

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7102012号

(P7102012)

(45)発行日 令和4年7月19日(2022.7.19)

(24)登録日 令和4年7月8日(2022.7.8)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/4162(2006.01)

A 6 1 K 31/4162

A 6 1 P 35/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 16 外国語出願 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-36345(P2020-36345)

(22)出願日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(62)分割の表示 特願2017-500822(P2017-500822)
の分割

原出願日 平成27年7月10日(2015.7.10)

(65)公開番号 特開2020-105195(P2020-105195)
A)

(43)公開日 令和2年7月9日(2020.7.9)

審査請求日 令和2年3月5日(2020.3.5)

(31)優先権主張番号 62/022,946

(32)優先日 平成26年7月10日(2014.7.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 509001010

ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシ
ティ オブ コロラド , ア ボディ コーポ
レイトアメリカ合衆国 コロラド州 8 0 2 0 3
デンバー グラント・ストリート 1 8 0
0 , エイトス・フロア

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 セオドレスク ダン

アメリカ合衆国 8 0 1 1 1 コロラド州
エングルウッド イースト クレストリッ
ジ レーン 1 0 2 6 4

(72)発明者 ウェンベ マイケル

アメリカ合衆国 8 0 0 1 3 コロラド州
最終頁に続く

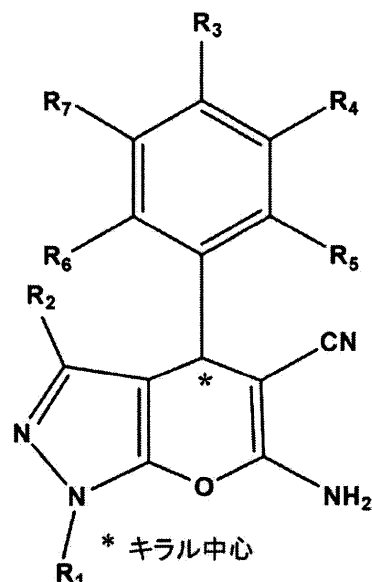
(54)【発明の名称】 R a l G T Pアーゼを標的とする抗癌化合物及びそれを使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学構造：

【化1】



(ここで、

R₁は、水素、C₁～C₁₂アルキル、C₃～C₁₂アルケニル、C₄～C₁₂ジエニル、C₆～C₁₂トリエニル、C₈～C₁₂テトラエニル、C₆～C₁₂アリール、置換されたC₆～C₁₂アリール、シアノ、C₁～C₁₂アルカノイルオキシ、C₁～C₁₂アルキルスルホニル、C₂～C₁₂アルコキシカルボニル、C₂～C₁₂アルカノイルアミノ、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈及び-NHCO₂-R₈から選択され、

R₂は、水素、ハロゲン、-OH、C₁～C₁₂アルキル、C₃～C₁₂アルケニル、C₄～C₁₂ジエニル、C₆～C₁₂トリエニル、C₈～C₁₂テトラエニル、C₆～C₁₂アリール、置換されたC₆～C₁₂アリール、C₁～C₁₂アルコキシ、カルボキシ、シアノ、C₁～C₁₂アルカノイルオキシ、C₁～C₁₂アルキルチオ、C₁～C₁₂アルキルスルホニル、C₂～C₁₂アルコキシカルボニル、C₂～C₁₂アルカノイルアミノ、-O-R₈、-S-R₈、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈及び-NHCO₂-R₈から選択され、

R₃は、独立して、水素、ハロゲン、-OH、C₁～C₁₂アルキル、置換されたC₁～C₁₂アルキル、C₃～C₁₂アルケニル、C₄～C₁₂ジエニル、C₆～C₁₂トリエニル、C₈～C₁₂テトラエニル、イミダゾール、C₆～C₁₂アリール、置換されたC₆～C₁₂アリール、C₁～C₁₂アルコキシ、カルボキシ、シアノ、C₁～C₁₂アルカノイルオキシ、C₁～C₁₂アルキルチオ、C₁～C₁₂アルキルスルホニル、C₂～C₁₂アルコキシカルボニル、C₂～C₁₂アルカノイルアミノ、-O-R₈、-S-R₈、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈及び-NHCO₂-R₈から選択され、

R₄及びR₇は、独立して、水素、ハロゲン、-OH、C₁～C₁₂アルキル、置換されたC₁～C₁₂アルキル、C₃～C₁₂アルケニル、C₄～C₁₂ジエニル、C₆～C₁₂トリエニル、C₈～C₁₂テトラエニル、イミダゾール、C₆～C₁₂アリール、置換されたC₆～C₁₂アリール、C₁～C₁₂アルコキシ、置換されたC₁～C₁₂アルコキシ、カルボキシ、シアノ、C₁～C₁₂アルカノイルオキシ、C₁～C₁₂アルキルチオ、C₁～C₁₂アルキルスルホニル、C₂～C₁₂アルコキシカルボニル、C₂～C₁₂アルカノイルアミノ、-O-R₈、-S-R₈、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈及び-NHCO₂-R₈から選択されるか、又は

R₃及びR₄は、共にシクロヘキサン又は1,4-ジオキサンを形成し、

R₅及びR₆は、独立して、水素及びアルコキシから選択され、

R₈は、ハロゲン、酸素、C₁～C₆アルキル、C₆～C₁₀アリール及びC₁～C₆アルコキシから選択される1つ～3つの基で任意に置換されたC₁～C₁₂アルキルであり、但し、R₃、R₄、及びR₇の少なくとも1つは、ハロゲンで置換されたC₁～C₁₂アルキル、ハロゲンで置換されたC₁～C₁₂アルコキシ、及びイミダゾールから選択されるか、又は、R₃～R₇の少なくとも3つは独立してハロゲン又はC₁～C₁₂アルコキシである、

を有する化合物、又はその薬学的に許容可能なエナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体若しくは塩、及び少なくとも一種の薬学的に許容可能な賦形剤、を含む医薬組成物。

【請求項2】

R₃、R₄、及びR₇の少なくとも1つは、ハロゲンで置換されたC₁～C₁₂アルキル、ハロゲンで置換されたC₁～C₁₂アルコキシである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

R₃～R₇の少なくとも3つは独立してハロゲンである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

R₃、R₄及びR₇の少なくとも1つは、独立して-CF₃又はOCF₃である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

R₃及びR₄は、共にシクロヘキサン又は1,4-ジオキサンを形成する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

R₃ ~ R₇ の少なくとも 3 つはメトキシである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

R₃ ~ R₇ の少なくとも 1 つは水素である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

R₃、R₄ 及び R₇ の少なくとも 1 つは、イミダゾールである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

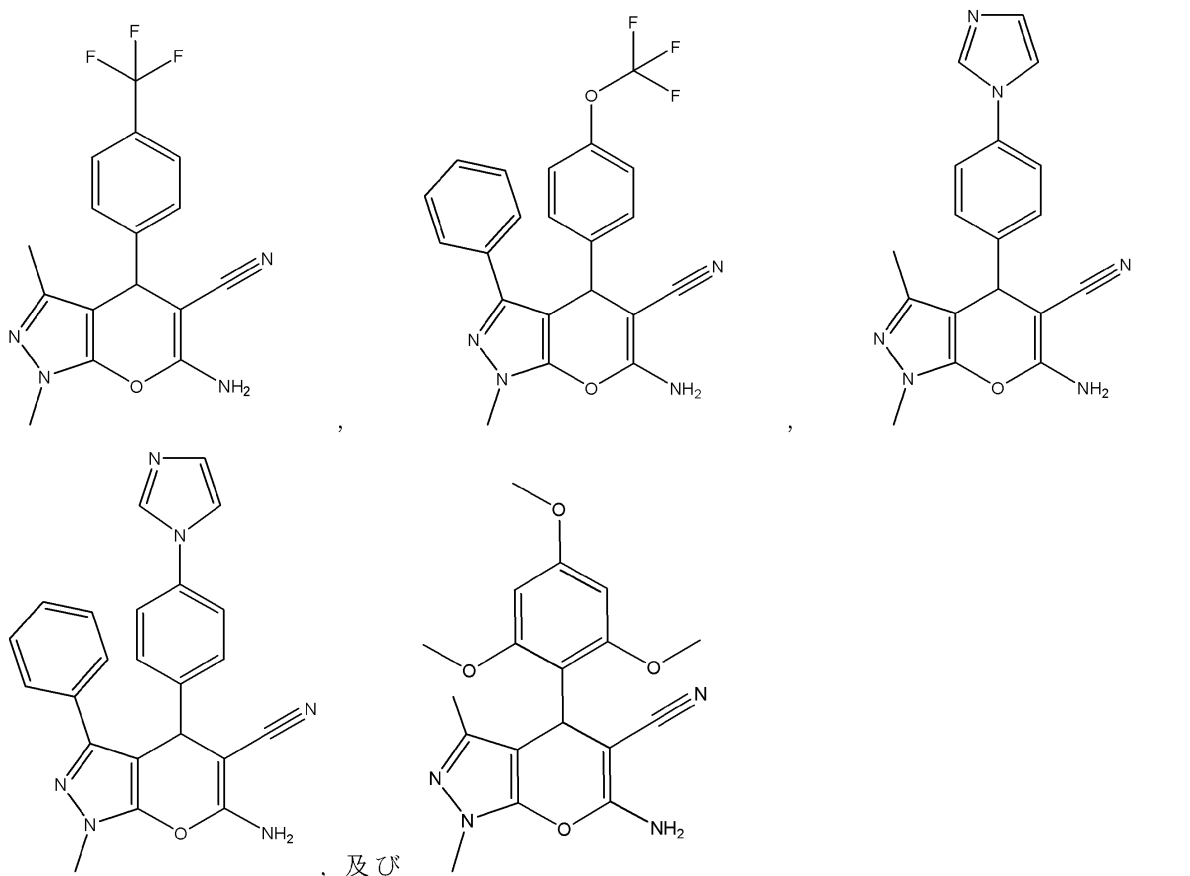
【請求項 9】

R₃ はイミダゾールである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記化合物が、

【化 2】



から成る群より選択されるか又はその薬学的に許容可能なエナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体若しくは塩である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

癌の予防、治療、改善、又は癌の転移予防のための、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 12】

治療有効量の該化合物を含む単相医薬組成物である、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

治療有効量の該化合物を含む、非経口投与に適した、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 14】

治療有効量の該化合物を含む、経口投与に適した、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記医薬組成物が、1つ以上のI型ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ（GGTアーゼ-I）阻害剤、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法、又はそれらの組合せと併せて投与されることによって更に特徴付けられる、請求項1～14のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項16】

癌の治療のための医薬の製造における請求項1～15のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

〔政府利益〕

本発明は、米国立衛生研究所により付与された認可番号CA091846、CA075115及びCA104106の下で政府による支援を受けている。米国政府は本発明に対して一定の権利を有する。

【0002】

本発明は、治療用化合物と、それを含有する医薬組成物と、癌の治療におけるそれらの使用とに関する。

【背景技術】

【0003】

Rasは、癌において任意の他の癌遺伝子よりも高頻度で突然変異している。このことから、合理的に設計された抗癌薬の開発の上でRasが注目されているが、これまでのところ開発には成功していない。1989年に、幾つかのグループがRasタンパク質のファルネシル脂質による翻訳後修飾がRas膜結合及び形質転換に必須であることを示した。続いてファルネシルトランスフェラーゼ（FTアーゼ）が精製され、特性決定されてその後間もなく、Rasをゲラニルゲラニル脂質で修飾する第2のプレニルトランスフェラーゼ、I型ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ（GGTアーゼ-I）が発見された。GGTアーゼ-I阻害剤（GGTI）が研究され、少なくとも1つのかかる阻害剤、GGTI-2417が、MiaPaCa2膵臓癌細胞株のin vitro成長及び生存を阻害することが分かっている。しかしながら、これらの阻害効果はあまり大きくなく、GGTIによる臨床試験は行われていない。

20

【0004】

Ral（Ras様）GTPアーゼはGTPアーゼのRasスーパーファミリーのメンバーであり、活性型GTP結合状態及び不活性型GDP結合状態の間を循環する分子スイッチとして機能し、RalからのGDPの放出を促進し、GTPをその位置に結合させるRal特異的グアニンヌクレオチド交換因子（Ral-GEF）ファミリーの1つとの相互作用によって活性化される。Ral-GEFはRaf及びホスホイノシチド-3-キナーゼ（PI3-K）とともに、細胞内のRasタンパク質との結合によって活性が調節される3つの既知のタンパク質群を構成する。Ral-GTPアーゼはヒトRasと46%～51%の同一性を有し、Rasシグナル伝達及びRas発癌の重要な構成要素であり、腫瘍中の突然変異Rasの重要なエフェクターである（非特許文献1）。Ral-GTPアーゼはまた、癌患者の主な死亡原因である腫瘍転移と高度に関与する。したがって、Ralタンパク質はRasと同様、治療的介入にとって臨床的に重要な標的である。しかし、臨床的に有用なRas又は任意の他のGTPアーゼの阻害剤が得られないことから、この標的ファミリーが治療上の課題であることが示唆される。この理由の1つは、グアニンヌクレオチドGDP/GTPとのそれらの高い親和性及び細胞内でこれらのヌクレオチドがミリモル濃度であることから、小Gタンパク質の活性部位を阻害のために直接標的化することができないことである。しかしながら、Ras及び他のGTPアーゼとは異なり、ヒト癌又は癌細胞株におけるRalA又はRalBの突然変異は稀であり（1%未満）、Ralの標的化は効果的な抗癌治療法の開発に実行可能なアプローチである。

30

40

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0005】

【文献】Genes & Cancer 2011 2(3):275-287

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、R a l G T Pアーゼは固形腫瘍及びこれらの癌の転移の防止及び治療の強力な (compelling) 治療標的であり、癌の治療に効果的な R a l G T Pアーゼ阻害方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は R a l G T Pアーゼに結合して効果的に阻害する小分子と、それを使用する治療法とを提供する。本発明者らの発見は、活性型ではなく不活性型のタンパク質立体構造において、ヌクレオチド結合ポケットとは異なる利用可能な部位を同定するコンピューター分析に基づくものであった。このポケットへの小分子の分子ドッキングに続く実験的検証により、*i n v i t r o*でそのエフェクター R a l B P 1への R a lの結合、ネズミ線維芽細胞における R a l 媒介細胞拡散及びヒト癌細胞株の足場非依存性成長を阻害する少なくとも3つの化合物が得られた。2つの化学的に関連した化合物の送達から、*i n v i v o*で有利な薬物動態及び腫瘍薬物の取込みが示された。これらの化合物の誘導体の合成により本発明の化合物がもたらされ、その R a l Bへの結合を表面プラズマ共鳴及び ^{15}N -H S Q C N M Rによって確認した。これらの化合物は異種移植成長を *s i R N A* R a l 枯渇と同程度まで阻害する。

【0008】

本発明の化合物は、ヒト腫瘍異種移植片において R a l A及び R a l Bの両方の活性を同様に阻害する。腫瘍形成及び転移における R a l A及び R a l Bの異なる、場合によっては拮抗的な役割が提唱されているが、遺伝マウスモデルにより発生及び腫瘍形成の両方における相当な重複が明らかになった。これらの研究から、R a l A及び R a l B G T Pアーゼの両方を阻害する化合物の重要性及び臨床の有用性が支持される。

【0009】

本発明の化合物は僅かなオフターゲット効果で R a l に対して選択的であり、R a l *s i R N A*によって誘導される成長阻害効果を模倣し、異種移植腫瘍サンプルにおいて密接に関連した G T Pアーゼ R a s又は R h o Aではなく、R a l A及び R a l Bの活性を阻害する。N M R滴定実験により、これらの化合物が R a l B - G T Pではなく R a l B - G D Pのみと結合し、それにより R a l 特異的グアニンヌクレオチド交換因子 (R a l - G E F) による活性化、及びその位置での G T Pの結合を伴う R a lからの G D P放出を防止し、R a l 活性依存性表現型を阻害することが示された。

【0010】

この計算に基づくスクリーニングに続く生化学アッセイ、細胞アッセイ及び *i n v i v o*アッセイにより、癌療法における臨床用途のための R a l タンパク質と結合し、その活性を効果的に阻害する本発明の小分子が同定された。このため、本発明は R a l G T Pアーゼを阻害することができる分子と、被験体における癌の成長及び転移を抑える又は遅らせるためのこれらの分子の治療的使用とを提供する。本発明はこれらの化合物を含有する医薬組成物、並びに癌を治療又は防止するのにこれらの化合物及び医薬組成物を使用する方法も提供する。

【0011】

本発明の一態様は、R a l G T Pアーゼ阻害活性を有するとともに、下記化学構造：

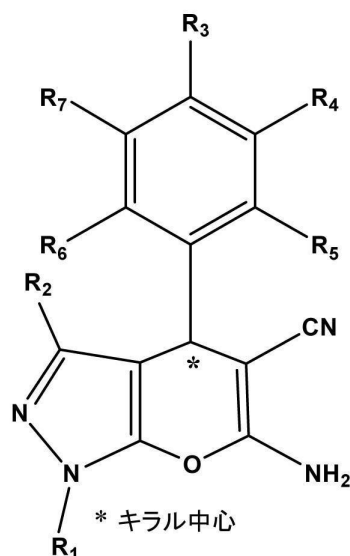
10

20

30

40

【化 1】



10

* キラル中心

(ここで、

R₁ は水素、ハロゲン、-OH、-O-R₈、C₁~C₁₂アルキル、C₃~C₁₂アルケニル、C₄~C₁₂ジエニル、C₆~C₁₂トリエニル、C₈~C₁₂テトラエニル、C₆~C₁₂アリール、置換C₆~C₁₂アリール、C₁~C₁₂アルコキシ、カルボキシ、シアノ、C₁~C₁₂アルカノイルオキシ、C₁~C₁₂アルキルチオ、C₁~C₁₂アルキルスルホニル、C₂~C₁₂アルコキシカルボニル、C₂~C₁₂アルカノイルアミノ、S-R₈、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈ 及び -NHCO₂-R₈ から選択され、

20

R₂ は水素、ハロゲン、-OH、-O-R₈、C₁~C₁₂アルキル、C₃~C₁₂アルケニル、C₄~C₁₂ジエニル、C₆~C₁₂トリエニル、C₈~C₁₂テトラエニル、C₆~C₁₂アリール、置換C₆~C₁₂アリール、C₁~C₁₂アルコキシ、カルボキシ、シアノ、C₁~C₁₂アルカノイルオキシ、C₁~C₁₂アルキルチオ、C₁~C₁₂アルキルスルホニル、C₂~C₁₂アルコキシカルボニル、C₂~C₁₂アルカノイルアミノ、S-R₈、-SO₂-R₈、-NH-SO₂-R₈ 及び -NHCO₂-R₈ から選択され、

30

R₃、R₄、R₅、R₆ 及び R₇ は独立して水素；ハロゲン；-OH；-O-R₈；C₁~C₁₂アルキル；C₃~C₁₂アルケニル；C₄~C₁₂ジエニル；C₆~C₁₂トリエニル；C₈~C₁₂テトラエニル；イミダゾール；C₆~C₁₂アリール；C₁~C₁₂アルコキシ；カルボキシ；シアノ；C₁~C₁₂アルカノイルオキシ；C₁~C₁₂アルキルチオ；C₁~C₁₂アルキルスルホニル；C₂~C₁₂アルコキシカルボニル；C₂~C₁₂アルカノイルアミノ；S-R₈；-SO₂-R₈；-NH-SO₂-R₈；-NHCO₂-R₈；ハロゲン、酸素、C₁~C₆アルキル、C₆~C₁₀アリール及びC₁~C₆アルコキシから選択される1つ~3つの基で任意に置換されたC₁~C₁₂アルキル；並びにハロゲン、C₁~C₆アルキル、C₆~C₁₀アリール及びC₁~C₆アルコキシから選択される1つ~3つの基で任意に置換されたC₆~C₁₂アリールから選択されるか、又は、

40

R₃ 及び R₄ がともにシクロヘキサン、1,4-ジオキサン若しくはフェニルを形成し、R₈ はハロゲン、酸素、C₁~C₆アルキル、C₆~C₁₀アリール及びC₁~C₆アルコキシから選択される1つ~3つの基で任意に置換されたC₁~C₁₂アルキル；又はハロゲン、C₁~C₆アルキル、C₆~C₁₀アリール及びC₁~C₆アルコキシから選択される1つ~3つの基で任意に置換されたC₆~C₁₂アリールである）、並びにその薬学的に許容可能なエナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体及び塩、並びにその薬

50

学的に許容可能なエナンチオマー、ジアステレオマー、ラセミ体及び塩を有する本発明の化合物である。

【 0 0 1 2 】

或る特定の実施の形態では、化合物の R₁ 置換基は水素；メチル；フェニル；メチル - フェニル；メトキシ；ハロゲン、C₁ ~ C₆ アルキル及び C₁ ~ C₆ アルコキシから選択される 1 つ ~ 3 つの基で置換された C₆ ~ C₁₂ アリールから選択される。

【 0 0 1 3 】

或る特定の実施の形態では、化合物の R₂ 置換基は水素；メチル；フェニル；メチル - フェニル；メトキシ；ハロゲン、C₁ ~ C₆ アルキル及び C₁ ~ C₆ アルコキシから選択される 1 つ ~ 3 つの基で置換された C₆ ~ C₁₂ アリールから選択される。

10

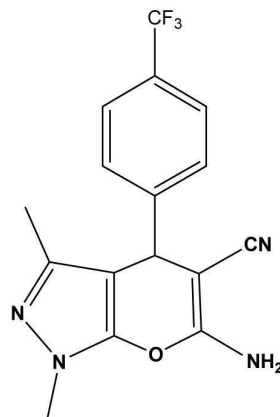
【 0 0 1 4 】

或る特定の実施の形態では、化合物の R₃ 置換基は水素；ハロゲン；メトキシ；ハロゲンで任意に置換された C₁ ~ C₆ アルキル；シアノ；イミダゾール；並びにハロゲン及び C₁ ~ C₆ アルコキシから選択される 1 つ ~ 3 つの基で置換された C₆ ~ C₁₂ アリールから選択される。

【 0 0 1 5 】

特定の実施の形態では、化合物は、

【 化 2 】

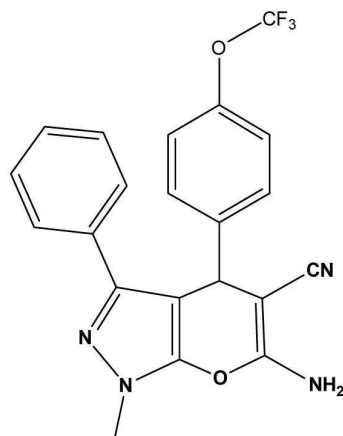


20

6 - アミノ - 1 , 3 - ジメチル - 4 - (4 - (トリフルオロメチル) フェニル) - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル、

30

【 化 3 】

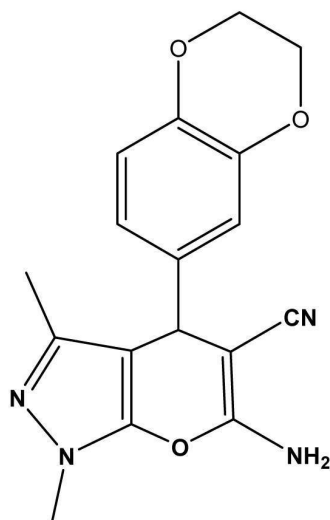


40

6 - アミノ - 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - (トリフルオロメトキシ) フェニル) - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル、

