

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 19 年 12 月 13 日 (2007.12.13)

【公表番号】特表 2007-509106 (P2007-509106A)

【公表日】平成 19 年 4 月 12 日 (2007.4.12)

【年通号数】公開・登録公報 2007-014

【出願番号】特願 2006-536068 (P2006-536068)

【国際特許分類】

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

C 0 7 D 403/04 (2006.01)

A 6 1 K 31/506 (2006.01)

A 6 1 K 31/5377 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

C 0 7 D 403/14 (2006.01)

C 0 7 D 413/14 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 45/00

C 0 7 D 403/04

A 6 1 K 31/506

A 6 1 K 31/5377

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 9/00

C 0 7 D 403/14

C 0 7 D 413/14

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 10 月 23 日 (2007.10.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

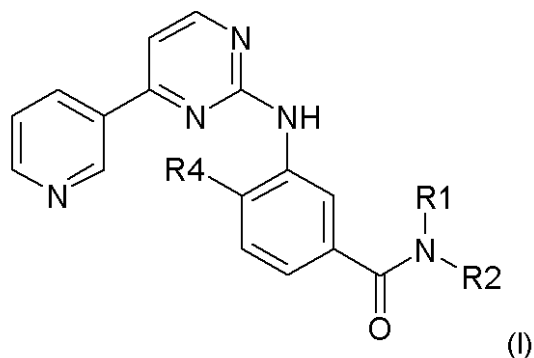
【請求項 1】

- アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患の処置および / または予防用医薬の製造のための、1 種またはそれ以上のタンパク質キナーゼ類 V E G F R - 2、T i e - 2、c - S r c、c - M e t、F G F R - 1、F l t - 1、H E R - 2、c - A b l、c - R a f、P D G F R - および c - K i t の阻害剤の使用。

【請求項 2】

阻害剤が、式 I

【化 1】



〔式中、

R_1 は水素、低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、カルボキシ - 低級アルキル、低級アルコキシカルボニル - 低級アルキル、またはフェニル - 低級アルキルであり；

R_2 は水素、所望により 1 個またはそれ以上の同一または異なるラジカル R_3 、シクロアルキル、ベンズシクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基または 0 個、1 個、2 個もしくは 3 個の窒素原子および 0 個もしくは 1 個の酸素原子および 0 個もしくは 1 個の硫黄原子を含む単環もしくは二環式ヘテロアリール基(ここで、各基はいずれの場合も非置換またはモノ - もしくはポリ - 置換されている)で置換されていてよい、低級アルキルであり；

そして R_3 はヒドロキシ、低級アルコキシ、アシルオキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、カルバモイル、N - モノ - または N, N - ジ置換カルバモイル、アミノ、モノ - またはジ置換アミノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基、または 0 個、1 個、2 個もしくは 3 個の窒素原子および 0 個もしくは 1 個の酸素原子および 0 個もしくは 1 個の硫黄原子を含む単環または二環式ヘテロアリール基(ここで、各基はいずれの場合も非置換またはモノ - もしくはポリ - 置換されている)であるか；

または R_1 および R_2 は、一体となって、所望により低級アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、アミノ、モノ - またはジ置換アミノ、オキソ、ピリジル、ピラジニルまたはピリミジニルでモノ - またはジ置換されていてよい、4 個、5 個または 6 個の炭素原子のアルキレン；4 個または 5 個の炭素原子を有するベンズアルキレン；1 個の酸素および 3 個または 4 個の炭素原子を有するオキサアルキレン；または 1 個の窒素および 3 個または 4 個の炭素原子を有するアザアルキレン(ここで、窒素は非置換であるか、または低級アルキル、フェニル - 低級アルキル、低級アルコキシカルボニル - 低級アルキル、カルボキシ - 低級アルキル、カルバモイル - 低級アルキル、N - モノ - または N, N - ジ置換カルバモイル - 低級アルキル、シクロアルキル、低級アルコキシカルボニル、カルボキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジニル、ピリミジニルもしくはピラジニルで置換されている)であり；

