

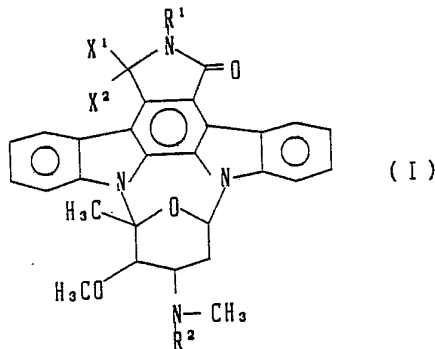


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類<sup>4</sup> C07D 498/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 89/ 07105</p> <p>(43) 国際公開日 1989年8月10日(10.08.89)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00086 (22) 国際出願日 1989年1月30日(30. 01. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-24571 (32) 優先日 1988年2月4日(04. 02. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 村形 力(MURAKATA, Chikara)(JP/JP) 〒351 埼玉県朝霞市根岸台2-1-47-302 Saitama, (JP) 佐藤 幸(SATO, Akira)(JP/JP) 〒194 東京都町田市木曽町1880-30 Tokyo, (JP) 河西政次(KASAI, Masaji)(JP/JP) 〒251 神奈川県藤沢市鶴沼松ヶ岡3-12-15 Kanagawa, (JP) 森本 真(MORIMOTO, Makoto)(JP/JP) 〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩203-5 Shizuoka, (JP) 秋永士朗(AKINAGA, Shiro)(JP/JP) 〒411 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 Shizuoka, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), IT(欧州特許), JP, LU(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: STAUROSPORIN DERIVATIVES

(54) 発明の名称 スタウロスポリン誘導体

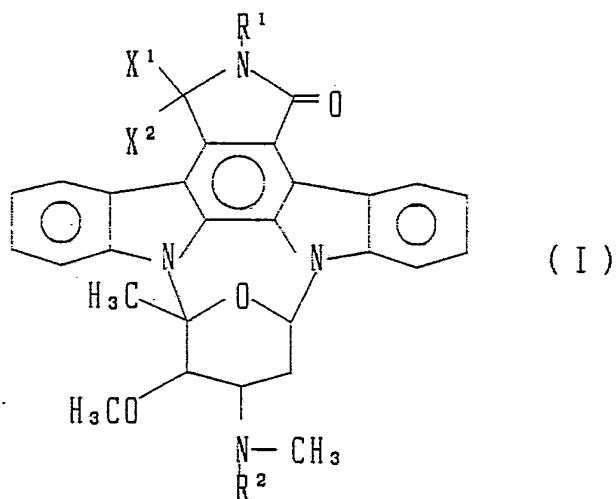


(57) Abstract

Novel staurosporin derivatives represented by formula (I) (wherein R<sup>1</sup> represents hydrogen, lower alkyl, formyl or amino, R<sup>2</sup> represents hydrogen, formyl, lower alkanoyl or a group formed by removing a hydroxy moiety from the carboxyl group of an α-amino acid whose amino group may optionally be protected, one of X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> represents hydrogen and the other represents hydrogen, hydroxy, lower alkoxy or lower alkylthio, or X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> are taken together to form oxygen, provided that, when R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are both hydrogen atoms and one of X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> is hydrogen, the other represents a group other than hydrogen or hydroxy) and their pharmacologically acceptable salts are disclosed. These compounds inhibit protein kinase C and have a cell growth inhibiting activity.

(57) 要約

本発明は、プロテインキナーゼCを阻害し、細胞生育阻害活性を有する下式 (I) で表わされる新規なスタウロsporin誘導体およびその薬理上許容される塩に関する。



(式中、R<sup>1</sup> は水素、低級アルキル、ホルミルまたはアミノを表わし、R<sup>2</sup> は水素、ホルミル、低級アルカノイルまたはα-アミノ酸のカルボキシル基のヒドロキシル部分を除く基を表わし、該アミノ酸のアミノ基は保護基で保護されていてもよく、X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は一方が水素で、他方が水素、ヒドロキシル、低級アルコキシルまたは低級アルキルチオであるか、もしくは両者が一体となって酸素を表わす。但し、同時に R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> が水素で X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> の一方が水素の場合、他方は水素またはヒドロキシル以外の基である)

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウエー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

## 明 細 書

## スタウロスポリン誘導体

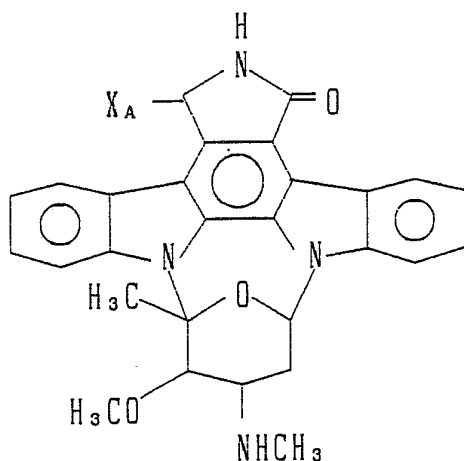
技 術 分 野

本発明はプロテインキナーゼCを阻害し、細胞生育阻害活性を有する新規なスタウロスポリン誘導体に関する。

背景技術

プロテインキナーゼCは、細胞の増殖や発癌機構に関与していると考えられている〔例えば、Science, 225, 1365(1984)〕。従って、プロテインキナーゼC活性を、その特異的阻害剤等を用いることにより人為的に抑制することができれば、腫瘍などの予防、治療が可能になると期待される。

一方、スタウロスポリン (Staurosporine)は次式で表わされる抗生物質であり、



スタウロスポリン:  $X_A = H$   
 UCN-01 :  $X_A = OH$

各種細菌に対し抗菌活性を有する他、HeLa細胞、ヒト白血病細胞等に対し細胞生育阻害活性を有することが知られている〔J. Antibiotics,

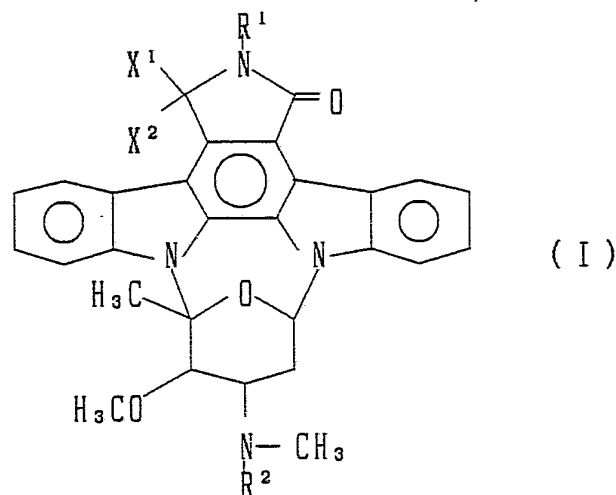
30, 275 (1977); J. Chem. Soc. Chem. Commun., 800 (1978); 特開昭60-185719号公報]。

また、スタウロスポリンの類似化合物として抗腫瘍活性を有するUCN-01が知られている (特開昭62-220196号公報)。

本発明の目的はプロテインキナーゼCを阻害し、優れた細胞生育阻害活性を有するスタウロスポリン誘導体を提供することにある。

### 発 明 の 開 示

本発明は式 (I)



(式中、 $R^1$  は水素，低級アルキル，ホルミルまたはアミノを表わし、 $R^2$  は水素，ホルミル，低級アルカノイルまたは $\alpha$ -アミノ酸のカルボキシル基のヒドロキシル部分を除く基を表わし、該アミノ酸のアミノ基は保護基で保護されていてもよく、 $X^1$  および  $X^2$  は一方が水素で、他方が水素，ヒドロキシル，低級アルコキシルまたは低級アルキルチオであるか、もしくは両者が一体となって酸素を表わす。但し、同時に  $R^1$  および  $R^2$  が水素で  $X^1$  および  $X^2$  の一方が水素の場合、他方は水素またはヒドロキシル以外の基である) で表わされるスタウ

ロスポリン誘導体〔以下、化合物（I）という。他の式番号の化合物についても同様である〕およびその薬理的に許容される塩に関する。

式（I）中の各基の定義において、低級アルキル、低級アルコキシルおよび低級アルキルチオにいう低級アルキル部分は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐のアルキル、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチルおよび *tert*-ブチル等を包含する。R<sup>2</sup>の定義中、低級アルカノイルは炭素数2～5の直鎖もしくは分岐のアルカノイル、例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリルおよびバレリル等を包含する。R<sup>2</sup>の定義中、 $\alpha$ -アミノ酸はグリシン、アラニン、プロリン等をまたアミノ基の保護基としてはベンジルオキシカルボニルまたは *t*-ブトキシカルボニル等を包含する。

