

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-527565

(P2005-527565A)

(43) 公表日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 487/04	C O 7 D 487/04 1 4 2	4 C O 5 0
A61K 31/136	C O 7 D 487/04 C S P	4 C O 8 6
A61K 31/337	A 6 1 K 31/136	4 C 2 0 6
A61K 31/519	A 6 1 K 31/337	
A61K 31/704	A 6 1 K 31/519	
	審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 129 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2003-580337 (P2003-580337)
 (86) (22) 出願日 平成15年3月27日 (2003. 3. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月26日 (2004. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/003207
 (87) 国際公開番号 W02003/082872
 (87) 国際公開日 平成15年10月9日 (2003. 10. 9)
 (31) 優先権主張番号 02007163.5
 (32) 優先日 平成14年3月28日 (2002. 3. 28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

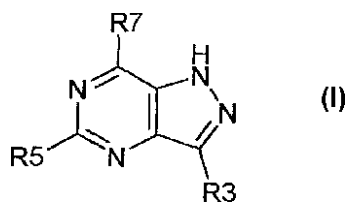
(71) 出願人 504363599
 ウスタフ エクスペリメンタルニ ボタニ
 キ エーブイ シーアール (インスティ
 チュート オブ エクスペリメンタル ボ
 タニー アカデミー オブ サイエンス
 ズ オブ ザ チェコ リパブリック)
 チェコ共和国 プラハ ロツヴォジョバ
 1 3 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新しいピラゾロ [4, 3 - d] ピリミジン、その調整方法、及び治療方法

(57) 【要約】

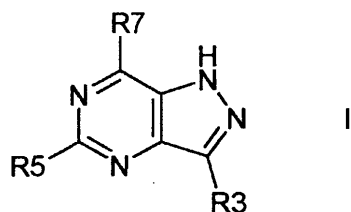
本発明は一般式(I)に代表される3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、及び薬学的に許容されるその塩に関係するものであり、その場合、R3は任意で置換されるアルキル、シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、又はアルキルアリール基であり; R5はハロゲン、-NHNH₂、-NHOH、NHCONH₂、グアニロ(NH-C(NH)NH₂)、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、複素環、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル基、-C(0)-R_a、-C(0)NR_bR_c、-SO₃R_d、又は-NHC(0)R_eの基であり、ここでR_aとR_fは任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基であり、R_bとR_cとR_dは水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基からなる群より独立的に選択されるものであり、R_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I



10

に代表される 3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、
及び薬学的に許容されるその塩

(ここで、

R3が任意で置換されるアルキル、シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、又はアルキルアリール基であり、

R5がハロゲン、-NHNH₂、-NHOH、NHCONH₂、グアニロ(NH-C(NH)NH₂)、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、複素環、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル基、-C(O)-R_a、-C(O)NR_bR_c、-SO₃R_d、又は-NHC(O)R_eの基で、ここでR_aとR_fが任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基であり、R_bとR_cとR_dが水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基からなる群より独立的に選択されるもので、R_eがヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基であり、または

20

-X-R₅・基であり、

ここでXが-NH-、-O-、-S-、又は-N(アルキル)-、及び

R5'が水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、アリール、複素環、ヘテロC₁-C₆アルキル、アリールアルキル、ヘテロアリール、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、又はヘテロアリールアルキル基、-C(O)-R_a、-C(O)NR_bR_c、-SO₃R_d、又は-NHC(O)R_eの基

30

で、ここでR_a、R_b、R_c、R_d、R_e、及びR_fが上述の意味を持ち、及び
R7がハロゲン、-NHNH₂、NHOH、NHCONH₂、グアニロ(NH-C(NH)NH₂)又は-X-R₇・基であり、
ここでXが上述の意味を持ち、R₇・がR₅・で定義されたものと同様である)。

【請求項 2】

請求項1に記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン

(ここで、

R3が

無置換アルキル、フッ素又は塩素置換のアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロアルキル、無置換シクロヘテロアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロヘテロアルキル、および無置換のシクロアルキルアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロアルキルアルキル、無置換のアリール、フッ素又は塩素置換のアリール、無置換のアリールアルキル、フッ素又は塩素置換のアリールアルキルからなる群より選択され、

40

R5が、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテル、およびイソブテニルの基からなる群より選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、
事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシ、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルチオ、及びカルバモイル基からなる群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

50

アシル-C(0)R、ここで R_a がメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルからなる群より選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルチオ、及びカルバモイル基から選択される0 - 5の置換基で置換され、

アミド-C(0)NR_bR_c、ここで R_b と R_c が側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキルの箇所で上述した群より選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

スルホ-SO₃R_d、ここで R_d がメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

カルバミノ-NHC(0)R_e、ここで R_e がアルコキシ、アルキルアミノがスルホの箇所で上述した群より選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

C_3 - C_{15} シクロアルキルがシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、または、アダマンチルからなる群より選択され、

置換 C_3 - C_{15} シクロアルキルがシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、または、アダマンチルからなる群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

R_f(シクロアルキル)、ここでR_fが、

上で定義した C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルの基で、

C_3 - C_{15} シクロアルキルがシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、または、アダマンチルからなる群より選択され、

置換 C_3 - C_{15} シクロアルキルがシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、または、アダマンチルからなる群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

アリールがフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、またはフェナントレニルからなる群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

複素環がチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

ヘテロアルキルが-R_g-Hetで、ここで、

R_gが上で定義した C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルで、及びHetが上で定義した複素環で、

ヘテロアリールが-R_h-HetArで、ここで、

R_hがメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの群より選択され、及び

HetArがベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、ファタジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より選択される0 - 5の置換基で置換され、

アリールアルキルが-R_iArで、ここで、

R_iが上で定義した C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルで、及び

Arがアシルの箇所で定義したアリールであり、
 シクロヘテロアルキルがピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、
 イミダゾリジニルからなる群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より
 選択される0 - 5の置換基で置換され、
 シクロヘテロアルキルアルキル R_j (シクロヘテロアルキル)、ここで、
 R_j がアリールアルキル R_i Arで、及び
 Arが上で定義したアリールであり、
 シクロヘテロアルキルがピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、
 イミダゾリジニルからなる群より選択され、事象毎に独立にアシルの箇所で定義した群より
 選択される0 - 5の置換基で置換され、
 ヘテロアリールアルキルが $-R_k$ -HetArで、ここで、
 R_k が上で定義した C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルで、及び
 HetArが上で定義したヘテロアリールで、
 R_5 が R_5' -Xで、ここでXがメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、エチニル、
 アリル、プロパギル、イソペンテニルからなる群より事象毎に選択される-N(アルキル)
 で、
 R_5' が C_1 - C_6 アルキル、アルケニル、アルキニル、 C_3 - C_{15} シクロアルキル、 R_f (C_3 - C_{15} シ
 クロアルキル)、アリール、複素環、ヘテロ C_1 - C_6 アルキル、アリールアルキル、ヘテロア
 リール、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、又はヘテロアリールア
 ルキル基、 $-C(0)-R_a$ 、 $-C(0)NR_bR_c$ 、 $-SO_3R_d$ の基、又は R_5 について定義された-NHC(0) R_e 基
 で、ここで R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、及び R_f が上述の意味を持ち、
 R_7 が R_7' -Xで、ここでXがメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、エチニル、
 アリル、プロパギル、イソペンテニルからなる群より事象毎に選択される-N(アルキル)
 で、
 R_7' が上述の R_5' の意味を持つ)。

10

20

【請求項3】

事象毎に独立に R_3 、 R_5 、又は R_7 に(R)又は(S)の構造を持つ、請求項1または2記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか一項記載の、式Iの3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンを調製する方法であって、 $SOCl_2$ /ジメチルホルムアミド/クロロホルム、 $POCl_3$ /ジメチルホルムアミド、 $POCl_3$ / PCl_5 /ジメチルホルムアミド、又は $Cl_2P(0)OP(0)Cl_2$ などの塩素化剤により3-, 5-二置換-7-ヒドロキシピラゾロ [4,3-d] ピリミジンを塩素化し、及び3-, 5-二置換-7-クロロピラゾロ [4,3-d] ピリミジンを得ること、および求核置換により7の位置の塩素原子を置換基 R_7' -Xで任意で置換することを含む方法。

30

【請求項5】

請求項1~4のいずれか一項記載の、式Iの3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンを調製する方法であって、ジホスホリルジクロライド($Cl_2P(0)OP(0)Cl_2$)の作用により5-, 7-ジヒドロキシ-3-置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンの塩素化、抽出及びその後の結晶化による5-, 7-ジクロロ-3-置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンの単離、及び R_5 と R_7 の位置の塩素原子を請求項1で定義した置換基 R_5' -X及び R_7' -Xで任意で、同時に又は連続的に置換することを含む方法。

40

【請求項6】

請求項1~5のいずれか一項記載の、式Iの3-, 7-置換-5-アミノピラゾロ [4,3-d] ピリミジンを調製する方法であって、 $SOCl_2$ の作用による5-アミノ-7-ヒドロキシ-3-置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンの塩素化、及びその後、請求項1で定義された R_7' -X置換基で塩素原子を求核置換することを含む方法。

【請求項7】

哺乳動物の細胞増殖を阻害する方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の化合物、または薬学的に許容されるこのような化合物の塩の有効量を薬学的担体と一緒に投与

50

することを含む方法。

【請求項 8】

癌、又は乾癬、慢性関節炎リウマチ、狼瘡、1型糖尿病、多発性硬化症、再狭窄、多嚢胞腎臓疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病及び痛風、菌類又は原生生物などによって引き起こされるもののような寄生生物症、又はアルツハイマー病を治療する方法、又は抗神経退化変性薬として、又は免疫刺激を抑制するための方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を薬学的担体と一緒に投与することを含む方法。

【請求項 9】

癌を治療する方法であって、通常使用されるミトキサントロン、シス白金、メトトレキサート、タキソール、又はドキソルピシンなどの細胞増殖抑制薬との組み合わせで、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を投与することを含む方法。 10

【請求項 10】

紫外線角膜炎、ボウエン病、乳頭腫、脂漏性角化症、中毒性湿疹、アトピー性皮膚炎、及び魚鱗癬で苦しんでいるヒトの増殖亢進性皮膚病の治療方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を薬学的担体と一緒に投与することを含む方法。

【請求項 11】

アドレナリン作動性及び/又はプリン作動性受容体の活性化を調節し、その結果、癌、喘息、心血管疾患、神経退化変性疾患、及び炎症性疾患のアデニレート・シクラーゼの活性化又は不活性化を調節するための請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジンの使用。 20

【請求項 12】

血液などの臨床試料中のウィルスの拡散又は成長を排除又は減少させるために、及び組織培養細胞に蛋白質及び二次産物(抗体や二次植物産物など)の製造を継続させる一方で細胞の成長を停止させるために、蛋白質やワクチンなどの生物薬剤学的又はその他の製品の製造中、組織培養系中のウィルスの拡散又は成長を排除又は減少させる方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を薬学的担体と一緒に投与することを含む方法。 30

【請求項 13】

哺乳動物の免疫刺激(例えば関節炎又は移植片拒絶抑制)を抑制する方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を薬学的担体と一緒に投与することを含む方法。

【請求項 14】

哺乳動物細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の治療学的有効量を薬学的担体と一緒に被験者に投与することを含む方法。

【請求項 15】

哺乳動物の細胞の老化と壊死を阻害し、皮膚及び体を健康で若々しくする方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または美容学的又は治療学的に許容されるその塩の治療学的有効量を美容、食品、又は薬学的担体と一緒に被験者に投与することを含む方法。 40

【請求項 16】

請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の有効量を担体と一緒に被験者に投与する、哺乳動物のクローン化プロセス中、哺乳動物の卵母細胞を胚胞期に維持しその受精も維持する方法。

【請求項 17】

ウイルス感染を治療する方法であって、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン、または薬学的に許容されるその塩の治療学的有効 50

量を薬学的担体と一緒に被験者に投与することを含む方法。

【請求項18】

ウイルス感染がヘルペスウイルスHSV-1、HSV-2、VZV、EBV、CMV、HHV-6、HHV-7、HHV-8又はワクシニアウイルス、乳頭腫ウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスなどのDNAウイルスにより引き起こされる、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

治療薬として請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d]ピリミジン。

【請求項20】

癌、又は乾癬、慢性関節炎リウマチ、狼瘡、1型糖尿病、多発性硬化症、再狭窄、多嚢胞腎臓疾患、移植片拒絶、移植片対宿主病及び痛風、菌類又は原生生物によって引き起こされるもののような寄生生物症、又はアルツハイマー病、喘息、紫外線角膜炎、ボウエン病、乳頭腫、脂漏性角化症、中毒性湿疹、アトピー性皮膚炎、及び魚鱗癬、心血管疾患、神経退化変性疾患、ウイルス性及び炎症性疾患の治療用薬剤調製において、請求項1から3のいずれか一項記載の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ [4,3-d]ピリミジンの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新しいピラゾロ [4,3-d]ピリミジン誘導体、及び適切な有用性、特に診断方法及び治療方法へのその使用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

細胞分裂周期は通常2つの期間の継続と見なされている。つまりS期(DNA合成)とM期(2つの娘細胞の中で合成されたDNAが分離する期間)であり、2つのギャップ期間G₁とG₂によってそれらの間は占められている。細胞周期の正味の結果は単に成長と分化だけではなく、腫瘍の成長とアポトーシスでもあってもよい。この見解は過去5年間にわたって哺乳類の分野で集積された証拠を反映しているものであり、大半又は十中八九すべての腫瘍が細胞周期機構を脱線させる欠陥を1つ又は複数有している。そういう欠陥は細胞周期装置の構成要素を標的にするが、その標的の中には、細胞周期の各期間を通して忠実で秩序正しい進行を確実にし、それによってゲノムを保護している検閲機構も含まれる。またはそういう欠陥は、その作用により結局は細胞周期事象の引き金役になる上流のシグナル伝達カスケードの要素を標的にすることもある (Bartekら1999, J. Pathol. 187: 95-99)。

【0003】

癌が細胞周期の病気であるという考えは、全ての周期制御の面の1つ又は複数の部分でどの腫瘍にも欠陥があることを意味しているが、だからと言って、腫瘍形成は細胞周期時計だけを標的にしているという意味ではない。腫瘍の成長には細胞死の機構の異常、及び細胞周期の欠陥と協調して生じる細胞間及び/又は細胞と細胞基質の相互作用の異常も必要としているように思える。

【0004】

腫瘍の分子病原論的見解では、細胞周期の欠陥は腫瘍進行の初期現象、素因、又は寄与条件を示している。腫瘍の素因となる変性の例には、例えばCDK阻害剤p16^{INK4A}又はp53^{KIP2}の胚芽系の突然変異も含まれるが、細胞周期欠陥の多くは、身体的な突然変異、または腫瘍形成の初期又は後期に起きることがある後成的な変化にも起因することが知られている(Hunter1997, Cell 88: 333-346, Fearon1997, Science278: 1043-1050)。

【0005】

細胞周期を調節する蛋白質の重要性、つまり、ヒトの腫瘍における癌遺伝子と腫瘍抑制遺伝子pRbとのその直接的相互作用、および多く見られるそれらの調節の喪失などにより、そういう蛋白質低分子制御因子の探索が活発に行なわれるようになった。そういう化学物質の中でも最初に発見されたのがサイクリン依存性キナーゼ(CDK)の化学的阻害剤であ

10

20

30

40

50

った。そういう阻害剤は抗有糸分裂性であり、とても興味深い抗有糸分裂活性及び抗腫瘍活性を示す。

【発明の開示】

【0006】

現在までに知られている類似体よりも優れた選択性及び有効指数を持つ、つまり毒性が低くしかも効果の高い抗癌化合物、抗炎症化合物、抗ウィルス化合物、抗神経変性化合物、神経性抑鬱化合物、及び免疫抑制化合物を提供するのが本発明の目的である。

【0007】

CDK、細胞増殖を阻害、及び/又はアポトーシスを誘導する3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジンを提供するのが本発明の目的である。

10

【0008】

3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジンを含む薬学的組成物及び薬学的に許容される担体を提供することも、本発明の目的の一つである。

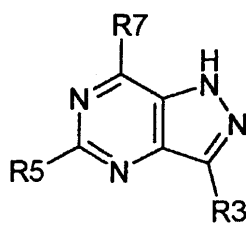
【0009】

有効量の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジンを必要としている哺乳動物へ、細胞増殖及び炎症性の疾病を阻害する方法を提供することも、本発明の目的の一つである。

【0010】

この目的の解決策が、式Iで表される3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジン、

20



I

及び薬学的に許容されるその塩であるが、ここで、

R7 はハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、ヒドロキシルアミノ、又はヒドラジノ R7' -Xで、この場合Xは-NH-、-N(アルキル)-、-O-、又は-S-部分である。

30

R7' は水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、複素環、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロヘテロアルキル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、及びシクロヘテロアルキルアルキルで、それはハロゲン、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基より選択される置換基で事象毎に独立に置換される。

R5はハロゲン、ヒドロキシルアミノ、ヒドラジノ、アルキル、アリール、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリールアルキル、ヘテロアルキル、ヘテロアリールアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、又はR5' -Xであり、ここでXは-NH-、-N(アルキル)-、-O-、又は-S-部分である。

40

R5' は水素、アルキル、アシル、シクロアルキル、アリール、置換アリール、複素環、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロヘテロアルキル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、及びシクロヘテロアルキルアルキルであり、それはハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基より選択される置換基で事象毎に独立に置換される。

R3はアルキル、フルオロ又はクロロ置換アルキル、シクロアルキル、フルオロ又はクロロ置換シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、シクロ

50

ヘテロアルキル、フルオロ又はクロロ置換シクロヘテロアルキルである。

【0011】

別の解決策は、CDK及び細胞増殖を阻害する方法、及び/又は哺乳動物のアポトーシスを誘導する方法であって、請求項1の化合物を治療学的に有効な量だけ哺乳動物に投与することも含まれる方法である。請求項1記載の化合物はCDK阻害分子であり、癌、再狭窄、慢性関節炎リウマチ、狼瘡、I型糖尿病、多発性硬化症、アルツハイマー病、寄生菌の増殖(動物、原生生物)、移植片拒絶(宿主対移植片病)、移植片対宿主病、および痛風のような細胞増殖を含むいくつかの疾病の治療に有効である。

【0012】

別の解決策は、哺乳動物の α 及び β アドレナリン作動性並びにプリン作動性の受容体の阻害又は刺激の方法であって、請求項1の化合物を治療学的に有効な量だけ哺乳動物に投与することも含まれるである。請求項1の阻害分子及び刺激分子は炎症性の疾病や喘息の治療に有効である。

【0013】

更に別の解決策は、1つ又は複数の薬学的賦形剤と混合した、請求項1の化合物を含む薬学的組成物である。本発明の薬学的組成物はヒト、動物、および植物の菌類感染の治療に有効である。

【0014】

本発明の3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジンは、定義された化合物のDNAウィルスに対する極めて高い効力の獲得をもたらす。

【0015】

本明細書で使用される場合、直接の文脈により変更されない限り、以下の通りである。

「ハロゲン」はフッ素、臭素、塩素、及びヨウ素を意味する。

「ヒドロキシ」は-OH基を意味する。

「メルカプト」は-SH基を意味する。

「アルキル」は任意で置換される側鎖のある又は側鎖のない、飽和又は不飽和の C_1 - C_6 鎖を意味する。この用語は、メチル、プロピル、イソプロピル、三級ブチル、アリル、ビニル、エチニル、プロパルギル、およびヘキセン-2-イル等のような基で代表されうる。

「置換アルキル」とは、ヒドロキシル、メルカプト、アルキルメルカプト、ハロゲン、アルコキシ、アシロキシ、アミノ、アシルアミノ、ヒドラジノ、カルバモイル、アミド、カルボキシル、スルホ、アシル、およびグアニジノなどの置換基を1つ又は複数含むまさに上述のアルキルを意味する。これらの基をアルキル部分のどの炭素原子にも結合してもよい。

「アルコキシ」は-OR基を意味し、ここでRは定義されているようなアルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、又は置換シクロヘテロアルキルである。

「アルキルメルカプト」は-SR基を意味し、ここでRは「アルコキシ」基について定義されたものと同様である。

「スルホ」は-SO₃R基を意味し、ここでRは水素、任意で置換されるアルキル又は置換アルキルである。

「スルファミド」はSO₂NR'基を意味し、ここでR及びR'は水素、アルキル、又は置換アルキルである。

「アシル」は-C(=O)R基を意味し、ここでRは本明細書で定義されるようなハロゲン、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキルである。

「アリールオキシ」は-OAr基を意味し、ここでArは本明細書で定義されているようなアリール、置換アリール、ヘテロアリール、又は置換ヘテロアリール基である。

「アルキルアミノ」は-NRR'基を意味し、ここでR及びR'は独立に、本明細書で定義されるようなハロゲン、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、

10

20

30

40

50

又は置換ヘテロアリールであっても良い。

「アミド」は $-C(=O)NRR'$ 基を意味し、ここでR及びR'は独立に、本明細書で定義されるようなハロゲン、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、又は置換ヘテロアリールであっても良い。

「カルボキシ」は $-C(=O)OR$ 基を意味し、ここでRは本明細書で定義されるようなハロゲン、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、ヘタリル (hetaryl)、又は置換ヘタリルである。

「アシルアミノ」は $-NHCOR$ 基を意味し、ここでRは本明細書で定義されるようなアルキル、置換アルキル、複素環、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、及び置換ヘテロアリールであっても良い。

10

「カルバモイルアミノ」は $NHCOOR$ 基を意味し、ここでRは任意で置換されるアルキル又はアリールである。

「アリール」又は記号「Ar」は任意で置換される芳香族炭素環基を意味し、少なくとも1つの芳香環 (例えばフェニル又はビフェニル)、または少なくとも1つの環が芳香族である複数の縮合環 (例えば1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、ナフチル、アントリル、又はフェナントリル)を有している。

「置換アリール」とは、ハロゲン、アルキル、ヒドロキシ、アミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、ヒドラジノ、メルカプト、アルコキシ、アルキルメルカプト、アルキルアミノ、アミド、カルボキシル、ニトロ、およびスルホなどの官能基1つ又は複数で任意で置換されるまさに上述のアリールを意味する。

20

「複素環」とは任意で置換される不飽和又は芳香族の炭素環を意味し、環の中にN、O、またはSのようなヘテロ原子を少なくとも1つ有している。環は単一の (例えばピラニル、ピリジル、又はフリル等)又は複数の縮合環 (例えばキナゾリニル、プリニル、キノリニル、又はベンゾフラニル等)でも良く、それは任意で無置換でも良いし、例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等で置換しても良い。

「ヘテロアリール」は任意で置換される複素環で、少なくとも1つの複素環が芳香族であることを意味する。

「置換ヘテロアリール」は、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等の官能基1つ又は複数で選択的に一置換又は複数置換された複素環を意味する。

30

「アリールアルキル」は $-R-Ar$ 基を意味し、ここでArは任意で置換されるアリール基、及びRはアルキル又は置換アルキル基である。アリール基は任意で無置換でも良いし、例えばハロゲン、アミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、ヒドラジノ、アシロキシ、アルキル、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルメルカプト、アルキルアミノ、アミド、カルボキシル、ヒドロキシ、アリール、ニトロ、メルカプト、及びスルホ等で置換しても良い。

「ヘテロアルキル」は $-R-Het$ 基を意味し、ここでHetは任意で置換される複素環基で、Rは任意で置換されるアルキル基である。ヘテロアルキル基は任意で無置換でも良いし、例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等で置換しても良い。

40

「ヘテロアリールアルキル」は $-R-HetAr$ 基を意味し、ここでHetArは任意で置換されるヘテロアリール基、及びRはアルキル又は置換アルキルである。ヘテロアリールアルキルは任意で無置換でも良いし、例えばハロゲン、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、アルキルメルカプト、ニトロ、チオ、及びスルホ等で置換しても良い。

「シクロアルキル」は任意で置換される二価の環式又は多環式のアルキル基を意味し、3

50

から15個の炭素原子を含む。

「置換シクロアルキル」は、例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等の置換基1つ又は複数を含むシクロアルキル基を意味する。

「シクロヘテロアルキル」は任意で置換されるシクロアルキル基を意味し、環メチレン基の1つ又は複数がNH、O、S等のヘテロ原子で置換されている。

「置換シクロヘテロアルキル」とは、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等の置換基を1つ又は複数を含む本明細書で定義されているようなシクロヘテロアルキル基を意味する。

10

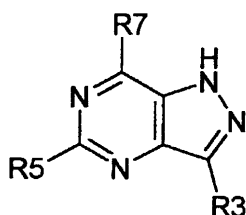
「シクロアルキルアルキル」は任意で置換される-R-シクロアルキル基を意味し、ここでシクロアルキルは任意で置換されるシクロアルキル基、Rはアルキル又は置換アルキルである。シクロアルキル基は任意で無置換であっても良いし、例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等で置換しても良い。

「シクロヘテロアルキルアルキル」は任意で置換される-R-シクロヘテロアルキル基を意味し、ここでRはアルキル又は置換アルキルである。シクロヘテロアルキル基は任意で無置換であっても良いし、例えばハロゲン、アミノ、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、メルカプト、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、カルバモイルアミノ、アシルオキシ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、カルボキシル、アミド、スルホ、およびスルファミド等で置換しても良い。

20

【0016】

本発明は、一般式I



I

30

で代表される3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジン、及び薬学的に許容されるその塩に関係しており、ここで、R3は任意で置換されるアルキル、シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、又はアルキルアリール基であり、R5はハロゲン、-NHNH₂、-NHOH、NHCONH₂、グアニロ(NH-C(NH)NH₂)、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、複素環、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル基、-C(=O)-R_a、-C(=O)NR_bR_c、-SO₃R_d、又は-NHC(=O)R_eの基で、ここでR_aとR_fは任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基であり、R_bとR_cとR_dは水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基からなる群より独立的に選択されるもので、及びR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、又はアルキニル基であり、または

40

-X-R₅・基であり、

ここでXは-NH-、-O-、-S-、又は-N(アルキル)-であり、及び

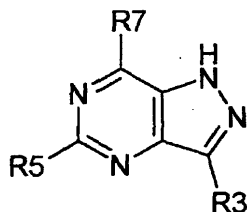
R₅・は水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、アリール、複素環、ヘテロC₁-C₆アルキル、アリ

50

ールアルキル、ヘテロアリール、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、又はヘテロアリールアルキル基、 $-C(0)-R_a$ 、 $-C(0)NR_b R_c$ 、 $-SO_3 R_d$ 、又は $-NHC(0)R_e$ の基で、ここで R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 、及び R_f は上述の意味を持ち、及び
 R_7 はハロゲン、 $-NHNH_2$ 、 $NHOH$ 、 $NHCONH_2$ 、グアニロ($NH-C(NH)NH_2$)又は $-X-R_7'$ 基であり、ここで X は上述の意味を持ち、 R_7' は R_5 で定義されたものと同様である。

【0017】

好ましい実施例では、本発明はサイクリン依存性キナーゼと α 及び β アドレナリン作動性及びプリン作動性の受容体を阻害又は刺激し、以下の式I



I

を有する3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジン、及び薬学的に許容されるその塩に関係しており、ここで
 R_7 は $NHNH_2$ 、

ハロゲン、

$R_7' -X$ (ここで X は $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ である)、

$R_7' -X$ (ここで X は事象毎にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、エチレン、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される $-N(アルキル)-$ であるのが好ましい)である。

R_7' は、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、これは、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から

選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、アシル $-C(0)R$ であり、ここで R_a はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から

選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、アミド $-C(0)NR_b R_c$ であり、ここで R_b 及び R_c は独立に水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から

選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、スルホ $-SO_3 R_d$ 、ここで R_d は水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から

10

20

30

40

50

ル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、カルバミノ-NHC(0)R_e、ここでR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルはR_f(シクロアルキル)であり、ここでR_fは、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは-R_g-Hetであり、ここで、

10

20

30

40

50

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、 R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールアルキルは $-R_i$ Arで、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル $-R_j$ (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリールアルキル R_i Arであり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、ア

10

20

30

40

50

ルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

10

ヘテロアリールアルキルは $-R_k$ -HetArであり、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、HetArはベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

20

R_5 は、

ハロゲン

$NHNH_2$;

$NHOH$ であり;

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

30

アシル- $C(0)R$ であり、ここで R_a はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

40

アミド- $C(0)NR_bR_c$ 、ここで R_b 及び R_c は水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

スルホ- SO_3R_d であり、ここで R_d は水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、

50

イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

カルバミノ-NHC(O) R_e であり、ここで R_e はヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノであり、またはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルは R_f (シクロアルキル)であり、ここで R_f は、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイ

10

20

30

40

50

ルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは $-R_g$ -Hetであり、ここで、

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、

R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び、

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールアルキルは $-R_i$ Arで、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル $-R_j$ (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリールアルキル $-R_i$ Arであり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択

される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

10

ヘテロアリアルアルキルは $-R_k$ -HetArであり、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。及び、

20

HetArはベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

$R5'$ -X、ここで、Xは-NH-、-O-、-S-部分であり、

$R5'$ -X、ここで、XはN-(アルキル)-であり、事象毎にメチル、エチル、プロピル、ビニル、エチニル、アリル、プロパギル、イソペンテニルの基より選択されることが好ましい。

30

$R5'$ は水素であり、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アシル- $C(0)R$ 、ここで R_a は C_1 -メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

40

アミド- $C(0)NR_bR_c$ 、ここで R_b 及び R_c は水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のない C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロ

50

キシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

スルホ-SO₃R_d、ここでR_dは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、およびイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

カルバミノ-NHC(O)R_e、ここでR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルはR_f(シクロアルキル)であり、ここでR_fは、メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選

10

20

30

40

50

択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは $-R_g$ -Hetであり、ここで、

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、

R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び、

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールアルキルは $-R_i$ Arで、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル- R_j (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリールアルキル- R_i Arであり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎

10

20

30

40

50

に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び

10

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールアルキルは R_k -HetArで、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、HetArはベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

20

30

R3は、

アルキル、フッ素又は塩素置換のアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロアルキル、シクロヘテロアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロヘテロアルキル、シクロアルキルアルキルである。

【0018】

以下の誘導体が特に好ましい。つまり、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-[1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル]アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)

40

50

50

[illegible]

ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミノ-3-
 イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチル
 ピロリジン-1-イル)-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(
 メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(2,6-ジ
 ヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]
]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジ
 ル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イ
 ソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミ
 ノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-
 (2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾ
 ロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-ク
 ロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-
 (2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジル) アミノ-3-
 イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プ
 ロピル]アミノ-7-(2-アセトキシベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラ
 ズロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル) -7-(2-アセト
 キシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(
 2-アミノプロピル) アミノ-7-(2-アセトキシベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、
 エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(2-アセトキ
 シベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)
)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(2-アセトキシベンジル) アミノ-3-
 イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル
) アミノ-7-(2-アセトキシベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[
 4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2-アセトキシベンジル) ア
 ミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメ
 チル)プロピル]アミノ-7-(2-アミノベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
 ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(2-アミノ
 ベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-
 アミノプロピル) アミノ-7-(2-アミノベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)
 ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(2-アミノベンジル)
 アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプ
 ロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(2-アミノベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチ
 ル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2-ア
 ミノベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(
 2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2-アミノベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル
 、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(2-
 アミノ-6-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピ
 リミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(2-アミノ-6-クロロベンジ
 ル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノ
 プロピル) アミノ-7-(2-アミノ-6-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エ
 チル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(2-アミノ-6-ク
 ロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-
 (R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(2-アミノ-6-クロロベンジル) ア
 ミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロ
 ヘキシル) アミノ-7-(2-アミノ-6-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エ
 チル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル)
 アミノ-7-(2-アミノ-6-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラ
 ズロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-アミノ-4-クロ
 ロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)
)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル) アミノ-3-

イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミ
ノ-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4
,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル)
アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプ
ロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプ
ロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミ
ノ-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4
,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロベンジル)
アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキ
シメチル)プロピル]アミノ-7-(3-アセトベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチ
ル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-
アセトベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、
5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(3-アセトベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エ
チル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-(3-アセトベンジ
ル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イ
ソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-(3-アセトベンジル)アミノ-3-イソプロピル(
メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-(3-
アセトベンジル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、
5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-アセトベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチ
ル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(
2-アセチルベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジ
ン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(2-アセチルベンジル)アミノ-3-
イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミ
ノ-7-(2-アセチルベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピ
リミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(2-アセチルベンジル)アミノ-3-イソプ
ロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロ
キシエチル) アミノ-7-(2-アセチルベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(2-アセチルベンジ
ル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシク
ロヘキシル) アミノ-7-(2-アセチルベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-アニリノ-3-イ
ソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピ
ロリジン-1-イル)-7-アニリノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミ
ジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-アニリノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラ
ゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-アニリノ-3-イソプロピル
(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエ
チル) アミノ-7-アニリノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン
、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-アニリノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-アニリノ-3-イソプロ
ピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]
アミノ-7-(3-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミ
ジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-クロロアニリノ)-3-イソプ
ロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(
3-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-
ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-
クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-ア
ミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロアニリノ)-
3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(1-ヒドロキシメチル

