

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4153693号
(P4153693)

(45) 発行日 平成20年9月24日 (2008. 9. 24)

(24) 登録日 平成20年7月11日 (2008. 7. 11)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/437 (2006. 01)

A 6 1 K 31/437

A 6 1 P 25/00 (2006. 01)

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 29/00 (2006. 01)

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 37/08 (2006. 01)

A 6 1 P 37/08

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 6 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-391481 (P2001-391481)

(22) 出願日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(65) 公開番号 特開2003-12516 (P2003-12516A)

(43) 公開日 平成15年1月15日 (2003. 1. 15)

審査請求日 平成16年11月25日 (2004. 11. 25)

(31) 優先権主張番号 特願2001-127524 (P2001-127524)

(32) 優先日 平成13年4月25日 (2001. 4. 25)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000002912

大日本住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号

(74) 代理人 100121588

弁理士 五十部 穰

(72) 発明者 徳光 浩

香川県高松市角屋2284-1 高松町宿舍

B203

(72) 発明者 村松 正明

東京都練馬区向山3-15-13

(72) 発明者 増保 安彦

千葉県木更津市矢那1532番地の3 株

式会社ヘリックス研究所内

最終頁に続く

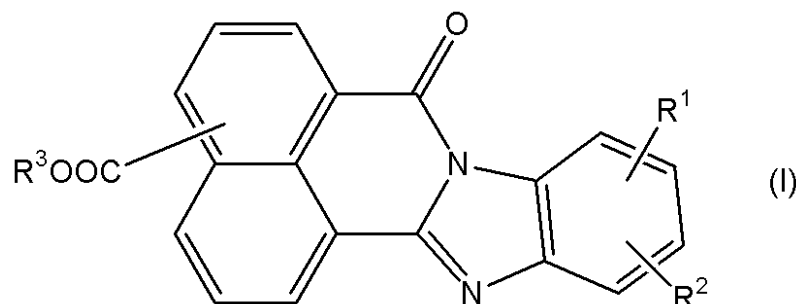
(54) 【発明の名称】 新規なCaMKK阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 (I) :

【化1】



〔式中、 R^1 、および R^2 は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、またはハロアルキル基のいずれかである。 R^3 は水素原子、アルキル基、または置換アルキル基を表し、 $COOR^3$ 基はナフタレン環のどの位置に置換していてもよい。〕で表される、7H-ベンズイミダゾ[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

【請求項2】

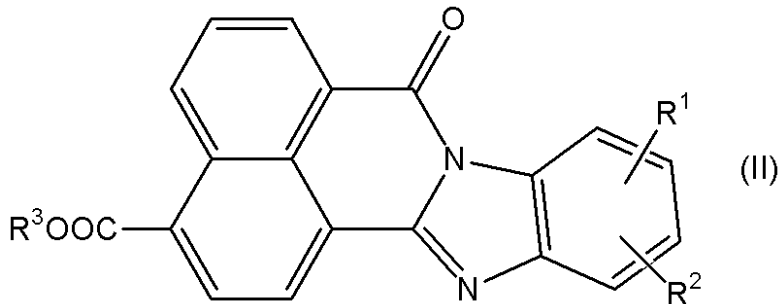
R^1 および R^2 が水素原子である、請求項1記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

【請求項3】

R^3 が水素原子である、請求項1または2記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

【請求項4】

式(II)：



10

[式中、 R^1 、 R^2 、および R^3 は、式(I)と同義である。]で表される7H-ベンズイミダゾ[2,1-a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体、またはその薬学上許容される塩を、有効成分として含有するカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

20

【請求項5】

R^1 および R^2 が水素原子である、請求項4記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

【請求項6】

R^3 が水素原子である、請求項4または5記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

30

本発明は、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ(CaMKK)阻害剤のハイスループットスクリーニング方法、およびカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ(CaMKK)に対して選択的に阻害活性を示す7H-ベンズイミダゾ-[2,1-a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞内カルシウム情報伝達系は、あらゆる細胞において細胞運動、分泌反応など、多岐にわたって機能している。細胞内情報伝達系の初期の反応は主に、遊離細胞内カルシウムが、カルモジュリンなどのカルシウム受容蛋白質へ結合することであると考えられており、これらカルシウム受容蛋白質がキナーゼなどの標的分子の機能を調節する。カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ(以下、CaMKKと略する)は、その活性発現にカルシウムイオン、カルモジュリンを必須とする蛋白質リン酸化酵素であり、大脳、小脳、膵臓、脾臓などにおいて発現されている。CaMKKのin vitroにおける基質としては、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼI、およびIV(CaM-KI、IV)が挙げられ、これらのキナーゼをリン酸化することにより、活性化すると考えられている。また、アポトーシス促進に関与すると考えられている、PKB(Protein kinase B)を直接リン酸化し活性化することが報告されている。その生理的機能としては、既報のin vitro試験結果から、中枢神経系、免疫系における遺伝子発現の制御および中枢神経系における細胞死抑制などが示唆されているが、実際の生体内での機能については、未だ不明な点が多い。その理由の一つは、CaMKKの選択的な阻害剤が無かったことである。従

40

50

って選択的にCaMKKを阻害する化合物は、CaMKKの細胞内カルシウム情報伝達機構における役割、およびCaMKKが関与する生理機能の解明に必須であると考えられ、*in vitro*試験および*in vivo*試験にCaMKK選択的な阻害剤を用いることができれば、CaMKKの機能を特定するのが容易になる。

また、CaMKK阻害剤の医薬品としての用途は未だ研究途上にあるが、上述したようなCaMKKの発現器官および示唆されている生理機能から考えると、CaMKK阻害剤は、アレルギー性疾患、炎症性疾患、中枢性疾患等の治療剤として応用できる。

【0003】

カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ類の阻害剤としては、中枢神経系初め、広く生体に存在し、多機能を有する、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼIIの阻害剤が知られている。具体的には、KN-62(J. Biol. Chem., 265, 4315-4320(1990))、KN-93(Biochem. Biophys. Res. Commun., 181, 968-975(1991))、ペプチド性の化合物(公開特許公報平11-152298)、アラキドン酸、12-HETE(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8550-8554(1989))などが挙げられる。KN-62は、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼIVの阻害剤としても知られている(J. Biol. Chem., 269, 15520-15527(1994))。しかし、CaMKKを阻害する化合物については知られていない。

