

(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2004-528311

(P2004-528311A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int.C1.⁷**CO7C 275/42****A61K 31/17****A61K 31/275****A61P 31/00****A61P 35/00**

F 1

CO7C 275/42

A61K 31/17

A61K 31/275

A61P 31/00

A61P 35/00

テーマコード(参考)

4C206

4H006

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-576193 (P2002-576193)	(71) 出願人	593182956 テリック、インコーポレイテッド TERRAPIN TECHNOLOGY ES, INC.
(86) (22) 出願日	平成14年3月1日 (2002.3.1)	(74) 代理人	1000683526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月8日 (2003.9.8)	(74) 代理人	100103230 弁理士 高山 裕貴
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/006217	(74) 代理人	100087114 弁理士 斎藤 みの里
(87) 國際公開番号	W02002/076930		
(87) 國際公開日	平成14年10月3日 (2002.10.3)		
(31) 優先権主張番号	60/273,988		
(32) 優先日	平成13年3月7日 (2001.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	10/082,802		
(32) 優先日	平成14年2月22日 (2002.2.22)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F a s 媒介アポトーシスの刺激剤としての置換ジアリールウレア

(57) 【要約】

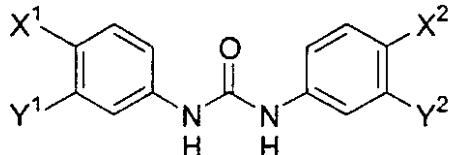
置換ジアリールウレア、それを含む医薬組成物および F a s 媒介アポトーシスを刺激するためのその使用。単一立体異性体または立体異性体混合物としての化合物、医薬的に許容しうる塩およびそれを含む医薬組成物は、自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍の治療方法において有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

【化 1】



10

[式中、X¹ および X² は独立して、-F、-Cl、-Br および -OSO₂R¹ から選ばれる；

Y¹ および Y² は独立して、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および -SO₂R¹R² から選ばれる；および

各 R¹ は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R² は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる]

で示される化合物およびその医薬的に許容しうる塩。

【請求項 2】

X¹ および X² が、同一である請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 3】

Y¹ および Y² が、同一である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

X¹ および X² が独立して、-F および -Cl から選ばれる請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

Y¹ および Y² が独立して、-CN、-NO₂ および -COR¹ から選ばれる請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

1,3-ビス(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレアである請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 7】

請求項 1 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 3 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 4 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 5 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 13】

治療有効量の請求項 1 に記載の化合物を哺乳動物に投与することを含む、Fas 媒介アボトーシスの刺激剤の投与によって治療可能な哺乳動物における疾患の治疗方法。

【請求項 14】

疾患が、自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍から選ばれる請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

慣例の形態の該疾患の療法で哺乳動物を治療することをさらに含む請求項 14 に記載の方法。

40

50

【請求項 16】

慣例の形態の療法が、免疫抑制剤、抗炎症剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤および抗がん性化学療法剤から選ばれる薬物を含む請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

細胞を Fas 媒介アポトーシスを刺激するのに十分な量の請求項1に記載の化合物を接触させることを含む、Fas 受容体を有する細胞における Fas 媒介アポトーシスを刺激する方法。

【請求項 18】

Fas 受容体を刺激することおよび Fas 媒介アポトーシスを刺激することから選ばれる少なくとも1つの機能を有する化合物を同定する方法であって、請求項1に記載の化合物を Fas 結合または Fas 媒介アポトーシスのアッセイに付して第1の結果を記録し、試験化合物を該アッセイに付して第2の結果を記録し、次いで、第1と第2の結果を比較することによって、第1の結果と同様あるいはより良い結果を生み出している試験化合物を、所望の機能を有する化合物として同定することを含む方法。 10

【請求項 19】

アッセイにおいて請求項1に記載の化合物の機能を模倣する標的化合物を同定する方法であって、請求項1に記載の化合物をアッセイに付して第1の結果を記録し、試験化合物を該アッセイに付して第2の結果を記録し、次いで、第1と第2の結果を比較することによって、第1の結果と同様あるいはより良い結果を生み出している試験化合物を、請求項1に記載の化合物の機能を模倣する標的化合物として同定することを含む方法。 20

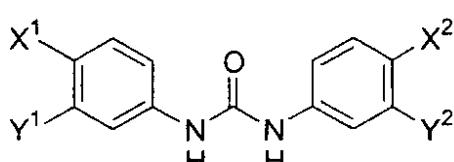
【請求項 20】

バイオアッセイを確認、最適化および標準化する方法であって、請求項1に記載の化合物をバイオアッセイに付し、次いでバイオアッセイにおける化合物の活性によってバイオアッセイを確認、最適化および標準化することを含む方法。

【請求項 21】

Fas 媒介アポトーシスの刺激剤の投与による、治療可能な疾患の治療のための医薬の製造のための式：

【化2】



[式中、X¹ および X² は独立して、-F、-Cl、-Br および -OSO₂R¹ から選ばれる；

Y¹ および Y² は独立して、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および -SO₂R¹R² から選ばれる；および

各 R¹ は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R² は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる] 40

で示される化合物およびその医薬的に許容しうる塩の使用。

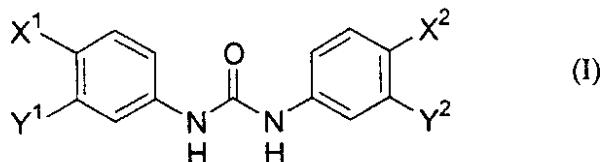
【請求項 22】

疾患が、自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍から選ばれる請求項21に記載の使用。

【請求項 23】

式：

【化3】



[式中、 X^1 および X^2 は独立して、-F、-Cl、-Br および $-OSO_2R^1$ から選ばれる；

10

Y^1 および Y^2 は独立して、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および $-SO_2R^1R^2$ から選ばれる；および

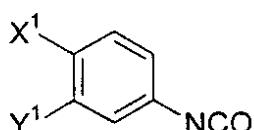
各 R^1 は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R^2 は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる]

で示される化合物およびその医薬的に許容しうる塩の製造方法であって、

(a) 式：

【化4】

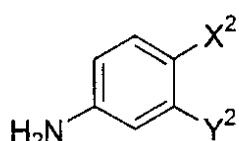


20

[式中、 X^1 および Y^1 は前記と同意義]

で示される化合物を式：

【化5】



30

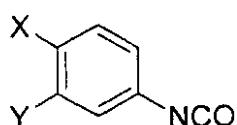
[式中、 X^2 および Y^2 は前記と同意義]

で示される化合物と反応させること

；または

(b) 式：

【化6】



40

[式中、 X は、-F、-Cl、-Br および $-OSO_2R^1$ から選ばれる；

Y は、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および $-SO_2R^1R^2$ から選ばれる；および

各 R^1 は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R^2 は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置

50

換されてもよいアラルキルから選ばれる]

で示される化合物を水の存在下で反応させる；または

(c) 式(I)の化合物を対応する塩基付加または酸付加塩に変換すること；または

(d) 式(I)の化合物の塩を遊離化合物に変換すること；または

(e) 式(I)の化合物の塩を医薬的に許容しうる塩に変換すること；または

(f) 式(I)の化合物の立体異性体の混合物を個々の立体異性体に分割すること；

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

(技術分野)

本発明は、置換ジアリールウレア、それを含む医薬組成物およびFas媒介アポトーシスを刺激するためのその使用に関する。

(従来技術の記載)

APO-1またはCD95としても知られるFas受容体は、種々の細胞タイプにおけるアポトーシス性のプログラム細胞死の重要なイニシエーターであると考えられている。Fasリガンド(FaSL)またはアゴニスト抗体によるFas受容体の活性化は、Fas受容体の凝集および細胞内死亡誘発シグナル複合体(DISC)の補充を導く。たとえば、Kischkelら, EMBO J. 14:5579-5588 (1995)を参照。カスパーゼなどの他の分子の補充、および他の細胞においてbc1-2などの補充もまた起こる。Fasシグナリング複合体の主要機能が、カスパーゼ8プロテアーゼを活性化させることであることが示唆されている。たとえば、Siegelら, J. Allergy Clin. Immunol. 103:729 (1999)を参照。CD4⁺T細胞は、それら自身のFas受容体を刺激することによって自殺を委託する能力において独特である。T細胞もまた、B細胞、マクロファージおよび他の細胞タイプにおいて、FaSLを介してアポトーシスの引き金を引くことができる。これらの相互作用は、免疫系をネガティブに調節するが、肝炎および他の臓器特異的自己免疫疾患における標的組織のFas媒介損傷においてなどの免疫病理の一因となることもできる。Fasは、ヒトの免疫応答において重要な役割を演じ、その臨床的重要性の詳細が、活発に研究されている。改変されたFas受容体または改変されたFaSLは、自己免疫リンパ増殖症候群、自己免疫甲状腺疾患、過好酸性症、ウイルス性肝炎、大腸がん、乳がん、前立腺がん、神経芽腫、神経膠腫および他のがんならびに疾患状態などの自己免疫、感染および悪性腫瘍の一因となると考えられる。たとえば、Houghton, J. Curr. Opin. Oncol. 11:475 (1999)およびSiegelら, J. Allergy Clin. Immunol. 103:729 (1999)を参照。

【0002】

文献に引用されている数多くのジアリールウレアがあるが、ハロゲンで置換されたジアリールウレアの数は限定されている。特定のジアリールウレアが、p38キナーゼインヒビター(WO 99/32463, WO 99/00357)、rafキナーゼインヒビター(WO 99/32436)および5-HT受容体アンタゴニスト(WO 98/50346)として有用であると報告されている。

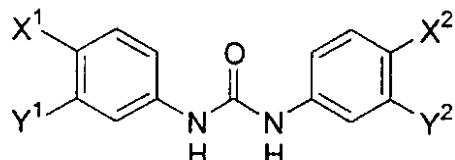
本明細書中および本出願におけるその他の箇所に引用した文献は、全体を参考文献として援用される。

【発明の概要】

【0003】

本発明の第1の態様は、式：

【化1】



10

20

30

40

40

50

[式中、 X^1 および X^2 は独立して、-F、-Cl、-Br および $-OSO_2R^1$ から選ばれる；

Y^1 および Y^2 は独立して、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および $-SO_2R^1R^2$ から選ばれる；および

各 R^1 は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R^2 は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる]

で示される化合物およびその医薬的に許容しうる塩である。

【0004】

本発明の第2の態様は、本発明の第1の態様の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物である。

本発明の第3の態様は、Fas媒介アポトーシスの刺激剤を投与することによる、すなわち、治療有効量の本発明の第1の態様の化合物または本発明の第2の態様の組成物を哺乳動物に投与することによる、治療可能な哺乳動物における疾患の治疗方法である。本発明の第1の態様の化合物は、Fas媒介アポトーシスを刺激し、Fas受容体を含む細胞を細胞死に至らしめ、免疫系および免疫応答、細胞増殖および悪性腫瘍の調節に有用である。このような治療に適した疾患は、自己免疫リンパ増殖症候群、自己免疫甲状腺疾患、過好酸性症、ウイルス性肝炎、大腸がん、乳がん、前立腺がん、神経芽腫、神経膠腫および他のがんならびに疾患などの自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍である。またこの態様は、Fas媒介アポトーシスの刺激剤の投与による、治療可能な哺乳動物における疾患の治療のための医薬の製造における本発明の第1の態様の化合物の使用を含む。

【0005】

本発明の第4の態様は、細胞をFas媒介アポトーシスを刺激するのに十分な量の本発明の第1の態様の化合物に接触させることによる、Fas受容体を有する細胞におけるFas媒介アポトーシスの刺激方法を提供する。インビオでは、細胞を本発明化合物に接触させるステップは、細胞を有する動物に有効量の化合物を投与することによって達成される。インビトロでは、細胞を本発明化合物に接触させるステップは、細胞または細胞を浸している溶液に有効量の化合物を投与することによって達成される。

本発明の第5の態様は、本発明の第1の態様の化合物の製造方法である。

【発明の詳細な記載】

【0006】

(a) 定義および一般的パラメーター

「アルキル」は、直鎖、分枝鎖または環式であってよいC₁ - C₁₀ の一価のヒドロカルビルを意味し、たとえば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、シクロペンチル、シクロプロピルメチル、シクロヘキシルおよびシクロヘキシルメチルが挙げられる。C₁ - C₆ アルキルが好ましい。

「置換アルキル」は、3個までのハロゲン原子および/または-CN、-NO₂、-OR、-SR、-COR、-OC(O)R、-C(O)OR、-NR₂、-SO₂OR、-OSO₂R、-SO₂NR₂、-NRSO₂R、-CONR₂ または-NRCOR (ここで、各Rは独立して、水素、R'-置換されてもよいアルキル、R'-置換されてもよいアリール、ヘテロアリール、R'-置換されてもよいアラルキルまたはヘテロアラルキルであり、各R'は独立して、ハロ、-CN、-NO₂、-OH、C₁ - ₃ アルキル、C₁ - ₃ アルコキシ、-SHまたは-NH₂ である) から選ばれる置換基で置換されたアルキルである。好ましい置換アルキルは、3個までのハロゲン原子および/または-CN、-NO₂、-OH、C₁ - ₃ アルコキシ、-SHおよび-NH₂ から選ばれる置換基の1つで置換されたアルキルであり、置換基が-CF₃ であるのが特に好ましい。

【0007】

「アリール」は、6 ~ 20個の環炭素原子を含み、単環(フェニル)または縮合多環、好

10

20

30

40

50

ましくは縮合二環（たとえば、ナフチル）、あるいは連結多環、好ましくは連結二環（たとえば、ビフェニル）である基を意味する。アリール基は、好ましくはC₆ - C₁₋₆、さらに好ましくはC₆ - C₁₋₄である。アリールがフェニルであるのが特に好ましい。

「置換アリール」は、ハロ、-CN、-NO₂、-OR、ハロ-置換されてもよいC₁₋₃アルキル、ハロ-置換されてもよいC₁₋₃アルコキシ、-SR、-COR、-OC(O)R、-C(O)OR、-NR₂、-SO₂OR、-OSO₂R、-SO₂NR₂、-NRSO₂R、-CONR₂または-NRCOR（ここで、各Rは独立して、水素またはR'-置換されてもよいアルキルであり、各R'は独立して、ハロ、-CN、-NO₂、-OH、C₁₋₃アルキル、C₁₋₃アルコキシ、-SHまたは-NH₂である）から選ばれる3個までの置換基で置換されたアリールである。好ましい置換アリールは、3個までのハロ、-CN、-NO₂、-OH、ハロ-置換されてもよいC₁₋₃アルキル、ハロ-置換されてもよいC₁₋₃アルコキシ、-SHおよび-NH₂から選ばれる3個までの置換基で置換されたアルキルであり、置換アリールが置換フェニルであるのが特に好ましい。

