(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3943126号
(P3943126)
(45)発行日　平成19年7月11日(2007.7.11)　(24)登録日　平成19年4月13日(2007.4.13)

(51)Int.Cl.　F I
C07D 487/14 (2006.01)　C07D 487/14
A61K 31/407 (2006.01)　A61K 31/407
A61P 25/28 (2006.01)　A61P 25/28

請求項の数 10　(全 29 頁)

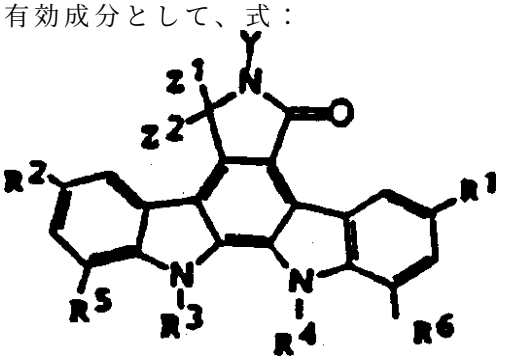
(21)出願番号　特願平7-509379
(86)(22)出願日　平成6年9月16日(1994.9.16)
(65)公表番号　特表平9-502730
(43)公表日　平成9年3月18日(1997.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/010495
(87)国際公開番号　WO1995/007911
(87)国際公開日　平成7年3月23日(1995.3.23)
審査請求日　平成13年9月14日(2001.9.14)
(31)優先権主張番号　08/122,893
(32)優先日　平成5年9月16日(1993.9.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
セファロン，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国１９３８０ペンシルベニア州、ウェスト・チェスター、ブランディワイン・パークウェイ１４５番
(73)特許権者
協和醗酵工業株式会社
東京都千代田区大手町１丁目６番１号
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　田中　光雄

最終頁に続く

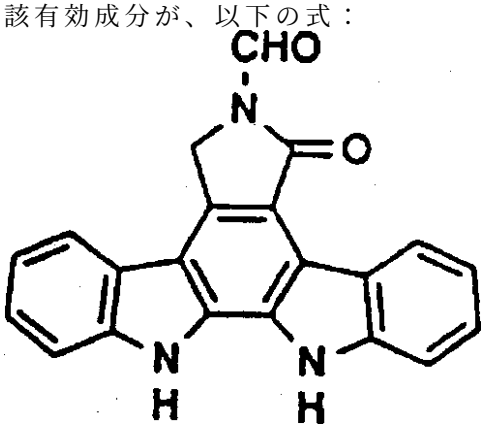
(54)【発明の名称】ニューロトロフィン誘導活性を高めるＫ－２５２ａ誘導体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
有効成分として、式：

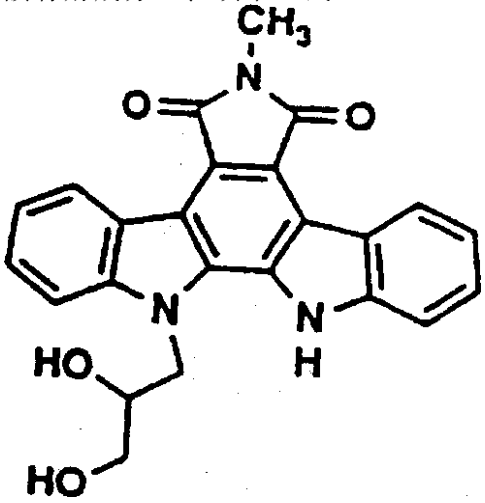


［式中：
ａ）Z^1およびZ^2は一緒になってＯを表し；
R^1、R^2、R^5およびR^6はＨであり；
Ｙは炭素数１-６のｎ－アルキルまたはＣＨＯであり；および
各R^3およびR^4は、独立して、Ｈまたはｎが１-６の整数である（CH_2）$_n$ＣＨ（ＯＨ）CH_2ＯＨであるか；または
ｂ）Z^1およびZ^2はＨであり；
ＹはＣＨＯであり；および

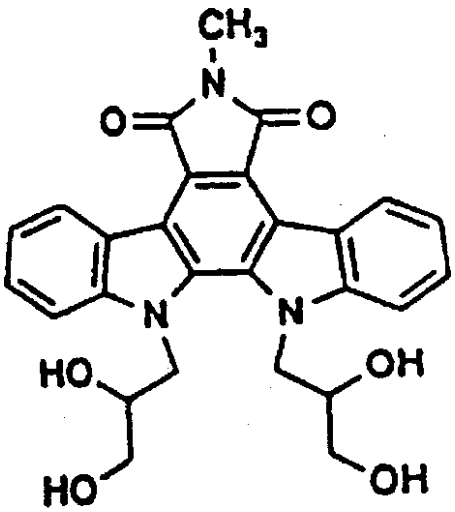
各R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6はHである］
で示されるＫ-２５２ａ誘導体またはその医薬上許容される塩を含有してなるニューロトロフィン応答性細胞のニューロトロフィン-誘導活性上昇剤。
【請求項２】
さらに、外因性のニューロトロフィンを含有する請求項１記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。
【請求項３】
外因性のニューロトロフィンと併用する請求項１記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。
【請求項４】
該ニューロトロフィンがＮＴ-３である請求項２または３記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。
【請求項５】
該有効成分が、以下の式：



によって表される化合物またはその医薬上許容される塩である請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。
【請求項６】
該有効成分が、以下の式：



によって表される化合物またはその医薬上許容される塩である請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。
【請求項７】
該有効成分が、以下の式：



によって表される化合物またはその医薬上許容される塩である請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。

【請求項８】

Z^1およびZ^2がＨであり、ＹがＣＨＯであって、R^1、R^2、R^3、R^4、R^5およびR^6がＨである請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。

【請求項９】

Z^1およびZ^2が一緒になってＯを表し、Ｙがメチルであり、R^4がＨであって、R^3が（CH_2）ＣＨ（ＯＨ）CH_2OHである請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。

【請求項１０】

Z^1およびZ^2が一緒になってＯを表し、Ｙがメチルであり、R^3およびR^4が（CH_2）ＣＨ（ＯＨ）CH_2OHである請求項１、２または４のいずれか１項に記載のニューロトロフィン－誘導活性上昇剤。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は、「Ｋ-２５２ａ」と称されるインドロカルバゾール・アルカロイドの誘導体、ならびに、ニューロトロフィン受容体よりなる細胞へのニューロトロフィンの結合により生じる、分子的、生物学的および細胞的な活性を高めるためのこれらの誘導体の使用に関する。

アルツハイマー病、パーキンソン病および筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳまたは「ルー・ゲーリック（Lou Gehrig）病」）のごとき神経変性疾患の原因は知られていない。しかしながら、近年において、ニューロトロフィンの局在性、ニューロトロフィンの発現レベル、および/またはニューロトロフィンに結合する受容体の発現レベルにおける変化が、かかる疾患に付随し得ると仮定されてきている。ニューロトロフィンは、ニューロンを包含するある種の細胞の発生、機能および/または生存において役割を演じる低分子量のポリペプチドである。ニューロンの死滅または機能不全は、多数の神経変性疾患に直接的に関与する。

種々のニューロトロフィンが同定されている。これらには、神経成長因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン-３（ＮＴ-３）、ニューロトロフィン-４/５（ＮＴ-４/５）および脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）が含まれる。これらのうち、ＮＧＦは同定された最初のニューロトロフィンであり、最もよく特徴付けられたニューロトロフィンである。

ＮＧＦは、ある種の感覚ニューロンおよび交感ニューロンの正常な発生および機能に必要である。現在までの実験的根拠により、ＮＧＦがニューロンの機能に重要な種々の細胞性応答を調節することが示されている。ＮＴ-３のごとき他のニューロトロフィンのイン・ビボ（in vivo）機能に関する明確な情報が現在不足していることにより、神経変性疾患の原因のそれらの調査が妨げられている。現在、ＮＴ-３が、前脳基底野におけるコリン

作動性ニューロンの生存および機能に役割を演じていることが知れている。しかしながら、ＮＧＦのように、ＮＴ-３も、多くの異なった細胞型の生存および/機能に影響し得る。ニューロトロフィンが欠如するか、その機能が不十分であると、ニューロン変性につながることが示唆されてきている。この変性は、アルツハイマー病、パーキンソン病およびＡＬＳのごとき疾患で起こる。従って、かかる疾患に苦しむ人々に、相応する神経栄養因子を提供することによって、かかるニューロン変性を緩和または予防し得ることが示されている（アッペル，エス・エイチ（Appel,S.H.）、アナルズ・オブ・ニューロロジー（Ann. Neurol.）第１０巻：４９９頁、１９８１年）。例えば、ＮＧＦはアルツハイマー病患者において変性している前脳基底野コリン作動性ニューロンの栄養因子であるため、ＮＧＦはアルツハイマー病の治療に有用であり得ることが示唆されている。示されているように、ＮＧＦを患者の系に「付加」することにより、かかるニューロンの死滅が予防されるか、またはかかるニューロンの機能が改善され得る。

残念なことに、技術的および倫理的な観点から、ニューロトロフィンに基づく治療剤の開発はこれまで抑制されてきた。例えば、いわゆる組換えＤＮＡ技術を用いて十分な量の純粋なニューロトロフィンを生産することは技術的に困難である。さらに、ヒト胎児細胞を利用してニューロトロフィンを生産することは可能ではあるが、（典型的には流産した胎児から得られた）かかる細胞を用いることにより生じる倫理的課題により、このアプローチは実際には利用できない。従って、これらとは異なったアプローチ、または、疾患もしくは疾病の進行過程においてニューロトロフィンを用いるアプローチを探索することが強く求められている。

神経変性疾患におけるニューロトロフィンの役割をより細やかに理解することは、かかるアプローチを扱うのに有用であろう。ニューロトロフィンと特定の疾患との間の作用機作面での関連が一旦十分に理解されれば、かかる作用機作における欠点、不備および問題点に対してより適切に取り組むことができるため、より合理的な治療デザインが可能となるであろう。

かかるアプローチの１つには、ニューロトロフィンの効果を「模倣する」分子；（例えば、ニューロトロフィン受容体に結合した結果、ニューロトロフィン様分子がその受容体に結合した場合に達成されるものと同一のある種の細胞性応答を誘導する分子）の開発が含まれるであろう。もう１つのアプローチには、ニューロトロフィンがその受容体に結合することと関連する応答（または応答群）を高める分子（すなわち、ニューロトロフィン-受容体相互作用を媒介する効果を示すが、他の作用面では効果がないか重要でない分子）の開発が含まれるであろう。

後者のアプローチに焦点を合わせると、ニューロトロフィンがその受容体（これらの受容体は、「ｔｒｋ」と総称されている）に結合すると、「自己リン酸化」と称される受容体上のチロシン残基のリン酸化が速やかに誘導されることが知られている。自己リン酸化は、ニューロンのごとき細胞の機能および/または生存に関連し得るある種の分子応答を調節する情報伝達経路の活性化に必須である（一般的には、クライン（Klein）ら、セル（Cell）第６５巻、１８９頁、１９９１年；ランバーレ（Lamballe）ら、セル（Cell）第６６巻、９６７頁、１９９１年参照）。ｔｒｋファミリーの受容体は、現在、ｔｒｋ Ａ、ｔｒｋ Ｂおよびｔｒｋ Ｃよりなる。個々のｔｒｋ受容体は、異なったサブセットのニューロトロフィンと結合する。例えば、ＮＧＦはｔｒｋ Ａには結合するが、ｔｒｋ Ｂには結合しない；ＮＴ-３は、主にｔｒｋ Ｃに結合し、より低い程度でしかｔｒｋ Ａには結合しない（しかし、ＮＴ-３がｔｒｋ Ａに結合しても、検出可能な機能活性はもし生じたとしても低いものである）。ＮＧＦおよびある種の神経変性疾患の間の関連を考慮すれば、ｔｒｋファミリーにおけるｔｒｋ Ａの重要性およびｔｒｋ Ａチロシンキナーゼ活性から起こる分子機作は、明らかである。

上記のことから、ニューロトロフィン誘導性活性を高める薬剤を見出すことが強く望まれている。かかる薬剤は、ニューロトロフィンの分子機作をさらに理解し、解明すること、ならびに神経変性疾患治療用治療剤として使用する上で有益であろう。