50

【化 4】

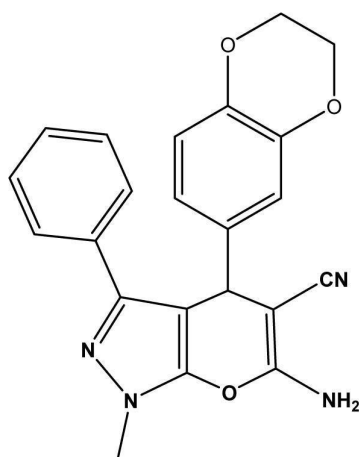


10

6 - アミノ - 4 - (2 , 3 - ジヒドロベンゾ [b] [1 , 4] ジオキシシ - 6 - イル) - 1 , 3 - ジメチル - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル、及び、

【化 5】

20



30

6 - アミノ - 4 - (2 , 3 - ジヒドロベンゾ [b] [1 , 4] ジオキシシ - 6 - イル) - 1 - メチル - 3 - フェニル - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル、

から選択される化学構造を有する。

【 0 0 1 6 】

本発明の別の態様は、癌の治療を必要とする被験体に、R a l G T Pアーゼ酵素活性を阻害する化合物を治療に効果的な量投与することによって癌を治療する方法である。この実施の形態の一態様では、該化合物がR a l G T Pアーゼ (G T P A s e) の少なくとも一方のパラログ (R a l A 又は R a l B のいずれか) を阻害し、それにより癌の成長又は転移が阻害される。この実施の形態の好ましい態様では、該化合物はR a l A パラログ及びR a l B パラログの両方を阻害する。

40

【 0 0 1 7 】

被験体において癌を治療又は防止するこれらの方法の特定の実施の形態において、上記化合物は本発明の医薬組成物内において被験体に投与される。

【 0 0 1 8 】

そのため本発明の別の態様は、1つ又は複数の本発明の化合物を、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体とともに含有する医薬組成物である。

50

【 0 0 1 9 】

本発明の別の実施の形態は、転移性癌の治療を必要とする又は癌若しくは癌の転移の疑いがある被験体に、治療に効果的な量の少なくとも1つの本発明の化合物を投与することによって、転移性癌、特に転移性の膵臓癌、前立腺癌、肺癌、膀胱癌、皮膚癌及び/又は結腸癌を防止又は治療する方法である。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の実施の形態は、本発明の化合物の少なくとも1つと、1つ又は複数の他の既知の抗癌治療又は抗炎症治療との治療に効果的な組合せを施すことによって癌を治療する方法である。例えば、他の抗癌治療には、I型ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ（G G Tアーゼ - I）阻害剤を含むプレニルトランスフェラーゼ阻害剤、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法又はそれらの組合せが含まれ得る。

10

【 0 0 2 1 】

被験体において癌を防止、治療又は予防する方法であって、本発明の医薬組成物のいずれかを治療に効果的な量、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法も本明細書において提供される。

【 0 0 2 2 】

被験体において癌の転移を防止する方法であって、例えば少なくとも1つの本発明の化合物を含有する医薬組成物を含む少なくとも1つの化合物を治療に効果的な量、被験体に投与することを含む、方法も本明細書において提供される。

【 0 0 2 3 】

少なくとも1つの本発明の化合物を医薬組成物内に治療に効果的な量含む医薬パッケージも本明細書において提供される。医薬組成物は被験体において癌の防止、治療又は改善に使用される他の化合物又は治療薬と別々に、同時に又は連続して投与することができる。これらのパッケージには、処方情報及び/又は容器も含まれ得る。存在する場合、処方情報は、単独での又は被験体において癌の防止、治療若しくは改善に使用される他の治療薬と組み合わせたこれらの医薬組成物の投与及び/又は使用を説明するものであり得る。

20

【 0 0 2 4 】

本発明の別の実施の形態は、被験体における成長阻害又は癌細胞数若しくは腫瘍体積の低減を示すR a l G T Pアーゼ活性の推定阻害剤の投与に対する被験体の応答を試験することによって、R a l G T Pアーゼ活性の推定阻害剤による治療に対する肺癌を患う被験体の感受性を試験する方法である。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の他の態様は、下記の実施形態の付随する記載において説明されるとともに、その記載から明らかとなり、又は本発明の実施によって認識することができる。しかしながら、下記の実施形態の記載は例示的に与えられているにすぎず、そのため本発明の趣旨及び範囲内での様々な変更及び修正が当業者にとって明らかとなり、本発明の範囲内に包含されることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図1】図1 A及び図1 BはR a l タンパク質上の標的部位の分子モデリングを示す。リボン図（図1 A）又は表面図（図1 B）でのR a l A - G D Pの構造モデル。アロステリック結合部位はスイッチI I、ヘリックス 2 及びヘリックス 3 によって形成される。（C及びD）e x o 8 4 と複合したR a l A - G N P（図1 C、e x o 8 4 は図示しない）、及びs e c 5 と複合したR a l A - G N P（図1 D、s e c 5 は図示しない）の表面図。図1 B及び図1 Cでは、球/表面により結合空洞における水と接触可能な領域を示す。全てのモデルは、公表されている構造を用いてAccelrysのD i s c o v e r y S t u d i oソフトウェアで生成した。

40

【図2】図2 Aは化合物B Q U 5 7 及びB Q U 8 5 の化学合成スキームを示す。図S 3 B ~ DはR a l へのB Q U 5 7 の結合の特性化を示す。図2 Bは1 0 0 μ MのB Q U 5 7 の存在下でのR a l B - G N P（1 0 0 μ M）の化学シフト変化を示す。図2 Cは、B Q U

50

57濃度の増大に伴うR a l B - G D P中の選択残基の $^1\text{H} - ^{15}\text{N} - \text{HSQC}$ NMR化学シフト変化のプロットを示す。B Q U 5 7とR a l B - G D Pとの間の結合のKDの表面プラズモン共鳴決定により、 $4.7\ \mu\text{M}$ のKD値をもたらす近似結合曲線が示された。

【図3】図3A～図3EはR a lへの化合物の結合の特性化を示す。図3AはR B C 8の誘導体であるB Q U 5 7の構造を示す。図3Bは $100\ \mu\text{M}$ R a l - G D Pと $100\ \mu\text{M}$ B Q U 5 7の存在下の $100\ \mu\text{M}$ R a l - G D Pとの $^{15}\text{N} - \text{HSQC}$ スペクトルの重ね合わせである。図3Cは、 $40\ \mu\text{M}$ 及び $100\ \mu\text{M}$ での漸増濃度のB Q U 5 7の非存在下及び存在下のR a l B - G D Pの選択残基を示す。図3Dは、R a l B - G D P単独($100\ \mu\text{M}$)と $100\ \mu\text{M}$ B Q U 5 7の存在下のR a l B - G D Pとを比較する、残基数に応じた化学シフト変化のプロットを示す。図3Eは、等温滴定カロリメトリー(I T C)を用いて決定されたR a l B - G D PへのB Q U 5 7の結合を示す。

10

【図4】図4A～4はヒト癌細胞株におけるR a l阻害剤の成長阻害活性を示す。4つのヒト肺癌細胞株の足場非依存性成長に対するB U Q 5 7(図4A)及びB Q U 8 5(図4B)処理の効果。細胞を様々な濃度の薬物を含む軟寒天に播種し、軟寒天に形成されたコロニーを2週間～4週間後に計数した。R a l s i R N A ノックダウンに対して感受性を有する細胞株(H 2 1 2 2及びH 3 5 8)に灰色を付け、R a l s i R N A ノックダウンに抵抗性を示す細胞株(H 4 6 0及びC a l u 6)に黒色を付ける。データは3回の独立実験の平均を表す。軟寒天における薬物誘導性成長阻害に対するH 2 1 2 2(図4C、図4D)及びH 3 5 8(図4E、図4F)細胞中のR a l A及びR a l Bの両方のs i R N A ノックダウンの効果。細胞を $10\ \text{nM}$ / $30\ \text{nM}$ / $50\ \text{nM}$ のs i R N Aで48時間トランスフェクトし、採取し、軟寒天コロニー形成アッセイに供した。軟寒天コロニー数に対するs i R N A単独の効果を図4C(H 2 1 2 2)及び図4E(H 3 5 8)に示し、コロニー形成に対するs i R N A + 薬物処理の効果をD M S O処理対照に対するパーセントとして図4D(H 2 1 2 2)及び図4F(H 3 5 8)に示す。軟寒天における薬物誘導性成長阻害に対するH 2 1 2 2(図4G、図4H)及びH 3 5 8(図4I、図4J)細胞中の構成的に活性なR a l A G 2 3 V及びR a l B G 2 3 Vの過剰発現の効果。H 2 1 2 2細胞を、軟寒天コロニー形成アッセイ前にF L A G - R a l A G 2 3 V又はF L A G - R a l B G 2 3 Vで48時間一過性にトランスフェクトした。H 3 5 8細胞はF L A G - R a l A G 2 3 V又はF L A G - R a l B G 2 3 Vで安定にトランスフェクトした。過剰発現を免疫プロット法によって確認し、図7Fに示した。示される全ての結果は3回の独立実験の平均 \pm S Dを表す。*は指定の群間の統計的有意差を意味する。

20

30

【図5】図5A～図5Hは肺癌のヒト異種移植モデルに対するR a l阻害剤の効果を示す。 $50\ \text{mg}/\text{Kg}$ の単回i . p . 投与の3時間後のヌードマウスにおけるR B C 8(図5A)及びB Q U 5 7(図5B)の組織分布。データは3匹のマウスの平均 \pm S Dを表す。(図5C及び図5D)接種の24時間後に開始した $50\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ のR B C 8は、ヒト肺癌細胞株H 2 1 2 2の異種移植腫瘍成長を阻害した。データは6匹のマウスの平均 \pm S E Mを表す。処理群における腫瘍体積は、ダネット検定によって決定されるように対照とは統計的に異なっていた(* $p < 0.05$)。典型的な腫瘍外観を図5Dに示す。図5Eは、R a l A及びR a l Bの両方のs i R N A 枯渇がH 2 1 2 2細胞の異種移植腫瘍成長を阻害したことを示す。細胞をR a l A及びR a l Bの両方に対するs i R N Aで24時間一過性にトランスフェクトした。次いで、細胞をヌードマウスに接種した。腫瘍をモニタリングし、上記のように測定した。データは6匹のマウスの平均 \pm S E Mを表す。処理群における腫瘍体積は、ダネット検定によって決定されるように対照とは統計的に異なっていた(* $p < 0.05$)。図5Fは、接種の24時間後に開始したB Q U 5 7処理($10\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、 $20\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、 $50\ \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$)がH 2 1 2 2細胞の異種移植腫瘍成長を阻害したことを示す。データは6匹のマウスの平均 \pm S E Mを表す。処理群における腫瘍体積は、ダネット検定によって決定されるように対照とは統計的に異なっていた(* $p < 0.05$)。図5Gは $50\ \text{mg}/\text{Kg}$ の単回i . p . 投与の3時間後のヌードマウスにおけるB Q U 8 5の組織分布を示す。データは3匹のマウスの平均 \pm S Dを表す。図5Hは肺癌のヒト異種移植モデルに対するB Q U 8 5処理の効果を示す。接種

40

50

の24時間後に開始したBQU85処理(5mg/kg/日、10mg/kg/日、20mg/kg/日、50mg/kg/日)がH2122細胞の異種移植腫瘍成長を阻害した。データは6匹のマウスの平均±SEMを表す。

【図6】図6A～図6Eは*in vitro*でのRal阻害剤の細胞取込みを示す。H2122ヒト肺癌細胞を10μMのRBC8(図6A)、BQU57(図6B)、BQU85(図6C)及びRBC5(図6D)で処理した。細胞を異なる時点(1分、5分、15分、30分及び60分)で採取し、細胞における薬物濃度をLC/MS-MS法を用いて決定した(各時点についてn=3)。図6EはRBC5、RBC8及びBQU57によるH2122及びH358細胞におけるRal活性の阻害を示す。細胞を足場非依存性条件下で成長させ、10μMの化合物で3時間処理した。次いで、細胞溶解物におけるRal活性をRalBP1アガロースビーズによるブルダウンアッセイを用いて決定した。データは3回の独立実験を表す。

10

【図7】図7A～図7Fは、4つのヒト肺癌細胞株の足場非依存性成長に対するK-Ras又はRalノックダウン又は過剰発現の効果を示す。図7Aは、siRNAトランスフェクションの48時間後のH2122、H358、H460及びCalu6細胞株におけるK-RasのsiRNAノックダウンの免疫プロットを示す。図7Bは、4つ全ての株が軟寒天コロニー形成アッセイを用いたK-Rasノックダウンに対して感受性を有していたことを示す。4つのヒト肺癌細胞株の足場非依存性成長に対するRalノックダウンの効果を、細胞をRalA、RalB又はRalA/Bに対するsiRNAで48時間トランスフェクトした後、細胞を軟寒天コロニー形成アッセイに供することによって調査した。図7Cは、細胞株H2122/H358がRalノックダウンに対して感受性を有していたことを示す。図7Dは、細胞株H460/Calu6がRalノックダウンに対して感受性を有しなかったことを示す。図7Eは、様々な濃度のsiRNAによる処理の48時間後のH2122及びH358細胞株におけるRalA及びRalBの両方のノックダウンの免疫プロットを示す。図7Fは、H2122及びH358細胞における構成的に活性なRalAG23V及びRalBG23Vの成功した過剰発現の免疫プロットを示す。H2122細胞をFLAG、FLAG-RalAG23V及びFLAG-RalBG23Vで48時間一過性にトランスフェクトした。FLAG、FLAG-RalAG23V及びFLAG-RalBG23Vを安定に過剰発現するH358細胞をG418選択によって生成した。

20

30

【発明を実施するための形態】

【0027】

腫瘍の樹立及び転移におけるその強力な臨床的重要性に基づき、本発明者らは、分子標的としてRalGTPアーゼを特定し使用している。全てのGTPアーゼと同様に、Ralの活性は不活性(GDP結合)立体構造と活性(GTP結合)立体構造との循環に応じたものである。活性Ralタンパク質は、Ral結合タンパク質1(RalBP1、RLIP76又はRIP1(37))、Sec5/Exo85、フィラミン及びホスホリパーゼD1を含む自身のエフェクター群を介して下流のプロセスを媒介する。そのため、Ral-GDPに結合し、Ral-GTPとは結合しない化合物を用いて、エフェクター結合を立体的に阻害し、及び/又はGTP結合状態に伴って起こる立体構造の変化を防ぎ、それによりシグナル伝送を遮断し、結果としてRal依存性癌細胞の成長の低減及びアポトーシスをもたらすことができる。これらの化合物は、RalGTPアーゼ阻害剤の仮想スクリーニングと物理的スクリーニングとの併用によって特定された。

40

【0028】

上述のように、Ralは不活性(GDP結合)型と活性(GTP結合)型との間で循環する。Ral-GTP(活性型)よりもRal-GDP(不活性型)に優先的に結合する化合物を発見し、それによりRalを不活性状態に安定化することを目的に、本発明者らは活性型及び不活性型のRalAの三次元構造を調べた。この分析から、ヌクレオチド結合部位から近いが、それとは異なるポケットの形状の違いが明らかになった(図1)。このポケット(アロステリック部位)は以前に記載のC3bot結合部位と同様であり、ス

50

イッチ - I I 領域 (R a l 7 0 ~ R a l 7 7)、ヘリックス 2 (R a l 7 8 ~ R a l 8 5) 及びヘリックス 3 の一面により構成される (図 1 A)。比較に使用される結晶構造は、e x o 8 4 (P D B コード 1 Z C 4、図 1 C) 又は s e c 5 (P D B コード 1 U A D、図 1 D) と複合した R a l A - G D P (P D B コード 2 B O V (図 1 B) 及び R a l A - G N P (非加水分解性形態の G T P) を含んでいた。各結合部位について算出された体積は R a l A - G D P では 175 ^3 (図 1 B)、R a l A - G N P - e x o 8 4 では 155 ^3 (図 1 C)、R a l A - G N P - s e c 5 では 116 ^3 (図 1 D) であった。R a l B - G D P 結晶構造は公表されていないが、R a l B - G N P 構造 (P D B コード 2 K E 5、図 1) では、この結合ポケットは殆ど存在しない。R a l A - G D P のアロステリック部位に結合する小分子を同定するために構造に基づく仮想スクリーニングアプローチを用いて、50000個の化合物を R a l A - G D P ポケットにドッキングさせた。タンパク質 - リガンド複合体をスコアリングし、相互作用エネルギーの算出に続く上位候補の目視検査に基づいて選別することで、88個の化合物が選択された。選択された88個の化合物を、培養物中の生細胞における R a l A 活性化を阻害するそれらの能力について、そのエフェクタータンパク質 R a l B P 1 への活性型 R a l A - G T P の選択的結合に基づく R a l 活性についての E L I S A を用いて評価した。

【 0 0 2 9 】

R a l A 活性を、フィブロネクチンコーティングカバースリップ上でのネズミ胎児線維芽細胞 (M E F) の拡散時の脂質ラフトエキソサイトーシスを測定することによっても独立してアッセイした。これらの細胞では、R a l A の s i R N A 枯渇が拡散を阻害し、カベオリン (C a v 1) - / - M E F は R a l A 枯渇に抵抗性を示す。

【 0 0 3 0 】

T R O S Y ^15N - H S Q C (横緩和最適化異核種単一量子コヒーレンス : Transverse Relaxation-Optimized Heteronuclear Single Quantum Coherence) N M R を用いて、R a l 標的部位への化合物の直接結合を確認した。本発明者らは、G N P と複合した R a l B の N M R 構造 (現時点で解明されている唯一の構造) に着目した。R a l B - G D P 及び R a l B - G N P の ^15N - H S Q C N M R スペクトルを初めに決定し、化学シフト差を分析した。次いで、N M R スペクトルを R B C 8 又は D M S O 対照の存在下で記録した。タンパク質への小分子の結合を ^15N - H S Q C タンパク質アミドピークの摂動によってモニタリングした。 $100 \mu\text{M}$ R B C 8 の非存在下及び存在下における R a l B - G D P ($100 \mu\text{M}$) の ^15N - H S Q C スペクトルにより、アロステリック部位に位置する代表的な残基のピーク位置の変化が示された。N M R スペクトルの最小化学シフト変化によって示されるように、R B C 8 は同じ条件下で R a l B - G N P に結合しなかった。さらに、細胞ベースの E L I S A アッセイにおいて活性型 R a l のレベルに影響を及ぼさなかった R B C 5 は、R a l B - G D P においても化学シフト変化を誘導しなかったため、付加的な陰性対照とした。

【 0 0 3 1 】

構造的特徴を含む全てのデータに基づき、一連の R B C 8 誘導体を合成し、i n v i t r o での結合について試験した。R B C 8 と比較して優れたその性能及びその薬らしい特性から B Q U 5 7 を更なる評価に選んだ。B Q U 5 7 と R a l B - G D P との間の結合の詳細な N M R 分析を行った。配列に応じた B Q U 5 7 による化学シフト変化のプロットから、顕著な変化を示す残基がスイッチ - I I (アミノ酸残基 7 0 ~ 7 7) 及びヘリックス 2 (アミノ酸残基 7 8 ~ 8 5) 領域に位置することが示された。R a l B - G D P 結晶構造は利用可能でないため、R a l A - G D P に対する類似性に基づいて相同性モデルを生成し、化合物に回答して化学シフト変化を示した残基をこのモデルにマップした。化学シフト変化の大部分は、モデリングに基づくこの部位への B Q U 5 7 結合の帰属と一致してアロステリック部位に局在化していた。R B C 8 による結果と同様、B Q U 5 7 は N M R スペクトルの最小化学シフト変化によって示されるように R a l B - G N P ($100 \mu\text{M}$) に結合しなかった。N M R 化学シフト滴定の分析から、B Q U 5 7 の結合が薬物の見掛けの溶解性の限界まで化学量論的であることが明らかになった。R a l B - G D P へ

の B Q U 5 7 の結合を、等温滴定カロリーメトリー (I T C) を用いることによっても決定し、結果は表面プラズマ共鳴 (S P R) による結果と同様であった。

【 0 0 3 2 】

ヒト肺癌細胞成長に対する R B C 8 及び B Q U 5 7 の効果を評価した。足場非依存性における R a l の役割は既知であるため、本発明者らは軟寒天における成長阻害アッセイを行った。ヒト肺癌細胞を薬物取込み、生物学的特異性及び効果を決定するための一連の実験で使用した。

【 0 0 3 3 】

R B C 8、B Q U 5 7、B Q U 8 5 及び R B C 5 の細胞取込みを検査し、全ての化合物が細胞に容易に入り込むことが見出された。全ての細胞株が K - R a s s i R N A 枯渇に対して感受性を有することが見出されたが、H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 のみが R a l ノックダウンに対して感受性を有していた。密接に関連した G T P アーゼである R a s と比較した R a l に対する化合物の特異性を決定するためにこの特徴を用いることで、本発明者らは軟寒天におけるコロニー形成の阻害を評価し、R a l 依存性株 H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 が感受性を有することを見出した。付加的に、R a l B P 1 アガロースビーズを用いた R a l プルダウンアッセイにより、R B C 5 ではなく R B C 8 及び B Q U 5 7 が、H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞株の両方において R a l A 及び R a l B の両方の活性化を阻害することが示された。ケモゲノミクス実験を行い、R a l に対する薬物特異性を更に決定した。R B C 8 又は B Q U 5 7 による R a l A 及び R a l B の s i R N A ノックダウンを有する H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞の処理は顕著な更なる阻害をもたらさなかった。まとめると、これらのデータから R B C 8 及び B Q U 5 7 が R a l 阻害により足場非依存性成長を低減することが実証された。

【 0 0 3 4 】

R a l の G T P 型と比較した G D P 型に対する化合物の特異性を、H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞において R a l A G 2 3 V 又は R a l B G 2 3 V の活性型を構成的に過剰発現させることによって評価した。(G 2 3 V 突然変異は G T P 加水分解の R a l G A P 媒介活性化を防止し、したがって R a l をその活性状態にロックする。) R a l A G 2 3 V 及び R a l B G 2 3 V の両方が、R B C 8 及び B Q U 5 7 化合物の成長阻害効果をレスキューすることができた。

【 0 0 3 5 】

R a l 活性及び腫瘍成長の阻害をヒト肺癌マウスモデルにおいて評価した。R B C 8 及び B Q U 5 7 の薬物動態を、初めにバイオアベイラビリティを試験するために、表 1 に示される良好な薬物候補を規定する有利な特性を示す R B C 8 及び B Q U 5 7 を用いてマウスにおいて分析した。

【 0 0 3 6 】

【表 1】

	RBC8	BQU57
用量 (mg/kg) i. p. n=3	50.0	50.0
Co (μM)	41.2 ± 4.2	41.6 ± 5.1
T _{1/2} (hr)	0.58 ± 0.26	1.50 ± 0.11
AUC _{0-5hr} (mg · h / mL)	139.6 ± 18.8	28.6 ± 2.1

【 0 0 3 7 】

化合物の腫瘍組織への侵入を決定したが、相当量の化合物が投与の 3 時間後に腫瘍組織において検出された。

【 0 0 3 8 】

次いで、異種移植腫瘍成長に対する R a l 阻害剤の効果をヌードマウスにおいて試験した

。R B C 8 は R a l A 及び R a l B の二重ノックダウンと同じ程度 (order of magnitude) で腫瘍成長を阻害し、二次肺癌株 H 3 5 8 は同様の結果をもたらした。B Q U 5 7 及び B Q U 8 5 も *in vivo* で試験し、用量依存的な成長阻害効果が観察された。

【0039】

R a l G T P アーゼ活性を H 2 1 2 2 異種移植片において *in vivo* で評価した。R a l 活性の R a l B P 1 プルダウン測定から、R B C 8 及び B Q U 5 7 による R a l A 及び R a l B の両方の顕著な阻害が示された。重要なことには、R a l 活性の B Q U 5 7 により誘導される用量依存的な阻害は腫瘍成長の阻害と相関していた。付加的に、R a s 及び R h o A 活性を B Q U 5 7 処理腫瘍において測定したが、顕著な阻害は観察されず、本発明の R a l 阻害剤の選択性が更に実証された。

