

(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2005-508953

(P2005-508953A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.C1.⁷**C07D 401/14****A61K 31/404****A61K 31/454****A61K 31/4545****A61K 31/5377**

F 1

C O 7 D 401/14

A 6 1 K 31/404

A 6 1 K 31/454

A 6 1 K 31/4545

A 6 1 K 31/5377

テーマコード(参考)

4 C O 6 3

4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-534421 (P2003-534421)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月10日 (2002.10.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月12日 (2004.4.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/032354
 (87) 國際公開番号 WO2003/031438
 (87) 國際公開日 平成15年4月17日 (2003.4.17)
 (31) 優先権主張番号 60/328,226
 (32) 優先日 平成13年10月10日 (2001.10.10)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 598009739
 スージェン・インコーポレーテッド
 S U G E N , I N C .
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9408
 0, サウス・サンフランシスコ, イースト
 ・グランド・アベニュー230
 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 9408
 0, United States of America
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キナーゼ阻害剤としての3-[4-(置換ヘテロサイクリル)-ピロール-2-イルメチリデン]-2-インドリノン誘導体

(57) 【要約】

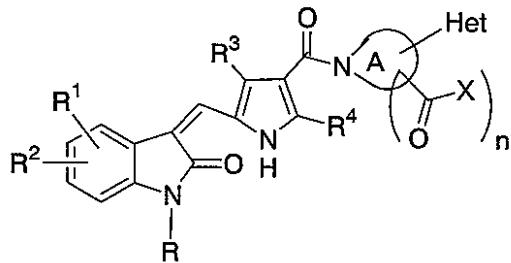
本発明は、キナーゼ、特にVEGFRおよび/またはPDGFRキナーゼを阻害する特定の3-[4-(置換ヘテロサイクリル)-ピロール-2-イルメチリデン]-2-インドリノン誘導体に関する。これらの化合物を含む医薬組成物、これらの化合物を含む医薬組成物を使用するキナーゼ媒介疾患の処置方法、およびこれらの化合物の製造方法も開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 : (IV)

【化 1】



(IV)

10

20

30

{ 式中、

Rは、

(a)水素；

(b)-PO(OR⁵)₂ [ここでR⁵はそれぞれ独立して水素またはアルキルである]；(c)-COR⁶ [ここでR⁶はアルキルである]；または(d)-CHR⁷NR⁸R⁹ [ここでR⁷は水素またはアルキルであり、R⁸およびR⁹は独立して水素若しくはアルキルであるか；またはR⁸とR⁹はこれらが結合している窒素原子と一緒にになってヘテロシクロアミノ環を形成する]

であり；

R¹は水素、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、F、Cl、Br、またはIであり；R²は水素、アルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、ヒドロキシ、F、Cl、Br、またはIであり；R³は水素またはアルキルであり；R⁴は水素またはアルキルであり；

環Aは場合により置換されたヘテロシクロアミノであり；

Hetはシクロアルキルアミノアルキル、シクロアルキルアルキルアミノアルキル、ヘテロアリール、複素環、ヘテロサイクリカルボニルアルキル、ヘテロサイクリカルキルカルボニルまたはヘテロサイクリカルキルであり；

XはNR₈R₉またはOR₈であり；および

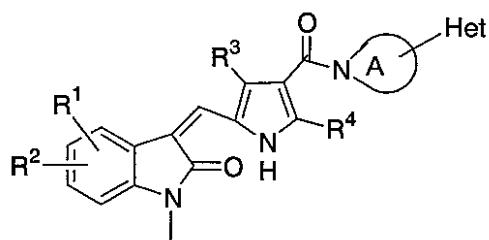
nは0または1である}

の化合物または医薬的に許容可能なその塩。

【請求項 2】

式 : (I) :

【化2】



(I)

10

{式中、

Rは、

(a)水素；

(b)-PO(OR<sup>5</sup>)<sub>2</sub>[ここでR<sup>5</sup>はそれぞれ独立して水素またはアルキルである]；

(c)-COR<sup>6</sup>[ここでR<sup>6</sup>はアルキルである]または

(d)-CHR<sup>7</sup>NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>[ここでR<sup>7</sup>は水素またはアルキルであり、R<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>は独立して水素若しくはアルキルであるか；またはR<sup>8</sup>とR<sup>9</sup>はこれらが結合している窒素原子と一緒にになってヘテロシクロアミノ環を形成する]

20

であり；

R<sup>1</sup>は水素、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、F、Cl、Br、またはIであり；

R<sup>2</sup>は水素、アルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、ヒドロキシ、F、Cl、BrまたはIであり；

R<sup>3</sup>は水素またはアルキルであり；

R<sup>4</sup>は水素またはアルキルであり；

環Aは場合により置換されたヘテロシクロアミノであり；

Hetはシクロアルキルアミノアルキル、シクロアルキルアルキルアミノアルキル、ヘテロアリール、複素環またはヘテロサイクリカルアルキルである}

30

の化合物または医薬的に許容可能なその塩。

【請求項3】

請求項1または2の一つに記載の化合物であって、式中、

R<sup>1</sup>は水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシ、F、ClまたはBrであり；および

R<sup>2</sup>は水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシ、F、ClまたはBrである、前記化合物。

【請求項4】

請求項1または2の一つに記載の化合物であって、式中、R<sup>1</sup>がFであり；およびR<sup>2</sup>が水素である、前記化合物。

【請求項5】

請求項4に記載の化合物であって、式中、R<sup>1</sup>が前記インドリノン環の5位にあり；およびRが、-PO(OH)<sub>2</sub>、-COCH<sub>3</sub>、またはピロリジン-1-イルメチルである、前記化合物。

40

【請求項6】

請求項5に記載の化合物であって、式中、Rが水素であり、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が独立して水素またはメチルである、前記化合物。

【請求項7】

請求項6に記載の化合物であって、式中、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がメチルである、前記化合物。

【請求項8】

請求項1または2の一つに記載の化合物であって、式中、Aが4～6個の環原子のヘテロシクロアミノ基である、前記化合物。

【請求項9】

50

請求項 1 または 2 の一つに記載の化合物であって、式中、Aがアゼチジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、ピペリジン-1-イル、またはピペラジン-1-イルである、前記化合物。

【請求項 1 0】

請求項 1 または 2 の一つに記載の化合物であって、式中、Hetは4～6個の環原子を含む複素環であり、ここで一つまたは二つの環原子は、窒素、酸素、または硫黄からなる群から選択され、残りの環原子は炭素原子である、前記化合物。

【請求項 1 1】

請求項 1 または 2 の一つに記載の化合物であって、式中、Hetがピペリジン-1-イル、モルホリン-4-イル、チオモルホリン-4-イル、ピペラジン-1-イル、2,6-ジメチルモルホリン-4-イル、または2,6-ジメチルピペラジン-1-イルであり、且つ前記A環の3または4位に配置されている、前記化合物。 10

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の化合物であって、式中、Aがアゼチジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、ピペリジン-1-イル、またはピペラジン-1-イルである、前記化合物。

【請求項 1 3】

請求項 1 または 2 の一つに記載の化合物であって、式中、Hetがヘテロサイクリカルアルキルであり、ここで前記ヘテロサイクリル環は5または6個の環原子を含み、ここで一つまたは二つの環原子は、窒素、酸素、または硫黄から選択され、残りの環原子は炭素である、前記化合物。 20

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の化合物であって、式中、Hetがピロリジン-1-イルメチルである、前記化合物。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の化合物であって、式中、Aがアゼチジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、ピペリジン-1-イル、またはピペラジン-1-イルである、前記化合物。

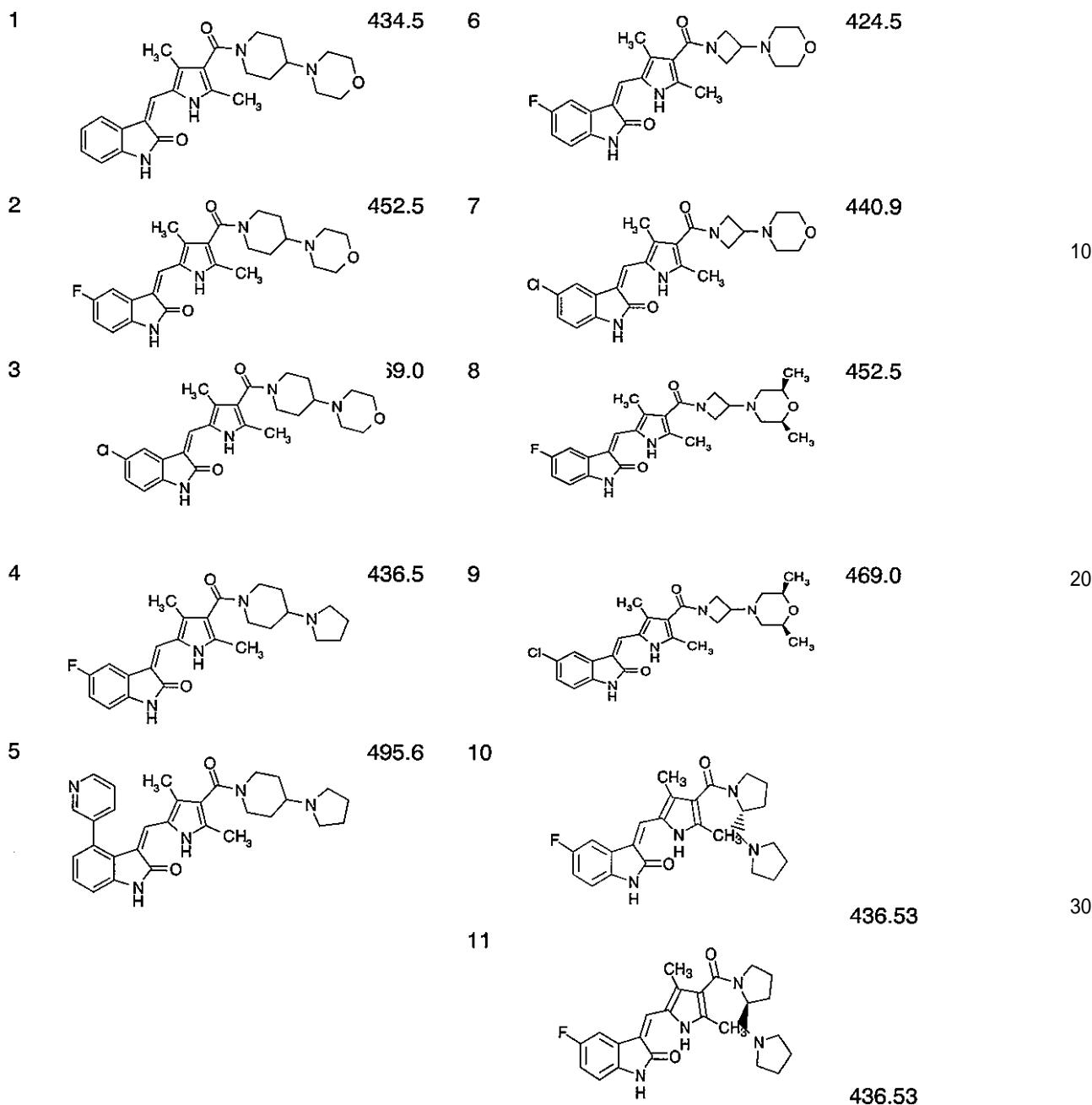
【請求項 1 6】

請求項 1 4 に記載の化合物であって、式中、Aがピロリジン-1-イルであり、ピロリジン-1-イルメチルは前記ピロリジン-1-イル環のC2位にあり、前記ピロリジン-1-イル環のC2位における立体化学はRまたはSである、前記化合物。

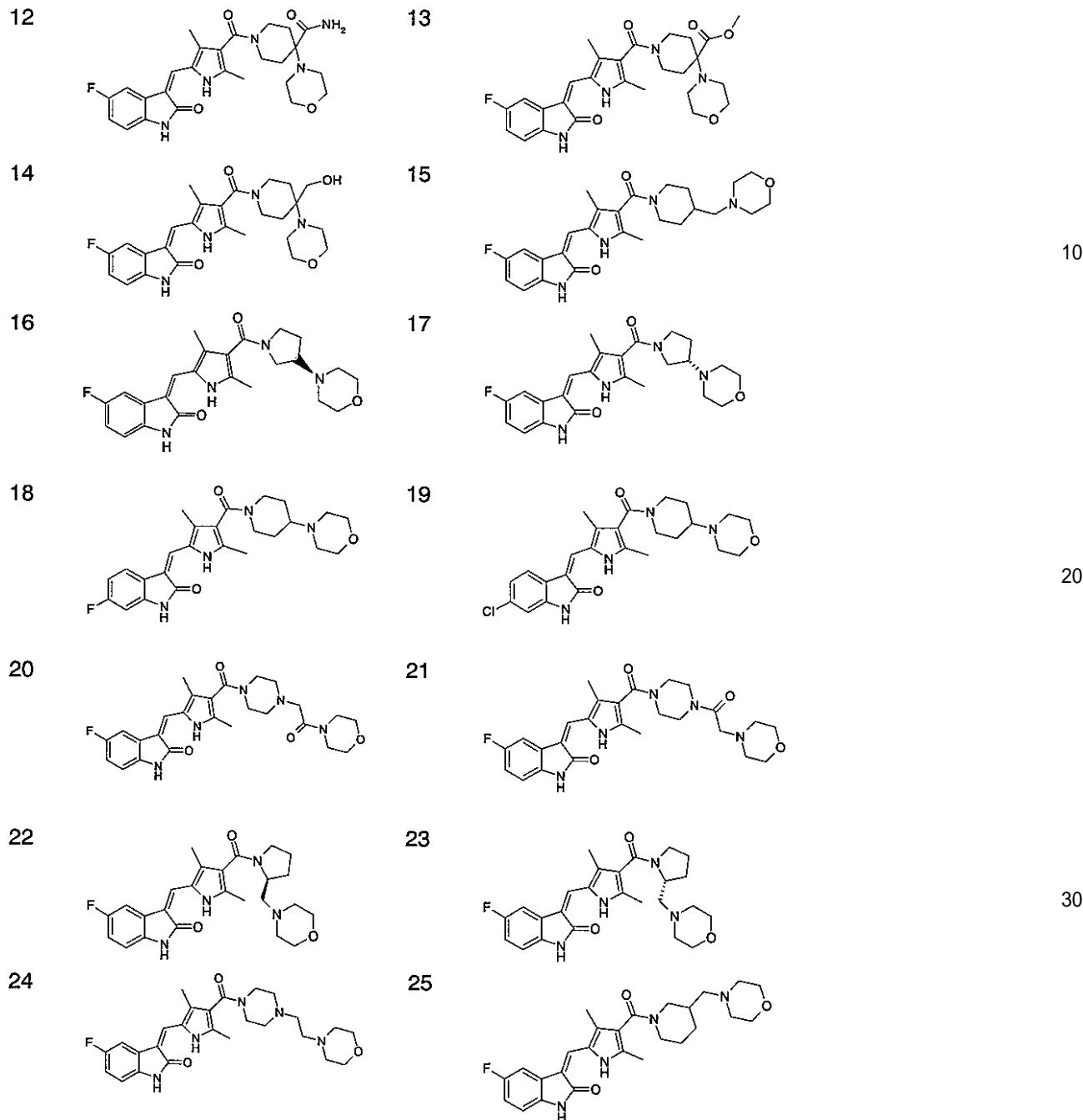
【請求項 1 7】

以下のもの：

【化3】



【化4】

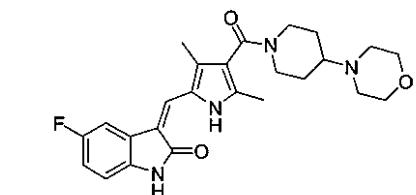


からなる群から選択される化合物。

【請求項1~8】

請求項1~7に記載の化合物であって、式中、前記化合物が、

【化5】



40

50

である、前記化合物。

【請求項 19】

請求項 1、2、17または18に記載の化合物または塩と、医薬的に許容可能な担体または賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 20】

蛋白質キナーゼの触媒活性を調節する方法であって、請求項 1、2、17または18に記載の化合物または塩と、前記蛋白質キナーゼとを接触させることを含む、前記方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法であって、前記蛋白質キナーゼがVEGFR、c-kit、およびPDGFRである、前記方法。 10

【請求項 22】

蛋白質キナーゼ関連の疾患の処置または予防の必要な患者におけるかかる疾患の処置または予防方法であって、請求項 1、2、17または18のいずれか1項に記載の化合物または塩と、医薬的に許容可能な担体または賦形剤とを含む医薬組成物の治療的有効量を前記患者に投与することを含む、前記方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法であって、前記疾患がVEGFR、c-kit、および / またはPDGFRキナーゼにより媒介される、前記方法。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、前記蛋白質キナーゼに関連する疾患が、神経膠芽細胞腫、非小細胞肺癌、黒色腫、急性骨髓性白血病および結腸直腸癌からなる群から選択される癌である、前記方法。 20

【請求項 25】

請求項 1 または 2 の一つに記載の化合物であって、式中、RがHである、前記化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キナーゼ、特にVEGFR、PDGFR、およびc-kitキナーゼを阻害する、特定の3-[4-(置換ヘテロサイクリル)-ピロール-2-イルメチリデン]-2-インドリノン誘導体に関する。これらの化合物を含む医薬組成物、これらの化合物を含む医薬組成物を使用する、キナーゼ、特にVEGFR、PDGFR、および / またはc-kitキナーゼにより媒介される疾患の処置方法、およびこれらの化合物の製造法も開示する。 30

【背景技術】

【0002】

蛋白質キナーゼ(PK)類は、蛋白質のチロシン、セリンおよびトレオニン残基上でヒドロキシル基のリン酸化を触媒する酵素である。一見、この簡単な活性の影響は甚大である；細胞の成長、分化、および増殖、すなわち、何らかの方法で細胞生命の実質的に全ての側面がPK活性に依存している。さらに、異常PK活性は、乾癬などの比較的生命を脅かさない疾患から神経膠芽細胞腫(脳腫瘍)などの非常に悪性の疾患に及ぶ疾患の宿主に関連している(本明細書中、その全体が参照として含まれる米国特許第5,792,783号を参照されたい)。たとえば、VEGFRおよび / またはPDGFRキナーゼは、たとえばT-細胞リンパ腫、急性リンパ球性リンパ腫、急性骨髓性白血病、黒色腫、神経膠芽細胞腫などの種々の癌に関係している(Bellamy W.T.ら、Cancer Res. 1999年、59巻、728~733頁参照)。VEGFは、糖尿病性網膜症、網膜虚血、および網膜新生血管などの眼の疾患にも関与している。 40

【0003】

PKに関連する細胞活性と、広範囲のヒトの疾患との間の明白な関連を受けて、PK活性を調節するための方法を発見するために多大な努力がなされてきている。その幾つかは、実際の細胞の過程に含まれる分子を模倣する大きな分子[たとえば、突然変異リガンド(米国特許出願第4,966,849号)；溶解性レセプターおよび抗体(PCT国際公開第W094/10202号、KendallおよびThomas、Proc. Nat'l Acad. Sci.、90巻：10705~09頁(1994年)、Kimら、 50

Nature、362巻：841～844頁(1993年))；RNAリガンド(Jelinekら、Biochemistry、33巻：10450～56頁)；Takanoら、Mol. Bio. Cell 4巻：358A頁(1993年)；Kinsellaら、Exp. Cell Res. 199巻：56～62頁(1992年)；Wrightら、J. Cellular Phys.、152巻：448～57頁)およびチロシンキナーゼ阻害剤[PCT国際公開第W094/03427号；同第W092/21660号；同第W091/15495号；同第W094/14808号；米国特許第5,330,992号；Marianiら、Proc. Am. Assoc. Cancer Res.、35巻：2268頁(1994年)]を使用するバイオミメティックアプローチに関連している。

【0004】

上記のものに加えて、PK阻害剤として作用する小さな分子を同定する試みがなされてきた。たとえば、ビス-単環式、二環式および複素環式アリール化合物(PCT国際公開第W092/20642号)、ビニレンアザインドール誘導体(PCT国際公開第W094/14808号)および1-シクロプロピル-4-ピリジルキノロン類(米国特許第5,330,992号)は、チロシンキナーゼ阻害剤として記載されてきた。スチリル化合物(米国特許第5,217,999号)、スチリル-置換ピリジル化合物(米国特許第5,302,606号)、キナゾリン誘導体(欧州特許出願第0 566 266 A1号)、セレナインドール(selenaindole)およびセレニド類(PCT国際公開第W094/03427号)、三環式多水酸基化合物(PCT国際公開第W092/21660号)、ベンジルホスホン酸化合物(PCT国際公開第W091/15495号)およびインドリノン化合物(米国特許第5,792,783号)は、全て、癌の処置に有用なPTK阻害剤として記載されてきた。しかし、これらの化合物は、毒性および/または低い生物学的利用能のため、有用性が限られている。従って、そのような欠点のない化合物が求められている。本発明の化合物は、この需要を充足するものである。

