

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

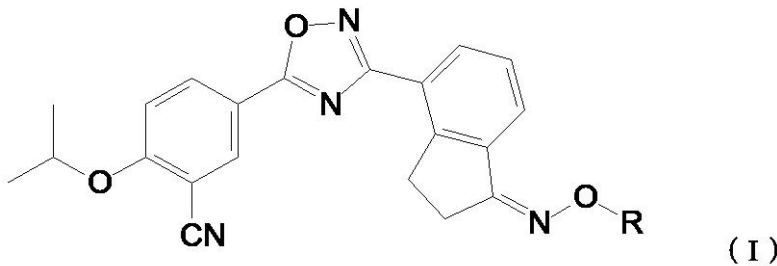
(11)特許番号
特許第7653447号
(P7653447)

(45)発行日 令和7年3月28日(2025.3.28)

(24)登録日 令和7年3月19日(2025.3.19)

(51)国際特許分類		F I			
C O 7 D	271/06 (2006.01)	C O 7 D	271/06	C S P	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	31/4245(2006.01)	A 6 1 K	31/4245		
A 6 1 K	31/454(2006.01)	A 6 1 K	31/454		
請求項の数 10 (全34頁)					
(21)出願番号 特願2022-558050(P2022-558050)			(73)特許権者 521440389		
(86)(22)出願日 令和3年3月25日(2021.3.25)			レセプトス・リミテッド・ライアビリテ		
(65)公表番号 特表2023-519308(P2023-519308			ィ・カンパニー		
A)			R e c e p t o s L L C		
(43)公表日 令和5年5月10日(2023.5.10)			アメリカ合衆国08543ニュージャー		
(86)国際出願番号 PCT/US2021/024179			ジー州プリンスストン、ルート206アン		
(87)国際公開番号 WO2021/195396			ド・プロビンス・ライン・ロード		
(87)国際公開日 令和3年9月30日(2021.9.30)			(74)代理人 100145403		
審査請求日 令和6年3月8日(2024.3.8)			弁理士 山尾 憲人		
(31)優先権主張番号 63/001,073			(74)代理人 100126778		
(32)優先日 令和2年3月27日(2020.3.27)			弁理士 品川 永敏		
(33)優先権主張国・地域又は機関			(74)代理人 100156155		
米国(US)			弁理士 水原 正弘		
(31)優先権主張番号 63/018,327			(74)代理人 100162684		
(32)優先日 令和2年4月30日(2020.4.30)			弁理士 呉 英燦		
最終頁に続く			最終頁に続く		
(54)【発明の名称】 スフィンゴシン1ホスフェート受容体モジュレーター					

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】
構造式(I)：
【化1】



[式中：
Rは、
アルキル；
アルカンジイル-NR¹R²；
アルカンジイル-C(=O)OR¹；または
ヘテロシクリルアルキルであり；
R¹およびR²は、独立して、HまたはC₁₋₄アルキルである]

で示される、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、水和物または溶媒和物。

【請求項 2】

R がアルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

アルキルがメチル、エチル、イソプロピルまたはtert-ブチルである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

R がアルカンジイル- NR^1R^2 である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

R^1 および R^2 が、独立して、水素またはメチルである、請求項 4 に記載の化合物。

10

【請求項 6】

R がアルカンジイル- $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^1$ である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

R^1 が水素またはメチルである、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

R がヘテロシクリルアルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

ヘテロシクリルアルキルが- (CH_2) -ヘテロサイクルである、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】

20

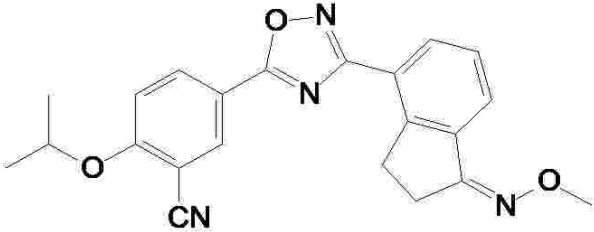
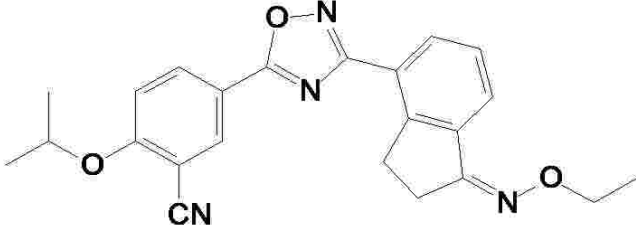
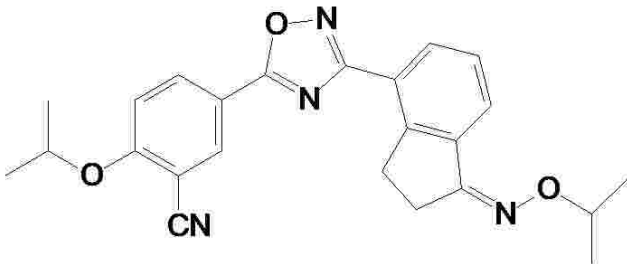
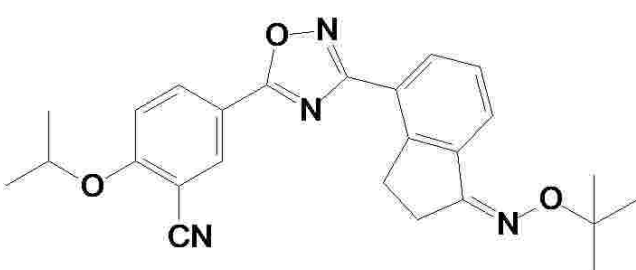
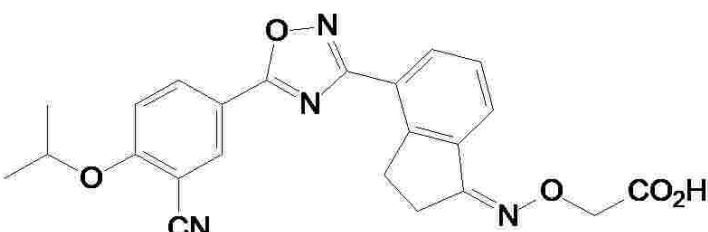
次の構造の一つを有する化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、水和物または溶媒和物。

30

40

50

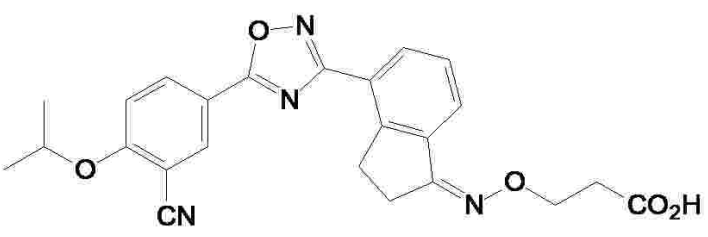
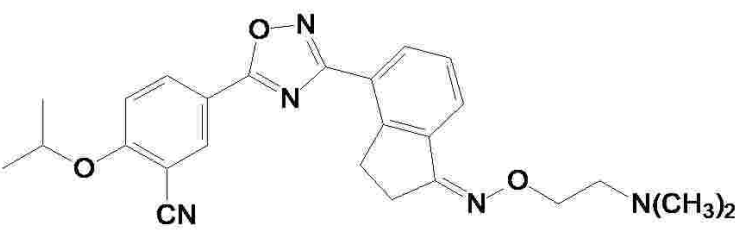
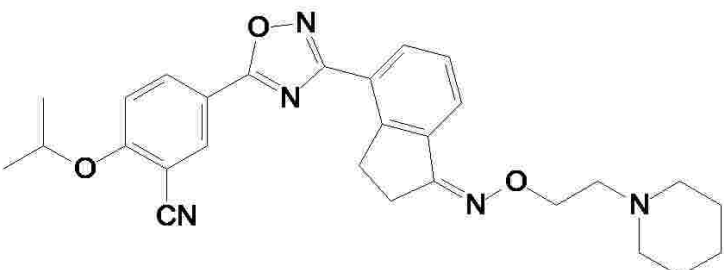
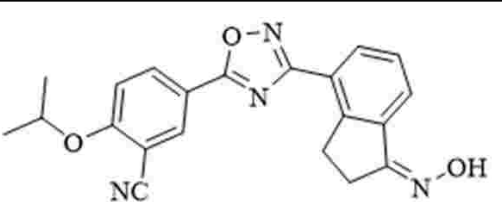
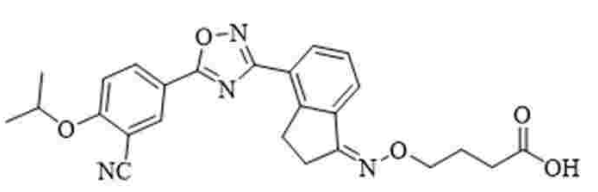
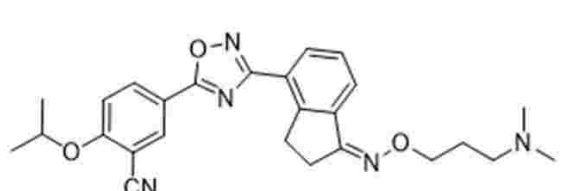
【表 1】

	
	10
	20
	30
	40

40

50

【表 2】

 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(OCC)C5=O</chem>	
 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(OCCN(C)C)C5=O</chem>	10
 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(OCCN1CCCC1)C5=O</chem>	20
 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(O)C5=O</chem>	
 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(OCCCC(=O)O)C5=O</chem>	30
 <chem>CC(C)Oc1ccc(C#N)cc1C2=NC3=CC=CC=C3N2C4=CC=CC=C5C(=C4)C(=O)N(OCCCN(C)C)C5=O</chem>	40

10

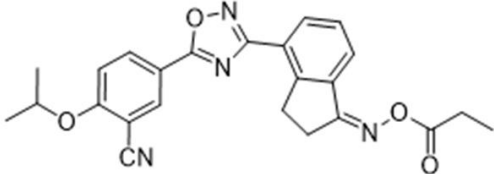
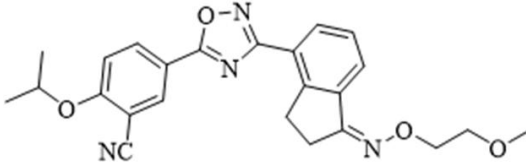
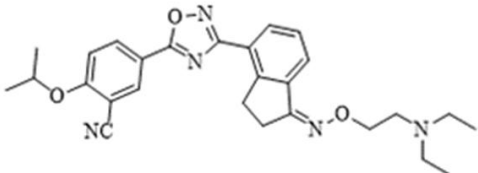
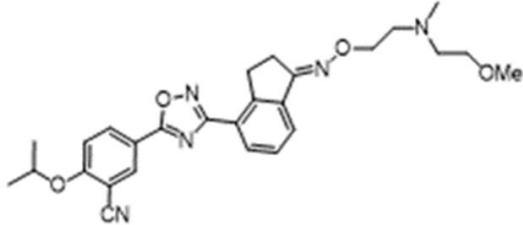
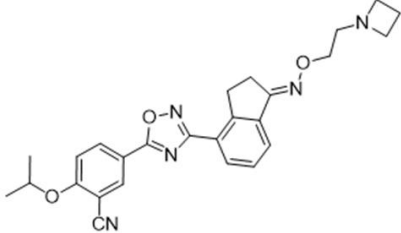
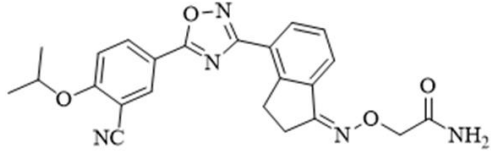
20

30

40

50

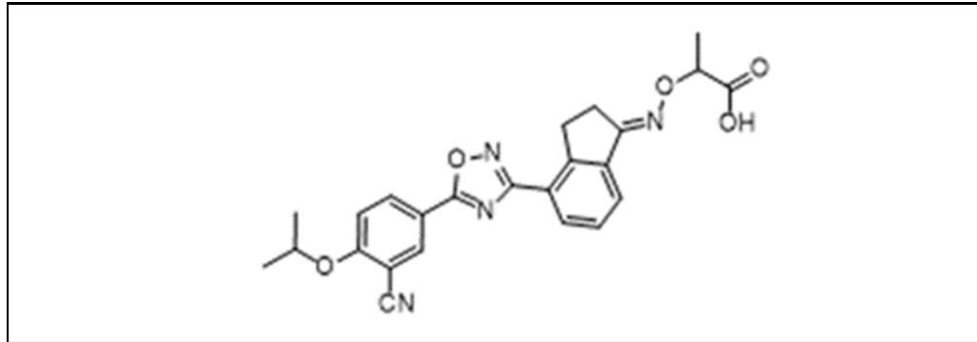
【表 3】

	
	10
	
	20
	30
	40

40

50

【表 4】



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体のモジュレーターが、その受容体の活性化が医学的に示される病態を治療するために提供される。