10

【0004】

CaMKK酵素活性のアッセイ方法については、徳光らによってジャーナル・オブ・バイオケミストリー、275巻、26号、20090頁に報告されている方法が挙げられる。ここで用いられている方法は、リン酸化源として[γ - ^{32}P]-ATPが用いられている。しかしながら、 ^{32}P はエネルギーの高い放射性同位元素であり、この方法をCaMKK阻害活性のハイスループットアッセイ系で用いることは位置的に近接するサンプル間で相互の放射活性の干渉作用が大き過ぎ、正確な放射活性測定ができないという点で困難であった。

20

【0005】

一方、本発明の7H-ベンズイミダゾール-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体の分野では、多数の化合物が公知であり、多くは染料または色素、およびその中間体として用いられている。例えば、1,8-ナフトイレンベンズイミダゾール-4(または5)-カルボン酸は、US2820037や有機合成化学第20巻第11号1016頁(1962年)に記載されている。

30

しかし、医薬用途としては、特開平6-263759に記載された、抗癌剤として有用な1,8-ナフトイレンベンズイミダゾール誘導体、および、US4670442に記載された、免疫調節剤として有用な1,8-ナフトイレンベンズイミダゾール誘導体が知られているに過ぎない。また、これらの化合物の作用機序については、全く記載されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ(CaMKK)阻害剤のハイスループットスクリーニング方法、およびCaMKKが関与する生理活性を解明するために必須であり、医薬品としても有用な、選択的CaMKK阻害剤を供することにある。

40

【0007】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、鋭意検討した結果、[γ - ^{33}P]-ATPをリン酸化源として用いることによって、リン酸化された基質を含む多数の反応混合物を1枚のフィルターに吸着させても、近接した反応混合物間の、相互の放射活性の干渉なしに正確な測定ができることを見出した。また、この方法では使用する放射線量を著しく減少させることもできる。これによって、一度に多数のサンプルをアッセイするハイスループットスクリーニング系を構築することができた。

上記の方法を用いて、選択的にCaMKKを阻害する化合物をスクリーニングした結果、

50

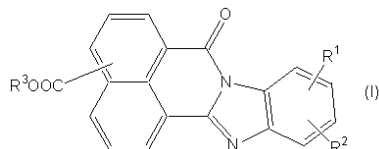
強いCaMKK阻害活性を示す7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体を見出すに至った。本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体またはその塩は、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼI Iに対する阻害活性は低く、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼI、IV、MLCK、プロテインキナーゼA、C、およびp42MAPキナーゼ等に対してはほとんど阻害活性を示さず、極めて選択的にCaMKKを阻害することがわかった。このようなプロフィールを有する化合物はこれまで見出されていなかった。

【0008】

すなわち本発明は、

[1] 式(I)：

【化3】



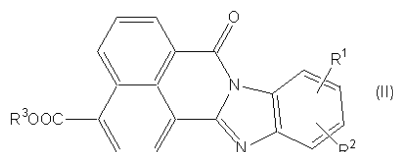
[式中、R¹、またはR²は、独立して、水素原子、ハロゲン原子、アルキル基、またはハロアルキル基のいずれかである。R³は水素原子、アルキル基、または置換アルキル基を表し、COOR³基はナフタレン環のどの位置に置換していてもよい。]で表される、7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体、またはその薬学上許容される塩を有効成分として含有するカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[2] R¹およびR²が水素原子である、[1]記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[3] R³が水素原子である、請求項1または2記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[4] 式(II)：

【化4】



(式中、R¹、R²、およびR³は前記と同義である。)

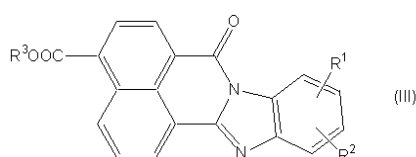
で表される7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体、またはその薬学上許容される塩を、有効成分として含有するカルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[5] R¹およびR²が水素原子である、[4]記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[6] R³が水素原子である、[4]または[5]記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[7] 式(III)：

【化5】



(式中、R¹、R²、およびR³は前記と同義である。)

で表される7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン

誘導体、またはその薬学上許容される塩を、有効成分として含有するカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤。

[8] R^1 および R^2 が水素原子である、[7] 記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[9] R^3 が水素原子である、[7] または [8] 記載のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤、

[10] [1] から [9] 記載のカルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤を有効成分として含有する、CaMKKの機能が亢進した病態を改善する治療剤、

[11] [1] から [9] 記載のカルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ阻害剤を有効成分として含有する、アレルギー性疾患、炎症性疾患、または中枢性疾患の治療剤、

[12] [$-^3^3P$] - ATP を基質のリン酸化源として用いて酵素反応を行い、リン酸化された基質をフィルターに吸着させてその放射活性を測定することを特徴とする、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼ (CaMKK) 阻害剤のハイスループットスクリーニング方法、
に関するものである。

【 0009 】

本発明において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を表し、好ましくはフッ素原子、または塩素原子である。

アルキル基としては炭素数 1 から 4 のアルキル基が挙げられ、具体的には、メチル、エチル、プロピル、1-メチルエチル、ブチル、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル、2, 2-ジメチルエチルなどが挙げられる。

ハロアルキル基とは、1 から 5 個のハロゲン原子が結合したアルキル基を表し、好ましくは、1 から 3 個のハロゲン原子が結合したアルキル基を表す。具体的にはトリフルオロメチル、2-トリフルオロエチル、2-クロロエチルなどが挙げられる。

置換アルキル基における置換基としては、炭素数 1 から 4 のアルコキシ基、炭素数 1 から 4 のアルキルカルボニル基、炭素数 1 から 4 のアルキルカルボニルオキシ基、炭素数 1 から 4 のアルコキシカルボニル基、炭素数 1 から 4 のアルコキシカルボニルオキシ基等が挙げられる。

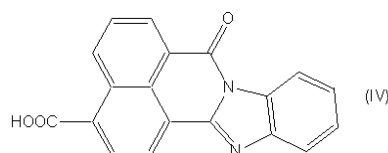
式 (I) ~ 式 (III) における、 R^1 および R^2 の好ましい例としては、同一または異なって、水素原子、ハロゲン原子、メチル基、エチル基、トリフルオロメチル基などが挙げられる。特に好ましいのは水素原子である。

