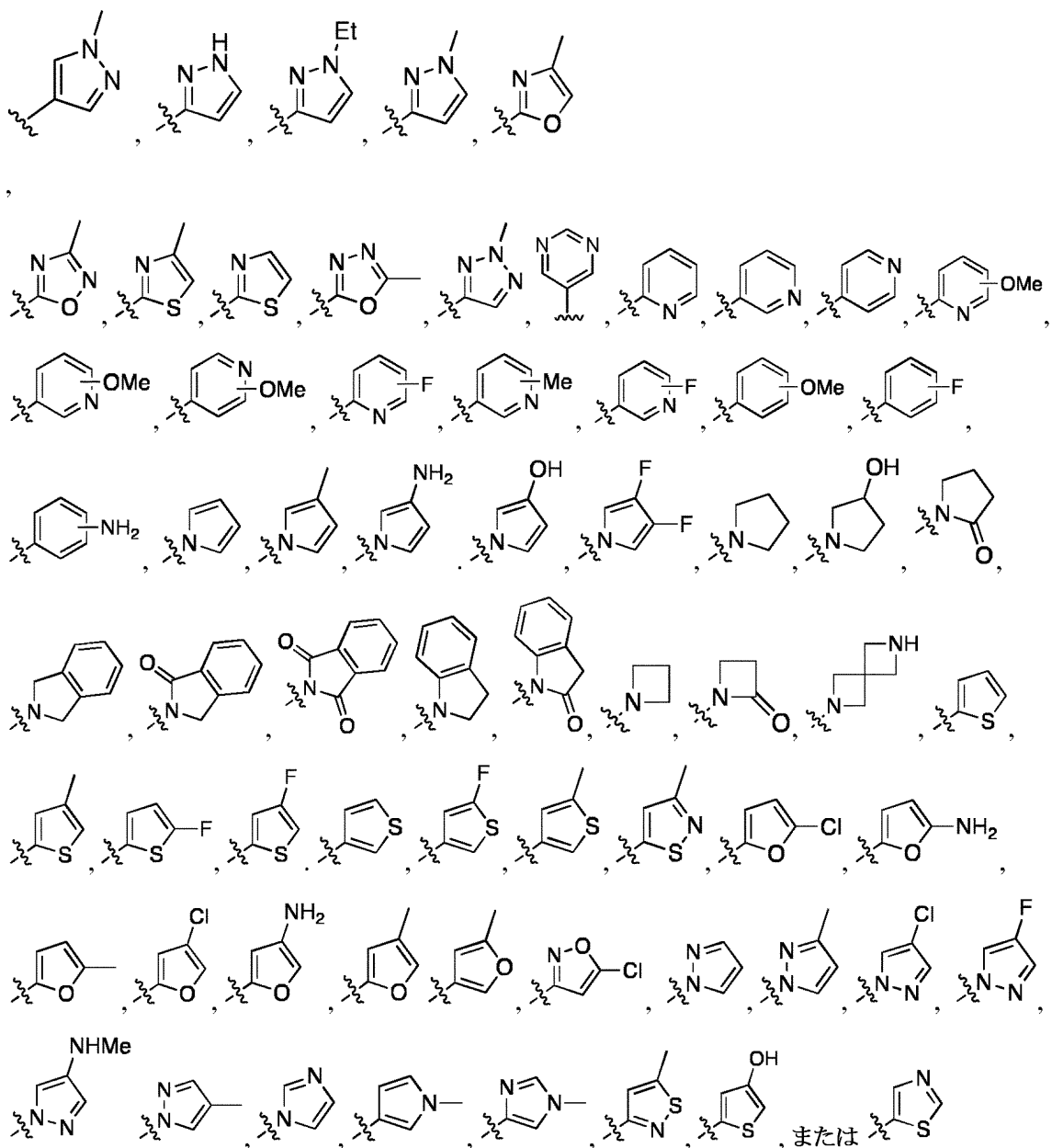
R¹が、N含有ヘテロアリールである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4】

R¹が、

40

50



10

20

30

である、請求項1記載の化合物。

【請求項5】

R¹が、アリールである、請求項1記載の化合物。

【請求項6】

R¹が、環状アミンである、請求項1記載の化合物。

【請求項7】

R¹が、アルコキシである、請求項1記載の化合物。

【請求項8】

R²が、Hである、請求項1～7のいずれか一項記載の化合物。

【請求項9】

R²が、C₁～4-アルキルである、請求項1～8のいずれか一項記載の化合物。

【請求項10】

R²が、-CHF₂または-CF₃である、請求項1～8のいずれか一項記載の化合物。

【請求項11】

R²が、-CNである、請求項1～8のいずれか一項記載の化合物。

【請求項12】

40

50

R^2 が、H、-OH、または-OMeである、請求項1～8のいずれか一項記載の化合物。

【請求項13】

R^2 が、Hまたはハロゲンである、請求項1～8のいずれか一項記載の化合物。

【請求項14】

R^3 および R^4 が、同じである、請求項1～13のいずれか一項記載の化合物。

【請求項15】

R^3 および R^4 が、Clである、請求項14記載の化合物。

【請求項16】

R^{5a} および R^{5b} のうちの少なくとも1つがHである、請求項1～15のいずれか一項記載の化合物。

10

【請求項17】

R^{5a} が、アルキルである、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項18】

R^{5a} が、メチルである、請求項17記載の化合物。

【請求項19】

R^{5a} が、アリールである、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

【請求項20】

R^{5a} および R^{5b} が、メチルである、請求項1～15のいずれか一項記載の化合物。

【請求項21】

R^6 が、 $N(H)R^a$ である、請求項1～20のいずれか一項記載の化合物。

20

【請求項22】

R^6 が、 NH_2 である、請求項21記載の化合物。

【請求項23】

R^6 が、 $N(H)Boc$ である、請求項21記載の化合物。

【請求項24】

R^6 が、O-アルキルである、請求項1～20のいずれか一項記載の化合物。

【請求項25】

R^6 が、OHである、請求項1～20のいずれか一項記載の化合物。

【請求項26】

R^6 が、 CO_2H である、請求項1～20のいずれか一項記載の化合物。

30

【請求項27】

R^6 が、 $CO_2(C_1\sim4\text{-アルキル})$ である、請求項1～20のいずれか一項記載の化合物。

【請求項28】

R^{7a} および R^{7b} が共に水素である、請求項1～27のいずれか一項記載の化合物。

【請求項29】

R^{7a} および R^{7b} のうちの少なくとも1つが水素である、請求項1～27のいずれか一項記載の化合物。

【請求項30】

R^{7a} および R^{7b} のうちの少なくとも1つが水素である、請求項1～27および29のいずれか一項記載の化合物。

40

【請求項31】

R^{7a} および R^{7b} が、これらが結合している炭素と一緒にあって、シクロプロピル環を形成する、請求項1～27のいずれか一項記載の化合物。

【請求項32】

Xが、NHである、請求項1～31のいずれか一項記載の化合物。

【請求項33】

Xが、NMeである、請求項1～31のいずれか一項記載の化合物。

【請求項34】

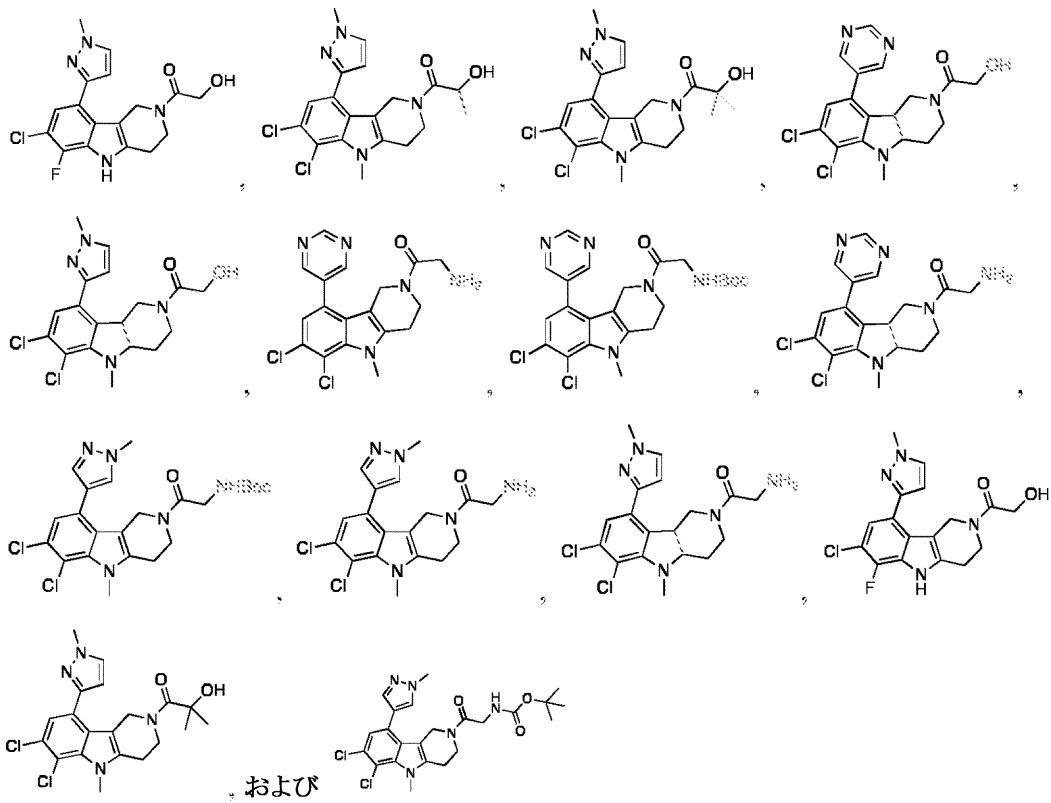
Xが、Oである、請求項1～31のいずれか一項記載の化合物。

【請求項35】

50

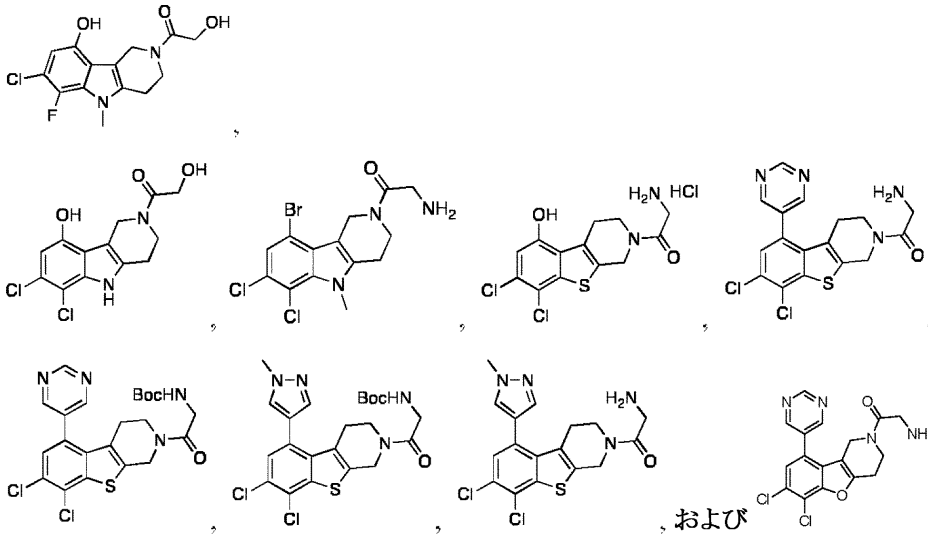
Xが、Sである、請求項1～31のいずれか一項記載の化合物。

【請求項36】



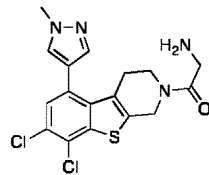
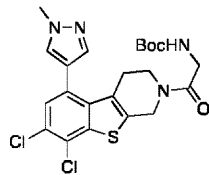
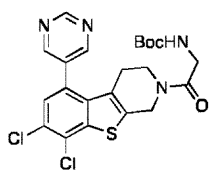
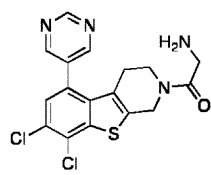
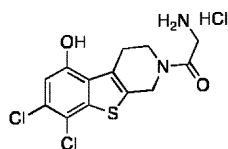
から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項37】



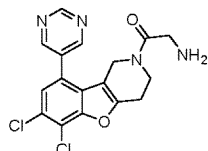
から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項38】



、および

10



から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項39】

表1の化合物から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項40】

請求項1～39のいずれか一項記載の化合物またはその塩と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

20

【請求項41】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、炎症を抑制する方法。

【請求項42】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、dsDNA誘発性のインターフェロン発現を阻害する方法。

【請求項43】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、神経変性疾患または障害を処置する方法。

30

【請求項44】

前記神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、タウオパチー、または前頭側頭型認知症である、請求項43記載の方法。

【請求項45】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、てんかんを処置する方法。

【請求項46】

前記てんかんが、薬物耐性てんかんである、請求項45記載の方法。

【請求項47】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、ウイルス感染関連認知症を処置する方法。

40

【請求項48】

前記認知症が、HIV認知症である、請求項47記載の方法。

【請求項49】

その必要のある対象に請求項1～39のいずれか一項記載の化合物を投与することを含む、COVIDに関連する神経障害を処置する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

50

本出願は、2022年2月14日に出願された米国仮特許出願第63/309,894号の優先権を主張するものであり、該仮特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府支援の声明

本発明は、国立衛生研究所によって授与された契約番号5250037401 (R01AG051390) の下、政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本教示は、全体として、cGAS関連疾患または障害を処置するのに有用な新規の化学化合物および方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

自然免疫は、侵入してくる病原体から宿主細胞を守り、適応免疫系へのシグナル伝達を開始する、最前線の細胞ストレス応答と考えられている。これらのプロセスは、保存された病原体関連分子パターン (PAMP) によって、多様なパターン認識受容体 (PRR) による感知とその後のサイトカインおよびI型インターフェロン遺伝子発現の活性化とを通じて引き起こされる。単球、マクロファージおよび樹状細胞などの主な抗原提示細胞は、インターフェロンを産生し、T細胞およびB細胞適応免疫系の応答を誘発するのに極めて重要である。主なPRRは、細胞表面、リソソーム膜の内部、または細胞質ゾルのいずれかにおいて、異常な、すなわち、誤って局在化した、未成熟な、または未改変の核酸を検出する。

【0005】

サイクリックGMP-AMPシンターゼ (cGAS/MB21D1) は、病原体を起源とする細胞質ゾルのdsDNAまたは核もしくはミトコンドリアの自己dsDNAの誤った局在化に対する、主要なセンサーである。dsDNAがcGASに結合すると、cGAMPと称される拡散性の環状ジヌクレオチドであるc[G(2',5')pA(3',5')p]の合成が活性化され、cGAMPは、小胞体膜結合型アダプタータンパク質であるインターフェロン遺伝子刺激因子 (STING/TMEM173) まで移動してそれを活性化する。

【0006】

活性化されたSTINGは、TANK結合キナーゼ1 (TBK1) を動員かつ活性化し、今度はこれが、サイトカインおよびI型インターフェロンのmRNA発現を誘導するインターフェロン調節因子 (IRF) の転写因子ファミリーをリン酸化する。I型インターフェロンは、10個を超えるIFNA遺伝子および1個のIFNB1遺伝子から発現される。

【0007】

dsDNAの感知におけるcGASの重要な役割は、種々の病原性細菌、ウイルスおよびレトロウイルスにおいて立証されている。加えて、cGASは、細胞老化および潜在的がん細胞の監視における破裂した小核の認識など、他の様々な生物学的プロセスに不可欠である。

【0008】

cGAS経路は、侵入してくる病原体からの宿主防御に重要である一方で、細胞ストレスおよび遺伝的な要因もまた、例えば核またはミトコンドリアの漏出による、細胞質ゾルへの自己dsDNAの蓄積を引き起こし得る。これは、自己炎症性の応答を引き起こす可能性がある。ループス様の重度の自己炎症性の免疫媒介性障害であるエカルディ・グティエール症候群 (AGS) は、細胞質ゾル中の異常なDNAの分解を担う主要なDNAエキソヌクレアーゼである、TREX1の機能喪失型変異に起因する。TREX1欠損マウスにおけるcGASのノックアウトは、そうしなければ致死性である自己免疫応答を防ぎ、このことは、cGASが、インターフェロン症の薬物標的および駆動因子であることを支持するものである。同様に、エンドサイトーシス中にリソソーム内の過剰なDNAの分解を担うエンドヌク

10

20

30

40

50

レアーゼである、DNase IIの欠乏によって引き起こされる胚致死は、STINGまたはcGASの追加のノックアウトによって完全に救済される。それゆえ、cGASの阻害は、病因に抗dsDNA抗体が関わっている自己炎症性疾患を防ぐための重要な治療戦略となる。全身性エリテマトーデス（SLE）は、そのような1つの疾患であり得る [Pisetsky, Nat Rev Rheumatol 12, 102-110 (2016)]。

【0009】

パーキンソン病モデルにおいて、ミトコンドリアDNAに変異を蓄積する、老齡パーキンソンノックアウト変異マウスにおいて観察される、黒質緻密部からのドーパミン作動性ニューロンの喪失、運動欠陥および炎症は、STINGの喪失によって救済され、このことは、炎症が、この表現型を促進することを示唆している (Sliter D, 2018)。cGASおよびSTINGは、阻害物質および／または活性化剤の同定に関して、構造生物学者および医薬品化学者の関心を集めてきた。ネズミ科動物のcGAS-DNA結晶構造を使用したインシリコスクリーニングの試みは、十分に特徴決定された低分子抗マalaria薬であるキナクリンを、有望なcGAS阻害物質として同定させるに至った [An et al, Immunol. 194, 4089-4093 (2015)]。しかしながら、既知のDNAインターカレーターであるキナクリンは、cGASに直接結合して阻害する代わりに、dsDNA立体構造の崩壊を通じてこの酵素を活性化させないことによりcGAS活性に間接的に影響を及ぼすことが見いだされた。加えて、RIG-I経路との干渉を通じて、重大なオフターゲット効果が観察された。

【0010】

タウオパチーマウスおよびヒトAD脳のミクログリアにおけるcGAS活性化を調査し、ミクログリアにおいてcGAS依存性のI型インターフェロン応答を引き起こす潜在的機序として、タウ誘導性の細胞質ゾルmtDNAの漏出が同定された。行動学、電気生理学および単核 (sn) RNA-seqを組み合わせて使用して、本発明者らは、病原性タウ負荷に影響を及ぼすことなしにシナプスおよび認知の欠損に対するcGAS阻害の強力な保護効果を実証し、cGAS阻害によって誘導されるレジリエンスの驚くべき機構的基礎を発見した。本発明者らの知見は、不適応免疫応答と、AD患者のアミロイドおよびタウ病理に対する認知レジリエンスに関わるADリスク遺伝子であるMef2cの転写ネットワークとを関連付けるものであり、cGAS阻害物質を、ADの認知レジリエンスを向上させる新規の治療アプローチとして支持するものである。

【0011】

プロドラッグは、薬物の不活性な誘導体であり、標的器官に蓄積した後に生理学的条件下で活性化を受けるように設計される。いくつかのプロドラッグは、酵素媒介性の活性化を受けることもでき、受動的な細胞取り込みと受容体媒介性の能動的な細胞取り込みの両方を受けるように設計することができる。

【0012】

cGASに特異的な低分子阻害物質またはそのプロドラッグは、不適切なcGAS活性および結果として生じる望ましくないI型インターフェロン活性に起因する疾患の処置に大きな価値をもたらすと考えられる。そのような自己免疫疾患の例として、エカルディ・グティエール症候群 (AGS)、および150万人を超える米国人が罹患する複雑な慢性全身性自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) が挙げられる。SLEに対する現行の処置は、衰弱性の有害な副作用を伴う免疫抑制レジメンを必要とする。望ましくないI型インターフェロン活性の抑制に関連する他の可能な用途として、炎症性腸疾患 (IBD) および神経変性疾患の処置が含まれると考えられる。

【0013】

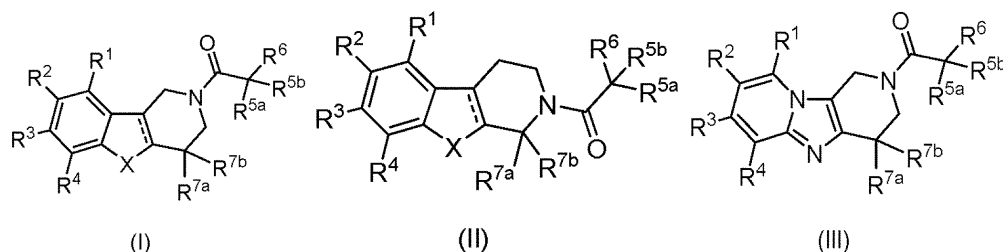
組織および血漿中を長期間循環できるまたは血液脳関門 (BBB) を通過する受容体媒介浸透を通じて脳内濃度を高めることができるcGAS阻害物質が必要とされている。

【発明の概要】

【0014】

概要

本開示は、式 (I)、(II)、もしくは (III)：



の化合物またはその薬学的に許容される塩に関し、
式中、

R^1 は、ヘテロアリール、ハロゲン、アリール、環状アミン、ヒドロキシ、 $-OC(O)$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-N(H)CO$ -アルキル、またはアルコキシであり；

R^2 は、H、アルキル、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^c$ 、ハロゲン、またはヘテロシクリルであり；

R^3 および R^4 は、独立して、H、ハロゲン、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OR^c$ 、または $-OCF_3$ であり；

R^{5a} および R^{5b} は、独立して、H、アルキル、アリール、またはシクロアルキルであり；

R^6 は、 $N(H)R^a$ 、O-アルキル、OH、 $-CO_2R^d$ であるか；

または、 R^{5a} および R^6 は、一緒になって、5～6員ヘテロシクリルを形成し；

R^{7a} および R^{7b} は、独立して、Hもしくはアルキルであるか、または、これらが結合している炭素と一緒に、3員脂肪族炭素環を形成し；

R^a は、H、アルキル、 $-COR^b$ 、 $-CON(H)R^b$ 、または $-CO_2R^e$ であり；

R^b は、アルキル、またはアリールであり；

R^c は、H、アルキル、または $-C(O)$ -アルキルであり；

R^d は、Hまたはアルキルであり；

R^e は、アルキル、またはアリールであり；

Xは、NH、NMe、NEt、O、またはSであり；かつ

は、単結合または二重結合である。

【0015】

本開示はまた、式(I)、(II)または(III)の化合物を含む薬学的組成物に関する。

【0016】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象におけるcGAS関連自己免疫疾患または障害を処置する方法を提供する。

【0017】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象における炎症反応を抑制する方法を提供する。

【0018】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象におけるdsDNA誘発性のインターフェロン発現を阻害する方法を提供する。

【0019】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象における神経変性疾患または障害を処置する方法を提供する。

【0020】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象におけるてんかんを処置する方法を提供する。

【0021】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象におけるウイルス感染関連認知症を処置

10

20

30

40

50

する方法を提供する。

【0022】

本開示はさらに、本開示の化合物を用いた対象におけるCOVIDに関連する神経障害を処置する方法を提供する。

【0023】

本開示はさらに、薬学的に許容される担体と本開示の化合物とを含む薬学的組成物に関する。

【0024】

本開示のこれらのならびに他の特徴、局面および利点は、以下の図面、関連する説明、および特許請求の範囲を参照してより良く理解されることになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】図1A～1Mは、cGAS-STING経路が、タウオパチーマウスおよびヒトAD脳の海馬で活性化されることを示している。図1Aは、8～9月齢のP301Sおよび非トランスジェニックマウス由来のバルク海馬組織からのRNA-seqデータのボルケーノプロットである。赤い点は、 $|\log_2$ 変化倍率 $| > 0.5$ の遺伝子を表す。ワルド検定を使用した。他の遺伝子は全て、青色で示している。選抜したアップレギュレーションされたインターフェロン遺伝子が標識されている。n=7 非トランスジェニック、n=6 P301S；図1Bは、非トランスジェニック試料と比較してP301Sにおいてアップレギュレーションされた上位500のDEGに関連するホールマーク経路を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Cは、非トランスジェニック試料と比較してP301Sにおいてアップレギュレーションされた上位500のDEGに関連する上位転写因子を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Dは、活性化zスコア（Activation z-score） > 1 および重複p値（p-value of overlap） < 0.05 を使用して同定された、アップレギュレーションされたDEGの上流調節因子としてのcGASのIPA（Ingenuity Pathway Analysis）予測である；図1Eは、リン酸化されたTank結合キナーゼ（pTBK1）、総Tank結合キナーゼ1（TBK1）およびGAPDHについてのウェスタンブロットである。海馬組織溶解物を使用。レーン1～7：非トランスジェニック（ntg）；レーン8～14：P301S；図1Fは、非トランスジェニック海馬と比較してP301Sにおいて有意に高いホスホ-TBK1を示している（E）からのpTBK1/TBK1の比である。* $p = 0.0015$ スチューデントの両側t検定；図1Gは、抗Iba1（緑）および抗STING抗体で標識された非トランスジェニックおよびP301S海馬の代表的な免疫蛍光画像である（スケールバー=50 μ m）；図1Hは、P301S海馬における増加したIba1カバレッジおよびIba1-Sting重複を示している、Iba1およびSting免疫蛍光強度の定量化である。結果は、動物1匹当たり3～4個の断面からの平均強度測定として提示される。p値 < 0.05 。スチューデントの両側t検定（n=5 Ntg、n=5 P301S）；図1Iは、単核10×ゲノミクスシーケンシングに使用された患者数および脳領域を示している図解である（n=7、男性4名および女性3名）；図1Jは、ヒトミクログリア集団のsnRNA-Seqにおけるミクログリアマーカー遺伝子INPP5DおよびCSF1RならびにSTAT1およびcGAS（MB21D1）の発現を示しているUMAPプロットである；図1Kは、cGAS発現ミクログリアにおいて濃縮された関連するホールマーク経路を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Lは、ヒト前頭皮質脳溶解物を使用したpTBK1およびGAPDHについての代表的なウェスタンブロットである。レーン1～3：非AD（Braakステージ0）；レーン4～6：AD（Braakステージ6）；図1Mは、非AD脳と比較してヒトADにおいて有意に高いホスホ-TBK1を示している（L）からのpTBK1/GAPDHの比である。* $p < 0.01$ 、スチューデントの両側t検定（n=10 非AD、n=8 AD）。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図1C】図1Aの説明を参照のこと。

【図1D】図1Aの説明を参照のこと。

【図1E】図1Aの説明を参照のこと。

10

20

30

40

50

【図 1 F】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 G】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 H】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 I】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 J】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 K】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 L】図 1A の説明を参照のこと。

【図 1 M】図 1A の説明を参照のこと。

【図 2 A】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2A は、未処置（対照）およびタウ処置（タウ）初代マウスミクログリア由来の培養培地上清中の ELISA による IFNB ならびに MagPix マルチプレックス ELISA による CXCL10 および CCL5 タンパク質の定量化である。IFNB: $n=7$, ** $p=0.0016$ 、対応のある t 検定。CXCL10 および CCL5, $n=5$, *** $p=0.0004$, ** $p=0.0031$ 、対応のない t 検定。

10

【図 2 B】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2B は、マウス初代ミクログリア細胞溶解物を使用したリン酸化された Tank 結合キナーゼ (pTBK1)、総 Tank 結合キナーゼ 1 (TBK1) および GAPDH についての代表的なウェスタンブロットである（レーン 1: 未処置；レーン 2: タウ線維で処置）。

【図 2 C】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2C は、未処置（対照）と比較してタウ線維で処置された初代ミクログリア（タウ）において有意に高いホスホ-TBK1 を示している図 2A からの pTBK1/TBK1 の比である。*、 $p<0.05$ 、スチューデントの対応のある t 検定 ($n=3$)。

20

【図 2 D】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2D は、タウ線維で処置され、タウに対する抗体についてイムノゴールド標識された初代マウスミクログリアの電子顕微鏡写真である（L=リソソーム、M=ミトコンドリア）。

【図 2 E】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2E は、ddC (40 または 80 $\mu\text{g/ml}$) または EtBr (50 または 100 ng/ml) で 7 日間処置して mtDNA 枯渇 (p°) 細胞を生成させた BV2 IfnB ルシフェラーゼレポーター細胞の DNA 抽出物に対する RT-qPCR によって測定されたゲノム DNA (Tert) に対するミトコンドリア DNA (Nd2) の比である。値は、未処置試料に対して正規化される ($n=2$)、**** $p<0.0001$ 、一元配置 ANOVA。

30

【図 2 F】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2F では、対照および mtDNA 枯渇 (p°) IfnB ルシフェラーゼレポーター BV2 細胞をタウ線維で刺激したかまたは刺激しなかった。IfnB シグナルおよび生存率を 16 時間後に測定した。IfnB-ルシフェラーゼシグナルは、生存率/細胞数を補正するために Cell Titer Glo シグナルに対して正規化して示される ($n=3$)、**** $p<0.0001$ 、二元配置 ANOVA。

40

【図 2 G】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2G は、タウ線維または HT 鎖 DNA で処置したまたは処置しなかった Cgas^{+/+} および Cgas^{-/-} 初代培養ミクログリアについてのバルク RNA-seq 解析である（1 条件当たり $n=3$ ）。Cgas^{+/+} ミクログリアにおける dsDNA およびタウ処置によってアップレギュレーションされた遺伝子の重複を示しているベンダイアグラム。ログ変化倍率 >1 および FDR <0.05 。

【図 2 H】図 2A～2J は、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGAS およびミトコンドリア DNA 漏出によって媒介されることを示している。図 2H は、dsDNA およびタウ処置 Cgas^{+/+} ミクログリアに共通しているアップレギュレーションされ

50

たDEGで表される上位5つのリアクトーム経路である。FDR<0.05。

【図2I】図2A~2Jは、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGASおよびミトコンドリアDNA漏出によって媒介されることを示している。図2Iは、HT-DNAまたはタウで刺激されたCgas^{+/+}ミクログリアと比較してCgas^{-/-}において低いインターフェロン刺激遺伝子のヒートマップ概要である。

【図2J】図2A~2Jは、タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化が、cGASおよびミトコンドリアDNA漏出によって媒介されることを示している。図2Jは、Stat1、Sp100およびDdx60を含むインターフェロン遺伝子を含む(I)からの遺伝子のストリング相互作用プロットである。

【図3A】図3A~3Jは、Cgasの部分的または完全な喪失が、タウオパチー関連ミクログリアインターフェロニングネチャーを軽減することを示している。図3Aは、単核シーケンシング(snRNA-Seq)試料中のCgas(Mb21d1)およびSting(Tmem173)の正規化された細胞型発現を示しているドットプロットである；図3Bは、snRNA-Seqミクログリア集団におけるマーカー遺伝子P2ry12、Siglech、Sall1およびCsf1rの強い発現を示しているUMAPプロットである(1遺伝子型当たりn=6)；図3Cは、ミクログリアサブクラスターに従って色付けされ、遺伝子型によって分割されたUMAPプロットである；図3Dは、ミクログリアクラスターにおける恒常性遺伝子(P2ry12、Siglech)、疾患関連遺伝子(Apoe、Itgax)およびインターフェロン遺伝子(Parp14、Stat1、Trim30a、Rnf213)の発現レベルを示しているバイオリンプロットである；図3Eは、P301S Cgas^{+/+}ミクログリアと比較してP301S Cgas^{+/-}およびP301S Cgas^{-/-}ミクログリアにおいて有意に低いインターフェロン刺激遺伝子を示しているドットプロットである；図3Fは、マウス海馬のCA1放線状層(stratum radiatum)におけるホスホル(phosphor)-STAT1の免疫染色の代表的な63×共焦点画像である(スケールバー=10μm)；図3Gは、CA1放射状線条体(striatum radiatum)において測定されたホスホル-STAT1の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。データは、平均±SEMとして報告される(n=6 Cgas^{+/+}、n=8 Cgas^{+/-}、n=7 Cgas^{-/-}、n=6 P301S Cgas^{+/+}、n=9 P301S Cgas^{+/-}、n=5 P301S Cgas^{-/-}) (Cgas^{+/+}対P301S Cgas^{+/+} : p=0.0002、P301S Cgas^{+/+}対P301S Cgas^{+/-} : p=0.0002、P301S Cgas^{+/+}対P301S Cgas^{-/-} : p=0.0415)；図3Hは、遺伝子モジュールと遺伝子型との関連性を示しているヒートマップである；図3Iは、疾患関連、初期応答および後期応答ミクログリアシグネチャーと比較した疾患モジュール1および2マーカーの解析である。

【図3B】図3Aの説明を参照のこと。

【図3C】図3Aの説明を参照のこと。

【図3D】図3Aの説明を参照のこと。

【図3E】図3Aの説明を参照のこと。

【図3F】図3Aの説明を参照のこと。

【図3G】図3Aの説明を参照のこと。

【図3H】図3Aの説明を参照のこと。

【図3I】図3Aの説明を参照のこと。

【図3J】図3Aの説明を参照のこと。

【図4A】図4A~4Iは、Cgasの喪失が、タウオパチー誘導性の海馬シナプス毒性および記憶障害を救済することを示している。図4Aは、7~8月齢のP301S cGAS^{+/+}、P301S cGAS^{+/-}およびP301S cGAS^{-/-}ならびにそれらの非トランスジェニック同腹仔での空間学習および記憶のモリス水迷路(MVM)評価の隠し試行(セッション1~12)過程での累積探索距離である。雄と雌は、別々の日に試験した。ここに提示されるデータは、両方の性を合わせて表示している。n=12 cGAS^{+/+}、n=11 cGAS^{+/-}、n=11 cGAS^{-/-}、n=8 P301S cGAS^{+/+}、n=17 P301S cGAS^{+/-}、n=6 P301S cGAS^{-/-}。二元配置ANOVA。****、p<0.0001；図4Bは、MVM評価の24時間ブローブ過程で標的四分区画に費やされた時間または非標的(その他)四分区画に費やされた平均時間のパ

ーセンテージである。対応のある両側スチューデントのt検定；図4Cは、MVM評価の72時間プローブ過程で標的四分区画に費やされた時間または非標的（その他）四分区画に費やされた平均時間のパーセンテージである。対応のある両側スチューデントのt検定；図4Dでは、歯状回分子層でフィールド興奮性シナプス後電位（fEPSP）を記録し、貫通経路にTBSプロトコル（矢印）を適用してLTPを誘導した。代表的なトレースは、LTP誘導前後のfEPSPを示している（上）。スケールバー、0.4mVおよび5ms。TBS後に最大60分間なされたfEPSP傾斜測定は、LTP誘導前の平均ベースラインfEPSP傾斜に対して正規化した（下、1群当たり3～4匹のマウスからn=8～11の断面）；図4Eでは、TBSを適用した55～60分後に、正規化された平均fEPSP傾斜からLTPの規模を算出した（1群当たり3～4匹のマウスからn=8～11の断面；*、 $p<0.05$ 、**、 $p<0.01$ ；一元配置ANOVA、ボンフェローニ事後解析）；図4Fは、顆粒、CA1およびCA2/3、CA2マーカーの発現による興奮性ニューロンのクラスターの分類を示しているドットプロットである；図4Gは、歯状回に関するクラスター（DG）、CA1およびCA2/3クラスターからのDEGの割合をまとめたパイチャートである；図4Hは、PSD95抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である（スケールバー=10 μ m）；図4Iは、CA1放射状線条体において測定されたPSD-95点の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3～5つの画像の平均強度測定を表す。統計比較は、一元配置または二元配置ANOVAを使用して実施した（Cgas+/+対P301S Cgas+/+： $p=0.0275$ 、P301S Cgas+/+対P301S Cgas+/-： $p=0.0002$ 、P301S Cgas+/+対P301S Cgas-/-： $p=0.0415$ ）；データは、平均 $\pm$ SEMとして報告される。

10

20

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

【図4E】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F】図4Aの説明を参照のこと。

【図4G】図4Aの説明を参照のこと。

【図4H】図4Aの説明を参照のこと。

【図4I】図4Aの説明を参照のこと。

【図5A】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Aは、P301S Cgas+/+興奮性ニューロンと比較してP301S Cgas-/-においてアップレギュレーションされた代表的な発現変動遺伝子を示しているボルケーノプロットである（ $\log_2FC>0.1$ 、 $FDR<0.05$ ）。

30

【図5B】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Bは、マウス海馬のCA1放射状層におけるNRG1の免疫染色の代表的な63 $\times$ 共焦点画像である（スケールバー=10 μ m）。

【図5C】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Cは、CA1放射状線条体において測定されたNRG1の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。データは、平均 $\pm$ SEMとして報告される（n=11 Cgas+/+、n=6 P301S Cgas+/+、n=8 P301S Cgas+/-、n=6 P301S Cgas-/-。Cgas+/+対P301S Cgas+/+： $p=0.0016$ 、P301S Cgas+/+対P301S Cgas-/-： $p=0.0234$ ）。

40

【図5D】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Dは、P301S Cgas+/+抑制性ニューロンと比較してP301S Cgas-/-においてアップレギュレーションされた代表的な発現変動遺伝子を示しているボルケーノプロットである（ $\log_2FC>0.1$ 、 $FDR<0.05$ ）。

【図5E】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよ

50

びその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Eは、マウス海馬のCA1錐体層におけるMef2cおよびNeuNの免疫染色の代表的な25×共焦点画像である（スケールバー＝50um）。

【図5F】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Fは、CA1錐体層におけるMef2c+、NeuN+ニューロン中のMef2cの平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。*、 $p < 0.05$ 、対応のないt検定。データは、平均±SEMとして報告される（ $n=4$ P301S Cgas+/+, $n=5$ P301S Cgas-/-）。

【図5G】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Gは、興奮性ニューロンDEG、抑制性ニューロンDEGおよびMEF2C標的遺伝子の間の重複のベンダイアグラムである。

10

【図5H】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Hは、興奮性/抑制性ニューロンDEGと転写因子標的遺伝子（MEF2A、MEF2C、FOSL2、JUNB）および活性誘導発現変動遺伝子（ARGおよびscARG）のリストとの間の重複を示しているヒートマップである。各ボックス内の数は、重複しているオッズ比を表している。

【図5I】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Iは、WT、P301S、およびP301S Cgas-/-興奮性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意なDEGの発現のヒートマップである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ または ≤ -0.1 ）。

20

【図5J】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Jは、WT、P301S、およびP301S Cgas-/-抑制性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意なDEGの発現のヒートマップである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ または ≤ -0.1 ）。

【図5K】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Kは、興奮性ニューロンクラスターにおいてヒト認知レジリエンスと正に相関している、Cgas欠失による有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ ）。

30

【図5L】図5A～5Lは、cGASの喪失が、タウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579。図5Lは、抑制性ニューロンクラスターにおいてヒト認知レジリエンスと正に相関している、Cgas欠失による有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ ）。

【図6A】図6A～6Iは、脳透過性のcGAS阻害物質が、MEF2C標的遺伝子を上昇させ、シナプス喪失ならびに空間学習および記憶の障害を防ぐことを示している。図6Aは、興奮性ニューロン、抑制性ニューロンおよびMEF2C標的遺伝子における、P301S TDI DEG対P301S Veh DEG間の重複のベンダイアグラムである；図6Bは、興奮性/抑制性ニューロンDEGと転写因子標的遺伝子（MEF2A、MEF2C、FOSL2、JUNB）および活性誘導発現変動遺伝子（ARGおよびscARG）のリストとの間の重複を示しているヒートマップである。各ボックス内の数は、重複しているオッズ比を表している；図6Cは、Ntg対照、Ntg TDI、P301S対照、P301S TDI興奮性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ ）；図6Dは、Ntg対照、Ntg TDI、P301S対照、P301S TDI抑制性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである（ $p_{adj} < 0.5$ 、 $\log FC \geq 0.1$ ）；図6Eは、150mg/kgのTDI-6570または対照飼料を3ヶ月間与えたNtgおよびP301Sマウスに対する新規物体認識試験である。F：日常物体、N：新規物体（ $n=9$ Ntg対照、 $n=6$ Ntg TDI-6570、 $n=5$ P301S対照、 $n=12$ P301S TDI6

40

50

570)。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ ；データは、平均±SEMとして報告される；図6Fは、PSD95抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である（スケールバー＝10 μm ）；図6Gは、CA1放射状線条体において測定されたPSD95点の平均強度である。各丸は、1つの画像の平均強度測定を表す。動物1匹当たり3～5つの画像を取得した。統計比較は、混合モデルを使用して実施した（ $n=13$ Ntg対照、 $n=12$ Ntg TDI-6570、 $n=9$ P301S対照、 $n=12$ P301S TDI-6570。Ntg対照対P301S対照： $p=0.0302$ 、P301S対照対P301S TDI-6570： $p=0.0427$ ）；図6Hは、vGAT抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である（スケールバー＝10 μm ）；図6Iは、CA1放射状線条体において測定されたvGAT点の平均強度である。各丸は、1つの画像の平均強度測定を表す。動物1匹当たり3～5つの画像を取得した。統計比較は、混合モデルを使用して実施した（ $n=12$ Ntg対照、 $n=11$ Ntg TDI-6570、 $n=8$ P301S対照、 $n=13$ P301S TDI-6570。Ntg対照対P301S対照： $p=0.0453$ 、P301S対照対P301S TDI-6570： $p=0.0318$ ）。

10

20

30

40

50

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図6C】図6Aの説明を参照のこと。

【図6D】図6Aの説明を参照のこと。

【図6E】図6Aの説明を参照のこと。

【図6F】図6Aの説明を参照のこと。

【図6G】図6Aの説明を参照のこと。

【図6H】図6Aの説明を参照のこと。

【図6I】図6Aの説明を参照のこと。

【図7】Cgas欠失がまた、タウオパチーにおいて抑制性ニューロンのトランスクリプトームを改変したことを示している。pan-介在ニューロンマーカーGAD1およびGAD2陽性ニューロン集団のサブクラスタリングは、9つの抑制性ニューロンの部分集団を同定した（図6A）（Arneson et al., 2018；Cembrowski et al., 2016）。本発明者らは、Cgas欠失が、SstでもCckでもなく、Pvalb、Vip、Reln、Lhx6などの介在ニューロンマーカーのサブセットのタウオパチー誘導性ダウンレギュレーションを救済したことを見いだした。加えて、介在ニューロンからのDEGの分析は、Cgas欠失が、GABA受容体Gabbr2およびGABAトランスポーターSlc6aを含むGABAシグナル伝達に關与する遺伝子のアップレギュレーションを導き、Cgas欠失による介在ニューロン機能の回復を支援することを明らかにした（図6B）。興味深いことに、Cgas欠失によってアップレギュレーションされた遺伝子の中で、本発明者らは、カリウムチャネルおよび相互作用サブユニットKcnc1、Kcnc2、Kacnip1ならびにナトリウムチャネルScn1aを含め、多くが、ニューロンの興奮性および発作活動の調節に關与することを見いだした（図6C）。実際に、Cgas欠失は、Scn1aを含め、P301Sマウスの介在ニューロンで減少していた抗発作遺伝子の顕著なアップレギュレーションをもたらした（図6D）。Scn1aの欠乏は、全般性強直間代発作を伴う難治性小児てんかんである、ドラベ症候群を導く。

【図8A】図8A～8Dは、タウオパチーでのcGAS-IFN-MEF2c軸を図示しているワーキングモデルを示す。疾患／脆弱状態下では、病原性タウは、ミクログリアにおけるmtDNAの漏出を介したcGAS依存性インターフェロン応答と、興奮性および抑制性ニューロンにおけるMEF2c転写ネットワークの低減を活性化し、認知機能障害をもたらす。cGASの喪失は、ミクログリアにおいてインターフェロン応答を低減し、Mef2c転写ネットワークを増強し、その結果、認知レジリエンスをもたらす。

【図8B】図8A～8Dは、タウオパチーでのcGAS-IFN-MEF2c軸を図示しているワーキングモデルを示す。疾患／脆弱状態下では、病原性タウは、ミクログリアにおけるmtDNAの漏出を介したcGAS依存性インターフェロン応答と、興奮性および抑制性ニューロンにおけるMEF2c転写ネットワークの低減を活性化し、認知機能障害をもたらす。cGASの喪失は、ミクログリアにおいてインターフェロン応答を低減し、Mef2c転写ネットワークを増強し、その結果、認知レジリエンスをもたらす。

【図 8 C】図 8 A～8 D は、タウオパチーでの cGAS-IFN-MEF2c 軸を図示しているワーキングモデルを示す。疾患／脆弱状態下では、病原性タウは、ミクログリアにおける mtDNA の漏出を介した cGAS 依存性インターフェロン応答と、興奮性および抑制性ニューロンにおける MEF2c 転写ネットワークの低減を活性化し、認知機能障害をもたらす。cGAS の喪失は、ミクログリアにおいてインターフェロン応答を低減し、Mef2c 転写ネットワークを増強し、その結果、認知レジリエンスをもたらす。

【図 8 D】図 8 A～8 D は、タウオパチーでの cGAS-IFN-MEF2c 軸を図示しているワーキングモデルを示す。疾患／脆弱状態下では、病原性タウは、ミクログリアにおける mtDNA の漏出を介した cGAS 依存性インターフェロン応答と、興奮性および抑制性ニューロンにおける MEF2c 転写ネットワークの低減を活性化し、認知機能障害をもたらす。cGAS の喪失は、ミクログリアにおいてインターフェロン応答を低減し、Mef2c 転写ネットワークを増強し、その結果、認知レジリエンスをもたらす。

10

【発明を実施するための形態】

【0026】

詳細な説明

本開示の概念は、本明細書の図面および説明で詳細に例証かつ記載されるが、図面およびそれらの説明における結果は、例として考慮されるべきであり、性質を限定するものではない；例証となる態様のみが示されかつ説明されていること、そして、本開示の精神の範囲内に入る全ての変化および変更が保護されることが望ましいことが理解されよう。

【0027】

20

別途定義しない限り、科学用語および技術用語は、本発明が関係する技術分野の通常の技能を有する者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0028】

本明細書において引用されるありとあらゆる特許公報、非特許公報および参考文献文書の内容全体が、参照により本明細書に組み入れられるが、ただし、本明細書と矛盾する開示または定義がある場合は、本明細書における開示または定義が優先されるものとする。

【0029】

前述の各々および以下の態様の各々において、式は、その共役式 (conjugate formulae) の全ての薬学的に許容される塩を包含しかつ表すだけではないと理解されるべきである。ある特定の官能基、例えば、ヒドロキシ、アミノおよび同類の基は、式 (I) または (II) の化合物の様々な物理的形態で、水および／または様々な溶媒と錯体および／または配位複合体を形成することが認められている。本開示全体を通して描写される式は、式 (I)、(II) または (III) の化合物の水和物および／または溶媒和物を含みかつ表すと理解される。また、式 (I)、(II) または (III) の化合物の水和物および／または溶媒和物と同じく、式 (I)、(II) または (III) の化合物の非水和物および／または非溶媒和物もそのような式によって記載されることも理解されるべきである。

30

【0030】

定義

便宜のため、本開示のさらなる説明の前に、明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において用いられるいくつかの用語をここでまとめて示す。これらの定義は、本開示の残部に照らして読まれるべきであり、当業者によって理解されるように同様に理解されるべきである。別途定義しない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、当技術分野の通常の技能を有する者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

40

【0031】

本開示がより容易に理解されるために、いくつかの用語および語句が下記および本明細書全体を通して定義される。

【0032】

「1つの (a)」および「1つの (an)」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは1つ超 (すなわち、少なくとも1つ) のことを指すために使

50

用される。例として、「1つの要素」は、1つの要素または1つ超の要素のことを意味する。

【0033】

「および／または」という語句は、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、それにより結びつけられた要素、すなわち、ある場合には接続して存在し、他の場合には離接して存在する要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解されるべきである。「および／または」と共に列記される複数の要素は、同じ方式で解釈されるべきであり、すなわち、それにより結びつけられた要素の「1つまたは複数」として解釈されるべきである。具体的に同定された要素に関係するか関係しないかによらず、「および／または」句によって具体的に同定された要素以外の他の要素が任意で存在してよい。したがって、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」についての言及は、「含む (comprising)」などの限定のない言葉と併せて使用される場合、Aのみ（任意でB以外の要素を含む）；またはBのみ（任意でA以外の要素を含む）；またはさらにAとBの両方（任意で他の要素を含む）；などのことを指すことができる。

10

【0034】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「または」は、上で定義された通りの「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、一覧の中の項目を分離する場合、「または」または「および／または」は、包括的である、すなわち、多数または一覧の要素のうちの少なくとも1つを含むが、そのうちの1つ超もまた含み、任意で、追加の列記されていない項目も含むと解釈されるものとする。「のうちの1つのみ」もしくは「のうちの厳密に1つ」、または特許請求の範囲において使用される場合の「からなる」などの、反対のことが明確に示されている用語だけが、多数のまたは一覧の要素の厳密に1つの要素を含むことを指す。一般に、「または」という用語は、本明細書において使用される場合、「いずれか」、「のうちの1つ」、「のうちの1つのみ」または「のうちの厳密に1つ」などの排他的な用語がその前にある場合にのみ、排他的代替物（すなわち、「1つまたは他方であるが両方ではない」）を指すと解釈されるものとする。特許請求の範囲において使用される場合の「から本質的になる」は、特許法の分野において使用されるようなその通常の意味を有するものとする。

20

【0035】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、「少なくとも1つ」という語句は、1つまたは複数の要素の一覧を参照して、その一覧の要素の中のいずれか1つまたは複数の要素から選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであるが、必ずしもその一覧の要素内に具体的に列記されたありとあらゆる要素のうちの少なくとも1つを含むわけではなく、かつ、その一覧の要素の中の任意の要素の組み合わせを除外するわけではない。この定義はまた、具体的に同定された要素に関係するか関係しないかによらず、「少なくとも1つ」という語句が指すその一覧の要素内で具体的に同定された要素以外の要素が任意で存在してよいことを許容する。したがって、非限定的な例として、「AおよびBのうちの少なくとも1つ」（または同等に「AまたはBのうちの少なくとも1つ」、または同等に「Aおよび／またはBのうちの少なくとも1つ」）は、任意でその1つ超を含む少なくとも1つのAであり、Bが存在しない（かつ任意でB以外の要素を含む）こと；または任意でその1つ超を含む少なくとも1つのBであり、Aが存在しない（かつ任意でA以外の要素を含む）こと；または任意でその1つ超を含むさらに少なくとも1つのA、および任意でその1つ超を含む（かつ任意で他の要素を含む）少なくとも1つのBなどのことを指すことができる。

30

40

【0036】

また、反対のことが明確に示されていない限り、1つ超の工程または行為を含む本明細書において主張される任意の方法において、その方法の工程または行為の順序は、その方法の工程または行為が記載されている順序に必ずしも限定されるわけではないと理解されるべきである。

【0037】

50

上記明細書と同じく、特許請求の範囲において、全ての移行句、例えば、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「担持する (carrying)」、「有する (having)」、「含有する (containing)」、「伴う (involving)」、「保持する (holding)」、「から構成される (composed of)」などは、限定のない、すなわち、含むがそれらに限定されない (including but not limited to) を意味すると理解されるべきである。

【0038】

本開示の組成物に含有される様々な化合物は、特定の幾何学形態または立体異性形態で存在し得る。加えて、本開示のポリマーはまた、光学的に活性であり得る。本開示は、本開示の範囲内に入るものとして、cis-およびtrans-異性体、R-およびS-エナンチオマー、ジアステレオマー、(d)-異性体、(l)-異性体、それらのラセミ混合物、ならびにそれらの他の混合物を含め、そのような全ての化合物を想定している。追加の不斉炭素原子が、アルキル基などの置換基中に存在してよい。そのような全ての異性体、ならびにそれらの混合物は、本開示に含まれるものと意図される。

【0039】

例として、本開示の化合物の特定のエナンチオマーが所望される場合、そのエナンチオマーは、不斉合成によって、またはキラル補助剤による誘導体化によって調製され得るが、この場合、結果として生じたジアステレオマー混合物が分離され、補助基が開裂して、純粋な所望のエナンチオマーがもたらされる。あるいは、その分子が、アミノなどの塩基性官能基、またはカルボキシルなどの酸性官能基を含有する場合、適切な光学的に活性な酸または塩基とジアステレオマー塩が形成され、続いて、そのように形成されたジアステレオマーが当技術分野において周知の分別晶析またはクロマトグラフィー手段によって分割され、その後、純粋なエナンチオマーが回収される。

【0040】

本明細書に描写される構造はまた、1つまたは複数の同位体濃縮原子の存在のみが異なる化合物を含むことも意味する。例えば、水素と重水素もしくは三重水素との、または炭素と ^{13}C もしくは ^{14}C 濃縮炭素との置換によって生産された化合物は、本開示の範囲内である。

【0041】

「プロドラッグ」という用語は、本明細書において使用される場合、生理学的条件下で治療上活性な作用物質へと変換される化合物を包含する。プロドラッグを作製するための一般的な方法は、生理学的条件下で加水分解されて所望の分子が現れるように選択された部分を含むことである。プロドラッグは、宿主動物の酵素活性によって変換され得る。

【0042】

「薬学的に許容される賦形剤」または「薬学的に許容される担体」という語句は、本明細書において使用される場合、対象の化学物質を身体の1つの器官または部分から身体別の器官または部分へと運搬または輸送する際に関与する、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材などの薬学的に許容される材料、組成物または媒体のことを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、患者に害を及ぼすことなく、かつ実質的に非発熱性であるという意味で、「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体としての役目を果たし得る材料のいくつかの例として、(1) 糖、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース；(2) デンプン、例えば、コーンデンプンおよびジャガイモデンプン；(3) セルロース、およびその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、およびセルロースアセタート；(4) トラガカント粉末；(5) 麦芽；(6) ゼラチン；(7) タルク；(8) 賦形剤、例えば、ココアバターおよび坐剤ワックス (suppository wax)；(9) 油類、例えば、落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油；(10) グリコール類、例えば、プロピレングリコール；(11) ポリオール類、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール；(12) エステル類、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；(13) 寒天；(14) 緩衝

10

20

30

40

50

化剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；（15）アルギン酸；（16）パイロジェンフリー水；（17）等張食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）リン酸緩衝液；ならびに（21）薬学的製剤に用いられる他の非毒性の適合可能な物質が挙げられる。本開示の薬学的組成物は、非発熱性、すなわち、患者に投与された際に有意な温度上昇を誘導しない。

【0043】

「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物の相対的に非毒性の無機および有機酸付加塩のことを指す。これらの塩は、化合物の最終単離および精製の間にその場で調製するか、または、精製した化合物をその遊離塩基形態で好適な有機または無機酸と別々に反応させ、そのように形成された塩を単離することによって調製することができる。代表的な塩として、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩（naphthylate）、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる（例えば、Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19.を参照のこと）。

【0044】

他の場合では、本開示の方法において有用な化合物は、1つまたは複数の酸性官能基を含有してよく、したがって、薬学的に許容される塩基と薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの場合の「薬学的に許容される塩」という用語は、化合物の相対的に非毒性の無機および有機塩基付加塩のことを指す。これらの塩は、同様に、化合物の最終単離および精製の間にその場で調製するか、または、精製した化合物をその遊離酸形態で薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩などの好適な塩基と、アンモニアと、または薬学的に許容される有機一級、二級もしくは三級アミンと別々に反応させることによって調製することができる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類塩として、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびアルミニウム塩などが挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとして、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが挙げられる（例えば、上記のBerge et al.を参照のこと）。

【0045】

処置で使用する化合物の「治療有効量」（または「有効量」）は、所望の投与レジメンの一部として（哺乳動物、例えばヒトに）投与された際に、例えば、任意の医学的処置に適合可能な合理的なベネフィット／リスク比で、疾患もしくは状態が処置されるようにまたは美容を目的として、臨床的に許容される標準に従って、症状を緩和する、状態を改善する、または疾患状態の発症を遅らせる、調製物中の化合物の量のことを指す。

【0046】

「予防的または治療的」処置という用語は、当技術分野において認められており、患者に本開示の1つまたは複数の化合物を投与することを含む。望まれていない状態（例えば、宿主動物の疾患または他の望まれていない状態）の臨床症状が現れる前に化合物が投与される場合、処置は予防的である（すなわち、望まれていない状態の発生から宿主を保護する）が、望まれていない状態が現れた後に化合物が投与される場合、処置は治療的である（すなわち、既存の望まれていない状態またはその副作用を減少させる、改善する、または安定化させることが意図される）。

【0047】

「患者」または「対象」という用語は、疾患、障害または状態を患っている哺乳動物のことを指す。患者または対象は、霊長類、イヌ科、ネコ科、またはウマ科であることができる。患者は、トリである対象であることができる。トリは、ニワトリなどの家畜のトリであることができる。トリは、家禽であることができる。患者または対象は、ヒトであることができる。

【0048】

脂肪族鎖は、下に定義されるアルキル、アルケニルおよびアルキニルのクラスを含む。線状の脂肪族鎖は、分岐していない炭素鎖部分に限定される。本明細書において使用される場合、「脂肪族基」という用語は、直鎖、分岐鎖または環状の脂肪族炭化水素基のことを指し、アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基などの飽和および不飽和脂肪族基を含む。

【0049】

「アルキル」は、指定の炭素原子数または指定のない場合は最大30個の炭素原子を有する、完全に飽和された環状または非環状の分岐したまたは分岐していない炭素鎖部分のことを指す。例えば、1～8個の炭素原子のアルキルは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチルおよびオクチルなどの部分、ならびにこれらの部分の位置異性体である部分のことを指す。10～30個の炭素原子のアルキルには、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、ヘンエイコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル、ペンタコシル、ヘキサコシル、ヘプタコシル、オクタコシル、ノナコシル、トロコンタニル (trocontanyl)、ペンタコセニル、およびヘキサコセニルが含まれる。直鎖または分岐鎖アルキルは、その骨格に30個もしくはより少ない炭素原子（例えば、直鎖ではC1～C30、分岐鎖ではC3～C30）、または20個もしくはより少ない炭素原子を有することができる。アルキル基は、置換されていても置換されていなくてもよい。

【0050】

本明細書において使用される場合、「アルキレン」という用語は、その最長の炭素鎖上に化合物の残部への結合点を2個含有する、指定の炭素数、例えば、2～12個の炭素原子を有するアルキル基のことを指す。アルキレン基の非限定的な例として、メチレン-(CH₂)-、エチレン-(CH₂CH₂)-、n-プロピレン-(CH₂CH₂CH₂)-、イソプロピレン-(CH₂CH(CH₃))-などが挙げられる。アルキレン基は、環状または非環状の分岐したまたは分岐していない炭素鎖部分であることができ、1つまたは複数の置換基で場合により置換されていてよい。

【0051】

「シクロアルキル」は、各々3～12個の炭素原子を有する、単環式もしくは二環式または架橋もしくはスピロ環式または多環式の飽和炭素環ことを意味する。様々な局面では、シクロアルキルは、その環構造内に3～10個の炭素原子、または環構造内に3～6個の炭素を有する。シクロアルキル基は、置換されていても置換されていなくてもよい。

【0052】

炭素の数が特に指定されていない限り、「低級アルキル」は、本明細書において使用される場合、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、およびtert-ブチルなどの、上で定義された通りであるがその骨格構造内に1～10個の炭素または1～6個の炭素原子を有するアルキル基のことを意味する。同様に、「低級アルケニル」および「低級アルキニル」は、類似の鎖長を有する。本明細書においてアルキルと表される置換基は、低級アルキルであることができる。

