

(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2020-524178

(P2020-524178A)

(43) 公表日 令和2年8月13日 (2020.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 C 233/87</b> (2006.01)	C 0 7 C 233/87	4 C 0 8 6
<b>C 0 7 D 211/62</b> (2006.01)	C 0 7 D 211/62 C S P	4 C 2 0 6
<b>C 0 7 D 257/04</b> (2006.01)	C 0 7 D 257/04 E	4 H 0 0 6
<b>C 0 7 D 295/155</b> (2006.01)	C 0 7 D 295/155	
<b>A 6 1 K 31/195</b> (2006.01)	A 6 1 K 31/195	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-515285 (P2020-515285)	(71) 出願人	519417610
(86) (22) 出願日	平成30年5月24日 (2018.5.24)		ヨハン ヴォルフガング ゲーテウニヴ
(85) 翻訳文提出日	令和1年12月26日 (2019.12.26)		ェルズィテート フランクフルト アム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/063699		マイン
(87) 国際公開番号	W02018/215610		ドイツ連邦共和国 6 0 3 2 3 フランク
(87) 国際公開日	平成30年11月29日 (2018.11.29)		フルト アム マイン テオドルーダブ
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2017/062692		リュ. - アドルノーブラッツ 1
(32) 優先日	平成29年5月24日 (2017.5.24)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ファルネソイド X 受容体および可溶性エポキシドヒドロラーゼの二重調節剤

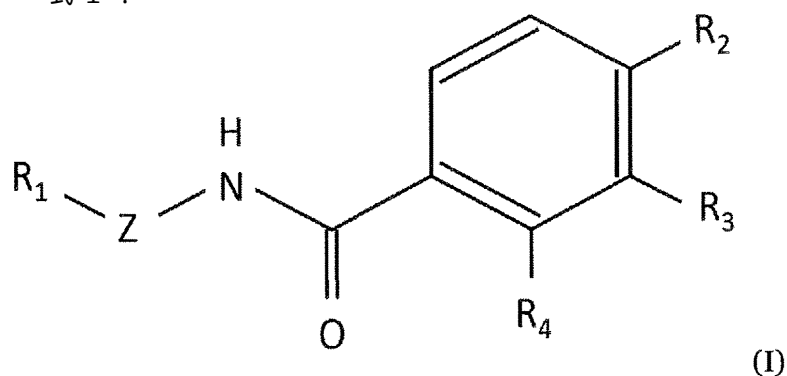
## (57) 【要約】

本発明は、ファルネソイド X 受容体 (F X R) および可溶性エポキシドヒドロラーゼ (s E H) の新規二重調節剤に関する。本発明の調節剤は、F X R のアゴニストおよび s E H の阻害剤 (アンタゴニスト) としての二重活性を有する化合物を提供するために設計された。本発明はまた、F X R および s E H に関連した疾患、例えば代謝障害、具体的には非アルコール性脂肪肝または非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) に罹患している対象を治療するための方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 I :



10

を有する化合物、またはその異性体、プロドラッグもしくは誘導体、またはこれらの化合物の薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物：

式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が、独立して、H、非置換、一置換または多置換の  $C_{1} \sim C_{18}$  アルキルまたはヘテロアルキル（ここでアルキルは直鎖、分岐、または環式である）、非置換、一置換または多置換の  $C_{1} \sim C_{18}$  アルケニルまたはヘテロアルケニル（ここでアルケニルは直鎖、分岐、または環式である）、非置換、一置換または多置換のアリールまたはヘテロアリール、非置換、一置換または多置換のベンジル基、アシル基、例えばホルミル、アセチル、トリクロロアセチル、フマリル、マレイル、スクシニル、ベンゾイル、または分岐した、ヘテロ原子で置換された、もしくはアリールで置換されたアシル基、糖または別のアセタール、およびスルホニル基から選択され、かつ／あるいは  $R_2$ 、 $R_3$  および／または  $R_4$  が一緒になって、非置換、一置換または多置換の環、好ましくは芳香環を形成し、

20

Z が、任意の置換を有するかまたは有しない C である。

## 【請求項 2】

$R_2$  が、 $C_{1} \sim C_{10}$  アルキル、好ましくは分岐アルキル、より好ましくは  $-C(CH_3)_3$  であり、好ましくは  $R_3$  が、H、 $-OH$  または  $-OMe$  であり、好ましくは  $R_4$  が、H、 $-OH$  または  $-OMe$  である、請求項 1 に記載の化合物。

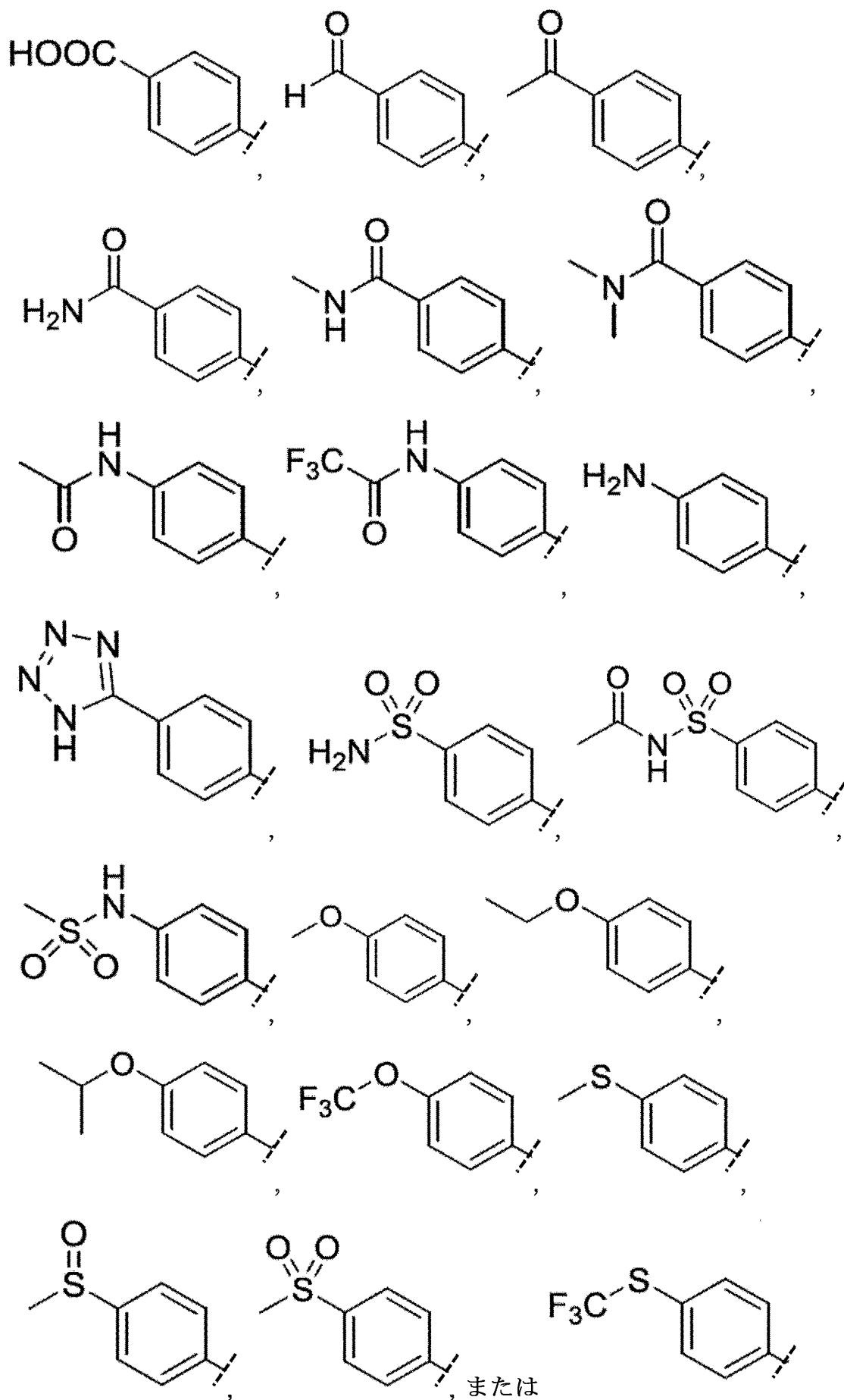
30

## 【請求項 3】

$R_1$  が、一置換または多置換アリールである、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

$R_1$  が、以下の群：



10

20

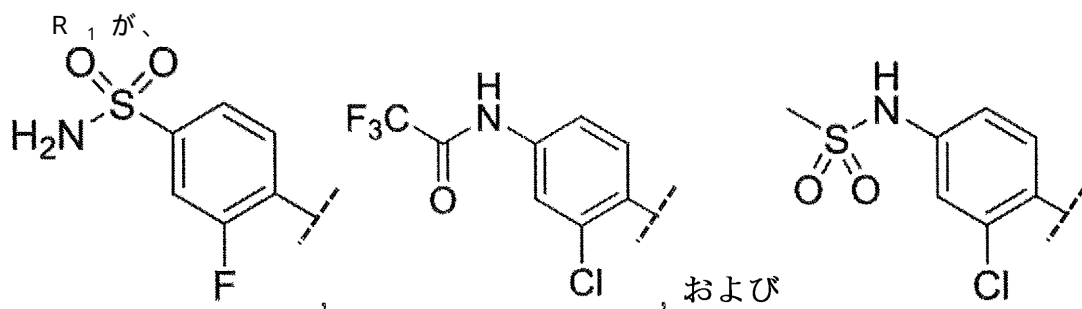
30

40

のうちのいずれかから選択される、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

50

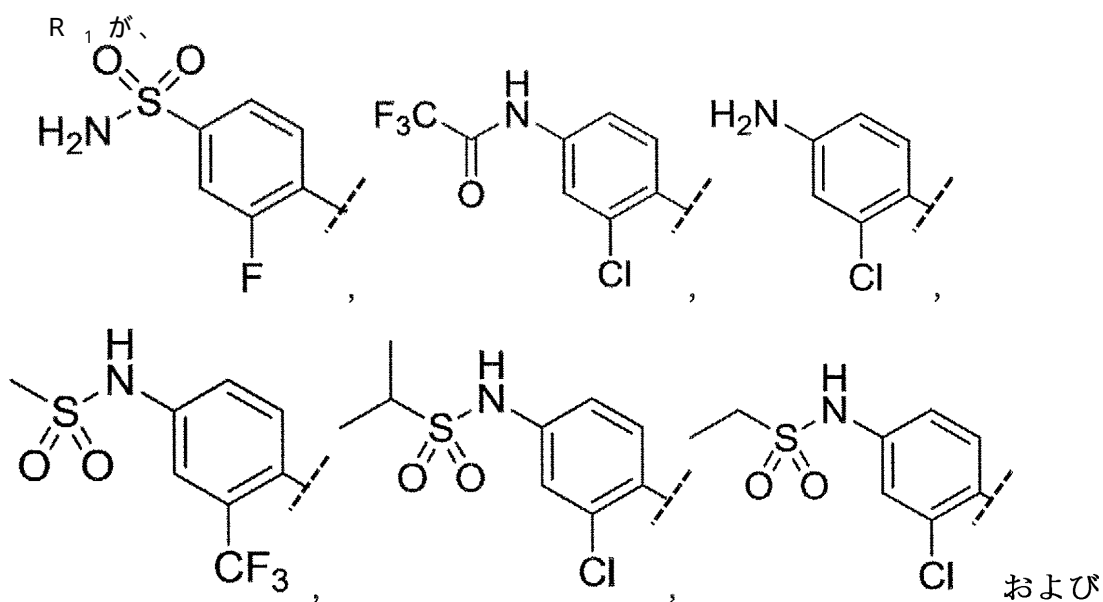


からなる群から選択され、

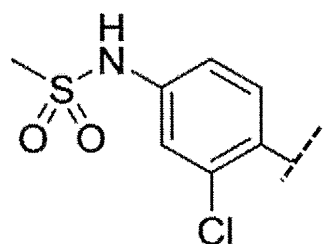
ZがCであり、 $R_2$ が $-C(CH_3)_3$ であり、 $R_3$ がHである、請求項1～3のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項6】



20

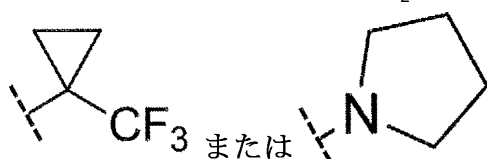


30

からなる群から選択され、

ZがCであり、 $R_3$ がHまたはOHであり、 $R_4$ がHまたはOHであり、特に $R_3$ および $R_4$ が両方ともOHであることはなく、 $R_2$ が、 $-C(CH_3)_3$ 、 $-N(CH_3)_2$ から選択されるか、または $R_2$ が、以下の構造：

40



のうちのいずれかである、請求項1～3のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項7】

ファルネソイドX受容体(FXR)アゴニストおよび可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)阻害剤である、請求項1～6のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項8】

疾患の治療に使用するための、請求項1～7のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項9】

50

前記疾患が、F X R および s E H に関連した障害である、請求項 8 に記載の使用のための化合物。

【請求項 10】

前記疾患が、代謝障害、好ましくは高脂肪食によって引き起こされるかまたはそれに関連した代謝障害である、請求項 8 に記載の使用のための化合物。

【請求項 11】

前記疾患が、肝疾患、例えば非アルコール性脂肪性肝疾患または非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) である、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物を生成するための方法。

10

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物を、薬学的に許容される担体および / または賦形剤とともに含む、薬学的組成物。

【請求項 14】

F X R および s E H の同時調節のための方法であって、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 13 に記載の薬学的組成物を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 15】

前記対象が、疾患、好ましくは代謝疾患に罹患している、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記化合物を前記対象に投与することによって、前記対象の前記疾患を治療する方法である、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

調節が、F X R の活性化および s E H の阻害である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

投与することが、治療有効量の前記化合物を前記対象に投与することを含む、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

対象における疾患を治療する方法であって、治療有効量の請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 13 に記載の薬学的組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

30

【請求項 20】

前記対象が、哺乳動物、好ましくはマウス、ラット、ロバ、ウマ、ネコ、イヌ、モルモット、サル、類人猿であるか、または好ましくはヒト患者である、請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記疾患が、代謝障害、好ましくは高脂肪食によって引き起こされるかまたはそれに関連した代謝障害である、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記疾患が、肝疾患、例えば非アルコール性脂肪性肝疾患または非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) である、請求項 16 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ファルネソイド X 受容体 (F X R) および可溶性エポキシドヒドロラーゼ (s E H) の新規二重調節剤に関する。本発明の調節剤は、F X R のアゴニストおよび s E H の阻害剤 (アンタゴニスト) としての二重活性を有する化合物を提供するために設計された。本発明はまた、F X R および s E H に関連した疾患、例えば代謝障害、具体的には非アルコール性脂肪肝または非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) に罹患している対象

50

を治療するための方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

説明

過栄養および座りがちの生活様式から生じる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、特に西洋文化社会および世界中の成人にますます影響を及ぼしている。最近では、世界で最大3人に1人の成人がNAFLDを有し、最大15%が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進行すると推定されている。最も驚くことに、最大11%の青年がNAFLDを患っていると考えられている。したがって、代謝症候群の肝臓における発現とみなされることの多いNAFLDおよびNASHの疾患群は、健康への深刻な脅威である。しかしながら、現在のNAFLD治療には限界があり、薬理的オプシオンが不十分である。したがって、NAFLDおよびNASHを治療するための新規の薬理的介入が、緊急に必要とされている (Rinella, M. E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. JAMA 2015, 313 (22), 2263 - 2273; Gawrieh, S.; Chalasani, N. Pharmacotherapy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Semin. Liver Dis. 2015, 35 (3), 338 - 348; Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J. E.; Diehl, A. M.; Brunt, E. M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A. J. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology 2012, 55 (6), 2005 - 2023)。

【0003】

インビボモデルおよび臨床試験により、NAFLD/NASHの治療について治療可能性のあるいくつかの戦略が特定された。特に、内在性FXRアゴニストであるケノデオキシコール酸 (CDCA、1b) から開発されたオベチコール酸 (6 - エチル - CDCA、OCA、1a) が、NASH治療における臨床効果を既に明らかにしているため (Adorini, L. et al. Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. Drug Discov. Today 2012, 17 (17 - 18), 988 - 997; Neuschwander-Tetri, B. et al. Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. Lancet 2014, 385 (9972), 956 - 965)、ファルネソイドX核内受容体 (FXR) (Arab, J. P.; Karpen, S. J.; Dawson, P. A.; Arrese, M.; Trauner, M. Bile Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives. Hepatology 2017, 65 (1), 350 - 362) は、NAFLD/NASHの治療法に対する非常に有望な標的であると思われる。FXRは、肝臓、腸および腎臓において主に見出されるリガンド活性化転写因子であり、胆汁酸によって生理学的に活性化される (Makishima, et al. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. Science 1999, 284 (

10

20

30

40

50

5418), 1362-1365、Parks, D. J. et al. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* 1999, 284 (5418), 1365-1368、Wang, H. et al. Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 1999, 3 (5), 543-553)。これは胆汁酸、脂質およびグルコースホメオスタシスに関与するいくつかの遺伝子を制御することによって代謝調節物質として作用し、蓄積する胆汁酸の毒性レベルを感知することによって重要な肝臓保護物質として作用する (Gadaleta, R. M et al. Tissue-Specific Actions of FXR in Metabolism and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1851, 30-39、Pellicciari, R. et al; Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. *J Med Chem* 2005, 48 (17), 5383-5403)。

#### 【0004】

臨床試験により、OCA (1a) 治療後のNAFLD/NAASHの改善された組織学的特徴および臨床マーカー、ならびに改善された代謝パラメータが報告されており、これにより、FXRは脂肪肝障害および潜在的に他の代謝疾患を治療するための標的として確認された (Mudaliar, S et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2013, 145 (3), 574-582.e1)。しかしながら、FXR活性化は、コレステロールの胆汁酸への代謝変換における律速酵素であるコレステロール7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) の抑制につながるため、FXRの完全活性化は、望ましくないコレステロールの蓄積を引き起こし得る。1cなどの典型的なFXRアゴニストよりも低い最大効能を有する部分的FXRアゴニズムが、コレステロールホメオスタシスを妨害することなくFXR活性化の望ましい効果を利用するための有望な概念であると思われる (Merk, D et al. Anthranilic Acid Derivatives as Novel Ligands for Farnesoid X Receptor (FXR). *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22 (8), 2447-2460、Merk, et al. Extending the Structure-Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives As Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* 2014, 57 (19), 8035-8055、Merk, D. et al. Medicinal Chemistry of Farnesoid X Receptor Ligands: From Agonists and Antagonists to Modulators. *Future Med. Chem.* 2012, 4 (8), 1015-1036)。

#### 【0005】

可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) は、アラキドン酸代謝のCYP経路の下流酵素であり、また、NAFLD/NAASHおよび他の代謝疾患、例えば2型糖尿病の治療において有望である (Shen, H. C.; Hammock, B. D. Discovery of Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase: A Target with Multiple Potential Therapeutic Indications. *J. Med. Chem.* 2012, 55 (5), 1789-1808、Newman, J. W. et al; Epoxide H

ydrolases: Their Roles and Interactions with Lipid Metabolism. *Prog. Lipid Res.* 2005, 44(1), 1-51、Imig, J. D. Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology. *Physiol. Rev.* 2012, 92(1), 101-130、Huang, H.; Weng, J.; Wang, M.-H. EETs/sEH in Diabetes and Obesity-Induced Cardiovascular Diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016, 125, 80-89)。これは、アラキドン酸からCYP酵素によって形成されたエポキシエイコサトリエン酸(EET)を、各ジヒドロキシエイコサトリエン酸(DHET)に変換する。EETは、強固な抗炎症活性を呈するため、sEH阻害は、抗炎症戦略を構成する。sEHは、身体全体、特に心臓、肝臓および腎臓において高レベルで発現される。NASHのマウスモデルからの最近の結果は、sEHノックアウトまたは阻害が、高脂肪食下での肝脂肪蓄積および肝炎を低減することを明らかにした。

10

20

30

40

50

【0006】  
NASHは、2型糖尿病または肥満などの様々な危険因子に関連し、脂肪症、肝炎および線維症を含む多様な兆候を有する。したがって、いくつかの実験的戦略はNASHにおける治療効果を明らかにし(Sanyal, A. J. Novel Therapeutic Targets for Steatohepatitis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015, 39 Suppl 1, S46-50、Milic, S, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: Emerging Targeted Therapies to Optimize Treatment Options. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015, 9, 4835-4845.)、この多因子疾患に対して、その別個の病理学的因子を治療する複数の治療機序を用いて対抗することが妥当であると思われる。しかしながら、その結果として多数の薬物を用いる多剤療法は、不利益であり、例えば複雑かつ問題のある薬物間相互作用および追加の副作用をもたらす。多数の所望の治療機序に対応する多標的剤は、多剤薬理学の多くの欠点を回避することができる。

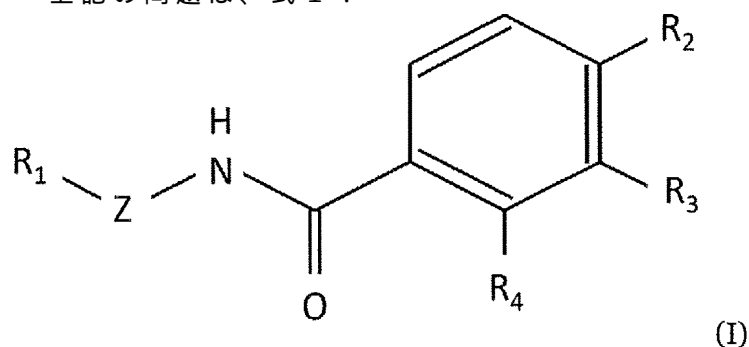
【0007】

NASHの進行および脂質蓄積を低減することにおけるFXR活性化の臨床効果ならびにsEH阻害の肝臓への抗炎症効果および抗脂肪症効果に照らして、FXRおよびsEHの二重調節は、相乗効果を生じ得る、NAFLD/NASHを治療するための有望な戦略であると思われる。したがって、本発明の目的は、FXRに対する部分的アゴニスト活性およびsEHに対する阻害能力を有する二重調節剤を提供することである。

【発明の概要】

【0008】

上記の問題は、式I:



を有する化合物、またはその異性体、ラセミ化合物、プロドラッグもしくは誘導体、またはこれらの化合物の薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物によって解決される:

式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が、独立して、H、非置換、一置換または多置換のC<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>アルキルまたはヘテロアルキル(ここでアルキルは直鎖、分岐、または環式で



ある)、非置換、一置換または多置換の  $C_1 \sim C_{18}$  アルケニルまたはヘテロアルケニル(ここでアルケニルは直鎖、分岐、または環式である)、非置換、一置換または多置換のアリールまたはヘテロアリール、非置換、一置換または多置換のベンジル基、アシル基、例えばホルミル、アセチル、トリクロロアセチル、フマリル、マレイル、スクシニル、ベンゾイル、または分岐した、ヘテロ原子で置換された、もしくはアリールで置換されたアシル基、糖または別のアセタール、およびスルホニル基から選択され、かつ/あるいは  $R_2$ 、 $R_3$  および/または  $R_4$  が一緒になって、非置換、一置換または多置換の環、好ましくは芳香環を形成し、

Z が、任意の置換を有するかまたは有しない C、好ましくは H またはアルキルで置換された C である。

#### 【0009】

いくつかの好ましい実施形態では、 $R_2$  は、 $C_1 \sim C_{10}$  アルキル、好ましくは分岐アルキル、より好ましくは  $-C(CH_3)_3$  基であり、好ましくは  $R_3$  は、H、 $-OH$  または  $OMe$  であり、好ましくは  $R_4$  は、H、 $-OH$  または  $-OMe$  である。

#### 【0010】

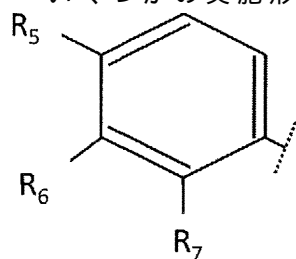
別の好ましい実施形態では、化合物は、本明細書に開示される化合物 4a、4b、6、7、9、14、16、19、29、33、36、42 および 45 を除く、上記の定義された化合物群である。この点において、本出願の実施例セクションにおいて表 1 ~ 8 に開示される他の(上記を除く)化合物のうちのいずれか 1 つがさらに好ましい。いくつかの実施形態では、表 8 の化合物が好ましい。

#### 【0011】

好ましい一実施形態では、上記化合物中の  $R_3$  および  $R_4$  は、H である。

#### 【0012】

いくつかの実施形態では、 $R_1$  は、式 II :



(II)

を有する基であって、式中、 $R_5$ 、 $R_6$  および  $R_7$  は、独立して、H、非置換、一置換または多置換の  $C_1 \sim C_{18}$  アルキルまたはヘテロアルキル(ここでアルキルは直鎖、分岐、または環式である)、非置換、一置換または多置換の  $C_1 \sim C_{18}$  アルケニルまたはヘテロアルケニル(ここでアルケニルは直鎖、分岐、または環式である)、非置換、一置換または多置換のアリールまたはヘテロアリール、非置換、一置換または多置換のベンジル基、アシル基、例えばホルミル、アセチル、トリクロロアセチル、フマリル、マレイル、スクシニル、ベンゾイル、または分岐した、ヘテロ原子で置換された、もしくはアリールで置換されたアシル基、糖または別のアセタール、および非置換、一置換または多置換のアミドまたはスルホニル基から選択される。

