

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6412656号
(P6412656)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 D 207/48 (2006.01)

C O 7 D 207/48 C S P

C O 7 D 413/12 (2006.01)

C O 7 D 413/12

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

請求項の数 9 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-540775 (P2017-540775)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月11日 (2015.11.11)
 (65) 公表番号 特表2018-503675 (P2018-503675A)
 (43) 公表日 平成30年2月8日 (2018.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/094255
 (87) 国際公開番号 W02016/119505
 (87) 国際公開日 平成28年8月4日 (2016.8.4)
 審査請求日 平成29年9月22日 (2017.9.22)
 (31) 優先権主張番号 201510040549.8
 (32) 優先日 平成27年1月27日 (2015.1.27)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 517264498
 江▲蘇▼柯菲平医▲薬▼股▲分▼有限公司
 中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区
 中山▲東▼路323号之2前半山▲園▼1
 2号1幢1▲層▼
 (73) 特許権者 517264502
 南京柯菲平盛▲輝▼制▲薬▼有限公司
 中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区
 中山▲東▼路323号之2前半山▲園▼1
 2号1幢1▲層▼
 (74) 代理人 110000659
 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所

最終頁に続く

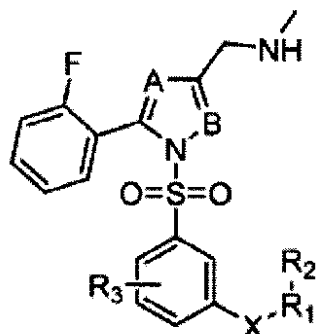
(54) 【発明の名称】 ピロールスルホニル誘導体及びその製造方法、並びに医薬への応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)に示す化合物若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、又は薬学的に許容されるその塩：

【化 1】



(I)

式中、

A、BがC R₄から選択され、ここで、R₄が水素、ハロゲン、及びアルキルから選択

され、

X が O 又は N R₅ から選択され、ここで、R₅ が水素及びアルキルから選択され、

R₁ がアルキル及びヘテロシクロアルキルから選択され；前記アルキル及びヘテロシクロアルキルが更に 1 又は複数の、水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される置換基に置換され、

R₂ がアルキルスルホニル、ヘテロシクロアルキル、アルコキシ、アルキルアシル、フェノキシ、アルキルアミノから選択され；前記アルキルスルホニル、ヘテロシクロアルキル、アルコキシ、アルキルアシル、フェノキシ、アルキルアミノが更に 1 又は複数の、水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される置換基に置換され、

R₃ が水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される。

10

【請求項 2】

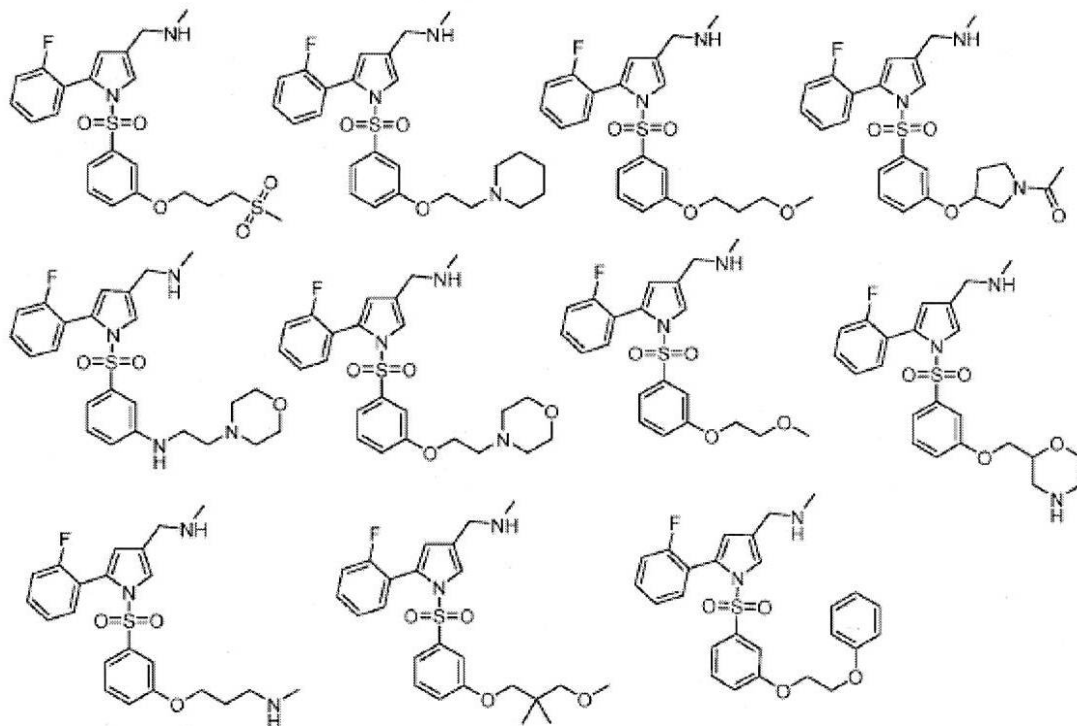
A、B が C R₄ から選択され、R₄ が水素から選択される、請求項 1 に記載の式 (I) に示す化合物若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、又は薬学的に許容されるその塩。

【請求項 3】

前記化合物が以下のいずれかの化合物から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の式 (I) に示す化合物若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、又は薬学的に許容されるその塩。

【化 2】

20



30

40

【請求項 4】

有効な投与量の請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、又は薬学的に許容されるその塩；及び薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤を含有する、医薬組成物。

【請求項 5】

胃酸分泌抑制薬である、請求項 1 ~ 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

H⁺ / K⁺ A T P a s e 阻害剤の調製における請求項 5 に記載の医薬組成物の使用。

50

【請求項 7】

カリウムイオン競合型アシッドブロッカーの調製における請求項 6 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 8】

消化性潰瘍、ゾリンジャー・エリスン症候群、胃炎、びらん性食道炎、逆流性食道炎、症候性胃食道逆流症、バレット食道、機能性消化不良、ヘリコバクター・ピロリ感染、胃癌、胃 MALT リンパ腫、非ステロイド系抗炎症薬誘発性胃潰瘍、手術後ストレスによる胃酸過多若しくは潰瘍の予防・治療用薬の調製、又は消化性潰瘍、急性ストレス潰瘍、出血性胃炎・侵襲的ストレスによる上部消化管出血を抑制するための薬物の調製における、請求項 7 に記載の医薬組成物の使用。

10

【請求項 9】

前記消化性潰瘍が胃潰瘍、十二指腸潰瘍、又は吻合部潰瘍を含み、前記症候性胃食道逆流症が非びらん性逆流症、食道炎のない胃食道逆流症を含む、請求項 8 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】

本発明は新規なピロールスルホニル誘導体及びその製造方法、該誘導体を含有する医薬組成物、並びにその治療薬としての、特に胃酸分泌抑制剤やカリウムイオン競合型アシッドブロッカー（P-CABs）としての使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

1988 年以来、オメプラゾールを初めとするプロトンポンプ阻害剤が、胃酸分泌を抑制することにより、消化性潰瘍、逆流性食道炎、ゾリンジャー・エリスン症候群等を治療することは、臨床診療において広く使用されていた。従来のプロトンポンプ阻害剤は、長期的臨床応用において、薬物動態学的・薬力学的側面において制限、例えば、投薬時間から薬効への影響、夜間胃酸急増に対する効果発現の遅延、酸性環境での不安定性（腸溶剤にする必要）、CYP450 酵素に対する依存（著しい個体差につながる）等があることに気付いた。