【0053】

「アルケニル」は、指定された炭素原子数または指定される炭素原子数に制限がない場合は最大26個の炭素原子を有し；その部分内に1つまたは複数の二重結合を有する、任意の環状または非環状の分岐したまたは分岐していない不飽和炭素鎖部分のことを指す。6～26個の炭素原子のアルケニルは、様々な異性体形態のヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデニル (doderyl)、トリデセニル、テトラデセニル、ペンタデセニル、ヘキサデセニル、ヘプタデセニル、オクタデセニル、ノナデセニル、エイコセニル、ヘンエイコセニル (heneicosoenyl)、ドコセニル、トリコセニル、およびテトラコセニルによって例示され、この場合、不飽和結合は、その部分内のどこに位置してもよく、二重結合の周囲で (Z) または (E) のいずれかの立体

配置を有することができる。

【0054】

「アルキニル」は、アルケニルの範囲のヒドロカルビル部分であるが、その部分内に1つまたは複数の三重結合を有するヒドロカルビル部分のことを指す。

【0055】

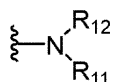
「アルキルチオ」という用語は、硫黄部分が結合している上で定義された通りのアルキル基のことを指す。「アルキルチオ」部分は、-(S)-アルキル、-(S)-アルケニル、-(S)-アルキニル、および-(S)-(CH₂)_m-R₁のうちの1つによって表すことができ、ここで、mおよびR₁は、下に定義される。代表的なアルキルチオ基として、メチルチオ、エチルチオなどが挙げられる。「アルコキシル」または「アルコキシ」という用語は、本明細書において使用される場合は、酸素部分が結合している下に定義される通りのアルキル基のことを指す。代表的なアルコキシル基として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、tert-ブトキシなどが挙げられる。「エーテル」は、酸素によって共有結合された2つの炭化水素である。したがって、アルキルをエーテルにするアルキルの置換基は、アルコキシルであるかまたは似たものであり、例えば、-O-アルキル、-O-アルケニル、-O-アルキニル、-O-(CH₂)_m-R₁₀のうちの1つによって表すことができ、ここで、mおよびR₁₀は、下に記載される。

10

【0056】

「アミン」および「アミノ」という用語は、当技術分野において認められており、置換されていないアミンと置換されたアミンの両方、例えば、式：

20



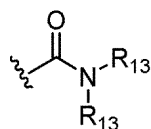
によって表すことができる部分のことを指し、式中、R₁₁およびR₁₂は、各々独立して、水素、アルキル、アルケニル、-(CH₂)_m-R₁₀を表すか、または、R₁₁およびR₁₂は、これらが結合しているN原子と一緒に、その構造内に4～8個の原子を有する複素環を完成し；R₁₀は、アルケニル、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、またはポリシクリルを表し；かつ、mは、ゼロまたは1～8の範囲の整数である。いくつかの例では、R₁₁またはR₁₂の一方だけが、カルボニルであることができ、例えば、R₁₁、R₁₂、および窒素は、一緒にイミドを形成しない。R₁₁およびR₁₂は、各々独立して、水素、アルキル、アルケニル、または-(CH₂)_m-R₁₀を表すことができる。したがって、「アルキルアミン」という用語は、本明細書において使用される場合、置換されたまたは置換されていないアルキルが結合した上で定義された通りのアミン基のことを意味し、すなわち、R₁₁およびR₁₂のうちの少なくとも1つは、アルキル基である。アミノ基またはアルキルアミンは、塩基性であり、このことは、それがpK_a>7.00の共役酸を有することを意味し、すなわち、これらの官能基のプロトン化形態は、水に対して約7.00を上回る相対pK_aを有する。

30

【0057】

「アミド」という用語、本明細書において使用される場合、基：

40



のことを指し、ここで、各R₁₃は、独立して、水素もしくはヒドロカルビル基を表すか、または、2つのR₁₃は、これらが結合しているN原子と一緒に、その構造内に4～8個の原子を有する複素環を完成する。

【0058】

「アリール」という用語は、本明細書において使用される場合、環の各原子が炭素である、3～12員の置換されたもしくは置換されていない単環芳香族基（すなわち、炭素環

50

式アリール)、または1つもしくは複数の原子がヘテロ原子である、3~12員の置換されたもしくは置換されていない単環芳香族基(すなわち、ヘテロアリール)を含む。様々な局面では、アリール基は、5~12員環、または6~10員環を含む。「アリール」という用語はまた、2個またはそれ以上の炭素が2つの隣接している環に共通している、2つまたはそれ以上の環式の環を有する多環式環系を含み、ここで、該環のうちの少なくとも1つが、芳香族であり、例えば、他の環式の環は、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリルであることができる。炭素環式アリール基は、ベンゼン、ナフタレン、フェナントレン、フェノール、アニリンなどを含む。ヘテロアリール基は、置換されたまたは置換されていない芳香族3~12員環構造、5~12員環、または5~10員環を含み、その環構造は、1~4個のヘテロ原子を含む。ヘテロアリール基は、例えば、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジンおよびピリミジンなどを含む。アリールおよびヘテロアリールは、単環式、二環式、または多環式であることができる。アリール基の各事例は、独立して、場合により置換されていてよく、すなわち、置換されていなくても(「置換されていないアリール」)、1つまたは複数の置換基;例えば、例として、1~5個の置換基、1~4個の置換基、1~3個の置換基、1~2個の置換基またはちょうど1個の置換基で置換されていてもよい(「置換されたアリール」)。芳香族環は、1つまたは複数の環位置で、1つまたは複数の置換基、例えば、ハロゲン、アジド、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホナート、ホスフィナート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族またはヘテロ芳香族分子、フルオロアルキル(トリフルオロメチルなど)、シアノなどで置換されていてよい。例えば、アリール基は、置換されていないC5~C12アリールであることができるか、または、アリール基は、置換されたC5~C10アリールであることができる。

10

20

【0059】

「ハロ」、「ハロゲン化物」、または「ハロゲン」という用語は、本明細書において使用される場合、ハロゲンのことを意味し、例えば、限定されるわけではないが、放射性形態と非放射性形態の両方のフルオロ、クロロ、ブロモ、ヨードなどを含む。ハロは、フルオロ、クロロおよびブロモからなる群より選択することができる。

30

【0060】

「ヘテロシクリル」または「複素環式基」は、環構造が1~4個のヘテロ原子を含む、3~12員環構造、5~12員環、または5~10員環のことを指す。複素環は、単環式、二環式、スピロ環式、または多環式であることができる。複素環は、飽和されていても飽和されていなくてもよい。ヘテロシクリル基は、例えば、チオフェン、チアントレン、フラン、ピラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサントエン、フェノキサチン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、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、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、ピリミジン、フェナントロリン、フェナジン、フェナルサジン、フェノチアジン、フラザン、フェノキサジン、ピロリジン、オキサラン、チオーレン、オキサゾール、ペペリジン、ペペラジン、モルホリン、ラクトン類、ラクタム類、例えばアゼチジノン類およびピロリジノン類、スルタム類、スルトン類などを含む。複素環式環は、1つまたは複数の位置で、例えば、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、カルボニル、カルボキシル、シリル、スルファモイル、スルフィニル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族またはヘテロ芳香族部分、-CF₃、-CNなどの上

40

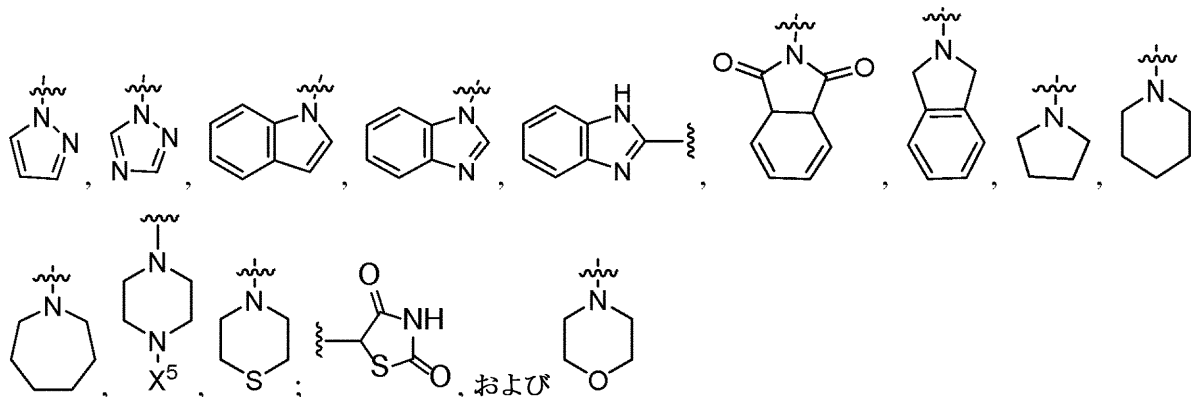
50

記したような置換基で置換されていてよい。

【0061】

ヘテロアリール環は、ヘテロシクリル基の一態様である。「ヘテロシクリル基」という語句は、縮合芳香族および非芳香族基を含むものを含めた縮合環種を含む。代表的なヘテロシクリル基には、ピペリジニル (piperidynyl)、ピペラジニル、モルホリニル、フランニル、ピロリジニル、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、トリアジニル、チオフェニル、テトラヒドロフラニル、ピロリル、オキサゾリル、イミダゾリル、トリアゾリル (triazolylyl)、テトラゾリル、ベンゾキサゾリル (benzoxazolinyl)、およびベンズイミダゾリニル基が含まれるが、それらに限定されない。例えば、ヘテロシクリル基は、非限定的に、

10



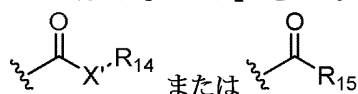
20

を含み、ここで、X⁵は、H、(C₁~C₂₀)アルキル、(C₆~C₂₀)アリールまたはアミン保護基（例えば、t-ブチルオキシカルボニル基）を表し、ヘテロシクリル基は、置換されていても置換されていない場合でもよい。窒素含有ヘテロシクリル基は、環内の原子として窒素原子を含有するヘテロシクリル基である。いくつかの態様では、ヘテロシクリルは、チオフェンまたは置換されたチオフェン以外である。いくつかの態様では、ヘテロシクリルは、フランまたは置換されたフラン以外である。

【0062】

「カルボニル」という用語は、当技術分野において認められており、式：

30



によって表すことができるような部分を含み、式中、X'は、結合であるか、または酸素、窒素もしくは硫黄を表し、R₁₄は、水素、アルキル、アルケニル、-(CH₂)_m-R₁₀または薬学的に許容される塩を表し、R₁₅は、水素、アルキル、アルケニル、または-(CH₂)_m-R₁₀を表し、ここで、mおよびR₁₀は、上で定義された通りである。X'が酸素であり、R₁₄またはR₁₅が水素でない場合、式は、「エステル」を表す。X'が酸素であり、R₁₄が上で定義された通りである場合、部分は、本明細書においてカルボキシル基と称され、特に、R₁₄が水素である場合、式は、「カルボン酸」を表す。X'が酸素であり、R₁₅が水素である場合、式は、「ホルマート」を表す。一般に、上記式の酸素原子が硫黄によって置換されている場合、式は、「チオカルボニル」基を表す。X'が硫黄であり、R₁₄またはR₁₅が水素でない場合、式は、「チオエステル」基を表す。X'が硫黄であり、R₁₄が水素である場合、式は、「チオカルボン酸」基を表す。X'が硫黄であり、R₁₅が水素である場合、式は、「チオホルマート」基を表す。一方で、X'が結合であり、R₁₄が水素でない場合、上記式は、「ケトン」基を表す。X'が結合であり、R₁₄が水素である場合、上記式は、「アルデヒド」基を表す。

40

【0063】

「アミド」という用語は、本明細書において使用される場合は、式C(O)NRRを有する

50

基のことを指し、式中、Rは、本明細書において定義され、各々独立して、例えば、水素、アルキル、アリールであることができるか、または、各Rは、これらが結合している窒素原子と一緒に、ヘテロシクリル基を形成することができる。

【0064】

本明細書において使用される場合、「ニトロ」という用語は、 $-NO_2$ のことを意味し；「ハロゲン」という用語は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ のことを指し；「スルフヒドリル」という用語は、 $-SH$ のことを意味し；「ヒドロキシル」という用語は、 $-OH$ のことを意味し；「スルホニル」という用語は、 $-SO_2-$ のことを意味し；「アジド」という用語は、 $-N_3$ のことを意味し；「シアノ」という用語は、 $-CN$ のことを意味し；「イソシアナト」という用語は、 $-NCO$ のことを意味し；「チオシアナト」という用語は、 $-SCN$ のことを意味し；「イソチオシアナト」という用語は、 $-NCS$ のことを意味し；そして、「シアナト」という用語は、 $-OCN$ のことを意味する。

10

【0065】

本明細書において使用される場合、各表現、例えば、アルキル、m、nなどの定義は、任意の構造内に1回超出現するとき、同じ構造内の他の場所でその定義から独立していることが意図される。

【0066】

「置換された」という用語は、骨格の1つまたは複数の炭素上の水素と置き換わる置換基を有する部分のことを指す。「置換」または「～で置換された」は、そのような置換が、置換される原子および置換基の許容される原子価に従うものであること、そして、置換が、安定した化合物、例えば、転位、環化、脱離などによる変換を自発的に受けない化合物をもたらすという暗黙の条件を含むことが理解されよう。本明細書において使用される場合、「置換された」という用語は、有機化合物の全ての許容可能な置換基を含むことが想定される。幅広い局面では、許容可能な置換基は、有機化合物の非環状および環状の分岐したおよび分岐していない、炭素環式および複素環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。許容可能な置換基は、適切な有機化合物に対して、1つまたは複数あり、同じまたは異なることが可能である。本開示の目的では、窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および／またはヘテロ原子の原子価を満たす本明細書に記載される有機化合物の任意の許容可能な置換基を有し得る。置換基は、本明細書に記載される任意の置換基、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセタート、またはチオホルマートなど）、アルコキシ、ホスホリル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルファート、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アリール、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含むことができる。置換されたアルキル上の置換基は、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_3 \sim 6$ シクロアルキル、ハロゲン、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択することができる。置換されたアルキル上の置換基は、フルオロ、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択することができる。適切であれば、置換基それ自体が置換されていてよいことが当業者によって理解されよう。「置換されていない」と具体的に述べられていない限り、本明細書における化学部分についての言及は、置換された変種を含むことが理解される。例えば、「アリール」基または部分についての言及は、置換された変種と置換されていない変種の両方を暗に含む。

20

30

40

【0067】

本明細書において使用される場合の「置換された」という用語はまた、以下の基：ハロゲン（例えば、 F 、 Cl 、 Br 、および I ）、 R 、 OR 、 ROH （例えば、 CH_2OH ）、 $OC(O)N(R)_2$ 、 CN 、 NO 、 NO_2 、 ONO_2 、アジド、 CF_3 、 OCF_3 、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ、 $(C_3 \sim C_{20})$ ヘテロアリール、 $N(R)_2$ 、 $Si(R)_3$ 、 SR 、 SOR 、 SO_2R 、 $SO_2N(R)_2$ 、 SO_3R 、 $P(O)(OR)_2$ 、 $OP(O)(OR)_2$ 、 $C(O)R$ 、 $C(O)C(O)R$ 、 $C(O)CH_2C(O)R$ 、 $C(S)R$ 、 $C(O)OR$ 、 $OC(O)R$ 、 $C(O)N(R)_2$ 、 $C(O)N(R)OH$ 、 $OC(O)N(R)_2$ 、 $C(S)N(R)_2$

50

、 $(\text{CH}_2)_{0\sim 2}\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $(\text{CH}_2)_{0\sim 2}\text{N}(\text{R})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{N}(\text{R})\text{CON}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{SO}_2\text{R}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{S})\text{R}$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{N}(\text{COR})\text{COR}$ 、 $\text{N}(\text{OR})\text{R}$ 、 $\text{C}(=\text{NH})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{OR})\text{R}$ 、または $\text{C}(=\text{NOR})\text{R}$ 、を含むがそれらに限定されない1つまたは複数の基で置換された基のことを指し、ここで、Rは、水素、 $(\text{C}_1\sim\text{C}_{20})$ アルキル、 $(\text{C}_6\sim\text{C}_{20})$ アリール、ヘテロシクリルまたはポリアルキレンオキシド基、例えば、式- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_f\text{-R-OR}$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_g\text{-R-OR}$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_f(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_g\text{-R-OR}$ のポリアルキレンオキシド基であることができ、その各々は、次に、置換されていても置換されていなくてもよく、fおよびgは、各々独立して、1～50（例えば、1～10、1～5、1～3または2～5）の整数である。置換されたはまた、以下の基：フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、アミノ、アミド、アルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルキルアミド、アルケニル、アルキニル、アルコキシカルボニル、アシル、ホルミル、アリールカルボニル、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、カルボキシ、ハロアルキル、ヒドロキシ、シアノ、ニトロソ、ニトロ、アジド、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、チオ、アルキルチオ、アリールチオール、アルキルスルホニル、アルキルスルフィニル、ジアルキルアミノスルホニル、スルホン酸、カルボン酸、ジアルキルアミノ、およびジアルキルアミド、を含むがそれらに限定されない1つまたは複数の基で置換された基を含む。2つまたはそれ以上の隣接する置換基がある場合、置換基は、連結して、炭素環式または複素環式環を形成することができる。そのような隣接する基は、ビシナルもしくはジェルミナルな関係にあることができるか、または、これらは、環上に、例えば、オルト配置で隣接することができる。置換されたの各事例は、独立していると理解される。例えば、置換されたアリールは、ブロモで置換されていてよく、同じ化合物上の置換された複素環は、アルキルで置換されていてよい。置換された基は、1つまたは複数の非フルオロ基で置換されていてよいことが想定される。別の例として、置換された基は、1つまたは複数の非シアノ基で置換されていてよい。別の例として、置換された基は、ハロアルキル以外の1つまたは複数の基で置換されていてよい。さらに別の例として、置換された基は、tert-ブチル以外の1つまたは複数の基で置換されていてよい。なおさらなる例として、置換された基は、トリフルオロメチル以外の1つまたは複数の基で置換されていてよい。なお一層のさらなる例として、置換された基は、ニトロ以外、メチル以外、メトキシメチル以外、ジアルキルアミノスルホニル以外、ブロモ以外、クロロ以外、アミド以外、ハロ以外、ベンゾジオキセピニル (benzodioxepinyl) 以外、多環式ヘテロシクリル以外、多環式置換アリール以外、メトキシカルボニル以外、アルコキシカルボニル以外、チオフエニル以外、もしくはニトロフェニル以外の1つもしくは複数の基、またはそのような記述の組み合わせに対応する基で置換されていてよい。さらに、置換されたはまた、フルオロ、シアノ、ハロアルキル、tert-ブチル、トリフルオロメチル、ニトロ、メチル、メトキシメチル、ジアルキルアミノスルホニル、ブロモ、クロロ、アミド、ハロ、ベンゾジオキセピニル、多環式ヘテロシクリル、多環式置換アリール、メトキシカルボニル、アルコキシカルボニル、チオフエニル、およびニトロフェニル基を含むことが理解される。

10

20

30

40

【0068】

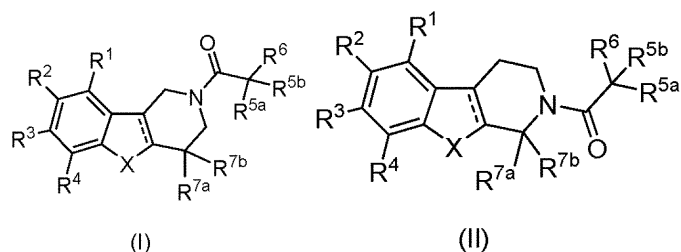
本開示の目的では、化学要素は、Periodic Table of the Elements, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87（表紙裏）に従って同定される。

【0069】

本開示の化合物

本開示は、式 (I) もしくは (II)：

50



の化合物またはその薬学的に許容される塩に関し、
式中、

R¹は、ヘテロアリール、ハロゲン、アリール、環状アミン、ヒドロキシ、-OC(O)アルキル、-NH₂、-N(H)CO-アルキル、またはアルコキシであり；

R²は、H、アルキル、-CHF₂、-CF₃、-CN、-OR^c、ハロゲン、またはヘテロシクリルであり；

R³およびR⁴は、独立して、H、ハロゲン、-CHF₂、-CF₃、-CN、-OR^c、または-OCF₃であり；

R^{5a} および R^{5b} は、独立して、H、アルキル、アリール、またはシクロアルキルであり

R^6 は、 $N(H)R^a$ 、 O -アルキル、 OH 、 $-CO_2R^d$ であるか；

または、 R^{5a} および R^6 は、一緒になって、5～6員ヘテロシクリルを形成し；

R^{7a}およびR^{7b}は、独立して、Hもしくはアルキルであるか、または、これらが結合している炭素と一緒にあって3員脂肪族炭素環を形成し；

R^a は、H、アルキル、 $-\text{COR}^b$ 、 $-\text{CON}(\text{H})R^b$ 、または $-\text{CO}_2R^e$ であり；

R^b は、アルキル、またはアリールであり；

R^cは、H、アルキル、または-C(O)-アルキルであり；

R^d は、H またはアルキルであり；

R^eは、アルキル、またはアリールであり；

Xは、NH、NMe、NEt、O、またはSであり；かつ

は、単結合または二重結合である。

【 0 0 7 0 】

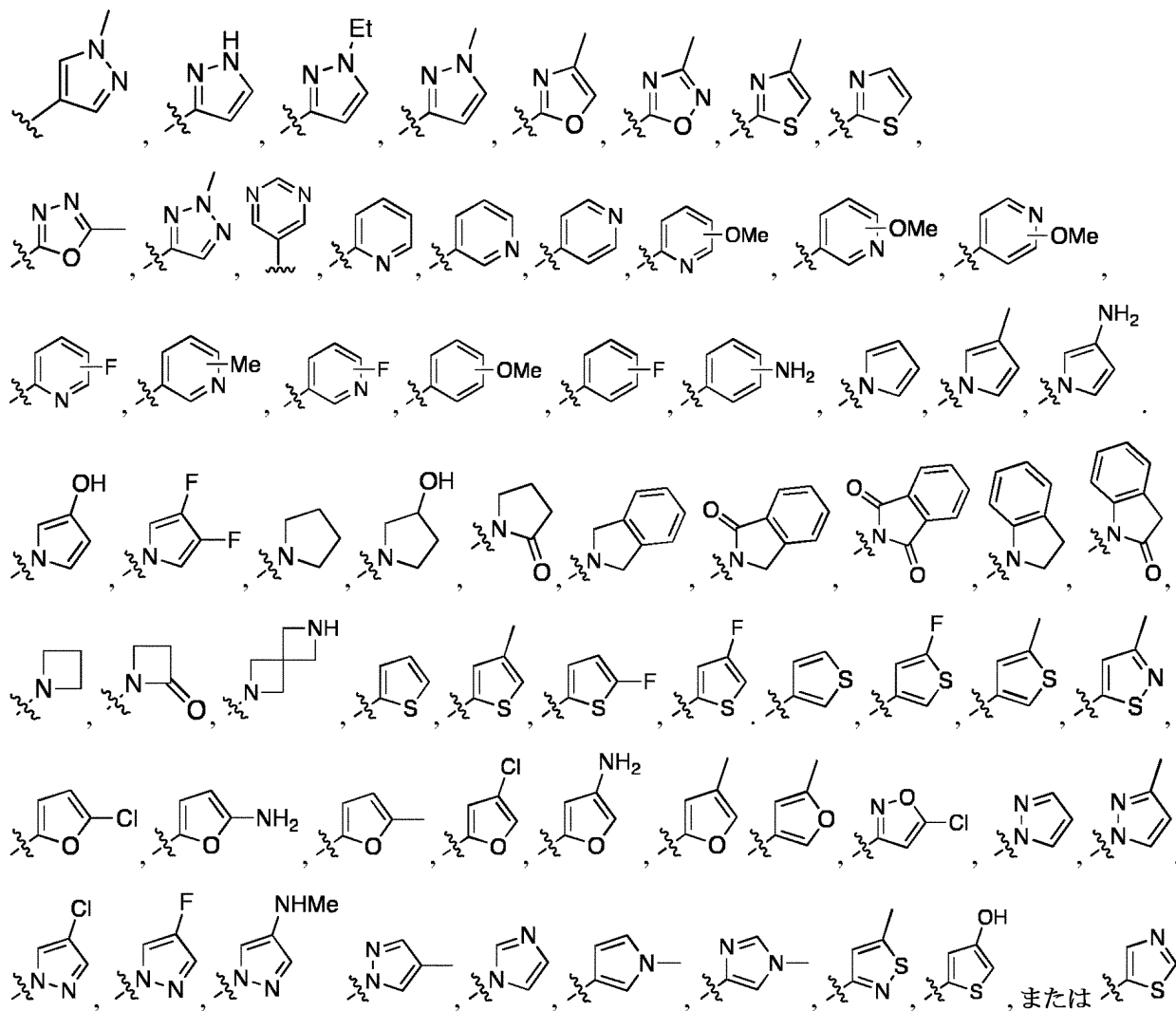
本発明は、式（I）の化合物に関する。本発明は、式（II）の化合物に関する。本発明はまた、式（I）もしくは（II）の化合物のプロドラッグまたはその薬学的に許容される塩に関する。

【 0 0 7 1 】

R^1 は、置換されたまたは置換されていないヘテロアリールであることができる。 R^1 は、N含有ヘテロアリールであることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていないC-CまたはC-N連結単環式または二環式ヘテロアリールであることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていないアリールであることができる。 R^1 は、オルト、メタまたはパラアミノフェニル、メトキシフェニル、またはフルオロフェニルであることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていないアリールであることができる。 R^1 は、ハロゲンであることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていない環状アミンであることができる。 R^1 は、官能化されたおよび官能化されていないアザシクロブタン、アザシクロブタノン、アザシクロペンタン、アザシクロペンタノンであることができる。 R^1 は、ヒドロキシであることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていない-OC(O)アルキルであることができる。 R^1 は、-NH₂であることができる。 R^1 は、置換されたまたは置換されていない-N(H)COアルキルであることができる。 R^1 は、アルコキシであることができる。 R^1 は、C₁~C₄アルコキシであることができる。

【 0 0 7 2 】

R¹ は、



10

20

30

であることができる。

【0073】

R²は、Hであることができる。R²は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。R²は、C₁~4アルキルであることができる。R²は、-CHF₂であることができる。R²は、-CF₃であることができる。R²は、-CNであることができる。R²は、-OR^cであることができる。R²は、-OHであることができる。R²は、OMeであることができる。R²は、ハロゲンであることができる。R²は、ClまたはFであることができる。R²は、置換されたまたは置換されていないヘテロシクリルであることができる。R²は、置換されたまたは置換されていない5員ヘテロシクリルであることができる。R²は、置換されたまたは置換されていない6員ヘテロシクリルであることができる。

40

【0074】

R³は、Hであることができ、R³は、ハロゲンであることができる。R³は、ClまたはFであることができる。R³は、-CHF₂であることができる。R³は、-CF₃であることができる。R³は、-CNであることができる。R³は、-OR^cであることができる。R³は、-OCF₃であることができる。

【0075】

R⁴は、Hであることができ、R⁴は、ハロゲンであることができる。R⁴は、ClまたはFであることができる。R⁴は、-CHF₂であることができる。R⁴は、-CF₃であることができる。R⁴は、-CNであることができる。R⁴は、-OR^cであることができる。R⁴は、-OCF₃であることができる。

50

【0076】

R^3 および R^4 は、同じであることができ、例えば、 R^3 および R^4 は、共にハロゲン、例えばClであることができる。

【0077】

R^3 および R^4 は、異なることができ、例えば、 R^3 および R^4 は、共にハロゲンであることができるが、 R^3 はClであり、 R^4 はFであるか、または、 R^3 はHであり、 R^4 はハロゲンである。

【0078】

R^{5a} は、Hであることができる。 R^{5a} は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^{5a} は、メチルであることができる。 R^{5a} は、置換されたおよび置換されていないアリールであることができる。 R^{5a} は、置換されたまたは置換されていないシクロアルキルであることができる。

10

【0079】

R^{5b} は、Hであることができる。 R^{5b} は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^{5b} は、メチルであることができる。 R^{5b} は、置換されたまたは置換されていないアリールであることができる。 R^{5b} は、置換されたまたは置換されていないシクロアルキルであることができる。

【0080】

R^{5a} および R^{5b} は、同じであることができ、例えば、 R^{5a} および R^{5b} は、共にメチルであることができる。 R^{5a} および R^{5b} は、異なることができ、例えば、 R^{5a} は、Hであることができ、 R^{5b} は、メチルであることができる。

20

【0081】

R^6 は、 $N(H)R^a$ であることができる。 R^6 は、 NH_2 であることができる。 R^6 は、 $N(H)C(O)OtBu$ であることができる。 R^6 は、O-アルキルであることができる。 R^6 は、OHであることができる。 R^6 は、 $-CO_2R^d$ であることができる。 R^6 は、 $-OCH_3$ 、 $-OC_2H_5$ 、 $-OC_3H_7$ 、 $-OC_4H_9$ 、 $-OC_5H_{11}$ 、 $-OC_6H_{13}$ 、 $-OC_7H_{15}$ 、 $-OC_8H_{17}$ 、 $-OC_{10}H_{21}$ 、 $-OC_{12}H_{25}$ 、 $-OC_{14}H_{29}$ または $-OC_{16}H_{33}$ であることができる。 R^6 は、 $-NHCH_3$ 、 $-NHC_2H_5$ 、 $-NHC_3H_7$ 、 $-NHC_4H_9$ 、 $-NHC_6H_{13}$ 、 $-NHC_7H_{15}$ 、 $-NHC_8H_{17}$ 、 $-NHC_{10}H_{21}$ 、 $-NHC_{14}H_{29}$ または $-NHC_{16}H_{33}$ であることができる。

【0082】

R^{5a} および R^6 は、一緒になって、置換されたまたは置換されていない5員ヘテロシクリルを形成することができる。 R^{5a} および R^6 は、一緒になって、置換されたまたは置換されていない6員ヘテロシクリルを形成することができる。

30

【0083】

R^{7a} は、Hであることができる。 R^{7a} は、アルキルであることができる。

【0084】

R^{7b} は、Hであることができる。 R^{7b} は、アルキルであることができる。

【0085】

R^{7a} および R^{7b} は、同じであることができ、例えば、 R^{7a} および R^{7b} は、共にメチルであることができる。 R^{7a} および R^{7b} は、異なることができ、例えば、 R^{7a} は、Hであることができ、 R^{7b} は、メチルであることができる。

40

【0086】

R^{7a} および R^{7b} は、これらが結合している炭素と一緒に、3員脂肪族炭素環を形成することができる。

【0087】

R^a は、Hであることができる。 R^a は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^a は、 $-COR^b$ であることができる。 R^a は、 $-CON(H)R^b$ であることができる。 R^a は、 $-CO_2R^e$ であることができる。 R^a は、 $-CO_2tBu$ であることができる。

【0088】

R^b は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^b は、置換

50

されたまたは置換されていないアリールであることができる。

【0089】

R^c は、Hであることができる。 R^c は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^c は、置換されたまたは置換されていない-C(O)-アルキルであることができる。

【0090】

R^d は、Hであることができる。 R^d は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。

【0091】

R^e は、置換されたまたは置換されていないアルキルであることができる。 R^e は、置換されたまたは置換されていないアリールであることができる。

10

【0092】

Xは、NHであることができる。Xは、NMeであることができる。Xは、NEtであることができる。Xは、Oであることができる。Xは、Sであることができる。

【0093】

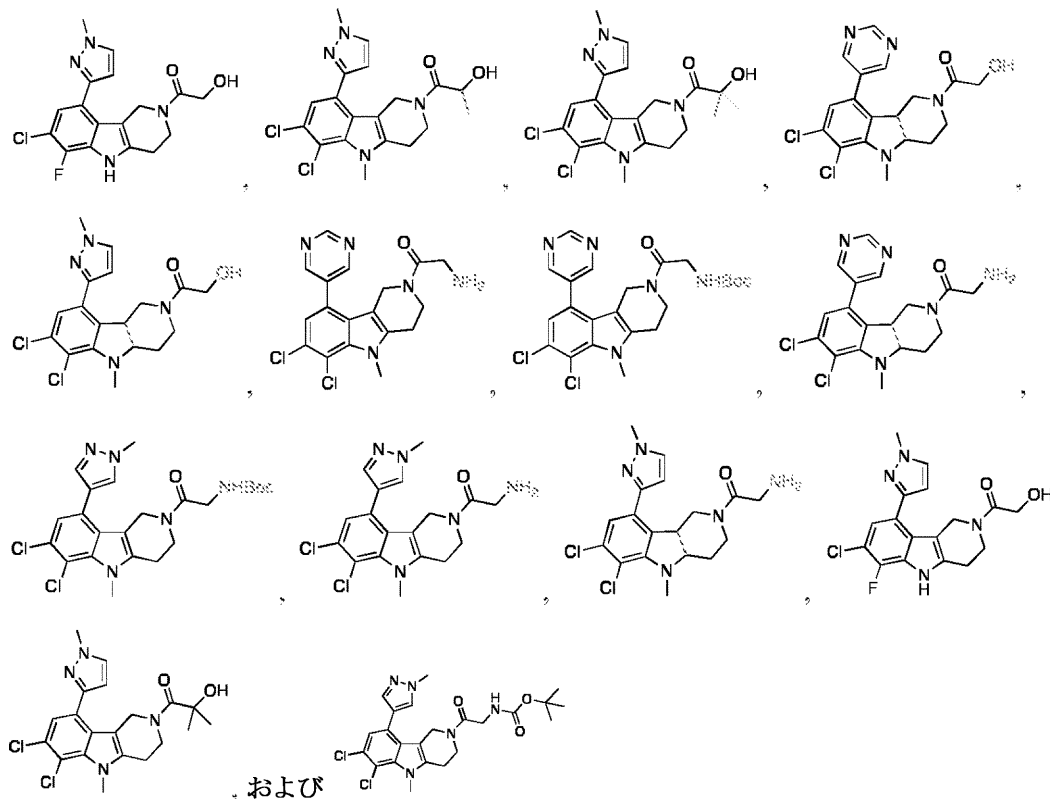
は、単結合であることができる。

20

は、二重結合であることができる。

【0094】

式 (I) の化合物は、



30

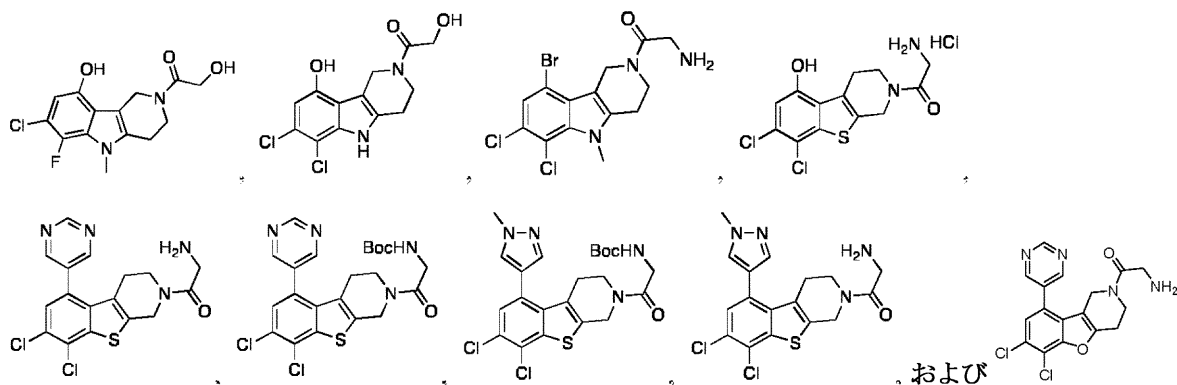
40

から選択される化合物であることができる。

【0095】

式 (I) の化合物は、

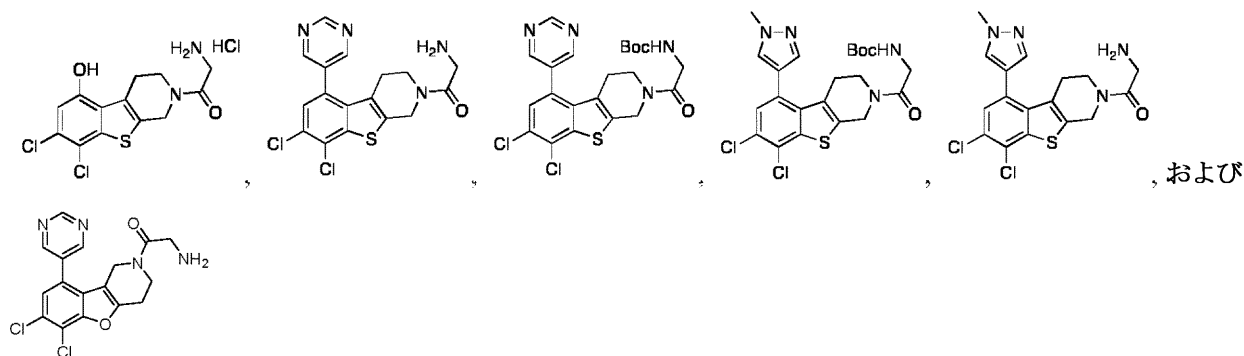
50



から選択される化合物であることができる。

【0096】

式 (II) の化合物は、



から選択される化合物であることができる。

【0097】

式 (I) または (II) の化合物は、表1からの化合物であることができる。

【0098】

式 (I) ~ (II) の化合物の全てのジアステレオマーが本明細書において想定される。

【0099】

また、化合物中の1つまたは複数の原子がその原子の同位体で置換されている化合物である、同位体異性体も本明細書において想定される。したがって、例えば、本開示は、1つもしくは複数の水素原子が重水素で置換されているかまたはフッ素原子が ^{19}F 原子で置換されている化合物に関する。

【0100】

本開示の化合物は、当技術分野において周知の任意の方法によって合成することができる。

【0101】

処置の方法

本開示は、その必要のある対象に治療有効量の前述の化合物のいずれか1つを投与する工程を含む、cGAS関連疾患または障害を処置する方法に関する。

【0102】

本開示は、その必要のある対象に治療有効量の前述の化合物のいずれか1つを投与する工程を含む、炎症反応を抑制する方法に関する。

【0103】

本開示は、その必要のある対象に治療有効量の前述の化合物のいずれか1つを投与する工程を含む、dsDNA誘発性のインターフェロン発現を阻害する方法に関する。

【0104】

本開示はさらに、その必要のある対象に治療有効量の前述の化合物のいずれか1つを投

10

20

30

40

50

与する工程を含む、神経変性疾患または障害を処置する方法を提供する。

【0105】

神経変性疾患または障害は、AIDS認知症複合、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、副腎白質ジストロフィー、アレキサンダー病、アルパーズ病、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病、牛海綿状脳症（BSE）、カナバン病、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、レビー小体型認知症、致死性家族性不眠症、前頭側頭葉変性症、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、ライム病、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、多系統萎縮症、神経有棘赤血球症、ニーマン・ピック病、パーキンソン病、ピック病、原発性側索硬化症、進行性核上性麻痺、レフサム病、サンドホフ病、びまん性脱髄性硬化症（diffuse myelinoclastic sclerosis）、脊髄小脳失調症、亜急性連合性脊髄変性症、脊髄癆、テイ・サックス病、中毒性脳症、伝達性海綿状脳症、およびハリネズミふらつき症候群からなる群より選択することができる。一態様では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、およびパーキンソン病からなる群より選択される。

10

【0106】

神経変性疾患または障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、タウオパチー、または前頭側頭型認知症からなる群より選択することができる。

【0107】

本開示はさらに、ドラベ症候群および他の薬物耐性発作を含むてんかんを処置する方法を提供する。

20

【0108】

本開示はさらに、HIV認知症などのウイルス感染関連認知症を処置する方法を提供する。

【0109】

本開示はさらに、COVIDに関連する神経障害を処置する方法を提供する。

【0110】

薬学的組成物、投与の経路、および投薬

ある特定の態様では、本開示は、本開示の化合物と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を対象とする。ある特定の態様では、薬学的組成物は、複数の本開示の化合物と薬学的に許容される担体とを含む。

30

【0111】

ある特定の態様では、本開示の薬学的組成物はさらに、本開示の化合物以外の少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用物質を含む。少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用物質は、虚血再灌流傷害の処置において有用な作用物質であることができる。

【0112】

本開示の薬学的組成物は、1つまたは複数の本開示の化合物を、薬学的に許容される担体と、任意で1つまたは複数の追加の薬学的に活性な作用物質と組み合わせることによって調製することができる。

【0113】

上述したように、「有効量」は、所望の生物学的効果を達成するのに十分な任意の量のことを指す。本明細書に提供される教示と組み合わせて、様々な活性化合物から選び出し、効力、相対バイオアベイラビリティ、患者体重、有害な副作用の重篤度および投与の様式などの要因を考慮することによって、実質的な望まれていない毒性を引き起こさず、なおかつ特定の対象を処置するのに有効である、有効な予防的または治療的処置レジメンを計画することができる。任意の特定の用途に対する有効量は、処置されている疾患もしくは状態、投与されている本開示の特定の化合物、対象のサイズ、または疾患もしくは状態の重症度のような要因に応じて変動し得る。当技術分野の通常の技能を有する者は、過度の実験を必要とすることなく、本開示の特定の化合物および／または他の治療用物質の有効量を経験的に決定することができる。最大用量、すなわち、最も高い安全用量が、いくつかの医学的判断に従って使用され得る。化合物の適切な全身レベルを達成するために1

40

50

日当たり複数の用量が想定され得る。適切な全身レベルは、例えば、患者のピークまたは持続した薬物血漿レベルの測定によって決定することができる。「用量」および「投与量」は、本明細書において互換的に使用される。

【0114】

一般的に、化合物の1日経口用量は、ヒト対象に対して、1日当たり約0.01ミリグラム/kg～1日当たり1000ミリグラム/kgである。1日当たり1回または複数回の投与の0.5～50ミリグラム/kgの範囲の経口用量は、治療結果をもたらすことができる。投与量は、投与の様式に応じて、局所または全身で、所望の薬物レベルが達成されるように適切に調整され得る。例えば、静脈内投与は、1日当たり一桁から数桁低い用量で変動し得る。そのような用量で対象での応答が不十分である場合、患者耐容性が許す範囲でさらにより高い用量（または異なるより局所的な送達経路による有効なより高い用量）が用いられ得る。化合物の適切な全身レベルを達成するために1日当たり複数の用量が想定される。

10

【0115】

本明細書に記載される任意の化合物について、治療有効量は、まず動物モデルから決定することができる。治療有効用量はまた、ヒトで試験されていた化合物に関するおよび他の関連する活性作用物質などの類似の薬理学的活性を示すことが既知の化合物に関するヒトデータから決定することができる。非経口投与ではより高い用量が必要となる場合がある。適用される用量は、投与される化合物の相対バイオアベイラビリティおよび効力に基づいて調整することができる。上記の方法および他の方法に基づき最大の有効性を達成するために用量を調整することは、当技術分野において周知であるように、十分に当業者の技能の範囲内である。

20

【0116】

臨床用途では、本開示の任意の化合物は、1日当たり、対象の体重1キログラム（kg）当たり、化合物0.2～2000ミリグラム（mg）に等しいまたは等価な量で投与することができる。本開示の化合物は、1日当たり、対象の体重1kg当たり、化合物2～2000mgに等しいまたは等価な用量で投与することができる。本開示の化合物は、1日当たり、対象の体重1kg当たり、化合物20～2000mgに等しいまたは等価な用量で投与することができる。本開示の化合物は、1日当たり、対象の体重1kg当たり、化合物50～2000mgに等しいまたは等価な用量で投与することができる。本開示の化合物は、1日当たり、対象の体重1kg当たり、化合物100～2000mgに等しいまたは等価な用量で投与することができる。本開示の化合物は、1日当たり、対象の体重1kg当たり、化合物200～2000mgに等しいまたは等価な用量で投与することができる。化合物そのものではなく本開示の化合物の前駆体またはプロドラッグを投与しようとする場合、本発明の化合物の上述した量と等価な、すなわち、それを送達するのに十分な量で投与される。

30

【0117】

本開示の化合物の製剤は、ヒト対象に治療有効量で投与することができる。典型的な用量範囲は、1日当たり約0.01マイクログラム/kg～約2mg/kg（体重）である。投与しようとする薬物の投与量は、障害の種類および程度、特定の対象の全体的な健康状態、投与されている具体的な化合物、化合物を製剤化するために使用される賦形剤、ならびにその投与経路のような変動因子（variable）に左右される可能性が高い。ルーチン実験を使用して、任意の特定の化合物についての用量および投薬頻度を最適化してよい。

40

【0118】

本開示の化合物は、約0.001マイクログラム/kgから約500mg/kgを超える範囲の濃度で投与することができる。例えば、濃度は、0.001マイクログラム/kg、0.01マイクログラム/kg、0.05マイクログラム/kg、0.1マイクログラム/kg、0.5マイクログラム/kg、1.0マイクログラム/kg、10.0マイクログラム/kg、50.0マイクログラム/kg、100.0マイクログラム/kg、500マイクログラム/kg、1.0mg/kg、5.0mg/kg、10.0mg/kg、15.0mg/kg、20.0mg/kg、25.0mg/kg、30.0mg/kg、35.0mg/kg、40.0mg/kg、45.0mg/kg、50.0mg/kg、60.0mg/kg、70.0mg/kg、80.0mg/kg、90.0mg/kg、100.0mg/kg、150.0mg/kg、200.0mg/kg、250.0mg/kg、300.0

50

mg/kg、350.0mg/kg、400.0mg/kg、450.0mg/kgから、約500.0mg/kg超またはその任意の増分値であり得る。これらの値および範囲間の全ての値および範囲が本発明に包含されるものと理解されるべきである。

【0119】

本開示の化合物は、約0.2ミリグラム/kg/日から約100mg/kg/dayを超える範囲の投与量で投与することができる。例えば、投与量は、0.2mg/kg/日～100mg/kg/日、0.2mg/kg/日～50mg/kg/日、0.2mg/kg/日～25mg/kg/日、0.2mg/kg/日～10mg/kg/日、0.2mg/kg/日～7.5mg/kg/日、0.2mg/kg/日～5mg/kg/日、0.25mg/kg/日～100mg/kg/日、0.25mg/kg/日～50mg/kg/日、0.25mg/kg/日～25mg/kg/日、0.25mg/kg/日～10mg/kg/日、0.25mg/kg/日～7.5mg/kg/日、0.25mg/kg/日～5mg/kg/日、0.5mg/kg/日～50mg/kg/日、0.5mg/kg/日～25mg/kg/日、0.5mg/kg/日～20mg/kg/日、0.5mg/kg/日～15mg/kg/日、0.5mg/kg/日～10mg/kg/日、0.5mg/kg/日～7.5mg/kg/日、0.5mg/kg/日～5mg/kg/日、0.75mg/kg/日～50mg/kg/日、0.75mg/kg/日～25mg/kg/日、0.75mg/kg/日～20mg/kg/日、0.75mg/kg/日～15mg/kg/日、0.75mg/kg/日～10mg/kg/日、0.75mg/kg/日～7.5mg/kg/日、0.75mg/kg/日～5mg/kg/日、1.0mg/kg/日～50mg/kg/日、1.0mg/kg/日～25mg/kg/日、1.0mg/kg/日～20mg/kg/日、1.0mg/kg/日～15mg/kg/日、1.0mg/kg/日～10mg/kg/日、1.0mg/kg/日～7.5mg/kg/日、1.0mg/kg/日～5mg/kg/日、2mg/kg/日～50mg/kg/日、2mg/kg/日～25mg/kg/日、2mg/kg/日～20mg/kg/日、2mg/kg/日～15mg/kg/日、2mg/kg/日～10mg/kg/日、2mg/kg/日～7.5mg/kg/日、または2mg/kg/日～5mg/kg/日であり得る。

10

20

【0120】

本開示の化合物は、約0.25ミリグラム/kg/日～約25mg/kg/日の範囲の投与量で投与することができる。例えば、投与量は、0.25mg/kg/日、0.5mg/kg/日、0.75mg/kg/日、1.0mg/kg/日、1.25mg/kg/日、1.5mg/kg/日、1.75mg/kg/日、2.0mg/kg/日、2.25mg/kg/日、2.5mg/kg/日、2.75mg/kg/日、3.0mg/kg/日、3.25mg/kg/日、3.5mg/kg/日、3.75mg/kg/日、4.0mg/kg/日、4.25mg/kg/日、4.5mg/kg/日、4.75mg/kg/日、5mg/kg/日、5.5mg/kg/日、6.0mg/kg/日、6.5mg/kg/日、7.0mg/kg/日、7.5mg/kg/日、8.0mg/kg/日、8.5mg/kg/日、9.0mg/kg/日、9.5mg/kg/日、10mg/kg/日、11mg/kg/日、12mg/kg/日、13mg/kg/日、14mg/kg/日、15mg/kg/日、16mg/kg/日、17mg/kg/日、18mg/kg/日、19mg/kg/日、20mg/kg/日、21mg/kg/日、22mg/kg/日、23mg/kg/日、24mg/kg/日、25mg/kg/日、26mg/kg/日、27mg/kg/日、28mg/kg/日、29mg/kg/日、30mg/kg/日、31mg/kg/日、32mg/kg/日、33mg/kg/日、34mg/kg/日、35mg/kg/日、36mg/kg/日、37mg/kg/日、38mg/kg/日、39mg/kg/日、40mg/kg/日、41mg/kg/日、42mg/kg/日、43mg/kg/日、44mg/kg/日、45mg/kg/日、46mg/kg/日、47mg/kg/日、48mg/kg/日、49mg/kg/日、または50mg/kg/日であり得る。

30

【0121】

化合物またはその前駆体は、0.01マイクロモルから500マイクロモルを超えるまたは等しい範囲の濃度で投与することができる。例えば、用量は、0.01マイクロモル、0.02マイクロモル、0.05マイクロモル、0.1マイクロモル、0.15マイクロモル、0.2マイクロモル、0.5マイクロモル、0.7マイクロモル、1.0マイクロモル、3.0マイクロモル、5.0マイクロモル、7.0マイクロモル、10.0マイクロモル、15.0マイクロモル、20.0マイクロモル、25.0マイクロモル、30.0マイクロモル、35.0マイクロモル、40.0マイクロモル、45.0マイクロモル、50.0マイクロモル、60.0マイクロモル、70.0マイクロモル、80.0マイクロモル、90.0マイクロモル、100.0マイクロモル、150.0マイクロモル、200.0マイクロモル、250.0マイクロモル、300.0マイクロモル、350.0マイクロモル、400.0マイクロモル、450.0マイクロモルから、約500.0マイクロモル超またはその任意の増分値であり得る。これらの値および範囲間の全ての値および範囲が本発明に

40

50

包含されるものと理解されるべきである。

【0122】

化合物またはその前駆体は、0.10マイクログラム/mL～500.0マイクログラム/mLの範囲の濃度で投与することができる。例えば、濃度は、0.10マイクログラム/mL、0.50マイクログラム/mL、1マイクログラム/mL、2.0マイクログラム/mL、5.0マイクログラム/mL、10.0マイクログラム/mL、20マイクログラム/mL、25マイクログラム/mL、30マイクログラム/mL、35マイクログラム/mL、40マイクログラム/mL、45マイクログラム/mL、50マイクログラム/mL、60.0マイクログラム/mL、70.0マイクログラム/mL、80.0マイクログラム/mL、90.0マイクログラム/mL、100.0マイクログラム/mL、150.0マイクログラム/mL、200.0マイクログラム/mL、250.0g/mL、250.0マイクログラム/mL、300.0マイクログラム/mL、350.0マイクログラム/mL、400.0マイクログラム/mL、450.0マイクログラム/mLから、約500.0マイクログラム/mL超またはその任意の増分値であり得る。これらの値および範囲間の全ての値および範囲が本発明に包含されるものと理解されるべきである。

10

【0123】

本開示の製剤は、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝化剤、保存料、適合可能な担体、アジュバントおよび任意で他の治療用成分を日常的に含有し得る薬学的に許容される溶液で投与することができる。治療で使用するために、有効量の化合物を、化合物を所望の表面に送達する任意の様式によって対象に投与することができる。薬学的組成物を投与することは、当業者に公知の任意の手段によって達成され得る。投与の経路には、静脈内、筋肉内、腹腔内、嚢内（膀胱）、経口、皮下、直接注射（例えば、腫瘍または膿瘍への）、粘膜（例えば、眼への外用）、吸入および局所が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0124】

静脈内および他の非経口の投与経路について、本開示の化合物は、凍結乾燥調製物として、リポソーム挿入もしくは封入活性化合物の凍結乾燥調製物として、水性懸濁液中の脂質複合物として、または塩錯体として製剤化することができる。凍結乾燥製剤は、一般的に、投与の直前に、好適な水溶液、例えば、滅菌水または食塩水中で再構成される。

【0125】

経口投与について、化合物は、活性化合物を当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。そのような担体は、処置しようとする対象によって経口摂取されるように、本開示の化合物を錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。経口用途の薬学的製剤は、固体の賦形剤として得ることができ、任意で、得られた混合物を粉碎し、所望により好適な補助剤を加えた後に、顆粒の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアが得られる。好適な賦形剤は、特に、充填剤、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む糖；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、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、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）などである。所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸もしくはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤が加えられてよい。任意で、経口用製剤はまた、食塩水または緩衝液、例えば、内部酸性条件を中和するためのEDTA中に製剤化されてもよく、任意の担体なしに投与されてもよい。

30

40

【0126】

また、本開示の化合物の経口剤形も想定される。本開示の化合物は、誘導体の経口送達が無効であるように化学修飾されてもよい。一般的に、想定される化学修飾は、少なくとも1つの部分を化合物それ自体に結合させることであり、ここで、前記部分は、（a）酸加水分解の阻害；および（b）胃または腸から血流への取り込みを可能にする。また、化合物の全体的な安定性の増大および体内の循環時間の増大も望ましい。そのような部分の例として、ポリエチレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールの共重

50

合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンおよびポリプロリンが挙げられる。Abuchowski and Davis, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., pp. 367-383 (1981); Newmark et al., J Appl Biochem 4:185-9 (1982)。使用できる他のポリマーは、ポリ-1,3-ジオキソランおよびポリ-1,3,6-チオキソカン (tioxocane) である。医薬用途では、上に示したように、ポリエチレングリコール部分が好適である。

【0127】

本開示の化合物の放出の場所は、胃、小腸（十二指腸、空腸または回腸）、または大腸であり得る。当業者は、胃で溶解しないが十二指腸または腸の他の場所で物質を放出する製剤が利用可能である。放出は、本開示の化合物の保護または腸などの胃環境を超える化合物の放出のいずれかによって、胃環境の有害効果を回避することができる。

10

【0128】

十分な胃耐性を確実にするために、少なくともpH 5.0まで不透過性であるコーティングが不可欠である。腸溶コーティングとして使用されるより一般的な不活性成分の例は、酢酸トリメリット酸セルロース (CAT)、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、酢酸フタル酸ポリビニル (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、酢酸フタル酸セルロース (CAP)、Eudragit L、Eudragit S、およびシェラックである。これらのコーティングは、混合膜として使用され得る。

【0129】

コーティングまたはコーティングの混合物を錠剤上に使用することもでき、これらは胃の保護を意図してない。これは、糖コーティング、または錠剤の飲み込みをより容易にするコーティングを含むことができる。カプセル剤は、乾燥治療薬（例えば、粉剤）の送達用の硬質シェル（ゼラチンなど）からなり得；液体形態では、軟質ゼラチンシェルが使用され得る。カシェ剤のシェル材料は、粘度の高いデンプンまたは他の食用紙であることが可能である。丸剤、ロゼンジ剤、湿製錠剤または粉薬錠剤について、モイスト・マッシング技術を使用することができる。

20

【0130】

治療薬は、粒径約1mmの顆粒またはペレットの形態の微細多粒子として製剤中に含めることができる。カプセル投与用材料の製剤は、粉末、低圧縮プラグとしてまたはさらには錠剤としても可能である。治療薬は、圧縮によって調製することもできる。

30

【0131】

着色剤および香味剤のいずれが含まれてもよい。例えば、本開示の化合物は、製剤化し（例えば、リボソームまたはマイクロスフェア封入によって）、次いでさらに、着色剤および香味剤を含有する冷蔵飲料などの食用製品中に含有させてよい。

【0132】

不活性物質を用いて治療薬を希釈するかまたは増量させてよい。これらの希釈剤は、炭水化物、とりわけマンニトール、 α -ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾デキストランおよびデンプンを含むこともできる。三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを含む特定の無機塩を充填剤として使用してもよい。いくつかの市販の希釈剤は、Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、EmcompressおよびAvicellである。

40

【0133】

固体剤形への治療薬の製剤化において崩壊剤を含めてよい。崩壊剤として使用される材料には、デンプンベースの市販の崩壊剤であるExplotabを含むデンプンが含まれるが、それに限定されない。デンプングリコール酸ナトリウム、Amberlite、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸カルボキシメチルセルロース、天然スポンジおよびベントナイトがいずれも使用されてよい。崩壊剤の別の形態は、不溶性の陽イオン交換樹脂である。粉末ゴムを崩壊剤および結合剤として使用してよく、これらとして、寒天、カラヤ (Karaya) ま

50

たはトラガカントなどの粉末ゴムを挙げるができる。アルギン酸およびそのナトリウム塩も崩壊剤として有用である。

【0134】

結合剤を使用して、治療用物質と一緒にまとめて硬質錠剤を形成してよく、これらには、アカシア、トラガカント、デンプンおよびゼラチンなどの天然産物からの材料が含まれる。他には、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）およびカルボキシメチルセルロース（CMC）が含まれる。ポリビニルピロリドン（PVP）およびヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）を共にアルコール溶液中に用いて、治療薬を造粒することもできる。

【0135】

製剤化プロセス中の粘着を防ぐために治療薬の製剤化において抗摩擦剤を含めてよい。治療薬と金型壁との間の層として滑沢剤を使用してよく、これらとして、そのマグネシウムおよびカルシウム塩を含むステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、液体パラフィン、植物油およびワックスを挙げるができるが、それらに限定されない。また、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000および6000などの可溶性の滑沢剤を使用してもよい。

【0136】

製剤化中の薬物の流動性を向上させ、圧縮中の再構成を助けるであろう、流動促進剤を加えてもよい。流動促進剤には、デンプン、タルク、焼成シリカおよび水和したケイアルミン酸塩が含まれ得る。

【0137】

水性環境への治療薬の溶解を助けるために、湿潤剤として界面活性剤を加えてもよい。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウムおよびジオクチルスルホン酸ナトリウムなどの陰イオン性洗剤が含まれ得る。使用できる陽イオン性洗剤には、塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムを挙げるができる。界面活性剤として製剤中に含めることが可能な非イオン性洗剤には、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースならびにカルボキシメチルセルロースが含まれる。これらの界面活性剤は、本開示の化合物または誘導体の製剤中に、単独または異なる比率の混合物のいずれかとして存在することもできる。

【0138】

経口使用できる薬学的調製物には、ゼラチン製の押し込み型カプセル、ならびにゼラチンとグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤から作られた軟性密封カプセルが含まれる。押し込み型カプセルは、有効成分を、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、任意で安定剤との混合物で含有することができる。軟質カプセルでは、活性化合物を、脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体中に溶解または懸濁させてよい。加えて、安定剤を加えてよい。また、経口投与用に製剤化されたマイクロスフェアを使用してもよい。そのようなマイクロスフェアは、当技術分野において十分に定義されている。経口投与用の製剤は全て、そのような投与に好適な投与量でなければならない。

