

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6325573号
(P6325573)

(45) 発行日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(24) 登録日 平成30年4月20日(2018.4.20)

(51) Int. Cl.		F I		
C07D 403/04	(2006.01)	C07D 403/04	CSP	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00		
A61P 29/00	(2006.01)	A61P 29/00	101	
A61P 37/08	(2006.01)	A61P 37/08		

請求項の数 12 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-550315 (P2015-550315)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月26日(2013.12.26)
 (65) 公表番号 特表2016-504351 (P2016-504351A)
 (43) 公表日 平成28年2月12日(2016.2.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/012204
 (87) 国際公開番号 W02014/104757
 (87) 国際公開日 平成26年7月3日(2014.7.3)
 審査請求日 平成28年12月26日(2016.12.26)
 (31) 優先権主張番号 61/746,980
 (32) 優先日 平成24年12月28日(2012.12.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 515178085
 クリスタルジェノミクス・インコーポレイ
 テッド
 CRYSTALGENOMICS, IN
 C.
 大韓民国 463-400 ギョンギ-ド
 ションナム-シ ブンダン-グ デウォ
 ンパンギョ-ロ 700 コリア・バイオ
 ・パーク タワー・エイ フィフスフロア
 5THF, TOWER A, KORE
 A BIO PARK, 700 DAE
 WANGPANGYO-RO, BUND
 ANG-GU, SEONGNAM-SI
 , GYEONGGI-DO 463-4
 00, REPUBLIC OF KOR
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BTKキナーゼ抑制剤としての2, 3-ジヒドロイソインドール-1-オン誘導体及びこれを含む薬学的組成物

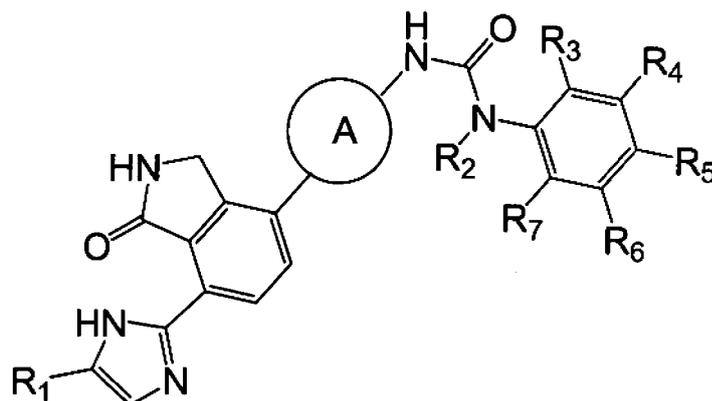
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学式1で表示される化合物、その薬学的に許容可能な塩、水和物、溶媒和物、鏡像異性体(エナンチオマー)、ジアステレオマー、及び、ラセミ混合物で構成される群から選択される化合物。

【化1】

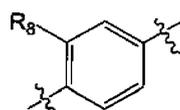
〔化学式1〕



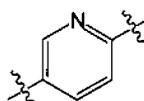
10

20

上記化学式 1 で、Aは、
【化 2】



または、
【化 3】



10

であり、

R₈ は、水素、ハロゲンまたはC₁₋₃アルキルであり、

R₁ はC₁₋₃アルキルであり、

R₂ は水素または C₁₋₃アルキルであり、

R₃乃至R₇はそれぞれ独立的に水素、ハロゲン、シアノ、ニトロまたは C₁₋₃ハロアルキルであり、ただし、R₃乃至R₇の少なくとも2つはそれぞれ独立的にハロゲン、シアノ、ニトロまたはC₁₋₃ハロアルキルである。

【請求項 2】

R₃、R₅及びR₇はハロゲン、シアノ、ニトロ、又はC₁₋₃ハロアルキルであり、R₄及びR₆は水素である請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 3】

R₁ はメチルであり、R₂ は水素またはメチルであり、R₈ は水素またはフルオロである請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

上記化学式1の化合物は、下記化合物から構成された群から選択されるものを特徴とする請求項 1 に記載の化合物。

1) 1-(2,6-ジクロロ-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -尿素

3) 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -尿素

30

4) 1-(2-クロロ-6-フルオロ-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -尿素

5) 1-(2,6-ビス-トリフルオロメチル-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -尿素

6) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -3-(2-フルオロ-6-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素

7) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -3-(2,4,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素

40

8) 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -1-メチル-尿素

9) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -3-ペンタフルオロフェニル-尿素

10) 1-(2,5-ジフルオロフェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドリン-4-イル]フェニル } 尿素

11) 1-(2,4-ジフルオロ-フェニル)-3- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル } -尿素

12) 1- { 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-

50

- 1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素
- 13) 1-(3,5-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 14) 1-(3,4-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 15) 1-(4-シアノ-3-フルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドリン-4-イル]-フェニル}-尿素
- 16) 1-(4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドリン-4-イル]-フェニル}-尿素
- 17) 1-(3-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドリン-4-イル]-フェニル}-尿素
- 18) 1-(2-クロロ-3,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドリン-4-イル]-フェニル}-尿素
- 19) 1-(4-クロロ-2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 20) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,5,6-テトラフルオロ-フェニル)-尿素

【請求項 5】

前記化学式1の化合物は、1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,4,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素、その薬学的に許容可能な塩、水和物、溶媒和物、鏡像異性体（エナンチオマー）、ジアステレオマー、及び、ラセミ混合物で構成される群から選択される請求項1に記載の化合物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の化合物を有効成分として含む薬学的組成物。

【請求項 7】

抗生剤、アルキル化剤、抗代謝剤、ホルモン剤、免疫学的製剤、インターフェロン型製剤及び抗癌剤で構成される群から選択される1種以上を追加で含む請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

タンパク質キナーゼの異常な、または、脱調節された活性によって引き起こされる疾病の治療、緩和または予防のための薬学製剤の製造のための請求項6又は7に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 9】

前記タンパク質キナーゼが、ABL、ACK、AXL、Aurora、BLK、BMX、BTK、CDK、CSK、DDR、EPHA、FER、FES、FGFR、FGR、FLT、FRK、FYN、HCK、IRR、ITK、JAK、KDR、KIT、LCK、LYN、MAPK、MER、MET、MINK、MNK、MST、MUSK、PDGFR、PLK、RET、RON、SRC、SRM、TIE、SYK、TNK1、TRK、またはTNIKである請求項8に記載の使用。

【請求項 10】

前記タンパク質キナーゼが、BTKである請求項9に記載の使用。

【請求項 11】

前記タンパク質キナーゼの異常な、または、脱調節された活性によって引き起こされる疾病が、癌、リウマチ性関節炎及び骨関節炎に関する炎症、喘息、アレルギー、アトピー皮膚炎、または乾癬である請求項8に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 12】

前記癌が、リンパ腫、白血病、血液癌、胃癌、非小細胞肺癌、肝臓癌、大腸癌、小腸癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨癌、メラノーマ、乳癌、硬化性腺腫、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、頭頸部癌、食道癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、腎臓癌、肉腫、前立腺癌、尿道癌、膀胱癌、繊維腺腫、または神経膠芽腫である請求項11に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

下記化学式1で表示される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物及びこれを有効成分として含むタンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防用薬学的組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

BTK(ブルトン型チロシンキナーゼ: Bruton's tyrosine kinase) 酵素は、Tecファミリー(Tec family) に属する非受容体チロシンキナーゼとして知られており、650個のアミノ酸で構成され、プレクストリン相同ドメイン(pleckstrin homology domain)(PH-domain)、ジンクフィンガー領域(zinc-finger region)、SH3ドメイン(SH3 domain)、SH2ドメイン(SH2 domain)キナーゼドメイン(domain)を持っている。この中で、キナーゼドメインは、医薬標的としての関心が広範囲に広がっている傾向がある。

10

【0003】

BTKキナーゼは、一部、T-細胞、ナチュラルキラー細胞(natural killer cell)、血漿細胞などを除外するB-細胞や造血細胞に分布しており、多様な炎症反応や癌によるB細胞膜受容体(BCR)信号伝達を通して活性化されたBTKは、ホスホリパーゼCガンマー2(Phospholipase C gamma2)(PLCγ2)などのような下部信号伝達体系を活性化させ、TNF-α、IL-6のようなサイトカイン(cytokine)などと、NF-κBの分泌を促進させるのに核心的な役割を行なう。

20

【0004】

炎症治療において、BTKは、B-細胞で炎症誘発物質の信号を補足するB-細胞抗原受容体、CD40、TLR-4、FcγRなどの膜受容体の反応を媒介するものと知られており、肥満細胞(mast cell)、B-cell、そしてマクロファージ(macrophage)の活性化により発生する炎症の信号伝達機構にも重要な影響を及ぼすために、この酵素を阻害することによって、炎症信号体系(IgEシグナリング: IgE signaling)の遮断と共に、疾病の進行を抑制できる。こうした信号伝達機構は、免疫物質分泌の複雑な信号伝達過程であり、この過程は様々な段階に及ぶタンパク質のリン酸化、脱リン酸化過程を経て進行するが、この中でBTKは、炎症機構信号伝達体系でSYK(脾臓チロシンキナーゼ: spleen tyrosine kinase)と共に、上位段階の中の一つであるため、他のキナーゼ標的に比べて免疫反応をもたらす要素の活性化を防ぐのに、より効果的だ。

30

【0005】

また、抗癌治療において、BTKは、B細胞膜受容体(BCR)とB細胞表面のタンパク質を変形させ、細胞死滅を抑制する信号(antisuicide signal)を送るということが知られているため、この酵素を阻害することによって、BCR信号伝達と関連したリンパ腫のような癌治療に効果を上げることができる。実際に、Pharmacoclics社のIbrutinib(PCI-32765)が慢性リンパ球性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)の抗癌治療剤として最近承認され、その次に、Avila社のAVL-292化合物が小リンパ球性白血病(small lymphocytic leukemia, SLL)及びCLLを対象とする臨床3相段階にある。これらの化合物は、相対的に患者群が希少なSLL、CLLに対する長所を見せる反面、患者群が最も多いびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)などにはそれほど大きな効果を見せることが出来ず、新しい薬剤の必要性は続けて求められている。

40

【0006】

BTKキナーゼ阻害剤が抗癌症及び抗癌治療剤としての二つの役割をすることができる作用機構に対する背景は、非特許文献1(Nature Chemical Biology7,(2011),4)によく説明されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

50

【非特許文献1】Nature Chemical Biology7,(2011),4

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、下記化学式1で表示される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物を提供するところにある。

【0009】

本発明のもう一つの目的は、上記化合物を有効成分として含むタンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防用薬学的組成物を提供するところにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

