

(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2015-509917

(P2015-509917A)

(43) 公表日 平成27年4月2日(2015.4.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
C07C 235/74 (2006.01)	C 07 C 235/74	C S P	4 B 02 4
A61K 31/196 (2006.01)	A 61 K 31/196	Z N A	4 C 20 6
A61P 9/10 (2006.01)	A 61 P 9/10	1 O 1	4 H 00 6
C07C 231/12 (2006.01)	A 61 P 9/10		
C12N 15/09 (2006.01)	C 07 C 231/12		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

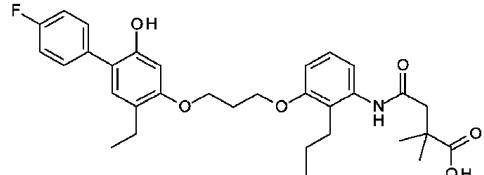
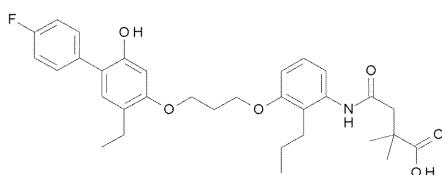
(21) 出願番号	特願2014-552215 (P2014-552215)	(71) 出願人	594197872 イーライ リリー アンド カンパニー
(86) (22) 出願日	平成25年1月4日 (2013.1.4)		アメリカ合衆国 インディアナ州 462 85 インディアナポリス リリー コー
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月9日 (2014.7.9)		ボレイト センター (番地なし)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/020195	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 瞳
(87) 國際公開番号	W02013/106238	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恒生
(87) 國際公開日	平成25年7月18日 (2013.7.18)	(74) 代理人	100138900 弁理士 新田 昌宏
(31) 優先権主張番号	61/584,975	(74) 代理人	100162684 弁理士 吳 英燦
(32) 優先日	平成24年1月10日 (2012.1.10)	(74) 代理人	100176474 弁理士 秋山 信彦
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/585,799		
(32) 優先日	平成24年1月12日 (2012.1.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ロイコトリエンB4アンタゴニスト化合物

(57) 【要約】

本発明は、式(I)の化合物：



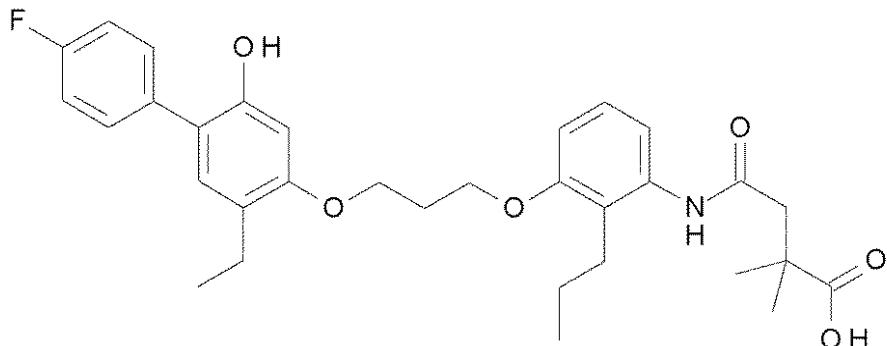
またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。また、本発明は、式(I)の化合物またはその薬学的に許容可能な塩および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。本発明はさらに、治療有効量の式(I)の化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩または薬学的に許容可能な担体および治療有効量の式(I)の化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物を投与することを含む、腹部大動脈瘤またはアテローム性動脈硬化症を治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(I)の化合物

【化1】



10

またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

ナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタノエートである、請求項1に記載の化合物。

20

【請求項 3】

請求項1または2に記載の化合物および薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 4】

治療有効量の請求項1に記載の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を患者に投与することを含む、それを必要とする患者において、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療する方法。

【請求項 5】

治療有効量の請求項2に記載の化合物を患者に投与することを含む、それを必要とする患者において、腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療する方法。

【請求項 6】

治療に使用するための請求項1に記載の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

30

【請求項 7】

治療に使用するための請求項2に記載の化合物。

【請求項 8】

腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するための請求項1に記載の化合物またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 9】

腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するための請求項2に記載の化合物。

【請求項 10】

腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するための請求項1に記載の化合物またはその薬学的に許容可能な塩の使用。

40

【請求項 11】

腹部大動脈瘤、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するための請求項2に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はロイコトリエンB₄アンタゴニスト化合物に関する。

【背景技術】

【0002】

50

ロイコトリエンB₄（LTB₄）は、酵素5-リポキシゲナーゼおよびロイコトリエンA₄ヒドロラーゼの下流の経路により生成されるエイコサノイド炎症性脂質メディエータである。LTB₄は、細胞動員、反応性酸素種の生成および遺伝子発現の誘導を導く複数の白血球サブセットを活性化する。LTB₄は、主にその高い親和性のGタンパク質共役受容体、BLT₁およびより少ない程度でその低い親和性のBLT₂受容体を介して伝達する。BLT₁受容体は、循環末梢白血球の特異的サブセットにおいて、同様に内皮細胞および平滑筋細胞を含む非白血球上で高度に発現される。LTB₄は、腹部大動脈瘤（AAA）およびアテローム性動脈硬化症を含むいくつかの炎症状態の血管病変に関与する。

【0003】

10

変性疾患、AAAは、大動脈壁の炎症の継続的進行、破壊的プロテアーゼの制御されていない局所産生、構造タンパク質の破壊、および中間平滑筋細胞の枯渇により特徴付けられる。早期または急性期は炎症細胞の動員により開始する。局所的反応性酸素、ロイコトリエン、ケモカインおよびマトリクス分解産物が、種々のプロテアーゼ系を活性化するために協働して作用する場合、損傷が生じる。腹部大動脈の細胞外マトリクスもまた、AAAとして知られている病態を導く過剰な分解により弱体化され得る。

【0004】

20

大動脈内膜の動脈硬化性plaquesの形成における脂質沈着の役割は十分に証明されている。アテローム発生における別の主要な要因は血管内膜病変に対する炎症細胞動員である。高脂質および炎症細胞内容物の両方を有するplaquesは破裂ならびに心筋梗塞および脳虚血を含む後発事象に対して脆弱である。

【0005】

30

現在、AAAは、55歳を超える男性における死因の第10番目である。AAAについて示されている公知の承認された医薬品治療は存在しない。また、高コレステロールレベルおよび高血圧を扱う医薬品治療の利用可能性にも関わらず、アテローム性動脈硬化症はさらなる医学的に必要な領域が存在する。さらに、特許文献1および特許文献2におけるものなどのロイコトリエンアンタゴニストの有用性にも関わらず、LTB₄アンタゴニストは炎症性の兆候について承認されていない。LTB₄アンタゴニスト化合物はまた、抗炎症薬としてペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）の発達を制限すると考えられるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）のリガンドであることが示されている。有意なPPAR結合を有さないLTB₄の拮抗作用は、AAA、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医学的必要性を扱うための選択を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第5,462,954号

【特許文献2】国際公開第98/42346号

【発明の概要】

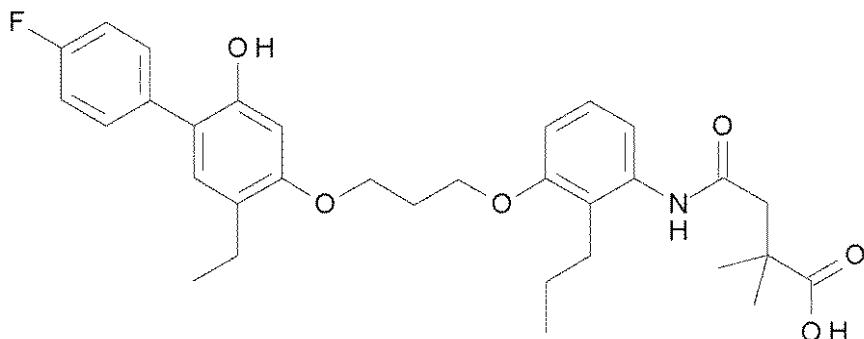
【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本発明は式（I）の化合物：

【化1】



10

またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。式(I)の化合物は、Symyx(登録商標)Drawバージョン3.2.NETにおけるIUPAC命名特性に従って4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタン酸と命名される。

【0008】

本発明の第2の態様は、ナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタノエートである式1の化合物のナトリウム塩を提供する。

20

【0009】

本発明の第3の態様は、式(I)の化合物またはその薬学的に許容可能な塩および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0010】

本発明の第4の態様は、ナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタノエートおよび薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

30

【0011】

本発明の第5の態様は、治療有効量の式(I)の化合物、もしくはその薬学的に許容可能な塩、または薬学的に許容可能な担体および治療有効量の式(I)の化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、それを必要とする患者において、AAA、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための方法を提供する。

【0012】

本発明の第6の態様は、治療有効量のナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタノエートである化合物または薬学的に許容可能な担体および治療有効量のナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタノエートである化合物を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、それを必要とする患者において、AAA、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療する方法を提供する。

40

【0013】

本発明の第7の態様は、治療に使用するための式(I)の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0014】

本発明の第8の態様は、治療に使用するためのナトリウム4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシ-フェノキシ]プロポキシ]-2-

50

- プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 9 の態様は、 A A A 、アテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するための式 (I) の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 10 の態様は、 A A A 、アテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するためのナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フエノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物を提供する。 10

【 0 0 1 7 】

本発明の第 11 の態様は、 A A A 、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するための、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容可能な塩の使用である。

【 0 0 1 8 】

本発明の第 12 の態様は、 A A A 、アテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するための、ナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フエノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物の使用である。 20

【 0 0 1 9 】

本発明の別の態様は、薬学的に許容可能な担体、および任意に 1 種以上の他の治療剤と組み合わせて、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらなる態様は、薬学的に許容可能な担体、および任意に 1 種以上の他の治療剤と組み合わせて、ナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フエノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物を含む医薬組成物を提供する。 30

【 0 0 2 1 】

本発明のさらに別の態様は、 A A A もしくはアテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するための、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる態様は、 A A A もしくはアテローム性動脈硬化症またはその両方の治療に使用するための、ナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フエノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物を提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の態様は、 A A A もしくはアテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するための、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容可能な塩の使用を提供する。 40

【 0 0 2 4 】

本発明のなおさらなる態様は、 A A A もしくはアテローム性動脈硬化症またはその両方を治療するための医薬を製造するためのナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フエノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエートである化合物の使用を提供する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 5 】

上記および本発明の明細書全体を通して使用する場合、以下の用語は、他に示されない限り、以下の意味を有する。

【0026】

本明細書で使用される「腹部大動脈瘤」（または「AAA」）という用語は、腹部大動脈の限局性の拡張または膨張を意味し、一般に、腹部大動脈の少なくとも一部のサイズが、そうでない場合にみなされる2cmの正常な状態のサイズを超える、哺乳動物における横隔膜の下の大動脈のその部分であると理解される。腹部大動脈は、限定されないが、外径、内腔径、内腔周囲および内腔領域を含む、任意の測定次元に関して測定され、比較され得る。測定および診断のための手段は、超音波、CTスキャンまたは他のイメージング技術の使用を介してもよい。例えば、AAAは、外側大動脈直径が3cmより大きくなる場合にヒトに存在する。しかしながら、外側大動脈直径が5cmより大きくなる場合、即時手術または血管内修復（ステントまたは移植）が、破裂および可能性のある致死を防ぐ治療標準である。しかしながら、このような治療が、いくらかの理由、例えば年齢に起因して利用できないかまたは選択肢にならない場合、この集団はまた、本発明を使用して治療され得る。

10

【0027】

本明細書で使用される「アテローム性動脈硬化症」という用語は、動脈内膜における脂質の多いplaqueまたは病変を意味する。

【0028】

本明細書に使用される「それを必要とする」という用語は、治療を必要とする病態、AAAまたはアテローム性動脈硬化症を有するまたは診断されていることを意味する。

20

【0029】

本明細書に使用される「患者」という用語は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタまたはヒトなどの哺乳動物を意味する。