10

20

30

40

50

20

40

50

ピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ
 -7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミ
 ジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピ
 ル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]ア
 ミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]
 ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-クロロ-5-アミノアニ
 リノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピ
 ル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[
 4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリノ)-
 3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2
 -ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、
 エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-
 5-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-
 アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル
 、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-
 クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミ
 ジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリ
 ノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル
) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾ
 ロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシア
 ニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプ
 ロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピ
 ル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7
 -(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピ
 リミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-
 イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プ
 ロピル]アミノ-7-(3-カルボキシ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピ
 ラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-カルボ
 キシ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、
 5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(3-カルボキシ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メ
 チル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピルアミノ) -7-(3-カル
 ボキシ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジ
 ン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-カルボキシ-4-クロロア
 ニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシク
 ロヘキシル) アミノ-7-(3-カルボキシ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチ
 ル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-カルボキシ-
 4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-
 (ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(
 メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-
 イル)-7-(3-アミノ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]
]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロアニリノ)-3-イソプ
 ロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ
 -7-(3-アミノ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリ
 ミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロア
 ニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシク
 ロヘキシル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)
 ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-アミノ-4-クロ
 ロアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒド
 ロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-クロロ-4-アミノアニリノ)-3-イソプロピル(メチル
 、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-

[illegible]

ル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン。

【0019】

本発明は上記に定義された誘導体の光学異性体及びラセミ混合物、特に次の化合物の(R)又は(S)異性体にも関係している。その化合物とは、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-[1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-7-(3,4-ジヒドロキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-[2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル]-7-(3,4-ジヒドロキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(1R-イソプロピル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-7-(1S-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(1S-イソプロピル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-7-(1S-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンである。

10

【0020】

有用性

本発明の新規化合物それ自体又は新規化合物調製の間体には、診断上、治療上、および産業上の様々な有用性がある。

【0021】

本発明の化合物は中間体として、その化合物の置換基の化学的性質を利用する親和性吸収マトリックスの調製に適している。例えば、マトリックスに結合したホスホン酸基は、プラスに帯電した分子をクロマトグラフィーで分離する場合に有効である。本明細書の化合物の他の固定される例は、細胞周期の酵素(cdk)、本発明の化合物の認識に関係している酵素(例えば輸送蛋白質)などの蛋白質の精製に有用である。本発明の化合物をポリマー樹脂に取り込む方法は、当技術者には容易に明らかである。例えば、化合物は既知の架橋結合剤を使って、ホスホネート置換基又はヒドロキシメチル置換基のヒドロキシ基を架橋結合させることにより取り込む。複素環式の塩基以外の基による結合により、疎水性アフィニティ・クロマトグラフィー用の樹脂を作製する。

20

【0022】

式Iの化合物及び薬学的に許容されるその塩は、酵素p34^{cdc2}/サイクリンBキナーゼ及び関連のcdk(cdk2、cdk5、cdk7、cdk9、erk1、erk2)を選択的に阻害する。

30

【0023】

別の態様では、本発明はcdk及び細胞増殖を阻害する方法、及び/又は哺乳動物のアポトーシスを誘導する方法に関係しており、この方法には請求項1の化合物を治療学的に有効な量だけ哺乳動物に投与することも含まれる。cdk阻害分子は、癌、再狭窄、慢性関節炎リウマチ、狼瘡、I型糖尿病、多発性硬化症、アルツハイマー病、寄生菌の成長(動物、原生生物)、移植片拒絶(宿主対移植片病)、移植片対宿主病、および痛風のような細胞増殖を含む疾病のいくつかの治療に有用である。

【0024】

別の態様では、本発明はヒト、動物、および植物の菌感染(菌類)の治療に有用な化合物に関係している。

40

【0025】

本発明の三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体により、定義された化合物の形で、DNAウイルスに対する極めて高い効力の獲得が生じる。そういう化合物は、DNAウイルスに対してほとんど又は全く活性がないと考えられていた。更に驚いたことには、キラル性に富んだ又は純粋な(S)鏡像異性体は抗ウイルス活性を持つ。これまでは、(R)鏡像異性体だけが抗ウイルス活性があり、しかもレトロウイルスに対してだけ活性であった。本発明の重要な局面は、複製のための細胞増殖に伴う事象に基づいてDNAウイルスの増殖を阻害する方法である。DNAウイルスにはヘルペスウイルス科のいずれかを、特にヒトのサイトメガロウイルスも含まれる。それには、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤の有効量を患者又は動物に予防又は治療目的で投与する方法も含まれる。治療上有効な量とは、細胞のCDK

50

活性を阻害しウイルスの複製を阻止する程度まで十分な量である。単純ヘルペスのような他のヘルペスウイルス及び他のサイトメガロウイルスも、本発明の方法により治療可能である。

【0026】

他のcdc2関連のキナーゼに加えて、このキナーゼも細胞分裂周期のある段階、特に G_1 期からS期への移行及び特に G_2 期からM期への移行を制御している。式Iの化合物及び薬学的に許容されるその塩は、抗有糸分裂化合物として癌や再狭窄など増殖性の疾患の治療にも使用可能である。従って、種々の動物の体及び胚で行なわれる細胞周期の移行 (G_1/S 、 G_2/M 、M期/中期)を非常に低い濃度(マイクロモル以下)で阻害できる。更に、この化合物は、慢性関節炎リウマチ、狼瘡、I型糖尿病、多発性硬化症などの自己免疫疾患の治療、アルツハイマー病、再狭窄、移植片拒絶(宿主対移植片病)、移植片対宿主病、痛風などの心血管疾患の治療、及び癌、多嚢胞性腎臓疾患、及び病因として異常細胞増殖を含む増殖性疾患の治療に有用である。

10

【0027】

増殖性の疾患に加え、有糸分裂への頓挫性再入を任意で伴うことがある組織の脱分化等に起因する分化性疾患も治療する。そういう退化性疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、および筋萎縮性側索硬化症などの神経系の慢性退化変性病、並びに脊髄小脳退行変性も含まれる。分化性疾患にはこれ以外にも、例えば軟骨細胞又は骨細胞の脱分化などによって生じることがある結合組織関連の疾患、並びに内皮組織及び平滑筋細胞の脱分化を含む血管の病気、腺細胞の退行性変化を特徴とする胃潰瘍、および分化不全が原因の腎臓疾患(例えばピルムス腫瘍)などが含まれる。

20

【0028】

治療用途に加え(例えばヒトや動物の両方のために)、本発明の化合物は、細胞培養添加剤としても使用でき、例えばCDKの活性化レベルの制御などにより、インビトロで細胞の増殖及び/又は分化状態が制御できるようになる。説明すると、神経培養系は、インビトロで、神経発達及び栄養因子同定の研究のための基本的かつ不可欠な道具であることが分かっている。神経細胞は一旦分化を終了すると、通常別の細胞タイプへ最終的に分化されることはない。にも拘らず、神経細胞は分化状態をすぐに喪失してしまう場合もある。これは、大人の組織から得た培養物を増殖している場合、及び再生の過程で芽株を形成する場合によく観察される。対象阻害剤は、 G_0/G_1 CDKの活性を阻害することにより有糸分裂の進行を阻止し、適度に制限された環境を確実にする手段を提供し、神経細胞を種々の分化段階に維持することを可能とする。並びに、栄養因子の比活性を試験するために設計される細胞培養などに使用できる。分化状態の維持を必要とする他の組織培養系は、当技術者には容易に明らかである。これに関して、例えば、各CDK4阻害剤をエクスピボ組織発生に使用し、移植用の補綴組織装置の成形を促進することも可能である。

30

【0029】

以下の理論に拘束されるものではないが、本発明の化合物がサイクリン依存性キナーゼの触媒活性を阻害するのは、酵素のATP結合部位でこの化合物が相互作用を起こすことによってもたらされる可能性が高い。そういう化合物は、過剰な細胞増殖を引き起こす過剰なキナーゼ活性の原因が何であれ、キナーゼ活性を阻害するのであるから、過剰な細胞の成長を減少させるという目的には特に望ましいものである。従って、本発明の化合物は、キナーゼが突然変異的に機能亢進性になり過剰なキナーゼ活性が生じる状態、つまりキナーゼの形およびキナーゼが過剰レベルで存在する状態、その形態において活性となる。そういう化合物は、キナーゼを調節しているサイクリンが過剰に存在する場合又はキナーゼとサイクリンとの結合が促進される場合にも、過剰なキナーゼの活性を阻止できる。更に、酵素のATP結合部位と相互作用することによりキナーゼの活性を阻止する化合物は、サイクリン・キナーゼ複合体の天然阻害剤が突然変異を起こしている場合にも、キナーゼ活性を阻害するのに有効である。

40

【0030】

ヒト以外のCDK酵素に特異性を持つ本発明の化合物を選択するのに、分化スクリーニン

50

グ検定法が使用できることも明らかである。従って、抗菌剤又は駆虫剤などの真核細胞性の病原体に特異的に作用する化合物は、対象ピラゾロピリミジン阻害剤の中から選択可能である。説明すると、カンジダ症及び衰弱している患者並びに免疫抑制下にある患者によく起きる日和見感染症の治療に、カンジダ菌（Candida）CDKキナーゼCKS 1阻害剤が使用できる。CKS 1 阻害剤は、白血病及びリンパ腫の患者、免疫抑制治療を受けている患者、及び菌類感染が特に問題となる真性糖尿病又はエイズのような罹りやすい因子を持つ患者などの感染症の治療に使用できる。

【0031】

具体例を示せば、当技術分野で説明されている検定法を使用することにより、カンジダ症、アスペルギルス症、ムコール菌症、ブラストミセス症、ゲオトリウム症、クリプトコックス症、クロモブラストミセス症、コクシジウム症、コニジオスポロシス（conidiosis）、ヒストプラスマ症、菌種、リノスポリジウム症、ノカルジア症、パラアクチノミコーシス（paraactinomycosis）、ペニシリウム症、モニリア症、又はスポロトリクス症などの真菌症を引き起こす菌類を少なくとも1種類阻止するのに極めて有用な薬剤が選定可能である。例えば、治療が望まれる真菌感染症がカンジダ症であれば、上述又は添付の実施例に記述されている検定法には、哺乳動物のCDK酵素を阻害する試験化合物の相対的有效性と鷺口瘡カンジダ（Candida albicans）、カンジダ・ステラトイデア（Candida stellatoidea）、カンジダ・トロピカリス（Candida tropicalis）、カンジダ・パラシロシス（Candida parapsilosis）、カンジダ・クルセイ（Candida krusei）、カンジダ・プソイドトロピカリス（Candida pseudotropicalis）、カンジダ・オーイラーモンディ（Candida auillermondii）、カンジダ・ルゴサ（Candida rugosa）からなる群より選択される酵母のCDK酵素への有効性とを比較することを含むことができる。カンジダCDK遺伝子は米国特許出願第08/463,090号などに記述されている。

【0032】

同様に、分化スクリーニング検定法を用いれば、アスペルギルス・フミガーツス（Aspergillus fumigatus）、黄色アスペルギルス（Aspergillus flavus）、黒色アスペルギルス（Aspergillus niger）、アスペルギルス・ニジュランス（Aspergillus nidulans）、又はアスペルギルス・テレウス（Aspergillus terreus）などの酵母を使ってクローニングしたCDK遺伝子を使用することにより、アスペルギルス症の治療に治療上価値のある抗菌剤を同定することもできる。

【0033】

同様に、真菌感染症がムコール菌症の場合、CDK検定法はリゾプス・アリズス（Rhizopus arrhizus）、リゾプス・オリゼ（Rhizopus oryzae）、アブシジア・コリムビフェラ（Absidia corymbifera）、アブシジア・ラモサ（Absidia ramosa）、又はムコール・プシラス（Mucor pusillus）などの酵母を由来とすることも可能である。

【0034】

このような分化スクリーニング検定法により開発される抗菌剤は、上述の治療学的用途以外にも、食料品の保存、家畜の体重増加用の栄養補助食品、又は除染されている病院の装置及び部屋など非生物の物品の処理などにも使用可能である。

【0035】

同様に、哺乳動物のCDKとショウジョウバエのCDK5遺伝子（Hellmichら（1994）FEBS Lett 356:317-21）などの挿入CDKの阻害力を並べて比較することにより、対象ピラゾロ・ピリミジン誘導体の中から、ヒト/哺乳動物の酵素と昆虫の酵素を区別する阻害剤を選定することも可能である。従って、本発明は、殺虫剤における対象ベンゾピラノンの製剤とその応用（ショウジョウバエなどの昆虫の管理における使用等）も明らかに考慮している。

【0036】

別の実施例では、哺乳動物の酵素と比較して植物のCDKに対する阻害特異性を元に阻害剤を本発明のCDK阻害剤の中から選定することも可能である。例えば植物のCDKを1つ又は複数のヒトの酵素を用いた分化スクリーニングにおいて取り上げ、植物の酵素を最も選択的に阻害するこれらのピラゾロ・ピリミジン化合物を選定することも可能である。この

ように本発明は、落葉剤の形態などのような農業面への応用にこのCDK阻害剤を製剤することも特に考慮している。

【0037】

本発明は、強力で特異的なI κ B- α キナーゼ阻害剤であることが見出された新規な化合物にも関係している。この阻害剤は、インビボ及びインビトロで、シグナル誘導性のNF- κ Bの活性化及びサイトカイン合成を阻止する。こういった阻害剤は、合成がNF- κ Bにより転写調節されているサイトカイン及び接着性蛋白質の合成を阻害すると考えられている。IL-1、IL-6、TNF、及び接着性蛋白質(ICAM、VCAMおよびその選択物等)などの炎症を促進するサイトカインはこの分子クラスに属し、炎症性疾患の原因に関係している。従って、強力なI κ B- α キナーゼ阻害剤は、NF- κ Bの活性化が発病に不可欠である疾患の臨床管理に有効である。 10

【0038】

本発明は、例えばホスファチジル転換及びサイクリックAMP合成にそれぞれ関係している α 及び β アドレナリン作動性受容体の活性化、及び/又はシグナル伝達に影響を及ぼす新規化合物にも関係している。 β アドレナリン作動性受容体の活性化は、マクロファージや星状細胞のサイトカイン生産を減少させることにより、及び血管透過性の増加を阻止(図2を参照の事)することにより抗炎症効果をもたらす。一方、 β アドレナリン作動性受容体の活性低下は多発性硬化症や慢性関節リウマチなどの疾患に有効である。これらの新規化合物は、ホスファチジル転換及びサイクリックAMP合成活性化の阻害に関係しているP2プリン作動性受容体の活性化、又は受容体のサブタイプ次第でアデニル酸シクラーゼの活性化と正の方向に又は負の方向に関係しているP1プリン作動性受容体の活性化に影響を及ぼすようである。プリン作動性受容体シグナル伝達の調節は、大脳虚血症、卒中、神経退化性疾患(パーキンソン病など)の治療、腎臓不全、肺機能不全の治療、及び癌増殖の阻止に有効であると考えられる。 20

【0039】

本発明はp53を活性化させる新規化合物にも関係している。p53は哺乳類の細胞に備わった天然の抑制遺伝子で、制御下にない細胞増殖(癌)を停止させることができる。p53及び網膜芽細胞腫(Rb)は特徴が良く知られている2つの腫瘍抑制因子で、それを不活性化すると制御下にない細胞の増殖と悪性化につながる場合がある。これらの2つの蛋白質のリン酸化は細胞周期の調節メカニズムに関係しているが、その機能を調節することが知られている。従って強力なp53調節因子は、野生型p53蛋白質の誘導により生じる癌の治療に有効な手段である。 30

【0040】

本発明の誘導体は、その研究により、多くの癌細胞株のアポトーシスに強力な影響を及ぼすことが証明されている。アポトーシスはG₁期とG₂期に誘導され、DNAへの損傷の後、ある細胞はG₁期で停止し、次にp53依存性のアポトーシス経路が誘起されることが観察されている。ある場合には、細胞はDNAへの損傷に呼応してG₂/M期で停止しているように見え、p53非依存性のアポトーシス経路が活性化されることが観察されている。この経路は、p53の活性が衰えていると観察される腫瘍の治療において特に重要であることが証明されている。従って、ミトキサントロン又はシスプラチナなどの薬剤を使ってDNAに損傷を与えG₂期で停止させた細胞において、本発明の誘導体を適用することによりp53非依存性のアポトーシスを刺激するかどうかの評価の対象となった。本発明のcdk阻害剤は、このように現在用いられている抗腫瘍剤の治療学的可能性を高めることができる。 40

【0041】

本発明の化合物は通常オリゴヌクレオチドの末端に組み込まれる。非ホスホニル遊離ヒドロキシ基が含まれている場合は、オリゴヌクレオチドの配列の内部に任意で組み込まれる。末端に組み込まれた本発明のジホスホニル化合物は、鎖伸長に関与できる遊離のヒドロキシを含んでいない場合、デオキシNTPに用いられているのと本質的に同じ方法を使ってDNAの塩基配列決定に使用できる(例えば米国特許第5,276,143号の実施例8を参照の事)。本発明のヌクレオチド類似体(二リン酸化されている場合)は、ポリメラーゼ媒介の鎖 50

伸長に適した遊離のヒドロキシ基を欠如している場合、ジデオキシヌクレオチド・タイプのDNA塩基配列決定プロトコール用連鎖終了暗号として有効である。こういう化合物はR=ヒドロキシメチルを含んでおらず、燐原子を組み込む環状構造を有していない(そういう例外的な構造を持つ化合物は中間体であっても良いが)。ヌクレオチド類似体はDNA塩基配列決定に必要な他の試薬(例えばクレノー・ポリメラーゼ又はT4ポリメラーゼ、dNTPなど)と一緒にキットの中に含まれている。(Otvosら 「Nucl. Acids Res.」 1987;15: 1763-1777)。

【0042】

オリゴヌクレオチドを組み込んだ本発明の化合物が相補配列に結合可能ならば、つまり塩基対形成可能ならば、その際そのヌクレオチド単量体はハイブリダイゼーションに關与する。しかし、組み込まれた本発明のヌクレオチド類似体の塩基対などがハイブリダイゼーションに關与する必要はない。それがオリゴヌクレオチドの末端に位置している場合は、免疫認識部位又はハプテン認識部位として有効であり、本発明の化合物に結合できる抗体によりオリゴヌクレオチドの検出が容易になる。

【0043】

本発明の化合物は、親和性吸収マトリックス(上述の親和性部分それ自体としての機能とは反対に)、プロセス制御の固定化酵素、または免疫検定試薬を調製する際のリンカー又はスペーサーとしても有効である。本明細書の化合物には、架橋結合が望まれる物質の部位に適した複数の官能基が含まれている。例えば、ホルモン、ペプチド、抗体、および薬剤などの親和性試薬を不溶性の基質に結合するのに便利である。こういう不溶化された結合試薬は、製造製剤、診断用標本、およびその他の不純混合物などから親和性試薬の結合パートナーを吸収するのに既知の方法を使って活用される。同様に、固定化酵素は触媒転換を行なうのに用いられ、酵素の回収は容易に行なわれる。二機能化合物は、診断用の試薬を調製する際、分析物を検出可能な基に結合するのに一般に用いられている。

【0044】

本発明の化合物に含まれる多くの官能基は架橋結合での使用に適している。例えば、ホスホン酸はアルコールとの間でエステル、またはアミンとの間でアミドを形成するのに用いられる。OHで置換されたR基、アジド(必要ならば架橋結合の前にアミンに還元される)、又はビニルは適した部位の例である。同様に、B基に見出されるアミノ、ハロ、アシル及びその他の反応部位も適している。架橋結合試薬を作製する場合、必要ならば、適切に反応基を保護する。一般的に化合物は、本明細書に述べられているのと同じ方法で、ホスホン酸又はアミノ基を通して結合パートナーのヒドロキシル又はアミノ基と結合され、R基を通して他の結合パートナーと共有結合をするために用いられる。例えば、ステロイドホルモンのような最初の結合パートナーがエステル化され、次にこの複合体がヒドロキシメチルRを通して臭化シアン活性化セファロースへ架橋結合を行なうことにより、固定化ステロイドが得られる。複合体に関する他の化学反応は良く知られている。例えば、Maggioの「Enzyme-Immunoassay」(CRC, 1988, pp 71-135)及び本明細書に引用されている参考文献を参照の事。

【0045】

本発明のピラゾロ・ピリミジンは、フルオレセインのような蛍光部分、 ^{14}C 又は ^3H などの放射性同位元素、安定な遊離基、アビジン、及びビオチンなど(いずれも免疫検定や診断用プローブの標識として今まで使用されている)従来の検出可能な標識で標識するのに有効である。標識はオリゴヌクレオチド上、または本発明の類似体の残基上に存在するようになる。適切な標識方法は良く知られており、ヒドロキシ基及びアシル基などの反応基とともに簡単に使用されている。簡単な方法は、陽子交換により ^3H で本発明の化合物を標識することである。化合物は従来の方法を使ってビオチニル化しても良い。例えば、類似体構造に関する米国特許第5,276,143号を参照の事。しかし本発明の化合物は、検出可能な標識なしに、直接診断用プローブ検定法でも有用である。これに変わる実施例の一つとして、本発明の化合物の抗体が作製される。そういう抗体(二抗体構造で標識又は使用される)は本発明の類似体と結合するので、蛋白質又はオリゴヌクレオチドの標識としてそ

の存在を検出するのに有効である。

【0046】

本発明の化合物は、微生物感染の治療、腫瘍の治療、又は以下に述べる他の問題の治療に有効である。本発明の化合物により治療可能な微生物感染にはウイルス、寄生菌、酵母、及び菌類が含まれるが、ウイルスに対する効果が最も高い(好ましい有用性に相当する)と考えられている。ウイルス感染の例にはDNA又はRNAウイルスが原因の感染も含まれ、例えば、ヘルペスウイルス(I型単純ヘルペスウイルス(HSV-1))、HSV-2、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトのヘルペスウイルス6型(HHV-6)、HHV-7、HHV-8、ウシのヘルペスウイルスI型、ウマのヘルペスウイルスI型、乳頭腫ウイルス(HPV1-55型(発癌性のHPVを含む))、フラビウイルス(黄熱病ウイルス、豚コレラウイルス、および日本脳炎ウイルスを含む)、トガウイルス(ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルスを含む)、インフルエンザウイルス(A-C型)、レトロウイルス(HIV-1、HIV-2、HTLV-I、HTLV-II、SIV、FeLV、FIV、MoMSV)、アデノウイルス(1-8型)、ポックスウイルス(ワクシニアウイルス)、エンテロウイルス(ポリオウイルス1-3型、コクサッキー、A型肝炎ウイルス、及びECHOウイルス)、胃腸炎ウイルス(ノーウォークウイルス、ロタウイルス)、ハンタウイルス(ハンターウイルス)、ポリーマウイルス、パポバウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス1-4型、狂犬病ウイルス、呼吸シンクシャルウイルス(RSV)、並びにA、B、C、及びE型肝炎ウイルスなどである。

10

【0047】

各化合物の抗ウイルス活性は、当業者に理解されている酵素阻害検定法、組織培養検定法、および動物モデル検定法などを用いた通常の抗ウイルス(又は他の抗微生物)活性検定法により決定される。

20

【0048】

原生動物寄生の感染症は本発明の化合物を使って治療される。原生動物には、原生動物門(Protozoa)の有毛根虫亜門(Sarcomastigophora)及び孢子虫亜門(Sporozoa)のメンバーも含まれる。特に本明細書で用いられる原生動物には、ヒト又は家畜に病気を起こすことから人間にとって重要な寄生性原生動物の属が含まれる。こういう属はほとんど、Bakerの分類(1969)によれば、有毛根虫亜門の鞭毛虫上綱(Mastigophora)及び孢子虫亜門のテレスポリア綱(Telesporea)に分類される。具体的には、こういう属に含まれる寄生性原生動物は、ヒストモナス(Histomonas)、ニューモシスティス(Pneumocystis)、トリパノソーマ(Trypanosoma)、ジアルジア(Giardia)、トリコモナス(Trichomonas)、アイメリア(Eimeria)、イソパラ(Isopara)、リーシュマニア(Leishmania)、エントアメーバ(Entamoeba)、トキソプラズマ(Toxoplasma)、及びプラスモジウム(Plasmodium)である。寄生性原生動物には熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)、プラスモジウム・ベルゲイ(Plasmodium berghei)、四日熱熱マラリア原虫(Plasmodium malariae)、三日熱熱マラリア原虫(Plasmodium vivax)、ブラジルリーシュマニア(Leishmania braziliensis)、ドノバンリーシュマニア(Leishmania donovani)、クルーズリーシュマニア(Trypanosoma cruzi)、トリパノソーマ・ブルーセイ(Trypanosoma brucei)、ローテシアトリパノソーマ(Trypanosoma rhodesiense)、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、赤痢アメーバ(Entamoeba histolytica)、及び腫トリコモナス(Trichomonas vaginalis)など(de Vries, E.ら「Mol. Biochem. Parasitol.」1991;47:43-50)及びトリパノソーマ類(Kaminskyら「J. Parasitol.」1994;80(6):1026-1030)が含まれる。RがCH₂OHでBが3-デアザアデニンの化合物はマラリア寄生菌の治療の面で特に興味深い。

30

40

【0049】

本発明の化合物は、カンジダ・グラブラタ(Candida glabrata)、カンジダ・トロピカンス(Candida tropicalis)や鷲口瘡カンジダなどのカンジダ種、クリプトコッカス・ネオフォルマンس(Cryptococcus neoformans)を含むクリプトコッカス種、ブラストミセス・デルマティティデス(Blastomyces dermatitidis)を含むブラストミセス種、トルロプシス・グラブラタ(Torulopsis glabrata)を含むトルロプシス、コキシジオイデス・

50

イミティス (*Coccidioides immitis*) を含むコクシジオイデス種、及びアスペルギルス種などが引き起こす酵母又は菌類感染の治療にも使用される。

【0050】

本発明の化合物は (1) 生物薬剤学製品その他の製品(蛋白質又はワクチンなど)の製造中、ウイルスの増殖又は成長を排除又は減少させる目的で組織培養系への応用、(2) 臨床用標本(血液など)においてウイルスの蔓延又は成長を排除又は減少させる目的での使用、および(3) 組織培養の細胞に蛋白質の製造を継続させる一方、この細胞の成長を停止させる目的での使用も可能である。

【0051】

本明細書の化合物には、免疫刺激を抑制する機能があることも発見された。従って、コンカナバリンAなどの種々の薬剤により刺激を受けるTリンパ球の代謝活性を抑制することもできる。それは関節炎などの自己免疫疾患の治療又は移植片拒絶の抑制に主に応用される。その治療学的に活性の高い濃度は、体重比1 mg/kg から50 mg/kgの範囲である。

【0052】

調製工程

本発明に係る式Iのピラゾロ[4,3-d]ピリミジンは、反応スキーム1 - 5に概略される方法を使って中間体化合物を経由して調製できる。最初のピラゾロ化合物IIは文献 (Baraldi P. G., Cacciari B., Recanatini A.L.M., Roberti M., Rosii M., Farmaco 46, 1991: 1351-1363)に従って合成される。以下のスキームでRは下位のアルキル又はアリールで、X、R3、R5、R7、R5'、R7'は請求項1の式Iの化合物に関して定義されている通りである。工程Aはピラゾロ化合物を4の位置でニトロ化する工程段階である。この反応は加熱下(104℃)にオレウム(65%)及び硝酸(60%)中で行なわれる。工程Bはアミド生成で通常使用される段階である。工程Cは中間体IVのニトロ基を化合物Vのアミノ基に変換する段階である。この反応は適切な溶媒系中レイニーニッケル、Pd⁰、又はPt⁰上で水素添加することにより、またはSn²⁺又はS₂O₄²⁻を使って行なわれる。化合物Vを合成する別の方法は、工程D(エステル化)、次に工程E(還元)、及び工程F(アミド化)である。この方法では化合物Vの収率は低い。式VIIの化合物は、スキーム2で説明している方法によっても得ることができる。ニトリルを使った既知の環化方法を使用すればヒドロキシ化合物XIが得られる。工程Kは7-クロロ誘導体XIIを生成する段階であり、XII(単離しない)は、アミン、金属アルコキシド、又は金属メルカプチドなどの求核分子による処理により、3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンXIIIに変換される。化合物Vはスキーム3、4、及び5に示されている合成の出発物質である。工程Mはピラゾロ[4,3-d]ピリミジンXIVの5,7ジヒドロキシ誘導体の調製段階である。5及び7のヒドロキシ基の塩素置換はピロホスホリルクロライド(ジホスホリルジクロライド)処理により達成される。求核置換(工程O及びP)により3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンが得られる。工程Qは、グアニジン又はクロロホルムアミジンを使った環化方法による5-アミノ-7-ヒドロキシ誘導体の調製段階である。次に化合物XVIIIの7ヒドロキシ基は塩素により置換される(工程R、SOCl₂、室温)。求核置換により、5-アミノ-3,7-二置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンが得られる(スキーム4)。スキーム5に示される合成方法は化合物XIの合成の別の方法である(スキーム2)。

【0053】

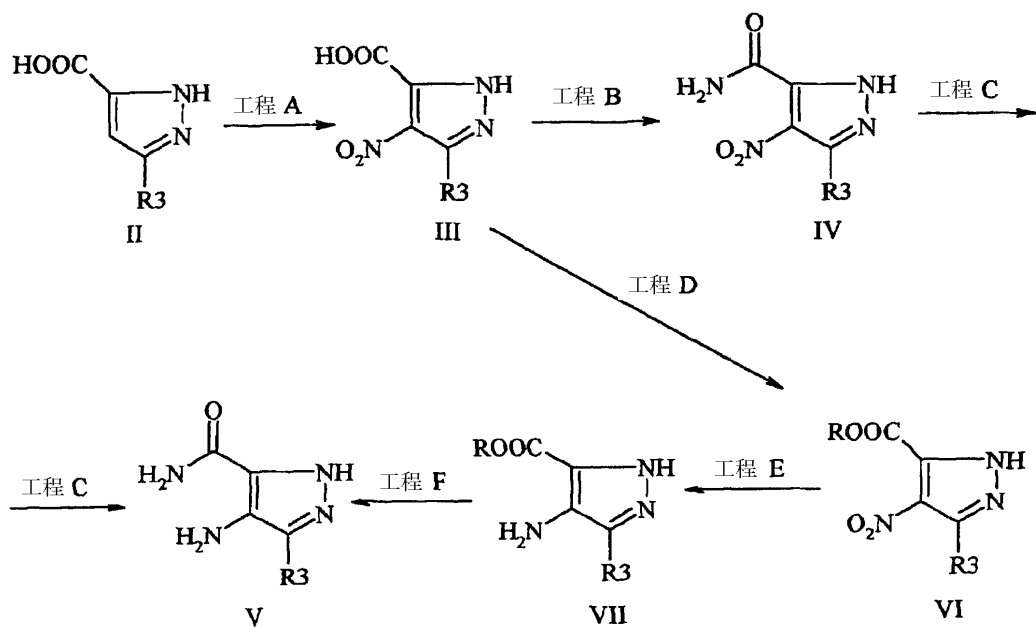
スキーム 1:

10

20

30

40



10

工程 A: $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ 工程 B: 1) SOCl_2 ; 2) NH_4OH 工程 C: $\text{H}_2 + \text{Ra Ni} / \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$; $\text{H}_2 + \text{Pd}$ 又は $\text{Pt} / \text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3\text{COOH}$; SnCl_2 ; $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$

20

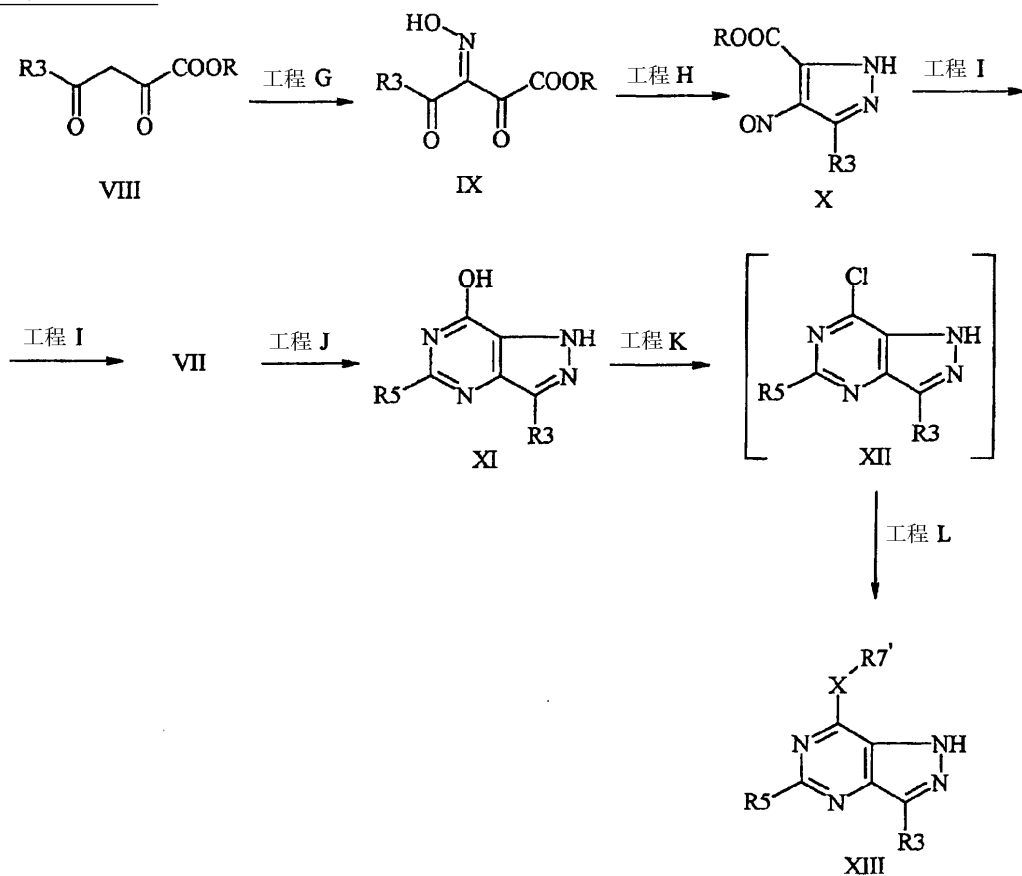
工程 D: ROH / HCl

工程 E: 工程 C 参照

工程 F: NH_4OH

【 0 0 5 4 】

スキーム 2:



