

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2001-527079(P2001-527079A)

【公表日】平成13年12月25日(2001.12.25)

【出願番号】特願2000-526515(P2000-526515)

【国際特許分類第7版】

C 0 7 D 498/22

A 6 1 K 31/553

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 21/00

A 6 1 P 21/02

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 25/08

A 6 1 P 25/14

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 43/00

【F I】

C 0 7 D 498/22

A 6 1 K 31/553

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 21/00

A 6 1 P 21/02

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 25/08

A 6 1 P 25/14

A 6 1 P 25/16

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 43/00 1 1 1

【手続補正書】

【提出日】平成16年12月1日(2004.12.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

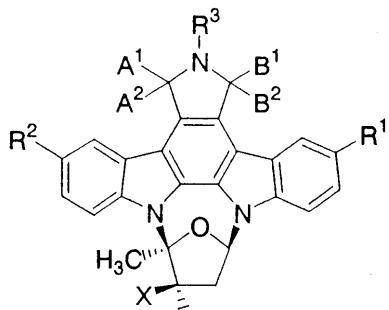
【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項1】式：

【化1】



II

上式中：

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は独立に：

水素；低級アルキル；ハロゲン；アシル；ニトロ；スルホ；

- C H = N R<sup>4</sup> (ここでR<sup>4</sup>はグアニジノ、複素環基、もしくは - N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup> (ここでR<sup>5</sup>もしくはR<sup>6</sup>は水素もしくは低級アルキルであり、そして他方は水素、低級アルキル、アシル、アリール、複素環基、カルバモイルもしくは低級アルキルアミノカルボニルである)である)；

- N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup>；

- C H ( S R<sup>7</sup> )<sub>2</sub> (ここでR<sup>7</sup>は低級アルキルもしくは2つのR<sup>7</sup>が一緒になってアルキレンを表す)；

- ( C H<sub>2</sub> )<sub>j</sub> R<sup>8</sup> [ここでjは1 - 6であり、そしてR<sup>8</sup>はハロゲン；置換アリール；未置換アリール；置換ヘテロアリール；未置換ヘテロアリール；N<sub>3</sub>；

- C O<sub>2</sub> R<sup>9</sup> (ここでR<sup>9</sup>は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリールもしくは未置換ヘテロアリールである)；

- C ( = O ) N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup> (ここでR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は独立に水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキル、未置換アラルキル、低級アルキルアミノカルボニルもしくは低級アルコキシカルボニルであるか、またはR<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>は窒素原子と結合して複素環基を形成する)；

- O R<sup>12</sup> (ここでR<sup>12</sup>は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、または - C ( = O ) R<sup>13</sup> (ここでR<sup>13</sup>は水素、N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup>、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキルもしくは未置換アラルキルである)である；

- N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup>；

- C ( = O ) R<sup>14</sup> (ここでR<sup>14</sup>は水素、低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリールもしくは未置換ヘテロアリールである)；または

- S ( = O )<sub>r</sub> R<sup>15</sup> (ここでrは0ないし2であり、そしてR<sup>15</sup>は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキル、未置換アラルキル、チアゾリニル、( C H<sub>2</sub> )<sub>a</sub> C O<sub>2</sub> R<sup>16</sup> (ここでaは1もしくは2であり、そしてR<sup>16</sup>は水素もしくは低級アルキルである)、または - ( C H<sub>2</sub> )<sub>a</sub> C ( = O ) N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup> である)；である]；

- O R<sup>17</sup> (ここでR<sup>17</sup>は水素、低級アルキルもしくは - C ( = O ) R<sup>18</sup> (ここでR<sup>18</sup>は置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリールもしくは未置換アリールである)である)；

- C ( = O ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>j</sub> R<sup>19</sup> (ここでR<sup>19</sup>は水素、ハロゲン、N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup>、N<sub>3</sub>、S R<sup>15</sup>もしくはO R<sup>20</sup> (ここでR<sup>20</sup>は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキルもしくはC ( = O ) R<sup>14</sup>である)である)；

