

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-516464

(P2015-516464A)

(43) 公表日 平成27年6月11日(2015.6.11)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
C07D 239/48 (2006.01)	C07D 239/48	C S P	4 C 050
C07D 401/12 (2006.01)	C07D 401/12		4 C 063
C07D 487/04 (2006.01)	C07D 487/04	1 4 0	4 C 084
C07D 405/12 (2006.01)	C07D 487/04	1 4 4	4 C 086
C07D 405/14 (2006.01)	C07D 405/12		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-512620 (P2015-512620)	(71) 出願人	514291370 カルアジア ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 102 , ナンシー リッジ ドライブ 6330 , ナンシー リッジ テクノロジー センター
(86) (22) 出願日	平成25年5月15日 (2013.5.15)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月13日 (2015.1.13)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/000133		
(87) 國際公開番号	W02013/172872		
(87) 國際公開日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		
(31) 優先権主張番号	61/647,081		
(32) 優先日	平成24年5月15日 (2012.5.15)		
(33) 優先権主張國	米国(US)	(71) 出願人	511150953 サンフォードーバーンハム メディカル リサーチ インスティテュート アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホヤ ノース トレー パインズ ロード 10901

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞質Hsp90の阻害剤としてのピリミジンジアミン誘導体

(57) 【要約】

本出願は、細胞質のヒートショックタンパク質Hsp90の活性を阻害する有機化合物を記載する。神経性疾患、増殖性障害、及び感染などのHsp90活性の阻害に応答する疾患又は状態の症状の予防、治療又は改善に有用な方法も記載される。

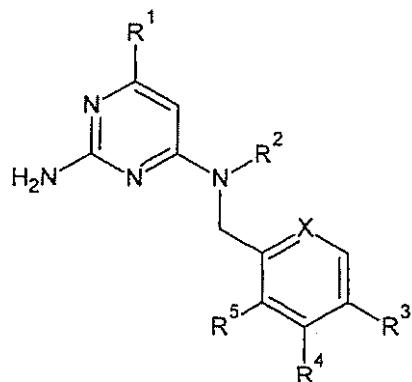
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式

【化 1】



10

(式中、

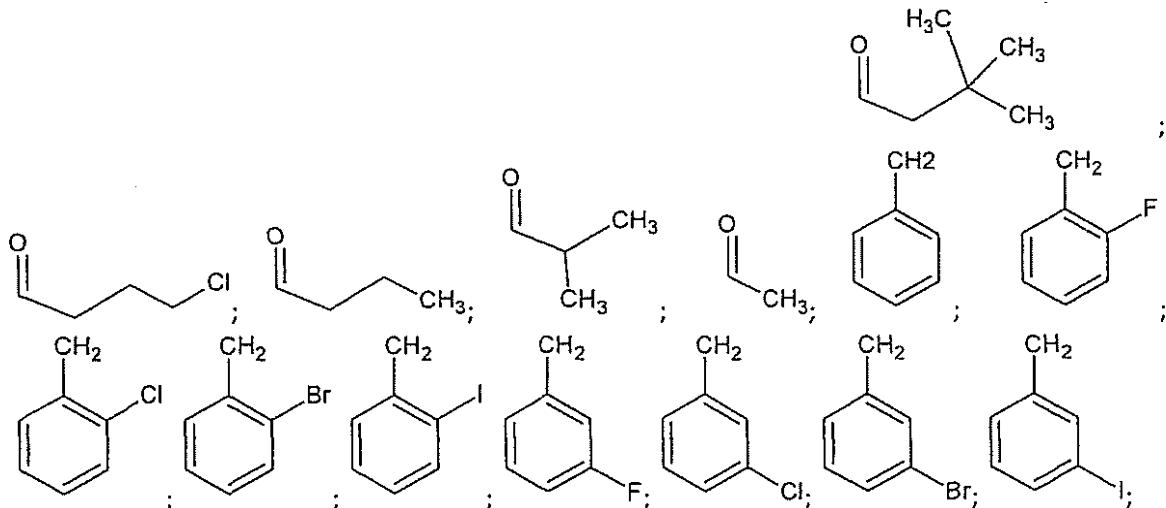
R¹は、H、CH₃、OCH₃、CF₃、F、Cl、Br又はIであり；

Xは、C又はNであり；

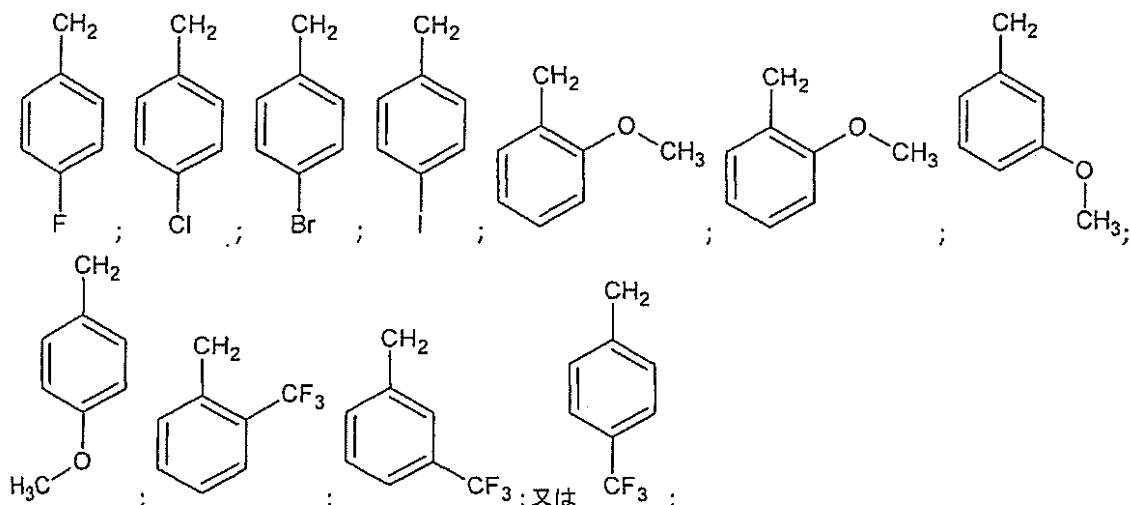
R²はH、CH₃、CH₂CH₃、CH(CH₃)₂、C(CH₃)₃、CH₂CH₂CH₃；CH₂CH₂OH、CH₂CH₂CH₂CH₃、CH₂C
H₂CH₂CH₃、CH₂CHCH₂、CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃；

20

【化 2】



30



であり；

R^3 はH、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 であり；

R^4 はH、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 であり；

R^5 はH、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 である）

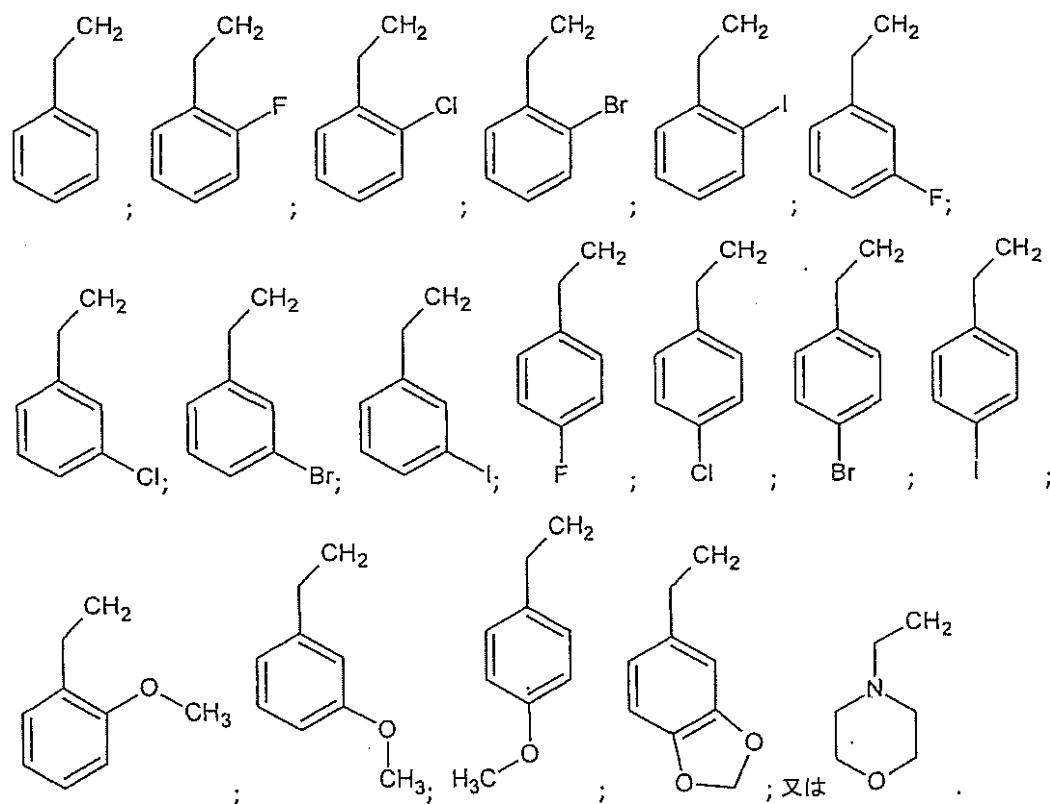
の化合物又はそれらの塩、水和物若しくは溶媒和物。

20

【請求項2】

R^2 が、

【化3】



である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を、1種以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤と共に含む医薬組成物。

【請求項4】

50

病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、Hsp90活性を阻害するために有効な量を投与することを含む方法。

【請求項5】

病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療のための、Hsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

【請求項6】

病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療方法であって、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、Hsp90活性を阻害するのに有効な量及び追加の治療剤を、それらを必要とする対象に投与することを含む方法。

10

【請求項7】

病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療のための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物及び追加の治療剤の使用。

【請求項8】

病状又は状態がHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

20

【請求項9】

病状又は状態がHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させるための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

【請求項10】

病状又は状態がHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量及び追加の治療剤を投与することを含む方法。

30

【請求項11】

病状又は状態がHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させるための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物及び追加の治療剤の使用。

【請求項12】

治療剤を用いた治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態がHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

40

【請求項13】

治療剤を用いた治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療のための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物及び追加の治療剤の使用。

【請求項14】

治療剤を用いた治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態がHsp90活性の阻害に応答する対象において病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、Hsp90活性を阻害するのに有効な量を投与すること

50

を含む方法。

【請求項 1 5】

治療剤を用いた治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する対象において、病状又は状態の発生率を軽減又は減少させるための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物及び追加の治療剤の使用。

【請求項 1 6】

Hsp90に媒介される病状又は状態が、自己免疫疾患、炎症性疾患、神経性疾患、感染、癌、癌腫、心臓血管疾患、アレルギー、喘息、増殖性障害、代謝性疾患、白血病、新生物、ホルモン関連疾患、加齢黄斑変性、及び神経線維腫症から生じる腫瘍又は症状を含む群から選択される、請求項4、6、8、10、12、及び14のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

Hsp90に媒介される病状又は状態が、自己免疫疾患、炎症性疾患、神経性疾患、感染、癌、癌腫、心臓血管疾患、アレルギー、喘息、増殖性障害、代謝性疾患、白血病、新生物、ホルモン関連疾患、加齢黄斑変性、及び神経線維腫症から生じる腫瘍又は症状を含む群から選択される、請求項5、7、9、11、13、及び15のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 1 8】

Hsp90に媒介される疾患又は状態が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症を含む群から選択される神経変性性疾患である、請求項4、6、8、10、12、及び14のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

Hsp90に媒介される疾患又は状態が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症を含む群から選択される神経変性性疾患である、請求項5、7、9、11、13、及び15のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 0】

Hsp90に媒介される疾患又は状態が、肝硬変、強皮症、多発性筋炎、全身性狼瘡、リウマチ性関節炎、間質性腎炎、肺線維症、及びケロイド形成を含む群から選択される線維形成障害である、請求項4、6、8、10、12、及び14のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

Hsp90に媒介される疾患又は状態が、肝硬変、強皮症、多発性筋炎、全身性狼瘡、リウマチ性関節炎、間質性腎炎、肺線維症、及びケロイド形成を含む群から選択される線維形成障害である、請求項5、7、9、11、13、及び15のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 2 2】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態を治療する方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 2 3】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態を治療する方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法。

40

【請求項 2 4】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態の発生率を軽減若しくは減少させる方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 2 5】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態の発生率を軽減若しくは減少させる方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に

50

投与することを含む方法。

【請求項 2 6】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態の予防又は治療のための方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法。

【請求項 2 7】

哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態の予防又は治療のための方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、請求項1又は2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法。

10

【請求項 2 8】

異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態が、膀胱、乳房、大腸、腎臓、表皮、肝、肺、食道、胆嚢、卵巣、脾、胃、子宮頸部、甲状腺、前立腺、胃腸系又は皮膚の癌；リンパ系統の造血性腫瘍；骨髄腫系統の造血性腫瘍；甲状腺の濾胞性癌；間葉系起源の腫瘍；中枢又は末梢神経系の腫瘍；メラノーマ；精上皮腫；奇形癌；骨肉腫；色素性乾皮症；神経線維腫症；角化棘細胞腫；甲状腺濾胞性癌；及びカポジ肉腫を含む、請求項22から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

抗癌剤に対する耐性の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

20

【請求項 3 0】

対象における抗癌剤に対する耐性の発生率を軽減又は減少させるための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

【請求項 3 1】

抗癌剤に対する耐性を逆行させる方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

30

【請求項 3 2】

対象における抗癌剤に対する耐性を逆行させるための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

【請求項 3 3】

請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む、抗癌剤の活性を強化する方法。

【請求項 3 4】

対象における抗癌剤の活性を強化するための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

40

【請求項 3 5】

抗癌剤に対する耐性の発現を遅延又は防止する方法であって、それらを必要とする対象に、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法。

【請求項 3 6】

対象における抗癌剤に対する耐性の発現を遅延又は防止するための、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な、請求項1又は請求項2のいずれか一項に記載の少なくとも1種の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本出願は、全体を引用により本明細書に組み込む「Novel, selective and potent brain-penetrating small molecule inhibitors of cytosolic Hsp90」と題する2012年5月15日出願の仮出願第61/647,081号の利益を主張する。

【0002】

本発明は、ヒートショックタンパク質Hsp90の阻害に応答する病状に使用するためのHsp90阻害活性を有する化合物、及び病状を治療するための前記化合物を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

10

ヒートショックタンパク質(Hsp)は、ヒートショック、酸化ストレス、毒素、放射線、感染、及び炎症などの細胞のストレスに対して応答する細胞により産生される(Macario and de Macario 2000, Int. J. Clin. Lab. Res., 30:49-66)。ヒートショックタンパク質は、結合により分子シャペロンとして作用して、クライアントタンパク質をフォールディングの中間段階で安定化し、タンパク質が折り畳まれてそれらの機能的状態になることを可能にする。ある種のHspは、正常なストレスのない条件下で、リストに載る数が増えつつある重要な細胞タンパク質の正確なフォールディング、分解、局在化及び機能を制御することにより、主要な分子シャペロンの役割を演じることもできる。Hsp90は、十分に研究されたヒートショックタンパク質の1つである。Hsp90の2種の主要なヒトアイソフォーム、即ち、主要な誘発可能な形態のHsp90 α 、及び少量の構成的に発現した形態のHsp90 β が知られている。それに加えて2つの他の密接に関連するシャペロン、即ち、小胞体のGP96/GRP94、及びミトコンドリアのTRAP1(TNF受容体関連タンパク質1)がある。Hsp90 α 、GRP94及びTRAP1の間の機能における差については、それらの細胞内局在化における差以外は殆ど知られていない。

20

【0004】

正常条件下でHsp90は、細胞内の最も豊富な細胞質のヒートショックタンパク質である。Hsp90は、ある範囲のクライアントタンパク質及び調節タンパク質と相互作用することによりそのシャペロン機能を働かせる(Smith, 2001, Molecular chaperones in the cell, pp. 165-178)。Hsp90のシャペロン機能の詳細な洞察が生化学的及びX線結晶学的研究から実施可能になっている(Prodromouら, 1997, Cell, 90:65-75; Stebbinsら, 1997, Cell, 89:239-250)。Hsp90は、Hsp70、Hsc70相互作用タンパク質(Hip)、Hsp70-Hsp90組織化タンパク質(Hop)、p23、及びp50cdc37を含む他のシャペロンとの複合体で単離される。Hsp90は、そのN末端に明確なATP結合部位を有する。Hsp90の機能の機構の単純化モデルによれば、アミノ端部ポケットへのATPの結合が、Hsp90コンホーメーションを変化させて多シャペロン複合体との会合を可能にする。多シャペロン複合体は、クライアントタンパク質のHsp70/Hsp40複合体への結合により形成される。次に、複合体は、シャペロンHopを通してHsp90と会合する。ADPをATPにより置き換えると、Hsp90のコンホーメーションは変化して、Hop及びHsp70が放出されて、コシャペロンの他の基が補充される。ATPを加水分解すると、成熟複合体からこれらのコシャペロン及びクライアントタンパク質の遊離が起こる。ATP結合部位阻害剤のハービマイシンA、ゲルダナマイシン(GA)及び17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン(17-AAG)は、ATPの結合を阻止して成熟複合体への変換を妨げる(Grenertら, 1997. J Biol. Chem., 272:23834-23850)。ハービマイシンA及びゲルダナマイシン(GA)は、v-Src癌遺伝子により形質転換された線維芽細胞の悪性の表現型を逆行させて(Ueharaら, 1986, Mol. Cell. Biol., 6:2198-2206)、インビトロ(Schulteら, 1998, Cell Stress and Chaperones, 3:1008-108)及びインビトロ動物モデル(Supkoら, 1995, Cancer Chemother. Pharmacol., 36:305-315)の両方で強い抗腫瘍活性を有することが示された。ATP結合部位への結合により、GA及び(17-N-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン)17-AAGは、Hsp90に本来備わっているATPアーゼ活性を阻害する(Prodromouら, 1997, Cell, 90:65-75; Stebbinsら, 1997, Cell, 89:239-250; Panaretouら, 1998, EMBO J., 17:4829-4836)。

30

40

50

【 0 0 0 5 】

Hspの90ATPアーゼ活性を阻害すると、シャペロン-クライアントタンパク質複合体からp23が失われて、シャペロンサイクルの中斷が生じる。生じたHsp90-クライアントタンパク質複合体は、ユビキチンプロテアソーム経路による分解の標的にされる(Neckersら, 1999, Invest. New Drugs, 17:361-373; Whitesell & Lindquist, 2005, Nat. Rev. Cancer, 5:761-772)。Hsp阻害剤による処理で起こる分解の標的になるタンパク質の中に、癌において根本的に重要で且つ共通して無秩序なプロセスである細胞増殖、細胞周期調節及びアポトーシスに関与するタンパク質がある(Hosteinら, 2001, Cancer Res., 61:4003-4009)。それ故、Hsp90活性のモジュレーションは、抗癌療法として利益がある可能性を有し得る。