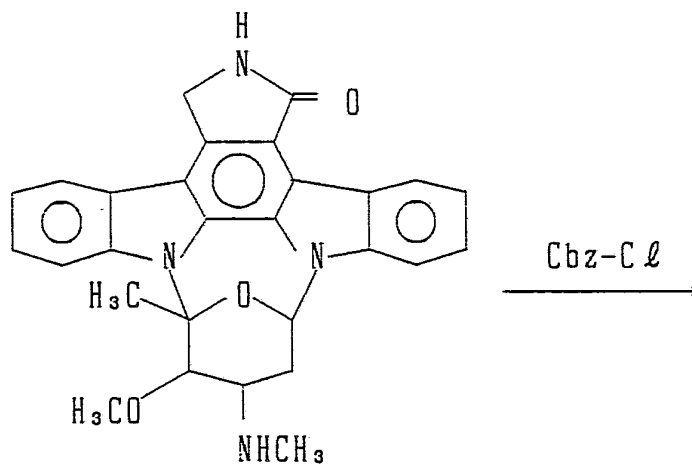
化合物（I）が塩基性化合物の場合には酸付加塩を形成させることができる。化合物（I）の酸付加塩としては塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等があげられる。非毒性の薬理的許容される塩、例えば上記に列挙の酸付加塩が好ましいが、生成物の単離、精製にあたってはその他の塩もまた有用である。

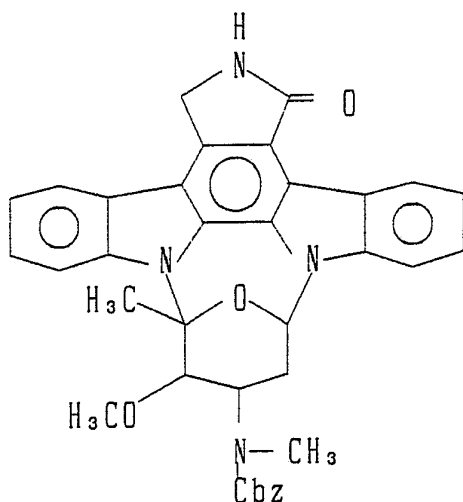
本発明による化合物は、通常は光学活性であるスタウロスポリンを出発化合物として得られるものであるが、全ての可能な立体異性体およびそれらの混合物も本発明に包含される。

次に化合物 (I) の製造方法について説明する。しかし、化合物 (I) の製造方法は、それらに限定されるものではない。

なお、以下に示した製造方法において、定義した基が実施方法の条件下変化するかまたは方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される方法、例えば官能基の保護、脱保護等の手段〔例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス、グリーン著、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (1981年) 参照〕に付すことにより容易に実施することができる。

例えば原料化合物スタウロsporin (II a) にアミノ基の保護基として常用されるベンジルオキシカルボニルクロライド (Cbz-Cl) を反応させれば化合物 (II b) を得る。





( II b )

反応は化合物 ( II a ) をアセトン—水の混合溶媒中、適当な塩基、例えば炭酸水素ナトリウム存在下 C b z — C l と氷冷下で 0.5 ~ 1 時間反応させることにより化合物 ( II b ) を得る。

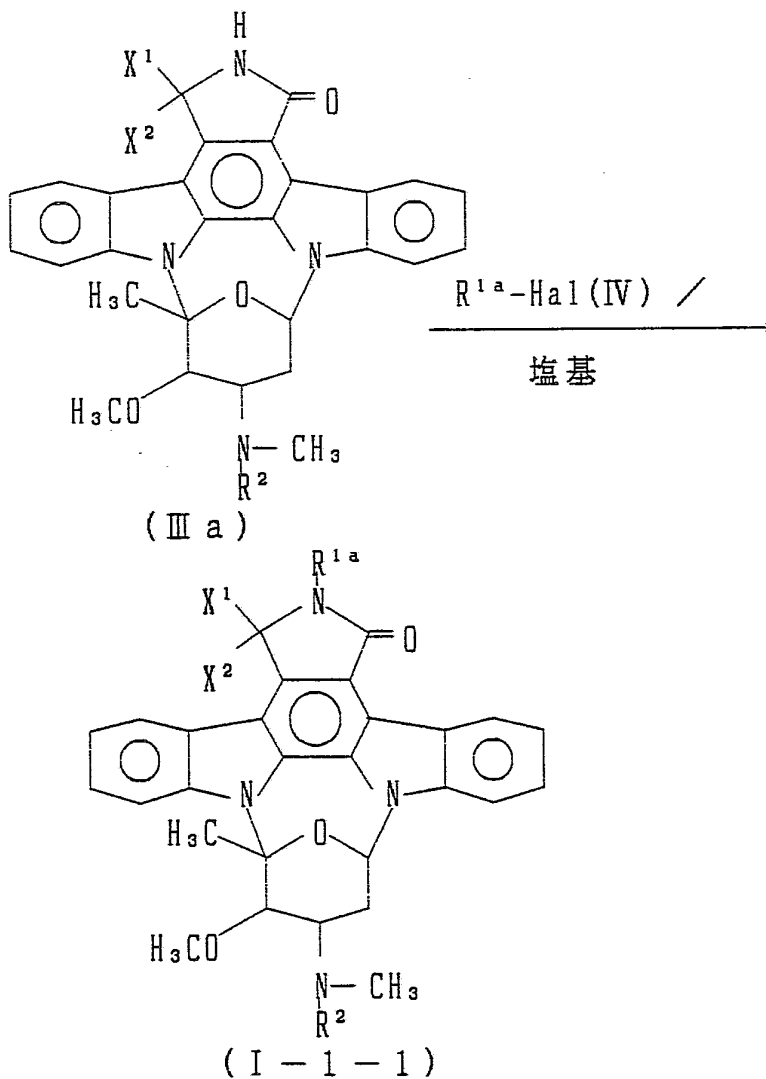
化合物 ( II a ) に対し塩基は 1 ~ 5 当量、C b z — C l は 1 ~ 1.5 当量用いられる。

次いで化合物 ( II b ) を以下に記載の方法 1 または 3 の反応に付した後、脱保護すれば目的化合物を得ることができる。

脱保護の方法は、常用される還元法、例えば接触還元法により還元することにより目的化合物を得る。反応はテトラヒドロフラン ( T H F ) , ジメチルホルムアミド ( D M F ) 等の不活性溶媒中、通常 5 ~ 10 % パラジウム / 炭素等の触媒を用い、水素雰囲気中室温下 1 時間 ~ 1 日で終了する。

方法 1 :  $R^1$  を修飾した化合物 (I-1) の合成

1-1 :  $R^1$  が低級アルキルの化合物 (I-1-1)



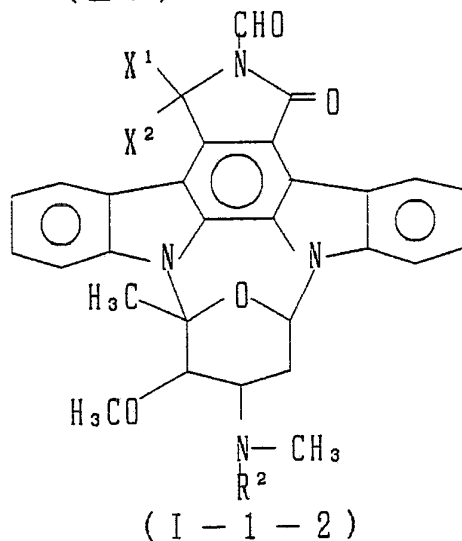
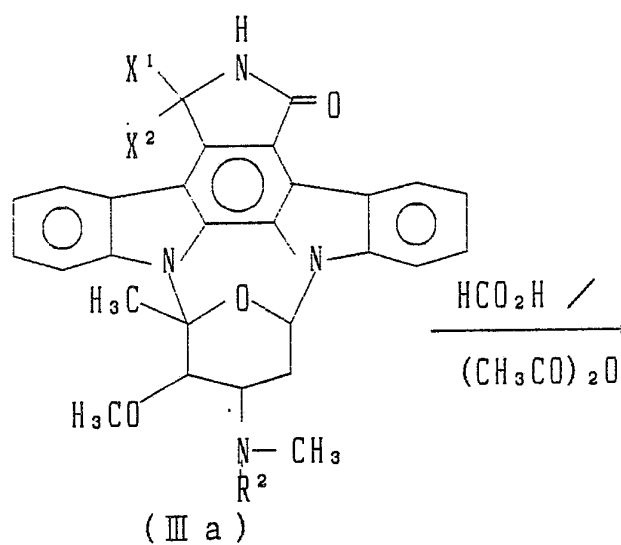
(式中、 $R^2$ 、 $X^1$  および  $X^2$  は前記と同義であり、 $R^{1a}$  は  $R^1$  の定義中の低級アルキルを、Hal は塩基、臭素またはヨウ素のハロゲンを表わす)