【背景技術】

【0002】

S1P₁/EDG₁受容体はGタンパク質結合受容体(GPCR)であり、内皮細胞分化遺伝子(EDG)受容体ファミリーのメンバーである。EDG受容体に対する内因性リガンドには、スフィンゴシン-1-ホスフェート(S1P)などのリゾリン脂質が含まれる。すべてのGPCRと同様に、該受容体がライゲートすると、Gタンパク質(アルファ、ベータおよびガンマ)の活性化を介して第2のメッセンジャーシグナルが伝搬される。低分子のS1P₁アゴニストおよびアンタゴニストが開発されたことで、S1P₁/S1P受容体のシグナル伝達系のいくつかの生理学的役割に関する知見が提供された。このために、S1P受容体は5つの亜型(すなわち、S1P₁、S1P₂、S1P₃、S1P₄およびS1P₅)に分けられ、これらの亜型は多種多様な組織で発現し、異なる細胞特性を示す。S1P₁受容体の作動性は、リンパ球の輸送を阻害し、それらのリンパ球をリンパ節および他の第2リンパ組織に隔離する。このことは迅速かつ可逆的なリンパ球減少をもたらし、このことは、おそらく、リンパ内皮細胞およびリンパ球それ自体の両方での受容体のライゲーションによるものである(Rosenら、Immunol. Rev., 195:160-177, 2003)。

20

【発明の概要】

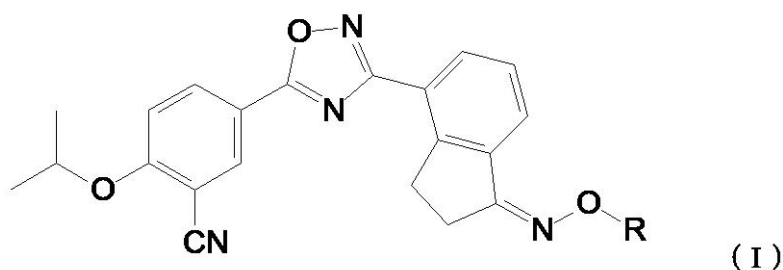
【0003】

簡単に言えば、スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体の活性化が医学的に指示されている病態を治療するための、そのモジュレーターが提供される。

30

1の実施態様において、構造式(I)：

【化1】



40

[式中、Rは下記のとおりである]

で示される、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒

50

和物が提供される。

【発明を実施するための形態】

【0004】

明細書および添付した特許請求の範囲にて使用されるような「a」、「an」および「the」なる単数形は、文脈が明らかに他の指示をする場合を除いて、複数の形態を包含する。さらには、「含む」、「包含する」および「有する」なる語は、本明細書で 사용되는場合に、制約のない用語であり、付加的な要素または構成要素の存在を排除するものではない。

【0005】

本発明は、S1P受容体をモジュレートする化合物、ならびにそれらの化合物を製造および使用するための関連する生成物および方法と関連付けられる。S1P受容体は5つの亜型（すなわち、S1P₁、S1P₂、S1P₃、S1P₄およびS1P₅）に分けられ、その亜型は多種多様な組織において発現し、異なる細胞特異性を呈する。本明細書にて開示される化合物は1または複数のこれらの亜型をモジュレートする。1の実施態様において、該化合物は、スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体の亜型1をモジュレートするために、「S1P₁」モジュレーターである。もう一つ別の実施態様において、該化合物は、亜型1と、亜型5などのもう一つ別の亜型とをモジュレートする。本明細書にて使用される場合、「S1P₁モジュレーター」は、S1P₁亜型だけをモジュレートするか、S1P₁亜型、ならびに1または複数の他の亜型をモジュレートする化合物を包含すると理解される。1の実施態様において、S1P₁モジュレーターはS1P₁亜型およびS1P₅亜型の両方をモジュレートする。

【0006】

本明細書にて使用される場合、S1P₁受容体の「モジュレーター」とは、対象に投与されると、該化合物が受容体それ自体に直接作用するか、または化合物の代謝物が受容体に作用するかのいずれかで、標的とする受容体との望ましいインテグレーションを提供する、化合物である。対象に投与されると、本発明の化合物は、S1P₁受容体をシグナル伝達のために活性化することで、該受容体をモジュレートする。かかる化合物はまた、本明細書にて、「アゴニスト」または「S1P₁アゴニスト」とも称される。かかるS1P₁アゴニストはS1P₁に対する作用に選択的であり得る。例えば、S1P₁に対する作用に選択的な化合物は、S1P受容体ファミリーの他の亜型に対するよりも、S1P₁に対してより低い濃度で作用する。

【0007】

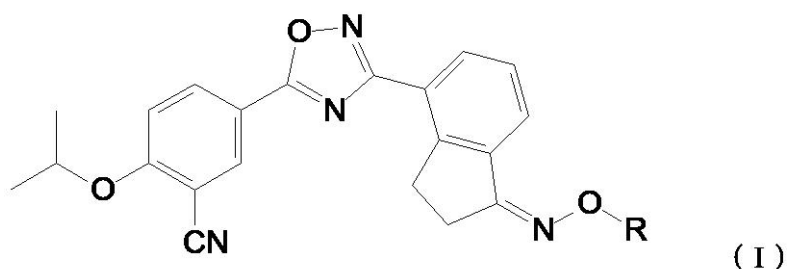
受容体アゴニストは、オルトステリックまたはアロステリックのいずれかに分類することができ、本発明のS1P₁アゴニストは、該化合物が受容体に作用するか、該化合物の代謝物が該受容体に作用するかのいずれかで両方の分類を包含する。特定の実施態様において、本発明の化合物はオルトステリックアゴニストである。オルトステリックアゴニストは、天然のリガンドの結合と有意に重なる、受容体での部位に結合し、天然のリガンドと受容体との鍵となる相互作用を再現する。オルトステリックアゴニストは天然のリガンドの分子機構と同様の分子機構によって受容体を活性化し、天然のリガンドと競合し、天然のリガンドについて競合的なアンタゴニストである薬理剤と競合的に拮抗するであろう。

【0008】

特定の他の実施態様において、本発明の化合物はアロステリックアゴニストである。アロステリックアゴニストは、天然のリガンドと部分的または全体的にも重ならない、ある程度有意な相互作用をもたらす、受容体の部位に結合する。アロステリックアゴニストは真のアゴニストであり、アロステリック増強剤ではない。結果として、アロステリックアゴニストは受容体のシグナル伝達だけを活性化し、天然のリガンドの最大下濃度を必要としない。アロステリックアゴニストは、オルトステリックリガンドと競合することが知られているアンタゴニストが非競合的な拮抗作用を示す場合に、同定され得る。アロステリックアゴニスト部位は受容体の変異形成によってもマッピングされ得る。

【0009】

1の実施態様において、構造式(I)：
【化2】



【式中：

Rは、

アルキル；

アルカンジイル-NR¹R²；

アルカンジイル-C(=O)OR¹；または

ヘテロシクリルアルキルであり；

R¹およびR²は、独立して、HまたはC₁-4アルキルである]

で示される、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物が提供される。

【0010】

式(I)にて使用される場合に、次の用語は以下の意義を有する。

「アルカンジイル」は、アルキル基から1個の水素原子を除去することで誘導されるメチレン(-CH₂-)などの二価の基を意味する。従って、本明細書で規定されるいずれのアルキル基も、1個の水素原子を除去し、二価の基とすることにより、アルカンジイルを構成する。

【0011】

「アルキル」は、直鎖、分岐鎖または環状アルキル基(シクロアルキル)の飽和であって、1ないし約20個の炭素原子を有し(C₁-20アルキル)、シクロアルキルの場合には3~20個の炭素原子を有する、アルキル基を意味する。アルキルは、典型的には、1ないし12個の炭素原子(C₁-12アルキル)で構成されるか、ある実施態様では、1ないし8個の炭素原子(C₁-8アルキル)で構成されるか、ある実施態様では、1ないし4個の炭素原子(C₁-4アルキル)で構成されるか、またはある実施態様では、1ないし3個の炭素原子(C₁-3アルキル)で構成される。直鎖アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、およびn-オクチル基が含まれるが、これらに限定されない。分岐アルキル基の例には、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ネオペンチル、イソペンチル、および2,2-ジメチルプロピル基が含まれるが、これらに限定されない。シクロアルキルの例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、シクロアルキル基は3ないし8個の環員を有し、それに対して他の実施態様では、環炭素原子の数は、3ないし5個、3ないし6個、または3ないし7個の範囲にある。シクロアルキル基は、さらには、限定されないが、ノルボルニル、アダマンチル、ボルニル、カンフェニル、イソカンフェニル、およびカレニル基などの多環式シクロアルキル基、および限定されないが、デカリニル等などの縮合環を包含する。

【0012】

「アルケニル」は、上記した直鎖、分岐または環状アルキル基を意味し、ここで2個の炭素原子の間に少なくとも1個の二重結合が存在する。かくして、アルケニル基は2ないし約20個の炭素原子を、典型的には2ないし12個の炭素原子、またはいくつかの実施態様においては、2ないし8個の炭素原子を有する。例として、限定されないが、CH=

$\text{CH}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ 、 $\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ 、ビニル、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、シクロヘキサジエニル、ブタジエニル、ペンタジエニル、およびヘキサジエニル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0013】

「アルキニル」は、上記した直鎖、分岐または環状アルキル基を意味し、ここで2個の炭素原子の間に少なくとも1個の三重結合が存在する。かくして、アルキニル基は2ないし約20個の炭素原子を、典型的には2ないし12個の炭素原子、またはいくつかの実施態様においては、2ないし8個の炭素原子を有する。例として、限定されないが、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_3)$ 、および $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 等が挙げられる。

10

【0014】

「ヘテロシクリル」は、3個またはそれ以上の環員を含有し、その中の1個または複数がヘテロ原子である、芳香族（ヘテロアリール）および非芳香族環化合物を意味する。いくつかの実施態様において、ヘテロシクリルは3ないし20個の環員を含み、一方で他のそのような基は3ないし15個の環員を有する。少なくとも1個の環はヘテロ原子を含有するが、多環系におけるすべての環がヘテロ原子を含有する必要はない。例えば、ジオキサニル環およびベンズジオキサニル環系（メチレンジオキシフェニル環系）は、共に本明細書でいうところのヘテロシクリル基である。 $\text{C}2$ -ヘテロシクリルと称されるヘテロシクリル基は、2個の炭素原子と3個のヘテロ原子を有する5員環、2個の炭素原子と4個のヘテロ原子を有する6員環等とすることができる。同様に、 $\text{C}4$ -ヘテロシクリルは、1個のヘテロ原子を有する5員環、2個のヘテロ原子を有する6員環等とすることができる。炭素原子の数とヘテロ原子の数の和が、合計で環原子の総数と等しくなる。飽和ヘテロ環式環とは、不飽和の炭素原子を含有しないヘテロ環式環をいう。ヘテロ環式環には、芳香族基と非芳香族基の縮合した環種を含む、縮合環種が含まれる。それらはまた、キヌクリジルなどのヘテロ原子を含有する多環式環系を包含するが、これに限定されない。

20

【0015】

代表的なヘテロシクリルとして、ピロリジニル、フラニル、テトラヒドロフラニル、ジオキサニル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、ピリジニル、チオフェニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾフラニル、ジヒドロベンゾフラニル、インドリル、ジヒドロインドリル、アザインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、アザベンズイミダゾリル、ベンズオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、イミダゾピリジニル、イソキサゾロピリジニル、チアナフタレニル、プリニル、キサンチニル、アデニニル、グアニニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、キノキサリニル、およびキナゾリニル基が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0016】

「ヘテロシクリルアルキル」は、アルキル基の水素または炭素結合が、上記したヘテロシクリル基との結合と置き換えられている、上記したアルキル基を意味する。

40

「ヘテロアリール」は、5個またはそれ以上の環員を含有し、その中の1個または複数がヘテロ原子である、芳香族ヘテロシクリルを意味する。 $\text{C}2$ -ヘテロアリールと称されるヘテロアリール基は、2個の炭素原子と3個のヘテロ原子を有する5員環、2個の炭素原子と4個のヘテロ原子を有する6員環等とすることができる。同様に、 $\text{C}4$ -ヘテロアリールは、1個のヘテロ原子を有する5員環、2個のヘテロ原子を有する6員環等とすることができる。炭素原子の数とヘテロ原子の数の和が、合計で環原子の総数と等しくなる。

【0017】

代表的なヘテロアリールとして、ピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、ピリジニル、チオフェニル、ベンゾチオ

50

フェニル、ベンゾフラニル、インドリル、アザインドリル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、アザベンズイミダゾリル、ベンズオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、イミダゾピリジニル、イソキサゾロピリジニル、チアナフタレニル、プリニル、キサンチニル、アデニニル、グアニニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、キノキサリニル、およびキナゾリニル基が挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロアリールにはまた、少なくとも1個の環（必ずしもすべての環である必要はない）が芳香族である場合に、例えば、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、インドリルおよび2,3-ジヒドロインドリルを含む、縮合環化合物が含まれる。

「ヘテロアリールアルキル」は、アルキル基の水素または炭素結合が上記したヘテロアリール基への結合と置き換えられている、上記したアルキル基を意味する。

【0018】

1の実施態様において、式(I)の構造を有する化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物であって、ここでRがアルキルであり、さらに具体的な実施態様において、アルキルがメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチルまたはtert-ブチルである、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物が提供される。

1の実施態様において、式(I)の構造を有する化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物であって、ここでRがアルカンジイル- NR^1R^2 であり、 R^1 および R^2 が独立してHまたは C_{1-4} アルキルである、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物が提供される。

【0019】

1の実施態様において、式(I)の構造を有する化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物であって、ここでRがアルカンジイル-C(=O)OR¹であり、 R^1 がHまたは C_{1-4} アルキルである、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物が提供される。