10

【 0 0 0 6 】

Hsp90クライアントタンパク質は、細胞の増殖及び生存に關係し、それ故、抗癌療法のための標的として重要であり、標的として、多くの成長因子の受容体により惹起される有糸分裂に必要な受容体チロシンキナーゼである細胞Src (c-Src);乳房、卵巣、前立腺、及び胃の癌を含む各種悪性腫瘍で過発現した受容体チロシンキナーゼであるErbB2(Her2/neu);M-相中の細胞周期進行の調節因子として重要なポロ様キナーゼ(PIks);細胞増殖を刺激してアポトーシスを抑制することにより細胞の成長を調節する経路に関するAkt (PKB);成長シグナルに対する細胞の応答を媒介するRAS-RAF-MEK-ERK-MAPキナーゼ経路に関するc-Raf、B-Raf、及びMek;細胞の成長、分化、増殖、生存、アポトーシス、及び移動に関するEGFR;細胞の増殖、分化及びアポトーシスに関する受容体チロシンキナーゼであるFMS様チロシンキナーゼ3(FLT3);肝細胞成長因子に結合して細胞運動性及び細胞成長の両方を調節する受容体チロシンキナーゼであるc-met;細胞周期を駆動するCdk1、Cdk2、Cdk4、及びCdk6;DNA損傷に対する応答におけるG2-相チェックポイントの活性化に必要なWee-1;細胞周期停止を生じさせてアポトーシスを誘発する腫瘍抑制タンパク質であるP53;プロゲステロン受容体、エストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体;血管新生に役割を演じる遺伝子の発現を制御する転写因子である低酸素症誘発可能因子-1a (HIF-1a);T細胞及びナチュラルキラー細胞で正常に発現され、且つ慢性リンパ球性白血病(CLL)の約50%の症例で異常に発現されるSyk-ZAP-70タンパク質チロシンキナーゼファミリーのメンバーであるZAP-70が挙げられる。(US2011/0046155A1、2011年2月24日)。

20

【 0 0 0 7 】

30

インビボにおける多くのタンパク質の正確なフォールディングには、分子シャペロンとして作用するヒートショックタンパク質の介助が必要である。ストレスのかかった細胞、例えば、敵対的宿主環境により包囲された腫瘍細胞は、この介助に大きく依存する。腫瘍細胞は、タンパク質のフォールディングに欠陥を生じさせる条件下でそれらのプロテオームの完全性を維持するためにHspを上方制御することが観察されている。一般的に分子シャペロン阻害剤は、及び特にHsp90阻害剤は、複数の異常なシグナル伝達経路を同時に阻害する可能性を有し、それ故、複数の異常シグナル伝達経路を同時に阻害する独特の能力を有する部類の化学療法剤として有望である。

【 0 0 0 8 】

40

抗癌剤を用いる治療は、標的の腫瘍細胞に課されるストレスをさらに増大させるが、Hsp90は、そのようなストレスの有害な効果を軽減するために、癌の薬剤及び治療計画の効果に抵抗することに関与する。それ故、シャペロンのモジュレーター又は阻害剤、特にHsp90阻害剤は、悪性の細胞を抗癌剤及び治療計画に対する感受性を高め、抗癌剤及び治療に対する耐性の発生率を軽減又は減少させ、抗癌剤及び又は治療に対する耐性を逆行させ、抗癌剤の活性及び又は治療を強化して、抗癌剤及び又は治療に対する耐性の発現を遅延又は防止する作用剤として有望である(US2011/0046155A1、2月24、2011)。

【 0 0 0 9 】

50

Hsp90の阻害剤は、神経疾患のための治療を提供する可能性を有する。大部分の神経変性性疾患においては、異常なタンパク質が細胞内に蓄積して病理学的症状に至る。例えば、アルツハイマー病(AD)においては、過リン酸化されたタンパク質の凝集が、疾患の発

生における要因の1つとして関与する。Hsp90及びその補助因子であるユビキチンリガーゼ(Hsp70-相互作用タンパク質のカルボキシ末端)CHIPが、微小管関連タンパク質のレベルを調節するので、Hsp90阻害剤は、ADを治療するために凝集を取り除くべく探求されている(Calcul L. ら 2012, Future Med. Chem. 4(13):1751-61)。この過リン酸化物はcdk5などの無調節のSer/Thrキナーゼの生成物である。CDK5は、数種の他のニューロンタンパク質もリン酸化するので、筋萎縮性側索硬化症(ALS)及びニーマンピックC型疾患(NPD)などのAD以外の神経変性性疾患の病原性において役割を演じると考えられる。cdk5の活性は、ニューロン特異的活性化剤であるp35及びp39との会合により調節される。(Tsaiら, Nature, 1994;371:419-423)。p35のp25への変換は異常なCdk5活性をもたらす。p35タンパク質は、Hsp90に対するクライアントタンパク質である。Hsp90の阻害は、p35のレベルを減少させる。(Luo W. ら Proc. Natl. Acad. Sci., 2007, 104(22): 9511-9516)。タウオバシーの細胞モデル及びマウスモデルにおけるHsp90の阻害は、これらのタンパク質の病原性活性の低下及び凝集したの排除に結びつく。(Luo W. ら 2007)。

10

【0010】

Hsp90阻害剤ゲルダナマイシンは、Hsp70シャペロン活性の上方制御によりパーキンソン病(PD)の数種の動物モデルにおいて、-シヌクレイン媒介毒性を防止する。Hsp70シャペロン活性が高い程、-シヌクレイン凝集物の形成が防止され(Auluck, PK and Bonini, NM, 2002, Nat. Med. 8: 1185-1186; Fowler, TR. ら, 2005, J. Mol. Biol. 351:1081-1100)、siRNAに媒介されるTRAP1の消耗により、細胞を酸化ストレスにより誘発されるチトクロームc放出及び細胞死に対して感受性とし、ミトコンドリアのアポトーシスカスケードの変調におけるTRAP1(ミトコンドリアのHsp90)に対する役割が示される。Hsp90の阻害は、これらのPD関連タンパク質により誘発される細胞傷害性を緩和することができる。

20

【0011】

Hsp90阻害剤薬剤の数通りの臨床試験が癌の治療について進行中である。しかしながら、多くの試験が、最大耐量において効力が大きく不足したので、放棄された。細胞をHsp90阻害剤治療の効果の影響を受けにくくし得る異なった細胞機構が存在すると報告された(Peter W. Piper PW and Millson SH, Pharmaceuticals 2011, 4, 1400-1422)。例えば、Hsp90阻害の主要な効果は、Hsp27及びHsp70など生存を支持するシャペロンの細胞中のレベルを増大させるストレス応答であるヒートショック応答の強い誘発である。この応答は、癌治療の関係では有益ではないが、他の疾患条件の関係では有利なこともある。さらに、阻害剤は、癌細胞中においてアポトーシスを抑制するように作用するHsp90の形態であるミトコンドリアのHsp90タンパク質に常に接触するとは限らない。神経変性性疾患の場合に、阻害剤は、血液脳関門を通過するときにも有効であるべきである。

30

【0012】

ゲルダナマイシンを主とするHsp90阻害剤の第1世代のベンゾキノンアンサマイシンは、溶解度が低く、肝毒性があり、それに加えて多薬剤耐性に関わるp-糖タンパク質(P-gp)送出ポンプのための基質であるという幾つかの欠点を有する。第2世代のHsp90阻害剤も、不十分な経口バイオアベイラビリティー、眼毒性、製薬に適さない骨格(scaffold)を含む重大な不利点又は限界を有する。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】US2011/0046155A1

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Macario and de Macario 2000, Int. J. Clin. Lab. Res., 30:49-66

【非特許文献2】Smith, 2001, Molecular chaperones in the cell, pp. 165-178

【非特許文献3】Prodromouら, 1997, Cell, 90:65-75

【非特許文献4】Stebbinsら, 1997, Cell, 89:239-250

【非特許文献5】Grenertら, 1997. J Biol. Chem., 272:23834-23850

50

- 【非特許文献 6】Ueharaら, 1986, Mol. Cell. Biol., 6:2198-2206
 【非特許文献 7】Schulteら, 1998, Cell Stress and Chaperones, 3:1008-108
 【非特許文献 8】Supkoら, 1995, Cancer Chemother. Pharmacol., 36:305-315
 【非特許文献 9】Prodromouら, 1997, Cell, 90:65-75
 【非特許文献 10】Stebbinsら, 1997, Cell, 89:239-250
 【非特許文献 11】Panaretouら, 1998, EMBO J., 17:4829-4836
 【非特許文献 12】Neckersら, 1999, Invest. New Drugs, 17:361-373
 【非特許文献 13】Whitesell & Lindquist, 2005, Nat. Rev. Cancer, 5:761-772
 【非特許文献 14】Hosteinら, 2001, Cancer Res., 61:4003-4009
 【非特許文献 15】Calcul L.ら 2012, Future Med. Chem. 4(13):1751-61 10
 【非特許文献 16】Tsaiら, Nature, 1994;371:419-423
 【非特許文献 17】Luo W.ら Proc. Natl. Acad. Sci., 2007, 104(22): 9511-9516
 【非特許文献 18】Auluck, PK and Bonini, NM, 2002, Nat. Med. 8: 1185-1186
 【非特許文献 19】Fowler, TR.ら, 2005, J. Mol. Biol. 351:1081-1100
 【非特許文献 20】Peter W. Piper PW and Millson SH, Pharmaceuticals 2011, 4, 140
 0-1422

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、より効果的な医薬成分であるHsp90阻害剤を開発する必要性がある。 20

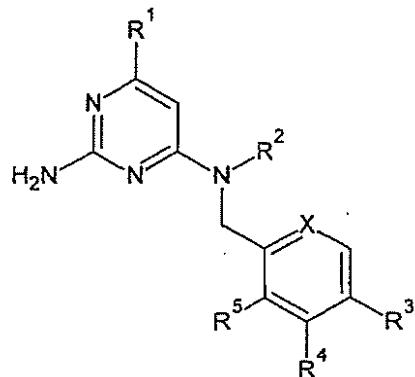
【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の実施形態は、式(I)

【0017】

【化1】



(I)

(R¹は、H、CH₃、OCH₃、CF₃、F、Cl、Br又はIであり；

XがC又はNであり；

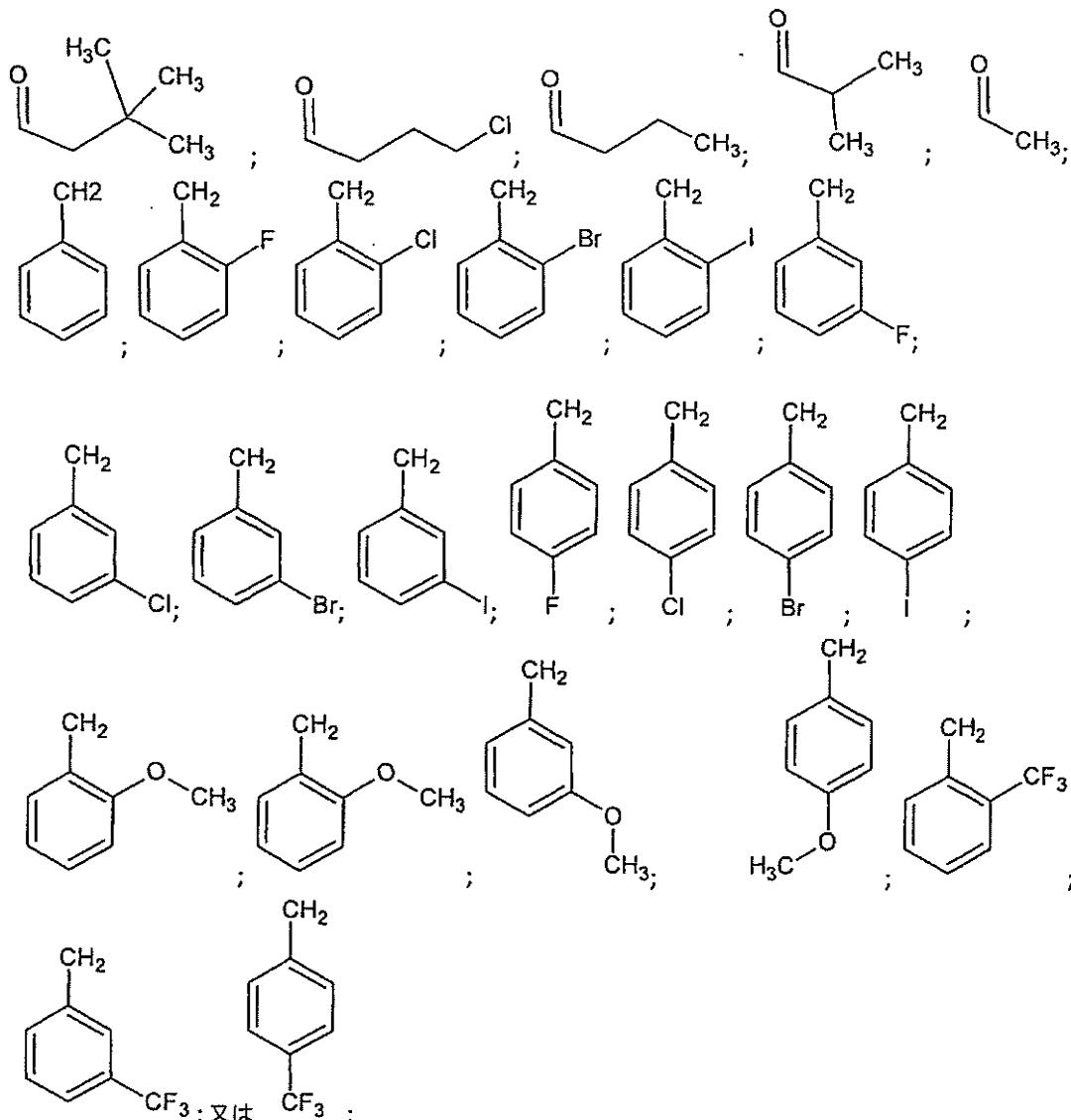
R²は、H、CH₃、CH₂CH₃、CH(CH₃)₂、C(CH₃)₃、CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂OH、CH₂CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃；

【0018】

30

40

【化2】



10

20

30

であり；

 R^3 は、H、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 であり； R^4 は、H、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 であり； R^5 は、H、 CH_3 、 OCH_3 、F、Cl、Br、I又は CF_3 である）

を有する化合物又は化合物の塩、水和物若しくは溶媒和物を提供する。

【0019】

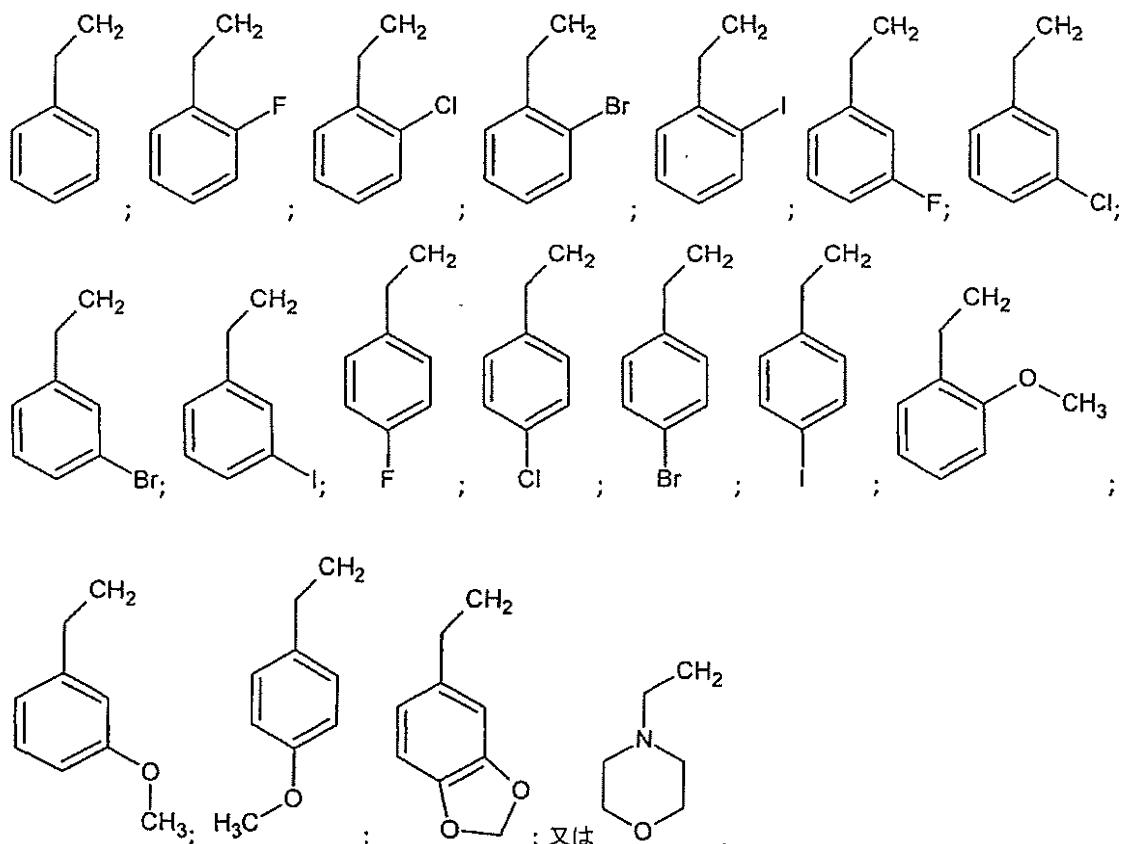
関連する実施形態において、本発明は、

 R^2 が、

【0020】

40

【化3】



である式(I)を有する化合物を提供する。

【0021】

関連する実施形態において、本発明は、式(I)に記載の少なくとも1種の化合物を、1種以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。

【0022】

本発明のさらなる他の態様は、病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療方法であって、それらを必要とする対象に、式(I)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するために有効な量を投与することを含む方法を提供する。

【0023】

本発明の関連する実施形態は、病状又は状態が対象におけるHsp90活性の阻害に応答する、対象における病状又は状態の予防又は治療方法であって、式(I)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量及び追加の治療剤を、それらを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。

【0024】

関連する実施形態において、本発明は、病状又は状態が対象におけるHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、式(I)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。関連する実施形態において、本発明は、病状又は状態がHsp90により媒介される、対象における病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、式(I)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量及び追加の治療剤を投与することを含む方法を提供する。

