

明 細 書

発明の名称：ピラゾールアミド化合物およびその医薬用途

技術分野

[0001] 本発明は、ピラゾールアミド化合物およびその医薬用途である。より詳細には、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ（以下、PDHKと略記する。）阻害活性を有するピラゾールアミド化合物またはその製薬上許容される塩、それらを含む医薬組成物、および糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病等）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障等）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病の予防または治療剤等に関する。

背景技術

[0002] 組織内において、エネルギーを使う反応、例えば、生合成、能動輸送、筋肉の収縮等ではアデノシン三リン酸（ATP）の加水分解により、エネルギーが供給される。ATPはグルコースまたは遊離脂肪酸のようなエネルギーの多い代謝燃料の酸化により生成される。筋肉のような酸化的組織において、ATPの大部分はクエン酸サイクルに入るアセチルCoAから生じる。アセチルCoAは解糖経路によるグルコースの酸化または遊離脂肪酸の β 酸化によって生成される。グルコースからのアセチルCoA産生を調節する司令的役割を果たす酵素はPDHである。PDHはピルビン酸からアセチルCoAおよび二酸化炭素への酸化と同時に、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）のNADHへの還元を触媒する（例えば、非特許文献1、2）。

[0003] PDHは、ミトコンドリアマトリックスに局在する3つの酵素成分（E1

、E 2 および E 3）といくつかのサブユニットからなる多重酵素複合体である。E 1、E 2 および E 3 は、それぞれ、ピルビン酸の脱炭酸、アセチル C o A の生成および N A D の還元による N A D H の生成を行う。

P D H には、調節的役割をもつ 2 種類の酵素が結合している。一つは P D H K であり、P D H に特異性を示すプロテインキナーゼである。その役割は、複合体の E 1 α サブユニットをリン酸化して不活性化することである。他の一つは P D H ホスファターゼであり、E 1 α サブユニットの脱リン酸化を介して P D H を活性化する特異的なプロテインホスファターゼである。活性（脱リン酸化）状態の P D H の割合は、キナーゼ活性とホスファターゼ活性のバランスにより決定される。キナーゼ活性は、代謝基質の相対濃度により調節を受ける。例えば、キナーゼ活性は、N A D H / N A D、アセチル C o A / C o A および A T P / アデノシン二リン酸（A D P）の各比率の上昇により活性化し、ピルビン酸で阻害される（例えば、非特許文献 3）。

[0004] 哺乳類の組織においては 4 種の P D H K アイソザイムが同定されている。なかでも、P D H K 2 は、糖代謝に関与する肝臓、骨格筋、脂肪組織を含む広範囲な組織に発現している。さらに、P D H K 2 は、N A D H / N A D やアセチル C o A / C o A の上昇による活性化およびピルビン酸による阻害への感受性が比較的高いことから、短期的な糖代謝調節に関与することが示唆される（例えば、非特許文献 4）。

[0005] また、P D H K 1 は、心筋、骨格筋、膵 β 細胞等に多く発現している。さらに、P D H K 1 は、虚血状態において、低酸素誘導因子（H I F）1 の活性化を介して発現が誘導されることから、虚血性疾患や癌性疾患に関与することが示唆される（例えば、非特許文献 5）。

[0006] インスリン依存性（1 型）糖尿病および非インスリン依存性（2 型）糖尿病等の疾患では、脂質の酸化が亢進し、同時にグルコースの利用が低下する。このグルコース利用低下が高血糖を呈する一因となる。1 型および 2 型糖尿病、肥満のような酸化的グルコース代謝が低下した状態において P D H 活性は低下していることから、1 型および 2 型糖尿病におけるグルコース利用

の低下にはPDH活性の低下が関与することが示唆される（例えば、非特許文献6、7）。

また、1型および2型糖尿病では肝臓における糖新生が亢進しており、このことも高血糖を呈する一因となる。PDH活性の低下はピルビン酸を上昇させ、その結果、肝臓における糖新生基質としての乳酸利用能が増大する。このことから、1型および2型糖尿病における糖新生の亢進にPDH活性の低下が関与する可能性がある（例えば、非特許文献8、9）。

PDHK阻害によりPDHを活性化すると、グルコース酸化速度が増加すると考えられる。その結果、生体のグルコース利用が亢進し、また、肝臓における糖新生が抑制されることで、1型および2型糖尿病における高血糖を改善することができると期待される（例えば、非特許文献10、11、12）。

糖尿病に関与する別の因子はインスリン分泌障害であり、これには膵 β 細胞におけるPDH活性の低下やPDHK1、2および4の誘導が関与することが知られている（例えば、非特許文献13、14）。

また、糖尿病による持続的な高血糖は糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症等の合併症を起こすことが知られている。チアミンや α -リポ酸は補酵素としてPDHの活性化に寄与する。これら、もしくは、チアミン誘導体や α -リポ酸誘導体は糖尿病合併症の治療に有望な効果を有することが示されている。従って、PDHの活性化は、糖尿病合併症を改善することができると期待される（例えば、非特許文献15、16）。

[0007] 虚血状態では、酸素供給が限られるため、グルコースおよび脂肪酸両方の酸化が低下し、組織における酸化的リン酸化によって産生されるATP量が減少する。十分な酸素がない状態では、ATPレベルを維持しようとして嫌氣的解糖が亢進する。その結果、乳酸の増加および細胞内pHの低下が起こる。エネルギーを消費してイオンの恒常性を維持しようとするが、異常に低いATPレベルおよび細胞の浸透性崩壊の結果、細胞死が起こる。加えて、アデノシン-リン酸活性化キナーゼが虚血中に活性化されてリン酸化するこ

とで、アセチルC○Aカルボキシラーゼを不活化する。組織のマロニルC○Aレベルが低下することで、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼーI活性が上昇し、アシルC○Aのミトコンドリア内への輸送が促進されるため、脂肪酸酸化がグルコース酸化よりも有利となる。グルコースの酸化は、脂肪酸の酸化より消費される酸素1分子あたりのATP産生量が高い。よって、虚血状態では、PDHを活性化することによりエネルギー代謝をグルコース酸化優位に移行させると、ATPレベルを維持する能力が高まると考えられる（例えば、非特許文献17）。

また、PDHを活性化すると、解糖を経て生成したピルビン酸が酸化され、乳酸産生が低下するので、虚血組織におけるプロトン負荷の正味の低下が起こると考えられる。従って、PDHK阻害によるPDHの活性化は、虚血性疾患、例えば、心筋虚血において、保護的に作用することが期待される（例えば、非特許文献18、19）。

[0008] PDHK阻害によりPDHを活性化する薬剤は、ピルビン酸代謝を亢進させることにより、乳酸産生を減少させると考えられる。従って、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症または敗血症のような高乳酸血症に対する治療に有用であると考えられる（例えば、非特許文献20）。

[0009] 癌細胞では、PDHK1または2の発現が上昇している。また、癌細胞では、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によるATP産生が低下し、細胞質における嫌氣的解糖系を介したATP産生が増加している。PDHK阻害によりPDHを活性化すると、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化が亢進し、活性酸素の産生が高まることで、癌細胞のアポトーシスが誘導されると期待される。よって、PDHK阻害によるPDHの活性化は癌性疾患治療に有用であると考えられる（例えば、非特許文献21）。

[0010] また、肺高血圧症は肺動脈の細胞増殖が亢進し、肺動脈が部分的に縮小することにより血圧が高くなることを特徴とする疾患である。肺高血圧症における肺動脈細胞のPDHを活性化すると、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化が亢進し、活性酸素の産生が高まることで、肺動脈細胞のアポトーシス

を誘導することが期待される。従って、PDHK阻害によるPDHの活性化は、肺高血圧症に対する治療に有用であると考えられる（例えば、非特許文献22）。

[0011] アルツハイマー病では大脳におけるエネルギー産生及びグルコース代謝が低下し、また、PDH活性が低下している。PDH活性が低下するとアセチルCoAの産生が低下する。アセチルCoAはクエン酸回路を介して電子伝達系でATP産生に利用される。また、アセチルCoAは神経伝達物質の一つであるアセチルコリンを合成する原料である。よって、アルツハイマー病における脳PDH活性の低下は、ATP産生の低下によって神経細胞死を引き起こすと考えられる。また、コリン作動性神経において、その伝達物質であるアセチルコリン合成が抑制され、記憶力の低下等を引き起こすと考えられる。アルツハイマー病において脳のPDHを活性化すると、エネルギー産生及びアセチルコリン合成の亢進が期待される。従って、PDHK阻害によるPDHの活性化は、アルツハイマー病に対する治療に有用であると考えられる（例えば、非特許文献23、24）。

[0012] PDH活性化作用を有する薬剤であるジクロロ酢酸は、糖尿病、心筋虚血、心筋梗塞、狭心症、心不全、高乳酸血症、脳虚血症、脳卒中、末梢動脈疾患、慢性閉塞性肺疾患、癌性疾患、肺高血圧症の治療に有望な効果を有することが示されている（例えば、非特許文献10、18、20、22、25、26、27）。

[0013] これらの知見から、PDHK阻害剤は、グルコース利用障害に関連した疾患、例えば、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病等）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障等）の治療または予防に有益であると考えられる。また、PDHK阻害剤は、組織へのエネルギー基質供給が制限される疾患、例えば、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症および脳卒

中の治療または予防に有益であると考えられる。さらに、P D H K阻害剤はミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症等の治療または予防に有益であると考えられる。

[0014] したがって、P D H K阻害剤は、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病等）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障等）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病の治療または予防に有益であると考えられる。

先行技術文献

非特許文献

[0015] 非特許文献1: Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem.* 1990 Jun 5;265(16):8971-4.

非特許文献2: Patel MS, Roche TE. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 1990 Nov;4(14):3224-33.

非特許文献3: Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 May;284(5):E855-62.

非特許文献4: Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* 1998 Jan 1;329 (Pt 1):191-6.

非特許文献5: Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch r

required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):177-85.

非特許文献6: Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, S hatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3587-93.

非特許文献7: Caterson ID, Fuller SJ, Randle PJ. Effect of the fatty acid oxidation inhibitor 2-tetradecylglycidic acid on pyruvate dehydrogenase complex activity in starved and alloxan-diabetic rats. *Biochem J.* 1982 Oct 15;208(1):53-60.

非特許文献8: Boden G, Chen X, Stein TP. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jan;280(1):E23-30.

非特許文献9: Shangraw RE, Fisher DM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dichloroacetate in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther.* 1999 Oct;66(4):380-90.

非特許文献10: Stacpoole PW, Moore GW, Kornhauser DM. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med.* 1978 Mar 9;298(10):526-30.

非特許文献11: Mayers RM, Leighton B, Kilgour E. PDH kinase inhibitors: a novel therapy for Type II diabetes? *Biochem Soc Trans.* 2005 Apr;33(Pt 2):367-70.

非特許文献12: Jeoung NH, Rahimi Y, Wu P, Lee WN, Harris RA. Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice. *Biochem J.* 2012 May 1;443(3):829-39.

非特許文献13: Zhou YP, Berggren PO, Grill V. A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta-cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes.*

1996 May;45(5):580-6.

非特許文献14 : Xu J, Han J, Epstein PN, Liu YQ. Regulation of PDK mRNA by high fatty acid and glucose in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 9;344(3):827-33.

非特許文献15 : Benfotiamine. Monograph. *Altern Med Rev*. 2006 Sep;11(3):238-42.

非特許文献16 : Vallianou N, Evangelopoulos A, Koutalas P. Alpha-lipoic Acid and diabetic neuropathy. *Rev Diabet Stud*. 2009 Winter;6(4):230-6.

非特許文献17 : Ussher JR, Lopaschuk GD. The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):259-68.

非特許文献18 : Wargovich TJ, MacDonald RG, Hill JA, Feldman RL, Stacpoole PW, Pepine CJ. Myocardial metabolic and hemodynamic effects of dichloroacetate in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1988 Jan 1;61(1):65-70.

非特許文献19 : Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, Pehowich DJ, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Apr;280(4):H1762-9.

非特許文献20 : Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jul;43(7):683-91.

非特許文献21 : Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007 Jan;11(1):37-51.

非特許文献22 : McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimo

to K, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 2004 Oct 15;95(8):830-40.

非特許文献23 : Saxena U. Bioenergetics breakdown in Alzheimer's disease: targets for new therapies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2011;3(2):133-9.

非特許文献24 : Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell.* 2012 Jun;11(3):371-7.

非特許文献25 : Marangos PJ, Turkel CC, Dziewanowska ZE, Fox AW. Dichloroacetate and cerebral ischaemia therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs.* 1999 Apr;8(4):373-82.

非特許文献26 : Calvert LD, Shelley R, Singh SJ, Greenhaff PL, Bankart J, Morgan MD, et al. Dichloroacetate enhances performance and reduces blood lactate during maximal cycle exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 May 15;177(10):1090-4.

非特許文献27 : Flavin DF. Non-Hodgkin's Lymphoma Reversal with Dichloroacetate. *J Oncol.* Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology Volume 2010, Article ID 414726, 4 pages doi:10.1155/2010/414726.

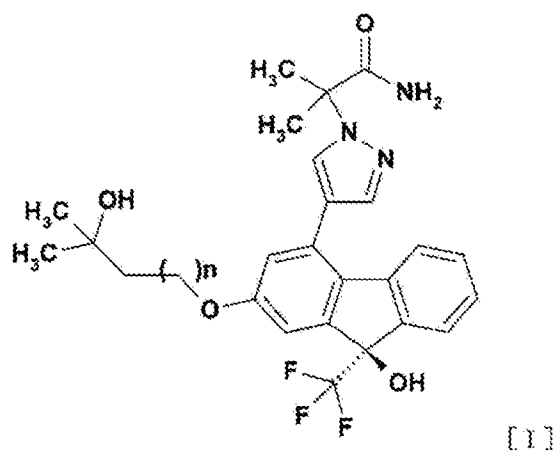
発明の概要

[0016] 本発明は、以下の通りである。

[1] 式 [1] :

[0017]

[化1]

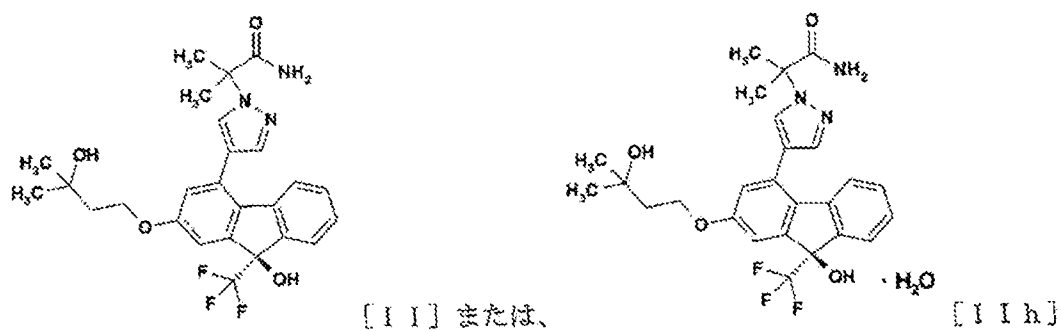


[0018] [式中、nは1または2を示す。]

で表される化合物またはその製薬上許容される塩、

[2] 式：

[0019] [化2]

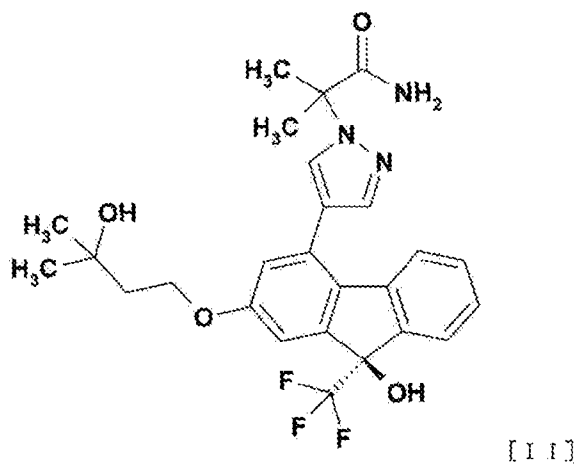


[0020] で表される化合物、

[3] 式 [1 i]：

[0021]

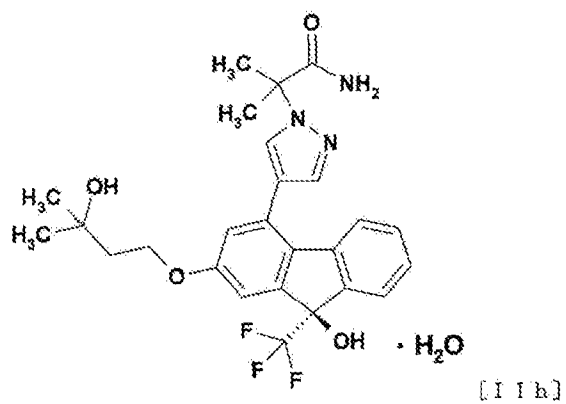
[化3]



