(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 961236 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 961236

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D487/14
A61K 31/55

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.09.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.03.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.03.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **16.09.1994 PCT/US1994/010495**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

16.09.1993 US 122893

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Cephalon Inc.,** 145 Brandywine Parkway, WEST CHESTER, PA 19380, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd,** Ohtemachi Building, 1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100, JAPANI, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Glicksman, Marcie A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Rotella, David P.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Neff, Nicola,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Murakata, Chikara,** Tokyo 192-03, JAPANI, (JP)
5 • **Hudkins, Robert L.,** Chester Springs, PA 19425, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
K-252a-johdannaisia, jotka lisäävät neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivi suutta

K-252a-derivat som ökar neurotrofininduerad aktivitet

K-252a-johdannaisia, jotka lisäävät neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivisuutta

Keksinnön tausta

Tämä keksintö koskee indolokarbotsolialkaloidin johdannaisia, joihin viitataan "K-252a:na", ja näiden johdannaisten käyttöä lisäämään molekulaarisia, biologisia ja sellulaarisia aktiivisuuksia, jotka johtuvat neurotrofiinien sitoutumisesta soluihin, jotka käsittävät neurotrofiinireseptoreita.

Neurodegeneratiivisten sairauksien, kuten Alzheimerin taudin, Parkinsonin taudin ja liikeratakovettumataudin (ALS tai "Lou Gehrigin tauti"), syy on tuntematon. Viime vuosina on kuitenkin oletettu, että muutokset neurotrofiinin sijainnissa, neurotrofiinien ilmentämistasoissa ja/tai reseptorien, jotka sitovat neurotrofiineja, ilmentämistasoissa voivat seurata tällaisia sairauksia. Neurotrofiinit ovat alhaisen moolimassan polypeptidejä, joilla on roolinsa tiettyjen solujen, mukaan lukien hermosolujen, kehittymisessä, toiminnassa ja/tai elossa pysymisessä. Hermosolujen kuolema tai toimintahäiriö on liitetty suoraan lukuisiin neurodegeneratiivisiin sairauksiin.

Erilaisia neurotrofiineja on identifioitu. Näihin kuuluvat hermokasvutekijä (NGF), neurotrofiini-3 (NT-3), neurotrofiini-4/5 (NT-4/5) ja aivosta johdettu neurotrofinen tekijä (BDNF). Näistä NGF oli ensimmäinen identifioitu neurotrofiini ja se on paras karakterisoitu neurotrofiini.

NGF:a vaaditaan tiettyjen tuntohermosolujen ja sympaattisten hermosolujen normaalia kehittymistä ja toimintaa varten. Kokeellinen todiste tähän mennessä osoittaa, että NGF säätelee erilaisia soluvasteita, jotka ovat tärkeitä hermosolujen toiminnalle. Tämä täsmällisen tiedon puute koskien muiden neurotrofiinien, kuten NT-3, <u>in vivo</u> toimintaa on vaikeuttanut neurodegeneratiivisten sairauksien syiden tutkimista. Nykyään tiedetään, että NT-3:lla

on roolinsa kolinergisten hermosolujen elossa pysymisessä ja toiminnassa etuaivopohjassa. Kuten NGF, NT-3 voi kuitenkin myös vaikuttaa monien erilaisten solutyyppien elossa pysymiseen ja/tai toimintaan.

On ehdotettu, että neurotrofiinien puute tai riittämätön toiminta liittyy neuronaaliseen degeneraatioon. Tämä degeneraatio tapahtuu sairauksissa, kuten Alzheimerin tauti, Parkinsonin tauti ja ALS. Siis, on ehdotettu, että antamalla niille, jotka kärsivät tällaisista sairauksista, vastaava neurotrofinen tekijä tällaista neuraalista degeneraatiota voidaan lievittää tai se voidaan estää. (Katso, Appel, S.H. 10 Ann. Neurol. 499, 1981). Esimerkiksi on ehdotettu, että NGF voi olla käyttökelpoinen Alzheimerin taudin hoidossa, koska NGF on troofinen tekijä etuaivopohjan kolinergisten hermosolujen populaatiolle, jotka hermosolut rappeutuvat Alzheimerin taudin potilaissa. Kuten on ehdotettu, NGF:n "lisäys" potilaan systeemiin voi ehkäistä tällaisten hermosolujen kuoleman tai parantaa tällsiten hermosolujen toimintaa.

Valitettavasti tekniset ja eettiset seikat ovat toistaiseksi vaikeuttaneet neurotrofiineihin pohjautuvien terapeuttisten aineiden kehitystä. Esimerkiksi, on teknisesti vaikeaa tuottaa riittävät määrät puhtaita neurotrofiineja käyttäen niin kutsuttua rekombinantti DNA -menetelmiä. Lisäksi, vaikka on mahdollista käyttää ihmisen sikiösoluja tuottamaan neurotrofiineja, tällaisten solujen (tyypillisesti saatu abortoidusta sikiöstä) käytöstä syntyvät eettiset seuraumukset ovat melkein estäneet tämän lähestymisen käytön. Siis, erilaisen lähestymisen tai lähestymisten, neurotrofiinien käyttöä varten häiriöiden tai sairauksien välityksessä, etsintä on tehostunut.

Neurotrofiinien roolin neurodegeneratiivisissa sairauksissa parantunut ymmärtäminen olisi hyödyllistä ryhdyttäessä tällaisiin lähestymisiin. Tällainen ymmärtäminen sallisi terapeuttisten aineiden järkevämmän suunnittelun,

koska kun mekaaniset suhteet neurotrofiinien ja tietyn sairauden välillä ymmärretään täysin, puutteet, viat tai ongelmat tällaisissa mekanismeissa voidaan kohdistaa sopivammin.

Yksi tällainen lähestyminen käsittäisi molekyylien kehittymisen, jotka "matkivat" neurotrofiinien vaikutusta; esimerkiksi molekyylit, jotka sitoutuvat neurotrofiinireseptoreihin, minkä avulla tällainen sitoutuminen johtaa tiettyihin soluvasteisiin, jotka ovat identtisiä niiden kanssa, jotka saavutetaan, kun neurotrofiinin kaltainen molekyyli sitoutuu sen reseptoriin. Toinen lähestyminen käsittäisi molekyylien kehittämisen, jotka lisäävät vastetta tai vasteita, jotka liittyvät neurotrofiinien sitoutumiseen niiden reseptoreihin, so. molekyyleihin, jotka itse asiassa, välittävät neurotrofiinireseptorin vuorovaikutusta, joka ei muutoin ole käyttökelpoinen tai se on merkityksetön.

Keskittyen jälkimmäiseen lähestymiseen tiedetään, että neurotrofiinien sitoutuminen niiden reseptoreihin (näihin reseptoreihin viitataan yhteisesti "trk:na") johtaa tyrosiinitähteiden välittömään fosforylaatioon reseptoriin, mihin viitataan "autofosforylaationa". Autofosforylaatio on absoluuttinen vaatimus signaalin siirtoreittien aktivoinnille, jotka säätelevät tiettyjä molekyylivasteita, jotka voidaan yhdistää solujen, kuten hermosolujen, toimintaan ja/tai elossa pysymiseen. (Katso yleisesti, Klein et al. 65 Cell 189, 1991; ja Lamballe et al. 66 Cell 967, 1991). Reseptoreiden trk-suku käsittää tällä hetkellä trk A:n, trk B:n ja trk C:n. Yksittäiset trk-reseptorit sitovat erilaisia neurotrofiinien alaryhmiä. Esimerkiksi, NGF sitoo trk A:n, mutta ei trk B:tä; NT-3 sitoo ensisijaisesti trk C:n ja vähemmässä määrin trk A:n (kuitenkin, NT-3:n sitoutumisesta trk A:han saadaan vähäinen, jos lainkaan, havaittava funktionaalinen aktiivisuus). trk A:n tärkeys trk-suvussa ja molekyylimekanismit, jotka ovat

tulosta trk A:n tyrosiinikinaasiaktiivisuudesta, ovat ilmeisiä oletetun yhteyden vuoksi NGF:n ja tiettyjen neurodegeneratiivisten sairauksien välillä.

Säilyttäen tämän keskittämisen olisi erittäin toivottavaa idetifioida aineita, jotka lisäävät neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivisuutta. Tällaiset aineet tarjoaisivat sen edun, että neurotrofiinien molekyylimekanismeja ymmärretään lisää ja käytetään, samoin kuin käytettäväksi terapeuttisina aineina neurodegeneratiivisten sairauksien hoitamista varten.

Keksinnön yhteenveto

Laajimmassa merkityksessään keksintö suunnataan K-252a-johdannaisiin. K-252a on indolokarbatsolialkaloidi, joka eristettiin alunperin Nocardiosis sp. viljelmästä (Kase et al. 39 J. Antibiotics 1059, 1986). K-252a on useiden entsyymien inhibiittori, mukaan lukien proteiinikinaasi C ja trk tyrosiinikinaasi (katso, Kase et al. 142 Biochem. Biophys. Res. Comm. 436, 1987; Nakamishi et al. 263 J. Biol. Chem. 6215, 1988; ja Berg et al. 267 J. Biol. Chem. 13, 1992). Yhdenmukainen trk tyrosiinikinaasiaktiivisuuden inhibition kanssa, K-252a estää NGF:n välittämän solun eloonjäämisen joissakin in vitro soluanalyyseissä, mutta ei muissa analyysisysteemeissä (katso Kuizumi et al. 8 J. Neurosci. 715, 1988; Doherty et al. 96 Neurosci. Lett. 11, 1988; mutta katso Borasio 108 Neurosci. Lett. 207, 1990). K-252a saa aikaan neurotrofiinin tyyppisiä vaikutuksia tietyissä neuronaalisissa solutyypeissä, mutta kemiallisesti samankaltainen K-252b ei saa (katso Knusel et al. 59 J. Neurochem. 715, 1992). Nämä havainnot viittaavat siihen, että moninkertaiset molekyylit, mukaan lukien proteiinit, ovat vuorovaikutuksessa K-252a:n kanssa (Coussens et al. 233 Science 859, 1986). K-252a ja K-252b vaikuttavat trk:n fosforylaatiotilaan. Esimerkiksi, K-252a voi inhiboida neurotrofiinin aiheuttamaa reseptorin autofosforylaatiota (Squinto et al. WO 93/00909); joissakin

puitteissa K-252a ja K-252b kuitenkin voimistavat kohdesolun toimintaa ja trk:n trk-tyrosiinifosforylaatiota, jota NT-3 välittää (katso Knusel, yllä).

Edellä keskustellut ristiriitaiset tiedot osoittavat, että tarkkaa lähestymistä ennustettaessa K-252a:n funktionaalisten aktiivisuuksien sotavarustusta ei voida helposti varmistaa tai ennustaa. Tätä kohtaa tuetaan edelleen, kun harkitaan K-252a:n ehdotettuja käyttöjä: kasvaimen inhibitiota (US-patentti 4 877 776; US-patentti 5 093 330; EP-julkaisu 238 011 nimellä Nomato); anti-insektisidistä aktiivisuutta (US-patentti 4 735 939); ja tulehduksen inhibitiota (US-patentti 4 816 450).

Olemme havainneet, että tietyt määritellyt yhdisteet, jotka yleisesti kuvataan K-252a-johdannaisina (esitetty yksityiskohtaisesti alla), ovat käyttökelpoisia lisämään neurotrofiiniherkkien solujen neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivisuutta.

Kuten tässä on käytetty, termit "lisätä" ja "lisääminen", kun niitä käytetään modifioimaan fraasia "neurotrofiinin aiheuttama aktiivisuus", tarkoittavat kumpikin, että K-252a-johdannaisen ja neurotrofiinin yhdistelmällä on verrattavasti suurempi vaikutus aktiivisuuden aiheuttamiseen kuin neurotrofiinilla yksin on sen aktiivisuuden aiheuttamiseen.

Kuten tässä on käytetty, fraasi "neurotrofiinin aiheuttama aktiivisuus" tarkoittaa mitä tahansa vastetta, joka saadaan suoraan tai epäsuoraan neurotrofiinin sitoutumisesta neurotrofiiniherkkään soluun ja josta saadaan aikaan neurotrofiinireseptoriin liittyneiden tyrosiinitähteiden autofosforylaatio. Edullisimmin neurotrofiinireseptori on trk-reseptori. Tyypillisiä vasteita, jotka saadaan suoraan tai epäsuoraan neurotrofiinireseptoriin liittyneiden tyrosiinitähteiden autofosforylaatiosta, ovat (1) koliiniasetyylitranferaasi (ChAT) aktiivisuus; (2) selkäydinhermosolmun (DRG) hermosolun elossa pysyminen; (3) so-

lun jakautuminen (mitogeneesi); tai (4) elossa pysymisen tai kolinergisten hermosolujen ja tuntohermosolujen toiminnan edistäminen. Nämä tyypilliset vasteet liitetään tiettyjen sairauksien välittämiseen ja/tai hoitamiseen, mukaan lukien (a) Alzheimerin taudin, (b) motoriset hermosolusairaudet (esim. ALS, Parkinsonin tauti), (c) serebrovaskulaariset sairaudet (esim. halvaus, iskemia), (d) Huntingtonin taudin, (e) AIDS dementian, (f) epilepsian, (g) perifeeriset neuropatiat (esim. ne, jotka vaikuttavat DRG-hermosoluihin kemoterapiaan liittyvässä perifeerisessä neuropatiassa), (h) sairaudet, jotka aiheutuvat kiihottavista aminohapoista, samoin kuin sairaudet, jotka liittyvät aivojen tai selkäytimen tärähdysvaurioihin tai tunkeutuviin vaurioihin. Sellaisenaan K-252a-johdannaisia voidaan käyttää sairauksien välityksessä ja/tai hoidossa, jotka johtuvat esim. solujen, joihin neurotrofiini voi sitoutua, kuolemasta tai toimintahäiriöstä, esim. kolinergiset, tunto- tai DRG-hermosolut.

Kuten fraasissa "neurotrofiinin aiheuttama aktiivisuus" käytetään, termi "neurotrofiini" käsittää sekä endogeenisen että eksogeenisen neurotrofiinin, jossa "endogeeninen" viittaa jo läsnä olevaan neurotrofiiniin ja "eksogeeninen" viittaa systeemiin lisättyyn neurotrofiiniin. Kuten on määritelty, "neurotrofiinin aiheuttama aktiivisuus" käsittää aktiivisuuden, jonka aiheuttaa: (1) endogeeninen neurotrofiini; (2) eksogeeninen neurotrofiini; ja (3) endogeenisten ja eksogeenisten neurotrofiinien yhdistelmä.

Kuten tässä on käytetty, fraasi "neurotrofiiniherkkä solu" tarkoittaa solua, joka käsittää reseptorin, johon neurotrofiini voi sitoutua spesifisesti. Edullisimmin reseptori on trk-reseptori. Tyypillisiin neurotrofiiniherkkiin soluihin kuuluvat hermosolut ja ei-neuronaaliset solut.

Kuten tässä on käytetty termi "trk" viittaa sukuun suuren affiniteetin neurotrofiinireseptoreita, jotka käsittävät trk A:n, trk B:n ja trk C:n, ja muihin membraaniin liittyviin proteiineihin, joihin neurotrofiini voi sitoutua ja joka sitoutuminen johtaa tyrosiinitähteen autofosforylaatioon, joka liittyy tällaiseen membraaniin liittyvään proteiiniin, ja funktionaalisen vasteen suoraan tai epäsuoraan aktivointiin. Kuten tässä on käytetty, termi "neurotrofiini" tarkoittaa polypeptidiä, joka suoraan tai epäsuoraan edistää solun, kuten hermosolun, elossa pysymistä tai toimintaa. Tyypillisiin neurotrofiineihin kuuluvat hermokasvutekijä (NGF), neurotrofiini-3 (NT-3), neurotrofiini-4/5 (NT-4/5) ja aivoista johdettu neurotrofinen tekijä (BDNF).