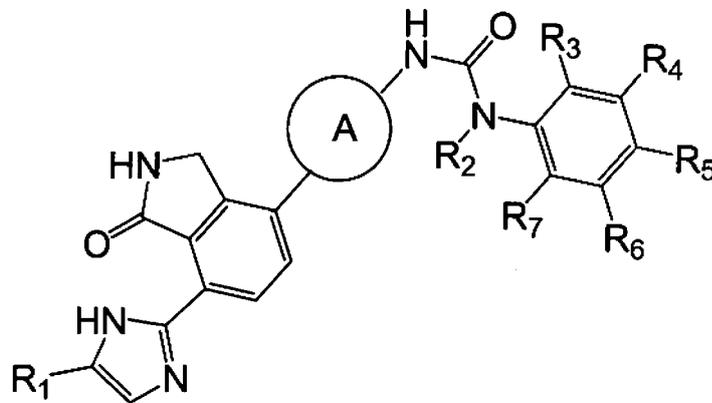
上記目的を達成するために、本発明は、下記化学式1で表示される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物を提供する。

【0011】

【化1】

〔化学式1〕

20

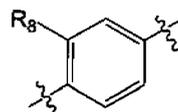


30

【0012】

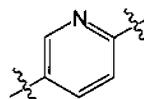
上記化学式1で、Aは、

【化2】



または

【化3】



40

であり、

R₈は水素、ハロゲンまたはC₁₋₃アルキルであり、

R₁及びR₂は、それぞれ独立的に水素またはC₁₋₃アルキルであり、

R₃乃至R₇は、それぞれ独立的にハロゲン、シアノ、ニトロまたはC₁₋₃ハロアルキルである。

【0013】

50

また、本発明は、上記化合物を有効成分として含むタンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防用薬学的組成物を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明の詳細な説明

以下で、本発明をさらに詳細に説明する

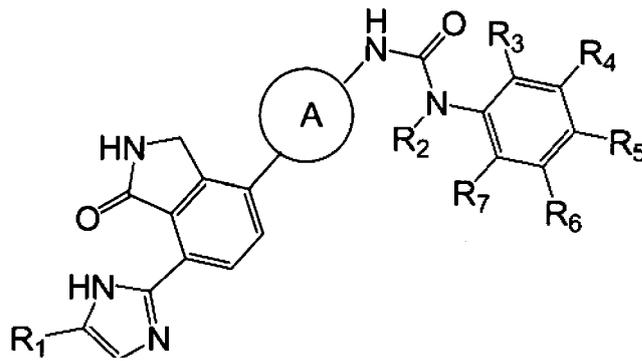
【0015】

本発明は、下記化学式1で表示される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物を提供する。

【0016】

【化4】

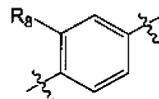
〔化学式1〕



【0017】

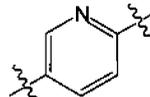
上記化学式1で、Aは、

【化5】



または、

【化6】



であり、

R₈は水素、ハロゲンまたはC₁₋₃アルキルであり、

R₁及びR₂は、それぞれ独立的に水素またはC₁₋₃アルキルであり、

R₃乃至R₇は、それぞれ独立的に水素または電子求引置換基であり、上記の電子求引置換基は、例えば、ハロゲン、シアノ、ニトロまたはC₁₋₃ハロアルキルである。

【0018】

本発明の一つの具体的な例で、上記 R₃乃至R₇は、それぞれ独立的に水素、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、シアノ、ニトロ、ジフルオロメチルまたはトリフルオロメチルである。

【0019】

本発明の一つの具体的な例で、

R₁及びR₂は、それぞれ独立的に水素またはメチルであり、

R₃乃至R₇は、それぞれ独立的に水素、フルオロ、クロロ、シアノまたは、トリフルオロ

10

20

30

40

50

メチルであり、

R_9 は、水素またはフルオロである。

【0020】

本明細書で使用される用語「ハロ」または「ハロゲン」は、他の言及がなければ、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味する。

【0021】

本明細書で使用される用語「アルキル」は、他の言及がなければ、直鎖型または分枝型の炭化水素残基を意味する。

【0022】

本発明に伴う他の化学式(I)の化合物は、無機酸または、有機酸から誘導される薬学的に許容可能な塩形態で使用される場合があり、こうした薬学的に許容可能な塩には薬剤学的に許容される陰イオンを含む無毒性酸付加塩を形成する酸、例を挙げると、塩酸、窒酸、リン酸、臭化水素酸、ヨード化水素酸などのような無機酸、酒石酸、ギ酸、クエン酸、酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、グルコン酸、安息香酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸などのような有機カルボン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸またはナフタレンスルホン酸などのようなスルホン酸などにより形成される酸付加塩、特に好ましくは、硫酸、メタンスルホン酸またはハロゲン化水素酸などにより形成される酸付加塩を挙げることができる。

10

【0023】

上記化学式1の化合物の「薬学的に許容可能な塩」は通常的な方法を使用し、化学式1の化合物から製造し使用することができる。具体的には本発明に伴う薬剤学的に許容可能な塩は、化学式1の化合物を水に溶解させる有機溶媒、例を挙げると、アセトン、メタノール、エタノールまたは、アセトニトリルなどに溶かして、過量の有機酸を加えたり、無機酸の酸受容液を加えた後、沈殿させたり結晶化させて、製造することができる。続いて、この混合物から溶媒や過量の酸を蒸発させた後、乾燥させて、付加塩を得たり、または析出された塩を吸引ろ過させて製造することができる。

20

【0024】

本明細書に使用される用語「エステル」は、R及びR'がお互いに独立的にアルキル、シクロアルキル、アリル、ヘテロアリル(炭素環式化合物を通して、酸素原子と結合する)及びヘテロ脂環族(炭素環式化合物を通して結合する)で構成された群から選択され、nが0または1の化学式 $-(R)_n-COOR$ を持つ化学成分(chemical moiety)を称する。

30

【0025】

本明細書で使用される用語「プロドラック」は、生体内(in vivo)で親薬物(parent drug)に変形させた薬剤を称する。プロドラックは、様々な状況では、上記親薬物を投与するより容易に投与することができるために、これらはしばしば有用である。例えば、これらは経口投与によって生物学的に利用可能だが、上記親薬物は生物学的に利用できない。上記プロドラックは、また親薬物に対して、薬学組成物から改善された溶解度を持つことができる。例えば、薬物の水溶性は細胞膜に対する移動性に悪影響を及ぼすため、細胞膜を通した薬物伝達を促進させるために、エステル形態のプロドラックとして投与され、上記エステル形態のプロドラックは、細胞内で物質代謝的にカルボン酸と活性本体(active entity)に加水分解される。

40

【0026】

本発明に伴う化学式1の化合物は、これから製造されうる水和物及び溶媒和物を含む。

【0027】

また、本発明による化学式1の化合物は非対称炭素中心を持つため、異性体を含むことができ、上記異性体は、鏡像異性体、部分立体異性体またはラセミ混合物であり、これら全ての異性体または混合物は、本発明の範囲に含まれる。

【0028】

本発明の上記化学式1で表示される化合物の具体的な例は、以下の通り。

1)1-(2,6-ジクロロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル

50

-)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 2) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素
- 3) 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 4) 1-(2-クロロ-6-フルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 5) 1-(2,6-ビス-トリフルオロメチル-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 6) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2-フルオロ-6-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素
- 7) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,4,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素
- 8) 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-1-メチル-尿素
- 9) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-ペンタフルオロフェニル-尿素
- 10) 1-(2,5-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]フェニル} 尿素
- 11) 1-(2,4-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 12) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素
- 13) 1-(3,5-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 14) 1-(3,4-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 15) 1-(4-シアノ-3-フルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 16) 1-(4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 17) 1-(3-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 18) 1-(2-クロロ-3,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 19) 1-(4-クロロ-2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
- 20) 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,5,6-テトラフルオロ-フェニル)-尿素
- 【 0 0 2 9 】

上記化学式1で表示された化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成された群から選択される化合物は、ABL (アベルソンチロシンキナーゼ : Abelson tyrosine kinase)、ACK (活性化cdc42関連キナーゼ : Activated cdc42-associated kinase)、AXL、Aurora、BLK (Bリンパ球チロシンキナーゼ : B lymphoid tyrosine kinase)、BMX (骨髄X-結合キナーゼ : Bone marrow X-linked kinase)、BTK(ブルトン型チロシンキナーゼ : Bruton's tyrosine kinase)、CDK(サイクリン依存性キナーゼ : Cyclin-dependent kinase)、CSK (C-Src キナーゼ : C- Src kinase)、DDR (ジスコイジンドメイン受容体 : Discoidin domain receptor)、EPHA (エ

10

20

30

40

50

フリリンA型受容体キナーゼ：Ephrin type A receptor kinase)、FER (Fer (fps/fes関連)チロシンキナーゼ：Fer(fps/fes related)tyrosine kinase)、FES (ネコ肉腫オンコジーンFeline sarcoma oncogene)、FGFR (繊維芽細胞増殖因子受容体：Fibroblast growth factor receptor)、FGR、FLT(Fms様チロシンキナーゼ：Fms-like tyrosine kinase)、FRK (Fyn関連キナーゼ：Fyn-related kinase)、FYN、HCK (造血細胞キナーゼ：Hemopoietic cell kinase)、IRR (インシュリン受容体関連受容体：Insulin-receptor-related-receptor)、ITK (インターロイキン2誘導性T細胞キナーゼ：Interleukin 2-inducible T cell kinase)、JAK (ヤヌスキナーゼ：Janus kinase)、KDR (キナーゼ挿入ドメインレセプター：Kinase insert domain receptor)、KIT、LCK (リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ：Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)、LYN、MARK (マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ：Mitogen activated protein kinase)、MER (c-Merプロトオンコジーンチロシンキナーゼ：c-Mer proto-oncogen tyrosine kinase)、MET、MINK (Misshapen 様キナーゼ：Misshapen-like-kinase)、MNK (MARK 共役キナーゼ：MARK-interacting kinase)、MST (Mammalian sterile 20-like kinase)、MUSK (筋特異的キナーゼ：Muscle-specific kinase)、PDGFR (血小板由来増殖因子受容体：Platelet-derived growth factor receptor)、PLK(Polo 様キナーゼ：Polo-like kinase)、RET (Rearranged during transfection)、RON、SRC (ステロイド受容体コアクティベーター：Steroid receptor coactivator)、SRM (スperlミジンシンターゼ：Spermidine synthase)、TIE (Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF repeats)、SYK (脾臓チロシンキナーゼ：spleen tyrosine kinase)、TNK1 (チロシンキナーゼ、非受容体、1：Tyrosine kinase, non-receptor, 1)、TRK(トロポミオシン受容体キナーゼ：Tropomyosin-receptor-kinase)、またはTNIK (TRAF2 及び NCK共役キナーゼ：TRAF2 and NCK interacting kinase)などのタンパク質キナーゼの異常な、または脱超脱した活性と関連する疾病の治療、緩和または予防のために使用される。