10

【0040】

したがって、本発明は R a l G T P アーゼ阻害化合物を提供する。これらの化合物は不活性型の R a l タンパク質に結合し、G E F 誘導活性化又は G T P 交換を防止することができ、R a l に対して僅かなオフターゲット効果で選択的である。このため、本開示の R a l G T P アーゼ阻害剤は、G T P 結合時の R a l タンパク質の関連立体構造変化を妨げることにより、エフェクターの関与及び下流のシグナル伝達を防止するために使用することができる。

【0041】

したがって本発明は、被験体において R a l G T P アーゼを阻害することにより被験体における癌の成長及び/又は転移を阻害する方法も提供する。好ましい実施形態では、R a l G T P アーゼは、R a l A パラログ及び R a l B パラログの内の少なくとも一方である。「パラログ」という用語は、同じゲノムの異なる位置を占有するような重複が起きている生物における遺伝子を示すのに本開示において使用される。

20

【0042】

別の態様において、本発明は少なくとも1つの本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を被験体に投与することにより、被験体において癌の成長及び/又は転移を阻害する方法を提供する。

【0043】

本明細書で使用される場合、「化合物」という用語は、単純な若しくは複雑な有機分子、ペプチド、タンパク質又はオリゴヌクレオチド等の化学分子又は生体分子を意味する。

30

【0044】

「薬学的に許容可能な」という語句は本明細書において、正しい医学的判断の範囲内において過度な毒性、炎症、アレルギー反応、又は合理的なベネフィット/リスク比に応じた他の問題若しくは合併症を伴わず、ヒト及び動物の組織に接触させて使用するのに適したそれらの化合物、材料、組成物及び/又は剤形を表すのに用いられる。

【0045】

「薬学的に許容可能な塩」は、親化合物がその酸塩又は塩基塩を生成することによって修飾されている開示される化合物の誘導体を指す。薬学的に許容可能な塩の例としては、アミン等の塩基性残基の無機塩若しくは有機酸塩、又はカルボン酸等の酸性残基のアルカリ塩若しくは有機塩が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容可能な塩としては、例えば非毒性の無機酸又は有機酸から生成される親化合物の従来の非毒性塩又は第四級アンモニウム塩が挙げられる。かかる従来の非毒性塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸等の無機酸に由来する塩と、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸等の有機酸から調製される塩とが挙げられる。薬学的に許容可能な塩は、過度な毒性、炎症、アレルギー反応、又は合理的なベネフィット/リスク比に応じた他の問題若しくは合併症を伴わず、ヒト及び動物の組織に接触させて使用するのに適した化合物の形態である。

40

50

【 0 0 4 6 】

本明細書において提供される化合物の薬学的に許容可能な塩形態は、従来の化学的方法によって塩基性部分又は酸性部分を含有する本発明の化合物から合成される。一般的には、かかる塩は例えば、水若しくは有機溶媒、又はそれら 2 つの混合物（一般的にはエーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール又はアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい）において、これらの化合物の遊離酸形態又は遊離塩基形態を化学量論量の適切な塩基又は酸と反応させることによって調製される。好適な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985 の 1 4 1 8 頁に見られる。

【 0 0 4 7 】

「被験体」という用語はヒト又は霊長類、例えば類人猿、サル、オランウータン、ヒヒ、テナガザル及びチンパンジー等の哺乳動物を指す。「被験体」という用語は伴侶動物、例えばイヌ及びネコ；動物園の動物；ウマ科動物、例えばウマ；食用動物、例えばウシ、ブタ及びヒツジ；並びに疾患モデル動物、例えばウサギ、マウス及びラットを指す場合もある。被験体はヒトであっても又は非ヒトであってもよい。被験体は任意の年齢であり得る。例えば幾つかの実施形態では、被験体はヒト乳児、すなわち出生後から約 1 歳まで；ヒト小児、すなわち約 1 歳～ 1 2 歳のヒト；思春期のヒト、すなわち約 1 2 歳～ 1 8 歳のヒト；又は成人のヒト、すなわち約 1 8 歳を超えるヒトであり得る。幾つかの実施形態では、被験体は成人の男性又は女性である。

【 0 0 4 8 】

「治療に効果的な量」又は「治療量」の本発明の化合物という用語は、癌を患う被験体に投与した後に癌の形成又は進行を阻害するのに効果的な量を意味する。

【 0 0 4 9 】

「溶媒和物」という用語は、溶媒と化合物との相互作用によって形成される化合物を指す。好適な溶媒和物は、一水和物及び半水和物を含む水和物等の薬学的に許容可能な溶媒和物である。

【 0 0 5 0 】

キラル中心を有する本発明の化合物は、光学活性体及びラセミ体の形で存在し、単離することができることが当業者に理解されている。本発明の化合物は本明細書に記載の治療的に有用な特性を備える、任意のラセミ体、光学活性体、位置異性体若しくは立体異性体、又はそれらの混合物を包含することが理解される。本発明の化合物が少なくとも 1 つのキラル中心を有する場合、本発明の化合物はエナンチオマーとして存在し得る。本発明の化合物が 2 つ以上のキラル中心を有する場合、本発明の化合物は更にジアステレオマーとして存在し得る。本発明による化合物を調製する方法によって、立体異性体の混合物が得られる場合、これらの異性体を分取クロマトグラフィ等の従来法によって分離することができる。本発明の化合物を、立体特異的合成又は分割によってラセミ体で又は個々のエナンチオマー若しくはジアステレオマーとして調製することができる。本発明の化合物を例えば、光学活性酸、例えば (-) - ジ - p - トルオイル - D - 酒石酸及び / 又は (+) - ジ - p - トルオイル - L - 酒石酸との塩形成による立体異性体対の形成、その後の分別晶出及び遊離塩基の再生等の標準法によってそれらの構成要素であるエナンチオマー又はジアステレオマーへと分割することができる。本発明の化合物を、立体異性体のエステル又はアミドの形成、その後のキラル補助基 (chiral auxiliary) のクロマトグラフィ分離及び除去によっても分割することができる。代替的には本発明の化合物を、キラル H P L C カラムを用いて分割することができる。その全ての立体異性体、ラセミ混合物、ジアステレオマー及びエナンチオマーが本発明の範囲内に包含されることが理解される。

【 0 0 5 1 】

光学活性体をどのように（例えば再結晶法、光学活性出発材料からの合成、キラル合成、又はキラル固定相を用いたクロマトグラフィ分離によるラセミ体の分割によって）調製するかは当該技術分野において既知である。また本発明の範囲には、存在し得る各種異性体だけでなく、形成され得る異性体の各種混合物も包含されることが理解される。本発明

10

20

30

40

50

の化合物、それらの出発材料及び / 又は中間体の分割は、例えばfour volume compendium

Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds: Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N.Y.、及びEnantiomers, Racemates and

Resolutions, Jean Jacques, Andre Collet and Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., New York, 1981 (これは引用することによりその全体が本明細書の一部をなす) に記載されるような既知の手法によって行うことができる。要するに、化合物の分割は鏡像異性的に純粋な部分の化学的又は酵素的な結合によるジアステレオマーの物理特性の差異に基づくものであり、これにより分別晶出、蒸留又はクロマトグラフィにより分離可能な形態が得られる。

10

【 0 0 5 2 】

本発明の医薬組成物を作製するのに本発明の化合物と組み合わせて使用される化学物質は市販品を (commercially) 購入することができる。これらの化合物の塩を含む本発明の化合物は、有機成分分野の当業者にとって既知の方法で調製することもできる。本発明の化合物は、用いられる試薬及び材料に適切であり、形質転換をもたらすのに好適な溶媒中で行われる反応を用いて調製することができる。分子の様々な箇所に存在する官能基が提唱される試薬及び反応に適合可能でなければならないことが有機成分分野の当業者に理解されている。反応条件に適合可能であるという置換基に対するこのような制限は、当業者にとって容易に明らかとなり、代替方法を使用しなければならない。

20

【 0 0 5 3 】

本発明の医薬組成物は、1つ又は複数の本発明の化合物と、動物、特に被験体への生物学的活性剤の送達に関して当該技術分野において一般的に許容される媒体である薬学的に許容可能な担体とを含有する。薬学的に許容可能な担体は、決定及び調整する上で十分当業者の範囲内にある多くの因子に従って配合される。これらとしては、配合される活性剤の種類及び性質；活性剤を含有する組成物を投与する被験体；組成物の目的とする投与経路；並びに標的となる治療指標が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容可能な担体には、水性液体媒体及び非水性液体培体の両方と、多様な固体剤形及び半固体剤形とが含まれる。このような担体は、活性剤に加えて多くの様々な成分及び添加剤を含むことができ、かかる付加的な成分は、当業者に既知の様々な理由、例えば活性剤の安定化のために配合物中に含まれる。好適な薬学的に許容可能な担体、及びその選択に関わる因子の記述は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985等の容易に入手可能な各種出典に見られる。

30

【 0 0 5 4 】

本発明は更に、癌に冒された被験体を治療する又は被験体においてかかる癌の転移を防止する方法であって、被験体に本明細書で提供される医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。かかる組成物は概して、治療に効果的な量の本発明の化合物を、癌を防止、改善、軽減又は阻害するのに効果的な量で含む。かかる量は典型的に、組成物が投与される被験体の体重1キログラム当たり約0.1mg ~ 約100mgの化合物を含む。治療に効果的な量の組成物は当業者にとって良好な任意の投与計画に従って投与することができる。

40

【 0 0 5 5 】

投与は例えば、様々な非経口手段によって行うことができる。非経口投与に適した医薬組成物としては、水性デキストロス及び生理食塩水溶液等の様々な水性媒体が挙げられる。グリコール溶液も有用な担体であり、活性成分の水溶性塩と、好適な安定剤と、必要に応じて緩衝剤とを含有するのが好ましい。重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム又はアスコルビン酸等の抗酸化剤は単独で又は組み合わせて、好適な安定剤であり、クエン酸及びその塩並びにEDTAも使用される。加えて、非経口溶液は塩化ベンザルコニウム、メチルパラベン又はプロピルパラベン及びクロロブタノール等の防腐剤を含有していてもよい。

50

【 0 0 5 6 】

代替的には、組成物はカプセル、錠剤及び粉末等の固体剤形、又はエリキシル、シロップ及び／又は懸濁剤等の液体形態で経口投与することができる。ゼラチンカプセルを、活性成分と、限定するものではないが、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はセルロース誘導体等の好適な担体とを含有させるのに使用することができる。同様の希釈剤を、圧縮錠を作製するのに使用することができる。錠剤及びカプセルはともに、経時的な薬剤の連続的放出をもたらす持続放出性製剤として製造することができる。圧縮錠は不快な風味をマスクングするために糖衣錠若しくはフィルムコート錠とすることができ、又は活性成分を環境から保護するのに使用することができ、又は胃腸管内で錠剤を選択的に崩壊させることができる。

10

【 0 0 5 7 】

好ましい本発明の配合物は、治療に効果的な量の本発明の化合物と、薬学的に許容可能な担体とから本質的になる、癌を防止、治療又は予防するための非経口投与又は経口投与に適した単相医薬組成物である。

【 0 0 5 8 】

本発明の医薬組成物に用いることができる好適な水性担体及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物、オリーブ油等の植物油、並びにオレイン酸エチル等の注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は例えば、レシチン等のコーティング材料の使用によって、分散液の場合は所望の粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。

20

【 0 0 5 9 】

これらの組成物は湿潤剤、乳化剤及び分散剤等のアジュバントを含有することもできる。組成物に糖、塩化ナトリウム等の等張剤を含めることも望まれ得る。加えて、注射用医薬形態の持続的吸収はモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン等の吸収を遅らせる作用物質の包含によってもたらされ得る。

【 0 0 6 0 】

場合によっては、薬物の効果を延ばすために、皮下注射又は筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい。これは水溶性が低い結晶質又は非晶質の液体懸濁液の使用によって達成することができる。薬物の吸収速度はその溶解速度に依存するものであり、溶解速度は結晶サイズ及び結晶形に依存するものであり得る。代替的には、非経口投与薬物の遅延吸収は薬物を油性ビヒクルに溶解又は懸濁することによって達成される。

30

【 0 0 6 1 】

注射用デポー剤形は、ポリラクチド - ポリグリコリド等の生分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセル化マトリクスを形成することによって作製される。薬物とポリマーとの比及び用いられる特定のポリマーの性質に応じて、薬物の放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としてはポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が挙げられる。注射用デポー配合物は、薬物を、体組織に適合するリボソーム又はマイクロエマルジョンに封入することによっても調製される。注射用材料は、例えば細菌保持フィルターによる濾過によって滅菌することができる。

40

【 0 0 6 2 】

錠剤等の固体組成物を調製するために、主活性成分を医薬賦形剤と混合して、本発明の化合物の一樣混合物を含有する固体予備配合組成物を形成する。これらの予備配合組成物を一樣であると称する場合、これは組成物を錠剤、丸薬及びカプセル等の等しく効果的な単位剤形へと容易に細分することができるように活性成分が組成物全体に均等に分散されていることを意味する。次いでこの固体予備配合物を、例えば 0 . 1 m g ~ 約 5 0 0 m g の本発明の治療用化合物を含有する上記のタイプの単位剤形へと細分する。

【 0 0 6 3 】

経口投与に適した本発明の配合物は、それぞれが活性成分として所定量の本発明の化合物（単数又は複数）を含有する、カプセル、カシェ剤、丸薬、錠剤、粉末、細粒、又は水性

50

若しくは非水性の液体の溶液若しくは懸濁液、又は水中油型若しくは油中水型の液体エマルション、又はエリキシル若しくはシロップ、又はトローチ（ゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアカシア等の不活性基剤を使用する）等の形態であり得る。本発明の化合物（単数又は複数）を巨丸剤、舐剤又はペーストとしても投与することができる。

【0064】

経口投与用の本発明の固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、粉末、細粒等）では、活性成分を1つ若しくは複数の薬学的に許容可能な担体、例えばクエン酸ナトリウム若しくはリン酸二カルシウム、及び／又は下記のいずれかと混合する：（1）充填剤又は増量剤、例えばデンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及び／又はケイ酸；（2）結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／又はアカシア等；（3）保湿剤、例えばグリセロール；（4）崩壊剤、例えば寒天（agar-agar）、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、或る特定のケイ酸塩及び炭酸ナトリウム；（5）溶解遅延剤、例えばパラフィン；（6）吸収促進剤、例えば第四級アンモニウム化合物；（7）湿潤剤、例えばセチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロール等；（8）吸収剤、例えばカオリン及びベントナイト粘土；（9）潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール固体、ラウリル硫酸ナトリウム及びそれらの混合物；並びに（10）着色剤。カプセル、錠剤及び丸薬の場合、医薬組成物は緩衝剤を含んでいてもよい。類似のタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖のような賦形剤と高分子量ポリエチレングリコール等を用いて、軟ゼラチンカプセル及び硬ゼラチンカプセル内の充填剤として用いることができる。

【0065】

錠剤は任意に1つ又は複数の補助成分を用いて圧縮又は成形によって作製することができる。圧縮錠は、結合剤（例えばゼラチン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、防腐剤、崩壊剤（例えばデンプングリコール酸ナトリウム又は架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤又は分散剤を用いて調製することができる。成形錠は好適な機械において不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状の化合物の混合物を成形することによって作製することができる。

【0066】

本発明の医薬組成物の錠剤、並びに糖衣錠、カプセル、丸薬及び細粒等の他の固体剤形は、任意に割線を入れるか（scored）又は腸溶コーティング及び医薬配合分野で既知の他のコーティング等のコーティング及びシェルを用いて調製することができる。それらは、例えば所望の放出プロファイルをもたらすのに様々な割合でヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、リポソーム及び／又はミクロスフェアを用いて、その中の活性成分の徐放又は制御放出が起こるように配合することもできる。それらは、例えば細菌保持フィルターによる濾過によって滅菌することができる。これらの組成物は任意に不透明剤を含有していてもよく、活性成分のみを、又は任意に遅延して胃腸管の或る特定の部分に優先的に放出する組成を有してもよい。使用することのできる包埋組成物の例としては高分子物質及びワックスが挙げられる。活性成分はマイクロカプセル化形態であってもよい。

【0067】

本発明の錠剤又は丸薬を、持続作用の利点をもたらす剤形が得られるようにコーティング又はそれ以外の方法で調合することができる。例えば、錠剤又は丸薬は内側剤形構成要素と外側剤形構成要素とを備えていてもよく、外側剤形構成要素は内側剤形構成要素の上にエンベロープの形態で存在する。2つの構成要素は胃での崩壊を抑える働きがある腸溶層によって隔てられ、内側構成要素が無傷で十二指腸に入るか又は放出を遅延させることができる。多様な材料をこのような腸溶層又はコーティングに使用することができ、かかる材料としては、多くのポリマー酸、並びにポリマー酸とシェラック、セチルアルコール及び酢酸セルロースのような材料との混合物が挙げられる。

【0068】

10

20

30

40

50

本発明の化合物の経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容可能なエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが挙げられる。活性成分に加えて、液体剤形は当該技術分野において一般的に使用される不活性希釈剤、例えば水又は他の溶媒等、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにそれらの混合物を含有することができる。

【0069】

不活性希釈剤の他にも、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤及び防腐剤等のアジュバントも含むことができる。

【0070】

懸濁液は、活性化合物に加えて、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド (aluminum metahydroxide)、ベントナイト、寒天及びトラガカント、並びにそれらの混合物等の懸濁化剤を含有することができる。

【0071】

直腸投与又は腔内投与用の本発明の医薬組成物の配合物は坐剤として与えることができる。坐剤は1つ又は複数の本発明の化合物を、例えばココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤用ワックス又はサリチル酸塩を含む1つ又は複数の好適な非刺激性賦形剤又は担体と混合することによって調製することができ、室温では固体であるが、体温では液体であり、そのため直腸又は腔内で溶解して活性化合物を放出する。腔内投与に適した本発明の配合物には、当該技術分野において適切であることが知られているような担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ジェル、ペースト、泡状物質又は噴霧配合物も含まれる。

【0072】

本発明の化合物の局所投与又は経皮投与用の剤形としては、粉末、噴霧剤、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ジェル、溶液、パッチ、滴剤及び吸入剤が挙げられる。活性成分は滅菌条件下において薬学的に許容可能な担体、及び要求され得る任意の緩衝液又は高圧ガスと混合することができる。

【0073】

軟膏、ペースト、クリーム及びジェルは、活性成分に加えて、賦形剤、例えば動物性脂肪及び植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク及び酸化亜鉛、又はそれらの混合物を含有することができる。

【0074】

粉末及び噴霧剤は、活性成分に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉末等の賦形剤、又はこれらの物質の混合物を含有することができる。噴霧剤はフロン (chlorofluorohydrocarbons) 等の慣用の高圧ガス、並びに揮発性非置換炭化水素、例えばブタン及びプロパンを更に含有することができる。

【0075】

経皮パッチには本発明の化合物の身体への制御送達をもたらすという追加利点がある。かかる剤形は、1つ又は複数の本発明の化合物を適切な媒体、例えば弾性マトリクス材料に溶解、分散又はそれ以外の方法で組み込むことによって作製することができる。皮膚を介した化合物の流れを増大させるのに吸収促進剤を使用することもできる。このような流れの速度を、速度制御膜を設ける又は化合物をポリマーマトリクス若しくはゲルに分散させることによって制御することができる。

【0076】

医薬配合物は、吸入若しくは送気による投与又は鼻腔投与若しくは眼内投与に適したも

10

20

30

40

50

のを含む。吸入による上気道（鼻腔）又は下気道への投与のために、本発明の化合物は送気器（insufflator）、ネブライザ若しくは加圧バック、又はエアロゾル噴霧剤を送達する他の簡便な手段から簡便に送達される。加圧バックには、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の好適なガス等の好適な高圧ガスが含まれ得る。加圧エアロゾルの場合、投与単位は決まった量（metered amount）を送達するバルブを設けることによって決定することができる。

【0077】

代替的には、吸入又は送気による投与のために、組成物は乾燥粉末、例えば1つ又は複数の本発明の抗癌化合物と好適な粉末基剤、例えばラクトース又はデンプンとの粉末混合物の形態をとることができる。粉末組成物は単位剤形、例えばカプセル若しくはカートリッジ、又は例えば吸入器、送気器若しくは定量吸入具を用いて粉末を投与することができるゼラチン若しくはブリストアバックで与えられ得る。

10

【0078】

鼻内投与のために、本発明の化合物は点鼻薬又は液体噴霧剤を用いて、例えばプラスチックボトル噴霧器又は定量吸入具を用いて投与することができる。典型的な噴霧器はMistometer（Wintrop）及びMedihaler（Riker）である。

【0079】

滴剤、例えば点眼薬又は点鼻薬を、1つ又は複数の分散剤、可溶化剤又は懸濁化剤を更に含む、水性又は非水性基剤を用いて配合することができる。液体噴霧剤は加圧バックから簡便に送達される。滴剤は単純な点眼器である蓋の閉まったボトルを用いて又は特別な形状のクロージャ（closure）によって液体内容物を液滴として送達させるように適合されたプラスチックボトルを用いて送達することができる。

20

【0080】

配合物は単回用量又は複数回用量の封止容器、例えばアンプル及びバイアル内に与えられ、使用の直前に滅菌液体担体、例えば注射用水を添加するだけでよい凍結乾燥条件下で保管することができる。即時注射溶液及び懸濁液を上記のタイプの滅菌粉末、細粒及び錠剤から調製することができる。

【0081】

本発明によって提供される投与配合物は、本発明の治療用化合物を、単独で又は他の治療的に活性な成分及び薬学的に許容可能な不活性賦形剤と組み合わせて含有することができる。「薬学的に許容可能な不活性賦形剤」という用語は、希釈剤、結合剤、潤滑剤/滑剤、着色剤及び放出調節ポリマーの内の少なくとも1つを含む。

30

【0082】

好適な抗酸化剤は当該技術分野において知られる1つ又は複数の薬学的に許容可能な抗酸化剤の中から選択され得る。薬学的に許容可能な抗酸化剤の例としては、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、アスコルビン酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、亜硫酸ナトリウム、クエン酸、リンゴ酸及びアスコルビン酸が挙げられる。抗酸化剤は投与配合物の約0.001重量%～約5重量%の濃度で本発明の投与配合物に存在し得る。

【0083】

好適なキレート剤は当該技術分野において知られる1つ又は複数のキレート剤の中から選択され得る。好適なキレート剤の例としては、エデト酸二ナトリウム（EDTA）、エデト酸、クエン酸及びそれらの組合せが挙げられる。キレート剤は投与配合物の約0.001重量%～約5重量%の濃度で存在し得る。

40

【0084】

剤形は、典型的に約20重量%～約80重量%の範囲内の量で1つ又は複数の希釈剤、例えばラクトース、糖、コーンスターチ、加工コーンスターチ、マンニトール、ソルビトール、及び/又は木材セルロース及び微結晶性セルロース等のセルロース誘導体を含むことができる。

【0085】

50

剤形は最大約 60% (w/w) の量で 1 つ又は複数の結合剤を含むことができる。好適な結合剤の例としては、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、オイドラギット、エチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ポリビニルアルコール、プルラン、カルボマー、アルファ化デンプン、寒天、トラガカント、アルギン酸ナトリウム、微結晶性セルロース等が挙げられる。

【0086】

好適な崩壊剤の例としては、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、低置換ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。濃度は剤形の 0.1 重量% ~ 15 重量% と様々であり得る。