#### 【0013】

好ましくは、 $R_6$  および  $R_7$  は、H またはハロゲン、好ましくは F または Cl から選択されるハロゲンである。最も好ましくは、 $R_6$  は H であり、 $R_7$  は H、F または Cl である。

#### 【0014】

好ましくは、 $R_5$  は、カルボン酸、またはテトラゾール、スルホンアミド、アミド(例えば有機アミド、スルホンアミドもしくはホスホルアミド)等を含むがこれらに限定されない典型的な生物学的等価体などの好適なカルボン酸代替物を含む、任意の長さの側鎖である。

#### 【0015】

本明細書で使用される場合、「生物学的等価体」という用語は、化学部分に関し、これはその生物活性に対して著しい影響を及ぼすことなく、活性化合物の分子中の別の部分に取って代わる。例えば、薬品としてのその安定性などの活性化合物の他の特性は、このようにして影響され得る。

【0016】

カルボキシ(COOH)基の生物学的等価体部分として、特に、窒素、酸素および硫黄から選択される1~4個のヘテロ原子を有する5員複素環式基、例えば1,3,4-オキサジアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,5-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,2,3-チアジアゾリル、1,2,5-チアジアゾリル、フリル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、イソキサゾリル、イソチアゾリルおよびN-置換テトラゾリル等を挙げることができる。5員複素環式基は、フェニル、ピリジニル、直鎖または分岐アルキル基、アミノ基、ヒドロキシ基、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、トリフルオロチオメトキシ、アルコキシおよびチオアルコキシを含む群から選択される1つまたは2つの置換基で置換されていてもよい。

10

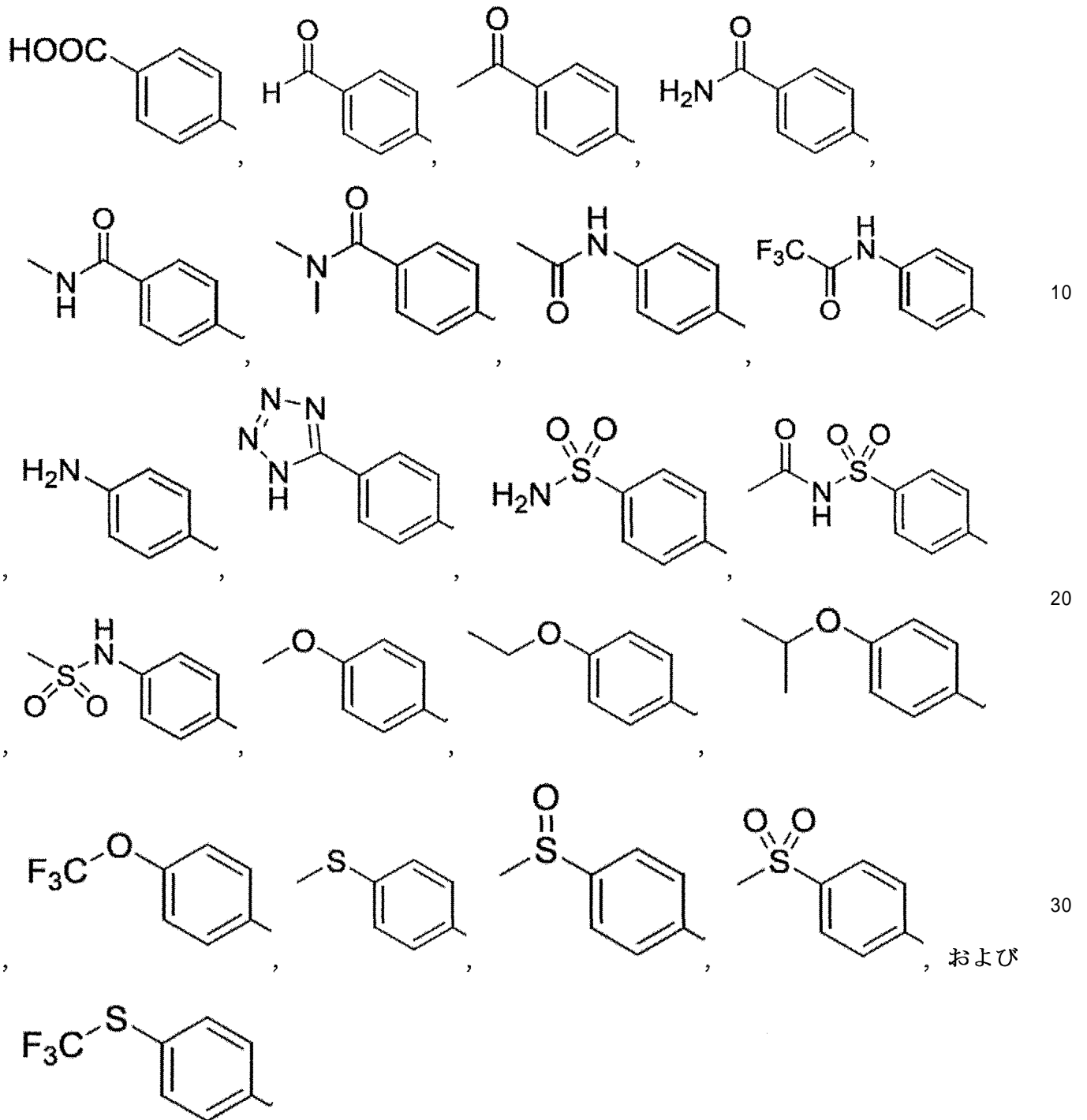
【0017】

また、カルボキシ(COOH)基の生物学的等価体部分として、フェニル、ならびに、窒素、酸素および硫黄から選択される1~4個のヘテロ原子を有する6員複素環式基、例えばピリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、トリアジニル、テトラジニル等を挙げることができる。フェニルおよび6員複素環式基は、フェニル、ピリジニル、直鎖または分岐アルキル基、アミノ基、ヒドロキシ基、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、トリフルオロチオメトキシ、アルコキシおよびチオアルコキシを含む群から選択される1つまたは2つの置換基で置換されていてもよい。

20

【0018】

本発明のいくつかの実施形態では、R<sub>1</sub>は、以下の置換基のうちのいずれかから選択される。



10

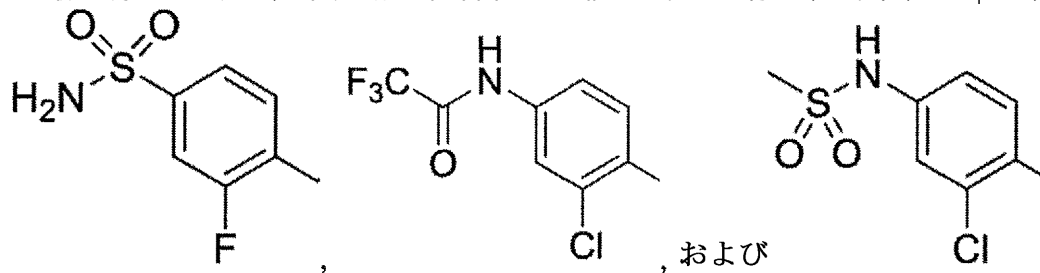
20

30

, および

## 【 0 0 1 9 】

最も好ましくは、本発明の化合物は上記の式 I を有し、式中、 $R_1$  は、



40

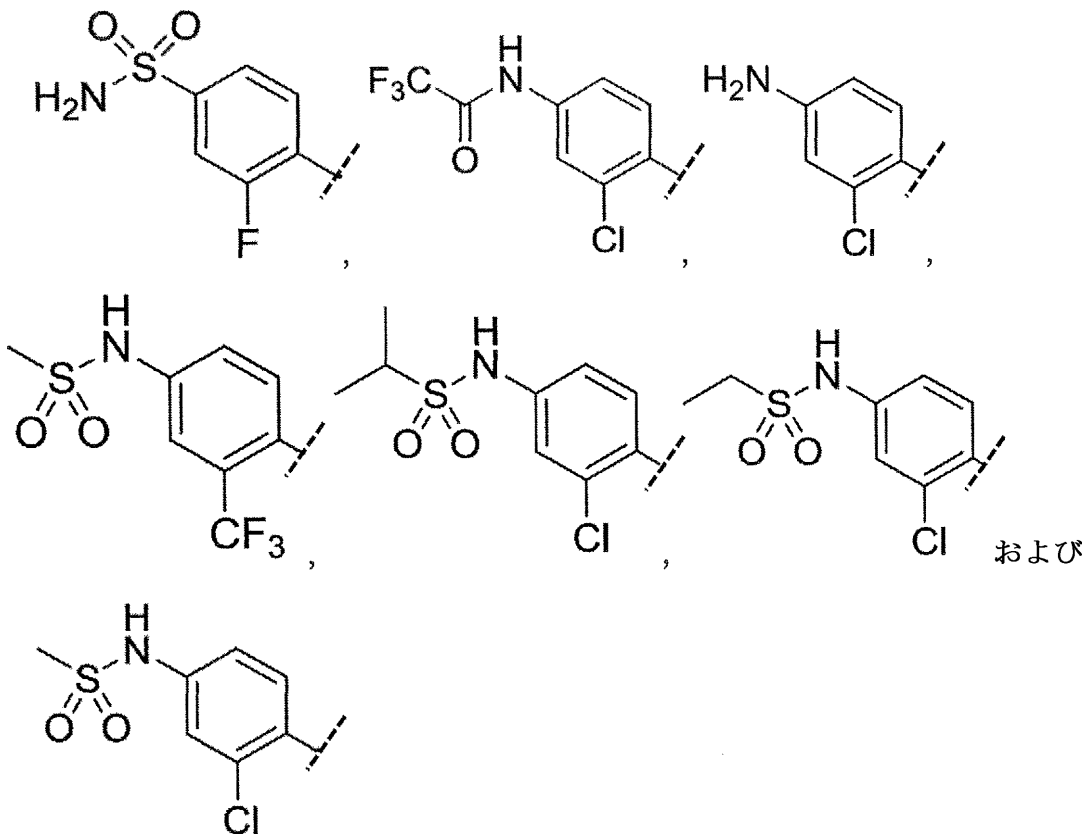
からなる群から選択され、

Z は C であり、 $R_2$  は  $-C(CH_3)_3$  であり、 $R_4$ 、 $R_3$  は、H である。

## 【 0 0 2 0 】

別の実施形態では、式 I を有する上記の化合物がさらに好ましく、式中、 $R_1$  は、

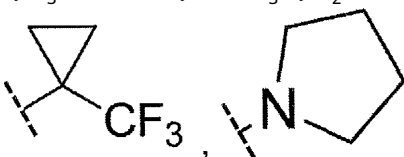
50



10

20

からなる群から選択され、ZはCであり、 $\text{R}_3$ はHまたはOHであり、 $\text{R}_4$ はHまたはOHであり、特に $\text{R}_3$ および $\text{R}_4$ が両方ともOHであることはなく、 $\text{R}_2$ は、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ から選択されるか、または $\text{R}_2$ は、以下：



のうちのいずれかである。

30

【0021】

ファルネソイドX受容体(FXR)アゴニストおよび可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)阻害剤である、請求項1～5のいずれか一項に記載の化合物。

【0022】

薬学的に許容されないアニオンを有する塩も同様に、薬学的に許容される塩の調製もしくは精製のためおよび/または非治療的用途、例えばインビトロでの用途における使用のための有用な中間体として本発明の範囲の一部を形成する。本発明の化合物はまた、様々な多形体で、例えば非晶質および結晶性多形体として存在し得る。本発明の化合物のすべての多形体は、本発明の範囲内であり、本発明のさらなる態様である。

【0023】

本明細書で使用される場合、「ファルネソイドX受容体」または「FXR」という用語は、例えば、選択的スプライスアイソフォームおよび天然に存在するアイソフォームを含む、そのような受容体のすべての哺乳類形態を指す(例えば、*R. M. Huber et al.*, *Gene* 2002, 290, 35を参照)。代表的なFXR種としては、限定されないが、受容体のラット(*GenBank*アクセッション番号NM\_21745)形態、マウス(*GenBank*アクセッション番号NM\_09108)形態およびヒト(*GenBank*アクセッション番号NM\_05123)形態が挙げられる。

40

【0024】

「可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)」という用語は、ヒトにおいてEPHX2遺伝子(*HGNC*: 3402)によってコードされる二官能性酵素を指すことが意図され

50

ている。s E Hは、エポキシドヒドロラーゼファミリーのメンバーである。サイトゾルおよびペルオキシソームの両方に見られるこの酵素は、特定のエポキシドに結合し、それらに対応するジオールに変換する。

【0025】

別の態様では、本発明はまた、本明細書に開示される新規の化合物を合成するための方法を提供する。

【0026】

本発明の化合物は、特に、対象における疾患を治療する方法において有用である。好ましくは、本発明により治療される疾患は、F X Rおよびs E Hに関連した障害である。

【0027】

したがって、F X Rおよびs E Hを同時に調節するための方法もまた提供され、この方法は、本明細書で前述されるF X Rおよびs h eの二重調節剤を対象または細胞に投与するステップを含む。

【0028】

次いで、別の態様は、対象における疾患を治療する方法に関し、この方法は、治療有効量の本発明の化合物または本発明の薬学的組成物を、対象に投与するステップを含む。

【0029】

本開示の文脈において、「対象」という用語は、好ましくは哺乳類、好ましくはマウス、ラット、ロバ、ウマ、ネコ、イヌ、モルモット、サル、類人猿または好ましくはヒト患者、例えば、本明細書に記載される障害に罹患している患者に関する。

【0030】

好ましい実施形態では、疾患または障害は、代謝障害、好ましくは高脂肪食によって引き起こされるかまたはそれに関連した代謝障害である。

【0031】

肝疾患は、肝臓の損傷または肝臓の疾患の一種である。100種類を超える肝疾患が存在する。最も広く知られているのは以下のとおりである：肝蛭症、肝炎、アルコール性肝疾患、脂肪性肝疾患、肝硬変、肝臓、胆汁、硬化性胆管炎、小葉中心壊死、バッド・キアリ症候群、遺伝性肝疾患（体内の鉄の蓄積に関与するヘモクロマトーシスおよびウィルソン病）、トランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス、ならびにジルベール症候群。

【0032】

本明細書で使用される場合、「肝疾患」という用語は、肝臓に影響を及ぼす任意の疾患または障害を指す。肝疾患の例としては、アラジール症候群、アルコール関連肝臓病、1アンチトリプシン欠乏症、自己免疫性肝炎、良性肝腫瘍、胆道閉鎖症、肝硬変、ガラクトース血症、ジルベール症候群、ヘモクロマトーシス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝細胞癌、肝性脳症、肝嚢胞、肝臓癌、新生児黄疸、非アルコール性脂肪性肝疾患（非アルコール性脂肪肝および非アルコール性脂肪性肝炎を含む）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、原発性硬化性胆管炎（PSC）、ライ症候群、I型糖原貯蔵症、ならびにウィルソン病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

「非アルコール性脂肪肝」または「非アルコール性脂肪性肝疾患」（NAFLD）という用語は、過剰なアルコール摂取に起因せずに肝臓内に脂肪が蓄積したときに起こる、脂肪肝の一因である病態を指す。NAFLDは、インスリン抵抗性および代謝症候群に関し、体重減量、メトホルミンおよびチアゾリジンジオンなどの、他のインスリン抵抗性状態（例えば、2型糖尿病）のために本来開発された治療に応答し得る。NAFLDは、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）および非アルコール性脂肪肝（NAFL）として細分類され得る。NASHは、NAFLDのより極端な形態であり、原因不明の肝硬変の主な原因とみなされている。

【0034】

NAFLDを有する大部分の患者は、症状をほとんどまたは全く有しない。患者は、疲労、倦怠感および右上腹部の鈍い不快感を訴える場合がある。希ではあるが、軽度黄疸が

10

20

30

40

50

認められる場合がある。より一般的には、N A F L Dは、日常的な血液検査において腹部肝機能検査後に診断される。N A F L Dは、インスリン抵抗性および代謝症候群（肥満、複合型高脂血症、糖尿病（Ⅱ型）および高血圧）に関連している。一般的な所見は、上昇した肝酵素、および脂肪症を示す肝臓超音波検査である。また超音波検査を使用して、胆石の問題（胆石症）を除外する場合もある。肝生検（組織検査）は、N A S Hを他の形態の肝疾患から決定的に区別するものとして広く受け入れられている唯一の検査であり、それを使用して、炎症および結果として生じる線維症の重症度を評価することができる。

【0035】

非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）は、一般的な、多くの場合「サイレントな」肝疾患である。N A S Hにおける主な特徴は、炎症および損傷を伴う、肝臓内の脂肪である。N A S Hを有する大部分の人々は、体調が良く、肝臓に問題があることに気づかない。それにもかかわらず、N A S Hは深刻であり得、肝硬変につながり得、この場合、肝臓が永久的に損傷され、傷跡が残り、適切に機能することができなくなる。

10

【0036】

N A S Hは通常、日常的な血液検査パネルに含まれる肝臓検査において、アラニンアミノトランスフェラーゼ（A L T）またはアスパルテートアミノトランスフェラーゼ（A S T）などの上昇を有することが見出された人において最初に疑われる。さらなる評価により肝疾患の明らかな理由が示されない場合、および肝臓のx線または画像解析が脂肪を示す場合、N A S Hが疑われる。N A S Hの決定的な診断を提供し、それを単なる脂肪肝と区別する唯一の手段は、肝生検である。N A S Hは、生検から、肝細胞の炎症および損傷を伴う脂肪が観察された場合に診断される。組織が炎症および損傷のない脂肪を示す場合、N A F LまたはN A F L Dと診断される。現在、血液検査もスキャンも、この情報を確実に提供することができない。

20

【0037】

したがって、本発明の化合物で治療される好ましい疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患または非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）などの肝疾患である。

【0038】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、例えば、研究者または医師によって調べられる、組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を引き出す化合物の量を意味する。さらに、「治療有効量」という用語は、そのような量を受けなかった対応する対象と比較して、疾患、障害もしくは副作用の改善された治療、治癒、予防もしくは寛解、または疾患もしくは障害の進行速度の減少をもたらす任意の量を意味する。

30

【0039】

さらに別の態様では、薬学的に許容される担体および/または賦形剤とともに本発明の化合物を含む薬学的組成物が提供される。

【0040】

本発明の化合物（複数可）はまた、さらなる活性成分と組み合わせて投与することもできる。所望の生物学的効果を達成するために必要とされる式Ⅰの化合物の量は、多くの因子、例えば、選択される特定の化合物、使用目的、投与形態および患者の臨床状態に依存する。

40

【0041】

1日用量は、一般に、体重1キログラムあたり1日0.3mg~100mg（典型的に、3mg~50mg）の範囲、例えば3~10mg/kg/日である。静脈内用量は、例えば0.3mg~1.0mg/kgの範囲であってよく、体重1キログラムあたり毎分10ng~100ngの注入として好適に投与することができる。これらの目的のための好適な輸液は、例えば1ミリリットルあたり0.1ng~100mg、典型的に1ng~100mgを含有し得る。単一用量は、例えば、1mg~10gの活性成分を含有し得る。したがって、注射用アンプルは、例えば、1mg~100mgを含有してよく、経口投与可能な単一用量製剤、例えば錠剤またはカプセルは、例えば1.0~1000mg、典型

50

的に10～600mgを含有し得る。上述の病態の治療の場合、式Iの化合物自体を化合物として使用してもよいが、それらは好ましくは、適合する担体とともに薬学的組成物の形態で存在する。当然のことながら、担体は、組成物の他の構成要素と適合性であり患者の健康に有害でないという意味において許容可能でなければならない。担体は、固体もしくは液体または両方であってよく、好ましくは、0.05重量%～95重量%の活性成分を含有し得る単一用量として、例えば錠剤として、化合物とともに製剤化される。他の式Iの化合物を含む、他の薬学的に活性な物質も同様に存在し得る。本発明の薬学的組成物は、既知の薬学的方法のうちの1つによって生成することができ、本質的に、成分を薬学的に許容される担体および/または賦形剤と混合することを伴う。

#### 【0042】

本発明の薬学的組成物は、経口(oral)、直腸、局所、経口(peroral)(例えば、舌下)および非経口(例えば、皮下、筋肉内、皮内または静脈内)投与に適したものであるが、最も好適な投与形態は、各個々の症例において治療される病態の性質および重症度、ならびに各症例において使用される式Iの化合物の性質に依存する。被覆製剤または薬剤形態もまた、本発明の範囲内である。糖被覆製剤および糖被覆徐放製剤もまた、本発明の範囲内である。耐酸性および耐胃液性製剤が優先される。好適な耐胃液性被覆は、酢酸フタル酸セルロース、酢酸フタル酸ポリビニル、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ならびにメタクリル酸およびメタクリル酸メチルのアニオン性ポリマーを含む。経口投与に適した薬学的化合物は、別個の、すなわち単一用量単位の形態、例えばカプセル、カシェ剤、舐剤、フィルム錠剤、糖被覆錠剤、可溶性錠剤、舌下錠剤、経口錠剤または錠剤の形態であってよく、各々が、定義された量の式Iの化合物を、粉体もしくは顆粒として、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油もしくは油中水エマルジョンとして含有する。これらの組成物は、既述のとおり、活性成分および担体(1種以上の追加成分からなり得る)を接触させるステップを含む、任意の好適な薬学的方法によって調製され得る。組成物は、一般に、活性成分を液体および/または細分された固体担体と均一かつ均質に混合することによって生成され、その後、生成物は、必要に応じて成形される。例えば、錠剤は、化合物の粉体または顆粒を、該当する場合は1種以上の追加成分とともに、圧縮または成型することによって生成され得る。圧縮された錠剤は、易流動性形態、例えば粉体または顆粒などの化合物を錠剤化することによって生成することができ、該当する場合は、好適な機械の中で、結合剤、滑剤、不活性希釈剤(充填剤)および/または1種(もしくは複数種)の界面活性剤/分散剤と混合することができる。成型された錠剤または顆粒は、好適な機械の中で、不活性液体希釈剤で湿らせた粉状化合物を成型することによって生成され得る。

#### 【0043】

経口(舌下)投与に適した薬学的組成物としては、香味剤、典型的にスクロース、およびアラビアガムまたはトラガカントとともに、式Iの化合物を含有する舐剤、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはスクロースおよびアラビアガムなどの不活性基剤中に該化合物を含むトローチ剤が挙げられる。

#### 【0044】

好ましくは、非経口投与に適した薬学的組成物は、意図されるレシピエントの血液と好ましくは等張である、式Iの化合物の滅菌水性調製物を含む。これらの調製物は、好ましくは静脈内投与されるが、投与は、皮下、筋肉内または皮内注射によって行われてもよい。これらの調製物は、好ましくは、化合物を水と混合し、得られた溶液を好適な滅菌プロセス(例えば、蒸気滅菌、滅菌濾過)によって滅菌し、血液と等張にすることによって生成することができる。本発明の注射可能な組成物は、一般に、0.1～5重量%の活性化合物を含有する。直腸投与に適した薬学的組成物は、好ましくは単一用量坐薬の形態である。これらは、式Iの化合物を1種以上の従来の固体担体、例えばココアバターと混合し、得られた混合物を成形することによって生成され得る。

#### 【0045】

皮膚の局所使用に適した薬学的組成物は、好ましくは軟膏、クリーム、粉体、ローショ

10

20

30

40

50

ン、ペースト、スプレー、エアロゾルまたは油の形態である。使用され得る担体は、ペトロラタム、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコールおよびこれらの物質のうちの2つ以上の組み合わせである。活性成分は、一般に、組成物の0.1~15重量%、例えば0.5~2%の濃度で存在する。

#### 【0046】

経皮投与も可能である。経皮使用に適した薬学的組成物は、患者の上皮との密接な長期接触に適した単一パッチの形態であってよい。そのようなパッチは、緩衝化され、該当する場合は接着剤中に溶解および/もしくは分散されるかまたはポリマー中に分散される、水性溶液中に、活性成分を含有する。好適な活性成分濃度は、約1%~35%、好ましくは約3%~15%である。特定のオブションは、例えばPharmaceutical Research, 2(6):318(1986)に記載される電氣的輸送またはイオン泳動によって、活性成分が放出されるようにするものである。

10

#### 【0047】

本発明は、添付の図面およびシーケンスを参照して以下の実施例においてさらに説明されるが、それらに限定されない。本発明の目的のために、本明細書に引用されるすべての参考文献は、全体が参照により組み込まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0048】

【図1】二重調節剤の能力プロットにより、最も強力な部分的FXRアゴニストとして30、46および54(赤色)が示され、一方で最も高いsEH阻害能力については31、44および51(青色)が明らかになった。結果として、これらの化合物の構造的特徴を組み合わせ、二重活性を増加させ、55および57(緑色、表7)が得られた。

20

【図2】57の分子ドッキング:(A)FXR-LBD(PDBコード4QE8)における化合物57の結合様式。(B)sEH(PDBコード3I28)における化合物57の結合様式。分子表面は、親油性に従って着色した(緑色:親油性、マゼンタ色:親水性)。選択された側鎖は線として示し、化合物57は棒として表す。