【0008】

「アラルキル」は、アリールで置換されたアルキルを意味する。好ましいアラルキルはベンジルおよびフェネチルである。

「置換アラルキル」は、アリールもしくはアルキル、または両方が、上記置換アリールおよび置換アルキルで述べた仕方と同様にして置換されたアラルキルである。

【0009】

「ヘテロアリール」は、6～20個の原子を含み、そのうちの1～3個の環原子が、O、S、NまたはNR（ここで、RはHまたはC₁₋₃アルキルである）で置換される単環式または縮合二環式芳香族ヒドロカルビルを意味する。好ましいヘテロアリールは、5または6個の環原子を含む単環式基であり、フリル、チエニル、ピロリル、オキサゾリル、イミダゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニルなどである。

【0009】

「医薬的に許容しうる塩」は、「化合物」と題するセクションにおいて記載する。 「治療有効量」は、疾患を処置するために哺乳動物へ投与する場合、その疾患に対するそのような治療を達成するのに十分である量を意味する。

哺乳類において疾患を「治療すること」または疾患の「治療」には、以下のものが含まれる：

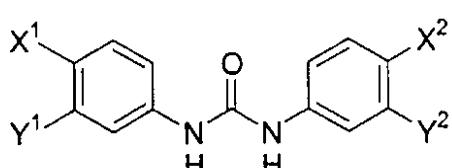
- (1) その疾患になりやすいが、まだその疾患を経験していないかまたはその疾患の症状が表れていない哺乳動物において、その疾患の発生を予防すること；
- (2) その疾患を阻害すること、すなわち、その疾患の進行を制止すること；
- (3) その疾患の症状を軽減すること、すなわち、その疾患の影響を減少させること；および
- (4) その疾患の後退をもたらすこと。

【0010】

(b) 化合物

第1の態様において、本発明は、式：

【化2】



[式中、X¹およびX²は独立して、-F、-Cl、-Brおよび-OSO₂R¹から選ばれる；

10

20

30

40

50

Y^1 および Y^2 は独立して、-CN、-NO₂、-COR¹、-CONR¹R²、-SO₂R¹ および -SO₂R¹R² から選ばれる；および

各 R¹ は独立して、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる；

各 R² は独立して、H、置換されてもよいアルキル、置換されてもよいアリールおよび置換されてもよいアラルキルから選ばれる]

で示される化合物およびその医薬的に許容しうる塩である。

【0011】

好みしい種類の化合物の例は、1つまたはそれ以上の以下の条件が当てはまる場合である：

- (1) X¹ および X² が独立して、-F または -Cl；
- (2) Y¹ および Y² が独立して、-CN、-NO₂ または -COR¹；
- (3) X¹ および X² が同じ；または
- (4) Y¹ および Y² が同じ。

【0012】

より好みしい種類の化合物の例は、1つまたはそれ以上の以下の条件が当てはまる場合である：

- (1) X¹ および X² の両方が -F または両方が -Cl；または
- (2) Y¹ および Y² の両方が -NO₂ または両方が -CN。

特に好みしい化合物は、X¹ および X² が -Cl であり、Y¹ および Y² が -NO₂ である化合物、すなわち、1,3-ビス(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレアである。

これらの化合物の合成および説明は、実施例において概説する。

【0013】

特定の本発明化合物は、1つまたはそれ以上のキラル中心を含んでいてもよい。そのような場合、すべての立体異性体もまた本発明の範囲に含まれる。本発明の化合物には、個々に単離された立体異性体ならびにそのような立体異性体の混合物が含まれる。

本発明化合物の医薬的に許容しうる塩、カチオンおよびアニオンもまた本発明に含まれ、本明細書に記載する方法および医薬組成物において有用である。

【0014】

医薬的に許容しうる塩には、存在する酸性プロトンが無機または有機の塩基と反応することができるときに形成しうる塩が含まれる。典型的には、親化合物を、過剰のアルカリ試薬、たとえば適当なカチオンを含む、水酸化物、カーボネートまたはアルコキシドなどで処理する。Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ および NH₄⁺などのカチオンが、医薬的に許容しうる塩に存在するカチオンの例である。Na⁺ 塩は特に有用である。したがって、許容しうる無機塩基には、水酸化アルミニウム、水酸化カルシウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウムおよび水酸化ナトリウムが含まれる。塩は、第1級、第2級および第3級アミン、天然に存在する置換アミンなどの置換アミンおよびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、2-ジメチルアミノエタノール、トロメタミン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、N-アルキルグルカミン、テオブロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N-エチルピペリジンなどの環式アミンの塩などの有機塩基を用いて調製することもできる。

【0015】

本発明化合物が、塩基性基を含んでいるならば、酸付加塩を調製することができる。その化合物の酸付加塩は、適当な溶媒中、親化合物と、過剰量の酸、たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸（硫酸塩および重硫酸塩を生じる）、硝酸、リン酸など、有機酸、たとえば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、ヘキサン酸、ヘ

ブタン酸、シクロペンタンプロピオン酸、乳酸、o-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、ショウノウスルホン酸、4-メチル-ビシクロ[2.2.2]オクタン-2-エン-1-カルボン酸、グルコヘプタン酸、グルコン酸、4,4'-メチレンビス(3-ヒドロキシ-2-ナフトエ)酸、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、t-ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルクロン酸、グルタミン酸、3-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ステアリン酸、ムコン酸などから、標準的な方法で調製する。

本発明のある特定の化合物は分子内塩または両性イオンを形成する。

【0016】

(c) 医薬組成物

本発明の第2の態様は、本発明の第1の態様の化合物および医薬的に許容しうる賦形剤を含む医薬組成物である。

本発明の医薬組成物は、有効成分として、好ましい本発明の第1の態様の化合物を含むのが好ましい。しかし、本発明化合物のいずれかを含む医薬組成物を意図するものである。本発明の医薬組成物は、医薬的に許容しうる賦形剤も含む。

【0017】

本発明組成物は、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、髄膜下、脳室内、経粘膜または経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、舌下、直腸内あるいは座剤などの他の体腔からなどの数多くの経路によって局所的投与することができ、または経口で投与することができるが、これらに限定されるものではない。投与は、急性であってもよく、経口投与時放出カプセルなどの制御放出、遅延放出もしくは持続性放出システムまたは他のデリバリー手段、投薬量の相対的一定レベルが維持されるようなデボ投与、留置カテーテル、経皮薬物デリバリー・パッチもしくは皮下インプラントを介する慢性投与などによるものでもよい。US 3,710,795を参照。

【0018】

製剤は、水性、油性、エマルジョンであってよく、あるいは投与様式に適した溶媒を含むことができ、必要に応じて、リポソーム製剤、粘膜を通して薬物を投与するように設計された製剤または経皮製剤であってもよい。これらのそれぞれおよび本出願において述べた他の投与方法に適した製剤は、たとえば、Gennaro編、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」, 20th ed., 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia PAに見出すことができる。

【0019】

意図する投与様式に応じて、医薬組成物は、たとえば、錠剤、座剤、丸剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁液剤、クリーム剤、軟膏、ローションなどの固形、半固体または液体投与剤形の形態をとることができ、正確な用量の一回投与に適した単位投与剤形であるのが好ましい。有効量の有効成分に加えて、組成物は、医薬的に使用しうる調製品への有効化合物の加工を促進する適当な医薬的に許容しうる賦形剤および助剤を含むことができる。本明細書で用いる用語「医薬的に許容しうる賦形剤」は、有効成分の生物活性の有効性を妨げず、投与される宿主に対する毒性がない賦形剤または賦形剤の混合物を意味する。

【0020】

さらに、医薬組成物は、他の医薬的作用剤、アジュバント、希釈剤、緩衝剤などを含むことができる。したがって、化合物は、経口、非経口、経皮、経直腸、鼻腔内、バッカル、局所投与することができ、あるいは慣例の非毒性医薬的に許容しうる担体、アジュバントおよびビヒクルを含む投与製剤としてインプラントリザーバーを介して投与してもよい。本明細書で用いる用語「非経口」は、皮下、静脈内および筋肉内注射を含むことを意図している。

【0021】

固形組成物については、慣例の非毒性固形担体として、たとえば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、

10

20

30

40

50

タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。液体の薬理学的に投与可能な組成物は、たとえば、本明細書に記載した有効成分および任意の医薬的アジュvantを水、生理的食塩水、水性デキストロース、グリセロールなどの賦形剤に溶解、分散して、溶液または懸濁液を形成することなどによって調製することができる。要すれば、投与されるべき医薬組成物は、酢酸ナトリウム、モノラウリル酸ソルビタン、酢酸ナトリウムトリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミンなどの湿潤または乳化剤、pH緩衝剤などの少量の非毒性助剤物質も含んでもよい。

【0022】

経口投与には、組成物は、一般に錠剤またはカプセル剤の形態をとるが、あるいは水性または非水性溶液、懸濁液またはシロップであってもよい。錠剤およびカプセル剤が、好ましい経口投与剤形である。経口用の錠剤およびカプセル剤は、一般に、ラクトースおよびコーンスタークなどの1種またはそれ以上の通例用いられる担体を含む。ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤も一般的に加えられる。液状の懸濁液を用いる場合、有効成分を乳化剤および懸濁化剤と合わせることができる。要すれば、香味剤、着色剤および/または甘味料も加えることができる。経口製剤に配合するための他の任意の成分として、保存剤、懸濁化剤、増粘剤などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0023】

非経口投与を用いる場合は、一般に、注射を特徴とする。注射用製剤は、溶液剤または懸濁液剤のいずれか、注射を行う前に液体に可溶化または懸濁するのに適した固形形態、またはエマルジョンなどの慣例の形体で製造することができる。好ましくは、適当な担体、分散または湿潤剤および懸濁化剤を用いる当業界で公知の技術にしたがって、滅菌注射用懸濁液として製剤する。滅菌注射用製剤は、滅菌注射用溶液剤または非毒性の非経口的に許容しうる希釈剤または溶媒中の懸濁液であってもよい。使用することができる該許容しうるビヒクルおよび溶媒は、水、リンゲル液、および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、滅菌不揮発性油、脂肪エステルまたはポリオールが、従来、溶媒または懸濁媒体として用いられる。

【0024】

また本発明化合物は、慣例の経皮ドラッグデリバリーシステム、すなわち、通常、皮膚に貼られるドラッグデリバリーデバイスとして働く積層構造内に作用剤を含有する経皮“パッチ”を用いて、皮膚を通してデリバリーされる。このような構造では、医薬組成物は、通常、上部基材層の下にある1つの層または「リザーバー」内に含まれる。積層デバイスは、単一のリザーバーを含んでもよく、あるいは複数のリザーバーを含んでもよい。1つの具体例において、リザーバーは、ドラッグデリバリー中に皮膚にシステムを貼りつけるように働く医薬的に許容しうるコンタクト接着物質ポリマーマトリックスからなる。適当な皮膚コンタクト接着物質の例として、ポリエチレン、ポリシロキサン、ポリイソブチレン、ポリアクリレート、ポリウレタンなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。あるいは、薬物含有リザーバーおよび皮膚コンタクト接着剤は、接着剤がリザーバーの下にある、分離した別の層として存在してもよく、この場合、リザーバーは、上述のポリマーマトリックスであるか、または液体もしくはヒドロゲルリザーバーであるか、またはその他の形態であるかのいずれかであってよい。

【0025】

別法として、本発明医薬組成物を直腸投与用の座剤の形態で投与してもよい。これらは、作用剤を室温では固体であるが、直腸温度では液体であり、したがって、直腸で融けて薬物を放出する適当な非刺激性賦形剤と混合することによって調製することができる。

本発明医薬組成物は、鼻腔エアロゾルまたは吸入によって投与することもできる。このような組成物は、医薬品製造業界で周知の技術を用いて調製され、ベンジルアルコールまたは他の適当な保存剤、バイオアベイラビリティを増強するための吸収促進剤、フルオロカーボンまたは窒素などの噴霧剤および/または慣例の可溶化もしくは分散剤を用いて生理的食塩水中の溶液剤として製造することができる。

【0026】

10

20

30

40

50

局所ドラッグデリバリー用の好ましい製剤は、軟膏およびクリーム剤である。軟膏は、通常、ワセリンまたは他の石油誘導体を基剤とする半固体製剤である。選択された活性剤を含有するクリーム剤は、水中油型または油中水型のいずれかの当業界で公知の粘稠な液体または半固体エマルジョンである。クリーム基剤は、水洗可能であり、油相、乳化剤および水相を含む。油相は「内部」相と呼ばれることもあり、一般に、ワセリンおよびセチルもしくはステアリルアルコールなどの脂肪アルコールを含む；水相は、通常、必須ではないが、体積において油相より多く、一般に保湿剤を含む。クリーム製剤中の乳化剤は、一般に、非イオン性、アニオン性、カチオン性または両性界面活性剤である。用いられる特定の軟膏またはクリーム基剤は、当業者に公知であるが、最適のドラッグデリバリーを提供するものである。他の担体またはビヒクルに関して、軟膏基剤は、不活性で、安定な、10 非刺激性、非感作性でなければならない。