【 0010 】

式 (I) ~ 式 (III) における、 R^3 の好ましい例としては、水素原子、メチル基、エチル基、アセトキシメチル基、または、ピバロイルオキシメチル基等が挙げられ、特に好ましいものは水素原子である。

本発明における CaMKK 阻害剤は、好ましくは、式 (II) で表される化合物、またはその薬学上許容される塩であり、更に好ましくは、式 (IV) :

【 化 6 】



で表される化合物、またはその薬学上許容される塩である。

【 0011 】

本明細書において、式 (I) ~ 式 (IV) で表される 7H-ベンズイミダゾ-[2,1-a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体の「薬学上許容される塩」としては、例えば、塩基性塩の場合、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、亜鉛塩等の無機金属塩、メチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、トリヒドロキシメチル

10

20

30

40

50

アミノメタン等の一級、二級、三級の有機アミン塩、ピリジニウム塩等が挙げられ、酸性塩の場合、塩酸、硝酸、燐酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸などの無機酸、並びにメタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの脂肪族、芳香族を含むスルホン酸類、およびギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、安息香酸などの脂肪族、芳香族を含むカルボン酸のような有機酸との塩を含む。

また、本発明には、式(I)～式(IV)で表される7H-ベンズイミダゾ-[2,1-a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体またはその塩の水和物、エタノール溶媒和物等の溶媒和物等も含まれる。

【0012】

式(I)～式(IV)で表される化合物は、以下の方法で製造することができる。

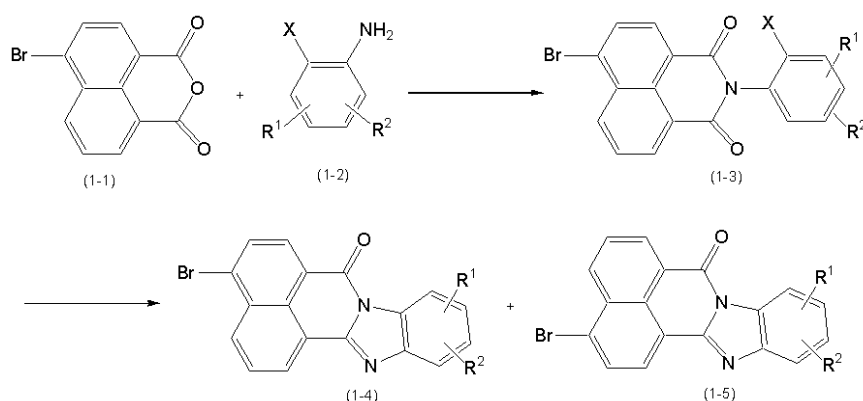
10

製造法1:

US2820037に記載された方法などを用いて、以下の工程で製造することができる。すなわち、

[1] 式(1-4)、または式(1-5)で表される化合物の製造工程

【化7】



20

(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義である。X は、ニトロ基、アミノ基、または保護基で保護されたアミノ基を表す。)

O-置換アニリン誘導体：式(1-2)と、プロモナフタレン酸無水物：式(1-1)を、必要に応じて酸触媒の存在下、水中、または酢酸、エタノール、DMFのような極性溶媒を用いて、通常0～250の範囲で縮合し、式(1-3)の化合物を製造することができる。Xがアミノ基である場合、式(1-3)の化合物は、必要に応じてジシクロヘキシルカルボジイミドなどの脱水縮合剤の存在下、DMFなどの不活性溶媒中で縮合反応を行い、式(1-4)の化合物、および式(1-5)の化合物へ導くことができる。Xが保護基で保護されたアミノ基を表す場合、保護基を脱保護し、アミノ基へと返還した後縮合反応を行うことができる。

30

また、Xがニトロ基の場合、接触水素化反応、鉄、亜鉛などの金属を用いた還元反応を用いてアニリン誘導体を合成し、続いて上述の縮合反応を行うことができる。

式(1-4)の化合物、および式(1-5)の化合物を含む混合物は、そのまま次の反応へ供することも可能であるが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーや、分別再結晶等を用いて、それぞれの位置異性体を分離精製することも可能である。式(1-4)、および(1-5)の異性体は、各々公知化合物であり、 $^1\text{H-NMR}$ データを取得することで区別することができる。(Bull.Chem.Soc.Jpn., 74, 173(2001))

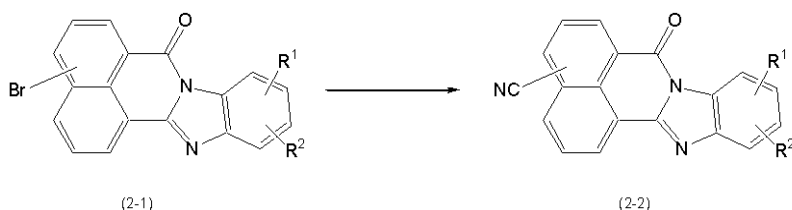
40

また、式(1-1)の化合物の位置異性体を原料に用いることにより、上記と同様の方法で、式(1-4)の化合物の他の異性体を合成することもできる。

【0013】

[2] 式(2-2)の化合物の製造工程

【化8】



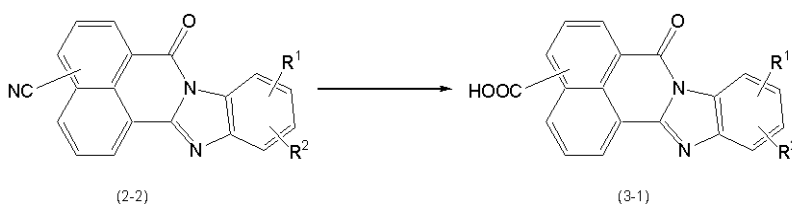
(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義である。)

工程 1 で得られる式 (1 - 4) の化合物、式 (1 - 5) の化合物、またはそれらの混合物等の、式 (2 - 1) で表される化合物から、実施例に記載された方法などを用いて、式 (2 - 2) の化合物を製造することができる。式 (2 - 2) で表される化合物が位置異性体の混合物である場合は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分別再結晶等を用いて位置異性体を分離することもできる。

【0014】

[3] 式 (3 - 1) の化合物の製造工程

【化 9】



(式中、 R^1 および R^2 は前記と同義である。)