R_4 は水素、低級アルキル、またはハロゲンである。〕

の化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 3】

阻害剤が

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアニリド、
 4 - メチル - N - (3 - ピリジニル) - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
 N - (4 - クロロフェニル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
 2 (R) - および 2 (S) - [4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンゾイルアミノ]プロパン酸、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (8 - キノ
リニル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (3 - [トリ
フルオロメトキシ]フェニル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (2 - ピロ
リジノエチル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (3 - ピロ
リジノフェニル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (1 - [2 -
ピリミジニル] - 4 - ピペリジニル)ベンズアミド、
N - (4 - ジ - [2 - メトキシエチル]アミノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - メ
チル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
N - (4 - [1 H - イミダゾリル] - 3 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - メチル - 3 -
[[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (2 - ピロ
リジノ - 5 - トリフルオロメチルフェニル)ベンズアミド、
N - (3, 4 - ジフルオロフェニル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピ
リミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (3 - トリ
フルオロメチルベンジル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (3 - トリ
フルオロメチルフェニル)ベンズアミド、
N - (3 - クロロ - 5 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピ
リジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
N - (4 - ジメチルアミノブチル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリ
ミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [4 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) - 3 - トリフルオロメチルフェ
ニル] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (2 ,
2 , 2 - トリフルオロエトキシ) - 3 - トリフルオロメチルフェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [4 - (2 - メチル - 1 H - イミダゾリル) - 3 - トリフルオロメチルフ
ェニル] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - (4 - フェニル - 3 - トリフルオロメチルフェニル) - 3 - [[4 - (3 -
ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [4 - (4 - メチル - 1 H - イミダゾリル) - 3 - トリフルオロメチルフ
ェニル] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
メチル 2 (R) - および 2 (S) - [4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミ
ジニル]アミノ]ベンゾイルアミノ] - 3 - [4 - ヒドロキシフェニル]プロパノエート、
N - [2 - (N - シクロヘキシル - N - メチルアミノメチル)フェニル] - 4 - メチル - 3 -
[[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
N - [3 - [2 - (1 H - イミダゾリル)エトキシ]フェニル] - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3
- ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [3 - モルホリノ - 5 - トリフルオロメチルフェニル] - 3 - [[4 - (3
- ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (4 - ピロ
リジノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル)ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (4 - ピペ
リジノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル)ベンズアミド、
4 - メチル - N - [4 - モルホリノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル] - 3 - [[4 - (3
- ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、

N - (4 - エチルアミノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - (3 - トリフルオロメトキシフェニル)ベンズアミド、
N - [4 - (2 - ヒドロキシプロピルアミノ) - 3 - トリフルオロメチルフェニル] - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
N - (4 - ジエチルアミノ - 3 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - (3 - ピリジニル) - 5 - トリフルオロフェニル]ベンズアミド、
N - [3 - [3 - (1 H - イミダゾリル)プロポキシ]フェニル] - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (3 - ピリジニル) - 3 - トリフルオロフェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) - 5 - トリフルオロフェニル] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [3 - メチルカルバモイル - 5 - トリフルオロフェニル] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - N - [3 - メチルカルバモイル - 5 - モルホリノ] - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - [3 - (1 H - イミダゾル - 1 - イル)プロポキシ] - フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - [2 - (1 H - イミダゾル - 1 - イル)エトキシ]フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (エチルアミノ) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (ジエチルアミノ) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
(±) - 4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - [(2 - ヒドロキシプロピル)アミノ] - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - [ビス(2 - メトキシエチル)アミノ] - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (1 - ピペリジニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (1 - ピロリジニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (4 - モルホリニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - フェニル - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - [4 - (3 - ピリジニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]メチル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、
4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (2 , 4 - ジメチル - 1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (4 - メチル - 1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [4 - (2 - メチル - 1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - (4 - モルホリニル) - 5 - [(メチルアミノ)カルボニル]フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - [(メチルアミノ)カルボニル] - 5 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [5 - (3 - ピリジニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [5 - (4 - モルホリニル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [5 - (2 - メチル - 1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - N - [3 - (4 - メチル - イミダゾル - 1 - イル) - 5 - トリフルオロメチル - フェニル] - 3 - (4 - ピリジン - 3 - イル - ピリミジン - 2 - イルアミノ) - ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [5 - (5 - メチル - 1 H - イミダゾル - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) - 5 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド、および