【0025】

本発明のさらなる他の実施形態は、治療剤を用いた治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態がHsp90の阻害に応答する、対象に

10

20

30

40

50

おける病状又は状態の予防又は治療方法であって、それらを必要とする対象に、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。

【0026】

さらなる他の実施形態により、本発明は、治療剤を用いた病状又は状態の治療を受けており、病状又は状態が前記治療剤に対する耐性の発生であり、病状又は状態がHsp90の阻害に応答する対象において病状又は状態の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物のHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。

【0027】

本発明の方法の関連態様において、Hsp90に媒介される病状又は状態又は障害は、自己免疫疾患、炎症性疾患、神経性疾患、感染、癌、癌腫、心臓血管疾患、アレルギー、喘息、増殖性障害、代謝性疾患、白血病、新生物、ホルモン関連疾患、加齢黄斑変性、及び神経線維腫症から生じる腫瘍又は症状を含む群から選択される。神経線維腫症は、1型神経線維腫症を含み、それはそれ自体、小さい皮膚の神経線維腫、網状の神経線維腫、鼠径又は腋窩の雀斑発症、色素が沈着したカフェオレ斑点、神経に局在化した淡褐色斑紋、蝶形骨異形成又は身体の長骨の皮質の薄化などの骨格異常、視神経膠腫又は視神経の腫瘍、脊柱側彎症、及び脳水腫のない小児集団における大頭症を含む多くの形態で現れる。神経線維腫症は2型神経線維腫症も含み、それはそれ自体、両側性聴神経腫又は神経鞘腫、頭痛、顔面脱力/麻痺、平衡感覚の障害、及び末梢性眩暈を含む形態で出現する。

10

【0028】

本発明の方法の他の態様において、Hsp90に媒介される病状又は状態又は障害は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症を含む群から選択される神経変性性疾患である。本発明の方法のさらに他の態様において、Hsp90に媒介される病状又は状態又は障害は、肝硬変、強皮症、多発性筋炎、全身性狼瘡、リウマチ性関節炎、間質性腎炎、肺線維症、及びケロイド形成を含む群から選択される線維形成障害である。

20

【0029】

本発明のさらなる他の実施形態は、哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態を治療する方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。関連する実施形態は、哺乳動物における異常な細胞成長を含むか又はそれから生じる疾患若しくは状態の発生率を軽減若しくは減少させる方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。さらなる他の関連する実施形態は、哺乳動物における異常な細胞成長を有するか又はそれから生じる病状若しくは状態の予防又は治療のための方法であって、哺乳動物においてHsp90活性を阻害するのに有効な量の、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。本発明の方法の関連する実施形態において、異常な細胞成長から生じる病状又は状態は、膀胱、乳房、大腸、腎臓、表皮、肝、肺、食道、胆嚢、卵巣、脾、胃、子宮頸部、甲状腺、前立腺、胃腸系又は皮膚の癌、リンパ系統の造血性腫瘍、骨髄腫系統の造血性腫瘍、甲状腺の濾胞性癌、間葉系起源の腫瘍、中枢又は末梢神経系の腫瘍、メラノーマ、精上皮腫、奇形癌、骨肉腫、色素性乾皮症、神経線維腫症、角化棘細胞腫、甲状腺濾胞性癌及びカポジ肉腫を含む。

30

【0030】

本発明のさらなる他の実施形態は、抗癌剤に対する耐性の発生率を軽減又は減少させる方法であって、それらを必要とする対象に、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。関連する実施形態において、本発明は、抗癌剤に対する耐性を逆行させる方法であって、それらを必要とする対象に、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp9

40

50

0活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。さらなる他の関連する実施形態において、本発明は、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む、抗癌剤の活性を強化する方法を提供する。さらに他の関連する実施形態により、本発明は、抗癌剤に対する耐性の発現を遅延又は防止する方法であって、それらを必要とする対象に、式(1)に記載の少なくとも1種の化合物の、対象におけるHsp90活性を阻害するのに有効な量を投与することを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】対照のHsp90阻害剤SNX-0723の量、及び化合物によるHsp90活性の阻害を、それぞれ、化合物を用いて処理したラットの脳組織において示す線グラフ及び棒グラフである。

【0032】

図1パネルAは、ラットに体重により10ミリグラム/キログラム(mg/kg)の投与計画で投薬した後の時間(hour)で示した時間の関数として、中枢神経系中(CNS)の及び血漿中の対照のHsp90阻害剤SNX-0723(構造を挿入図として示した)の濃度をマイクロモル(μM)で示す線グラフである。この例は、Hsp90阻害剤SNX-0723が、血漿と比較してCNS領域中に選択的に分配されることを示す。

【0033】

図1パネルBは、10mg/kgで投薬されたラットの脳組織中の対照Hsp90阻害剤SNX-0723によるHsp90活性の阻害率(%)を示す棒グラフである。第1のバー及び第2のバーは、投薬後2時間及び8時間における阻害効果を示す。各バー上の黒線は、測定における標準偏差を表し、星印は測定の統計的有意性である。

【図2】個々の断片の阻害効力に基づいてHsp90活性を阻害するためのそれより大きい化合物を合成するために使用されるべき低分子(断片)のHsp90阻害活性を示す棒グラフ及び表である。

【0034】

図2パネルAは棒グラフであり、図中、各バーは、X軸に示した範囲内のHsp90阻害活性を有する断片の数を示す。左から、バーは、7個の断片が70-100%の阻害効果を有し、35個の断片が40-69%の阻害効果を有し、7個の断片が20-39%の阻害効果を有し、及び142個の断片が0-19%の阻害効果を有することを示す。

【0035】

図2パネルBは、Hsp90の活性に対して70-100%の阻害効果を有する7個の断片(パネルAから)の分子構造、分子量(ダルトン)、及び物理化学的性質を示す表である。

【図3】化合物とHsp90との複合体の3次元構造及び化合物の薬理学的性質に基づいて改良されたHsp90阻害活性を有する化合物の開発の順序を示す。各化合物の阻害定数 K_i により測定した化合物のHsp90活性に対する阻害効果における段階的改良を示す。化合物は、ナノモル(nM)の範囲に K_i を有する。 K_i の値が低いほど化合物は強力である。

【図4】各化合物で処理されたラットのCNS中における典型的二置換アミン化合物、及び典型的三置換アミン化合物の量(CNS露出)を示す2つのグラフの1組である。

【0036】

図4パネルAは、二置換アミン化合物の1つのCNS中の濃度の例を投薬後の時間(時間)の関数として示す。黒丸印は、実験的に決定したCNS中の濃度であり、中空の丸印は、血漿中の化合物の濃度の外挿に基づくCNS中の濃度の推定値を表す。

【0037】

図4パネルBは、三置換アミン化合物の1つのCNS中の濃度の例を投薬後の時間の関数(時間)として示す。黒丸印は実験的に決定したCNS中の濃度であり、中空の丸印は血漿中の化合物の濃度の外挿に基づくCNS中の濃度の推定値を表す。二置換アミン化合物と比較して三置換アミン化合物には、CNSがはるかに大きく露出することを示す。

【図5】典型的Hsp90阻害剤SB-0639353のCNS中への分配、化合物によるHsp90の阻害、及び化合物で処理されたラット中におけるHsp90阻害の典型的バイオマーカーに対する化合

10

20

30

40

50

物の効果を示す棒グラフ及びプロットの1組である。

【0038】

図5パネルAは、典型的Hsp90阻害剤SB-0639353(SBI-0639353とも命名される)の、血漿と比較したCNS中への優先的分配を示す棒グラフである。CNS中のSB-0639353のレベルを、ラットのCNS組織を使用して体外(ex-vivo)測定により定量した。

【0039】

図5パネルBは、40mg/kgを投薬されたときのラットのCNS組織中の具体例としての化合物SBI-0639353によるHsp90活性の阻害を示す棒グラフである。バー上の垂直な線は測定における標準偏差を表す。

【0040】

図5パネルCは、Hsp90に対するインビボにおけるバイオマーカーのAkt1に基づく、具体例としての化合物SBI-0639353によるHsp90阻害の効果を示す棒グラフである。SBI-0639353は、ラット腹腔内に投与した。Akt1キナーゼは、適当なフォールディング及び細胞中における維持を、Hsp90活性に依存するクライアントタンパク質である。ラットのCNS組織中におけるSBI-0639353によるHsp90活性の阻害は、Akt1の分解及びビヒクルで処理したラットと比較したそのレベルにおける減少を生じる。各バー上の垂直な線は、測定における標準偏差を表し、星印は、測定の統計的有意性を示す。

【図6】FITC標識されたゲルダナマイシン(GA-FITC)のHsp90に対する結合の濃度応答曲線である。蛍光分極Hsp90競合結合アッセイを使用してGA-FITCの結合親和性を得た。50nMのHsp90を添加して又は添加せずにGA-FITCの異なる濃度を使用した。GA-FITCに対する K_d は、188nMの B_{max} で3.1nMであると決定された。

【図7】Hsp90活性の阻害をHsp90阻害剤の濃度の関数として示す2つのグラフの1組である。

【0041】

図7パネルAは、SBI-0640725の濃度の関数としてのHsp90活性の阻害のグラフである。SBI-0640725に対する IC_{50} は0.101μMであると決定された。

【0042】

図7パネルBは、SBI-0639353の濃度の関数としてのHsp90活性の阻害のグラフである。SBI-0639353に対する IC_{50} は0.255μMであると決定された。

【図8】プログラムされた腫瘍細胞死を、クライアントタンパク質Akt1のレベル及び本明細書における典型的Hsp90阻害化合物SBI-0639353の活性を測定するための、組織培養アッセイにおけるカスパー-3の誘発により測定したHsp90阻害に対する細胞のバイオマーカーのレベルにおける変動を示すグラフの1組である。

【0043】

図8パネルAは、典型例としての化合物SBI-0639353の濃度の関数としての細胞の生存能力の低下のグラフである。SBI-0639353に対する EC_{50} は3.8μMであると決定された。

【0044】

図8パネルBは、SBI-0639353の濃度の上昇によるHsp90活性の阻害の結果としてのAkt1分解のグラフである。SBI-0639353に対する IC_{50} は5.4μMであると決定された。

【0045】

図8パネルCは、10μMの濃度におけるSBI-0639353によるカスパー-3の誘発のグラフである。カスパー-3の誘発は、カスパー-3/7アッセイキット(Promega, Inc.、米国ウィスコンシン州Madison)を使用して測定した。

【図9】対照化合物SNX-0723を10mg/kgの投与計画で使用して、Hsp90阻害のCNS中におけるHsp70に対する効果を示すグラフである。Hsp70のレベルは、SNX-0723では、処理されないラット(ビヒクルのみ)と比較して上昇し、投薬後24時間まで(X軸)上昇したままである。

【発明を実施するための形態】

【0046】

Hsp90は、クライアントタンパク質が適当に折り畳まれるのを介助し、熱ストレスに対

してタンパク質を安定化して、タンパク質分解を促進する分子シャペロンである。Hsp90の200種を超えるクライアントタンパク質が同定されている。Hsp90は、腫瘍成長に必要な多くのタンパク質、例えば、細胞周期調節、シグナル伝達及び染色質再造形経路に関与することが知られているタンパク質などを安定化する。この理由で、Hsp90阻害剤は、抗癌剤として研究されている(Lu Xら Biochemical Pharmacol. 2012, 83:8, 995-1004)。さらに、Hsp90阻害剤は、マウスの腫瘍モデル並びにヒトにおける固形腫瘍及び白血病の両方の治療において、多くの他の薬剤と加算的に又は相乗的に作用する(Lu X 2012)。Hsp90阻害は、そうでなければ薬剤に耐性の癌細胞株で薬剤効果を惹起するので(Modi Sら, Clin Cancer Res. 2011; 17:5132-5139)、Hsp90阻害剤は、Her2/Erb2Bを標的とするトラスツズマブ(ハーセプチニン(商標))を含む、Hsp90クライアントタンパク質を標的とする抗癌剤の作用を強化する。

10

【0047】

本明細書に記載したHsp90阻害剤は、実施例32に示すように、ヒト前立腺から誘導された細胞の成長の阻害に有効である。本明細書中の化合物は、広範囲の腫瘍細胞に対して有効であることが予測される。

【0048】

PD、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病(HD)及び他のポリグルタミン拡大障害を含む種々の神經変性性障害は、ある種の異常なポリペプチド又はタンパク質の蓄積が原因で、特異的ニューロン集団の変性及び死を伴う(Meriin AB and Sherman MY. Int J Hyperthermia. 2005; 21:5, 403-19)。細胞タンパク質の少なくとも2成分、即ち、ユビキチンプロテアソーム系(UPS)及びHspがPDと関連する(Berke SJ and Pauslson HL. Curr Opin Genet Dev. 2003, 13:3, 253-61; Grunblatt Eら, J Neural Transm. 2004, 111:12, 1543-73)。ヒートショックタンパク質の中でHsp90は、細胞質の分子シャペロン複合体の主成分であり、Hsp40、Hsp70、及びHsp90を含むヒートショック遺伝子の転写の活性化に応答するヒートショック因子1(HSF1)の負の調節と関係づけられて来た(Bharadwaj Sら Mol Cell Biol. 1999, 19:12, 8033-41)。Hsp90は、Hsp70及びHsp40と多シャペロン複合体を形成して、ステロイドホルモン受容体及び転写因子を含む数種の調節タンパク質を調節する。Hsp90は、主にPDの脳中で増加することが知られており、その増加はPDの病理と関係するタンパク質の不溶性 -シヌクレインの上昇したレベルと相關する(Uryu Kら, Am J Pathol. 2006, 168:3, 947-61)。それ故、Hsp90の阻害は、PDの治療のための有望な取り組みと考えられる。神經変性性疾患のためにHsp90阻害剤を開発する挑戦は、血液脳関門を効率的に横断することができる分子の開発である。本明細書において記載した多くのHsp90阻害剤、例えばSBI-0639353は、血漿と比較して脳中への優先的分配を示し(図6)、それ故、PDの症状を治療又は改善するための分子として有用である。

20

【0049】

Hsp90阻害剤GAは、加齢黄斑変性の治療剤として試験された。GAは、低酸素症に誘発された血管内皮成長因子の網膜色素の上皮細胞のインビトロにおける発現を弱めることが見出された(Wu, WCら Exp Eye Res. 2007 Nov, 85:5, 721-31)。低酸素症は、失明の主要な原因であり、増殖性糖尿病性網膜症及び加齢黄斑変性(AMD)で起こる脈絡膜の血管新生の病原性の一因となる最も普通の因子である。網膜色素上皮(RPE)細胞は、低酸素症における網膜下の血管新生の調節において役割を演じる。正常酸素圧の対照によるよりも有意に高い量の、血管形成を支持する成長因子VEGF(血管内皮成長因子)が、低酸素のRPE細胞から放出された。同様にVEGF(165)イソ型遺伝子の発現は、正常酸素圧の細胞と比較して低酸素のRPEにおいて高かった(Wu 2007)。GAを用いる前処理は、低酸素のRPE細胞における低酸素症に誘発されるVEGF遺伝子発現、及び低酸素のRPE細胞からのペプチド放出を有意に抑制し、Hsp90阻害剤が、眼内血管新生を伴う疾患のための新規抗血管新生剤と考えられ得ることを示した(Wu, 2007)。本発明において、本明細書において記載した中核の式(1)を有するHsp90阻害剤は、AMDの症状の治療又は改善のための作用剤として有効であろうということが予測される。

30

40

50

【0050】

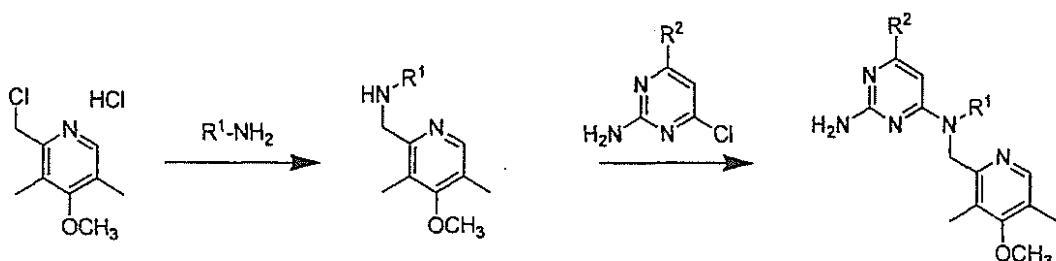
本明細書において記載したHsp90阻害剤は、薬剤発見プロセスの一部としてリード化合物を見出すために使用される方法である断片に基づいてスクリーニングする方法(図2)を使用して誘導されたものを含む。それは、生物学的標的に弱く結合するだけで、次にそれらを成長させるか又はそれらを組み合わせてさらに高い親和性を有するリード化合物(lead)を生成させることができる小さい化学的断片の同定に基づく(図3)。Hsp90を阻害するための分子中に組み合わせるために本出願で試験した典型的断片を図2に示す。

【0051】

本明細書において記載したピリミジンアナログは、下に記載する一般的手順にしたがって合成した。

【0052】

【化4】



10

20

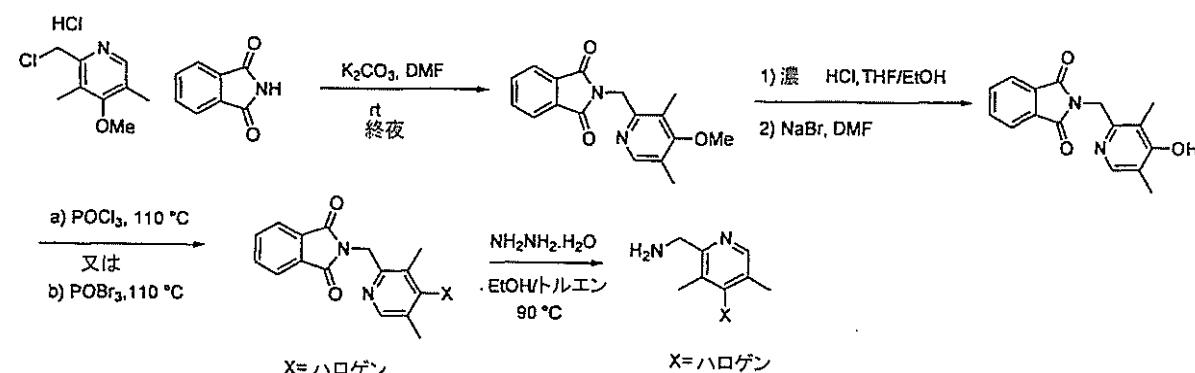
2-(クロロメチル)-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩、 $R^1\text{-NH}_2$ 、及び N,N -ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)をDMFに溶解してマイクロ波照射により125 $^\circ\text{C}$ で10分間加熱した。自動分取HPLCを使用して粗ジアミンを精製した。ジアミン及び $4R^2,6$ -クロロ-ピリミジン-2-アミン、及び Et_3N の懸濁液をDMFに溶解して65 $^\circ\text{C}$ で2.5h加熱した。自動分取HPLCを使用して粗生成物を精製し、所望のピリミジンアナログを得た。