Kuten tässä on käytetty, termi "hermosolu" käsittää kolinergiset hermosolut ja tuntohermosolut. Kuten tässä on käytetty, fraasi "kolinergiset hermosolut" tarkoittaa hermosoluja keskushermostossa (CNS) ja ääreishermostossa (PNS), joiden neurotransmitteri on asetyylikoliini. Kuten tässä on käytetty, fraasi "tuntohermosolut" käsittää hermosolut, jotka ovat alttiita ympäristövihjeille (esim. lämpötila, liike) esimerkiksi nisäkkään ihosta, lihaksesta ja nivelistä. Tyypillinen tuntohermosolu on hermosolu DRG:stä.

Kuten tässä on käytetty, termi "K-252a-johdannainen" käsittää ne yhdisteet, jotka esitetään tarkemmin alla; yleensä K-252a-johdannaiset, kuten tässä on esitetty, ovat kemiallisesti modifioituja K-252a:n muotoja.

Kuten alla on yksityiskohtaisesti esitetty, K-252a-johdannaisen kyky lisätä neurotrofiiniherkän solun neurotrofisesti aiheutettua aktiivisuutta voidaan määrittää käyttäen mitä tahansa seuraavista analyyseistä:

1. etuaivopohjan hermosolun ChAT-analyysi; tai
2. DRG-hermosolun elossa pysymisanalyysi; tai
3. PC-12 trk tyrosiinifosforylaatioanalyysi; tai

4. trk-reseptorin mitogeneesianalyysi.

ChAT katalysoi neurotransmitteri asetyylikoliinin synteesiä ja sitä pidetään siksi entsymaattisena leimana funktionaaliselle kolinergiselle hermosolulle (so. kolinerginen hermosolu, joka on tai joka pystyy selviytymään tai toimimaan). DRG-hermosolun elossa pysymistä voidaan analysoida in vitro väriaineen spesifisen pidättämisen kvantitaatiolla ja entsymaattisella muuttamisella elävillä hermosoluilla. Tyrosiinin fosforylaatiota voidaan arvioida käyttäen PC-12 (pahanlaatuinen neuronaalinen edeltäjäsolulinja feokromosytoomasta) soluja; tällainen fosforylaatio voidaan helposti havaita immunosaostamalla ja suorittamalla trk:n elektroforeesi vasta-aineella, joka tunnistaa trk A:n, B:n ja C:n sytoplasma-alan, minkä jälkeen havaitaan käyttäen leimattua anti-fosfotyrosiini vasta-ainetta. Mitogeneesi, jota välittävät solulinjat, jotka transfektoidaan erikseen trk A:lla, trk B:llä ja trk C:llä, ottaa huomioon K-252a-johdannaisen kyvyn lisätä neurotrofiiniherkän solun neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivisuutta (esim. mitogeneesi NT-3:n sitomisen trk-reseptoreihin välittämänä).

Keksinnön muut piirteet ja edut tulevat ilmeisiksi seuraavasta edullisten toteutusmuotojen kuvauksesta ja vaatimuksista.

Edullisten toteutusmuotojen kuvaus

Ensin kuvataan piirrokset.

Piirrokset

Kuvio 1 on graafinen esitys, joka havainnollistaa NT-3:n annosvaikutuksen ChAT-aktiivisuudelle alkioasteella olevan rotan etuaivopohjaviljelmissä.

Kuvio 2 on graafinen esitys, joka kuvaa tyypillisen edustajan K-252a funktionaalisen johdannaisen (I-16) ja NT-3:n annosvaikutuksen ChAT-aktiivisuudelle alkioasteella olevan rotan etuaivopohjaviljelmissä.

Kuvio 3 on graafinen esitys, joka havainnollistaa NT-3:n annosvaikutuksen selkäydinhermosolmun hermosolun elossa pysymiselle in vitro.

Kuvio 4 on graafinen esitys, joka havainnollistaa NT-3:n ja tyypillisen edustajan K-252a funktionaalisen johdannaisen (I-16) annosvaikutuksen selkäydinhermosolmun hermosolun elossa pysymiselle in vitro.

Kuvio 5 on immunonäytelevy, joka osoittaa trk solureseptorin lisääntyneen tyrosiinifosforylaation, kun PC-12 solut saatetaan kosketuksiin K-252a funktionaalisella johdannaisella.

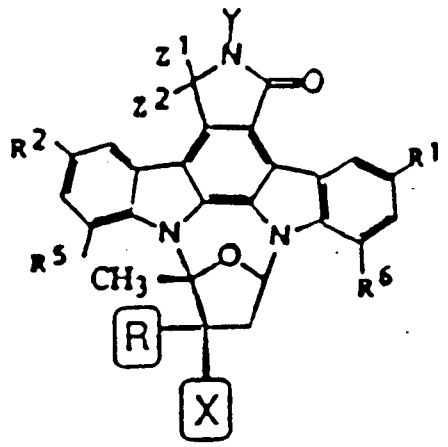
Kuvio 6 on kuvio, joka esittää yhdisteiden I-9 ja I-14 kemiallisen synteesin.

Kuvio 7 on kuvio, joka esittää yhdisteiden I-15 ja I-21 kemiallisen synteesin.

Tässä esitetään K-252a-johdannaiset, jotka ovat käyttökelpoisia lisäämään neurotrofiiniherkkien solujen neurotrofiinin aiheuttamaa aktiivisuutta. Edullisissa toteutusmuodoissa käytetään vähintään yhden tyyppistä eksogeenistä neurotrofiinia K-252A-johdannaisen yhteydessä; edullisimmin vähintään yksi näin käytetyistä eksogeenisistä neurotrofiineista on NT-3.

K-252a-johdannaisilla, kuten tässä esitetään, on kaavat I-VI.

A. Kaava I:



jossa:

a) Z^1 ja Z^2 yhdessä merkitsevät happea; kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 on itsenäisesti H, F, Cl, Br, I, NO_2, CN, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $NR^{13}R^{14}$, jossa kukin R^{13} ja R^{14} on itsenäisesti vety tai n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; Y on vety, OH, NH_2, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, CHO, $OCONH_2$, bentsyyli, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $(CH_2)_nOH$ tai $(CH_2)_nNH_2$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; silloin joko

1) R on OH, $OCONH_2$ tai O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; ja X on CH_2OH, CH_2NH_2 (tai sen happosuola), CH_2O-n-alkyyli, jossa on 2 - 7 hiiltä, CO_2R^7, jossa R^7 on vety tai alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $CONHOR^8$, $CONH(CH_2)_nOR^8$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6 ja R^8 on vety tai asyylijohdannaisryhmä, tai $CONHR^9$, jossa R^9 on alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai

2) R ja X yhdistetään, jolloin muodostuu liitosryhmä, jolla on kaava $-CH_2OCR^{10}R^{11}O-$, jossa kukin R^{10} ja R^{11} on itsenäisesti vety tai alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai $-CH_2NR^{12}CO_2-$, jossa R^{12} on vety tai alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai

b) Z^1 on vety ja Z^2 on OH;

Y on vety tai CHO;

R on OH; ja

X on $CONH(CH_2)_2OH$, CO_2CH_3 tai CH_2OH; ja

R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a);

tai

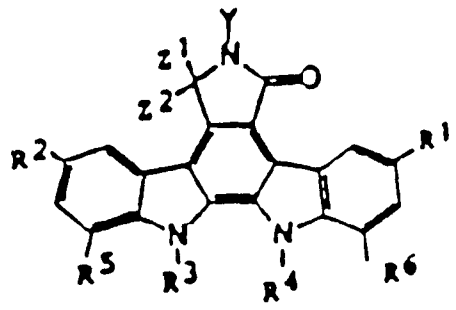
c) Z^1 ja Z^2 ovat molemmat vetyjä ja Y on vety, CHO, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $OCONH_2$; silloin joko

1) R on OH, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $OCONH_2$, paitsi että, kun Y on vety, R on OH; ja X on $CONHOR^8$, $CONH(CH_2)_nOR^8$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6 hiiltä, CH_2OH tai CO_2CH_3, paitsi että, kun Y on vety ja R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat kukin vety, X ei voi olla CO_2CH_3; tai

2) R ja X yhdistetään, jolloin muodostuu liitosryhmä, jolla on kaava $-CH_2NR^{12}CO_2-$; ja kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a), paitsi että, kun R^1 on bromi, X ei voi olla CH_2OH; tai

d) Z^1 on vety ja Z^2 on SR^{15}, jossa R^{15} on n-alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; ja Y, R ja X ovat määriteltyjä kohdassa b), paitsi että, kun R^{15} on C_2H_5, X ei voi olla CH_2OH; ja R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a).

B. Kaava II:



jossa

a) Z^1 ja Z^2 yhdessä merkitsevät happea, silloin joko

1) kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 on itsenäisesti H, F, Cl, Br, I, NO_2, CN, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $NR^{13}R^{14}$, jossa kukin R^{13} ja R^{14} on itsenäisesti vety tai n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; ja

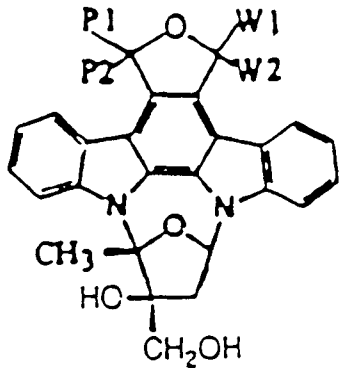
Y on H, OH, NH_2, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, CHO, bentsyyli, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $(CH_2)_nOH$ tai $(CH_2)_nNH_2$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; ja kukin R^3 ja R^4 on itsenäisesti vety tai $(CH_2)_nCH(OH)CH_2OH$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; tai

2) kukin R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 ja R^6 on itsenäisesti vety ja Y on määritelty kohdassa a) 1), paitsi että Y ei voi olla bentsyyli; tai

b) Z^1 on vety ja Z^2 on vety, OH tai SR^{15}, jossa R^{15} on n-alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä;

Y on vety tai CHO; ja
kukin R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 on itsenäisesti vety.

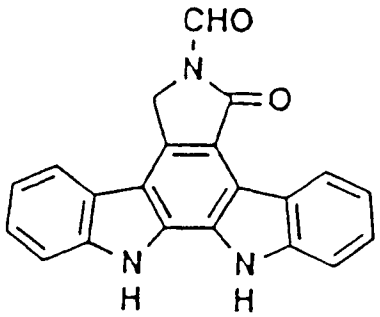
C. Kaava III:



jossa:

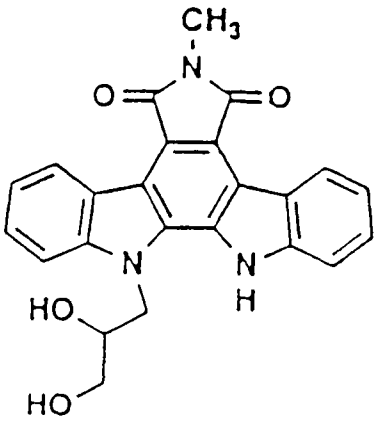
a) kukin P1 ja P2 on vety tai P1 ja P2 yhdessä merkitsevät happea; ja kukin W1 ja W2 on vety tai W1 ja W2 yhdessä merkitsevät happea; edellyttäen, että kukin P1 ja P2 on erilainen kuin W1 ja W2.

D. Kaava IV:



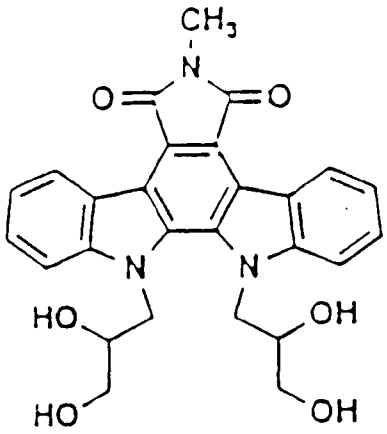
tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

E. Kaava V:



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

F. Kaava VI:



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

Kaavat IV, V ja VI ovat lajeja, jotka johdetaan kaavan II mukaisesta suvusta.

"Farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat", kuten tässä on määritelty, ovat epäorgaanisia happoadditiosuoloja, kuten vetykloridi, sulfaatti ja fosfaatti; ja orgaanisia happoadditiosuoloja, kuten asetaatti, maleaatti, fumaraatti, tartraatti ja sitraatti. Esimerkkejä farmaseuttisesti hyväksyttävistä metallisuoloista ovat alkalimetallisuolat, kuten natriumsuola ja kaliumsuola, maa-alkalimetallisuolat, kuten magnesiumsuola ja kalsiumsuola, alumiinisuola ja sinkkisuola. Esimerkkejä farmaseuttisesti hyväksyttävistä ammoniumsuoloista ovat ammoniumsuola ja tetrametyyliammoniumsuola. Esimerkkejä farmaseuttisesti hyväksyttävistä orgaanisista amiiniadditiosuoloista ovat suolat morfoliinin ja piperidiinin kanssa. Esimerkkejä farmaseuttisesti hyväksyttävistä aminoadditiosuoloista ovat suolat lysiinin, glysiinin ja fenyylialaniinin kanssa.

Edullisia K-252a-johdannaisten toteutusmuotoja ovat ne, joissa tehdään taulukossa 1 listatut substituoinnit (roomalainen numero merkitsee kaavan numeron, josta lajit johdetaan).

Taulukko 1

Yhdiste[1]	Y	X	R	Z^1Z^2[2]
IV	CHO	-	-	H,H
II-2	H	-	-	O
I-1	H	CO_2CH_3	OH	O
I-2	H	$CO_2n\text{-}C_3H_7$	OH	O
I-3	H	$CO_2n\text{-}C_4H_9$	OH	O
I-4	H	$CO_2n\text{-}C_6H_{13}$	OH	O
I-5	CH_3	CO_2CH_3	OCH_3	O
I-6[3]	H	CO_2CH_3	OH	O
III-1[7]	-	CH_2OH	OH	-
I-7	H	$CONH(CH_2)_2OH$	OH	H,H
I-8[6]	H	$-CH_2OC(CH_3)_2O-$	-	O
I-9[6]	NH_2	$-CH_2OC(CH_3)_2O-$	-	O
I-10	NH_2	CH_2OH	OH	O
I-11	H	$CONHCH_3$	OH	O
I-12[6]	H	$-CH_2NHCO_2-$	-	O
I-13[6]	H	$-CH_2H(CH_3)CO_2-$	-	O
I-14	CH_3	CH_2OH	OH	O
I-15	CH_2CH_2OH	CH_2OH	OH	O
V[4]	CH_3	-	-	O
VI[5]	CH_3	-	-	O
I-16	NH_2	$CH_2NH_2 \cdot HCl$	OH	O
II-5	CH_3	-	-	O
I-17	OH	CH_2OH	OH	O
I-18	H	CO_2CH_3	OH	H,OH
I-19	H	CO_2CH_3	OH	H,SC_2H_5
I-20	H	CH_2OH	-	OHH,OH
I-21[6]	H	$-CH_2N(C_2H_5)CO_2-$	-	O
I-22	H	CONHOH	OH	H,H

Taulukko 1 (jatkoa)				
I-23	CH_3	CO_2CH_3	OCH_3	H,H
I-24[6]	CH_3	$-CH_2N(CH_3)CO_2-$	-	H,H
I-25	$OCONH_2$	CO_2CH_3	$OCONH_2$	H,H
III-2[8]	-	CH_2OH	OH	-

(1) R^1 ja R^2 ovat vetyjä, paitsi silloin, kun erikseen mainitaan [3]; R^5 ja R^6 ovat vetyjä; R^3 ja R^4 ovat vetyjä paitsi silloin, kun erikseen mainitaan [4] ja [5].

(2) Z^1 ja Z^2 ovat kuten mainitaan, tai ne yhdistetään yhteen, jolloin edustetaan happea, silloin kun mainitaan.

(3) R^1 ja R^2 ovat molemmat bromi.

(4) R^3 on $CH_2CH(OH)CH_2OH$ ja R^4 on vety.

(5) R^3 ja R^4 ovat molemmat $CH_2CH(OH)CH_2OH$.