[0022] で表される上記 [2] 記載の化合物、

[4] 式 [11h] :

[0023] [化4]

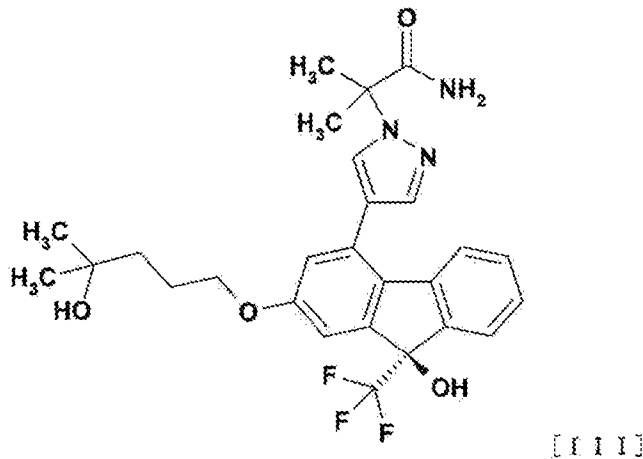


[0024] で表される上記 [2] 記載の化合物、

[5] 式 [11i] :

[0025]

[化5]



[0026] で表される化合物、

[6] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩、および製薬上許容される担体を含む、医薬組成物、

[7] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK阻害剤、

[8] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK1阻害剤、

[9] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK2阻害剤、

[1 0] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、血糖低下剤、

[1 1] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、乳酸低下剤、

[1 2] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、糖尿病、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症、心不全、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌または肺高血圧症の予防または治療剤、

[1 2'] 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、糖尿病、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症、心不全、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病の予防または治療剤、

[1 3] 糖尿病が、1型糖尿病または2型糖尿病である上記 [1 2] 記載の予防または治療剤、

[1 4] 糖尿病合併症が、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症および白内障からなる群から選択される、上記 [1 2] 記載の予防または治療剤、

[1 5] 心不全が、急性心不全または慢性心不全である上記 [1 2] 記載の予防または治療剤、

[1 6] (a) 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩、ならびに

(b) 糖尿病 (1型糖尿病、2型糖尿病)、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症 (糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障)、心不全 (急性心不全、慢性心不全)、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌および肺高血圧症からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも1つの他の薬剤を含有する医薬組成物、

[1 6'] (a) 上記 [1] 乃至 [5] のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩、ならびに

(b) 糖尿病 (1型糖尿病、2型糖尿病)、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症 (糖尿病性神

経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも1つの他の薬剤を含有する医薬組成物、

[17] (a) 上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩、ならびに

(b) 糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌および肺高血圧症からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも1つの他の薬剤を、同時に、別々にまたは連続的に投与する、組み合わせ医薬、

[17'] (a) 上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩、ならびに

(b) 糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも1つの他の薬剤を、同時に、別々にまたは連続的に投与する、組み合わせ医薬、

[18] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれか

に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物におけるPDHK阻害方法、

[19] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物におけるPDHK1阻害方法、

[20] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物におけるPDHK2阻害方法、

[21] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物における糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌または肺高血圧症の予防または治療方法、

[21'] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物における糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症またはアルツハイマー病の予防または治療方法、

[22] 哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該

哺乳動物における血糖値の低下方法、

〔23〕哺乳動物に対し、医薬上有効量の上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩を投与することを含む、当該哺乳動物における乳酸値の低下方法、

〔24〕PDHK阻害剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔25〕PDHK1阻害剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔26〕PDHK2阻害剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔27〕血糖値低下剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔28〕乳酸値低下剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔29〕糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌または肺高血圧症の予防または治療剤を製造するための上記〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔29'〕糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症

、またはアルツハイマー病の予防または治療剤を製造するための上記〔１〕乃至〔５〕のいずれかに記載の化合物またはその製薬上許容される塩の使用、

〔３０〕糖尿病（１型糖尿病、２型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌または肺高血圧症からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも１つの他の薬剤と組み合わせての、上記〔２４〕乃至〔２９〕のいずれかに記載の使用、ならびに

〔３０′〕糖尿病（１型糖尿病、２型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症またはアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の予防または治療に有効な少なくとも１つの他の薬剤と組み合わせての、上記〔２４〕乃至〔２９〕のいずれかに記載の使用等に関する。

発明の効果

〔００２７〕 本発明化合物またはその製薬上許容される塩は、ＰＤＨＫ活性を阻害するので、糖尿病（１型糖尿病、２型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症

、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病等の治療剤または予防剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]図1は、非絶食SD（IGS）ラットにおける被験化合物の肝PDH活性に対する効果（肝total PDH活性に対する肝active PDH活性の百分率）を示す（平均±標準偏差（n=3））。

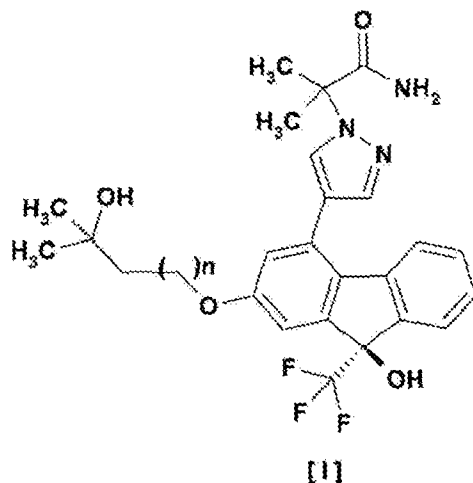
[図2]図2は、非絶食SD（IGS）ラットにおける被験化合物の脂肪組織PDH活性に対する効果（脂肪組織total PDH活性に対する脂肪組織active PDH活性の百分率）を示す（平均±標準偏差（n=3））。

発明を実施するための形態

[0029] 以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明化合物は、一般式〔I〕：

[0030] [化6]



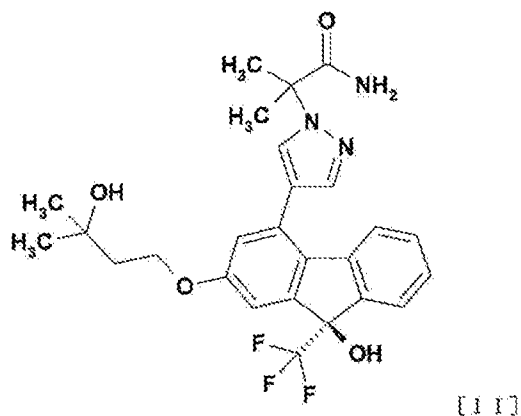
[0031] [式中、nは1または2を示す。]

で表される化合物（以下、化合物（1）ともいう）またはその製薬上許容される塩である。

[0032] 本発明化合物は、式〔II〕：

[0033]

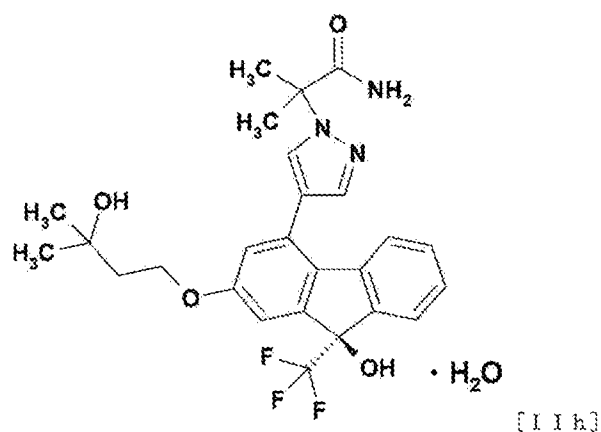
[化7]



[0034] で表される化合物（2－{4－[（9R）－9－ヒドロキシ－2－（3－ヒドロキシ－3－メチルブチルオキシ）－9－（トリフルオロメチル）－9H－フルオレン－4－イル]－1H－ピラゾール－1－イル}－2－メチルプロパンアミド）（以下、化合物（2）ともいう）である。

本発明化合物は、式 [11h]：

[0035] [化8]

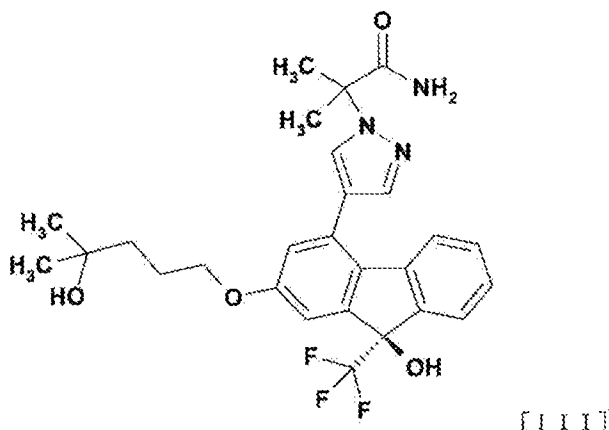


[0036] で表される化合物（2－{4－[（9R）－9－ヒドロキシ－2－（3－ヒドロキシ－3－メチルブチルオキシ）－9－（トリフルオロメチル）－9H－フルオレン－4－イル]－1H－ピラゾール－1－イル}－2－メチルプロパンアミド・1水和物）（以下、化合物（2h）ともいう）である。

[0037] 本発明化合物は、式 [11i]：

[0038]

[化9]



[0039] で表される化合物（2－{4－〔（9R）－9－ヒドロキシ－2－（4－ヒドロキシ－4－メチルペンチルオキシ）－9－（トリフルオロメチル）－9H－フルオレン－4－イル〕－1H－ピラゾール－1－イル}－2－メチルプロパンアミド）（以下、化合物（3）ともいう）である。

[0040] 本発明化合物の製薬上許容される塩とは、本発明化合物と無毒の塩を形成するものであればいかなる塩でもよく、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0041] 無機酸との塩として、例えば、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸、臭化水素酸等との塩が挙げられる。

有機酸との塩として、例えば、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸、フマル酸、乳酸、リンゴ酸、コハク酸、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、グルコン酸、アスコルビン酸、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等との塩が挙げられる。

アミノ酸との塩として、例えば、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。

本発明化合物の製薬上許容される塩として、好ましくは、無機酸との塩である。

[0042] また、本発明化合物またはその製薬上許容される塩は、同位元素（例えば、 ^3H 、 ^2H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 等）で標識されていてもよい。

[0043] 本発明化合物またはその製薬上許容される塩としては、実質的に精製され

た、化合物（１）またはその製薬上許容される塩が好ましい。さらに好ましくは、８０％以上の純度に精製された、本発明化合物またはその製薬上許容される塩である。

[0044] 一般式〔１〕で表される化合物又はその製薬上許容される塩は溶媒和物として存在することもある。「溶媒和物」とは、一般式〔１〕で表される化合物又はその医薬上許容される塩に、溶媒の分子が配位したものであり、水和物も包含される。溶媒和物は、製薬上許容される溶媒和物が好ましい。例えば、一般式〔１〕で表される化合物又はその医薬上許容される塩の水和物、エタノール和物、ジメチルスルホキシド和物等が挙げられる。具体的には、一般式〔１〕で表される化合物の半水和物、１水和物、２水和物又は１エタノール和物、或いは一般式〔１〕で表される化合物の製薬上許容される塩の１水和物又は２塩酸塩の２／３エタノール和物等が挙げられる。公知の方法に従って、その溶媒和物を得ることができる。

[0045] 「医薬組成物」としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の経口剤、あるいは外用剤、坐剤、注射剤、点眼剤、経鼻剤、経肺剤等の非経口剤が挙げられる。

[0046] 本発明の医薬組成物は、医薬製剤の技術分野において自体公知の方法に従って、本発明化合物またはその製薬上許容される塩を、少なくとも１種以上の製薬上許容される担体等と、適宜、適量混合等することによって、製造される。該医薬組成物中の本発明化合物またはその製薬上許容される塩の含有率は、剤形、投与量等により異なるが、例えば、組成物全体の０．１から１００重量％である。

[0047] 該「製薬上許容される担体」としては、製剤素材として慣用の各種有機または無機担体物質が挙げられ、例えば、固形製剤における賦形剤、崩壊剤、結合剤、流動化剤、滑沢剤等、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。さらに必要に応じて、保存剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の添加物が用いられる。

[0048] 「賦形剤」としては、例えば、乳糖、白糖、Ｄ－マンニトール、Ｄ－ソル

ビトール、トウモロコシデンプン、デキストリン、微結晶セルロース、結晶セルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、アラビアゴム等が挙げられる。

[0049] 「崩壊剤」としては、例えば、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、結晶セルロース等が挙げられる。

[0050] 「結合剤」としては、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポビドン、結晶セルロース、白糖、デキストリン、デンプン、ゼラチン、カルメロースナトリウム、アラビアゴム等が挙げられる。

[0051] 「流動化剤」としては、例えば、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム等が挙げられる。

[0052] 「滑沢剤」としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク等が挙げられる。

[0053] 「溶剤」としては、例えば、精製水、エタノール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

[0054] 「溶解補助剤」としては、例えば、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

[0055] 「懸濁化剤」としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、カルメロース、ヒドロキシプロピルセルロース、プロピレングリコール、ポビドン、メチルセルロース、モノステアリン酸グリセリン等が挙げられる。

[0056] 「等張化剤」としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、D-マンニトール等が挙げられる。

[0057] 「緩衝剤」としては、例えば、リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、

炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

[0058] 「無痛化剤」としては、例えば、ベンジルアルコール等が挙げられる。

[0059] 「保存剤」としては、例えば、パラオキシ安息香酸エチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、デヒドロ酢酸ナトリウム、ソルビン酸等が挙げられる。

[0060] 「抗酸化剤」としては、例えば、亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸等が挙げられる。

[0061] 「着色剤」としては、例えば、食用色素（例：食用赤色 2 号もしくは 3 号、食用黄色 4 号もしくは 5 号等）、 β -カロテン等が挙げられる。

[0062] 「甘味剤」としては、例えば、サッカリンナトリウム、グリチルリチン酸二カリウム、アスパルテーム等が挙げられる。

[0063] 本発明の医薬組成物は、ヒトはもちろんのこと、ヒト以外の哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル等）に対しても、経口的または非経口的（例：局所、筋肉内、皮下、直腸、静脈投与等）に投与することができる。投与量は、投与対象、疾患、症状、剤形、投与ルート等により異なるが、例えば、成人の患者（体重：約 60 kg）に経口投与する場合の投与量は、有効成分である化合物（1）として、1 日あたり、通常約 1 mg から 1 g の範囲である。これらの量を 1 回から数回に分けて投与することができる。

[0064] 本発明化合物またはその製薬上許容される塩は、PDHK（PDHK 1 および／または PDHK 2）を阻害する活性を有するので、グルコース利用障害に関連した疾患、例えば、糖尿病（1 型糖尿病、2 型糖尿病等）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障等）の治療または予防に有益であると考えられる。また、PDHK 阻害剤は、組織へのエネルギー基質供給が制限される疾患、例えば、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚

血症および脳卒中の治療または予防に有益であると考えられる。さらに、PDHK阻害剤はミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、アルツハイマー病等の治療または予防に有益であると考えられる。

[0065] 糖尿病とは、例えば、1型糖尿病、2型糖尿病である。

[0066] 糖尿病合併症としては、例えば、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障が挙げられる。

[0067] 心不全とは、例えば、急性心不全、慢性心不全である。

[0068] 「PDHKを阻害する」とは、PDHKの機能を阻害してその活性を消失もしくは減弱することを意味する。「PDHKを阻害する」として、好ましくは、「ヒトPDHKを阻害する」である。「PDHK阻害剤」として、好ましくは、「ヒトPDHK阻害剤」である。

[0069] 「PDHK1を阻害する」とは、PDHK1の機能を阻害してその活性を消失もしくは減弱することを意味し、例えば、後述する試験例1の条件に基づいて、PDHK1の機能を阻害することを意味する。「PDHK1を阻害する」として、好ましくは、「ヒトPDHK1を阻害する」である。「PDHK1阻害剤」として、好ましくは、「ヒトPDHK1阻害剤」である。さらに好ましくは、「ヒト標的臓器におけるPDHK1阻害剤」である。