【0053】

以下の一般的手順を、本明細書において記載したハロゲン化ピリミジンアナログを合成するために使用した。

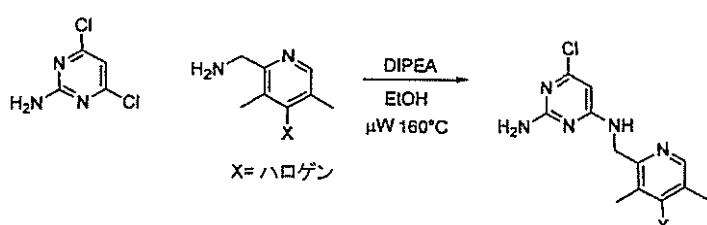
【0054】

【化5】



30

40



2-(クロロメチル)-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩、フタルイミド、及び $K_2\text{CO}_3$ (25g、180.8mmol)の懸濁液をDMF(200mL)中で作製して室温で16h反応させた。生じた白

50

色固体に、塩基性条件に達するまで飽和NaHCO₃を加え、混合物を濾過して、2-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを、白色固体として定量的収率で得た。2-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンのTHF/EtOH中の溶液に濃HClを加えて、反応混合物を濃縮した。残渣をDMFに溶解してNaBrを加え、続いて120℃で1h加熱した。EtOAcを溶液に加えて、得られた沈殿を濾過して2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを得た。

【0055】

上で示したようにして合成した2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンとPOCl₃/POBr₃を封管中で組み合わせて110℃で45分間加熱した。溶液を冷却し、氷水に加えて40%KOHで塩基性にした。形成された沈殿を濾過して2-((4-クロロ/ブロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを白色固体として得た。2-((4-クロロ/ブロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンのEtOH/トルエン中の溶液にNH₂NH₂.H₂Oを加え、続いて90℃で20分間加熱した。反応混合物を冷却し濾過して濾液を濃縮し、CH₂Cl₂で洗浄して粗アミンを得た。4,6-ジクロロピリミジン-2-アミン、DIPEA及び(4-クロロ/ブロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メタノアミンのEtOH中の懸濁液をマイクロ波照射により160℃で10分間加熱した。粗生成物を自動分取HPLCを使用して精製し、所望の生成物を得た。

10

【0056】

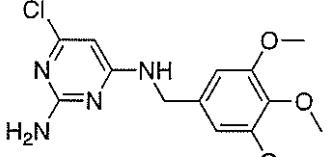
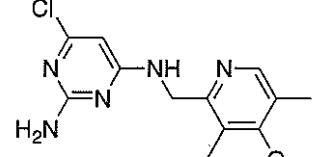
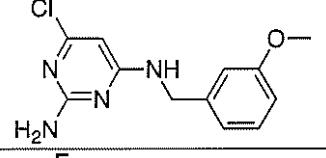
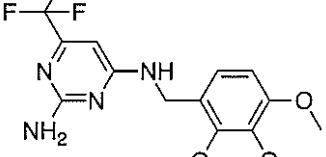
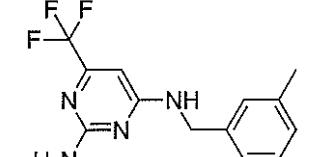
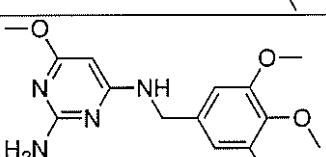
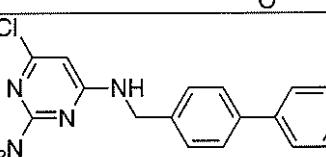
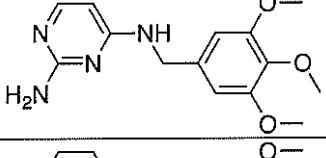
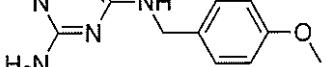
下表1に、上の方法にしたがって製造したHsp90阻害剤化合物の構造及び式量並びにそれらの阻害効力を示す。

20

【0057】

【表1】

表I.ピリミジンジアミン誘導体の分子構造、式量、及びHsp90阻害の効力

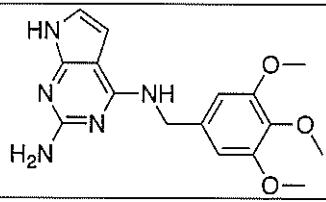
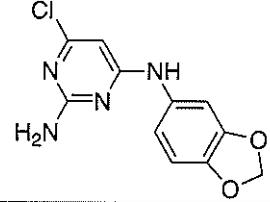
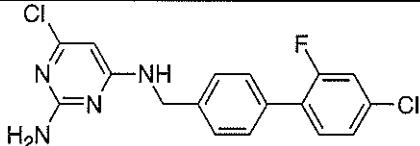
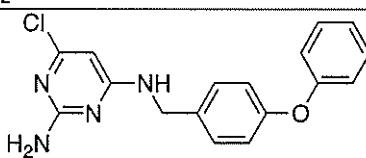
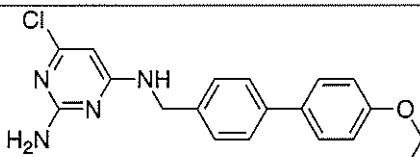
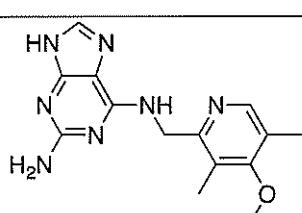
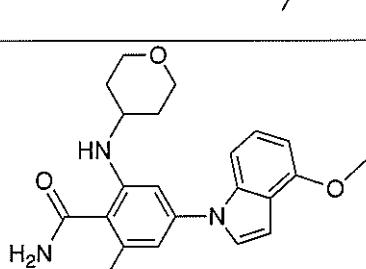
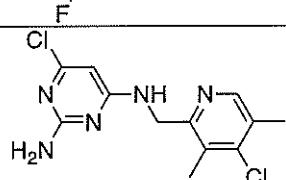
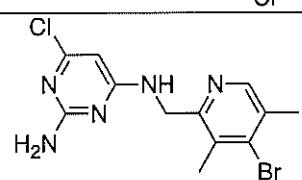
化合物	分子構造	式量 (Da)	生化学的効力		
			IC ₅₀ (μM)	% 10 μMに おける阻 害率	% 1 μMにお ける阻害 率
SBI-0206664		324.763		25	
SBI-0206665		293.752	7.5	61	7
SBI-0630160		264.711		13	
SBI-0630180		358.32		4	
SBI-0633823		296.291		17	
SBI-0633825		320.344	>250		
SBI-0633826		310.781		21	
SBI-0634911		290.318	>250		
SBI-0634912		260.292	>250		

10

20

30

40

SBI-0635446		329.354		10	
SBI-0636438		264.668		18	
SBI-0638966		363.216		34	
SBI-0638967		326.78		10	
SBI-0638969		354.833		3	
SBI-0639182		299.331		19	4
SBI-0639186		383.416		10	5
SBI-0639217		298.171		93	47
SBI-0639218		342.622		94	44

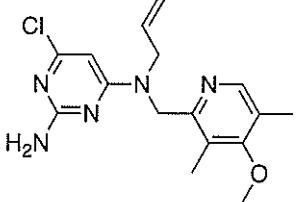
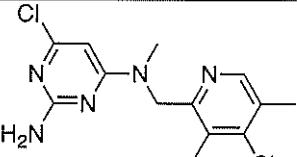
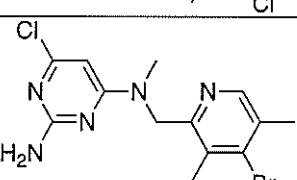
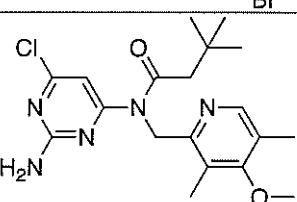
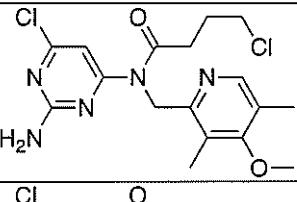
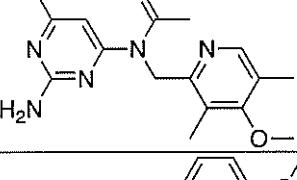
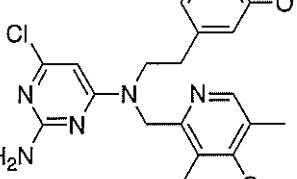
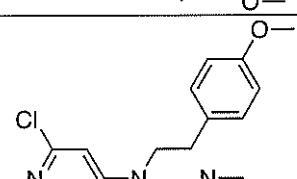
10

20

30

40

SBI-0639219		307.779		94	57
SBI-0639220		389.622		98	66
SBI-0639349		351.831	1.37		
SBI-0639350		335.832	1.1		
SBI-0639351		383.875	2.21		
SBI-0639352		335.832	32		
SBI-0639353		397.901	0.255		
SBI-0639354		349.858	0.719		

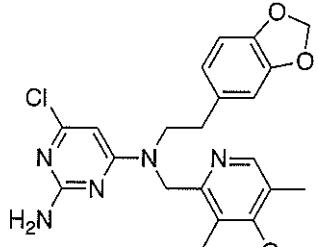
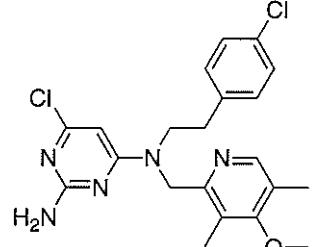
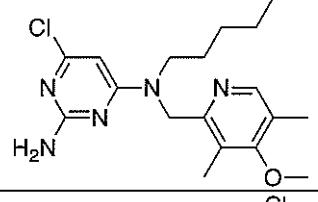
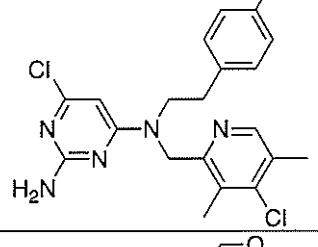
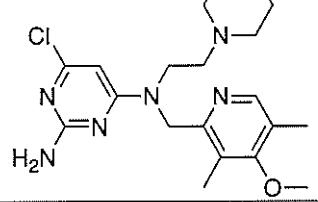
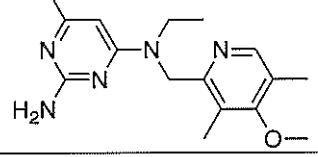
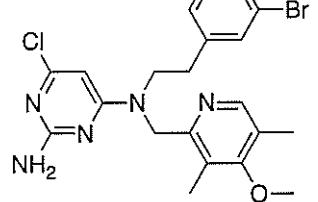
SBI-0639355		333.816	2.87		
SBI-0639899		312.198	2.15		
SBI-0639900		356.649	32		
SBI-0639901		391.895	30		
SBI-0639902		398.287	32		
SBI-0640492		335.789	32		
SBI-0640605		427.930	0.35		
SBI-0640606		427.930	0.432		

10

20

30

40

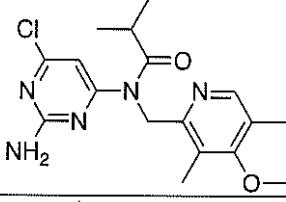
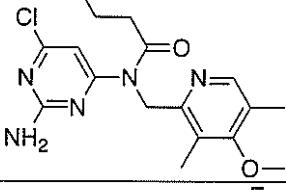
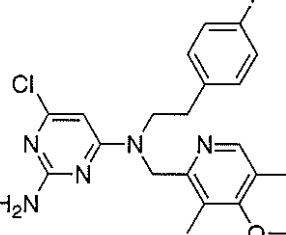
SBI-0640607		441.910	0.368		
SBI-0640608		432.350	0.311		
SBI-0640609		377.910	0.391		
SBI-0640610		436.770	0.194		
SBI-0640611		406.910	1.690		
SBI-0640612		321.810	1.14		
SBI-0640613		476.80	0.097		

10

20

30

40

SBI-0640644		363.84	13.93		
SBI-0640645		363.840	30.02		
SBI-0640725		415.890	0.101		

【0058】

10

医薬組成物

20

本発明の1態様において、少なくとも1種の式(I)の化合物を含み、場合により薬学的に許容される担体も含む医薬組成物が提供される。ある実施形態において、これらの組成物は、場合により1種以上の追加の治療剤をさらに含む。ある実施形態において、追加の治療剤又は作用剤は、成長因子、抗炎症剤、昇圧剤、コラゲナーゼ阻害剤、局所用ステロイド、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、アスコルビン酸塩、カルレチクリン、テトラサイクリン、フィブロネクチン、コラーゲン、トロンボスpongin、形質転換成長因子(TGF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、インスリン様成長因子(IGF)、上皮性成長因子(EGF)、血小板由来の成長因子(PDGF)、neu分化因子(NDF)、及びヒアルロン酸からなる群から選択される。

30

【0059】

30

本明細書において使用する、用語「薬学的に許容される担体」は、所望の特定の剤形に合わせた任意の及び全ての溶媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散又は懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、防腐剤、固体結合剤、潤滑剤等を含む。Remington's Pharmaceutical Sciences、Gennaro編、Mack Publishing, Easton, ペンシルヴェニア州, 1995(その内容は引用により本明細書中に組み込む)には、医薬組成物を製剤化する際に使用される種々の担体及びそれらの調製のための公知の技法が開示されている。薬学的に許容される担体として役立ち得る材料の若干の例として、ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖類; トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン類; セルロース及びその誘導体、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース及びセルロースアセテートなど; 粉末トラガカント; 麦芽; ゼラチン; タルク; ココアバター及び坐剤ワックスなどの賦形剤; ピーナツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油などの油類; プロピレングリコールなどのグリコール; エチルオレエート及びエチルラウレートなどのエステル; 寒天; 水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤; アルギン酸; 発熱物質を含まない水; 等張生理食塩水; リンゲル溶液; エチルアルコール、及びリン酸緩衝溶液、並びにラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなどの他の無毒性相溶性潤滑剤が挙げられるが、これらに限定されず、これらに加えて、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味料、着香料及び香料、防腐剤及び抗酸化剤も、製剤製作者の判断にしたがって組成物中に存在することができる。

40

50

【0060】

治療に有効な用量

さらに他の態様においては、本発明の治療方法にしたがった、感染症に罹患している対象における感染因子のHsp90又はその同族体の阻害に優先的に応答する病状又は状態を含む、Hsp90の阻害に応答する対象における病状又は状態の治療又は軽減は、対象を本明細書に記載した医薬組成物の治療に有効な量と接触させることにより促進される。本発明のある実施形態において、医薬組成物の「治療に有効な量」とは、Hsp90の阻害に応答する病状若しくは状態に関する症状の治療、軽減、又は発生率の減少又は予防のいずれかに有効な量である。本発明の方法による組成物は、有効な任意の量及び任意の投与経路を使用して投与することができる。正確な用量は、治療されるべき患者を診て個々の医師により選択される。用量及び投与は、十分なレベルの活性作用剤(単数又は複数)を提供するか又は所望の効果を維持するように調節される。考慮に入れてよい追加の要因として、病状の重症度、例えば、浮腫又は多血の程度、患者の年齢、体重及び性、食事、投与の時刻及び頻度、薬剤の組合せ、療法に対する反応感受性、及び耐性/応答が挙げられる。製剤化された医薬組成物は、具体的な製剤の半減期及びクリアランス速度に応じて、毎日、1日に数回、隔日、3ないし4日に1回、毎週、又は2週間に1回投与することができる。

10

【0061】

本発明の活性作用剤は、投与を容易にするために、及び用量を一定にするために、好ましくは用量単位の形態で製剤化される。本明細書において使用する「用量単位の形態」という表現は、治療されるべき患者にとって適当な活性作用剤の物理的に離散した単位を指す。しかしながら、本発明の組成物の合計した毎日の使用量は、信頼できる医学的判断の範囲内で主治医により決定されることは理解されるであろう。任意の活性作用剤について、治療的に有効な用量は、最初に、動物モデル、通常マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ又は靈長類で評価することができる。動物モデルは、望ましい濃度範囲及び投与経路を得るためにも使用される。次に、そのような情報は、ヒトにおける有用な用量及び投与経路を決定するために使用することができる。治療的に有効な用量とは、症状又は状態を緩和する活性作用剤の量のことである。活性作用剤の治療効力及び毒性は、標準的な薬学的手順、例えば、実験動物におけるED50(集団の50%で治療に有効な用量)及びLD50(集団の50%に致死的な用量)により決定することができる。毒性と治療効果との用量比が治療の指標であり、それは、比LD50/ED50として表現することができる。治療の大きい指標を示す医薬組成物が好ましい。動物研究から得られたデータは、ヒトに使用する用量の範囲の製剤化に使用される。

20

【0062】

医薬組成物の投与

適当な薬学的に許容される担体を用いて所望の用量で製剤化した後、本発明の医薬組成物は、ヒト又は他の哺乳動物に、散剤、軟膏又は点滴剤として、重症度及び治療される浮腫の状態の部位に応じて、経口的に、直腸に、非経口的に、脳室内に、腔内に、腹腔内に、パックルとして、眼内に又は鼻腔に含む限定されない任意の経路により投与することができる。経口投与のための液体の投薬形態として、薬学的に許容されるエマルション剤、マイクロエマルション剤、溶液剤、懸濁液剤、シロップ剤及びエリキシルが挙げられるが、これらに限定されない。活性作用剤(単数又は複数)に加えて、液体投薬形態は、当技術分野において普通に使用される不活性希釈剤、例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油(特に、綿実、ピーナツ、トウモロコシ、胚芽、オリーブの油、ヒマシ油、及びゴマ油)、グリセリン、テトラヒドロフルオルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、及びそれらの混合物などを含有することができる。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、加湿剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味料、着色料、及び香料などの補助剤も含むことができる。

30

【0063】

40

50

本発明の医薬組成物の局所又は経皮投与のための投薬形態として、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、散剤、溶液剤、スプレー剤、吸入剤又はパッチ剤が挙げられる。活性作用剤は、滅菌条件下で薬学的に許容される担体及び任意の必要とされる防腐剤又は必要とされることがある緩衝剤と混合される。投与は、治療のためにあってもよく又は予防的であってもよい。軟膏、ペースト剤、クリーム剤、及びゲル剤は、本発明の活性作用剤に加えて、賦形剤、例えば、動物性及び植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、酸化亜鉛又はそれらの混合物などを含むことができる。