反応は化合物 (III a) [化合物 (I) で  $R^1$  が水素である化合物、化合物 (II a) および (II b) など] を DMF 溶媒中適当な塩基、例えば水素化ナトリウムの 1~1.5 当量存在下、氷冷下に



アルキルハライド (IV) の 1 ~ 10 当量と反応させることにより化合物 (I-1-1) を得ることができる。反応は通常 15 分 ~ 12 時間で終了する。

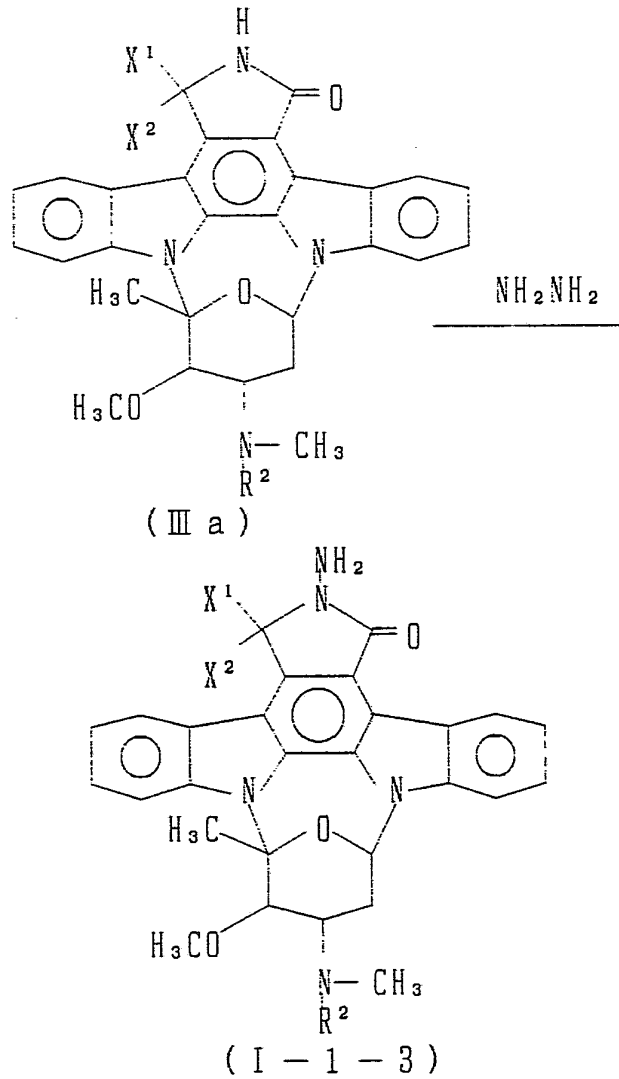
1-2 : R<sup>1</sup> がホルミルの化合物 (I-1-2)



(式中、R<sup>2</sup>、X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は前記と同義である)

化合物 (III a) を溶媒を兼ねて大過剰量のギ酸および無水酢酸と室温下 12 ~ 24 時間反応させることにより化合物 (I-1-2) を得ることができる。

1-3 : R<sup>1</sup> がアミノの化合物 (I-1-3)

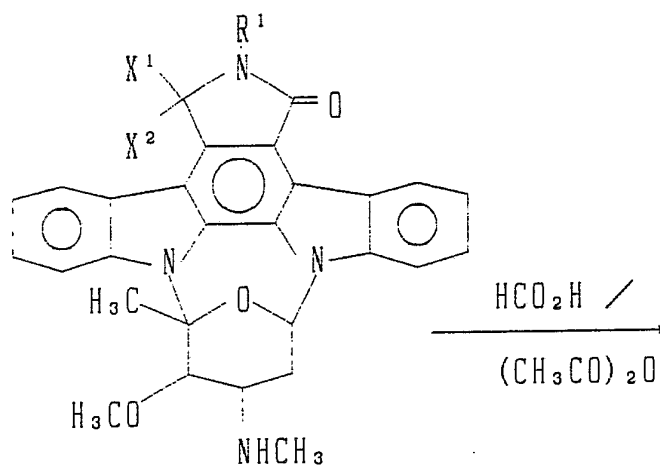


(式中、R<sup>2</sup>, X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>は前記と同義である)

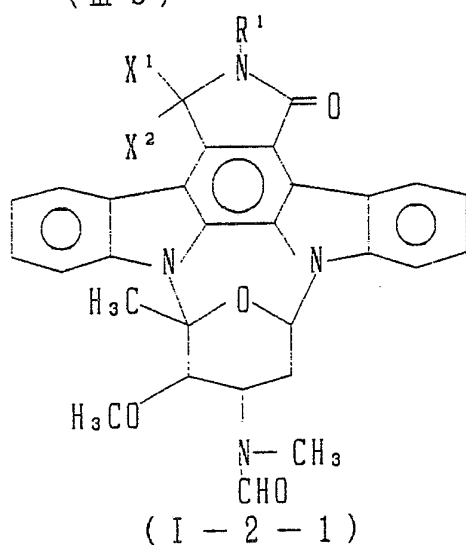
化合物(III a)を不活性溶媒、例えばジオキサン中、10～50当量の抱水ヒドラジンと70～110℃で1～2日間反応させることにより化合物(I-1-3)を得ることができる。

方法 2 :  $R^2$  を修飾した化合物 (I-2) の合成

2-1 :  $R^2$  がホルミルの化合物 (I-2-1)



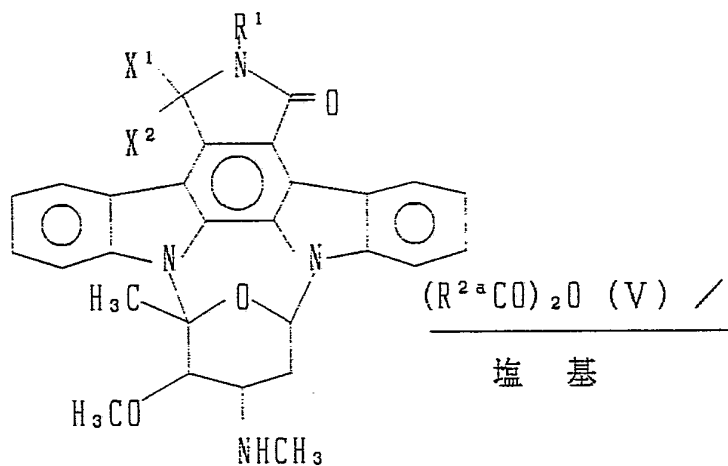
(III b)



(式中、 $R^1$ ,  $X^1$ および $X^2$ は前記と同義である)

反応は化合物 (III b) [化合物 (I) で $R^2$  が水素である化合物および (II a) など] より、方法 1-2 と同様の方法により化合物 (I-2-1) を得ることができる。

2-2 :  $R^2$  が低級アルカノイルの化合物 (I-2-2)



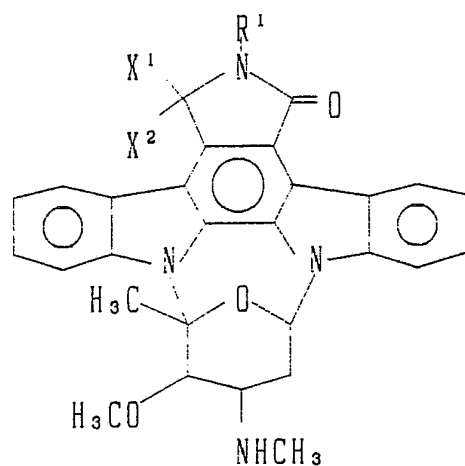
(式中、 $R^1$ 、 $X^1$ および $X^2$ は前記と同義であり、 $R^{2a}$ は低級アルキルを表わす)

ここで、低級アルキルは各基の定義におけるアルキルと同義である。

反応は、化合物 (III b) と適当な塩基、例えばピリジン中、酸無水物 (V) とを室温下 12 ~ 24 時間反応させることにより化合物 (I-2-2) を得ることができる。化合物 (V) は化合物