[0070] 「PDHK2を阻害する」とは、PDHK2の機能を阻害してその活性を消失もしくは減弱することを意味し、例えば、後述する試験例1の条件に基づいて、PDHK2の機能を阻害することを意味する。「PDHK2を阻害する」として、好ましくは、「ヒトPDHK2を阻害する」である。「PDHK2阻害剤」として、好ましくは、「ヒトPDHK2阻害剤」である。さらに好ましくは、「ヒト標的臓器におけるPDHK2阻害剤」である。

[0071] 「PDHを活性化する」とは、標的臓器（例、肝臓、骨格筋、脂肪組織、心臓、脳）等または癌等のPDHを活性化することを意味する。

[0072] 「血糖値を低下させる」とは、血中（血清中または血漿中を含む）のグルコース濃度を低下させることを意味し、好ましくは高い血糖値を低下させることを意味する。さらに好ましくは、血糖値を、治療学的に有効なヒトの正

常値に低下させることを意味する。

[0073] 「乳酸値を低下させる」とは、血中（血清中または血漿中を含む）の乳酸濃度を低下させることを意味し、好ましくは高い乳酸値を低下させることを意味する。さらに好ましくは、乳酸値を、治療学的に有効なヒトの正常値に低下させることを意味する。

[0074] 本発明化合物またはその製薬上許容される塩を、医薬分野で行われている一般的な方法で、1または複数の他の薬剤（以下、併用薬剤ともいう）と組み合わせ使用（以下、併用ともいう）することができる。

[0075] 本発明化合物またはその製薬上許容される塩、および併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、配合剤として投与してもよいし、両薬剤を同時にまたは一定の間隔をおいて投与してもよい。また、本発明の医薬組成物および併用薬剤とからなるキットであることを特徴とする医薬として用いてもよい。併用薬剤の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、疾患、症状、剤形、投与ルート、投与時間、組み合わせ等により適宜選択することができる。併用薬剤の投与形態は、特に限定されず、本発明化合物またはその製薬上許容される塩と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。

[0076] 併用薬剤としては、例えば、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病の治療剤および／または予防剤等が挙げられ、これらのうち1剤から複数剤と本発明化合物またはその製薬上許容される塩とを組み合わせ使用することができる。

[0077] 「糖尿病の治療剤および／または予防剤」としては、例えば、インスリン製剤、スルホニルウレア系血糖降下剤、メトフォルミン、DPP-4阻害剤

、インスリン抵抗性改善薬（例えばチアゾリジン誘導体）、GLP-1受容体作動薬等が挙げられる。

実施例

[0078] 次に、本発明化合物またはその製薬上許容される塩の製造方法を実施例によって具体的に説明する。しかしながら、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

本製法に記載はなくとも、必要に応じて官能基に保護基を導入し、後工程で脱保護を行う；官能基を前駆体として各工程に処し、しかるべき段階で所望の官能基に変換する；各製法および工程の順序を入れ替える等の工夫により効率のよい製造を実施してもよい。

また、各工程において、反応後の処理は、通常行われる方法で行えばよく、単離精製は、必要に応じて、結晶化、再結晶、蒸留、分液、シリカゲルクロマトグラフィー、分取HPLC等の慣用される方法を適宜選択し、また組み合わせで行えばよい。全ての試薬および溶媒は、市販用の品質を備えており、精製することなく使用した。

[0079] 百分率%は重量%を示す。その他の本文中で用いられている略号は下記の意味を示す。

s : シングレット

d : ダブレット

t : トリプレット

q : カルテット

m : マルチプレット

br : ブロード

dd : ダブルダブレット

td : トリプルダブレット

ddd : ダブルダブルダブレット

J : カップリング定数

CDCl₃ : 重クロロホルム

DMSO-D₆ : 重ジメチルスルホキシド

¹H NMR : プロトン核磁気共鳴

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

DPPA : ジフェニルリン酸アジド

¹H-NMRスペクトルはCDCl₃またはDMSO-D₆中、テトラメチルシランを内部標準として測定し、全 δ 値をppmで示した。

[0080] (10mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0))

リン酸二水素ナトリウム (3.60g) を水 (3000ml) に溶解し、リン酸を用いてpHを2.0にすることで、標題緩衝液を得た。

[0081] HPLC分析条件

分析条件1

測定機器 : HPLCシステム 島津製作所 高速液体クロマトグラフ Prominence

カラム : ダイセル CHIRALCEL OD-3R 4.6mm ϕ ×150mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : (A液) 10mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0)、(B液) アセトニトリル

移動相の組成 (A液 : B液) を50 : 50から20 : 80まで20分間かけて直線的に変化させ、その後、20 : 80で5分間保持した。

流速 : 0.5ml/min

検出 : UV (220nm)

[0082] 分析条件2

測定機器 : HPLCシステム 島津製作所 高速液体クロマトグラフ Prominence

カラム : ダイセル CHIRALCEL OJ-RH 4.6mm ϕ ×150mm

カラム温度 : 40°C

移動相：（A液）10 mM リン酸塩緩衝液（pH 2.0）、（B液）アセトニトリル

移動相の組成（A液：B液）を70：30から40：60まで20分間かけて直線的に変化させ、その後、40：60で10分間保持した。

流速：0.5 ml/min

検出：UV（220 nm）

[0083] 分析条件3

測定機器：HPLCシステム 島津製作所 高速液体クロマトグラフ Prominence

カラム：ダイセル CHIRALPAK AD-3R 4.6 mm ϕ $\times$ 150 mm

カラム温度：40℃

移動相：（A液）10 mM リン酸塩緩衝液（pH 2.0）、（B液）アセトニトリル

移動相の組成（A液：B液）を50：50から20：80まで20分間かけて直線的に変化させ、その後、20：80で5分間保持した。

流速：0.5 ml/min

検出：UV（220 nm）

[0084] 実施例1

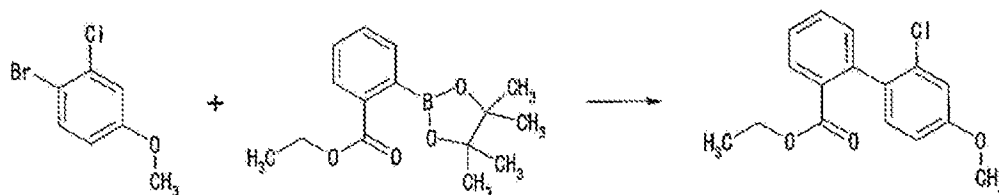
2- {4- [(9R)-9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9- (トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル]-1H-ピラゾール-1-イル}-2-メチルプロパンアミド（化合物（2））の合成

[0085] 工程1

2'-クロロ-4'-メトキシビフェニル-2-カルボン酸エチル

[0086]

[化10]



[0087] アルゴン雰囲気下、1-ブromo-2-クロロ-4-メトキシベンゼン（44.3 g）をトルエン（220 ml）に溶解し、2-（4,4,5,5-テトラメチル[1,3,2]ジオキサボロラン-2-イル）安息香酸エチル（60.8 g）、水（132 ml）、炭酸水素ナトリウム（33.6 g）およびジクロロビス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（II）（2.8 g）を加えた後、油浴温度120℃で7時間撹拌した。反応混合物に2-（4,4,5,5-テトラメチル[1,3,2]ジオキサボロラン-2-イル）安息香酸エチル（5.2 g）を追加し、さらに2時間撹拌した。反応混合物を室温まで冷却し、トルエン（100 ml）および水（200 ml）を加え、一晩撹拌した。反応混合物に活性炭（3 g）を加え、さらに1時間撹拌した。不溶物をセライトでろ去し、ろ過物をトルエン（100 ml）および水（200 ml）で洗浄した。得られたろ液を合わせて分層した。得られた有機層を水（100 ml）で洗浄した後、溶媒を留去して、標題化合物（67.7 g）を得た。

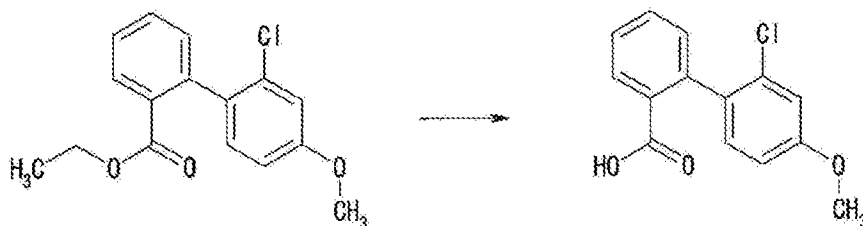
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 7.88–7.86 (1H, m), 7.63 (1H, td, $J = 7.6, 1.4$ Hz), 7.51 (1H, td, $J = 7.6, 1.4$ Hz), 7.27 (1H, dd, $J = 7.6, 0.9$ Hz), 7.18 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 6.95 (1H, dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz), 4.01 (2H, m), 3.80 (3H, s), 0.96 (3H, t, $J = 7.1$ Hz).

[0088] 工程2

2'-クロロ-4'-メトキシビフェニル-2-カルボン酸

[0089]

[化11]



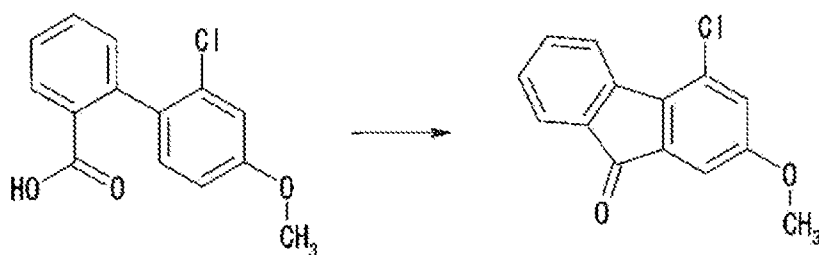
[0090] 2'-クロロ-4'-メトキシビフェニル-2-カルボン酸エチル (6.7 g) をエタノール (100 ml) に溶解し、4 N水酸化ナトリウム水溶液 (100 ml) を加え、油浴温度 110℃ で 4.5 時間撹拌した。反応混合物を室温まで冷却し、水 (200 ml) およびトルエン (100 ml) を加えて一晩撹拌した。反応混合物に活性炭 (3.6 g) を加え、さらに 1 時間撹拌した。不溶物をセライトろ去し、ろ過物をトルエン (30 ml) および水 (300 ml) で洗浄した。得られたろ液を合わせて分層した。得られた水層をトルエン (100 ml) で洗浄した後、水層に濃塩酸 (40 ml) を加えて酸性にし、室温で 1 時間撹拌した。析出した固体をろ取した。得られた固体を 3 時間風乾した後、60℃ で一晩減圧乾燥して、標題化合物 (50.2 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 12.57 (1H, s), 7.90–7.88 (1H, m), 7.60 (1H, td, $J = 7.6, 1.3$ Hz), 7.49 (1H, td, $J = 7.6, 1.3$ Hz), 7.24 (1H, dd, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.19 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.95 (1H, dd, $J = 8.5, 2.4$ Hz), 3.81 (3H, s).

[0091] 工程 3

4-クロロ-2-メトキシ-9H-フルオレン-9-オン

[0092] [化12]



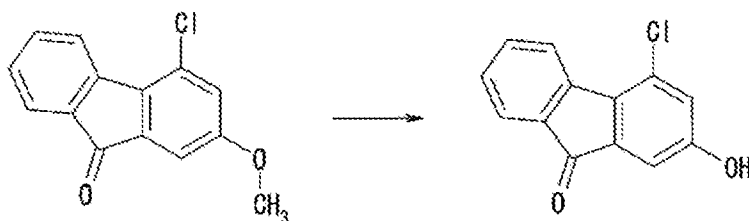
[0093] アルゴン雰囲気下、2'-クロロ-4'-メトキシビフェニル-2-カルボン酸 (65.4 g) に Eaton 試薬 (五酸化リン-メタンスルホン酸 (重量比 1 : 10) 溶液) (330 ml) を加え、油浴温度 100℃ で 1 時間撹拌した。反応混合物を氷冷し、水 (650 ml) をゆっくり滴下した後、室温で 1 時間撹拌した。析出した固体をろ取し、水 (500 ml) で洗浄した。得られた固体を一晩風乾して、標題化合物を (92.0 g) を得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-D₆) δ : 8.01 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.64-7.60 (2H, m), 7.36 (1H, td, J = 7.4, 0.9 Hz), 7.17 (2H, dd, J = 8.4, 2.3 Hz), 3.85 (3H, s).

[0094] 工程 4

4-クロロ-2-ヒドロキシ-9H-フルオレン-9-オン

[0095] [化13]



[0096] アルゴン雰囲気下、4-クロロ-2-メトキシ-9H-フルオレン-9-オン (92.0 g) に N-メチルピロリドン (120 ml) およびピリジン塩酸塩 (144 g) を加えた。反応混合物をディーン・スターク装置で水を留去しながら、油浴温度 200℃ で 3 時間撹拌した。反応混合物を 90℃ まで冷却した後、水 (600 ml) を滴下し、室温で 2 時間撹拌した。析出した固体をろ取し、ろ過物を水 (400 ml) で洗浄した。得られた固体を 3 日間風乾後、ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (ヘキサン : 酢酸エチル 1 : 1、300 ml) を加え室温で 1 時間撹拌した。固体をろ取し、ろ過物をヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1、500 ml) で洗浄した。得られた固体を 50℃ で 3 時間減圧乾燥して、標題化合物 (48.6 g) を得た。

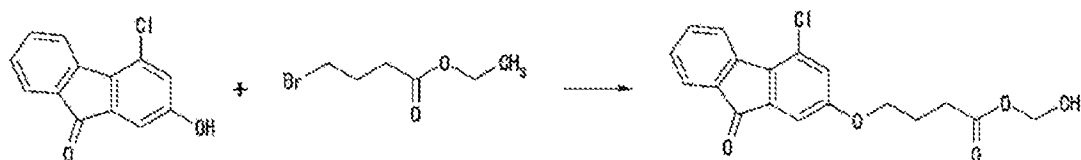
¹H-NMR (400MHz, DMSO-D₆) δ : 10.56 (1H, s), 7.96 (1H, d, J = 8.4 Hz),

7.61-7.57 (2H, m), 7.32 (1H, td, $J = 7.4, 0.9$ Hz), 6.97 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 2.2$ Hz).

[0097] 工程 5

4-(4-クロロ-9-オキソ-9H-フルオレン-2-イルオキシ) 酪酸エチル

[0098] [化14]



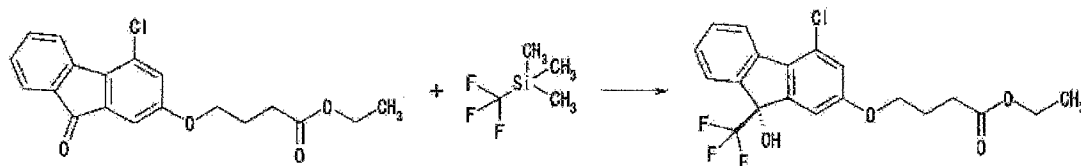
[0099] 4-クロロ-2-ヒドロキシ-9H-フルオレン-9-オン (48.6 g) を、N, N-ジメチルホルムアミド (150 ml) に溶解し、炭酸カリウム (58.3 g) および4-ブromo酪酸エチル (33.5 ml) を加え、60℃で2時間攪拌した。反応混合物を40℃まで冷却し、トルエン (300 ml) および水 (300 ml) を加え、分層した。得られた水層をトルエン (100 ml) で再抽出した。得られた有機層を合わせて、水 (100 ml) で2回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムおよび活性炭 (2.5 g) を加え、室温で5分間攪拌した。不溶物をセライトろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣にヘキサン (220 ml) を加え、50℃で10分間、室温で1時間攪拌した。析出した固体をろ取し、ろ過物をヘキサンで洗浄した。得られた固体を減圧乾燥して、標題化合物 (66.9 g) を得た。また、得られたろ液は溶媒を留去し、残渣に酢酸エチル (5 ml) およびヘキサン (20 ml) を加えて、室温で1時間攪拌した。析出した固体をろ取し、ろ過物をヘキサンで洗浄した。得られた固体を減圧乾燥して、標題化合物 (2.5 g) をさらに得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.01 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.65-7.61 (2H, m), 7.37 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.17-7.14 (2H, m), 4.13-4.05 (4H, m), 2.47 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.02-1.95 (2H, m), 1.19 (3H, td, $J = 7.2, 0.7$ Hz).

