

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506334**(P2005-506334A)**

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷

C07D 333/36
A61K 31/381
A61P 1/04
A61P 3/10
A61P 9/00

F 1

C07D 333/36
A61K 31/381
A61P 1/04
A61P 3/10
A61P 9/00

テーマコード(参考)

4 C023
4 C086

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-532491 (P2003-532491)
(86) (22) 出願日 平成14年10月4日 (2002.10.4)
(85) 翻訳文提出日 平成16年4月2日 (2004.4.2)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/031902
(87) 国際公開番号 WO2003/029242
(87) 国際公開日 平成15年4月10日 (2003.4.10)
(31) 優先権主張番号 60/326,976
(32) 優先日 平成13年10月4日 (2001.10.4)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 591002957
スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ
ション
SMITHKLINE BEECHAM
CORPORATION
アメリカ合衆国ペンシルベニア州1940
6-0939、キング・オブ・ブルシア、
スウェードランド・ロード709番
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
(74) 代理人 100116311
弁理士 元山 忠行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NF- κ B阻害剤

(57) 【要約】

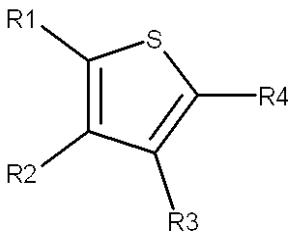
本発明は、新規化合物ならびに I-B の IKK- リン酸化に対するアミノチオフェン阻害剤を用いる疾患の治療方法を提供する。それを実施する場合、これらのアミノチオフェン阻害剤は、NF- κ B の過剰活性化が関与している疾患において、転写因子 NF- κ B の病理学的活性化をブロックする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下式 I :

【化 1】



10

[式中、

R₁ は CONH₂ 、または SO₂NH₂ であり；R₂ は NR₅R₆ であり；R₃ は H 、またはハロゲンであり；R₄ はアリールまたはヘテロアリールであり；R₅ は H またはアルキルであり；ただし、R₁ が CONH₂ である場合には、R₆ は H 、 CO - アルキル、 SO₂ - アルキル、 CONH₂ 、 CONH - アルキル、 CONH - アリール、 CONH - ヘテロアリール、 CSNH₂ 、 CSNH - アルキル、 CSNH - アリール、 CSNH - ヘテロアリール、 SO₂NH₂ 、 SO₂NH - アルキル、 SO₂NH - アリール、 および SO₂NH - ヘテロアリールからなる群より選択され；R₁ が SO₂NH₂ である場合には、R₆ は CONH₂ であり；R₁ が CONH₂ である場合には、R₂ は NHCONH₂ でない] で示される化合物およびその医薬上許容される塩、水和物および溶媒和物。

【請求項 2】

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド；

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド；

5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド；

5 - (3 - クロロ - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド；

5 - (4 - トリフルオロメチル - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド； および

5 - フェニル - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド

からなる群より選択される請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

病理学的な NF - B の活性化により特徴付けられる疾病的治療方法であって、治療を要する患者に有効量の請求項 1 記載の化合物を投与することにより該病理学的な活性化を阻害することを特徴とする方法。

【請求項 4】

疾病が炎症または組織修復障害である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

疾病が、炎症および組織修復障害；特に、リューマチ性関節炎、炎症性腸疾患、喘息および COPD (慢性閉塞性肺疾患) 、骨関節炎；骨粗しょう症および線維症；乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射 (UV) により誘発される皮膚ダメージを包含する皮膚病；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎を包含する自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム性動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を包含する癌、悪液質、後天性免疫不全症候群

40

50

(AIDS)を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連する炎症、成人の呼吸困難症候群、毛細血管拡張性運動失調からなる群より選択されるものである請求項4記載の方法。

【請求項6】

疾病が皮膚病である請求項3記載の方法。

【請求項7】

疾病が乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射による皮膚ダメージからなる群より選択される請求項3記載の方法。

【請求項8】

疾病が自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム性動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、骨関節炎、骨粗しょう症ならびに毛細血管拡張性運動失調からなる群より選択されるものである請求項3記載の方法。 10

【請求項9】

疾病が自己免疫疾患である請求項3記載の方法。

【請求項10】

自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎または強直性脊椎炎である請求項3記載の方法。

【請求項11】

疾病が癌および／または悪液質である請求項3記載の方法。

【請求項12】

癌がホジキン病である請求項3記載の方法。

【請求項13】

疾病が後天性免疫不全症候群(AIDS)を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連した炎症である請求項3記載の方法。

【請求項14】

疾病がAIDSである請求項3記載の方法。

【請求項15】

疾病が成人の呼吸困難症候群である請求項3記載の方法。

【請求項16】

NF-Bおよびチェックポイントキナーゼの二重阻害が存在する請求項3記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般的には、アミノチオフェン化合物を用いる転写因子NF-B(核因子-B)の病理学的活性化を阻害する方法に関する。かかる方法はNF-Bの活性化が関与する疾病的治療に特に有用である。より詳細には、これらの方法は、NF-Bダイマーの分解および活性化を結果として引き起こすIKB(阻害性蛋白B)のIKK-(IKBキナーゼ-)リン酸化を阻害するために用いることができる。かかる方法は、炎症および組織修復障害；特に、リューマチ性関節炎、炎症性腸疾患、喘息およびCOPD(慢性閉塞性肺疾患)、骨関節炎；骨粗しょう症および線維症；乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射(UV)により誘発される皮膚ダメージを包含する皮膚病；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、を包含する自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム性動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を包含する癌、悪液質、後天性免疫不全症候群(AIDS)を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連する炎症、成人の呼吸困難症候群、毛細血管拡張性運動失調を包含するNF-B活性化に関連した種々の疾病的治療において有用である。 40

【0002】

発明の背景

急性および慢性炎症および癌に関するメディエイタを理解する最近の科学の進歩は、有 50

効な治療のサーチの新たな戦略を導いた。伝統的なアプローチは、特異的抗体、受容体アンタゴニスト、または酵素阻害剤の使用のごとき直接標的化法を包含する。種々のメディエイタの転写および翻訳に関する調節機構の解明における最近のブレークスルーは、遺伝子転写レベルに向けられた治療アプローチに対する興味の増加を導いた。

【0003】

核因子 B (NF-B) はポリペプチドの Rel / NF-B ファミリーの種々の組み合わせから構成される、密接に関連したダイマー転写因子複合体のファミリーに属する。該ファミリーは哺乳動物における個々の遺伝子産物、RelA (p65)、NF-B1 (p50 / p105)、NF-B2 (p49 / p100)、c-Rel および RelB からなり、それらはすべてヘテロダイマーまたはホモダイマーを形成しうる。これらの蛋白は非常に相同意向的な 300 個のアミノ酸「Rel 相同ドメイン」を共有しており、該ドメインは DNA 結合およびダイマー化ドメインを含んでいる。Rel 相同ドメインの外部 C-末端は、NF-B を細胞質から核へと輸送するのに重要な核トランスポンス配列である。さらに、p65 および c-Rel は、それらの C 末端に強力なトランスポンス活性化ドメインを有する。

【0004】

NF-B の活性は、それと蛋白の阻害剤 I-B ファミリーのメンバーとの相互作用により調節される。この相互作用は NF-B 蛋白上の核局在化配列を効果的にブロックし、かくして、ダイマーが核へ移動するのを防止する。広範な刺激が多数のシグナルトランスダクション経路により NF-B を活性化させる。細菌生成物 (LPS)、いくつかのウイルス (HIV-1、HTLV-1)、炎症サイトカイン (TNF-、IL-1)、環境性および酸化性ストレスならびに DNA 損傷剤が包含される。しかしながら、すべてに共通した刺激は I-B のリン酸化およびその後の分解である。I-B は、最近同定された IKK キナーゼ (IKK- および IKK-) により 2 つの N 末端セリンにおいてリン酸化される。部位特異的突然変異の研究により、いったんリン酸化された蛋白はユビキチン - プロテアソーム経路を経る分解用にフラッゲを付されるという点で、これらのリン酸化がその後の NF-B の活性化に重要であることが示された。I-B がないと、活性な NF-B 複合体が核に転移して、そこでそれらが選択的な様式で好ましい遺伝子特異的エンハンサー配列に結合しうる。多くのサイトカインおよびケモカイン、細胞接着分子、急性フェーズ蛋白、免疫調節蛋白、エイコサノイド代謝酵素ならびに抗 - アポトーシス遺伝子が NF-B により調節されている遺伝子に関連している。

【0005】

TNF、IL-1、IL-6 および IL-8 のごときサイトカイン、ICAM および VCAM のごとき細胞接着分子、ならびに誘導可能亜硝酸酸化シンターゼ (iNOS) を包含する多数の前炎症メディエイタの調節発現において NF-B が重要な役割を果たしていることはよく知られている。かかるメディエイタは炎症部位における白血球の動員において役割を演じてあり、iNOS の場合にはいくつかの炎症性および自己免疫疾患において器官破壊を導く。

【0006】

炎症性疾患における NF-B の重要性は、喘息を包含する気道炎症に関する研究においてさらに高められており、そこで NF-B が活性化されていることが示されている。この活性化はこれらの疾患に特徴的なサイトカイン産生増加および白血球浸潤の基礎となっている。さらに、吸入されたステロイドは気道過敏性を低下させ、喘息性気道の炎症応答を抑制することが知られている。NF-B のグルココルチコイド阻害に関する最近の知見に鑑みると、これらの効果は NF-B の阻害を介して媒介されると考えてよい。

【0007】

炎症性疾患における NF-B の役割に関するさらなる証拠はリューマチ性滑膜の研究から得られる。通常には、NF-B は不活性細胞質複合体として存在するが、最近の免疫組織化学的研究により、NF-B が核に存在し、それゆえリューマチ性滑膜を構成する細胞において活性があることが示されている。さらに、NF-B は TNF- または

10

20

30

40

50

I L - 1 での刺激に応答してヒト滑膜細胞中で活性化されることが示されている。かかる分布は、この組織に特徴的なサイトカインおよびエイコサノイドの産生増加に関する機構を基礎としうる。Roshak, A. K., et al., J. Biol. Chem., 271, 31496-31501 (1996) 参照。I K K - の発現はリューマチ性関節炎患者の滑膜細胞において示されており、遺伝子導入の研究により、これらの細胞中の刺激された炎症メディエイタ産生における I K K - の中心的役割が示されている。Aupperle et al. J. Immunology 1999, 163:427-433 および Aupperle et al. J. Immunology 2001;166:2705-11 参照。より最近になって、野生型 I K K - アデノウイルス構築物の関節内投与は、ドミナント - ネガティブ I K K - により阻害されたアジュバントにより誘導される関節炎のラットに投与している間に足の腫れを引き起こすことが示された。Tak et al. Arthritis and Rheumatism 2001; 44:1897-1907 参照。

10

20

【0008】
N F - B / Rel および I B 蛋白もまた新生物の形質転換および転移において役割を果たしている可能性がある。ファミリーのメンバーがインビトロおよびインビボにおいて過剰発現、遺伝子増幅、遺伝子転移または転座の結果としての細胞の形質転換に関連している。さらに、これらの蛋白をコードする遺伝子の転移および / または増幅はある種のヒトリンパ腫の 20 ~ 25 % において見られる。さらに、N F - B はオンコジーン r a s により活性化され、N F - B 活性化の遮断は r a s により媒介される細胞の形質転換を抑制する。そのうえ、アポトーシスの調節における N F - B の役割が報告されており、腫瘍細胞増殖の調節におけるこの転写因子の役割が強調されている。TNF、イオン化照射およびDNA損傷剤はすべて N F - B を活性化させ、その結果、数種の抗 - アポトーシス蛋白のアップレギュレーションされた発現を導いた。逆に、N F - B の阻害は、数種の細胞タイプにおいてこれらの作用剤によるアポトーシス性細胞死滅を促進することが示された。このことは、化学療法に対する腫瘍細胞の主な耐性機構である可能性があるので、N F - B 活性化の阻害剤は、単一作用剤または混合治療剤として有用な化学療法作用剤でありうる。最近の報告は骨格筋細胞分化の阻害剤ならびにサイトカインにより誘導される筋肉疲労の調節剤としての N F - B に関するものである。

30

【0009】
いくつかの N F - B 阻害剤が C. Wahl, et al. J. Clin. Invest. 101(5), 1163-1174 (1998), R. W. Sullivan, et al. J. Med. Chem. 41, 413-419 (1998), J. W. Pierce, et al. J. Biol. Chem. 272, 21096-21103 (1997) に記載されている。

30

【0010】
海洋天然産物であるヒメニアルジシン (hymenialdisine) は N F - B を阻害することが知られている。Roshak, A., et al., JPET, 283, 955-961 (1997). Breton, J. J and Chabot-Fletcher, M. C., JPET, 282, 459-466 (1997)。

40

【0011】
さらに、I K K 複合体のインドールおよびベンズイミダゾール阻害剤に関する特許が出願されており (DE 19928424 および WO200130774 参照)、天然産物であるスタウロスボリン (staurosporine) ケルセチン (quercetin)、K 252a および K 252b は I K K - 阻害剤であることが示されている。Peet, G. W. and Li, J. J. Biol. Chem., 274, 32655-32661 (1999) および Wisniewski, D., et al., Analytical Biochem. 274, 220-228 (1999) 参照。

40

【0012】
米国特許第 3 9 6 3 7 5 0 号にはある種のアミノチオフェン類の製造が記載されている。

50

【0013】
発明の概要

本発明は、新規化合物ならびに本発明の化合物を用いる転写因子 N F - B の活性化抑制のための新規方法に関する。

本発明の1の目的は、転写因子N F - Bの活性を変化させることにより治療的に改変されうる疾病的治疗方法を提供することである。

したがって、第1の態様において、本発明は、式Iで示される化合物を含む医薬組成物を提供する。

もう1つの態様において、本発明は、I K K - によるI Bのリン酸化およびその後の分解を阻害することにより疾病的病理が治療的に改変されうるものである、疾病的治疗方法を提供する。

さらにもう1つの態様において、本発明は、N F - Bの病理学的活性化を阻害することにより疾病的病理が治療的に改変されうるものである、疾病的治疗方法を提供する。

【0014】

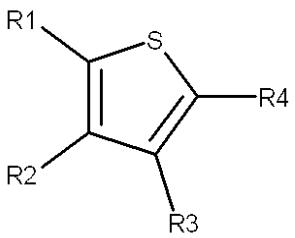
特別な態様において、本発明は、炎症性および組織修復障害、特にリューマチ性関節炎、炎症性腸疾患、喘息およびC O P D（慢性閉塞性肺疾患）、骨関節炎、骨粗しょう症および線維症的疾患、乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射（U V）により誘発される皮膚ダメージを包含する皮膚病；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎を包含する自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム製動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を包含する癌、悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連した炎症、成人性呼吸困難症候群ならびに毛細血管拡張性運動失調を包含する、N F - B活性化に関連した種々の疾病的治疗方法を提供する。