10

【0087】

潤滑剤 / 滑剤の例としては、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、硬化ヒマシ油、脂肪酸のスクロースエステル、微結晶性ワックス、黄蠟、白蠟等が挙げられる。濃度は剤形の 0.1 重量% ~ 15 重量% と様々であり得る。

【0088】

放出調節ポリマーは、本発明の治療用化合物を含有する長期放出配合物を形成するのに使用することができる。放出調節ポリマーは水溶性ポリマー又は水不溶性ポリマーのいずれであってもよい。水溶性ポリマーの例としては、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸ビニルコポリマー、ポリエチレンオキシド、多糖類（例えばアルギン酸塩、キサンタンガム等）、メチルセルロース、及びそれらの混合物が挙げられる。水不溶性ポリマーの例としては、メタクリレート、アクリル酸コポリマー等のアクリレート；エチルセルロース又は酢酸セルロース等のセルロース誘導体；ポリエチレン、及び高分子量ポリビニルアルコールが挙げられる。

20

【0089】

Ra1 GTPアーゼを阻害することによって肺癌の転移を防止、治療又は阻害することができる潜在的な治療剤をスクリーニングする方法であって、(a) Ra1 GTPアーゼと潜在的な治療用化合物とを相互作用する条件下において組み合わせることと、(b) Ra1 GTPアーゼの酵素活性をモニタリングすることとを含み、潜在的な治療用化合物が添加されていない対照サンプルと比較して酵素活性が阻害されている場合、潜在的な治療用化合物を更なる研究のために選択する、方法も本発明に包含される。一実施形態では、潜在的な治療用化合物は、医薬品、サイトカイン、小分子薬、細胞透過性小分子薬、ホルモン、インターロイキンの組合せ、レクチン、二重特異性抗体、及びペプチド模倣薬からなる群から選択される。

30

【0090】

本発明の一実施形態は、被験体における癌又は癌の転移の治療又は防止に使用される本発明の化合物に関する。本発明の関連の実施形態は、被験体における癌又は癌の転移の治療又は防止に使用される本発明の組成物に関する。

【0091】

本発明の別の実施形態は、被験体における癌の成長又は転移を阻害する薬剤の調製への本発明の化合物又は組成物のいずれかの使用に関する。

40

【0092】

本明細書に言及される刊行物又は特許はそれぞれその全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【実施例】

【0093】

下記実施例は本開示の或る特定の態様、実施形態及び構成を説明するために与えられており、添付の特許請求の範囲に記載されるような本開示を限定するものとは解釈されない。

【0094】

実施例 1 - Ra1 阻害剤の分子モデリング

50

分子モデリングを、かかる分子が不活性状態を安定化することを期待して R a l - G T P (活性型) よりも R a l - G D P (不活性型) に優先的に結合する化合物を発見するために用いた。活性型及び不活性型の R a l A の三次元構造の検査により、ヌクレオチド結合部位から近いが、それとは異なるポケットの形状の違いが明らかになった (図 1)。このポケット (アロステリック部位) は以前に記載の C 3 b o t 結合部位と同様であり、スイッチ - I I 領域 (R a l 7 0 ~ R a l 7 7)、ヘリックス 2 (R a l 7 8 ~ R a l 8 5) 及びヘリックス 3 の一面により構成される (図 1 A)。比較に使用される結晶構造は、e x o 8 4 (P D B コード 1 Z C 4、図 1 C) 又は s e c 5 (P D B コード 1 U A D、図 1 D) と複合した R a l A - G D P (P D B コード 2 B O V、図 1 B) 及び R a l A - G N P (非加水分解性形態の G T P) を含んでいた。各結合部位について算出された体積は R a l A - G D P では 175 \AA^3 (図 1 B)、R a l A - G N P - e x o 8 4 では 155 \AA^3 (図 1 C)、R a l A - G N P - s e c 5 では 116 \AA^3 (図 1 D) であった。R a l B - G D P 結晶構造は公表されていないが、R a l B - G N P 構造 (P D B コード 2 K E 5、図 1) では、この結合ポケットは殆ど存在しない。

【0095】

構造に基づく仮想スクリーニングアプローチを行い、R a l A - G D P のアロステリック部位に結合する小分子を同定した。2.66 のヒト R a l A - G D P (P D B : 2 B O V)、e x o 8 4 と複合した R a l A - G N P (P D B : 1 Z C 4)、s e c 5 と複合した R a l A - G N P (P D B : 1 U A D) 結晶構造の結晶学的座標は R C S B タンパク質データバンク (rcsb.org) から取得した。A u t o D o c k 4 を初期ライブラリスクリーニングに用いた。C h e m D i v ライブラリー [v 2 0 0 6 . 5、反応基を保有するものを除外した 5 0 0 0 0 0 個の化合物、既知の A D M E / 毒性、物理化学的特性は p H 7 での「薬らしさ」パラメーター (リピンスキーの 5 の法則及び V e b e r の 2 の法則) の範囲外である] は Z I N C データベースからダウンロードし、剛体ドッキング (r i g i d d o c k i n g) プロトコルを用いて R a l A - G D P 上の同定された部位にドッキングさせた。リガンド分子に、A u t o D o c k T o o l s で提供される G a s t e i g e r 電荷及び極性水素原子をリガンド調製モジュールによって帰属させた。A u t o D o c k 4 の L a m a r c k i a n 遺伝的アルゴリズムを用いて、立体構造探索空間全体にわたるリガンド結合エネルギーを評価した。タンパク質 - リガンド複合体をスコアリングし、相互作用エネルギーの算出に続く上位候補の目視検査に基づいて選別することで、88 個の化合物が選択された。

【0096】

実施例 2 - 細胞ベースの機能アッセイ

選択された 88 個の化合物を、培養物中の生細胞における R a l A 活性化を阻害するそれらの能力について評価した。

【0097】

ヒト膀胱癌細胞株 J 8 2、並びに肺癌細胞株 H 2 1 2 2、H 3 5 8、H 4 6 0 及び C a l u 6 は ATCC から入手した。使用される抗体はヒト R a l A (B D Biosciences、# 6 1 0 2 2 2)、R a l B (Millipore # 0 4 - 0 3 7) 及び F L A G タグ (Novagen # 7 1 0 9 7) に対するものである。R a s (# B K 0 0 8) 及び R h o A (# B K 0 3 6) の活性アッセイキットは Cytoskeleton (Denver, CO) から入手した。そのエフェクタータンパク質 R a l B P 1 への活性型 R a l A - G T P の選択的結合に基づく R a l 活性についての E L I S A を用いた。

【0098】

F L A G - R a l A を安定に過剰発現する J 8 2 細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 8 0 0 0 0 0 細胞プレーティングし、16 時間インキュベートした。細胞を、試験化合物 ($50 \mu\text{M}$) 又は D M S O 対照 (1 時間 ; 3 7) を含有する $500 \mu\text{l}$ の新鮮培地で処理した。次いで、細胞を氷冷 P B S で洗浄し、氷冷溶解バッファー (50 mM トリス (p H 7 . 5)、 200 mM N a C l、1 % I g e p a l c a - 6 3 0、 10 mM M g C l ₂ 及びプロテアーゼ阻害剤を含有する $750 \mu\text{l}$) に採取した。溶解物を遠心分

離によって清澄化した後、上清を急速冷凍し、試験するまで - 80 で保管した。E L I S A アッセイのために、H i s G r a b ニッケルコーティング 96 ウェルプレート ストリップ (Pierce、# 15142) を E L I S A バッファー (50 mM トリス (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% Tween 20 及び 10 mM MgCl₂ からなる 200 µl) で 3 回洗浄した。次いで、R a l B P 1 (0.5 µg / 100 µl) をウェルに添加し、振動させながらインキュベートした (室温で 2 時間)。次いで、プレートを 200 µl の E L I S A バッファーで 3 回洗浄した。プレートを氷上に置き、溶解物又は溶解バッファー対照 (100 µl) をウェルに四連で添加した。次いで、プレートを振動させながら 4 で一晩インキュベートし、続いて氷冷 E L I S A バッファーで 2 回洗浄した。次いで、マウス抗 F L A G (Sigma、F 1804) 抗体 (E L I S A バッファー中で 20000 倍) を 1 ウェル当たり 100 µl 添加し、インキュベートした (1 時間、4)。3 回洗浄した後、H R P にコンジュゲートしたヤギ抗マウス抗体 (Pierce、# 31430) (2500 倍) を 1 ウェル当たり 100 µl 添加し、インキュベートした (1 時間、4)。3 回洗浄した後、H R P 基質 (Vector Laboratories、# S K - 4400) を各ウェルに 100 µl 添加し、1 時間室温でインキュベートした。硫酸 (100 µl、2 N) を添加することによって反応を停止させた。吸光度を B i o t e k S y n e r g y H 1 プレートリーダー (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) において O D 450 で読み取った。O D 540 での同じウェルについての読み取り値を減算することによって、吸光度をバックグラウンド吸光度に対して補正した。

【0099】

F L A G タグ付き R a l A を安定に発現する J 82 ヒト膀胱癌細胞により、抗 R a l 抗体によってもたらされるよりもタンパク質検出が改善された。これによりアッセイに対するダイナミックレンジの増強が得られた。結合した R a l A の量は相対活性化状態に比例していた。

【0100】

独立アプローチを用いて、フィブロネクチンコーティングカバースリップ上のネズミ胎児線維芽細胞 (M E F) の拡散時に脂質ラフトエキソサイトーシスに必要とされる R a l A 活性を評定した。簡潔に述べると、野生型又はカベオリン - / - マウス胎児線維芽細胞を 24 時間飢餓状態にし、A c c u t a s e (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA) を用いて培養プレートから剥離し、0.2% 血清及び 0.5% メチルセルコースを含む D M E M に再懸濁し、懸濁液中に保持した (90 分間、37)。懸濁液中で細胞を阻害剤 (50 µM 又は D M S O 対照、1 時間) で処理した。処理の後、細胞を 0.2% 血清を含有する D M E M で 1 回リンスし、全ての処理による同数の細胞を、一晩コーティングした (4、2 µg / mL のヒトフィブロネクチン) 24 ウェルプレートに添加した。細胞を 30 分間拡散させた後、標準プロトコルを用いてホルムアルデヒドで固定した。可視化を可能にするために、細胞を L a v a C e l l (Active Motif) で標識し、N i k o n T E 300 蛍光顕微鏡で可視化した。各ウェルの 3 つの異なる領域を撮像し、I m a g e J (NIH) を用いて細胞拡散領域を定量化した。

【0101】

これらの細胞においては、R a l A の s i R N A 枯渇により拡散が阻害される一方で、カベオリン (C a v 1) - / - M E F は R a l A 枯渇に抵抗性を示す。ヒト R a l A 及び R a l B 又はその両方に対する s i R N A は、公表されている配列を用いて Dharmacon (Boulder, CO) から入手した。

【0102】

実施例 3 - i n v i t r o 結合アッセイ

標的への化合物の直接結合を確認するために、T R O S Y 15 N - H S Q C (横緩和最適化異核種単一量子コヒーレンス) NMR を用いた。p E T 16 b (Novagen) プラスミド中の R a l B (Q 72 L 突然変異体) は、Darerca Owen 博士 (ケンブリッジ大学) の好意により提供された。R a l B を、G D P 又は非加水分解性形態の G T P、G M P N P (G N P、Sigma-Aldrich) をローディングする付加的な工程により精製した。均一 1

^{13}C ^{15}N 二重標識タンパク質を、 ^{15}N - NH_4Cl 及び ^{13}C -グルコースを添加したM9培地中で作製した。サンプルをNMRのために50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、100mM NaCl 及び1mM MgCl_2 中で調製した。全てのNMR実験をAgilent 900MHzシステムにおいて25℃で記録した。RalB-GNP複合体についての共鳴帰属(Resonance assignments)は、生体分子磁気共鳴データバンク(BMRB、コード:15230)に寄託された以前に公表された研究から得られた。RalB-GDP複合体の化学シフト帰属は、 HNCA CB、CBCA(CO)NH及びCOCNH-TOCSY実験を用いて独立して得られた。全てのNMRデータをNMRFIPPEを用いて処理し、CCPNMR分析プログラムを用いて分析した。帰属はPINEに続く手動検証を用いる自動化帰属によって得られた。 ^{15}N -HSQC実験を用いてRalBタンパク質(100 μM)からのアミドシフトをモニタリングし、続いて重水素化DMSO中で再構成した化合物を添加した。最終サンプル中のDMSO濃度は0.5%又は1%であった。対照サンプルは0.5%又は1%重水素化DMSOから作製し、化合物を含有する全てのサンプルをそれらの対応するDMSO対照と比較した。

【0103】

GNPと複合したRalBのNMR構造のみが解明されていることから(PDBコード2KE5、BMRBエントリ15230)、このアイソフォームに着目した。RalB-GDP及びRalB-GNPの ^{15}N -HSQC NMRスペクトルを初めに決定し、化学シフト差を分析した。次いで、NMRスペクトルをRBC8又はDMSO対照の存在下で記録した。タンパク質への小分子の結合を ^{15}N -HSQCタンパク質アミドピークの振動によってモニタリングした。100 μM RBC8の非存在下及び存在下におけるRalB-GDP(100 μM)の ^{15}N -HSQCスペクトルにより、アロステリック部位に位置する代表的な残基のピーク位置の変化が示された。一方で、NMRスペクトルの最小化学シフト変化によって示されるように、RBC8は同じ条件下でRalB-GNPに結合しなかった。

【0104】

構造的特徴を含む全てのデータに基づき、一連のRBC8誘導体を合成し、*in vitro*での結合について試験した。RBC8と比較して優れたその性能及び薬らしい特性からBQU57及びBQU85を更なる評価に選んだ(図3A、図2)。

【0105】

化合物BQU57及びBQU85の合成スキームを図2Aに示す。

【0106】

A. 6-アミノ-1,3-ジメチル-4-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(BQU57): エタノール(10mL)中の4-(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒド(500mg、2.87mmol)、マロノニトリル(190mg、2.87mmol)及びトリエチルアミン(400 μL 、2.87mmol)を1.0分間攪拌し、その後1H-ピラゾール-5(4H)-オン(321mg、2.87mmol)を添加し、蓋をし、室温で(22時間)攪拌した後、濃縮し、クロマトグラフィ(SiO_2 ; 塩化メチレン中2% MeOH)によって精製して、BQU57(445mg、1.33mmol、収率46%)を黄色の固体として得た。 ^1H -NMR(400MHz) DMSO- D_6 : 7.28(s, 4H)、7.10(brs, 2H)、4.64(s, 1H)、3.57(s, 3H)、1.64(s, 3H); ^{13}C -NMR(100MHz) DMSO- D_6 : 160.1、147.6、144.7、143.9、142.9、129.9、122.3、121.4、120.6、96.2、58.2、36.8、33.9、12.8。

【0107】

B. 6-アミノ-1-メチル-3-フェニル-4-(4-(トリフルオロメトキシ)フェニル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(BQU85): エタノール(6.0mL)中の4-(トリフルオロメトキシ)ベンズアルデヒド(0.327g、1.72mmol、1.0当量)、マロノニトリル(0.114

g、1.72 mmol、1.0当量)及びトリエチルアミン(0.240 mL、1.72 mmol、1.0当量)の混合物を10分間攪拌し、その後1H-ピラゾール-5(4H)-オン(0.300 g、1.72 mmol)を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮し、SiO₂カラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン中の2%メタノール)によって精製して、BQU_03_85(174 mg、0.421 mmol、25%)を黄色の固体として得た。¹H-NMR(400 MHz) DMSO: 7.47~7.45(d, 2H)、7.26~7.24(d, 2H)、7.20~7.14(m, 7H)、5.08(s, 1H)、3.76(s, 3H); ¹³C-NMR(100 MHz) DMSO: 159.3、147.4、146.0、144.7、144.1、133.1、129.8、128.6、128.0、126.5、121.7、121.2、120.4、95.3、59.3、37.4、34.5。

10

【0108】

BQU57とRαB-GDPとの間の結合の詳細なNMR滴定を行った。100 μM BQU57の非存在下(黒色)及び存在下(赤紫色)のRαB-GDP(100 μM)のNMRスペクトルを図3Bに示す。用量依存的な化学シフト変化を受ける代表的な残基を図3Cに示す。100 μMのBQU57による化学シフト変化マップを生成したが(図3D)、顕著な化学シフト変化を示す残基の大半(強調表示バー)はスイッチ-II(a70~77)及びヘリックス 2(a78~85)領域に位置していた。RαB-GDPの結晶構造の非存在下で、RαA-GDPに対する配列類似性に基づいて相同性モデルを生成し、薬物の存在下で化学シフト変化を受けた残基をこのモデルにマップした(図3E)。これにより、化学シフト変化の大部分がアロステリック部位に局在化していたことが示され、BQU57が予測部位に結合していることが確認される。RBC8と同様、BQU57(100 μM)はNMRスペクトルの最小化学シフト変化によって示されるようにRαB-GNP(100 μM)に結合しなかった(図2B)。

20

【0109】

NMR化学シフト滴定の分析から、BQU57の結合が薬物の見掛けの溶解性の限界(タンパク質を用いない対照実験においておよそ75 μMと推定される)まで化学量論的であることが明らかになった(図2C)。したがって、RαB-GDPへのBQU57の結合を次いで等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて決定した。ITC実験はMicroCal iTC 200システムを用いて行った。タンパク質及び薬物の両方を50 mM リン酸ナトリウム(pH 7.6)、100 mM NaCl及び1 mM MgCl₂中で調製した。最終DMSO濃度を1%に調整した。RαB-GDPタンパク質(500 μM)をシリンジに充填し、薬物(25 μM)又は対照としてのバッファー単独に滴定した。全ての実験を25℃で行った。ITCによりK_D = 7.7 ± 0.6 μMが得られた(図3F)。この結果を表面プラズマ共鳴(SPR)によって確認した。SPR実験はBiacore 3000システムを用いて行った。泳動バッファー: PBS(pH 7.4)、1 μM GDP、2 mM MgCl₂、3% DMSO。再生バッファー: PBS(pH 7.4)、1 μM GDP、2 mM MgCl₂。RαBタンパク質をCM5チップに固定化し、泳動バッファー中の化合物BQU57のサンプルを30 μL/分で60秒の接触時間にわたって注入し、続いて5分間再生した。アッセイの感度の低さにもかかわらずSPRにより4.7 ± 1.5 μMのK_Dが得られた。

30

40

【0110】

示差走査蛍光測定(DSF)を用いて化合物とRαB-GDPとの間の結合を評価した。タンパク質の疎水性領域に結合するSYPROオレンジの増大をモニタリングすることによって融解温度を測定した。20 mM トリス(pH 8.0)、200 mM NaCl、2.5 mM MgCl₂及び1 mM DTTバッファー中に10 μM RαB-GDP及び10 μM RαB-GPNPP、4×SYPROオレンジを含有するプレートを作製することによってDSFを行った。試験化合物を各ウェルに添加し、DMSOの最終濃度が全てのサンプルにわたって1%であることを確実にした。熱融解曲線をLight cycler 480(Roche)で得た。曲線を正規化し、遷移曲線の中点の温度を得

50

ることによって融解温度を得た。D S F により B Q U 5 7 と R a l B - G D P との間の用量依存的結合が確認され、ヌクレオチド依存性も実証された。

【 0 1 1 1 】

実施例 4 - *in vitro*でのヒト癌細胞成長に対する効果

ヒト肺癌細胞成長に対する R B C 8 及び B Q U 5 7 の効果を評価した。足場非依存性における R a l の役割は既知であるため、軟寒天における成長阻害アッセイを行った。4 つのヒト肺癌細胞 H 2 1 2 2、H 3 5 8、H 4 6 0 及び C a l u 6 を薬物取込み、生物学的特異性及び効果を決定するために一連の実験で利用した。軟寒天における足場非依存性条件下のヒト肺癌細胞の成長阻害を測定するために、様々な濃度の薬物を含有する 3 m l の 0 . 4 % 低融点アガロース中の細胞を 6 ウェルプレート (2 m l の 1 % 低融点アガロースで作られる基層でコーティングした) に 1 ウェル当たり 1 5 0 0 0 細胞播種した。 (細胞株に応じて) インキュベーションの 2 週間 ~ 4 週間後に、細胞を 1 m g / m l の M T T で染色し、コロニーを顕微鏡下で計数した。I C 5 0 値は、D M S O 処理対照と比較してコロニー数の 5 0 % の低減をもたらす薬物の濃度として規定した。

10

【 0 1 1 2 】

s i R N A 処理によって誘導される成長効果については、細胞を記載の方法及び配列を用いて R a l A、R a l B 又はその両方 (R a l A / B) に対する 5 0 n M s i R N A でトランスフェクトした。7 2 時間後、細胞を軟寒天コロニー形成アッセイに供した。

【 0 1 1 3 】

化学遺伝学実験のために、s i R N A 処理細胞を様々な濃度の薬物の存在下で軟寒天に播種した。過剰発現実験のために、F L A G、F L A G - R a l A G 2 3 V 又は F L A G - R a l B G 2 3 V を安定に過剰発現する H 3 5 8 細胞を生成し、細胞を薬物の存在下で軟寒天コロニー形成アッセイに供した。H 2 1 2 2 細胞において F L A G - R a l A G 2 3 V 又は F L A G - R a l B G 2 3 V を安定に過剰発現する試みは失敗に終わり、H 2 1 2 2 を用いたレスキュー実験を F L A G、F L A G - R a l A G 2 3 V 又は F L A G - R a l B G 2 3 V の一過性トランスフェクションの 7 2 時間後に薬物の存在下で軟寒天コロニー形成アッセイを用いて行った。

20

【 0 1 1 4 】

試験化合物がどの程度細胞に入り込むかを定量化するために、H 2 1 2 2 ヒト肺癌細胞を 6 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 3×10^5 細胞播種し、1 6 時間静置した。化合物 (1 0 μ M) を個別に三連で投与した。次いで、細胞を 5 0 0 μ l の氷冷 A C N : M e O H : H₂O (1 : 1 : 1) に異なる時点 (1 分、5 分、1 5 分、3 0 分及び 6 0 分) で採取した。次いで、細胞溶解物中の薬物濃度をマウスにおける薬物動態研究及び薬力学研究に関して記載され、下記実施例 5 に詳細に説明される L C / M S - M S 法を用いて決定した。

30

【 0 1 1 5 】

R B C 8、B Q U 5 7 及び B Q U 8 5 の細胞取込みを試験することにより、全ての薬物が細胞に容易に入り込むことが示された (図 6)。薬物処理により R a l 活性が H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞において阻害されることを確認するために、R a l 活性プルダウンアッセイを行った。細胞を薬物で 3 時間処理し、採取し、R a l 活性を R a l B P 1 プルダウンアッセイキット (Millipore # 1 4 - 4 1 5) を用いて測定した。R B C 5 ではなく、R B C 8 及び B Q U 5 7 が両方の細胞株において R a l A 及び R a l B 活性の両方を阻害した (図 6 E)。

40

【 0 1 1 6 】

付加的に、全ての株が K - R a s s i R N A 枯渇に対して感受性を有することが見出されたが (図 7 A、図 7 B)、H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 のみが R a l ノックダウンに対して感受性を有していた (図 7 C、図 7 D)。この特徴を用いて、密接に関連した G T P アーゼである R a s と比較した R a l に対する化合物の特異性を決定することで、軟寒天におけるコロニー形成の阻害を評価し、H 4 6 0 又は C a l u 6 細胞ではなく R a l 依存性株 H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 が感受性を有することに気付いた (図 4 A、図 4 B、図 4 K)。R B C 8 に対する I C 5 0 は H 2 1 2 2 では 3 . 5 μ M、H 3 5 8 では 3 . 4 μ M、B