【図3】57のインビトロ特性化:(A)選択性プロファイル:PPAR に対する中程度の活性を除いて( $EC_{50} = 14.7 \pm 0.9 \mu M$ 、最大 $30 \pm 1\%$ )、57は、関連する核内受容体に対して不活性であり、したがってFXRに対して高度に選択的であった(値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 3$ )。(B)57は、 $100 \mu M$ までのHepG2細胞に関する一般的なWST-1アッセイにおいて、細胞毒性がないことが明らかになった(値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 4$ )。(C)57は、許容可能なインビトロマイクロソーム安定性を表し、ウスターラット肝臓マイクロソームとの60分のインキュベーション後に50%超が残存した(値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 3$ )。

30

【図4】57の細胞活性の決定:(A)50 $\mu M$ のCDCA(1b)と比較した、0.1 $\mu M$ および1 $\mu M$ の57との8時間または16時間のインキュベーション後のHepG2細胞におけるFXR標的遺伝子mRNAの定量化:57は、BSEP、SHP、PPAR、GLUT4、FGF19、PDK4およびFABP1の濃度依存的な部分誘導、ならびにCYP7A1、SREBP1cおよびFASの濃度依存的な部分抑制を引き起こした(ビヒクル処理した対照細胞は、100%として定義される。値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 4$ )。(B)57は、PPAR 標的遺伝子であるCD36およびFAM3Aの有意な調節は引き起こさなかった(陽性対照としてのピオグリタゾン(PIO)。値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 3$ )。(C)HepG2細胞からの細胞ホモジネートにおける可溶性エポキシドヒドロラーゼ活性:二重調節剤57は、およそ10nMの $IC_{50}$ 値で細胞sEHによる14.15-EEt-d11の14.15-DHEt-d11への変換を阻害し、0.1nMという低い濃度で統計的に有意な阻害を行う(値は平均 $\pm$ SEMである。 $n = 3$ )。(\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ )

40

【図5】57のインビボ特性化:(A)57のインビボ薬物動態評価により、二重調節剤の急速な取り込み、高いバイオアベイラビリティ、および中程度だが許容可能な半減期が明らかになった。57は、体重1キログラムあたり10mgの単回経口投与の後、およそ

50



3.5 時間にわたって  $IC_{50}$  (sEH) 値および  $EC_{50}$  (FXR) 値を超える有効血漿濃度を達成した。(B) 投与後 8 時間のマウス血漿中の EET / DHEET 比におけるおよそ 2 倍の増加は、57 がインビボで sEH を阻害したことを示した。(C) ビヒクルで処置したマウス (100%) と比較した、投与後 8 時間の FXR 標的遺伝子 BSEP、SHP、CYP7A1、SREBP1c および FGF15 ならびに PPAR 標的遺伝子 F ATP の mRNA レベルの定量化。57 は、BSEP および SHP を誘導する傾向を示し、CYP7A1 をわずかに抑制した。さらに、57 は、SREBP1c を有意に抑制し、FGF15 を有意に誘導した。これは、インビボでの FXR 調節および NASH における潜在的に有益な効果を示す。PPAR 標的遺伝子である F ATP は、インビボで調節されなかった。(n (ビヒクル) = 3、n (57) = 6、\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ )

【図 6】(またはスキーム 10) : 57 のインビトロ代謝。二重調節剤 57 のスルホンアミド部分の加水分解により、代謝産物 69a (LC-MS-MS によって確認される) が生成され、これは高い二重調節能力を表し、薬力学的活性に寄与し得る。LC-MS-MS 分析はまた、tert-ブチルベンズアミド残基におけるヒドロキシル化から生じる代謝産物の存在を示す。3 つの可能性のある異性体 77、78 および 79 のうち、77 および 78 は検出不可能であり、79 をもたらす tert-ブチル基における代謝性ヒドロキシル化を確認した。さらに、57 は、ベンジル置換基の芳香環においてヒドロキシル化される。

【図 7】(またはスキーム 1) 重要な FXR リガンド : オベチコール酸 (1a)、生理学的アゴニストである CDC A (1b)、および合成参照 FXR アゴニスト (1c) を示す。

【図 8】(またはスキーム 2) sEH 阻害剤 GSK2188931B (2) および部分的 FXR アゴニスト 3 のファルマコフォアをマージすることによるリード化合物 5 の発見を示す。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0049】

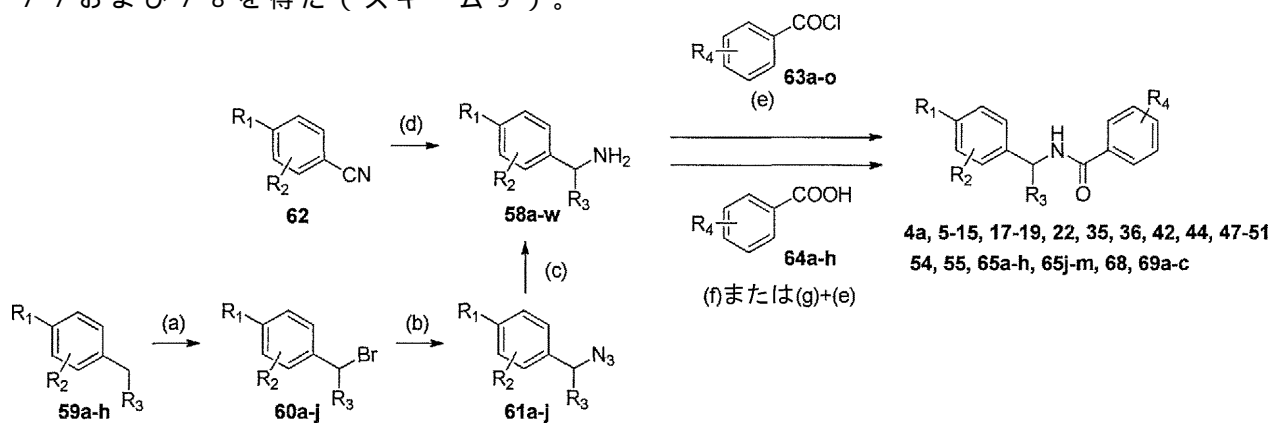
FXR および sEH に対して強力な二重活性を有する剤を開発するために、本発明者らは、最初に FXR 調節剤の社内ライブラリーの代表的な化合物をスクリーニングしたが、それらの中で sEH に対して阻害能力を有するリード化合物を特定することはできなかった。したがって、本発明者らは、既知の部分的 FXR アゴニストおよび既知の sEH 阻害剤からマージしたファルマコフォアを探索した。いくつかの sEH 阻害剤は、酵素によって切断されるエポキシド部分を模倣するアミドまたは尿素残基を含有する。ファルマコフォアとして N-ベンジルアミド残基を含む sEH 阻害剤 GSK2188931B (2) は、最近報告された<sup>15</sup> 部分的 FXR アゴニスト (例えば 3) といくらかの構造的類似性を共有する。したがって、本発明者らは、両方の化合物に類似する構造的特徴を抽出し、それらを組み合わせて、sEH 阻害のための N-ベンジルアミド残基および FXR 活性化のためのカルボン酸基を含有する最小二重ファルマコフォア 4a にした (図 8、スキーム 2)。化合物 4a は、50  $\mu$ M で  $37 \pm 1\%$  の中程度の sEH 阻害を呈したが、FXR に対しては不活性であった。テンプレート 2 のペリジン部分を組み込んだ 4b は、さらに低い活性を示し、sEH および FXR に対して不活性であった。しかしながら、本発明者らが 4a および 4b の飽和環を 5 の芳香族部分で置き換えたとき、本発明者らは、50  $\mu$ M の濃度での  $12 \pm 1\%$  の FXR 活性化および  $16 \pm 2\%$  の sEH 阻害を伴う所望の二重活性を達成した。低フラグメント様サイズ (MW 255 Da) の 5 について、本発明者らは、この中程度の能力を十分であると考え、sEH および FXR の二重調節剤としての 5 の構造活性相関 (SAR) を系統的に調査した (図 2)。

【0050】

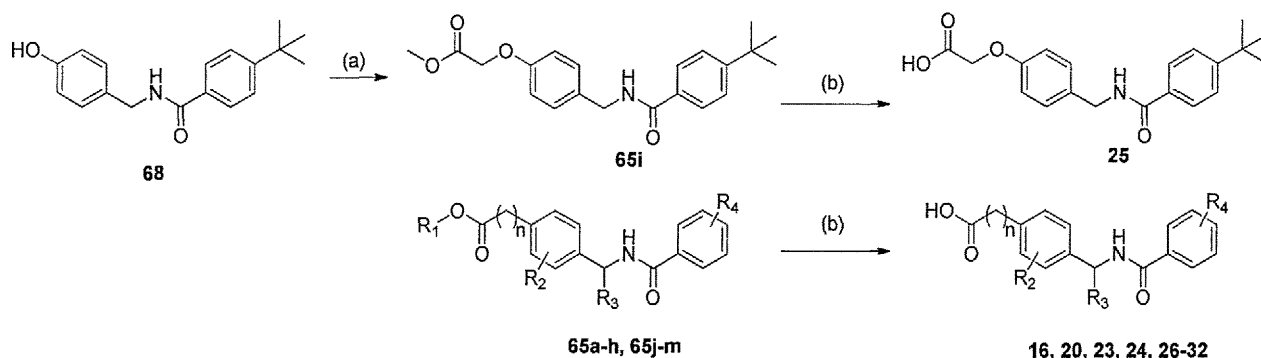
実施例 1 : 合成

N-ベンジルベンズアミド 4 ~ 57 および 77 ~ 78 を、スキーム 3 ~ 9 に従って調製

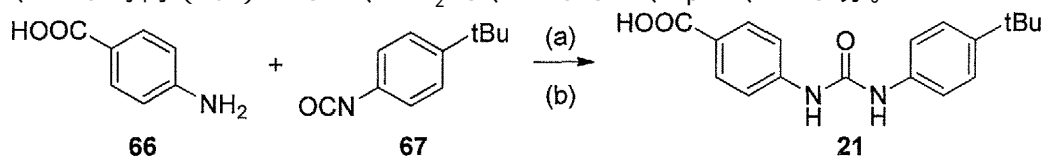
した。アミノメチルベンゼン前駆体 58a~j の合成は、NBS および AIBN を使用した、それぞれのメチルベンゼン誘導体 59a~j のプロモメチルベンゼン 60a~j へのラジカル臭素化で開始した。その後、プロモメチルベンゼン 60a~j を、アジ化ナトリウムを使用する 2 ステップのシュタウディングー反応に適用して、それらの還元のために水中でアジド 61a~j およびトリフェニルホスフィンを生成した。アミノメチルベンゼン誘導体 58k は、LiAlH<sub>4</sub> を使用した 4 - アミノ - 2 - クロロベンゾニトリル 62 の還元によって調製した。アミノメチルベンゼン誘導体 58l~w は、市販されていた。その後、58a~w を、ピリジンの存在下で塩化カルボニル 63a~o と、または EDC および 4 - DMA P の存在下でカルボン酸 64a~f と反応させて、化合物 18、19、22、35、36、44、47~51、54、55、68 および 69a~c、またはそれらのエステル 65a~h を得た (スキーム 3)。化合物 68 を BrCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub> で処理して、エステル 65i を生成した。すべてのエステル 65a~i を、アルカリ条件下で最終生成物 16、20 および 23~32 へと加水分解した (スキーム 4)。4 - アミノ安息香酸 (66) および 4 - tert - ブチルフェニルイソシアネート (67) から、NEt<sub>3</sub> およびその後の水酸化リチウムによる加水分解によって、尿素 21 を調製した (スキーム 5)。遊離カルボン酸 18 は、塩化アンモニウム、塩化メチルアンモニウムまたは塩化ジメチルアンモニウムおよび EDC / DMA P を使用したアミド 37~39 の調製に役立った。LiAlH<sub>4</sub> による 18 の還元によってエチルアルコール誘導体 33 を得て、これを PCC でアルデヒド 34 へとさらに変換した (スキーム 6)。反転アミド 40、41 および 56、反転スルホンアミド 46 および 57、ならびに N - アシルスルホンアミド 45 を、カルボン酸活性化のために EDC / DMA P を用いて 42、44 および 69a から生成した。テトラゾール 43 は、Cu<sub>2</sub>O 触媒下で NaN<sub>3</sub> の環化付加によってニトリル 36 から取得可能であった (スキーム 7)。メチルメルカプタン 51 のスルホキシド 52 およびスルホン 53 への酸化は、好適な当量のメタクロロ過安息香酸 (mCPBA、スキーム 8) を使用して達成し、最終的に、標準手順に従ったメトキシ誘導体 76a~b の調製 (スキーム 3) および BBr<sub>3</sub> によるそれらの脱メチル化により、フェノール誘導体 77 および 78 を得た (スキーム 9)。



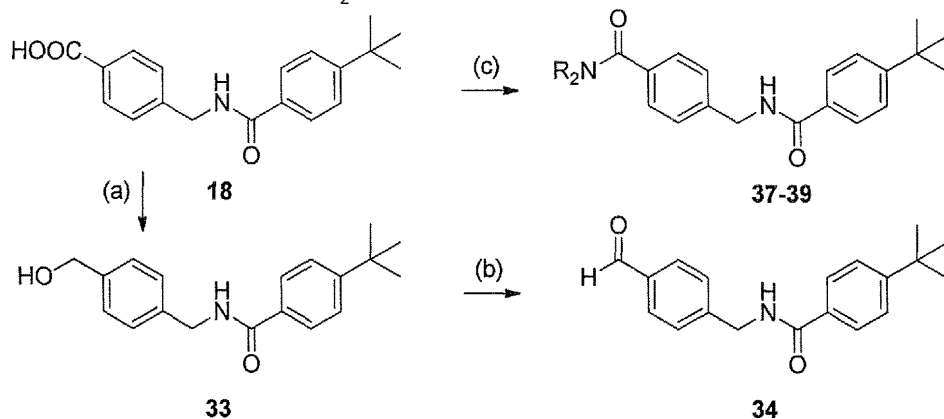
スキーム 3 : 試薬および条件 (a) NBS、AIBN、CHCl<sub>3</sub>、還流、4 時間 (b) NaN<sub>3</sub>、DMF、80 °C、16 時間 (c) PPh<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O、THF、室温、12 時間 (d) LiAlH<sub>4</sub>、THF、還流、18 時間 (e) ピリジン、THF、室温、2 時間 (f) EDC・HCl、DMA P、CHCl<sub>3</sub>、50 °C、6 時間 (g) SOCl<sub>2</sub>、DCM、DMF、還流、4 時間。



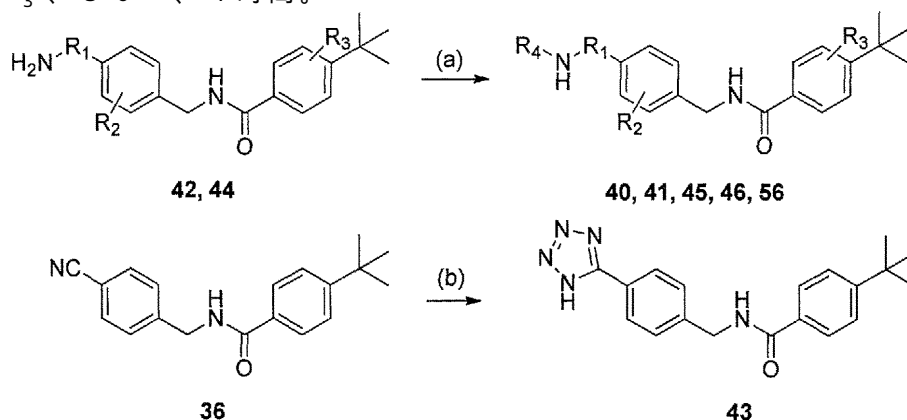
スキーム 4：試薬および条件 (a)  $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$ 、DMF、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、室温、18 時間 (b)  $\text{KOH}$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MeOH}$ 、 $\mu\text{w}$ 、15 分。



スキーム 5：試薬および条件 (a)  $\text{DCM}$ 、 $\text{NEt}_3$ 、室温、24 時間 (b)  $\text{LiOH}$ 、 $\text{THF}$ 、 $\text{MeOH}$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 、室温、15 時間。



スキーム 6：試薬および条件 (a)  $\text{LiAlH}_4$ 、 $\text{THF}$ 、室温、18 時間 (b)  $\text{PCC}$ 、 $\text{DCM}$ 、室温、2 時間 (c)  $\text{R}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{DMAP}$ 、 $\text{CHCl}_3$ 、50℃、4 時間。



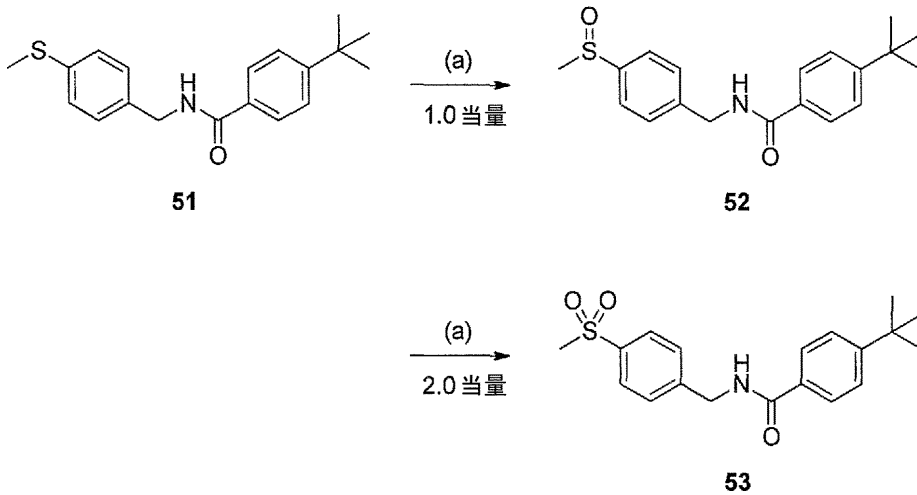
スキーム 7：試薬および条件 (a)  $\text{R}-\text{OH}$ 、 $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{DMAP}$ 、 $\text{CHCl}_3$ 、50℃、4 時間、または塩化メシル、 $\text{THF}$ 、室温、2 時間 (b)  $\text{Cu}_2\text{O}$ 、 $\text{NaN}_3$ 、 $\text{DMF}$ 、 $\text{MeOH}$ 、90℃、24 時間 (c)  $\text{BBr}_3$ 、 $\text{DCM}$ 、0℃～室温、2 時間。

10

20

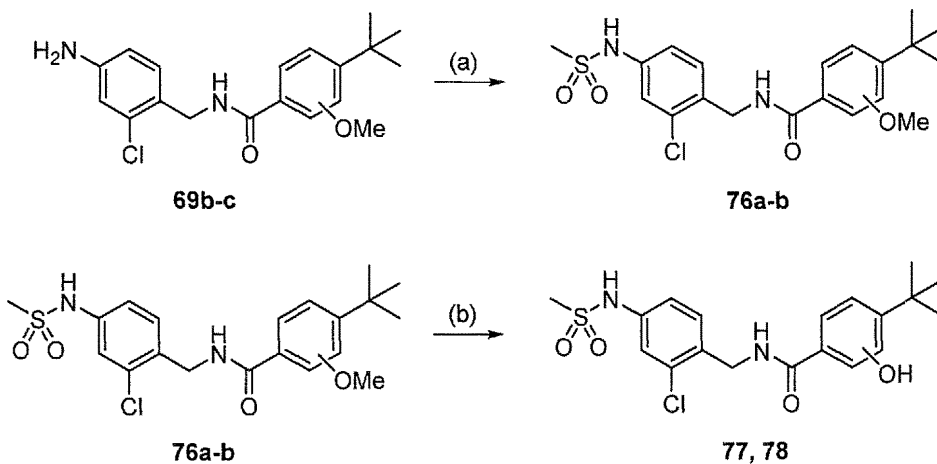
30

40



10

スキーム 8：試薬および条件 (a) mCPBA、CHCl<sub>3</sub>、0 で 2 時間または室温で 18 時間。



20

スキーム 9：試薬および条件 (a) 塩化メシル、THF、室温、2 時間 (b) BBr<sub>3</sub>、DCM、0 ~ 室温、2 時間。

【0051】

30

#### 実施例 2：生物学的評価

FXR アゴニスト活性を決定するために、試験化合物 4 ~ 57 を、HeLa 細胞における全長 (fl) FXR レポーター遺伝子アッセイにおいて特性化した。このアッセイは、胆汁酸塩排出タンパク質 (BSEP) 由来の FXR 応答エレメントの制御下にホタルルシフェラーゼを含有するレポーター構築物に基づく。FXR およびそのヘテロ二量体パートナーであるレチノイド X 受容体 (RXR) を CMV プロモーターの制御下にある発現構築物として、ならびに正規化および毒性対照のための構造的に発現されるウミシイタケルシフェラーゼ (SV40 プロモーター) を、同時導入した。合成 FXR アゴニスト GW4064 (1c) を、参照アゴニストとして使用し、3 μM におけるそのトランス活性化活性を、100% 活性化として定義した。このアッセイでは、多様な既知の FXR アゴニストを検証し、これらは文献と良く一致する能力をもたらした (GW4064 (1c) : EC<sub>50</sub> = 0.51 ± 0.16 μM、OCA (1a) : EC<sub>50</sub> = 0.16 ± 0.02 μM、および CDCA (1b) : EC<sub>50</sub> = 1.8 ± 1 μM)。十分に特性化された sEH 阻害剤である CIU<sup>36</sup> は、sEH 阻害剤の非特異的作用を除いて、このアッセイにおいて 10 μM では活性を有していなかった。試験化合物の sEH 阻害能力を、組み換え酵素、および sEH によって蛍光 6-メトキシナフトアルデヒドへと加水分解される蛍光発生 sEH 基質 PHOME<sup>37</sup> を使用して、蛍光ベースのアッセイにおいて定量化した。

40

【0052】

#### 実施例 3：構造活性相関および構造最適化

SAR 研究における最初のステップとして (表 1)、本発明者らは、5 のベンズアミド

50

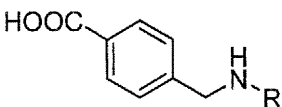
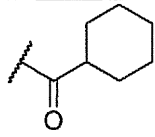
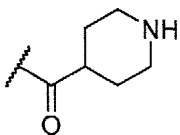
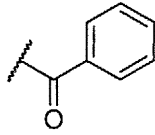
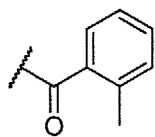
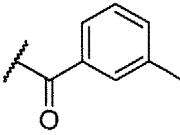
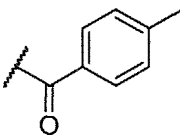
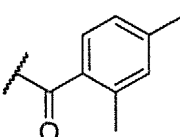
部分構造のあらゆる位置に追加のメチル基を導入した(6~8)。すべてのメチル化誘導体6~8は、弱いsEH阻害活性を呈したが、FXRは、8の4-メチル基しか許容せず、これはFXR結合ポケットが、特にこの方向に追加の空間を提供することを示した。3-メチル基(7)は、メチル化誘導体の中で最も高いsEH阻害をもたらしたため、本発明者らは、両方の標的に対する改善を組み合わせるために、2つのメチル置換基を含む化合物(9、10)を調製した。2,4-ジメチル誘導体9は、ほぼ不活性であり、一方で3,4-ジメチル誘導体10は、改善された二重活性を呈したが、FXRに対するその最大相対活性化はむしろ低かった。

#### 【0053】

追加のメチル基は、いずれかの標的に対する能力を著しくは改善しなかったため、本発明者らはまた、ベンズアミド部分上により大きな残基を導入することについて調査し、ビフェニル誘導体11~13を特性化した。3つのビフェニル11~13はすべて、それぞれのメチルベンズアミド6~8よりも大幅に高い能力を明らかにしたが、能力の順位は変わらなかった。FXRは、3-置換(12)は許容したが、4-置換(13)を好み、sEHは、3-(12)および4-ビフェニル誘導体(13)によって同程度に阻害することができた。

#### 【0054】

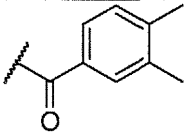
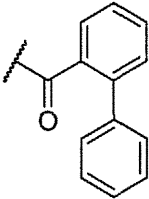
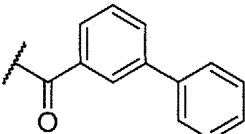
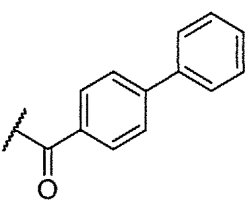
(表1) FXRおよびsEHに対する4~13のインビトロ活性(データは平均±SEMを表す、n=3~6)

#	 <b>R =</b>	<b>FXR 活性化</b>	<b>sEH 阻害</b>
		EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%
<b>4a</b>		不活性 (50 μM)	37±1% 阻害 (50 μM)
<b>4b</b>		不活性 (50 μM)	不活性 (50 μM)
<b>5</b>		12±1% 活性化 (50 μM)	16±2% 阻害 (50 μM)
<b>6</b>		不活性 (50 μM)	14±1% 阻害 (50 μM)
<b>7</b>		不活性 (50 μM)	37±1% 阻害 (50 μM)
<b>8</b>		15±3% 活性化 (50 μM)	24±1% 阻害 (50 μM)
<b>9</b>		不活性 (50 μM)	7±2% 阻害 (50 μM)