【0015】

発明の詳細な説明

本発明の化合物は下式I：

【化1】



[式中、

R₁ は C O N H₂、または S O₂ N H₂ であり；

R₂ は N R₅ R₆ であり；

R₃ は H、またはハロゲンであり；

R₄ はアリールまたはヘテロアリールであり；

R₅ は H またはアルキルであり；

ただし、R₁ が C O N H₂ である場合には、R₆ は H、C O - アルキル、S O₂ - アルキル、C O N H₂、C O N H - アルキル、C O N H - アリール、C O N H - ヘテロアリール、C S N H₂、C S N H - アルキル、C S N H - アリール、C S N H - ヘテロアリール、S O₂ N H₂、S O₂ N H - アルキル、S O₂ N H - アリール、および S O₂ N H - ヘテロアリールからなる群より選択され；

R₁ が S O₂ N H₂ である場合には、R₆ は C O N H₂ であり；

R₁ が C O N H₂ である場合には、R₂ は N H C O N H₂ でない] で示される化合物およびその医薬上許容される塩、水和物および溶媒和物から選択される。

【0016】

本発明において有用な好ましい化合物は

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド；

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸ア

10

20

30

40

50

ミド；

5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド；

5 - (3 - クロロ - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド；

5 - (4 - トリフルオロメチル - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド；および

5 - フェニル - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド

を包含する。

【0017】

本発明は、炎症性および組織修復障害、特にリューマチ性関節炎、炎症性腸疾患、喘息およびCOPD（慢性閉塞性肺疾患）、骨関節炎、骨粗しょう症および線維症的疾患、乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射（UV）により誘発される皮膚ダメージを包含する皮膚病；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎を包含する自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム製動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を包含する癌、悪液質、後天性免疫不全症候群（エイズ）を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連した炎症、成人性呼吸困難症候群ならびに毛細血管拡張性運動失調を包含する、NF-B活性化に関連した種々の疾患の治療方法を提供する。10

【0018】

定義

本発明は、本発明の化合物のすべての水和物、溶媒和物、複合体およびプロドラッグを包含する。プロドラッグは共有結合した化合物であり、インビボにおいて式IおよびIIで示される活性のある親薬剤を放出するものである。キラル中心または別形態の異性中心が本発明の化合物中に存在する場合、エナンチオマーおよびジアステレオマーを包含するすべての形態のかかる異性体（複数も可）は本発明に包含される。キラル中心を含む本発明の化合物をラセミ混合物、エナンチオマー的に豊富化された化合物として使用してもよく、あるいはよく知られた方法を用いてラセミ混合物を分離し、個々のエナンチオマーを単独で用いてもよい。化合物が不飽和炭素-炭素二重結合を有する場合、シス（Z）およびトランス（E）の両方の異性体が本発明の範囲内である。化合物がケト-エノール互変異性体のごとき互変異性体として存在する場合、各互変異性体は、平衡状態であってもあるいは1の形態が優勢であっても本発明の範囲内である。20

【0019】

式Iまたはその下位の式中に含まれる置換基の意味は、特記しないかぎり、いずれの場合にもその意味から独立したものであり、あるいはまた他のいずれの場合にも他の置換基の意味とは独立したものである。

【0020】

本明細書の用語「アルキル」は、一重の炭素-炭素結合により結合された、1~6個の炭素原子を有する、置換されていてもよい炭化水素基をいう。アルキル炭化水素基は直鎖状、分枝状または環状であってよく、飽和または不飽和であってよい。置換アルキル上に存在してもよい置換基は、アリール、OH、O-アルキル、CO、ハロゲン、CF₃、およびOCF₃からなる群より選択される。30

【0021】

本明細書の用語「アリール」は、共役パイ電子系を有する少なくとも1個の環を有する置換されていてもよい芳香族基をいい、2個までの共役または縮合した環システムを含むものである。アリールは炭素環式アリールおよびバイアリール基を包含し、それらはいずれも置換されていてもよい置換基はハロゲン、C₁-₄アルキル、NH₂、OCF₃、CF₃、O-アルキル、S-アルキル、CN、CHO、SO₂-アルキルおよびNO₂からなる群より選択される。40

【0022】

本明細書の用語「ヘテロアリール」は、共役パイ電子系を有する少なくとも1個の環を有する置換されていてもよい芳香族基をいい、2個までの共役または縮合した環システムお50

よりO、SおよびNから選択される1～3個の異種原子を含むものである。ヘテロアリールは炭素環式ヘテロアリールアリール、アリール-ヘテロアリールおよびバイヘテロアリール基を包含し、それらはいずれも置換されていてもよい。好ましい置換基は、ハロゲン、C₁～₄アルキル、NH₂、OCF₃、CF₃、O-アルキル、S-アルキル、CN、CHO、SO₂-アルキルおよびNO₂からなる群より選択される。ヘテロアリール環の例はピロール、フラン、チオフェン、インドール、イソインドール、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、ベンゾチオフェン、ピリジン、キノリン、イソキノリン、キノリジン、ピラゾール、イミダゾール、イソオキサゾール、オキサゾール、イソチアゾール、チアゾール、ピリダジン、ピリミジンおよびピラジンを包含する。

[0 0 2 3]

10

本明細書の用語「ハロゲン」は、F、Cl、BrおよびIを包含する。

[0 0 2 4]

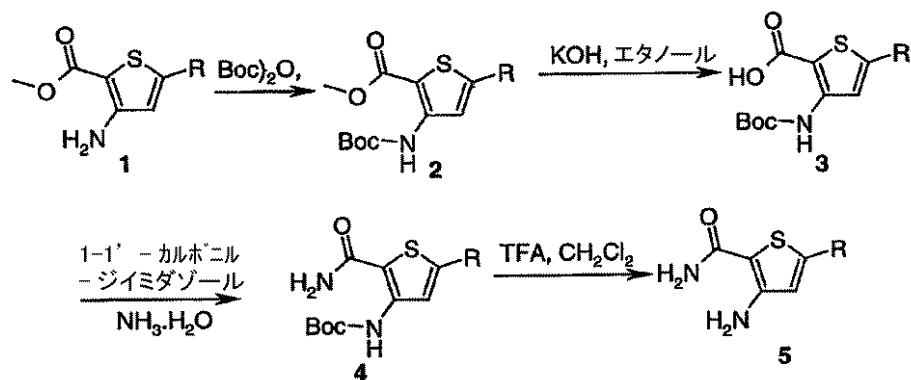
製造方法

アミノチオフェンカルボン酸アミドアナログの一般的な製造スキーム I および II に示す。市販アミノチオフェンカルボン酸エステル 1 から合成を開始した。ジ炭酸ジ-tert-ブチル [(BOC)₂O] を用いるアミノ基の保護およびエステルの加水分解により酸 3を得た。得られた酸を 1,1-カルボニルジイミダゾールを用いて活性化させ、次いで、水酸化アンモニウムと反応させ、トリフルオロ酢酸 (TFA) で処理し、次いで、アミノチオフェンカルボン酸アミド 5を得た。化合物 5 は容易にアセトアミド 6、アウルホニアミド 7a およびメチルウレア 7b に変化させられた。

20

【化 2】

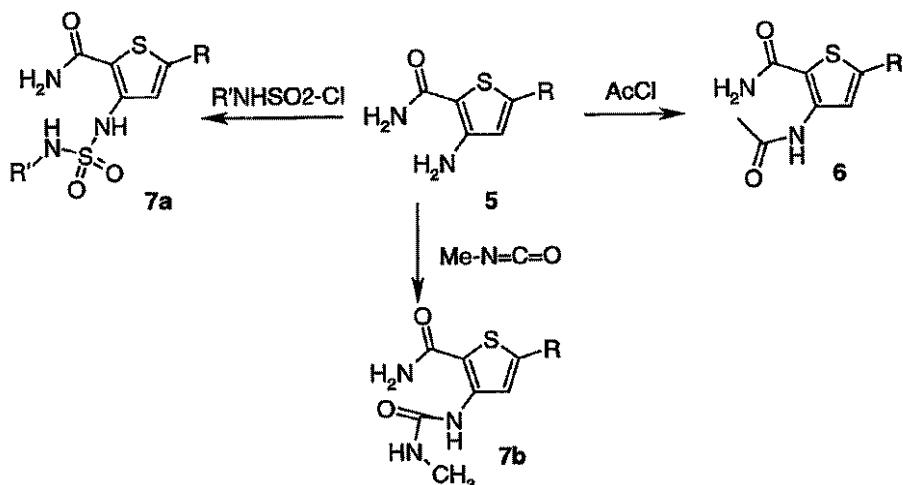
スキーム I



30

【化 3】

スキーム II



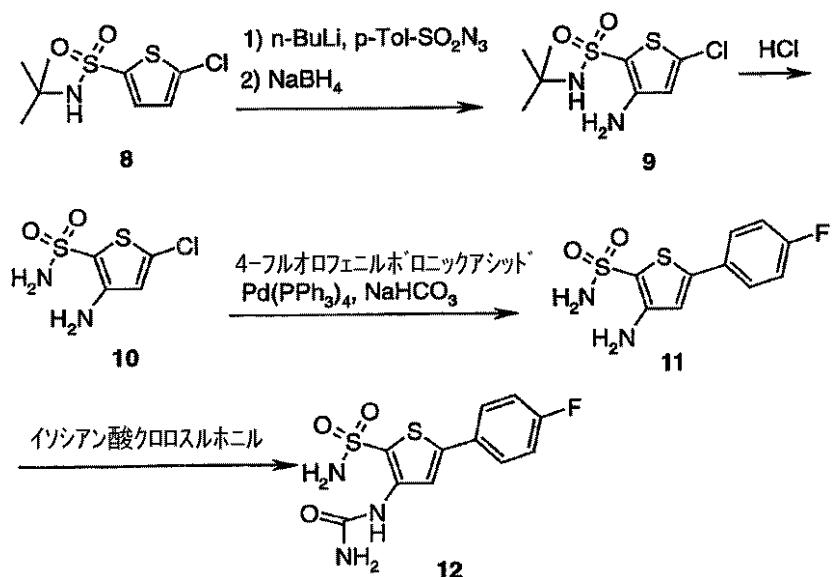
10

【0025】

ウレイドチオフェンスルホンアミドの一般的な製造をスキーム III にて説明する。tert-ブチルスルホンアミド 8 から合成を開始した。n-BuLi を用いる脱保護、次いで、アジ化 4-メチル-ベンゼンスルホニルおよび水素化ホウ素ナトリウムとの反応を行ってアミノ-チオフェン 9を得た。HCl での処理および 4-フルオロフェニルボロニックアシッドとのスズキカップリングによりアミノ-チオフェンスルホンアミド 11を得た。次いで、第 1 級アミンをウレア 12 に変換した。

【化4】

スキーム III



20

30

40

【0026】

下記実施例は本発明の説明を意図するものであり、何ら限定的なものではない。

【0027】

通常には、Bruker AC 400スペクトル計を用いて 400 MHz で核磁気共鳴スペクトルを記録した。CDCl₃ はジューテリオクロロホルム、DMSO-d₆ はヘキサジューテリオジメチルスルホキシドであり、CD₃OD はテトラジューテリオメタノールである。内部標準テトラメチルシランから低磁場側へ 100 万あたりの部数で化学シフトを表す。NMR データの略号は以下のとおり：s = シングレット、d = ダブルレット、t = トリプレット、q = カルテット、m = マルチプレット、dd = ダブルレットのダブルレット、dt = トリ

50

プレットのダブルレット、*app* = 見かけ、*br* = 広い。Jはヘルツ単位で測定されたNMR結合定数を示す。エレクトロスプレー(ES)イオン化法を用いるMDS SCIELEX(LC-MS)装置で質量スペクトルを取った。すべての温度はセ氏である。薄層クロマトグラフィーにはAnaltech Silica Gel GF および E. Merck Silica Gel 60 F-254 薄層プレートを用いた。E. Merck Kieselgel 60 (230-400 メッシュ)シリカゲルにてフラッシュクロマトグラフィーを行った。

【0028】

実施例1

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミドの調製

1 a) 3 - *tert* - プトキシカルボニルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸メチルエステル

THF (20 mL) 中の 3 - アミノ - 5 - (4 - クロロフェニル)チオフェン - 2 - カルボン酸メチル (1 g, 3.73 mmol) の溶液に 4 - (ジメチルアミノ)ピリジン (4.5 mg, 0.373 mmol) およびジ炭酸ジ - *tert* - プチル (1.22 g, 5.6 mmol) を添加した。室温で 24 時間攪拌後、溶液をブライン溶液 (100 mL) で希釈し、酢酸エチル (100 mL, 3 x) で抽出した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル, 4 : 1) を行なった後、標記化合物 1 a を白色固体として得た。

【0029】

1 b) 3 - *tert* - プトキシカルボニルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸

エタノール (20 mL) 中の 1 a (1.37 g, 3.73 mmol) の溶液を水 (20 mL) 中の KOH (627 mg, 11.2 mmol) と混合した。得られた混合物を 60 度で 1 時間加熱し、HCl (50 mL, 12 N) で希釈し、酢酸エチル (60 mL, 3 x) で抽出した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮して化合物 1 b を黄色固体として得た。

【0030】

1 c) [2 - カルバモイル - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 3 - イル] - カルバミン酸 *tert* プチルエステル

DMF (10 mL) 中の 1 b (1.3 g, 3.7 mmol) の溶液に、1,1' - カルボニルジイミダゾール (1.2 g, 7.4 mmol) を添加した。得られた溶液を 1 時間攪拌し、水酸化アンモニウム (37%, 5 mL) と混合した。混合物をブライン溶液 (10 mL) で希釈し、酢酸エチル (100 mL) で抽出した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル, 4 : 1) を行なった後、化合物 1 c を黄色固体として得た。

【0031】

1 d) 3 - アミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド CH₂Cl₂ (10 mL) 中の 1 c (250 mg, 0.71 mmol) の溶液に TFA (1 mL) を添加した。得られた溶液を 1 時間攪拌し、次いで、飽和 NaHCO₃ 溶液 (60 mL) と混合し、次いで、酢酸エチル (50 mL, 3 x) で抽出した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル, 1 : 1) を行なった後、化合物 1 d を黄色固体として得た。MS (ES) 253 (M + H)⁺。

【0032】

1 e) 3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - クロロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド

