

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4646626号
(P4646626)

(45) 発行日 平成23年3月9日(2011.3.9)

(24) 登録日 平成22年12月17日(2010.12.17)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4433 (2006.01)	A 6 1 K 31/4433
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 5 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-528779 (P2004-528779)	(73) 特許権者	300022641
(86) (22) 出願日	平成15年8月18日(2003.8.18)		アストラゼネカ アクチボラグ
(65) 公表番号	特表2006-500361 (P2006-500361A)		スウェーデン国 1 5 1 8 5 セーデル
(43) 公表日	平成18年1月5日(2006.1.5)		テルイエ (無番地)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2003/004177	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02004/016607		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成16年2月26日(2004.2.26)	(74) 代理人	100096183
審査請求日	平成18年7月25日(2006.7.25)		弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	60/403, 639	(72) 発明者	ジャクソン, シャウン, ピー.
(32) 優先日	平成14年8月16日(2002.8.16)		オーストラリア国 3 1 0 4 ビクトリア
(33) 優先権主張国	米国 (US)		州, ノース バルウイン, クリフトン ス
(31) 優先権主張番号	60/428, 283		トリート 3 3
(32) 優先日	平成14年11月22日(2002.11.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホイノシチド3-キナーゼβの阻害

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高剪断条件下で起こる血小板の凝集及び接着を分離するための組成物であって、有効量の選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を含んでなり、当該選択的PI3-キナーゼ 阻害薬が、
(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)；

8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-286)；および

8-(1-(2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN327)

からなる群から選択される前記組成物。

【請求項2】

抗血栓のための組成物であって、有効量の選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を含んでなり、当該選択的PI3-キナーゼ 阻害薬が、

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)；

8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-286)；および

8-(1-(2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN327)

からなる群から選択される前記組成物。

【請求項3】

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)；

8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-286)；および

8-(1-(2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN327)

からなる群から選択される化合物。

【請求項4】

ホスホイノシチド3-キナーゼを阻害するため、心血管疾患を予防若しくは治療するため、癌を予防若しくは治療するため、又は白血球機能障害に関連する疾患を予防若しくは治療するための組成物であって、有効量の8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-286)；および8-(1-(2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN327)からなる群から選択される化合物を含み、前記白血球機能障害に関連する疾患が急性及び/又は慢性の炎症性疾患である、前記組成物。

【請求項5】

ホスホイノシチド3-キナーゼを阻害するため、又は心血管疾患を予防若しくは治療するための組成物であって、有効量の(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)を含む、前記組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、新規抗血栓療法及び該新規療法に有用な化合物に関する。より詳細には、本発明は、ホスホイノシチド(P1)3-キナーゼの選択的阻害薬、該選択的阻害薬の抗血栓療法における使用、及び、化合物が有するP13-キナーゼの選択的阻害活性を検出することによる新規抗血栓療法に有用な化合物のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血小板は、止血の過程において根本的な役割を果たす特殊化した粘着細胞である。通常の状態では、血小板は、血管内皮に接着することなく、また、血管内皮細胞によって活性化されることもない。しかしながら、血管内皮が損傷を受けたり、又は、プラークが破裂したりすると、流れている血液が、コラーゲン、フィブロネクチン及びフォンウィルブラント因子(vWF)などのようなさまざまな血栓形成性因子に接触することとなる。循環する血小板は、これら血栓形成性因子の受容体を有している。血管が損傷を受けると、血小板は、糖タンパク質GP 1b受容体を介して、プラークが破裂した部位の特定の内皮下接着性タンパク質(例えば、フォンウィルブラント因子(vWF))に結合し(血小板接着)、活性化されて(血小板活性化)、アデノシン二リン酸(ADP)、トロンビン、セロトニン及び血管収縮性トロンボキサンA2(TxA2)などの多くの物質を産生する。活性化されたADP受容体が、次に、血小板の表面にあるGP 11b/111a受容体を活性化する。これらの受容体が、血小板を互いに連結させるフィブリノーゲン架橋の部位となり(血小板凝集)、その後、血栓が形成される。

【0003】

従って、進行したアテローム斑が突然破裂するか又は進行したアテローム斑に突然裂け目ができる、異常に大きな血小板接着応答が起こり、これにより、一般に、血管閉塞性の血小板血栓が形成される。これらの血栓が冠状動脈循環又は脳循環内に形成されると、それぞれ、急性心筋梗塞及び卒中が引き起こされるが、この急性心筋梗塞と卒中は、合わせて、工業化した世界における死亡の主要な原因となっている。さらにまた、血小板血栓が形成されると、不安定狭心症、突然死、一過性脳虚血発作、一過性黒内障、並びに、手

10

20

30

40

50

足及び内臓の急性虚血などの別の多くの臨床状態が引き起こされる。破裂したプラークが血栓を形成する可能性を増大させる一因となる多くの要因には、(1)プラーク内の接着性基体の高い反応性；(2)損傷部位における組織因子の存在；及び、(3)アテローム血栓が形成される過程により血管管腔が狭くなることが原因となって起こる高剪断の間接的な血小板の活性化作用などがある。

【0004】

既存の抗血栓療法は、主として、血栓が形成される過程における1つ以上の重要な段階を標的にしている。即ち、血栓症を緩和するために、抗凝血薬及び抗血小板薬がしばしば使用される。血液の凝固は、多くの場合、1種以上のクマリン誘導体(例えば、ワルファリン及びジクマロールなど)若しくは荷電ポリマー(例えば、ヘパリン、ヒルジン又はヒルログなど)などの適切な抗凝血薬を投与するか、又は、抗血小板薬(例えば、アスピリン、クロピドグレル、チクロピジン、ジピリジモール(dipyridimole)、又は、何種類かあるGPIIb/IIIa受容体拮抗薬の内に1種など)を用いることにより、最小限度に抑えることができるか又は除去することができる。しかしながら、抗凝血薬及び血小板阻害薬は、出血、再開塞、「ホワイトクロット(white-clot)」症候群、刺激状態、先天的欠損症、血小板減少症及び肝機能障害などのような副作用が原因で、重大な制限を受ける。さらに、抗凝血薬及び血小板阻害薬を長期投与すると、特に、生命にかかわる病気又は出血のリスクが増大し得る。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0005】

従って、既存の抗血栓療法の上記欠点を回避するために、病理学的な血栓の形成にとって欠くことのできないプロセスを正常な止血を妨げることなく選択的に標的とする新規な抗血栓療法を開発することが求められている。

【0006】

病理学的な血栓形成を促進する上で、流動学的な障害(高剪断及び乱流)が主要な役割を果たしている。従って、上記のような方策の一つは、血小板における機械感覚要素を標的とすることにより、高剪断応力が有する血小板活性化作用を弱めることであろう。しかしながら、本発明以前は、止血も含めて、剪断により惹起される血小板の活性化にとって重要なシグナルイベントは、同定されていない。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

従って、本発明の目的は、高剪断条件下で起こる血小板の凝集及び接着を分離させる方法を提供することであり、ここで、該方法は、そのような血小板の凝集及び接着を分離させることが必要な患者に有効量の選択的PI3-キナーゼ阻害薬を投与することを含んでなる。

【0008】

本発明のさらなる目的は、抗血栓方法を提供することであり、ここで、該方法は、抗血栓が必要な患者に有効量の選択的PI3-キナーゼ阻害薬を投与することを含んでなる。該方法によれば、剪断により惹起される血小板の活性化にとって重要なPI3-キナーゼを標的とすることにより、正常な止血に悪影響を与えることなく、血栓の形成を特異的に阻害することができる。従って、本発明には、出血時間が長くなるなどの正常な止血を破壊することに起因する副作用が伴わない。

40

【0009】

従って、本発明の別の目的は、剪断により惹起される血小板の活性化を阻害する方法を提供することであり、ここで、該方法は、そのような血小板の活性化を阻害することが必要な患者に有効量の選択的PI3-キナーゼ阻害薬を投与することを含んでなる。さらにまた、冠状動脈閉塞、心臓発作、急性冠動脈症候群、急性心筋梗塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症及び不安定狭心症などのような心血管疾患を予防又は治療する方法を提供することも本発明の目的であり、ここで、該方法は、そのような心血管疾患を予防又は治療す

50

ることが必要な患者に有効量の選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を投与することによる。この方法では、選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を使用することにより、出血時間が長くなるなどの正常な止血を破壊することに起因する副作用を回避することが可能である。

【0010】

本発明の方法では、単離したPI3-キナーゼのイソ型に候補化合物を接触させること及び各イソ型に対する該化合物の阻害効果を検出することを含むアプローチ(ここで、各イソ型に対する該化合物の検出された効果を比較することにより、該化合物は、選択的PI3-キナーゼ 阻害薬として決定される)により同定される選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を使用するのが好ましい。

【0011】

従って、本発明の別の目的は、選択的PI3-キナーゼ についてのスクリーニング方法を提供することであり、ここで、該方法は、単離したPI3-キナーゼのイソ型に候補化合物を接触させること及び各イソ型に対する該化合物の阻害効果を検出することを含んでなるが、その際、各イソ型に対する該化合物の検出された効果を比較することにより、該化合物は、選択的PI3-キナーゼ 阻害薬として決定される。

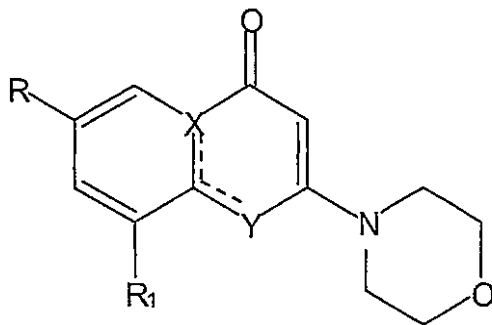
【0012】

好ましくは、該選択的PI3-キナーゼ 阻害薬は、生化学的なアッセイにおいて、別のタイプI PI3-キナーゼのイソ型に比較して、PI3-キナーゼ の阻害について、少なくとも約10倍以上の選択性、より好ましくは、20倍以上の選択性、さらに好ましくは、30倍以上の選択性を有する。そのような別のタイプI PI3-キナーゼには、PI3-キナーゼ 、PI3-キナーゼ 及びPI3-キナーゼ などがある。

【0013】

本発明の別の目的は、抗血栓が必要な患者に有効量の選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を投与することを含んでなる抗血栓のための方法に関し、但し、該阻害薬は、式(II)：

【化1】



(II)

【0014】

[式中、

Rは、H、OH、F、Cl、Br、I、C₁-C₆アルキル、アリール、又は、(CH₂)_n-アリールであり；

R¹は、H、OH、F、Cl、Br、I、C₁-C₆アルキル、C₃-C₆シクロアルキル、CH=CH-アリール、C-C-アリール、(CHR³)_n-アリール、NR³-C₁-C₆アルキル、NR³-シクロアルキル、NR³-(CHR³)_n-アリール、(CHR³)_n-NR³-アルキル、(CHR³)_n-NR³-シクロアルキル、(CHR³)_n-O-アリール、(CHR³)_n-O-アルキル、(CHR³)_n-O-シクロアルキル、O-(CHR³)_n-アリール、S-(CHR³)_n-アリール、又は、CO-アリールであり、その際、nは、0、1又は2であり、アルキル、シクロアルキル又はアリールは、場合により、F、Cl、Br、I、CN、CO₂H、CO₂R³、NO₂、CF₃、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリー

10

20

30

40

50

ル、OCF₃、OR³、OSO₂-アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、NH₂、COR³、NHSO₂R³、CONHR³又はSO₂NHR³で置換されていてもよく；

R³は、Hであるか、又は、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである]

で表される化合物（但し、式(11)の化合物が、

9-(3-ピリジニルメチル)オキシ-2-モルホリニル-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-140)；

7-メチル-9-フェニルアミノメチル-2-モルホリニル-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-183)；

8-(4-メチルフェニル)-2-(4-モルホリニル)-4(1H)-キノリノン(TGX-113)；

8-(4-フルオロフェノキシ)-2-(4-モルホリニル)-4(1H)-キノリノン(TGX-121)；

2-モルホリニル-8-(フェニルメチル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-90)；

2-(4-モルホリニル)-8-(4-フルオロ-2-メチルフェニル)オキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-184)；

9-[[2-(2-クロロフェニル)-メチル]アミノ]-7-メチル-2-(4-モルホリニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-167)；

9-[[2-(2-メトキシフェニル)-メチル]アミノ]-7-メチル-2-(4-モルホリニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-137)；

7-メチル-2-(4-モルホリニル)-9-[(フェニルメチル)アミノ]-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-126)；

9-[[4-(4-フルオロ-2-メチルフェニル)アミノ]-7-メチル-2-(4-モルホリニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-170)；

7-メチル-2-(4-モルホリニル)-9-[[1R]-1-フェニルエチル]アミノ]-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-123)；

7-メチル-2-(4-モルホリニル)-9-[(2-ピリジニルメチル)アミノ]-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-161)；

9-[[4-(4-クロロフェニル)メチル]アミノ]-7-メチル-2-(4-モルホリニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-108)；

2-(4-モルホリニル)-9-(フェニルメチル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-040)；

7-メチル-9-(N-メチル-N-フェニル)アミノメチル-2-(4-モルホリニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-195)；

2-(4-モルホリニル)-8-(フェニルメチル)オキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-102)

；

2-(4-モルホリニル)-8-(フェニルメチル)アミノ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-204)

；

2-(4-モルホリニル)-8-フェニルアミノ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-324)；

8-(3-クロロフェニル)オキシ-2-(4-モルホリニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-259)；

8-(3-メチルフェニル)-2-(4-モルホリニル)-4(1H)-キノリノン(TGX-127)；

8-(2-フルオロフェニル)-2-(4-モルホリニル)-4(1H)-キノリノン(TGX-143)；

及び、

(±)-7-メチル-2-モルホリニル-4-イル-9-[1-(3-ピリジニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(KN-304)；

からなる群から選択される場合を除く)ではない。

【0015】

本発明の別の目的において、該抗血栓方法は、式(1)：

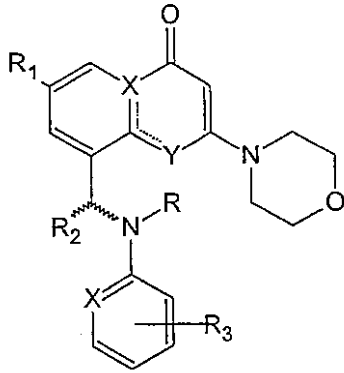
10

20

30

40

【化2】



(I)

10

【0016】

[式中、

Rは、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリール若しくは(CH₂)_n-アリールであり；

R₁は、H、OH、OCH₃、OCF₃、F、Cl、CF₃、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリール若しくは(CH₂)_n-アリールであり；

R₂は、R又はSの立体配置にある、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリール若しくは(CH₂)_n-アリールであり；

R₃は、1つ以上の、H、F、Cl、Br、I、CN、CO₂H、CO₂R、NO₂、CF₃、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、OCH₃、OCH₂F、OCHF₂、OCF₃、OR、OSO₂-アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、NHCOR、NHSO₂R、CONHR、又は、SO₂NHRであり；

Xは、C又はNであり；

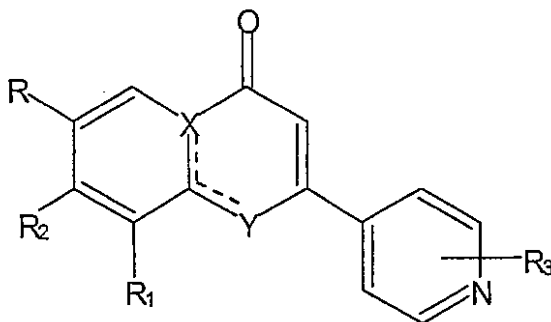
Yは、N又はOである]

で表される選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を投与することを含む。

【0017】

本発明のさらに別の目的において、該抗血栓方法は、式(III)：

【化3】



(III)

40

【0018】

[式中、

X及びYは、それぞれ、C及びOであるか、又は、それぞれ、C及びNHであるか、又は、両方とも、Nであり；

Rは、H、OH、OCH₃、OCF₃、F、Cl、Br、I、C₁-C₆アルキル、アリール、又は、(CH₂)_n-ア

50

ルールであり；

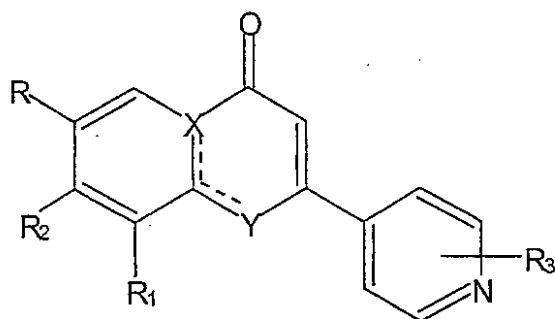
R_1 、 R_2 及び R_3 は、独立して、H、OH、F、Cl、Br、I、 C_1 - C_6 アルキル、 C_3 - C_6 シクロアルキル、CH=CH-アリール、C-C-アリール、 $(CHR'^3)_n$ -アリール、 NR'^3 - C_1 - C_6 アルキル、 NR'^3 -シクロアルキル、 NR'^3 - $(CHR'^3)_n$ -アリール、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -アリール、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -アルキル、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -シクロアルキル、 $(CHR'^3)_n$ -O-アリール、 $(CHR'^3)_n$ -O-アルキル、 $(CHR'^3)_n$ -O-シクロアルキル、O- $(CHR'^3)_n$ -アリール、S- $(CHR'^3)_n$ -アリール、又は、CO-アリールであり、その際、nは、0、1又は2であり、アルキル、シクロアルキル又はアリールは、場合により、F、Cl、Br、I、CN、 CO_2H 、 $CO_2R'^3$ 、 NO_2 、 CF_3 、置換されているか若しくは置換されていない C_1 - C_6 アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、 OCF_3 、 OR'^3 、 OSO_2 -アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、 $NHCOR'^3$ 、 $NHSO_2R'^3$ 、 $CONHR'^3$ 又は $SO_2NHR'^3$ で置換されていてもよく；

R'^3 は、Hであるか、又は、置換されているか若しくは置換されていない C_1 - C_6 アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである]
で表される選択的PI3-キナーゼ 阻害薬を投与することを含む。

【0019】

本発明の目的は、下記式(III)：

【化4】



(III)

【0020】

[式中、

X及びYは、それぞれ、C及びOであるか、又は、それぞれ、C及びNHであるか、又は、両方とも、Nであり；

Rは、H、OH、 OCH_3 、 OCF_3 、F、Cl、Br、I、 C_1 - C_6 アルキル、アリール、又は、 $(CH_2)_n$ -アリールであり；

R_1 、 R_2 及び R_3 は、独立して、H、OH、F、Cl、Br、I、 C_1 - C_6 アルキル、 C_3 - C_6 シクロアルキル、CH=CH-アリール、C-C-アリール、 $(CHR'^3)_n$ -アリール、 NR'^3 - C_1 - C_6 アルキル、 NR'^3 -シクロアルキル、 NR'^3 - $(CHR'^3)_n$ -アリール、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -アリール、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -アルキル、 $(CHR'^3)_n$ - NR'^3 -シクロアルキル、 $(CHR'^3)_n$ -O-アリール、 $(CHR'^3)_n$ -O-アルキル、 $(CHR'^3)_n$ -O-シクロアルキル、O- $(CHR'^3)_n$ -アリール、S- $(CHR'^3)_n$ -アリール、又は、CO-アリールであり、その際、nは、0、1又は2であり、アルキル、シクロアルキル又はアリールは、場合により、F、Cl、Br、I、CN、 CO_2H 、 $CO_2R'^3$ 、 NO_2 、 CF_3 、置換されているか若しくは置換されていない C_1 - C_6 アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、 OCF_3 、 OR'^3 、 OSO_2 -アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、 $NHCOR'^3$ 、 $NHSO_2R'^3$ 、 $CONHR'^3$ 又は $SO_2NHR'^3$ で置換されていてもよく；

R'^3 は、Hであるか、又は、置換されているか若しくは置換されていない C_1 - C_6 アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである]
で表される新規化合物に関する。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の目的において、該抗血栓法は、式(1)[式中、Rは、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリールであり；

R₁は、H、OH、OCH₃、OCF₃、F、Cl、CF₃、又は、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキルであり；

R₂は、R又はSの立体配置にある、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリールであり；

R₃は、1つ以上の、H、F、Cl、Br、CN、CO₂H、CO₂R、NO₂、CF₃、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、OCH₃、OCH₂F、OCHF₂、OCF₃、OR、置換されて

10

いるか若しくは置換されていないアミン、NHCOR、NHSO₂R、CONHR、又は、SO₂NHRであり；
Xは、C又はNであり；及び、Yは、N又はOである]で表される2-モルホリノ置換誘導体を投与することを含む。

【 0 0 2 2 】

本発明の別の目的において、該抗血栓法は：

(±)-7-メチル-9-{[メチル(フェニル)アミノ]メチル}-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-195)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(4-フルオロフェニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-224)；

20

(±)-9-[1-(3,4-ジフルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-237)；

(±)-9-[1-(2,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-238)；

(±)-9-[1-(3,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-239)；

(±)-9-[1-(4-フルオロ-2-メチルフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-240)；

(±)-9-[1-(4-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-243)；

30

(±)-9-[1-(3,4-ジクロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-244)；

(±)-9-[1-(3-フルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-247)；

(±)-9-[1-(3-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-248)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(2-チアゾリルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-261)；

(±)-7-メチル-9-[1-(3-メチルフェニルアミノ)エチル]-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-262)；

40

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(3-トリフルオロメチルフェニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-264)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(2-ピリジニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-295)；

(±)-2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-イル]エチル}アミノ)安息香酸(KN-309)；

(±)メチル2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-イル]エチル}アミノ)ベンゾエート(KN-321)；

(±)-2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-

50

イル]エチル}アミノ)ベンゾニトリル(KN-320) ;

(±)-7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-9-(1-{[2-(2H-テトラゾール-5-イル)フェニル]アミノ}エチル)-ピリド[1,2-a]ピリミド-4-オン(KN-325) ;

