

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/061931

発行日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)

(43) 国際公開日 平成22年6月3日 (2010. 6. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 473/34 (2006.01)	C O 7 D 473/34 C S P	4 C O 8 6
C07D 473/40 (2006.01)	C O 7 D 473/40	
A61K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52	
A61P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A61P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求有 予備審査請求有 (全 60 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2010-540532 (P2010-540532)	(71) 出願人 304028346
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/070062	国立大学法人 香川大学
(22) 国際出願日 平成21年11月27日 (2009.11.27)	香川県高松市幸町1番1号
(31) 優先権主張番号 特願2008-303239 (P2008-303239)	(74) 代理人 100115255
(32) 優先日 平成20年11月27日 (2008.11.27)	弁理士 辻丸 光一郎
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100129137
	弁理士 中山 ゆみ
	(74) 代理人 100146064
	弁理士 吉田 玲子
	(74) 代理人 100154081
	弁理士 伊佐治 創
	(72) 発明者 塚本 郁子
	香川県木田郡三木町大字池戸1750-1
	国立大学法人香川大学医学部内

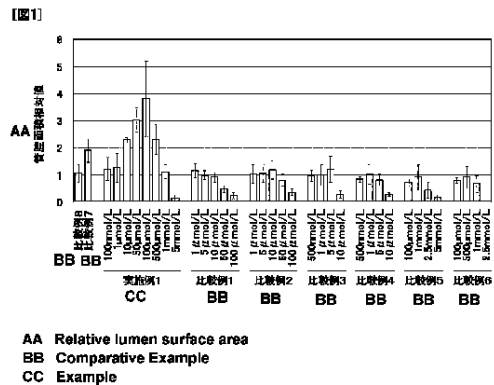
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シクロプチルプリン誘導体、血管新生促進剤、管腔形成促進剤、神経細胞成長促進剤および医薬品

(57) 【要約】

細胞増殖促進活性、血管新生促進活性、管腔形成促進活性、細胞遊走促進活性および神経細胞成長促進活性の少なくとも一つを有し、化学的に安定な低分子物質であり、低分子量のため、吸収性が高く、安価に安定して供給可能な化合物を提供する。

本発明のシクロプチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、下記一般式(1)で表されるシクロプチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である。

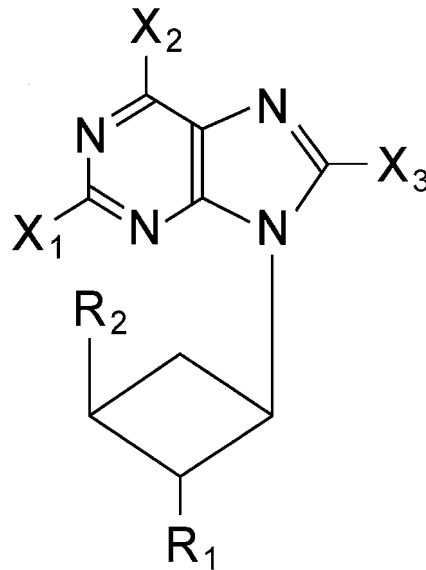


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【化 2 0】



10

20

前記一般式(1)中、

X_1 は、ハロゲン基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

X_2 は、ハロゲン基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、

X_3 は、水素原子、ハロゲン基またはアルコキシ基であり、

R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲン基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホノオキシアルキル基であり、

30

X_1 がアミノ基である場合は、

X_2 および X_3 がともにハロゲン基であるか、

X_2 および X_3 がともにアルコキシ基であるか、または、

X_2 がヒドロキシ基であり、 X_3 がハロゲン基であり、かつ、 R_1 および R_2 がともにアシルオキシアルキル基であり、

前記 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_1 および R_2 において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基(チオール基)、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記カルボキシル基、前記アシル基、前記カルバモイル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホノオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

40

【請求項 2】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基である請求の範囲 1 記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項 3】