【 0 0 2 7 】

バッカル投与用製剤として、錠剤、ロゼンジ、ゲルなどが挙げられる。あるいは、バッカル投与は、当業者に公知の経粘膜デリバリーシステムを用いて行うこともできる。

【 0 0 2 8 】

本発明医薬組成物は、非経口投与用の溶液剤または凍結乾燥散剤として製剤化することができる。散剤は使用前に適当な希釈剤または他の医薬的に許容される担体を加えることによって再組成することができる。液状製剤は一般に、緩衝化された等張性水溶液である。適当な希釈剤の例は、正常等張性塩類溶液、水中の 5 % デキストロースまたは緩衝化酢酸ナトリウムまたは酢酸アンモニウム溶液である。このような製剤は非経口投与用に特に適当であるが、経口投与用に用いることもできる。賦形剤、例えばポリビニルピロリジノン、ゼラチン、ヒドロキシセルロース、アカシア、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を加えるのが望ましいこともある。別法では、これらの化合物を、経口投与用にカプセル化、錠剤化、あるいはエマルジョンまたはシロップ中で調製することができる。医薬的に許容しうる固体または液状担体を加えて、組成物を強めるか、あるいは安定化するか、あるいは組成物の調製を容易にすることができる。液状担体には、シロップ、ラッカセイ油、オリーブ油、グリセリン、塩類溶液、アルコールおよび水が含まれる。固体担体には、デンプン、ラクトース、硫酸カルシウム、ジヒドレート、白土、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、アカシア、寒天またはゼラチンが含まれる。担体にはまた、持続放出物質、例えば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で、あるいはワックスとともに含ませてもよい。固体担体の量は変化するが、好ましくは約 20 mg ~ 約 1 g / 用量単位の範囲であろう。医薬調製物は、錠剤用には、必要な場合に、粉碎、混合、顆粒化、および圧縮を含み；硬ゼラチンカプセル剤用には粉碎、混合、および充填を含む製薬業における慣用技術にしたがって作成する。液状担体を用いる場合、調製物はシロップ、エリキシル、エマルジョン、または水性または非水性懸濁剤の剤型であろう。このような液状製剤を直接経口投与するか、あるいは軟ゼラチンカプセルに充填することができる。30

【 0 0 2 9 】

医薬製剤は、さらに、本発明化合物に加えて、1つまたはそれ以上の薬理学的活性剤を含んでもよい。これらの追加の活性剤は、通常、自己免疫、感染症および悪性腫瘍を予防するか、または本発明化合物によるこのような障害の治療を強化するのに有用である。40

適当な医薬組成物の特定の例をいくつか、後記の実施例に記載する。

典型的には、本発明の医薬組成物を、自己免疫リンパ増殖症候群、自己免疫甲状腺疾患、過好酸性症、ウイルス性肝炎、大腸がん、乳がん、前立腺がん、神経芽腫、神経膠腫または他のがんもしくは他の疾患などの自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍の治療における医薬組成物の用途を示すラベルもしくは指示書またはその両方を有する容器内にパッケージングする。

【 0 0 3 0 】

(c) 本発明方法および本発明化合物の使用

本発明化合物は、後記実施例において説明するように、Fas 媒介アポトーシスを刺激す50

るのに有用である。Fas媒介アポトーシスの刺激は、たとえば、自己免疫、感染または悪性腫瘍を有する患者の治療および管理に有用である。本発明化合物の使用のさらに詳しい例として、自己免疫リンパ増殖症候群、自己免疫甲状腺疾患、過好酸性症、ウイルス性肝炎、大腸がん、乳がん、前立腺がん、神経芽腫、神経膠腫および他のがんおよび他の疾患の治療が挙げられる。

【0031】

したがって、本発明の第3の態様は、治療有効量の本発明化合物またはその医薬組成物を哺乳動物に投与することによる、哺乳動物、好ましくはヒトにおける自己免疫疾患の治疗方法である。要すれば、該方法は、さらに、慣例の免疫抑制剤の投与などの慣例の治療形態で自己免疫疾患について哺乳動物を治療することを含む。別法として、抗炎症剤または慢性関節リウマチなどのこのような自己免疫疾患の症状に対する他の慣例の治療と併用して本発明化合物を哺乳動物に投与してもよい。個々の薬物それぞれの量はそれ自体、最適下限であるが、哺乳動物に投与される薬物の組合せの総量は、治療有効量でなければならない。

【0032】

本発明の第3の態様は、治療有効量の本発明化合物またはその医薬組成物を哺乳動物に投与することによる、哺乳動物、好ましくはヒトにおける感染の治疗方法である。要すれば、該方法は、さらに、慣例の形態の感染に対する療法で哺乳動物を治療することを含む。たとえば、該哺乳動物に、抗ウイルス剤、抗菌剤または抗真菌剤を投与することもできる。個々の薬物それぞれの量はそれ自体、最適下限であるが、哺乳動物に投与される薬物の組合せの総量は、治療有効量でなければならない。

【0033】

本発明の第3の態様は、治療有効量の本発明化合物またはその医薬組成物を哺乳動物に投与することによる、哺乳動物、好ましくはヒトにおける悪性腫瘍の治疗方法である。この場合も、他の本発明治療方法と同様に、さらに、抗がん性化学療法剤を哺乳動物に投与することなどの慣例の形態の悪性腫瘍に対する療法で哺乳動物を治療することを含む。個々の薬物それぞれの量はそれ自体、最適下限であるが、哺乳動物に投与される薬物の組合せの総量は、治療有効量でなければならない。

【0034】

したがって、本発明化合物またはその医薬組成物は、治療有効量の選ばれた化合物を、好ましくは医薬的担体に分散して投与することによって、そのような治療を必要とする哺乳動物におけるFas媒介アポトーシスを刺激するのに用いることができる。本発明化合物の治療有効量は、0.01～1000mg/kg、好ましくは0.01～100mg/kg、より好ましくは1～30mg/kgの範囲であるが、適当な用量は、当業者であれば、投与経路、患者の年齢および状態に応じて容易に決定できる。急性または慢性疾患に対して、これらの用量単位を1日当たり1～10回投与することができる。本発明化合物を本発明にしたがって投与する場合、許容できない毒性作用は予期されない。

【0035】

本発明の別の態様では、Fas受容体を有する細胞をFas媒介アポトーシスを刺激するのに十分な量の本発明化合物に接触させることによって、Fas媒介アポトーシスを刺激する。このような場合、接触は、インビボでは、細胞を有する動物に本発明化合物またはその医薬組成物を投与することによって達成される；インビトロでは、細胞が存在する容器または細胞を浸している溶液に本発明化合物またはその医薬組成物投与することによって達成される。

【0036】

本発明化合物は、Fas媒介アポトーシスを刺激することが実証されており、自己免疫、感染および悪性腫瘍の治療に用いることができる。同様に、Fas媒介アポトーシスにおいて同じ効果を示す他の化合物は、自己免疫、感染および悪性腫瘍の治療に用いることができる。本出願に開示する化合物は、Fas媒介アポトーシスを刺激するように作用する他の新規な作用剤を発見するためのモデルとして使用することができる。新規な治療薬を

発見するためにこれらの化合物を利用しうるプロセスにおけるステップは、次のようにして達成することができる：化合物を用いて、Fas媒介アポトーシスを刺激する、およびFas受容体における作用によってFas媒介アポトーシスを刺激する他の化合物の発見に必要なアッセイを確認、最適化および標準化することができる。これらの化合物は、アッセイにおいて：

1. Fas受容体を活性化／刺激する；
2. Fas受容体をブロックする；
3. Fas媒介アポトーシスを刺激する；
4. 細胞増殖のFas媒介調節に影響を及ぼす；
5. 免疫応答のFas媒介調節に影響を及ぼす；および／または
6. 感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；

改良された活性を示す他の作用剤を発見するための判断基準として利用することができる。

【0037】

アッセイにおいて、Fas受容体を活性化／刺激する；Fas受容体をブロックする；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；改良された活性を示す作用剤を発見する方法は、複数の濃度の本発明化合物の存在下におけるFas媒介アポトーシスについてのアッセイの結果を得ること、複数の濃度の試験化合物の存在下におけるアッセイの結果を得ること、アッセイの結果を比較すること、および、試験化合物を、アッセイにおいて得られた結果が本発明化合物で得られた結果と比べて改良された、アッセイにおいて、Fas受容体との相互作用を測定または検出する；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；改良された活性を示す作用剤として同定すること、というステップを含む。

【0038】

アルゴリズムを用いて、例示化合物および他の試験化合物などの化合物の構造または化学的特性を比較することができる。アルゴリズムを用いて、試験化合物のライブラリー内で構造または化学的特性を一致させることもできる。この方法で、例示化合物または試験化合物が、特定の構造、特性または興味の対象となる活性をもつことがわかっている場合、化合物を利用して、このような構造、特性または活性をもつ他の化合物または作用剤を発見することができる。たとえば、興味の対象となる活性は、バイオアッセイにおける望ましい活性である。このようなアルゴリズムは公知である：たとえば、米国特許5,567,317および米国特許5,587,293には、標的部または受容体との候補化合物の反応性の決定方法が記載されている。標的受容体との式から予測される反応性は、特定の特性に関して系統的に異なる受容体の対象セットまたは化合物のパネルから得られる。この方法で試験される化合物は、対象受容体、適用された式に関して物理学的に評価することができ、実際の標的受容体との期待する反応性を予測することができる。米国特許5,587,293の方法は、受容体の物理的存在を必要としない。

【0039】

構造または化学的特性を比較する、および／または試験化合物ライブラリー内で構造または化学的特性を一致させるこのようなアルゴリズムの使用は、バイオアッセイにおいて活性を示す作用剤を発見するのに有効である。このようなバイオアッセイとして、Fas受容体との相互作用、Fas受容体のブロック、Fas媒介アポトーシス、Fas媒介アポトーシスの活性化、Fas媒介アポトーシスの刺激、および細胞増殖のFas媒介調節、免疫応答のFas媒介調節および感染のFas媒介調節における効果を検出および測定するためのバイオアッセイが挙げられる。

【0040】

さらに、構造または化学的特性を比較する、および／または試験化合物ライブラリー内で構造または化学的特性を一致させるアルゴリズムと組み合わせる場合、これらの化合物を利用して、バイオアッセイにおいて、

10

20

30

40

50

1. Fas受容体を活性化／刺激する；
 2. Fas受容体をブロックする；
 3. Fas媒介アポトーシスを刺激する；
 4. 細胞増殖のFas媒介調節に影響を及ぼす；
 5. 免疫応答のFas媒介調節に影響を及ぼす；および／または
 6. 感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；
- 活性を示す化合物を発見することができる。

【0041】

バイオアッセイにおいて、Fas受容体を活性化／刺激する；Fas受容体をブロックする；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；活性を示す化合物を発見する方法は、試験化合物ライブラリー内の化学構造または化学的特性を本発明化合物の化学構造または化学的特性と比較するためにアルゴリズムを適用すること、およびバイオアッセイにおいて、Fas受容体を活性化／刺激する；Fas受容体をブロックする；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；活性を示す作用剤として、本発明化合物と類似した化学構造または化学的特性をもつことがアルゴリズムによって決定された試験化合物を同定すること、を含む。

10

【0042】

また、アルゴリズムを用いて、分子間相互作用をモデリングするために構造を比較する、および／または構造を一致させることができる。このようなアルゴリズムは公知である；たとえば、米国特許5,567,317および米国特許5,587,293の方法を用いて、分子間相互作用をモデリングするために構造を比較する、および／または構造を一致させることができる。

20

このようなアルゴリズムの使用は、Fas受容体との相互作用、Fas受容体のブロック、Fas媒介アポトーシス、Fas媒介アポトーシスの活性化、Fas媒介アポトーシスの刺激、および細胞増殖のFas媒介調節、免疫応答のFas媒介調節および感染のFas媒介調節における効果を検出および測定するためのバイオアッセイなどのバイオアッセイにおいて活性を示す作用剤を発見するのに有効である。

【0043】

さらに、分子間相互作用をモデリングするために、構造を比較する、および／または構造を一致させるアルゴリズムと組み合わせる場合、これらの化合物を利用して、バイオアッセイにおいて、

30

1. Fas受容体を活性化／刺激する；
 2. Fas受容体をブロックする；
 3. Fas媒介アポトーシスを刺激する；
 4. 細胞増殖のFas媒介調節に影響を及ぼす；
 5. 免疫応答のFas媒介調節に影響を及ぼす；および／または
 6. 感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；
- 活性を示す化合物を発見することができる。

【0044】

バイオアッセイにおいて、Fas受容体を活性化／刺激する；Fas受容体をブロックする；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；活性を示す作用剤を発見する方法は、分子間相互作用をモデリングするために、試験化合物ライブラリー内の化学構造を本発明化合物の化学構造と比較する、および／または一致させるためにアルゴリズムを適用すること、およびFas受容体を活性化／刺激する；Fas受容体をブロックする；Fas媒介アポトーシスを刺激する；または細胞増殖、免疫応答および／または感染のFas媒介調節に影響を及ぼす；活性を示す作用剤として、本発明化合物と類似するか、または一致する化学構造もつことがアルゴリズムによって決定された試験化合物を同定すること、を含む。

40

さらに、本発明方法は、バイオアッセイを確認、最適化または標準化する過程を含む。こ

50

の過程は、(a) 本発明化合物をバイオアッセイに付すこと；および(b) バイオアッセイにおける化合物の活性によって、バイオアッセイを確認、最適化または標準化することを含む。

【実施例】

【0045】

以下の実施例によって、本発明を説明するが、これらは本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

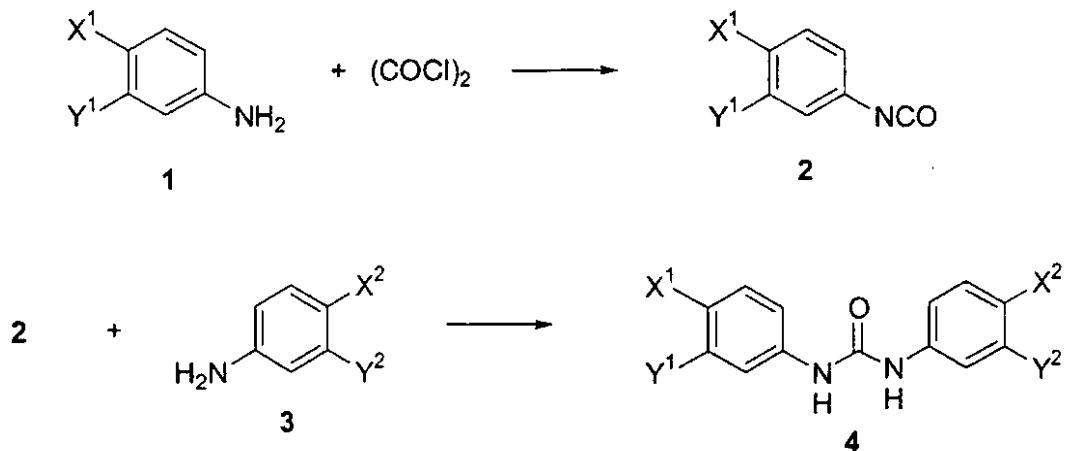
本発明化合物は、有機化学の慣例の方法によって製造され、置換ウレアの合成のための多くの方法が当業界で公知である。たとえば、Larock, 「Comprehensive Organic Transformations」, Wiley-VCH, New York NYを参照。幾つかの場合、保護基を導入し、後で除去してもよい。アミノ、ヒドロキシルおよびカルボキシル基のための適当な保護基は、Greeneら「Protective Groups in Organic Synthesis」, 2nd ed., 1991, John Wiley and Sons, New York NYに記載されている。本発明化合物は、後記実施例に示すように合成することができるが、あるいは当業者に公知の手段による例示の合成を変更することもできる。