[0100] 工程 6

4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ] 酪酸エチル

[0101] [化15]



[0102] アルゴン雰囲気下、4-(4-クロロ-9-オキシ-9H-フルオレン-2-イルオキシ) 酪酸エチル (69.4 g) を THF (700 ml) に溶解し、N-(4-tert-ブチルベンジル) シンコニジウム 4-メトキシフェノキシド (6.4 g) を加えた。反応混合物に -16℃ でトリメチル(トリフルオロメチル) シラン (52.0 ml) の THF (140 ml) 溶液を滴下し、同温で 15 分間攪拌した。反応混合液に酢酸 (23.0 ml) および 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド / THF 溶液 (222 ml) を順次加えた後、室温で 1 時間攪拌した。反応混合液の溶媒を留去し、得られた残渣にトルエン (500 ml) および飽和重曹水 (200 ml) を加え、分層した。得られた有機層を飽和重曹水 (150 ml) で 2 回、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (100 ml)、水 (100 ml)、1 N 塩酸 (100 ml)、水 (100 ml)、飽和食塩水 (100 ml) で順次洗浄した。得られた有機層に無水硫酸マグネシウムおよびシリカゲル (150 g) を加え、10 分間攪拌した。不溶物をろ去し、ろ過物をトルエン (300 ml) および酢酸エチル (800 ml) で順次洗浄した。得られたろ液とトルエン洗浄液を合わせて溶媒を留去し、標題化合物 (72.1 g) を得た。また、酢酸エチル洗浄液の溶媒を留去し、得られた残渣にシリカゲル (40 g) ならびに、ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (酢酸エチル : ヘキサン 2 : 1、300 ml) を加え、室温で攪拌した。不溶物をろ去し、ろ過物をヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1、300 ml) で洗浄した。得られたろ液の溶媒を留去して標題化合物 (20.3 g) をさら

に得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.14 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.53 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.42–7.38 (2H, m), 7.14 (2H, s), 4.11–4.05 (4H, m), 2.47 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.03–1.96 (2H, m), 1.19 (3H, td, $J = 7.1, 0.8$ Hz).

[0103] (絶対立体配置について)

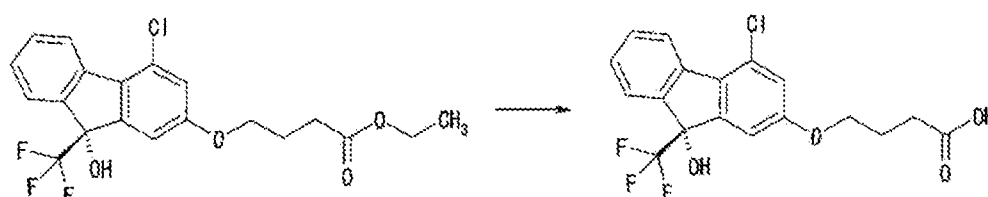
後述する工程10において4-クロロ-2-メチル-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール¹の絶対立体配置を同定したことにより、本工程で得られた標題化合物は(R)体であることが確認された。光学純度は52.9% e. e. であった。

光学純度は、HPLC分析条件1にて決定した。(S)体の保持時間19.6分、(R)体の保持時間23.0分。

[0104] 工程7

4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸

[0105] [化16]



[0106] 4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸エチル (92.2 g) をエタノール (100 ml) に溶解し、4 N水酸化ナトリウム水溶液 (100 ml) を加え、80℃で一晩攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、水 (200 ml) を加え、トルエン (100 ml) で2回洗浄した。得られた水層を濃塩酸 (40 ml) で中和し、酢酸エチル (300 ml) で2回抽出した。得られた酢酸エチル抽出液を水 (100 ml) で2回、飽和食塩水 (100 ml) で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムおよび活性炭 (4.

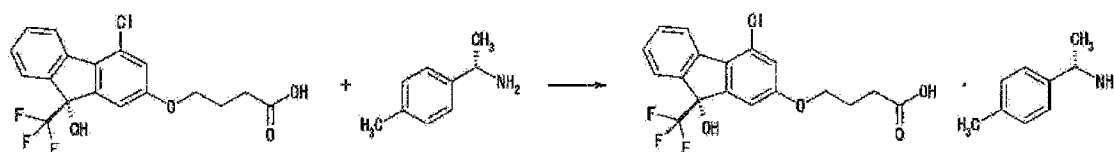
2 g) を加え、室温で 10 分間攪拌した。不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣にクロロホルム (80 ml) を加え、50℃ に加熱した後、ヘキサン (400 ml) を滴下し、同温で 30 分間、室温で 2 時間攪拌した。析出した固体をろ取し、ヘキサンとクロロホルムの混合溶媒 (ヘキサン : クロロホルム = 9 : 1、50 ml) で洗浄した後、80℃ で 2 時間減圧乾燥して、標題化合物 (72.5 g) を得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-D₆) δ : 12.17 (1H, br s), 8.14 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.66 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.54 (1H, td, J = 7.7, 1.2 Hz), 7.42–7.30 (2H, m), 7.18–7.15 (2H, m), 4.09 (2H, t, J = 6.4 Hz), 2.41 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.00–1.93 (2H, m).

[0107] 工程 8

4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸の(1S)-1-(4-メチルフェニル)エチルアミンの塩

[0108] [化17]



[0109] 窒素雰囲気下、(1S)-1-(4-メチルフェニル)エチルアミン (19.5 g) を酢酸エチル (720 ml) に溶解し、4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸 (72.5 g) を加えた。反応混合物を 60℃ で 2 時間、室温で一晩攪拌した。析出した固体をろ取し、ろ過物を酢酸エチル (1000 ml) で洗浄した。得られた固体を 60℃ で 5 時間減圧乾燥して、標題化合物 (68.6 g) を得た。一方、ろ液から 4-[(9S)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸を得ることができた。

[0110] (光学純度について)

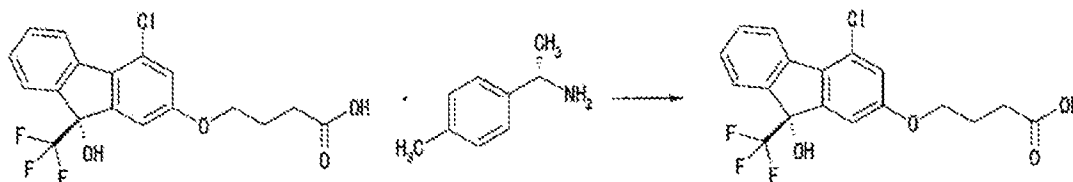
4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸の光学純度は、HPLC分析条件1にて決定した(光学純度90.2% e. e.)。(R)体の保持時間12.9分、(S)体の保持時間10.4分。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.14 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.53 (1H, td, $J = 7.6, 1.1$ Hz), 7.40 (1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.26 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.16-7.10 (4H, m), 4.08 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.01 (1H, q, $J = 6.7$ Hz), 2.32 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.26 (3H, s), 1.98-1.91 (2H, m), 1.26 (3H, d, $J = 6.7$ Hz).

[0111] 工程9

4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸

[0112] [化18]



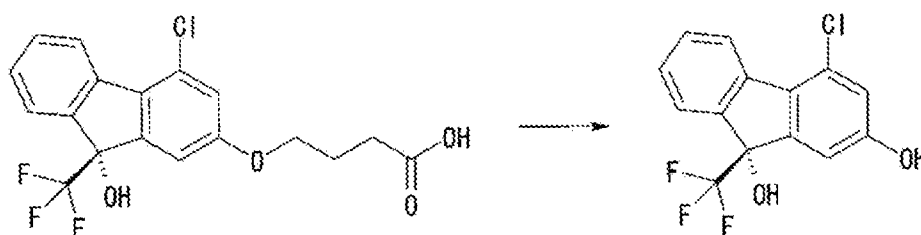
[0113] 4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸と(1S)-1-(4-メチルフェニル)エチルアミンの塩(68.6g)に酢酸エチル(500ml)、2N塩酸(300ml)を加え、室温で10分撹拌した。この混合液を分層した。得られた有機層を水(250ml)、飽和食塩水(200ml)で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去して、標題化合物(60.0g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 12.17 (1H, br s), 8.14 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.54 (1H, td, $J = 7.7, 1.2$ Hz), 7.42-7.30 (2H, m), 7.18-7.15 (2H, m), 4.09 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.41 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.00-1.93 (2H, m).

[0114] 工程10

(9R)-4-クロロ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2,9-ジオール

[0115] [化19]



[0116] 4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ]酪酸(50g)に、N-メチルピロリドン(200ml)とピリジン塩酸塩(298g)を加え、油浴温度200℃で2日間攪拌した。反応混合液を室温まで冷却した後、酢酸エチル(500ml)で希釈し、水で2回洗浄した。得られた水層を酢酸エチル(300ml)で再抽出し、先に得られた有機層と合わせて、水、1N塩酸、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層に無水硫酸マグネシウムおよび活性炭(10g)を加え、室温で攪拌した後、不溶物をセライトろ去した。得られた有機層の溶媒を留去し、残渣にヘキサンを加え、室温で攪拌した。析出した固体をろ取し、室温で減圧乾燥した。得られた粗生成物を酢酸エチル(500ml)に溶解し、水で3回洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。残渣にヘキサンを加え、室温で攪拌した。析出した固体をろ取し、室温で減圧乾燥して、標題化合物(22.4g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 10.37 (1H, br s), 8.09 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.63 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.50 (1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.36 (1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.32 (1H, br s), 7.06 (1H, s), 6.91 (1H, br d, $J = 2.0$ Hz).

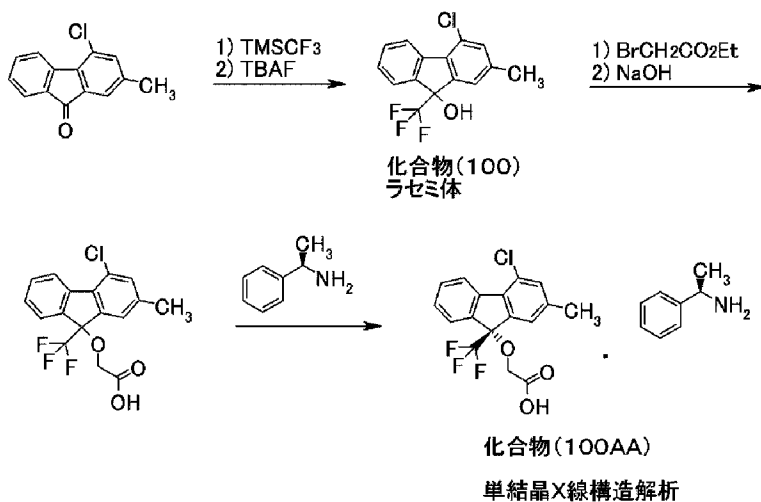
[0117] (絶対立体配置について)

標題化合物の絶対立体配置は、下記の工程(工程A-1から工程A-2および工程B-1)により調製した化合物(100A)と化合物(100B)

の光学活性カラムを用いたHPLC分析によって決定した。

[0118] 工程A-1

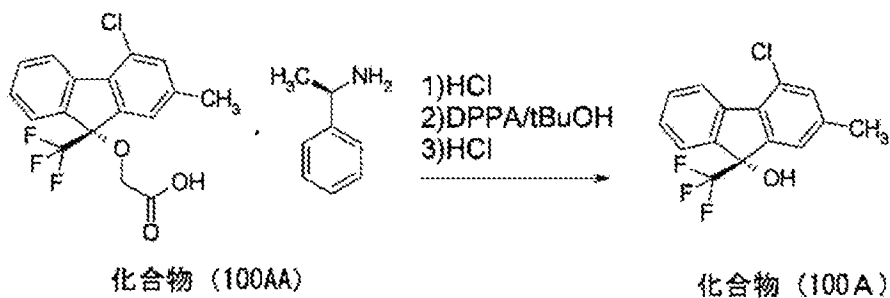
[0119] [化20]



[0120] 4-クロロ-2-メチル-9H-フルオレン-9-オンに対して、トリフルオロメチル化、ブromo酢酸エチルとの反応、および加水分解を行い、[4-クロロ-2-メチル-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-イルオキシ]酢酸を得た。この化合物を(1R)-1-フェニルエチルアミンを用いて光学分割し、得られた(1R)-1-フェニルエチルアミンの塩(100AA)を単結晶X線構造解析により、絶対立体配置を(R)と決定した。

[0121] 工程A-2

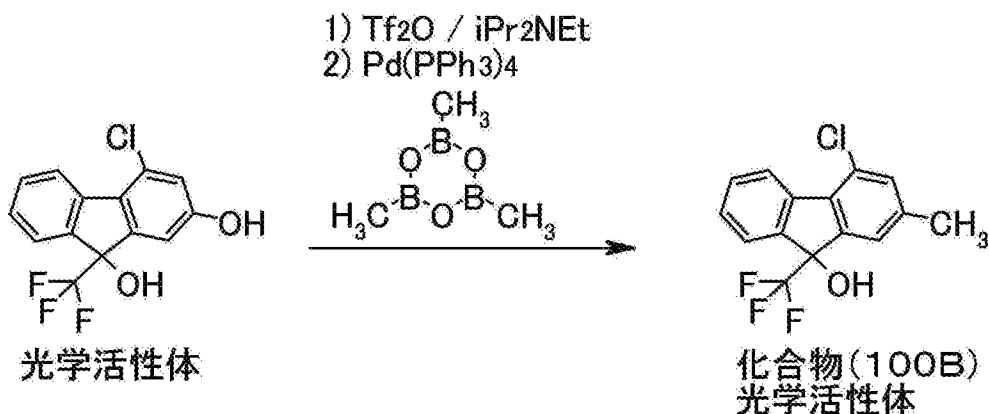
[0122] [化21]



[0123] 化合物100AAから酸処理等により、(9R)-4-クロロ-2-メチル-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール(化合物(100A))を合成した。

[0124] 工程 B - 1

[0125] [化22]



[0126] 工程 10 で得られた 4-クロロ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2,9-ジオールの 2 位水酸基を、上記の方法によりメチル基に変換し、4-クロロ-2-メチル-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール (化合物 (100B)) を得た。

[0127] (光学活性カラムを用いた HPLC 分析)

化合物 (100) の両対掌体は、光学活性カラムを用いた HPLC で分離することができた (HPLC 分析条件 3)。化合物 100A の HPLC 分析結果から、(R) 体の保持時間 18.4 分、(S) 体の保持時間 17.0 分であることが明らかとなった。この HPLC 条件により、化合物 (100A) と化合物 (100B) を分析したところ、保持時間が一致した。

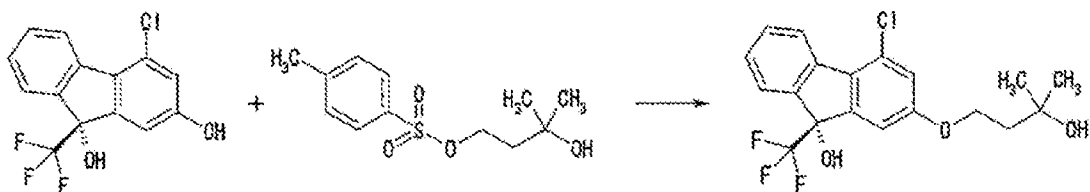
上記化合物 (100A) および化合物 (100B) の製造の際に、不斉炭素の立体配置の変換は起こらないと考えられる。この結果から、工程 10 で得られた 4-クロロ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2,9-ジオールは (R) の絶対立体配置を持つことが確認された。

[0128] 工程 11

(9R)-4-クロロ-2-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール

[0129]

[化23]



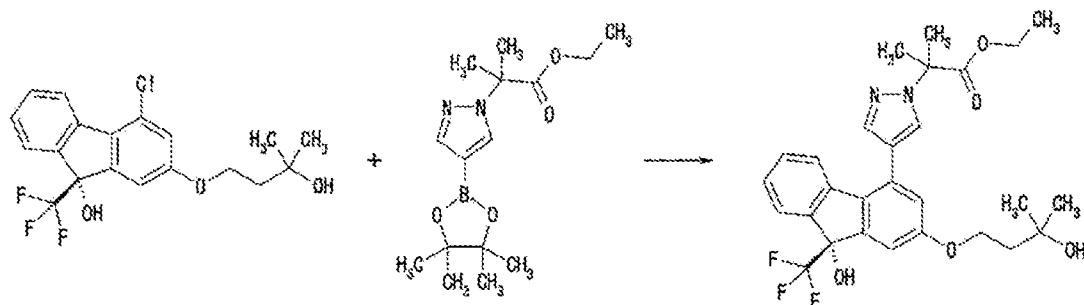
[0130] 窒素雰囲気下、(9R)-4-クロロ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2,9-ジオール(55.5g)をN,N-ジメチルホルムアミド(550ml)に溶解し、トルエン-4-スルホン酸 3-ヒドロキシ-3-メチルブチルエステル(49.6g)と炭酸カリウム(39.5g)を加え、油浴温度70℃で一晩撹拌した。反応混合液にトルエン-4-スルホン酸 3-ヒドロキシ-3-メチルブチルエステル(4.0g)のN,N-ジメチルホルムアミド(5ml)溶液を追加し、同温でさらに9.5時間撹拌した。反応混合液を氷冷後、水(800ml)を加え、酢酸エチル(900ml)で抽出した。得られた有機層を水(500ml)で3回、飽和食塩水(500ml)で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒としてヘキサンと酢酸エチルの混合液を用いた。まず混合比3:1(ヘキサン:酢酸エチル)の混合液を溶出した。ついで混合比2:1の混合液で溶出し、さらに混合比3:2の混合液で溶出した。)で精製して、標題化合物(49.5g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.12 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.64 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.52 (1H, td, $J = 7.6, 0.9$ Hz), 7.40-7.36 (2H, m), 7.15-7.13 (2H, m), 4.41 (1H, s), 4.16 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.85 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.17 (6H, s).