式 (2 - 2) の化合物に対して、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの塩基、あるいは濃塩酸などの酸の存在下、加水分解反応を行い、式 (3 - 1) で表される本発明の化合物を製造することができる。上記式 (3 - 1) で表される化合物が位置異性体の混合物である場合は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分別再結晶等を用いて位置異性体を分離することもできる。

式 (3 - 1) で表される化合物は、公知の方法でエステル化反応を行い、カルボキシル基をエステルへと変換することができる。該方法については、新実験化学講座 (丸善; 第 2 巻) 等に記載されている。

また、前記製造方法で使用されるアミノ基の保護基としては、当業者が通常使用する保護基が挙げられ、保護・脱保護の方法等については、「Protective groups in organic chemistry (第 2 版/Greene, T.W., John Wiley & Sons, Inc.)」に記載された方法等が挙げられる。

【0015】

本発明において、CaMKK は、そのホモログ、アイソフォームも含んでいる。例えばラット CaMKK の配列は、Anderson, K.A. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 31880-31889 等に記載されているが、CaMKK、および CaMKK の 2 種類のアイソフォームが知られている。また、ヒト CaMKK の配列についても上記文献等の開示されている。

【0016】

本発明におけるハイスループットスクリーニング方法とは、1 度に多数のサンプルの酵素阻害活性を評価することができるスクリーニング方法を表し、具体的には、96 穴プレート (具体的には、8.5cm x 12.7cm の大きさのものなどが汎用されている。) 等を用いて評価する方法等が挙げられる。

本発明のハイスループットスクリーニング方法は、以下の工程を含むものである。すなわち、

[1] 96 穴 V 底プレート等、多数のサンプルを独立した反応槽にサンプリングできる構造を有するプレートの各穴に、被検化合物、CaMKK、カルモジュリンキナーゼ I などの基質、カルモジュリン、[γ - 32 P]-ATP を添加して、適当な温度、例えば 37 °C で、

10

20

30

40

50

約1時間、リン酸化反応を進行させた後、EDTA、トリクロロ酢酸、塩酸などの試薬を用いて反応を停止させる。

ここで、基質と酵素の相互作用を促進するために、酵素反応時にコールドのATPを添加してもよい。また、 ^{33}P の取り込みを完全に停止させるために、反応停止時にコールドのATPを添加してもよい。

〔2〕各穴の反応液の一部を等量ずつ、シート状のフィルター、好ましくは、リン酸基が導入されたグラスファイバーフィルター上の対応する位置に滴下する。このフィルターをリン酸溶液で5回、エタノールで1回洗浄して未反応の $[\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ を除いた後、乾燥させる。

〔3〕乾燥後のフィルターにシンチレータ、好ましくは固形シンチレータシートを重ねて熱融解により浸透させ、再固化後、プレートカウンタで $[\text{-}^{33}\text{P}]$ の放射活性を定量する。

10

ここでCaMKKは、本発明明細書の実施例に示す方法等を用いて調製することができる。

本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体は、前述のように、CaMKKに選択的な唯一の阻害剤であり、CaMKK阻害作用を指標とした医薬品のスクリーニング等に用いることができる。例えば、CaMKKの機能はそもそも不明であるが、当該化合物を加えることにより、CaMKKの機能を阻害した細胞培養系を構築することができる。従って、そのような細胞培養系における生理学的な挙動を調べることによって、CaMKKの機能を推定することができる。また、本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体は、CaMKKの機能を指標とする種々のスクリーニング系において、陽性、あるいは陰性の対照化合物として用いることができる。

20

また、本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体は、CaMKKの機能亢進が増悪をもたらす疾患の治療剤として用いることができる。

本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体は、これを医薬として用いるにあたり、経口的または非経口的（例えば、静脈内、皮下、もしくは筋肉内注射、局所的、経直腸的、経皮的、または経鼻的）に投与することができる。経口投与のための形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、散剤、液剤、シロップ剤または懸濁剤などが挙げられ、非経口投与のための形態としては、例えば、注射用水性剤もしくは油性剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾル剤、坐剤、貼付剤などが挙げられる。これらの製剤は、従来公知の技術を用いて調製され、許容される通常の担体、賦形剤、結合剤、安定剤等を含有することができる。また、注射剤で用いる場合には許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。

30

本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体またはその医薬上許容される塩の投与量、投与回数は、症状、年齢、体重、投与形態によって異なるが、通常は成人に対して本発明化合物の有効成分量として、1日あたり約1~2000mg、好ましくは10~500mgを1回または数回に分けて投与することができる。

40

【0017】

【実施例】

以下に実施例および参考例を説明するが、本発明はもとよりこれに限定されるものではない。実施例では、下記の略号が使用されている。

DMSO = ジメチルスルホキシド

TF A = トリフルオロ酢酸

実施例 1

化合物の合成（混合物）

工程 1

50

3 - ブロモ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - ブロモ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物

3 - ブロモ - 1 , 8 - ナフタリンジカルボン酸無水物 (2 . 7 9 g) と O - フェニレンジアミン (1 . 1 0 g) 、酢酸 (1 5 m l) を O - クロロベンゼン (2 5 m l) に懸濁させ、100 で7時間加熱還流した。反応液を放冷後、結晶を濾取、減圧乾燥した後、標記化合物 (2 . 4 9 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 - DMSO , 300 MHz) : 8 . 8 1 (m) , 8 . 6 7 - 8 . 4 9 (m) , 8 . 4 4 (m) , 8 . 2 5 (m) , 8 . 0 4 (m) , 7 . 8 6 (m) , 7 . 4 9 (m)

【 0 0 1 8 】

工程 2

3 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物

3 - ブロモ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - ブロモ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物 (1 . 0 g) とシアン化銅 (I) (0 . 3 1 g) をピリジン (7 . 1 m l) に加え、封管中、150 で10時間加熱した。反応液を放冷後、アンモニア水で希釈し沈殿した結晶を濾取した。濾上物は水で洗液が中性になるまで洗浄し、室温で減圧乾燥し、標記化合物 (1 . 1 3 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 - DMSO , 300 MHz) : 8 . 7 8 (m) , 8 . 6 1 - 8 . 3 7 (m) , 8 . 1 3 (m) , 7 . 8 9 (m) , 7 . 5 2 (m)