【0030】

「その薬学的に許容可能な塩」という用語は本発明の化合物の塩を指す。それらを調製するための例および方法は当業者の知識の十分な範囲内である。例えば、Stahrla、「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use」、VCHA/Wiley-VCH、2002；およびS.M.Bergeら、「Pharmaceutical Salts」、Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, 1977年1月、1-19ページを参照のこと。特定の薬学的に許容可能な塩としては、ナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウムが挙げられる。本発明の好みの薬学的に許容可能な塩はナトリウムである。

30

【0031】

「治療有効量」という用語は、治療を達成するための、式(I)の化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩、または式(I)の化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩を含む組成物の量または用量を指す。式(I)の化合物またはその薬学的に許容可能な塩の予想される投薬量は60～1000mg/患者/日の範囲である。好みの投薬量は100～800mg/患者/日の範囲であると予想される。最も好みの投薬量は130～650mg/患者/日の範囲であると予想される。治療有効量は、当業者などの担当医により、例えば、体重、身長、年齢、全体的な健康、病態の重症度、投与様式、投与計画などの当業者に公知の多くの要因を考慮することにより容易に決定され得る。1日当たりに基づいた投薬量として表されるが、投与計画はより最適な治療有効性を患者に提供するために調節されてもよい。毎日の投薬に加えて、1日に2回の投薬(BID)または1日に3回の投薬が適切であってもよい。BIDの投与計画が現在好適であると意図される。

40

【0032】

本明細書に使用される「治療」という用語は、疾患状態の速度または進行を遅延させること意味する。それは疾患状態を停止させることを含んでもよい。この用語はさらに、疾患を停止させるだけでなく、既に発生している疾患状態を減少させることを含んでもよい

50

。例えば、AAAに関して、「治療」という用語は腹部大動脈瘤の膨張速度を遅延させることを意味し得る。それはまた、腹部大動脈瘤の膨張を中断させることを含んでもよい。さらに、それは既に発生している膨張を減少させることを含んでもよい。アテローム性動脈硬化症に関して、「治療」という用語はアテローム動脈硬化性plaquesの進行を遅延させることまたは中断させることを意味し得る。それはまた、既存のplaquesを減少させることを含んでもよい。

【0033】

本発明の化合物は、好ましくは、医薬組成物として製剤化され、様々な経路により投与される。好ましくは、このような組成物は経口投与用である。それらを調製する例および方法は当業者の知識の十分な範囲内である。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaroら、eds. 19th ed., Mack Publishing Co., 1995) を参照のこと。10

【0034】

本発明の化合物およびその薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野において公知の種々の手順ならびに以下のスキーム、調製例および実施例に記載されている手順により調製され得る。しかしながら、以下の説明は本発明の範囲を限定するものと決して意図されない。例えば、記載されている経路の各々についての特定の合成工程は、本発明の化合物および薬学的に許容可能な塩を調製するために、異なる方法で組み合わされてもよいか、または異なるスキームからの工程と組み合われてもよい。スキーム2は本発明の化合物を合成するための代替プロセスを例示する。20

【0035】

以下の調製例および実施例は本発明をさらに例示し、任意の新規の中間化合物を含む、式(I)の化合物の典型的な合成を表す。試薬および出発物質は、当業者にとって容易に入手可能であるか、または公知の構造的に類似した化合物の合成と同様の技術である、有機および複素環化学の標準的な技術、ならびに任意の新規の手順を含む、以下の実施例に記載されている手順から選択される手順により作製され得る。

【0036】

公知の手順および方法の例は、Comprehensive Organic Transformations、VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1 - 10、1974 - 2002、Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure、5th Edition、Michael B. Smith and Jerry March、Wiley Interscience、2001; Advanced Organic Chemistry、4th Edition、Part B、Reactions and Synthesis、Francis A. Carey and Richard J. Sundberg、Kluwer Academic/Plenum Publishers、2000およびそれらに引用されている参考文献などの一般的な参考文献に記載されているものを含む。30

【0037】

以下の調製例および実施例の命名は一般に、Symyx (登録商標) Drawバージョン3.2.NETにおけるIUPAC命名特性を使用して行われる。異なる命名法を使用する代替の命名が、調製例および式(I)の化合物を明確に識別するために使用されてもよい。

【0038】

本明細書で使用する場合、以下の用語は示した意味を有する:「Bn」はベンジルを指し;「DBU」は1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを指し;「DMF」はジメチルホルムアミドを指し;「DMSO」はジメチルスルホキシドを指し;「EtOAc」は酢酸エチルを指し;「EtOH」はエタノールを指し;「MeOH」は40

10

20

30

40

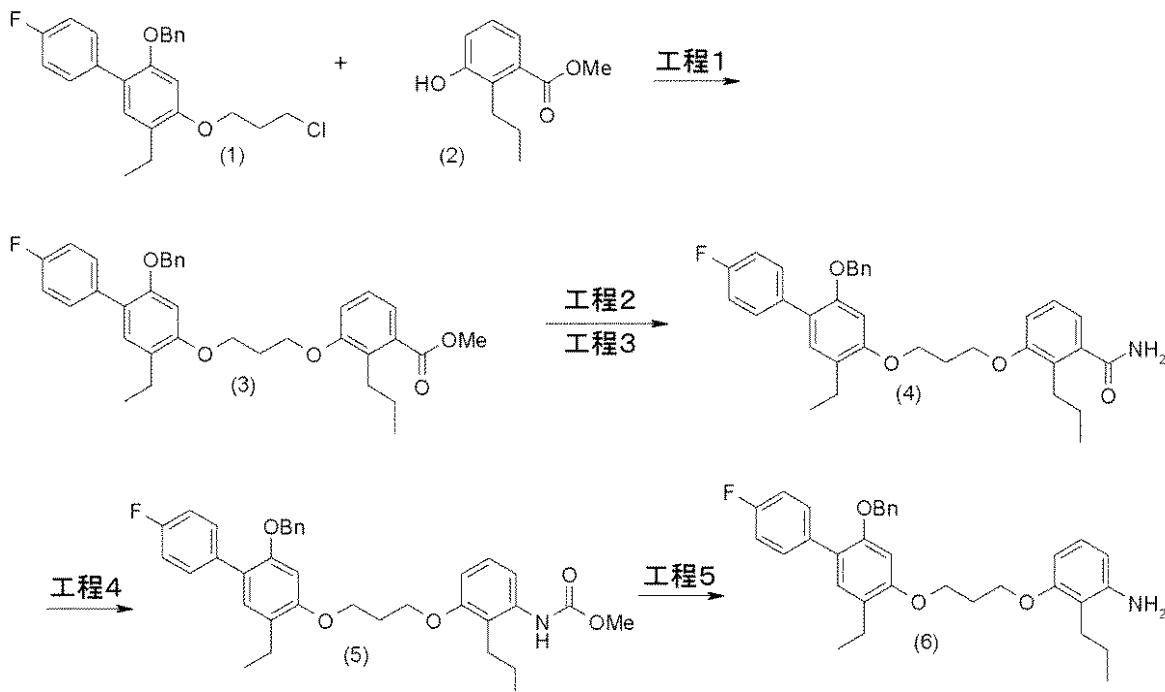
50

メタノールを指し；「NBS」はN - プロモスクシンイミドを指し；「THF」はテトラヒドロフランを指す。

【0039】

【化2】

スキーム1



スキーム1において、中間体2 - プロピルアニリン(6)の形成が示される。

【0040】

工程1において、メチル3 - ヒドロキシ - 2 - プロピル - ベンゾエート(2)は、1 - ベンジルオキシ - 5 - (3 - クロロプロポポキシ) - 4 - エチル - 2 - (4 - フルオロフェニル)ベンゼン(1)(Org. Process Res. Dev. (2009)、13: 268 - 275に従って調製した)でアルキル化されて、メチルプロポキシベンゾエート(3)が得られる。当業者は、このようなアルキル化をもたらす種々の反応条件が存在することを認識するであろう。例えば、反応は、約50 ~ 90にて2 ~ 4日間、塩基として炭酸カリウムと共にN,N -ジメチルピリジン - 4 - アミンの存在下で、DMSOなどの不活性溶媒中で実施されてもよい。あるいは、反応は、炭酸カリウムまたは好ましくは炭酸セシウムなどの無機塩基と共にヨウ化カリウムの存在下で、DMF中で実施されてもよい。反応は、8 ~ 24時間、50 ~ 110の温度で実施される。使用され得る他の塩基としては、例えば、水素化ナトリウムが挙げられる。

【0041】

工程2において、90 ~ 140の温度にて、N - メチルピロリドン中のKOHを使用して安息香酸メチル(3)が安息香酸に加水分解される(示さず)。この後、工程3において、塩化チオニルで処理して、ハロゲン化アシルを生成し、水酸化アンモニウムと反応させてベンズアミド(4)を得る。

【0042】

工程4において、ベンズアミド(4)はホフマン転移を受けてイソシアネートを生じ、溶媒としてMeOHの存在下でカルバメート(5)が得られる。反応は、DBUなどの塩基およびNBSなどの臭素化剤の存在下で行われる。使用される溶媒はMeOHであり、反応は、12 ~ 30時間の間、-10 ~ 10の温度にて進行する。

【0043】

工程5において、カルバメート(5)は、1 ~ 8時間、90 ~ 140の温度にて、N

10

20

30

40

50

- メチルピロリドンなどの不活性溶媒中の固体水酸化カリウムを使用して 2 - プロピルアニリン (6) に加水分解される。

【 0 0 4 4 】

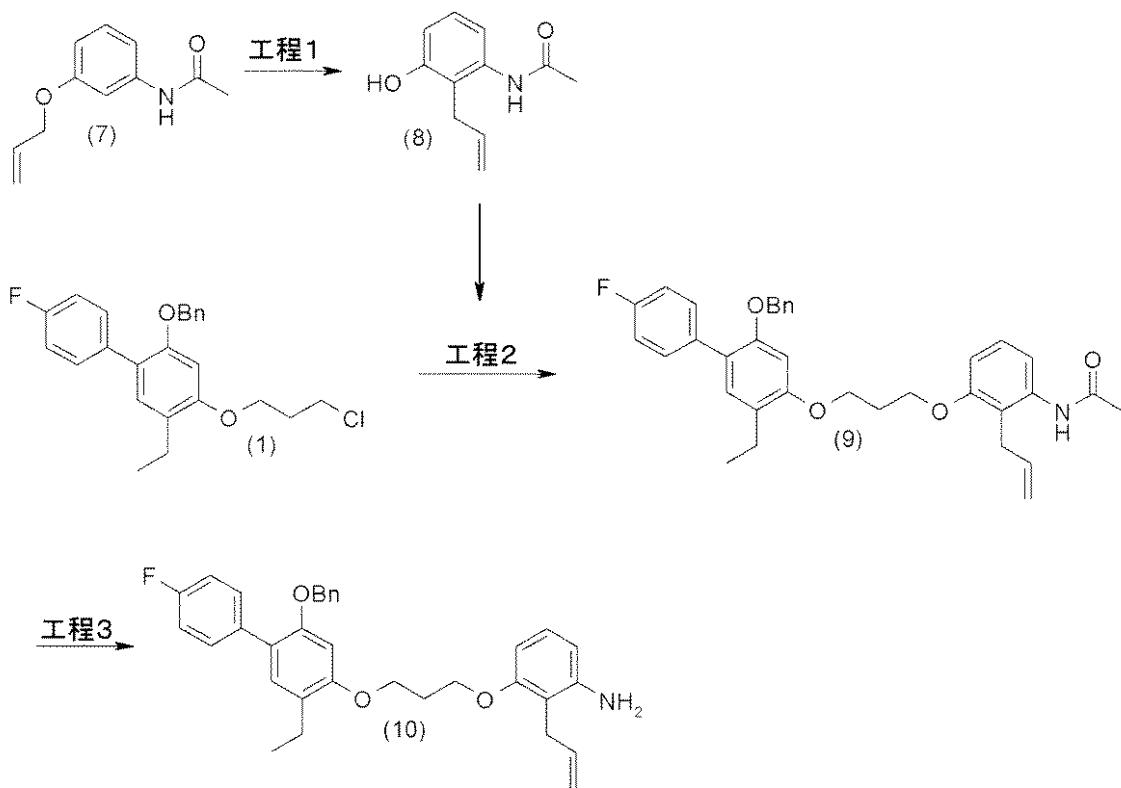
メチル 3 - ヒドロキシ - 2 - プロピル - ベンゾエート (2) は 2 , 3 - ジメトキシ安息香酸から調製される。安息香酸はハロゲン化アシルにより *t e r t* - ブチル 2 , 3 - ジメトキシベンゾエートに変換される。グリニヤール試薬、塩化プロピルマグネシウムでの処理により、オルトメトキシ基の置換がもたらされて、*t e r t* - ブチル 3 - メトキシ - 2 - プロピル - ベンゾエートが得られる。BBr₃による脱保護により、3 - ヒドロキシ - 2 - プロピル - 安息香酸が得られ、次いでそれをエステル化してメチル 3 - ヒドロキシ - 2 - プロピルベンゾエート (6) が得られる。3 - ベンジルオキシベンズアルデヒドで開始する代替の合成が文献において利用可能である (Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 595 - 604) 。