50

Q U 5 7 に対する I C 5 0 は H 2 1 2 2 では $2.0 \mu\text{M}$ 、H 3 5 8 では $1.3 \mu\text{M}$ であった。次に、ケモゲノミクス実験を行い、R a l に対する薬物特異性を更に決定した。R B C 8 又は B Q U 5 7 による R a l A 及び R a l B の s i R N A ノックダウンを有する H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞の処理は顕著な更なる阻害をもたらさなかった（図 4 C ~ 図 4 F、図 7 E）。まとめると、このデータから R B C 8、B Q U 5 7 及び B Q U 8 5 が R a l 阻害により足場非依存性成長を低減することが示唆される。

【 0 1 1 7 】

R a l の G T P 型と比較した G D P 型に対する化合物の特異性に対処するために、H 2 1 2 2 及び H 3 5 8 細胞において活性型の R a l A G 2 3 V 又は R a l B G 2 3 V を構成的に過剰発現させた。G 2 3 V 突然変異は G T P 加水分解の R a l G A P 媒介活性化を防止し、したがって R a l をその活性状態にロックする。R a l A G 2 3 V 及び R a l B G 2 3 V の両方が、R B C 8 及び B Q U 5 7 化合物の成長阻害効果をレスキューし得ることが見出された（図 4 G ~ 図 4 J、図 7 F）。

10

【 0 1 1 8 】

実施例 5 - *in vivo* での薬物動態、薬力学及び腫瘍成長

R a l 活性及び腫瘍成長の阻害をヒト肺癌マウスモデルにおいて評価した。R B C 8 及び B Q U 5 7 の薬物動態（P K）をヌードマウスにおいて初めに分析し、バイオアベイラビリティを試験した。単回腹腔内注射（ $50 \text{ mg} / \text{kg}$ ）の後、血液サンプルを投与後 0 ~ 5 時間の時間間隔（9 つの時点）で採取した。曲線下面積（A U C）、C m a x 及び $t_{1/2}$ を含む薬物動態パラメーターを L C - M S / M S によるノンコンパートメント法を用いて推定し、良好な薬物候補を規定する有利な特性が示された（上掲の表 1 を参照されたい）。

20

【 0 1 1 9 】

次に腫瘍組織への化合物の侵入を決定した。そのために、無胸腺ヌードマウス（N c r n u / n u ; National Cancer Institute , Fredrick , MD）を 5 週齢 ~ 6 週齢で入手し、一定の温度及び湿度の滅菌マイクロアイソレーターケージにおいて 2 週間順応させた。マウスに食餌及び水を自由摂取させた。対数増殖期の H 2 1 2 2 細胞を使用日に採取した。細胞を無添加 R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁し、 0.1 mL （ 2×10^5 細胞）を 1 匹のマウス当たり 4 つの部位に s . c . 注射した。H 3 5 8 異種移植片については、細胞（ 5×10^6 ）をマトリゲル（最終濃度 20 %）と混合し、1 つの部位当たり 0.1 mL を s . c . 接種した。細胞接種の後、マウスを毎日モニタリングし、週 2 回体重を量り、腫瘍が認識された時点でキャリパー測定を始めた。腫瘍体積を $(L \times W^2) / 2$ （ここで、L はより長い腫瘍測定値であり、W はより小さい腫瘍測定値である）によって算出した。薬物処理を接種の翌日に開始した。化合物を D M S O に溶解し、週末を除いて毎日 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ で i . p . 注射した。腫瘍サイズを考慮して対照と薬物処理動物との間の体重の差によって評定されるように、対照（D M S O）又は薬物処理動物において明白な毒性は観察されなかった。図 5 A、図 5 B、図 5 G に示されるように、相当量の化合物が投与の 3 時間後に腫瘍組織において検出された。次いで、異種移植腫瘍成長に対する R a l 阻害剤の効果をヌードマウスにおいて試験した。マウスに H 2 1 2 2 ヒト肺癌細胞を皮下接種し、接種の 2 4 時間後に $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ （週末を除く）の R B C 8 で腹腔内処理した。R B C 8 は R a l A 及び R a l B の二重ノックダウン（図 5 E）と同じ程度で腫瘍成長を阻害し（図 5 C 及び図 5 D）、二次肺癌株 H 3 5 8 は同様の結果をもたらした。B Q U 5 7 及び B Q U 8 5 を *in vivo* でも幾つかの異なる用量（ $5 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 及び $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ ）で試験したが、用量依存的な成長阻害効果が観察された（図 5 F、図 5 H）。

30

40

【 0 1 2 0 】

最後に、H 2 1 2 2 異種移植片において *in vivo* での R a l G T P アーゼ活性を評価した。ヌードマウスに 5×10^6 細胞の H 2 1 2 2 細胞を 1 匹のマウス当たり 4 つの部位に s . c . 接種した。腫瘍サイズは 10 日間で平均 250 mm^3 に達し、その時点でマウスに R B C 8 又は B Q U 5 7 の単回 i . p . 投与を様々な濃度で行った。次いで、

50

腫瘍をRBC8又はBQU57注射の3時間後に採取した。次いで、腫瘍サンプルにおけるRα1A及びRα1B活性をRα1BP1プルダウンアッセイキット（Millipore # 14-415）を用いて測定した。腫瘍サンプルにおけるRαs及びRhoA活性を、それぞれのプルダウンアッセイキットを用いて測定した。全ての活性アッセイにウエスタンブロット法を最終読取りとして用いた。免疫ブロットの定量化のために、各ブロットのバンドを初めにそれらのそれぞれの内部対照（最終レーンで泳動した10 ngの組換えRα1、Rαs又はRα1タンパク質）に対して正規化した後、数を各々が1つの処理条件を代表する異なるブロットで比較した。H2122腫瘍（中央サイズ250 mm³）を担持するマウスにRBC8（50 mg / kg）又はBQU57（10 mg / kg、20 mg / kg、50 mg / kg）の単回腹腔内投与を行い、腫瘍を投与の3時間後に採取した。Rα1活性のRα1BP1プルダウン測定から、RBC8及びBQU57によるRα1A及びRα1Bの両方の顕著な阻害が示された。重要なことには、BQU57により誘導される用量依存的なRα1活性の阻害は腫瘍成長の阻害と相関し、Rαs及びRhoA活性がBQU57処理腫瘍においても測定され、顕著な阻害は観察されず、これらのRα1阻害剤の選択性が更に実証された。

10

【0121】

実施例6 - 本発明の化合物の合成

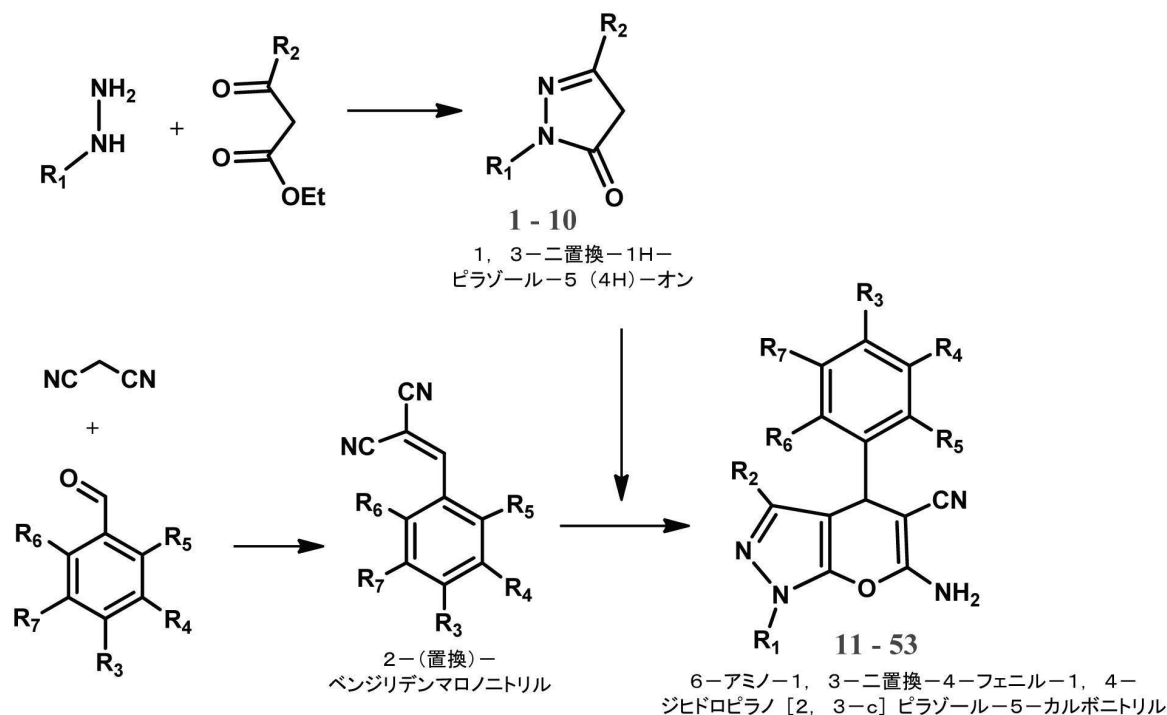
本発明の化合物を以下の合成スキーム及び材料に従って合成した。

【0122】

化合物合成スキーム

20

【化6】



30

40

1, 3 - 二置換 - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン

2 - (置換) - ベンジリデンマロニトリル

6 - アミノ - 1, 3 - 二置換 - 4 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル

【0123】

50

【表 2】

化合物番号	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
1	Ph	Me	---	---	---	---	---
2	Ph	Me	---	---	---	---	---
3	Me	Ph	---	---	---	---	---
4	Ph	Ph	---	---	---	---	---
5	CH ₂ -Ph	Ph	---	---	---	---	---
6	Me	m,p-DiOMe-Ph	---	---	---	---	---
7	Ph	Ph	---	---	---	---	---
8	Ph	p-OMe-Ph	---	---	---	---	---
9	Me	p-OMe-Ph	---	---	---	---	---
10	Me	Me	H	H	H	H	H
11	Me	Ph	H	H	H	H	H
12	Ph	Me	H	H	H	H	H
13	Ph	Ph	H	H	H	H	H
14	Ph	p-OMe-Ph	H	H	H	H	H
15	Me	p-OMe-Ph	H	H	H	H	H
16	Me	m,p-diOMe-Ph	H	H	H	H	H
17	Me	Me	F	H	H	H	H
18	Ph	Me	F	H	H	H	H
19	Me	Ph	F	H	H	H	H
20	Ph	Ph	F	H	H	H	H
21	Me	m,p-diOMe-	F	H	H	H	H

10

20

30

40

50

		Ph						
22	Ph	p-OMe-Ph	F	H	H	H	H	
		m,p-diOMe-						
23	Ph	Ph	F	H	H	H	H	
24	Me	p-OMe-Ph	F	H	H	H	H	
25	Me	Me	H	F	H	H	F	
26	Me	Ph	H	F	H	H	F	
27	Ph	Me	OMe	H	H	H	H	
28	Me	Me	OMe	H	H	H	H	10
29	Me	Ph	OMe	H	H	H	H	
30	Ph	Ph	OMe	H	H	H	H	
31	Ph	p-OMe-Ph	OMe	H	H	H	H	
32	Me	p-OMe-Ph	OMe	H	H	H	H	
33	Me	Me	OMe	F	H	H	H	
34	Me	Me	OMe	H	OMe	OMe	H	
35	Me	Ph	OMe	F	H	H	H	
36	Me	Me	CF ₃	H	H	H	H	
37	Me	Ph	CF ₃	H	H	H	H	
38	Me	Me	O-CF ₃	H	H	H	H	20
39	Me	Ph	O-CF ₃	H	H	H	H	
40	Me	Me	CN	H	H	H	H	
41	Me	Ph	CN	H	H	H	H	
42	Me	Me	CH(CH ₃) ₂	H	H	H	H	
43	Me	Ph	CH(CH ₃) ₂	H	H	H	H	
				CH ₂ -				
44	Me	Me	O-CH ₂ -	O-	H	H	H	
				CH ₂ -				
45	Me	Ph	O-CH ₂ -	O-	H	H	H	30
46	Me	Me	N:	H	H	H	H	
47	Me	Ph	N:	H	H	H	H	
48	Me	Me	H	N:	H	H	H	
49	Me	Ph	H	N:	H	H	H	
50	Me	Me	H	Br	N:	H	H	
51	Me	Ph	H	Br	N:	H	H	
52	Me	Me	イミダゾール	H	H	H	H	
53	Me	Ph	イミダゾール	H	H	H	H	

【 0 1 2 4 】

材料及び方法

アニスアルデヒド、ベンズアルデヒド、1,4-ベンゾジオキサン-6-カルボキサルデヒド、ベンジル-ヒドラジン、6-ブromo-2-ピリジンカルボキサルデヒド、重水素化クロロホルム(CDC13)、重水素化ジメチルスルホキシド(DMSO-d6)、3,5-ジフルオロベンズアルデヒド、アセト酢酸エチル、ベンゾイル酢酸エチル、3,4-ジメトキシベンゾイル酢酸エチル、エチル-ヒドロクプレイン塩酸塩、4-メトキシベンゾイル酢酸エチル、4-フルオロベンズアルデヒド、3-フルオロ-4-メトキシベンズアルデヒド、4-ホルミルベンズニトリル、4-イソプロピルベンズアルデヒド、4-(1H-イミダゾール-1-イル)ベンズアルデヒド、マロノニトリル、メチル-ヒドラジン、フェニル-ヒドラジン、3-ピリジンカルボキサルデヒド、ナトリウムエトキシド

40

50

、トリメチルアミン (T E A)、2, 4, 6 - トリメトキシベンズアルデヒド及び4 - (トリフルオロメトキシ) ベンズアルデヒドはSigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) から購入した。酢酸エチル (E t O A c)、H P L C グレードメタノール (M e O H)、H P L C グレードアセトニトリル (A C N)、H P L C グレード水 (H₂O)、ギ酸、酢酸アンモニウム、ヘキサン及び塩化メチレン (D C M) はFisher Scientific (Pittsburgh, PA) から入手した。エタノールはDecon Laboratories, Inc. (King of Prussia, PA) から購入した。シリカゲル 60 40 µm ~ 63 µmはSorbent Technologies (Norcross, GA) から購入した。

【0125】

¹H及び¹³C NMRスペクトルは400 MHz Bruker NMR、Avance III 400を用いて記録した。化学シフトはppmで報告する。Shimadzu HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.; Columbia, MD) 及びLeap オートサンプラー (LEAP Technologies; Carrboro, NC) を備えるApplied Biosystems Sciex 4000 (Applied Biosystems; Foster City, CA) を使用した。液体クロマトグラフィにはAgilent TechnologiesのZorbax extend-C18 50×4.6 mm、5ミクロンカラムを40、0.4 mL/分の流量で用いた。移動相はA: H₂O中の10 mM (NH₄OAc)、0.1%ギ酸及びB: 50:50のACN: MeOHからなるものであった。用いたクロマトグラフィ法は1.0分間の95%A; 3.0分時点で95%Bまで増加させ、4.5分間保持し、最後に8.5分時点で95%Aに戻し、1.0分間保持することであった(総実行時間9.5分)。合成された化合物を、以下の条件を用いたエレクトロスプレーイオン化陽イオンモード(ESI+)によってモニタリングした: i) 5500 Vのイオンスプレー電圧; ii) 450 の温度; iii) カーテンガス(CUR; 10に設定)及び衝突活性化解離(CAD; 5に設定)ガスは窒素とした; iv) イオン源ガス1(GS1)及び2(GS2); v) 入口電位を10 Vに設定した; vi) 四重極1(Q1)及び(Q3)を単位分解能で設定した; vii) 滞留時間を200ミリ秒に設定した; 並びにviii) デクラスタリング電位(DP)、衝突エネルギー(CE)及び衝突セル出口電位(CXP)を電圧(V)とする。サンプル(10 µL)をLC/MS-MSによって分析した。NMR及びLC/MS-MS分析によって判断されるように、精製された全ての化合物は純度が97%超であった。

【0126】

合成:

3 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (1): アセト酢酸エチル (9.02 mL、71.2 mmol) のEtOH溶液 (130 mL) を、0 においてフェニル - ヒドラジン (7.00 g、64.7 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温した後、60 に加熱した (3時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (EtOAc: ヘキサン; 1:1) によって精製して、1 (7.60 g、43.6 mmol、収率67%) を明黄色の粉末として得た。¹H - NMR (400 MHz) CDCl₃: 7.87 ~ 7.85 (d, 2H)、7.41 ~ 7.37 (t, 2H)、7.19 ~ 7.16 (t, 1H)、3.42 (s, 2H)、2.19 (s, 3H)、¹³C - NMR (100 MHz) CDCl₃: 170.5、156.2、138.0、128.8、125.0、118.8、43.0、17.0; LC/MS-MS: 175.0 77.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 56、CE = 25、CXP = 4、t_R = 3.52分。

【0127】

1, 3 - ジメチル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (2): EtOH (200 mL) 中のアセト酢酸エチル (15.1 mL、119 mmol) を、0 においてメチル - ヒドラジン (5.00 g、109 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温した後、60 に加熱した (3時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルカラムク

ロマトグラフィ (EtOAc : ヘキサン ; 1 : 1) によって精製して、結晶化 (DCM 及びヘキサン) による精製後に 2 (8.02 g、71.5 mmol、収率 66%) をオフホワイト色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) CDCl₃ : 3.25 (s, 3H)、3.16 (s, 2H)、2.08 (s, 3H)、¹³C-NMR (100 MHz) CDCl₃ : 172.2、155.4、138.0、41.3、31.0、16.8。LC/MS-MS : 113.2 82.0 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 61、CE = 25、CXP = 4、t_R = 2.9 分。

【0128】

1-メチル-3-フェニル-1H-ピラゾール-5(4H)-オン(3) : EtOH (180 mL) 中のベンゾイル酢酸エチル (18.4 mL、95.5 mmol) を、0 においてメチル-ヒドラジン (4.57 mL、86.8 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温した後、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (EtOAc : ヘキサン ; 1 : 1) によって精製して、結晶化 (エタノール) による精製後に 3 (11.0 g、63.1 mmol、収率 73%) を明黄色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) CDCl₃ : 7.67 ~ 7.65 (m, 2H)、7.42 ~ 7.41 (m, 3H)、3.60 (s, 2H)、3.41 (s, 3H)、¹³C-NMR (100 MHz) CDCl₃ : 171.8、154.2、131.0、130.3、128.8、125.6、37.9、31.4。LC/MS-MS : 175.0 77.2 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 66、CE = 43、CXP = 4、t_R = 3.45 分。

【0129】

1,3-ジフェニル-1H-ピラゾール-5(4H)-オン(4) : EtOH (130 mL) 中のベンゾイル酢酸エチル (12.2 mL、71.2 mmol) を、0 においてフェニル-ヒドラジン (7.00 g、71.2 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温し、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (EtOAc : ヘキサン ; 1 : 4) 及び結晶化 (EtOH) によって精製して、4 をオフホワイト色の固体 (6.75 g、28.6 mmol、収率 44%) として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO : 11.8 (s, 1H)、7.84 ~ 7.82 (d, 4H)、7.50 ~ 7.40 (m, 4H)、7.34 ~ 7.27 (m, 2H)、6.02 (s, 1H)、¹³C-NMR (100 MHz) DMSO : 154.2、150.0、139.3、133.8、129.3、129.0、128.2、126.1、125.5、121.5、85.5 ; LC/MS-MS : 237.0 77.1 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 81、CE = 68、CXP = 4、t_R = 4.15 分。

【0130】

1-ベンジル-3-フェニル-1H-ピラゾール-5(4H)-オン(5) : ベンゾイル酢酸エチル (4.80 mL、28.2 mmol) の EtOH 溶液 (60 mL) を、0 においてベンジル-ヒドラジン (5.00 g、25.6 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温して、60 に加熱した (16 時間)。反応混合物を濃縮して、EtOH (100 mL) で希釈した後、3.0 g のナトリウムエトキシドを添加し、撹拌した (40 時間)。固体を濾別し溶媒を真空除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (4 : 1 ヘキサン : EtOAc 100% EtOAc) によって精製して、5 (25.5 mg、1.02 mmol、収率 4%) を明橙色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO : 11.2 (s, 1H)、7.71 ~ 7.70 (d, 2H)、7.37 ~ 7.31 (m, 4H)、7.27 ~ 7.20 (m, 4H)、5.85 (s, 1H)、5.13 (s, 2H)、¹³C-NMR (100 MHz) DMSO : 153.6、148.6、138.3、134.4、128.8、128.7、127.6、127.5、125.1、83.7、50.0 ; LC/MS-MS : 251.1 91.1 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 2、CE = 33、CXP = 14、t_R = 4.01 分。

。

10

20

30

40

50

【0131】

3 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (6) : EtOH (60 mL) 中の 3, 4 - ジメトキシベンゾイル酢酸エチル (5.00 g、19.8 mmol) を、0 においてメチル - ヒドラジン (0.95 mL、19.8 mmol、1.0 当量) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温し、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (ヘキサン : EtOAc ; 4 : 1 1 : 1) によって精製して、6 (1.86 g、7.94 mmol、収率 44%) を明黄色の粉末として得た。¹H - NMR (400 MHz) CDCl₃ : 7.35 ~ 7.35 (d, 1H)、7.06 ~ 7.04 (dd, 1H)、6.87 ~ 6.85 (d, 1H)、3.94 (s, 3H)、3.92 (s, 3H)、3.57 (s, 2H)、3.39 (s, 3H) ; ¹³C - NMR (100 MHz) CDCl₃ : 171.6、154.1、151.1、149.4、124.1、119.6、110.7、107.3、55.9、55.9、38.0、31.3 ; LC/MS - MS : 235.1 219.0 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 66、CE = 33、CXP = 14、t_R = 3.26 分。

10

【0132】

3 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン : (7) : EtOH (60 mL) 中の 3, 4 - ジメトキシベンゾイル酢酸エチル (3.00 g、11.9 mmol) を、0 においてフェニル - ヒドラジン (1.17 mL、10.8 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温し、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (ヘキサン : EtOAc ; 4 : 1 1 : 1) によって精製して、結晶化 (EtOH) による精製後に 7 (920 mg、2.32 mmol、収率 22%) を黄色の粉末として得た。¹H - NMR (400 MHz) CDCl₃ : 8.00 ~ 7.97 (d, 1H)、7.48 ~ 7.42 (m, 3H)、7.25 ~ 7.21 (t, 1H)、7.17 ~ 7.14 (dd, 1H)、6.91 ~ 6.89 (d, 1H)、3.98 (s, 3H)、3.95 (s, 3H)、3.83 (s, 2H) ; ¹³C - NMR (100 MHz) CDCl₃ : 170.1、154.4、151.4、149.4、138.1、128.8、125.2、123.8、120.1、119.1、110.7、107.6、56.0、56.0、39.7 ; LC/MS - MS : 297.0 218.2 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 96、CE = 37、CXP = 18、t_R = 3.98 分。

20

30

【0133】

3 - (4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (8) : EtOH (100 mL) 中の 4 - メトキシベンゾイル酢酸エチル (7.00 g、27.8 mmol) を、0 においてフェニル - ヒドラジン (2.50 mL、25.3 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温し、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (ヘキサン : EtOAc ; 4 : 1 1 : 1) によって精製して、結晶化 (EtOH) 後に 3 - (4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (8 ; 5.21 g、19.6 mmol、収率 78%) を明黄色の固体として得た。¹H - NMR (400 MHz) CDCl₃ : 7.99 ~ 7.97 (d, 1H)、7.66 ~ 7.64 (d, 2H)、7.44 ~ 7.40 (t, 2H)、7.22 ~ 7.18 (t, 1H)、6.94 ~ 6.92 (d, 2H)、3.82 (s, 3H)、3.68 (s, 3H) ; ¹³C - NMR (100 MHz) CDCl₃ : 170.1、161.5、154.4、138.2、128.8、127.5、125.0、123.5、118.8、114.2、55.3、39.6 ; LC/MS - MS : 267.0 77.2 m/z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 81、CE = 65、CXP = 4、t_R = 4.15 分。

