

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-89712

(P2019-89712A)

(43) 公開日 令和1年6月13日(2019.6.13)

| (51) Int.Cl.                    | F I                  | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 31/196 (2006.01)</b> | A 6 1 K 31/196       | 4 C 2 0 6   |
| <b>A 6 1 P 25/20 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 25/20        | 4 H 0 0 6   |
| <b>C 0 7 C 229/58 (2006.01)</b> | C 0 7 C 229/58 C S P |             |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 32 頁)

|                   |                              |          |  |
|-------------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号         | 特願2017-202225 (P2017-202225) | (71) 出願人 | 504171134<br>国立大学法人 筑波大学<br>茨城県つくば市天王台一丁目1番1 |
| (22) 出願日          | 平成29年10月18日(2017.10.18)      | (74) 代理人 | 100080791<br>弁理士 高島 一                        |
| (特許庁注：以下のものは登録商標) |                              | (74) 代理人 | 100125070<br>弁理士 土井 京子                       |
| 1. テフロン           |                              | (74) 代理人 | 100136629<br>弁理士 鎌田 光宜                       |
|                   |                              | (74) 代理人 | 100121212<br>弁理士 田村 弥栄子                      |
|                   |                              | (74) 代理人 | 100163658<br>弁理士 小池 順造                       |
|                   |                              | (74) 代理人 | 100174296<br>弁理士 當麻 博文                       |

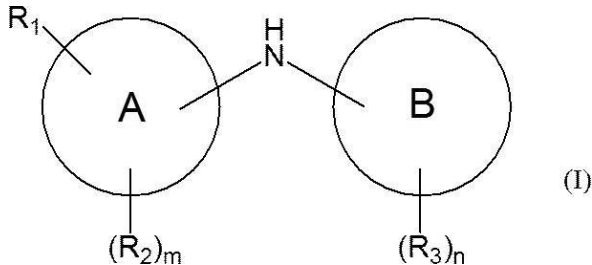
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規徐波睡眠誘導剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 心血管作用等の副作用を引き起こすことなく、徐波睡眠(SWS)を誘導する睡眠誘導剤の提供。

【解決手段】 式(I)：



(R<sub>1</sub> はカルボキシル基であり； m個の R<sub>2</sub> は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリアル基であり； n個の R<sub>3</sub> は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリアル基であり； mは 0、1又は2であり； nは 1又は2である) で表される化合物又はその薬学上許容され得る塩を含む徐波睡眠誘導剤。

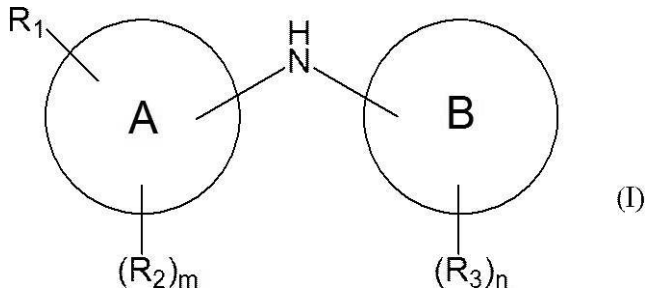
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (I) :

## 【化 1】



10

(式中、

環 A 及び環 B は同一又は異なって 5 又は 6 員芳香環であり；

 $R_1$  はカルボキシル基であり； $m$  個の  $R_2$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリール基であり； $n$  個の  $R_3$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリール基であり； $m$  は 0、1 又は 2 であり； $n$  は 1 又は 2 である)

で表される化合物またはその医薬上許容される塩を含む、徐波睡眠誘導剤。

20

## 【請求項 2】

環 A 及び環 B がベンゼンである、請求項 1 記載の剤。

## 【請求項 3】

 $m$  が 2 である、請求項 1 又は 2 記載の剤。

## 【請求項 4】

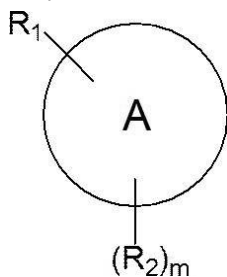
 $R_2$  がハロゲン原子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の剤。

## 【請求項 5】

下記部分構造：

30

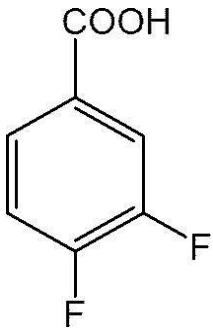
## 【化 2】



40

が、下記式：

【化 3】



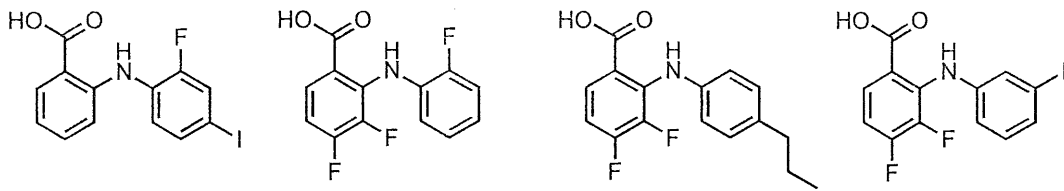
10

で表される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の剤。

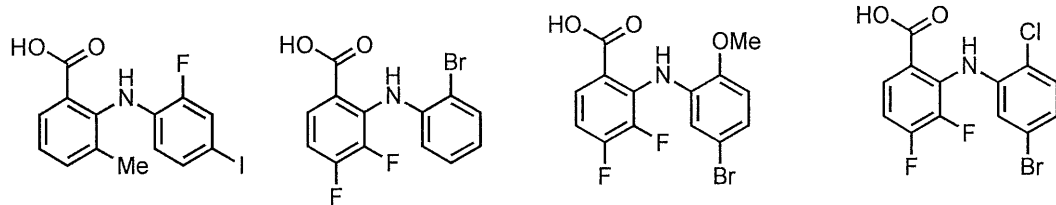
【請求項 6】

式 (I) で表される化合物が下記化合物群から選択される、請求項 1 記載の剤。

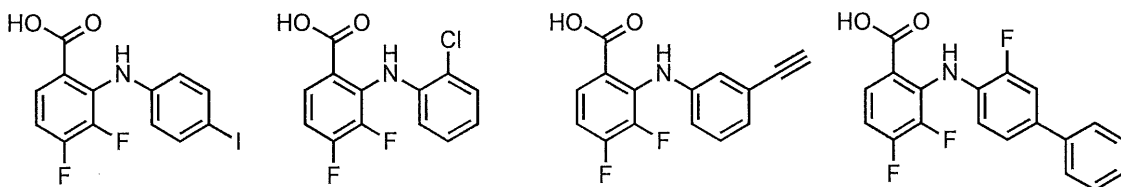
【化 4】



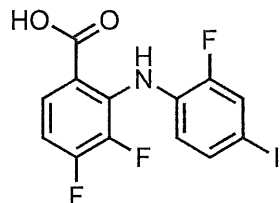
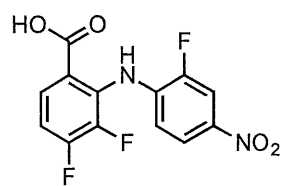
20



30



40



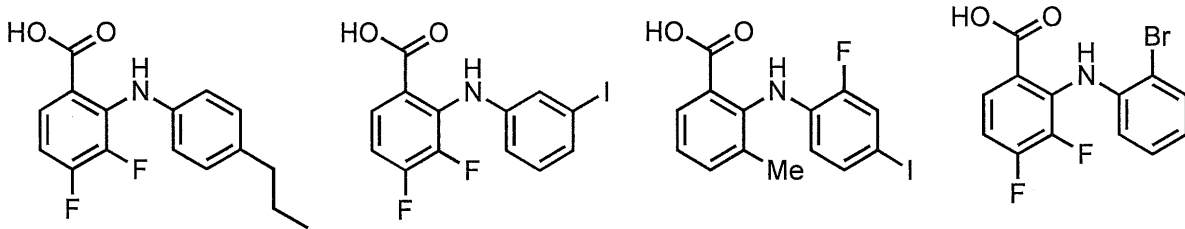
【請求項 7】

心血管系の副作用が低減された、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の剤。

【請求項 8】

下記化合物群から選択される化合物及びその医薬上許容される塩。

## 【化 5】



10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、睡眠誘導剤に関する。本発明は、特に熟睡感を与える徐波睡眠を提供可能な睡眠誘導剤に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

不眠症は最も一般的な睡眠障害の一つであり、推定有病率が一般の集団で10～15%、高齢者集団で30～60%である。不眠症の治療のための最も広く処方されている薬剤は、ベンゾジアゼピン（BDZ）および非BDZとして知られている、抑制性神経伝達物質 - アミノ酸のシグナル伝達を増強する中枢神経系抗うつ薬である。しかしながら、これらの薬物療法は、筋肉弛緩、リバウンド不眠症、食欲の変化、翌日の鎮静、認知機能障害、健忘症効果、ならびに薬物耐性および依存性の発生を含む広範囲の副作用に悩まされている。また、オレキシン受容体アンタゴニストは、最近、不眠症治療薬として開発され承認された（非特許文献1）。しかしながら、これらの薬物の主な問題点は、筋力低下、奇妙な夢、夢遊病、他の夜間行動または自殺願望の起こり得る兆候を伴う翌朝の眠気である（非特許文献2）。さらに、オレキシン受容体アンタゴニストは、ほとんどの場合、睡眠から覚醒することを妨げることによって作用するので、寝付きに問題がある人にはあまり効果がない。

30

## 【0003】

極めて選択的なアデノシンA<sub>2A</sub>受容体（A<sub>2A</sub>R）アゴニストであるCGS21680は、ラットの前脳基底部吻側腹側部のくも膜下腔またはマウスの側脳室への注入後に睡眠を著しく増加させる（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5）。しかしながら、A<sub>2A</sub>Rアゴニストの投与は、低血圧や頻脈等の心血管作用のために睡眠障害を治療する臨床的可能性はないと一般に考えられている（非特許文献6）。A<sub>2A</sub>Rアロステリック調節剤の作用は、オルソステリックA<sub>2A</sub>Rアゴニストとは対照的に、アデノシンが放出され脳内のアデノシンレベルが覚醒時に上昇する場合に限定されるため、アロステリックA<sub>2A</sub>R調節は不眠症治療の代替的戦略であり得る（非特許文献7）。

40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0004】

【非特許文献1】Cox et al, 2010, J Med Chem 53: 5320-5332

【非特許文献2】Jacobson et al, 2014, Expert Rev Clin Pharmacol 7: 711-730

【非特許文献3】Satoh et al, 1999, Eur J Neurosci 11: 1587-1597

【非特許文献4】Scammell et al, 2001, Neuroscience 107: 653-663

50

【非特許文献 5】Urade et al, 2003, Neurology 61: S94-96

【非特許文献 6】Lera Ruiz et al, 2014, J Med Chem 57: 3623-3650

【非特許文献 7】Porkka-Heiskanen et al, 1997, Science 276: 1265-1268

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、筋肉弛緩、リバウンド不眠症、食欲の変化、翌日の鎮静、認知機能障害、健忘症効果、ならびに薬物耐性および依存性の発生等の副作用がない睡眠誘導剤、特に熟睡感を与える徐波睡眠を提供することが可能な睡眠誘導剤として有用な化合物を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

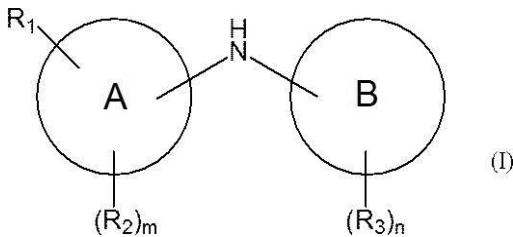
本発明者らは、上記課題を解決すべく、アデノシン  $A_2A$  受容体を標的としたポジティブアロステリックモジュレーター (PAM) を探索研究し、その過程で  $A_2A$  R PAM 活性を有する一連の化合物 (以下、 $A_2A$  R PAM と総称する場合がある) を見出し、当該化合物を投与することにより、心血管作用等の副作用を引き起こすことなく、徐波睡眠 (SWS) を誘導することに成功して本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の通りである。

(1) 式 (I) :

【0007】

【化 1】



【0008】

(式中、

環 A 及び環 B は同一又は異なって 5 又は 6 員芳香環であり；

30

$R_1$  はカルボキシル基であり；

$m$  個の  $R_2$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリール基であり；

$n$  個の  $R_3$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアリール基であり；

$m$  は 0、1 又は 2 であり；

$n$  は 1 又は 2 である)