及び、

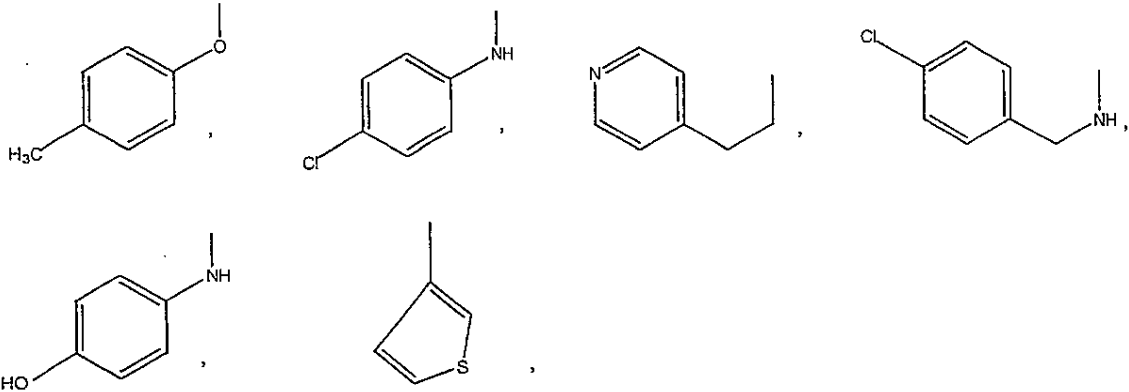
(±)-2-(4-モルホリニル)-8-[1-(フェニルアミノ)エチル]-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-280) ;

からなる群から選択されるPI3-キナーゼ阻害薬を投与することを含む。

【0023】

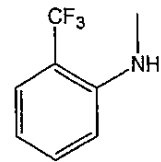
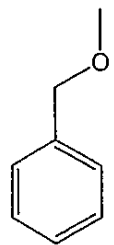
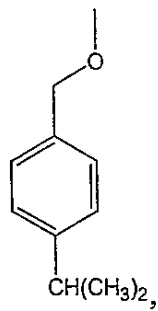
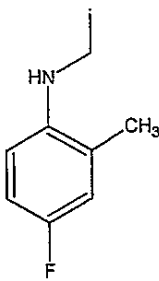
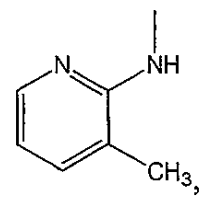
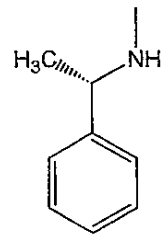
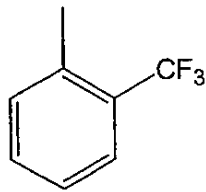
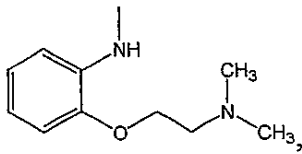
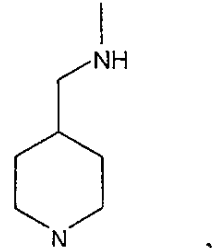
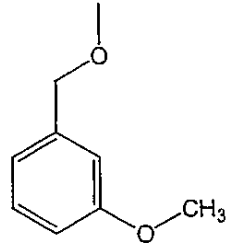
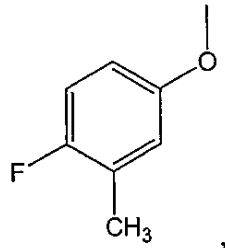
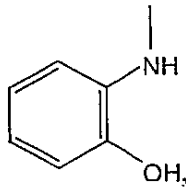
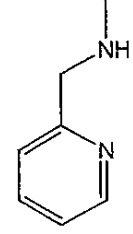
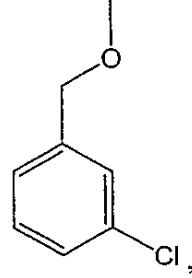
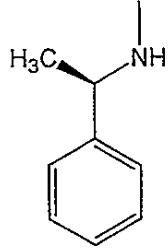
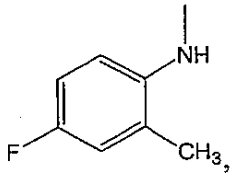
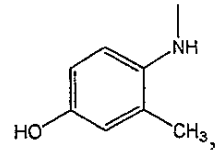
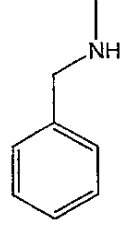
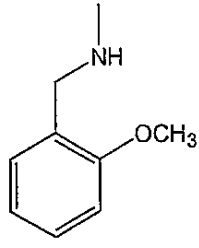
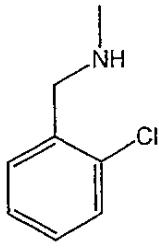
本発明の目的は、式(III)で表される化合物を提供することであり、その際、R¹は、CH₃、C₂H₅、

【化5】



10

20

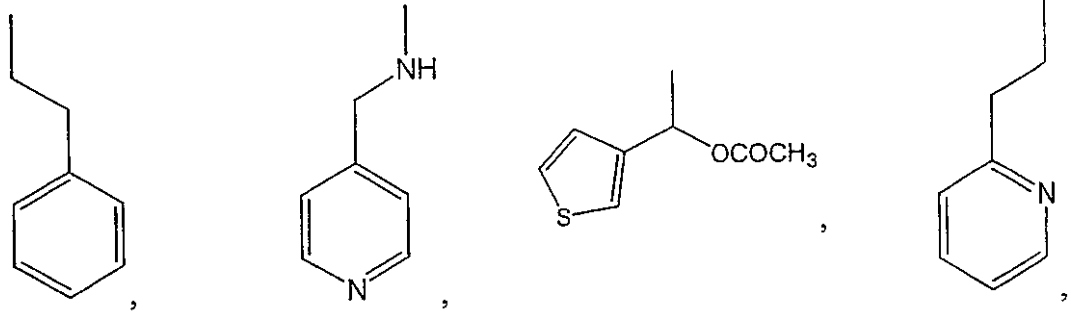


10

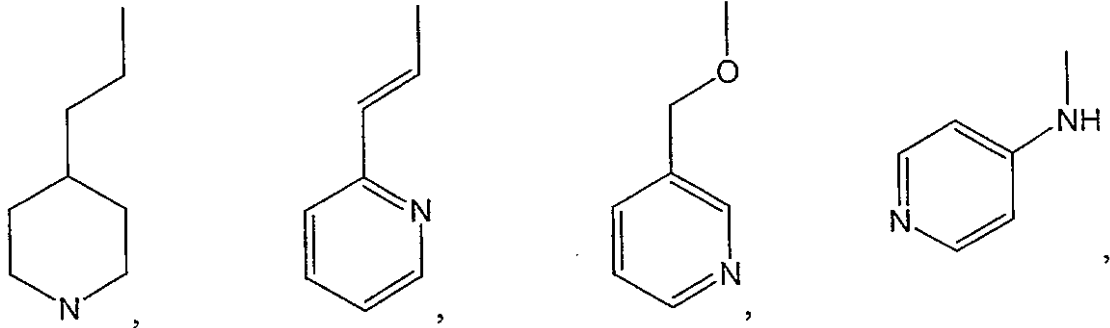
20

30

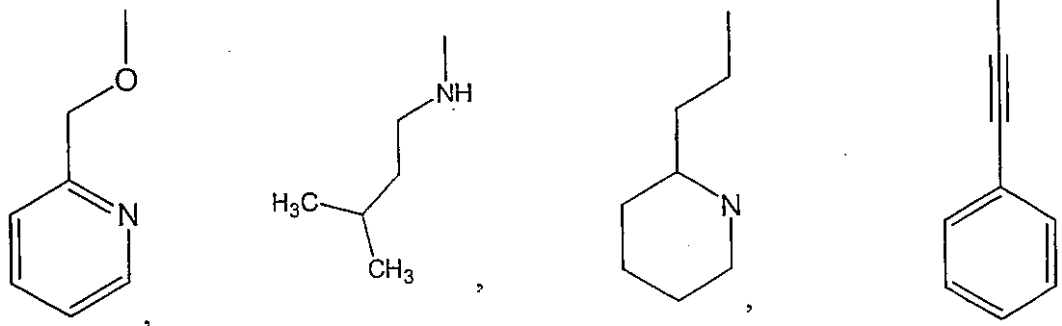
40



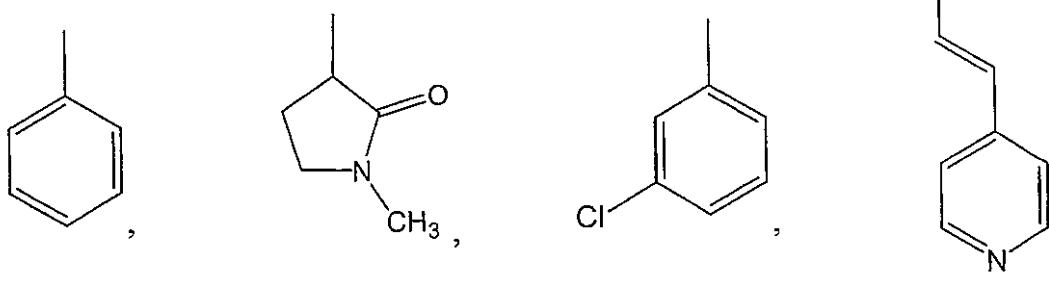
10



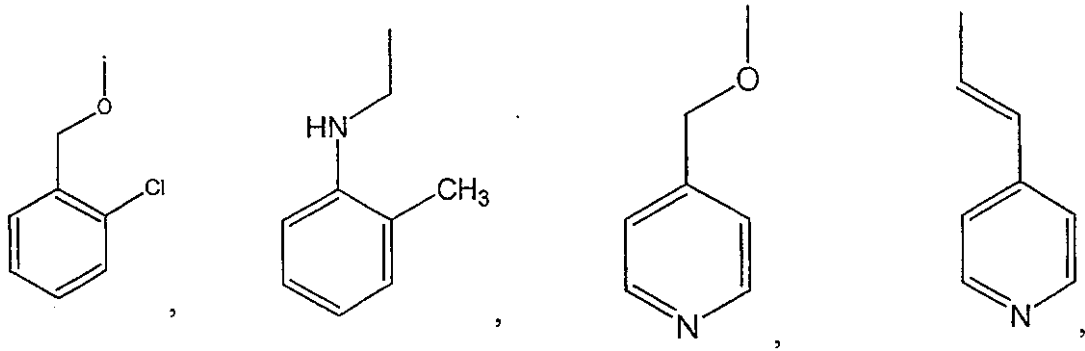
20



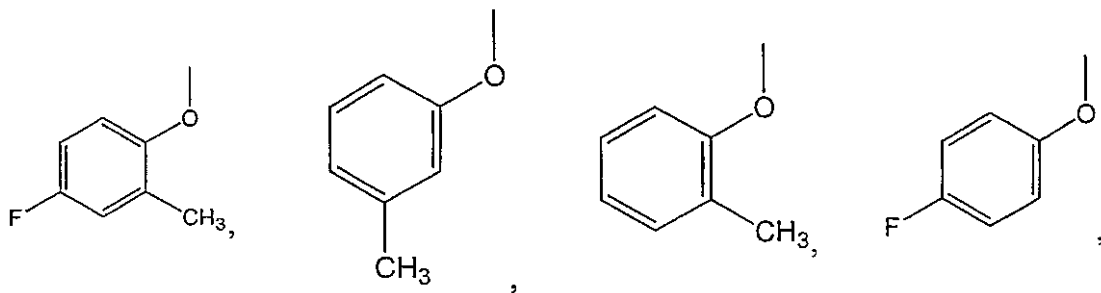
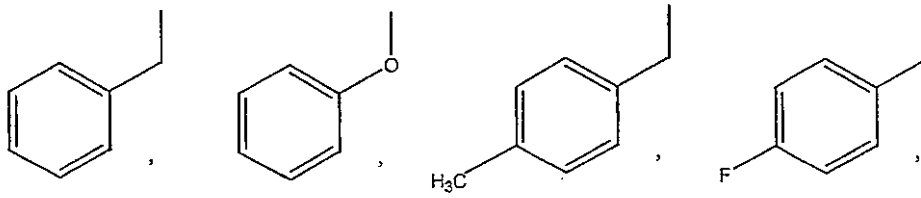
30



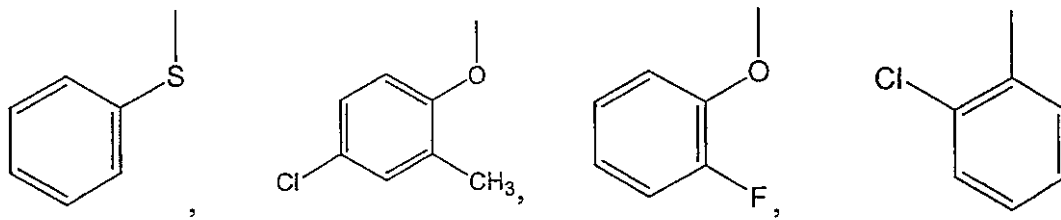
40



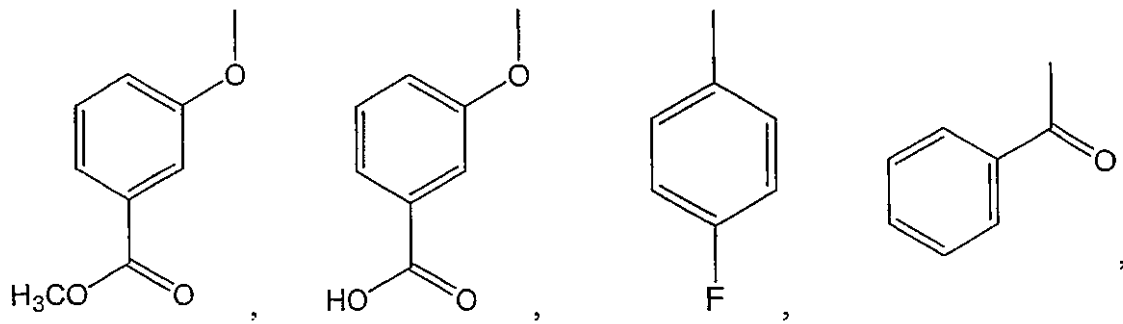
10



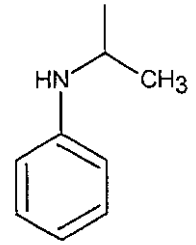
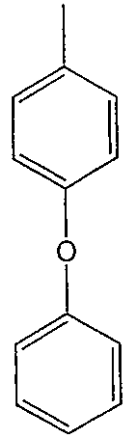
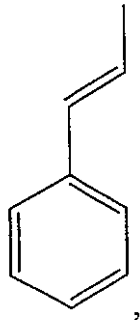
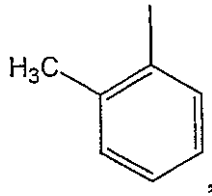
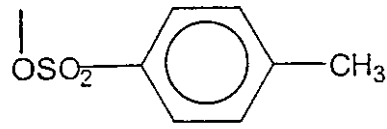
20



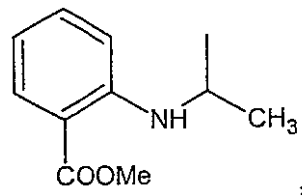
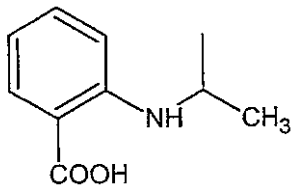
30



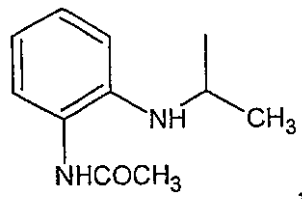
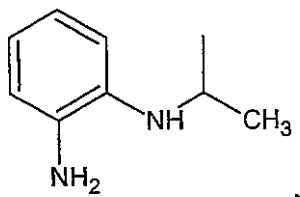
40



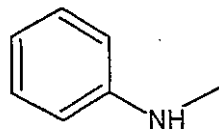
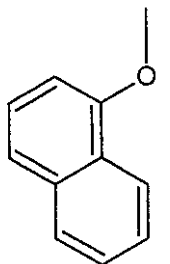
10



20



30

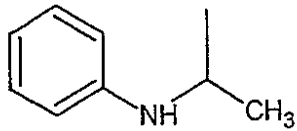


40

【 0 0 2 4 】
からなる群から選択される。

【 0 0 2 5 】
式中のRがメチルであり、且つ、R¹が

【化6】



【0026】

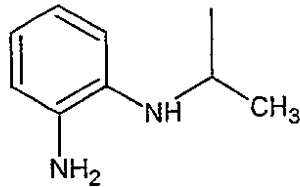
である、式(III)の特定の化合物も意図されている。

【0027】

式中のRがメチルであり、且つ、R¹が

10

【化7】



【0028】

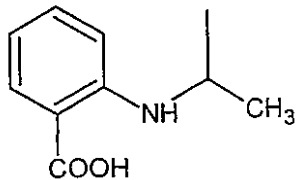
である、式(III)の特定の化合物も意図されている。

20

【0029】

式中のRがメチルであり、且つ、R¹が

【化8】



30

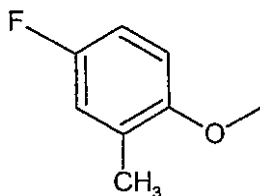
【0030】

である、式(III)の特定の化合物も意図されている。

【0031】

式中のRがHであり、且つ、R¹が

【化9】



40

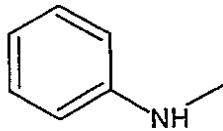
【0032】

である、式(III)の特定の化合物も意図されている。

【0033】

式中のRがHであり、且つ、R¹が

【化10】



【0034】

である、式(III)の特定の化合物も意図されている。

【0035】

10

さらにまた、本発明は、患者のホスホイノシチド3-キナーゼを阻害する方法も意図しており、ここで、該方法は、患者においてホスホイノシチド3-キナーゼを阻害するのに有効な量の式(III)の化合物を患者に投与することを含む。

【0036】

さらにまた、本発明は、心血管疾患を予防又は治療する方法も意図しており、ここで、該方法は、そのような予防又は治療が必要な患者に有効量の式(III)の化合物を投与することを含む。

【0037】

さらにまた、本発明は、呼吸器疾患を予防又は治療する方法も意図しており、ここで、該方法は、そのような予防又は治療が必要な患者に有効量の式(III)の化合物を投与することを含む。

20

【0038】

さらにまた、本発明は、癌を予防又は治療する方法も意図しており、ここで、該方法は、そのような予防又は治療が必要な患者に有効量の式(III)の化合物を投与することを含む。

【0039】

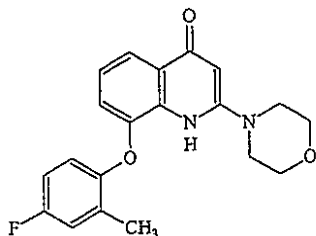
さらにまた、本発明は、白血球機能障害に関連する疾患を予防又は治療する方法も意図しており、ここで、該方法は、そのような予防又は治療が必要な患者に有効量の式(III)の化合物を投与することを含む。

【0040】

30

本発明の方法の一目的は、下記阻害薬：

【化11】



【0041】

40

を投与することを含む。

【0042】

本発明の方法の一目的は、6-メチル-8-[1-(フェニルアミノ)エチル]-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-4-オンを投与することを含む。

【0043】

本発明の方法の一目的は、6-メチル-8-{1-[(2-アミノフェニル)アミノ]エチル}-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-4-オンを投与することを含む。

【0044】

本発明は、さらにまた：

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリ

50

ミジン-4-オン；

(±)-2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-イル]エチル}アミノ)安息香酸；

(±)-2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-イル]エチル}アミノ)ベンゾニトリル；

(±)メチル2-({1-[7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-4-オキソ-ピリド[1,2-a]ピリミジン-9-イル]エチル}アミノ)ベンゾエート；

及び

(±)-7-メチル-2-(モルホリン-4-イル)-9-(1-{[2-(2H-テトラゾール--イル)フェニル]アミノ}エチル)-ピリド[1,2-a]ピリミド-4-オン；

からなる群から選択される新規化合物にも関する。

【0045】

従って、本発明のさらに別の目的は、PI3-キナーゼ を阻害する方法を提供することであり、ここで、該方法は、患者においてPI3-キナーゼ を阻害するのに有効な量の式(1)で表される1種の化合物を患者に投与することを含んでなる。

【0046】

図面の説明

図(1A)～図(1E)は、LY294002又はWortmanninでPI3-キナーゼを阻害することにより、加速された剪断に対する血小板の反応が除去されることを実証するための試験の結果を表している。インビトロ流動条件下接着アッセイ(flow based adhesion assay)を用いることにより、(細胞質ゾルカルシウムフラックスをモニタリングすることにより)固定したフォンウィルブラント因子(vWf)上での血小板の接着動力学と活性化を同時に分析することが可能となる。簡潔に言えば、単離した血小板をvWf(100 µg/mL)でコーティングしたマイクロキャピラリーチューブを通して灌流し、共焦点顕微鏡により細胞質ゾルカルシウムフラックスの分析をリアルタイムで行う。

【0047】

図(1A)は、さまざまな血流条件下において不可逆的な接着を形成するvWfと相互作用している血小板の割合をグラフにより示している。グラフ(i)においては、単離した血小板を、vWfマトリックス上で、一定の剪断速度(600, 1800、又は、 $10,000 \cdot s^{-1}$)で灌流し、グラフ(ii)では、単離した血小板をvWfマトリックス上に静置し、次いで、 $10,000 \cdot s^{-2}$ の剪断速度勾配()で加速した。

【0048】

図(1B)は、固定したvWfの表面における個々の血小板の挙動を示している。グラフは、細胞質ゾルカルシウムフラックス($[Ca^{2+}]_c$)プロフィール及びそれに付随して時間(秒)に対する個々の血小板の変位(µm)を表している。単離した血小板をvWfの表面上に静置した後、1秒間隔で、剪断速度を加速した()。矢印()は、剪断を加えた時点を表している：持続的，血小板は振動型の $[Ca^{2+}]_c$ を受け、接着は固定されたままである；一時的，血小板は、 $[Ca^{2+}]_c$ の急上昇を受け、接着は一時的に固定された状態にある；回転，血小板は最少の $[Ca^{2+}]_c$ を示し、vWf表面上を急速に移動する。