発明の概要

本発明は、その最も広範な意味で、K-２５２ａ誘導体に関する。K-２５２ａは、ノカルジオシス種（Nocardiosis sp.）培養物か初めて単離されたインドロカルバゾール・アルカロイドである（カセ（Kase）ら、ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス（J.Antibiotics）第３９巻、１０５９頁、１９８６年）。K-２５２ａは、プロテインキナーゼCおよびｔｒｋチロシンキナーゼを含む幾つかの酵素の阻害剤である（カセ（Kase）ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミューニケイションズ（Biochem.Biophys.Res.Comm.）第１４２巻、４３６頁、１９８７年；ナカミシ（Nakamishi）ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J.Biol.Chem.）第２６３巻、６２１５頁、１９８８年；およびベルグ（Berg）ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J.Biol.Chem.）第２６７巻、１３頁、１９９２年参照）。あるイン・ビトロ（in vitro）細胞アッセイにおいては、ｔｒｋチロシンキナーゼ活性の阻害と相関して、K-２５２ａはＮＧＦ媒介の細胞の生育を阻害するが、他のアッセイ系では阻害しない（阻害するものについては、コイズミ（Koizumi）ら、ジャーナル・オブ・ニューロサイニンス（J.Neurosci.）第８巻、７１５頁、１９８８年；ドーティー（Doherty）ら、ニューロサイエンス・レターズ（Neurosci.Lett.）第９６巻、１１頁、１９８８年を参照せよ；阻害しないものについては、ボラシオ（Borasio）、ニューロサイエンス・レターズ（Neurosci.Lett.）第１０８巻、２０７頁、１９９０年を参照）。K-２５２ａは、ある種の神経細胞においてニューロトロフィン様の作用を誘導するが、しかし化学的に類似しているK-２５２ｂは誘導しない（ヌーゼル（Knusel）ら、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー（J.Neurochem.）第５９巻、７１５頁、１９９２年参照）。これらの知見は、蛋白質を含む複数の分子がK-２５２ａと相互作用していることを示唆している（カッセンス（Coussens）ら、サイエンス（Science）第２３３巻、８５９頁、１９８６年）。K-２５２ａおよびK-２５２ｂは、ｔｒｋのリン酸化状態に作用する。例えば、K-２５２ａはニューロトロフィン誘導性の受容体の自己リン酸化を阻害し得る（スクイント（Squinto）ら、ＷＯ ９３/００９０９）；しかし、ある環境においては、K-２５２ａおよびK-２５２ｂは、標的細胞の作用およびＮＴ-３により媒介されるｔｒｋのｔｒｋチロシン・リン酸化を促進する（ヌーゼル（Knusel）、前掲参照）。

前記で論じた矛盾するデータは、K-２５２ａ機能活性の全貌を予想する正確なアプローチが容易には確認または予想できないことを示している。この点については、K-２５２ａの提唱された使用：腫瘍の阻害（米国特許第４，８７７，７７６号；米国特許第５，０９３，３３０号；ノマト（Nomato）なる名称における欧州特許公開第２３８，０１１号）；抗-殺虫剤活性（米国特許第４，７３５，９３９号）；ならびに炎症の阻害（米国特許第４，８１６，４５０号）を考慮すればより理解される。

本発明者らは、（以後詳細に開示する）K-２５２ａ誘導体として一般的に記載されるある種の明確な化合物が、ニューロトロフィン応答性細胞のニューロトロフィン-誘導性活性を高めるのに有用であることを発見した。

「ニューロトロフィン-誘導性活性」なる句を修飾する場合に本明細書で用いる「増強」および「増強する」なる語は、各々、K-２５２ａ誘導体をニューロトロフィンと組み合せることにより、ニューロトロフィン単独でその活性の誘導に作用するよりも、活性の誘導により大きく作用することを意味する。

本明細書で用いる「ニューロトロフィン-誘導性活性」なる句は、ニューロトロフィンがニューロトロフィン応答性細胞に結合することから直接的または間接的に生じるいずれの応答も、およびニューロトロフィン-受容体に関連するチロシン残基の自己リン酸化を起こすこととなるいずれの応答も意味する。最も好ましくは、該ニューロトロフィン受容体は、ｔｒｋ受容体である。ニューロトロフィン-受容体に関連するチロシン残基の自己リン酸化から直接的また間接的に起こる応答は、例えば（ｉ）コリン・アセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）活性；（２）後根神経節（ＤＲＧ）ニューロンの生育；（３）細胞分裂（分裂促進）；または（４）コリン作動性ニューロンおよび交感ニューロンの生育または機能の促進である。これらの応答は、例えば（ａ）アルツハイマー病、（ｂ）運動ニューロン病（例えば、ＡＬＳ、パーキンソン病）、（ｃ）脳血管疾患（例えば、脳卒中、

虚血）、（ｄ）ハンチントン舞踏病、（ｅ）ＡＩＤＳ痴呆、（ｆ）癲癇、（ｇ）末梢神経障害（例えば、化学療法-関連性の末梢神経障害において、ＤＲＧニューロンに影響を及ぼすもの）、（ｈ）興奮性アミノ酸により誘導される疾患、ならびに脳または脊髄の振とう性または穿通性の障害に関連する疾患を含む、ある種の疾患の緩和および/または治療に関与する。Ｋ-２５２ａ誘導体は、それ自体、例えば、ニューロトロフィンが結合できる細胞（例えば、コリン作動性ニューロン、感覚ニューロンまたはＤＲＧニューロン）の死滅または機能不全に起因する疾患の緩和および/または治療に利用することができる。

「ニューロトロフィン-誘導性活性」なる句で用いる「ニューロトロフィン」なる語には、内因性および外因性の両ニューロトロフィンが包含され、ここで、「内因性」とは、既に存在するニューロトロフィンをいい、「外因性」とは、系に付加したニューロトロフィンをいう。定義により、「ニューロトロフィン-誘導性活性」には：（１）内因性ニューロトロフィン；（２）外因性ニューロトロフィン；および（３）内因性および外因性のニューロトロフィンの組合せによって誘導される活性が包含される。

本明細書で用いる「ニューロトロフィン応答性細胞」なる句は、ニューロトロフィンが特異的に結合できる受容体を含む細胞を意味する。最も好ましくは、該受容体はｔｒｋ受容体である。ニューロトロフィン応答性細胞には例えば、ニューロンおよび非-ニューロン細胞が包含される。

本明細書で用いる「ｔｒｋ」なる語は、現在のところ、ｔｒｋＡ、ｔｒｋＢおよびｔｒｋＣよりなる高アフィニティーのニューロトロフィン受容体ファミリー、ならびに、ニューロトロフィンが結合でき、その結合がかかる膜関連性蛋白質と関連するチロシン残基の自己リン酸化、および機能性反応の直接的および間接的な活性化を誘導する他の膜関連蛋白質をいう。本明細書で用いる「ニューロトロフィン」なる語は、ニューロンのごとき細胞の生育および機能を直接的または間接的に促進するポリペプチドを意味する。ニューロトロフィンには例えば、神経成長因子（ＮＧＦ）、ニューロトロフィン-３（ＮＴ-３）、ニューロトロフィン-４/５（ＮＴ-４/５）および脳由来神経成長因子（ＢＤＮＦ）が含まれる。

本明細書で用いる「ニューロン」なる語には、コリン作動性ニューロンおよび感覚ニューロンが包含される。本明細書で用いる「コリン作動性ニューロン」なる句は、その神経伝達物質がアセチルコリンである中枢神経系（ＣＮＳ）および末梢神経系（ＰＮＳ）におけるニューロンを意味する。本明細書で用いる「感覚ニューロン」なる句には、例えば、哺乳動物の皮膚、筋肉および関節からの（例えば、温度、運動のような）環境的信号に応答するニューロンが含まれる。感覚ニューロンの例は、ＤＲＧからのニューロンである。

本明細書で用いる「Ｋ-２５２ａ誘導体」なる語は、以下により詳細に開示する化合物よりなり；一般的には、本明細書で開示するＫ-２５２ａ誘導体は、Ｋ-２５２ａの化学的修飾体である。

以下により詳細に概説するごとく、ニューロトロフィン応答性細胞のニューロトロフィン-誘導性活性を増強するＫ-２５２ａ誘導体の能力は、以下のアッセイのいずれかを用いて測定することができる：

１．前脳基底野ニューロンＣｈＡＴアッセイ；または
２．ＤＲＧニューロン生育アッセイ；または
３．ＰＣ-１２ ｔｒｋチロシン・リン酸化アッセイ；または
４．ｔｒｋ受容体細胞分裂促進アッセイ。

ＣｈＡＴは、神経伝達物質アセチルコリンの合成を触媒し、よって機能性のコリン作動性ニューロン（すなわち、生育もしくは機能する、またはその可能性があるコリン作動性ニューロン）についての酵素マーカーと考えられている。ＤＲＧニューロン生育は、生存しているニューロンによる染料の特異的取り込みおよび酵素的変換の定量によってイン・ビトロ（in vitro）でアッセイできる。チロシンのリン酸化は、ＰＣ-１２（クロム親和性細胞腫由来の悪性ニューロンの原始細胞系）を用いて評価でき；かかるリン酸化は、ｔｒｋＡ、ＢおよびＣの細胞質ドメインを認識する抗体によるｔｒｋの免疫沈降およびブロッティング、続いての標識化抗-リンチロシン抗体を用いた検出によって容易に検出できる

。（例えば、ｔｒｋ受容体へのＮＴ-３の結合により媒介される細胞分裂促進のような）ｔｒｋＡ、ｔｒｋＢおよびｔｒｋＣで別々にトランスフェクトした細胞系により媒介される細胞分裂促進により、ニューロトロフィン応答性細胞のニューロトロフィン-誘導性活性を増強するＫ-２５２ａ誘導体の能力を分析できる。

本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい具体例の説明および請求の範囲から明らかである。

好ましい具体例の説明

最初に図面を説明する。

図面

図１は、胚性ラットの前脳基底野培養物における、ＣｈＡＴ活性に対するＮＴ-３の投与量の効果を示すグラフである。

図２は、胚性ラットの前脳基底野培養物における、ＣｈＡＴ活性に対する代表的なＫ-２５２ａ機能性誘導体（Ｉ-１６）およびＮＴ-３の投与量の効果を示すグラフである。

図３は、イン・ビトロ（in vitro）における、後根神経節ニューロンの生育に対するＮＴ-３の投与量の効果を示すグラフである。

図４は、イン・ビトロ（in vitro）における、後根神経節ニューロンの生育に対するＮＴ-３および代表的なＫ-２５２ａ機能性誘導体（Ｉ-１６）の効果を示すグラフである。

図５は、ＰＣ-１２細胞を接触させた場合のＫ-２５２ａ機能性誘導体によるｔｒｋ細胞受容体の増強されたチロシン・リン酸化を示すイムノブロットである。

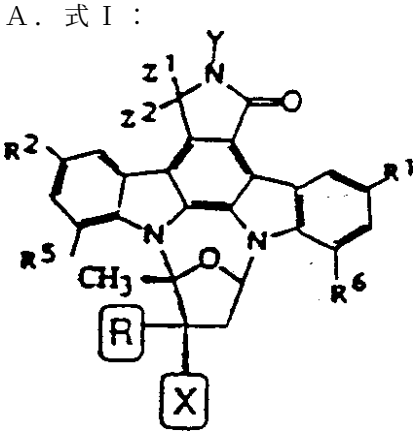
図６は、化合物Ｉ-９およびＩ-１４の化学合成を概説する図である。

図７は、化合物Ｉ-１５およびＩ-２１の化学合成を概説する図である。

ニューロトロフィン応答性細胞のニューロトロフィン-誘導性活性を増強するのに有用なＫ-２５２ａ誘導体を本明細書に開示する。好ましい具体例において、少なくとも１つのタイプの外因性ニューロトロフィンをＫ-２５２ａ誘導体と組み合わせて用い；最も好ましくは、かく用いる少なくとも１つの外因性ニューロトロフィンはＮＴ-３である。

本明細書に開示するＫ-２５２ａ誘導体は、式Ｉ-VIのいずれかを有する。

Ａ．式Ｉ：



［式中：

ａ）Z^1およびZ^2は一緒になってＯを表す；

各R^1、R^2、R^5およびR^6は、独立して、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、NO_2、ＣＮ、炭素数１-６のアルキル、または、各R^{13}およびR^{14}が独立してＨまたは炭素数１-６のｎ-アルキルである$NR^{13}R^{14}$；