THF (10 mL) 中の 1 d の固体 (20 mg, 0.079 mmol) を塩化アセチル (11.2 μL, 0.158 mmol) で 1 時間処理した。得られた溶液を水 (0.1 mL) および DMSO (2 mL) で希釈した。混合物を濃縮した。逆相 HPLC により分離し

10

20

30

40

50

た後、標記化合物を白色固体として得た。MS (ES) 295 ($M + H$)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOC_D₃) 11.08 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.69 (ws, 2H), 7.68 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.54 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 2.14 (s, 3H)。

【0033】

実施例2

3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミドの調製

2a) 3 - アミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド

実施例1a ~ 1d の手順に従って、3 - アミノ - 5 - (4 - フルオロフェニル)チオフェン - 2 - カルボン酸メチルから化合物を得た。化合物は黄色固体である：MS (ES) 237 ($M + H$)⁺

【0034】

2b) 3 - アセチルアミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - カルボン酸アミド

実施例1e の手順に従って、2a から標記化合物を得た。化合物は白色固体である：MS (ES) 279 ($M + H$)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOC_D₃) 11.09 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.72 - 7.69 (m, 4H), 7.35 - 7.30 (m, 2H), 2.14 (s, 3H)

【0035】

実施例3

5 - (4 - フルオロ - フェニル) - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミドの調製

3a) 3 - アミノ - 5 - クロロ - チオフェン - 2 - スルホン酸tert - ブチルアミド - 78 において THF (10 mL) 中の 5 - クロロ - チオフェン - 2 - スルホン酸tert - ブチルアミド (310 mg, 1.22 mmol) の溶液に、n - ブチルリチウム (ヘキサン中 1.6 M, 1.7 mL, 2.7 mmol) を滴下した。得られた溶液を -30 まで温め、-20 ないし -30 に 10 分間維持した。それを THF (2 mL) 中のアジ化 4 - メチルベンゼンスルホニル (361 mg, 1.83 mmol) の溶液と混合した。混合物を周囲温度で 1 時間攪拌し、次いで、ブライン溶液 (30 mL) で希釈し、NaBH₄ (500 mg, 13.2 mmol) および H₂O (5 mL) と混合した。混合物を室温で 2 時間攪拌し、次いで、ブライン溶液 (50 mL) で希釈し、酢酸エチル (50 mL, 3 x) で希釈した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル, 4 : 1) を行なった後、3a (250 mg) を黄色油状物質として得た。

【0036】

3b) 3 - アミノ - 5 - クロロ - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド
濃塩酸溶液 (10 mL) 中の 3a (250 mg, 0.93 mmol) の溶液を 55 で 2 時間加熱した。すべての溶媒を除去した後、3b (198 mg) を黄色固体として得た。

【0037】

3c) 3 - アミノ - 5 - (4 - フルオロ - フェニル) - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド

1, 4 - ジオキサン / 水 (40 mL, 3 : 1) 中の 3b (104 mg, 0.5 mmol) の溶液に、4 - フルオロフェニルボロニックアシッド (140 mg, 1 mmol)、Na₂CO₃ (212 mg, 2 mmol) および Pd (PPh₃)₄ (9% Pd, 59 mg, 0.05 mmol) を添加した。得られた混合物を 110 で 3 時間加熱し、ブライン溶液 (50 mL) で希釈し、酢酸エチル (50 mL, 3 x) で抽出した。一緒にした有機相を MgSO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル, 1 : 1) を行なった後、3c (45 mg, 33%) を黄色固体として得

10

20

30

40

50

た：MS (ES) 273 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, MeOD) 87.52 (m, 2H), 7.04 (m, 2H), 6.72 (s, 1H)

【0038】

3d) 5-(4-フルオロ-フェニル)-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミド

CH_2Cl_2 (10 mL) 中の 3c (30 mg, 0.11 mmol) の混合物に、イソシアニ酸クロロスルホニル (14 μ L, 0.165 mmol) を添加した。得られた混合物を室温で 3 時間攪拌し、次いで、水 (0.5 mL) と混合した。逆相 HPLC を用いる分離により 3d (20 mg, 58%) を白色固体として得た。MS (ES) 316 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, CD₃OD) 8.02 (s, 1H), 7.69 (10 m, 2H), 7.20 (m, 2H)

【0039】

実施例 4

5-(3-クロロ-フェニル)-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミドの調製

4a) 3-アミノ-5-(3-クロロ-フェニル)-チオフェン-2-スルホン酸アミド 実施例 3c の手順に従って、3-クロロベンゼンボロニックアシッドおよび 3b から標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：MS (ES) 289 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.62 (s, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.40 (m, 2H), 6.92 (s, 1H)

【0040】

4b) 5-(3-クロロ-フェニル)-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミド

実施例 3d の手順に従って、4a から標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：MS (ES) 332 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, CD₃SOC₂CD₃) 8.28 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.72 (s, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.49 (m, 2H), 6.72 (s, 2H)

【0041】

実施例 5

5-(4-トリフルオロメチル-フェニル)-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミドの調製

5a) 3-アミノ-5-(4-トリフルオロメチル-フェニル)-チオフェン-2-スルホン酸アミド

実施例 3c の手順に従って、4-トリフルオロメチルベンゼンボロニックアシッドおよび 3b から標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：MS (ES) 323 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.80 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.72 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.02 (s, 1H)

【0042】

5b) 5-(4-トリフルオロメチル-フェニル)-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミド

実施例 3d の手順に従って、標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：MS (ES) 366 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (400 MHz, CD₃OD) 8.20 (s, 1H), 7.85 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.75 (d, 2H, J = 8.2 Hz)

【0043】

実施例 6

5-フェニル-3-ウレイド-チオフェン-2-スルホン酸アミドの調製

6a) 3-アミノ-5-フェニル-チオフェン-2-スルホン酸アミド

実施例 3c の手順に従って、フェニルボロニックアシッドおよび 3b から標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：MS (ES) 255 ($M + H$)⁺; 1 H NMR (4

10

20

40

50

0 0 M H z , C D₃ O D) 7 . 6 1 (m , 2 H) , 7 . 4 2 - 7 . 3 7 (m , 3 H) ,
6 . 8 9 (s , 1 H)

【 0 0 4 4 】

6 b) 5 - フェニル - 3 - ウレイド - チオフェン - 2 - スルホン酸アミド

実施例 3 d の手順に従って、6 a から標記化合物を得た。この化合物は白色固体である：

M S (E S) 2 9 8 (M + H)⁺ ; ¹ H N M R (4 0 0 M H z , C D₃ S O C D₃)
8 . 3 0 (s , 1 H) , 8 . 1 0 (s , 1 H) , 7 . 6 8 - 7 . 3 9 (m , 8 H) , 6 .
6 5 (s , 1 H)

【 0 0 4 5 】

本発明は、式 I の化合物および医薬上許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。したがって、式 I の化合物を医薬の製造に用いてもよい。後で説明するように製造される式 I の化合物の医薬組成物を、非経口投与用の溶液または凍結乾燥粉末として処方してもよい。使用前に適切な希釈剤または他の医薬上許容される担体を添加することにより粉末を復元してもよい。液体処方は緩衝化された等張水溶液であってもよい。適切な希釈剤の例は通常の等張セイライン溶液、標準水中 5 % デキストロースまたは緩衝化酢酸ナトリウムもしくは酢酸アンモニウム溶液である。かかる処方は非経口投与に特に適するが、経口投与に用いてもよく、あるいは一定量の吸入器もしくは吸入用ネブライザーに入れてもよい。ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ヒドロキシセルロース、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、マンニトール、塩化ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムのごとき賦形剤を添加することが望ましい。

10

20

30

【 0 0 4 6 】

別法として、これらの化合物をカプセル封入、錠剤化あるいは経口投与用のエマルジョンまたはシロップとして調合してもよい。医薬上許容される固体または液体担体を添加して組成物の安定化を促進してもよく、あるいは組成物の調合を容易ならしめてもよい。固体担体はデンブン、ラクトース、硫酸カルシウム二水和物、白陶土、ステアリン酸マグネシウムまたはステアリン酸、タルク、ペクチン、アラビアゴム、寒天またはゼラチンを包含する。液体担体は糖蜜、ピーナッツ油、オリーブ油、セイラインおよび水を包含する。担体はモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルを単独またはロウとの混合物のごとき除放性材料を含有してもよい。固体担体の量は様々であるが、好ましくは、1 回分につき約 2 0 m g ないし約 1 g であろう。錠剤形態が必要ならば粉碎、混合、顆粒化、および圧縮；あるいは硬ゼラチンカプセル形態が必要な場合には粉碎、混合および充填を包含する慣用的な製薬方法に従って医薬組成物を製造する。液体担体を用いる場合、調合物はシロップ、エリキシル、エマルジョンまたは水性もしくは非水製懸濁液の形態であろう。かかる液体処方を直接経口投与してもよく、あるいは軟ゼラチンカプセルに充填してもよい。

30

【 0 0 4 7 】

直腸投与には、本発明の化合物をカカオ脂、グリセリン、ゼラチンまたはポリエチレングリコールのごとき賦形剤と混合し、座薬に成型してもよい。

40

【 0 0 4 8 】

本発明の方法は、式 I の化合物の局所吸入および結腸内投与を包含する。局所投与は非全身投与を意味し、本発明の化合物の外部からの皮膚、頬腔への投与、かかる化合物の耳、目および鼻への滴下を包含し、化合物は有意には血流に入らない。全身投与は蛍光、静脈、腹腔内および筋肉内投与を包含する。局所投与による治療的または予防的効果に必要な本発明の化合物（以下、有効成分という）の量は、もちろん、選択した化合物、処置すべき症状の性質および重篤度ならびに治療される動物により変更されようが、最終的には医師の裁量による。

【 0 0 4 9 】

有効成分をそのまま単独で投与することも可能であるが、それを医薬処方として提供することが好ましい。有効成分は、局所投与には、処方の 0 . 0 1 ないし 5 . 0 重量 % を占めてもよい。

50

【0050】

獣医用ならびにヒトの医療用の本発明の局所処方は、1種またはそれ以上の許容される担体および所望により他の治療成分と一緒にになった有効成分を含む。担体は、処方の他の成分と適合するものであり、その受容者に有害でないという意味で「許容される」ものでなくてはならない。

【0051】

局所投与に適した処方は、治療が必要な部位へ皮膚を通して浸透するのに適した液体または半液体調合物を包含し、例えば、リニメント、ローション、クリーム、軟膏またはパスタ、ならびに目、耳または鼻への投与に適した滴剤である。

【0052】

本発明の滴剤は滅菌水性または油性溶液または懸濁液を含んでいてもよく、殺細菌剤および／または殺真菌剤および／または他の適当な保存料の適当な水溶液、好ましくは界面活性剤を含む水溶液中に有効成分を溶解することにより調合してもよい。次いで、得られた溶液を濾過により清澄化させ、適当な容器中に移し、その後密封し、オートクレーブまたは90～100に半時間維持することにより滅菌することができる。別法として、濾過により溶液を滅菌し、無菌的方法により容器に移してもよい。滴剤に含有させるに適した殺細菌剤および殺真菌剤の例は、フェニルマーキュリックニトラートまたはアセタート(0.002%)、ベンザルコニウムクロリド(0.01%)およびクロロヘキシジンアセタート(0.01%)である。油性溶液の調製に適した溶媒はグリセロール、希アルコールおよびプロピレングリコールを包含する。

10

20

【0053】

本発明のローションは、皮膚または目への適用に適したものと包含する。アイローションは殺細菌剤を含んでいてもよい滅菌水溶液を含んでいてもよく、滴剤の調合と同様の方法により調合してもよい。皮膚に適用するローションまたはリニメントは、アルコールまたはアセトンのごとき乾燥を促進し皮膚を冷却する薬剤、および／またはグリセロールのごとき湿潤剤またはヒマシ油もしくは落花生油のごとき油脂を含んでいてもよい。

30

【0054】

本発明のクリーム、軟膏またはパスタは外用される有効成分の半固体処方である。それらは、細かくふるい分けされた、あるいは粉末形態の有効成分をそれのみ、あるいは水性もしくは非水製液体中の溶液もしくは懸濁液として、適当な機器の助けを借りてグリース状または非グリース状基材と混合することにより製造されうる。基材は硬、軟または流動バラフィンのごとき炭化水素、グリセロール、蜜ロウ、金属セッケン、粘滑剤、アーモンド油、トウモロコシ油、落花生油、ヒマシ油またはオリーブ油のごとき天然起源の油脂またはその誘導体、プロピレングリコールまたはマクロゴールのごときアルコールと一緒にになったステアリン酸またはオレイン酸を含んでいてもよい。処方はソルビタンエステルまたはポリオキシエチレン誘導体のごときアニオン性、カチオン性または非イオン性界面活性剤のような適当な界面活性剤を含んでいてもよい。天然ガム類、セルロース材料またはケイ酸塩含有シリカのごとき無機材料のような懸濁剤、ならびにラノリンのごとき他の成分が含まれていてもよい。

40

【0055】

本発明の有用性

式Iの化合物はI-BのIKK-ベータキナーゼリン酸化の阻害剤として有用であり、そのようなものとしてNF-B活性化の阻害剤である。本発明の方法は、該化合物の医薬組成物および処方を包含する該化合物の組成物および処方を用いるものである。

【0056】

特に、本発明は、不適切なNF-B活性化に関連する疾病的治療方法を提供し、該方法は、治療を要する動物、特に哺乳動物、最も特別にはヒトに1種またはそれ以上の式Iの化合物を投与することを含む。本発明は、特に、炎症および組織修復障害；特に、リューマチ性関節炎、炎症性腸疾患、喘息およびCOPD(慢性閉塞性肺疾患)、骨関節炎；骨粗しょう症および線維症；乾癬、アトピー性皮膚炎および紫外線照射(UV)により誘発

50

される皮膚ダメージを包含する皮膚病；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎を包含する自己免疫疾患、組織および器官の拒絶反応、アルツハイマー病、卒中、アテローム性動脈硬化、再狭窄、糖尿病、糸球体腎炎、ホジキン病を包含する癌、悪液質、後天性免疫不全症候群（AIDS）を包含する感染およびある種のウイルス感染に関連する炎症、成人の呼吸困難症候群、毛細血管拡張性運動失調の治療方法を提供する。

【0057】

急性の治療には、1種またはそれ以上の式Iの化合物の非経口投与が有用である。水または通常のセイライン中5%デキストロース中の化合物の静脈輸液、あるいは適切な賦形剤を伴う類似の処方が最も有効であるが、筋肉内ボーラス注射も有用である。典型的には、非経口用量は、IKK-ベータを阻害し、それゆえNF-Bの活性化を阻害するに有効な血漿中濃度を維持させるように、約0.01ないし約50mg/kg；好ましくは0.1ないし20mg/kgである。1日の合計用量が約0.4ないし約80mg/kg/日となるようなレベルで1日に1ないし4回化合物を投与する。本発明の方法に使用される化合物の正確な治療上有効な量、ならびにかかる化合物が最もうまく投与される経路は、治療効果を示すに必要な濃度と薬剤の血中レベルを比較することにより当業者により容易に決定される。10