【0003】

30

カリウムイオン競合型アシッドブロッカー（Potassium-Competitive Acid Blocker, P-CABs）は直接・可逆過程を通じて競合的に $H^+ / K^+ - ATP$ 酵素にある K^+ を抑制する。従来のプロトンポンプ阻害剤に比べて、P-CABs は親油性、弱塩基性、高解離定数及び低 pH の条件下での安定性という特徴がある。酸性環境では、P-CABs はイオン化形態で $H^+ / K^+ - ATP$ 酵素と結合し、 H^+ の輸送及び胃内腔へ酸の分泌を抑制することにより、急速に胃の pH 値を上げる。動物実験及び臨床研究によると、P-CABs は効果発現が早く、1 時間以内に最大限の治療効果を得ることができ、また、血漿中濃度が経口投与量と線形関係になり、容易に最もよい酸抑制効果を得ることができると認められた。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、これまで様々なカリウムイオン競合型アシッドブロッカーが開示されたが、構造タイプがより豊かで、よりドラッグブルである新規な化合物を開発する必要がある。たゆまない努力を通じて、本発明は式（I）に示す構造を持つ、優れた効果を有する化合物を開示する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

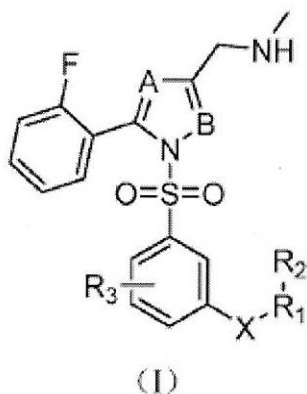
本願は、式（I）に示す胃酸分泌阻害剤及びその使用方法を提供し、以下に詳述する。

【0006】

50

本願は、式 (I) に示す化合物若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、又は薬学的に許容されるその塩を提供する。

【化 1】



10

【0007】

式中、

A、B が独立して N 又は C R₄ から選択され、ここで、R₄ が水素、ハロゲン、及びアルキルから選択され、

20

X が O 又は N R₅ から選択され、ここで、R₅ が水素及びアルキルから選択され、

R₁ がアルキル及びヘテロシクロアルキルから選択され；前記アルキル及びヘテロシクロアルキルが更に 1 又は複数の、水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される置換基に置換され、

R₂ がアルキルスルホニル、ヘテロシクロアルキル、アルコキシ、アルキルアシル、フェノキシ、アルキルアミノから選択され；前記アルキルスルホニル、ヘテロシクロアルキル、アルコキシ、アルキルアシル、フェノキシ、アルキルアミノが更に 1 又は複数の、水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される置換基に置換され、

R₃ が水素、ハロゲン、及びアルキルから選択される。

【0008】

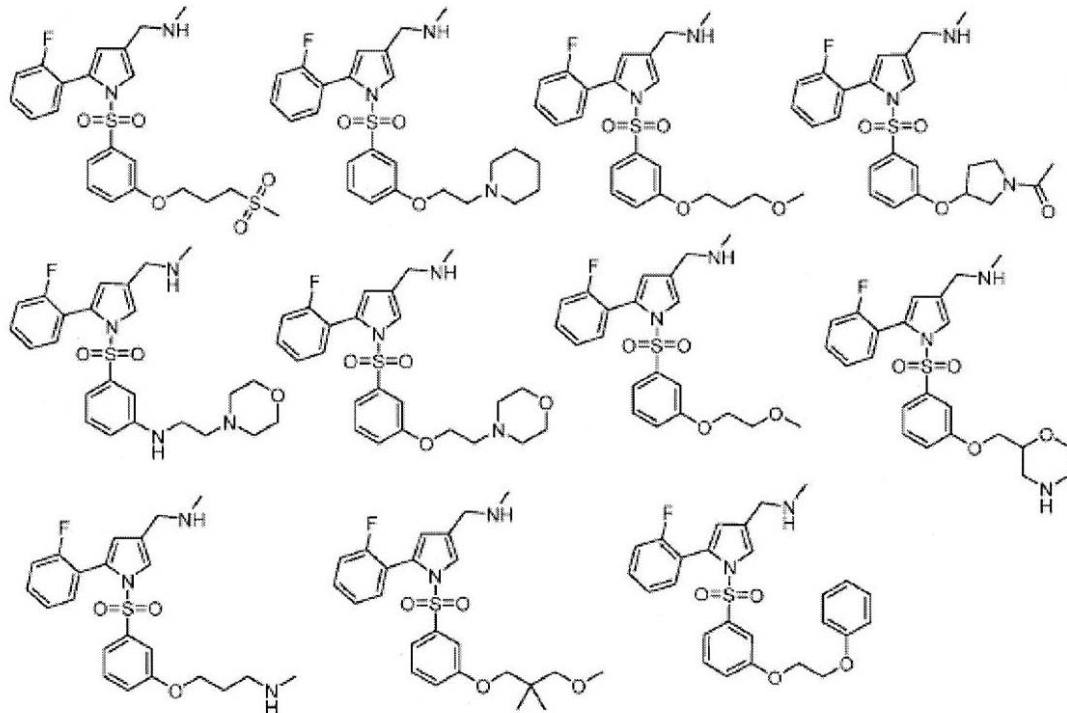
更に、A、B が C R₄ から選択され、R₄ が水素から選択される。

30

【0009】

更に、前記化合物は以下のいずれかの化合物から選択される。

【化 2】



【0010】

本発明に係る医薬組成物は、請求項1～3のいずれかに示す有効な投与量の化合物、若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、或いは薬学的に許容されるその塩及び薬学的に許容される担体・賦形剤・希釈剤を含有する。

【0011】

本発明に係る胃酸分泌を抑制するための方法は、治療を必要とする患者に対し、有効な投与量の、式(I)に示す化合物、若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、或いは薬学的に許容されるその塩又はそれを含有する医薬組成物を投与する。

【0012】

本発明は、式(I)に示す化合物、若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、或いは薬学的に許容されるその塩又はそれを含有する医薬組成物を、 H^+ / K^+ -アデノシントリホスファターゼ($H^+ / K^+ - ATPase$)阻害剤の調製に使用する用途も提供する。

【0013】

本発明は、式(I)に示す化合物、若しくはその互変異性体、メソ体、ラセミ体、エナンチオマー、ジアステレオマー、又はその混合物、或いは薬学的に許容されるその塩又はそれを含有する医薬組成物を、カリウムイオン競合型アシッドブロッカー($P - CABs$)の調製に使用する用途も提供する。

【0014】

本発明は、消化性潰瘍、ゾリンジャー・エリソン症候群、胃炎、びらん性食道炎、逆流性食道炎、症候性胃食道逆流症、バレット食道、機能的消化不良、ヘリコバクター・ピロリ感染、胃癌、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症薬誘発性胃潰瘍、手術後ストレスによる胃酸過多や潰瘍の予防・治療用薬の調製に使用され、あるいは消化性潰瘍、急性ストレス潰瘍、出血性胃炎・侵入的ストレスによる上部消化管出血を抑制するための薬物の調製に使用される方法を提供する。そのうち、前記消化性潰瘍が胃潰瘍、十二指腸潰

10

20

30

40

50

瘍又は吻合部潰瘍を含み、前記症候性胃食道逆流症が非びらん性逆流症、食道炎のない胃食道逆流症を含む。

【発明を実施するための形態】

【0015】

反対の表記がない限り、明細書及び特許請求の範囲に使用される以下の用語は、次の意味がある。

【0016】

アルキルとは飽和脂肪族炭化水素基を言う。1～20個の炭素原子より構成される直鎖状基又は分枝鎖基を含有する。1～6個の炭素原子を含有する中サイズのアルキルが好適である。例えば、メチル、エチル、プロピル、2-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、ペンチル等。1～4個の炭素原子を含有する低級アルキルがさらに好適である。例えば、メチル、エチル、プロピル、2-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル等。アルキルは置換又は非置換であってもよい。置換の場合、ハロゲン、 C_2-C_6 アルケニル基、 C_6-C_{10} アリール基、 C_5-C_{10} ヘテロアリール基、ハロゲン化 C_1-C_6 アルキル、4～8員ヘテロ脂環基、ヒドロキシ、 C_1-C_6 アルコキシ基、 C_6-C_{10} アリールオキシ基が好適である。