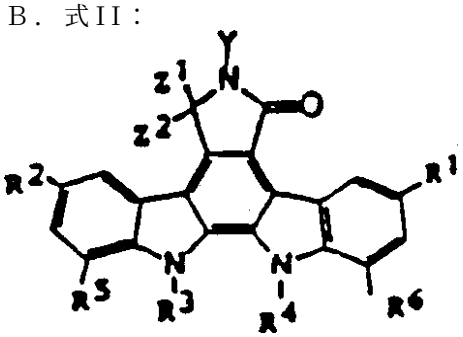
ＹはＨ、ＯＨ、NH_2、炭素数１-６のｎ-アルキル、ＣＨＯ、$OCONH_2$、ベンジル、炭素数１-６のＯ-ｎ-アルキル、または、ｎが１-６の整数である$(CH_2)_n$-ＯＨもしくは$(CH_2)_nNH_2$；

上記の場合には、

１）ＲはＯＨ、$OCONH_2$、または、炭素数１-６のＯ-ｎ-アルキル；

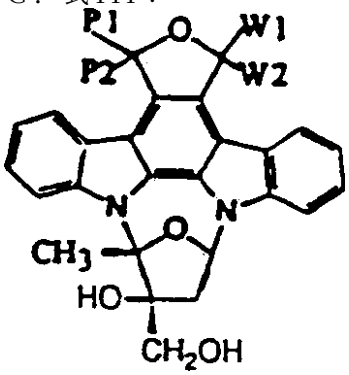
ＸはＣＨ$_2$ＯＨ、CH_2NH_2（またはその酸塩）、炭素数２-７のCH_2O-ｎ-アルキル、R^7がＨまたは炭素数１-６のアルキルであるCO_2R^7、ｎが１-６の整数であってR^8がも

しくはアシル誘導基であるＣＯＮＨＯＲ[8]、ＨもしくはＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＲ[8]、または、Ｒ[9]が炭素数１-３のアルキルであるＣＯＮＨＲ[9]；または
２）ＲおよびＸは、一緒になって、各Ｒ[10]およびＲ[11]が、独立して、Ｈまたは炭素数１-３のアルキルである式-ＣＨ$_2$ＯＣＲ[10]Ｒ[11]Ｏ-；または、Ｒ[12]がＨまたは炭素数１-３のアルキルである-ＣＨ$_2$ＮＲ[12]ＣＯ$_2$-で示される連結基を形成する；のいずれかである；
あるいは、
ｂ）Ｚ[1]はＨであって、Ｚ[2]はＯＨ；
ＹはＨまたはＣＨＯ；
ＲはＯＨ；および
ＸはＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＨ、ＣＯ$_2$ＣＨ$_3$またはＣＨ$_2$ＯＨ；および
Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[5]およびＲ[6]はａ）の定義に同じ；
あるいは、
ｃ）Ｚ[1]およびＺ[2]は共にＨ；および
ＹはＨ、ＣＨＯ、炭素数１-６のｎ-アルキルまたはＯＣＯＮＨ$_2$；
上記の場合には、
１）ＲはＯＨ、炭素数１-６のＯ-ｎ-アルキルまたはＯＣＯＮＨ$_2$、但し、ＹがＨである場合、ＲはＯＨ；および、ＸはＣＯＮＨＯＲ[8]、ｎが１-６の整数であるＣＯＮＨ（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＲ[8]、ＣＨ$_2$ＯＨまたはＣＯ$_2$ＣＨ$_3$、但し、ＹがＨであって、Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[5]およびＲ[6]が各々Ｈである場合、ＸはＣＯ$_2$ＣＨ$_3$とはなり得ず；
または
２）ＲおよびＸは、一緒になって、式-ＣＨ$_2$ＮＲ[12]ＣＯ$_2$-で示される連結基を形成する；各Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[5]およびＲ[6]はａ）の定義に同じであり、但し、Ｒ[1]がＢｒである場合、ＸはＣＨ$_2$ＯＨとはなり得ない；のいずれかである；
あるいは、
ｄ）Ｚ[1]はＨであって、Ｚ[2]はＲ[15]が炭素数１-３のｎ-アルキルであるＳＲ[15]；Ｙ、ＲおよびＸはｂ）の定義に同じであり、但し、Ｒ[15]がＣ$_2$Ｈ$_5$である場合、Ｘは
ＣＨ$_2$ＯＨとはなり得ず；かつ、Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[5]およびＲ[6]はａ）の定義に同じ］、
Ｂ．式II：

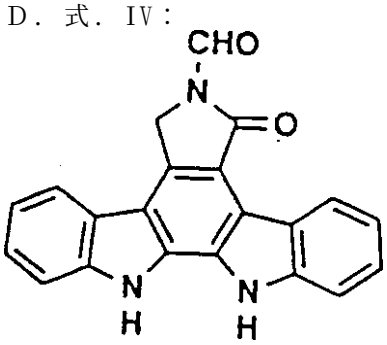


［式中、
ａ）Ｚ[1]およびＺ[2]は一緒になってＯを表し、
上記の場合には、
１）各Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[5]およびＲ[6]は、独立して、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、ＮＯ$_2$、ＣＮ、炭素数１-６のアルキル、または、各Ｒ[13]およびＲ[14]が、独立して、Ｈまたは炭素数１-６のｎ-アルキルであるＮＲ[13]Ｒ[14]；ＹはＨ、ＯＨ、ＮＨ$_2$、炭素数１-６のｎ-アルキル、ＣＨＯ、ベンジル、炭素数１-６のＯ-ｎ-アルキル、ｎが１-６の整数である（ＣＨ$_2$）$_n$ＯＨもしくは（ＣＨ$_2$）$_n$ＮＨ$_2$；各Ｒ[3]およびＲ[4]は、独立して、Ｈまたはｎが１-６の整数である（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ（ＯＨ）ＣＨ$_2$ＯＨ；または
２）各Ｒ[1]、Ｒ[2]、Ｒ[3]、Ｒ[4]、Ｒ[5]およびＲ[6]は、独立して、Ｈ；Ｙはａ）１）の定義に同じ、但し、Ｙはベンジルとはなり得ない；のいずれかである；
あるいは
ｂ）Ｚ[1]はＨであって、Ｚ[2]はＨ、ＯＨまたはＲ[15]が炭素数１-３のｎ-アルキルであるＳＲ[15]；

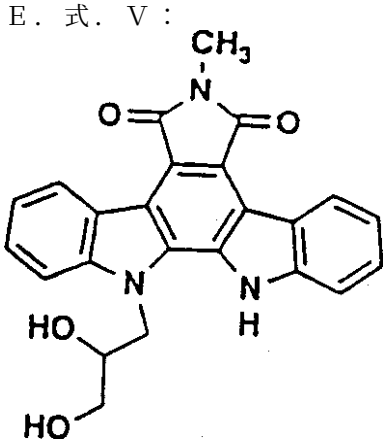
ＹはＨまたはＣＨＯ；および
各R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6は、独立して、Ｈを意味する］、
Ｃ．式III：



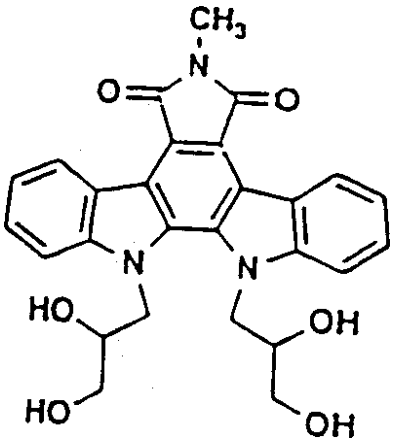
［式中、
ａ）各Ｐ１およびＰ２はＨであるか、またはＰ１およびＰ２は一緒になってＯを表し；各Ｗ１およびＷ２はＨであるか、またはＷ１およびＷ２は一緒になってＯを表す；但し、各Ｐ１およびＰ２はＷ１およびＷ２とは異なる］、
Ｄ．式．IV：



またはその医薬上許容される塩、
Ｅ．式．Ｖ：



またはその医薬上許容される塩、
Ｆ．式．VI：



またはその医薬上許容される塩。
式IV、ＶおよびVIは、式IIの属に由来する種である。
本明細書で定義する「医薬上許容される塩」とは、塩酸塩、硫酸塩およびリン酸塩のごとき無機酸の付加塩；ならびに酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩およびクエン酸塩のごとき有機酸の付加塩である。医薬上許容される金属塩の例は、ナトリウム塩およびカリウム塩のごときアルカリ金属塩、マグネシウム塩およびカルシウム塩のごとき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。医薬上許容され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アンモニウム塩である。医薬上許容され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。医薬上許容されるアミノ酸付加塩の例は、リジン、グリシンおよびフェニルアラニンとの塩である。
Ｋ-２５２ａ誘導体の好ましい具体例は、表１に掲載する置換基が導入されたものである（ローマ数字は、その種が由来する式番号を示す）。

表 1

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

表 1(続き)

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

(1)R^1およびR^2は、(3)に記載した以外は、H；R^5およびR^6はH；R^3およびR^4は、(4)および(5)に記載した以外は、Hである。
(2)Z^1およびZ^2は前記に同じ、または一緒に結合して示した酸素を表す。
(3)R^1およびR^2は共にBrである。
(4)R^3は$CH_2CH(OH)CH_2OH$であって、R^4はHである。
(5)R^3およびR^4は共に$CH_2CH(OH)CH_2OH$である。
(6)XおよびRは一緒に結合して連結基を形成する。
(7)P_1、P_2は一緒に結合してOを表す；W1、W2＝H。
(8)P1、P2＝H；W1、W2は一緒に結合してOを表す。

K-252a誘導体の特に好ましい具体例は、表2に掲載する置換基が導入されたものである。

表 2

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

(1)R^1およびR^2は、(3)に記載した以外は、H；R^4、R^5およびR^6はH；R^3は、(4)に記載した以外は、Hである。
(2)Z^1およびZ^2は一緒に結合して酸素を表す。
(3)R^1およびR^2は共にBrである。
(4)R^3は$CH_2CH(OH)CH_2OH$である。
(5)R^3およびR^4は共に$CH_2CH(OH)CH_2OH$である。

本明細書に開示するK-252a誘導体は、種々の分野において利用できることが見い出されている。例えば、研究分野では、該化合物を利用して、自己リン酸化の「ダウン-ストリーム（down-stream）」効果のモデルを研究し、改良し、決定すること、ならびにニ

ューロトロフィンの機能活性を解明することができる。（例えば、ｔｒｋにおける）受容体に結合したチロシンキナーゼのチロシン残基の自己リン酸化は、例えば、ニューロンのような機能性応答を調節する情報伝達経路の活性化に必須である；従って、例えば、かかる自己リン酸化を増強するような開示された化合物は、かかる自己リン酸化により影響を受ける分子機作を分析するためのイン・ビトロ（in vitro）アッセイの開発に用いることができる。このように、開示された化合物は、ニューロトロフィンへのｔｒｋ受容体の結合による設計に利用することができる。ニューロトロフィン様の薬剤を発見するためのモデル系を設計する上で、開示されたＫ-２５２ａ誘導体が有用であることは、以下の点からさらに明白である：（１）ニューロトロフィン・情報伝達経路の正確な機作が十分に理解されていないこと；および（２）ニューロトロフィンとニューロンの栄養性および生育促進作用との関連性も十分には理解されていないこと。従って、開示されたＫ-２５２ａ誘導体は、例えば、かろうじてしかニューロトロフィン様活性を有さない薬剤の発見に用いることができ、開示されたＫ-２５２ａ誘導体と組み合わせた場合には、ニューロトロフィン-誘導活性の増強をスクリーニングできる。

神経細胞変性を起こすニューロンの変性、死滅または機能消失は、限定するものではないが、アルツハイマー病；運動ニューロン障害（例えば、ＡＬＳ、パーキンソン病）；脳血管疾患（例えば、脳卒中、虚血）；ハンチントン舞踏病；ＡＩＤＳ痴呆；癲癇；脳または脊髄の震盪性または穿通性の障害；末梢神経障害（例えば、化学療法-関連性の末梢神経障害においてＤＲＧに影響を及ぼすもの）；ならびに興奮性アミノ酸により誘導される疾患を含む、多くのヒト神経疾患の特徴である。開示されたＫ-２５２ａ誘導体は、ニューロトロフィン応答性細胞（例えば、コリン作動性ニューロン、感覚ニューロンまたはＤＲＧニューロン）のニューロトロフィン-誘導性活性を増強するのに有用であるので、開示された化合物は、それ自体を治療剤として有効に利用できる。従って、開示された化合物は、例えば、ＣｈＡＴ活性またはＤＲＧニューロンの生育を増強させるような明らかな有用性を有するため、例えば、ＣｈＡＴ活性の低下またはＤＲＧニューロンの死滅に関連する疾患の治療に該化合物を用いることは本発明の範囲に含まれる。