(6) X ja R yhdistetään, jolloin muodostuu liitosryhmä.

(7) P1, P2 yhdistetään, jolloin tarkoitetaan happea; W1, W2 = H.

(8) P1, P2 = H; W1, W2 yhdistetään, jolloin tarkoitetaan happea.

Erityisen edullisia K-252a-johdannaisten toteutusmuotoja ovat ne, joissa tehdään taulukossa 2 listatut substituoinnit.

Taulukko 2

Yhdiste[1]	Y	X	R	Z^1Z^2[2]
II-2	H	-	-	O
I-4	H	$CO_2n\text{-}C_6H_{13}$	OH	O
I-6[3]	H	CO_2CH_3	OH	O
I-10	NH_2	CH_2OH	OH	O
I-14	CH_3	CH_2OH	OH	O
I-15	CH_2CH_2OH	CH_2OH	OH	O
V[4]	CH_3	-	-	O
I-16	NH_2	$CH_2NH_2 \cdot HCl$	OH	O
I-7	H	$CON(CH_2)_2OH$	OH	H,H
VI[5]	CH_3			

(1) R^1 ja R^2 ovat vetyjä, paitsi silloin, kun erikseen mainitaan [3]; R^4, R^5 ja R^6 ovat vetyjä; R^3 on vety, paitsi silloin, kun erikseen mainitaan [4].

(2) Z^1 ja Z^2 yhdistetään, jolloin tarkoitetaan happea.

(3) R^1 ja R^2 ovat molemmat bromi.

(4) R^3 on $CH_2CH(OH)CH_2OH$.

(5) R^3 ja R^4 ovat molemmat $CH_2CH(OH)CH_2OH$.

Tässä esitetyillä K-252a-johdannaisilla on käyttöä erilaisissa puitteissa. Esimerkiksi tutkimusympäristössä yhdisteitä voidaan käyttää tutkimaan, parantamaan ja määrittämään malleja autofosforylaation "myötävirta"-vaikutuksia varten, samoin kuin neurotrofiinien funktionaalisten aktiivisuuksien selventämisessä. Reseptoriin liitettyjen tyrosiinikinaasien tyrosiinitähteiden autofosforylaatio (esim. trk:ssa) on absoluuttinen vaatimus signaalinsiirtoreittien aktivoimiseksi, jotka reitit säätelevät esim. hermosolujen funktionaalisia vasteita; siis, esitet-

tyjä yhdisteitä, jotka esim. lisäävät tällaista autofosforylaatiota, voidaan käyttää in vitro analyysien kehittämisessä molekyylimekanismien analyysiä varten, joihin mekanismeihin vaikutetaan tällaisella autofosforylaatiolla. Tällä tavalla esitettyjä yhdisteitä voidaan käyttää suunnittelussa trk-reseptorin sitoutumisessa neurotrofiineihin. Esitettyjen K-252a-johdannaisten käyttökelpoisuutta mallisysteemien suunnittelussa neurotrofiinin kaltaisten aineiden löytämiseksi korostetaan edelleen seuraavilla: (1) neurotrofiinin signaalireitin tarkkaa mekanismia ei täysin ymmärretä; ja (2) neurotrofiinien liittämistä hermosolujen troofisiin ja elossa pysymistä edistäviin vaikutuksiin ei myöskään täysin ymmärretä. Siksi esitettyjä K-252a-johdannaisia voidaan käyttää esim. aineiden löydössä, joilla on marginaalinen neurotrofiinin kaltainen aktiivisuus, sillä tällaisista aineista, kun ne yhdistetään esitettyjen K-252a-johdannaisten kanssa, voidaan seuloa neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisäys.

Hermosolujen degeneraatio, kuolema tai toimimattomuus, joka johtaa hermosolun degeneraatioon, on monien ihmisten neurologisten sairauksien piirre, mukaan lukien, mutta ei niihin rajoittuen, Alzheimerin taudin, motoriset hermosolusairaudet (esim. ALS, Parkinsonin tauti); serebrovaskulaariset sairaudet (esim. halvaus, iskemia); Huntingtonin taudin; AIDS dementian; epilepsian; aivojen tai selkäytimen tärähdysvauriot tai tunkeutuvat vauriot; perifeeriset neuropatiat (esim. ne, jotka vaikuttavat DRG-hermosoluihin kemoterapiaan liittyvässä perifeerisessä neuropatiassa); ja sairaudet, jotka aiheutuvat kiihottavista aminohapoista. Koska esitetyt K-252a-johdannaiset ovat käyttökelpoisia lisäämään neurotrofiiniherkkien solujen (esim. kolinergisten, tunto- tai DRG-hermosolujen) neurotrofiinin aiheuttamia aktiivisuuksia, esitetyt yhdisteet soveltuvat edullisesti käyttöön terapeuttisina aineina. Siten, koska esitetyt yhdisteet ovat todistaneet käyt-

tökelpoisuutensa esim. lisäämään ChAT-aktiivisuutta tai DRG-hermosolun elossa pysymistä, yhdisteiden käyttökelpoisuus sairauksien hoidossa, jotka liittyvät esim. vähentyneeseen ChAT-aktiivisuuteen tai DRG-hermosolujen kuolemaan, on tämän selityksen piirissä.

K-252a funktionaalisten johdannaisten antaminen

Tässä tarjotut yhdisteet voidaan formuloida farmaseuttisiksi koostumuksiksi seoksella farmaseuttisesti hyväksyttävien ei-toksisten täyteaineiden ja kantajien kanssa. Kuten edellä mainitaan, tällaiset koostumukset voidaan valmistaa käytettäväksi parenteraalisessa antamisessa, erityisesti nestemäisten liuosten tai suspensioiden muodossa; oraalista antamista varten, erityisesti tablettien tai kapselien muodossa; tai nenän sisään, erityisesti jauheiden, nenätippojen tai aerosolien muodossa.

Koostumus voidaan sopivasti antaa yksikköannosmuodossa ja se voidaan valmistaa millä tahansa farmaseuttisella alalla tunnetulla menetelmällä. Katso Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Formulaatiot parenteraalista antamista varten voivat sisältää yleisinä täyteaineina steriiliä vettä tai suolaliuosta, polyalkyleeniglykoleja, kuten polyetyleeniglykolia, kasvisperäisiä öljyjä, hydrattuja naftaleenejä ja niiden kaltaisia. Erityisesti bioyhteensopiva, biohajoava laktidipolymeeri, laktidi/glykolidi-kopolymeeri tai polyoksietyleeni-polyoksipropyleeni-kopolymeerit voivat olla käyttökelpoisia täyteaineita kontrolloimaan K-252a-johdannaisten vapautumista. Muihin mahdollisesti käyttökelpoisiin parenteraalisiin jakelusysteemeihin kuuluvat etyleeni-vinyyliasetaatti-kopolymeerihiukkaset, osmoottiset pumput, siirrännäisinfuusiosysteemit ja liposomit. Formulaatiot inhalaatioantamista varten sisältävät täyteaineina esimerkiksi laktoosia, tai ne voivat olla vesipitoisia liuoksia, jotka sisältävät esimerkiksi polyoksietyleeni-9-lauryylieetteriä, glykokolaattia ja deoksikolaattia, tai

öljymäisiä liuoksia nenätippojen muodossa antamista varten, tai geelinä levitettäväksi nenän sisäisesti. Formulaatiot parenteraalista antamista varten voivat käsittää myös glykokolaatin poskeen antamista varten, metoksisalisylaatin rektaalia antamista varten tai sitruunahapon emättimeen antamista varten.

Tämän keksinnön materiaaleja voidaan käyttää ainoana aktiivisena aineena farmaseuttisessa aineessa tai niitä voidaan käyttää yhdistelmässä muiden aktiivisten aineosien kanssa, esim. neurotrofiinien, tai muiden tekijöiden (so. kasvutekijät) tai lääkkeiden kanssa, jotka helpottaisivat neuronaalista elossa pysymistä tai aksonaalista kasvua neurologisissa sairauksissa.

Tässä kuvatun K-252a funktionaalisen johdannaisen pitoisuus terapeuttisessa koostumuksessa vaihtelee riippuen lukuisista tekijöistä, mukaan lukien annettavan K-252a funktionaalisen johdannaisen annoksen, käytettyjen yhdisteiden kemialliset ominaispiirteet (esim. hydrofobisuus), ja antamisreitti. Yleisesti tämän keksinnön yhdisteet voidaan tarjota vesipitoisessa fysiologisessa puskuriliuoksessa, joka sisältää noin 0,1 - 10 % paino/tilavuus yhdistettä parenteraalista antamista varten. Tyypilliset annosalueet ovat noin 1 µg/kg - 1 g/kg kehon painoa vuorokaudessa; edullinen annosalue on noin 0,01 - 100 mg/kg kehon painoa vuorokaudessa. Annettavan lääkkeen edullinen annos riippuu todennäköisesti sellaisista muuttujista kuten neurologisen sairauden edistymisen tyyppi ja laajuus, tietyn potilaan kokonaisterveystilanne, valitun K-252a-johdannaisen suhteellinen biologinen tehokkuus, yhdistetäyteaineiden formulaatio ja sen antamisreitti.

Seuraavat esimerkit esitetään selvennystarkoituksia varten eikä niiden ole tarkoitus rajoittaa esitettyä keksinnön piiriä.

Esimerkki 1

Etuaivopohjan hermosolu ChAT-analyysi

Menetelmät: Etuaivopohjaviljelmät valmistettiin E17 (Alkio päivä 17) alkioasteella olevista rotista käyttäen trypsiinin dissosiaatiota. Etuaivopohja leikeltiin ja otettiin talteen hibernaatioväliaineeseen, joka koostuu 0,3 M KH_2PO_4:sta, 20 mM natriumlaktaatista, 195 mM sorbitolista, 5 mM glukoosista, pH 7,4. Kudosta sentrifugoitiin 2 minuuttia kierrosnopeudella 50 x g. Supernatantin poistamisen jälkeen kudos suspendoitiin uudelleen 1 ml:aan 0,05-%:sta trypsiiniä kalsiumittomassa ja magnesiumittomassa Hanks Balanced Salt -liuoksessa (CMF-HBSS) ja 10 mM HEPESiin, pH 7,2, ja inkuboitiin 8 minuuttia 37 °C:ssa. Naudan seerumialbumiini (BSA) (4 %) HBSS:ssa lisättiin ja putkea sentrifugoitiin 2 minuuttia. Pelletti suspendoitiin uudelleen HBSS-puskuriin, joka sisälsi 10 mM HEPESiä pH 7,2, 0,5 % BSA:a ja DNaasia. Kudos hajotettiin mekaanisesti käyttäen tulessa puhdistettuja Pasteur-pipettejä, sitten vietiin steriilin 53 µm Nitex-suodattimen läpi ja sentrifugoitiin 5 ml:n 4-%:sta BSA:a HBSS:ssa läpi. Pelletin uudelleensuspedoinnin jälkeen viljelmäväliaineeseen, solut laskettiin hemosytometrillä. Soluja lisätiin 4 x 10^5 solua/cm^2 poly-1-ornitiinilla päällystettyihin muovisiin kudosvijelmän 96-kuoppaisiin levyihin DMEM/F12-väliaineessa (50/50 tilavuus/tilavuus), jossa on 5 % hevosen seerumia ja 0,5 % naudan sikiöseerumia. Seerumittomia olosuhteita varten käytettiin N2-väliainetta, joka sisälsi 0,05 % naudan seerumialbumiinia (Bottenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:514-517, 1979). Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa kostutetussa atmosfäärissä 5 % CO_2/95 % ilmaa 5 vuorokauden ajan. ChAT-aktiivisuus mitattiin käyttäen Fonnum-menetelmän modifikaatiota (Fonnum, J. Neurochem., 24:407-409, 1975) Ishida et al. parannusten mukaisesti, J. Neurosci., 3:1818-1823 (1983), McManaman et al., Dev. Biol., 125:311-320 (1988) ja Glicksman et al., J.

Neurochem., 61:210-211 (1993). Väliaine poistettiin täysin kustakin kuopasta ja analyysiliuos, joka sisälsi 0,1 M natriumfosfaattia, pH 7,4, 0,1 % NP-40:a, 0,15 M NaCl:a, 1,5 mM koliinikloridia, 10 mM EDTA:a, 0,1 mM eseriinisulfaattia, 3 mCi/ml (111 MBq) [^{3}H]asetyyli-CoA:a ja 100 mM asetyyli-CoA:a, lisättiin kuhunkin kuoppaan ja levyä inkuboitiin 37 °C:ssa 1,5 tuntia. Näytteet siirrettiin tuikeviaaleihin, jotka sisälsivät 1,5 ml 0,1 M natriumfosfaattipuskuria, pH 7,4, ja 1,5 ml tuikeseosta (1,25 g/l tetrafenyylibooria, 200 ml asetonitriiliä, 800 ml tolueenia, joka sisälsi 32 ml/l PPO-POPOP:a). Voimakkaan sekoittamisen jälkeen ei-vesipitoiseen faasiin sisältynyt radioaktiivisuus laskettiin käyttäen Packard Scintillation -laskinta (Model 2500TR).

Rekombinanttirotan NT-3 tuotettiin käyttäen rekombinantti baculovirus ilmennysvektoria käyttäen polyhedronpromoottorin kontrollia (Fraser, In Vitro Cell. and Dev. Biol., 25:225-235, 1989). Plasmidin (Hallböök et al., Neuron, 6:845-858, 1991) pXM-NT-3, joka sisälsi rotan NT-3 cDNA-kloonia, tarjosi Dr. Ira Black (University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Piscataway, NJ). NT-3 cDNA subkloonattiin siirtovektoriksi pVL1392 (saatiin In Vitrogen Corp.:sta, San Diego, CA) rekombinanttiviruksen tuotantoa varten. Rekombinantti baculovirus tuotettiin transfektoimalla yhdessä *Spodoptera frugiperda* hyönteissolujen kanssa (Sf-21) yksikerroksessa 1 µg:n kanssa *Autographa californica* tumaliikahikoiluvirus-DNA:ta (InVitrogen tai Baculogold™ PharMingen, San Diego, CA) ja 2 - 4 µg:n kanssa siirtovektoria Smith et al., J. Virol., 46:584-593 (1983) kalsiumfosfaattimenetelmällä. Rekombinanttitäplien varmistettiin olevan rekombinantti [^{32}P] leimattujen NT-3 sekvenssien hybridisaatiolla infektoituneiden solulysaattien näytelevyille (Summers and Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, s. 29-32, 1987). Rekombinanttivirus plakkipuhdistet-

tiin ja amplifioitiin. Hyönteisen solulinjat, *Trichoplusia ni* Tn-5B1-4 (InVitrogen Corp.) infektoitiin rekombinantti baculoviruksella infektion multiplisiteetillä 2 0,2 ml/cm^2:ssa Ex-Cell 401:a (JRH Biosciences, Lenexa, KS). Konditioitu väliaine, joka sisälsi NT-3:a, saatiin talteen 4 vuorokautta infektion jälkeen. Suunnilleen 1 litra konditioitua väliainetta, joka sisälsi NT-3:a, sentrifugoitiin kierrosnopeudella 25 000 x g 15 minuutin ajan. Supernatantti vietiin sitten 1 cm x 4 cm karboksimetyyli-Sepharose Fast Flow kolonnin läpi (Pharmacia, Piscataway, NJ). Kolonnipuskurilla (150 mM NaCl, 100 mM natriumfosfaatti pH 6,2), 250 mM NaCl:lla 100 mM Tris·HCl:ssa, pH 7,6, pesun jälkeen sitä eluoitiin sitten 500 mM NaCl:lla 100 mM:ssa Tris·HCl:a, pH 7,6. NT-3:a sisältävät fraktiot identifioitiin natriumdodekyylisulfaatti polyakryyliamidi geelielektroforeesilla (Laemmli, Nature, 277:680-685, 1970), minkä jälkeen hopeavärjäyksellä proteiinin havaitsemiseksi Morrisseyn menetelmällä, Anal. Biochem., 117:307-310 (1981) ja yhdistettiin. Sitten nämä levitettiin 4,6 x 250 mm Vydac käänteisfaasi C4 kolonnille käyttäen Rainin HPLC käyttöjärjestelmää. Pesujen sekä 0,1-%:isella trifluorietikkahapolla (TFA) ja 5-%:isella (tilavuus/tilavuus) asetonitriili/0,1-%:isella TFA:lla jälkeen NT-3 eluoitiin käyttäen lineaarista gradienttia 5 - 65-%:inen asetonitriili 0,1-%:isessa TFA:ssa. NT-3:a sisältävät fraktiot kuivattiin tyhjössä Speed-Vac:ssa (Savant, Farmingdale, NY) ilman kuumennusta. NT-3 suspendoitiin uudelleen 10 mM etikkahappoon 0,1-%:isen BSA:n kanssa ja varastoitiin erissä -70 °C:ssa.