1の実施態様において、式(I)の構造を有する化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物であって、ここでRがヘテロシクリルアルキルであり、ヘテロシクリルアルキルが $-(\text{CH}_2)_{1-3}$ ヘテロサイクルであり、ヘテロサイクルが上記されるとおりである、化合物、あるいはその医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物が提供される。

【0020】

式(I)の代表的な化合物を表1に列挙する。

表1

10

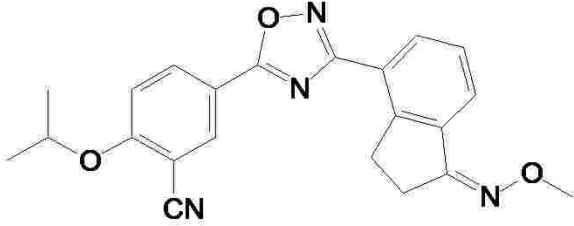
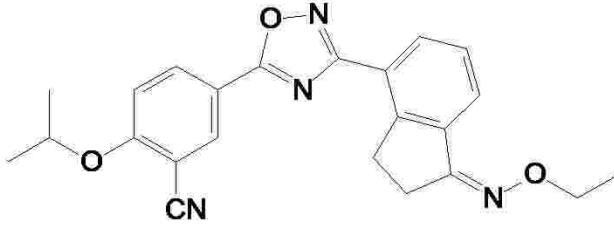
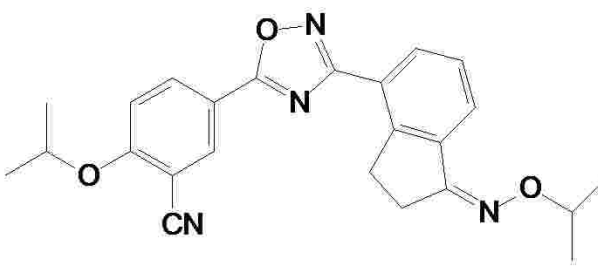
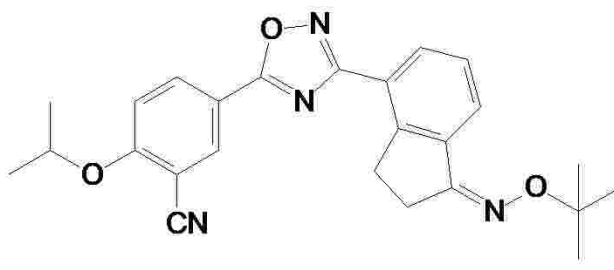
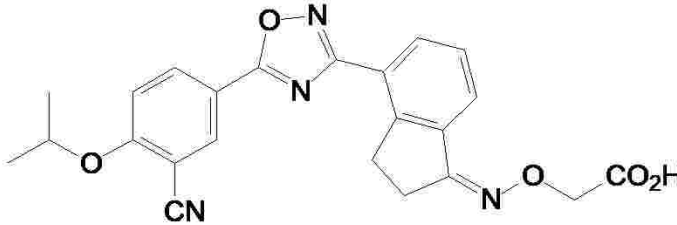
20

30

40

50

【表 1】

化合物番号	構造
2	
3	
4	
5	
6	

10

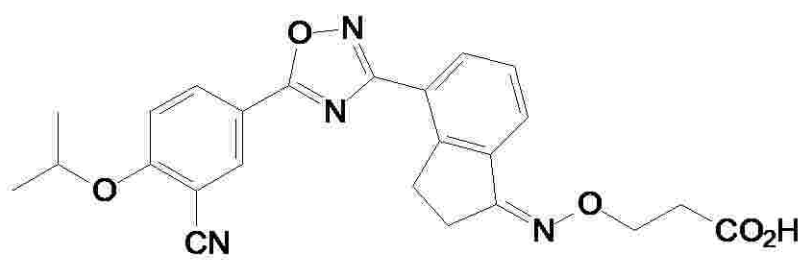
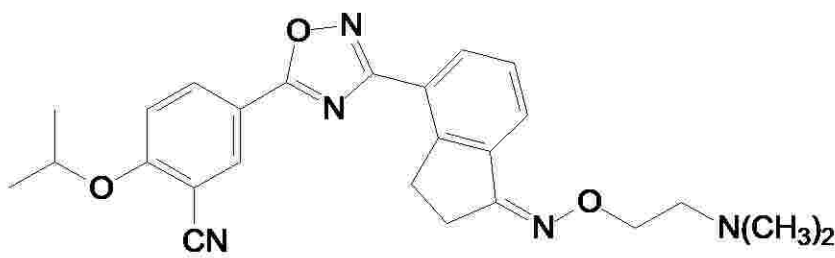
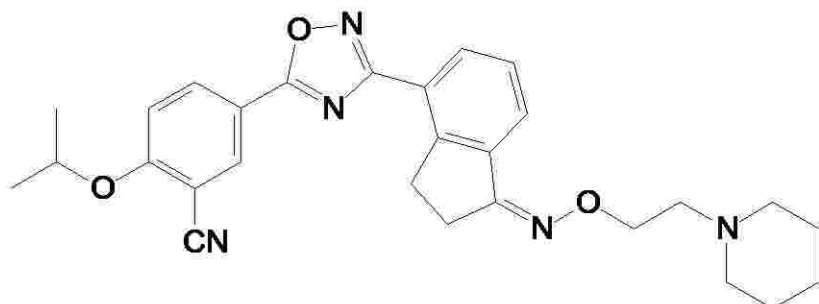
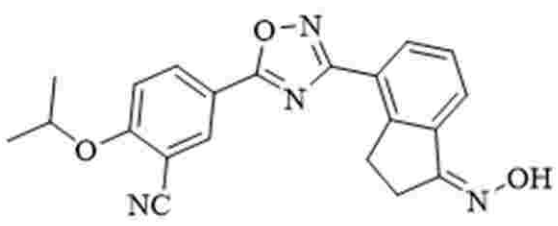
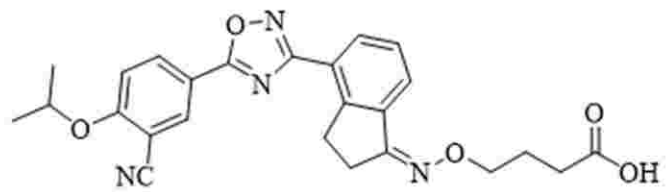
20

30

40

50

【表 2】

7	
8	
9	
10	
11	

10

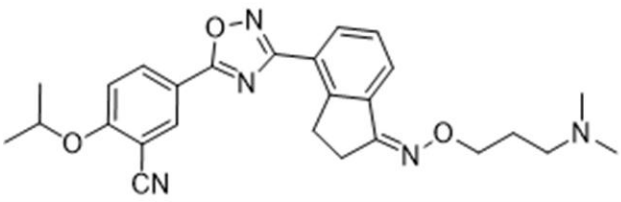
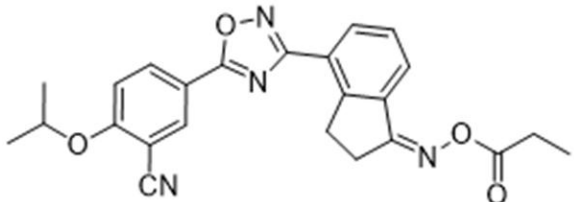
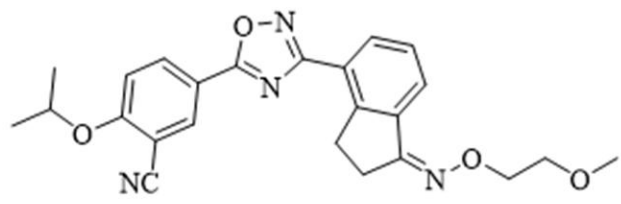
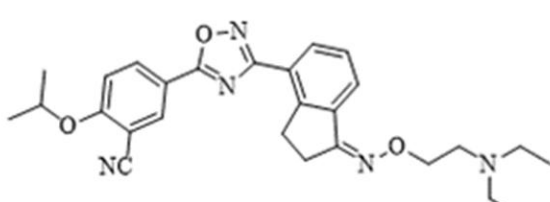
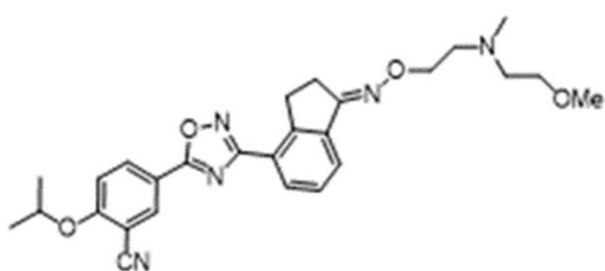
20

30

40

50

【表 3】

12	
13	
14	
15	
16	

10

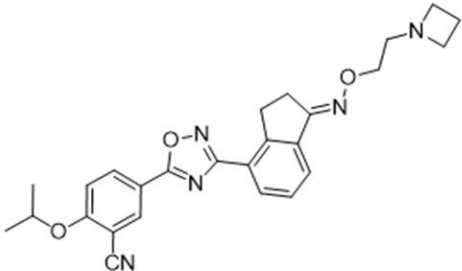
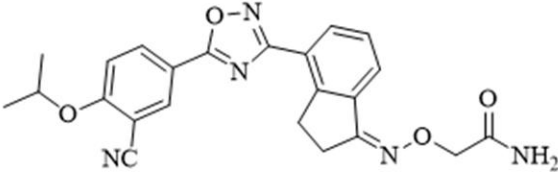
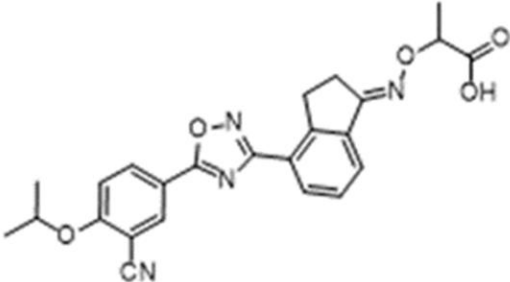
20

30

40

50

【表 4】

17	
18	
19	

【0021】

上記されるように、構造式（I）で示される化合物はまた、その医薬的に許容される塩、ホモログ、水和物または溶媒和物を包含する。

【0022】

当該分野において周知であるように、「塩」は、例えば、カルボン酸、スルホン酸またはアミンがイオン形態で対イオンと組み合わせさせた有機化合物を包含する。例えば、そのアニオン形態の酸は、金属カチオン、例えば、ナトリウム、カリウム等などのカチオンと塩を形成することができ、例えば NH_4^+ または種々のアミンのカチオンとアンモニウム塩（テトラメチルアンモニウムなどのテトラアルキルアンモニウム塩、およびトロメタナミン塩などのアルキルアンモニウム塩を含む）、または他のカチオン、例えばトリメチルスルホニウム等の他のカチオンと塩を形成し得る。「医薬的に許容される」または「薬理的に許容される」塩は、塩化物塩またはナトリウム塩などのヒトでの摂取が承認され、一般的に非毒性である、イオンから形成される塩である。「双性イオン」は、少なくとも2個のイオン化可能な基を有し、一方がアニオンを、他方がカチオンを形成し、それらが相互にバランスを取るのに供する、分子中にて形成され得るような内部塩である。例えば、グリシンなどのアミノ酸は双性イオンの形態で存在し得る。「双性イオン」は本明細書にて意図する範囲内にある塩である。本開示の化合物は塩の形態を取ってもよい。「塩」なる語は、本開示の化合物である、遊離酸または遊離塩基の付加塩を包含する。塩は「医薬的に許容される塩」であり得る。「医薬的に許容される塩」なる語は、医薬用途において有用性をもたらす範囲内で毒性プロファイルを有する塩をいう。医薬的に許容されない塩は、それにもかかわらず、本開示の化合物の合成、精製または製剤化の工程において例えば有用性があるなどの、本開示を実施するにおいて有用性を有する結晶性の高さなどの特性のある可能性がある。

【0023】

適切な医薬的に許容される酸付加塩は、無機酸から、または有機酸から製造され得る。無機酸の例には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸、およびリン酸が含まれる。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、芳香脂肪族、ヘテロ環式、カルボン酸またはスルホン酸クラスの有機酸より選択され得、その例として、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、β-ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクトール酸、およびガラクトン酸が挙げられる。医薬的に許容されない酸付加塩の例には、例えば、過塩素酸塩およびテトラフルオロホウ酸塩が含まれる。

10

【0024】

本開示の化合物の適切な医薬的に許容される塩基付加塩には、例えば、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムおよび亜鉛の塩などの、アルカリ金属、アルカリ土類金属および遷移金属の塩を含む、例えば、金属塩が含まれる。医薬的に許容される塩基付加塩はまた、例えば、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N-メチルグルカミン）およびプロカインなどの塩基性アミンから製造される有機塩を包含する。医薬的に許容されない塩基付加塩の例として、リチウム塩およびシアン酸塩が挙げられる。医薬的に許容されない塩は、一般には、医薬品として有用ではないが、かかる塩は、例えば、化合物を合成する際の間体として、例えば再結晶によりそれらを精製する際に有用である可能性がある。これらの塩はすべて、例えば、適切な酸または塩基を対応する化合物と反応させることにより、該化合物より通常の手段によって製造され得る。「医薬的に許容される塩」なる語は、非毒性の無機または有機酸および／または塩基付加塩をいう。例えば、Gouldら、Salt Selection for Basic Drugs (1986), Int. J. Pharm., 33, 201-217（出典明示により本明細書に組み込む）を参照のこと。