前記一般式(1)において、前記 X_2 が、アミノ基である請求の範囲 1 記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

50

【請求項 4】

前記一般式(1)において、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である請求の範囲1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項 5】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基またはチオメトキシ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である、請求の範囲1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

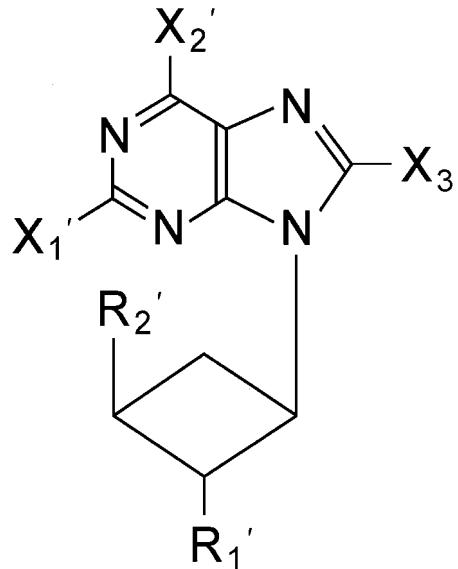
【請求項 6】

6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリンもしくは6-アミノ-2-チオメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である請求の範囲1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項 7】

下記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤。

【化 2 1】



前記一般式(1)中、

X_1 は、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

X_2 は、ハロゲノ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、

X_3 は、水素原子、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、ヒドロキシフェニル基またはカルバモイル基であり、

R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲノ基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホノオキシアルキル基であり、

X_1 がアミノ基かつ X_3 が水素原子である場合は、 R_1 および R_2 は、ヒドロキ

10

20

30

40

50

シアルキル基以外の原子または置換基であり、

前記 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_1 および R_2 において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基（チオール基）、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記ヒドロキシフェニル基、前記カルバモイル基、前記カルボキシ基、前記アシル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホノオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

【請求項 8】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基である、請求の範囲 7 記載の促進剤。

10

【請求項 9】

前記一般式(1)において、前記 X_2 が、アミノ基である、請求の範囲 7 記載の促進剤。

【請求項 10】

前記一般式(1)において、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である、請求の範囲 7 記載の促進剤。

【請求項 11】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基またはチオメトキシ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 X_3 が、水素原子であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である、請求の範囲 7 記載の促進剤。

20

【請求項 12】

請求の範囲 6 記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤。

【請求項 13】

請求の範囲 1 記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体および立体異性体、およびそれらの塩、溶媒和物および水和物、ならびに請求の範囲 7 記載の促進剤からなる群から選択される少なくとも一つを含み、血管新生促進用、管腔形成促進用および神経細胞成長促進用からなる群から選択される少なくとも一つの用途を有する医薬品。

30

【請求項 14】

創傷治癒薬、アルツハイマー治療薬、アルツハイマー予防薬、梗塞性疾患治療薬、梗塞性疾患予防薬および育毛剤からなる群から選択される少なくとも一つである請求の範囲 1 3 記載の医薬品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シクロブチルプリン誘導体、血管新生促進剤、管腔形成促進剤、神経細胞成長促進剤および医薬品に関する。

【背景技術】

40

【0002】

従来、4員環に核酸が結合したいくつかの誘導体は、抗ウイルス作用を有することが知られている。前記誘導体としては、例えば、シクロブチルプリン誘導体（例えば、特許文献 1 ~ 3 参照）、オキセタン環に核酸が結合したオキセタノシン誘導体（例えば、特許文献 4）等が挙げられる。

【0003】

他方、血管新生、神経細胞成長等を促進する物質として、生体由来の成長因子である、線維芽細胞増殖因子（FGF）、血小板由来増殖因子（PD-ECGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、神経成長因子（NGF）等が知られている。そこで、これらの成長因子の中には、創傷治癒薬、育毛剤等の有効成分として用いられているものもある。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第2694999号公報