【0064】

10

注射用調製物、例えば、滅菌注射用の水性又は油性の懸濁液は、適当な分散剤又は加湿剤及び懸濁剤を使用して、知られた技術により製剤化することができる。滅菌注射用調製物は、無毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液又はエマルジョン、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液であってもよい。使用してもよい許容されるビヒクル及び溶媒の中に、水、米国薬局方のリンゲル溶液、及び等張塩化ナトリウム溶液がある。それに加えて、滅菌固定油は、溶媒又は懸濁媒体として従来使用されている。この目的のために、合成モノ又はジグリセリドを含む刺激のない任意の固定油を使用することができる。それに加えてオレイン酸などの脂肪酸が注射用の調製物に使用される。注射用製剤は、例えば、細菌捕捉フィルタを通す濾過により、又は滅菌剤を、使用前に滅菌水又は他の滅菌注射用媒体に溶解又は分散することができる滅菌固体組成物の形態で組み込むことにより、滅菌することができる。活性作用剤の効果を延長するために、皮下又は筋肉内注射からの作用剤の吸収を遅らせることができることがしばしば望ましい。非経口的に投与された活性作用剤の遅延された吸収は、作用剤を油性ビヒクル中に溶解又は懸濁することにより達成することができる。注射用デポの形態は、ポリ乳酸-ポリグリコール酸などの生分解性ポリマー中に作用剤のマイクロカプセルマトリックスを形成させることにより作製される。活性作用剤とポリマーとの比及び使用される特定のポリマーの性質に依存して、活性作用剤放出の速度は、制御することができる。他の生分解性ポリマーの例として、ポリ(オルトエステル)及びポリ(酸無水物)が挙げられる。デポ注射用製剤は、身体組織と適合性のリポソーム又はマイクロエマルジョン中に作用剤を閉じ込めることにより調製することができる。

20

【0065】

30

直腸又は膣内投与のための組成物は好ましくは坐剤であり、それは、本発明の活性作用剤(单数又は複数)を適当な非刺激性賦形剤又は担体、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール又は周囲温度で固体であるが体温で液体であり、それ故直腸若しくは膣内空洞で溶融して活性作用剤(单数又は複数)を放出する坐剤ワックスなどと混合することにより調製することができる。

【0066】

40

経口投与のための固体の投薬形態として、カプセル剤、錠剤、ピル剤、散剤、及び顆粒剤が挙げられる。そのような固体の投薬形態では、活性作用剤は、少なくとも1種の不活性な薬学的に許容される賦形剤又は担体、例えば、クエン酸ナトリウム又はリン酸二カルシウムなど、及び/又はa)デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及びケイ酸などの充填剤又は增量剤、b)例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びアラビアゴムなどの結合剤、c)グリセリンなどの湿潤剤、d)寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のシリケート、及び炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、e)パラフィンなどの溶解遅延剤、f)第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、g)例えば、セチルアルコール及びグリセリンモノステアレートなどの加湿剤、h)カオリン及びベントナイトクレイなどの吸収剤、及びi)タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びそれらの混合物などの潤滑剤と混合される。

50

【0067】

同様なタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコール等のような賦形剤を使用する軟質及び硬質の充填されたゼラチンカプセルにおける充填剤としても使用することができる。錠剤、糖衣錠、カプセル、ピル、及び顆粒の固体の投薬形態は、腸溶性コーティング、放出制御コーティング及び薬学製剤化の技術分野で周知の他のコーティングなどのコーティング及び外殻を用いて調製することができる。そのような固体投薬形態において、活性作用剤(単数又は複数)は、スクロース、ラクトース又はデンプンなどの少なくとも1種の不活性希釈剤と混合することができる。そのような投薬形態は、通常実施されるように、不活性希釈剤以外の追加の物質、例えば、錠剤化潤滑剤及びステアリン酸マグネシウム及び微結晶性セルロースなどの他の錠剤化助剤も含むことができる。カプセル、錠剤及びピルの場合に、投薬形態は緩衝剤も含んでいてもよい。それらは、乳白剤を含んでもよく、腸管のある部分で活性作用剤(単数又は複数)のみを又はそれを優先的に、場合により遅延した様式で放出する組成物であることもできる。使用することができる封入する組成物の例として、ポリマー性物質及びワックスが挙げられる。

10

【0068】

医薬組成物の使用

式(I)を有する化合物を含む本明細書中の組成物は、自己免疫疾患、炎症性疾患、神経性疾患、感染、癌、癌腫、心臓血管疾患、アレルギー、喘息、増殖性障害、代謝性疾患、白血病、新生物、ホルモン関連疾患、加齢黄斑変性、及び、腫瘍又は神経線維腫症から生じる症状を含む広範囲の疾患又は状態を治療するために使用される。組成物は、肝硬変、強皮症、多発性筋炎、全身性狼瘡、リウマチ性関節炎、間質性腎炎、肺線維症、及びケロイド形成を含む群から選択される線維形成障害;及びパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、及び筋萎縮性側索硬化症を含む群から選択される神経変性性疾患を治療するために有用である。

20

【0069】

当業者は、上で記載したもの及び特許請求の範囲に記載したものに置き換える又は加えて使用される組成物及び方法の多くの適当な変形を認識するであろう。本発明の実施形態並びにその種々の態様の他の変形及び改変の実施は、当業者には明らかであること、及び本発明は本明細書に及び特許請求の範囲に記載した特定の実施形態により限定されないことが理解されるべきである。それ故、本発明は、本発明の現在の実施形態並びに本出願で開示され及び特許を請求された基礎の底流をなす原理の真の精神及び範囲内に入る任意の及び全ての改変、変形、又は等価事物を包含することを意図する。

30

【0070】

ここで十分に説明された本発明を、以下の実施例及び請求項により例証するが、それらは例示の目的のためにすぎず、さらに限定することは意図しない。

【実施例】

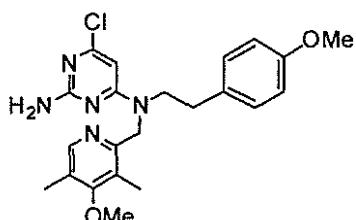
【0071】

[実施例1:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(4-メトキシフェニル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

40

【0072】

【化6】



2-(クロロメチル)-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩(200mg、0.9mmol)、2-(4-

50

メトキシフェニル)エタンアミン(0.79mL、5.4mmol)及びDIPEA(0.16mL、0.9mmol)をDMF(1mL)に溶解して、マイクロ波照射により125℃で10分間加熱した。自動分取HPLCを使用して粗生成物を精製し、N-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-2-(4-メトキシフェニル)エタンアミンを淡黄色固体として得た(130mg、48%)。

【0073】

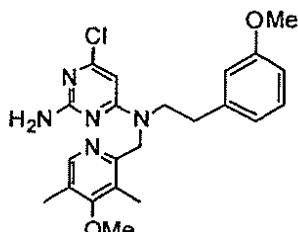
上のアミン及び4,6-ジクロロ-ピリミジン-2-アミン(71mg、0.43mmol)及びEt₃N(0.12mL、0.86mmol)の懸濁液をDMF(0.7mL)に溶解して、65℃で2.5h加熱した。自動分取HPLCを使用して粗生成物を精製し、所望の生成物を白色非晶質の固体として得た(57mg、31%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): 8.16(s, 1H), 7.02(d, J=8.2Hz, 1H), 6.78(d, J=8.2Hz, 1H), 5.89(s, 1H), 4.89(s, 2H), 3.75(s, 3H), 3.72(s, 3H), 3.55-3.48(m, 2H), 2.73-2.67(m, 2H), 2.21(s, 3H), 2.13(s, 3H). ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): 164.0, 163.2, 161.9, 159.8, 158.2, 149.0, 129.6, 125.4, 114.1, 113.9, 92.6, 59.9, 55.2, 49.7, 32.3, 13.2, 10.7. C₂₂H₂₆CIN₅O₂[M+H]⁺のLRMS計算値:427.9; 実測値:428.05。

【0074】

[実施例2:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(3-メトキシフェネチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0075】

【化7】



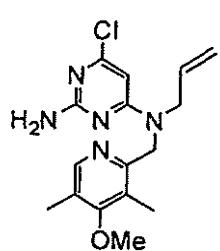
6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(3-メトキシフェネチル)ピリミジン-2,4-ジアミン化合物を、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(102mg、31%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): 8.16(s, 1H), 7.16(dd, J=7.3Hz, 1H), 6.73-6.69(m, 2H), 6.65(s, 1H), 5.90(s, 1H), 4.95(s, 2H), 3.77(s, 3H), 3.72(s, 3H), 3.58-3.53(m, 2H), 2.78-2.70(m, 2H), 2.19(s, 3H), 2.13(s, 3H). ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): 163.9, 162.0, 159.8, 159.7, 149.1, 129.5, 125.3, 121.1, 114.5, 111.6, 109.9, 92.5, 59.9, 55.1, 49.4, 33.3, 13.2, 10.7. C₂₂H₂₆CIN₅O₂[M+H]⁺のLRMS計算値:427.9; 実測値:428.05。

【0076】

[実施例3:N4-アリル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0077】

【化8】



N4-アリル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(100mg、52%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): 8.13

10

20

30

40

50

(s, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.71-5.60 (m, 1H), 5.11-4.99 (m, 4H), 3.99 (bs, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.16 (s, 3H). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): 163.8, 163.6, 161.9, 159.7, 149.0, 132.2, 125.1, 124.7, 116.6, 92.5, 59.8, 49.7, 49.6, 13.1, 10.6. $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{ClN}_5\text{O}$ [M+H] $^+$ のLRMS計算値:333.8; 実測値:334.0。

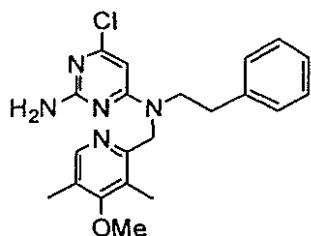
【0078】

[実施例4:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-フェネチルピリミジン-2,4-ジアミン]

【0079】

【化9】

10



6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-フェネチルピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(130mg、56%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.19 (s, 1H), 7.29-7.13 (m, 5H), 5.93 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.70-3.51 (m, 2H), 2.81-2.79 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.15 (s, 3H). $^{13}\text{CNMR}$ (100MHz, CDCl_3): 163.9, 163.3, 162.0, 159.8, 154.1, 149.1, 138.1, 128.7, 128.5, 126.4, 125.3, 124.8, 92.4, 59.8, 49.5, 33.2, 13.2, 10.6. $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}$ [M+H] $^+$ のLRMS計算値:397.9; 実測値:398.0。

20

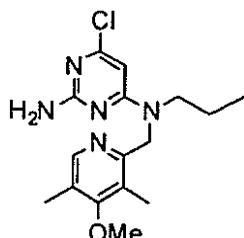
【0080】

[実施例5:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-プロピルピリミジン-2,4-ジアミン]

【0081】

【化10】

30



6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-プロピルピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(85mg、45%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 7.95 (s, 1H), 5.65 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.12-2.90 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.32-1.28 (m, 2H), 0.66-0.61 (m, 3H). $^{13}\text{CNMR}$ (100MHz, CDCl_3): 163.4, 161.7, 161.3, 159.0, 148.5, 124.7, 124.3, 108.5, 91.6, 59.4, 49.7, 48.8, 19.6, 12.7, 10.8, 10.2. $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{O}$ [M+H] $^+$ のLRMS計算値:335.8; 実測値:336.0。

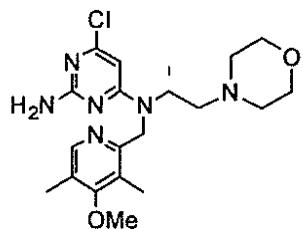
40

【0082】

[実施例6:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(2-モルホリノエチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0083】

【化11】



6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(2-モルホリノエチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(130mg、52%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.11 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.65-3.62 (m, 4H), 3.54-3.50 (m, 2H), 2.44 (bs, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 163.9, 163.4, 161.9, 159.6, 148.9, 125.3, 92.3, 66.4, 59.8, 55.2, 53.5, 44.5, 13.2, 10.6. C₁₉H₂₇ClN₆O₂[M+H]⁺のLRMS計算値:406.9; 実測値:407.0。

10

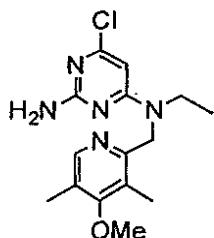
【0084】

[実施例7:6-クロロ-N4-エチル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

20

【0085】

【化12】



6-クロロ-N4-エチル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(71mg、67%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.15 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 4.93 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.37 (bs, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.02-0.98 (m, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 163.9, 163.0, 162.0, 159.8, 155.0, 149.0, 125.3, 125.0, 92.3, 59.8, 49.7, 41.8, 13.2, 11.8, 10.7. C₁₅H₂₀ClN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値:321.8; 実測値:322.0。

30

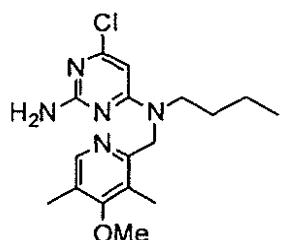
【0086】

[実施例8:N4-ブチル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

40

【0087】

【化13】



N4-ブチル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化

50

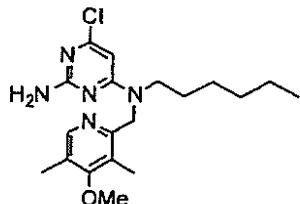
合物は非晶質白色固体として生成した(106mg、45%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.11 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.26 (bs, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.41-1.38 (m, 2H), 1.23-1.18 (m, 2H), 0.84-0.80 (m, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 163.8, 163.2, 161.9, 159.5, 154.1, 148.9, 125.1, 124.8, 92.1, 59.7, 50.1, 47.2, 28.7, 19.9, 13.7, 13.1, 10.6. C₁₇H₂₄CIN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値: 349.8; 実測値: 350.0。

【0088】

[実施例9:6-クロロ-N4-ヘキシル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0089】

【化14】



6-クロロ-N4-ヘキシル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。

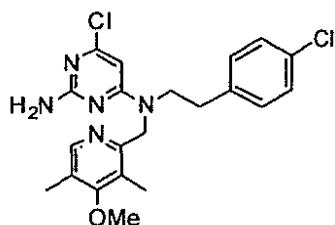
化合物は非晶質白色固体として生成した(59mg、37%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.14 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.28 (bs, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.48-1.40 (m, 2H), 1.27-1.17 (m, 6H), 0.86-0.82 (m, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 163.9, 163.2, 161.9, 159.6, 154.4, 149.0, 125.2, 124.9, 92.3, 59.8, 50.2, 47.5, 31.4, 26.6, 26.4, 22.4, 13.9, 13.2, 10.7. C₁₉H₂₈CIN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値: 377.9; 実測値: 378.0。

【0090】

[実施例10:6-クロロ-N4-(4-クロロフェネチル)-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0091】

【化15】



6-クロロ-N4-(4-クロロフェネチル)-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(105mg、38%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.17 (s, 1H), 7.22-7.19 (m, 2H), 7.04 (dd, J=8.2Hz, J=2.3Hz, 2H), 5.87 (s, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.58 (bs, 2H), 2.77-2.73 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.13 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 164.5, 163.2, 161.9, 159.9, 154.1, 148.4, 137.2, 132.2, 130.1, 128.6, 125.6, 125.1, 92.5, 59.9, 50.2, 49.6, 32.7, 13.3, 10.7. C₂₁H₂₃Cl₂N₅O [M+H]⁺のLRMS計算値: 432.3; 実測値: 432.0。

【0092】

[実施例11:N4-(2-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル)-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0093】

10

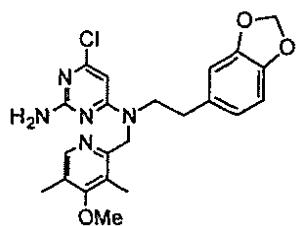
20

30

40

50

【化16】



N4-(2-(ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)エチル)-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(10mg、26%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.19 (s, 1H), 6.77-6.57 (m, 3H), 5.94 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.56-3.52 (m, 2H), 2.78-2.69 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 164.0, 161.9, 161.0, 159.9, 149.2, 147.7, 146.1, 125.4, 121.6, 109.1, 108.3, 100.9, 92.6, 59.9, 49.2, 39.3, 33.0, 13.3, 10.7. C₂₂H₂₄ClN₅O₃[M+H]⁺のLRMS計算値:441.9; 実測値:442.0。

10

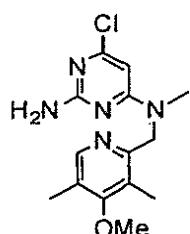
【0094】

[実施例12:6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-メチルピリミジン-2,4-ジアミン]

20

【0095】

【化17】



6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-メチルピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(300mg、60%)。¹H NMR (400MHz, DMSO d₆): 8.06 (s, 1H), 6.32 (s, 2H), 5.89 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.90 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO d₆): 163.9, 163.3, 162.3, 158.9, 154.1, 148.5, 124.5, 123.9, 90.6, 59.8, 50.1, 36.0, 12.9, 10.2. C₁₄H₁₈ClN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値:307.8; 実測値:308.0。

30

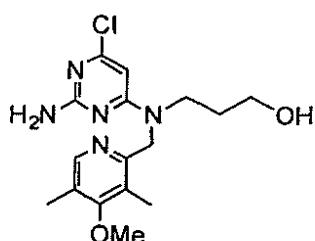
【0096】

[実施例13:13-((2-アミノ-6-クロロピリミジン-4-イル)((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)アミノ)プロパン-1-オール]

40

【0097】

【化18】



13-((2-アミノ-6-クロロピリミジン-4-イル)((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-

50

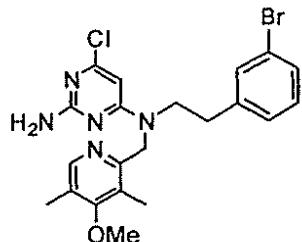
イル)メチル)アミノ)プロパン-1-オールを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(120mg、48%)。¹H NMR (400MHz, DMSO d₆): 8.06 (s, 1H), 6.30 (s, 2H), 5.90 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.36 (t, J=5.9Hz, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.62-1.52 (m, 2H). ¹³CNMR (100MHz, DMSO d₆): 163.3, 162.4, 158.9, 148.5, 124.6, 123.9, 90.7, 59.8, 58.3, 49.2, 45.0, 30.1, 12.9, 10.2. C₁₆H₂₂CIN₅O₂[M+H]⁺のLRMS計算値:351.8; 実測値:352.0。

【0098】

[実施例14:N4-(3-ブロモフェネチル)-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0099】