20

【0025】

本開示の可能性のある塩の非限定的な例としては、塩酸塩、クエン酸塩、グリコール酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、メシル酸塩、エタンスルホン酸塩、ケイ皮酸塩、イセチオン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、硝酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、コハク酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、ジクロロ酢酸塩、乳酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、パルミチン酸塩、ピドロ酸塩、パモ酸塩、サリチル酸、4-アミノサリチル酸塩、安息香酸塩、4-アセトアミド安息香酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、グリコレート、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、ベシル酸塩、カンファー酸塩、カンファースルホン酸塩、カンシル酸塩、カプリン酸、カプロン酸塩、サイクラミン酸塩、ラウリル硫酸塩、エジシル酸塩、ゲンチジン酸塩、ガラクトール酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、オキシグルタル酸塩、馬尿酸塩、ラクチオン酸塩、マロン酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、ナブシレート、ナバジシル酸塩、シュウ酸塩、オレイン酸塩、セバシン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、チオシアン酸塩、ウンデシレン酸塩、およびキシナホ酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0026】

本開示の化合物の「ホモログ」は、該化合物の1または複数の原子がかかる原子の同位体によって置き換えられている、化合物である。例えば、ホモログは、式I-RおよびI-Sのイソプロポキシ部分のメチル基が完全にまたは部分的に重水素化されている（例えば、(D₃C)₂CHO-）、本開示の化合物などの該化合物の1または複数の水素原子に代わって重水素が用いられる化合物を包含する。本開示のホモログを形成するのに行われ得る同位体置換には、重水素および炭素13などの非放射性（安定）原子、ならびに三

50

重水素、炭素 14、ヨウ素 123、ヨウ素 125 等などの放射性（不安定）原子が含まれる。

【0027】

「水和物」とは、組成物中に水分子と一緒に存在する、化合物である。組成物は、一水和物または二水和物などの化学量論量の水を含むことができ、あるいはランダムな量の水を含むことができる。該用語が本明細書にて用いられる場合、「水和物」は固体形態をいい、すなわち、水溶液中の化合物は、それは水和されているかもしれないが、その用語は本明細書にて用いる場合の水和物ではない。

【0028】

「溶媒和物」は、水が水以外の溶媒と置き換えられることを除いて、同様の組成物である。例えば、メタノールまたはエタノールは「アルコール」を形成することができ、それは再び化学量論的または非化学量論的とすることもできる。該用語が本明細書にて使用される場合、「溶媒和物」は固体形態をいい、すなわち、化合物の溶媒中溶液は、それは溶媒和されているかもしれないが、その用語は本明細書にて用いる場合の溶媒和物ではない。

本明細書において開示される化合物は、当業者に公知の技法により、ならびに以下の実施例において開示される操作によって製造され得る。

【0029】

実施例

合成の一般的方法

^1H NMR (400 MHz) および ^{13}C NMR (100 MHz) は、重水素クロロホルム (CDCl_3)、重水素メタノール (CD_3OD) またはジメチルスルホキシド- D_6 (DMSO) の溶液にて得られた。NMR スペクトルは、Mestrec 5.3.0 および 6.0.1 を用いて処理された。 ^{13}C NMR ピークのうち、括弧で囲まれたものは、同じ炭素の 2 つの回転異性体である。質量分析 (LCMS) は、Thompson OD S-A、100 A、5 μ (50 x 4.6 mm) カラムを備えた Agilent 1100 / 6110 HPLC システムを用い、移動相 A として水 + 0.1 % ギ酸を、移動相 B としてアセトニトリル + 0.1 % ギ酸を使用して得られた。勾配は、2.5 分間にわたって移動相 B で 20 ~ 100 % とし、ついで 100 % で 2.5 分間保持する。流速は 1 mL / 分であった。疎水性がより高い化合物の場合、方法 1 (0.5 分間にわたって 40 ~ 95 % とし、95 % で 8.5 分間保持し、次に 2 分間にわたって 40 % に戻し、流速を 1 mL / 分とする) と称される、次の勾配を用いた。最終化合物は、方法 2 (5 % で 1 分間、9 分間にわたって 5 ~ 95 % とし、ついで 95 % で 5 分間保持し、流速を 1 mL / 分とする) を用いて純度をチェックした。エナンチオマー過剰率は、Chiralpak AD-H、250 x 4.6 mm カラム、5 μ m 粒径で分離したピークをインテグレーションに付すことで測定された。流速は 1 mL / 分、移動相はアイソクラティックとした。特記されない限り、提供されるキラルデータはこの方法を用いる。別法として、キラル分離は、キラル方法 1、キラル方法 2 と称される、次の条件の下で行われた：キラル方法 1 (Chiralpak AY-H、250 x 4.6 mm カラム、5 μ m 粒径；流速：1 mL / 分、および移動相：アイソクラティック)、およびキラル方法 2 (Chiralcel OZ-3、250 x 4.6、3 μ m 粒径、流速：0.75 mL / 分)。操作に使用されるピリジン、ジクロロメタン (DCM)、テトラヒドロフラン (THF) およびトルエンは、窒素 (N_2) 下で貯蔵されていた Aldrich Sure-Seal 瓶からのものであった。反応はすべて磁気で攪拌され、温度は外部反応温度である。Redisep (Teledyne Isco) シリカゲル (SiO_2) カラムを備えた Combiflash Rf フラッシュ精製システム (Teledyne Isco) を用いてクロマトグラフィー操作を行った。分取性 HPLC 精製は、移動相 A として 0.05 % トリフルオロ酢酸を含有する水、および移動相 B として 0.05 % トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリルを用いて、Varian ProStar / PrepStar システムで行われた。勾配は、2.2 mL / 分の流速で、12 分間にわたって移動相 B で 10 ~ 80 % とし、次に 80 % で 2 分間にわたって保持し、次に 2 分間にわたって 10 % に戻した。この操作と同様の他の方法も利用され得る。Varian Prostar フラクション収集装置を用いてフラクシ

10

20

30

40

50

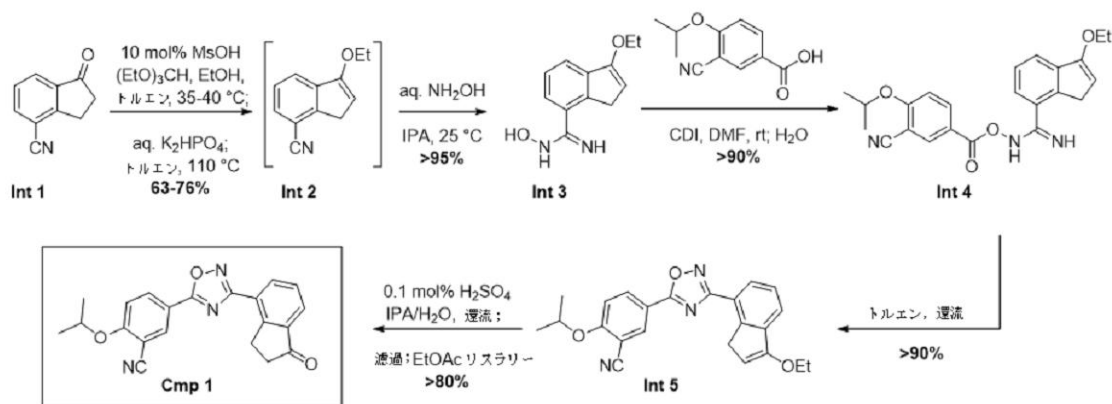
オンを集め、Savant SpeedVac Plus真空ポンプを用いて蒸発させた。Biotageマイクロ波容器を備えたBiotage Initiatorマイクロ波反応装置を用いて、マイクロ波加熱を行った。以下の略語：エタノール（EtOH）、カルボニルジイミダゾール（CDI）、イソプロパノール（IPA）および4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）を用いた。

【0030】

実施例1

化合物番号1の合成

【化3】



【0031】

工程1：3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボニトリル（中間体2）の合成：

1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-カルボニトリル（中間体1）（20.0 g、98 wt%、18.6 g アッセイ、124.8 ミリモル）／無水 EtOH（20 mL）、トリエチルオルトホルメート（80 mL、481 ミリモル）およびメタンスルホン酸（0.88 mL、12.5 ミリモル）／トルエン（80 mL）の攪拌した混合物を43-47 °Cで加熱した。1時間後、GC分析によって、オルトホルメートが消費され、12.8 面積%の中間体1が残っていることがわかった。トリエチルオルトホルメート（20 mL、120.2 ミリモル）のさらなる充填がなされ、45分後に、GC分析は1.5 面積%の中間体1の存在を示した。バッチを外界温度に冷却し、ついで激しく攪拌し、そしてクエンチ温度を<15 °Cに維持しながら、1 M水性K₂HPO₄（200 mL）に注いだ。二相混合物を10分間にわたって激しく攪拌した。相を分離し、水相（pH 11）をトルエン（100 mL）で逆抽出した。有機相を合わせ、大気圧で蒸留し、340 mLの留出液を除去した。トルエン（500 mL）を加え、大気圧で蒸留し、500 mLの留出液を除去した。蒸留時間はすべてで3時間、温度範囲は80-120 °Cであった。この時点で、バッチを<5 °Cで一晩貯蔵した。減圧下、蒸留が止むまで酢酸エチル（100 mL）でチェイスすることにより過剰量のオルトホルメートを除去した。

もう一つ別の容量の酢酸エチル（100 mL）を加え、ついで蒸留が止むまで減圧下で濃縮した。第3の容量の酢酸エチル（100 mL）を加え、ついで蒸留が止むまで減圧下で濃縮し、その後でGC分析によって、オルトホルメートが残っていないことを確認した。次に粗製物を110 °Cで1時間攪拌し、その中間体のケタールを3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボニトリル（中間体2）に変換した。冷却した後、該粗製物（流動油、21.34 g）を、内部標体としてメシチレンを利用する¹H NMRによって中間体2についてアッセイした。該油は78.1 wt%生成物=16.73 g アッセイ、90.0 ミリモル=72.1%収率アッセイであるとアッセイされた。次に該粗製物をシリカゲルプラグを介する濾過に付し、15% EtOAc／ヘキサンで溶出して精製した。純粋なフラクションを合わせ、次の工程に利用した。¹H NMR（400 MHz、d₆-DMSO）δ 7.78（d、J=8.4、1H）、7.63（m、1H）、7.49（m、1H）、5.60（m、1H）、1.38（t、J=6.8 Hz、1H）、1.19（t、J=6.8 Hz、1H）；LRMS：C₁₂H₁₂NO⁺として、計算値[M+H]：186.2；測定値：18

6.2

【0032】

工程2：中間体3の合成：

3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボニトリル（中間体2）のEtOAc／ヘキサン溶液（650 mL）を減圧下で約17 mLに濃縮し、イソプロピルアルコール（IPA、40 mL）を加えた。該溶液を約17 mLに濃縮し、第2の容量のIPA（34 mL）を添加した。この攪拌した溶液に、水性ヒドロキシルアミン（50%、30 mL、455 ミリモル）を添加した。次にバッチを35-40℃で5時間にわたって加温に付し、ついで外界温度で一夜にわたって攪拌した。該バッチを0℃に冷却し、播種（50 mg）に供し、発生させるのに種床を30分間攪拌した。次に水（250 mL）を約1.5時間にわたって滴下して加えた。該バッチを0-20℃で1時間攪拌した。生成物を濾過で単離し、ケーキを水（100 mL）で洗浄し、フィルター上にて真空および窒素雰囲気下で乾燥させ、3-エトキシ-N-ヒドロキシ-1H-インデン-7-カルボキシイミダミド（中間体3）（20.8 g、収率90%）を得た。¹H NMR（400 MHz、d₆-DMSO） δ 9.61（s, 1H）、7.43（m, 1H）、7.32（m, 2H）、5.77（s, 1H）、5.41（s, 1H）、4.08（q, J=6.8 Hz, 2H）、3.45（s, 2H）、1.39（t, J=6.8 Hz, 3H）；LRMS：C₁₂H₁₅N₂O₂⁺として計算値[M+H]：219.2；測定値：219.1

10

【0033】

工程3：N-（（3-シアノ-4-イソプロポキシベンゾイル）オキシ）-3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボキシイミダミド（中間体4）：

20

CDI（16.64 g、102.6 ミリモル）および3-シアノ-4-イソプロポキシ安息香酸（21.06 g、102.6 ミリモル）のDMF（83 mL）中混合物を20℃で1時間攪拌した。3-エトキシ-N-ヒドロキシ-1H-インデン-7-カルボキシイミダミド（中間体3）（20.8 g、93.3 ミリモル）のDMF（40 mL）中溶液を滴下漏斗を介して約5分間にわたって添加した。約30分後、バッチは粘性を増し、攪拌を助けるために、さらなる容量のDMF（40 mL）を添加した。この時点で、HPLCアッセイは反応が完了していることを示した。得られたスラリーを水（1.5 L）で希釈し、0℃に冷却し、濾過で単離した。濾過ケーキを水（1.5 L）で洗浄し、その生成物を窒素流の下でフィルター上で乾燥させ、N-（（3-シアノ-4-イソプロポキシベンゾイル）オキシ）-3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボキシイミダミド（中間体4）をオフホワイト色の固体（34.8 g、収率90%）として得た。¹H NMR（400 MHz、d₆-DMSO） δ 8.70（s, 1H）、8.33（d, J=6.8 Hz, 1H）、7.45（m, 4H）、7.10（m, 2H）、5.49（s, 1H）、4.94（m, 1H）、4.10（q, J=6.8 Hz, 2H）、3.55（s, 2H）、1.38（m, 9H）；LRMS：C₂₃H₂₄N₃O₄⁺として計算値[M+H]：406.4；測定値：406.2