【0058】

薬剤濃度がIKK-ベータを阻害し、それゆえNF-Bを活性化させるに十分であるように、あるいは本明細書に開示した他の治療的指標を得るに十分であるように、式Iの化合物を患者に経口投与してもよい。典型的には、化合物を含有する医薬組成物を、患者の症状に適合するように、約0.1ないし約50mg/kgの経口用量で投与する。好ましくは、経口用量は約0.5ないし約20mg/kgであろう。20

【0059】

薬剤濃度がIKK-ベータを阻害し、それゆえNF-Bの活性化を阻害し、あるいは本明細書に開示した他の治療的指標が得られるように、式Iの化合物を患者に局所投与してもよい。典型的には、約0.01重量%ないし約5重量%の局所処方として化合物を含有する医薬組成物を投与する。

【0060】

本発明の化合物を本発明に従って投与する場合には、許容されない毒物学的效果は考えられない。30

【0061】

本明細書に記載の、NF-Bの活性化を阻害する化合物の能力は、IKK-によるIB-のN-末端フラグメントのリン酸化を阻害する能力において明確に証明される（例えば、表I参照）。また、これらの化合物は、前炎症性刺激（例えば、TNF-、LPS等）で細胞が活性化された場合にヒト単球および他の哺乳動物細胞におけるIB-の分解およびNF-Bの核トランスロケーションをブロックする。さらに、これらの化合物は、LPSにより刺激されたヒト単球および刺激されたヒト一次滑膜線維芽細胞からの前炎症メディエイタの産生を阻害する。本発明のNF-B阻害剤の疾病の治療における有用性は、種々の疾患におけるNF-B活性化の重要性を前提としている。40

【0062】

NF-Bは、TNF、IL-1、IL-6およびIL-8のごときサイトカイン（Makada et al., 1990; Liberman and Baltimore, 1990; Matsusaka et al., 1993）を包含する多数の前炎症メディエイタ、ICAMおよびVCAMのごとき接着分子（Marui et al., 1993; Kawai et al., 1995; Ledebur and Parks, 1995）、ならびに誘導可能な亜硝酸オキシドシンターゼ（iNOS）（Xie et al., 1994; Adcock et al., 1994）の調節された発現において重要な役割を果たしている（全引用文献はこのセクションの末尾にある）。かかるメディエイタは白血球の炎症部位における動員において役割を果たすことが知られており、iNOSの場合には、いくつかの炎症疾患および自己免疫疾患において器官破壊を導きうる（McCartney-Francis et al., 1993; Kleemann et al., 1993）。50

【0063】

炎症性疾患におけるNF-Bの重要な役割に関する証拠が喘息患者の研究において得られている。中程度のアトピー性喘息患者からの気管支生検は、正常非アトピー性対照からの生検と比較すると、粘膜下染色において活性化されたNF-B、全NF-B、ならびにGM-CSFおよびTNFのごときNF-Bにより調節されるサイトカインに関する多くの細胞の有意な増加を示す(Wilson et al., 1998)。さらにそのうえ、NF-B免疫反応性を示す血管のパーセンテージは、生検標本の上皮におけるIL-8免疫反応性の増加と同様に増加する(Wilson et al., 1998)。そのようなものとして、これらの化合物により示されたNF-Bの阻害によるIL-8産生の阻害は気道炎症において有益であると予測されるであろう。

10

【0064】

最近の研究は、NF-Bが炎症性腸疾患(IBD)においても重要な役割を果たしている可能性を示唆している。活性化されたNF-Bは、クローン病患者および潰瘍性大腸炎患者の大腸生検標本において見られる(Ardite et al., 1998; Rogler et al., 1998; Schreiber et al., 1998)。活性化は、炎症を起こしている粘膜において明らかであるが、炎症を起こしていない粘膜においては明らかでなく(Ardite et al., 1998; Rogler et al., 1998)、同じ部位における増加したIL-8 mRNA発現に関連している(Ardite et al., 1998)。さらに、コルチコステロイド処理は、腸のNF-B活性化を強く阻害し、大腸の炎症を抑制する(Ardite et al., 1998; Schreiber et al., 1998)。さらに、これらの化合物により示されるようなNF-Bの阻害によるIL-8産生阻害は、炎症性腸疾患において有益であると予測されるであろう。

20

【0065】

胃腸炎症の動物モデルは、大腸炎の重要な調節因子としてのNF-Bに関するさらなる支持を提供する。活性化複合体の主要成分であるp65を有するマウスの2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)により誘導された大腸の固有層マクロファージにおいて増加したNF-Bが観察されている(Neurath et al., 1996; Neurath and Pettersson, 1997)。p65アンチセンスの局所投与は、処置動物において確立された大腸炎の徴候をなくし、毒性の兆候も見られない(Neurath et al., 1996; Neurath and Pettersson, 1997)。そのようなものとして、NF-Bの小型分子阻害剤はIBDの治療に有用であろう。

30

【0066】

炎症性疾患におけるNF-Bの役割に関するさらなる証拠はリューマチ性滑膜の研究から得られる。通常には、NF-Bは不活性細胞質複合体として存在するが、最近の免疫組織学的研究は、NF-Bが核に存在し、それゆえヒトリューマチ性滑液を含む細胞(Handel et al., 1995; Marok et al., 1996; Sioud et al., 1998)および疾病的動物モデル(Tsao et al., 1997)において活性を有することを示している。染色はA型滑膜細胞および血管内皮に関連したものである(Marok et al., 1996)。さらに、NF-Bの構成的活性化が培養滑膜細胞(Roshak et al., 1996; Miyazawa et al., 1998)ならびにIL-1またはTNFで刺激された滑膜細胞培養物(Roshak et al., 1996; Fujisawa et al., 1996; Roshak et al., 1997)において見られる。よって、NF-Bの活性化は、炎症滑膜に特徴的なサイトカイン産生増加および白血球浸潤の原因となりうる。NF-Bを阻害し、それによりこれらの細胞による前炎症メディエイタ(例えば、サイトカインおよびプロスタノイド)の産生を阻害するこれらの化合物の能力は、リューマチ性関節炎において利益をもたらすと予測されよう。

40

【0067】

生物学的アッセイ：

薬理学的效果を生じさせるに必要な化合物の濃度を決定するための数種の生物学的アッセイの1つにおいて本発明の化合物を試験することができる。

【0068】

核中のNF-B蛋白の存在を評価するための電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA) 50

)においてN F - B活性を測定してもよい。目的細胞を培養して 1×10^6 個/mLの密度とする。遠心分離により細胞を集め、Ca²⁺およびMg²⁺不含のPBSで洗浄し、次いで、Ca²⁺およびMg²⁺含有PBSに再懸濁して 1×10^7 個/mLとする。N F - Bの活性化に対する化合物の影響を調べるために、細胞懸濁液を種々の濃度の薬剤または担体(DMSO 0.1%)で37℃において30分処理してから、TNF-(5.0ng/mL)でさらに15分処理する。細胞および核抽出物を以下のようにして調製する。簡単に説明すると、インキュベーション期間の終わりに細胞(1×10^7 個)をCa²⁺およびMg²⁺不含のPBSで2回洗浄する。得られた細胞ペレットを20μLのバッファーA(10mM Hepes(pH 7.9), 10mM KC1, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM デチオスレイトール(DTT)および0.1%NP-40)に再懸濁し、氷上で10分間インキュベーションする。
10 4℃で35000rpm、10分間マイクロ遠心分離することにより核を集め。生じた上清を細胞抽出物としてを集め、核ペレットを15μLのバッファーC(20mM Hepes(pH 7.9), 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 25%グリセロール, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, および0.5mM フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF))に再懸濁する。懸濁物を4℃で20分間おだやかに混合し、次いで、4℃で14000rpm、10分間マイクロ遠心分離する。上清を集め、60μLのバッファーD(20mM Hepes(pH 7.9), 50mM KC1, 20%グリセロール, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, および0.5mM PMSF)で希釈する。すべての試料を分析するまで-80℃で保存する。BioRad試薬を用いてBradford(Bradford, 1976)の方法に従って抽出物の蛋白濃度を決定する。

10

20

【0069】

転写因子活性化に対する化合物の影響を、上記のごとく処理した細胞からの核抽出物を用いる電気泳動移動シフトアッセイ(EMSA)において評価する。2本鎖NF-Bコンセンサスオリゴヌクレオチド(5'AGTTGAGGGACTTCCCAGGC-3')をT4ポリヌクレオチドキナーゼおよび[³²P-gATP]で標識する。結合混合物(25μL)は10mM Hepes-NaOH(pH 7.9), 4mM Tris-HCl(pH 7.9), 60mM KC1, 1mM EDTA, 1mM デチオスレイトール, 10%グリセロール, 0.3mg/mLウシ血清アルブミン、および1ugポリ(dI-dC)・ポリ(dI-dC)を含有する。未標識競争物質の存在下または不存在下で、結合混合物(10μgの核抽出蛋白)を0.5ngの³²P-標識オリゴヌクレオチド(50000~100000cpm)とともに室温で20分インキュベーションし、その後、1X Trisボラート/EDTA中で調製した4%ポリアクリルアミドゲルに混合物を乗せ、200Vで2時間電気泳動する。電気泳動後、ゲルを乾燥させ、結合反応の検出のためにフィルムに曝露する。

30

30

30

【0070】

I Bのリン酸化に対する化合物の影響を、ウェスタンプロットにおいてモニターしてもよい。細胞抽出物を10%のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)(BioRad, Hercules, CA)にかけ、次いで、蛋白をニトロセルロースシート(Hybond™-ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, IL)に移行させる。I BまたはI Bに対するポリクローナルウサギ抗体、ついで、ペルオキシダーゼ抱合ロバ抗-ウサギ二次抗体(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)を用いてイムノプロットアッセイを行なう。エンハンストケミルミネッセンス(ECL)アッセイ系(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)を用いて免疫反応性バンドを検出する。

40

40

40

【0071】

下記のようにしてI Bキナーゼに関するアッセイを行なった：IKK-をヘキサ-ヒスチジンタグを付した蛋白としてバキュロウイルス感染昆虫細胞中で発現させ、Ni-NTAアフィニティカラムで精製した。種々の濃度の化合物またはDMSO担体および示された濃度のATP(Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)を含有するアッセイバッファー(20mM Hepes, pH 7.7, 2mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 10mM ss-グリセロリン酸, 10mM NaF, 10mM PNPP, 0.3mM Na₃VO₄, 1mM ベンズアミジン, 2μM PMSF, 10μg/mlアプロチニン, 1μg/mLロイペプチド, 1μg/mLペプスタチン, 1mM DTT)中で、50ngの精製蛋白を用いてキナーゼ活性をアッセイした。200ngのI B-GST(Santa Cruz B 50

iotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) を添加して全体積 50 μL とすることにより反応を開始させた。30 で 1 時間反応させ、そして EDTA を添加して最終濃度 20 mM とすることにより反応を終結させた。ホスホ - I B - (Ser 32) 抗体 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) および Eu³⁺ - 標識抗 - ウサギ IgG (Wallac Oy, Turku, Finland) を用い、解離により促進されるランタノイド蛍光イムノアッセイ (Wallac Oy, Turku, Finland) によりキナーゼ活性を決定した。標準的なユーロピウムプロトコル (励起 340 nm、エミッショ n 615 nm; 400 μs 遅延後 400 μs 蛍光測定) を用い、VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac) にてプレートを読んだ。データを蛍光 (cpm) 単位として表す。

【0072】

10

IKK- を GST - タグ付き蛋白として発現させ、その活性を 96 ウエルシンチレーション近接アッセイ (SPA) にてアッセイした。簡単に説明すると、上記のごとく IKK- をアッセイバッファーで希釈し (最終 20 nM)、種々の濃度の化合物または DMSO 担体、240 nM ATP および 200 nCi [³³P] - ATP (10 mCi/mL, 2000 Ci/mmol; NEN Life Science Products, Boston, MA) とした。I B - のアミノ酸 15 ~ 46 を含むビオチン化ペプチド (American Peptide) を添加して最終体積 50 μL 中最終濃度 2.4 μM とすることにより反応を開始させた。試料を 30 で 1 時間インキュベーションし、次いで、0.2 mg のストレプトアビジン - 被覆 SPA PVT ビーズ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を含む 150 μL の停止バッファー (PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺, 0.1% Triton X-100(v/v), 10 mM EDTA) を添加した。試料を混合し、室温で 10 分間インキュベーションし、遠心分離 (1000 × g, 2 分間) し、次いで、Hewlett-Packard TopCount で測定した。

【0073】

20

一次滑膜線維芽細胞メディエイタ産生に対する IKK- 阻害剤の効果を下記のごとく評価した：すでに記載されているようにして (Roshak et al., 1996b) リューマチ性関節炎の成人患者から得た滑膜を酵素消化することによりヒト R SF の一次培養物を得た。10 % ウシ胎児血清 (FBS)、100 ユニット / mL のペニシリンおよび 100 μg / mL のストレプトアビジン (GIBCO, Grand Island, NY) を含む Earl の最少必須培地 (EMEM) 中で、37 °C、5 % CO₂ で細胞を培養した。いくつかの研究には、線維芽細胞を 16 mm (直径) の 24 ウエルプレート (Costar, Cambridge, MA) に 5 × 10⁴ 個 / mL の密度で撒いた。細胞 (70 ~ 80 % 集密) を一定時間 IL-1 (1 ng / mL) (Genzyme, Cambridge, MA) に曝露した。IL-1 添加 15 分前に DMSO 担体中の薬剤 (1 %) を細胞培養物に添加した。異なるドナーからの滑膜細胞を用いて実験を 3 ~ 4 回行った。上記のごとく処理した細胞から R SF 細胞抽出物を得た。簡単に説明すると、ヒト R SF をトリプシン / EDTA により取り、洗浄し、次いで、遠心分離により集めた。すでに記載されているようにして (Dignamet al., 1983; Osborn, et al., 1989) 細胞抽出物を調製した。簡単に説明すると、インキュベーション期間の終わりに細胞 (1 × 10⁷ 個) を Ca²⁺ および Mg²⁺ 不含 PBS 中で 2 回洗浄した。得られた細胞ペレットを 20 μL のバッファー A (10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KC1, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM) に再懸濁した。

