

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4780549号
(P4780549)

(45) 発行日 平成23年9月28日 (2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日 (2011.7.15)

| | |
|---------------------------|----------------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| C O 7 D 487/04 (2006.01) | C O 7 D 487/04 1 4 O |
| A 6 1 K 31/4985 (2006.01) | C O 7 D 487/04 C S P |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 K 31/4985 |
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/16 |

請求項の数 60 (全 39 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-528508 (P2004-528508) | (73) 特許権者 | 500049369 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年8月8日 (2003.8.8) | | サーントウル ナシオナル ドゥ ラ ル シェルシュ シャーンティフィク フランス国 16 セデクス パリー リ ユ ミケラーンジュ 3 |
| (65) 公表番号 | 特表2006-502137 (P2006-502137A) | (74) 代理人 | 100083149 |
| (43) 公表日 | 平成18年1月19日 (2006.1.19) | | 弁理士 日比 紀彦 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2003/009515 | (74) 代理人 | 100060874 |
| (87) 国際公開番号 | W02004/016614 | | 弁理士 岸本 瑛之助 |
| (87) 国際公開日 | 平成16年2月26日 (2004.2.26) | (74) 代理人 | 100079038 |
| 審査請求日 | 平成18年6月14日 (2006.6.14) | | 弁理士 渡邊 彰 |
| (31) 優先権主張番号 | 02292019.3 | (72) 発明者 | メイエル ローラン フランス国 ロスコフ リュ ドゥ ピラ ケム 16 |
| (32) 優先日 | 平成14年8月9日 (2002.8.9) | | |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | |
| 前置審査 | | | |

最終頁に続く

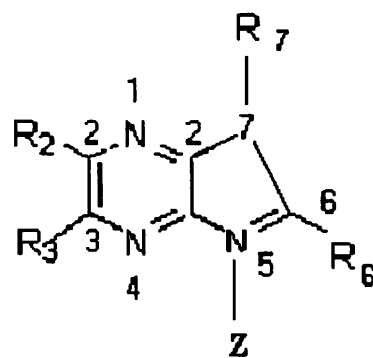
(54) 【発明の名称】 キナーゼ阻害活性を有するピロピラジン誘導体およびその生物学的用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体を含む、神経変性疾患を治療または予防するための医薬組成物であって、該誘導体は、一般式 (I) :

【化 1】



(I)

(式中、

- R 2 および R 3 は、同一または異なって、HまたはC 1 - C 6 アルキルを示し、前記アルキルは、直鎖または分枝鎖アルキルであり、置換されてもよく、

- R6は、置換されてもよい芳香環Arまたはシクロアルキルであり、前記シクロアルキルは、置換されてもよいアリール基によって置換されてもよく、
 - R7は、H、C1-C6アルキル、(alk.)_n-hal.、CH₂-CH=CH₂、CH₂-シクロアルキルまたはCH₂-Arであり、ここで、「alk.」はC1-C6アルキレン基であり、nは1~6であり、
 - ZはHまたはCH₃である)
- により示される、医薬組成物。

【請求項2】

Arはフェニル、ナフチル、フリル、チエニル、ピリジル、シクロプロピルフェニルまたはフェニルジオキシリルである、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項3】

シクロアルキル基はC3-C6シクロアルキルである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

置換基は、1種以上のハロゲン(F、Cl、Br、I、CF₃)、OH、NH₂、N(H, アルキル)、N(アルキル)₂、O-アルキル、COOH、COO-アルキル、CONH₂、CON(H, アルキル)、CON(アルキル)₂、NHCONH₂、NHCON(H, アルキル)、NHCON(アルキル)₂、N(アルキル)CONH₂、N(アルキル)CON(H, アルキル)、N(アルキル)CON(アルキル)₂、アルコキシ、CN、O-SO₂-NH₂、O-SO₂-N(H, アルキル)、-O-SO₂-N(アルキル)₂、SHおよびS-アルキルからなる群から選択される、請求項1~3のいずれか1つ

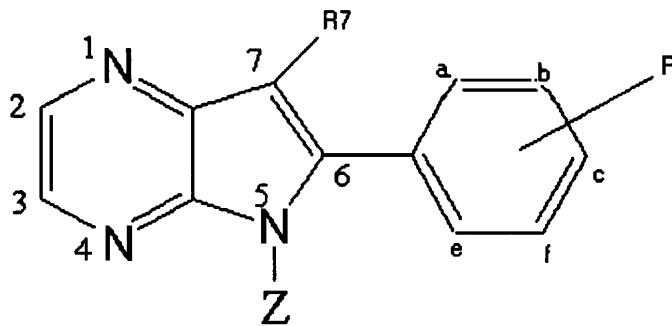
20

に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記誘導体は、CDK1/サイクリンBおよび/またはCDK5/p25および/またはGSK-3に対してIC₅₀ 10μMを有し、化学式(II)：

【化2】



30

(II)

(式中、

- 6位のフェニル基は、
 - H、-OH、アルキル、-Oアルキル、hal.、-NH₂、-N(H, アルキル)、-N(アルキル)₂、-O-SO₂-NH₂、-SO₂-N(H, アルキル)、-O-SO₂-N(アルキル)₂、-COOH、-COO-アルキル、CONH₂、-CON(H, アルキル)および-CON(アルキル)₂
- からなる群から選択される1、2または3つの置換基Rによって置換され、

40

- R7は、H、アルキル、(alk.)_nhal.、-CH₂-CH=CH₂、(alk.)_n-シクロアルキルまたはalk.-Arであり、
 - ZはHまたはCH₃である)
- により示される、請求項1~4のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【請求項6】

式(II)の誘導体において、

R = H、OH、アルコキシ、hal. またはアルキルであり、かつ、R7 = Hであるか

50

、または、

R = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキル、(alk.)_n-hal. または CH₂-CH = CH₂ であるか、または、

R = O-SO₂-N(アルキル)₂、hal. または OH であり、R7 = アルキルであり、n = 1 ~ 3 であり、かつ、Z = H である、

請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 5 μM を有する、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

式 (II) の誘導体において、R = H、p-アルコキシ、p-および m-アルコキシ、p-OH、p-hal.、p-アルキルまたは p-O-SO₂-N(アルキル)₂ であり、かつ、R7 はアルキル、(alk.)_n-hal.、CH₂-CH = CH₂ または H であり、Z は H であり、かつ、n = 1 ~ 3 である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

- フェニル基は、無置換であり、かつ、R7 は H であるか、または、

- Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、OH または hal. であり、かつ、R7 = H であるか、または、

- Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、

- Ra および Rd = H であり、かつ、Rb および Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、

- Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、

- Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、OH または hal. であり、かつ、R7 = アルキル、(alk.)_n-hal. または CH₂-CH = CH₂ であるか、または、

- Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = OH であり、かつ、R7 = アルキルである (a-e はフェニル基上の R の位置に対応する)、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 1 μM を有する、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

式 (II) の誘導体において、R が p-アルコキシ、p-O-SO₂-N-(アルキル)₂ または p-OH であり、かつ、R7 がアルキルである、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、O-SO₂-N(アルキル)₂ または OH であり、かつ、R7 = アルキルである化合物を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 0.5 μM を有し、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシまたは OH であり、かつ、R7 = アルキルである、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B および CDK5 / p25 または GSK-3 に対して、または、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 10 μM を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記誘導体は、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 10 μM を有す

10

20

30

40

50

る、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

R = H、OH、アルコキシ、hal、アルキルまたは O-SO₂-N(アルキル)₂ であり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-hal または CH₂-CH=CH₂ である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記誘導体は、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 5 μM を有し、R は H、p-アルコキシ、OH、hal または O-SO₂-N-(アルキル)₂ であり、かつ、R7 は H、アルキル、(alk)_nhal または CH₂-CH=CH₂ である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 18】

前記誘導体において、Ra、Rb、Rc、Rd および R7 = H であるか、または、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、hal、(alk)_n-hal または OH であり、かつ、R7 = H であるか、または、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、OSO₂-N(アルキル)₂、hal または OH であり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、Ra および Rd = H であり、かつ、Rb および Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルである、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記誘導体は、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 1 μM を有し、R = p-アルコキシ、p- および m-ジアルコキシ、hal、p-O-SO₂-N(アルキル)₂ または p-OH であり、かつ、R7 = H または アルキルである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 20】

前記誘導体において、Ra、Rb、Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、Ra および Rd = H であり、かつ、Rb および Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = O-SO₂-N(アルキル)₂ または OH であり、かつ、R7 = アルキルである、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記誘導体は、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 0.5 μM を有し、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシまたは OH であり、かつ、R7 = アルキルである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 22】

前記誘導体は、CDK1 および GSK3 に対して IC₅₀ 10 μM を有し、R = H、OH、アルコキシ、hal、アルキル、CN または O-SO₂-N(アルキル)₂ であり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、alk-シクロアルキルまたは alk-アリアルである、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記誘導体は、CDK1 および GSK-3 に対して IC₅₀ 5 μM を有し、R = H、p-アルコキシ、p- および m-アルコキシ、p-OH、p-hal、p-O-SO₂-N(アルキル)₂ または p-CN であり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、(alk)_n-シクロアルキルまたは (alk)_n-アリアルである、請求項 22 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 24】

前記誘導体は、Ra、Rb および Rd = H、Rc = アルコキシ、OH、hal、アルキル、CN、および R7 = H、または、Ra、Rb、Rd = H、Rc = アルコキシおよび R7 = アルキル、(alk)_n-hal または CH₂-CH=CH₂、または、Ra および Rd = H、Rb および Rc = アルコキシ、および R7 = アルキル、または、Ra、

50

R b および R c = H、R d = O - S O ₂ - N - (アルキル)₂、および R 7 = アルキル、または、R a、R b および R d = H、R c = h a l . および、R 7 = (a l k .)_n - アリールを有する、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記誘導体は、C D K 1 および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 値 1 μ M を有し、R = p - アルコキシ、p - O - S O ₂ - N (アルキル)₂、p - h a l .、H または p - O H であり、かつ、R 7 = アルキル、(a l k .)_n - h a l .、C H ₂ - C H = C H ₂、(a l k .)_n - シクロアルキルまたは (a l k .)_n - アリールである、請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = アルコキシ、O H、O - S O ₂ - N (アルキル)₂ または h a l . であり、かつ、R 7 = アルキル、C H ₂ - C H = C H ₂ または C H ₂ - シクロアルキルである、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記誘導体は、C D K 1 / サイクリン B および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 値 0 . 5 μ M を有し、R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = アルコキシまたは O H であり、かつ、R 7 = アルキルである、請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記誘導体は、C D K 1 / サイクリン B および C D K 5 / p 2 5 に対して I C ₅₀ 1 0 μ M を有し、R = H、O H、アルコキシ、h a l .、アルキルまたは O - S O ₂ - N (アルキル)₂ であり、かつ、R 7 = H、アルキル、(a l k .)_n - h a l . または C H ₂ - C H = C H ₂ である、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

C D K 1 / サイクリン B および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 5 μ M を有し、R は H、o - アルコキシ、p - アルコキシ、m - および p - アルコキシ、p - O H、p - h a l .、p - O - S O ₂ - N (アルキル)₂ であり、かつ、R 7 は H、アルキル、(a l k .)_n - h a l . または C H ₂ - C H = C H ₂ である、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

R a、R b、R c、R d および R 7 = H であるか、または、R a = O H であり、かつ、R b、R c、R d および R 7 = H であるか、または、R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = アルコキシ、O H または h a l . であり、かつ、R 7 = H、(a l k .)_n - h a l .、C H ₂ - C H = C H ₂ または アルキルであるか、または、R a および R d = H であり、かつ、R b および R c = アルコキシであり、かつ、R 7 = H であるか、または、R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = O - S O ₂ - N - (アルキル)₂ または h a l . であり、かつ、R 7 = アルキルである、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

前記誘導体は、C D K 1 / サイクリン B および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 1 μ M を有し、R = p - アルコキシ、p - O - S O ₂ - N (アルキル)₂、p - h a l . または p - O H であり、かつ、R 7 = アルキルである、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = アルコキシ、O H または O - S O ₂ - N (アルキル)₂ であり、かつ、R 7 = アルキルである、請求項 3 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記誘導体は、C D K 1 / サイクリン B および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 0 . 5 μ M を有し、R a、R b および R d = H であり、かつ、R c = アルコキシまたは O H であり、かつ、R 7 = アルキルである、請求項 2 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記誘導体は、C D K 1 / サイクリン B、C D K 5 および G S K - 3 に対して I C ₅₀ 1 0 μ M を有し、式 (I I I) :

10

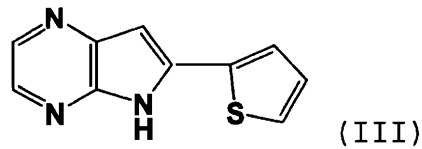
20

30

40

50

【化3】



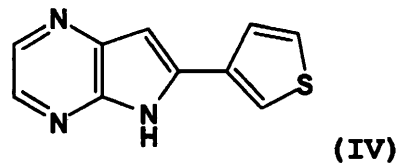
により示され、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して 5 μM でさえある、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項35】

10

前記誘導体は、式 (IV) :

【化4】



により示され、CDK1 / サイクリン B、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 5 μM であり、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 1 μM である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

20

【請求項36】

R2 および R3 および / または Z および / または R7 は H ではない、請求項 1 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項37】