10

【 0 0 4 5 】

【 化 3 】

スキーム2



20

30

スキーム 2 において、中間体 2 - アリルアニリン (10) の形成が示されている。

【 0 0 4 6 】

工程 1 において、N - 3 (- アリルオキシフェニル) アセトアミド (7) はクライゼン転移を受けて N - (2 - アリル - 3 - ヒドロキシ - フェニル) アセトアミド (8) が得られる。反応は、12 ~ 24 時間、溶媒の還流温度にてジメチルアニリンなどの高沸点の不活性溶媒中で実施される。

40

【 0 0 4 7 】

工程 2 において、スキーム 1、工程 1 について以前に記載した条件を使用して、N - (2 - アリル - 3 - ヒドロキシ - フェニル) アセトアミド (8) はベンジルオキシ - 5 - (3 - クロロプロポキシ) - 4 - エチル - 2 - (4 - フルオロフェニル) ベンゼン (1) でアルキル化されてフェノキシアセトアミド (9) が得られる。

【 0 0 4 8 】

50

工程 3において、フェノキシアセトアミド(9)は加水分解されて2-アリルアニリン(10)が得られる。反応は、約1~12時間、50の温度から溶媒の還流温度にて、6N HCl / エタノールの溶媒混合物中で進行する。

【0049】

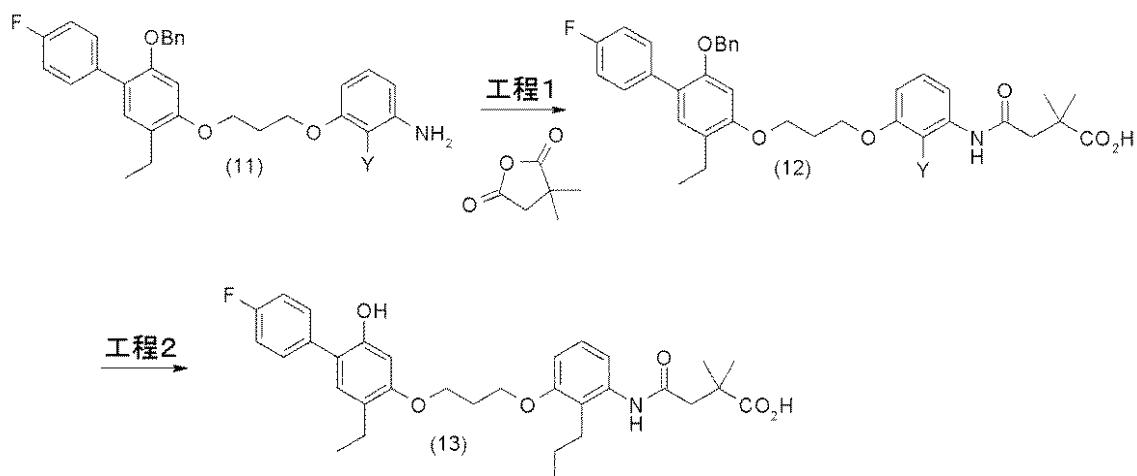
N-3(-アリルオキシフェニル)アセトアミド(7)は、3-ヨードプロペンを用いたアセトアミドフェノールのアルキル化により調製される。

【0050】

【化4】

スキーム3

10



20

スキーム3において、本発明の化合物(13)の合成が示される。

【0051】

工程1において、式(11)(Y = アリルまたはプロピル)のアニリンは3,3-ジメチルテトラヒドロフラン-2,5-ジオンでアシル化されてアミド(12)が得られる。反応はジクロロメタンまたはTHFなどの不活性溶媒中で実施される。N-メチルモルホリンまたはジイソプロピルエチルアミンなどの有機塩基が加えられてもよい。反応は、6~72時間、10~40の温度にて進行する。

30

【0052】

工程2において、化合物(12)のベンジル保護基は水素化を使用して除去されて本発明の化合物(13)が得られる。反応は、THF、EtOH / THF、EtOH、MeOHまたはEtOAc / MeOHなどの溶媒または溶媒の混合物中で5または10%パラジウム炭素を使用して水素雰囲気下で進行する。Y = アルキルである場合、アリル基は反応条件下でプロピル基に還元される。所望の場合、生成物はNaOH水溶液(1eq)を使用し、真空下で濃縮してカルボン酸ナトリウム塩に変換され得る。

40

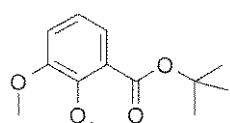
【実施例】

【0053】

調製例1

tert-ブチル2,3-ジメトキシベンゾエート

【化5】



塩化チオニル(67.6mL、928mmol)を、40に維持したトルエン(528mL)中の2,3-ジメトキシ安息香酸(132g、714mmol)およびDMF(50

50

1.32 mL) の溶液に滴下して加える。添加が完了した後、溶液を 40 にて 1 時間攪拌する。真空中で混合物を濃縮し、残渣をジクロロメタン (528 mL) 中に溶解する。混合物を還流まで加温し、tert - ブチルアルコール (203.4 mL) を加える。ピリジン (86.6 mL) を 5 分にわたって滴下して加え、続いて N,N - ジメチルピリジン - 4 - アミン (4.36 g, 35.7 mmol) を添加し、室温まで冷却しながら混合物を 1 時間攪拌する。混合物を水 (200 mL) で希釈し、混合物 (pH = 2) を 2 N の塩酸で酸性にする。相を分離し、有機相を 0.5 N の塩酸 (2 × 30 mL) で洗浄する。有機相を 15 % の炭酸カリウム、水およびブラインで洗浄する。有機相を真空中で濃縮して白色固体として標題化合物 (141.2 g, 83 %) を得る。ES/MS m/z 165 [M - (C₄H₉O)]⁺。

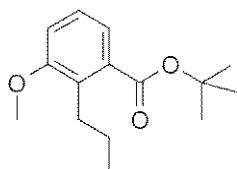
10

【0054】

調製例 2

tert - ブチル 3 - メトキシ - 2 - プロピル - ベンゾエート

【化6】



THF (855 mL) 中の tert - ブチル 2,3 - ジメトキシベンゾエート (171 g, 718 mmol) の冷却した溶液 (-34) に、エーテル (448.5 mL, 897 mmol) 中の 2 M の塩化プロピルマグネシウムを、-10 以下の内部温度を維持するのに十分な速度で滴下して加える。-12 付近に温度を維持しながら混合物を 3.5 時間攪拌する。-10 以下に温度を維持しながら酢酸 (51.4 mL) を混合物に滴下して加え、次いで水 (340 mL) で希釈する。相を分離し、メチル - tert - ブチルエーテル (3 × 100 mL) で水相を抽出する。合わせた有機抽出物をブラインで洗浄し、真空中で有機相を濃縮して、微量の THF およびメチル - tert - ブチルエーテルを含有する無色の油として標題化合物 (190 g, 定量的) を得る。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 7.24 - 7.14 (m, 2 H), 6.93 (dd, J = 1.4, 8.0 Hz, 1 H), 3.82 (s, 3 H), 2.84 - 2.79 (m, 2 H), 1.59 (m, 11 H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3 H)。

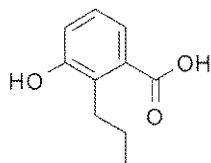
20

【0055】

調製例 3

3 - ヒドロキシ - 2 - プロピル - 安息香酸

【化7】



30

三臭化ホウ素 (305.6 mL, 305.6 mmol) を、0 以下の温度に維持しながら、-25 に冷却されたトルエン (428 mL) 中の tert - ブチル 3 - メトキシ - 2 - プロピル - ベンゾエート (61.2 g, 244 mmol) の溶液に滴下して加える。-5 にて 3 時間攪拌する。水 (100 mL) を滴下して加え、温度を 7 まで上げ、30 分攪拌する。混合物を真空中で濃縮し、次いで水 (200 mL) 中に半固体を懸濁する。1 時間攪拌し、ガラスフリットで懸濁液を濾過する。回収した固体を水で洗浄し、固体を乾燥させて標題化合物 (43.1 g, 98 %) を得る。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1 H); 7.16 (t, J = 8.0 Hz, 1 H); 6.99 (d, J = 7.7 Hz, 1 H); 5.0 (bs, 2 H); 2.98 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 1.64 (m, 2 H); 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 1 H)。

50

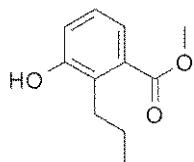
, 3 H)。

【0056】

調製例4

メチル3-ヒドロキシ-2-プロピル-ベンゾエート

【化8】



10

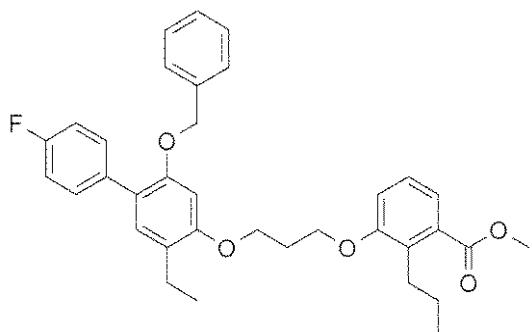
MeOH (598 mL) 中の 3 - ヒドロキシ - 2 - プロピル - 安息香酸 (59.79 g、332 mmol) の溶液を -10 で冷却し、35 分にわたってシリンドリポンプを使用して塩化チオニル (36.26 mL、497.1 mmol) を加える。35 時間にわたって攪拌しながら混合物を室温まで加温する。混合物を真空中で濃縮し、メチル - tert - ブチルエーテル (360 mL) で残渣を希釈する。得られた混合物を真空中で乾燥するまで濃縮して黄褐色の固体として標題化合物 (64.4 g、87%) を得る。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H); 7.10 (t, J = 8.0 Hz, 1H); 6.93 (dd, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H); 5.11 (bs, 1H); 3.89 (s, 3H); 2.98 (m, 2H), 1.61 (m, 2H); 1.00 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

【0057】

調製例5

メチル3-[3-[5-[ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-ベンゾエート

【化9】



30

ジメチルスルホキシド (240 mL) 中のメチル3-ヒドロキシ-2-プロピル-ベンゾエート (40.0 g、206 mmol) および 1 - ベンジルオキシ - 5 - (3 - クロロプロポポキシ) - 4 - エチル - 2 - (4 - フルオロフェニル) ベンゼン (Org. Proc. Res. Dev. (2009), 13: 268 - 275 に従って調製した) (82.15 g、206 mmol) の溶液に、炭酸カリウム (30.2 g、219 mmol) および N,N - デミチルピリジン - 4 - アミン (2.0 g、16 mmol) を連続して加える。60 にて 87 時間、懸濁液を攪拌し、次いでそれを冷却する。混合物を水 (600 mL) およびメチル - tert - ブチルエーテル (100 mL) で希釈し、15 分間攪拌する。相を分離し、水性部分をメチル - tert - ブチルエーテル (3 × 30 mL) で洗浄する。合わせた有機抽出物を水およびブラインで洗浄する。有機部分を真空中で濃縮して、褐色油として標題化合物 (123.0 g、定量的) を得る。ES/MS m/z 557 (M+1)。