【 0 0 1 9 】

工程 3

3 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物

3 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物 (1 0 0 m g) を濃硫酸 (1 0 m l) 、水 (1 0 m l) 、酢酸 (5 m l) に懸濁させ、120 で5時間加熱した。反応液を放冷後、60 m l の水に注入し、室温で1時間攪拌した。反応懸濁液をろ過し、濾上物を室温で減圧乾燥して残渣を得た。これを2%水酸化ナトリウム水溶液に懸濁し、100 で1時間攪拌した。反応懸濁液をろ過し、濾液を5%塩酸水でpHを3に調整した後、酢酸エチルで抽出し有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して減圧濃縮後、標記化合物 (8 0 m g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 - DMSO , 300 MHz) : 9 . 3 1 (d , $J = 7 . 5 \text{ Hz}$) , 9 . 0 3 (d , $J = 7 . 5 \text{ Hz}$) , 8 . 7 2 (m) , 8 . 3 9 (m) , 8 . 0 4 - 7 . 8 5 (m) , 7 . 4 8 (m) 。

【 0 0 2 0 】

実施例 2

3 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンと 4 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの分離精製

3 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンおよび 4 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オンの混合物 (7 0 μ g) を DMSO (1 滴) アセトニトリル (7 滴) に溶解し、逆相 HPLC 条件 [カラム , Cosmosil (登録商標) 5 C18 - AR - I (4 . 6 m m \times 1 5 c m) 、移動相 , アセトニトリル : 水 : TFA (4 5 : 5 5 : 0 .

10

20

30

40

50

0.5)] で分取し、保持時間 10.9 分の分画と保持時間 11.7 分の分画を得、それぞれを減圧濃縮し、異性体 A (7.5 μ g)、異性体 B (8.1 μ g) を得た。

【0021】

実施例 3

CaMKK の調製

ラットCaMKK (配列は以下の文献に記載。Tokumitsu, h. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 19320-19324) は大腸菌(BL21)を用いて以下の条件で発現および精製した。100 μ g/ml Ampicillin を含むLB-培地において培養し600 nmの吸光度が1.2 となった時点において0.1mM IPTG (終濃度)を加えさらに12-16時間培養した。その後大腸菌を回収し、超音波破碎した後、その上清をMono Qカラムに供しNaCl濃度勾配により溶出した。本方法により粗精製し、純度約90%の目的とする酵素を得た。

完全精製標品はCaM-セファロースカラムを用いて2mM EGTAを含む溶出液にて溶出することにより純度約95%以上の目的とする酵素を得た。

酵素標品は50mM HEPES pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 40% グリセロール, 10% エチレングリコールに溶解して-30度に保存した。

ラットCaMKK は、文献(Tokumitsu, H. et al. (2001), Bio-chemistry 40, 13925-13932)記載の方法で調製した。

【0022】

実施例 4

CaM - KI の調製

GST-CaMK- I (K49E) およびGST-CaM-KI(1-293, K49E)は大腸菌(JM109)を用いて以下の条件で発現および精製した。100 μ g/ml Ampicillin を含むLB-培地において培養し600 nmの吸光度が1.2 となった時点において1mM IPTG (終濃度)を加えさらに12-16時間培養した。その後大腸菌を回収し、0.1 mM PMSFを含むPBSに溶かし、超音波破碎した後、その上清をグルタチオンセファロースに供した。グルタチオンセファロースを0.1 mM PMSFを含むPBSにより洗浄し、10 mM グルタチオンを含む50 mM Tris pH 8.0 溶液にてGST-融合タンパク質を溶出した。本方法により純度約90%の目的とする酵素を得た。

精製標品は50mM HEPES pH7.5, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 40% グリセロール, 10% エチレングリコールに溶解して-30度に保存した。

【0023】

実施例 5

CaMKK 阻害作用の測定 (ハイスルーブットスクリーニング)

CaMKK (ここではCaMKK を用いた。)の活性測定は、[γ - 33 P]-ATPとCaM-KIを基質とし、CaMKKによるリン酸化反応でCaM-KIに導入された[γ - 33 P]の放射活性を測定することで定量した。以下のアッセイにおいて、各試薬は、緩衝液(10mM Mg(Ac)₂, 0.1mM CaCl₂, 1mM DTTを含む50mM HEPES(pH7.5))に溶解し、使用した。被検化合物は、粉末をDMSOに溶解した後、緩衝液で必要濃度に希釈して使用した。

96穴V底プレートの各穴に、種々の濃度の被検化合物溶液10 μ l、CaMKK、CaMK- I、カルモジュリンを含む溶液10 μ l、[γ - 33 P]-ATP、cold ATPを含む溶液10 μ lを順に添加して、反応を開始させた(反応液総量30 μ l中の各試薬濃度は、CaMKK: CaMKKストック液20 μ l/ml、CaM-KI: 67 μ g/ml、カルモジュリン: 1 μ M、[γ - 33 P]-ATP: 6.7 μ Ci/ml(2.2~6.7 nM)、Cold ATP: 0.3 μ M)。37 で1時間、リン酸化反応を進行させた後、100mM EDTA、10mM ATPを含む50mM HEPES(pH7.5)を5 μ lずつ加えて反応を停止させた。

反応停止後、反応液を15 μ lずつ、シート状のグラスファイバーフィルター(Wallac, filtermat P30)の各穴に対応する位置に滴下、浸透させた。このフィルターを150mMリン酸溶液で5回、エタノールで1回洗浄して未反応の[γ - 33 P]-ATPを除いた後、乾燥させた。乾燥後のフィルターに固形シンチレータシートを重ねて熱融解により浸透させ、再固化後、フィルターに補足されたCaM-KIに導入されている[γ - 33 P]の放射活性をプレート用カウンタで測定、定量した。

被験化合物の阻害率は、以下の式により算出した。

10

20

30

40

50

阻害率(%) = 100 × (A - B) / (A - C)

A : CaMKK添加、被検化合物非添加の場合の放射活性カウント

B : CaMKK添加、被検化合物添加の場合の放射活性カウント

C : CaMKK非添加、被検化合物非添加の場合の放射活性カウント(バックグランド)

1化合物につき4～5種類の濃度で求めた阻害率を解析して、 IC_{50} 値を算出した。尚、各濃度においては、N = 3で測定し、平均値を求めた。実施例1、および実施例2(異性体B)について IC_{50} 値を測定した結果を表1に示す。

【表1】

化合物	IC_{50} (濃度[μ g/ml])
実施例 1	0.013
実施例 2	0.037

10

【0024】

実施例6

3-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オンおよび4-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オンの合成