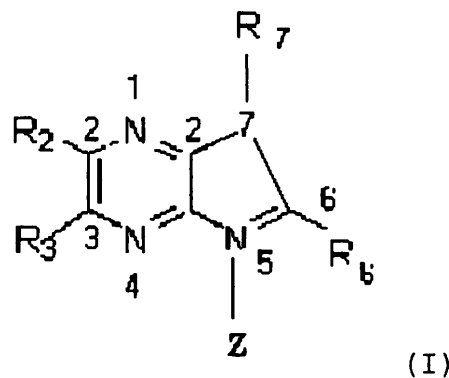
アルツハイマー病またはパーキンソン病を治療または予防するための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【請求項38】

ピロロ[2,3b]-ピラジン誘導体であって、CDK1 / サイクリン B および / または CDK5 / p25 および / または GSK-3 に対して IC₅₀ 1 μM を有し、式 (I) :

30

【化5】



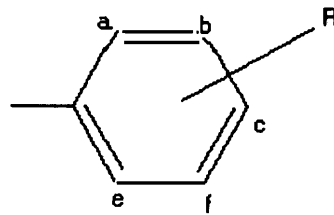
40

(式中、

R6 は、置換フェニル基または置換されてもよいナフチル、フリル、チエニル、ピリジル、シクロプロピル、フェニルジオキソリルであり、

ここで、式 (II) :

【化6】



(II)

10

の6位フェニル基は、

- H、アルキル、- O - アルキル、- NH₂、- N (H, アルキル)、N (アルキル)₂、- O - SO₂ - NH₂、- O - SO₂ - N (H, アルキル)、- O - SO₂ - N (アルキル)₂、- COOH、- COO - アルキル、CONH₂、- CON (H, アルキル)、- CON (アルキル)₂

からなる群において選択される1、2または3つの置換基Rによって置換され、

- R₇は、H、アルキル、(alk.)_nhal., - CH₂ - CH = CH₂、(alk.)_n - シクロアルキル、alk. - Arであり、
- ZはHまたはCH₃である)

20

により示され、ただし、

- R₆がフェニル基である場合、R₂、R₃、R₇およびZはHではなく、
- R₃、R₇およびZがHであり、R₆がフェニル基である場合、R₂はメチルではなく

- R₃およびZがHであり、R₇がメチルであり、R₆がフェニル基である場合、R₂はHではなく、

- R₆がフリル基である場合、R₂、R₃、R₇およびZはHではなく、および

- R₆が、アルキル、- O - アルキル、- N (H, アルキル)、- N (アルキル)₂および - NH₂ からなる群において選択される1、2または3つの置換基Rによって置換されたフェニル基である場合、R₂、R₃、R₇およびZはHではない、

30

ピロロ[2, 3b] - ピラジン誘導体。

【請求項39】

CDK1 / サイクリンB、CFK5 / p25 および GSK - 3 に対して IC₅₀ 1 μM を有する、請求項38に記載のピロロ[2, 3b] - ピラジン誘導体。

【請求項40】

式(II)の誘導体に対応し、Rは、p - アルコキシ、p - O - SO₂ - N - (アルキル)₂、p - OH であり、R₇はアルキルである、請求項39に記載のピロロ[2, 3b] - ピラジン誘導体。

【請求項41】

40

R_a、R_b および R_d = H、R_c = アルコキシ、O - SO₂ - N (アルキル)₂ または OH であり、かつ、R₇ = アルキルである化合物に対応する、請求項40に記載のピロロ[2, 3b] - ピラジン誘導体。

【請求項42】

CDK1 / サイクリンB、CDK5 / p25 および GSK - 3 に対して IC₅₀ 0.5 μM を有し、R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシまたは OH であり、かつ、R₇ = アルキルである、請求項38に記載のピロロ[2, 3b] - ピラジン誘導体。

【請求項43】

CDK5 / p25 および GSK - 3 に対して IC₅₀ 値 1 μM を有し、R = p - アル

50

コキシ、p - および m - ジアルコキシ、hal .、p - O - SO₂ - N (アルキル)₂、p - OH であり、かつ、R₇ = H またはアルキルである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 44】

R_a、R_b、R_d = H、R_c = アルコキシおよび R₇ = アルキル、または R_a および R_d = H、R_b および R_c = アルコキシおよび R₇ = アルキル、または、R_a、R_b および R_d = H、R_c = O - SO₂ - N (アルキル)₂ または OH および R₇ = アルキルである、請求項 43 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 45】

CDK5 / p25 および GSK - 3 に対して IC₅₀ 0.5 μM を有し、R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシまたは OH であり、かつ R₇ = アルキルである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

10

【請求項 46】

CDK1 および GSK - 3 に対して IC₅₀ 値 1 μM を有し、R = p - アルコキシ、p - O - SO₂ - N (アルキル)₂、p - hal .、H、p - OH であり、R₇ = アルキルまたは (alk.)_n - hal、CH₂ - CH = CH₂、(alk.)_n - シクロアルキル、(alk.)_n - アリールである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 47】

R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシ、OH、O - SO₂ - N (アルキル)₂、hal . であり、R₇ = アルキル、CH₂ - CH = CH₂、CH₂ - シクロアルキルである、請求項 46 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

20

【請求項 48】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B および GSK - 3 に対して IC₅₀ 値 0.5 μM を有し、R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシまたは OH であり、かつ、R₇ = アルキルである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 49】

前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B および GSK - 3 に対して IC₅₀ 1 μM を有し、R = p - アルコキシ、p - O - SO₂ - N (アルキル)₂、p - hal .、p - OH であり、かつ、R₇ = アルキルである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

30

【請求項 50】

R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシ、OH または O - SO₂ - N (アルキル)₂ であり、かつ、R₇ = アルキルである、請求項 49 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 51】

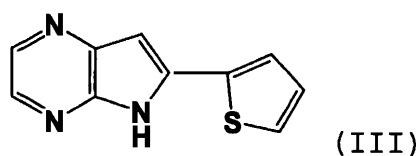
前記誘導体は、CDK1 / サイクリン B および GSK - 3 に対して IC₅₀ 0.5 μM を有し、R_a、R_b および R_d = H であり、R_c = アルコキシまたは OH であり、かつ、R₇ = アルキルである、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 52】

40

式 (III) :

【化 7】



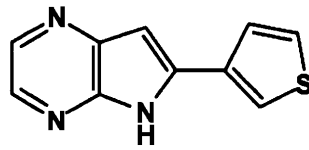
の、請求項 38 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

50

【請求項 5 3】

式 (IV) :

【化 8】



(IV)

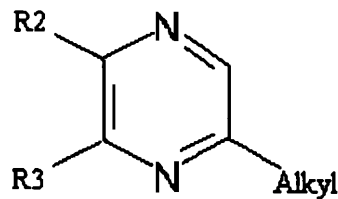
10

の、請求項 3 8 に記載のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体。

【請求項 5 4】

化学式 (V) :

【化 9】



(V)

20

(式中、

R 2 および R 3 は、同一または異なって、H または C 1 - C 6 アルキルを示し、前記アルキルは、直鎖または分枝鎖アルキルであり、置換されてもよく、Alkyl は、芳香族ニトリル類である R 6 C N を有する C 1 - C 6 アルキルであり、ここで、R 6 は請求項 3 8 のように定義される)

のアルキルピラジン類を反応させる工程を包含する、請求項 3 8 ~ 5 3 のいずれか 1 つに記載された化学式 I のピロロ [2 , 3 b] - ピラジン誘導体を合成する方法。

30

【請求項 5 5】

有効成分として請求項 3 8 ~ 5 3 のいずれかの少なくとも一つの誘導体の有効量を、医薬的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項 5 6】

神経変性疾患を治療または予防するための請求項 5 5 の医薬組成物。

【請求項 5 7】

抗増殖疾患を治療または予防するための請求項 5 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

経口により、局所に、または、注射 (静脈内、皮下、腹腔、または直腸) によって投与される、請求項 5 6 または 5 7 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 5 9】

投与量単位当たり 1 0 0 ~ 1 0 0 0 m g の有効成分を含む経口ルートによる投与のための請求項 5 8 の医薬組成物。

【請求項 6 0】

注射可能な形式の下、投与量単位当たり 1 0 0 ~ 1 0 0 0 m g の有効成分を含む、請求項 5 8 の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

本発明は、キナーゼ阻害活性を有するピロロピラジン誘導体およびその生物学的用途に関する。プロテインキナーゼは、ATPまたはGTPをリン酸基供与体として用いて、タンパク質のセリン、スレオニンおよびチロシン残基のリン酸化を触媒する。タンパク質リン酸化は、細胞の代謝および調整経路を最終的に調節するためにその細胞によって用いられる主要な翻訳後機構 (post-translational mechanism) の一つとして考えられる。

【背景技術】

【0002】

プロテインキナーゼ (ヒトゲノムにおいて推定800)、およびそれらの等価体であるプロテインホスファターゼは、大抵のヒトの病気に影響するようである。これが、強くかつ選択的なプロテインキナーゼ阻害剤に対するスクリーニングが最近数年にわたって強化された理由である。

10

【0003】

本発明者らは、2つのキナーゼファミリー (サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinases: CDK) およびグリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ-3 (glycogen synthase kinase-3: GSK-3)) に関するそれら阻害剤の作用力に焦点を合わせた。

【0004】

CDKは、細胞周期、アポトーシス、神経機能および神経変性 (neurodegeneration)、転写およびエキソサイトーシスを制御することに必要とされる。

【0005】

GSK-3は、WNTシグナリング経路の必須要素であり、サイクリンD1およびカテニンのレベルを制御することによる細胞周期調節、発生時の背腹軸形成 (dorso-ventral patterning)、グリコーゲン合成に関するインシュリン作用、軸索の成長、HIV-1 Tat媒介神経毒性、およびタウのリン酸化 (アルツハイマー病の特徴) を含む複数の生理学的プロセスに必要とされる。CDK/GSK-3阻害剤の適用は、癌、神経変性疾患 (アルツハイマー病等)、糖尿病、原生類寄生虫の増殖およびウイルス感染 (HIV、サイトメガロウイルスおよびヘルペスウイルス) に対して評価されている (1 (非特許文献1))。

20

【0006】

CDK阻害剤は、プリン類であるオロモーション (olomoucine)、ロスコビスチン (roscovitine)、パーバラノール (purvalanol)、CVT-313、C2アルキル化プリン類であるH717およびNU2058、ピペリジン置換プリン類であるトヨカマイシン (toyocamycin)、フラボピリドール (flavopiridol)、インジルピン類 (indirubins)、パウロン類 (paullones)、-ブチロラクトン、ヒメニアルディシン (hymenialdisine)、インデノピラゾール類 (indenopyrazoles)、ピリミジン類であるNU6027およびCGP60474、ピリドピリミジン、アミノピリミジンであるPNU112455A、オキシンドール類 (oxindoles)、PD0183812、シナムアルデヒド類、キナゾリン類、ファスクラプリシン (fasclaplysin)、SU9516およびベンゾカルバゾール類を含む (参照1 (非特許文献1)、参照2~8 (非特許文献2~8) に概観される)。GSK-3阻害剤は、インジルピン類 (indirubins)、パウロン類 (paullones)、マレイミド類 (maleimides) およびリチウムを含む。

30

40

【非特許文献1】「Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, anti-neurodegenerative, anti-viral and anti-parasitic agent」 Drug Resistance Update 2000,3,83-88 Meijer,L.

【非特許文献2】「Cyclin-dependent kinase inhibitors for treating cancer.」 Med.Res.Rev.2001,21,487~498 Toogood,P.L.

【非特許文献3】「ATP-site directed inhibitors of cyckin-dependent kinases.」 Curr.Med.Chem.1999,6,859~876 Gray,N;Detivaud,L;Doerig,C.;Meijer,L.

【非特許文献4】「Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics.」 Curr.Med.Chem.2000,7,1213~1245. Fischer,P.M.;Lane,D.P.

【非特許文献5】「Cyclin-dependent kinase inhibitors: novel anticancer agents.」 E

50

Expert Opin. Investig. Drugs 2000, 9, 1849-1870. Pestell, R.; Mani, S.; Wange, C.; Wu, K.; Francis, R.

【非特許文献6】「Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors.」Exp. Opin. Ther. Patents 2000, 10, 1-16. Rosiana, G.R.; Chang, Y.T.

【非特許文献7】「Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation.」J. Med. Chem. 2000, 43, 1-18. Sielecki, T.M.; Boylan, J.F.; Benfield, P.A.; Trainor, G.L.

【非特許文献8】「Cyclin-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical dependent.」Cancer J. 2000, 6, 192-212. Kaubisch, A.; Schwartz G.K.