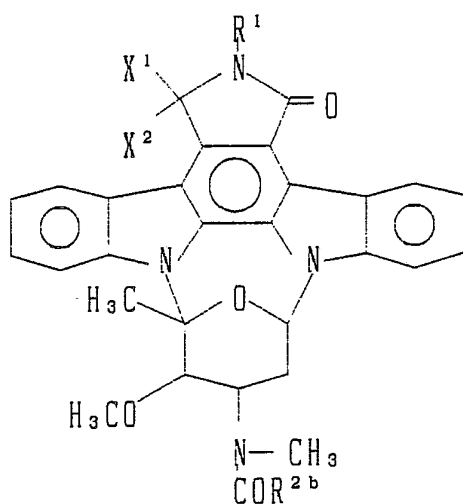
(III b) に対し 1 ~ 5 当量用いられる。

2-3 :  $R^2$  がアミノ酸由来のアシル基の化合物 (I-2-3)



(III b)

i) N-保護アミノ酸 (VI)/DCC  
 [ii) 脱保護]



(I-2-3)

(式中、 $R^1$ ,  $X^1$ および $X^2$ は前記と同義であり、 $R^{2b}$ は $\alpha$ -アミノ酸のアミノ基は保護されていてもよいカルボキシル基を除

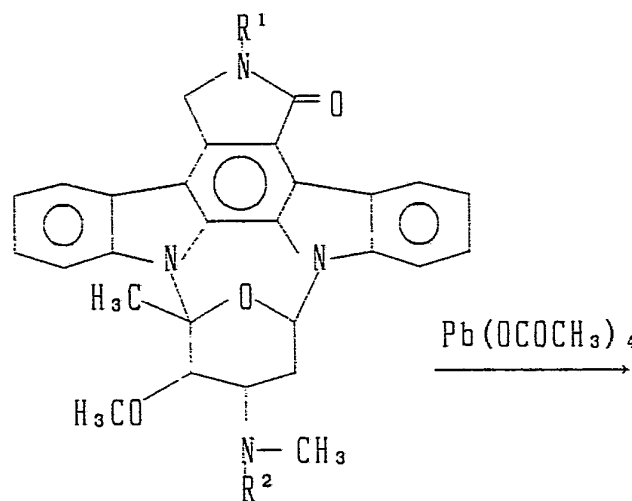
いた部分の基を表わす)

化合物 (III b) と N-保護されたアミノ酸 (VI) とを THF 溶媒中、N-オキシコハク酸イミドおよびジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いて縮合させることにより化合物 (I-2-3) を得ることができる。化合物 (III b) に対し、化合物 (VI) は 1~2 当量、N-オキシコハク酸イミドは 1 当量、DCC は 1~2 当量用いられる。反応は通常 0℃~室温で行われ 1 時間~1 日で終了する。

なお、遊離のアミノ基を有する化合物 (I-2-3 a) を所望の場合は、常法により脱保護すればよい。例えば保護基がベンジルオキシカルボニルの場合、例えば前記したと同様の接触還元法により還元することにより化合物 (I-2-3 a) を得ることができる。

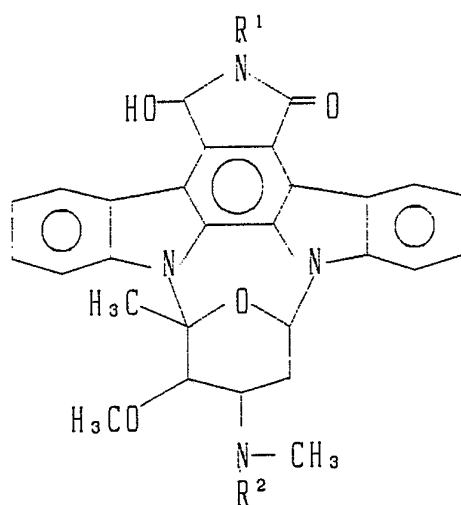
### 方法 3 : X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> を修飾した化合物 (I-3) の合成

#### 3-1 : X<sup>1</sup> または X<sup>2</sup> がヒドロキシルの化合物 (I-3-1)



(I a)

13

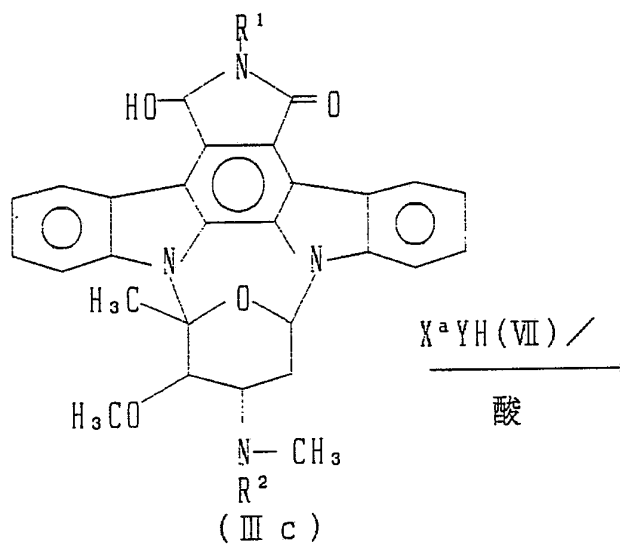


( I - 3 - 1 )

(式中、 $R^1$  および  $R^2$  は前記と同義である)

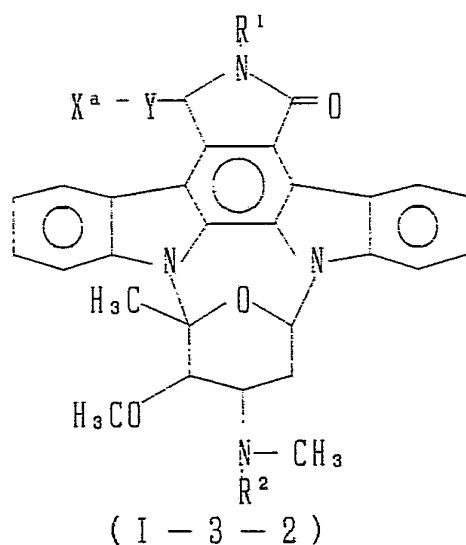
反応は化合物 (I a) [化合物 (I) で  $X^1$  および  $X^2$  が水素である化合物] と四酢酸鉛を酢酸中で室温下 7 ~ 10 時間反応させることにより化合物 (I - 3 - 1) を得ることができる。四酢酸鉛は化合物 (I a) に対し 1 ~ 2 当量用いられる。

3 - 2 :  $X^1$  または  $X^2$  が低級アルコキシルまたは低級アルキルチオの化合物 (I - 3 - 2)



( III c )

14



(式中、 $R^1$  および  $R^2$  は前記と同義であり、 $X^a$  は低級アルキルを表わし、 $Y$  は酸素または硫黄を表わす)

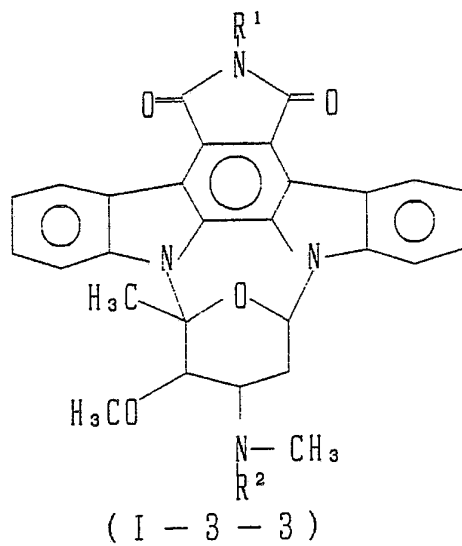
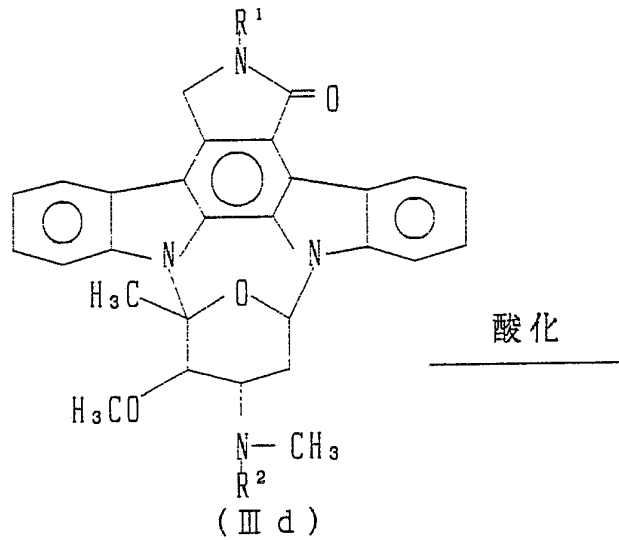
ここで、低級アルキルは各基の定義におけるアルキルと同義である。

反応は化合物 (III c) [化合物 (I-3-1) および UCN-01 あるいはその異性体など] と化合物 (VII) とを適当な酸触媒、例えばカンファースルホン酸存在下適当な不活性溶媒、例えば THF 中反応させることにより化合物 (I-3-2) を得ることができる。