[0131] 工程12

2-{4-[(9R)-9-ヒドロキシ-2-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル]-1H-ピラゾール-1-イル}-2-メチルプロピオン酸エチル

[0132] [化24]



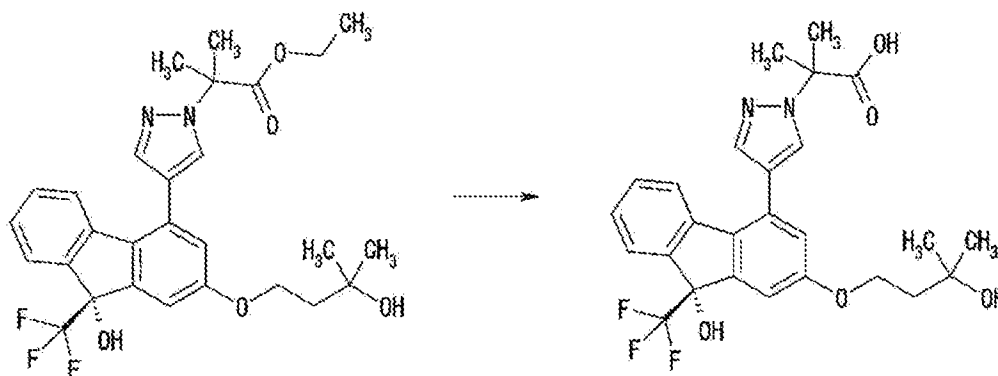
[0133] アルゴン雰囲気下、(9R)-4-クロロ-2-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール (49.5 g) をトルエン (445 ml) に溶解し、2-メチル-2-[4-(4,4,5,5-テトラメチル[1,3,2]ジオキサボロラン-2-イル)-1H-ピラゾール-1-イル]プロピオン酸エチル (59.2 g)、水 (149 ml)、リン酸三カリウム (54.3 g)、酢酸パラジウム (2.9 g) および2-ジシクロヘキシルフォスフィノ-2',6'-ジメトキシビフェニル (SPhos) (10.5 g) を加え、油浴温度 100℃で3.5時間撹拌した。反応混合液を室温まで冷却し、水 (300 ml) を加えた後、不溶物をセライトろ去し、トルエン (150 ml) および水 (50 ml) で洗浄した。得られたろ液を合わせて分層した。得られた有機層を水 (500 ml)、飽和食塩水 (500 ml) で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒としてヘキサンと酢酸エチルの混合液を用いた。まず混合比2:1 (ヘキサン:酢酸エチル) の混合液を溶出した。ついで混合比1:1、2:3の混合液で溶出し、さらに混合比1:2の混合液で溶出した。) にて精製した。さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒としてヘキサンとアセトンの混合液を用いた。まず混合比2:1 (ヘキサン:アセトン) の混合液を溶出した。ついで混合比4:1、3:1、2:1、1:1、2:3の混合液で順次溶出し、さらに混合比1:2の混合液にて溶出した。) で精製し、標題化合物 (68.4 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.18 (1H, s), 7.65 (1H, s), 7.59–7.57 (1H, m), 7.25–7.21 (4H, m), 7.13 (1H, br d, $J = 1.6$ Hz), 6.84 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.38 (1H, s), 4.16–4.11 (4H, m), 1.86 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.84 (6H, s), 1.16 (6H, s), 1.13 (3H, t, $J = 7.0$ Hz).

[0134] 工程 1 3

2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロピオン酸

[0135] [化25]



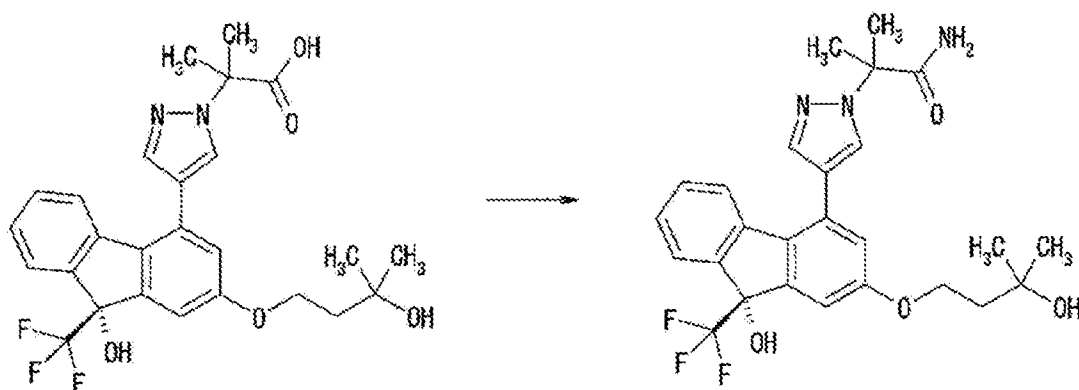
[0136] 2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロピオン酸エチル (68.4 g) をエタノール (256 ml) に溶解し、4 N水酸化ナトリウム水溶液 (128 ml) を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応混合物を氷冷し、2 N塩酸 (333 ml) を滴下後、酢酸エチル (500 ml) で抽出した。得られた有機層を水 (400 ml) で2回、飽和食塩水 (400 ml) で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去して、標題化合物 (70.0 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 13.06 (1H, br s), 8.14 (1H, s), 7.62 (1H, s), 7.57 (1H, dd, $J = 6.4, 0.6$ Hz), 7.27–7.19 (4H, m), 7.12 (1H, s), 6.84 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.38 (1H, s), 4.14 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.82 (3H, s), 1.81 (3H, s), 1.16 (6H, s).

[0137] 工程 1 4

2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロパンアミド (化合物 (2))

[0138] [化26]



[0139] 窒素雰囲気下、2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロピオン酸 (66.7 g) をN, N-ジメチルホルムアミド (480 ml) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 1水和物 (27.6 g)、1-エチル-3- (3'-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (WSC) 塩酸塩 (34.6 g) および28%アンモニア水 (24.5 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物を氷冷し、水 (630 ml) および2N塩酸 (330 ml) を滴下後、酢酸エチル (800 ml) で抽出した。得られた水層を酢酸エチル (500 ml) で再抽出した。得られた有機層を合わせて、水 (500 ml) で2回、飽和重曹水 (500 ml)、飽和食塩水 (500 ml) で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去して、標題化合物 (60.0 g) を得た。

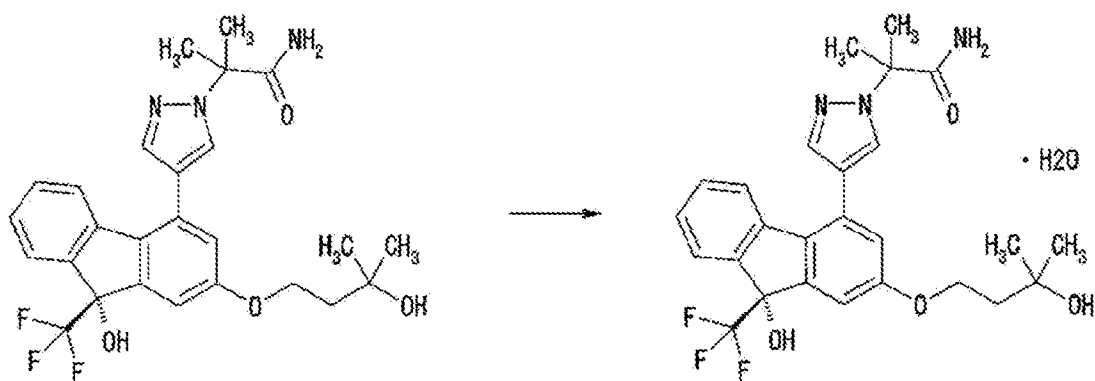
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.08 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.58-7.56 (1H

, m), 7.32-7.30 (1H, m), 7.25-7.22 (4H, m), 7.12 (1H, br s), 6.96 (1H, br s), 6.87 (1H, d, J = 2.3 Hz), 4.38 (1H, s), 4.14 (2H, t, J = 7.2 Hz), 1.85 (2H, t, J = 7.2 Hz), 1.78 (3H, s), 1.78 (3H, s), 1.17 (6H, s).

[0140] 工程 15

2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロパンアミド・1水和物 (化合物 (2h))

[0141] [化27]



[0142] 前工程で得られた2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロパンアミド (化合物 (2)) (60.0 g) を酢酸エチル (109 ml) に溶解し、水 (2 ml) を加え、50℃に加熱した。この混合液にヘキサン (226 ml)、ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (ヘキサン：酢酸エチル 2：1、150 ml) を順次滴下した後、室温に戻し一晩攪拌した。析出した固体をろ取り、ろ過物をヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒 (ヘキサン：酢酸エチル=2：1、180 ml) で洗浄した。得られた固体を室温で一晩減圧乾燥して、標題化合物 (52.2 g、光学純度98.6% e. e.) を得た。光学純度は、HPLC分析条件2にて決定した。(R)体の保持時間11.3分、(S)体の保持時間13.9分。

比旋光度 $[\alpha]_D + 37.9^\circ$ ($c = 1.01$ MeOH 25°C).

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8.08 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.58–7.56 (1H, m), 7.32–7.30 (1H, m), 7.25–7.22 (4H, m), 7.12 (1H, br s), 6.96 (1H, br s), 6.87 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.38 (1H, s), 4.14 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.78 (3H, s), 1.78 (3H, s), 1.17 (6H, s).

(元素分析測定)

元素分析結果は、化合物(2h)の理論値と良く一致した。

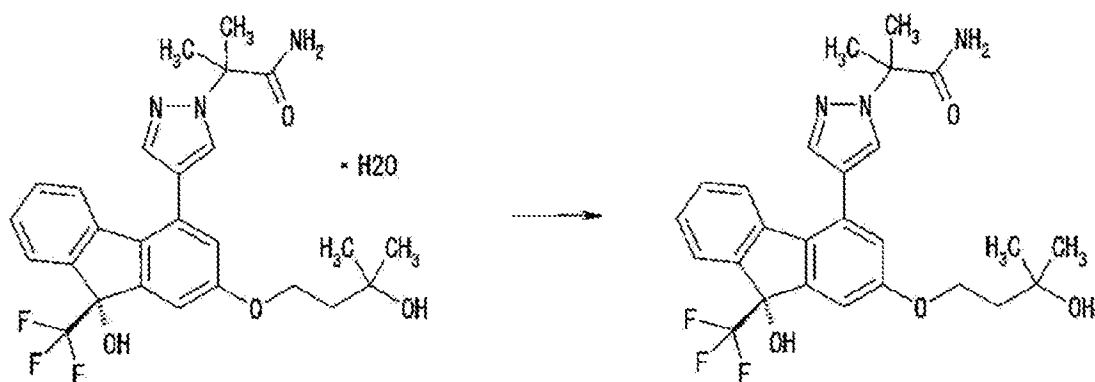
計算値: C, 59.88; H, 5.80; N, 8.06 (1水和物としての計算値)

実測値: C, 59.86; H, 5.74; N, 8.00.

[0143] 工程16

2- {4- [(9R)-9-ヒドロキシ-2-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル]-1H-ピラゾール-1-イル}-2-メチルプロパンアミド (化合物(2))

[0144] [化28]



[0145] 前工程で得られた2- {4- [(9R)-9-ヒドロキシ-2-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル]-1H-ピラゾール-1-イル}-2-メチルプロパンアミド · 1水和物 (化合物(2h)) (22.63g) にトルエン (340ml) を加えた。窒素雰囲気下、反応混合物をディーン・スターク装置

で脱水しながら、油浴温度 130℃で2時間攪拌した。反応混合物を油浴温度 70℃でさらに1時間半攪拌した後、室温に戻し一晩攪拌した。析出した固体をろ取り、ろ過物をトルエン (100 ml) で洗浄した。得られた固体を室温で3日間減圧乾燥後、さらに60℃で1日減圧乾燥して、標題化合物 (21.5 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.08 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.58–7.56 (1H, m), 7.32–7.30 (1H, m), 7.25–7.22 (4H, m), 7.12 (1H, br s), 6.96 (1H, br s), 6.87 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.38 (1H, s), 4.14 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.78 (3H, s), 1.78 (3H, s), 1.17 (6H, s).

(元素分析測定)

元素分析結果は、化合物 (2) の理論値と良く一致した。

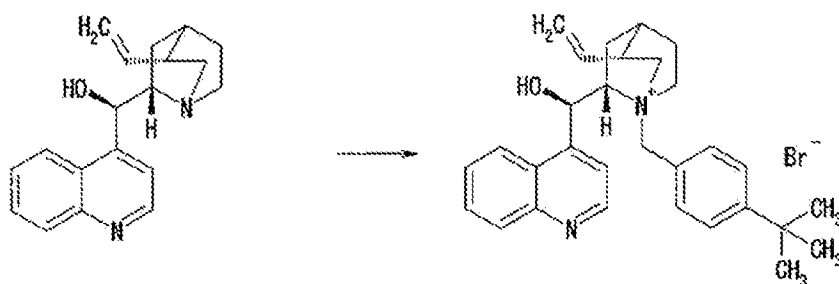
計算値: C, 62.02; H, 5.61; N, 8.35 (無水和物としての計算値)

実測値: C, 62.17; H, 5.60; N, 8.47.

[0146] 工程 C – 1

N – (4 – t e r t – ブチルベンジル) シンコニジウムブロミドの合成

[0147] [化29]



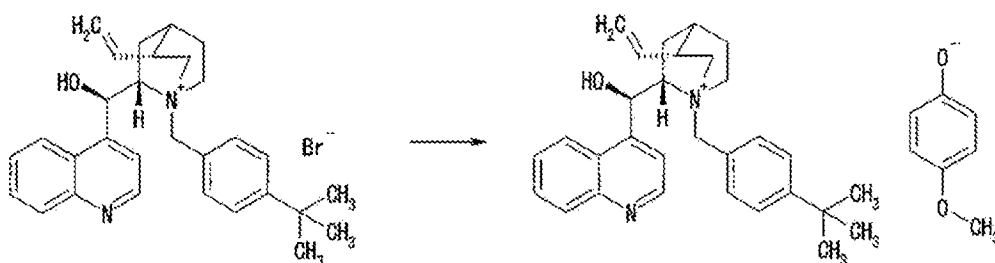
[0148] シンコニジン (10.6 g) をテトラヒドロフラン (200 ml) に溶解し、4 – t e r t – ブチルベンジルブロミド (10.1 g)、テトラブチルアンモニウムヨード (0.66 g) を加え、70℃で一晩攪拌した。反応混合物を室温まで冷却した後、固体をろ取り、酢酸エチル (50 ml) で洗浄した。得られた固体を一晩減圧乾燥して、標題化合物 (18.5 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.99 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 8.27 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 8.11 (1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz), 7.89–7.79 (2H, m), 7.78–7.71 (1H, m), 7.63 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.59 (2H, t, $J = 8.4$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 6.57–6.51 (1H, br s), 5.67 (1H, ddd, $J = 17.0, 10.4, 6.4$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 17.2$ Hz), 5.08 (1H, d, $J = 12.6$ Hz), 5.00–4.90 (2H, m), 4.30–4.18 (1H, m), 3.91 (1H, t, $J = 8.7$ Hz), 3.74–3.64 (1H, m), 3.35–3.18 (2H, m), 2.76–2.65 (1H, m), 2.18–1.94 (3H, m), 1.90–1.78 (1H, m), 1.40–1.22 (1H, m), 1.34 (9H, s).