40

【0134】

3 - (4 - メトキシフェニル) - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 (4 H) - オン (9) : EtOH (100 mL) 中の 4 - メトキシベンゾイル酢酸エチル (7.00 g、2

50

7.8 mmol) を、0 においてメチル - ヒドラジン (1.30 mL、25.2 mmol) で処理した。混合物を常温へとゆっくりと加温し、60 に加熱した (3 時間)。溶媒を真空除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (ヘキサン: EtOAc; 4:1 1:1) によって精製して、EtOH からの結晶化後に 9 (3.00 g、14.7 mmol、収率 58%) を明黄色の固体として得た。¹H - NMR (400 MHz) DMSO: 10.9 (s, 1H)、7.63 ~ 7.60 (d, 2H)、6.92 ~ 6.90 (d, 2H)、5.70 (s, 1H)、3.76 (s, 3H)、3.54 (s, 3H); ¹³C - NMR (100 MHz) CDCl₃: 161.1、153.4、147.9、126.3、114.6、114.4、83.1、59.7、31.3; LC/MS - MS: 205.0 190.1 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 51、CE = 29、CXP = 12、t_R = 3.44 分。

10

【0135】

6 - アミノ - 1, 3 - ジメチル - 4 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (10): EtOH (10 mL) 中のベンズアルデヒド (290 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及び TEA (400 µL、2.87 mmol) の混合物を 1.0 分間攪拌し、その後 2 (322 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 19 時間後に濃縮して、EtOH 及びヘキサンで洗浄した。粗物質を SiO₂ カラムクロマトグラフィ (ヘキサン中、25% EtOAc から 100% EtOAc まで増加させる) によって精製した後、EtOH から再結晶化して、10 (263 mg、0.988 mmol、収率 34%) を黄色の粉末として得た。¹H - NMR (400 MHz) DMSO: 7.34 ~ 7.32 (m, 2H)、7.25 ~ 7.23 (t, 1H)、7.19 ~ 7.17 (d, 2H)、7.05 (s, 2H)、4.57 (s, 1H)、3.60 (s, 3H)、1.66 (s, 3H); ¹³C - NMR (100 MHz) DMSO: 159.9、144.6、144.4、142.9、128.8、128.0、127.3、120.6、96.5、58.7、37.5、33.8、12.8; LC/MS - MS: 267.0 201.3 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 61、CE = 29、CXP = 12、t_R = 3.74 分。

20

【0136】

6 - アミノ - 1 - メチル - 3, 4 - ジフェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (11): EtOH (10 mL) 中のベンズアルデヒド (290 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及び TEA (400 µL、2.87 mmol) からなる混合物を 1.0 分間攪拌し、その後 3 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 21 時間後に濃縮して、EtOH 及びヘキサンで洗浄した。EtOH から再結晶化して、11 (282 mg、8.58 mmol、収率 30%) を白色の固体として得た。¹H - NMR (400 MHz) DMSO: 7.41 ~ 7.38 (m, 2H)、7.28 ~ 7.24 (m, 2H)、7.21 ~ 7.18 (m, 6H)、4.88 (s, 1H)、4.77 (s, 2H)、3.83 (s, 3H); ¹³C - NMR (100 MHz) DMSO: 158.1、146.0、144.8、144.6、133.2、128.7、128.5、127.9、127.8、127.1、126.4、120.5、95.7、59.9、38.2、34.5; LC/MS - MS: 329.1 263.1 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 71、CE = 31、CXP = 18、t_R = 4.00 分。

30

40

【0137】

6 - アミノ - 3 - メチル - 1, 4 - ジフェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (12): ベンズアルデヒド (290 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及び 1 (500 mg、2.87 mmol) の無水 DCM 攪拌溶液 (60 mL) に、無水 Na₂SO₄ (407 mg、2.87 mmol) 及びエチル - ヒドロクブレイン塩酸塩 (46 mg、0.122 mmol) を添加した。反応混合物を室温で攪拌した (25 時間)。濾過及び DCM による洗浄後、溶媒を減圧除去した。粗混合物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィ (

50

ヘキサン：EtOAc；1：1）に供して、12（270mg、0.822mmol、収率29%）を白色の固体として得た。¹H-NMR（400MHz）CDCl₃：7.69～7.66（d，2H）、7.50～7.46（t，2H）、7.39～7.26（m，6H）、4.68（s，1H）、4.67（s，2H）、1.91（s，3H）；¹³C-NMR（100MHz）CDCl₃：158.1、146.4、143.8、141.9、137.5、129.2、128.8、127.8、127.5、126.7、121.2、119.0、98.3、64.0、37.4、12.8；LC/MS-MS：329.1 263.1m/z；30のGS1及びGS2、DP=56、CE=31、CXP=18、t_R=4.18分。

【0138】

6-アミノ-1,3,4-トリフェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル（13）：EtOH（10mL）中のベンズアルデヒド（290μL、2.87mmol）、マロノニトリル（190mg、2.87mmol）及びTEA（400μL、2.87mmol）の混合物を1.0分間攪拌し、その後4（678mg、2.87mmol）を添加した。析出物を濾別し、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、13（330mg、0.845mmol、収率29%）を白色の固体として得た。¹H-NMR（400MHz）CDCl₃：7.82～7.80（d，2H）、7.55～7.50（m，4H）、7.41～7.37（t，1H）、7.32～7.22（m，8H）、4.96（s，1H）、4.68（s，2H）；¹³C-NMR（100MHz）CDCl₃：157.5、147.7、144.9、142.6、137.5、132.2、129.3、128.8、128.2、128.1、127.5、127.4、127.1、126.9、121.6、118.9、97.5、64.8、38.2；LC/MS-MS：391.1 325.0m/z；30のGS1及びGS2、DP=91、CE=33、CXP=22、t_R=4.33分。

【0139】

6-アミノ-3-（4-メトキシフェニル）-1,4-ジフェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル（14）：EtOH（10mL）中のベンズアルデヒド（290μL、2.87mmol、1.0当量）、マロノニトリル（190mg、2.87mmol、1.0当量）及びTEA（400μL、2.87mmol、1.0当量）の混合物を1.0分間攪拌し、その後8（764mg、2.87mmol）を添加した。反応混合物を19時間後に濃縮して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、14（695mg、1.65mmol、収率58%）を白色の固体として得た。¹H-NMR（400MHz）DMSO：7.94～7.92（d，2H）、7.58～7.53（m，4H）、7.41～7.37（t，1H）、7.27～7.16（m，7H）、6.83～6.81（d，2H）、5.04（s，1H）、3.71（s，3H）；¹³C-NMR（100MHz）DMSO：159.5、159.0、146.6、145.6、144.5、137.9、129.8、128.9、128.3、128.0、127.3、127.1、125.1、121.1、120.3、114.1、97.5、59.8、55.5、37.9；LC/MS-MS：421.2 355.0m/z；30のGS1及びGS2、DP=71、CE=33、CXP=24、t_R=4.3分。

【0140】

6-アミノ-3-（4-メトキシフェニル）-1-メチル-4-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル（15）：EtOH（10mL）中のベンズアルデヒド（290μL、2.87mmol、1.0当量）、マロノニトリル（190mg、2.87mmol、1.0当量）及びTEA（400μL、2.87mmol、1.0当量）の混合物を1.0分間攪拌し、その後9（583mg、2.87mmol）を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮した。粗物質をカラムクロマトグラフィ（ヘキサン中、25%EtOAcから100%EtOAcまで増加させる）によって精製した後、EtOHから再結晶化して、15（80.9mg、収率8%、0.22

10

20

30

40

50

6 mmol) を黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.42 ~ 7.40 (d, 2H)、7.23 ~ 7.21 (m, 2H)、7.15 ~ 7.13 (d, 3H)、7.06 (s, 2H)、6.77 ~ 6.75 (d, 2H)、4.93 (s, 1H)、3.76 (s, 3H)、3.69 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.1、159.0、145.9、144.8、144.5、128.8、127.8、127.7、127.1、125.8、120.5、113.9、95.0、59.9、55.4、38.2、34.4; LC/MS-MS: 359.1 293.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 76、CE = 31、CXP = 20、 t_R = 4.0分。

【0141】

6 - アミノ - 3 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 1 - メチル - 4 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (16): EtOH (5.0 mL) 中のベンズアルデヒド (145 μL 、1.44 mmol)、マロノニトリル (90.0 mg、1.44 mmol) 及びTEA (200 μL 、1.44 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後6 (336 mg、1.44 mmol) を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮した。粗物質をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン中、25% EtOAc から100% EtOAc まで増加させる) によって精製した後、EtOH から再結晶化して、16 (48.5 mg、収率9%、0.124 mmol) を黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) CDCl₃: 7.29 ~ 7.28 (d, 2H)、7.23 ~ 7.21 (d, 2H)、7.00 ~ 6.98 (d, 1H)、6.88 (s, 1H)、6.72 ~ 6.70 (d, 2H)、4.84 (s, 1H)、4.75 (s, 2H)、3.82 (s, 6H)、3.60 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) CDCl₃: 157.6、148.7、148.6、146.1、145.7、143.1、128.9、127.5、127.4、125.6、119.3、119.2、110.9、109.7、94.7、64.4、55.7、55.6、38.3、34.1; LC/MS-MS: 389.1 323.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 66、CE = 31、CXP = 22、 t_R = 3.82分。

【0142】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1, 3 - ジメチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (17): EtOH (8.0 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及びTEA (400 mL、2.87 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後2 (322 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、17 (335 mg、収率41%、1.17 mmol) を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.23 ~ 7.20 (m, 2H)、7.16 ~ 7.12 (m, 2H)、7.07 (s, 2H)、4.61 (s, 1H)、3.60 (s, 3H)、1.67 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 162.7、159.9 (d)、144.6、142.9、140.7、129.9、120.6、115.5 (d)、96.3、56.4、36.7、33.8、12.8; LC/MS-MS: 285.1 219.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 61、CE = 27、CXP = 14、 t_R = 3.8分。

【0143】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - メチル - 1 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (18): EtOH (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (356 mg、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol、1.0当量) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後1 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を18時間後に濃縮して、析出物を濾過し、EtOHから再結晶化して、18 (85.0 mg、0.245 mmol、収率9%) を白色の固体として得た

。 ^1H -NMR (400 MHz) CDCl_3 : 7.68 ~ 7.66 (d, 2H)、7.50 ~ 7.46 (t, 2H)、7.34 ~ 7.32 (t, 1H)、7.28 ~ 7.22 (m, 2H) 7.08 ~ 7.04 (t, 2H)、4.68 (s, 3H)、1.91 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) CDCl_3 : 158.0、146.2、143.7、137.8、137.5、129.4、129.2、126.8、121.2、118.8、115.8、115.6、98.1、63.8、36.7、12.8; LC/MS-MS: 347.1 281.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 11、CE = 31、CXP = 18、 t_R = 4.16分。

【0144】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - メチル - 3 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (19): EtOH (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後3 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を20時間後に真空濃縮して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、19 (182 mg、0.525 mmol、収率18%) を明黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.50 ~ 7.48 (d, 2H)、7.22 ~ 7.18 (m, 5H)、7.11 (s, 2H)、7.05 ~ 6.98 (t, 2H) 5.04 (s, 1H)、3.78 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 162.5、159.1、146.0、144.6、140.9、133.1、129.8 (d)、128.5、127.9、126.5、120.4、115.4 (d)、95.5、59.7、37.4、34.5; LC/MS-MS: 347.1 281.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 66、CE = 31、CXP = 14、 t_R = 4.0分。

【0145】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1, 3 - ジフェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (20): エタノール (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後4 (678 mg、2.87 mmol) を添加した。18時間後に形成された析出物を濾別して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、20 (240 mg、0.588 mmol、収率20%) を白色の粉末として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.94 ~ 7.92 (d, 2H)、7.61 ~ 7.55 (m, 4H)、7.42 ~ 7.38 (t, 1H)、7.28 ~ 7.24 (m, 7H)、7.06 ~ 7.02 (t, 2H)、5.15 (s, 1H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 162.6、159.0、146.8、145.6、140.6、137.8、132.5、130.0、129.9 (d)、128.6、128.6、127.3、127.0、121.3、120.2、115.5 (d)、97.9、59.6、37.0; LC/MS-MS: 410.4 242.2 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 21、CE = 47、CXP = 16、 t_R = 4.6分。

【0146】

6 - アミノ - 3 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - メチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (21): EtOH (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol、1.0当量) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol) の混合物を1.0分間攪拌し、その後6 (672 mg、2.87 mmol) を添加した。17時間後に形成された析出物を濾別して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、21 (782 mg、1.93 mmol、収率67%) を白色の粉末として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.20 ~ 7.18 (m, 2H)、7.09 ~ 7.03 (m, 5H)、6.96 ~ 6.9

10

20

30

40

50

5 (d, 1H)、6.80~6.78 (d, 1H)、5.02 (s, 1H)、3.77 (s, 3H)、3.69 (s, 3H)、3.62 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 162.6、159.0、148.7、146.0、144.6、141.0、129.8、129.7、125.9、120.4、119.0、115.7、115.4、111.8、109.8、94.7、55.8、55.7、37.3、34.4; LC/MS-MS: 407.1 341.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 71、CE = 33、CXP = 22、 t_R = 3.9分。

【0147】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - (4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (22) : EtOH (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol、1.0当量)の混合物を1.0分間攪拌し、その後8 (764 mg、2.87 mmol)を添加した。17時間後に形成された析出物を濾別して、EtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、22 (800 mg、1.83 mmol、収率64%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.93~7.91 (d, 2H)、7.55~7.53 (m, 4H)、7.41~7.37 (t, 1H)、7.26~7.23 (m, 4H)、7.07~7.05 (t, 2H)、6.84~6.82 (d, 2H)、5.11 (s, 1H)、3.72 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 162.6、159.0、146.6、145.5、140.7、140.6、137.9、130.0、129.9 (d)、128.3、127.1、125.0、121.1、120.2、115.5 (d)、114.1、97.3、59.6、55.5、37.0; LC/MS-MS: 439.2 373.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 61、CE = 35、CXP = 24、 t_R = 4.3分。

【0148】

6 - アミノ - 3 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (23) : EtOH (3.0 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (70.0 μL 、0.675 mmol)、マロノニトリル (45.0 mg、0.675 mmol) 及びTEA (90.0 μL 、0.675 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後7 (200 mg、0.675 mmol)を添加した。反応混合物を19時間後に濃縮して、粗物質をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン中、25% EtOAcから100% EtOAcまで増加させる) によって精製した。黄色の固体をEtOHからの再結晶化によって更に精製して、23 (164 mg、0.350 mmol、収率12%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) CDCl₃: 7.80~7.78 (d, 2H)、7.52~7.48 (t, 2H)、7.38~7.35 (t, 1H)、7.25~7.21 (m, 2H)、7.05~6.95 (m, 4H)、6.75~6.73 (d, 1H)、4.91 (s, 1H)、4.84 (s, 2H)、3.84 (s, 3H)、3.71 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) CDCl₃: 163.2、157.8、149.2、148.7、147.5、144.9、138.6、137.4、129.3、129.1 (d)、127.1、125.0、121.5、119.8、119.0、115.8 (d)、110.8、109.9、96.6、64.0、55.8、55.7、37.5; LC/MS-MS: 469.3 403.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 6、CE = 35、CXP = 26、 t_R = 4.2分。

【0149】

6 - アミノ - 4 - (4 - フルオロフェニル) - 3 - (4 - メトキシフェニル) - 1 - メチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (24) : EtOH (10 mL) 中の4 - フルオロベンズアルデヒド (300 μL 、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及びTEA (400 μL 、2.87 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後9 (586 mg、2.87 mmol)

10

20

30

40

50

1) を添加した。反応混合物を 19 時間後に濃縮して、形成された析出物を EtOH 及びヘキサンで洗浄し、EtOH から再結晶化して、24 (350 mg、0.930 mmol、収率 32%) を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.43~7.40 (d, 2H)、7.20~7.16 (m, 2H)、7.10 (s, 2H)、7.06~7.02 (t, 2H)、6.78~6.76 (d, 2H)、4.99 (s, 1H)、3.75 (s, 3H)、3.69 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) DMSO: 162.5、159.1、145.8、144.6、141.0、141.0、129.8 (d)、127.8、125.7、120.5、115.5 (d)、113.9、94.9、59.7、55.4、37.4、34.4; LC/MS-MS: 377.1 311.1 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 66、CE = 33、CXP = 20、t_R = 4.0 分。

10

【0150】

6-アミノ-4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1,3-ジメチル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(25): EtOH (10 mL) 中の 3,5-ジフルオロベンズアルデヒド (0.408 g、2.87 mmol)、マロノニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 5 分間攪拌し、その後 2 (0.321 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 23 時間後に濃縮して、粗物質を EtOH から再結晶化し、EtOH 及び n-ヘキサンで洗浄して、25 (291 mg、0.963 mmol、収率 34%) を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.15 (br-s, 2H)、7.09~7.05 (t, 1H)、6.92~6.89 (m, 2H)、4.66 (s, 1H)、3.57 (s, 3H)、1.68 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) DMSO: 163.9 (d, CF)、163.8 (d, CF)、160.2、149.2 (t)、144.8、142.9、120.4、111.2 (m)、102.9 (t)、95.4、57.5、37.1、33.9、12.8。LC/MS-MS: 303.9 236.9 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 11、CE = 31、CXP = 16、t_R = 4.19 分。

20

【0151】

6-アミノ-4-(3,5-ジフルオロフェニル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(26): EtOH (10 mL) 中の 3,5-ジフルオロベンズアルデヒド (0.408 g、2.87 mmol)、マロノニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 3 (0.500 g、2.87 mmol、1 当量) を添加した。反応混合物を 23 時間後に濃縮し、粗物質を EtOH から再結晶化して、26 (282 mg、0.77 mmol、収率 27%) を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.48~7.47 (d, 2H)、7.24~7.17 (m, 5H)、6.97~6.92 (m, 1H)、6.87~6.85 (d, 2H)、5.11 (s, 1H)、3.74 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) DMSO: 163.5 (d, CF)、163.5 (d, CF)、159.5、146.1、144.7、133.0、128.6、128.1、126.6、126.5、120.2、111.3 (d)、102.8、95.5、58.5、37.6、34.6。LC/MS-MS: 365.1 299.0 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 86、CE = 27、CXP = 20、t_R = 4.38 分。

30

40

【0152】

6-アミノ-4-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-1-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(27): EtOH (10 mL) 中のアニスアルデヒド (350 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル (190 mg、2.87 mmol) 及び TEA (400 µL、2.87 mmol) の混合物を 1.0 分間攪拌し、その後 1 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 24 時間後に濃縮して、析出物を EtOH 及びヘキサンで洗浄し、EtOH から再結晶化

50

して、27 (800 mg、収率78%、2.23 mmol) を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.80~7.78 (d, 2H)、7.51~7.47 (t, 2H)、7.32~7.28 (t, 1H)、7.18~7.16 (m, 4H)、6.91~6.89 (d, 2H)、4.62 (s, 1H)、3.74 (s, 3H)、1.79 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) DMSO: 159.7、158.6、145.7、144.2、138.0、136.0、129.7、129.2、126.5、120.5、120.3、114.3、99.3、59.0、55.4、36.4、13.0; LC/MS-MS: 359.2 293.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=71、CE=29、CXP=20、t_R=4.14分。

【0153】

6-アミノ-4-(4-メトキシフェニル)-1,3-ジメチル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(28): EtOH(10 mL)中のアニスアルデヒド(350 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル(190 mg、2.87 mmol)及びTEA(400 µL、2.87 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後2(321 mg、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、粗物質をカラムクロマトグラフィ(ヘキサン中、25% EtOAcから100% EtOAcまで増加させる)によって精製した。黄色の固体をEtOH及びヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、28(370 mg、1.25 mmol、収率44%)を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) CDCl₃: 7.12~7.10 (d, 2H)、6.85~6.83 (d, 2H)、4.61 (s, 2H)、4.55 (s, 1H)、3.79 (s, 3H)、3.69 (s, 3H)、1.80 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) CDCl₃: 158.8、157.9、144.5、144.4、134.5、128.8、119.3、114.0、96.4、64.2、55.2、36.7、33.7、12.7; LC/MS-MS: 297.0 231.2 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=61、CE=27、CXP=16、t_R=3.71分。

【0154】

6-アミノ-4-(4-メトキシフェニル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(29): EtOH(10 mL)中のアニスアルデヒド(350 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル(190 mg、2.87 mmol)及びTEA(400 µL、2.87 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後3(500 mg、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、析出物をEtOH及びヘキサンで洗浄し、生成物をEtOHから再結晶化して、29(210 mg、収率20%、0.586 mmol)を白色の固体として得た。¹H-NMR (400 MHz) DMSO: 7.50~7.48 (d, 2H)、7.21~7.17 (m, 3H)、7.05~7.02 (m, 4H)、6.76~6.74 (d, 2H)、4.91 (s, 1H)、3.76 (s, 3H)、3.64 (s, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz) DMSO: 158.9、158.3、146.0、144.6、136.9、133.2、128.9、128.5、127.8、126.4、120.6、114.1、95.9、60.3、55.3、37.5、34.5; LC/MS-MS: 359.2 293.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=66、CE=29、CXP=20、t_R=3.98分。

【0155】

6-アミノ-4-(4-メトキシフェニル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(30): EtOH(10 mL)中のアニスアルデヒド(350 µL、2.87 mmol)、マロノニトリル(190 mg、2.87 mmol)及びTEA(400 µL、2.87 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後4(678 mg、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、析出物をEtOH及びヘキサンで洗浄した。生成物をEtOHから再結晶化して、30(1.05 g、収率87%、2.50 mmol)を白色の固体とし

10

20

30

40

50

て得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.94~7.92 (d, 2H)、7.63~7.61 (d, 2H)、7.57~7.53 (t, 2H)、7.40~7.36 (t, 1H)、7.29~7.23 (m, 3H) 7.15 (s, 2H)、7.13~7.11 (d, 2H)、6.78~6.76 (d, 2H)、5.02 (s, 1H)、3.65 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 158.9、158.4、146.7、145.6、137.9、136.5、132.6、129.8、129.0、128.7、128.5、127.2、127.0、121.2、120.3、114.2、98.3、60.2、55.3、37.1; LC/MS-MS: 421.2 355.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=81、CE=35、CXP=24、t_R=4.32分。

【0156】

6-アミノ-3,4-ビス(4-メトキシフェニル)-1-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(31): EtOH(10 mL)中のアニスアルデヒド(350 μL、2.87 mmol、1.0当量)、マロノニトリル(190 mg、2.87 mmol、1.0当量)及びTEA(400 μL、2.87 mmol、1.0当量)の混合物を1.0分間攪拌し、その後8(764 mg、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、析出物をEtOH及びヘキサンで洗浄した後、EtOHから再結晶化して、31(1.06 g、2.35 mmol、収率82%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.93~7.91 (d, 2H)、7.56~7.52 (m, 4H)、7.38~7.35 (t, 1H)、7.15~7.11 (m, 4H)、6.83~6.78 (m, 4H)、4.98 (s, 1H)、3.70 (s, 3H)、3.66 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.5、158.9、158.4、146.6、145.5、137.9、136.6、129.8、129.0、128.3、127.0、125.2、121.0、120.4、114.2、114.1、97.7、60.3、55.5、55.3、37.1; LC/MS-MS: 452.3 89.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=36、CE=39、CXP=4、t_R=3.47分。