4 - メチル - 3 - [[4 - (3 - ピリジニル) - 2 - ピリミジニル]アミノ] - N - [2 - (1 - ピロリジニル) - 5 - (トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

またはその薬学的に許容される塩から選択される化合物である、請求項 1 記載の使用。

【請求項 4】

阻害剤が 4 - メチル - N - [3 - (4 - メチル - イミダゾル - 1 - イル) - 5 - トリフルオロメチル - フェニル] - 3 - (4 - ピリジン - 3 - イル - ピリミジン - 2 - イルアミノ) - ベンズアミド；

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 記載の使用。

【請求項 5】

化合物の 10 ~ 800 mg の 1 日量を成人に投与する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

処置すべき疾患がアルツハイマー病、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳炎症、神経および脳外傷、血管アミロイド症、またはアミロイド症を伴う脳出血から選択される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

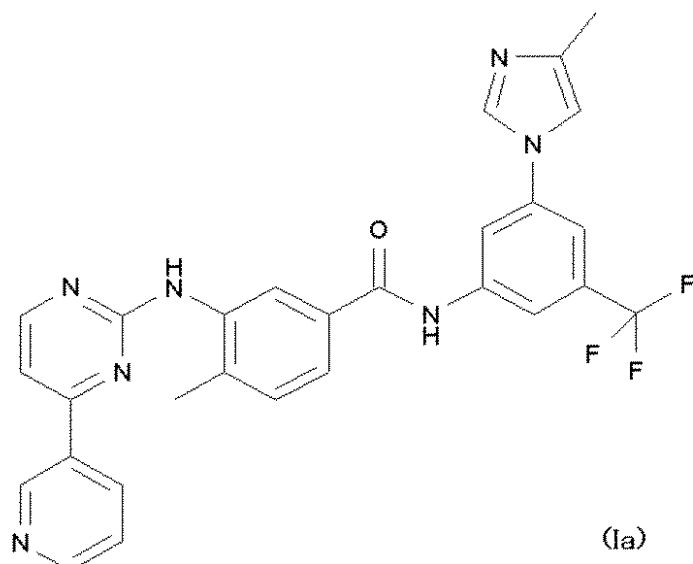
処置すべき疾患がアルツハイマー病である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8】

- アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患を有する哺乳動物を処置する方法であり、そのような処置を必要とする該哺乳動物に

(a) - アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患に対して有効な一定量の式 I a：

【化 2】



(Ia)

を有する 4 - メチル - N - [3 - (4 - メチル - イミダゾル - 1 - イル) - 5 - トリフルオロメチル - フェニル] - 3 - (4 - ピリジン - 3 - イル - ピリミジン - 2 - イルアミノ) -

(b) - アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患を処置するために使用する薬剤が選択される治療的有効量の第 2 剤を含む医薬組成物を投与することを含む、方法。

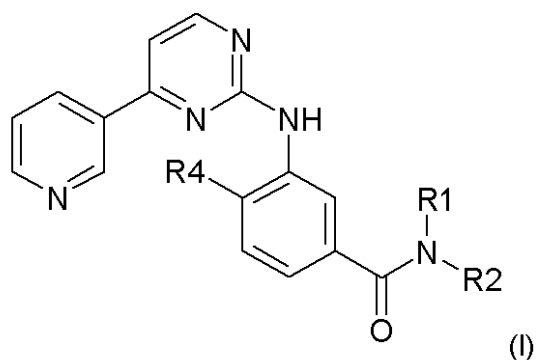
【請求項 9】

- アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患の処置および / または予防用医薬の製造のための、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の阻害剤またはその薬学的に許容される塩の使用。

【請求項 10】

- アミロイド産生および / または凝集が関与する神経および血管疾患の処置における、式 I

【化 3】



(I)