30

40

工程 G: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ または N_2O_3 (g) 中 $\text{NaNO}_2 / \text{HCl}$ 工程 H: N_2H_4

50

工程I: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ / $\text{EtOAc}+\text{H}_2\text{O}$

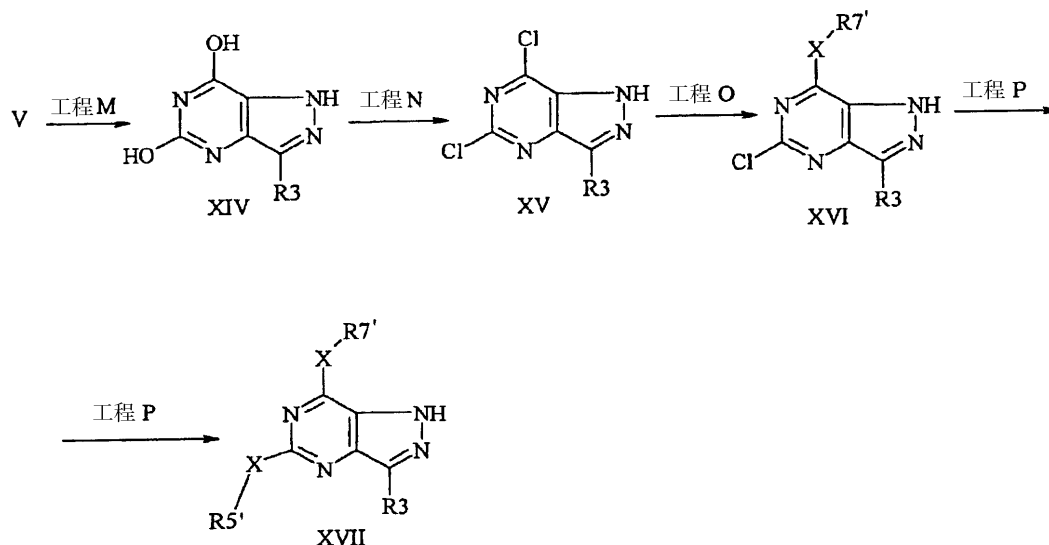
工程J: R^5CN

工程K: SOCl_2 / $T=40-100^\circ\text{C}$ 又は POCl_3 又は $\text{POCl}_3 + \text{PCl}_5$

工程L: $\text{R}^7'\text{NH}_2$ 又は $\text{R}^7'\text{ONa}$ (K,Li) 又は $\text{R}^7'\text{SNa}$ (K,Li)

【0055】

スキーム 3:



工程M: 尿素 / $T=160-200^\circ\text{C}$ 又は $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$ / $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{CO}$

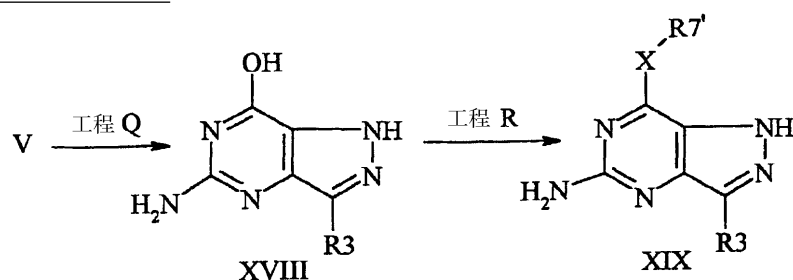
工程N: ジホスホリルジクロライド ($\text{Cl}_2\text{P}(0)\text{OP}(0)\text{Cl}_2$) / $T=140-180^\circ\text{C}$

工程O: ブタノール又はN- CH_3 -2-ピロリドン中 $\text{R}^7'\text{NH}_2$ / $T=60-65^\circ\text{C}$

工程P: $\text{R}^5'\text{NH}_2$ / $T=120-150^\circ\text{C}$

【0056】

スキーム 4:



工程Q: グアニジン / $T=140^\circ\text{C}$ 又は 2-エトキシエタノール / 130°C 中クロロホルムアミジン塩酸 + Et_3N

工程R: 1) SOCl_2 2) $\text{R}^7'\text{NH}_2$ / $T=50-90^\circ\text{C}$

【0057】

治療用の投与

適切な投与経路には、経口、直腸、局所(皮膚、目、頬、及び舌下など)、膣及び非経口(皮下、筋肉内、硝子液内、静脈内、皮膚内、胞膜内、及び硬膜外など)が含まれる。好ましい投与経路は、臨床医に知られている条件のうち特に患者の状態、化合物の毒性、及び感染部位に基づいて決定される。

【0058】

治療上の組成物は約1%から約95%の活性成分を含み、単回投与型の場合は活性成分を約20%から約90%含むのが好ましく、及び単回投与でない投与型の場合は活性成分を約5%から約20%含むのが好ましい。単回投与型は例えばコーティングした錠剤、錠剤、アンプル、水薬、座薬、またはカプセルなどである。他の投与方法には例えば軟膏、クリーム、ペースト、泡沫、チンキ、口紅、ドロップ、噴霧、及び分散などがある。活性成分を約0.05g

から約1.0g含むカプセルもその一例である。

【0059】

本発明の薬学的組成物はそれ自体既知の方法、例えば従来の混合方法、顆粒化方法、コーティング方法、溶解方法、凍結乾燥法などにより調製される。

【0060】

活性成分の溶液、更に懸濁液又は分散液、特に等張性の水溶液、分散液又懸濁液もまた使用するのが好ましい。活性物質単独又は活性物質とマンニトールのような担体を同時に含む凍結乾燥の組成物の場合は、使用前に調製することも可能である。薬学的組成物は滅菌及び/又は賦形剤を含むことも可能であり、それは例えば、保存剤、安定剤、加湿薬及び/又は乳化剤、溶解剤、浸透圧及び/又は緩衝液調整用の塩などであり、従来の溶解方法又は凍結乾燥法など既知の方法で本質的には調製される。上述の溶液や懸濁液には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン、又はゼラチンなどの粘性増加物質を含めても良い。

10

【0061】

油に懸濁させる場合は、油成分として、注射目的に通常使用される野菜油、合成油、又は半合成油などが含まれる。上述の油は、特に、酸性分として8-22個の炭素原子、特に12-22個の炭素原子を有する長鎖脂肪酸を含む液体脂肪酸エステルで、酸は例えばラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、酸、アラキドン酸、ベヘン酸又はそれに相当する不飽和酸、例えばオレイン酸、エライジン酸、ユウリン酸 (euryc acid)、ブラシジン酸又はリノレン酸、もし抗酸化剤の添加が適切であるならば、例えばビタミンE、βカロチン、又は3,5-ジ-三級ブチル-4-ヒドロキシトルエンを含む。これらの脂肪酸エステルのアルコール成分の炭素数は6未満であり、一価又は多価、例えば一価、二価、三価のアルコールで、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、もしくはペンタノール、又はその異性体のアルコールであるが、特にグリコール及びグリセロールである。従って、脂肪酸エステルは例えば、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、「ラブラフィルM 2375」(パリのGattefosse産のトリオレイン酸ポリオキシエチレングリセロール)、 「ラブラフィルM 1944 CS」(アプリコット仁油のアルコール分解により生成される不飽和ポリグリコール化グリセリドで、グリセリド及びポリエチレングリコールエステルで構成される；パリのGattefosse産)、 「ラブラゾル」(TCMのアルコール分解により生成される飽和ポリグリコール化グリセリドで、グリセリド及びポリエチレングリコールエステルで構成される；パリのGattefosse産)及び/又は「ミグリオール812」(炭素鎖C₈からC₁₂の飽和脂肪酸のトリグリセリドでドイツのHuls AG産)、特に野菜油、例えば綿実油、アーモンド油、オリーブ油、ヒマシ油、胡麻油、大豆油、特に落花生油である。

20

30

【0062】

注射液組成物の調製は、アンプルやガラス瓶などの瓶詰め及び容器の密封の場合同様、通常の方法で滅菌下に行われる。

【0063】

経口使用の薬学的組成物は、例えば活性成分を1つ又は複数の固形の担体と組み合わせることにより得られ、適切であれば混合物を顆粒化し、必要に応じて混合物又は顆粒を錠剤又はコーティングした錠剤の形に加工し、適切ならば賦形剤を更に追加する。適切な担体は、特に充填剤、例えばラクトース、シュクロース、マンニトール、又はソルビトールなどの糖、セルロース調製物、及び/又は二リン酸三カルシウムもしくはリン酸水素カルシウムなどのリン酸カルシウム、更に結合剤、例えばトウモロコシ、小麦、米、又はじゃが芋などの澱粉、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び/又はポリビニルピロリジン、及び/又は必要に応じて崩壊剤、例えば上述の澱粉、更にカルボキシメチル澱粉、架橋結合のポリビニルピロリドン、アルギン酸、又はアルギン酸ナトリウムなどのその塩である。更に賦形剤として、特に流量調整剤及び潤滑剤がある。例えば、サリチル酸、タルク、ステアリン酸又はステアリン酸マグネシウム又はステアリン酸カルシウムなどの塩、及び/又はポリエチレング

40

50

リコール又はその誘導体などである。

【0064】

コーティングされた錠剤には適切なコーティング剤が提供され、適切であればそれは胃酸に抵抗性を持つ。使用されるコーティング剤は特に濃縮糖液で、それは適切であればアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリジン、ポリエチレングリコール、及び/又は二酸化チタンを含み、コーティング用の溶液は適切な有機溶媒もしくは混合溶媒、または胃酸に抵抗性のあるコーティングの調製には、適切なセルロース調製用の溶液、例えばフタル酸アセチルセルロース又はフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースが用いられる。染料又は色素を、例えば活性成分の様々な投与量の決定又は特徴付けのために、錠剤を混ぜる、又は錠剤コーティングでコーティングすることができる。

10

【0065】

経口で使用できる薬学的組成物はゼラチンの硬いカプセル、柔かい密閉されたゼラチンカプセル、及びグリセロール又はソルビトールなどの可塑剤であっても良い。硬いカプセルは活性成分を顆粒の形で含み、トウモロコシの澱粉などの充填剤、タルク、もしくはステアリン酸マグネシウムなどの結合剤及び/又は潤滑剤、及び適切ならば安定剤を混合しても良い。柔かいカプセルの場合は、活性成分は脂油、パラフィン油、又は液体ポリエチレングリコールもしくはエチレングリコールもしくはプロピレングリコールの脂肪酸エステルなど適切な液体賦形剤に溶解するか懸濁するのが好ましい。例えば、ポリエチレンソルビタン脂肪酸エステルタイプなどの界面活性剤及び安定剤を添加しても良い。

20

【0066】

他の経口投与形態としては、通常の方法で調製されるシロップなどがあり、それは活性成分を例えば懸濁状態で含み、濃度は約5%~20%、好ましくは約10%または個人の適量(例えば5 ml又は10 mlを測る場合)と同じ濃度にする。他の形態としては、例えば、粉状又はシェーキ(例えばミルクシェーキ)用の濃縮液でも良い。このような濃縮物も単位用量で詰めても良い。

【0067】

直腸に使用できる薬学的組成物は、例えば座薬であり、これは活性成分と座薬用の基剤の組み合わせを含む。適切な座薬用基剤には、天然又は合成のトリグリセリド、パラフィン炭化水素、ポリエチレングリコール、又は上級アルカノールなどがある。

【0068】

腸管外投与に適した組成物は、水溶性の塩など水溶性の形にした活性成分の水溶液、または注射用の水懸濁液で、その場合、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール及び/又はデキストランなどの粘性増加物質、及び適切ならば安定剤が含まれる。活性成分は凍結乾燥した形でも良く、適切ならば賦形剤を加え、腸管外投与の前に適切な溶媒を加えて溶解することができる。例えば、腸管外投与に使われるような溶液は、輸液用の溶液としても使用可能である。好ましい保存剤は、例えばアスコルビン酸などの抗酸化剤又はソルビン酸もしくは安息香酸などの殺菌薬である。

30

【0069】

軟膏は水中油型乳剤で、70%未満好ましくは20 - 50%の水又は水相を含む。脂肪相は特にワセリン、パラフィン油、又は固形パラフィンなどの炭化水素で構成されており、水結合能力を高めるため、セチルアルコールなどの脂肪族アルコール又はそのエステル、または羊毛ロウなどの羊毛ロウアルコールを含んでいるのが好ましい。乳化剤は類似の親油性物質で、例えばオレイン酸ソルビタン及び/又はイソステアリン酸ソルビタンなどのソルビタン脂肪酸エステル(スパンズ)などである。水相への添加物は、例えば湿潤薬、例えばグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、及び/又はポリエチレングリコールなどの多価アルコール、または保存剤や発香性の物質である。

40

【0070】

脂肪性の軟膏は無水であり、基剤として特にパラフィン、ワセリン、又はパラフィン油などの炭化水素、更に天然の脂肪、又は水素化ココナッツ脂肪酸トリグリセリドなどの半合成脂肪、又は、好ましくは硬化落花生油もしくはヒマシ油などの硬化油、更にモノステ

50

アリン酸グリセロール及び／又はジステアリン酸グリセロールなどグリセロールの脂肪酸部分エステル、及び脂肪族アルコールを含む。更に、水の吸収を高める、軟膏の箇所で述べた乳化剤及び／又は添加剤も含む。

【0071】

クリームは水中油型乳剤で50%を超える水を含む。使用される油の基剤は、特にラウリルアルコール、セチルアルコール、又はステアリルアルコールなどの脂肪族アルコール、パルミチン酸もしくはステアリン酸などの脂肪酸、ミリスチン酸イソプロピル、羊毛ロウ、もしくは蜜ロウなどの液体-固体ロウ、及び／又はワセリンもしくはパラフィン油などの炭化水素である。乳化剤は親水性の性質の強い表面活性物質で、非イオン性の乳化剤、例えば多価アルコールの脂肪酸エステル又はそのエチレンオキシ添加物、例えばポリグリセリン酸脂肪酸エステルもしくはポリエチレンソルビタン脂肪酸エステル(トウイーンズ)、更にポリオキシエチレン脂肪族アルコールエーテルもしくはポリエチレン脂肪酸エステル、または類似のイオン性乳化剤、例えばセチルスステアリルアルコールもしくはステアリルアルコールなどの脂肪族アルコールの存在下で通常使用される硫酸脂肪族アルコール、例えばラウリル硫酸ナトリウム、セチル硫酸ナトリウム、又はステアリル硫酸ナトリウムなどのアルカリ金属塩である。水相の添加物は特にクリームが乾燥するのを防止する薬剤で、グリセロール、ソルビトール、プロピレングリコール、及び／又はプロピレングリコールなどの多価アルコール、さらに保存剤と発香剤である。

10

【0072】

ペーストはクリームと軟膏で、分泌物を吸収する粉末、例えば酸化チタン又は酸化亜鉛のような酸化金属、さらに存在する湿気又は分泌物に結合するタルク及び／又はケイ酸アルミニウムを含んでいる。

20

【0073】

泡沫は加圧容器から投与される液状の水中油型乳剤で、エアロゾルの泡として存在している。噴射ガスとしてハロゲン化炭化水素、例えばジクロロフルオロメタン及びジクロロテトラフルオロエタンなどの多ハロゲン化アルカン、又は、好ましくはハロゲン化されていないガス状の炭化水素、空気、 N_2O 、又は二酸化炭素が使用される。使用される油相は軟膏とクリームの所で上述された通りであり、そこで述べられた添加物も同様に使用される。

【0074】

チンキ及び溶液は通常水性エタノール性の塩基を含んでおり、それに蒸発を減少させるための湿潤剤、例えばグリセロール、グリコール、及び／又はポリエチレングリコールなどの多価アルコール、及び低級のポリエチレングリコールを持つ脂肪酸エステルなどの油除去剤、つまり皮膚由来の脂肪質をエタノールで置換する混合水溶液に可溶な親油性物質、及び必要ならば他の賦形剤及び添加剤が混合されている。

30

【0075】

本発明は、獣医用の担体と上で定義された活性成分を少なくとも1つ含む獣医学用の組成物も提供する。獣医学用の担体とはこのような組成物を投与する材料であり、固体、液体、またはガス状の不活性な物質であってもよく、又は、家畜分野で許容されており、活性成分と拮抗するものではない。これらの獣医用の混合物は経口、非経口、または他の好ましい任意の経路を使って投与されることもできる。

40

【0076】

本発明は上述の疾患の治療方法又は手順にも関係している。化合物はそのままの形または薬学的組成物の形で、予防のため又は治療目的で投与することができるが、上述の疾患に有効な量で投与するのが好ましい。そういう治療を必要としているヒトなどの温血動物には、化合物は特に薬学的組成物の形で使用される。本発明の化合物の一日投与量は、約70kgの体重当たり約0.1gから約5 g、好ましくは0.5gから約2gである。

【0077】

以下の実施例は本発明を説明するものであるが、これだけの範囲に限定されるものではない。

50

【0078】

融点はコフラーブロック上で決定され、修正はされていない。蒸発は真空中80℃未満の温度で回転式蒸発装置を使って行なわれた。¹H NMRスペクトル (d, ppm; J, Hz) はバリアンVXR-400 (400MHz)又はバリアンユニティー200 (300MHz)装置で測定された。スペクトルは全て内基準としてテトラメチルシランを用いて25℃で入手された。電子衝撃質量スペクトルm/z (rel.%, 組成物、偏差)はVG 7070E分光計(70eV、200℃、直接入線)で測定された。高分解能測定は、標準としてウルトラマーク1600F (PCR社、米国フロリダ州)を用いピークマッチング法によって行なわれた。カラムクロマトグラフィーにはメルクシリカゲル・キーゼルゲル60 (230-400メッシュ)が用いられた。全ての化合物が満足のいく元素分析結果を示した (0,4%)。

10

【0079】

実施例1

5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボン酸III

水で冷却し攪拌した2.9g (18.8mmol)の5-イソプロピルピラゾール-3-カルボン酸II (文献: Baraldi P. G.等: Farmaco, 46, 1337 (1991); mp=136-140℃)の溶液に、発煙硫酸(65%)中で、硝酸(65%)を少しずつ添加した。攪拌は室温下で1時間継続し、次に104℃で3時間継続し、それから氷水の中に注いだ。白色の生成沈殿物を濾過し、水で結晶化した (収率76%)。mp=139-142℃;

¹H NMR(300MHz,

DMSO): 1.22d(6H, 7.1Hz), 2.94sept(1H, 7.1Hz), 3.33s(1H), 6.45bs(1H); CHN

20

要求: C=42.02%; H=4.56%; N=21.09; 検出: C=42.41%; H=4.49%; N=21.01%.

【0080】

実施例2

5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボキシアミド IV

5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボン酸III (10.83 g; 0.054 モル)を塩化チオニル(19 mL)に懸濁し、溶解するまで過熱した。この混合物は還流しながら過熱し、1時間後、生成物が沈殿し始めた。反応混合物は2時間還流した後、乾燥するまで真空中で蒸発させた。残渣はそれ以上精製せず、アセトン(10 mL)に溶解し、攪拌しながら冷却した水酸化アンモニウム水溶液に添加した。溶液を5℃で冷却すると、数分後に生成物が沈殿し始めた。表題の化合物の沈殿物を冷却水で洗浄した。収率 6.9 g (64%); mp=179-180℃

30

MS (ES⁺):

199.1(100%, M+H⁺); 221.1(23%, M+Na). ¹H NMR (300MHz, DMSO): 1.28d(6H,

J=6.6Hz), 3.52sept(1H, J=6.6Hz), 7.71s(1H), 8.00s(1H).

【0081】

実施例3

4-アミノ-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシアミド V

5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボキシアミド(2.57 g; 12.97 mmol)、メタノール (20 mL)及び水(5 mL)の溶液に0.7gレイニーニッケル(W5)を加えた。混合物を水素下(760トル)で4時間攪拌した。反応混合物は濾過し、濾液は乾燥するまで真空中で濃縮、残渣は酢酸エチルで再結晶し、収率1.94 g (89%)の生成物を得た。生成物はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーで精製した。クロロホルムとメタノールの混合液(97/3)を移動層として用いた。収率 95%; mp=178-179℃;

40

MS (ES⁺):

169.1(100%, M+H⁺). ¹H NMR (CD₃OD; 400MHz): 1.31d(6H; J=7.5Hz), 3.06sept(1H; J=7.5Hz), 4.83s(2H).

【 0 0 8 2 】

実施例4

メチル 5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボキシレート (VI)

無水メタノール中、5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボン酸を4.5Mの塩酸液へ添加した。反応混合物は60℃で7時間加熱した。表題の化合物を酢酸エチルを使って結晶化した。収率91%; mp=78-80℃。

10

¹H NMR

(300MHz, CDCl₃): 1.39d(6H, J=7.1Hz); 3.64sept(1H, J=7.1Hz), 3.98s(3H). CHN

要求: C=45.07%; H=5.20%; N=19.70%; 検出: C=45.21%; H=5.23%;

N=19.65%.

【 0 0 8 3 】

実施例5

メチル 4-アミノ-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシレート (VII)

20

メチル-4-ニトロピラゾール-3-カルボキシレート (7.34g, 34.4mmol)、36 mLのnプロパノール、6 mLの水、及び5.6 mL 10 Mの塩酸の溶液に0.55gのPtO₂を加えた。混合物を水素下(760トル)に9時間撹拌した。反応混合物は濾過し、濾液は乾燥するまで真空中で濃縮した。求めているアミンは、クロロホルムへ抽出中にアンモニア水で処理することにより遊離した。生成物は蒸発後結晶化した。収率 95%; mp=122-123。

MS(EI, 70eV, 直接入線):

183(88; C₈H₁₃N₃O₂⁺; -1.0), 168(59), 152(3), 136(100), 108(8), 80(16), 68(20). ¹H

NMR(400MHz, CDCl₃): 1.31d(6H; J=6.9Hz), 2.93sept(1H), 3.9s(3H). IR (KBr, cm⁻¹

¹): 3399, 3296, 1710, 1626, 1584, 1302.

30

【 0 0 8 4 】

実施例6

5-メチル-7-ヒドロキシ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン (XI)

4-アセアミド-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシアミドXX (100mg, 0.40mmol)と1 Mの水酸化ナトリウム1 mLの溶液を80-90℃で3時間撹拌した。生成物は冷却し氷酢酸で酸性化した後沈殿した。収率98%; mp>250℃;

MS (ES⁺): 193.1(100%, M+H⁺). ¹H NMR (300MHz; CD₃OD):

1.38d(6H, J=7.1Hz); 2.41s(3H); 3.02sept(1H, J=7.1 Hz).

40

【 0 0 8 5 】

実施例7

7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル-5-メチルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン (XIII)

3-イソプロピル-7-ヒドロキシ-5-メチルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン (100 mg, 0.52 mmol) XIを 0.5 mLの塩化チオニル、0.1 mLのジメチルホルムアミド、3 mLのクロロホルムに溶解した。この混合物を還流下で3時間加熱した。溶液を真空下で蒸発させ、残渣をクロロホルムに溶解した。この溶液を水で2回抽出した。クロロホルム層は一緒にし、Na₂SO₄上で乾燥させた。その後すぐ濾過した後、この溶液に2 mLのベンジルアミンを加えた。この混合物を室温で一晩撹拌し、乾燥するまで真空中で蒸発させた。粗生成物はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーで精製した。可動層としてクロロホルムとメタノールの混

50

合液 (97/3) を使用した。収率 82%;

MS (ES⁺): 282.2(100%, M+H⁺). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): 1.35d(6H, J=7.1Hz); 2.58s(3H), 3.41sept(1H, J=7.1Hz); 4.79s(2H), 7.22-7.27m(5H).

【 0 0 8 6 】

実施例 8

5,7-ジヒドロキシ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (XIV)

4-アミノ-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシアミド (770mg, 4.58mmol) と尿素 (1.4 g, 4.58mmol) の混合物を 180°C で 30 分加熱した。冷却後、固形物を 2M の水酸化ナトリウム 2.3 mL に溶解した。沸騰している溶液を氷酢酸で酸性化し、温かい溶液を濾過した。この溶液を 5°C まで冷却すると、数分後に生成物が沈殿し始めた。粗生成物 (1.3 g) を温水で 2 度再結晶した。収率 78.5%; mp=295-298°C。

¹H

NMR (300MHz, DMSO): 1.21d(6H, J=6.6Hz), 3.17sept(1H, J=6.6Hz). MS (EI):

194(94;C₈H₁₀N₄O₂); 179(100;C₇H₇N₄O₂); 162(51;C₇H₄N₃O₂); 136(15); 123(7); 95(8);

81(13); 54(26); 43(23).

20

【 0 0 8 7 】

実施例 9

5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (XV)

5,7-ジヒドロキシ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (1.16 g; 5.974 mmol) をジホスホリルジクロライド (Cl₂(O)POP(O)Cl₂, 11.5 mL) に溶解した。この混合物をアンプルに入れ、密封し、160°C で 8 時間加熱した。溶液を真空中で蒸発させ (浴槽の温度は 100 °C まで)、残渣を冷却後攪拌しながら砕いた氷の上に注いだ。水溶液はクロロホルムで抽出した。クロロホルム抽出物は一緒にし、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。抽出物を蒸発させると、粗生成物である 5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (収率=46%) が得られた。mp>250°C;

30

MS (ES⁻

): 229.1(100%, M-H⁺), 231.1(63%, M- H⁺). ¹NMR (400MHz, C₆H₆): 1.41d(6H,

J=7.0Hz), 3.23sept(1H, J=7.0), 7.15s(1H).

【 0 0 8 8 】

実施例 10

7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (XVI)

5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジン (1.015mmol; 234.6 mg)、1 mL のベンジルアミン、及び n-ブタノール (2 mL) を 65°C で 4 時間攪拌した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させた。残渣はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけ、CHCl₃/MeOH (99/1) を溶媒として用いて溶出すると、7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ [4,3-d]ピリミジンが得られた。収率 96%;

40

MS (ES⁺):

302.3(100%, M+H⁺), 304.3(32%, M+H⁺). ¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.37d(6H,

J=7.1Hz); 3.39sept(1H, J=7.1Hz), 6.72s(1H), 4.82s(2H), 7.28m(5H).

【 0 0 8 9 】

実施例 11

50

7-(3-クロロアニリノ)-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン (XVIb)

5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(90mg)、1.2mLの3-クロロアニリン、及び250 μ Lのジイソプロピルエチルアミンを60℃で24時間攪拌した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させた。残渣はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけ、CHCl₃/ヘプタン (100/17)を溶媒として用いて溶出すると、7-(3-クロロアニリノ)-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジンが得られた。収率16% , mp=257-259℃

MS (ES⁺):

322.3(100%, M+H⁺), 324.3(64%, M+H⁺). ¹H NMR (CDCl₃; 300MHz): 1.54d(6H, J=7.1Hz); 3.60sept(1H, J=7.1Hz), 7.16d(1H), 7.34t(1H), 7.88d(1H), 8.10s(1H).

10

【0090】

(表1) 実施例 10及び11の方法により調製された化合物

ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン置換基				CHN 分析	MS 分析-ZMD	
	C5	C7	C3	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
A1	クロロ	3-クロロアニリノ	メチル	C=49,18;H=3,00 N=23,61;Cl=24,21	292,0 294,0	
A2	クロロ	アニリノ	メチル	C=55,52;H=3,90 N=26,95;Cl=13,63	258,1 260,1	
A3	クロロ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	メチル	C=46,18;H=2,68 N=20,61;Cl=20,00	336,0 338,0	
A4	クロロ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	メチル	C=46,18;H=2,58 N=20,73;Cl=20,98	336,0 338,0	
A5	クロロ	4-アミノ-3-クロロアニリノ	メチル	C=46,62;H=3,28 N=27,16;Cl=22,94	307,0 309,0	309,0 311,0
A6	クロロ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	C=53,87;H=4,17 N=24,19;Cl=12,19	288,1 290,1	
A7	クロロ	2-アセトキシベンジルアミノ	メチル	C=55,50;H=4,60 N=20,28;Cl=10,23	344,1 346,1	
A8	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	メチル	C=52,25;H=4,38 N=21,96;Cl=11,12	318,1 320,1	
A9	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	メチル	C=55,48;H=4,65 N=23,01;Cl=11,65	302,1 304,1	
A10	クロロ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	C=48,07;H=3,46 N=21,56;Cl=21,97	322,0 324,0	
A11	クロロ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	C=50,03;H=4,25 N=20,82;Cl=10,58	334,1 336,1	
A12	クロロ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	C=50,08;H=4,20 N=20,82;Cl=10,57	334,1 336,1	
A13	クロロ	2-アミノ-3-クロロベンジルアミン	メチル	C=48,21;H=3,71 N=26,10;Cl=21,98	321,0 323,0	323,0 325,0
A14	クロロ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミン	メチル	C=46,15;H=4,00 N=28,82;Cl=21,03	336,1 338,1	338,1 340,1
A15	クロロ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	メチル	C=55,36;H=4,68 N=23,11;Cl=11,65	302,1 304,1	
A16	クロロ	ベンジルアミノ	メチル	C=57,06;H=4,46 N=25,57;Cl=12,91		274,1 276,1

20

30

40

a) 溶液: MeOH p.a. + HCOOH

b) 溶液: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

50

【0091】

(表2) 実施例 10及び11の方法により調製された化合物

ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン置換基				CHN 分析	MS 分析 -ZMD	
	C5	C7	C3	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
B1	クロロ	3-クロロアニリン	エチル	C=50,65;H=3,63 N=22,63; Cl=23,09	306,0 308,0	
B2	クロロ	アニリン	エチル	C=57,04;H=4,42 N=25,59; Cl=12,95	272,1 274,1	274,1 276,1
B3	クロロ	5-アミノ-3-クロロアニリン	エチル	C=48,31;H=3,74 N=26,01; Cl=21,94	321,0 323,0	323,0 325,0
B4	クロロ	4-カルボキシ-3-クロロアニリン	エチル	C=47,82;H=3,15 N=19,88; Cl=20,23	350,0 352,0	
B5	クロロ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	エチル	C=47,75;H=3,17 N=19,82; Cl=20,14	350,0 352,0	
B6	クロロ	4-ブロモアニリン	エチル	C=44,26;H=3,14 N=19,85; Cl=10,15; Br=22,60	350,0 352,0 354,0	
B7	クロロ	4-クロロアニリン	エチル	C=50,69;H=3,53 N=22,78; Cl=23,00	306,0 308,0	
B8	クロロ	3-アミノ-4-クロロアニリン	エチル	C=48,24;H=3,58 N=26,00; Cl=22,18	321,0 323,0	323,0 325,0
B9	クロロ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	エチル	C=55,39;H=4,65 N=23,04; Cl=11,65	302,1 304,1	
B10	クロロ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	エチル	C=55,36;H=4,68 N=23,03; Cl=11,62	302,1 304,1	
B11	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	エチル	C=53,95;H=4,89 N=20,95; Cl=10,68	332,1 334,1	
B12	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	エチル	C=56,72;H=5,05 N=22,02; Cl=11,20	316,1 318,1	
B13	クロロ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	エチル	C=49,74;H=3,85 N=20,71; Cl=20,99	336,0 338,0	
B14	クロロ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	エチル	C=47,47;H=3,76 N=19,69; Cl=20,01	352,0 354,0	
B15	クロロ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	エチル	C=56,73;H=5,05 N=22,01; Cl=11,24	316,1 318,1	
B16	クロロ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N-メチル]アミノ	エチル	C=53,95;H=4,89 N=20,95; Cl=10,67	332,1 334,1	
B17	クロロ	ベンジルアミノ	エチル	C=58,41;H=4,88 N=24,36; Cl=12,44		288,1 290,1

a) 溶液: MeOH p.a. + HCOOH

b) 溶液: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

【0092】

(表3) 実施例 10及び11の方法により調製された化合物

10

20

30

40

ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン置換基				CHN 分析	MS 分析 -ZMD	
	C5	C7	C3	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
C1	クロロ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,96;H=4,80 N=21,02; Cl=10,66	332,1 334,1	
C2	クロロ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=52,22;H=4,04 N=21,78; Cl=21,96	320,0 322,0	
C3	クロロ	アニリン	イソプロピル	C=58,49;H=4,85 N=24,32; Cl=12,34	286,1 288,1	288,1 290,1
C4	クロロ	5-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=49,85;H=4,18 N=24,90; Cl=21,07	335,1 337,1	337,1 339,1
C6	クロロ	4-カルボキシ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=49,25;H=3,54 N=19,02; Cl=29,33	364,0 366,0	
C7	クロロ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=49,20;H=3,57 N=19,08; Cl=19,42	364,0 366,0	
C8	クロロ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=51,85;H=4,02 N=20,05; Cl=10,29	346,1 348,1	
C9	クロロ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=45,88;H=3,52 N=19,15; Cl=9,69; Br=21,76	364,0 366,0 368,0	
C10	クロロ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=52,15;H=4,03 N=21,77; Cl=22,05	320,0 322,0	
C11	クロロ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=49,92;H=4,13 N=24,87; Cl=21,08	335,1 337,1	337,1 339,1
C12	クロロ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=49,87;H=4,18 N=24,92; Cl=21,03	335,1 337,1	337,1 339,1
C13	クロロ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,72;H=5,10 N=22,08; Cl=11,18	316,1 318,1	
C14	クロロ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,74;H=5,06 N=22,01; Cl=11,21	316,1 318,1	
C15	クロロ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,78;H=5,01 N=19,48; Cl=9,94	358,1 360,1	
C16	クロロ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,75;H=5,08 N=19,51; Cl=9,95	358,1 360,1	
C17	クロロ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,35;H=5,32 N=20,30; Cl=10,39	342,1 344,1	
C18	クロロ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,42;H=5,33 N=20,34; Cl=10,29	342,1 344,1	
C19	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,27;H=5,33 N=20,12; Cl=10,09	346,1 348,1	
C20	クロロ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,87;H=5,51 N=21,07; Cl=10,73	330,1 332,1	
C21	クロロ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,11;H=4,38	350,1	

10

20

30

40

				N=19,90; Cl=20,04	352,1	
C22	クロロ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=48,96;H=4,15 N=18,95; Cl=19,20	366,1 368,1	
C23	クロロ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,82;H=5,08 N=19,21; Cl=9,70	362,1 364,1	
C24	クロロ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,80;H=4,98 N=19,21; Cl=9,85	362,1 364,1	
C25	クロロ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,84;H=5,03 N=19,28; Cl=9,68	362,1 364,1	
C26	クロロ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=48,90;H=4,15 N=18,94; Cl=19,35	366,1 368,1	
C27	クロロ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=48,85;H=4,14 N=19,07; Cl=19,39	366,1 368,1	
C28	クロロ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,35;H=4,57 N=23,99; Cl=20,09	349,1 351,1	351,1 353,1
C29	クロロ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,19;H=4,54 N=23,98; Cl=20,29	349,1 351,1	351,1 353,1
C30	クロロ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=49,12;H=4,63 N=26,82; Cl=19,43	364,1 366,1	366,1 368,1
C31	クロロ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=57,94;H=5,49 N=21,09; Cl=10,62	330,1 332,1	
C32	クロロ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=55,32;H=5,20 N=20,17; Cl=10,16	346,1 348,1	
C33	クロロ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,74;H=5,37 N=23,18; Cl=11,71		302,1 304,1

10

20

a) 溶液: MeOH p.a. + HCOOH

b) 溶液: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

【0093】

実施例12

7-ベンジルアミノ-5-[1(R,S)-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン (XVIIa)

30

7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン XVI (100mg, 0.331mmol)と2 mLの1-(R,S)-(ヒドロキシメチル)プロピルの混合物を120°Cで3時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させ、その後シリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルムとメタノールの混合液(97/3)を使用した。収率=83.5%; 白色シロップ状;

MS (ES⁺): 355.3(100%,M+H⁺). ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): 0.96t(3H, J=7.2Hz, CH₃CH₂), 1.299d(3H,

J=7.1Hz), 1.307 d(3H, J=7.1Hz), 1.6m(2H), 3.20sept(1H, J=7.1Hz), 3.55-3.80m(3H),

4.74bs(2H), 7.22-7.35m(5H).