【0139】

頬側投与について、組成物は、従来方法で製剤化された錠剤またはロゼンジ剤の形態を取ることができる。

【0140】

局所投与について、化合物は、当技術分野において周知であるように、溶液、ゲル、軟膏、クリーム、懸濁液などとして製剤化されてよい。全身用製剤には、注射、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、髄腔内または腹腔内注射による投与用に設計されたもの、ならびに経皮、経粘膜口腔または肺投与用に設計されたものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0141】

吸入による投与について、本開示に従って使用するための化合物は、加圧パックまたはネブライザーから、好適な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適な気体を使用して、エアロゾルスプレー提示の形態で簡便に送達され得る。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、計量された量を送達するためのバルブを設けることによって決定されてよい。化合物とラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有する、吸入器または吹入器で使用するための例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジを製剤化してよい。

【0142】

また、本明細書において、本明細書に開示される化合物（またはその塩）の肺送達も想定される。化合物は、吸入の間に哺乳動物の肺に送達され、肺上皮層を横断して血流へ入り込む。吸入分子に関する他の報告として、Adjei et al., Pharm Res 7:565-569 (1990); Adjei et al., Int J Pharmaceutics 63:135-144 (1990) (ロイプロリド酢酸塩); Braquet et al., J Cardiovasc Pharmacol 13(suppl. 5):143-146 (1989) (エンドセリン-1); Hubbard et al., Ann Int Med 3:206-212 (1989) (α1-抗トリプシン); Smith et al., 1989, J Clin Invest 84:1145-1146 (α1-プロテイナーゼ); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March (組換えヒト増殖ホルモン); Debs et al., 1988, J Immunol 140:3482-3488 (インターフェロン-γおよび腫瘍壊死因子α) およびPlatzらの米国特許第5,284,656号 (顆粒球コロニー刺激因子; 参照により組み入れられる) が挙げられる。全身性作用のための薬物の肺送達用の方法および組成物は、1995年9月19日にWongらに発行された米国特許第5,451,569号 (参照により組み入れられる) に記載されている。

【0143】

本開示の実施での使用に、ネブライザー、定用量吸入器および粉末吸入器を含むがそれらに限定されない、治療用製品の肺送達用に設計された広範な機械装置が想定され、これらは全て当業者によく知られている。

【0144】

本開示の実施に好適な市販の装置のいくつかの具体例は、Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.によって製造されたUltraventネブライザー; Marquest Medical Products, Englewood, Colo.によって製造されたAcorn IIネブライザー; Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolinaによって製造されたVentolin定用量吸入器; およびFisons Corp., Bedford, Massによって製造されたSpinhaler粉末吸入器である。

【0145】

そのような装置は全て、本開示の化合物の分注に好適な製剤の使用を必要とする。典型的には、各製剤は、用いられる装置の種類に合わせて特化され、治療において有用な通常の希釈剤、アジュバントおよび／または担体に加え、適切な噴射物質を使用する場合がある。また、リポソーム、マイクロカプセルもしくはマイクロスフェア、包接複合体、または他の種類の担体の使用も想定される。また、本開示の化学修飾化合物を、化学修飾の種類または用いられる装置の種類に応じて異なる製剤で調製してもよい。

【0146】

ジェット式または超音波式のいずれかのネブライザーでの使用に好適な製剤は、典型的には、本開示の生物学的に活性な化合物を溶液1mL当たり約0.1~25mgの濃度で水に溶解させた本開示の化合物を含む。製剤はまた、緩衝液および単糖（例えば、阻害物質安定化および浸透圧調節用）を含んでもよい。ネブライザー製剤はまた、エアロゾル形成の際の溶液の噴霧化によって引き起こされる本開示の化合物の表面誘導凝集を低減または防止するために、界面活性剤を含有してもよい。

10

20

30

40

50

【0147】

定用量吸入装置で使用するための製剤は、一般的に、界面活性剤を用いて噴射剤に懸濁させた本開示の化合物を含有する細粒化粉末を含む。噴射剤は、この目的のために用いられる任意の従来材料、例えば、クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、もしくはトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび1,1,1,2-テトラフルオロエタンを含む炭化水素、またはそれらの組み合わせであり得る。好適な界面活性剤には、トリオレイン酸ソルビタンおよび大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も界面活性剤として有用であり得る。

【0148】

粉末吸入装置からの分注用製剤は、本開示の化合物を含有する細粒化乾燥粉末を含み、また、ラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールなどの増量剤を、装置からの粉末の分散を容易にする量、例えば、製剤の50～90重量%で含み得る。本開示の化合物は、肺深部に送達するために、10マイクロメートル（mm）未満または0.5～5 mmの平均粒径の微粒子形態で調製することができる。

【0149】

また、本開示の薬学的組成物の鼻送達も想定される。鼻送達は、治療用製品を鼻に投与後、肺内に製品を沈着させる必要なしに、本開示の薬学的組成物を直接血流まで通すことを可能にする。鼻送達用の製剤は、デキストランまたはシクロデキストランを用いたものが含まれる。

【0150】

鼻投与のために、有用な装置は、定用量噴霧器が取り付けられている小型の硬いボトルである。一態様では、定用量は、本開示の薬学的組成物の溶液を規定容量のチャンバー内に吸い込むことによって送達され、そのチャンバーは、チャンバー内の液体が圧縮された時にスプレーが形成されることによりエアロゾル製剤をエアロゾル化するような大きさの開口部を有する。チャンバーは、本開示の薬学的組成物を投与するために圧縮される。特定の態様では、チャンバーは、ピストン配置である。そのような装置は市販されている。

【0151】

あるいは、絞った時にスプレーが形成されることによりエアロゾル製剤をエアロゾル化するような大きさの開口部または穴部を有するプラスチック製の絞り出しボトルが使用される。穴部は、通常、ボトルの頂部に見られ、頂部は、一般的に、エアロゾル製剤が効率的に投与されるよう鼻腔に部分的に合うように先細になっている。鼻吸入器は、測定用量の薬物が投与されるように、定量のエアロゾル製剤を提供することができる。

【0152】

化合物を全身送達することが望ましい場合、化合物は、注射による、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化されてよい。注射用製剤は、保存料を加えて、単位剤形で、例えば、アンプルでまたは多回投与容器で提示されてよい。組成物は、油性または水性媒体中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態を取ってよく、懸濁化剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤を含有してよい。

【0153】

非経口投与用の薬学的製剤は、水溶性形態の活性化合物の水溶液を含む。加えて、活性化合物の懸濁液を必要に応じて油性注射懸濁液として調製してもよい。好適な脂溶性溶媒または媒体には、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリボソームが含まれる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの懸濁液の粘性を増大させる物質を含有してよい。任意で、懸濁液はまた、好適な安定剤、または化合物の溶解度を増大させて高濃縮溶液の調製を可能にする作用物質を含有してもよい。

【0154】

あるいは、活性化合物は、使用前に、好適な媒体、例えば、滅菌パイロジェンフリー水で再構成する粉末形態であってもよい。

10

20

30

40

50

【0155】

また、化合物は、例えばココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤用基剤を含有する、坐剤または停留浣腸などの直腸または腔用組成物で製剤化されてもよい。

【0156】

上記の製剤に加えて、化合物は、デポー調製物として製剤化されてもよい。そのような長期作用型製剤は、好適なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）もしくはイオン交換樹脂を用いて、またはやや不溶性の誘導体として、例えば、やや不溶性の塩として製剤化されてもよい。

【0157】

薬学的組成物はまた、好適な固体またはゲル相の担体または賦形剤を含んでもよい。そのような担体または賦形剤の例として、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0158】

好適な液体または固体薬学的調製物形態は、例えば、吸入用の水溶液もしくは食塩水、マイクロカプセル封入されたもの、エンコクレートされた（encochleated）もの、微細金粒子上へコーティングされたもの、リポソーム内に含有されたもの、噴霧化されたもの、エアロゾル、皮膚内移植用ペレット、または皮膚内に擦過するように鋭器上に乾燥されたものである。薬学的組成物にはまた、顆粒剤、粉末剤、錠剤、コート錠、（マイクロ）カプセル剤、坐剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、クリーム剤、点滴薬または活性化合物が長期放出される調製物も含まれ、その調製において、賦形剤と添加物および／または補助剤、例えば、崩壊剤、結合剤、コーティング剤、膨潤剤、滑沢剤、香料、甘味料または可溶化剤が、上記したように慣例的に使用される。薬学的組成物は、様々な薬物送達システムでの使用に好適である。薬物送達方法の簡単な概説については、Langer R, Science 249:1527-33 (1990)を参照されたい。

20

【0159】

本開示の化合物および任意で他の治療薬は、それ自体（純形態）でまたは薬学的に許容される塩の形態で投与されてよい。医学で使用される場合、塩は、薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩を使用してその薬学的に許容される塩を調製することが都合のよい場合がある。そのような塩には、以下の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン-2-スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸から調製されたものが含まれるが、それらに限定されない。また、そのような塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類金属、例えば、カルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩として調製することができる。

30

【0160】

好適な緩衝化剤には、酢酸および塩（1～2% w/v）；クエン酸および塩（1～3% w/v）；ホウ酸および塩（0.5～2.5% w/v）；ならびにリン酸および塩（0.8～2% w/v）が含まれる。好適な保存料には、塩化ベンザルコニウム（0.003～0.03% w/v）；クロロブタノール（0.3～0.9% w/v）；パラベン類（0.01～0.25% w/v）およびチメロサル（0.004～0.02% w/v）が含まれる。

40

【0161】

本開示の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体に含まれる有効量の本明細書に記載される通りの化合物と任意で治療用物質を含有する。「薬学的に許容される担体」という用語は、ヒトまたは他の脊椎動物への投与に適した1つまたは複数の適合可能な固体または液体の充填剤、希釈剤または封入物質のことを意味する。「担体」という用語は、適用を容易にするために有効成分が組み合わされる天然または合成の有機または無機成分を表す。薬学的組成物の構成要素はまた、本開示の化合物と、また互いに、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用が起こらないように混ぜ合わせることが可能である。

【0162】

50

本開示の化合物を具体的に含むがそれに限定されない治療用物質は、粒子で提供されてよい。粒子は、本明細書において使用される場合、本開示の化合物または本明細書に記載されるような他の治療用物質から全体的または部分的に構成され得る、ナノ粒子またはマイクロ粒子（または、いくつかの例ではより大きな粒子）のことを意味する。粒子は、腸溶コーティングを含むがそれに限定されないコーティングで囲まれたコア内に治療用物質を含有し得る。治療用物質はまた、粒子全体に分散されてもよい。治療用物質はまた、粒子内に吸着されてもよい。粒子は、ゼロ次放出、一次放出、二次放出を含む任意の次数の放出動態、遅延放出、持続放出、即時放出およびそれらの任意の組み合わせなどのものであり得る。粒子は、治療用物質に加えて、浸食性、非浸食性、生分解性もしくは非生分解性の材料またはそれらの組み合わせを含むがそれらに限定されない薬学および医学の分野において日常的に使用される材料のいずれかを含んでよい。粒子は、溶液または半固体状態で本開示の化合物を含有するマイクロカプセルであってよい。粒子は、事実上どのような形態のものであってもよい。

10

【0163】

非生分解性および生分解性の両方のポリマー材料を、治療用物質を送達するための粒子の製造において使用することができる。そのようなポリマーは、天然または合成のポリマーであってよい。ポリマーは、放出が所望される期間に基づいて選択される。特に関心のある生体付着性ポリマーには、Sawhney H S et al. (1993) *Macromolecules* 26: 581-7に記載されている生体浸食性ヒドロゲルが含まれ、その教示は本明細書に組み入れられる。これらには、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギナート、キトサン、ポリ（メチルメタクリラート）、ポリ（エチルメタクリラート）、ポリ（ブチルメタクリラート）、ポリ（イソブチルメタクリラート）、ポリ（ヘキシルメタクリラート）、ポリ（イソデシルメタクリラート）、ポリ（ラウリルメタクリラート）、ポリ（フェニルメタクリラート）、ポリ（メチルアクリラート）、ポリ（イソプロピルアクリラート）、ポリ（イソブチルアクリラート）、およびポリ（オクタデシルアクリラート）が含まれる。

20

【0164】

治療用物質は、制御放出系に含有されてよい。「制御放出」という用語は、製剤からの薬物放出の様式およびプロファイルが制御される任意の薬物含有製剤のことを指すことを意図する。これは、即時放出製剤ならびに非即時放出製剤のことを指し、非即時放出製剤は、持続放出製剤および遅延放出製剤を含むが、それらに限定されない。「持続放出」（また「延長放出（extended release）」と称される）という用語は、その従来の意味で使用され、長期間にわたって薬物の徐放を提供し、長期間にわたって実質的に一定の血中薬物濃度をもたらすことができる薬物製剤のことを指す。「遅延放出」という用語は、その従来の意味で使用され、製剤の投与とそこからの薬物の放出との間に時間遅延が生じる薬物製剤のことを指す。「遅延放出」は、長期間にわたる薬物の徐放を伴っても伴わなくてもよく、したがって、「持続放出」であってもそれでもなくともよい。

30

【0165】

慢性状態の処置には、長期持続放出インプラントの使用が特に好適であり得る。「長期」放出は、本明細書において使用される場合、インプラントが、治療レベルの有効成分を少なくとも7日間かつ最大30～60日間送達するように構築されかつ配置されることを意味する。長期持続放出インプラントは、当技術分野の通常の技能を有する者に周知であり、上記の放出系のいくつかを含む。

40

【0166】

本明細書に記載される組成物および方法に対する他の好適な改変および適応は、当業者に公知の情報を考慮して本明細書に含まれる本開示の説明から容易に明らかであり、本開示またはその任意の態様の範囲から逸脱することなく行われてよいことが、関連分野の通常の技能を有する者に理解されよう。ここに本開示を詳細に記載してきたが、例示を目的としてのみ本明細書に含まれ、本開示の限定を意図するものではない以下の実施例を参照することにより、同じことがより明確に理解されよう。

50

【実施例】

【0167】

ここで、本発明を一般的に説明しているが、単に本発明の特定の局面および態様の例示を目的としてだけ含まれ、本発明を限定することを意図していない以下の実施例を参照することにより、本発明は、より容易に理解されよう。

【0168】

材料および方法

マウス

P301Sトランスジェニックマウス (<https://www.jax.org/strain/008169>) を、cGasノックアウトマウス (<https://www.jax.org/strain/026554>) と交雑して、同腹仔P301S cGas+/+マウス、P301S cGas+/-および同腹仔P301S cGas-/-マウス、ならびに非トランスジェニック同腹仔を生成させた。両方の性のマウスを行動分析、組織学的分析および生化学分析に使用した。7~8月齢でマウスに行動試験を受けさせ、他の実験に使用することはなかった。9~10月齢で、同じマウスを病理学研究およびRNA-seq研究に使用した。TDI-6570インビボ処置のために、6~7ヶ月のP301Sおよび非トランスジェニック同腹仔マウスを食餌実験に使用し、9~10ヶ月に行動および組織学についてアッセイした。マウスは、特定の病原体フリー条件下、12時間の明暗周期下で飼育し、マウスのプロトコルは全て、サンフランシスコカリフォルニア大学の施設内動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。

【0169】

RNA単離

新たに灌流したマウスから回収した脳を切開して、海馬および皮質を単離した。海馬を2つに分割し、実験まで-80℃で凍結した。RNAを単離するために、海馬を氷上で30分間解凍し、次いで、ホモジナイズした。簡単に述べると、21Gの針を使用して、海馬を1% β-メルカプトエタノールを含有するRLT緩衝液の溶液に通した。ホモジナイズに続いて、試料を簡単にスピンドウンし、次いで、-80℃で一晩凍結した。翌日、試料を氷上で解凍し、次いで、4℃で6分間にわたり14000rpmでスピンドウンした。RNA単離は、製造業者のプロトコル (RNeasy mini-kit, Qiagen) に従って海馬溶解物に対して実施した。単離したRNAは、RNAの品質および完全性の分析のためにWeill Cornell Medicine Genomics Coreに送られた。全ての試料がQCに合格し、NovaSeqを使用するシーケンシング用にRNAシーケンシングライブラリーを調製した。検証リアルタイムqPCR実験のために、iScript Reverse Transcription supermix (BioRad) を使用してcDNAを調製した。Rt-qPCRは、ABI7900HT配列検出器 (Applied biosystems) でSYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) を使用して3連で実施した。関心対象の転写物とマウスGAPDHとの間のCt値の変化を算出した。次いで、 $2^{-\Delta Ct}$ を使用して相対遺伝子発現を判定し、次いで、相対変化倍率として表した。

【0170】

ウェスタンブロット：

マウスの脳試料について、海馬の半分を、氷上で、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害物質 (Millipore Sigma) を含有するRIPA緩衝液中で機械的にホモジナイズした。海馬溶解物50ugを使用して、脳中のタンパク質発現を分析した。試料をNuPage Bis-Trisゲル (ThermoFisher) 上にロードし、SDSランニングバッファー中にて150Vで約2.5時間流した。低温室でゲルをメタノール活性化ニトロセルロース膜 (BioRad) に一晩転写した。0.01% Triton X-100を含むTBS (TBST) 中で膜を3×10分間洗浄し、5%ミルクTBST中で1時間ブロッキングした。適切な一次抗体を1%ミルクTBST中で希釈し、4℃で一晩インキュベートした。翌日、膜をTBST中で3×10分間洗浄し、次いで、1%ミルクTBST中にて適切な二次抗体と室温で1時間インキュベートした。膜を再度洗浄して非特異的な結合を最小限にし、次いで、ECL (BioRad) で60秒間処理して、暗室で発色させた。プロットを300 DPIでスキャンし、ImageJを使用して定量化した。

【0171】

ヒトの脳試料について、過去に記載されているように前頭皮質溶解物を調製した (Min et al., 2010)。簡単に述べると、ヒトまたはマウスの脳組織を、プロテアーゼ阻害物質カクテル (Sigma)、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma)、ホスファターゼ阻害物質カクテル (Roche) ならびに5mMニコチンアミド (Sigma) および1mMトリコスタチンA (Sigma) を含むHDAC阻害物質を含有するRIPA緩衝液中で溶解させた。超音波処理後、溶解物を170,000gにて4℃で15分間遠心にかけた。上清を収集し、ウェスタンブロットによって分析した。タンパク質濃度をBCAアッセイ (Thermo Scientific) によって測定した。

【0172】

培養初代ミクログリアについて、100~200万個の細胞を、HALTプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害物質カクテル (Thermo Scientific) と150mM NaClを補充したM-PER (商標) Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) 中で溶解させた。試料を4℃で10分間回転させた。16000×gにて4℃で15分間遠心にかけることによって溶解物を清澄にした。タンパク質濃度をBCAアッセイによって測定した。

【0173】

凍結したマウス海馬からの核単離

凍結したマウス海馬からの海馬単離は、過去の研究から変更を加えて改作した (Grubman et al., 2019; Habib et al., 2017)。手順は全て氷上または4℃で行った。簡潔に述べると、死後の脳組織をSigma nuclei PURE溶解バッファー (Sigma、NUC201-1KT) 1500μl中に入れ、Dounce組織グラインダー (Sigma、D8938-1SET) を用いて乳棒Aにより20ストローク、乳棒Bにより15ストロークしてホモジナイズした。ホモジナイズした組織を35μmのセルストレーナーに通して濾過し、次いで、600gにて4℃で5分間遠心にかけ、1% BSA、20mM DTTおよび0.2Uμl⁻¹組換えRNase阻害物質を含有するPBS 1mlで3回洗浄した。次いで、核を600gにて4℃で5分間遠心にかけ、0.04% BSAおよび1×DAPIを含有するPBS 800μlに再懸濁し、続いて、FACSソーティングによって細胞残屑を除去した。FACSソーティングしたDAPI染色核の懸濁液を計数し、0.04% BSAを含有するPBS中に1マイクロリットル当たり1000個の核濃度に希釈した。

【0174】

液滴ベース単核RNAシーケンシング

液滴ベースsnRNA-seqのために、Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v3 (10x Genomics、PN-1000075) を製造業者のプロトコルに従って用いてライブラリーを調製した。snRNA-seqライブラリーをNovaSeq 6000シーケンサー (Illumina) にて100サイクルでシーケンシングした。

【0175】

ヒト脳組織からの液滴ベース単核RNA-seqデータの解析

Cell Ranger software (v.3.1.0) (10x Genomics) を用いてリードをmm10ゲノムに整列させることによって、遺伝子カウントを得た。スプライシングされていない核転写物を考慮に入れるため、pre-mRNAにマッピングされたリードをカウントした。Cell Ranger 3.1.0デフォルトパラメーターを使用して、細胞バーコードをコールした。本発明者らはさらに、2種の細胞だけ、すなわち4,000超または200未満の固有の遺伝子カウントを有する細胞、およびミトコンドリアリードの画分が高い (>5%) 細胞で発現される遺伝子を除外した。DoubletFinder (McGinnis et al., 2019) を使用して試料毎に別々に潜在的なダブレット細胞を予測し、高信頼度のダブレットを除去した。正規化およびクラスターリングは、Seurat package v3.2.2 (Stuart et al., 2019) を用いて行った。簡潔に述べると、総ライブラリーサイズにスケール因子 (10,000) を掛けることによって全ての核のカウントをスケールリングし、ログスペースに変換した。scTransform R packageからのSCTransformを用いて可変安定化モードで2000個の高変

10

20

30

40

50

動遺伝子のセットを同定した。これを、補正された固有の分子識別子 (UMI) カウント行列、対数変換データ行列、および正規化した負の二項回帰モデルからのピアソン残差に戻した。主成分分析 (PCA) を全ての遺伝子に対して行って、t-SNEを上位20個のPCで実行した。Seurat functions FindNeighbors (上位20個のPCを使用) および FindClusters (分解能=0.02) を用いて細胞クラスターを同定した。この分析では、20個のPCを使用し、pNを自動的に0.25に設定して、平均分散正規化二峰性係数 (BCmvn) アプローチを使用して近傍サイズパラメータ-pKを推定した。クラスター毎に、本発明者らは、マーカー遺伝子のセットに対する統計的エンリッチメント (Lake et al., 2018; Wang et al., 2018)、および公知のマーカー遺伝子の小セットに対する遺伝子発現の手作業による評価を使用して、細胞型ラベルを割り当てた。FindMarkers function および MAST (Finak et al., 2015) を使用して発現変動遺伝子解析を行った。発現変動遺伝子 (DEG) において濃縮された遺伝子オントロジーおよび経路を同定するために、(MSigDB) 遺伝子アノテーションデータベース (Liberzon et al., 2011; Subramanian et al., 2005) を使用してDEGを解析した。多重検定を制御するために、本発明者らは、Benjamini-Hochberg (BH) アプローチを用いて偽発見率 (FDR) を制限した。軌跡解析のために、Seuratオブジェクトをcdsオブジェクトに変換し、Monocle 3 (Cao et al., 2019; Qiu et al., 2017; Trapnell et al., 2014) を使用して解析した。Moran's I空間的自己相関分析を実施して、ミクログリアの軌跡に有意に関連する遺伝子モジュールを同定した。標的遺伝子のエンリッチメント解析をGeneOverlapのRパッケージ (GeneOverlap package in R) を用いて実施した。簡単に述べると、MEF2C、MEF2A、JunBおよびFOSL2標的遺伝子リスト、ならびにヒト認知レジリエンス遺伝子リスト (好意からDr. Li Huei Tsaiにより共有) およびP301S Cgas-/-対P301S EN/IN DEGリストを比較の入力として使用した。結果には、重複p値および2つのデータベース間の関連性を調べるオッズ比が含まれる。

10

20

30

40

50

【0176】

抗体

免疫蛍光分析に使用された抗体は、以下の通りであった：使用された二次抗体は、Alexa fluor donkey anti-rabbit/goat 488 および anti-mouse 555と、Jackson donkey anti-goat 555 at 1:500 (Invitrogen) であった。

【0177】

STING (D2P2F, Cell Signaling Technology, 1:300)、抗IBA1 (ab5076、Abcam, 1:500)、抗PSD-95 (1:500、Millipore MAB1596)、抗vGAT (Ab5062、Millipore, 1:500)、抗pSTAT1 (mAb9167、Cell Signaling, 1:500)、抗NRG1 (MA5-12896、Invitrogen, 1:100)、MC1 (Dr. Peter Davisからの寛大な贈り物)、抗MEF2C (MAB6786、R&D systems 1:200)。

【0178】

ウェスタンブロットに使用された抗体は、以下の通りであった：STING (上記の通り)、TBK1 (D1B4、Cell Signaling Technology, 1:1000)、pTBK1 (D52C2、Cell Signaling Technology, 1:500)、Caspase-3 (9661、Cell Signaling Technology, 1:1000)、GAPDH (MAB374、Millipore, 1:10000 および GTX100118、GeneTex, 1:10000)。使用された二次抗体 (secondaries) は、抗ウサギHRP (401393、Calbiochem, 1:2000) または抗マウスHRP (401253、Calbiochem, 1:2000)、抗NeuN (ABN78、Millipore, 1:500) であった。イムノゴールド標識電子顕微鏡検査のために、タウに対する抗体 (A0024、Agilent Technologies, 1:1000) を使用した。

【0179】

免疫蛍光：

経心的に灌流したマウス由来の半脳を、4℃で、4%パラホルムアルデヒド中に48時間、続いて、30%スクロースPBS中に48時間置いた。切片を、凍結ミクロトーム (Leica) を使用して40 μmで冠状にカットし、使用するまで-20℃の凍結保護培地に入れた。

マウス1匹当たり8~10個の自由浮遊切片。全ての洗浄工程は、3×5分であった。切片をTBST (0.01% Triton X-100) 中で洗浄し、TBST (0.5% Triton X-100) で15分間透過処理し、次いで、再度洗浄した。次いで、切片を抗原アンマスキング溶液 (クエン酸緩衝液、pH 6.0、h-3300) に入れ、必要に応じて90℃のインキュベーターに30分間入れた。切片を洗浄し、次いで、PBST中10%正常口バ血清 (NDS、Vector BM K-2202) 中にて室温で2時間ブロッキングした。一次抗体を5% NDS PBST中で希釈し、4℃で一晩インキュベートした。翌日、切片を徹底的に洗浄し、適切な二次抗体 (1:500、Invitrogen) 中で1時間インキュベートした。切片を洗浄し、スライドに載せて、Keyence BZ-X700顕微鏡を使用して撮像した。pSTAT1イメージングのために、Zeiss Apotome 20×対物レンズ (Carl Zeiss) でマウス脳切片のCA1領域を撮像した。10
。画像は、ステップサイズ1μmで7μm間隔のZスタックにより取得した。MEF2Cについて、Zeiss LSM880共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) の25×対物レンズを使用して、マウス脳CA1ピラミッド形領域の画像を取得した。4×1タイルスキャンおよびステップサイズ3μmで12μmのZスタックを使用して、最大値投影画像を生成し、切片毎に画像をつなぎ合わせた。PSD-95、vGATおよびNRG1について、Zeiss LSM 880共焦点顕微鏡を使用してスライドを撮像した。ImageJ software (NIH) を使用し、陰性および陽性対照を使用して決定された閾値化に基づいて面積率を使用して定量化を行った。より高い分解能では、画像は、40×対物レンズを用いたLSM 880共焦点顕微鏡検査およびZen Black画像取得ソフトウェアにより取得した。海馬のCA1領域は、1μm間隔のZスタックで、1スライス当たり15μmの総距離にわたって、2×2タイルスキャンで撮像した。20
最終画像は、最大値投影法で処理した。

【0180】

行動研究

cGas+/+マウス、P301S cGas+/-および同腹仔P301S cGas-/-マウスをそれぞれの実験者には実験全体を通してマウス遺伝子型を知らせなかった。雄および雌のマウスを別々の日に試験した。

【0181】

Cgas+/+、Cgas+/-およびCgas-/-マウスをそれぞれのP301Sトランスジェニック同腹仔と比較した。雄および雌のマウスを別々の日に試験し、実験者には実験全体を通してマウス遺伝子型を知らせなかった。

【0182】

TDI-6570処置を伴う実験について、TDI-6570または対照飼料を与えた雄のP301Sおよび非トランスジェニック同腹仔を使用した。

【0183】

モリス水迷路

水迷路は、不透明な水 (20±1℃) を含有するプール (直径122cm) と水面下1.5cmのプラットフォーム (直径10cm) とからなる。空間的手がかりとして3つの異なる画像を部屋の壁に貼り付けた。隠しプラットフォームトレーニング (1~7日目) は、それぞれ2回の試行を行う14回のセッション (1日当たり2回、2時間空けて) からなる。マウスを試行毎に交互の四分区間でプールに入れた。マウスがプラットフォームに落ち着くかまたは60秒が経過した後に、試行を終了した。トレーニングの24時間後および72時間後に、隠しプラットフォームを取り除いてマウスを60秒間泳がせるプローブ試行でマウスを試験した。24時間および72時間のプローブ試行の前に、マウスに7日間の隠しプラットフォームトレーニングを受けさせた。可視プラットフォーム試験は、最後のプローブ試行の24時間後に行った。パフォーマンスは、EthoVisionビデオトラッキングシステム (Noldus Information Technology) で測定した。

【0184】

高架式十字迷路

迷路は、壁のない15×2インチの2つの開いたアームと高さ6.5インチの壁のある2つの閉じたアームとからなり、地上30.5インチにある。試験の1時間前に、マウスを試験

10

20

30

40

50

室に移動させて、薄暗い照明に順応させた。迷路の開いたアームと閉じたアームの交差点にマウスを個別に置き、迷路を10分間探索させた。

【0185】

オープンフィールド

コンピューターに接続された赤外線フォトセルの列を備える明るく照らされた自動化活動室 (San Diego Instruments) にマウスを個別に入れた。オープンフィールド活動を5分間記録した。記録されたビームブレイクを使用して、活動の合計時間を算出した。

【0186】

新規物体認識試験

物体認識に向かう前に、2日間の間隔をあけて2回の10分間試行でマウスを不透明なオープンフィールドアリーナ (40×40cm) に慣れさせた。2回目のアリーナ馴化試行の24時間後、2個の同一物体 (ガラス瓶) を各アリーナの中央に置いた。マウスに、これらの物体を1回の15分試行で探索させた。物体馴化の翌日、15分間の試験期間の間に同一物体のうちの1個を新規物体 (DUPLO (登録商標) block structure) と交換した。ビデオ録画および追跡 (Ethovision v15, Noldus, Wageningen, the Netherlands) を用いて、総移動距離を判定した。当該群を知らせなかった実験者は、マウスが各物体を探索するのに費やした時間を手動でスコア化した。個々のマウスが両物体を探索するのに費やした合計時間に基づいて選好度を算出した。

【0187】

電気生理学

麻酔をかけたマウスから脳を素早く切開し、210 スクロース、2.5 KCl、1.25 NaH₂PO₄、25 NaHCO₃、7 グルコース、2 MgSO₄、および0.5 CaCl₂ (mM単位) を含有する氷冷剥離溶液 (95% O₂~5% CO₂でガス化、pH 約7.4) に入れた。ビブラトーム上で水平なスライス (厚さ400 μm) を作製し、次いで、119 NaCl、2.5 KCl、26.2 NaHCO₃、1 NaH₂PO₄、11 グルコース、1.3 MgSO₄、および2.5 CaCl₂ (mM単位) を含有する35℃に温めた人工脳脊髄液 (ACSF) (95% O₂~5% CO₂でガス化、pH 約7.4) 中でスライスを30分間インキュベートした。次いで、記録を実施するまで、酸素化したACSF中でスライスを室温で保持した。

【0188】

フィールド記録は、記録室に入れた急性水平脳スライスの歯状回分子層で実施した。スライスを、30℃で連続的に灌流した酸素化ACSF中に沈めた。ガラス記録電極 (約3 MΩのピペット耐性) をACSFで満たし、歯状回の背側翼の分子層内に約50 μm下げた。記録電極から約150 μmに位置する双極タングステン電極 (FHC、Bowdoin、ME) を使用して、歯状回への貫通路入力を刺激した。Model 2100 Isolated Pulse Stimulator (A-M Systems) によって刺激パルスを発生させた。5~40 μAの範囲の刺激強度で0.5 msの刺激持続時間、30秒毎に反応を誘発させた。5~40 μAの刺激に反応したfEPSPを記録した後、LTP記録のためのベースラインを設定するために、最大fEPSP傾斜の30%が誘発されるように刺激強度を調整した。LTP記録をピクロトキシン (100 μM、Sigma) の存在下で実施した。ベースラインfEPSPを20分間記録した後、15秒毎に与えられる10回のシータバーストを含み、それぞれ200 ms毎に10回のバースト (4回のパルス、100 Hz) からなる、シータバースト刺激 (TBS) を与えた。刺激強度を、TBSの間のみ最大fEPSP傾斜の60%のレベルまで上昇させ、次いで、TBS後にベースライン記録中に使用した刺激強度に戻した。LTP誘導前にfEPSP傾斜をベースライン反応に対して正規化した。Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices) を使用して記録を実施し、10 kHzでデジタル化し、WinLTPソフトウェア (version 1.11b, University of Bristol) を用いて取得し、WinLTPソフトウェアを使用して解析した。記録および解析は、マウス遺伝子型を知らずに行った。

【0189】

ミクログリア培養および単離

BV2ミクログリア培養。BV2ミクログリア細胞株を、5% CO₂を含む37℃のHERAce

10

20

30

40

50

ll 150iインキュベーター (Caisson Labs) 内、成長培地-10%熱不活化ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone) および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies) を補充したDMEM (Thermo Fisher) 中で維持した。プレートが密集度80~90%達したら、BV2ミクログリアを連続継代した。

【0190】

生後初代ミクログリアの単離および培養。生後1~3日目のマウスの子供 (P1~P3) から初代ミクログリア細胞を採取した。簡単に述べると、脳皮質を単離し、細かく切り刻んだ。組織を0.25%トリプシン-EDTA中にて37℃で10分間解離させ、5分毎にかき混ぜた。トリプシンを完全培地 (10%熱不活化ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone) を補充したDMEM (Thermo Fisher)) で中和し、70μmのセルストレーナー (BD Falcon) に通して濾過し、1500rpmでの遠心によってペレット化した。混合グリア培養物を、成長培地中、37℃および5% CO₂で7~10日間インビトロで維持した。混合グリア培養物中に明るい円形細胞が現れ始めたら、組換えマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (1ng/ml、Life Technologies) を加えて、ミクログリアの増殖を促した。48~72時間後に機械攪拌によって初代ミクログリア細胞を採取し、成長培地中、ポリ-Lリシンコートしたt-75フラスコ (Corning) 上にプレーティングした。アッセイは、ミクログリアプレーティングの24~48時間後に実施した。

10

【0191】

インターフェロンβレポーターシステム

分子クローニング。Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) を使用して、BV2ミクログリアに、インターフェロンβレポータープラスミドpNiFty3-I-Lucia (Invivogen) を一過性トランスフェクションした。トランスフェクションの6時間後にトランスフェクション培地を除去し、完全成長培地と交換した。ゼオシンによる選択を3週間実行した。耐性細胞を96ウェルプレート (Corning) に単クローンとしてプレーティングした。クローンからゲノムDNAを単離して、ルシフェラーゼレポーターの組み込みを確認した。次いで、cGasアゴニストに応答したインターフェロンの誘導についてクローンを検証した。

20

【0192】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ。BV2 IfnBレポーターミクログリアを0~10ugのHT-DNA (Sigma) またはサイクリックGAMP (Invivogen) で刺激した。Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) を使用してDNAを細胞に送達した。培地中に分泌されたルシフェラーゼレベルを、Quanti-Luc (Invivogen) を使用して測定した。発光は、BioTek Synergy hybrid readerで測定した。

30

【0193】

cGasアゴニストアッセイ

細胞生存率。BV2ミクログリアをDMSO中に可溶化させた0~100uMのTDI 6570で処理した。処理の24時間後に、細胞生存率をCell Titer Gloアッセイ (Promega) を使用して測定した。簡単に述べると、96ウェルプレート内の細胞を室温で30分間平衡化させ、次いで溶解させた。発光は、BioTek Synergy hybrid readerで測定した。

【0194】

機能的アッセイ。初代生後ミクログリアまたはBV2 IfnBレポーターミクログリアを、HT-DNAトランスフェクションありまたはなしで、0~50uMのTDI6570で処理した。RNAを単離し、cDNAを調製し、cGas関連遺伝子のレベルを以下のプライマー：
Cxcl10 F: CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC. R: GGCTCGCAGGGATGATTTCAA

40

Gapdh F: ACCACAGTCCATGCCATCAC. R: CACCACCCTGTTGCTGTAGCC

cGas F: CATCTTCCCAGCCTGACATT. R: CACGCTTCCTGCTATGATGA

IfnB F: CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC. R: GGCAGTGTAACCTTTCTGCAT

50

を使用して測定した。あるいは、培地中のルシフェラーゼレベルを上記の通り測定した。

【0195】

ミトコンドリアDNA枯渇アッセイ

BV2 IfnBレポーターミクログリアを、10% FBS (GIBCO)、100ユニット/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを補充したDMEM中、50~100 ng/mlの臭化エチジウム (EtBr、Sigma Aldrich) または40~80 µg/mlのジデオキシシチジン (ddC、Sigma Aldrich) で7日間処理した。7日目に、掻き取るによりプレートから細胞を剥がした。細胞の一部をmtDNA定量化PCRアッセイのために保存した。残りの細胞を100ユニット/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを補充したDMEM F12中にプレーティングし、48時間静置した。次いで、ルシフェラーゼレポーター活性および細胞生存率をアッセイする前に、細胞をON4Rタウ線維またはABT-737 + Q-VD-Oph (ABT+QVD、各10 µM、SelleckChem) で24時間処理した。

10

【0196】

mtDNA枯渇qPCRのために、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) を使用して細胞ペレットからDNAを抽出した。mtDNA (Nd2) 対ゲノムDNA (Tert) の比を、以下のプライマーペア：

Nd2 フォワード：CCATCAACTCAATCTCACTTCTATG

Nd2 リバース：GAATCCTGTTAGTGGTGGGAAGG

20

Tert フォワード：CTAGCTCATGTGTCAAGACCCTCTT

Tert リバース：GCCAGCACGTTTCTCTCGTT

を使用したSybrGreenリアルタイムPCR (Bio-rad Laboratories) によって測定した。

【0197】

酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) およびマルチプレックスビーズベース免疫アッセイ

培養した初代マウスミクログリアからの細胞培養培地を、刺激の24時間後に収集し、2000rpmで5分間の遠心により清澄にした。上清を1:10希釈し、VeriKine-HS (商標) Mouse IFN Beta Serum ELISA Kit (PBL Assay Science) を製造業者の説明書に従って用いてアッセイした。MagPix Systemを使用し、MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead kit (Millipore) によりCXCL10およびCCL5を測定した。

30

【0198】

電子顕微鏡検査

電子顕微鏡検査実験は、Weill Cornell Medicineの電子顕微鏡検査コア施設 (electron microscopy core facility) によって実施した。細胞を無血清培地または適切なバッファーで洗浄し、次いで、pH 7.2の0.1Mカコジル酸ナトリウムバッファー中2.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒドおよび0.02%ピクリン酸の改変Karmovsky固定液で固定した。1%四酸化オスミウム、1.5%フェリシアン化カリウム中での2回目の固定に続いて、試料を段階的エタノール系列により脱水し、LX-112樹脂 (Ladd Research Industries) にインサイチューで包埋した。前の超薄切片を、Leica Ultracut Sウルトラミクロトーム (Leica, Vienna, Austria) 上でDiatomeダイヤモンドナイフ (Diatome, USA, Hatfield, PA) を使用してカットした。切片を銅格子上に集め、さらにクエン酸鉛で対比染色した。免疫標識のために、切片を200メッシュのニッケル格子上に集めた。簡単に述べると、切片をPBS中で再水和した。未反応のアルデヒドをPBS中50mMグリシンによってクエンチし、続いて、多くの二次AB (Aurion、EMS) をRTで15分間ブロッキングした。一次ABとのインキュベーションをPBS-c (PBS + 0.2% BSA-c [Aurion, EMS]) 中4°Cで一晩行った。翌日、切片をPBS-c中で6回

40

50

洗浄し、二次抗体（Aurion金コンジュゲート、BB中1：100）とRTで1～2時間インキュベートした。PBS-c、次いで、水により洗浄を行った。次いで、0.1Mバッファー中2.5%グルタルアルデヒドで切片を固定し、PBSで洗浄し、酢酸ウラニルで対比染色し、水で最終洗浄した後に風乾させた。120kVで動作させたJEM 1400電子顕微鏡（JEOL, USA, Inc., Peabody, MA）で試料を検分した。Veleta 2K×2K CCDカメラ（Olympus-SIS, Germany）でデジタル画像を撮った。

【0199】

TDI-6570の薬物動態評価

薬物動態を試験するために、TDI-6570（50mg/kg、0.2% Tween 80を含有する水中0.5%メチルセルロース溶液中の懸濁液として）を8週齢のCD-1雄マウス（各時点にn=3）に腹腔内（IP）投与し、血漿（EDTA-K2）と脳組織の両方を様々な時点（薬物投与後0.5、2、4、8および24時間）に収集した。脳収集の前に食塩水で経心腔的灌流を実施した。脳組織および血漿抽出物の生物分析は、LC-MS/MSによって実施した。

【0200】

統計分析

統計分析は、GraphPad Prism 8を使用して実施した。データは全て、平均±SEMとして表される。

【0201】

化学

市販の化学物質および溶媒は全て、試薬グレードであり、さらに精製することなく使用した。空気感受性の反応は全て、アルゴン保護下で実施した。カラムクロマトグラフィーは、シリカゲルSNAPカラムを使用して実施した。分析用薄層クロマトグラフィーは、Merck 250 μMシリカゲルF₂₅₄プレート上で実施し、分取薄層クロマトグラフィーは、Merck 1000 μMシリカゲルF₂₅₄プレート（EMD Millipore corporationから入手した）上で実施した。各生成物の同一性は、特に言及しない限り、質量分析法および溶媒としてCDCl₃を使用したNMRを使用して決定した。化学シフトは、内部標準としてのTMSから低磁場側のδ値（ppm単位）で報告される。¹Hデータは、以下の通り報告される：化学シフト、多重度（s=シングレット、d=ダブルット、t=トリプレット、q=カルテット、br=ブロード、m=マルチプレット）、結合定数（Hz）、積分（integration）。

【0202】

結果

cGas-STING経路はタウオパチーマウスおよびヒトAD脳の海馬で活性化される（図1）

図1Aは、8～9月齢のP301Sおよび非トランスジェニックマウス由来のバルク海馬組織からのRNA-seqデータのボルケーノプロットである。赤い点は、 $|\log_2 \text{変化倍率}| > 0.5$ の遺伝子を表す。ワルド検定を使用した。他の遺伝子は全て、青色で示している。選抜したアップレギュレーションされたインターフェロン遺伝子が標識されている。n=7 非トランスジェニック、n=6 P301S；図1Bは、非トランスジェニック試料と比較してP301Sにおいてアップレギュレーションされた上位500のDEGに関連するホールマーク経路を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Cは、非トランスジェニック試料と比較してP301Sにおいてアップレギュレーションされた上位500のDEGに関連する上位転写因子を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Dは、活性化zスコア>1および重複p値<0.05を使用して同定された、アップレギュレーションされたDEGの上流調節因子としてのcGASのIPA予測である；図1Eは、リン酸化されたTank結合キナーゼ（pTBK1）、総Tank結合キナーゼ1（TBK1）およびGAPDHについてのウェスタンプロットである。海馬組織溶解物を使用。レーン1～7：非トランスジェニック（ntg）；レーン8～14：P301S；図1Fは、非トランスジェニック海馬と比較してP301Sにおいて有意に高いホスホ-TBK1を示している（E）からのpTBK1/TBK1の比である。** p=0.0015 スチューデントの両側t検定；図1Gは、抗Iba1（緑）および抗STING抗体で標識された非トランスジェニックおよびP301S海馬の代表的な免疫蛍光

画像である（スケールバー＝50 μ m）；図1Hは、P301S海馬における増加したIba1カバレッジおよびIba1-Sting重複を示している、Iba1およびSting免疫蛍光強度の定量化である。結果は、動物1匹当たり3～4個の断面からの平均強度測定として提示される。p値<0.05。スチューデントの両側t検定（n=5 Ntg、n=5 P301S）；図1Iは、単核10×ゲノミクスシーケンシングに使用された患者数および脳領域を示している図解である（n=7、男性4名および女性3名）；図1Jは、ヒトミクログリア集団のsnRNA-Seqにおけるミクログリアマーカー遺伝子INPP5DおよびCSF1RならびにSTAT1およびcGAS（MB21D1）の発現を示しているUMAPプロットである；図1Kは、cGAS発現ミクログリアにおいて濃縮された関連するホールマーク経路を示している遺伝子セットエンリッチメント解析である；図1Lは、ヒト前頭皮質脳溶解物を使用したpTBK1およびGAPDHについての代表的なウェスタンブロットである。レーン1～3：非AD（Braakステージ0）；レーン4～6：AD（Braakステージ6）；図1Mは、非AD脳と比較してヒトADにおいて有意に高いホスホ-TBK1を示している（L）からのpTBK1/GAPDHの比である。** p<0.01、スチューデントの両側t検定（n=10 非AD、n=8 AD）。

10

【0203】

タウ刺激ミクログリアにおけるインターフェロン活性化はcGASおよびミトコンドリアDNA漏出によって媒介される（図2）

図2Aは、未処置（対照）およびタウ処置（タウ）初代マウスミクログリア由来の培養培地上清中のELISAによるIFNBならびにMagPixマルチプレックスELISAによるCXCL10およびCCL5タンパク質の定量化である。IFNB：n=7、** p=0.0016、対応のあるt検定。CXCL10およびCCL5、n=5、*** p=0.0004、** p=0.0031、対応のないt検定；図2Bは、マウス初代ミクログリア細胞溶解物を使用したリン酸化されたTank結合キナーゼ（pTBK1）、総Tank結合キナーゼ1（TBK1）およびGAPDHについての代表的なウェスタンブロットである（レーン1：未処置；レーン2：タウ線維で処置）；図2Cは、未処置（対照）と比較してタウ線維で処置された初代ミクログリア（タウ）において有意に高いホスホ-TBK1を示している図2AからのpTBK1/TBK1の比である。*、p<0.05、スチューデントの対応のあるt検定（n=3）；図2Dは、タウ線維で処置され、タウに対する抗体についてイムノゴールド標識された初代マウスミクログリアの電子顕微鏡写真である（L=リソソーム、M=ミトコンドリア）；図2Eは、ddC（40または80 μ g/ml）またはEtBr（50または100ng/ml）で7日間処置してmtDNA枯渇（p^o）細胞を生成させたBV2 IfnBルシフェラーゼレポーター細胞のDNA抽出物に対するRT-qPCRによって測定されたゲノムDNA（Tert）に対するミトコンドリアDNA（Nd2）の比である。値は、未処置試料に対して正規化される（n=2）、**** p<0.0001、一元配置ANOVA；図2Fでは、対照およびmtDNA枯渇（p^o）IfnBルシフェラーゼ-レポーターBV2細胞をタウ線維で刺激したかまたは刺激しなかった。IfnBシグナルおよび生存率を16時間後に測定した。IfnB-ルシフェラーゼシグナルは、生存率／細胞数を補正するためにCell TiterGloシグナルに対して正規化して示される（n=3）、**** p<0.0001、二元配置ANOVA；図2Gは、タウ線維またはHT鎖DNAで処置したまたは処置しなかったCgas+/+およびCgas-/-初代培養ミクログリアについてのバルクRNA-seq解析である（1条件当たりn=3）。Cgas+/+ミクログリアにおけるdsDNAおよびタウ処置によってアップレギュレーションされた遺伝子の重複を示しているベンダイアグラム。ログ変化倍率>1およびFDR<0.05；図2Hは、dsDNAおよびタウ処置Cgas+/+ミクログリアに共通しているアップレギュレーションされたDEGで表される上位5つのリアクトーム経路である。FDR<0.05；図2Iは、HT-DNAまたはタウで刺激されたCgas+/+ミクログリアと比較してCgas-/-において低いインターフェロン刺激遺伝子のヒートマップ概要である；図2Jは、Stat1、Sp100およびDdx60を含むインターフェロン遺伝子を含む（I）からの遺伝子のストリング相互作用プロットである。

20

30

40

【0204】

cGasの部分的または完全な喪失はタウオパチー関連ミクログリアインターフェロンシグネチャーを軽減する（図3）

50

図3Aは、単核シーケンシング (snRNA-Seq) 試料中のCgas (Mb21d1) およびSting (Tmem173) の正規化された細胞型発現を示しているドットプロットである；図3Bは、snRNA-Seqミクログリア集団におけるマーカー遺伝子P2ry12、Siglech、Sall1およびCsf1rの強い発現を示しているUMAPプロットである (1遺伝子型当たりn=6)；図3Cは、ミクログリアサブクラスターに従って色付けされ、遺伝子型によって分割されたUMAPプロットである；図3Dは、ミクログリアクラスターにおける恒常性遺伝子 (P2ry12、Siglech)、疾患関連遺伝子 (Apoe、Itgax) およびインターフェロン遺伝子 (Parp14、Stat1、Trim30a、Rnf213) の発現レベルを示しているバイオリンプロットである；図3Eは、P301S Cgas+/+ミクログリアと比較してP301S Cgas+/-およびP301S Cgas-/-ミクログリアにおいて有意に低いインターフェロン刺激遺伝子を示しているドットプロットである；図3Fは、マウス海馬のCA1放射状層におけるホスホル-STAT1の免疫染色の代表的な63×共焦点画像である (スケールバー=10 μm)；図3Gは、CA1放射状線条体において測定されたホスホル-STAT1の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。データは、平均±SEMとして報告される (n=6 Cgas+/+, n=8 Cgas+/-、n=7 Cgas-/-、n=6 P301S Cgas+/+, n=9 P301S Cgas+/-、n=5 P301S Cgas-/-) (Cgas+/+対P301S Cgas+/+ : p=0.0002、P301S Cgas+/+対P301S Cgas+/- : p=0.0002、P301S Cgas+/+対P301S Cgas-/- : p=0.0415)；図3Hは、遺伝子モジュールと遺伝子型との関連性を示しているヒートマップである；図3Gは、疾患関連、初期応答および後期応答ミクログリアシグネチャーと比較した疾患モジュール1および2マーカーの解析である。

10

20

【0205】

cGASの部分的または完全な喪失はタウオパチー誘導性の海馬シナプス毒性および記憶障害を救済する (図4)

図4Aは、7~8月齢のP301S cGAS+/+、P301S cGAS+/-およびP301S cGAS-/-ならびにそれらの非トランスジェニック同腹仔での空間学習および記憶のモリス水迷路 (MVM) 評価の隠し試行 (セッション1~12) 過程での累積探索距離である。雄と雌は、別々の日に試験した。ここに提示されるデータは、両方の性を合わせて表示している。n=12 cGAS+/+、n=11 cGAS+/-、n=11 cGAS-/-、n=8 P301S cGAS+/+、n=17 P301S cGAS+/-、n=6 P301S cGAS-/-。二元配置ANOVA。****、p<0.0001；図4Bは、MVM評価の24時間プローブ過程で標的四分区画に費やされた時間または非標的 (その他) 四分区画に費やされた平均時間のパーセンテージである。対応のある両側スチューデントのt検定；図4Cは、MVM評価の72時間プローブ過程で標的四分区画に費やされた時間または非標的 (その他) 四分区画に費やされた平均時間のパーセンテージである。対応のある両側スチューデントのt検定；図4Dでは、歯状回分子層でフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を記録し、貫通経路にTBSプロトコル (矢印) を適用してLTPを誘導した。代表的なトレースは、LTP誘導前後のfEPSPを示している (上)。スケールバー、0.4mVおよび5ms。TBS後に最大60分間なされたfEPSP傾斜測定は、LTP誘導前の平均ベースラインfEPSP傾斜に対して正規化した (下、1群当たり3~4匹のマウスからn=8~11の断面)；図4Eでは、TBSを適用した55~60分後に、正規化された平均fEPSP傾斜からLTPの規模を算出した (1群当たり3~4匹のマウスからn=8~11の断面)；*、p<0.05、**、p<0.01；一元配置ANOVA、ボンフェローニ事後解析)；図4Fは、顆粒、CA1およびCA2/3、CA2マーカーの発現による興奮性ニューロンクラスターの分類を示しているドットプロットである；図4Gは、歯状回に関するクラスター (DG)、CA1およびCA2/3クラスターからのDEGの割合をまとめたパイチャートである；図4Hは、PSD95抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である (スケールバー=10 μm)；図4Iは、CA1放射状線条体において測定されたPSD-95点の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3~5の画像の平均強度測定を表す。統計比較は、一元配置または二元配置ANOVAを使用して実施した (Cgas+/+対P301S Cgas+/+ : p=0.0275、P301S Cgas+/+対P301S Cgas+/- : p=0.0002、P301S Cgas

30

40

50

+/+対P301S Cgas^{-/-} : p=0.0415) ; データは、平均±SEMとして報告される。

【0206】

cGASの喪失はタウオパチーニューロンにおけるMef2cおよびその標的遺伝子の発現を救済する905 500x3579 (図5)

図5Aは、P301S Cgas^{+/+}興奮性ニューロンと比較してP301S Cgas^{-/-}においてアップレギュレーションされた代表的な発現変動遺伝子を示しているボルケーノプロットである (log₂FC>0.1、FDR<0.05) ; 図5Bは、マウス海馬のCA1放線状層におけるNRG1の免疫染色の代表的な63×共焦点画像である (スケールバー=10 μm) ; 図5Cは、CA1放射状線条体において測定されたNRG1の平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。データは、平均±SEMとして報告される (n=11 Cgas^{+/+}、n=6 P301S Cgas^{+/+}、n=8 P301S Cgas^{+/-}、n=6 P301S Cgas^{-/-}。Cgas^{+/+}対P301S Cgas^{+/+} : p=0.0016、P301S Cgas^{+/+}対P301S Cgas^{-/-} : p=0.0234) ; 図5Dは、P301S Cgas^{+/+}抑制性ニューロンと比較してP301S Cgas^{-/-}においてアップレギュレーションされた代表的な発現変動遺伝子を示しているボルケーノプロットである (log₂FC>0.1、FDR<0.05) ; 図5Eは、マウス海馬のCA1錐体層におけるMef2cおよびNeuNの免疫染色の代表的な25×共焦点画像である (スケールバー=50 μm) ; 図5Fは、CA1錐体層におけるMef2c⁺、NeuN⁺ニューロン中のMef2cの平均強度である。各丸は、動物1匹当たり3つの画像の平均強度測定を表す。*、p<0.05、対応のないt検定。データは、平均±SEMとして報告される (n=4 P301S Cgas^{+/+}、n=5 P301S Cgas^{-/-}) ; 図5Gは、興奮性ニューロンDEG、抑制性ニューロンDEGおよびMEF2C標的遺伝子の間の重複のベンダイアグラムである ; 図5Hは、興奮性/抑制性ニューロンDEGと転写因子標的遺伝子 (MEF2A、MEF2C、FOSL2、JUNB) および活性誘導発現変動遺伝子 (ARGおよびscARG) のリストとの間の重複を示しているヒートマップである。各ボックス内の数は、重複しているオッズ比を表している ; 図5Iは、WT、P301S、およびP301S Cgas^{-/-}興奮性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意なDEGの発現のヒートマップである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1または<=-0.1) ; 図5Jは、WT、P301S、およびP301S Cgas^{-/-}抑制性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意なDEGの発現のヒートマップである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1または<=-0.1) ; 図5Kは、興奮性ニューロンクラスターにおいてヒト認知レジリエンスと正に相関している、Cgas欠失による有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1) ; 図5Lは、抑制性ニューロンクラスターにおいてヒト認知レジリエンスと正に相関している、Cgas欠失による有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1) 。

【0207】

脳透過性のcGAS阻害物質はMEF2C標的遺伝子を上昇させ、シナプス喪失ならびに空間学習および記憶の障害を防ぐ (図6)

図6Aは、興奮性ニューロン、抑制性ニューロンおよびMEF2C標的遺伝子における、P301S TDI DEG DEG対P301S Veh DEG間の重複のベンダイアグラムである ; 図6Bは、興奮性/抑制性ニューロンDEGと転写因子標的遺伝子 (MEF2A、MEF2C、FOSL2、JUNB) および活性誘導発現変動遺伝子 (ARGおよびscARG) のリストとの間の重複を示しているヒートマップである。各ボックス内の数は、重複しているオッズ比を表している ; 図6Cは、Ntg対照、Ntg TDI、P301S対照、P301S TDI興奮性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1) ; 図6Dは、Ntg対照、Ntg TDI、P301S対照、P301S TDI抑制性ニューロンクラスターにおけるMEF2C標的である有意にアップレギュレーションされたDEGの発現を示しているドットプロットである (p.adjust<0.5、logFC>=0.1) ; 図6Eは、150mg/kgのTDI-6570または対照飼料を3ヶ月間与えたNtgおよびP301Sマウスに対する新規物体認識試験である。F：日常

物体、N：新規物体（ $n=9$ Ntg対照、 $n=6$ Ntg TDI-6570、 $n=5$ P301S対照、 $n=12$ P301S TDI6570）。統計比較は、二元配置ANOVAを使用して実施した。*、 $p<0.05$ 、**、 $p<0.01$ ；データは、平均 $\pm$ SEMとして報告される；図6Fは、PSD95抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である（スケールバー $=10\mu\text{m}$ ）；図6Gは、CA1放射状線条体において測定されたPSD95点の平均強度である。各丸は、1つの画像の平均強度測定を表す。動物1匹当たり3～5つの画像を取得した。統計比較は、混合モデルを使用して実施した（ $n=13$ Ntg対照、 $n=12$ Ntg TDI-6570、 $n=9$ P301S対照、 $n=12$ P301S TDI-6570。Ntg対照対P301S対照： $p=0.0302$ 、P301S対照対P301S TDI-6570： $p=0.0427$ ）；図6Hは、vGAT抗体で標識された海馬のCA1放射状線条体の代表的な共焦点画像である（スケールバー $=10\mu\text{m}$ ）；図6Iは、CA1放射状線条体において測定されたvGAT点の平均強度である。各丸は、1つの画像の平均強度測定を表す。動物1匹当たり3～5つの画像を取得した。統計比較は、混合モデルを使用して実施した（ $n=12$ Ntg対照、 $n=11$ Ntg TDI-6570、 $n=8$ P301S対照、 $n=13$ P301S TDI-6570。Ntg対照対P301S対照： $p=0.0453$ 、P301S対照対P301S TDI-6570： $p=0.0318$ ）。P301S行動障害に対するcGas枯渇の顕著な保護効果を受けて、低分子cGAS阻害物質が開発された。初めに、既知のcGAS阻害物質TDI-6570¹に焦点を当てた。TDI-6570は、マウスとヒトの両方のcGASをマイクロモル以下の活性（ IC_{50} ：それぞれ $0.0128\mu\text{M}$ および $0.138\mu\text{M}$ ）で阻害する。TDI-6570は、Lamaら¹によって以前に記載されている4工程プロセスを使用してマルチグラムスケールで調製された。

10

20

【0208】

タウオパチーでのcGAS-IFN-MEF2c軸を図示しているワーキングモデル（図7）。疾患／脆弱状態下では、病原性タウは、ミクログリアにおけるmtDNAの漏出を介したcGAS依存性インターフェロン応答と、興奮性および抑制性ニューロンにおけるMEF2c転写ネットワークの低減を活性化し、認知機能障害をもたらす。cGASの喪失は、ミクログリアにおいてインターフェロン応答を低減し、Mef2c転写ネットワークを増強し、その結果、認知レジリエンスをもたらす。