10

20

【0030】

これに伴い、本発明は上記化学式1で表記される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物のタンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防用途、及びこのための薬学製剤の製造のための用途を提供する。

【0031】

また、本発明は、上記化学式1で表記される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物の有効量を、これを必要とする哺乳動物に投与することを含む、タンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防方法を提供する。

30

【0032】

また、本発明は、上記化学式1で表記される化合物、その薬学的に許容可能な塩、エステル、プロドラッグ、水和物、溶媒和物及びこれらの異性体で構成される群から選択される化合物を有効成分として含む、タンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する疾病の治療、緩和または予防用薬学的組成物を提供する。

40

【0033】

上記キナーゼの活性と関連する疾病は、タンパク質キナーゼの異常な、または脱調節された活性と関係する全ての疾病を含み、具体的には、癌、リウマチ性関節炎及び骨関節炎に関する炎症、喘息、アレルギー、アトピー皮膚炎、または乾癬を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

【0034】

上記癌としては、リンパ腫、白血病、血液癌、胃癌、非小細胞肺癌、肝臓癌、大腸癌、小腸癌、膵臓癌、脳腫瘍、骨癌、メラノーマ、乳癌、硬化性腺腫、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、頭頸部癌、食道癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、腎臓癌、肉腫、前立腺癌、尿道癌、膀胱癌、繊維腺腫、または神経膠芽腫などを挙げることが出来るが、これに限定されるも

50

のではない。

【0035】

上記薬学的組成物は、抗生剤、アルキル化剤、抗代謝剤、ホルモン剤、免疫学的製剤、インターフェロン製剤及び抗癌剤で構成される群から選択される1種以上を追加で含めることができる。

【0036】

本発明の薬学的組成物は、直接的にまたは当業界によく知られている適切な担体または賦形剤と一緒に含むことができる。

【0037】

上記薬学的組成物を利用した治療、緩和または予防方法は、例えば、慢性心不全、糖尿病、癌、AIDS、放射線療法、化学療法、腎臓透析、または手術による貧血症があるか、危険な対象に効果的な量の本発明の化合物を含む薬学的組成物を投与方法を含む。望ましい具体的例として、被験対象は哺乳動物の場合もあり、最も相応しい具体例で被験対象は、ヒトである場合もある。

【0038】

効果的な量の本発明の薬学的組成物は、最も効果的で便利な経路及び最も適当な製法となるように、日常的な実験により、簡単に決定されうる。多様な製剤と薬物送達システムは、当業界で利用される方法であれば、制限なく利用可能である。例を挙げると、上記の適当な投与の経路は、硬膜内、直接心室内、静脈内、腹膜内、鼻腔内または眼内注射をはじめ、筋肉内、皮下、骨髄内注射を含み、経口、直腸、粘膜を通して、鼻腔または腸への投与及び非経口送達を含むことができる (Gennaro, A.R., ed. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences参照)。作用剤または組成物は、全身よりも局所に投与される。例えば、適当な作用剤は、注射を通してまたは、保存または持続放出製剤のような標的薬物送達システムを通して、送達される。

【0039】

本発明の製薬組成物は、よく知られている方法の中で従来混合、溶解、顆粒化、糖衣錠-製造、粉末化、乳化、カプセル化、捕捉化または、凍結乾燥プロセスのようなものによって製造される。上記で言及したように、本発明の組成物は、賦形剤と補助剤のように、活性分子のプロセッシングを製薬用途で製造するための一つ以上の生理学的に許容可能な担体を含む。

【0040】

適切な製剤は、選択される投与の経路に依存する。例えば、注射のために組成物は、水性溶液、望ましくはHanks溶液、Ringer溶液、または生理的食塩水緩衝液のような生理的に互換可能な緩衝液で調整される。粘膜を通した投与または鼻腔を通した投与によって、粘膜に浸透するのに適当な浸透剤が製剤に使用されうる。上記浸透剤は、一般的に当業界に知られている。本発明の望ましい具体的な例として、本発明の化合物は、経口投与のための製剤として製造されることができる。経口投与の為に、本発明の化合物を当業界に公示された薬学的に許容可能な担体と組み合わせることによって、簡単に製剤化することができる。上記担体を通して、本発明の化合物を対象による経口摂取が可能ないように、錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などで製剤化することができる。上記化合物は、例をあげると、ココアバター、または他のグリセリドのような従来の座薬ベースを含有する座薬または停留浣腸液のような直腸組成物として製剤化することができる。

【0041】

経口用途のための製剤は、必要に応じて錠剤または糖衣錠コアを得たために、適当な補助剤を添加した後、結果の混合物を選択的にクラインディングして、微粒の混合物を加工し、固体賦形剤として製造することができる。適当な賦形剤としては特に、乳糖、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖のような充填剤、とうもろこし、澱粉、小麦澱粉、米澱粉、じゃがいも澱粉、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル-セルロース、ナトリウム・カルボキシメチルセルロースの

10

20

30

40

50

ようなセルロース及び/またはポリビニルピロリドン (PVP) 製剤をあげることができる。また、架橋結合されたポリビニルピロリドン、寒天または、アルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸塩のような崩壊剤を添加することができる。また、ドデシル硫酸ナトリウムのような湿潤剤を含むことができる。

【0042】

糖衣錠コアは、適切なコーティングが提供される。このような目的のために、濃縮糖溶液が使用され、これは選択的にアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボボールゲル、ポリエチレン・グリコール及び/または、チタン、ジオキサイド、ラッカー溶剤、及び適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことが出来る。経口投与のための製薬製剤は、ゼラチンで作られた柔らかい密封のカプセル及びグリセロールまたはソロビトールのような可塑剤をはじめ、ゼラチンで作られたプッシュフィット (押し合せる) カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、乳糖のような充填剤、澱粉のような結合剤、及び/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤及び選択的に安定化剤と混合され、活性成分を含むことができる。粘質カプセルで活性化化合物は、脂肪オイル、液体パラフィン、または液体ポリエチレン・グリコールのような適当な液体に溶解したり、または懸濁することができ、または安定化剤を添加することができる。経口投与のための全ての製剤は、そのような投与に適当な容量とならなければならない。

10

【0043】

一つの具体的な例で、本発明の化合物は、皮膚パッチを通してのように、経皮でまたは局所に投与することができる。上記の経皮または局所製剤は、追加的に一または多重浸透によって、または送達された化合物の移動を強化する作用剤を含む他の作用体を含むことができる。経皮または局所投与は、例えば、部位特異的送達が相応しい状況で好ましく使用することができる。

20

【0044】

吸入による投与のために、本発明に伴う化合物は、適当な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適当なガスを含む加圧パックまたは噴霧器からエアロゾールスプレーの形態で、便利に伝達することができる。加圧エアロゾールの場合、適当な容量のユニットは、計量された量を伝達するためのバルブを提供することによって、決定される。例えば、吸入器または取込器で使用するためのゼラチンのカプセルとカートリッジが製剤化されることが出来る。これらは典型的に化合物と乳糖または澱粉のような適当な粉末ベースの粉末ミックスを含んでいる。注射または連続注入による非経口投与のために調剤された組成物は、添加された保存剤と共に、例えば、アンプルまたは多重服用量容器に単位容量形態で、提示することができる。組成物は油性または水性の媒体中の懸濁液、溶液、またはエマルジョンのような形態を取ることができ、懸濁剤、安定化剤及び/または分散剤のような化学剤を含むことが出来る。非経口投与のための製剤は、水性溶液または水溶性形態の他の組成物を含む。

30

【0045】

活性化化合物の懸濁液は、適当な油性注射懸濁液として製造される。適当な親油性溶媒または媒体は、ゴマオイルのような脂肪油及びオレイン酸エチルまたはトリグリセリド、またはリボソームのような合成脂肪酸エステルを含む。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含むことができる。上記懸濁液は、また高濃縮溶液の製造を可能にするために、追加で適当な安定化剤または化合物の溶解度を高める作用剤を含むことが出来る。また、活性成分は、適当な媒体 (例えば、滅菌水) と共に、製剤を構成することができる粉末形態の場合もある。

40

【0046】

前述したように、本発明の組成物は、保存 (reservoir) 製剤として調剤することができる。そのような長期作用製剤は、移植 (例えば、皮下にまたは筋肉内) により、または、筋肉内注射によって投与することができる。したがって、本発明の化合物は、例えば適

50

当なポリマーまたは疎水性物質（例えば、許容可能な油中エマルジョンとして）または、イオン交換樹脂として、または非常に若干可溶性のある塩などの誘導体として調剤することができる。

【0047】

本発明の治療方法に使用される薬学的組成物の治療に効果的な服用量は、初期に当業界によく知られていた多様な技術を使用し、推定することができる。例えば、上記服用量は、細胞培養分析法で動物モデルを利用して決定される IC_{50} を含む循環濃度範囲を通して、公式化することができる。人を対象にする適切な容量範囲は、例えば、細胞培養分析法または、他の動物研究から得られたデータを使用して決定することができる。

【0048】

薬剤治療に効果的な服用量は、対象で症状の緩和または、生存の延長をもたらす薬剤の量を言う。そのような分子の毒性及び治療効能は、細胞培養または、実験動物で、例えば LD_{50} （個体の50%が致死する服用量）及び ED_{50} （個体の50%が治療に効果的な服用量）を決定することにより、標準製薬過程を通して決定することができる。治療に対する毒性の服用量比は治療指数であり、これは LD_{50}/ED_{50} で表わされる。高い治療指数を表わす薬剤が相応しい。

【0049】

容量は望ましくは、ほとんどまたは、全く毒性がない ED_{50} を含む循環する濃度の範囲内にある。容量は、採択された容量形態と利用された投与の経路に従い、この範囲内で変わる。正確な調剤物、投与の経路及び容量は、対象の状態及び特徴を考慮して、当業界に公示された方法によって選択される。

【0050】

また、本発明に伴う化合物などの有効成分の人体投与量は、患者の年齢、体重、性別、投与形態、健康状態及び疾患の程度によって異なり、苦痛の深刻性、投与の方式、及び処方する医師の判断を含む多様な因子によって異なる。

【0051】

以下、本発明に伴う化合物の製造方法に対して説明する。

【0052】

本発明の化合物を合成するための出発物質の場合、多様な合成法が知られており、上記出発物質が市販されている場合は、供給処から購買し使用することができる。試薬供給処としては、Aldrich、Sigma、TCI、Wako、Kanto、Fluorchem、Acros、Abocado、Alfa、Flukaなどの会社があるが、これに限定するものではない。

【0053】

本発明の化合物は、下記の一般的な方法及び工程を使用して、簡単に利用可能な出発物質から製造することができる。典型的なまたは望ましい工程条件（即ち、反応温度、時間、反応物のモル比、溶媒、圧力）としては、別途言及しない限り、他の工程条件も使用することができる。最適な反応状態は、使用される特徴反応物または、溶媒に伴い変わるが、そのような状態は、通常的な最適化工程によって、本技術分野の熟練者により決定される。