10

20

30

10		$0.32 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (12±1%)	52±1% 阻害 (50 $\mu\text{M}$ )
11		22±1% 活性化 (50 $\mu\text{M}$ )	19±2% 阻害 (50 $\mu\text{M}$ )
12		$0.67 \pm 0.17 \mu\text{M}$ (14±1%)	10.0±1.2 $\mu\text{M}$
13		$0.44 \pm 0.04 \mu\text{M}$ (24±1%)	8.1±0.1 $\mu\text{M}$

10

20

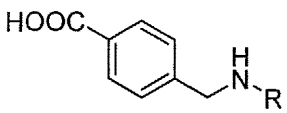
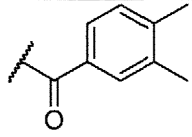
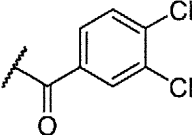
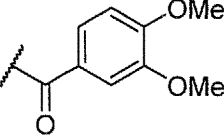
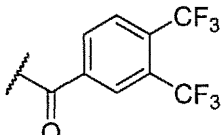
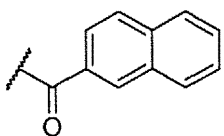
## 【0055】

最初のSARの結果は、5のベンズアミド残基における3-置換および4-置換が、両方の標的によって許容され、最終的に二重能力を改善したことを示唆した。したがって、本発明者らは、様々な3,4-二置換(14~16)ならびに2-ナフチル誘導体17を調査した(表2)。しかしながら、14~17は、FXRおよびsEHに対する二重能力の著しい改善はもたらすことができなかった。3,4-ジクロロ(14)および3,4-ビス(トリフルオロメチル)置換(16)は、sEHにしか許容されず、2-ナフチル誘導体17は、10よりもFXRに対して低活性であった。3,4-ジメトキシベンズアミド15のみが、EC<sub>50</sub>値に影響を及ぼすことなくFXRに対する最大相対活性化を改善し、sEH活性を弱く阻害したため、好ましかった。

30

## 【0056】

(表2) FXRおよびsEHに対する14~17のインビトロ活性(データは平均±SEMを表す、n=3~6)

#	 <b>R =</b>	<b>FXR 活性化</b>	<b>sEH 阻害</b>
		EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%
10		0.32±0.03 μM (12±1%)	52±1% 阻害 (50 μM)
14		不活性 (50 μM)	10.5±0.3 μM
15		0.37±0.02 μM (18±1%)	26±2% 阻害 (50 μM)
16		不活性 (50 μM)	55±1% 阻害 (50 μM)
17		1.36±0.08 μM (18±1%)	45±1% 阻害 (50 μM)

10

20

30

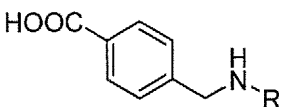
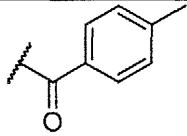
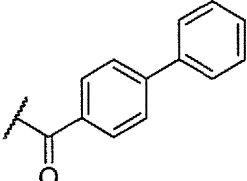
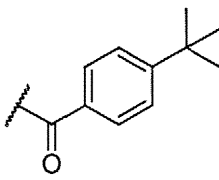
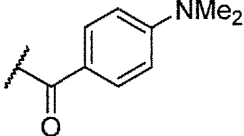
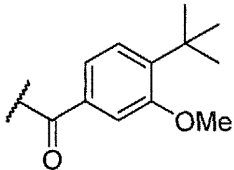
## 【 0 0 5 7 】

これまでのところ、4 - ビフェニル誘導体 1 3 が、最高の二重能力を明らかにし、両方の標的が、ベンズアミド残基における大きな 4 - 置換基を許容したことを示した (表 3)。1 8 における 4 - *tert* - ブチル部分の導入は、二重活性のさらなる改善につながったが、*tert* - ブチル模倣体としてのより極性の 4 - ジメチルアミノベンズアミド 1 9 は、大幅に低い活性であった。2 0 における、1 8 の好ましい大きな *tert* - ブチル残基と 1 5 の 3 - メトキシ基との組み合わせは、追加の効果をもたらさなかったため、本発明者らは、さらなる最適化のために 4 - *tert* - ブチル誘導体 1 8 を選択した。

## 【 0 0 5 8 】

(表 3) F X R および s E H に対する 1 8 ~ 2 0 のインビトロ活性 (データは平均 ± S E M を表す、n = 3 ~ 6)



#	 <b>R =</b>	<b>FXR 活性化</b>	<b>sEH 阻害</b>
		EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%
8		15±3% 活性化 (50 μM)	24±1% 阻害 (50 μM)
13		0.44±0.04 μM (24±1%)	8.1±0.1 μM
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
19		不活性 (50 μM)	19±1% 阻害 (50 μM)
20		1.2±0.4 μM (23±1%)	5.04±0.30 μM

10

20

30

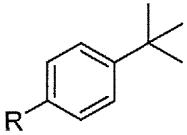
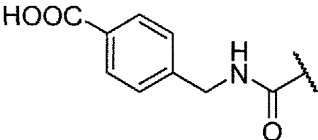
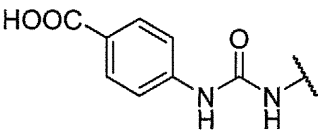
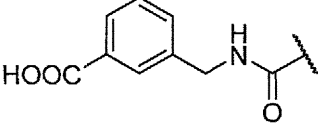
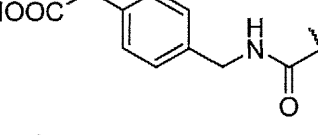
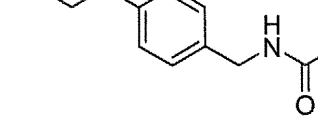
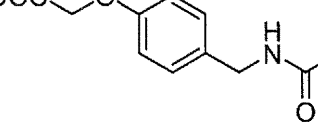
40

## 【0059】

18を新たなリードとして用いて、本発明者らは、次にN-ベンジル置換基の最適化に焦点を当てた(表4)。18のN-ベンジルベンズアミド構造を、伝統的なsEHファルマコフォアとしての21のジフェニル尿素と交換することは、両方の標的によって十分に許容されなかった。同様に、18の4位から22の3位へのカルボン酸部分の移行は、能力の顕著な低下を引き起こした。安息香酸(18)からフェニル酢酸(23)への側鎖長の変動は、両方の標的に対する能力を減少させたが、フェニルプロピオン酸24は、18とほぼ等しい活性をもたらした。このSARは、以前の研究において観察されたように、18の水媒介性相互作用および24による水の置換によって最終的に説明することができる<sup>15</sup>。フェノキシ酢酸25は、FXRに対してフェニルプロピオン酸24と同様の活性を呈したが、エーテル残基は、sEHによって十分に許容されず、阻害能力を約10分の1に著しく減少させた。

## 【0060】

(表4) FXRおよびsEHに対する21~25のインビトロ活性(データは平均±SEMを表す、n=3~6)

#	 <b>R =</b>	<b>FXR 活性化</b>	<b>sEH 阻害</b>
		EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
21		3.8±1.7 μM (14±1%)	18.5±2.8 μM
22		1.70±0.03 μM (14±1%)	26±2% 阻害 (50 μM)
23		6.4±1.2 μM (19±1%)	20.0±5.1 μM
24		0.35±0.03 μM (16±1%)	1.63±0.02 μM
25		0.73±0.18 μM (21±1%)	19.0±0.7 μM

## 【 0 0 6 1 】

二重能力の著しい改善は、分子構造およびファルマコフォア特徴間の距離の変動によって達成されなかったため(21~25)、本発明者らは、次に18の安息香酸芳香環に追加の置換基を導入する可能性を調べた(表5)。2位の置換基(26~28)は、FXRに対する能力を顕著に増加させ、2-クロロ誘導体28を非常に強力な部分的FXRアゴニストとした。しかしながら、sEH阻害活性は、同時に著しく低下した。これに対して、漸増する置換基サイズを有する3-置換(29~31)は、sEHに対する阻害能力に有益であり、3-クロロ安息香酸31を非常に強力なsEH阻害剤とした。FXRに関して、3-メチル置換(29)は、活性を完全になくし、一方で3-クロロ誘導体31は、依然として活性であったが、能力は大幅に低下した。3-フルオロ安息香酸30は、FXRに対して非常に強力であった。ベンジル位置におけるメチル化(32)は、FXRに対するアゴニスト活性を著しく強化したが、予想どおり、sEHによって許容されなかった。アミド部分は、EETのエポキシドおよび酵素の活性部位における攻撃性水分子を模倣するため<sup>3 4</sup>、ベンジル位置における立体障害は、sEHに対する阻害能力を著しく減少させる。総じて、安息香酸残基上のいくつかの追加の残基は、FXRまたはsEHに対する活性を改善したが、さらなる置換によって二重能力が生じ、強化され、均衡がとれる位置を特定することはできなかった。

## 【 0 0 6 2 】

(表5) FXRおよびsEHに対する26~32のインビトロ活性(データは平均±S

10

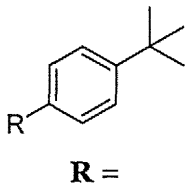
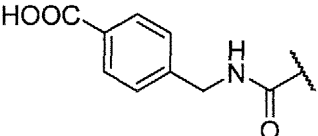
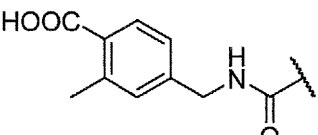
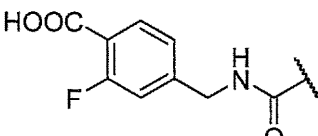
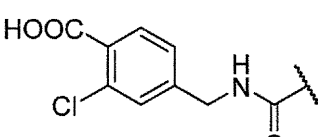
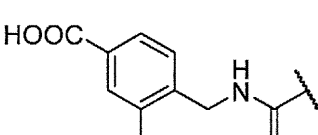
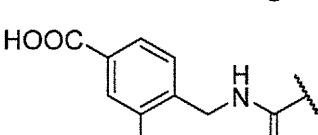
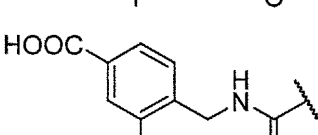
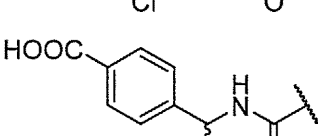
20

30

40

50

E Mを表す、n = 3 ~ 6)

#	 R =	<b>FXR 活性化</b> EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	<b>sEH 阻害</b> IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%	
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM	10
26		0.16±0.05 μM (14±1%)	53±1% 阻害 (50 μM)	
27		0.14±0.06 μM (28±2%)	20.3±1.2 μM	20
28		0.0088±0.0033 μM (21±2%)	50±1% 阻害 (50 μM)	
29		不活性 (50 μM)	0.68±0.06 μM	
30		0.0078±0.0007 μM (26±1%)	1.43±0.10 μM	30
31		7.5±0.4 μM (25±1%)	0.17±0.01 μM	
32		0.076±0.027 μM (24±1%)	37±1% 阻害 (50 μM)	40

## 【 0 0 6 3 】

したがって、本発明者らは、18のカルボン酸のSARを調査し、いくつかの代替極性残基および生物学的等価体を導入した(表6)。アルコール33は、sEHに対して18と同程度に強力であったが、FXRに対して不活性であった。一方でアルデヒド34は、依然として約10分の1の低い能力でFXRを活性化したが、18と比較してsEHに対して著しく強力であった。メチルケトン35は、両方の標的に対して顕著に改善された活性を示し、FXRおよびsEHに対するナノモル能力を有する最初の二重調節剤であった。このSARは、カルボン酸の代わりに、アルコールではなくカルボニル部分が、FXR

活性化に十分であったこと、および s E H がこの位置においてより極性の低い基を選好したことを示した。アルデヒド 3 4 の能力の低減は、f 1 F X R アッセイの細胞状況における低い安定性に起因し得る。ニトリル 3 6 は、ナノモル能力で s E H を阻害したが、F X R に対して不活性であった。アミド 3 7 ~ 3 9 は、中程度に強力な s E H 阻害剤にすぎず、これも同様に、この位置におけるより極性の高い残基が不利であったことを示した。アミド 3 7 ~ 3 9 は、F X R に対して、窒素原子上の置換が増加するにつれて能力を著しく獲得した。第 1 級アミド 3 7 は、カルボン酸 1 8 よりも大幅に低い活性であったが、N - メチルアミド 3 8 は、1 8 と同程度の能力を備えていた。N , N - ジメチルアミド 3 9 におけるもう一つのメチル基は、能力をさらに強化した。N - アセチルアニリン 4 0 におけるアミドの反転は、F X R アゴニスト活性を低減したが、N - トリフルオロアセチルアニリン 4 1 における 3 つのフッ素原子の導入は、非常に好ましく、均衡のとれたナノモル二重調節剤を生成した。遊離アニリン 4 2 は、依然として s E H を阻害したが、F X R に対して不活性であった。

10

#### 【 0 0 6 4 】

カルボン酸の伝統的な生物学的等価体としてのテトラゾール 4 3 は、F X R に対してわずかに強化された能力を有し、1 8 と比較して低減された s E H 阻害活性を伴った。大幅に酸性度の低いスルホンアミド 4 4 は、1 8 の活性プロファイルを若干反転させ、F X R よりも s E H に対してより強力であった。4 4 の酸性度を増加させるために、本発明者らは、N - アセチルスルホンアミド 4 5 を調製したが、これは F X R に対して不活性であり、4 4 と比較して s E H に対する能力を著しく失った。4 6 におけるスルホンアミド残基の反転は、4 0 におけるアミドの反転と同様の効果を有し、同じく強力な二重調節剤をもたらした。

20

#### 【 0 0 6 5 】

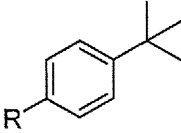
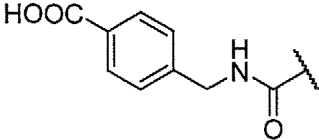
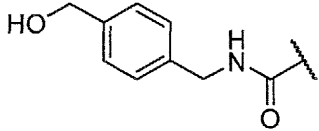
最後に、本発明者らは、4 7 において 1 8 のカルボン酸をメトキシ基と交換し、これが驚くべきことに、両方の標的に対して相当な能力をもたらした。エトキシ誘導体 4 8 は、F X R および s E H に対して同程度の能力を明らかにしたが、イソプロピルオキシ類似体 4 9 は、F X R に対して同程度に活性であったが、不溶性に起因して s E H に関しては特性化することができなかった。トリフルオロメトキシ誘導体 5 0 によって、s E H に対する能力のわずかな改善が達成され、これは高度でかつ良好に均衡がとれた二重能力を明らかにした。メチルメルカプタン 5 1 における硫黄による酸素の置換によって、およそ 0 . 1  $\mu$  M において両方の標的に対して半最大活性を有する、さらにより強力な二重調節剤が生成された。メルカプタン 5 1 をスルホキシド 5 2 またはスルホン 5 3 に酸化させた場合、F X R に対する能力は顕著に低下したが、5 2 は、s E H に対して依然として非常に活性であり、5 3 のみが著しく減少した阻害能力を明らかにした。カルボン酸置換としてのメルカプタンの場合、5 4 におけるトリフルオロメチル基の導入は、F X R に対する能力の顕著な増加につながり、ナノモル以下の部分的アゴニストが生成された。しかしながら、トリフルオロメチルメルカプタン 5 4 は、メチルメルカプタン 5 1 と比較して、s E H に対するわずかに減少した活性を明らかにし、したがって高度ではあるが均衡が十分にとれていない二重能力を備えていた。

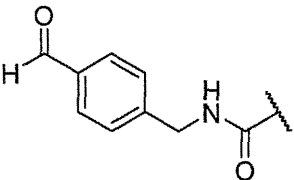
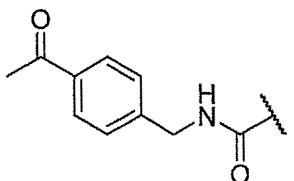
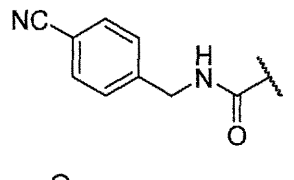
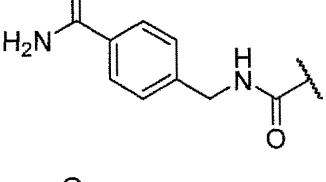
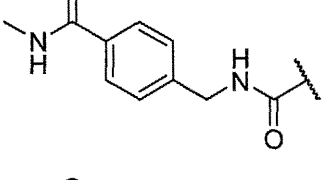
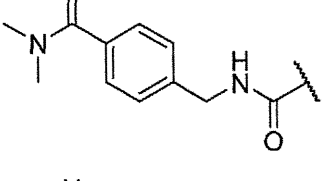
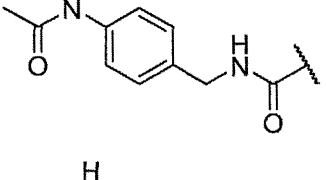
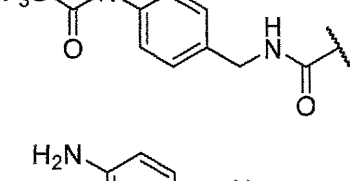
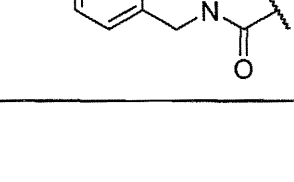
30

#### 【 0 0 6 6 】

( 表 6 ) F X R および s E H に対する 3 3 ~ 5 4 のインビトロ活性 ( データは平均  $\pm$  S E M を表す、n = 3 ~ 6 )

40

#	 <b>R =</b>	<b><i>FXR</i> 活性化</b> EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	<b><i>sEH</i> 阻害</b> IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%
<b>18</b>		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
<b>33</b>		不活性 (50 μM)	2.05±0.31 μM

34		$5.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$ (22±2%)	$0.51 \pm 0.04 \mu\text{M}$
35		$0.10 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (29±1%)	$0.157 \pm 0.009 \mu\text{M}$
36		不活性 (50 $\mu\text{M}$ )	$0.91 \pm 0.07 \mu\text{M}$
37		$3.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (27±1%)	$1.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$
38		$0.34 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (29±1%)	$1.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$
39		$0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (17±1%)	$4.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$
40		$2.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$ (31±1%)	$1.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$
41		$0.26 \pm 0.11 \mu\text{M}$ (20±1%)	$0.66 \pm 0.01 \mu\text{M}$
42		不活性 (50 $\mu\text{M}$ )	$3.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$

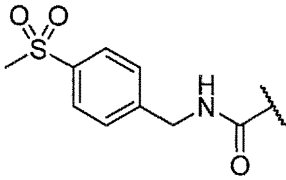
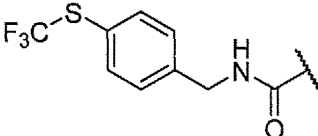
10

20

30

40

43		0.12±0.02 μM (23±1%)	18.2±3.2 μM
44		1.4±0.2 μM (16±1%)	0.28±0.12 μM
45		不活性 (50 μM)	12.7±0.4 μM
46		0.044±0.009 μM (22±1%)	0.65±0.04 μM
47		0.15±0.04 μM (19±1%)	0.43±0.01 μM
48		0.16±0.01 μM (31±1%)	0.57±0.05 μM
49		0.17±0.01 μM (26±1%)	n.d. (不良な可溶性)
50		0.16±0.04 μM (26±1%)	0.22±0.06 μM
51		0.10±0.01 μM (33±1%)	0.12±0.01 μM
52		1.3±0.4 μM (24±1%)	0.22±0.03 μM

53		$3.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (34±1%)	$1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$
54		$0.00040 \pm 0.00004 \mu\text{M}$ (19±1%)	$0.39 \pm 0.05 \mu\text{M}$

10

## 【0067】

本発明者らの最適化リード化合物18単独の単一修飾はいずれも、両方の標的に対する能力を低ナノモル値へと改善することができなかつたため、本発明者らは、各標的の最も好ましい構造変化を1つの分子において組み合わせる可能性を評価した。標的のうちの1つに対して顕著な活性を有する誘導体を特定するために、本発明者らは、最も強力な化合物の $pIC_{50}$  (sEH) 値対 $pEC_{50}$  (FXR) 値をプロットした(図1)。この能力プロットは、ベンジル部分における3-フルオロ置換(30)、トリフルオロメチルメルカプタン残基(54)および反転スルホンアミド46が、FXRに対して非常に好ましいことを明らかにした。トリフルオロアセトアミド41は、46と構造的に類似し、同じくFXRに対して高い能力を有していたため、組み合わせのために追加で選択した。sEH阻害に関して、ベンジル部分における3-クロロ置換(31)、メチルメルカプタン残基(51)およびスルホンアミド44は、他の誘導体から突出していた。51および54は、それらの比較的に不良な可溶性のために、またこれら2つの部分をマージすることができなかつたため、組み換えについては除外した。代わりに、30、31、41、44および46を、構造的組換えのために選択した(表7)。

20

## 【0068】

スルホンアミド44における30の3-フッ素原子の導入は、二重調節剤55をもたらし、これはFXR能力の予想どおりの増加を明らかにした。しかしながら、この改善は、中程度にすぎず、低ナノモルの能力を有する所望の二重調節剤を生成しなかつた。これに対して、N-(3-クロロフェニル)トリフルオロアセトアミド56における31および41のマージ、ならびにN-(3-クロロフェニル)メタンスルホンアミド57における31および46の組み合わせは、両方の標的に対する能力の顕著な上昇を伴っていた。部分的FXR活性化について、それぞれ $1.4 \pm 1 \text{ nM}$ および $2.0 \pm 4.2 \text{ nM}$ の $EC_{50}$ 値、ならびにsEH阻害について、 $8.9 \pm 1.6 \text{ nM}$ および $4.1 \pm 0.4 \text{ nM}$ の $IC_{50}$ 値を有し、二重調節剤56および57は、最終的に両方の標的に対する所望の低ナノモルの能力を備えていた。これら2つの二重調節剤のうち、57は、56( $< 0.1 \mu\text{g/mL}$  (LLOQ))よりも著しく高い水溶性( $1.5 \mu\text{g/mL}$ )を明らかにしたため、さらなるインビトロ評価のために選択した。等温滴定熱量測定(ITC、補足図S7)によって、57について $0.13 \mu\text{M}$ の $K_d$ が明らかになり、エンタルピー結合( $\Delta H = -19.5 \text{ kcal/mol}$ 、 $\Delta S = -34.0 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$ )が示された。細胞 $EC_{50}$ 値と $K_d$ との間の不一致は、結合平衡に著しく影響を及ぼし得る、ITC実験における共活性因子の不在に起因していると思われる。高い結合エネルギーは、結合時のFXR-LBDにおける潜在的に顕著な立体構造変化から一部生じ得る。

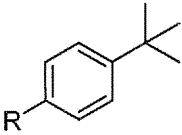
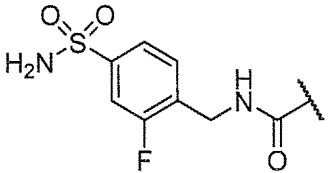
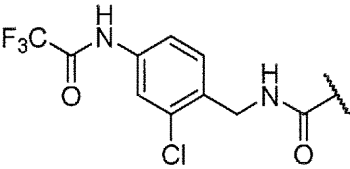
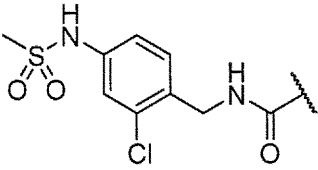
30

40

## 【0069】

(表7) FXRおよびsEHに対する55~57のインビトロ活性(データは平均±SEMを表す、 $n = 3 \sim 6$ )



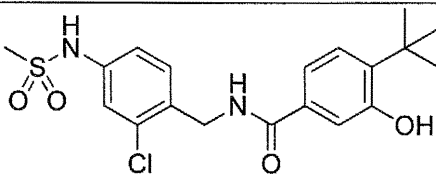
#	 <b>R =</b>	<b>FXR 活性化</b>	<b>sEH 阻害</b>	
		EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度での 活性化%	IC <sub>50</sub> または示された濃度での 阻害%	
55		0.97±0.11 μM (34±1%)	0.137±0.018 μM	10
56		0.014±0.001 μM (21±1%)	0.0089±0.0016 μM	
57		0.0204±0.0042 μM (35±1%)	0.0041±0.0004 μM	20

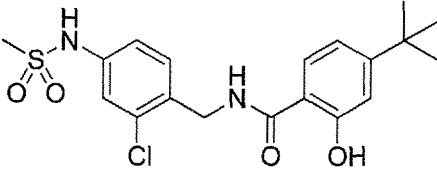
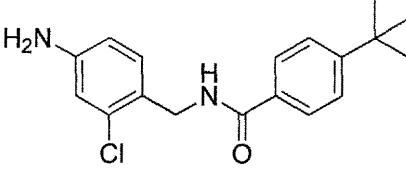
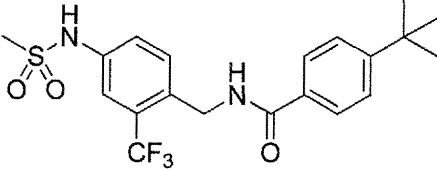
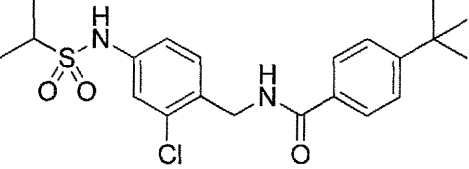
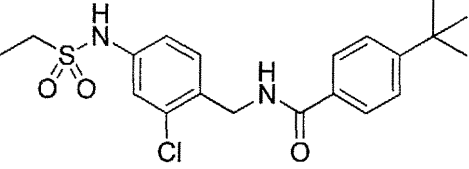
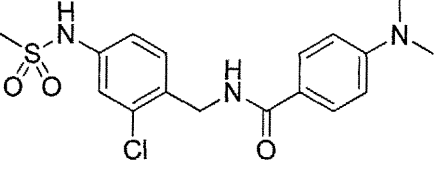
## 【 0 0 7 0 】