Esimerkki 1A

ChAT-aktiivisuus, jota NT-3 välittää

NT-3:n neurotrofista aktiivisuutta analysoitiin määrittämällä koliiniasetyylitransferaasiaktiivisuus (ChAT) etuaivopohjaviljelmissä, seuraten edellä kuvattua metodologiaa. NT-3 lisättiin mainituissa pitoisuuksissa

sen jälkeen, kun soluja oli maljaviljelty 2 tunnin ajan, jolloin sallitaan liittyminen substraattiin. ChAT-aktiivisuus mitattiin 5 vuorokauden kuluttua in vitro. NT-3 johti annosriippuvaiseen kasvuun ChAT-aktiivisuudessa etuaivopohjaviljelmissä mahksimitehokkuudella (1,5 - 2-kertainen kasvu) 1 000 ng/ml (kuvio 1). Seerumittomassa väliaineessa NT-3 oli tehokkaampi (2- - 2,5-kertainen kasvu) 1 000 ng/ml:ssa (kuvio 1).

Esimerkki 1B

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen K-252a-johdannaista I-16

K-252a-johdannaisen I-16 kyky lisätä NT-3 aktiivisuutta etuaivopohjaviljelmissä määritettiin käyttäen ChAT-aktiivisuutta kolinergisen hermosolutoiminnan tai eloonjäämisen mittana. I-16:lla yksin ei ollut vaikutusta ChAT-aktiivisuuteen. I-16:sta NT-3:n ollessa läsnä saatiin kuitenkin annosriippuvainen ChAT-aktiivisuuden kasvu (kuvio 2) tasoille, jotka ovat suurempia kuin ne, tulevat esiin NT-3:lla yksinään. Esitetyt tulokset ovat tulosta NT-3:n ja I-16:n yksittäisestä käytöstä viljelyn aloituspäivänä, osoittaen pitkäaikaisen vaikutuksen etuaivopohjan kolinergisten hermosolujen elossa pysymiselle tai toiminnalle. Menetelmät kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkissä 1.

Esimerkki 1C

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen erilaisia K-252a-johdannaisia

K-252a:n funktionaalista johdannaisista testattiin etuaivopohjan ChAT-analyysissä niiden kyky tehostaa NT-3 aktiivisuutta. Tiedot taulukoissa 3A ja 3B osoittavat, että K-252a-johdannaiset johtivat NT-3 aktiivisuuden merkittävään kasvuun yhdessä tai useammassa testatussa pitoisuudessa. 24 näistä johdannaisista osoittaa aktiivisuutta 10nM:ssa NT-3:a. Seerumin ollessa läsnä tai poissa listatut yhdisteet lisäsivät ChAT-aktiivisuutta verrattuna ChAT-aktiivisuuteen, joka tuli esiin NT-3:lla yksinään.

Listatuilla johdannaisilla ei ollut vaikutusta ChAT-aktiivisuuteen NT-3:n ollessa poissa. Tietomme osoittavat NT-3:n ja listatun johdannaisen yksittäisen käytön tuloksen viljelyn aloituspäivänä, osoittaen pitkäaikaisen vaikutuksen etuaivopohjan kolinergisten hermosolujen elossa pysymiselle tai toiminnalle. Menetelmät kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkissä 1.

Taulukko 3A

Yhdiste	ChAT-aktiivisuus (%NT-3) etuaivopohjaviljelmät 10nM	100nM	300nM
IV	inaktiivinen	115	131
II-2	inaktiivinen	inaktiivinen	139
I-1	172	136	toksinen
I-2	138	142	108
I-3	135	148	130
I-4	120	149	146
I-5	115	150	150
I-6	146	183	183
III-1	120	120	119
I-7	121	inaktiivinen	toksinen
I-8	118	132	120
I-9	128	160	172
I-10	120	188	185
I-11	163	inaktiivinen	inaktiivinen
I-12	153	inaktiivinen	inaktiivinen
I-13	172	141	toksinen
I-14	155	181	181
I-15	159	177	176
V	inaktiivinen	142	148
VI	inaktiivinen	130	129
I-16	143	196	206
II-5	inaktiivinen	122	151
I-17	154	176	127
I-18	inaktiivinen	123	149
I-19	inaktiivinen	113	116
I-20	112	128	127
I-21	165	143	inaktiivinen
III-2	159	181	177

Taulukko 3B		
	ChAT-aktiivisuus (%NT-3) etuaivopohjaviljelmät	
Yhdisteet	10nM	100nM
I-23	inaktiivinen	128
I-22	150	inaktiivinen
I-24	125	165
I-25	125	164

Esimerkki 2

DRG-hermosolun elossa pysymisanalyysi

Menetelmät: Selkäydinhermosolmut leikeltiin alkioasteella olevista 9 päivän ikäisistä kananpoika-alkioista (vaihe 35) ja dissosioidut solut valmistettiin myöhemmällä Dispase-käsittelyllä (neutraali proteaasi, Collaborative Research). Hermosoluja lisättiin alhaisella tiheydellä ($1,8 \times 10^4$ solua/cm^2) 96-kuoppaisiin poly-l-ornitiinilla ja laminiinilla päällystettyihin levyihin. Soluja viljeltiin 48 tuntia seerumittomassa N_2 väliaineessa, joka sisälsi 0,05 % naudan seerumialbumiinia (Bottenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:541-517, 1979) 37 °C:ssa kostutetussa atmosfäärissä, 5-%:inen CO_2/95-%:inen ilma. Solun elossa pysyminen määrättiin 48 tunnissa käyttäen kalseiinielinkykyisyysfluorimetristä analyysiä. Kalseiini AM laimennettiin 2 x Dulbeccon fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (DPBS) 2 x lopulliseen analyysipitoisuuteen (6 µM), ja 100 µl laimennettua kalseiini AM:a lisättiin viljelmäkuoppiin, jotka sisälsivät 100 µl väliainetta. Levyjä inkuboitiin sitten 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Sitten solut pestiin 4 kertaa PBS:lla ylimääräisen kalseiinin poistamiseksi, jota solut eivät pidättäneet. Levy luettiin käyttäen Millipore levyluenta fluorimetriä (Cytofluor 2350) emissiolla = 485 nm ja viritysellä = 538 nm. Nolla-arvojen (kuopat, jotka sisältävät väliainetta, mutta eivät

soluja) vähentämisen jälkeen suhteelliset fluoresoivat arvot heijastavat solun elossa pysyminen kvantitatiivisen mittauksen pääasiallisesti (> 95 %) neuronaalisissa viljelmissä (Bozyczko-Coyne et al., J. Neuroscience Methods, 50:205-216, 1993).

Esimerkki 2A

NT-3:n välittämä DRG-hermosolun elossa pysyminen

NT-3:n vaikutus neuronaaliseen elossa pysymiseen analysoitiin selkäydinhermosolmun hermosoluviljelmissä. Solun elossa pysymistä mitattiin kalseiini AM:n pidättämisellä (Molecular Probes, Eugene, OR), joka on väriaine fluoreseiinidiasetaatin analogi. Solut pidättävät kalseiinia ja elävät solut pilkkovat sitä solunsisäisesti fluoresoiviksi suoloiksi, joita elävien solujen koskemattomat mebraanit pidättävät. Elävien hermosolujen mikroskooppiset laskennat korreloivat suoraan suhteellisten fluoresenssiarvojen kanssa, jotka saatiin käyttäen fluorimetristä elinkykyisyysanalyysimenetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 2. Tämä menetelmä tarjoaa solun elossa pysymisen luotettavan ja kvantitatiivisen mittauksen. Selkäydinhermosolmun hermosolun elossa pysyminen lisääntyi NT-3:lla annosriippuvaisella tavalla, joka on maksimissaan 1,6-kertainen verrattuna kontrolliin 50 ng/ml:ssa NT-3:a. Menetelmät kuvattiin esimerkissä 2.

Esimerkki 2B

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen K-252a-johdannaista I-16

K-252a-johdannaisen I-16 ollessa poissa, NT-3 sai aikaan 40-%:n kasvun DRG-solun elossa pysymisessä verrattuna käsittelemättömiin kontrolliviljelmiin (kuvio 3). 100 tai 300 nM I-16:a ollessa läsnä oli selvä kasvu NT-3:n kyvyssä edistää DRG:n elossa pysymistä arvoihin, jotka ovat suurempia kuin 200 % käsittelemättömiä kontrolliviljelmiä. NT-3:n ollessa poissa I-16:lla ei ollut vaikutusta

DRG-hermosolujen elossa pysymiseen. Menetelmät kuvattiin yksityiskohtaisesti esimerkissä 2.

Esimerkki 2C

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen erilaisia K-252a-johdannaisia

Useista erilaisista K-252a:n funktionaalisista johdannaisista testattiin DRG neuronaalisessa eloonjäämisanalyysissä kyky lisätä NT-3 aktiivisuutta. Johdannaiset, jotka testattiin 100 nM:ssa, johtivat merkittävään NT-3 aktiivisuuden kasvuun. Taulukossa 4 listatut yhdisteet lisäsivät neuronaalista eloonjäämistä enemmän kuin NT-3:n yksin aiheuttama lisäys. Esitetyt tulokset ovat tulokset NT-3:n ja listattujen yhdisteiden yksittäisen käytön viljelyn aloituspäivänä, osoittaen pitkäaikaisen vaikutuksen neuronaaliseen elossa pysymiseen. Menetelmät kuvattiin yksityiskohtaisesti esimerkissä 2.

Taulukko 4

Yhdiste	DRG hermosolujen elossa pysyminen (%NT-3) **100nM**
II-2	162
I-4	134
I-6	174
I-10	178
I-14	159
I-15	182
V	148
I-16	154

Esimerkki 3

PC-12 trk tyrosiinifosforylaatioanalyysi

Menetelmät: PC-12 soluja (saatiin American Type Culture Collectionista) säilytettiin Dulbecco's Modified Eagle's Mediumissa (DMEM), joka sisälsi 2 mM glutamiinia, 7,5 % hevosen seerumia, 7,5 % naudan sikiöseerumia, 1 mM natriumpyruvaattia ja penisilliiniä ja streptomysiiniä. Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa kostutetussa atmosfäärissä 5 % CO_2/95 % ilma. Alayhtymäkohdan omaavia solun yksikerroksia inkuboitiin 37 °C:ssa 2 tunnin ajan seerumittomassa DMEM:ssa, joka sisälsiä vehikkeliä tai K-252a funktionaalista johdannaista. Silloin kun mainittiin, NT-3 (50 ng/ml) lisättiin 37 °C:ssa 5 minuutin ajan. Kaikki näytteet, mukaan lukien kontrollit, altistettiin 0,075-%:iselle DMSO:lle. Kokeen päättämiseksi solut huuhdeltiin jääkylmällä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS), minkä jälkeen hajotettiin RIPA-puskurissa (1-%:inen Triton X-100, 1-%:inen natriumdeoksikolaatti, 0,1-%:inen natriumdodekyylisulfaatti, 150 mM natriumkloridi, 10 mM Tris, pH 7,5, joka sisältää 20 µg/ml aprotiniiniä, 1 mM fenyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF), 10 µM leupeptiiniä ja 1 mM natriumvanadaattia). Lysaatit vietiin 26 mittaneulan läpi, jolloin leikataan DNA, minkä jälkeen sentrifugoidaan 15 minuuttia kierrosnopeudella 14 000 x g. Supernatantit normalisoitiin proteiinipitoisuuteen. Pan-anti-<u>trk</u>-vasta-aine (joka tunnistaa <u>trk</u> A:n, <u>trk</u> B:n ja <u>trk</u> C:n) lisättiin lysaatteihin ja 2 tunnin inkuboinnin jälkeen 4 °C:ssa immuunikompleksi otettiin talteen Protein A-Sepharose helmille. Proteiinit eluoitiin helmistä 4x Laemmli-puskurilla (Laemmli, <u>Nature</u>, 277:680-685, 1970), erotettiin natriumdodekyylisulfaatti polyakryyliamidi geelielektroforeesilla ja siirrettiin PVDF-membraaniin. Membraani tutkittiin anti-fosfotyrosiini vasta-aineella (UBI). Vasta-aineen sitominen visualisoitiin lisääntyneellä kemiluminesenssillä (ECL Kit, Amersham, Inc.).

Esimerkki 3A

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen erilaisia K-252a-johdannaisia

Feokromosytooma (PC-12) soluja inkuboitiin 2 tunnin ajan vehikkelin (<0,1 % DMSO) tai K-252a funktionaalisen johdannaisen kanssa. Sitten soluja inkuboitiin 5 minuuttia NT-3:n ollessa poissa tai läsnä. Solut hajotettiin ja immunosaostettiin pan-anti-trk vasta-aineen kanssa. Proteiinit erotettiin natriumdodekyylisulfaatti (SDS) polyakryyliamidi geelielektroforeesilla ja siirrettiin polyvinylideenidifluoridi (PVDF) membraaniin. Membraanista suoritettiin immunoelektroforeesi antifosfotyrosiini vasta-aineen kanssa tyrosiinifosforyloidun trk:n visualisoinnin sallimiseksi. trk:n autofosforylointia ei havaittu käsittelemättömissä soluissa (kuvio 5, kaista 1). Minkä tahansa K-252a- funktionaalisen johdannaisen ollessa poissa NT-3 ei tuonut esiin havaittavaa trk:n tyrosiinifosforylaatiota (kaista 2). Samalla tavalla, NT-3:n ollessa poissa, ei K-252b 300 nM:ssä (kaista 3) eivätkä yhdisteet I-16 tai I-10 10 ja 100 nM:ssä (kaistat 4 - 7) aiheuttaneet trk:n autofosforylaatiota. Yhdistelmässä NT-3 + 300 nM K-252b (kaista 8), tai 100 nM yhdistettä I-10 (kaista 10) tai 100 nM yhdistettä I-16 (kaista 12) johtivat kuitenkin trk:n vaikuttavaan tyrosiinifosforylaatioon. NT-3:n inkuboinnista 10 nM:lla yhdistettä I-10 tai yhdistettä I-16 (kaistat 9 ja 11) saatiin pienemmät, mutta mitattavat kasvut trk:n tyrosiinifosforylaatiossa.

Esimerkki 4

trk reseptorispesifinen mitogeeninen analyysi

Menetelmät: Klonaaliset NIH-3T3 solut (ATCC talletusnumero CRL1658), jotka erikseen yli-ilmentävät rotan trk A:ta, trk B:tä ja trk C:tä, muodostettiin transfektiolla ja selektiolla. Tylppäpäinen rotan cDNA trk A:lle (Geenipankki talletusnumero L14445; katso Valenzuela, D.M. et al., 10 Neuro. 1, 1993); trk B:lle (Geenipankki talle-

tusnumero L14446; katso Valenzuela, yllä) ja trk C;lle (Geenipankki talletusnumero L03813; katso Merlio, J.P. et al., 51 Neuro. 513, 1992) asetettiin erikseen vektorin pMEX-neo Eco RI kohtaan (bp 1215) (katso Kho, C.J. ja Zarbl, H., 89 PNAS 2200, 1992, pMEX-neon kuvausta varten). Rotan cDNA trk C:lle on edelleen saatavissa geenipankin talletusnumerolla L14447; katso Valenzuela, yllä. Transfektioprotokolloja, kuten kuvataan yleisesti julkaisussa Molecular Cloning, J. Sambrook, E.F. Fritsch & T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, seurattiin NIH-3T3 solujen transfektiota varten pMEX-neo:trk A, pMEX-neo:trk B; ja pMEX-neo:trk C vektoreilla. Transfektoituja solulinjoja käytettiin mitogeneesin määrittämistä varten, kuten välitetään sitomalla neurotrofiineja spesifisiin trk-reseptoreihin.