Bull.Chem.Soc.Jpn. 74, 173 (2001)に記載された方法を参考に合成した。4-プロモ-1,8-ナフチル酸無水物(76.3g)の酢酸(300ml)中に室温下でO-フェニレンジアミン(30.15g)およびクロロベンゼン(600ml)を加えた後、5時間還流撹拌をした。反応液を10-15℃に冷却し、結晶を濾取し、3-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オンおよび4-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オンの混合物(一番晶:80.2g,二番晶:11.1g)を得た。一番晶およびほぼ同一組成の結晶(103.99g)を数バッチに分けてクロロホルムで再結晶を繰り返し、4-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン(14.99g)を得た。二番晶およびほぼ同一組成の結晶(33.75g)をあわせて数バッチに分けてクロロホルムを用いてカラムクロマト精製を繰り返し、3-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン(1.16g)を得た。それぞれの異性体の構造は、 1H -NMRデータを取得し、上記文献記載のデータと比較することで確認した。

20

30

【0025】

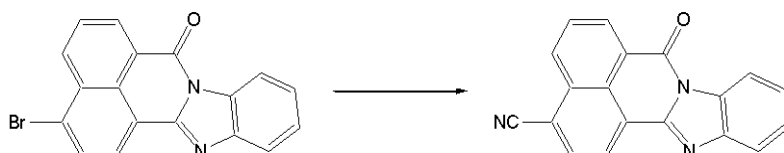
実施例7

化合物の合成(異性体)

工程1

3-シアノ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン

【化10】



40

実施例6で得た3-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン(1.13g)とシアニ化銅(I)(0.47g)をピリジン(10ml)に加え、封管中、150℃で20時間加熱した。反応液を放冷後、アンモニア水で希釈し沈殿した結晶を濾取した。濾上物は水で洗液が中性になるまで洗浄し、室温で減圧乾燥し、標記化合物を3-プロモ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オンとの混合物として得た。収量0.45g。 1H NMR面百値 83.5%(3-シアノ-7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン)。

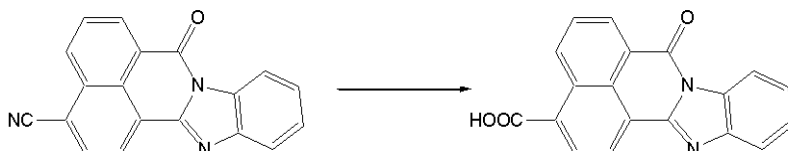
50

^1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) : 8.84 - 8.80 (2H, m), 8.62 (1H, dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz), 8.51 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.46 - 8.43 (1H, m), 8.18 (1H, d, $J = 7.5, 1.0$ Hz), 7.94 (1H, m), 7.54 (2H, m)

工程 2

3 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン

【化 1 1】



10

3 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン (0.45 g) を濃硫酸 (5 ml)、水 (5 ml)、酢酸 (2.5 ml) に懸濁させ、3 時間加熱還流した。反応液を放冷後、270 ml の水に注入し、反応懸濁液をろ取して残渣を得た。これを 2 % 水酸化ナトリウム水溶液に加熱溶解して不溶物を吸引ろ過により除いた。濾液を 5 % 塩酸水で pH を 2 に調整した後、析出した結晶をろ取した。得られた粗結晶を酢酸で再結晶し、標記化合物 (0.36 g) を得た。本化合物は、実施例 2 の異性体 B と HPLC 溶出時間保持時間が完全に一致した。本化合物は、1 モルの酢酸を含む

20

^1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) : 9.33 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.84 - 8.76 (2H, m), 8.45 (2H, m), 8.06 (1H, m), 7.92 (1H, m), 7.54 (2H, m), 1.91 (3H, s)

【0026】

実施例 8

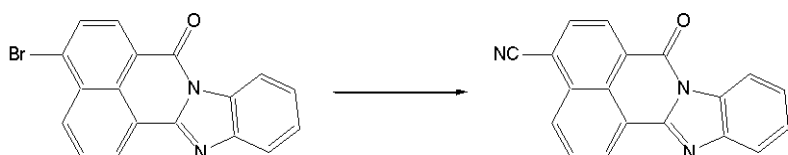
化合物の合成 (異性体)

工程 1

4 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン

30

【化 1 2】



実施例 6 で得た 4 - ブロモ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン (6.90 g) とシアン化銅 (I) (2.18 g) をピリジン (40 ml) に加え、封管中、150 で 20 時間加熱した。反応液を放冷後、アンモニア水で希釈し沈殿した結晶を濾取した。濾上物は水で洗液が中性になるまで洗浄し、室温で減圧乾燥し、粗シアノ体 (4.60 g) を得た。粗シアノ体 (0.8 g) をカラムクロマトグラフィーで分離精製し、精シアノ体 0.57 g を得た。

40

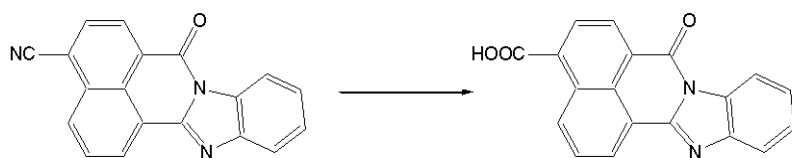
^1H -NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) : 8.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.76 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.56 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 8.48 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.43 (1H, m), 8.16 (1H, m), 7.90 (1H, m), 7.54 (2H, m)

工程 2

4 - カルボキシ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン

【化 1 3】

50



4 - シアノ - 7 H - ベンズイミダゾ - [2 , 1 a] ベンズ [d e] イソキノリン - 7 - オン (9 9 2 m g) を濃硫酸 (1 0 m l) 、水 (1 0 m l) 、酢酸 (5 m l) に懸濁させ、1 時間加熱還流した。反応液を放冷後、6 0 0 m l の水に注入してろ過し、濾上物を室温で減圧乾燥して残渣を得た。これを 2 % 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、1 時間加熱還流した。反応懸濁液をろ過し、濾液を 5 % 塩酸水で p H を 3 に調整した後、析出した結晶