【0046】

対称および非対称ジアリールウレアの両方に好都合な代表的な合成を反応工程式1に示す。塩基性溶液中、イソシアネート(2)(塩基性溶液中、最初のアミン(1)とホスゲンとの反応によって都合よく合成される)と第2のアミン(3)との反応により、ウレア(4)を得る。この反応工程式において、各X¹およびX²は同一あるいは異なってもよく、同様に各Y¹およびY²は同一あるいは異なってもよい。

反応工程式1

【化3】



実施例1：1-(4-クロロ-3-シアノフェニル)-3-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレア

50 mLのベンゼンおよび5 mLのトリエチルアミン中の3-ニトロ-4-クロロアニリン(2 g)の溶液を、トルエン(6 g)および10 mLのベンゼン中のホスゲンの20w/w%溶液に5 にて攪拌しながら滴下する。添加完了後、反応混合物を室温まで温め、3時間攪拌して、イソシアネートを形成し、次いで、イソシアネート溶液に10 mLのベンゼン中の2.1 gの3-シアノ-4-クロロアニリンを滴下する。反応混合物を65 にて一夜攪拌する。溶液を室温まで冷却し、100 mLのジエチルエーテルを加えて生成物およびアミン塩を沈澱させる。フリットロートを用いてスラリーを濾過し、ジエチルエーテルで洗浄する。水を加えて固体を再スラリー化し、水、10% 塩酸(2回)および蒸留水(3回)で洗浄する。生成物を風乾して、2.9 g(72%)の1-(4-クロロ-3-シアノフェニル)-3-(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレアを得る。

反応工程式2に示すように、イソシアネート(5)(もちろん、上述したようにアミンから製造したもの)を水で処理して、ある程度のイソシアネートをアミンに戻すように加水分解

10

20

30

40

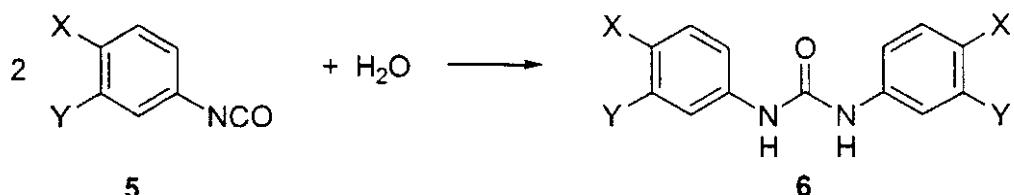
50

し、残っているイソシアネートをアミンと縮合させて、適当な対象ウレア(6)を得ることによって、対称ウレアを都合よく製造することができる。

【0047】

反応工程式2

【化4】



10

【0048】

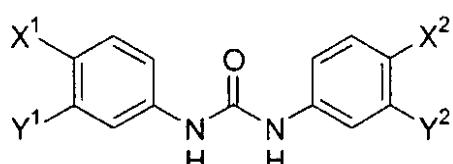
実施例2：1,3-ビス(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレア

50 mLのベンゼン、5 mLのピリジンおよび100 mgの4-ジメチルアミノピリジン中の3-ニトロ-4-クロロアニリン(2 g)の溶液を、トルエン(6 g)および10 mLのベンゼン中のホスゲンの20w/w%溶液に5 にて攪拌しながら滴下する。添加完了後、反応混合物を室温まで温め、3時間攪拌を続ける。次いで、この溶液を、200 mLのジエチルエーテル、0.5 mLのピリジンおよび100 mgの水の混合物に攪拌しながら加え、一夜攪拌する。10 mLの水を追加し、攪拌を1時間続ける。得られる沈澱をフリットロートを用いて濾過し、ジエチルエーテルで洗浄する。水を加えて固体を再スラリー化し、水、10% 塩酸(2回)および蒸留水(洗液が中性pHになるまで)で洗浄する。生成物を風乾して、0.97 g(47%)の1,3-ビス(4-クロロ-3-ニトロフェニル)ウレアを得る。

【0049】

下記の表は、本発明化合物の代表例である。

【化5】



20

30

【表1】

化合物番号	X ¹	X ²	Y ¹	Y ²
1	Cl	Cl	NO ₂	NO ₂
2	F	F	NO ₂	NO ₂
3	Br	Br	NO ₂	NO ₂
4	Cl	Cl	CN	CN
5	F	F	CN	CN
6	Br	Br	CN	CN
7	Cl	Cl	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃
8	F	F	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃

40

【表2】

化合物番号	X ¹	X ²	Y ¹	Y ²
9	Br	Br	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃
10	Cl	Cl	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
11	F	F	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
12	Cl	Cl	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
13	F	F	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
14	F	Cl	CN	CN
15	F	Cl	NO ₂	NO ₂
16	Br	Cl	NO ₂	NO ₂
17	F	Cl	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
18	F	F	COCH ₃	COCH ₃
19	Cl	Cl	COCH ₃	COCH ₃
20	F	F	CONHCH ₃	CONHCH ₃
21	Cl	F	CON(CH ₃) ₂	CON(CH ₃) ₂
22	Cl	Cl	CON(CH ₃) ₂	COCH ₃
23	Br	Cl	NO ₂	CN
24	F	F	NO ₂	CN
25	F	Cl	NO ₂	CN
26	Cl	F	NO ₂	CN
27	Cl	Cl	COCH ₃	CN
28	Cl	Cl	COCH ₃	NO ₂
29	F	Cl	COCH ₃	NO ₂
30	Cl	Cl	SO ₂ CF ₃	NO ₂
31	Cl	F	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CH ₃
32	Cl	F	SO ₂ CF ₃	NO ₂
33	Cl	F	SO ₂ CF ₃	CN
34	F	F	SO ₂ CH ₃	NO ₂
35	Cl	Cl	SO ₂ CH ₃	NO ₂
36	F	Cl	SO ₂ CH ₃	NO ₂
37	Cl	Cl	COPh	NO ₂
38	F	Cl	SO ₂ Ph	NO ₂

10

20

30

40

【表3】

化合物番号	X ¹	X ²	Y ¹	Y ²
39	F	F	SO ₂ Ph	NO ₂
40	Cl	Cl	SO ₂ Ph	NO ₂
41	F	Cl	SO ₂ Ph	CN
42	F	F	SO ₂ Ph	NO ₂
43	F	Cl	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
44	Cl	F	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
45	F	F	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
46	Cl	Cl	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
47	Cl	Br	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
48	OSO ₂ CF ₃	OSO ₂ CF ₃	NO ₂	NO ₂
49	OSO ₂ CH ₃	Cl	NO ₂	NO ₂
50	OSO ₂ CF ₃	F	NO ₂	NO ₂

10

20

【0050】

実施例3：Fas媒介アポトーシス

Fas媒介アポトーシスについてのアッセイは当業界で公知である。たとえば、Ruiz-Ruizら, Cell Death Diff. 6:271(1999); およびMullerら, J. Exp. Therap. 188:2033(1998)を参照。

アポトーシスは、アポトーシス細胞死に特有のDNA断片化パターンの検出によって同定される。この実施例では、CellQuestソフトウェアを用いてFACScan(登録商標)フローサイトメーター(Becton Dickinson)で行うFACS(登録商標)分析によってアポトーシスを検出し、測定する。DNA断片化の定量は、Nicollettiら, J. Immunol. Methods 139:271-279(1991)に記載されているように、ヨウ化プロピジウム染色核のFACS(登録商標)分析によって行う。培養培地中の浮遊肝細胞を200×gの遠心分離によって集める。1%トリプシンとともに1分間インキュベートすることにより付着肝細胞を採取する。細胞をリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)で洗浄し、低張溶解緩衝液(0.1%クエン酸ナトリウム、0.1%トリトンXおよび50 ng/mLヨウ化プロピジウム)(Sigma)に懸濁し、4にて6時間インキュベートする。次いで、フローサイトメトリーによってDNA含量について細胞を分析する。

30

【0051】

アポトーシス(しかし、正常ではない)細胞膜上に曝露されるたホスファチジルセリン分子(PS)(PSは通常、細胞膜二分子層の内部リーフレットに限定される)に結合するアネキシンV-Fluos(Boehringer Mannheim)を用いて、早期アポトーシス変化を同定する。ヨウ化プロピジウムを用いて、アネキシンVポジティブ染色細胞クラスターから壊死細胞を識別する。細胞をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、200×gにて5分間遠心分離し、100 μLのHEPES緩衝液(10 mLのHEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)および20 μLのヨウ化プロピジウムに再懸濁する。細胞を10~15分間インキュベートし、CellQuestソフトウェアを用いるフローサイトメーターで分析する。488nmの励起波長および560 nmのカットオフフィルターを用いてヨウ化プロピジウムを分析する。

40

化合物(3)が、10 μMにてFas媒介アポトーシスの刺激を示す。

【0052】

実施例4：Fas媒介アポトーシスの刺激

ヒト化抗体である抗ヒトFas抗体h-HF7Aは、Sankyo Co., Ltd.から入手した。この抗

50

体は、インピトロにおいて二次抗体と架橋した場合にアポトーシスを誘発する。

ヒト滑膜のサンプルは、全膝置換手術または滑膜切除術の時点において慢性関節リウマチの患者から入手した。滑膜組織を細かく刻んで小片にし、コラゲナーゼで消化し、加湿した5%CO₂雰囲気中、37℃にて10%ウシ胎児血清(F10F)を補足したハムのF12培地にて培養した。付着細胞を滑膜細胞とみなし、F10F中で培養した。

【0053】

Cancer Res. 48:4827(1988)に記載のXTT法を用いて細胞の生存率を決定した。96ウェル平板を抗ヒトIgGでプレコートした。h-HFE7A(1000 ng/mL)および/または10 μMの本発明化合物を加え、2時間インキュベートした。滑膜細胞を播き(10,000/ウェル)、16時間インキュベートした。バックグラウンドウェルには培地のみを入れた。XTT(2,3-ビス[2-メトキシ-4-ニトロ-スルホフェニル]-2H-テトラゾリウム-5-カルボキサニリド)(最終濃度200 μg/mL)およびメチル硫酸フェナジン(最終濃度5 μM)を各ウェルに加え、さらに4時間インキュベートする。450nmにおける吸光度を測定し、細胞生存率を次の式により決定した：

$$(テストサンプルのOD_{450} - バックグラウンドのOD_{450}) \times 100$$

細胞生存率(%) = /

$$(対照サンプルのOD_{450} - バックグラウンドのOD_{450})$$

本発明化合物によるFas媒介アポトーシスの強化を刺激インデックス(SI)によって決定した：

$$(化合物のみの細胞生存率(%) \times (h-HFE7Aのみの細胞生存率(%)))$$

$$SI = /$$

$$(化合物およびh-HFE7Aの細胞生存率(%)) \times 100$$

SIが2.0以上の場合、ポジティブとみなした。化合物(3)が、このアッセイにおいて10 μMにてポジティブであった。

【0054】

実施例5：Fas受容体の発現

Mullerら, J. Exp. Med. 188:2033-2045(1998)の方法によって、Fas受容体の発現を測定した。CellQuestソフトウェアを用いるFACScan(登録商標)フローサイトメーター(Becton Dickinson)を用いて、Fas受容体の発現の増加パーセントを決定した。精製ビオチン化抗体として、Fas受容体に特異的な抗APO-1抗体(IgG3)を用いる。クォンタム・レッド・ストレプトアビジン(Sigma)を間接免疫蛍光法の二次試薬として用いる。ビオチン化抗APO-1を加えた50 μLの培養培地内で肝腫瘍細胞をインキュベートする。30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、クォンタム・レッド・ストレプトアビジンとともに30分間インキュベートし、再度2回洗浄し、アッセイする。データ獲得後、無処置の細胞に前方/側方散乱分析によりゲートをセットし、10⁴個の生存細胞を分析する。以下の式にしたがって、Fas受容体の増加パーセントを、処置細胞において検出されたFas受容体%と対照細胞において検出されたFas受容体%の間の差として計算する：Fas受容体発現の増加(%)=(処置細胞におけるFas受容体% - 処置細胞におけるクォンタム・レッド%) - (対照細胞におけるFas受容体% - 対照細胞におけるクォンタム・レッド%)

本発明化合物は、Fas受容体発現を増加することがわかった。

【0055】

実施例6：経口医薬組成物調製 - 固形投与製剤

経口投与用医薬組成物を以下の成分：

	<u>重量%</u>
本発明化合物	10%
ステアリン酸マグネシウム	0.5%
デンプン	2.0%
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	1.0%
微晶質セルロース	86.5%

を調合することによって製造する。

10

混合物を錠剤に圧縮する。別法として、混合物を硬ゼラチンカプセルに充填する。

錠剤はフィルム形成剤(たとえば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、色素(たとえば、二酸化チタン)および可塑剤(たとえば、フタル酸ジエチル)の懸濁液を塗布し、溶媒の蒸発によりフィルムを乾燥させることによってコーティングすることができる。フィルムコーティングは錠剤重量の2%~6%、好ましくは約3%であつてよい。

本実施例の方法によって製造された本発明化合物を含む錠剤は、経口投与に適しており、Fas媒介アポトーシスの増加ならびに自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍の治療において有効である。

【0056】

実施例7：経口医薬組成物調製 - 軟ゲル剤

20

経口投与に適した本発明化合物の医薬組成物を以下の成分：

	<u>重量%</u>
本発明化合物	20%
ポリエチレングリコール	80%

を調合することによって製造する。

化合物を必要であれば増粘剤を含む液体担体中に分散または溶解する。次いで、製剤を適当な技術によって軟ゼラチンカプセルに封入する。

本実施例の方法によって製造された本発明化合物を含む軟ゼラチンカプセル剤は、経口投与に適しており、Fas媒介アポトーシスの増加ならびに自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍の治療において有効である。

30

【0057】

実施例8：非経口投与用医薬組成物

非経口投与用医薬組成物は、典型的には、医薬活性成分およびリン酸緩衝食塩水または動物への導入に適したpHおよび塩含量の他の水溶液などの生理的食塩水を含む。非経口投与用医薬組成物は、以下のとおり、本発明化合物およびダルベッコのリン酸緩衝食塩水(D86 62、Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)を合わせることによって製造する：

	<u>重量%</u>
本発明化合物	1.0%
生理的食塩水	99.0%

溶液を滅菌し、滅菌容器に入れ密封する。

本実施例の方法によって製造された本発明化合物を含む医薬組成物は、経口投与に適しており、Fas媒介アポトーシスの増加ならびに自己免疫疾患、感染症および悪性腫瘍の治療において有効である。

40

【0058】

本発明の範囲および意図から逸脱することのない、本発明の種々の改良および変法は、当業者には明白であろう。しかし、本発明は特に好ましい態様に関連して記載したものであ

50

って、特許請求する本発明がこのような特定の態様に制限されないことを理解すべきである。本発明を実施するために記載した方法の種々の改良が、特許請求の範囲内にあることは、当業者には明白のことである。

【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
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/076930 A2

(51) International Patent Classification: C07C 275/42, 275/50, 317/42, A61K 31/17, A61P 35/00, 37/00, 19/00

(21) International Application Number: PCT/US02/06217

(22) International Filing Date: 1 March 2002 (01.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/273,988 7 March 2001 (07.03.2001) US
10/082,802 22 February 2002 (22.02.2002) US

(71) Applicant: TELIK, INC. [US/US]; 750 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors: ROBINSON, Louise; 1349 Rosewood Avenue, San Carlos, CA 94070 (US); VILLAR, Hugo, O.; 5549 Soledad Mountain Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AT

(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,

CII, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE

(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, HE,

EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GL,

GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KR,

KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,

MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU,

SD, SE, SG, SL, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TN,

TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,

NE, SN, TD, TG).

(Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(74) Agents: CHOW, V., Ping et al.; Heller Libman White & McAuliffe, LLP, 275 Middlefield Road, Menlo Park CA 94025-3506 (US).

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.



WO 02/076930 A2

(54) Title: SUBSTITUTED DIARYLUREAS AS STIMULATORS FOR FAS-MEDIATED APOPTOSIS

(57) Abstract: Substituted diarylureas, pharmaceutical compositions containing them, and their use for stimulating Fas-mediated apoptosis. The compounds, as single stereoisomers or mixtures of stereoisomers, their pharmaceutically acceptable salts, and pharmaceutical compositions containing them, are useful in methods of treating autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.

|

**SUBSTITUTED DIARYLUREAS AS STIMULATORS
FOR FAS-MEDIATED APOPTOSIS**

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

- 5 This invention relates to substituted diarylureas, to pharmaceutical compositions containing them, and to their use for stimulating Fas-mediated apoptosis.

Description of the Related Art

The Fas receptor, also known as APO-1 or CD95, is thought to be a key initiator of apoptotic programmed cell death in a variety of cell types. Activation of the Fas receptor by Fas ligands (FasL) or agonist antibodies leads to aggregation of the Fas receptor and recruitment of the intracellular death-inducing signal complex (DISC). See, for example, Kischkel et al., *EMBO J.* 14:5579-5588 (1995). Recruitment of other molecules, such as caspases, and in some cells, bcl-2, may also occur. It has been suggested that the main function of the Fas signaling complex is to activate caspase-8 protease. See, for example, Siegel et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:729 (1999). CD4⁺ T cells are unique in their ability to commit suicide by stimulating their own Fas receptors. T cells can also trigger apoptosis in B cells, macrophages, and other cell types through FasL. These interactions negatively regulate the immune system but can also contribute to immunopathology, such as in Fas-mediated damage of target tissues in hepatitis and other organ-specific autoimmune diseases. Fas plays a significant role in regulation of the human immune response, and the details of its clinical importance is being actively investigated. Altered Fas receptor or altered FasL are thought to contribute to autoimmune, infectious, and malignancies including autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmune thyroid disease, hypereosinophilia, viral hepatitis, colon carcinomas, breast carcinomas, prostate cancers, neuroblastomas, gliomas, and other cancers and disease conditions. See, for example, Houghton, *J. Curr. Opin. Oncol.* 11:475 (1999) and Siegel et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:729 (1999).

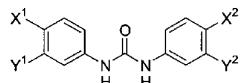
There are large numbers of diarylureas cited in the literature, however there are only a limited number of diarylureas substituted with halogens. Certain diarylureas have

been reported are to be useful as p38 kinase inhibitors (WO 99/32463, WO 99/00357), raf kinase inhibitors (WO 99/32436), and 5-HT receptor antagonists (WO 98/50346).

The documents cited here and elsewhere in this application are incorporated into this application by reference.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

In a first aspect, this invention is compounds of the formula:



where:

- X¹ and X² are independently selected from -F, -Cl, -Br, and -OSO₂R¹;
- 10 Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and -SO₂R¹R²; and
- each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;
- each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl,
- 15 and the pharmaceutically acceptable salts thereof.

In a second aspect, this invention is pharmaceutical compositions comprising a compound of the first aspect of the invention and a pharmaceutically acceptable excipient.

- 20 In a third aspect, this invention is methods of treating diseases in mammals treatable by administration of a stimulator of Fas-mediated apoptosis, by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a compound of the first aspect of this invention or a composition of the second aspect of this invention. The compounds of the first aspect of this invention stimulate Fas-mediated apoptosis, leading to cell death
- 25 in cells containing the Fas receptor, and are useful in the regulation of the immune system and immune responses, cell proliferation, and malignancy. Suitable diseases for such treatment are autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies,

including autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmune thyroid disease, hypereosinophilia, viral hepatitis, colon carcinomas, breast carcinomas, prostate cancers, neuroblastomas, gliomas, and other cancers and diseases. This aspect also includes the use of compounds of the first aspect of this invention in the preparation of medicaments 5 for the treatment of diseases in mammals treatable by administration of a stimulator of Fas-mediated apoptosis.

In a fourth aspect, this invention provides a method of stimulating Fas-mediated apoptosis in a cell that has a Fas receptor, by contacting the cell with a compound of the first aspect of this invention in an amount sufficient to stimulate Fas-mediated apoptosis.

10 *In vivo*, the step of contacting the cell with the compound may be effected by administering to an animal containing the cell an effective amount of the compound. *In vitro*, the step of contacting the cell with a compound of the formula may be effected by administering to the cell or to a solution bathing the cell an effective amount of the compound.

15 In a fifth aspect, this invention is methods of making the compounds of the first aspect of this invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

(a) Definitions and General Parameters

20 "Alkyl" means a C₁-C₁₀ monovalent hydrocarbyl that may be linear, branched, or cyclic, and includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, hexyl, cyclopentyl, cyclopropylmethyl, cyclohexyl, and cyclohexylmethyl. C₁-C₆ alkyls are preferred.

25 A "substituted alkyl" is an alkyl substituted with up to three halogen atoms and/or a substituent selected from -CN, -NO₂, -OR, -SR, -COR, -OC(O)R, -C(O)OR, -NR₂, -SO₂OR, -OSO₂R, -SO₂NR₂, -NRSO₂R, -CONR₂, or -NRCOR, where each R is, independently, hydrogen, optionally R'-substituted alkyl, optionally R'-substituted aryl, heteroaryl, optionally R'-substituted aralkyl, or heteroaralkyl and each R' is, independently, halo, -CN, -NO₂, -OH, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, -SH, or -NH₂. Preferred substituted alkyls are substituted with up to three halogen atoms and/or one of the

substituents selected from the group consisting of -CN, -NO₂, -OH, C₁₋₃ alkoxy, -SH, and -NH₂; and a particularly preferred substituted alkyl is -CF₃.

“Aryl” means an aromatic hydrocarbyl containing 6 to 20 ring carbon atoms,

which is monocyclic (phenyl), condensed polycyclic, preferably condensed bicyclic (e.g.,

5 naphthyl), or linked polycyclic, preferably linked bicyclic (e.g., biphenylyl). The aryl is preferably C₆-C₁₆ and even more preferably, C₆-C₁₄. A particularly preferred aryl is phenyl.

A “substituted aryl” is an aryl substituted with up to three substituents selected from halo, -CN, -NO₂, -OR, optionally halo-substituted C₁₋₃ alkyl, optionally halo-10 substituted C₁₋₃ alkoxy, -SR, -COR, -OC(O)R, -C(O)OR, -NR₂, -SO₂OR, -OSO₂R, -SO₂NR₂, -NRSO₂R, -CONR₂, or -NRCOR, where each R is, independently, hydrogen or optionally R'-substituted alkyl and each R' is, independently, halo, -CN, -NO₂, -OH, C₁₋₃ alkyl, C₁₋₃ alkoxy, -SH, or -NH₂. Preferred substituted aryls are substituted with up to three substituents selected from the group consisting of halo, -CN, -NO₂, -OH, 15 -NH₂; and particularly preferred substituted aryls are substituted phenyls.

“Aralkyl” means an alkyl substituted with an aryl. Preferred aralkyls are benzyl and phenethyl.

A “substituted aralkyl” is an aralkyl in which the aryl or the alkyl, or both, are 20 substituted in the manner described above for substituted aryl and substituted alkyl.

“Halogen” or “halo” means F, Cl, or Br.

“Heteroaryl” means a monocyclic or condensed bicyclic aromatic hydrocarbyl containing 6 to 20 ring atoms in which 1 to 3 of the ring carbon atoms are replaced by O, S, N, or NR (where R is H or C₁₋₃ alkyl). Preferred heteroaryls are monocyclic 25 containing 5 or 6 ring atoms and include furyl, thienyl, pyrrolyl, oxazolyl, imidazolyl, pyridinyl, pyrazinyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, and the like.

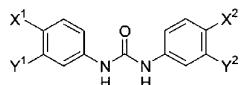
“Pharmaceutically acceptable salts” are described in the section entitled “Compounds”.

A “therapeutically effective amount” means that amount which, when 30 administered to an animal for treating a disease, is sufficient to effect such treatment for the disease.

“Treating” or “treatment” of a disease in a mammal includes (1) preventing the disease from occurring in a mammal which may be predisposed to the disease but does not yet experience or display symptoms of the disease, (2) inhibiting the disease, i.e., arresting its development, (3) relieving symptoms of the disease, i.e., reducing the effects 5 of the disease, and (4) causing regression of the disease.

(b) Compounds

In a first aspect, this invention is compounds of the formula:



where:

- 10 X¹ and X² are independently selected from -F, -Cl, -Br, and -OSO₂R¹;
 Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and
 -SO₂R¹R²; and
 each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally
 substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;
 15 each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally
 substituted aryl, and optionally substituted aralkyl,
 and the pharmaceutically acceptable salts thereof.

Examples of preferred classes of compounds are those where one or more of the following are true:

- 20 (1) X¹ and X² are independently -F or -Cl,
 (2) Y¹ and Y² are independently -CN, -NO₂ or -COR¹,
 (3) X¹ and X² are the same, or
 (4) Y¹ and Y² are the same.

- Examples of more preferred classes of compound are those where one or more of
 25 the following are true:
 (a) both X¹ and X² are -Cl, or both are -F, or
 (b) both Y¹ and Y² are -NO₂, or both are -CN.

A particularly preferred compound is the compound where X^1 and X^2 are -Cl and Y^1 and Y^2 are -NO₂, i.e. the compound 1,3-bis(4-chloro-3-nitrophenyl)urea.

Syntheses and descriptions of these compounds are outlined in the Examples.

Certain compounds of the invention may contain one or more chiral centers. In 5 such cases, all stereoisomers also fall within the scope of this invention. The invention compounds include the individually isolated stereoisomers as well as mixtures of such stereoisomers.

10 Pharmaceutically acceptable salts, cations and anions of the compounds of the invention are also included in the present invention and are useful in the methods and pharmaceutical compositions described herein.

15 Pharmaceutically acceptable salts include salts that may be formed when acidic protons present are capable of reacting with inorganic or organic bases. Typically the parent compound is treated with an excess of an alkaline reagent, such as hydroxide, carbonate or alkoxide, containing an appropriate cation. Cations such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and NH₄⁺ are examples of cations present in pharmaceutically acceptable salts. The Na⁺ salts are especially useful. Acceptable inorganic bases, therefore, include aluminum hydroxide, calcium hydroxide, potassium hydroxide, sodium carbonate and sodium hydroxide. Salts may also be prepared using organic bases, such as salts of primary, 20 secondary and tertiary amines, substituted amines including naturally-occurring substituted amines, and cyclic amines including isopropylamine, trimethylamine, diethylamine, triethylamine, tripropylamine, ethanolamine, 2-dimethylaminoethanol, tromethamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, cocaine, hydramine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, N-alkylglucamines, theobromine, purines, piperazine, piperidine, N-ethylpiperidine, and the like.

25 If a compound of the invention contains a basic group, an acid addition salt may be prepared. Acid addition salts of the compounds are prepared in a standard manner in a suitable solvent from the parent compound and an excess of an acid, such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid (giving the sulfate and bisulfate salts), nitric acid, phosphoric acid and the like, and organic acids such as acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic

acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, salicylic acid, p-toluenesulfonic acid, hexanoic acid, heptanoic acid, cyclopentanepropionic acid, lactic acid, o-(4-hydroxybenzoyl)benzoic acid, 1,2-ethanedisulfonic acid, 2-hydroxyethanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, p-chlorobenzenesulfonic acid, 2-naphthalenesulfonic acid, 5 camphorsulfonic acid, 4-methyl-bicyclo[2.2.2.]oct-2-ene-1-carboxylic acid, glucoheptonic acid, gluconic acid, 4,4'-methylenbis(3-hydroxy-2-naphthoic)acid, 3-phenylpropionic acid, trimethylacetic acid, t-butylacetic acid, laurylsulfuric acid, glucuronic acid, glutamic acid, 3-hydroxy-2-naphthoic acid, stearic acid, muconic acid and the like.

10 Certain of the compounds may form inner salts or Zwitterions.

(c) Pharmaceutical Compositions

A second aspect of the present invention is pharmaceutical compositions comprising a compound of the first aspect of this invention and a pharmaceutically acceptable excipient.