30

【0074】

40

ヒト単球により刺激されたエイコサノイドおよびサイトカイン産生に対する IKK- 阻害の効果を下記のごとく評価した：すでに説明されている二重勾配遠心分離によりヘパリン処理全血から単球を単離した。次いで、PBMCs が豊富化された単離された単球を RPMI 1640 10 % FBS (Hyclone, Logan, Utah) 中 2 × 10⁶ 個 / mL として 24 ウエルプレートに 2 時間付着させてさらに単球集団を豊富化させた。次いで、培地を除去し、細胞を RPMI 1640 で 1 回洗浄し、1 mL の RPMI 1640 10 % FBS をウェルに添加した。試験化合物をウェルに添加し、最終担体濃度を 0.05 % DMSO とした。200 ng / mL のエンドトキシン (LPS; E. coli serotype 026: B6) (Sigma, St. Louis, MO.) を添加することにより単球を活性化させ、24 時間インキュベ

50

ーションした。TNF- (EIA developed at SB)、PGE2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、およびIL-8 およびIL-6 (Biosource International, Camarillo, CA) に関する無細胞上清をELISAにより分析した。トリパンブルー排除法により細胞の生存率を決定した。

【0075】

ホルボールエステルにより誘導される炎症に対するIKK- 阻害剤の影響を下記のように評価した：ホルボールエステル (PMA) をBalb/cマウスの耳介外側の皮膚に適用することにより誘発された炎症応答は、多因子炎症細胞浸潤および炎症による皮膚の変化を試験するための有用なモデルであることが証明されている。強い炎症性傷害は好中球浸潤が支配的であり、それは、好中球に存在するアズール親和性顆粒酵素であるミエロペルオキシダーゼの組織濃度を測定することにより容易に測定することができる。さらに、耳の厚みを測定することにより炎症応答の正味の強さを測定することができる。Balb/cマウス (n = 6 / 群) に薬剤または担体を投与し、次いで、PMA (4 μg / 耳) を投与した。4 時間後にマウスを殺し、耳の厚みを決定し、IB ウエスタンまたはEMSA分析によりNF-B活性化をモニターした。

【0076】

ラットのカラギーナンにより誘発される足の浮腫に対するIKK- の影響を下記のように評価した：オスのLewisラット (Charles River-Raleigh, NC) を飼育し、エサと水を自由に取らせ、各実験用に体重200~275gとした。カラギーナン注射の30分ないし1時間前に化合物または担体 (0.5% トラガカント) (p.o.) または10% DMSO、5% DMA、30% クレモフォア (Cremophor) (i.p.) を投与した。滅菌蒸留水中1%カラギーナンを右の後ろ足の足底表面に注射 (0.05ml / 足) することにより浮腫を誘発した。化合物または担体の投与前、ならびに3時間後に足の厚みを測定して足の体積の変化を決定した。CO₂吸入によりラットを安樂死させ、右の後ろ足を取り、即剤に液体窒素中で凍結し、分析まで -80° で保存した。

【0077】

本明細書に引用された特許および特許出願（これらに限らない）を包含するすべての刊行物を、参照により本明細書に記載されているものとする。

上の説明は、いかにして本発明を実施するのかを十分に開示するものである。しかしながら、本発明は、本明細書に記載された特定の具体例に限定されるのではなく、そのすべての改変は特許請求の範囲およびそれらの均等の範囲内である。当業者は、通常の実験により、本発明の範囲を逸脱せずに種々の変更および修飾が可能であることを認識するであろう。

10

20

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/029242 A1(51) International Patent Classification⁵: C07D 333/36, A61K 31/38

(21) International Application Number: PCT/US02/31902

(22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/326,976 4 October 2001 (04.10.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103 (US).

(74) Agents: SIMON, Soma, G. et al.; SmithKline Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).

(81) Designated States (national): A1, AG, A1, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GI, GM, IIR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CL, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WAN, Zeihong [CN/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US); BURGESS, Joelle, Lorraine [US/US]; 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426-0989 (US); CALLAHAN, James, Francis [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



A1

(54) Title: NF-κB INHIBITORS

(57) Abstract: The present invention provides novel compounds and methods for using them to treat diseases with aminothiophene inhibitors of IKK-β phosphorylation of IκB. In so doing these aminothiophene inhibitors block pathological activation of transcription factor NF-κB in which diseases excessive activation of NF-κB is implicated.

WO 03/029242 A1

WO 03/029242

PCT/US02/31902

NF-κB Inhibitors**FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates in general to a method of inhibiting pathological activation of the transcription factor NF-κB (nuclear factor-κB) using aminothiophene compounds. Such methods are particularly useful for treating diseases in which activation of NF-κB is implicated. More specifically, these methods may be used for inhibiting IKK-β (IκB kinase-β) phosphorylation of IκB (inhibitory protein κB)-which prevents subsequent degradation and activation of NF-κB dimers. Such methods are useful in the treatment of a variety of diseases associated with NF-κB activation including inflammatory and tissue repair disorders; particularly rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) osteoarthritis; osteoporosis and fibrotic diseases; dermatosis, including psoriasis, atopic dermatitis and ultraviolet radiation (UV)-induced skin damage; autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, cancer, including Hodgkin's disease, cachexia, inflammation associated with infection and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS), adult respiratory distress syndrome, Ataxia Telangiectasia.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Recent advances in scientific understanding of the mediators involved in acute and chronic inflammatory diseases and cancer have led to new strategies in the search for effective therapeutics. Traditional approaches include direct target intervention such as the use of specific antibodies, receptor antagonists, or enzyme inhibitors. Recent breakthroughs in the elucidation of regulatory mechanisms involved in the transcription and translation of a variety of mediators have led to increased interest in therapeutic approaches directed at the level of gene transcription.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

Nuclear factor κB (NF-κB) belongs to a family of closely related dimeric transcription factor complexes composed of various combinations of the Rel/NF-κB family of polypeptides. The family consists of five individual gene products in mammals, RelA (p65), NF-κB1 (p50/ p105), NF-κB2 (p49/ p100), c-Rel, and RelB,
5 all of which can form hetero- or homodimers. These proteins share a highly homologous 300 amino acid "Rel homology domain" which contains the DNA binding and dimerization domains. At the extreme C-terminus of the Rel homology domain is a nuclear translocation sequence important in the transport of NF-κB from the cytoplasm to the nucleus. In addition, p65 and cRel possess potent
10 transactivation domains at their C-terminal ends.

The activity of NF-κB is regulated by its interaction with a member of the inhibitor IκB family of proteins. This interaction effectively blocks the nuclear localization sequence on the NF-κB proteins, thus preventing migration of the dimer to the nucleus. A wide variety of stimuli activate NF-κB through what are likely to
15 be multiple signal transduction pathways. Included are bacterial products (LPS), some viruses (HIV-1, HTLV-1), inflammatory cytokines (TNFα, IL-1), environmental and oxidative stress and DNA damaging agents. Apparently common to all stimuli however, is the phosphorylation and subsequent degradation of IκB. IκB is phosphorylated on two N-terminal serines by the recently identified IκB
20 kinases (IKK-α and IKK-β). Site-directed mutagenesis studies indicate that these phosphorylations are critical for the subsequent activation of NF-κB in that once phosphorylated the protein is flagged for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Free from IκB, the active NF-κB complexes are able to translocate to the
25 nucleus where they bind in a selective manner to preferred gene-specific enhancer sequences. Included in the genes regulated by NF-κB are a number of cytokines and chemokines, cell adhesion molecules, acute phase proteins, immunoregulatory proteins, eicosanoid metabolizing enzymes and anti-apoptotic genes.

It is well-known that NF-κB plays a key role in the regulated expression of a large number of pro-inflammatory mediators including cytokines such as TNF, IL-
30 1β, IL-6 and IL-8, cell adhesion molecules, such as ICAM and VCAM, and

WO 03/029242

PCT/US02/31902

inducible nitric oxide synthase (iNOS). Such mediators are known to play a role in the recruitment of leukocytes at sites of inflammation and in the case of iNOS, may lead to organ destruction in some inflammatory and autoimmune diseases.

The importance of NF- κ B in inflammatory disorders is further strengthened by studies of airway inflammation including asthma, in which NF- κ B has been shown to be activated. This activation may underlie the increased cytokine production and leukocyte infiltration characteristic of these disorders. In addition, inhaled steroids are known to reduce airway hyperresponsiveness and suppress the inflammatory response in asthmatic airways. In light of the recent findings with regard to glucocorticoid inhibition of NF- κ B, one may speculate that these effects are mediated through an inhibition of NF- κ B.

Further evidence for a role of NF- κ B in inflammatory disorders comes from studies of rheumatoid synovium. Although NF- κ B is normally present as an inactive cytoplasmic complex, recent immunohistochemical studies have indicated that NF- κ B is present in the nuclei, and hence active, in the cells comprising rheumatoid synovium. Furthermore, NF- κ B has been shown to be activated in human synovial cells in response to stimulation with TNF- α or IL-1 β . Such a distribution may be the underlying mechanism for the increased cytokine and eicosanoid production characteristic of this tissue. See Roshak, A. K., et al., *J. Biol. Chem.*, **271**, 31496-31501 (1996). Expression of IKK- β has been shown in synoviocytes of rheumatoid arthritis patients and gene transfer studies have demonstrated the central role of IKK- β in stimulated inflammatory mediator production in these cells. See Aupperle et al. *J. Immunology* 1999; 163:427-433 and Aupperle et al. *J. Immunology* 2001; 166:2705-11. More recently, the intra-articular administration of a wild type IKK- β adenoviral construct was shown to cause paw swelling while intra-articular administration of dominant-negative IKK- β inhibited adjuvant-induced arthritis in rat. See Tak et al. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44:1897-1907.

The NF- κ B/Rel and I κ B proteins are also likely to play a key role in neoplastic transformation and metastasis. Family members are associated with cell transformation *in vitro* and *in vivo* as a result of overexpression, gene amplification ,

WO 03/029242

PCT/US02/31902

gene rearrangements or translocations. In addition, rearrangement and/or amplification of the genes encoding these proteins are seen in 20-25% of certain human lymphoid tumors. Further, NF- κ B is activated by oncogenic ras, the most common defect in human tumors and blockade of NF- κ B activation inhibits ras mediated cell transformation. In addition, a role for NF- κ B in the regulation of apoptosis has been reported, strengthening the role of this transcription factor in the regulation of tumor cell proliferation. TNF, ionizing radiation and DNA damaging agents have all been shown to activate NF- κ B which in turn leads to the upregulated expression of several anti-apoptotic proteins. Conversely, inhibition of NF- κ B has been shown to enhance apoptotic-killing by these agents in several tumor cell types. As this likely represents a major mechanism of tumor cell resistance to chemotherapy, inhibitors of NF- κ B activation may be useful chemotherapeutic agents as either single agents or adjunct therapy. Recent reports have implicated NF- κ B as an inhibitor of skeletal cell differentiation as well as a regulator of cytokine-induced muscle wasting (Guttridge et al. *Science*; 2000; 289: 2363-2365.) further supporting the potential of NF- κ B inhibitors as novel cancer therapies.

Several NF- κ B inhibitors are described in C. Wahl, et al. *J. Clin. Invest.* 101(5), 1163-1174 (1998), R. W. Sullivan, et al. *J. Med. Chem.* 41, 413-419 (1998), J. W. Pierce, et al. *J. Biol. Chem.* 272, 21096-21103 (1997).

The marine natural product hymenialdisine is known to inhibit NF- κ B. Roshak, A., et al., *JPET*, 283, 955-961 (1997). Breton, J. J and Chabot-Fletcher, M. C., *JPET*, 282, 459-466 (1997). Additionally, patent applications have been filed on indole and benzimidazole inhibitors of the IKK complex, see DE 19928424 and WO200130774, and the natural products staurosporine, quercetin, K252a and K252b have been shown to be IKK- β inhibitors, see Peet, G. W. and Li, J. *J. Biol. Chem.*, 274, 32655-32661 (1999) and Wisniewski, D., et al., *Analytical Biochem.* 274, 220-228 (1999).

WO 03/029242

PCT/US02/31902

U.S. Patent No. 3,963,750 describes the preparation of certain aminothiophenes.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 The present invention involves novel compounds and novel methods of inhibiting the activation transcription factor NF- κ B using the present compounds.

An object of the present invention is to provide a method for treating diseases which may be therapeutically modified by altering the activity of transcription factor NF- κ B.

10 Accordingly, in the first aspect, this invention provides a pharmaceutical composition comprising a compound according to Formula I.

In another aspect, this invention provides a method of treating diseases in which the disease pathology may be therapeutically modified by inhibiting phosphorylation and subsequent degradation of I κ B by IKK- β .

15 In still another aspect, this invention provides a method of treating diseases in which the disease pathology may be therapeutically modified by inhibiting pathological activation of NF- κ B.

In a particular aspect, this invention provides methods for treating a variety of diseases associated with NF- κ B activation including inflammatory and tissue repair disorders, particularly rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) osteoarthritis, osteoporosis and fibrotic diseases, dermatosis, including psoriasis, atopic dermatitis and ultraviolet radiation (UV)-induced skin damage; autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, psoriatic arthritis, alkylosing spondylitis, tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, cancer, including Hodgkins disease, cachexia, inflammation associated with infection and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS), adult respiratory distress syndrome and Ataxia Telangiectasia

30

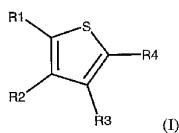
WO 03/029242

PCT/US02/31902

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The compounds of the present invention are selected from Formula (I) herein below:

5



wherein:

- R₁ is CONH₂, or SO₂NH₂;
- R₂ is NR₃R₆
- 10 R₃ is H, or halogen;
- R₄ is aryl or heteroaryl;
- R₅ is H or alkyl;
- provided that when R₁ is CONH₂, R₆ is selected from the group consisting of H, CO-alkyl, SO₂-alkyl, CONH₂, CONH-alkyl, CONH-aryl, CONH-heteroaryl, CSNH₂,
- 15 CSNH-alkyl, CSNH-aryl, CSNH-heteroaryl, SO₂NH₂, SO₂NH-alkyl, SO₂NH-aryl, and SO₂NH-heteroaryl;
- When R₁ is SO₂NH₂, R₆ is CONH₂; and
- when R₁ is CONH₂, R₂ is not NHCONH₂;
- and pharmaceutically acceptable salts, hydrates and solvated thereof.
- 20 Preferred compounds useful in the present invention include: 3-Acetylamino-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide; 3-Acetylamino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide; 5-(4-Fluoro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide; 5-(3-Chloro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide; 5-(4-
- 25 Trifluoromethyl-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide; and 5-phenyl-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

This invention provides methods for treating a variety of diseases associated with NF- κ B activation including inflammatory and tissue repair disorders; particularly rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) osteoarthritis, osteoporosis and fibrotic diseases; 5 dermatosis, including psoriasis, atopic dermatitis and ultraviolet radiation (UV)-induced skin damage; autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, cancer, including Hodgkins disease, cachexia, inflammation associated with infection 10 and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS), adult respiratory distress syndrome, and Ataxia Telangiectasia.