【0054】

更に、本技術分野の熟練者において自明なように、特定の官能基が望まない反応をしないように防止するために、通常の保護基が必要な場合がある。特定の官能基を保護及び/または脱保護するために相応しい条件だけでなく、多様な官能基に対して相応しい保護基は本技術分野でよく知られている。

【0055】

例を挙げると、数多くの保護基は、T.W.Greene及びG.M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Second edition, Wiley, New York, 1991、及び上記文献に引用された参考文献に記述されている。

【0056】

一つの具体的な実施形態として、本発明に伴う化学式1の化合物は、下記反応式1に現れ

10

20

30

40

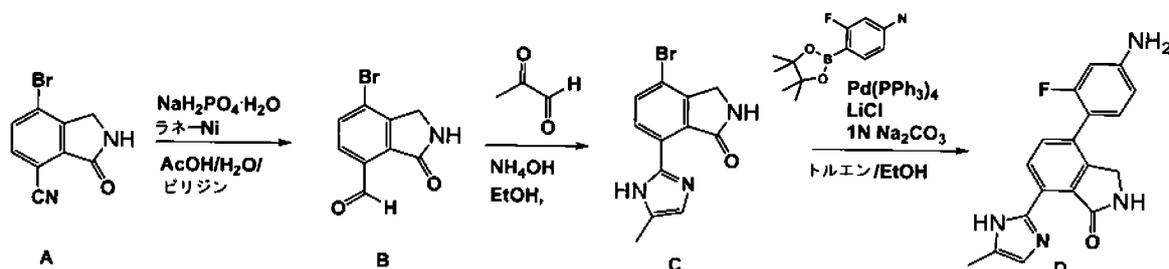
50

る合成方法に伴い、基本中間体である化合物Dを合成したあと、これを利用して、反応式2または3の方法で製造される。この時、上記化合物Dの合成方法は、下記反応式1の方法に限定されるものではない。

【0057】

【化7】

〔反応式1〕



10

【0058】

上記反応式1の出発物質である「化合物A」は、国際特許WO2012/014017にその合成方法が具体的に詳述されており、開示された「化合物D」は、下記手順に伴って合成される。

【0059】

<1-1> 化合物Bの合成

20

化合物A (40g、168mmol) を酢酸 (400ml) に分散させた後、水 (400ml) 及びピリジン (800ml) を入れて、10℃で冷却する。リン酸一ナトリウム水和物 (sodium phosphate monobasic monohydrate、280g、2.01mol) を添加して、ラネーニッケル (Raney Ni) (101g) を水 (70ml) を利用して添加する。反応液の温度を50℃に上げ、2時間反応させた後、冷却してろ過する。酢酸エチル (EA、2.5 l) で洗浄し、ろ過液に水 (800ml) を加え、分液した後、分離された有機層を減圧下で濃縮する。これに冷却された水 (800ml) を入れ、生成された固体をろ過した後、乾燥して、目的の化合物Bを得た。(26.7g、収率66%)

【0060】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 11.10(s,1H),9.15(s,1H),7.95(d,J=8.1Hz, 1H), 7.78(d, J=8.1Hz, 1H), 4.41(s, 2H)

30

LCMS[M+1]:241.1

【0061】

<1-2> 化合物Cの合成

化合物B (26.7g、111mmol) をエタノール (800ml) に分散させた後、メチルグリオキサール48%水溶液 (67ml) 及びアンモニア28%水溶液 (75ml) を添加する。反応液の温度を90℃に上げ、3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で濃縮し、反応液のかさを200ml程度に減らして、生成された固体を固体ろ過する。エタノール (50ml) で洗浄した後、ろ過された固体を乾燥し、目的の化合物Cを得た。(17.2g、収率53%)

【0062】

40

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.21-14.12(m,1H), 9.48(s,1H), 8.27(d,J=8.4Hz,1H), 7.83(d,J=8.4Hz,1H), 7.07-6.82(m,1H),4.39(s,2H), 2.27-2.18(m, 3H)

LCMS[M+1]:293.1

【0063】

<1-3> 化合物Dの合成

化合物C (17.2g、58.9mmol)、3-フルオロ-4-(4,4,5,5-テトラメチル-[1,3,2]ジオキサボロラン-2-イル)-フェニルアミン (19.5g、82mmol)、LiCl (6.9g、165mmol) 及びPd(PPh₃)₄ (6.8g、5.9mmol) をトルエン (589ml) とエタノール (589ml) に分散させた後、1N Na₂CO₃水溶液 (117ml) を添加し、85℃で12時間反応させる。反応が完了すると、反応液を減圧下で完全に濃縮させる。ここでアセトン (1.2 l) とアセトニトリル (1.2 l) の

50

混合溶液を入れた後、80℃で2時間攪拌反応した後、冷却してろ過し、アセトニトリル（0.5 l）で洗浄する。ろ過された溶液をアセトニトリルが約150mlになるまで減圧し、濃縮した後、ろ過する。ろ過して得られた固体を減圧下で順番にアセトニトリル（60ml）とn-ヘキサン（100ml）と水（100ml）で洗浄し乾燥して、目的の化合物D（4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン）を得た。（13.31g、収率70%）

【0064】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.44-14.32(m, 1H), 9.36(s, 1H), 8.36(d, J=8.4Hz, 1H), 7.51(d, J=7.8Hz, 1H), 7.16(t, J=8.7Hz, 1H), 7.04-6.79(m, 1H), 6.49-6.42(m, 2H), 5.65(s, 2H), 4.36(s, 2H), 2.28-2.18(m, 3H)

LCMS[M+1]:323.3

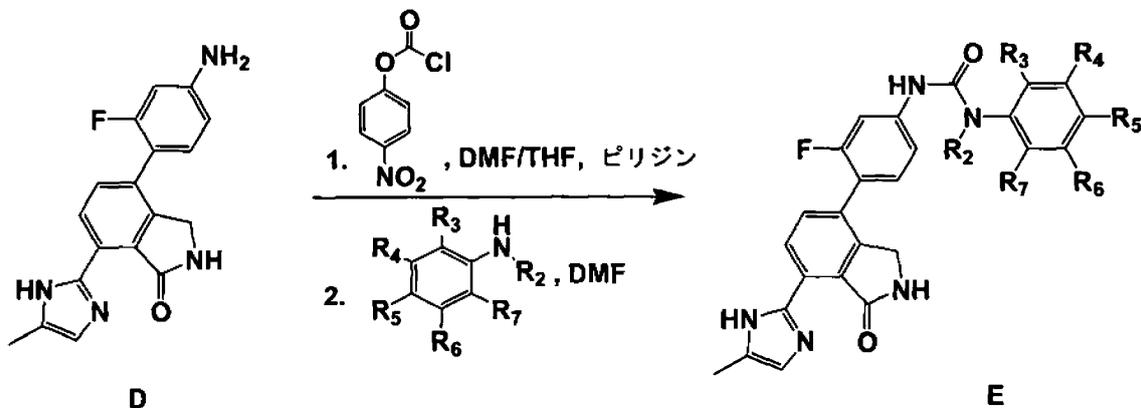
【0065】

本発明の化学式1で表示される、多様な化合物を合成するために得られる基本中間体の「化合物D」を利用した具体的な合成方法を、下記反応式2と反応式3に詳細に記述する。しかし、こうした例は基本中間体の「化合物D」から求める化学式1の化合物を合成するための方法のうち、代表的なもので、これに限定されるものではない。

【0066】

【化8】

〔反応式2〕



【0067】

上記反応式2で開始される「化合物E」は、下記の工程に従い、合成したものである。

【0068】

<2-1> 反応式2に伴う化合物Eの合成

4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン（化合物D、1当量）をDMF/THF（1:4の比率）に分散させた後、（0.08モル濃度）ピリジン（1.15当量）及び4-ニトロフェニル・カルボノクロリダート（1.15当量）を添加し、4時間攪拌する。TLCで反応が完了したことを確認した後、n-ヘキサン（反応溶液であるTHFと同一の体積）を入れて、30分間、攪拌し、生成された固体をn-ヘキサン：THF = 1:1（反応溶液であるTHFの体積の4倍）の溶媒で洗浄しながら、ろ過した後、乾燥する。乾燥した化合物をDMFに分散した後（0.1モル濃度）、置換されたフェニルアミン（6または15当量）を入れた後、マイクロウェーブ（250W、250psi、150℃）で20分間、攪拌する。反応液に5%メタノールを含めた酢酸エチルを入れて、十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液と水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム（MgSO₄）で脱水した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メチレンクロライド：メタノール = 20:1）で展開し、目的の化合物Eを純粋に得た。

【0069】

上記反応式2で合成した「化合物E」は、下記反応式3に伴う合成方法を通して、得る

10

20

30

40

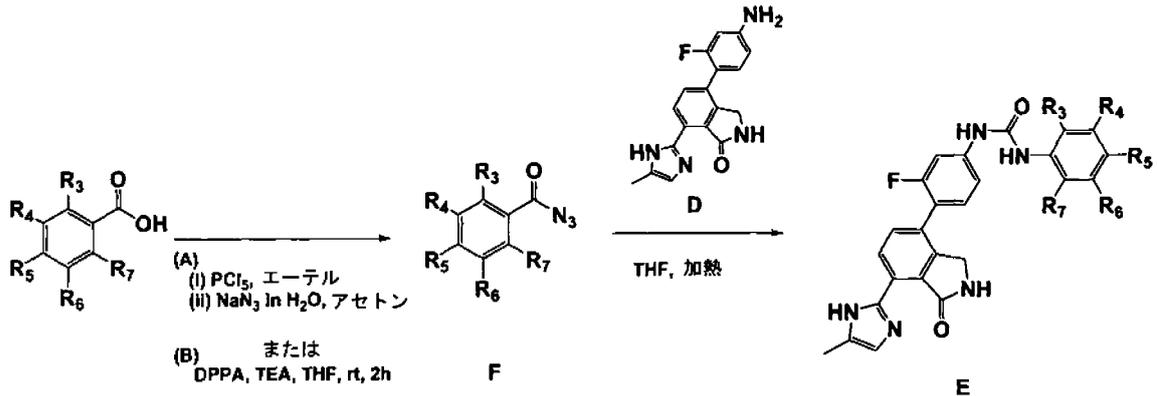
50

ことができる。

【0070】

【化9】

[反応式3]



10

【0071】

<3-1> 反応式3に伴う化合物Eの合成 (A)

置換された安息香酸 (2当量) をジエチルエーテル (diethyl ether) に分散させた後 (0.08モル濃度)、五塩化リン (PCl_5 、2.2当量) を添加し、2時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトンに反応物を入れて、希釈する (0.08モル濃度)。続いて、反応物に水 (アセトン体積の1/12) に溶かしたアジ化ナトリウム (NaN_3 、2.4当量) を0 でゆっくりと滴下する。