【0058】

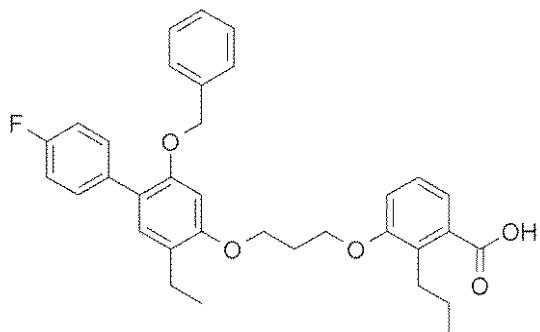
調製例6

40

50

3 - [3 - [5 - ベンジルオキシ - 2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - 安息香酸

【化 1 0】



10

N - メチルピロリドン (476 mL) 中のメチル 3 - [3 - [5 - ベンジルオキシ - 2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - ベンゾエート (119 g, 181 mmol) の溶液に、水酸化カリウム (21.2 g, 378 mmol) を加え、120 にて 25 分攪拌する。混合物を冷却し、次いで水 (240 mL) およびメチル - t e r t - ブチルエーテル (100 mL) で希釈する。12 N の塩酸で pH = 2.5 に調整する。相を分離し、水相をメチル - t e r t - ブチルエーテル (3 × 35 mL) で洗浄する。合わせた有機抽出物を水で 2 回およびブライインで 1 回洗浄する。有機抽出物を真空中で濃縮する。得られた残渣をアセトニトリルから再結晶化し、濾過し、乾燥させて白色固体 (78 g, 67 %) として得る。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.60 - 7.47 (m, 3H) ; 7.37 - 7.20 (m, 6H) ; 7.12 - 7.02 (m, 4H) ; 6.60 (s, 1H) ; 5.00 (s, 2H) ; 4.20 (m, 4H) ; 3.00 (m, 2H) ; 2.61 (q, J = 7.7 Hz, 2H) ; 2.33 (m, 2H) ; 1.59 (m, 2H) ; 1.18 (t, J = 7.7 Hz, 3H) ; 0.98 (t, J = 7.7 Hz, 3H)。

20

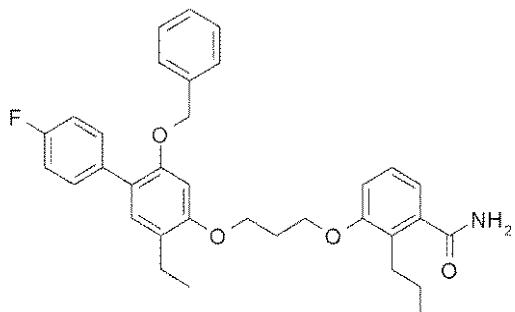
【0059】

調製例 7

3 - [3 - [5 - ベンジルオキシ - 2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - ベンズアミド

30

【化 1 1】



40

塩化チオニル (8.22 mL, 113 mmol) を、THF (250 mL) 中の 3 - [3 - [5 - ベンジルオキシ - 2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - 安息香酸 (50.0 g, 92 mmol) および DMF (2.5 mL, 32 mmol) の溶液に滴下して加える。1 時間攪拌し、次いで反応物を水酸化アンモニウム溶液 (102.5 mL, 1.52 mol) に 0 ~ 5 にて加える。MeOH (250 mL) および水 (500 mL) を滴下方式で加える。真空中でほぼ半分の体積に濃縮し、得られた懸濁液を 0 ~ 5 にて 30 分攪拌する。懸濁物をガラスフリットで濾過し、得られた固体を真空下で乾燥させて灰色がかった固体として標題化合物 (50.3 g, 定量的) を得る。ES / MS m/z 542 (M + 1)。

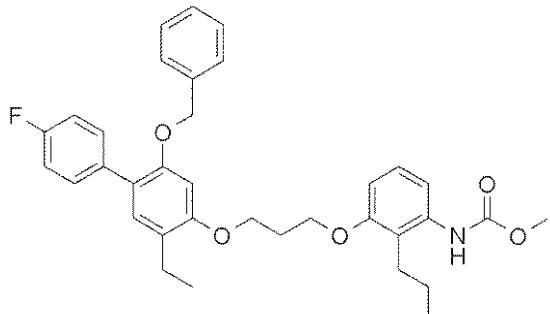
50

【0060】

調製例8

メチルN-[3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]カルバメート

【化12】



10

1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(51.6mL、345mmol)およびN-ブロモスクシンイミド(34.6g、194mmol)を、MeOH(620mL)中の3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-ベンズアミド(62.0g、114mmol)の機械的に攪拌した懸濁液に連続して加え、この時間の間、1分にわたって温度が-4.1から-3.2に上昇する。反応物を-5~-10にて22時間攪拌する。攪拌しながら亜硫酸水素ナトリウム溶液(25mL水中に25.1g、209mmol)を加える。水(620mL)を滴下して加え、10にて30分攪拌する。懸濁液をガラスフリットで濾過し、回収した固体を水で洗浄し、真空下で乾燥させて、灰色がかかった粉末として標題化合物(65.8g、定量的)を得る。ES/MS m/z 572(M+1)。

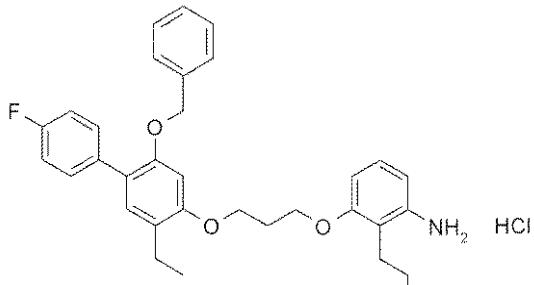
20

【0061】

調製例9

3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-アニリン塩酸塩

【化13】



30

N-メチルピロリドン(203mL)中のメチルN-[3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]カルバメート(65.8g、115mmol)の溶液に水酸化カリウム(12.97g、231mmol)を加え、110~120にて2時間攪拌する。混合物を冷却し、次いでそれを水(450mL)およびメチル-tert-ブチルエーテル(180mL)の混合物中に注ぐ。混合物を20分攪拌し、相を分離する。水相を追加のメチル-tert-ブチルエーテル(3×50mL)で抽出する。合わせた有機抽出物をガラスフリットで濾過し、濾液を15%ブライン溶液で洗浄する。濾液を真空中で濃縮し、残渣を、酢酸エチル(300mL)およびメチル-tert-ブチルエーテル(300mL)の混合物中に溶解する。得られた懸濁液を氷/塩浴で攪拌し、冷却しながら、4Nの塩酸(43.1mL)をこの溶液に滴下して加える。ガラスフリットでの濾過により固体を回収し、冷メチル-tert-ブチルエーテルで洗浄し、真空下で乾燥させて灰色がかっ

40

50

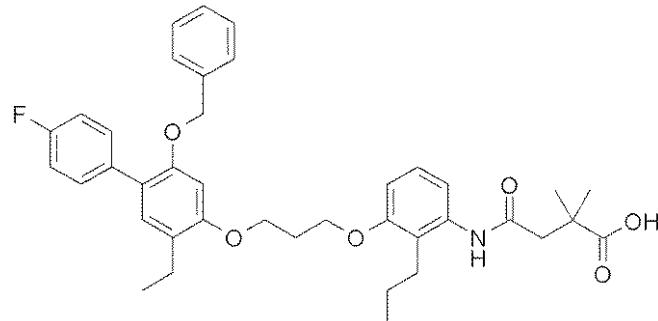
た固体として標題化合物（57.8 g、91%）を得る。ES/MS m/z 514 (M+1、遊離塩基)。

【0062】

調製例10

4-[3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタン酸

【化14】



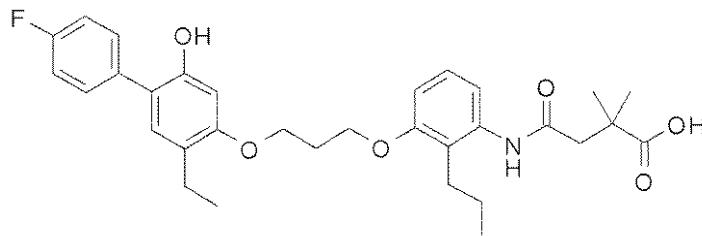
ジイソプロピルエチルアミン（57 mL、327 mmol）を、THF（450 mL）中の3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-アニリン塩酸塩（90 g、175 mmol）の懸濁液に加える。この混合物にジヒドロ-3,3-ジメチル-2,5-フランジオン（32.1 g、251 mmol）を加え、5%の開始物質が残存していることをLCMSが示すまで35にて攪拌する。混合物を真空中で濃縮し、メチルtert-ブチルエーテル（100 mL）および水（75 mL）を加える。リン酸でpH=2~3に調整し、相を分離する。水相を追加のメチルtert-ブチルエーテル（2×50 mL）で洗浄する。合わせた有機抽出物をブライインで洗浄し、真空中で濃縮する。粗残渣をメチルtert-ブチルエーテル（180 mL）中に溶解し、ヘキサン（450 mL）を加えて懸濁液を得、30分間攪拌する。懸濁液を濾過により回収し、乾燥させて白色固体として標題化合物（92.5 g、88%）を得る。ES/MS m/z 642 (M+1)。

【0063】

実施例1

4-[3-[3-[2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシフェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタン酸

【化15】



10%のパラジウム炭、50%の湿潤物（重量に基づき水を有する）（13 g）およびTHF（1560 mL）中の4-[3-[3-[5-ベンジルオキシ-2-エチル-4-(4-フルオロフェニル)フェノキシ]プロポキシ]-2-プロピル-フェニル]アミノ]-2,2-ジメチル-4-オキソ-ブタン酸（260 g、405 mmol）のスラリーを900 psiの水素圧力で開始して水素化する。さらなる水素を加えずに、20時間水素化を継続する。200 psiの水素圧力を維持しながらさらに2日水素化する。混合物を珪藻土で濾過し、濾液を真空中で濃縮して固体として標題化合物（251 g、定量的

10

20

30

40

50

)を得る。過剰な重量は THF の存在に起因する。ES / MS m / z 552 (M + 1)。

【0064】

実施例 2

ナトリウム 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタノエート

1 N の水酸化ナトリウム (404 mL) を、THF (1115 mL) 中の 4 - [[3 - [3 - [2 - エチル - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシ - フェノキシ] プロポキシ] - 2 - プロピル - フェニル] アミノ] - 2 , 2 - ジメチル - 4 - オキソ - ブタン酸 (223 g, 404 mmol) の溶液に滴下して加え、周囲温度にて 15 分間攪拌する。真空中で体積を減少させ、水 (1300 mL) を加える。溶液を加熱することを回避するために膜ポンプを使用してさらなる溶媒を除去して 1250 mL の最終体積を得る。バッヂ中で残存溶液を凍結乾燥させて、灰色がかった固体として標題化合物 (230 g, 99 %) を得る。ES / MS m / z 552 (M + 1、遊離塩基)。

【0065】

動物研究はますます、アテローム性動脈硬化症およびAAAを含む、慢性炎症性疾患におけるロイコトリエン合成経路に関与している。Po eckeら、Cardiovacular Research (2010)、86 : 243 - 253。アテローム性動脈硬化症は、アテローム動脈硬化性plaquesまたは病変が動脈内膜中に形成し、増大する病態である。それは、マクロファージ白血球の蓄積により主に引き起こされ、機能的高密度リポタンパク質によりマクロファージから脂肪およびコレステロールを適切に除去せずに低密度リポタンパク質により促進される動脈の壁の慢性炎症反応である。動脈は炎症を起こす。LTB₄は、内皮を横切る白血球の付着および走化性を促進するその能力のために、アテローム性動脈硬化症においてアテローム生成促進的役割を果たす。B a c k 、 C u r r e n t Atherosclerosis Reports (2008)、10 : 244 - 251; Aielloら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2002) 22 : 443 - 449; Rosenfeld、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2002) 22 : 361 - 363。コレステロールplaquesは、筋細胞を増大させ、罹患した領域上に硬い覆いを形成する。Spanbroekら、PNAS、(2003)、100 (3) : 1238 - 1243。