【0209】

Cgas欠失はタウオパチーにおいて抑制性ニューロンのトランスクリプトームを改変した（図8）。pan-介在ニューロンマーカーGAD1およびGAD2陽性ニューロン集団のサブクラスタリングは、9つの抑制性ニューロンの部分集団を同定した（図8A）（Arneson et al., 2018；Cembrowski et al., 2016）。本発明者らは、Cgas欠失が、SstまたはCckではなく、Pvalb、Vip、Reln、Lhx6などの介在ニューロンマーカーのサブセットのタウオパチー誘導性ダウンレギュレーションを救済したことを見いだした。加えて、介在ニューロンからのDEGの分析は、Cgas欠失が、GABA受容体Gabbr2およびGABAトランスポーターSlc6aを含むGABAシグナル伝達に関与する遺伝子のアップレギュレーションを導き、Cgas欠失による介在ニューロン機能の回復を支援することを明らかにした（図8B）。興味深いことに、Cgas欠失によってアップレギュレーションされた遺伝子の中で、本発明者らは、カリウムチャネルおよび相互作用サブユニットKcnc1、Kcnc2、Kacn1p1ならびにナトリウムチャネルScn1aを含め、多くが、ニューロンの興奮性および発作活動の調節に関与することを見いだした（図8C）。実際に、Cgas欠失は、Scn1aを含め、P301Sマウスの介在ニューロンで減少していた抗発作遺伝子の顕著なアップレギュレーションをもたらした（図8D）。Scn1aの欠乏は、全般性強直間代発作を伴う難治性小児てんかんである、ドラベ症候群を導く。

30

40

【0210】

cGAS-STING経路はタウトランスジェニックマウスおよびヒトAD脳において活性される
タウオパチーに関連する遺伝子発現変化を特徴決定するために、P301Sタウトランスジェニックおよび非トランスジェニック海馬（8～9ヶ月）のバルクRNAシーケンシングを実施した。発現変動遺伝子（DEG）分析は、非トランスジェニック海馬と比較してP301Sにおいてインターフェロン遺伝子の顕著なアップレギュレーション、ならびにイン

50

ターフェロン応答因子 (IRF) およびISRE (インターフェロン感受性応答要素) 転写因子モチーフの濃縮を明らかにした (図1A~C)。アップレギュレーションされたDEGの予測上流調節因子のIPAは、Ifnar1、Stat1およびIrf3を含むインターフェロンシグナル伝達の多数の構成要素を立証した。注目すべきことに、サイクリックGMP-AMPシターゼ (cGAS)、インターフェロン遺伝子刺激因子 (STING) およびtank結合キナーゼ1 (TBK1) を含むcGAS-STING経路の構成要素も、アップレギュレーションされたDEGの予測活性化因子であった (図1D)。

【0211】

TBK1リン酸化へのイムノブロットングによってcGAS-STING経路活性化を試験し、P301S海馬溶解物において増加したTBK1リン酸化が観察された (図1E~F)。加えて、免疫蛍光標識を実施し、非トランスジェニック海馬と比較してP301Sにおいて有意に増加したミクログリアSTING発現が観察された (図1G~H)。まとめると、これらの研究は、cGAS-STING経路がP301Sタウオパチーマウスにおいて活性化されることを示している。

10

【0212】

ヒトADのミクログリアインターフェロン応答におけるcGASの関与を調査するために、健常対AD (Braakステージ0対VI) の死後脳試料のコホートでTBK1リン酸化のレベルを評価し、pTBK1レベルがヒトAD脳において有意に上昇したことが示された (図1L~M)。加えて、ApoE3/4遺伝子型を有する11名のAD患者 (男性6名および女性5名、図1I) の中前頭皮質のAD単核RNA-seq (snRNA-seq) の独立コホートを調べた。snRNA-seq実験を過去に記載されているように実施して分析した (Sayed et al., 2021)。マルチプレット (multiplet) から得られたシーケンシングリードを、DoubletFinder (McGinnis et al., 2019) を使用して除外し、低品質核からのリードを、遺伝子カウント、UMIカウントおよび核1個当たりのミトコンドリア遺伝子パーセントを閾値化することによって除去した (図S2)。INPP5DおよびCSF1R陽性ミクログリアの分析は、STAT1陽性ミクログリアの部分集団を同定し、これは、CGASを発現する細胞と重なり合った (図1J)。CGAS⁺ミクログリアのホールマーク経路分析は、補体、インターフェロン γ および α 応答の濃縮を明らかにした (図1K)。総合すると、結果は、cGAS-STINGシグナル伝達が、ヒトADにおけるインターフェロン活性化に寄与することを示している。

20

30

【0213】

タウ線維はcGAS活性化およびミトコンドリアDNA漏出を通じてミクログリアのインターフェロンシグナル伝達を活性化する

病原性タウがミクログリアにおいてインターフェロンシグナル伝達を直接活性化するかどうか判定するために、マルチプレックスELISAを使用して、タウ線維で処置した初代ミクログリアからの培養培地中のIFNB、CXCL10およびCCL5タンパク質のレベルを測定し、タウに応答したそれらの誘導を確認した (図2A)。タウ処置はまた、ロバストなTBK1リン酸化も導き、このことは、タウが、ミクログリアにおいてcGAS-STINGシグナル伝達の活性化を直接誘導することを示している (図2B~C)。

【0214】

40

次に、タウ処置後のインターフェロン活性化の機序を調査した。ミクログリアにおけるタウ線維の細胞内局在化を判定するために、処置の24時間後にタウに対するイムノゴールド標識を行ったタウ処置初代ミクログリアの電子顕微鏡検査を実施した。驚くべきことに、タウは、ファゴサイトーシス後のそれらの予想される場所であるリソソームに加え、ミトコンドリアにも局在することが判明した (図2D)。本発明者らは、ミトコンドリア中のタウが、cGASおよびインターフェロンシグナル伝達を活性化できるmtDNAの放出を引き起こす可能性があるかと推論した。インターフェロン応答の定量化を容易にするために、IfnBルシフェラーゼレポーターBV2細胞株を生成させた。これらの細胞は、タウ線維だけでなく、cGAMPおよびニシン精巢 (herring testis) DNA (HT-DNA) などの既知のcGASアゴニストにも応答して、IfnBをアップレギュレーションする。次いで、If

50

nB BV2細胞を低用量の臭化エチジウム (EtBr) またはジデオキシシチジン (ddC) で処置することにより、mtDNA枯渇細胞 (p°細胞) を生成させた (Hashiguchi and Zhang-Akiyama, 2009; Kaguni, 2004)。ミトコンドリアおよび核の遺伝子へのqPCRにより、ddCおよびEtBr処置後にmtDNAの用量依存的枯渇が確認された (図2E)。本発明者らの系が、mtDNAの漏出によって誘導されるインターフェロン応答を確実に測定できるかどうかを調べるために、本発明者らは、IfnBルシフェラーゼBV2細胞をBcl2阻害物質ABT-737とカスパーゼ阻害物質Q-VD-OPH (QVD) で同時処置して、アポトーシス誘導なしにmtDNAの漏出を引き起こした (Rongvaux et al., 2014; White et al., 2014)。ABT-737+QVD処置は、IfnB依存性のルシフェラーゼ発現を活性化し、これは、ddCまたはEtBr誘導mtDNA枯渇と共に著しく減退した。注目すべきことに、ddCとEtBrの両方の処置は、タウ線維に対するミクログリアのIfnB応答を用量依存的な様式で有意に減退させ、このことは、ミクログリアにおけるタウ依存性のIfnB応答の一部としてのmtDNAの関与を強く裏付けている (図2F)。

10

【0215】

cGASが、タウ誘導性のインターフェロン応答を媒介するかどうかを調査するために、Cgas^{-/-}およびCgas^{+/+}初代ミクログリアをタウ線維またはHT-DNAで処置し、RNAシーケンシングを実施した。HT-DNAに対するミクログリア応答は、Cgas^{-/-}ミクログリアでのトランスクリプトーム応答の完全排除によって明らかのように、cGASに依存的である。比較して、Cgas欠失は、一部のタウ刺激性の炎症およびサイトカイン発現だけを低減させた。それにもかかわらず、さらなる分析は、HT-DNAおよびタウによって誘導されるミクログリア応答の顕著な重なりを明らかにし、タウによってアップレギュレーションされた遺伝子のほぼ80%が、HT-DNAによってもアップレギュレーションされた (図2G)。インターフェロン-αおよびβシグナル伝達ならびにインターフェロン-γシグナル伝達などの経路エンリッチメント用語は、これらの共有されたDEGにおいて過剰出現した経路であり、このことは、HT-DNAおよびタウが、類似のインターフェロン応答遺伝子を関与させて、ミクログリア炎症を促進することを示唆している (図2H)。実際に、Cgas欠失は、HT-DNAまたはタウ線維で処置したミクログリアにおいて、Stat1、Ddx60、Isg20、Rnf213、Parp12、Ifi35およびSp100を含むインターフェロン刺激遺伝子のサブセットの発現を減少させた (図2I~J)。したがって、ミクログリアのcGASは、タウ誘導性のインターフェロンおよび炎症反応を促進し、細胞質ゾルDNAによって誘導されかつミトコンドリアDNA漏出によって少なくとも部分的に媒介されるものと重複する。

20

30

【0216】

cGAS喪失はインビボのタウオパチー関連ミクログリアインターフェロンシグネチャーを軽減する

タウオパチーにおけるcGASの役割を直接評価するために、本発明者らは、P301SマウスをCgas^{-/-}マウスと交雑させ、機能的Cgasの2コピーを発現する、1コピーを発現するまたはそれを発現しないトランスジェニックおよび非トランスジェニック同腹仔のコホートを生成させた。本発明者らは、8~9月齢のCgas^{+/+}、P301S Cgas^{+/+}、P301S Cgas^{+/+}およびP301S Cgas^{-/-}マウス由来の海馬の単核RNAシーケンシング (snRNA-seq) を実施した。厳格な品質管理措置を実施して、マルチプレットから得られたシーケンシングリードを、DoubletFinder (McGinnis et al., 2019) を使用して除外し、低品質核からのリードを、遺伝子カウント、UMIカウントおよび核1個当たりのミトコンドリア遺伝子パーセントを閾値化することによって除外した。次いで、教師なしクラスタリングを実施して、結果として生じた234,474の高品質核を転写的に異なるクラスターにグループ分けし、これらは脳の主要な細胞型の全てを表した。

40

【0217】

本発明者らのsnRNA-seqデータでは、Csf1r、P2ry12およびSiglechのようなミクログリアマーカーの強発現を特徴とするミクログリアクラスターにおいてのみ、Cgas (Mb21d1) およびSting (Tmem173) が検出された (図3A~B)。Cgasの低減がタウ

50

オパチーに対するミクログリア応答にどのように影響を及ぼすかを分析するために、ミクログリアをさらに4つのミクログリア部分集団にサブクラスター化したところ、 $Cgas^{+/+}$ 試料は、主にクラスター1のミクログリアから構成される一方で、4つのクラスターは全てタウオパチー試料中に見いだされ、このことから、過去に報告されているように (Say ed et al., 2021)、タウオパチーにおけるミクログリア状態のロバストな転換が立証される (図3C)。クラスター1は、高レベルの恒常性遺伝子 $P2ry12$ および $Siglech$ を発現し、クラスター2、3、および4は、これらの恒常性遺伝子の低減した発現、ならびに疾患関連遺伝子 ($Apoe$ 、 $Itgax$) およびインターフェロン刺激遺伝子 ($Stat1$ 、 $Parp14$ 、 $Trim30a$ および $Rnf213$) の同時アップレギュレーションを示した (図3D)。クラスター3は、インターフェロン遺伝子が特異的に濃縮されていたが、これは、マウスアミロイドモデルにおいて報告されている (Keren-Shaul et al., 2017) 十分に確立された疾患関連ミクログリア表現型 (DAM) が濃縮されたクラスター4とは異なる (図3D)。 $Cgas^{+/+}$ ミクログリアと比較して、インターフェロン応答に関連する遺伝子 ($Trim30a$ 、 $Trim30b$ 、 $Stat1$ 、 $Ddx60$ 、 $Rnf213$ 、 $Parp14$ 、および他) の発現は、 $P301S$ $Cgas^{+/+}$ マウスのミクログリアにおいてはるかにより強かった (図3E)。 $cGAS$ の低減によるミクログリアでのインターフェロン応答の抑制を検証するために、本発明者らは、ホスホ-STAT1の免疫蛍光標識を実施した。 $P301S$ $Cgas^{+/+}$ の海馬CA1領域のミクログリアにおける $pSTAT1$ シグナルの増加は、 $P301S$ $Cgas^{+/-}$ および $P301S$ $Cgas^{-/-}$ 脳において有意に減少した (図3F~G)。

10

20

【0218】

恒常性シグネチャーから疾患シグネチャーへのミクログリアの転換をモデル化するために軌跡解析を使用して (Trapnell et al., 2014)、ミクログリアの疾患転換に有意に関連した3つの遺伝子モジュール (図3H) を同定した。遺伝子オントロジー分析を実施して、2つのミクログリア疾患モジュールに関連する過剰出現した遺伝子シグネチャーを同定した。疾患モジュール1 (D1) マーカーは、細胞活性化、防御応答および免疫応答系などのエンリッチメント用語に関連し、疾患モジュール2 (D2) マーカーは、ウイルスに対する応答およびI型インターフェロンに対する応答に関与する遺伝子が濃縮されていた。D1遺伝子は、 $Apoe$ 、 $Lyz2$ および $Itgax$ などのDAM遺伝子を含んでいた一方で、D2は、インターフェロン遺伝子の発現によって特徴決定された。 $P301S$ $Cgas^{+/+}$ と比較して、 $P301S$ $Cgas^{+/-}$ および $P301S$ $Cgas^{-/-}$ ミクログリアは、D1モジュールの変化を示さなかったが、D2が減少していた (図3I)。さらに、D2は、神経変性の $p25$ 誘導モデルのシナプスおよびニューロンの喪失ならびに認知障害と関連していた遅発応答ミクログリア (LRM) シグネチャーと最も強く相関していた (図3J) (Mathys et al., 2017)。

30

【0219】

$cGAS$ の喪失はタウオパチー誘導記憶障害ならびに海馬のシナプス喪失および可塑性を救済する

本発明者らのデータは、 $cGAS$ の喪失が、ミクログリア応答を微調整して、疾患応答モジュールのサブセットを抑制することを示した。 $Cgas$ 欠失により影響されるタウオパチー誘導性の空間学習および記憶は、モリス水迷路 (MWM) 行動試験を使用して評価した。空間学習を評価するために、6日間連続にわたる隠しプラットフォーム試行を実施し、各試行でプラットフォームにたどり着くために移動した累積距離を測定した (図4A)。 $Cgas^{+/-}$ および $Cgas^{-/-}$ マウスは、 $Cgas^{+/+}$ マウスを表現型模写した一方で、 $P301S$ $Cgas^{+/+}$ マウスは、非トランスジェニックマウスと比較して学習障害を示し、最後の隠しプラットフォーム試行で有意に長い探索距離を示した (セッション12)。注目すべきことに、 $P301S$ $Cgas^{+/-}$ および $P301S$ $Cgas^{-/-}$ マウスは、隠しプラットフォーム試行において $Cgas^{+/+}$ マウスと類似したパフォーマンスを示し、このことは、 $cGAS$ 喪失によって誘導される強い保護を示している (図4A)。空間記憶を評価するための24時間のプロープ試行において、 $P301S$ $Cgas^{-/-}$ マウスは、他の四分区画と比較して標的プラットフォーム四分区画を探索するのに有意に多くの時間を要したが、 $P301S$ $Cgas^{+/+}$ は、標的

40

50

四分区画を他のものと識別することができなかった（図4B）。空間記憶に対するcGAS喪失の有益な効果は、72時間のプローブ試行において持続し、このことは、空間記憶障害の強い救済を実証している（図4C）。泳ぐ速度、視覚（vision）、全体的な活動および不安レベルは、全ての遺伝子型を通して変化しておらず、このことは、タウオパチーマウスにおける空間学習および記憶に対するcGAS喪失の特異的な効果を裏付けている。

【0220】

海馬シナプス可塑性のタウ誘導性欠損は、タウオパチー関連記憶喪失と関係があるとされてきた（Tracy et al., 2016）。TBSは、P301S Cgas^{+/+}およびP301S Cgas^{-/-}スライスにおいて、長期増強（LTP）をLTPの初期で類似したレベルまで誘導した。しかしながら、LTPの規模は、誘導後60分までに、P301S Cgas^{-/-}スライスと比較してP301S Cgas^{+/+}で有意に低減され、このことは、P301S Cgas^{+/+}海馬における後期LTP障害が、Cgas欠失によって救済されたことを示している（図4D～E）。したがって、cGAS喪失は、海馬回路におけるタウ媒介性の可塑性欠損を防ぐ。

【0221】

cGASの喪失が海馬回路におけるニューロンの変化にどのように影響するかを評価するために、興奮性ニューロン集団のサブクラスタリング分析を実施し、10個の転写的に異なる興奮性ニューロンの部分集団を同定し（図4F）、その大部分は、歯状の顆粒、CA1、およびCA2/3ニューロン特異的サブタイプマーカーの非重複発現を示した（Arneson et al., 2018; Cembrowski et al., 2016; Dong et al., 2009; Sarkar et al., 2018）（図4F）。P301S Cgas^{-/-}とP301S Cgas^{+/+}の興奮性ニューロンを比較すると、CA1マーカーを発現しかつCA3をより少ない程度に発現するクラスターでDEGの濃縮が観察されたが、顆粒細胞マーカーを発現するものでは観察されなかった（図4G）。CA1海馬シナプスに対するcGASの効果、放射状線条体における興奮性シナプス後終末マーカーであるPSD-95の免疫蛍光標識および密度の定量化によりさらに調べた。cGAS喪失は、CA1錐体ニューロンのタウオパチー誘導性PSD-95喪失の用量依存的救済をもたらした（図4H～I）。立体構造特異的タウ抗体MC1を使用して、トランスジェニックマウスの海馬および嗅内皮質で不溶性タウ凝集体の蓄積に差がないことが観察された。これらの知見は、タウ病理の存在下でcGAS喪失がシナプスおよび認知レジリエンスを付与するという考えを支持するものである。

【0222】

Cgasの欠失は興奮性および抑制性ニューロンにおいてMef2cおよびその標的遺伝子の発現を上昇させる

cGAS喪失がタウ毒性からの保護をどのように付与するのかをさらに分析するため、海馬の興奮性および抑制性ニューロンにおけるDEGを調べた。興奮性ニューロンにおける上位DEGは、転写調節およびクロマチン再構成に関わる遺伝子（Mef2c、Satb1、Satb2）、興奮性を調節する遺伝子（カリウムチャネル調節因子、Dpp10）、ならびにシナプス維持に関与する遺伝子（Nrg1 Pcdh7、Pcdh5）を含んだ（Jaitner et al., 2016; Li et al., 2008; Li et al., 2017; Wang et al., 2020）（図5A）。CA1中のNRG1への免疫蛍光標識を使用して、本発明者らは、NRG1タンパク質レベルが、実際にタウオパチーにおいてダウンレギュレーションされ、Cgasの欠失によって救済されたかを検証した（図5B～C）。Cgas欠失はまた、タウオパチーにおいて抑制性ニューロンのトランスクリプトームを改変した。pan-介在ニューロンマーカーGAD1およびGAD2陽性ニューロン集団のサブクラスタリングは、9つの抑制性ニューロンの部分集団を同定した（Arneson et al., 2018; Cembrowski et al., 2016）。介在ニューロンでCgas欠失によってアップレギュレーションされる遺伝子は、GABA作動性シグナル伝達、GABAトランスポーター（Slc6a1）、GABA受容体（Gabbr2）、ニューロンの興奮性および発火を調節するイオンチャネル、例えばshaw型カリウムチャネル（Kcnc1、Kcnc2）に関与する遺伝子を含んだ。Cgas欠失によってダウンレギュレーションされる遺伝子はまた、カルシウムチャネル（Cacnb2、Cacna1e）およびリアノジン受容体カルシウム放出チャネル（Ryr3）も含んだ（図5D）。

【0223】

中でも、P301S *Cgas*^{-/-}マウスの興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの両方においてアップレギュレーションされる上位DEGは、晩期発症型ADに関わる転写因子のMef2cであり、これは、最近になってAD脳における認知レジリエンスと関連付けられた（Barker et al., 2021）。免疫組織染色を使用して、P301S *Cgas*^{-/-}マウスの海馬において上昇したMEF2C発現が確認された。MEF2Cが、*Cgas*欠失に対するニューロン応答の重要な調節因子であるかどうかを調べるために、MEF2C標的遺伝子を有する興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの両方でDEG（P301S *Cgas*^{-/-}対P301S）を比較し、P301S *Cgas*^{-/-}興奮性および抑制性ニューロンにおいてMEF2C標的遺伝子の顕著な過剰出現が観察された（図5G）。これらのニューロンのトランスクリプトーム変化は、MEF2Cネットワークに特異的であったが、ニューロン活動後の転写変化の公開された2つのデータセット（Barker et al., 2021）を使用してDEGとMEF2A、FOSL2およびJUNB標的遺伝子との間に強い重複がなかったように、他のMEF2ファミリーメンバーまたはニューロン活動を調節する転写因子には特異的ではなかった（図5G）。

10

【0224】

*Cgas*喪失は、P301Sマウスにおいて、興奮性および抑制性ニューロンでの転写活性化因子と抑制因子の両方として、MEF2C転写ネットワークの特異的な増強を誘導した（図5I、J）。興奮性ニューロン（EN）では、P301Sマウスで*Cgas*欠失によって救済されるMEF2C標的遺伝子は、軸索ガイダンス、樹枝状成長およびシナプス維持に関与する遺伝子（*Tenm3*、*Unc5d*、*Nrxn1*、*Lzts1* *Ptprd*、*Fhod3*、*Hs6st2*）、ならびにカルシウムシグナル伝達／恒常性の調節における遺伝子（*Cacng3*、*Ncald*、*Slc24a3*）を含んだ（図5I）。同様に、抑制性ニューロン（IN）における*Cgas*欠失も、軸索ガイダンス、成長およびシナプス維持に関与するMEF2C標的遺伝子（*Tenm3*、*Unc5d*、*Lzts1*、*Ctnnd2*、*Cdh8*、*Sipa1l1*）、ならびにカルシウムシグナル伝達／恒常性を調節する遺伝子（*Ncald*、*Camk4*）を救済した（図5J）。MEF2C過剰発現がP301Sマウスで過興奮性を改善したという知見（Barker et al., 2021）と一致して、本発明者らは、*Cgas*欠失がまた、ニューロンの興奮性の調節に関与する遺伝子、例えば、ENにおけるカリウムチャネルおよび調節サブユニット*Kcnab2*、*Dpp10*（図5I）およびINにおける*Kcnj9*、*Kcnip2*を救済することを見いだした（図5J）。中でも、ENとINの両方で*Cgas*欠失によってダウンレギュレーションされるMEF2C標的遺伝子は、Eph/エフリンシグナル伝達に関与する遺伝子（*Eph6*および*Eph7*）であったが（図5I～J）、その遮断は、傷害の間に再生を促進することが見いだされた（Teng et al., 2019）。*Cgas*^{-/-} ENおよびINでアップレギュレーションされたMEF2C標的遺伝子のさらなる検査は、*Ncald*、*Rasgef1b*、*Igsf3*および*R3hdm2*を含め、AD脳での認知レジリエンスに関与する遺伝子との複数の重複を明らかにした（図5K～L）。したがって、増強されたMEF2C転写ネットワークは、タウ病理の存在下で*Cgas*^{-/-}ニューロンの根底にある保護的機序を駆動し得る。

20

30

【0225】

*Cgas*欠失は、*Scn1a*を含め、P301Sマウスの介在ニューロンで減少していた抗発作遺伝子の顕著なアップレギュレーションをもたらした（図6A～D）。*Scn1a*の欠乏は、全般性強直間代発作を伴う難治性小児てんかんである、ドラベ症候群を導く。

40

【0226】

cGASの薬学的阻害はタウオパチーマウスにおいてシナプス喪失を防ぎ、認知を改善するタウ媒介性の神経毒性を防ぐTDI-6570の有効性を判定するために、6月齢のNtgおよびP301Sマウスのコホートに、150mg/kgのTDI-6570または対照飼料を3ヶ月間与えた。興奮性および抑制性ニューロン集団に対するTDI-6570の効果を、最初に単核RNA-seqで調べた。*Cgas*の遺伝子欠失と一致して、*Mef2c*は、抑制性ニューロンクラスターにおける上位のアップレギュレーション遺伝子であった。TDI-6570処置P301SマウスのニューロンにおいてMEF2C転写ネットワークが有意に濃縮されたかどうかを評価するために、本発明者らは、再び、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの両方でDEGとME

50

F2C標的遺伝子との間のオーバーラップ分析を実施した（図7A）。Cgasの遺伝子欠失からの結果と一致して、本発明者らは、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの両方のP301S TDI-6570 DEGにおいてMEF2C標的遺伝子の強い濃縮を観察したが、MEF2A標的遺伝子、ニューロン活動調節転写因子FOSLおよびJUNB標的遺伝子も、活動誘導遺伝子（ARGおよびscARG）も強い濃縮は観察されなかった（図7B）。本発明者らはまた、P301S TDI-6570対P301Sの興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロクラスターにおける上位のアプレギュレーション遺伝子の中で、多くのMEF2C標的遺伝子を同定した（図7C～D）。

【0227】

新規物体認識試験パラダイムを実施して、記憶に対するcGAS阻害の効果を評価した。対照飼料を与えたP301Sマウスは、日常（F）物体の中から新規（N）物体を認識する際に欠陥を示した（図7E）。注目すべきことに、この欠陥は、TDI-6750を与えたマウスで救済され、このことは、cGAS阻害が、タウオパチーで観察された記憶障害を改善できることを示している（図7E）。タウオパチーでのシナプスに対するCgas欠失の保護効果を受けて、本発明者らは、cGAS阻害がまた、P301Sマウスの海馬のシナプス密度を変化させることができるかを追及した。興奮性シナプス（PSD-95、図7F～G）および阻害性シナプス（vGAT、図7H～I）への免疫蛍光染色は、TDI-6570による慢性処置が、P301S依存性のシナプス喪失を救済したことを示した。したがって、cGASの薬理的阻害は、タウオパチーにおいて、おそらくMEF2C転写ネットワークおよび関連する認知レジリエンスを増強することを介して、シナプス喪失および認知障害を防いだ。

【0228】

本発明者らの現在の研究は、過度に活性のcGAS-インターフェロン抗ウイルス応答と、減少したMEF2C関連認知レジリエンスとを関連付けた。疾患状態では、タウ誘導性のcGAS過活性化は、ミクログリアのI型インターフェロン応答を促進し、ニューロンのMEF2Cトランス活性化を低減させ、ニューロンをタウ毒性の影響を受けやすくする（図8）。一方で、cGASの除去は、ミクログリアのI型インターフェロン応答を減少させ、ニューロンのMEF2C転写ネットワークを増強し、タウ病理に対する認知レジリエンスを導く（図8）。また、TDI-6570によるcGASの薬理的阻害は、MEF2C標的遺伝子を増強し、シナプス完全性および記憶を回復させ、このことは、レジリエンスを改善してADを処置するために、cGAS-MEF2c軸を標的化することの治療可能性を支持している。

【0229】

本発明者らの2つの独立したデータセットの分析は、培養ミクログリアで実施された最近の研究（Jin et al., 2021）と一致して、タウが、タウオパチーマウスにおいて強いcGAS活性化およびI型インターフェロン応答を誘導することことを明らかにした。AD脳およびマウスモデルにおけるインターフェロン応答の活性化は、過去の研究で報告され、補体関連のシナプス喪失に関わっていることが見いだされた（Roy et al., 2020）。ヒトADミクログリアのsnRNA-seqを使用して、cGASとSTAT1の重複発現を有するミクログリアの部分集団を同定し、これは、補体およびインターフェロン応答の濃縮を示す。正常脳に対してAD脳でpTBK1のレベルが上昇したという本発明者らの知見は、cGAS-STING活性化が、ADのインターフェロン応答の根底にある可能性があることをさらに支持するものである。STINGシグナル伝達の活性化は、他の神経変性疾患の病因と関連付けられており、STING活性化を阻害することは、パーキンソン病、ハンチントン病およびALSにおけるインターフェロン応答の有害効果を防ぐことが示され（Sharma et al., 2020; Sliter et al., 2018; Yu et al., 2020）、このことは、神経変性においてcGAS-STING活性化が集中的で有害な役割を持つことを裏付けている。

【0230】

脳におけるCgasの発現は、ミクログリアにおいて最も濃縮しており、本発明者らのインビトロ研究は、タウがミクログリアにおいてcGAS依存性のインターフェロンシグナル伝達を誘導するという直接証拠を提供する。細胞質ゾルDNAのセンサーとして、cGASは、ミトコンドリアまたは核からのDNAの漏出によって活性化され得る（Rongvaux et al.

l., 2014; White et al., 2014)。本発明者らは、ファゴサイトーシス後、タウがリソソームだけでなくミトコンドリアにも見いだされることを示した。ミトコンドリアへのタウの侵入が、細胞質ゾルへのミトコンドリアDNAの漏出を引き起こし、これがcGAS-STING活性化を引き起こす可能性がある。実際に、2つの独立した方法を使用してmtDNAを枯渇させることによって、本発明者らは、mtDNA枯渇ミクログリアにおいて、タウ誘導性のインターフェロン応答が用量依存的な様式で低減されたことを示した。これらの知見は、TDP-43過剰発現が、mtDNAの放出およびcGAS-STING活性化を導き、神経炎症をもたらすという観察と一致する。研究は、TDP-43が、ミトコンドリアの輸送内膜トランスロカーゼTIM22を介してミトコンドリアマトリックスに侵入する可能性があり、これが、ミトコンドリアの不安定化およびmtDNAの漏出を導くことを示した (Yu et al., 2020)。タウのミトコンドリアへの侵入に、TIM22が関与しているのか他のミトコンドリアトランスロカーゼが関与しているのかは知られていない。タウのミトコンドリアへの侵入によって誘導されるミトコンドリアストレスは、直接的または間接的にmtDNAの漏出を導くと考えられている。タウ誘導性のミクログリアのcGAS-インターフェロン応答においてmtDNAの明確な証拠があるにもかかわらず、本発明者らの研究は、ゲノム不安定性の結果として高まった細胞質ゾルのクロマチン断片など、核起源の細胞質ゾルDNAの寄与の可能性を排除しておらず、細胞質ゾルDNAが、cGAS-STING活性化を刺激する可能性もある。

10

【0231】

タウ刺激ミクログリアにおけるCgas欠失は、インビトロおよびインビボでインターフェロンおよび炎症性シグナル伝達を軽減した。本発明者らのsnRNA-seqデータは、タウオパチーに対するタウ誘導性のミクログリア応答を無効にするのではなく、Cgas欠失が、ミクログリア応答を微調整し、DAM応答がほとんど影響を受けない一方で、インターフェロン関連遺伝子だけが選択に低減されたことを示した。研究は、タウオパチーにおいて、グリアのインターフェロンシグナル伝達が、過剰な補体活性を介してミクログリアによるシナプス除去を駆動し得ることを示している (Dejanovic et al., 2018; Litvinchuk et al., 2018)。

20

【0232】

MEF2Cは、HIV関連認知症患者のニューロンにおいて劇的にダウンレギュレーションされるが、このことは、抗ウイルスシグナル伝達とMEF2C転写ネットワークの相互作用が、脳に存在し得ることを示唆している (Yelamanchili et al., 2010)。ミクログリアのインターフェロンがニューロンのMef2cをダウンレギュレーションできるかどうかは、まだ解明されていない。cGASと認知レジリエンスおよびニューロン興奮性の調節因子との間の関連性をさらに分析するために、Cgasの細胞型特異的欠失を有するマウスモデルが必要である。

30

【0233】

AD脳では、臨床症状が現れる何十年も前に、アミロイドプラークおよび神経原線維タングルの蓄積が起こるが、これは、健康的な老化における長期間に及ぶ認知レジリエンスの指標となる。脳の固有の認知レジリエンス機序を活用および促進することは、有効な処置を導き得る。cGAS不活性化がタウ病理の存在下で顕著な保護を誘導するという本発明者らによる新事実は、プラークおよびタングル病理の発生後であっても有効となり得る刺激的で新たなクラスの治療戦略を支持するものである。このことは、Cgas^{-/-}が健康的で繁殖力があるという事実と一緒に、cGASの薬理的阻害の、ADの有望な治療戦略としてのさらなる評価を支持するものである。

40

【0234】

合成。新たな化合物は全て、¹H NMR (表1) とマスマスペクトルおよび／またはLC-MS分析を使用して確認した。

【0235】

1. インドール誘導体。本発明者らは、過去に記載されておらずcGAS活性がないことが知られている新たなインドール誘導体に焦点を当てた。これらの化合物は、スキーム1

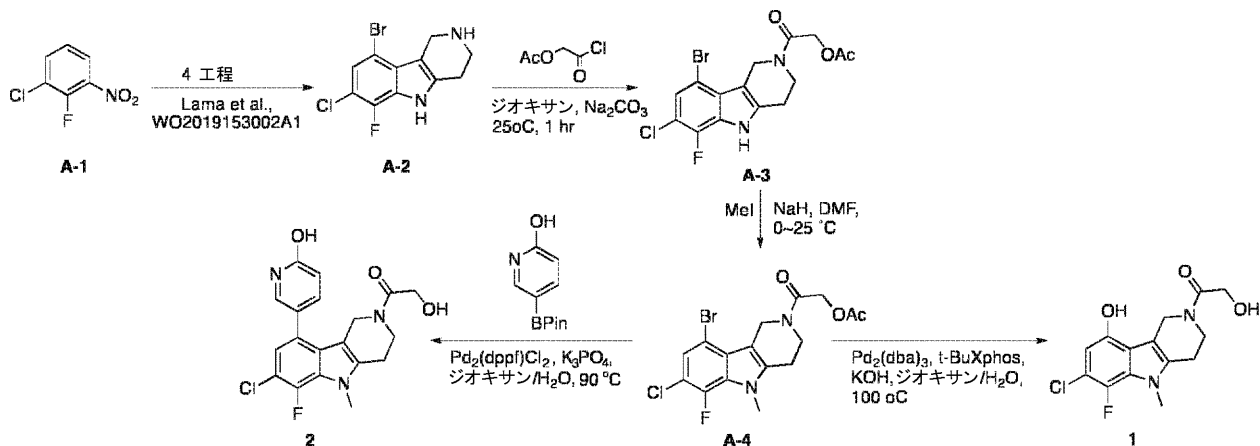
50

に記載されているように市販の化合物から3～4工程で得られる容易に入手可能な出発物質を使用して調製した。

【0236】

1.1. 化合物1および2 (スキーム1A)。市販の2-フルオロ-3-クロロニトロベンゼンを、4工程でインドールA-2に変換した (Lama, et. al, WO2019153002A1)。中間体A-2を、2 アセトキシアセチルクロリドと反応させてアミドA-3を与え、そして、後者は、Pdにより触媒される臭化物-水酸化物変換を受けて化合物1を与えるか、またはボロン酸とのスズキカップリングを受けて化合物2を与えた (スキーム1A)。

【0237】



10

20

スキーム1A. 化合物1および2の合成

【0238】

化合物A-2。市販の化合物A-1は、過去に記載されている通り (Lama, et. al, WO2019153002A1)、臭素化、アミンへのニトロ還元、ヒドラジン形成およびインドール合成を含む4工程の変換を受けて、A-2 HCl塩 (6.2g、粗物質) を白色の固体として与えた。ESI [M+H] = 304.9/302.9

【0239】

化合物A-3。ジオキサン (20mL) および飽和Na₂CO₃水溶液 (10mL) 中のA-2 (1.5g、4.9mmol、1当量) の混合物に、(2-クロロ-2-オキソ-エチル)アセタート (4.7g、34.4mmol、7.0当量) を加え、次いで、混合物を25°Cで1時間攪拌した。混合物をH₂O (10mL) でクエンチし、EtOAc (30mL×3) で抽出し、ブライン (15mL×2) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル:THF、1:0~1:1) によって精製して、A-3 (1.2g、2.9mmol、収率57.7%) を黄色の固体として生成した。ESI [M+H] = 404.9/402.9

30

【0240】

化合物A-4。DMF (30mL) 中のA-3 (1.1g、2.7mmol、1当量) の混合物に、NaH (218mg、5.5mmol、純度60%、2当量) およびCH₃I (773.6mg、5.5mmol、2当量) を0°Cで加え、次いで、混合物を25°Cで1時間攪拌した。混合物を1N HCl (15mL) によってクエンチし、EtOAc (50mL×3) で抽出した。有機層をブライン (10mL×5) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex luna C18 250×50mm×10um; 移動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 50%~70%、10分) によって精製して、A-4 (370mg、885.9umol、収率32.5%) を白色の固体として生成した。ESI [M+H] = 419.0/417.0

40

【0241】

化合物1。ジオキサン (2.4mL) およびH₂O (0.9mL) 中のA-4 (100mg、239.4umol、1当量)、Pd₂(dba)₃ (22mg、23.9umol、0.1当量)、t-Bu Xphos (10mg、23.9umol、0.1当量) およびKOH (27mg、478.9umol、2当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて100°Cで1時間攪拌した。

50

混合物をH₂O (15mL) によってクエンチし、EtOAc (50mL×3) で抽出した。有機層をブライン (10mL×5) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna 80×30mm×3μm; 移動相: [水(0.1% TFA)-ACN]; B%: 20%~45%、8分) によって精製して、1-(7-クロロ-6-フルオロ-9-ヒドロキシ-5-メチル-3,4-ジヒドロ-1H-ピリド[4,3-b]インドール-2-イル)-2-ヒドロキシ-エタノン1 (69mg、212.4μmol、収率88.7%、純度96.3%) を黄色の固体として生成した。

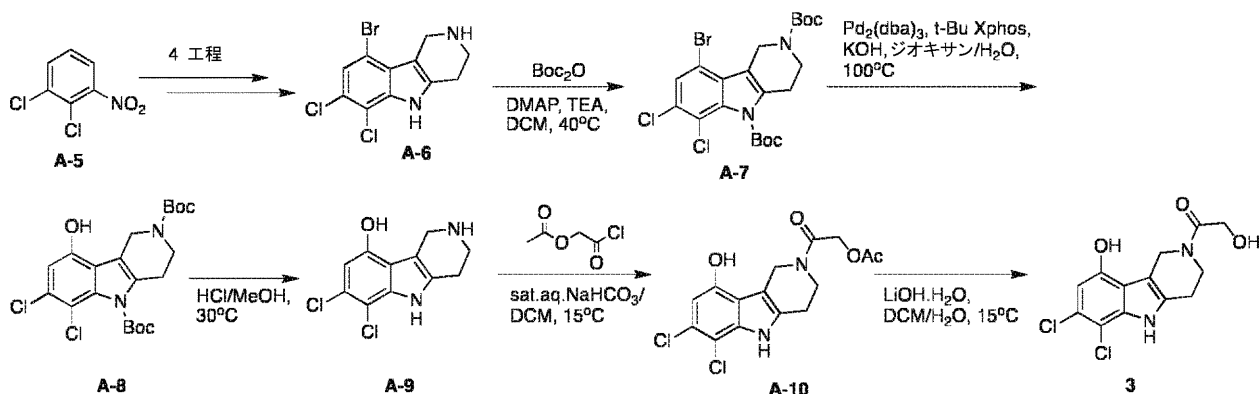
【0242】

化合物2 (一般的方法A)。H₂O (0.5mL) およびジオキサン (1.5mL) 中のA-4 (50mg、120μmol、1.0当量)、5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ピリジン-2-オール (106mg、479μmol、4.0当量)、Pd(dppf)Cl₂ (9mg、12μmol、0.1当量)、K₃PO₄ (102mg、479μmol、4.0当量) の混合物をN₂雰囲気下にて80℃で12時間攪拌し、次いで、H₂O (2mL) で希釈し、EtOAc (3mL×3) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム: Phenomenex Luna 80×30mm×3μm; 移動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 20%~50%、8分) によって精製して、化合物2 (6mg、13μmol、収率11.3%、純度92.6%) を黄色のガム状物として生成した。

【0243】

1.2. 化合物3 (スキーム1B)。化合物A-7中のプロモ官能基からA-8中のフェノールへのPd触媒変換に加え、出発物質A-5を使用した以外は、化合物1について記載したのと同様にして調製した。

【0244】



スキーム1B. 化合物3の合成

【0245】

化合物A-6。市販の化合物A-5は、スキーム1AのA-1からA-2で記載したように4工程でA-6に変換した。標記生成物は、淡桃色の固体として得られた (5.5g、粗物質、HCl)。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 12.14 (s, 1H), 9.22 (br s, 1H),

7.52 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.50 (br t, J=6.0 Hz, 2H), 3.05 (br t, J=5.8 Hz, 2H). ESI [M+H] =

320.9/ 318.9.

【0246】

化合物A-7。DCM (10mL) 中のA-6 (700mg、2.2mmol、1.0当量) およびTEA (664mg、6.6mmol、3.0当量) の溶液に、Boc₂O (2.9g、13.1mmol、6.0当量) およびDMAP (27mg、218.7μmol、0.1当量) を加え、40℃で12時間攪拌した。水 (10mL) を加え、DCM (10mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル: 酢酸エチル

= 20 : 1 ~ 15 : 1) によって精製して、化合物A-7 (550 mg、1.1 mmol、収率48.3%) を白色の固体として生成した。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ = 7.49 (s, 1H), 4.90 (br s, 2H), 3.77 (br s, 2H), 2.90 (br s, 2H), 1.64 (s, 9H), 1.51 (s, 9H). ESI [M-Boc+H] = 421.0/419.0

【0247】

化合物A-8。ジオキサン (4 mL) および H_2O (1.5 mL) 中の化合物A-7 (480 mg、92.7 μmol 、1.0当量)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (85 mg、92.3 μmol 、0.1当量)、*t*-Bu Xphos (39 mg、92.3 μmol 、0.1当量) および KOH (104 mg、1.9 mmol、2.0当量) の混合物を、 N_2 雰囲気下にて100℃で1時間攪拌した。混合物に、 H_2O (5 mL) を加え、EtOAc (20 mL×3) で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex luna C18 100×40 mm×5 μm ; 移動相: [水(0.1% TFA)-ACN]; B%: 40%~80%、8分) によって精製して、A-8 (110 mg、240.5 μmol 、収率26.1%) を白色の固体として生成した。

^1H NMR

(400MHz, DMSO- d_6) δ = 6.80 (s, 1H), 4.63 (br s, 2H), 3.76 - 3.60 (m, 2H), 3.01 - 2.79 (m, 2H), 1.64 - 1.56 (m, 9H), 1.45 (s, 9H). ESI [M-Boc+H] = 357.1/ 359.1

【0248】

化合物A-9 (一般的方法B)。HCl/MeOH (4 mL) (4 M) 中の化合物A-8 (80 mg、174.9 μmol 、1.0当量) の混合物を30℃で18時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、真空下で乾燥させて、A-9 (50 mg、粗物質) を淡褐色の固体として生成した。ESI [M+H] = 257.0/259.0

【0249】

化合物A-10。DCM (1 mL) および飽和 NaHCO_3 水溶液 (0.5 mL) 中のA-9 (35 mg、136.1 μmol 、1.0当量) の混合物に、2-アセトキシアセチルクロリド (149 mg、1.1 mmol、8.0当量) を加え、結果として生じた混合物を15℃で1時間攪拌した。水 (2 mL) を加え、DCM (5 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、真空下で乾燥させて、A-10 (50 mg、粗物質) を黄色の固体として生成した。ESI [M+H] = 357.0/359.0

【0250】

化合物3 (一般的方法C)。DCM (2 mL) 中の化合物A-10 (50 mg、140.0 μmol 、1.0当量) の溶液に $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 M、1.4 mL、10.0当量) を加え、混合物を15℃で1時間攪拌した。反応物をHCl (2 mL、1 M) でクエンチし、DCM (5 mL×3) で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna C18 150×30 mm×5 μm ; 移動相: [水(0.1% TFA)-ACN]; B%: 1%~35%、8分) によって精製して、化合物3 (5 mg、14.0 μmol 、収率10.0%、純度100.0%) を黄色のガム状物として生成した。

【0251】

1.3. 化合物4および5 (スキーム1C)。標記化合物は、A-6を使用して5工程で調製した。最初に、化合物A-6をBoc保護してA-11を与え、次いで、N-メチル化してA-12を与えた。後者は、N-メチルピラゾールボロン酸誘導体とのスズキカップリングを受けてA-13を与えた。その後のA-14への脱保護とそれに続く2-ヒドロキシプロパン酸または2-メチル-2-ヒドロキシプロパン酸との反応により、化合物4および5を与えた。

【0252】

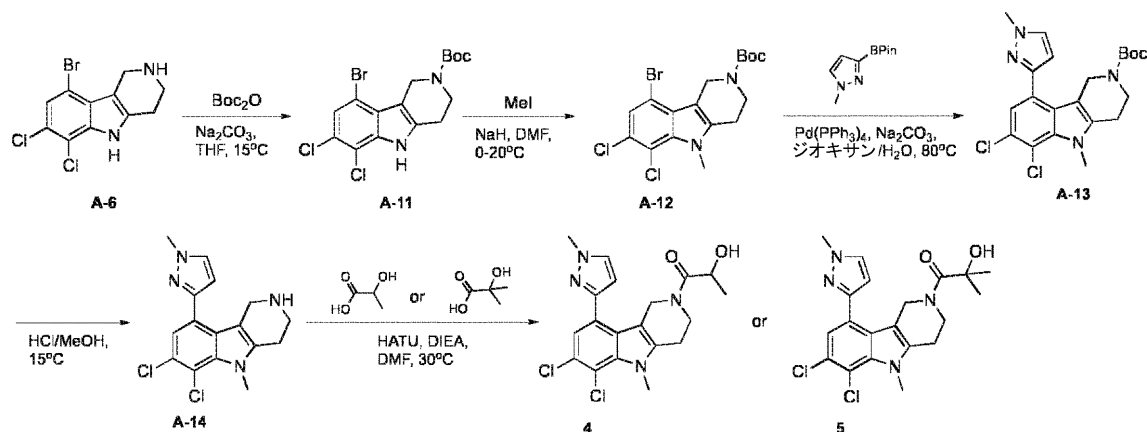
10

20

30

40

50



10

スキーム1C. 化合物4および5の合成

【0253】

化合物A-11。THF (8 mL) 中の化合物A-6 (700 mg、2.0 mmol、1.0 当量、HCl) の溶液に、飽和Na₂CO₃水溶液 (2 mL) およびBoc₂O (429 mg、2.0 mmol、1.0 当量) を加えた。混合物を15°Cで1時間攪拌した。水 (2 mL) を加え、EtOAc (10 mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：THF、10：1～2：1) によって精製して、A-11 (670 mg、1.6 mmol、収率81.2%) を黄色の固体として生成した。

20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.87 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 4.83 (br s, 2H), 3.70 (br t, J=5.6 Hz, 2H), 2.81 (br s, 2H), 1.45 (s, 9H). ESI [M-tBu+H] = 364.9/ 362.9

【0254】

化合物A-12。DMF (5 mL) 中のA-11 (580 mg、1.4 mmol、1.0 当量) の溶液に、NaH (110 mg、2.8 mmol、純度60.0%、2.0 当量) およびCH₃I (235 mg、1.7 mmol、1.2 当量) を0°Cで加えた。結果として生じた混合物を20°Cで1時間攪拌した。反応混合物を飽和NH₄Cl水溶液 (10 mL) によってクエンチし、EtOAc (10 mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、EtOAc (5 mL) でトリチュレートして、A-12 (520 mg、1.2 mmol、収率84.4%、純度97.3%) を白色の固体として生成した。

30

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.44 (s, 1H), 4.83 (br s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.70 (t, J=5.8 Hz, 2H), 2.83 - 2.73 (m, 2H), 1.44 (s, 9H). ESI [M+H] = 378.8/376.8

【0255】

化合物A-13。ジオキサン (4.5 mL) およびH₂O (1.5 mL) 中のA-12 (250 mg、575.8 μmol、1.0 当量)、1-メチル-3-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ピラゾール (144 mg、691.0 μmol、1.2 当量)、Pd(PPh₃)₄ (67 mg、57.6 μmol、0.1 当量) およびNa₂CO₃ (183 mg、1.7 mmol、3.0 当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、N₂雰囲気下にて80°Cで4時間攪拌した。混合物をH₂O (10 mL) で希釈し、EtOAc (10 mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件；カラム：Phenomenex Luna 80×30 mm×3 μm；移動相：[水(0.1% TFA)-ACN]；B%：50%～85%、8分) によって精製して、tert-ブチル A-13 (310 mg、粗物質) を緑色の固体として生成した。

40

50

^1H NMR (400MHz,

DMSO- d_6) δ = 7.78 (d, J =2.2 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.50 - 6.37 (m, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.68 - 3.59 (m, 2H), 2.78 (br t, J =5.6 Hz, 2H), 1.35 (br s, 9H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 435.1/437.1$

【0256】

化合物A-14。HCl/MeOH (4M、5mL) 中のA-13 (260mg、597.2 μmol 、1.0当量) の溶液を15℃で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮して、A-14 (192mg、粗物質のHCl塩) を褐色の固体として生成した。ESI $[\text{M}+\text{H}] = 335.1/337.1$

10

【0257】

化合物4 (一般的方法D)。DMF (1mL) 中のA-14 (50mg、134.5 μmol 、1.0当量、HCl) およびDIEA (70mg、538.1 μmol 、4.0当量) の溶液に、2-ヒドロキシプロパン酸 (24mg、269.0 μmol 、2.0当量)、HATU (77mg、201.8 μmol 、1.5当量) を加え、混合物を30℃で1時間攪拌した。混合物を濾過して濾液を得て、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna 80 $\times$ 30mm $\times$ 3 μm ; 移動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 23%~53%、8min) によって精製して、4 (7mg、15.5 μmol 、収率11.5%、純度93.2%) を黄色の固体として生成した。

20

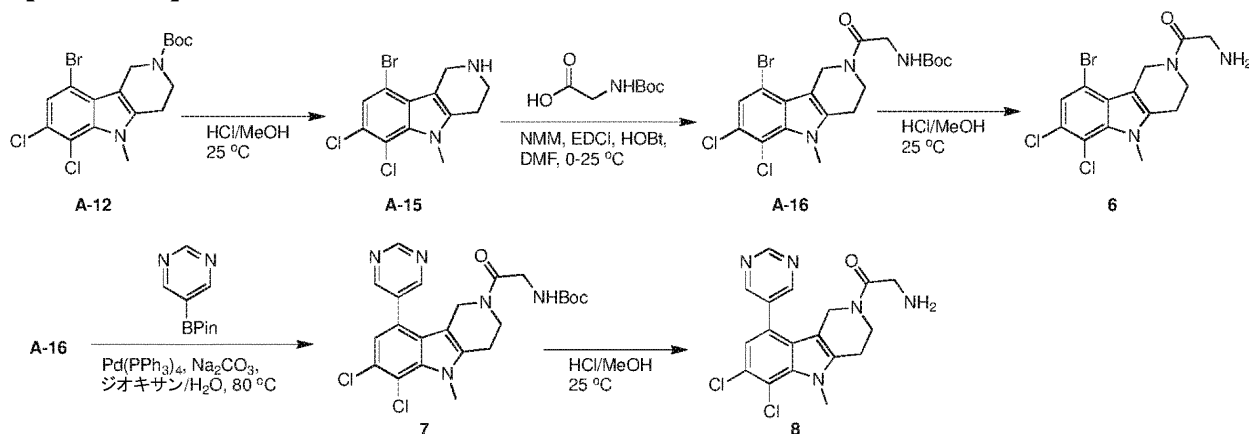
【0258】

化合物5。方法Dによって、4について記載したように、中間体A-14および2-ヒドロキシ-2-メチルプロパン酸を使用して得た。

【0259】

1.4. 化合物6~8 (スキーム1D)。標記化合物は、中間体A-12を使用して調製した。最初に、中間体A-12を酸性条件下で脱保護し、結果として生じたアミンA-15をNBocグリシンと反応させてA-16を与えた。その後のA-16中のBoc脱保護は、化合物6を与えた。これとは別に、A-16とピリジンボロン酸誘導体とのスズキカップリングは化合物7を与え、続いてBoc脱保護して8を与えた。

【0260】



30

40

スキーム1D. 化合物6~8の合成

【0261】

化合物A-15。メタノール性HClを使用したA-12中のBoc脱保護は、A-15 HCl塩を黄色の固体として与えた。ESI $[\text{M}+\text{H}] = 334.9/332.9$

【0262】

化合物A-16。DMF (1mL) 中のA-15 (10mg、30.0 μmol 、1.0当量) およびNMM (12mg、119.8 μmol 、4.0当量) の溶液に、EDCI (9mg、44.9 μmol 、1.5当量)、HOBt (6mg、44.9 μmol 、1.5当量) およびN-Bocグリシン (11mg、59.9 μmol

50

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.51 - 7.44 (m, 1H), 6.91 - 6.77 (m, 1H), 4.97 - 4.87 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.94 - 3.89 (m, 2H), 3.87 - 3.76 (m, 2H), 2.93 - 2.74 (m, 2H), 1.38 (s, 9H). ESI [M-tBu+H] = 435.9/ 433.9.

10

【 0 2 6 4 】

20

【 0 2 6 6 】

【 0 2 6 7 】



【 0 2 6 8 】

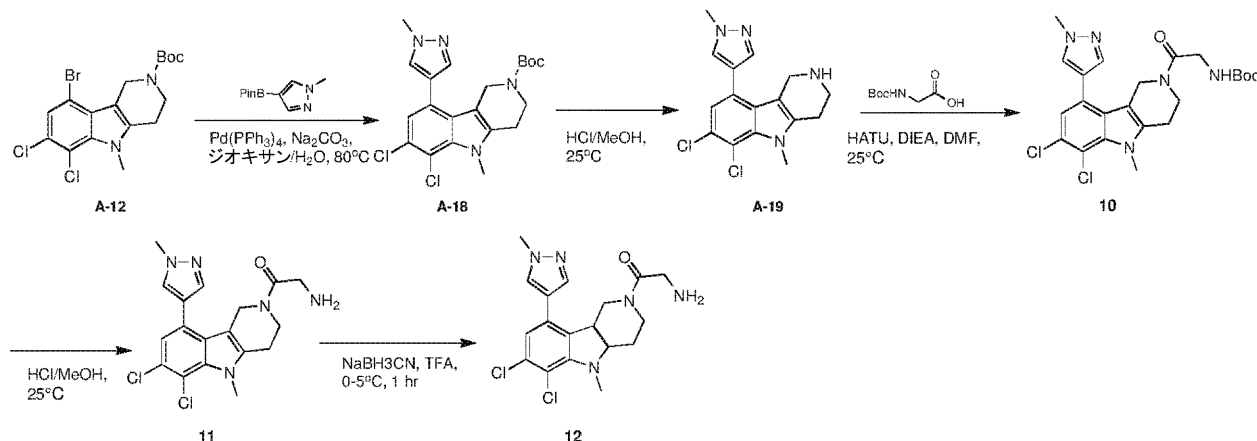
40

【 0 2 7 0 】

50

Boc脱保護を受けて遊離アミンA-19を与え、続くN-Bocグリシンとのアミド形成により化合物10を与え、Boc脱保護により遊離アミン11を与えた。化合物12は、上の化合物7～8で述べたように、11のNaBH₃CN還元によって得られた。

【0271】



10

スキーム1F. 化合物10～12の合成（スキーム1F）

【0272】

化合物A-18。ジオキサン（9mL）およびH₂O（3mL）中の化合物A-12（580mg、1.3mmol、1.0当量）、1-メチル-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)ピラゾール（334mg、1.6mmol、1.2当量）、Pd(PPh₃)₄（154mg、133.4μmol、0.1当量）、Na₂CO₃（425mg、4.0mmol、3.0当量）の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて80℃で2時間攪拌した。混合物をH₂O（10mL）で希釈し、EtOAc（10mL×5）で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC（カラム：Phenomenex Luna 80×30mm×3μm；移動相：[水(TFA)-ACN]；B%：50%～80%、8min）によって精製して、化合物A-18（210mg、482.4μmol、収率36.1%、純度100.0%）を黄色の固体として生成した。

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) δ = 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.16 (br s, 2H),

4.03 - 3.96 (m, 6H), 3.76 (brs, 2H), 2.81 (br t, J = 5.7 Hz, 2H), 1.49 - 1.37 (m, 9H). ESI [M+H] = 435.1 / 437.1

20

30

【0273】

化合物A-19。方法Bを使用したA-18中のN-Boc脱保護を実施することによって、黄色の固体として得た（3.44mg、9.43μmol、収率41.04%、純度91.861%）。

¹H NMR (400

MHz, DMSO-d₆) δ = 8.91 (br s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.96 - 3.88 (m, 5H), 3.47 (br s, 2H), 3.07 (br t, J = 5.8 Hz, 2H). ESI [M+H] = 335.0/336.9

40

【0274】

化合物10。方法Cを使用してA-24とN-Bocグリシンとを反応させることによって調製した。標記生成物10（7mg、14.1μmol、収率47.3%、純度95.9%）を黄色の固体として得た。

【0275】

化合物11。メタノール性HClを使用した化合物10のN-Boc脱保護（方法B）は、11（11mg、26.5μmol、収率43.4%、純度97.4%）を黄色の固体として与えた。

【0276】

化合物12。TFA（0.5mL）中の11（15mg、30.5μmol、1.0当量）の溶液に、NaB

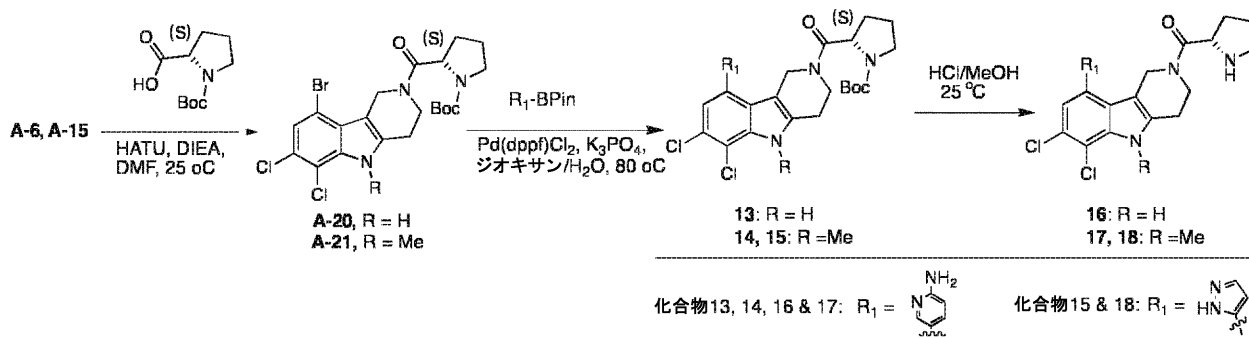
50

H₃CN (10mg、152.3 μ mol、5.0当量)を0℃で加え、混合物を15℃で0.5時間撹拌した。次いで、混合物を濃縮し、飽和Na₂CO₃水溶液(10mL)で希釈し、EtOAc(10mL×3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC(カラム: Waters Xbridge BEH C18 100×30mm×10 μ m; 移動相: [水(NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 25%~55%、10分)によって精製して、12(1.0mg、2.5 μ mol、収率8.2%、純度97.0%)を黄色のガム状物として生成した。

【0277】

1.7. 化合物13~18(スキーム1G)。標記化合物は、インドール誘導体A-6およびA-15を使用して2~3工程で調製した。最初に、A-6およびA-15をBoc保護プロリンと反応させて、アミドA-20およびA-21を与え、これらの化合物は、適切なボロン酸誘導体を受けて化合物13~15を与えた。次に、これらの生成物は、Boc脱保護を受けて遊離アミン化合物16~18を与えた。

【0278】

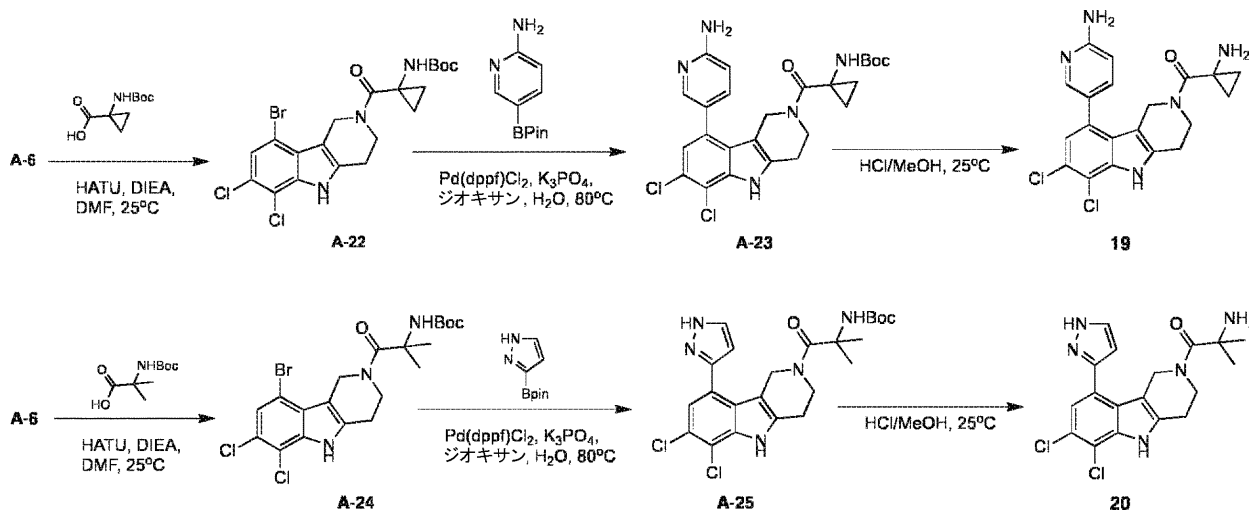


スキーム1G. 化合物13~18の合成

【0279】

1.8. 化合物19および20(スキーム1H)。標記化合物は、化合物A-6を使用して3工程で調製した。ここで、A-6は、N-Boc保護アミノシクロプロピルカルボン酸およびアミノ-イソ-プロピルカルボン酸とのアミド形成を受けて、それぞれ、A-22およびA-24を与えた。A-22とアミノピリジンボロン酸とのおよびA-24とピラゾールボロン酸誘導体とのスズキカップリングは、化合物A-23およびA-25を与えた。最後に、後者の生成物をN-Boc脱保護して、それぞれ、19および20を与えた。

【0280】



スキーム1H. 化合物19および20の合成

【0281】

化合物A-22. 化合物A-6を、方法Cを使用してBoc保護2-アミノシクロプロピルカル

ボン酸と反応させて、A-22を白色の固体として与えた（140 mg、278.21 μ mol、収率99.17%）。

【0282】

化合物A-23。化合物A-22を、方法Aを使用して2-アミノピリジン-5-ボロン酸誘導体とカップリングさせて、A-23（8.58 mg、12.88 μ mol、収率9.30%、純度94.97%、TFA）を白色の固体として与えた。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.75 (s, 1H), 8.09 (s, 2H),

7.99 (br d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.79 (br s, 1H), 7.70 - 7.40 (m, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.12 (br s, 2H), 3.88 (br s, 2H), 2.89 (br s, 2H), 1.29 (br s, 7H), 1.15 - 1.01 (m, 4H), 0.87 - 0.79 (m, 2H). ESI [M+H] = 516.1 / 518.1

10

【0283】

化合物19（ADI-51-9）。方法Bを使用したA-23中のNBoc脱保護は、化合物19（1.48 mg、2.95 μ mol、収率30.58%、純度90.62%）をHCl塩として与えた。

【0284】

化合物A-24。化合物A-6を、方法Cを使用してBoc保護2-アミノ-イソ-プロピルカルボン酸と反応させて、A-24（50 mg、粗物質）を与えた。ESI [M+H] = 506.0 / 504.0

20

【0285】

化合物A-25。化合物A-24を、方法Aを使用してピラゾール-3-ボロン酸誘導体とカップリングさせて、A-25（2.78 mg、5.65 μ mol、収率28.52%）を黄色のガム状物として与えた。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.55 - 11.48 (m, 1H), 7.89 - 7.70 (m, 2H), 7.38 - 7.13 (m, 2H), 6.54 (br s, 1H), 4.63 - 4.33 (m, 2H), 4.01 - 3.86 (m, 2H), 2.86 - 2.77 (m, 2H), 1.31 (br s, 9H), 1.17 - 0.94 (m, 6H). ESI [M+H] = 492.1 / 494.1.