- C H ( O H ) ( C H<sub>2</sub> )<sub>j</sub> R<sup>19</sup>；

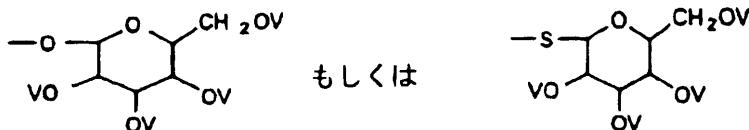
-  $(C H_2)_d C H R^{21} C O_2 R^{16A}$  (ここで  $d$  は 0 - 5 であり、そして  $R^{21}$  は水素、  $C O N R^{10} R^{11}$  もしくは  $C O_2 R^{16A}$  (ここで  $R^{16A}$  は  $R^{16}$  と同義である) である) ;  
 -  $(C H_2)_d C H R^{21} C O N R^{10} R^{11}$  ;  
 -  $C H = C H (C H_2)_m R^{22}$  (ここで  $m$  は 0 - 4 であり、そして  $R^{22}$  は水素、低級アルキル、  $C O_2 R^9$ 、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、  $O R^{12}$  もしくは  $N R^{10} R^{11}$  である) ;  
 -  $C H = C (C O_2 R^{16A})_2$  ;  
 -  $C (C H_2)_m R^{22}$  ;  
 -  $S O_2 N R^{23} R^{24}$  (ここで  $R^{23}$  および  $R^{24}$  は独立に水素、低級アルキル、もしくは隣接する窒素原子と複素環基を形成する基である) ;  
 -  $O C O_2 R^{13A}$  (ここで  $R^{13A}$  は  $R^{13}$  と同義である) ; あるいは  
 -  $O C (=O) N R^{10} R^{11}$

であり；

$R^3$  は、水素；低級アルキル；カルバモイル；アミノ；テトラヒドロピラニル；ヒドロキシル；  $C (=O) H$ ；アラルキル；低級アルカノイル；もしくは  $C H_2 C H_2 R^{25}$  (ここで  $R^{25}$  はハロゲン、アミノ、ジ低級アルキルアミノ、ヒドロキシルもしくはヒドロキシ置換された低級アルキルアミノである) であり；  
 $X$  は、水素；ホルミル；カルボキシル；低級アルコキシカルボニル；低級アルキルヒドロジノカルボニル；-  $C N$ ；低級アルキル；-  $C (=O) N R^{26} R^{27}$  (ここで  $R^{26}$  および  $R^{27}$  は独立に水素、未置換低級アルキルもしくは未置換アリールであるか；または  $R^{26}$  および  $R^{27}$  は窒素原子と結合して複素環基を形成する)；-  $C H (R^{34}) W$  (ここで  $R^{34}$  は水素もしくは低級アルキルであり、そして  $W$  は-  $N = C H N$  (アルキル)<sub>2</sub>；グアニジノ；  $N_3$ ；  $N R^{28} R^{29}$  (ここで  $R^{28}$  もしくは  $R^{29}$  は水素もしくは低級アルキルであり、そして他方は水素、アリル、アルカノイル、アリールオキシカルボニル、未置換アルキルもしくは- アミノ酸の残基、(その中でカルボキシル基のヒドロキシ基が排除される) である)；-  $C O_2 R^9$ ；-  $C (=O) N R^{10} R^{11}$ ；-  $S (=O)_r R^{30}$  (ここで  $R^{30}$  は置換もしくは未置換の低級アルキル、アリールもしくはヘテロアリールである)；あるいは-  $O R^{31}$  (ここで  $R^{31}$  は水素、置換もしくは未置換のアルキル、または置換もしくは未置換のアルカノイルである) である)；  
 -  $C H = N - R^{32}$  (ここで  $R^{32}$  はヒドロキシル、低級アルコキシ、アミノ、グアニジノ、ウレイド、イミダゾリルアミノ、カルバモイルアミノもしくは  $N R^{26A} R^{27A}$  (ここで  $R^{26A}$  は  $R^{26}$  と同義でありかつ  $R^{27A}$  は  $R^{27}$  と同義である) である)；あるいは

-  $C H_2 Q$  (ここで  $Q$  は

【化 2】



により表わされる糖残基であり、

上式中  $V$  は水素、メチル、エチル、ベンジル、アセチルもしくはトリフルオロアセチルを表わす)