【0017】

ヘテロシクロアルキルは単環又は縮合環基を指す。環に5～9個の環原子を有し、その中の1個又は2個の環原子がN、O又は $S(O)_p$ （そのうち、pは0～2の整数である）から選択されるヘテロ原子であり、残った環原子がCである。これらの環は1又は複数の二重結合を持つことができるが、完全に共役した π ：電子システムを持たない。未置換のヘテロ脂環基の非限定的な例としては、ピロリジニル、ピペリジノ、ピペラジノ、モルフォリノ、チオモルホリノ、ホモピペラジンジノ等がある。ヘテロ脂環基は置換又は非置換であってもよい。置換の場合、1又は複数の置換基が好適であり、1個、2個、又は3個の置換基がより好適であり、1個又は2個の置換基が更に好適である。前記置換基は水素、ヒドロキシル、メルカプト、オキソ、低級アルキル、低級アルコキシ、低級シクロアルキル、低級ヘテロ脂環基、低級ハロアルコキシ、アルキルチオ基、ハロゲン、低級ハロアルキル、低級ヒドロキシアルキル、低級シクロアルキレン、低級ヘテロ脂環基アルキ、アリール、ヘテロアリール、アルコキシカルボニル、アミノ、アルキルアミノ、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アルキルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、アルキルスルホニルアミノ、アリールスルホニルアミノ、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノから選択される。特に明記しない限り、ヘテロ脂環基の例としてモルホリニル、ピペラジニル、ピペリジニル、アゼチジン、ピロリジニル、ヘキサヒドロアゼピノ、オキサタニル、テトラヒドロフラ、テトラヒドロチエニル、オキサゾリジニル、チアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、テトラヒドロピラニ、チオモルホリノ、キヌクリジニル、及びイミダゾリニルを含むが、これらに限定されない。上記のように各原子団は二環式であってもよい。例えば、3,8-ジアザビシクロ[3.2.1]オクタン、2,5-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン又はオクタヒドロ-ピラジノ[2,1-c][1,4]オキサジンが挙げられる。そのヘテロ脂環基（及び誘導体）は、そのイオン形態を含む。

【0018】

「アルコキシ」は-O-（非置換のアルキル）及び-O（非置換のシクロアルキル）である。代表的な例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシ等を含むがこれらに限定されない。

【0019】

「アルキルスルホニル」は、 $-S(O_2)-$ アルキルである。

【0020】

「アルキルアミノ」は-NH-アルキルである。

【0021】

10

20

30

40

50

「アルキルアシル」は

【化 3】



であり、R は低級アルキルである。

【0022】

「ヒドロキシ」は -OH 原子団である。

10

【0023】

「ハロゲン」はフッ素、塩素、臭素、又はヨウ素であり、フッ素又は塩素が好適である。

【0024】

「いずれか」とは、後発事象又は状況が発生するか発生しない可能性があり、かつ、この表記に含まれる物事や状況が発生するか発生しない可能性があり、かつ、この表記に含まれる物事や状況が発生するか発生しないことをいう。

【0025】

一部の実施形態において、「1 又は複数の基に置換される」とは、指定された原子又は原子団にある 1 個、2 個、3 個、又は 4 個の水素原子が、それぞれ指定範囲における基から選択される同一又は異なる基に置換されることをいう。

20

【0026】

「薬学的に許容されるその塩」とは、親化合物の生物学的有効性及び性質を保持しているその塩をいう。このような塩として次のものを含む。

【0027】

(1) 酸付加塩。親化合物の遊離塩基と無機酸又は有機酸との反応により得るものであり、無機酸として塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、メタリン酸、硫酸、亜硫酸、過塩素酸等を含み、有機酸として酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、シュウ酸、(D) 又は (L) リンゴ酸、フマル酸、マレイン酸、ヒドロキシ安息香酸、γ-ヒドロキシ酪酸、メトキシ安息香酸、フタル酸、メシル酸、エチルスルホン酸、ナフタレン-1-スルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サルチル酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、マンデル酸、コハク酸、マロン酸等を含む。

30

【0028】

(2) 親化合物にある酸性プロトンが金属イオンに置換されるか、有機塩基との配位化による塩；金属イオン（アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオンやアルミイオン等）、有機塩基（エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミン等）。

【0029】

「医薬組成物」とは、1 又は複数の本発明に係る化合物又はその薬学的に許容される塩、溶媒和物、アコ錯体、若しくはプロドラッグと、薬学的に許容される担体等のその他の化学成分との混合物を言う。医薬組成物は、動物への投与のプロセスを促進することを目的とする。

40

【0030】

「薬学的に許容される担体」とは、有機体に有意な刺激を引き起こさなく、且つ、投与される化合物の生物学的活性と性質に影響しない医薬組成物にある不活性成分を言う。例えば、炭酸カルシウムやリン酸カルシウム、種々の糖（例えばラクトース、マンニトール等）、デンプン、シクロデキストリン、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、炭酸マグネシウム、アクリルポリマー、メタクリルポリマー、ゲル、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エチレングリコール、ヒマシ油、水添ヒマシ油、ポリエトキシ水添ヒマシ油、ゴマ油、トウモロコシ油、ピーナッツ油等。

50

【 0 0 3 1 】

前述医薬組成物は、薬学的に許容される担体に加え、薬学（薬物）的に一般的に使用される補助剤を含む。例えば、抗菌剤、抗真菌剤、抗微生物剤、品質保証剤、調色剤、可溶化剤、増粘剤、界面活性剤、錯化剤、タンパク質、アミノ酸、脂肪、炭水化物、ビタミン、ミネラル、微量元素、甘味剤、着色料、香料又はそれらのものの結合物等。

【実施例】

【 0 0 3 2 】

以下実施例と結びつけて本発明を更に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

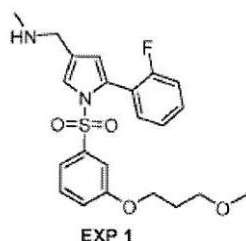
【 0 0 3 3 】

10

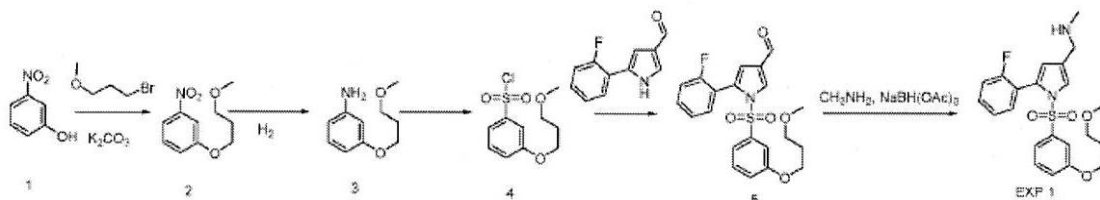
実施例 1

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (E X P 1) の合成

【化 4】



20



30

【 0 0 3 4 】

1) 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - ニトロベンゼン (化合物 2) の合成

3 - ニトロフェノール (化合物 1、1.0 g、7.19 mmol)、炭酸カリウム (2.9 g、21.6 mmol) 及び 1 - ブロモ - 3 - メトキシプロパン (1.65 g、10.79) を無水 DMF (20 mL) に溶解し、90 で一晩攪拌し、水 (50 mL) を加え、酢酸エチルで抽出し (50 mL × 3)、有機相を合わせ乾燥・濃縮を行い、黄色固体の 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - ニトロベンゼン (化合物 2、1.5 g、収率 100 %) を得た。