で表される化合物またはその医薬上許容される塩を含む、徐波睡眠誘導剤。

(2) 環 A 及び環 B がベンゼンである、上記 (1) 記載の剤。

(3)  $m$  が 2 である、上記 (1) 又は (2) 記載の剤。

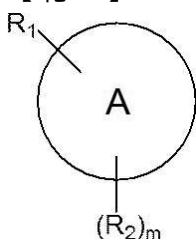
40

(4)  $R_2$  がハロゲン原子である、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の剤。

(5) 下記部分構造：

【0009】

【化 2】



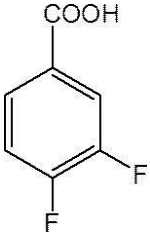
50

【 0 0 1 0 】

が、下記式：

【 0 0 1 1 】

【 化 3 】



10

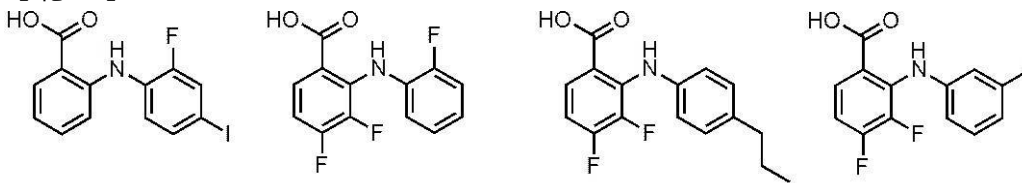
【 0 0 1 2 】

で表される、上記(1)～(4)のいずれかに記載の剤。

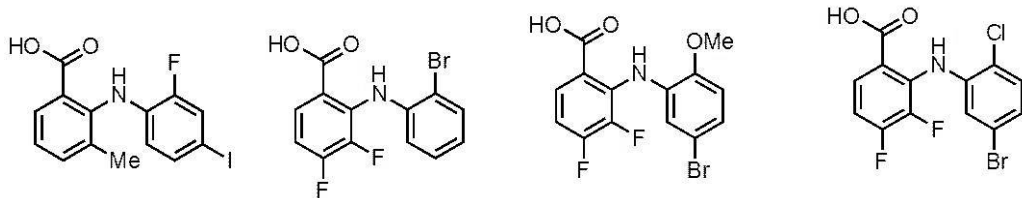
(6)式(I)で表される化合物が下記化合物群から選択される、上記(1)記載の剤。

【 0 0 1 3 】

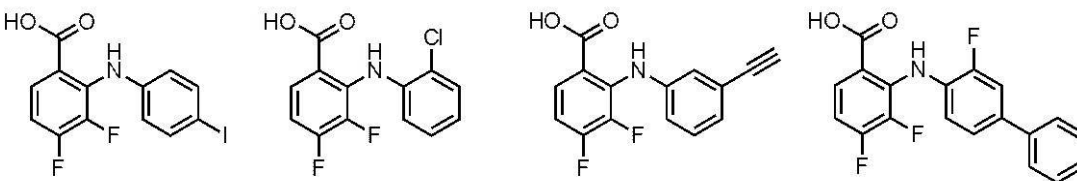
【 化 4 】



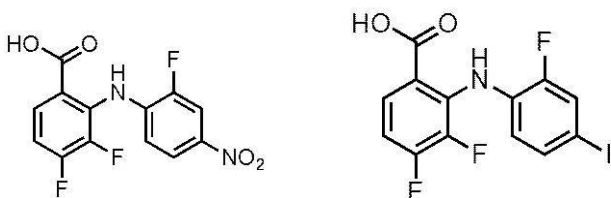
20



30



40



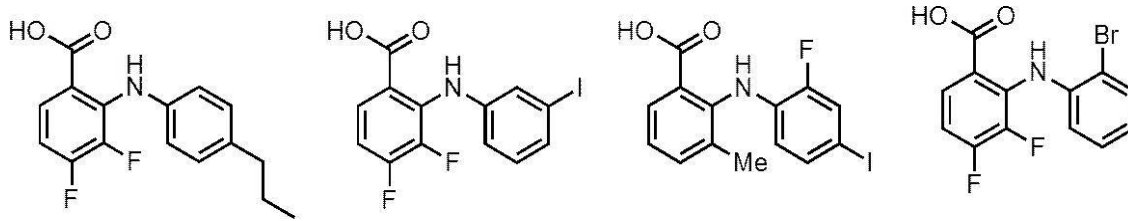
【 0 0 1 4 】

(7)心血管系の副作用が低減された、上記(1)～(6)のいずれかに記載の剤。

(8)下記化合物群から選択される化合物及びその医薬上許容される塩。

【 0 0 1 5 】

## 【化5】



## 【発明の効果】

## 【0016】

本発明によれば、心血管作用等の副作用を引き起こすことなく、徐波睡眠（SWS）を誘導することが可能となる。従って本発明は、睡眠誘導剤、特に熟睡感を与える徐波睡眠を提供可能な睡眠誘導剤の提供が可能となる。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0017】

【図1】マウス  $A_{2A}R$  発現 CHO 細胞の特徴づけ。(a) FRET アッセイのための細胞数の最適化。(b) 異なる濃度のアデノシンに対する  $mA_{2A}R$  - CHO 細胞株の応答。

【図2】 $mA_{2A}R$  - CHO 細胞における  $A_{2A}R$  PAM 及びアデノシンの共処理は、アロステリック調節作用を示した。(a) 化合物のハイスループットスクリーニング。(b, c) 化合物番号 371 ( $A_{2A}R$  PAM - 1) のアロステリック効果とその構造。(d)  $mA_{2A}R$  - CHO 及びネイティブ - CHO 細胞を用いた  $A_{2A}R$  PAM - 1 のアロステリック効果の妥当性確認。(e, f) 異なる濃度のアデノシン存在下での異なる濃度の  $A_{2A}R$  PAM - 1 のアロステリック効果。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. アデノシン、Student's t-検定による。CMP: 化合物

20

【図3】 $mA_{2A}R$  - CHO 細胞において、 $A_{2A}R$  PAM は、選択的な  $A_{2A}R$  アゴニストである CGS 21680 の活性を増強しなかった。 $A_{2A}R$  PAM - 1 (100  $\mu$ M) 及び異なる濃度での選択的  $A_{2A}R$  アゴニストである CGS 21680 とで共処理された  $mA_{2A}R$  - CHO 細胞。\*\*:  $p < 0.01$ 、CGS 21680 及び  $A_{2A}R$  PAM - 1 間で。

【図4】 $A_{2A}R$  PAM - 1 の IP 投与はマウスにおいて SWS を誘導した。(a) 生理食塩水及び  $A_{2A}R$  PAM - 1 の IP 注射後のポリグラフ記録及び対応するヒプノグラムの典型例。(b)  $A_{2A}R$  PAM - 1 を 75 mg / kg で投与したマウスにおける、SWS、REM 睡眠及び覚醒のタイムコース。(c)  $A_{2A}R$  PAM - 1 (75 mg / kg, IP) 注射して 8 時間後の SWS、レム睡眠及び覚醒の総量。(d) 異なる用量での  $A_{2A}R$  PAM - 1 の SWS 誘導効果。(e)  $A_{2A}R$  PAM - 1 (75 mg / kg, IP) 注射して 8 時間の間の EEG パワー密度。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$  vs. 生理食塩水、ANOVA Tukey Test 又は student's t-検定。(n=5)

30

【図5】 $A_{2A}R$  PAM - 1 の IP 投与後のマウスの睡眠構造。マウスにおける、 $A_{2A}R$  PAM - 1 の IP 投与後の各段階のエピソード数 (a)、平均持続時間 (b) 及び睡眠遷移段階 (c)。

40

【図6】 $A_{2A}R$  PAM - 4 の IP 投与はマウスにおいて SWS を誘導した。 $A_{2A}R$  PAM - 4 を 75 mg / kg 又は 90 mg / kg で投与したマウスにおける、SWS のタイムコース。 $A_{2A}R$  PAM - 4 (75 mg / kg, IP) 投与後の SWS の総量、及び  $A_{2A}R$  PAM - 4 (90 mg / kg, IP) 注射して 8 時間の間の SWS の EEG パワー密度をもまた示した。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. 生理食塩水、Student's t-検定。

【図7】マウスにおけるアデノシン  $A_{2A}R$  に依存した  $A_{2A}R$  PAM - 1 の睡眠誘導効果。マウスにおいて、 $A_{2A}R$  PAM - 1 の睡眠誘導効果は  $A_{2A}R$  アンタゴニストである ZM 241385 によって抑制された (a, b)。 $A_{2A}R$  PAM - 1 の睡眠誘

50

導効果は  $A_{2A}R - KO$  マウスでは見られなかった (c, d)。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. 生理食塩水、ANOVA Tukey Test 又は student's t-検定。(n=4-5又は8)

【図8】マウスにおいて、 $A_{2A}R - PAM - 1$  の ICV 注入は SWS を誘導した。 $A_{2A}R - PAM - 1$  を  $200 \text{ nmol/h}$  で投与したマウスにおける、SWS、REM 睡眠及び覚醒の (a) タイムコース及び (b) 総量。(c)  $A_{2A}R - PAM - 1$  ( $200 \text{ nmol/h}$ , ICV) 注入の間の SWS の EEG パワー密度。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. 生理食塩水、ANOVA Tukey Test 又は student's t-検定。(n=5)

【図9】 $A_{2A}R - PAM - 1$  の IP 投与後のマウスの睡眠構築。マウスにおける、 $A_{2A}R - PAM - 1$  の IP 投与後の各段階のエピソード数 (a)、平均持続時間 (b) 及び睡眠遷移段階 (c)。

【図10】 $A_{2A}R - PAM - 1$  は心血管系に対しては有意な影響はなかった。(a) マウスにおける、 $A_{2A}R - PAM - 1$  又は CGS 21680 投与の前後での ECG (Lead I) 及び心臓内心電図 (ICE) シグナル。(b) マウスにおける、 $A_{2A}R - PAM - 1$  又は CGS 21680 注射後の血圧。(c) マウスにおける、 $A_{2A}R - PAM - 1$  又は CGS 21680 投与後の心拍数。データは、平均値  $\pm$  SEM で示した。\*\*:  $p < 0.01$  vs. 生理食塩水、Student's t-検定。(n=5-6)。SBP: 収縮期血圧; DBP: 拡張期血圧; MBP: 平均血圧; CGS 21680: 選択的アデノシン  $A_{2A}$  受容体アゴニスト。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

【0019】

「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子である。

【0020】

「アルキル基」とは、1~10、好ましくは1~6の炭素原子を有する直鎖または分岐状のアルキル基を意味し、その具体例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、ネオペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、n-ヘキシル、2-ヘキシル等が挙げられる。該アルキル基は置換基を有していてもよい。

【0021】

「アリール基」とは、6~10の炭素原子を有するアリール基を意味し、その具体例は、フェニル、ナフチル基等が挙げられる。該アリール基は置換基を有していてもよい。

【0022】

「アルコキシ基」とは、1~10、好ましくは1~6の炭素原子を有する直鎖または分岐状のアルコキシ基を意味し、その具体例は、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、n-ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、tert-ペンチルオキシ、ネオペンチルオキシ、2-ペンチルオキシ、3-ペンチルオキシ、n-ヘキシルオキシ、2-ヘキシルオキシ等が挙げられる。該アルコキシ基は置換基を有していてもよい。

【0023】

「5又は6員芳香環」としては、例えば、ベンゼン環、ピロール環、ピラゾール環、イミダゾール環、トリアゾール環(1,2,3-aトリアゾール環、1,2,4-aトリアゾール環、1,3,4-aトリアゾール環)、テトラゾール環、オキサゾール環、イソオキサゾール環、チアゾール環、イソチアゾール環、オキサジアゾール環、チアジアゾール環、フラン環、チオフエン環、ピリジン環、ピリダジン環、ピリミジン環、ピラジン環、トリアジン環等が挙げられ、好ましくはベンゼン環である。

【0024】

10

20

30

40

50



- 「アルキル基」、「アリール基」及び「アルコキシ基」が有してもよい置換基としては、
- (1) ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素；好ましくはフッ素）、
  - (2) ハロゲン原子で置換されていてもよい低級アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル等の $C_{1-6}$ アルキル基等）、
  - (3) シクロアルキル基（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の $C_{3-6}$ シクロアルキル基等）、
  - (4) 低級アルキニル基（例えば、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル等の $C_{2-6}$ アルキニル基等）、
  - (5) 低級アルケニル基（例えば、ビニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル等の $C_{2-6}$ アルケニル基等）、
  - (6)  $C_{1-6}$ アルコキシ基（例えば、メトキシ）で置換されていてもよいアラルキル基（例えば、ベンジル、*p*-メチルベンジル、フェネチル等の $C_{7-12}$ アラルキル基等）、
  - (7) アリール基（例えば、フェニル、ナフチル等の $C_{6-10}$ アリール基等、好ましくはフェニル基）、
  - (8) ハロゲン原子で置換されていてもよい低級アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ等の $C_{1-6}$ アルコキシ基、トリフルオロメトキシ等）、
  - (9) アリールオキシ基（例えば、フェノキシ等の $C_{6-10}$ アリールオキシ基等）、
  - (10) ハロゲン原子で置換されていてもよい、ホルミル基又は低級アルカノイル基（例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル等の $C_{1-6}$ アルキル-カルボニル基等、シクロヘキシルカルボニル等の $C_{3-6}$ シクロアルキル-カルボニル基等）、
  - (11) アリールカルボニル基（例えば、ベンゾイル、ナフトイル等の $C_{6-10}$ アリール-カルボニル基等）、
  - (12) ホルミルオキシ基又は低級アルカノイルオキシ基（例えば、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ等の $C_{1-6}$ アルキル-カルボニルオキシ基等）、
  - (13) アリールカルボニルオキシ基（例えば、ベンゾイルオキシ、ナフトイルオキシ等の $C_{6-10}$ アリール-カルボニルオキシ基等）、
  - (14) カルボキシル基、
  - (15) 低級アルコキシカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル等の $C_{1-6}$ アルコキシ-カルボニル基等）、
  - (16) アラルキルオキシカルボニル基（例えば、ベンジルオキシカルボニル等の $C_{7-12}$ アラルキルオキシ-カルボニル基等）、
  - (17) カルバモイル基、
  - (18) モノ-、ジ-又はトリ-ハロゲノ低級アルキル基（例えば、クロロメチル、ジクロロメチル、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル等のモノ-、ジ-又はトリ-ハロゲノ $C_{1-6}$ アルキル基等）、
  - (19) オキソ基、
  - (20) アミジノ基、
  - (21) イミノ基、
  - (22) アミノ基、
  - (23) モノ-低級アルキルアミノ基（例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ等のモノ- $C_{1-6}$ アルキルアミノ基等）、
  - (24) ジ-低級アルキルアミノ基（例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノ、*N*-エチル-*N*-メチルアミノ等