さらに、以下の追加の化合物を生成し、F X R 活性化および s h e 阻害に対するそれらの活性について試験した（表 8 を参照）。

## 【 0 0 7 1 】

（表 8）F X R および s E H に対する追加の化合物のインビトロ活性（データは平均 ± S E M を表す、n = 3 ~ 6）

		FXR 活性化 EC <sub>50</sub> (最大相対活性化) または示された濃度 での活性化%	sEH 阻害 IC <sub>50</sub> または示された濃度 での阻害%	
78	 化学式: C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S 精密質量: 410,11 分子量: 410,91	0.003±0.000001 μM (24±1%)	0.0160±0.0006 μM	30
				40

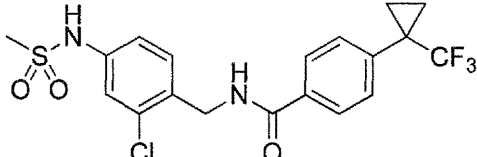
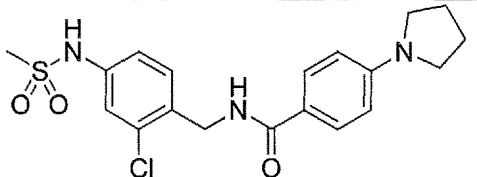
77	 <p>化学式: <math>C_{19}H_{23}ClN_2O_4S</math>  精密質量: 410,11  分子量: 410,91</p>	アンタゴニスト	0.38±0.05 $\mu$ M
69a	 <p>化学式: <math>C_{18}H_{21}ClN_2O</math>  精密質量: 316,13  分子量: 316,83</p>	0.045±0.011 $\mu$ M (29±1%)	0.040±0.006 $\mu$ M
80	 <p>化学式: <math>C_{20}H_{23}F_3N_2O_3S</math>  精密質量: 428,14  分子量: 428,47</p>	1.2±0.18 $\mu$ M (19±1%)	0.002±0.00008 $\mu$ M
81	 <p>化学式: <math>C_{21}H_{27}ClN_2O_3S</math>  精密質量: 422,14  分子量: 422,97</p>	0.42±0.02 $\mu$ M (11±1%)	0.011±0.0003 $\mu$ M
82	 <p>化学式: <math>C_{20}H_{25}ClN_2O_3S</math>  精密質量: 408,13  分子量: 408,94</p>	0.49±0.05 $\mu$ M (23±1%)	0.006±0.0005 $\mu$ M
83	 <p>化学式: <math>C_{17}H_{20}ClN_3O_3S</math>  精密質量: 381,09  分子量: 381,88</p>	1.46±0.023 $\mu$ M (23±1%)	0.045±0.002 $\mu$ M

10

20

30

40

84	 <p>化学式: <math>C_{19}H_{18}ClF_3N_2O_3S</math>  精密質量: 446,07  分子量: 446,87</p>	$0.54 \pm 0.02 \mu M$ (31 $\pm$ 1%)	$0.004 \pm 0.0004 \mu M$
85	 <p>化学式: <math>C_{19}H_{22}ClN_3O_3S</math>  精密質量: 407,11  分子量: 407,91</p>	$0.25 \pm 0.012 \mu M$ (27 $\pm$ 1%)	$0.041 \pm 0.004 \mu M$

10

## 【0072】

以下の手順を使用して、以下の化合物を合成した。

## 【0073】

1 - (4 - アミノ - 2 - クロロフェニル)メタンアミン(58k) :  $LiAlH_4$  (THF中1M、16.4 mL、16.4 mmol、2.5当量)を0 に冷却した。3 mLのTHF中の4 - アミノ - 2 - クロロベンゾニトリル62 (1.0 g、6.6 mmol、1.0当量)を、混合物にゆっくり添加した。 $H_2$ の発生が止まった後、混合物を放置して室温まで温め、次いで16時間還流した。室温に冷却した後、混合物を10 mLのTHFで希釈し、次いで0 に冷却した。1 mLの10% NaOH溶液および1.8 mLの水を滴下添加した。無色の沈殿物をセライトで濾過し、15 mLのジエチルエーテルで洗浄した。濾液からの有機溶媒の蒸発により、58kを黄色の油として得た(0.77 g、75%)。

20

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.11 (d,  $J$  = 8.2 Hz,

1H), 6.58 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J$  = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.59 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR

30

(126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 148.56, 132.33, 129.67, 127.74, 113.63, 112.72, 42.88

## 【0074】

N - (4 - アミノ - 2 - クロロベンジル) - 4 - (tert - ブチル)ベンズアミド(69a) : 1 - (4 - アミノ - 2 - クロロフェニル)メタンアミン58k (0.31 g、2.0 mmol、1.1当量)を、10 mLの $CHCl_3$ に溶解し、5 mLのNEt<sub>3</sub>を添加し、混合物を0 に冷却した。4 - tert - ブチルベンゾイルクロリド63o (0.35 mL、1.8 mmol、1.0当量)を、10分間にわたってゆっくり添加し、混合物を室温で2時間攪拌した。次いで、50 mLの10%塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層を30 mLのEtOAcで洗浄した。この水層をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液でpH 10にし、1回80 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ペトロールエーテル/EtOAc (90 : 10)を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、69aを黄色の固体として得た(0.57 g、97%)。R<sub>f</sub> (ペトロールエーテル/EtOAc = 67 : 33) = 0.26。

40

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{MeOH}-d_4$ )  $\delta$ = 7.81 (dt,  $J$ = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.53 (dt,  $J$ = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.45 (d,  $J$ = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$ = 2.2 Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$ = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 1.36 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{MeOH}-d_4$ )  $\delta$ = 170.32, 156.67, 140.89, 135.23, 132.33, 131.39, 128.29, 126.59, 122.96, 120.82, 119.16, 42.13, 35.36, 31.54. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 317.14152 for  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ , found 317.14130  $[\text{M}+\text{H}]^+$

# 【 0 0 7 5 】

N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( tert - ブチル - 2 - メトキシ )  
ベンズアミド ( 6 9 b ) : 4 - アミノ - 2 - クロロベンズアミン ( 5 8 k 、 0 . 2 3 g 、  
0 . 1 5 mmol 、 1 . 3 当量 ) を、 3 0 mL の乾燥  $\text{CHCl}_3$  に溶解した。 4 - DMA  
P ( 0 . 1 2 g 、 1 . 1 5 mmol 、 1 . 0 0 当量 ) 、 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチル  
アミノプロピル ) カルボジイミド ( 0 . 2 4 g 、 1 . 2 7 mmol 、 1 . 1 0 当量 ) およ  
び 4 - tert - ブチル - 2 - メトキシ安息香酸 ( 6 4 b 、 0 . 2 4 g 、 1 . 1 5 mmol  
、 1 . 0 当量 ) を添加した。混合物を室温で 1 6 時間撹拌した。次いで、 2 5 mL の 5  
% 塩酸水溶液を添加し、水層を 1 5 mL の EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機層を  
 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、溶媒を真空中で除去した。さらなる精製を、ヘキサン / 酢酸  
エチルからの結晶化によって行い、 6 9 b を薄黄色の固体として得た ( 0 . 3 2 4 g 、 8  
1 % ) 。

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ = 8.62 (t,  $J$ = 6.0 Hz, 1H), 7.73 (d,  
 $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.27 (d,  $J$ = 8.3 Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J$ = 10.1, 2.0 Hz, 3H), 6.97 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 1H),  
4.47 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 1.31 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ = 164.89,  
156.98, 155.90, 150.38, 150.31, 132.32, 130.41, 129.61, 119.72, 117.52, 109.08, 106.97, 55.89,  
34.91, 30.90

# 【 0 0 7 6 】

4 - ( tert - ブチル - 3 - メトキシ ) - N - ( 2 - クロロ - 4 - ( メチルスルホン  
アミド ) ベンジル ) ベンズアミド ( 7 6 a ) : N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル )  
- 4 - ( tert - ブチル - 2 - メトキシ ) ベンズアミド 6 9 b ( 0 . 3 2 g 、 0 . 9 3  
mmol 、 1 . 0 0 当量 ) を、 2 0 mL の  $\text{CHCl}_3$  に溶解し、 5 mL のピリジンを添加  
した。塩化メシル ( 7 0 、 0 . 0 9 mL 、 1 . 1 2 mmol 、 1 . 2 0 当量 ) を慎重に添  
加した。混合物を室温で 2 時間撹拌した。次いで、 1 5 mL の 1 0 % 塩酸水溶液を添加し  
、 3 0 mL の酢酸エチルによって 3 回抽出した。合わせた有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥  
させ、溶媒を真空中で除去した。さらなる精製を、ヘキサン / 酢酸エチルからの結晶化  
によって行い、 7 6 a を薄茶色の固体として得た ( 0 . 1 7 2 g 、 3 5 % ) 。

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  
 $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ = 9.97 (s, 1H), 8.72 (t,  $J$ = 6.0 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$ = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$ = 14.9,  
5.2 Hz, 2H), 7.25-7.13 (m, 3H), 4.56 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 1.37 (s, 9H).  
 $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ = 165.47, 157.45, 156.36, 138.79, 132.71, 132.32, 130.85, 129.87,  
120.27, 117.99, 109.54, 60.22, 56.36, 35.39, 31.37, 21.24, 14.56

# 【 0 0 7 7 】

4 - ( tert - ブチル - 2 - ヒドロキシ ) - N - ( 2 - クロロ - 4 - ( メチルスルホ  
ンアミド ) ベンジル ) ベンズアミド ( 7 7 ) : 4 - ( tert - ブチル - 2 - メトキシ )  
- N - ( 2 - クロロ - 4 - ( メチルスルホンアミド ) ベンジル ) ベンズアミド ( 7 6 a 、  
0 . 1 7 g 、 0 . 4 0 mmol 、 1 . 0 当量 ) を、 3 0 mL の DCM に溶解し、  $\text{BBr}_3$   
( 4 . 0 5 mL 、 DCM 中 4 . 0 5 mmol 、 1 0 . 0 当量 ) を 0 で添加した。混合物  
を室温で 1 6 時間撹拌し、次いで 3 0 mL の氷水中で希釈した。  $\text{NaHCO}_3$  で pH を 6

に調整し、混合物を1回30 mLの酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機層を真空中で濃縮した。さらなる精製を、ヘキサン/酢酸エチルからの結晶化によって行い、77を無色の固体として得た(0.098 g、60%)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 12.30

(s, 1H), 9.95 (s, 1H), 9.21 (t,  $J$ = 5.5 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J$ = 8.4 Hz, 1H), 7.35-7.24 (m, 2H), 7.15 (d,  $J$ = 8.5 Hz, 1H), 6.98-6.93 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.51 (d,  $J$ = 5.6 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 1.26 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 168.84, 159.78, 157.29, 138.57, 132.42, 131.05, 129.75, 127.69, 119.71, 118.24, 116.17, 113.95, 112.50, 34.65, 30.71, 30.49. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 411.11398 for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ , found 411.11373  $[\text{M}+\text{H}]^+$

10

# 【0078】

N-(4-アミノ-2-クロロベンジル)-4-(tert-ブチル-3-メトキシ)ベンズアミド(69c): 4-アミノ-2-クロロベンズアミン(58k、0.23 g、0.15 mmol、1.3当量)を、30 mLの乾燥 $\text{CHCl}_3$ に溶解した。4-DMA P(0.12 g、1.15 mmol、1.00当量)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(0.24 g、1.27 mmol、1.10当量)および4-tert-ブチル-3-メトキシ安息香酸(64a、0.24 g、1.15 mmol、1.0当量)を添加した。混合物を室温で16時間撹拌した。次いで、25 mLの5%塩酸水溶液を添加し、水層を1回15 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させ、溶媒を真空中で除去した。さらなる精製を、ヘキサン/酢酸エチルからの結晶化によって行い、69cを薄黄色の固体として得た(0.312 g、78%)。

20

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 8.84 (t,  $J$ = 5.7 Hz, 1H),

7.45 (d,  $J$ = 9.7 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$ = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$ = 8.4 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.72 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 1H), 4.42 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 1.34 (s, 9H). MS (ESI+):  $m/z$  369.10  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 100)

# 【0079】

4-(tert-ブチル-3-メトキシ)-N-(2-クロロ-4-(メチルスルホンアミド)ベンジル)ベンズアミド(76b): N-(4-アミノ-2-クロロベンジル)-4-(tert-ブチル-3-メトキシ)ベンズアミド69c(0.31 g、0.89 mmol、1.00当量)を、20 mLの $\text{CHCl}_3$ に溶解し、5 mLのピリジンを添加した。塩化メシル70(0.07 mL、1.07 mmol、1.20当量)を慎重に添加した。混合物を室温で2時間撹拌した。次いで、15 mLの10%塩酸水溶液を添加し、30 mLの酢酸エチルによって3回抽出した。合わせた有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させ、溶媒を真空中で除去した。さらなる精製を、ヘキサン/酢酸エチルからの結晶化によって行い、76bを薄茶色の固体として得た(0.315 g、83%)。

30

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,

DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 9.92 (s, 1H), 8.95 (t,  $J$ = 5.8 Hz, 1H), 7.46 (dd,  $J$ = 9.6, 1.6 Hz, 2H), 7.34-7.26 (m, 3H), 7.15 (dd,  $J$ = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 4.49 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.34 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ = 172.05, 170.40, 166.16, 158.02, 140.79, 138.38, 133.14, 132.33, 131.72, 129.59, 126.16, 119.82, 119.39, 118.34, 110.73, 59.79, 55.42, 34.68, 29.43

40

# 【0080】

4-(tert-ブチル-3-ヒドロキシ)-N-(2-クロロ-4-(メチルスルホンアミド)ベンジル)ベンズアミド(78): 4-(tert-ブチル-3-メトキシ)-N-(2-クロロ-4-(メチルスルホンアミド)ベンジル)ベンズアミド(76b、0.31 g、0.74 mmol、1.0当量)を、50 mLのDCMに溶解し、 $\text{BBr}_3$

50

(7.40 mL、DCM中7.40 mmol、10.0当量)を0 で添加した。混合物を室温で16時間攪拌し、次いで50 mLの氷水中で希釈した。NaHCO<sub>3</sub>でpHを6に調整し、混合物を1回30 mLの酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機層を真空中で濃縮した。さらなる精製を、ヘキサン/酢酸エチルからの結晶化によって行い、78を無色の固体として得た(0.145 g、48%)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 9.92 (s,

1H), 9.62 (s, 1H), 8.81 (t, *J*= 5.8 Hz, 1H), 7.31-7.27 (m, 2H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.21 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J*= 8.4, 2.2 Hz, 1H), 4.45 (d, *J*= 5.8 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.35 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 170.82, 166.91, 156.27, 139.24, 138.78, 133.49, 132.72, 132.23, 129.83, 126.61, 120.22, 118.72, 117.77, 115.88, 34.93, 29.61. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 411.11398 for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, found 411.11383 [M+H]<sup>+</sup>

10

#### 【0081】

N-(4-アミノ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル)-4-(tert-ブチル)ベンズアミド(69d): 1-(4-アミノ-2-(トリフルオロメチル)フェニル)メタンアミン58z(0.25 g、1.3 mmol、1.1当量)を、7 mLのCHCl<sub>3</sub>に溶解し、7 mLのNEt<sub>3</sub>を添加し、混合物を0 に冷却した。4-tert-ブチルベンゾイルクロリド63o(0.28 mL、1.4 mmol、1.1当量)を、10分間にわたってゆっくり添加し、混合物を室温で2時間攪拌した。次いで、10 mLの10%塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層を10 mLのEtOAcで洗浄した。この水層をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液でpH10にし、1回10 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ヘキサン/EtOAc(90:10)を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、69dを黄色の固体として得た(0.35 g、84%)。R<sub>f</sub>(ヘキサン/EtOAc=90:10)=0.27。

20

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 8.77 (t, *J*= 5.7 Hz, 1H),

7.87-7.79 (m, 2H), 7.48 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H), 7.13 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J*= 2.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J*= 8.3, 2.1 Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 4.47 (d, *J*= 5.3 Hz, 2H), 1.30 (s, 9H).

30

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 166.14, 154.04, 147.81, 131.50, 129.71, 127.15, 125.05, 123.08, 116.80, 110.55, 110.47, 34.60, 30.94

#### 【0082】

4-(tert-ブチル)-N-(2-トリフルオロメチル-4-(メチルスルホンアミド)ベンジル)ベンズアミド(80): N-(4-アミノ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル)-4-(tert-ブチル)ベンズアミド69d(0.35 g、1.0 mmol、1.00当量)を、50 mLのTHFに溶解し、5 mLのピリジンを添加した。塩化メシル(70、0.23 mL、3.0 mmol、3.0当量)を慎重に添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。次いで、50 mLの10%塩酸水溶液を添加し、20 mLの酢酸エチルによって3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で除去した。さらなる精製を、ヘキサン/EtOAc(67:33)を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、80を薄ピンク色の固体として得た(0.09 g、22%)。R<sub>f</sub>(ヘキサン/EtOAc=67:33)=0.19。

40

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

δ= 10.06 (s, 1H), 9.00 (t, *J*= 5.8 Hz, 1H), 7.89-7.82 (m, 2H), 7.54-7.43 (m, 5H), 4.59 (d, *J*= 5.5 Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 1.30 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.42, 154.33, 137.52, 132.71, 131.25, 129.78, 127.24, 125.20, 123.13, 116.72, 116.67, 34.69, 30.98. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 429.14542 for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, found 429.14523 [M+H]<sup>+</sup>

【 0 0 8 3 】

4 - ( *tert* - ブチル ) - N - ( 2 - クロロ - 4 - ( イソプロピルスルホンアミド ) ベンジル ) - ベンズアミド ( 8 1 ) : N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( *tert* - ブチル ) ベンズアミド 6 9 a ( 0 . 1 5 4 g 、 0 . 4 9 m m o l 、 1 . 0 当量 ) を、 2 0 m L の T H F に溶解し、 2 m L のピリジンを添加した。イソプロピルスルホニルクロリド 8 6 a ( 0 . 5 7 m L 、 4 . 8 9 m m o l 、 1 0 当量 ) を慎重に添加し、混合物を室温で 2 4 時間撹拌した。次いで、 1 5 m L の 1 0 % 塩酸水溶液を添加し、混合物を 1 回 3 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。合わせた有機層を N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ヘキサン / E t O A c ( 6 7 : 3 3 ) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、 8 1 を黄色の固体として得た ( 0 . 0 4 1 g 、 2 0 % ) 。 R<sub>f</sub> ( ヘキサン / E t O A c = 6 7 : 3 3 ) = 0 . 2 0 。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 9.95 (s, 1H), 8.92

(t, *J*= 5.7 Hz, 1H), 7.84 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.49 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.36-7.24 (m, 2H), 7.17 (dd, *J*= 8.5, 2.1 Hz, 1H), 4.46 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H), 1.30 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.28, 154.21, 138.65, 132.33, 131.37, 131.34, 129.56, 127.20, 125.13, 119.19, 117.78, 51.59, 34.65, 30.96, 16.10. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 423.15037 for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, found 423.14967 [M+H]<sup>+</sup>

【 0 0 8 4 】

4 - ( *tert* - ブチル ) - N - ( 2 - クロロ - 4 - ( エチルスルホンアミド ) ベンジル ) - ベンズアミド ( 8 2 ) : N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( *tert* - ブチル ) ベンズアミド 6 9 a ( 0 . 1 6 g 、 0 . 5 1 m m o l 、 1 . 0 当量 ) を、 2 0 m L の T H F に溶解し、 2 m L のピリジンを添加した。エタンスルホニルクロリド 8 6 b ( 0 . 5 m L 、 5 . 1 m m o l 、 1 0 当量 ) を慎重に添加し、混合物を室温で 2 4 時間撹拌した。次いで、 1 5 m L の 1 0 % 塩酸水溶液を添加し、混合物を 1 回 3 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。合わせた有機層を N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ヘキサン / E t O A c ( 5 0 : 5 0 ) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、 8 2 を黄色の固体として得た ( 0 . 1 2 5 g 、 6 0 % ) 。 R<sub>f</sub> ( ヘキサン / E t O A c = 5 0 : 5 0 ) = 0 . 5 1 。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 9.98 (s, 1H), 8.93 (t, *J*=

5.8 Hz, 1H), 7.84 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.49 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 7.27 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J*= 8.4, 2.1 Hz, 1H), 4.47 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H), 3.11 (q, *J*= 7.3 Hz, 2H), 1.30 (s, 9H), 1.18 (t, *J*= 3.6 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.27, 154.20, 138.42, 132.34, 131.51, 131.34, 129.57, 127.19, 125.13, 119.35, 117.89, 59.78, 45.29, 39.52, 34.65, 30.96, 8.02. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 409.13472 for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, found 409.13444 [M+H]<sup>+</sup>

【 0 0 8 5 】

N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( ジメチルアミノ ) ベンズアミド ( 6 9 e ) : 1 - ( 4 - アミノ - 1 - クロロフェニル ) メタンアミン 5 8 k ( 0 . 3 0 g 、 1 . 9 2 m m o l 、 1 . 1 当量 ) を、 1 0 m L の D M F に溶解した。 1 0 m L の N E t<sub>3</sub> を添加し、混合物を 0 に冷却した。 4 - ジメチルアミノベンゾイルクロリド 6 3 p ( 0 .