DEFINITIONS

The present invention includes all hydrates, solvates, complexes and 15 prodrugs of the compounds of this invention. Prodrugs are any covalently bonded compounds, which release the active parent, drug according to Formulas I and II *in vivo*. If a chiral center or another form of an isomeric center is present in a compound of the present invention, all forms of such isomer or isomers, including enantiomers and diastereomers, are intended to be covered herein. Inventive 20 compounds containing a chiral center may be used as a racemic mixture, an enantiomerically enriched mixture, or the racemic mixture may be separated using well-known techniques and an individual enantiomer may be used alone. In cases in which compounds have unsaturated carbon-carbon double bonds, both the cis (Z) and trans (E) isomers are within the scope of this invention. In cases wherein 25 compounds may exist in tautomeric forms, such as keto-enol tautomers, each tautomeric form is contemplated as being included within this invention whether existing in equilibrium or predominantly in one form.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

and trans (E) isomers are within the scope of this invention. In cases wherein compounds may exist in tautomeric forms, such as keto-enol tautomers, each tautomeric form is contemplated as being included within this invention whether existing in equilibrium or predominantly in one form.

- 5 The meaning of any substituent at any one occurrence in Formula I or any subformula thereof is independent of its meaning, or any other substituent's meaning, at any other occurrence, unless specified otherwise.

As used herein, "alkyl" refers to an optionally substituted hydrocarbon group joined by single carbon-carbon bonds and having 1-6 carbon atoms joined together.

- 10 The alkyl hydrocarbon group may be linear, branched or cyclic, saturated or unsaturated. Substituents on optionally substituted alkyl are selected from the group consisting of aryl, OH, O-alkyl, CO, halogen, CF₃, and OCF₃.

As used herein, "aryl" refers to an optionally substituted aromatic group with at least one ring having a conjugated pi-electron system, containing up to two

- 15 conjugated or fused ring systems. Aryl includes carbocyclic aryl, and biaryl groups, all of which may be optionally substituted. Substituents are selected from the group consisting of halogen, C₁₋₄ alkyl, NH₂, OCF₃, CF₃, O-alkyl, S-alkyl, CN, CHO, SO₂-alkyl and NO₂.

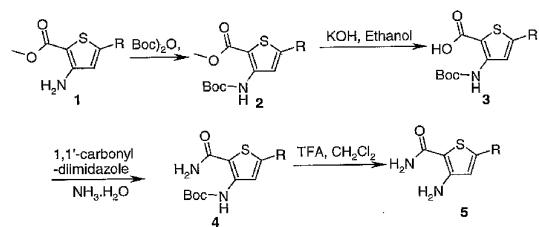
- 20 As used herein, "heteroaryl" refers to an optionally substituted aromatic group with at least one ring having a conjugated pi-electron system, containing up to two conjugated or fused ring systems and 1-3 heteroatoms selected from O, S and N. Heteroaryl includes carbocyclic heteroarylaryl, aryl-heteroaryl and biheteroarylaryl groups, all of which may be optionally substituted. Preferred aryl include phenyl and naphthyl. More preferred aryl include phenyl. Preferred substituents are selected
25 from the group consisting of halogen, C₁₋₄ alkyl, NH₂, OCF₃, CF₃, O-alkyl, S-alkyl, CN, CHO, SO₂-alkyl and NO₂. Examples of heteroaryl rings included pyrrole, furan, thiophene, indole, isoindole, benzofuran, isobenzofuran, benzothiphene, pyridine, quinoline, isoquinoline, quinolizine, pyrazole, imidazole, isoxazole, oxazole, isothiazole, thiazole, pyridazine, pyrimidine, and pyrazine.

30

As used herein "halogen" refers to include F, Cl, Br, and I.

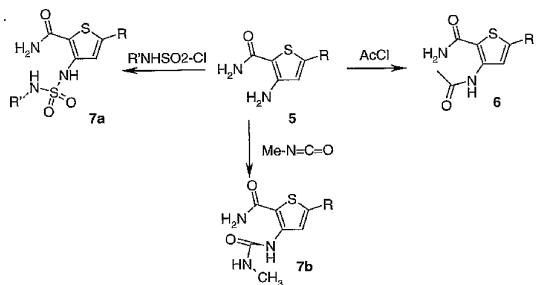
METHODS OF PREPARATION

The general preparation of the aminothiophene carboxylic amide analogs is shown in **Schemes I** and **II**. The synthesis started with commercially available 5 aminothiophene carboxylic ester 1. Protection of the amino group with di-*tert*-butyl dicarbonate [(Boc)₂O] and hydrolysis of the ester provided acid 3. The resultant acid was activated with 1,1'-carbonyldimidazole, followed by reaction with ammonium hydroxide and treatment with trifluoroacetic acid (TFA) then furnished the aminothiophene carboxylic amide 5. Compound 5 was readily transformed to 10 acetamide 6, sulfomyl amide 7a and methyl urea 7b.

Scheme I

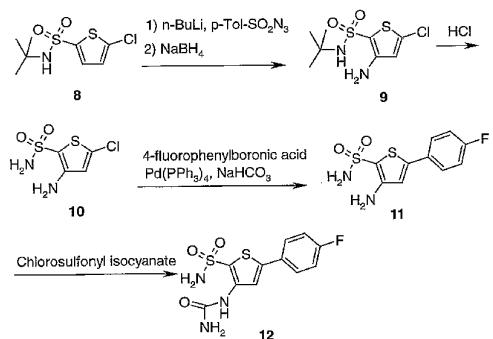
WO 03/029242

PCT/US02/31902

Scheme II

The general preparation of ureidothiophene sulfonamides is described in **Scheme III**.

III. The synthesis started with *tert*-butyl sulfonamide 8. Deprotonation with *n*-BuLi followed by reaction with 4-methyl-benzenesulfonyl azide and sodium borohydride afforded amino-thiophene 9. Treatment with HCl and suzuki cross-coupling with 4-fluorophenylboronic acid provided amino-thiophene sulfonamide 11. The primary amine was then converted into urea 12.

10 **Scheme III**

10

WO 03/029242

PCT/US02/31902

The following examples are intended to be illustrative of the present invention
but not limiting in any way.

In general, nuclear magnetic resonance spectra were recorded at 400 MHz
5 using Bruker AC 400 spectrometer. CDCl₃ is deuteriochloroform, DMSO-d₆ is
hexadeuteriodimethylsulfoxide, and CD₃OD is tetradeuteriomethanol. Chemical
shifts are reported in parts per million (d) downfield from the internal standard
tetramethylsilane. Abbreviations for NMR data are as follows: s = singlet, d =
10 doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, dt =
doublet of triplets, app = apparent, br = broad. J indicates the NMR coupling
constant measured in Hertz. Mass spectra were taken on MDS SCIEX (LC-MS)
instrument using electrospray (ES) ionization technique. All temperatures are
reported in degrees Celsius. Analtech Silica Gel GF and E. Merck Silica Gel 60
F-254 thin layer plates were used for thin layer chromatography. Flash
15 chromatography was carried out on E. Merck Kieselgel 60 (230-400 mesh) silica
gel.

Example 1

Preparation of 3-acetylamo-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid

20 amide 1a) 3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic
acid methyl ester
To a solution of methyl 3-amino-5-(4-chlorophenyl)thiophene-2-carboxylate
(1 g, 3.73 mmol) in THF (20 mL) was added 4-(dimethylamino)pyridine (45 mg,
0.373 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (1.22 g, 5.6 mmol). After stirring for 24 h
25 at room temperature, the solution was diluted with brine solution (100 mL) and
extracted with ethyl acetate (100 mL, 3x). The combined organic phases were dried
over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl
acetate, 4:1) then provided the title compound 1a as a white solid.

30 1b) 3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid

WO 03/029242

PCT/US02/31902

A solution of 1a (1.37 g, 3.73 mmol) in ethanol (20 mL) was mixed with KOH (627 mg, 11.2 mmol) in water (20 mL). The resultant mixture was heated at 60 °C for 1 h, diluted with HCl (50 mL, 1N) and extracted with ethyl acetate (60 mL, 3x). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and 5 concentrated to afford compound 1b as a yellow solid.

1c) [2-Carbamoyl-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-3-yl]-carbamic acid *tert* butyl ester

To a solution of 1b (1.3 g, 3.7 mmol) in DMF (10 mL) was added 1,1'-carbonyl diimidazole (1.2 g, 7.4 mmol). The resultant solution was stirred for 1 h 10 and mixed with ammonium hydroxide (37%, 5 mL). The mixture was diluted with brine solution (100 mL) and extracted with ethyl acetate (100 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl acetate, 4:1) then provided compound 1c as a yellow solid.

15

1d) 3-Amino-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide

To a solution of 1c (250 mg, 0.71 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added TFA (1 mL). The resultant solution was stirred for 1 h, then mixed with saturated NaHCO₃ solution (60 mL), and extracted with ethyl acetate (50 mL, 3x). The 20 combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl acetate, 1:1) then provided compound 1d as a yellow solid: MS (ES) 253 (M+H)⁺.

1e) 3-acetylamo-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide A
25 solution of 1d (20 mg, 0.079 mmol) in THF (10 mL) was treated with acetyl chloride (11.2 μL, 0.158 mmol) for 1 h. The resultant solution was diluted with water (0.1 mL) and DMSO (2 mL). The mixture was concentrated. Separation by reverse phase HPLC then provided the title compound as a white solid: MS (ES) 295 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOCD₃) δ 11.08 (s, 1 H), 8.27 (s, 1 H), 7.69 (ws, 2 H), 7.68 (d, 30 2 H, J = 8.8 Hz), 7.54 (d, 2 H, J = 8.8 Hz), 2.14 (s, 3 H).

WO 03/029242

PCT/US02/31902

Example 2**Preparation of 3-acetylamino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid****amide****2a) 3-amino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide**

5 The compound was prepared from methyl 3-amino-5-(4-fluorophenyl)-thiophene-2-carboxylate by following the procedure in example 1a-1d. The compound is a yellow solid: MS (ES) 237 ($M+H$)⁺.

2b) 3-acetylamino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide The title compound was prepared from 2a by following the procedure in example 1e. The compound is a white solid: MS (ES) 279 ($M+H$)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOCD₃) δ11.09 (s, 1 H), 8.22 (s 1 H), 7.72-7.69 (m, 4 H), 7.35-7.30 (m, 2 H), 2.14 (s, 3 H).

Example 3**15 Preparation of 5-(4-fluoro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide****3a) 3-Amino-5-chloro-thiophene-2-sulfonic acid *tert*-butylamide**

To a solution of 5-chloro-thiophene-2-sulfonic acid *tert*-butylamide (310 mg, 1.22 mmol) in THF (10 mL) at -78 °C was added *n*-Buli (1.6 M in hexane, 1.7 mL, 2.7 mmol) dropwise. The resultant solution was warmed up to -30 °C and maintained at -20 °C - -30 °C for 10 min. It was mixed with a solution of 4-methylbenzenesulfonyl azide (361 mg, 1.83 mmol) in THF (2 mL). The mixture was stirred at ambient temperature for 1 h before diluted with brine solution (30 mL) and washed with toluene (20 mL). The organic phase was separated and mixed with NaBH₄ (500 mg, 13.2 mmol) and H₂O (5 mL). The mixture was stirred for 2 h. at room temperature, then diluted with brine solution (50 mL) and washed with ethyl acetate (50 mL, 3x). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl acetate, 4:1) then provided 3a (250 mg) as a yellow oil.

30 3b) 3-Amino-5-chloro-thiophene-2-sulfonic acid amide

WO 03/029242

PCT/US02/31902

A solution of 3a (250 mg, 0.93 mmol) in concentrated HCl solution (10 mL) was heated at 55 °C for 2h. Removal of all solvents then afforded 3b (198 mg) as a yellow solid.

- 5 3c) 3-Amino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-sulfonic acid amide To a solution of 3b (104 mg, 0.5 mmol) in 1,4-dioxane / water (40 mL, 3:1) was added 4-fluorophenylboronic acid (140 mg, 1 mmol), Na₂CO₃ (212 mg, 2 mmol), and Pd(PPh₃)₄ (9% Pd, 59 mg, 0.05 mmol). The resultant mixture was heated at 110 °C for 3h, diluted with brine solution (50 mL) and extracted with ethyl acetate (50 mL, 10x). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl acetate, 1:1) then provided 3c (45 mg, 33%) as a yellow solid: MS (ES) 273 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) 87.52 (m, 2 H), 7.04 (m, 2 H), 6.72 (s, 1 H).
- 10 3x). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. Flash chromatography (hexanes / ethyl acetate, 1:1) then provided 3c (45 mg, 33%) as a yellow solid: MS (ES) 273 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) 87.52 (m, 2 H), 7.04 (m, 2 H), 6.72 (s, 1 H).
- 15 3d) 5-(4-Fluoro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide To the mixture of 3c (30 mg, 0.11 mol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added chlorosulfonyl isocyanate (14 μL, 0.165 mmol). The resultant mixture was stirred at room temperature for 3h, then mixed with water (0.5 mL). Separation using a reverse phase HPLC afforded 3d (20 mg, 58%) as a white solid: MS (ES) 316 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 88.02 (s, 1 H), 7.69 (m, 2 H), 7.20 (m, 2 H).
- 20 3e) 5-(3-Chloro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide

Example 4

Preparation of 5-(3-chloro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide

4a) 3-Amino-5-(3-chloro-phenyl)-thiophene-2-sulfonic acid amide

- 25 The title compound was prepared from 3-chlorobenzene boronic acid and 3b by following the procedure in example 3c. This compound is a white solid: MS (ES) 289 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 87.62 (s 1 H), 7.53 (m, 1 H), 7.40 (m, 2 H), 6.92 (s, 1 H).

- 30 4b) 5-(3-Chloro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide

WO 03/029242

PCT/US02/31902

The title compound was prepared from 4a by following the procedure in example 3d. This compound is a white solid: MS (ES) 332 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOCD₃) 88.28 (s, 1 H), 8.14 (s, 1 H), 7.72 (s, 2 H), 7.69 (s, 1 H), 7.60 (m, 1 H), 7.49 (m, 2 H), 6.72 (s, 2 H).