10

をろ取し、酢酸で再結晶した後、標記化合物 (1 7 9 m g) を得た。本化合物は、実施例 2 の異性体 A と H P L C 保持時間が完全に一致した。
 ^1H - NMR (d_6 - DMSO , 3 0 0 M H z) : 9 . 0 6 (1 H , d , $J = 8 . 5 \text{ H z}$) , 8 . 8 2 (1 H , d , $J = 7 . 5 \text{ H z}$) , 8 . 7 6 (1 H , d , $J = 7 . 5 \text{ H z}$) , 8 . 4 6 - 8 . 3 9 (2 H , m) , 8 . 0 1 (1 H , m) , 7 . 9 0 (1 H , m) , 7 . 5 1 (2 H , m)

【 0 0 2 7 】

実施例 9

実施例 5 と同様の方法で、実施例 7 の化合物および実施例 8 の化合物の C a M K K 阻害活性を測定した。結果を表 2 に示した。

20

【 表 2 】

化合物	IC50 (濃度[ng/ml])
実施例 7	0.79
実施例 8	814
実施例 1	17

【 0 0 2 8 】

実施例 1 0

C a M K K 特異性の測定

以下の方法で、各種CaMKK (ここではCaMKK を用いた。) に対する阻害作用を測定した。CaMKK(0.28 $\mu\text{g/ml}$) の活性測定は、100 μM [^{-32}P] -ATP と 100 μg GST-CaM-KI (1-293, K49E) を基質とし、CaMKK によるリン酸化反応でGST-CaM-KI に導入された [^{-32}P] の放射活性を測定することで定量した。反応溶液は10mM Mg(Ac)₂、1mM CaCl₂、1mMジチオトレイトール、3 μM カルモデュリンを含む50mM HEPES(pH7.5)) 使用し、反応時間は5 分間である。被験化合物 (実施例 1 の化合物) は、粉末をDMSO に溶解した後、DMSO で必要濃度に希釈して終濃度 4 % DMSO 存在下の条件でCaMKK の活性を測定した。反応は 2 5 μl 反応溶液のうち15 μl をP-81 Phosphocellulose フィルターにスポットすることにより終了させ、75 mM リン酸溶液にて十分に洗浄し、遊離の [^{-32}P] -ATP を除去後乾燥させ放射活性をシンチレーションカウンターにより測定し、CaM-KK活性とした。

30

【 0 0 2 9 】

CaM-KI, CaM-KII, CaM-KIV 活性測定法

CaM-KI(2.5 $\mu\text{g/ml}$) , CaM-KII(0.75 $\mu\text{g/ml}$) , CaM-KIV(0.57 μM) 活性測定は100 μM [^{-32}P] -ATP と 40 μM syntide-2 を基質とし、それぞれの C a M 依存性キナーゼによるリン酸化反応でsyntide-2 に導入された [^{-32}P] の放射活性を測定することで定量した。反応溶液は10mM Mg(Ac)₂、1mM CaCl₂、1mM DTT、3 μM カルモデュリンを含む50mM HEPES(pH7.5)) 使用し反応時間は5 分間である。被験化合物 (実施例 1 の化合物) は、粉末をDMSO に溶解した後、DMSO で必要濃度に希釈して終濃度 4 % DMSO 存在下の条件 (CaM-KK 活性測定と同条件) でCaM-KI, CaM-KII, CaM-KIVの活性を測定した。反応は 2 5 μl 反応溶液のうち15 μl をP-81 Phosphocellulose フィルターにスポットすることにより終了させ、75 mM リン酸溶液にて十分に洗浄し、遊離の [^{-32}P] -ATP を除去後乾燥させ放射活性をシンチレーションカウンターにより測定し、CaM-KI, CaM-KII, CaM-KIV 活性とした。

40

結果を表 3 に示した。

50

【表 3】

酵素	被験物質の阻害活性
CaMK I	—
CaMK II	+
CaMK IV	—
CaMKK	+++

【0030】

実施例 11

CaMKK (CaMKK、) の阻害活性

精製したリコンビナントCaM-KK (0.3 µg/ml) およびCaM-KK (0.5 µg/ml) と、10または100 µgのGST-CaM-K I (1-293, K49E) を、30 で5分間、50mM HEPES (pH 7.5)、10 mM Mg(Ac)₂、1 mM DTT、50または100 µM [-³²P]ATPを含む溶液(25 µl)中で、1mM CaCl₂/2または3 µM カルモジュリン (CaM) の存在下、種々の濃度の、実施例7の化合物 (最終濃度: 0-10 µg/ml 4%DMSO溶液) と共にインキュベートした。酵素反応は、[-³²P]ATP を加えることによって開始し、ホスホセルロース紙 (Whatman P-81) 上に 15 µlをスポットすることによって終了させ、これを75mM リン酸で数回洗浄した。GST-CaM-K I (1-293, K49E)への取り込みは、フィルターの液体シンチレーションカウントを測定することによって定量した。結果を表4に示した。

【0031】

CaMK I、II、IV、およびMLCKに対する阻害効果

CaMK Iは、実施例 10と同様に調製した。CaMK IIは文献 (Tokumitsu et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4315-4320) に記載の方法で調製した。CaMK IVは文献 (Brickey, D.A., et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 578-584) に記載の方法で調製した。CaM-K I (2.5 µg/ml)、CaM-K II (0.75 µg/ml)、CaM-K IV (9 µg/ml)、またはMLCK (広島大学、Dr. Hiroshi Hosoyaより分与, 0.6 µg/ml) と、40 µM Syntide-2 (MLCKについては、50 µM MLCペプチド) を、30 で5分間、50mM HEPES (pH 7.5)、10 mM Mg(Ac)₂、1 mM DTT、50または100 µM [-³²P]ATPを含む溶液(25 µl)中で、1mM CaCl₂/2または3 µM カルモジュリン (CaM) の存在下、種々の濃度の実施例7の化合物 (最終濃度: 0-10 µg/ml 4%DMSO溶液) と共にインキュベートした。プロテインキナーゼ活性は、実施例 10に記載されたホスホセルロースフィルター法で測定した。