であり；

$Y$  は、水素；-  $O H$ ；-  $O C (=O) R^{33}$  (ここで  $R^{33}$  はアルキル、アリールもしくはアミノである)；-  $O C H_2 O$  - アルキル；-  $O$  - アルキル；またはアラルキルオキシであるか；または  $X$  および  $Y$  は-  $X - Y -$  として結合されて-  $C H_2 O C O_2 -$  もしくは-  $C H_2 N (R^{16B}) C O_2 -$  (ここで  $R^{16B}$  は  $R^{16}$  と同義である) を形成し；  
 $A^1$  および  $A^2$  は水素であるか、もしくは双方は結合されて  $O$  を表わすか；または

$B^1$  および  $B^2$  は水素であるか、もしくは双方は結合されて  $O$  を表わす；  
 の化合物、あるいはその製薬学的に許容できる塩であるが；ただし  $A^1$ 、 $A^2$  もしくは  $B^1$

、  $B^2$  の少なくとも一方が 0 を表わし；また、さらにただし  $X$  および  $Y$  の双方が同時に水素ではない。

## 【手続補正2】

### 【補正対象書類名】明細書

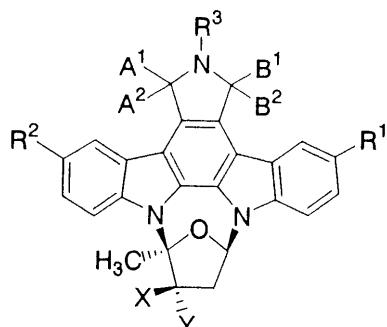
【補正対象項目名】 0 0 0 8

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【 0 0 0 8 】

【化 6】



### 【手續補正3】

### 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 9

### 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

〔 0 0 0 9 〕

上式中：

$R^1$  および  $R^2$  は独立に：

水素；低級アルキル；ハロゲン；アシル；ニトロ；スルホ；

- C H = N R <sup>4</sup> (ここで R <sup>4</sup> はグアニジノ、複素環基、もしくは - N R <sup>5</sup> R <sup>6</sup> (ここで R <sup>5</sup> もしくは R <sup>6</sup> は水素もしくは低級アルキルであり、そして他方は水素、低級アルキル、アシル、アリール、複素環基、カルバモイルもしくは低級アルキルアミノカルボニルである) である) :

$$= N B^5 B^6 .$$

-  $\text{CH}(\text{SR}^7)_2$  (ここで  $\text{R}^7$  は低級アルキルもしくは 2つの  $\text{R}^7$  が一緒になって アルケンを表す) ;

-  $C_6O_2R$  (ここで  $R$  は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリールもしくは未置換ヘテロアリールである) ;  
 $C_6(-O_2)N(R^1)_2R^2$  (ここで  $R^1$  および  $R^2$  は独立に水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリールもしくは未置換ヘテロアリールである) ;

-C(-O)NR<sub>2</sub> (ここでR<sub>2</sub> およびR<sub>3</sub> は独立に水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキル、未置換アラルキル、低級アルキルアミノカルボニルもしくは低級アルコキシカルボニルであるか、またはR<sup>10</sup> およびR<sup>11</sup> は窒素原子と結合して複素環基を形成する)；

- OR<sup>12</sup> (ここでR<sup>12</sup>は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、または-C(=O)R<sup>13</sup> (ここでR<sup>13</sup>は水素、NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキルもしくは未置換アラルキルである)である)である；

- N R<sup>10</sup> R<sup>11</sup> : あるいは

- C ( = O ) R <sup>14</sup> (ここで R <sup>14</sup> は水素、低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリールもしくは未置換ヘテロアリールである) ; または

- S ( = O ) <sub>r</sub> R <sup>15</sup> (ここで r は 0 ないし 2 であり、そして R <sup>15</sup> は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、置換アラルキル、未置換アラルキル、チアゾリニル、(C H<sub>2</sub>)<sub>a</sub> C O<sub>2</sub> R <sup>16</sup> (ここで a は 1 もしくは 2 であり、そして R <sup>16</sup> は水素もしくは低級アルキルである) 、または - (C H<sub>2</sub>)<sub>a</sub> C ( = O ) N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup> である) ;

である] ;

- O R <sup>17</sup> (ここで R <sup>17</sup> は水素、低級アルキルもしくは - C ( = O ) R <sup>18</sup> (ここで R <sup>18</sup> は置換低級アルキル、未置換低級アルキル、置換アリールもしくは未置換アリールである) である) ;