Seuraavaa menettelyä käytettiin mitogeneesianalyysiä varten: NIH-3T3 soluista, jotka oli transfektoitu spesifisillä vektoreilla, tehtiin maljaviljelmä 96-kuoppaiselle formaatille pitoisuudessa 1 x 10^4 solua/kuoppa 100 µl:ssa N2-väliainetta (Bottenstein, yllä), joka sisälsi 0,05 % naudan seerumialbumiinia 24 tunnin ajan. Sen jälkeen väliaine poistettiin ja korvattiin 50 µl:lla N2-väliainetta, joka sisälsi ilmoitetut K-252a-johdannaiset ilmoitetuissa pitoisuuksissa (0,1 nM, 1,0 nM, 10 nM ja 100 nM) (0,025-%:inen DMSO loppupitoisuus kussakin kuopassa) aikaisemmin määritettyjen spesifisten neurotrofiinien maksimivastepitoisuuksien ollessa läsnä (kokonaistilavuus kussakin kuopassa: 50 µl), minkä jälkeen lisättiin 1,5 µCi (55,5 kBq) ^{3}H-tymidiiniä/kuoppa 24 tunnin ajan. Sen jälkeen solut kerättiin PBS:ssä lasikuitusuodattimille Brandellaitteella (malli nro MB-48R), hajotettiin ja kiinnitettiin 10-%:isella trikloorietikkahapolla, minkä jälkeen huuhdeltiin PBS:llä. Sitten suodattimet poistettiin ja asetettiin 4 ml Ecosafe Scintillantille (Research Products

Int. Cat. No. 111195) sisältyneen leimatun tritiumin laskentaa varten (Packard malli nro Tri-Carb 2500TR).

Esimerkki 4A

NT-3:n neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisääminen käyttäen erilaisia K-252a-johdannaisia

Seuraten edellä kuvattua menettelyä analysoitiin erilaisia ilmoitettujen K-252a-johdannaisten pitoisuuksia, jolloin määritettiin mitogeneesin lisääntyminen, jota välitti NT-3:n sitoutuminen trk A:han käyttäen pMEX-neo:trk A solulinjaa; kuten aikaisemmin on mainittu, edullinen trk A-ligandi on NGF, ei NT-3.

Aikaisemmin määritettyjen maksimivastepitoisuuksien, koskien käsittelemättömiä soluja, määritettiin olevan seuraavat: NGF:n sitoutumiseksi trk A:han, 0,1 ng/ml NGF:a tarjosi 7,1-kertaisen kasvun mitogeneesissä (mitattuna tritium-leimatun tymidiinin sisällyttämisellä hajotettuihin soluihin) verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin; siten, trk A:lle maksimivaste (määriteltynä edullisella ligandilla trk A:lle, NGF) oli 7,1. NT-3:n sitomiseksi trk A:han vaadittiin pitoisuudet välillä 500 - 1 000 ng/ml saavuttamaan maksimivaste, joka havaittiin NGF-sitomisella (tietoja ei esitetty).

Näitä analyysejä varten NT-3:n pitoisuus pidettiin 100 ng/ml:ssa. Tulokset esitetään taulukossa 5; esitetyt arvot ovat kertaistuneita kasvuja mitogeneesissä verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin. Arvo, joka oli yli 1,5, määriteltiin mielivaltaisesti mitogeneesin kasvuna trk A:n NT-3 sitomisella ilmoitetun K-252a-johdannaisen ollessa läsnä. K-252a, jolla ei ole positiivista vaikutusta mitogeneesianalyysissä, käytettiin kontrollina. Termi "NT" tarkoittaa "ei testattu".

Taulukko 5
Mitogeeninen analyysi

Yhdiste/johdannainen	Yhdisteen/johdannaisen pitoisuus			
	0,1 nM	1,0 nM	10 nM	100 nM
K-252a	1,0	1,4	1,4	0,6
II-5	1,3	1,5	1,6	3,2
I-7	1,7	2,9	4,4	4,4
I-16	2,9	4,3	3,7	5,0
I-15	4,1	4,1	5,3	4,9
I-6	3,2	4,3	3,1	0,9
I-14	1,9	5,0	7,4	5,2
V	NT	NT	3,4	6,0
VI	NT	NT	1,9	7,1

K-252a funktionaalisten johdannaisten synteesi

Tyypillisten K-252a-johdannaisten kemiallinen synteesi on kuvattu alla. Lisää K-252a-johdannaisia voidaan valmistaa alusta kemiallisella synteesillä käyttäen alan ammattimiehen tuntemia menetelmiä. Esimerkiksi, menetelmät, joita käytetään kaavalla I esitetyn yhdisteen valmistamiseksi, kuvataan julkaisuissa Murakata et al., US-patentti nro 4 923 986 ja US-patentti nro 4 877 776, jotka täten sisällytetään viittauksella. Menetelmät, joita käytetään kaavalla II esitetyn yhdisteen valmistamiseksi, kuvataan julkaisuissa Moody et al., J.Org. Chem., 57:2105-2114, 1992, Steglich et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 19:459-460, 1980, Nakanishi et al., J. Antobiotics, 39:1066-1071, 1986 ja julkaistut JP-hakemukset numerot 60-295173, 62-327858, 62-327859 ja 60-257652.

Tyypillisten K-252a-johdannaisten kemiallinen synteesi ja analyysi

Yhdistenumerot viittaavat K-252a-johdannaisiin, jotka on listattu taulukossa 1.

Yhdisteen IV valmistus

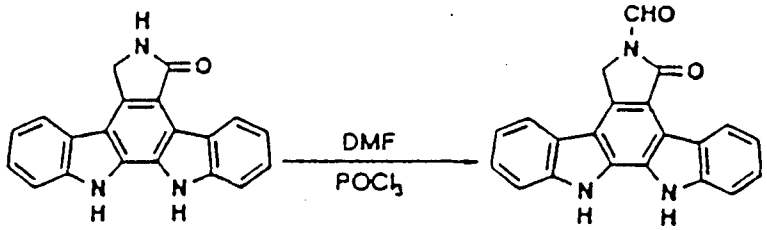
$POCl_3$ (0,28 ml, 3 mmol) ja yhdiste (A) (311 mg, 1 mmol) lisättiin 20 ml:aan dimetyyliformamidia käyttäen jää-jäähdytystä, minkä jälkeen sekoitettiin 90 °C:ssa 4 tuntia. Sakat otettiin talteen suodattamalla ja pestiin peräkkäin vedellä ja metanolilla, jolloin saatiin 250 mg (saanto 74 %) yhdistettä IV.

Lähtöaineyhdiste (A) on kuvattu (Nakanishi et al., J. Antibiotics, 39:1066-1071, 1986).

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada ydinmagneettisen resonanssin spektroskopialla (NMR) tai massaspektroskopialla (MS):

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 5,298 (2H, s), 7,255 - 8,073 (7H, m), 9,036 (1H, d, J = 7,7 Hz), 9,300 (1H, s), 11,891 (1H, s), 12,175 (1H, s).

EI-MS (m/z): 339 $(M)^+$



(A) IV

Yhdisteen V valmistus

Yhdiste (B) (208 mg, 0,61 mmol) liuotettiin 20 ml:aan tetrahydrofuraania, ja sitten 74 mg (1,83 mmol) natriumhydridiä (60 %) lisättiin siihen, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan. Allyylibromidi (0,063 ml, 0,73 mmol) lisättiin siihen ja seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 15 tunnin ajan. Liuokseen lisättiin kylläinen vesipitoinen ammoniumkloridin liuos, ja orgaaninen kerros pestiin suolaliuoksella ja kuivattiin magnesiumsulfaatilla. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös altistettiin silikageelipylväskromatografialle

(kloroformi), jolloin saatiin 135 mg (saanto 58 %) yhdistettä (C).

Seuraavat tunnusomaiset arvot yhdisteelle C voidaan saada NMR:llä:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + DMSO-d_6; 4/1) δ (ppm): 3,04 (3H, s), 4,80 - 5,20 (4H, m), 5,96 - 6,40 (1H, m), 7,28 - 7,72 (6H, m), 9,18 (1H, d, J = 8,0 Hz), 9,20 (1H, d, J = 8,0 Hz), 9,84 (1H, s).

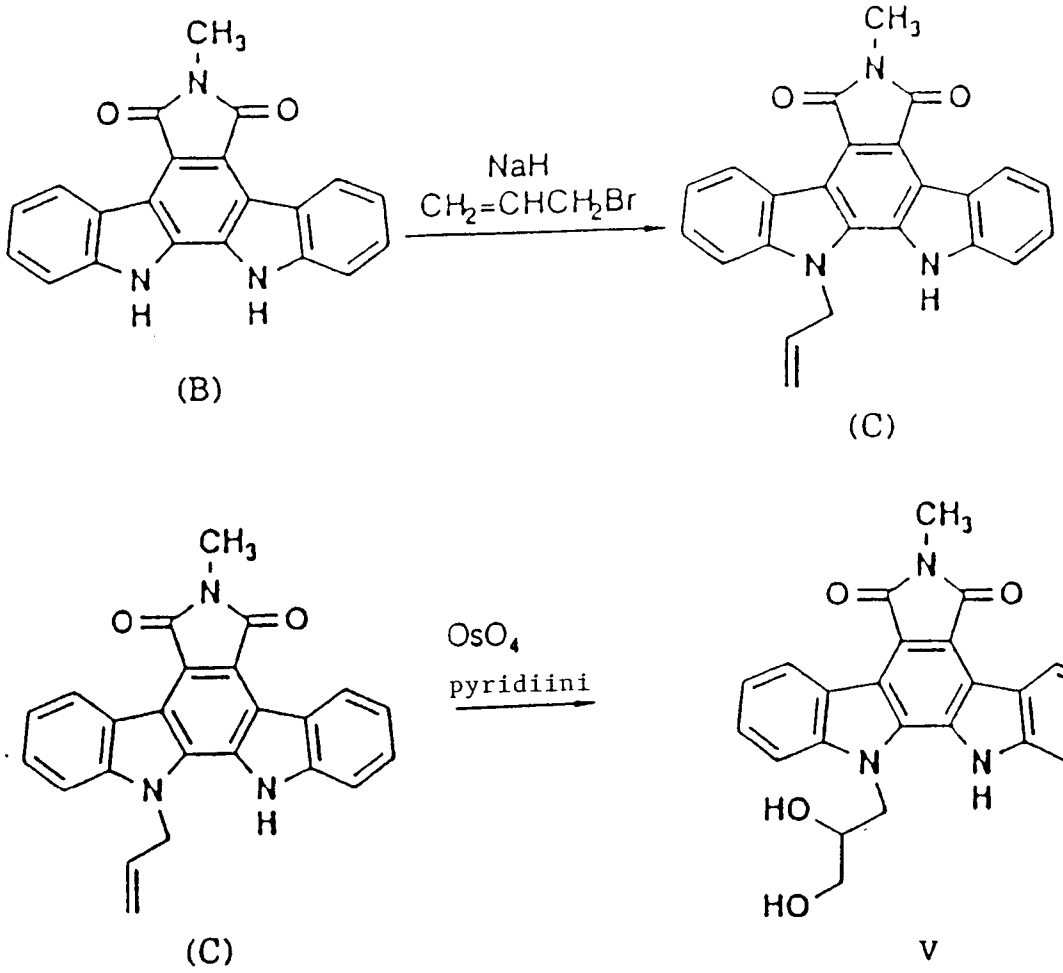
Yhdiste (C) (145 mg, 0,38 mmol) liuotettiin seokseen, jonka muodostivat 7 ml tetrahydrofuraania ja 0,5 ml pyridiiniä, ja sitten siihen lisättiin 4 ml tetrahydrofuraania, joka sisälsi 200 mg osmiumtetroksidia, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 6 tunnin ajan. Natriumtiosulfaatti (348 mg), 7 ml vettä ja 7 ml pyridiiniä lisättiin reaktioliuokseen, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Liuokseen lisättiin tetrahydrofuraani laimentamaan, ja seos pestiin kylläisellä vesipitoisella natriumbikarbonaatin liuoksella ja kuivattiin magnesiumsulfaatilla. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös altistettiin silikageelipylväskromatografialle (kloroformi/metanoli = 97/3), jolloin saatiin 93 mg yhdistettä II-3.

Lähtöainemateriaali yhdisteen (B) ovat kuvanneet Gribble ja Berthel, Tetrahedron, 48:8869 (1992).

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada NMR:llä ja MS:llä:

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 3,186 (3H, s), 3,633 (2H, m), 4,068 (1H, brs), 4,804 (1H, dd, J = 7,9, 15,6 Hz), 4,955 (1H, dd, J = 3,2, 15,6 Hz), 5,407 (1H, d, J = 4,9 Hz), 5,480 (1H, t, J = 5,1 Hz), 7,351 - 7,818 (6H, m), 9,093 (1H, d, J = 7,9 Hz), 9,131 (1H, dd, J = 0,5, 7,9 Hz), 11,736 (1H, s).

FAB-MS (m/z): 414 $(M+1)^+$.



Yhdisteen VI valmistus

Yhdiste (D) voidaan valmistaa yhdisteen (B) reaktiolla 2 - 4 ekvivalentin kanssa allyylibromidia 3 - 5 ekvivalentin emästä ollessa läsnä. Esimerkki emäksestä on alkalimetallihydridi, kuten natriumhydridi. Reaktioliuottimena käytetään tetrahydrofuraania, dimetyyliformamidia tai niiden kaltaista. Reaktio menee loppuun 0,5 - 15 tunnissa -10 - 40 °C:ssa.

Yhdiste VI voidaan saada käsittelemällä yhdistettä (D) 2 - 4 ekvivalentilla hapetinta. Esimerkki hapettimesta on OsO_4. Reaktioliuottimena käytetään tetrahydrofuraanin ja pyridiinin sekoitettua liuotinta, tai niiden kaltaista.

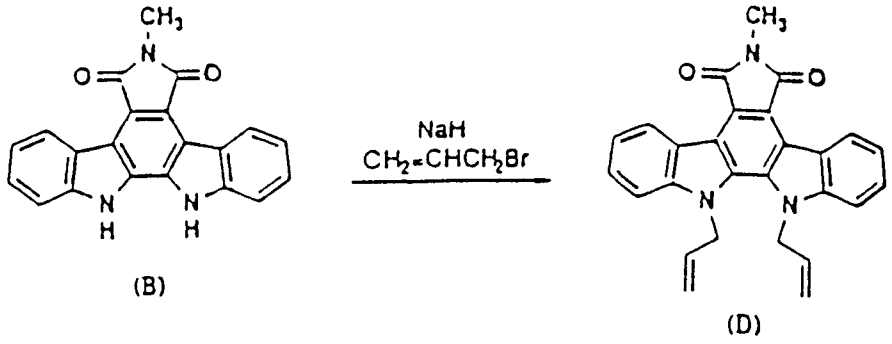
tetrahydrofuraanin suhde pyridiiniin on 1/20 - 1/5. Reaktio menee loppuun 3 - 8 tunnissa 0 - 40 °C:ssa.