【0032】

PKA、PKC、およびp42MAPキナーゼに対する阻害効果

PKA(Promega、8 µg/ml)、PKC(Promega、25ng/ml)、またはp42MAPキナーゼ (upstate biotechnology、2 µg/ml) を、それぞれ100 µM Kemptamide (PKA基質)、100 µM Neurograninペプチド (PKC基質; プロメガ製)、または0.4mg/ml Myelin basic protein (p42 MAPキナーゼ基質) と、30 で5分間、50mM HEPES (pH 7.5)、10 mM Mg(Ac)₂、1 mM DTT、50 µM [-³²P]ATP (4500cpm/pmol)を含む溶液(25 µl)中で、1mM CaCl₂/0.4 µg/ml ホスファチジルセリンおよび0.1mg/ml BSAの存在下 (PKC)、あるいは非存在下 (PKAおよびp42MAPキナーゼ) に、種々の濃度の実施例7の化合物 (最終濃度: 0-10 µg/ml 4%DMSO溶液) と共にインキュベートした。プロテインキナーゼ活性は、実施例 10に記載されたホスホセルロースフィルター法で測定した。

結果を表4に示した。

【表 4】

10

20

30

40

実施例7の化合物の種々の Protein Kinases に対する阻害効果

Protein kinases	IC ₅₀ value (% inhibition at 10 µg/ml)	
CaM-KK α	120 ng/ml	
CaM-KK β	40 ng/ml	
CaM-kinase I	>10 µg/ml (20 ± 4 %)	10
CaM-kinase II	10 µg/ml	
CaM-kinase IV	>10 µg/ml (ND)	
Myosin light chain kinase	>10 µg/ml (46 %)	
Protein kinase C	>10 µg/ml (24 ± 4 %)	
cAMP-dependent protein kinase	>10 µg/ml (22 ± 3 %)	
p42 MAP-kinase	>10 µg/ml (18 ± 5 %)	20
ND, not detected		

【 0 0 3 3 】

実施例 1 2

ヒト神経芽細胞腫における内因性CaMKKに対する阻害効果

Ca²⁺/CaM-非依存型CaMK-IV (305HMDT-DEDD)、機能不全変異型CaMK-IV (305HMDT-DEDD、K71E)、恒常的活性型CaM-KK (1-434) のcDNAを含むリコンビナントアデノウイルスは以下のように調製した。すなわち、pME18sプラスミド中のcDNAを制限酵素で切り出し、末端を平滑化してpShuttle (Clontech) 中に組み込んだ。Adeno-X発現システム (Clontech) を用いて添付のプロトコールに従い、HEK293細胞よりリコンビナントウイルスが得られた。6穴培養プレートに播種してコンフルエントになったSY5Y細胞に、上記のように得られたリコンビナントウイルスを種々の組み合わせで、37 °C 1時間、10プラーク形成単位 / Cell の感染多重度 (M.O.I.) で感染させた。感染後、ウイルスは吸引除去し、細胞は更に10%FBSを含むRPMI培地で12時間培養した。その後細胞を6時間、種々の濃度の実施例7の化合物 (最終濃度: 0-10 µg/ml 0.5%DMSO溶液) の存在あるいは非存在下に無血清状態で培養した。細胞を1 µM イオノマイシン存在下あるいは非存在下で10分間刺激した後、溶解し、抽出物をSDS-7.5% PAGEに供した。これに抗CaM-K IV抗体 (1:2000、Transduction Lab.) または抗phosphoThr286CaM-KII抗体 (熊本大 Dr.Koji Fukunagaより供与) を用いてウェスタン・ブロッティングを行った。フィルム上のCaM-K IVの免疫反応性バンドをデンシトメーターでスキャンして数値化し、化合物1がCaM-K IVの活性型形成に及ぼす効果を定量した。結果を図1に示した。

この結果から、実施例7の化合物は細胞膜透過性を有し、ヒト神経芽細胞腫の細胞内で内因性CaM-KKに対しても阻害作用を示すことがわかる。

【 0 0 3 4 】

【発明の効果】

本発明の7H-ベンズイミダゾ-[2,1a]ベンズ[de]イソキノリン-7-オン誘導体またはその塩は、その高い選択性のために、CaMKKの生理作用を解明するために有用である。更に、本発明の化合物は、高い選択性を示すため、生体内で重要な役割を果

たしている他の種類のカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ類を阻害することがない。従ってCaMKK由来の病態のみを改善する薬剤の有効成分となり得る。上記のように本発明により、選択的なカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼキナーゼの阻害剤を提供することが可能になった。

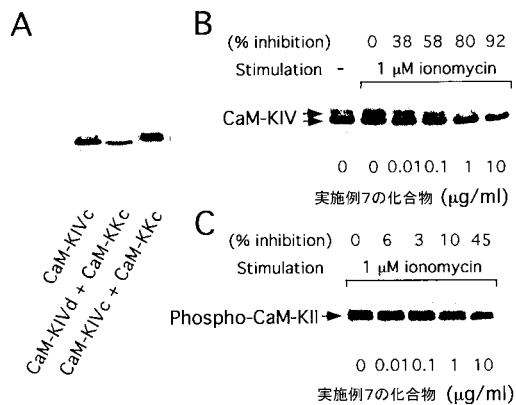
【0035】

【図面の簡単な説明】

【図1】 Aは、遺伝子組み込みでヒト神経芽細胞腫内に発現させたCa²⁺/CaM-非依存型CaM-KIVが、細胞内でCaM-KKにより確かに活性型になる（リン酸化される）ことを示す。Bは、ヒト神経芽細胞腫において遺伝子組み込みにより発現されたCa²⁺/CaM-非依存型CaM-KIVが内因性CaM-KKにより活性化（リン酸化）され、実施例7の化合物がそれを濃度依存的に阻害していることを示す。Cは、CaM-KIIのリン酸化に対しては、実施例7の化合物の阻害作用が弱く、その阻害作用がCaMKK特異的であることを示す。

10

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 D 471/06 (2006.01) C 0 7 D 471/06

- (72)発明者 池田 雅彦
兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内
- (72)発明者 近江 直子
兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友製薬株式会社内
- (72)発明者 西中 重行
千葉県舟橋市印内町668-1 ファミール西船橋6番館1007
- (72)発明者 青木 幹雄
大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

審査官 當麻 博文

- (56)参考文献 特開平6-263759(JP,A)
特開昭59-5184(JP,A)
米国特許第2820037(US,A)
特開平2-180818(JP,A)
特表2001-509808(JP,A)
山崎康男,有機合成化学協会誌,1962年11月,Vol.20/No.11,p.1016-1022

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K 31/33~33/44
C07D 471/06
A61P 25/00
A61P 29/00
A61P 37/08
A61P 43/00
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)
EMBASE(STN)