化合物 (III c) に対し、化合物 (VII) は当量以上、好ましくは大過剰量、酸触媒は 0.02 ~ 0.05 当量用いられる。反応は通常室温で行われ、0.5 ~ 1 時間で終了する。



3-3 :  $X^1$  および  $X^2$  が一体となって酸素である化合物 (I-3-3)



(式中、 $R^1$  および  $R^2$  は前記と同義である)

反応は化合物 (III d) [化合物 (I) で  $X^1$  および  $X^2$  が水素の化合物、化合物 (II a) および (II b) など] をピリジン溶媒中、適当な酸化剤、例えばクロム酸で  $0^\circ\text{C}$  ~ 室温の範囲内で1日反応させることにより化合物 (I-3-3) を得ることができる。

酸化剤は化合物（Ⅲ d）に対し 5～7 当量用いられる。

上記した方法 1～3 を適宜組合わせて実施することにより、所望の位置に所望の官能基を有する化合物（I）を得ることができる。

上記各工程終了後の生成物の単離、精製は通常の有機合成で用いられる方法、例えば抽出、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組合わせ行うことができる。

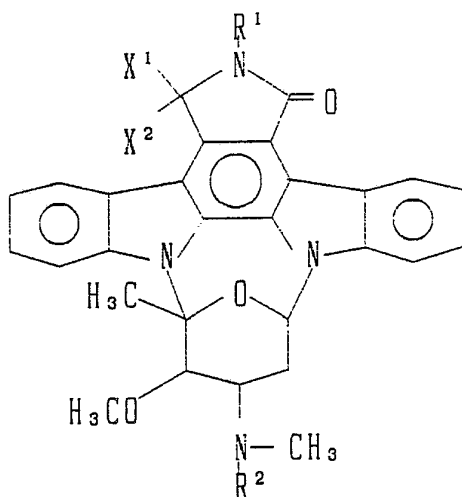
化合物（I）は、顕著な細胞生育阻害活性を示し、従って化合物（I）を有効成分とする抗腫瘍剤が提供される。

化合物（I）を抗腫瘍剤として用いる場合には、各々の化合物を、0.01～20 mg/kg の投与量で、生理食塩水、ブドウ糖、ラクトース、マンニット注射液などに溶解して注射剤として通常静脈内に投与する。また日本薬局方に基づいて凍結乾燥してもよいし、塩化ナトリウムを加えた粉末注射剤としてもよい。さらに医薬品的用途を満たした塩類のような、よく知られた薬学的に許容されている希釈剤、補助剤および/または担体を含んでもよい。注射剤として使用する場合には溶解度を高めるための助剤を併用するのが望ましい場合がある。投与量は年齢や症状により適宜増減できる。投与スケジュールも症状や投与量によって変えることができるが、たとえば 1 日 1 回（単回投与または連日投与）、週 1～3 回あるいは 3 週間に 1 回などの間歌投与がある。また同様の投与量で動脈、腹腔、胸腔内に投与することもできる。また経口投与あるいは直腸投与も可能であり、それらに際しては適当な

補助剤と共に、錠剤，粉剤，粒剤，シロップ剤あるいは坐剤等として投与できる。

次に上記製法によって得られる化合物（I）の代表例を第1表に、その中間体を第2表に示す。またこれらの化合物（I）の製造例を実施例に、その中間体の製造例を参考例に、代表的化合物（I）の生理活性を実験例にそれぞれ示す。

第 1 表



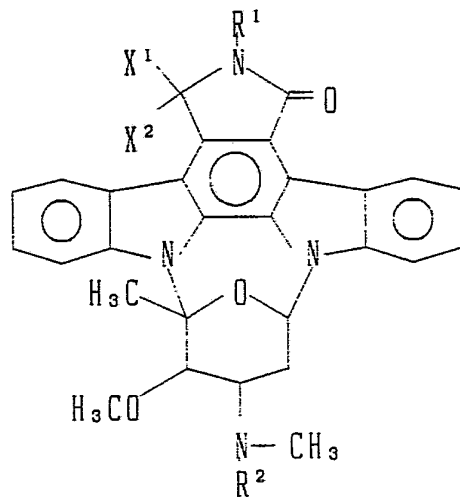
実施例 番号	化合物 番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	塩
1	1	CH <sub>3</sub>	H	H	H	
2	2	CHO	CHO	H	H	
2	3	H	CHO	H	H	
3	4	CHO	H	H	H	
4	5	NH <sub>2</sub>	H		= O	HCℓ
5	6	H	COCH <sub>3</sub>	H	H	
6	7	H	COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	H	
7	8	H	CO-n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	
8	9	H	COCH <sub>2</sub> NHCbz**	H	H	
9	10	H	COCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H	H	HCℓ
10	11*	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	
11	12*	H	H	SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	

18

12	13	H	COCH <sub>3</sub>	= O	
13	14	CH <sub>3</sub>	H	= O	
14	15	H	H	= O	
15	16	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
15	17	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
16	18*	H	H	O-i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
17	19*	H	H	O-n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H
18	20*	H	H	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H

\* 約 1 : 1 のジアステレオマー混合物  
 \*\* C b z はベンジルオキシカルボニルを意味する  
 (以下の記載においても同様である)

第 2 表 (中間体)



化合物 番号	参考例番号 (実施例番号)	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>
a	1	H	Cbz	H	H
b	(1)	CH <sub>3</sub>	Cbz	H	H
c	(3)	CHO	Cbz	H	H
d	2	H	H	OH	H
e	(13)	CH <sub>3</sub>	Cbz	= O	
f	(14)	H	Cbz	= O	

## 実施例 1

参考例 1 で得られる化合物 a, 360 mg (0.6 mmol) を DMF 18 ml に溶解し、60%水素化ナトリウム 36 mg (0.9 mmol) を加え 10 分攪拌し、ついでヨウ化メチル 0.054 ml (0.9 mmol) を加え室温下 0.5 時間攪拌した。反応溶液に水 5 ml とクロロホルム 30 ml を加え有機層を分取し、飽和食塩水で洗浄後無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去後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) で精製し化合物 b, 312 mg (85%) を得た。

化合物 b :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.64 (s, 3H), 2.20-3.04 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.90- 3.24 (m, 1H), 4.68-5.20 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 6.72 (t, 1H), 7.20-7.92 (m, 11H), 7.98 (d, 1H, J=8Hz), 9.60 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 615 (M+1) $^+$

上記化合物 b, 70 mg (0.11 mmol) を DMF 3 ml に溶解し、10%パラジウム/炭素 60 mg を加え、水素を通気しながら 40℃で 1 時間攪拌した。反応溶液はセライトを通し口過し、溶媒を減圧下留去した。残渣を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) で精製し、化合物 1, 27 mg (51%) を得た。

化合物 1 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.56 (s, 3H), 2.20-3.00 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 3.20-3.50 (m, 2H), 3.38 (s, 6H), 3.87 (d, 1H, J=4Hz), 4.96 (s, 2H), 6.54 (m, 1H), 7.20-8.08 (m, 7H), 9.52 (d, 1H, J=8Hz)

EI-MS (m/z); 480 (M<sup>+</sup>)

### 実施例 2

スタウロスポリン 249 mg (0.5 mmol) をギ酸 3 ml および無水酢酸 1 ml に溶解し、室温下一夜攪拌した。反応溶液に水 20 ml およびクロロホルム 30 ml を加え有機層を分取した。ついで飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後溶媒を減圧下留去した。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) で精製し、化合物 2, 25 mg (9%) および化合物 3, 33 mg (12.5%) を得た。

#### 化合物 2 :

<sup>1</sup>H-NMR (CDC<sub>3</sub>) δ ; 2.30 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.20-2.86 (m, 2H), 3.96 (br. s, 1H), 4.72-5.36 (m, 3H), 6.68 (m, 1H), 7.12-8.04 (m, 7H), 8.14 (s, 1H), 9.25 (d, 1H, J=8Hz), 9.37 (s, 1H)

SI-MS (m/z); 523 (M+1) <sup>+</sup>

#### 化合物 3 :

<sup>1</sup>H-NMR (CDC<sub>3</sub>) δ ; 2.28-2.88 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 3.95 (d, 1H, J=2Hz), 4.76-5.16 (m, 1H), 4.94 (s, 2H), 6.54 (br. s, 1H), 6.65 (br. t, 1H), 7.04-7.60 (m, 5H), 7.72 (d, 1H, J=8 Hz), 7.88 (d, 1H, J=8Hz), 8.11 (s, 1H), 9.44 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 495 (M+1) <sup>+</sup>