【化19】



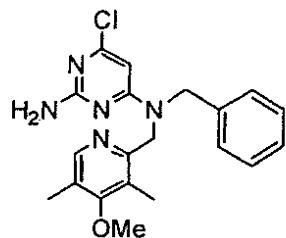
N4-(3-ブロモフェネチル)-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(146mg、36%)。¹H NMR (400MHz, DMSO d₆): 8.10 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.37-7.35 (d, J=6.4Hz, 1H), 7.40-7.21 (m, 2H), 6.43 (s, 2H), 5.93 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.59-3.44 (m, 2H), 2.82-2.75 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.14 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO d₆): 163.2, 162.4, 158.8, 148.4, 142.1, 131.5, 130.3, 128.9, 127.9, 124.5, 123.9, 121.6, 90.8, 59.7, 49.1, 32.0, 12.8, 10.1. C₂₁H₂₃BrCIN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値:476.0, 478.0; 実測値:476.0, 478.0。

【0100】

[実施例15:N4-ベンジル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0101】

【化20】



N4-ベンジル-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(10mg、23%)。¹H NMR (400MHz, DMSO d₆): 8.13 (s, 1H), 7.32-7.19 (m, 5H), 6.45 (s, 2H), 5.90 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO d₆): 164.0, 163.2, 162.4, 158.9, 148.5, 138.0, 128.4, 127.1, 126.8, 124.6, 124.0, 90.8, 59.7, 49.3, 12.8, 10.1. C₂₀H₂₂CIN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値:383.8; 実測値:384.0。

【0102】

[実施例16:6-クロロ-N4-イソプロピル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

10

20

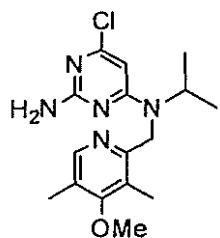
30

40

50

【0103】

【化21】



10

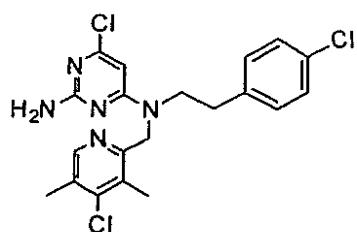
6-クロロ-N4-イソプロピル-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(96mg、40%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.14 (s, 1H), 5.71 (s, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.84 (s, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H). C₁₆H₂₂CIN₅O [M+H]⁺のLRMS計算値:335.8; 実測値:336.0。

【0104】

[実施例17:6-クロロ-N4-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(4-クロロフェネチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0105】

【化22】



20

6-クロロ-N4-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-(4-クロロフェネチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質白色固体として生成した(104mg、38%)。¹H NMR (400MHz, DMSO d₆): 8.17 (s, 1H), 7.26-7.19 (m, 4H), 6.41 (s, 2H), 5.88 (1H), 3.57 (s, 2H), 2.79-2.73 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO d₆): 163.1, 162.4, 158.9, 154.0, 147.1, 143.5, 138.1, 130.8, 130.6, 129.8, 128.9, 128.1, 90.8, 49.3, 32.0, 16.8, 14.3. C₂₀H₂₀Cl₃N₅ [M+H]⁺のLRMS計算値:436.0, 438.0; 実測値:436.0, 438.0。

30

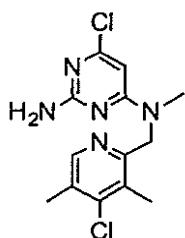
【0106】

[実施例18:6-クロロ-N4-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-メチルピリミジン-2,4-ジアミン]

【0107】

【化23】

40



6-クロロ-N4-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-N4-メチルピリミジン

50

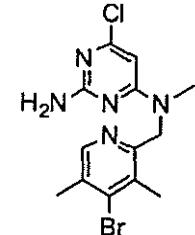
-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(4.1mg、26%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.13 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.25 (s, 3H)。.
¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 163.8, 161.8, 160.0, 147.5, 145.0, 130.8, 130.2, 92.4, 52.0, 35.4, 17.4, 14.9. C₁₃H₁₅Cl₂N₅[M+H]⁺のLRMS計算値:312.2; 実測値:312.0。

【0108】

[実施例19:N4-((4-プロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-6-クロロ-N4-メチルピリミジン-2,4-ジアミン]

【0109】

【化24】



N4-((4-プロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-6-クロロ-N4-メチルピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例1に記載した手順及び適当な出発材料を使用して合成した。化合物は非晶質黄色固体として生成した(102mg、45%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.16 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.35 (s, 3H). C₁₃H₁₅BrCIN₅ [M+H]⁺のLRMS計算値:356.0, 358.0; 実測値:356.0, 358.0。

【0110】

[実施例20:2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン]

2-(クロロメチル)-4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン塩酸塩(10g、45mmol)、フタルイミド(7.28g、49.5mmol)及びK₂CO₃(25g、180.8mmol)の懸濁液を、DMF (200mL)に溶解して室温で16h反応させた。形成された白色固体に飽和NaHCO₃を塩基性になるまで加えて濾過し、2-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを白色固体として定量的収率で得た。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.04 (s, 1H), 7.89-7.87 (m, 2H), 7.73-7.72 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.18 (s, 3H)。

【0111】

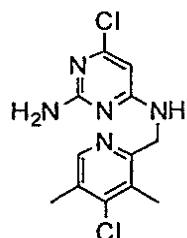
上の生成物(737mg、2.49mmol)のTHF/EtOH (5mL/5mL)中の溶液に、濃HCl (0.41mL)を加えて、それを濃縮した。残渣をDMF (4mL)に溶解してNaBr (256mg、2.49mmol)を加えて120度1h加熱した。この溶液にEtOAcを加え沈殿を濾過して、2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを白色固体として定量的収率で得た。C₁₆H₁₄N₂O₃に対して計算されたLCMS (ESI)[M+1]⁺:282.3; 測定値、283.0。

【0112】

[実施例21:6-クロロ-N4-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0113】

【化25】



10

20

30

40

50

上の実施例20で示したようにして合成された2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン(50mg、0.17mmol)とPOCl₃(0.15mL、1.66mmol)を、封管中で組み合わせて110℃で45分間加熱した。溶液を冷却し、氷水に加えて40%KOHで塩基性にした。形成された沈殿を濾過して、2-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオンを白色固体として得た(22.9mg、45%)。C₁₆H₁₃CIN₂O₂に対して計算されたLC-MS (ESI)[M+1]⁺:300.7; 測定値、301.0。

【0114】

2-((4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン(22.9mg、0.076mmol)のEtOH/トルエン(0.4mL:0.2mL)中の溶液に、NH₂NH₂·H₂O(22μl、0.456mmol)を加えて90℃で20分間加熱した。反応混合物を冷却し、濾過して濾液を濃縮し、CH₂Cl₂で洗浄して粗アミンを黄色油状物として得、それを、次のステップのためにさらに精製せずにそのまま使用した。C₈H₁₁CIN₂に対して計算されたLC-MS (ESI)[M+1]⁺:170.6; 測定値、171.0。

10

【0115】

4,6-ジクロロピリミジン-2-アミン(11.5mg、0.07mmol)、DIPEA(24μL、0.14mmol)及び(4-クロロ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メタンアミン(12mg、0.07mmol)のEtOH(0.5mL)中の懸濁液を、マイクロ波照射により160℃で10分間加熱した。自動分取HPLCを使用して粗生成物を精製し、所望の生成物を白色非晶質固体として得た(10mg、2ステップを通して44%)。¹H NMR(400MHz, DMSO d₆): 8.25(s, 1H), 6.37(bs, 2H), 5.89(s, 1H), 4.51(s, 2H), 2.29(s, 3H), 2.24(s, 3H). ¹³C NMR(100MHz, DMSO d₆): 163.9, 162.9, 157.1, 154.6, 146.9, 143.7, 130.2, 129.0, 93.1, 44.1, 16.9, 14.6. C₁₂H₁₃Cl₂N₅ [M+H]⁺のLRMS計算値:298.2; 実測値:298.0。

20

【0116】

[実施例22: 2-((1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)メチル)-3,5-ジメチルピリジン-4-イルトリフルオロメタンスルホネートの合成]

上の実施例20で示したようにして合成した2-((4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン(3.2g、11.3mmol)及び0℃に冷却したDIPEA(2.36mL、13.6mmol)のCH₂Cl₂(98mL)中の溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸無水物(2.29mL、13.6mmol)を滴下した。反応混合物を冷却し、水を加えてCH₂Cl₂で抽出した。有機層をNa₂SO₄で脱水し、濾過して溶媒を真空中で蒸発させて、粗生成物を橙色固体として得て(4.0g、85%)、それを、次のステップのためにさらに精製せずにそのまま使用した。C₁₇H₁₃F₃N₂O₅S[M+H]⁺に対して計算されたLRMS:414.4; 測定値415.0。

30

【0117】

[実施例23:N4-((4-プロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)-6-クロロピリミジン-2,4-ジアミン]

【0118】

【化26】



40

上の実施例22で示したようにして合成した2-((1,3-ジオキソイソインドリン-2-イル)メチル)-3,5-ジメチルピリジン-4-イルトリフルオロメタンスルホネート(3.19g、7.69mmol)のTHF/EtOH(15mL/15mL)中の溶液に、H₂O中の47%HBr(0.84mL、15.4mmol)を加えて濃縮した。残渣をDMFに溶解してNaBr(1.58g、15.4mmol)を加え、110℃で1.5h加熱した。次に、それを水中に注いでEtOAcで抽出した。有機層をNa₂SO₄で脱水し、濾過して溶媒を真空中で

50

蒸発させ、粗生成物を淡黄色固体として得た(2.0g、75%)。C₁₆H₁₃BrN₂O₂[M+H]⁺に対して計算されたLRMS:345.2、測定値345.0。

【0119】

2-((4-ブロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)イソインドリン-1,3-ジオン(2g、5.8mmol)のEtOH/トルエン(30mL:15mL)中の溶液に、NH₂NH₂·H₂O(1.4mL、28.9mmol)を加えて110℃で20分間加熱した。反応混合物を冷却し、濾過して濾液を濃縮した。2MのNaOHを加えCH₂Cl₂で抽出して、粗アミンを褐色油状物として得た(542mg、44%)。C₈H₁₁BrN₂に対するLC-MS(ESI)の計算値[M+1]⁺、215.1; 测定値215.0。

【0120】

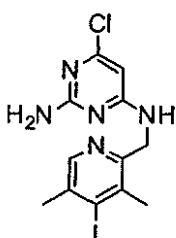
4,6-ジクロロピリミジン-2-アミン(411.5mg、2.51mmol)、DIPEA(2.45mL、14.1mmol)及び(4-ブロモ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メタンアミン(542mg、2.51mmol)のnBuOH(12mL)中の懸濁液を、115℃で1h加熱した。自動分取HPLCを使用して粗生成物を精製し、所望の生成物を白色非晶質固体として得た(400mg、47%)。¹H NMR(400MHz, DMSO d₆): δ 8.20(s, 1H), 6.38(s, 2H), 5.89(s, 1H), 4.53(s, 2H), 2.33(s, 3H), 2.26(s, 3H). ¹³C NMR(100MHz, DMSO d₆): δ 163.8, 162.9, 154.2, 146.6, 137.9, 132.4, 131.1, 93.1, 44.0, 20.1, 17.8. C₁₂H₁₃BrCIN₅[M+H]⁺のLRMS計算値:342.6; 実測値:343.8。

【0121】

[実施例24:6-クロロ-N4-((4-ヨード-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミン]

【0122】

【化27】



6-クロロ-N4-((4-ヨード-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-2,4-ジアミンを、実施例20-23の方法にしたがって適当な出発材料を使用して合成した。化合物は白色非晶質固体として生成した(31mg、47%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.12(s, 1H), 6.72(bs, 1H), 5.98(s, 1H), 4.85(s, 2H), 4.52(s, 2H), 2.48(s, 3H), 2.44(s, 3H). C₁₂H₁₃Cl₂N₅[M+H]⁺のLRMS計算値:389.6; 実測値:390.0。

【0123】

[実施例25:2-ビス-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-4-アミン]

4,6-ジクロロピリミジン-2-アミン(2.2g、13.4mmol)、DMAP(164mg、1.34mmol)のTHF(20mL)中の溶液に、Boc₂O(6.4g、29.3mmol)を加えて、混合物を室温で終夜攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて、生じた残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、EtOAc/ヘキサン)により精製し、2-ビス-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ-4,6-ジクロロピリミジンを白色固体として定量的収率で得た。¹H NMR(400MHz, DMSO d₆): δ 8.02(s, 1H), 1.40(s, 18H)。

【0124】

上で合成されてBocで保護されたピリミジン(460mg、1.26mmol)、DIPEA(1.23mL、7.06mmol)及び(4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メタンアミン(211mg、1.26mmol)のnBuOH(6mL)中の懸濁液を、115℃で1h加熱した。混合物を冷却して溶媒を真空中で蒸発させた。生じた残渣を水に溶解してCH₂Cl₂及びEtOAcで抽出した。有機層をNa₂SO₄で脱水し、濾過して溶媒を真空中で蒸発させて、生成物を淡黄色油状物として得た(523.6mg、84%)。

【0125】

10

20

30

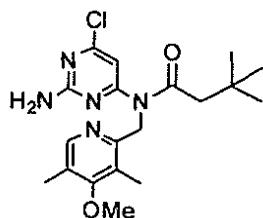
40

50

[実施例26:N-(2-アミノ-6-クロロピリミジン-4-イル)-N-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリミジン-2-イル)メチル)-3,3-ジメチルブタンアミド]

【0126】

【化28】



10

上の実施例26で示したようにして合成した2-ビス-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ-6-クロロ-N4-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ピリミジン-4-アミン(120mg、0.24mmol)を無水CH₂Cl₂(2.5mL)に溶解し、0℃に冷却して、DIPEA(0.12mL、0.72mmol)を、続いて塩化3,3-ジメチルブタノイル(67μL、0.48mmol)を滴下した。反応混合物を室温に温まるに任せて16h攪拌した。減圧下で濃縮した後、残渣を無水CH₂Cl₂(1.4mL)に溶解してTFA(0.48mL)を加え、生じた溶液を室温で30分間攪拌した。自動分取HPLCを使用して得られた粗生成物を精製し、所望の生成物を黄色非晶質固体として得た(52mg、55%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.64(s, 1H), 6.61(s, 1H), 5.31(s, 2H), 3.94(s, 3H), 2.52(s, 2H), 2.35(s, 3H), 2.33(s, 3H), 0.97(9H). C₁₉H₂₆CIN₅O₂ [M+H]⁺のLRMS計算値:391.8; 実測値:392.0。

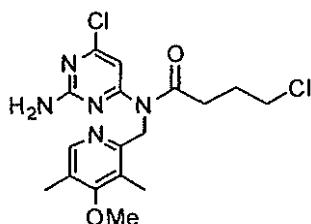
20

【0127】

[実施例27:N-(2-アミノ-6-クロロピリミジン-4-イル)-4-クロロ-N-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ブタンアミド]

【0128】

【化29】



30

N-(2-アミノ-6-クロロピリミジン-4-イル)-4-クロロ-N-((4-メトキシ-3,5-ジメチルピリジン-2-イル)メチル)ブタンアミドを、実施例26に示した手順を使用して、適当な出発材料を使用することにより同様に合成した。化合物は白色非晶質固体として得られた(20mg、42%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.52(s, 1H), 6.78(s, 1H), 5.26(s, 2H), 3.91(s, 3H), 3.63-3.58(m, 2H), 2.84-2.80(m, 2H), 2.32(s, 3H), 2.30(s, 3H), 2.17-2.12(m, 2H). C₁₇H₂₁Cl₂N₅O₂ [M+H]⁺のLRMS計算値:398.3; 実測値:398.0。

40

【0129】

[実施例28:ヒートショックタンパク質90(Hsp90)阻害剤の構造活性相関を決定するための材料及び方法]

ヒドロキシエチルピベラジンエタンスルホン酸(HEPES)、塩化カリウム(KCl)、塩化マグネシウム(MgCl₂)、モリブデン酸ナトリウム、ジチオスレイトール(DTT)、タージェトールNP-40(NP40)タイプ、ジメチルスルホキシド(DMSO)、及びウシ血清アルブミン(BSA)は、Sigma(St.Louis、ミズーリ州)から購入した。フルオレセインイソチオシアネート(FITC)-標識ゲルダナマイシン(GM-FITC)(lot#3-A110334d)は、Enzo Life Sciences(Farmingdale、ニューヨーク州)から購入した。蛍光分極測定のために使用したPolarStar Omegaのプレートリーダーは、BMG-Lab Tech(Stafford、テキサス州)の製品であった。低分子量の骨格は、Sorrento Technologiesから得た。Hsp90阻害剤化合物は、Dr.Nick Cosford、Burnh

50

am Institute (La Jolla、カリフォルニア州)の実験室で設計されて合成された。

【0130】

[実施例29:全長ヒトHsp90のクローニング、発現及び精製]

ヒトHsp90のアミノ酸残基1から732をコードする構造遺伝子(GenBank:BC121062.2)は、混合された組織タイプ(catalog # MHS4426-99625755; Lot # 40118488; Thermo-Fisher Scientific Inc., West Palm Beach, フロリダ州)から単離されたヒトcDNAからクローニングした。クローニングは、PCRクローニングキット(AccuPrime Pfx; Invitrogen Inc., Carlsbad、カリフォルニア州)及びサーモサイクラー(Model # DNA-Engine; Biorad Inc.; Hercules,、カリフォルニア州)を使用し、Integrated DNA Technologies, Inc.(Coralville, アイオワ州)で合成された順方向(5'-TGACAGGATCCTGAGGAAACCCAGACC-3'、配列番号:)及び逆方向(5'-CGCATGGAAGAAGTAGACTAAGGATCCATATAT-3'配列番号:)のオリゴヌクレオチドプライマーを利用して行った。次に、生じたHsp90構造遺伝子をコードするDNAを、E.coli(大腸菌)の発現ベクター系(pET15b; EMD-Millipore Inc., Billerica, マサチューセッツ州)にサブクローニングした。全長Hsp90を含む発現ベクターをBL21DE3細胞(EMD-Millipore Inc., Billerica, マサチューセッツ州)に形質転換させて培養した。生じた発現培養物を、25%グリセリンを含有する貯蔵緩衝液中でさらに使用するまで-80°で凍結した。