[0149] 工程C – 2

N – (4 – t e r t – ブチルベンジル) シンコニジウム 4 – メトキシフェノキシドの合成

[0150] [化30]



[0151] N – (4 – t e r t – ブチルベンジル) シンコニジウムブロミド (18.5 g)、アンバーリスト (登録商標) A 26 (スチレン、ジビニルベンゼンマトリックスの強塩基性イオン交換樹脂) (18.5 g) およびメタノール (280 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。不溶物をセライトろ去し、メタノール (100 ml) で洗浄した。ろ液に4 – メトキシフェノール (4.8 g) を加え、溶媒を留去した。残渣をトルエン (100 ml) で3回共沸後、トルエン (20 ml) を加え、次いでジイソプロピルエーテル (200 ml) を滴下し、室温で3時間攪拌した。析出した固体をろ取し、ジイソプロピルエーテル (50 ml) で洗浄した後、室温で一晩減圧乾燥して標題化合物 (21.8 g) を得た。

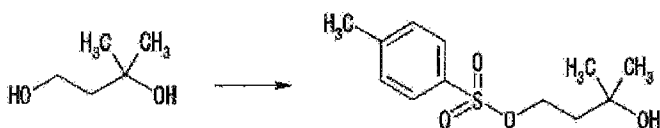
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-D_6) δ : 8.91 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 8.17 (1H, d, J

= 8.2 Hz), 8.07 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.89 (1H, d, J = 4.4 Hz), 7.79 (1H, t, J = 7.6 Hz), 7.64 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.57–7.52 (5H, m), 6.56–6.55 (2H, m), 6.43–6.42 (3H, m), 5.67–5.59 (1H, m), 5.28 (1H, d, J = 12.1 Hz), 5.12 (1H, d, J = 17.2 Hz), 4.92 (1H, d, J = 10.6 Hz), 4.84 (1H, d, J = 12.1 Hz), 4.65–4.53 (1H, m), 3.80 (1H, t, J = 8.8 Hz), 3.65–3.63 (1H, m), 3.57 (3H, s), 3.25 (1H, t, J = 11.6 Hz), 3.10–3.07 (1H, m), 2.67 (1H, br s), 2.07–2.02 (2H, m), 1.95 (1H, br s), 1.79–1.76 (1H, br m), 1.33 (9H, s), 1.16–1.11 (1H, m).

[0152] 工程 D

トルエン-4-スルホン酸 3-ヒドロキシ-3-メチルブチルエステルの合成

[0153] [化31]



[0154] 窒素雰囲気下、3-メチルブタン-1, 3-ジオール (300 g) をピリジン (900 ml) に溶解し、4-メチルベンゼンスルホニルクロリド (500 g) のトルエン (900 ml)、アセトニトリル (125 ml) 溶液を2時間かけて滴下した。反応混合物を室温で4時間攪拌した後、トルエン (500 ml) と水 (1800 ml) を加え、分層した。得られた有機層を硫酸水、水2回で順次洗浄した。得られた有機層の溶媒を留去した後、トルエン (500 ml) で共沸して、標題化合物 (535 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.81–7.76 (2H, m), 7.36–7.31 (2H, m), 4.20 (2H, td, J = 6.8, 1.6 Hz), 2.44 (3H, s), 1.85 (2H, td, J = 6.8, 1.6 Hz), 1.33 (1H, s), 1.21 (6H, s).

[0155] 実施例 2

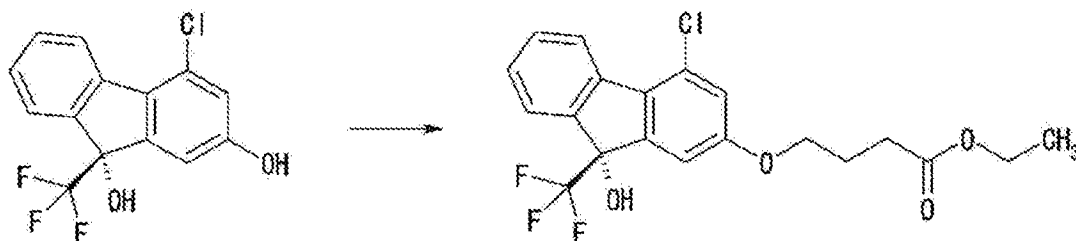
2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロパンアミド (化

合物（３））の合成

[0156] 工程 1

4-[(9R)-4-クロロ-9-ヒドロキシ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2-イルオキシ] 酪酸エチル

[0157] [化32]



[0158] 実施例 1 工程 10 で得られた (9R)-4-クロロ-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-2, 9-ジオール (200 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶解し、炭酸カリウム (185 mg) および 4-ブロモ酪酸エチル (105 μ l) を加え、室温で 7 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。得られた有機層を、水で 2 回、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒としてヘキサンと酢酸エチルの混合液を用いた。まず混合比 5 : 1（ヘキサン：酢酸エチル）の混合液にて溶出した。ついで混合比 3 : 1 の混合液にて順次溶出し、さらに混合比 2 : 1 の混合液にて溶出した。）にて精製し、標題化合物 (197 mg) を得た。

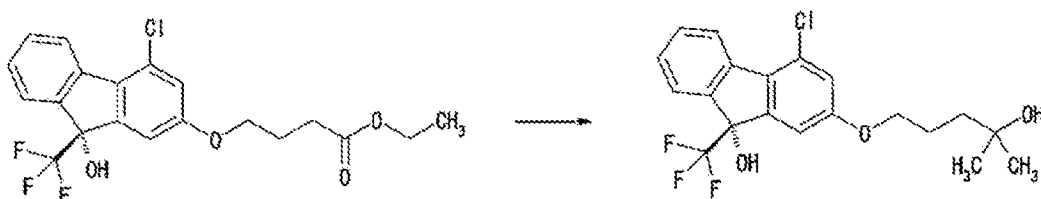
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.46 (1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.32 (1H, td, $J = 7.6, 1.0$ Hz), 7.16 (1H, br s), 6.93 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.05 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.82 (1H, s), 2.50 (2H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.15-2.06 (2H, m), 1.25 (3H, t, $J = 7.1$ Hz).

[0159] 工程 2

(9R)-4-クロロ-2-(4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ)

) - 9 - (トリフルオロメチル) - 9 H - フルオレン - 9 - オール

[0160] [化33]



[0161] 窒素雰囲気下、4 - [(9 R) - 4 - クロロ - 9 - ヒドロキシ - 9 - (トリフルオロメチル) - 9 H - フルオレン - 2 - イルオキシ] 酪酸エチル (1.97 mg) を T H F (2 m l) に溶解し、0℃でメチルリチウム／ジエチルエーテル溶液 (1.07 M、2.2 m l) を滴下した。反応混合液を同温で2時間撹拌した後、水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。得られた有機層を水で2回、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒としてヘキサンと酢酸エチルの混合液を用いた。まず混合比 3 : 1 (ヘキサン : 酢酸エチル) の混合液を溶出した。ついで混合比 2 : 1 の混合液にて溶出した。) にて精製して、標題化合物 (1.69 mg) を得た。

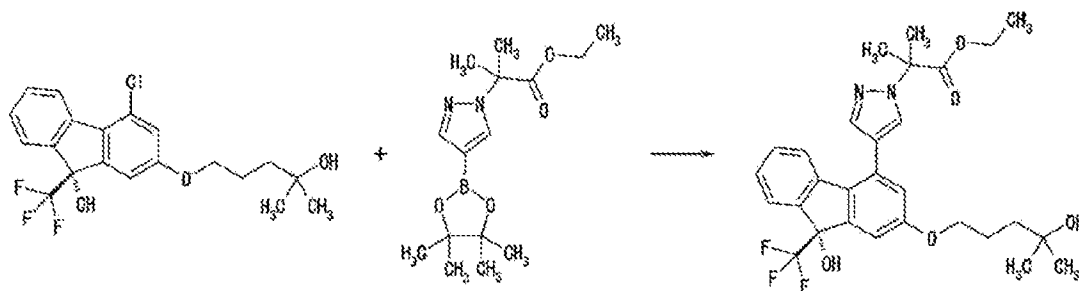
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 8.19 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.47 (1H, td, $J = 7.7, 1.0$ Hz), 7.32 (1H, td, $J = 7.7, 1.0$ Hz), 7.17 (1H, br s), 6.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.02 (2H, t, $J = 6.4$ Hz), 2.82 (1H, s), 1.92-1.85 (2H, m), 1.65-1.62 (2H, m), 1.26 (3H, s), 1.25 (3H, s).

[0162] 工程 3

2 - { 4 - [(9 R) - 9 - ヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシ - 4 - メチルペンチルオキシ) - 9 - (トリフルオロメチル) - 9 H - フルオレン - 4 - イル] - 1 H - ピラゾール - 1 - イル } - 2 - メチルプロピオン酸エチル

[0163]

[化34]



[0164] アルゴン雰囲気下、(9R)-4-クロロ-2-(4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-9-オール (169 mg) を、1,4-ジオキサン (1.5 ml) で溶解し、2-メチル-2-[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)-1H-ピラゾール-1-イル]プロピオン酸エチル (194 mg)、水 (0.5 ml)、リン酸三カリウム (178 mg)、酢酸パラジウム (9 mg)、SPhos (33 mg) を加え、100℃で4.5時間撹拌した。反応混合液を室温まで冷却した後、水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。得られた有機層を、水で2回、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒として混合比1:1 (ヘキサン:酢酸エチル) の混合液にて溶出した。) にて精製して、標題化合物 (218 mg) を得た。

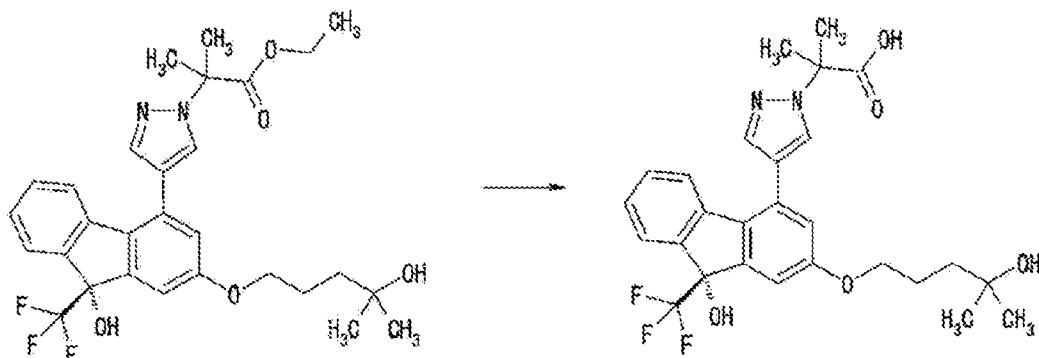
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 7.69 (1H, s), 7.63-7.62 (2H, m), 7.21-7.19 (4H, m), 6.81 (1H, d, J = 2.3 Hz), 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.04 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.82 (1H, s), 1.92 (3H, s), 1.91 (3H, s), 1.89-1.88 (2H, m), 1.66-1.64 (2H, m), 1.26 (6H, s), 1.26-1.23 (3H, m).

[0165] 工程4

2-{4-[(9R)-9-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ)-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル]-1H-ピラゾール-1-イル}-2-メチルプロピオン酸

[0166]

[化35]



[0167] 2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロピオン酸エチル (218 mg) をエタノール (2.2 ml) に溶解し、4 N水酸化ナトリウム水溶液 (320 μ l) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合液を1 N塩酸で中和し、酢酸エチルで2回抽出した。得られた有機層を水で2回、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去して、標題化合物 (179 mg) を得た。

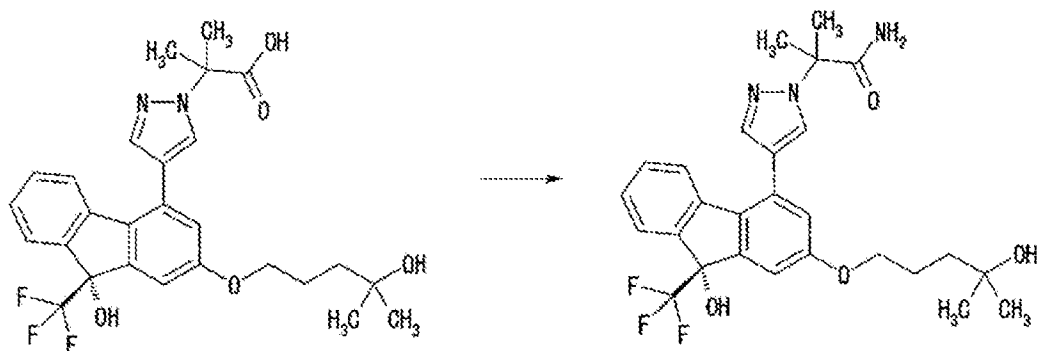
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (1H, s), 7.68 (1H, s), 7.63-7.62 (1H, m), 7.23-7.09 (4H, m), 6.78 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 4.02 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 1.93 (6H, s), 1.89-1.86 (2H, m), 1.65-1.61 (2H, m), 1.25 (6H, s).

[0168] 工程5

2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロパンアミド (化合物 (3))

[0169]

[化36]



[0170] 窒素雰囲気下、2- {4- [(9R) -9-ヒドロキシ-2- (4-ヒドロキシ-4-メチルペンチルオキシ) -9- (トリフルオロメチル) -9H-フルオレン-4-イル] -1H-ピラゾール-1-イル} -2-メチルプロピオン酸 (89 mg) をN, N-ジメチルホルムアミド (1 ml) に溶解し、塩化アンモニウム (28 mg) 、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (148 μ l) および1- [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] -1H-1, 2, 3-トリアゾロ [4, 5-b] ピリジン-1-イウム 3-オキシドヘキサフルオロフォスフェート (HATU) (99 mg) を加え、室温で一晩撹拌した。反応混合液に水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。得られた有機層を、食塩水で2回、飽和食塩水で1回順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒としてクロロホルムとメタノールの混合液を用いた。混合比9 : 1 (クロロホルム : メタノール) の混合液を用いた。) にて精製して、標題化合物 (48 mg、光学純度96.9% e. e.) を得た。光学純度は、HPLC分析条件2にて決定した。(R) 体の保持時間13.0分、(S) 体の保持時間14.4分。

比旋光度 $[\alpha]_D + 37.5^\circ$ (c = 1.04 MeOH 25°C) .

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- D_6) δ : 8.07 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.57-7.55 (1H, m), 7.34-7.31 (1H, m), 7.24-7.23 (3H, m), 7.18 (1H, s), 7.11 (1H, br s), 6.94 (1H, br s), 6.86 (1H, d, J = 2.3 Hz), 4.16 (1H, s), 4.03 (

2H, t, J = 6.5 Hz), 1.80 (3H, s), 1.79 (3H, s), 1.80–1.75 (2H, m), 1.51–1.47 (2H, m), 1.11 (6H, s).