15 The pharmaceutical compositions of the invention preferably comprise as an active ingredient a preferred compound of the first aspect of this invention. However, pharmaceutical compositions that comprise any of the compounds of the invention are contemplated. The pharmaceutical compositions of the invention also comprise a pharmaceutically acceptable excipient.

20 The compositions of this invention may be administered by any number of routes, including but not limited to, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transmucosal or transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, sublingual, rectally or by way of other body cavity, including suppository and the like, topical, or may be administered orally. Administration may be 25 acute, or by means of controlled-release, slow release or sustained release systems, including orally-administered time-release capsules or other delivery means, depot administration, indwelling catheter, chronic administration via a transdermal drug-delivery patch or subdermal implant, such that a relatively constant level of dosage is maintained. See, e.g., US 3,710,795.

Formulations may be aqueous, oily, emulsified, or contain solvents suitable to the mode of administration, and may optionally be liposomal formulations, formulations designed to administer the drug across mucosal membranes or transdermal formulations. Suitable formulations for each of these and other methods of administration discussed in 5 this application may be found, for example, in Gennaro, ed., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th ed., 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia PA.

Depending on the intended mode of administration, the pharmaceutical compositions may be in the form of solid, semi-solid or liquid dosage forms, such as, for 10 example, tablets, suppositories, pills, capsules, powders, liquids, suspensions, creams, ointments, lotions or the like, preferably in unit dosage form suitable for single administration of a precise dosage. In addition to an effective amount of the active ingredients, the compositions may contain suitable pharmaceutically-acceptable excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into 15 preparations which can be used pharmaceutically. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable excipient" refers to an excipient or mixture of excipients which does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredients and which is not toxic to the host to which it is administered.

In addition, the pharmaceutical compositions may include other pharmaceutical 20 agents, adjuvants, diluents, buffers, etc. The compounds may thus be administered orally, parenterally, transdermally, rectally, nasally, buccally, topically or via an implanted reservoir in dosage formulations containing conventional non-toxic pharmacologically acceptable carriers, adjuvants and vehicles. The term "parenteral" as used herein is intended to include subcutaneous, intravenous, and intramuscular injection.

25 For solid compositions, conventional nontoxic solid carriers include, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talc, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like. Liquid pharmacologically administrable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc., an active compound as described herein and optional 30 pharmaceutical adjuvants in an excipient, such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol, and the like, to thereby form a solution or suspension. If desired, the pharmaceutical composition to be administered may also contain minor

amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents and the like, for example, sodium acetate, sorbitan monolaurate, triethanolamine sodium acetate, triethanolamine oleate, etc.

For oral administration, the composition will generally take the form of a tablet 5 or capsule, or it may be an aqueous or nonaqueous solution, suspension or syrup. Tablets and capsules are preferred oral administration forms. Tablets and capsules for oral use will generally include one or more commonly used carriers such as lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. When liquid suspensions are used, the active agent may be combined with emulsifying and 10 suspending agents. If desired, flavoring, coloring and/or sweetening agents may be added as well. Other optional components for incorporation into an oral formulation herein include, but are not limited to, preservatives, suspending agents, thickening agents, and the like.

Parenteral administration, if used, is generally characterized by injection. 15 Injectable formulations can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions, solid forms suitable for solubilization or suspension in liquid prior to injection, or as emulsions. Preferably, sterile injectable suspensions are formulated according to techniques known in the art using suitable carriers, dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable formulation may also be a sterile 20 injectable solution or a suspension in a nontoxic parenterally acceptable diluent or solvent. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils, fatty esters or polyols are conventionally employed as solvents or suspending media.

The compounds of the invention may also be delivered through the skin using 25 conventional transdermal drug delivery systems, i.e., transdermal "patches" wherein the agent is typically contained within a laminated structure that serves as a drug delivery device to be affixed to the skin. In such a structure, the drug composition is typically contained in a layer, or "reservoir," underlying an upper backing layer. The laminated device may contain a single reservoir, or it may contain multiple reservoirs. In one 30 embodiment, the reservoir comprises a polymeric matrix of a pharmaceutically acceptable contact adhesive material that serves to affix the system to the skin during drug delivery. Examples of suitable skin contact adhesive materials include, but are not limited to, polyethylenes, polysiloxanes, polyisobutylenes, polyacrylates, polyurethanes,

and the like. Alternatively, the drug-containing reservoir and skin contact adhesive are present as separate and distinct layers, with the adhesive underlying the reservoir which, in this case, may be either a polymeric matrix as described above, or it may be a liquid or hydrogel reservoir, or may take some other form.

- 5 Alternatively, the pharmaceutical compositions of the invention may be administered in the form of suppositories for rectal administration. These can be prepared by mixing the agent with a suitable non-irritating excipient which is solid at room temperature but liquid at the rectal temperature and therefore will melt in the rectum to release the drug. Such materials include cocoa butter, beeswax and
- 10 polyethylene glycols.

- The pharmaceutical compositions of the invention may also be administered by nasal aerosol or inhalation. Such compositions are prepared according to techniques well-known in the art of pharmaceutical formulation and may be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to
- 15 enhance bioavailability, propellants such as fluorocarbons or nitrogen, and/or other conventional solubilizing or dispersing agents.

- Preferred formulations for topical drug delivery are ointments and creams. Ointments are semisolid preparations which are typically based on petrolatum or other petroleum derivatives. Creams containing the selected active agent are, as known in the
- 20 art, viscous liquid or semisolid emulsions, either oil-in-water or water-in-oil. Cream bases are water-washable, and contain an oil phase, an emulsifier and an aqueous phase. The oil phase, also sometimes called the "internal" phase, is generally comprised of petrolatum and a fatty alcohol such as cetyl or stearyl alcohol; the aqueous phase usually, although not necessarily, exceeds the oil phase in volume, and generally contains a
- 25 humectant. The emulsifier in a cream formulation is generally a nonionic, anionic, cationic or amphoteric surfactant. The specific ointment or cream base to be used, as will be appreciated by those skilled in the art, is one that will provide for optimum drug delivery. As with other carriers or vehicles, an ointment base should be inert, stable, nonirritating and nonsensitizing.

- 30 Formulations for buccal administration include tablets, lozenges, gels and the like. Alternatively, buccal administration can be effected using a transmucosal delivery system as known to those skilled in the art.

The pharmaceutical compositions of this invention 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 is generally a buffered, isotonic, aqueous solution. Examples of suitable diluents are normal isotonic saline solution, 5% dextrose in water or buffered sodium or ammonium acetate solution. Such formulations are especially suitable for parenteral administration, but may also be used for oral administration. It may be desirable to add excipients such as polyvinylpyrrolidinone, gelatin, hydroxycellulose, acacia, polyethylene glycol, mannitol, sodium chloride or sodium citrate. Alternatively, these compounds may be encapsulated, tableted, or prepared in an emulsion or syrup for oral administration. Pharmaceutically acceptable solid or liquid excipients may be added to enhance or stabilize the composition, or to facilitate preparation of the composition. Liquid excipients include syrup, peanut oil, olive oil, glycerin, saline, alcohol, and water. Solid excipients include starch, lactose, calcium sulfate dihydrate, terra alba, magnesium stearate, stearic acid, talc, pectin, acacia, agar, and gelatin. The excipient may also include a sustained release material such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate, alone or with a wax. The amount of solid excipient varies but, preferably, will be between about 20 mg to about 1 g per dosage unit. The pharmaceutical preparations are made following the conventional techniques of pharmacy involving milling, mixing, granulation, and compressing, when necessary, for tablet forms; or milling, mixing and filling for hard gelatin capsule forms. When a liquid excipient is used, the preparation will be in the form of syrup, elixir, emulsion or aqueous or non-aqueous suspension. Such a liquid formulation may be administered orally directly or filled into a soft gelatin capsule.

25 The pharmaceutical formulation may additionally contain one or more pharmacologically active agents in addition to a compound of the invention. These additional active agents will typically be useful for preventing or treating autoimmune, infectious and malignancies, or for enhancing the treatment of such disorders by compounds of the invention.

30 Some specific examples of suitable pharmaceutical compositions are described in the Examples below.

Typically, a pharmaceutical composition of the present invention is packaged in a container with a label, or instructions, or both, indicating use of the pharmaceutical composition in the treatment of autoimmune diseases, infectious diseases, malignancies, such as autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmune thyroid disease, 5 hypereosinophilia, viral hepatitis, colon carcinoma, breast carcinoma, prostate cancer, neuroblastoma, glioma, or other cancer or other disease.

(c) Methods and Uses of Compounds of this Invention.

The compounds of the invention are effective to stimulate Fas-mediated apoptosis as demonstrated in the Examples below. Stimulation of Fas-mediated apoptosis 10 is useful, for example, in the treatment and management of subjects with autoimmune, infectious, or malignancies. More particular examples of the uses of the compounds include the treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome, autoimmune thyroid disease, hypereosinophilia, viral hepatitis, colon carcinomas, breast carcinomas, prostate cancers, neuroblastomas, gliomas, and other cancers and diseases.

15 Thus, the third aspect of this invention includes a method of treating an autoimmune disease in a mammal, preferably a human, by administering a therapeutically effective amount of a compound of the invention, or a pharmaceutical composition thereof, to the mammal. Optionally, the method may further comprise treating the mammal with a conventional form of therapy for an autoimmune disease, 20 such as administration of a conventional immunosuppressant. Alternatively, the compounds of the invention may be administered to the mammal in combination with an antiinflammatory agent or other conventional treatment for the symptoms of such autoimmune disease, e.g. where the disease is rheumatoid arthritis. The total amount of the combination of drugs administered to the mammal must be a therapeutically effective 25 amount, although the amounts of each of the individual drugs may be, by themselves, suboptimal for therapeutic purposes.

The third aspect of this invention also includes a method of treating infection in a mammal, preferably a human, by administering a therapeutically effective amount of a compound of the invention, or a pharmaceutical composition thereof, to the mammal. 30 The method may optionally further comprise treating the mammal with a conventional form of therapy for infection. For instance, an antiviral, antibacterial, or antifungal agent

may also be administered to the mammal. The total amount of the combination of drugs administered to the mammal must be a therapeutically effective amount, although the individual amounts of each of the individual drugs may be, by themselves, suboptimal for therapeutic purposes.

- 5 The third aspect of this invention also includes methods of treating malignancies in a mammal, preferably a human, by administering a therapeutically effective amount of a compound of the invention, or a pharmaceutical composition thereof, to the mammal. Again, like the other treatment methods of the invention, this method may further comprise treating the mammal with a conventional form of therapy for malignancy, such
10 as administering an anticancer chemotherapeutic agent to the mammal. The total amount of the combination of drugs administered to the mammal must be a therapeutically effective amount, although the individual amounts of each of the individual drugs may be, by themselves, suboptimal for therapeutic purposes.

- The compounds of the invention, or pharmaceutical compositions thereof, are
15 thus used to stimulate Fas-mediated apoptosis in mammals that require such treatment, by administering a therapeutically effective amount of the chosen compound, preferably dispersed in a pharmaceutical carrier. Therapeutically effective amounts of compounds of the invention are in the range of 0.01 to 1000 mg/kg, preferably 0.01 to 100 mg/kg and more preferably 1-30 mg/kg, and suitable doses will be readily determined by one
20 skilled in the art depending upon the route of administration, age and condition of the patient. The dosage units may be administered up to one to ten times daily for acute or chronic disease. No unacceptable toxicological effects are expected when compounds of the invention are administered in accordance with the present invention.

- In another aspect of the invention, Fas-mediated apoptosis is stimulated by
25 contacting a cell having a Fas receptor with a compound of the invention in an amount sufficient to stimulate Fas-mediated apoptosis. In such a case, the contacting is effected *in vivo* by administering the compound, or a pharmaceutical composition thereof, to a mammal containing the cell; and *in vitro* by administering the compound, or a pharmaceutical composition thereof, to a container in which the cell is present or to a
30 solution bathing the cell.

The compounds of the invention have been demonstrated to stimulate Fas-mediated apoptosis and can be useful in the treatment of autoimmune, infectious and malignancies. Similarly, other compounds which show the same effects on Fas-mediated apoptosis can be useful for the treatment of autoimmune, infectious and malignancies.

- 5 The compounds disclosed in this application can be used as models to discover other new agents that act to stimulate Fas-mediated apoptosis. The steps in a process in which these compounds can be utilized to discover new therapeutic agents may be achieved by the following: the compounds may be utilized to validate, optimize, and standardize assays necessary for the discovery of other compounds that stimulate Fas-mediated apoptosis and that stimulate Fas-mediated apoptosis by action at the Fas receptor. These compounds can be utilized as benchmarks to discover other agents that show improved activity in assays that:
 1. activate/stimulate the Fas receptor;
 2. block the Fas receptor;
 - 15 3. stimulate Fas-mediated apoptosis;
 4. affect Fas-mediated regulation of cell proliferation;
 5. affect Fas-mediated regulation of the immune response; and/or
 6. affect Fas-mediated regulation of infection.
- 10
- 15

- A method to discover agents that show improved activity in assays that
- 20 activate/stimulate the Fas receptor, that block the Fas receptor, that stimulate Fas-mediated apoptosis, or that affect Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection, comprises the steps of obtaining the results of an assay for Fas-mediated apoptosis in the presence of a plurality of concentrations of a compound of the invention, obtaining the results of the assay in the presence of a plurality of concentrations of a test compound, comparing the results of the assays, and identifying as an agent that shows improved activity in assays that measure or detect interaction with the Fas receptor, that stimulate Fas-mediated apoptosis, or that affect Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection a test compound from which the results obtained in the assay were improved compared to
 - 25
 - 30 the results obtained with the compound of the invention.

Algorithms may be used to compare structures or chemical properties of compounds, such as exemplary compounds and other test compounds. Algorithms may also be used to match structures or chemical properties within libraries of test compounds. In this way, where exemplary compounds or test compounds are known to have certain structures, properties, or activities of interest, compounds can be utilized to discover other compounds or agents that also have such structures, properties, or activities. For example, an activity of interest may be a desired activity in a bioassay. Such algorithms are known; for example, US 5,567,317 and US 5,587,293 describe methods for determining the reactivity of candidate compounds with target moieties or receptors. A formula predictive of reactivity with the target receptor may be obtained from a reference set of receptors or from a panel of compounds that are systematically diverse with respect to certain properties. Compounds to be tested in this way can be physically assessed with respect to the reference receptors, the formula applied, and the expected reactivity with the actual target receptor may be predicted. The method of US 5,587,293 does not require the physical presence of the receptor.