32 mL、1.73 mmol、1.0 当量) を、10 分間にわたってゆっくり添加し、混合物を室温で5時間撹拌した。次いで、50 mLの10%塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液でpH10にし、1回80 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、EtOAc/ヘキサン/NEt<sub>3</sub> (65:33:2) を用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、69eを黄色の固体として得た(0.205 g、39%)。R<sub>f</sub> (EtOAc/ヘキサン/NEt<sub>3</sub> = 65:33:2) = 0.47。

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 8.42 (t, *J*= 5.7 Hz,

1H), 7.76 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H), 6.70 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H), 6.61 (d, *J*= 2.2 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J*= 8.3, 2.3 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.34 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.25, 152.23, 148.96, 132.34, 129.62, 128.71, 123.13, 121.02, 113.65, 112.70, 110.88, 39.87

10

#### 【0086】

4 - (ジメチルアミノ) - N - (2 - クロロ - 4 - (メチルスルホンアミド) ベンジル) ベンズアミド (83) : N - (4 - アミノ - 2 - クロロベンジル) - 4 - (ジメチルアミノ) ベンズアミド 69e (0.204 g、0.67 mmol、1.0 当量) を、30 mLのTHFに溶解し、3 mLのピリジンを添加した。塩化メシル70 (0.27 mL、3.36 mmol、5.0 当量) を慎重に添加し、混合物を室温で2時間撹拌した。次いで、15 mLの10%塩酸水溶液を添加し、混合物を1回30 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、EtOAcを移動相として使用するカラムクロマトグラフィーによって行った。さらなる結晶化を、DCM/ヘキサンおよびアセトン/水中で行い、83を黄色の固体として得た(0.064 g、25%)。R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.64。

20

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ= 7.76 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H), 7.33 (t, *J*= 5.5 Hz, 2H), 7.14 (dd, *J*= 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.02 (s, 6H), 2.96 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ= 170.50, 154.38, 139.71, 134.72, 133.51, 130.77, 129.89, 121.74, 121.54, 119.63, 112.13, 41.90, 40.22, 39.32. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 380.08302 for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, found 380.08274 [M-H]<sup>-</sup>

30

#### 【0087】

4 - ((1 - トリフルオロメチル) シクロプロプ - 1 - イル) 安息香酸 (64i) : Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.045 mmol、0.01 g、3 mol%)、キサントホス (0.045 mmol、0.01 g、3 mol%) を、10 mLのDMFに溶解した。その後、ギ酸 (10.6 mmol、0.4 mL、7.0 当量) および1 - ブロモ - 4 - ((1 - (トリフルオロメチル) シクロプロプ - 1 - イル) ベンゼン 87 (1.5 mmol、0.4 g、1.0 当量) を滴下添加した。次いで、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドおよびトリエチルアミンを混合物に添加した。混合物を50℃で20時間撹拌した。混合物を室温に冷却した後、10 mLの10%塩酸水溶液を添加し、混合物を1回30 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層を、1回30 mLのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>飽和水溶液で抽出した。次いで、合わせた水層を、濃縮塩酸でpH1にし、1回30 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させて、さらなる精製なしに64iをベージュ色の固体として得た(0.177 g、51%)。

40



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

δ= 13.04 (s, 1H), 8.00-7.93 (m, 2H), 7.60 (d, *J*= 8.1 Hz, 2H), 1.40 (dd, *J*= 7.0, 5.0 Hz, 2H), 1.23-1.11 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.85, 140.01, 131.17, 130.85, 129.40, 128.15, 27.75-27.32, 9.78-9.75

【 0 0 8 8 】

N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( ( 1 - トリフルオロメチル ) シクロプロプ - 1 - イル ) - ベンズアミド ( 6 9 f ) : 1 - ( 4 - アミノ - 1 - クロロフェニル ) メタンアミン 5 8 k ( 0 . 3 1 g 、 2 . 0 m m o l 、 3 . 0 当量 ) 、 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カルボジイミド ( 0 . 3 1 g 、 2 . 0 m m o l 、 3 . 0 当量 ) および 4 - ( ジメチルアミノ ) ピリジン ( 0 . 6 6 m m o l 、 0 . 0 8 g 、 1 . 0 当量 ) を、 1 0 m L の C H C l <sub>3</sub> および 1 m L の D M F に溶解した。次いで、 5 m L の C H C l <sub>3</sub> および 0 . 5 m L の D M F に溶解した 4 - ( ( 1 - トリフルオロメチル ) シクロプロプ - 1 - イル ) 安息香酸 6 4 i ( 0 . 1 5 g 、 0 . 6 6 m m o l 、 1 . 0 当量 ) を、 1 0 分間にわたってゆっくり添加し、混合物を 6 0 ° で 5 時間撹拌した。混合物を室温に冷却した後、 1 0 m L の 1 0 % 塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層を N a <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> 溶液で p H 1 0 にし、 1 回 2 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。合わせた有機層を N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ヘキサン / E t O A c ( 5 7 : 4 3 ) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、 6 9 f を黄色の固体として得た ( 0 . 1 2 3 g 、 5 0 % ) 。 R <sub>f</sub> ( ヘキサン / E t O A c = 5 7 : 4 3 ) = 0 . 4 5 。

10

20

<sup>1</sup>H NMR

(300 MHz, アセトン-*d*<sub>6</sub>) δ= 7.95-7.90 (m, 2H), 7.57 (d, *J*= 8.1 Hz, 2H), 7.15 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H), 6.72 (d, *J*= 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J*= 8.3, 2.3 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.54 (d, *J*= 5.6 Hz, 2H), 1.39 (dd, *J*= 6.9, 5.0 Hz, 2H), 1.18-1.12 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ= 169.60, 149.99, 140.91, 135.73, 134.95, 132.42, 131.42, 128.50, 124.97, 116.42, 114.75, 42.29, 29.28, 28.83, 10.41

【 0 0 8 9 】

4 - ( ( 1 - トリフルオロメチル ) シクロプロプ - 1 - イル ) - N - ( 2 - クロロ - 4 - ( メチルスルホンアミド ) ベンジル ) ベンズアミド ( 8 4 ) : N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( ( 1 - トリフルオロメチル ) シクロプロプ - 1 - イル ) - ベンズアミド 6 9 f ( 0 . 1 g 、 0 . 0 2 8 m m o l 、 1 . 0 当量 ) を、 1 5 m L の T H F に溶解し、 1 . 5 m L のピリジンを添加した。塩化メシル 7 0 ( 0 . 2 2 m L 、 2 . 8 m m o l 、 1 0 . 0 当量 ) を慎重に添加し、混合物を室温で 2 4 時間撹拌した。次いで、 1 5 m L の 1 0 % 塩酸水溶液を添加し、混合物を 1 回 3 0 m L の E t O A c で 3 回抽出した。合わせた有機層を N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ヘキサン / E t O A c ( 5 0 : 5 0 ) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、 8 4 を白色の固体として得た ( 0 . 0 5 2 g 、 4 1 % ) 。 R <sub>f</sub> ( ヘキサン / E t O A c = 5 0 : 5 0 ) = 0 . 3 6 。

30

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 9.93 (s, 1H), 9.04 (s, 1H),

40

7.91 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H), 7.57 (d, *J*= 8.1 Hz, 2H), 7.32 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 7.26 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J*= 8.4, 2.1 Hz, 1H), 4.48 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 1.38 (s, 2H), 1.17 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ= 169.74, 141.13, 139.98, 135.45, 134.93, 132.85, 132.52, 131.10, 128.53, 121.72, 119.59, 42.16, 39.37, 29.21-28.95, 10.44-10.43. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 447.07515 for C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, found 447.07455 [M+H]<sup>+</sup>

【 0 0 9 0 】

N - ( 4 - アミノ - 2 - クロロベンジル ) - 4 - ( ピロリジン ) - ベンズアミド ( 6 9 g ) 1 - ( 4 - アミノ - 1 - クロロフェニル ) メタンアミン 5 8 k ( 0 . 4 9 g 、 3 .

50

1 mmol、3.0 当量)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(0.49 g、3.1 mmol、3.0 当量)および4-(ジメチルアミノ)ピリジン(1.1 mmol、0.13 g、1.0 当量)を、20 mLのCHCl<sub>3</sub>および2 mLのDMFに溶解した。次いで、5 mLのCHCl<sub>3</sub>および0.5 mLのDMFに溶解した4-ピロリジン安息香酸(0.2 g、1.1 mmol、1.0 当量)を、10分間にわたってゆっくり添加し、混合物を60℃で5時間撹拌した。混合物を室温に冷却した後、10 mLの10%塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液でpH 10にし、1回20 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、EtOAc/ヘキサン(86:14)を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、69 gを黄色の固体として得た(0.100 g、29%)。R<sub>f</sub>(EtOAc/ヘキサン=86:14)=0.45。

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 8.39 (s, 1H), 7.76 (d, *J*=

8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H), 6.61 (d, *J*= 2.2 Hz, 1H), 6.53 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H), 6.47 (dd, *J*= 8.3, 2.3 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.35 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H), 3.27 (d, *J*= 7.2 Hz, 4H), 1.96 (t, *J*= 4.8 Hz, 4H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 162.32, 149.50, 148.89, 132.23, 129.53, 128.75, 123.11, 120.31, 113.53, 112.59, 110.54, 47.21, 35.78, 24.96

#### 【0091】

4-(ピロリジン)-N-(2-クロロ-4-(メチルスルホンアミド)ベンジル)ベンズアミド(85): N-(4-アミノ-2-クロロベンジル)-4-(ピロリジン)-ベンズアミド69 g(0.1 g、0.03 mmol、1.0 当量)を、15 mLのTHFに溶解し、2 mLのピリジンを添加した。塩化メシル70(0.12 mL、1.55 mmol、5.0 当量)を慎重に添加し、混合物を室温で2時間撹拌した。次いで、15 mLの10%塩酸水溶液を添加し、混合物を1回30 mLのEtOAcで3回抽出した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、EtOAc/ヘキサン(67:33)を使用するカラムクロマトグラフィーによって行い、85を白色の固体として得た(0.033 g、26%)。R<sub>f</sub>(EtOAc/ヘキサン=67:33)=0.37。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 9.91 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.77 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H), 7.28 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 7.25 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J*= 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.54 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H), 4.44 (d, *J*= 5.5 Hz, 2H), 3.28 (s, 4H), 3.01 (s, 3H), 1.98-1.94 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ= 166.38, 149.61, 138.20, 132.30, 132.19, 129.43, 128.81, 119.97, 119.76, 118.29, 110.59, 47.23, 42.98, 36.56, 24.98. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 408.11432 for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, found 408.11361 [M+H]<sup>+</sup>

#### 【0092】

##### 実施例4: 仮想検査

化合物57の結合を、リード化合物5が構築されたりガンドを含有するSEHおよびFXRのX線構造(FXRについては、化合物3/PDB-ID: 4QE8、SEHについては、化合物2/PDB-ID: 3I28)を使用する分子ドッキングによってコンピュータで分析した。得られた結合様式(図2に示される)は、両方の標的に対するN-ベンジルベンズアミド5~57のSARと一致する。FXRにおける57の結合様式では(図2A)、tert-ブチル部分は、結合ポケットに緊密に適合し、らせんの安定化を通して受容体活性化を媒介する12。隣接したフェニル環は、親油性ポケットの中に良好に位置付けられ、2位または3位における変動を許容しない。スルホンアミドは、親水性領域を占め、特異的な相互作用を示さず、これはベンジル部分のこの位置における親水性部分の広い許容性を説明する。アミド部分は、有向H結合を形成せず、これはFXR X線構

10

20

30

40

50

造 4 Q E 8 における参照リガンド 3 の場合も同様である。メチレン架橋は、L e u 2 8 7 に近接して結合され、この位置に追加のメチル基を担持する化合物 3 2 の強化された能力を説明する。塩素原子は、I l e 3 5 2、および T y r 3 6 9 のフェノール部分（補足図 S 1）によって定義された狭いサブポケットの方へ向いており、このサブポケットは、塩素またはフッ素（3 0）を許容するが、2 9 におけるメチル置換基のような純粋に親油性の残基は許容しない。

#### 【 0 0 9 3 】

5 7 と s E H との提案された結合様式（図 2 B）は、そのアミド基が、触媒残基 T y r 3 8 3、T y r 4 6 6 および A s p 3 3 5 と相互作用することを明らかにする。メチレン架橋は、いかなる構造修飾も許容しない狭いトンネル内に位置する。ベンジル部分の塩素置換基は、親油性ポケットの方へ向いており、結合に重要である。F X R 結合様式と同様に、スルホンアミド部分はより親油性のサブポケットにおいて結合し、特異的な相互作用を形成しない。4 - t e r t - ブチルフェニル残基は、狭い疎水性ポケット内に位置し、芳香環の 4 位または 3 位における置換のための空間を提供するが、2 位における置換のための空間は提供しない。

#### 【 0 0 9 4 】

関連する核内受容体の中で 5 7 の選択性プロファイル进行研究するために、本発明者らは、1 0  $\mu$  M 濃度での P P A R、L X R、R X R、R A R、P X R および V D R に対するその活性を、それぞれの受容体に関する G a l 4 - ハイブリッドレポーター遺伝子アッセイにおいて決定した（図 3 A）。5 7 は、P P A R および P P A R、両方の L X R サブタイプ、ならびに R X R に対して不活性であった。5 7 は、P P A R に対してのみ弱い部分的アゴニズムを呈し、E C<sub>50</sub> 値は 1 4 . 7  $\pm$  0 . 9  $\mu$  M であったため、核内受容体の中で F X R に対して高度に選択的である（選択性 7 2 0）。さらに、5 7 は、水溶性テトラゾリウム（W S T - 1）アッセイにおいて最大 1 0 0  $\mu$  M の濃度で細胞毒性活性を表さなかった（図 3 B）。代謝安定性を推定するために、5 7 を、ウイスターラットの肝臓マイクロソームとインキュベートし、これによって、6 0 分後に化合物の 5 0 % 超が残存する、許容可能な安定性が明らかになった（図 3 C）。さらに、本発明者らは、5 7 の代謝変換をインビトロでより詳細に研究し、その代謝産物を特定した（図 6、スキーム 1 0）。L C - M S - M S 分析（補足図 S 2 ~ S 6）によると、5 7 は、アニリン 6 9 a を生じるスルホンアミド部分の加水分解によって、3 つの異性体 7 7、7 8 および 7 9 をもたらし得る t e r t - ブチルベンズアミド部分におけるヒドロキシル化によって（図 6、スキーム 1 0）、ならびにベンジル置換基の芳香環におけるヒドロキシル化によって代謝される。本発明者らは、ベンズアミド芳香環上にヒドロキシル基を担持する 7 7 および 7 8 を合成したが、両方の異性体は、代謝された残基において検出可能ではなく、7 9 を 5 7 の代謝産物として確認した。代謝産物 6 9 a は、相当の能力を保持し、0 . 0 4 6  $\pm$  0 . 0 0 6  $\mu$  M の E C<sub>50</sub> 値で F X R を活性化し、0 . 0 4 0  $\pm$  0 . 0 0 6  $\mu$  M の I C<sub>50</sub> 値で s E H を阻害する。したがって、代謝産物 6 9 a は、インビボでの二重調節の薬理学的活性に寄与し得、元の化合物 5 7 の薬理学的効果を延長し得る。

#### 【 0 0 9 5 】

レポーター遺伝子アッセイよりも人工的でない条件下で 5 7 の F X R アゴニスト効果を評価するために、本発明者らはまた、H e p G 2 ヘパトーマ細胞における F X R 標的遺伝子の発現に対する化合物の効果を定量化した（図 4 A）。この目的で、細胞を 5 0  $\mu$  M の内在性 F X R アゴニスト C D C A（1 b）、0 . 1  $\mu$  M および 1  $\mu$  M の部分的アゴニスト 5 7、または対照としての D M S O（0 . 1 %）と 8 時間または 1 6 時間インキュベートし、次いで F X R 標的遺伝子の m R N A を定量化した。2<sup>-C<sub>t</sub></sup> 方法に従ってデータを分析し、すべての結果を、ハウスキーピング遺伝子であるグリセリンアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ（G A P D H）の値に対して正規化した。ビヒクル処理された対照細胞の遺伝子発現を、1 0 0 % として定義した。5 7 は、部分的 F X R アゴニストプロファイルを明らかにし、内在性アゴニスト C D C A（1 b）と同様に、しかしより小さい規模で、9 つの研究された遺伝子すべてを調整した。胆汁酸塩排出タンパク質（B S E P）の

発現は、57によって中程度に増加しただけであったが、小型ヘテロ二量体パートナー (small hetero-dimer partner (SHP))、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR)、線維芽細胞成長因子19 (FGF19)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4 (PDK4) および肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (脂肪酸結合タンパク質1、FABP1) の誘導は、CDC A (1b) の50~80%の規模に達した。さらに、57は、SHPの誘導を介してFXRによって間接的に調節される、コレステロール7-ヒドロキシラーゼ (CYP7A1)、ステロール調節エレメント結合タンパク質1c (SREBP1c) および脂肪酸シンターゼ (FAS) を抑制した。CYP7A1に関して、57は、部分的アゴニストとして動作し、1bよりも少ない抑制をもたらしたが、57および1bによるSREBP1cおよびFASの抑制は、同程度の規模に達した。すべての遺伝子について、57は、0.1  $\mu$ Mおよび1  $\mu$ Mで同程度の効果をもたらした、これによりこれらの濃度での飽和を確認した。これに対して、PPAR標的遺伝子であるスカベンジャー受容体3B (CD36) およびサイトカイン様タンパク質2~19 (FAM3A) は、10  $\mu$ Mの高い方の濃度においても57によって顕著には調節されず、これにより化合物の選択性をさらに確認した (図4B)。

10

#### 【0096】

可溶性エポキシドヒドロラーゼの阻害もまた、HepG2細胞ホモジネート中、より人工的でない状況において、異なる濃度の阻害剤57の存在下で重水素化sEH基質14, 15-EET-d11の変換を定量化することによって研究した (図4C)。化合物は、細胞sEHの頑強な阻害をもたらした、1 nMの濃度においてもEET/DHET比が統計的に有意に増加した。細胞状況において、57は、sEH阻害についておよそ10 nMのIC<sub>50</sub>値を明らかにした。

20

#### 【0097】

##### 実施例5：インビボ特性化

本発明者らは、57の高い能力および非常に好ましいインビトロ特性によって促されて、雄の野生型C57BL/6Jマウスにおける化合物のパイロットインビボ研究を実施した (図5)。インビボでのFXR活性化およびsEH阻害に関する薬物動態プロファイルを記録し、薬力学的データを評価するために、6匹のマウスに57の単回投与を行った (経口、体重1 kgあたり10 mg)。追加の3匹の動物をビヒクル対照とした。

30

#### 【0098】

二重調節剤57は、好ましい経口バイオアベイラビリティ ( $c_{max} = 1182$  ng/mL) および急速な取り込み ( $t_{max} = 0.5$  h) を示し、中程度の半減期 ( $t_{1/2} = 0.7$  h) を伴っていた。総じて、57の単回投与は、およそ3~4時間にわたってEC<sub>50</sub> (FXR) 値およびIC<sub>50</sub> (sEH) 値を超える有効濃度をもたらした (図5A)。57の薬力学的効果を評価するために、マウス血漿をEET/DHET比について分析し、FXR標的遺伝子の発現を、適用の8時間後にマウスの肝臓において決定した (図5B)。8.9-および11.12-異性体のEET/DHET比は、57での処置時におよそ2倍増加し、これはsEH活性がインビボで二重調節剤によって阻害されたことを示した。さらに、FXR標的遺伝子の発現は、57を受けたマウスの肝臓において変化し、BSEP (およそ3倍)、SHP (およそ4倍) およびFGF15 (およそ2.5倍) の増加した発現、ならびに低減したSREBP1c (およそ5倍) レベルを伴い、これもまたインビボでのFXR活性化を示唆した (図5C)。CYP7A1 mRNAレベルは、わずかな抑制傾向を示した。PPAR標的遺伝子である脂肪酸輸送タンパク質 (FATP) の発現は、インビボで57によって影響を受けなかった。したがって、パイロット動物研究は、許容可能な薬物動態を明らかにし、インビボでの57の二重標的係合を明らかに示した。

40

#### 【0099】

肝細胞癌および肝硬変を起り得る最も深刻な結果として伴うNASHの発生の増加は、急速に増大する世界的な健康問題である。肝臓移植は、現在まで使用可能な唯一の有効な治療法であるが、薬理的オプシオンに関する研究が非常に集中的である。FXRアゴ

50

ニストであるOCA(1a)は、パイプラインを先導し、NASHに対抗する第1の有効な薬物となる見込みが高い。これは臨床試験において、いくつかの代謝的改善を伴い、抗脂肪症および抗線維症効果を呈した<sup>6, 12</sup>。二重PPAR $\gamma$ / $\alpha$ アゴニストであるエラフィブラノールは、第II相試験を良好に完了し、治療オプションとしてOCAの後続となり得る<sup>3, 8</sup>。依然として、脂肪症、線維症および重要なことに炎症を伴うNASHの多因子性質は、関与するすべての因子に対処するより広い治療戦略を必要とし得る。脂肪症に対するFXR活性化の優れた効能<sup>6, 12</sup>ならびにSEH阻害の肝臓への抗脂肪症効果および抗炎症効果に関する有望な報告<sup>2, 3, 39</sup>に照らして、本発明者らは、これらの戦略の組み合わせが相乗的であり得ると推測した。したがって、本発明者らは、良好に均衡がとれた活性を有するFXRおよびSEHの非常に強力な二重調節剤を開発した。

10

#### 【0100】

本発明者らは、部分的FXRアゴニストおよびSEH阻害剤の既知のファルマコフォアをマージすることに成功して、リード構造5を生成し、これは両方の標的に対して弱いものの統計的に有意な活性を表した。このリード化合物の低フラグメント様特性および構造的可撓性は、最適化を達成するための相当の構造的変動を可能にすることから、中程度の活性で十分であると思われた。4つの連続ステップにおいて、本発明者らは、FXRおよびSEHに対する化合物クラスのSARを系統的に調査し、二重能力の強力な最適化に至った。しかしながら、本発明者らは、単一標的のいくつかの非常に強力な調節剤を特定したが、両方の標的に対して低ナノモルの能力を有する化合物は、系統的SAR研究において発見されなかった。したがって、最終の決定的最適化ステップのために、単一標的に対する最も活性な剤の構造要素を組み合わせ、これが部分的FXR活性化について $20.4 \pm 4.2$  nMのEC<sub>50</sub>値およびSEH阻害について $4.1 \pm 0.4$  nMのIC<sub>50</sub>値を有する非常に強力な二重調節剤としての57の開発につながった。57のより広範なインビトロ特性化は、関連核内受容体に対する非常に好ましい選択性プロファイル、および最大100  $\mu$ Mの濃度で細胞毒性活性がないことを明らかにした。インビトロ代謝の評価において、57は、中程度に安定していることがわかり、これはインビトロでの中程度の半減期によって確認された。しかしながら、主な代謝産物の詳細な評価および特性化は、57のスルホンアミド部分の加水分解によって形成されたアニリン69aがほぼ同程度の能力を有し、薬理学的に活性であり57の二重調整効果を延長する可能性があることを示す。

20

30

#### 【0101】

HepG2細胞において、57は、内在性アゴニストであるCDCA(1b)と比較して、FXR標的遺伝子の部分誘導をもたらした。非形質導入肝臓細胞におけるこの観察、および部分的アゴニスト性調節が1  $\mu$ Mおよび0.1  $\mu$ Mの濃度で同程度であるという事実により、二重調節剤57の真の部分的FXRアゴニスト性質が確認された。オベチコール酸(1a)の臨床開発<sup>6</sup>は、完全FXRアゴニストによる治療時にコレステロールホメオスタシスの妨害を報告しており、これはFXR標的遺伝子であるコレステロール7 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ(CYP7A1)の強い抑制に起因すると思われる。この酵素は、コレステロールの胆汁酸への代謝変換において第1の律速酵素を構成し、したがって完全FXR活性化は、コレステロール排出の主要経路のうちの1つを遮断する。この副作用を回避するために、部分的FXR活性化が好ましいと思われる。

40

#### 【0102】

57による刺激後のHepG2細胞のFXR標的遺伝子の発現プロファイルは、NAFLDおよびNASHに対する有益な効果を示唆する。最近の研究は、NAFLDおよびNASH患者における線維芽細胞因子19(FGF19)の低減した血清レベルを報告し<sup>40</sup>、FGF19による処置は、マウスにおいてインスリン感受性を改善し、体重を低下させ、肝脂肪含有量を減少させた。OCA(1a)による処置下で、増加したFGF19レベルが観察され、これは重要で有益な薬力学的効果とみなされた<sup>12</sup>。酸化による肝脂肪酸分解の主要な調節因子と考えられているPPAR $\alpha$ <sup>41</sup>の誘導と、脂肪酸デノボ合成の低減を引き起こす肝臓FASの抑制との組み合わせは、肝脂肪症を低減するために好ま

50

しい。とりわけ、N A F L DおよびN A S Hにおける肝脂肪含有量は、遊離脂肪酸によって占められる<sup>4</sup>。この効果は、糖分解の低減および結果としてエネルギー生成のための脂肪酸利用につながるP D K 4の誘導によってさらに強化され得る<sup>4 2</sup>。肝臓型脂肪酸結合タンパク質(F A B P 1)は、多くの生理学的プロセスに関与し、脂質ホメオスタシスに広く影響を及ぼす。肝臓において、F A B P 1は、細胞保護的役割を有し、酸化細胞損傷に対抗する<sup>4 3</sup>。肝細胞における酸化ストレスは、N A F L D / N A S Hの進展および顕性化における主要因子であるため、5 7によってもたらされるようなF A B P 1の強化された発現が、N A S Hにおいて好ましいと思われる。

#### 【0103】

可溶性エポキシドヒドロラーゼに対する5 7の阻害能力もまた、H e p G 2細胞溶解物中の重水素化s E H基質1 4 . 1 5 - E E T - d 1 1の変換を定量化することによって、より人工的でない状況で研究した。このシステムでは、5 7は、1 . 6 ± 0 . 5 n MのI C<sub>50</sub>値を有し、これは組み換えタンパク質に関する無細胞蛍光ベースのアッセイにおいて得られた結果と完全に一致する。したがって、二重調節剤5 7は、他のタンパク質および肝細胞からの細胞成分の存在下で、ヒトs E Hを阻害することにおいて同程度に強力である。

#### 【0104】

本発明者らは、有望なインビトロプロファイルに促され、雄の野生型C 5 7 B L 6 / Jマウスにおけるパイロットインビボ研究に5 7を適用して、二重調節剤の薬物動態および薬力学的効果を評価した。5 7は、好ましい速い取り込みおよび経口バイオアベイラビリティを示し、分子はむしろ短い半減期を有していたが、本発明者らは、体重1 k gあたり1 0 m gの単回経口投与後、およそ3 . 5 ~ 4 時間にわたって活性濃度を観察した。5 7の適用後8時間のマウス肝臓におけるF X R標的遺伝子のm R N Aの定量化は、統計的有意性に至ることはわずかにできなかったもののS H PおよびB S E Pの明らかな上方調節の傾向を明らかにし、ならびにF G F 1 5およびS R E B P 1 cの発現に対する顕著な効果を明らかにした。C Y P 7 A 1は、わずかな下方調節傾向を示した。特に、B S E Pの誘導は、この遺伝子がF X Rによってほぼ排他的に調節されるため、インビボでの5 7によるF X Rの活性化を示す<sup>4 4 - 4 6</sup>。さらに、上述されるように、S R E B P 1 cの抑制およびF G F 1 5の誘導は、N A F L D / N A S H治療における好ましい効果を示唆する。インビボでのs E H阻害に関して、本発明者らは、血漿におけるs E H基質(E E T)対s E H生成物(D H E T)の比に対する5 7の効果を評価し、これらの比は二重調節剤を受けたマウスにおいてE E Tへ著しくシフトした。このE E Tの蓄積は、5 7がインビボでも同様にs E Hを阻害し、N A S Hにおける有益な効果に高度に寄与するであろう抗炎症活性を呈し得ることを示す。

#### 【0105】

低ナノモルの能力でF X Rを部分的に活性化しs E Hを阻害する、本明細書で報告された二重調節剤5 7は、そのような活性を有する最初の化合物である。F X R標的遺伝子の発現およびE E T / D H E T比の調整を伴うその薬力学的効果は、5 7が、インビボで両方の標的に到達することを示す。この固有の活性のために、この二重調節剤は、より大きな動物モデルについて、N A S Hおよび関連する代謝障害または心血管障害におけるその治療効果およびF X R / s E H二重調節の概念を研究するのに完全に適格である。