20

【0072】

室温で2時間、攪拌した後、反応物を酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム (MgSO_4) で脱水した後、THFに分散させ (0.04モル濃度)、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン (化合物D、1当量) を添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムでメチレンクロライド：メタノール = 20：1で展開し、目的の化合物Eを回収する。

【0073】

上記反応式2で合成した「化合物E」は、上記反応式3に伴うまた他の合成方法を通しても得ることができる。

30

【0074】

<3-2> 反応式3に伴う化合物Eの合成 (B)

置換された安息香酸 (2当量) をTHFに分散させた後 (0.05モル濃度)、トリエチルアミン (4当量) 及びジフェニルリン酸アジド (diphenyl phosphorazidate DPPA、2.3当量) を入れ、室温で2時間攪拌する。反応に4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン (化合物D、1当量) を添加し、90 で4時間攪拌する。続いて、5%メタノールを含む酢酸エチルで十分に希釈した後、水と飽和 NaHCO_3 水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム (MgSO_4) で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (メチレンクロライド：メタノール = 20：1) で展開し分離した後、濃縮し、純粋な目的化合物Eを得た。

40

【0075】

以下に、本発明を実施例によって詳細に説明する。ただし、下記の実施例は、本発明を例示するに過ぎず、本発明の内容は下記実施例によって、限定されるものではない。

【実施例】

【0076】

実施例1：1-(2,6-ジクロロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

50

4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.1g、0.31mmol)をDMF(0.8ml)、THF(3.4ml)に分散させた後、ピリジン(0.03ml)及び4-ニトロフェニル・カルボノクロリダート(0.07g、0.36mmol)を添加し、4時間攪拌する。TLCで反応が完了したことを確認した後、n-ヘキサン(3ml)を入れて30分間、攪拌し、生成された固体をn-ヘキサン:THF=1:1(12ml)の溶媒で洗浄しながらろ過した後、乾燥する。乾燥した化合物をDMF(3ml)に分散した後、2,6ジクロロアニリン(0.34g、2.08mmol)を入れた後、マイクロウェーブ(250W、250psi、150度)で20分間、攪拌する。反応液に5%メタノールを含めた酢酸エチルを入れて、十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液を入れて洗浄した後、水で再度、洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を純粋に得た。(0.03g、収率19%)

【0077】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 9.54(s, 1H), 9.36(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.43(d, J=8.1Hz, 1H), 7.59(m, 3H), 7.47(t, J=8.4Hz, 1H), 7.32(m, 2H), 7.08(s, 1H), 4.41(s, 2H), 2.25(m, 3H)

LCMS[M+1]:511

【0078】

実施例2: 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素の製造

4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.1g、0.31mmol)をDMF(0.8ml)、THF(3.4ml)に分散させた後、ピリジン(0.03ml)及び4-ニトロフェニル・カルボノクロリダート(0.07g、0.36mmol)を添加し、4時間攪拌する。続いて、n-ヘキサン(3ml)を入れて30分間、攪拌し、生成された固体をn-ヘキサン:THF=1:1(12ml)の溶媒で洗浄しながらろ過した後、乾燥する。乾燥した化合物をDMF(2ml)に分散した後、2-トリフルオロメチル・アニリン(0.74g、4.65mmol)を入れた後、室温で3時間攪拌する。反応液にメタノール(6ml)を入れた後、飽和NaHCO₃水溶液(6ml)を入れて30分間、攪拌し、生成した固体をろ過して水で洗浄する。洗浄した化合物を乾燥させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.07g、収率44%)

【0079】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 9.54(s, 1H), 9.36(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.43(d, J=8.1Hz, 1H), 7.59(m, 3H), 7.47(t, J=8.4Hz, 1H), 7.32(m, 2H), 7.08(s, 1H), 4.41(s, 2H), 2.25(m, 3H)

LCMS[M+1]:510.0

【0080】

実施例3: 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

2,6-ジフルオロ-安息香酸(0.04g、0.248mmol)をジエチルエーテル(diethyl ether、3ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.057g、0.273mmol)を添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(2ml)を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水(0.2ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.019g、0.298mmol)を0℃でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了すると、2,6-ジフルオロ-ベンゾイルアジトが生成されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.04g、0.124mmol)が入っているTHF(4ml)に添加し、90℃で4時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、

10

20

30

40

50

目的の化合物を得た。(0.025g、収率42%)

【0081】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.45-14.36(m, 1H), 9.40-9.36(m, 2H), 8.42(d, J=8.1Hz, 1H), 8.33(s, 1H), 7.62-7.57(m, 2H), 7.48(t, J=8.4Hz, 1H), 7.37-7.26(m, 2H), 7.20-0.82(m, 3H), 4.40(s, 2H), 2.29-2.19(m, 3H)

LCMS[M+1]:478.4

【0082】

実施例4: 1-(2-クロロ-6-フルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
2-クロロ-6-フルオロ安息香酸(0.054g、0.31mmol)をジエチルエーテル(3ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.074g、0.357mmol)をゆっくり添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(2ml)を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水(0.2ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.024g、0.372mmol)を0℃でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.05g、0.155mmol)が入っているTHF(4ml)に添加し、90℃で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.029g、収率42%)

【0083】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.45-14.35(m, 1H), 9.40-9.35(m, 2H), 8.42(d, J=8.1Hz, 1H), 8.33(s, 1H), 7.63-7.58(m, 2H), 7.47(t, J=8.4Hz, 1H), 7.41-7.26(m, 4H), 7.07-0.82(m, 1H), 4.40(s, 2H), 2.30-2.20(m, 3H)

LCMS[M+1]:494.4

【0084】

実施例5: 1-(2,6-ビス-トリフルオロメチル-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素
2,6-ビス-トリフルオロメチル安息香酸(0.088g、0.31mmol)をジエチルエーテル(3ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.068g、0.326mmol)をゆっくり添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(2ml)を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水(0.2ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.024g、0.372mmol)を0℃でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了し、2,6-ビス-トリフルオロメチルベンゾイルアジトが生産されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.05g、0.155mmol)をTHF(4ml)で希釈したフラスコに添加し、90℃で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.018g、収率20%)

【0085】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 8.40(d, J=8.4Hz, 1H), 8.09-8.06(m, 2H), 7.76(t, J=8.1Hz, 1H), 7.63(d, J=8.1Hz, 1H), 7.54(d, J=12.9Hz, 1H), 7.38(t, J=8.4Hz, 1H), 7.24(d/d, J=8.4Hz, 1H), 6.94(s, 1H), 4.43(s, 2H), 2.33(s, 3H)

LCMS[M+1]:578.4

【0086】

実施例6: 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2-フルオロ-6-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素

2-フルオロ-6-トリフルオロメチル安息香酸 (0.058g、0.279mmol) をジエチルエーテル (3ml) に分散させた後、五塩化リン (PCl_5 、0.064g、0.307mmol) をゆっくり添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン (2ml) を反応物に入れて希釈する。続いて、反応物に水 (0.2ml) に溶かしたアジ化ナトリウム (NaN_3 、0.024g、0.363mmol) を0 でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了し、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム (MgSO_4) で脱水した後、THF (1ml) に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン (化合物D、0.045g、0.14mmol) をTHF (4ml) で希釈したフラスコに添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メチレンクロライド：メタノール = 20 : 1) で展開し、目的の化合物を得た。(0.023g、収率32%)

10

【 0 0 8 7 】

$^1\text{H-NMR}$ Spectrum(300 MHz, DMSO-d_6): 8.41-8.39(m, 1H), 7.64-7.50(m, 5H), 7.39(t, J=8.4Hz, 1H), 7.25(m, J=8.4Hz, 1H), 6.94(s, 1H), 4.43(s, 2H), 2.33(s, 3H)

LCMS[M+1]:528.4

【 0 0 8 8 】

実施例7: 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,4,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素の製造

20

2,4,6-トリフルオロ安息香酸 (0.08g、0.45mmol) をジエチルエーテル (5.7ml) に分散させた後、五塩化リン (PCl_5 、0.11g、0.52mmol) をゆっくり添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン (3.8ml) を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水 (0.28ml) に溶かしたアジ化ナトリウム (NaN_3 、0.035g、0.545mmol) を0 でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了し、2,4,6-トリフルオロベンゾイルアジトが生産されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム (MgSO_4) で脱水した後、THF (2ml) に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン (化合物D、0.073g、0.23mmol) が入っているTHF (7.5ml) に添加し、90 で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メチレンクロライド：メタノール = 20 : 1) で展開し、目的の化合物を得た。(0.026g、収率23%)

30

【 0 0 8 9 】

$^1\text{H-NMR}$ Spectrum(300 MHz, DMSO-d_6): 14.46-14.37(m, 1H), 9.47-9.45(br m, 1H), 9.37(s, 1H), 8.45(d, J=1.8Hz, 1H), 8.30-8.27(br m, 1H), 7.63-7.46(m, 3H), 7.31-7.26(m, 3H), 7.09-6.84(m, 1H), 4.42(s, 2H), 2.31-2.21(m, 3H)

LCMS[M+1]:496.3

【 0 0 9 0 】

実施例8: 1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-1-メチル-尿素の製造

40

4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン (化合物D、0.1g、0.31mmol) をDMF (0.8ml)、THF (4ml) に分散させた後、ピリジン (0.05ml) 及び4-ニトロフェニル・カルボノクロリダート (0.07g、0.36mmol) を添加し、4時間攪拌する。反応が完了した後、n-ヘキサン (3ml) を入れて、30分間、攪拌し、生成された固体を n-ヘキサン : THF = 1 : 1 (12ml) の溶媒で洗浄しながらろ過した後、乾燥する。乾燥した化合物をDMF (4ml) に分散した後、2,6-ジフルオロ-メチルアニリン (0.294g、2.05mmol) を入れ、100 で12時間、攪拌する。室温で冷却した後、反応液に5%メタノールを含めた酢酸エチルを入れて、十分に希釈した後、飽和 NaHCO_3 水溶液と水を入れて洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム (MgSO_4) で脱水した後、ろ過して

50

濃縮する。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メチレンクロライド：メタノール＝20：1）で展開し、目的の化合物を純粋に得た。（0.018g、収率18%）

【0091】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.45-14.36(m, 1H), 9.36(s, 1H), 8.91(s, 1H), 8.42(d, J=8.1Hz, 1H), 7.61-7.34(m, 5H), 7.26-7.21(m, 2H), 7.07-6.82(m, 1H), 4.40(s, 2H), 3.20(s, 3H), 2.30-2.20(m, 3H)

LCMS[M+1]: 492.4

【0092】

実施例9: 1- $\{$ 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル $\}$ -3-ペンタフルオロフェニル-尿素の製造