【 0 0 3 5 】

40

2) 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - アニリン (化合物 3) の合成

1 - (3 - メトキシプロポキシ) - ニトロベンゼン (化合物 2、1.0 g、4.74 mmol)、Raney Ni (100 mg) を無水メタノール (20 mL) 溶液に溶解し、水素雰囲気下、室温で一晩攪拌した。濾過し、脱水機にかけ固体の 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - アニリン (化合物 3、0.80 g、収率 91 %) を得た。

【 0 0 3 6 】

3) 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - 塩化ベンゼンスルホニル (化合物 4) の合成

0 で亜硝酸ナトリウム (571 mg、8.29 mmol) を何回かに分けて 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - アニリン (化合物 3、1.0 g、5.52 mmol) の酢酸 (10 mL) ・塩酸水溶液 (2 N、10 mL) に加える。0 で 25 分間攪拌し、溶液 I を

50

得た。0 で塩化第一銅 (190 mg、1.1 mmol) を二酸化イオウの酢酸溶液 (10 mL、2 N) に加え、溶液 I I を得た。0 で溶液 I を溶液 I I に滴加し、滴加が終了後、自然な状態で室温に温め、3 時間攪拌・反応した。酢酸エチル (150 mL × 3) で抽出し、有機相を合わせ乾燥・濃縮・カラムクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル = 20 : 1) を行い、黄色のオイル状物質 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - 塩化ベンゼンスルホニル (化合物 4、800 mg、収率 55%) を得た。

【0037】

4) 5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - ホルムアルデヒド (化合物 5) の合成

0 で t - BuOK (233 mg、2.08 mmol) を 5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 H - ピロール - 3 - ホルムアルデヒド (200 mg、1.04 mmol) の無水 THF (5 mL) 溶液に加え、0 で 30 分間攪拌して反応させた。反応終了後、15 - クラウン (crown) - 5 (542 mg、2.08 mmol) と 1 - (3 - メトキシプロポキシ) - 塩化ベンゼンスルホニル (化合物 4、412 mg、2.08 mmol) を加えた。添加後、自然な状態で室温に温め、90 分間攪拌して反応させた。反応終了後、氷水 (50 g) で急冷し、酢酸エチル (50 mL × 3) で抽出した。有機相を合わせ、乾燥・濃縮・カラムクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル = 8 : 1) を行い、黄色固体の 5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - ホルムアルデヒド (260 mg、収率 60%) を得た。

【0038】

5) 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP 1) の合成

5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - ホルムアルデヒド (化合物 5、500 mg、1.19 mmol)、酢酸 (144 mg、2.39 mmol)、メタンアミンのアルコール溶液 (1 mL) を無水メタノール 3 mL に溶解し、室温で 4 時間攪拌した。NaBH₃CN (212 mg、3.59 mmol) を加え、60 分間攪拌した。氷水 (30 g) で急冷し、酢酸エチル (50 mL × 3) で抽出した。有機相を合わせ乾燥・濃縮・カラムクロマトグラフィーを行い、白色固体の 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシプロポキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP 1、100 mg、20%) を得た。

【0039】

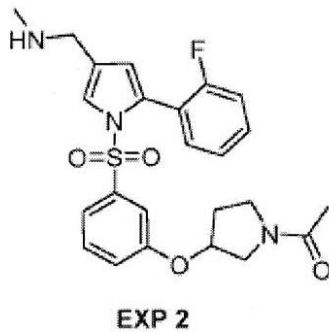
HPLC : 99.4% ; MS (ESI) m/z : [M + H]⁺ = 433.0 ; ¹H - NMR (400 MHz、DMSO - d₆) δ : 8.72 (s、1H) , 7.78 (d、1H) , 7.46 - 7.55 (m、2H) , 7.21 - 7.32 (m、3H) , 6.85 - 7.11 (m、2H) , 6.83 - 6.85 (m、1H) , 6.44 (d、1H) , 3.95 - 4.02 (m、4H) , 3.47 (t、2H) , 3.32 (s、3H) , 2.52 (m、3H) , 1.94 (t、2H) ppm。

【0040】

実施例 2

1 - (3 - (3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メチルアミノ)メチル) - 1 H - ピロール - 1 - イル) スルホニル) フェノキシ) ピロリジン - 1 - イル) エチル - 1 - オン (EXP 2) の合成

【化5】



10

【0041】

実施例1の合成方法を参照し、白色の固体化合物1-(3-(3-(2-(2-フルオロフェニル)-4-((メチルアミノ)メチル)-1H-ピロール-1-イル)スルホニル)フェノキシ)ピロリジン-1-イル)エチル-1-オン(EXP2)を得た。収率は65%である。

【0042】

HPLC: 94.8%; MS (ESI) m/z : $[M+H]^+ = 472.1$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.75 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.48-7.53 (m, 2H), 7.35 (t, 1H), 7.22-7.25 (m, 2H), 7.04-7.09 (m, 2H), 6.86-6.88 (m, 1H), 6.45 (d, 1H), 4.77-4.79 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.39-3.64 (m, 4H), 2.55 (d, 3H), 1.86-2.09 (m, 4H) ppm。

20

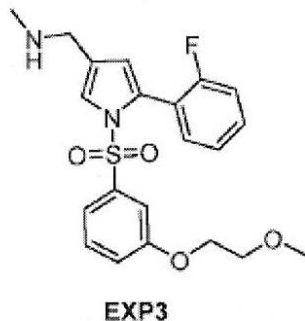
【0043】

実施例3

1-(5-(2-フルオロフェニル)-1-((3-(2-メトキシエトキシ)フェニル)スルホニル)-1H-ピロール-3-イル)-N-メチルメタンアミン(EXP3)の合成

30

【化6】



40

【0044】

実施例1の合成方法を参照し、化合物1-(5-(2-フルオロフェニル)-1-((3-(2-メトキシエトキシ)フェニル)スルホニル)-1H-ピロール-3-イル)-N-メチルメタンアミン(EXP3) 80 mgを得た。収率は10%であった。

【0045】

HPLC: 96.5%; MS (ESI) m/z : $[M+H]^+ = 419.2$; 1H -N

50

MR (400 MHz, MeOD) δ : 7.44 (d, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.37 (t, 1H), 7.04 - 7.19 (m, 5H), 6.89 (t, 1H), 6.28 (d, 1H), 4.03 (t, 2H), 3.72 (t, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.42 (d, 3H), 2.38 (s, 3H) ppm.

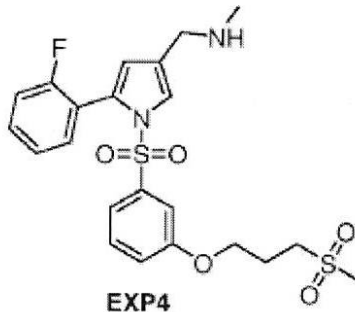
【0046】

実施例 4

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メチルスルホプロポキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP 4) の合成

【化 7】

10



20

【0047】

実施例 1 の合成方法を参照し、化合物 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メチルスルホプロポキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP 4) 70 mg を得た。収率は 20 % であった。

【0048】

HPLC: 94.28%; MS (ESI) m/z : $[M+H]^+ = 481.2$; 1H -NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.45 (m, 2H), 7.34 (t, 1H), 7.06 - 7.19 (m, 5H), 6.89 (t, 1H), 6.28 (d, 1H), 4.06 (t, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.34 (m, 2H), 3.42 (d, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.27 (m, 2H) ppm.