10

20

30

40

50

のジ - C<sub>1-6</sub> アルキルアミノ基等)、

(25) 置換基を有していてもよい、炭素原子と1個の窒素原子に加えて窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選ばれたヘテロ原子を1~3個含んでもよい3~8員の含窒素複素環基(例えば、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、ヒドロキシ基、ハロゲン化されていてもよいC<sub>1-6</sub> アルキル基、ハロゲン化されていてもよいC<sub>1-6</sub> アルコキシ基、アミノ基、モノ - C<sub>1-6</sub> アルキルアミノ基、ジ - C<sub>1-6</sub> アルキルアミノ基、カルボキシル基、C<sub>1-6</sub> アルキル - カルボニル基、C<sub>1-6</sub> アルコキシ - カルボニル基、カルバモイル基、モノ - C<sub>1-6</sub> アルキル - カルバモイル基、ジ - C<sub>1-6</sub> アルキル - カルバモイル基、C<sub>6-10</sub> アリール - カルバモイル基、C<sub>6-10</sub> アリール基、C<sub>6-10</sub> アリールオキシ基、及びハロゲン化されていてもよいC<sub>1-6</sub> アルキル - カルボニルアミノ基、オキソ基等から選ばれる1~5個の置換基を有していてもよい、炭素原子と1個の窒素原子に加えて窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選ばれたヘテロ原子を1~3個含んでもよい3~8員の含窒素複素環基;例えば、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピリジニル、ピロリニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、オキサジアゾリル、イソオキサゾリル、モルホリニル、ジヒドロピリジニル、テトラヒドロピリジニル、ピペラジニル、N - メチルピペラジニル、N - エチルピペラジニル等)、

(26) アルキレンジオキシ基(例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等のC<sub>1-3</sub> アルキレンジオキシ基等)、

(27) ヒドロキシ基、

(28) ニトロ基、

(29) シアノ基、

(30) メルカプト基、

(31) スルホ基、

(32) スルフィノ基、

(33) ホスホノ基、

(34) スルファモイル基、

(35) モノ - 低級アルキルスルファモイル基(例えば、N - メチルスルファモイル、N - エチルスルファモイル、N - プロピルスルファモイル、N - イソプロピルスルファモイル、N - ブチルスルファモイル等のモノ - C<sub>1-6</sub> アルキルスルファモイル基等)、

(36) ジ - 低級アルキルスルファモイル基(例えば、N, N - ジメチルスルファモイル、N, N - ジエチルスルファモイル、N, N - ジプロピルスルファモイル、N, N - ジブチルスルファモイル等のジ - C<sub>1-6</sub> アルキルスルファモイル基等)、

(37) 低級アルキルチオ基(例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec - ブチルチオ、tert - ブチルチオ等のC<sub>1-6</sub> アルキルチオ基等)、

(38) アリールチオ基(例えば、フェニルチオ、ナフチルチオ等のC<sub>6-10</sub> アリールチオ基等)、

(39) 低級アルキルスルフィニル基(例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、プロピルスルフィニル、ブチルスルフィニル等のC<sub>1-6</sub> アルキルスルフィニル基等)、

(40) アリールスルフィニル基(例えば、フェニルスルフィニル、ナフチルスルフィニル等のC<sub>6-10</sub> アリールスルフィニル基等)、

(41) 低級アルキルスルホニル基(例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、ブチルスルホニル等のC<sub>1-6</sub> アルキルスルホニル基等)、

(42) アリールスルホニル基(例えば、フェニルスルホニル、ナフチルスルホニル等のC<sub>6-10</sub> アリールスルホニル基等)、

(43) 低級アルキルカルボニルアミノ基(例えば、メチルカルボニルアミノ等のC<sub>1-6</sub> アルキルカルボニルアミノ基等)等からなる群(本明細書中、置換基群Aという)、

(44) アラルキルアミノ(例えば、ベンジルアミノ等のC<sub>7-12</sub> アラルキルアミノな

10

20

30

40

50

ど)、及び

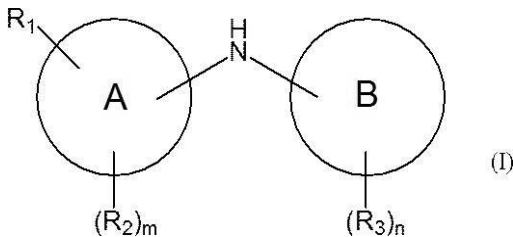
(45) 置換基(例えば、ハロゲン原子で置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基)を有していてもよいアールスルホニルアミノ基(例えば、フェニルスルホニルアミノ、ナフチルスルホニルアミノ等の $C_{6-10}$ アールスルホニルアミノ基等)(本明細書中、置換基群 A という)から選択される置換基が用いられる。

【0025】

以下に、式(I)で表される化合物(以下、化合物(I)と称する場合もある)について説明する。尚、特に記載のない限り、各基の定義は上述したものと同義である。

【0026】

【化6】



10

【0027】

(式中、

環 A 及び環 B は同一又は異なって 5 又は 6 員芳香環であり；

$R_1$  はカルボキシル基であり；

$m$  個の  $R_2$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアール基であり；

$n$  個の  $R_3$  は独立してハロゲン原子、アルキル基、ニトロ基、アルコキシ基、シアノ基又はアール基であり；

$m$  は 0、1 又は 2 であり；

$n$  は 1 又は 2 である)。

環 A は、 $m$  個の  $R_2$  に加えて置換可能な位置で置換基を有していてもよい。環 B は、 $n$  個の  $R_3$  に加えて置換可能な位置で置換基を有していてもよい。環 A 及び環 B がさらに有していてもよい置換基としては、上記[置換基群 A]として例示されたものが挙げられる。

環 A 及び環 B の「5 又は 6 員芳香環」としては、好ましくは 6 員芳香環(例えば、ベンゼン環、ピリジン環、ピリダジン環、ピリミジン環、ピラジン、トリアジン)が挙げられる。中でも、ベンゼンが好ましい。

20

30

$R_2$  のハロゲン原子としては、フッ素原子が好ましい。

$R_2$  のアルキル基としては、メチルが好ましい。

$R_2$  のアルコキシ基としては、メトキシが好ましい。

$R_2$  のアール基としては、フェニル基が好ましい。

$R_2$  は、好ましくはハロゲン原子及びアルキル基であり、より好ましくはフッ素原子である。

$R_3$  のハロゲン原子としては、フッ素原子、ヨウ素原子及び臭素原子が好ましい。

$R_3$  のアルキル基としては、プロピルが好ましい。

$R_3$  のアルコキシ基としては、メトキシが好ましい。

$R_3$  のアール基としては、フェニル基が好ましい。

$R_3$  は、好ましくはハロゲン原子及びアルキル基であり、より好ましくはフッ素原子及びヨウ素原子である。

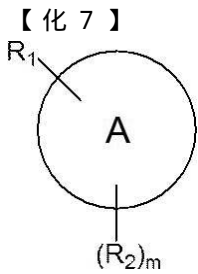
40

$m$  は好ましくは 1 又は 2 であり、より好ましくは 2 である。

$n$  は好ましくは 2 である。

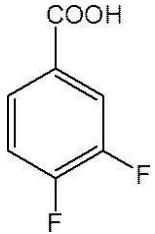
式(I)で表される化合物のうち、下記部分構造：

【0028】



【0029】  
が、下記式：

【化8】



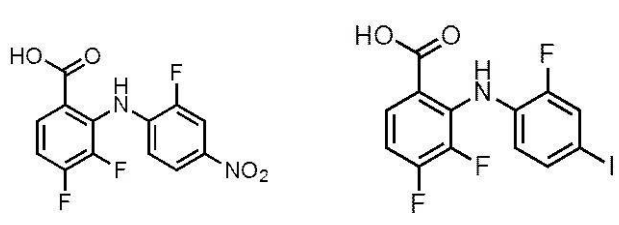
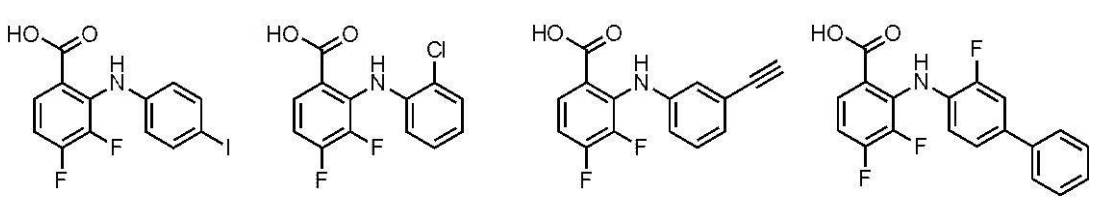
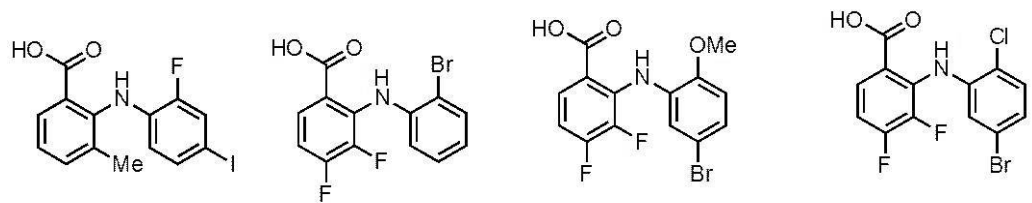
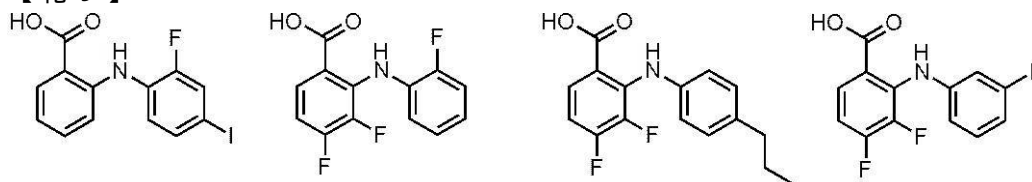
【0031】  
で表される化合物。

【0032】

式(I)で表される化合物のうち、下記化合物群から選択される化合物が特に好ましい

【0033】

【化9】



10

20

30

40

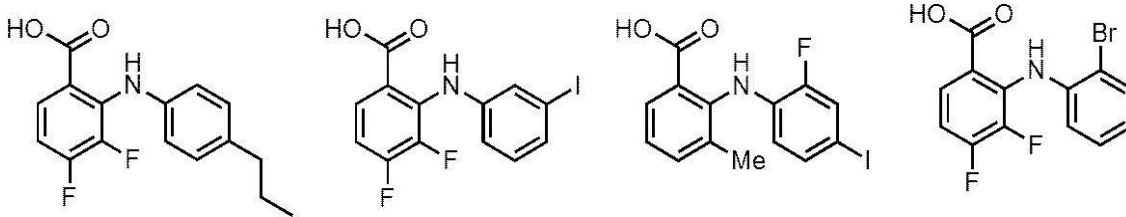
50

## 【0034】

特に、下記化合物は新規化合物である。

## 【0035】

## 【化10】



10

## 【0036】

化合物(I)の塩としては、医薬上許容され得る塩等が挙げられる。含まれる例は、トリフルオロ酢酸、酢酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、グルコン酸、アスコルビン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ケイ皮酸、フマル酸、ホスホン酸、塩酸、硝酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、スルファミン酸、硫酸等の酸との酸付加塩；ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等の金属塩；トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン等の有機塩基との塩等が挙げられる。

## 【0037】

化合物(I)が、光学異性体、立体異性体、位置異性体、回転異性体等の異性体を有する場合には、いずれか一方の異性体も、異性体の混合物も化合物(I)に包含される。例えば、化合物(I)に光学異性体が存在する場合には、ラセミ体から分割された光学異性体も化合物(I)に包含される。これらの異性体は、自体公知の合成手法、分離手法(濃縮、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶等)によりそれぞれを単品として得ることができる。また、化合物(I)には、互変異性体等の構造異性体及び幾何異性体が存在し、かかる異性体も本発明の範囲内である。

20

## 【0038】

化合物(I)は、結晶であっても無晶形であってもよい。化合物(I)が結晶である場合、結晶形が単一であっても結晶形混合物であっても化合物(I)に包含される。結晶は、自体公知の結晶化法を適用して、結晶化することによって製造することができる。

30

## 【0039】

化合物(I)は、溶媒和物(例えば、水和物等)であっても、無溶媒和物であってもよく、いずれも化合物(I)に包含される。

## 【0040】

化合物(I)は、同位元素(例、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等)等で標識されていてもよい。