Seuraavat tunnusomaiset arvot yhdisteelle (D) voidaan saada käyttäen NMR:a ja MS:a:

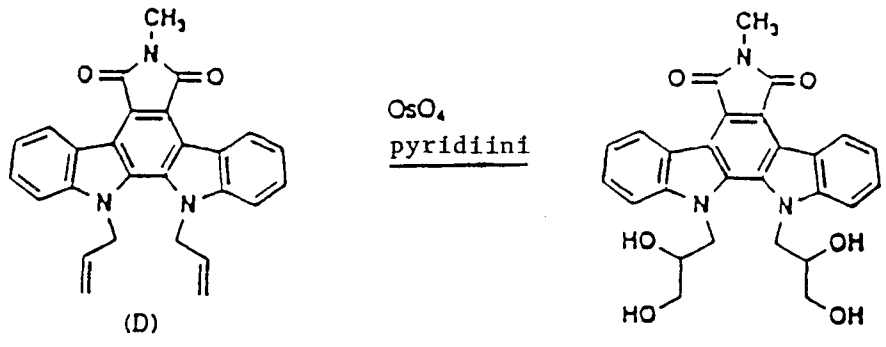
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3,21 (3H, s), 4,92 - 6,40 (10H, m), 7,40 - 7,64 (6H, m), 9,32 (2H, d, J = 8,0 Hz).
EI-MS (m/z): 419 $(M+1)^+$.

Seuraavat tunnusomaiset arvot yhdisteelle (II-4) voidaan saada käyttäen NMR:a ja MS:a:

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 2,965 (2H, t, J = 5,5 Hz), 3,139 (2H, m), 3,196 (1,5H, s), 3,198 (1,5H, s), 3,626 (2H, m), 4,651 - 4,945 (4H, m), 7,399 (2H, t, J = 7,2 Hz), 7,612 (2H, dt, J = 1,2, 7,2 Hz), 7,828 kuvio 8 (2H, t, J = 8,7 Hz), 9,142 (2H, d, J = 7,9 Hz).
FAB-MS (m/z): 488 $(M+1)^+$.



(B) (D)



(D) VI

Yhdisteiden I-9 ja I-14 valmistus

Yhdiste (E) (katso kuvio 6 ja julkaistu tutkimaton JP-hakemus nro 295589/88) (49,3 mg, 0,1 mmol) liuotettiin

3 ml:aan dioksaania ja sitten siihen lisättiin 0,1 ml hydratsiinihydraattia, minkä jälkeen sekoitettiin 110 °C:ssa 2 tunnin ajan. Liuottimen haihdutuksen jälkeen metanoli lisättiin jäännökseen ja sakat otettiin talteen suodattamalla, jolloin saatiin 40 mg yhdistettä I-9.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1,19 (3H, s), 1,36 (3H, s), 2,30 (3H, s), 2,45 (1H, dd, J = 5,0, 14,0 Hz), 2,91 (1H, dd, J = 7,0, 14,0 Hz), 4,10 (1H, d, J = 10,0 Hz), 4,54 (1H, d, J = 10,0 Hz), 6,63 (1H, dd, J = 5,0, 7,0 Hz), 7,22 - 7,86 (6H, m), 8,97 (1H, d, J = 8,0 Hz), 9,25 (1H, d, J = 8,0 Hz).

SIMS (m/z): 509 $(M+1)^+$

Kromihappo (2,8 g, 28 mmol) lisättiin 20 ml:aan pyridiiniä käyttäen jää-jäähdytystä ja sitten siihen lisättiin 5 ml pyridiiniä, joka sisälsi 1,98 g (4 mmol) yhdistettä (F) (katso kuvio 6 ja julkaistu tutkimaton JP-hakemus nro 295 589/88), minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 12 tunnin ajan. Kun liuos oli suodatettu Celiten läpi, liuotin haihdutettiin ja jäännös altistettiin silikageelipylväskromatografialle (kloroformi), jolloin saatiin 0,98 g (saanto 48 %) yhdistettä (G), katso kuvio 6.

Seuraavat tunnusomaiset arvot yhdisteelle (G) voidaan saada käyttäen NMR:a:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1,52 (2,1H, s), 1,60 (0,9H, s), 2,32 (0,9H, s), 2,36 (2,1H, s), 2,67 (1H, dd, J = 5,0, 14,0 Hz), 3,09 (2,1H, s), 3,38 (0,9H, s), 4,72 - 4,81 (2H, m), 6,72 (1H, m), 7,20 - 9,32 (8H, m).

Yhdiste (G) (305 mg, 0,6 mmol) liuotettiin 6 ml:aan dimetyyliformamidia ja sitten siihen lisättiin 36 mg (0,9 mmol) natriumhydridiä (60 %) käyttäen jää-jäähdytystä, minkä jälkeen sekoitettiin samassa lämpötilassa 10 minuuttia. Metyylijodidi (0,056 ml, 0,9 mmol) lisättiin siihen ja seosta sekoitettiin samassa lämpötilassa 30 minuutin ajan. Kylläinen vesipitoinen ammoniumkloridin liuos (1 ml)

ja 10 ml vettä lisättiin liuokseen ja sakat otettiin talteen suodattamalla.

Näin saatu tuote liuotettiin seokseen, jonka muodostivat 25 ml kloroformia, 1 ml metanolia ja 1 ml 3 N HCl:a, ja liuosta sekoitettiin 60 °C:ssa 10 minuuttia. Liuos pestiin kylläisellä vesipitoisella natriumbikarbonaatin liuoksella, ja sitten orgaaniseen kerrokseen lisättiin 10 ml tetrahydrofuraania, 10 ml metanolia ja 1,5 ml 2 N NaOH:a, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 10 minuuttia ja liuotin haihdutettiin. Kun kloroformi lisättiin siihen laimentamaan, seos pestiin peräkkäin 5-%:isella vesipitoisella sitruunahapon liuoksella ja suolaliuoksella, ja kuivattiin magnesiumsulfaatilla. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös altistettiin silikageelipylväskromatografialle (kloroformi/metanoli = 98/2), jolloin saatiin 102 mg (saanto 36 %) yhdistettä I-14. Seuraavat tunnusomaiset arvot yhdisteelle I-14 voidaan saada käyttäen NMR:a ja MS:a:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + DMSO-d_6' 41) δ (ppm): 2,24 (3H, s), 3,18 (3H, s), 4,81 (1H, t, J = 6,0 Hz), 6,83 (1H, dd, J = 5,0, 7,0 Hz), 7,24 - 8,08 (6H, m), 9,06 (1H, d, J = 7,0 Hz), 9,25 (1H, d, J = 7,0 Hz).

EI-MS (m/z): 467 $(M+1)^+$

Yhdisteiden I-15 ja I-21 valmistus

Yhdiste (H) (katso kuvio 8 ja WO 88/07045) (112 mg, 0,2 mmol) liuotettiin 2 ml:aan dimetyyliformamidia ja sitten siihen lisättiin 195 mg (2 mmol) etanoliamiinin vetykloridia ja 0,61 ml (4 mmol) 1,8-diatsabisyklo[5,4,0]-7-undekeeniä, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 3 vuorokauden ajan. Liuottimen haihdutuksen jälkeen jäännös altistettiin silikageelipylväskromatografialle (kloroformi/metanoli = 98/2), jolloin saatiin 75 mg (saanto 25 %) yhdistettä I-15.

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada käyttäen NMR:a ja MS:a:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ + DMSO-d_6; 4/1) δ (ppm): 2,23 (3H, s), 4,72 (1H, t, J = 5,0 Hz), 4,90 (1H, t, J = 5,0 Hz), 5,41 (1H, s), 6,89 (1H, m), 7,32 - 8,10 (6H, m), 9,18 (1H, d, J = 7,0 Hz), 9,36 (1H, d, J = 7,0 Hz).

SIMS (m/z): 498 $(M+1)^+$

Yhdiste (J) (katso kuvio 8 ja julkaistu tutkimaton JP-hakemus nro 155 285/87) (890 mg, 1,5 mmol) liuotettiin 10 ml:aan dimetyyliformamidia ja sitten siihen lisättiin 1,43 g (15 mmol) etyyliamiinin vetykloridia ja 2,28 ml (15 mmol) 1,8-diatsabisyklo[5,4,0]-7-undekeeniä, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2,5 tuntia. Liuokseen lisättiin 10 ml vettä ja sakat otettiin talteen suodattamalla, jolloin saatiin 729 mg yhdistettä (K). Katso kuvio 8.

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada käyttäen NMR:a:

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 1,32 (3H, t), 2,00 - 2,32 (1H, m), 2,16 (3H, s), 2,96 - 3,60 (5H, m), 5,00 (2H, s), 7,00 - 7,76 (6H, m), 8,02 (2H, t, J = 8,0 Hz), 8,58 (1H, s), 9,18 (1H, d, J = 8,0 Hz).

Yhdiste (K) (650 mg, 1,39 mmol) liuotettiin 7 ml:aan dimetyyliformamidia ja sitten siihen lisättiin 675 mg (4,16 mmol) karbonyylidi-imidatsolia, minkä jälkeen sekoitettiin 3,5 tuntia käyttäen jää-jäähdytystä. Kun 10 ml vettä oli lisätty liuokseen, sakat otettiin talteen suodattamalla ja altistettiin silikageelipylväskromatografialle (kloroformi/metanoli = 97/3), jolloin saatiin 395 mg (saanto 58 %) yhdistettä (L). Katso kuvio 8.

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada käyttäen NMR:a:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1,30 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,30 (2H, s), 2,68 - 2,96 (2H, m), 3,44 (2H, q, J = 7,0 Hz), 3,64 (1H, d, J = 9,0 Hz), 4,09 (1H, d, J = 9,0 Hz), 4,97 (2H, s), 6,45 (1H, brs), 6,76 (1H, m), 7,20 - 8,08 (7H, m), 9,32 (1H, d, J = 8,0 Hz).

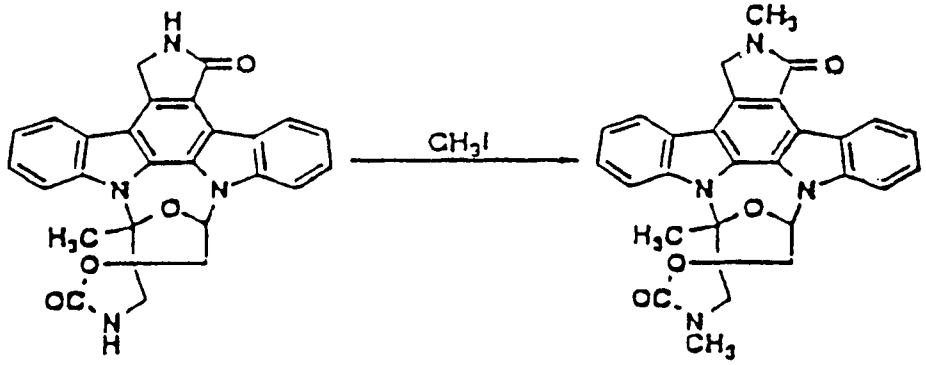
Kromihappo (0,49 g, 4,9 mmol) lisättiin 4 ml:aan pyridiiniä käyttäen jää-jäähdytystä, ja sitten siihen lisättiin 2 ml pyridiiniä, joka sisälsi 345 mg yhdistettä (L), minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 12 tuntia. Kun liuos oli suodatettu Celiten läpi, liuotin haihdutettiin ja jäännös uudelleenkiteytettiin kloroformi/metanolista, jolloin saatiin 272 mg (saanto 77 %) yhdistettä I-21.

Seuraavat tunnusomaiset arvot voidaan saada käyttäen NMR:a:

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 2,28 - 2,80 (1H, m), 2,36 (3H, s), 3,12 - 3,60 (3H, m), 3,86 (1H, brd, J = 10,0 Hz), 4,22 (1H, brd, J = 10,0 Hz), 7,16 - 8,00 (6H, m), 9,04 (1H, d, J = 8,0 Hz), 9,23 (1H, d, J = 8,0 Hz).

Yhdisteiden I-22, I-23, I-24 ja I-25 valmistus

Yhdisteen I-22 valmistus on kuvattu (Murakata et al., US-patentti nro 4 923 986). Yhdisteiden I-23 ja I-25 valmistus on kuvattu julkaistussa tutkimattomassa JP-hakemuksessa nro 295588/88. Yhdisteen I-24 valmistus on seuraava:



Yhdiste M — Yhdiste I - 24

Yhdiste M (julkaistu tutkimaton JP-hakemus nro 155 285/87) (1 g, 2,2 mmol) liuotettiin 30 ml:aan dimetyyliformamidia ja sitten siihen lisättiin 0,68 ml (11 mmol) metyylijodidia ja 3 ml 20-%:ista vesipitoista kaliumhyd-

roksidin liuosta, minkä jälkeen sekoitettiin huoneenlämpötilassa 20 minuuttia. Vesi lisättiin reaktioseokseen ja sakat otettiin talteen suodattamalla ja altistettiin silikageelipylväskromatografialle (2-%:inen metanoli/kloroformi), jolloin saatiin 204 mg (saanto 19 %) yhdistettä I-24.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 2,34 (3H, s), 2,88 (3H, s), 3,12 - 3,56 (2H, m), 3,82 (1H, d, J = 10 Hz), 4,16 (1H, d, J = 10 Hz), 5,08 (2H, s), 7,12 - 8,12 (8H, m), 9,18 (1H, d, J = 8 Hz).

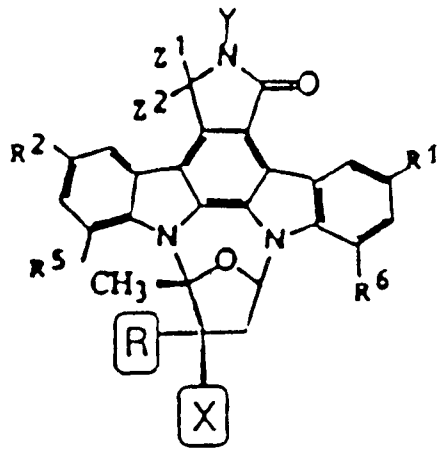
Yhdisteiden III-1 ja III-2 valmistus

Yhdisteiden III-1 ja III-2 valmistus on kuvattu (julkaistu tutkimaton JP-hakemus nro 247 056/93).

Koska keksintö on esitetty huomattavan yksityiskohtaisesti, on ymmärrettävä, että ekvivalentit ja modifikaatiot, jotka ovat alan ammattimiehen piirissä, pidetään osana tätä selitystä ja seuraavia patenttivaatimuksia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä neurotrofiiniherkän solun neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisäämiseksi, mainittu menetelmä käsittää vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin K-252a-johdannaisen kanssa, jolla on kaava:



jossa

a) Z^1 ja Z^2 yhdessä merkitsevät happea; kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 on itsenäisesti H, F, Cl, Br, I, NO_2, CN, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $NR^{13}R^{14}$, jossa kukin R^{13} ja R^{14} on itsenäisesti vety tai n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; Y on vety, OH, NH_2, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, CHO, $OCONH_2$, bentsyyli, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $(CH_2)_nOH$ tai $(CH_2)_nNH_2$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; silloin joko

1) R on OH, $OCONH_2$ tai O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; ja X on CH_2OH, CH_2NH_2 (tai sen happosuola), CH_2O-n-alkyyli, jossa on 2 - 7 hiiltä, CO_2R^7, jossa R^7 on vety tai alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $CONHOR^8$, $CONH(CH_2)_nOR^8$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6 ja R^8 on vety tai asyylijohdannaisryhmä, tai $CONHR^9$, jossa R^9 on alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai

2) R ja X yhdistetään, jolloin muodostuu liitosryhmä, jolla on kaava $-CH_2OCR^{10}R^{11}O-$, jossa kukin R^{10} ja R^{11} on

itsenäisesti vety tai alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai $-CH_2NR^{12}CO_2-$, jossa R^{12} on vety tai alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; tai

b) Z^1 on vety ja Z^2 on OH;

Y on vety tai CHO;

R on OH; ja

X on $CONH(CH_2)_2OH$, CO_2CH_3 tai CH_2OH; ja

R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a); tai

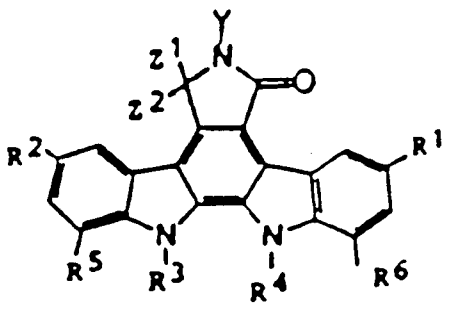
c) Z^1 ja Z^2 ovat molemmat vetyjä ja Y on vety, CHO, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $OCONH_2$; silloin joko

1) R on OH, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $OCONH_2$, paitsi että, kun Y on vety, R on OH; ja X on $CONHOR^8$, $CONH(CH_2)_nOR^8$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6 hiiltä, CH_2OH tai CO_2CH_3, paitsi että, kun Y on vety ja R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat kukin vety, X ei voi olla CO_2CH_3; tai

2) R ja X yhdistetään, jolloin muodostuu liitosryhmä, jolla on kaava $-CH_2NR^{12}CO_2-$; ja kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a), paitsi että, kun R^1 on bromi, X ei voi olla CH_2OH; tai

d) Z^1 on vety ja Z^2 on SR^{15}, jossa R^{15} on n-alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä; ja Y, R ja X ovat määriteltyjä kohdassa b), paitsi että, kun R^{15} on C_2H_5, X ei voi olla CH_2OH; ja R^1, R^2, R^5 ja R^6 ovat määriteltyjä kohdassa a).