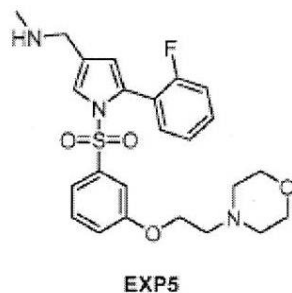
30

【0049】

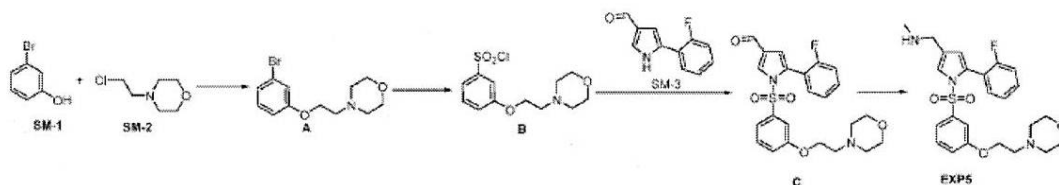
実施例 5

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - モルホリニルエトキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP 5) の合成

【化 8】



10



【0050】

1) 4 - (2 - (3 - ブロモフェノキシ) エチル) モルホリン (化合物 A) の合成
 3 - ブロモフェノール (SM - 1、5 g、29 mmol、1 eq)、N - (2 - クロロ
 エチル) モルホリン (SM - 2、4.3 g、29 mmol、1 eq)、及び炭酸カリウム
 (8 g、58 mmol、2 eq) を乾燥 DMF (50 mL) に溶解し、室温で一晩攪拌し、
 TLC で反応が完了したことを検出した。水を加え、EA で抽出し、有機層を乾燥する
 まで蒸発させ、カラムクロマトグラフィーによる分離で化合物 A (9 g、収率 90%) を
 得た。

20

【0051】

2) 3 - (2 - モルホリニルエトキシ) 塩化ベンゼンスルホニル (化合物 B) の合成
 化合物 A (4 g、14 mmol、1 eq) を無水 THF (50 mL) に溶解し、-78
 まで冷却させ、n - BuLi (13 mL、21 mmol、1.5 eq) を加え、-78
 で 1 時間攪拌し、反応溶液に二酸化硫黄ガスを 20 分間導入し、且つ 2 時間内に -78
 から 0 まで昇温させた。反応溶液を濃縮し乾燥するまで蒸発させ、DCM (50 mL)
) 及び N - クロロスクシンイミド (NCS、2.8 g、21 mmol、1.5 eq) を加
 え、継続的に 12 時間攪拌した。反応溶液について直接カラムクロマトグラフィーによる
 分離を行い、化合物 B (2 g、収率 50%) を得た。

30

【0052】

3) 5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - モルホリニルエトキシ) フェニル)
 スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - ホルムアルデヒド (化合物 C) の合成
 化合物 SM - 3 (1.2 g、6.5 mmol、1 eq) を THF (15 mL) に溶解し、0
 まで冷却させ、NaH (0.4 g、9.8 mmol、1.5 eq) を加え、0 で
 0.5 時間攪拌した。化合物 B (2 g、6.5 mmol、1 eq) と 15 - crown -
 5 (2 g) を反応溶液に加え、室温で 0.5 時間攪拌し、水を加え、EA で抽出し、有機
 層を乾燥するまで蒸発させ、カラムクロマトグラフィーによる分離で化合物 C (700 mg、
 収率 30%) を得た。

40

【0053】

4) 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - モルホリニルエトキシ)
 フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP
 P 5) の合成

化合物 C (0.7 g、1.53 mmol、1 eq) をメタノール (5 mL) に溶解し、
 メタンアミンのアルコール溶液 (4 mL) を加え、0 で酢酸 (2 mL) を加えて 2 時間
 攪拌し、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.9 g、15.3 mmol、10 eq) を加

50

えて継続的に14時間攪拌し、LC-MSで反応が完了したことを検出してから、炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、EAで抽出し、有機層を乾燥するまで蒸発させ、化合物EXP5(100mg、収率15%)を得た。

【0054】

HPLC: 96.06%; MS (ESI) m/z : $[M+H]^+ = 474.6$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.42 - 7.51 (m, 3H), 7.17 - 7.27 (m, 3H), 7.08 - 7.12 (m, 1H), 7.02 (d, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 4.03 (t, 2H), 3.57 (t, 4H), 3.50 (s, 2H), 2.66 (t, 2H), 2.45 - 2.50 (m, 4H), 2.24 (s, 3H) ppm.

10

【0055】

実施例6

3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メチルアミノ)メチレン) - 1H - ピロール - 1 - イル)スルホニル) - N - (2 - モルホリニルエチル)アニリン (EXP6) の合成

【化9】



20

【0056】

実施例5の合成方法を参照し、化合物3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メチルアミノ)メチレン) - 1H - ピロール - 1 - イル)スルホニル) - N - (2 - モルホリニルエチル)アニリン (EXP6) 100mgを得た。収率は20%であった。

30

【0057】

HPLC: 96.99%; MS (ESI) m/z : $[M+H]^+ = 473.6$; 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.57 (d, 1H), 7.48 (q, 1H), 7.17 - 7.24 (m, 3H), 7.08 - 7.12 (m, 1H), 6.85 (d, 1H), 6.55 - 6.58 (m, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.11 (t, 1H), 3.83 (s, 2H), 3.59 (s, 4H), 3.03 (q, 2H), 2.39 - 2.44 (m, 9H) ppm.

【0058】

実施例7

3 - (3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メチルアミノ)メチレン) - 1H - ピロール - 1 - イル)スルホニル)フェノキシ) - N - メチル - n - プロピルアミン (EXP7) の合成

40

【化 10】



10

【0059】

実施例5の合成方法を参照し、化合物3-(3-((2-(2-フルオロフェニル)-4-((メチルアミノ)メチレン)-1H-ピロール-1-イル)スルホニル)フェノキシ)-N-メチル-n-プロピルアミン(EXP7)80mgを得た。収率は40%であった。

【0060】

HPLC: 95.84%; MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ = 432.2; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.40-7.51 (m, 3H), 7.18-7.25 (m, 3H), 7.03-7.13 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.39 (t, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.59 (t, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.81 (m, 2H) ppm.

20

【0061】

実施例8

1-(5-(2-フルオロフェニル)-1-((3-(モルホリニル-2-イルメトキシ)フェニル)スルホニル)-1H-ピロール-3-イル)-N-メチルメタンアミン(EXP8)の合成

【化 11】



30

40

【0062】

実施例5の合成方法を参照し、化合物1-(5-(2-フルオロフェニル)-1-((3-(モルホリニル-2-イルメトキシ)フェニル)スルホニル)-1H-ピロール-3-イル)-N-メチルメタンアミン100mgを得た。収率は20%であった。

【0063】

HPLC: 95.75%; MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ = 460.2, [M+Na]⁺ = 482.2; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.44-7.47 (m, 3H), 7.18-7.28 (m, 3H), 7.04-7.13 (m, 1H), 7.02 (d, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.31 (d, 1H), 3.86 (d, 2H), 3.65-3.75 (m, 2H), 3.44-3.48 (m, 3H), 2

50

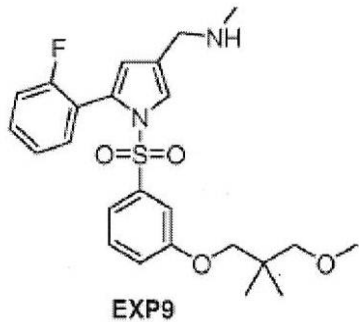
. 82 - 2.85 (m, 1H), 2.64 - 2.67 (m, 3H), 2.45 - 2.51 (m, 1H), 2.23 (s, 3H) ppm。

【0064】

実施例 9

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシ - 2, 2 - ジメチルプロポキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP9) の合成

【化12】



10

【0065】

実施例 1 の合成方法を参照し、1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (3 - メトキシ - 2, 2 - ジメチルプロポキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP9) 59 mg を得た。収率は 15 % である。

【0066】

HPLC : 96.4 % ; MS (ESI) m/z : [M+H]⁺ = 461.5 ; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.85 (t, 1H), 7.68 - 7.75 (m, 3H), 7.46 - 7.49 (m, 2H), 7.27 - 7.35 (m, 2H), 6.80 - 6.83 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 3.79 - 3.85 (m, 4H), 3.61 (t, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.38 (m, 3H), 0.89 (s, 6H) ppm。