【0157】

6-アミノ-3,4-ビス(4-メトキシフェニル)-1-メチル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(32): エタノール(10 mL)中のアニスアルデヒド(350 μL、2.87 mmol)、マロノニトリル(190 mg、2.87 mmol)及びTEA(400 μL、2.87 mmol)の混合物を1.0分間攪拌し、その後9(689 mg、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を24時間後に濃縮して、析出物をEtOH及びヘキサンで洗浄した後、EtOHから再結晶化して、32(690 mg、1.78 mmol、収率62%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.42~7.40 (d, 2H)、7.05~7.03 (d, 2H)、7.00 (s, 2H)、6.78~6.75 (dd, 4H)、4.86 (s, 1H)、3.73 (s, 3H)、3.68 (s, 3H)、3.66 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.0、158.9、158.3、145.9、144.5、136.9、128.9、127.7、125.9、120.6、114.1、113.9、95.3、60.3、55.4、55.3、37.5、34.3; LC/MS-MS: 389.2 323.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP=66、CE=29、CXP=22、t_R=3.94分。

【0158】

6-アミノ-4-(3-フルオロ-4-メトキシフェニル)-1,3-ジメチル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(33): EtOH(10 mL)中の3-フルオロ-4-メトキシベンズアルデヒド(0.442 g、2.87 mmol)、マロノニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を5分間攪拌し、その後2(0.321 g、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を18時間後に濃縮して、粗物質をEtOHから再

10

20

30

40

50

結晶化し、固体をEtOH及びn-ヘキサンで洗浄して、31(475mg、1.51mmol、収率53%)を明橙色の固体として得た。¹H-NMR(400MHz)DMSO: 7.10~7.04(m, 3H)、6.95~6.93(m, 2H)、4.53(s, 1H)、3.79(s, 3H)、3.56(s, 3H)、1.65(s, 3H); ¹³C-NMR(100MHz)DMSO: 159.9、153.0(d, CF)、146.4(d)、144.6、142.9、137.6(d)、124.1、120.6、115.4(d)、114.0、96.2、58.5、56.4、36.6、33.9、12.8。LC/MS-MS: 315.0 248.9m/z; 30のGS1及びGS2、DP=66、CE=27、CXP=16、t_R=4.05分。

【0159】

6-アミノ-1,3-ジメチル-4-(2,4,6-トリメトキシフェニル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(34): EtOH(10mL)中の2,4,6-トリメトキシベンズアルデヒド(0.563g、2.87mmol)、マロノニトリル(0.190g、2.87mmol)及びTEA(0.40mL、2.87mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後2(0.321g、2.87mmol)を添加した。反応混合物を26時間後に濃縮した。粗物質をSiO₂カラムクロマトグラフィ(DCM中、2%MeOH)によって精製した。黄色の固体をEtOHから再結晶化し、EtOH及びn-ヘキサンで洗浄して、34(60mg、0.168mmol、収率6%)を黄色の固体として得た。¹H-NMR(400MHz)DMSO: 6.72(s, 2H)、6.20(brs, 2H)、4.97(s, 1H)、3.72(s, 6H)、3.53(s, 6H)、1.65(s, 3H); ¹³C-NMR(100MHz)DMSO: 161.3、160.1、145.4、142.1、121.3、111.7、96.5、93.1、91.2、57.0、56.6、55.5、33.7、26.1、12.2。LC/MS-MS: 357.1 189.0m/z; 30のGS1及びGS2、DP=56、CE=29、CXP=12、t_R=4.07分。

【0160】

6-アミノ-4-(3-フルオロ-4-メトキシフェニル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(35): EtOH(10mL)中の3-フルオロ-4-メトキシベンズアルデヒド(0.442g、2.87mmol)、マロノニトリル(0.190g、2.87mmol)及びTEA(0.40mL、2.87mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後3(0.500g、2.87mmol)を添加した。反応混合物を18時間後に濃縮し、粗物質をEtOHから再結晶化して、35(348mg、0.927mmol、収率33%)を白色の固体として得た。¹H-NMR(400MHz)DMSO: 7.50~4.8(d, 2H)、7.22~7.15(m, 3H)、7.07(brs, 2H)、6.97~6.89(m, 3H)、4.96(s, 1H)、3.74(s, 3H)、3.71(s, 3H); ¹³C-NMR(100MHz)DMSO: 159.1、152.8(d, CF)、146.1(d)、146.0、144.6、137.9(d)、133.2、128.6、127.9、126.5、124.0、120.5、115.2(d)、113.9、95.4、59.7、56.3、37.2、34.5。LC/MS-MS: 377.1 311.1m/z; 30のGS1及びGS2、DP=66、CE=31、CXP=20、t_R=4.27分。

【0161】

6-アミノ-1,3-ジメチル-4-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(36): EtOH(10mL)中の4-(トリフルオロメチル)ベンズアルデヒド(0.500g、2.87mmol)、マロノニトリル(0.190g、2.87mmol)及びTEA(0.40mL、2.87mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後2(0.321g、2.87mmol)を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮し、SiO₂カラムクロマトグラフィ(DCM中、2%MeOH)によって精製し、36(445mg、1.33mmol、収率46%)を白色の固体として得た。¹H-NMR(400MHz)DMSO: 7.50~7.40(d, 2H)、7.22~7.15(m, 3H)、7.07(brs, 2H)、6.97~6.89(m, 3H)、4.96(s, 1H)、3.74(s, 3H)、3.71(s, 3H); ¹³C-NMR(100MHz)DMSO: 159.1、152.8(d, CF)、146.1(d)、146.0、144.6、137.9(d)、133.2、128.6、127.9、126.5、124.0、120.5、115.2(d)、113.9、95.4、59.7、56.3、37.2、34.5。LC/MS-MS: 377.1 311.1m/z; 30のGS1及びGS2、DP=66、CE=31、CXP=20、t_R=4.27分。

o 1、収率 46%) を黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.28 (s, 4H)、7.10 (brs, 2H)、4.64 (s, 1H)、3.57 (s, 3H)、1.64 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.1、147.6、144.7、143.9、142.9、129.9、122.3、121.4、120.6、96.2、58.2、36.8、33.9、12.8。LC/MS-MS: 337.2 59.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 26、CE = 31、CXP = 10、 t_R = 5.10分。

【0162】

6 - アミノ - 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - (トリフルオロメチル)フェニル) - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (37): EtOH (6 mL) 中の 4 - (トリフルオロメチル)ベンズアルデヒド (0.300 g、1.72 mmol)、マロノニトリル (0.114 g、1.72 mmol) 及び TEA (0.240 mL、1.72 mmol) の混合物を 1.0 分間攪拌し、その後 3 (300 mg、1.72 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濃縮して、 SiO_2 カラムクロマトグラフィ (DCM 中 2% MeOH、次いで EtOAc: ヘキサン (1:1)) によって 2 回精製して、37 (120 mg、0.301 mmol、収率 18%) を明黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.58 ~ 7.56 (d, 2H)、7.49 ~ 7.47 (d, 2H)、7.37 ~ 7.35 (d, 2H)、7.20 ~ 7.17 (m, 5H)、5.17 (s, 1H)、3.77 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.4、149.3、146.1、144.7、133.0、128.8、128.6、128.0、126.4、126.0、125.7 (d)、123.3、120.3、94.9、59.0、37.9、34.6。LC/MS-MS: 397.1 331.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 96、CE = 33、CXP = 22、 t_R = 4.44分。

【0163】

6 - アミノ - 1, 3 - ジメチル - 4 - (4 - (トリフルオロメトキシ)フェニル) - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (38): EtOH (10 mL) 中の 4 - (トリフルオロメトキシ)ベンズアルデヒド (0.546 g、2.87 mmol)、マロノニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 2 (0.321 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濃縮し、 SiO_2 カラムクロマトグラフィ (DCM 中、2% MeOH) によって精製して、38 (359 mg、1.03 mmol、収率 36%) を橙色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.68 ~ 7.66 (d, 2H)、7.40 ~ 7.38 (d, 2H)、7.14 (brs, 2H)、4.71 (s, 1H)、3.58 (s, 3H)、1.64 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.2、149.2、144.7、142.9、129.0、127.2、125.9、124.1、120.5、95.8、57.8、37.2、33.9、12.8。LC/MS-MS: 352.0 335.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 26、CE = 9、CXP = 24、 t_R = 4.31分。

【0164】

6 - アミノ - 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - (トリフルオロメトキシ)フェニル) - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (39): EtOH (6 mL) 中の 4 - (トリフルオロメトキシ)ベンズアルデヒド (0.327 g、1.72 mmol)、マロノニトリル (0.114 g、1.72 mmol) 及び TEA (0.240 mL、1.72 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 3 (300 mg、1.72 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濃縮して、 SiO_2 カラムクロマトグラフィ (DCM 中、2% MeOH) によって精製して、39 (174 mg、0.421 mmol、収率 25%) を黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.47 ~ 7.45 (d, 2H)、7.26 ~ 7.24 (d, 2H)、

10

20

30

40

50

7.20 ~ 7.14 (m, 7H)、5.08 (s, 1H)、3.76 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.3、147.4、146.0、144.7、144.1、133.1、129.8、128.6、128.0、126.5、121.7、121.2、120.4、95.3、59.3、37.4、34.5。LC/MS-MS: 413.1 346.9 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 86、CE = 33、CXP = 24、 t_R = 4.49分。

【0165】

6 - アミノ - 4 - (4 - シアノフェニル) - 1, 3 - ジメチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (40): EtOH (10 mL) 中の4 - ホルミルベンゾニトリル (0.376 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及びTEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を10分間攪拌し、その後2 (0.321 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を18時間後に濃縮して、粗物質をSiO₂ カラムクロマトグラフィ (DCM中、2% MeOH) によって精製した。黄色の固体をEtOH及びn - ヘキサンで洗浄し、EtOHから再結晶化して、40 (484 mg、1.66 mmol、収率58%) をオフホワイト色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.78 ~ 7.76 (d, 2H)、7.38 ~ 7.36 (d, 2H)、7.17 (brs, 2H)、4.70 (s, 1H)、3.57 (s, 3H)、1.63 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.2、150.1、144.7、142.9、133.0、129.2、120.4、119.2、110.2、95.6、57.5、37.4、33.9、12.8。LC/MS-MS: 292.0 226.2 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 51、CE = 31、CXP = 14、 t_R = 3.90分。

【0166】

6 - アミノ - 4 - (4 - シアノフェニル) - 1 - メチル - 3 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (41): EtOH (10 mL) 中の4 - ホルミルベンゾニトリル (0.376 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及びTEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を10分間攪拌し、その後3 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を18時間後に濃縮し、粗物質をEtOH及びn - ヘキサンからの再結晶化によって精製して、41 (160 mg、0.453 mmol、収率16%) をオフホワイト色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.68 ~ 7.66 (d, 2H)、7.48 ~ 7.46 (d, 2H)、7.35 ~ 7.33 (d, 2H)、7.22 ~ 7.19 (m, 5H)、5.17 (s, 1H)、3.77 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.4、150.2、146.1、144.7、133.0、132.8、129.1、128.7、128.1、126.5、120.2、119.1、110.0、94.7、58.6、38.0、34.6。LC/MS-MS: 354.2 288.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 66、CE = 33、CXP = 20、 t_R = 4.21分。

【0167】

6 - アミノ - 4 - (4 - イソプロピルフェニル) - 1, 3 - ジメチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ [2, 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (42): EtOH (10 mL) 中の4 - イソプロピルベンズアルデヒド (0.425 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及びTEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を10分間攪拌し、その後2 (0.321 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮して、析出物を濾別し、EtOHで洗浄して、42 (163 mg、0.528 mmol、収率18%) を明黄色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 7.16 ~ 7.14 (d, 2H)、7.05 ~ 7.03 (d, 2H)、6.99 (s, 2H)、4.50 (s, 1H)、3.56 (s, 3H)、2.85 ~ 2.79 (m, 1H)、1.64 (s, 3H)、1.17 ~ 1.15 (d, 6H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.0、147.2、144.6

、142.9、141.9、127.9、126.7、120.8、96.7、58.8、37.1、33.9、33.4、24.3、12.9。LC/MS-MS：309.1243.0 m/z；30のGS1及びGS2、DP=71、CE=31、CXP=16、t_R=4.44分。

【0168】

6-アミノ-4-(4-イソプロピルフェニル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(43)：エタノール(6 mL)中の4-イソプロピルベンズアルデヒド(0.254 g、1.72 mmol)、マロノニトリル(0.114 g、1.72 mmol)及びTEA(0.240 mL、1.72 mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後3(0.300 g、1.72 mmol)を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮して、SiO₂カラムクロマトグラフィ(DCM中2% MeOH、次いでEtOAc：ヘキサン；1：1)によって2回精製して、43(207 mg、0.559 mmol、収率33%)を黄色の固体として得た。¹H-NMR(400 MHz) DMSO：7.50~7.48(d, 2H)、7.22~7.16(m, 3H)、7.09~7.02(m, 6H)、4.92(s, 1H)、3.76(s, 3H)、2.80~2.73(m, 1H)、1.12~1.10(d, 6H)；¹³C-NMR(100 MHz) DMSO：159.2、147.1、146.1、144.5、142.3、133.3、128.6、127.9、127.7、126.7、126.4、120.7、95.9、60.1、37.9、34.5、33.3、24.2。LC/MS-MS：371.1305.0 m/z；30のGS1及びGS2、DP=106、CE=29、CXP=20、t_R=4.60分。

【0169】

6-アミノ-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)-1,3-ジメチル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(44)：EtOH(10 mL)中の1,4-ベンゾジオキサン-6-カルボキサルデヒド(0.471 g、2.87 mmol)、マロノニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を5分間攪拌し、その後2(0.321 g、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を23時間後に濃縮して、粗物質をEtOHから再結晶化し、EtOH及びn-ヘキサンで洗浄して、44(131 mg、0.404 mmol、収率14%)を黄色の固体として得た。¹H-NMR(400 MHz) DMSO：6.98(brs, 2H)、6.76~6.74(d, 1H)、6.59~6.57(m, 2H)、4.43(s, 1H)、4.18(s, 4H)、3.56(s, 3H)、1.67(s, 3H)；¹³C-NMR(100 MHz) DMSO：159.9、144.6、143.5、143.0、142.6、137.7、120.7、120.7、117.3、116.5、96.6、64.5、64.4、58.9、36.8、33.9、12.9。LC/MS-MS：325.0259.1 m/z；30のGS1及びGS2、DP=51、CE=29、CXP=18、t_R=3.98分。

【0170】

6-アミノ-4-(2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)-1-メチル-3-フェニル-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(45)：EtOH(10 mL)中の1,4-ベンゾジオキサン-6-カルボキサルデヒド(0.471 g、2.87 mmol)、マロノニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後3(0.500 g、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を23時間後に濃縮して、粗物質をSiO₂カラムクロマトグラフィ(DCM中、2% MeOH)によって精製した後、EtOHから再結晶化して、45(93 mg、0.240 mmol、収率8%)を黄色の固体として得た。¹H-NMR(400 MHz) DMSO：7.53~7.51(d, 2H)、7.25~7.18(m, 3H)、7.03(brs, 2H)、6.98~6.66(d, 1H)、6.60~6.57(m, 2H)、4.86(

s, 1H)、4.13 (s, 4H)、3.75 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.1、146.0、144.5、143.5、142.5、138.1、133.3、128.7、127.9、126.5、120.6、120.5、117.2、116.3、95.8、64.4、64.3、60.2、37.5、34.5。LC/MS-MS: 387.1 321.0 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 66、CE = 31、CXP = 22、 t_R = 4.25分。

【0171】

6-アミノ-1,3-ジメチル-4-(ピリジン-4-イル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(46): エタノール(10 mL)中の3-ピリジンカルボキサルデヒド(0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後2(0.321 g、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮して、 SiO_2 カラムクロマトグラフィ(DCM中、2% MeOH)によって精製し、EtOHで洗浄して、46(132 mg、0.493 mmol、収率17%)を明橙色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 8.49~8.48 (d, 2H)、7.18~7.18 (m, 4H)、4.61 (s, 1H)、3.58 (s, 3H)、1.66 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.4、152.9、150.3、144.8、142.9、123.4、120.4、95.2、57.1、36.8、33.9、12.8。LC/MS-MS: 268.0 189.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 56、CE = 25、CXP = 12、 t_R = 3.38分。

【0172】

6-アミノ-1-メチル-3-フェニル-4-(ピリジン-4-イル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(47): EtOH(10 mL)中の3-ピリジンカルボキサルデヒド(0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を10分間攪拌し、その後3(500 mg、2.87 mmol)を添加した。22時間後に析出物を濾別し、EtOH及びヘキサンで洗浄して、47(340 mg、1.03 mmol、収率36%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 8.38~8.36 (dd, 2H)、7.48~7.46 (d, 2H)、7.22~7.13 (m, 7H)、5.08 (s, 1H)、3.77 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 159.6、153.0、150.1、146.1、144.7、133.0、128.7、128.1、126.5、123.2、120.2、94.3、58.2、37.4、34.6。LC/MS-MS: 330.1 80.1 m/z; 30のGS1及びGS2、DP = 76、CE = 63、CXP = 4、 t_R = 3.94分。

【0173】

6-アミノ-1,3-ジメチル-4-(ピリジン-3-イル)-1,4-ジヒドロピラノ[2,3-c]ピラゾール-5-カルボニトリル(48): エタノール(10 mL)中の3-ピリジンカルボキサルデヒド(0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル(0.190 g、2.87 mmol)及びTEA(0.40 mL、2.87 mmol)の混合物を5分間攪拌し、その後2(0.321 g、2.87 mmol)を添加した。反応混合物を22時間後に濃縮して、析出物を濾別し、EtOHで洗浄して、48(463 mg、1.73 mmol、収率60%)を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO: 8.43~8.43 (d, 2H)、7.53~7.51 (d, 1H)、7.34~7.31 (m, 1H)、7.14 (br s, 2H)、4.63 (s, 1H)、3.57 (s, 3H)、1.64 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO: 160.2、149.4、148.8、144.8、142.8、139.7、135.8、124.2、120.5、95.7、57.8、35.0、33.9、12.8。LC/MS-MS: 268.0 189.2 m/z; 30のGS1及びGS2、DP

= 71、CE = 34、CXP = 12、 t_R = 3.5分。

【0174】

6 - アミノ - 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (ピリジン - 3 - イル) - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (49) : EtOH (10 mL) 中の 3 - ピリジンカルボキサリデヒド (0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 3 (500 mg、2.87 mmol) を添加した。白色の析出物が形成され、22 時間後に濾別した。形成された析出物を EtOH で再結晶化して、49 (389 mg、1.19 mmol、収率 41%) を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO : 8.41 ~ 8.40 (d, 1H)、8.30 ~ 8.29 (dd, 1H)、7.49 ~ 7.47 (d, 3H)、7.23 ~ 7.16 (m, 6H)、5.12 (s, 1H)、3.77 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO : 159.4、149.3、148.5、146.1、144.7、139.9、135.6、133.0、128.6、128.0、126.5、124.0、120.4、94.8、58.9、35.6、34.6。LC/MS-MS : 330.1 80.1 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 56、CE = 57、CXP = 14、 t_R = 3.96 分。

10

【0175】

6 - アミノ - 4 - (6 - ブロモピリジン - 2 - イル) - 1, 3 - ジメチル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (50) : EtOH (10 mL) 中の 6 - ブロモ - 2 - ピリジンカルボキサリデヒド (0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 2 (0.321 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濾過し、析出物を濾別し、EtOH で洗浄して、50 (427 mg、1.23 mmol、収率 43%) を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO : 7.73 ~ 7.69 (t, 1H)、7.50 ~ 7.48 (d, 1H)、7.32 ~ 7.30 (d, 1H)、7.19 (brs, 2H)、4.69 (s, 1H)、3.56 (s, 3H)、1.71 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO : 164.4、160.7、144.7、142.9、141.4、140.8、127.0、122.0、120.5、95.3、56.3、39.3、33.9、12.8。LC/MS-MS : 348.0 283.0 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 66、CE = 25、CXP = 18、 t_R = 4.00 分。

20

30

【0176】

6 - アミノ - 4 - (6 - ブロモピリジン - 2 - イル) - 1 - メチル - 3 - フェニル - 1, 4 - ジヒドロピラノ[2, 3 - c]ピラゾール - 5 - カルボニトリル (51) : EtOH (10 mL) 中の 6 - ブロモ - 2 - ピリジンカルボキサリデヒド (0.307 g、2.87 mmol)、マロニトリル (0.190 g、2.87 mmol) 及び TEA (0.40 mL、2.87 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 3 (500 g、2.87 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濾過し、析出物を濾別し、EtOH で洗浄して、51 (971 mg、2.38 mmol、収率 83%) を白色の固体として得た。 ^1H -NMR (400 MHz) DMSO : 7.59 ~ 7.53 (t, 1H)、7.52 ~ 7.50 (d, 2H)、7.38 ~ 7.35 (d, 1H)、7.30 ~ 7.26 (d, 1H)、7.24 ~ 7.21 (m, 5H)、5.12 (s, 1H)、3.76 (s, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz) DMSO : 164.4、160.0、146.0、144.7、141.2、140.5、133.0、128.6、128.1、126.9、126.4、122.2、120.2、94.6、57.5、39.3、34.5。LC/MS-MS : 408.0 175.1 m/z; 30 の GS1 及び GS2、DP = 86、CE = 31、CXP = 10、 t_R = 4.28 分。

40

【0177】

4 - (4 - (1H - イミダゾール - 1 - イル)フェニル) - 6 - アミノ - 1, 3 - ジメチ

50

ル - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (5 2) : EtOH (10 mL) 中の 4 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) ベンズアルデヒド (0 . 494 g、2 . 87 mmol)、マロノニトリル (0 . 190 g、2 . 87 mmol) 及び TEA (0 . 40 mL、2 . 87 mmol) の混合物を 1 . 0 分間攪拌し、その後 2 (0 . 321 g、2 . 87 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濃縮し、SiO₂ カラムクロマトグラフィ (DCM 中、2 % MeOH) によって精製して、52 (322 mg、0 . 967 mmol、収率 34 %) を明褐色の固体として得た。¹H - NMR (400 MHz) DMSO : 8 . 20 (s , 1 H)、7 . 69 (s , 1 H)、7 . 58 ~ 7 . 56 (d , 2 H)、7 . 29 ~ 7 . 27 (d , 2 H)、7 . 09 ~ 7 . 07 (d , 3 H)、4 . 64 (s , 1 H)、3 . 58 (s , 3 H)、1 . 68 (s , 3 H) ; ¹³C - NMR (100 MHz) DMSO : 160 . 1、144 . 7、143 . 2、143 . 0、136 . 1、136 . 0、130 . 3、129 . 5、121 . 0、120 . 7、118 . 5、95 . 3、58 . 4、36 . 9、33 . 9、12 . 9。LC / MS - MS : 333 . 3 266 . 9 m / z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 61、CE = 41、CXP = 18、t_R = 3 . 4 分。