Ｋ-２５２ａ機能性誘導体の投与

本明細書に開示される化合物は、医薬上許容される無毒性の賦形剤および担体と混合することにより、医薬組成物に処方化できる。前記したごとく、かかる組成物は、非経口投与での使用には、特に液状の溶液または懸濁液の形態に；経口投与には、特に錠剤またはカプセル剤の形態に；あるいは、鼻腔内投与には、特に散剤、点鼻液またはエアロゾルの形態に調製できる。

該組成物は、単位投与量形態で簡便に投与でき、医薬分野でよく知られているいずれの方法によっても調製することができる（「レミントンの薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences」（ペンシルベニア州、イーストン（Easton,PA）のマック・パブリッシング・コーポレイション（Mack Pub.Co.）社、１９８０年）参照）。非経口投与用の処方には、通常の賦形剤の滅菌水または滅菌生理食塩水、ポリエチレングリコールのごときポリアルキレングリコール、植物油、水添ナフタレン等を含ませることができる。特に、生体適合性、生分解性のラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドのコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンのコポリマーが、Ｋ-２５２ａ誘導体の放出を制御するのに有用な賦形剤となり得る。他の利用可能な非経口デリバリー系に有用なシステムには、エチレン-酢酸ビニルのコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、移植注入システム、およびリポソームが含まれる。吸入投与用の処方には、例えば、ラクトースのような賦形剤が含まれるか、あるいは、例えば、ポリオキシエチレン-９-ラウリルエーテル、グリココレートおよびデオキシコレートを含有する水性溶液、または点鼻液の形態で投与するための油性溶液、または鼻腔内的に適用するゲルが含まれていてもよい。また、非経口投与用の処方には、口腔内投与用のグリココレート、直腸内投与用のメトキシサリシレート、または膣内投与用のクエン酸が含まれていてもよい。

本発明の物質は、医薬中に単独の有効剤として、あるいは例えば、ニューロトロフィンもしくは（例えば、成長因子のような）他の因子、または神経学的疾病においてニューロン

生育もしくは軸索増殖性を促進することができる薬剤と組み合わせて用いることができる。

治療組成物中の本明細書に記載するK-２５２ａ機能性誘導体の濃度は、投与すべきK-２５２ａ機能性誘導体の投与量、（例えば、疎水性のような）用いる化合物の化学的特質、および投与経路を含めた多くの因子に応じて変化する。一般的な条件においては、本発明の化合物は、非経口投与には約０．１％～１０％ｗ/ｖの化合物を含有する水溶性生理学的緩衝溶液中として提供される。典型的な用量の範囲は、一日当たり約１μｇ/ｋｇ体重～約１ｇ/ｋｇ体重であり；好ましい用量の範囲は、一日当たり約０．０１ｍｇ/ｋｇ体重～１００ｍｇ/ｋｇ体重である。投与すべき薬物の好ましい投与量は、神経学的疾病のタイプおよび程度、個々の患者の総合的健康状態、選択されたK-２５２ａ誘導体の相対的生理作用、化合物賦形剤の処方、ならびにその投与経路のような要因に依存する。

以下の実施例は、説明目的で示すものであって、開示された本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

実施例１：前脳基底野ニューロンＣｈＡＴアッセイ

方法：前脳基底野培養物は、トリプシン分離を用いてＥ１７（胚日１７）の胚性ラットから調製した。前脳基底野を切開し、０．３ＭのKH_2PO_4、２０ｍＭの乳酸ナトリウム、１９５ｍＭのソルビトール、５ｍＭのグルコースよりなるｐＨ７．４の休眠培地に採取した。組織を５０×ｇにて２分間遠心した。上清を除去した後に、該組織を無カルシウム・無マグネシウムのハンクスのバランス塩溶液（ＣＭＦ-ＨＢＳＳ）および１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２中の０．０５％トリプシン１ｍｌに再懸濁し、３７℃にて８分間インキュベートした。ＨＢＳＳ中のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（４％）を添加し、試験管を２分間遠心した。ペレットを、ｐＨ７．２の１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、０．５％のＢＳＡおよびＤＮａｓｅを含有するＨＢＳＳ緩衝液に再懸濁した。該組織を、熱処理したパスツールピペットを用いて機械的に分離し、次いで滅菌した５３μｍのニテックス（Nitex）フィルターを通し、ＨＢＳＳ中の４％ＢＳＡ５ｍｌを通して遠心した。培養培地にペレットを再懸濁した後に、細胞を血球計数器で計測した。５％ウマ血清および０．５％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ/Ｆ１２培地（５０/５０ｖ/ｖ）を入れたポリ-1-オルニチン被覆-プラスチック製９６-ウェル組織培養プレートに、該細胞を４×１０^5細胞/$ｃｍ^2$で撒いた。無血清条件には、０．０５％のウシ血清アルブミンを含有するＮ２培地（ボッテンシュタイン（Bottenstein）ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユーエスエイ（Proc.Natl.Acad.Sci.USA）第７６巻：５１４-５１７頁、１９７９年）を用いた。５％CO_2/９５％空気の湿度調節した大気中、３７℃にて５日間細胞をインキュベートした。イシダ（Ishida）ら、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス（J.Neurosci.）第３巻：１８１８-１８２３頁（１９８３年）、マクマナマン（McManaman）ら、デベロプメンタル・バイオロジー（Dev.Biol.）第１２５巻：３１１-３２０頁（１９８８年）およびグリックスマン（Glicksman）ら、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー（J.Neurochem.）第６１巻：２１０-２１１頁（１９９３年）の改善法に準じ、フォナム（Fonnum）の修飾法（フォナム（Fonnum）、ジャーナル・オブ・ニューロケミストリー（J.Neurochem.）第２４巻：４０７-４０９頁、１９７５年）を用いてＣｈＡＴ活性を測定した。各ウェルから培地を完全に除去し、０．１Ｍのリン酸、ｐＨ７．４、０．１％のＮＰ-４０、０．１５ＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭの塩化コリン、１０ｍＭのＥＤＴＡ、０．１ｍＭの硫酸エセリン、３ｍＣｉ/ｍｌの［^{3}Ｈ］アセチルＣｏＡおよび１００ｍＭのアセチルＣｏＡを含有するアッセイ溶液を各ウェルに添加し、該プレートを３７℃にて１．５時間インキュベートした。試料は、１．５ｍｌのｐＨ７．４の０．１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液および１．５ｍｌのシンチレーションカクテル（１．２５ｇ/Ｌのテトラフェニルボロン、２００ｍｌアセトニトリル、３２ｍｌ/ＬのＰＰＯ-ＰＯＰＯＰを含有する８００ｍｌのトルエン）を含有するシンチレーションバイアルに移した。激しく振盪した後、非水性相に取り込まれた放射能を、パッカード・シンチレーション・カウンター（Packard Scintillation counter）（モデル２５００ＴＲ）を用いて計測した。

組換えラットＮＴ-３は、ポリヘドロン・プロモーター制御下の組換えバキュロウイルス発現ベクターを用いて産生した（フレーザー（Fraser）、イン・ビトロ・セリュリャー・アンド・ディベロプメンタル・バイオロジー（In Vitro Cell.and Dev.Biol.）第２５巻：２２５-２３５頁、１９８９年）。ラットＮＴ-３のｃＤＮＡクローンを含有するプラスミドｐＸＭ-ＮＴ３
（ハールベーク（Hallböök）ら、ニューロン(Neuron)第６巻：８４５-８５８頁、１９９１年）

は、アイラ・ブラック（Ira Black）博士（ニュージャージー州、ピスカタウェイ（Piscataway,ＮＪ）のニュージャージー医科歯科大学（University of Medicine and Dentistry of New Jersey））により提供された。ＮＴ-３ｃＤＮＡは、組換えウイルス産生のために、（カリフォルニア州、サンジエゴ（San Diego,ＣＡ）のインビトローゲン・コーポレイション（InVitrogen Corp.）社から得た）トランスファーベクターｐＶＬ１３９２にサブクローン化した。組換えバキュロウイルスは、スミス（Smith）ら、ジャーナル・オブ・バイロロジー（J.Virol.）第４６巻：５８４-５９３頁（１９８３年）のカルシウム共沈法によって、１μｇのアウトグラファ・カリフォルニカ（Autographa californica）核多核体病ウイルスＤＮＡ（インビトローゲン（InVitrogen）社またはカリフォルニア州、サンジエゴ（San Diego)のファルミンゲン（PharMingen）社によるバキュロゴールド^{TM}（Baculo-gold^{TM}））および２-４μｇのトランスファーベクターと共に、単層のスポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）昆虫細胞（Ｓｆ-２１）を同時トランスフェクトすることによって作製した。組換えプラークは、感染細胞溶解物のブロットに［^{32}Ｐ］標識ＮＴ-３配列をハイブリダイズさせることによって、組換え体であることを確認した（サマーズ（Summers）およびスミス（Smith）、ア・マニュアル・オブ・メソッズ・フォー・バキュロウイルス・ベクターズ・アンド・インセクト・セル・カルチャー・プロシーデュアズ（A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures）２９-３２頁、１９８７年）。組換えウイルスは、プラーク精製し、増幅させた。昆虫細胞系トリコプルジア・ニィ（Trichoplusia ni）Ｔｎ-５Ｂ１-４（インビトローゲン・コーポレイション（InVitrogen Corp.）社）は、０．２ｍｌ/ｃｍ^{2}のＥｘ-細胞４０１（カンザス州、レネキサ（Lenexa,KS）のジェイアールエイチ・バイオサイエンシズ（JRH Biosciences）社）において２の感染の多重度で、組換えバキュロウイルスを感染させた。ＮＴ-３を含有する条件培地は、感染４日後に採取した。ＮＴ-３を含有する約１ｌの条件培地を、２５，０００×ｇにて１５分間遠心した。次いで、上清を１ｃｍ×４ｃｍのカルボキシメチル-セファロース・ファースト・フロー・カラム（Sepharose Fast Flow column）（ニュージャージー州、ピスカタウェイ（Piscataway,NJ）のファルマシア（Pharmacia）社）に通した。カラム緩衝液（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．２）、１００ｍＭのトリス-ＨＣｌ、ｐＨ７．６中の２５０ｍＭのＮａＣｌで洗浄した後、次いで、それを１００ｍＭのトリス-ＨＣｌ、ｐＨ７．６中の５００ｍＭのＮａＣｌで溶出した。ＮＴ-３含有画分は、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（レムリ（Laemmli）、ネイチャー（Nature）第２７７巻：６８０-６８５頁、１９７０年）により同定し、続いてモリッセイ（Morrissey）、アナリィティカル・バイオケミストリー（Anal.Biochem.）第１１７巻：３０７-３１０頁（１９８１年）の方法によって銀染色して蛋白質を検出し、保存した。次いで、これらを、ライニン（Rainin）ＨＰＬＣ・オペレーティング・システムを用いた４．６×２５０ｍｍのビダック（Vydac）逆相Ｃ４カラムに付した。０．１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）および５％（ｖ/ｖ）アセトニトリル/０．１％ＴＦＡの双方で洗浄した後、０．１％ＴＦＡ中の５-６５％アセトニトリルの直線的グラジエントを用いてＮＴ-３を溶出した。ＮＴ-３を含有する画分は、加熱することなく、スピード-バック（Speed-Vac）（ニューヨーク州、ファーミンダール（Farmingdale,NY）のサバント（Savant）社）中で、真空下にて乾燥した。ＮＴ-３は、０．１％のＢＳＡを含有する１０ｍＭの酢酸に再懸濁し、分割して-７０℃にて保存した。