10

20

30

【発明の開示】

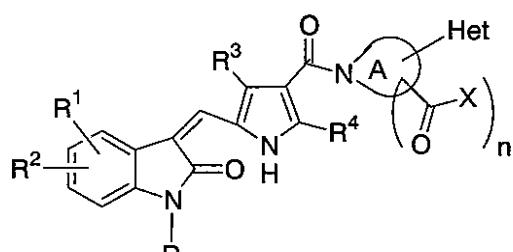
【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の概要

一側面において、本発明の好ましい態様は、式(IV)：

【化6】



(IV)

{式中、

Rは、

(a)水素；

(b)-PO₂(OR⁵)₂[ここでR⁵はそれぞれ独立して水素またはアルキルである]；

40

(c)-COR⁶[ここでR⁶はアルキルである]；または

(d)-CHR⁷NR⁸R⁹[ここでR⁷は水素またはアルキルであり、R⁸およびR⁹は独立して水素若しくはアルキルであるか；またはR⁸とR⁹はこれらが結合している窒素原子と一緒にになってヘテロシクロアミノ環を形成する]

であり；

R¹は水素、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、F、Cl、Br、またはIであり；

R²は水素、アルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、ヒドロキシ、F、Cl、Br、またはIであり；

R³は水素またはアルキルであり；

50

R^4 は水素またはアルキルであり；

環Aは場合により置換されたヘテロシクロアミノであり；

Hetはシクロアルキルアミノアルキル、シクロアルキルアルキルアミノアルキル、ヘテロアリール、複素環、ヘテロサイクリカルボニルアルキル、ヘテロサイクリカルボニルまたはヘテロサイクリアルキルであり；

Xは NR_8R_9 または OR_8 であり；および

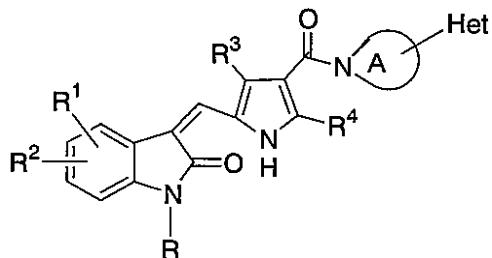
nは0または1である}

の化合物または医薬的に許容可能なその塩に関する。

【0006】

もう一つの側面において、本発明の好ましい態様は、式(I)：

【化7】



(I)

10

20

{式中、

Rは、

(a)水素；

(b)-PO(OR^5)₂ [ここで R^5 はそれぞれ独立して水素またはアルキルである]；

(c)-COR⁶ [ここで R^6 はアルキルである]または

(d)-CHR⁷NR⁸R⁹ [ここで R^7 は水素またはアルキルであり、 R^8 および R^9 は独立して水素若しくはアルキルであるか；または R^8 と R^9 はこれらが結合している窒素原子と一緒にになってヘテロシクロアミノ環を形成する]

であり；

30

R^1 は水素、アルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、F、Cl、Br、またはIであり；

R^2 は水素、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、F、Cl、BrまたはIであり；

R^3 は水素またはアルキルであり；

R^4 は水素またはアルキルであり；

環Aは場合により置換されたヘテロシクロアミノであり；

Hetはシクロアルキルアミノアルキル、シクロアルキルアルキルアミノアルキル、ヘテロアリール、複素環またはヘテロサイクリアルキルである}

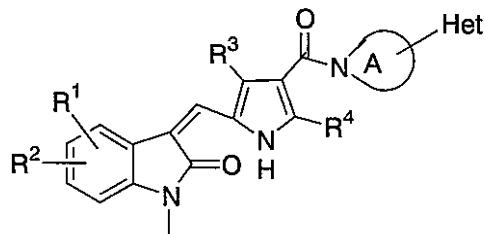
の化合物または医薬的に許容可能なその塩に関する。

【0007】

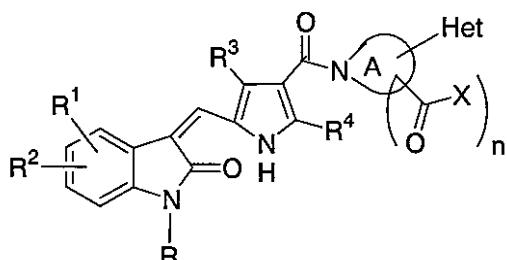
40

さらにもう一つの側面において、本発明の好ましい態様は、式(I)または(IV)：

【化8】



(I)



(IV)

10

[式中、

Rは、Hであり；

R¹は水素、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、F、Cl、Br、またはIであり；R²は水素、アルキル、ヘテロアリール、アルコキシ、ヒドロキシ、F、Cl、Br、またはIであり；R³は水素またはアルキルであり；R⁴は水素またはアルキルであり；

環Aは場合により置換されたヘテロシクロアミノであり；

Hetはシクロアルキルアミノアルキル、シクロアルキルアルキルアミノアルキル、ヘテロアリール、複素環、ヘテロサイクリカルボニルアルキル、ヘテロサイクリカルキルカルボニル、またはヘテロサイクリカルキルであり；

XはOR₈(式中、R₈は水素またはアルキルである)またはNR₈R₉であり、ここでR⁸およびR⁹は独立して水素またはアルキルであるか；あるいはR⁸とR⁹とはこれらに結合している窒素原子と一緒にになってヘテロシクロアミノ環を形成し；および

nは0または1である]

の化合物またはその医薬的に許容可能な塩に関する。

【0008】

さらにもう一つの側面において、本発明は、式(I)または(IV)の一種以上の化合物またはその医薬的に許容可能な塩と、医薬的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【0009】

もう一つの側面において、本発明は、生物、特にヒトにおいて、異常蛋白質キナーゼ(PK)活性、特にレセプターチロシンキナーゼ(RTK)、非レセプター・蛋白質キナーゼ(CTK)およびセリン/トレオニン蛋白質キナーゼ(STK)により媒介された疾患の処置方法に関し、この方法は、式(I)または(IV)の化合物と、医薬的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を前記生物に投与することを含む。具体的には、この疾患は、EGF、Met、HER2、HER3、HER4、IR、IGF-1R、IRR、PDGFR(、PDGFR(、CSF1R、C-Kit、C-fms、Flk-1R、Flk4、KDR/Flk-1、Flt-1、Flt-3、FGFR-1R、FGFR-2R、FGFR-3R、FGFR-4R、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、ZAP70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Btk、Hck、Fgr、Yrk、CDK2およびRafにより媒介される。特に、VEGFR、c-kit、および/またはPDGFRキナーゼに媒介される疾患がある。このような疾患としては、癌、たとえば肺癌、NSCLC(非小細胞肺癌)、骨肉腫、膀胱癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚または眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、大腸癌、乳癌、婦人科腫瘍(たとえば、子宮肉腫、卵管の悪性腫瘍、子宮内膜の悪性腫瘍、子宮頸部の悪性腫瘍、腔の悪性腫瘍または外陰の悪性腫瘍)、ホジキン病、食道癌、小腸の癌、内分泌系の癌(たとえば、甲状腺、副甲状腺または副腎の癌)、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性または急性白血病、幼児期の充実性腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または尿管の癌(たとえば、腎細胞癌、腎盂癌)、小児悪性腫瘍、中枢神経系の新生物(たとえば、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹神經

20

30

40

50

膠腫または下垂体腺腫)、バレット食道(前-悪性症候群)、新生物皮膚疾患、乾癬、菌状息肉腫、および良性前立腺肥大症、糖尿病に関連する疾患、たとえば糖尿病性網膜症、網膜虚血、および網膜新生血管、肝硬変、心疾患、たとえばアテローム性動脈硬化症、免疫疾患、たとえば自己免疫疾患および腎臓病が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、この疾患は、癌、たとえば急性骨髄性白血病、直腸結腸癌、黒色腫、神経膠芽細胞腫、および非小細胞肺癌である。

【 0 0 1 0 】

上記方法は、化学療法薬と組み合わせても実施できる。一様において、この化学療法薬は、分裂阻害剤、アルキル化剤、抗代謝薬、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物学的応答調節剤、抗ホルモン薬、抗血管新生薬、たとえばMMP-2、MMP-9およびCOX-2阻害剤、並びに抗男性ホルモン薬からなる群から選択される。
10

【 0 0 1 1 】

有用なCOX-II阻害剤の例としては、Vioxx(商標)、CELEBREX(商標)(アレコキシブ : alecoxib)、バルデコキシブ(valdecoxib)、ロフェコキシブ(rofecoxib)、およびCox 189が挙げられる。有用なマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤の例は、PCT国際公開第W096/33172号(1996年10月24日発行)、PCT国際公開第W096/27583号(1996年5月7日発行)、欧洲特許出願第97304971.1号(1997年7月8日出願)、欧洲特許出願第99308617.2号(1999年10月29日出願)、PCT国際公開第W098/07697号(1998年2月26日発行)、PCT国際公開第W098/03516号(1998年1月29日発行)、PCT国際公開第W098/34918号(1998年8月13日発行)、PCT国際公開第W098/34915号(1998年8月13日発行)、PCT国際公開第W098/33768号(1998年8月6日発行)、PCT国際公開第W098/30566号(1998年7月16日発行)、欧洲特許公開第606,046号(1994年7月13日発行)、欧洲特許公開第931,788号(1999年7月28日発行)、PCT国際公開第W090/05719号(1990年5月31日発行)、PCT国際公開第W099/52910号(1999年10月21日発行)、PCT国際公開第W099/52889号(1999年10月21日発行)、PCT国際公開第W099/29667号(1999年6月17日発行)、PCT国際出願番号第PCT/IB98/01113号(1998年7月21日出願)、欧洲特許出願第99302232.1号(1999年3月25日出願)、英国特許出願番号第9912961.1号(1999年6月3日出願)、米国仮出願番号第60/148,464号(1999年8月12日出願)、米国特許第5,863,949号(1999年1月25日発行)、米国特許第5,861,510号(1999年1月19日発行)、および欧洲特許公開第780,386号(1997年6月25日発行)に記載されており、これらは全てその全体が本明細書中、参照として含まれる。好ましいMMP-2およびMMP-9阻害剤は、MMP-1を阻害する活性をほとんどまたは全く持たないようなものである。より好ましいものは、他のメタロプロテイナーゼ(すなわち、MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12、およびMMP-13)と比べて選択的にMMP-2および/またはMMP-9を阻害するようなものである。
20
30

【 0 0 1 2 】

本発明で有用なMMP阻害剤の具体例として、AG-3340、R032-3555、RS13-0830、および以下のリストに列記された化合物：3-[[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-
1-ヒドロキシカルバモイル-シクロペンチル)-アミノ]-プロピオン酸；3-エキソ-3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-ビシクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド；(2R,3R)1-[4-(2-クロロ-4-フルオロ-ベンジルオキシ)-
ベンゼンスルホニル]-3-ヒドロキシ-3-メチル-ペリジン-2-カルボン酸ヒドロキシアミド；4-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；3-[[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-
1-ヒドロキシカルバモイル-シクロブチル)-アミノ]-プロピオン酸；4-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド；(R)3-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド；(2R,3R)1-[4-(4-フルオロ-2-メチル-ベンジルオキシ)-
ベンゼンスルホニル]-3-ヒドロキシ-3-メチル-ペリジン-2-カルボン酸ヒドロキシアミド；3-[(4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル)-(1-ヒドロキシカルバモイル-
1-メチル-エチル)-アミノ]-プロピオン酸；3-[(4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンス
40
50

ルホニル]-(4-ヒドロキシカルバモイル-テトラヒドロ-ピラン-4-イル)-アミノ]-プロピオ
ン酸；3-エキソ-3-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-ビ
シクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド；3-エンド-3-[4-(4-フルオロ-フ
ェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-ビシクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン
酸ヒドロキシアミド；および(R)3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミ
ノ]-テトラヒドロ-フラン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド；並びに前記化合物の医薬的に
許容可能な塩および溶媒和物がある。

【0013】

他のCOX-II阻害剤および他のMMP阻害剤を含む他の抗脈管形成剤も本発明で使用するこ
とができる。

10

【0014】

式(I)または(IV)の化合物は、シグナル伝達阻害剤、たとえばEGFR(表皮成長因子レセプ
ター)の応答を阻害できるような薬剤、たとえばEGFR抗体、EGF抗体、およびEGFR阻害剤で
ある分子；VEGF(血管内皮成長因子)阻害剤；およびerbB2レセプター阻害剤、たとえばerb
B2レセプターに結合する有機分子または抗体、たとえばHERCEPTIN.TM.(Genentech, Inc.
、サウスサンフランシスコ、Calif. USA)と一緒に使用することもできる。EGFR阻害剤は
、たとえばPCT国際公開第W095/19970号(1995年7月27日発行)、PCT国際公開第W098/14451
号(1998年4月9日発行)、PCT国際公開第W098/02434号(1998年1月22日発行)、および米
国特許第5,747,498号(1998年5月5日発行)に記載されており、かかる物質は、本明細書
中に記載の如く本発明で使用することができる。

20

【0015】

EGFR阻害剤としては、モノクローナル抗体C225および抗EGFR 22Mab(ImClone Systems
Incorporated、ニューヨーク、N.Y.、USA)、化合物ZD-1839(AstraZeneca)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、MDX-447(Medarex Inc.、アンデール、N.J.、USA)、および0
LX-103(Merck&Co.、ホワイトハウスステーション、N.J.、USA)、VRCTC-310(Ventech Res
earch)およびEGF融合毒素(Seragen Inc.、ホプキンソン、Mass.)が挙げられるが、これ
らに限定されない。

【0016】

これらおよび他のEGFR阻害剤は、本発明で使用することができる。VEGF阻害剤、たとえ
ばSU-5416、SU11248、SU-6668(Sugen Inc.、サウスサンフランシスコ、Calif.、USA)は
、式(I)または(IV)の化合物と組み合わせても使用することができる。VEGF阻害剤は、た
とえばPCT国際公開第W099/24440号(1999年5月20日発行)、PCT国際特許出願第PCT/IB99/0
0797号(1999年5月3日出願)、PCT国際公開第W095/21613号(1995年8月17日発行)、PCT国
際公開第W099/61422号(1999年12月2日発行)、米国特許第5,834,504号(1998年11月10日発
行)、PCT国際公開第W001/60814号、PCT国際公開第W098/50356号(1998年11月12日発行)、米
国特許第5,883,113号(1999年5月16日発行)、米国特許第5,886,020号(1999年3月23日発
行)、米国特許第5,792,783号(1998年8月11日発行)、PCT国際公開第W099/10349号(1999年
3月4日発行)、PCT国際公開第W097/32856号(1997年9月12日発行)、PCT国際公開第W097/
22596号(1997年6月26日発行)、PCT国際公開第W098/54093号(1998年12月3日発行)、PCT国
際公開第W098/02438号(1998年1月22日発行)、PCT国際公開第W099/16755号(1999年4月8
日発行)、およびPCT国際公開第W098/02437号(1998年1月22日発行)に記載されており、こ
れらはすべてその全体が本明細書中、参照として含まれる。本発明で有用な他の具体的な
VEGF阻害剤の例としては、IM862(Cytran Inc.、カーランド、Wash.、USA)；抗VEGFモ
ノクローナル抗体(Genentech, Inc.、サウスサンフランシスコ、Calif.)；およびアンジ
オザイム(angiozyme)、Ribozyme(Boulder, Colo.)およびChiron(Emeryville, Calif.)製
の合成リボザイムがある。これらおよび他のVEGF阻害剤を本明細書中で記載の如く本発明
で使用することができる。

30

【0017】

ErbB2レセプター阻害剤、たとえばGW-282974(Glaxo Wellcome plc)、およびモノクロ
ーナル抗体AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc.、The Woodlands, Tex.、USA)および

40

50

2B-1(Chiron)は、さらに式(I)または(IV)の化合物、たとえばPCT国際公開第W098/02434号(1998年1月22日発行)、PCT国際公開第W099/35146号(1999年7月15日発行)、PCT国際公開第W099/35132号(1999年7月15日発行)、PCT国際公開第W098/02437号(1998年1月22日発行)、PCT国際公開第W097/13760号(1997年4月17日発行)、PCT国際公開第W095/19970号(1995年7月27日発行)、米国特許第5,587,458号(1996年12月24日発行)、および米国特許第5,877,305号(1999年3月2日発行)に記載のものと組み合わせて使用することができ、これらはその全体が本明細書中、参照として含まれる。上記PCT公開公報および米国特許に記載のこのerbB2レセプター阻害剤化合物および物質、並びにerbB2レセプターを阻害する他の化合物および物質は、本発明に従って、式(I)または(IV)の化合物と一緒に使用することができる。

10

【0018】

式(I)または(IV)の化合物は、癌の処置に有用な他の薬剤、たとえば、限定されないが、抗腫瘍免疫応答を促進し得る薬剤、たとえばCTLA4(細胞毒性リンパ球抗体4)抗体、およびCTLA4を遮蔽し得る他の薬剤；並びに抗増殖薬、たとえばファネシルプロテイン・トランスフェラーゼ阻害剤、たとえば米国特許第6,258,824B1号の従来技術セクションに引用された文献に記載のファネシルプロテイン・トランスフェラーゼ阻害剤と一緒に使用することもできる。本発明で使用し得る具体的なCTLA4阻害剤としては、本明細書中、その全体が参照として含まれる米国仮出願第60/113,647号(1998年12月23日出願)に記載のものが挙げられるが、他のCTLA4抗体も本発明で使用することができる。

20

【0019】

上記方法は、放射線治療と組み合わせても使用することができ、ここでこの放射線治療と組み合わせる式(I)または(IV)の化合物の量は、上記疾患の処置に有効な量である。

【0020】

放射線治療を施す方法は当業界で公知であり、これらの方法は、本明細書中で記載の併用療法で使用することができる。この併用療法における本発明の化合物の投与は、本明細書に記載の如く実施することができる。

30

【0021】

もう一つの側面において、本発明は、本発明の化合物または、本発明の化合物と医薬的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を使用して、PK、特にレセプターチロシンキナーゼ(RTK)、非レセプター蛋白質チロシンキナーゼ(CTK)およびセリン/トレオニン蛋白質キナーゼ(STK)の触媒活性を調節する(たとえば触媒活性を阻害する)方法に関する。本方法は、インビトロまたはインビボで実施することができる。特に、その触媒活性が本発明の化合物によって調節されるレセプター蛋白質キナーゼは、Met、EGF、HER2、HER3、HER4、IR、IGF-1R、IRR、PDGFR(、PDGFR(、CSF1R、C-Kit、C-fms、Flk4、VEGFR、Flt-1、FGFR-1R、FGFR-2R、FGFR-3RおよびFGFR-4Rからなる群から選択され、特にVEGFRおよび/またはPDGFRキナーゼである。その触媒活性が本発明の化合物によって調節される細胞チロシンキナーゼは、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、ZAP70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack、Yes、Fyn、Lyn、Lck、Blk、Hck、FgrおよびYrkからなる群から選択される。その触媒活性が本発明の化合物によって調節されるセリン-トレオニン蛋白質キナーゼは、CDK2およびRafからなる群から選択される。

40

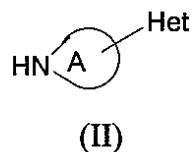
【0022】

さらにもう一つの側面において、本発明は、異常VEGFRおよび/またはPDGFRキナーゼ活性により媒介される疾患の処置に有用な薬剤の製造における、式(I)または(IV)の化合物の使用に関する。