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、今、CDK1/2/5およびGSK-3/に選択的であり、酵素学的研究および結晶構造研究により示されるように、ATPと競争してキナーゼの活性部位に結合することによって100万分の1モル未満の範囲(sub-micromolar)で作用する新しいキナーゼファミリー阻害剤を確認した。

【0008】

前記ファミリーは、CDK(複数)および/またはGSK-3/脱調節を伴う病的状況において治療価値を有する。

20

【0009】

本発明は、このため、新規なピロロピラジン誘導体に関する。

【0010】

本発明はまた、前記誘導体を合成する方法に関する。

【0011】

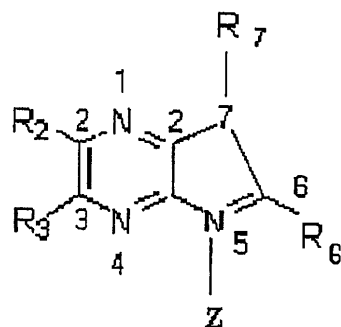
さらに別の局面によると、本発明は、前記誘導体の薬物有効成分としての使用に関する。

【0012】

本発明のピロロ[2,3b]-ピラジン誘導体は、一般式(I)を有する。

【化1】

30



(I)

40

【0013】

ここで、

- R2およびR3は、同一または異なって、H、C1-C6アルキルを示し、該アルキルは、直鎖または分枝鎖アルキルであり、置換されていてもよく、

- R6は、置換されていてもよい芳香環Arまたはシクロアルキルであり、該シクロアルキルは、アリール基によって置換されていてもよく、このアリール基もまた置換されていてもよく、

- R7は、H、C1-C6アルキル、(alk.)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、CH₂-シクロアルキル、CH₂-Arであり、

- Zは、HまたはCH₃である。

50

【0014】

好ましくは、R₂およびR₃、および/またはZおよび/またはR₇は、Hではない。

【0015】

Arは、好ましくは、フェニル、ナフチル、フリル、チエニル、ピリジル、シクロプロピルフェニル、フェニルジオキソリルである。

【0016】

「シクロアルキル」は、C₃-C₆シクロアルキルである。

【0017】

アルキル基、芳香環またはシクロアルキルの置換基は、ハロゲン(F、Cl、Br、I、CF₃)、OH、NH₂、N(H, アルキル)、N(アルキル)₂、O-アルキル、COOH、COO-アルキル、CONH₂、CON(H, アルキル)、CON(アルキル)₂、NHCONH₂、NHCON(H, アルキル)、NHCON(アルキル)₂、N(アルキル)CONH₂、N(アルキル)CON(H, アルキル)、N(アルキル)CON(アルキル)₂、アルコキシ、CN、O-SO₂-NH₂、O-SO₂-N(H, アルキル)、-O-SO₂-N(アルキル)₂、SH、S-アルキルの1以上からなる群において選択される。1以上の置換基が存在していてもよい。

10

【0018】

「アルキル」は、C₁-C₆アルキルであり、異性体を含む。

【0019】

「アルコキシ」は、C₁-C₆アルキル基を有する。

20

【0020】

「Alk_n」は、C₁-C₆アルキレン基であり、nは、1~6であり、「hal」は、F、Cl、Br、IまたはCF₃である。

【0021】

前記ピロロ[2,3-b]ピラジン類(以後、アロイシン類(aloisines)とも称する)は、強力なキナーゼ阻害性骨格であり、CDK(複数)およびGSK-3 / に対して選択的であり、100万分の1モル未満の範囲でそれらのほとんどに対して作用する。

【0022】

反応速度論研究、およびCDK/アロイシン類の共結晶構造の解明は、アロイシン類が触媒サブユニットへのATP結合の競争阻害によって作用することを立証する。それらは、骨格のLeu83の窒素および酸素原子の2つとの水素結合を通じてATP-結合ポケットと相互作用する。

30

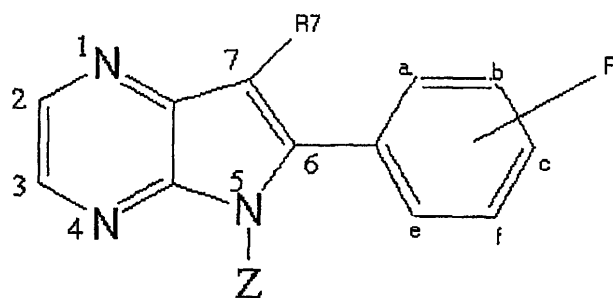
【0023】

前記アロイシン類はまた、後述の複数の実施例によって例示されるように、G1およびG2の双方において細胞を抑制することによって細胞増殖を阻害する点で特徴付けられる。

【0024】

好ましいピロロピラジン誘導体は、式(II)を有する。

【化2】



(II)

40

【0025】

50

ここで、

- 6位のフェニル基は、1、2または3つのR置換基によって置換され、該Rは、
- H、OH、アルキル、-O-アルキル、hal、-NH₂、-N(H,アルキル)、
- N(アルキル)₂、-O-SO₂-NH₂、-O-SO₂-N(H,アルキル)、
- O-SO₂-N(アルキル)₂、-COOH、-COO-アルキル、-CONH₂、-CON(H,アルキル)およびCON(アルキル)₂

を含む群内で選択され、

- R7は、H、アルキル、(alk)_nhal、-CH₂-CH=CH₂、(alk)_n-シクロアルキルまたはalk-Arであり、そして、
- Zは、HまたはCH₃である。

10

【0026】

好ましい基において、Zおよび/またはR7は、Hとは異なっている。

【0027】

前記ファミリーの好ましい群(group)は、CDK1/サイクリンB、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀値 10 μmである。それらは、

R = H、OH、アルコキシ、halまたはアルキルであり、かつ、R7 = Hである化学式(II)の誘導体または、R = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂である誘導体、または、

R = O-SO₂-N-(アルキル)₂、好適には、halまたはOHであり、かつ、R7 = アルキルであり、かつ、n = 1~3であり、かつ、Z = Hである誘導体に対応する。

20

【0028】

前記化学式(II)のファミリーのより好ましい群は、CDK1/サイクリンB、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀値 5 μmである。

【0029】

それらは、R = H、p-アルコキシ、p-およびm-アルコキシ、p-OH、p-hal、p-アルキルまたはp-O-SO₂-N(アルキル)₂であり、かつ、R7 = アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂またはHであり、かつ、Z = Hであり、かつ、n = 1~3である、化学式(II)の誘導体に対応する。

【0030】

前記群の好ましい誘導体は、

- フェニル基は無置換であり、かつ、R7はHであるか、または、
- Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシ、OHまたはhalであり、かつ、R7 = Hであるか、または、
- Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、
- RaおよびRd = Hであり、かつ、RbおよびRc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、
- Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、
- Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシ、OHまたはhalであり、かつ、R7 = アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂であるか、または、
- Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = OHであり、かつ、R7 = アルキルである

30

化合物(a~eは、フェニル基上のRの位置に対応する)に対応する。

【0031】

前記化学式(II)のファミリーのさらにより好ましい群は、CDK1/サイクリンB、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 1 μmである。

【0032】

40

50

それらは、Rがp-アルコキシ、p-O-SO₂-N-(アルキル)₂またはp-OHであり、かつ、R7がアルキルである化学式(II)の誘導体に対応する。

【0033】

好ましい誘導体は、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシ、O-SO₂-N(アルキル)₂またはOHであり、かつ、R7=アルキルである化合物に対応する。

【0034】

特により好ましい群では、誘導体は、CDK1/サイクリンB、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 0.5 μmである。特に有利な誘導体は、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシまたはOHであり、かつ、R7=アルキルである。

10

【0035】

前記化学式(II)のファミリーの別の好ましい群は、CDK1/サイクリンBおよびCDK5/p25またはGSK-3に対して、または、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 値 10 μMである。

【0036】

本発明は、特に、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 10 μMである誘導体を有する群に関する。

【0037】

このような群では、R=H、OH、アルコキシ、hal、アルキルまたはO-SO₂-N(アルキル)₂であり、かつ、R7=H、アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂である。

20

【0038】

前記群の好ましい誘導体は、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 値 5 μMである。前記誘導体では、RはH、p-アルコキシ、OH、halまたはO-SO₂-N-(アルキル)₂であり、かつ、R7は、H、アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂である。

【0039】

有利な誘導体は、Ra、Rb、Rc、RdおよびR7=Hであるか、または、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシ、hal、(alk)_n-halまたはOHであり、かつ、R7=Hであるか、または、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシまたはOSO₂-N(アルキル)₂、halまたはOHであり、かつ、R7=アルキルであるか、またはRaおよびRd=Hであり、かつ、RbおよびRc=アルコキシであり、かつ、R7=アルキルである。

30

【0040】

前記群のより好ましい誘導体は、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 値 1 μMである。このような誘導体では、

R=p-アルコキシ、p-およびm-ジアルコキシ、hal、p-O-SO₂-N(アルキル)₂またはp-OHであり、かつ、R7=Hまたはアルキルである。

【0041】

特に有利な誘導体は、Ra、Rb、Rd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシであり、かつ、R7=アルキルであるか、または、RaおよびRd=Hであり、かつ、RbおよびRc=アルコキシであり、かつ、R7=アルキルであるか、または、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=O-SO₂-N(アルキル)₂またはOHであり、かつ、R7=アルキルである。

40

【0042】

さらにより好ましい誘導体は、CDK5/p25およびGSK-3に対してIC₅₀ 0.5 μMである。有利な誘導体は、Ra、RbおよびRd=Hであり、かつ、Rc=アルコキシまたはOHであり、かつ、R7=アルキルである。

【0043】

50

本発明の別の群では、誘導体は、CDK1およびGSK3に対してIC₅₀ 10 μMである。

【0044】

前記群の誘導体では、R = H、OH、アルコキシ、hal、アルキル、CNまたはO-SO₂-N(アルキル)₂であり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、alk-シクロアルキルまたはalk-アリールである。

【0045】

前記ファミリーの好ましい群では、誘導体は、CDK1およびGSK-3に対してIC₅₀ 5 μMである。

10

【0046】

有利な誘導体では、R = H、p-アルコキシ、p-およびm-アルコキシ、p-OH、p-hal、p-O-SO₂-N(アルキル)₂またはp-CNであり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、(alk)_n-シクロアルキルまたは(alk)_n-アリールである。

【0047】

対応する好ましい誘導体は、Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシ、OH、hal、アルキルまたはCNであり、かつ、R7 = Hであるか、または、Ra、Rb、Rd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂であるか、または、RaおよびRd = Hであり、かつ、RbおよびRc = アルコキシであり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、Ra、RbおよびRc = Hであり、かつ、Rd = O-SO₂-N-(アルキル)₂であり、かつ、R7 = アルキルであるか、または、Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = halであり、かつ、R7 = (alk)_n-アリールである。

20

【0048】

前記ファミリーのさらにより好ましい群では、誘導体は、CDK1およびGSK-3に対してIC₅₀ 値 1 μMである。

【0049】

対応する誘導体は、R = p-アルコキシ、p-O-SO₂-N(アルキル)₂、p-hal、Hまたはp-OHであり、かつ、R7 = アルキル、(alk)_n-hal、CH₂-CH=CH₂、(alk)_n-シクロアルキルまたは(alk)_n-アリールである。

30

【0050】

好ましい誘導体は、Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシ、OH、O-SO₂-N(アルキル)₂またはhalであり、かつ、R7 = アルキル、CH₂-CH=CH₂またはCH₂-シクロアルキルである。

【0051】

前記ファミリーの特により好ましい群では、誘導体は、CDK1/サイクリンBおよびGSK-3に対してIC₅₀ 値 0.5 μMである。

【0052】

有利な誘導体は、Ra、RbおよびRd = Hであり、かつ、Rc = アルコキシまたはOHであり、かつ、R7 = アルキルである。

40

【0053】

本発明はまた、CDK1/サイクリンBおよびCDK5/p25に対してIC₅₀ 10 μMである誘導体を有する群に関する。

【0054】

このような群では、R = H、OH、アルコキシ、hal、アルキルまたはO-SO₂-N(アルキル)₂であり、かつ、R7 = H、アルキル、(alk)_n-halまたはCH₂-CH=CH₂である。

【0055】

50

好ましい誘導体は、CDK1 / サイクリンB および GSK-3 に対して IC_{50} $5 \mu M$ である。

【0056】

このような誘導体では、Rは、好ましくは、H、o-アルコキシ、p-アルコキシ、m-およびp-アルコキシ、p-OH、p-hal. または p-O-SO₂-N(アルキル)₂ であり、かつ、R7はH、アルキル、(alk.)_n-hal. または CH₂-CH=CH₂ である。

【0057】

特に有利な誘導体は、Ra、Rb、Rc、Rd および R7 = H であるか、または、Ra = OH であり、かつ、Rb、Rc、Rd および R7 = H であるか、または、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、OH または hal. であり、かつ、R7 = H、(alk.)_n-hal.、CH₂-CH=CH₂ または アルキル であるか、または、Ra および Rd = H であり、かつ、Rb および Rc = アルコキシ であり、かつ、R7 = H であるか、または、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = O-SO₂-N-(アルキル)₂ または hal. であり、かつ、R7 = アルキル である。

10

【0058】

さらにより好ましい群では、誘導体は、CDK1 / サイクリンB および GSK-3 に対して IC_{50} $1 \mu M$ である。

【0059】

有利な誘導体は、R = p-アルコキシ、p-O-SO₂-N(アルキル)₂、p-hal. または p-OH であり、かつ、R7 = アルキル である。

20

【0060】

特に好ましい誘導体は、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ、OH または O-SO₂-N(アルキル)₂ であり、かつ、R7 = アルキル である。

【0061】

特に好ましい群では、誘導体は、CDK1 / サイクリンB および GSK-3 に対して IC_{50} $0.5 \mu M$ である。

【0062】

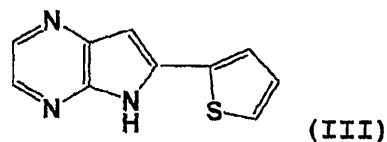
好ましい誘導体では、Ra、Rb および Rd = H であり、かつ、Rc = アルコキシ または OH であり、かつ、R7 = アルキル である。