- C ( = O ) (C H<sub>2</sub>)<sub>j</sub> R <sup>19</sup> (ここで R <sup>19</sup> は水素、ハロゲン、N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup>、N<sub>3</sub>、S R <sup>15</sup> もしくは O R <sup>20</sup> (ここで R <sup>20</sup> は水素、置換低級アルキル、未置換低級アルキルもしくは C ( = O ) R <sup>14</sup> である) である) ;

- C H (O H) (C H<sub>2</sub>)<sub>j</sub> R <sup>19</sup> ;

- (C H<sub>2</sub>)<sub>d</sub> C H R <sup>21</sup> C O<sub>2</sub> R <sup>16A</sup> (ここで d は 0 - 5 であり、そして R <sup>21</sup> は水素、C O N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup> もしくは C O<sub>2</sub> R <sup>16A</sup> (ここで R <sup>16A</sup> は R <sup>16</sup> と同義である) である) ;

- (C H<sub>2</sub>)<sub>d</sub> C H R <sup>21</sup> C O N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup> ;

- C H = C H (C H<sub>2</sub>)<sub>m</sub> R <sup>22</sup> (ここで m は 0 - 4 であり、そして R <sup>22</sup> は水素、低級アルキル、C O<sub>2</sub> R <sup>9</sup>、置換アリール、未置換アリール、置換ヘテロアリール、未置換ヘテロアリール、O R <sup>12</sup> もしくは N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup> である) ;

- C H = C (C O<sub>2</sub> R <sup>16A</sup>)<sub>2</sub> ;

- C C (C H<sub>2</sub>)<sub>m</sub> R <sup>22</sup> ;

- S O<sub>2</sub> N R <sup>23</sup> R <sup>24</sup> (ここで R <sup>23</sup> および R <sup>24</sup> は独立に水素、低級アルキル、もしくは隣接する窒素原子と複素環基を形成する基である) ;

- O C O<sub>2</sub> R <sup>13A</sup> (ここで R <sup>13A</sup> は R <sup>13</sup> と同義である) ; あるいは

- O C ( = O ) N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup>

であり；

R <sup>3</sup> は、水素；低級アルキル；カルバモイル；アミノ；テトラヒドロピラニル；ヒドロキシル；C ( = O ) H；アラルキル；低級アルカノイル；もしくは C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> R <sup>25</sup> (ここで R <sup>25</sup> はハロゲン、アミノ、ジ低級アルキルアミノ、ヒドロキシルもしくはヒドロキシ置換された低級アルキルアミノである) であり；

X は、水素；ホルミル；カルボキシル；低級アルコキシカルボニル；低級アルキルヒドロジカルボニル；- C N；低級アルキル；- C ( = O ) N R <sup>26</sup> R <sup>27</sup> (ここで R <sup>26</sup> および R <sup>27</sup> は独立に水素、未置換低級アルキルもしくは未置換アリールであるか；または R <sup>26</sup> および R <sup>27</sup> は窒素原子と結合して複素環基を形成する) ; - C H (R <sup>34</sup>) W (ここで R <sup>34</sup> は水素もしくは低級アルキルであり、そして W は - N = C H N (アルキル)<sub>2</sub>；グアニジノ；N<sub>3</sub>；N R <sup>28</sup> R <sup>29</sup> (ここで R <sup>28</sup> もしくは R <sup>29</sup> は水素もしくは低級アルキルであり、そして他方は水素、アリル、アルカノイル、アリールオキシカルボニル、未置換アルキルもしくは - アミノ酸の残基 (その中でカルボキシル基のヒドロキシ基が排除される) である) ; - C O<sub>2</sub> R <sup>9</sup>；- C ( = O ) N R <sup>10</sup> R <sup>11</sup>；- S ( = O ) <sub>r</sub> R <sup>30</sup> (ここで R <sup>30</sup> は置換もしくは未置換の低級アルキル、アリールもしくはヘテロアリールである) ; あるいは - O R <sup>31</sup> (ここで R <sup>31</sup> は水素、置換もしくは未置換のアルキル、または置換もしくは未置換のアルカノイルである) である) ;