実施例１Ａ：ＮＴ-３により媒介されるＣｈＡＴ活性

ＮＴ-３の神経栄養因子活性は、上記の方法に従って、前脳基底野培養物におけるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｈＡＴ）活性を測定することによってアッセイした。細胞を２時間平板培養して基体に付着させた後に、示した濃度のＮＴ-３を添加した。ＣｈＡＴ活性は、イン・ビトロ（in vitro）で５日後に測定した。ＮＴ-３は、前脳基底野培養物においてＣｈＡＴ活性を用量依存的に上昇させ、１０００ｎｇ/ｍｌにおいて最大効率（１．５～２倍上昇）であった（図１）。無血清培地においては、ＮＴ-３は１０００ｎｇ/ｍｌにおいてさらに効率的であった（２～２．５倍上昇）（図１）。

実施例１Ｂ：Ｋ-２５２ａ誘導体Ｉ-１６を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

前脳基底野培養物でＮＴ-３活性を増強するＫ-２５２ａ誘導体Ｉ-１６の活性は、コリン作動性ニューロンの機能および生育の尺度としてＣｈＡＴ活性を用いて測定した。Ｉ-１６単独では、ＣｈＡＴ活性に何等影響を及ぼさなかった。しかし、ＮＴ-３存在下のＩ-１６は、ＮＴ-３単独によって誘導されたものよりもはるかに高いレベルまでＣｈＡＴ活性を用量依存的に増強させた（図２）。示した結果は、培養開始日におけるＮＴ-３およびＩ-１６の単一適用の結果であり、これは、前脳基底野コリン作動性ニューロンの生育および機能性に対する持続的効果を示している。

実施例１Ｃ：異なるＫ-２５２ａ誘導体を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

ＮＴ-３活性を促進する活性を、Ｋ-２５２ａの機能性誘導体について前脳基底野ＣｈＡＴアッセイで調べた。表３Ａおよび３Ｂのデータは、Ｋ-２５２ａ誘導体が、試験した１以上の濃度でＮＴ-３活性を有意に増強することを示している。これらのうちの２４種が、１０ｎＭのＮＴ-３で活性を示す。血清の存在または非存在下で、表に示した化合物は、ＮＴ-３単独により誘導されるＣｈＡＴ活性を超えて、ＣｈＡＴ活性を増強した。表に示した誘導体は、ＮＴ-３不存在下ではＣｈＡＴ活性に何等影響を及ぼさなかった。本発明者らのデータは、培養開始日におけるＮＴ-３および表に示した誘導体の単一適用の結果を示しており、これは、前脳基底野コリン作動性ニューロンの生育および機能に対する持続的効果を示している。方法は実施例１に詳記したものである。

表３Ａ

化合物	ＣｈＡＴ活性(％ＮＴ３) 前脳基底野培養物 10nM	100nM	300nM
IV	不活性	115	131
II-2	不活性	不活性	139
I-1	172	136	毒性
I-2	138	142	108
I-3	135	148	130
I-4	120	149	146
I-5	115	150	150
I-6	146	183	183
III-1	120	120	119
I-7	121	不活性	毒性
I-8	118	132	120

表３Ａ（続き）

化合物	ＣｈＡＴ活性(％ＮＴ３) 前脳基底野培養物 10nM	100nM	300nM
I-9	128	160	172
I-10	120	188	185
I-11	163	不活性	不活性
I-12	153	不活性	不活性
I-13	172	141	毒性
I-14	155	181	181
I-15	159	177	176
V	不活性	142	148
VI	不活性	130	129
I-16	143	196	206
II-5	不活性	122	151
I-17	154	176	127
I-18	不活性	123	149
I-19	不活性	113	116
I-20	112	128	127
I-21	165	143	不活性
III-2	159	181	177

表３Ｂ

化合物	ＣｈＡＴ活性(％ＮＴ３) 前脳基底野培養物 10nM	100nM
I-23	不活性	128
I-22	150	不活性
I-24	125	165
I-25	125	164

実施例２：ＤＲＧニューロン生育アッセイ

方法：後根神経節は、胚齢９日のニワトリ胚（ステージ３５）から切り出し、続いて、ディスパース（Dispase）（中性プロテアーゼ、コラボラティブ・リサーチ（Collaborative Research）社）処理により解離細胞を調製した。ニューロンは、低密度（１．８×10^4細胞/cm^2）にて、ポリ-1-オルニチンおよびラミニン被覆-９６ウエルプレートに撒いた。細胞は、湿度調整した５％CO_2/９５％空気中、０．０５％ウシ血清アルブミンを含有する無血清N_2培地（ボッテンシュタイン（Bottenstein）ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユーエスエイ（Proc.Natl.Acad.Sci.USA）第７６巻：５４１-５１７頁、１９７９年）中で３７℃にて４８時間培養した。細胞生育は、カルセイン生存性蛍光アッセイを用いて、４８時間目に評価した。カルセインＡＭをダルベッコウの（Dulbecco）リン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）中で２倍に希釈して、２倍の最終アッセイ濃度（６μＭ）とし、１００μｌの希釈したカルセインＡＭ

を、１００μｌの培地を含有する培養ウェルに添加した。次いで、プレートを３７℃にて１時間インキュベートした。次いで、細胞をＰＢＳで４回洗浄して、細胞により取り込まれなかった過剰なカルセインを除去した。発光＝485nm、励起＝538nmにて、ミリポア（Millipore）プレート・リーディング・フルオリメーター（サイトフルオア２３５０（Cytofluor２３５０））を用いてプレートを判読した。ブランク値（培地は含んでいるが細胞を含まないウエル）を差し引いた後の相対蛍光値は、広く（＞９５％）ニューロン培養における細胞生育の定量的測定を反映する（ボジチコ（Bozyczko）-コイネ（Coyne）ら、ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・メソッズ（J.Neuroscience Methods）第５０巻：２０５-２１６頁、１９９３年）。

実施例２Ａ：ＮＴ-３により媒介されるＤＲＧニューロン生育

ＮＴ-３のニューロン生育に対する効果は、後根神経節細胞培養物でアッセイした。細胞生育は、染料フルオレセイン・ジアセテートの類似体であるカルセインＡＭ（オレゴン州、ユジーン（Eugene,OR）のモレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社）の取り込みによって測定した。カルセインは、細胞によって取り込まれ、生きた細胞により、生細胞の完全な膜によって保持される蛍光性の塩まで細胞内で分解される。生育ニューロンの顕微鏡計数は、実施例２に記載した蛍光生存性アッセイ法を用いて得た相対蛍光値に直接相関していた。この方法により、細胞生育の信頼でき、かつ定量的な測定が提供される。後根神経節ニューロン生存性はＮＴ-３によって用量依存的に増強され、最大は５０ｎｇ/ｍｌのＮＴ-３において対照の１．６倍であった。方法は実施例２に記載したものである。

実施例２Ｂ：Ｋ-２５２ａ誘導体Ｉ-１６を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

Ｋ-２５２ａ誘導体Ｉ-１６非存在下にて、ＮＴ-３は、非処理対照培養物を４０％上回るＤＲＧ細胞生存性の増強を誘導した（図３）。１００または３００ｎＭのＩ-１６の存在下では、非処理対照培養物の２００％を超える値までＤＲＧ生存性を促進するＮＴ-３の顕著な増強能があった。ＮＴ-３の非存在下では、Ｉ-１６はＤＲＧニューロンの生存性に何ら影響を及ぼさなかった。方法は実施例２に記載したものである。

実施例２Ｃ：異なるＫ-２５２ａ誘導体を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

いくつかの異なるＫ-２５２ａ機能性誘導体について、ＮＴ-３活性を増強する活性を、ＤＲＧニューロン生存性アッセイで調べた。１００ｎＭで試験した誘導体は、ＮＴ-３活性の有意な増強を起こした。表４に掲載する化合物は、ＮＴ-３単独により誘導される増強を超えてニューロン生育を増強した。示した結果は、培養開始日における表に示した化合物の単一適用の結果であり、これは、ニューロン生育に対する持続的効果を示している。方法は実施例２に記載したものである。

表 4

化合物	DRGニューロン生育性(%NT3) 100nM
II-2	162
I-4	134
I-6	174
I-10	178
I-14	159
I-15	182
V	148
I-16	154

実施例３：ＰＣ-１２ ｔｒｋチロシン・リン酸化アッセイ

方法：（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）から得た）ＰＣ-１２細胞は、２ｍＭのグルタミン、７．５％のウマ血清、７．５％のウシ胎児血清、１ｍＭのピルビン酸ナトリウムならびにペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するダルベッコウの修飾イーグル培地（ＤＭＥＭ）中に保持した。細胞は、湿度調整した５％CO_2/９５％空気中、３７℃にてインキュベートした。亜密集細胞単層は、ビーイクルまたはＫ-２５２ａ機能性誘導体を含有する無血清ＤＭＥＭ中、３７℃にて２時間インキュベートした。示した場合には、ＮＴ-３（５０ｎｇ/ｍｌ）を３７℃にて５分間添加した。対照を含む全試料は、０．０７５％のＤＭＳＯに曝した。実験の終了までに、細胞を氷冷リン酸-緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で濯ぎ、続いてＲＩＰＡ緩衝液（１％のトリトンＸ-１００、１％のデオキシコール酸ナトリウム、０．１％のドデシル硫酸ナトリウム、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、および２０μｇ/ｍｌのアプロチニン、１ｍＭのフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）、１０μｌのロイペプチンおよび１ｍＭのバナジン酸ナトリウムを含有する１０ｍＭのトリス、ｐＨ７．５）中で溶解した。溶解物を２６ゲージの針を通過させてＤＮＡを剪断し、続いて１４，０００×ｇにて１５分間遠心した。上清を蛋白質濃度に対して正規化した。（ｔｒｋＡ、ｔｒｋＢおよびｔｒｋＣを認識する）汎-抗-ｔｒｋ抗体を溶解物に添加し、４℃にて２時間インキュベートした後に、プロテインＡ-セファロース（Sepharose）ビーズ上に免疫複合体を収集した。蛋白質は、４×レムリ緩衝液（レムリ（Laemmli）、ネイチャー（Nature）第２７７巻：６８０-６８５頁、１９７０年）でビーズから溶出し、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ＰＶＤＦ膜に移した。該膜は抗-ホスホチロシン抗体（ＵＢＩ）でプローブした。抗体結合性は、増強された化学ルミネッセンス（イーシイエル・キット（ECL Kit)、アマーシャム，インコーポレイテッド（Amersham,Inc.）社）によって視覚化した。

実施例３Ａ：異なるＫ-２５２ａ誘導体を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

クロム親和性細胞腫（ＰＣ-１２）細胞を、ビーイクル（＜０．１％のＤＭＳＯ）またはＫ-２５２ａ機能性誘導体と共に２時間インキュベートした。次いで、細胞をＮＴ-３の非存在下または存在下で５分間インキュベートした。細胞を溶解し、汎-抗-ｔｒｋ抗体で免疫沈降させた。ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、二フッ化ポリビニリデン（ＰＶＤＦ）膜に移した。膜を抗-ホスホチロシン抗体でイムノブロットして、チロシンリン酸化ｔｒｋを視覚化させた。ｔｒｋの

自己リン酸化は、非処理細胞では全く観察されなかった（図５、レーン１）。いずれのＫ-２５２ａ機能性誘導体も存在しない場合、ＮＴ-３はｔｒｋの検出できるチロシンリン酸化を誘導しなかった（レーン２）。同様にして、ＮＴ-３の非存在下では、３００ｎＭのＫ-２５２ｂも（レーン３）、１０および１００ｎＭの化合物Ｉ-１６またはＩ-１０もｔｒｋの自己リン酸化を引き起こさなかった（レーン４-７）。しかしながら、ＮＴ-３＋３００ｎＭのＫ-２５２ｂ（レーン８）、または１００ｎＭの化合物Ｉ-１０（レーン１０）もしくは１００ｎＭの化合物Ｉ-１６（レーン１２）の組合せにおいては、ｔｒｋの際立ったチロシン・リン酸化を起こした。ＮＴ-３と１０ｎＭの化合物Ｉ-１０または化合物Ｉ-１６（レーン９および１１）とのインキュベーションにより、ｔｒｋチロシン・リン酸化の小さいが測定可能な上昇が得られた。