40

【0094】

実施例13

7-[1(R,S)-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-5-[1(R,S)-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVIIb)

5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(100 mg; 0.331mmol)と2 mLの1-(R,S)-(ヒドロキシメチル)プロピルアミンの混合物を120°Cで6時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させた。生成物はシリカゲルを使ったカラムクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルムとメタノールの混合液(96/4)を使用した。収率=80%; 白色シロップ状;

50

MS (ES⁺): 337.4(100%, M+H⁺). ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 0.90-1.03m(6H), 1.26d(6H), 1.50-1.71m(4H), 2.48bs(1H), 3.07m(1H), 3.40m(1H), 3.59-3.90m(4H).

【 0 0 9 5 】

実施例 14

7-ベンジルアミノ-5-(2-アミノエチル)アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVIIc)

138gの7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVI)、0.62mLの2アミノエチルアミン(20eq.)、及び0.6mLのN-メチル-2-ピロリドンの混合物を125℃で12時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させ、その後シリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルム/メタノール/NH₄OH(91:9:1)を使用した。収率=56%; mp=145-147℃;

MS (ES⁺): 326.1(100%, M+H⁺). ¹H-NMR (300MHz, CD₃OD):

1.41d(6H, J=6.9Hz), 3.10t(2H, J=5.8Hz), 3.35sept(1H, J=6.9Hz), 3.73t(2H, 5.8Hz), 4.86s(2H), 7.34m(5H).

【 0 0 9 6 】

実施例 15

7-ベンジルアミノ-5-ヘプチルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVIIId)

85.6mgの7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジンXVI、0.21mLのヘプチルアミン、及び1mLのペンタノールの混合物を125℃で12時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させ、その後シリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルム/アセトン/ヘプタン(1:1:1)混合物を使用した。収率=60%; 白色シロップ状;

MS (ES⁺):

381.0(100%, M+H⁺). ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): 0.86t(3H, J=6.6Hz), 1.22-1.36m(12H), 1.56m(2H), 1.64m(2H), 3.12sept(1H, J=7.1Hz), 3.41d(2H, J=5.2Hz), 4.79bs(2H), 7.19-7.35m(5H), 7.60s(1H).

【 0 0 9 7 】

実施例 16

7-ベンジルアミノ-5-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVIIe)

180mgの7-ベンジルアミノ-5-クロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジンXVI、90.7mgの4-アミノシクロヘキサノール塩酸(10eq.)、3mLのN-メチル-2-ピロリドンの混合物を145℃で13時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させた。蒸発して残った残渣は水から酢酸エチルへ抽出した。合わせた酢酸エチル抽出物はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルム/メタノール/NH₄OH(95:5:0.5)の混合液を使用した。収率=30%; mp=118-119℃;

MS (ES⁺):

381.1(100%, M+H⁺). ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆): 1.31d(6H, J=7.1Hz), 1.80m(4H), 1.83m(4H), 3.16sept(1H, J=7.1Hz), 3.60m(1H), 4.48m(1H), 4.67bs(2H), 7.25-7.39m(5H).

【 0 0 9 8 】

実施例 17

10

20

30

40

50

5,7-ジ[(4-メトキシベンジル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(XVII f)

5,7-ジクロロ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(156mg)、1.2mLの4-メトキシベンジルアミン、及び0.5mLのジイソプロピルエチルアミンを145℃で6時間加熱した。反応混合物は乾燥するまで真空中で蒸発させた。蒸発して残った残渣は水から酢酸エチルへ抽出した。合わせた酢酸エチル抽出物はシリカゲルを用いたクロマトグラフィーにかけた。可動層としてはクロロホルム/メタノール/NH₄OH(98:2:0.2)の混合液を使用した。収率=91%；mp=60-85℃；

MS (ES⁺): 433.2(100%, M+H⁺). ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):

1.24d(6H, J=7.1Hz), 3.02sept(1H, J=7.1Hz), 3.71s (6H), 4.74s (4H), 6.72-7.15m(8H), 8.12s(1H).

10

【0099】

(表4) 実施例 12及び17の方法により調製された化合物

No	ピラゾロ [4,3-d] ピリミジン置換基			CHN 分析	MS (ZMD)- 分析	
	C5	C7	C3	[%]	[M- H] ⁻ a)	[M+ H] ⁺ b)
1	2-ヒドロキシエチルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,93; H=6,18 N=23,47	357,2	
2	2-ヒドロキシプロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,02; H=6,50 N=22,61	371,2	
3	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,02; H=6,50 N=22,61	371,2	
4	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,72; H=6,54 N=20,83	401,2	
5	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,31; H=7,12 N=23,80	410,2	412,2
6	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,29; H=7,15 N=23,78	410,2	412,2
7	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,15; H=6,78 N=21,65	385,2	
8	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,97; H=7,06 N=20,95	399,2	
9	3-アミノプロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,31; H=6,76 N=26,52	370,2	372,2
10	2-アミノエチルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,16; H=6,49 N=27,26	356,2	358,2
11	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,41; H=5,52 N=24,23; Cl=10,22	345,1 347,1	
12	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,59; H=5,87 N=23,27; Cl=9,80	359,1 361,1	
13	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,34; H=5,93 N=21,58; Cl=9,04	389,1 391,1	
14	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=60,05; H=6,65 N=24,42; Cl=8,88	398,2 400,2	400,2 402,2
15	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=60,07; H=6,50 N=24,54; Cl=8,89	398,2 400,2	400,2 402,2
16	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,77; H=6,14 N=22,42; Cl=9,43	373,2 375,2	
17	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=58,65; H=6,49 N=21,61; Cl=9,21	387,2 389,2	
18	3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,79; H=6,11 N=27,26; Cl=9,84		360,2 362,2
19	2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,53; H=5,83 N=28,35; Cl=10,29		346,1 348,1

10

20

30

40

20	2-ヒドロキシエチルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=61,54;H=6,45 N=26,98		313,2
21	3-ヒドロキシプロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=62,52;H=6,85 N=25,71		327,2
22	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	アニリノ	イソプロピル	C=60,62;H=6,82 N=23,56	355,2	
23	2-アミノシクロヘキシルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=65,71;H=7,47 N=26,82		366,2
24	4-アミノシクロヘキシルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=65,75;H=7,43 N=26,82		366,2
25	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=63,58;H=7,13 N=24,65	339,2	
26	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=64,38;H=7,34 N=23,79	353,2	
27	3-アミノプロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=62,82;H=7,08 N=30,10		326,2
28	2-アミノエチルアミノ	アニリノ	イソプロピル	C=61,72;H=6,88 N=31,40		312,2
29	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=52,20;H=4,94 N=21,55;Cl=9,03	389,1 391,1	
30	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=53,49;H=5,24 N=20,66;Cl=8,73	403,1 405,1	
31	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=52,46;H=5,35 N=19,32;Cl=8,19	433,1 435,1	
32	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=56,86;H=5,94 N=22,09;Cl=7,91	442,2 444,2	
33	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=56,82;H=5,95 N=22,09;Cl=7,94	442,2 444,2	
34	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=54,44;H=5,59 N=20,04;Cl=8,46	417,1 419,1	
35	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=55,44;H=5,92 N=19,41;Cl=8,14	431,2 433,2	
36	3-アミノプロピルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=53,58;H=5,49 N=24,28;Cl=8,78	402,1 404,1	
37	2-アミノエチルアミノ	4-カルボキシ-3-クロロアニリノ	イソプロピル	C=52,38;H=5,02 N=25,15;Cl=9,19	388,1 390,1	
38	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	C=52,14;H=4,95 N=21,45;Cl=9,17	389,1 391,1	
39	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	C=53,45;H=5,28 N=20,76;Cl=8,66	403,1 405,1	
40	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	C=52,43;H=5,34 N=19,32;Cl=8,19	433,1 435,1	
41	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	C=56,80;H=5,90 N=22,19;Cl=7,91	442,2 444,2	
42	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	C=56,82;H=5,96 N=22,01;Cl=7,94	442,2 444,2	

10

20

30

40

43	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=54,41;H=5,53 N=20,06;Cl=8,44	417,1 419,1	
44	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,48;H=5,82 N=19,43;Cl=8,15	431,2 433,2	
45	3-アミノプロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,53;H=5,48 N=24,25;Cl=8,76	402,1 404,1	
46	2-アミノエチルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=52,38;H=5,19 N=25,15;Cl=9,07	388,1 390,1	
47	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=54,85;H=5,48 N=22,54	371,1	
48	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=55,89;H=5,76 N=21,77	385,2	
49	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=54,82;H=5,88 N=20,13	415,2	
50	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=59,25;H=6,43 N=23,07	424,2	
51	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=59,24;H=6,38 N=23,04	424,2	
52	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=56,97;H=6,05 N=20,94	399,2	
53	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=57,92;H=6,35 N=20,26	413,2	
54	3-アミノプロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=56,19;H=6,01 N=25,34	384	
55	2-アミノエチルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	C=54,95;H=5,71 N=26,46	370,2	
56	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=49,12;H=4,86 N=21,45;Br=20,47	389,1 391,1	
57	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=50,34;H=5,22 N=20,74;Br=19,78	403,1 405,1	
58	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=49,61;H=5,43 N=19,35;Br=18,34	433,1 435,1	
59	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=54,04;H=5,90 N=22,06;Br=18,00		444,2 446,2
60	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=54,03;H=5,96 N=22,06;Br=17,95		444,2 446,2
61	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=51,52;H=5,55 N=20,08;Br=19,04	417,1 419,1	
62	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=52,66;H=5,83 N=19,31;Br=18,49	431,1 433,1	
63	3-アミノプロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=50,54;H=5,54 N=24,25;Br=19,67		404,1 406,1
64	2-アミノエチルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	C=49,25;H=5,14 N=25,12;Br=20,49		390,1 392,1
65	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,41;H=5,54 N=24,20;Cl=10,29	345,1 347,1	
66	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,58;H=5,85 N=23,27;Cl=9,88	359,1 361,1	

10

20

30

40

67	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,35;H=5,93 N=21,50;Cl=9,17	389,1 391,1	
68	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=60,05;H=6,55 N=24,52;Cl=8,88		400,2 402,2
69	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=60,07;H=6,53 N=24,54;Cl=8,86		400,2 402,2
70	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,60;H=6,15 N=22,38;Cl=9,54	373,2 375,2	
71	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=58,68;H=6,46 N=21,58;Cl=9,16	387,2 389,2	
72	3-アミノプロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,75;H=6,14 N=27,15;Cl=9,96		360,2 362,2
73	2-アミノエチルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,58;H=5,88 N=28,30;Cl=10,24		346,1 348,1
74	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,11;H=5,59 N=27,11;Cl=9,85	360,1 362,1	362,1 364,1
75	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=54,33;H=5,98 N=26,05;Cl=9,40	374,2 376,2	376,2 378,2
76	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,24;H=5,96 N=24,16;Cl=8,79	404,2 406,2	
77	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,87;H=6,55 N=27,01;Cl=8,57		415,2 417,2
78	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,85;H=6,51 N=27,05;Cl=8,59		415,2 417,2
79	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,44;H=6,20 N=25,13;Cl=9,07	388,2 390,2	
80	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,56;H=6,49 N=24,25;Cl=8,71	402,2 404,2	
81	3-アミノプロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=54,39;H=6,18 N=29,93;Cl=9,50		375,2 377,2
82	2-アミノエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,21;H=5,87 N=31,05;Cl=9,87		361,2 363,2
83	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,11;H=5,57 N=27,10;Cl=9,80	360,1 362,1	362,1 364,1
84	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=54,33;H=5,90 N=26,09;Cl=9,43	374,2 376,2	376,2 378,2
85	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,29;H=5,94 N=24,23;Cl=8,71	404,2 406,2	
86	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,85;H=6,56 N=27,01;Cl=8,58		415,2 417,2
87	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=57,84;H=6,60 N=27,05;Cl=8,51		415,2 417,2
88	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=55,45;H=6,20 N=25,15;Cl=9,09	388,2 390,2	
89	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=56,50;H=6,49 N=24,27;Cl=8,78	402,2 404,2	
90	3-アミノプロピルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=54,52;H=6,18 N=29,89;Cl=9,41		375,2 377,2

10

20

30

40

91	2-アミノエチルアミノ	4-アミノ-3-クロロアニリン	イソプロピル	C=53,20;H=5,87 N=31,05;Cl=9,88		361,2 363,2
92	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,63;H=6,48 N=24,54	341,2	
93	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,68;H=6,82 N=23,49	355,2	
94	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,07;H=6,78 N=21,73	385,2	
95	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,75;H=7,39 N=24,84		396,3
96	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,77;H=7,39 N=24,79		396,3
97	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,63;H=7,07 N=22,66	369,2	
98	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,45;H=7,34 N=21,89	383,2	
99	3-アミノプロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,81;H=7,13 N=27,45		356,2
100	2-アミノエチルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,84;H=6,79 N=28,76		342,2
101	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,65;H=6,48 N=24,49	341,2	
102	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,72;H=6,75 N=23,57	355,2	
103	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,03;H=6,75 N=21,86	385,2	
104	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,74;H=7,39 N=24,87		396,3
105	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,76;H=7,37 N=24,74		396,3
106	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,66;H=7,01 N=22,66	369,2	
107	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,58;H=7,32 N=21,76	383,2	
108	3-アミノプロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,84;H=7,08 N=27,62		356,2
109	2-アミノエチルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,89;H=6,76 N=28,70		342,2
110	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,26;H=6,29 N=21,96	383,2	
111	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,29;H=6,55 N=21,12	397,2	
112	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,88;H=6,53 N=19,69	427,2	
113	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,21;H=7,14 N=22,31		438,2
114	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,14;H=7,18 N=22,36		438,2

10

20

30

40

115	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,17;H=6,88 N=20,29	411,2	
116	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,94;H=7,08 N=19,72	425,2	
117	3-アミノプロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,47;H=6,84 N=24,64		398,2
118	2-アミノエチルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,48;H=6,59 N=25,64		384,2
119	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,35;H=6,28 N=21,84	383,2	
120	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,27;H=6,63 N=21,05	397,2	
121	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,85;H=6,59 N=19,64	427,2	
122	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,17;H=7,14 N=22,36		438,2
123	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,14;H=7,17 N=22,40		438,2
124	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,11;H=6,84 N=20,42	411,2	
125	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,95;H=7,09 N=19,70	425,2	
126	3-アミノプロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,47;H=6,89 N=24,61		398,2
127	2-アミノエチルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,52;H=6,57 N=25,54		384,2
128	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,96;H=6,55 N=22,83	367,2	
129	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,81;H=6,86 N=21,98	381,2	
130	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,14;H=6,84 N=20,35	411,2	
131	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=65,59;H=7,41 N=23,32		422,3
131	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=65,53;H=7,49 N=23,21		422,3
132	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,60;H=7,10 N=21,28	395,2	
133	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=64,39;H=7,42 N=20,44	409,2	
134	3-アミノプロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,97;H=7,09 N=25,78		382,2
135	2-アミノエチルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,15;H=6,86 N=26,64		368,2
136	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,94;H=6,63 N=22,79	367,2	
137	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,87;H=6,88 N=21,86	381,2	

10

20

30

40

138	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,14;H=6,84 N=20,36	411,2	
139	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=65,53;H=7,55 N=23,18		422,3
140	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=65,57;H=7,38 N=23,29		422,3
141	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,60;H=7,12 N=21,27	395,2	
142	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=64,42;H=7,36 N=20,42	409,2	
143	3-アミノプロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,97;H=7,18 N=25,65		382,2
144	2-アミノエチルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,14;H=6,82 N=26,75		368,2
145	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,07;H=6,49 N=22,47	371,2	
146	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,07;H=6,77 N=21,69	385,2	
147	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,75;H=6,76 N=20,11	415,2	
148	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,21;H=7,28 N=23,01	424,3	426,3
149	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,10;H=7,31 N=23,07	424,3	426,3
150	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,84;H=7,03 N=21,06	399,2	
151	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,84;H=7,35 N=20,20	413,2	
152	3-アミノプロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,25;H=7,04 N=25,48		386,2
153	2-アミノエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,19;H=6,75 N=26,47		372,2
154	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,72;H=6,79 N=23,50	355,2	
155	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,61;H=7,14 N=22,56	369,2	
156	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,94;H=7,01 N=21,04	399,2	
157	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=64,58;H=7,62 N=23,91		410,3
158	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=64,57;H=7,60 N=23,90		410,3
159	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,40;H=7,37 N=21,93	383,2	
160	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,25;H=7,68 N=21,04	397,2	
161	3-アミノプロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,76;H=7,45 N=26,50		370,2

10

20

30

40

162	2-アミノエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	C=60,80;H=7,18 N=27,50		356,2
163	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,10;H=5,62 N=22,35;Cl=9,51	375,1 377,1	
164	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,34;H=5,94 N=21,56;Cl=9,01	389,1 391,1	
165	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,22;H=5,7 N=19,90;Cl=8,49	419,2 421,2	
166	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,64;H=6,56 N=22,85;Cl=8,24	428,2 230,2	
167	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,65;H=6,54 N=22,86;Cl=8,27	428,2 430,2	
168	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,36;H=6,18 N=20,72;Cl=8,84	403,2 405,2	
169	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,34;H=6,50 N=20,08;Cl=8,41	417,2 419,2	
170	3-アミノプロピルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,43;H=6,20 N=25,14;Cl=9,15	388,2 390,2	
171	2-アミノエチルアミノ	3-クロロ-2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,35;H=5,90 N=26,07;Cl=9,41	374,2 376,2	
172	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,90;H=5,38 N=21,45;Cl=9,07	391,1 393,1	
173	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,14;H=5,72 N=20,60;Cl=8,74	405,1 407,1	
174	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,23;H=5,82 N=19,18;Cl=8,15	435,2 437,2	
175	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,46;H=6,44 N=21,98;Cl=7,89	444,2 446,2	
176	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,54;H=6,33 N=21,99;Cl=7,94	444,2 446,2	
177	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,18;H=5,99 N=19,97;Cl=8,48	419,2 421,2	
178	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,13;H=6,26 N=19,31;Cl=8,25	433,2 435,2	
179	3-アミノプロピルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,27;H=5,97 N=24,12;Cl=8,77	404,2 406,2	
180	2-アミノエチルアミノ	4-クロロ-2,6-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,14;H=5,62 N=25,02;Cl=9,07	390,1 392,1	
181	2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,61;H=6,25 N=21,67	387,2	
182	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,71;H=6,54 N=20,81	401,2	
183	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,50;H=6,59 N=19,40	431,2	
184	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,80;H=7,00 N=22,31	440,2	
185	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,82;H=7,01 N=22,25	440,2	

10

20

30

40

186	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,68;H=6,71 N=20,12	415,2	
187	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,59;H=7,04 N=19,54	429,2	
188	3-アミノプロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,84;H=6,71 N=24,45	400,2	
189	2-アミノエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,84;H=6,54 N=25,24	386,2	
190	2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,61;H=6,26 N=21,66	387,2	
191	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,75;H=6,55 N=20,84	401,2	
192	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,55;H=6,53 N=19,43	431,2	
193	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,85;H=7,01 N=22,28	440,2	
194	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,91;H=7,06 N=22,18	440,2	
195	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,64;H=6,74 N=20,26	415,2	
196	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,51;H=7,14 N=19,51	429,2	
199	3-アミノプロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,86;H=6,75 N=24,40	400,2	
200	2-アミノエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,85;H=6,54 N=25,23	386,2	
201	2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,65;H=6,23 N=21,62	387,2	
202	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,70;H=6,48 N=20,85	401,2	
203	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,55;H=6,56 N=19,40	431,2	
204	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,88;H=7,04 N=22,20	440,2	
205	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=59,86;H=7,09 N=22,15	440,2	
206	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,63;H=6,73 N=20,28	415,2	
207	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,59;H=7,02 N=19,58	429,2	
208	3-アミノプロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,84;H=6,78 N=24,44	400,2	
209	2-アミノエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,80;H=6,50 N=25,31	386,2	
210	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,91;H=5,39 N=21,35;Cl=9,05	391,1 393,1	
211	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,14;H=5,71 N=20,62;Cl=8,72	405,1 407,1	

10

20

30

40

212	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,23;H=5,71 N=19,23;Cl=8,16	435,2 437,2	
213	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,55;H=6,37 N=21,92;Cl=7,92	444,2 446,2	
214	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,57;H=6,38 N=21,94;Cl=7,91	444,2 446,2	
215	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,23;H=5,92 N=19,94;Cl=8,45	419,2 421,2	
216	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,27;H=6,29 N=19,30;Cl=8,12	433,2 435,2	
217	3-アミノプロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,30;H=5,95 N=24,11;Cl=8,70	404,2 406,2	
218	2-アミノエチルアミノ	4-クロロ-2,3-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,14;H=5,61 N=25,00;Cl=9,08	390,1 392,1	
219	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=51,98;H=5,35 N=21,39;Cl=9,10	391,1 393,1	
220	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,14;H=5,70 N=20,61;Cl=8,75	405,1 407,1	
221	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,23;H=5,72 N=19,24;Cl=8,15	435,2 437,2	
222	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,54;H=6,38 N=21,94;Cl=7,96	444,2 446,2	
223	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,56;H=6,37 N=21,95;Cl=7,94	444,2 446,2	
224	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,20;H=5,98 N=19,90;Cl=8,50	419,2 421,2	
225	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,20;H=6,20 N=19,32;Cl=8,25	433,2 435,2	
226	3-アミノプロピルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,37;H=5,86 N=24,19;Cl=8,74	404,2 406,2	
227	2-アミノエチルアミノ	4-クロロ-2,5-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,11;H=5,46 N=25,12;Cl=9,15	390,1 392,1	
228	2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,33;H=5,95 N=26,04;Cl=9,43	374,2 376,1	
229	3-ヒドロキシプロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,45;H=6,25 N=25,13;Cl=9,04	388,2 390,2	
230	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,37;H=6,26 N=23,35;Cl=8,40	418,2 420,2	
231	2-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,80;H=6,81 N=26,15;Cl=8,24		429,2 431,2
232	4-アミノシクロヘキシルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,84;H=6,82 N=26,10;Cl=8,24		429,2 431,2
233	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,50;H=6,47 N=24,23;Cl=8,82		404,2 406,2
234	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,48;H=6,74 N=23,48;Cl=8,45		418,2 420,2
235	3-アミノプロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,57;H=6,44 N=28,85;Cl=9,14		389,2 391,2

10

20

30

40

236	2-アミノエチルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,49;H=6,19 N=29,89;Cl=9,43	375,2 377,2
237	2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,34;H=5,81 N=26,13;Cl=9,53	374,2 376,1
238	3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,41;H=6,25 N=25,15;Cl=9,05	388,2 390,2
239	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,35;H=6,23 N=23,34;Cl=8,50	418,2 420,2
240	2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,80;H=6,82 N=26,15;Cl=8,23	429,2 431,2
241	4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=58,83;H=6,84 N=26,09;Cl=8,24	429,2 431,2
242	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,51;H=6,45 N=24,26;Cl=8,74	404,2 406,2
243	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=57,41;H=6,75 N=23,44;Cl=8,46	418,2 420,2
244	3-アミノプロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,59;H=6,48 N=28,81;Cl=9,12	389,2 391,2
245	2-アミノエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,47;H=6,18 N=29,89;Cl=9,46	375,2 377,2
246	2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,24;H=5,93 N=28,67;Cl=9,07	391,2 393,2
247	3-ヒドロキシプロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,40;H=6,22 N=27,67;Cl=8,76	405,2 407,2
248	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,47;H=6,26 N=25,76;Cl=8,15	435,2 437,2
249	2-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,81;H=6,81 N=28,39;Cl=7,99	444,2 446,2
250	4-アミノシクロヘキシルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=56,81;H=6,81 N=28,39;Cl=7,99	444,2 446,2
251	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=54,47;H=6,50 N=26,75;Cl=8,46	419,2 421,2
252	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=55,48;H=6,75 N=25,88;Cl=8,19	433,2 435,2
253	3-アミノプロピルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=53,53;H=6,49 N=31,21;Cl=8,78	404,2 406,2
254	2-アミノエチルアミノ	4-クロロ-2,3-ジアミノベンジルアミノ	イソプロピル	C=52,37;H=6,20 N=32,33;Cl=9,09	404,2 406,2
255	2-ヒドロキシエチルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=60,68;H=6,79 N=23,54	355,2
256	3-ヒドロキシプロピルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=61,60;H=7,05 N=22,71	369,2
257	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=60,04;H=7,01 N=20,95	399,2
258	2-アミノシクロヘキシルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=64,54;H=7,65 N=23,91	410,3
259	4-アミノシクロヘキシルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1-フェニル)アミノ]	イソプロピル	C=64,52;H=7,63	410,3

10

20

30

40

		フェニル)-アミノ]		N=23,95		
260	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1- フェニル)-アミノ]	イソプロピル	C=62,48;H=7,35 N=21,87	383,2	
261	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1- フェニル)-アミノ]	イソプロピル	C=63,29;H=7,55 N=21,08	397,2	
262	3-アミノプロピルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1- フェニル)-アミノ]	イソプロピル	C=61,77;H=7,35 N=26,56		370,2
263	2-アミノエチルアミノ	[(R,S)-(2-ヒドロキシエチル-1- フェニル)-アミノ]	イソプロピル	C=60,83;H=7,04 N=27,62		356,2
264	2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,56;H=6,79 N=25,75		327,2
265	3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,51;H=7,11 N=24,69		345,2
266	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=61,60;H=7,07 N=22,69	369,2	
267	2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=66,46;H=7,70 N=25,83		380,2
268	4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=66,46;H=7,70 N=25,83		380,2
269	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=64,38;H=7,39 N=23,71		355,2
270	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=65,19;H=7,66 N=22,81		369,2
271	3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=63,69;H=7,42 N=28,8		340,2
272	2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	C=62,75;H=7,12 N=30,13		326,2
273	2-ヒドロキシエチルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=58,05;H=6,52 N=22,59	371,2	
274	3-ヒドロキシプロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,02;H=6,78 N=21,77	385,2	
275	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=57,68;H=6,78 N=20,18	415,2	
276	2-アミノシクロヘキシルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=62,15;H=7,35 N=23,01	424,2	
277	4-アミノシクロヘキシルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=62,12;H=7,37 N=23,02	424,2	
278	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピル アミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,93;H=7,09 N=20,97	399,2	
279	R-(1-ヒドロキシメチル-2- メチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=60,81;H=7,37 N=20,24	413,2	
280	3-アミノプロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,22;H=7,08 N=25,41	384,2	
281	2-アミノエチルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル)-N- メチル]アミノ	イソプロピル	C=58,21;H=6,76 N=26,48	370,2	

10

20

30

40

282	2-ヒドロキシエチルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,05;H=6,78 N=21,75	385,2	
283	3-ヒドロキシプロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,98;H=7,05 N=20,98	399,2	
284	ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=58,59;H=7,02 N=19,52	429,2	
285	2-アミノシクロヘキシルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=62,85;H=7,57 N=22,31		440,3
286	4-アミノシクロヘキシルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=62,83;H=7,57 N=22,32		440,3
287	R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=60,85;H=7,30 N=20,27	413,2	
288	R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=61,66;H=7,53 N=19,61	427,2	
289	3-アミノプロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=60,13;H=7,32 N=24,54		400,2
290	2-アミノエチルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	C=59,20;H=7,06 N=25,44		386,2

10

a) 溶液: MeOH p.a. + HCOOH

b) 溶液: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

20

【0100】

上記表4で定義されたR5及びR7を持ちR3にメチル又はエチル基を持つ三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンも合成されたが、その性質は正確には分かっていない。

【0101】

実施例18

4-アセトアミド-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシアミド (XX)

4-アミノ-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシアミド (102mg, 0.61mmol) (V)を0.8 mLのジクロロメタンに懸濁し、攪拌しながら60mlの無水酢酸を加えた。2時間攪拌した後、混合物を1 mLの石油エーテルで薄め濾過すると、収率90%の表題の化合物が得られた。
mp=162-164°C。

30

MS (ES⁺):211.2(100%, M+H⁺). ¹H NMR (300 MHz, DMSO): 1.17d(6H, J=6.6Hz); 1.96s(3H),

2.91s(1H), 3.44sept(1H, J=6.60Hz), 7.09s(1H), 7.29s(1H), 8.99s(1H).