【0286】

化合物20（ADI-47-13）。方法Bを使用したA-25中のNBoc脱保護は、化合物20（3.39 mg、8.41 μ mol、収率8.28%、純度97.31%）を黄色のガム状物として与えた。

30

【0287】

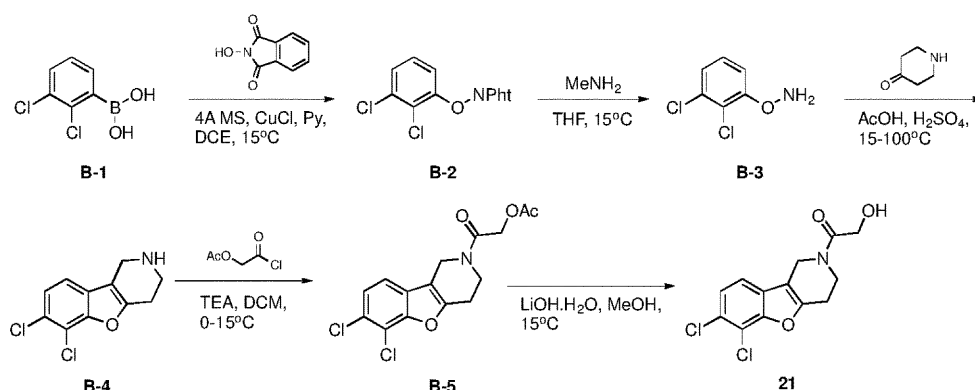
2. ベンゾフラン誘導体。本発明者らは、インドール化合物を模倣するようにベンゾフラン誘導体を設計、調製、評価した。様々なベンゾフラン誘導体の合成は、セクション2.1~2.xに記載するように、市販の物質から開始して達成された。

【0288】

2.1. 化合物21（スキーム2A）。化合物21の合成は、ボロン酸B-1とN-ヒドロキシフタルイミドとを反応させて化合物B-2を与えることから開始した。後者は、MeNH₂と反応させることによるフタル酸の除去を受けてB-3を与え、これを4-テトラヒドロピリドンと反応させて、重要な中間体B-4を与えた。その後の2-アセトキシアセチルクロリドとの反応および酢酸基の脱保護は、化合物B-5、次いで21を与えた。

40

【0289】



10

スキーム2A. 化合物21の合成

【0290】

化合物B-2。DCE (200 mL) 中の(2,3-ジクロロフェニル)ボロン酸B-1 (11.7 g、61.3 mmol、2.0当量)、2-ヒドロキシイソインドリン-1,3-ジオン (5.0 g、30.7 mmol、1.0当量)、Py (2.7 g、33.7 mmol、1.1当量)、4A MS (2.0 g) およびCuCl (3.0 g、30.7 mmol、1.0当量) の混合物を脱気して、O₂を3回パージし、次いで、混合物をO₂雰囲気下にて40°Cで48時間攪拌した。混合物を水 (50 mL) で希釈し、DCM (100 mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件；カラム：Phenomenex luna C18 250 mm×100 mm×10 μm；移動相：[水(0.1% TFA)-ACN]；B%：40%～70%、20分) によって精製して、化合物B-2 (550 mg、1.8 mmol、収率5.8%) を褐色の固体として生成した。

20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.02 - 7.92 (m, 4H), 7.57 (dd, J=1.2, 8.5 Hz, 1H), 7.49 (dd, J=1.2, 8.1 Hz, 1H), 7.39 - 7.31 (m, 1H). ESI [M+H] = 308/309.9

【0291】

化合物B-3。化合物B-2 (550 mg、1.8 mmol、1当量) とEtOH中のMeNH₂ (EtOH中30.0% MeNH₂、8 mL) の混合物を15°Cで1時間攪拌した。反応混合物を濃縮して、化合物B-3 (840 mg、粗物質) を褐色の固体として生成した。

30

¹H NMR

(400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.64 (br d, J=6.7 Hz, 1H), 7.42 - 7.37 (m, 1H), 7.03 - 6.97 (m, 1H), 2.34 (s, 2H).

【0292】

化合物B-4。AcOH (10 mL) 中の化合物B-3 (840 mg、4.7 mmol、1.0当量) の混合物に、H₂SO₄ (1 mL)、続いて、tert-ブチル 4-オキソピペリジン-1-カルボキシレート (1.1 g、5.7 mmol、1.2当量) を加えた。混合物を15°Cで5分間攪拌し、次いで、100°Cに12時間加熱した。反応混合物を濃縮し、分取HPLC (TFA条件；カラム：Phenomenex luna C18 250×50 mm×10 μm；移動相：[水(0.1% TFA)-ACN]；B%：15%～45%、10分) によって精製して、B-4 (350 mg、982.8 μmol、収率20.8%、TFA塩) を褐色の固体として生成した。

40

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.70 - 7.65 (m, 1H), 7.61 - 7.57 (m, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.59 (br t, J=6.0 Hz, 2H), 3.20 - 3.11 (m, 2H). ESI [M+H] = 242.0/244.0

【0293】

化合物B-5。DCM (1 mL) 中の化合物B-4 (100 mg、280.8 μmol、1.0当量、TFA) およびTEA (57 mg、561.6 μmol、2.0当量) の混合物に、2-アセトキシアセチル

50

ロリド (58 mg、421.2 μmol 、1.5 当量) を 0°C で加え、15°C で 1 時間攪拌した。混合物を MeOH (0.5 mL) でクエンチし、濃縮して、B-5 (100 mg、粗物質) を褐色の固体として生成した。ESI $[M+H] = 342.0/344.0$

【0294】

化合物 21。MeOH (2 mL) 中の化合物 B-5 (100 mg、292.3 μmol 、1.0 当量) および LiOH $\cdot$ H₂O (25 mg、584.5 μmol 、2.0 当量) の混合物を 15°C で 1 時間攪拌した。混合物を濃縮し、rep-HPLC (カラム: Waters Xbridge BEH C18 100 $\times$ 30 mm $\times$ 10 μm ; 移動相: [水 (10 mM NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 35% ~ 65%、10 分) によって精製して、化合物 21 (8 mg、27.6 μmol 、収率 9.4%、純度 100.0%) を白色の固体として生成した。

10

【0295】

2.2. 化合物 22 ~ 26 および 28 ~ 29 (スキーム 2B)。標記化合物を調製するために、重要なベンゾフラン中間体 B-20 および B-21 を、市販の化合物 B-6 および B-7 から開始し、それぞれボロン酸 B-12 および B-13 を経由して合成した (スキーム 2B)。ここで、化合物 B-6 および B-7 は、ナトリウムメトキシドと反応させて B-8 および B-9 を与え、これらは、B₂Pin₂ による Pd 触媒ボロニル化 (boronylation) を受け、結果として生じた生成物 B-10 および B-11 を過ヨウ素ナトリウムで処理して、B-12 および B-13 を与えた。後者の生成物を N-ヒドロキシフタルイミドと反応させ、結果として生じた生成物 B-14 および B-15 を、エタノール中 MeNH₂ を使用して加水分解し、化合物 B-16 および B-17 を与えた。その後、B-16 および B-17 は、N-Boc-4-テトラヒドロピリドンとのカップリングを受け、結果として生じたベンゾフラン B-18 および B-19 を BBr₃ と反応させて、重要な中間体 B-20 および B-21 を与えた。後者の化合物を Na₂CO₃ の存在下で 2-アセトキシアセチルクロリドと反応させ、生成物である B-22 および B-23 を、トリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させることによってトリフラート B-24 および B-25 に変換した。次に、B-24 および B-25 は、適切な複素環式ボロン酸誘導体とのスズキカップリングを受けて化合物 B- (26 ~ 32) を与え、酢酸脱保護により標記生成物 22 ~ 26 および 28 ~ 29 を与えた。ここに記載した方法は、化合物 B-7 のためのものであり、化合物 B-6 についても同様に処理される。

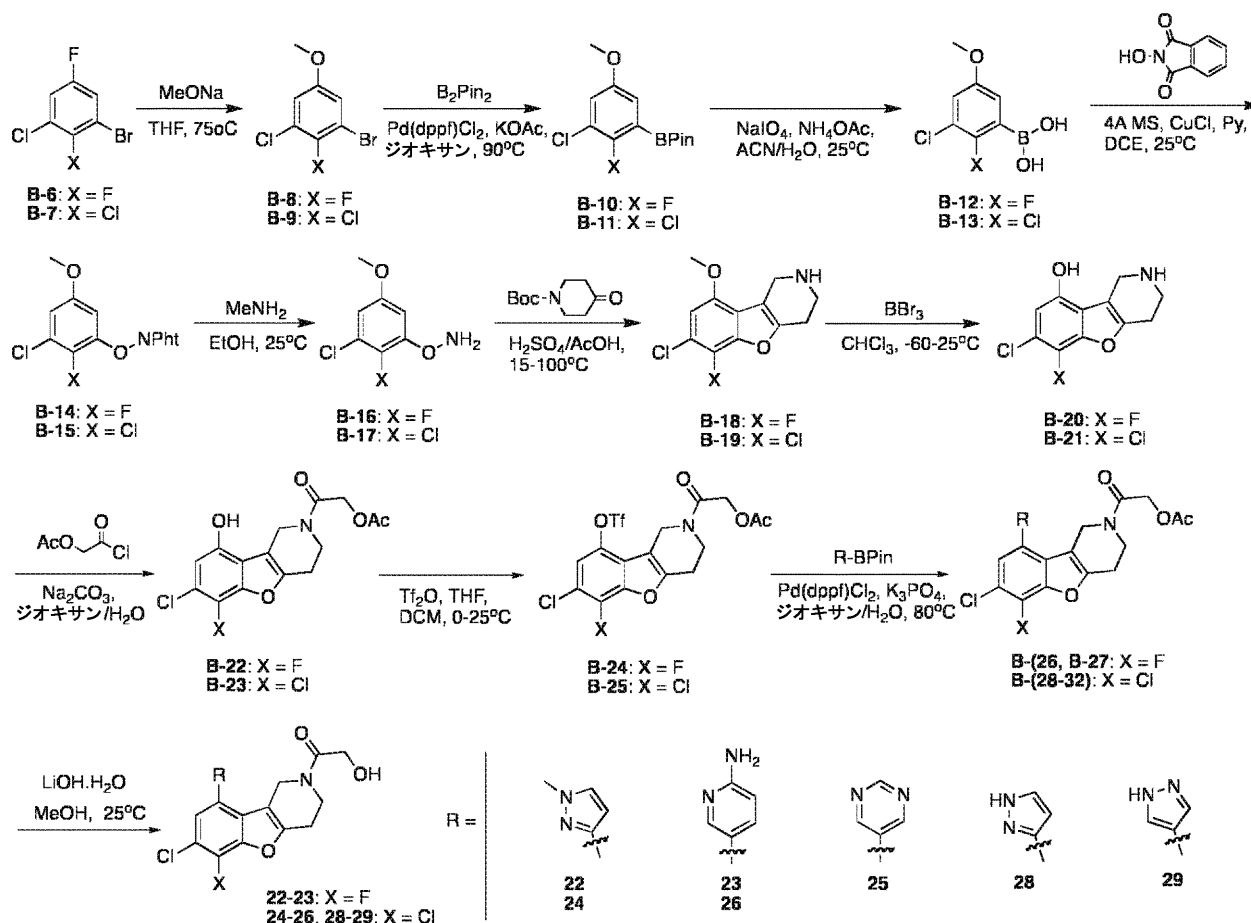
20

【0296】

30

40

50



10

20

スキーム2B. ベンゾフラン化合物22～26および28～29の合成

【0297】

化合物B-9。THF (100 mL) 中の化合物B-7 (10.0 g、41.0 mmol、1.0当量) およびNaOMe (8.9 g、164.0 mmol、4.0当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて75℃で4.5時間攪拌した。混合物をH₂O (50 mL) で希釈し、EtOAc (80 mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝95：5～9：1) によって精製して、B-9 (4.6 g、18.0 mmol、収率43.8%) を白色の固体として生成した。

¹H NMR (400MHz, クロロホルム-d) δ = 7.12 (d, J=2.9

Hz, 1H), 7.00 (d, J=2.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H)

30

40

【0298】

化合物B-11。ジオキサン (60 mL) 中のB-9 (4.2 g、16.4 mmol、1.0当量)、Pin₂B₂ (12.5 g、49.2 mmol、3.0当量)、Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (1.3 g、1.6 mmol、0.1当量) およびKOAc (4.8 g、49.2 mmol、3.0当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて90℃で12時間攪拌した。残留物をH₂O (50 mL) で希釈し、EtOAc (50 mL×3) で抽出し、次いで、有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：0～1：1) によって精製して、B-11 (2.2 g、7.3 mmol、収率44.2%) を緑色の油状物として生成した。

50

¹H NMR

(400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.32 (d, J=3.1 Hz, 1H), 7.07 (d, J=3.1 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 1.31 (s, 12H).

【 0 2 9 9 】

化合物B-13。H₂O (10mL) およびACN (10mL) 中のB-11 (2.2g、7.1mmol、1.0当量)、NaIO₄ (6.1g、28.4mmol、4.0当量) およびNH₄OAc (2.2g、28.4mmol、4.0当量) の混合物を25℃で1時間攪拌した。反応混合物を濾過し、分取HPLC (カラム: Phenomenex luna C18 (250×70mm、15μm) ; 移動相: [水(TFA)-ACN] ; B% : 15%~45%、30分) によって精製して、B-13 (1.2g、5.2mmol、収率73.4%) を白色の固体として生成した。

10

¹H NMR

(400MHz, クロロホルム-d) δ = 7.39 (d, J=3.0 Hz, 1H), 7.12 (d, J=3.1 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.83 (s, 3H).

【 0 3 0 0 】

化合物B-15。DCE (30mL) 中のB-13 (740mg、3.4mmol、1.0当量)、2-ヒドロキシイソインドリン-1,3-ジオン (1.1g、6.7mmol、2.0当量)、Py (292mg、3.7mmol、1.1当量)、4A MS (1g) およびCuCl (332mg、3.4mmol、1.0当量) の混合物を脱気して、O₂を3回パージし、次いで、混合物をO₂雰囲気下にて25℃で12時間攪拌した。反応混合物を濾過し、次いで、H₂O (10mL) で希釈し、DCM (30mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル: 酢酸エチル=1:0~5:1) によって精製して、B-15 (510mg、1.5mmol、収率45.0%) を白色の固体として生成した。

20

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 8.02 - 7.83 (m, 4H), 7.17 (d, J=2.8 Hz, 1H), 7.08

(d, J=2.8 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H). ESI [M+H] = 338.1/ 340.1

30

【 0 3 0 1 】

化合物B-17。MeNH₂ (純度30.0%、6mL、EtOH中) 中のB-15 (500mg、1.5mmol、1.0当量) の混合物を25℃で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮して、B-17 (550mg、粗物質) を黄色の油状物として生成した。

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 6.98 (d, J=2.9 Hz, 1H), 6.59 (d, J=2.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H).

【 0 3 0 2 】

化合物B-19。AcOH (3mL) 中のB-17 (500mg、2.4mmol、1.0当量) の混合物に、H₂SO₄ (0.3mL) を加え、続いて、tert-ブチル 4-オキソピペリジン-1-カルボキシレート (575mg、2.9mmol、1.2当量) を加えた。混合物を15℃で5分間攪拌し、次いで、100℃に12時間加熱した。混合物を飽和Na₂CO₃水溶液 (30mL) によってpH > 8までクエンチし、EtOAc (10mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム: Phenomenex C18 80×40mm×3μm ; 移動相: [水(NH₄HCO₃)-ACN] ; B% : 15%~65%、8分) によって精製して、B-19 (80mg、294.0μmol、収率12.2%) を褐色の固体として生成した。

40

¹H NMR

(400MHz, DMSO-d₆) δ = 6.99 (s, 1H), 3.86 - 3.80 (m, 5H), 2.98 (t, J=5.7 Hz, 2H), 2.67 - 2.63 (m, 2H). ESI [M+H] = 272.0/ 274.0

50

【0303】

化合物B-21。CHCl₃ (1mL) 中のB-19 (10mg、36.8μmol、1.0当量) の混合物に、BBr₃ (558mg、220.5μmol、215 uL、6.0当量) を-60℃で加えた。混合物を25℃で3時間攪拌した。混合物を飽和Na₂CO₃水溶液 (30mL) によってpH>8までクエンチし、EtOAc (10mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、B-21 (15mg、粗物質) を褐色の油状物として生成した。ESI [M+H] = 258.0/260.0

【0304】

化合物B-23。化合物A-2からA-3への変換において記載したように、化合物B-21を2-アセトキシアセチルクロリドと反応させて、B-23を与えた。

【0305】

化合物B-25。DCM (4mL) 中のB-23 (280mg、781.75μmol、1当量) およびDCM (1mL) 中のTEA (395mg、3.91mmol、5当量) の混合物に、DCM (0.5mL) 中のTf₂O (551.40mg、1.95mmol、2.5当量) を0℃で加え、N₂雰囲気下にて25℃で1時間攪拌し、濃縮し、H₂O (5mL) で希釈し、EtOAc (10mL×3) で抽出した。有機層をブライン (5mL×3) で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、B-25 (110mg、粗物質) を褐色の油状物として生成した。ESI [M+Na] = 511.8/510.0

【0306】

化合物B-(28~32)。化合物B-25を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、B-(28~32)を与えた。

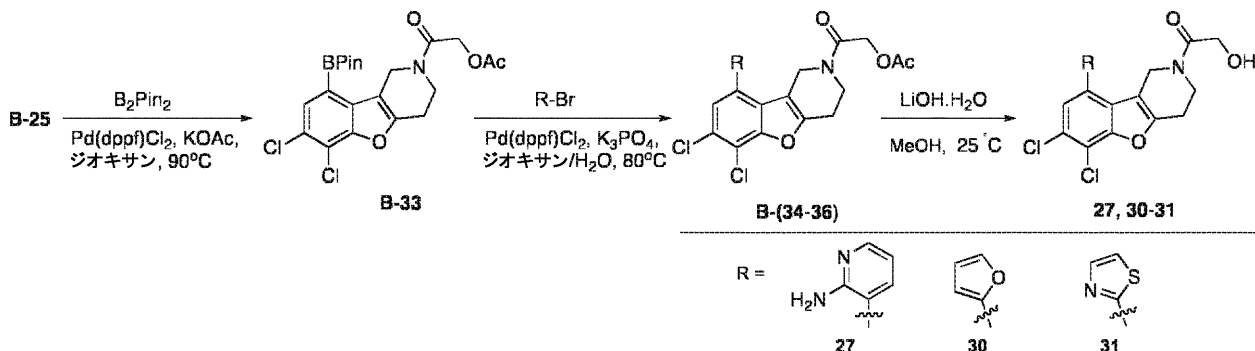
【0307】

化合物24~26および28~29。方法Cを使用したB-(26~32)中のエステル加水分解は、化合物24~26および28~29を与えた。

【0308】

2.3. 化合物27および30~31 (スキーム2C)。トリフラートB-25を、ボロン酸誘導体B-33に変換し、プロモ-複素環と反応させて化合物B-(34~36)を与え、その後、脱保護して化合物27および30~31を与えた。

【0309】



スキーム2C. ベンゾフラン誘導体27および30~31の合成

【0310】

化合物B-33。ジオキサン (6mL) 中のB-25 (130mg、265.18μmol、1当量)、4,4,5,5-テトラメチル-2-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-1,3,2-ジオキサボロラン (336.69mg、1.33mmol、5当量)、Pd(dppf)Cl₂ (19.40mg、26.52μmol、0.1当量)、KOAc (78.07mg、795.54μmol、3当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて110℃で12時間攪拌した。残留物をH₂O (10mL) で希釈し、EtOAc (15mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル=1:1~1:2) によって精製して、B-33 (120mg、256.34μmol、収率96.67%) を白色の固体として生成した。

【0311】

化合物B-34～36。化合物B-33を、方法Aを使用して置換臭化物誘導体とカップリングさせて、B-34～36（1.56 mg、1.95 μ mol、収率3.04%、純度94%）を淡黄色の固体として生成した。

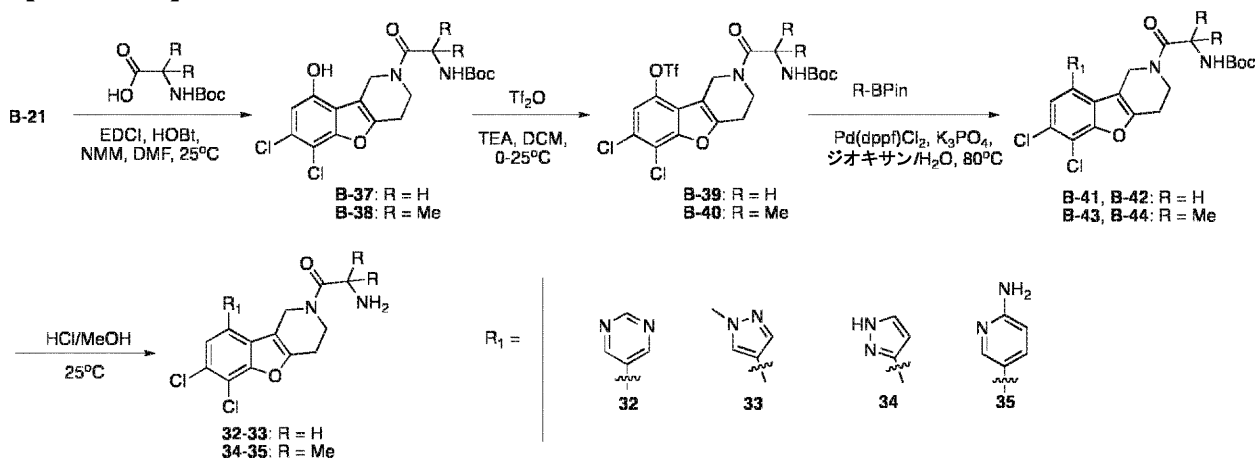
【0312】

化合物27、30および31。方法Cを使用した化合物B-34～36のエステル加水分解は、化合物27、30および31を与えた。

【0313】

2.4. 化合物32～35（スキーム2D）。化合物32～35の合成は、上述した中間体B-21を使用して達成され、中間体B-21は、Boc保護グリシンおよび2-メチルアラニンとのペプチドカップリングを受けて、化合物B-37およびB-38を与えた。後者の生成物を、Et₃Nの存在下でトリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させて、トリフラートB-39およびB-40を与え、これは、適切なブロモ-複素環とのスズキカップリングを受けてB-（41～44）を与え、その後のBoc脱保護により化合物32～35を与えた。

【0314】



スキーム2D. 化合物32～35の合成

【0315】

化合物B-37。DMF（1 mL）中のB-21（45 mg、152.8 μ mol、1.0当量、HCl）、2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)酢酸（54 mg、305.5 μ mol、2.0当量）およびNMM（62 mg、611.1 μ mol、4.0当量）の混合物に、EDCI（44 mg、229.2 μ mol、1.5当量）、HOBT（31 mg、229.2 μ mol、1.5当量）を加え、25°Cで1時間撹拌した。次いで、混合物を飽和Na₂CO₃水溶液（1 mL）でクエンチし、EtOAc（5 mL×3）で抽出した。有機層をブライン（3 mL×5）で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝5：1～3：1）によって精製して、B-37（45 mg、108.4 μ mol、収率70.9%）を白色の固体として生成した。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.79 - 10.59 (m, 1H), 6.93 - 6.69 (m, 2H), 4.75

- 4.60 (m, 2H), 3.97 - 3.83 (m, 2H), 3.81 - 3.66 (m, 2H), 2.90 (br s, 1H), 2.87 - 2.79 (m, 1H),

1.38 (s, 9H). ESI [M-H] = 413.0/ 415.0

【0316】

化合物B-39。DCM（1 mL）中のB-37（40 mg、96.3 μ mol、1.0当量）およびTEA（97 mg、963.2 μ mol、10.0当量）の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、N₂雰囲気下、DCM（0.2 mL）中のTf₂O（136 mg、481.6 μ mol、5.0当量）を0°Cでゆっくり加えた。次いで、混合物をN₂雰囲気下にて25°Cで1時間撹拌した。次いで、混合物をH₂O（2 mL）でクエンチし、EtOAc（5 mL×2）で抽出した。有機層をNa₂SO₄

4で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取TLC (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝2：1) によって精製して、B-39 (48mg、87.7μmol、収率91.1%) を黄色の油状物として生成した。ESI [M-H] = 544.9/546.9

【0317】

化合物B-41～42。化合物B-39を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、B-41～42 (1.56mg、1.95μmol、収率3.04%、純度94%) を淡黄色の固体として生成した。

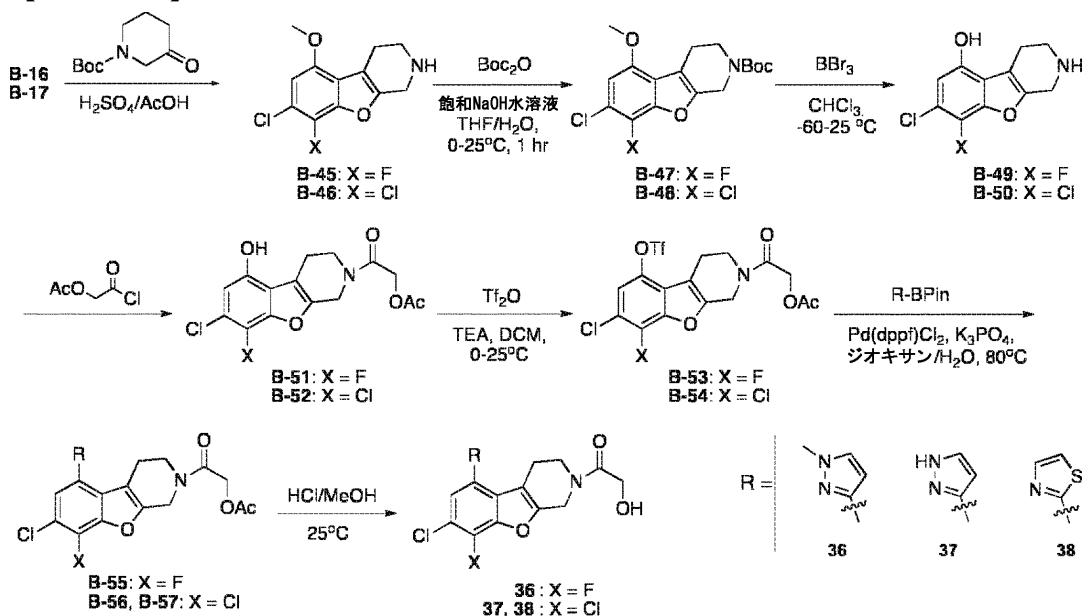
【0318】

化合物32～35。方法Bを使用したB-41～44中のNBoc脱保護は、化合物32～35を与えた。

【0319】

2.5. 化合物36～38 (スキーム2E)。化合物36～38の合成は、化合物B-16およびB-17を使用して達成され、化合物B-16およびB-17を1-Boc-3-ピペリドンと反応させて、重要なベンゾフラン中間体B-45およびB-46を与えた。単離のために、Boc₂Oを使用してこれらの生成物をN-Boc保護し、化合物B-47およびB-48を与え、その後、BBr₃で処理して、アミノ-フェノールB-49およびB-50を与えた。後者の生成物を、アミドB-51およびB-52を与えるアセトキシアセチルリンカーの付加、続く、ジクロロメタン中のトリフルオロメタンスルホン酸無水物/TEAによる処理によって、次の重要な中間体B-53およびB-54に変換した。

【0320】



スキーム2E. 化合物36～38の合成

【0321】

化合物B-46。AcOH (20mL) 中のB-17 (1.9g、9.13mmol、1当量)、tert-ブチル 3-オキソピペリジン-1-カルボキシレート (2.18g、10.96mmol、1.2当量) の溶液に、H₂SO₄ (4mL) を加えた。混合物を90℃で1時間攪拌した。反応混合物を、0℃で、飽和NaOH水溶液 (30mL) で希釈してpH＝9に調整した。混合物を2-Me-THF (20mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、B-46 (2.88g、粗物質) を白色の固体として生成した。

【0322】

化合物B-48。飽和NaOH水溶液 (20mL)、THF (30mL) 中のB-46 (2.88g、10.58mmol、1当量) の溶液に、Boc₂O (4.62g、21.17mmol、4.86mL、2当量) を0℃で加えた。混合物を25℃で1時間攪拌した。混合物を濃縮し、2-Me-THF (20mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残

留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO_2 、石油エーテル：酢酸エチル＝10：1～1：1) によって精製して、B-48 (780mg、2.10mmol、収率19.80%) を黄色の固体として生成した。ESI $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}] = 272.0/274.0$

【0323】

化合物B-50。 CHCl_3 (10mL) 中のB-48 (630mg、1.69mmol、1当量) の溶液に、 BBr_3 (4.24g、16.92mmol、1.63mL、10当量) を -60°C で加えた。混合物を 25°C で1時間攪拌した。反応混合物を 0°C で Na_2CO_3 (100mL) によってクエンチした。溶液を濃縮して CHCl_3 を除去し、これをさらに精製することなしに次の工程にそのまま使用した。

【0324】

化合物B-52。飽和 NaHCO_3 水溶液 (1mL) およびジオキサン (1mL) 中のB-50 (50mg、135 μmol 、1.0当量、 HCl) の溶液に、(2-クロロ-2-オキソ-エチル)アセタート (74mg、540 μmol 、4.0当量) を 0°C で加えて、 25°C で16時間攪拌し、次いで、 H_2O (3mL) で希釈し、 EtOAc (5mL $\times$ 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮して、B-52 (60mg、粗物質) を黄色の固体として生成した。

【0325】

化合物B-54。 DCM (1mL) 中のB-52 (70mg、162 μmol 、1.0当量) およびTEA (328mg、3mmol、20.0当量) の混合物に、 DCM (0.5mL) 中の Tf_2O (229mg、811 μmol 、5.0当量) を 0°C で加え、 N_2 雰囲気下にて 25°C で1時間攪拌し、 H_2O (2mL) で希釈し、 EtOAc (3mL $\times$ 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取TLC (SiO_2 、石油エーテル： EtOAc ＝1：1) によって精製して、B-54 (66mg、117 μmol 、収率72.2%) を黄色の固体として生成した。

【0326】

化合物B-55～57。化合物B-54を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、B-55～57 (1.56mg、1.95 μmol 、収率3.04%、純度94%) を淡黄色の固体として生成した。

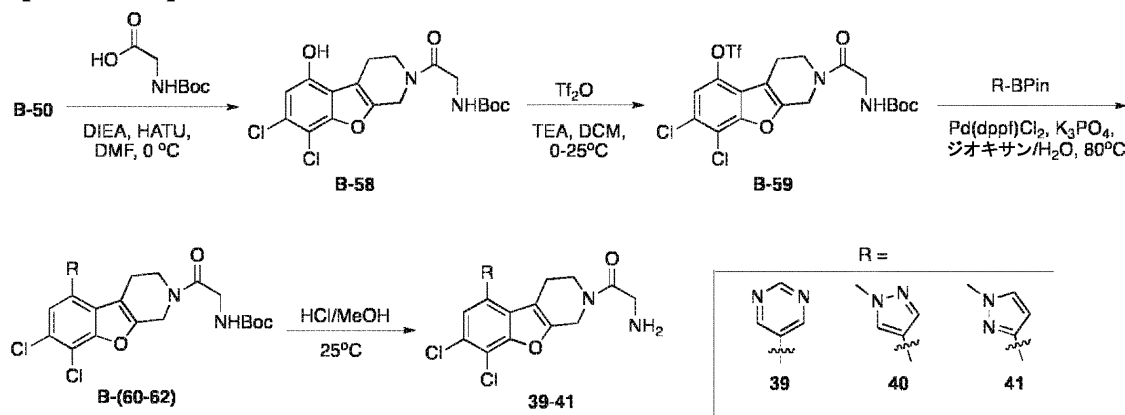
【0327】

化合物36～38。方法Cを使用した化合物B-55～57のエステル加水分解は、化合物32～35を与えた。

【0328】

2.6. 化合物39～41 (スキーム2F)。化合物39～41の合成は、中間体B-50を使用し、N-Bocグリシンと反応させてB-58を与えることから達成される。後者を Tf_2O と反応させて、トリフラートB-59を与え、これは、複素環-ボロン酸誘導体とのスズキ反応を受けて、化合物B-(60～62)を与え、次いで、Boc脱保護により標記生成物39～41を与えた。

【0329】



スキーム2F. 化合物39～41の合成

【0330】

10

20

30

40

50

化合物B-58。DMF (5mL) 中のB-50 (476mg、1.62mmol、1当量、HCl) の溶液に、2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)酢酸 (849.26mg、4.85mmol、3当量) およびDIEA (626.56mg、4.85mmol、3当量)、HATU (921.66mg、2.42mmol、1.5当量) を加えた。混合物を0℃で1時間攪拌した。反応混合物をH₂O (10mL) で希釈し、EtOAc (20mL×3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (10mL×3) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル=1：1～0：1) によって精製して、B-58 (380mg、915.07μmol、収率56.63%) を黄色の固体として生成した。ESI [M+H] = 414.9/416.9

【0331】

化合物B-59。DCM (5mL) 中のB-58 (370mg、890.99μmol、1当量)、TEA (450.80mg、4.45mmol、5当量) およびTf₂O (628.46mg、2.23mmol、2.5当量) の混合物を脱気して、0℃でN₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて25℃で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残留物をH₂O (10mL) で希釈し、EtOAc (20mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル=0：1～1：1) によって精製して、B-59 (220mg、401.95μmol、収率45.11%) を黄色の油状物として生成した。ESI [M+Na⁺] = 568.9/570.9

【0332】

化合物B-(60～62)。化合物B-59を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、B-(60～62)を生成した。

【0333】

化合物39～41。方法Bを使用したB-(60～62)中のNBoc脱保護は、化合物39～41を淡黄色の固体として与えた。

【0334】

3. ベンゾチオフラン誘導体

3.1. 化合物42～44 (スキーム3A)。化合物42～44の合成は、フェノールC-1のメチル化とそれに続く臭素化により臭化物C-2を与えることから開始した。3-メルカプトプロピオン酸エチルとのPd触媒反応は、化合物C-3を与え、これをN-Boc-3,3-エポキシピペリジンと反応させ、続いて、結果として生じたアルコールを酸化して、化合物C-4を与えた。後者は、リン酸介在環化を受けて重要な中間体C-5を与え、その後、2-アセトキシアセチルクロリドと反応させて、化合物42～44の前駆体ならびに他の類似化合物として役立つ中間体C-6を与えた。

【0335】

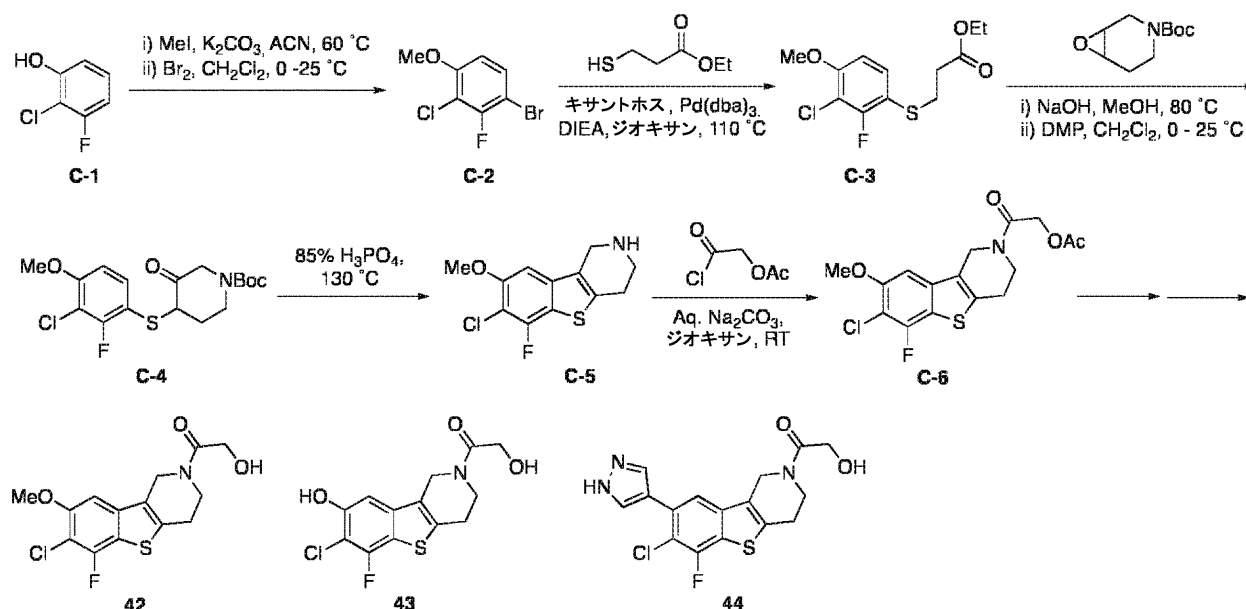
10

20

30

40

50



10

スキーム3A. 化合物42～44の合成

【0336】

3.2. 化合物45～52（スキーム3B）。化合物45～52の合成は、化合物C-7およびC-8から開始し、これらは、上で化合物C-5の合成で述べたように一連の反応を受け、アルコールC9/C10およびケトンC11/C12を経由して、中間体C-13およびC-14を与えた。化合物C-13およびC-14中のメトキシの BBr_3 による脱保護は、アミノフェノールC-15およびC16を与え、これらを2-アセトキシアセチルクロリドと反応させて、化合物C-17およびC-18を与えた。フェノールを、トリフラートに変換してC-19およびC-20を与え、ボロン酸誘導体とのPd触媒反応とそれに続く塩基性条件下での酢酸脱保護は、酢酸前駆体C-21およびC-（22～27）を経由して標的化合物45～52を与えた（スキーム3B）。詳細な方法については、下に化合物C-8から46～48への変換を提供しており、化合物C-7も同様に45に変換された。

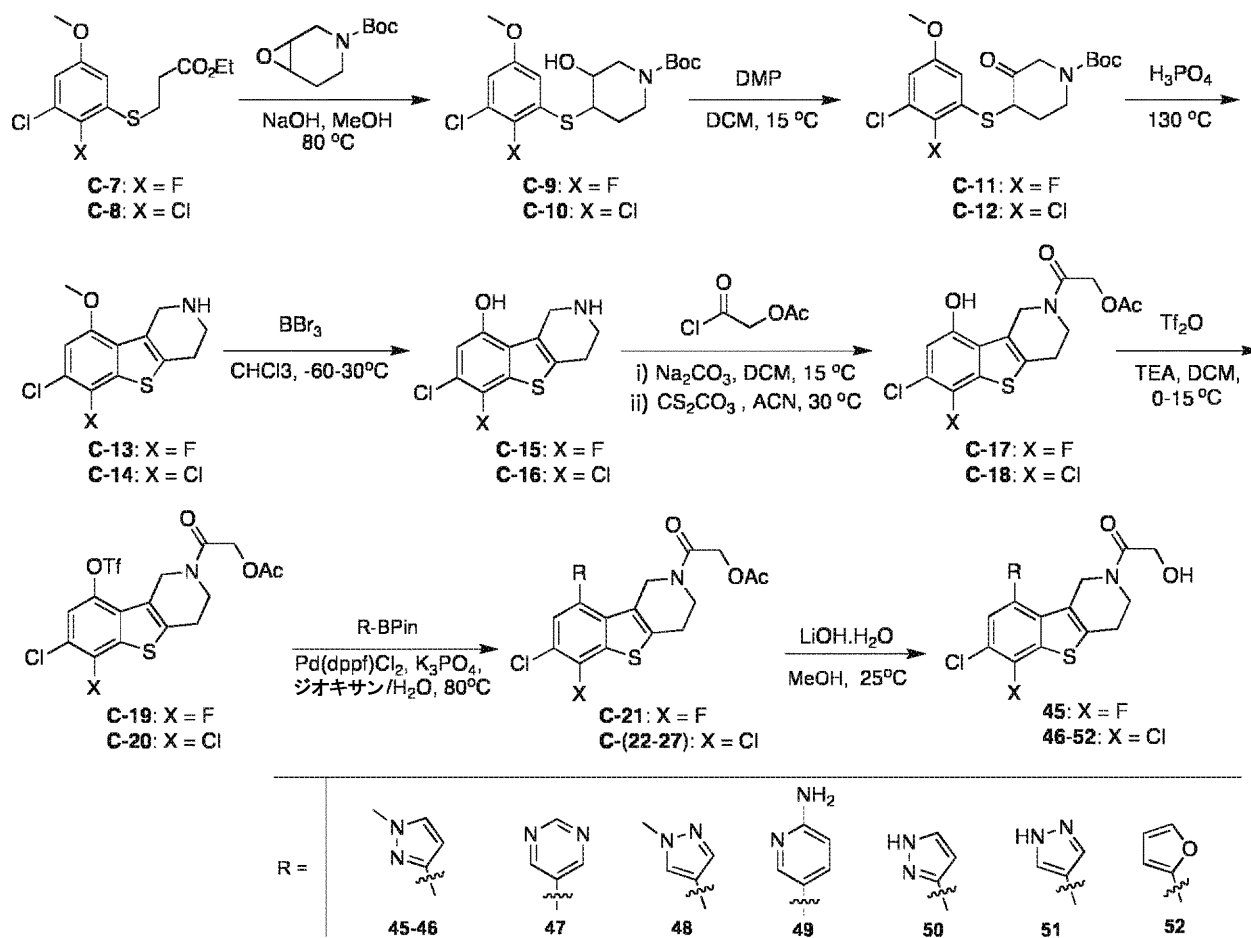
【0337】

20

30

40

50



10

20

スキーム3B. 化合物45～52の合成

【0338】

化合物C-10。MeOH (30 mL) 中の化合物C-8 (2.0 g、7 mmol、1.0 当量)、tert-ブチル 7-オキサ-3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプタン-3-カルボキシレート (1.4 g、7 mmol、1.1 当量) の溶液に、NaOH (247 mg、6 mmol、0.9 当量) を加え、80℃で2時間攪拌し、H₂O (20 mL) によってクエンチして、DCM (20 mL×5) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：EtOAc=3：2～3：2) によって精製して、C-10 (2.4 g、6 mmol、収率86.0%) を無色の油状物として生成した。

30

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ

= 7.16 - 7.04 (m, 2H), 5.53 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 3.98 - 3.81 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.76 - 3.67 (m, 1H), 3.46 - 3.33 (m, 2H), 3.03 - 2.87 (m, 1H), 2.04 - 1.99 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.34 - 1.26 (m, 1H).

40

【0339】

化合物C-12。DCM (20 mL) 中のC-10 (2.4 g、5.8 mmol、1.0 当量) の溶液に、DMP (3.0 g、7 mmol、1.2 当量) を加え、15℃で2時間攪拌し、飽和NaHCO₃水溶液 (30 mL) および飽和Na₂S₂O₃水溶液 (30 mL) によってクエンチして、DCM (50 mL×5) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム：Phenomenex Luna 80×30 mm×3 μm；移動相：[水(TFA)-ACN]；B%：45%～80%、8分) によって精製して、C-12 (3.3 g、粗物質) を黄色の油状物として生成した。

50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.21 - 7.11 (m, 1H), 7.09 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.55 (br d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.08 - 3.87 (m, 2H), 3.81 (br s, 3H), 3.54 - 3.42 (m, 2H), 2.58 (br s, 2H), 1.40 (br d, J = 6.0 Hz, 9H). ESI $[\text{M-tBu+H}]$ = 349.9 / 351.9.

【0340】

化合物C-14。H₃PO₄ (30 mL、純度85.0%) 中のC-12 (3.0 g、7 mmol、1.0当量) の溶液を130°Cで12時間攪拌し、5 M NaOH (150 mL) によってpH = 14にクエンチして、DCM (150 mL $\times$ 4) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム: Phenomenex luna C18 (250 $\times$ 70 mm, 15 μ m) ; 移動相: [水(TFA)-ACN] ; B% : 25% ~ 55%、20分) によって精製して、C-14 (600 mg、2 mmol、収率28.2%) を明褐色の固体として生成した。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.22 (s, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.48 (br t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.14 (br t, J = 5.8 Hz, 2H). ESI $[\text{M-H}]$ = 287.9 / 289.9.

【0341】

化合物C-16。CHCl₃ (6 mL) 中の化合物C-14 (530 mg、2 mmol、1.0当量) の溶液に、-60°CでBBr₃ (10.4 g、42 mmol、23当量) を加え、30°Cで48時間攪拌し、0°Cで飽和Na₂CO₃水溶液 (20 mL) によってpH = 9にクエンチして、CHCl₃およびH₂O中のC-16 (504 mg、粗物質) を淡黄色の液体として生成した。ESI $[\text{M+H}]$ = 274.0 / 276.0

【0342】

化合物C-18。DCM (40 mL)、Na₂CO₃ (30 mL) およびCHCl₃ (30 mL) 中の化合物C-16 (500 mg、2 mmol、1.0当量) の溶液に、2-アセトキシアセチルクロリド (996 mg、7 mmol、4.0当量) を加え、15°Cで1時間攪拌し、H₂O (20 mL) で希釈して、DCM (40 mL $\times$ 3) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル: EtOAc = 3 : 7 ~ 3 : 7) によって精製して、C-18のO-アセチル誘導体 (470 mg、粗物質) を淡黄色の固体として生成した。ESI $[\text{M+H}]$ = 473.9 / 475.9

【0343】

ACN (1 mL) 中のC-18の上述したO-アセチル誘導体 (50 mg、105 μ mol、1.0当量) およびCs₂CO₃ (137 mg、422 μ mol、4.0当量) の混合物を30°Cで1時間攪拌し、次いで、濾過し、1 N HCl (0.1 mL) によってpH = 4にクエンチして、EtOAc (30 mL $\times$ 3) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、化合物C-18 (60 mg、粗物質) を褐色の油状物として生成した。ESI $[\text{M+H}]$ = 373.9 / 375.9

【0344】

化合物C-20。DCM (1 mL) 中のC-18 (50 mg、134 μ mol、1.0当量) およびTEA (54 mg、534 μ mol、4.0当量) の溶液に、DCM (0.5 mL) 中のTf₂O (75 mg、267 μ mol、2.0当量) を0°Cで加え、15°Cで1時間攪拌し、飽和Na₂CO₃水溶液 (1 mL) によってクエンチして、DCM (30 mL $\times$ 3) で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、C-20 (80 mg、粗物質) を褐色の油状物として生成した。ESI $[\text{M+H}]$ = 505.9 / 507.9

【0345】

化合物C-(21~27)。化合物C-14を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-(22~27)を褐色の固体として生成した。化合物C-21も同様に調製した。

【0346】

化合物45~52。方法Cを使用した化合物C-21~27のエステル加水分解は、化合物45

10

20

30

40

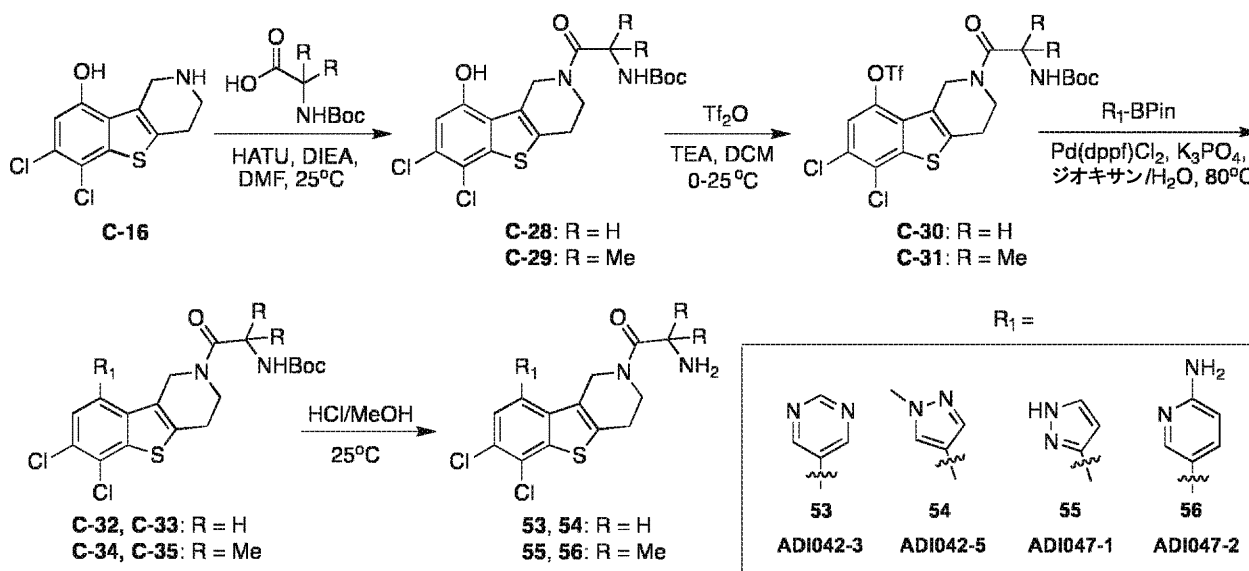
50

～52を与えた。

【0347】

3.3. 化合物53～56（スキーム3C）。化合物53～56の合成は、中間体C-16をN-Boc保護グリシンおよび2-メチルアラニンと反応させて化合物C-28およびC-29を与えることから開始した。後者の化合物をトリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させて、化合物C-30およびC-31を与え、これらは、複素環-ボロン酸誘導体とのPd触媒スズキカップリングを受けて化合物C-(32～35)を与え、その後、Boc脱保護して化合物53～56を与えた。

【0348】



スキーム3C. 化合物53～56の合成

【0349】

化合物C-28。DMF（50mL）中のC-16（484.16mg、2.38mmol、2当量）の溶液に、DIEA（461.83mg、3.57mmol、622.41μL、3当量）、6,7-ジクロロ-1,2,3,4-テトラヒドロベンゾチオフェノ[3,2-c]ピリジン-9-オール（370mg、1.19mmol、1当量、HCl）およびHATU（905.81mg、2.38mmol、2当量）を加えた。混合物を25℃で1時間攪拌し、飽和Na₂CO₃水溶液（10mL）を加え、15℃で12時間攪拌し、H₂O（20mL）で希釈し、EtOAc（15mL×3）で抽出した。有機層をブライン（5mL×3）で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：2）によって精製して、C-28（500mg、1.09mmol、収率91.38%）を黄色の油状物として生成した。ESI [M-Boc+H] = 359.1/361.0

【0350】

化合物C-30。DCM（60mL）中のC-28（500mg、1.09mmol、1当量）およびDCM（5mL）中のTEA（551mg、5mmol、5当量）およびDCM（5mL）中のTf₂O（768mg、2.72mmol、2.5当量）の0℃での混合物を、N₂雰囲気下にて25℃で1時間攪拌し、H₂O（10mL）で希釈し、DCM（30mL×3）で抽出した。有機層をブライン（10mL×3）で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：1）によって精製して、C-30（200mg、338.15μmol、収率31.07%）を白色の固体として生成した。ESI [M+Na] = 612.9/614.7

【0351】

化合物C-(32～35)。化合物C-30を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-(32～35)を白色の固体として与えた。

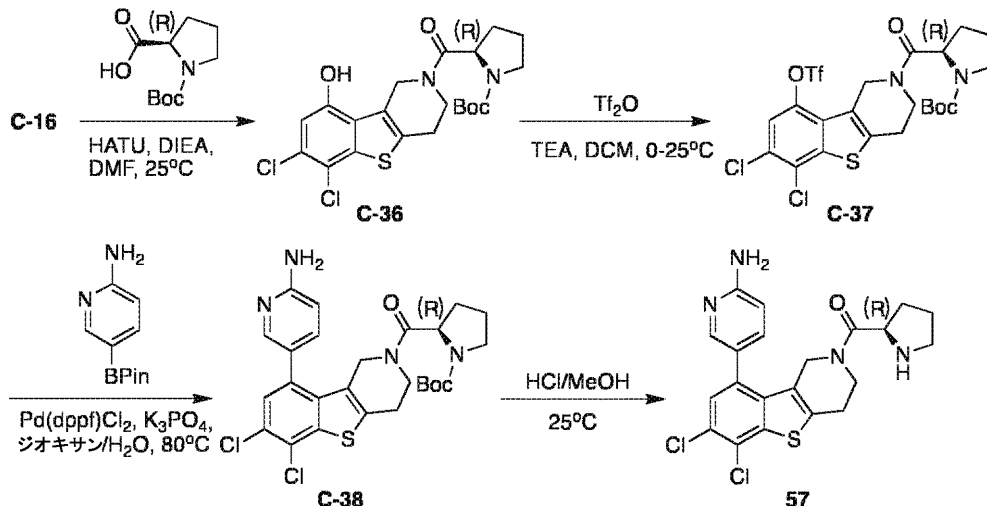
【0352】

化合物53～56。方法Bを使用したC-(32～35)のNBoc脱保護は、化合物53～56を白色の固体として与えた。

【0353】

3.4. 化合物57（スキーム3D）。57の合成は、アミンC-16とN-Boc保護(R)-プロリンとのペプチドカップリングにより化合物C-36を与えることから開始した。フェノールをTf₂Oと反応させて、トリフラートC-37を与え、後者は、2-アミノ-ピリジンボロン酸誘導体とのスズカップリングを受けて化合物C-38を与え、その後、Boc脱保護して標記生成物57を与えた（スキーム3D）。

【0354】



10

20

スキーム3D. 化合物57の合成

【0355】

化合物C-36。DMF（15mL）中のC-16（150mg、482.89μmol、1当量、HCl）の溶液に、DIEA（187mg、1mmol、3当量）、(2R)-1-tert-ブトキシカルボニルピロリジン-2-カルボン酸（208mg、966μmol、2当量）およびHATU（367mg、965μmol、2当量）を加え、25°Cで1時間攪拌し、飽和Na₂CO₃水溶液（10mL）を加え、15°Cで12時間攪拌し、H₂O（20mL）で希釈し、EtOAc（15mL×3）で抽出した。有機層をブライン（5mL×3）で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：2）によって精製して、C-36（200mg、424.27μmol、収率87.86%）を褐色の固体として生成した。ESI [M-Boc+H] = 371.0/372.9

30

【0356】

化合物C-37。DCM（4mL）中のC-36（120mg、254.56μmol、1当量）およびDCM（1mL）中のTEA（129mg、1mmol、5当量）およびDCM（1mL）中のTf₂O（180mg、636μmol、2.5当量）の0°Cでの混合物を、N₂雰囲気下にて25°Cで1時間攪拌し、濃縮し、H₂O（5mL）で希釈し、EtOAc（5mL×3）で抽出した。有機層をブライン（5mL×3）で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：1）によって精製して、C-37（100mg、165.71μmol、収率65.10%）を白色の固体として生成した。ESI [M-Boc+H] = 502.9/504.7

40

【0357】

化合物C-38。化合物C-37を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-38（9.74mg、17.79μmol、収率21.47%）を白色の固体として生成した。

50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.94 (br s, 1H), 7.47 - 7.32 (m, 2H), 6.59 (br d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.96 (br s, 2H), 4.71 - 4.20 (m, 1H), 4.00 (br d, J = 1.9 Hz, 2H), 3.92 - 3.66 (m, 2H), 3.33 (br t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.98 (br s, 2H), 2.26 - 1.93 (m, 1H), 1.91 - 1.66 (m, 3H), 1.36 - 1.10 (m, 9H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 547.1/549.1$.