### 実施例 3

化合物 a, 120 mg (0.2 mmol) より実施例 2 と同様の方法で化合物 c, 50 mg (40%) を得た。

精製することなく、上記化合物 c, 50 mg より、実施例 1 と同様の接触還元法により化合物 4, 30 mg (77%) を得た。

化合物 4 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ +DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ; 1.60 (s, 3H), 2.20-3.00 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 3.20-3.64 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.92 (d, 1H, J=4Hz), 5.04 (s, 2H), 6.48 (m, 1H), 7.12-8.08 (m, 7H), 9.10 (d, 1H, J= 8Hz), 9.25 (s, 1H)

SI-MS (m/z); 495 (M+1)<sup>+</sup>

実施例 4

実施例 1 4 で得られる化合物 1 5, 240 mg (0.5 mmol) をジオキサン 15 ml に溶解し、抱水ヒドラジン 1.21 ml を加え、100℃で2日間加熱した。溶媒を減圧留去し、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/28% アンモニア水=97/3/0.1) で精製し、1.7 規定塩酸/酢酸エチルで塩酸塩とし化合物 5, 207 mg (84%) を得た。

化合物 5 :

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ; 1.92-2.76 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.67 (br. s, 3H), 3.84-4.50 (m, 4H), 4.60 (br. s, 2H), 6.94 (m, 1H), 7.28-7.72 (m, 5H), 8.08 (d, 1H, J=8Hz), 9.09 (d, 1H, J= 8Hz), 9.30 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 496 (M+1)<sup>+</sup>

## 実施例 5

スタウロスポリン 50 mg をピリジン 3 ml に溶解し、無水酢酸 0.1 ml を加え室温下 3.5 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣にクロロホルム 10 ml を加え、5% 塩酸、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後溶媒を減圧下留去し、化合物 6, 27 mg (50%) を得た。

## 化合物 6 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 2.00-2.96 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 4.01 (d, 1H, J=3Hz), 4.99 (s, 2H), 5.23 (m, 1H), 6.70 (t, 1H), 7.16-8.00 (m, 7H), 8.68 (m, 1H), 9.50 (dd, 1H, J=2, 8Hz)

SI-MS (m/z); 509 (M+1)  $^+$

## 実施例 6

スタウロスポリン 249 mg (0.5 mmol) と無水プロピオン酸を用い実施例 5 と同様の方法で化合物 7, 80 mg (29%) を得た。

## 化合物 7 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.16 (t, 3H, J=8Hz), 2.04-2.92 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 4.00 (br. s, 1H), 4.97 (s, 2H), 5.20 (m, 1H), 6.68 (m, 2H), 7.16-7.60 (m, 5H), 7.74 (d, 1H, J=8Hz), 7.90 (d, 1H, J=8Hz), 9.44 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 523 (M+1)  $^+$

## 実施例 7

スタウロスポリン 249 mg (0.5 mmol) と無水酪酸を用い実施例 5



と同様の方法で化合物 8, 60 mg (21%) を得た。

化合物 8 :

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ; 0.98 (t, 3H,  $J=8\text{Hz}$ ), 1.66 (m, 2H), 2.20-3.00 (m, 4H), 2.46 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 4.03 (br. s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.96-5.36 (m, 1H), 6.44 (br. s, 1H), 6.72 (t, 1H,  $J=8\text{Hz}$ ), 7.20-7.60 (m, 5H), 7.75 (dd, 1H,  $J=2, 8\text{Hz}$ ), 7.93 (d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ ), 9.45 (d, 1H,  $J=7\text{Hz}$ )

SI-MS ( $m/z$ ); 537 ( $M+1$ )<sup>+</sup>

#### 実施例 8

スタウロスポリン 466 mg (1 mmol) を THF 25 ml に溶解し、N-Cbz-グリシン 522 mg (2.5 mmol)、N-メチルモルホリン 0.32 ml (3 mmol) および N-ヒドロキシコハク酸イミド 32.7 mg (2.5 mmol) を加え、氷冷下 DCC 515 mg (2.5 mmol) の THF 10 ml 溶液を加えた。室温下一夜攪拌した後反応溶液をセライトを通し口過し、溶媒を減圧下留去した。残渣を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) で精製し化合物 9, 690 mg (100%) を得た。

化合物 9 :

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ; 2.20-3.20 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 3.95 (d, 1H,  $J=6\text{Hz}$ ), 4.05 (br. s, 1H), 4.24-4.84 (m, 1H), 4.96 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.52 (m, 1H), 6.80 (t, 3H,  $J=8\text{Hz}$ ), 7.16-8.00 (m, 12H), 9.37 (d, 1H,  $J=8\text{Hz}$ )

SI-MS ( $m/z$ ); 656 ( $M-1$ )<sup>-</sup>, 657 ( $M^+$ ), 658 ( $M+1$ )<sup>+</sup>

## 実施例 9

実施例 8 で得られる化合物 9, 660 mg より実施例 1 と同様の接触還元法で化合物 10, 120 mg (21%) を得た。

化合物 10 :

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ; 2.16-2.90 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.68 (s, 3H),  
2.78 (s, 3H), 3.00-3.68 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 4.16 (br. s, 1H), 5.00  
(br. s, 2H), 6.84-8.60 (m, 11H), 9.26 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 524 (M+1)<sup>+</sup>

## 実施例 10

参考例 2 で得られる化合物 d, 30 mg (0.06 mmol) を THF 3 ml に溶解し、メタノール 1 ml およびカンファースルホン酸 18.6 mg (0.08 mmol) を加え、1 時間加熱還流した。反応溶液に酢酸エチル 20 ml を加え、飽和重曹水, 飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣を高速液体クロマトグラフィーで精製し、化合物 11, 24 mg (81%) を立体異性体の混合物として得た。

化合物 11 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ; 1.54 および 1.57 (s, 3H), 2.27 および 2.36 (s, 3H),  
2.38-2.45 (m, 2H), 2.68-2.77 (m, 1H), 3.07 および 3.14 (s, 3H), 3.55  
(m, 1H), 3.38 および 3.41 (s, 3H), 3.87 (m, 1H), 6.21 および 6.23 (s, 1  
H), 6.54 および 6.55 (s, 3H), 6.61 (dd, 1H, J=1.5, 8.2Hz), 7.28-7.51  
(m, 5H), 7.91 (dd, 1H, J=2.8, 8.5Hz), 8.40-8.44 (m, 1H), 9.36 (d, 1H,  
J=8Hz)

SI-MS(m/z); 497(M+1)<sup>+</sup>

#### 実施例 1 1

参考例 2 で得られる化合物 d およびメタノールの代わりにエチルメルカプタンを用い実施例 1 0 と同様の方法で、化合物 1 2, 2 2 mg (7 0 %) を立体異性体の混合物として得た。

化合物 1 2 :

<sup>1</sup>H-NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ ; 0.77および0.99(t, 3H, J=7.5Hz), 1.54および1.56 (s, 3H), 2.27および2.36(s, 3H), 2.30-2.44(m, 4H), 2.64-2.76(m, 1 H), 3.33(m, 1H), 3.36および3.37(s, 3H), 3.87(dd, 1H, J= 3.8Hz), 6.23および6.26(s, 1H), 6.40および6.46(s, 1H), 6.53(d, 1H, J=5.8Hz), 7.25-7.51(m, 5H), 7.92(t, 1H, J=7.9Hz), 8.42(m, 1H), 9.41(d, 1H, J =8.0Hz)

SI-MS(m/z); 527(M+1)<sup>+</sup>

#### 実施例 1 2

ピリジン 3 ml に氷冷下クロム酸 3 8 5 mg (3.8 5 mmol) を加え、ついで実施例 5 で得られる化合物 6, 3 0 0 mg (0.5 9 mmol) のピリジン溶液 5 ml を加え、室温下一夜攪拌した。反応溶液をセライトを通し口過し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (1 %メタノール/クロロホルム) で精製し、化合物 1 3, 2 0 8 mg (6 8 %) を得た。

化合物 1 2 :

<sup>1</sup>H-NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ ; 2.00-3.04(m, 2H), 2.15(s, 3H), 2.32(s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.84(s, 3H), 3.94(br. s, 1H), 5.24(m, 1H), 6.68(m, 1H),

7.16-7.80(m, 6H), 8.00(br. s, 1H), 9.24(d, 1H, J=8Hz), 9.40(d, 1H, J=8Hz)

EI-MS(m/z); 522(M<sup>+</sup>)

### 実施例 1 3

実施例 1 で得られる化合物 b, 232 mg (0.38 mmol) より実施例 1 2 と同様の方法で化合物 e, 160 mg (67%) を得た。

化合物 e :