【0066】

無症状性の傾向である安定なアテローム性動脈硬化症plaquesは細胞外マトリクスおよび平滑筋細胞において豊富にある。安定なplaquesはマクロファージおよび泡沫細胞において豊富にあり、動脈内腔（線維性被膜）から病変を分離する細胞外マトリクスは典型的に弱く、破裂する傾向がある。線維性被膜の破裂は、循環に対してコラーゲンなどの血栓形成物質を曝露し、最終的に内腔において血栓形成を誘導する。形成時に、管腔内血栓は動脈を完全に塞ぐ場合があるか、または分離し、循環内に移り、最終的に血栓塞栓症を引き起こす小さな下流の動脈枝を塞ぐ場合がある (Ross、N. Engl. J. Med. (1999)、340 (2) : 115 - 126)。

【0067】

変性疾患、AAAは、1) 大動脈壁の炎症；2) 破壊性プロテアーゼの抑制されていない局所産生；3) 構造タンパク質の破壊；および4) 中央平滑筋細胞の枯渇の絶え間なく続く進行により特徴付けられる。初期または急性期は中膜および外膜における炎症細胞の動員で開始する。局所反応性酸素、ロイコトリエン、ケモカインおよびマトリクス分解産物が、種々のプロテアーゼ系を活性化するように協働して作用する場合、壁内損傷が生じる。大動脈壁におけるこれらの病理変化は、部分的弱体化、進行性膨張および自然断裂を導く (Nandaら、Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (2009)、4 : 150 - 159)。

【0068】

10

20

30

40

50

慢性貫壁性炎症は、確立されたAAAの主要な組織学的特徴のうちの1つである。この炎症反応は、単核食細胞、リンパ球および血漿細胞からなる。AAAにおける慢性炎症反応の性質はアテローム性動脈硬化症において観察されたものと異なるように見える。AAAにおける炎症反応は、通常、中膜外層および外膜に主に集中する高密度の浸潤物を有して、貫壁性で分布している。アテローム性動脈硬化症において、浸潤性炎症細胞は主に病変した内膜に制限され、それらはAAAにおけるように集中してまたは広範囲に分布しないように見える。一般的な慢性炎症成分にもかかわらず、外側大動脈壁における構造タンパク質の破壊は、アテローム性動脈硬化症において見られず、動脈瘤変性に関与しているようである(Thompsonら、*Curr. Prob. Surg.* (2002)、39(2):110-230、115、137および142において)。

10

【0069】

それとは反対に公開された研究(例えば、Caoら、*Prostaglandins & other Lipid Mediators*、(2007)84:34-42を参照のこと)が存在するが、多数の公開された研究は、AAA病因における5-リポキシゲナーゼ経路、およびLTB₄の役割を支持すると考えられる。好中球由来の上昇したレベルのLTB₄はAAAの病因の重要な役割を果たす(Hougaardら、*FASEBJ.* J. (2009)、23:1376-1383; Ahluwaliaら、*J. Immunol.* (2007)、179:691-697; Kristofferssonら、*Atherosclerosis*、(2010)、210:107-113)。

20

【0070】

以下のインビトロおよびインビボ研究は、LTB₄を拮抗することによりアテローム性動脈硬化症およびAAAを治療する際の式(I)の化合物またはそのナトリウム塩の活性および効果を実証している。これらのアッセイは一般にヒト臨床治療活性の指標として当業者により認識される。LTB₄シグナル伝達拮抗活性および効果を証明するアッセイは、実質的に以下のようにまたは類似のデータを与える類似のアッセイにより実施され得る。

20

【0071】

インビトロアッセイ手順：

LTB₄によるBLT1結合および活性化は、細胞内カルシウム放出を導く細胞内イノシトール1,4,5-トリホスファーーゼ(triphosphatase)レベルを増加させ、カルシウム流入は、特異的Gタンパク質共役シグナル変換経路サブユニットと結合することにより、およびこれを介してシグナル伝達することにより媒介される(Gaudreauら、*Biochem. J.* (1998)、335(Pt 1):15-18)。以下は、BLT1近位シグナル伝達カスケード事象の実施例2の拮抗作用を実証するために使用される2つのインビトロアッセイ：BLT1およびBLT2安定細胞株から生成された膜調製物を使用した[³H]-LTB₄リガンド置換アッセイならびに全細胞カルシウム動員アッセイである。

30

【0072】

LTB₄リガンド置換アッセイ

[³H]-LTB₄ならびに公知のBLT1およびBLT2アンタゴニストを、本発明の化合物のためのLTB₄置換曲線およびIC₅₀値を生成するために使用する。本発明の化合物による受容体阻害は、有効性パーセントを得るためにBLT1阻害剤およびBLT2阻害剤参照分子に対して決定される。

40

【0073】

hBLT1試験化合物調製：hBLT1アッセイに関して、10mMのストック溶液を作製するためにDMSO中で試験化合物を調製する。ストック溶液は、緩衝液A(50mMの4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸(HEPES)pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl、10%のグリセロール(v/v)、1%のウシ血清アルブミン(BSA)(w/v))中で最初に1:10に希釈し、続いて緩衝液B(50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMの

50

N a C l 、 1 0 % のグリセロール (v / v) 、 1 % の B S A (w / v) 、 1 0 % の D M S O (v / v) 中で 3 倍連続希釈して、 1 0 点希釈曲線を作成する。インビトロアッセイを実施するために 3 0 μ M ~ 1 . 5 2 n M の範囲の最終化合物濃度を 9 6 ウエル丸底プレート中に播種する。

【 0 0 7 4 】

h B L T 2 試験化合物調製 : h B L T 2 アッセイに関して、 1 0 mM のストック溶液を作製するために D M S O 中で試験化合物を調製する。ストック溶液は、 緩衝液 A (5 0 m M の H E P E S p H 7 . 4 、 1 0 mM の M g C l ₂ 、 1 0 mM の N a C l 、 1 0 % のグリセロール (v / v) 、 1 % の B S A (w / v)) 中で最初に 1 : 1 0 に希釈し、 続いて緩衝液 B (5 0 mM の H E P E S p H 7 . 4 、 1 0 mM の M g C l ₂ 、 1 0 mM の N a C l 、 1 0 % のグリセロール (v / v) 、 1 % の B S A (w / v) 、 1 0 % の D M S O (v / v)) 中で 3 倍連続希釈して、 1 0 点希釈曲線を作成する。インビトロアッセイを実施するために 3 0 0 μ M ~ 1 5 . 2 n M の範囲の最終化合物濃度を 9 6 ウエル丸底プレート中に播種する。

10

【 0 0 7 5 】

B L T 1 / C H O - K 1 および B L T 2 / C H O - K 1 安定細胞株を生成する方法 : 一般に、これらの細胞株は、市販の物質を使用して、当業者に公知の手順により生成される。

【 0 0 7 6 】

h B L T 1 / C H O - K 1 安定 × 細胞株調製 : ヒト B L T 1 受容体 D N A (国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) (N C B I) 、 参照配列 N M _ 1 8 1 6 5 7) を合成し、 発現ベクター p c D N A 3 . 1 / H y g r o (+) (I n v i t r o g e n V 8 7 0 2 0) 内でクローニングする。 c D N A 発現ベクター構築物を、 トランスフェクション試薬としてリポフェクタミン 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を使用してチャイニーズハムスター卵巣 (C H O - K 1) 細胞 (アメリカンタイプカルチャーコレクション (A T C C) C C L - 6 1) 内にトランスフェクトする。 2 4 時間のトランスフェクション後、 2 0 0 μ g / m L のハイグロマイシンを含有する選択ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) 中で細胞を培養する。 単一コロニーを単離し、 ウェスタンプロット解析および蛍光イメージングプレートリーダ (F L I P R (登録商標)) カルシウム放出アッセイを使用して B L T 1 発現および機能についてスクリーニングする。

20

【 0 0 7 7 】

h B L T 2 / C H O - K 1 安定細胞株調製 : ヒト B L T 2 短形態受容体 D N A (国立生物工学情報センター (N C B I) 、 参照配列 G e n B a n k A B 0 2 9 8 9 2 (これは N 末端における長形態 B L T 2 より 3 2 アミノ酸短い) 、 W a n g ら、 J . B i o l . C h e m . (2 0 0 0) 、 2 7 5 (5 2) : 4 0 6 8 6 - 4 0 6 9 4) を合成し、 発現ベクター p c D N A 3 . 1 / H y g r o (+) (I n v i t r o g e n V 8 7 0 2 0) 内でクローニングする。 c D N A 発現ベクター構築物を、 トランスフェクション試薬としてリポフェクタミン 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を使用して C H O - K 1 細胞 (A T C C C C L - 6 1) 内にトランスフェクトする。 トランスフェクションの 4 8 時間後、 2 0 0 μ g / m L のハイグロマイシンを含有する選択 D M E M 培地中で細胞を培養する。 単一クローナーを単離し、 ウェスタンプロット解析および F L I P R (登録商標) カルシウム放出アッセイを使用して B L T 2 発現および機能についてスクリーニングする。

30

【 0 0 7 8 】

h B L T 1 膜調製 : h B L T 1 トランスフェクト C H O - K 1 細胞を、 5 0 mM の H E P E S p H 7 . 4 、 1 0 mM の M g C l ₂ 、 1 0 mM の N a C l 緩衝液中で懸濁し、 超音波処理し、 分画遠心法により濃縮する。つまり、 超音波処理後、 ホモジネートを 1 0 分間、 1 0 0 0 \times g で遠心分離する。上清を回収し、 再び 6 0 分間、 5 0 , 0 0 0 \times g にて遠心分離する。ペレットを回収し、 p H 7 . 4 にて 5 0 mM の H E P E S 、 1 0 mM の M g C l ₂ 、 1 0 mM の N a C l 、 1 0 % のグリセロールを含有する緩衝液中で再懸濁し、

40

50

hBLT1膜として使用する。

【0079】

hBLT2膜調製：hBLT2トランスフェクトCHO-K1細胞を、50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl緩衝液中で懸濁し、超音波処理し、分画遠心法により濃縮する。つまり、超音波処理後、ホモジネートを10分間、1000×gで遠心分離する。上清を回収し、再び60分間、50,000×gにて遠心分離する。ペレットを回収し、50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl、10%のグリセロールを含有する緩衝液中で再懸濁し、hBLT2膜として使用する。

【0080】

hBLT1を含有する膜における[³H]-LTB₄結合アッセイ：

[³H]-LTB₄(30μLの1.3nM、PerkinElmer NET-852)を、緩衝液A(50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl、10%のグリセロール、1%のBSA)で予め湿潤させた96ウェルMillipore Multiscreen-フィルタ結合プレート(カタログ番号MAFBNOB10)中にアリコートする。試験化合物の以前に調製した用量反応範囲(10μL)を次いで、3μM～152pMの範囲の最終化合物濃度を有するカラム2～11に添加する。結合対照のために、ナトリウム2-[3-[3-[(5-エチル-4'-フルオロ-2-ヒドロキシ[1,1'-ビフェニル]4-イル)オキシ]プロポキシ]-2-プロピルフェノキシ]-ベンゾエート(LY293111Na、市販の公知のhBLT1阻害剤；Sawyerら、J.Med.Chem.(1995)、38:4411-4432、化合物43b)(10μLの3μM、最終濃度)のアリコートを、選択したウェルに(陽性対照として)加えるか、または10μlの緩衝液B(50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl、10%のグリセロール、1%のBSA、10%のDMSO)(陰性対照)を選択したウェルに加える。hBLT1膜タンパク質(0.7μg)を、100μLの全体積としてマイクロタイタープレートの適切なウェルに加える。プレートを低速にてプレートミキサ上に置き、1時間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを吸引し、次いで200μLの氷冷緩衝液C(50mMのHEPES pH7.4、10mMのMgCl₂、10mMのNaCl)で洗浄し、続いてさらに2×100μLで洗浄し、洗浄の間で吸引する。プレートを空気乾燥させ、次いでMicroscint(登録商標)20(PerkinElmer)(100μL)を加える。プレートを16時間静置させ、次いで1分間、Packard Instrument Company Topcount(登録商標)で読み取る。CPM(カウント毎分)を阻害剤濃度に対してプロットし、一定の底部を有する3-パラメータロジスティックフィットを用いて曲線をフィッティングし、IC₅₀値を得る。2.7(以前に計算した)で割ることによりIC₅₀をKi値に変換する(2.7は、[³H]-LTB₄およびhBLT1を用いて飽和結合曲線を作成し、式 $K_i = IC_{50} / 1 + [基質] / K_M$ を使用してK_Mを決定し、 $K_i = IC_{50} / 2.7$ を簡略化することにより以前に決定した定数である)。