【0102】

実施例19: 親和性吸着剤の調製

5-(2-アミノプロピルアミノ)-7-(3-カルボキシ-4-クロロアニリノ)3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン・エポキシ活性セファロース6B親和性マトリックスの調製

40

ヒドロキシ含有リガンドとセファロースのエポキシド基との間でエーテル結合を形成する能力があるという理由で、凍結乾燥エポキシ活性セファロース6B (ファルマシア LKB, ニュージャージー州ピスカタウェイ)がカップリング反応のために選択された。メーカーの指示に従いゲルを膨潤させた。請求項1で定義されている化合物のいずれか1つ (100mg) 及び56を1 mLのカップリング液 (1.2:1, v/v, DMF, 0.1N NaOH)に溶解し、0.5 mLの膨潤ゲルと室温下pH 10-11で72時間静かに攪拌しながら混合した。過剰反応基は1Mのエタノールアミンを用い50°Cで4時間ブロックした。ゲルスラリーは1mlのシリジカラムに注入した。樹脂は20カラム容積のpH 4.0 (0.1M アセテート、0.5 M NaCl)緩衝液及び20カラム容積のpH 8.0 (0.1M トリスHCl、0.5 M NaCl)緩衝液、及び20カラム容積の反応緩衝液 (20 mM HEPES、pH 7.3、10 mM MgCl₂、15 mM グリセロリン酸塩、0.5 mM オルトバナジン

50

酸ナトリウム、0.5 mM EGTA)で交互の3サイクル活性化した。カラムは0.1%アジ化ナトリウムを含む反応緩衝液中に4 °Cで保存し、使用前に上述の低pHと高pHを用いる交互サイクルで再生させた。

【0103】

Sf9昆虫の細胞の溶解産物(1mlの反応緩衝液中500 mgの蛋白質)をアフィニティカラムマトリックスに連続5回通過させ、流液(非結合物質)は保存した。マトリックスは1mlの反応緩衝液で3度洗い(洗浄1-3)、その後0.5M NaClを含む反応緩衝液で3度洗浄した(溶出液1-3)。カップリングした蛋白質は上述の低pH (pH 4.0、0.1Mアセテート、0.5M NaCl)で溶出し、各試料のアリコート(1mL当たり20ml)はヒストンH1及び実施例15で述べられている他の基質蛋白質のリン酸化能力の検定法に用いられた。CDK複合体の存在もSDS-PAGEにより

10

【0104】

実施例20: CDK阻害検定法

選ばれた化合物は、結合複合体の相互作用エネルギーと阻害活性間の基本的関係を決定するため、cdk1/サイクリンB及びcdk2/サイクリンE に関して試験された。Cdk2/サイクリンE複合体は適当なバキュロウイルスコンストラクトで同時感染させたSf9昆虫の細胞から生成された。細胞は感染後70時間目に、氷上30分かけて溶菌緩衝液(50 mM トリス7,4 pH、150 mM NaCl、5 mM EDTA、20 mM NaF、1% トゥイーン20、プロテアーゼ阻害剤)の中に集められた。可溶画分は14.000g、10分間の遠心分離により回収された。蛋白質抽出物は使用まで -80 °Cで保存された。線形条件の下に動力学の実験を行なうため、キナーゼ活性測定用の最終点試験システムが用いられた。検定混合物は1mg/mlのヒストン(シグマType III-S型)、15 μ M ATP、0,2 μ Ci [γ - ^{32} P] ATP、及び試験化合物を含み、最終容積は20 μ lであった。すべて次の反応緩衝液中に含まれる: 50 mM ヘペス7,4 pH、10 mM MgCl₂、5 mM EGTA、10 mM 2-グリセロリン酸塩、1 mM NaF、1 mM DTT、及びプロテアーゼ阻害剤。10分後、SDS試料緩衝液を加えることにより恒温器を停止し、蛋白質は 12,5% SDS-PAGEを用いて分離した。キナーゼ阻害の測定には、デジタル画像分析器BAS 1800を用いた。キナーゼ活性は最大活性の百分率で表し、IC₅₀値はグラフ分析で決定された。キナーゼ活性は最大活性の百分率で表し、みかけの阻害定数は図1に示される用量反応曲線からグラフ分析により決定した。

20

【0105】

(表5) 選別された3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体のキナーゼ阻害活性

30

置換基			CDC2	I κ B- α
C5	C7	C3	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	4	9.3
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.7	1.8
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.9	2.1
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.03	0.09
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.02	0.05
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.1	0.3
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.01	0.02
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.2	0.4
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	2	5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	メチル	5	11
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリノ	メチル	0.04	0.09
2-ヒドロキシエチルアミノ	アニリノ	メチル	0.09	0.21
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリノ	メチル	0.01	0.02

40

2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	メチル	0.007	0.014
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	メチル	0.005	0.01
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	メチル	0.02	0.05
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-ブロモアニリン	メチル	0.008	0.02
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロアニリン	メチル	0.009	0.019
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	メチル	0.009	0.023
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	メチル	0.012	0.029
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	0.02	0.05
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	0.08	0.24
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	メチル	0.5	1.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	メチル	0.4	1.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	メチル	0.01	0.05
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	メチル	0.04	0.09
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.01	0.04
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	メチル	0.01	0.03
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	メチル	0.01	0.03
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.005	0.012
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.008	0.028
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.007	0.015
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.004	0.009
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.009	0.021
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.01	0.035
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	メチル	0.04	0.08
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	0.2	0.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	0.6	0.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	0.2	0.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	メチル	0.7	0.9
	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	1.2	2.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1	2.3
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.2	0.8
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.4	1.1
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.02
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.005	0.02
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.004	0.01
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.08	0.1
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.4	1.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.5	1.1
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.009
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	0.02	0.11
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	0.004	0.02
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	0.01	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	0.002	0.01
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	0.003	0.009

10

20

30

40

R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.013
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	0.002	0.009
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.008	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.1	0.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.07	0.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.005	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.004	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.014
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.007	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.005
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.006
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0008	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.003	0.011
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.008	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.012	0.0035
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.08	0.024
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.2	0.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	0.09	0.21
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	0.23	0.51
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	0.72	1.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.11	0.28
3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.08	0.2
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.09	0.19
2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.012
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.009
3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.02	0.08
2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.14	0.25
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.15	0.31
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	0.001	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	0.008	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	0.0009	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	0.0004	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-プロモアニリン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	0.0005	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0005	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.012

10

20

30

40

R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.06
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.05
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.005
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0004	0.0012
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0006	0.0015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0007	0.0016
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.0002	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.0008	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.0009	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.02	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	0.06	0.15
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	0.03	0.11
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	0.09	0.15

10

【0106】

20

表5は、CDC2及びIκB-αに対する新規化合物の阻害活性の結果を原型化合物(三置換プリン、オロモウシン、ロスコビチン、及びプルバラノールA)と比較して示している。3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体の大半が、インビトロのキナーゼ検定法で顕著な阻害活性を示した。プリン環をピラゾロ[4,3-d]ピリミジン環に変えることにより、試験化合物のcdk阻害活性が通常増大した。

【0107】

実施例21: 植物キナーゼにおけるCDK阻害活性

p13^{sup}1 ビーズへの結合による植物CDKの蛋白質抽出及び精製、またはcdc2a-MS蛋白質に特異的な抗体による免疫精製は、以前述べられている方法(Bogreら 1997、Plant Physiol. 113、1997、841-852)を用いて行なわれた。MMK1 蛋白キナーゼは、Bogreらにより述べられている方法(1997a、Plant Cell 9、75-83)により、ソラマメ (Vicia faba) 抽出物中の特異抗体を使って精製した。蛋白キナーゼ活性は、上述の実施例8に述べられている方法で測定した。ヒストンH1又はミエリン塩基性蛋白質に取り込まれた放射能の定量化は、ホスホイメジャーを使って行なわれた (図 2)。

30

【0108】

(表6) 選別3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体のキナーゼ阻害活性

置換基			Cdc2a	MMK1
C5	C7	C3	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	12	29.3
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	7.5	5.8
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	メチル	8.9	8.1
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.5	0.9
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.2	0.6
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.5	1.3
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	0.2	0.4
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.2	1.4
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	12	15
2-ヒドロキシエチルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	メチル	18	24
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	メチル	0.4	0.9
2-ヒドロキシエチルアミノ	アニリン	メチル	0.9	2.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	メチル	0.1	0.3
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	メチル	0.09	0.16
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	メチル	0.08	0.3
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	メチル	0.4	0.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-プロモアニリン	メチル	0.08	0.15
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロアニリン	メチル	0.09	0.18
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	メチル	0.09	0.24
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	メチル	0.13	0.25
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	0.25	0.41
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	0.6	0.84
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	メチル	1.5	3.3
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	メチル	1.4	3.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	メチル	0.12	0.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	メチル	0.4	0.9
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.12	0.45
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	メチル	0.15	0.34
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	メチル	0.16	0.38
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.06	0.16
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.08	0.29
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.07	0.16
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	0.05	0.09
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.09	0.22
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	0.15	0.38
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	メチル	0.45	0.86
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	2.4	1.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	1.6	2.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	1.3	1.6
2-ヒドロキシエチルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	メチル	1.8	1.95

10

20

30

	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	2.4	4.6
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1	2.3
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.2	0.8
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.4	1.1
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.02
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.005	0.02
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.004	0.01
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.08	0.1
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.4	1.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.5	1.1
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.009
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	0.02	0.11
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	0.004	0.02
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	0.01	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ブモアニリン	イソプロピル	0.002	0.01
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	0.003	0.009
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.013
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	0.002	0.009
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.008	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.1	0.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.07	0.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.005	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.01	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.004	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.014
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.007	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.005
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.006
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0008	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.003	0.011
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.008	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.012	0.0035
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.08	0.024
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.2	0.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	0.09	0.21
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	0.23	0.51
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	0.72	1.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.11	0.28
3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.08	0.2
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.09	0.19

10

20

30

40

2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.012
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.03
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.004	0.009
3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.02	0.08
2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.14	0.25
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.15	0.31
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	0.001	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	0.008	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	0.0009	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	0.0004	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-ブロモアニリン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	0.0005	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0005	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.012
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.06
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.02	0.05
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.005
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.006	0.015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.002	0.004
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.001	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0004	0.0012
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0006	0.0015
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.0007	0.0016
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.0002	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.0008	0.001
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.0009	0.002
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.002	0.003
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	0.02	0.04
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	0.06	0.15
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	0.03	0.11
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(2,3,4-ジヒドロキシフェニル-エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	0.09	0.15

10

20

30

40

50

【0109】

表6は、植物cdkに対する新規化合物の阻害活性の結果を示している。3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体の大半が、インビトロの植物キナーゼ検定法で顕著な阻害活性を示した。プリン環をピラゾロ[4,3-d]ピリミジン環に変えることにより、試験化合物の植物CDK阻害活性が通常増大した。

【0110】

実施例22: β アドレナリン作動性受容体の活性調節

新規化合物の作用機構は図2に示してある。ラットのC6神経膠腫(ATCC N° CCL107)は無血清の化学的に定義された培地中単層で培養された。培地は、ハムのF10/最小必要培地(1:1 vol/vol)、2mMのLグルタミン、1% (vol/vol)の最小必要培地用ビタミン(100x)、1% (vol/vol)の最小必要培地非必須アミノ酸(100x)、100U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、及び30 nMの亜セレン酸ナトリウムを含む。培養は加湿条件下37°Cで行なわれた。検定法は2.5x10⁵ 細胞/cm²の密度で対数増殖期に行なわれた。細胞内cAMP合成は5mM (-) イソプレテレンールの添加により誘導された。37°Cで30分培養したのち培地を

除き、細胞のcAMP量をアマシャムのcAMP酵素免疫検定キットを使って決定した。 I_{50} は用量反応曲線から二重検査で決定される。イソプレテレンールを同時に添加した後、7種類のプリン類似体の効果を測定した。

【0111】

(表7) 3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンによる β アドレナリン作動性受容体の活性調節

R5	R7	R3	作用	$I_{50}(\mu M)$
ヘキシルアミノ	(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ	イソプロピル	阻害	8 ± 1
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	阻害	25 ± 2
(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	阻害	25 ± 2
(R)-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.8倍活性化	
(R)-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.7倍活性化	
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1.3倍活性化	
(S)-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	(R)-ヒドロキシ-1-フェニルエチルアミノ	イソプロピル	不活性化	
2-ヒドロキシプロピルアミノ	(R)-ヒドロキシ-1-フェニルエチルアミノ	イソプロピル	不活性化	

10

20

【0112】

P2Y₁様受容体及びA2プリン作動性受容体がラットのC6神経膠腫に存在しており、それぞれアデニル酸シクラーゼと陰性的及び陽的に結合しているので、cAMP合成の調節がイソプレテレンールによる β アドレナリン作動性受容体の活性化阻害によるかどうかを決定されることについては、プリン作動性受容体の活性化による。

【0113】

実施例23: 造血細胞の増殖への新規化合物の影響

細胞の分離及び培養

細胞株:

ヒトの白血病細胞株はアメリカンタイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, 米国メリーランド州ロックビル)から得た。イスコフの改変ダルベッコ培地 (IMDM)でそれを培養した(培地に補足として熱失活させた10%の牛胎児血清(FCS)、200 U/mlのペニシリン、200 μ g/mlのストレプトマイシン、及び1 μ g/mlアンフォテリシンBを加えた)。細胞は5% CO₂-95%空気の十分加湿した培養器の中で培養した。クローン原性のアウトプット効果のため、1000細胞/ウェルをメチルセルロース(0.9%)(20% FCSで補足)中二通りにプレーティングし、14日間培養した。

30

【0114】

末梢血単核細胞 (PBMC):

ヒトの末梢血単核細胞は密度勾配により単離した(フィコールハイパック)(LSM、ICN バイオメディカル社)。PBMCはIMDM(10%のFCSで補足)中5 μ g/mlのファイトヘマグルチニンA (PHA) (シグマ)を使い24-48時間37℃で刺激を与えた。PHAを洗い流したのち、PBMCをインターロイキン2(IL-2) (10 U/ml) (ゲンザイム)と一緒に培養した。

40

【0115】

成人の骨髓細胞 (ABM):

骨髓試料は心臓手術を行なう血液学的に正常な供与者から、アントワープ大学の倫理規制に従ってインフォームドコンセントを得たのち、胸骨穿刺法により得た。細胞は10%のFCSと100 U/mlのヘパリンで補足したIMDMで集められ、PBMCで述べた密度勾配法により分離した。細胞は洗浄後IMDM 10% FCSに再度懸濁し、FACStar (ベクトン・ディッキンソン、エレンボデゲム、ベルギー)上で選別した。

50

【0116】

細胞の選別:

ABM 細胞 (10^7 細胞/ml)は43A1雑種細胞の上澄み液(10倍希釈)と一緒に4°Cで20分間培養した。43A1雑種細胞 (免疫グロブリンIgG3)の上澄み液はH. J. Buhring博士 (ドイツのチュービンゲン大学) の寄贈によるもので、抗CD34抗体源として使用した。細胞は、IMDMを2度洗浄したのちFITC結合のウサギ抗マウス免疫グロブリンG(40倍希釈)と一緒に4°Cで20分間培養した。細胞は2度洗浄後5 μ gのマウスIgと一緒に10分間、及び抗CD38-PE (20 μ l/ 10^6 細胞)と一緒に15分間培養した。細胞はIMDMで2度洗浄後、FACStarPlus細胞選別器で選別した。この細胞選別器は、488 nmのUVを含む複数の波長出力を持つ水冷却アルゴンイオンレーザー (INNOVA エンタープライズ・イオンレーザー)を備えた。低～中程度の前方散乱及び低側方散乱の極めてポジティブな緑色(CD34)の蛍光を持つ細胞、及び無関連同位体対照抗体で標識された細胞の平均蛍光より低いオレンジ色(CD38)蛍光シグナルを持つ細胞はCD34⁺CD38⁻細胞とし、この閾値を超えるオレンジ色の蛍光を持つ細胞はCD34⁺CD38⁺細胞とした。

【0117】

骨髓性コロニー形成単位 (CFU)検定法:

CD34⁺CD38⁺細胞の直接骨髓性コロニー形成をCFU検定法で評価した。この検定法はウェル当たり500細胞を用いて開始し、20 % FCS、1% のウシ血清アルブミン(BSA)、G-CSFとGM-CSFを含む5637膀胱癌腫細胞株についての 10^{-5} Mのメルカプトエタノールと10 vol.% 5637条件培地、2 U/mlのエリスロポイエチン、及び 30 U/mlのインターロイキン3 (IL-3)で補足したメチルセルロース(0.9%)中、二通りに平板培養した。培養物は、7.5 % O₂及び5 % CO₂ 中、十分加湿した37°Cの培養器の中で14日間培養したのち、コロニー形成用顕微鏡を用いて評価した。コロニータイプは次のように評価された。骨髓系コロニー(マクロファージ(CFU-M)、顆粒細胞(CFU-G)、及び顆粒細胞・マクロファージ(CFU-GM))、赤血球系コロニー (BFU-E (バースト形成単位、赤血球系)とCFU-E)、及び赤血球系骨髓系混合コロニー (CFU-ミックス)。

【0118】

前CFU:

前CFU検定法は、96ウェル平底プレートで二通りにCD34⁺CD38⁻を液体培養することにより開始した。培地はIMDM/10%FCS、1 %のウシ血清アルブミン(BSA)、及び100 U/ml IL-1、200 U/ml IL-6、30 U/ml IL-3、及び100 ng/ml 幹細胞因子(SCF)などのサイトカインの異なる組み合わせである。前CFU培養は500 CD34⁺CD38⁻細胞/ウェル(200 μ l)で開始した。7.5 % O₂及び5% CO₂ 中、十分加湿した37°Cの培養器の中で14日間培養したのち、各ウェルの細胞数を計数した。その後細胞を集め、IMDM/10% FCSで3度洗浄し、CFU検定法で述べた二次メチルセルロースCFU培養として、500細胞/ウェル(1000 μ l)で二通りに平板培養した。

【0119】

細胞増殖への新規化合物の影響

細胞は200 μ l IMDM培地にウェル当たり10000個、0-50 μ Mの新規化合物と一緒に培養した(表 8)。薬剤を直接培地に加え、37°Cで96時間培養した(表8)。絶対細胞数は既知濃度のフルオレスブライト小球(FITC)(ポリサイエンシス社)を加えることにより決定した。細胞/ウェルの絶対数は次の方法で計算した:{(ウェル当たり加えられたビーズの合計数)/(測定されたビーズ数)X(対象ゲートの測定細胞数)}。分析はすべてFACScan (BD)及びCELLQuestソフトウェア(ベクトン・ディッケンソン)を用いて行った。

【0120】

新規化合物の細胞増殖抑制効果に対する骨髓白血病KG1及びTリンパ球白血病Molt3細胞株の反応は、流動細胞測定法(FCM)による絶対細胞数決定に使用した上述の標準ビーズ懸濁法を用いて決定した。細胞は増加性濃度の新規化合物の存在下に成長させた。96時間の培養の後、細胞の成長が50%阻害される濃度、すなわちIC₅₀ を用量反応曲線(図4)を用いて計算した。表8にその結果を示す。

【0121】

(表8) 試験対象の新規化合物：構造名及び異なる細胞培養系における IC_{50} 値(リンパ球、KG1、Molt3、CFU、及び前CFU) 及び無細胞系のCDC2活性 IC_{50} 値

構造名	NR.	リンパ球 IC_{50} (μ M)	KG1 IC_{50} (μ M)	Molt3 IC_{50} (μ M)	CFU IC_{50} (μ M)	Pre-CFU IC_{50} (μ M)	CDC2 IC_{50} (μ M)
5-(3-ヒドロキシプロピルアミノ)-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	7	9 ± 0.2	25 ± 4.4	24 ± 2.2			1
5-(3-アミノプロピルアミノ)-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	17	4 ± 0.2	6 ± 1.0	9.3 ± 0.3	17	10	11
5-(メチルチオ)-7-[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	26	16.5 ± 0.8	13 ± 0.2	17 ± 2.9	> 50	86	>100
5-(ヘキシルアミノ)-7-[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	41	10 ± 2.0	15.3 ± 2.4	14 ± 3.2			1
5-(3-ヒドロキシプロピルアミノ)-7-[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	42	5.9 ± 2.9	10.7 ± 0.3	13 ± 2.1			2.6
5-(1-エチル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-7-(3,4-ジヒドロキシベンジル)アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	47	3 ± 1.2	8 ± 1.0	10 ± 1			1.2
5-(3-ヒドロキシプロピルアミノ)-7-[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	50	15 ± 7.3	21	21			
5-(モルフォリノ)-7-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	85	20 ± 7.7	28 ± 1.5	20 ± 1.3			5.5
5-(2-ヒドロキシエチルチオ)-6(7)-フェニル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	96	8 ± 0.5	9 ± 0.4	10 ± 1.2			5.8
5-(ヘキシルアミノ)-7-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	98	18 ± 1	5 ± 0.3	8 ± 0.4	5.4 ± 0.4	>25	30
5-(5-シアノベンチル)-7-[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-9-イソプロピルプリン	123	33 ± 4.4	42 ± 4.8	42.5 ± 6			33
5-(3-ヒドロキシプロピルアミノ)-7-ベンジルチオ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	145	18 ± 1.6	42 ± 5	19 ± 2			>50
5-(2,3-ジヒドロキシプロピルアミノ)-7-[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	158	10 ± 1	12 ± 1	13.4 ± 1.4			>50
5-(3-ヒドロキシプロピルアミノ)-7-[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	172	4 ± 0.5	3 ± 1	8 ± 1.5	> 20	>25	>50
5-(3-アミノエチルアミノ)-7-(3,4-ジヒドロキシベンジル)アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン	201	8 ± 2.2	12 ± 1.3	12 ± 1.8	4.5	1.5	0.5
2-(1-エチル-2-ヒドロキシエチルアミノ)-6(3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリン	243	9 ± 6.6	16.5 ± 1	9 ± 1.2			10

【0122】

異なる反応パターンが試験対象新規化合物に関し観察された。 IC_{50} の範囲はKG1に関して3 μ Mから> 50 μ M、Molt3に関して5 μ Mから> 50 μ Mであった。

【0123】

KG1のクローン原性アウトプット試験を25 μ Mの新規化合物のいくつかを含むメチルセルロースで行なった。コロニー・アウトプット対新規化合物なしの対照培養は、26で16%、98で19%、172で8%、および201で0%であった。

【0124】

10

20

30

40

50

PHA刺激リンパ球(PBMC)に関し、細胞株の正常対照物の1つとして細胞毒性試験を行った。細胞はIL-2及び異なる濃度の新規化合物の存在下で96時間成長させ、流動細胞測定器で細胞数を計算した。表8は IC_{50} 値を示している。正常なPHA刺激リンパ球と造血細胞株の比較により、リンパ球は造血細胞株よりも新規化合物に感受性である場合が多いことが示された。但し96は正常なPBMCよりもKG1により有意に効果が高かった(図5)。

【0125】

新規化合物の効果の可逆性を決定するため、細胞をウェル当たり10000平板培養し、指定された時間0-50 μ Mの化合物に接触させ、その後リン酸緩衝液生理食塩水(PBS)(ライフ・テクノロジーズ)で洗浄後、薬剤のない培地に再接種し更に7日間培養した。同一の細胞セットを平板培養し、さらに7日間薬剤に接触させた。7日(168時間)後、流動細胞測定法により相対細胞数を測定した。KG1細胞を化合物17、172、及び201に継続接触させた場合の IC_{50} は、それぞれ $16 \pm 1.7 \mu$ M、 $7 \pm 2 \mu$ M、及び $16 \pm 1.3 \mu$ M(表8)であったが、17、172、及び201に接触させて6時間後に新規化合物を洗い流すと、新規化合物のない対照と比較して細胞数が大幅に元に戻った。

【0126】

成人の骨髓から $CD34^+CD38^+$ 造血始原細胞(HPC)を単離し、新規化合物への反応を調べた。 $CD34^+CD38^+$ 細胞は、増加性濃度の化合物の存在下にメチルセルロース系を使って成長させた。14日後、コロニーを顕微鏡下で調べ、 IC_{50} 濃度を全コロニーアウトプットの用量反応曲線を使って計算した(表8)。26、98、172に関しては、造血始原細胞の成長への影響について更に調べられた。有効な対照として96及び201が選ばれた。26、98、及び158は造血始原細胞に対して阻害活性が低い、又は全く阻害活性を示さず、 $IC_{50} > 50 \mu$ Mであった。201は強力な阻害活性を示し IC_{50} は 8.5μ M、201は中位で IC_{50} は 37μ Mであった。

【0127】

$CD34^+CD38^+$ HPCのクローン原性アウトプットも差次的に評価した。26は様々なタイプの骨髓コロニーのアウトプットに重要な差異をもたらさなかった。17、98、172、及び201と一緒に培養すると、CFU-E、CFU-G、及びCFU-Mのコロニー・アウトプットは大幅に減少した。但しP27ではCFU-Mは有意な減少を示さなかった。試験化合物は、CFU-GM及びCFU-MIXに関しては有意な違いが観察されなかった。DMSOを含む半固体の対照培養と他の対照培養の間には有意な相違は見られなかった。

【0128】

前CFU培養は、FCM細胞選別器を使って単離した成人の骨髓 $CD34^+CD38^-$ 細胞から始めた。新規化合物を14日間の一次液体培養に様々な濃度で添加した。 IC_{50} は、二次メチルセルロース培養のあと全クローン原性アウトプットから得られた用量反応曲線を基に計算した(表8)。効果はCFUの場合と類似のレベルであったが、26はCFUよりも前CFUにより高い活性を示した。

【0129】

実施例24: CDK阻害剤の抗有糸分裂活性

中期停止のアフリカツメガエルの卵抽出物をBlowが以前述べた方法(「J. Cell Biol.」1993;122:993)で調製し、液体窒素中に保存した。細胞膜のないアフリカツメガエルの精子核は、Blow及びLaskeyが述べた方法(「Cell」1986;47:577)で調製した。解凍後、抽出物は25 mMのホスホクレアチン、 5μ g/mlのクレアチンホスホキナーゼ、 250μ g/mlのシクロヘキシミド、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (DNA合成検定用)などで補足した。細胞膜のない精子核を3 ng/mlの最終精子濃度のDNA抽出物に加え、次に試験対象のCDK阻害剤を様々な濃度で添加した。中期核に集められた精子核(完全期凝縮の核膜を有している)の量を評価することにより、添加後1.5時間目に、様々なCDK阻害剤による中期促進要因阻害効果をモニターした。DNA合成は、0.3 mM CaCl_2 を添加することにより抽出物を静止期状態にし、3時間後TCA共沈殿により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 取り込みの全量を測定することにより評価された。

【0130】

0.1 - 2μ Mの濃度のCDK阻害剤(表9を参照の事)で、染色体は極めて凝縮度の高い状態のままであり、核膜は観察されなかった。 $4\text{-}6 \mu$ M及びそれ以上の濃度で、静止期の核が部分

10

20

30

40

50

的に凝縮を失った染色質と無傷の核膜を伴って現れた。試験対象CDK阻害剤 1 - 5 μM で、複製が有意に阻害された。阻害効果が検出可能となるには、静止期抽出物を最初15分間培養すればおそらく十分である。

【0131】

(表9) 3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体の抗有糸分裂活性

置換基			MPF 活性阻害	DNA 合成阻害
R5	R7	R3	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
3-ヒドロキシプロピル アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1.4	4.2
3-ヒドロキシプロピル アミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	0.5	0.4
3-ヒドロキシプロピル アミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	2.6	3.7
(R)-1-(ヒドロキシエチル) プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.8	1.5
(R)-1-(ヒドロキシエチル) プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	0.5	0.65
(R)-1-(ヒドロキシメチル) プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.22	0.3

10

【0132】

実施例25: 新規化合物のインビトロにおける細胞毒性活性

本発明者らは以下のような細胞株を使用した: HELA (ヒト子宮頸癌)、MCF7 (ヒト乳癌)、NIH 3T3 (マウス線維芽細胞)、HOS (ヒト骨原生肉腫)、HL 60 (ヒト前骨髄細胞白血病)、G 361 (ヒト悪性黒色腫)、K562 (ヒト赤白血病)、CEM (ヒトリンパ芽球性白血病)。試験対象薬剤は6種類の濃度で細胞培養物に添加し、37°C、5% CO₂で3日間保存した。全ての細胞株は10% (v/v) のウシ胎児血清及びLグルタミンで補足したDMEM培地(Gibco BRL)で成長させ、加湿環境下37°C、5% CO₂に維持した。96ウェルプレートの各ウェルに10⁴の細胞を接種し、少なくとも2時間かけて安定させ、その後試験対象の化合物を200~0.2 μM の様々な濃度で三通りに添加した。薬剤添加の3日後カルセインAM溶液 (モレキュラー・プローブス)を加え、細胞に浸透させるため1時間置いた。生育可能な細胞の蛍光をフルオロスキャン・アセント(マイクロシステムス)を使って定量した。GI₅₀ 値、つまり腫瘍細胞の50%に致死となる薬剤濃度は、得られた用量反応曲線を基に計算した (図6)。

30

【0133】

新規化合物の細胞毒性を様々な組織発生源、及び種の起源の細胞株のパネルに関して試験した(表10)。試験された腫瘍細胞株のすべてに対してより高い活性が観察された。特に、新規誘導体の高い効果は、細胞周期に関連する蛋白質、例えばHL-60、BT549、Hela、U2 OS、MDA-MB231、およびSaos2などが様々な突然変異又は欠失を有する細胞株に見出された。これらの物質が、腫瘍抑制遺伝子つまりp53やRbなどが種々に変性した腫瘍にも同様に有効であることが示される。この観察より、新規の化合物が、生物活性がp53の状態に依存しているフラボピリドール及びその関連化合物とは異なるという点が重要である。

40

【0134】

(表10) 異なる癌細胞に対する新規化合物の細胞毒性

置換基			CEM	B16
R5	R7	R3	GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	45	47
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	40	41
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	メチル	35	40
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	2.3	3.2
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.7	2.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	3.4	4.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	2.8	4.3
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	32	38
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	35	41
2-ヒドロキシエチルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	メチル	15.5	18.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	メチル	8.9	9.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	アニリン	メチル	10.2	12.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	メチル	13.4	14.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	メチル	8.9	9.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	メチル	6.5	7.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	メチル	12.4	15.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-ブロモアニリン	メチル	8.5	8.6
2-ヒドロキシエチルアミノ	4-クロロアニリン	メチル	7.6	8.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	メチル	5.7	6.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	メチル	16.2	17.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	5.6	8.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	メチル	9.4	10.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	メチル	14.5	16.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	メチル	15.4	16.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	メチル	10.8	9.3
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	メチル	13.5	14.2

10

20

2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	メチル	3.5	4.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	メチル	2.8	3.1
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	メチル	1.5	2.1
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	1.8	2.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	3.5	4.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	4.2	3.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	メチル	2.8	4.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	2.1	3.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	メチル	1.5	2.8
2-ヒドロキシエチルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	メチル	5.8	7.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	12.4	13.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	メチル	5.6	6.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	8.9	9.4
2-ヒドロキシエチルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	メチル	10.3	11.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	メチル	12.4	14.2
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	25	37
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	21	32
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	25	38
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	14	28
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1.5	2.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	2.4	3.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	2.2	2.3
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	24	28
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	26	42
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	9.2	15.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	8.5	12.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	13.2	18.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	9.4	16.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	7.9	11.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	4.5	5.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	18.4	25.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ブromoアニリン	イソプロピル	6.5	9.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	6.7	9.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	4.7	7.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	12.2	19.6
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	7.8	9.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	10.5	12.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	13.8	19.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	18.5	23.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	11.9	16.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	11.5	19.1
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	3.1	6.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	1.9	2.1
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	1.2	2.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	1.6	2.9
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	4.7	6.2

10

20

30

40

R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	3.5	5.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.8	3.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	3.1	5.6
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	2.5	4.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	4.6	8.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	11.4	18.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	4.6	9.9
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	7.9	13.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	11.6	19.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	13.1	18.6
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	18	29
3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	15	33
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	21	34
2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	14	28
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.5	1.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	1.4	2.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	1.2	1.7
3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	15	18
2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	16	22
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	4.2	5.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	アニリン	イソプロピル	2.5	3.6
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	9.5	14.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	7.6	12.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	5.8	9.1
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	2.7	4.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-ブロキアニリン	イソプロピル	5.8	11.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	4.1	5.7
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	2.9	4.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	2.5	4.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	6.7	9.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-ヒドロキシベンジルアミノ	イソプロピル	4.9	8.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	8.7	10.9
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	12.5	14.6
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	14.5	18.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセチルベンジルアミノ	イソプロピル	8.6	9.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	9.7	9.1
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	1.2	3.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.7	1.1
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.4	1.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.6	2.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.7	2.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.2	2.7
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	0.9	1.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	1.3	2.7
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	1.5	2.5

10

20

30

40

R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	2.6	4.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	8.2	12.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	イソプロピル	2.6	4.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	イソプロピル	3.5	4.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ	イソプロピル	8.4	9.7

【0135】

実施例26：新規化合物は植物細胞に対して細胞毒性効果を持ち、そのアポトーシスを誘導する 10

新規化合物について、タバコ・カルスの細胞毒性(除草効果)及び細胞死誘導に関する生物検定法も行なった。試験対象の化合物はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、その溶液を蒸留水で 10^{-3} Mに薄めた。その保存溶液はタバコ生物検定法に用いられる 10^{-8} M から 10^{-4} Mまでの濃度の各々の培養液で更に希釈した。培養液中の最終DMSOは0.2%を超えなかった。サイトカニン依存性のタバコ・カルス(Nicotiana tabacum)用ウィスコニン38μラシゲ・スクーグ培地は1リットル当たり次の成分を含む：4μmolのニコチン酸、2.4μmolの塩酸ピリドキシン、1.2μmolのチアミン、26.6μmolのグリシン、1.37μmolグルタミン、1.8μmolのミオイノシトール、30gのショ糖、8gの寒天、5.37mmolのαナフチル酢酸、及び0.5μmolの6-ベンジルアミノプリン。3週間毎に植え継ぎを行なった。生物検定の14日前に、カルス組織を6-ベンジルアミノプリンを含まない培地へ移した。化合物を2つの異なる濃度 (10^{-5} M及び 10^{-6} M)の6-ベンジルアミノプリンを用いて試験した。成長阻害活性は、4週間の培養の後、新鮮なカルスの重量増加から決定した。各試験濃度について5つの反復試験区を設け、試験はすべて少なくとも2回反復して行なった。阻害活性は 10^{-8} Mから 10^{-4} Mの6-ベンジルアミノプリンの成長反応曲線と比較し、 IC_{50} は化合物毎に 10^{-5} Mから 10^{-6} Mの6-ベンジルアミノプリンについて計算した(図7)。図7は化合物17の阻害効果を示している。