<sup>1</sup>H-NMR(CDCℓ<sub>3</sub>) δ ; 1.53(s, 3H), 2.20-2.92(m, 2H), 2.36(s, 3H), 2.79(s, 3H), 3.25(s, 3H), 3.90(m, 1H), 4.60-5.00(m, 1H), 5.20(s, 2H), 6.65(dd, 1H, J=7, 8Hz), 7.16-7.80(m, 11H), 9.28(d, 1H, J=8Hz), 9.44(d, 1H, J=8Hz)

SI-MS(m/z); 629

上記化合物 e, 140 mg より実施例 1 と同様の接触還元法で化合物 1 4, 96 mg (89%) を得た。

化合物 1 4 :

<sup>1</sup>H-NMR(CDCℓ<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>) δ ; 2.00-4.12(m, 5H), 2.24(s, 3H), 2.46(s, 3H), 2.70(br. s, 3H), 3.14(s, 3H), 4.66(br. s, 1H), 6.74(m, 1H), 7.08-8.04(m, 6H), 9.14(d, 1H, J=8Hz), 9.34(d, 1H, J=8Hz)

EI-MS(m/z); 494(M<sup>+</sup>)

### 実施例 1 4

参考例 1 で得られる化合物 a, 70 mg (0.1 mmol) より実施例 1 2 と同様の方法で化合物 f, 26 mg (43%) を得た。

この化合物 f, 20 mg より実施例 1 と同様の接触還元法で化合物

15, 4 mg (27%) を得た。

化合物 15 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.60 (s, 3H), 2.12-2.84 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 3.20-3.60 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.92 (d, 1H, J=4Hz), 6.56 (m, 1H), 7.24-8.04 (m, 7H), 9.32 (d, 1H, J=8Hz), 9.44 (d, 1H, J=8Hz)

EI-MS (m/z); 480 (M<sup>+</sup>)

実施例 15.

参考例 2 で得られる化合物 d と UCN-01 の混合物 200 mg を THF 16 ml に溶解し、メタノール 4 ml とカンファースルホン酸 125 mg を加え 1 時間加熱還流した。反応溶液に酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。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) で精製し化合物 16, 55 mg (27%)、化合物 17, 39 mg (19%) および化合物 16 と 17 の混合物 53 mg (26%) を得た。

化合物 16 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.55 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.39 (ddd, 1H, J=3.7, 5.7, 14.7Hz), 2.74 (ddd, 1H, J=1.3, 4.1, 14.7Hz), 3.14 (s, 3H), 3.35 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.89 (d, 1H, J=3.5Hz), 6.28 (br. s, 1H), 6.55 (dd, 1H, J=1.2, 5.7Hz), 6.60 (d, 1H, J=1.6Hz), 7.29 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.92 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.42 (ddd, 1H, J=0.5, 1.3, 7.9Hz), 9.36 (ddd, 1H, J=0.7, 1.2, 7.9Hz)

SI-MS (m/z); 497(M+1)<sup>-</sup>, 465, 368, 336, 309

化合物 17:

<sup>1</sup>H-NMR (CDC<sub>3</sub>) δ; 1.58 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.42 (ddd, 1H, J=3.8, 5.9, 14.7Hz), 2.71 (ddd, 1H, J=1.3, 4.3, 14.7Hz), 3.08 (s, 3H), 3.34 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.87 (d, 1H, J=3.5Hz), 6.26 (br. s, 1H), 6.55 (dd, 1H, J=1.2, 5.8Hz), 6.62 (d, 1H, J=1.6Hz), 7.29 (d, 1H, J=8.3 Hz), 7.33 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.91 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.44 (ddd, 1H, J=0.5, 0.8, 7.9Hz), 9.36 (ddd, 1H, J=0.7, 1.1, 7.9Hz)

SI-MS (m/z); 497(M+1)<sup>+</sup>, 465, 409, 368, 336, 309

実施例 16.

参考例 2 で得られる化合物 d と UCN-01 の混合物 100 mg およびメタノールの代わりにイソプロパノールを用いて、実施例 15 と同様の方法で化合物 18, 56 mg (49%) を立体異性体の混合物として得た。

化合物 18:

<sup>1</sup>H-NMR (CDC<sub>3</sub>) δ; 0.77 および 0.91 (d, 3H, J=6.2Hz), 1.26 および 1.27 (d, 3H, J=6.2Hz), 1.72 および 1.80 (br. 3H), 2.38 (s, 3H), 2.52 ~ 2.57 (m, 1H), 2.64 および 2.72 (m, 1H), 3.20 ~ 3.23 (br. 3H), 3.41 (br. 1H), 3.85 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 6.46 および 6.52 (br. 1H), 6.56 ~ 6.59 (m, 2H), 7.27 ~ 7.49 (m, 5H), 7.86 および 7.88 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.39 および 8.41 (dd, 1H, J=0.8, 7.9Hz), 9.32 および 9.34 (d, 1H, J=8Hz)

EI-MS (m/z); 524(M<sup>-</sup>), 466, 395, 336, 156

## 実施例 17.

参考例 2 で得られる化合物 d と U C N — 0 1 の混合物 1 0 0 mg およ  
びメタノールの代わりに n — ブタノールを用いて実施例 1 5 と同様の  
方法で化合物 1 9 , 6 6 mg ( 5 7 % ) を立体異性体の混合物として得た。

化合物 1 9 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 0.75 および 0.79 (t, 3H, J=7.3Hz), 1.22~1.32 (m, 2  
H), 1.41~1.53 (m, 2H), 1.56 および 1.64 (s, 3H), 2.36 および 2.37 (s,  
3H), 2.41 ~ 2.48 (m, 1H), 2.68~2.77 (m, 1H), 3.03 および 3.14 (m, 1  
H), 3.36 および 3.39 (s, 3H), 3.52 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 6.27 および  
6.28 (br. s, 1H), 6.55 (m, 1H), 6.58 および 6.60 (d, 1H, J=1.5Hz),  
7.28~7.51 (m, 5H), 7.90 および 7.91 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.42~8.47 (m,  
1H), 9.36 (dd, 1H, J=0.7, 7.9Hz)

EI-MS (m/z); 538 (M<sup>+</sup>), 466, 409, 336, 156

## 実施例 18.

参考例 2 で得られる化合物 d と U C N — 0 1 の混合物 5 0 mg および  
メタノールの代わりにエタノールを用いて実施例 1 5 と同様の方法で  
化合物 2 0 , 3 7 mg ( 7 3 % ) を立体異性体の混合物として得た。

化合物 2 0 :

$^1\text{H-NMR}$  (CDC  $\ell_3$ )  $\delta$  ; 1.11 および 1.13 (t, 3H, J=7.1Hz), 1.56 および 1.61  
(s, 3H), 2.36 および 2.37 (s, 3H), 2.42 (m, 1H), 2.69~2.77 (m, 1H),  
3.12 および 3.23 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.38 および 3.40 (s, 3H), 3.60  
(m, 1H), 3.89 (m, 1H), 6.27 および 6.28 (br. s, 1H), 6.55 (m, 1H),  
6.58 および 6.60 (d, 1H, J=1.5Hz), 7.28~7.51 (m, 5H), 7.91 (m, 1H),

8.46 (m, 1H), 9.35 (d, 1H, J=8.0Hz)

EI-MS (m/z); 510 (M<sup>+</sup>), 465, 381, 336, 185, 156

#### 参考例 1

スタウロスポリン 932 mg (2 mmol) をアセトン 30 ml および水 20 ml に溶解し、炭酸水素ナトリウム 840 mg (10 mmol) を加え、氷冷下、ベンジルオキシカルボニルクロライド 0.43 ml (3 mmol) を加え同温度で 0.5 時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチル 50 ml を加え水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去し化合物 a, 1.17 g (98%) を得た。

化合物 a :

<sup>1</sup>H-NMR (CDC l<sub>3</sub>) δ ; 1.63 (s, 3H), 2.07-2.93 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 3.99 (m, 1H), 4.60-5.10 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.46 (s, 1H), 6.66 (t, 1H), 7.10-8.00 (m, 12H), 9.43 (d, 1H, J=8Hz)

SI-MS (m/z); 601 (M+1)<sup>+</sup>

#### 参考例 2

参考例 1 で得られる化合物 a, 5.41 g (9.0 mmol) を酢酸 115 ml に溶解し、四酢酸鉛 6.0 g (13.5 mmol) を加え、遮光下室温で 6 時間攪拌した。反応溶液に水 150 ml を加え析出した沈澱物を濾取した。これ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/28%アンモニア水 = 99/1/0.1) で粗精製しヒドロキシ体 (I-3-1; R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=Cbz), 1.68 g (40%) を得た。