【0081】

実質的に上記のプロトコルに従って、実施例2の化合物は、これらの条件下で5.5nMの絶対Ki(10.4nMの相対Ki)を示した。これらのデータは、高親和性LTB₄受容体にて実施例2の化合物によるLTB₄の有効な拮抗作用を証明している。

【0082】

hBLT2を含有する膜における[³H]-LTB₄結合アッセイ：

[³H]-LTB₄(30μLの2.8nM、PerkinElmer NET-852)をFalcon(登録商標)3072マイクロタイタープレート(BD Biosciences)の各ウェルにアリコートする。次いで試験化合物(10μL)の以前に調製した10点用量反応範囲を、30μM～1.5nMの範囲の最終化合物濃度でカラム2～11に加える。結合対照のために、1-(5-エチル-2-ヒドロキシ-4-(6-

10

20

30

40

50

チル - 6 - 1 H - テトラゾール - 5 - イル) ヘプチルオキシ) フェニル) エタノン (LY 255283、市販されている公知の hBLT2 阻害剤) (10 μL の 100 μM、10 μM の最終濃度) のアリコートを、選択したウェルに (陽性対照として) 加えるか、または 10 μL の緩衝液 B (50 mM の HEPES pH 7.4、10 mM の MgCl₂、10 mM の NaCl、10% のグリセロール、1% の BSA、10% の DMSO) (陰性対照) を選択したウェルに加える。hBLT2 膜タンパク質 (7.5 μg) を、100 μL の全体積でマイクロタイプレートの適切なウェルに加える。プレートを低速でプレートミキサに置き、1時間インキュベートする。インキュベーション後、反応混合物の各ウェルから 90 μL を 96 ウェル Millipore Multiscreen - フィルタ結合プレート (カタログ番号 MAFBNOB10) に移し、それを緩衝液 A (50 mM の HEPES pH 7.4、10 mM の MgCl₂、10 mM の NaCl、10% のグリセロール、0.03% の BSA) で予め湿潤させる。プレートを吸引し、次いで 300 μL の氷冷緩衝液 C (50 mM の HEPES pH 7.4、10 mM の MgCl₂、10 mM の NaCl) で 3 回洗浄し、各洗浄工程の後、吸引する。プレートを空気乾燥させ、次いで Microscint (登録商標) 20 (PerkinElmer) (100 μL) を加える。プレートを 16 時間静置させ、次いで 1 分間、Packard Instrument Company Topcount (登録商標) で読み取る。CPM (カウント毎分) を阻害剤濃度に対してプロットし、曲線を、一定の底部を有する 3-パラメータロジスティックフィットを用いてフィッティングさせて IC₅₀ 値を得る。

10

20

30

40

【0083】

実質的に上記のプロトコルに従って、実施例 2 の化合物はこれらの条件下で 16.5 μM の絶対 IC₅₀ (15.4 μM の相対 IC₅₀) を示した。これらのデータは、低親和性 LTB₄ 受容体にて実施例 2 の化合物により LTB₄ の統計的に有意でない拮抗作用を証明する。

【0084】

F L I P R (登録商標) カルシウム放出アッセイ :

高親和性 (BLT1) LTB₄ 受容体を安定に発現するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO-K1) 細胞を、DMEM/F-12 (3:1) w/o フェノールレッド (Invitrogen)、5% のウシ胎仔血清 (FBS) (Hyclone)、20 mM の HEPES (Invitrogen)、200 μg/mL のハイグロマイシン B (Invitrogen) および 40 μg/mL の L-プロリン (Sigma) を含有する増殖培地入りの 96 ウェルプレート (Corning) 中に 10,000 細胞 / ウェルにて播種する。次いでプレートを 37、5% CO₂ にて 22 ~ 24 時間インキュベートし、増殖培地を、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) RPMI-1640 w/o フェノールレッド、20 mM の HEPES (両方 Invitrogen 製)、および 0.2% w/v のウシ血清アルブミン (Sigma) を含有する 50 μL / ウェルの試験培地と置き換える。37、5% CO₂ にて 30 ~ 60 分のインキュベーション後、5 mM のプロベネシド (Sigma) を含有する 50 μL の希釈した F L I P R カルシウム 3 アッセイキット試薬 (Molecular Devices) をウェルに加え、37、5% CO₂ にてさらに 1.25 時間、プレートをインキュベートする。プレートを F L I P R (登録商標) 機器 (Molecular Devices) に置き、50 μL の 4% v/v の DMSO または化合物を加え、6 分後、50 μL のビヒクルまたは LTB₄ を加える。最終濃度の LTB₄ は 8 nM である。0.5 秒の曝露長さおよび 0.6 ワットのレーザ出力を使用してプレートを読み取る。

【0085】

実施例 2 の化合物は、LTB₄ 誘導性カルシウム動員 (有効性および選択性) の阻害、0.98 (2 の n ; + / - 1.64) の K_b (nM) および 6.48 (2 の n ; + / - 10.8) の相対 IC₅₀ (nM) を証明した。

【0086】

さらに、以下は、マウスおよびヒト血液における関連細胞種類における単球内の細胞外

50

シグナル調節キナーゼ1および2(ERK)のリン酸化(Lindsayら、J. Leukoc. Biol. (1998)、64:555-562)および好中球内のCD11bの誘導、ならびにペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)の核内受容体サブファミリーに対するLTB₄結合親和性を含む、BLT1に対するLTB₄結合により誘導される下流の事象を測定するために使用されるいくつかのさらなるアッセイである。

【0087】

ヒトリン酸化細胞外関連キナーゼ(pERK)アッセイ：

BLT1を介するLTB₄誘導性シグナル伝達を遮断する実施例2の化合物の能力を、健康なヒトボランティアからおよび前臨床AAA有効性評価についてのモデル株である129SvEvマウスから得た全血中で評価した。

10

【0088】

10mLのK2エチレンジアミン四酢酸(EDTA)バキュテナーチューブ(BD Biosciences)中で全血をヒトドナーから回収する。全血のアリコートを37にて20分間予め加温する。試験化合物の10点用量反応曲線を20nM~10μMの最終濃度にてアッセイする。1000倍の最終アッセイ濃度にて化合物の10点1/2連続希釈をDMSO中で調製する。次いで化合物をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)(DMSO濃度はここで1%)中で10倍に希釈する。10μLの化合物希釈(DPBS中に10倍にて)またはDPBS中の1%DMSOを、2.0mL体積の96ディープウェルプレート(Nunc)のウェルに加え、37の加熱ブロックに入れる。

20

【0089】

その後すぐに、80μLの全血を加え、37にて20分間インキュベートする(BD Biosciences製の10μLの抗ヒトCD14-FITCを最後の10分間加える)。Cayman Chemicals製の11μLの予め加温した10×LTB₄(最終濃度10nM)を加え、37にて1分間インキュベートする。BD Biosciences製の1.5mLの1×Phosflow Lyse/Fix(37で予め加温した)で反応を停止させる。プレートをシールし、ボルテックスし、37にて10分間インキュベートする。1.5mLのDPBS(Hyclone)で細胞を1回洗浄し、次いで30分間氷上で100μLの2%Cytofix(BD Biosciences)+900μLの冷メタノールで透過処理する。1mLの洗浄緩衝液(ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)+5%FBS)で細胞を1回洗浄し、次いで室温にて1時間100μLのpERK抗体(1:100希釈したCell Signaling)とインキュベートする。洗浄緩衝液で細胞を1回洗浄し、次いで室温にて30分間暗所で100μLの2μg/mL抗ウサギIgG-PE(Invitrogen)とインキュベートする。洗浄緩衝液で細胞を再び洗浄し、次いで400μLの1%Cytofix(BD Biosciences)中に固定する。細胞を12×75チューブに移し、次いで分析まで冷蔵する。試料を室温に加温し、Beckman Coulter FC500フローサイトメーターで分析する。ヒト単球を、ゲーティングストラテジー側方散乱対CD14-FITC陽性により単離する。WinListソフトウェア(Verity Software House)によりデータを分析して、単球集団由来のpERK-PEについて平均および中央蛍光強度値を決定する。

30

【0090】

実施例2の化合物が種々の濃度でヒト全血に加えられる場合、単球におけるERKのLTB₄誘導性リン酸化は814nMのIC₅₀で遮断され、実施例2の化合物による下流のシグナル伝達事象の拮抗作用が証明される。

40

【0091】

マウスpERKアッセイ：

50mMのEDTA(Gibco)中で129SvEvマウスから全血を採取する。インピトロ実験のために、試験化合物の10点用量反応曲線を20nM~10μMの最終濃度にてアッセイする。1000倍の最終アッセイ濃度にて化合物の10点1/2連続希釈をDMSO中で調製する。次いで化合物をDPBS(DMSO濃度はここで1%である)

50

中で 10 倍に希釈する。10 μL の化合物希釈 (D PBS 中で 10 倍に希釈) または D PBS 中の 1% DMSO を 96 ディープウェルプレートのウェルに加える。80 μL の全血を加え、室温にて 20 分間インキュベートする (1 μg / mL 最終濃度にて 10 μL の抗マウス LY6G - FITC 抗体 (BD Pharmingen) および 10 μl の抗マウス CD11b - APC BD Biosciences を最後の 10 分間加える)。11 μL の 10 倍の予め加温した LTB₄ (最終濃度 20 nM) を加え、37 ℃ にて 2 分間インキュベートする。BD Biosciences 製の 1.5 mL の 1 × Phosflow Lyse / Fix (37 ℃ に予め加温した) で反応を停止させる。プレートをシールし、ボルテックスし、37 ℃ にて 10 分間インキュベートする。1.5 mL の D PBS で細胞を 1 回洗浄し、次いで室温にて 10 分間、1 mL の BD Perm / 洗浄緩衝液 (BD Biosciences) で透過処理する。1 mL の Perm / 洗浄緩衝液で細胞を 1 回洗浄し、次いで室温にて 1 時間、100 μl の pERK 抗体 (1 : 100 に希釈した Cell Signaling) とインキュベートする。Perm / 洗浄緩衝液で細胞を再び洗浄し、次いで室温にて 30 分間、暗所で 100 μL の 2 μg / mL 抗ウサギ IgG - PE (Invitrogen) とインキュベートする。Perm / 洗浄緩衝液で細胞を再び洗浄し、次いで 400 μl の 1% の BD Cytofix 中で固定する。マウス単球をゲーティングストラテジー LY6G - FITC 隆性 / CD11b - APC 隆性により単離する。

10

【0092】

実施例 2 の化合物は 243 nM の IC₅₀ でマウス全血単球中の ERK の LTB₄ 誘導性リン酸化を遮断し、下流のシグナル伝達事象の拮抗作用が証明される。