【0049】

図(1C)は、ピヒクル(DMSO <0.25% v/v)、0.5U/mLのアピラーゼ、1mMのアスピリン、又は、25 µMのLY294002による前処理を行った後の、持続的、一時的又は回転の挙動を示すvWf接着血小板の割合をグラフにより示している。

【0050】

図(1D)は、GPIb/V/IX結合のモデュレーターであるリストセチン(1mg/mL)で処理した後の、固定されたvWfの表面におけるGPIb/V/IX依存性 $[Ca^{2+}]_c$ を示す代表的な単独の血小板のレコードを示している。血小板は、アッセイを行う前に、インテグリン $\alpha_{IIb} \beta_3$ 拮抗薬であるアグラスタット(200nM)で10分間処理した：静的状態，血小板は、vWfでコーティングしてあるカバーガラスの表面上に、剪断なしで37 °Cで10分間静置した。10分経過した時点で、1.5分間、 $[Ca^{2+}]_c$ をモニタリングした；コンスタント，血小板を、vWf

10

20

30

40

50

TGX-221のインビトロ抗血栓活性

図(5A)は、Foltsモデルにおける、ペントバルビトンで麻酔をかけたラット(A)及びウサギ(B)での薬物投与前(a; -30-0分)及び薬物投与後(b~d; それぞれ、1-30分、31-60分、及び、61-90分)の30分間当たりの頸動脈血流の周期的流量減少(CFR)が認められた平均個体数に対するピヒクル(プロピレングリコール)又はTGX-221の影響を示している。CFRは、薬物投与前の30分間及び薬物投与後の90分間モニタリングした。n:動物の数。標準偏差(error bars)は、 ± 1 SEMである。

【0060】

図(5B)は、電解質モデルにおける、ペントバルビトンで麻酔をかけたラットでの電解質による傷害(7mAの電流4分間(時間 -4-0分)血流量0; 0分で動脈鉗子を除去)を受けた後の頸動脈血流量(体重100g当たりのmL/分)に対するピヒクル(プロピレングリコール)又はTGX-221の影響を示している。処理は、-9分(即ち、電流を与える5分前)に静脈内ボラス投与として行った。標準偏差は、反復測定ANOVAから得た平均SEMである。図(5B)の挿入図は、麻酔をかけたラットでの電解質による傷害を受けた後の頸動脈血流容積(刺激期間の終了後60分間にわたる血流量曲線の下面積)に対する上記処理の影響を示している。標準偏差は、 ± 1 SEMである。

10

【0061】

図(5C)は、それぞれ、TGX-221、TGX-221+ヘパリン、アスピリン、クロピドグレル、クロピドグレル+ヘパリン、クロピドグレル+ヘパリン+TGX-221、アスピリン+ヘパリン、及び、アスピリン+ヘパリン+TGX-221で処理した、ハロタンで麻酔をかけたラットにおけるラット尾部の出血時間の比較を示している。

20

【0062】

図(6A)及び図(6B)は、ROS応答に対する種々の濃度のTGX-286の影響を示している。

【0063】

図(7)は、エラストアーゼの放出に対する種々の濃度のTGX-286の影響を示している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0064】

2種類の主要な血小板接着受容体であるGPIb/VIIX(「GPIb」)及びインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ は、流動学的な障害(高剪断及び剪断の急激な加速)の条件下における血小板の活性化に関連する特有の機械感覚機能を有している。本発明者らは、両方の受容体を介したシグナル伝達が、剪断速度の急激な加速()により調節されることを見いだした。ここで、剪断速度の急激な加速は、PI3-キナーゼ依存性シグナル伝達プロセスを介して血小板を活性化させる。

30

【0065】

従って、本発明者らは、高剪断条件下で血小板の活性化を調節している重要なシグナル伝達機構を明らかにした。その結果、本発明者らは、病理学的な血流条件下で血小板の活性化を惹起する要素として、PI3-キナーゼ を同定した。特定の血小板接着受容体をブロックする既存の抗血小板療法は、病理学的な血小板活性化と正常な止血における血小板活性化を区別しない。従って、PI3-キナーゼ を選択的に阻害することにより、生理学的な作動因子により惹起される血小板の活性化に悪影響を与えることなく、剪断速度の病理学的な増加により惹起される血小板の活性化を防止することが可能であるという本発明者らの発見は、抗血栓療法のための新規化合物を包含する、抗血栓療法に対する新規で特異的なアプローチを提供する。

40

【0066】

図(1A)に示されているように、剪断環境により血小板の活性化及び血小板のvWfへの接着が調節される。定常状態の剪断に付されている血小板とは対照的に、剪断速度の加速()に付された場合、血小板がさらに活性化され、接着接触を維持する。細胞質ゾルカルシウムフラックスをモニタリングすることにより血小板の活性化についてより綿密な試験を行った結果、 が、GPIbとインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ のカルシウムシグナル伝達に対して異なった補足的な作用を有していることが明らかになった。インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$

50

カルシウムシグナル伝達の場合は、
によりカルシウムシグナルの急激なオンセットが惹起され、そのカルシウムシグナルは、vWfに堅く接着したままでいることができる血小板内に特異的に維持されていた。この剪断により調節されるインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ カルシウムシグナルは、内因性の血小板作動因子(ADP及びTXA₂)とは独立して生じたが、PI3-キナーゼには完全に依存していた(図(1B)及び図(1C))。により新規なGPIbカルシウムシグナルが誘導されたが、これは、文献(Nesbit et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 2965.)において既に認識されているGPIbカルシウム濃度変化(calcium transient)とは異なるものである(図(1D))。GPIbカルシウムシグナルの決定的な3つの特徴には、(1)の加速速度に厳密に依存すること(図(1E)); (2)カルシウム応答の頻度の増加(図(1D)); 及び、(3)PI3-キナーゼ阻害薬に対する感受性(図(1D))などがある。

10

【0067】

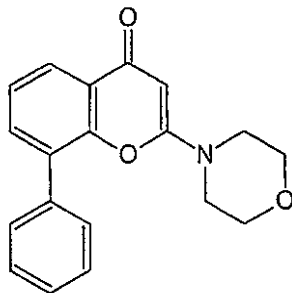
GPIbとインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ のカルシウムシグナル伝達が両方ともPI3-キナーゼに依存するので、PI3-キナーゼを阻害することにより、剪断速度の急激な加速()により誘発されるGPIbとインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ のカルシウムシグナルは排除される。

【0068】

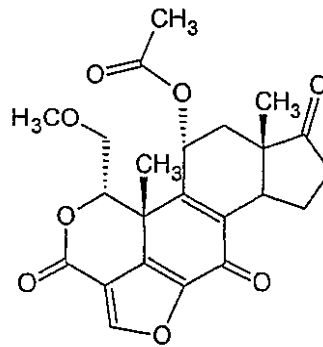
LY294002又はWortmannin(下記参照)のような構造的に関連のないPI3-キナーゼ阻害薬の、剪断により惹起される血小板の凝集を防止する能力についての初期の研究により、剪断により惹起される血小板の活性化のための、PI3-キナーゼに関する重要な機械感覚シグナル伝達機能が示唆された。しかしながら、これらの化合物はPI3-キナーゼの種々のイソ型を区別しないので、剪断に依存する血小板の活性化にPI3-キナーゼのどの特定のイソ型(1種又は複数種)が関与しているかについては、依然としてはっきりしないままであった。

20

【化12】



LY294002



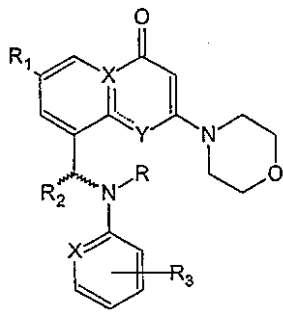
wortmannin

30

【0069】

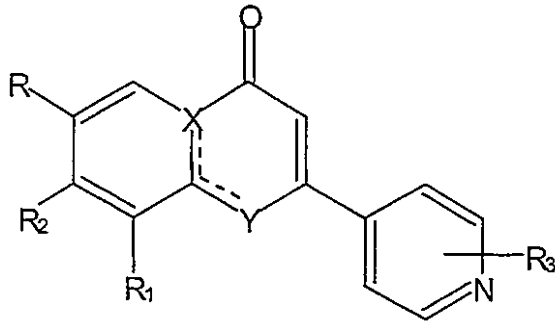
PI3-キナーゼ を選択的に阻害する本発明の例示的な化合物を以下に示す。

【化13】



(I) or

10



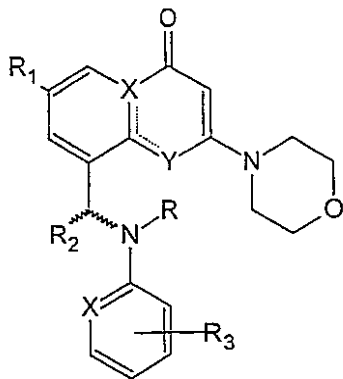
(III)

20

【0070】

式(I)で表される2-モルホリノ置換誘導体は、以下のように定義される。

【化14】



(I)

30

【0071】

上記式中、

Xは、C又はNであり；

Yは、N又はOであり；

Rは、H、分枝鎖若しくは直鎖の C_1 - C_6 アルキル、又は、アリール若しくは $(CH_2)_n$ -アリールであり；

R_1 は、H、OH、 OCH_3 、 OCF_3 、F、Cl、 CF_3 、分枝鎖若しくは直鎖の C_1 - C_6 アルキル、又は、アリール若しくは $(CH_2)_n$ -アリールであり；

R_2 は、R又はSの立体配置にある、H、分枝鎖若しくは直鎖の C_1 - C_6 アルキル、又は、アリール若しくは $(CH_2)_n$ -アリールであり；

R_3 は、1つ以上の、H、F、Cl、Br、I、CN、 CO_2H 、 CO_2R 、 NO_2 、 CF_3 、置換されているか若しくは置換されていない C_1 - C_6 アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、 OCH_3 、 OCH_2F 、 $OCHF_2$ 、 OCF_3 、OR、 OSO_2 -アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、NHC

40

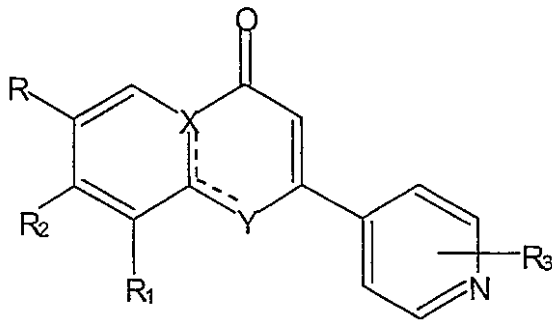
50

OR、NHSO₂R、CONHR、又は、SO₂NHRである。

【0072】

PI3-キナーゼ 活性の阻害薬としての式(I)の化合物に加えて、PI3-キナーゼ を選択的に阻害する式(III)の新規化合物が以下のように定義される。

【化15】



(III)

【0073】

上記式中、

X及びYは、それぞれ、C及びOであるか、又は、それぞれ、C及びNHであるか、又は、両方とも、Nであり；

Rは、H、OH、OCH₃、OCF₃、F、Cl、Br、I、C₁-C₆アルキル、アリール、又は、(CH₂)_n-アリールであり；

R₁、R₂及びR₃は、独立して、H、OH、F、Cl、Br、I、C₁-C₆アルキル、C₃-C₆シクロアルキル、CH=CH-アリール、C-C-アリール、(CHR'³)_n-アリール、NR'³-C₁-C₆アルキル、NR'³-シクロアルキル、NR'³-(CHR'³)_n-アリール、(CHR'³)_n-NR'³-アリール、(CHR'³)_n-NR'³-アルキル、(CHR'³)_n-NR'³-シクロアルキル、(CHR'³)_n-O-アリール、(CHR'³)_n-O-アルキル、(CHR'³)_n-O-シクロアルキル、O-(CHR'³)_n-アリール、S-(CHR'³)_n-アリール、又は、CO-アリールであり、その際、nは、0、1又は2であり、アルキル、シクロアルキル又はアリールは、場合により、F、Cl、Br、I、CN、CO₂H、CO₂R'³、NO₂、CF₃、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、OCF₃、OR'³、OSO₂-アリール、置換されているか若しくは置換されていないアミン、NHCOR'³、NHSO₂R'³、CONHR'³又はSO₂NHR'³で置換されていてもよく；

及び、

R'³は、Hであるか、又は、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである。

【0074】

本発明の方法について有用な好ましい化合物には、式(I)[式中、Rは、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリールであり；

R₁は、H、OH、OCH₃、OCF₃、F、Cl、CF₃、又は、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキルであり；

R₂は、R又はSの立体配置にある、H、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、又は、アリールであり；

R₃は、1つ以上の、H、F、Cl、Br、CN、CO₂H、CO₂R、NO₂、CF₃、分枝鎖若しくは直鎖のC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないシクロアルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリール、OCH₃、OCH₂F、OCHF₂、OCF₃、OR、置換されているか若しくは置換されていないアミン、NHCOR、NHSO₂R、CONHR、又は、SO₂NHRであり；

Xは、C又はNであり；及び、Yは、N又はOである]で表される2-モルホリノ置換ピリドピリミジン誘導体が包含される。

【0075】

10

20

30

40

50

式(1)で表される特定の阻害薬の例としては：

(±)-7-メチル-9-{[メチル(フェニル)アミノ]メチル}-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-195)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-221)；

(±)-9-[1-(3,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-239)；

(±)-9-[1-(4-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-243)；

(±)-9-[1-(3,4-ジクロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-244)；

(±)-9-[1-(3-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-248)；

(±)-7-メチル-9-[1-(3-メチルフェニルアミノ)エチル]-2-モルホリン-4-イル-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-262)；

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(3-トリフルオロメチルフェニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-264)；

及び

(±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-[1-(2-ピリジニルアミノ)エチル]-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(TGX-295)；

などを挙げることができる。

【0076】

本明細書に関連して、用語「アルキル」は、直鎖又は分枝鎖の飽和脂肪族炭化水素基を意味する。好ましくは、該アルキル基は、1~6個の炭素を有し、その例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチル、ペンチル、i-ペンチル及びヘキシルなどがある。該アルキル基は、場合により、以下のものから選択される1つ以上の基で置換されていてもよい：ハロゲン、例えば、F、Cl、Br又はI；C_N；CO₂R₃；NO₂；CF₃；置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル；置換されているか若しくは置換されていないC₃-C₆シクロアルキル；置換されているか若しくは置換されていないアリール；OCF₃；OR₃；置換されているか若しくは置換されていないアミン；NHCOR₃；NHCO₂R₃；CONHR₃；又は、SO₂NHR₃(ここで、R₃は、H、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである)。

【0077】

用語「シクロアルキル」は、非ヘテロ環式環(即ち、炭素環式環)又はヘテロ環式環を意味する。この点に関して、非ヘテロ環式環の例は、置換されているか若しくは置換されていないシクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘキサジオン、シクロペンタンジオン及びキノンなどである。適するヘテロシクロアルキル基には、置換されているか若しくは置換されていないピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、2-ピペリドン、アザシクロヘキサン-2-オン及びモルホリン基などがある。該シクロアルキル基は、場合により、1つ以上の位置に置いて、ハロゲン、例えば、F、Cl、Br若しくはI；CN；CO₂R₃；NO₂；CF₃；置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル；置換されているか若しくは置換されていないC₃-C₆シクロアルキル；置換されているか若しくは置換されていないアリール；OCF₃；OR₃；置換されているか若しくは置換されていないアミン；NHCOR₃；NHCO₂R₃；CONHR₃；又は、SO₂NHR₃(ここで、R₃は、H、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである)により置換されていてもよい。

【0078】

用語「アリール」は、芳香環又はヘテロ芳香環を意味する。アリール基の例は、ピロリジン、チオフェン、ピロール、ピラゾール、イミダゾール、1,2,3-トリアゾール、1,2,4-

10

20

30

40

50

トリアゾール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、フラン、1,2,3-オキサジアゾール、1,2,4-オキサジアゾール、1,2,5-オキサジアゾール、1,3,4-オキサジアゾール、1,2,3,4-オキサトリアゾール、1,2,3,5-オキサトリアゾール、1,2,3-チアジアゾール、1,2,4-チアジアゾール、1,2,5-チアジアゾール、1,3,4-チアジアゾール、1,2,3,4-チアトリアゾール、1,2,3,5-チアトリアゾール、テトラゾール、ベンゼン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン、インデン、ナフタレン、インドール、イソインドール、インドリジン、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、インダゾール、ベンゾイミダゾール、ベンゾチアゾール、プリン、キノリジン、キノリン、イソキノリン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、ナフチリジン、プテリジン、フルオレン、カルバゾール、カルボリン、アクリジン、フェナジン及びアントラセンである。該アリール基は、場合により、1つ以上の位置に置いて、ハロゲン、例えば、F、Cl、Br若しくはI；CN；CO₂R₃；NO₂；CF₃；置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル；置換されているか若しくは置換されていないC₃-C₆シクロアルキル；置換されているか若しくは置換されていないアリール；OCF₃；OR₃；置換されているか若しくは置換されていないアミン；NHCOR₃；NHSO₂R₃；CONHR₃；又は、SO₂NHR₃(ここで、R₃は、H、置換されているか若しくは置換されていないC₁-C₆アルキル、置換されているか若しくは置換されていないアリールである)により置換されていてもよい。

10

【0079】

本明細書において使用されている用語「選択的PI3-キナーゼ阻害薬」は、PI3-キナーゼファミリーの別のイソ型に比較して、PI3-キナーゼを、少なくとも約10倍以上、好ましくは、20倍以上、さらに好ましくは、30倍以上効果的に阻害する化合物を意味する。「選択的PI3-キナーゼ阻害薬」化合物は、LY294002又はWortmanninのような慣習的に且つ一般的にPI3-キナーゼ阻害薬として指定される化合物よりも、PI3-キナーゼに対して選択性が高いものと理解される。本発明の方法においては、PI3-キナーゼの発現又は活性を選択的に阻害する任意のタイプの化合物を選択的PI3-キナーゼ阻害薬として使用することが可能である。

20

【0080】

本発明のピリジンで置換されている化合物は、高剪断血流条件下において血小板の接着過程を調節する脂質シグナル伝達酵素PI3-キナーゼを阻害することが分かっており、従って、本発明のピリジンで置換されている化合物は、抗血栓活性を示すこと、及び、以下で詳細に述べられている別の薬理学的特性を示すことが分かっている。PI3-キナーゼは、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸(PI(3)P)、ホスファチジルイノシトール-3,4-二リン酸(PI(3,4)P₂)及びホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PI(3,4,5)P₃)などの3-リン酸化PI二次メッセンジャーを生成させる。これらの二次メッセンジャーは、グルコース輸送、アポトーシスの防止、小胞輸送、細胞増殖及び細胞骨格再編成などのさまざまな細胞内現象を調節するものと考えられている。

30

【0081】

病態生理学的に関連した血流条件下での血小板の接着に対するPI3-キナーゼ阻害薬の作用に関する公表された報告は存在しない。それにもかかわらず、PI3-キナーゼが、血小板の接着の調節において、特に、生理学的な血流の条件下における血小板の接着の調節において、重要な役割を果たしていることが見いだされた。従って、本発明の化合物で血小板を処理することにより、PI3-キナーゼのリン酸化脂質産物(PI(3)P、PI(3,4)P₂、及び、PI(3,4,5)P₃)の形成が阻害され、それにより、血流条件下における血小板のvWfマトリックスへの接着が著しく低減される。この血小板の接着の低減は、異常な血小板拡散及び血栓形成に関連する。剪断に依存する血小板の接着及び活性化は動脈血栓の形成において重要であるので、PI3-キナーゼは、一般に、心血管疾患における治療的介入のための重要な標的である。

40

【0082】

さらにまた、PI3-キナーゼの上記阻害薬は、さまざまな別の疾患状態における潜在的な治療用途も有する。例えば、PI3-キナーゼは、血管樹の平滑筋の増殖、即ち、血管平滑筋

50

細胞の増殖において重要な役割を果たしており(Thyberg, 1998, European Journal of Cell Biology 76(1) : 33-42)、また、肺における平滑筋(気道平滑筋細胞)の増殖において重要な役割を果たしている(Krymskaya et al., 1999, American Journal of Physiology 277 : 65-78)。血管平滑筋細胞の過度の増殖は、アテローム斑の形成及び侵襲性の血管の処置の後で起こる新内膜の過形成の進行において重要な役割を果たしている(Scwartz et al., 1984, Progress in Cardiovascular Disease 26 : 355-372; Clowes et al., 1978, Laboratory Investigations 39 : 141-150)。さらに、気道平滑筋細胞が過度に増殖すると、慢性気管支炎及び喘息の状態においてCOPDが発症する。従って、PI3-キナーゼの阻害薬は、血管の再狭窄、アテローム性動脈硬化症及びCOPDを予防するために使用し得る。

【 0 0 8 3 】

PI3-キナーゼは、腫瘍細胞の調節においても重要な役割を果たしており、また、腫瘍細胞がアポトーシス増殖する傾向を有することにおいても重要な役割を果たしている(Sellers et al., 1999, The Journal of Clinical Investigation 104 : 1655-1661)。さらに、脂質ホスファターゼPTENによるPI3-キナーゼ脂質産物(PI(3,4,5)P₃及びPI(3,4)P₂)の制御されない調節は、ヒトの多くの種類の悪性腫瘍の進行において重要な役割を果たしている(Leever et al., 1999, Current Opinion in Cell Biology 11 : 219-225)。従って、PI3-キナーゼの阻害薬を用いて、ヒトの腫瘍を治療し得る。