【0023】

もう一つの側面において、本発明は式(II)：

【化9】



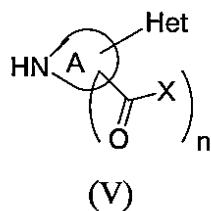
{式中、HetおよびAは上記定義のごときである}

の中間体に関する。式(II)の化合物は、上記開示の式(I)の化合物の合成に有用である。

【0024】

もう一つの側面において、本発明は、式(V)：

【化10】



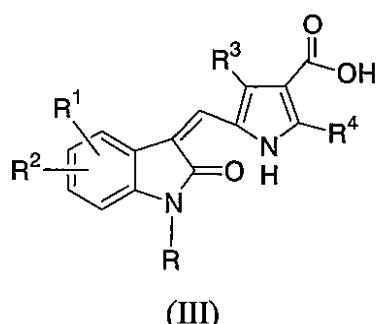
{式中、Het、A、Xおよびnは上記定義のごときである}

の中間体に関する。式(V)の化合物は、上記開示の式(IV)の化合物の合成に有用である。

【0025】

もう一つの側面において、本発明は、式(I)または(IV)の化合物の合成法であって、以下の式(III)：

【化11】



{式中、Rは水素であり、R¹～R⁵は式(I)の化合物での定義のごときである}

の化合物と、上記式(II)の化合物とを、カップリング剤の存在下で反応させて；

(i)場合によりR～R⁵基のいずれかを変形させ；次いで

(ii)場合により酸付加塩を製造し；次いで

(iii)場合により遊離塩基を製造することを含む、前記方法に関する。

【0026】

最後に本発明は、基準として式(I)または(IV)の化合物を使用して、蛋白質キナーゼの酵素活性を調節する化学化合物を同定する方法であって、前記化合物または式(I)の化合物と前記蛋白質キナーゼを発現する細胞とを接触させて、次いで前記細胞を効果に関してモニターすることを含む、前記方法に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

定義

他に記載しない限り、本明細書および請求の範囲で使用する以下の用語は、以下の意味を持つ：

10

20

30

40

50

「アルキル」とは、1～6個の炭素原子、好ましくは1～4個の炭素原子の飽和の直鎖または分岐の炭化水素基を意味し、たとえばメチル、エチル、プロピル、2-プロピル、n-ブチル、iso-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等であり、メチル、エチル、プロピル、または2-プロピルが好ましい。

【0028】

「アルキレン」とは、1～6個の炭素原子の線状の飽和二価炭化水素基または、3～6個の炭素原子の分岐の飽和二価炭化水素基を意味し、たとえばメチレン、エチレン、2,2-ジメチルエチレン、プロピレン、2-メチルプロピレン、ブチレン、ペンチレン等であり、メチレン、エチレン、またはプロピレンが好ましい。

【0029】

「シクロアルキル」とは、3～6個の炭素原子の飽和環式炭化水素基を意味し、たとえばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルまたはシクロヘキシルである。

【0030】

「アルコキシ」は、基：-OR {式中、Rは上記定義のごときアルキルである}を意味し、たとえばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシなどである。

【0031】

「アルコキカルボニル」は、基：-COOR {式中、Rは上記定義のごときアルキルである}を意味し、たとえばメトキカルボニル、エトキカルボニル、プロポキカルボニル、ブトキカルボニル等である。

【0032】

「アルキルチオ」は、基：-SR {式中、Rは上記定義のごときアルキルである}を意味し、たとえばメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、ブチルチオ等である。

【0033】

「アルキルアミノ」および「ジアルキルアミノ」は、それぞれ基：-NHRおよび-NRR'を意味し、式中、RおよびR'は独立して本明細書中の定義のごときアルキル基を表す。代表例としては、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、ジメチルアミノ、メチルエチルアミノ、ジ-(1-メチルエチル)-アミノなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】

「シクロアルキルアルキル」は、上記定義のごとき1または2個のシクロアルキル基で置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐の一価の炭化水素基を意味し、たとえばシクロプロピルメチル、シクロプロピルエチル、シクロブチルメチル、シクロヘキシルエチルなどが挙げられる。

【0035】

「シクロアルキルアミノ」は、-NRR'基 {式中、Rは水素またはアルキルであり、R'はシクロアルキルである}を意味し、たとえばシクロプロピルアミノ、シクロブチルアミノ、シクロヘキシルアミノ等がある。

【0036】

「シクロアルキルアミノアルキル」は、-(アルキレン)-NRR'基 {式中、Rは水素またはアルキルであり、R'はシクロアルキルである}を意味し、たとえばシクロプロピルアミノメチル、シクロプロピルアミノエチル、シクロブチルアミノメチル、シクロヘキシルアミノエチル等がある。

【0037】

「シクロアルキルアルキルアミノアルキル」は、-(アルキレン)-NRR' {式中、Rは水素またはアルキルであり、R'は上記定義のごときシクロアルキルアルキルである}基を意味し、たとえばシクロプロピルメチルアミノメチル、シクロプロピルメチルアミノエチル、シクロブチルメチル-アミノメチル、シクロヘキシルメチルアミノエチル等がある。

【0038】

「アルキルアミノカルボニル」および「ジアルキルアミノカルボニル」はそれぞれ基：-CONHRおよび-CONRR'を意味し、式中、RおよびR'は独立して本明細書中の定義のごときアルキル基を表す。代表例としては、メチルアミノカルボニル、エチルアミノカルボニル、

10

20

30

40

50

プロピルアミノカルボニル、ジメチルアミノカルボニル、メチルエチルアミノカルボニル、ジ(1-メチルエチル)アミノカルボニル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード、好ましくはフルオロおよびクロロを表す。

【0040】

「ハロアルキル」は、1以上、好ましくは1、2または3個の同一または異なるハロ原子で置換されたアルキルを意味し、たとえば $-CH_2Cl$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、 $-CH_2CCl_3$ 等がある。

【0041】

「ハロアルコキシ」は、基： $-OR$ {式中、Rは上記定義のごときハロアルキルである}を意味し、たとえばトリフルオロメトキシ、トリクロロエトキシ、2,2-ジクロロプロピキシなどがある。

【0042】

「ヒドロキシアルキル」は、1または2個のヒドロキシ基で置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐の一価炭化水素基を意味し、ただし、2個のヒドロキシ基が存在する場合、これらは両方とも同一炭素原子上にはない。代表例としては、2-ヒドロキシエチル、2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、1-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル、2-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシブチル、4-ヒドロキシブチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、1-(ヒドロキシメチル)-2-ヒドロキシエチル、2,3-ジヒドロキシブチル、3,4-ジヒドロキシブチルおよび2-(ヒドロキシメチル)-3-ヒドロキシプロピル、好ましくは2-ヒドロキシエチル、2,3-ジヒドロキシプロピル、および1-(ヒドロキシメチル)-2-ヒドロキシエチルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

「アルコキシアルキル」は、上記定義のごとき1または2個のアルコキシ基で置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐の一価炭化水素基を意味し、たとえばメトキシメチル、2-メトキシエチル、2-メトキシプロピル、3-メトキシプロピル、エトキシメチル、2-エトキシエチル等がある。

【0044】

「アミノアルキル」は、1または2個の $-NH_2$ で置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐の一価炭化水素基を意味し、たとえば2-アミノエチル、3-アミノプロピル、2-アミノプロピル、2-、3-、または4-アミノブチル等がある。

【0045】

「アミノアルキルカルボニル」は、基： $-COR$ {式中、Rは上記定義のごときアミノアルキル基である}を意味し、たとえば2-アミノエチルカルボニル、3-アミノプロピルカルボニル、2-アミノプロピルカルボニル、2-、3-、または4-アミノブチルカルボニル等がある。

【0046】

「アルキルアミノアルキル」は、1または2個の $-NHR$ {式中、Rはアルキル、またはアシリルである}により置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐の一価炭化水素基を意味し、たとえば2-N-メチルアミノエチル、2-N-エチルアミノエチル、2-N-アセチルアミノエチル等がある。

【0047】

「アルキルアミノアルキルカルボニル」は基： $-COR$ {式中、Rは、上記定義のごときアルキルアミノアルキル基である}を意味し、たとえば2-N-メチルアミノエチルカルボニル、2-N-エチルアミノエチルカルボニル、2-N-アセチルアミノエチルカルボニル等がある。

【0048】

「ジアルキルアミノアルキル」は、1または2個の $-NRR'$ {式中、RおよびR'は独立してアルキルから選択される}で置換された1～6個の炭素原子の飽和直鎖または分岐一価炭化水素基を意味し、たとえば2-N,N-ジエチルアミノエチル、2-N,N-ジエチルアミノプロピ

10

20

30

40

50

ル等がある。

【0049】

「ジアルキルアミノアルキルカルボニル」は、基：-COR{式中、Rは上記定義のごときジアルキルアミノアルキル基である}を意味し、たとえば2-N,N-ジエチルアミノエチルカルボニル、2-N,N-ジエチルアミノプロピル-カルボニル等がある。

【0050】

「アシル」は基：-C(0)R{式中、Rは、本明細書中の定義のごとき水素、アルキル、またはハロアルキルである}を意味し、たとえばホルミル、アセチル、トリフルオロアセチル、ブタノイルなどがある。

【0051】

「アリール」は、6～12個の炭素原子の単環式または融合芳香族環(すなわち、隣接する原子対を共有する環)を意味し、たとえばフェニル、ナフチルなどがある。このアリール基は、置換されてもまたは非置換であってもよい。置換されている場合、このアリール基は、アルキル、ハロアルキル、アルキルチオ、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アシル、ニトロ、ハロアルコキシ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アミノ、アルキルアミノまたはジアルキルアミノからなる群から独立して選択される、1個以上、好ましくは1、2または3個、さらには好ましくは1または2個の置換基で置換されている。

【0052】

「ヘテロアリール」は、N、OまたはSから選択される1、2、3または4個の環ヘテロ原子を含み、残りの環原子がCであり、さらに完全共役パイ電子系をもつ、5～12個の環原子の単環式または融合環(すなわち、隣接する原子対を共有する環)を指す。非置換ヘテロアリール基の例としては、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピリミジン、キノリン、イソキノリン、プリン、トリアゾール、テトラゾール、トリアジンおよびカルバゾールが挙げられるが、これらに限定されない。このヘテロアリール基は、置換されても、置換されていなくてもよい。置換されている場合には、このヘテロアリール基は、アルキル、ハロアルキル、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アシル、ニトロ、ハロアルコキシ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アミノ、アルキルアミノまたはジアルキルアミノからなる群から独立して選択される、1個以上、好ましくは1、2または3個、より好ましくは1または2個の置換基で置換されている。

【0053】

「複素環」または「ヘテロサイクリル」は、1、2または3個の環原子がN、O、またはS(O)n(式中、nは0～2の整数である)から選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子がCであり、1または2個のC原子は場合によりカルボニル基により置換されてもよい、3～8個の還原子の飽和または不飽和の環式基を意味する。好ましくは、この複素環は、その環に少なくとも1個の窒素原子を含む。不飽和である場合、この複素環は、1または2個の二重結合を含み、ただしこの環は芳香族ではない。このヘテロサイクリル環は、場合により、アルキル[ここでこのアルキルは、場合によりカルボキシまたは?COOR(式中、Rはアルキルである)から独立して選択される1または2個の置換基で置換されてもよい]、ハロアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキル、カルボキシアルキル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、アミノアルキルカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルコキシアルキル、アルキルアミノアルキルカルボニル、ジアルキルアミノアルキルカルボニル、アリール、ヘテロアリール、アリールオキシ、アラルキル、ヘテロアラルキル、および-COR(式中、Rはアルキルである)から選択される、1個以上、好ましくは1、2または3個の置換基で独立して置換されてもよい。より具体的には、ヘテロサイクリルなる用語は、テトラヒドロピラニル、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン、ピペリジノ、N-メチルピペリジン-3-イル、ピペラジノ、N-メチルピロリジン-3-イル、ピロリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオモルホリノ-1-オキシド、チオモルホリノ-1,1-ジオキシド、4-エチルオキシカルボニ

10

20

30

40

50

ルピペラジノ、3-オキソピペラジノ、2-イミダゾリドン、2-ピロリジノン、2-オキソホモピペラジノ、テトラヒドロピリミジン-2-オンおよびその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0054】

「ヘテロシクロアミノ」は、3～8個の環原子の飽和環式基を意味し、ここでこの環原子の少なくとも1個が窒素で、場合により1または2個の追加の環原子が-NR^a-（式中、R^aはアルキル、置換アルキルアシル、アリール、またはヘテロアリールである）、0、またはS(0)n（式中、nは0～2の整数である）から選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子がCであり、ここで1または2個のC原子は場合により、カルボニル基により置換されていてもよい。このヘテロシクロアミノ環は、場合によりアルキル、ヒドロキシアルキルまたはカルボキシから選択される1、2または3個の置換基で独立して置換されていてもよい。より具体的には、「ヘテロシクロアミノ」としては、ピペリジン-1-イル、ピペラジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、2-オキソ-ピロリジン-1-イル、2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イル、モルホリン-4-イル、チオモルホリン-4-イル、チオモルホリノ-1-オキシド、チオモルホリノ-1,1-ジオキシド、4-エチルオキシカルボニルピペラジン-1-イル、3-オキソピペラジン-1-イル、2-イミダゾリドン-1-イル、2-ピロリジノン-1-イル、2-オキソホモピペラジノ、テトラヒドロピリミジン-2-オンおよびその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。このヘテロシクロアミノ基は、上記定義のごとき複素環基のサブセットである。

【0055】

「場合により置換されたヘテロシクロアミノ」は、環の中に1または2個の二重結合を含む、4～8個の環原子の非芳香族環式基を意味し、ただしこの環は芳香族ではなく、ここで前記環原子の少なくとも1個は窒素であり、場合によりここで1個または2個の追加の環原子は、-NR^a-（式中、R^aはアルキル、置換アルキルアシル、アリール、またはヘテロアリールである）、0、またはS(0)n（式中、nは0～2の整数である）から独立して選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子はCである。1または2個のC原子は、場合によりカルボニル基で置換されていてもよい。このヘテロシクロアミノ環は、場合によりアルキル、シクロアルキルアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、およびジアルキルアミノから選択される1、2または3個の置換基で独立して置換されていてもよい。

【0056】

「ヒドロキシ」は、-OH基を指す。

【0057】

「アリールオキシ」は、本明細書中で定義のごとき-OR（式中、Rはアリール基である）を指す。代表例としては、フェニルオキシ、F、Cl、またはBr、フェニルオキシ等およびその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

「シアノ」は、-C≡N基を指す。

【0059】

「ニトロ」は、-NO₂基を指す。

【0060】

「アラルキル」は、上記定義のごときアリールで置換されている上記定義のごときアルキルを意味し、たとえば-CH₂フェニル、-(CH₂)₂フェニル、-(CH₂)₃フェニル、-H₂CH(CH₃)CH₂フェニル等およびその誘導体がある。

【0061】

「ヘテロアラルキル」基は、ヘテロアリール基で置換されている上記定義のごときアルキルを意味し、たとえば、-CH₂ピリジニル、-(CH₂)₂ピリミジニル、-(CH₂)₃イミダゾリルなどおよびその誘導体が挙げられる。

【0062】

「ヘテロサイクリカルキル」基は、複素環基で置換されている上記定義のごときアル

10

20

30

40

50

キルを意味し、たとえば-CH₂ピロリジン-1-イル、-(CH₂)₂ピペリジン-1-イル等およびその誘導体がある。

【0063】

「ヘテロサイクリカルボニルアルキル」基は、-(アルキレン)-C(0)-ヘテロサイクリルを意味し、たとえば2-モルホリン-4-イルアセチルがある。

【0064】

「ヘテロサイクリカルキルカルボニル」基は、-C(0)-(アルキレン)-ヘテロサイクリルを意味し、たとえば2-モルホリン-4-イル-2-オキソエチルがある。

【0065】

「任意の」または「任意に」とは、続いて記載された事象または状況が生じるかもしれないが、生じなくてもよく、且つその記載がその事象または状況が生じる場合と生じない場合とを含むことを意味する。たとえば「アルキル基で場合により置換された複素環基」は、アルキル基が存在するかもしれないが、存在しなくてもよく、且つその記載が、前記複素環基がアルキル基で置換されている場合と、前記複素環基がアルキル基で置換されていない場合とを含むことを意味する。10

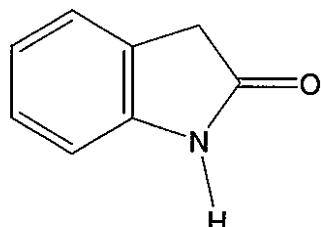
【0066】

「2-インドリノン」、「インドリン-2-オン」および「2-オキシンドール」は、本明細書中、以下の化学構造：

【化12】

10

20



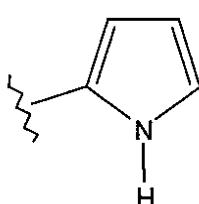
をもつ分子を指すものとして互換的に使用する。

【0067】

「ピロール」なる用語は、以下の化学構造：

30

【化13】



をもつ分子を指す。

【0068】

同一分子式をもつが、その原子の結合の性質または順や、空間におけるその原子の配置が異なっている化合物は、「異性体」という。空間におけるその原子の配置が異なる異性体は、「立体異性体」という。互いに鏡像でない立体異性体は、「ジアステレマー」といい、互いに重ね合わすことができない鏡像である立体異性体は、「鏡像異性体」という。ある化合物が不斉中心をもつとき、たとえば4つの異なる基に結合しているとき、一対の鏡像異性体が可能である。鏡像異性体は、その不斉中心の絶対配置によって特徴づけることができ、カーンおよびブレローグのR-およびS-配列法によって記載され、または、分子が偏光表面を回転させる様式によって記載され、右旋性または左旋性[すなわち、それぞれ(+)-または(-)-異性体]として表される。キラル化合物は、個々の鏡像異性体として、またはその混合物として存在することができる。鏡像異性体の等量を含む混合物は、「40

50

ラセミ混合物」といわれる。

【0069】

本発明の化合物は、一つ以上の不斉中心をもっていてもよく；そのような化合物は、個々の(R)-若しくは(S)-立体異性体またはその混合物として製造することができる。たとえば、式(I)または(IV)の化合物の置換基が2-ヒドロキシエチルである場合、このヒドロキシ基が結合している炭素原子は不斉中心であるので、式(I)または(IV)の化合物は、(R)-または(S)-立体異性体として存在することができる。他に記載しない限り、本明細書および請求の範囲の特定の化合物の記載または命名は、個々の鏡像異性体と、ラセミでもそうでなくともその混合物とのいずれをも含むものとする。立体化学の決定法および立体異性体の分離法は当業界で公知である("Advanced Organic Chemistry"、第4章、第4版、J. March、John Wiley and Sons、New York、1992年を参照されたい)。

10

【0070】

式(I)または(IV)の化合物は、互変異性と構造異性の現象を示すことができる。たとえば、本明細書で記載される化合物は、ピロール部分に対して2-インドリノン部分を結合している二重結合についてEまたはZ配置を採用することができるか、これらはEとZの混合であってもよい。本発明は、RTK、CTKおよび/またはSTK活性を調節する能力を持つ、任意の互変異性形または構造異性形およびその混合物を包含する。式(I)または(IV)の化合物は、ピロール部分に対して2-インドリノン部分を結合している二重結合についてZ配置を持つのが好ましい。

20

【0071】

式(I)または(IV)の化合物は、ヒトなどの生物の身体の酵素によって代謝されて、蛋白質キナーゼの活性を調節し得る代謝産物を生成すると予想される。かかる代謝産物は、本発明の範囲内である。

【0072】

「医薬組成物」とは、本明細書中で記載する一種以上の化合物、またはその医薬的に許容可能な塩またはプロドラッグと、他の化学成分、たとえば医薬的に許容可能な賦形剤との混合物を指す。医薬組成物の目的は、化合物を生物に投与し易くすることである。

30

【0073】

「医薬的に許容可能な賦形剤」とは、さらに化合物を投与し易くするために、医薬組成物に添加した不活性物質を指す。賦形剤としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、およびスターク、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレンゴリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

「医薬的に許容可能な塩」とは、親化合物の生物学的有効性と特性とを保持する塩を指す。そのような塩としては、以下のものがある：

40

(1)無機酸、たとえば塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、硫酸および過塩素酸など、または有機酸、たとえば酢酸、蔴酸、(D)若しくは(L)リンゴ酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸若しくはマロン酸など、好ましくは塩酸または(L)-リンゴ酸と親化合物の有機塩基との反応により得られる酸付加塩；あるいは

(2)親化合物に存在する酸性プロトンが金属イオン、たとえばアルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、若しくはアルミニウムイオンによって置換されている時に形成した塩；または有機塩基、たとえばエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミン等との配位結合体。

【0075】

式(I)または(IV)の化合物は、プロドラッグとしても作用することができる。「プロドラッグ」とは、インビボで親薬剤に転換される薬剤を指す。プロドラッグは、場合によっては親の薬剤よりも投与し易いことがあるので、有用なことが多い。これらプロドラッグはたとえば、経口投与によって生物利用可能性であり得るのに対して、親の薬剤はそうではない。このプロドラッグは、親の薬剤よりも医薬組成物中で優れた溶解性をもつことも

50

ある。プロドラッグの例としては、エステル(プロドラッグ)、カルバメートまたはウレアとして投与される本発明の化合物があろうが、これらに限定されない。たとえば、式(I)または(IV) {式中、Rは-COR⁶または-PO(OR⁵)₂である}の化合物は、インビボで加水分解されて、式(I)または(IV) {式中、Rは水素である}の化合物を生成する。