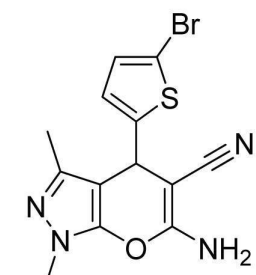
【 0178 】

4 - (4 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) フェニル) - 6 - アミノ - 1 - メチル - 3 - フェニル - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (53) : EtOH (6 mL) 中の 4 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) ベンズアルデヒド (0 . 296 g、1 . 72 mmol)、マロノニトリル (0 . 114 g、1 . 72 mmol) 及び TEA (0 . 240 mL、1 . 72 mmol) の混合物を 10 分間攪拌し、その後 3 (0 . 300 g、1 . 72 mmol) を添加した。反応混合物を 22 時間後に濃縮し、SiO₂ カラムクロマトグラフィ (DCM 中、2 % MeOH) によって精製して、53 (308 mg、0 . 780 mmol、収率 45 %) をオフホワイト色の固体として得た。¹H - NMR (400 MHz) DMSO : 8 . 15 (s , 1 H)、7 . 64 (s , 1 H)、7 . 54 ~ 7 . 52 (d , 2 H)、7 . 49 ~ 7 . 47 (d , 2 H)、7 . 28 ~ 7 . 13 (m , 7 H)、7 . 04 (s , 1 H)、5 . 09 (s , 1 H)、3 . 78 (s , 3 H) ; ¹³C - NMR (100 MHz) DMSO : 159 . 2 145 . 1、144 . 6、143 . 5、135 . 9、135 . 9、133 . 2、130 . 2、129 . 3、128 . 7、128 . 0、126 . 5、120 . 7、120 . 5、118 . 4、95 . 4、59 . 6、37 . 6、34 . 6。LC / MS - MS : 395 . 2 144 . 0 m / z ; 30 の GS1 及び GS2、DP = 101、CE = 59、CXP = 8、t_R = 3 . 89 分。

【 0179 】

化合物 54

【 化 7 】



化学式 : C₁₃H₁₁BrN₄OS
分子量 : 351.22

化学式 : C₁₃H₁₁BrN₄OS

分子量 : 351.22

6 - アミノ - 4 - (5 - プロモチオフエン - 2 - イル) - 1 , 3 - ジメチル - 1 , 4 - ジヒドロピラノ [2 , 3 - c] ピラゾール - 5 - カルボニトリル (54) : エタノール (10 mL) 中の 5 - プロモチオフエン - 2 - カルバルデヒド (0 . 548 g、2 . 87 m

10

化合物 5 5

N#CC1=C(N)OC2=C(C1)C(=NN2C3=CC=CC=C3)C4=CC(=CC=C4)S5=CC(=CC=C5)Br

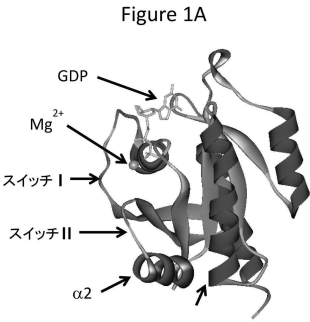
20

分子量：413.29

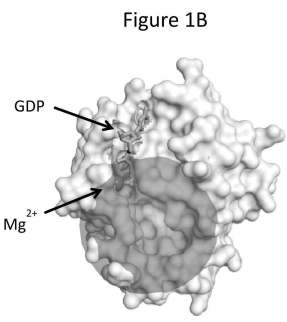
30

50

【図面】
【図 1 A】

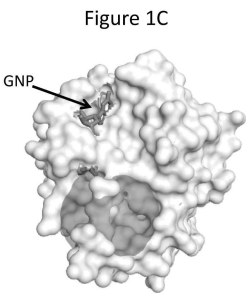


【図 1 B】

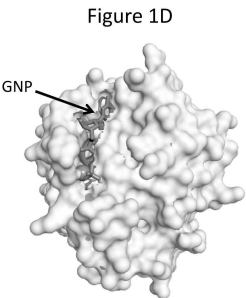


10

【図 1 C】



【図 1 D】



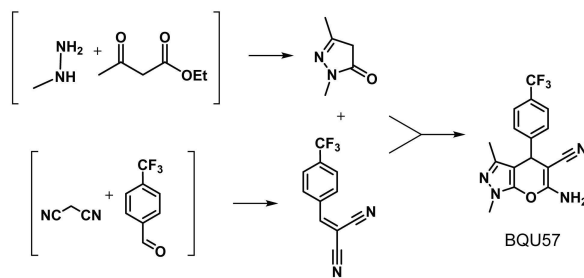
20

30

40

50

【図 2 A】



【図 2 B】

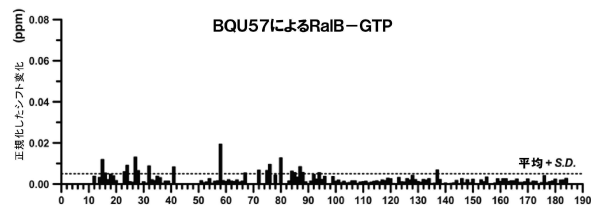


Figure 2B

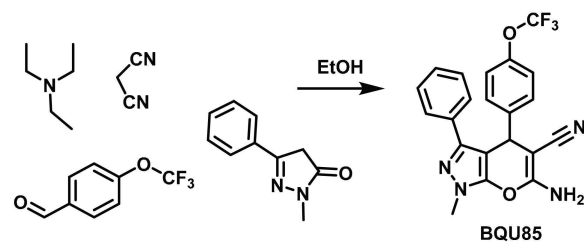


Figure 2A

【図 2 C】

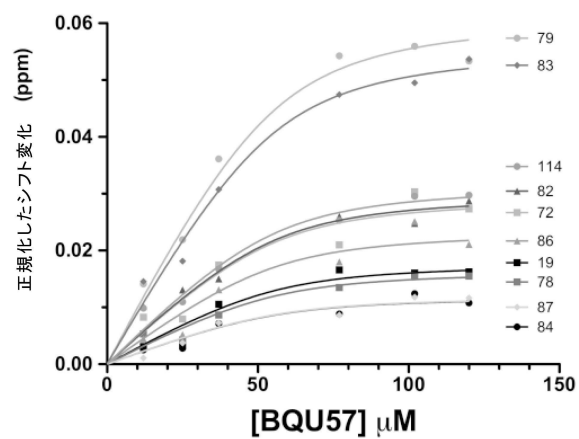


Figure 2C

【図 3 A】

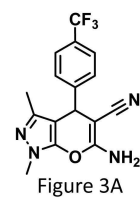


Figure 3A

10

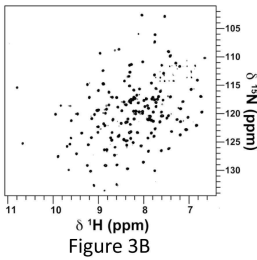
20

30

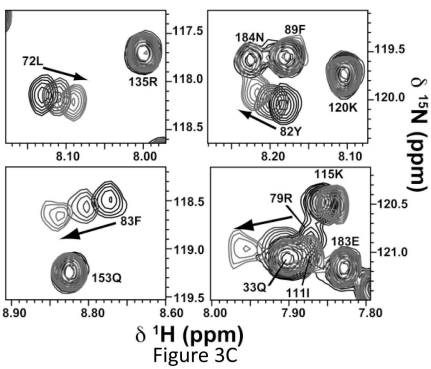
40

50

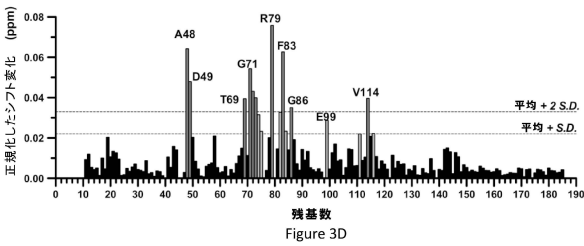
【図 3 B】



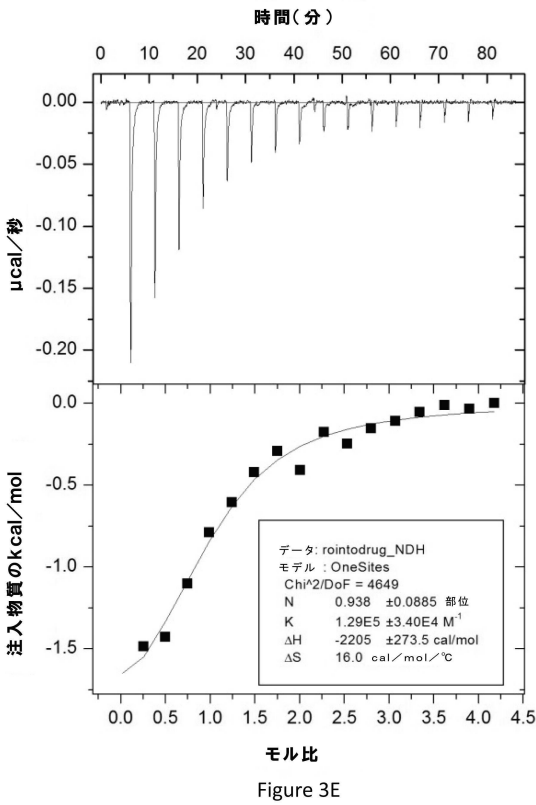
【図 3 C】



【図 3 D】



【図 3 E】



10

20

30

40

50

【図 4 A】

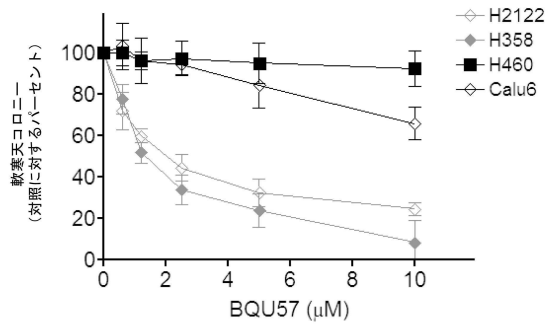


Figure 4A

【図 4 B】

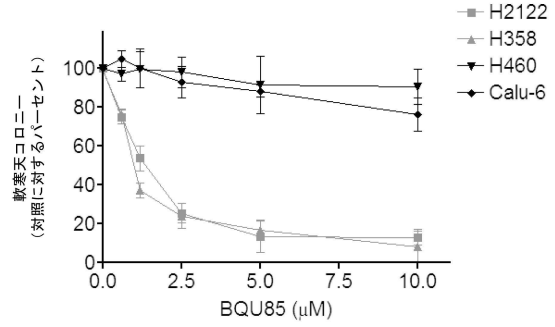


Figure 4B

【図 4 C】

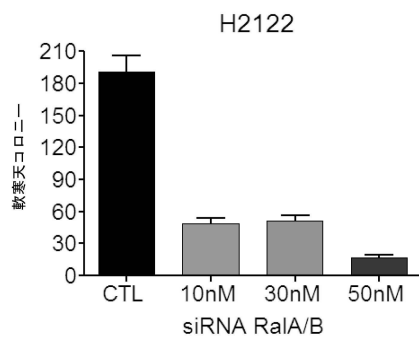


Figure 4C

【図 4 D】

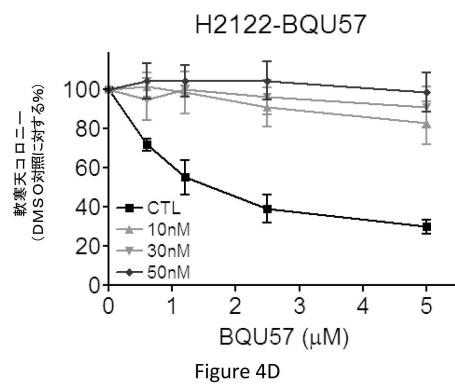


Figure 4D

【図 4 E】

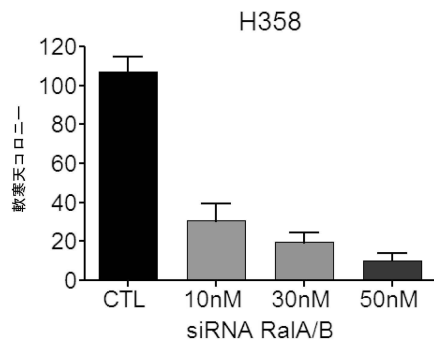


Figure 4E

【図 4 F】

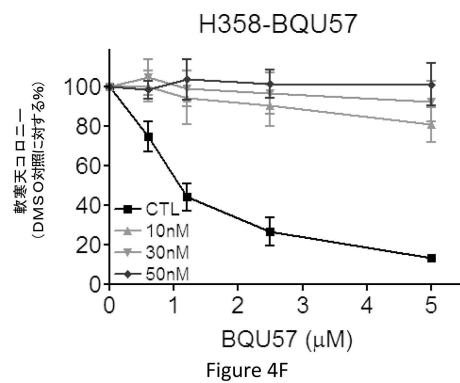


Figure 4F

10

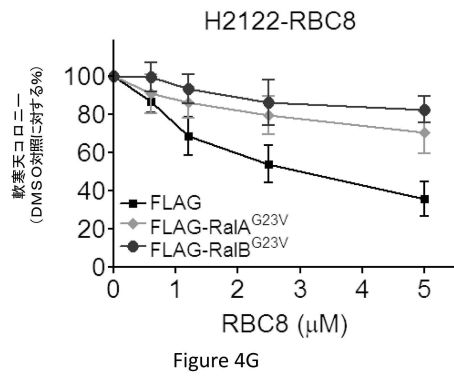
20

30

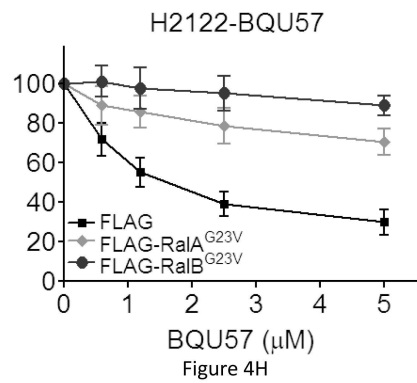
40

50

【図 4 G】

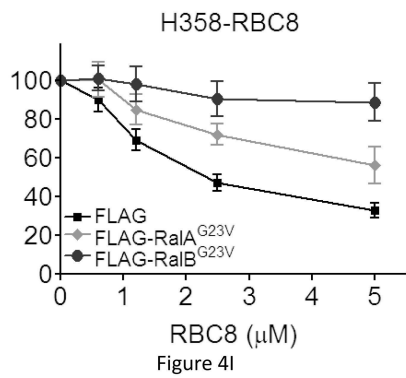


【図 4 H】

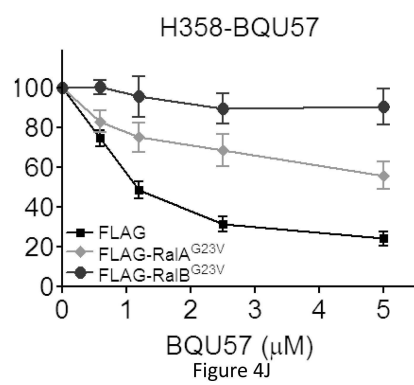


10

【図 4 I】

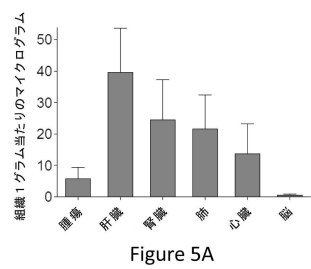


【図 4 J】

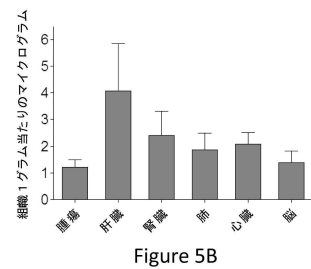


20

【図 5 A】



【図 5 B】



30

40

50

【図 5 C】

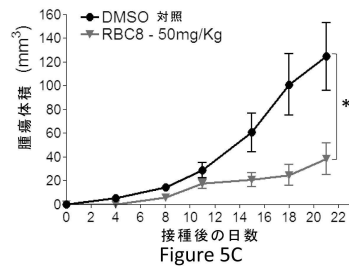


Figure 5C

【図 5 D】

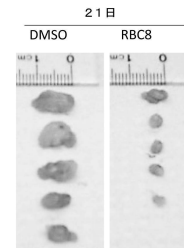


Figure 5D

【図 5 E】

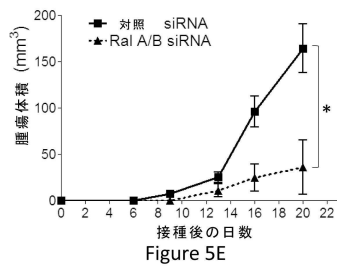


Figure 5E

【図 5 F】

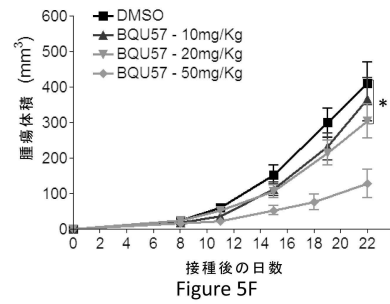


Figure 5F

【図 5 G】

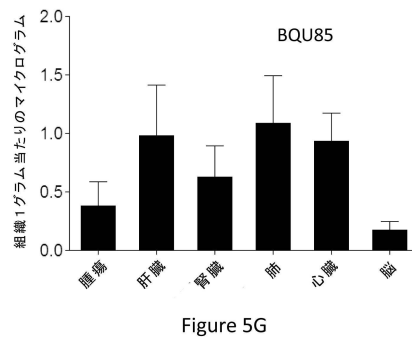


Figure 5G

【図 5 H】

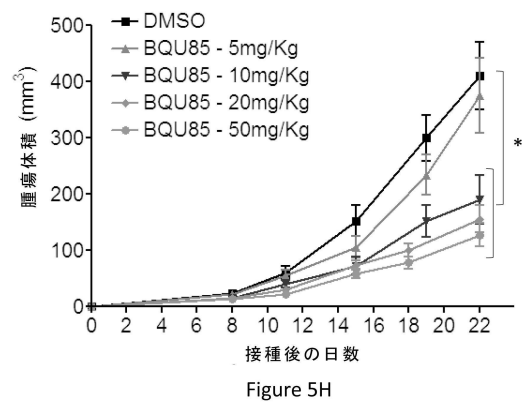


Figure 5H

10

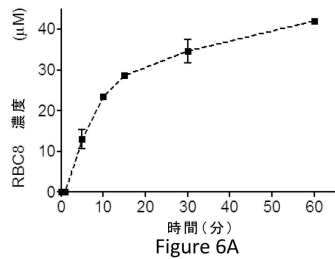
20

30

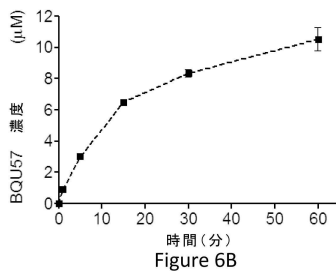
40

50

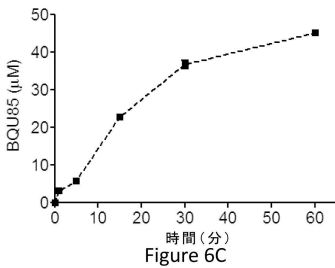
【図 6 A】



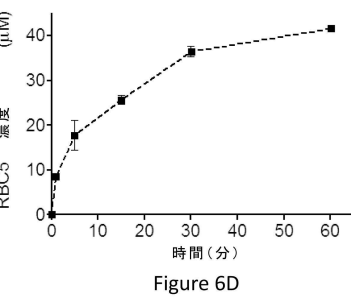
【図 6 B】



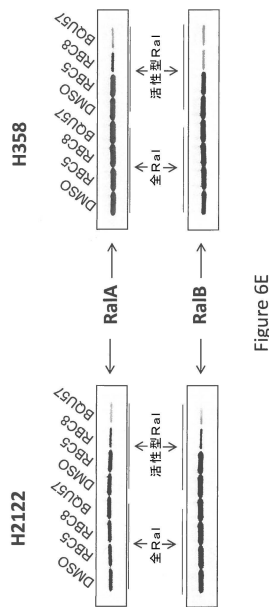
【図 6 C】



【図 6 D】



【図 6 E】



【図 7 A】

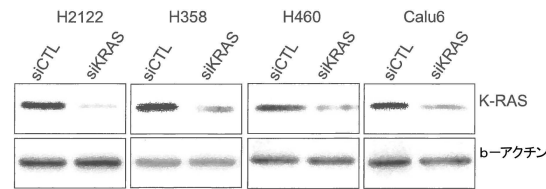


Figure 7A

10

20

30

40

50

【図 7 B】

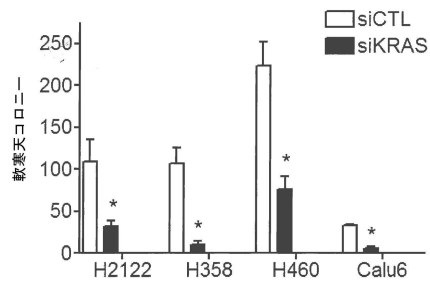


Figure 7B

【図 7 C】

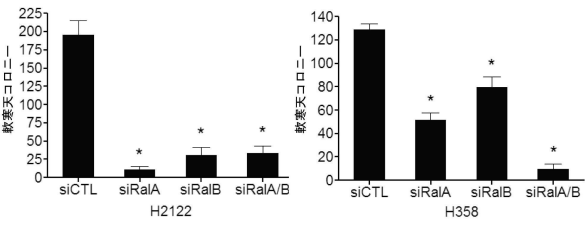


Figure 7C

10

【図 7 D】

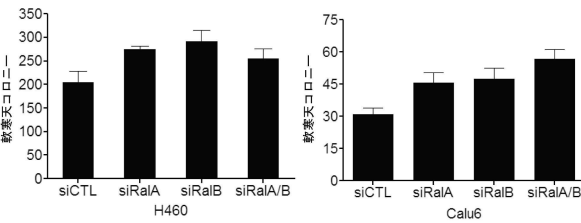


Figure 7D

【図 7 E】

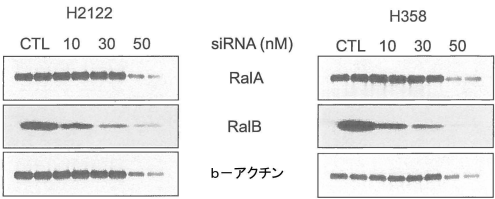


Figure 7E

20

【図 7 F】

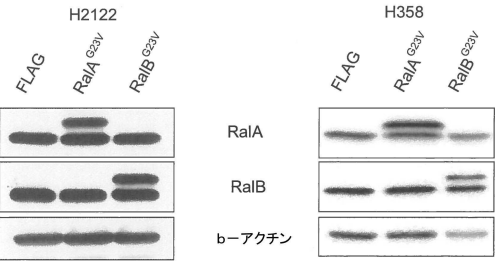


Figure 7F

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 D 491/052 (2006.01)

F I

C 0 7 D 491/052

オーロラ イースト マンズフィールド プレイス 2 1 4 9 7

(72)発明者 ロス デビッド

アメリカ合衆国 8 0 5 0 3 コロラド州 ナイワット コマンチェ ロード 8 7 8 7

(72)発明者 ヤン チャオ

アメリカ合衆国 8 0 2 4 7 コロラド州 デンバー イースト ミシシッピ アヴェニュー 9 1 2 3
アパート 6 - 2 0 2

(72)発明者 リーガン フィリップ

アメリカ合衆国 8 0 2 0 9 コロラド州 デンバー イースト ベイオード アヴェニュー 3 3 2 9
アパート 1 2 1 5

審査官 東 裕子

(56)参考文献

特許第 6 6 7 2 2 5 5 (J P , B 2)

File REGISTRY [online] , CAS Registry No. 311326-67-7 , 6-Amino-1,4-dihydro-3-methyl-4-[4[(trifluoromethyl)phenyl]pyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile , STN International , Entered STN: 27 Dec 2000

File REGISTRY [online] , CAS Registry No. 309920-83-0 , Pyrano [2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile, 6-amino-1,4-dihydro-3-phenyl-4-[4-(trifluoromethyl)phenyl]- , STN International , Entered STN: 20 Dec 2000

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 P

A 6 1 K

C 0 7 D

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)