The use of such algorithms that compare structures or chemical properties and/or match structures or chemical properties within libraries of test compounds, is effective to discover agents that display activity in bioassays. Such bioassays include bioassays to detect and measure interaction with the Fas receptor, blockade of the Fas receptor, Fas-mediated apoptosis, activation of Fas-mediated apoptosis, stimulation of Fas-mediated apoptosis, and effects on Fas-mediated regulation of cell proliferation, Fas-mediated regulation of the immune response, and Fas-mediated regulation of infection.

In addition, when combined with algorithms that compare structures or chemical properties and/or match structures or chemical properties within libraries of test compounds, these compounds can be utilized to discover agents that display activity in bioassays that:

1. activate/stimulate the Fas receptor;
2. block the Fas receptor;
3. stimulate Fas-mediated apoptosis;
4. affect Fas-mediated regulation of cell proliferation;
5. affect Fas-mediated regulation of the immune response; and/or
6. affect Fas-mediated regulation of infection.

- A method to discover agents that display activity in bioassays that activate/stimulate the Fas receptor, that block the Fas receptor, that stimulate Fas-mediated apoptosis, or that affect Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection, comprising applying an algorithm to compare the 5 chemical structures or chemical properties within a library of test compounds with the chemical structure or chemical properties of a compound of the invention, and identifying as an agent that displays activity in bioassays that activate/stimulate the Fas receptor, that block the Fas receptor, that stimulate Fas-mediated apoptosis, or that affect Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection, a 10 test compound determined by the algorithm to have a chemical structure or chemical properties similar to the compound of the invention.

Algorithms may also be used to compare structures and/or match structures for the purpose of modeling molecular interactions. Such algorithms are known; for example, the methods of US 5,567,317 and US 5,587,293 may be used to compare 15 structures and/or match structures for the purpose of modeling molecular interactions.

- The use of such algorithms is effective to discover agents that display activity in bioassays such as bioassays to detect and measure interaction with the Fas receptor, blockade of the Fas receptor, Fas-mediated apoptosis, activation of Fas-mediated apoptosis, stimulation of Fas-mediated apoptosis, and effects on Fas-mediated regulation 20 of cell proliferation, Fas-mediated regulation of the immune response, and Fas-mediated regulation of infection.

Further, when combined with algorithms that compare structures and/or match structures for the purpose of modeling molecular interactions, these compounds can be utilized to discover agents that display activity in bioassays that:

- 25 1. activate/stimulate the Fas receptor;
2. block the Fas receptor;
3. stimulate Fas-mediated apoptosis;
4. affect Fas-mediated regulation of cell proliferation;
5. affect Fas-mediated regulation of the immune response; and/or
30 6. affect Fas-mediated regulation of infection.

A method to discover agents that display activity in bioassays that activate/stimulate the Fas receptor, that block the Fas receptor, that stimulate Fas-

- mediated apoptosis, or that affect Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection, comprising applying an algorithm to compare and/or match the chemical structures within a library of test compounds with the chemical structure of a compound of the invention for the purpose of modeling molecular interactions, and identifying as an agent that activates/stimulates the Fas receptor, that blocks the Fas receptor, that stimulates Fas-mediated apoptosis, or that affects Fas-mediated regulation of cell proliferation, the immune response, and/or infection, a test compound determined by the algorithm to have chemical structure comparable to or matching the compound of the invention.
- 5

- 10 In addition, the methods of the invention include a process for validating, optimizing, or standardizing a bioassay. This process comprises (a) submitting a compound of the invention to the bioassay; and (b), validating, optimizing, or standardizing the bioassay by the activity of the compound in the bioassay.

EXAMPLES

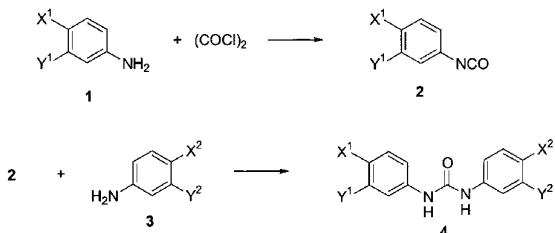
- 15 The following Examples illustrate this invention, and are in no way intended to limit the scope of this invention.

- The compounds of this invention are prepared by conventional methods of organic chemistry, and many methods for the synthesis of substituted ureas are well known to the art. See, for example, Larock, "Comprehensive Organic Transformations", 20 Wiley-VCH, New York NY. In some cases, protective groups may be introduced and later removed. Suitable protective groups for amino, hydroxyl, and carboxyl groups are described in Greene et al. "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd ed., 1991, John Wiley and Sons, New York NY. The compounds of this invention can be synthesized as shown in the following examples or by modifying the exemplified syntheses by means 25 known to those of ordinary skill in the art.

A typical synthesis that is convenient for both symmetrical and unsymmetrical diarylureas is shown in Reaction Scheme 1 below. The reaction of an isocyanate **2** (conveniently prepared by reaction of a first amine **1** and phosgene in a basic solution) with a second amine **3** in a basic solution affords urea **4**. In this scheme, each of X¹ and

X^2 may be the same, or may be different, and similarly each of Y^1 and Y^2 may be the same, or may be different.

Reaction Scheme 1



5 Example 1: 1-(4-chloro-3-cyanophenyl)-3-(4-chloro-3-nitrophenyl)urea

A solution of 3-nitro-4-chloroaniline (2 g) in 50 mL benzene and 5 mL triethylamine was added dropwise to a stirred solution of 20% w/w phosgene in toluene (6 g) and 10 mL benzene at 5 °C. Once addition was completed, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirring was continued for 3 hours to form the isocyanate; then 2.1 g 3-cyano-4-chloroaniline in 10 mL of benzene was added dropwise to the isocyanate solution. The reaction mixture was stirred at 65 °C overnight. The solution was cooled to room temperature, and 100 mL diethyl ether was added to precipitate the product and amine salts. The slurry was filtered using a fritted funnel and washed with diethyl ether. The solids were re-slurried with water and washed with water, 10 15 10% hydrochloric acid (twice), and distilled water (three times). The product was air dried to give 2.9 grams (72%) of 1-(4-chloro-3-cyanophenyl)-3-(4-chloro-3-nitrophenyl)urea.

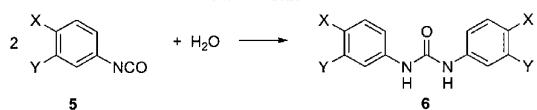
As shown in Reaction Scheme 2, symmetrical ureas can be conveniently prepared by treating an isocyanate 5 (which may, of course, have been prepared from an amine as 20 described above) with water to hydrolyze some of the isocyanate back to the amine, whereupon the subsequent condensation of the amine with the remaining isocyanate yields the appropriate symmetrical urea 6.

WO 02/076930

PCT/US02/06217

19

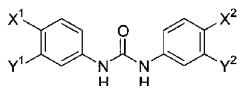
Reaction Scheme 2



Example 2: 1,3-bis(4-chloro-3-nitrophenyl)urea

A solution of 3-nitro-4-chloroaniline (2 g) in 50 mL benzene, 5 mL pyridine, and 100 mg 4-dimethylaminopyridine was added dropwise to a stirred solution of 20% w/w phosgene in toluene (6 g) and 10 mL benzene at 5°C. Once the addition was completed, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirring was continued for 3 hours. This solution was then added to a stirred mixture of 200 mL diethyl ether, 0.5 mL pyridine, and 100 mg water, and stirred overnight. An additional 10 mL of water was added, and stirring was continued for 1 hour. The resulting precipitate was filtered using a fritted funnel and washed with diethyl ether. The solids were re-slurried with water and washed with water, 10% hydrochloric acid (twice), and distilled water (until the wash water was neutral pH). The product was air dried to give 0.97 g (47%) of 1,3-bis(4-chloro-3-nitrophenyl)urea.

15 The table below gives representative examples of compounds of this invention.



Compound No.	X¹	X²	Y¹	Y²
1	Cl	Cl	NO ₂	NO ₂
2	F	F	NO ₂	NO ₂
3	Br	Br	NO ₂	NO ₂
4	Cl	Cl	CN	CN
5	F	F	CN	CN
6	Br	Br	CN	CN
7	Cl	Cl	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃
8	F	F	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃

Compound No.	X ¹	X ²	Y ¹	Y ²
9	Br	Br	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CF ₃
10	Cl	Cl	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
11	F	F	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
12	Cl	Cl	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
13	F	F	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
14	F	Cl	CN	CN
15	F	Cl	NO ₂	NO ₂
16	Br	Cl	NO ₂	NO ₂
17	F	Cl	SO ₂ CH ₃	SO ₂ CH ₃
18	F	F	COCH ₃	COCH ₃
19	Cl	Cl	COCH ₃	COCH ₃
20	F	F	CONHCH ₃	CONHCH ₃
21	Cl	F	CON(CH ₃) ₂	CON(CH ₃) ₂
22	Cl	Cl	CON(CH ₃) ₂	COCH ₃
23	Br	Cl	NO ₂	CN
24	F	F	NO ₂	CN
25	F	Cl	NO ₂	CN
26	Cl	F	NO ₂	CN
27	Cl	Cl	COCH ₃	CN
28	Cl	Cl	COCH ₃	NO ₂
29	F	Cl	COCH ₃	NO ₂
30	Cl	Cl	SO ₂ CF ₃	NO ₂
31	Cl	F	SO ₂ CF ₃	SO ₂ CH ₃
32	Cl	F	SO ₂ CF ₃	NO ₂
33	Cl	F	SO ₂ CF ₃	CN
34	F	F	SO ₂ CH ₃	NO ₂
35	Cl	Cl	SO ₂ CH ₃	NO ₂
36	F	Cl	SO ₂ CH ₃	NO ₂
37	Cl	Cl	COPh	NO ₂
38	F	Cl	SO ₂ Ph	NO ₂

Compound No.	X ¹	X ²	Y ¹	Y ²
39	F	F	SO ₂ Ph	NO ₂
40	Cl	Cl	SO ₂ Ph	NO ₂
41	F	Cl	SO ₂ Ph	CN
42	F	F	SO ₂ Ph	NO ₂
43	F	Cl	SO ₂ Ph	SO ₂ Ph
44	Cl	F	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
45	F	F	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
46	Cl	Cl	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
47	Cl	Br	CON(CH ₃) ₂	NO ₂
48	OSO ₂ CF ₃	OSO ₂ CF ₃	NO ₂	NO ₂
49	OSO ₂ CH ₃	Cl	NO ₂	NO ₂
50	OSO ₂ CF ₃	F	NO ₂	NO ₂

Example 3. Fas-mediated apoptosis

Assays for Fas-dependent apoptosis are known in the art. See, for example, Ruiz-Ruiz et al., *Cell Death Diff.* 6:271 (1999); and Muller et al., *J. Exp. Therap.* 188:2033

5 (1998).

Apoptosis is identified by detection of the DNA fragmentation pattern characteristic of apoptotic cell death. In this Example, apoptosis is detected and measured by FACS® analysis carried out in a FACScan® flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software. Quantification of DNA fragmentation is performed 10 by FACS® analysis of propidium iodide-stained nuclei as described in Nicolletti et al., *J. Immunol. Methods* 139:271-279 (1991). Hepatocytes floating in the culture medium are collected by centrifugation at 200 xg. Adherent hepatocytes are harvested by incubation with 1% trypsin for 1 min. The cells are washed in phosphate-buffered saline (PBS), suspended in hypotonic lysis buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X, and 50 ng/mL 15 propidium iodide) (Sigma) and incubated at 4 °C for 6 hours. Cells are then analyzed for DNA content by flow cytometry.

Early apoptotic changes are identified using annexin V-Fluos (Boehringer Mannheim) which binds to phosphatidylserine molecules (PS) exposed on apoptotic, but not normal, cell membranes (PS is normally restricted to the inner leaflet of the cell membrane bilayer). Propidium iodide is used to discriminate necrotic cells from the

5 annexin V positively stained cell cluster. Cells are trypsinized, washed with PBS, centrifuged at 200 $\times g$ for 5 min, and resuspended in 100 μL HEPES buffer (10 ml HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) and 20 μL propidium iodide. Cells are incubated for 10-15 min and analyzed on a flow cytometer using CellQuest software. A 488 nm excitation wavelength and a 560 nm cutoff filter is used for detection of

10 propidium iodide.

Compound 3 shows stimulation of Fas-dependent apoptosis at 10 μM .

Example 4. Stimulation of Fas-mediated apoptosis

Anti-human Fas antibody h-HFE7A, humanized antibody was obtained from Sankyo Co., Ltd. This antibody induces apoptosis when cross-linked with secondary

15 antibody *in vitro*.

Samples of human synovium were obtained from rheumatoid arthritis patients at the time of total knee replacement surgery or synovectomy. Synovial tissue was minced into small pieces and was digested with collagenase and cultured in Ham's F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (F10F) in a humidified 5% CO₂ atmosphere

20 at 37 °C. Adherent cells were considered as synoviocytes and were cultivated in F10F.

Cell viability was determined with the XTT method described in *Cancer Res.* 48:4827 (1988). Ninety-six well flat plates were precoated with anti-human IgG. h-HFE7A (1000 ng/mL) and/or 10 μM of a compound of this invention were added and incubated for 2 hours. Synoviocytes were seeded (10,000/well) and incubated for 16

25 hours. Background wells received culture medium only. XTT (2,3-Bis[2-methoxy-4-nitro-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), final concentration 200 $\mu g/mL$, and phenazine methosulfate, final concentration 5 μM , were added to each well, and further incubated for 4 hours. The absorbance at 450 nm was measured and cell viability was determined as follows:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{OD}_{450} \text{ of test sample} - \text{OD}_{450} \text{ of background}) \times 100}{(\text{OD}_{450} \text{ of control sample} - \text{OD}_{450} \text{ of background})}$$

Enhancement of Fas-mediated apoptosis by compounds of this invention was determined
5 by the stimulation index (SI):

$$\text{SI} = \frac{(\text{Cell viability (\%)} \text{ with compound only}) \times (\text{Cell viability (\%)} \text{ with h-HFE7A only})}{(\text{Cell viability (\%)} \text{ with compound and h-HEF7A}) \times 100}$$

An SI over 2.0 was considered positive.