## 【0041】

化合物(I)は、アデノシン $A_{2A}$ 受容体を活性化する作用を有する。アデノシン $A_{2A}$ 受容体は睡眠/覚醒サイクルに密接に関与し、アデノシン $A_{2A}$ 受容体を活性化することによって睡眠を誘導することができる。アデノシン $A_{2A}$ 受容体を活性化する作用は、当分野で通常実施されている方法に準じて、あるいは当該方法を必要に応じて改変することによって測定することができる。例えば、実施例で示されるように、 $A_{2A}R$ を発現しているチャイニーズハムスター卵巣細胞を用い、 $A_{2A}R$ 活性化によって産生されるcAMPの量を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)イムノアッセイにより測定することによって評価され得る。

40

## 【0042】

アデノシン $A_{2A}$ 受容体は、睡眠/覚醒サイクルに密接に関与する一方で、大脳皮質、海馬、線条体、冠血管、肺、白血球、血小板などに分布しており、睡眠調節以外の、血管拡張、痛み、内臓平滑筋の弛緩など、様々な生理機能に関与している。従って、アデノシン $A_{2A}$ 受容体活性化剤は、心血管系の副作用が懸念される。しかしながら、化合物(I)

50

)は、内在性リガンドの作用するオルソステリック部位とは異なる部位に作用することで、上記副作用が生じることがない。すなわち、化合物(I)はアデノシンA<sub>2A</sub>受容体のポジティブアロステリックモジュレーターとして作用する。

【0043】

優れたアデノシンA<sub>2A</sub>受容体活性化作用を有する化合物(I)は、哺乳動物(例、ヒト、サル、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ウサギ等)に対し、睡眠誘導剤、特に熟睡感を与える徐波睡眠を提供することができる睡眠誘導剤として有用である。

【0044】

本発明化合物を有効成分として含有する医薬(例えば睡眠誘導剤等)中における化合物(I)の含有量は製剤全体に対して通常、約0.01~約99.9重量%、好ましくは約0.1~約50重量%である。

10

【0045】

化合物(I)の用量は、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

用量は対象疾患、症状、投与対象、投与方法等によって異なるが、例えば、本発明化合物を化合物(I)の量として、約0.1~100mg/kg(体重)、好ましくは約1~10mg/kg(体重)、更に好ましくは約1~3mg/kg(体重)を1日あたり、1回又は2ないし3回に分けて投与するのが好ましい。

20

【0046】

化合物(I)は、例えば睡眠誘導剤として用いる場合、対象となる睡眠障害の程度に応じて、他の薬剤と組み合わせて用いることができる。これらの併用薬剤は低分子量の化合物であってもよく、また高分子量のタンパク、ポリペプチド、抗体あるいはワクチンなどでもよい。この場合、化合物(I)と併用薬剤の投与時期は限定されず、投与時に化合物(I)と併用薬剤とが組み合わせられていればよい。

【0047】

化合物(I)は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の固形製剤；シロップ剤、注射剤等の液状製剤；貼付剤、軟膏剤、硬膏剤等の経皮吸収剤；吸入剤；坐剤として、適宜製剤化することができる。

30

化合物(I)を含有する医薬は、経口又は非経口投与され、上記した化合物を1種単独で用いてもよく、又は2種以上を併用して用いてもよい。

【0048】

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用されている各種有機あるいは無機担体物質を用いることができる。具体的には、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、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、無痛化剤等を配合することができる。又、必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることもできる。

【0049】

賦形剤の例としては、乳糖、白糖、ブドウ糖、でんぷん、蔗糖、結晶セルロース、カンゾウ末、マンニトール、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム等が挙げられる。

40

【0050】

滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、精製タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。

【0051】

結合剤の例としては、結晶セルロース、白糖、マンニトール、デキストリン、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、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

【0052】

50

崩壊剤の例としては、でんぷん、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロス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等が挙げられる。

【0053】

溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油等が挙げられる。

【0054】

溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、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、トリスアミノメタン、コレステロール、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。

10

【0055】

懸濁化剤の例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤；ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

【0056】

等張化剤の好適な例として、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

20

【0057】

緩衝剤の好適な例として、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

無痛化剤の好適な例として、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。

【0058】

防腐剤の好適な例として、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

抗酸化剤の好適な例として、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸等が挙げられる。

着色剤の好適な例として、例えばタール色素、カラメル、三二酸化鉄、酸化チタン、リポフラビン類等が挙げられる。

30

甘味剤の好適な例として、ブドウ糖、果糖、転化糖、ソルビトール、キシリトール、グリセリン、単シロップ等が挙げられる。

【0059】

製造法

本発明の式(I)で表される化合物、その異性体、溶媒和物及びそれらの医薬上許容され得る塩は、その基本骨格あるいは置換基の種類に基づく特徴を利用し、種々の公知の合成法を適用して製造することができる。例えば以下の合成法に従って製造することができるが、これらに限定されるものではなく、所望に応じて適宜修飾できる。かかる修飾としては、アルキル化、アシル化、アミノ化、イミノ化、ハロゲン化、還元、酸化等が挙げられ、通常当分野で用いられる反応又は方法が利用される。その際、官能基の種類によっては、当該官能基を原料もしくは中間体の段階で適当な保護基(容易に当該官能基に転化可能な基)に置き換えておくことが製造技術上効果的な場合がある。保護基の化学的特性、その導入の手法、及びその除去は例えばT. Greene and P. Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis" (3<sup>rd</sup> ed.), John Wiley & Sons NY (1999)に詳述されている。

40

【0060】

原料化合物は、特に述べない限り、市販されているものを容易に入手できるか、あるいは、自体公知の方法又はこれらに準ずる方法に従って製造することができる。

【0061】

各反応および原料化合物合成の各反応において、反応中に一般的に知られる溶媒を用い

50

る場合がある。

一般的に知られる溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、1,2-ジメトキエタン、1,4-ジオキサンのエーテル類、酢酸エチル、酢酸ブチル等のエステル類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素、ピリジン、ルチジン等の芳香族ヘテロ環化合物、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類、クロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン化物、メタノール、エタノール、2-プロパノール、2,2-ジメチルエタノール等のアルコール類、ヘキサン、ヘプタン、石油エーテル等の炭化水素化合物、ギ酸、酢酸等のカルボン酸類、あるいは、水等が挙げられる。

反応において用いられる溶媒は、単一の溶媒を用いる場合も、2種類から6種類の溶媒を混合して用いる場合もある。

又、反応において、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン等のアミン類、又は塩基を共存させて行なう場合がある。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、トリ-n-ブチルアミン、ピペリジン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の水酸化アルカリ金属類、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸塩類、りん酸一水素二カリウム、りん酸三ナトリウム等のりん酸塩類、水素化ナトリウム等の水素化アルカリ金属類、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド等のアルカリ金属アルコラート類、n-ブチルリチウム等の有機リチウム類、エチルマグネシウムプロミド等のグリニャール試薬類、リチウムアミド、リチウムジイソプロピルアミド等を例示することができる。

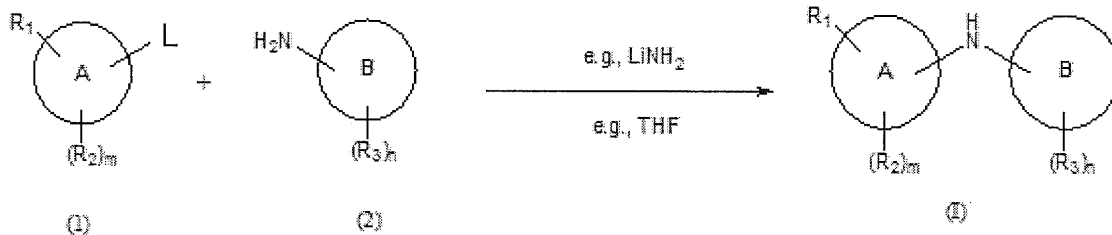
又、反応において、例えば、塩酸、硫酸、酢酸等の酸を共存させて行なう場合がある。

#### 【0062】

本発明化合物の合成スキームを以下に示す（詳細な反応は実施例に準じる）。尚、スキーム中、具体的な基、化合物で記載されている場合があるが、代替可能な基、化合物が用いられ得ることは当業者には明らかである。

#### 【0063】

##### 【化11】



#### 【0064】

式中、Lはハロゲン原子（例、塩素原子）等の脱離基を意味し、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。

適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で、等モル量の化合物（1）及び化合物（2）を反応させて式（I）で表される化合物を得る工程である。

溶媒は、特に限定されないが、通常、化合物（1）に対して1～10倍モル当量の範囲で適宜選択して使用すればよい。

塩基は、特に限定されないが、通常、化合物（1）に対して0.01から5倍モル当量の範囲で適宜選択して使用すればよい。

反応温度は、通常、約-80～約150、好ましくは約0～約100である。

反応時間は、通常、約0.5～約20時間である。

以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は何ら限定されるものではない。使用する試薬及び材料は特に限定されない限り商業的に入手可能である。

#### 【実施例】

#### 【0065】



A<sub>2</sub>A R P A M - 13を除く全ての化合物は一般的方法に基づいて合成される。

[フェナム酸誘導体の合成についての一般的方法]

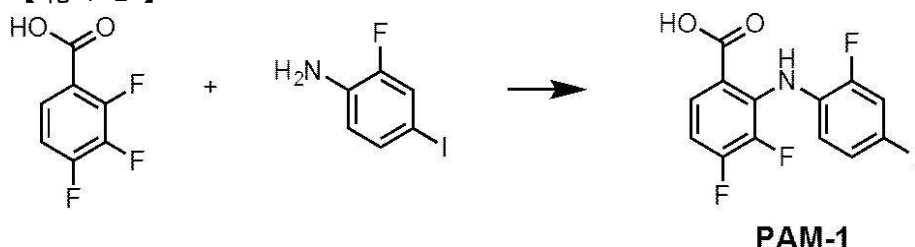
5 mLのマイクロ波バイアルに安息香酸、アニリン、LiNH<sub>2</sub>及びTHFを充填した。容器を200で3分間マイクロ波加熱した。その後、反応チューブを室温まで冷却し、混合物を1 M HCl aq. (20mL)で希釈しCHCl<sub>3</sub> (20mL×3)で抽出した。有機層をあわせ、食塩水で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>/10% AcOH - MeOH溶液 = 100/090/10)で精製して標題化合物を得た。

【0066】

実施例1：A<sub>2</sub>A R P A M - 1の合成

【0067】

【化12】



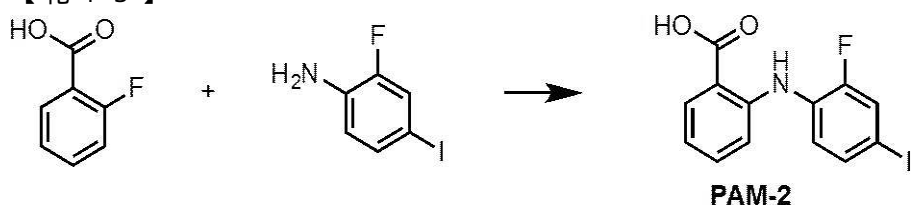
【0068】

2,3,4-フルオロ安息香酸(126.1 mg, 0.716 mmol)、2-フルオロ-4-ヨードアニリン(171.4 mg, 0.723 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(82.2 mg, 3.58 mmol)のTHF(3 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2</sub>A R P A M - 1(155.2 mg, 55%)を褐色固体として得た；<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) 7.89 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 9.2 Hz), 7.48 (1 H, dd, J = 1.8, 10.5 Hz), 7.41 (1 H, td, J = 1.8, 8.7 Hz), 6.91 (1 H, td, J = 7.3, 9.6 Hz), 6.75 (1 H, td, J = 5.9, 8.2 Hz).

実施例2：A<sub>2</sub>A R P A M - 2の合成

【0069】

【化13】



【0070】

2-フルオロ安息香酸(116.5 mg, 0.651 mmol)、2-フルオロ-4-ヨードアニリン(164.5 mg, 0.694 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(19.3 mg, 0.845 mmol)のTHF(3 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2</sub>A R P A M - 2(168.2 mg, 72%)を褐色固体として得た；<sup>1</sup>H NMR (Acetone - d<sub>6</sub>) 9.75 (1 H, br), 8.06 (1 H, dd, J = 1.4, 8.2 Hz), 7.60 (1 H, dd, J = 1.8, 10.1 Hz), 7.53 (1 H, d, J = 8.2 Hz), 7.46 (1 H, ddd, J = 1.4, 7.6, 8.7 Hz), 7.37 (1 H, t, J = 8.7 Hz), 7.24 (1 H, d, J = 8.7 Hz), 6.90 (1 H, t, J = 7.6 Hz).