【0131】

Hsp90の全長遺伝子を含む発現ベクターで形質転換させたE.coliの6リットル(L)を成長させることにより、ヒトHsp90の全長タンパク質を生成させた。E.coliの凍結した培養物(-80°で貯蔵した)を使用して100mLのアンピシリンナトリウム(100 μg/mL)を補完した滅菌Luria-Bertaniプロスの入った250mL培養フラスコに接種し(100mLの培地当たり100 μgのE.coli)、16h、37°で一定の攪拌下で(250rpm)成長させて出発培養物を得た。出発培養物を使用して、アンピシリンナトリウム(100 μg/ml)を補完した1Lの滅菌Luria-Bertaniプロスの入った6個の(2.8L)縦溝を彫った震盪フラスコに接種して(1L当たり10mL)、37°で一定の攪拌下に成長させた(250rpm)。培養の成長は、マイクロタイタープレートリーダー(Model # Synergy HT; BioTek Inc., Winooski, バーモント州)及び丸底96ウェルマイクロタイタープレートを利用して、600nmにおける光散乱によりモニターした。光学密度が0.4に達したとき、培養液を、200Xフィルタ-滅菌IPTG水性貯蔵溶液の添加(1L当たり5mL)によりイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG、最終の濃度1mM)で補完して、次に、培養物を25°で18h成長させた。16h後に、遠心管懸垂型ロータ(Model # 981, Damon Inc., Needham Heights, マサチューセッツ州)を備えた冷蔵遠心分離機(Model # DPR-6000, Damon Inc., Needham Heights, マサチューセッツ州)を使用して、4°において4,000rpm、15分間で、培養物を1Lのポリカーボネートのバケットに収集した。上清を除去してペレットを-80°で凍結した。

【0132】

[実施例30:フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識ゲルダナマイシン(GA-FITC)のK_d値の決定]

85マイクロリットル(μl)の結合アッセイ緩衝液(20mM HEPES、pH 7.5、50mM KCl、5mM MgCl₂、20mMモリブデン酸ナトリウム、0.01%NP-40、2mM DTT、及び0.1mg/mL BSA)を、氷上に置いた96ウェル黒色プレートに加えた。DMSO(3 μl)をウェルに加え、続いて結合アッセイ緩衝液で希釈した10 μlのヒト全長HSP90(最終の濃度50nM)又は10 μlの緩衝液単独のいずれかを加えた。プレートシェーカー上でプレートを4°で24時間インキュベートした。DMSO中の最終の範囲が160nMから0.3125nMの50 × GA-FITC滴定試料2 μlをウェルに加え、続いて周囲温度で1h攪拌しながらインキュベートした。蛍光分極の読み取りは、それぞれ480及び500nmの励起波長及び発光波長で行った。測定は2連で実施した。Hsp90の存在における分極値を、Hsp90不在の値から差し引くことにより、特異的結合を計算した。GA-FITCのK_d値は、プリズムソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego, カリフォルニア州)を使用して計算した。

【0133】

GM-FITCのHsp90に対する結合についての10点濃度応答曲線を得た。使用したGM-FITCの

10

20

30

40

50

濃度は、160nMから0.3125nMの範囲であり、それは飽和し得る濃度応答曲線を生じた。GM-FITCについての K_d は、曲線から3.1nMであると決定された。結合の最大値(B_{max})は188nMであると決定された。

【0134】

[実施例31:Hsp90結合アッセイ]

Hsp90結合アッセイは、J. Biomol. Screening 9:375, 2004 and Anal. Biochem. 350:202, 2006に記載された手順にしたがって一般的に実施した。Hsp90阻害剤をDMSOに50mMの貯蔵濃度で溶解した。Hsp90阻害剤を10 μM及び1 μMでスクリーニングするか、又はDMSO中で滴定した(32 μMから62.5nMの範囲で最高の最終濃度に達するまで2倍希釈)。85 μlの結合アッセイ緩衝液(20mM HEPES、pH-7.5、50mM KCl、5mM MgCl₂、20mMモリブデン酸ナトリウム、0.01% NP-40、2mM DTT、及び0.1mg/ml BSA)を、氷上に置いた96ウェル黒色プレートのウェルに加えた。DMSO中のHsp90阻害剤化合物の3 μlの33.3倍濃縮溶液、又はDMSO単独(対照)をウェルに加えた。次に、10 μlの結合アッセイ緩衝液単独(対照)又は結合アッセイ緩衝液に希釈したヒト全長Hsp90タンパク質のいずれかを加えて、50nMの最終の濃度にする。プレートシェーカー上でプレートを4℃で24hインキュベートした。DMSO中の50XG M-FITC(最終9nM)2 μlを全てのウェルに加えてプレートを周囲温度で1h振盪しながらインキュベートした。蛍光分極の読み取りをそれぞれ480nm及び500nmの励起及び発光波長において2連で行った。特異的結合は、Hsp90が存在したときの分極値をHsp90が不在のときの値から差し引くことにより計算した。阻害率(%)を計算するために、化合物の存在下でGA-FITCについて得た特異的結合値を、化合物の不在(DMSOのみ)におけるGA-FITCについての値と比較した。各プレートは、対照の化合物、例えばSNX-0723を10 μM、1 μM、又は80nMの濃度で、又は増大する濃度でHsp90阻害剤を含有したウェルを有した。

10

20

30

30

【0135】

本実施例における蛍光分極Hsp90競合結合アッセイ特性は、SBI-0638418(Biogen-Idec、BII B021)及びSNX-0723(Pfizer)について、前に報告されている値と一致するIC₅₀値を生じ、したがって、アッセイは検証された。SBI-0638418は20nMのIC₅₀値を有することが決定され、Mol. Canc. Ther. 8:921-929, 2009で報告された結合親和性と一致し; SNX-0723は30nMのIC₅₀値を有することが観察されて、J. Pharm. Exp. Ther. 332:849-857, 2010の報告と一致した。

【0136】

アッセイの精度を評価するために、SNX-0723を対照の化合物として、1点又は2点の濃度で各アッセイを行った。10 μM又は1 μM (n=12)におけるSNX-0723は、一致して100%の阻害値を生じた。84nMのSNX-0723濃度(n=12)においては、阻害値は、77%から100%の範囲であった(変動係数、CV=9%)。さらに、滴定曲線をSBI-0630353について5回のアッセイ(n=5)で得て、結果は255から308nMの範囲のIC₅₀値になった(CV=2%)。これらの結果は、アッセイにおける測定間の精度が高いことを示した。

【0137】

実験内の測定精度は、2連の定量から得て、無作為に5枚の異なったアッセイプレート(n=55)から集めたCVにより評価した。CVの範囲は0-41%で、平均値は11%であった。

【0138】

アッセイを使用して決定された58種のHsp90阻害剤についてのIC₅₀値は、97nMから32 μMを超える範囲にあった(表II)。K_i値は24nMから8 μMを超える範囲にあった。代表的濃度応答結合曲線を図7に示す。新規Hsp90阻害剤の結合親和性は、100nM未満にK_i値を有する最も強い阻害剤で明確な構造活性相関を示した。

40

【0139】

【表2】

表II.効力により等級付けした新規なHsp90阻害剤シリーズの結合親和性

化合物	$IC_{50}(\mu M)$	$K_i(\mu M)$
SBI-0640613	0.097	0.024
SBI-0640725	0.101	0.025
SBI-0640610	0.194	0.049
SBI-0639353	0.255	0.064
SBI-0640608	0.311	0.078
SBI-0640605	0.350	0.088
SBI-0640607	0.368	0.092
SBI-0640609	0.391	0.098
SBI-0640606	0.432	0.108
SBI-0639220	0.44	0.110
SBI-0639354	0.72	0.180
SBI-0639219	0.85	0.213
SBI-0639350	1.10	0.275
SBI-0640612	1.14	0.285
SBI-0639217	1.20	0.300
SBI-0639349	1.37	0.343
SBI-0639218	1.47	0.368
SBI-0640611	1.69	0.423
SBI-0639899	2.15	0.538
SBI-0639351	2.21	0.553
SBI-0639355	2.87	0.718
SBI-0206665	4.0	1.00
SBI-0206664	>10	>2.5
SBI-0630160	>10	>2.5
SBI-0630161	>10	>2.5
SBI-0630180	>10	>2.5
SBI-0633823	>10	>2.5
SBI-0633825	>10	>2.5
SBI-0633826	>10	>2.5
SBI-0634911	>10	>2.5
SBI-0634912	>10	>2.5
SBI-0635330	>10	>2.5
SBI-0635446	>10	>2.5
SBI-0635448	>10	>2.5
SBI-0636373	>10	>2.5
SBI-0636378	>10	>2.5
SBI-0636436	>10	>2.5
SBI-0636437	>10	>2.5
SBI-0636438	>10	>2.5
SBI-0636439	>10	>2.5

10

20

30

40

化合物	$IC_{50}(\mu M)$	$K_i(\mu M)$
SBI-0638965	>10	>2.5
SBI-0638966	>10	>2.5
SBI-0638967	>10	>2.5
SBI-0638968	>10	>2.5
SBI-0638969	>10	>2.5
SBI-0638970	>10	>2.5
SBI-0639179	>10	>2.5
SBI-0639180	>10	>2.5
SBI-0639181	>10	>2.5
SBI-0639182	>10	>2.5
SBI-0639186	>10	>2.5
SBI-0640644	13.9	3.48
SBI-0639901	30	7.50
SBI-0640645	30	7.50
SBI-0639900	>32	>8
SBI-0639902	>32	>8
SBI-0640492	>32	>8
SBI-0639352	>32	>8

10

20

30

40

50

【0140】

[実施例32: プログラムされた腫瘍細胞死及び細胞のバイオマーカーアッセイ]

腫瘍細胞株(LnCaP)は、Sanford Burnham Medical Research Institute (La Jolla, カリフォルニア州)から得た。LnCaP細胞を培養培地(RPMI-glutamax、10% FCS、100 units/mlペニシリン、及び100 μg/mlストレプトマイシン)中で培養した。細胞を0.25%トリプシン/EDTAを使用して処理(lifting)した後継代して、 3×10^5 細胞を6枚のウェルプレートの各ウェルに播種した(合計体積2.5mL/ウェル)。細胞を24h培養した後、DMSO含有貯蔵溶液から濃度を増加させながらHsp90阻害剤をウェルに3連で加えて、攪拌により穏やかに混合した。全ウェル中の最終DMSO濃度は0.25%であった。次に、処理された細胞を48h培養してから試料を溶解した。培養培地をウェルから除去して、ウェルを、1mMのCaCl₂及び0.5mMのMgCl₂を含有するDPBSで2回洗浄した。次に、細胞を細胞溶解緩衝液(PBS、0.5%TX-100、1mM EDTA、5mM NaF、1mMオルトバナジン酸ナトリウム、2.5mMピロリン酸ナトリウム、及び1×H ALTプロテアーゼ阻害剤)で溶解した。1ウェル当たり100 μLの細胞溶解緩衝液を6枚のウェルプレートに使用して、40 μLを12枚のウェルプレートに使用した。細胞溶解物は、Akt1のアッセイまで-80°Cで貯蔵した。細胞溶解物中のタンパク質濃度を、メーカーの推奨にしたがって使用されるBCAタンパク質アッセイキットを使用して定量した。PBS中の1:10希釈した各溶解産物の25 μLを96ウェルプレートのウェルに加えた。標準曲線は、ウシ血清アルブミンタンパク質(BCAタンパク質アッセイキットで提供された)を2.0-0.125mg/mlの範囲で希釈して25 μLを加えることにより作成した。200 μLのBCAタンパク質アッセイキット試薬を加えて、混合物を37°Cで30分間インキュベートした。タンパク質濃度は、マイクロタイタープレートリーダー(Model # Synergy HT; BioTek Inc., Winooski, バーモント州)を使用して定量した。

【0141】

細胞溶解物中のAkt1レベルは、R&D Systemsのメーカーの推奨にしたがって使用されるキットを使用して測定した。細胞溶解物をAkt1 ELISAのために1:24希釈でアッセイした。細胞溶解物中のAkt1濃度を標準曲線から外挿して、溶解産物のタンパク質濃度について補正した。Akt1レベルを、マイクロタイターパレートリーダー(Model # Synergy HT; BioTek Inc., Winooski, バーモント州)を使用して定量した。LnCaP細胞を培養培地中で培養し

て、0.25%トリプシン/EDTAを使用して処理した後継代した。LnCaP細胞を96ウェルの組織培養プレートに1ウェル当たり 1.3×10^4 細胞で体積100μLの培養培地中に播種した。細胞を24h培養した後、DMSO含有貯蔵溶液からHsp90阻害剤の濃度を増加させながらウェルに3連で加えて穏やかに攪拌することにより混合した。全てのウェル中の最終DMSO濃度は0.25%であった。細胞を48h培養した。カスパーゼ3/7活性を、メーカーの推奨にしたがって使用される均一カスパーゼ3/7アッセイキットを使用して測定した。詳細には、等体積のカスパーゼ3/7アッセイキット試薬をウェルに加えて、蛍光読み取り(Ex/Em485/528)を3、6、及び23h後に周囲温度でマイクロタイタープレートリーダーを使用して実行した。ローダミン110貯蔵溶液(10mM)をDMSO中で調製して、水で4000-62.5nMの範囲内に希釈した。希釈試料の蛍光強度を測定して標準曲線を得た。LnCaP細胞を、培養培地を使用して組織培養プレートに播種した。播種後、培養液を37℃、5%CO₂で16hインキュベートした。Hsp90阻害剤を、濃度を増加させながらDMSO含有貯蔵溶液から培養液に加えて、穏やかに攪拌することにより混合した。全てのウェル中の最終のDMSO濃度は0.25%であった。培養液を386ウェルフォーマットのプレートに加えて37℃、5%CO₂で72hインキュベートした。細胞生存率をメーカーの推奨にしたがって使用するATPliteキットを用いて測定した。培養液を周囲温度で30分間平衡させて10μlのATPliteキット試薬を各ウェルに加えた。培養液を1,000rpmで暗所において2分間混合して、マイクロタイタープレートリーダー(POLARstar Omegaマイクロタイタープレートリーダー;BMG Labtech)を使用してルミネッセンスによる定量を実施した(図8)。

10

20

30

40

50

【0142】

[実施例33:ラットCNSへの露出、CNSのHsp90阻害及びCNSのバイオマーカーアッセイ]

試験の対象(Sprague-Dawleyラット)を、温度、湿度を制御し、12時間の明暗サイクル(7:00点灯及び19:00消灯)の滅菌動物施設に収容した。調達後、ラットは、実験開始日に先立つ7日間食餌及び水の両方に随意に接する動物施設で気候順化させた。床敷きは週に2回交換した。試験物品は、100%PEG400中16mg/mLの濃度で実験開始日に40mg/Kg用量で製剤化した。実験開始日にラットにビヒクル又はHsp90阻害剤の製剤を投与した。試験物品製剤の投与に続いて、血液及びCNS組織を投薬後6.5hで剖検手順により採取した。詳細には、CNS組織を、ビヒクル群と用量群から単離して、2つの正中の切断部に分割し、タールを塗った1mLミクロ遠心分離管に入れ、秤量して直ちにドライアイスで凍結した。血液をビヒクル群及びHsp90阻害剤用量群から心臓穿刺の手順により単離した。これらの試料から血漿を、エチレンジアミン四酢酸を抗凝血剤として含有する血漿分離管中に単離した。血漿及びCNS組織中のHSP90阻害剤濃度を60%アセトニトリル抽出に続いてLC-MS/MSに基づく方法を使用して定量した。CNS細胞溶解物におけるHsp90結合部位を、標識されたゲルダナマイシン置換アッセイ([実施例31]を参照されたい)により蛍光で定量した。CNS細胞溶解物におけるAkt1の定量は、ELISAに基づくアッセイにより実施した([実施例32]を参照されたい)。

【0143】

[実施例34:Hsp90阻害の治療の利益のためのバイオマーカーとしてのCNSにおけるHsp70誘発]

Hsp90阻害の効果の1つは、ヒートショックタンパク質-70(Hsp70)として知られる、バイオマーカーでもあるさらなる他の分子シャペロンのレベルにおける増大である。図9は、対照化合物SNX-0723で処理されたラットにおいては処理されないラット(ビヒクル)に比較してHsp70レベルが上昇して、投薬後の24hrまで上昇したまま(X軸)であることを示す。Hsp90の阻害で上昇したHsp70のレベルは、PD、AD、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病及び複数の硬化症を含む神経変性性障害の治療にとって治療の利益を有する。

【0144】

CNS組織の全Hsp70の定量は、メーカーの推奨にしたがって使用されるサンドイッチELISAアッセイキット(catalog # DYC1663、R & D systems Inc.)により実施した。CNS中のHsp70の定量の手順は、一般的に以下の通りである。本発明の式(I)の化合物又はビヒクル単独で処理した実験動物からの脳組織試料を、PBS緩衝液中でホモジナイズして15,000gで30

分間遠心分離し、上清を集めて-80℃で貯蔵する。使用前に試料を取り出して、解凍するために氷上に置き、それに続いてそれらを2000×gで5分間遠心分離し、上清を清浄な試験管に移す。試料のタンパク質濃度を、全タンパク質アッセイを使用して定量する。

【0145】

Hsp70特異的捕捉抗体は、製品で推薦される実用的濃度に希釈する。96ウェルマイクロプレートを1ウェル当たり100μLの希釈捕捉抗体でコートする。プレートを封じて終夜室温でインキュベートする。各ウェルを吸引して洗浄緩衝液で洗浄し、この工程を2回繰り返して合計3回洗浄する。各洗浄に400μLの洗浄緩衝液を使用した。プレートのウェルは、300μLロック緩衝液を各ウェルに加えて室温で1-2時間インキュベートすることによりロックする。吸引/洗浄ステップをステップ2と同様にして繰り返す。これでプレートは試料添加の準備が完了する。適当な希釈剤で希釈された試料又は標準(100μL)をウェルに加える。プレートを粘着性ストリップで覆い、2時間室温でインキュベートする。吸引/洗浄ステップを繰り返す。次に適当な希釈剤で希釈した100μLの検出抗体を各ウェルに加えて、プレートを新しい粘着性ストリップで覆い、2時間室温でインキュベートする。次に、ウェルを前のステップと同様に洗浄する。ストレプトアビジン-HRPを推薦される実用濃度に希釈して、100μLの希釈ストレプトアビジン-HRPを各ウェルに加える。室温における20分のインキュベーション時間の後、吸引/洗浄ステップを、ステップ2と同様にして繰り返す。次に、100μLのHRP基質溶液を各ウェルに加え、続いて室温で20分インキュベートする。続くステップで、50μLの停止溶液を各ウェルに加え、続いて穏やかに混合する。各ウェルの光学密度を、450nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して直ちに測定する。Hsp90の阻害でHsp70の上昇したレベルは、PD、AD、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病及び複数の硬化症を含む神経変性性障害の治療のために治療の利益を有する。

10

20

30

【0146】

[実施例35:抗真菌活性の定量]