ペンタフルオロ安息香酸（0.066g、0.31mmol）をジエチルエーテル（3ml）に分散させた後、五塩化リン（PCl₅、0.071g、0.341mmol）をゆっくり添加し、40分間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン（3ml）を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水（0.2ml）に溶かしたアジ化ナトリウム（NaN₃、0.026g、0.403mmol）を0℃でゆっくりと滴下する。室温で1時間、攪拌した後、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム（MgSO₄）で脱水した後、THF（1ml）に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン（化合物D、0.050g、0.155mmol）をTHF（3ml）で希釈したフラスコに添加し、90℃で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メチレンクロライド：メタノール＝20：1）で展開し、目的の化合物を得た。（0.023g、収率28%）

【0093】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.45-14.36(m, 1H), 9.60(s, 1H), 9.36(s, 1H), 8.83(br s, 1H), 8.43(d, J=8.1Hz, 1H), 7.62-7.57(m, 2H), 7.50(t, J=8.4Hz, 1H), 7.30(d, J=8.4Hz, 1H), 7.08-6.83(m, 1H), 4.40(s, 2H), 2.30-2.20(m, 3H)

LCMS[M+1]: 532.4

【0094】

実施例10: 1-(2,5-ジフルオロフェニル)-3- $\{$ 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]フェニル $\}$ 尿素の製造

2,5-ジフルオロ安息香酸（0.05g、0.32mmol）をTHF（4ml）に分散させた後、トリエチルアミン（0.088ml、0.63mmol）及びジフェニルリン酸アジド（DPPA、0.08ml、0.36mmol）を入れ、室温で2時間攪拌する。2,5-ジフルオロベンゾイルアジドが生成されたことを確認した後、化合物D（0.051g、0.16mmol）を添加し、90℃で4時間攪拌する。反応が完了すると、5%メタノールを含む酢酸エチルを入れ、十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム（MgSO₄）で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（メチレンクロライド：メタノール＝20：1）で展開し分離した後、濃縮し、純粋な目的化合物を得た。（0.026g、収率34%）

【0095】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz, DMSO-d₆): 14.47-14.37(m, 1H), 9.58(s, 1H), 9.37(s, 1H), 8.96(s, 1H), 8.45(d, J=8.4Hz, 1H), 8.06-7.99(m, 1H), 7.67-7.49(m, 3H), 7.36-7.09(m, 2H), 6.89-6.84(m, 1H), 4.43(s, 2H), 2.31-2.22(m, 3H)

LCMS[M+1]: 478.4

【0096】

実施例11: 1-(2,4-ジフルオロフェニル)-3- $\{$ 3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル $\}$ -尿素の製造

2,4-ジフルオロ安息香酸（0.04g、0.248mmol）をTHF（3ml）に分散させた後、トリエチルアミン（0.069ml、0.496mmol）及びジフェニルリン酸アジド（DPPA、0.075g、0.273mmol）を入れ、室温で2時間攪拌する。反応に4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチ

10

20

30

40

50

ル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.040g、0.124mmol)を添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すれば、反応液に5%メタノールを含む酢酸エチルを入れて十分に希釈した後、水と飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し分離した後、濃縮し、純粋な目的化合物を得た。(0.024g、収率42%)

【0097】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.45-14.36(m,1H), 9.39-9.35(m,2H), 8.64(s,1H), 8.43(d,J=8.1Hz,1H), 8.09-8.00(m,1H), 7.65-7.59(m,2H), 7.49(t,J=8.4Hz,1H), 7.35-7.21(m,2H), 7.08-6.83(m, 2H),4.41(s, 2H), 2.30-2.20(m, 3H)

10

LCMS[M+1]:478.4

【0098】

実施例12: 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素の製造

2,3,6-トリフルオロ安息香酸(0.044g、0.248mmol)をジエチルエーテル(4ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.057g、0.273mmol)をゆっくり添加し、40分攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、アセトン(3ml)を反応物に入れて希釈する。続いて、反応物に水(0.2ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.021g、0.322mmol)を0 でゆっくりと滴下する。室温で1時間、攪拌した後、酢酸エチルで希釈したし、その後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.040g、0.124mmol)をTHF(3ml)で希釈したフラスコに添加し、90 で6時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.022g、収率36%)

20

【0099】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.45-14.36(m,1H),9.51(br s,1H), 9.35(s,1H), 8.62(br s,1H), 8.43(d,J=8.1Hz,1H), 7.62-7.57(m,2H),7.48(t,J=8.4Hz,1H), 7.44-7.34(m,1H), 7.31-7.20(m,2H), 7.07-6.83(m,1H), 4.40(s, 2H), 2.30-2.20(m, 3H)

30

LCMS[M+1]:496.4

【0100】

実施例13: 1-(3,5-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

3,5-ジフルオロ安息香酸(0.04g、0.248mmol)をTHF(4ml)に分散させた後、トリエチルアミン(0.069ml、0.496mmol)及びジフェニルリン酸アジド(DPPA,0.075g、0.273mmol)を入れ、室温で1時間攪拌する。反応物に4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.040g、0.124mmol)を添加し、90 で4時間攪拌する。室温で冷却した後、酢酸エチルで希釈した後、水と飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し分離した後、濃縮し、純粋な目的化合物を得た。(0.032g、収率55%)

40

【0101】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.45-14.36(m,1H),9.50(s,2H), 9.36(s,1H), 8.43(d,J=8.1Hz,1H), 7.64-7.60(m,2H),7.50(t, J=8.4Hz 1H), 7.30-7.20(m,3H), 7.08-6.77(m,2H), 4.41(s, 2H), 2.30-2.20(m, 3H)

LCMS[M+1]:478.3

【0102】

50

実施例14: 1-(3,4-ジフルオロ-フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

3,4-ジフルオロ安息香酸(0.05g、0.32mmol)をTHF(4ml)に分散させた後、トリエチルアミン(0.088ml、0.63mmol)及びジフェニルリン酸アジド(DPPA、0.08ml、0.36mmol)を入れ、室温で2時間攪拌する。3,4-ジフルオロベンゾイルアジドが生成されたことを確認された後、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.051g、0.16mmol)を添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、5%メタノールを含む酢酸エチルで十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し分離した後、濃縮し、目的化合物を得た。(0.035g、収率46%)

【0103】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.40(br s,1H), 9.37(s,1H), 9.13-9.03(m,2H), 8.44(d,J=8.1Hz,1H), 7.71-7.47(m,4H), 7.41-7.27(m,3H), 7.18-7.16(m,1H),7.00(s,1H), 4.43(s, 2H), 2.26(m, 3H)

LCMS[M+1]:478.4

【0104】

実施例15: 1-(4-シアノ-3-フルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

4-シアノ-3-フルオロ安息香酸(0.08g、0.48mmol)をTHF(6.1ml)に分散させた後、トリエチルアミン(0.14ml、0.97mmol)及びジフェニルリン酸アジド(DPPA、0.12ml、0.56mmol)を入れ、室温で2時間攪拌する。4-シアノ-3-フルオロベンゾイルアジドが生成されれば、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.078g、0.24mmol)を添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、5%メタノールを含む酢酸エチルで十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し分離した後、濃縮し、目的化合物を得た。(0.012g、収率10%)

【0105】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.40(br s,1H), 9.89(s,1H), 9.64(s,1H), 9.37(s,1H), 8.44(d,J=8.7Hz,1H), 7.94-7.15(m,7H), 7.01-6.99(m,1H), 4.43(s, 2H), 2.26(m, 3H)

LCMS[M+1]:485.4

【0106】

実施例16: 1-(4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

4-クロロ-3-トリフルオロメチル安息香酸(0.08g、0.35mmol)をTHF(4.5ml)に分散させた後、トリエチルアミン(0.1ml、0.71mmol)及びジフェニルリン酸アジド(DPPA、0.09ml、0.41mmol)を入れ、室温で2時間攪拌する。4-シアノ-3-トリフルオロメチルベンゾイルアジドが生成されたことを確認後、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.057g、0.18mmol)を添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、5%メタノールを含む酢酸エチルで十分に希釈した後、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄する。その後、有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、減圧して濃縮する。濃縮した反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し分離した後、濃縮し、目的化合物を得た。(0.012g、収率12%)

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.47-14.37(m,1H), 9.36-9.32(m,2H), 9.25(s,1H) 8.45(d,J=8.1Hz,1H), 8.12-8.05(m,1H), 7.71-7.61(m,4H), 7.54-7.48(m,1H), 7.33-7.29(m,1H), 7.09-6.85(m,1H), 4.42(s, 2H), 2.32-2.22(m, 3H)

LCMS[M+1]:544.3

【 0 1 0 8 】

実施例17: 1-(3-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

3-クロロ-2,6-ジフルオロ安息香酸(0.08g、0.41mmol)をジエチルエーテル(5.2ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.099g、0.48mmol)をゆっくりと添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(3.5ml)を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水(0.25ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.032g、0.50mmol)を0 でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了すると、3-クロロ-2,6-ジフルオロベンゾイルアジトが生成されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1.6ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.067g、0.21mmol)が入っているTHF(7ml)に添加し、90 で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.017g、収率16%)

10

20

【 0 1 0 9 】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.47-14.38(m,1H), 9.49-9.39(m,2H), 8.53(s,1H), 8.44(d,J=8.1Hz,1H), 7.63-7.47(m,4H), 7.31-7.24(m,2H), 7.09-6.84(m,1H), 4.42(s, 2H), 2.31-2.21(m, 3H)

LCMS[M+1]:512.3

【 0 1 1 0 】

実施例18: 1-(2-クロロ-3,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

2-クロロ-3,6-ジフルオロ安息香酸(0.08g、0.41mmol)をジエチルエーテル(5.2ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl₅、0.099g、0.48mmol)をゆっくりと添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(3.5ml)を反応物に入れて、希釈する。続いて、反応物に水(0.25ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN₃、0.032g、0.50mmol)を0 でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了すると、2-クロロ-3,6-ジフルオロベンゾイルアジトが生成されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO₄)で脱水した後、THF(1.6ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.067g、0.21mmol)が入っているTHF(7ml)に添加し、90 で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.038g、収率36%)

30

40

【 0 1 1 1 】

¹H-NMR Spectrum(300 MHz,DMSO-d₆): 14.46-14.37(m,1H), 9.51(s,1H), 9.37(s,1H), 8.58(s,1H), 8.44(d,J=8.1Hz,1H), 7.63-7.59(m,2H), 7.52-7.29(m,4H), 7.09-6.84(m,1H), 4.42(s, 2H), 2.31-2.21(m, 3H)