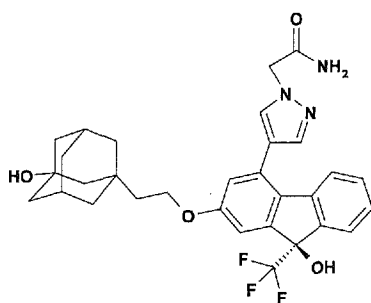
[0171] (化合物(3)の結晶の調製例)

上記実施例の手順で合成した化合物(3) (40 mg) に MeOH と水の混合液 (容量比 1 : 3 (0.5 mL)) を添加した。ついで、この溶液に化合物(2h)の結晶 (0.5 mg) を添加し室温にて3日間攪拌した。析出した固体を濾取し、化合物(3)の結晶 (41 mg) を得た。

[0172] (化合物(A)、(B)、(C)、および(D)の合成)

下記式で表される化合物(A)、化合物(B)、化合物(C)及び化合物(D)は、国際公開第2010/041748号に記載の製造方法に従い、それぞれ光学活性体として得た。

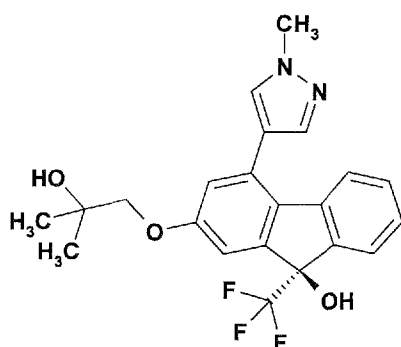
[0173] [化37]



[0174] 化合物(A)

2-((4-{(9R)-9-ヒドロキシ-2-[2-(3-ヒドロキシアダマンタン-1-イル)エトキシ]-9-(トリフルオロメチル)-9H-フルオレン-4-イル}-1H-ピラゾール-1-イル)酢酸アミド

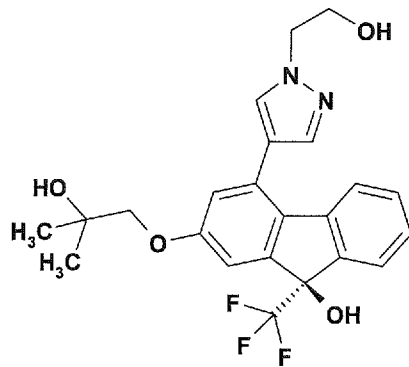
[0175] [化38]



[0176] 化合物 (B)

(9R) - 2 - (2-ヒドロキシ-2-メチルプロポキシ) - 4 - (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) - 9 - (トリフルオロメチル) - 9H-フルオレン-9-オール

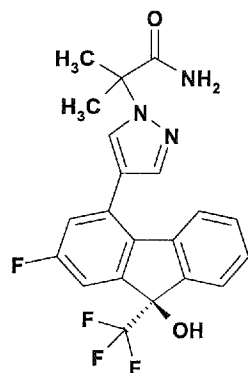
[0177] [化39]



[0178] 化合物 (C)

(9R) - 4 - [1 - (2-ヒドロキシエチル) - 1H-ピラゾール-4-イル] - 2 - (2-ヒドロキシ-2-メチルプロポキシ) - 9 - (トリフルオロメチル) - 9H-フルオレン-9-オール

[0179] [化40]



[0180] 化合物 (D)

2 - {4 - [(9R) - 2-フルオロ-9-ヒドロキシ-9 - (トリフルオロメチル) - 9H-フルオレン-4-イル] - 1H-ピラゾール-1-イル} - 2-メチルプロパンアミド

[0181] 本発明の製剤例としては、例えば下記の製剤が挙げられる。しかしながら

、本発明はこれら製剤例によって限定されるものではない。

[0182] 製剤例 1 (カプセルの製造)

1) 実施例 1 の化合物 (化合物 (2))	30 mg
2) 微結晶セルロース	10 mg
3) 乳糖	19 mg
4) ステアリン酸マグネシウム	1 mg

1)、2)、3) および 4) を混合して、ゼラチンカプセルに充填する。

[0183] 製剤例 2 (錠剤の製造)

1) 実施例 1 の化合物 (化合物 (2))	10 g
2) 乳糖	50 g
3) トウモロコシデンプン	15 g
4) カルメロースカルシウム	44 g
5) ステアリン酸マグネシウム	1 g

1)、2)、3) の全量および 30 g の 4) を水で練合し、真空乾燥後、整粒を行う。この整粒末に 14 g の 4) および 1 g の 5) を混合し、打錠機により打錠する。このようにして、1 錠あたり実施例 1 の化合物 (化合物 (2)) 10 mg を含有する錠剤 1000 錠を得る。

[0184] 試験例 1 : インビトロにおける PDHK 活性阻害作用

PDHK 活性阻害作用は被験化合物存在下においてキナーゼ反応を行い、その後、残存した PDH 活性を測定することにより、間接的に評価した。

[0185] (PDHK 1 活性阻害作用)

ヒト PDHK 1 (hPDHK 1, ジーンバンク (Genbank) 寄託番号 L42450. 1) の場合、このタンパク質をコードする 1.3 kbp フラグメントをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりヒト肝 cDNA から単離した。PCR で N 末端に FLAG-Tag 配列を付加した改変 hPDHK 1 cDNA を作製し、ベクター (pET17b-Novagen 社) にクローニングした。組換え構築体を大腸菌 (DH5 α -TOYOBO 社) 内へ形質転換した。組換えクローンを同定し、プラスミド DNA を単離し、DN

A配列分析した。予想核酸配列を持つ1クローンを発現作業用を選択した。

[0186] hPDHK1 活性発現のために、改変hPDHK1 cDNAを含むpET17bベクターを大腸菌株BL21 (DE3) (Novagen社) 内に形質転換した。大腸菌を光学濃度0.6 (600nmol/L) に達するまで30℃で増殖させた。500μmol/L イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの添加によりタンパク質発現を誘導した。大腸菌を30℃で5時間培養した後、遠心分離により採集した。大腸菌ペースト再懸濁液をマイクロフロイダイザーにより破碎した。FLAG-Tag付加タンパク質を、FLAGアフィニティーゲル (Sigma社) により分離した。

[0187] 20mmol/L N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸-水酸化ナトリウム (HEPES-NaOH)、500mmol/L 塩化ナトリウム、1% エチレングリコール、0.1% ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロック共重合体 (プルロニックF-68) (pH8.0) でゲルを洗浄した後、20mmol/L HEPES-NaOH、100μg/mL FLAGペプチド、500mmol/L 塩化ナトリウム、1% エチレングリコール、0.1% プルロニックF-68 (pH8.0) で結合タンパク質を溶離した。

[0188] FLAG-Tag付加タンパク質を含有する溶離画分をプールし、20mmol/L HEPES-NaOH、150mmol/L 塩化ナトリウム、0.5mmol/L エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1% エチレングリコール、0.1% プルロニックF-68 (pH8.0) に対し透析し、-80℃に保存した。アッセイに際し、hPDHK1の酵素濃度は90%を上回るPDH活性抑制を示す最少濃度に設定した。

[0189] 緩衝液 (50mmol/L 3-モルホリノプロパンスルホン酸 (pH7.0)、20mmol/L リン酸水素二カリウム、60mmol/L 塩化カリウム、2mmol/L 塩化マグネシウム、0.4mmol/L EDTA、0.2% プルロニックF-68、2mmol/L ジチオスレイトール) 中において、0.05U/mL PDH (ブタ心臓PDH複合体、

S i g m a 社 P 7 0 3 2) および $1.0 \mu\text{g/mL}$ h P D H K 1 を混合し、 4°C で一晩インキュベーションしてP D H / h P D H K 1 複合体を調製した。

[0190] 被験化合物はジメチルスルホキシド (DMSO) で希釈した。96穴ハーフエリアUV透過マイクロプレート (C o r n i n g 社 3679) にP D H / h P D H K 1 複合体 $20 \mu\text{L}$ 、被験化合物 $1.5 \mu\text{L}$ および $3.53 \mu\text{mol/L}$ A T P (緩衝液にて希釈) $8.5 \mu\text{L}$ を添加し、室温で45分間P D H K 反応を行った。対照ウェルには被験化合物の代わりにDMSOを $1.5 \mu\text{L}$ 添加した。また、P D H 反応の最大速度を測定するためのブランクウェルには、被験化合物の代わりにDMSOを $1.5 \mu\text{L}$ 添加し、h P D H K 1 を除いた。

[0191] 続いて、基質 (5 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、 5 mmol/L コエンザイムA、 12 mmol/L NAD、 5 mmol/L チアミンピロリン酸、緩衝液にて希釈) を $10 \mu\text{L}$ 添加し、室温で90分間インキュベーションすることにより、残存P D H 活性を測定した。

[0192] P D H 反応前後における 340 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定することにより、P D H 反応により産生されるNADHを検出した。被験化合物のh P D H K 1 阻害率 (%) は式 $[\{ (\text{被験化合物のP D H 活性} - \text{対照のP D H 活性}) / \text{ブランクのP D H 活性} - \text{対照のP D H 活性} \} \times 100]$ から算出した。 IC_{50} 値はh P D H K 1 阻害率50%を挟む2点の被験化合物濃度より算出した。

被験化合物として化合物 (2)、化合物 (2 h) および化合物 (3) を用いた場合に得られた結果を以下の表1に示す。

[0193] (P D H K 2 活性阻害作用)

ヒトP D H K 2 (h P D H K 2、ジーンバンク (G e n b a n k) 寄託番号B C 0 4 0 4 7 8. 1) の場合、h P D H K 2 c D N A クローン (p R e c e i v e r - M 0 1 / P D K 2 - G e n e C o p o e i a 社) を基に、P C R でN末端にF L A G - T a g 配列を付加した改変h P D H K 2 c D

NAを作製し、ベクター（pET17b-Novagen社）にクローニングした。組換え構築体は大腸菌（DH5 α -TOYOBO社）内へ形質転換した。組換えクローンを同定し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列分析した。予想核酸配列を持つ1クローンを発現作業用を選択した。

[0194] hPDHK2 活性発現のために、改変hPDHK2 cDNAを含むpET17bベクターを大腸菌株BL21（DE3）（Novagen社）内に形質転換した。大腸菌を光学濃度0.6（600nmol/L）に達するまで30℃で増殖させた。500 μ mol/L イソプロピルー β -チオガラクトピラノシドの添加によりタンパク質発現を誘導した。大腸菌を30℃で5時間培養した後、遠心分離により採集した。大腸菌ペースト再懸濁液をマイクロフロイダイザーにより破碎した。FLAG-Tag付加タンパク質を、FLAGアフィニティーゲルにより分離した。20mmol/L HEPES-NaOH、500mmol/L 塩化ナトリウム、1% エチレングリコール、0.1% プルロニックF-68（pH8.0）でゲルを洗浄した後、20mmol/L HEPES-NaOH、100 μ g/mL FLAGペプチド、500mmol/L 塩化ナトリウム、1% エチレングリコール、0.1% プルロニックF-68（pH8.0）で結合タンパク質を溶離した。FLAG-Tag付加タンパク質を含有する溶離画分をプールし、20mmol/L HEPES-NaOH、150mmol/L 塩化ナトリウム、0.5mmol/L EDTA、1% エチレングリコール、0.1% プルロニックF-68（pH8.0）に対し透析し、-80℃に保存した。アッセイに際し、hPDHK2の酵素濃度は90%を上回るPDH活性抑制を示す最少濃度に設定した。

[0195] 緩衝液（50mmol/L 3-モルホリノプロパンスルホン酸（pH7.0）、20mmol/L リン酸水素二カリウム、60mmol/L 塩化カリウム、2mmol/L 塩化マグネシウム、0.4mmol/L EDTA、0.2% プルロニックF-68、2mmol/L ジチオスレイトール）中において、0.05U/mL PDHおよび0.8 μ g/mL

hPDHK2を混合し、4℃で一晩インキュベーションしてPDH/hPDHK2複合体を調製した。被験化合物はDMSOで希釈した。96穴ハーフエリアUV透過マイクロプレートにPDH/hPDHK2複合体20μL、被験化合物1.5μLおよび3.53μmol/L ATP（緩衝液にて希釈）8.5μLを添加し、室温で45分間PDHK反応を行った。対照ウェルには被験化合物の代わりにDMSOを1.5μL添加した。また、PDH反応の最大速度を測定するためのブランクウェルには、化合物の代わりにDMSOを1.5μL添加し、hPDHK2を除いた。続いて、基質（5mmol/L ピルビン酸ナトリウム、5mmol/L コエンザイムA、12mmol/L NAD、5mmol/L チアミンピロリン酸、緩衝液にて希釈）を10μL添加し、室温で90分間インキュベーションすることにより、残存PDH活性を測定した。PDH反応前後における340nmの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定することにより、PDH反応により産生されるNADHを検出した。被験化合物のhPDHK2阻害率（%）は式
$$\left[\left\{ \left(\text{被験化合物のPDH活性} - \text{対照のPDH活性} \right) / \text{ブランクのPDH活性} - \text{対照のPDH活性} \right\} \times 100 \right]$$
から算出した。IC₅₀値はhPDHK2阻害率50%を挟む2点の被験化合物濃度より算出した。

被験化合物として化合物（2）、化合物（2h）、化合物（3）、化合物（A）、化合物（B）、化合物（C）、および化合物（D）を用いた場合に得られた結果を以下の表1に示す。

[0196]

[表1]

化合物	hPDHK1 IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	hPDHK2 IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
化合物(2)	0.0047	0.0046
化合物(2h)	0.0066	0.0049
化合物(3)	0.0035	0.0042
化合物(A)	— (未測定)	0.0051
化合物(B)	— (未測定)	0.0074
化合物(C)	— (未測定)	0.0067
化合物(D)	— (未測定)	0.0051

[0197] 試験例2 : E x v i v o PDH活性化試験

(試験方法)

被験化合物を投与した動物における組織のPDH活性化作用を評価した。
p-ヨードニトロテトラゾリウムバイオレット (INT) 共役系を介してNADH生成を検出することによりPDH活性を測定した。

正常な雄性Sprague-Dawleyラットを媒体群または被験化合物群にランダムに群分けした。ラットに媒体 (0.5%メチルセルロース水溶液, 5 mL/kg) または被験化合物を経口投与した。投与後、5または20時間後に、ペントバルビタールナトリウム60 mg/kgを腹腔内投与して麻酔を施し、肝切片および副睾丸上脂肪組織を摘出した。

摘出した肝切片に湿重量の9倍容の氷冷したホモジナイズ緩衝液 (0.25 mol/L スクロース、5 mmol/L トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (pH 7.5)、2 mmol/L EDTA) を速やかに添加し、ポリtronホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを600×g、4℃、10分間遠心して上清を回収した。上清1 mLを16000×g、4℃、10分間遠心して沈殿を得た。この沈殿をホモジナイズ緩衝液1 mLに再懸濁し、同様に遠心して沈殿を洗浄した。この沈殿を

肝ミトコンドリア画分とし、液体窒素にて凍結後、 -80°C に保存した。

摘出した脂肪組織に湿重量の3倍容の氷冷したホモジナイズ緩衝液を速やかに添加し、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを $600\times g$ 、 4°C 、10分間遠心して上清を回収した。上清全量を $16000\times g$ 、 4°C 、10分間遠心して沈殿を得た。この沈殿をホモジナイズ緩衝液1 mLに再懸濁し、同様に遠心して沈殿を洗浄した。この沈殿を脂肪組織ミトコンドリア画分とし、液体窒素にて凍結後、 -80°C に保存した。

ミトコンドリア画分を解凍し、サンプル緩衝液 (0.25 mol/L スクロース、 20 mmol/L トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 ($\text{pH } 7.5$)、 50 mmol/L 塩化カリウム、 1 mL/L 4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル) フェニルポリエチレングリコール (トリトンX-100)) に懸濁した。PDH活性は活性型PDH活性 (PDHa活性) と総PDH活性 (PDHt活性) の2種類を測定した。PDHt活性を測定するために、ミトコンドリア懸濁液と活性化緩衝液 (0.25 mol/L スクロース、 20 mmol/L トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 ($\text{pH } 7.5$)、 50 mmol/L 塩化カリウム、 1 mL/L トリトンX-100、 4 mmol/L 塩化カルシウム、 40 mmol/L 塩化マグネシウム、 10 mmol/L ジクロロ酢酸ナトリウム) を等量混合し、 37°C にて10分間インキュベーションした。サンプル緩衝液で希釈したミトコンドリア懸濁液 $40\text{ }\mu\text{L}$ を活性測定用およびblank測定用としてそれぞれ96穴マイクロプレートに添加した。これに反応混合液 (0.056 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH } 7.5$)、 5.6 mmol/L DL-カルニチン、 2.8 mmol/L NAD、 0.22 mmol/L チアミンピロリン酸、 0.11 mmol/L コエンザイムA、 1.1 mL/L トリトンX-100、 1.1 mmol/L 塩化マグネシウム、 1.1 g/L ウシ血清アルブミン、 0.67 mmol/L INT、 $7.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ フェナジンメトサルフェート、 28 mmol/L

o l / L オキサミド酸ナトリウム) を 180 μ L 添加した。活性測定用に 50 mm o l / L ピルビン酸ナトリウムを、ブランク測定用に精製水をそれぞれ 20 μ L 添加し、室温、遮光下にてインキュベーションした。最終的な電子受容体である I N T の還元に起因する 500 – 750 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて経時的に測定して吸光度変化を算出した。活性測定ウェルの吸光度変化からブランクウェルの吸光度変化を差し引いて、PDH 活性とした。PDH t 活性に対する PDH a 活性の百分率を算出し、PDH 活性化の指標とした。

被験化合物として化合物 (2 h)、化合物 (3)、化合物 (A)、化合物 (B)、化合物 (C) および化合物 (D) を用いた場合に得られた結果を表 2、図 1 (肝) 及び図 2 (脂肪組織) に示す。また、化合物 (2) を用いた場合に得られた結果を表 3 に示す。

[0198] [表2]