【0076】

「PK」は、レセプター蛋白質チロシンキナーゼ(RTK)、非レセプターまたは「細胞の」チロシンキナーゼ(CTK)およびセリン-トレオニンキナーゼ(STK)を指す。

【0077】

「方法」とは、化学的、医薬的、生物学的、生化学的および医学の分野の熟練者に公知であるか、またはこれらの者により、公知方法、手段、技術および手順から容易に開発される方法、手段、技術および手順を含む所定の課題を達成するための方法、手段、技術および手順を指すが、これらに限定されない。

10

【0078】

「調節」または「調節している」とは、RTK、CTKおよびSTKの触媒活性を変化させることを指す。特に、「調節する」とは、RTK、CTKおよびSTKの触媒活性の活性化、好ましくは、RTK、CTKまたはSTKが暴露される化合物または塩の濃度に依存して、RTK、CTKおよびSTKの触媒活性の活性化若しくは阻害、またはより好ましくは、RTK、CTKおよびSTKの触媒活性の阻害を指す。

【0079】

「触媒活性」とは、RTKおよび/またはCTKの直接的若しくは間接的な影響下におけるチロシンのリン酸化、またはSTKの直接的若しくは間接的な影響下におけるセリンのリン酸化の速度を指す。

20

【0080】

「接触させる」とは、本発明の化合物と標的PKとと一緒に、本化合物がPKの触媒活性を直接的、すなわちキナーゼ自身との相互作用によって、または間接的に、すなわちキナーゼの触媒活性が依存するもう一つの分子との相互作用によって影響し得る状態にすることを指す。そのような「接触させる」とは、「インビトロ」、すなわち試験管、ペトリ皿などの内で実施することができる。試験管では、接触させると、化合物と当該PKとだけを含むことができるか、または細胞全体を含むことができる。細胞は、細胞培地皿で保持または成長させて、その環境で化合物と接触させることもできる。これに関連して、特定の化合物がPKに関連する疾患に影響する能力、すなわち以下に定義される化合物のIC₅₀は、より複雑な、生きている生物でインビボで化合物を使用する前に測定することができる。生物の外部の細胞に関しては、これらに限定されないが、直接細胞マイクロインジェクションおよび多数の膜貫通型担体方法を含む、化合物とPKを接触させるために多くの方法があり、且つ当業者に公知である。

30

【0081】

「インビトロ」とは、これらに限定されないが、たとえば試験管または培地などの人工的な環境で実施する手順を指す。

【0082】

「インビボ」とは、これらに限定されないが、マウス、ラットまたはウサギなどの生きている生物で実施する手順を指す。

40

【0083】

「PKに関連する疾患」、「PK促進疾患」および「異常PK活性」とは全て、不適当なPK触媒活性、すなわちPK触媒活性不足、より一般的には過剰のPK触媒活性により特徴付けられる状況を指し、ここで特定のPKはRTK、CTKまたはSTKであってもよい。不適当な触媒活性は、以下の、(1)PKを正常に発現しない細胞でのPK発現；(2)高いPK発現により不都合な細胞増殖、分化および/または成長が引き起こされる；または(3)低いPK発現により、細胞増殖、分化および/または成長での好ましくない低下が引き起こされる、のいずれかの結果として発生しうる。PKの過剰活性とは、特定のPKをコードする遺伝子の増幅または、細胞増殖、分化および/または成長異常と相互関連し得るPK活性レベルの產生を指す(すな

50

わち、PKレベルが上昇するにつれて、細胞疾患の一つ以上の症状の重篤度が高まる)。活性不足はその逆であり、PK活性のレベルが低下するにつれて、細胞疾患の一つ以上の症状の重篤度が高まることである。

【0084】

「処置する」、「処置している」とは、PKが媒介する細胞疾患および/またはその付帯症状を緩和または取り去る方法を指す。特に癌に関しては、これらの用語は、癌によって影響を受けた個体の平均寿命を延ばすこと、または当該疾患の一つ以上の症状を軽減することを意味する。

【0085】

「生物」とは、少なくとも一つの細胞から構成される任意の生きている存在物を指す。生体は、たとえば1個の真核細胞のような単純なもの、あるいは、ヒトなどの哺乳類のような複雑なものであってもよい。

【0086】

「治療的有効量」とは、処置される疾患の一つ以上の症状をいくらか緩和する、投与化合物の量を指す。癌の処置に関しては、治療的有効量とは、以下の効果：

- (1)腫瘍のサイズを小さくする；
- (2)腫瘍の転移を阻害する(すなわち、いくらか遅延させる、好ましくは停止させる)；
- (3)腫瘍の成長をいくらか阻害する(すなわち、いくらか遅延させる、好ましくは停止させる)；および/または
- (4)癌に関連する一つ以上の症状をいくらか緩和させる(または好ましくは、除去する)をもつ量をさす。

【0087】

「モニターする」とは、特定のPKを発現する細胞と化合物とを接触させる効果を観察または検出することを指す。観察または検出された効果は、PKの触媒活性における細胞の表現型での変化、または自然の結合パートナーとPKとの相互作用での変化であってもよい。そのような効果を観察または検出する方法は、当業界で公知である。

【0088】

上記の効果は、細胞表現型の変化の有無、前記蛋白質キナーゼの触媒活性における変化の有無、または本発明の最後の側面での自然の結合パートナーと前記蛋白質キナーゼとの相互作用における変化の有無から選択される。

【0089】

「細胞表現型」とは、細胞若しくは組織の外観、または細胞若しくは組織の生物学的機能を指す。細胞表現型の例としては、細胞サイズ、細胞成長、細胞増殖、細胞分化、細胞生存、アポトーシス並びに栄養摂取および使用があるが、これらに限定されない。このような表現型の特徴は、当業界で公知の方法で測定可能である。

【0090】

「自然の結合パートナー」とは、細胞中の特定のPKに結合するポリペプチドを指す。自然の結合パートナーは、PK媒介シグナル伝達プロセスでシグナルを増殖させる役割を果たすことができる。PKと自然の結合パートナーとの相互作用における変化は、PK/自然の結合パートナー複合体の濃度の上下として、およびその結果、PKがシグナル伝達を媒介する能力における観察可能な変化として現れることがある。

【0091】

好ましい態様の説明

本発明の概要では最も広い定義を述べたが、以下に記載の式(I)または(IV)の特定の化合物が好ましい。

a. 化合物の好ましい一群は、式中、以下のようなものである：

R¹は水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシ、F、ClまたはBrである。好ましくは、R¹は水素またはF、より好ましくはFである；および

R²は水素、メチル、メトキシ、ヒドロキシ、F、ClまたはBrである。好ましくは、R¹は水素またはF、より好ましくは水素である。

10

20

30

40

50

【0092】

この群の中で、より好ましい化合物の群は、式中、以下のようなものである：

R^1 はインドリノン環の5位であり；および

R は水素、 $-PO(OH)_2$ 、 $-COCH_3$ 、またはピロリジン-1-イルメチルであり、より好ましくは水素である。

【0093】

上記の好ましい群およびより好ましい群の中で、さらにより好ましい群の化合物は、式中、以下のようなものである：

R^3 および R^4 は独立して、水素またはメチルであり、より好ましくはメチルである。

【0094】

上記好ましい群、より好ましい群、さらに好ましい群の中で、特に好ましい化合物群は、式中、以下のようなものである：

Aは4～6個の環原子のヘテロシクロアミノ基であり、好ましくはアゼチジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、ピペリジン-1-イル、またはピペラジン-1-イルであり；より好ましくはピロリジン-1-イルであり；および

Hetは、以下のいずれかである：

(i) 4～6個の環原子を含有する複素環であり、ここで1または2個の環原子は、窒素、酸素または硫黄からなる群から選択され、残りの環原子は炭素である。この複素環は、場合により1または2個のアルキルで置換されていてもよい。好ましくは、この複素環はピペリジン-1-イル、モルホリン-4-イル、チオモルホリン-4-イル、ピペラジン-1-イル、2,6-ジメチルモルホリン-4-イル、または2,6-ジメチルピペラジン-1-イルであり、前記A環の3または4位に配置される；

(ii) ヘテロアリール、好ましくはピリジンであり、または

(iii) ヘテロサイクリカルキルであり、ここで前記複素環は4～6個の環原子を含有し、ここで1または2個の環原子は、窒素、酸素または硫黄からなる群から選択され、残りの環原子は炭素である。好ましくはこの複素環は、ピロリジン-1-イルメチル、ピロリジン-1-イルエチル、ピロリジン-1-イルメチル、またはピロリジン-1-イルエチルである。より好ましくは、ピロリジン-1-イルメチル、ピロリジン-1-イルエチル、ピロリジン-1-イルメチル、またはピロリジン-1-イルエチルは、前記ピロリジン-1-イル(上記A環)のC-2位に結合し、前記ピロリジン-1-イル環(前記A環)のC-2位の立体化学はRまたはSである。

【0095】

b. 化合物のもう一つ的好ましい群は、式中、以下のようなものである：

Hetは、4～6個の環原子を含有する複素環であり、ここで1または2個の環原子は、窒素、酸素または硫黄からなる群から選択され、残りの環原子は炭素である。この複素環は、場合により1または2個のアルキルで置換されていてもよい。好ましくは、この複素環は、ピペリジン-1-イル、モルホリン-4-イル、チオモルホリン-4-イル、ピペラジン-1-イル、2,6-ジメチルモルホリン-4-イル、または2,6-ジメチルピペラジン-1-イルであり、前記A環の3または4位に配置されている。

【0096】

この群の中では、より好ましい化合物群は、式中、Aが4～6個の環原子のヘテロシクロアミノ基であるものであり、好ましくはアゼチジン-1-イル、ピロリジン-1-イル、ピペリジン-1-イル、またはピペラジン-1-イルである。

【0097】

この群の中では、より好ましい化合物群は、式中、以下のようなものである：

R は水素であり；

R^1 はフルオロであり、前記インドリノン環の5位にある。

【0098】

本発明の代表的な化合物を、以下の表1に示す。

10

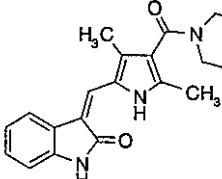
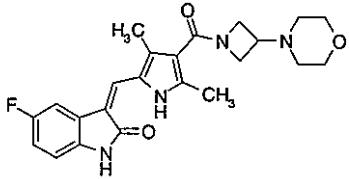
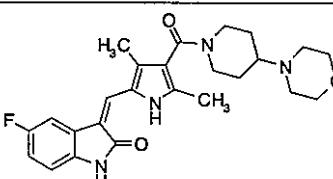
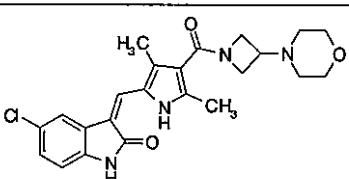
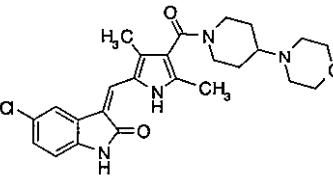
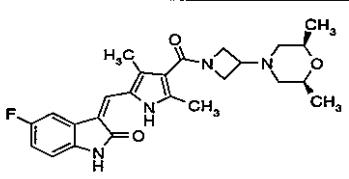
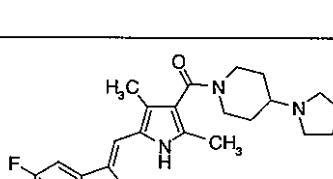
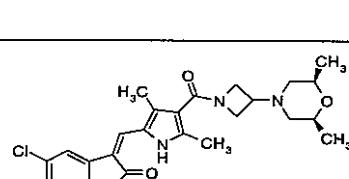
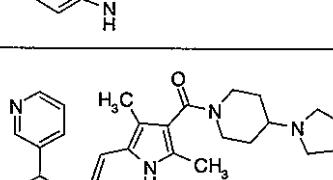
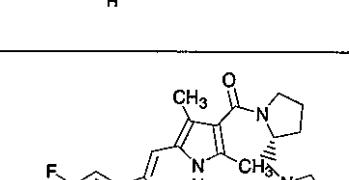
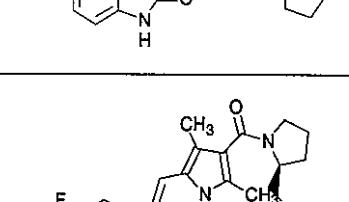
20

30

40

【化14】

表1

化合物番号		分子量	化合物番号		分子量
1		434.5	6		424.5
2		452.5	7		440.9
3		469.0	8		452.5
4		436.5	9		469.0
5		495.6	10		436.53
			11		436.53

10

20

30

40

【0099】

【化15】

表1(続き)

化合物番号		分子量	化合物番号		分子量
12		495.55	13		510.56
14		482.55	15		466.55
16		438.49	17		438.49
18		452.52	19		468.98
20		495.55	21		495.55
22		452.52	23		452.52
24		481.56	25		466.55

10

20

30

40

【0100】

有用性

式(I)または(IV)の化合物は、VEGFR、PDGFRおよび/またはc-kitを阻害し、従って、異常VEGFR、PDGFRおよび/またはc-kit活性によって媒介された疾患の処置において有用である。そのような疾患としては、癌、たとえばT-細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性リンパ腫、急性骨髓性白血病、黑色腫、神経膠芽細胞腫他(Bellamy W.T.ら、Cancer Res. 1999年、59巻、728~733頁を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、VEGFRは、眼の疾患、たとえば糖尿病性網膜症、網膜虚血、および網膜新生血管にも関与する。従って、本発明の化合物は、眼の疾患の処置でも有用である。さらに、本発明

50

の化合物は、他のレセプターチロシンキナーゼ（RTK）、非レセプター蛋白質キナーゼ（CK）およびセリン/トレオニン蛋白質キナーゼ（STK）を阻害し得ると考えられる。従って、これらの化合物は、これらのキナーゼによって媒介される疾患、たとえば、扁平上皮細胞癌、星状細胞腫、カポジ肉腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、膀胱癌、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、急性骨髓性白血病、結腸直腸癌、性尿器癌および胃腸癌、糖尿病、自己免疫疾患、過増殖性疾患、再狭窄、線維症、乾癬、フォン・ヒッペル・リンダウ病、変形性関節症、リウマチ様関節炎、脈管形成、炎症性疾患、免疫疾患および心臓血管疾患からなる群から選択される癌の処置に有用であろう。他の疾患については、米国特許第5,792,783号に開示されており、この開示はその全体が、本明細書中参照として含まれる。

10

【0101】

投与および医薬組成物

本発明の化合物またはその医薬的に許容可能な塩は、そのままでヒト患者に投与することができ、また好適な担体または単数若しくは複数種類の賦形剤と前述の材料を混合した医薬組成物で投与することができる。薬剤の配合および投与方法は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton、PA.、最新版に見ることができる。

20

【0102】

本明細書で使用するように、「投与する」または「投与」とは、本発明の式(I)若しくは(IV)の化合物またはその医薬的に許容可能な塩あるいは式(I)若しくは(IV)の化合物またはその医薬的に許容可能な塩を含有する医薬組成物を、PKに関連する疾患の予防または処置の目的に關して生物にデリバリーすることを指す。

20

【0103】

好適な投与経路としては、経口、直腸、粘膜経由若しくは腸投与、または筋肉内、皮下、脊髄内、鞘内、直接心室内、静脈内、硝子体内、腹膜内、鼻腔内または眼内注射が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい投与経路は、経口および静脈内である。

30

【0104】

あるいは、本化合物は、たとえば多くはデポーまたは徐放性製剤で、充実性腫瘍に直接化合物を注射することにより、全身でなく局所投与してもよい。

【0105】

さらに、標的化ドラッグデリバリーシステム、たとえば腫瘍特異的抗体でコーティングしたリポソームで、本薬剤を投与してもよい。このリポソームは、腫瘍を標的とし、腫瘍により選択的に摂取されよう。

【0106】

本発明の医薬組成物は、当業界で公知のプロセス、たとえば慣用の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、糊状化、乳状化、カプセル化、トラップ化または凍結乾燥プロセスによって製造することができる。

40

【0107】

本発明に従って使用する医薬組成物は、医薬的に使用し得る製剤に活性化合物を加工し易い賦形剤および助剤を含む一種以上の生理的に許容可能な担体を使用して、慣用法で製剤化することができる。適切な製剤は、選択した投与経路に依存する。

【0108】

注射用には、本発明の化合物は、水溶液、好ましくは生理的に適合可能な緩衝液、たとえばハング液、リンガー液、または生理的塩緩衝液に配合することができる。粘膜経由投与に関しては、浸透すべきバリヤに対し好適な浸透剤を、この製剤中で使用する。そのような浸透剤は、当業界で公知である。

【0109】

経口投与に関しては、本化合物は、当業界で公知の医薬的に許容可能な担体と、本活性化合物とを混合することによって配合することができる。そのような担体は、患者に経口摂取させるために、錠剤、ピル、ロゼンジ、ドライエ(糖衣錠)、カプセル、液体、ゲル、

50

シロップ、スラリー、懸濁液などとして本発明の化合物を配合することができる。経口利用用の医薬製剤は、固体賦形剤を使用し、場合により得られた混合物を粉碎し、所望により他の好適な助剤を添加した後に粒状物の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアを得ることができる。有用な賦形剤は、特に、充填剤、たとえば糖、たとえばラクトース、蔗糖、マンニトールまたはソルビトール、セルロース製剤、たとえばトウモロコシスター、小麦スター、ライススターおよびポテトスター、並びに他の材料、たとえばゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および/またはポリビニル-ピロリドン(PVP)がある。所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸などの崩壊剤を添加することができる。アルギン酸ナトリウムなどの塩も使用することができる。

10

【0110】

糖衣錠には、好適なコーティングを施す。この目的に関して、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る、高濃度の糖溶液を使用することができる。活性化合物の用量の種々の組み合わせを識別または特徴づけるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加することができる。

20

【0111】

経口で使用し得る医薬組成物としては、ゼラチン製の押出カプセル、並びにグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤とゼラチンとからできた柔らかい密閉カプセルが挙げられる。この押出カプセルは、充填剤、たとえばラクトース、バインダー、たとえばスター、および/または潤滑剤、たとえばタルクまたはステアリン酸マグネシウムと、場合により安定剤と組み合わせた活性成分を含むことができる。ソフトカプセルでは、本活性化合物は好適な液体、たとえば脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁させることができる。安定化剤もこれらの製剤に添加することができる。

20

【0112】

使用し得る医薬組成物としては、ハードゼラチンカプセルがある。非限定的な例として、活性化合物のカプセルの経口薬品製剤は、50mgと200mgの用量濃度であってもよい。この二種類の用量濃度は、50mgカプセルに関してはサイズ3と、200mgカプセルに関してはサイズ0の異なるサイズのハードゼラチンカプセルに充填することによって、同一粒子から製造する。本製剤の組成は、たとえば表2に示したようであってもよい。

30

【0113】

【表1】

表2

成分名/等級	粒状物中の濃度 (%w/w)	50mg カプセル中 の量(mg)	200mg カプセル 中の量(mg)
活性化合物 NF	65.0	50.0	200.0
マンニトール NF	23.5	18.1	72.4
クロスカルメロース ナトリウム NF	6.0	4.6	18.4
ポビドン K30 NF	5.0	3.8	15.2
ステアリン酸マグ ネシウム NF	0.5	0.38	1.52
カプセル、スウェー デンイエロー NF		サイズ3	サイズ0

40

カプセルは、活性化合物を遮光するために茶色いガラスまたはプラスチックボトルに包装することができる。この活性化合物カプセル製剤を含む容器は、管理室温(15~30)で貯蔵しなければならない。

50

【0114】

吸入による投与に関しては、本発明に従って使用する化合物は、加圧パックまたはネプライザーと、これらに限定されないが、たとえばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素などの好適な噴射剤を使用するエーロゾルスプレーの形態で都合よくデリバリーされる。加圧エーロゾルの場合には、用量単位は、計量した分をデリバリーするためのバルブを準備することによって制御することができる。吸入器または粉吹き器で使用するためのたとえばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、ラクトースまたはスターーチなどの好適な粉末ベースと本化合物との粉末混合物を含んで配合することができる。

【0115】

10 本化合物は、たとえば静脈内ボーラス注射または連続輸液による非経口投与用にも配合することができる。注射用の製剤は、追加の防腐剤と共に、アンプルまたは複数回分の用量の容器中の単位剤形に含めることができる。本組成物は、懸濁液、溶液または、油性若しくは水性ビヒクル中の乳液としての形態をとることができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤用物質を含むことができる。