LCMS[M+1]:512.3

【 0 1 1 2 】

実施例19: 1-(4-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-尿素の製造

4-クロロ-2,6-ジフルオロ安息香酸(0.060g、0.31mmol)をジエチルエーテル(4ml)に

50

分散させた後、五塩化リン(PCl_5 、0.071g、0.341mmol)をゆっくりと添加し、40分攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(3 ml)を反応物に入れて希釈する。続いて、反応物に水(0.2ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN_3 、0.026g、0.403mmol)を0 でゆっくりと滴下する。室温で1時間、攪拌した後、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO_4)で脱水した後、THF(1ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.050g、0.155mmol)をTHF(3ml)で希釈したフラスコに添加し、90 で4時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.024g、収率30%)

10

【0113】

$^1\text{H-NMR}$ Spectrum(300 MHz, DMSO-d_6): 14.46-14.37(m, 1H), 9.86(s, 1H), 9.38(s, 1H), 8.82(s, 1H), 8.41(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.63-7.59(m, 2H), 7.52-7.29(m, 4H), 6.97(s, 1H), 4.42(s, 2H), 2.21(s, 3H)

LCMS[M+1]:512.3

【0114】

実施例20: 1-{3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル}-3-(2,3,5,6-テトラフルオロ-フェニル)-尿素の製造

2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸(0.08g、0.41mmol)をジエチルエーテル(5.2ml)に分散させた後、五塩化リン(PCl_5 、0.099g、0.48mmol)をゆっくりと添加し、1時間攪拌する。反応が完了すると、有機溶媒を室内温度以下で減圧し、濃縮した後、アセトン(3.4ml)を反応物に入れて希釈する。続いて、反応物に水(0.25ml)に溶かしたアジ化ナトリウム(NaN_3 、0.032g、0.50mmol)を0 でゆっくりと滴下する。室温で2時間、攪拌した後、反応が完了して、2,3,5,6-テトラフルオロベンゾイルアジトが生成されると、酢酸エチルで希釈した後、水で洗浄する。有機層を無水硫酸マグネシウム(MgSO_4)で脱水した後、THF(1.6ml)に分散させ、4-(4-アミノ-2-フルオロフェニル)-7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)イソインドリン-1-オン(化合物D、0.066g、0.21mmol)が入っているTHF(7ml)に添加し、90 で3時間攪拌する。反応が完了すると、減圧下で溶媒を濃縮させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(メチレンクロライド:メタノール=20:1)で展開し、目的の化合物を得た。(0.014g、収率13%)

20

30

【0115】

$^1\text{H-NMR}$ Spectrum(300 MHz, DMSO-d_6): 8.45(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.69-7.61(m, 2H), 7.48-7.33(m, 3H), 7.00(s, 1H), 4.48(s, 2H), 2.38(s, 3H)

LCMS[M+1]:514.3

【0116】

上記実施例1乃至20で得られた化合物の構造式を下記の表1で表わす。

【0117】

【表 1 - 1】

化合物	化合物名	
1	1-(2,6-ジクロロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素	
2	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-(2-トリフルオロメチルフェニル)-尿素	
3	1-(2,6-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素	
4	1-(2-クロロ-6-フルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素	
5	1-(2,6-ビス-トリフルオロメチルフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素	
6	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-(2-フルオロ-6-トリフルオロメチルフェニル)-尿素	

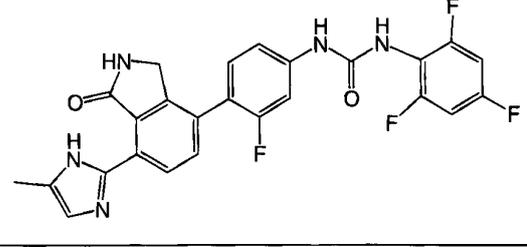
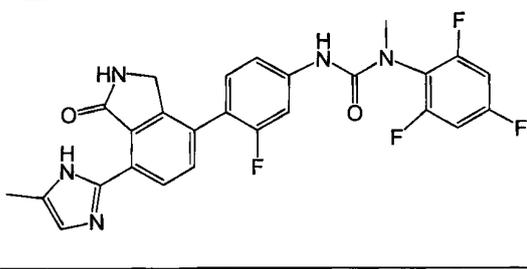
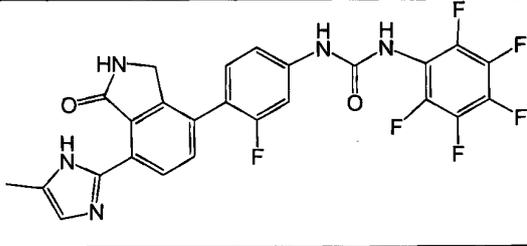
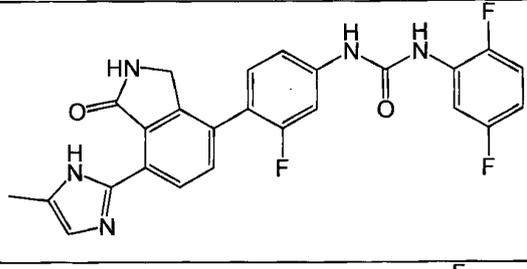
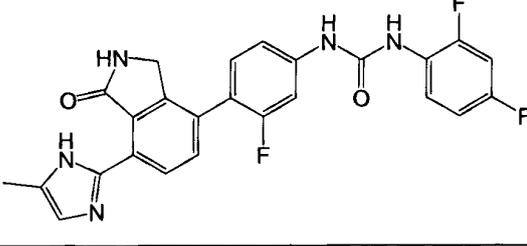
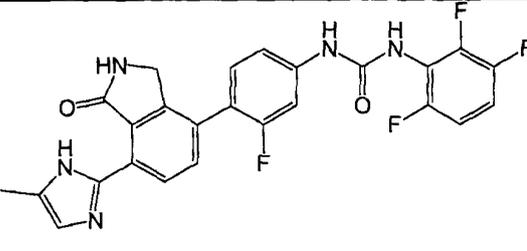
10

20

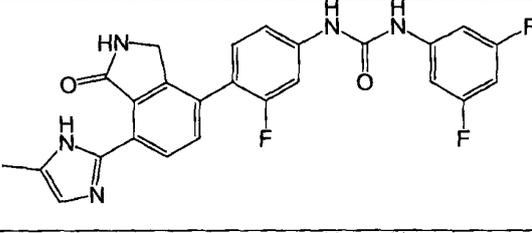
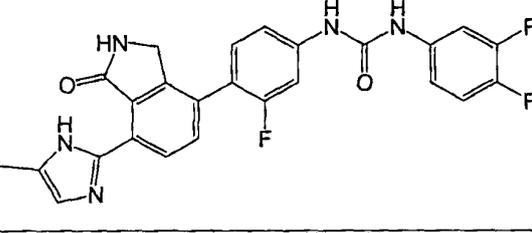
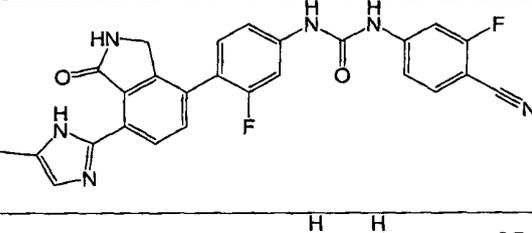
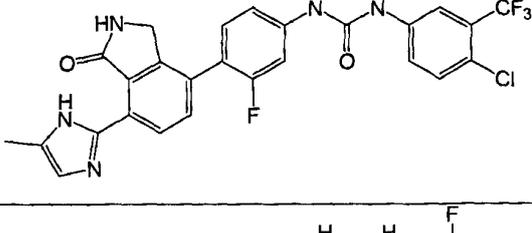
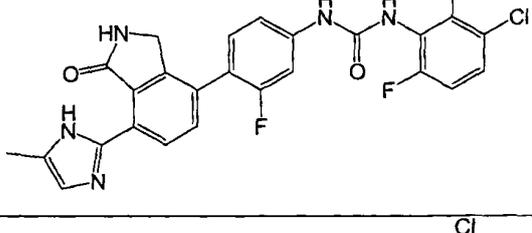
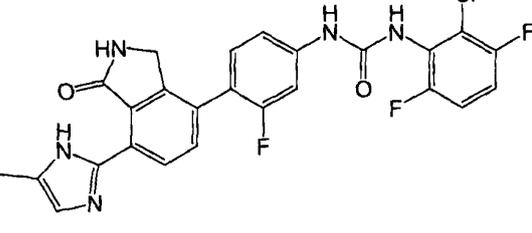
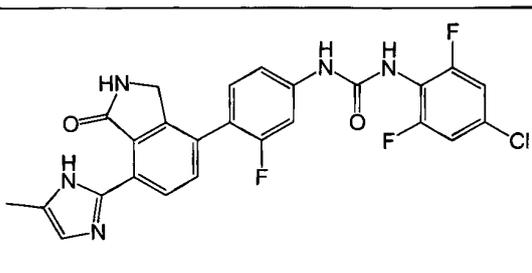
30

40

【表 1 - 2】

7	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-(2,4,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素		
8	1-(2,6-ジフルオロ-フェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-1-メチル-尿素		10
9	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-ペンタフルオロフェニル-尿素		20
10	1-(2,5-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]フェニル]尿素		
11	1-(2,4-ジフルオロ-フェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		30
12	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-(2,3,6-トリフルオロ-フェニル)-尿素		40

【表 1 - 3】

13	1-(3,5-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		
14	1-(3,4-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		10
15	1-(4-シアノ-3-フルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		20
16	1-(4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		30
17	1-(3-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		40
18	1-(2-クロロ-3,6-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソイソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		
19	1-(4-クロロ-2,6-ジフルオロフェニル)-3-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-尿素		

【表 1 - 4】

20	1-[3-フルオロ-4-[7-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-1-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-4-イル]-フェニル]-3-(2,3,5,6-テトラフルオロ-フェニル)-尿素	
----	---	--

【 0 1 1 8 】

10

上記発明の化合物の生物学的活性は、従来から公示されたある方法を使用して評価される。的確な検定方法は、当業界によく公示されている。

【 0 1 1 9 】

以下の検定法は、多様なキナーゼの分析法の一例で、これに制限しようとする意図はない。本発明の化合物は、下記の検定法の中で少なくとも一つで活性を表わす。

【 0 1 2 0 】

試験例1: BTK活性抑制分析(ELISA法)

本発明の化合物のBTK抑制剤としての活性を評価するために、市販されているBTK (promega) を使用した。具体的には、0.4nMのBTK酵素と基質として作用する40M ピオチン-S1基質ペプチド、50M ATPを反応バッファー (15ml Tris-HCl(pH7.5)、20mM MgCl₂、2mM MnCl₂、2mM DTT、0.1mg/ml BSA) 内で酵素反応を遂行した。試験したい濃度の化合物を処理し、30 で20分間反応させた。反応が終わった後、ELISA法を利用して活性の有無を測定。化合物を処理しない試料の吸光度値を100%対照群とし、試験したい濃度の化合物を処理した試料でBTK酵素の残留活性の%として、BTK抑制剤の活性を評価した。