2. Menetelmä neurotrofiiniherkän solun neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisäämiseksi, mainittu menetelmä käsittää vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin K-252a-johdannaisen kanssa, jolla on kaava:



jossa

a) Z^1 ja Z^2 yhdessä merkitsevät happea, silloin joko

1) kukin R^1, R^2, R^5 ja R^6 on itsenäisesti H, F, Cl, Br, I, NO_2, CN, alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, tai $NR^{13}R^{14}$, jossa kukin R^{13} ja R^{14} on itsenäisesti vety tai n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä; ja

Y on H, OH, NH_2, n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, CHO, bentsyyli, O-n-alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiltä, $(CH_2)_nOH$ tai $(CH_2)_nNH_2$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; ja kukin R^3 ja R^4 on itsenäisesti vety tai $(CH_2)_nCH(OH)CH_2OH$, jossa n on kokonaisluku 1 - 6; tai

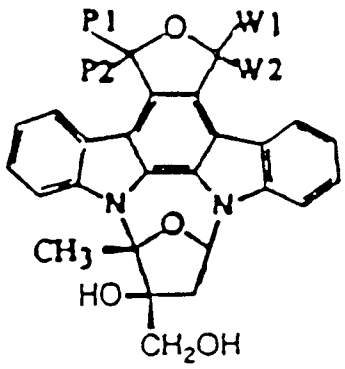
2) kukin R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 ja R^6 on itsenäisesti vety; ja Y on määritelty kohdassa a) 1), paitsi että Y ei voi olla bentsyyli; tai

b) Z^1 on vety ja Z^2 on vety, OH tai SR^{15}, jossa R^{15} on n-alkyyli, jossa on 1 - 3 hiiltä;

Y on vety tai CHO; ja

kukin R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 on vety.

3. Menetelmä neurotrofiiniherkän solun neurotrofiinin aiheuttaman aktiivisuuden lisäämiseksi, mainittu menetelmä käsittää vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin K-252a-johdannaisen kanssa, jolla on kaava:



jossa:

a) kukin P1 ja P2 on vety tai P1 ja P2 yhdessä merkitsevät happea; ja kukin W1 ja W2 on vety tai W1 ja W2

yhdessä merkitsevät happea; edellyttäen, että kukin P1 ja P2 on erilainen kuin W1 ja W2.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin eksogeenisen neurotrofiinin kanssa.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, jossa mainittu neurotrofiini on NT-3.

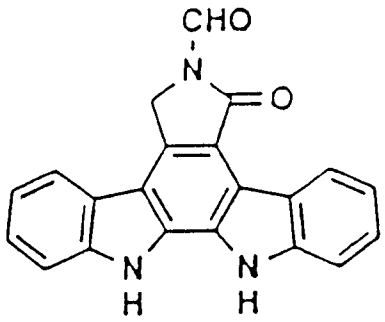
6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin eksogeenisen neurotrofiinin kanssa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, jossa mainittu neurotrofiini on NT-3.

8. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, joka käsittää lisäksi vaiheen, jossa mainittu solu saatetaan kosketuksiin eksogeenisen neurotrofiinin kanssa.

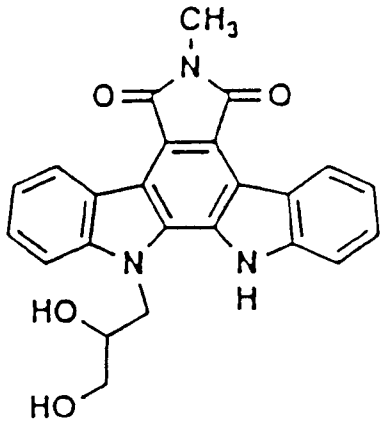
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, jossa mainittu neurotrofiini on NT-3.

10. Yhdiste, joka esitetään seuraavalla kaavalla:



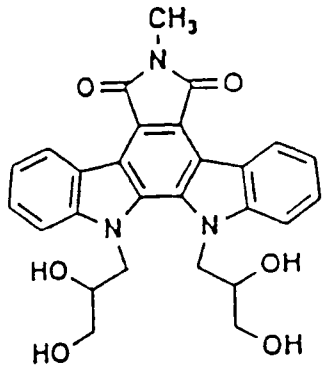
tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

11. Yhdiste, joka esitetään seuraavalla kaavalla:



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

12. Yhdiste, joka esitetään seuraavalla kaavalla:



tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

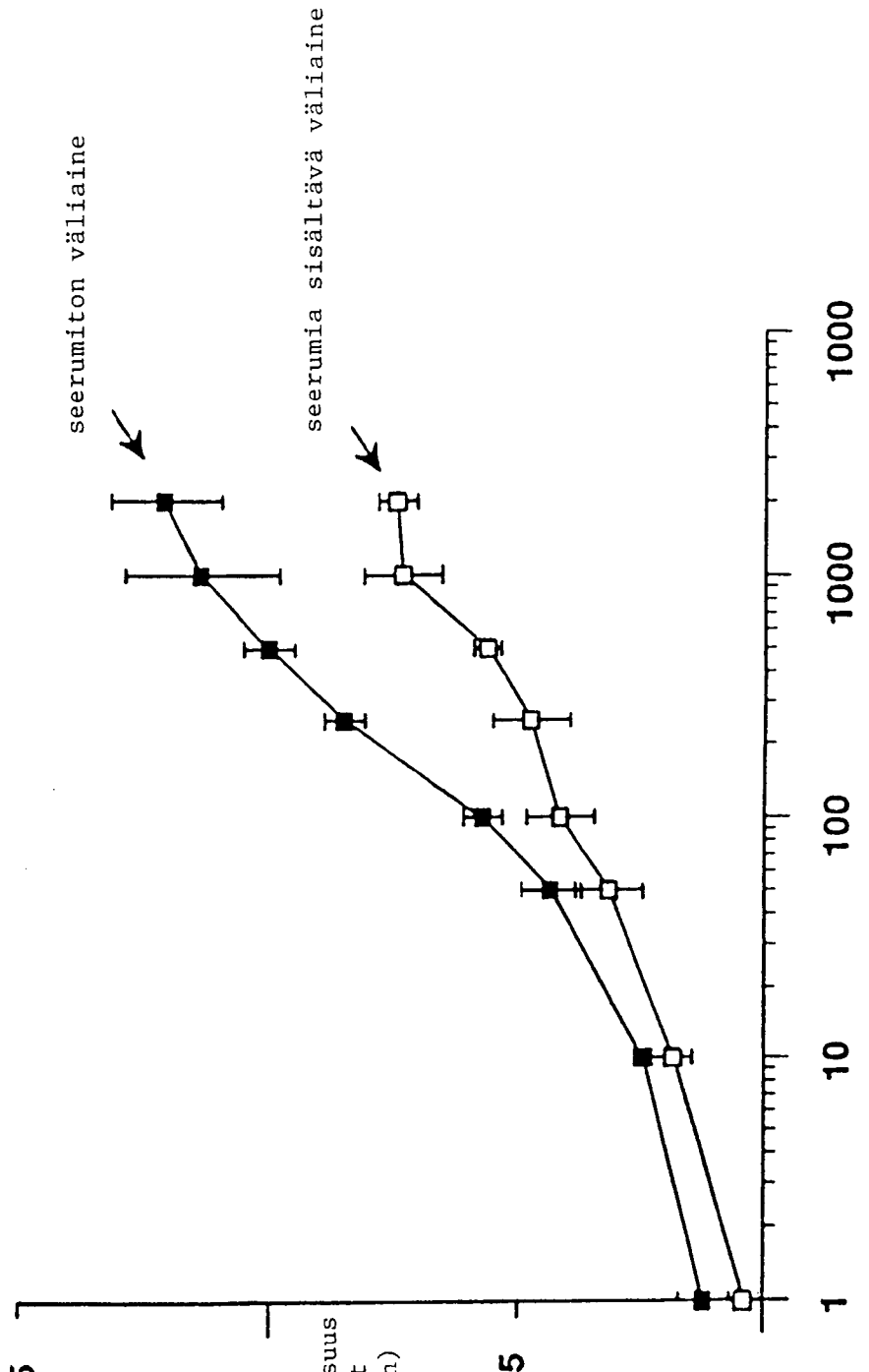

seerumiton väliaine
seerumia sisältävä väliaine
ChAT-aktiivisuus (kertaantunut lisääntyminen)
2,5
2
1,5
1
1
10
100
1000
1000
NT-3 pitoisuus (ng/ml)

FIG. 1

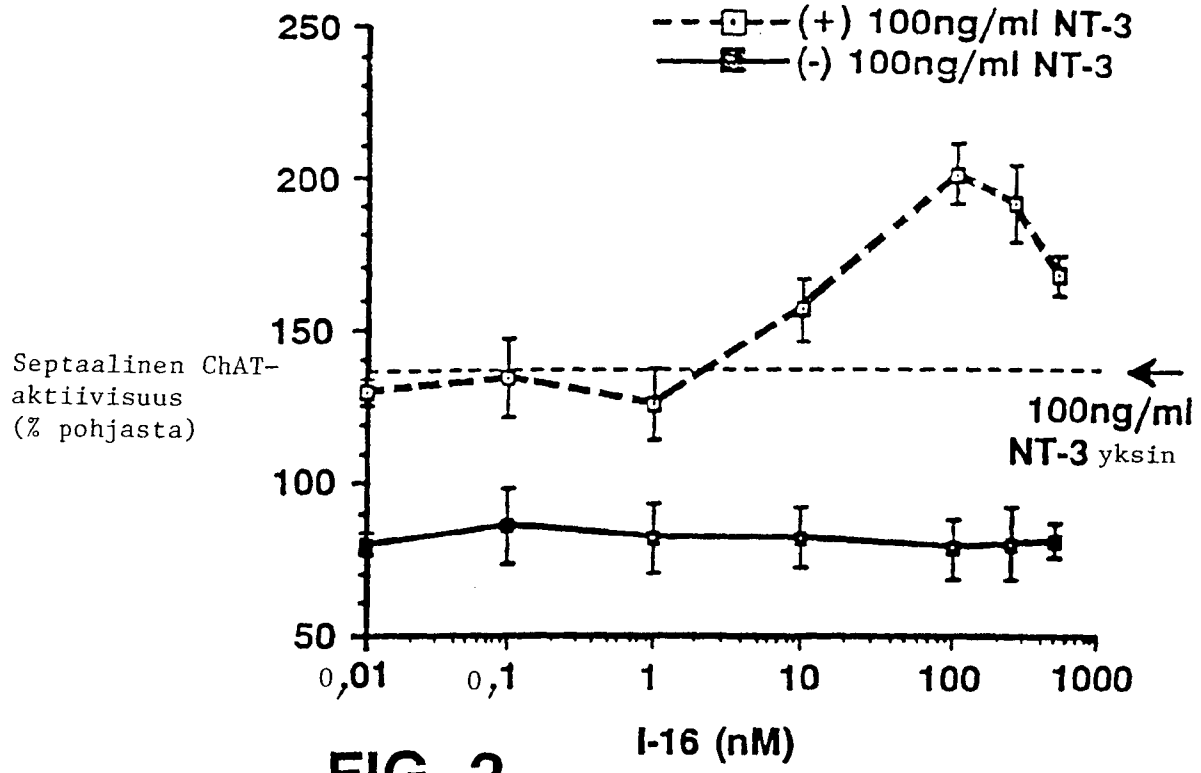

(+) 100ng/ml NT-3
(-) 100ng/ml NT-3
Septaalinen ChAT-aktiivisuus (% pohjasta)
250
200
150
100
50
100ng/ml NT-3 yksin
0,01
0,1
1
10
100
1000
I-16 (nM)

FIG. 2

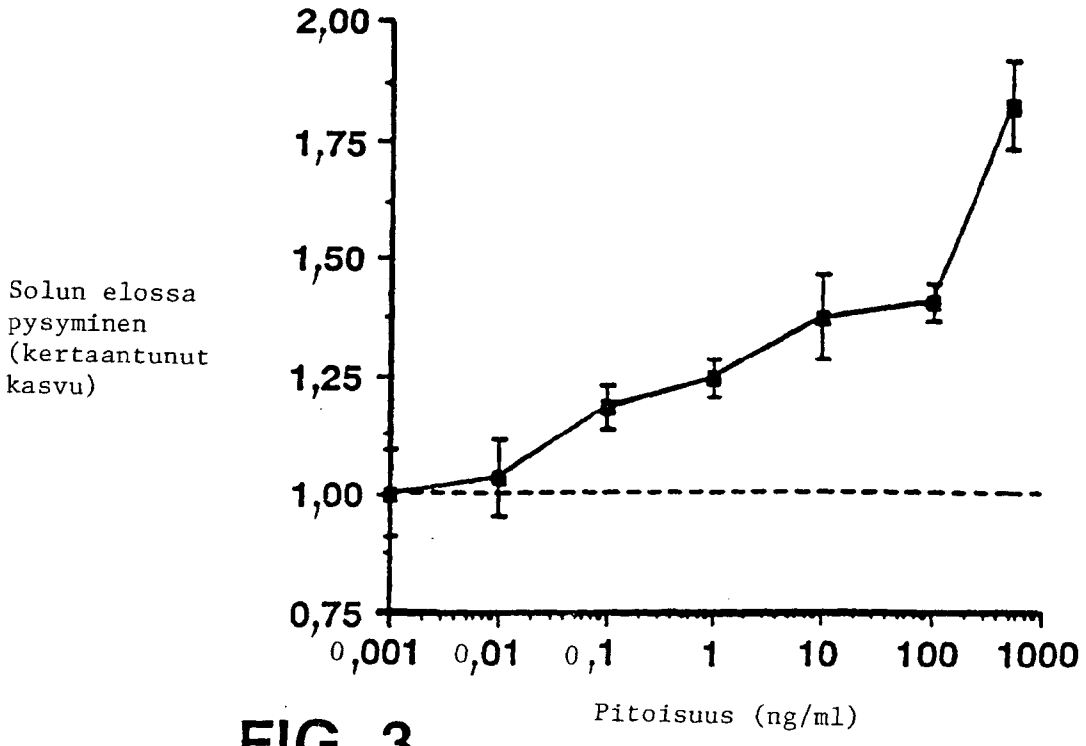

Solun elossa pysyminen (kertaantunut kasvu)
2,00
1,75
1,50
1,25
1,00
0,75
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Pitoisuus (ng/ml)