実施例４：ｔｒｋ受容体-特異的細胞分裂促進アッセイ

方法：ラットｔｒｋＡ、ｔｒｋＢおよびｔｒｋＣを別々に過剰発現するクローンＮＩＨ-３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ１６５８）は、トランスフェクションおよび選抜により得た。ｔｒｋＡ用（ジーンバンク（Genebank）受託番号Ｌ１４４４５；バレンズエラ，ディ・エム（Valenzuela,D.M.）ら、ニューロロジー（Neuro.）第１０巻、１頁、１９９３年参照）；ｔｒｋＢ用（ジーンバンク（Genebank）受託番号Ｌ１４４４６；バレンズエラ（Valenzuela）、前掲参照およびｔｒｋＣ用（ジーンバンク（Genebank）受託番号Ｌ０３８１３；マーリオ，ジェイ・ピイ（Merlio,J.P.）ら、ニューロロジー（Neuro.）第５１巻、５１３頁、１９９２年参照）の平滑末端化ラットｃＤＮＡを、ベクターｐＭＥＸ-neo（ｐＭＥＸ-ｎｅｏの記載に関しては、コー，シィ・ジェイ（Kho,C.J.）およびザービル，エイチ（Zarbl,H.）、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・イン・ユウエスエイ（ＰＮＡＳ）第８９巻、２２００頁、１９９２年参照）のＥｃｏＲＩ部位（塩基対１２１５）に別々に挿入した。ｔｒｋＣ用のラットｃＤＮＡは、さらに、ジーンバンク（Genebank）受託番号Ｌ１４４４７下で入手可能である；（バレンズエラ（Valenzuela）、前掲参照）。ｐＭＥＸ-ｎｅｏ：ｔｒｋＡ、ｐＭＥＸ-ｎｅｏ：ｔｒｋＢ；およびｐＭＥＸ-ｎｅｏ：ｔｒｋＣベクターによるＮＩＨ-３Ｔ３細胞のトランスフェクションは、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）、ジェイ・サムブルック（J.Sambrook）、イー・エフ・フリッシュ（E.F.Fritsch）およびティ・マニアティス（T.Maniatis）、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Labratory Press）、１９８９年に一般的に記載されているトランスフェクション・プロトコールに従った。トランスフェクト細胞系は、ニューロトロフィンの特異的ｔｒｋ受容体への結合により媒介される細胞分裂促進の判断に利用した。

以下のプロトコールを、細胞分裂促進アッセイに用いた：特定のベクターでトランスフェクトしたＮＩＨ-３Ｔ３細胞を、０．０５％のウシ血清アルブミンを含有するＮ２培地（ボッテンシュタイン（Bottenstein）、前掲）１００μｌ中、1×10^{4}細胞/ウェルの濃度で/９６ウェルにて２４時間平板培養した。しかる後、培地を除去し、以前に測定した最大応答濃度の特定のニューロトロフィンの存在下、示した濃度（０．１ｎＭ；１．０ｎＭ；１０ｎＭ；および１００ｎＭ）（各ウェル中、０．０２５％のＤＭＳＯ最終濃度）の示したＫ-２５２ａ誘導体を含有するＮ２培地５０μｌで置き換え（各ウエルの合計容量：５０μｌ）、続いて、１．５μＣｉの^{3}Ｈ-チミジン/ウエルを２４時間添加した。しかる後、細胞をブランデル（Brandel）装置（モデル番号ＭＢ-４８Ｒ）でガラス繊維フィルター上のＰＢＳに採取し、溶解し、１０％のトリクロロ酢酸で固定し、続いてＰＢＳで濯いだ。次いで、フィルターを取り除き、標識トリチウムの取り込みを計数（パカード（Packard）・モデル番号トリ-カーブ（Tri-Carb）２５００ＴＲ）するための、４ｍｌのエコセーフ・シンチラント（Ecosafe Scintillant）（リサーチ・プロダクツ・インターナショナル（Research Products Int.）カタログ番号１１１１９５）で置き換えた。

実施例４Ａ：異なるＫ-２５２ａ誘導体を用いたＮＴ-３のニューロトロフィン誘導活性の増強

前記した方法に従い、種々の濃度のＫ-２５２ａ誘導体を分析して、ｐＭＥＸ-ｎｅｏ：ｔｒｋＡ細胞系（前記したごとく、好ましいｔｒｋＡ-リガンドはＮＴ-３ではなくＮＧＦで

ある）を用いて、ＮＴ-３のｔｒｋＡへの結合により媒介される細胞分裂促進の増強を測定した。
予め決定した非処理細胞に比しての最大応答濃度は、以下のごとく測定した；ｔｒｋＡに対するＮＧＦ結合については、０．１ｎｇ/ｍｌのＮＧＦにより、（溶解細胞におけるトリチウム標識チミジンの取込みにより測定される）細胞分裂促進は非処理対照に比して７．１倍増強された；かくして、ｔｒｋＡについては、（ｔｒｋＡについての好ましいリガンドであるＮＧＦにより判明した）最大応答は７．１であった。ｔｒｋＡに対するＮＴ-３結合性については、５００ｎｇ/ｍｌおよび１０００ｎｇ/ｍｌの間の濃度が、ＮＧＦ結合性で観察された最大応答を達成するのに必要であった（データは示さず）。
これらの分析では、ＮＴ-３の濃度を１００ｎｇ/ｍｌに維持した。結果を表５に示す；示した値は、非処理対照に比しての細胞分裂促進における「増強の倍数」。１．５を超える値を、示したＫ-２５２ａ誘導体の存在下のｔｒｋＡのＮＴ-３結合による細胞分裂促進の増強として任意に定義した。細胞分裂促進アッセイで正の効果を有しないＫ-２５２ａを対照に用いた。「ＮＴ」なる語は、「試験せず」を示す。

表　5
細胞分裂促進アッセイ

	化合物／誘導体の濃度			
化合物／誘導体	0.1 nM	1.0 nM	10 nM	100 nM
K-252a	1.0	1.4	1.4	0.6
II-5	1.3	1.5	1.6	3.2
I-7	1.7	2.9	4.4	4.4
I-16	2.9	4.3	3.7	5.0
I-15	4.1	4.1	5.3	4.9
I-6	3.2	4.3	3.1	0.9
I-14	1.9	5.0	7.4	5.2
V	NT	NT	3.4	6.0
VI	NT	NT	1.9	7.1

Ｋ-２５２ａ機能性誘導体の合成
代表的なＫ-２５２ａ誘導体の化学合成を以下に概説する。Ｋ-２５２ａのさらなる誘導体は、当業者に知られている方法を用いた化学合成によって、デ・ノボ（de novo）にて調製できる。例えば、式Ｉで表される化合物の調製に用いる方法は、（出典明示して、本明細書の一部とみなす）ムラカタ（Murakata）ら（米国特許第４，９２３，９８６号および米国特許第４，８７７，７７６号）により記載されている。式IIで表される化合物の調製に用いる方法は、ムーディー（Moody）ら（ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー（J.Org.Chem.）第５７巻：２１０５-２１１４頁、１９９２年、ステグリッチ（Steglich）ら、アンギュ・ケム・イント・エド・イングル（Angew.Chem.Int.Engl.）第１９巻：４５９-４６０頁、１９８０年）、ナカニシ（Nakanishi）ら、（ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス（J.Antibiotics）第３９巻：１０６６-１０７１頁、１９８６年）および特開昭６０-２９５１７３号、６２-３２７８５８号、６２-３２７８５９号および６０-２５７６５２号に記載されている。
代表的なＫ-２５２ａ誘導体の化学合成および分析
化合物番号は、表１に掲載したＫ-２５２ａ誘導体を示す。
化合物IVの調製
$POCl_3$（０．２８ｍｌ、３ミリモル）および化合物（Ａ）（３１１ｍｇ、１ミリモル

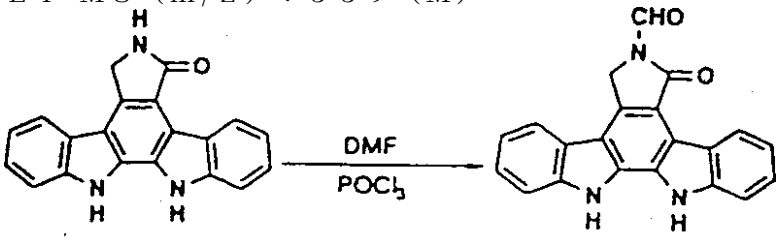
）を、氷冷下、２０ｍｌのジメチルホルムアミドに添加し、続いて９０℃にて４時間撹拌した。沈澱を濾過によって収集し、水およびメタノールで順次洗浄して２５０ｍｇの化合物IVを得た（収率７４％）。

出発物質化合物（Ａ）は、ナカニシ（Nakanishi）らにより、ジャーナル・オブ・アンチバイオティックス（J.Antibiotics）第３９巻：１０６６-１０７１頁、１９８６年に記載されている。

核磁気共鳴分光学（ＮＭＲ）および質量分析（ＭＳ）によって、以下の特性値を得ることができる：

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

ＥＩ-ＭＳ（ｍ/ｚ）：３３９（Ｍ）$^+$



(A) IV

化合物Ｖの調製

化合物（Ｂ）（２０８ｍｇ、０．６１ミリモル）を２０ｍｌのテトラヒドロフランに溶解し、次いで、７４ｍｇ（１．８３ミリモル）の水素化ナトリウム（６０％）をそれに添加し、続いて室温にて１０分間撹拌した。臭化アリル（０．０６３ｍｌ、０．７３ミリモル）をそれに添加し、該混合物を室温にて１５時間撹拌した。塩化アンモニウムの飽和水溶液を該溶液に添加し、有機層を食塩水溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去させた後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）に付して、１３５ｍｇの化合物（Ｃ）を得た（収率５８％）。

ＮＭＲによって、化合物Ｃについて以下の特性値を得ることができる：

^{1}H-ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$＋ＤＭＳＯ-d_6；４/１）δ（ｐｐｍ）：３．０４（３Ｈ，ｓ），４．８０-５．２０（４Ｈ，ｍ），５．９６-６．４０（１Ｈ，ｍ），７．２８-７．７２（６Ｈ，ｍ），９．１８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ），９．２０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ），９．８４（１Ｈ，ｓ）

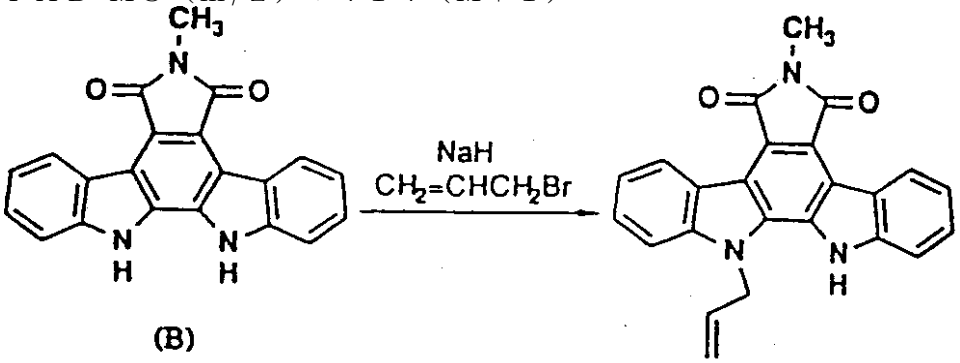
化合物（Ｃ）（１４５ｍｇ、０．３８ミリモル）を７ｍｌのテトラヒドロフランおよび０．５ｍｌのピリジンの混合液に溶解し、次いで、２００ｍｇの四酸化オスミウムをそれに添加し、続いて室温にて６時間撹拌した。チオ硫酸ナトリウム（３４８ｍｇ）、７ｍｌの水、および７ｍｌのピリジンを反応溶液に添加し、続いて室温にて１時間撹拌した。希釈用のテトラヒドロフランをその溶液に添加し、その混合液を重炭酸ナトリウムの飽和水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去させた後に、残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホル/メタノール＝９７/３）に付して９３ｍｇの化合物Ｖを得た。

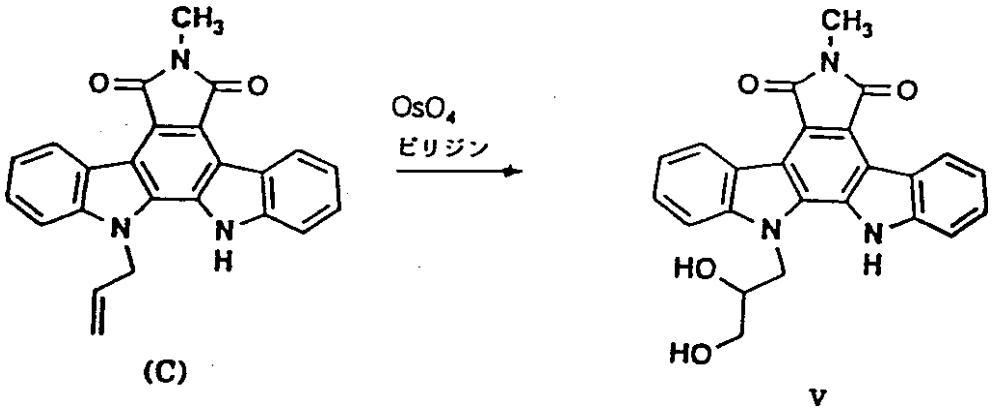
出発物質化合物（Ｂ）は、グリブル（Gribble）およびバーセル（Berthel）により、テトラヘドロン（Tetrahedron）第４８巻：８８６９頁（１９９２年）に記載されている。