20

【 0 1 2 1 】

様々な濃度の化合物処理時に残るBTK酵素活性を測定した後、対照群比50% BTK酵素活性抑制が起こる化合物の濃度をBTK抑制剤のIC₅₀値で決定した。

【 0 1 2 2 】

前述した本発明の範囲に属する化合物の中で、任意の数個の化合物に対して、BTKキナーゼ活性抑制効果を測定し、次の表2に要約した。

30

【 0 1 2 3 】

【表 2】

代表的な化合物のBTKキナーゼの活性抑制効果

化合物	BTK IC ₅₀ (nM)
3	1.00
4	0.90
7	0.10
9	0.40
12	0.28
14	5.60
15	5.00
17	0.05
18	0.07
19	4.00
20	0.90

40

【 0 1 2 4 】

試験例2: ヒスタミン遊離実験(histamine release assay)

肥満細胞でBTK活性が抑制されると、ヒスタミンのようなメディエータ (mediator)、

50

脂質メディエータ (liquid mediator) の生産またはサイトカイン (cytokine) の分泌 (secretion) が減る (文献 (J Immunol.2000 Aug 1;165(3):1210-9 Reductant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. Kawakami Y, Kitaura, J, Satterthwaite AB, Kato RM, Asai K, Hartman SE, Maeda-Yamamoto M, Lowell CA, Rawlings DJ, Witte ON, Kawakami T)) 。

【 0 1 2 5 】

ヒスタミン遊離実験は、文献 (FEBS Lett. 2002 Sep 11;527(1-3):274-8. Silencing of Bruton's tyrosine kinase(Btk) using short interfering RNA duplexes (siRNA). Heinonen JE, Smith CI, Nore BF) の方法を土台に実施し、ヒスタミンの量は酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay) を利用して、実施した。

10

【 0 1 2 6 】

RBL-2H3細胞 (韓国細胞株銀行から入手) を10% (v/v) FBSが添加されたDMEM培地で5% CO₂、37℃、72時間培養した後、96ウェルプレートに各ウェル当たり10,000個の細胞を分け株して、5%CO₂、37℃のインキュベータで24時間培養した。

【 0 1 2 7 】

上で培養された細胞にモノクローナル アンチ-DNP (monoclonal anti-DNP) (sigma) 500ng/mlと100% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かした化合物をそれぞれ0.001、0.01、0.1、1.0、10 μM濃度で一緒に処理し、対照群として100% (v/v) ジメチルスルホキシドを使用した。その後、5%CO₂、37℃のインキュベータで24時間培養した。その後、EIAヒスタミンキット (Immunotech) 実験方法に従い、培養が終わったプレートに50 μl ヒスタミン遊離バッファー (histamine release buffer) を各ウェル当たり50 μlずつ処理した後、37℃で30分間、反応させた後、反応が終わったプレートの培地を各ウェル当たり100 μlずつ、新しいプレートに移し、25 μlアセチル化バッファー (acetylation buffer) 及び25 μlアセチル化試薬 (acetylation reagent) を入れて、十分に混ぜる。上記のように作られたアセチル化試料の内、50 μlを抗体がコーティングされたプレートに移し、200 μlヒスタミンアルカリホスファターゼコンジュゲート (conjugate) を入れて混ぜた後、4℃で18時間反応させる。反応が終わったプレートの試料を全て除去した後、洗浄バッファー (wash buffer) を200 μl添加し、3度洗浄した後、基質 (substrate) を200 μl添加し、常温で30分反応させた後、停止液 (stop solution) 50 μlを添加し、反応を停止した後、Benchmark plus (Biorad) 装置を使用して、406nmで吸光度を測定した。化合物を処理しない対照群細胞の吸光度を基準に各化合物の処理濃度に伴うヒスタミン遊離の程度を算出した。EC₅₀ (μM) 値は、ヒスタミン遊離を50%抑制する各化合物の濃度をエクセルグラフィックプログラム (Excel graphic program) を使用して算出した。

20

30

【 0 1 2 8 】

前述した本発明の範囲に属する化合物の中で、任意の数個の化合物に対して、抗炎症治療剤の可能性を確認するために、ヒスタミン遊離試験を行い、その EC₅₀ 値を次の表 3 異性体に要約したが、その効果は極めて優れて現われた。

【 0 1 2 9 】

【表3】

代表的な化合物のヒスタミン遊離試験の結果

化合物	ヒスタミン遊離(histamine release) EC ₅₀ (μM)
3	0.45
4	0.25
7	0.22
9	0.35
12	0.30
14	0.20
15	0.22
17	0.04
18	0.30
19	0.30
20	0.30

10

【0130】

試験例3：細胞基盤増殖抑制試験(抗細胞増殖アッセイ：anti-proliferatin assay)による検定法(MTS アッセイ：MTT assay)

【0131】

20

上記で製造された化合物は細胞の信号調節キナーゼ活性抑制を通して、癌細胞増殖抑制効果を確認するために、MTSエッセイを遂行した。(Barltrop J.A. et al (1991) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analog of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble formazans as cell-viability indicators. Bioorg. Med. Chem. Lett.1, 611-4; Cory, A.H. et al (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/ formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Comm. 3, 207-12.)

【0132】

ヒトリンパ腫細胞株のJeko-1(ATCC)、Mino(ATCC)、H9(韓国細胞株銀行)及びSR(ATCC)と、ヒト白血病細胞株のMV4-11(ATCC)、MoIm-13(DSMZ)、Ku812(ATCC)などを対象にして、以下のような分析を行なった。

30

【0133】

Jeko-1、Mino、H9、SR、MV4-11、MoIm-13及びKu812細胞は、10% FBSを含むRPMI1640培地(GIBCO、invitrogen)が入っている96ウェルプレートに、それぞれ10,000細胞株/ウェルの濃度で株分けした後、5%CO₂及び37℃の条件で24時間培養した。その後、各ウェルに上記実施例の化合物をそれぞれ0.2、1、5、25及び100μM濃度で処理し、対照群としてジメチルスルホキシド(DMSO)を化合物処理時に使用した%と同じ0.08重量%で処理した。その後、各細胞を48時間培養した。

【0134】

40

細胞の生存能力を確認するために、上記のそれぞれ培養された細胞の培地にCellTiter96(登録商標)水系非放射性細胞増殖実験キット(Aqueous Non-radioactive cell proliferation assay kit)(Promega)で提供されるMTS(3-(4,5-ジメチルサイアゾール-2-イル)-5-(3-カルボメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、分子内塩(inner salt))とPMS(フェナジンメトサルフェート)の混合液20μlを添加し、37℃の条件で2時間更に培養する。その後、490nmで吸光度を測定した。化合物を処理しない対照群細胞の吸光度を基準に、各化合物の処理濃度に伴う細胞増殖阻害の程度を算出し、この時に癌細胞の増殖を50%抑制する各化合物の濃度をEC₅₀(μM)値で算出した。

【0135】

抗炎症治療剤としての可能性だけでなく、リンパ腫のような抗癌治療剤としての可能性

50

を確認するために、Jeko-1、Mino、H9、SRの四つのリンパ腫細胞に対して、増殖抑制試験を行い、そのEC₅₀値を次の表に要約した。

【 0 1 3 6 】

【表 4】

代表的な化合物のリンパ腫細胞に対する増殖抑制試験結果

化合物	EC ₅₀ in Jeko-1 (μM)	EC ₅₀ in Mino (μM)	EC ₅₀ in H9 (μM)	EC ₅₀ in SR (μM)
3	0.10	—	0.03	0.100
4	0.10	—	0.03	0.030
7	0.03	0.018	0.007	0.015
9	0.03	—	0.006	0.018
12	0.15	—	0.04	0.020
14	0.03	—	0.02	0.018
15	0.10	—	0.19	0.150
17	0.03	0.018	0.02	0.025
18	0.03	—	0.02	0.020
19	0.03	—	0.04	0.020
20	0.03	—	0.01	0.017

10

20

【 0 1 3 7 】

また、リンパ腫細胞で活性が良かった任意の化合物に対して、リンパ腫以外に白血病細胞に対しても、増殖抑制試験を行い、高い抗癌効果を確認した。その効果に対する EC₅₀値を以下の表5に要約する。

【 0 1 3 8 】

【表 5】

代表的な化合物の白血病細胞に対する増殖抑制試験結果

化合物	EC ₅₀ in MV4-11 (μM)	EC ₅₀ in Molm-13 (μM)	EC ₅₀ in Ku812 (μM)
7	0.002	0.003	0.600
17	0.004	0.012	0.190

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 K 38/21
A 6 1 K 31/4178	(2006.01)	A 6 1 K 31/4178

(73)特許権者 515178085

クリスタルジェノミクス・インコーポレイテッド
 CRYSTALGENOMICS, INC.
 大韓民国 4 6 3 4 0 0 ギョンギ ド ションナム シ ブンダン グ デウォンパンギョ
 ロ 7 0 0 コリア・バイオ・パーク タワー・エイ フィフスフロア
 5THF, TOWER A, KOREA BIO PARK, 700 DAEWANGPA
 NGYO RO, BUNDANG GU, SEONGNAM SI, GYEONGGI D
 O 4 6 3 4 0 0, REPUBLIC OF KOREA

(74)代理人 110001818

特許業務法人R&C

(72)発明者 ホン, ヨン・レ

大韓民国 4 3 5 7 7 4 ギョンギ ド グンポ シ ダンジョンヨク ロ 7 1 0 3 1 6
 0 4

(72)発明者 ナ, ジョン・ユン

大韓民国 4 4 8 7 6 8 ギョンギ ド ヨンギン シ スジ グ ムンジョン ロ 5 5 1
 0 4 1 5 0 4

(72)発明者 ミン, イム・ソク

大韓民国 4 1 5 7 4 8 ギョンギ ド ギンポ シ チョンソン ロ 7 0 1 0 5 1 7 0
 5

(72)発明者 チャ, ヒュン・ジュ

大韓民国 1 3 7 7 5 8 ソウル ショチョ グ ヒョリョン ロ 1 6 4 5 2 0 1

(72)発明者 クウォン, ソル・キ

大韓民国 4 6 3 9 4 2 ギョンギ ド ソンナム シ ブンダン グ ヤタップ ロ 2 4 4
 3 0 1 1 3 0 3

(72)発明者 ロ, ショング

大韓民国 1 3 8 7 4 0 ソウル ソンパ グ オギユム ロ・3 5 ギル 1 7 3 1 9 0
 1

(72)発明者 チョウ, ジョン・ミュン

大韓民国 1 3 8 7 9 1 ソウル ソンパ グ オリンピック ロ 2 1 2 ビー 4 6 0 1

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 国際公開第2012/047017(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 2 0 1 / 0 0 - 5 2 1 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

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