10 Compound 3 was positive in this assay at 10 μM .

Example 5. Expression of the Fas Receptor

Expression of the Fas receptor is measured by the method of Muller et al., *J. Exp. Med.* 188:2033-2045 (1998). A FACScan[®] flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software is used to determine the percent enhanced Fas receptor expression.

15 The antibody anti-APO-1 (IgG3), specific for the Fas receptor, is used as a purified biotinylated antibody. Quantum Red streptavidin (Sigma) is used as a secondary reagent for indirect immunofluorescence. Hepatoma cells are incubated in 50 μL culture medium with biotinylated anti-APO-1. After 30 min incubation, cells are washed twice, incubated for 30 min with Quantum Red streptavidin, washed twice again, and assayed. Upon data
20 acquisition, a gate is set on intact cells by forward/side scatter analysis, and 10^4 viable cells are analyzed. The percent enhanced Fas receptor expression is calculated as the difference between the % Fas receptor detected in treated cells and the % Fas receptor detected in control cells, according to the formula:

Enhanced Fas receptor expression (\%) = (% Fas receptor in treated cells — % Quantum
25 Red in treated cells) — (% Fas receptor in control cells — % Quantum Red in control cells).

Compounds of the invention are found to enhance Fas receptor expression.

Example 6. Oral pharmaceutical composition preparation - solid dosage formulation

A pharmaceutical composition for oral administration is prepared by combining the following:

	% w/w
	Compound of the invention
5	10%
	Magnesium stearate
	2.0%
	Starch
10	hydroxypropylmethylcellulose
	1.0%
	Microcrystalline cellulose
	86.5%

The mixture is compressed in a press to form tablets. Alternatively, the mixture 10 is instead filled into hard gelatin capsules.

Tablets may be coated by applying a suspension of film former (e.g. hydroxypropylmethylcellulose), pigment (e.g. titanium dioxide) and plasticizer (e.g. diethyl phthalate) and drying the film by evaporation of the solvent. The film coat is typically between 2% and 6% of the tablet by weight, e.g. 3% by weight.

15 Tablets comprising compounds of the invention made by the methods of this Example are suitable for oral administration and are effective in the enhancement of Fas-mediated apoptosis and for the treatment of autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.

Example 7. Oral pharmaceutical composition preparation – softgel

20 A pharmaceutical composition of a compound of the invention suitable for oral administration is prepared by combining the following:

	% w/w
	Compound of the invention
	20%
	Polyethylene glycol
	80%

25 The compound is dispersed or dissolved in the liquid carrier, and a thickening agent is optionally added. The formulation is then enclosed in a soft gelatin capsule.

Soft gelatin capsules comprising compounds of the invention made by the methods of this example are suitable for oral administration and are effective in the enhancement of Fas-mediated apoptosis and for the treatment of autoimmune diseases, 30 infectious diseases, and malignancies.

Example 8. Pharmaceutical composition for parenteral administration

Pharmaceutical compositions for parenteral administration typically comprise the pharmaceutically active ingredient and physiological saline, such as phosphate buffered saline or other water solution with pH and salt content suitable for introduction into an animal. A pharmaceutical composition for parenteral administration is prepared by combining a compound of the invention and Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D8662, Sigma Chemical Co. St. Louis MO) as described in the following:

		<u>% w/w</u>
	Compound of the invention	1.0%
10	Saline	99.0%

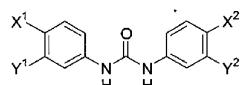
The solution is sterilized and sealed in sterile containers.

Pharmaceutical compositions comprising compounds of the invention made by the methods of this example are suitable for parenteral administration and are effective in the enhancement of Fas-mediated apoptosis and for the treatment of autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.

Various modifications and variations of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed is not limited to such specific embodiments. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that various modifications of the described modes for carrying out the invention are within the scope of the following claims.

We claim:

1. A compound of the formula:



5 where:

X¹ and X² are independently selected from -F, -Cl, -Br, and -OSO₂R¹;
 Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and
 -SO₂R¹R²; and
 each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally
 10 substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;
 each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally
 substituted aryl, and optionally substituted aralkyl,
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound of claim 1, where X¹ and X² are the same.

- 15 3. A compound of claim 1, where Y¹ and Y² are the same.

4. A compound of claim 1, where X¹ and X² are independently selected from -F and
 -Cl.

5. A compound of claim 1, where Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -
 NO₂, and -COR¹.

- 20 6. The compound of claim 1 which is 1,3-bis(4-chloro-3-nitrophenyl)urea.

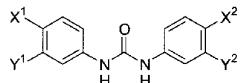
7. A pharmaceutical composition comprising:
 a compound of claim 1, and
 a pharmaceutically acceptable excipient.

- 25 8. A pharmaceutical composition comprising:
 a compound of claim 2, and
 a pharmaceutically acceptable excipient.

9. A pharmaceutical composition comprising:
a compound of claim 3, and
a pharmaceutically acceptable excipient.
10. A pharmaceutical composition comprising:
5 a compound of claim 4, and
a pharmaceutically acceptable excipient.
11. A pharmaceutical composition comprising:
a compound of claim 5, and
a pharmaceutically acceptable excipient.
- 10 12. A pharmaceutical composition comprising:
a compound of claim 6, and
a pharmaceutically acceptable excipient.
13. A method of treating a disease in a mammal treatable by administration of a
stimulator of Fas-mediated apoptosis, comprising:
15 administering to the mammal a therapeutically effective amount of a compound of claim
1.
14. The method of claim 13, where the disease is selected from the group consisting
of autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.
15. The method of claim 14, further comprising treating said mammal with a
20 conventional form of therapy for the disease.
16. The method of claim 15, where the conventional form of therapy comprises
administering a drug selected from the group consisting of immunosuppressants,
antinflammatory agents, antiviral agents, antibacterial agents, antifungal agents, and
anticancer chemotherapeutic agents.
- 25 17. A method of stimulating Fas-mediated apoptosis in a cell with a Fas receptor,
comprising contacting the cell with a compound of claim 1 in an amount sufficient to
stimulate the Fas receptor.

18. A process for identifying a compound that has at least one function selected from the group of stimulating the Fas receptor and stimulating Fas-mediated apoptosis, the process comprising administering to an assay of Fas binding or of Fas-mediated apoptosis a compound of claim 1 and noting a first result, administering a test compound 5 to the assay and noting a second result, and comparing the first and second results, whereby a test compound producing results similar to or better than the first result is identified as a compound having the desired function.
19. A process for identifying a target compound that mimics the function of a compound of claim 1 in an assay, the process comprising administering a compound of 10 claim 1 to the assay and noting a first result, administering a test compound to the assay and noting a second result, and comparing the first and second results, whereby a test compound producing results similar to or better than the first result is identified as a target compound that mimics the function of a compound of claim 1.
20. A process for validating, optimizing, or standardizing a bioassay, the process 15 comprising submitting a compound of claim 1 to the bioassay; and validating, optimizing, or standardizing the bioassay by the activity of the compound in the bioassay.

21. Use of a compound of the formula:
- 20



where:

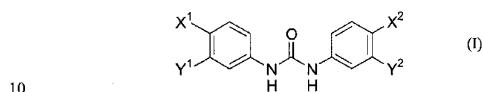
X¹ and X² are independently selected from -F, -Cl, -Br, and -OSO₂R¹;
Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and

25 -SO₂R¹R²; and
each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;

each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl,
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament useful for the treatment of a disease treatable by administration of a stimulator of Fas-mediated apoptosis.

22. Use of Claim 21 wherein the disease is selected from the group consisting of autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.

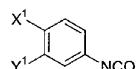
23. A process for the preparation of a compound of the formula:



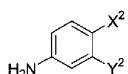
where:

X¹ and X² are independently selected from -F, -Cl, -Br, and -OSO₂R¹;
 Y¹ and Y² are independently selected from -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and -SO₂R¹R²; and

- 15 each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;
 each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally substituted aryl, and optionally substituted aralkyl,
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof, which process comprises:
- 20 a) reacting a compound of formula:

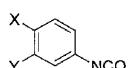


wherein X¹ and Y¹ are as defined above, with a compound of the formula:



wherein X^2 and Y^2 are as defined above; or

5 b) reacting a compound of the formula:



wherein X is -F, -Cl, -Br or -OSO₂R¹;

10 Y is -CN, -NO₂, -COR¹, -CONR¹R², -SO₂R¹, and -SO₂R¹R²; and
each R¹ is independently selected from optionally substituted alkyl, optionally
substituted aryl, and optionally substituted aralkyl;
each R² is independently selected from H, optionally substituted alkyl, optionally
substituted aryl, and optionally substituted aralkyl, in the presence of water; or

15 c) converting a compound of Formula (I) to a corresponding base-addition or acid-
addition salt; or
d) converting a salt of a compound of Formula (I) to a free compound; or
e) converting a salt of a compound of Formula (I) to a pharmaceutically acceptable salt;
20 or
f) resolving a mixture of stereoisomers of a compound of Formula (I) to individual
stereoisomers.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/076930 A3(51) International Patent Classification: C07C 275/42,
275/50, 317/02, A61K 31/17, A61P 35/00, 37/00, 19/00,
C07C 309/65

(21) International Application Number: PCT/US02/06217

(22) International Filing Date: 1 March 2002 (01.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/273,988 7 March 2001 (07.03.2001) US
10/082,802 22 February 2002 (22.02.2002) US

(71) Applicant: TELIK, INC. [US/US]; 750 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors: ROBINSON, Louise, 1349 Rosewood Avenue, San Carlos, CA 94070 (US); VILLAR, Hugo, O.; 5549 Soledad Mountain Road, La Jolla, CA 92037 (US).

(74) Agents: CHOW, Y. Ping et al., Heller Ehrman White & McAuliffe, 1111, 275 Middlefield Road, Menlo Park CA 94025-3506 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,

CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, I, K, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MR, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TU, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
 — with international search report
 — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
16 January 2003

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.



WO 02/076930 A3

(54) Title: SUBSTITUTED DIARYLUREAS AS STIMULATORS FOR FAS-MEDIATED APOPTOSIS

(57) Abstract: Substituted diarylureas, pharmaceutical compositions containing them, and their use for stimulating Fas-mediated apoptosis. The compounds, as single stereoisomers or mixtures of stereoisomers, their pharmaceutically acceptable salts, and pharmaceutical compositions containing them, are useful in methods of treating autoimmune diseases, infectious diseases, and malignancies.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 02/06217
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07C275/42 C07C275/30 C07C317/42 A61K31/17 A61P35/00 A61P37/00 A61P19/00 C07C309/65		
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 C07C 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) CHEM ABS Data, EPO-Internal, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 00357 A (VERTEX PHARMACEUTICALS) 7 January 1999 (1999-01-07) cited in the application the whole document	1-23
A	WO 99 32436 A (BAYER CORPORATION) 1 July 1999 (1999-07-01) cited in the application the whole document	1-23
A	WO 99 32463 A (BAYER CORPORATION) 1 July 1999 (1999-07-01) cited in the application the whole document	1-23
A	US 3 214 468 A (W.E. FRICK) 26 October 1965 (1965-10-26) the whole document	1-23
	-/-	-/-
<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.
* 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 document but published on or after the International filing date		
L document which may have bearing on prior art 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 12 November 2002	Date of mailing of the International search report 19/11/2002	
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 Beslier, L	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/US 02/06217
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 54286 A (WAYNE HUGHES INSTITUTE) 28 October 1999 (1999-10-28) the whole document	1-23

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 02/06217
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 13-16 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. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.: 		
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No.
PCT/US 02/06217

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9900357	A 07-01-1999	US 6093742 A AU 8377698 A EP 0993441 A1 WO 9900357 A1	25-07-2000 19-01-1999 19-04-2000 07-01-1999
WO 9932436	A 01-07-1999	AU 1905499 A BG 104599 A BR 9814375 A CA 2315646 A1 CN 1283180 T DE 1049664 T1 EP 1049664 A1 ES 2153809 T1 GR 2001300006 T1 HU 0004437 A2 JP 2001526258 T NO 20003230 A PL 342078 A1 SK 9612000 A3 TR 200002616 T2 TR 200100874 T2 WO 9932436 A1	12-07-1999 30-03-2001 21-05-2002 01-07-1999 07-02-2001 03-05-2001 08-11-2000 16-03-2001 28-02-2001 28-06-2001 18-12-2001 21-08-2000 21-05-2001 12-03-2001 21-11-2000 21-06-2001 01-07-1999
WO 9932463	A 01-07-1999	AU 1939999 A CA 2315715 A1 DE 1042305 T1 EP 1042305 A1 ES 2154252 T1 JP 2001526276 T WO 9932463 A1	12-07-1999 01-07-1999 19-04-2001 11-10-2000 01-04-2001 18-12-2001 01-07-1999
US 3214468	A 26-10-1965	CH 364384 A CH 362068 A DE 1168606 B GB 921682 A NL 254871 A US 3230141 A	30-05-1962 31-05-1962 23-04-1964 20-03-1963 18-01-1966
WO 9954286	A 28-10-1999	US 6303652 B1 AU 3653099 A CA 2328962 A1 EP 1071658 A2 HU 0102661 A2 JP 2002512216 T NO 20005224 A WO 9954286 A2 US 6160010 A US 6221900 B1 US 6294575 B1 US 6365626 B1	16-10-2001 08-11-1999 28-10-1999 31-01-2001 28-11-2001 23-04-2002 18-12-2000 28-10-1999 12-12-2000 24-04-2001 25-09-2001 02-04-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

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 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 C 273/02	C 0 7 C 273/02	
C 0 7 C 273/16	C 0 7 C 273/16	
// C 0 7 B 57/00	C 0 7 B 57/00	3 5 0
C 0 7 M 7:00	C 0 7 M 7:00	

(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,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,S1,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ルイーズ・ロビンソン

アメリカ合衆国 9 4 0 7 0 カリフォルニア州サン・カルロス、ローズウッド・アベニュー 1 3 4 9
番

(72)発明者 ヒューゴ・オー・ビラー

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州ラ・ホラ、ソレダッド・マウンテン・ロード 5 5 4 9
番

F ターム(参考) 4C206 AA01 AA02 AA03 HA30 KA01 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB05

ZB21 ZB26 ZB32

4H006 AA01 AA02 AA03 AB20 AC57 AC83