【 0 0 8 4 】

PI3-キナーゼは、白血球の機能においても重要な役割を果たしており(Fuller et al., 1999, The Journal of Immunology 162(11) : 6337-6340; Eder et al., 1998, The Journal of Biological Chemistry 273(43) : 28025-31)、また、リンパ球の機能においても重要な役割を果たしている(Vicente-Manzanares et al., 1999, The Journal of Immunology 163(7) : 4001-4012)。例えば、炎症を起こしている内皮への白血球の接着には、PI3-キナーゼ依存性シグナル伝達プロセスによる内因性白血球インテグリンの活性化が関与している。さらに、好中球における急激な活性酸素発生(oxidative burst)(Nishioka et al., 1998, FEBS Letters 441(1) : 63-66)及び細胞骨格再編成(Kirsch et al., 1999, Proceedings National Academy of Sciences USA 96(11) : 6211-6216)には、PI3-キナーゼシグナル伝達が関与しているように見える。従って、PI3-キナーゼの阻害薬は、炎症部位における白血球の接着及び活性化を低減するのに有用であり得る。従って、PI3-キナーゼの阻害薬を用いて、急性及び/又は慢性の炎症性疾患を治療し得る。PI3-キナーゼは、リンパ球の増殖及び活性化においても重要な役割を果たしている(Fruman et al., 1999, Science 283(5400) : 393-397)。自己免疫疾患においてリンパ球が重要な役割を果たしていることを考慮すると、PI3-キナーゼの阻害薬を用いてそのような疾患を治療し得る。

【 0 0 8 5 】

酵素活性の阻害薬としての化合物の相対的効力は、例えば、各化合物が該活性を予め定められた程度まで阻害する濃度を測定し、次いで、結果を比較することにより、確定することができる。典型的には、好ましい測定は、生化学的なアッセイにおいて、該活性の50%を阻害する濃度、即ち、50%阻害濃度(即ち、「IC₅₀」)を求めることである。IC₅₀は、当技術分野で知られている慣習的な技術を用いて決定することができる。

【 0 0 8 6 】

本発明により、血小板内のPI3-キナーゼが、剪断により惹起される血小板の活性化及び閉塞性血栓の形成に関連する重要な機械感覚機能を有していることが確認された。GPIb及びインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ を介した機械的刺激に対する細胞応答(mechano-transduction)へのPI3-キナーゼ阻害薬TGX-221の効果を解析することにより、両方の受容体を介してにより惹起されたカルシウムフラックスにとってPI3-キナーゼが必要不可欠であることが示された(図(4A)及び図(4B))。カルシウムフラックスに対するTGX-221の作用は、に依存しないGPIbカルシウムシグナル伝達は阻害しなかった(図(4B))。さらに、トロンビン、コラーゲン及びADPにより惹起される別の血小板活性化応答(例えば、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化(PAC-1結合)及び $\alpha_{IIb}\beta_3$ -顆粒分泌(P-セレクチン発現)など)は、TGX-221の影響を受けなかった(図(4C))。

10

20

30

40

50

【0087】

PI3-キナーゼ のシグナル伝達機能は、主要な2種類の血小板接着受容体であるGPIb及びインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の下流に作用して、流動学的な障害の条件下で細胞質ゾルカルシウムフラックスと血小板の活性化を促進する。これらの受容体の機械感覚機能に起因して、PI3-キナーゼ を阻害すると、止血に必要とされる血小板の正常な機能的反応を妨害することなく、閉塞性の血栓の形成が排除される。

【0088】

本発明化合物の潜在的な抗血栓能力を調べるために、2種類の異なった血栓症モデルを用いた：ラット及びウサギにおける修正Foltsモデル(Folts et al., 1991, Circulation, 10 IV-3-IV-14)及びラットにおける電解質傷害頸動脈モデル(Bush et al., 1990, Faseb J. , 4 : 3087)。2mg/kgの本発明化合物(例えば、TGX-221)を実験動物に注入することにより、両方のモデルにおいて、閉塞性血栓の形成は完全に防止されたが(図(5A)及び図(5B))、傷害期間の終了後の60分間にわたり、頸動脈の血流容積は維持された(図(5B)挿入図)。さらに、TGX-221は、Foltsモデルの試験と電解質モデルの試験の両方において、傷害を受けた頸動脈内の基準動脈圧、基準心拍数又は基準血流に対して影響を与えなかった(データは示していない)。重要なのは、TGX-221による処理が、尾部若しくは耳の出血時間で評価した場合に、これらの動物における正常な止血に対して悪影響を与えなかったということ、又は、ヘパリン、アスピリン若しくはクロピドグレルのような別の抗凝血薬と組み合わせ投与したときに、そのような別の抗凝血薬により引き起こされる出血を長引かせなかったということである(図(5C))。 20

【0089】

本明細書において概説した本発明により、剪断により惹起される血小板の活性化及び閉塞性血栓の形成に関連した、血小板内にあるPI3-キナーゼ に関する主要な機械感覚機能が明らかにされる。PI3-キナーゼ 阻害薬であるTGX-221が、止血に関連する血小板の正常な機能的応答を妨害することなく、閉塞性血栓の形成を阻害するということが実証されたことにより、この新規脂質キナーゼ阻害薬が抗血栓療法のための重要な新しい薬物であるということは明白である。

【0090】

疾患状態を予防又は治療するための本発明の方法において、有利には、有効量の1種の本発明化合物を1回用量の形態で投与する。好ましい実施形態において、該1回用量は、好ましくは、錠剤(例えば、経口投与、舌下投与、及び、口腔内投与用に製剤された錠剤)、カプセル剤(例えば、粉末製剤、液体製剤、又は、制御放出製剤を含んでいるカプセル剤)、静脈内投与用製剤、鼻腔内投与用製剤、筋肉注射用の製剤、シロップ剤、坐剤、エーロゾル剤、バツカル剤、経皮投与用製剤又は腔坐剤の形態である。好ましくは、該1回用量は、約5~約500mgの該化合物を含んでおり、さらに好ましくは、約25~約300mgの該化合物を含んでいる。 30

【0091】

本発明の別の態様は、1種以上の製薬上許容される担体及び/又は希釈剤と一緒に本発明のピリジン置換化合物を含有する医薬組成物に関する。以下において、用語「活性成分」は、本発明のいずれかのピリジン置換化合物又はその製薬上許容される塩、溶媒和物若しくは機能的な誘導体であり得る。 40

【0092】

本発明の医薬組成物の投与は、任意の都合のよい方法で行う。用量は、例えば、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内若しくは坐剤の経路によるか、又は、植込み(例えば、徐放性分子の使用)により、毎日、週1回、月1回、又は、別の適切な時間間隔で投与する。該活性化化合物を錠剤の形態で投与する場合、該錠剤は、結合剤、例えば、トラガカントゴム、トウモロコシデンプン又はゼラチンなど；崩壊剤、例えば、アルギン酸など；及び、滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなどを含有する。

【0093】

注射可能な用途に適する医薬組成物には、無菌の水溶液若しくは水分散液、及び、無菌 50

の注射可能な溶液若しくは分散液を必要に応じて調製するための無菌の粉末などがあり、又は、クリーム形態若しくは局所適用に適する別の形態である。該担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、及び、植物油などを含んでいる、分散媒又は溶媒であることができる。例えば、レシチンのようなコーティングを用いることにより、及び、分散剤の場合には所要の粒径を維持することにより、及び、界面活性剤を使用することにより、適切な流動性を維持させる。微生物による汚染は、さまざまな抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸及びチメロサルなどにより防止することができる。等張化剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムなどを含有させるのが好ましい場合がある。吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどを組成物中で使用することにより、注射可能な組成物の吸収時間を長くすることが可能である。

10

【0094】

無菌の注射可能な溶液は、上記で挙げたさまざまな別の成分を含んでいる適切な溶媒に所要量の該活性化化合物を組み入れた後、濾過滅菌に付すことにより調製する。一般に、分散液は、基本的な分散媒と1種以上の上記成分を含んでいる無菌のビヒクルに滅菌した種々の活性化化合物を組み入れることにより調製する。無菌の注射可能な溶液を調製するための無菌の粉末の場合、好ましい調製方法は、活性化化合物と任意の追加的な所望の成分の予め滅菌濾過してある溶液からそれらの粉末を生じる真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0095】

20

該医薬組成物は、例えば不活性希釈剤若しくは同化可能な食用の担体と一緒に経口投与するか、又は、硬質ゼラチンカプセル若しくは軟質ゼラチンカプセルの中に封入するか、又は、圧縮して錠剤とするか、又は、直接食物と混合する。経口投与の場合、該活性化化合物は賦形剤と混合し、摂取可能な錠剤、バッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤及びカシェ剤などの形態で使用される。そのような組成物及び調製物は、少なくとも1重量%の活性化化合物を含有する。該組成物及び調製物の百分率は変えることが可能であり、構成単位の重量の約5~約80%であり得る。そのような治療上有用な組成物中の活性化化合物の量は、適切な投与量が得られるような量である。

【0096】

さらにまた、錠剤、トローチ剤、丸剤及びカプセル剤などは、結合剤、例えば、ゴム、アラビアゴム、トウモロコシデンプン又はゼラチンなど；賦形剤、例えば、リン酸二カルシウムなど；崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン及びアルギン酸など；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなど；及び、甘味剤、例えば、ショ糖(乳糖又はサッカリンを加えてもよい)、又は、矯味矯臭剤、例えば、ペパーミント、ウインターグリーン油若しくはサクランボの香味料なども含有し得る。投与単位形態がカプセルである場合、それは、上記タイプの物質に加えて、液体担体を含有し得る。コーティングとして、又は、投与単位の物理的形態を修飾するために、さまざまな別の物質を存在させてもよい。例えば、錠剤、丸剤又はカプセル剤は、セラック、糖、又はその両方によりコーティングし得る。シロップ剤又はエリキシル剤は、該活性化化合物、甘味剤としてのショ糖、保存剤としてのメチルパラベン及びプロピルパラベン、色素、並びに、矯味矯臭剤(例えば、サクランボ風味又はオレンジ風味など)を含有し得る。もちろん、任意の投与単位形態の調製において使用するどの物質も、製薬的に純粋であり且つ使用する量では実質的に無毒であるべきである。さらに、該活性化化合物は、徐放性の調製物及び製剤中に組み入れてもよい。

30

40

【実施例】**【0097】**

以下の実施例を参照することにより、本発明についてさらに記述する。該実施例は、例証のみを目的として記載されている。これらの実施例に含まれているどのような記載も、本発明の総体的な範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

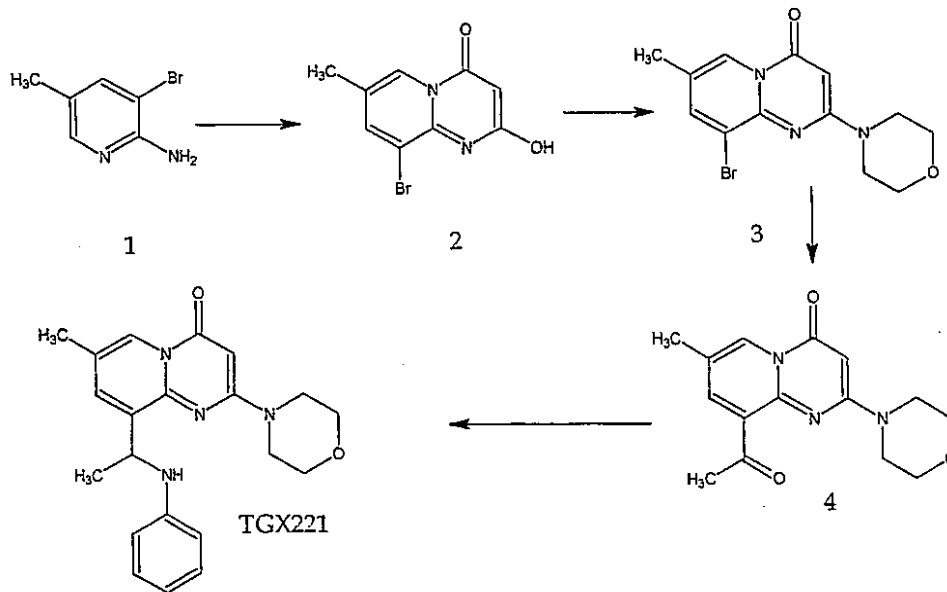
【0098】

50

合成実施例

実施例 1 : (±)-7-メチル-2-モルホリン-4-イル-9-(1-フェニルアミノエチル)-ピリド[1,2-a]-ピリミジン-4-オン (TGX-221 : $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3$, $R_3=H$) の合成

【化 1 6】



10

20

【 0 0 9 9 】

化合物 2 : 2-アミノ-3-ブロモ-5-メチルピリジン(1) (45g, 0.24mol) をジクロロメタン(500mL) に溶解させた溶液に、氷冷温度で、マロニルジクロリド(25mL, 0.25mol) を添加した。この混合物を、次いで、周囲温度で48時間撹拌した。沈澱した薄黄色の固体を濾過により集め、ジクロロメタン(3×100mL) で洗浄し、減圧下に乾燥させて、生成物 2 (52.5g) を得た。濾液を減圧下に濃縮した。得られた残渣をH₂Oに懸濁させ、1時間撹拌した。得られた溶液を濾過し、濾液を固体のNaHCO₃で中和して、未反応の2-アミノ-3-ブロモ-5-メチルピリジン(6g) を得た。未精製の化合物 2 をそれ以上精製することなく、次の合成ステップに付した。

30

【 0 1 0 0 】

¹H-NMR(300MHz, DMSO-d₆) 8.72(s, 1H), 8.28(s, 1H), 5.50(s, 1H), 2.33(s, 3H)。

【 0 1 0 1 】

化合物 3 : ジクロロメタン(300mL) 中の化合物 2 (12.75g, 0.05mol) の懸濁液に、トリエチルアミン(14mL, 0.1mol) を添加した後、氷冷温度で、メタンスルホニルクロリド(5.42mL, 0.07mol) を添加した。得られた反応混合物を、次いで、室温で0.5時間撹拌した。モルホリン(13mL, 0.15mol) を添加した後、反応混合物を還流温度で24時間撹拌した。この混合物を減圧下に濃縮し、H₂O(300mL) で希釈することにより、淡黄色の沈澱物が生じた。この固体を濾過し、減圧下に乾燥させ、ケトン 3 (6.8g, HPLCによる純度 >80%) であることを確認した。この生成物 3 をそれ以上精製することなく次の反応に付した。

40

【 0 1 0 2 】

¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) 8.69(s, 1H), 7.84(s, 1H), 5.58(s, 1H), 3.80(m, 4H), 3.70(m, 4H), 2.32(s, 3H)。

【 0 1 0 3 】

化合物 4 : 臭化物 3 (35mmol) をDMF(70mL) に溶解させた溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(18mL)、ブチルビニルエーテル(13mL) 及びジクロロ1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセンパラジウム(II)(1.09g, 1.5mmol) を添加した。得られた懸濁液(これは、20分後に均質になった)を、次いで、120 °C で16時間撹拌した。反応混合物を冷却し、氷冷した1MのHCl溶液(200mL) 中に注ぎ入れ、1時間撹拌した。得られた溶液をジクロロメタンで抽出し、有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄で脱水した(* 溶液がエマルションになるの

50

で、水性NaClでの洗浄は避けた)。減圧下に濃縮した後、暗色の残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 3:1 酢酸エチル, 石油エーテル)により精製して、淡黄色の固体を得た。

【0104】

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 8.86(s, 1H), 7.84(s, 1H), 5.63(s, 1H), 3.79(m, 4H), 3.62(m, 4H), 2.77(s, 3H), 2.36(s, 3H)。

【0105】

TGX 221: トルエン(10mL)中のケトン 4 (1mmol)の懸濁液に、アニリン(3mmol)を添加し、4時間還流した。この反応混合物を徐々に冷却し、氷冷温度で、ホウ水素化ナトリウム(1mmol)を添加した。次いで、この反応混合物を室温でさらに1時間攪拌した。得られた溶液をジクロロメタン(30mL)で希釈し、有機層を水で洗浄し、ブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水した。減圧下に濃縮した後、残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 3:1 酢酸エチル, 石油エーテル)により精製して、淡黄色の固体を得た(収率 >60%)。

【0106】

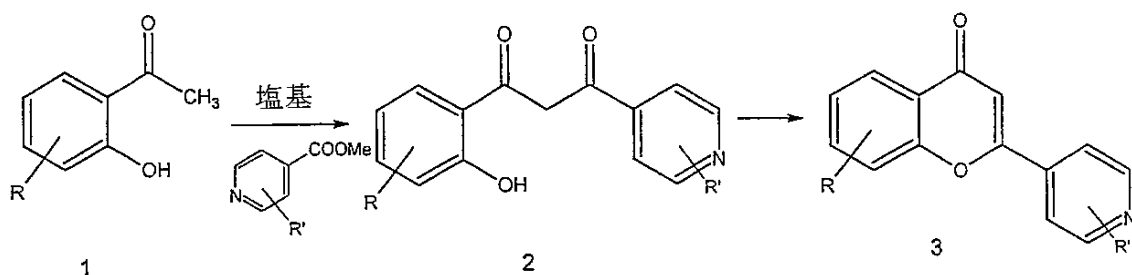
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 8.65(s, 1H), 7.58(s, 1H), (7.11 br t, 2H), 6.68(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.46(br t, 2H), 5.66(s, 1H), 5.12(m, 1H), 4.24(br s, -NH, 1H), 3.80(m, 4H), 3.68(m, 4H), 2.26(s, 3H), 1.57(d, $J=6.7$ Hz, 3H)。

【0107】

実施例2: ピリジン置換ベンゾピラノン誘導体の調製

Cushman and Nagarathnam, 1990, Tetrahedron Letters 31:6497 を適合させた以下の一般手順により、8-(置換)-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した。簡潔に述べれば、さまざまな前駆物質の2-ヒドロキシアセトフェノン誘導体(1)をイソニコチン酸のメチルエステル及び誘導体で処理した後、脱水環化に付して、ピリジン置換生成物(3)を生成させた。次いで、さまざまなカップリング反応により、 R_1 に特定の置換基を導入した。

【化17】



【0108】

アセトフェノン(R)上の置換には、プロモ置換基、ヒドロキシ置換基、アセトアミド置換基、メトキシメチル置換基、メチル置換基、エチル置換基、メトキシ置換基、トリフルオロメタンスルホニルオキシ置換基及びアセチル置換基などがあるが、これらに限定されない。イソニコチン酸エステル(R')上の置換には、クロロ置換基、メチル置換基及びアミノ置換基などがあるが、これらに限定されない。上記縮合反応のための試薬には、テトラヒドロフラン又はN,N-ジメチルホルムアミドのような溶媒中のナトリウムメトキシド、カリウムブトキシド、1,8-ジアザビシクロ[2.2.2]ウンデカン、水素化ナトリウム又はリチウムビス(トリメチルシリル)アミドの使用などがある。脱水環化は、エタノール中の硫酸、メタノール中の塩酸、DMF中の1,8-ジアザビシクロ[2.2.2]ウンデセン、又は、ジクロロメタン中のトリフルオロメタンスルホン酸無水物のような試薬の混合物を用いて行うことができる。

【0109】

生成物(3)のさらなる反応としては、R(ここで、Rは、ハライド又はトリフルオロメタンスルホニルオキシである)におけるパラジウム触媒クロスカップリング反応による生成物(ここで、Rは、アリール、アリールアミノ、アルキルアミノ又はアセチルである)の生成な

どを挙げることができる。Rがアセチル官能基である場合、さらなる反応としては、還元又は還元的アミノ化による生成物(ここで、Rは、ヒドロキシエチル又はアミノエチルである)の生成などを挙げることができる。Rがメトキシアルキル官能基又はヒドロキシアルキル官能基である場合、さらなる反応により、生成物(ここで、Rはプロモアルキルである)を生成させることができる。Rがプロモアルキルである場合、さらなる反応により、生成物(ここで、Rは、アリールアミノアルキル又はアリールオキシアルキルである)を生成させることができる。Rがヒドロキシである場合、さらなる反応により、生成物(ここで、Rは、アリールオキシ又はアルキルオキシである)を生成させることができる。Rがアミノである場合、さらなる反応により、生成物(ここで、Rは、アリールアミノ又はアルキルアミノである)を生成させることができる。

10

【0110】

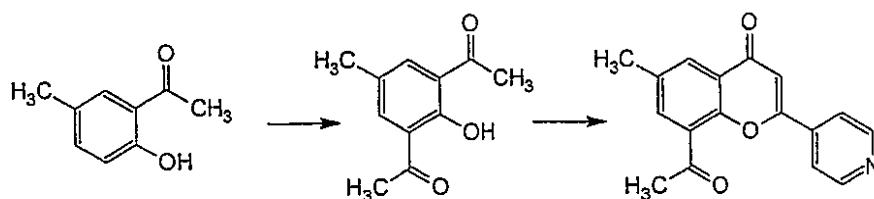
以下の実施例により本発明をさらに説明する。

【0111】

中間体の調製

実施例 2 a : 6-メチル-8-アセチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

【化18】



20

【0112】

3'-アセチル-2'-ヒドロキシ-5'-メチルアセトフェノン

ジクロロメタン(100mL)中の2-ヒドロキシ-5-メチルアセトフェノン(15g, 0.1mol)の混合物を、トリエチルアミン(13.9mL)、ジメチルアミノピリジン(1.22g)及び無水酢酸(9.5mL)で処理し、室温で一晩撹拌した。次いで、この混合物を水(300mL)に注ぎ入れ、ジクロロメタン(3×60mL)で抽出した。抽出物を合して飽和水性NaHCO₃で洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、溶媒を除去して、無色の油状物(19.5g)を得た。

30

【0113】

この生成物を0 のジクロロメタン(200mL)に溶解させ、塩化アルミニウム(19.5g)で処理し、室温で5日間撹拌した。この溶液を氷(50g)及び2N 塩酸(50mL)で処理し、室温で1時間撹拌した。ジクロロメタン層を分離し、水層をジクロロメタン(2×60mL)で抽出した。抽出物を合して飽和水性NaClで洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、溶媒を除去して、粗物質を得た。この生成物をカラムクロマトグラフィー(ガソリン中の0-25%酢酸エチル)により精製して、黄色/緑色の固体(11.4g)を得た。