30

【0063】

CDK1 / サイクリンB、CDK5 および GSK-3 に対して IC_{50} $10 \mu M$ である別の好ましいファミリーは、化学式(III)を有し、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して $5 \mu M$ 以下のものすらある。

【化3】

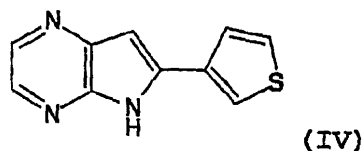


40

【0064】

さらに別の好ましいファミリーは、化学式IVを有し、CDK1 / サイクリンB、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC_{50} $5 \mu M$ である。

【化4】



50

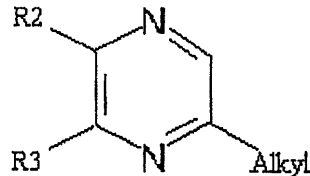
【0065】

前記誘導体は、興味深いことに、CDK5 / p25 および GSK-3 に対して IC₅₀ 値 1 μM である。

【0066】

本発明はまた、化学式(V)のアルキルピラジン類を反応させる工程を含む前記アロイシン類を合成する方法に関する。

【化5】



10

(V)

【0067】

ここで、

R1 および R3 は、上記定義の通りであり、Alkyl は、芳香族ニトリル類 R6CN を有する C1 ~ C6 アルキルであり、ここで、R6 は、上記定義の通りである。

20

【0068】

有利には、化学式(V)のアルキルピラジン誘導体は、ブチルリチウムまたはその類似物を含む有機溶媒に、0 を超えない温度、好ましくは、約 -40 の温度で加えられる。結果として生じる溶液は、30分~約1時間攪拌される。次いで、ニトリル誘導体が加えられ、その溶液は、30分~約1時間、さらに、周囲温度(20 前後)で約1~20時間攪拌される。

【0069】

加水分解後、生じる誘導体が回収され、所望であれば、精製および結晶化される。

【0070】

アルキルピラジン類は、ピラジニルメチルリチウムをプロモアルカン類、およびベンゾニトリルと反応させることによって得られてもよい。メトキシ化合物の脱メチル化は、酸性条件で環流させることによって達成され得る。脱メチル化に要求される時間は、3~20時間で変動された。

30

【0071】

上記に言及したように、そして、後述の複数の実施例に例示されるように、前記化合物は、CDK1 および / または CDK5 および / または GSK-3 を強力に阻害する。

【0072】

前記キナーゼ(これは、神経変性病(neurodegeneration disease)における基質の過リン酸化に必要な主要なキナーゼを代表する)に対して作用させることによって、前記誘導体は、対応する状態を予防および治療するための薬物の有効成分として大きな興味対象になる。それらはまた、抗増殖作用を有する。

40

【0073】

したがって、本発明は、有効成分として少なくとも一つの上記定義の誘導体の有効量を、医薬的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物に関する。

【0074】

前記担体は、投薬形式に応じて固体または液体であってもよい。

【0075】

前記医薬組成物は、アルツハイマー病またはパーキンソン病等の神経変性病の治療または予防に有用である。本発明はまた、癌等の増殖疾患または単細胞または多細胞寄生生物の増殖を治療するための前記医薬組成物の使用に関する。他の用途は、増殖に関連する心

50

臓血管病に対する前記医薬組成物の使用を含む。それらはまた、ウイルス感染（HIV、サイトメガロウイルスおよびヘルペスウイルス）を治療するためのそれらの使用を含む。本発明はまた、除草剤としての前記誘導体の使用に関する。

【0076】

前記医薬組成物は、種々の方式で、例えば、経口的に、局所的に、注射（静脈内、皮下、腹腔内、または、直腸）により投薬され得る。それらは、より特定的には、経口ルートによって投薬される。

【0077】

経口ルートによる投薬のために、口内錠（lozenges）、圧縮錠剤、丸剤、錠剤、カプセル剤、滴剤、シロップ剤、懸濁剤または乳剤が用いられてもよい。これらの組成物は、有利には、投与量単位あたり100～1000mg、好ましくは、300～600mgの有効成分を含む。

10

【0078】

投薬の他の方式は、静脈内、皮下または筋肉内のルートに注射可能であり、消毒されたまたは消毒可能な溶液から処方された溶液を含む。それらはまた、懸濁剤または乳剤であってもよい。

【0079】

これらの注射可能な方式は、投与量単位あたり100～1000mg、好ましくは、300～600mgの有効成分を含む。

【0080】

目安として、必要な患者に用いられ得る投与量は、以下の投与量に対応する。：例えば、神経変性疾患の治療のために100～1000mg/日が、こうして、1日あたり1～4回患者に投薬される。

20

【0081】

本発明はまた、有効成分が上記定義の式（I）の化合物からなる生物学的試薬に関する。

【0082】

これらの試薬は、細胞分割およびリン酸化機構の研究において参照または基準として用いられ得る。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0083】

本発明の他の特徴および利点が、図1～7を参照しながら、以下に開示された複数の実施例において与えられる。

【0084】

（A．化学）

融点は、Electrothermal 9200装置によりオープンキャピラリーチューブにおいて測定され、無修正とした。IRスペクトルは、ATI Mattson genesis series FTIRによりKBrにおいて得られた。¹H NMRは、Varian EM 360 A分光計（60 MHz）により記録され、ケミカルシフト（ppm）は、TMSに関して記録された。シグナルは、以下のように表される。：b s（ブロード・シングレット：broad singlet）、s（シングレット：singlet）、d（ダブルット：doublet）、d d（ダブルット・オフ・ダブルット：doublet of doublets）、t（トリプレット：triplet）、m（マルチプレット：multiplet）。マススペクトルは、LKB 209（70 eVでのEI）により決定された。元素微量分析は、元素記号によって示され、その結果は、他の記載がなければ理論値の±0.4%の範囲内であった。それらは、Perkin Elmer 240装置により行われた。

40

【0085】

ブチルリチウムまたは水素化ナトリウムを必要とする全ての実験は、無水無酸素 - 窒素の雰囲気の下、無水装置中で実施された。テトラヒドロフラン（THF）は、ベンゾフェノン - ナトリウムから蒸留された。ジイソプロピルアミンおよびメチルヘテロ環類は、蒸

50

留され、酸化バリウムで保存された。ブチルリチウム（1.6 Mヘキサン溶液）は、Acrosによって供給され、ジフェニル酢酸に対する滴定によって分析された。アルキルおよびアラルキルピラジン類は、通常の手順にしたがって合成された。Grace silica gel 60A 20~45 μm がカラムクロマトグラフィーのために採用された。2-フェニルインドールは、Aldrichから購入され、受け取った状態で使用された。

【0086】

（a - アロイシン類合成の一般法）

ジイソプロピルアミン（2.23 g ; 0.022 モル）（THF（50 mL）中）を0に冷却し、ブチルリチウム（0.022 モル）を滴下して加えた。0で30分攪拌した後、溶液を-40に冷却してからアルキルピラジン誘導体（0.022 モル）（THF（20 mL）中）を加えた。30分後、ニトリル誘導体 R6-CN（0.012 モル）（THF（20 mL）中）を加え、溶液を-40で30分、さらに、20で1時間~20時間攪拌し、その後、10%のNH₄Cl水溶液で加水分解した。有機層をNa₂SO₄で乾燥し、減圧下に濃縮した。粗生成物をシリカゲルによるクロマトグラフィー精製に付し、塩化メチレン、次いで、酢酸エチルで溶離した。必要な場合には、生成物を、エタノールまたは塩化メチレン-エタノール混合物から結晶化した。

10

【0087】

（b - 実験結果）

6 - (2 - フリル) [5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン (1, RP19) : 融点 232.6 ; IR 3157, 3143, 3102 cm^{-1} ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO-d₆) 6.50 - 6.70 (m, 1H)、6.80 (s, 1H)、7.05 (d, 1H, J = 3 Hz)、7.80 (bs, 1H)、8.20および8.35 (2d, それぞれ1H, J = 3 Hz)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₀H₇N₃O) C, H, N。

20

【0088】

6 - (2 - チエニル) [5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン (2, RP6) : 融点 260.3 ; IR 3208, 3150, 3068 cm^{-1} ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO-d₆) 6.95 (bs, 1H)、7.15 - 7.45 (m, 1H)、7.75 (s, 1H)、7.85 (bd, 1H)、8.25および8.45 (2d, それぞれ1H, J = 2.8 Hz)、12.85 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₀H₇N₃S) C, H, N。

30

【0089】

6 - (3 - チエニル) [5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン (3, RP128) : 融点 230 (分解) ; IR 3095, 3050, 3000 cm^{-1} ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO-d₆) 6.95 (s, 1H)、7.60 - 7.75 (m, 2H)、8.10 - 8.20 (m, 2H)、8.30 (d, 1H, J = 2.6 Hz)、12.30 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₀H₇N₃S) C, H, N。

【0090】

6 - (2 - ピリジル) [5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン (4, RP13) : 融点 233.1 ; IR 3100, 3059 cm^{-1} ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO-d₆) 7.30 - 7.60 (m, 2H)、7.95 - 8.20 (m, 2H)、8.30および8.45 (2d, それぞれ1H, J = 2.8 Hz)、8.75 (d, 1H, J = 5 Hz)、12.65 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₁H₈N₄) C, H, N。

40

【0091】

6 - フェニル [5H]ピロロ[2,3-b]ピラジン (5, RP7) : 融点 216 (文献融点 215 ~ 216) ; IR 3135, 3050 cm^{-1} ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO-d₆) 7.00 (s, 1H)、7.55 (m, 3H)、7.90 (m, 2H)、8.25および8.50 (2d, それぞれ1H, J = 3 Hz)、11

50

. 90 (bs, 1H); MS m/e 209 (M⁺) (100)。元素分析 (C₁₂H₉N₃) C, H, N。

【0092】

6 - (1 - ナフチル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (6, RP17) : 融点 216.4 ; IR 3214、3110、3048 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 6.95 (s, 1H)、7.50 - 7.85 (m, 4H)、7.95 - 8.40 (m, 4H)、8.50 (d, 1H, J = 2.5 Hz)、12.05 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₆H₁₁N₃) C, H, N。

【0093】

3 - メチル - 6 - フェニル [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (8, RP18) : 融点 261.8 ; IR 3104、3030、2985、2915、2878、2801 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 2.55 (s, 1H)、7.15 (s, 1H)、7.35 - 7.60 (m, 3H)、7.75 - 8.10 (m, 2H)、8.40 (s, 1H)、12.30 (bs, 1H); MS m/e 209 (M⁺) (100)。元素分析 (C₁₃H₁₁N₃) C, H, N。

10

【0094】

6 - [1 - (4 - クロロフェニル) - 1 - シクロプロピル] [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (9, RP124) : 融点 189.7 ; IR 3210、3125、3049、3000、2940、2850 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 1.50 (d, 4H)、6.15 (s, 1H)、7.30 (s, 4H)、8.10 および 8.25 (2d, それぞれ 1H, J = 3 Hz)、12.00 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₅H₁₂N₃Cl) C, H, N。

20

【0095】

6 - (2 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (10, RP9) : 融点 156.9 ; IR 3080、3051、2925、2887、2830 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 3.90 (s, 3H)、6.95 - 7.35 (m, 4H)、7.80 - 8.10 (m, 1H)、8.20 および 8.35 (2d, それぞれ 1H, J = 2.5 Hz)、11.90 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₃H₁₁N₃O) C, H, N。

【0096】

6 - (3 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (12, RP10) : 融点 195.7 ; IR 3123、2968、2921、2836 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 3.95 (s, 3H)、6.90 - 7.80 (m, 5H)、8.25 および 8.40 (2d, それぞれ 1H, J = 2.5 Hz)、12.55 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₃H₁₁N₃O) C, H, N。

30

【0097】

6 - (4 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (14, RP11) : 融点 256.1 (文献 238 ~ 240 分解) ; IR 3143、3035、2959、2857 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 3.80 (s, 3H)、6.95 - 7.10 (m, 3H)、8.00 (d, 2H, J = 8 Hz)、8.15 および 8.35 (2d, それぞれ 1H, J = 2.6 Hz)、12.35 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₃H₁₁N₃O) C, H, N。

40

【0098】

6 - (3, 5 - ジメトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (16, RP21) : 融点 216.7 ; IR 3150、2950、2880 cm⁻¹ ; ¹H NMR (60 MHz, DMSO - d₆) 3.90 (s, 6H)、6.55 (s, 1H)、7.20 (m, 3H)、8.15 および 8.35 (2d, それぞれ 1H, J = 2.5 Hz)、12.40 (bs, 1H)。元素分析 (C₁₄H₁₃N₃O₂) C, H, N。

【0099】

50

6 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (17、RP16) : 融点 231.7 ; IR 3098、2964、2939、2834 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 3.75 (s, 3H)、3.95 (s, 6H)、7.25 (s, 1H)、7.40 (bs, 2H)、8.25および8.40 (2d, それぞれ1H, $J = 2\text{Hz}$)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$) C, H, N。

【0100】

6 - (4 - フルオロフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (18、RP76) : 融点 244 分解 ; IR 3149 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.05 - 7.50 (m, 3H)、7.65 - 8.10 (m, 2H)、8.20および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 2.4\text{Hz}$)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_3\text{F}$) C, H, N。