【0358】

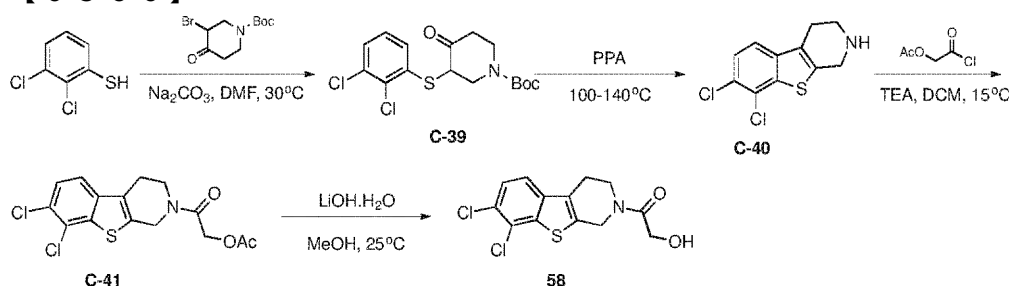
化合物57。方法Cを使用した化合物C-38のエステル加水分解は、化合物57 (15 mg、32 μmol 、収率25.01%、HCl) を白色の固体として与えた。

10

【0359】

3.5. 化合物58 (スキーム3E)。化合物58の合成は、N-Boc-3-ブロモピリドン中の臭化物と2,3-ジクロロベンゼンチオール中のチオールとの求核置換によりチオエーテルC-39を与えることから開始し、C-39は、PPA介在環化を受けてベンゾチオフラン中間体C-40を与えた。後者を2-アセトキシアセチルクロリドと反応させ、結果として生じた生成物C-41は、塩基性加水分解を受けて標的化合物58を与えた。

【0360】



20

スキーム3E. 化合物51の合成

【0361】

化合物C-39。DMF (50 mL) 中の2,3-ジクロロ-チオフェノール (5.0 g、27.9 mmol、1.0当量)、tert-ブチル 3-ブロモ-4-オキソ-ピペリジン-1-カルボキシレート (7.8 g、27.9 mmol、1.0当量) および Na_2CO_3 (5.9 g、55.9 mmol、2.0当量) の混合物を30°Cで1.5時間攪拌した。混合物を H_2O (40 mL) でクエンチし、EtOAc (50 mL $\times$ 3) で抽出し、ブライン (20 mL $\times$ 5) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (中性条件; カラム: Phenomenex Titank C18 Bulk 250 $\times$ 100 mm 10 μ ; 移動相: [水 (10 mM NH_4HCO_3)-ACN]; B%: 50%~80%、20分) によって精製して、C-39 (7.7 g、20.5 mmol、収率73.3%) を黄色の油状物として生成した。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 7.59 - 7.48 (m, 2H), 7.42 - 7.33 (m, 1H), 4.54 - 4.46 (m, 1H), 4.07 (br s, 1H), 3.94 - 3.84 (m, 1H), 3.50 (br s, 2H), 2.64 - 2.54 (m, 2H), 1.41 (br s, 9H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 320.0/322.0$

30

40

【0362】

化合物C-40。PPA (2 mL) の溶液を100°Cで30分間攪拌した。次いで、化合物C-39 (200 mg、531.5 μmol 、1.0当量) を加え、140°Cで2時間攪拌した。混合物に H_2O (10 mL) を加え、NaOH水溶液 (aq. aq.) (10 mL) でpH > 8に調整し、EtOAc (50 mL $\times$ 3) で抽出し、ブライン (20 mL $\times$ 5) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (中性条件; カラム: Phenomenex Gemini-NX C18 75 $\times$ 30 mm $\times$ 3 μm ; 移動相: [水 (10 mM NH_4HCO_3)-ACN]; B%: 35%~65%、8分) によって精製して、C-40 (27 mg、103.2 μmol 、収率19.4%、純度100.0%) を黄色の固体として生成した。

50

^1H NMR (400MHz,

DMSO-d₆) δ = 7.72 - 7.59 (m, 2H), 3.99 (br s, 2H), 3.04 (br s, 2H), 2.71 (br s, 2H). ESI [M+H]

= 258.0/ 260.0

【0363】

化合物C-41。DCM (3mL) 中のC-40 (170mg、658.5 μ mol、1.0当量) およびTEA (200mg、2.0mmol、3.0当量) の溶液に、2-アセトキシアセチルクロリド (539mg、4.0mmol、6.0当量) を加えた。混合物を15℃で1時間攪拌した。混合物をH₂O (5mL) によってクエンチし、DCM (10mL $\times$ 3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna C18 150 $\times$ 30mm $\times$ 5 μ m; 移動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 28%~58%、8分) によって精製して、C-41 (130mg、361.1 μ mol、収率54.8%、純度99.5%) を褐色の固体として生成した。

^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.75 - 7.68 (m, 1H), 7.67 -

7.62 (m, 1H), 4.96 - 4.84 (m, 2H), 4.83 - 4.76 (m, 2H), 3.87 - 3.72 (m, 2H), 2.97 - 2.78 (m, 2H),

2.08 (s, 3H). ESI [M+H] = 357.9/ 359.9

【0364】

化合物58。MeOH (2mL) 中のC-41 (100mg、279.1 μ mol、1.0当量) の溶液に、LiOH $\cdot$ H₂O (35mg、837.4 μ mol、3.0当量) を加えた。混合物を25℃で12時間攪拌した。混合物を濃縮し、H₂O (5mL) で希釈し、DCM (10mL $\times$ 3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna 80 $\times$ 30mm $\times$ 3 μ m; 移動相: [水(0.1%TFA)-ACN]; B%: 23%~53%、8分) によって精製して、化合物58 (32mg、101.2 μ mol、収率36.3%、純度100.0%) を淡黄色の固体として生成した。

【0365】

3.6. 化合物59~66 (スキーム3F)。化合物59~66を調製するために、本発明者らは、上記の中間体C-7およびC-8から開始し、これらを1-Boc-3-ブロモ-4-ピリミジノン (pyrimidinone) と反応させて、チオエーテルC-42およびC-43を与えた。アルコールの酸化は、C-44およびC-45でケトンを与え、リン酸介在環化は、重要なベンゾチオフラン誘導体C-46およびC-47を与えた。低温でCHCl₃中BBr₃を使用してメトキシ基を脱保護し、結果として生じた生成物C-48およびC-49をトリフラートC-50およびC-51に変換した。トリフラートと適切な複素環-ボロン酸誘導体とのスズキカップリングは、化合物C-52およびC-(53~59)を与え、後者の化合物中の酢酸除去は、標的生成物59~66を与えた (スキーム3F)。

【0366】

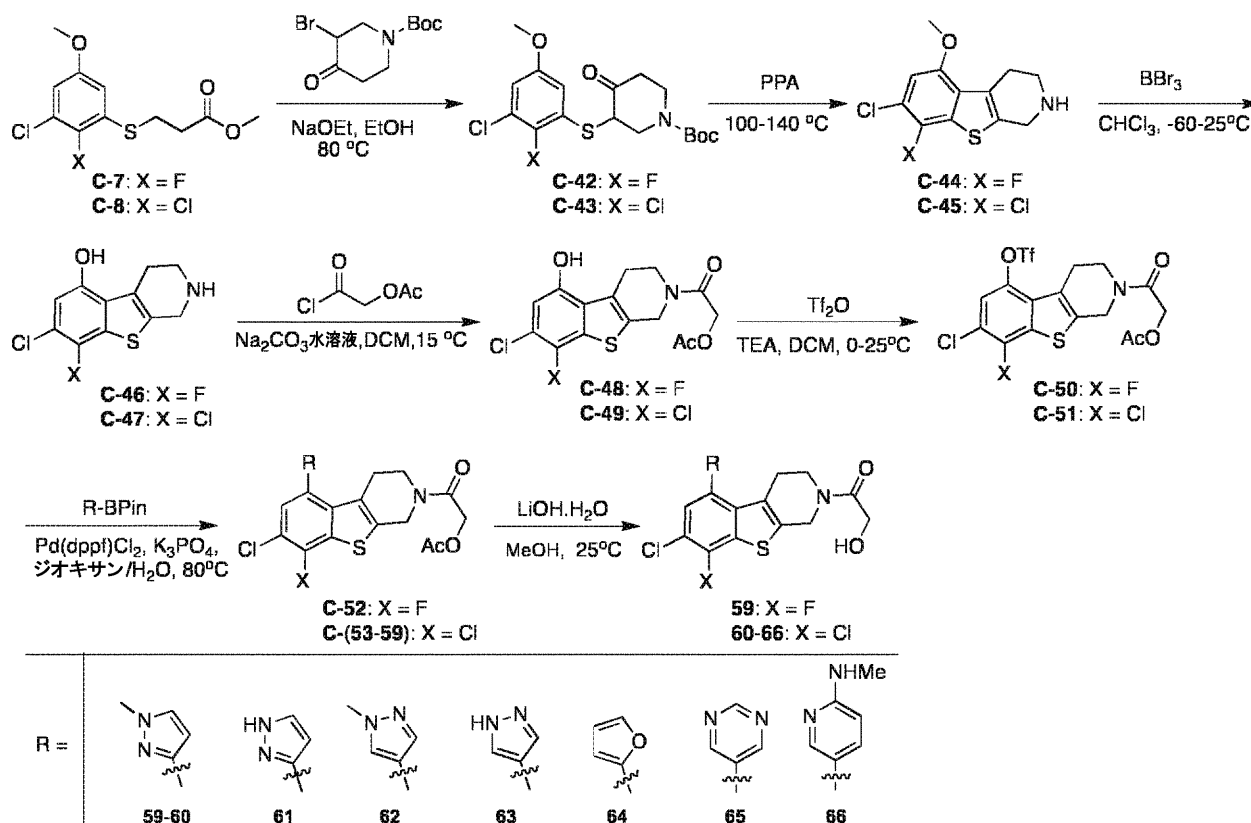
10

20

30

40

50



10

20

スキーム3F. 化合物59～66の合成

【0367】

化合物C-43. EtOH (2 mL) 中のC-8 (100 mg、338.8 μ mol、1.0当量) の混合物に、EtONa (69 mg、1.0 mmol、3.0当量) を加えた。混合物を25℃で1時間攪拌した。混合物に、tert-ブチル 3-ブromo-4-オキソ-ピペリジン-1-カルボキシレート (283 mg、1.0 mmol、3.0当量) を加え、25℃で1時間攪拌した。混合物をH₂O (10 mL) でクエンチし、EtOAc (10 mL $\times$ 3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取TLC (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル=5:1) によって精製して、化合物C-43 (100 mg、246.1 μ mol、収率72.7%) を無色の油状物として生成した。

30

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 7.19 (br s, 1H), 7.11 (d, J=2.8 Hz,

1H), 4.05 (q, J=7.2 Hz, 2H), 3.83 (br s, 3H), 3.65 - 3.58 (m, 2H), 3.52 (br dd, J=7.0, 13.7 Hz,

2H), 3.20 - 3.13 (m, 1H), 1.41 (d, J=5.9 Hz, 9H). ESI [M-tBu+H] = 306.0/ 308.0.

【0368】

化合物C-45. PPA (0.5 mL) の溶液を100℃で30分間攪拌した。次いで、C-43 (20 mg、49.2 μ mol、1.0当量) を加え、140℃で2時間攪拌した。反応混合物をMeOH (5 mL) で希釈し、分取HPLC (カラム: Phenomenex Luna 80 $\times$ 30 mm $\times$ 3 μ m; 移動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 15%~45%、8分) によって精製して、C-45 (1 mg、4.2 μ mol、収率8.4%、純度98.0%) を淡黄色の固体として生成した。

40

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ =

7.20 (s, 1H), 4.38 (br s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.81 (br s, 2H), 3.17 (br d, J=5.4 Hz, 2H). ESI [M+H]

= 287.9/ 289.9.

【0369】

化合物C-47. CHCl₃ (10 mL) 中のC-45 (820 mg、2.9 mmol、1.0当量) の混合

50

物に、 BBr_3 (2.1g、8.5mmol、3.0当量) を -60°C で加えた。混合物を 25°C で12時間攪拌し、次いで、飽和 Na_2CO_3 水溶液 (20mL) によって $\text{pH} > 8$ までクエンチして、DCM (15mL $\times$ 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム: Waters Xbridge Prep OBD C18 150 $\times$ 40mm $\times$ 10 μm ; 移動相: [水($\text{NH}_3\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4\text{HCO}_3$)-ACN]; B%: 20%~50%、8分) によって精製して、C-47 (110mg、367.6 μmol 、収率12.9%、純度91.6%) を褐色の固体として生成した。

^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 6.89 (s, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.02 - 2.94 (m, 4H).

ESI [M+H] = 273.9/ 275.9.

10

【0370】

化合物C-49。DCM (4mL) および飽和 Na_2CO_3 水溶液 (4mL) 中のC-47 (390mg、1.26mmol、1当量、HCl) の溶液に、(2-クロロ-2-オキソ-エチル)アセタート (514.26mg、3.77mmol、404.93 μL 、3当量) を加えた。混合物を 15°C で3時間攪拌した。混合物を H_2O (20mL) で希釈し、EtOAc (30mL $\times$ 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO_2 、DCM:THF=1:0~5:1) によって精製して、C-49 (280mg、748.19 μmol 、収率59.59%) を褐色の固体として生成した。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.70 (s, 1H),

6.89 (s, 1H), 4.98 - 4.84 (m, 2H), 4.83 - 4.65 (m, 2H), 3.72 - 3.56 (m, 2H), 3.21 - 2.97 (m, 2H),

2.09 (s, 3H). ESI [M-H] = 372.0 /374.0.

20

【0371】

化合物C-51。DCM (1mL) 中のC-49 (40mg、106.88 μmol 、1当量) およびTEA (216.31mg、2.14mmol、20当量) の混合物を脱気して、 N_2 を3回パージし、次いで、DCM (0.5mL) 中の Tf_2O (90.47mg、320.65 μmol 、3当量) を 0°C で加え、次いで、混合物を N_2 雰囲気下にて 25°C で12時間攪拌した。混合物を H_2O (10mL) で希釈し、DCM (15mL $\times$ 3) で抽出した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮して、C-51 (130mg、粗物質) を褐色の固体として生成した。ESI [M+H] = 506.0/508.0

30

【0372】

化合物C-(52~59)。化合物C-50~51を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-52~59を褐色の固体として生成した。

【0373】

化合物59~66。方法Cを使用した化合物C(52~59)のエステル加水分解は、化合物59~66を与えた。

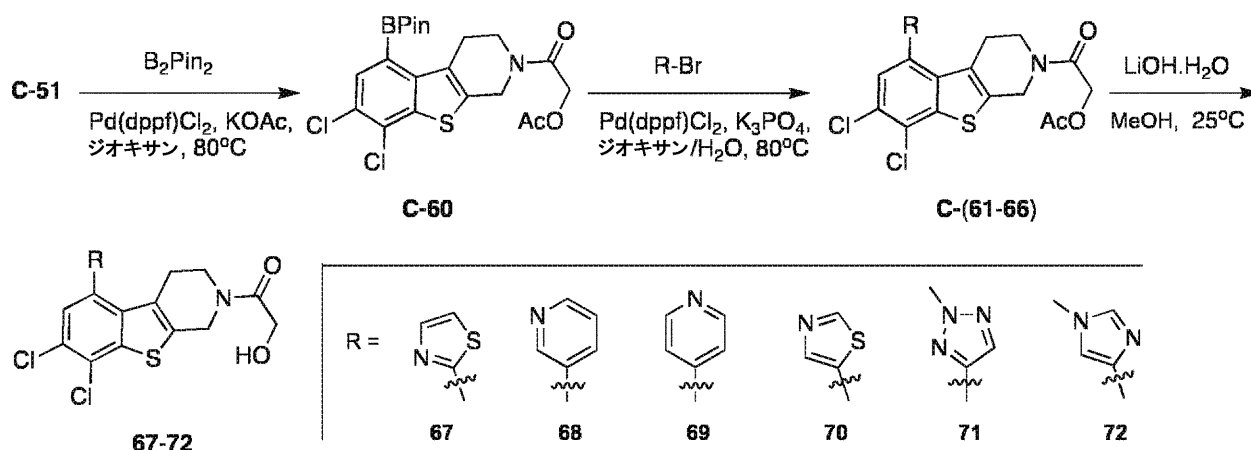
【0374】

3.7. 化合物67~72 (スキーム3G)。67~72の合成は、トリフラートC-51とジピナコラト-ジボラン (B_2Pin_2) を一緒に反応させ、続いて、結果として生じたボロン酸誘導体C-60とプロモ複素環とのスズキカップリングにより化合物C-(61~66)を与え、エステル加水分解して標記生成物を与えることによって達成された。

40

【0375】

50



10

スキーム3G. 化合物67～72の合成

【0376】

化合物C-60。ジオキサン（20mL）中のC-51（660mg、1.30mmol、1当量）、4,4,5,5-テトラメチル-2-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-1,3,2-ジオキサボロラン（993.08mg、3.91mmol、3当量）、Pd(dppf)Cl₂（95.38mg、130.36μmol、0.1当量）、KOAc（383.81mg、3.91mmol、3当量）の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて80℃で12時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残留物を、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：0～0：1）によって精製して、C-60（430mg、888.06μmol、収率68.13%）を白色の固体として生成した。ESI [M+H]⁺ = 483.9/485.7

20

【0377】

化合物C-(61～66)。化合物C-60を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-(61～66)を白色の固体として生成した。

【0378】

化合物67～72。方法Cを使用した化合物C-54～56のエステル加水分解は、化合物67～72を与えた。

30

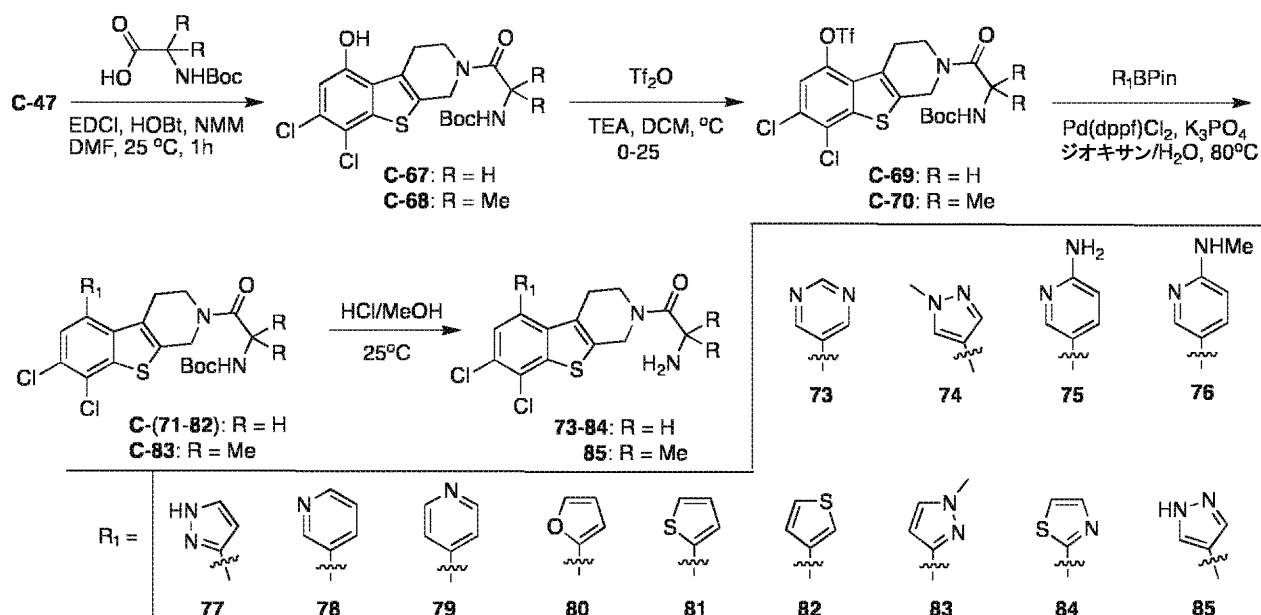
【0379】

3.8. 化合物73～84（スキーム3H）。化合物73～84の合成は、化合物C-47から開始し、後者をN-Boc保護グリシンおよび2-メチルアラニンと反応させることから達成された。結果として生じたアミド-アルコールC-67およびC-68を、トリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させることによってトリフラートC-69およびC-70に変換し、その後、複素環-ボロン酸誘導体（R₁BPin）で処理して化合物C-(71～83)を与えた。最後に、C-(71～83)をメタノール性HCl中で撹拌して、73～85をHCl塩として与えた。

【0380】

40

50



10

スキーム3H. 化合物73～84の合成

【0381】

化合物C-67。DMF (1mL) 中のC-49 (10mg、36.5 μ mol、1.0当量)、N-bocグリシン (19mg、109.4 μ mol、3.0当量) およびNMM (15mg、145.9 μ mol、4.0当量) の混合物に、EDCI (10mg、54.7 μ mol、1.5当量) およびHOBt (7mg、54.7 μ mol、1.5当量) を加えた。混合物を25 $^\circ$ Cで1時間攪拌した。反応混合物を濾過し、分取HPLC (TFA条件; カラム: Phenomenex Luna 80 $\times$ 30mm $\times$ 3 μ m; 移動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 40%~75%、8分) によって精製して、C-67 (8mg、17.8 μ mol、収率48.7%、純度100.0%) を白色の固体として生成した。

^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ = 10.70 (s, 1H), 6.96 - 6.75 (m, 2H), 4.83 - 4.67 (m, 2H), 3.98 - 3.83 (m, 2H), 3.80 - 3.65 (m, 2H), 3.15 - 2.97 (m, 2H), 1.39 (s, 9H). ESI [M-tBu+H] = 374.9/376.9.

20

30

【0382】

化合物C-69。DCM (1.0mL) 中のC-67 (75mg、173.9 μ mol、1.0当量) およびTEA (352mg、3.5mmol、20.0当量) の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、DCM (0.5mL) 中のTf₂O (245mg、869.4 μ mol、5.0当量) を0 $^\circ$ Cで加え、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて25 $^\circ$ Cで1時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル: 酢酸エチル=3:2~3:2) によって精製して、C-69 (93mg、165.1 μ mol、収率95%) を褐色の固体として生成した。ESI [M-H] = 561.0/563.0

40

【0383】

化合物C-(71~83)。化合物C-69を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-71~82を白色の固体として生成した。化合物C-83も同様に調製した。

【0384】

化合物73~85。方法Bを使用したC-(71~83)のNBoc脱保護は、化合物73~85を白色の固体として与えた。

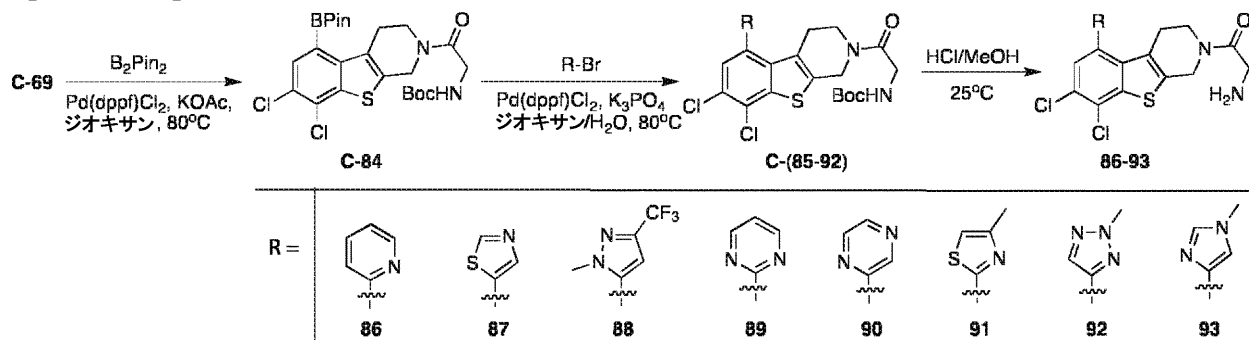
【0385】

3.9. 化合物86~93 (スキーム3I)。化合物86~93を調製するために、トリフレートC-69を、ボロン酸誘導体C-84に変換し、必要に応じてプロモ複素環と反応させ、化合物C-(85~92)を与えた。後者は、メタノール性HClを使用したN-Boc脱保護を受けて

50

、標記生成物を与えた。

【0386】



10

スキーム3I. 化合物86～93の合成

【0387】

化合物C-84。ジオキサン（50 mL）中のC-69（1.6 g、2.84 mmol、1当量）、4,4,5,5-テトラメチル-2-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-1,3,2-ジオキサボロラン（1.44 g、5.68 mmol、2当量）、Pd(dppf)Cl₂（207.80 mg、283.99 μmol、0.1当量）、KOAc（836.15 mg、8.52 mmol、3当量）の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、次いで、混合物をN₂雰囲気下にて80℃で12時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残留物を、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：1～1：2）によって精製して、C-84（1.5 g、2.77 mmol、収率97.58%）を白色の固体として生成した。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.76 (s, 1H), 6.90 (br d, *J* = 4.9 Hz,

1H), 4.94 - 4.85 (m, 2H), 3.83 (br d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 3.69 - 3.65 (m, 2H), 3.10 - 2.94 (m, 2H),

1.44 (br s, 12H), 1.22 (s, 4H), 1.13 (s, 5H).

20

【0388】

化合物C-(85～92)。化合物C-84を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-(85～92)を白色の固体として生成した。

30

【0389】

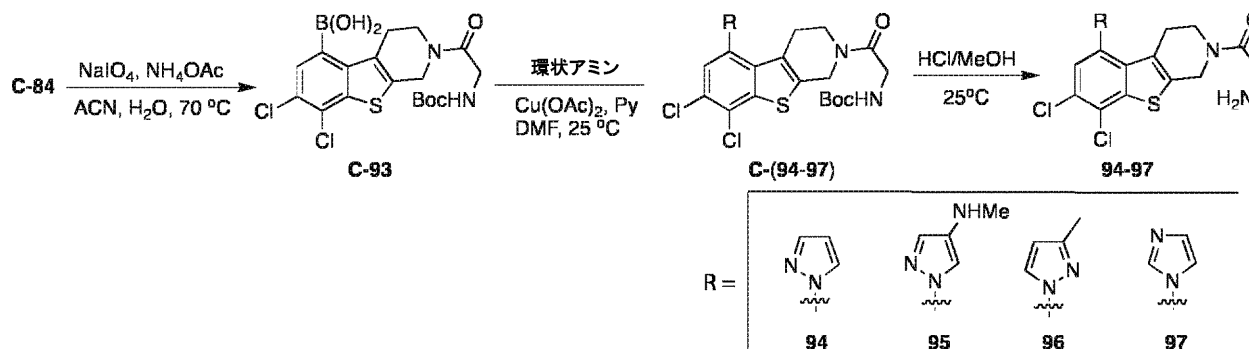
化合物86～93。方法Bを使用したC-(85～92)のNBoc脱保護は、化合物86～93を白色の固体として与えた。化合物C-(85～92)。化合物C-84を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、C-(85～92)を白色の固体として生成した。

【0390】

化合物86～93。方法Bを使用したC(85～92)のNBoc脱保護は、化合物86～93を白色の固体として与えた。

【0391】

3.10. 化合物94～97（スキーム3J）



40

50

スキーム3J. 化合物94～97の合成

【0392】

化合物C-93。MeCN (15mL) およびH₂O (6mL) 中のC-84 (1g、1.85mmol、1当量) の溶液に、NaIO₄ (1.58g、7.39mmol、409.48uL、4当量) およびNH₄OAc (569.62mg、7.39mmol、4当量) を加えた。混合物を70℃で12時間撹拌した。反応混合物を濾過し、分取HPLC (カラム: Phenomenex luna C18 250×50mm×10um; 移動相: [水(TFA)-ACN]; B%: 30%～70%、10分) によって精製して、C-93 (350mg、762.28umol、収率41.26%) を淡黄色の固体として生成した。LCMS: m/z 458.9 [M+H]⁺

【0393】

化合物C-(94～97)。DMF (2mL) 中のC-93 (30mg、65.34umol、1当量)、置換環状第二級アミン (98.01umol、1.5当量)、Cu(OAc)₂ (35.60mg、196.02umol、3当量)、Py (25.84mg、326.70umol、5当量) の混合物を脱気して、O₂を3回パージし、次いで、混合物をO₂雰囲気下にて25℃で1時間撹拌した。反応混合物をH₂O (2mL) で希釈し、EtOAc (5mL×3) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた。残留物を、分取HPLC (カラム: Waters Xbridge Prep OBD C18 150×40mm×10um; 移動相: [水(NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 50%～85%、8分) によって精製して、C-(94～97)を白色の固体として生成した。

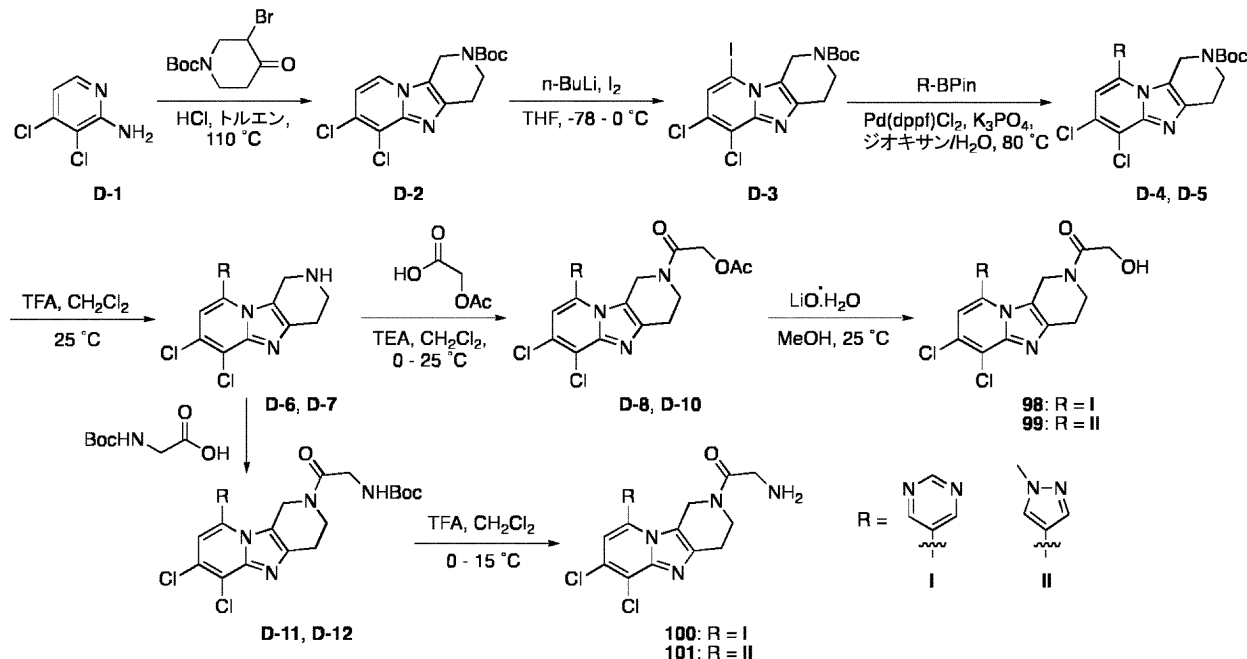
【0394】

化合物94～97。方法Bを使用した中間体C-(94～97)のNBoc脱保護は、化合物94～97を白色の固体として与えた。

【0395】

4. ピリドイミダゾール誘導体

4.1. 化合物98～101 (スキーム4A)



スキームJ. 化合物97～101の合成

【0396】

化合物D-2。トルエン (10mL) 中のD-1 (980mg、6.0mmol、1.0当量)、tert-ブチル 3-ブromo-4-オキソ-ピペリジン-1-カルボキシレート (5.0g、18.0mmol、3.0当量) およびHCl (1M、601uL、0.1当量) の混合物を110℃で24時間撹拌した。混合物をH₂O (10mL) でクエンチし、EtOAc (50mL×3) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥さ

せ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与えた、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝1：0～78：22）によって精製して、D-2（1.1g、3.2mmol、収率53.5%）を白色の固体として生成した。

¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.41 (d, J=7.3 Hz, 1H), 7.16 (d, J=7.3 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.73 (t, J=5.8 Hz, 2H), 2.80 (br t, J=5.6 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H). ESI [M+H] = 342.1 / 344.1

【0397】

化合物D-3。THF（4mL）中のD-2（330mg、964.3μmol、1.0当量）の混合物を脱気して、N₂を3回パージし、*n*-BuLi（2.5M、578μL、1.5当量）を-78℃で加え、0.5時間攪拌し、次いで、混合物にI₂（367mg、1.4mmol、1.5当量）を加え、N₂雰囲気下にて0℃で1時間攪拌した。混合物を飽和NH₄Cl水溶液（5mL）によってクエンチし、EtOAc（20mL×3）で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を与え、カラムクロマトグラフィー（SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル＝6：1～4：1）によって精製して、D-3（350mg、748μmol、収率77.5%）を黄色の固体として生成した。

¹H NMR

(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.62 (s, 1H), 5.25 (br s, 2H), 3.67 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 2.78 (br t, J = 5.3 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). ESI [M+H] = 467.9 / 469.8.

【0398】

化合物D-4およびD-5。化合物D-3を、方法Aを使用して置換ボロン酸エステル誘導体とカップリングさせて、D-4およびD-5を白色の固体として生成した。同様に

【0399】

tert-ブチル 10,11-ジクロロ-13-ピリミジン-5-イル-1,4,8-トリアザトリシクロ[7.4.0.0^{2,7}]トリデカ-2(7),8,10,12-テトラエン-4-カルボキシラート、D-4（70mg、166.6μmol、収率91.7%）。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.42 (s, 1H), 9.14 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 3.78 -

3.72 (m, 2H), 3.60 (br s, 2H), 2.80 (br t, J = 5.3 Hz, 2H), 1.41 - 1.27 (m, 9H). ESI [M+H] = 420.2 / 422.1.

【0400】

褐色の油状物としての、*tert*-ブチル 10,11-ジクロロ-13-（1-メチルピラゾール-4-イル）-1,4,8-トリアザトリシクロ[7.4.0.0^{2,7}]トリデカ-2(7),8,10,12-テトラエン-4-カルボキシラート、D-5（70mg、165.8μmol、収率91.3%）。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.17 (s, 1H), 7.80 (br d, J = 2.2

Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 3.96 (br s, 2H), 3.69 - 3.60 (m, 5H), 2.86 - 2.75 (m, 2H), 1.37 (br s, 9H).

ESI [M+H] = 422.2 / 424.2

【0401】

化合物D6およびD7。DCM（1.5mL）中のD-4およびD-5（65mg、154.6μmol、1.0当量）の混合物に、TFA（0.5mL）を0℃で加えた。混合物を25℃で1時間攪拌した。反応物を濃縮して、D6およびD7（70mg、粗物質、TFA）を褐色の油状物として生成し、これをさらに精製することなく次の工程に使用した。

【0402】

化合物D8およびD-10。DCM（1mL）中のD6およびD7（60mg、138.2μmol、1.0当量、TFA）とTEA（70mg、690.9μmol、5当量）の混合物に、（2-クロロ-2-オキソ

-エチル)アセタート (28mg、207.3umol、1.5当量) を0℃で加えた。混合物を25℃で1時間攪拌した。混合物をNa₂CO₃ (2mL) でクエンチし、EtOAc (3mL×5) で抽出し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、D8およびD-10 (50mg、粗物質) を褐色の固体として生成し、これをさらに精製することなく次の工程に使用した。

【0403】

化合物98および99。方法Cを使用した化合物D8およびD-10のエステル加水分解は、化合物98および99を与えた。

【0404】

化合物D11およびD-12。DMF (1mL) 中のD6/D7 (25mg、69.7umol、1.0当量、HCl) および2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)酢酸 (24mg、139.4umol、2.0当量) の混合物に、NMM (28mg、278.8umol、4.0当量)、EDCI (20mg、104.6umol、1.5当量) およびHOBT (14mg、104.6umol、1.5当量) を加えた。混合物を25℃で1時間攪拌した。混合物をH₂O (3mL) でクエンチし、EtOAc (3mL×5) で抽出し、有機層をブライン (3mL×3) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、D11およびD-1 (25mg、粗物質) を褐色の固体として生成し、これをさらに精製することなく次の工程に使用した。

【0405】

化合物100および101。DCM (0.9mL) 中のD11/D-12 (20mg、41.9umol、1.0当量) の混合物に、TFA (0.3mL) を0℃で加え、次いで、25℃で1時間攪拌した。反応物を濃縮し、飽和Na₂CO₃水溶液 (5mL) で希釈し、EtOAc (5mL×5) で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過して、濃縮し、分取HPLC (カラム: Waters Xbridge BEH C18 100×30mm×10um; 移動相: [水 (NH₄HCO₃) -ACN] ; B% : 15%~45%、10分) によって精製して、100および101 (2mg、4.3umol、収率10.3%、純度100.0%) を淡黄色の固体として生成した。

【0406】

(表1) スペクトルデータ

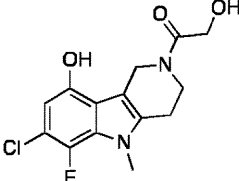
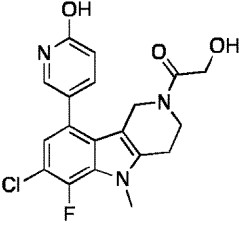
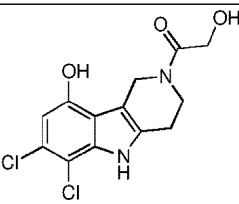
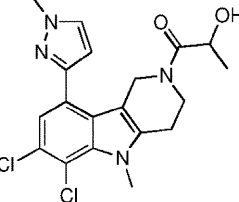
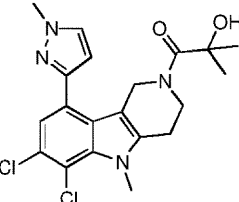
10

20

30

40

50

化合物 番号	構造	スペクトルデータ
1		^1H NMR (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 9.91 - 9.82 (m, 1H), 6.34 (d, J=5.0 Hz, 1H), 4.78 - 4.64 (m, 2H), 4.26 - 4.10 (m, 2H), 3.90 - 3.81 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.70 (br t, J=5.5 Hz, 1H), 2.89 - 2.73 (m, 2H). ESI [M+H] = 313.1/ 315.0.
2		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.53 - 7.46 (m, 1H), 7.42 (br s, 1H), 6.95 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.31 - 4.10 (m, 3H), 4.00 - 3.89 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.75 - 3.65 (m, 2H), 2.92 - 2.78 (m, 2H). LCMS: m/z 390.1 [M+H] ⁺ .
3		^1H NMR (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 11.31 - 11.19 (m, 1H), 10.10 - 10.01 (m, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.66 - 4.61 (m, 1H), 4.24 - 4.13 (m, 2H), 3.85 - 3.59 (m, 2H), 2.85 - 2.69 (m, 2H). ESI [M+H] = 315.0/ 317.0.
4		^1H NMR (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.83 (s, 1H), 7.23 (d, J=11.7 Hz, 1H), 6.59 - 6.49 (m, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.54 - 4.48 (m, 0.5H), 4.42 (br d, J=5.1 Hz, 1H), 4.30 (q, J=6.7 Hz, 0.5H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (d, J=9.2 Hz, 3H), 3.91 - 3.77 (m, 2H), 2.96 - 2.78 (m, 2H), 1.23 - 1.11 (m, 3H). ESI [M+H] = 407.0/ 409.0.
5		^1H NMR (400MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.81 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.50 (d, J=2.2 Hz, 1H), 4.89 (br s, 1H), 4.43 - 4.19 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (br s, 2H), 2.97 - 2.76 (m, 2H), 1.39 - 1.16 (m, 6H). ESI [M+H] = 421.0/ 423.0.

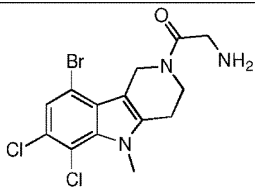
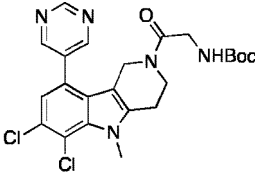
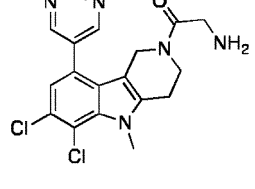
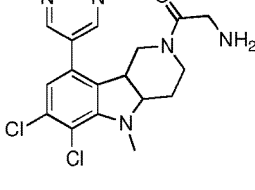
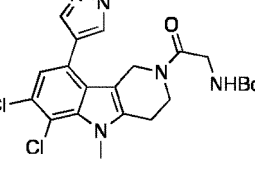
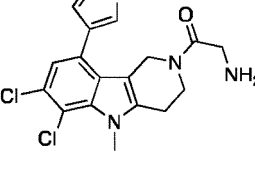
10

20

30

40

50

6		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.11 (br s, 2H), 7.49 - 7.44 (m, 1H), 5.04 - 4.83 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 4.02 - 3.98 (m, 0.5H), 3.95 (s, 3H), 3.94 - 3.89 (m, 0.5H), 3.76 (br t, J =5.6 Hz, 1H), 3.00 - 2.77 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 391.9/389.9$.
7		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.11 (br s, 2H), 7.49 - 7.44 (m, 1H), 5.04 - 4.83 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 4.02 - 3.98 (m, 0.5H), 3.95 (s, 3H), 3.94 - 3.89 (m, 0.5H), 3.76 (br t, J =5.6 Hz, 1H), 3.00 - 2.77 (m, 2H). LCMS: m/z 391.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
8		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 9.33 (s, 1H), 8.99 - 8.88 (m, 2H), 7.30 (s, 1H), 4.02 (s, 4H), 3.90 - 3.68 (m, 3H), 3.41 (br s, 2H), 2.96 - 2.80 (m, 2H). LCMS: m/z 390.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
9		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 8.06 (br s, 2H), 7.36 - 7.23 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.59 - 4.44 (m, 2H), 4.04 (br s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.95 (br s, 1H), 3.79 (br s, 1H), 3.03 - 2.81 (m, 3H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 392.0/394.0$.
10		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.00 - 7.86 (m, 1H), 7.67 - 7.49 (m, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.83 - 6.63 (m, 1H), 4.34 - 4.13 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.86 - 3.71 (m, 4H), 2.91 - 2.73 (m, 2H), 1.35 (s, 9H). LCMS: m/z 492.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
11		^1H NMR (400 MHz, メタノール- d_4) δ = 7.75 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.56 (br d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.14 (s, 1H), 4.09 (br d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.01 - 3.98 (m, 6H), 3.95 (br t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.78 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.60 - 3.50 (m, 1H), 2.93 - 2.82 (m, 2H). LCMS: m/z 392.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.27 - 8.13 (m, 1H), 7.86 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.06 (br dd, J = 5.6, 13.4 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.69 - 3.69 (m, 1H), 3.79 - 3.58 (m, 1H), 3.57 - 3.40 (m, 2H), 3.17 - 3.09 (m, 1H), 3.06 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 2.97 - 2.85 (m, 1H), 2.78 (br dd, J = 8.8, 13.8 Hz,

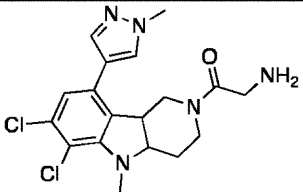
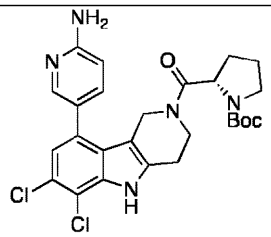
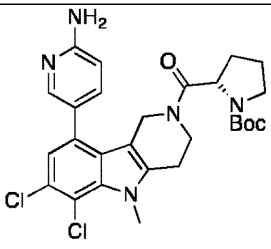
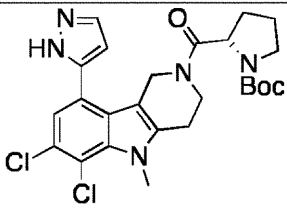
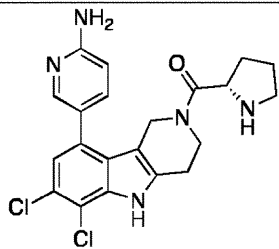
10

20

30

40

50

12		^1H , 2.11 - 2.03 (m, 1H), 1.95 - 1.87 (m, 1H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 394.0 / 396.0$.
13		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 11.36$ (br s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.44 (br d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.58 (br d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.86 (br s, 2H), 4.65 (br s, 1H), 4.41 - 4.22 (m, 1H), 4.11 (br s, 1H), 3.92 - 3.68 (m, 2H), 3.37 - 3.25 (m, 2H), 2.86 (br s, 2H), 1.77 (br s, 2H), 1.38 (br s, 2H), 1.35 - 1.01 (m, 9H). LCMS: m/z 530.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
14		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.93$ (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.58 (br d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.88 (br s, 2H), 4.09 (br s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.93 - 3.74 (m, 2H), 3.36 - 3.27 (m, 2H), 3.15 (br s, 2H), 2.86 (br s, 2H), 1.78 (br s, 3H), 1.45 - 1.38 (m, 1H), 1.36 - 1.09 (m, 9H). LCMS: m/z 544.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
15		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 13.21 - 12.65$ (m, 1H), 7.89 - 7.59 (m, 1H), 7.28 - 7.11 (m, 1H), 6.61 - 6.36 (m, 1H), 4.54 - 4.13 (m, 2H), 4.10 - 3.92 (m, 3H), 3.85 - 3.67 (m, 1H), 3.40 - 3.24 (m, 2H), 3.22 - 3.16 (m, 2H), 2.93 - 2.85 (m, 2H), 1.87 - 1.66 (m, 3H), 1.47 - 1.40 (m, 1H), 1.38 - 1.17 (m, 9H). LCMS: m/z 518.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
16		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 11.95 - 11.86$ (m, 1H), 10.27 - 10.11 (m, 1H), 8.42 (br d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 8.14 - 8.08 (m, 1H), 8.02 (dd, $J = 2.0, 9.1$ Hz, 1H), 7.20 - 7.14 (m, 2H), 4.72 - 4.64 (m, 1H), 4.37 - 4.30 (m, 1H), 4.22 (br d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 3.98 - 3.64 (m, 2H), 3.26 - 3.13 (m, 2H), 3.05 - 2.95 (m, 1H), 2.94 - 2.87 (m, 1H), 2.48 - 2.38 (m, 1H), 2.00 - 1.67 (m, 3H). LCMS: m/z 430.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10

20

30

40

50

17		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.91 (br s, 1H), 7.48 - 7.35 (m, 1H), 7.08 - 6.98 (m, 1H), 6.59 - 6.49 (m, 1H), 6.19 - 6.05 (m, 2H), 4.27 - 4.01 (m, 3H), 3.98 (d, J = 3.1 Hz, 3H), 3.83 (br d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.64 - 3.57 (m, 1H), 3.02 - 2.72 (m, 5H), 1.72 - 1.48 (m, 3H), 1.24 (s, 1H). LCMS: m/z 444.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
18		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.84 - 9.69 (m, 1H), 8.54 - 8.31 (m, 1H), 7.89 - 7.78 (m, 1H), 7.31 - 7.19 (m, 1H), 6.63 - 6.48 (m, 1H), 4.71 - 4.62 (m, 1H), 4.51 - 4.32 (m, 3H), 4.20 - 4.09 (m, 1H), 4.00 (d, J = 1.3 Hz, 3H), 3.84 (br t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.01 - 2.83 (m, 3H), 2.04 - 1.65 (m, 4H). LCMS: m/z 418.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
19		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.85 (s, 1H), 8.12 (br d, J = 1.9 Hz, 2H), 8.02 (br d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.71 - 7.63 (m, 1H), 7.58 (br dd, J = 2.2, 7.2 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.09 (br d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.26 (s, 2H), 3.95 - 3.87 (m, 2H), 2.96 (br s, 2H), 1.30 - 1.25 (m, 2H), 1.19 - 1.10 (m, 2H). LCMS: m/z 416.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
20		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.04 (br d, J = 2.8 Hz, 1H), 11.72 - 11.43 (m, 1H), 7.90 - 7.76 (m, 1H), 7.74 - 7.28 (m, 2H), 7.21 (s, 1H), 6.57 (br s, 1H), 4.87 - 4.43 (m, 2H), 4.26 - 3.93 (m, 2H), 2.86 (br s, 2H), 1.25 (br s, 6H). LCMS: m/z 392.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
21		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 7.71 - 7.59 (m, 1H), 7.53 (br d, J =7.9 Hz, 1H), 4.83 - 4.71 (m, 1H), 4.70 - 4.56 (m, 2H), 4.33 - 4.20 (m, 2H), 3.94 (br s, 1H), 3.79 (br s, 1H), 3.03 - 2.86 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 300.0/302.0$.
24		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.89 - 7.80 (m, 1H), 7.74 - 7.64 (m, 1H), 6.79 (dd, J = 1.8, 17.2 Hz, 1H), 4.75 (br d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.19 (br d, J = 13.9 Hz, 2H), 4.00 - 3.93 (m, 3H), 3.91 - 3.72 (m, 2H), 3.01 - 2.87 (m, 2H). LCMS: m/z 380.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

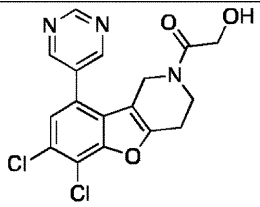
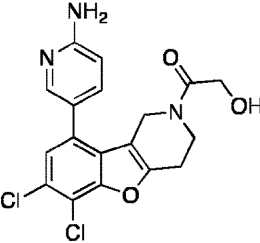
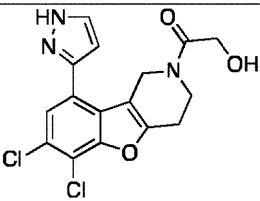
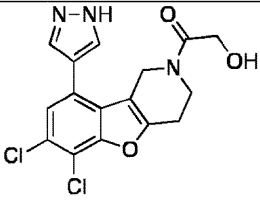
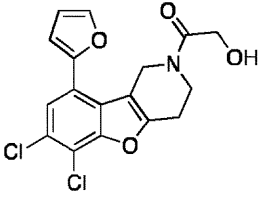
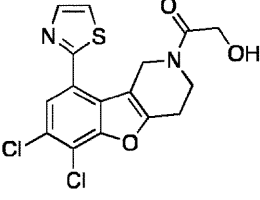
10

20

30

40

50

25		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.34 (s, 1H), 9.03 (s, 2H), 7.69 (s, 1H), 4.84 - 4.64 (m, 1H), 4.26 - 4.06 (m, 3H), 3.98 - 3.81 (m, 1H), 3.77 - 3.65 (m, 1H), 3.08 - 2.83 (m, 2H). LCMS: m/z 377.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
26		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.19 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.05 (br d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.08 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.30 (br s, 1H), 4.20 (br s, 2H), 4.09 - 4.01 (m, 1H), 3.89 - 3.81 (m, 1H), 3.75 (br s, 1H), 3.04 - 2.90 (m, 2H). LCMS: m/z 392.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
28		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.37 - 13.07 (m, 1H), 7.88 (br s, 1H), 7.74 - 7.59 (m, 1H), 6.87 - 6.74 (m, 1H), 4.74 - 4.65 (m, 2H), 4.23 - 4.11 (m, 2H), 3.98 - 3.69 (m, 2H), 3.02 - 2.92 (m, 2H). LCMS: m/z 366.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
29		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.88 (br s, 2H), 7.43 - 7.33 (m, 1H), 4.41 (br s, 2H), 4.15 (br s, 2H), 3.83 (br s, 2H), 2.97 (br s, 2H). LCMS: m/z 366.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
30		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.98 - 7.88 (m, 1H), 7.86 - 7.75 (m, 1H), 7.07 (br d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.77 - 6.66 (m, 1H), 4.80 - 4.70 (m, 2H), 4.23 (br dd, J = 5.8, 14.4 Hz, 2H), 3.81 - 3.62 (m, 2H), 3.02 - 2.77 (m, 2H). LCMS: m/z 366.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
31		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.18 - 8.10 (m, 1H), 8.05 (br d, J = 3.1 Hz, 1H), 7.96 - 7.85 (m, 1H), 4.76 - 4.71 (m, 2H), 4.31 - 4.16 (m, 2H), 4.01 - 3.91 (m, 1H), 3.82 (br t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.13 - 2.97 (m, 2H). LCMS: m/z 383.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

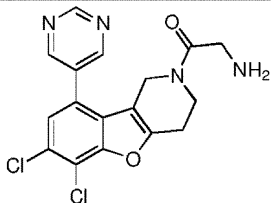
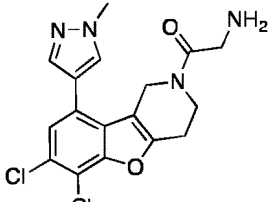
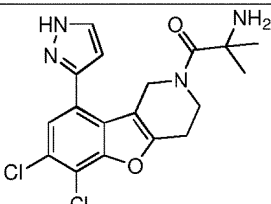
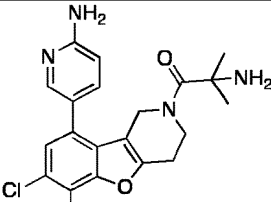
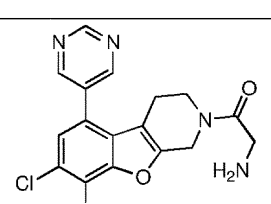
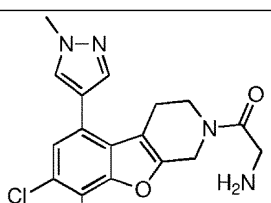
10

20

30

40

50

32		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.29 (s, 1H), 8.98 (s, 2H), 8.06 (br s, 2H), 7.72 - 7.65 (m, 1H), 4.85 - 4.78 (m, 2H), 4.00 (br d, J = 1.4 Hz, 2H), 3.71 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.55 (br t, J = 5.3 Hz, 1H), 2.39 (br s, 1.5H), 2.28 (br s, 0.5H). ESI $[\text{M}-\text{H}]$ = 377.0/ 379.0.
33		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.05 (br d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.78 - 7.67 (m, 1H), 7.43 - 7.35 (m, 1H), 4.75 (br s, 1H), 4.51 - 4.31 (m, 1H), 3.91 (d, J = 9.7 Hz, 3H), 3.79 - 3.67 (m, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.50 - 3.43 (m, 2H), 3.02 - 2.85 (m, 2H), 2.68 - 2.53 (m, 2H). LCMS: m/z 379.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
34		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.29 (br s, 2H), 7.85 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 6.74 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.87 (br s, 2H), 3.84 (br t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.81 (br s, 2H), 1.63 (s, 6H) ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 393.1/395.1
35		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.24 (br s, 4H), 8.17 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.98 (br d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.59 - 7.52 (m, 1H), 7.06 - 7.03 (m, 1H), 4.33 (s, 2H), 3.97 (br t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.02 (br s, 2H), 1.55 (br s, 6H). LCMS: m/z 419.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
39		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.37 (s, 1H), 9.06 (s, 2H), 8.30 (br d, J = 5.3 Hz, 2H), 7.82 - 7.74 (m, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.12 - 4.04 (m, 2H), 3.83 - 3.75 (m, 1H), 3.69 - 3.61 (m, 1H), 2.48 (br s, 1H), 2.40 - 2.34 (m, 1H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 377.0/379.0
40		$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.20 (br s, 2H), 8.05 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.81 (br d, J = 5.4 Hz, 2H), 4.02 (br dd, J = 5.6, 9.4 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.77 (br t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.62 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 2.70 (br s, 1H), 2.60 (br s, 1H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 379.0/381.0

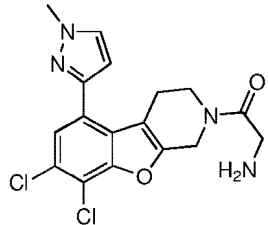
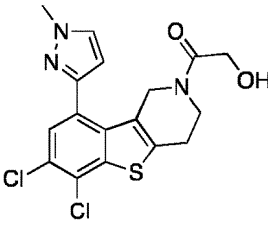
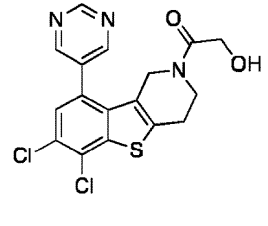
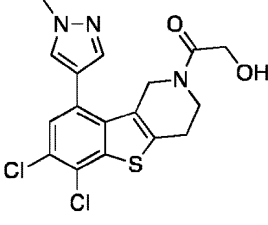
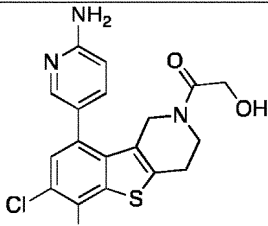
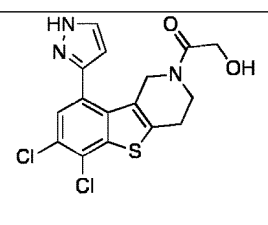
10

20

30

40

50

41		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 8.17 (br s, 2H), 7.82 (dd, J = 2.1, 5.2 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 2.2, 5.7 Hz, 1H), 4.81 (br d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (br dd, J = 5.8, 11.9 Hz, 2H), 3.93 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 3.80 - 3.77 (m, 1H), 3.63 (br t, J = 5.5 Hz, 1H), 2.90 (br s, 1H), 2.80 (br s, 1H). ESI [M+H] = 379.0/381.0.
46		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.86 (br s, 1H), 7.50 (s, 1H), 6.50 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.16 - 4.11 (m, 1H), 4.10 - 4.04 (m, 1H), 3.97 - 3.92 (m, 3H), 3.89 - 3.81 (m, 1H), 3.78 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.67 - 3.63 (m, 1H), 3.07 - 2.88 (m, 2H). LCMS: m/z 396 [M+H] ⁺ .
47		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 9.34 (s, 1H), 8.97 (s, 2H), 7.67 (s, 1H), 4.67 - 4.54 (m, 1H), 4.12 (br d, J = 4.9 Hz, 1H), 3.90 (br s, 1H), 3.80 - 3.61 (m, 4H), 3.05 - 2.93 (m, 2H). LCMS: m/z 394.0 [M+H] ⁺ .
48		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.98 - 7.91 (m, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 4.22 (br s, 1H), 4.14 (s, 1H), 4.01 (br s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.84 (br s, 1H), 3.79 - 3.62 (m, 2H), 3.06 - 2.88 (m, 2H). LCMS: m/z 396.1 [M+H] ⁺ .
49		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.89 (br s, 1H), 7.45 - 7.33 (m, 2H), 6.50 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.16 (s, 2H), 4.82 - 4.76 (m, 2H), 4.74 (br t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.14 (br d, J = 5.1 Hz, 2H), 3.48 (br s, 1H), 2.31 - 2.10 (m, 2H). LCMS: m/z 408.1 [M+H] ⁺ .
50		¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.97 - 7.82 (m, 1H), 7.57 - 7.41 (m, 1H), 6.60 - 6.47 (m, 1H), 4.17 - 4.09 (m, 2H), 4.06 - 3.47 (m, 4H), 3.05 - 2.91 (m, 2H). LCMS: m/z 382.0 [M+H] ⁺ .