【0116】

20 非経口投与用の医薬組成物としては、これに限定されないが、活性化合物の塩などの水溶形の水溶液がある。さらに、活性化合物の懸濁液は脂肪親和性ビヒクル中に製造することができる。好適な脂肪親和性ビヒクルとしては、脂肪油、たとえばゴマ油、合成脂肪酸エステル、たとえばオレイン酸エチルおよびトリグリセリド、またはリポソームなどの物質が挙げられる。水性の注射用懸濁液は、この懸濁液の粘度を増加させる物質、たとえばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランを含んでいてもよい。場合により、この懸濁液は、化合物の溶解度を高めて、非常に高濃度の製剤とするための好適な安定化剤および/または薬剤を含むこともできる。

【0117】

あるいは、本活性成分は、使用前に、たとえば滅菌の発熱物質を含まない水などの好適なビヒクルで構築するための粉末形であってもよい。

【0118】

30 本化合物は、ココアバターまたは他のグリセリドなどの慣用の座薬ベースを使用して、座薬または残留浣腸剤などの直腸組成物に配合することもできる。

【0119】

先に記載の製剤に加えて、本化合物は、デポー製剤としても配合することができる。そのような長時間作用性の製剤は、移植(たとえば、皮下若しくは筋肉内)により、または筋肉内注射によって投与することができる。本発明の化合物は、この投与経路用に、好適なポリマーまたは疎水性材料と(たとえば、薬理学的に許容可能な油との乳液に)、イオン交換樹脂と一緒に、またはこれに限定されないが、溶解性の低い塩などの溶解性の低い誘導体として配合することができる。

【0120】

40 本発明の疎水性化合物用の医薬的担体の非限定例は、ベンジルアルコール、無極性界面活性剤、水混和性有機ポリマーおよび、VPD補助溶媒系などの水相を含む、補助溶媒系である。VPDは、無水エタノール中に容積に合わせて製造したベンジルアルコール3%w/v、非極性界面活性剤ポリソルベート80 8%w/v、およびポリエチレングリコール300 65%w/vの溶液である。このVPD補助溶媒系(VPD:D5W)は、水溶液中に5%デキストロースで1:1に希釈したVPDからなる。この補助溶媒系は疎水性化合物をよく溶解し、且つ全身投与した際に、それ自体毒性が低い。当然、そのような補助溶媒系の割合は、その溶解性および毒性の特徴を損なわずに、かなり変動することができる。さらにこの補助溶媒成分の種類は変動してもよい;たとえば、他の毒性の低い非極性界面活性剤をポリソルベート80の代わりに使用することができ、ポリエチレングリコールの割合は変動してもよく、他の生体適合性ポリマー、たとえばポリビニルピロリドンでポリエチレングリコールを置き換えてよく、他の糖または多糖類をデキストロースの代わりに用いてもよい。

【 0 1 2 1 】

あるいは、疎水性医薬化合物用に他のデリバリー系を使用してもよい。リポソームおよびエマルションは、疎水性薬剤のデリバリー用ビヒクルまたは担体としての公知の例である。さらに、毒性が高いが、ジメチルスルホキシドなどの特定の有機溶媒を使用してもよい。

【 0 1 2 2 】

さらに、本化合物は、治療薬を含有する固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの、徐放性の系を利用してデリバリーさせることができる。種々の徐放性材料が確立されており、当業者には公知である。その化学的な性質に依存して、徐放性カプセルは、数週間～100日間、化合物を放出することができる。その治療薬の化学的な性質および生物学的安定性に依存して、蛋白質安定化のためのさらなる方法を使用することができる。10

【 0 1 2 3 】

本明細書における医薬組成物は、好適な固体またはゲル相の担体または賦形剤も含むことができる。そのような担体または賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、スターチ、セルロース誘導体、ゼラチンおよびポリマー、たとえばポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 2 4 】

本発明のPK調節化合物の多くは、生理学的に許容可能な塩として提供され、ここで請求された化合物は、負または正に帯電した種を形成してもよい。本化合物が正に帯電した部分を形成する塩の例としては、これらに限定されないが、四級アンモニウム(本明細書中に定義)、塩、たとえば塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩が挙げられ、ここで前記四級アンモニウム基の窒素原子は、好適な酸と反応した本発明の選択化合物の窒素である。本発明の化合物が負に帯電した種を形成する塩としては、これらに限定されないが、好適な塩基[たとえば、水酸化ナトリウム(NaOH)、水酸化カリウム(KOH)、水酸化カルシウム(Ca(OH)₂)など]と本化合物のカルボン酸基との反応により形成した、ナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウム塩が挙げられる。20

【 0 1 2 5 】

本発明で使用するのに好適な医薬組成物としては、たとえばPK活性の調節または、PKに関連する疾患の処置若しくは予防などの、所定の目的を達成するのに十分量で活性成分を配合した組成物が挙げられる。30

【 0 1 2 6 】

より具体的には、治療的有効量は、処置される被験者の疾患の症状を予防、軽減若しくは改善するか、または被験者を延命させるのに十分な化合物の量を意味する。

【 0 1 2 7 】

治療的有効量の決定は、当業者の能力の範囲内であり、本明細書中に提供した詳細な開示の範囲内である。

【 0 1 2 8 】

本発明の方法で使用される任意の化合物に関して、この治療的有効量または用量は、細胞培地アッセイから最初に予測することができる。次いで、この用量を動物モデル用に配合して、細胞培地で決定したIC₅₀を含む循環濃度範囲(すなわち、PK活性を最大の半分阻害する試験化合物の濃度)を得ることができる。そのような情報を使用して、ヒトでの有用な用量をより正確に決定することができる。40

【 0 1 2 9 】

本明細書中で記載した化合物の毒性および治療効果は、たとえば被験化合物に関するIC₅₀およびLD₅₀(いずれも本明細書中に記載)を測定することにより、細胞培地または実験動物で標準的な医薬的手段によって決定することができる。これらの細胞培地アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトで使用するための用量範囲を計画するのに使用することができる。この用量は、使用する剤形および使用する投与経路に依存して変動し得る。正確な製剤、投与経路および用量は、患者の症状を考慮してそれぞれの医師によって50

選択することができる。(たとえば、Finglら、1975年、"The Pharmacological Basis of Therapeutics"、第1章、1頁を参照されたい)。

【0130】

用量および間隔は、キナーゼ調節効果を維持するのに十分な活性種の血漿レベルを提供するために個々に調節することができる。これらの血漿レベルは、最小有効濃度(MEC)と称される。このMECは個々の化合物で変動するが、インピトロデータから予測することができ、たとえばキナーゼ50~90%阻害を達成するのに必要な濃度は、本明細書中に記載のアッセイを使用して確認することができる。MECを達成するのに必要な容量は、個々の特徴および投与経路に依存するだろう。HPLCアッセイまたはバイオアッセイを使用して、血漿濃度を測定することができる。

10

【0131】

投与間隔も、MECの値を使用して決定することができる。化合物は、当該時間の10~90%、好ましくは30~90%、もっとも好ましくは50~90%の間、MECを超える血漿レベルを維持する投薬計画を使用して投与しなければならない。

【0132】

現在、式(I)または(IV)の化合物の治療的有効量は、1日当たり約 $25\text{mg}/\text{m}^2 \sim 1500\text{mg}/\text{m}^2$ であり、好ましくは約 $200\text{mg}/\text{m}^2$ /日である。

20

【0133】

局所投与または選択的摂取の場合には、薬剤の効果的な局所濃度は血漿濃度に関係せず、当業界で公知の他の手順を使用して、正確な用量および間隔を決定することができる。

20

【0134】

投与した組成物の量は、もちろん処置される被験者、苦痛の重篤度、投与方法、処方する医師の判断などに依存するだろう。

【0135】

本組成物は、所望により、本活性成分を含有する一つ以上の剤形を含み得る、FDA認可キットなどのパックまたはディスペンサー装置で提供することができる。このパックはたとえば金属またはプラスチックホイル、たとえばプリスター・パックを含んでもよい。パックまたはディスペンサー装置は、投与するための指示書が添付されていてもよい。このパックまたはディスペンサーは、医薬品の製造業者、使用または販売を規定する政府機関によって指定された書式で容器に添付された注意書きが添付されていてもよく、この注意書きは、ヒト若しくは家畜への投与または組成物の形態の政府機関による承認を表す。そのような注意書きは、たとえば、処方薬に関して連邦食品医薬品局によって承認されたラベルまたは、承認食品差し込みページであってもよい。適合可能な医薬的な担体に配合した本発明の化合物を含む組成物も製造し、好適な容器に入れ、表示の症状の処置用にラベル付けすることができる。ラベルに表示された適応症としては、腫瘍の処置、脈管形成の阻害、線維形成、糖尿病などの処置が挙げられる。

30

【0136】

本明細書中に記載された化合物を、上記疾病および疾患の処置のために他の化学療法薬と組み合わせてもよいことは、本発明の一側面でもある。たとえば、本発明の化合物、塩またはプロドラッグは、アルキル化剤、たとえば単独若しくはさらにロイコボリンと組み合わせたフルオロウラシル(5-FU)；または他のアルキル化剤、これらに限定されないが、たとえば他のピリミジン類似体、たとえばUFT、カペシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン、アルキルスルホネート類、たとえばブスルファン(慢性顆粒球白血病の処置で使用)、イムプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン類、たとえばベンゾデパ、カルボクオン、メツレデパおよびウレデパ；エチレンイミン類およびメチルメラミン類、たとえばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミン；およびナイトロジエンマスター、たとえばクロラムブシリ(慢性顆粒球白血病、原発性マクログロブリン血症および、非ホジキンリンパ種の処置で使用)、シクロホスホルアミド(ホジキン病、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、ウィルムス腫瘍および横紋筋肉腫の処置で使用)

40

50

、エストラムスチン、イホスファミド、ノベムブリチン、ブレドニムスチンおよびウラシルマスター(原発性血小板増加症、非ホジキンリンパ腫、および卵巣癌の処置で使用)；並びにトリアジン類、たとえばダカルバジン(軟組織肉腫の処置で使用)と組み合わせることができる。

【0137】

本発明の化合物は、他の代謝拮抗物質の化学療法薬、これらに限定されないが、たとえば葉酸類似体、たとえばメトトレキセート(急性リンパ性白血病、絨毛癌、菌状息肉腫乳癌、頭頸部癌および骨原性肉腫の処置で使用)およびブテロプロテリン；並びにプリン類似体、急性顆粒球性、急性リンパ性、および慢性顆粒球性の白血病の処置に使用される、たとえばメルカプトプリンおよびチオグアニンと組み合わせて使用することもできる。

10

【0138】

本発明の化合物は、天然物をベースとする化学療法薬、これらに限定されないがたとえば、ビンカ・アルカロイド類、たとえばビンプラスチン(乳癌および睾丸癌の処置に使用)、ビンクリスチンおよびビンデシン；エピボドフィロトキシン類、たとえばエトポシドおよびテニポシド、いずれも睾丸癌およびカボジ肉腫の処置に有用；抗生物質の化学療法薬、たとえばダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、マイトマイシン(胃癌、子宮癌、大腸癌、乳癌、膀胱癌および肺腺癌を処置するのに使用)、ダクチノマイシン、テモゾロミド、プリカマイシン、ブレオマイシン皮膚癌、食道癌および尿生殖路癌の処置に使用)；並びに酵素の化学療法薬、たとえばL-アスパラギナーゼと組み合わせても使用することができると考えられる。

20

【0139】

上記のものに加えて、本発明の化合物は、プラチナ配位錯体(シスプラチンなど)；置換ウレア類、たとえばヒドロキシウレア；メチルヒドラジン誘導体、たとえばプロカルバジン；副腎皮質抑制剤、たとえばミトタン、アミノグルテチミド；並びにホルモンおよびホルモン類似体、たとえば副腎皮質ステロイド(たとえばブレドニゾン)、プロゲスチン(たとえば、ヒドロキシプロゲステロン・カプロエート)；女性ホルモン物質(たとえば、ジエチルスチルベスチロール)；抗エストロゲン薬、たとえばタモキシフェン；男性ホルモン物質、たとえばテストステロン・プロピオネート；およびアロマターゼ阻害薬、たとえばアナストロゾールと組み合わせて使用することもできる。

30

【0140】

最後に、本発明の化合物の組み合わせは、充実性腫瘍または白血病、これらに限定されないが、たとえば急性骨髄性(非リンパ球性)白血病の処置のため、Endostatin(登録商標)、Gleevec(登録商標)、Camptosar(登録商標)、Herceptin(登録商標)、Imclone(登録商標)C225、ミトキサントロンまたはパクリタキセルと組み合わせても有効であると考えられる。本発明の化合物は、COX-2阻害剤と一緒に使用することもできる。

30

【0141】

本明細書に記載の併用療法および医薬組成物に関して、異常な細胞成長を阻害するのに有用な本発明の化合物および化学療法薬または他の薬剤(たとえば他の抗増殖性薬、抗血管形成薬、シグナル伝達阻害剤または免疫系促進剤)の有効量は、本明細書に記載の化合物および、公知のものまたは化学療法薬若しくは他の薬剤に関して記載の有効量をベースとして、当業者により決定することができる。そのような治療および組成物の製剤および投与経路は、単独の活性剤として本発明の化合物を含む組成物および治療に関して本明細書に記載の情報と、これらと組み合わせる化学療法薬または他の薬剤に関して提供された情報をベースとすることができます。

40

【実施例1】

【0142】

以下の製剤および実施例は、当業者が本発明をより明確に理解且つ実施できるように提供するものである。これらは本発明の範囲を限定するものではなく、本発明を説明するものだけのものと理解すべきである。

【0143】

50

合成例

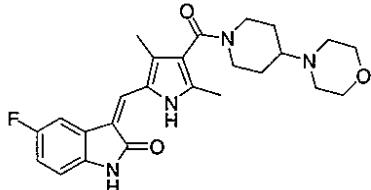
以下の実施例番号は、表1の化合物番号と対応する。

【0144】

実施例2

(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの合成

【化16】



10

段階1

50 に加熱した4-アミノ-1-ベンジルピペリジン(Aldrich、1.53mL、7.5mmol)、 K_2CO_3 (2.28g、16.5mmol)、およびジメチルホルムアミド(DMF)(15mL)の攪拌混合物に、ビス(2-ブロモエチル)エーテル(Aldrich、工業用、90%、0.962mL、7.65mmol)を60分で滴下添加した。80 で6時間攪拌した後、TLC(90:10:1のクロロホルム/MeOH/濃NH₄OH水溶液)から、新しいスポットの形成が判明した。窒素流を吹き込むことによって溶媒を蒸発させながら、2時間加熱を継続した。この粗な物質は比較的純粋であったが、比較的短いシリカゲルカラム(クロロホルム中9:1のMeOH/NH₄OH水溶液の1%~6%勾配液)にかけた。純粋な画分を蒸発させると、蝶状固体のジアミン4-(モルホリン-4-イル)-1-ベンジルピペリジン約1.7gが得られた。

20

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 7.31(m, 4H), 7.26(m, 1H), 3.72(t, J=4.7Hz, 4H), 3.49(s, 2H), 2.94(br d, J=5.9Hz, 2H), 2.54(t, J=4.7Hz, 4H), 2.19(tt, J=11.5, 3.9Hz, 1H), 1.96(td, J=11.7, 2.2Hz, 2H), 1.78(br d, J=12.5Hz, 2H), 1.55(m, 2H)。

20

【0145】

段階2

窒素下のPd(OH)₂(炭素上20%(<50%ウェット)、390mg、25wt%)、メタノール(50mL)、および<1.7M HCl(3当量、~10.6mL - 沈殿が見られたときに、後で添加した水を含む)の攪拌混合物を、窒素バルーンを使用して容器内へ、外へはオイルバブラーを通してフラッシュ(20秒)することにより、1気圧の水素雰囲気に交換した。20分後、この水素下の反応混合物を50 に加熱し、メタノール(8 mL)中の4-(モルホリン-4-イル)-1-ベンジルピペリジン(1.56g、6.0mmol)を30分で滴下添加した。10時間後、tlcは、全ての出発アミンが消費されて、より極性のスポット(ニンヒドリン活性)となつことを示した。この反応混合物をセライトで濾過し、蒸発させると、オフホワイト固体状の4-(モルホリン-4-イル)ピペリジンジニ酸塩が得られた。この物質を過剰の塩基性樹脂(>16g、Bio-Rad Laboratories、AG 1-X8、20~50メッシュ、水酸化物形、メタノールで2回洗浄)と、このアミン塩酸塩のメタノール混合物を使用するフリーべーシング(free-basing)にかけた。この樹脂を30分間かき混ぜた後、このメタノール溶液をデカンテーションし、蒸発させると、蝶状結晶固体の4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン遊離塩基932mgが得られた。

30

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 3.53(br s, 4H), 3.30(v br s, 1H(+H₂O)), 2.92(br d, J=11.7Hz, 1H), 2.41(s, 4H), 2.35(~obscd t, J=11.7Hz, 2H), 2.12(br t, 1H), 1.65(br d, J=11.7Hz, 2H), 1.18(br q, J=10.9Hz, 2H); LCMS-APCI m/z171[M+1]⁺。

40

【0146】

段階3

PCT国際公開第W001/60814号に記載の如く製造した(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(120mg, 0.40mmol)、およびBOP(221mg, 0.50mmol)を室温でよく攪拌しながらDMF(5mL)に懸濁さ

50

せ、トリエチルアミン(134 μL、0.96mmol)を添加した。10~15分後、この均質反応混合物に、4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン(85mg、0.50mmol)を全部一度に添加した。この反応混合物を48時間攪拌し(もっと早く済んだかもしれない)、次いでクロロホルム-イソブロパノール(5/1)と5%LiCl水溶液をと含有する漏斗に移した。この曇った橙色有機相を分離し、追加の5%LiCl(2×)、1M NaOH水溶液(3×)、飽和NaCl水溶液(1×)で洗浄し、次いで乾燥(Na₂SO₄)し、蒸発させると、粗な生成物(純度96.3%；痕跡量のヘキサメチルホスホルアミド(HMPA)¹HNMRによる)が得られた。この粗な生成物をシリカゲルの非常に短いカラム(3cm)(ジクロロメタン(DCM)中MeOHの5~15%勾配液)に通して精製して、痕跡量の早く移動する3E-異性体を除去した。純粋な画分を蒸発させ、飽和EtOAc溶液から一晩再結晶し、これをEt₂O(~3倍)で希釈し、0℃に冷蔵した。この母液をデカンテーションし、完全に真空にした後で、橙色結晶状の所望の化合物が得られた(153mg、85%)。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 13.60(s, 1H), 10.87(s, 1H), 7.72(dd, J=9.4, 2.7Hz, 1H), 7.68(s, 1H), 6.91(td, J=9.3, 2.6Hz, 1H), 6.82(dd, J=8.6, 4.7Hz, 1H), 3.54(app br t, J=4.3Hz, 4H), 3.31(2x s, 3H+3H), 2.43(br s, 4H), 2.36(m, 1H), 2.25(br m, 6H), 1.79(br s, 2H), 1.22(br s, 2H); LCMS m/z 453[M+1]⁺。

【0147】

実施例1

上記実施例2に記載の手順であるが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、(3Z)-3-[3,5-ジメチル4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 13.55(s, 1H), 10.87(s, 1H), 7.74(d, J=7.6Hz, 1H), 7.59(s, 1H), 7.11(t, J=7.6Hz, 1H), 6.97(t, J=7.6Hz, 1H), 6.86(d, J=7.4Hz, 1H), 3.54(app br t, J=4.3Hz, 4H), 3.31(2x s, 3H+3H), 2.43(br s, 4H), 2.35(m, 1H), 2.28(br m, 6H), 1.79(br s, 2H), 1.22(br s, 2H); LCMSm/z435[M+1]⁺。

【0148】

実施例3

実施例2に記載の手順であるが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、(3Z)-3-[3,5-ジメチル4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 13.56(s, 1H), 10.97(s, 1H), 7.95(d, J=2.0Hz, 1H), 7.74(s, 1H), 7.11(dd, J=8.2, 2.0Hz, 1H), 6.85(d, J=8.2Hz, 1H), 3.54(app br t, J=~4Hz, 4H), 3.31(2xs, 3H+3H), 2.43(br s, 4H), 2.37(m, 1H), 2.25(br m, 6H), 1.79(br s, 2H), 1.23(br s, 2H); LCMSm/z470[M+1]⁺。

【0149】

実施例4

実施例2に記載の手順であるが、4-(モルホリン-4-イル)-ピペリジンを市販の4-(1-ピロリジニル)-ピペリジンに代えて、(3Z)-3-[3,5-ジメチル4-[4-(ピロリジン-1-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イル]メチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) E/Z異性体混合物; LCMSm/z437[M+1]⁺。