20

【0136】

(表11) インビトロで培養されたタバコ植物細胞に対する新規化合物の細胞毒性

置換基			10 ⁻⁵ M BAP	10 ⁻⁶ M BAP
R5	R7	R3	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	48
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	43
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	37
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	28
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	45
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	>50	>50
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	36
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	32
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	28
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	14
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	48
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	>50	>50
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	45	5.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	48	6.2
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリノ	イソプロピル	36	2.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリノ	イソプロピル	>50	12.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	28	1.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリノ	イソプロピル	>50	>50
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-ブモアニリノ	イソプロピル	38	4.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリノ	イソプロピル	35	3.9
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリノ	イソプロピル	26	1.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリノ	イソプロピル	48	8.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	45	12.4
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	>50	28.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	>50	14.8
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	>50	12.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	46	6.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	>50	29.7
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	25.7	1.3
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	49	8.3
2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	28
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	25
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	23
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	11
3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	45
2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	>50	48
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	アニリノ	イソプロピル	42	4.8

10

20

30

R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-5-アミノアニリン	イソプロピル	38	4.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	イソプロピル	26	1.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	イソプロピル	>50	9.6
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	イソプロピル	18	1.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-プロモアニリン	イソプロピル	>50	>50
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-クロロアニリン	イソプロピル	24	2.3
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロアニリン	イソプロピル	25	1.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロ-4-アミノアニリン	イソプロピル	16	0.9
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	38	4.2
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アセトキシベンジルアミノ	イソプロピル	36	8.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	>50	21.6
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	イソプロピル	>50	10.7
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	イソプロピル	>50	9.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	イソプロピル	38	3.7
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	>50	19.4
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	イソプロピル	15.6	0.4

10

20

30

40

50

【0137】

表11はインビトロで培養したタバコ細胞の成長に対する新規化合物の阻害活性結果を示している。3,5,7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体のほとんどが、インビトロ成長に対して顕著な阻害活性を示した。更にこういう化合物は、植物細胞のアポトーシスを誘導(植物細胞の死滅)することも強力な抗有糸分裂を誘導することもできる(図8)。本明細書で提示された結果は、新規化合物が除草効果を持っていることを示している。

【0138】

実施例27: 植物細胞における新規化合物によるアポトーシスの誘導

ソラマメ(*Vicia faba* L.)をホーランド溶液中25℃で発芽させた。約2cmの長さの主根を持つ実生を新しいcdk阻害剤で処理した。濃度は20-300 mM、期間は2時間、6時間、12時間、24時間、及び48時間であった。

【0139】

抗体

CDC-2は、Bogreらが述べた(1997)ように、cdc2Ms(Hirtら、1991)の最後の16アミノ酸に相当するペプチド(RITARGALEHEYFKDIK)に対して調製されたウサギのポリクローナルAbを用いて検出した。有糸分裂細胞のリン酸化エピトープに対するモノクローナル抗体MPM-2は、P.Rao博士(テキサス大学、テキサス医療センター、ヒューストン)の好意によって提供された。微小管構造は、 α チューブリンに対するマウスのモノクローナル抗体DmlA(シグマ)により、または α , β チューブリン・ヘテロマーに対するウサギのアフィニティー精製抗体により検出した。 γ チューブリンはマウスのモノクローナル抗体TU-31、またはウサギのアフィニティー精製ポリクローナル抗体により検出した(Novakovaら: Cell Motil. Cytoskel. 33,1996: 38-51)。イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)及びインドカルボシアネート(Cy3)結合抗マウス及び抗ウサギ抗体は、ジャクソン・イミュノリサーチ・ラボラトリーズ(米国ペンシルバニア州ウェストグローブ)のものであった。アルカリホスファターゼと結合した抗マウス抗体はプロメガ・バイオテク(米国バージン諸島マジソン)のものであった。

【0140】

蛍光抗体染色

根端は、微小管安定化緩衝液(MTSB; 100mM PIPES, 1 mM MgSO₄, 2.0 mM EGTA, pH 6.9)の3.7%パラホルムアルデヒド中に1時間固定した。MTSBで洗浄後、根端はプロテアーゼ阻害剤(0.3 mMロイペプチン、1.0 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド)を含むMTSBの1%セルリシン(カルビオケム)中で30分間消化させた。洗浄後、根端はポリ-L-リシンでコーティングしたスライド上で押し潰し、その後、細胞は100%メタノール中に-20℃で10分間固定し、室温でMTSSBの1%トリトンX-100を使って30分抽出した。洗浄後、PBSスライ

ドは室温で1時間、又は4℃で一晩、一次抗体と一緒にインキュベートした。全ての抗体はPBSの2% BSAで希釈した。抗体TU-31は希釈なしの上澄み液として、抗体DMA1とMPM-2は500倍希釈で使用した。 α 、 β チューブリンヘテロ二量体及びgチューブリンに対するポリクローナル抗体は5倍希釈であった。スライドをPBSで洗浄後、200倍希釈の二次蛍光色素結合の抗体と一緒に室温で45分間インキュベートした。試料は二次抗体を洗い流した後、PBS(1 μ m/mg)の4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)で10分間染色した。スライドは MOWIOL 4-88 (カルビオテック、ルサーン、スイス)に載せ、100x1.4標準対物レンズ、落射照明、及び35mmカメラを備えたオリンパスBX60顕微鏡で観察した。

【0141】

BrdUTPによる DNA鎖断片の標識

10

固定、酵素による消化、ポリLスライド上での押し潰し、その後のメタノールによる固定は、蛍光抗体法で述べたのと同じであった。次に三リン酸ブロムデオキシウリジン(シグマ)及び末端のデオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ(ペーリンガー)を含む反応がスライドに対して行なわれ、酵素反応を37℃で40分間継続した。PBS緩衝液で洗浄後、スライドは抗BrdU MoAb溶液(アマシャム、バスキンハムシャイヤ、UK)及び二次抗マウスFITS結合Ab (シグマ)と一緒にインキュベートした。二重標識として、スライドは抗BrdU Abと一緒にインキュベートした後、cdc-2に対する一次Ab又は抗チューブリンmo Abと一緒にインキュベートした。スライドはDAPIでDNAの染色を行ない、蛍光抗体法で述べたように装置に載せ観察した。

【0142】

20

DNA 抽出及び電気泳動

根端は液体窒素中で均質化し、CTAB溶解緩衝液 (2% CTAB w/v、0.1 M トリス、20 mM EDTA、pH 8.0、0.2% β -メルカプトエタノール)中65℃で5分間インキュベートした。次に試料をクロロホルム/イソアミルアルコール/水で抽出し、エタノールで沈殿させた。DNA試料はTE緩衝液に再び懸濁し、電圧 2 V/cmで40分間電気泳動を行なった。

【0143】

観察

新規誘導体は、ソラマメの根端細胞の細胞周期の進行と微小管組織におけるCDKの機能に対しどのような役割を果たしているのかを研究するために用いられた。試験対象薬剤は、免疫精製されたソラマメ及びアルファルファのcdc2キナーゼ活性を阻害した。A型及びB型サイクリン並びにcdc2 遺伝子の転写レベルは処理された根端で減少したが、D型サイクリン遺伝子のmRNAレベルは影響を受けなかった。G1/SとG2/Mの調節点で一過性の停止が観察されたが、これは cdc2キナーゼ阻害が両方の移行に影響を与えていることを示している。通常は無処置の双極紡錘体とは対照的に、薬剤で処理された中期細胞では、異常に短くて凝縮した動原体の微小管繊維が観察された。こういう微小管は動原体の近くにランダムに配列され、染色体と結合していた。従って、染色体は中期板上には配列されないが円形に配列され、動原体は内側を染色体腕は外側を指す。微小管の核形成に何らかの役割を果たしている γ -チューブリンも単極紡錘体の中心に配置される。ある特定のCDK薬剤によりCDC2キナーゼの阻害と後の有糸分裂の異常が観察されたが、これはこの酵素が双極紡錘体構造に到るある段階を調節していることを示している。こういう化合物はインビボで種々の植物細胞のアポトーシスも誘導している(図 8)。

30

40

【0144】

実施例28: 新規化合物による老化の阻害

この実施例では、ヒトの二倍体線維芽細胞 (種々の継代レベルのHCA細胞: 継代25 - 指定されたHCA25; 継代 45 - 指定された HCA45; 継代80 - 指定されたHCA80)が、 β ガラクトシダーゼ活性用に染色された。培養細胞から培地を取り除き、細胞はPNSで2度洗浄し、PBS中に2%のホルムアルデヒドと0.2%のグルタルアルデヒドを含む固定溶液で固定した。細胞は室温で5分培養し、PBSで2度洗浄した。次にクエン酸・リン酸緩衝液(pH 6.0)にフェリシアン化カリウム(5 mM)、フェロシアン化カリウム(5 mM)、MgCl₂ (2 mM)、X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)(1 mg/ml)を含む溶液2-3 m

50

1の中で1時間から16時間、37℃の条件（CO₂なし）で細胞を培養した。この培養期間後、青色の細胞が存在するかどうか細胞の試料を観察した。青色細胞があるということはX-galが切断された（当然老化細胞）を示している。この実験では、基質に存在するβガラクトシダーゼの作用ゆえに老化細胞だけが染色され、それ以外の細胞は染色されない（図9）。

【0145】

（表12）ヒト線維芽細胞の培養物における老化細胞の数に及ぼす新規化合物の影響

置換基			老化細胞 (%)		
R5	R7	R3	HCA25	HCA45	HCA80
対照			3	3	36
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	4	4	38
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	4	5	35
クロロ	3-クロロアニリン	イソプロピル	3	4	33
H	3-クロロアニリン	イソプロピル	5	3	31
H	3-クロロアニリン	H	5	5	24
H	3,4-ジヒドロキシベンジルアミノ	H	4	6	29
H	アニリン	H	5	6	25
H	3-クロロ-5-アミノアニリン	H	3	4	26
H	3-クロロ-4-カルボキシアニリン	H	2	5	26
H	3-カルボキシ-4-クロロアニリン	H	2	4	21
H	3-カルボキシ-4-ヒドロキシアニリン	H	3	5	29
H	4-ブモアニリン	H	4	4	28
H	4-クロロアニリン	H	3	6	27
H	3-アミノ-4-クロロアニリン	H	3	3	21
H	3-クロロ-4-アミノアニリン	H	4	3	26
H	2-ヒドロキシベンジルアミノ	H	3	3	18
H	3-ヒドロキシベンジルアミノ	H	4	3	28
H	2-アセトキシベンジルアミノ	H	5	6	31
H	3-アセトキシベンジルアミノ	H	4	5	28
H	2-アセチルベンジルアミノ	H	3	5	28
H	3-アセチルベンジルアミノ	H	3	6	29
H	2-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミノ	H	3	3	20
H	2-ヒドロキシ-3-メチルベンジルアミノ	H	2	3	17
H	2-ヒドロキシ-3-クロロベンジルアミノ	H	3	3	18
H	2,6-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	H	2	3	21
H	2,3-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	H	3	4	23
H	2,5-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	H	4	5	23
H	2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシベンジルアミノ	H	2	2	18
H	2,3-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	H	3	3	21
H	2,5-ジヒドロキシ-4-クロロベンジルアミノ	H	4	3	21
H	2-アミノ-6-クロロベンジルアミン	H	3	3	16
H	3-アミノ-4-クロロベンジルアミン	H	4	5	21
H	2,3-ジアミノ-4-クロロベンジルアミン	H	3	3	18
H	[(R,S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]	H	4	5	23
H	[N-(3,4-ジヒドロキシベンジル-N-メチル)アミノ]	H	4	4	22
H	[N-(2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル)-N-メチル]アミノ]	H	3	5	24

【0146】

表12に示されているように、継代の数が増えるに従って色素の色は濃くなっていった。古い細胞では明るい青からほとんど不透明に近い色まで青色の細胞のみであった。三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンは老化を遅らせる働きの方ではあまり活発ではなく、そのため詳細な結果は示さなかった。一方、一置換及び二置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体は80継代後も老化細胞をかなり低いレベルに抑えられるほど極めて有効であった。ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン環のあらゆる可能性のある置換の中で、R7が最も効果的であった

。

【0147】

実施例29: 新規化合物は腫瘍細胞でアポトーシスを誘導する

細胞死の中でもアポトーシス型と壊死型の違いを検出するため、独立した2つの方法、すなわち蛍光顕微鏡による形態評価及びTUNEL技術を使った流動細胞測定法によるDNA断片の分析を用いた。

【0148】

アポトーシス及び細胞周期分布の決定

顕微鏡:

細胞の核形態は、0.1 mg/mlのリン酸緩衝液生理食塩水(PBS)中で調製し最終濃度2 µg/ml 10
1で培地へ追加された蛍光染色ヘキスト33342 (λ_{Ex} 最大 346 nm; λ_{Em} 最大 460 nm)(シグマ)、及び100 µg/mlのPBS中で調製し最終濃度2 µg/ml (リザード、1995)で培地に追加されたエチジウム・ホモ二量体(EB) (λ_{Ex} 最大540 nm; λ_{Em} 最大 625 nm)を用いて分析した。試料毎に100の細胞を計数し、アポトーシスの割合を決定した。

【0149】

TdT媒介 dUTP ニック端の標識 (TUNEL):

対照及び新規化合物処理の細胞培養物はPBSで洗浄し、氷上で15分間、1%の緩衝ホルムアルデヒド(pH 7.4)で固定した。細胞はPBSで洗浄後、70 %の冷却(-20°C)エタノールで透過性を与えた後4 °Cに移し、少なくとも1時間保った。PBSで再水和した後、細胞には50 µl/ウェルのTUNEL反応混合物(バーリンガー・マンハイム)で標識した。細胞はこの溶液中3 20
7°Cで40分間インキュベートし、PBSで洗浄後、5 µg/ml EB及び0.1 %のRNaseを含む500 µl PBSに再び懸濁させた。4°Cで30分間インキュベート後、細胞毎に緑 (FITC-dUTP)及び赤 (EB-DNA)の蛍光をFACScan流動細胞測定器(ゴルクジカ、1993)で測定した。陰性の対照(TUNEL反応混合物の代わりに、末端トランスフェラーゼなしにウェル当たり50 µlの標識溶液と一緒にインキュベートされ固定化され透過性を与えられた細胞) 及び陽性の対照(DNA鎖断片を含むDNase I (100 µg/ml)と一緒にインキュベートされ固定化され透過性を与えられた細胞)も各実験設定に含まれた。

【0150】

アポトーシス及び FACSによる細胞周期分析:

細胞(1.10^6 /ml)は濃度70 µMのOC誘導体を含む(又は含まない)6ウェルプレート上で、37 30
°C及び5% CO₂の条件下3-24時間培養した。培養細胞はペレット状にした後、ハンクの緩衝塩溶液で洗浄し、96%エタノールに-20° Cで一晩固定した。低分子量のアポトーシスを起こしたDNAをクエン酸緩衝液で抽出し、RNAはRNAアーゼ(50 µg/ml)を使って切断した。DNAは臭化エチジウムで染色し、細胞は488 nmのシングルビームレーザー(ベクトン・ディッキンソン)を用いて流動細胞測定器で分析した。

【0151】

新規化合物のアポトーシス促進効果

アポトーシス及び壊死の蛍光顕微鏡分析:

異なる用量の新規化合物で処理された細胞培養物のアポトーシスを顕微鏡下で検査した。アポトーシスを起こした細胞は非常に明るいヘキスト33342蛍光を示すが、生細胞はか 40
すかな蛍光しか示さない。アポトーシスを起こした後期の細胞又は二次壊死細胞は断片化された核を持ち、明るい赤色の臭化エチジウム蛍光を示す。一次壊死細胞は赤い蛍光を示すが、断片化された核は持たない。こういう様々な特徴は図9に示してある (化合物98と一緒に培養されたMCF-7細胞株)。

【0152】

図10は98、172、及び201と一緒に培養したKG1の顕微鏡検査の結果である。生細胞、アポトーシスを起こした細胞、壊死を起こした細胞(一次壊死で、続いてアポトーシスが起こらない)、及び二次壊死細胞(後期アポトーシスで壊死へ移行)は、新規化合物に 6時間、12時間、24時間、48時間、及び72時間接触させた後それぞれ評価した。3つの製品に関し、異なるアポトーシス誘導パターンが観察できた。172及び201と一緒にインキュベート 50

するとアポトーシス誘導は急速に起きたが、98と一緒にインキュベートした場合は緩慢であった。

【0153】

流動細胞測定器によるアポトーシスの検出及び細胞周期分析：

新規化合物によるMCF-7細胞のアポトーシス死の誘導は、TUNEL反応技術の使用により確認された(図9)。初期位相差顕微鏡検査により、CDKI処理MCF-7株はアポトーシス細胞の典型的な形態的特徴を示しており、これは後にCEM細胞の電子顕微鏡写真により確認されたことを示した(図10)。種々のサイトカイニン誘導体で処理したCEM細胞のDNA含量についての流動細胞測定分析によっても同一の結果が得られた(図11)。腫瘍細胞の広範囲なアポトーシスはサブG₀/G₁の百分率として測定されるが、処置6時間後にも細胞に開始された。細胞周期内にある細胞分布は、処置細胞におけるG₂/M期及びS期細胞が早い時期に消失することを示された(図11)。細胞死の機構を解明するため、アポトーシス過程を操作する実験を更に計画した。こういう実験の結果より、特異的阻害剤であるアクチノマイシンD及びシクロヘキシミドによりそれぞれ誘導されるDNA転写及び蛋白質翻訳の阻害は、合成CDKI誘導のアポトーシスに影響を及ぼさないことが示される。しかし、オカダ酸によるセリン/トレオニン・ホスファターゼの不活性化も特異的ペプチドYVADによるカスパーゼの阻害もCDK阻害剤誘導のアポトーシスを阻害した。それにも拘らず、特異的阻害剤である3アミノベンズアミドによるポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)活性の下方制御は、アポトーシス過程に影響を及ぼさなかった。合成CDKIにより引き起こされたアポトーシスにはRb蛋白質(110 kDa)の脱リン酸及びRb (105 kDa)の同時低発生型の出現が伴い、これは後に40 kDa免疫反応性のRb断片に切断され、急速に分解された(示されていない)。ラミンBとPARPの切断も検出されていることから、活性化されたカスパーゼが蛋白質を消化したものと考えられる。

【0154】

201との接触の結果、アポトーシスは既にインキュベーションの6時間後には検出されることが分かる。インキュベーション6~12時間後には、アポトーシスの集団は主にS期から始まっているようである。G₀-G₁期にあるアポトーシス細胞は24時間後には時間とともに増加する。インキュベートされた対照とアポトーシスを起こさなかった集団との間には有意な差は検出されなかった。

【0155】

実施例30：免疫抑制活性

特異的細胞免疫の最も重要なパラメーターの1つは、抗原又は多クローン性分裂促進因子に呼応するリンパ球の増殖反応である。哺乳動物の正常末梢リンパ球のほとんどが静止細胞を含んでいる。抗原又は非特異的な多クローン性分裂促進因子にはリンパ系細胞を活性化する能力が備わっており、これには細胞内機構(ミトコンドリアの活動、蛋白質合成、核酸合成、芽細胞の形成、及び細胞の増殖)の劇的な変化が伴う。リンパ球の増殖を選択的に阻害できる化合物は強力な免疫抑制剤である。リンパ球の増殖反応を測定するため、種々のインビトロ検定方法が開発された。最も良く使われているのが³Hチミジン取り込み法である。

【0156】

細胞増殖時に、細胞が2つの娘細胞に分かれる前にDNAが複製されなければならない。細胞の2倍化とDNA合成との間の密接な関係は、細胞増殖の評価にとってとても魅力的である。標識されたDNA前駆体を細胞培養物へ添加する場合、まさに分裂しようとしている細胞が標識ヌクレオチドをそのDNAへ取り込む。従来、こういう検定法には、放射性同位元素で標識したヌクレオシド、特にトリチウム標識チミジン([³H]-TdR)の使用が通常含まれる。細胞のDNAに取り込まれる[³H]-TdRの量は、液体シンチレーション計数法により定量化される。

【0157】

ヘパリン化されたヒトの末梢血を肘脈穿刺により健康なボランティアから得た。血液はPBS (1:3)で希釈し、単核細胞をフィコールハイパック密度勾配(ファルマシア、1.077 g/

ml)の遠心分離(2200 rpm、30分)により分離した。遠心分離の後、リンパ球をPBSで洗浄し、細胞培養用培地(RMPI 1640、2mM グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10% ウシ胎児血清、及び重炭酸ナトリウム)に再び懸濁した。

【0158】

標的密度1.100.000 細胞/mlに希釈した細胞をピペット(180 µl)で96/ウェルのマイクロタイタプレートに加えた。目的の試験濃度の4倍希釈液を20 mlずつ0時間においてマイクロタイタプレートのウェルに加えた。試験化合物は通常6つの4倍希釈液で評価した。日常的試験では、ウェルの最高濃度は266.7 µMであった。薬剤濃度はすべて二通り検査した。無刺激の対照を除くすべてのウェルを50 µlのコンカナバリンA (25 µg/ml)で活性化した。試験化合物を含む細胞のインキュベーションを37 °C、CO₂ 5%、湿度100%の条件下で72時間継続した。インキュベーション期間の終わりに、細胞は [³H]-TdRを用いて検定した。 10

【0159】

細胞培養物は37°C、CO₂ 5%の条件下、ウェル当たり0.5 µCi (保存溶液500 µCi/mlのうち20 µl)と一緒に6時間培養した。細胞を水中で溶解し、自動細胞収穫器を用いて、マイクロタイタプレートの形式の繊維ガラスフィルタ上にDNAを吸収させた。 [³H]-TdRを取り込んだDNAはフィルタ上に残ったが、取り込んでいない物質はフィルタを通過する。フィルタは一晩室温で乾燥し、10-12 mlのシンチラントの入った試料用袋の中に入れ密閉した。各フィルタに存在する [³H]-TdRの量(cpm)はベータプレート液体シンチレーション計数器のシンチレーション計測により決定した。免疫抑制剤(ED)の有効用量は次の式を用いて計算した: $ED = (CCPM_{\text{薬剤入りのウェル}} / \text{平均} CCPM_{\text{対照のウェル}}) \times 100\%$ 。ED₅₀ 値、すなわちリンパ球の50%の増殖を阻害する薬剤濃度は、得られた用量反応曲線から計算した。 20

【0160】

置換アデニンの免疫抑制活性を評価するため、多クローン分裂促進因子誘導のヒト正常リンパ球増殖の阻害能力を分析した(表13)。本発明者らのデータでは、これらの化合物の³Hチミジン取り込み活性は不十分なものしか示さないが、それでも、活性化されたリンパ球の増殖を効果的に阻害することを示している。インビトロ条件における新規誘導体の有効免疫抑制量はほぼ1-20 mMであった。

【0161】

(表13) 新規誘導体の免疫抑制活性

30

置換基			ヒトのリンパ球
R5	R7	R3	ED ₅₀ (μM)
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	34
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	28
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	メチル	25
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.2
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	9.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	6.5
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	12.4
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	14.7
2-ヒドロキシエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	27
3-ヒドロキシプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	21
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	16
2-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	0.8
4-アミノシクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	1.1
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	4.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	6.5
3-アミノプロピルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	9.8
2-アミノエチルアミノ	ベンジルアミノ	イソプロピル	11.5
2-ヒドロキシエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	17
3-ヒドロキシプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	12
ビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	7
2-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.2
4-アミノシクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	0.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	1.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	3.2
3-アミノプロピルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	4.5
2-アミノエチルアミノ	3-クロロアニリン	イソプロピル	6.7

10

20

30

40

【0162】

実施例31: 抗ウイルス活性

HIV-1及びHIV-2誘導の細胞壊死に対する化合物の活性をヒトリンパ球MT-4細胞において検査した。細胞(300 000 細胞/ml)は100 CCID₅₀ (1 CCID₅₀ は実験条件下で細胞の50%に細胞壊死を起こすウイルス量)のHIV-1又はHIV-2に感染させ、様々な倍率で希釈した試験化合物を含むマイクロタイタプレートの200 μlウェルに加えた。感染させた細胞培養物は、加湿したCO₂ 培養器中、37°Cで5日間培養した。ウイルスの細胞壊死力は、トリパンブルー染色法によりMT-4細胞の生存可能性を決定することにより求めた。結果は原型化合物との比較に基づいて表10に要約している。

【0163】

表14もMSV誘導によるネズミの胚の線維芽C3H/3T3細胞壊死に対する新規化合物の活性試験の結果を示している。細胞は48ウェルプレートの1mlウェルに接種し、80 PFU (プラーク形成単位)に60 - 90分間接触させた。その後ウイルスを除去し、適切な濃度の試験化合物を含む培地を加えた (ウェル当たり1 ml)。感染6日目に、細胞培養物のMSV誘導形質転換を顕微鏡下で調べた。結果は原型化合物のデータとの比較に基づいて表14に要約している。

【0164】

(表14) R9をPMP (N-(2-ホスホノメトキシプロピル)基) 又は PME (N-(2-ホスホノメトキシエチル)誘導体) (μg/ml) (R2 = NH₂)で置換した新規化合物の抗レトロウイルス活性。IC₅₀値 (μg/ml)。

R3	MSV	HIV-1		HIV-2	
PME 誘導体		MT-4	CEM	MT-4	CEM
アミノ	0,6	2,67	6.9	ND	ND
シクロヘキシルアミノ	0.26	5.7	>20	4.8	>20
シクロブチルアミノ	1.5	50	>20	49	>20
シクロペンチルアミノ	1.3	47	>20	45	>20
3-クロロアニリン	1.8	56	>20	57	>20
3-カルボキシ-4-クロロアニリン	0.9	45	>20	32	>20

10

R3	MSV	HIV-1		HIV-2	
PMP 誘導体		MT-4	CEM	MT-4	CEM
シクロブチルアミノ	3.78	3.4	4.5	5.8	8.5
シクロペンチルアミノ	2,54	3.2	4.1	4.6	8.3
3-クロロアニリン	6.32	10.1	>20	11.2	>20
3-カルボキシ-4-クロロアニリン	1.37	2.1	5.2	3.2	7.8

20

【0165】

式IのPMP(N-(2-ホスホノメトキシプロピル)誘導体)及びPME(N-(2-ホスホノメトキシエチル)誘導体)化合物のほとんどはインビトロで顕著な抗HIV活性を示した。試験化合物への感受性の面でHIV-1とHIV-2の間に違いはなかった。(R)-PMP化合物は2 - 3 $\mu\text{g/ml}$ でレトロウイルスを顕著に阻害し、100 $\mu\text{g/ml}$ で細胞毒性はなかった。その選択性指数(細胞毒性用量/抗ウイルス活性用量)は、原型化合物PMEのそれよりも優れていることを示した。PMEの(S)-鏡像異性体には顕著な抗レトロウイルス活性はなかった。(R)-PMPDはレトロウイルスの複製を見事に阻害 (EC_{50} 0.01 -0.1 $\mu\text{g/ml}$)し、100 $\mu\text{g/ml}$ で細胞毒性はなかった。抗ウイルス活性及び毒性の欠如の両方の面で、PMEA及び他の原型化合物よりも優れていることが分かった。HIV-1及びHIV-2に対する選択性指数は2000を超えていた。

30

【0166】

実施例32: 癌細胞における腫瘍抑制因子p53の誘導
細胞培養及び処置

ヒト子宮頸癌種(HeLa)、ヒト乳癌腫(MCF-7、BT549及びBR474)、ヒト骨肉腫(HOS)、ヒト結腸癌種(HT29)、ネズミ線維芽細胞(T221acZ)、及びヒト黒色腫(Arn8)細胞株から得た細胞株を10%のウシ胎児血清で補足したダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)で培養した。試験化合物は、ジメチルスルホキシド(DMSO)の50mM保存溶液から最終濃度20 μM で培地に加えた。対照の細胞には等量の DMSOを加えた。

40

【0167】

p53依存性転写活性の分析

ヒト黒色腫細胞株Arn8及びネズミ線維芽細胞細胞株T221acZ (いずれもp53応答性レポーターコンストラクトpRGCD Δ foslacZを導入されており安定)(Frebungら、Cancer Res., 52,1992-6976)の β ガラクトシダーゼ活性を決定した。全 β ガラクトシダーゼ活性を決定するため、細胞を0.25 M トリス pH 7.5で3度凍結・解凍サイクルを繰り返し溶解した。溶解産物はSambrookらが述べている方法(Mol. cloning、ニューヨーク、1989)で検定した。

【0168】

抗体

50

(a)D0-1、D0-2、及び1801モノクローナル抗体はp53蛋白質のN末端部位を認識し、モノクローナル抗体D0-11及びD0-12はp53蛋白質のコア領域の異なるエピトームを認識し、モノクローナル抗体Bp53-10及びPab421は p53蛋白質のC末端領域を認識する。

(b)モノクローナル抗体118はp21^{WAF1}を認識する。

【0169】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法及び免疫ブロット法

直接免疫ブロット法のため、熱いラエムリ電気泳動試料緩衝液に細胞を集めることにより、全細胞蛋白質溶解産物を調製した。次に蛋白質を10%ゲルのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分離し、トランスファー緩衝液(240 mM トリス、190 mM グリシン、及び20% メタノール)150mAを用いてBio.Rad ミニトランスブロット電気泳動トランスファーセルのニトロセルロース膜上に転写した(4℃、2時間)。それと平行して、予め染色した分子量マーカー(Bio-Rad)を泳動した。ブロッティングされた膜はPBSの0.1%トウイーン20及び5%のミルクで2時間ブロッキングし、プローブとしてモノクローナル抗体と一緒に一晩置いた。PBSと 0.1%トウイーン20で3度洗浄後、ペルオキシダーゼ結合のウサギ抗マウス免疫グロブリン抗血清(ダコ、デンマーク)(1000倍希釈)を二次抗体として用いた。ペルオキシダーゼの活性を視覚化するため、メーカーの指示に従って、アマシヤムのECL試薬を使用した。

【0170】

形質移入実験

MCF7-DDp53細胞株は、ドミナントネガティブ切断型マウスp53 (アミノ酸残基1-14位及び302-390位を含みCMVプロモーター(37)の制御下にある)をコードしたプラズミドpCMVneo nDDp53で安定形質移入することにより、MCF-7親細胞株から得られた(37)。対照の細胞株MCF-7neoはpCMVneoベクターをMCF-7細胞に形質移入することにより得られた。形質移入は供給業者の勧めに従って、エフェクテン形質移入試薬(QIAGEN、ドイツ)を用いることにより行なった。安定形質移入体は2 mg/ml G418サルフェート(ライフテクノロジーズ)を選んだ。MCF-7Ddp53細胞株におけるDdp53ミニ蛋白質の発現は、Bp53-10 モノクローナル抗体を用いる免疫ブロッティング法で調べた。独立に単離したMCF-7Dp53のクローン9、12、及び14(高レベルのDdp53 ミニ蛋白質を発現)及びMCF-7-neoのクローン3、4、及び7を使用した。

【0171】

25は突然変異型ではなく、野生型の p53蛋白質を誘導する

まず本発明者らは 25の適切な実験用の濃度を決定した。1μMから100μMまでの増加性濃度で MCF-7 (wt p53)細胞を12時間処理し、モノクローナル抗体D0-1 (図 1A)を用いてp53蛋白質の発現を分析した。25 の濃度20-100μMはこれらの細胞でp53蛋白質のレベルに影響を及ぼすことが証明された。図 1Aに示すように、20μMの 25 により誘導される蛋白質発現レベルと100μMにより誘導される発現との間には有意な差異はなく、追加試験には濃度を選択した。第2に、時間として6時間、12時間、及び24時間を選んだ。というのは蛋白質の発現レベルが安定状態に達したからである。図は、20μM 25処理後におけるp53の時間依存性の増加を示している。

【0172】

本発明者らは、MCF-7 (wt p53)、BT549 (mut p53)及びBT474 (mut p53)の乳癌細胞株、HT29 (mut p53)結腸直腸癌細胞株、及び骨肉腫細胞株HOS (mut p53)におけるp53蛋白質の発現を分析した。MCF-7細胞を20μM 25で6時間、12時間、及び24時間処理すると、野生型p53がかなり堆積する (図 2)。突然変異型p53を発現するBT549及びHOS細胞株を20μM 25に6時間、12時間、及び24時間接触させても、p53の誘導は見られなかった(図 2)。細胞株の25の感受性と野生型又は突然変異型p53の存在との間には相関関係は観察されなかった。

【0173】

25は突然変異型でなく、野生型の p53蛋白質を誘導する

まず本発明者らは 25の適切な実験用の濃度を決定した。1μMから100μMまでの増加性

10

20

30

40

50

濃度で MCF-7 (wt p53)細胞を12時間処理し、モノクローナル抗体D0-1 (Fig. 1A)を用いてp53蛋白質の発現を分析した。25 の濃度20-100 μ Mはこれらの細胞でp53蛋白質のレベルに影響を及ぼすことが証明された。図 1A に示すように、20 μ Mの25 により誘導される蛋白質発現と100 μ Mの25により誘導される発現との間には重大な差異はなく、従って追加試験には濃度20 μ Mを選択した。第2に、時間として6時間、12時間、及び24時間を選んだ。というのは蛋白質の発現レベルが安定状態に達したからである。図15は、20 μ Mの25処理後におけるp53の時間依存性増加を示している。

【0174】

本発明者らは、MCF-7 (wt p53)、BT549 (mut p53)及びBT474 (mut p53)の乳癌細胞株、HT29 (mut p53)結腸直腸癌細胞株、及び骨肉腫細胞株HOS (mut p53)におけるp53蛋白質の発現を分析した。MCF-7細胞を20 μ M 25で6時間、12時間、及び24時間処理すると、野生型p53がかなり堆積する (図 16)。突然変異型p53を発現するBT549及びHOS細胞株を20 μ M 25に6時間、12時間、及び24時間接触させても、p53の誘導は見られなかった(図 16)。細胞株の25の感受性と野生型又は突然変異型p53の存在との間には相関関係は観察されなかった。