10

【0101】

6 - (4 - クロロフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (19、RP14) : 融点 250 分解 (文献 250 分解) ; IR 3300 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.20 (s, 1H)、7.55および8.05 (2d, それぞれ2H, $J = 8\text{Hz}$)、8.20および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 2.4\text{Hz}$)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_3\text{Cl}$) C, H, N。

【0102】

20

6 - (3, 5 - ジクロロフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (20、RP15) : 融点 252 分解 ; IR 3216、3164、3114 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.35 (s, 1H)、7.75 (m, 1H)、8.15 (d, 2H)、8.25および8.40 (2d, それぞれ1H, $J = 2.2\text{Hz}$)、12.40 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{Cl}_2$) C, H, N。

【0103】

6 - (4 - ブロモフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (21、RP77) : 融点 256 分解 ; IR 3211、3109 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.20 (s, 1H)、7.70および8.00 (2d, それぞれ2H, $J = 8.2\text{Hz}$)、8.20および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 2.5\text{Hz}$)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_3\text{Br}$) C, H, N。

30

【0104】

6 - (4 - トリフルオロメチルフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (22、RP8) : 融点 238 分解 ; IR 3164 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.35 (s, 1H)、7.85 (d, 2H, $J = 8.2\text{Hz}$)、8.10 - 8.50 (m, 4H)、12.70 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_3\text{F}_3$) C, H, N。

【0105】

6 - (4 - シアノフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (23、RP20) : 融点 340 分解 ; IR 3464、3056、2205 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 7.45 (s, 1H)、7.90 - 8.65 (m, 6H)、12.85 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_4$) C, H, N。

40

【0106】

6 - (4 - メチルフェニル) [5H]ピロロ[2, 3 - b]ピラジン (24、RP78) : 融点 265.4 ; IR 3150、3120、2940、2920 cm^{-1} ; ^1H NMR (60MHz, DMSO - d_6) 2.40 (s, 3H)、7.05 (s, 1H)、7.30および7.90 (2d, それぞれ2H, $J = 8\text{Hz}$)、8.15および8.30 (2d, それぞれ1H, $J = 2.4\text{Hz}$)、12.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3$) C, H, N。

【0107】

50

6 - [4 - (2 - ジオキソリル) - フェニル] [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (25、RP 122) : 融点 265.6 ; IR 3120、2980、2889 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 3.95 (s , 4 H)、5.75 (s , 1 H)、7.15 (s , 1 H)、7.50 および 8.05 (2 d , それぞれ 2 H , $J = 7 \text{ Hz}$)、8.20 および 8.35 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 3 \text{ Hz}$)、12.45 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$) C , H , N。

【 0108 】

6 - (4 - ジメチルアミノフェニル) [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (26、RP 129) : 融点 271 分解 ; IR 3211、3157、2900、2818 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 3.15 (s , 6 H)、6.80 - 6.90 (m , 3 H)、7.85 (d , 2 H , $J = 8 \text{ Hz}$)、8.05 および 8.20 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 3 \text{ Hz}$)、12.15 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4$) C , H , N。

10

【 0109 】

6 - (4 - メトキシフェニル) - 7 - メチル [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (27、RP 95) : 融点 221.6 ; IR 3142、3043、2955、2844 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 2.40 (s , 3 H)、3.80 (s , 3 H)、7.10 および 7.70 (2 d , それぞれ 2 H , $J = 7 \text{ Hz}$)、8.15 および 8.30 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 2.6 \text{ Hz}$)、12.00 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$) C , H , N。

20

【 0110 】

6 - (3 , 4 - メトキシフェニル) - 7 - メチル [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (29、RP 123) : 融点 230.2 ; IR 3102、2963、2920、2850 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 2.55 (s , 3 H)、3.80 (s , 3 H)、3.85 (s , 3 H)、7.00 - 7.40 (m , 3 H)、8.15 および 8.30 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 3 \text{ Hz}$)、12 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) C , H , N。

【 0111 】

6 - (4 - クロロフェニル) - 7 - メチル [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (30、RP 80) : 融点 260 分解 ; IR 3148、2920、2853 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 2.40 (s , 3 H)、7.40 - 7.85 (m , 4 H)、8.15 および 8.30 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 2.5 \text{ Hz}$)、12.00 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{Cl}$) C , H , N。

30

【 0112 】

6 - (4 - ジメチルアミノスルファモイルオキシフェニル) - 7 - メチル [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (31、RP 125) : 融点 235.1 ; IR 3140、3045、2970、2925、2880 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 2.45 (s , 3 H)、2.95 (s , 6 H)、7.45 および 7.90 (2 d , それぞれ 2 H , $J = 8 \text{ Hz}$)、8.30 - 8.50 (m , 2 H)、12.25 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{SO}_3$) C , H , N。

40

【 0113 】

6 - (4 - メトキシフェニル) - 7 - プロピル [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (32、RP 127) : 融点 188.5 ; IR 3215、3158、3055、2958、2934、2866、2836 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz , DMSO - d_6) 0.9 (t , 3 H , $J = 7 \text{ Hz}$)、1.70 (m , 2 H)、2.80 (t , 2 H , $J = 7 \text{ Hz}$)、3.80 (s , 3 H)、7.05 および 7.65 (2 d , それぞれ 2 H , $J = 8 \text{ Hz}$)、8.15 および 8.30 (2 d , それぞれ 1 H , $J = 3 \text{ Hz}$)、12.00 (bs , 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$) C , H , N。

【 0114 】

7 - アリル - 6 - (4 - メトキシフェニル) [5 H] ピロロ [2 , 3 - b] ピラジン (

50

34、RP110) : 融点 193.8 ; IR 3135、3063、2962、2934、2878、2838 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3) 3.65 - 3.85 (m, 2H)、3.90 (s, 3H)、4.80 - 5.20 (m, 2H)、5.76 - 6.45 (m, 1H)、7.10および7.75 (2d, それぞれ2H, $J = 8.2\text{ Hz}$)、8.05および8.40 (2d, それぞれ1H, $J = 2.4\text{ Hz}$)、11.85 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

【0115】

7 - (3 - クロロプロピル) - 6 - (4 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (35、RP126) : 融点 178 分解 ; IR 3220、3159、3050、3000、2835 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 2.00 - 2.60 (m, 2H)、3.00 (m, 2H)、3.60 (t, 2H, $J = 6\text{ Hz}$)、3.80 (s, 3H)、7.10および7.70 (2d, それぞれ2H, $J = 8\text{ Hz}$)、8.15および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 3\text{ Hz}$)、12.00 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OCl}$) C, H, N。

10

【0116】

7 - イソプロピル - 6 - (4 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (36、RP102) : 融点 204.8 ; IR 3135、3050、2957、2924、2859 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 1.30 (d, 6H)、3.50 (m, 1H)、3.80 (s, 3H)、7.10および7.55 (2d, それぞれ2H, $J = 8\text{ Hz}$)、8.15および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 2.4\text{ Hz}$)、11.75 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

20

【0117】

6 - (4 - クロロフェニル) - 7 - イソプロピル [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (37、RP90) : 融点 208.6 ; IR 3130、3051、2977、2925、2869 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3) 1.50 (d, 6H, $J = 6\text{ Hz}$)、3.25 (m, 1H)、7.60 (s, 4H)、8.20および8.35 (2d, それぞれ1H, $J = 2.5\text{ Hz}$)、12.00 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{Cl}$) C, H, N。

【0118】

7 - n - ブチル - 6 - (4 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (38、RP106) : 融点 183.8 ; IR 3143、3050、2956、2934、2870 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 1.00 (t, 3H, $J = 7.2\text{ Hz}$)、1.60 (m, 4H)、3.00 (t, 2H, $J = 7.6\text{ Hz}$)、3.90 (s, 3H)、7.10および7.70 (2d, それぞれ2H, $J = 8\text{ Hz}$)、8.00および8.30 (2d, それぞれ1H, $J = 2.6\text{ Hz}$)、11.75 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

30

【0119】

7 - n - ブチル - 6 - (4 - クロロフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (40、RP108) : 融点 200 ; IR 3161、3048、2954、2924、2856 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 0.90 (t, 3H, $J = 6\text{ Hz}$)、1.20 - 2.00 (m, 4H)、2.95 (t, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$)、7.65 (s, 4H)、8.25および8.40 (2d, それぞれ1H, $J = 2.5\text{ Hz}$)、12.05 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{Cl}$) C, H, N。

40

【0120】

7 - n - ヘプチル - 6 - (4 - メトキシフェニル) [5H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (41、RP111) : 融点 132.5 ; IR 3142、3064、2955、2925、2850 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3) 0.90 - 2.00 (m, 13H)、3.05 (t, 2H, $J = 7.2\text{ Hz}$)、3.90 (s,

50

3 H)、7.05 および 7.70 (2 d, それぞれ 2 H, $J = 8.2 \text{ Hz}$)、8.00 および 8.40 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 3 \text{ Hz}$)、12.05 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

【0121】

6 - (4 - メトキシフェニル) - 7 - メチルシクロプロピル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (42, RP104) : 融点 193.9 ; IR 3142、3080、3046、3000、2931、2820 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO- d_6) 0.20 - 0.50 (m, 4 H)、1.00 - 1.40 (m, 1 H)、2.90 (d, 2 H, $J = 6 \text{ Hz}$)、3.85 (s, 3 H)、7.15 および 7.75 (2 d, それぞれ 2 H, $J = 8.2 \text{ Hz}$)、8.20 および 8.40 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 2.6 \text{ Hz}$)、12.20 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

10

【0122】

7 - ベンジル - 6 - フェニル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (44, RP92) : 融点 209.8 ; IR 3144、3056、3024、2929、2871 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO- d_6) 4.30 (s, 2 H)、7.20 (s, 6 H)、7.75 - 8.25 (m, 4 H)、8.30 および 8.40 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 3 \text{ Hz}$)、12.25 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3$) C, H, N。

【0123】

7 - ベンジル - 6 - (4 - クロロフェニル) [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (45, RP91) : 融点 266.3 ; IR 3138、3050、3025、2928、2858 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO- d_6) 4.25 (s, 2 H)、7.15 (s, 5 H)、7.55 (s, 4 H)、8.20 および 8.35 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 3 \text{ Hz}$)、12.25 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{Cl}$) C, H, N。

20

【0124】

6 - (4 - メトキシフェニル) - 7 - メチルシクロヘキシル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (46, RP98) : 融点 220.3 ; IR 3434、3135、2921、2850 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO- d_6) 0.85 - 1.80 (m, 11 H)、2.80 (d, 2 H, $J = 6.5 \text{ Hz}$)、3.80 (s, 3 H)、7.15 および 7.70 (2 d, それぞれ 2 H, $J = 8.2 \text{ Hz}$)、8.15 および 8.35 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 2.5 \text{ Hz}$)、11.90 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

30

【0125】

6 - (4 - クロロフェニル) - 7 - メチルシクロヘキシル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (47, RP99) : 融点 203.5 ; IR 3142、3048、2928、2847 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO- d_6) 0.80 - 1.75 (m, 11 H)、2.80 (d, 2 H, $J = 6.5 \text{ Hz}$)、7.65 (s, 4 H)、8.20 および 8.40 (2 d, それぞれ 1 H, $J = 2.4 \text{ Hz}$)、12.10 (bs, 1 H)。元素分析 ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Cl}$) C, H, N。

40

【0126】

(c. メトキシ置換 6 - フェニル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン類の脱メチル化の一般法)

まず、痕跡量の 50% の次リン酸により臭化水素酸を再蒸留した。: 48% 臭化水素酸の各 100 g に対して 1 g。メトキシ化合物 (0.003 モル) を臭化水素酸 (20 ml) とともに加熱した。前留水 (aqueous forerun) を除去した後、温度は 126 に達する。脱メチル化に要する時間は、3 ~ 10 時間で変動する。過剰の臭化水素酸を減圧下に除去し、粗生成物をエタノールから結晶化した。

【0127】

50

6 - (2 - ヒドロキシフェニル) [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (11、RP109) : 融点 250 分解 ; IR 3419、3354、3090、2710、2641 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 5.80 (s, 3H)、6.80 - 7.30 (m, 4H)、7.70 - 8.00 (m, 1H)、8.40 (bs, 3H)、12.85 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, HBr, H_2O) C, H, N。

【0128】

6 - (3 - ヒドロキシフェニル) [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (13、RP134) : 融点 258 分解 ; IR 3448、3137、3085、2700、2630 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 6.70 - 7.50 (m, 7H)、8.65 (bs, 2H)、13.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, HBr) C, H, N。

【0129】

6 - (4 - ヒドロキシフェニル) [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (15、RP26) : 融点 255 分解 ; IR 3448、3176、3060 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 6.65 - 6.85 (m, 4H)、7.70 および 7.85 (2d, それぞれ 2H, $J = 8.2\text{ Hz}$)、8.15 および 8.25 (2d, それぞれ 1H, $J = 3\text{ Hz}$)、9.65 (s, 1H)、12.10 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$, HBr, H_2O) C, H, N。

【0130】

6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 7 - メチル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (28、RP96) : 融点 262 分解 ; IR 3465、3143、3090、2796、2759 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 2.45 (s, 3H)、7.00 および 7.70 (2d, それぞれ 2H, $J = 8.2\text{ Hz}$)、8.50 (bs, 2H)、9.80 (s, 2H)、13.00 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, HBr) C, H, N。