【0150】

実施例18

実施例2に記載の手順であるが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,

10

20

30

40

50

5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-6-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-6-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 13.41(s, 1H), 11.02(s, 1H), 7.79(dd, J=8.2, 5.5Hz, 1H), 7.60(s, 1H), 6.81(dd, J=~11, 8.6, 2.5Hz, 1H), 6.70(dd, J=9.0, 2.3Hz, 1H), 3.56(app br t, J=~4Hz, 4H), 2.45(br s, 4H), 2.37(m, 1H), 2.26(br m, 6H), 1.81(br s, 2H), 1.25(br s, 2H); LCMSm/z453[M+1]⁺。

【0151】

実施例19

10

実施例2に記載の手順であるが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-6-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-6-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 13.46(s, 1H), 11.02(s, 1H), 7.79(d, J=8.2Hz, 1H), 7.66(s, 1H), 7.03(dd, J=8.2, 2.0Hz, 1H), 6.89(d, J=2.0Hz, 1H), 3.56(app br t, J=~4Hz, 4H), 2.45(br s, 4H), 2.37(m, 1H), 2.26(br m, 6H), 1.81(br s, 2H), 1.25(br s, 2H); LCMSm/z469[M+1]⁺。

20

【0152】

実施例26

上記実施例2の手順であるが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-6-ブロモ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(モルホリン-4-イル)ピペリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-6-ブロモ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) 13.26(s, 1H), 9.43(s, 1H), 7.23(d, J=8.2Hz, 1H), 7.21(s, 1H), 7.10(dd, J=8.2, 2.0Hz, 1H), 6.95(d, J=1.6Hz, 1H), 3.73(m, 4H), 2.56(br s, 4H), 2.37(br m, 6H), 2.22(br m, 4H), 1.9(br s, 2H), 1.4(br s, 2H); LCMSm/z 513, 515[M+1]⁺。

30

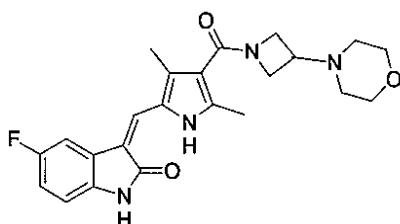
【0153】

実施例6

(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(モルホリン-4-イル)アゼチジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの合成

【0154】

【化17】



40

段階1

Tetrahedron Lett.40巻、3761～64頁(1999年)に記載の公知手順に従って2,3-ジブロモプロピルアミン臭化水素塩(58.8mmol)から製造した1-アザビシクロ[1.1.0]ブタンの溶液を、モルホリン(15.7ml; 180mmol)と硫酸(96%溶液3.3g)の無水非変性エタノール(250ml)の溶液に0°でゆっくりと添加した。この反応混合物を氷浴上で30分、次いで室温で8時

50

間攪拌した。水酸化カルシウム(5.5g)と水100mlを添加し、得られたスラリーを1時間攪拌し、次いでセライト床を通して濾過した。この濾液を濃縮し、減圧(20mmHg)下で蒸留して、水と過剰量のモルホリンを除去した。この蒸留残渣をクーゲルロフ装置を使用して高真空で再蒸留すると、無色油状液体の純粋な4-(アゼチジン-3-イル)モルホリンが収率33%(2.759g)で得られた。

¹³C-NMR(CDCl₃, 100MHz) : 66.71(2C), 59.37(1C), 51.46(2C), 49.95(2C)¹H(CDCl₃, 400MHz) : 3.727(t, J=4.4Hz, 4H), 3.619(t, J=8Hz, 2H), 3.566(t, J=8Hz, 2H), 3.227(m, J=7Hz, 1H), 2.895(br s, 1H), 2.329(br s, 4H)。

【0155】

段階2

(3Z)-3-([3,5-ジメチル-4-カルボキシ]1-H-ピロール-2-イル)メチレン)-5-フルオロ-1-3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(0.5mmol, 210mg)の1-(8-アザベンズトリアゾリル)-エステル[(3Z)-3-(3,3-ジメチル-4-カルボキシ-1-H-ピロール-2-イルメチレン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(480mg; 1.6mmol)をDMF(5ml)中、Hunig塩基(3.0mmol, 0.525ml)の存在下で、HATU試薬(570mg, 1.5mmol)で活性化し、クロロホルム(5ml)で沈殿させて純粋形で単離し、高真空で乾燥することにより製造、収率92%(579mg)を無水DMA(1.0ml)に懸濁させた。無水DMA(1.0ml)中の4-(アゼチジン-3-イル)-モルホリン(142.5mg, 1mmol)の溶液を一度に添加し、得られた溶液を室温で20分間攪拌した。この反応混合物を、オイルポンプを使用して室温で蒸発させて、粘稠な残渣をメタノールとジエチルアミン(20:1, v/v)の混合物6mlで希釈し、機械的に接種し、冷蔵庫(+3℃)に8時間おいた。この沈殿を濾過(氷冷メタノールで簡単に洗浄)し、高真空で乾燥すると、所望の生成物(収率71.5%、橙色固体152mg)が得られた。LC/MS : +APCI : M+1=425; -APCI : M-1=423。

¹⁹F-NMR(d-DMSO, 376.5MHz) : -122.94(m, 1F)。

¹H(d-DMSO, 400MHz) : 13.651(s, 1H), 10.907(s, 1H), 7.754(dd, J=9.4Hz, J=2.4Hz, 1H), 7.700(s, 1H), 6.935(dt, J=8.2Hz, J=2.4Hz, 1H), 6.841(dd, J=8.6Hz, J=3.9Hz; 1H), 3.963(br s, 2H), 3.793(br s, 2H), 3.581(br t, J=4.3Hz, 4H), 3.133(m, 1H), 2.367(s, 3H), 2.340(s, 3H), 2.295(br s, 4H)。

【0156】

実施例7

上記実施例6に記載の手順を使用するが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用いて、橙色固体状の(3Z)-3-[[3-(モルホリン-4-イル)アゼチジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

LC/MS : +APCI : M+1=441; -APCI : M-1=440, 441。

¹H(d-DMSO, 400MHz) : 13.607(s, 1H), 11.006(s, 1H), 7.976(d, J=2.0Hz, 1H), 7.756(s, 1H), 7.136(dd, J=8.2Hz, J=2.0Hz, 1H), 6.869(d, J=8.2Hz, 1H), 3.964(br s, 2H), 3.793(br s, 2H), 3.582(br t, J=4.3Hz, 4H), 3.134(m, 1H), 2.369(s, 3H), 2.347(s, 3H), 2.296(br s, 4H)。

【0157】

実施例8

上記実施例6に記載の手順を使用するが、4-(アゼチジン-3-イル)-cis-3,5-ジメチル-モルホリン[モルホリンの代わりにcis-3,5-ジメチル-モルホリン(20.7g; 180mmol)を使用して、4-(アゼチジン-3-イル)-モルホリンの製造と似た手順で製造]を使用すると、橙色固体状の(3Z)-3-[[3,5-ジメチル-4-(2,5-ジメチル-モルホリン-4-イル)アゼチジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

LC/MS : +APCI : M+1=453; -APCI : M-1=451。

¹⁹F-NMR(d-DMSO, 376.5MHz) : -122.94(m, 1F)。

10

20

30

40

50

¹H(d-DMSO, 400MHz) : 13.651(s, 1H), 10.907(s, 1H), 7.758(dd, J=9.4Hz, J=2.3Hz, 1H), 7.700(s, 1H), 6.935(dt, J=8.6Hz, J=2.7Hz, 1H), 6.842(dd, J=8.2Hz, J=4.3Hz, 1H), 3.961(br s, 2H), 3.790(br s, 2H), 3.546(br m, 2H), 3.092(m, 1H), 2.690(br s, 2H), 2.364(s, 3H), 2.338(s, 3H), 1.492(br m, 2H), 1.038(br s, 6H)。

【0158】

実施例9

上記実施例6に記載の手順を使用するが、(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンの代わりに(3Z)-3-(3,5-ジメチル-4-カルボキシ-1H-ピロール-2-イルメチリデン)-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを用い、4-(アゼチジン-3-イル)モルホリンの代わりに4-(アゼチジン-3-イル)-cis-3,5-ジメチル-モルホリンを用いて、橙色固体状の(3Z)-3-[3,5-ジメチル-4-(3,5-ジメチル-モルホリン-4-イル)アゼチジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-クロロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

LC/MS : +APCI : M+1=469, 470 ; -APCI : M-1=468, 469。

¹H(d-DMSO, 400MHz) : 13.606(s, 1H), 11.008(s, 1H), 7.979(d, J=2.0Hz, 1H), 7.758(s, 1H), 7.138(dd, J=8.2Hz, J=2.0Hz, 1H), 6.870(d, J=8.2Hz, 1H), 3.964(br s, 2H), 3.790(br s, 2H), 3.547(br m, 2H), 3.095(m, 1H), 2.691(br s, 2H), 2.366(s, 3H), 2.345(s, 3H), 1.494(br m, 2H), 1.039(br s, 6H)。

【0159】

実施例10

上記実施例2に記載の手順を使用するが、4-(モルホリン-4-イル)-ピペリジンを以下に記載の2-(R)-ピロリジン-1-イルメチルピロリジンに置き換えて、(3Z)-3-[3,5-ジメチル-2R-(ピロリジン-1-イルメチル)ピロリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンが得られた。

【0160】

2(R)-ピロリジン-1-イルメチルピロリジンの合成

段階1

DMF(20mL)中の(+)-カルボベンジルオキシ-D-プロリン(1.5g, 6.0mmol)、EDC(2.3g, 12.0mmol)とHOBr(800mg, 12.9mmol)の溶液に、トリエチルアミン(1.5mL)とピロリジン(1.0mL, 12.0mmol)とを添加した。これを室温で18時間攪拌し、飽和NaHCO₃を添加し、これをCH₂Cl₂(3回)で抽出した。この有機層を分離し、Na₂SO₄で乾燥した。溶媒を除去し、残渣をシリカゲルのクロマトグラフィー(EtOAc)により精製すると、白色固体状の1-(R)-[N-(ベンジルオキシカルボニル)-プロリル]ピロリジンが得られた(94%)。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃, 全て回転異性体) 1.57-1.66(m, 1H), 1.71-2.02(m, 5H), 2.04-2.19(m, 2H), 3.26-3.43(m, 3H), 3.44-3.78(m, 3H), 4.41(dd, J=4.5, 7.6Hz, 0.5H), 4.52(dd, J=3.7, 7.6Hz, 0.5H), 4.99(d, J=12.1Hz, 0.5H), 5.05(d, J=12.5Hz, 0.5H), 5.13(d, J=12.1Hz, 0.5H), 5.20(d, J=12.5Hz, 0.5H), 7.27-7.38(m, 5H)。

【0161】

段階2

メタノール(15mL)中の1-(R)-[N-(ベンジルオキシカルボニル)プロリル]ピロリジン(2.7g, 8.9mmol)と5%Pd-C触媒(270mg)の混合物を、水素雰囲気下で20時間攪拌した。この反応混合物をセライトを通して濾過し、溶媒を除去すると、粘稠油状の2(R)-プロリルピロリジンが得られた(80%)。これをさらに精製することなく、次段階に使用した。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 1.52-1.78(m, 5H), 1.82-1.89(m, 2H), 1.97-2.04(m, 1H), 2.63-2.71(m, 1H), 2.97-3.02(m, 1H), 3.22-3.35(m, 3H), 3.48-3.54(m, 1H), 3.72(dd, J=6.1, 8.0Hz, 1H)。

【0162】

段階3

2-(R)-プロリルピロリジン(1.2g, 7.1mmol)をTHF(10mL)に溶解した。この反応混合物を0℃に冷却し、THF中、1MのBH₃(10mL, 10mmol)を0℃で滴下した。この反応混合物を16時

10

20

30

40

50

間還流し、3MのHCl(4.7mL)。pHが10に達するまで2M NaOH溶液を添加した。この生成物をCH₂Cl₂中の5%MeOH(3回)で抽出した。この有機層をNa₂SO₄で乾燥し、溶媒を除去すると、薄黄色液体状の表記化合物が得られた(73%)。これをさらに精製することなく、次段階に使用した。

¹H-NMR(400MHz, d₆-DMSO) 1.22-1.30(m, 1H), 1.55-1.69(m, 6H), 1.71-1.79(m, 1H), 2.26-2.30(m, 1H), 2.33-2.38(m, 1H), 2.40-2.45(m, 4H), 2.65-2.71(m, 1H), 2.78-2.84(m, 1H), 3.02-3.09(m, 1H)。

【0163】

実施例11

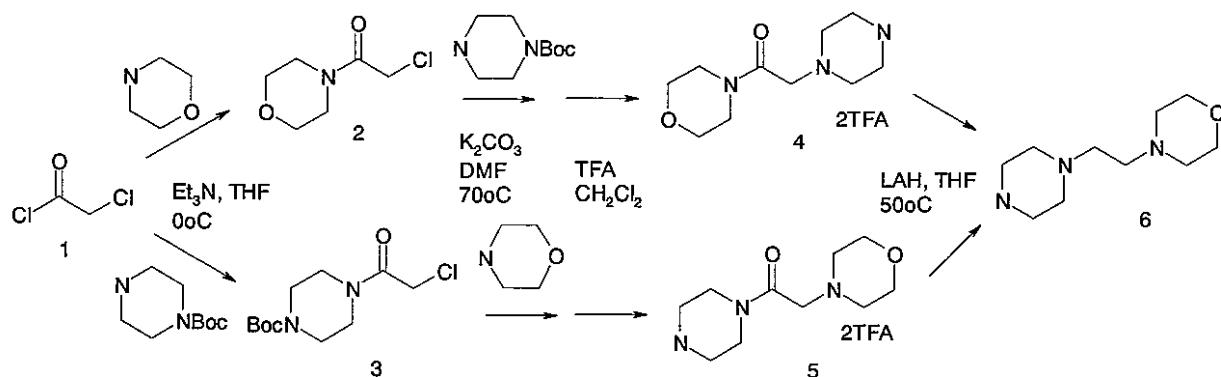
上記実施例2に記載の手順を使用するが、4-(モルホリン-4-イル)-ピペラジンを2-(S)-ピロリジン-1-イルメチルピロリジンに[上記の如く、(+)-カルボベンジルオキシ-D-プロリンをカルボベンジルオキシ-L-プロリンに置き換えて使用することにより製造]置き換えることにより、(3Z)-3-[3,5-ジメチル-2S-(ピロリジン-1-イルメチル)ピロリジン-1-イルカルボニル]-1H-ピロール-2-イルメチリデン]-5-フルオロ-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オンを製造した。

【0164】

実施例20、21、24、16、17、22および23の合成

1. 側鎖4、5および6の合成

【化18】



0におけるTHF(20mL)中のモルホリン(10mmol, 0.872mL)とEt₃N(15mmol, 2.09mL)の溶液を、塩化クロロアセチル1(12mmol, 0.956mL)に滴下した。この混合物を0で4時間、次いで室温で一晩攪拌した。この反応物をH₂Oでクエンチして、蒸発乾涸させた。カラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂/CH₃OH=50/1)により精製すると、2-クロロ-1-モルホリン-4-イル-エタノン2(1.62g, 100%)が得られた。この化合物2(1.6g, 0.98mmol)を、K₂CO₃(3mmol, 4.14g)の存在下で、DMF(20mL)中のピペラジン-1-カルボン酸t-ブチルエステル(10mmol, 1.86g)で70において処理した。溶媒を蒸発させ、粗な生成物をフラッシュクロマトグラフィー(CH₂Cl₂/CH₃OH=30/1)により精製すると、4-(2-モルホリン-4-イルオキソ-エチル)-ピペラジン-1-カルボン酸t-ブチルエステル4が得られ、これをCH₂Cl₂(5mL)で室温で2時間処理した。全ての溶媒を蒸発させると、1-モルホリン-4-イル-2-ピペラジン-1-イル-エタノンのTFA塩4が得られた(4.1g, 93%)。

¹H-NMR(CDCl₃) 3.25(m, 4H), 3.40(m, 4H), 3.47(m, 2H), 3.61(m, 2H), 3.70(m, 4H), 3.77(s, 2H)。

【0165】

モルホリンとピペラジン-1-カルボン酸t-ブチルエステルの順番を変えた以外には、同スケールおよび条件で同じ反応を実施した。同様に4-(2-クロロ-アセチル)-ピペラジン-1-カルボン酸t-ブチルエステル3と2-モルホリン-4-イル-1-ピペラジン-1-イル-エタノンのTFA塩5が得られた(4.0g, 91%)。

¹H-NMR(CDCl₃) 3.06(t, J=5.4Hz, 2H), 3.14(t, J=5.4Hz, 4H), 3.20(m, 2H), 3.24(m, 2H), 3.53(t, J=5.2Hz, 2H), 3.71(t, J=5.4Hz, 2H), 3.84(m, 4H), 4.15(s, 2H)。

10

20

30

40

50

【0166】

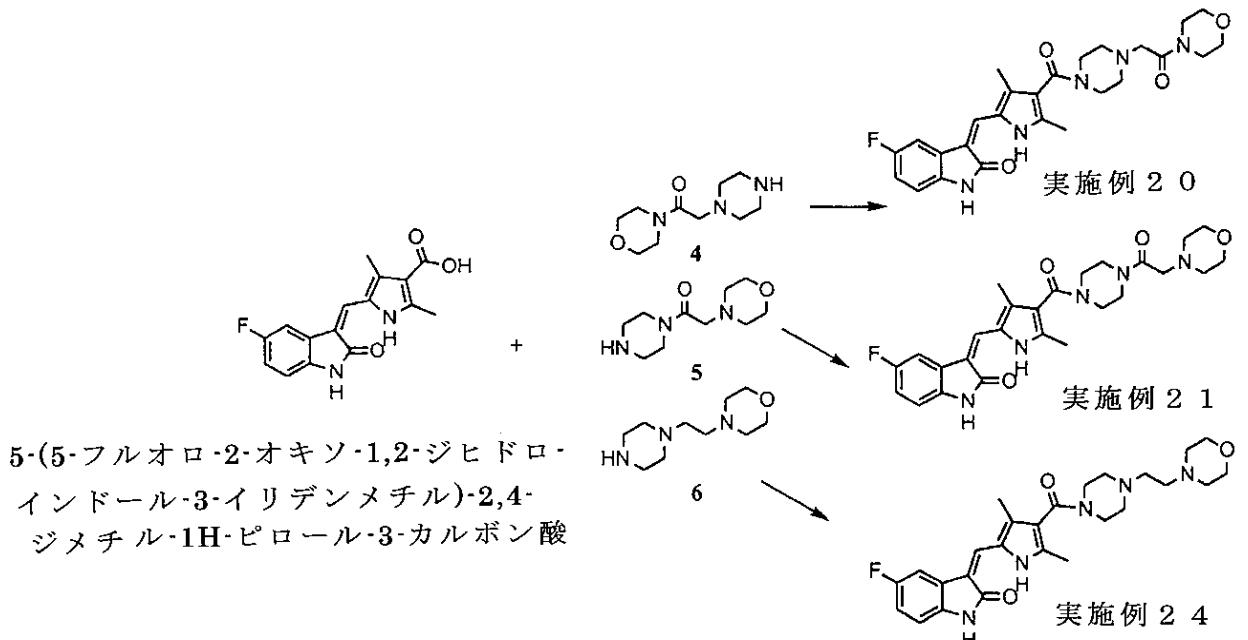
THF(10mL)中の化合物4または5(5mmol, 2.2g)を、よく攪拌したTHF(50mL)中のNaH(50mmol, 1.9g)の混合物の懸濁液に滴下した。この得られた混合物を50℃で一晩攪拌し、次いで0℃でH₂O(5mL)、続いて10%NaOH(10mL)でクエンチした。白色固体を濾過し、THF(4×20mL)で超音波洗浄した。この混合した液体を蒸発乾涸させ、カラムクロマトグラフィー(CHCl₃/CH₃OH/NH₃・H₂O=15/1/0.1~10/1/0.1)により精製すると、4-(2-ピペラジン-1-イル)-モルホリン6(70mg, 70%)が得られた。

¹H-NMR(CD₃COCD₃) 2.35(s, 1H), 2.42(m, 12H), 2.74(t, J=4.4Hz, 4H), 3.57(t, J=4.2Hz, 4H)。LCMS(m/z)200(M+1)。