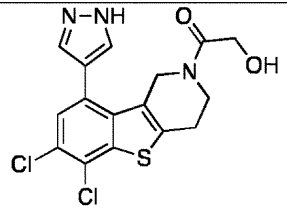
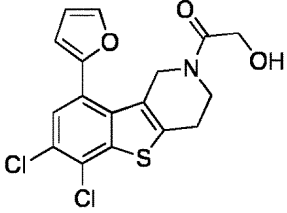
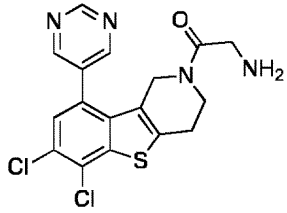
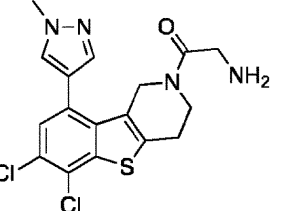
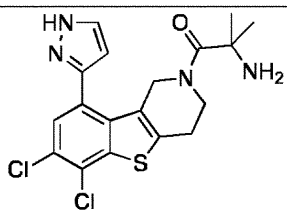
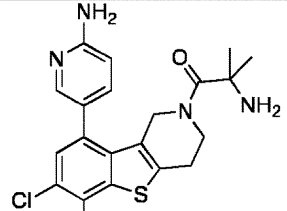
10

20

30

40

50

51		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 13.15 (br s, 1H), 7.99 (br s, 1H), 7.72 - 7.63 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 4.64 - 4.55 (m, 1H), 4.18 (br s, 1H), 4.13 (br d, J = 5.5 Hz, 1H), 3.95 (br s, 1H), 3.82 - 3.63 (m, 3H), 3.04 - 2.88 (m, 2H). LCMS: m/z 382.0 [M+H] ⁺ .
52		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.96 - 7.85 (m, 1H), 7.71 - 7.60 (m, 1H), 6.85 - 6.67 (m, 2H), 4.67 - 4.56 (m, 1H), 4.28 - 4.25 (m, 1H), 4.19 - 4.04 (m, 2H), 3.86 (br d, J = 5.3 Hz, 1H), 3.83 - 3.64 (m, 2H), 3.08 - 2.93 (m, 2H). LCMS: m/z 382.0 [M+H] ⁺ .
53		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 9.30 (s, 1H), 8.92 (s, 2H), 7.69 - 7.54 (m, 1H), 4.82 (br s, 2H), 3.63 - 3.43 (m, 2H), 3.37 (br s, 2H), 2.16 - 1.97 (m, 2H). LCMS: m/z 393.1 [M+H] ⁺ .
54		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 7.95 (s, 1H), 7.74 - 7.53 (m, 1H), 7.45 - 7.32 (m, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.01 (s, 1H), 3.97 - 3.87 (m, 3H), 3.80 - 3.58 (m, 2H), 3.41 - 3.37 (m, 1H), 3.05 (br s, 1H), 3.03 - 2.85 (m, 2H). LCMS: m/z 395.0 [M+H] ⁺ .
55		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 13.26 - 13.05 (m, 1H), 7.90 (br s, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.65 - 3.88 (m, 4H), 2.97 (br s, 2H), 1.31 (s, 1H), 1.17 (br s, 5H). LCMS: m/z 409.1 [M+H] ⁺ .
56		^1H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ = 8.25 (br s, 4H), 8.13 (s, 1H), 7.98 (br d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.09 (br d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.18 (s, 2H), 3.90 (br d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.04 (br s, 2H), 1.61 - 1.41 (m, 6H). LCMS: m/z 435.0 [M+H] ⁺ .

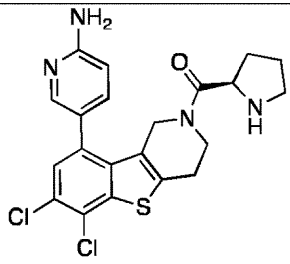
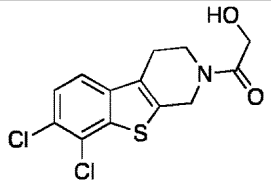
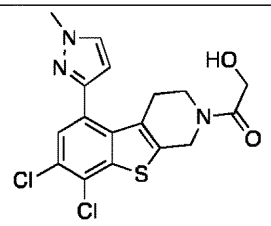
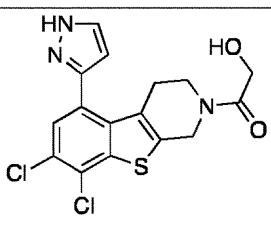
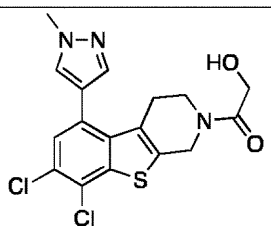
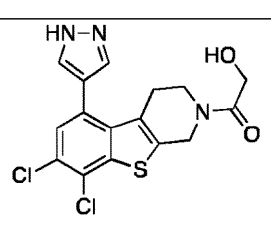
10

20

30

40

50

57		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.22 (br d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.58 (br s, 2H), 8.27 - 8.16 (m, 1H), 8.08 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.68 - 7.59 (m, 1H), 7.24 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.81 - 4.56 (m, 1H), 4.44 - 4.25 (m, 1H), 4.23 - 4.13 (m, 1H), 3.97 - 3.76 (m, 2H), 3.31 - 3.07 (m, 4H), 2.53 - 2.40 (m, 1H), 2.11 - 1.76 (m, 3H). LCMS: m/z 447.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
58		^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ = 7.76 - 7.71 (m, 1H), 7.70 - 7.65 (m, 1H), 4.89 - 4.75 (m, 3H), 4.30 - 4.17 (m, 2H), 3.91 - 3.71 (m, 2H), 2.96 - 2.80 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 315.9/318.0$.
60		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.82 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 6.45 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.86 - 4.75 (m, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.58 (br s, 2H), 2.38 - 2.21 (m, 2H). LCMS: m/z 396.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
61		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.18 (br s, 1H), 7.94 (br s, 1H), 7.60 - 7.50 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.86 (br d, J = 12.5 Hz, 2H), 4.21 (br s, 2H), 3.65 - 3.53 (m, 2H), 2.38 - 2.23 (m, 2H). LCMS: m/z 382.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
62		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.91 (br s, 1H), 7.60 - 7.53 (m, 1H), 7.38 (br s, 1H), 4.81 - 4.68 (m, 2H), 4.17 (br s, 2H), 3.91 (br s, 3H), 3.67 - 3.44 (m, 2H), 2.45 - 2.32 (m, 2H). LCMS: m/z 396.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
63		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.17 - 13.02 (m, 1H), 7.97 (br d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.74 - 7.60 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 4.85 - 4.69 (m, 3H), 4.17 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.64 - 3.56 (m, 1H), 3.51 - 3.45 (m, 1H), 2.39 (br s, 1H), 2.29 (br s, 1H). LCMS: m/z 382.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

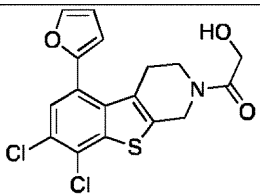
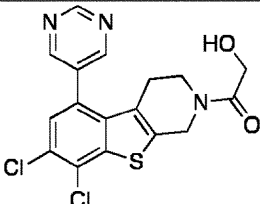
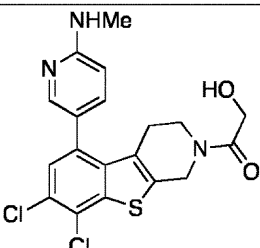
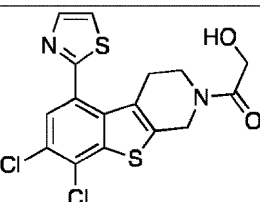
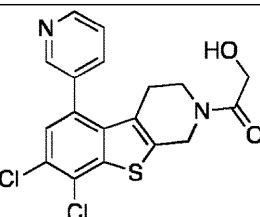
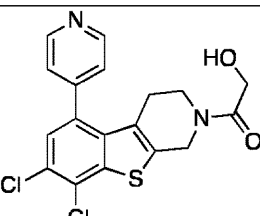
10

20

30

40

50

64		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.90 - 7.83 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.76 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 6.69 (br d, J = 1.8 Hz, 1H), 4.82 (br d, J = 10.5 Hz, 2H), 4.18 (br s, 2H), 3.65 - 3.49 (m, 2H), 2.44 - 2.29 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 381.9/383.9
65		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.30 (s, 1H), 8.92 (s, 2H), 7.76 - 7.54 (m, 1H), 4.82 (br s, 1H), 4.81 - 4.68 (m, 2H), 4.13 (br d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.61 - 3.39 (m, 2H), 2.21 - 1.96 (m, 2H). LCMS: m/z 393.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
66		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.99 (br s, 1H), 7.45 - 7.36 (m, 1H), 6.80 - 6.74 (m, 1H), 6.52 (br d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.87 - 4.71 (m, 2H), 4.24 - 4.03 (m, 2H), 2.99 - 2.95 (m, 3H), 2.83 (br d, J = 3.4 Hz, 2H), 2.35 - 2.06 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 422.0/424.0
67		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.06 - 8.01 (m, 2H), 7.75 (s, 1H), 4.86 - 4.78 (m, 2H), 4.15 (br s, 2H), 3.58 - 3.49 (m, 2H), 2.26 - 2.11 (m, 2H). LCMS: m/z 398.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
68		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.91 (br s, 2H), 8.29 (br s, 1H), 7.87 (br s, 1H), 7.67 (br s, 1H), 4.94 - 4.85 (m, 2H), 4.27 - 4.14 (m, 2H), 3.74 - 3.41 (m, 2H), 2.23 - 2.02 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 393.0/395.0
69		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.95 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 8.00 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 4.90 - 4.78 (m, 2H), 4.15 (br s, 2H), 3.55 (br s, 1H), 3.44 (br s, 1H), 2.14 (br s, 1H), 2.10 - 2.05 (m, 1H). ESI $[\text{M}+\text{H}]$ = 392.9 /394.9.

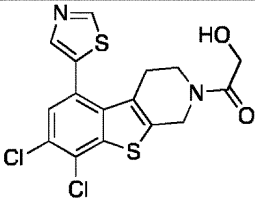
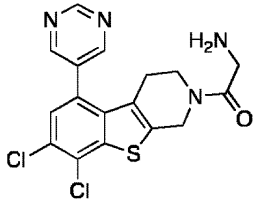
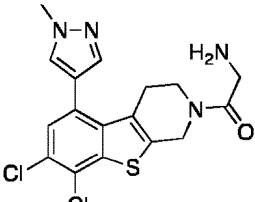
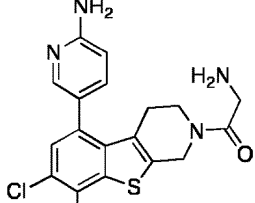
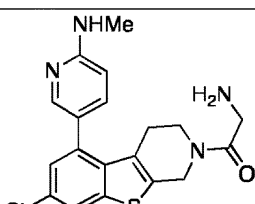
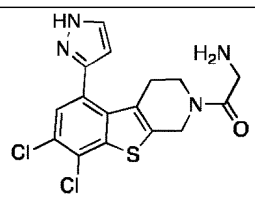
10

20

30

40

50

70		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.28 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 4.83 - 4.77 (m, 2H), 4.15 (br d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.62 - 3.55 (m, 1H), 3.52 - 3.47 (m, 1H), 2.29 - 2.23 (m, 1H), 2.20 - 2.12 (m, 1H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 398.9 / 400.9$
73		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.31 (s, 1H), 9.00 - 8.81 (m, 2H), 8.08 (br s, 2H), 7.73 - 7.62 (m, 1H), 4.90 - 4.82 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.65 - 3.45 (m, 2H), 2.22 - 1.95 (m, 2H). LCMS: m/z 392.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
74		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.91 (s, 1H), 7.62 - 7.55 (m, 1H), 7.38 (s, 1H), 4.85 - 4.75 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.64 - 3.48 (m, 2H), 3.44 (br s, 2H), 2.45 - 2.30 (m, 2H), 2.07 (s, 2H). LCMS: m/z 395.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
75		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.59 - 8.33 (m, 2H), 8.29 (br s, 2H), 8.10 - 8.04 (m, 1H), 7.98 - 7.91 (m, 1H), 7.59 - 7.54 (m, 1H), 7.17 - 7.09 (m, 1H), 5.07 - 4.69 (m, 2H), 3.95 (br s, 2H), 3.85 - 3.57 (m, 2H), 2.45 - 2.38 (m, 1H), 2.30 (br s, 1H). LCMS: m/z 407.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
76		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.11 - 9.14 (m, 1H), 8.33 (br s, 2H), 8.05 - 7.82 (m, 2H), 7.59 - 7.52 (m, 1H), 7.28 - 7.18 (m, 1H), 5.02 - 4.72 (m, 2H), 3.95 (br s, 2H), 3.75 - 3.57 (m, 2H), 3.06 (br s, 3H), 2.48 - 2.36 (m, 1H), 2.29 (br s, 1H). LCMS: m/z 421.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
77		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.30 - 12.88 (m, 1H), 7.91 - 7.72 (m, 1H), 7.49 (br s, 1H), 6.49 (br s, 1H), 4.86 - 4.75 (m, 2H), 3.56 (br d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.49 (br s, 2H), 3.15 (br s, 3H), 2.29 (br s, 1H), 2.18 (br s, 1H). LCMS: m/z 381.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

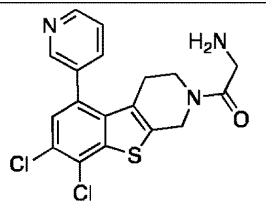
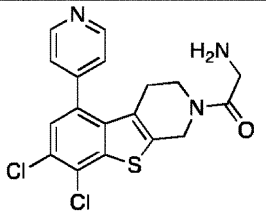
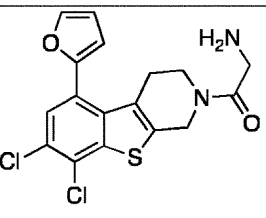
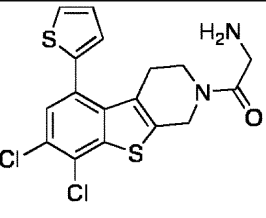
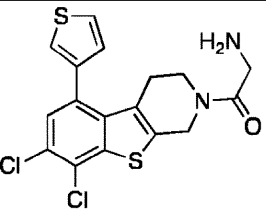
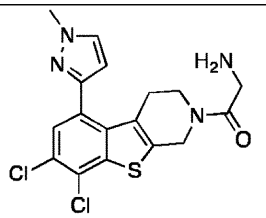
10

20

30

40

50

78		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.69 (dd, J = 1.5, 4.8 Hz, 1H), 8.63 (br s, 1H), 7.87 (br d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.56 - 7.49 (m, 2H), 4.82 (br s, 2H), 3.45 (br t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.40 (br s, 1H), 3.37 (s, 1H), 3.33 (br s, 1H), 2.51 (br s, 2H), 2.07 (br s, 1H), 1.96 (br s, 1H). LCMS: m/z 392.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
79		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.94 - 8.82 (m, 2H), 8.26 - 8.17 (m, 2H), 7.81 (br d, J = 5.4 Hz, 2H), 7.64 - 7.57 (m, 1H), 4.93 - 4.84 (m, 2H), 3.94 (br t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.60 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.48 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 2.18 (br s, 1H), 2.08 (br s, 1H). LCMS: m/z 392.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
80		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.90 - 7.88 (m, 1H), 7.99 - 7.79 (m, 1H), 6.84 - 6.60 (m, 2H), 4.95 - 4.73 (m, 2H), 3.68 - 3.39 (m, 4H), 3.32 (br s, 2H), 2.41 (br s, 1H), 2.31 (br s, 1H). LCMS: m/z 381.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
81		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.73 (br d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.59 - 7.51 (m, 1H), 7.23 - 7.15 (m, 2H), 4.83 (br s, 2H), 3.61 - 3.37 (m, 4H), 3.32 (s, 2H), 2.28 (br s, 1H), 2.18 (br d, J = 2.1 Hz, 1H). LCMS: m/z 397.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
82		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.68 (dd, J = 2.9, 4.8 Hz, 1H), 7.63 (br s, 1H), 7.49 - 7.42 (m, 1H), 7.24 - 7.23 (m, 1H), 4.85 - 4.75 (m, 2H), 3.61 - 3.52 (m, 1H), 3.52 - 3.39 (m, 3H), 3.36 - 3.32 (m, 2H), 2.23 (br s, 1H), 2.12 (br d, J = 1.4 Hz, 1H). LCMS: m/z 397.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
83		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.83 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.47 (br s, 1H), 4.88 - 4.77 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.63 - 3.55 (m, 1H), 3.50 (br t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.33 (br s, 2H), 2.36 (br s, 1H), 2.26 (br s, 1H). LCMS: m/z 395.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

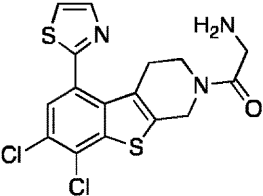
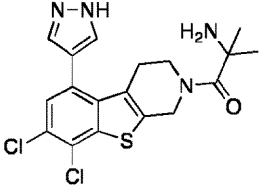
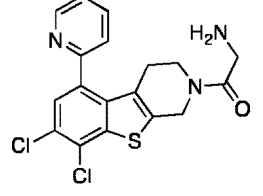
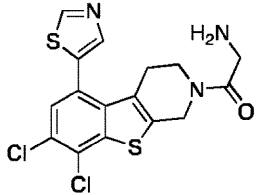
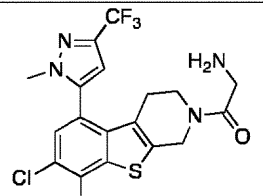
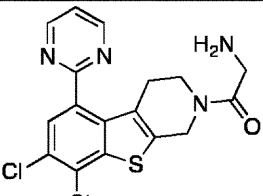
10

20

30

40

50

84		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.23 - 8.09 (m, 2H), 8.04 (s, 2H), 7.80 - 7.75 (m, 1H), 4.93 - 4.83 (m, 2H), 3.98 - 3.93 (m, 2H), 3.67 - 3.59 (m, 1H), 3.53 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 2.29 (br s, 1H), 2.21 - 2.10 (m, 1H). LCMS: m/z 398.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
85		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.19 - 8.14 (m, 2H), 8.02 - 7.60 (m, 2H), 7.42 (s, 1H), 4.92 (br s, 2H), 3.79 - 3.63 (m, 2H), 2.42 - 2.34 (m, 2H), 1.57 (s, 6H). LCMS: m/z 409.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
86		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.92 - 8.83 (m, 1H), 8.44 - 8.32 (m, 3H), 7.97 - 7.84 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 1H), 4.89 (br s, 2H), 4.00 - 3.88 (m, 2H), 3.62 - 3.55 (m, 1H), 3.48 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 2.14 (br s, 1H), 2.01 (br s, 1H). LCMS: m/z 392.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
87		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.33 - 9.28 (m, 1H), 8.21 - 8.11 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.69 - 7.62 (m, 1H), 4.90 - 4.84 (m, 2H), 3.95 (br d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.31 (br s, 2H), 2.18 (br s, 1H). LCMS: m/z 397.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
88		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.79 - 7.71 (m, 1H), 6.96 (s, 1H), 4.97 - 4.87 (m, 1H), 4.84 - 4.71 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.66 - 3.52 (m, 2H), 3.39 (br s, 4H), 2.17 - 2.00 (m, 2H). LCMS: m/z 463.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
89		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.99 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 8.21 (br s, 2H), 7.77 - 7.73 (m, 1H), 7.64 (q, J = 5.1 Hz, 1H), 4.91 - 4.87 (m, 2H), 3.99 - 3.91 (m, 2H), 3.60 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.48 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 2.25 (br s, 1H), 2.14 (br t, J = 5.3 Hz, 1H). LCMS: m/z 393.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

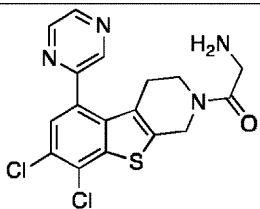
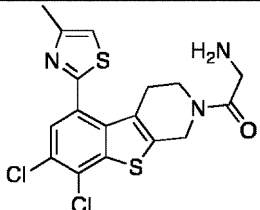
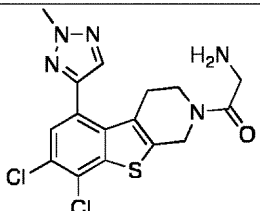
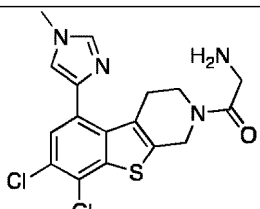
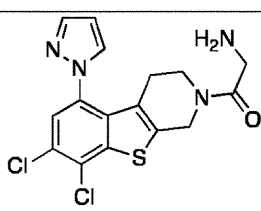
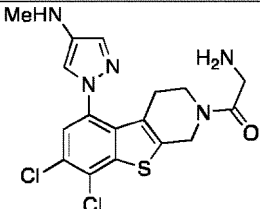
10

20

30

40

50

90		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.93 - 8.89 (m, 1H), 8.81 - 8.77 (m, 2H), 8.30 - 8.17 (m, 2H), 7.76 - 7.72 (m, 1H), 4.92 - 4.85 (m, 2H), 3.99 - 3.91 (m, 2H), 3.55 - 3.41 (m, 2H), 2.14 (br s, 1H), 2.06 - 1.98 (m, 1H). LCMS: m/z 393.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
91		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.71 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 4.90 - 4.78 (m, 2H), 3.59 (br d, J = 5.8 Hz, 1H), 3.54 - 3.49 (m, 1H), 3.42 (br s, 2H), 3.38 - 3.34 (m, 2H), 2.49 - 2.45 (m, 3H), 2.26 (br s, 1H), 2.17 (br s, 1H). LCMS: m/z 412.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
92		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.02 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 4.87 - 4.78 (m, 2H), 4.26 (s, 3H), 3.61 (br t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.51 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.43 (br s, 4H), 2.30 (br s, 1H), 2.22 (br s, 1H). LCMS: m/z 396.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
93		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.19 (br d, J = 12.1 Hz, 1H), 8.29 (br d, J = 5.1 Hz, 3H), 7.91 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.91 (br d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.98 - 3.93 (m, 4H), 3.70 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.59 - 3.55 (m, 2H), 2.47 (br s, 1H), 2.38 - 2.32 (m, 1H). LCMS: m/z 395.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
94		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.18 - 8.04 (m, 3H), 7.80 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.77 - 7.73 (m, 1H), 6.59 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 4.93 - 4.82 (m, 2H), 3.95 (br d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.66 - 3.59 (m, 1H), 3.51 (br t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.14 - 2.10 (m, 1H), 2.04 - 1.98 (m, 1H). LCMS: m/z 381.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
95		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.30 - 8.19 (m, 1H), 8.11 (br d, J = 4.9 Hz, 3H), 7.87 (br d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.81 - 7.75 (m, 1H), 4.93 - 4.82 (m, 2H), 4.02 - 3.91 (m, 2H), 3.64 (br t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.20 (br s, 1H), 2.06 (br s, 1H). LCMS: m/z 410.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

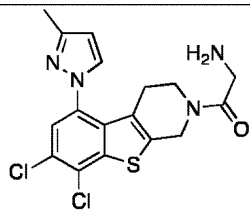
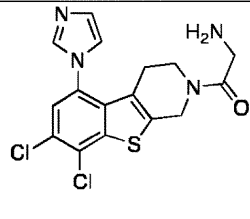
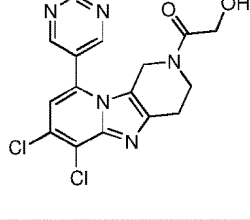
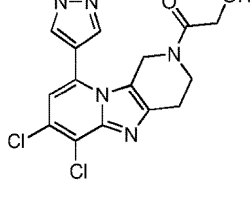
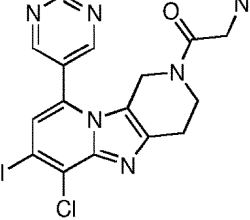
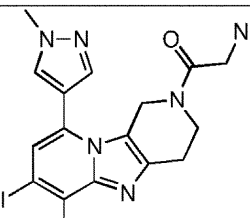
10

20

30

40

50

96		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.10 (br s, 2H), 7.99 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.74 - 7.65 (m, 1H), 6.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.91 - 4.82 (m, 2H), 3.96 (br s, 2H), 3.64 (br t, J = 5.7 Hz, 1H), 3.53 (br t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.31 - 2.26 (m, 3H), 2.21 (br s, 1H), 2.13 - 2.07 (m, 1H). LCMS: m/z 395.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
97		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.64 - 9.24 (m, 1H), 8.35 - 8.27 (m, 2H), 8.13 - 8.01 (m, 2H), 7.49 - 7.37 (m, 1H), 4.91 (br s, 2H), 3.95 (br d, J = 4.6 Hz, 3H), 3.62 - 3.59 (m, 1H), 2.21 (br s, 1H), 2.09 (br d, J = 3.9 Hz, 1H). LCMS: m/z 381.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
98		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.43 (s, 1H), 9.19 - 9.08 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 4.69 - 4.59 (m, 1H), 4.13 (br d, J = 5.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.86 - 3.72 (m, 2H), 3.63 (br t, J = 5.3 Hz, 1H), 2.90 - 2.78 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 378.2 / 380.2$
99		^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.23 - 8.14 (m, 1H), 7.86 - 7.74 (m, 1H), 7.08 - 6.89 (m, 1H), 4.68 (br s, 1H), 4.19 (br d, J = 19.9 Hz, 2H), 4.10 - 3.81 (m, 5H), 3.80 - 3.61 (m, 2H), 2.95 - 2.73 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 380.0 / 382.0$
100		^1H NMR (400 MHz, メタノール- d_4) δ = 9.48 - 9.35 (m, 1H), 9.10 (s, 2H), 7.28 - 7.12 (m, 1H), 4.64 (br d, J = 1.8 Hz, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.97 - 3.88 (m, 1H), 3.76 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.57 (s, 1H), 3.00 - 2.88 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 376.9 / 379.0$.
101		^1H NMR (400 MHz, メタノール- d_4) δ = 8.03 (s, 1H), 7.85 - 7.76 (m, 1H), 7.00 - 6.92 (m, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.09 - 4.00 (m, 4H), 3.92 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.87 - 3.67 (m, 2H), 3.61 (br s, 1H), 2.99 - 2.85 (m, 2H). ESI $[\text{M}+\text{H}] = 379.2 / 381.2$

10

20

30

40

【0407】

無細胞マウスおよびヒトcGAS酵素阻害アッセイ (表2)。全ての化合物 (表1中) のm-cGAS (30nM) およびまたはh-cGAS (100nM) に対する活性は、Tris-HCl (20mM、pH7.4)、NaCl (150mM)、MnCl₂ (0.2mM、h-cGAS) またはMgCl₂ (5mM、m-cGAS) およびTween-20 (0.01%) から構成される反応バッファー中、dsDNA (5μg/mL) の存在下でのATPおよびGTP (各100μM) からcGAMPへの変換、ならびに残留ATP濃度を、Kinase-Glo (登録商標) Max Luminescent Kinase Assay (Promega, Madison, WI) を記載の通り (Lama, et. al., 2019) 使用して測定することによって判定した。簡単に述べると、2mM DTTを補充した反応バッファー中の0.4

50

mM ATP、0.4mM GTP、0.02mg/mL dsDNAのマスターミックス10 μ lを、Thermo 8-channel Multidrop Combiディスペンサーを使用して、同じバッファー（20 μ L）中のTDI-6570またはTDI-8246（所望の濃度の2 $\times$ ）を含有する反応ウェルに加えた。次に、2mM DTTを補充した反応バッファー中の4 $\times$ m-cGAS（0.120 μ M）またはh-cGAS（0.4 μ M）溶液10 μ lを適切なウェルに加えた。バッファーのみ添加することによって、cGASまたは阻害物質なしの同様の反応セットを設定した。プレートを密閉した反応物を37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし（m-cGASでは1時間、h-cGASでは3時間）、Kinase-Glo（登録商標）Max 40 μ lの添加によって停止させた。Biotek Synergy H1 Hybridプレートリーダー（BioTek, Winooski, VT）を使用して、発光を相対発光量（RLU）で記録した。ATP枯渇を陽性対照（cGASなし）および陰性対照（cGASあり）に対して次のように正規化した：阻害% = $100 \times (\text{RLU}_{\text{試料}} - \text{RLU}_{\text{平均陰性対照}}) / (\text{RLU}_{\text{平均陽性対照}} - \text{RLU}_{\text{平均陰性対照}})$ 。反応は全て、3連で実行し、GraphPad Prism 9を使用して算出した。値は、平均IC₅₀ $\pm$ S.Dを表す。

10

【0408】

（表2）無細胞酵素アッセイにおけるcGAS阻害物質の活性

化合物番号	h-cGAS, 濃度		m-cGAS, 濃度	
	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M
1	+++	-	+++	n.d.
2	-	n.d.	-	n.d.
3	+++	++	+++	+++

20

30

40

50

4	+++	+	-	n.d.
5	+++	+	-	n.d.
6	+++	-	+++	n.d.
7	+++	++	-	n.d.
8	+++	++	-	n.d.
9	+++	++	-	n.d.
10	+++	n.d.	-	n.d.
11	+++	+++	+	n.d.
12	+++	-	-	n.d.
13	-	n.d.	-	n.d.
14	-	n.d.	-	n.d.
15	-	n.d.	-	n.d.
16	+++	n.d.	-	n.d.
17	+++	+	-	n.d.
18	-	n.d.	-	n.d.
19	-	n.d.	-	n.d.
20	+++	+	-	n.d.
21	+	n.d.	+++	n.d.
24	+++	++	++	-
25	++	+	++	-
26	+++	++	+	n.d.
28	++	+	n.d.	n.d.
29	+++	+	n.d.	n.d.

10

20

30

40

50

30	++	-	n.d.	n.d.
31	+++	++		
32	++	+	+++	++
33	+++	++	+++	+++
34	++	+	n.d.	n.d.
35	+++	+	n.d.	n.d.
39	+++	-	n.d.	n.d.
40	+++	++	n.d.	n.d.
41	+++	++	n.d.	n.d.
46	+++	++	-	n.d.
47	++	-	++	-
48	++	-	-	n.d.
49	-	n.d.	+	n.d.
50	-	n.d.	-	n.d.
51	+	-	-	n.d.
52	++	-	-	n.d.
53	++	-	+++	-
54	+++	++	++	-
55	-	n.d.	-	n.d.
56	++	n.d.	-	n.d.
57	++	n.d.	-	n.d.
58	++	-	+++	n.d.
60	+	n.d.	++	-

10

20

30

40

50

61	+	n.d.	n.d.	n.d.
62	+	n.d.	+++	+
63	+	n.d.	++	+
64	+	-	n.d.	n.d.
65	+	n.d.	+++	-
66	-	n.d.	n.d.	n.d.
67	+	n.d.	n.d.	n.d.
68	-	n.d.	n.d.	n.d.
69	-	n.d.	n.d.	n.d.
70	-	n.d.	n.d.	n.d.
73	++	-	++	-
74	+	-	+++	+
75	++	-	+++	n.d.
76	++	-	+++	n.d.
77	++	+	+++	+
78	++	-	+++	+
79	+	n.d.	+++	+
80	+++	+	+++	+
81	++	-	++	-
82	++	-	++	-
83	++	+	+++	+
84	+++	+	++	-
85	++	-	n.d.	n.d.

10

20

30

40

50

86	++	-	+	-
87	++	-	+++	+
88	-	n.d.	-	n.d.
89	++	-	+	-
90	++	-	++	+
91	++	+	++	-
92	++	+	+++	+
93	++	-	++	-
94	++	+	++	-
95	++	n.d.	++	n.d.
96	+	-	+	n.d.
97	+	n.d.	++	n.d.
98	—	n.d.	—	n.d.
99	—	n.d.	—	n.d.
100	—	n.d.	—	n.d.
101	—	n.d.	—	n.d.

注記：無細胞での0～24%の活性は「—」として；25～49%は+として；50～74%は++として；75～100%は+++として表される。

【0409】

THP1細胞での活性なcGAS阻害物質の評価（表3）。全ての化合物（表3中）の細胞活性は、THP1-Dual（商標）細胞を使用して記載の通り判定した（Lama et. al., 2019）。THP1-Dual（商標）細胞（Invivogen）（培地100ul中50000個の細胞）を96ウェルプレートの各ウェルに播種し、様々な希釈度の化合物で4時間処理した。その後、細胞にDNA（2ug/ml）およびリポフェクタミンをトランスフェクトし、細胞を一晩インキュベートした。Ifnb発現は、Quantilucを使用して細胞上清中で測定し、nfkb発現はQuantibluueを使用して、細胞生存率はPromega（登録商標）CellTiter-Glo（登録商標）を使用して判定した。

【0410】

（表3）THP1アッセイにおける生物学的評価の例

10

20

30

40

50

化合物 番号	活性-阻害および細胞生存率					
	IFNB		NFkB-SEAP		細胞生存率	
	10 μ M	30 μ M	10 μ M	30 μ M	10 μ M	30 μ M
1	-	-	-	-	+++	+++
3	-	n.d.	-	-	+++	+++
4	-	++	-	+	+++	+++
5	-	-	-	-	+++	+++
6	-	-	-	+	+++	+++
7	+	+++	-	+	+++	+++
8	++	+++	+	++	+++	-
9	-	-	-	-	+++	+++
10	-	+++	-	++	+++	+++
11	++	+++	-	++	++	-
12	-	n.d.	-	n.d.	+++	n.d.
16	+++	+++	+++	+++	+++	+
17	+	+++	+	+++	+++	++
20	++	+++	+++	+++	+++	+++
21	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	+++
24	++	+++	-	n.d.	+++	+++
25	n.d.	-	-	n.d.	+++	n.d.
26	++	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
28	++	++	n.d.	n.d.	+++	+++

10

20

30

40

50

29	++	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
30	-	+	n.d.	n.d.	+++	+++
31	++	++	n.d.	n.d.	+++	+++
32	-	-	-	-	+++	+++
33	+	+++	+	+++	+++	+
34	+++	+++	n.d.	n.d.	+++	-
35	+++	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
39	+	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
40	+++	+++	n.d.	n.d.	+++	-
41	++	+++	n.d.	n.d.	+++	-
46	+	+++	n.d.	n.d.	+++	++
48	+	++	-	++	+++	+++
51	+	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
52	+	+++	n.d.	n.d.	+++	+++
53	-	+++	+	++	+++	-
54	+++	+++	+++	+++	++	-
56	+++	+++	n.d.	n.d.	+	-
57	+++	+++	n.d.	n.d.	-	-
62	++	n.d.	-	n.d.	+++	n.d.
63	++	+++	+	+++	+++	+++
73	-	+++	-	+++	+++	-
74	+++	+++	+	++	+++	-
75	+++	+++	-	+++	+++	+++

10

20

30

40

50

76	+++	+++	-	+++	+++	+++
77	+	+++	++	+++	+++	-
78	+++	+++	++	+++	+	-
79	+++	+++	++	+++	+	-
80	++	+++	++	+++	+++	-
81	++	+++	+++	+++	+++	-
82	++	+++	+++	+++	+++	+
83	++	+++	+++	+++	++	-
84	+	+++	-	++	+++	-
85	+++	+++	n.d.	n.d.	+	-
86	-	+++	-	++	+++	-
87	+++	+++	++	+++	-	-
88	+	+++	++	+++	+++	-
89	-	++	-	++	+++	++
90	+	++	+	+++	+++	-
91	++	n.d.	+	n.d.	++	-
92	+++	+++	+++	+++	++	-
93	-	+++	-	++	+++	-
94	-	n.d.	-	n.d.	+++	n.d.
95	-	+	+	+	+++	+++
96	-	-	-	-	+++	+++
97	++	+++	+	+++	+++	+++
陽性対照	++	+++	+++	+++	+++	+++

注記：THP1細胞での細胞生存率＜24％は「－」として表され、同様に、＋、＋＋および＋＋＋は、化合物が、それぞれ、25～49％；50～74％；または75～100％の細胞生存率を示すことを意味する。

【0411】

選択された化合物についての薬物動態研究、オフターゲット効果、タンパク質結合研究および代謝研究のデータを表4～7に提供する。

【0412】

（表4）血漿（上）および脳（下）PKパラメーターの概要

10

20

30

40

50

PKパラメーター (血漿)	単位	化合物		
		48	63	TDI-8246
用量/経路	mg/Kg	25, I.P.	25, I.P.	25, I.P.
T _{1/2}	h	4.53	4.79	0.729
T _{最大}	h	1.00	2.00	1.00
C _{最大}	ng/mL	6323	5073	3603
AUC _{最終}	h*ng/mL	33477	34242	6326
AUC _{無限大}	h*ng/mL	33490	34261	6331
AUC_ _{%外挿} p_obs	%	0.0394	0.0536	0.0766
MRT _{無限大_obs}	h	4.95	4.76	1.57
AUC _{最終} /D	h*mg/mL	1339	1370	253
F	%	NA	NA	NA

10

20

30

40

50

PKパラメーター (脳)	単位	化合物		
		48	63	TDI-8246
用量/経路	mg/Kg	25, I.P.	25, I.P.	25, I.P.
T _{1/2}	h	3.45	3.86	0.512
T _{最大}	h	2.00	4.00	1.00
C _{最大}	ng/mL	19853	3721	1655
AUC _{最終}	h*ng/mL	127025	33856	2425
AUC _{無限大}	h*ng/mL	128066	34413	2447
AUC _{%外挿p_obs}	%	0.813	1.62	0.884
MRT _{無限大_obs}	h	4.69	6.51	1.37
AUC _{最終/D}	h*mg/mL	5081	1354	97.0
C _{最大の比} (脳/血漿)		3.14	0.734	0.459
AUC _{最終の比} (脳/血漿)		3.79	0.989	0.383

10

20

30

40

50

【 0 4 1 3 】

(表 5) 化合物 48 および 63 のオフターゲット効果

クラス	安全性パネルスクリーニング のリスト		アッセイフォーマット	アゴニストモード		アンタゴニストモード	
				10 μ M での平均活性化率 (%)		10 μ M での平均阻害率 (%)	
	ファミリー	標的		48	63	48	63
GPCR	ドーパミン	D1	cAMP アッセイ	4.36	6.19	6.62	3.08
	5- ヒドロキシトリプタミン	5HT2B	Ca ²⁺ 移行	-0.48	22.36	34.49	49.43
hERG	カリウムチャネル	hERG	自動パッチクランプ	NA	NA	62.98	49.70
トランスポーター	セロトニン トランスポーター	SET	神経伝達物質の取り込み	NA	NA	46.25	15.15
酵素	ホスホジエステラーゼ	PDE4D2	IMAP	NA	NA	56.43	73.16

【 0 4 1 4 】

(表 6) マウス脳ホモジネート中の cGAS 阻害物質画分のタンパク質結合結果

化合物番号	種	結合% (脳)	未結合% (脳)	LogK	回収%	6時間時点 の残留%
テルミサルタン (対照化合物)	マウス	98.12	1.88	1.72	99.29	103.38
33 ¹	マウス	> 99.996	< 0.004	> 4.39	< 82.40	90.87
48 ¹	マウス	> 99.99	< 0.01	> 4.17	< 91.07	92.46
63 ¹	マウス	> 99.998	< 0.002	> 4.72	< 88.44	108.27
74	マウス	92.94	7.06	1.12	92.81	98.24
99	マウス	81.03	18.97	0.64	90.09	99.35
TDI-6570 ³	マウス	99.58	0.42	2.38	89.39	94.51
TDI-8264	マウス	98.56	1.44	1.84	82.78	95.58

1 試験化合物はバッファー側で検出できず（検出限界未満、BLOD）、LODをピーク面積として使用してカットオフ値を算出した。

2 化合物は不安定であり、残留%の値は50%より低かった。

3 対照としてのTDI-6570をマウス選択的cGAS阻害物質として使用した。

【0415】

（表7）試験化合物の代謝安定性

ヒト肝ミクロソーム						
化合物番号	R2	T1/2 (min)	CLint (ミクロソーム) (μL/min/mg)	CLint(肝臓) (mL/min/kg)	残留 (T=60min)	残留 (NCF=60min)
11	0.4256	>145	<9.6	<8.6	88.2%	116.1%
33	0.6510	>145	<9.6	<8.6	87.6%	109.6%
54	0.5346	>145	<9.6	<8.6	85.4%	129.8%
74	0.1584	>145	<9.6	<8.6	93.6%	89.2%
TDI-6570	0.9798	18.3	75.8	68.2	11.3%	120.6%
TDI-8246	0.9634	80.6	17.2	15.5	59.5%	134.1%
テストステロン	0.9887	12.7	109.1	98.2	4.0%	109.9%
ジクロフェナク	0.9998	4.3	323.6	291.2	0.0%	114.8%
プロパフェノン	0.9355	5.4	255.0	229.5	0.0%	117.3%

マウス肝ミクロソーム						
化合物番号	R2	T1/2 (min)	CLint (ミクロソーム) ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	CLint(肝臓) ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	残留 (T=60min)	残留 (NCF=60min)
11	0.8004	>145	<9.6	<38.0	80.1%	97.7%
24	0.8749	> 184.78	< 7.50	< 23.07	6.3%	116.2%
33	0.8553	142.5	9.7	38.5	72.5%	90.0%
48	0.6968	2.0	679.2	87.2	88.1%	94.7%
54	0.9172	>145	<9.6	<38.0	82.0%	94.5%
74	0.8676	>145	<9.6	<38.0	84.8%	97.8%
TDI-6570	0.9860	5.5	251.9	997.5	0.0%	100.0%
TDI-8246	0.9902	17.0	81.7	323.4	8.8%	99.8%
ベラパミル	NA	16.4	84.5	71.6	0.0%	104.0%
テストステロン	1.0000	3.7	375.9	1488.6	0.0%	88.7%
ジクロフェナク	0.9971	38.0	36.5	144.6	33.1%	100.4%
プロパフェノン	0.9905	1.8	776.9	3076.4	0.0%	103.5%

注記：

NCF：補因子なし。60分間のインキュベーション中にNADPHをNCF試料に添加しない（バッファに交換）。NCF残留が60%未満であれば、おそらく非NADPH依存的な代謝が起こる。

R^2 ：速度定数を決定するための線形回帰の相関係数（生データのワークシートを参照）

$T_{1/2}$ ：半減期

CLint（ミクロソーム）：固有クリアランス

CLint（ミクロソーム）= $0.693 / T_{1/2} / \text{ミクロソームタンパク質 mg/mL}$

CLint（肝臓）= CLint（ミクロソーム）× ミクロソームタンパク質 mg / 肝臓重量 g × 肝臓重量 g / 体重 kg

【0416】

参照による組み入れ

本明細書において引用される米国特許および米国特許出願公報は全て、参照により本明細書に組み入れられる。

【0417】

等価物

当業者は、本明細書に記載される本開示の様々な態様に対する多くの等価物を認識するか、または過度なルーチン実験を行うことなくそれらを確認することができるであろう。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に包含される。

10

20

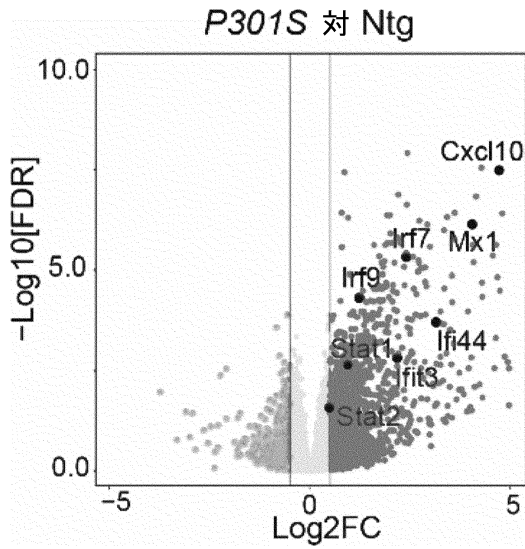
30

40

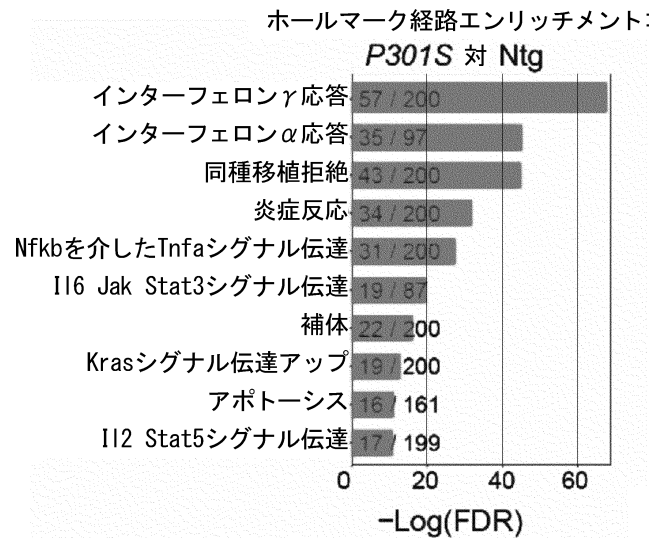
50

【図面】

【図 1 A】

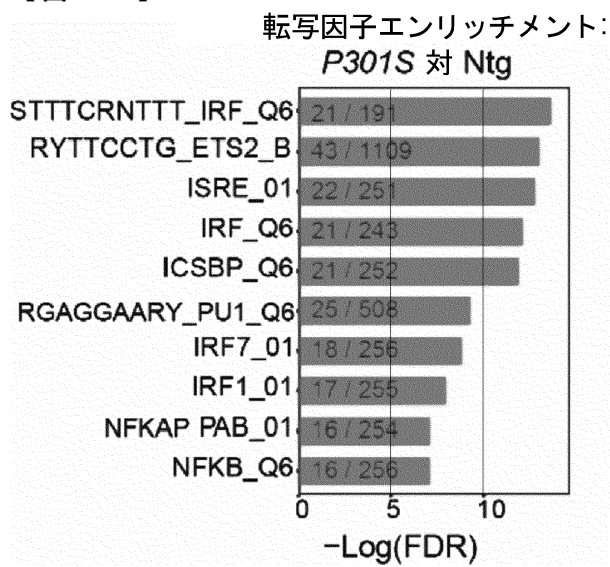


【図 1 B】

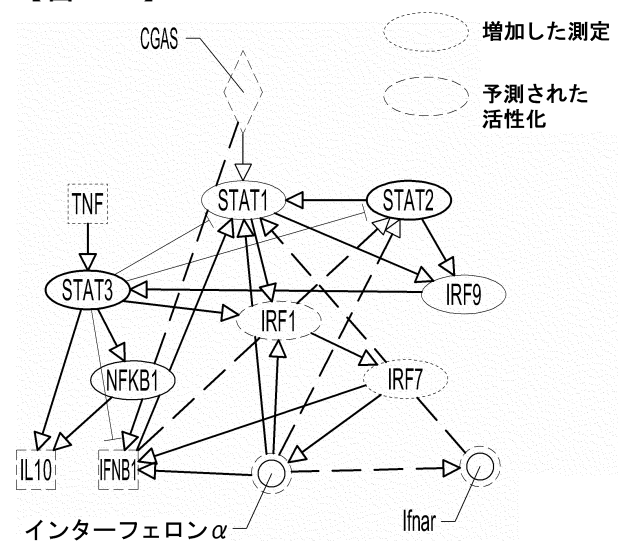


10

【図 1 C】



【図 1 D】



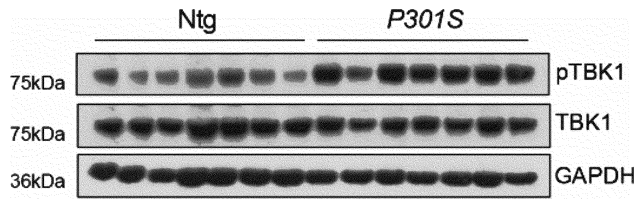
20

30

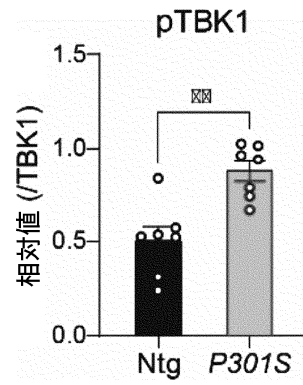
40

50

【図 1 E】

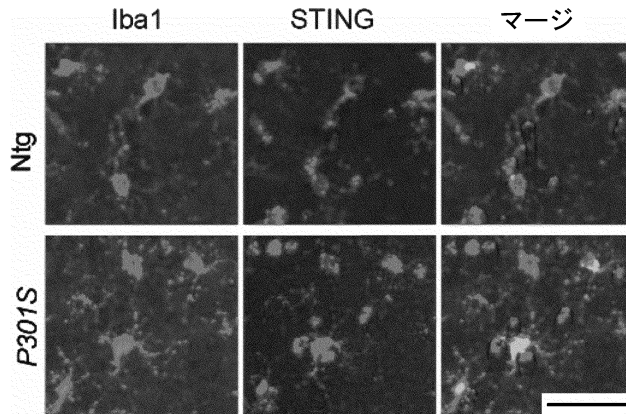


【図 1 F】

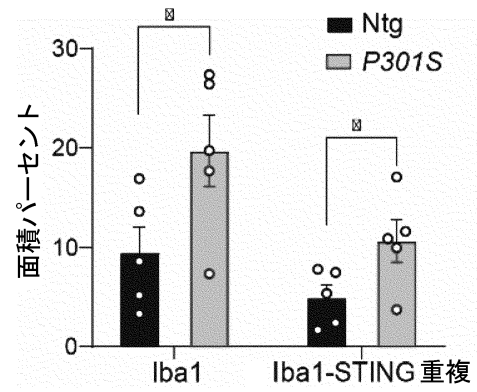


10

【図 1 G】



【図 1 H】



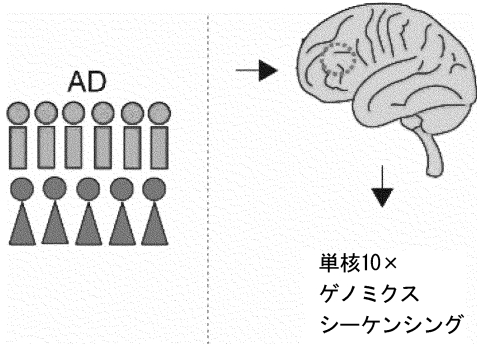
20

30

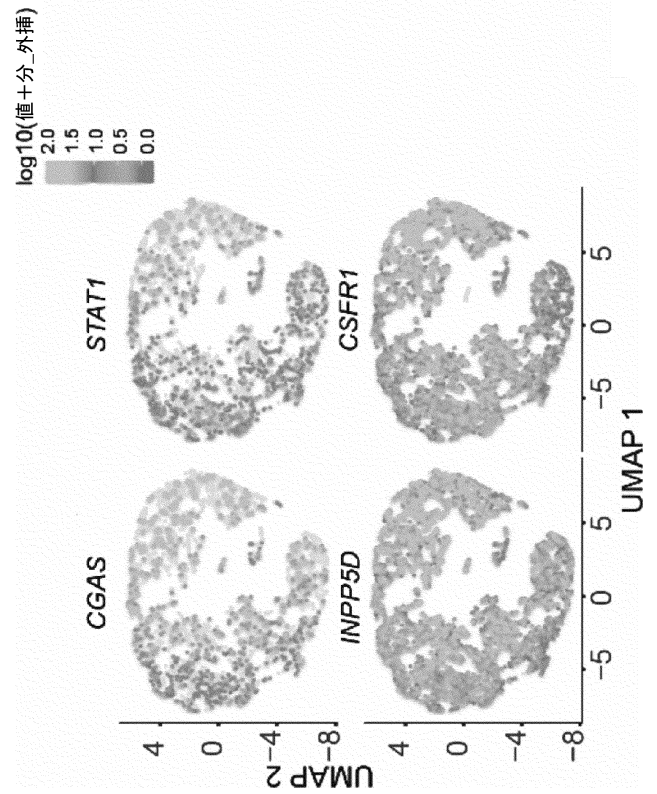
40

50

【図 1 I】



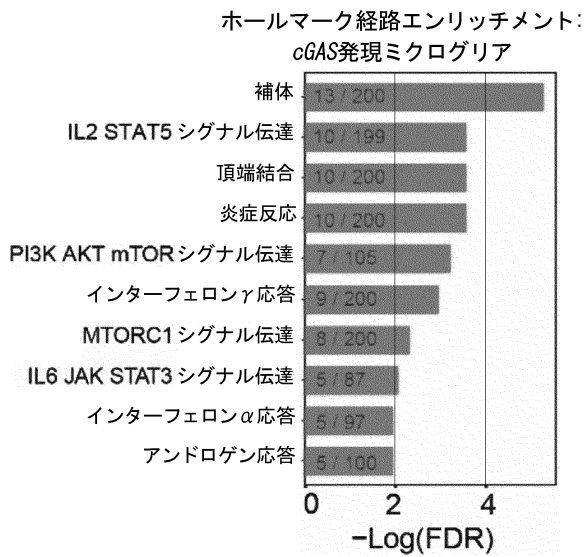
【図 1 J】



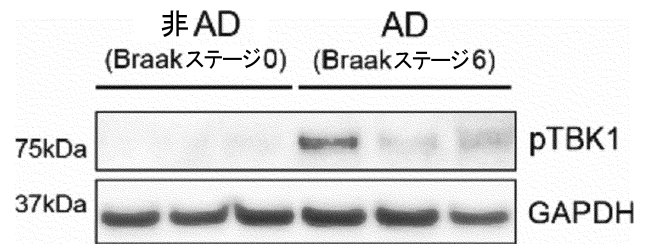
10

20

【図 1 K】



【図 1 L】

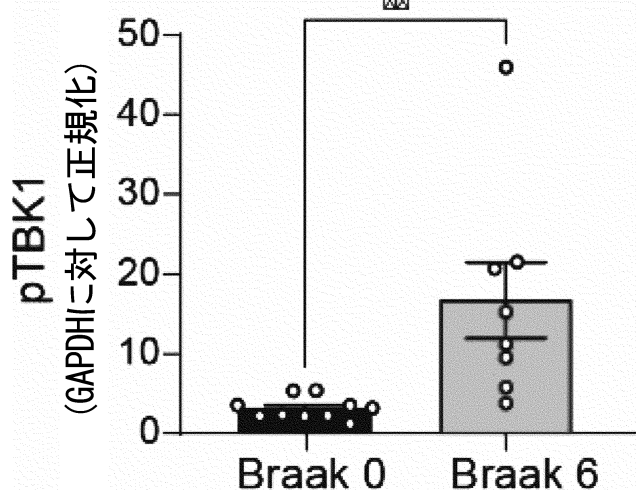


30

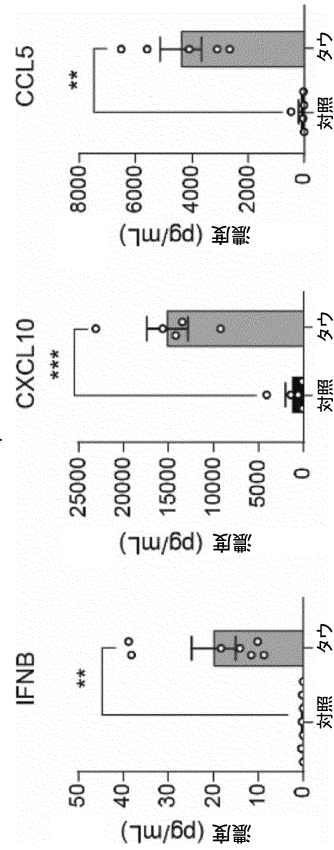
40

50

【図 1 M】



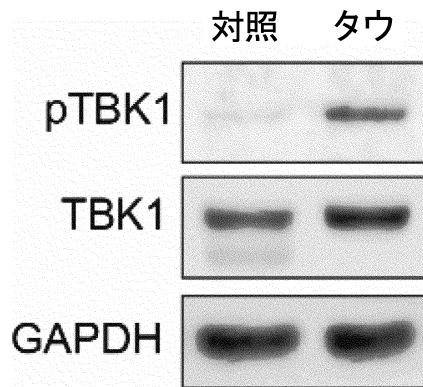
【図 2 A】



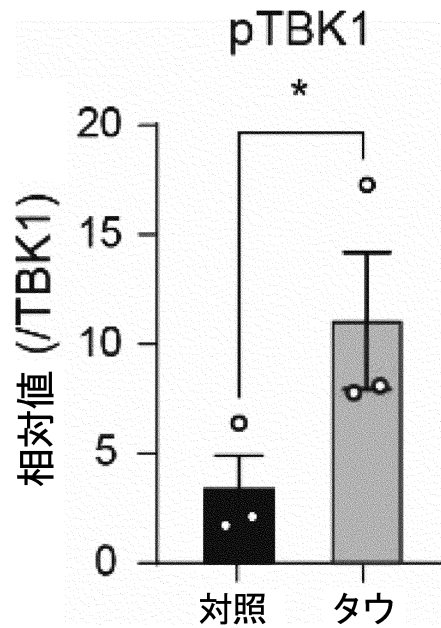
10

20

【図 2 B】



【図 2 C】

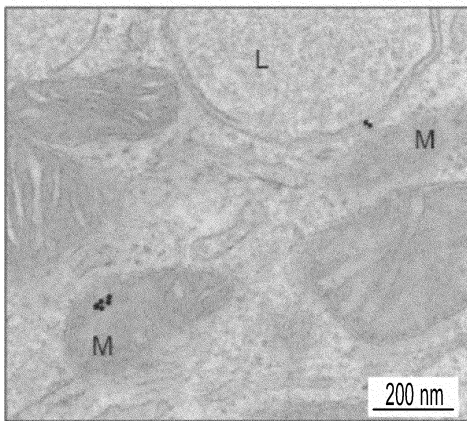
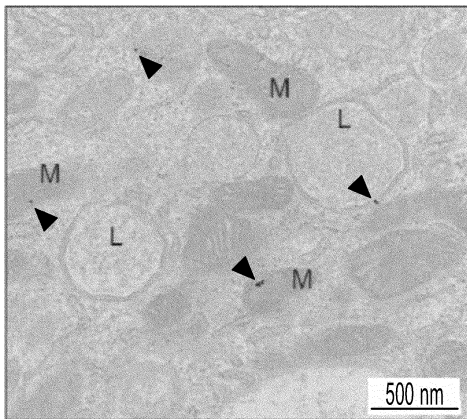