【0114】

8-アセチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

3'-アセチル-2'-ヒドロキシ-5'-メチルアセトフェノン(3.0g, 15.6mmol)を無水THF(100 mL)に溶解させた溶液に、窒素雰囲気下、-78 で、リチウムビス(トリメチルシリル)アミド(THF中1.0M, 50mL, 50mmol)を添加し、得られた混合物を0 で1時間撹拌した。この混合物を-78 まで冷却し、イソニコチン酸メチル(2.14mL, 15.6mmol)を添加した。反応混合物を室温まで昇温させ、撹拌を一晩続けた。混合物を1N 塩酸溶液(200mL)中に注ぎ入れ、減圧下にTHFを除去した。この混合物を1N 水性水酸化ナトリウムで中和し、次いで、濾過した。フィルターケーキを高真空下で一晩乾燥させた。

40

【0115】

得られた固体(3.0g)を酢酸(40mL)で処理した後、濃硫酸(2mL)で処理し、80 で3時間加熱した。混合物が冷えた時点で、その混合物を水(100mL)で希釈し、1N 水性水酸化ナトリウムで中和した。沈澱物を濾過し、水で洗浄し、高真空下に乾燥させた。得られた粗生成

50

物をカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル中の0-20%の勾配のメタノールで溶離)により精製して、黄褐色の固体を得た。

【0116】

ES-MS : 280.36(M+H)。

【0117】

同様の方法により：

2,3-ジヒドロキシアセトフェノンから、8-ヒドロキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 240.2(M+H)；

3-ブromo-5-メチル-2-ヒドロキシアセトフェノンから、8-ブromo-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 316.2, 318.2(M+H)；

2,4-ジヒドロキシアセトフェノンから、7-ヒドロキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 240.15(M+H)；

3-アセチルアミノ-2-ヒドロキシアセトフェノンから、8-アセチルアミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 281.2(M+H)；

3-アセチルアミノ-2-ヒドロキシアセトフェノンから、8-アミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 239.2(M+H)；

8-アセチル-6-メチル-2-(2-クロロ-6-メチル-4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 328.12, 330.12(M+H)；

8-アセチル-6-メチル-2-(2-アミノ-4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 295.5(M+H)；

6-メチル-8-アセチル-2-(3-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 280.3(M+H)；

及び、

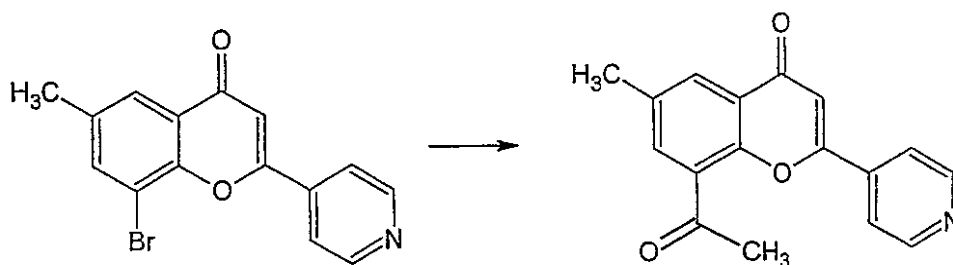
6-メトキシ-8-メトキシメチル-2-(3-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オンを調製した； ES-MS : 316.2(M+H)。

【0118】

実施例 2 b : ブromo-クロモンのヘックカップリング

8-アセチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(別法)

【化19】



【0119】

6-メチル-8-(アセチル)-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

DMF(5mL)中の、8-ブromo-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(0.12 g, 0.36mmol)、n-ブチルビニルエーテル(0.047mL, 0.36mmol)及びトリエチルアミン(0.050mL, 0.36mmol)の混合物をN₂でパージした後、PdCl₂(dppf)(27mg, 0.036mmol)で処理した。この混合物を一晩90℃に加熱した。この混合物を室温まで冷却し、1N 水性HCl(30mL)で処理し、一晩撹拌を続けた。混合物を、次いで、水(50mL)で希釈し、凍結乾燥した。残渣を、C8-HPLCカラムを通して溶離させ、生成物をオフホワイトの固体(2.5mg)として単離した。生成物は、上記で記載したものと同一であった。

【0120】

実施例 2 c : アセチルクロモンの還元：8-(1-ヒドロキシエチル)-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

メタノール(100mL)中の8-アセチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-

オン(4.6g, 16.5mmol)の混合物を、ホウ水素化ナトリウム(1.22g, 33mmol)で処理し、一晩加熱還流した。混合物が冷えた時点で、水(2mL)を添加し、得られた溶液を減圧下にほぼ乾固に近い状態まで濃縮した。水(100mL)を添加した。沈澱物が形成されたが、それを濾過して、黄褐色/橙色の固体(4.0g)を得た。

【0121】

実施例 2 d : アルコールの臭素化 : 8-(1-プロモエチル)-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

氷酢酸(45mL)中の8-(1-ヒドロキシエチル)-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(4.0g)の混合物を48%水性臭化水素酸(34mL)で処理し、80 で一晩加熱した。混合物が冷えた時点で、その混合物を氷水中に注ぎ入れ、50%水酸化ナトリウムで中和し、ジクロロメタン(3×40mL)で抽出した。抽出物を合して脱水し、溶媒を除去した。残渣を、酢酸エチル中の0-10%メタノールで溶離させるシリカカラムのクロマトグラフィーに付して、黄褐色の固体(1.1g)を得た。

10

【0122】

ESI-MS : 344.1, 346.1(M+H) (別法として、この生成物は、アルコールをジクロロメタン中のPBr₃で処理することにより得ることができる)。

【0123】

実施例 2 e : アルコールのメシル化 : 8-(1-メタンスルホニルオキシエチル)-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

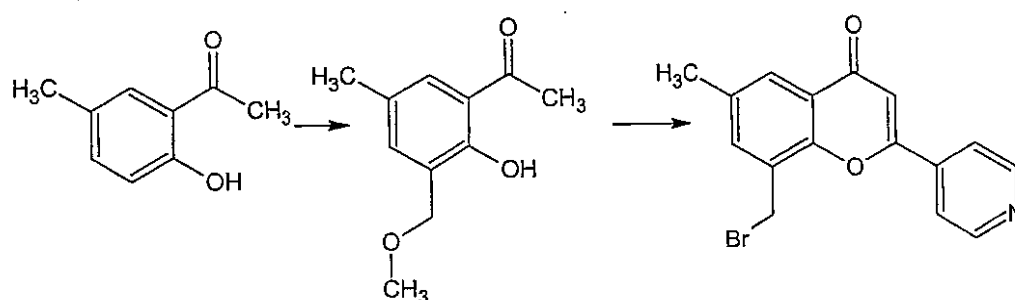
ジクロロメタン(100mL)中の8-(1-ヒドロキシエチル)-2-(4-ピリジニル)-6-メチル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(2.4g)の混合物を氷浴内に置き、それを、トリエチルアミン(1.3mL)で処理した後、メタンスルホニルクロリド(0.67mL)で処理し、0 で30分間撹拌した。次いで、得られた溶液を0.1N HCl(水性)(2×30mL)で洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、溶媒を除去して、油性の褐色の固体を得た。これは、それ以上精製しなかった。

20

【0124】

実施例 2 f : 6-メチル-8-プロモメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オンの合成 : 6-メチル-8-プロモメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン

【化20】



30

【0125】

2'-ヒドロキシ-5'-メチル-3'-メトキシメチルアセトフェノン

2'-ヒドロキシ-5'-メチルアセトフェノン(1.0g, 6.7mmol)の混合物をパラホルムアルデヒド(0.18g)及び濃塩酸(5mL)で処理し、得られた混合物を60 で一晩加熱した。混合物が冷えた時点で、その混合物をトルエン(3×30mL)で抽出し、抽出物を合して脱水し(Na₂SO₄)、溶媒を除去して、黄色の油状物を得た。その油状物をメタノール(30mL)で処理し、1時間加熱還流した。得られた溶液が冷えた時点で、その溶液をほぼ乾固に近い状態まで蒸発させ、残渣を、石油エーテル中の0-10%酢酸エチルで溶離させるシリカカラムのクロマトグラフィーに付した。精製された生成物を白色の粉末(0.76g)として得た。

40

【0126】

8-プロモメチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン

アセトフェノン(0.76g, 3.9mmol)をTHF(30mL)に溶解させた溶液に、-78 で、リチウムビス(トリメチルシリル)アミド(THF中1.0M, 11.8mL, 11.8mmol)を添加した。得られた混

50

合物を0 で1時間攪拌し、-78 に冷却し、イソニコチン酸メチル(0.53mL, 3.9mmol)を添加した。この反応混合物を室温まで昇温させ、一晩攪拌を続けた。混合物を1N 塩酸溶液(200mL)中に注ぎ入れ、減圧下にTHFを除去した。混合物を1N 水性水酸化ナトリウムで中和した後、濾過した。フィルターケーキを高真空下で一晩乾燥させた。

【0127】

残渣を酢酸(6mL)で処理した後、臭化水素酸(水中48%, 6mL)で処理し、得られた混合物を80 で一晩加熱した。混合物が冷えた時点で、2N 水酸化ナトリウム溶液を用いて、その混合物をpH5とした。生じた沈澱物を濾過し、減圧下に乾燥させた。残渣を、酢酸エチル中の0-5%メタノールで溶離させるシリカカラムのクロマトグラフィーに付した。生成物を、オフホワイトの固体(310mg)として単離した。

10

【0128】

LC-MS : 332, 334(M+H)。

【0129】

実施例 2 g : 8-トリフルオロメタンスルホニルオキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン

アセトニトリル(2mL)中の8-ヒドロキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(10mg)の混合物に、ジイソプロピルエチルアミン(20uL)を添加した後、N-フェニルトリフリミド(20mg)を添加した。得られた混合物を室温で2時間攪拌し、シリカゲルに吸着させ、溶離液として酢酸エチルを使用してシリカカラムを通して溶離させて、標題化合物を黄褐色の固体(10mg)として得た。

20

【0130】

ESI-MS : 372.1(M+H)。

【0131】

実施例 2 h : ケトンの還元的アミノ化 : 8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(TGX-286)

メタノール(30mL)中の8-アセチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(0.28g)の懸濁液に、氷酢酸(2.5mL)、アニリン(2.5mL)及びシアノホウ水素化ナトリウム(62mg)を添加し、得られた混合物を70 で一晩加熱した。混合物が冷えた時点で、その混合物をシリカゲルに吸着させ、酢酸エチル中の0-10%の勾配のメタノールで溶離させるカラムクロマトグラフィーにより精製して、黄褐色の固体(200mg)を得た。

30

【0132】

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) : 1.65(d, 3H, J=1.2Hz), 2.39(s, 3H), 5.186(m, 1H), 6.51(d, 2H, J=7.8Hz), 6.69(t, 1H, J=7.5Hz), 6.94(s, 1H), 7.11(t, J=8.1Hz), 7.65(d, 1H, J=1.8Hz), 7.73(d, 2H, J=6Hz), 7.90(s, 1H), 8.80(d, 2H, J=6Hz)。

【0133】

ES-MS : 357.3(M+H), 264.3。

【0134】

同様の方法により :

8-1-(4-フルオロ-2-メチルフェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(KN-303) ; ES-MS : 389.3(M+H) ;

40

8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(3-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(KN-305) ; ES-MS 357.3(M+H) ;

8-1-(6-メチルピリジン-2-イルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(KN-310) ; ES-MS : 372.3(M+H) ;

8-1-(3-トリフルオロメチルフェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(KN-322) ; ES-MS : 425.0(M+H) ;

及び、

8-1-(フェニルアミノ)エチル-6-メチル-2-(2-クロロ-6-メチル-4-ピリジニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン(KN-340) ; ES-MS : 405.44, 407.42(M+H) ;

も調製した。

50

【 0 1 3 5 】

実施例 2 i : プロモアルキル置換クロモンとフェノール又はアニリンの反応：6-メチル-8-フェニルアミノメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-312)

アセトニトリル(5mL)中の8-プロモメチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(48mg, 0.15mmol)の混合物をアニリン(48uL, 0.52mmol)で処理し、得られた混合物を70 で4時間加熱した。混合物が冷えた時点で、その混合物を固体の炭酸カリウム(60mg)で処理し、シリカゲル(1.0g)に吸着させ、溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムに適用し、酢酸エチル中の0-5%メタノールを用いて生成物を溶離させた。生成物を黄色の粉末(25mg)として単離した。

【 0 1 3 6 】

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): 2.41(s, 3H), 4.19(s, 1H), 4.71(s, 2H), 6.68(d, 2H, J=8.4Hz), 6.77(t, 1H, J=7.2Hz), 6.9(s, 1H), 7.21(t, 2H, 7.5Hz), 7.59(s, 1H), 7.67(d, 2H, 4.8Hz), 7.91(s, 1H), 8.74(s, 2H)。

【 0 1 3 7 】

LC-MS: 343.08(M+H), 249.98。

【 0 1 3 8 】

同様の方法により:

6-メチル-8-フェノキシメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-313); E S-MS 344.1;

6-メチル-8-(2-ピリジニル)アミノメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-315); ES-MS: 344.1;

6-メチル-8-1-(フェノキシ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-317); ES-MS 358.1;

6-メチル-8-(2-カルボキシ)フェニルアミノメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-323); ES-MS 387.04(M+H);

6-メチル-8-(2-アセトアミド)フェニルアミノメチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-326); ES-MS: 413.9(M+H);

及び、

6-メチル-8-[1-(2-カルボキシ)フェニルアミノ]エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-334); ES-MS: 401.4;

を調製した。

【 0 1 3 9 】

実施例 2 j : 8-(1-(2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN327)

アセトニトリル(50mL)中の8-(1-メタンスルホニルオキシ)エチル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(2.4g)の混合物を炭酸カリウム(2.4g)及びモノ-Bocフェニレンジアミン(2.7g)で処理し、得られた混合物を70 で一晩加熱した。混合物が冷めた時点で、その混合物をジクロロメタンで処理し、シリカゲルに吸着させた。溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムに適用し、酢酸エチル中の0-5%メタノールを用いて生成物を溶離させた。生成物を黄色の油状物(0.9g)として単離した。

【 0 1 4 0 】

ES-MS: 472.3(M+H)。

【 0 1 4 1 】

ジクロロメタン(12mL)中の8-(1-(Boc-2-アミノフェニルアミノ)エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(0.9g)をトリフルオロ酢酸(8mL)で処理し、得られた混合物を室温で1時間攪拌した。その混合物をジクロロメタン(30mL)で希釈し、水(30mL)で抽出した後、1N 水性塩酸(30mL)で抽出した。水性抽出物を合し、水酸化ナトリウム水溶液で中和し、ジクロロメタン(3×50mL)で抽出した。次いで、有機抽出物を合して、0.3N 水性塩酸(2×50mL)で再抽出した。次いで、水性抽出物を合して凍結乾燥により乾固させて、赤褐色の固体(0.61g)を得た。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

ES-MS : 372.3。

【 0 1 4 3 】

同様の方法により :

6-メチル-8-1-(2-トリフルオロメチル-ベンゾイミダゾール-1-イル)-エチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-328) ; ES-MS : 450(M+H) ;
を調製した。

【 0 1 4 4 】

実施例 2 k : 8-ベンジルオキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-335)

アセトニトリル中の8-ヒドロキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(52mg)及び無水炭酸カリウム(117mg)の混合物を臭化ベンジルで処理し、一晩加熱還流した。混合物が冷えた時点で、その混合物をジクロロメタンで処理し、シリカゲルに吸着させ、シリカクロマトグラフィーカラムに適用した。酢酸エチル中の0-4%メタノールで生成物を溶離させた。所望の生成物を褐色の固体(17mg)として単離した。

10

【 0 1 4 5 】

ES-MS : 330.2(M+H)。

【 0 1 4 6 】

同様の方法により :

7-ベンジルオキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-342) ; ES-MS : 330.5 (M+H) ;
を調製した。

20

【 0 1 4 7 】

実施例 2 l : 8-ベンジルアミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-336)

メタノール(5mL)中の8-アミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(16mg)、ベンズアルデヒド(40 μ L)及び酢酸(20 μ L)の混合物をシアノホウ水素化ナトリウム(5mg)で処理し、70 で一晩加熱した。得られた溶液が冷えた時点で、その溶液をシリカゲルに吸着させ、酢酸エチル中の0-5%の勾配のメタノールを使用してシリカに通すクロマトグラフィーに付した。所望の生成物を黄色の固体として単離した。

【 0 1 4 8 】

ES-MS : 329.3(M+H)。

30

【 0 1 4 9 】

実施例 2 m : 8-フェニルアミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-341)

ジクロロメタン(5mL)中の8-アミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(20mg)、フェニルボロン酸(30mg, 0.25mmol)及びトリエチルアミン(70 μ L, 0.5mmol)の混合物を酢酸第二銅(45mg, 0.25mmol)で処理し、得られた混合物を室温で一晩攪拌した。次いで、この混合物をシリカに吸着させ、シリカカラムに適用し、酢酸エチル中の0-5%メタノールで溶離させた。所望の化合物を黄色の固体(4mg)として得た。

【 0 1 5 0 】

ES-MS : 315.5(M+H)。

【 0 1 5 1 】

同様の方法により :

8-(3-フルオロフェニルアミノ)-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(KN-351) ;
ES-MS : 333.3(M+H) ;
を調製した。

40

【 0 1 5 2 】

実施例 2 n : 8-フェニル-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(TGX-258)

ジオキサン(6mL)中の8-ブロモ-6-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-オン(0.1g, 0.32mmol)、リン酸カリウム(0.2g, 0.95mmol)、フェニルボロン酸(0.042g, 0.35mmol)及びPdCl₂(dppf)(7.8mg, 0.009mmol)の窒素でパージした混合物を一晩加熱還流した。

50

混合物が冷えた時点で、その混合物を濾過し、濾液を濃縮乾固させた。残渣を、溶離剤として0.1%水性TFA中の0-60%アセトニトリルを使用してC8 HPLCカラムに通すクロマトグラフィーに付した。精製されたフラクションを合して、黄色の粉末(53.4mg)を得た。

【0153】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : 2.53(s, 3H), 7.03(s, 1H), 7.55(m, 6H), 7.80(d, J=5.7Hz, 2H), 8.04(s, 1H), 8.80(d, J=5.7Hz, 2H)。

【0154】

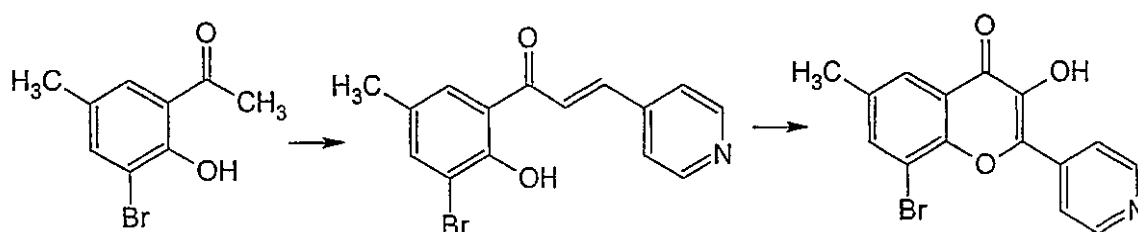
ES-MS : 314.3(M+H)。

【0155】

実施例 2 o : 6-メチル-8-ブロモ-3-ヒドロキシ-2-(4-ピリジニル)-4H-ベンゾピラン-1-
オンの合成

10

【化21】



20

【0156】

エタノール(10mL)中の3'-プロモ-2'-ヒドロキシ-5'-メチルアセトフェノン(1.15g)及びピリジン-4-カルボキシアリデヒド(0.54g)の混合物に、50%水酸化ナトリウム溶液を滴下して加えた。得られた混合物を室温で4時間攪拌した。この混合物を氷令した氷酢酸で処理してpHを5.5とすることにより沈澱物が生じた。その沈澱物を濾過して、カルコン中間体を黄色の固体(0.85g)として得た。

【0157】

得られたカルコン(0.132g)を0 のメタノール(2.3mL)に入れ、それを、2N 水酸化ナトリウム(2.1mL)で処理した後、30%(v/v)過酸化水素溶液(189 μ L)で処理した。得られた混合物を4 で一晩攪拌した。その混合物を2N 硫酸を用いて中和することにより、沈澱物が形成された。その沈澱物を濾過して、黄褐色の固体を得た。

30

【0158】

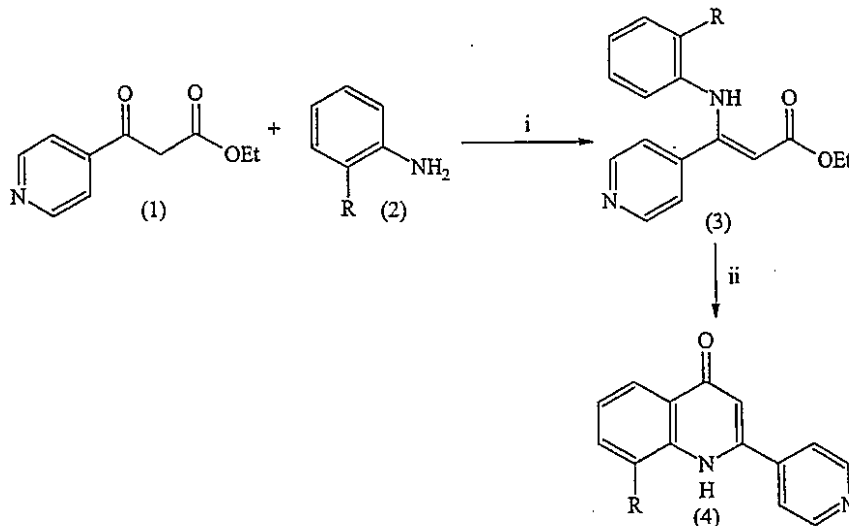
ES-MS : 332.0, 334.0(M+H)。

【0159】

実施例 3 : ピリジン置換キノロン誘導体の調製

以下に示す一般的な方法により、本発明のピリジン置換キノロン化合物を調製した。

【化22】



10

【0160】

試薬：i. p-トルエンスルホン酸，トルエン，還流； ii. Ph_2O ，加熱

【0161】

i. エステル中間体(化合物3)の合成

20

トルエン(30mL)中の -オキシ-4-ピリジンプロパン酸エチル(化合物1, 4.35mmol) [Les her et al., 1984, *J. Heterocycl. Chem.* 21(6): 1849]、アニリン(化合物2, 3.35mmol)及びp-トルエンスルホン酸(0.54mmol)を還流温度で18時間加熱し、共沸により水を除去した。減圧下に溶媒を蒸発させて、黄色の未精製油状物を得た。この油状物を、溶離剤として石油エーテル/酢酸エチル(1:1)を使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製した後、エステル中間体(化合物3, 70~80%)を得た。