【0131】

6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 7 - ピロピル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (33、RP132) : 融点 244 分解 ; IR 3187、3100、2965、2873、2798 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 0.85 (t, 3H, $J = 7\text{ Hz}$)、1.35 - 1.90 (m, 2H)、3.10 - 2.75 (m, 2H)、7.20 および 7.65 (2d, それぞれ 2H, $J = 8.2\text{ Hz}$)、8.50 (s, 2H)、9.8 (s, 2H)、13.1 (s, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, HBr) C, H, N。

【0132】

7 - n - ブチル - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル) [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン (39、RP107) : 融点 281.4 ; IR 3134、3100、2946、2924、2867 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 0.90 (t, 3H, $J = 7\text{ Hz}$)、1.20 - 1.90 (m, 4H)、2.90 (t, 2H, $J = 7.5\text{ Hz}$)、6.95 および 7.60 (2d, それぞれ 2H, $J = 7\text{ Hz}$)、8.15 および 8.30 (2d, それぞれ 1H, $J = 2.6\text{ Hz}$)、9.80 (bs, 1H)、11.80 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$) C, H, N。

【0133】

6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 7 - メチルシクロプロピル [5 H] ピロロ [2, 3 - b] ピラジン臭化水素酸塩 (43、RP112) : 融点 260 分解 ; IR 3482、3335、3064、2983 cm^{-1} ; ^1H NMR (60 MHz, DMSO - d_6) 1.60 (d, 4H, $J = 6\text{ Hz}$)、2.00 - 2.60 (m, 3H)、2.90 - 3.60 (m, 4H)、7.05 および 7.90 (2d, それぞれ 2H, $J = 8.2\text{ Hz}$)、8.55 - 8.80 (m, 2H)、13.45 (bs, 1H)。元素分析 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$, HBr, H_2O) C, H, N。

10

20

30

40

50

【0134】

(B. 生化学)

(生化学試薬)

オルトバナジン酸ナトリウム、EGTA (ethylene glycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、Mops (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)、 γ -グリセロリン酸塩、フェニルリン酸塩、フッ化ナトリウム、ジチオトレイトール (dithiothreitol: DTT)、グルタチオン - アガロース、グルタチオン、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、ニトロフェニルリン酸塩、ロイペプチン、アプロチニン、ペプスタチン、ダイズトリプシンインヒビター、ベンズアミジン、ヒストンH1 (タイプII - S) が、Sigma Chemicals から得られた。[γ - 32 P]-ATP (PB 168) が Amersham から得られた。GS-1ペプチドは、配列番号 1 YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSPEDDEEE を有する。

10

【0135】

(緩衝液)

均質化緩衝液: 60 mM の γ -グリセロリン酸塩、15 mM の p-ニトロフェニルリン酸塩、25 mM の Mops (pH 7.2)、15 mM の EGTA、15 mM の $MgCl_2$ 、1 mM の DTT、1 mM のバナジン酸ナトリウム、1 mM の NaF、1 mM のフェニルリン酸塩、10 μ g のロイペプチン/ml、10 μ g のアプロチニン/ml、10 μ g のダイズトリプシンインヒビター/ml および 100 μ M のベンズアミジン。

20

【0136】

緩衝液 A: 10 mM の $MgCl_2$ 、1 mM の EGTA、1 mM の DTT、25 mM の トリス (tris(hydroxymethyl)aminomethane: Tris) - HCl pH 7.5、50 μ g のヘパリン/ml。

【0137】

緩衝液 C: EGTA が 5 mM であり、NaF を含まず、プロテアーゼ阻害剤を含まない以外は均質化緩衝液。

【0138】

Tris - Buffered Saline - Tween - 20 (TBST): 50 ml の トリス (pH 7.4)、150 mM の NaCl、0.1% の トウイーン (Tween) - 20。

30

【0139】

Hypotonic Lysis Buffer (HLB): 50 mM の トリス - HCl (pH 7.4)、120 mM の NaCl、10% のグリセロール、1% のノニデット - P40、5 mM の DTT、1 mM の EGTA、20 mM の NaF、1 mM のオルトバナジン酸塩、5 μ M のミクロシスチン、ロイペプシン、アプロチニンおよびペプスタチンをそれぞれ 100 μ g/ml。

【0140】

(キナーゼ調製およびアッセイ)

キナーゼ活性は、30 で、最終的な ATP 濃度が 15 μ M となるように、(別の記載がなければ) 緩衝液 A または C においてアッセイされた。ブランク値が差し引かれ、10 分のインキュベーションの間に取り込まれたリン酸塩の pモルとして活性が計算された。活性は、通常、最大活性、すなわち、阻害剤がないときの % で表現される。コントロールは、ジメチルスルホキシドの適切な希釈液で行われた。2, 3 の場合には、基質のリン酸化は、SDS - PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 後のオートラジオグラフィーによって評価された。

40

【0141】

GSK-3 / は、ブタの脳から精製するか、または、昆虫の Sf9 細胞を圧搾し、これを精製するかのいずれかによって得られた。1 mg BSA/ml の 10 mM DTT で 1/1000 に希釈した後、これは、基質としての 5 μ l の 40 μ M GS-1ペプチ

50

ドで、緩衝液 A において、 $15 \mu\text{M}$ の $[\text{-}^3\text{ }^2\text{P}] \text{ATP}$ ($3,000 \text{Ci}/\text{mmol}$; $1 \text{mCi}/\text{ml}$) の存在下に、 $30 \mu\text{l}$ の最終容量でアッセイされた。 30°C で 30 分インキュベートした後、 $25 \mu\text{l}$ の一定分量の上澄みを、一片が $2.5 \times 3 \text{cm}$ の Whatman P81 ホスホセルロースペーパー上に点在させ、 20 秒後、フィルタを 5 回 (各回、少なくとも 5 分)、(10ml のリン酸 / 1 リットルの水) の溶液で洗浄した。湿ったフィルタを、 1ml の ACS (Amersham) シンチレーション流体の存在下に計数した。

【0142】

CDK / サイクリン B は、均質化緩衝液において、M 期のヒトデ (*Marthasterias glacialis*) の卵母細胞から抽出し、そして、 $p9^{\text{CKShs1}}$ - セファロースビーズを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーによって精製する (遊離の $p9^{\text{CKShs1}}$ によって溶離された) ことにより得られた。キナーゼ活性は、緩衝液 C において、 1mg のヒストン H1 / ml で、 $15 \mu\text{M}$ の $[\text{-}^3\text{ }^2\text{P}] \text{ATP}$ ($3,000 \text{Ci}/\text{mmol}$; $1 \text{mCi}/\text{ml}$) の存在下に、 $30 \mu\text{l}$ の最終容量でアッセイされた。 30°C で 10 分インキュベートした後、 $25 \mu\text{l}$ の一定分量の上澄みを、P81 ホスホセルロースペーパー上に点在させ、上記のように処理した。

10

【0143】

CDK5 / p25 は、等量の組み換え哺乳動物の CDK5 および p25 (大腸菌 (*E. coli*) において発現された) を GST (Glutathion-S-transferase) 融合タンパク質と混合することによって再構成し、そして、グルタチオン - アガロースを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーによって精製することにより得られた (p25 は、p35 (35 kDa の CDK5 活性化因子) の不完全な異形である)。その活性は、緩衝液 C において、CDK1 / サイクリン B について記載されたようにしてアッセイされた。

20

【0144】

他のキナーゼは、参照 (9)、(10) に記載されたように、圧搾、精製することにより得られ、アッセイされた。

【0145】

(結果)

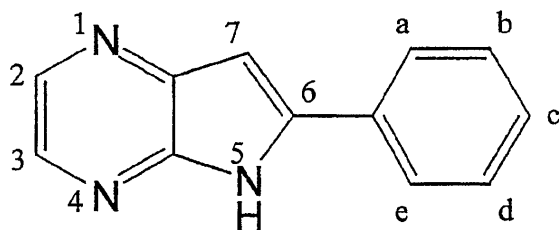
(CDK1、CDK5 および GSK-3 についてのアロイシン類の阻害効果)

複数のキナーゼは、増加する濃度のアロイシン類の存在下に、上記のようにアッセイされた。 IC_{50} は、投与量 - 応答曲線から計算され、表 1 に与えられ、以降、 μM で示す。

30

【表 1 A】

表 1



| 番号 | a | b | c | d | 7 | CDK1/ サイクリン B | CDK5/ P25 | GSK-3 |
|-----------|------------------|------------------|----------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|--------------|---------|
| 5(RP7) | — | — | — | — | — | 5.00 | 4.00 | 2.30 |
| 10(RP9) | OCH ₃ | — | — | — | — | 20.00 | 23.00 | 3.30 |
| 11(RP109) | OH | — | — | — | — | 2.50 | 3.00 | 6.50 |
| 12(RP10) | — | OCH ₃ | — | — | — | 13.00 | 10.00 | 3.20 |
| 13(RP134) | — | OH | — | — | — | 2.50 | — | — |
| 14(RP11) | — | — | OCH ₃ | — | — | 2.00 | 4.00 | 1.10 |
| 15(RP26) | — | — | OH | — | — | 1.20 | 1.00 | 1.20 |
| 16(RP21) | — | OCH ₃ | — | OCH ₃ | — | 100.00 | >100.00 | 60.00 |
| 17(RP16) | — | OCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₃ | — | 100.00 | >100.00 | 85.00 |
| 18(RP76) | — | — | F | — | — | 2.30 | 1.00 | 1.90 |
| 19(RP14) | — | — | Cl | — | — | 1.80 | — | — |
| 20(RP15) | — | Cl | — | Cl | — | >100.00 | >100.00 | >100.00 |
| 21(RP77) | — | — | Br | — | — | 4.00 | >100.00 | 6.00 |
| 22(RP8) | — | — | CF ₃ | — | — | 6.00 | >100.00 | 7.20 |
| 24(RP78) | — | — | CH ₃ | — | — | 3.00 | 10.00 | 2.60 |
| 23(RP20) | — | — | CN | — | — | 3.00 | 13.00 | 4.80 |
| 26(RP129) | — | — | N(CH ₃) ₂ | — | — | 20.00 | >100.00 | 12.00 |
| 27(RP95) | — | — | OCH ₃ | — | CH ₃ | 0.30 | 0.80 | 0.46 |
| 29(RP123) | — | OCH ₃ | OCH ₃ | — | CH ₃ | 1.10 | 1.00 | 2.00 |

【 0 1 4 6 】

【表 1 B】

| | | | | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|--|-------|---------|--------|
| 32(RP127) | — | — | OCH ₃ | — | (CH ₂) ₂ C H ₃ | 0.40 | 0.50 | 0.40 |
| 35(RP126) | — | — | OCH ₃ | — | (CH ₂) ₃ - Cl | 1.30 | 3.00 | 2.50 |
| 36(RP102) | — | — | OCH ₃ | — | CH(CH ₃) 2 | 1.00 | 2.00 | 0.50 |
| 34(RP110) | — | — | OCH ₃ | — | CH ₂ - CH=CH ₂ | 1.00 | 2.00 | 0.60 |
| 38(RP106) | — | — | OCH ₃ | — | (CH ₂) ₃ - CH ₃ | 0.70 | 1.50 | 0.92 |
| 41(RP111) | — | — | OCH ₃ | — | (CH ₂) ₆ - CH ₃ | 7.00 | >100.00 | >10.00 |
| 42(RP104) | — | — | OCH ₃ | — | CH ₂ -C ₃ H ₅ | 1.00 | >100.00 | 1.10 |
| 46(RP98) | — | — | OCH ₃ | — | CH ₂ - C ₆ H ₁₁ | 5.00 | >100.00 | 6.80 |
| 31(RP125) | — | — | O-SO ₂ -N (CH ₃) ₂ | — | CH ₃ | 0.70 | 0.90 | 0.50 |
| 30(RP80) | — | — | Cl | — | CH ₃ | 0.40 | 5.00 | 1.70 |
| 37(RP90) (アロイソ B) | — | — | Cl | — | CH(CH ₃) 2 | 0.85 | 13.00 | 0.75 |
| 40(RP108) | — | — | Cl | — | (CH ₂) ₃ - CH ₃ | 0.20 | >100.00 | 5.90 |
| 45(RP91) | — | — | Cl | — | CH ₂ -C ₆ H ₅ | 40.00 | >100.00 | 6.80 |
| 44(RP92) | — | — | — | — | CH ₂ -C ₆ H ₅ | 2.00 | >100.00 | 1.00 |
| 47(RP99) | — | — | Cl | — | CH ₂ - C ₆ H ₁₁ | 10.00 | >100.00 | 8.00 |
| 28(RP96) | — | — | OH | — | CH ₃ | 0.25 | 0.20 | 0.52 |
| 33(RP132) | — | — | OH | — | (CH ₂) ₂ C H ₃ | 25.00 | 1.20 | 1.80 |
| 39(RP107) (アロイソ A) | — | — | OH | — | (CH ₂) ₃ - CH ₃ | 0.15 | 0.20 | 0.65 |
| 43(RP112) | — | — | OH | — | CH ₂ -C ₃ H ₅ | 50.00 | >100.00 | 3.00 |