実施例3：A<sub>2</sub>A R P A M - 3の合成

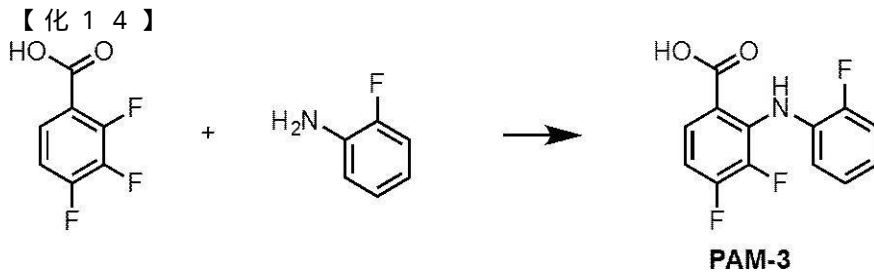
【0071】

10

20

30

40



## 【 0 0 7 2 】

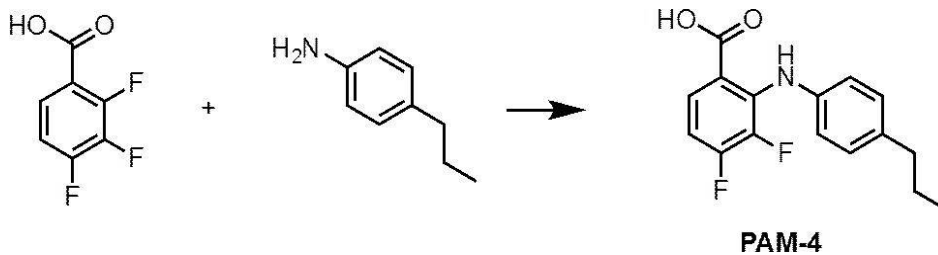
2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (43.1 mg, 0.241 mmol)、2 - フルオロアニリン (25.3  $\mu$ L, 0.264 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (28.1 mg, 1.22 mmol) の THF (1 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-3}$  (29.1 mg, 45%) を褐色の結晶として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 9.37 (1 H, br), 7.96 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.0, 9.2$  Hz), 7.21-7.04 (4 H, m), 6.97 (1 H, td,  $J = 7.3, 9.2$  Hz).

10

実施例 4 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-4}$  の合成

## 【 0 0 7 3 】

## 【化 1 5】



20

## 【 0 0 7 4 】

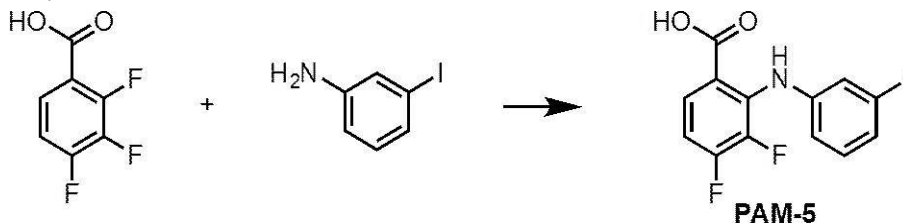
2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (86.7 mg, 0.484 mmol)、4 - プロピルアニリン (70  $\mu$ L, 0.492 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (55.5 mg, 2.42 mmol) の THF (1 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-4}$  (68.2 mg, 48%) を白色固体として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 9.37 (1 H, br), 7.93 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.0, 9.2$  Hz), 7.13 (1 H, td,  $J = 2.3, 8.7$  Hz), 6.97 (2 H, m), 6.97 (1 H, td,  $J = 7.3, 9.2$  Hz), 2.55 (2 H, t,  $J = 7.6$  Hz), 1.61 (2 H, tq,  $J = 7.3, 7.6$  Hz) 0.92 (3 H, t,  $J = 7.3$  Hz).

30

実施例 5 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-5}$  の合成

## 【 0 0 7 5 】

## 【化 1 6】



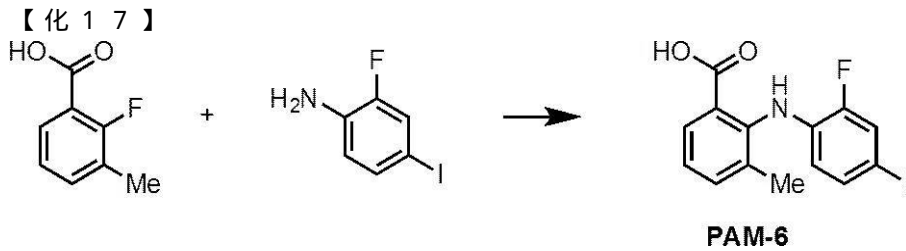
## 【 0 0 7 6 】

2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (94.1 mg, 0.526 mmol)、3 - ヨードアニリン (63.3  $\mu$ L, 0.526 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (59.9 mg, 2.61 mmol) の THF (1 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-5}$  (149.0 mg, 76%) を褐色の結晶として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 9.37 (1 H, br), 7.94 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.0, 9.2$  Hz), 7.42 (1 H, s), 7.37 (1 H, td,  $J = 1.4, 7.3$  Hz), 7.09-6.95 (3 H, m).

40

実施例 6 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-6}$  の合成

## 【 0 0 7 7 】



## 【0078】

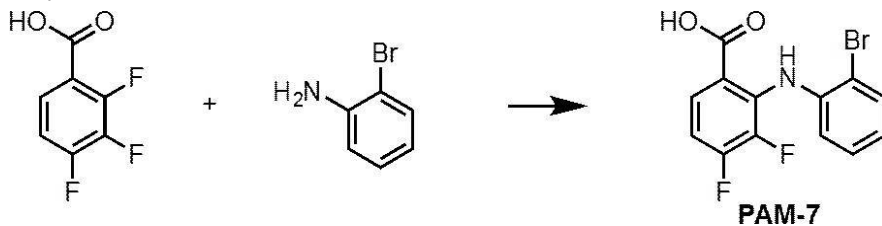
2-フルオロ-3-メチル安息香酸(30.8 mg, 0.200 mmol)、2-フルオロ-4-ヨードアニリン(53.2 mg, 0.225 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(23.0 mg, 1.00 mmol)のTHF(1 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2</sub>AR PAM-6(35.0 mg, 47%)を褐色の結晶として得た；<sup>1</sup>H NMR (Acetone - d<sub>6</sub>) 7.97 (1 H, dd, J = 1.4, 7.8 Hz), 7.53-7.48 (2 H, m), 7.33 (1 H, qd, J = 0.9, 8.2 Hz), 7.21 (1 H, t, J = 7.5 Hz), 6.25 (1 H, t, J = 8.7 Hz), 2.14 (3 H, s).

10

実施例7：A<sub>2</sub>AR PAM-7の合成

## 【0079】

## 【化18】



20

## 【0080】

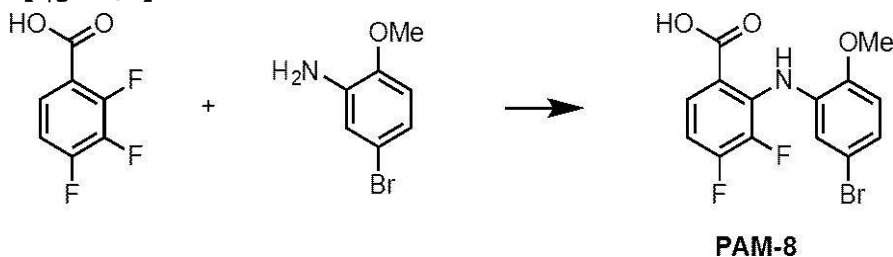
2,3,4-トリフルオロ安息香酸(138.0 mg, 0.771 mmol)、2-ブロモアニリン(88.0 μL, 0.778 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(89.0 mg, 3.88 mmol)のTHF(5 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2</sub>AR PAM-7(194.6 mg, 77%)を白みがあった赤色の固体として得た；<sup>1</sup>H NMR (Acetone - d<sub>6</sub>) 9.40 (1 H, br), 7.98 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 8.8 Hz), 7.62 (1 H, dd, J = 1.4, 8.0 Hz), 7.31 (1 H, dd, J = 1.4, 7.3 Hz), 7.08-6.95 (3 H, m).

30

実施例8：A<sub>2</sub>AR PAM-8の合成

## 【0081】

## 【化19】



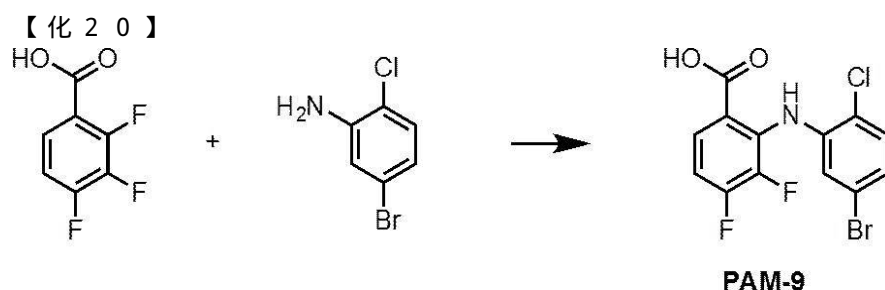
40

## 【0082】

2,3,4-トリフルオロ安息香酸(100.0 mg, 0.568 mmol)、2-メトキシ-5-ブロモアニリン(126.2 mg, 0.625 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(65.3 mg, 2.85 mmol)のTHF(2.8 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2</sub>AR PAM-8(151.9 mg, 75%)を褐色の固体として得た；<sup>1</sup>H NMR (Acetone - d<sub>6</sub>) 9.21 (1 H, br), 7.95 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.4, 8.7 Hz), 7.01 (1 H, dd, J = 2.3, 8.7 Hz), 7.04-6.46 (3 H, m), 3.92 (3 H, s)

実施例9：A<sub>2</sub>AR PAM-9の合成

## 【0083】



## 【 0 0 8 4 】

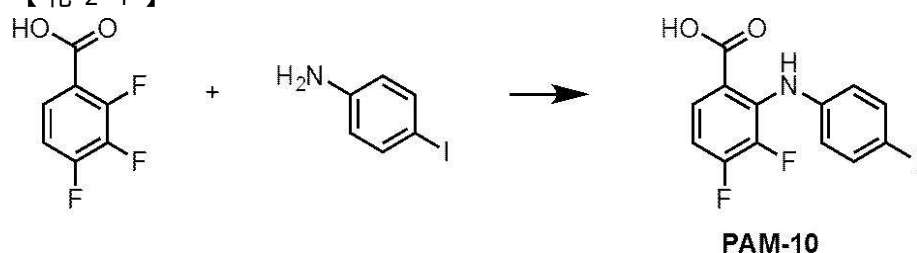
2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (100.0 mg, 0.568 mmol)、2 - クロロ - 5 - ブロモアニリン (133.5 mg, 0.647 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (65.1 mg, 2.84 mmol) の THF (2.8 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-9}$  (171.1 mg, 83%) を褐色固体として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 9.45 (1 H, br), 7.99 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.4, 8.7$  Hz), 7.40 (1 H, d,  $J = 8.7$  Hz), 7.19-7.08 (3 H, m).

10

実施例 10 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-10}$  の合成

## 【 0 0 8 5 】

## 【化 2 1】



20

## 【 0 0 8 6 】

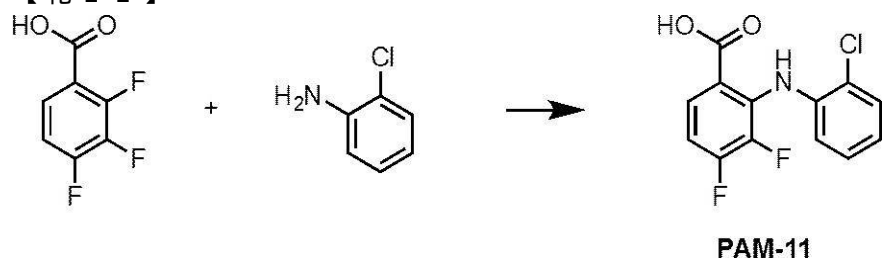
2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (100.0 mg, 0.568 mmol)、4 - ヨードアニリン (141.7 mg, 0.647 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (65.2 mg, 2.84 mmol) の THF (2.8 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-10}$  (195.8 mg, 92%) を白みがかった褐色の固体として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 7.95 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.0, 9.2$  Hz), 7.63 (1 H, td,  $J = 2.3, 8.7$  Hz), 7.00 (1 H, td,  $J = 7.3, 9.2$  Hz), 6.90 (2 H, m).

30

実施例 11 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-11}$  の合成

## 【 0 0 8 7 】

## 【化 2 2】



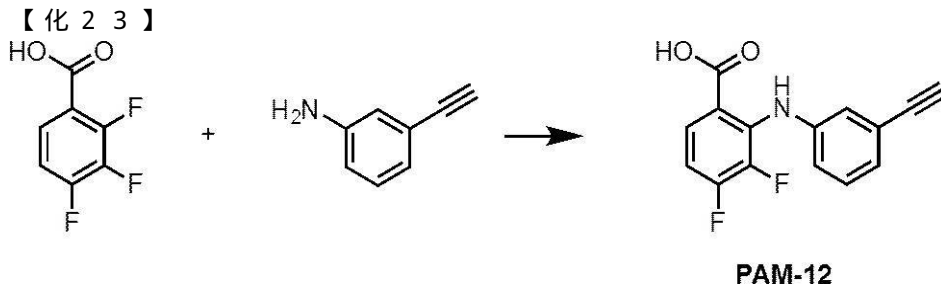
40

## 【 0 0 8 8 】

2, 3, 4 - トリフルオロ安息香酸 (100.0 mg, 0.568 mmol)、2 - クロロアニリン (68.0  $\mu\text{L}$ , 0.647 mmol) 及び  $\text{LiNH}_2$  (65.3 mg, 2.84 mmol) の THF (2.8 mL) 溶液を一般的方法に従って反応させ  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-11}$  (129.1 mg, 92%) を褐色固体として得た；  $^1\text{H NMR}$  (Acetone -  $\text{d}_6$ ) 9.45 (1 H, br), 7.98 (1 H, ddd,  $J = 2.3, 6.0, 9.2$  Hz), 7.44 (1 H, dd,  $J = 1.4, 8.5$  Hz), 7.25 (1 H, dt,  $J = 1.4, 8.5$  Hz), 7.06-6.99 (3 H, m).