ＮＭＲおよびＭＳによって、以下の特性値を得ることができる：

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

ＦＡＢ-ＭＳ（m/z）：４１４（Ｍ＋１）$^{+}$





化合物VIの調製

化合物（Ｄ）は、３～５当量の塩基の存在下、化合物（Ｂ）と２～４当量の臭化アリルとを反応させることによって調製できる。塩基の例としては、水素化ナトリウムのごときアルカリ金属水素化物がある。反応溶媒としては、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド等を用いる。反応は、-１０～４０℃にて０．５～１５時間で完了する。

化合物VIは、化合物（Ｄ）を２～４当量の酸化剤で処理することによって得ることができる。酸化剤の例は、OsO_4である。反応溶媒としては、テトラヒドロフランおよびピリジンの混合溶媒等を用いる。ピリジンに対するテトラヒドロフランの比は、１/２０～１/５である。反応は、０～４０℃にて３～８時間で完了する。

ＮＭＲおよびＭＳを用いることによって、化合物（Ｄ）に関する以下の特性値を得ることができる：

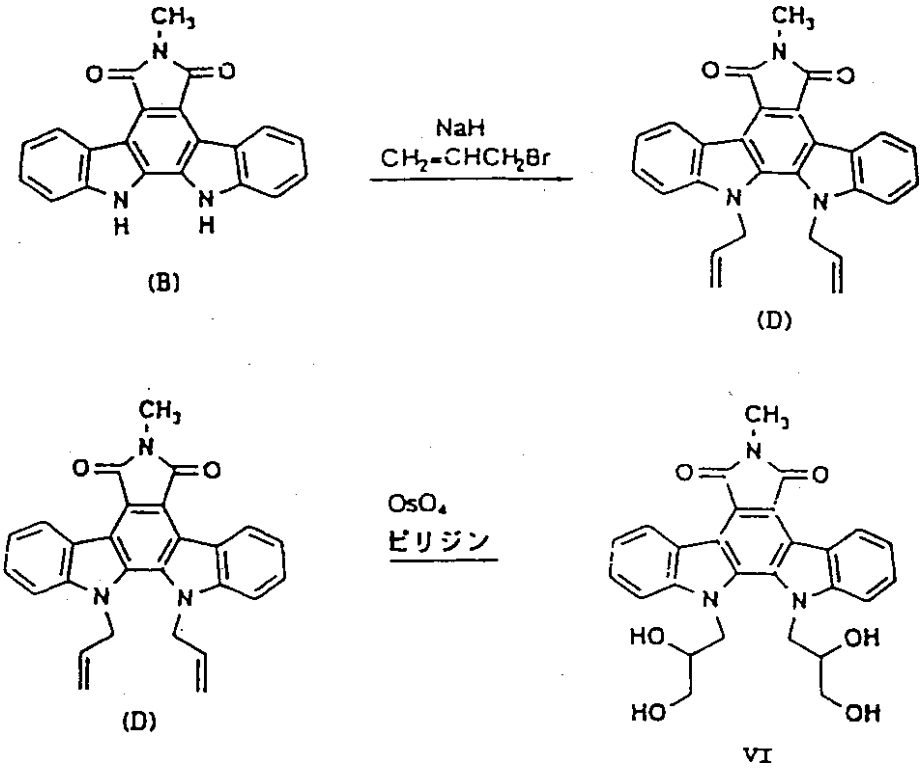
^{1}Ｈ-ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_3$）δ（ｐｐｍ）：３．２１（３Ｈ，ｓ），４．９２-６．４０（１０Ｈ，ｍ），７．４０-７．６４（６Ｈ，ｍ），９．３２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ）

ＥＩ-ＭＳ（m/z）：４１９（Ｍ）$^{+}$

ＮＭＲおよびＭＳを用いることによって、化合物（VI）に関する以下の特性値を得ることができる：

^{1}Ｈ-ＮＭＲ（ＤＭＳＯ-ｄ$_6$）δ（ｐｐｍ）：２．９６５（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝５．５Ｈｚ），３．１３９（２Ｈ，ｍ），３．１９６（１．５Ｈ，ｓ），３．１９８（１．５Ｈ，ｓ），３．６２６（２Ｈ，ｍ），４．６５１-４．９４５（４Ｈ，ｍ），７．３９９（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝７．２Ｈｚ），７．６１２（２Ｈ，ｄｔ，Ｊ＝１．２，７．２Ｈｚ），７．８２８（２Ｈ，ｔ，Ｊ＝８．７Ｈｚ），９．１４２（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ）

ＦＡＢ-ＭＳ（m/z）：４８８（Ｍ＋１）$^{+}$



化合物Ｉ-９およびＩ-１４の調製

化合物（Ｅ）（図６および特開昭６３-２９５５８９号参照）（４９．３ｍｇ、０．１ミリモル）を３ｍｌのジオキサンに溶解し、次いで、０．１ｍｌのヒドラジン水和物をそれに添加し、続いて１１０℃にて２時間撹拌した。溶媒を留去させた後に、残渣にメタノールを添加し、沈澱を濾過により収集して４０ｍｇの化合物Ｉ-９を得た。

^{1}Ｈ-ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$）δ（ｐｐｍ）：１．１９（３Ｈ，ｓ），１．３６（３Ｈ，ｓ），２．３０（３Ｈ，ｓ），２．４５（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝５．０，１４．０Ｈｚ），２．９１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝７．０，１４．０Ｈｚ），４．１０（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ），４．５４（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．０Ｈｚ），６．３３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝５．０，７．０Ｈｚ），７．２２-７．８６（６Ｈ，ｍ），８．９７（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ），９．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ）

ＳＩＭＳ（ｍ/ｚ）：５０９（Ｍ＋１）$^{+}$

氷冷下、２０ｍｌのピリジンにクロム酸（２．８ｇ、２８ミリモル）を添加し、次いで、１．９８ｇ（４ミリモル）の化合物（Ｆ）（図６および特開昭６３-２９５５８９号参照）を含有する５ｍｌのピリジンをそれに添加し、続いて室温にて１２時間撹拌した。該溶液をセライト（Celite）を通して濾過した後に、溶媒を留去させ、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）に付して０．９８ｇの化合物（Ｇ）を得た（収率４８％）。図６参照。

ＮＭＲを用いることによって、化合物（Ｇ）に関する以下の特性値を得ることができる：

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

化合物（Ｇ）（３０５ｍｇ、０．６ミリモル）を６ｍｌのジメチルホルムアミドに溶解し、次いで、氷冷下３６ｍｇ（０．９ミリモル）の水素化ナトリウム（６０％）をそれに添加し、続いて同温度にて１０分間撹拌した。それにヨウ化メチル（０．０５６ｍｌ、０．９ミリモル）を添加し、該混合液を同温度にて３０分間撹拌した。塩化アンモニウム（１ｍｌ）の飽和水溶液および１０ｍｌの水を該溶液に添加し、濾過によって沈澱を採取した。

かく得た生成物を、２５ｍｌのクロロホルム、１ｍｌのメタノール、および１ｍｌの３Ｎ ＨＣｌの混合液に溶解し、該溶液を６０℃にて１０分間撹拌した。該溶液を重炭酸ナトリウムの飽和水溶液で洗浄し、次いで、該有機層に１０ｍｌのテトラヒドロフラン、１０ｍｌのメタノール、および１．５ｍｌの２Ｎ ＮａＯＨを添加し、続いて室温にて１０分間撹拌し、溶媒を留去させた。それに希釈用のクロロホルムを添加した後に、該混合液を５％クエン酸水溶液および食塩水溶液で順次洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去させた後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール＝９８/２）に付して、１０２ｍｇの化合物Ｉ-１４を得た（収率３６％）。ＮＭＲおよびＭＳを用いることによって、化合物Ｉ-１４に関する以下の特性値を得ることができる：

^{1}Ｈ-ＮＭＲ（ＣＤＣｌ$_{3}$＋ＤＭＳＯ-ｄ$_{6}$；４／１）δ（ｐｐｍ）：２．２４（３Ｈ，ｓ），３．１８（３Ｈ，ｓ），４．８１（１Ｈ，ｔ，Ｊ＝６．０Ｈｚ），６．８３（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ＝５．０，７．０Ｈｚ），７．２４-８．０８（６Ｈ，ｍ），９．０６（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ），９．２５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ）

ＥＩ-ＭＳ（ｍ/ｚ）：４６７（Ｍ＋１）$^{+}$

化合物Ｉ-１５およびＩ-２１の調製

化合物（Ｈ）（図７およびＷＯ ８８/０７０４５参照）（１１２ｍｇ、０．２ミリモル）を２ｍｌのジメチルホルムアミドに溶解し、次いで、１９５ｍｇ（２ミリモル）の塩酸エタノールアミンおよび０．６１ｍｌ（４ミリモル）の１，８-ジアザビシクロ［５，４，０］-７-ウンデセンをそれに添加し、続いて室温にて３日間撹拌した。溶媒を留去させた後に、残渣をシリカゲル・カラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール＝９８/２）に付して、７５ｍｇの化合物Ｉ-１５を得た（収率２５％）。

ＮＭＲおよびＭＳを用いることによって、以下の物性値を得ることができる：

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

ＳＩＭＳ（ｍ/ｚ）：４９８（Ｍ＋１）$^{+}$

化合物（Ｊ）（図７および特開昭６３－１５５２８５号参照）（８９０ｍｇ、１．５ミリモル）を、１０ｍｌのジメチルホルムアミドに溶解し、次いで、１．４３ｇ（１５ミリモル）の塩酸エチルアミンおよび２．２８ｍｌ（１５ミリモル）の１，８-ジアザビシクロ［５．４．０］-７-ウンデセンをそれに添加し、続いて室温にて２．５時間撹拌した。１０ｍｌの水を該溶液に添加し、濾過により沈殿を収集して７２９ｍｇの化合物（Ｋ）を得た。図７参照。

ＮＭＲを用いることによって以下の特性値を得ることができる：

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

化合物（Ｋ）（６５０ｍｇ、１．３９ミリモル）を７ｍｌのジメチルホルムアミドに溶解し、次いで、６７５ｍｇ（４．１６ミリモル）のカルボニルジイミダゾールをそれに添加し、続いて氷冷下で３．５時間撹拌した。１０ｍｌの水を該溶液に添加した後に、濾過によって沈殿を収集し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール＝９７/３）に付して３９５ｍｇの化合物（Ｌ）を得た（収率５８％）。図７参照。

ＮＭＲを用いることによって以下の特性値を得ることができる：

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

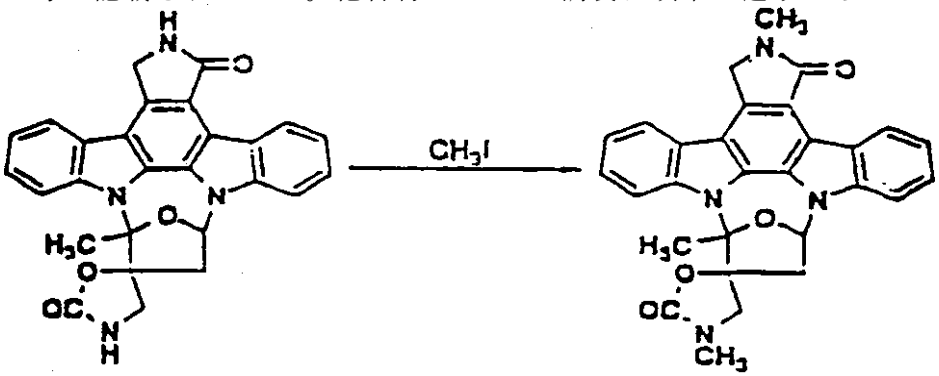
氷冷下、クロム酸（０．４９ｇ、４．９ミリモル）を４ｍｌのピリジンに添加し、次いで、３４５ｍｇの化合物（Ｌ）を含有する２ｍｌのピリジンをそれに添加し、続いて室温にて１２時間撹拌した。溶液をセライトを通して濾過した後に、溶媒を留去させ、残渣をクロロホルム/メタノールから再結晶化させて、２７２ｍｇの化合物Ｉ-２１を得た（収率２１％）。