10

20

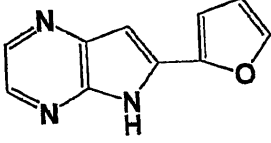
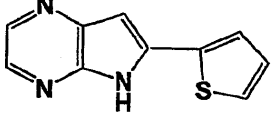
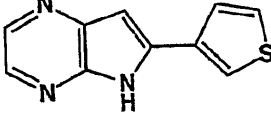
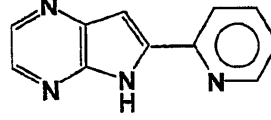
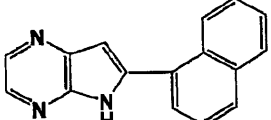
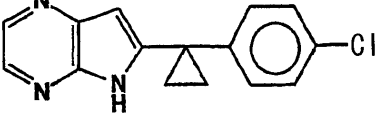
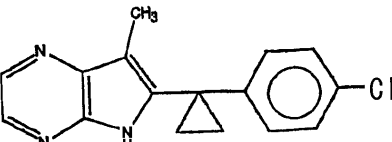
30

40

【 0 1 4 7 】

【表 2 A】

表 1 (続き)。アロイシン関連化合物の構造活性相関

| 番号 | 構造 | CDK1/サイクリン B | CDK5/p25 | GSK-3 |
|-----------|---|-----------------|----------|-------|
| 1(RP19) |  | 12 | 9.30 | 15 |
| 2(RP6) |  | 7.00 | 2.00 | 1.20 |
| 3(RP128) |  | 2.30 | 1.00 | 0.80 |
| 4(RP13) |  | 21.00 | 53.00 | 15.00 |
| 6(RP17) |  | >100.00 | 80.00 | 27.00 |
| 9(RP124) |  | 30.00 | 100.00 | 1.00 |
| 49(RP130) |  | 25.00 | 100.00 | 18.00 |

10

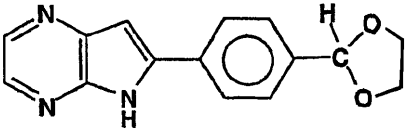
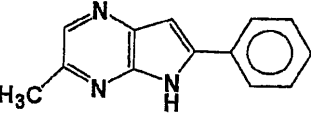
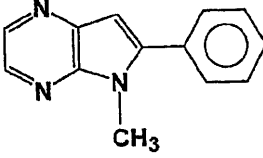
20

30

40

【 0 1 4 8 】

【表 2 B】

| | | | | |
|-----------|---|--------|--------|---------|
| 25(RP122) |  | 8.00 | 15.00 | 20.00 |
| 8(RP18) |  | 69.00 | 100.00 | >100.00 |
| 48(RP22) |  | 100.00 | 7.00 | >100.00 |

10

【 0 1 4 9 】

20

図 1 は、増加する濃度のアロイシン A および B の存在下に得られた結果を与える。活性は、最大活性（すなわち、阻害剤が存在しないときに測定される活性）の % として表されている。

【 0 1 5 0 】

前記結果は、本発明のアロイシン類が CDK および GSK - 3 の強い阻害剤であり、それらの大部分については、100 万分の 1 モルよりも小さい範囲にあることを示す。

【 0 1 5 1 】

（アロイシンは、ATP バインディングの競争阻害剤である）

アロイシン作用の機構を調べるために、反応速度論実験を、ATP レベルおよびアロイシン A 濃度の双方を変更することによって行った。アロイシン A の異なる濃度における CDK 1 / サイクリン B (A)、CDK 5 / p 2 5 (B) および GSK - 3 (C) のキナーゼ活性のアッセイからの速度論データの両逆数プロット (double reciprocal plot) が図 2 に与えられる。酵素活性は、実験項に記載されるようにアッセイされた。反応混合物における ATP 濃度は、0.1 から 0.25 mM に (CDK 1 および CDK 5)、または、0.015 から 0.15 mM に (GSK - 3) に変動した。ヒストン H 1 (A、B) および GS - 1 (C) の濃度は、0.7 mg / ml および 6.7 μM の一定にそれぞれ維持された。

30

【 0 1 5 2 】

データは、アロイシン A が ATP に対する競争阻害剤として作用することを立証している。これらの結果は、CDK 2 の ATP バインディングポケット内へのアロイシン B の局在化と完全に一致する（以下を参照）。

40

【 0 1 5 3 】

（結晶学）

（ヒト CDK 2 の圧搾、精製および結晶化）

ヒト CDK 2 は、Sf9 昆虫細胞における組み換えバキュロウイルスから圧搾し、そして、精製することにより得られる。モノマーのリン酸化されていない CDK 2 結晶は、参照 (11) にすでに記載されるように成長される。

【 0 1 5 4 】

（X 線結晶学データ収集および処理）

CDK 2 - アロイシン B のデータセットを、(1 × 母液溶液 (50 mM 酢酸アンモニウ

50

ム、10%のPEG 3350、15 mMのNaCl、100 mMのHEPES (pH 7.4) + 5% DMSO) 中の1 mMのアロイシン B に60時間浸漬されたモノマーのCDK 2 結晶から収集した。結晶が一時的に低温予備保護剤 (20%グリセロールを含むように調整された母液) に移された後、100 KでElectra Light Source によるX-RAY DIFFRACTIONの光線によりデータを収集した。画像を、MOSFLMパッケージを用いて積算し (参照 (12))、続いて、SCALAを用いて反射光をスケール調整および併合した (参照 (13))。続いて、データ整復および構造細分を、CCP 4 スート (suite) のプログラムを通じて実行した。

【0155】

アロイシン B は、CDK 2 ATP バインディング部位を占め、キナーゼの2つのローブ (lobe) を連結するヒンジ配列内のCDK 2 骨格に対して2つの水素結合を形成する。CDK 2 は、リボン状表示で描写され、N末端で始まる青から赤にカラー勾配が付けられる。N末端のローブは、5-ストランド・アンチパラレル - シート (5-Stranded anti-parallel - sheet) によって占められ、C末端のローブは、 α -ヘリックスによって占められている。アロイシン B は、2つのドメイン間の裂け目にあるATP - バインディング部位に結合されたボールおよび棒の形式で描写されている。アロイシン B の炭素原子は、シアンに色付けされ、窒素原子は青に、塩素原子は黄色に描写されている。

【0156】

天然のリガンドであるATPとは違って、アロイシン B は、Glu 81の骨格酸素と相互作用しないが、代わりに、Leu 83の骨格窒素および酸素原子からそれぞれ水素結合を受け入れ、そしてこれを占める (図3)。結合したアロイシン B 分子の4 内にある残基は、ボールおよび棒の様式で描写される。アロイシン B の炭素原子は、シアンで描写され、CDK 2 の炭素原子は緑で描写される。酸素原子は、赤に色付けされ、窒素原子は青に、塩素原子は、黄色で描写される。点線は、アロイシン B とLeu 83の骨格窒素および酸素原子と間の水素結合 ($dO \rightarrow N$ または $dN - O < 3.4$) を示す。図はまた、20 ~ 1.9 Å の分解能でREFMACからのマップ計数出力を用いて細分の終了時に計算されたアロイシン B に対する ($2Fo - Fc$) - 計算電子密度を含む。マップは、平均値からのマップの自乗平均ルート (root-mean-square: r.m.s.) 偏差の1.0倍に対応して $0.19 e^{-} \cdot \text{\AA}^{-3}$ のレベルで等高線表示される。

【0157】

この水素結合パターンは、以前に、オロモーション、ロスコピスチン、パーバラノール B、OL567およびH717と複合体を形成したモノマーのCDK 2 の構造において観察された。CDK 2 ATP - バインディング部位は、今日確認されたCDK 阻害剤の特徴である平面のヘテロ環系に対して複数の位置を許容する。最も近接するCDK 2 ATP バインディング部位内のアロイシン B の縮合環系の位置は、インジルピン - 5 - スルホネートおよびオキシンドール - 3 の位置に似ている。しかしながら、インジルピン - 5 - スルホネートより小さく、オキシンドール - 3 に対して異なる配向にあるので、アロイシン B は、ATP - バインディングの裂け目の後部を満たさず、Phe 80の側鎖との等価な端部から環へのスタッキング相互作用を形成することはない。

【0158】

(アロイシン類、キナーゼの選択性)

ここまでで最も活性が強いアロイシンであるアロイシン A が、26の高度に精製されたキナーゼに関する選択性について試験された。キナーゼの活性は、適切な基質 (例えば、ヒストン H1、カゼイン、ミエリン塩基性タンパク質およびペプチド) を用いて、15 μ MのATPとともに、アロイシン A の増加する濃度の存在中でアッセイされた。IC₅₀ 値は、投与量 - 応答曲線から評価され、表3に表されている。

【表3】

表3 アロイシンAのキナーゼ阻害選択性

| プロテインキナーゼ | IC ₅₀ (μM) |
|---------------------|-----------------------|
| CDK1/サイクリン B | 0.15 |
| CDK2/サイクリン A | 0.12 |
| CDK2/サイクリン E | 0.40 |
| CDK4/サイクリン D1 | >100.00 |
| CDK5/p35 | 0.16 |
| erk1 | 18.00 |
| erk2 | 22.00 |
| c-raf | >100.00 |
| MAPKK | >100.00 |
| c-Jun N 末端キナーゼ | 3.3-10 |
| プロテインキナーゼ C α | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C β 1 | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C β 2 | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C γ | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C δ | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C ε | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C η | >100.00 |
| プロテインキナーゼ C ζ | >100.00 |
| cAMP 依存性プロテインキナーゼ | 100.00 |
| cGMP 依存性プロテインキナーゼ | 100.00 |
| GSK3-α | 0.50 |
| GSK3-β | 1.50 |
| カゼインキナーゼ 1 | >100.00 |
| カゼインキナーゼ 2 | >100.00 |
| インシュリンレセプターチロシンキナーゼ | 60.00 |
| PIM 1 | >10.00 |

【0159】

試験された大部分のキナーゼは、不十分に阻害されたかまたは阻害されなかった (IC₅₀ > 10 μM)。しかしながら、2つのキナーゼファミリーとして、GSK-3 / およびCDKsは、アロイシンAに対する感受性が強かった (それぞれ0.65および0.15 μMのIC₅₀) (図1; 表3)。複数のCDKの中で、CDK4ではなくCDK1、CDK2およびCDK5は、アロイシンAによって阻害される。これは、CDK1/2/5を阻害するが、CDK4/6に対して効果が著しく劣るか、または効果がない、プリン類、ヒメニアルディシン、パウロン類、およびインジルピン類等の他のCDK阻害剤を思い出させる。アロイシン類は、CDKおよびGSK-3に対して顕著に特異的であるようであるが、それらの細胞内標的の実際のスペクトルは、識別されたように維持される

10

20

30

40

50

。この目的のために、我々は、現在、プリン類およびパウロン類について記載されたアフィニティ・クロマトグラフィ法によりアロイシン - バインディングタンパク質を精製するための固定されたアロイシンマトリクスを設計している。

【0160】

(C. 細胞生物学)

(試薬)

ペニシリン、ストレプトマイシン、ノコダゾール、インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレシン、セレン酸ナトリウム、臭化3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)、RNAse A、ヨウ化プロピジウムがSigmaから購入された

10

(細胞培養)

クローンヒトNT2テラテロカルシノーマ(teraterocarcinoma)細胞を、Stratagen(La Jolla, CA)から取得し、ダルベッコ改変イーグル液体培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium):5%FCS(fetal calf serum:牛胎児血清)が補足され、37°Cでペニシリン(20UI/ml)およびストレプトマイシン(20µg/ml)を含む2mMのL-グルタミン(BIO WHITTAKER)含有F-12培地(Nutrient Mixture F-12)において、空気中に5%のCO₂を含む湿気のある雰囲気成長させた。

【0161】

(NT2分化)

NT2細胞のhNT細胞への分化は、Soullieらによって改変されたPleasureらの方法(参照(17))にしたがって誘導された。簡単には、2回目の再塗布の後、細胞は、処理前5日間、分裂抑制剤(1µMのサイトシン・アラビノシド(cytosine arabinoside)、10µMのフルオロデオキシウリジンおよび10µMのウリジン)と、塩とホルモン(25µgインシュリン/ml、100µgトランスフェリン/ml、20nMのプロゲステロン、60µMのプトレシンおよび30nMのセレン酸ナトリウム)の混合物とを加えた血清除去培地において培養された。

20

【0162】

(アロイシンによる処理)

指数関数的な増殖細胞をアロイシンA(ジメチルスルホキシドに溶解された保存液)存在下に24時間インキュベートした。細胞のノコダゾール処理を0.04µgノコダゾール/ml(培養液)の濃度で24時間行った。ノコダゾール処理の後、新しい培養液で細胞を2回洗浄し、アロイシンA存在下または非存在下に24時間培養した。血清廃除を実施するために、血清がない培地中に40時間細胞を維持した。血清廃除の後、細胞を2回洗浄し、アロイシンAの存在下または非存在下に新しい血清含有培地中で40時間培養した。

30

【0163】

(細胞生存度アッセイ)

NT2細胞およびhNTヒトニューロンについてのアロイシンAの毒性を定量するために、NTTホルマザンに対するNTTの細胞減少の阻害を、Sailleらにしたがって評価した。アロイシンAの暴露の後、0.5mg・MTT/ml(新しい培地)の存在下に37°C1時間細胞をインキュベートした。ホルマザン生成物をDMSOに溶解し、562nmでの吸収の測定によって定量した。

40

【0164】

(流動細胞計測法(flow cytometry)による細胞周期分析)

細胞をトリプシン処理し、遠心分離により収集し、冷却70%エタノールで少なくとも4時間凝集させた。凝集された細胞をPBS(phosphate buffered saline:リン酸緩衝生理食塩水)で洗浄し、10µgRNAse/mlの存在下にインキュベートし、25µg/mlのヨウ化プロピジウムにより37°Cで1時間染色した。次いで、FACSsort流動細胞計測器(Beckton Dickinson)を用いて染色された細胞を細胞