#### 【0106】

##### 材料および方法

##### 化学

一般。すべての化学物質および溶媒は、試薬グレードであり、別途特定されない限り、さらなる精製なしに使用された。すべての反応は、アルゴン雰囲気下オープン乾燥したガラス容器内、および純粋溶媒中で行った。N M Rスペクトルは、B r u k e r A V 4 0 0、B r u k e r A V 3 0 0、B r u k e r a m 2 5 0 x pまたはB r u k e r A V 5 0 0分光計(B r u k e r C o r p o r a t i o n , B i l l e r i c a , M A , U S A)で記録した。化学シフト( )は、基準としてのテトラメチルシラン(T M S)

に対して ppm 単位で報告され、多重度：s，一重項；d，二重項；dd，二重項の二重項；t，三重項；dt，三重項の二重項；m，多重項；近似カップリング定数（J）は、ヘルツ（Hz）単位で示される。質量スペクトルは、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を使用し、VG Platform II（Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA）で得られた。高解像度質量スペクトルは、MALDI LTQ ORBITRAP XL 計器（Thermo Fischer Scientific）で記録した。化合物純度は、1 mL / 分の流量での勾配（H<sub>2</sub>O / MeOH 80 : 20 + 0.1 % 酢酸の 5 分間のイソクラチックから、さらに 45 分後の MeOH + 0.1 % 酢酸、およびさらに 10 分間の MeOH + 0.1 % 酢酸）ならびに 245 nm および 280 nm での UV 検出を使用し、MultoHigh 100 フェニル - 5 μ 240 + 4 mm カラム（CS - Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany）を備えた Varian ProStar HPLC（Spectralab Scientific Inc., Markham, ON, Canada）で分析した。化合物 16 は、MS において分子イオンが見出されなかったため、元素分析によって分析した。生物学的評価のためのすべての最終化合物は、純度 95 % を有していた。

10

## 【0107】

二重調節剤 57 の調製：

1 - (4 - アミノ - 1 - クロロフェニル) メタンアミン (58 k) : LiAlH<sub>4</sub> (THF 中 1 M、16.4 mL、16.4 mmol、2.5 当量) を 0 に冷却した。3 mL の THF 中の 4 - アミノ - 2 - クロロベンゾニトリル 62 (1.0 g、6.6 mmol、1.0 当量) を、混合物にゆっくり添加した。H<sub>2</sub> の発生が止まった後、混合物を放置して室温まで温め、次いで 16 時間還流した。室温に冷却した後、混合物を 10 mL の THF で希釈し、次いで 0 に冷却した。1 mL の 10 % NaOH 溶液および 1.8 mL の水を滴下添加した。無色の沈殿物をセライトで濾過し、15 mL のジエチルエーテルで洗浄した。濾液からの有機溶媒の蒸発により、58 k を黄色の油として得た (0.77 g、75 %)。

20

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.11 (d, *J* = 8.2 Hz,

1H), 6.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.59 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 148.56, 132.33, 129.67, 127.74, 113.63, 112.72, 42.88

30

## 【0108】

N - (4 - アミノ - 2 - クロロベンジル) - 4 - (tert - ブチル) ベンズアミド (69 a) : 1 - (4 - アミノ - 1 - クロロフェニル) メタンアミン 58 k (0.31 g、2.0 mmol、1.1 当量) を、10 mL の CHCl<sub>3</sub> に溶解し、5 mL の NEt<sub>3</sub> を添加し、混合物を 0 に冷却した。4 - tert - ブチルベンゾイルクロリド 63 o (0.35 mL、1.8 mmol、1.0 当量) を、10 分間にわたってゆっくり添加し、混合物を室温で 2 時間攪拌した。次いで、50 mL の 10 % 塩酸水溶液を添加し、相を分離し、水層を 30 mL の EtOAc で洗浄した。この水層を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液で pH 10 にし、1 回につき 80 mL の EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ペトロールエーテル / EtOAc (9 : 1) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、69 a を黄色の固体として得た (0.57 g、97 %)。R<sub>f</sub> (ペトロールエーテル / EtOAc = 2 : 1) = 0.26。

40

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  = 7.81 (dt,  $J$  = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.53 (dt,  $J$  = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.45 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 1.36 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  = 170.32, 156.67, 140.89, 135.23, 132.33, 131.39, 128.29, 126.59, 122.96, 120.82, 119.16, 42.13, 35.36, 31.54. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 317.14152 for  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ , found 317.14130  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 【 0 1 0 9 】

4 - (tert - ブチル) - N - (2 - クロロ - 4 - (メチルスルホンアミド) ベンジル) ベンズアミド (57) : N - (4 - アミノ - 2 - クロロベンジル) - 4 - (tert - ブチル) ベンズアミド 69a (0.04 g、0.12 mmol、1.0 当量) を、5 mL の  $\text{CHCl}_3$  に溶解し、0.5 mL のピリジンを追加した。塩化メシル 70 (0.02 mL、0.14 mmol、1.2 当量) を慎重に添加し、混合物を室温で 2 時間撹拌した。次いで、15 mL の 10% 塩酸水溶液を追加し、混合物を 1 回 30 mL の EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、溶媒を真空中で蒸発させた。さらなる精製を、ペトロールエーテル / EtOAc (4 : 1) を移動相として用いるカラムクロマトグラフィーによって行い、57 を無色の固体として得た (0.047 g、66%)。  $R_f$  (ペトロールエーテル / EtOAc = 2 : 1) = 0.13。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  = 7.80 (dt,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 2H), 7.52 (dt,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 2.97 (s, 3H), 1.35 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  = 170.30, 156.55, 139.90, 134.88, 133.07, 132.46, 130.99, 128.29, 126.56, 121.75, 119.62, 42.06, 39.36, 35.81, 31.55. MS (ESI-):  $m/z$  393.1 (100,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 395.11907 for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ , found 395.11892  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 【 0 1 1 0 】

化合物 4 ~ 56 および 77 ~ 78 の調製および特性化、ならびにそれぞれの中間体については、補足情報を参照されたい。

#### 【 0 1 1 1 】

生物学的評価

全長 F X R トランス活性化アッセイ

プラスミド : p c D N A 3 - h F X R は、ヒト F X R の配列を含有し、既に他の場所で公開されている<sup>4 7</sup>。p G L 3 b a s i c (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) をレポータープラスミドとして使用し、胆汁酸塩排出タンパク質 (BSEP) のプロモーターの短縮構築物を、ルシフェラーゼ遺伝子の前の Sac I / Nhe I 切断部位にクローニングした<sup>4 8</sup>。p R L - S V 4 0 (Promega) を、形質導入効率および細胞成長の正規化のための対照として形質導入した。p S G 5 - h R X R も同様に、他の場所で既に公開されている<sup>4 9</sup>。

#### 【 0 1 1 2 】

アッセイ手順 : HeLa 細胞を、10% FCS、ビルビン酸ナトリウム (1 mM)、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100  $\mu\text{g}$ /mL) で補充した DMEM 高グルコース中、37 °C および 5% の  $\text{CO}_2$  で成長させた。形質導入の 24 時間前に、HeLa 細胞を、96 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 8000 細胞の密度で播種した。形質導入の 3.5 時間前に、培地を、ビルビン酸ナトリウム (1 mM)、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100  $\mu\text{g}$ /mL) および 0.5% のチャコール処理済み FCS で補充した DMEM 高グルコースに変更した。BSEP - pGL3、pRL - SV40 ならびに発現プラスミド p c D N A 3 - h F X R および p S G 5 - h R X R による HeLa 細胞の一過性形質導入は、リン酸カルシウム形質導入方法を使用して実行した。形質導入の 16 時間後に、培地を、ビルビン酸ナトリウム (1 mM)、



ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) および 0.5 % のチャコール処理済み FCS で補充した DMEM 高グルコースに変更した。形質導入の 24 時間後に、培地を、フェノールレッドなしで、ビルビン酸ナトリウム (1 mM)、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL)、L-グルタミン (2 mM) および 0.5 % チャコール処理済み FCS で補充し、ここでは追加として 0.1 % DMSO およびそれぞれの試験化合物または 0.1 % DMSO 単独を無処置対照として含有する、DMEM に変更した。各濃度を三つ組のウェルで試験し、各実験を、独立して少なくとも 3 回繰り返した。試験化合物との 24 時間のインキュベーションに続いて、製造者のプロトコルに従って Dual-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を使用し、ルシフェラーゼ活性について細胞をアッセイした。Tecan Infinite M200 ルミノメーター (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany) を用いて、発光を測定した。形質導入効率および細胞成長の正規化は、ホタルルシフェラーゼデータをウミシタケルシフェラーゼデータで除算し、1000 を掛けることによって行い、相対光単位 (RLU) を得た。活性化倍率は、それぞれの濃度での試験化合物の平均 RLU を、無処置対照の平均 RLU で除算することによって得られた。相対活性化は、それぞれの濃度での試験化合物の活性化倍率を、FXR 完全アゴニストである GW4064 (1c) の 3 µM での活性化倍率で除算することによって得られた。EC<sub>50</sub> および平均値の標準誤差は、4 パラメータロジスティック回帰を使用し、SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) により、少なくとも 3 回の独立した実験の平均相対活性化値を用いて算出した。このアッセイは、FXR アゴニストである 1b (EC<sub>50</sub> = 18 ± 1 µM, 88 ± 3 % の相対最大活性化)、1a (EC<sub>50</sub> = 0.16 ± 0.02 µM, 87 ± 3 % の相対最大活性化) および 1c (EC<sub>50</sub> = 0.51 ± 0.16 µM, 3 µM を 100 % として定義した) で検証した<sup>15</sup>。

#### 【0113】

##### sEH 活性アッセイ

化合物の sEH 阻害能力は、組み換えヒト酵素を使用し、蛍光ベースの 96 ウェル sEH 活性アッセイにおいて決定した<sup>50, 51</sup>。sEH によって蛍光 6-メトキシナフトアルデヒドに加水分解され得る、非蛍光 PHOME (3-フェニルシアノ-(6-メトキシ-2-ナフタレニル)メチルエステル 2-オキシラン酢酸; Cayman Chemicals) を基質とした。組み換えヒト sEH (最終濃度 0.01 % の Triton-X 100 を含有する 0.1 mg/mL BSA を含む、Bis-Tris 緩衝液 (pH 7) 中) を、試験化合物 (DMSO 中、最終 DMSO 濃度: 1 %) と室温で 30 分間、プレインキュベートした。次いで、基質を添加し (最終濃度 50 µM)、基質の加水分解を、Tecan Infinite F200 Pro (ε<sub>m</sub> = 330 nm, ε<sub>x</sub> = 465 nm) で 30 分間 (毎分 1 ポイント) 蛍光生成物の形成を測定することによって決定した。ブランク対照 (タンパク質なしおよび化合物なし) ならびに陽性対照 (化合物なし) を実施した。すべての実験を三つ組で行い、少なくとも 3 回の独立した実験において繰り返した。IC<sub>50</sub> の算出の場合、漸増する化合物濃度の用量応答曲線を記録した。

#### 【0114】

PPAR / / 、LXR / / 、RXR / / 、RAR / / 、VDR および PXR のハイブリッドレポーター遺伝子アッセイ

プラスミド: Gal4 融合受容体プラスミドである pFA-CMV-hPPAR-LBD<sup>52</sup>、pFA-CMV-hPPAR-LBD<sup>52</sup>、pFA-CMV-hPPAR-LBD<sup>52</sup>、pFA-CMV-hLXR-LBD<sup>32</sup> および pFA-CMV-hLXR-LBD<sup>32</sup> は、以前に報告されている。それぞれの核内受容体の標準的アイソフォームのヒンジ領域およびリガンド結合ドメイン (LBD) (UniProt エントリー: hRXR - P19793、残基 225 ~ 462; hRXR - P28702 - 1、残基 294 ~ 533; hRXR - P48443 - 1、残基 229 ~ 463; hRAR - P10276 - 1、残基 177 ~ 462; hRAR - P10826 - 1、残基 177 ~ 4

10

20

30

40

50

55 ; h R A R - P 1 3 6 3 1 - 1、残基 1 7 9 ~ 4 5 4 ; h V D R - P 1 1 4 7 3 - 1、残基 1 1 9 ~ 4 2 7 ; h P X R - O 7 5 4 6 9 - 1、残基 1 3 8 ~ 4 3 4 ) をコードする G a l 4 融合受容体プラスミド p F A - C M V - h R X R - L B D、p F A - C M V - h R X R - L B D、p F A - C M V - h R X R - L B D、p F A - C M V - h R A R - L B D、p F A - C M V - h R A R - L B D、p F A - C M V - h V D R - L B D および p F A - C M V - h P X R - L B D は、市販の c D N A ( S o u r c e B i o S c i e n c e , N o t t i n g h a m , U K ) の P C R 増幅から得られた c D N A フラグメントを、p F A - C M V ベクター ( S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A , U S A ) の B a m H 1 切断部位およびその前に挿入された K p n I 切断部位に組み込むことによって構築した。すべての融合受容体のフレームおよび配列は、配列決定によって検証した。p F R - L u c ( S t r a t a g e n e ) をレポータープラスミドとして、p R L - S V 4 0 ( P r o m e g a ) を形質導入効率および細胞成長の正規化のために使用した。

#### 【 0 1 1 5 】

アッセイ手順：H E K 2 9 3 T 細胞を、1 0 % F C S、ビルビン酸ナトリウム ( 1 m M )、ペニシリン ( 1 0 0 U / m L ) およびストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m L ) で補充した D M E M 高グルコース中、3 7 °C および 5 % の C O <sub>2</sub> で成長させた。形質導入の前日に、H E K 2 9 3 T 細胞を 9 6 ウェルプレートに播種した ( 2 . 5 × 1 0 <sup>4</sup> 細胞 / ウェル )。形質導入前に、培地を補充なしの O p t i - M E M に変更した。一過性形質導入は、p F R - L u c ( S t r a t a g e n e )、p R L - S V 4 0 ( P r o m e g a ) および p F A - C M V - h R X R - L B D を用いて、製造者のプロトコルに従ってリポフェクタミン L T X 試薬 ( I n v i t r o g e n ) を使用して実行した。形質導入の 5 時間後に、培地を、ペニシリン ( 1 0 0 U / m L )、ストレプトマイシン ( 1 0 0 μ g / m L ) で補充し、ここでは追加として 0 . 1 % D M S O およびそれぞれの試験化合物または 0 . 1 % D M S O 単独を無処置対照として含有する、O p t i - M E M に変更した。各濃度を三つ組で試験し、各実験を、独立して少なくとも 3 回繰り返した。試験化合物と一晚 ( 1 2 ~ 1 4 時間 ) インキュベーションした後、製造者のプロトコルに従って D u a l - G l o ( 商標 ) ルシフェラーゼアッセイシステム ( P r o m e g a ) を使用し、ルシフェラーゼ活性について細胞をアッセイした。I n f i n i t e M 2 0 0 ルミノメーター ( T e c a n D e u t s c h l a n d G m b H ) を用いて、発光を測定した。形質導入効率および細胞成長の正規化は、ホタルルシフェラーゼデータをウミシイタケルシフェラーゼデータで除算し、その値に 1 0 0 0 を掛けることによって行い、相対光単位 ( R L U ) を得た。活性化倍率は、それぞれの濃度での試験化合物の平均 R L U を、無処置対照の平均 R L U で除算することによって得られた。相対活性化は、それぞれの濃度での試験化合物の活性化倍率を、それぞれの参照アゴニストの 1 μ M での活性化倍率で除算することによって得られた ( P P A R : G W 7 6 4 7 ; P P A R : ビオグリタゾン ; P P A R : L 1 6 5 , 0 4 1 ; L X R / : T 0 9 0 1 3 1 7 ; R X R : ベキサロテン ; R A R : トレチノイン ; V D R : カルシトリオール ; P X R : S R 1 2 8 1 3 )。すべてのハイブリッドアッセイは、上述の参照アゴニストを用いて検証し、文献と一致する E C <sub>50</sub> 値を得た。

#### 【 0 1 1 6 】

F X R 標的遺伝子の定量化 ( 定量的リアルタイム P C R )

F X R 標的遺伝子の定量化は、以前に記載されているように行った<sup>15</sup>。簡潔に説明すると、H e p G 2 細胞を、試験化合物 5 7 ( 0 . 1 μ M および 1 μ M ) または 1 b ( 5 0 μ M ) または無処置対照としての 0 . 1 % D M S O 単独と 8 時間または 1 6 時間インキュベートし、採取し、冷たいリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) で洗浄した後、R N A 抽出に直接使用した。2 マイクログラムの全 R N A を、全 R N A ミニキット ( R 6 8 3 4 - 0 2、O m e g a B i o - T e k , I n c . , N o r c r o s s , G A , U S A ) によって、H e p G 2 細胞から抽出した。高性能 c D N A 逆転写キット ( 4 3 6 8 8 1 4、T h e r m o F i s c h e r S c i e n t i f i c , I n c . ) を使用し、製造者のプロ

10

20

30

40

50

トコルに従って、RNAをcDNAに逆転写した。FXR標的遺伝子の発現は、Power SYBR Green (Life Technologies; 12.5  $\mu$ L/ウェル) を使用し、StepOnePlus (商標) システム (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、定量的リアルタイムPCR分析によって評価した。プライマーは、補足情報に列挙されている。各試料を二つ組で設定し、少なくとも3回の独立した実験において繰り返した。発現は、比較 Ct 方法によって定量化し、グリセリンアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を参照遺伝子とした。結果 (100%として設定されたビヒクルと比較した発現の平均  $\pm$  SEM % 変化として表される、n = 4) : BSEP : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 557  $\pm$  28 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 216  $\pm$  18 ; 57 (1  $\mu$ M) : 222  $\pm$  20。SHP : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 368  $\pm$  35 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 242  $\pm$  61 ; 57 (1  $\mu$ M) : 317  $\pm$  78。CYP7A1 : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 34  $\pm$  12 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 50  $\pm$  7 ; 57 (1  $\mu$ M) : 52  $\pm$  8。PPAR : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 289  $\pm$  59 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 170  $\pm$  11 ; 57 (1  $\mu$ M) : 211  $\pm$  10。SREBP1c : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 45  $\pm$  7 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 49  $\pm$  17 ; 57 (1  $\mu$ M) : 36  $\pm$  12。FAS : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 34  $\pm$  14 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 22  $\pm$  8 ; 57 (1  $\mu$ M) : 38  $\pm$  15。FGF19 : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 407  $\pm$  42 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 309  $\pm$  101 ; 57 (1  $\mu$ M) : 325  $\pm$  77。PDK4 : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 284  $\pm$  50 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 255  $\pm$  54 ; 57 (1  $\mu$ M) : 226  $\pm$  57。FABP1 : DMSO : 100 ; 1b (50  $\mu$ M) : 249  $\pm$  17 ; 57 (0.1  $\mu$ M) : 183  $\pm$  34 ; 57 (1  $\mu$ M) : 194  $\pm$  42。CD36 : DMSO : 100 ; ピオグリタゾン (1  $\mu$ M) : 353  $\pm$  43 ; 57 (1  $\mu$ M) : 119  $\pm$  33 ; 57 (10  $\mu$ M) : 129  $\pm$  42。FAM3A : DMSO : 100 ; ピオグリタゾン (1  $\mu$ M) : 310  $\pm$  66 ; 57 (1  $\mu$ M) : 112  $\pm$  12 ; 57 (10  $\mu$ M) : 142  $\pm$  7。

#### 【0117】

#### 細胞sEHアッセイ

細胞sEH代謝活性の定量化は、Zhaらによって記載されているように行った<sup>53</sup>。したがって、HepG2細胞からの1  $\mu$ gの全細胞ホモジネート (0.1 mg/mL BSAを含有する100  $\mu$ LのPBS中に希釈した) を、異なる濃度の57、陽性対照としてのN-シクロヘキシル-N-(4-ヨードフェニル)尿素 (CIU、10  $\mu$ M)<sup>36</sup> または陰性対照としてのビヒクル (最終濃度1%のDMSO) と15分間、37 でインキュベートした。25 ngの(±)14(15)-EET-d11 (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) を添加し、インキュベーションを37 でさらに10分間継続した。同様に処理したPBS (0.1 mg/mLのBSAを含有する) でブランク試験を行った。100  $\mu$ Lの氷冷メタノールを添加することによって、反応を停止させた。遠心分離 (2000 rpm、4、5分) 後、上澄みをLC-MS/MSによって分析し、(±)14(15)-EET-d11および対応する(±)14(15)-DHET-d11の量を決定した。上澄みからの(±)14(15)-EET-d11および(±)14(15)-DHET-d11の定量化は、マウス血漿からのEETおよびDHETの定量化について報告された手順に従い、LC-MSによって行った (下記を参照)。結果 (平均 (±)14(15)-EET-d11 / (±)14(15)-DHET-d11 比  $\pm$  SEMとして表される; n = 3) : ブランク (細胞なし) : 499  $\pm$  123 ; DMSO (1%) : 63  $\pm$  16 ; CIU (10  $\mu$ M) : 519  $\pm$  55 ; 57 : 0.001  $\mu$ M : 191  $\pm$  7 ; 0.01  $\mu$ M : 396  $\pm$  65 ; 0.1  $\mu$ M : 442  $\pm$  7 ; 1  $\mu$ M : 602  $\pm$  56 ; 10  $\mu$ M : 614  $\pm$  96。

#### 【0118】

#### 動物研究

動物および化合物の適用 : 9匹の雄C57BL/6Jマウス (体重23 ~ 26 g、

Janvier Labs (France) から購入した) を、本研究において使用した。動物を温度制御された部屋 (20 ~ 24 ) に入れ、明 12 時間 / 暗 12 時間のサイクルで維持した。食餌および水は自由に摂取可能であった。インライフ (in life) 相は、医薬品開発業務受託機関である Pharmaceilsus (Saarbrücken, Germany) によって行われた。すべての実験手順は、地域の動物愛護当局 (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen, Saarbrücken) によって承認され、その規定に従って行った。6 匹の動物は、1 % HPMC / Tween 80 (99 : 1) を含有する水中の二重調節剤 57 の体重 1 kg あたり 10 mg の単回経口投与を受けた。3 匹の動物は、ビヒクル (1 % HPMC / Tween 80 (99 : 1) を含有する水) を受けた。すべての動物は、研究期間中正常に行動し、有害作用を示さなかった。

10

20

30

40

50

#### 【0119】

血液および肝臓試料採取：6 つの時点で (57 の適用後 15 分、30 分、60 分、120 分、240 分および 480 分)、6 匹の拘束された意識のあるマウスの血液 (20  $\mu$ L) を横尾静脈から得た。最後の時点 (480 分) で、マウスをイソフルラン下で麻酔し、血液 (約 500  $\mu$ L) を後眼窩穿刺によって得た。血液の一部を遠心分離して (6000 rpm、10 分、+4 )、EET / DHEET 比の定量化のための血漿を得て、さらなる評価まで -80 で保存した。肝臓回収のために、最後の血液採取後 (投与後 8 時間) に、マウスを頸椎脱臼によって屠殺した。完全な肝臓を即時に急速冷凍し、さらなる評価まで -80 で保存した。ビヒクル (1 % HPMC / Tween 80 (99 : 1) ) の経口適用を受けた 3 匹の対照マウスから血漿および肝臓を同様に得た。

#### 【0120】

血漿試料からの 57 の定量化：校正試料：試験製品のストック溶液 (DMSO 中 1 mg / mL) を、DMSO 中で最終濃度 200  $\mu$ g / mL (開始溶液) に希釈した。さらなるワーキング溶液を、DMSO 中でのワーキング溶液の希釈によって調製した。個々のストック溶液を、校正標準および QC の調製に使用した。校正標準および QC は、薬物を含まない 20  $\mu$ L のブランク血液に、2 . 4  $\mu$ L のワーキング溶液を加えることによって調製した。したがって、未知の試料、ゼロ試料およびブランクに、2 . 4  $\mu$ L の DMSO を加えた。校正標準および品質管理は、二つ組で調製した。内部標準 (グリセオフルビン、600 ng / mL) を含有する 40  $\mu$ L 量のアセトニトリルを、22 . 4  $\mu$ L の未知の試料、ゼロ試料、校正標準および QC 試料に添加した。内部標準を含まないアセトニトリルを、ブランク試料に添加した。すべての試料を激しく振とうし、6000 g で 10 分間、室温で遠心分離した。粒子を含まない上澄み (50  $\mu$ L) を等量の水で希釈した。分割量を 200  $\mu$ L のサンプラーバイアルに移し、その後、15  $\mu$ L の注入量で LC - MS に供した。LC - MS 分析：HPLC ポンプ流量を 600  $\mu$ L / 分に設定し、プレカラム (Kinetex Phenyl - Hexyl, Security Guard Ultra, 2 . 1 mm) を有する Kinetex Phenyl - Hexyl、2 . 6  $\mu$ m、50  $\times$  2 . 1 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) 分析カラムで分離した。水相 (A) としての水および 0 . 1 % ギ酸ならびに有機相 (B) としての 0 . 1 % ギ酸含有アセトニトリルによる勾配溶出を使用した：% B (t (分))、0 (0 - 0 . 1) - 97 (0 . 4 - 1 . 7) - 0 (1 . 8 - 3 . 0)。全走査質量スペクトルは、シリンジポンプ注入を使用して陽イオンモードで取得され、プロトン化された準分子イオン [M + H]<sup>+</sup> を特定した。イオン量を最大化するために自動調節を行い、一般的なパラメータ設定を使用して特徴的なフラグメントイオンを特定した：イオン移動キャピラリー温度 350 、キャピラリー電圧 3 . 8 kV、衝突気体 0 . 8 mbar アルゴン、シーガス、イオンスイープガスおよび補助ガス圧は、それぞれ 20、2 および 8 (任意単位) であった。薬物動態分析は、Kinetic 5 . 0 ソフトウェア (Thermo Scientific, Waltham, USA) を使用し、非コンパートメントモデルを適用して行った。