30

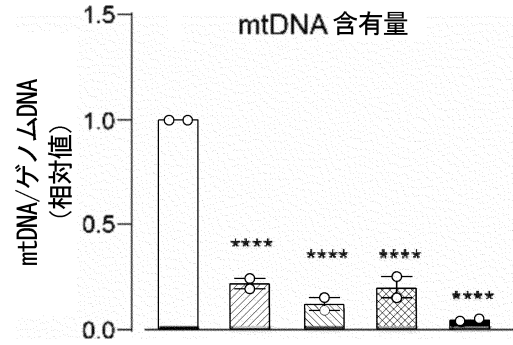
40

50

【図 2 D】



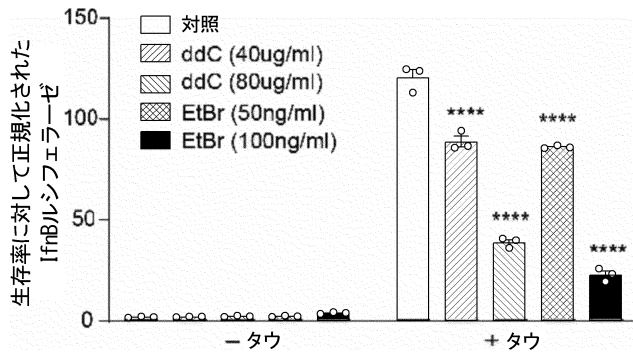
【図 2 E】



10

20

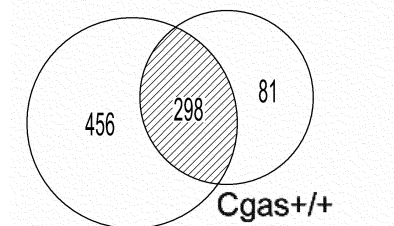
【図 2 F】



【図 2 G】

HT-DNAによって
アップレギュレーション

タウ線維によって
アップレギュレーション

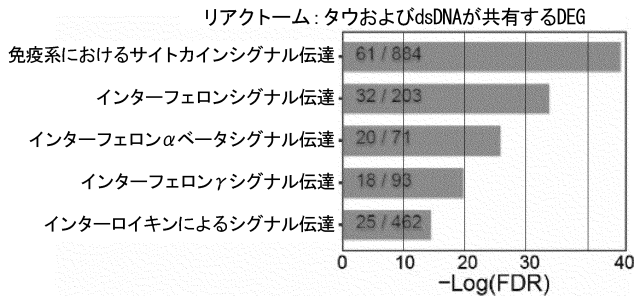


30

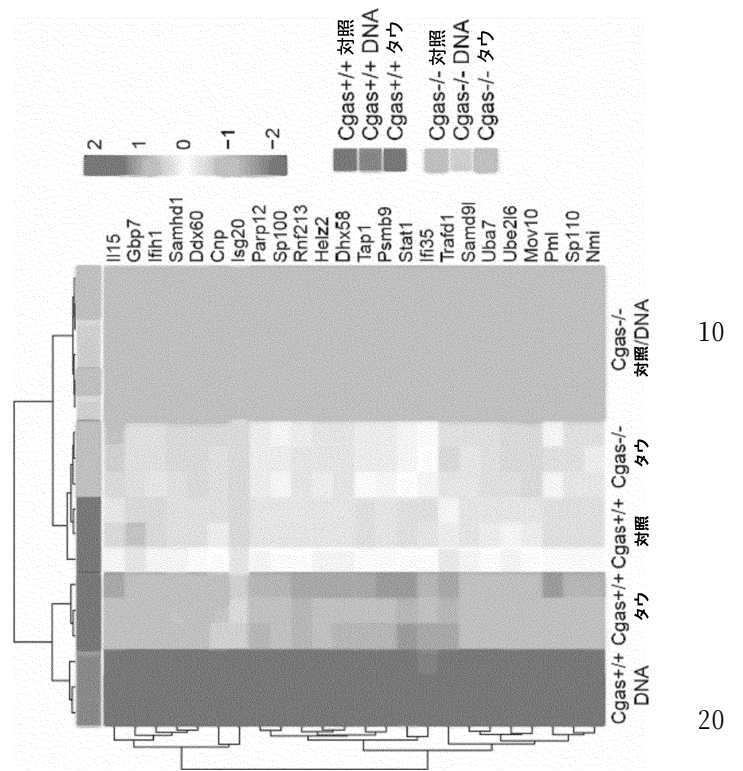
40

50

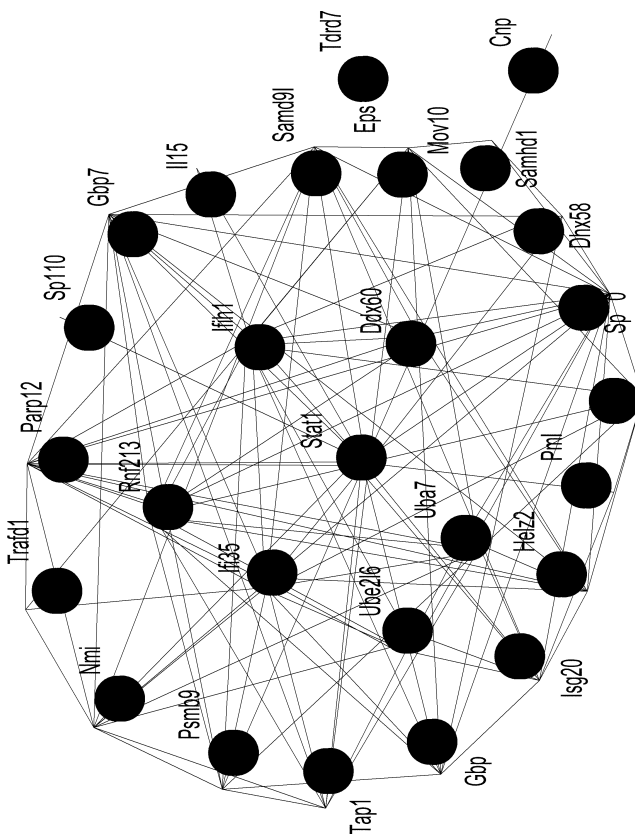
【図 2 H】



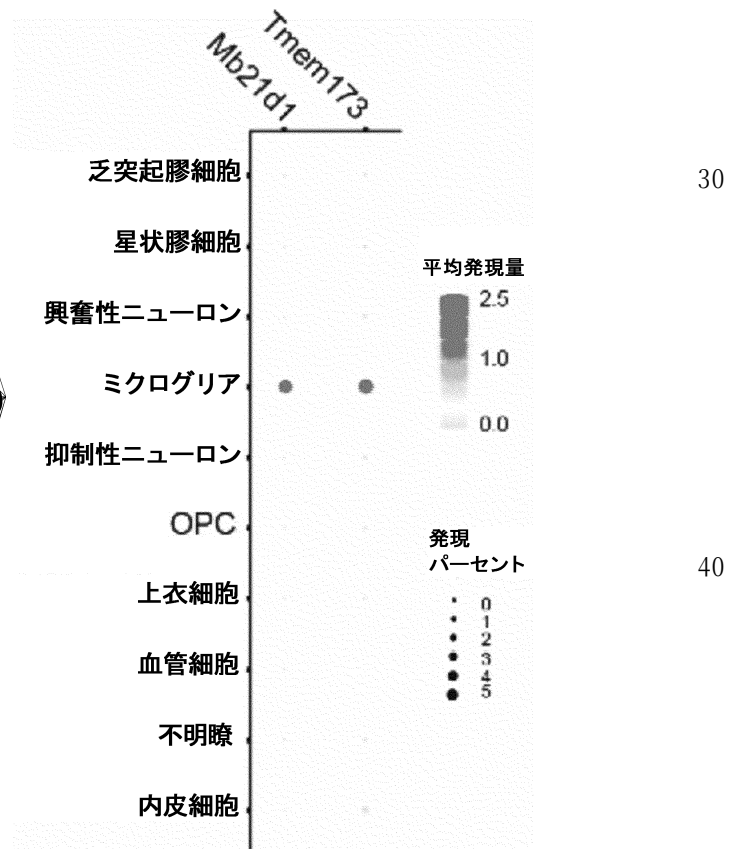
【図 2 I】



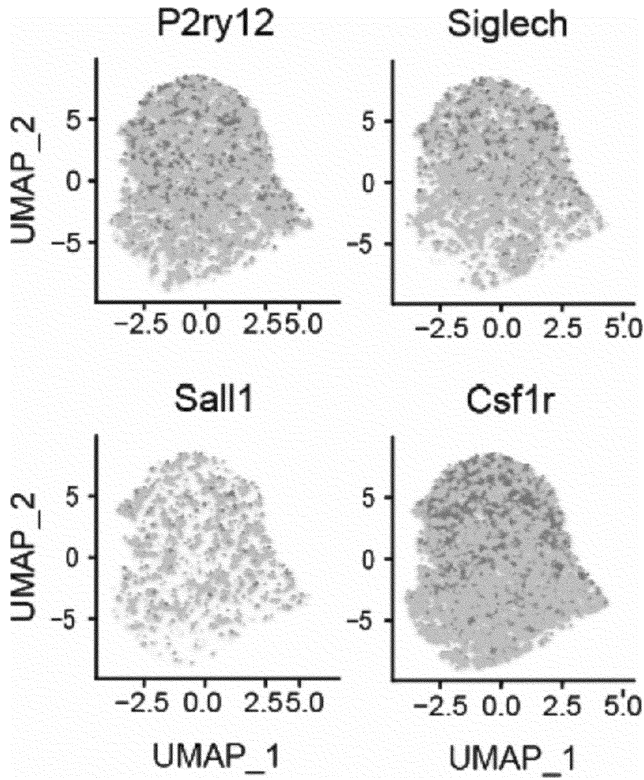
【図 2 J】



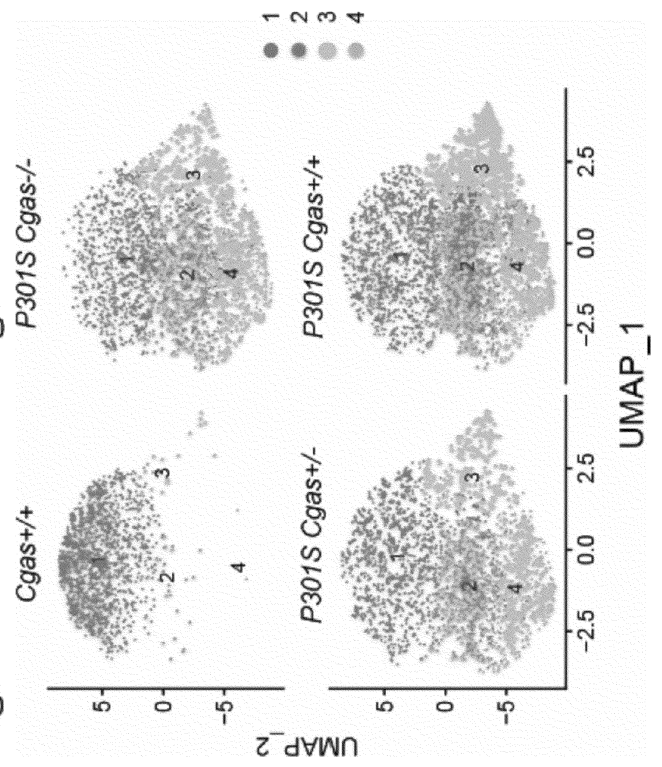
【図 3 A】



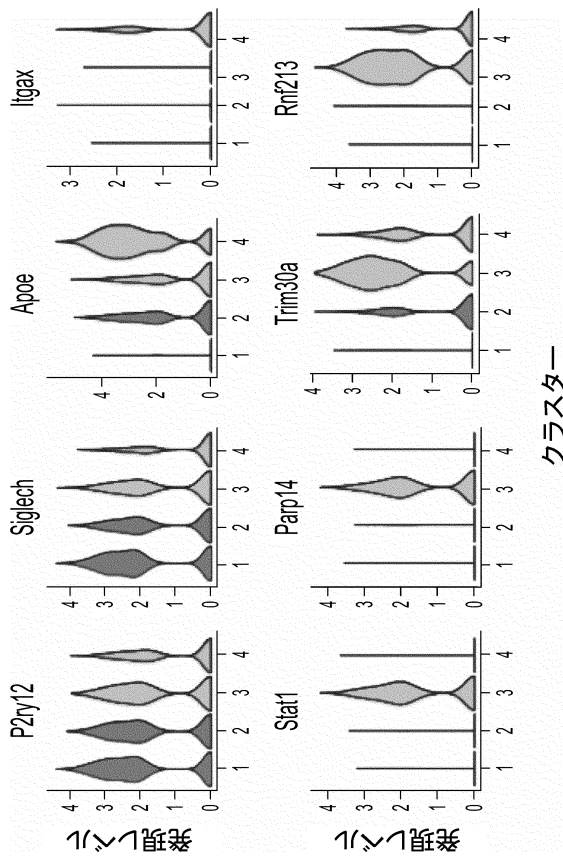
【図 3 B】



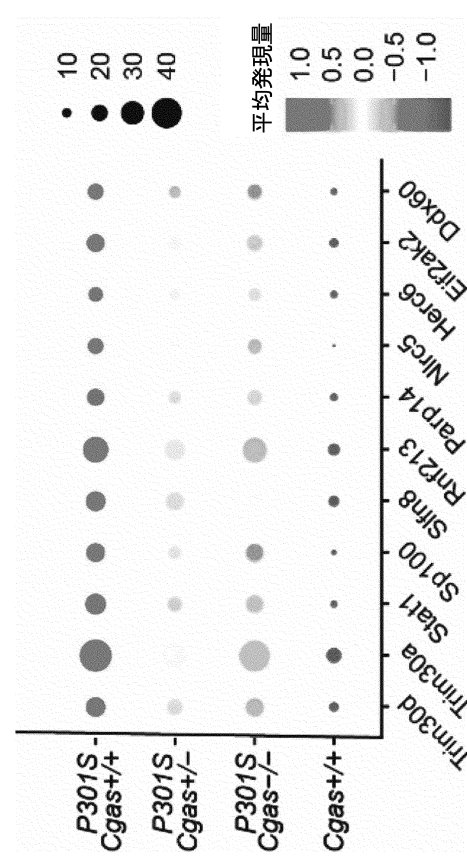
【図 3 C】

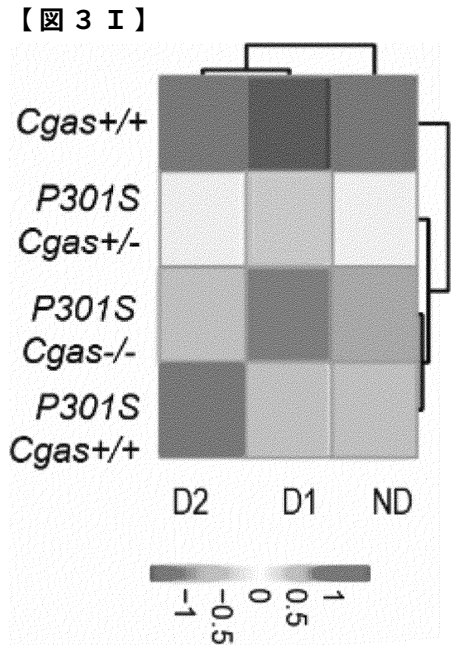
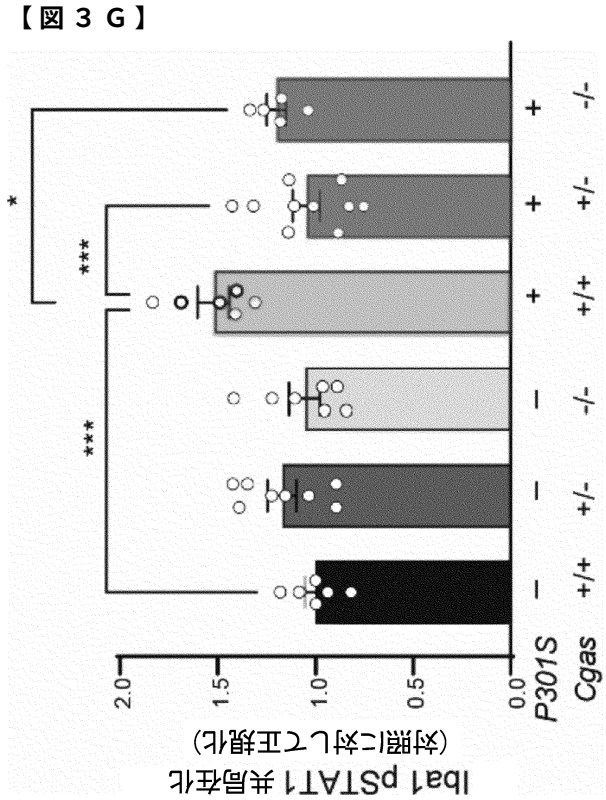
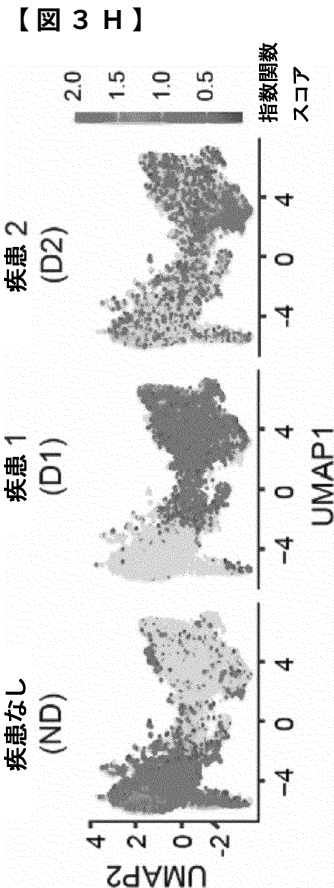
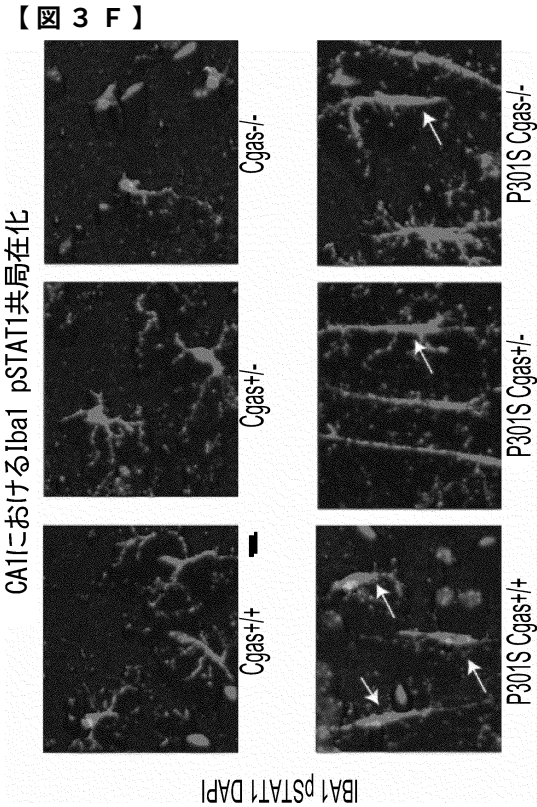


【図 3 D】



【図 3 E】





10

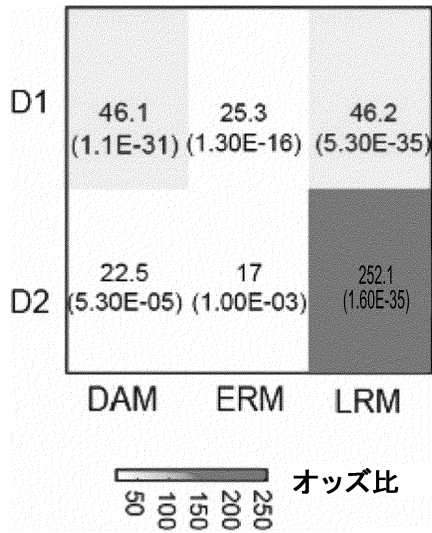
20

30

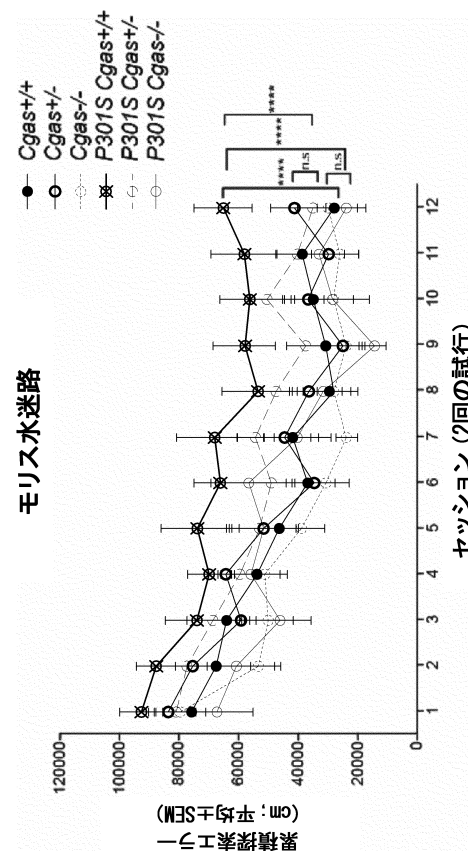
40

50

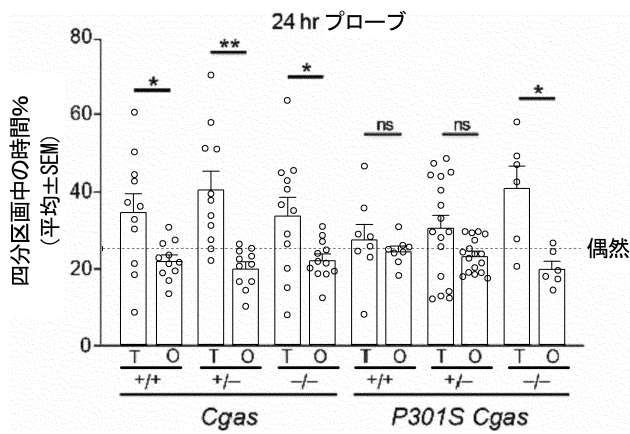
【図 3 J】



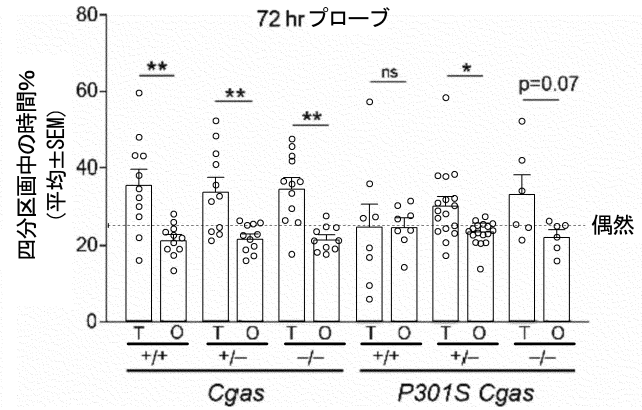
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



10

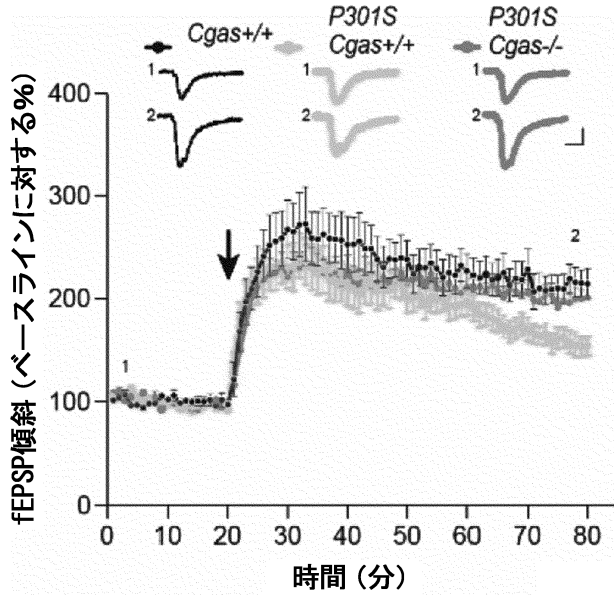
20

30

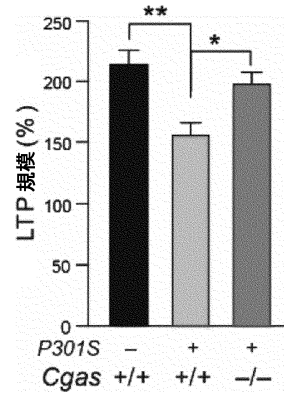
40

50

【図 4 D】

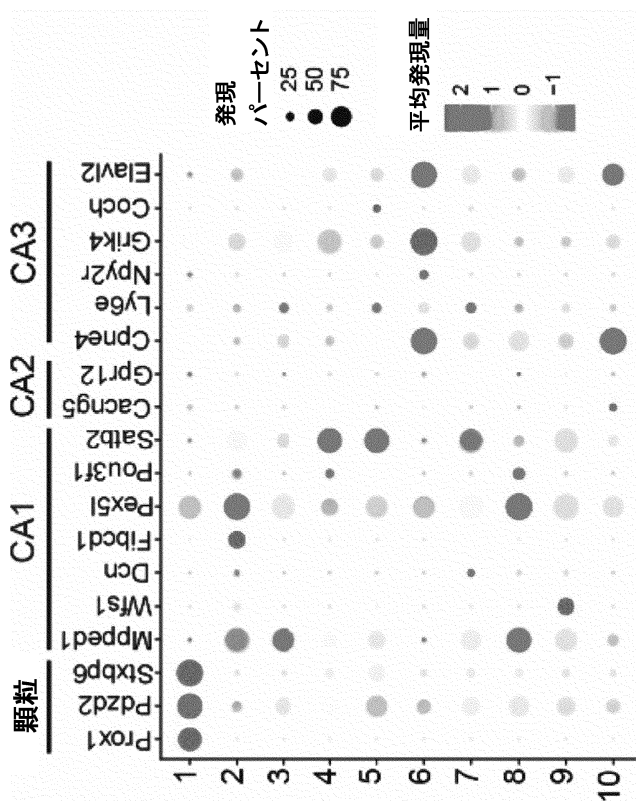


【図 4 E】

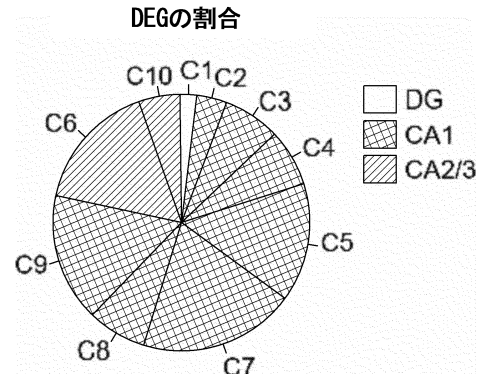


10

【図 4 F】



【図 4 G】



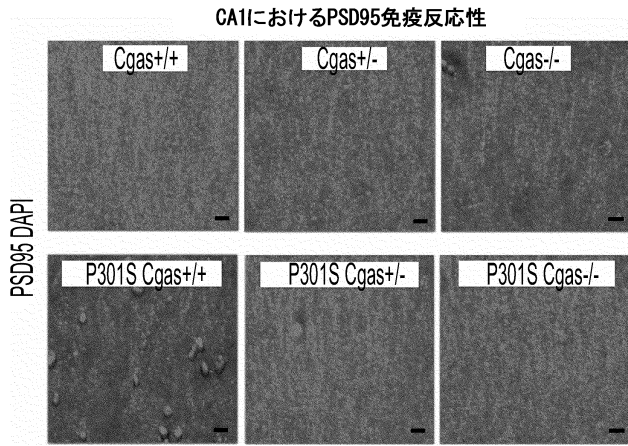
20

30

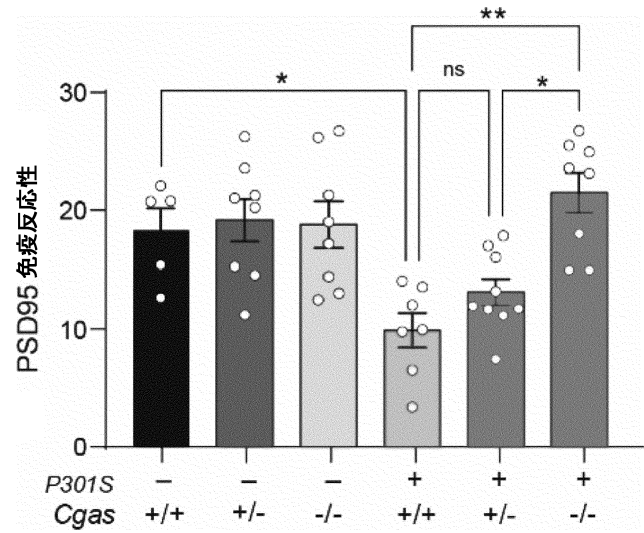
40

50

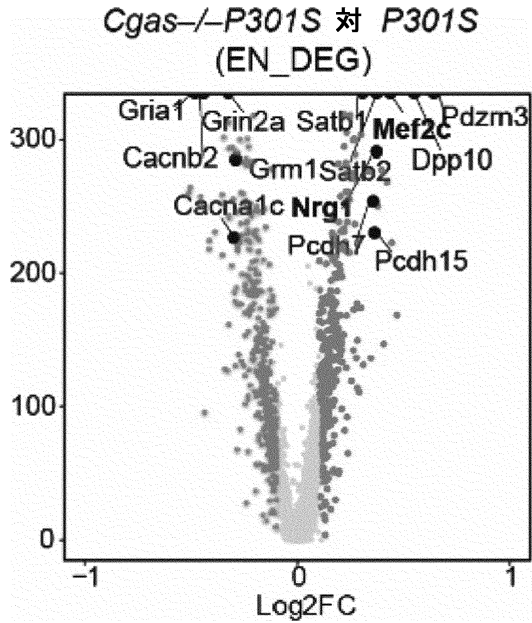
【図 4 H】



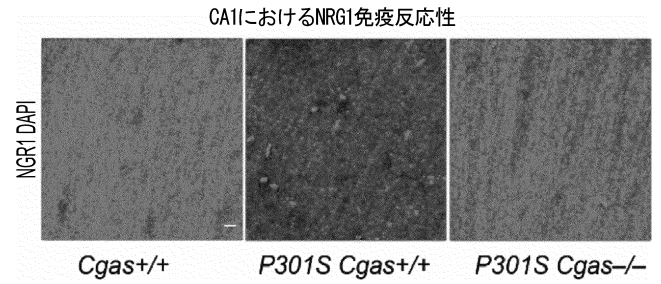
【図 4 I】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

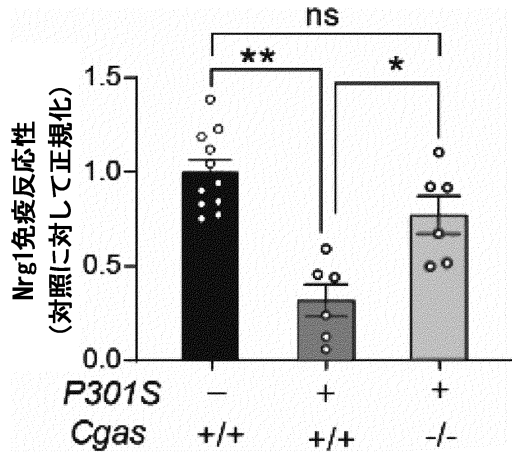
20

30

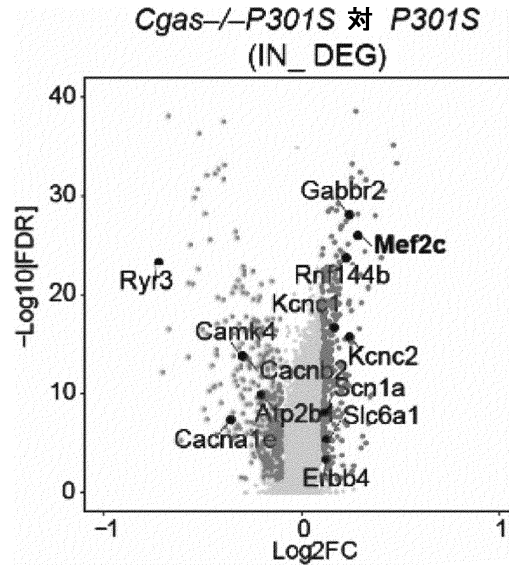
40

50

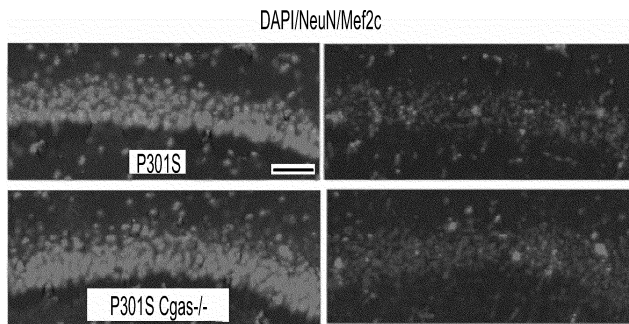
【図 5 C】



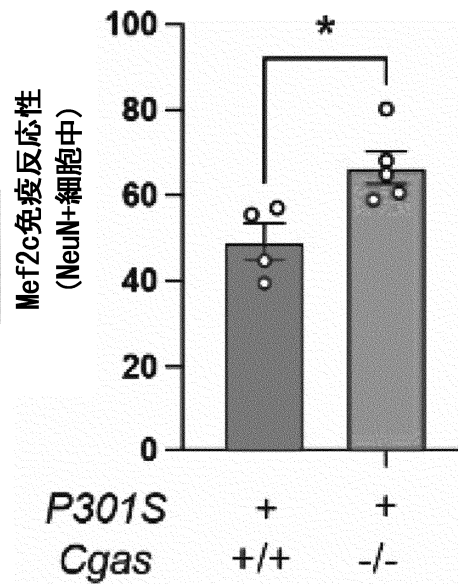
【図 5 D】



【図 5 E】



【図 5 F】



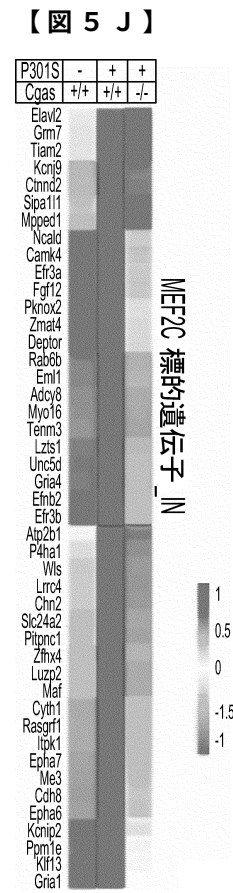
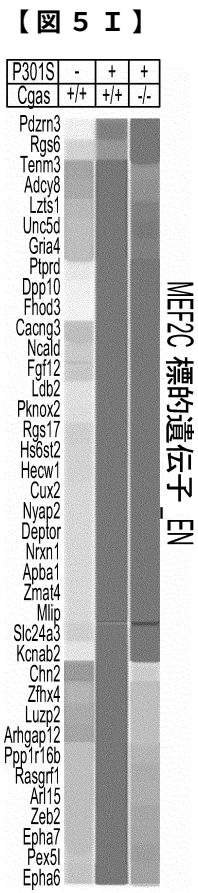
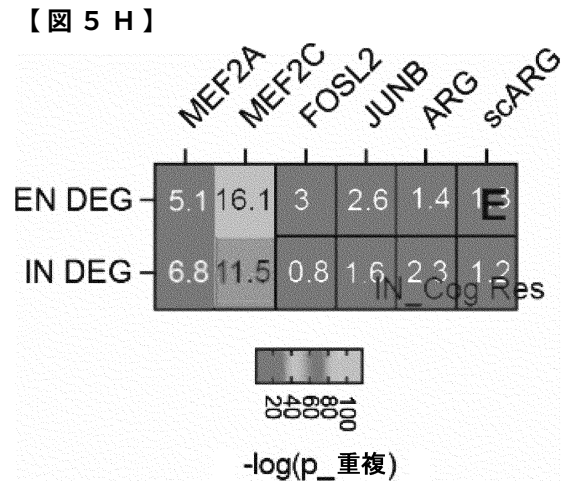
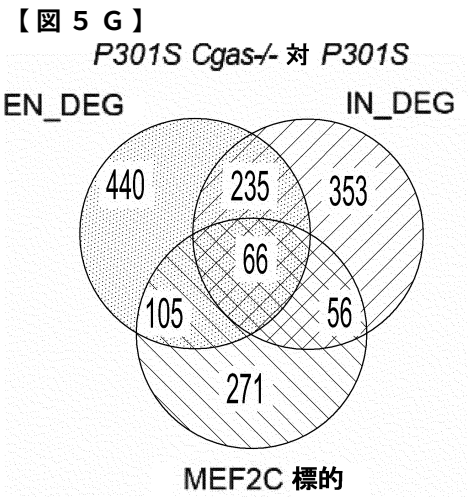
10

20

30

40

50



10

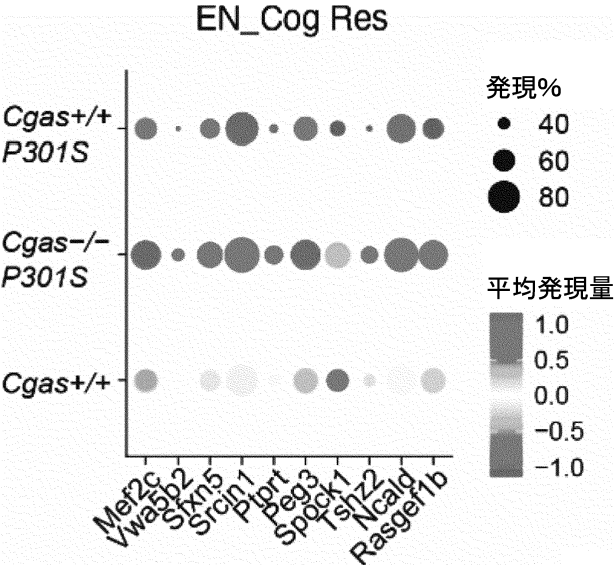
20

30

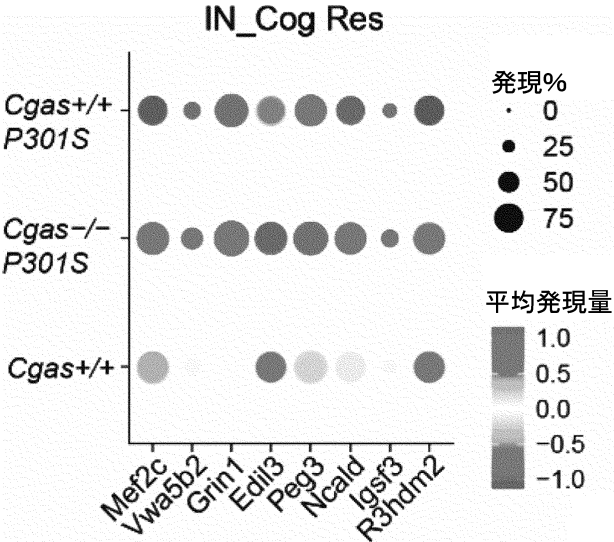
40

50

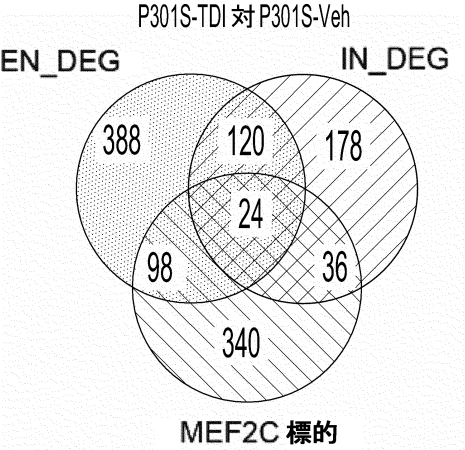
【図 5 K】



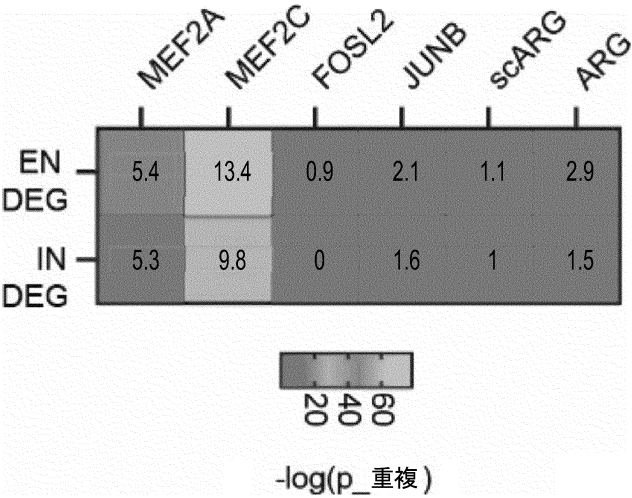
【図 5 L】



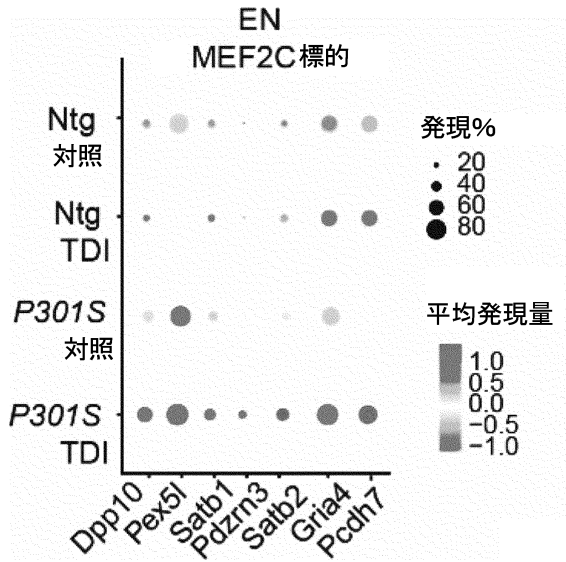
【図 6 A】



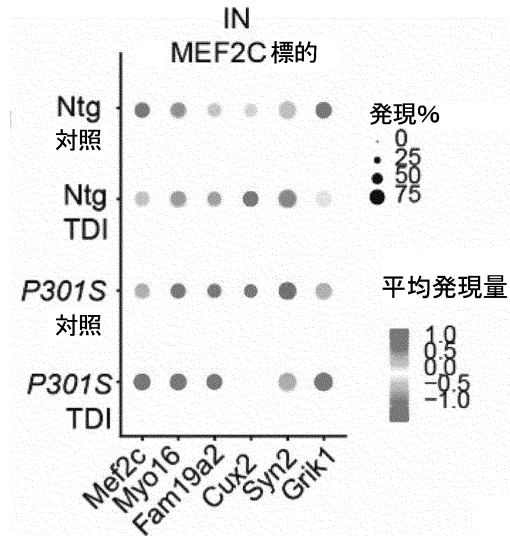
【図 6 B】



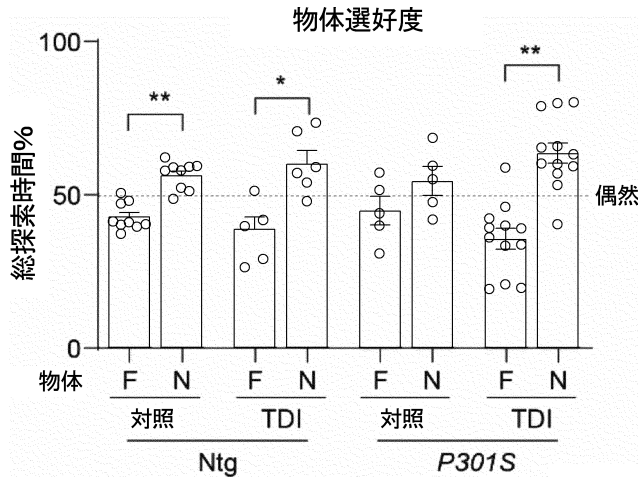
【図 6 C】



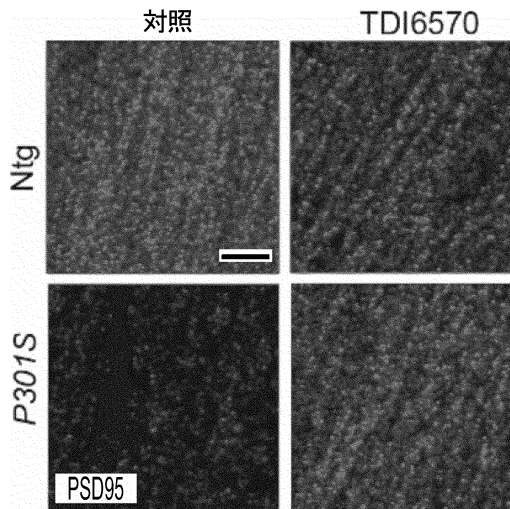
【図 6 D】



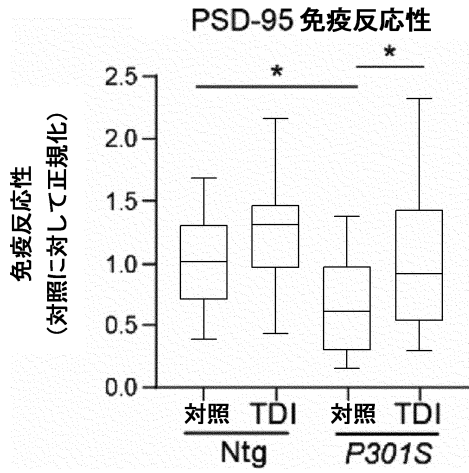
【図 6 E】



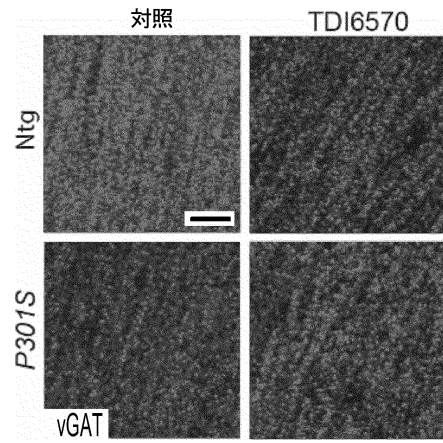
【図 6 F】



【図 6 G】

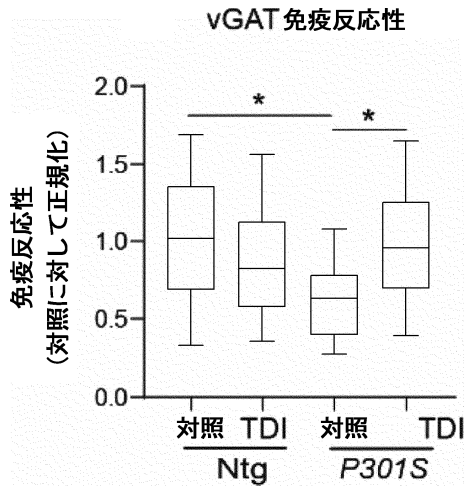


【図 6 H】

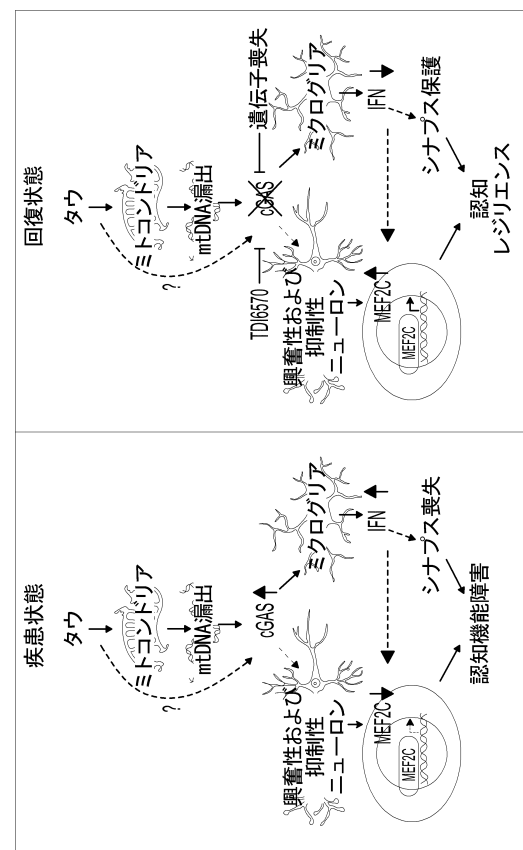


10

【図 6 I】



【図 7】



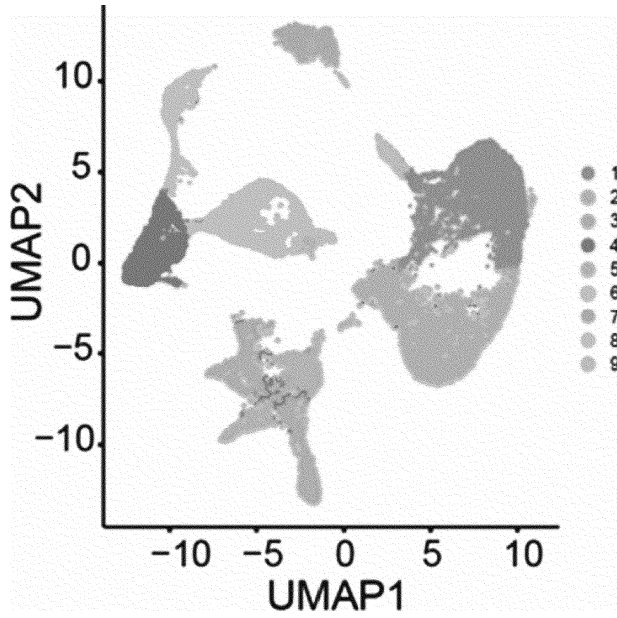
20

30

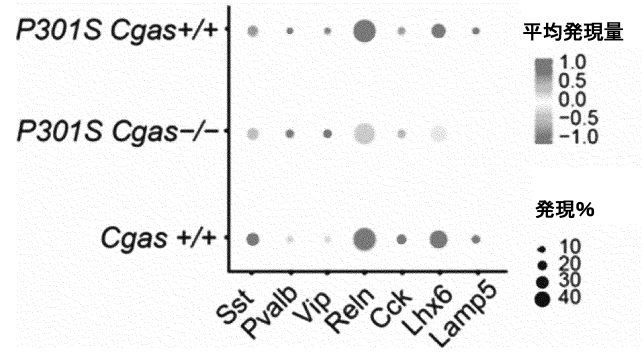
40

50

【図 8 A】

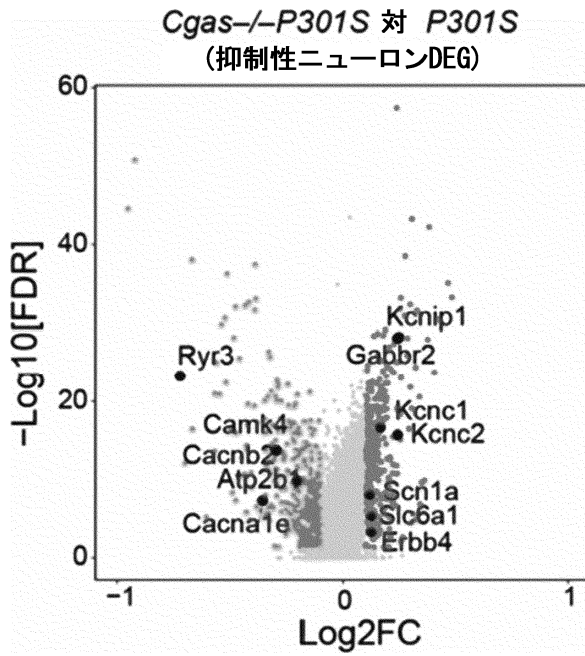


【図 8 B】

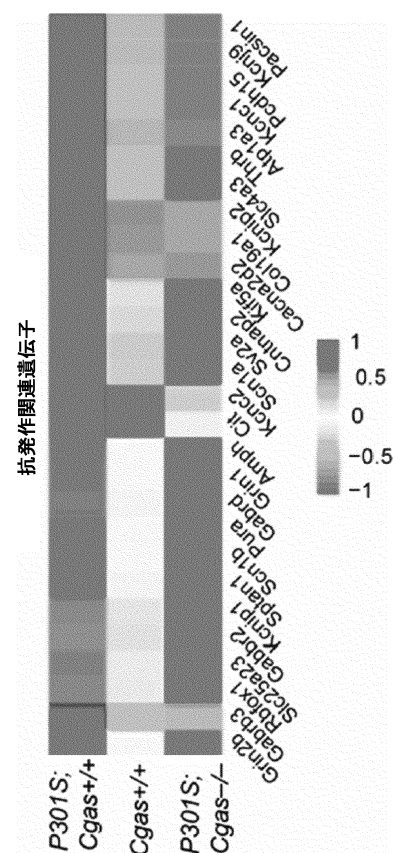


10

【図 8 C】



【図 8 D】



20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年10月28日(2024.10.28)

【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】

2025507382000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/12 C07D471/04 C07D491/048 C07D495/04 A61K31/4745 A61K31/506 A61K31/4743 A61K31/4741 C07D471/14 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) A61P C07D 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI 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 2019/153002 A1 (LAMA LODOE [US]; TUSCHL THOMAS [US] ET AL.) 8 August 2019 (2019-08-08) cited in the application claims 1, 32-37 table 1	1-33, 36, 37, 39-49
X	WO 2020/186027 A1 (TOMITA DAISUKE [US]; LAMA LODOE [US] ET AL.) 17 September 2020 (2020-09-17) claims 1, 71-79 table 3	1-33, 36, 37, 39-49
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex. * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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		Date of mailing of the international search report
3 April 2023		06/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brandstetter, T

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/062593

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:
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).

10

20

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:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
36 (completely); 1-33, 37, 39-49 (partially)

30

40

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

International application No
PCT/US2023/062593

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAN JING ET AL: "Synthesis and Pharmacological Evaluation of Tetrahydro-[gamma]-carboline Derivatives as Potent Anti-inflammatory Agents Targeting Cyclic GMP-AMP Synthase", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 64, no. 11, 10 June 2021 (2021-06-10), pages 7667-7690, XP055883994, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00398 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.1c00398> title scheme 1; 12a, 13a, 12b, 13b, 12c, 13c, 12d, 13d, 15, 16, 20, 21; page 7667 scheme 2; page 7670; compounds 22-37 -----	1-4, 8, 12-16, 21-23, 28-30, 32, 40, 41
X	LAMA LODOE ET AL: "Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 10, no. 1, 1 December 2019 (2019-12-01), XP055825490, DOI: 10.1038/s41467-019-08620-4 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-019-08620-4.pdf> the whole document & Lama LodoE ET AL: "Supplementary Information: Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression", , 21 May 2019 (2019-05-21), pages 1-36, XP093036436, Retrieved from the Internet: URL:https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41467-019-08620-4/MediaObjects/41467_2019_8620_MOESM1_ESM.pdf [retrieved on 2023-03-31] ----- -/--	1-8, 12-16, 24, 25, 28-30, 32, 33

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062593

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts Service, Columbus, Ohio; 28 August 2017 (2017-08-28), Anonymous: "2-(methylamino)-1-(1,3,4,5-tetrahydro-6-methoxy-9-methyl-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036466, retrieved from STN Database accession no. 2121373-51-9 abstract -----	1, 8, 12, 13, 16, 21, 28-30, 32
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts Service, Columbus, Ohio; 28 August 2017 (2017-08-28), Anonymous: "2-amino-1-(1,3,4,5-tetrahydro-6-methoxy-5,9-dimethyl-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036468, retrieved from STN Database accession no. 2121299-08-7 abstract -----	1, 8, 12, 13, 16, 21, 22, 28-30, 33
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts service, Columbus, Ohio; 23 August 2017 (2017-08-23), Anonymous: "2-amino-1-(1,3,4,5-tetrahydro-6,9-dimethoxy-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036476, retrieved from STN Database accession no. 2118769-72-3 abstract -----	1, 7, 8, 12, 13, 16, 21, 22, 28-30, 32
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts Service; 17 August 2017 (2017-08-17), Anonymous: "2-amino-1-(9-chloro-1,3,4,5-tetrahydro-6-methoxy-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036484, retrieved from STN Database accession no. 2115477-03-5 abstract ----- -/--	1, 8, 12, 13, 16, 21, 22, 28-30, 32

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062593

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts Service; 15 August 2017 (2017-08-15), Anonymous: "2-amino-1-(1,3,4,5-tetrahydro-6-methoxy-9-methyl-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036486, retrieved from STN Database accession no. 2114266-66-7 abstract -----	1, 8, 12, 13, 16, 21, 22, 28-30, 32
X	DATABASE Registry [Online] Chemical Abstracts Service; 15 August 2017 (2017-08-15), Anonymous: "2-amino-1-(1,3,4,5-tetrahydro-7,9-dimethoxy-2H-pyrido[4,3-b]indol-2-yl)-ethanone", XP093036489, retrieved from STN Database accession no. 2113975-23-6 abstract -----	1, 7, 8, 12, 13, 16, 21, 22, 28-30, 32
X, P	CN 115 197 207 A (UNIV SHANGHAI JIAOTONG; SHANGHAI INST MATERIA MEDICA CAS) 18 October 2022 (2022-10-18) claims 1, 4, 5, 7-10 compound S1 to S30 -----	1-4, 8, 12-16, 21, 22, 28-30, 32, 40-49

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/062593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019153002 A1	08-08-2019	BR 112020016008 A2	15-12-2020
		EP 3749293 A1	16-12-2020
		IL 276501 A	30-09-2020
		JP 2021515804 A	24-06-2021
		US 2021155625 A1	27-05-2021
		WO 2019153002 A1	08-08-2019

WO 2020186027 A1	17-09-2020	CA 3131881 A1	17-09-2020
		CN 114901279 A	12-08-2022
		EP 3937932 A1	19-01-2022
		JP 2022531755 A	11-07-2022
		US 2022185812 A1	16-06-2022
		WO 2020186027 A1	17-09-2020

CN 115197207 A	18-10-2022	NONE	

International Application No. PCT/US2023/062593

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 36(completely); 1-33, 37, 39-49(partially)

compounds of formula I, wherein X is NH, NMe or NEt and subject-matter referring to them

2. claims: 1-31, 34, 35, 37-49(all partially)

compounds of formula I, wherein X is O or S and subject-matter referring to them

3. claims: 1-35, 37-49(all partially)

compounds of formula II and subject-matter referring to them

4. claims: 39-49(partially)

compounds of of claim 39, which do not fall within the scope of claim 1 and subject-matter referring to them

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 25/16 (2006.01)
A 6 1 P 25/08 (2006.01)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)
A 6 1 K 31/437 (2006.01)
A 6 1 K 31/444 (2006.01)
A 6 1 K 31/506 (2006.01)
C 0 7 D 491/048 (2006.01)
A 6 1 K 31/4355 (2006.01)
C 0 7 D 495/04 (2006.01)
A 6 1 K 31/4365 (2006.01)
C 0 7 D 471/14 (2006.01)
C 1 2 N 9/99 (2006.01)
C 1 2 N 5/079 (2010.01)

A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/14
A 6 1 K 31/437
A 6 1 K 31/444
A 6 1 K 31/506
C 0 7 D 491/048
A 6 1 K 31/4355
C 0 7 D 495/04
A 6 1 K 31/4365
C 0 7 D 471/14
C 1 2 N 9/99
C 1 2 N 5/079

C S P

1 0 5 A

1 0 2

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(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 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 シンハ スバシュ

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 3 2 0 アパー
トメント 1 9 エイ

(72)発明者 ガン リー

アメリカ合衆国 1 0 0 6 5 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト シックスティセブンス ス
トリート 4 0 0 アパートメント 1 8 ディー

(72)発明者 ナギリ ラヴィ クマール

アメリカ合衆国 1 0 0 4 4 ニューヨーク州 ニューヨーク メイン ストリート 4 6 5 アパート
メント 1 2 エイチー 3

(72)発明者 アミン サダフ

アメリカ合衆国 1 0 0 6 5 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト シックスティフォース ス
トリート 4 2 3

(72)発明者 ファン イゲ

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト セブンティス ストリート
4 2 0 アpartment 1 1 エム

F ターム (参考) 4B065 AA91X AC12 BB13 BC12
4C086 AA01 AA02 AA03 CB05 CB09 CB22 CB26 MA01 MA04 NA14
ZA01 ZA06 ZA15 ZA16 ZB33 ZC20