5

Example 5**Preparation of 5-(4-trifluoromethyl-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide****5a) 3-Amino-5-(4-trifluoromethyl-phenyl)-thiophene-2-sulfonic acid amide**

10 The title compound was prepared from 4-trifluoromethylbenzene boronic acid and 3b by following the procedure in example 3c. This compound is a white solid: MS (ES) 323 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 87.80 (d, 2 H, J = 8.2 Hz), 7.72 (d, 2 H, J = 8.2 Hz), 7.02 (s, 1 H).

15 5b) 5-(4-trifluoromethyl-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide

The title compound was prepared from 5a by following the procedure in example 3d. This compound is a white solid: MS (ES) 366 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 88.20 (s, 1 H), 7.85 (d, 2 H, J = 8.2 Hz), 7.75 (d, 2 H, J = 8.2 Hz).

20

Example 6**Preparation of 5-phenyl-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide****6a) 3-Amino-5-phenyl-thiophene-2-sulfonic acid amide**

The title compound was prepared from phenylboronic acid and 3b by following the procedure in example 3c. This compound is a white solid: MS (ES) 255 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 87.61 (m, 2 H), 7.42-7.37 (m, 3 H), 6.89 (s, 1 H).

6b) 5-Phenyl-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide The title compound was prepared from 6a by following the procedure in example 3d. This compound is a white solid: MS (ES) 298 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃SOCD₃) 88.30 (s, 1 H), 8.10 (s, 1 H), 7.68-7.39 (m, 8 H), 6.65 (s, 1 H).

WO 03/029242

PCT/US02/31902

- This invention provides a pharmaceutical composition, which comprises a compound according to Formula I and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Accordingly, the compounds of Formula I may be used in the manufacture of a medicament. Pharmaceutical compositions of the compounds of
- 5 Formula I prepared as hereinbefore described may be formulated as solutions or lyophilized powders for parenteral administration. Powders may be reconstituted by addition of a suitable diluent or other pharmaceutically acceptable carrier prior to use. The liquid formulation may be a buffered, isotonic, aqueous solution.
- Examples of suitable diluents are normal isotonic saline solution, standard 5%
- 10 dextrose in water or buffered sodium or ammonium acetate solution. Such formulation is especially suitable for parenteral administration, but may also be used for oral administration or contained in a metered dose inhaler or nebulizer for insufflation. It may be desirable to add excipients such as polyvinylpyrrolidone, gelatin, hydroxy cellulose, acacia, polyethylene glycol, mannitol, sodium chloride or
- 15 sodium citrate.
- Alternately, these compounds may be encapsulated, tableted or prepared in an emulsion or syrup for oral administration. Pharmaceutically acceptable solid or liquid carriers may be added to enhance or stabilize the composition, or to facilitate preparation of the composition. Solid carriers include starch, lactose, calcium
- 20 sulfate dihydrate, terra alba, magnesium stearate or stearic acid, talc, pectin, acacia, agar or gelatin. Liquid carriers include syrup, peanut oil, olive oil, saline and water. The carrier may also include a sustained release material such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate, alone or with a wax. The amount of solid carrier varies but, preferably, will be between about 20 mg to about 1 g per dosage
- 25 unit. The pharmaceutical preparations are made following the conventional techniques of pharmacy involving milling, mixing, granulating, and compressing, when necessary, for tablet forms; or milling, mixing and filling for hard gelatin capsule forms. When a liquid carrier is used, the preparation will be in the form of a syrup, elixir, emulsion or an aqueous or non-aqueous suspension. Such a liquid
- 30 formulation may be administered directly p.o. or filled into a soft gelatin capsule.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

For rectal administration, the compounds of this invention may also be combined with excipients such as cocoa butter, glycerin, gelatin or polyethylene glycols and molded into a suppository.

- The methods of the present invention include topical inhaled and intracolonic
- 5 administration of the compounds of Formula I. By topical administration is meant non-systemic administration, including the application of a compound of the invention externally to the epidermis, to the buccal cavity and instillation of such a compound into the ear, eye and nose, wherein the compound does not significantly enter the blood stream. By systemic administration is meant oral, intravenous,
- 10 intraperitoneal and intramuscular administration. The amount of a compound of the invention (hereinafter referred to as the active ingredient) required for therapeutic or prophylactic effect upon topical administration will, of course, vary with the compound chosen, the nature and severity of the condition being treated and the animal undergoing treatment, and is ultimately at the discretion of the physician
- 15 While it is possible for an active ingredient to be administered alone as the raw chemical, it is preferable to present it as a pharmaceutical formulation. The active ingredient may comprise, for topical administration, from 0.01 to 5.0 wt% of the formulation.

- The topical formulations of the present invention, both for veterinary and for
- 20 human medical use, comprise an active ingredient together with one or more acceptable carriers therefor and optionally any other therapeutic ingredients. The carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient thereof.

- Formulations suitable for topical administration include liquid or semi-liquid
- 25 preparations suitable for penetration through the skin to the site of where treatment is required such as: liniments, lotions, creams, ointments or pastes, and drops suitable for administration to the eye, ear or nose.

- Drops according to the present invention may comprise sterile aqueous or oily solutions or suspensions and may be prepared by dissolving the active
- 30 ingredient in a suitable aqueous solution of a bactericidal and/or fungicidal agent and/or any other suitable preservative, and preferably including a surface active

WO 03/029242

PCT/US02/31902

- agent. The resulting solution may then be clarified by filtration, transferred to a suitable container, which is then sealed and sterilized by autoclaving, or maintaining at 90-100 C for half an hour. Alternatively, the solution may be sterilized by filtration and transferred to the container by an aseptic technique. Examples of
- 5 bactericidal and fungicidal agents suitable for inclusion in the drops are phenylmercuric nitrate or acetate (0.002%), benzalkonium chloride (0.01%) and chlorhexidine acetate (0.01%). Suitable solvents for the preparation of an oily solution include glycerol, diluted alcohol and propylene glycol.
- Lotions according to the present invention include those suitable for
- 10 application to the skin or eye. An eye lotion may comprise a sterile aqueous solution optionally containing a bactericide and may be prepared by methods similar to those for the preparation of drops. Lotions or liniments for application to the skin may also include an agent to hasten drying and to cool the skin, such as an alcohol or acetone, and/or a moisturizer such as glycerol or an oil such as castor oil or arachis
- 15 oil.
- Creams, ointments or pastes according to the present invention are semi-solid formulations of the active ingredient for external application. They may be made by mixing the active ingredient in finely divided or powdered form, alone or in solution or suspension in an aqueous or non-aqueous fluid, with the aid of suitable
- 20 machinery, with a greasy or non-greasy basis. The basis may comprise hydrocarbons such as hard, soft or liquid paraffin, glycerol, beeswax, a metallic soap, a mucilage, an oil of natural origin such as almond, corn, arachis, castor or olive oil, wool fat or its derivatives, or a fatty acid such as stearic or oleic acid together with an alcohol such as propylene glycol or macrogols. The formulation
- 25 may incorporate any suitable surface active agent such as an anionic, cationic or non-ionic surface active agent such as sorbitan esters or polyoxyethylene derivatives thereof. Suspending agents such as natural gums, cellulose derivatives or in organic materials such as siliceous silicas, and other ingredients such as lanolin, may also be included.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

UTILITY OF THE PRESENT INVENTION

- The compounds of Formula I are useful as inhibitors of the IKK-beta kinase phosphorylation of I_KB and as such are inhibitors of NF- κ B activation. The present method utilizes compositions and formulations of said compounds, including pharmaceutical compositions and formulations of said compounds.
- The present invention particularly provides methods of treatment of diseases associated with inappropriate NF- κ B activation, which methods comprise
- 5 administering to an animal, particularly a mammal, most particularly a human in need thereof one or more compounds of Formula I. The present invention particularly provides methods for treating inflammatory and tissue repair disorders, particularly rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) osteoarthritis, osteoporosis and fibrotic
- 10 diseases; dermatosis, including psoriasis, atopic dermatitis and ultraviolet radiation (UV)-induced skin damage, autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, cancer, including Hodgkins disease, cachexia, inflammation
- 15 associated with infection and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS), adult respiratory distress syndrome and Ataxia Telangiectasia.
- For acute therapy, parenteral administration of one or more compounds of Formula I is useful. An intravenous infusion of the compound in 5% dextrose in water or
- 20 25 normal saline, or a similar formulation with suitable excipients, is most effective, although an intramuscular bolus injection is also useful. Typically, the parenteral dose will be about 0.01 to about 50 mg/kg; preferably between 0.1 and 20 mg/kg, in a manner to maintain the concentration of drug in the plasma at a concentration effective to inhibit IKK-beta and therefore activation of NF- κ B. The compounds are
- 30 administered one to four times daily at a level to achieve a total daily dose of about 0.4 to about 80 mg/kg/day. The precise amount of a compound used in the present

WO 03/029242

PCT/US02/31902

method which is therapeutically effective, and the route by which such compound is best administered, is readily determined by one of ordinary skill in the art by comparing the blood level of the agent to the concentration required to have a therapeutic effect.

5 The compounds of Formulas I may also be administered orally to the patient, in a manner such that the concentration of drug is sufficient to inhibit IKK-beta and therefore activation of NF- κ B or to achieve any other therapeutic indication as disclosed herein. Typically, a pharmaceutical composition containing the compound is administered at an oral dose of between about 0.1 to about 50 mg/kg in a manner
10 consistent with the condition of the patient. Preferably the oral dose would be about 0.5 to about 20 mg/kg.

The compounds of Formulas I may also be administered topically to the patient, in a manner such that the concentration of drug is sufficient to inhibit IKK-beta and therefore activation of NF- κ B or to achieve any other therapeutic indication
15 as disclosed herein. Typically, a pharmaceutical composition containing the compound is administered in a topical formulation of between about 0.01% to about 5% w/w.

No unacceptable toxicological effects are expected when compounds of the present invention are administered in accordance with the present invention.

20 The ability of the compounds described herein to inhibit the activation of NF- κ B is clearly evidenced in their ability to inhibit the phosphorylation of the N-terminal fragment of I κ B- α by IKK- β (see Table 1 for examples). These compounds also block the degradation of I κ B- α and the nuclear translocation of NF- κ B in human monocytes and other mammalian cells upon activation of the cells with a
25 pro-inflammatory stimuli (e.g., TNF- α , LPS, etc.). In addition these compounds inhibit pro-inflammatory mediator production from LPS-stimulated human monocytes and stimulated human primary synovial fibroblasts. The utility of the present NF- κ B inhibitors in the therapy of diseases is premised on the importance of NF- κ B activation in a variety of diseases.

30 NF- κ B plays a key role in the regulated expression of a large number of pro-inflammatory mediators including cytokines such as TNF, IL-1 β , IL-6 and IL-8

WO 03/029242

PCT/US02/31902

(Mukaida *et al.*, 1990; Liberman and Baltimore, 1990; Matsusaka *et al.*, 1993), cell adhesion molecules, such as ICAM and VCAM (Marui *et al.*, 1993; Kawai *et al.*, 1995; Ledebur and Parks, 1995), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Xie *et al.*, 1994; Adcock *et al.*, 1994). (Full reference citations are at the end of this section). Such mediators are known to play a role in the recruitment of leukocytes at sites of inflammation and in the case of iNOS, may lead to organ destruction in some inflammatory and autoimmune diseases (McCartney-Francis *et al.*, 1993; Kleemann *et al.*, 1993).

Evidence for an important role of NF- κ B in inflammatory disorders is obtained in studies of asthmatic patients. Bronchial biopsies taken from mild atopic asthmatics show significant increases in the number of cells in the submucosa staining for activated NF- κ B, total NF- κ B, and NF- κ B-regulated cytokines such as GM-CSF and TNF α compared to biopsies from normal non-atopic controls (Wilson *et al.*, 1998). Furthermore, the percentage of vessels expressing NF- κ B immunoreactivity is increased as is IL-8 immunoreactivity in the epithelium of the biopsy specimens (Wilson *et al.*, 1998). As such, inhibition of IL-8 production through the inhibition of NF- κ B, as has been demonstrated by these compounds would be predicted be beneficial in airway inflammation.

Recent studies suggest that NF- κ B may also play a critical role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD). Activated NF- κ B is seen in colonic biopsy specimens from Chron's disease and ulcerative colitis patients (Ardite *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Activation is evident in the inflamed mucosa but not in uninflamed mucosa (Ardite *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 1998) and is associated with increased IL-8 mRNA expression in the same sites (Ardite *et al.*, 1998). Furthermore, corticosteroid treatment strongly inhibits intestinal NF- κ B activation and reduces colonic inflammation (Ardite *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Again, inhibition of IL-8 production through the inhibition of NF- κ B, as has been demonstrated by these compounds would be predicted be beneficial in inflammatory bowel disease.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

Animal models of gastrointestinal inflammation provide further support for NF- κ B as a key regulator of colonic inflammation. Increased NF- κ B activity is observed in the lamina propria macrophages in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in mice with p65 being a major component of the activated complexes (Neurath *et al.*, 1996; Neurath and Pettersson, 1997). Local administration of p65 antisense abrogates the signs of established colitis in the treated animals with no signs of toxicity (Neurath *et al.*, 1996; Neurath and Pettersson, 1997). As such, one would predict that small molecule inhibitors of NF- κ B would be useful in the treatment of IBD.

Further evidence for a role of NF- κ B in inflammatory disorders comes from studies of rheumatoid synovium. Although NF- κ B is normally present as an inactive cytoplasmic complex, recent immunohistochemical studies have indicated that NF- κ B is present in the nuclei, and hence active, in the cells comprising human rheumatoid synovium (Handel *et al.*, 1995; Marok *et al.*, 1996; Sioud *et al.*, 1998) and in animal models of the disease (Tsao *et al.*, 1997). The staining is associated with type A synoviocytes and vascular endothelium (Marok *et al.*, 1996). Furthermore, constitutive activation of NF- κ B is seen in cultured synoviocytes (Roshak *et al.*, 1996; Miyazawa *et al.*, 1998) and in synovial cell cultures stimulated with IL-1 β or TNF α (Roshak *et al.*, 1996; Fujisawa *et al.*, 1996; Roshak *et al.*, 1997). Thus, the activation of NF- κ B may underlie the increased cytokine production and leukocyte infiltration characteristic of inflamed synovium. The ability of these compounds to inhibit NF- κ B and thereby inhibit the production of pro-inflammatory mediators (e.g. cytokines and prostanooids) by these cells would be predicted to yield benefit in rheumatoid arthritis.