【0162】

ii. キノロン(化合物4)の合成

エステル中間体(化合物3)(2.58mmol)をジフェニルエーテル(3mL)で20分間還流し、室温まで冷却し、石油エーテルで処理して、クリーム色の固体を得た。その沈澱物を濾過し、石油エーテルで数回洗浄し、溶離剤として酢酸エチル/メタノール(9:1)を使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、所要のキノロン化合物4(60~70%)を得た。

30

【0163】

8-フェノキシ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-319)

エステル中間体(化合物3, ここで、RはOPhである)をその場で環化し、トルエン中で還流して(ステップi)、キノロン(化合物4)を得た： $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 6.64(d, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 7.06(dd, $J=8.0, 1.1\text{Hz}$, 1H), 7.15(dd, $J=7.7, 0.7\text{Hz}$, 2H), 7.20-7.31(m, 2H), 7.44(td, $J=7.7, 0.7\text{Hz}$, 2H), 7.57(dd, $J=5.0, 1.4\text{Hz}$, 2H), 8.06(dd, $J=8.0, 1.1\text{Hz}$, 1H), 8.80(d, $J=5.0\text{Hz}$, 2H), 8.88(br.s, NH); MS-ES m/e 315(M+H)。

【0164】

8-プロモ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-343)

エステル中間体(化合物3, ここで、RはBrである): $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 1.33(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 4.25(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.17(s, 1H), 6.31(dd, $J=7.7, 1.6\text{Hz}$, 1H), 6.81(td, $J=7.7, 1.6\text{Hz}$, 1H), 6.89(td, $J=7.7, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.21(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 7.54(dd, $J=7.7, 1.6\text{Hz}$, 1H), 8.56(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 10.16(br.s, NH); MS-ES m/e 347(M+H)。

40

【0165】

キノロン(化合物4): $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 7.45(t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.49(s, 1H), 8.12(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 8.14(dd, $J=7.9, 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.19(dd, $J=7.9, 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.78(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 12.02(br.s, NH); MS-ES m/e 301(M+H)。

50

【 0 1 6 6 】

KN-343は、さまざまな別のピリジン置換キノロン類似体の合成における中間体である。

【 0 1 6 7 】

8-(4-フルオロ-2-メチルフェノキシ)-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-337)

エステル中間体(化合物3, ここで, Rは4-フルオロ-2-メチルフェノキシである): $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 1.29(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 2.26(s, 3H), 4.20(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.07(s, 1H), 6.41(dd, $J=7.7$, 1.9Hz, 1H), 6.56(dd, $J=7.7$, 1.9Hz, 1H), 6.69(td, $J=7.7$, 1.9Hz, 1H), 7.76(dd, $J=8.9$, 5.0Hz, 1H), 6.81-6.86(m, 2H), 6.97(dd, $J=8.9$, 3.1Hz, 1H), 7.27(dd, $J=4.5$, 1.5Hz, 2H), 8.57(dd, $J=4.5$, 1.5Hz, 2H), 10.25(s, NH); MS-ES m/e 393(M+H)。

10

【 0 1 6 8 】

キノロン(化合物4): $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 2.23(s, 3H), 6.67(d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 6.76(dd, $J=8.1$, 1.0Hz, 1H), 6.98(td, $J=8.2$, 2.8Hz, 1H), 7.03-7.07(m, 2H), 7.20(t, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.62(dd, $J=4.5$, 1.6Hz, 2H), 8.02(dd, $J=8.1$, 1.0Hz, 1H), 8.84(dd, $J=4.5$, 1.6Hz, 2H), 8.86(s, NH); MS-ES m/e 347(M+H)。

【 0 1 6 9 】

8-メトキシ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-344)

エステル中間体(化合物3, ここで, RはOMeである)をその場で環化し、トルエン中で還流して(ステップi)、キノロン(化合物4)を得た: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 3.99(s, 3H), 6.66(s, 1H), 7.25(dd, $J=7.9$, 1.3Hz, 1H), 7.32(t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.70(dd, $J=7.9$, 1.3Hz, 1H), 7.82(dd, $J=4.4$, 1.7Hz, 2H), 8.72(dd, $J=4.4$, 1.7Hz, 2H); MS-ES m/e 253(M+H)。

20

【 0 1 7 0 】

KN-344は、さまざまな別のピリジン置換キノロン類似体の合成における重要な中間体である。

【 0 1 7 1 】

8-フェニル-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-345)

エステル中間体(化合物3, ここで, Rはフェニルである)をその場で環化し、トルエン中で還流して(ステップi)、キノロン(化合物4)を得た: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 6.65(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.38(dd, $J=4.5$, 1.7Hz, 2H), 7.46(td, $J=8.1$, 1.6Hz, 1H), 7.52-7.56(m, 3H), 7.58-7.63(m, 2H), 8.42(dd, $J=8.1$, 1.6Hz, 2H), 8.75(dd, $J=4.5$, 1.7Hz, 2H); MS-ES m/e 299(M+H)。

30

【 0 1 7 2 】

8-ベンジル-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-346)

エステル中間体(化合物3, ここで, Rはベンジルである)をその場で環化し、トルエン中で還流して(ステップi)、キノロン(化合物4)を得た: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 4.34(s, 2H), 6.52(s, 1H), 7.27-7.33(m, 3H), 7.37-7.44(m, 4H), 7.63(d, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 8.35(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.67(br.s, 2H); MS-ES m/e 313(M+H)。

【 0 1 7 3 】

8-ニトロ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-352)

エステル中間体(化合物3, ここで, Rはニトロ基である)を、それ以上精製することなく、未精製のままでキノロン(化合物4)の合成に使用した: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) 6.77(d, $J=2\text{Hz}$, 1H), 7.51(t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.65(dd, $J=4.5$, 1.7Hz, 2H), 8.72(dd, $J=7.9$, 1.6Hz, 1H), 8.80(ddd, $J=7.9$, 1.6, 0.6Hz, 1H), 8.89(dd, $J=4.5$, 1.7Hz, 2H); MS-ES m/e 268(M+H)。

40

【 0 1 7 4 】

8-アミノ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-353)

エタノール中でPd/Cを用いて8-ニトロ-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-352)を水素化することにより、標題化合物を得た: MS-ES m/e 238(M+H)。

【 0 1 7 5 】

50

8-ナフチル-2-(4-ピリジニル)-4(1H)-キノリノン(KN-350)

エステル中間体(化合物3, ここで、Rはナフトキシである) : $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) :

1.23(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 4.13(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.01(d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 6.56(dd, $J=7.8$, 1.6Hz , 1H), 6.77-6.82(m, 3H), 6.88(td, $J=7.8$, 1.6Hz , 1H), 7.27(dd, $J=4.5$, 1.6Hz , 2H), 7.37(t, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.50-7.54(m, 2H), 7.62(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.85-7.89(m, 1H), 8.18-8.21(m, 1H), 8.57(dd, $J=4.5$, 1.6Hz , 2H), 10.24(s, NH) ; MS-ES m/e 410(M+H)。

【 0 1 7 6 】

キノロン(化合物4) : $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : 6.69(d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 6.97(dd, $J=7.6$, 1.2Hz , 1H), 7.16(dd, $J=7.6$, 1.2Hz , 1H), 7.21(t, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.48(t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.52-7.55(m, 2H), 7.59(td, $J=7.6$, 1.2Hz , 1H), 7.78(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.96(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.07(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.08(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 8.79(dd, $J=4.5$, 1.6Hz , 2H), 8.94(br.s, NH) ; MS-ES m/e 365(M+H)。

10

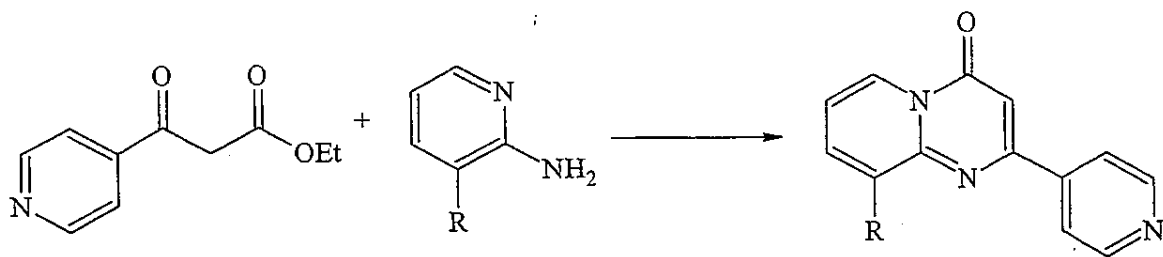
【 0 1 7 7 】

実施例4 : ピリジン置換ピリドピリミジノン誘導体の調製実施例4 a

一般的な実験手順 : アミン(3.00mmol)と -オキソ-4-ピリジンプロパン酸エチル(3.00mmol)の混合物を、180~200 で20~45分間加熱した。得られた粗物質を、次いで、カラムクロマトグラフィー(SiO_2 , EtOAc)により精製して、所要のピリミジンを得た。反応収率は、10~20%であった。

20

【化23】



【 0 1 7 8 】

30

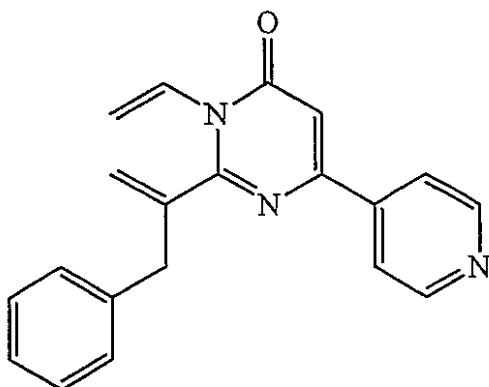
9-メチル-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(KN-347)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz) 2.75(s, 3H), 7.03(s, 1H), 7.15(t, $J=6.97\text{Hz}$, 1H), 7.69-7.73(bd, $J=6.91\text{Hz}$, 1H), 8.12-8.15(bd, $J=6.05\text{Hz}$, 2H), 8.82-8.84(bd, $J=4.73\text{Hz}$, 2H), 9.01-9.05(bd, $J=7.40\text{Hz}$, 1H) ; LCMS m/z 238(M++H)。

【 0 1 7 9 】

9-ベンジル-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(KN-349)

【化24】



40

50

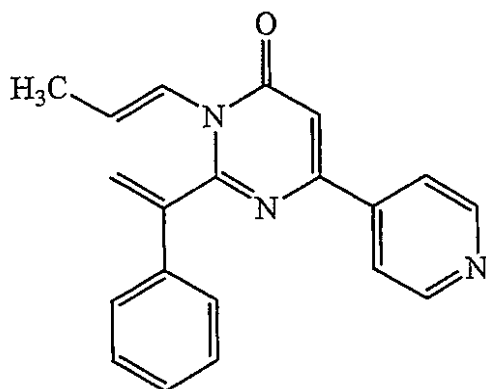
【 0 1 8 0 】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) 4.50(s, 2H), 7.03(s, 1H), 7.16(t, $J=7.03\text{Hz}$, 1H), 7.28-7.39(m, 5H), 7.56-7.58(m, 1H), 8.21(bs, 2H), 8.83(bs, 2H), 9.02-9.05(m, 1H); LCMS m/z 314($\text{M}++\text{H}$).

【 0 1 8 1 】

9-フェニル-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(KN-348)

【 化 2 5 】



10

【 0 1 8 2 】

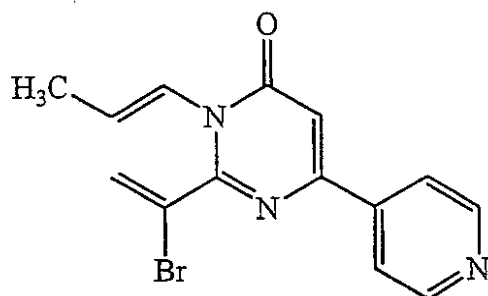
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) 2.50(d, $J=1.07\text{Hz}$, 3H), 7.00(s, 1H), 7.48-7.56(m, 4H), 7.71-7.75(m, 4H), 7.90(bs, 2H), 8.96(m, 1H); LCMS m/z 314($\text{M}++\text{H}$).

20

【 0 1 8 3 】

9-ブromo-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン

【 化 2 6 】



30

【 0 1 8 4 】

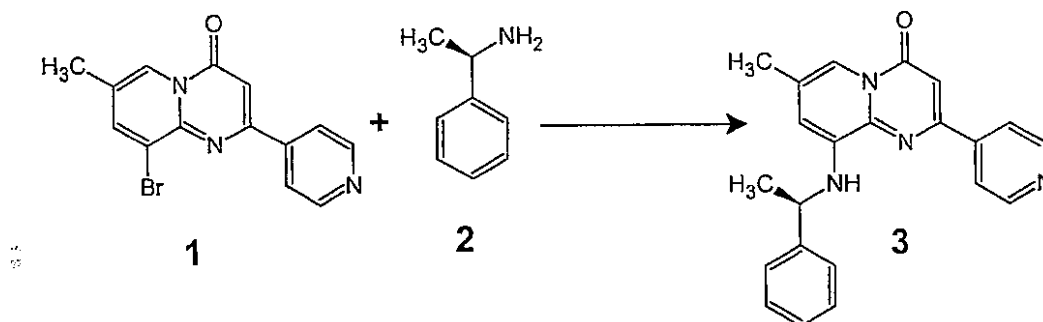
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300MHz) 2.42(m, 3H), 7.23(s, 1H), 8.19(dd, $J=4.48, 1.66\text{Hz}$, 2H), 8.40(d, $J=1.95\text{Hz}$, 1H), 8.77(dd, $J=4.56, 1.65\text{Hz}$, 2H), 8.83(m, 1H); LCMS m/z 316($\text{M}++\text{H}$).

【 0 1 8 5 】

実施例 4 b : 9-(2-フェネチル)アミノ-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オン(KN-316)

40

【化27】



10

【0186】

THF中のプロモ誘導体 1 (324mg, 1mmol)、(R)-(+)-1-メチルベンジルアミン 2 (122mg, 1mmol)、カリウムt-ブトキシド(225mg, 2mmol)及びPdCl₂(dppf)(35mg, 0.05mmol)の混合物を窒素雰囲気下、還流温度で20時間撹拌した。反応混合物を冷却し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水で洗浄し、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄で脱水した。酢酸エチル層を減圧下に濃縮し、残渣を、カラムクロマトグラフィー(シリカゲル, 酢酸エチル)に付して、所要の生成物 3 を得た。

【0187】

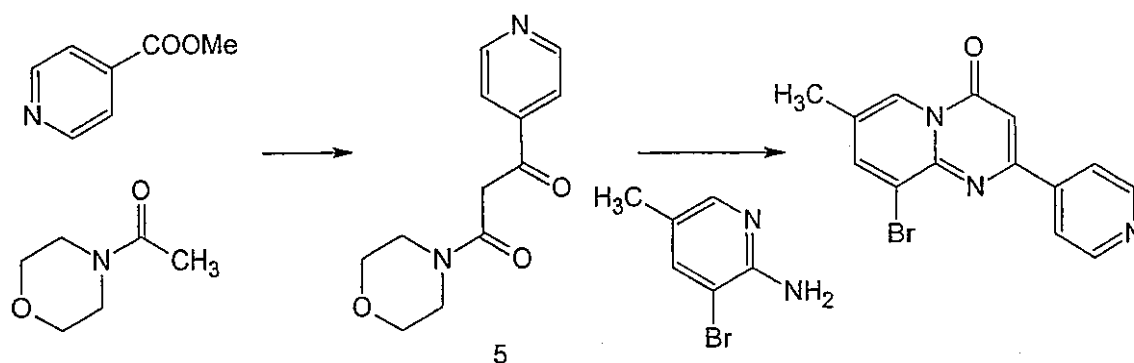
¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) 8.78(br s, 2H), 8.21(s, 1H), 7.92(d, J=5.9Hz, 2H), 7.4-7.26(m, 5H), 6.90(s, 1H), 6.50(d, J=5.5Hz, 1H, -NH), 6.27(s, 1H), 4.60(m, 1H), 2.23(s, 3H), 1.71(d, J=6.9Hz, 3H); MS(m/z)=357.13(m+1)。

20

【0188】

実施例4c : 9-プロモ-2-(4-ピリジニル)-4H-ピリド[1,2-a]ピリミジン-4-オンの別法による合成

【化28】



30

【0189】

イソニコチン酸エチル(5.0mL, 25.91mmol)及び4-アセチルモルホリン(3.0mL, 25.91mmol)をTHF(25mL)に溶解させた溶液を、リチウムビス(トリメチルシリル)アミド(7.0g, 41.83mmol)をTHF(25mL)に溶解させた溶液で処理した。得られた溶液を周囲温度で24時間撹拌した。その溶液を濾過し、エーテル(3×50mL)で洗浄した。濾液を水(100mL)に溶解させ、氷酢酸を用いて酸性化し、CH₂Cl₂(3×30mL)で抽出し、脱水し(Na₂SO₄)、濾過し、蒸発乾固させた。粗反応混合物をカラムクロマトグラフィー(SiO₂, 酢酸エチル)により精製して、化合物 5 を薄黄色の粘性油状物として得たが、これは、静置することで固化(3.6g, 59%)した。

40

【0190】

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz)ケトンとエノールエーテルを一緒にしたNMR 3.47-3.57(bm, 8H), 3.95及び5.77(s, 1H), 7.44及び7.61(dd, J=4.43, 1.62Hz, 2H), 8.49(bd, J=5.93Hz), 8.64(dd, J=4.44, 1.62Hz)2H; LCMS m/z 235(M⁺+H)。

【0191】

50

インキュベーションした。PI4 キナーゼアッセイのために、タンパク質Aビーズ-免疫複合体を同様に溶解バッファーで2回洗浄した後、1×PI4 キナーゼアッセイバッファー(20mM HEPES, pH7.5, 10mM MgCl₂, 0.3% Triton X-100)で2回洗浄し、上記で記載したように、他のアッセイ成分を添加した。100 µLの1M HCl、200 µLのクロロホルム/メタノール(1:1)及び500 µLの2M KClを添加することにより全ての反応を終結させ、2分間15,000×gの遠心に付すことにより脂質を抽出した。PI3又はPI4 キナーゼの脂質産物であるPtdIns(3)P及びPtdIns(4)Pの産生について、TLC分析により確認した。次いで、TLCプレートから脂質のスポットを除去し、放射能のレベルを定量して、PtdIns(3)P/PtdIns(4)Pの産生のレベルを正確に決定した。

【 0 1 9 7 】

PI3-キナーゼ イソ型を阻害するTGX-221の能力について試験するために、0.5 µgのp110 組換えタンパク質を、10 µLの10×キナーゼバッファー(2.5mM EDTA, 200mM HEPES, 50 mM MgCl₂ pH7.2), 30 µLのMilliQ H₂O, 40 µLのPI(150 µg/mL), 10 µLのATPミックス(0.5 µLの ³²P-ATP + 0.5 µLの10mM ATP)及び1 µLのTGX-221(0~10 µM)と一緒に、室温で20分間インキュベーションした。PI3-キナーゼの別のイソ型のアッセイに関して上記で記載したようにして、反応を終結させ、脂質産物について分析した。

【 0 1 9 8 】

別のチロシンキナーゼ及びSer/Thr キナーゼに対するTGX-221の阻害活性については、MDS Pharma Services(Panlabs, Taiwan)が行った。

【 0 1 9 9 】

TGX-221は、PI3-キナーゼ に対して5nMのIC₅₀を示し、血小板内の別の主要な2種類のタイプI PI3-キナーゼイソ型(PI3-キナーゼ 及びPI3-キナーゼ)と比較して、100倍を超える選択性を示した。

10

20

【表 1】

E. 酵素	TGX-221 IC ₅₀ (μM)
脂質キナーゼ	
p110 α -PI3K	5
p110 β -PI3K	0.005
p110 γ -PI3K	>10
p110 δ -PI3K	0.1
PI4K	>10
チロシンキナーゼ	
Ab1	>10
EGF 受容体	>10
Fyn	>10
HER2 受容体	>10
インスリン受容体	>10
Ser/Thr キナーゼ	
カドインキナーゼ 2	>10
Cdk2/サイクリンA	>10
ERK1	>10
p38 α	>10
p70 ^{S6}	>10
PKA非選択的	>10
PKC非選択的	>10
CaMK	>10

10

20

30

【0200】

TGX-221は、広範なタンパク質キナーゼと比較して、PI3-キナーゼ に対して1000倍を超える選択性を示した。この結果は、図(2D)に示されている。TGX-221は、PI4 キナーゼ に対して最低の阻害効果を示した(図(2D))。TGX-221は、また、インビボにおいて、通常ホスホイノシチド、PtdIns、PtdIns(4)P(データは示されていない)及びPtdIns(4,5)P₂の細胞レベルを変えず(図(3A))、PI3-キナーゼによる脂質の生成をインビボで選択的に阻害した(図(3A))。