- C H = N - R <sup>32</sup> (ここで R <sup>32</sup> はヒドロキシル、低級アルコキシ、アミノ、グアニジノ、ウレイド、イミダゾリルアミノ、カルバモイルアミノもしくは N R <sup>26A</sup> R <sup>27A</sup> (ここで R <sup>26A</sup> は R <sup>26</sup> と同義でありかつ R <sup>27A</sup> は R <sup>27</sup> と同義である) である) ; あるいは

- C H<sub>2</sub> Q (ここで Q は

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明のいくつかの態様において、K-252aの3'-エピマー誘導体は製薬学的組成物に処方される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

本発明のK-252aの3'-エピマー誘導体は、チロシンキナーゼ活性の阻害、例えばPKCもしくはtrkチロシンキナーゼの阻害（この阻害は癌を包含する疾患の治療に有用でありうる）を包含する薬理学的活性を示す。本発明の化合物は栄養因子応答性細胞、例えばコリン作動性ニューロンの機能および／もしくは生存を高めるのに有用である。ニューロンに対する影響は以下、すなわち（1）培養された脊髄のコリンアセチルトランスクフェラーゼ（「ChAT」）アッセイ；および（2）培養された基底前脳ニューロン（「BFN」）のChAT活性アッセイを初めとするアッセイで立証され得る。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

栄養因子応答性細胞の栄養因子誘発活性を高めるため、本発明の化合物は、哺乳動物、例えばヒトでのニューロン系統の細胞の機能および／もしくは生存を高める治療薬として使用され得る。とりわけ、それらは、低下されたChAT活性もしくは脊髄の運動ニューロンに対する傷害を伴う障害の治療で有用である。

化学合成

本発明の化合物は後述されるとおり製造され得る（図1-7）。当該化合物は適当に保護されたK-252a誘導体を用いて出発することにより製造され得る。K-252aは例えばアセテートもしくはシリル誘導体としてラクタムのアミドの窒素を保護され得る。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>の位置に置換基をもつK-252a誘導体を製造するのに使用される既知の方法が、3'-エピ-K-252a上で対応するR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>の位置に置換基を得るのに使用され得る。例えば、米国特許第4,923,986; 5,461,146；および5,654,427号を参照。例えば、1等量のN-プロモスクシンイミド（NBS）でのXIVの処理（図7）はR<sup>1</sup>がBrである誘導体XXVを生じる。2等量のNBSはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>双方がBrである誘導体を与えるとみられる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0035】

本発明はK-252aの3'-エピマー誘導体の製薬学的に許容できる塩を包含する。製薬学的に許容できる塩は、製薬学的に許容できる酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、およびアミノ酸付加塩を包含する。酸付加塩は、塩酸塩、硫酸塩およびリン酸塩のような無機酸付加塩、ならびに酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩および乳酸塩のような有機酸付加塩を包含する。金属塩の例は、リチウム塩、ナトリウム塩およびカリウム塩のようなアルカリ金属塩、マグネシウム塩およびカルシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩ならびに亜鉛塩である。アンモニウム塩の例はアンモニウム塩およびテトラメチルチルアンモニウム塩である。有機アミン付加塩の例はモルホリンおよびピペリジンとの塩である。アミノ酸付加塩の例は、グリシン、フェニルアラニン、グルタミン酸およびリシンとの塩である。

## 【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0039】

## 実験実施例

## チロシンキナーゼ活性の阻害

K-252aのエピマー誘導体を、アンジェレ(Angelies)らにより記述された(Anal. Biochem. 236: 49-55, 1996)とおり、ELISAを基礎としたアッセイを使用して、バキュロウイルスで発現されたヒトtrkAの細胞質ドメインのキナーゼ活性の阻害について試験した。96穴マイクロタイタープレートを基質溶液(組換えヒトホスホリパーゼC-1/グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質；ロティン(Rotin)ら、EMBO J., 11: 559-567, 1992)で被覆した。阻害を、50mM Hepes, pH 7.4, 40μM ATP, 10mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, 2% DMSOおよび多様な濃度の阻害剤を含有する100μlのアッセイ混合物中で測定した。反応を、trkAキナーゼの添加により開始し、そして37℃で15分間進行させた。ホスホチロシンに対する抗体(UBI)、次いで二次酵素結合抗体、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG(バイオラッド(Bio-Rad))をその後添加した。