実施例 12 :  $\text{A}_{2\text{A}}\text{R PAM-12}$  の合成

## 【 0 0 8 9 】

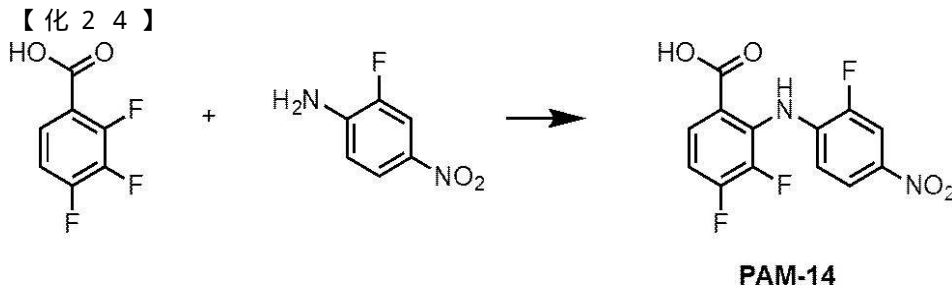


## 【0090】

2,3,4-トリフルオロ安息香酸(100.0 mg, 0.568 mmol)、3-エチルアニン(7.2.9  $\mu$ L, 0.647 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(65.3 mg, 2.84 mmol)のTHF(2.8 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2A</sub>R PAM-12(63.0 mg, 41%)を褐色の結晶として得た；<sup>1</sup>H NMR (Acetone-d<sub>6</sub>) 9.31 (1 H, br), 7.95 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 9.2 Hz), 7.31 (1 H, d, J = 8.2 Hz), 7.09-6.95 (3 H, m), 7.37 (1 H, dt, J = 7.3, 9.2 Hz), 3.61 (1 H, s).

実施例13：A<sub>2A</sub>R PAM-14の合成

## 【0091】

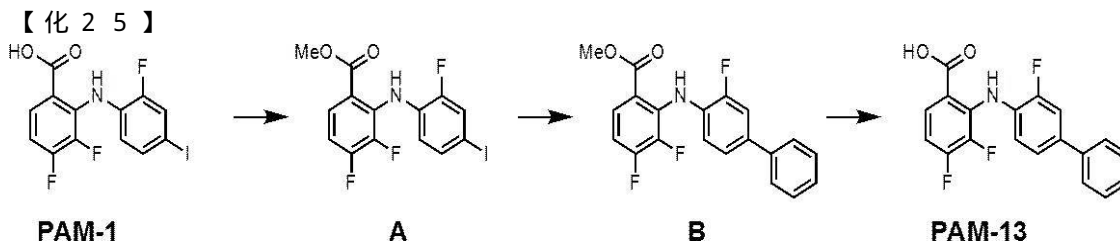


## 【0092】

2,3,4-トリフルオロ安息香酸(489.3 mg, 2.78 mmol)、2-フルオロ-4-ニトロアニン(455.7 mg, 2.92 mmol)及びLiNH<sub>2</sub>(318.7 mg, 13.9 mmol)のTHF(15 mL)溶液を一般的方法に従って反応させA<sub>2A</sub>R PAM-14(63.0 mg, 41%)をオレンジ色の固体として得た；(CD<sub>3</sub>OD) 8.08-8.01 (2 H, m), 7.94 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 8.5 Hz), 7.13 (1 H, td, J = 7.3, 9.6 Hz), 6.95 (1 H, dt, J = 6.5, 8.52 Hz).

実施例14：A<sub>2A</sub>R PAM-13の合成

## 【0093】



## 【0094】

(1) A<sub>2A</sub>R PAM-1からの化合物Aの合成

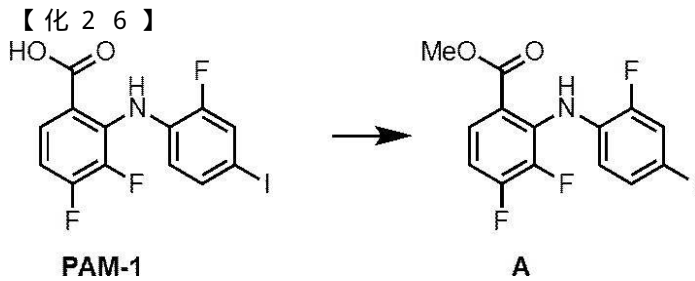
## 【0095】

10

20

30

40



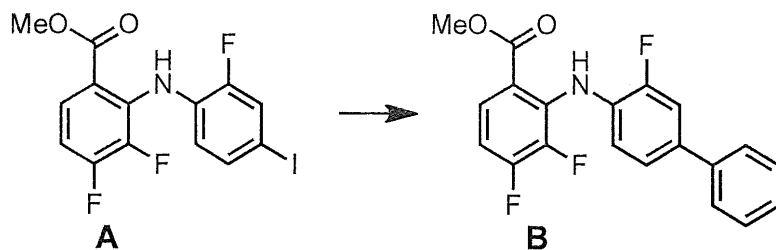
## 【0096】

A<sub>2</sub>A R P A M - 1 (105.7 mg, 0.269 mmol) の MeOH (5 mL) 中の攪拌溶液に SOCl<sub>2</sub> (0.13 mL, 1.6 mmol) を室温で添加した。得られた混合物を 90 °C で 9 時間攪拌し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン, 1 / 10) で精製して化合物 A (86.0 mg, 79%) を白色粉末として得た; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 9.05 (1 H, br), 8.06 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 9.2 Hz), 7.42 (1 H, dd, J = 1.8, 10.1 Hz), 7.35 (1 H, td, J = 1.4, 8.2 Hz), 6.77 (1 H, td, J = 7.3, 9.2 Hz), 6.68 (1 H, td, J = 5.5, 8.2 Hz), 3.91 (3 H, s).

(2) 化合物 A からの化合物 B の合成

## 【0097】

## 【化27】



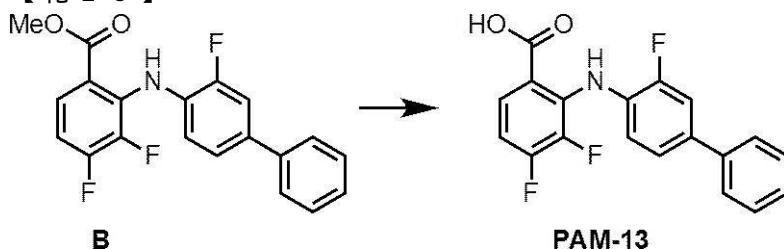
## 【0098】

化合物 A (54.5 mg, 0.134 mmol) 及びフェニルボロン酸 (32.6 mg, 0.267 mmol) の 1,4-ジオキサン (4 mL) 中の攪拌溶液に PdCl<sub>2</sub> · dppf · CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mg, 0.0122 mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (92.6 mg, 0.670 mmol) 及び H<sub>2</sub>O (1 mL) を室温で添加した。得られた混合物を 120 °C で 1 時間攪拌し、セライト濾過した。濾液を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) 及び H<sub>2</sub>O (20 mL) で希釈し、CHCl<sub>3</sub> で抽出した。有機層をあわせ、食塩水で洗浄し、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を分取薄層クロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン, 1 / 10) で精製し、化合物 B (39.4 mg, 82%) を黄色固体として得た; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 9.14 (1 H, br), 7.81 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.0, 9.2 Hz), 7.57-7.54 (2 H, m), 7.43 (2 H, tt, J = 1.4, 7.4 Hz), 7.34-7.28 (3 H, m), 7.02 (1 H, td, J = 5.5, 8.2 Hz), 6.76 (1 H, td, J = 7.3, 9.2 Hz), 3.92 (3 H, s).

(3) 化合物 B からの A<sub>2</sub>A R P A M - 13 の合成

## 【0099】

## 【化28】



## 【0100】

10

20

30

40

50

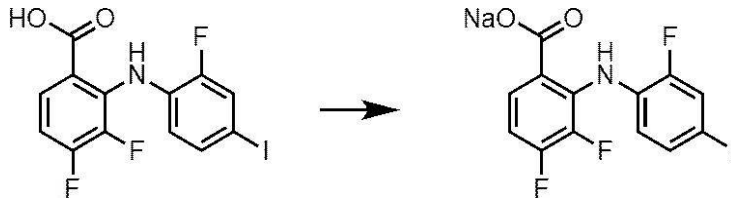
化合物 B (20.5 mg, 0.0574 mmol) の MeOH (2 mL) 中の攪拌溶液に 5 M NaOH aq. (0.6 mL) を室温で添加し、2 時間攪拌した。反応混合物を 1 M HCl aq. (20 mL) で希釈し CHCl<sub>3</sub> (20mL x 3) で抽出した。有機層をあわせ、食塩水で洗浄し無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し減圧濃縮した。残渣を分取薄層クロマトグラフィー (CH<sub>3</sub>Cl / MeOH / AcOH, 20 / 1 / 0.1) で精製し PAM-13 (13.2 mg, 67%) を褐色の結晶として得た; <sup>1</sup>H NMR (Acetone-d<sub>6</sub>) 7.94 (1 H, ddd, J = 2.3, 6.2, 8.6 Hz), 7.66-7.64 (2 H, m), 7.49-7.90 (4 H, m), 7.32 (1 H, tt, J = 1.4, 7.3 Hz), 7.14 (1 H, t, J = 5.5, 8.6 Hz), 6.97 (1 H, td, J = 7.3, 9.4 Hz).

実施例 15: A<sub>2A</sub>R PAM-1 のナトリウム塩の合成

【0101】

10

【化29】



【0102】

A<sub>2A</sub>R PAM-1 (265.5 mg, 0.6754 mmol) の EtOH (20 mL) 中の攪拌溶液に 100 μM NaOH aq. (828 μL) を 0 で添加し室温で 45 分間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、凍結乾燥した。残渣を水に溶解し濾過した。濾液を凍結乾燥して A<sub>2A</sub>R PAM-1 (265.3 mg, 89%) のナトリウム塩を灰色の固体として得た; M.p. 290-291 °C, Anal. Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub> · Na · 1.5H<sub>2</sub>O: C, 35.32; H, 2.05; N, 3.17. Found: C, 35.34; H, 1.91; N, 3.14.

20

【0103】

実験例

[材料と方法]

(1) 動物

体重 21 ~ 27 g (10 ~ 15 週齢) の雄性 C57BL/6J 近交系マウスを動物資源センター (つくば、日本) から入手しこれらの実験に用いた。動物は、室温 23 ± 0.5 °C、相対湿度 50 ± 5% の、12 時間明 / 12 時間暗のサイクル (8 時ちょうどに点灯、照度およそ 100 lux) に自動制御された断熱や防音を施した記録室で飼育した。全ての動物は自由飲水・摂餌とした。実験プロトコルは、関連する日本及び機関の法令及びガイドラインに準拠するものであり、筑波大学動物実験委員会によって許可されたものである (14-322)。使用する動物の数、被検体が経験する任意の痛みや不快感を最小限にするあらゆる努力を行った。

30

【0104】

(2) EEG / EMG 電極と注入カニューレを設置するための定位固定手術

腹腔内 (IP) ペントバルビタール (ソムノペンチル、50 mg / kg; 共立製薬、東京、日本) によりマウスを麻酔し、次いで定位固定装置に置いた。睡眠ポリグラフの記録の為の脳波計 (EEG) 及び筋電図 (EMG) の電極を慢性的にマウスに埋め込んだ。フランクリンとパキノスのアトラス (Paxinos and Franklin, 2004) に従って、皮質の頭蓋骨を通して 2 つのステンレス鋼ネジ (直径 1 mm) からなるインプラントを挿入し (プレグマ又はラムダから、前後, +1.0 mm; 左右, -1.5 mm) EEG 電極として用いた。2 つの絶縁されたステンレス鋼のテフロンコートされたワイヤーを両方の僧帽筋の筋肉内に両側性に配置し EMG 電極として用いた。全ての電極にはマイクロコネクターをつけ、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。A<sub>2A</sub>R PAM-1 の脳室内 (ICV) 注入のために、マウスの手術中に、プレグマの前方 0.5 mm および外側 1.6 mm の位置に、硬膜下 1.6 mm の深さまで 20 度の角度でステンレス鋼カニューレを挿入した。この方法でカニューレを側脳室に挿入した。実験の間、マウスには、輸液ポンプを用いて、脳の側脳室領域に人工脳脊髄液 (ACSF) を 1 μl / h の速度で持続注入した。各化合物注

40

50

入に対して、36時間の期間、睡眠-覚醒状態をモニターした。各動物において、36時間(20時ちょうどに開始)の生理食塩水注入の記録をとり同じ動物に対するコントロールとして用いた。次の実験の際には、 $A_{2A}R$  PAM-1 (200 nmol/h)を12時間(20時ちょうど-8時ちょうど)の間マウスの側脳室領域に注入した。