## 【0121】

マウス肝臓からのFXR標的遺伝子mRNAの定量化：RT-qPCRのためのマウス肝臓組織の肝細胞単離：肝臓試料を均質化するために、各肝臓の3分の1を、50mLのFalcon管中の、40μm孔径を有するFalcon（商標）細胞ストレーナ（BD Bioscience, Erembodegem, Belgium）上に置いた。すべての組織を、10% FCSおよび1% PenStrepを含有するPBS緩衝液で洗い、5mLの細胞懸濁液が回収されるまで細胞ストレーナに押し通した。試料を1200rpmで10分間、4℃で遠心分離した。上澄みを廃棄し、ペレットを5mLの冷たいPBS緩衝液で洗浄し、1200rpmで10分間、4℃で再度遠心分離した。上澄みを廃棄した後、細胞ペレットを1mLのPBSに再懸濁し、E.Z.A.全RNAキットI（Omega bio-tek Inc., Narcoss, Georgia, USA）を使用し、動物組織プロトコルに従って、全RNAを抽出した。抽出したRNAを、qRT-PCRに使用し、HepG2細胞からのmRNA定量化について記載したのと同様に処理した（上記を参照）。マウス遺伝子のPCRプライマーを補足情報に列挙する。結果（100%として設定されたビヒクルと比較した発現の平均±SEM%変化として表される。57の場合n=6、ビヒクルの場合n=3）：BSEP：ビヒクル：105±24；57（10mg/kg）：312±103。SHP：ビヒクル：108±29；57（10mg/kg）：410±147。CYP7A1：ビヒクル：106±25；57（10mg/kg）：70±11。SREBP1c：ビヒクル：82±14；57（10mg/kg）：17±10。FGF15：ビヒクル：119±15；57（10mg/kg）：254±9。FATP：ビヒクル：101±1；57（10mg/kg）：105±5。

10

20

## 【0122】

マウス血漿試料からのEET/DHET比の分析（LC-MS/MSによるエポキシエイコサトリエン酸（EET）およびそれらの代謝産物であるジヒドロキシエポキシエイコサトリエン酸（DHET）の決定）：抽出された試料の8,9-EET、11,12-EETおよびそれらのデヒドロ代謝産物の含有量は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いて分析した。LC-MS/MSシステムは、API5500 QTrap（AB Sciex, Darmstadt, Germany）を含み、ネガティブESIモードで動作するTurbo-V-ソース、Agilent 1200バイナリHPLCポンプおよび脱ガス装置（Agilent, Waldbronn, Germany）、ならびに25μLのLEAPシリンジ（Axel Semrau GmbH, Sprockhovel, Germany）を装備したHTC Palオートサンプラー（Chromtech, Idstein, Germany）を備えていた。質量分析計のための高純度窒素は、NGM22-LC/MS窒素生成器（cmc Instruments, Eschborn, Germany）によって生成した。すべての化合物は、Cayman Chemical（Ann Arbor, MI, USA）から得た。2500ng/mLの全分析物を含むストック溶液を、メタノール中で調製した。エポキシエイコサトリエン酸およびそれらのデヒドロ代謝産物のさらなる希釈によって、0.1~250ng/mLの濃度範囲の実用標準を得た。マウス血漿試料の抽出は、液液抽出によって行った。150μLの試料/マトリックスホモジネートを、20μLの内部標準（メタノール中200ng/mLの濃度の8,9-EET-d8および11,12-EET-d8）と緩やかに混合し、600μLの酢酸エチルで2回抽出した。標準曲線および品質管理のための試料を調製するために、150μLのPBSを添加し、さらに20μLのメタノール、20μLの実用標準および20μLの内部標準を、150μLのマトリックスホモジネートの代わりに添加した。緩やかな窒素流の下、45℃の温度で有機溶媒を蒸発させた。残渣を50μLのメタノール/水（50:50、v/v）で再構成し、10000gで2分間遠心分離し、次いでガラスバイアル（Macherey-Nagel, Duren, Germany）に移した後、LC-MS/MSシステムに注入した。クロマトグラフィー分離のために、Gemini NX C18カラムおよびプレカラムを使用した（内径150mm×2mm、粒径5μmおよび孔径110Å、Phenomenex, A

30

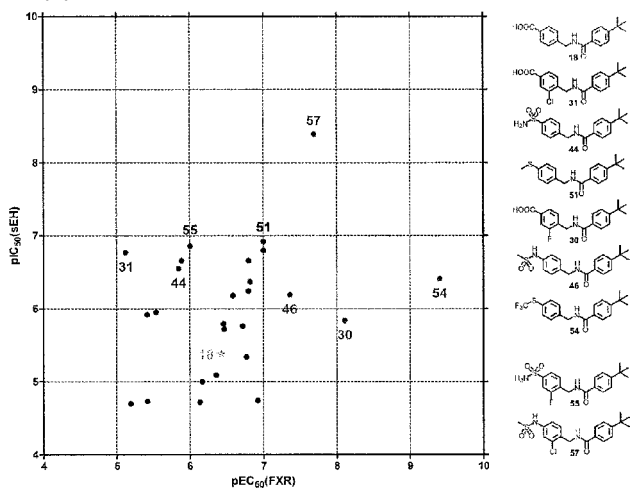
40

50

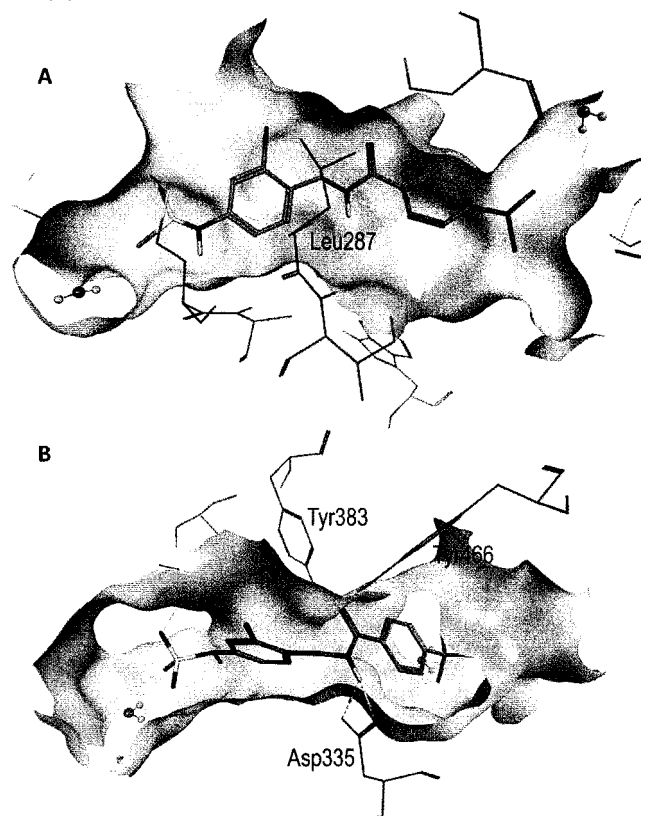
s c h a f f e n b u r g , G e r m a n y ) 。 総実行時間 17.5 分、0.5 mL / 分移動相の流量で、線形勾配を用いた。移動相は、A 水 / アンモニア (100 : 0.05、v / v) および B アセトニトリル / アンモニア (100 : 0.05、v / v) であった。勾配は、85 % A から開始し 12 分以内に 10 % にし、これを 10 % A で 1 分間保持した。0.5 分以内に、移動相を 85 % A に戻し、3.5 分間保持してカラムを次の試料のために平衡化した。試料の注入量は 20  $\mu$ L であった。定量化は、内部標準方法 (同位体希釈質量分析) を用い、Analyst ソフトウェア V1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) で行った。分析物ピーク面積と内部標準面積との比 (y 軸) を、濃度 (x 軸) に対してプロットし、校正曲線を、 $1/c^2$  加重を伴う最小二乗回帰によって計算した。結果 (平均比  $\pm$  SEM として表される; 57 の場合  $n = 6$ 、ビヒクルの場合  $n = 3$ ) : 8, 9 - EET / 8, 9 - DHET : ビヒクル :  $0.40 \pm 0.03$ ; 57 (10 mg / kg) :  $0.63 \pm 0.03$ 。11, 12 - EET / 11, 12 - DHET : ビヒクル :  $0.15 \pm 0.01$ ; 57 (10 mg / kg) :  $0.25 \pm 0.03$ 。

10

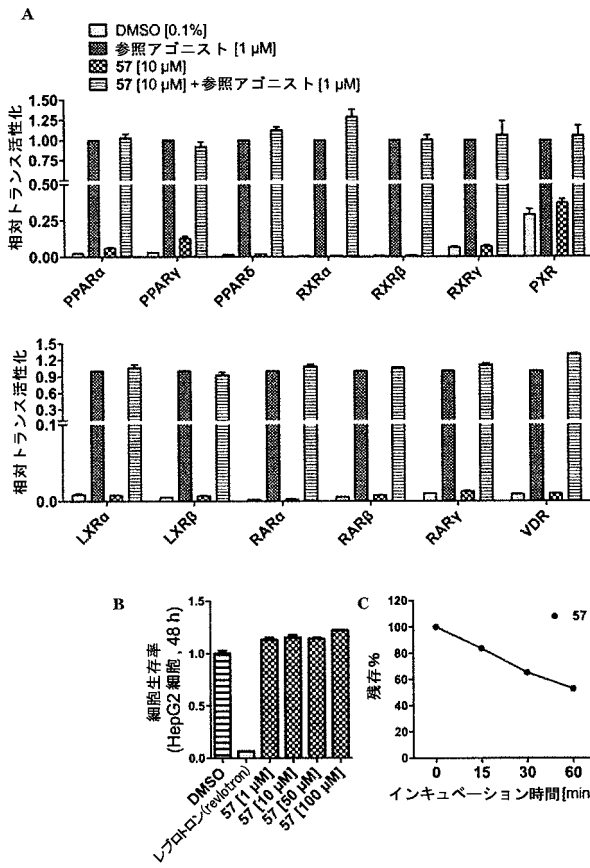
【 図 1 】



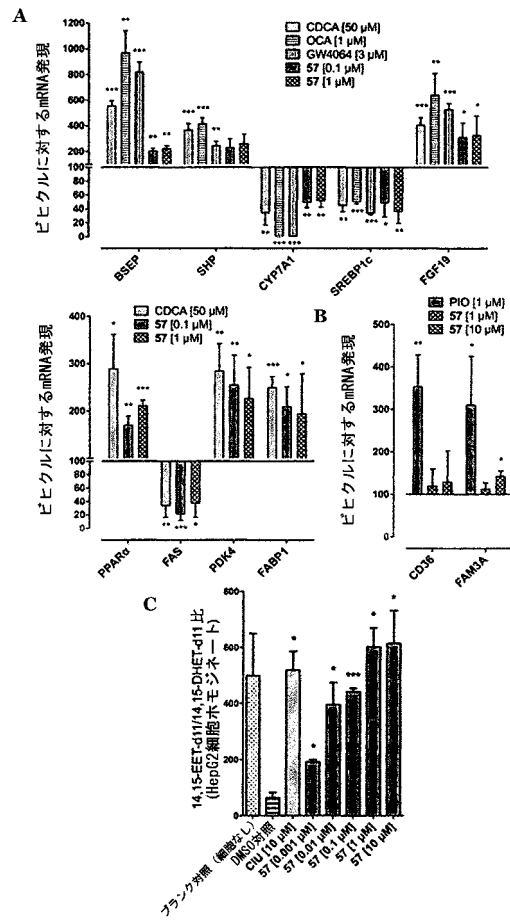
【 図 2 】



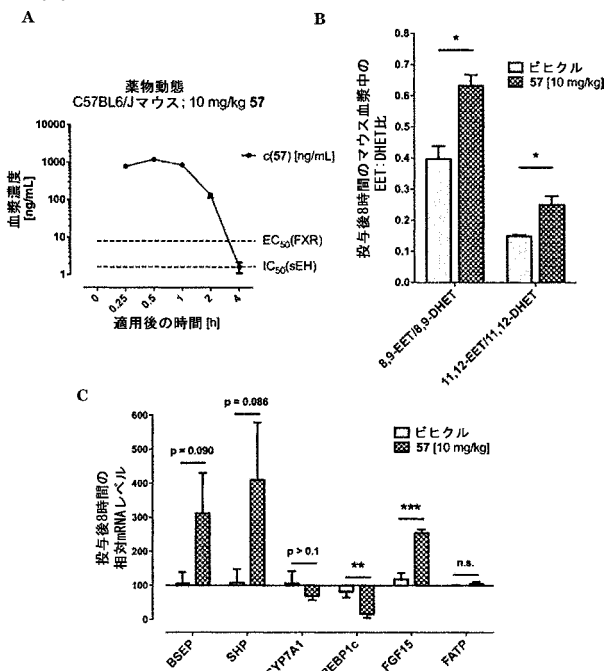
【図3】



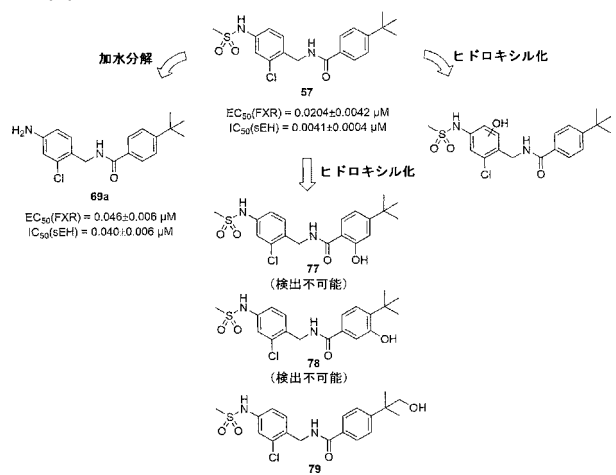
【図4】



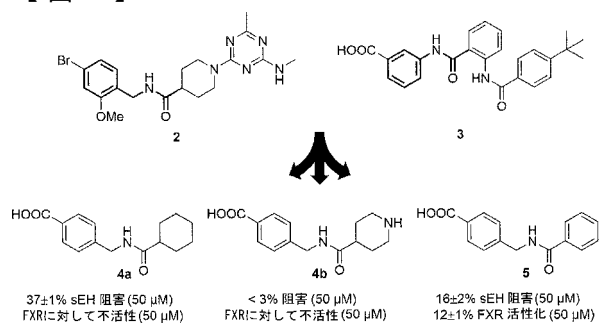
【図5】



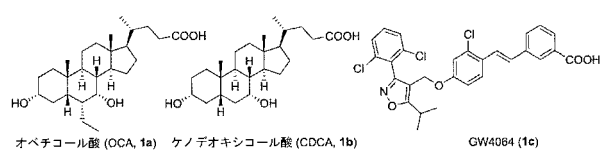
【図6】



【図7】



## 【 図 8 】





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/063699

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/192 C07C255/60 C07C311/08 C07C311/46 C07C311/51  
 C07C317/32 C07C321/28 C07D257/04 C07C233/73 C07C233/76  
 C07C233/78 C07C233/87 C07C235/52 C07C237/30 C07C237/36

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 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 135 949 A (VON DER SAAL WOLFGANG [DE] ET AL) 4 August 1992 (1992-08-04) column 1; example 37	1-4, 8, 12, 13
X	EP 1 438 973 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]) 21 July 2004 (2004-07-21) claims; examples 1(1), 1(34), 1(47), 1(50), 1(51), 1(74), 1(78), 1(88) examples 1(89), 1(118), 1(120)-1(122), 9(1), 14(17)-14(19) ----- -/--	1-4, 8, 12, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier application or patent but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2018

Date of mailing of the international search report

29/08/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ginoux, Claude

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/063699

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NISHIMORI I ET AL: "Carbonic anhydrase inhibitors: DNA cloning and inhibition studies of the alpha-carbonic anhydrase from <i>Helicobacter pylori</i> , a new target for developing sulphonamide and sulphamate gastric drugs", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 49, no. 6, 16 February 2006 (2006-02-16), pages 2117-2126, XP002452423, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM0512600 Scheme 1; table 2; compound 28 -----	1-4,8, 12,13
X	MARIYA AL-RASHIDA ET AL: "Diarylsulfonamides and their bioisosteres as dual inhibitors of alkaline phosphatase and carbonic anhydrase: Structure activity relationship and molecular modelling studies", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, no. 10, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 2435-2444, XP055449178, GB ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2015.03.054 compound 1b -----	1,3,4,8, 12,13
X	WO 03/032986 A1 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ANGELL RICHARD MARTYN [GB]; BAMBOROUGH PAUL [GB]) 24 April 2003 (2003-04-24) claims; examples 18,19,21-29,31-36,50,51,54-61,92,97,98 -----	1,3,4,8, 12,13
X	MAEDA TAISHI ET AL: "Potent histone deacetylase inhibitors: N-hydroxybenzamides with antitumor activities", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEM, PERGAMON, GB, vol. 12, no. 16, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 4351-4360, XP008122886, ISSN: 0968-0896 Scheme 1; paragraphs [04.6], [4.10], [4.14], [4.18], [4.22], [4.26], [4.30]; compounds 3a-3g ----- -/--	1,3,4,8, 12,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/063699

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UESATO S ET AL: "Novel histone deacetylase inhibitors: N-hydroxycarboxamides possessing a terminal bicyclic aryl group", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 12, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 1347-1349, XP002276408, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/S0960-894X(02)00175-0 Scheme 1; table 1; compounds 8c,8d -----	1,3,4,8, 12,13
X	WO 2005/087713 A1 (SAKAI CHEMICAL INDUSTRY CO [JP]; IKESHITA SHINJI [JP]; YAMAMOTO JUNJI) 22 September 2005 (2005-09-22) Abstract; compounds 18,26,32 -----	1,3,4,8, 12,13
X	MANFRED JUNG ET AL: "Amide Analogues of Trichostatin A as Inhibitors of Histone Deacetylase and Inducers of Terminal Cell Differentiation", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 42, no. 22, 4 November 1999 (1999-11-04), pages 4669-4679, XP002144226, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM991091H page 4676, left-hand column, paragraph 5; compound 7g -----	1,3,4,8, 12,13
X	EP 1 604 981 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]) 14 December 2005 (2005-12-14) Abstract; example 28(5) -----	1,3,4,8, 12,13
X	BAKER S J ET AL: "Synthesis of two bi-functional ligands for the QUEST three-hybrid system", TETRAHEDRON LET, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 36, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 7009-7012, XP004208250, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)01202-8 compound 5 -----	1,3,4,12
X	US 2003/153596 A1 (SUH YOUNG GER [KR] ET AL) 14 August 2003 (2003-08-14) example 169 ----- ----- -/--	1-3,8, 12,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/063699

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARY A. MOLANDER ET AL: "Synthesis of Amidomethyltrifluoroborates and Their Use in Cross-Coupling Reactions", ORGANIC LETTERS, vol. 12, no. 21, 5 November 2010 (2010-11-05), pages 4876-4879, XP055159940, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/o1102039c tables 2-4 -----	1,3,4
X	WO 2017/004525 A1 (THE MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN INC [US]; JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIV) 5 January 2017 (2017-01-05) paragraphs [0013] - [0015]; claims 1-9,11; tables 1-4 -----	1,3,4,8,12,13
A	DANIEL MERK ET AL: "Anthranilic acid derivatives as novel ligands for farnesoid X receptor (FXR)", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 22, no. 8, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 2447-2460, XP055450179, GB ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.053 cited in the application compounds 21,22 -----	1-22
A	KOMPA ANDREW R ET AL: "Soluble epoxide hydrolase inhibition exerts beneficial anti-remodeling actions post-myocardial infarction", INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 167, no. 1, 10 January 2012 (2012-01-10), pages 210-219, XP028556732, ISSN: 0167-5273, DOI: 10.1016/J.IJCARD.2011.12.062 the whole document -----	1-22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/063699

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5135949	A	04-08-1992	DE 3830054 A1 15-03-1990 EP 0358118 A1 14-03-1990 JP H02117650 A 02-05-1990 US 5135949 A 04-08-1992
EP 1438973	A1	21-07-2004	EP 1438973 A1 21-07-2004 JP W02003030937 A1 20-01-2005 US 2005009812 A1 13-01-2005 WO 03030937 A1 17-04-2003
WO 03032986	A1	24-04-2003	EP 1435949 A1 14-07-2004 JP 2005507910 A 24-03-2005 US 2004266839 A1 30-12-2004 WO 03032986 A1 24-04-2003
WO 2005087713	A1	22-09-2005	JP 4737084 B2 27-07-2011 JP W02005087713 A1 24-01-2008 WO 2005087713 A1 22-09-2005
EP 1604981	A1	14-12-2005	AU 2004220225 A1 23-09-2004 AU 2010201633 A1 20-05-2010 BR P10408332 A 21-03-2006 CA 2517888 A1 23-09-2004 CN 101928284 A 29-12-2010 EP 1604981 A1 14-12-2005 EP 2385040 A1 09-11-2011 IL 170690 A 29-03-2012 JP 4736043 B2 27-07-2011 JP W02004080966 A1 08-06-2006 KR 20050108386 A 16-11-2005 MA 27756 A1 01-02-2006 MX PA05009771 A 26-10-2005 NO 333573 B1 15-07-2013 NZ 542304 A 31-07-2009 RU 2366655 C2 10-09-2009 RU 2009117469 A 20-11-2010 TW I344955 B 11-07-2011 TW 201018661 A 16-05-2010 US 2006178399 A1 10-08-2006 WO 2004080966 A1 23-09-2004
US 2003153596	A1	14-08-2003	AT 328868 T 15-06-2006 AU 8023001 A 04-03-2002 DE 60120421 T2 28-12-2006 EP 1311478 A1 21-05-2003 ES 2266227 T3 01-03-2007 JP 2004506714 A 04-03-2004 KR 20020030009 A 22-04-2002 KR 20040048393 A 09-06-2004 US 2003153596 A1 14-08-2003 US 2003212140 A1 13-11-2003 WO 0216319 A1 28-02-2002
WO 2017004525	A1	05-01-2017	AU 2016288642 A1 18-01-2018 CA 2991161 A1 05-01-2017 CN 108026028 A 11-05-2018 EP 3317249 A1 09-05-2018 WO 2017004525 A1 05-01-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

### Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/063699

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<hr/>			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
A 6 1 K 31/166 (2006.01)	A 6 1 K 31/166	
A 6 1 K 31/167 (2006.01)	A 6 1 K 31/167	
A 6 1 K 31/4465 (2006.01)	A 6 1 K 31/4465	
A 6 1 K 31/41 (2006.01)	A 6 1 K 31/41	
A 6 1 K 31/402 (2006.01)	A 6 1 K 31/402	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
C 0 7 C 235/52 (2006.01)	C 0 7 C 235/52	
C 0 7 C 237/36 (2006.01)	C 0 7 C 237/36	
C 0 7 C 275/42 (2006.01)	C 0 7 C 275/42	
C 0 7 C 233/73 (2006.01)	C 0 7 C 233/73	
C 0 7 C 233/76 (2006.01)	C 0 7 C 233/76	
C 0 7 C 255/60 (2006.01)	C 0 7 C 255/60	
C 0 7 C 233/78 (2006.01)	C 0 7 C 233/78	
C 0 7 C 237/42 (2006.01)	C 0 7 C 237/42	
C 0 7 C 311/46 (2006.01)	C 0 7 C 311/46	
C 0 7 C 311/51 (2006.01)	C 0 7 C 311/51	
C 0 7 C 311/08 (2006.01)	C 0 7 C 311/08	
C 0 7 C 323/42 (2006.01)	C 0 7 C 323/42	
C 0 7 C 317/40 (2006.01)	C 0 7 C 317/40	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

1 . T R I T O N

2 . T W E E N

- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 メルク ダニエル  
ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 8 フランクフルト アム マイン ハプスブルガーアレー 6
- (72)発明者 シュミット ユレマ  
ドイツ連邦共和国 6 3 1 1 0 ロートガウ プラガー シュトラーセ 1 0
- (72)発明者 プロシャク ユジェニジ  
ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 9 フランクフルト クロイツァーホール 6
- (72)発明者 シューベルト - ツズィラヴェツ マンフレート  
ドイツ連邦共和国 6 1 3 5 2 パート ホムブルク ゴテンシュトラーセ 1 9 エー
- (72)発明者 ヘルムスタッター モーリッツ  
ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 7 フランクフルト アム マイン アム ヴァイスキルヒェナー  
ベルク 3 1

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC07 BC21 BC62 MA01 MA04 NA14  
ZA75 ZC20 ZC21 ZC33 ZC41  
4C206 AA01 AA02 AA03 AA04 FA44 GA07 GA08 GA31 GA36 KA01  
MA01 MA04 NA14 ZA75 ZC20 ZC21 ZC33 ZC41  
4H006 AA01 AB26 AB27 BJ20 BJ30 BJ50 BM10 BM30 BM71 BM72  
BP30 BS30 BU46 BV25 BV72 TA01 TA02 TA04 TB02 TC34