30

【0034】

工程4：5-（3-（3-エトキシ-1H-インデン-7-イル）-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル）-2-イソプロポキシベンゾニトリル（中間体5）の合成

N-（（3-シアノ-4-イソプロポキシベンゾイル）オキシ）-3-エトキシ-1H-インデン-7-カルボキシイミダミド（中間体4）（34.8 g、83.97 ミリモル）をトルエン（590 mL）に懸濁させ、Dean-Stark装置で18時間にわたって加熱して還流させた。約2 mLを集めた（理論上は1.5 mL）。バッチを外界温度に冷却し、セライトを通して濾過し、真空下で濃縮した。粗製固体の5-（3-（3-エトキシ-1H-インデン-7-イル）-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル）-2-イソプロポキシベンゾニトリル（中間体5）（30 g、収率90%）を次の工程にそのまま適用する。LRMS：C₂₃H₂₂N₃O₃⁺として、計算値[M+H]：388.4；測定値：388.3

40

【0035】

工程5：2-イソプロポキシ-5-（3-（1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル）-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル）ベンゾニトリル（化合物番号

50

1) の合成:

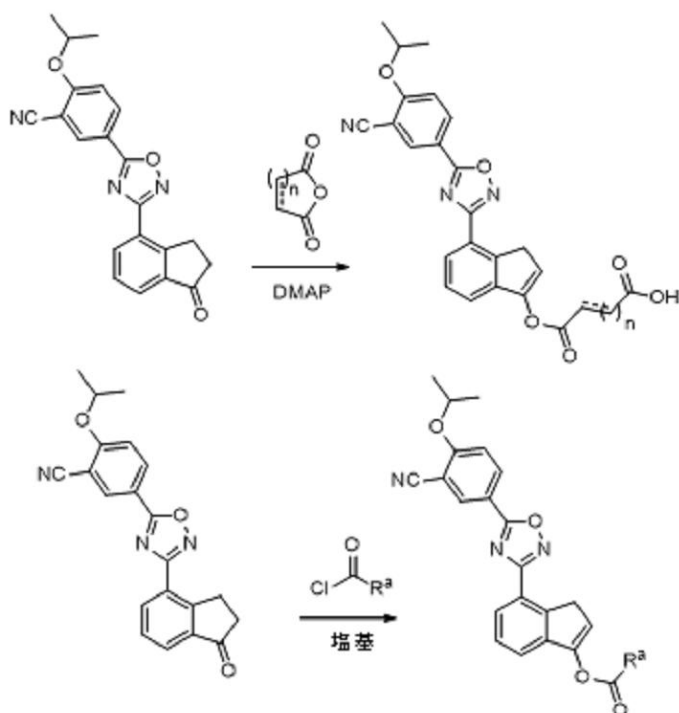
中間体 5 (30 g、75.57 ミリモル) を IPA/H₂O (4:1) (300 mL) に懸濁させる。触媒作用の H₂SO₄ (0.1 mL、0.19 ミリモル) を加え、得られた混合物を 12 時間にわたって加熱して還流させる。スラリーを外界温度に冷却し、1 時間攪拌する。生成物を濾過で単離し、IPA/H₂O (4:1) (100 mL) で洗浄する。真空下にてフィルター上で 1 時間乾燥させた後、その湿ったケーキを反応器に戻し、EtOAc (300 mL) に懸濁させる。該混合物を 3 時間にわたって加熱して還流させ、次に外界温度に冷却し、1 時間攪拌する。スラリーを濾過し、EtOAc (100 mL) で洗浄し、窒素下にてフィルター上で乾燥させ、2-イソプロポキシ-5-(3-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル (化合物番号 1) (22 g、収率 80%) をオフホワイト色の固体として得る。¹H NMR (400 MHz、d₆-DMSO) δ 8.55 (d, J=2.0 Hz, 1H)、8.44 (m, 2H)、7.88 (d, J=7.6 Hz, 1H)、7.69 (t, J=7.6 Hz, 1H)、7.57 (d, J=9.2 Hz, 1H)、4.99 (h, J=12.4 Hz, 1H)、3.46 (dd, J₁=5.6、J₂=11.2 Hz, 2H)、2.76 (dd, J₁=5.6、J₂=11.2 Hz, 2H)、1.45 (d, J=12.4 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz、d₆-DMSO) δ 205.9、173.4、167.4、162.6、154.2、138.1、134.7、134.2、133.9、128.2、125.9、124.5、115.8、115.3、114.9、102.5、72.6、35.9、27.3、21.5; LRMS: C₂₁H₁₈N₃O₃⁺として、計算値 [M+H]: 360.1; 測定値: 360.2; CHN分析: 測定値: %C: 70.25、%H: 4.69; %N: 11.71; 理論値: %C: 70.18; %H: 4.77; %N: 11.69

【0036】

実施例 2

式 (I) の化合物の一般合成

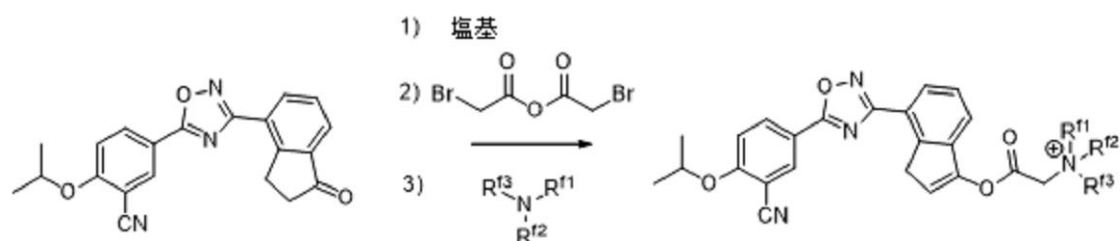
【化 4】



式 (I) の化合物は化合物 1 (実施例 1) から出発して合成され得る。DMAP のような触媒の存在下で環状酸無水物で処理し、式 (I) の化合物を得る。さらには、式 (I) の化合物の生成は、化合物 1 を強塩基で処理し、つづいて酸塩化物でトラップすることにより達成され得る。

【0037】

【化5】



10

式(I)の化合物はまた、化合物1(実施例1)から出発して、強塩基で処理し、つづいて2-ハロ無水酢酸でトラップし、対応するアルファハロエステルを第3アミンでアミノ化することにより合成され得る(ここで、上記したスキームでの R^{f1} 、 R^{f2} および R^{f3} は C_{1-4} アルキルなどのアルキルを意味する)。

【0038】

実施例3

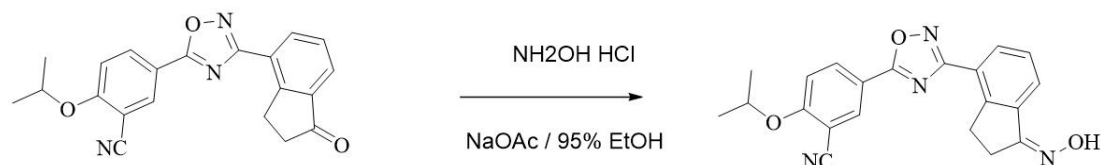
化合物10

((Z)-5-(3-(1-(ヒドロキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル)

20

の合成

【化6】



2-イソプロポキシ-5-(3-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル(100mg、0.28ミリモル)をDCM(8ml)に完全に溶かし、95%EtOH(4ml)、NH₂OH(43mg、0.61ミリモル)およびNaOAc(52mg、0.61ミリモル)を室温で添加した。反応の進行をHPLCでモニター観察した。反応が完了した後(一夜)、沈殿物を集め、DCM(5ml x 2)で洗浄し、純粋な生成物：((Z)-5-(3-(1-(ヒドロキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル(60mg、0.16ミリモル、57%)を得た。¹H NMR(400MHz、DMSO-d₆) δ ppm 1.40(d, J=8Hz, 6H)、2.90(m, 2H)、3.39(m, 2H)、4.99(m, 1H)、7.56(m, 2H)、7.80(d, J=8Hz, 1H)、8.14(d, J=8Hz, 1H)、8.42(d, J=8Hz, 1H)、8.54(s, 1H)、11.1(s, 1H); C₂₁H₁₈N₄O₃として、ESI-MS 測定値:m/z 375.3(M+1)

30

40

【0039】

実施例4

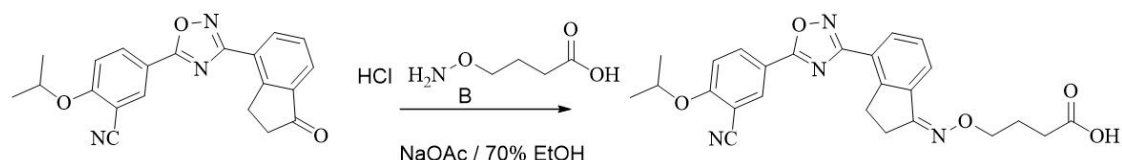
化合物11

((Z)-4-(((4-(5-(3-シアノ-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル)イデン)アミノ)オキシ)ブタン酸)

の合成

50

【化 7】



2-イソプロポキシ-5-(3-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル(100mg、0.28ミリモル)をDCM(8ml)に完全に溶かし、70% EtOH(4ml)、4-(アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩(95mg、0.61ミリモル)およびNaOAc(68mg、0.61ミリモル)を室温で添加した。反応の進行をHPLCでモニター観察に付した。反応物を室温で48時間攪拌し、30%の変換を達成した。溶媒を除去し、精製のためにISCOに直接ロードした。しかしながら、分離されなかった；それでRP ISCO [5-95% MeOH (0.05% AcOHを含有する) / 水] に付して再び精製し、所望の生成物：(Z)-4-(5-(3-(1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イル)アミノ)オキシ)ブタン酸(19mg、0.041ミリモル、15%)を得た。¹H NMR(400MHz、DMSO-D₆) δ ppm 1.47(d, J=8Hz, 6H)、2.09(m, 2H)、2.54(m, 2H)、2.95(m, 2H)、3.41(m, 2H)、4.26(m, 2H)、4.80(m, 1H)、7.10(d, J=8Hz, 1H)、7.40(m, 1H)、7.83(d, J=8Hz, 1H)、8.12(d, J=8Hz, 1H)、8.34(d, J=8Hz, 1H)、8.40(s, 1H)；C₂₅H₂₄N₄O₅として、ESIMS 測定値：m/z 461.3(M+1)

【0040】

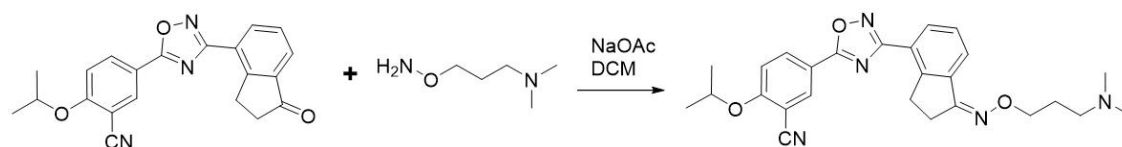
実施例 5

化合物 12

((Z)-4-(5-(3-(1-アザネイリデン)-1,3-メチル)-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン O-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)オキシム

の合成

【化 8】



((Z)-4-(5-(3-(1-アザネイリデン)-1,3-メチル)-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン O-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)オキシムが、4-(アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりに3-(アミノオキシ)-N,N-ジメチルプロパン-1-アミンを用いることを除き、実施例4において記載される操作に従って収率25%で製造された。¹H NMR(400MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.48(d, J=8Hz, 6H)、2.25(m, 2H)、2.7(s, 6H)、2.97(m, 4H)、3.45(m, 2H)、4.29(m, 2H)、4.81(m, 1H)、7.12(d, J=8Hz, 1H)、7.45(t, J=4Hz, 1H)、7.80(d, J=8Hz, 1H)、8.23(d, J=8Hz, 1H)、8.35(d, J=8Hz, 1H)、8.43(s, 1H)；C₂₆H₂₉N₅O₃として、ESIMS 測定値：m/z 460.5(M+1)

【0041】

実施例 6

化合物 13

10

20

30

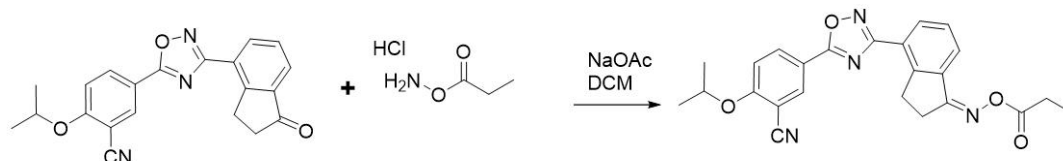
40

50

((Z) - 4 - (5 - (3 - ((1,2 - アザネイリデン) - 1,3 - メチル) - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - オン オ - プロピオニルオキシム)