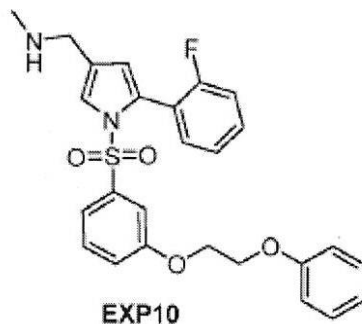
30

【0067】

実施例 10

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - フェノキシエトキシ)フェニル)スルホニル) - 1H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (EXP10) の合成

【化13】



40

【0068】

50

実施例 1 の合成方法を参照し、化合物 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - フェノキシエトキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (E X P 1 0) 7 4 m g を得た。収率は 2 5 % であった。

【 0 0 6 9 】

H P L C : 9 8 . 4 % ; M S (E S I) m / z : [M + H] ⁺ = 4 8 1 . 5 ; ¹ H - N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d 6) δ : 7 . 6 5 - 7 . 8 1 (m , 4 H) , 7 . 4 6 - 7 . 5 0 (m , 2 H) , 7 . 2 5 - 7 . 3 3 (m , 4 H) , 6 . 8 9 - 6 . 9 3 (m , 4 H) , 6 . 1 3 (s , 1 H) , 4 . 5 1 (s , 4 H) , 3 . 6 1 (s , 2 H) , 3 . 2 1 (s , 3 H) p p m。

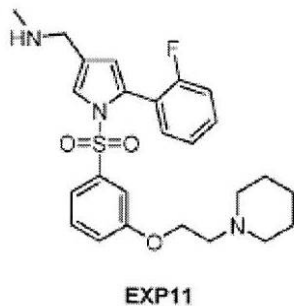
【 0 0 7 0 】

10

実施例 1 1

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - ピペリジン - 1 - イル) エトキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (E X P 1 1) の合成

【 化 1 4 】



20

【 0 0 7 1 】

実施例 1 の合成方法を参照し、化合物 1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - (2 - ピペリジン - 1 - イル) エトキシ) フェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (E X P 1 1) 1 7 4 m g を得た。収率は 3 5 % であった。

30

【 0 0 7 2 】

H P L C : 9 8 . 1 % ; M S (E S I) m / z : [M + H] ⁺ = 4 7 2 . 6 ; ¹ H - N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d 6) δ : 7 . 4 8 - 7 . 7 2 (m , 3 H) , 7 . 1 8 - 7 . 3 2 (m , 3 H) , 7 . 1 0 - 7 . 1 5 (m , 2 H) , 6 . 8 7 (s , 1 H) , 6 . 2 3 (s , 1 H) , 4 . 0 3 (t , 2 H) , 3 . 5 0 (s , 2 H) , 2 . 6 6 (t , 2 H) , 2 . 4 1 - 2 . 5 2 (m , 4 H) , 2 . 2 8 (s , 3 H) , 1 . 3 7 - 1 . 5 1 (m , 6 H) p p m。

【 0 0 7 3 】

実施例 1 2

40

1 - (5 - (2 - フルオロフェニル) - 1 - ((3 - メトキシフェニル) スルホニル) - 1 H - ピロール - 3 - イル) - N - メチルメタンアミン (E X P 1 2) の合成

【化15】



10

【0074】

国際公開WO2006/036024号公報及びJournal of Medicinal Chemistry(2012), 55(9), 4446-4456に記載の合成方法を参照し、化合物1-(5-(2-フルオロフェニル)-1-(3-メトキシフェニル)スルホニル)-1H-ピロール-3-イル)-N-メチルメタンアミン(EXP12)105mgを得た。収率は20%であった。

【0075】

HPLC: 95.4%; MS(ESI)m/z: [M+H]⁺ = 375.5。

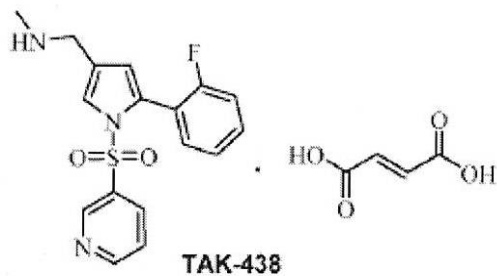
20

【0076】

実施例13

5-(2-フルオロフェニル)-N-メチル-1-(3-ピリジルスルホニル)-1H-ピロール-3-メタンアミンフマル酸塩(TAK-438)の合成

【化16】



30

【0077】

国際公開WO2006/036024号公報及びJournal of Medicinal Chemistry(2012), 55(9), 4446-4456に記載の合成方法を参照し、化合物5-(2-フルオロフェニル)-N-メチル-1-(3-ピリジルスルホニル)-1H-ピロール-3-メタンアミンフマル酸塩(TAK-438)5.0gを得た。収率は40%であった。

40

【0078】

HPLC: 99.8%; MS(ESI)m/z: [M+H]⁺ = 347.1, ¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ: 10.71(s, 3H), 8.86(dd, 1H), 8.55(d, 1H), 7.83-7.85(m, 1H), 7.78(s, 1H), 7.55-7.60(m, 1H), 7.46-7.50(m, 1H), 7.13-7.19(m, 1H), 7.07-7.10(m, 1H), 6.49-6.51(m, 3H), 3.94(s, 2H), 2.50(s, 3H) ppm。

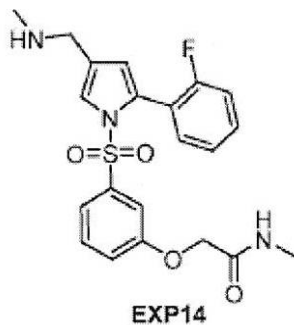
【0079】

実施例14

50

2 - (3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メタンアミン) メチル) - 1 H - ピロール - 1 - イル) スルホニル) フェノキシ) - N - メチルアセトアミド (E X P 1 4) の合成

【化 1 7】



10

【 0 0 8 0】

国際公開 WO 2 0 1 4 / 0 7 5 5 7 5 号公報に記載の合成方法を参照し、化合物 2 - (3 - ((2 - (2 - フルオロフェニル) - 4 - ((メタンアミン) メチル) - 1 H - ピロール - 1 - イル) スルホニル) フェノキシ) - N - メチルアセトアミド (E X P 1 4) 5 0 m g を得た。収率は 4 0 % であった。

20

【 0 0 8 1】

H P L C : 9 6 . 4 % ; M S (E S I) m / z : [M + H] ⁺ = 4 3 2 . 3 。 ¹ H - N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d 6) δ : 7 . 7 5 (s , 1 H) , 7 . 3 9 - 7 . 4 9 (m , 2 H) , 7 . 2 7 - 7 . 2 9 (m , 1 H) , 7 . 0 5 - 7 . 1 7 (m , 4 H) , 6 . 9 6 (s , 1 H) , 6 . 3 9 (d , 1 H) , 4 . 4 5 (s , 2 H) , 4 . 0 9 (s , 2 H) , 3 . 3 1 (s , 3 H) , 2 . 7 9 (s , 3 H) , 2 . 6 8 (s , 3 H) p p m 。

【 0 0 8 2】

実験例 1

H ⁺ / K ⁺ - A T P a s e 生物学的評価

以下のインビトロ (i n v i t r o) スクリーニング実験は、本発明の化合物による H ⁺ / K ⁺ - A T P a s e の酵素活性の阻害作用を評価するためのものである。