25

Biological Assays:

The compounds of this invention may be tested in one of several biological assays to determine the concentration of compound, which is required to have a given pharmacological effect.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

NF- κ B activity may also be measured in an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to assess the presence of NF- κ B protein in the nucleus. The cells of interest are cultured to a density of 1×10^6 /mL. The cells are harvested by centrifugation, washed in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} and resuspended in PBS with 5 Ca^{2+} and Mg^{2+} at 1×10^7 cells/mL. To examine the effect of compound on the activation of NF- κ B, the cell suspensions are treated with various concentrations of drug or vehicle (DMSO, 0.1%) for 30 min. at 37 °C prior to stimulation with TNF- α (5.0 ng/mL) for an additional 15 min. Cellular and nuclear extracts are prepared follows. Briefly, at the end of the incubation period the cells (1×10^7 cells) are 10 washed 2x in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} . The resulting cell pellets are resuspended in 20 uL of Buffer A (10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and 0.1% NP-40) and incubated on ice for 10 min. The nuclei are pelleted by microcentrifugation at 3500 rpm for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was collected as the cellular extract and the nuclear pellet was 15 resuspended in 15 uL Buffer C (20 mM Hepes (pH 7.9), 0.42 M NaCl, 1.5mM MgCl_2 , 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)). The suspensions are mixed gently for 20 min at 4 °C then microcentrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant is collected and diluted to 60 uL with Buffer D (20mM Hepes (pH 7.9), 20 50 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 0.5 mM PMSF). All samples are stored at -80 °C until analyzed. The protein concentration of the extracts is determined according to the method of Bradford (Bradford, 1976) with BioRad reagents.

The effect of compounds on transcription factor activation is assessed in an 25 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using nuclear extracts from treated cells as described above. The double stranded NF- κ B consensus oligonucleotides (5' - AGTTGAGGGGACTTCCCCAGGC-3') are labelled with T₄ polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP. The binding mixture (25 uL) contains 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.9), 4 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% 30 glycerol, 0.3 mg/mL bovine serum albumin, and 1 ug poly(dI-dC) \bullet poly(dI-dC). The binding mixtures (10 ug nuclear extract protein) are incubated for 20 min at room

WO 03/029242

PCT/US02/31902

- temperature with 0.5 ng of ^{32}P -labelled oligonucleotide (50,000-100,000 cpm) in the presence or absence of unlabeled competitor after which the mixture is loaded on a 4% polyacrylamide gel prepared in 1X Tris borate/EDTA and electrophoresed at 200 V for 2 h. Following electrophoresis the gels are dried and exposed to film for
- 5 detection of the binding reaction.
- The effect of compounds on the phosphorylation of I κ B may be monitored in a Western blot. Cellular extracts are subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% gels (BioRad, Hercules, CA) and the proteins transferred to nitrocellulose sheets (HybondTM-ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Immunoblot assays are performed using a polyclonal rabbit antibody directed against I κ B α or I κ B β followed with a peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Immunoreactive bands are detected using the Enhanced Chemiluminescence (ECL) assay system (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).
- 10 Assays for I κ B kinases were conducted as follows: IKK- α was expressed as a hexa-histidine tagged protein in baculovirus-infected insect cells and purified over a Ni-NTA affinity column. Kinase activity was assayed using 50 ng of purified protein in assay buffer (20 mM Hepes, pH 7.7, 2 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 10 mM PNPP, 0.3 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamidine, 2 μ M PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 ug/mL leupeptin, 1 ug/mL pepstatin, 1mM DTT) containing various concentrations of compound or DMSO vehicle and ATP as indicated (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). The reaction was started by the addition of 200 ng I κ B-GST (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), in a total volume of 50 μ L. The reaction was allowed to
- 15 proceed for 1 h. at 30 °C after which the reaction was terminated by the addition of EDTA to a final concentration of 20 mM. Kinase activity was determined by dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (Wallac Oy, Turku, Finland) using a phospho-I κ B- α (Ser32) antibody (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) and an Eu³⁺-labelled anti-rabbit IgG (Wallac Oy, Turku, Finland).
- 20 The plates were read in a VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac), using a
- 25
- 30

WO 03/029242

PCT/US02/31902

standard europium protocol (excitation 340 nm, emission 615 nm; fluorescence measured for 400 μ s after a 400 usec delay). Data are expressed as fluorescence (cps) units.

- IKK- β was expressed as a GST-tagged protein, and its activity was assessed
- 5 in a 96-well scintillation proximity assay (SPA). Briefly, IKK- β was diluted in assay buffer as described above (20 nM final), with various concentrations of compound or DMSO vehicle, 240 nM ATP and 200 nCi [γ - 33 P]-ATP (10 mCi/mL, 2000 Ci/mmol; NEN Life Science Products, Boston, MA). The reaction was started with the addition of a biotinylated peptide comprising amino acids 15 – 46 of I κ B- α
- 10 (American Peptide) to a final concentration of 2.4 μ M, in a total volume of 50 μ L. The sample incubated for one hour at 30 °C, followed by the addition of 150 μ L of stop buffer (PBS w/o Ca $^{2+}$, Mg $^{2+}$, 0.1% Triton X-100 (v/v), 10 mM EDTA) containing 0.2 mg streptavidin-coated SPA PVT beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The sample was mixed, incubated for 10 min. at room
- 15 temperature, centrifuged (1000 xg, 2 minutes), and measured on a Hewlett-Packard TopCount.

- The effect of IKK- β inhibitors on primary synovial fibroblast mediator production was assessed as follows: Primary cultures of human RSF were obtained by enzymatic digestion of synovium obtained from adult patients with rheumatoid
- 20 arthritis as previously described (Roshak *et al.*, 1996b). Cells were cultured in Earl's Minimal Essential Medium (EMEM) which contained 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY), at 37°C and 5% CO₂. Cultures were used at passages 4 through 9 in order to obtain a more uniform type B fibroblast population. For some studies, fibroblasts
- 25 were plated at 5×10^4 cells/mL in 16 mm (diameter) 24 well plates (Costar, Cambridge, MA). Cells (70-80% confluence) were exposed to IL-1 β (1 ng/mL) (Genzyme, Cambridge, MA) for the designated time. Drugs in DMSO vehicle (1%) were added to the cell cultures 15 minutes prior to the addition of IL-1. Studies were conducted 3-4 times using synovial cells from different donors. RSF cellular
- 30 extracts were prepared from cells treated as described above. Briefly, human RSF were removed by trypsin/EDTA, washed, and harvested by centrifugation. Cellular

WO 03/029242

PCT/US02/31902

extracts were prepared as previously described (Dignam *et al.*, 1983; Osborn, *et al.*, 1989). Briefly, at the end of the incubation period the cells (1×10^7 cells) were washed 2x in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} . The resulting cell pellets were resuspended in 20 μL of Buffer A (10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM

5 MgCl_2 , 0.5 mM).

Effect of IKK- β inhibition on human monocyte stimulated eicosanoid and cytokine production was assessed as follows: Monocytes were isolated from heparinized whole blood by double gradient centrifugation as previously described. Isolated monocyte enriched PBMCs were then adhered to 24 well culture plates at 2
10 $\times 10^6$ cells/mL in RPMI 1640 10% FBS (Hyclone, Logan, Utah) for 2 h. to further enrich the monocyte population. The media was then removed, cells washed once with RPMI 1640, and 1 mL RPMI 1640 10% FBS was added to the wells. Test compounds are added to the wells with a final vehicle concentration of 0.05% DMSO. Monocytes were activated by the addition of 200 ng/mL endotoxin (LPS; *E.
15 coli* serotype 026:B6)(Sigma, St. Louis, MO.) and incubated for 24 hrs. Cell-free supernates were analyzed by ELISA for TNF- α (EIA developed at SB), PGE₂ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), and IL-8 and IL-6 Biosource International, Camarillo, CA). Viability of the cells was determined by trypan blue exclusion.

Effect of IKK- β inhibitors on phorbol ester-induced inflammation was
20 assessed as follows: The inflammatory response induced by the cutaneous application of phorbol ester (PMA) to the external pinnae of Balb/c mice has proven to be a useful model to examine multifactorial inflammatory cell infiltration and inflammatory alteration of epidermis. The intense inflammatory lesion is dominated by neutrophil infiltration, which can be easily quantified by measurement tissue
25 concentration myeloperoxidase, an azurophilic granular enzyme present in neutrophils. In addition, the overall intensity of the inflammatory response can be measured by determination of ear thickness. Balb/c mice (n = 6/group) were administered drug treatment or vehicle followed by PMA (4 ug/ear). The mice were sacrificed 4 h. later, the ear thickness determined and NF- κ B activation was
30 monitored by I κ B α western or EMSA analysis.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

Effect of IKK- β inhibitors on rat carrageenan-induced paw edema was assessed as follows: Male Lewis rats (Charles River- Raleigh, NC) were housed and allowed free access to food and water, and weighed between 200-275g for each experiment. Compound or vehicle (0.5% Tragacanth (p.o.) or 10%DMSO, 5%DMA, 30% Cremophor(i.p.)) was administered 30 minutes to 1 hour prior to the carrageenan injection. Edema was induced by injection of 1% carrageenan in sterile dH₂O (0.05ml/paw) into the plantar surface of the right hindpaw. Paw thickness was measured prior to administration of compound or vehicle, and again at 3 hours, to determine change in paw volume. Rats were euthanized by CO₂ inhalation and 10 the right hindfoot was removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80C for analysis.

All publications, including, but not limited to, patents and patent applications cited in this specification, are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as 15 though fully set forth.

The above description fully discloses how to make and use the present invention. However, this invention is not limited to the particular embodiments described hereinabove, but includes all modification thereof within the scope of the appended claims and their equivalents. Those skilled in the art will recognize 20 through routine experimentation that various changes and modifications can be made without departing from the scope of this invention.

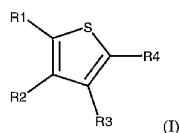
WO 03/029242

PCT/US02/31902

What is claimed is:

1. A compound according to formula (I) hereinbelow:

(I) herein below:



5

 R_1 is CONH_2 , or SO_2NH_2 . R_2 is NR_3R_6 . R_3 is H, or halogen; R_4 is aryl, or heteroaryl;10 R_5 is H, or alkyl;

provided that when R_1 is CONH_2 , R_5 is selected from the group consisting of H, CO-alkyl, SO_2 -alkyl, CONH_2 , CONH -alkyl, CONH -aryl, CONH -heteroaryl, CSNH_2 , CSNH -alkyl, CSNH -aryl, CSNH -heteroaryl, SO_2NH_2 , SO_2NH -alkyl, SO_2NH -aryl, and SO_2NH -heteroaryl;

15 When R_1 is SO_2NH_2 , R_5 is CONH_2 ; andwhen R_1 is CONH_2 , R_2 is not NHCONH_2 ,

and pharmaceutically acceptable salts, hydrates and solvated thereof.

2. A compound according to claim 1 wherein the compound is selected from
20 the group consisting of:

3-Acetylamino-5-(4-chloro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide;

3-Acetylamino-5-(4-fluoro-phenyl)-thiophene-2-carboxylic acid amide;

5-(4-Fluoro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide;

5-(3-Chloro-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide;

25 5-(4-Trifluoromethyl-phenyl)-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide;

and

5-phenyl-3-ureido-thiophene-2-sulfonic acid amide.

WO 03/029242

PCT/US02/31902

3. A method of treating a disease characterized by pathological NF- κ B activation comprising inhibiting the pathological activation by administering to a patient in need thereof an effective amount of a compound according to claim 1.

5

4. A method according to claim 3 wherein the disease is an inflammatory or tissue repair disorder.

5. A method according to Claim 4 wherein the disease is selected from the
10 group consisting of inflammatory and tissue repair disorders, particularly rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, asthma and COPD (chronic obstructive pulmonary disease) osteoarthritis, osteoporosis and fibrotic diseases, dermatosis, including psoriasis, atopic dermatitis and ultraviolet radiation (UV)-induced skin damage, autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus, multiple
15 sclerosis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, cancer, including Hodgkin's disease, cachexia, inflammation associated with infection and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS), adult respiratory distress syndrome, and Ataxia Telangiectasia.

20

6. A method according to Claim 3 wherein said disease is dermatosis.

7. A method according to Claim 3 wherein the disease is selected from the group consisting of: psoriasis, atopic dermatitis, and UV-induced skin damage.

25

8. A method according to Claim 3 wherein the disease is selected from the group consisting of autoimmune diseases; tissue and organ rejection, Alzheimer's disease, stroke, atherosclerosis, restenosis, diabetes, glomerulonephritis, osteoarthritis, osteoporosis, and Ataxia Telangiectasia.

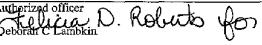
30

WO 03/029242

PCT/US02/31902

9. A method according to Claim 3 wherein said disease is an autoimmune disease.
10. A method according to Claim 3 wherein the autoimmune disease is systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis, diabetes
11. A method according to Claim 3 wherein the disease is cancer and/or cachexia.
- 10 12. A method according to Claim 3 wherein the cancer is Hodgkin's disease.
13. A method according to Claim 3 wherein the disease is inflammation associated with infection and certain viral infections, including acquired immune deficiency syndrome (AIDS).
- 15 14. A method according to Claim 3 wherein the disease is AIDS.
15. A method according to Claim 3 wherein the disease is adult respiratory distress syndrome.
- 20 16. A method according to claim 3 wherein there is dual inhibition of NF-κB and checkpoint kinase.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31902									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07D 333/36; A61K 31/38 US CL : 549/68, 69; 514/447 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 549/68, 69; 514/447											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 5,422,335 A (HAGEN et al) 06 June 1995 (06.06.1995), columns 1-4.</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,143,777 A (JONAS et al) 07 November 2000 (07.11.2000), columns 1-4.</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	US 5,422,335 A (HAGEN et al) 06 June 1995 (06.06.1995), columns 1-4.	1-16	A	US 6,143,777 A (JONAS et al) 07 November 2000 (07.11.2000), columns 1-4.	1-16
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	US 5,422,335 A (HAGEN et al) 06 June 1995 (06.06.1995), columns 1-4.	1-16									
A	US 6,143,777 A (JONAS et al) 07 November 2000 (07.11.2000), columns 1-4.	1-16									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.									
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on a priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 02 December 2002 (02.12.2002)	Date of mailing of the international search report 10 DEC 2002										
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT-1 Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Telephone No. 703-308-1235										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/00	
C 0 7 D 333/40	A 6 1 P 37/06	
	C 0 7 D 333/40	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU, ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 ワン・ゼホン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19406、キング・オブ・ブルシア、スウェードランド・ロード709番

(72)発明者 ジョエル・ロレン・バージェス

アメリカ合衆国 19426-0989 ペンシルベニア州 カレッジビル、サウス・カレッジビル・コード 1250番

(72)発明者 ジェイムズ・フランシス・キャラハン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406、キング・オブ・ブルシア、スウェードラント・ロード709番

F ターク(参考) 4C023 GA03 HA04

4C086 AA01 AA03 BB02 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA16 ZA36 ZA59
ZA68 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
ZB33 ZC55