化合物	PDHa 活性 (PDHt 活性の %)							
	肝				脂肪組織			
	5 時間		20 時間		5 時間		20 時間	
	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg
化合物 (2 h)	13 $\pm$ 3	59 $\pm$ 6	13 $\pm$ 3	31 $\pm$ 5	31 $\pm$ 10	59 $\pm$ 2	31 $\pm$ 10	44 $\pm$ 12
化合物 (3)	13 $\pm$ 3	56 $\pm$ 8	13 $\pm$ 3	32 $\pm$ 9	31 $\pm$ 10	70 $\pm$ 9	31 $\pm$ 10	42 $\pm$ 3
化合物 (A)	13 $\pm$ 3	35 $\pm$ 6	13 $\pm$ 3	16 $\pm$ 10	31 $\pm$ 10	32 $\pm$ 14	31 $\pm$ 10	24 $\pm$ 7
化合物 (B)	13 $\pm$ 3	43 $\pm$ 7	13 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	31 $\pm$ 10	59 $\pm$ 5	31 $\pm$ 10	30 $\pm$ 4
化合物 (C)	13 $\pm$ 3	44 $\pm$ 5	13 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3	31 $\pm$ 10	53 $\pm$ 4	31 $\pm$ 10	28 $\pm$ 7
化合物 (D)	13 $\pm$ 3	41 $\pm$ 15	13 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1	31 $\pm$ 10	43 $\pm$ 7	31 $\pm$ 10	24 $\pm$ 3

平均 $\pm$ 標準偏差 (n = 3)

[0199]

[表3]

化合物	PDHa 活性 (PDHt 活性の %)							
	肝				脂肪組織			
	5 時間		20 時間		5 時間		20 時間	
	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg	媒体	3 mg/kg
化合物 (2)	28±6	74±12	28±6	50±16	42±4	88±11	42±4	61±15

平均±標準偏差 (n = 3)

[0200] 試験例 3 : Z D F ラットにおける被験化合物反復投与の H b A 1 c に対する効果

(試験方法)

精製飼料 (5.9% fat diet、オリエンタル酵母工業) を供与した 2 型糖尿病モデル Z u c k e r D i a b e t i c F a t t y ラット (雄、7 週齢、日本チャールス・リバー) を血糖値、血漿中インスリン濃度、H b A 1 c および体重に差がでないように、媒体群および被験化合物群に群わけを行った。ラットに被験化合物 (1 mg / k g / 5 m L) を暗期 3 時間前に 1 日 1 回反復経口投与した。媒体群のラットには 0.5% メチルセルロース水溶液を同様に経口投与した。投与 14 日目に尾静脈から採血を行い、H b A 1 c (%) を測定した。統計的有意性は、D u n n e t t 法により検定し、危険率 $p < 0.05$ を有意とみなした。

被験化合物として化合物 (2) および化合物 (3) を用いた場合に得られた結果を以下の表 4 に示す。

[0201] [表4]

化合物	H b A 1 c (%)			
	媒体		1 mg/kg	
化合物 (2)	3.6	± 0.3	3.2	± 0.1*
化合物 (3)	3.7	± 0.2	3.4	± 0.1*

投与 14 日目

平均値±標準偏差 (n = 10)

* $p < 0.05$ 対 媒体群 (D u n n e t t 検定)

[0202] 試験例 4 : h E R G (h u m a n E t h e r - a - g o - g o R e l a

ted Gene) ホールセルパッチクランプ試験

(試験方法)

Human ether-a-go-go related gene (hERG) 導入HEK293細胞 (Cytomix Limited) を用いて、hERG電流に及ぼす影響をホールセルパッチクランプ法により検討した。hERG導入HEK293細胞は、CO₂インキュベーター (BNA-111、タバイエスベック株式会社) を使用し、温度37℃、炭酸ガス濃度5%、飽和湿度の設定条件下で継代培養した。培養容器には、Collagen Type I Coated 75cm²フラスコ (4123-010、旭テクノグラス株式会社) およびCollagen Type I Coated 35mm培養皿 (4000-010、旭テクノグラス株式会社) を使用した。培養液には10%FCS (Fetal calf serum、バイオウエスト社)、1%MEM Non-Essential Amino Acids Solution (NEAA、インビトロジェン株式会社) を添加したE-MEM (Eagle Minimum Essential Medium (Earle's Salts、株式会社日研生物医学研究所)) を使用した。これにhERG遺伝子発現細胞を選別するためのgeneticinを400μg/mLの濃度になるように加えた。測定用の細胞として、hERG電流測定の前4から7日前に、35mm培養皿に3×10⁴個のhERG導入HEK293細胞を播種した。測定用に作製する培養皿内には、上記培養液にgeneticin (インビトロジェン株式会社) を加えないものを使用した。

各化合物の評価最高濃度は、標準細胞外液 (NaCl: 140mmol/L、KCl: 2.5mmol/L、MgCl₂: 2mmol/L、CaCl₂: 2mmol/L、HEPES: 10mmol/L、glucose: 10mmol/L (Tris-baseを用いてpH7.4に調整)) 中で析出の認められなかった最高濃度から設定した。適用方法として、細胞に近接 (約2mm) させた先端径約0.25mmのY-tubeにより各適用液を噴

出させて細胞に適用した。噴出速度は、約 0.4 mL/min とした。

実験は室温、位相差顕微鏡下にて行った。細胞を播種した 35 mm 培養皿を測定装置にセットし、細胞に常時 *Y-tube* より標準細胞外液を与えた。測定用ガラス電極内には細胞内液 (*Potassium Gluconate* : 130 mmol/L 、*KCl* : 20 mmol/L 、*MgCl₂* : 1 mmol/L 、*ATP-Mg* : 5 mmol/L 、*EGTA* : 3.5 mmol/L 、*HEPES* : 10 mmol/L (*Tris-base* を用いて $\text{pH} 7.2$ に調整)) を充填した。細胞に *conventional whole cell patch clamp* 法を適用し、保持電位を -80 mV とした。電位固定下に全細胞電流をパッチクランプ用アンプ (*AXOPATCH-200B*、*Axon Instruments, Inc.*) により増幅し、データ取得解析ソフトウェア (*pCLAMP 9.2*、*Axon Instruments, Inc.*) を用いてデータをコンピュータ (*IMC-P642400*、*Intermedical Co., Ltd.*) に取り込んだ。

hERG 電流の測定は次の2段階で実施した。なお、どちらの場合においても *command potential* (保持電位 -80 mV 、*prepulse* $+20 \text{ mV}$ 、 1.5 秒間、*test-pulse* -50 mV 、 1.5 秒間) を与えて *hERG* 電流を惹起させた。

工程 (1) : 上記 *command potential* を 0.1 Hz で 2 分間与えた。

工程 (2) : 上記 *command potential* に *pCLAMP 9.2* の *P/3 subtraction* を行なって、*leak* 電流を取り除き、これを3度繰り返してその平均を *hERG* 電流とした。

工程 (1) に続いて工程 (2) を行い (約 3 分間)、工程 (2) の方法で得られた *hERG* 電流の *test-pulse* における *tail* 電流の最大値を *hERG* 電流値とした。以後、実験終了まで (1)、(2) の操作を交互に繰り返し行い、*hERG* 電流値を測定した。

安定したhERG電流値を3回記録した（約10分間）後、標準細胞外液を各適用液に瞬時に交換した。適用液灌流中も同様にhERG電流値を3回測定し（約10分間）、3回目の測定で得られた電流値を適用液灌流後のhERG電流値とした。

データは各細胞において、適用液灌流前の約10分間で記録した3回のhERG電流値の平均値（Before値）を100%とする相対値に変換した。これを2細胞について測定し、その平均値をRelative current（%）として算出した。

$$\text{Relative current (\%)} = 100 \times A \div B$$

A：適用液灌流後のhERG電流値

B：適用液灌流前の約10分間で記録した3回のhERG電流値の平均値（Before値）

また、DMSO群に対する抑制率を以下の式に従い算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - (C \div D) \times 100$$

C：各被験化合物群のRelative current（%）の平均値

D：DMSO群のRelative current（%）の平均値

被験化合物として化合物（2）、化合物（3）、化合物（A）、化合物（B）、化合物（C）および化合物（D）を用いた場合に得られた結果を表5に示す。

[0203]

[表5]

被験化合物	濃度 ^{a)} ($\mu\text{mol/L}$)	阻害率 (%)	IC ₅₀ 値 ($\mu\text{mol/L}$)
化合物 (2)	30	24.4	>30
化合物 (3)	30	27.3	>30
化合物 (A)	10	11.8	>10
化合物 (B)	1 10	17.4 72.9	3.6
化合物 (C)	3 30	11.5 69.0	13.2
化合物 (D)	3 30	9.4 67.5	14.2

a) : 各化合物の評価最高濃度は、標準細胞外液中での析出の認められなかった最高濃度から設定した。

[0204] 試験例 5 : 肝ミクロソーム中での代謝安定性試験

(試験方法)

ヒトの肝ミクロソーム (Xenotech 社製、H0620、終濃度 (希釈後)、0.2 mg protein/mL) を 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4、 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 1.3 mM、D-glucose-6-phosphate: 3.3 mM、塩化マグネシウム: 3.3 mM、glucose-6-phosphate dehydrogenase: 0.45 U/mL を含む) に懸濁し、さらに、MeCN/DMSO (95/5) にて溶解した被験化合物 (終濃度 5 μM) と混合した。混合液を 37°C にて 10 分および 60 分インキュベート後、ギ酸 (終濃度 0.1%) を含むアセトニトリルを加え、遠心分離した上清中の被験化合物 (未変化体) を高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC/MS) (Waters 社製、LC: Acquity UPLC、MS: SQ Detector または TQ Detector) を用いて測定した。得られた測定値より、残存率 (%) を算出した。

被験化合物として化合物（２）、化合物（３）、化合物（Ａ）、化合物（Ｂ）、化合物（Ｃ）および化合物（Ｄ）を用いた場合に得られた結果を表６に示す。

[0205] [表6]

被験化合物	肝ミクロソーム中安定性（残存率％）			
	ヒト		ラット	
	１０分	６０分	１０分	６０分
化合物（２）	98.8	96.5	98.8	100.0
化合物（３）	98.4	85.9	102.7	95.8
化合物（Ａ）	34.8	0.0	24.8	0.0
化合物（Ｂ）	98.0	88.2	101.1	92.1
化合物（Ｃ）	94.0	75.1	94.2	85.3
化合物（Ｄ）	105.4	101.5	105.2	105.1

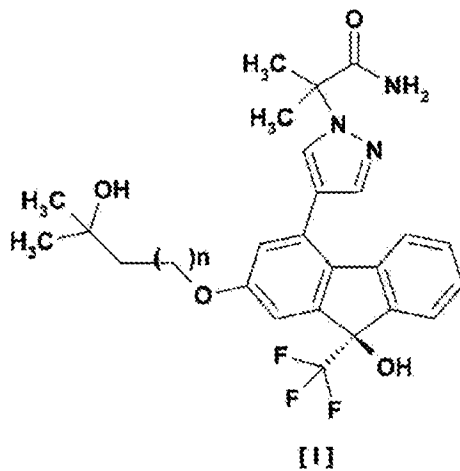
産業上の利用可能性

[0206] 本発明化合物またはその製薬上許容される塩は、PDHK阻害活性を有するので、糖尿病（１型糖尿病、２型糖尿病等）、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症（糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、白内障等）、心不全（急性心不全、慢性心不全）、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌、肺高血圧症、またはアルツハイマー病の予防または治療のための医薬の有効成分として有用である。

請求の範囲

[請求項1] 式 [I] :

[化1]

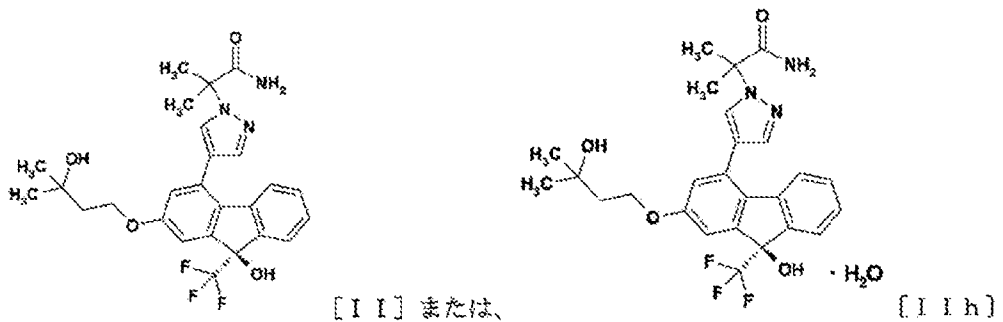


[式中、nは1または2を示す。]

で表される化合物またはその製薬上許容される塩。

[請求項2] 式 :

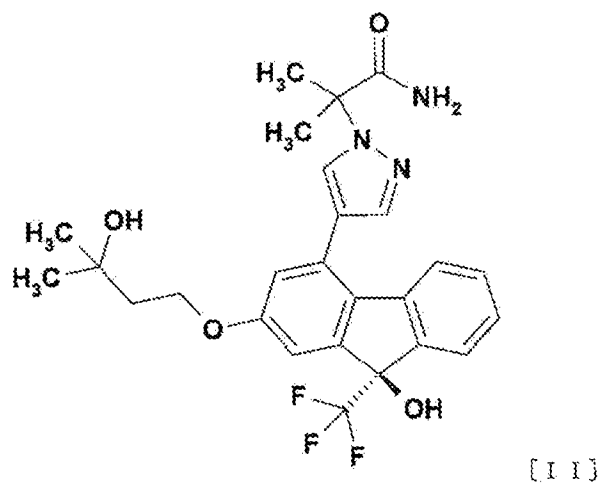
[化2]



で表される化合物。

[請求項3] 式 [I i] :

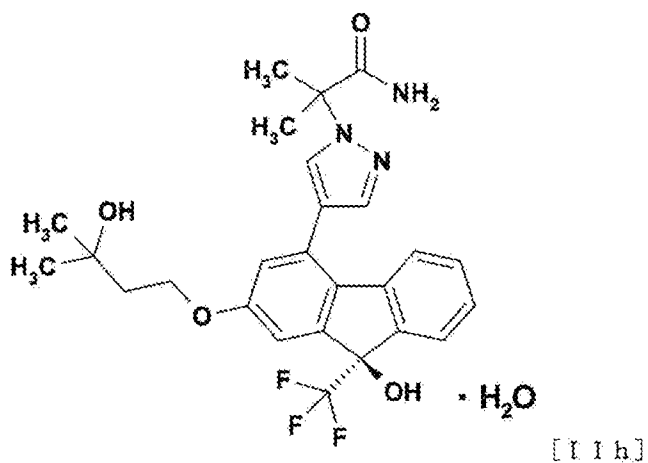
[化3]



で表される請求項2記載の化合物。

[請求項4] 式 [11h] :

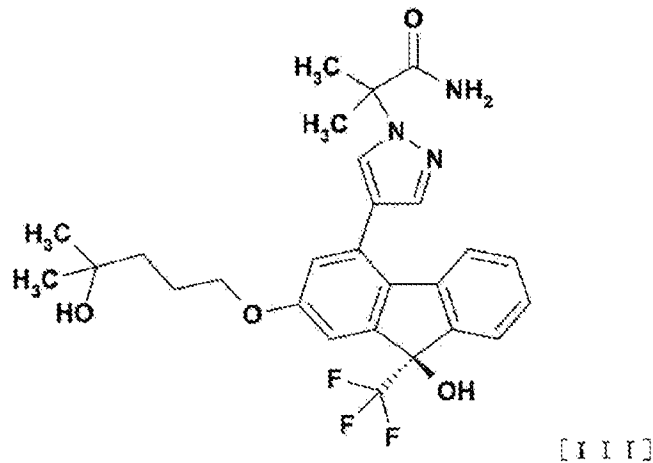
[化4]



で表される請求項2記載の化合物。

[請求項5] 式 [11i] :

[化5]



で表される化合物。

- [請求項6] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩、および製薬上許容される担体を含む、医薬組成物。
- [請求項7] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK阻害剤。
- [請求項8] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK1阻害剤。
- [請求項9] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、PDHK2阻害剤。
- [請求項10] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、血糖低下剤。
- [請求項11] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、乳酸低下剤。
- [請求項12] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載の化合物またはその製薬上許容される塩を含む、糖尿病、インスリン抵抗性症候群、メタボリックシンドローム、高血糖症、高乳酸血症、糖尿病合併症、心不全、心筋症、心筋虚血症、心筋梗塞、狭心症、脂質異常症、アテローム性硬化症、末梢動脈疾患、間欠性跛行、慢性閉塞性肺疾患、脳虚血症、脳卒中、ミトコンドリア病、ミトコンドリア脳筋症、癌または肺高血圧症

の予防または治療剤。

[請求項13] 糖尿病が、1型糖尿病または2型糖尿病である請求項12記載の予防または治療剤。

[請求項14] 糖尿病合併症が、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症および白内障からなる群から選択される、請求項12記載の予防または治療剤。

[請求項15] 心不全が、急性心不全または慢性心不全である請求項12記載の予防または治療剤。