## 【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0049】

## プロテインキナーゼC活性の阻害

プロテインキナーゼC活性を、ミリポアマルチスクリーン(Millipore Multiscreen)TCAインプレート(in-plate)アッセイ(ピット(Pit))ら、J. Biomol. Screening, 1: 47-51, 1996を使用して測定した。アッセイを、96穴マルチスクリーン(Multiscreen)-DPプレート(ミリポア(Millipore))中で実施した。各40μlのアッセイ混合物は、20mM Hepes, pH 7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM EGTA, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 80mg/mlホスファチジルセリン、3.2mg/mlジオレン、200mg/mlヒストンH-1(フルカ(Fukac))、5mM [-<sup>32</sup>P]ATP、1.5ngプロテインキナーゼC(UBI; a, b, gのアイソザイムの混合物)、0.1% BSA、2% DMSOおよびK-252aの3'-エピマー誘導体を含有した。反応を37℃で10分間進行させた。反応を冰冷50%トリクロロ酢酸(TCA)でクエンチした。プレートを4℃で30分間平衡化し、その後冰冷25%TCAで洗浄した。

シンチレーションカクテルをプレートに添加し、そして放射活性をワラックマイクロベータ 1450 プラス (Wallac MicroBeta 1450 PLUS) シンチレーション計数器を使用して測定した。IC<sub>50</sub> 値を、データをグラフパッド プリズム (Graph Pad Prism) 中の S 字形の用量応答 (変動する傾き) 等式に適合させることにより算出した。結果を表 4 に要約する。

## 【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0052】

K-252a の 3'-エピマー誘導体は、解離されたラット胚脊髄培養物アッセイで ChAT 活性を増大させた (表 5)。化合物 XVII は、細胞が対照の組織培養ウェルに付着するための 2 ~ 3 時間のプレート培養期間の後に、ChAT 活性を、対照培養物 (K-252a の 3'-エピマー誘導体で処理されない) に対して 195% まで増大させた。これらのアッセイでは、化合物を解離された脊髄培養物に直接添加した。ChAT 活性を対照活性の少なくとも 120% まで増大させた化合物を活性があるとみなした。増大された ChAT 活性が、選択された K-252a の 3'-エピマー誘導体の単回の適用後に観察された。結果を表 5 に要約する。

## 【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0056】

ニューロンの生存を、蛍光定量的生存率アッセイ (ボジツコ・コイネ (Bozyczko-Coyne) ら、J. Neurosci. Meth. 50: 205 - 216, 1993) でカルセイン AM (モレキュラー プローブス (Molecular Probes)、オレゴン州ユージーン) により 4 日後に評価した。培養培地を、ダルベッコのリン酸緩衝生理的食塩水 (DPBS) で連続的に希釈した。6 μM の最終濃度のカルセイン AM ストックを各ウェルに添加した。プレートを 37 °C で 30 分間インキュベーションし、次いで DPBS で連続的に希釈洗浄した。蛍光シグナルを、プレート読み取り蛍光定量器 (サイトフルオル (Cytofluor) 2350) (励起 = 485 nm; 発光 = 538 nm) を使用して読み取った。各プレートについて、カルセイン AM を受領するがしかし細胞を含有しないウェルから生じた平均の背景を全部の値から差し引いた。蛍光シグナルの直線性を、細胞密度の範囲での濃度およびインキュベーション時間について確かめた。ニューロンの顕微鏡での計数は相対的蛍光値と直接相關した。

## 化合物 V の製造

化合物 IVb (米国特許第 4,923,986 号) をトリメチルホスファイト (2 mL) に溶解し、そして 3 時間還流下に加熱した。反応混合物を室温に冷却し、そして、クロロホルム - メタノール (20:1) を使用してフラッシュシリカゲルカラムを通して洗い流してトリメチルホスファイトを除去した。生成物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル; 酢酸エチル:ヘキサン; 1:1) により精製して化合物 V を淡黄色固体物 (1.5 mg、95% 収率) として得た。MS (ESI<sup>+</sup>): m/e 406 (M + H)<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): 2.62 (s, 3 H)、2.85 (d, 1 H)、3.37 - 3.45 (m, 1 H)、4.95 (s, 1 H)、5.00 (s, 2 H)、5.09 (s, 1 H)、6.29 (s, 1 H)、6.90 (d, 1 H)、7.33 - 7.53 (m, 5 H)、7.91 (d, 1 H)、9.41 (d, 1 H)。