#### 【0105】

##### (3) EEG/EMGポリグラフ記録を用いたビジランス状態評価

手術後10日目に、マウスを断熱及び防音が施された記録室の透明バレルに個々に収容し、ポリグラフ記録を開始する前の順化の3-5日間の記録が可能なEEG-EMG記録ケーブルにつないだ。自発的な睡眠-覚醒サイクルを調べる為に、各動物について24時間(20時ちょうどに開始、暗期のはじまり)の記録をとった。次いで動物は、睡眠-覚醒のパラメーターが36時間記録される、検査の薬理的フェーズに入った。最初の24時間の間に集積したデータもまた実験日に対するベースラインとなる比較データとして用いた。皮質EEG/EMGを増幅し、フィルタリングし(EEG 0.5-30 Hz; EMG 20-200 Hz)、次いでサンプリング速度128 Hzでデジタル化し、データ収集プログラムSleepSing(登録商標)レコーダーソフトウェア(キッセイコムテック、長野、日本)を用いて記録した。ビジランス状態は、SleepSign(ver 3.4)ソフトウェア(キッセイコムテック、長野、日本)によって、標準的な基準に従って(Mizoguchi et al, 2001)、覚醒、急速眼球運動(REM)睡眠、および徐波睡眠(SWS)の3段階に10秒エポックでオフライン記録された。最終工程として、定義づけられたビジランス状態を視覚的に調べ、必要な場合には補正した。

10

20

#### 【0106】

##### (4) 化合物と試薬

種々の $A_{2A}R$  PAMを上記した実施例に従って合成した。アデノシンはナカライテスク株式会社から購入した。ZM241385はTocris Bioscienceから購入した。CGS21680及びCremophor(登録商標)ELはSigma-Aldrichから購入した。DMSOはナカライテスク株式会社から購入した。PerkinElmer Ultrance cAMP-kitはPerkinElmer, Incから購入した。

#### 【0107】

##### (5) 薬理治療

ベースラインとなるデータの為に、22時ちょうどに生理食塩水のみ(10 ml/kg体重)をマウスにIP注射した。使用直前に $A_{2A}R$  PAM-1を生理食塩水に溶解し、実験日の22時ちょうどに、30、60、75 mg/kgの用量でIP投与した。ZM241385(15 mg/kg, IP; Tocris Bioscience)を生理食塩水(5% DMSO, 5% Cremophor(登録商標)EL)に溶解し22時ちょうどにC57BL/6Jマウスに注射した。

30

#### 【0108】

##### (6) データ解析と統計

全ての結果は平均値±平均の標準誤差(SEM)で表した。2群間の統計的比較の為に、両側Student's t-検定を用いた。SWS、REM睡眠及び覚醒の量における用量-応答効果の為に二元配置反復測定ANOVAとそれに続くTukey's検定を使用した。全ケースにおいて、有意水準として $p < 0.05$ を用いた。

40

#### 【0109】

##### (7) 細胞培養

マウス $A_{2A}R$ 発現チャイニーズハムスター卵巣細胞(m $A_{2A}R$ -CHO)を5% FBS、1% NEAA、1% P/S、0.5% 50 mg/ml Hygromycin Bを添加したDMEMで増殖させた。細胞は全て、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、37で維持した。

#### 【0110】

##### (8) cAMPアッセイ

アデノシン $A_{2A}$ 受容体の活性化は、マウスアデノシン $A_{2A}$ 受容体を発現しているC

50



CHO細胞における環状アデノシンーリン酸(cAMP)の蓄積によって定量した。CHO細胞を、384-ウェルマイクロプレート(1ウェルあたり $2 \times 10^3$ 細胞)中、1M HEPES、0.25M IBMXを含むHanks'平衡塩溶液(HBSS)に懸濁し、アデノシン、CGS21680、所定の濃度のA<sub>2A</sub>RPAM-1で30分間、25°Cでインキュベートした。Eu-cAMPトレーサー及びULight-抗-cAMP抗体を含む検出混合液を添加し1時間25°Cでインキュベートした。マイクロプレートリーダー(ARVOX5;励起:340nm;発光:665nm)を用いてForster共鳴エネルギー移動(FRET)シグナルを測定した。全ての実験は、製造元の指示のガイドラインのもとに実施した。(LANCE Ultra cAMP Kit, PerkinElmer)

【0111】

10

(9) 血圧及び心拍数測定

マウスの血圧をBP-98A血圧計(ソフトロン、東京、日本)を用い、テールカフ法により測定した。マウス(9~12週齢)の血圧および心拍数を試験するために、血圧の正常な日々の変動を避けるために、同じ時間枠(1~4pm)を選択した。装置へのマウスの訓練の為に5日間連続して使用した。心血管循環を最適化するために、尾部を除いてマウスをシリンダーヒーター内で37°Cに保ち、さらに綿シートの内側カバーで覆った。テール(または膨張式バルーン)カフに取り付けられたプログラム可能なセンサーを使用して、テールパルス波をモニターし、パルス波が安定して周期的であるときの血圧および心拍数を測定する。血圧及び心拍を測定しソフトウェアにより記録した。連続した5日間の訓練の後、マウスにA<sub>2A</sub>RPAM-1(75mg/kg, IP)を注射した。注射後、30分、1時間30分及び2時間30分で血圧及び心拍数を測定した(各マウスについて20測定値を収集した)。次いで、マウスに、CGS21680(1mg/kg, IP)注射前の連続2日間、訓練を続けさせた。CGS21680(1mg/kg, IP)注射後、30分、1時間30分及び2時間30分で血圧及び心拍数を測定した(各マウスについて20測定値を収集した)。試験後、マウスを尾からそっと持ち上げて静かにケージに戻した。全ての実験は、マウスにとって最もストレスのかからない条件下で実施された。

20

【0112】

[結果]

(1) アロステリックA<sub>2A</sub>R調節に対する1174の低分子化合物のスクリーニング

30

我々は、マウスA<sub>2A</sub>Rを発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を確立し(図1)、続いて、それを用いてA<sub>2A</sub>Rにおけるアロステリック効果について1174の低分子化合物をスクリーニングした。化合物は筑波大学の長瀬博博士の研究室で合成された。CHO細胞におけるA<sub>2A</sub>R活性は、アデノシンと低分子化合物とを添加した後産生される環状アデノシンーリン酸(cAMP)を、蛍光共鳴エネルギー移動イムノアッセイキットを用いて測定することによって評価した。まず、我々は、一次スクリーニングで3つの化合物の混合物を調べ、8つの混合物がA<sub>2A</sub>Rにおけるアデノシン効果を増幅することを見つけた(図2a)。さらに、個々の化合物370、371及び372について調べたところ、アデノシンによるA<sub>2A</sub>R活性化の増強に化合物371が寄与していることがわかった(図2b)。アデノシンの非存在下でのA<sub>2A</sub>Rを発現している、あるいはネイティブなCHO細胞の化合物371による処理、あるいはネイティブなCHOのアデノシン及び化合物371での処理は、細胞培養バイオアッセイにおいてcAMPレベルを変化させなかった(図2d)。このことは、化合物371がおそらくA<sub>2A</sub>Rに対するポジティブアロステリックモジュレーターであることを示唆している。そして我々はこの化合物をA<sub>2A</sub>RPAM-1と命名した(図2c)。A<sub>2A</sub>R発現CHO細胞を150µMアデノシンと種々の濃度でのA<sub>2A</sub>RPAM-1(即ち、25、50、及び100µM)とで共処理することにより、アデノシンA<sub>2A</sub>R-誘発性のcAMPの蓄積が、それぞれ、42%±1.4, 46%±1.1, 及び50%±1.0と、用量依存的に増幅された(図2e)。同様に、100µMのA<sub>2A</sub>RPAM-1および50、100、または150µMのアデノシンによるA<sub>2A</sub>R発現CHO細胞の共処理は、用量依存的に5

40

50

5% ± 0.4、66% ± 1.5及び72% ± 1.7でCHO細胞におけるA<sub>2A</sub>R活性を増加させた。一方、100 μMのA<sub>2A</sub>R PAM-1は250 μMのアデノシンで処理したA<sub>2A</sub>R発現CHO細胞の細胞活性を有意に増強しなかった(図2f)。驚くべきことに、100 μMのA<sub>2A</sub>R PAM-1および異なる濃度の高い選択性を有するA<sub>2A</sub>RアゴニストであるCGS21680とのA<sub>2A</sub>R発現CHO細胞の共処理は、cAMP産生の増強を全くもたらさなかった(図3)。

#### 【0113】

(2) A<sub>2A</sub>R PAM-1の腹腔内投与はマウスにおいてSWSを誘導する

次に、我々は、野生型マウスの睡眠/覚醒行動におけるA<sub>2A</sub>R PAM-1の腹腔内(IP)投与の効果について調べた。従って、我々は、暗期の間、22時にベヒクル又はA<sub>2A</sub>R PAM-1を注射した後、脳波図(EEG)と筋電図(EMG)を記録した。マウスは通常、この時間の大半を起きて過ごしている。A<sub>2A</sub>R PAM-1は用量依存的に8時間までの間、SWS(低速で高振幅の脳波を特徴とする睡眠の大部分である非急速眼球運動(non-REM)睡眠としても知られている)を増加させた(図4a、b、d)。SWSの合計量は、最も高用量のA<sub>2A</sub>R PAM-1(即ち、75 mg/kg)で、8時間の間に、ベヒクル処理と比較して、60.8 ± 11.4分増加した。一方、覚醒は59.2 ± 12.8分減少した(図4c)。A<sub>2A</sub>R PAM-1のIP注射は、ベヒクル注射と比べて、暗期におけるREM睡眠時間には何ら有意な変化を与えなかった。

暗期中の8時間の間、マウスにA<sub>2A</sub>R PAM-1(75 mg/kg, IP)を投与してもSWS及びREM睡眠エピソード数に有意な影響を与えることはなかった(図5a)。一方、生理食塩水での測定に比べ、暗期中の8時間の間の120~239秒続く覚醒エピソードの数が75%(p=0.006)増加し、暗期中の8時間の間の480~959秒あるいは960~1909秒続く覚醒エピソードの数はそれぞれ47%(p=0.02)、88%(p=0.02)減少した。覚醒エピソードの平均持続時間は生理食塩水での測定に比べ38%(p=0.01)減少したが、SWS及びREM睡眠には、A<sub>2A</sub>R PAM-1(75 mg/kg, IP)投与の後に有意な違いはなかった(図5b)。A<sub>2A</sub>R PAM-1(75 mg/kg, IP)はまた、SWS、覚醒及びREM睡眠間の遷移の数にも有意な影響は与えなかった(図5c)。

EEG活性がA<sub>2A</sub>R PAM-1投与によって変化したかどうかを評価するために、ベヒクル又はA<sub>2A</sub>R PAM-1で処理した後のマウスにおけるSWSの正規化EEGパワースペクトルを比較した(図4e)。SWS中の0.5~25 Hzの周波数範囲でのEEG活性は、A<sub>2A</sub>R PAM-1誘発性の睡眠と自然(ベヒクル治療)な睡眠との間で区別がつかなかった。これらのデータは、A<sub>2A</sub>R PAM-1は正常でない睡眠ではなく、生理学的な睡眠を誘導しているということを示唆している。

同様の結果がA<sub>2A</sub>R PAM-4を投与した場合でも得られた(図6)。

#### 【0114】

(3) A<sub>2A</sub>R PAM-1の睡眠誘導効果はA<sub>2A</sub>Rを阻害することによって抑制される

我々は、さらにA<sub>2A</sub>RがA<sub>2A</sub>R PAM-1の睡眠誘導効果を仲介するのかどうかを調べた。まず、我々は、野生型のマウスを、22時にA<sub>2A</sub>R PAM-1を注射する前に、選択的A<sub>2A</sub>RアンタゴニストであるZM241385(15 mg/kg, IP)又はベヒクルで30分間前処理した。ZM241385の用量は、以前の研究(El Yacoubi et al, 2000; Nakamura et al, 2016)に基づいて選択された。A<sub>2A</sub>R PAM-1の注射は、ZM241385存在下では、SWSに有意な変化を与えなかった(図7a、7b)。このことは、ZM241385が、A<sub>2A</sub>R PAM-1により誘導されるSWSを完全に阻害していることを示している。我々が、IP注射後4時間でのSWSの合計量を算出したところ(図7a)、A<sub>2A</sub>R PAM-1は、ZM241385で前処理した後ではSWSの合計量に有意な変化を与えなかった。ベヒクル前処理に比べてZM241385前処理のみではSWSに対し有意な効果はなかった(図7b)。

次いで、我々は、A<sub>2A</sub>Rノックアウトマウスとその野生型の同腹仔に、75 mg/kg

gのA<sub>2A</sub>R PAM-1を22時に腹腔内投与した。A<sub>2A</sub>Rノックアウトマウスにおいて、ベヒクル処理に比べてSWSに有意な変化は観察されなかった(図7c)。一方、A<sub>2A</sub>Rノックアウトマウスの野生型同腹仔では、6時間の間でSWSが74.3 ± 12.0分増加した(図7d)。

これらの知見は、A<sub>2A</sub>R PAM-1がSWSを誘導するにはA<sub>2A</sub>Rが必要であることを示唆している。

#### 【0115】

(4) A<sub>2A</sub>R PAM-1の脳室内投与はマウスにおいてSWSを誘発する

A<sub>2A</sub>R PAM-1の睡眠誘導効果が脳で発現されるA<sub>2A</sub>Rにより仲介されているかどうかを明らかにするために、我々は、暗期(20:00~8:00)の間に200 nmol/hで野生型マウスの側脳室にA<sub>2A</sub>R PAM-1を注入した。そしてそれらのEEGおよびEMGを記録した。注入後3時間で、12時間のA<sub>2A</sub>R PAM-1注入によるSWSに費やす時間が増加した。結果、SWSの合計量は、暗期の間、ベヒクル処理に比べて141.6 ± 12.5分増加した。付随的に、覚醒の合計量は、A<sub>2A</sub>R PAM-1の12時間脳室内(ICV)注入の間に145.5 ± 15.8分減少したが、REM睡眠はA<sub>2A</sub>R PAM-1注入の影響を受けなかった(図8a、8b)。