20

【0093】

CD11b アッセイ：

炎症はバイオマーカーの開発を受け入れやすい 1 つの病態生理学的プロセスである。例えば、簡単な血液検査は好中球活性化をモニターするための組織生検に対する代理として役立ち得る。好中球活性化は血液から組織損傷部位までそれらの移動をもたらし、炎症プロセスの中心となり (Busse, Am. J. Respir. Crit. Care Med. (1998), 157 : S210 - 213)、好中球は典型的に健康な組織に存在しない。血液中の好中球活性化に特異的なバイオマーカーに基づいたアッセイは組織内の炎症反応の低侵襲性指標である。好中球表面上の 2 インテグリン CD11b / CD18 (Mac-1)、糖タンパク質の増加した発現は炎症領域内の好中球の移動における最初のステップである (Parkos, BioEssays (1997), 19 : 865 - 873)。BLT1 受容体拮抗作用の前臨床および臨床バイオマーカーとしての CD11b の有用性は、LTB₄ 有効性が好中球上で CD11b 発現を上方制御し (Turnerら, J. Clin. Invest. (1996), 97 : 381 - 387)、LTB₄ による CD11b の刺激が、LTB₄ 受容体のアンタゴニストにより顕著に減少することが示されている (Allenら, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1996), 277 : 341 - 349; Davisら, J. Immunol. Methods (2000), 240 : 125 - 132; Marderら, Biochem. Pharmacol. (1995), 49 : 1683 - 1690) という事実に基づく。

30

【0094】

EDTA 抗凝固血液は上記のようにヒトドナーまたはマウスから採取する。インビトロ実験のために、試験化合物の 8 または 10 点用量反応曲線をそれぞれ 78 nM ~ 10 μM または 20 nM ~ 10 μM の最終濃度にてアッセイする。1000 倍の最終アッセイ濃度にて化合物の 1 / 2 連続希釈を DMSO 中で調製する。次いで化合物を D PBS 中で 10 倍に希釈する (DMSO 濃度はここで 1% である)。10 μL の化合物希釈 (D PBS 中に 10 倍にて) または D PBS 中の 1% DMSO を 96 ディープウェルプレートのウェルに加える。90 μL の全血を加え、室温にて 20 分インキュベートする。11 μL の 10 × LTB₄ (最終濃度、マウスについて 25 nM またはヒトについて 10 nM) を加え、37 ℃ にて 30 分間インキュベートする。5 分間氷上でプレートをインキュベートするこ

40

50

とによって反応を停止させる。10 μLの抗マウスまたは抗ヒトCD11b-PE(BD Biosciences、マウスについて1:20希釈し、ヒトについて未希釈)で細胞を染色し、暗所にて氷上で30分間インキュベートする(マウスの実験について、1:25に希釈した10 μLの抗マウスLY6G-FITC抗体(BD Pharmingen)を最後の10分間加える)。1.5mLの1×BD FACSlyse(BD Biosciences)を加えることにより赤血球(RBC)を溶解し、暗所で室温にて10分間インキュベートする。1.5mLのDPBSで細胞を1回洗浄し、次いで400 μLの1%Cytotfix中で固定する。ゲーティングストラテジーLY6G-FITC陽性によりマウス好中球を単離し、光散乱特性によりヒト好中球を単離する。WinListソフトウェア(Verity Software House)を用いてデータを分析して、好中球集団からのCD11b-PEについての平均および中央蛍光強度値を決定する。

10

【0095】

好中球におけるLTB₄誘導性CD11b発現は実施例2の化合物によりこの前臨床モデルにおいて用量依存的に阻害され、実施例2はマウスおよびヒト全血好中球におけるLTB₄誘導性CD11b発現を遮断する。ヒト全血好中球におけるCD11bのLTB₄誘導性発現は193 nMのIC₅₀で遮断される。同様に、実施例2の化合物は1.45 μMのIC₅₀でマウス全血好中球におけるCD11b発現を阻害する。

【0096】

リガンド活性化ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アルファ、デルタおよびガンマ(PPARα、δ、γ)結合アッセイ：

LTB₄およびBLT受容体アンタゴニストは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)の核内受容体サブファミリーのリガンドであると示されており、それらの開発機会を制限していると考えられる(Devchandら、J. Biol. Chem. (1999)、274:23341-23348; Devchandら、Nature (1996)、384:39-43)。

20

【0097】

PPAR機能的溶解物調製：

一般に、これらの細胞株は、市販の物質を使用して当業者に公知の手順により生成される。

30

【0098】

完全長PPAR受容体DNA(国立生物工学情報センター(NCBI)参照配列NM_005036.4)、PPAR受容体DNA(NCBI参照配列NM_006238.4)、PPAR受容体DNA(NCBI参照配列NM_015869.4)およびレチノイドX受容体(RXR)DNA(NCBI参照配列NM_002957.4)をコードするヌクレオチド配列を合成し、ベクター由来のN末端HISタグがインフレームされているpFastBacHTb(Invitrogen)ベクター内に挿入する。組換えbacmid(バキュロウイルスシャトルベクタープラスミド)は、DH10Bac細胞を形質転換し、Bac-to-Bacバキュロウイルス発現系の製造業者のプロトコル(Invitrogen; Invitrogenユーザーマニュアル、バージョンF、2010年9月04日付け；およびInvitrogen機器マニュアル2002年2月27日付けも参照のこと)に従って白いコロニーからDNAを単離することにより作製される。Sf9細胞を、CellFectin試薬(Invitrogen)を使用して0.9×10⁶個細胞/ウェルにて6ウェルプレート中にトランスフェクトする。P0ウイルスをトランスフェクションの72時間後に収集し、1.5×10⁶個細胞/mLにて50 mLの細胞当たり100 μLのP0ウイルスにて懸濁液中でSf9昆虫細胞を感染させるために使用する。P1ウイルスを96時間後に収集する。タンパク質産生のために、1LのSf9細胞を1.5×10⁶個細胞/mLにて5mLのP1ウイルスで感染させ、細胞を48時間後に収集する。細胞溶解物を調製するために、1L培養物からの細胞ペレットを、PPARについて12.5mLの氷冷溶解緩衝液(20 mMのHEPES、pH 7.4)にて溶解する。

40

50

8、160 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、2 mMのジチオスレイトール(DTT)、1%の3-[(-クロロアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)、40%グリセロール、1×Rocheプロテアーゼ阻害剤カクテル)またはRXRについて溶解緩衝液B(10 mMのTris-HCl、pH 7.5、500 mMのNaCl、1 mMのEDTA、1 mMのDTT、50%グリセロール、1×Rocheプロテアーゼ阻害剤カクテル)で再懸濁し、次いでホモジナイズし、氷上で超音波処理する。4にて45分間16,500 rpmにてBeckman JA18ローターでの遠心分離後、上清をアリコートし、-80にて凍結する。タンパク質濃度は、標準物としてBSAを使用したBradfordアッセイにより決定する。

【0099】

10

PPAR_α、_γ受容体についての化合物の結合親和性は、シンチレーション近接アッセイ(SPA)技術を使用して評価する。

ビオチン化オリゴヌクレオチド(DR2)

ケイ酸イットリウムストレプトアビジンでコーティングしたSPAビーズ(Perkin Elmer)に対する受容体の結合のために^{5'} T A A T G T A G G T A A T A G T T C A A T A G G T C A A A G G G^{3'}(配列番号1)を使用する。PPAR_α、_γおよびレチノイドX受容体(RXR)受容体(ヘテロ二量体として内因的に発現された)は、Sf9細胞におけるバキュロウイルス発現系由来の細胞溶解物である。DR2を、pH 7.8にて10 mMのHEPES、80 mMのKCl、0.5 mMのMgCl₂、1 mMのDTT、0.5%のCHAPSおよび16.6 μgのウシ血清アルブミンを含有する結合緩衝液中で室温にて30分にわたって混合することによりストレプトアビジンSPAビーズに付着させる。ビーズ-オリゴミックスをペレットにするために混合物を3分間2000 rpmにて回転させる。上清を除去し、ビーズ-オリゴペレットを上記と同じ結合緩衝液中に再懸濁する。細胞溶解物を、上記の結合緩衝液プラス14%グリセロールおよび5 μgの剪断したサケ精子DNA中で、アルファおよびデルタ受容体について約0.0338 μCiのトリチウム化したGW2331(ラセミ体2-[4-[2-[[(2,4-ジフルオロフェニル)カルバモイル](ヘプチル)アミノ]エチル]フェノキシ]-2-メチルブタン酸)およびガンマ受容体について約0.0373 μCiのトリチウム化した2-メチル-[4-[3-[プロピル[(5-ピリジン-2-イル)オフエン-2-イル]スルホニル]アミノ]プロピル]フェノキシプロパン酸、110.3 μgのSPAストレプトアビジンでコーティングしたビーズ、0.126 nMのHDオリゴDR2、ならびに0.5 μgのRXRと共に0.3 μgのPPAR_α、0.5 μgのRXRと共に0.5 μgのPPAR_γまたは3.03 μgのRXRと共に1.25 μgのPPAR_γのいずれかの存在下で0.17~10,000 nMの範囲の11の濃度の化合物のうちの1つで各ウェル中でインキュベートする。非特異的結合を、アルファおよびデルタ受容体について10000 nMの非標識GW2331(Kliewer, S.A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997)、94:4318-4323)ならびにガンマ受容体について2-メチル-2-[4-[3-[プロピル[(5-ピリジン-2-イル)オフエン-2-イル]スルホニル]アミノ]-プロピル]フェノキシプロパンオイック(WO2004/073606)の存在下で決定する。結合反応物(96ウェル[Costar 3632]プレート中の100 μL/ウェル)を10時間インキュベートし、Wallac Microbeta Luminometer Liquid Scintillation Counterで分解/分(dpm)としてカウントする。化合物についての受容体結合親和性(IC₅₀)を、4-パラメータロジスティック式を用いて11点濃度反応曲線をフィッティングすることにより決定する。チェン-ブルソフ式および飽和結合により決定したKdを使用してIC₅₀からK_iを決定する。

【0100】

20

30

40

40

トリチウム化したGW2331は、トリチウム化していない物質を得るためにgem-ジメチル類似体の合成についての文献(WO92/10468; Hawke, R.Lら、J. Lipid Res. 1997, 38:1189-1203)における一般的な以下

50

の手順により得られ得る。トリチウム化は、トリチウムをジフルオロフェニルのオルト位に配置するトリチウムガスおよびクラブトリー触媒 (Hey s , J . R . ら、 J . L a b e l l e d C p d . R a d i o p h a r m . (1 9 9 9) 、 4 2 : 7 9 7 - 8 0 7) を使用して達成され得る。あるいは、トリチウムは、ヘプテニル類似体のトリチウムガスを用いたパラジウム触媒還元による分子のヘプチル位に配置されてもよい(前出、 K l i e w e r , S . A)。

【 0 1 0 1 】

トリチウム化した 2 - メチル - 2 - [4 - [3 - [プロピル [(5 - ピリジン - 2 - イルチオフェン - 2 - イル) スルホニル] アミノ] プロピル] フェノキシ] プロパン酸は、トリチウムガスを用いたアリル (a l l y) 前駆体の触媒還元により作製できる。アリル前駆体 (2 - [4 - [3 - [アリル - [[5 - (2 - ピリジル) - 2 - チエニル] スルホニル] アミノ] プロピル] フェノキシ] - 2 - メチル - プロパン酸) は一般に、アリルアミンとの反応、続いて 5 - (2 - ピリジニル) - 2 - チオフェンスルホニルクロリドでのスルホニル化およびエチルエステルの加水分解においてエチル 2 - メチル - 2 - [4 - [3 - (p - トリルスルホニルオキシ) プロピル] フェノキシ] プロパン酸で開始する、 W O 2 0 0 4 / 0 7 3 6 0 6 における以下の手順により作製できる。

10

【 0 1 0 2 】

2つの放射性リガンドの使用は文献 (B u r r i s ら、 M o l e c u l a r P h a r m a c o l o g y 、 2 0 0 4 6 7 : 9 4 8 - 9 5 4 および X u ら、 J . M e d . C h e m . 2 0 0 4 、 4 7 : 2 4 2 2 - 2 4 2 5) に見出され得る。