## 化合物 VI の製造

窒素下、0 °C の化合物 V (1.61 mg, 0.397 mmol) の攪拌された THF (8

m L) 溶液に、BH<sub>3</sub> THF (1.59 mL の 1 M 溶液、1.59 mmol) を添加した。反応混合物を 0 ℃ で 30 分間攪拌し、そしてその後一夜室温に温めた。混合物を 0 ℃ に再冷却し、そして 10% NaOH (0.1 mL) を気体の活発な発生を伴い添加した。過酸化水素 (80 mL) をその後一滴ずつ添加した。0 ℃ で 30 分間攪拌した後に、反応を酢酸エチル (15 mL) で希釈し、そして水 (3 × 10 mL) で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして淡緑色固体まで真空中で濃縮した。生成物をクロマトグラフィー (シリカゲル：ヘキサン：酢酸エチル；1:1) により精製して化合物 V I を白色固体 (0.12 g、71% 収率) として得た。MS (ESI<sup>+</sup>) : m/e 424 (M + H)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 2.54 (s, 3 H)、2.51 (m, 1 H)、2.99 - 3.01 (m, 2 H)、3.47 (m, 1 H)、3.8 (m, 1 H)、5.049 (s, 2 H)、6.21 (broad s, 1 H)、6.98 (m, 1 H)、7.13 - 7.49 (m, 6 H)、7.94 - 8.02 (m, 2 H)、9.34 (d, 1 H)。

#### 化合物 V I I の製造

室温で窒素下の化合物 V a (TBDMS - V) (350 mg、0.673 mmol) の攪拌された THF (10 mL) 溶液に、ピリジン (0.435 mL、5.39 mmol)、次いで四酸化オスミウム (6.73 mL、0.673 mmol、CCl<sub>4</sub> 中 0.1 M) を添加した。反応混合物を室温で 36 時間攪拌した。この時間の間に混合物は色を黄色から橙褐色まで変化させた。水性重亜硫酸ナトリウム (30 mL) を反応混合物に添加し、そして反応を 30 分間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (2 × 20 mL) で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして真空中で濃縮して淡褐色薄膜を得た。混合物を、酢酸エチルを使用するシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、化合物 V I I a (TBDMS - V I I) を黄色固体 (280 mg、76% 収率) として得た。MS (ESI<sup>+</sup>) : m/e 544 (M + H)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 0.56 (d, 6 H)、1.079 (s, 9 H)、2.04 (dd, 1 H)、2.12 (broad s, 1 H)、2.40 (s, 3 H)、2.86 (dd, 1 H)、3.52 (broad s, 3 H)、4.99 (s, 2 H)、6.98 (dd, 1 H)、7.32 (t, 1 H)、7.39 - 7.46 (m, 4 H)、7.97 (dd, 2 H)、9.35 (d, 1 H)。

#### 【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正の内容】

#### 【0062】

化合物 X X I I I は上述されたアッセイで以下の IC<sub>50</sub> 値を示した。すなわち、trk A キナーゼの阻害、4 nM; VEGF レセプター キナーゼの阻害、25 nM、およびプロテインキナーゼ C の阻害、> 1000 nM。

#### 化合物 X X V の製造

室温で窒素下の、化合物 X I V (30.4 mg、0.065 mmol) の攪拌された THF (5 mL) 溶液に、N-プロモスクシンイミド (11.6 mg、0.065 mmol) を一度に添加した。反応混合物は当初色が淡橙色であり、そして徐々に淡紫色になった。反応混合物を室温で一夜攪拌した。溶媒を真空中で除去し、そして、固体を、ヘキサン - 酢酸エチル (2:1) を使用するシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。化合物 X X V を灰白色固体 (31.2 mg、88% 収率) として得た。MS (ESI) : m/e 547 (M + H)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) : 2.42 (s, 3 H)、2.77 - 2.83 (m, 1 H)、2.86 (3 H, s)、3.166 (dd, 1 H)、4.105 (s, 1 H)、5.07 (s, 2 H)、6.39 (s, 1 H)、7.01 (dd, 1 H)、7.95 (d, 1 H)、7.58 (d, 1 H)、7.34 - 7.57 (m, 4 H)、9.50 (s, 1 H)。

化合物 X X I X の製造