〔式中、

R₁ は水素、低級アルキル、低級アルコキシ - 低級アルキル、アシルオキシ - 低級アルキル、カルボキシ - 低級アルキル、低級アルコキシカルボニル - 低級アルキル、またはフェニル - 低級アルキルであり；

R₂ は水素、所望により 1 個またはそれ以上の同一または異なるラジカル R₃、シクロアルキル、ベンズシクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基、または 0 個、1 個、2 個もしくは 3 個の環窒素原子および 0 個もしくは 1 個の酸素原子および 0 個もしくは 1 個の硫黄原子を含む単環または二環式ヘテロアリール基(ここで、各基はいずれの場合も非置

換またはモノ - もしくはポリ - 置換されている)で置換されていてよい、低級アルキルであり；

そして R_3 はヒドロキシ、低級アルコキシ、アシルオキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、カルバモイル、N - モノ - またはN,N - ジ置換カルバモイル、アミノ、モノ - またはジ置換アミノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基、または0個、1個、2個もしくは3個の窒素原子および0個もしくは1個の酸素原子および0個もしくは1個の硫黄原子を含む単環または二環式ヘテロアリール基(ここで、各基はいずれの場合も非置換またはモノ - もしくはポリ - 置換されている)であるか；

または R_1 および R_2 は、一体となって、所望により低級アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、アミノ、モノ - またはジ置換アミノ、オキソ、ピリジル、ピラジニルまたはピリミジニルでモノ - またはジ置換で置換されていてよい、4個、5個または6個の炭素原子のアルキレン；4個または5個の炭素原子を有するベンズアルキレン；1個の酸素および3個または4個の炭素原子を有するオキサアルキレン；または1個の窒素および3個または4個の炭素原子を有するアザアルキレン(ここで、窒素は非置換であるか、または低級アルキル、フェニル - 低級アルキル、低級アルコキシカルボニル - 低級アルキル、カルボキシ - 低級アルキル、カルバモイル - 低級アルキル、N - モノ - またはN,N - ジ置換カルバモイル - 低級アルキル、シクロアルキル、低級アルコキシカルボニル、カルボキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジニル、ピリミジニルもしくはピラジニルで置換されている)であり；

R_4 は水素、低級アルキル、またはハロゲンである。]

またはその薬学的に許容される塩を、- アミロイド産生および/または凝集が関与する神経および血管疾患の処置のための、同時、別々または連続使用のための指示書と共に含む、商品包装物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

本発明は、さらに、- アミロイド産生および/または凝集が関与する神経および血管疾患、例えばアルツハイマー病、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳炎症、神経および脳外傷、血管アミロイド症、またはアミロイド症を伴う脳出血のような神経変性疾患の処置および/または予防のための、タンパク質キナーゼ類VEGFR - 2、Tie - 2、c - Src、c - Met、FGFR - 1、Flt - 1、HER - 2、c - Abl、c - Raf、PDGFR - 、c - Kitに対してまたは上記酵素の組み合わせに対して活性を有する医薬の製造のための、“化合物”、またはそのN - オキシドもしくは薬学的に許容される塩の使用に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

実施例1：

細胞培養

HEK / APPsw細胞を、10 μ g/ml ポリ - D - リシンで予めコートしたマイクロタイタープレートに、10% FCS、0.25 mg/ml G418スルフェート、1% ペニシリンストレプトマイシン添加100 μ l/ウェル DMEM培地中、12,000細胞/ウェルで播種する。翌日、上清を90 μ l/ウェルの新鮮培地および10 μ l/ウェルの培養培地で希釈した化合物を添加する。2種のコントロールを使用する：細胞なしでか

つ 10 μ l / ウェルの全化合物希釈 (背景シグナル) を含む細胞培養培地と、非処置細胞由来の細胞培養培地 (ポジティブコントロール)。化合物添加 24 時間後、馴化培地を回収し、A レベルを特異的サンドイッチ E L I S A で測定する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

実施例 2 の化合物は、10 マイクロ M より低い濃度で、H E K / A P P s w e 細胞の培養培地における A 分泌を、細胞生存能に何ら影響することなく、明らかに減少させることが証明される。