30

【 0 0 8 3】

実験材料と機器：

- 1) ウサギ胃粘膜のミクロソーム (H ⁺ / K ⁺ - A T P a s e が豊富で、自己抽出)
- 2) 5 - アデノシン三リン酸 A T P (シグマ - アルドリッチ社、品番 : A 2 3 8 3)
- 3) マラカイトグリーン (百霊威化学技術有限公司、品番 : 9 1 3 1 2 0)
- 4) モリブデン酸アンモニウム (百霊威化学技術有限公司、品番 : 1 2 8 3 2 1)
- 5) バリノマイシン (百霊威化学技術有限公司、品番 : 2 2 7 3 0 4)

【 0 0 8 4】

実験手順：

40

試薬の調製：

- 1) 化合物は D M S O で溶解され、適切な濃度に調製した。
- 2) 緩衝液 : 5 0 m m o l / L H E P E s - T r i s 、 p H = 6 . 5 、 5 m m o l / L 塩化マグネシウム、 1 0 μ m o l / L バリノマイシン。
- 3) 緩衝液 : 5 0 m m o l / L H E P E s - T r i s 、 p H = 6 . 5 、 5 m m o l / L 塩化マグネシウム、 1 0 μ m o l / L バリノマイシン、 5 m m o l / L 塩化カリウム。
- 4) A T P : 緩衝液 1 で A T P を 5 m M に希釈する。
- 5) マラカイトグリーン溶液 : 0 . 1 2 % マラカイトグリーンを 2 . 5 m o l / L の硫酸に溶解し、 7 . 5 % (v / v) モリブデン酸アンモニウム及び 1 1 % T w e e n 2 0 (v / v) を使用する時、 1 0 0 : 2 5 : 2 の割合で混合した。

50

6) ウサギ胃粘膜のミクロソーム ($H^+ / K^+ - ATPase$ が豊富) について、抽出方法はショ糖勾配遠心: ウサギの胃を水道水、3 M NaCl 溶液で洗浄し、濾紙で表面の水分を除去した。冷えた均質化緩衝液 (4 mL / g 組織) を加え、組織ホモジナイザーで 2 ~ 5 分間均質化した。均質化後、比較的大きな組織粒子がある場合、遠心分離 (600 g、10 分間) で除去でき、上澄液をクリーンな遠心管に移動して 20000 g で 30 分間遠心分離してから、上澄液をクリーンな遠心管に移動し、更に遠心した。10000 g で 90 分間遠心分離した後、沈殿物を収集した。沈殿物をホモジネートに懸濁させ、沈殿を行い、均一に分散させ、Bradford 法でタンパク質濃度を測定し、濃度を 10 mg / mL に調整した。7.5 % Ficoll 成層液を等比例的に加え、10000 g で 60 分間遠心分離してから、中層 ($H^+ / K^+ - ATPase$ が豊富な胃粘膜) をクリーンな遠心管に収集し、ホモジネートで 4 ~ 5 倍希釈し、引き続き 10000 g で 90 分間遠心分離し、沈殿物を収集した。沈殿物をホモジネートに懸濁させ、沈殿を行い、ガラスホモジナイザーで均一にホモジネートし、Bradford 法でタンパク質濃度を測定し、濃度を 22.5 mg / mL に調整し、-80 °C に冷凍した。

10

【0085】

実験プロセス:

45 μ L の緩衝液 2 に 5 μ L の胃粘膜のミクロソーム ($H^+ / K^+ - ATPase$) を加え、そして 5 μ L の化合物溶液を加え、5 mM の ATP を 5 μ L 加えて反応を開始し、37 °C で 30 分間予備反応を行った。マラカイトグリーン溶液 15 μ L を加えて反応を終了させ、室温で 20 分間平衡化してから、620 nm での光吸収値を測定した。

20

【0086】

また、同じ体積で塩化カリウムが加えられない反応をバックグラウンドとして実施し、酵素活性を計算する時に差し引いた。

【0087】

化合物の IC_{50} 値は、異なる濃度での抑制率により算出した。

【0088】

実験結果: 化合物の IC_{50} 値

$H^+ / K^+ - ATPase$ の活性に対する本発明で提供する式 I に示す化合物の 50 % 阻害濃度 (IC_{50})

【0089】

30

【表 1】

表 1: 化合物の $H^+/K^+-ATPase$ の活性に対する 50 % 阻害濃度 (IC_{50})

TAK-438	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4	EXP 5	EXP 6	EXP 7	EXP 8
+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++
EXP 9	EXP 10	EXP 11	EXP 12	EXP 14				
++	+++	+	+++	++				

+++は $IC_{50} < 100$ nM、++は 0.1 ~ 1 μ M の範囲、+は 1 ~ 5 μ M の範囲を示す。

40

【0090】

実験例 2

hERG カリウムチャネルに対する化合物 EXP 1、TAK-438、及び EXP 12 の効果に関する研究

【0091】

実験システム

1) 細胞培養: hERG 細胞株を通常の培養で、10 % ウシ胎児血清及び 250 μ g / mL の G418 を含有する DMEM において継代した。

2) 液体調製: 全細胞パッチクランプ実験技術法で使用する細胞外液の成分 (mM) は: NaCl 145; MgCl₂ 1; KCl 4; グルコース 10; HEPES 1

50

0 ; 及び CaCl_2 2 であり、 NaOH で pH 値を 7.4 に調整し、スクロースで浸透圧を 300 mOsm に調整した。細胞内液の成分 (mM) は: KCl 140 ; MgCl_2 1 ; EGTA 5 ; HEPES 10 ; 及び Na_2ATP 4 であり、 KOH で pH 値を 7.2 に調整しスクロースで浸透圧を 290 mOsm に調整した。

【0092】

細胞内・外液の主成分

試薬	細胞外液(mM)	細胞内液(mM)
CaCl_2	2	-
MgCl_2	1	1
KCl	4	140
NaCl	145	-
グルコース	10	-
HEPES	10	10
EGTA	-	5
Na_2ATP	-	4
pH	7.4 (NaOH で調整), モル浸透圧濃度 ~300 mOsm	7.2 (KOH で調製), モル浸透圧濃度 ~290 mOsm

10

20

【0093】

実験方法

1) 電気生理学的記録: 実験においてペトリ皿を取り出し、細胞外液で2回洗い、倒立の顕微鏡ステージに置いた。室温で全細胞パッチクランプ実験を行い、ホウケイ酸ガラスの微小電極先端の抵抗は3~5 MΩである。

2) 電圧刺激策及び電流記録: 全細胞記録モード確立後、膜電位を -80 mV に抑え、30秒毎に細胞に +50 mV の脱分極電圧刺激を与え、2秒間継続してから -50 mV に再分極し、3秒間継続して hERG テール電流を出した。脱分極電圧刺激の前に、細胞に 50 ms で -50 mV の再分極電圧を与え、この電圧で記録される電流が hERG テール電流を計算するためのベースラインである。記録標準に達した細胞のみが実験対象化合物の検出に使用される。化合物を加える前に、hERG テール電流は細胞外液において少なくとも3分間安定に記録される。灌流投与後、hERG テール電流の振幅変動が < 5 % の場合、薬物効果が定常状態になったと認められる。電流が6分以内に定常状態にならない場合、当該濃度での化合物の検出も終了する。

30

3) 検出基準: 実験において膜抵抗が 1,000 MΩ より大きい。初期電流が 300 pA より大きい。全細胞記録モード確立後、直列抵抗が 12 MΩ より小さい。リーク電流がイオンチャネル電流の 10 % (-80 pA は最大値) より小さい。

【0094】

データ分析

生データには Clampex 10.2 記録を使用し、*abf ファイルに保存した。データ収集・分析には pCLAMP 10.1 プログラムを使用した。化合物を加える前に電流が定常状態になった 4~5 つの sweep を選出し、比較用電流の振幅として平均ピークを算出した。化合物を加えた後に電流が定常状態になった 4~5 つの sweep を選出し、電流が抑制された後の残りの振幅として平均ピークを算出した。実験対象化合物の hERG 電流に対する抑制率は、以下の式に従って計算した。