A<sub>2A</sub>R PAM-1(200 nmol/h)のマウスへのICV注入は、暗期の間のSWS及び覚醒エピソードの数に影響を与えた(図9a)。SWS及び覚醒エピソードの数は暗期中の注入の間増加し、0~29秒、30~59秒、60~120秒続くものは、それぞれ生理食塩水での測定に比べて、73%(p < 0.0001)、66%(p = 0.008)、61%(p = 0.02)であり、67%(p = 0.04)、64%(p = 0.007)、58%(p = 0.02)であった。REM睡眠エピソードの数はA<sub>2A</sub>R PAM-1(200 nmol/h, ICV)により有意な影響は受けなかった。覚醒エピソードの平均持続時間は、生理食塩水での測定に比べて72%(p = 0.01)にまで減少したが、SWS及びREM睡眠にはA<sub>2A</sub>R PAM-1(200 nmol/h, ICV)投与後も有意な違いは見られなかった(図9b)。A<sub>2A</sub>R PAM-1(200 nmol/h, ICV)は、SWS及び覚醒間遷移の数を60%(p = 0.001)増加させ、生理食塩水での測定に比べて覚醒からSWSの遷移の数を56%(p = 0.002)増加させた(図9c)。

さらに、SWSエピソード中の0.5~25 Hzの周波数範囲でのEEG活性は、ベヒクル又はA<sub>2A</sub>R PAM-1で処理した後のマウスで区別がつかなかった(図8c)。これらのデータは、A<sub>2A</sub>R PAM-1は正常でない睡眠ではなく、生理学的な睡眠を脳で発現しているであろうA<sub>2A</sub>Rを介して誘導しているということを示唆している。

#### 【0116】

(5) A<sub>2A</sub>R PAM-1の腹腔内投与は血圧及び心拍リズムに影響しない

A<sub>2A</sub>Rアゴニストは、低血圧と頻脈等の心血管系の作用を誘発することが知られている(Hutchison et al, 1989; Kirkup et al, 1998; Nekooeian and Tabrizchi, 1996)。従って、我々は、野生型マウスの血圧及び心拍リズムに対するA<sub>2A</sub>R PAM-1のIP投与の影響を調べた。まず、我々は、電気血圧計を用いて75 mg/kgのA<sub>2A</sub>R PAM-1あるいは1 mg/kgのA<sub>2A</sub>RアゴニストであるCGS 21680をマウスにIP投与した後、30、90、及び15分後に血圧を測定した。A<sub>2A</sub>RアゴニストであるCGS 21680の用量は以前の研究(Ledent et al, 1997)に基づいて選択された。ベヒクル処理したものと比べて、A<sub>2A</sub>RアゴニストCGS 21680注射後90分までは収縮期、拡張期及び平均血圧が有意に低下したが、A<sub>2A</sub>RアゴニストCGS 21680での処理後150分では通常のレベルに戻った。対照的に、血圧は、75 mg/kgのA<sub>2A</sub>R PAM-1をIP投与しても、処理後30、90、及び150分で測定した際には変化はなかった(図10b)。さらに、我々は、75 mg/kgのA<sub>2A</sub>R PAM-1又は1 mg/kgのA<sub>2A</sub>RアゴニストCGS 21680をIP注射した後の麻酔をかけたマウスについて、心房内心電図を用いて心拍数及びリズムをモニタリングした。マウスの心拍数は、A<sub>2A</sub>RアゴニストCGS 21680のIP投与後に、わずかに上昇した

。一方、75 mg/kgのA<sub>2A</sub>R PAM-1で処理したマウスでは心拍数は影響を受けなかった(図10c)。A<sub>2A</sub>R PAM-1投与とは対照的に、A<sub>2A</sub>RアゴニストCGS 21680のIP投与はマウスにおいて心房期外収縮を伴う洞性不整脈を引き起こした(図10a)。

【0117】

リファレンス：

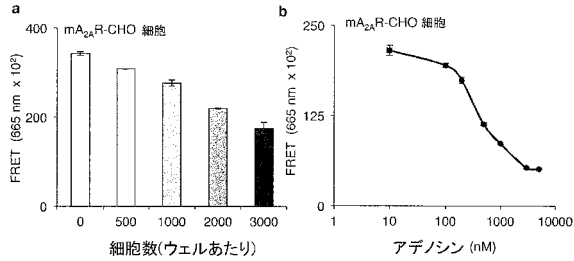
- (1) El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois J (2000). SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional "atypical" adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 401: 63-77. 10
- (2) Hutchison AJ, Webb RL, Oei HH, Ghai GR, Zimmerman MB, Williams M (1989). CGS 21680C, an A<sub>2</sub> selective adenosine receptor agonist with preferential hypotensive activity. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 47-55.
- (3) Kirkup AJ, Eastwood C, Grundy D, Chessell IP, Humphrey PP (1998). Characterization of adenosine receptors evoking excitation of mesenteric afferents in the rat. *Br J Pharmacol* 125: 1352-1360.
- (4) Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, et al (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature* 388: 674-678.
- (5) Nakamura Y, Midorikawa T, Monoi N, Kimura E, Murata-Matsuno A, Sano T, et al (2016). Oral administration of Japanese sake yeast (*Saccharomyces cerevisiae* sake) promotes non-rapid eye movement sleep in mice via adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *J Sleep Res* 25: 746-753. 20
- (6) Nekooeian AA, Tabrizchi R (1996). Effects of adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist, CGS 21680, on blood pressure, cardiac index and arterial conductance in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 307: 163-169.
- (7) Paxinos G, Franklin KBJ (Gulf Professional Publishing: 2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.

【産業上の利用可能性】

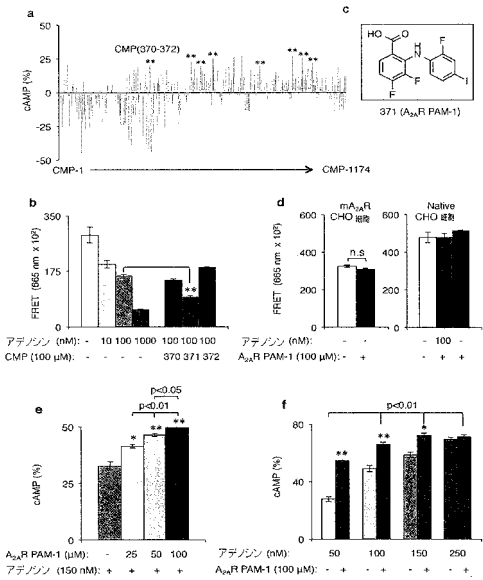
【0118】

本発明によれば、心血管系作用等の副作用を引き起こすことなく、徐波睡眠(SWS)を誘導することができる。従って、本発明は睡眠導入剤、特に熟睡感を与える徐波睡眠の提供が可能な睡眠導入剤の提供が可能となる。 30

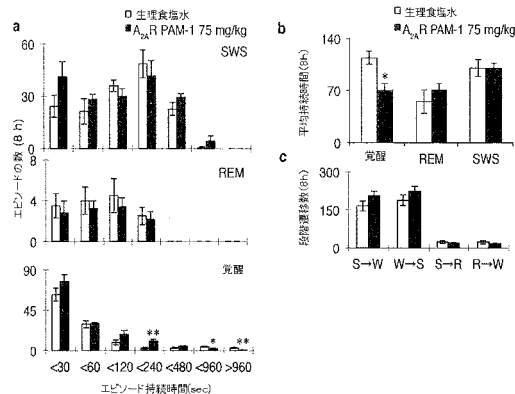
【 図 1 】



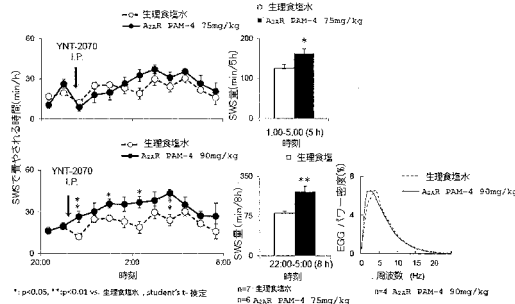
【 図 2 】



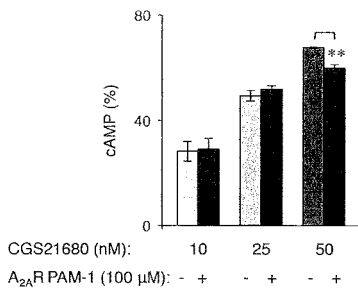
【 図 5 】



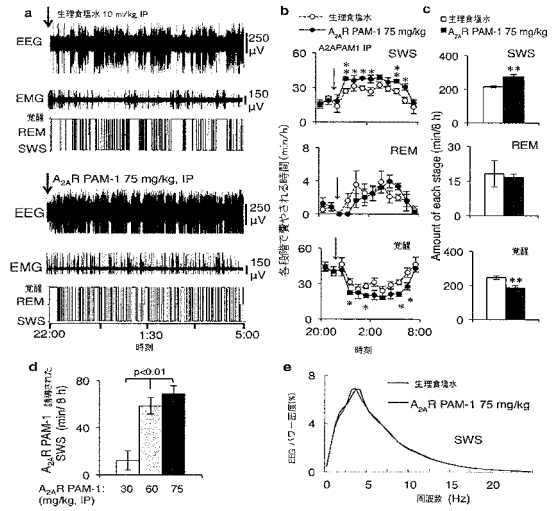
【 図 6 】



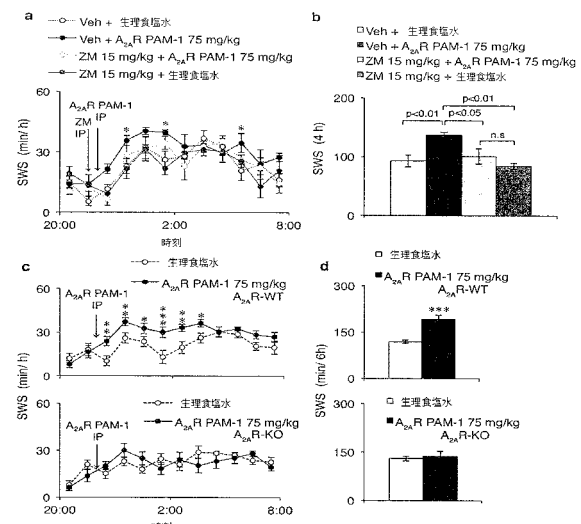
【 図 3 】



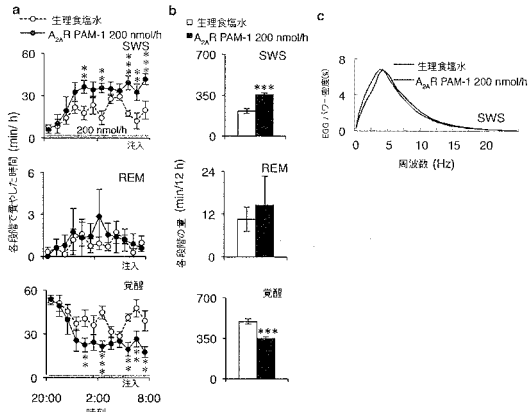
【 図 4 】



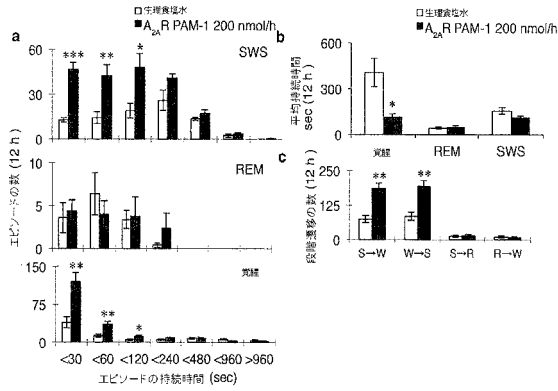
【 図 7 】



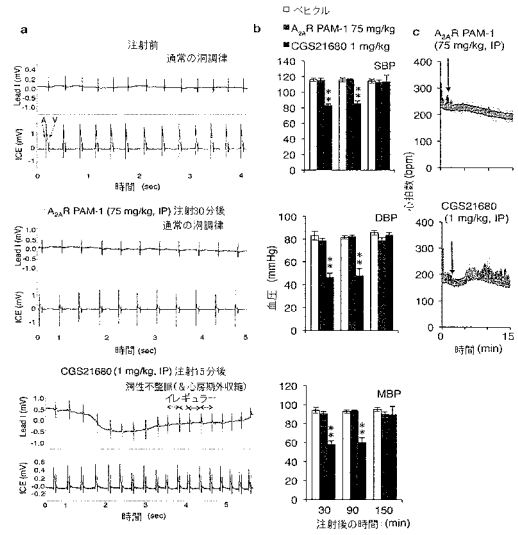
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## フロントページの続き

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 ラザルス ミハエル

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 斉藤 毅

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 長瀬 博

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 コルクタタ ムスタファ

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 井岡 秀二

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 AA03 FA33 MA01 MA04 NA06 NA14 ZA05

4H006 AA01 AA03 AB21 BJ50 BM30 BM71 BM72 BM73 BM74 BS30

BU46

【外国語明細書】

2019089712000001.pdf

2019089712000002.pdf

2019089712000003.pdf

2019089712000004.pdf