の合成

【化 9】



10

(Z) - 4 - (5 - (3 - ((1,2 - アザネイリデン) - 1,3 - メチル) - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - オン オ - プロピオニルオキシムが、4 - (アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりに O - プロピオニルヒドロキシルアミン・塩酸塩を用いることを除き、実施例 4 において記載される操作に従って収率 3 % で製造された。C₂₄H₂₂N₄O₄として、E S I M S 測定値：m/z 431.5 (M+1)

【0042】

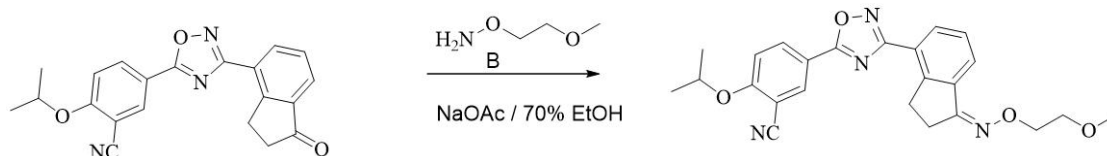
実施例 7

化合物 14

((Z) - 2 - イソプロポキシ - 5 - (3 - (1 - ((2 - メトキシエトキシ) イミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) ベンゾニトリル)

の合成

【化 10】



30

(Z) - 2 - イソプロポキシ - 5 - (3 - (1 - ((2 - メトキシエトキシ) イミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) ベンゾニトリルが、4 - (アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりに O - (2 - メトキシエチル)ヒドロキシルアミンを用いることを除き、実施例 4 において記載される操作に従って収率 7 % で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.48 (d, J = 8 Hz, 6 H)、3.0 (m, 2 H)、3.01 (s, 3 H)、3.05 (m, 2 H)、3.72 (m, 2 H)、4.37 (m, 2 H)、4.81 (m, 1 H)、7.12 (d, J = 8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J = 4 Hz, 1 H)、7.86 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.46 (s, 1 H) ; C₂₄H₂₄N₄O₄として、E S I M S 測定値：m/z 433.2 (M+1)

40

【0043】

実施例 8

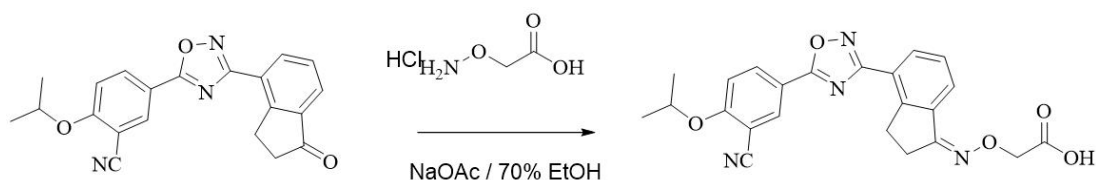
化合物 6

((Z) - 2 - ((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) アミノ) オキシ) 酢酸)

の合成

50

【化 1 1】



(Z) - 2 - ((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) アミノ) オキシ) 酢酸が、4 - (アミノオキシ) ブタン酸・塩酸塩の代わりに2 - (アミノオキシ) 酢酸・塩酸塩を用いることを除き、実施例 4 において記載される操作に従って収率 42 % で製造された。¹H NMR (400 MHz、DMSO - D₆) δ ppm 1.47 (d, J = 8 Hz, 6 H)、2.92 (m, 2 H)、3.29 (m, 2 H)、4.62 (s, 2 H)、4.80 (m, 1 H)、7.48 (m, 2 H)、7.71 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.11 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.31 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.40 (s, 1 H) ; C₂₃H₂₀N₄O₅として、ESI MS 測定値 : m/z 433.1 (M + 1)

【 0 0 4 4 】

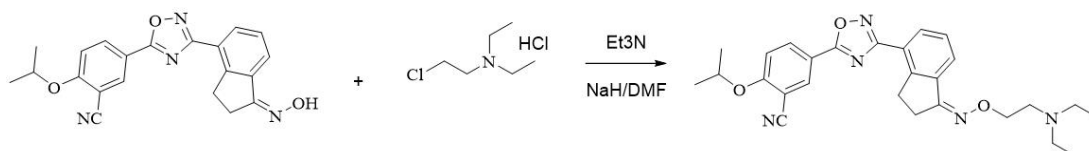
実施例 9

化合物 15

((Z) - 5 - (3 - (1 - ((2 - (ジエチルアミノ) エトキシ) イミノ) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 5 - イル) - 2 - イソプロポキシベンゾニトリル)

の合成

【化 1 2】



DMF (1.5 ml) 中の 2 - クロロ - N, N - ジエチルエタン - 1 - アミン・塩酸塩 (138 mg、0.8 ミリモル) に、Et₃N (0.112 ml、0.8 ミリモル) を添加し、室温で 10 分間攪拌した。一方で、DMF (1.5 ml) 中の (Z) - 5 - (3 - (1 - (ヒドロキシイミノ) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 5 - イル) - 2 - イソプロポキシベンゾニトリル (100 mg、0.27 ミリモル) に、NaH (32 mg、0.8 ミリモル、油中 60 %) を室温で添加し、10 分間攪拌した。次に、その最初の溶液を第 2 の溶液に室温で添加し、一夜攪拌した。反応混合物を氷水中に注ぎ、DCM (20 ml) で抽出し、その DCM 層をブラインで洗浄し、乾燥させ、濃縮し、ISCO (0 - 10 % MeOH / DCM、0.35 M NH₃ で溶出する) に付して精製し、所望の生成物 : (Z) - 5 - (3 - (1 - ((2 - (ジエチルアミノ) エトキシ) イミノ) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 5 - イル) - 2 - イソプロポキシベンゾニトリル (23 mg、0.048 ミリモル、18 %) を得た。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム - d) δ ppm 1.07 (m, 6 H)、1.47 (d, J = 8 Hz, 6 H)、2.66 (m, 4 H)、2.99 (m, 4 H)、3.42 (m, 2 H)、4.31 (m, 2 H)、4.81 (m, 1 H)、7.12 (d, J = 8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J = 4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H) ; C₂₇H₃₁N₅O₃として、ESI MS 測定値 : m/z 474.3 (M + H)

【 0 0 4 5 】

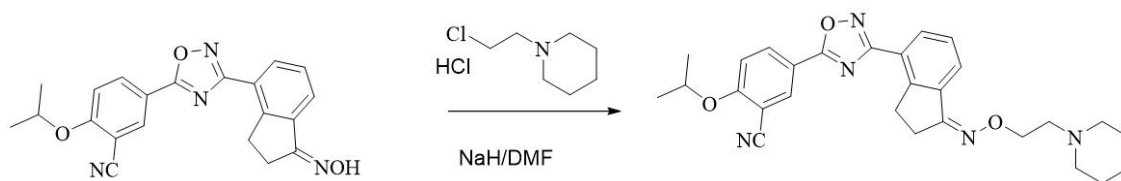
実施例 10

化合物 9

(Z)-2-イソプロポキシ-5-(3-(1-((2-(ピペリジン-1-イル)エトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル)

の合成

【化13】



10

(Z)-2-イソプロポキシ-5-(3-(1-((2-(ピペリジン-1-イル)エトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリルが、2-クロロ-N,N-ジエチルエタン-1-アミン・塩酸塩の代わりに1-(2-クロロエチル)ピペリジン・塩酸塩を用いることを除き、実施例9において記載される操作に従って収率37%で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.25 (m, 2H)、1.47 (d, J=8 Hz, 6H)、1.77 (m, 4H)、2.76 (m, 4H)、2.99 (m, 4H)、3.42 (m, 2H)、4.31 (m, 2H)、4.81 (m, 1H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1H)、8.43 (s, 1H); C₂₈H₃₁N₅O₃として、ESI MS 測定値: m/z 486.5 (M+1)

20

【0046】

実施例 11

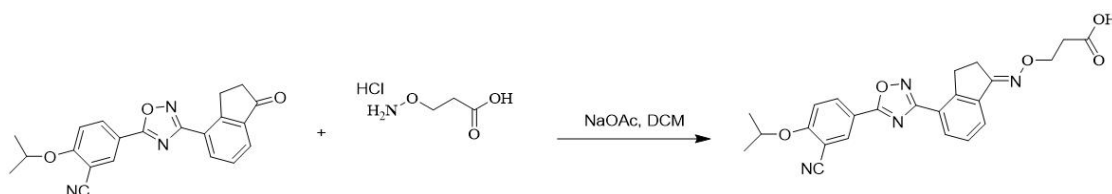
化合物 7

(E)-3-(((4-(5-(3-シアノ-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イリデン)アミノ)オキシ)プロピオン酸)

30

の合成

【化14】



(E)-3-(((4-(5-(3-シアノ-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イリデン)アミノ)オキシ)プロピオン酸が、4-(アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりに3-(アミノオキシ)プロピオン酸・塩酸塩を用いることを除き、実施例4において記載される操作に従って収率3%で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.47 (d, J=8 Hz, 6H)、2.86 (m, 2H)、2.97 (m, 2H)、3.46 (m, 2H)、4.48 (m, 2H)、4.81 (m, 1H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1H)、8.43 (s, 1H); C₂₄H₂₂N₄O₅として、ESI MS 測定値: m/z 447.4 (M+1)

40

【0047】

50

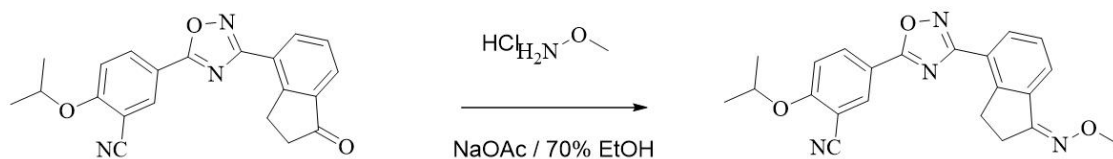
実施例 1 2

化合物 2

((Z) - 2 - イソプロポキシ - 5 - (3 - (1 - (メトキシイミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) ベンゾニトリル)

の合成

【化 1 5】



10

(Z) - 2 - イソプロポキシ - 5 - (3 - (1 - (メトキシイミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) ベンゾニトリル (N39-031) が、4 - (アミノオキシ) ブタン酸・塩酸塩の代わりに O - メチルヒドロキシルアミン・塩酸塩を用いることを除き、実施例 4 において記載される操作に従って収率 34% で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム - d) δ ppm 1.47 (d, J = 8 Hz, 6 H)、2.97 (m, 2 H)、3.44 (m, 2 H)、4.01 (s, 3 H)、4.81 (m, 1 H)、7.12 (d, J = 8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J = 4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H) ; C₂₂H₂₀N₄O₃ として、ESI MS 測定値 : m/z 389.1 (M+1)

20

【0048】

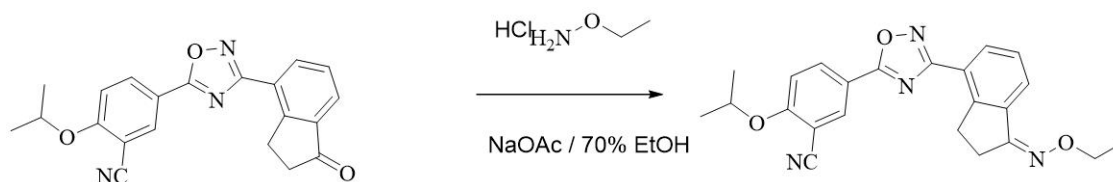
実施例 1 3

化合物 2

((Z) - 5 - (3 - (1 - (エトキシイミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) - 2 - イソプロポキシベンゾニトリル)

の合成

【化 1 6】



30

(Z) - 5 - (3 - (1 - (エトキシイミノ) - 2,3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 4 - イル) - 1,2,4 - オキサジアゾール - 5 - イル) - 2 - イソプロポキシベンゾニトリル (N39-030) が、4 - (アミノオキシ) ブタン酸・塩酸塩の代わりに O - エチルヒドロキシルアミン・塩酸塩を用いることを除き、実施例 4 において記載される操作に従って収率 65% で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム - d) δ ppm 1.34 (m, 3 H)、1.47 (d, J = 8 Hz, 6 H)、2.97 (m, 2 H)、3.00 (m, 2 H)、4.23 (m, 2 H)、4.81 (m, 1 H)、7.12 (d, J = 8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J = 4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H) ; C₂₃H₂₂N₄O₃ として、ESI MS 測定値 : m/z 402.4 (M+)

40

【0049】

実施例 1 4

化合物 4

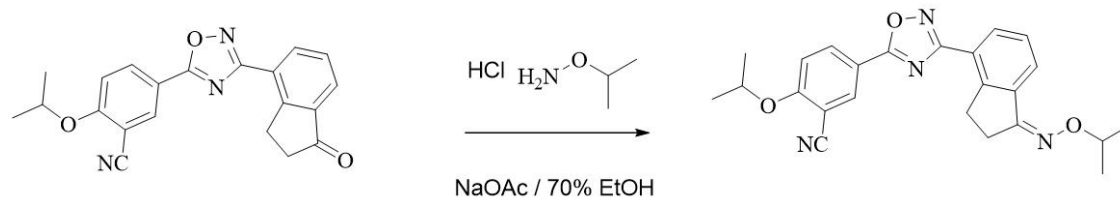
((Z) - 2 - イソプロポキシ - 5 - (3 - (1 - (イソプロポキシイミノ) - 2,3 - ジ