50

周期分布について分析した。multiCYCLEにより細胞周期分析を実施した(参照(18))。

【0165】

細胞周期分布に関するアロイシンAの効果流動細胞計測法によってNT2細胞について調べた。非同調(unsynchronised)細胞(図4E)を20 μ MのアロイシンAに40時間暴露した(図4F)。指数関数的成長細胞におけるアロイシンAによって誘導された増殖停止が、G2/N相での蓄積によって明らかに加えられた。アポトーシスの徴候は検出されず、以前に観察された明らかな毒性の欠落を確認した。

【0166】

血清廃除によるG0/G1においてまたはノコダゾール処理によるG2/Mにおいて同調されたNT2細胞に関するアロイシンAの効果も調べた。その結果を図4に示す。：ヨウ化プロピジウム染色後の細胞周期相分布を流動細胞計測法によって分析した(A、B、C)。NT2細胞は、24時間の血清廃除によって同調され(A)、次いで、20 μ MアロイシンAの非存在下で(B)または存在下に(C)新しい培地において40時間培養された(D、E、F)。NT2細胞は、ノコダゾール処理(0.2 μ g/ml)によって24時間同調され(D)、その後、アロイシンAの非存在下(E)または存在下(F)に新しい培地において40時間培養された。

【0167】

24時間の血清廃除により、G0/G1における細胞の有意な増加がみられた(図5A)。次いで、細胞を、20 μ MのアロイシンAの非存在下(図5B)または存在下(図5C)に血清濃厚化培地(serum-enriched media)に40時間再暴露した。アロイシンAで処理した細胞は、本質的にはG0/G1で残るが、わずかにG2/M細胞で蓄積する(最も有望には、最初のS相副次集団(sub-population)から誘導される)(図5C)。コントロール細胞は、古典的な細胞周期パターンに再配分される(図5B)。24時間のノコダゾール処理により、G2/Mの細胞が大規模に蓄積される(図5D)。次いで、細胞を洗浄してノコダゾールを取り除き、20 μ MのアロイシンAの非存在下(図5E)または存在下(図5F)に40時間インキュベートした。ノコダゾールを除去して40時間後、コントロール細胞を、種々の細胞周期相に再配分した(図8E)。対照的に、ノコダゾール処理後にアロイシンAに暴露された大部分の細胞は、G2/Mで残され(図5F)、コントロール細胞で見られたG1/G0の増加を妨げた。小さい副G2ピーク(sub-G2-peak)が、アポトーシスによる細胞死の少数の始まりを示しているかもしれない。

【0168】

全ての合わせたこれらのデータが示しているのは、アロイシンAが抗増殖特性を有していること、およびG0/G1からの退出およびG2/Mからの退出の双方を阻害することが可能であることであり、いくつかの細胞内ターゲットの存在を示唆している。G1阻止は、CDK2/サイクリンEに抗するアロイシンAの高い潜在力と対応する。S相に入る能力がないこともまた、GSK-3(サイクリンD1分解に必要であることが知られるキナーゼ)の阻害からの結果であるかもしれない。G2/M阻止は、CDK1/サイクリンBに抗するアロイシンAの潜在力と良く対応する。

【0169】

(参照)

1. Meijer, L. Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, anti-neurodegenerative, anti-viral and anti-parasitic agent. Drug Resistance Update 2000, 3, 83-88.
2. Toogood, P.L. Cyclin-dependent kinase inhibitors for treating cancer. Med. Res. Rev. 2001, 21, 487-498.
3. Gray, N.; Detivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. Curr. Med. Chem. 1999, 6, 859-876.
4. Fischer, P.M.; Lane, D.P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. Curr. Med. Chem. 2000, 7, 1213-1245.

10

20

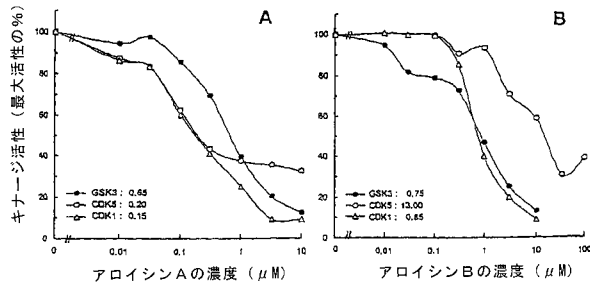
30

40

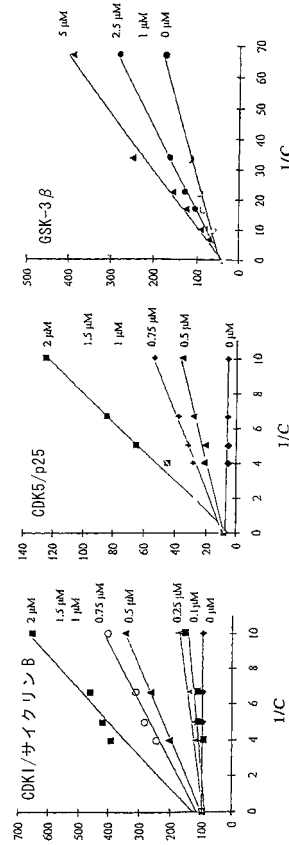
50

5. Pestell, R.; Mani, S.; Wange, C.; Wu, K.; Francis, R. Cyclin-dependent kinase inhibitors: novel anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2000, 9, 1849-1870.
 6. Rosiana, G.R.; Chang, Y.T. Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* 2000, 10, 1-16.
 7. Sielecki, T.M.; Boylan, J.F.; Benfield, P.A.; Trainor, G.L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1-18.
 8. Kaubisch, A.; Schwartz, G.K. Cyclin-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical dependent. *Cancer J.* 2000, 6, 192-212.
 9. Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J.P.J.; Blow, J.J.; Inagaki, M.; Delcros, J.G.; Moulinoux, J.P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 1997, 243, 527-536. 10
 10. Meijer, L.; Thunissen, A.M.W.H.; White, A.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L.H.; Walter, J.; Cleveley, K.E.; Salinas, P.C.; Wu, Y.Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E.M.; Kim, S.-H.; Pettit, G.R. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 and casein kinase 1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. & Biol.* 2000, 7, 51-63.
 11. Lawrie, A.M.; Noble, N.E.; Tunnah, P.; Brown, N.R.; Johnson, L.N.; Endicott, J.A. Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nature Structural Biol.* 1997, 4, 796-800. 20
 12. Leslie, A.G.W. Joint CCP4 and ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography. 1992, vol. 26.
 13. CCP4. The CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4) suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D*, 1994, 50, 760-763.
 14. Navaza, J. AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.*, 1994, A50, 157-163.
 15. Murshudov, G.N.; Vagin, A.A.; and Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst. D*, 1997, 53, 240-255.
 16. Jones, T.A.; Zou, J.Y.; Cowan, S.W.; Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A*, 1991, 47, 110-119. 30
 17. Pleasure, S.J.; Page, C.; Lee, V.M.Y. Pure, post-mitotic polarized human neurons derived from NT2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* 1992, 12, 1802-1815.
 18. Damiens, E.; Baratte, B.; Marie, D.; Eisenbrand, G.; and Meijer, L. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene*, 2001, 20, 3786-3797.
- 【図面の簡単な説明】
- 【 0 1 7 0 】 40
- 【図 1】本発明のアロイシン類による CDK 1 / サイクリン B、CDK 5 / p 2 5 および GSK - 3 阻害結果である。
- 【図 2】A ~ C は、ATP 存在下でのアロイシン A に対する酵素活性 (CDK 1 / サイクリン B : A、CDK 5 / p 2 5 : B、GSK - 3 : C) である。
- 【図 3】アロイシン B と CDK 2 ATP 結合部位との間の相互作用のステレオ図である。
- 【図 4】A ~ E は、アロイシン A による指数関数的な細胞成長の可逆阻害である。
- 【図 5】G 0 / G 1 (A、B、C) および G 2 / M (D、E、F) でのアロイシン A の効果の比較である。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

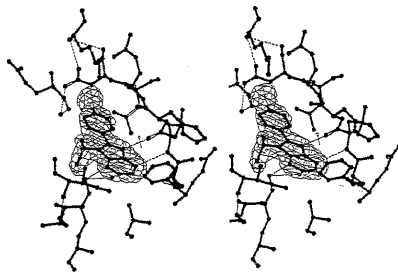
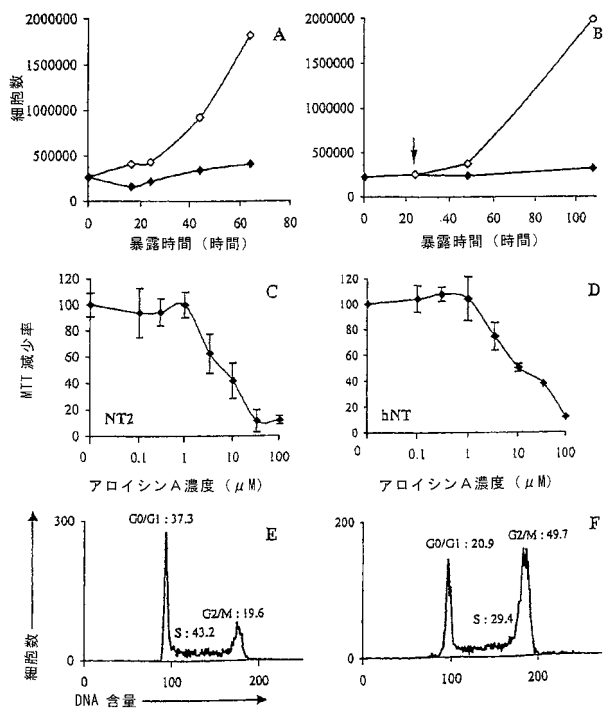
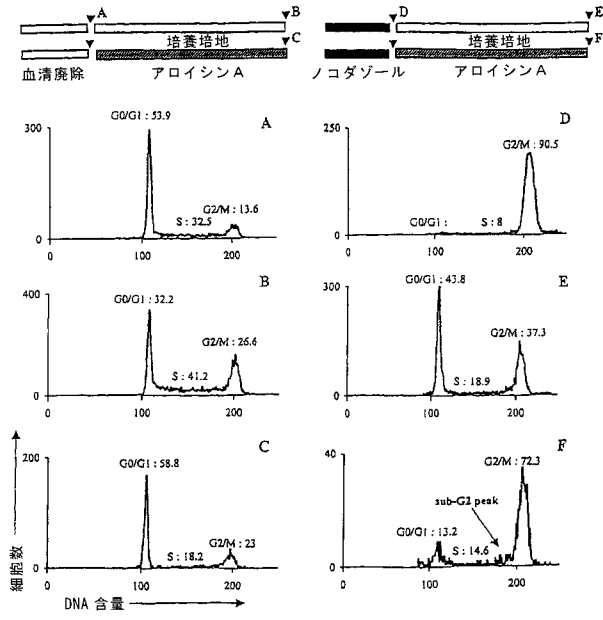


Fig. 3

【 図 4 】



【図5】



【配列表】

0004780549000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ヴィエルフォン ジャン ミシェル
 フランス国 メゾン アルフォール リュ モリエール 2
 (72)発明者 メッテ イヴェット
 フランス国 ポワチエ リュ ドゥ ランシャン コメディ 5

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 国際公開第01/047922(WO, A1)
 国際公開第01/096336(WO, A1)
 特表2001-520227(JP, A)
 特表2001-506980(JP, A)
 DAVIS, M.L. et al, Reactions of α -(lithiomethyl)azines with nitriles as a route to pyrrolopyridines, -quinolines, -pyrazines, -quinoxalines and -pyrimidines, Tetrahedron, 1992年, Vol.48, No.5, pp.939-952
 MARTIN, C. et al, Selective reactions of o-chlorobenzonitrile: SNAr, Tetrahedron Letters, 1989年, Vol.30, No.8, pp.935-936
 VIERFOND, J.M. et al, Cyclization by intramolecular amination in the pyrazine series, Tetrahedron Letters, 1981年, Vol.22, No.13, pp.1219-1222
 HARDY, C.R. et al, Ring opening or rearrangement versus N-oxidation in the action of peracids upon pyrrolo[2,3-b]pyridines, pyrrolo[2,3-b]pyrazines, and triazolo[1,5-a]- and triazolo[4,3-a]pyrazine. Some chemical and spectroscopic properties of the triazolo pyrazines and their N-oxides, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry(1972-1999), 1980年, No.2, pp.506-511
 CLARK, B.A. et al, Mass spectrometry of pyrrolo[2,3-b]pyrazines and pyrazino[2,3-b]indole, Organic Mass Spectrometry, 1977年, Vol.12, No.7, pp.421-423
 CLARK, B.A. et al, Formation of certain substituted 5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazines by thermal cyclization of pyrazinyldiazones and a route to 5H-pyrazino[2,3-b]indole; a synthesis of 5H-pyrrolo[2,3-b]pyrazine and some of its properties, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry(1972-1999), 1976年, No.13, pp.1361-1363
 CLARK, B.A. et al, Pyrrolo[2,3-b]pyrazines and pyrazino[2,3-b]indole, Chemistry & Industry(London, United Kingdom), 1975年, No.5, pp.215-216

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C07D487/00-491/22
 A61K 31/33- 33/44
 A61P 1/00- 43/00
 CApIus/REGISTRY(STN)