ＮＭＲを用いることによって以下の特性値を得ることができる：

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

化合物Ｉ-２２、Ｉ-２３、Ｉ-２４およびＩ-２５の調製

化合物Ｉ-２２の調製は、ムラカタ（Murakata）らにより、米国特許第４，９２３，９８６号に記載されている。化合物Ｉ-２３およびＩ-２５の調製は、特開昭６３－２９５５８８号に記載されている。化合物Ｉ-２４の調製は以下の通りである：



化合物　M　　化合物　I-24

化合物Ｍ（特開昭６２－１５５２８５号）（１ｇ、２．２ミリモル）を３０ｍｌのジメチルホルムアミドに溶解し、次いで、０．６８ｍｌ（１１ミリモル）のヨウ化メチルおよび３ｍｌの２０％水酸化カリウム水溶液をそれに添加し、続いて室温にて２０分間撹拌した。該反応混合液に水を添加し、濾過によって沈殿を収集し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（２％メタノール/クロロホルム）に付して２０４ｍｇの化合物Ｉ-２４を得た（収率１９％）。

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

化合物III-１およびIII-２の調製

化合物III-１およびIII-２の調製は特開平５－２４７０５６号に記載されている。

本発明をかなり詳細に開示してきたが、当業者の範囲内にある同等のものおよび修飾もこの開示および以下の請求の範囲の一部と理解される。

【図１】

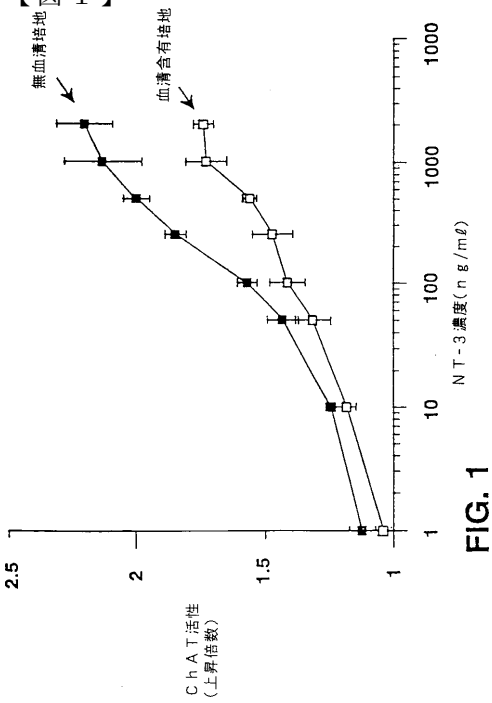


FIG. 1

【図２】

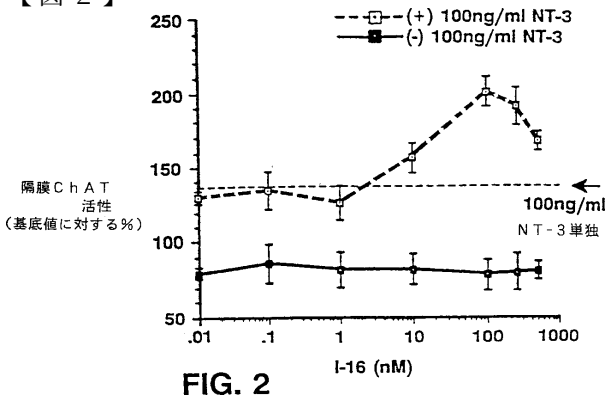


FIG. 2

【図３】

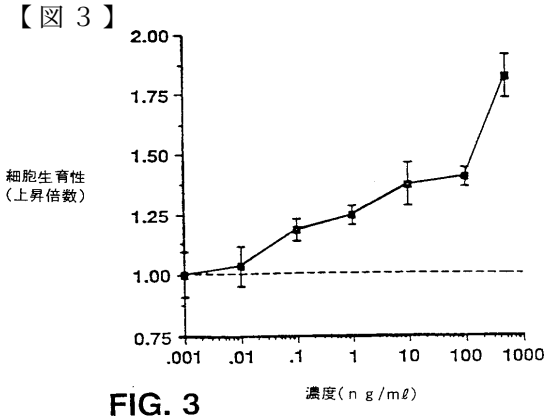


FIG. 3

【図４】

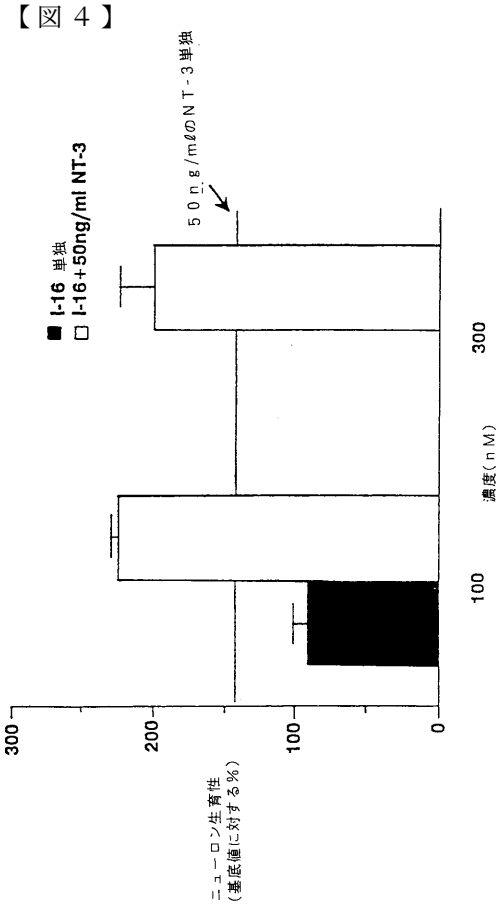


FIG. 4

【図５】

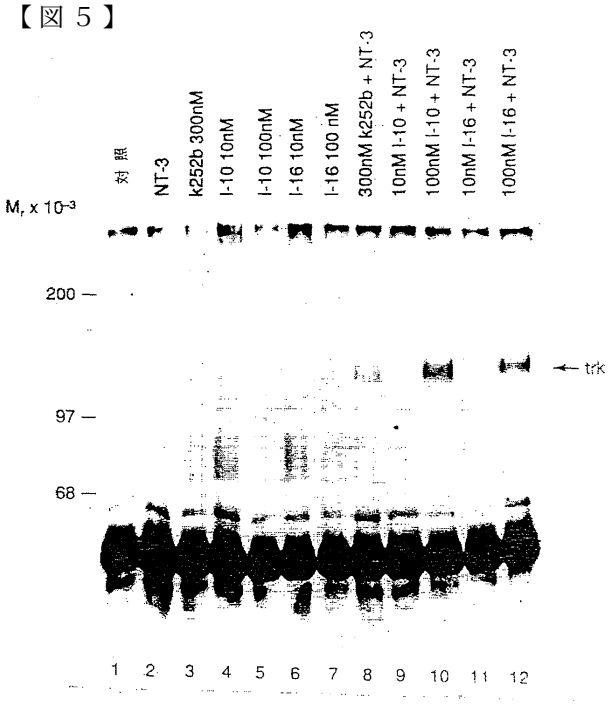


FIG. 5

【図６】

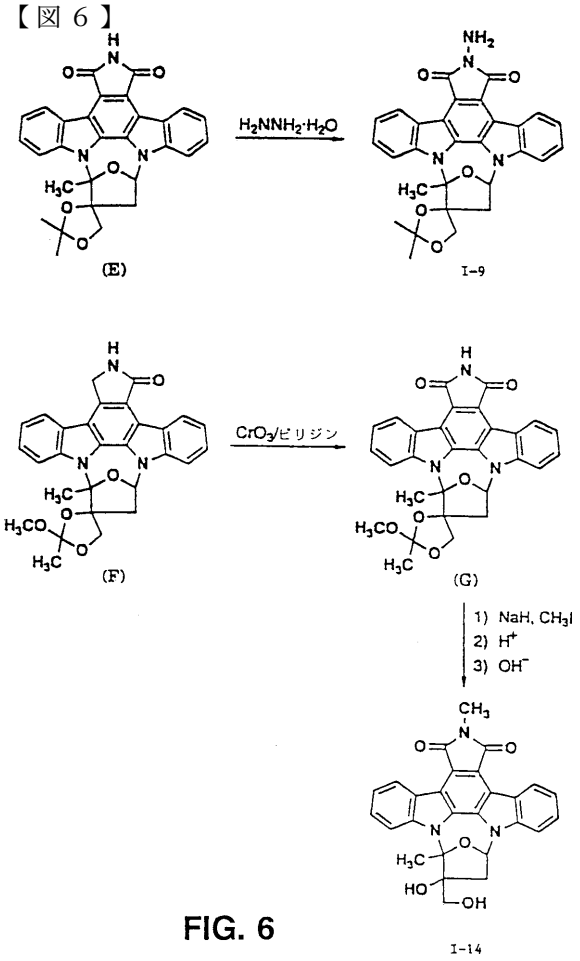


FIG. 6

【図７】

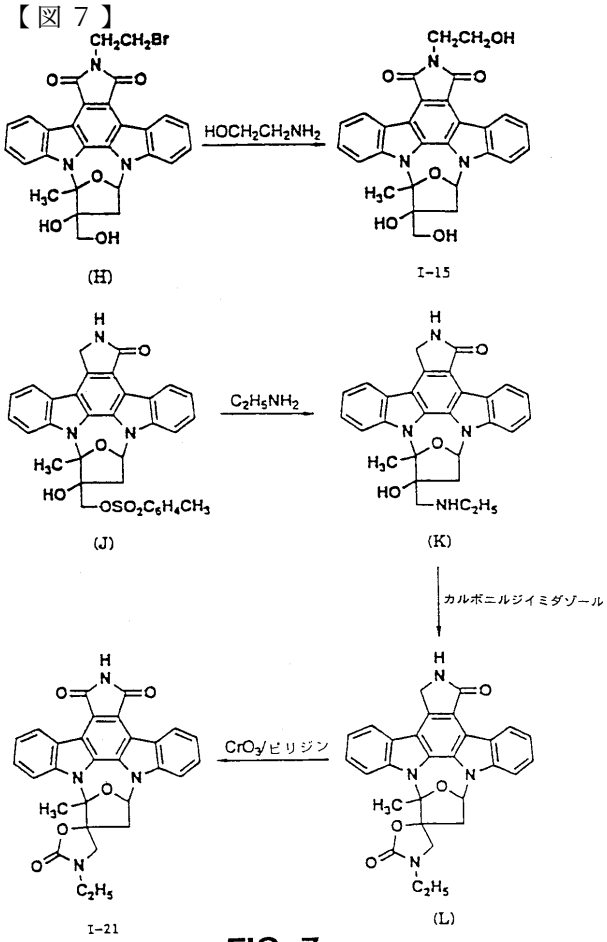


FIG. 7

フロントページの続き

(72)発明者　グリックスマン，マーシー・エイ
アメリカ合衆国１９０８１ペンシルベニア州、スワルスモア、ブリン・モール・アベニュー５３１番
(72)発明者　ロテラ，デビッド・ピー
アメリカ合衆国１９３３５ペンシルベニア州、ダウニントン、アッシュコム・ドライブ１４００番
(72)発明者　ネフ，ニコラ
アメリカ合衆国１９０８６ペンシルベニア州、ローズ・バレー、トッドモーデン・ドライブ５９番
(72)発明者　村形　力
東京都八王子市別所２－１１－２－７０２
(72)発明者　ハドキンス，ロバート・エル
アメリカ合衆国１９４２５ペンシルベニア州チェスター・スプリングス、サドルブルック・サークル４３９番

審査官　關　政立

(56)参考文献　特開平０２－１４９５２０（ＪＰ，Ａ）
特表平０７－５０８２６８（ＪＰ，Ａ）
特表平０８－５０１０８０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９３／００８８０９（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07D487/14
A61K 31/407
CA(STN)
REGISTRY(STN)