FIG. 3

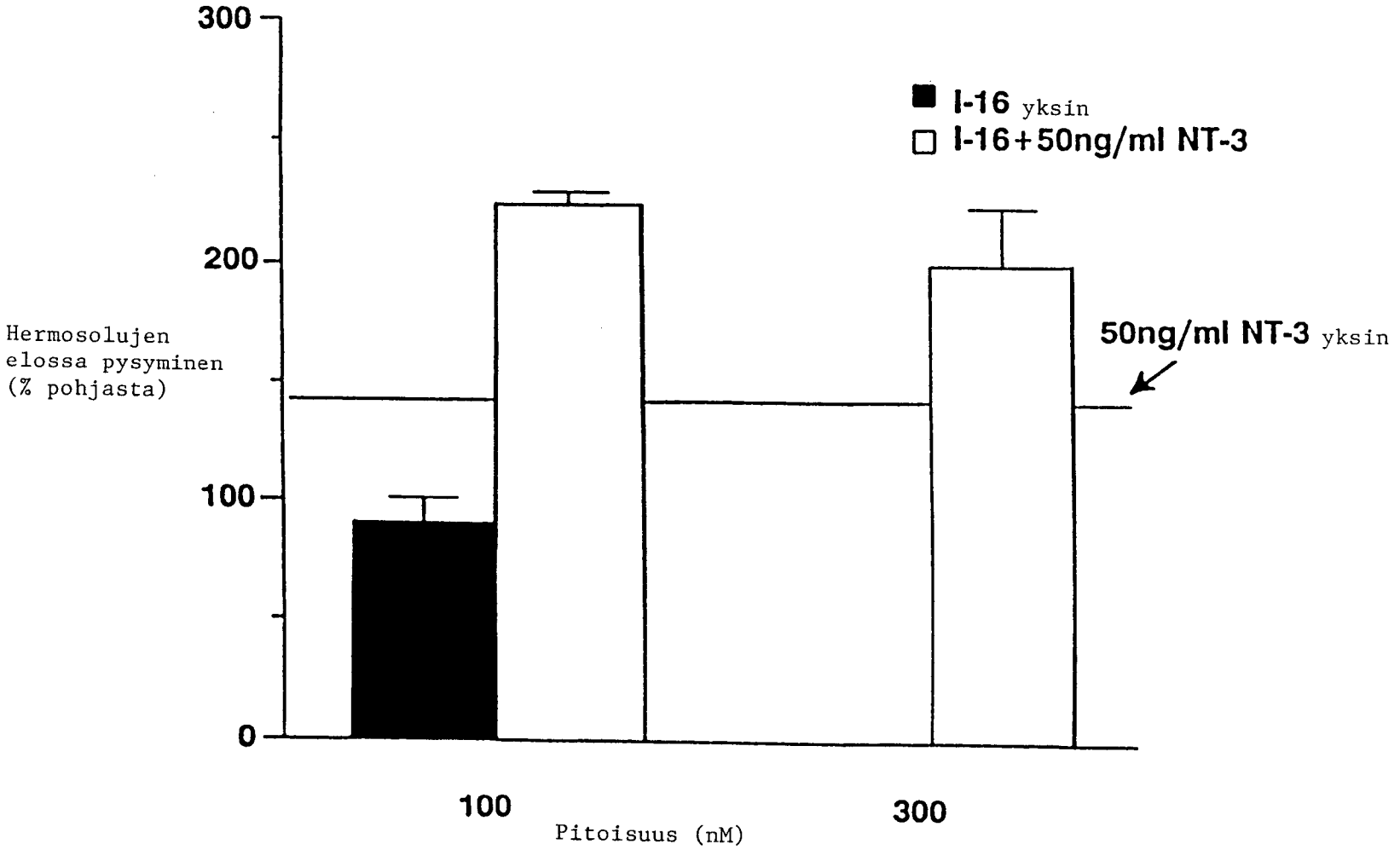

300
200
100
0
Hermosolujen
elossa pysyminen
(% pohjasta)
I-16 yksin
I-16+50ng/ml NT-3
50ng/ml NT-3 yksin
100
300
Pitoisuus (nM)

FIG. 4

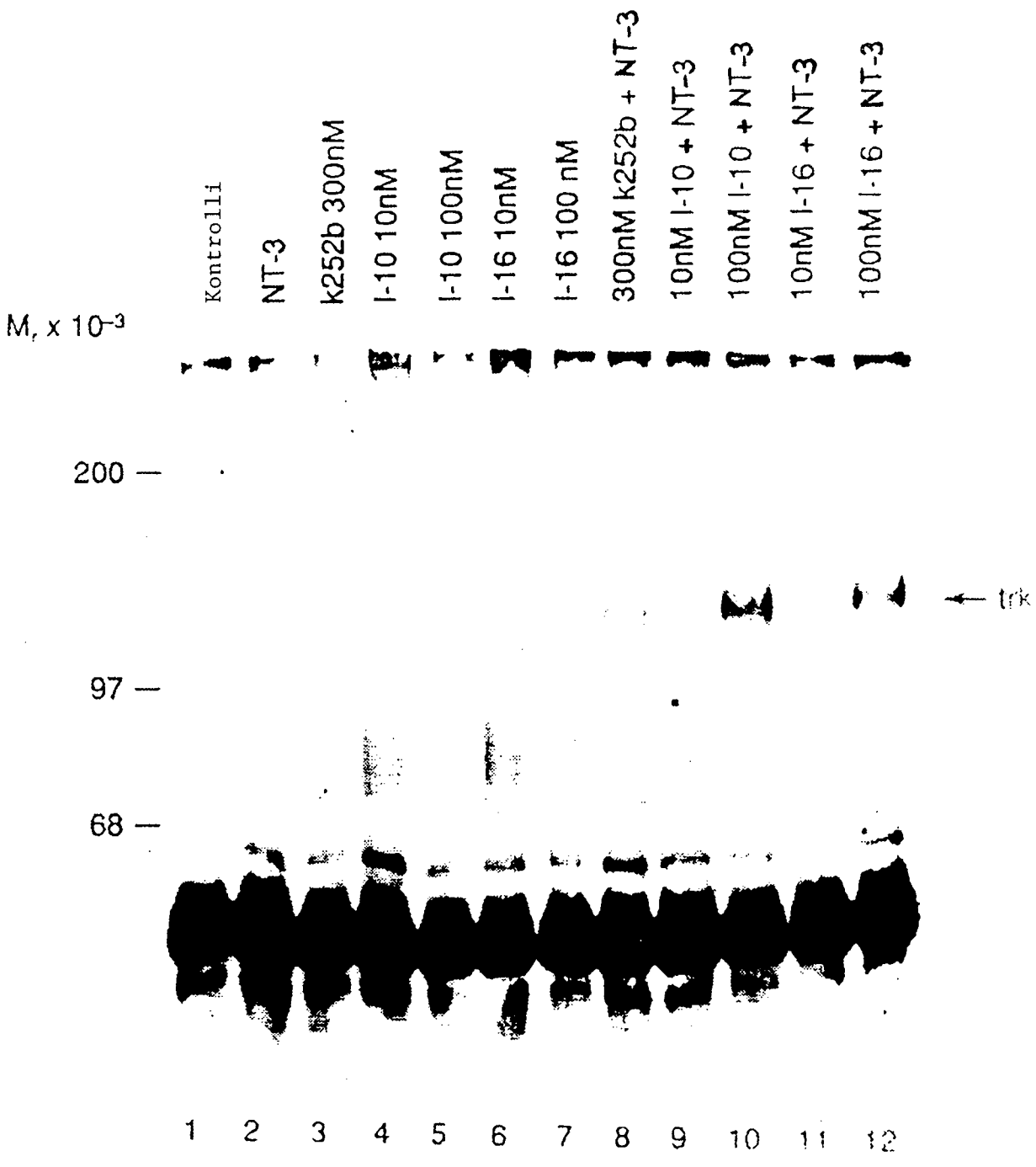

M, x 10⁻³
200 —
97 —
68 —
Kontrolli
NT-3
K252b 300nM
I-10 10nM
I-10 100nM
I-16 10nM
I-16 100 nM
300nM K252b + NT-3
10nM I-10 + NT-3
100nM I-10 + NT-3
10nM I-16 + NT-3
100nM I-16 + NT-3
← trk
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

FIG. 5

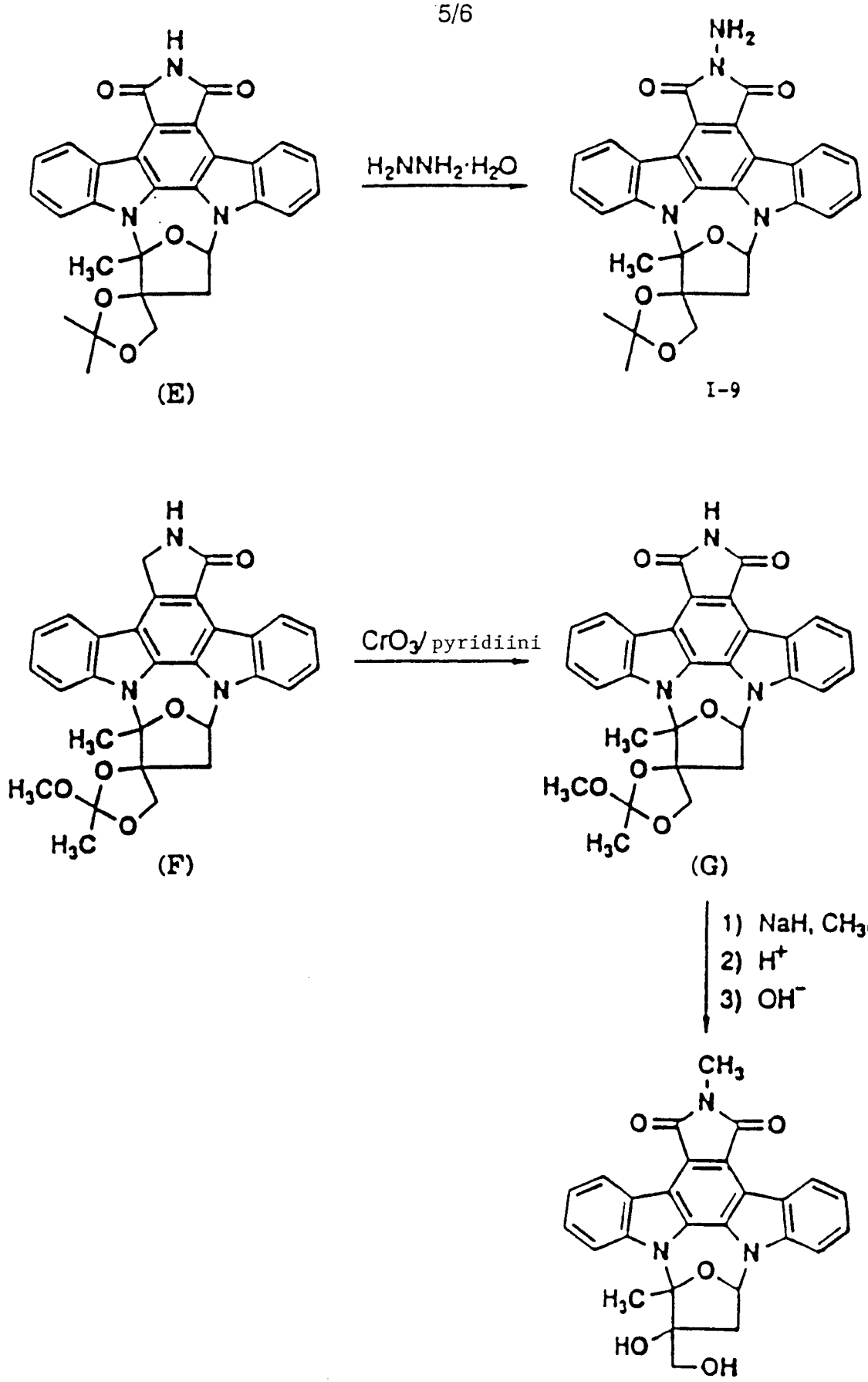

H
N
O
O
N
N
O
H3C
O
O
(E)
H2NNH2·H2O
NH2
N
O
O
N
N
O
H3C
O
O
I-9
H
N
O
N
N
O
H3C
O
H3CO
O
H3C
(F)
CrO3/ pyridiini
H
N
O
O
N
N
O
H3C
O
H3CO
O
H3C
(G)
1) NaH, CH3I
2) H+
3) OH-
CH3
N
O
O
N
N
O
H3C
HO
OH
I-14

FIG. 6

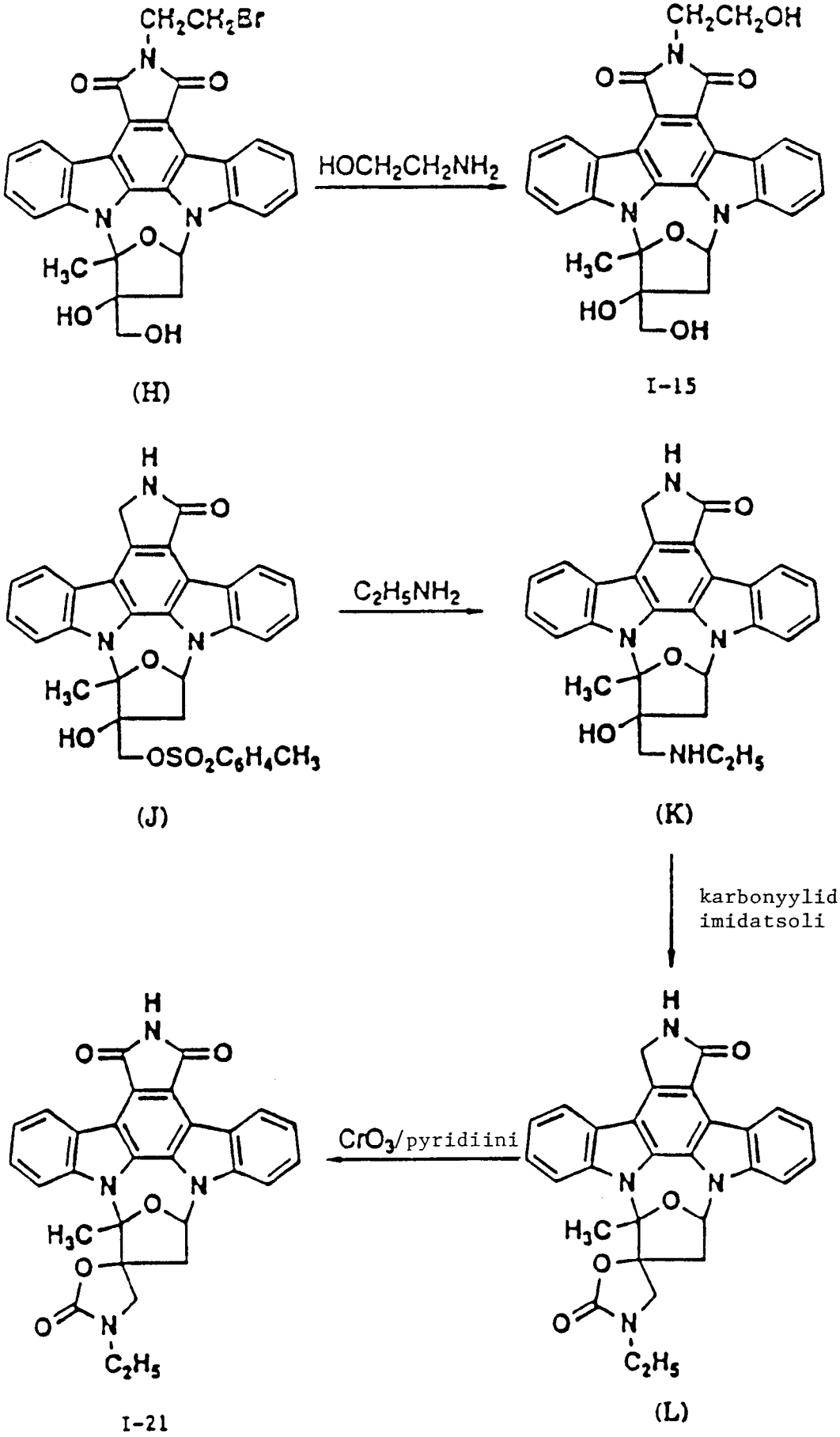

CH2CH2Br
HOCH2CH2NH2
CH2CH2OH
(H)
I-15
C2H5NH2
OSO2C6H4CH3
NHC2H5
(J)
(K)
karbonyylidi-
imidatsoli
CrO3/pyridiini
I-21
(L)

FIG. 7