40

$$\% \text{抑制率} = \{ 1 - (\text{電流の残りの振幅}) / (\text{比較用電流の振幅}) \} * 100$$

【0095】

上記の式により複数の濃度での実験対象化合物の hERG 電流に対する抑制率 (平均値 ± 標準偏差) を得てから、ロジスティック方程式でデータフィッティングを行い、 IC_{50} 値を得た。

50

【 0 0 9 6 】

【表 2】

表 2 ; EXP 1, TAK-438, EXP 12 の hERG 電流に対する抑制効果

化合物の名称	最高検出濃度	最高検出濃度での抑制率	IC ₅₀ 値
EXP 1	100 μ M	86.21 $\pm$ 1.67 0/0	18.69M
TAK-438	100 μ M	88.23 $\pm$ 3.18%	15.93M
EXP 12	30 μ M	90.33 $\pm$ 2.16%	3.95M

10

【 0 0 9 7 】

実験例 3

ヒスタミン誘発性胃酸分泌に対する化合物 E X P 1、T A K - 4 3 8、及び E X P 1 4 の効果に関する研究

【 0 0 9 8 】

実験材料

1) 動物

S D ラット、S P F 級、雄、1 8 0 ~ 2 2 0 g、浙江省実験動物センターより提供され、生産ライセンス番号：S C X K (浙) 2 0 1 4 - 0 0 0 1。

2) 薬物及び試薬

化合物 E X P 1：使用の直前に少量の酢酸（約 1 . 1 0 N E X P 1）、0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液で所望の濃度の透明な溶液に溶解した。

化合物 T A K - 4 3 8：使用の直前に 0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液で所望の濃度の透明な溶液に溶解した。

化合物 E X P 1 4：使用の直前に少量の酢酸（約 1 . 1 0 N E X P 1 4）、0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液で所望の濃度の透明な溶液に溶解した。

0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液：安徽雙鶴薬業有限責任公司、ロット番号：1 3 1 2 0 2。

ヒスタミン二塩酸塩：a l a d d i n、ロット番号：H 1 1 0 8 6 8。

抱水クロラル：国薬集団化学試剤有限公司、ロット番号：2 0 1 3 0 3 1 4、使用の直前に 0 . 9 % の塩化ナトリウム溶液で 3 % の抱水クロラル溶液に調製した。

フェノールフタレイン：国薬集団化学試剤有限公司、ロット番号：F 2 0 1 1 0 1 2 5、使用の直前に 9 5 % のエタノールで 1 % のフェノールフタレイン溶液に調製した。

3) 器具

電子天秤：北京賽多利斯儀器系統有限公司製

遠心分離機：上海医療器械（集団）有限公司手術器械廠製

アルカリピュレット：中国薬科大学分析教研室より提供された。

【 0 0 9 9 】

方法と結果

1 8 0 ~ 2 2 0 g の S P F 級 S D ラットを 6 0 匹用意し、体重により無作為に 5 つの群、即ち、実験対象化合物 E X P 1 群（2 m g / k g）、T A K - 4 3 8 群（2 m g / k g、遊離塩基により）、E X P 1 4 群（2 m g / k g）、陰性対照群（同体積の生理食塩水）、及びモデル対照群（同体積の生理食塩水）に分けた。各群のラットは 1 2 匹である。2 4 時間断食で、断水なし。2 4 時間後、実験対象化合物 A、B、C 群には強制経口投与を行い、投与の容積が 1 m L / 1 0 0 g で、各群に 1 回投与した。陰性対照群及びモデル対照群には、同体積の生理食塩水を強制経口投与した。その後、ラットを抱水クロラル 3 0 0 m g / k g（1 m L / 1 0 0 g）で麻酔してから、ラットボードに固定させ、胸骨剣状突起の下部から腹中線に沿って腹壁を切り、切開部が 2 ~ 3 c m であり、左肋骨縁部に指で押し上げ、胃を切開部から露出させた。幽門の下部に糸を通し、幽門を結紮してから（隣の血管は結紮しない）、腹壁の切開部を縫合した。動物への実験対象化合物又は生理

20

30

40

50

食塩水の強制経口投与から1時間後、ヒスタミン二塩酸塩（30mg/10m/kg）を皮下投与した。ヒスタミン二塩酸塩投与から3時間後、過剰なCO₂による窒息でラットを殺し、胃を取り出し、内容物を収集した。3000rpm/分で10分間遠心分離し、0.1mol/LのNaOHで酸液をpH7.0に滴定した。3時間の間の全酸を計算した。その結果は表3に示す。

【0100】

【表3】

表3；実験対象化合物のヒスタミン誘発性胃酸分泌に対する効果

群別	用量(mg/kg)	全酸量 (10 ⁻⁴ mol)	酸抑制率%
陰性対照	/	0.33±0.12	/
モデル対照	/	1.09±0.18	/
EXP1	2	0.49±0.12**	55.4
TAK-438	2	0.52±0.10**	52.3
EXP14	2	0.65 ±0.20**	40.4

注：*p<0.05、**<0.01、モデル群と比較。

10

【0101】

実験例4

化合物EXP1、TAK-438のラット強制経口投与の急性毒性実験報告

20

【0102】

対象薬物：化合物EXP1（約1.10N EXP1）、TAK-438（投与量は遊離塩基による）

実験内容：単回投与量：2000mg/kg、600mg/kg、1回強制経口投与。投与の容積：10ml/kg。14日間観察し、毎日ラットの行動と体重を観察した。

動物：SPF級SDラット、体重180～220g、浙江省実験動物センターより提供された。動物合格証番号：SCXK（浙）2014-0001。

グルーピング：対照群、600mg/kg群、2000mg/kg群、各群に4匹あり、雌雄同数。

30

【0103】

実験結果：

EXP1：600mg/kg又は2000mg/kgの単回経口投与で動物の死亡なし。600mg/kgの単回経口投与の場合、動物の体重に有意な影響がない。

TAK-438：2000mg/kg：全部死亡、600mg/kg：体重増加の抑制。

【0104】

説明・理解のために、例示及び実施例を通じて上記の発明を詳細に説明した。当業者には、特許請求の範囲において変更及び修正を行えることは勿論である。従って、以上の説明は例示であって制限的なものではないことを意図していることが理解されるべきである。従って、本発明の範囲は明細書により決定されるのではなく、特許請求の範囲及び特許請求の範囲により授權される等価物の全ての範囲により決定されるべきである。

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04
A 6 1 K	31/40	(2006.01)	A 6 1 K	31/40
A 6 1 K	31/4025	(2006.01)	A 6 1 K	31/4025
A 6 1 K	31/5377	(2006.01)	A 6 1 K	31/5377
A 6 1 K	31/454	(2006.01)	A 6 1 K	31/454

(72)発明者 秦引林

中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区中山▲東▼路3 2 3号之2 前半山▲園▼1 2号1 幢1 ▲層▼

(72)発明者 ▲蘇▼梅

中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区中山▲東▼路3 2 3号之2 前半山▲園▼1 2号1 幢1 ▲層▼

(72)発明者 金秋

中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区中山▲東▼路3 2 3号之2 前半山▲園▼1 2号1 幢1 ▲層▼

(72)発明者 ▲陳▼涛

中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区中山▲東▼路3 2 3号之2 前半山▲園▼1 2号1 幢1 ▲層▼

(72)発明者 ▲蒋▼建▲華▼

中華人民共和国 江▲蘇▼省南京市玄武区中山▲東▼路3 2 3号之2 前半山▲園▼1 2号1 幢1 ▲層▼

審査官 水島 英一郎

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 7 5 5 7 5 (WO , A 1)

特表2 0 0 8 - 5 2 2 9 5 2 (JP , A)

国際公開第2 0 0 6 / 0 3 6 0 2 4 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 D

C A p l u s (S T N)

R E G I S T R Y (S T N)