【0175】

25誘導の wt p53は転写活性がありp21^{WAF1}誘導に関係している

25及びその関連化合物がp53蛋白質の活性化に及ぼす影響についても、ヒト黒色腫細胞株 Arn8及びp53応答プロモーターの制御下にある β ガラクトシダーゼの発現を行なうネズミ線維芽細胞細胞株T22LacZを用いて分析した。20 μ M 25(6時間、12時間、及び24時間)で処理したこれら細胞におけるp53の誘導は応答プロモーターの活性化をもたらし、ひいては β ガラクトシダーゼの発現に到った。25 で処理されたArn8及びT22lacZ細胞は固定され、X-gal 基質を用いて β ガラクトシダーゼの活性を顕微鏡下で観察した。その結果、DMSO処理の対照細胞(データは示していない)の青色細胞が1%未満であったのに対し、約25%が青色の細胞であった。Arn8細胞の β ガラクトシダーゼ全活性も比色検定法を用いて判定した。その結果は、処理後12時間及び24時間目に β ガラクトシダーゼの高い活性を示している。DMSO処理の対照に比べてp53蛋白質の転写活性があることをこれは示している。

【0176】

この転写活性はMCF-7細胞のp21^{WAF1} 発現を分析することによっても証明された。P53の誘導は4時間目に明らかとなったが、p21^{WAF1}蛋白質の高いレベルは25で処理後12時間目になって初めて観察された(図16)。wt p53を発現する細胞だけがp21誘導を伴って25に応答した。p21^{WAF1}誘導がp53応答性であることを確認するため、高レベルのドミナントネガティブ型Ddp53ミニ蛋白質を発現する安定形質移入された一連のMCF-7クローンを確立した。マウスp53配列の中でアミノ酸1-14及び302-390で構成されるこの蛋白質は、wt p53のC末端に結合し、p53依存性の転写を無効にすることが証明されている。対照のMCF-7neoクローンも、挿入断片のない主軸ベクターpCMVneoをMCF-7細胞に安定形質移入することにより作成された。高レベルのDdp53を発現しているクローン及び対照のクローンを25で処理し、p21^{WAF1} に特異的なモノクローナル抗体118による免疫ブロッティングを用いることにより、p21^{WAF1}の発現の検定法を行なった。P53転写活性を阻害するDdp53発現により、p21^{WAF1}誘導はMCF-7Ddp53クローンでは検出できなかった (図17)。

【0177】

以下の化合物は同じような結果をもたらしているが、最大の β ガラクトシダーゼ活性を誘導する試験化合物の濃度は互いに異なっていた。その結果は、 β ガラクトシダーゼ活性の最大値誘導濃度として表15に示してある。R3、R5、及びR7に疎水性の置換基を持つ三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンは、wt p53発現の強力な誘導剤であるように見える。

【0178】

(表 15) 野生型p53を発現したMCF-7 細胞における選別された三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンによるp53蛋白質及びp21^{WAF1} 蛋白質誘導効果

置換基			最大 β ガラクトシダーゼ 活性 濃度 (μ M)
R5	R7	R3	
4-メトキシベンジルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	34
ベンチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	28
オクチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	25
シクロペンチルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.2
シクロヘキシルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	1.5
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	9.5
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	ベンジルアミノ	メチル	6.5
4-メトキシベンジルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	12.4
ベンチルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	14.7
オクチルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	27
シクロペンチルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	21
シクロヘキシルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	16
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	0.8
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	4-メトキシベンジルアミノ	イソプロピル	1.1
4-メトキシベンジルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	4.5
ベンチルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	6.5
オクチルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	9.8
シクロペンチルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	11.5
シクロヘキシルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	17
R-(1-ヒドロキシメチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	12
R-(1-ヒドロキシメチル-2-メチル)プロピルアミノ	3-クロロアニリノ	イソプロピル	7

10

20

30

40

50

【0179】

実施例33: 選別された三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジンによる減数分裂阻害後のウシの卵母細胞及び胚の発達

卵母細胞の最終成熟期間中に、未成熟な卵母細胞は前期I、胚胞(GV)期、中期IIへと進行し、その段階で受精又は単為生殖の活性化が起きるまで再び成長が停止する。インビトロで胚を成長させる研究が過去10年にわたりかなり行なわれてきたにも関わらず、インビトロでの成熟、受精、及び培養後、胚盤胞段階まで成長するのはウシの卵母細胞のわずか30-40%である。最適とは言えない培養条件がこの貧しい結果の一原因であるのは疑いのないところではあるが、卵母細胞自体の内因性とその主な制限要因である。

【0180】

卵母細胞の発達を改善する新しい方法により、卵母細胞の「未成熟化」、すなわちインビトロで正常に成熟させる前にインビトロのGV段階で卵母細胞を保つかどうか調べられている。GV段階で停止状態を維持する条件下で卵母細胞をインビトロ培養するならば、より優れた発達能力を獲得する可能性を持つという仮説を立てている。

【0181】

卵母細胞の採取及びインビトロでの成熟 (IVM)

化学薬品は、特に言及しない限り、シグマケミカル社(ミズリー州セントルイス)から購入した。10 μ g/mlの表皮細胞成長因子(EGF)の保存溶液を調製し、分画後、使用まで-20℃で保存した。

【0182】

卵母細胞複合体(COC)は、屠殺された雌牛の子宮の2-8 mm卵胞を吸引することにより得た。改変リン酸緩衝液生理食塩水(PBS、36 μ g/mlのピルベート、50 μ g/mlのゲンタマイシン、及び0.5mg/mlのウシ血清アルブミン、シグマ画分V、cat # A-9647で補足)で4度洗浄後、約50のCOCグループを4ウェル皿(ヌンク、ロスシルディ、デンマーク)の成熟培地500 μ lの中に置き、39℃、CO₂ 5%空気中、最大湿度の条件下で24時間培養した。成熟培地は10 ng/mlのEGF及び10% (v/v)のウシ胎児血清(FCS)で補足した培地199である。

【0183】

精子の調製とインビトロ受精 (IVF)

IVFのために、COCをPBSで4度洗浄し、次に受精培地で洗浄後、ウェル当たり250 μ lの受精培地(25 mMのバイカーボネート、22mMの乳酸ナトリウム、1Mのピルビン酸ナトリウム、6 mg/mlの脂肪酸不含有BSA、及び10 μ g/mlのヘパリン-ナトリウム塩-184 U/mgを含むタイロード培地、カルビオテック、カルフォルニア州サンディエゴ)を含む4ウェルプレートに50のグループを移した。運動型精子は、パーコール(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン)不連続密度勾配(2.5 ml の90% パーコール上2.5 ml の45%パーコール)上の凍結融解精子(デアリーゴールドA.I.ステーション、マロー、アイルランド)を室温700gで20分間遠心分離することにより得た。90%画分の底から集めた生存可能な精子は、HEPES緩衝タイロード培地で洗浄し、100gで10分間遠心分離してペレット状にした。精子は血球計数器で計数し、適当な量のTALPで希釈して 2×10^6 精子/mlの濃度を得た。この懸濁液の250 μ lを各受精ウェルに加え、最終濃度 1×10^6 精子/mlを得た。プレートは加湿空气中5%のCO₂下39°Cで24時間培養した。 10

【0184】

インビトロ培養 (IVC)

胚培養は、改変合成輸卵管液体培地(SOF)の中で、鉱油の下に、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の加湿空气中39°Cで行なった(Carolanら、1995)。受精24時間後、卵丘細胞をPBS 2 ml中2分間激しく攪拌することにより露出し予定接合子を得た。接合子は PBSで4度洗浄、次にSOFで洗浄し、その後25 μ lの培養物小滴に移した。培地に移してから24時間後(すなわち受精48時間後、hpi)、ウシ胎児血清をその小滴(10%, v/v)に添加した。胚盤胞率は受精後6-8日目に記録した。胚盤胞数を推定するため、胚盤胞を風乾下スライド上に置き、100%エタノールで一晩固定した。その後ヘキスト33342(2.3% (w/v)クエン酸ナトリウム中10mg/ml)で染色し、上位蛍光顕微鏡(epifluorescence microscope)で観察した。 20

【0185】

卵母細胞のガラス化

成熟卵母細胞はDinnyesらが述べた方法(2000)を使ってガラス化した。成熟COCは0.1%のヒアルロニダーゼに短期間接触させ、その後ピペットを使用することにより部分的に露出させた。卵母細胞は20%のFCSで補足したTCM 199で3度洗浄し、次にTCM 199中 4% (v/v)のエチレングリコール + 20% FCSからなる平衡培地に39°Cで12-15分間懸濁した。平衡になった後、5-10個の卵母細胞を25%のエチレングリコール、5%のポリビニルピロリドン、TCM 199+20% FCS中0.4 Mのトレハロースからなるガラス化溶液の小滴で25-30秒間 3度リンスし、アルミ箔で覆ったスチールキューブの表面に滴下し、液体窒素への部分浸漬により-150°C及び -180°Cに冷却した。 30

【0186】

ガラス化した小滴は0.3 Mトレハロース溶液に3分間滴下することにより解凍した。その後、卵母細胞の生残は卵母細胞膜及び透明層の完全性を基に評価した。生残したガラス化解凍卵母細胞は単為生殖により活性化させ、上述の方法で培養した。

【0187】

卵母細胞の活性化

単為生殖活性化のため、卵母細胞はIVM後卵丘を完全に露出させ、室温でCaイオン透過孔 A23187に5分間接触させた後2.5 mMの6-ジメチルアミノプリン中3.5時間培養することにより活性化した(Liuら、1998)。次に卵母細胞は上述した方法で培養した。 40

【0188】

結果

本研究では、サイクリン依存性キナーゼの強力な阻害剤である16が、用量依存的に胚損傷を阻止することによりウシ卵母細胞の減数分裂回復を阻害することを本発明者らは示した(図18)。濃度30 μ Mでは60%を超える卵母細胞が阻止されたが、100 μ Mではほとんど全ての卵母細胞が阻止された。一方、対照では85%を超えるものが減数分裂を回復した。正常な成熟に適した条件下で行われた二次24時間培養の後、阻止された卵母細胞のほとんど全て(90%)が減数分裂を回復し中期IIへ進んだ。発達能力の点では、80 μ Mで24時間減数分裂停止を維持した卵母細胞は、成熟、受精、及びインビトロ培養ののち胚盤胞へ成長す 50

るという意味で、阻止されていない対照の卵母細胞と同じような能力を示した。阻止された卵母細胞と対照の卵母細胞との間の生存能力の違いを検出する方法として、低温保存法が用いられた。BL-1処理(40.2% 対 71.9%、 $P<0.05$)及び対照グループ(45.6% 対 81.7%、 $P<0.05$)の両方で、ガラス化及び活性化の後、卵母細胞の分割が有意に減少した。しかし、非処理卵母細胞(ガラス化卵母細胞から34.0% 対 非ガラス化卵母細胞から42.9%、 $P<0.05$)と比較して、BL-1処理の卵母細胞はガラス化(ガラス化から20.0% 対 非ガラス化分割卵母細胞から42.5%、 $P<0.05$ 、分割卵母細胞に基づく)ののち胚盤胞へ成長する確率は低かった。これらの結果は、続く発達能力を損なうことなくウシ卵母細胞を人工的な減数分裂停止状態に維持できること、及び能力の低い卵母細胞の発達を改善する方法にもなり得ることを示している(表16及び17)。

10

【0189】

(表16) ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン16を用いたウシ卵母細胞の減数分裂回復阻害がその後の発達に及ぼす効果

胚盤胞率											
		分割率		5-8 細胞		6 日目		8 日目		孵化	
処理	n	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
対照	211	167	79	89	42.1 ^a	29	13.7	57	27 ^a	28	49.1
BL1-50 ²	225	198	88	83	36.9 ^{ab}	35	15.6	64	28.4 ^a	24	37.5
BL1-100 ²	243	213	87	82	33.7 ^a	28	11.5	58	22.2 ^b	17	29.3

20

¹ 対照の卵母細胞はM199 + 105 FCS + 10 mg/ml EGF中24時間培養した。

² 16の処理後、対照条件下に24時間の成熟期間を置いた。

³ 同欄で異なる上付き数字の値は有意に異なる ($P<0.05$, χ^2 試験)。

【0190】

(表17) ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン16による減数分裂回復阻害後のウシ卵母細胞の活性化に及ぼすガラス化の影響

胚盤胞率												
		分割率		5-8 細胞		6 日目		8 日目		孵化		細胞数 平均 $\pm$ SEM(n)
処理	n	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	
対照	176	142	80.7a	60	34.1	33	18.7a	61	34.6a	7	11.5	76.6 $\pm$ 5.8 (54)
ガラス化	103	47	45.6a	12	11.6	5	4.8b	16	15.5b	0	-	82.7 $\pm$ 8.1 (13)
BL1 ²	121	87	71.9a	22	18.2	20	16.5a	37	30.6a	10	27.0	70.3 $\pm$ 7.2 (26)
ガラス化	87	35	40.2b	7	8.0	4	4.6b	7	8.0b	1	14.2	75.0 $\pm$ 11.7 (5)

30

40

【0191】

実施例34: 乾燥カプセル

5000カプセルであり、各カプセルが、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式I、II、及びIIIの化合物の1つを0.25 g含んでいる。

組成

活性成分	1250 g
タルク	180 g
小麦澱粉	120 g
ステアリン酸マグネシウム	80 g
ラクトース	20 g

50

調製工程：前出の粉末状の物質を幅0.6 mmのメッシュの篩上で押す。混合物の0.33gをカプセル充填装置を使ってゼラチン製のカプセルに移す。

【0192】

実施例35：ソフトカプセル

ゼラチン製のソフトカプセル5000、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式I、II、及びIIIの化合物の1つを0.05g含んでおり、次の方法で調製される。

組成

活性成分	250 g
ラウログリコール	2 リットル

調製工程：粉末状の活性成分をラウログリコール (Lauroglykol) (登録商標) (ラウリン酸プロピレングリコール、ガッテフォッセS.A.、セイントプリースト、フランス)に懸濁し、湿性粉碎機で粒子サイズ約1~3 μmにすり潰す。次に、混合物の0.419g分を各々カプセル充填装置を使ってゼラチン製のソフトカプセルに移す。

【0193】

実施例36：ソフトカプセル

ゼラチン製のソフトカプセル5000、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式I、II、又はIIIの化合物の1つを0.05g含んでおり、次の方法で調製される。

組成

活性成分	250 g
PEG 400	1 リットル
トウイーン 80	1 リットル

調製工程：粉末状の活性成分をPEG 400 (380と約420の間のMrのポリエチレングリコール、シグマ、フルカ、アルドリッチ、米国) 及びTween (登録商標) 80 (モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、Atlas Chem. Inc., USA、米国アルドリッチ、フルカ、シグマにより提供)に懸濁し、湿性粉碎機で粒子サイズ約1~3 mmにすり潰す。次に、混合物の0.43g分を各々カプセル充填装置を使ってゼラチン製のソフトカプセルに移す。

【図面の簡単な説明】

【0194】

【図1】3-イソプロピル-5-メチル-7-ベンジルアミノ-ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(■)、3-イソプロピル-5-クロロ-7-ベンジルアミノ-ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(▲), 3-イソプロピル-5-(4-hドロキシシクロヘキシルアミノ)-7-ベンジルアミノ-ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(●)によるCDK1/サイクリンBキナーゼ阻害の用量反応曲線。

【図2】ソラマメの細胞における3-イソプロピル-5-(4-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-ベンジルアミノピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(268)によるcdc2Msキナーゼ活性の特異的阻害。種々の濃度のロスコビチンの存在下において、ヒストンH1基質蛋白質のリン酸化によって測定された酵素活性。(A) ホスホイメジャー (B) 種々の濃度のロスコビチンで処理された細胞のcdc2Msキナーゼのインビボでの阻害 (D) ウェスタンブロッティング法により検出された全細胞抽出物の全cdk蛋白質レベル。対照 レーン(1)、268による処理48時間後 レーン(2)、Suc1結合cdksのウェスタンブロッティング法 - 対照レーン(3)、268による処理48時間後。

【図3】α及びβアドレナリン作動性受容体及びプリン作動性受容体と結合する作動薬又は拮抗薬が誘導するシグナル経路のスキーム。PAK - プロテインキナーゼA、Pi-3K-ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、Ga-蛋白質Gサブユニット、Gb,g - 蛋白質Gサブユニット、pKB - プロテインキナーゼB、NDPKA-アデニル酸キナーゼ、GFAB-アデニル酸キナーゼ、AC-アデニル酸キナーゼ、cAMP - サイクリックアデノシン-5'-一リン酸、P2Y-プリン作動性受容体結合アデノシン。

【図4】a. 成長曲線 CEM + 1, b. 成長曲線 CEM + 172, c. 成長曲線 CEM + 47。

【図5】新規プリン誘導体のCEM IC₅₀ とリンパ球のIC₅₀ の比較。星印の生成物は1つの試験システムでかなり活性が高いことを示している。

【図6】種々のピラゾロ[4,3-d]ピリミジンによるK562 (A)及びMCF7 (B)腫瘍細胞株の成

10

20

30

40

50

長阻害。細胞毒性はカルセインAMの存在下に決定された。活性は最大活性(阻害剤不在)の百分率で示される。E.2.1.C1: 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチルプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.44: 5-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン。

【図7】数個の三置換ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン誘導体によるタバコ・カルスの成長阻害。阻害活性は 10^{-6} 及び 10^{-7} M濃度のサイトカイニン6ベンジルアミノプリン(BAP)存在下に決定された。試験化合物16、26、33、及び269の構造は表4を参照の事。

【図8】ソラマメ細胞のDNA二本鎖切断の蛍光抗体法によるインサイチュー検出。細胞の染色: DNA切断の標識用FITC、クロマチン結合色素DAPI。A-B: DNA切断標識。B: クロマチン結合色素DAPI; A-B: 25 処理12時間後の核のDNA切断標識、クロマチンは既にアポトーシス性の断片化を起こしている(矢印)。C: 凝縮球状クロマチン・ドメインを持ったアポトーシス性の核。

【図9】基質X-gal (5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル-b-D-ガラクトピラノシド) (1 mg/ml)に対する β -ガラクトシダーゼの作用により青色に染色されたヒト線維芽細胞の老化細胞(B)、他の細胞は染色されない(A)。

【図10】新規ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン12によるMCF-7細胞のアポトーシス誘導。A MCF-7, アポトーシスを起こした細胞: 6時間、12、20 μ M; B MCF-7、二次壊死細胞(すなわちアポトーシス後の壊死)、12時間、12、40 μ M; C MCF-7、壊死細胞、24時間、12、40 μ M。アネキシンFITC V (Mol. Probes)及びヨウ化プロピジウム標識: アネキシン - 緑、PI - 赤。

【図11】アネキシン(緑の蛍光)及びヘキスト33258(青い蛍光)標識によるアポトーシスの検出。新規[4,3-d]ピリミジン14によるMCF-7の処理後オリンパスイメージ分析により分析したもの。A,B - 処理なしの対照; C,D - アポトーシスを起こした細胞(染色体の凝縮); A,C - 蛍光顕微鏡写真; B,D - 蛍光のイメージ分析。

【図12】a.98 b.172 c.201 とのCEM培養物における細胞における生存可能な細胞、アポトーシスを起こした細胞、壊死細胞、及び二次壊死細胞の顕微鏡検出(T: 単位は化合物とのインキュベーション時間)。

【図13】合成CDKによるアポトーシスの誘導。処理/未処理のCEM細胞の電子顕微鏡による超微細構造分析。E.2.1.C1: C33, 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチルプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン。

【図14】合成CDKIはCEM細胞のアポトーシスを誘導する - FACS研究。E.2.1.C1: C33, 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチルプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン。

【図15】25で12時間処理後、MCF-7細胞におけるp53蛋白質の濃度依存性誘導。p53の有意の誘導が、25の濃度20 μ Mにおいて(低い濃度と比較して)顕著に見られる。25の濃度を更に上げて、p53の誘導レベルの点でそれほど変わらないように見える。B: MCF-7細胞におけるp53蛋白質の時間依存性誘導。P53誘導は処理後30分で既に明らかであり、処理後2時間で最大に達した。次の時間帯でもP53レベルは変化なかった。細胞の溶解産物はすべて10% SDSゲル上で分離された。免疫ブロッティングはモノクローナル抗53抗体D0-1で行なわれた。

【図16】野生型又は突然変異型p53蛋白質を発現する細胞において、p53及びp21^{WAF1}誘導への25の影響。全細胞溶解産物は12.5% SDSゲル上で分離された。免疫ブロッティング

10

20

30

40

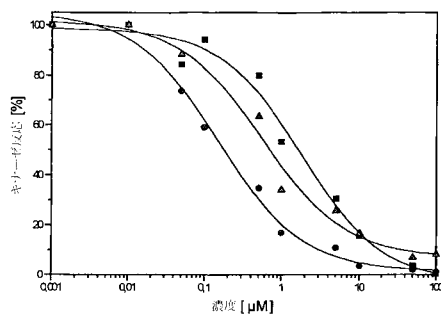
50

は、蛋白質の泳動量が等量であることを確認するため、モノクローナル抗p53抗体D0-1及び抗p21抗体118で、及びその後抗PCNA抗体PC-10を使って行なわれた。Aは、野生型p53を発現するMCF-7において、20 μ M 25がp53蛋白質及びp21^{WAF1}蛋白質を誘導できることを示している。一方、パネルB及びCは、突然変異型p53を発現するBT549及びHOS細胞において、20 μ M 25がこれら蛋白質を発現していないことを示している。

【図17】p53転写活性を阻害するドミナントネガティブ切断型マウスp53蛋白質(Ddp53)形質導入を用いて、20 μ M 25によるMCF-7細胞処理後、p53依存性p21^{WAF1}蛋白質の誘導を確認。全細胞溶解産物は12.5% SDSゲル上で分離された。免疫ブロッティングは、モノクローナル抗p53抗体D0-1、Bp53-10 (Ddp53検出用)、抗p21抗体118、及び泳動対照として抗PCNA抗体PC-10を用いて行なわれた。左側のパネルは、高レベルのDdp53を発現しているMCF-7Ddp53-9クローンを示している。25処理は突然変異型p53を発現する細胞で観察されたと類似の結果を示している。右側のパネルは、Ddp53のないMCF-7neo-7の対照クローンである。25処理により、p53蛋白質とp21^{WAF1}蛋白質の両方が誘導される。

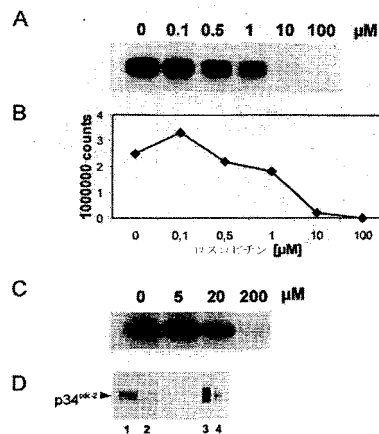
【図18】ウシ卵母細胞の減数分裂回復に関するピラゾロ[4,3-d]ピリミジン16の効果。未成熟卵母丘細胞複合体(COC、n=341)は16 (0-200 mM)の不在又は存在下、M199 + 3 mg/ml BSA中24時間培養。試験は二重に行われた(1グループ当たり合計約50 COC)。

【図1】



3-イソゾロピル-5-メチル-7-ベンジルアミノピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(■)、
3-イソゾロピル-5-クロロ-7-ベンジルアミノピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(▲)、
3-イソゾロピル-5-(4-ヒドロキシクロロヘキシルアミノ)-7-ベンジルアミノピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(●)によるCDK1/サイクリンBキナーゼ阻害の用量反応曲線。

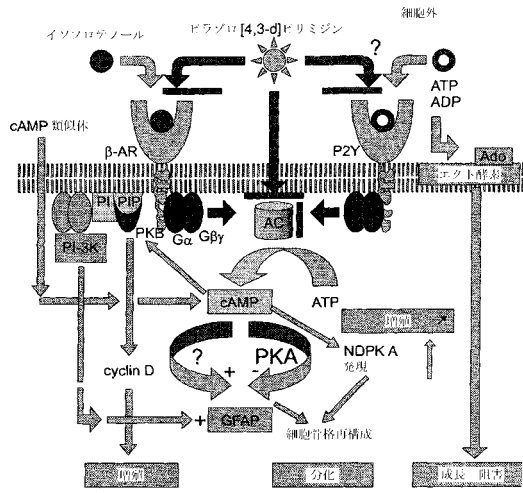
【図2】



ソラマメの細胞における3-イソゾロピル-5-(4-アミノクロロヘキシルアミノ)-7-ベンジルアミノピラゾロ[4,3-d]ピリミジン(268)によるcdc2Msキナーゼ活性の特異的阻害。種々の濃度のロスコピチンの存在下において、ヒストンH1基質蛋白質のリン酸化によって測定された酵素活性 (A) ホスホイメーダー (B) 種々の濃度のロスコピチンで処理された細胞のcdc2Msキナーゼのインビボでの阻害 (D) ウェスタンブロッティング法により検出された全細胞抽出物の全cdc蛋白質レベル。対照レーン(1)、268による処理48時間後レーン(2)、suc I結合cdksのウェスタンブロッティング法 - 対照レーン(3)。

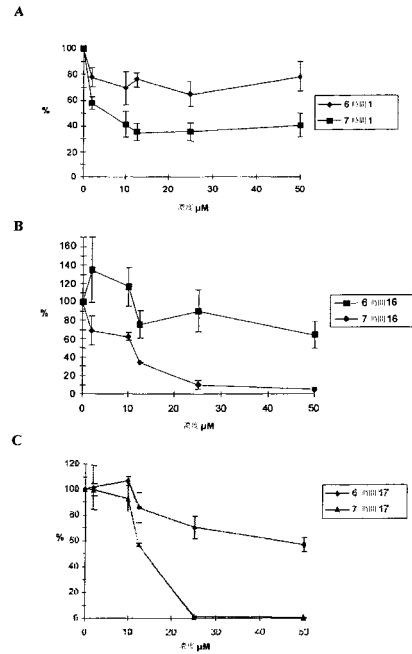
268による処理48時間後

【図 3】



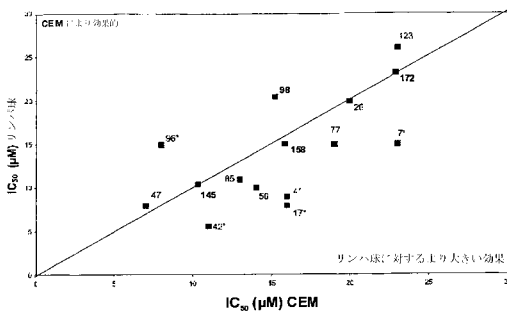
α 及び β アドレナリン作動性受容体及びP2Y作動性受容体と結合する作動薬又は拮抗薬が誘導するシグナル経路のスキーム。PAK = フロイデンキナーゼA、Pi-3K = ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、Gα = 蛋白質Gサブユニット、Gβ,γ = 蛋白質Gサブユニット、pKB = フロイデンキナーゼB、NDPKA = アデニル酸キナーゼ、GFAP = アデニル酸キナーゼ、AC = アデニル酸キナーゼ、cAMP = サイクリックアデニン-5'-リン酸、P2Y = ノリン作動性受容体結合アデニン。

【図 4】



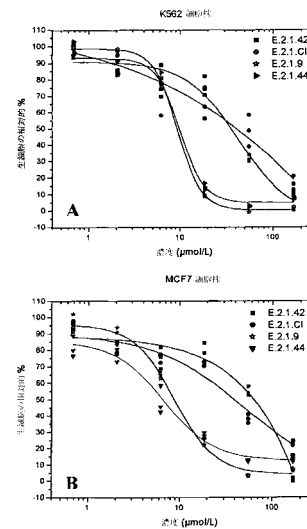
a. 成長曲線 CEM + 1, b. 成長曲線 CEM + 172, c. 成長曲線 CEM + 47

【図 5】



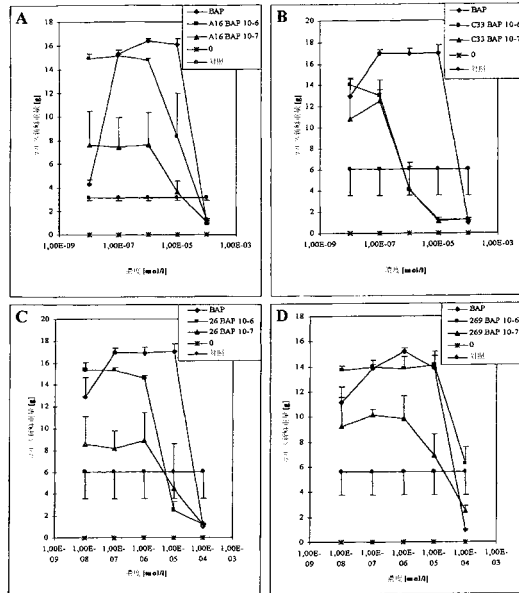
新規リン誘導体のCEM IC₅₀とリンハ床のIC₅₀の比較
早期の生成物10つの試験システムでかなり活性が高いことを示している

【図 6】



種々のドラゾロ[4,3-d]ピリミジンによるK562 (A) 及びMCF7 (B) 腫瘍細胞株の成長阻害
細胞毒性カルセインAMの存在下に決定された。活性は最大活性(阻害剤不在)の百分率で
示される。E.2.1.Cl: 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルヒラゾロ[4,3-d]ピリミジン;
E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロ
ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジ
ルアミノ-3-イソプロピルヒラゾロ[4,3-d]ピリミジン; E.2.1.44: 5-(4-ヒドロキシシクロヘキ
シル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルヒラゾロ[4,3-d]ピリミジン

【図 7】



放射の二置換ラジロ[4,3-d]ピリミジン誘導体によるタバコ・カサの成長阻害
阻害活性は 10^{-6} 及び 10^{-7} M 濃度のサイトカイニン 6-ベンジルアミノプリン(BAP)
存在下に決定された。試験化合物 16, 26, 33, 及び 269 の構造は表 4 を参照のこと

【図 8】



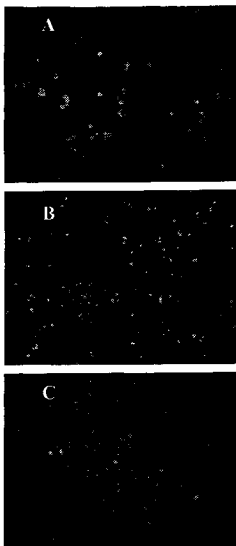
ソラマメ 細胞の DNA 二本鎖切断の蛍光抗体法によるインサイチュー 検出 細胞の染色
DNA 切断の標識用 FITC、クロマチン結合色素 DAPI A-B: DNA 切断標識
B: クロマチン結合色素 DAPI A-B: 25 時間後の核の DNA 切断標識、クロマチン
は既にアポトーシスの断片化を起こしている(矢印) C: 凝縮球状クロマチン・ドメイン
を持つアポトーシス性の核

【図 9】



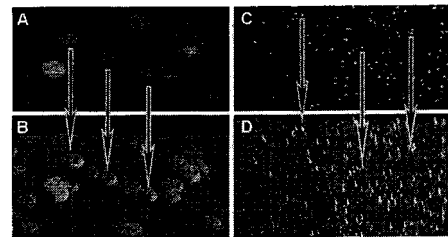
基質 X-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル-β-D-ガラクトシド) (1 mg/ml)
に対する β-ガラクトシダーゼの作用により青色に染色されたヒト膵臓細胞の老化細胞
(B)、他の細胞は染色されない(A)

【図 10】



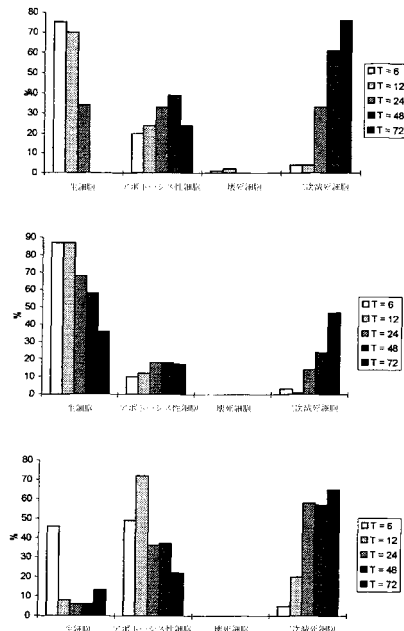
新規ラジロ[4,3-d]ピリミジン12によるMCF-7細胞のアポトーシス誘導 A MCF-7、
アポトーシスを起こした細胞: 6 時間, 12, 20 μM; B MCF-7、二次死細胞(すなわち
アポトーシス後の壊死), 12 時間, 12, 40 μM; C MCF-7、壊死細胞, 24 時間, 12, 40 μM
アネキシン FITC V (Mol. フローロ) 及びヨウ化プロピジウム標識: アネキシン-緑, PI-赤

【図 11】



アネキシン(緑の蛍光)及びヘキスト 33258 (赤い蛍光)標識によるアポトーシス
の検出 新規 [4,3-d]ピリミジン14によるMCF-7の処理後オシホスイメージ分析
により分析したもの A,B-処理なしの対照; C,D-アポトーシスを起こした細胞
(染色体の凝縮); A,C-蛍光顕微鏡写真; B,D-蛍光のイメージ分析