上記化合物は、実施例 1 と同様の接触還元法に付し、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/28%アンモ



ニア水 = 99 / 1 / 0.1) で精製し、UCN-01, 88 mg (9%) および化合物 d, 221 mg (23%) を得た。

UCN-01 :

SI-MS(m/z); 483(M+1)<sup>+</sup>, 465

化合物 d :

SI-MS(m/z); 483(M+1)<sup>+</sup>, 465

なお、UCN-01と化合物 d は、X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> の立体配置がアンチであるジアステレオマーの関係にある。

#### 実験例 1.

本発明により得られる化合物 (I) の細胞生育阻害活性について以下の方法によって試験した。結果を第 3 表に示す。

(1) HeLa S<sub>3</sub> 細胞生育阻害試験 :

96穴マイクロタイタープレートに10%胎児血清2mMグルタミンを含むMEM培地で $3 \times 10^4$ 個/mlに調製したHeLa S<sub>3</sub>細胞を0.1mlずつ各ウェルに分注する。炭酸ガスインキュベーター内で一晩37℃下培養後培養液より適宜希釈した試験化合物を0.05mlずつ加える。このまま細胞を炭酸ガスインキュベーター内で細胞を培養後、培養上清を除去し、PBS(-)で一回洗浄後、新鮮な培地を0.1mlずつ各ウェルに加え炭酸ガスインキュベーター内で37℃下、72時間培養する。培養上清を除去後、0.02%ニュートラルレッドを含む培養液を0.1mlずつ各ウェルに加え37℃下、1時間炭酸ガスインキュベーター内で培養し細胞を染色する。培養上清を除去後、生理食塩水で一回洗浄し、0.001規定塩酸/30%エノールで色素を抽出後、マイ

クオプレートリーダーにより550 nmの吸収を測定する。無処理細胞と既知濃度の試験化合物で処理した細胞の吸収を比較することにより、細胞の増殖を50%阻害する検体濃度を算出し、それをIC<sub>50</sub>とする。

(2) CoLo320DM細胞生育阻害試験：

96穴マイクロタイタープレートに、10%牛胎児血清100 u/ml ペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシンを含むRPMI 1640 培地で10<sup>5</sup>個/mlに調製したCoLo320DM細胞を0.1 mlずつ各ウェルに分注する。以下(1)と同様に行い、細胞の算出はマイクロセルカウンターにより行う。無処理細胞と、既知濃度の試験化合物で処理した細胞の細胞数を比較することにより細胞の増殖を50%阻害する検体濃度を算出し、IC<sub>50</sub>とする。

第 3 表

化合物 番 号	I C <sub>50</sub> (µg/ml)	
	HeLaS <sub>3</sub>	CoLo320DM
4	0.18	0.19
5	0.75	0.59
10	0.051	0.55
11	0.17	0.14
12	0.16	0.088
14	0.78	> 1
16	0.20	—
17	0.16	—
18	0.29	—

化合物 番号	I C <sub>50</sub> (μg/ml)	
	HeLaS <sub>3</sub>	CoLo320DM
19	0.32	—
20	0.29	—
スタウロスポリン (参考化合物)	0.05	0.018
UCN-01 (参考化合物)	0.17	—

## 実験例 2.

### (1) プロテインキナーゼ C 阻害活性試験 :

吉川らの方法 [J. Biol. Chem., 257, 13341(1982)] に従い、2.5 μmole 酢酸マグネシウム、50 μg ヒストンタイプ II S (シグマ社製)、20 μg ホスファチジルセリン、0.8 μg ダイオレイン、25 nmole 塩化カルシウム、5 μg 粗酵素 (吉川らの方法によりラットの脳より部分精製したもの) および 5 μmole トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を含む 250 μl の溶液に試験化合物溶液 10 μl を加え、30℃で3分間インキュベートした。つぎに、1.25 nmole [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (5~10 × 10<sup>3</sup> cpm/nmole) を加え、30℃で3分間、リン酸化反応を行った後、25% トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止させた。反応液を酢酸セルロース膜 (ポアサイズ 0.45 μm) (東洋濾紙社製) で濾過し、5% TCA で4回洗浄後、該膜上に残った放射活性を測定した。一方、試験化合物を加えないで前記と同様に放射活性を測定した。対照に対して 50% 阻害を示す検体濃度を I C<sub>50</sub> とした。

その結果を第4表に示す。

(2) プロテインキナーゼ A 阻害活性試験：

Kuoらの方法〔Biochemistry, 64, 1349(1969)〕に従い、5  $\mu$ mole トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)、2.5  $\mu$ mole 酢酸マグネシウム、100  $\mu$ g ヒストンタイプ II S (シグマ社製)、0.25 nmole c-AMP および 200  $\mu$ g 粗酵素 (Kuoらの方法により子牛の心臓より部分精製したもの) を含む 250  $\mu$ l の溶液に試験化合物の溶液 10  $\mu$ l を加え、以下、前記プロテインキナーゼ C 阻害活性の測定の場合と同様に行い IC<sub>50</sub> を求めた。その結果を第4表に示す。

第 4 表

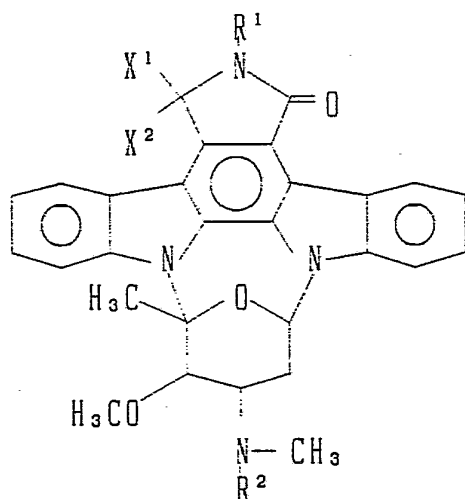
化合物 番号	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g / ml )		A / C *
	プロテインキナーゼ C	プロテインキナーゼ A	
3	0.06	10	166.7
6	0.003	0.03	10.0
11	0.0031	0.16	51.6
12	0.012	0.15	12.5
13	0.002	0.036	18.0
15	0.0018	0.013	7.2
16	0.014	0.19	13.6
17	0.00068	0.12	176.5
スタウロsporin (参考化合物)	0.001	0.004	4.0
UCN-01 (参考化合物)	0.002	0.02	10.0

\* プロテインキナーゼ C と プロテインキナーゼ A との活性比を示す。

第4表にみられるように本発明化合物（I）は、参考化合物に比べてより選択的にプロテインキナーゼC阻害活性を有しており、抗腫瘍剤としての使用にあたっては毒性の低減の可能性が期待される。

## 請求の範囲

式



(式中、 $R^1$  は水素、低級アルキル、ホルミルまたはアミノを表わし、 $R^2$  は水素、ホルミル、低級アルカノイルまたは $\alpha$ -アミノ酸のカルボキシル基のヒドロキシル部分を除く基を表わし、該アミノ酸のアミノ基は保護基で保護されていてもよく、 $X^1$  および  $X^2$  は一方が水素で、他方が水素、ヒドロキシル、低級アルコキシルまたは低級アルキルチオであるか、もしくは両者が一体となって酸素を表わす。但し、同時に  $R^1$  および  $R^2$  が水素で  $X^1$  および  $X^2$  の一方が水素の場合、他方は水素またはヒドロキシル以外の基である) で表わされるスタウロスポリン誘導体およびその薬理的に許容される塩。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00086

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>4</sup> C07D498/22		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07D498/22	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	JP, A, 60-185719 (Ajinomoto Co., Inc.) 21 September 1985 (21. 09. 85) Claim (Family: none)	1
A	JP, A, 62-220196 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 10 July 1987 (10. 07. 87) Claim & EP, A, 238011	1
P	EP, A, 296110 (CIBA-Geigy A.G.) 21 December 1988 (21. 12. 88) & JP, A, 64-34989	1
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
March 24, 1989 (24. 03. 89)		April 17, 1989 (17. 04. 89)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>4</sup> C07D498/22		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07D498/22	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A, 60-185719 (味の素株式会社) 21. 9月, 1985 (21. 09. 85) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1
A	JP, A, 62-220196 (協和醸酵工業株式会社) 10. 7月, 1987 (10. 07. 87) 特許請求の範囲 & EP, A, 238011	1
P	EP, A, 296110 (チバガイギー アクチェンゲゼル シャフト) 21. 12月, 1988 (21. 12. 88) & JP, A, 64-34989	1
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 24. 03. 89	国際調査報告の発送日 7.04.89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 佐伯憲生	4C 8615