式(1)の化合物の抗真菌活性は以下のようにして定量する。化合物は、カンジダ・パラシローシス(*Candida parapsilosis*)、カンジダ・トロピカリシス(*Candida tropicalis*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)-ATCC36082及びトリプトコッカス・ネオフォルマンス(*Cryptococcus neoformans*)を含む真菌のパネルに対して試験する。試験生物体は、サブローデキストロース寒天斜面上に4℃で維持する。アミノ酸(Difco、Detroit、ミシガン州)を添加し、0.05モルホリンプロパンスルホン酸(MOPS)でpH7.0にした酵母窒素系プロス(YNB)中で、酵母を回転ドラム上で終夜27℃で成長させることにより、各生物体のそれぞれについて1つの懸濁液を調製する。次に、懸濁液を遠心分離して0.85%NaClで2回洗浄してから、洗浄された細胞懸濁液を4秒間超音波処理する(Branson Sonifier、モデル350、Danbury、コネチカット州)。個々の出芽胞子を血球計算器で計数して0.85%NaCl中で所望の濃度に調節する。

30

【0147】

試験化合物の抗真菌活性は、改変したプロス微量希釈技法を使用して定量する。試験化合物をDMSO中で1.0mg/ml比で希釈し、次にMOPSでpH7.0にしたYNBプロス中で64μg/mlに希釈して(フルコナゾールを対照として使用する)、各化合物の試験溶液を提供する。96ウェルプレートを使用して、ウェル1、及び3から12までをYNBプロスで準備する。10倍希釈の試験化合物溶液をウェル2から11で作製する(濃度範囲は64から0.125μg/mlである)。ウェル1は、滅菌対照として及び分光光度アッセイのための空試験として役立てる。ウェル12は成長の対照として役立てる。マイクロタイタープレートに、2から11の各ウェル中に10μLの出芽胞子懸濁液を接種する(最終の接種原サイズは10⁴生物体/mlである)。接種されたプレートを48時間35℃でインキュベートする。ボルテックスミキサー(Vorte-Genie 2 Mixer, Scientific Industries, Inc., Bohemia, ニューヨーク州)を用いてプレートを2分間攪拌した後、最小阻害濃度(MIC)値は、420nmにおける吸光度を分光光度測定で(Biotek Synergyのプレートリーダー)測定することにより定量する。MIC終点は、対照ウェルと比較して約50%(又はそれを超える)の成長の減少を示す最低の薬剤濃度と定義される。濁度

40

50

アッセイでは、これはウェル中の濁度が対照の<50%である最低の薬剤濃度として定義される。最小細胞溶解濃度(MCC)は、96ウェルプレートから全てのウェルをサブローデキストロース寒天(SDA)プレートに植え継ぎ培養し、1ないし2日間35℃でインキュベートして、次に生存率を検査することにより定量される。この手法は、多くの種類の真菌により引き起こされる抗真菌性感染を治療する化合物の効力を試験するために使用することができる。

【0148】

[実施例36:疼痛軽減又は疼痛防止活性の試験方法]

(I)炎症性痛覚過敏試験:機械的痛覚過敏は、炎症性疼痛のラットモデルで検査することができる。増大する圧力刺激に対して足を逃避する閾値を、Randall-Sellito技法により無痛計(Ugo Basile、ミラノ)を使用して、フロインドの完全アジュバント(FCA)を左後足の足底に注射する前の未処置動物で測定する。足を逃避する閾値を24時間後に再び測定してから(投薬前)、次に本発明の式(I)の化合物又はビヒクル単独の投与に続いて10分から6時間測定する。同じ側の足の痛覚過敏の逆行を式により計算する。

10

【0149】

【数1】

$$\% \text{逆行} = \frac{\text{投薬後閾値} - \text{投薬前閾値}}{\text{未処理閾値} - \text{投薬前閾値}} \times 100$$

20

(ii)神経障害性痛覚過敏試験:機械的痛覚過敏は、左側の坐骨神経の部分結紮により誘発された神経障害疼痛のラットモデルで検査することができる。手術の約14日後に、結紮された(同じ側)及び結紮されていない(反対側)両方の足の機械的逃避閾値(投薬前)を測定してから、次に本発明の式(I)の化合物又はビヒクル単独の投与後10分から6時間まで測定する。各時点における痛覚過敏の逆行を次の式により計算する。

【0150】

【数2】

30

$$\% \text{逆行} = \frac{\text{同側の投薬後閾値} - \text{同側の投薬前閾値}}{\text{対側の投薬前閾値} - \text{同側の投薬前閾値}} \times 100$$

上の試験は、6頭の動物群を使用して実施する。貯蔵濃度の薬剤を蒸留水に溶解して、それに続く希釀を、4ml/kgの体積で皮下投与するために0.9%生理食塩水で行う。本発明の化合物をプラスチックバイアル中で溶解して、暗所で保管する。

【0151】

統計分析は、繰り返された測定についてのANOVAを使用した逃避閾値読み取り(g)に続いて、テューキーのHSD検定を実施する。効力は、使用された用量で観察された痛覚過敏の最高の逆行とする。

40

【0152】

(iii)骨癌疼痛のラットモデルにおける式(I)の化合物の効果の試験:成熟雌ラットにMRM Z-1ラットの乳腺の腺癌細胞(3μl、10⁷細胞/ml)の脛骨内注射を与えた。典型的には、この動物は、細胞注射後12-14日目に始まる機械的痛覚過敏、機械的異痛(有害でない刺激に対する皮膚の感受性)及び後肢回避の症状を徐々に起こす。式(I)の化合物(例えば10及び30μg/kg s.c.の用量で)を細胞注射の日から週に3回投与して、後肢回避及び機械的異痛の阻害の程度をビヒクルで処理した対象と比較して定量する。

50

【0153】

上の手法は、疼痛に関連する種々のタイプの障害及び炎症を治療するために使用することができます。

【0154】

[実施例37: 寄生生物のインビトロ分化及び操作]

本発明の式(1)の化合物の寄生生物のインビトロ分化を阻害する能力を以下の方法を使用して定量する。

【0155】

RHウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(UPRT)ノックアウト寄生生物は、低CO₂でプラディゾイトに分化するように誘導して、ピリミジン飢餓を生じさせることができる。(Bohneら(編), (1997) Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites Vol. 88. Mol Biochem Parasitol; Bohneら, (1997) Mol Biochem Parasitol 88, 115-126)。CO₂欠乏は、タキゾイトを、低接種で(寄生生物/宿主細胞比<1:10)ヒト包皮線維芽細胞(HFF)の宿主細胞単層中に、10%FBS(Gibco(登録商標) Cell Culture Products, Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州)添加NaHCO₃無添加であるが25mMHEPESを含有する最小必須培地(ダルベッコー改変イーグル培地、DMEM)中で接種することにより達成される。寄生生物の培養液を、pH7で平衡させて37°、環境CO₂(0.03%)でインキュベートする。他の実験においては、式(1)の化合物(100nM)又はDMSO(対照として)を同じ培地に及び条件で加える。約4日までに、液胞が囊胞になった明確な兆候を示し、寄生生物の分裂が減少して囊胞壁が顕性になる(Bohneら(編)、(1997) Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites Vol. 88. Mol Biochem Parasitol; Bohneら, (1997) Mol Biochem Parasitol 88, 115-126)。この方法の下におけるプラディゾイト誘導を評価し、続いてドリコス・ビフロラスレクチンを使用して囊胞壁を検出する(Boothroydら, (1997) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 352, 1347-1354)。

10

20

20

【0156】

PKタキゾイト、囊胞を生成するT.ゴンディイ(*T.gondii*) Me49株から単離されたクローリンを誘導して(Kasperら, (1985) J Clin Invest 75, 1570-1577)、プラディゾイトにインビトロで分化させるために、高pH法が選択される(Soeteら, (1994) Exp Parasitol 78, 361-370)。HFFのコンフルエントの単層を、24-ウェルプレートの各ウェル中で、又は10×10⁶を直径8cmの組織培養ペトリ皿中で約2×10⁵タキゾイトで感染させて、標準的タキゾイト条件で4h、pH7.2で5%CO₂下に成長させて侵襲及び初期成長を可能にする。この後、培地を除去して誘導培地(RPMI/HEPES、pH8.1、5%ウシ胎児血清)で置き換え、培養液を37°のインキュベーター(環境のCO₂ 0.03%)中に置く。他の実験においては、本発明の式(1)の化合物(100nM)又はDMSO(対照として)を、同じ培地及び条件で加える。誘導培地は2日目ごとに取り替える。約2日までに、液胞が囊胞になった明確な兆候を示し(タキゾイト液胞の平坦になった口ゼットと比較して、一団に集まり詰め込まれた寄生生物を示す)、寄生生物の分裂速度が低下する。タキゾイト表面タンパク質SAG1(マウスのmAbの-p30T4IE5)又はプラディゾイト特異的タンパク質P34(マウスのmAbの-34T82C2)又はP21(マウスのmAbのT84G10)(Tomavoら, 1991 Infect Immun 59, 3750-3753)、並びにD. biflorusレクチン(Sigma, St Louis、ミズーリ州)に特異的な抗体が、プラディゾイト発生を制御するために使用される。

30

40

【0157】

プラディゾイト単離、プラディゾイト誘発の両モデルにおいて、培地を除去し、細胞を洗浄PBSで1回洗浄し、単層をすり落として27ゲージ注射針を5回、続いて30ゲージ注射針を1回通して、寄生生物を宿主細胞から放出する。次に、寄生生物を1800r.p.m.で10分間室温で遠心分離し、滅菌PBS中に再懸濁させて、改良ノイバウエル型血球計算盤で計数する。タキゾイト培養液は、標準的タキゾイト条件で成長する寄生生物から得て、HFFからの放出のために27ゲージ注射針が使用される以外は同様に処理することができる。両ステ

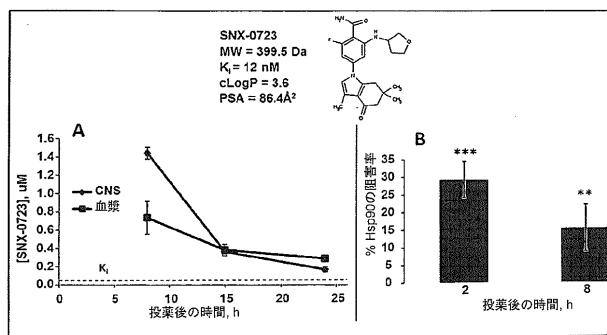
50

ージの寄生生物を、宿主細胞材料から、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 孔径サイズのフィルタ(Nucleopore Corporation、Pleasanton、カリフォルニア州)を通すことにより精製する。

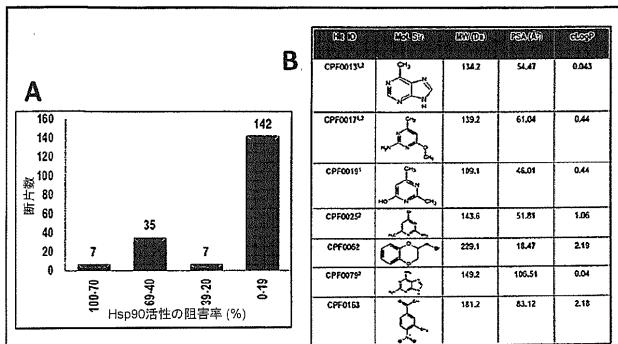
【0158】

この手法は、マラリア及び全身性トキソプラズマ症の原因となる寄生生物により惹起される感染を治療するために使用することができる。

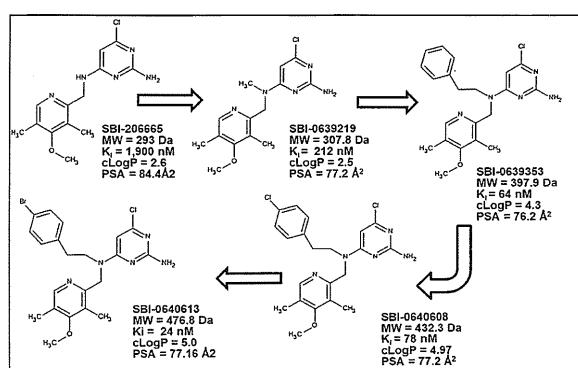
【図1】



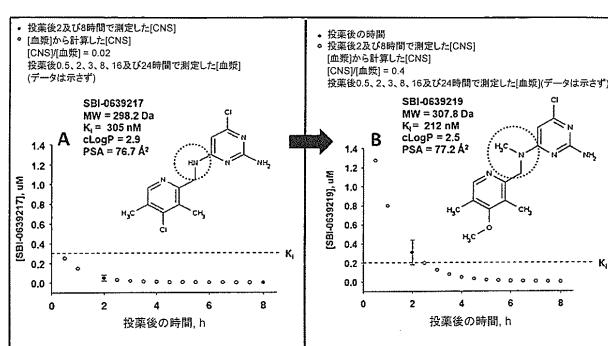
【図2】



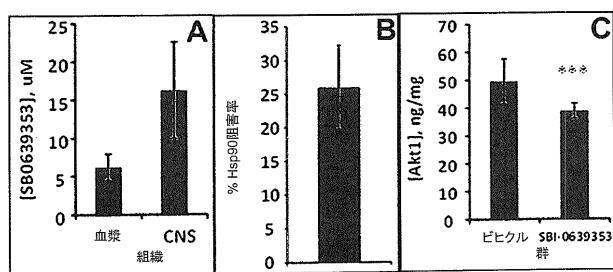
【図3】



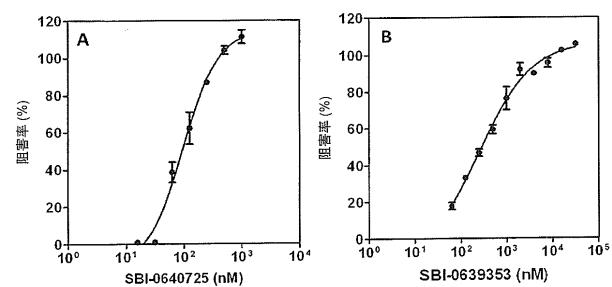
【図4】



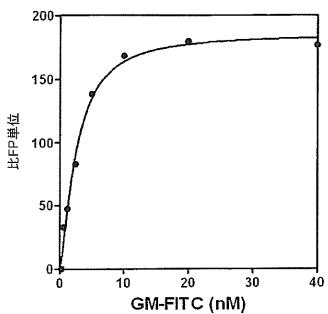
【図5】



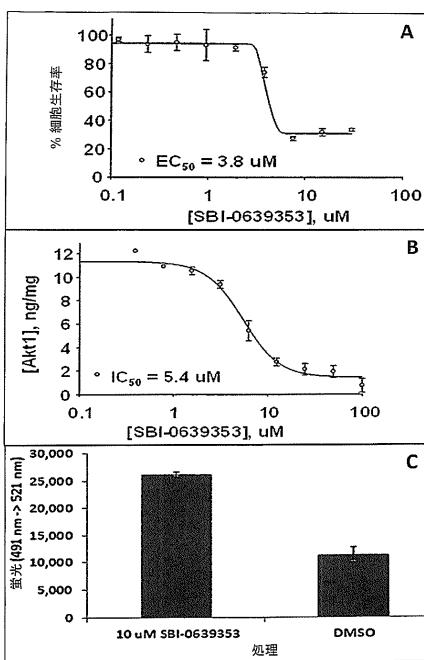
【図7】



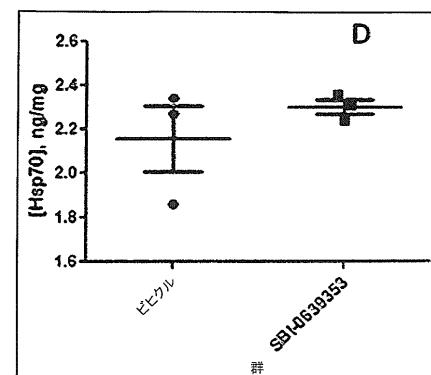
【図6】



【図8】



【図9】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/000133

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.: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22-29, 31, 33, 35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22-29, 31, 33, 35 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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.: 16-21, 28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2013/000133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C07D 239/48(2006.01)i, C07D 401/12(2006.01)i, A61K 31/505(2006.01)i, A61K 31/506(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 239/48; C07D 471/04; A61K 31/437; C07D 401/12; A61K 31/505; A61K 31/506; A61P 25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility modelsElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@snec, PAJ, USPTO, Google**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012-059172 A1 (MERCK PATENT GMBH, et al.) 10 May 2012 See page 4 line 3	1-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 , 30, 32, 34, 36
A	BERNARD R. NEUSTADT, et al., Potent and selective adenosine A2A receptor antagonists: 1,2,4-Triazolo[1,5-c]pyrimidines. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1 February 2009, 19(3), pp.967-971 See page 968, Scheme 1, Table 1	1-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 , 30, 32, 34, 36

 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 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
31 October 2013 (31.10.2013)

Date of mailing of the international search report

31 October 2013 (31.10.2013)Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City,
302-701, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-472-7140

Authorized officer

KIM, Bum Soo

Telephone No. +82-42-481-5412



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2013/000133

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012-059172 A1	10/05/2012	AR083751A1 AU 2011-325480 A1 CA 2816896 A1 CN103180320 A DE102010050558 A1 EP 2635574 A1 IL226095D0 US 2013-231519 A1	20/03/2013 02/05/2013 10/05/2012 26/06/2013 10/05/2012 11/09/2013 27/06/2013 05/09/2013

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	C 0 7 D 405/14	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/505	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
	A 6 1 P 13/12	
	A 6 1 P 11/00	
	A 6 1 P 17/02	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,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,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,H,U,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

- (74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
- (74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
- (74) 代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
- (74) 代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100180862

弁理士 花井 秀俊

(72)発明者 プラサド,スリッドハー,ジー.

アメリカ合衆国 92129 カリフォルニア州,サンディエゴ,ラグウェード ストリート 1
2236

(72)発明者 コスフォード,ニコラス

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州,ラホーヤ,エヌ.トリー・パインズ・ロード
10901

F ターム(参考) 4C050 AA01 BB04 BB05 CC08 EE03 EE04 FF01 GG04 HH01 HH04

4C063 AA01 AA03 BB09 CC29 CC78 CC81 DD06 DD12 DD29 EE01

4C084 AA19 NA14 ZA011 ZA021 ZA161 ZA331 ZA361 ZA591 ZA621 ZA751

ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211 ZB261

ZB271 ZB311 ZC031 ZC211 ZC411 ZC751

4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 CB05 GA02 GA07 GA08 GA12 MA01

MA02 MA04 MA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA33 ZA36 ZA59

ZA62 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15

ZB21 ZB26 ZB27 ZB31 ZC03 ZC21 ZC41 ZC75