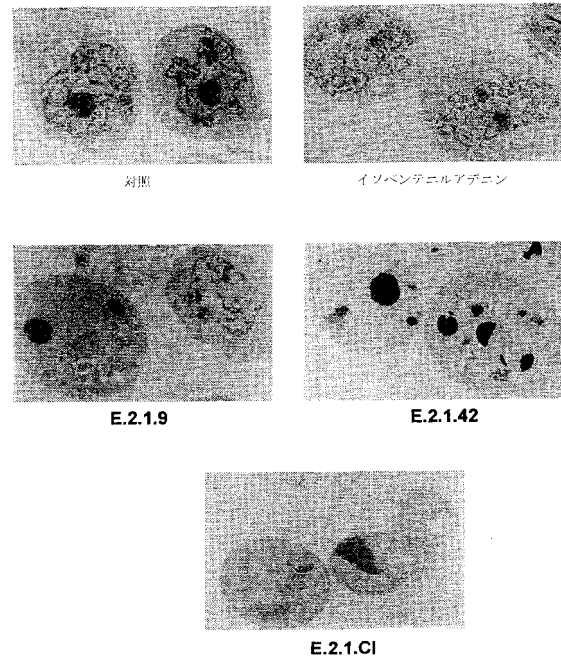
【図 1 2】



a. 98 b. 172 c. 201 上の CEM 培養物における細胞における生存可能な細胞、アポトーシスを起こした細胞、壊死細胞、及び二次死細胞の顕微鏡検出。

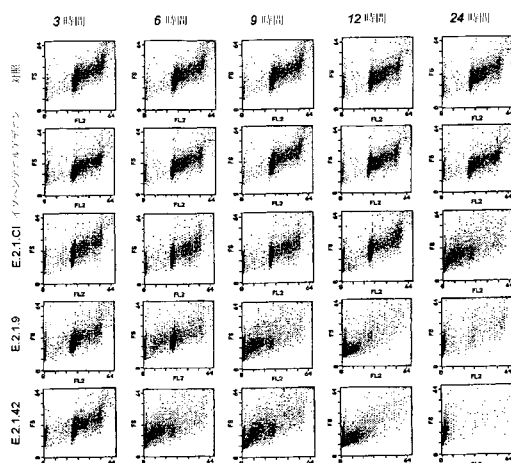
(T: 単位は化合物上のインキュベーション時間)

【図 1 3】



合成 CDK によるアポトーシスの誘導 処理/未処理の CEM 細胞の電子顕微鏡による超微細構造分析 E.2.1.CI: C33, 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]トリミジン; E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチルプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]トリミジン; E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]トリミジン

【図 1 4】



合成 CDK によるアポトーシスを誘導する - FACS 研究

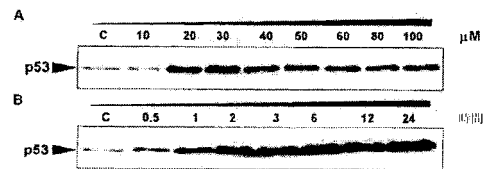
E.2.1.CI: C33, 5-クロロ-7-ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]

トリミジン; E.2.1.9: 269 - 5-(R)-(1-ヒドロキシメチルプロピル)アミノ-7-

ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]トリミジン;

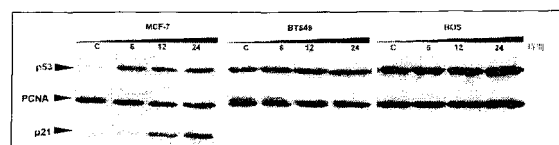
E.2.1.42: 268 - 5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソノロドリン [4,3-d]トリミジン

【図 1 5】



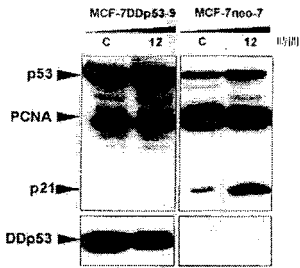
25 で 12 時間処理後、MCF-7 細胞における p53 蛋白質の濃度依存性誘導 p53 の有意の誘導が、25 の濃度 20 μM において (低い濃度と比較して) 顕著に見られる 25 の濃度を更に上げて、p53 の誘導レベルの点でそれは変わらないように見える B MCF-7 細胞における p53 蛋白質の時間依存性誘導 p53 誘導は処理後 30 分で既に明らかであり、処理後 2 時間で最大に達した 次の時間帯でも p53 レベルは変化なかった 細胞の溶解産物はすべて 10% SDS ゲル上で分離された 免疫ブロッティングはモノクローナル抗 p53 抗体 DO-1 で行われた

【図 1 6】



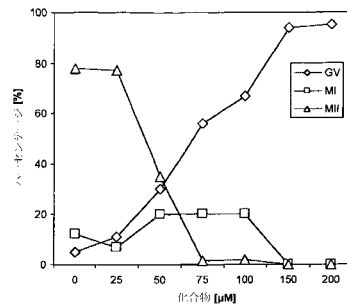
野生型又は突然変異型 p53 蛋白質を発現する細胞において、p53 及び p21^{WAF1} 誘導への 25 の影響 全細胞溶解産物は 12.5% SDS ゲル上で分離された 免疫ブロッティングは、蛋白質の泳動量が等量であることを確認するため、モノクローナル抗 p53 抗体 DO-1 及び抗 p21 抗体 118 で、及びその後抗 PCNA 抗体 PC-10 を使って行われた A は、野生型 p53 を発現する MCF-7 において、20 μM 25 が p53 蛋白質及び p21^{WAF1} 蛋白質を誘導できることを示している 一方、ハネル B 及び C は、突然変異型 p53 を発現する BT20 及び HOS 細胞において、20 μM 25 がこれら蛋白質を発現していないことを示している

【図 17】



p53転写活性を阻害するドミナントネガティブ型マウス p53 蛋白質(Ddp53)形質導入を用いて、20 μ M 25 による MCF-7 細胞処理後、p53 依存性 p21^{WAF1} 蛋白質の誘導を確認。全細胞溶解産物は 12.5% SDS ゲル上で分離された。免疫ブロッティングは、モノクローナル抗 p53 抗体 DO-1、Bp53-10 (Ddp53 検出用)、抗 p21 抗体 118、及び泳動対照として抗 PCNA 抗体 PC-10 を用いて行われた。左側のパネルは、高レベルの Ddp53 を発現している MCF-7Ddp53-9 クローンを示している。25 処理は突然変異型 p53 を発現する細胞で観察されたのと類似の結果を示している。右側のパネルは、Ddp53 のない MCF-7neo-7 の対照クローンである。25 処理により、p53 蛋白質と p21^{WAF1} 蛋白質の両方が誘導される。

【図 18】



ウシ胎母細胞の減数分裂回復に関するトランスポゾ[4,3-d]ピリミジン 16 の効果。未成熟卵母細胞複合体(COC、n=341)は 16 (0-200 μ M) の存在又は存在下、M199 + 3 mg/ml BSA 中 24 時間培養。試験は二重に行われた。(1 グループ当たり合計約 50 COC)

【手続補正書】

【提出日】平成16年12月9日(2004.12.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

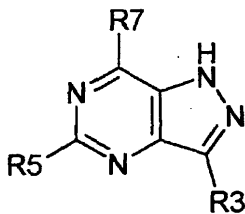
【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

好ましい実施例では、本発明はサイクリン依存性キナーゼと α 及び β アドレナリン作動性及びプリン作動性の受容体を阻害又は刺激し、以下の式 I



I

を有する 3-, 5-, 7-三置換ピラゾロ[4,3-d]ピラミジン、及び薬学的に許容されるその塩に関係しており、ここで R7 は NHNH_2 、

ハロゲン、

R7' -X (ここで X は -NH-, -O-, -S- である)、

R7' -X (ここで X は事象毎にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、エチレン、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される -N(アルキル)- であるの

が好ましい)である。

R7' は、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、これは、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

アシル-C(0)R_aであり、ここでR_aはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

アミド-C(0)NR_bR_cであり、ここでR_b及びR_cは独立に水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

スルホ-SO₃R_d、ここでR_dは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

カルバミノ-NHC(0)R_e、ここでR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルはR_f(シクロアルキル)であり、ここでR_fは、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペン

テニル、及びイソブテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは $-R_g$ -Hetであり、ここで、

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、 R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールアルキルは $-R_i$ Arで、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチ

ニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル- R_j (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリールアルキル R_i Arであり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールアルキルは- R_k -HetArであり、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、HetArはベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択され

る0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

R5 は、

ハロゲン

NHNH₂;

NHOHであり;

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

アシル-C(0)Rであり、ここでR_aはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

アミド-C(0)NR_bR_c、ここでR_b及びR_cは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

スルホ-SO₃R_dであり、ここでR_dは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、

カルバミノ-NHC(0)R_eであり、ここでR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノであり、またはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルは R_f (シクロアルキル)であり、ここで R_f は、メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは $-R_g$ -Hetであり、ここで、

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、

R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び、

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換

されるのが好ましい。

アリールアルキルは $-R_i\text{Ar}$ で、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル $-R_j$ (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリールアルキル $-R_i\text{Ar}$ であり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Arはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールアルキルは $-R_k\text{-HetAr}$ であり、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。及び、HetArはベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独

立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

R5' -X、ここで、Xは-NH-、-O-、-S-部分であり、

R5' -X、ここで、XはN-(アルキル)-であり、事象毎にメチル、エチル、プロピル、ビニル、エチニル、アリル、プロパギル、イソペンテニルの基より選択されることが好ましい。

R5' は水素であり、

メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アシル-C(0)R、ここでR_aは C₁-メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アミド-C(0)NR_bR_c、ここでR_b及びR_cは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

スルホ-SO₃R_d、ここでR_dは水素、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、およびイソブテニルの基から選択される側鎖のある又は側鎖のないC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

カルバミノ-NHC(0)R_e、ここでR_eはヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、またはメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ビニル、アリル、プロペニル、プロパルギル、プロピニル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択されるC₁-C₆のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択されるC₃-C₁₅シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト

、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルアルキルは R_f (シクロアルキル)であり、ここで R_f は、メチル、エチル、イソプロピル、ブチル、アリル、プロペニル、プロパルギル、イソペンテニル、及びイソブテニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであるのが好ましい。

置換シクロアルキルは、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、シクロヘプチル、またはアダマンチルの基から選択される C_3 - C_{15} シクロアルキルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリールはフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

複素環はチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアルキルは $-R_g$ -Hetであり、ここで、

R_g はメチル、エチル、イソプロピル、ブチル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1 - C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Hetはチエニル、フリル、ピラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサジルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリールは R_h -HetArであり、ここで、

R_h はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニルの基から選択されるのが好ましく、及び、

HetArはベンゾチエニル、ナフトチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、キナキサリニル、シンノリニル、キナゾリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキ

シ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

アリーラルアルキルは $-R_i \text{Ar}$ で、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Ar はフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

シクロヘテロアルキルアルキル $-R_j$ (シクロヘテロアルキル)において、

R_j はアリーラルアルキル $-R_i \text{Ar}$ であり、ここで、

R_i はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、エチニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

Ar はフェニル、ビフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インデニル、又はフェナントレニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び

シクロヘテロアルキルはピペリジニル、ピペラジニル、モルフォリニル、ピロリジニル、イミダゾリジニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

ヘテロアリーラルアルキルは $R_k\text{-HetAr}$ で、ここで、

R_k はメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ビニル、プロピニル、プロペニル、アリル、プロパルギル、イソペンテニルの基から選択される C_1-C_6 のアルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましく、及び、

HetAr はベンゾチエニル、ベンゾフラニル、クロメニル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリニル、フタラジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、カルバゾリル、アクリジニル、インドリニル、及びイソインドリニルの基から選択され、事象毎に独立にハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、ヒドラゾ、メルカプト、カルボキシル、シアノ、ニトロ、アミド、スルホ、スルファミド、アシルアミノ、アシロキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルメルカプト、及びカルバモイルの基から選択される0 - 5の置換基で置換されるのが好ましい。

R3は、

アルキル、フッ素又は塩素置換のアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロアルキル、シクロヘテロアルキル、フッ素又は塩素置換のシクロヘテロアルキル、シクロアルキルアルキルである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

以下の誘導体が特に好ましい。つまり、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-[1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル]アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-[(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-(3-アセトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-[1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル]アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル)アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(4-アミノフェニル) アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-5-アミノアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(4-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノシクロヘキシル) アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリン)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロ

[illegible]

-ヒドロキシエチル)アミノ-7-[1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、2-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-6-{N-[2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル]-N-メチル}アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン-3-イソプロピルピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、2(R)-[1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル]アミノ-7-(R)-[1-フェニル-2-ヒドロキシエチル]アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、2-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-(R/S)-[(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-クロロ-6-(R/S)-(1-フェニル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-[1-(ヒドロキシメチル)プロピル]アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-アミノプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-(4-メトキシベンジル)アミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-(3-クロルアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(2-ヒドロキシプロピル)アミノ-7-(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(2-ヒドロキシメチルピロリジン-1-イル)-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イオプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-6-(3-クロロ-4-カルボキシアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-7-ベンジルアミノ-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン、5-(R)-(1-イソプロピル-2-ヒドロキシエチル)アミノ-6-(3-クロルアニリノ)-3-イソプロピル(メチル、エチル)ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン。

【手続補正 3】**【補正対象書類名】** 明細書**【補正対象項目名】** 0044**【補正方法】** 変更**【補正の内容】****【0044】**

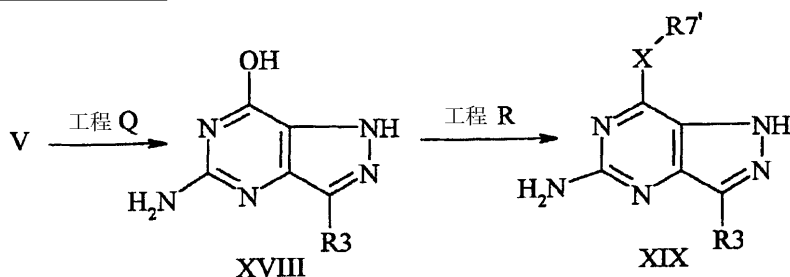
本発明の化合物に含まれる多くの官能基は架橋結合での使用に適している。例えば、ホスホン酸はアルコールとの間でエステル、またはアミンとの間でアミドを形成するのに用いられる。OHで置換されたR基、アジド（必要ならば架橋結合の前にアミンに還元される）、又はビニルは適した部位の例である。同様に、R基に見出されるアミノ、ハロ、アシル及びその他の反応部位も適している。架橋結合試薬を作製する場合、必要ならば、適切に反応基を保護する。一般的に化合物は、本明細書に述べられているのと同じ方法で、ホスホン酸又はアミノ基を通して結合パートナーのヒドロキシル又はアミノ基と結合され、R基を通して他の結合パートナーと共有結合をするために用いられる。例えば、ステロイドホルモンのような最初の結合パートナーがエステル化され、次にこの複合体がヒドロキシメチルRを通して臭化シアン活性化セファロースへ架橋結合を行なうことにより、固定化ステロイドが得られる。複合体に関する他の化学反応は良く知られている。例えば、Maggioの「Enzyme-Immunoassay」(CRC, 1988, pp 71-135) 及び本明細書に引用されている参考文献を参照の事。

【手続補正 4】**【補正対象書類名】** 明細書**【補正対象項目名】** 0056**【補正方法】** 変更

【補正の内容】

【0056】

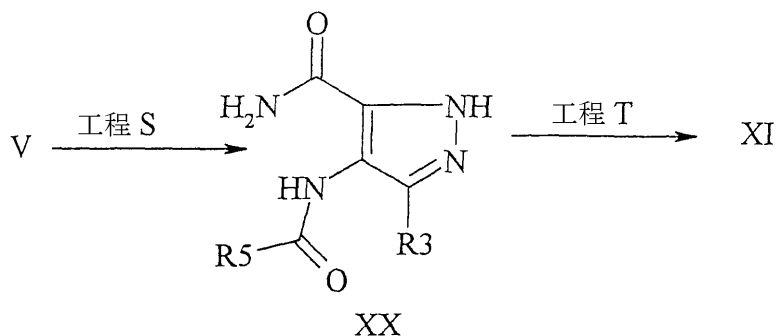
スキーム 4:



工程 Q: グアニジン / $T=140^{\circ}\text{C}$ 又は 2-エトキシエタノール / 130°C 中クロロホルムアミジン塩酸 + Et_3N

工程 R: 1) SOCl_2 2) $\text{R7}'\text{NH}_2$ / $T=50-90^{\circ}\text{C}$

スキーム 5:



工程 S: $(\text{R5CO})_2\text{O}$ 又は R5COCl 又は R5-CHO (ここで R5 は (置換)アリールに過ぎない)

工程 T: OH^- / $T=90^{\circ}\text{C}$ 又は $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$ 又は ポリリン酸 / $T=110-160^{\circ}\text{C}$

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

油に懸濁させる場合は、油成分として、注射目的に通常使用される野菜油、合成油、又は半合成油などが含まれる。上述の油は、特に、酸性分として8-22個の炭素原子、特に12-22個の炭素原子を有する長鎖脂肪酸を含む液体脂肪酸エステルで、酸は例えばラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、ベヘン酸又はそれに相当する不飽和酸、例えばオレイン酸、エライジン酸、ユウリン酸 (euric acid)、ブラシジン酸又はリノレン酸、もし抗酸化剤の添加が適切であるならば、例えばビタミンE、 β カロチン、又は3,5-ジ-三級ブチル-4-ヒドロキシトルエンを含む。これらの脂肪酸エステルのアルコール成分の炭素数は6未満であり、一価又は多価、例えば一価、二価、三価のアルコールで、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、もしくはペンタノール、又はその異性体のアルコールであるが、特にグリコール及びグリセロールである。従って、脂肪酸エステルは例えば、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、「ラブラフィルM 2375」(パリのGattefossee産のトリオレイン酸ポリオキシエチレングリセロール)、「ラブラフィルM 1944 CS」(アブリコット仁油のアルコール分解により生成される不

飽和ポリグリコール化グリセリドで、グリセリド及びポリエチレングリコールエステルで構成される；パリのGattefossee産）、「ラブラゾル」（TCM のアルコール分解により生成される飽和ポリグリコール化グリセリドで、グリセリド及びポリエチレングリコールエステルで構成される；パリのGattefossee産）及び/又は「ミグリオール812」（炭素鎖C₈からC₁₂の飽和脂肪酸のトリグリセリドでドイツのHuls AG産）、特に野菜油、例えば綿実油、アーモンド油、オリーブ油、ヒマシ油、胡麻油、大豆油、特に落花生油である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

実施例5

メチル 4-アミノ-5-イソプロピルピラゾール-3-カルボキシレート (VII)

メチル 5-イソプロピル-4-ニトロピラゾール-3-カルボキシレート (7.34g, 34.4mmol)、36 mLのnプロパノール、6 mLの水、及び5.6 mL 10 Mの塩酸の溶液に0.55gのPtO₂を加えた。混合物を水素下(760トル)に9時間攪拌した。反応混合物は濾過し、濾液は乾燥するまで真空中で濃縮した。求めているアミンは、クロロホルムへ抽出中にアンモニア水で処理することにより遊離した。生成物は蒸発後結晶化した。収率 95%；mp=122-123。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0107】

実施例21: 植物キナーゼにおけるCDK阻害活性

p13^{supercil} ビーズへの結合による植物CDKの蛋白質抽出及び精製、またはcdc2a-MS蛋白質に特異的な抗体による免疫精製は、以前述べられている方法(Bogreら 1997、Plant Physiol. 113、1997、841-852)を用いて行なわれた。MMK1 蛋白キナーゼは、Bogreらにより述べられている方法(1997a、Plant Cell 9、75-83)により、ソラマメ (Vicia faba) 抽出物中の特異抗体を使って精製した。蛋白キナーゼ活性は、上述の実施例20に述べられている方法で測定した。ヒストンH1又はミエリン塩基性蛋白質に取り込まれた放射能の定量化は、ホスホイメージャーを使って行なわれた (図 2)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

実施例22: βアドレナリン作動性受容体の活性調節

新規化合物の作用機構は図3に示してある。ラットのC6神経膠腫(ATCC N° CCL107)は無血清の化学的に定義された培地中単層で培養された。培地は、ハムのF10/最小必要培地(1:1 vol/vol)、2mMのLグルタミン、1% (vol/vol)の最小必要培地用ビタミン(100x)、1% (vol/vol)の最小必要培地非必須アミノ酸(100x)、100U/mlのペニシリン、100µg/mlのストレプトマイシン、及び30 nMの亜セレン酸ナトリウムを含む。培養は加湿条件下37°Cで行なわれた。検定法は2.5x10⁵ 細胞/cm²の密度で対数増殖期に行なわれた。細胞内cAMP合成

は5mM (-) イソプレテレノールの添加により誘導された。37℃で30分培養したのち培地を除き、細胞のcAMP量をアマシャムのcAMP酵素免疫検定キットを使って決定した。I₅₀は用量反応曲線から二重検査で決定される。イソプレテレノールを同時に添加した後、7種類のプリン類似体の効果を測定した。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 1】

25は突然変異型でなく、野生型の p53蛋白質を誘導する

まず本発明者らは 25の適切な実験用の濃度を決定した。1 μMから100 μMまでの増加性濃度で MCF-7 (wt p53)細胞を12時間処理し、モノクローナル抗体D0-1 (Fig. 15)を用いてp53蛋白質の発現を分析した。25 の濃度20-100 μMはこれらの細胞でp53蛋白質のレベルに影響を及ぼすことが証明された。図 15に示すように、20 μMの25 により誘導される蛋白質発現と100 μMの25により誘導される発現との間には重大な差異はなく、従って追加試験には濃度20 μMを選択した。第2に、時間として6時間、12時間、及び24時間を選んだ。というのは蛋白質の発現レベルが安定状態に達したからである。図15は、20 μMの25処理後におけるp53の時間依存性増加を示している。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 2】

本発明者らは、MCF-7 (wt p53)、BT549 (mut p53)及びBT474 (mut p53)の乳癌細胞株、HT29 (mut p53)結腸直腸癌細胞株、及び骨肉腫細胞株HOS (mut p53)におけるp53蛋白質の発現を分析した。MCF-7細胞を20 μM 25で6時間、12時間、及び24時間処理すると、野生型p53がかなり堆積する (図 16)。突然変異型p53を発現するBT549及びHOS細胞株を20 μM 25に6時間、12時間、及び24時間接触させても、p53の誘導は見られなかった(図 16)。細胞株の25の感受性と野生型又は突然変異型p53の存在との間には相関関係は観察されなかった。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 3】

25は突然変異型でなく、野生型の p53蛋白質を誘導する

まず本発明者らは 25の適切な実験用の濃度を決定した。1 μMから100 μMまでの増加性濃度で MCF-7 (wt p53)細胞を12時間処理し、モノクローナル抗体D0-1 (Fig. 15)を用いてp53蛋白質の発現を分析した。25 の濃度20-100 μMはこれらの細胞でp53蛋白質のレベルに影響を及ぼすことが証明された。図 15に示すように、20 μMの25 により誘導される蛋白質発現と100 μMの25により誘導される発現との間には重大な差異はなく、従って追加試験には濃度20 μMを選択した。第2に、時間として6時間、12時間、及び24時間を選んだ。というのは蛋白質の発現レベルが安定状態に達したからである。図15は、20 μMの25処理後におけるp53の時間依存性増加を示している。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 1】

実施例34：乾燥カプセル

5000カプセルであり、各カプセルが、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式Iの化合物の1つを0.25 g含んでいる。

組成

活性成分	1250 g
タルク	180 g
小麦澱粉	120 g
ステアリン酸マグネシウム	80 g
ラクトース	20 g

調製工程：前出の粉末状の物質を幅0.6 mmのメッシュの篩上で押す。混合物の0.33gをカプセル充填装置を使ってゼラチン製のカプセルに移す。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 2】

実施例35：ソフトカプセル

ゼラチン製のソフトカプセル5000、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式Iの化合物の1つを0.05g含んでおり、次の方法で調製される。

組成

活性成分	250 g
ラウログリコール	2 リットル

調製工程：粉末状の活性成分をラウログリコール (Lauroglykol) (登録商標) (ラウリン酸プロピレングリコール、ガッテフォッセS.A.、セイントプリースト、フランス)に懸濁し、湿性粉碎機で粒子サイズ約1~3 μm にすり潰す。次に、混合物の0.419g分を各々カプセル充填装置を使ってゼラチン製のソフトカプセルに移す。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 3】

実施例36：ソフトカプセル

ゼラチン製のソフトカプセル5000、活性成分として前出又は後出の実施例に述べられた式Iの化合物の1つを0.05g含んでおり、次の方法で調製される。

組成

活性成分	250 g
PEG 400	1 リットル
トウイーン 80	1 リットル

調製工程：粉末状の活性成分をPEG 400（380と約420の間のMrのポリエチレングリコール、シグマ、フルカ、アルドリッチ、米国）及びTween（登録商標）80（モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、Atlas Chem. Inc., USA、米国アルドリッチ、フルカ、シグマにより提供）に懸濁し、湿性粉碎機で粒子サイズ約1～3 mmにすり潰す。次に、混合物の0.43g分を各々カプセル充填装置を使ってゼラチン製のソフトカプセルに移す。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/03207

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 7 - 18 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/03207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D487/04 A61K31/519 A61P35/00 A61L29/00 A61P31/12 //(C07D487/04,239:00,231:00)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07D A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 200 980 B1 (PAMUKCU RIFAT ET AL) 13 March 2001 (2001-03-13) claim 1; examples 133-135	1,7,8
X	SUBRAMANYAM, CHAKRAPANI ET AL: "6-(4-Pyridinyl)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-d]- pyrimidin-4(5H)-one: A Structurally Novel Competitive AMPA Receptor Antagonist" J. MED. CHEM. (1995), 38(4), 587-9, XP002087483 table 1; compound 8 --- -/--	1,8,11
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 July 2003		Date of mailing of the international search report 18/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Alfaro Faus, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/03207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUCHANAN, J. GRANT ET AL: "C-nucleoside studies. Part 20. Synthesis of some pyrazolo[4,3-d]pyrimidine acyclonucleosides related to (S)-(2,3-dihydroxypropyl)adenine; a direct method for double functionalization of the pyrazole ring" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1 (1989), (5), 925-30, XP002208249 compounds 5 and 7 ---	1
X	ELLAMES, GEORGE J. ET AL: "The syntheses of acycloformycins and 5-amino-3-(2-hydroxyethoxy)methylpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7(6H)-one, an analog of the antiviral acycloguanosine" J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1 (1985), (10), 2087-91, XP002047056 compounds 9 and 34 ---	1
X	WO 01 19827 A (CIPLA LTD (IN)) 22 March 2001 (2001-03-22) examples 1 and 3, starting product ---	1
X	WO 98 49166 A (PFIZER) 5 November 1998 (1998-11-05) * preparations 12-14, 39, 40 * ---	1
X	WO 99 54333 A (PFIZER) 28 October 1999 (1999-10-28) preparation 44 ---	1
X	WO 98 29413 A (NEUROGEN CORP) 9 July 1998 (1998-07-09) page 24, line 20 -page 25, line 6 ---	1
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; NEUWELS, M.: "Approach to an adenosine pharmacophore by molecular modeling" retrieved from STN Database accession no. 117:244995 XP002208254 * RN = 144691-17-8 * & J. PHARM. BELG. (1992), 47(4), 351-63, ---	1
X	US 3 988 338 A (SKOOG FOLKE ET AL) 26 October 1976 (1976-10-26) column 2, line 41 -column 3, line 22; examples 13,14 ---	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/03207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HECHT, SIDNEY M. ET AL: "Activation of cytokinins" retrieved from STN Database accession no. 83:189243 XP002208255 * RNS '57358-05-1! '57357-99-0! '57358-00-6! '28745-13-3! * & J. BIOL. CHEM. (1975), 250(18), 7343-51, ---	1
X	HERNANDEZ, MARIA A. ET AL: "General route for the facile synthesis of pyrimidin-2-one-4-thione derivatives via the annulation of cyclic o-aminonitriles using carbonyl sulfide" J. ORG. CHEM. (1981), 46(20), 3941-5, XP002208251 compound 15 ---	1
X	LONG, ROBERT A. ET AL: "Derivatives of the new ring system pyrazolo'4,3-d!-v-triazine and the synthesis of 5,7-disubstituted 3-methylpyrazolo'4,3- d!pyrimidines and 5,7-disubstituted 3-methylpyrazolo'4,3- d!pyrimidine 6-oxides which are structurally related to the nucleoside antibiotics formycin and formycin B" J. HETEROCYCL. CHEM. (1970), 7(4), 863-9, XP002208252 compounds 15 and 16 ---	1
X	FARKAS, JIRI ET AL: "Nucleic acid components and their analogs. CLI. Novel process for the preparation of 1H-pyrazolo'4,3-d!pyrimidine as an approach to the synthesis of formycin B" COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN. (1972), 37(8), 2786-97, XP002208253 compounds IV,V,VI --- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/03207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SANGHVI, YOGESH S. ET AL: "In vivo antiviral activity of 5-amino-1-methyl-3-.beta.-D- ribofuranosylpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7(6H)-one and related guanosine analogs prepared from formycin" retrieved from STN Database accession no. 115:256537 XP002208256 abstract & NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES (1991), 10(6), 1417-27, -----	1,12,17, 18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/03207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6200980	B1	13-03-2001	NONE
WO 0119827	A	22-03-2001	WO 0119827 A1 22-03-2001 AU 1888800 A 17-04-2001
WO 9849166	A	05-11-1998	AP 1002 A 14-08-2001 AU 730670 B2 08-03-2001 AU 7644598 A 24-11-1998 BG 103828 A 30-06-2000 BR 9810233 A 17-10-2000 CN 1253561 T 17-05-2000 EA 2057 B1 24-12-2001 WO 9849166 A1 05-11-1998 EP 0977756 A1 09-02-2000 HR 980222 A1 28-02-1999 JP 2000510485 T 15-08-2000 NO 995211 A 25-10-1999 NZ 338075 A 27-10-2000 PL 336586 A1 03-07-2000 SK 144699 A3 12-03-2001 TR 9902646 T2 22-05-2000 ZA 9803478 A 25-10-1999 HU 0001389 A2 28-09-2000
WO 9954333	A	28-10-1999	AP 1022 A 14-11-2001 AU 748352 B2 06-06-2002 AU 2742599 A 08-11-1999 BG 104949 A 29-06-2001 BR 9909808 A 26-12-2000 CA 2329077 A1 28-10-1999 CN 1305478 T 25-07-2001 EP 1073658 A1 07-02-2001 HR 20000712 A1 30-06-2001 HU 0102543 A2 28-11-2001 WO 9954333 A1 28-10-1999 JP 2002512248 T 23-04-2002 NO 20005255 A 19-12-2000 PL 343794 A1 10-09-2001 SK 15532000 A3 03-12-2001 TR 200003039 T2 22-01-2001 US 6251904 B1 26-06-2001 US 2001039271 A1 08-11-2001 ZA 9902793 A 19-10-2000
WO 9829413	A	09-07-1998	US 5723608 A 03-03-1998 AT 214701 T 15-04-2002 AU 738324 B2 13-09-2001 AU 5811098 A 31-07-1998 BR 9713808 A 25-01-2000 CN 1246860 A ,B 08-03-2000 DE 69711241 D1 25-04-2002 DE 69711241 T2 12-12-2002 EP 0960110 A1 01-12-1999 ES 2172830 T3 01-10-2002 JP 2001507705 T 12-06-2001 NO 993240 A 27-08-1999 NZ 336529 A 30-03-2001 WO 9829413 A1 09-07-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9829413	A	US 6211187 B1	03-04-2001
US 3988338	A	26-10-1976	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/24	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/08	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 マラフコファ ダニエラ
チェコ共和国 ホラードオービス ミスリフ 3 5
(72)発明者 ハフリケク リポール
チェコ共和国 プラハ ブルーテカ 2 7 6 6
(72)発明者 クリストフ ブラディミール
チェコ共和国 オスタラバ クリツコファ 1 0
(72)発明者 レノベル レネ
チェコ共和国 フリデク ミステク オストラフスカ 6 9 5
(72)発明者 スタルナド ミロスラフ
チェコ共和国 オロモウク ザパドニ 2 5

Fターム(参考) 4C050 AA01 BB05 CC08 EE04 FF02 GG02 GG04 HH01
4C086 AA01 AA02 AA03 BA02 CB06 CB09 EA10 HA12 HA28 MA01
MA02 MA04 NA05 NA14 ZA01 ZA16 ZA33 ZA36 ZA39 ZA59
ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37
ZC02 ZC31 ZC35
4C206 AA01 AA02 AA03 FA31 MA02 MA04 NA05 ZB26

【要約の続き】

であり; または-X-R₅・基であり、ここでXは-NH-、-O-、-S-、又は-N(アルキル)-、及びR₅・は水素、任意で置換されるC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、C₃-C₁₅シクロアルキル、R_f (C₃-C₁₅シクロアルキル)、アリール、複素環、ヘテロC₁-C₆アルキル、アリールアルキル、ヘテロアリール、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、又はヘテロアリールアルキル基、-C(O)-R_a、-C(O)NR_bR_c、-SO₃R_d、又は-NHC(O)R_eの基で、ここでR_a、R_b、R_c、R_d、R_e、及びR_fは上述の意味を持ち、及びR₇はハロゲン、-NHNH₂、NHOH、NHCONH₂、グアニロ(NH-C(NH)NH₂)又は-X-R₇・基であり、ここでXは上述の意味を持ち、R₇・はR₅・で定義されたものと同様である。