【0167】

2. 側鎖4、5および6と5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸との縮合

【化19】



DMF(0.8mL)中の5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸(90mg, 0.3mmol)、トリエチルアミン(0.084mL, 0.6mmol)、EDC(86mg, 0.45mmol)とHOBT(60mg, 0.45mmol)の攪拌した黄色い濁った混合物に、化合物4(0.45mmol)を添加した。得られた溶液を室温で一晩攪拌した。この反応系から黄色固体生成物が沈殿した。この固体を真空濾過により単離し、エタノール(1mL)で1回洗浄し、ジエチルエーテル(2mL)で10分間超音波処理した。真空下で乾燥した後、実施例20の化合物が黄色固体状で得られた(110mg, 収率74%)。

¹H-NMR(DMSO-d₆) 2.27, 2.25(2xs, 6H, CH₃), 2.41(m, 4H), 3.12(s, 2H), 3.33(m, 4H), 3.40(br s, 2H), 3.52(m, 6H, CH₂), 6.83(m, 1H), 6.89(m, 1H), 7.68(s, 1H), 7.31(d, J=8.8Hz, 1H)(芳香族およびビニル), 10.87(s, 1H, CONH), 13.61(s, 1H, NH)。LC-MS(m/z)496.0(M+1)。

【0168】

実施例20の化合物の合成に使用したのと同一条件下で、化合物5と5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸との反応混合物から、実施例21の化合物(70mg, 47%)が沈殿した。

¹H-NMR(DMSO-d₆) 2.28, 2.27(2xs, 6H), 2.37(m, 4H), 3.14(s, 2H), 3.31(m, 4H), 3.45(br s, 2H), 3.55(m, 6H), 6.83(m, 1H), 6.91(m, 1H), 7.70(s, 1H), 7.52(dd, J=2.0, 9.2Hz, 1H), 10.88(s, 1H), 13.63(s, 1H)。LC-MS(m/z)496.0(M+1)。

【0169】

実施例20の化合物を合成するのに使用したのと同一条件下で、化合物6と5-(5-フル

10

20

30

40

50

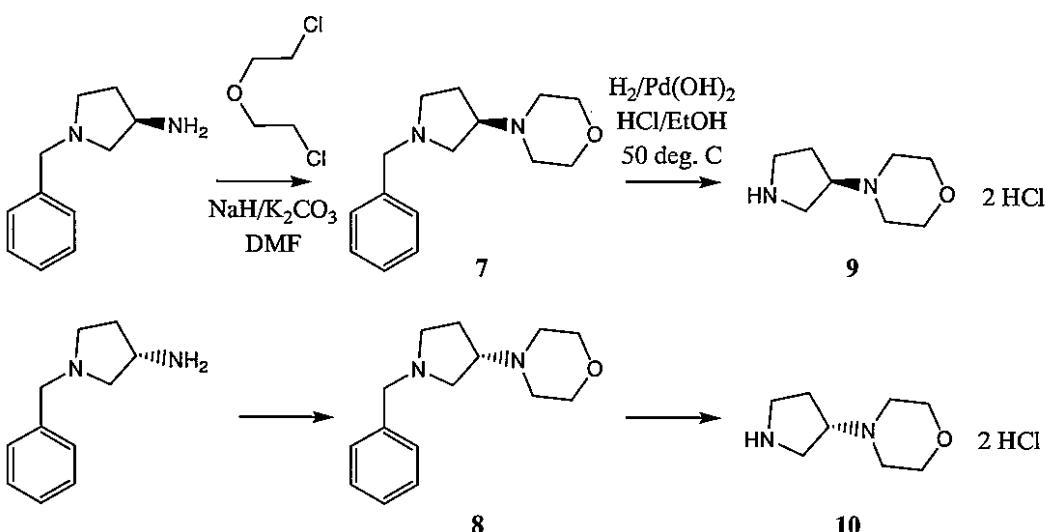
オロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸との反応後、実施例24の化合物(110mg, 76%)をカラムクロマトグラフィー($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = 15/1/0.1$)により精製した。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ 2.27, 2.24(2xs, 6H), 2.35(m, 4H), 2.40(t, $J=3.8\text{Hz}$, 4H), 3.52(t, $J=4.8\text{Hz}$, 8H), 6.83(m, 1H), 6.91(m, 1H), 7.68(s, 1H), 7.72(dd, $J=2.4, 9.6\text{Hz}$, 1H), 10.87(s, 1H), 13.60(s, 1H)。LC-MS(m/z)482.2(M+1)。

【0170】

3. 側鎖9および10の合成

【化20】



CH_3CN (100mL)中の(3R)-(-)-1-ベンジル-ピロリジン-3-イルアミン(10mmol, 1.76g)、ビス(2-クロロエチル)エーテル(11mmol, 1.29mL)、 K_2CO_3 (40mmol, 5.52g)およびNaI(0.4mmol, 60mg)の混合物を N_2 下で36時間、還流下で加熱した。次いでこれをシリカゲル(10g)に吸着させて、蒸発乾涸させた。この固体をシリカゲルカラムに充填し、フラッシュクロマトグラフィー($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}=60/1 \sim 20/1$)にかけた。白色ガム状の(3R)-1-(1-ベンジル-ピロリジン-3-イル)-ピペリジン7が得られた(1.4g, 60%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 1.72(m, 1H), 2.0(m, 1H), 2.37(m, 3H), 2.49(m, 3H), 2.75(m, 1H), 2.86(m, 2H), 3.63, 3.61(2xs, 2H), 3.71(m, 4H), 7.29(m, 5H)。LC-MS(m/z)247(M+1)。

【0171】

化合物7(1.4g, 6.0mmol)を、 H_2 バルーンを備え且つ EtOH (50mL)中の $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (400mg, 炭素上20%)と HCl (1.15mL, H_2O 中35%, 19.5mmol)の混合物を含有するフラスコに滴下添加した。この混合物を50°、 H_2 下で10時間加熱した。固体を濾過し、熱 HOCH_3 (2x10mL)で洗浄した。混合した液体を蒸発乾涸させると、(3R)-1-ピロリジン-3-イル-ピペリジン9のHCl塩(1.4g, 100%)が得られた。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ 1.7(br s, 1H), 2.42(m, 1H), 2.57(m, 1H), 3.31(m, 2H), 3.42(m, 1H), 3.65(m, 3H), 3.73(m, 1H), 3.93(m, 3H), 4.06(br s, 2H), 4.17(m, 1H)。LC-MS(m/z)157(M+2)。

【0172】

同一手順に従って、(3S)-(+)-1-ベンジル-ピロリジン-3-イルアミン(10mmol, 1.76g)から(3S)-1-(1-ベンジル-ピロリジン-3-イル)-ピペリジン9と(3S)-1-ピロリジン-3-イル-ピペリジン10(1.5g, 100%)とを製造した。

【0173】

化合物9： $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ 1.75(m, 1H), 2.01(m, 1H), 2.38(m, 3H), 2.52(m, 3H), 2.74(m, 1H), 2.85(m, 2H), 3.61, 3.62(2xs, 2H), 3.71(m, 4H), 7.30(m, 5H)。LC-MS(m/z)247(M+1)。

10

20

30

40

50

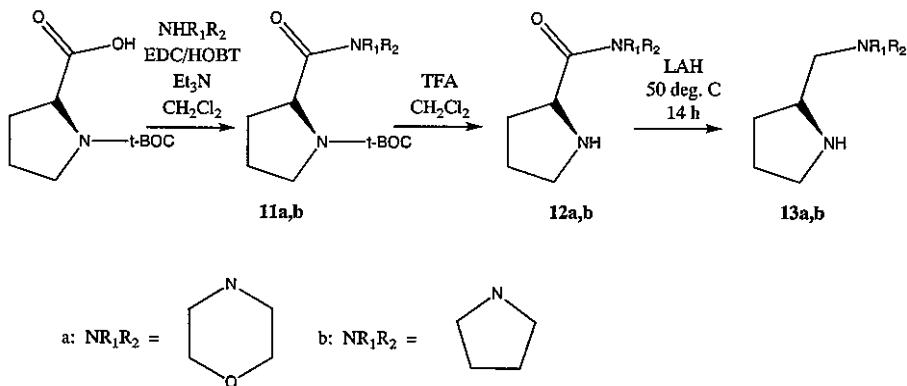
【0174】

化合物10: $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ 1.72(br s, 1H), 2.44(m, 1H), 2.57(m, 1H), 3.35(m, 3H), 3.71(m, 5H), 3.96-4.18(m, 6H)。LC-MS(m/z)157(M+2)。

【0175】

4. 側鎖13a、bの合成

【化21】



(2R)-ピロリジン-1,2-ジカルボン酸1-tert-ブチルエステル(2.15g, 10mmol)を、EDC(2.7g, 15mmol)、HOBt(1.9g, 5mmol)およびEt₃N(2.1mL, 15mmol)の存在下、室温で14時間、CH₂Cl₂(30mL)中のモルホリン(1.3mL, 15mmol)と反応させた。この混合物を蒸発乾涸させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた固体をNaHCO₃水溶液、続いてH₂Oで洗浄してHOBt混入物を除去した後、純粋な化合物(2R)-2-(モルホリン-4-カルボニル)-ピロリジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル11a(1.79g, 63%)が得られた。

【0176】

化合物11a(1.79g, 0.63mmol)を、CH₂Cl₂(5mL)中のTFA(5mL)で室温で2時間、処理した。溶媒を蒸発させると、(2R)-モルホリン-4-イル-ピロリジン-2-イル-メタノンのTFA塩12a(2.89g, 100%)が得られ、これをTHF(50mL)中のLAH(0.85g, 5当量)で50°で12時間還元した。この反応物をH₂O(2.4mL)と10% NaOH(2.4mL)でクエンチした。白色固体Al₂O₃を濾別し、THF(3×10mL)で洗浄した。混合した液体から溶媒を除去した後、透明ガム状生成物(2R)-4-ピロリジン-2-イルメチル-モルホリン13a(1.1g, 95%)が得られた。

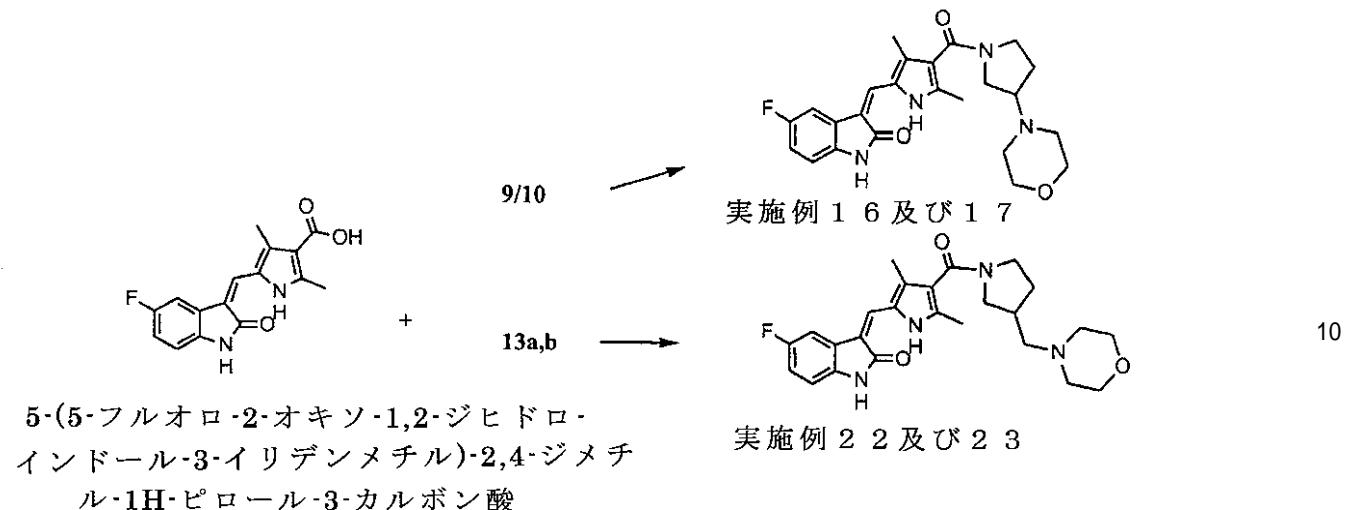
【0177】

同一手順に従って、モルホリンの代わりにピロリジン(1.06g, 15mmol)を使用して、(2R)-ピロリジン-2-イルメチルピロリジン13bを合成した。

【0178】

6. 側鎖9、10および13a、bと5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸の縮合

【化22】



先の条件(実施例21の合成を参照されたい)に従って、5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸を化合物9と縮合すると、実施例16の化合物が得られた(85mg, 65%)。

¹H-NMR(DMSO-d₆) 1.67(m, 1H), 2.0(m, 1H), 2.06, 2.31(2xs, 6H), 2.34(m, 3H), 2.77, 3.01, 3.22, 3.36, 3.65(m, 6H), 3.46(m, 2H), 3.52(m, 2H), 6.75(m, 1H), 6.86(m, 1H), 7.62(s, 1H), 7.66(d, J=9.8Hz, 1H), 10.81(s, 1H), 13.51(s, 1H)。LCMS(m/z)439.0(M+1)。

【0179】

実施例17の化合物(78mg, 60%)は、5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸と化合物10から製造した。

¹H-NMR(CDCl₃-DMSO-d₆) 1.85(m, 1H), 2.26(m, 1H), 2.31, 2.37(2xs, 6H), 2.52(m, 3H), 2.8(m, 1H), 3.18-3.94(m, 6H), 3.68(m, 2H), 3.73(m, 2H), 6.81(m, 2H), 7.17(d, J=8.4Hz, 1H), 7.30(s, 1H), 10.07(s, 1H), 13.54(s, 1H)。LCMS(m/z)439.4(M+1)。

【0180】

実施例22の化合物(80%)は、5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸と化合物13aから製造した。

¹H-NMR(CDCl₃) 2.04(m, 4H), 2.3(m, 3H), 2.41, 2.28(2xs, 6H), 2.77, 2.61(m, 3H), 3.33(m, 1H), 3.53(m, 1H), 3.71(m, 4H), 4.54(m, 1H), 6.82(m, 2H), 7.15(d, J=8.4Hz, 1H), 7.27(s, 1H), 8.51(s, 1H), 13.33(s, 1H)。LC-MS(m/z)453.2(M+1)。

【0181】

実施例23の化合物(77%)は、5-(5-フルオロ-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-インドール-3-イリデンメチル)-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボン酸と化合物13bから製造した。

¹H-NMR(CDCl₃) 1.93, 2.04(m, 7H), 2.41, 2.30(2xs, 6H), 2.76, 2.62(m, 3H), 3.33(m, 1H), 3.53(m, 1H), 3.71(m, 4H), 4.55(m, 1H), 6.82(m, 2H), 7.17(d, J=8.8Hz, 1H), 7.27(m, 2H), 8.15(s, 1H), 13.32(s, 1H)。LC-MS(m/z)453.2(M+1)。

【0182】

生物学的実験PDGFRバイオアッセイ

このアッセイを使用して、ELISAアッセイにおいてFGF1-Rのインビトロキナーゼ活性を分析した。

材料および試薬

1. コーニング96-ウェルElisaプレート。
2. 28D4C10モノクローナル抗PDGFR抗体(SUGEN, Inc.)。

3. PBS。
4. TBST緩衝液。
5. プロッキング緩衝液(EGFRバイオアッセイ用と同じ)。
6. PDGFR- 発現用 NIH 3T3細胞溶解物(SUGEN, Inc.)。
7. TBS緩衝液。
8. TBS+10%DMSO。
9. ATP。
10. MnCl₂。
11. キナーゼ緩衝液リン酸化混合物: 10mI用、10mIとするのに十分量のdH₂O中の、250 μl 1M TRIS、200 μl 5M NaCl、100 μl 1M MnCl₂および50 μl 100mM Triton X-100の混合物。
12. NUNC 96-ウェルV底ポリプロピレンプレート。
13. EDTA。
14. ウサギポリクローナル抗ホスホチロシン血清(SUGEN, Inc.)。
15. ヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼコンジュゲート(Biosourceカタログ番号AL10404)。
16. ABTS。
17. 過酸化水素、30%溶液。
18. ABTS/H₂O₂。
19. 0.2M HCl。

20

【0183】

手順

1. Corning製96ウェルELISAプレートを、ウェル当たり100 μl PBS中の0.5 μg 28D4C10でコーティングし、4℃で一晩貯蔵する。
2. プレートを逆さにしてウェルから未結合28D4C10を除去し、液体を取り除く。dH₂Oで1回洗浄する。ペーパータオル上でプレートを軽くたたいて余分の液体を取り除く。
3. それぞれのウェルにプロッキング緩衝液150 μlを添加する。これを室温で振盪しつつ30分間インキュベートする。
4. プレートを脱イオン水で3回洗浄し、次いでTBSTで1回洗浄する。ペーパータオル上でプレートを軽くたたいて、余分の液体と気泡を除去する。
5. 溶解物をHNTG(10 μg溶解物/100 μl HNTG)で希釈する。
6. 希釈した溶解物100 μlをそれぞれのウェルに添加する。室温で60分間振盪する。
7. 段階4に記載の如く、プレートを洗浄する。
8. 捕捉したPDGFRを含むELISAプレートに、80 μlの作用キナーゼ緩衝液混合物を添加する。
9. 試験化合物を96ウェルポリプロピレンプレート中、TBSで1:10に希釈する。
10. 希釈した試験化合物10 μlをELISAプレートに添加する。対照ウェルには、10 μl TBS+10%DMSOを添加する。室温で振盪させつつ30分間インキュベートする。
11. 10 μlのATPを、負の対照ウェル以外の全てのウェルに直接添加する(最終ウェル溶液は、それぞれのウェル中で20 μMのATPと共に約100 μlとなるべきである)。振盪させつつ30分間インキュベートする。
12. それぞれのウェルにEDTA溶液を10 μl添加して、反応を停止させる。
13. 脱イオン水で4回、TBSTで2回洗浄する。
14. それぞれのウェルに、100 μlの抗ホスホチロシン(TBST中の1:3000希釈液)を添加する。室温で振盪させつつ30~45分間インキュベートする。
15. 段階4と同様に洗浄する。
16. それぞれのウェルに、100 μlのBiosource製ヤギ抗ウサギIgGペルオキシダーゼコンジュゲート(TBST中、1:2000希釈液)を添加する。室温で、振盪させつつ30分間インキュベートする。
17. 段階4と同様に洗浄する。

40

50

18. それぞれのウェルに $100\mu\text{l}$ の ABTS/ H_2O_2 溶液を添加する。
19. 振盪させつつ 10~30 分間インキュベートする。気泡を全て除去する。
20. 必要により、それぞれのウェルに $100\mu\text{l}$ の 0.2M HCl を添加して、反応を停止させる。
21. 410nMにおいてテストフィルター、630nMで参考フィルターのついた Dynatech 製 MR7000 ELISA リーダーでアッセイを読み取る。

【0184】

GST-FLK-1バイオアッセイ

このアッセイは、ポリ(glu、tyr)ペプチドにおける GST-FLk1 のチロシンキナーゼ活性を分析する。

10

材料および試薬

1. Corning 製 96-ウェル ELISA プレート (Corning カタログ番号 5805-96)。
2. ポリ(glu, tyr) 4 : 1、凍結乾燥物 (Sigma カタログ番号 P0275)。
3. ポリ(glu, tyr)(pEY) コーティングアッセイプレートの調製：ポリ(glu, tyr)(pEY) を $100\mu\text{l}$ PBS 中で $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ウェル}$ でコーティングし、室温で 2 時間または 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保持する。プレートを十分に覆って蒸発を防ぐ。
4. PBS 緩衝液：1 L 用、約 900mL の dH₂O で、0.2g KH₂PO₄、1.15g Na₂HPO₄、0.2g KCl と 8 g NaCl を混合する。全ての試薬が溶解したら、HCl で pH を 7.2 に調節する。dH₂O で総容積を 1 L にする。
5. PBST 緩衝液：PBS 緩衝液 1 L に、1.0mL の Tween-20 を添加する。
6. TBB-ブロッキング緩衝液：1 L 用、約 900 mL の dH₂O 中で、1.21g TRIS、8.77g NaCl、1 mL Tween-20 を混合する。HCl で pH を 7.2 に調節する。10g BSA を添加し、攪拌して溶解させる。dH₂O で総容積を 1 L にする。濾過して粒状物を除去する。
7. PBS 中 1% BSA：1 倍の作用溶液を製造するには、10g の BSA を約 990mL の PBS 緩衝液に添加し、攪拌して溶解させる。総溶液を PBS 緩衝液で 1 L に調節し、濾過して粒状物を除去する。
8. 50mM Hepes pH7.5。
9. sf9 組換えバキュロウイルス形質転換から精製した GST-FLk1cd (SUGEN, Inc.)。
10. dH₂O 中 4%DMSO。
11. dH₂O 中 10mM ATP。
12. 40mM MnCl₂。