20

【 0 1 0 3 】

実質的に上記のプロトコルに従って、実施例 2 の化合物は、 P P A R 、 、 結合アッセイにおいて約 6 1 7 n M (n = 3) 、 > 8 8 3 0 n M (n = 4) 、および 1 3 8 0 n M (n = 2) の K _i をそれぞれ示した。これらのデータは、実施例 2 の化合物が P P A R 受容体と弱くのみ相互作用することを実証している。活性は、選択的で、開発の制限を示さないことが証明されると考えられる。

【 0 1 0 4 】

インビボアッセイ手順 :

C a C l ₂ 誘導性 A A A 動物有効性モデル :

マウス大動脈に対する塩化カルシウム溶液の標的適用は血管拡張を誘発する (C h i o u ら、 J . S u r g . R e s . (2 0 0 1) 、 9 9 : 3 7 1 - 3 7 6 ; L o m g o ら、 J . C l i n . I n v e s t . (2 0 0 2) 、 1 1 0 : 6 2 5 - 6 3 2) 。処置の 2 週間後、元の血管径と比較した血管拡張は、4 週後に大動脈内腔周囲が 7 5 % まで増加し、統計的に有意である。カルシウム沈殿物は媒体の弾力網内に主に局在化する。カルシウム - 弾性組織複合体によるこの構造の破壊は、血管壁を弱体化し、動脈瘤形成の原因となる。この損傷はまた、炎症刺激として機能し、好中球、リンパ球、単球および肥満細胞を動員する。

30

【 0 1 0 5 】

動物 :

マウス : 1 2 9 S v E v オス、7 週齢は、T a c o n i c F a r m s 、 G e r m a n t o w n 、 N e w Y o r k 、 U S A から獲得する。

40

ラット : S p r a g u e - D a w l e y ラット、7 ~ 8 週齢は、H a r l a n 、 I n d i a n a p o l i s 、 I n d i a n a 、 U S A から獲得する。

【 0 1 0 6 】

動脈瘤誘導モデル : 全ての手順は、E l i L i l l y a n d C o m p a n y I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e ガイダンスに従って実施する。それらの到着時に、動物を 1 週間順化させ、その間、標準的な齧歯動物の餌 (P u r i n a # 2 0 1 4) および家庭用水をそれらに自由にとらせる。順化期間の後、動物をイソフルランで麻酔し、腹部大動脈瘤 (A A A) の C a C l ₂ で刺激する誘導のために開腹を実施する。腎動脈のレベルから腸骨分岐までの腹部大動脈を、外科用顕微鏡技

50

術を使用して下大静脈および周囲結合組織から単離する。一旦、単離すると、腹部大動脈の対象の領域（R O I）を、0.25MのCaCl₂溶液中に予め浸した滅菌綿ガーゼで覆う。偽対照動物において、0.9%の生理食塩水をCaCl₂と置き換える。7分後、ガーゼを除去し、2回目のCaCl₂を浸したガーゼを再び適用する。2回目の7分後、ガーゼを除去し、0.9%の生理食塩水で大動脈をリーンスし、腹部を閉じる。それらの手術日の終わりに動物を通常の居住に戻す。

【0107】

化合物投与：10mL/kg体重の用量体積にて経口強制投与によりマウスに試験化合物（実施例2）を与える。2.5mL/kg体重の用量体積にて経口強制投与によりラットに試験化合物（実施例2）を与える。化合物投与はBID（a.m.およびp.m.）であり、手術の前日（p.m.）に最初の用量を与え、手術の午前中に2回目の用量を与える。動物は手術日のp.m.に用量を受けない。手術日後、投薬を28日間BIDで継続する。10

【0108】

超音波による大動脈測定：手術の28日後、動物を麻酔し、7.5MHzプローブを備えたeSaote MyLab30 Gold Biosound Ultrasound装置を使用して腹部超音波測定に供する。前臨床CaCl₂齧歯動物モデルにおけるAAAの非対称発達に起因して、動脈測定を長手方向および断面軸の両方に沿ってピーク心収縮の間、外径および内（内側）径からを行い、ROI内で最も拡張した部分を識別する。内部断面内腔周囲測定（mm）をその点で収集し、効果を評価し、JMP（登録商標）7ソフトウェア（Cary、North Carolina）を用いて統計的に解析する。20

【0109】

統計的解析：内腔周囲の測定は平均値±SEとして表す。薬物で処置した群についてのAAA阻害のパーセントを決定するために、ビヒクリで処置した偽対照群からの測定をAAA発症の100%阻害と表し、一方、ビヒクリで処置したCaCl₂群からの測定をAAA発症の0%阻害と表す。JMP（登録商標）7ソフトウェア（Cary、North Carolina）を用いて統計的解析を実施し、処置群にわたる統計比較のためにダネット検定を使用する。統計的有意性はP<0.05にて容認される。

【0110】

CaCl₂誘導性腹部大動脈瘤モデルにおける有効性シグナルウインドウを、生理食塩水を浸したガーゼで処置し、続いて、ビヒクリを4週間投与したマウスにおける大動脈の内腔周囲を100%有効性（「偽ビヒクリ」）と決定し、CaCl₂を浸したガーゼで処置し、続いてビヒクリ（「ビヒクリ」）を4週間投与したマウスにおける大動脈の内腔周囲は0%有効性と決定する。30

【0111】

実質的に上記のプロトコルに従って、129SvEvマウスを使用した、大動脈の内腔周囲は、実施例2の化合物を使用したビヒクリで処置したマウスと比較して統計的に減少し（表1）、実施例2の化合物がこの動物モデルにおいてAAAを減少させることを証明する。

【0112】

40

【表1】

表1. マウスにおけるAAAのインビボでの減少パーセンテージ(%)

群	減少 % (± S.E.)	P 値
ビヒクル	0%±9	
10 mg/kg b.i.d.	41%±13	p=0.0522
30 mg/kg b.i.d.	48%±10	p=0.0179
60 mg/kg b.i.d.	58%±13	p=0.0028
偽	100%±8	p=<0.0001

10

20

30

40

【0113】

同様の研究設計において、 CaCl_2 誘導性損傷後に大動脈瘤拡張を調節する実施例2の化合物の能力を、Sprague-Dawleyラットにおいて評価する。大動脈の内腔周囲はビヒクルで処置したラットと比較して統計的に減少し(表2)、実施例2の化合物はAAAを減少させることが証明される。

【0114】

【表2】

表2. ラットにおけるAAAのインビボでの減少パーセンテージ(%)

群	減少 % (± S.E.)	P 値
ビヒクル	0%±7	
3 mg/kg b.i.d.	46%±7	p=0.0001
10 mg/kg b.i.d.	69%±4	p=<0.0001
30 mg/kg b.i.d.	85%±5	p=<0.0001
60 mg/kg b.i.d.	69%±10	p=<0.0001
偽	100%±6	p=<0.0001

【0115】

LDLr KOマウス腕頭アーチアテローム性動脈硬化症モデル:

実施例2の化合物を、アテローム性動脈硬化症の低密度リポタンパク質(LDL)受容体ノックアウト(LDLr KO)マウスモデルにおいて試験する。LDL受容体(LDLr KO)をコードし、合成する能力の欠損したマウスは、特に高いコレステロール食餌で維持した場合、高コレステロール血症になる(Ishibashira, J. Clin

50

. Invest. (1994)、93:1885-1893）。大動脈において、LDLr KOマウスは、ヒト病変の細胞、脂質および細胞外マトリクス組成物の主な特徴を模倣する自然に発生するアテローム性動脈硬化症を発症する。ヒトおよびマウスの両方の病変の重要な構成要素は、動脈内皮下層における脂質を持ったマクロファージまたは「泡沫細胞」である。マクロファージにより保存されたエステル化されたコレステロールは病変発生の代わりである。（LC/MSにより）マウス動脈組織から直接エステル化されたコレステロールのアッセイは病変負荷の迅速な指標を与える。本発明の研究に使用したLDLr KOモデルは腕頭動脈（BCA）において成熟アテローム動脈硬化性ブラークの迅速な発生を利用する。この研究についての主要エンドポイントは、動脈コレステリルエステル含有量および動脈の連続断面における病変の光学顕微鏡測定により得られる病変寸法である。

10

【0116】

LDLr KOマウス（JAX #002207）、7週齢のオスは、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) から得た。試験施設に到着すると、合計10週間存続させ、マウスを個々に収容し、アテローム生成食餌T D . 88137 (Teklad) を自由に与えた。最初の6週の間、マウスをそれらのケージに平穩に置いた。最後の4週の間、経口強制投与により1日に2回、マウスに試験化合物を与えた。その評価からのデータを以下の表3に報告する。

20

【0117】

【表3】

表3: LDLr KOマウスBCAアテローム性動脈硬化病変領域はアテローム性動脈硬化症エンドポイントの用量依存的減少を示す。処置群の間の比較は、1元ANOVA、続いてダネット検定により行った。

	ビヒクル	3mg/kg BID 実施例 2	10 mg/kg BID 実施例 2	30 mg/kg BID 実施例 2
病変領域 (mm ²)	50,686	23,737	21,247	17,090
病変領域対ビヒクル		-53%* (p<0.049)	-58%* (p<0.034)	-66%* (p<0.017)
コレステリルエステル (nmoles)	22.50	17.95	16.97	14.51
コレステリルエステル 対ビヒクル		-8% (p=NS)	-18% (p<0.09)	-23%* (p<0.04)
マクロファージ領域 (茶色, mm ²)	18,571	6,515	2,864	8,520
マクロファージ領域対 ビヒクル		-65%* (p<0.02)	-84%* (p<0.002)	-54% (p<0.09)
AUC (ng·hr/ml)		1,106	5,375	12,849

30

【0118】

表3は、30mg/kg b.i.d投薬において実施例2の化合物が、ビヒクルで処置した群と比較してBCAコレステリルエステル(CE)含有量を23%減少させることを示す(p<0.04)。30mg/kg b.i.dにおいてより低い有効性であるが、10mg/kg b.i.dにおいて実施例2の化合物は、ビヒクル処置と比較してCE含有量を18%減少させた(p<0.09)。これらの代理データにより支持されるBCAアテローム性動脈硬化症の有意な減少の傾向は、BCA病変の直接測定により確認され、示される。表3は、30mg/kg 経口 b.i.d投薬における実施例2の化合物により生成される病変領域の有意な減少を示す。この用量における処置の結果、ビヒクル単独での処置と比較して66%の病変領域の減少がもたらされる(p<0.017)。10mg/kg b.i.dおよび3mg/kg b.i.d投薬のそれぞれにおける実施例

40

50

2の化合物により生成される病変領域の58%および53%の減少は、B C A C E含有量に対する効果と比較して同様の用量反応効果を示す。

【配列表】

2015509917000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2013/020195						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07C233/25 A61K31/167 A61P19/02 ADD.								
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) C07C A61K								
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								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 5 462 954 A (BAKER S RICHARD [US] ET AL) 31 October 1995 (1995-10-31) cited in the application examples 69,95,96 -----</td> <td style="padding: 2px;">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 5 462 954 A (BAKER S RICHARD [US] ET AL) 31 October 1995 (1995-10-31) cited in the application examples 69,95,96 -----	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	US 5 462 954 A (BAKER S RICHARD [US] ET AL) 31 October 1995 (1995-10-31) cited in the application examples 69,95,96 -----	1-9						
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.								
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 10 April 2013	Date of mailing of the international search report 18/04/2013							
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Scheid, Günther							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/020195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5462954	A 31-10-1995 PH US	30449 A 5462954 A	28-05-1997 31-10-1995

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

(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,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,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,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,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

(72) 発明者 ダグラス・リチャード・スタック

アメリカ合衆国 4 6 2 0 6 - 6 2 8 8 インディアナ州インディアナポリス、ポスト・オフィス・ボックス 6 2 8 8、イーライ・リリー・アンド・カンパニー内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 HA11
4C206 AA01 AA02 AA03 GA13 GA31 KA12 MA01 MA04 NA14 ZA36
ZA45
4H006 AA01 AB23 BJ50 BM30 BM71 BN30 BP30 BS10 BS70 BV25