50

ヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル)

の合成

【化17】



10

(Z)-2-イソプロポキシ-5-(3-(1-(イソプロポキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリルが、4-(アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりにO-イソプロピルヒドロキシルアミン・塩酸塩を用いることを除き、実施例4において記載される操作に従って収率48%で製造された。C₂₄H₂₄N₄O₃として、ESI-MS 測定値：m/z 417.2 (M+1)

【0050】

実施例15

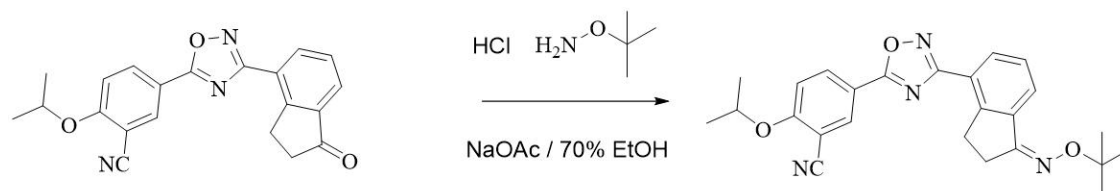
化合物5

((Z)-5-(3-(1-(tert-ブトキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル)

20

の合成

【化18】



30

(Z)-5-(3-(1-(tert-ブトキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリルが、4-(アミノオキシ)ブタン酸・塩酸塩の代わりにO-(tert-ブチル)ヒドロキシルアミン・塩酸塩を用いることを除き、実施例4において記載される操作に従って収率51%で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.36 (s, 9H)、1.47 (d, J=8 Hz, 6H)、2.97 (m, 2H)、3.44 (m, 2H)、4.81 (m, 1H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1H)、8.43 (s, 1H); C₂₅H₂₆N₄O₃として、ESI-MS 測定値：m/z 431.2 (M+1)

40

【0051】

実施例16

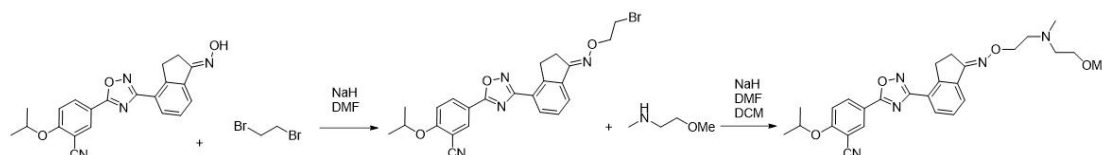
化合物16

((Z)-5-(3-(1-(2-ヒドロキシエトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル)

の合成

50

【化19】



【0052】

工程1：

(E)-5-(3-(1-(ヒドロキシイミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル (0.6 g、1.6ミリモル) のDMF (9 mL) 溶液に、NaH (192 mg、4.8ミリモル) を添加し、20分間攪拌した。このDMFスラリーに、1,2-ジブロモエタン (3 g、16ミリモル) のDCM (6 mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した。LCMSはいくらかの変換を示し、反応混合物をDCM (100 mL) で希釈し、水 (100 mL x 2) で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮し、ISCO (25 g カラム、0-100% EtOAc/Hex) に付して精製し、所望の生成物：(E)-5-(3-(1-(2-ブロモエトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル (0.08 g、0.166ミリモル、10%) を得た。C₂₃H₂₁BrN₄O₃として、ESIMS 測定値：m/z 481.3 (M+1)

【0053】

工程2：

50 mLのフラスコに、2-メトキシ-N-メチルエタン-1-アミン (11 mg、0.125ミリモル)、DMF (1 mL)、NaH (5 mg、0.125ミリモル) を添加し、次に5分間攪拌した。その攪拌した混合物に、(E)-5-(3-(1-(2-ブロモエトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル (40 mg、0.08ミリモル) のDCM (4 mL) 中溶液を加え、次に室温で16時間攪拌した。溶媒を除去し、残渣をISCO (4 g カラム、0-10% MeOH/DCM、0.35 N NH₃) に付して精製し、所望の生成物：(E)-2-イソプロポキシ-5-(3-(1-(2-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)エトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)ベンゾニトリル (10 mg、0.02ミリモル、24%) を得た。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.47 (d, J=8 Hz, 6H)、2.49 (s, 3H)、2.50 (m, 2H)、2.80 (m, 2H)、2.99 (m, 2H)、3.40 (s, 3H)、3.46 (m, 2H)、3.50 (m, 2H)、4.36 (m, 2H)、4.80 (m, 1H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1H)、8.43 (s, 1H)；C₂₇H₃₁N₅O₄として、ESIMS 測定値：m/z 490.5 (M+1)

【0054】

実施例17

化合物17

((E)-5-(3-(1-(2-(アゼチジン-1-イル)エトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリル)

の合成

10

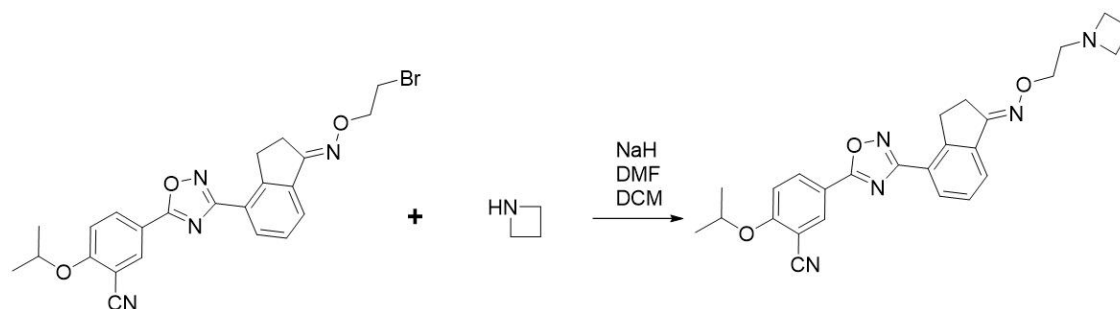
20

30

40

50

【化 20】



10

(E)-5-(3-(1-((2-(アゼチジン-1-イル)エトキシ)イミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-4-イル)-1,2,4-オキサジアゾール-5-イル)-2-イソプロポキシベンゾニトリルが、2-メトキシ-N-メチルエタン-1-アミンの代わりにアゼチジンを用いることを除き、実施例16、工程2において記載される操作に従って収率12.9%で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.47 (d, J=8 Hz, 6 H)、1.82 (m, 2 H)、2.46 (m, 2 H)、2.90 (m, 2 H)、3.01 (m, 2 H)、3.46 (m, 2 H)、3.60 (m, 2 H)、4.36 (m, 2 H)、4.80 (m, 1 H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H); C₂₆H₂₇N₅O₃として、ESI MS 測定値: m/z 458.6 (M+1)

20

【0055】

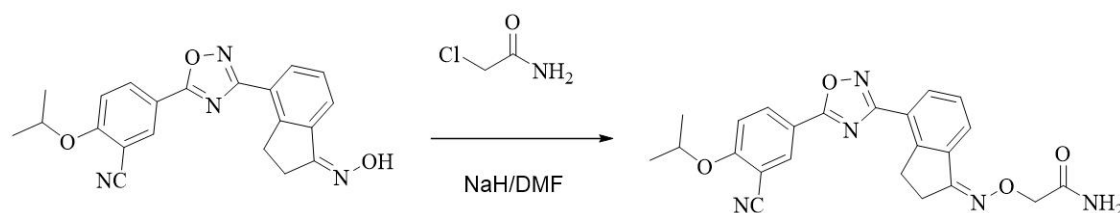
実施例18

化合物18

((Z)-2-(((4-(5-(3-シアノ-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イリデン)アミノ)オキシ)アセトアミド)

の合成

【化 21】



30

(Z)-2-(((4-(5-(3-シアノ-4-イソプロポキシフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イリデン)アミノ)オキシ)アセトアミドが、2-クロロ-N,N-ジエチルエタン-1-アミン・塩酸塩の代わりに2-クロロアセトアミドを用いることを除き、実施例9において記載される操作に従って収率19.4%で製造された。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ ppm 1.47 (d, J=8 Hz, 6 H)、3.00 (m, 2 H)、3.5 (m, 2 H)、4.69 (s, 2 H)、4.78 (m, 1 H)、5.50 (s, 1 H)、6.40 (s, 1 H)、7.12 (d, J=8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J=4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J=8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H); C₂₃H₂₁N₅O₄として、ESI MS 測定値: m/z 432.4 (M+1)

40

【0056】

実施例19

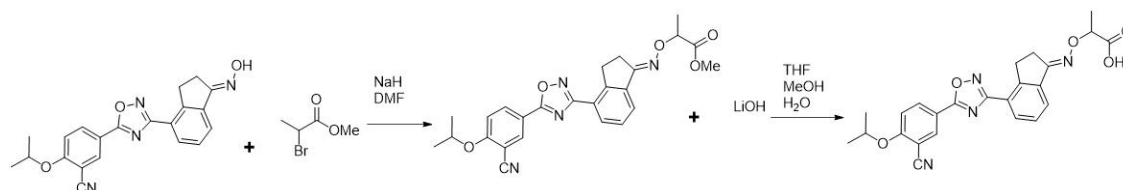
化合物19

50

((E) - 2 - (((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) アミノ) オキシ) プロピオン酸)

の合成

【化 2 2】



10

【0057】

工程 1 :

(E) - 2 - (((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) アミノ) オキシ) プロパン酸メチルが、2 - クロロ - N, N - ジエチルエタン - 1 - アミン・塩酸塩の代わりに 2 - ブロモプロパン酸メチルを用いることを除き、実施例 9 において記載される操作に従って収率 80 % で製造された。C₂₅H₂₄N₄O₅ として、E S I M S 測定値 : m/z 461.4 (M + 1)

【0058】

工程 2 :

(E) - 2 - (((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) アミノ) オキシ) プロパン酸メチル (33 mg、0.072 ミリモル) の THF (5 mL) および MeOH (2 mL) 中の攪拌した溶液を LiOH (10.3 mg、0.215 ミリモル) の水溶液 (1 mL) で処理した。混合物を室温で 2 時間攪拌した。ついで該混合物を 6 M HCl を用いて pH 1 の酸性にした。混合物を DCM (20 mL) で希釈し、水 (20 mL) で抽出した。水層を DCM (20 mL x 3) で抽出した。有機層を合わせ、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ついで濃縮して所望の生成物 : (E) - 2 - (((4 - (5 - (3 - シアノ - 4 - イソプロポキシフェニル) - 1, 2, 4 - オキサジアゾール - 3 - イル) - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - インデン - 1 - イリデン) - アミノ) オキシ) プロピオン酸 (26 mg、0.058 ミリモル、81 %) を得た。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム - d) δ ppm 1.47 (d, J = 8 Hz, 6 H)、1.43 (s, 1 H)、1.63 (d, J = 8 Hz, 3 H)、3.07 (m, 2 H)、3.50 (m, 2 H)、4.80 (m, 1 H)、4.82 (m, 1 H)、7.12 (d, J = 8 Hz, 1 H)、7.45 (t, J = 4 Hz, 1 H)、7.80 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.23 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.35 (d, J = 8 Hz, 1 H)、8.43 (s, 1 H) ; C₂₄H₂₂N₄O₅ として、E S I M S 測定値 : m/z 447.4 (M + 1)

【0059】

実施例 20

インビトロ生物学的アッセイ

細胞膜調製物

組換え S1P 受容体を発現する CHO 細胞を 500 cm² の培養トレイで培養し、コンフルエントになれば、細胞リフティングバッファー (10 mM HEPES、154 mM NaCl、6.85 mM EDTA、pH 7.4) で濯ぎ、剥離させた。次に、遠心分離に供することで細胞をペレット状にし、膜調製バッファー (10 mM HEPES および 10 mM EDTA、pH 7.4) 中に再懸濁させ、Polytron PT 1200E ホモジナイザー (Kinematica, Luzern, Switzerland) を用いて均質にした。細胞タンパク質を 48,000 x g で 4℃ にて 30 分間にわたって遠心分離に付すことでペレット状にした。得られた上清を捨て、そのペレットを、上記されるように、膜調製バッファーに再び再懸濁させ、

20

30

40

50

もう一度均質とし、次に再び遠心分離に付した。最終的な細胞タンパク質のペレットを氷冷した再懸濁バッファー（10mM HEPESおよび0.1mM EDTA、pH 7.4）に懸濁させ、アリコートに分け、使用するまで-80℃で貯蔵した。