【0201】

被験化合物の各々についての阻害濃度を以下の表に挙げる。

40

【表 2】

表 I 選択された化合物のPI3-キナーゼのイソ型に対する活性

TGX#	置換パターン	α	β	γ	δ	比 α/β
		----- nM -----				
195	7-メチル-9-{[メチル(フェニル)アミノ]メチル}	>5000	20	>5000	500	25.00
221	7-メチル-9-(1-フェニルアミノエチル)	>5000	5	>5000	100	20.00
239	9-[1-(3,5-ジフルオロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル	>5000	7	>5000	80	11.43
243	9-[1-(4-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル	>5000	50	>5000	2000	40.00
244	9-[1-(3,4-ジクロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル	>5000	50	>5000	1000	20.00
248	9-[1-(3-クロロフェニルアミノ)エチル]-7-メチル	>5000	10	>5000	100	10.00
262	7-メチル-9-[1-(3-メチルフェニルアミノ)エチル]	>5000	50	>5000	1000	20.00
264	7-メチル-9-[1-(3-トリフルオロメチルフェニルアミノ)エチル]	>5000	75	>5000	10000	133.33
295	7-メチル-9-[1-(2-ピリジニルアミノ)エチル]	>5000	50	>5000	2000	40.00

10

【 0 2 0 2 】

実施例 2 : 剪断により惹起される血小板の凝集についての試験

PI3-キナーゼ脂質産物の産生を阻害するTGX-221の能力及び病理学的なレベルの剪断により惹起される血小板の凝集を阻害するTGX-221の能力について、特注のコンプレート装置を用いて試験した。

20

【 0 2 0 3 】

このアッセイのために、抗凝血薬[1容積の抗凝血薬(90mM クエン酸ナトリウム, 7mM クエン酸, pH4.6, 140mM デキストロース及び70mM テオフィリン)に対して6容積の血液]の存在下に全血を採集し、血小板を単離して、Baezinger及びMajerusの方法(1974)を修正した方法を用いて洗浄した。簡潔に述べると、全血を30分間200×gの遠心に付すことにより、多血小板血漿(PRP)を得た。次いで、PRPを10分間2,000×gの遠心に付すことにより、血小板をペレット化した。得られた血小板のペレットを、血小板洗浄バッファー(PWB)[4.3mM K₂HPO₄, 4.3mM Na₂HPO₄, 24.3mM NaH₂PO₄, pH6.5, 113mM NaCl, 5.5mM グルコース, 0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)及び10mMテオフィリン]に再懸濁させた。次いで、血小板を、血小板活性化阻害薬(テオフィリン(10mM))を含んでいるリン酸非含有タイロッドバッファーで2回洗浄した後、0.3mCi/mLの無機³²Pを用いて、37℃で2時間標識化した。取り込まれなかった³²Pは、テオフィリン(10mM)の存在下、血小板をリン酸非含有タイロッドバッファーで2回洗浄した後、1mMのカルシウムを含んでいるテオフィリン非含有タイロッドバッファーに再懸濁させることにより除去した。放射能標識された血小板を、増大する濃度のTGX-221(0-500nM)と一緒に、37℃で30分間インキュベーションした。vWf(10µg/mL)を添加し、その後すぐに、血小板を5000s⁻¹の病理学的な剪断速度に2分間付した。次いで、Stephens et al.(1997, Cell, 89: 105-114)に従って、血小板を溶解させ、抽出し、HPLC分析により分離させた。市販されているPtdIns(3,4)P₂標準及びPtdIns(4,5)P₂標準と一緒に溶出する脂質のピークを積分し、適用した総脂質に対して規格化し、対照サンプルのフラクションとして表した。

30

40

【 0 2 0 4 】

病理学的な剪断速度により惹起される血小板の凝集に対するTGX-221の効果を試験するために、1mMのカルシウムを含んでいるタイロッドバッファーに懸濁させた洗浄済み血小板(350×10⁹)を、増大する濃度のTGX-221(0-1µM)と一緒に、37℃で10分間インキュベーションした。vWf(10µg/mL)を添加し、その後すぐに、血小板を5000s⁻¹の病理学的な剪断速度に5分間付した。血小板のサンプルを吸引し、Sysmex™ KN-21N Hematology Analyzerを使用して、組み込まれなかった単独の血小板の数を分析することにより、血小板の凝集のレベルを測定した。全てのデータを対照実験に対して規格化し、対照サンプルに対する

50

相対的な増加として表した。TGX-221は、3-リン酸化脂質の阻害に匹敵する濃度範囲($IC_{50} = 0.05-0.1 \mu M$)において、剪断により惹起される血小板の凝集を効果的に阻害した(図(3B))。

【0205】

実施例3： FACS分析

FACS分析により、インテグリン活性化及び血小板活性化に対するTGX-221の効果を測定した。1mM $CaCl_2$ /1mM $MgCl_2$ を含んでいるタイロッドバッファーに懸濁させた洗浄済み血小板を、 $1 \mu g/mL$ の抗-Pセレクチン又は $1 \mu g/mL$ のPAC-1抗体及びビヒクル単独又は $0.5 \mu M$ のTGX-221と一緒に、37 de10分間インキュベーションした。次いで、トロンピン($1U/mL$)、ADP($12.5mM$)、U46619($1 \mu M$)又はコラーゲン($10 \mu g/mL$)を用いて血小板を室温で20分間刺激した後、2%パラホルムアルデヒドを用いて、室温で45分間固定化した。固定化した血小板をタイロッドバッファーで2回洗浄し、 $1 \mu g/mL$ のFITC複合抗マウスF(ab)2'抗体と一緒に室温で15分間インキュベーションし、タイロッドバッファーで2回洗浄し、 $500 \mu L$ の最終容積でタイロッドバッファーに再懸濁させ、FACSにより分析した。

10

【0206】

実施例4： インビトロ流動試験

流動条件下接着アッセイ(flow-based adhesion assay)を用いて、血小板カルシウムフラックスに対するTGX-221の効果について試験した。PWBに懸濁させた洗浄済み血小板(1.5×10^9)を、カルシウム指示色素、Oregon Green 488 BAPTA-1, AM($1 \mu M$)及びFura Red, AM($1.25 \mu M$)と一緒に37 で30分間インキュベーションした。血小板をPWBで2回洗浄した後、1mMのカルシウムを含んでいるタイロッドバッファーに再懸濁させた。血小板を、ビヒクル単独、TGX-221($0.5 \mu M$)、LY294002($20 \mu M$)、アスピリン($1mM$)、アピラーゼ($0.5U/mL$)又はAggrastat($200nM$)と一緒に10分間インキュベーションした後、静止接着アッセイ又は流動条件下接着アッセイを行った。

20

【0207】

静止接着アッセイ(static adhesion assay)のために、vWfでコーティングしたカバーガラスの表面上に、血小板を37 で30分間静置した。流動アッセイ(flow assay)のために、血小板を、vWfでコーティングしたマイクロキャピラリーチューブ上に $600s^{-1}$ 、 $1800s^{-1}$ 若しくは $10,000s^{-1}$ の一定の剪断速度で灌流するか、又は、vWfでコーティングしたマイクロキャピラリーチューブの表面上に静置した後、1秒間隔で $10,000s^{-1}$ の剪断の勾配で加速した。個々の血小板におけるリアルタイムの血小板カルシウムフラックスを、それぞれ、静止アッセイ又は流動条件下アッセイについて、30分間のインキュベーション期間にわたり1秒間隔でモニタリングするか、又は、0.586秒間隔で最大175秒間モニタリングした。

30

【0208】

実施例5： 修正Foltsモデルにおけるアッセイ

麻酔をかけたラット及びウサギにおける修正Foltsモデルを用いて、TGX-221のインビボ抗血栓活性を評価した。試験は、オーストラリアのNational Health & Medical Research Councilのガイドラインに従い、University of Melbourne Animal Ethics Committeeの承認を得た。スプラーク-トーレーラット($260 \sim 400g$)においては、ナトリウムペンバルピトン(Nembutal; $60mg/kg$ i.p.; Merial Australia Pty. Ltd., Sydney, NSW, Australia)を用いて麻酔をかけ、ニュージーランドホワイトラビット($2 \sim 3kg$)においては、ペンバルピトン($15mg/kg$ i.v.)とフェンタニール($6 \mu g/kg$ i.v.; David Bull Laboratories, Mulgrave, VIC, Australia)を用いて麻酔をかけた。動物には、酸素を補足した室内の空気を機械的に供給した(Ugo Basile ventilator, Comerio, VA, Italy)。試験期間を通して体温を維持させた。動脈圧は、圧力変換器(Model 1050.1, AD Instruments, Sydney, NSW)に接続した大腿動脈カテーテルを介してを測定した。それぞれの(対照及び被験)頸動脈の周囲に、血流プローブ(ラット $1mm$ i.d., ウサギ $2.5mm$ i.d.; 流量計 T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)を配置した。全てのパラメータは、PowerLab データ収集システム(8SP; AD Instruments)で記録した。後続の狭窄のために、流動プローブから遠い部位で、1本の動脈の周囲を絹製縫合糸で緩く縛った。クレキササン(ラット $0.24m$

40

50

g/kg, ウサギ 1mg/kg ; エノキサパリンナトリウム ; Aventis Australia Pty. Ltd., Sydney, NSW, Australia)を静脈内投与してから5分後に、試験を開始した。縫合糸を引き締めて狭窄を生じさせ、それにより、頸動脈の血流量が50%減少した。次いで、縫合糸のうえから動脈を鉗子で5回挟んで締め付けることにより、動脈の狭窄下にある部位の内皮を除去した。頸動脈の血流量を、0mL/分(これは、狭窄部位に凝血塊が形成されたことを示す)になるまでモニタリングした。1分後、狭窄部位を軽くたたいたが、これは、凝血塊の塞栓形成と血流の回復をもたらす。再度、頸動脈流を0mL/分になるまでモニタリングし、その時間を記録した。薬物を投与する前に、これらの周期的流量減少(CFR)を30分間観察した。30分後、ピヒクルとしての0.25mL/kgのプロピレングリコール、又は、2mg/kgのTGX-221を、静脈内ボラスとして投与し、さらに90分間にわたり血流量を継続的に測定した。この期間の間に、CFRが止まないか、又は、一定期間止んだ後で復帰した場合、(血管を軽くたたくことにより)凝血塊を機械的に塞栓形成させてその都度血流量をゼロとし、CFRを回復させる。TGX-221は、ラット(n=8)及びウサギ(n=9)の100%において、閉塞性血栓の形成を直ちに根絶した(図(5A))。

10

【0209】

実施例6：電解質モデルにおけるアッセイ

電氣的に分離するために、左の頸動脈流動プローブから遠い部位の血管の下にパラフィンフィルムを挿入した。鉤の形状を有する白金電極上に動脈を配置し、その後、電極から遠い部位を締め付けて血流を遮断し、Grass SD9 刺激器に接続した定電流ユニット(Model CCU1, Grass Instruments, Quincy, MA, USA)を用いて、7mAの電流を4分間加えた。この4分の期間が経過した後、すぐに、動脈を締め付けから解放した。刺激が終わってから60分間、血流をモニタリングした。血栓の形成は、血流量が低下してゼロになることにより明示された。ラットの電解質傷害頸動脈モデル(Bush & Shebuski, 1990)を用いた試験において、ピヒクルで処理されたラット(n=10)では90%の割合で閉塞したのに比較して、傷害を誘発する5分前にTGX-221(PG中, 2mg/kg)を注入することにより、閉塞性血栓の形成が完全に防止され(n=6)(図(5B))、傷害を受けた期間の後の60分間にわたり頸動脈の血流容積が維持された(図(5B)挿入図)。TGX-221は、Foltsモデルの試験と電解質モデルの試験の両方において、傷害を受けなかった頸動脈内の基準動脈圧、基準心拍数又は基準血流に対して影響を与えなかった。

20

【0210】

実施例7：ラットにおける尾部出血試験

酸素を補足してある室内の空気に含ませたハロタンを用いて、ラットに麻酔をかけた。薬物の投与15分前(-15)、並びに、薬物の投与5分後及び30分後に、尾部出血時間を測定した。アスピリン及びクロピドグレルによる前処理を含んでいる試験のために、尾部出血時間は、-25時間に最初の胃管栄養を与える前にも測定した。各時点において、尾部に、長さ5mmで深さ1mmの切り傷をつけ、出血が止まるまで(= 出血時間)、30秒ごとに出血をモニタリングした。

30

【0211】

図(5C)に示したラットの試験により、TGX-221は、最低治療濃度の20倍を超えて投与した場合にも、出血時間を増大させなかった。TGX-221(20mg/kg i.v.)を単独で投与するか又はヘパリン(100U/kg i.v.)と一緒に投与した場合に、ラットの尾部の出血時間が影響を受けなかったということは、重要である(図(5C))。クロピドグレル(10mg/kg p.o.)+ヘパリン(100U/kg i.v.)と組み合わせても、又は、アスピリン(200mg/kg p.o.)+ヘパリン(100U/kg i.v.)と組み合わせても、TGX-221(2mg/kg i.v.)は、これらの薬剤により引き起こされた出血時間の長期化を、悪化させなかった(図(5C))。また、TGX-221(2mg/kg i.v.)は、クロピドグレル又はアスピリンのいずれかと組み合わせ投与した場合にも、出血時間に悪影響を与えなかった。

40

【0212】

実施例8：インビトロPI3-キナーゼアッセイ

インビトロPI3-キナーゼアッセイを用いて、PI3-キナーゼ活性に対するピリジン置換化

50

合物の影響について確認した。このアッセイは、ヒトの血小板から免疫沈降させたPI3-キナーゼを酵素として使用し、PIを基質として使用することにより実施した。PI3-キナーゼ活性は、既に記述されているように(Susa et al., 1992, The Journal of Biological Chemistry 267(32) : 22951-22956)、 $[^{32}\text{P}]$ がPIに酵素的に取り込まれてPI($[^{32}\text{P}]-3$)Pを形成するのを測定することにより定量した。

【0213】

洗浄したヒト血小板を、Triton X-100溶解バッファー(10mM Tris, pH7.4, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 1mM PMSF)中で、30分間溶解させた。細胞溶解物を10分間15,000 × gの遠心に付すことにより、Triton X-100に不溶性のフラクションを除去した。500 μgの細胞溶解物を、PI3-キナーゼのp85/110形態に対する1 μgのウサギ抗-ラット抗体及び30 μLの50%タンパク質A-セファロースペースと4 で2時間混合することにより、PI3-キナーゼを免疫沈降させた。該ビーズを15,000 × gで5秒間ベレット化し、氷冷したTriton X-100溶解バッファーで3回洗浄した後、PI3-キナーゼアッセイバッファー(20mM HEPES, pH7.4, 1mM EGTA, 5mM MgCl₂)で4回洗浄することにより、タンパク質A-セファロースに結合したPI3-キナーゼを単離した。

【0214】

CHCl₃中に保存したPIをN₂下で乾燥させ、330 μg/mLの最終濃度で脂質バッファー(50mM HEPES, pH7.2, 1mM EDTA)中に再懸濁させ、氷上で6分間超音波処理した。免疫沈降させたPI3-キナーゼを、20分間、40 μLのPI、10 μLのATP(1mM)及び ^{32}P -r-ATP(0.5 μCi, 1 μCi/nmol)、及び、10 μLの10 × キナーゼバッファーと、水で調製した100 μLの最終アッセイ容積で混合することにより、PI($[^{32}\text{P}]-3$)Pを生成させた。TGXをPI3-キナーゼと一緒に5分間プレインキュベーションした後、ATPを添加した。100 μLの1N HClを用いて反応を終結させ、PI($[^{32}\text{P}]-3$)P産物を200 μLのクロロホルム : メタノール(1:1)及び500 μLの2M KClを用いて抽出した。クロロホルム相中のPI($[^{32}\text{P}]-3$)Pを、CHCl₃ : MeOH : HAC : H₂O(43:38:5:7)(v:v:v:v)を含む溶媒系を用いる薄層クロマトグラフィーにより分割し、オートラジオグラフィーにより可視化した。次いで、PI($[^{32}\text{P}]-3$)PのスポットをTLCプレートから除去し、1mLのメチルアミン : ブタノール : メタノール(42:9:47)(v:v:v)を用いて、53 で4時間、脱アシル化し、液体シンチレーションカウンター(LKB 1209 RackBETA)を用いて定量した。

【0215】

実施例9 : 流動条件下における再構成アッセイ(flow-based reconstitution assay)

流動条件下接着アッセイ(flow-based adhesion assay)を用いて、血小板の接着に対するTGX-286の効果について試験した。洗浄した血小板を、10nM、25nM若しくは50nMのTGX-286、又は対照バッファー(0.1% DMSO)で、37 で30分間前処理した後、50%のヘマトクリット値で赤血球細胞と一緒に再構成させた。血小板と、再構成させた赤血球細胞を、vWfでコーティングしたガラス製マイクロスライドを通して、1800s⁻¹の剪断速度で1分間灌流させた。1800s⁻¹で10分間洗浄することにより、未接着の細胞を除去し、接着した血小板の数を測定し、平均 ± SEMで表した。血小板を10nM、25nM及び50nMのTGX-286で前処理した場合に、血小板の接着が51%、67%及び86%低減したので、TGX-286は、血小板の接着能力を、用量依存的に阻害した。

【0216】

実施例10 : CD9-抗体により惹起された、多血小板血漿の血小板凝集

抗体CD9によって惹起された血小板の凝集に対するTGX286及びKN327の阻害効果について、多血小板血漿(PRP)で試験した。PRPの懸濁液を、20 ~ 100nMのTGX286又は対照バッファー(0.1% DMSO)と一緒にインキュベーションし、該抗体のアリコートで処理した。攪拌下における凝集について、4チャンネル凝集検出計で10分間モニタリングした。凝集のレベルを、サンプル細胞を通した光透過率の変化として測定した。PRPの凝集を50%阻害する被験化合物の濃度として、IC₅₀濃度を求めた。

【0217】

全血流動アッセイ

洗浄した血小板により形成される血栓は小さくて再現性に乏しいので、血小板血栓の形成に対するTGX-286の阻害効果について、全血流動アッセイを用いて試験した。凝固を阻止した全血を、50nM、100nM若しくは200nMのTGX-286、又は、対照バッファ(0.1% DMSO)と一緒に、適度に振動させながら30分間インキュベーションした後、vWfでコーティングしたガラス製マイクロスライドを通して、 1800s^{-1} の剪断速度で2分間灌流させた。 1800s^{-1} で10分間洗浄することにより、未接着の血小板を除去し、接着した赤血球を1%シュウ酸アンモニウムで溶解させた。血栓形成のレベルは、分光光度法で全細胞溶解物中の血小板LDH(U/L)レベルを測定することにより、間接的に定量した。全血を2分間灌流させた後、マイクロスライドの表面上に、多血小板血栓(platelet-rich thrombi)が観察された。TGX-286で前処理した場合、血小板がvWfマトリックス上で血栓を形成する能力が、用量依存的に阻害された。全血を、50nM、100nM及び200nMのTGX-286で前処理したことにより、対照と比較して、血栓の形成が、25%、53%及び80%減少した。

10

【0218】

実施例11： 内頸動脈閉塞症の動物モデル

TGX-286の阻害効果について、Foltsら(1982, Circulation 65:248-255)の十分に確立した動脈血栓症動物モデルで試験した。このモデルを用いて、挫傷とその後の動脈狭窄にตอบสนองしたインビボにおける凝固時間に対する抗血栓薬の効果について評価する。

【0219】

麻酔をかけたラットの頸動脈を解剖し、その頸動脈の周囲に電磁血流プローブ(electromagnetic flow probe)を配置して、血流量を測定する。その血流プローブの近位において、動脈をシリコンの管で覆われている手術用鉗子で締めることにより、血管壁に、血管内膜と血管中膜の損傷を引き起こさせる。結紮系又は適切な内径を有するプラスチック製シリンダで動脈の周囲を締めて、動脈の直径を70%縮小させる。

20

【0220】

損傷を受け狭窄した血管の領域において血小板が集まり、徐々に閉塞性の血小板血栓を形成していく。これは、血流量の減少として観察される。血栓の形成に伴い血圧が上昇し、それによって、血栓が分裂して、狭窄部位から離れたところに塞栓を形成する。その血栓が自然発生的に塞栓を形成しない場合、狭窄部位を適度に揺り動かして、血栓を遊離させる。これにより、血流が急激に回復する。血小板は、再度、損傷を受け狭窄した動脈血管の領域に集まり、血栓-塞栓形成パターンを繰り返す。血小板が介在するこの急性の血栓形成と、それに続く塞栓形成により、血流における周期的流量減少(CFR)が起こる。ラットにおいて規則正しいCFRがひとたび生じた後で、抗血栓化合物又はビヒクル対照を頸静脈に投与する。

30

【0221】

2.5mg/kg及び4mg/kgの投与量で、TGX-286又はKN327を頸静脈に投与し、血流量の安定化を記録した。TGX-286、及び、14.0mg/kgのKN327は、処理した動物の80%を10分以内に基準状態に戻した。このことは、これらの化合物が、冠状動脈閉塞の治療において有用性を有していることを示している。

【0222】

実施例12： 流動条件下の血小板血栓形成に対するTGX-286及びKN-327の効果

40

クエン酸処理した全血を、50nM、100nM若しくは200nMのTGX-286若しくはKN-327、又は対照バッファ(0.1% DMSO)で、37℃で10分間前処理した。血液を、フォンウィルブラント因子-(vWf)でコーティングしたマイクロキャピラリーチューブを通して、 600s^{-1} で2分間灌流した。バッファを 600s^{-1} で2分間灌流することにより接着しなかった細胞を除去し、接着した全ての赤血球を、1%シュウ酸アンモニウムで処理することにより溶解させた。次いで、1% Triton X-100を加えることにより、接着した血小板を溶解させ、分光光度法により乳酸脱水素酵素(LDH)のレベル(U/L)を分析した。全血を、50nM、100nM及び200nMのTGX-286で前処理することにより、対照と比較して血栓の形成が低減した。

【0223】

実施例13： イソ型選択的インビトロPI3K酵素アッセイ

50

第一次選抜としてインビトロ酵素アッセイを行って、薬物としての候補イソ型の親和性及び特異性を決定した。p110 (sc-7174)イソ型及びp110 (sc-603)イソ型の特定の領域を認識する、Santa Cruz Biotechnologyから入手した抗体を用いて、血小板溶解物から、PI3Kのイソ型及びイソ型を免疫沈降させた。イソ型は、Kinacia laboratoriesにおいて、組換えタンパク質として生成させた。イソ型は、イソ型特異的抗体(sc-7176)を用いて同様の方法によりTHP-1細胞から免疫沈降させた。ホスファチジルイノシトールと³²Pを使用する標準的なリン酸化アッセイを用いて、阻害薬の存在下又は非存在下での免疫沈降における酵素活性を測定した。酵素活性は、IC₅₀値を確定するために、阻害薬の特定の濃度範囲にわたって測定した。