20

13. キナーゼ希釈緩衝液 (KDB)：10mL Hepes (pH7.5)、1 mL 5M NaCl、40 μL 100mM ナトリウムオルトバナデートと dH₂O 中 5% BSA 0.4mL と 88.56mL dH₂O とを混合する。

14. NUNC 96-ウェル V 底ポリプロピレンプレート、Applied Scientific カタログ番号 AS-72092。

15. EDTA：14.12g エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を混合して約 70mL dH₂O とする。EDTA が溶解するまで 10N の NaOH を添加する。pH を 8.0 に調節する。dH₂O で総容積を 100mL に調節する。

16. 1° 抗体希釈緩衝液：PBS 緩衝液中 5% BSA の 10mL を 89.5mL の TBST と混合する。

17. セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合させた抗ホスホチロシンモノクローナル抗体 (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech)。

18. 2,2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS, Moss, カタログ番号 ABST)。

19. 10% SDS。

40

【0185】

手順

1. 材料および試薬の段階 3 で記載したように、滅菌 PBS 中で Corning 製 96-ウェル ELISA プレートを $2\text{ }\mu\text{g}$ のポリ EY ペプチドでコーティングする。
2. プレートを逆さにして、未結合液体をウェルから除去する。TBST で 1 回洗浄する。ペーパータオル上でプレートを軽くたたいて、余分な液体を除去する。

50

3. それぞれのウェルにPBS中の1%BSA100μlを添加する。室温で振盪させつつ1時間インキュベートする。

4. 段階2を繰り返す。

5. ウェルを50mM HEPES(pH7.5)(150μl/ウェル)で湿らせる。

6. 試験化合物をdH₂O/4%DMSOで、96-ウェルポリプロピレンプレート中の所望の最終濃度の4倍に希釈する。

7. 希釈した試験化合物25μlをELISAプレートに加える。対照ウェルには、dH₂O/4%DMSO 25μlを入れる。

8. それぞれのウェルに4×ATP(2μM)と一緒に40mM MnCl₂25μlを加える。

9. 負の対照ウェルに0.5M EDTA25μlを添加する。

10. GST-F1k1をKDBで0.005μg(5ng)/ウェルに希釈する。

11. それぞれのウェルに希釈した酵素50μlを添加する。

12. 室温で、振盪させつつ15分間インキュベートする。

13. 250mM EDTA(pH8.0)50μlを添加して、反応を停止させる。

14. TBSTで3回洗浄し、ペーパータオル上でプレートを軽くたたいて余分の液体を除去する。

15. ウェル毎に100μlの抗ホスホチロシンHRPコンジュゲート、抗体希釈緩衝液中1:5,000希釈物を添加する。室温で振盪させつつ、90分間インキュベートする。

16. 段階1~4の通りに洗浄する。

17. それぞれのウェルに室温のABTS溶液100μlを添加する。

18. 振盪しながら10~15分間インキュベートする。気泡を全て除去する。

19. それぞれのウェルに10%SDS 20μlを添加して、反応を停止させる。

20. 410nMでテストフィルター、630nMで参照フィルターのついたDynatech製MR7000 ELISAリーダーでアッセイを読み取る。

【0186】

C-KITアッセイ

このアッセイを使用してc-kitリン酸化のレベルを検出する。

M07E(ヒト急性骨髓性白血病)細胞は、0.1%血清中、一晩血清飢餓状態にさせた。細胞を本化合物で予備処理(血清飢餓と同時に)してから、リガンドで刺激した。細胞を250ng/mlのrh-SCFで15分間刺激した。刺激後、細胞を溶解し、抗c-kit抗体で免疫沈降させた。ホスホチロシンと蛋白質レベルをウエスタンプロットティングにより測定した。

【0187】

HUV-EC-Cアッセイ

このアッセイを使用して、全てHUV-EC細胞により自然発現させたPDGF-R、FGF-R、VEGF、aFGFまたはFlk-1/KDRに対する化合物の活性を測定する。

0日目

1. HUV-EC-C細胞(ヒト臍帯血管内皮細胞)(American Type Culture Collection、カタログ番号1730CRL)を洗浄し、トリプシン処理する。組織培養フラスコ約1ml/10cm²で、ダルベッコのリン酸塩緩衝化食塩水(D-PBS、Gibco BRL製、カタログ番号14190-029)で2回洗浄する。非酵素細胞解離溶液(Sigma Chemical Company、カタログ番号C-1544)中、0.05%トリプシン-EDTAでトリプシン処理する。この0.05%トリプシンは、細胞解離溶液中で0.25%トリプシン/1mM EDTA(Gibco、カタログ番号25200-049)を希釈することにより製造する。細胞培地フラスコ約1ml/25~30cm²で、37℃で約5分間、トリプシン処理する。細胞がフラスコから剥がれたら、アッセイ媒質を等容量添加し、50ml滅菌遠心分離管(Fisher Scientific、カタログ番号05-539-6)に移す。

【0188】

2. アッセイ媒質を添加して、50ml滅菌遠心分離管中、約35mlのアッセイ媒質で細胞を洗浄し、約200×gで10分間、遠心分離し、上清を吸引し、35ml D-PBSで再び懸濁させる。D-PBSでさらに2回洗浄を繰り返し、約1mlアッセイ媒質/組織培養フラスコ15cm²で細胞を再び懸濁させる。アッセイ媒質は、F12K媒質(Gibco BRL、カタログ番号21127-014)

10

20

30

40

50

と0.5%熱不活化ウシ胎児血清からなっている。Coulter Counter(登録商標)(Coulter Electronics、Inc.)で細胞を計測し、細胞に媒質を添加して、濃度 $0.8 \sim 1.0 \times 10^5$ 細胞/mlとする。

【0189】

3. 細胞を96-ウェル平底プレートに $100\mu l$ /ウェルまたは $0.8 \sim 1.0 \times 10^4$ 細胞/ウェルで添加し、37℃で~24時間、5%CO₂でインキュベートする。

【0190】

1日目

1. 別の96-ウェルプレートに、2倍の試験化合物滴定液、通常 $50\mu M \sim 0\mu M$ を作成する。上記0日目、段階2に記載の如く、同一アッセイ媒質を使用する。特定のプレートカラムの上部ウェルに対して $200\mu M$ ($4 \times$ 最終ウェル濃度)で試験化合物 $90\mu l$ /ウェルを添加することによって滴定する。このストック試験化合物は、通常DMSO中20mMであるので、この $200\mu M$ 薬剤濃度は2%DMSOを含む。

10

【0191】

アッセイ媒質(F12K+0.5%ウシ胎児血清)中2%DMSOに作成した希釈液を試験化合物の滴定用の希釈剤として使用し、試験化合物を希釈するが、DMSO濃度は一定に保持する。この希釈液を $60\mu l$ /ウェルでカラムの残りのウェルに添加する。カラムの上部ウェルに $200\mu M$ 試験化合物希釈液から $60\mu l \sim 120\mu l$ を取り、カラムの第二のウェル中で $60\mu l$ と混合する。このウェルから $60\mu l$ を取り、カラムの第三のウェルの $60\mu l$ と混合し、二倍の滴定液が完成するまで以下同様にする。次のウェルから最後のウェルを混合するとき、このウェルの $120\mu l$ の $60\mu l$ を取って捨てる。試験化合物を含有しない対照として、DMSO/媒質希釈液 $60\mu l$ を最後のウェルに残す。(1)VEGF(Pepro Tech Inc.製、カタログ番号100-200)、(2)内皮細胞成長因子(ECGF)(酸性線維芽細胞成長因子、またはFGFとしても知られる)(Boehringer Mannheim Biochemica製、カタログ番号1439 600)、または(3)ヒトPDGF B/B(127 6-956、Boehringer Mannheim、ドイツ)用にそれぞれ三つのウェルに十分な滴定した試験化合物を9カラム作る。ECGFはナトリウムヘパリンを含む調製物として入手する。

20

【0192】

2. 試験化合物希釈液 $50\mu l$ /ウェルを、0日目由来の $0.8 \sim 1.0 \times 10^4$ 細胞/ $100\mu l$ /ウェルのHUV-EC-C細胞を含む96-ウェルアッセイプレートに移し、37℃、5%CO₂で~2時間インキュベートする。

30

【0193】

3. $80\mu g/ml$ VEGFを $50\mu l$ /ウェル、 $20ng/ml$ ECGF、または媒質対照を、それぞれの試験化合物条件に三通りに添加する。試験化合物に関しては、成長因子濃度は所望の終濃度の4倍である。0日目の段階2由来のアッセイ媒質を使用して、成長因子の濃度を作成する。37℃、5%CO₂で約24時間インキュベートする。ウェルはそれぞれ $50\mu l$ の試験化合物希釈液、 $50\mu l$ 成長因子または媒質と、 $100\mu l$ 細胞とを含み、これは計算すると全部で $200\mu l$ /ウェルとなる。従って、全てをウェルに添加すると、試験化合物と成長因子の4倍の濃度は1倍になる。

40

【0194】

2日目

1. ³H-チミジン(Amersham、カタログ番号TRK-686)を $1\mu Ci$ /ウェル(RPMI媒質中に製造した $100\mu Ci/ml$ 溶液 $10\mu l$ /ウェル+10%熱不活化ウシ胎児血清)で添加し、37℃、5%CO₂で~24時間インキュベートする。RPMIはGibco BRLから入手し、カタログ番号11875-051である。

40

【0195】

3日目

1. プレートを-20℃で一晩凍結する。

【0196】

4日目

プレートを解凍し、フィルターマット(Wallac、カタログ番号1205-401)上、96-ウェル

50

プレートハーベスター(Tomtec Harvester 96:登録商標)で集め、Wallac Betaplate(商標)液体シンチレーションカウンターでカウントを読む。

【0197】

インビボ動物モデル

異種移植片動物モデル

無胸腺マウス(たとえば、Balb/c、nu/nu)における異種移植片としてヒト腫瘍が成長する能力は、ヒト腫瘍の治療に対する生物学的応答を研究するための有用なインビボモデルとなる。無胸腺マウスへのヒト腫瘍の異種移植が最初に成功して以来(RygaardおよびPovlsen、1969年、*Acta Pathol. Microbial. Scand.* 77巻：758～760頁)、多種多様なヒト腫瘍細胞系(たとえば、乳房、肺、尿生殖器、胃腸管、頭頸部、神経膠芽細胞腫、骨、および悪性黒色腫)をヌードマウスに移植して、うまく成長させてきた。以下のアッセイを使用して、本発明の種々の化合物の活性、特異性および効果を測定することができる。三種類の一般的なタイプのアッセイ：細胞/触媒アッセイ、細胞/生物学的アッセイおよびインビボアッセイは、化合物を評価するのに有用である。細胞/触媒アッセイの目的は、細胞内の公知基質におけるTKのチロシンをリン酸化する能力における化合物の効果を測定することである。細胞/生物学的アッセイの目的は、細胞中でTKにより刺激された生物学的応答の効果を測定することである。インビボアッセイの目的は、癌などの特定の疾患の動物モデルにおける化合物の効果を測定することである。

【0198】

皮下異種移植片実験用の好適な細胞系としては、EGFR、PDGFR、IGF-1Rまたは任意の他の試験キナーゼを過剰発現するように遺伝的に設計されたC6細胞(神経膠腫、ATCC#CCL107)、A375細胞(黒色腫、ATCC#CRL1619)、A431細胞(表皮悪性腫瘍、ATCC#CRL1555)、Calu 6細胞(肺、ATCC#HTB56)、PC3細胞(前立腺、ATCC#CRL1435)、SKOV3TP5細胞およびNIH 3T3線維芽細胞が挙げられる。以下のプロトコルを使用して、異種移植片実験を実施することができる。

【0199】

雌の無胸腺マウス(BALB/c、nu/nu)は、Charles River Laboratories Inc.、(Wilmington、MA)から入手した。全ての動物は、Alpha-dri床敷きを備えたマイクロアイソレーターケージ中、クリーンルーム条件下で管理した。これらの動物は、滅菌した齧歯類用の食事を与え、水は適宜摂取した。

【0200】

細胞系は、適当な媒質[たとえば、MEM、DMEM、Ham's F10、またはHam's F12 + 5%～10%ウシ胎児血清(FBS)および2 mMグルタミン(GLN)]で成長させる。全ての細胞培地媒質、グルタミンおよびウシ胎児血清は、他に記載しない限り、Gibco Life Technologies (Grand Island、NY)から入手した。全ての細胞は、空気90～95%とCO₂ 5～10%の高湿度雰囲気中、37℃で成長させる。全ての細胞系は、1週間に2回定期的に継代培養し、Mycotect法(Gibco)により測定してマイコプラズマに関して陰性であった。

【0201】

細胞を集密またはその付近で0.05%トリプシン-EDTAで集め、450×gで10分間ペレット化した。ペレットを滅菌PBSまたは媒質(PBSを含まない)中に再懸濁させて、特定の濃度とし、この細胞をマウス後側腹部(hindflank)(8～10匹/群、2～10×10⁶細胞/動物)に移植する。腫瘍の成長は、ベニエカリパスを使用して3～6週間にわたって測定する。腫瘍の容積は、他に記載しない限り、長さ×幅×高さの積として計算する。P値は、スチューデントt検定を使用して計算する。50～100 μL賦形剤(DMSO、またはVPD:D5W)中の試験化合物は、移植後1日目から通常出発して、種々の濃度でIP輸液によりデリバリーすることができる。

【0202】

腫瘍侵襲モデル

以下の腫瘍侵襲モデルを開発し、KDR/FLK-1レセプターを選択的に阻害することが同定された化合物の効力および治療上の価値の評価に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0203】

手順

8週齢ヌードマウス(雌)(Simonsen Inc.)を実験動物として使用する。層流フード中で腫瘍細胞の移植を実施することができる。麻酔に関しては、キシラジン/ケタミンカクテル(Xylazine/Ketamine Cocktail)(100mg/kgケタミンおよび5mg/kgキシラジン)を腹膜内投与する。正中線で切開して、腹腔(長さ約1.5cm)を露出させて、100μl媒質容積中、 10^7 腫瘍細胞を注射する。この細胞は、脾臓の十二指腸突出部に、または結腸漿膜下に注射する。腹膜と筋肉を6~0縫連続縫合糸で閉じて、皮膚は創傷クリップで閉じる。動物を毎日観察する。

【0204】

分析

この動物の全体観察に依存して2~6週間後、マウスを犠牲にして、種々の臓器(肺、肝臓、脳、胃、脾臓、心臓、筋肉)への局所腫瘍転移を切除し、分析した(腫瘍サイズ、侵襲等級、免疫化学、インシトゥーハイブリダイゼーション測定などの測定)。

【0205】

アポトーシスアッセイ

M07E細胞は、rh-GM-CSF(10ng/mL)およびrh-IL-3(10ng/mL)と一緒に10%FBS中、+/-SCFおよび+/-化合物で培養した。サンプルを24時間と48時間でアッセイする。活性化カスパー-3を測定するには、サンプルをPBSで洗浄し、氷冷70%エタノールで浸透させる。次いでこの細胞をPE-結合ポリクローナルウサギ抗活性カスパー-3で染色し、FACSで分析する。開裂RARPを測定するには、サンプルを溶解させて、抗RARP抗体でウエスタンプロットすることにより分析する。

【0206】

細胞毒性の測定

治療用化合物は、細胞毒性効果を及ぼすよりもレセプターチロシンキナーゼを阻害する方が強力でなければならない。化合物の有効性および細胞毒性の尺度は、治療指數、すなわちIC₅₀/LD₅₀を測定することによって得ることができる。IC₅₀、50%阻害率を達成するのに必要な用量は、本明細書中に記載のごとき標準的な方法を使用して測定することができる。LD₅₀、50%毒性となる用量も、放出されたLDH量を測定することにより(KorzeniewskiおよびCallewaert、1983年、*J. Immunol. Methods*、64巻：313頁、DeckerおよびLohmann-Matthes、1988年、*J. Immunol. Methods*、115巻：61頁)、または動物モデルにおいて致死量を測定することにより、同様に標準方法(Mossman、1983年、*J. Immunol. Methods*、65巻：55~63頁)によっても測定することができる。治療指數の大きな化合物が好ましい。この治療指數は、2を超えるべきであり、好ましくは少なくとも10であり、より好ましくは少なくとも50である。

【0207】

他のキナーゼに対する本発明の化合物の活性は、当業界で公知のアッセイおよび方法を使用して測定することができる。そのようなアッセイとしては、本明細書中、その開示全体が参照として含まれるPCT国際公開第W001/60814号に記載されている。このアッセイとしては、バイオ-flik-1アッセイ、全細胞におけるEGFレセプター-HER2キメラレセプターアッセイ、バイオ-srcアッセイ、バイオ-lckアッセイおよびrafのリン酸化機能を測定するアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。これらのアッセイのプロトコルは、本明細書中、その全体が参照として含まれる、米国特許第6,130,238号に知見できる。

【0208】

上記本発明を、明確にするためおよび理解する目的のために、説明および例示によって説明してきた。当業者には、付記請求の範囲内で変形および変更を実施し得ることが明らかである。従って、上記記載は説明的なものであって、限定的なものではないことを理解すべきである。かくして、本発明の範囲は、上記記載を参照するだけでなく、そのような請求の範囲に権利が与えられる等価物の全範囲と共に、以下の付記請求の範囲を参照して決定しなければならない。

【 0 2 0 9 】

本出願に引用された全ての特許、特許出願および刊行物は、それぞれの特許、特許出願または刊行物が個別に示されているかのように、同一範囲で全ての目的に関してその全体が参照として含まれる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No PCT/US 02/32354
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D401/14 A61K31/404 C07D403/14 A61P35/00		
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) IPC 7 C07D A61K A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 60814 A (NEMATALILASAAD S ; LI XIAOYUAN (US); LIANG CONGXIN (US); MILLER T0) 23 August 2001 (2001-08-23) examples ---	1-25
Y	SUN ET AL: "Synthesis and Biological Evaluation of 3-Substituted Indolin-2-ones: A novel Class of Tyrosine Kinase Inhibitors That Exhibit Selectivity toward Particular Receptor Tyrosine Kinases" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 41, no. 14, July 1998 (1998-07), pages 2588-2603, XP002122185 ISSN: 0022-2623 page 2596; table 2 ---	1-25 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
17 December 2002	30/12/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lauro, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 02/32354

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 37820 A (SUGEN INC ;SHENOY NARMADA (US); SORASUCHART WARANUSH (US)) 31 May 2001 (2001-05-31) examples -----	1-25
P,Y	WO 02 055517 A (CHU JI YU ;DO STEVEN HUY (US); KOENIG MARCEL (US); LI XIAOYUAN (US)) 18 July 2002 (2002-07-18) claim 1; examples -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 02/32354**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 20-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple Inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/US 02/32354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0160814	A 23-08-2001	AU	3977001 A	27-08-2001
		EP	1255752 A2	13-11-2002
		NO	20023831 A	15-10-2002
		WO	0160814 A2	23-08-2001
		US	2002156292 A1	24-10-2002
WO 0137820	A 31-05-2001	AU	1928501 A	04-06-2001
		EP	1233943 A2	28-08-2002
		WO	0137820 A2	31-05-2001
WO 02055517	A 18-07-2002	WO	02055517 A2	18-07-2002

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 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
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 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 D 403/06	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 D 403/14	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 413/14	C 0 7 D 403/06	
	C 0 7 D 403/14	
	C 0 7 D 413/14	

(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,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100105991

弁理士 田中 玲子

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(72)発明者 マットソン,マシュー

アメリカ合衆国 9 5 0 5 1 カリフォルニア州 サンタ クララ,ベントン ストリート 3 6
6 5 ,アパートメント 8 4

(72)発明者 ヴォジュコフスキー,トマス

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サン フランシスコ,キンポール ウエイ 1 8 0 ,セレーラ ジェノミクス,ケミストリー デパートメント

(72)発明者 リヤン,コンシン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 7 カリフォルニア州 サニーベール,ダブリュ レミントン ドライブ 7 2 9

(72)発明者 タン,ベン,チヨー

アメリカ合衆国 9 4 5 5 6 カリフォルニア州 モラゴ,カミーノ リカルド 8 2 7

(72)発明者 グアン,フィピン

アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州 ウォルサム,ゲートハウス ドライブ 3 5 ,ルーム シー 3 1 2 7

F ターム(参考) 4C063 AA01 AA03 AA05 BB01 BB03 BB04 BB06 CC10 CC12 DD04
DD06 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 BC13 BC21 BC73 GA07 GA08 GA09 MA01
MA04 NA14 ZA36 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB21 ZB26
ZC20 ZC35