【0060】

GTPγS結合アッセイ

[³⁵S]-GTPγSに対する結合アッセイを、200μLの最終容量で、96ウェルの非結合表面プレートにて行った。試験化合物をDMSOで連続希釈に付し、Tecan D300Eデジタルディスペンサーを用い、0.4μLの総容量で、アッセイプレートに加えた。対照となるスフィンゴシン-1-ホスフェート（S1P）は、100ナノモルのS1Pペレットからの、2%β-シクロデキストリンを含む、10mM Na₂CO₃中の400μMのストック溶液を調製することで別個に調製された。S1Pの連続希釈は完全アッセイバッファー（20mM HEPES、10mM MgCl₂、100mM NaCl、1mM EDTA、0.1%脂肪酸不含ウシ血清アルブミン[BSA]、および30μg/mLのサポニン、pH 7.4）を用いて行われ、予め0.4μL DMSOを含めたウェルに移した。ついで、非特異的結合（NSB）ウェルを除き、すべてのウェルに総容量で40μLの完全アッセイバッファーをロードした。NSBウェルには、40μL/ウェルの50μM GTPγS（Sigma Aldrich、カタログ番号G8634、St. Louis、MO）を、0.4μLのDMSOを含有するウェルに添加した。完全バッファー中に40μg/mLの膜タンパク質、16.67μMのグアノシン二リン酸（GDP；Sigma Aldrich、カタログ番号G7127、St. Louis、MO）、および2.5mg/mLのWGA PVT SPAビーズを含有する、120μL/ウェルのCHO-S1P受容体膜溶液を添加することでアッセイを開始した。ついでアッセイプレートを密封し、30分間にわたって室温で緩やかに

かき混ぜながらインキュベートした。次に、ベーシックアッセイバッファー（20mM HEPES、10mM MgCl₂、100mM NaCl、および1mM EDTA、pH 7.4）中の1nMの[³⁵S]-GTPγS（PerkinElmer、カタログ番号NEG030X250UC、Waltham、MA）を40μL/ウェルでアッセイプレートに200pMの最終濃度が得られるように加え、該プレートを40分間にわたって室温で緩やかに

かき混ぜながらさらにインキュベートした。該プレートをEppendorf 5810R遠心分離機（Eppendorf、Hamburg、Germany）を用いて1000rpmで3分間にわたって遠心分離に付すことでアッセイを終え、MicroBeta2マイクロプレートシンチレーションカウンター（PerkinElmer、Waltham、MA）を用いてGタンパク質結合放射能を定量した。

【0061】

上記の技法でアッセイされた代表的な化合物に関するデータを表2に示す。

表2

【表5】

化合物番号	S1P ₁		S1P ₅	
	EC ₅₀ (μM)	%有効性	EC ₅₀ (μM)	%有効性
5	0.020	98	0.078	79
6	0.019	90	>2.0	---
7	0.336	89	0.030	29
8	0.008	90	0.015	64
10	0.004	97	0.006	58
11	0.006	85	0.080	85

【0062】

実施例 21

インビボ生物学的アッセイ

ラットにおける絶対的経口生物学的利用能の測定

薬物動態試験を絶食していない雄のスプラグドローラット (Simonsen Laboratories または Harlan Laboratories) で行う。ラットを A L A A C 認定の施設で飼育し、その研究は施設の Institutional Animal Care and Use Committee (I A C U C) によって承認されている。実験を開始する前に、少なくとも 48 時間にわたって動物を実験室に馴化させる。

【0063】

化合物を 5% DMSO / 5% ツーン 20 および 90% 精製水 (静脈内注入) または 5% DMSO / 5% ツーン 20 および 90% の 0.1 N HCL (経口胃管投与) 中にて製剤化する。投与用溶液の濃度は HPLC-UV で確認する。静脈内投与の場合、手で押さえ付けた動物に、1 分間にわたって頸静脈にインフュージョンポンプを通して化合物を投与する (化合物に付き $n = 4$ のラット)。経口投与は、標準的なステンレス製胃管投与針を用いるガベージによるものである (化合物に付き $n = 2 \sim 4$ のラット)。両方の投与経路でも、投与した後に 8 つの時点で採血し、最終サンプルを投与から 24 時間後に採取する。血液サンプルのアリコートポリプロピレン製の 96 ウェルプレートに移し、分析するまで -20°C で凍結させる。

【0064】

血液サンプルを室温で解凍させた後、5 μL の DMSO を各ウェルに添加する。200 nM の内部標体 (4-ヒドロキシ-3-(アルファ-イミノベンジル)-1-メチル-6-フェニルピリジン-2-(1H)-オン) および 0.1% ギ酸を含有する、150 μL のアセトニトリルを添加することでタンパク質を沈降させる。プレートをプレート振盪器で 1 分間混合し、タンパク質の沈降を促進させ、次に 3,000 rpm で 10 分間にわたって遠心分離に付し、タンパク質をペレット状にした。上清を清浄なプレートに移し、LC/MS/MS 分析に供する前に、3,000 rpm で 10 分間にわたって遠心分離に付し、残りのいずれの固形物もペレット状にする。DMSO 中の 5 μL の化合物ストックを新たに採集した EDTA ラット血液にスパイクすることで基準となる検量線を作成する。5 nM ~ 10,000 nM の範囲に及ぶ 8 点の標準曲線は各バイオ分析単位に含まれる。標準ラットの薬物動態学的サンプルと同様に処理する。

【0065】

ラット薬物動態サンプル中の濃度を、8 ポイントの標準曲線に関連して標準化された HPLC-LC/MS/MS 方法を用いて測定する。このシステムは、Leap CTC Pal インジェクター、Applied Biosystems 3200 QTrap と連結したバイナリーポンプ付きの Agilent 1200 HPLC で構成される。化合物を、Security Guard を備えた Phenomenex Synergy Fusion RP の 20 x 2 mm 2 μm の Mercury Cartridge でクロマトグラフィーに付す。水中 0.1% ギ酸からなる移動相 A と、アセトニトリル中 0.1% ギ酸からなる移動相 B との勾配方法であって、0.7 ~ 0.8 mL / 分の間で変化する流速で該方法を用いる。イオンは電子噴射イオン化 (ESI) インターフェースを用いるポジティブイオン化モードで生成される。各化合物に固有の複数反応モニタリング (MRM) 方法を開発する。加熱式ネブライザーを、325 $^{\circ}\text{C}$ で、4.8 μA のネブライザー電流に設定する。衝突エネルギーは 29 と 39 V との範囲で娘イオンを生成するのに使用される。定量するのに用いられる各化合物に特異的な質量変化を MRM に付し、ピーク面積比を得る。この方法の定量限界は、典型的には、5 nM である。Analyst ソフトウェアバージョン 1.4.2 を用いて、データを収集して解析する。

【0066】

血中濃度対時間のデータは、ノンコンパートメント方法 (WinNonlin version 5.2; 経口投与用のモデル 200 および静脈内注入用のモデル 202) を用いて解析される。絶対的経口生物学的利用能 (%) は、次式：

10

20

30

40

50

$(\text{経口AUC} \times \text{IV用量}) / (\text{IV AUC} \times \text{経口用量}) \times 100$
を用いて算出される。

【0067】

リンパ球減少症

マウスでは：

雌のC57BL6マウス (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) を、A L A A C 認定の施設で飼育し、その研究は施設のInstitutional Animal Care and Use Committee (I A C U C) によって承認された。実験を開始する前に、少なくとも5日間にわたって動物を実験室に馴化させる。マウス ($n=3$ / 化合物 / 時点) に、5% DMSO / 5% ツーン20および90% 0.1 N HCLからなるビヒクル中に化合物を1~30mg / kgで処方して経口胃管を介して投与する。対照となるマウスにビヒクルをPO投与する。心臓穿刺によりイソフルランで麻酔処理に付したマウスから最終全血サンプルをEDTAに集める。全血をラット抗マウスCD16 / CD32 (マウスBD Fc Block、#553141)、PE-ラット抗マウスCD45R / B220 (BD #553089)、APC-Cy7-ラット抗マウスCD8a (BD #557654)、およびAlexa Fluor 647-ラット抗マウスCD4 (BD #557681) と共に氷上で30分間インキュベートする。BD Pharm Lyse Lysingバッファー (#555899) を用いて赤血球を溶解し、FACSにより白血球を解析する。リンパ球減少はCD4またはCD8陽性T細胞である、白血球の%として表される。24時間にわたる全体的なリンパ球減少応答は、線形台形法を用いて効果曲線下面積 (AUEC) を計算することにより推定される。

10

20

【0068】

ラットでは：

雄のラット (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) を、A L A A C 認定の施設で飼育し、その研究は施設のInstitutional Animal Care and Use Committee (I A C U C) によって承認された。実験を開始する前に、少なくとも5日間にわたって動物を実験室に馴化させる。ラット ($n=3$ / 化合物 / 時点) に、5% DMSO / 5% ツーン20および90% 0.1 N HCLからなるビヒクル中に化合物を1~30mg / kgで処方して経口胃管を介して投与する。対照となるマウスにビヒクルをPO投与する。イソフルランで麻酔処理に付したラットから後眼窩洞を介して全血を集め、最終サンプルは心臓穿刺によりEDTAに集めた。全血をマウス抗ラットCD32 (BD #550271)、PE-マウス抗ラットCD45R / B220 (BD #554881)、PECy5-マウス抗ラットCD4 (BD #554839)、およびAPC-マウス抗ラットCD8a (eBioscience #17-0084) と共に氷上で30分間インキュベートする。BD Pharm Lyse Lysingバッファー (#555899) を用いて赤血球を溶解し、BD FACS Arrayにより白血球を解析する。リンパ球減少はCD4またはCD8陽性T細胞である、白血球の%として表される。24時間にわたる全体的なリンパ球減少応答は、線形台形法を用いて効果曲線下面積 (AUEC) を計算することにより推定される。

30

【0069】

リンパ球減少症

マウスでは：

雌のC57BL6マウス (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) を、A L A A C 認定の施設で飼育し、その研究は施設のInstitutional Animal Care and Use Committee (I A C U C) によって承認された。実験を開始する前に、少なくとも5日間にわたって動物を実験室に馴化させる。マウス ($n=3$ / 化合物 / 時点) に、5% DMSO / 5% ツーン20および90% 0.1 N HCLからなるビヒクル中に化合物を1mg / kgで処方して経口胃管を介して投与する。対照となるマウスにビヒクルをPO投与する。心臓穿刺によりイソフルランで麻酔処理に付したマウスから最終全血サンプルをEDTAに集める。全血をラット抗マウスCD16 / CD32 (マウスBD Fc Block、#553141)、PE-ラット抗マウスCD45R / B220 (BD #553089)、A

40

50

PC-Cy7-ラット抗マウスCD8a (BD #557654)、およびAlexa Fluor 647-ラット抗マウスCD4 (BD #557681)と共に氷上で30分間インキュベートする。BD Pharm Lyse Lysingバッファー (#555899)を用いて赤血球を溶解し、FACSにより白血球を解析する。リンパ球減少はCD4またはCD8陽性T細胞である、白血球の%として表される。24時間にわたる全体的なリンパ球減少応答は、線形台形法を用いて効果曲線下面積(AUEC)を計算することにより推定される。

【0070】

ラットでは：

雄のラット (Simonsen Laboratories, Gilroy CA) を、ALAAAC認定の施設で飼育し、その研究は施設のInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認された。実験を開始する前に、少なくとも5日間にわたって動物を実験室に馴化させる。ラット (n=3/化合物/時点) に、5% DMSO/5% ツーン20および90% 0.1N HCLからなるビヒクル中に化合物を1mg/kgで処方して経口胃管を介して投与する。対照となるマウスにビヒクルをPO投与する。イソフルランで麻酔処理に付したラットから後眼窩洞を介して全血を集め、最終サンプルは心臓穿刺によりEDTAに集めた。全血をマウス抗ラットCD32 (BD #550271)、PE-マウス抗ラットCD45R/B220 (BD #554881)、PECy5-マウス抗ラットCD4 (BD #554839)、およびAPC-マウス抗ラットCD8a (eBioscience #17-0084)と共に氷上で30分間インキュベートする。BD Pharm Lyse Lysingバッファー (#555899)を用いて赤血球を溶解し、BD FACS Arrayにより白血球を解析する。リンパ球減少はCD4またはCD8陽性T細胞である、白血球の%として表される。24時間にわたる全体的なリンパ球減少応答は、線形台形法を用いて効果曲線下面積(AUEC)を計算することにより推定される。

【0071】

上記した種々の実施態様は組み合わせられてさらなる実施態様を提供し得る。本願明細書に言及され、および/または出願データシートに列挙される、米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許文献はすべて、出典明示によりその全体が本明細書に組み込まれるものとする。実施態様の態様は、必要に応じて種々の特許、出願および公報の概念を利用するように修飾され、さらに別の実施態様を提供することができる。これらの変形、および他の変形は、上記の詳細な説明に照らして、実施態様に対して行うことができる。一般に、次の特許請求の範囲において、使用される用語は、請求項を本明細書および特許請求の範囲に開示された特定の実施態様に限定するように解釈されるべきではなく、かかる請求項が権利を有する均等物の全範囲と共に、可能性のあるすべての実施態様を含むものと解釈されるべきである。2020年3月27日付け出願の米国仮出願63/001,073、および2020年4月30日付け出願の米国仮出願63/018,327は、出典明示によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 バケール, ロジャー

アメリカ合衆国07901ニュージャージー州サミット、モリス・アベニュー86

(72)発明者 シュカーヤンツ, ジェフ

アメリカ合衆国07901ニュージャージー州サミット、モリス・アベニュー86

(72)発明者 マルシーニ, モーリス

アメリカ合衆国07901ニュージャージー州サミット、モリス・アベニュー86

審査官 薄井 慎矢

(56)参考文献 特表2009-524611(JP, A)

特表2017-532294(JP, A)

国際公開第2018/231745(WO, A1)

特表2011-523412(JP, A)

特表2013-510885(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07D

CAplus/REGISTRY(STN)