【0224】

10

PI3-キナーゼ阻害薬であるLY294002(8-フェニル-2-(4-モルホリニル)-4H-ベンゾピラン-4-オン, Sigma #L9908)のPI3Kの種々のイソ型に対するIC₅₀は、既に報告されている値と一致した(0.5~1.5 μM)。

【0225】

実施例14：好中球ROS応答

人血からの白血球の調製

保存薬を含んでいない3mLの全血を、50mL容の円錐管内に入れた。血液ニューテーター(haematology nutator)上で、48mLの赤血球溶解液を25 で10分間反転により静かに混合した後、卓上遠心機(table top centrifuge)で、25、350×gで、10分間遠心分離した。白血球を多く含んでいるペレットを、10%w/vのゼラチンを補足したリン酸緩衝化生理食塩水(PBS-gel)に再懸濁させ、上記のように遠心に付した。白血球のペレットをハンクス平衡塩類溶液(HBSS)で1回洗浄し、最終的な細胞数2×10⁶/mLで再懸濁させ、直ちに使用した。

20

【0226】

好中球からのROS産生の測定

活性酸素種(ROS)の発生は、好中球が活性化されたことの特徴の1つである。好中球によるROSの産生は、多くの種類のケモカイン及びサイトカインによって増強される。走化性ペプチドfmlpによる刺激に続くROSの産生に対するPI3K阻害薬TGX-286の効果を測定した。ROSの産生は、Robinsonらの方法(pp 9.7.5-9.7.9 in Curr. Protocols in Cytometry(1997))に修正を加えた蛍光活性化細胞解析分離法(FACS)で細胞内ジヒドロローダミン123(DHR)の酸化をモニタリングすることにより測定した。細胞1mL当たり2 μLの50mM DHR(最終50 mM)を白血球の懸濁液にバルクで加え、37 で12分間インキュベーションした。500 μLアリコート(DHRを加えた細胞を、5 μLの100 μM fmlp使用溶液を用いて37 で20分間刺激した後、氷上でクエンチした。フローサイトメーターは、488nmで励起して使用可能な状態とし、DHR発光のための520±20nmの帯域フィルターを使用した。刺激を受けていない対象サンプルを用いて好中球の数を確認し、ゲートで制御し、また、抗-CD14免疫染色により確認した。これらのゲート制御した好中球を用いて、蛍光の基準データを較正した。刺激を受けた細胞のサンプルを分析し、各サンプルからの5000個のゲート制御した好中球について、線状の緑色蛍光(linear green fluorescence)(DHR)をモニタリングした。ROSの相対量を測定するために、対照サンプルから得た値を、全ての値から減じ、fmlp単独のサンプル(阻害薬なし)から得た値に対して規格化した。

30

40

【0227】

実施例15：好中球エラスターゼ放出

人血からの好中球の調製

健康なボランティアから得たヘパリン処理した血液のアリコート(24mL)を、Histopaque-19(登録商標)及びHistopaque-1077(登録商標)(Sigma)の12mLのクッションの上に層状に重ね、卓上遠心機で、25、700×gで30分間遠心分離した。Histopaque-119クッションのすぐ上にある好中球を多く含むバンドを集めてHBSSで洗浄した。残った赤血球は、0.2%のNaClを用いて低張溶解(hypotonic lysis)することにより除去した。好中球調製物をHBSSで2回洗浄し、直ちに使用した。

【0228】

50

好中球エラスターゼエキソサイトーシスの測定

活性化された好中球は、特定の範囲の刺激に対して、炎症に際して組織及び細胞外マトリックスの破壊を引き起こす数種類のプロテアーゼを放出することにより応答する。プロテアーゼ放出の指標として、好中球エラスターゼエキソサイトーシスに対するTGX-286の効果を測定した。エラスターゼエキソサイトーシスは、下記の通りに、Cieslaらの方法(The Journal of Trauma, 48(3) : 388-395(2000))を修正することにより定量した。好中球エラスターゼ放出は、特異的なエラスターゼ基質AAPV-pNAを開裂することにより測定した。単離した好中球(6.25×10^5 細胞)を37 °Cで5分間プレインキュベーションした後、0.1 μMのfmlpで20分間刺激した。次いで、細胞懸濁液を5分間400 × gの遠心に付し、生じた上清を吸引し、保持した。エラスターゼ放出は、0.17mMのNaCl及び33.3mMのヒドロキシエチレンピペラジンエタンスルホン酸中の0.33mMの特異的なエラスターゼ発色基質AAPV-pNAを含んでいる96-ウェルマイクロプレートの個々のウェルに100 μLの無細胞上清を添加することにより評価した。ブランクウェルには、エラスターゼ阻害薬AAPV-CK(0.17mM)も含ませた。総反応容積は150 μLであり、各試験は、別個のAAPV-CKブランクを使用して、二反復で行った。96-ウェルプレートを37 °Cで60分間インキュベーションし、405nmでの吸光度を測定した。エラスターゼの相対量を測定するために、対照サンプルから得た値を、全ての値から減じ、fmlp単独のサンプル(阻害薬なし)から得た値に対して規格化した。

10

【0229】

実施例16：細胞増殖アッセイ

TGX-286の増殖抑制活性は、U937(単球)細胞系で測定した。該化合物の細胞毒性活性は、細胞数を数えることにより4日間にわたりモニタリングし、代謝活性の比色定量アッセイを用いて細胞の生存力を測定した。

20

【0230】

各生物学的活性における被験化合物についての阻害濃度(nM)は、下記表(II)に記載されている。

【表 3】

表 I I

方法	単離した酵素のアッセイ (nM)		
	I C ₅₀		
	実施例 8	実施例 1 3	
#	血小板 IP(p85)	P110 γ	P110 δ
TGX 258	10000	>20000	>10000
TGX 286	2	1000	100
KN 303	10	1500	500
KN 310	100	7500	1000
KN 312	50	10000	10000
KN 313	100	10000	5000
KN 315	>100	5000	5000
KN 316	1000	20000	1000
KN 317	>100	20000	5000
KN 319	500	20000	300
KN 322	1000	10000	1000
KN 326	500	5000	1000
KN 327	20	15000	500
KN 328	50	10000	10000
KN 333	10000	>10000	
KN 335	1000	10000	1000
KN 336	1000	10000	200
KN 337	200	>10000	200
KN 340	10000	>10000	>10000
KN 341	500	5000	50
KN 342	10000	>10000	>10000
KN 344	5000	>10000	
KN 345	5000	>10000	10000
KN 346	>10000	>10000	10000
KN 347	>10000	>10000	>10000
KN 348	>10000	>10000	>10000
KN 349	500	>10000	2000
KN 350	500		
KN 351	500		

10

20

30

40

【表4】

表 I I I

	P110 α イソ型	P110 β イソ型	血小板 凝集 v. CD9抗体	血栓形成 の 阻害	好中球 からの ROS放出	抗増殖 活性 v. U937細胞
方法	実施例13	実施例13	実施例10	実施例12	実施例14	実施例16
#	IC ₅₀ /(nM)	IC ₅₀ /(nM)	IC ₅₀ /(nM)	IC ₅₀ /(nM)	IC ₅₀ /(nM)	IC ₅₀ /(nM)
TGX-286	5000	2	100	500	5	5
KN-327			200	250	78	20

10

【0231】

製剤実施例

実施例1：ピリジン置換化合物含有している医薬組成物の調製及び投与

本発明の好ましい数種類の医薬製剤について、以下に記載する。

【0232】

経口投与用錠剤

下記表(IV)に、経口投与用の錠剤の成分が挙げられている。錠剤A、錠剤B及び錠剤Cは、表(IV)に挙げられている最初の6種類の成分をポビドンと一緒に湿式造粒した後、ステアリン酸マグネシウムを添加し、次いで、打錠することにより調製する。

20

【表5】

表 I V			
	mg/錠		
	錠剤A	錠剤B	錠剤C
活性成分	25	25	25
アピセル	13	-	7
乳糖	78	47	-
デンプン (トウモロコシ)	-	9	-
デンプン (プレラチン化, NF15)	-	-	32
デンプングリコール酸ナトリウム	5	-	-
ポビドン	3	3	-
ステアリン酸マグネシウム	1	1	1
合計	125	85	85

30

40

【0233】

舌下投与用錠剤

下記表(V)に、舌下投与用の2種類の錠剤の成分が挙げられている。錠剤A及び錠剤Bは、表(V)に挙げられている最初の6種類の成分をポビドンと一緒に湿式造粒した後、ステアリン酸マグネシウムを添加し、次いで、打錠することにより調製する。

【表 6】

表 V		
	mg/錠	
	錠剤 A	錠剤 B
活性成分	25	25
アビセル	10	-
乳糖	-	36
マンニトール	51	57
ショ糖	-	3
アラビアゴム	-	3
ポビドン	3	-
ステアリン酸マグネシウム	1	1
合計	90	125

10

【0234】

口腔内投与用錠剤

20

口腔内投与用の錠剤は、下記表(VI)に挙げてある成分を混合した後、混合された成分を直接打錠することにより調製する。

【表 7】

表 VI	
	mg/錠
活性成分	25
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	25
(HPMC)	-
ポリカルボフィル	39
ステアリン酸マグネシウム	1
合計	90

30

【0235】

粉末充填カプセル製剤

下記表(VII)に、2種類の粉末充填カプセル製剤の成分が挙げてある。カプセル A 及びカプセル B は、成分を混合し、得られた混合物を2つの部分からなる硬質ゼラチンカプセルに充填することにより調製する。

40

【表 8】

表VII		
	mg/錠	
	カプセルA	カプセルB
活性成分	25	-
アピセル	45	-
乳糖	153	-
デンプン (1500NF)	-	117
デンプングリコール酸ナトリウム	-	6
ステアリン酸マグネシウム	2	2
合計	225	150

10

【0236】

液体充填カプセル製剤

下記表(VIII)に、2種類の液体充填カプセル製剤の成分が挙げてある。カプセルAは、マクロゴール4000BPを融解させ、融解したマクロゴール4000BP中に活性成分を分散させ、それを2つの部分からなる硬質ゼラチンカプセルに充填することにより調製する。カプセルBは、活性成分をレシチンとラッカセイ油の中に分散させ、得られた分散液を弾性のある軟質ゼラチンカプセルに充填することにより調製し得る。

20

【表 9】

表VIII		
	mg/錠	
	カプセルA	カプセルB
活性成分	25	25
マクロゴール 4000USP	200	-
レシチン	-	100
ラッカセイ油	-	100
合計	225	225

30

【0237】

制御放出カプセル製剤

制御放出のためのカプセル製剤は、下記表(IX)に挙げてある最初の4種類の成分を混合して押し出し、押し出し物を球状化し(spheronizing)、乾燥させることにより調製する。乾燥したペレットに、制御放出膜としてのエチルセルロースでコーティングする。得られたペレットを、2つの部分からなる硬質ゼラチンカプセルに充填する。

40

【表 1 0】

表 I X	
	mg/カプセル
活性成分	25
アピセル	123
乳糖	62
クエン酸トリエチル	3
エチルセルロース	12
合計	225

10

【 0 2 3 8】

静脈内投与用製剤

下記表(X)に挙げてある成分を含んでいる静脈内投与用の製剤は、活性成分をクエン酸緩衝液中に入れ、次いで、得られた溶液のpHを塩酸を用いてpH7に調節することにより調節する。得られた溶液の容積を所定の容積とし、次いで、微小孔フィルターで濾過して無菌のガラス製水薬瓶の中に入れ、充填後、密封し、オーバーシールを施す。

【表 1 1】

20

表 X	
	重量%
活性成分	2
塩酸 (クエン酸緩衝液)	pHを7にするのに十分な量
注射用蒸留水	100% まで

【 0 2 3 9】

鼻腔内投与用製剤

下記表(XI)に挙げてある成分を含んでいる鼻腔内投与用の製剤は、活性成分をヒドロキシ安息香酸の混合物の中に入れ、次いで、得られた溶液のpHをクエン酸緩衝液中の塩酸を用いてpH7に調節することにより調節する。得られた溶液の容積を所定の容積とし、次いで、微小孔フィルターで濾過して無菌のガラス製水薬瓶の中に入れ、充填後、密封し、オーバーシールを施す。

【表 1 2】

30

表 X I	
	重量%
活性成分	0.5
クエン酸緩衝液中の塩酸	pHを7にするのに十分な量
ヒドロキシ安息香酸メチル	0.2
ヒドロキシ安息香酸プロピル	0.2
注射用蒸留水	100% まで

40

【 0 2 4 0】

筋肉内注射用製剤

下記表(XII)に挙げてある成分を含んでいる筋肉内注射用の製剤は、活性成分をグリコ

50

フロール(glycofurol)に溶解させることにより調製する。次いで、ベンジルアルコールを加えて溶解させ、水を加えて最終容積を3mLとする。次いで、得られた混合物を、微小孔フィルターで濾過して無菌のガラス製水薬瓶の中に入れ、充填後、密封し、オーバーシールを施す。

【表 1 3】

表 X I I	
活性成分	0.05g
ベンジルアルコール	0.1g
Glycofurol 751	1.45g
注射用蒸留水	3.00mLにするのに十分な量

10

【 0 2 4 1】

シロップ製剤

下記表(XIII)に挙げてある成分を含んでいるシロップ製剤は、安息香酸ナトリウムを純水の一部に溶解させ、次いで、ソルビトール溶液を加えることにより調製する。次いで、活性成分を加え、溶解させる。次いで、得られた溶液をグリセロールと混合し、純水を用いて所要の容積とする。

【表 1 4】

表 X I I I	
活性成分	0.05g
ソルビトール溶液	1.5g
グリセロール	1.0g
安息香酸ナトリウム	0.005g
香料	0.0125mL

20

【 0 2 4 2】

坐剤

下記表(XIV)に挙げてある成分を含んでいる坐剤は、蒸気ジャケットのついた皿で最大温度45℃で、Witepsolの5分の1を融解させることにより調製する。次いで、活性成分を200µmの篩にかけ、切削ヘッドの付いたSilverson混合機を用いて、均質な分散液が得られるまで先に融解させた基剤と混合する。得られた混合物の温度を45℃に維持しながら、残りのWitepsol H15を分散液に添加し、その際、分散液を攪拌して、確実に均質な混合物が得られるようにする。次いで、懸濁液の全体を攪拌しながら250µmのステンレススチール製スクリーンに通し、40℃に冷却する。得られた混合物の2.0gのアリコートをし、38~40℃の温度で、適切なプラスチック金型(plastic mold)に充填する。得られた坐剤を室温まで冷却する。

30

40

【表 1 5】

表 X I V	
	mg/坐剤
活性成分 (63 μ m) ¹	50
硬質脂肪, USP (Witepsol H15-dynamit NoBel)	1950
合計	2000

¹ 活性成分は粉末(少なくとも90%の粒子の直径が63 μ m以下である)として使用

10

【 0 2 4 3】

エーロゾル製剤

下記表(XV)に挙げてある成分を含んでいるエーロゾル製剤は、活性化合物をエタノールと混合し、注射用蒸留水を加えることにより調製する。次いで、得られた溶液を、Propellant 22の一部に添加し、-30℃に冷却し、充填装置に移す。次いで、所要量をステンレススチール製の容器に入れ、残りの噴射剤で希釈する。次いで、容器にバルブユニットを取り付ける。

【表 1 6】

表 X V	
	重量%
活性成分	0.25
エタノール	10
注射用蒸留水	19.75
Propellant 22 (クロシフルオロメタン)	70
合計	100

20

【 0 2 4 4】

膺坐剤

膺坐剤は、下記表(XVI)に挙げてある成分を直接混合することにより調製する。得られた混合物を圧縮することにより、膺坐剤を調製する。

【表 1 7】

表 X V I	
	mg/膺坐剤
活性成分 (63 μ m) ¹	50
無水デキストロース	470
ジヤガイモンブソ	473
ステアリン酸マグネシウム	473
注射用蒸留水	1000

¹ 活性成分は粉末(少なくとも90%の粒子の直径が63 μ m以下である)として使用

40

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 5】

50

【図1】図1 Aは、さまざまな血流条件下において不可逆的な接着を形成するvWfと相互作用している血小板の割合をグラフにより示す図である。図1 Bは、固定したvWfの表面における個々の血小板の挙動を示す図である。図1 Cは、ビヒクル(DMSO <0.25% v/v)、0.5U/mLのアピラーゼ、1mMのアスピリン、又は、25 μ MのLY294002による前処理を行った後の、持続的、一時的又は回転の挙動を示すvWf接着血小板の割合をグラフにより示す図である。図1 Dは、GPIb/V/IX結合のモデュレーターであるリストセチン(1mg/mL)で処理した後の、固定されたvWfの表面におけるGPIb/V/IX依存性 $[Ca^{2+}]_c$ を示す代表的な単独の血小板のレコードを示す図である。図1 Eは、1秒又は60秒の時間間隔で $[Ca^{2+}]_c$ に反応して高周波 $[Ca^{2+}]_c$ を示すGPIb/V/IX接着血小板の割合を示す図である。

【図2】図2 Aは、単離したPI3-キナーゼイソ型を用いて行ったTGX-221の選択性を示す図である。

10

【図3】図3 Aは、円錐平板粘度計内で剪断(5000 s^{-1} , 2分間)により活性化させた後の、血小板内における脂質生成に対するTGX-221による用量応答性障害を表す棒グラフを示す図である。図3 Bは、未処理(対照)サンプルに対する、TGX-221の種々の濃度における単独血小板総数の比例的増加を示す棒グラフを示す図である。

【図4】図4 Aは、0.5 μ MのTGX-221による前処理が、1秒間隔で $10,000 \cdot \text{s}^{-1}$ までの剪断速度勾配()に付した後に持続的挙動、一時的挙動又は回転挙動(上記)を示すvWf接着血小板の割合に及ぼす影響を実証しているポピュレーション解析の棒グラフを示す図である。図4 Bは、vWfの表面におけるGPIb/V/IX依存性 $[Ca^{2+}]_c$ を示す代表的な単独の血小板のレコードを示す図である。図4 Cは、生理学的作動薬で刺激した後の、P-セレクチンの表面発現及びインテグリン $\alpha_{IIb} \beta_3$ 活性化のレベル(PAC-1結合により求めた)を説明するFACS解析を示す図である。

20

【図5】図5 Aは、Foltsモデルにおける、ペントバルビトンで麻酔をかけたラット(A)及びウサギ(B)での薬物投与前(a; -30-0分)及び薬物投与後(b~d; それぞれ、1-30分、31-60分、及び、61-90分)の30分間当たりの頸動脈血流の周期的流量減少(CFR)が認められた平均個体数に対するビヒクル(プロピレングリコール)又はTGX-221の影響を示す図である。図5 Bは、電解質モデルにおける、ペントバルビトンで麻酔をかけたラットでの電解質による傷害(7mAの電流4分間(時間 -4-0分)血流量0; 0分で動脈鉗子を除去)を受けた後の頸動脈血流量(体重100g当たりのmL/分)に対するビヒクル(プロピレングリコール)又はTGX-221の影響を示す図である。図5 Cは、それぞれ、TGX-221、TGX-221+ヘパリン、アスピリン、クロピドグレル、クロピドグレル+ヘパリン、クロピドグレル+ヘパリン+TGX-221、アスピリン+ヘパリン、及び、アスピリン+ヘパリン+TGX-221で処理した、ハロタンで麻酔をかけたラットにおけるラット尾部の出血時間の比較を示す図である。

30

【図6】図6 Aは、ROS応答に対する種々の濃度のTGX-286の影響を示す図である。図6 Bは、ROS応答に対する種々の濃度のTGX-286の影響を示す図である。

【図7】図7は、エラスターゼの放出に対する種々の濃度のTGX-286の影響を示す図である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 401/10	(2006.01)	C 0 7 D 401/10	C S P
C 0 7 D 471/04	(2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 1 7 A

- (72)発明者 ロバートソン, アラン ディー.
オーストラリア国 2 0 9 4 ニュー サウス ウェールズ, フェアライト, カメラ ストリート 1 4
- (72)発明者 ケンチェ, ヴィジャヤ
オーストラリア国 3 1 6 6 ビクトリア州, オークレイ イースト, キングズ クローズ 9
- (72)発明者 トンプソン, フィリップ
オーストラリア国 3 0 7 0 ビクトリア州, ノースコート, ウィニフレッド ストリート 8
- (72)発明者 プラバハラン, ヒシャニ
オーストラリア国 3 1 2 5 ビクトリア州, パーウッド, クランブレ アベニュー 3 5
- (72)発明者 アンダーソン, カレン
オーストラリア国 3 1 2 8 ビクトリア州, ボックス ヒル, ステーション ストリート 4 / 7 5 4
- (72)発明者 アボット, ベリンダ
オーストラリア国 3 1 2 5 ビクトリア州, パーウッド, リッジウェイ アベニュー 4 / 1
- (72)発明者 ゴンカルヴェス, イサーク
オーストラリア国 3 8 0 2 ビクトリア州, エンデバー ヒルズ, ロバート モリノー アベニュー 4 5
- (72)発明者 ネスピット, ワーウィック
オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア州, カールトン, ユニバーシティ ストリート 1 1 / 1 5
- (72)発明者 ショエンワエルダー, シモーネ
オーストラリア国 3 1 2 5 ビクトリア州, パーウッド, リッジウェイ アベニュー 3 / 1
- (72)発明者 セイリク, ディレク
オーストラリア国 3 0 4 8 ビクトリア州, メドウ ハイツ, ダンケルド ストリート 8

審査官 伊藤 基章

- (56)参考文献 特開平02 - 2 8 8 8 6 4 (J P , A)
国際公開第01 / 0 5 3 2 6 6 (W O , A 1)
国際公開第00 / 0 1 7 1 8 4 (W O , A 1)
英国特許出願公開第00728767 (G B , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/00
C07D 401/00
C07D 471/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)