【特許文献2】特許第2577640号公報

【特許文献3】特許第2962494号公報

【特許文献4】特開平5-32691号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

しかしながら、前記成長因子は、いずれも分子量が15000~30000の高分子タンパク質であるため、低吸収性と安定性が課題となっている。そこで、本発明の目的は、血管新生促進活性、管腔形成促進活性および神経細胞成長促進活性の少なくとも一つを有し、化学的に安定な低分子物質であり、低分子量のため、吸収性が高く、安価に安定して供給可能な化合物を提供することである。

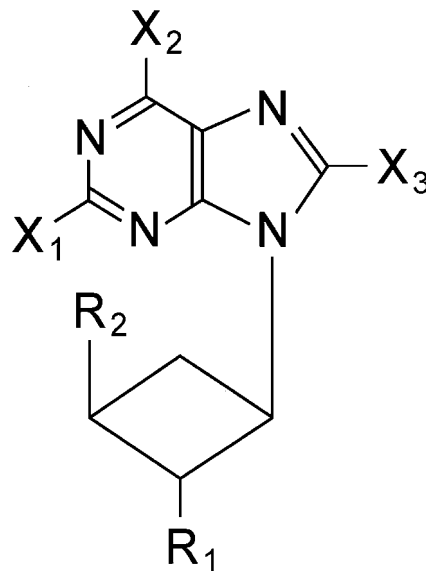
【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、下記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である。

【化1】

20



30

前記一般式(1)中、

X_1 は、ハロゲン基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

X_2 は、ハロゲン基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、

40

X_3 は、水素原子、ハロゲン基またはアルコキシ基であり、

R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲン基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホオキシアルキル基であり、

X_1 がアミノ基である場合は、

X_2 および X_3 がともにハロゲン基であるか、

X_2 および X_3 がともにアルコキシ基であるか、または、

X_2 がヒドロキシ基であり、 X_3 がハロゲン基であり、かつ、 R_1 および R_2 がともにア

50

シルオキシアルキル基であり、

前記 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_1 および R_2 において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基（チオール基）、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記カルボキシ基、前記アシル基、前記カルバモイル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホノオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

【発明の効果】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明者らは一連の研究を重ねたところ、血管新生促進活性、管腔形成促進活性および神経細胞成長促進活性の少なくとも一つを有する、前記一般式(1)で表される新規なシクロブチルプリン誘導体を見出し、本発明に到達した。本発明のシクロブチルプリン誘導体は、化学的に安定な低分子物質であり、低分子量のため、吸収性が高く、安価に安定して供給可能である。そして、本発明のシクロブチルプリン誘導体は、血管新生促進活性、管腔形成促進活性および神経細胞成長促進活性の少なくとも一つを利用した、種々の医薬品、医薬部外品等に利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、実施例1および比較例1～8における管腔形成測定の結果を示すグラフである。

【図2】図2は、実施例1、比較例7および比較例8における細胞増殖測定の結果を示すグラフである。

【図3】図3(A)～(F)は、実施例1、比較例7および比較例8における管腔形成測定の結果を示す写真である。

【図4】図4(A)～(H)は、実施例1、比較例7～10における細胞遊走性測定の結果を示す写真である。

【図5】図5(A)～(H)は、実施例1、比較例7～10における細胞遊走性測定の結果を示す写真である。

【図6】図6は、実施例1、比較例7～10における細胞遊走性測定の結果を示すグラフである。

【図7】図7(A)は、実施例3における、経時的な pERK および ERK 量を示すイムノプロット写真であり、図7(B)は、pERK 相対値のグラフである。

【図8】図8は、実施例3における、経時的な pAkt、Akt、pJNK および pp38 量を示すイムノプロット写真である。

【図9】図9(A)は、本発明の実施例4における、2-CL-OCT-A 添加濃度による pERK 量への影響を示すイムノプロット写真であり、図9(B)は、pERK 相対値のグラフである。

【図10】図10(A)は、実施例5における、経時的な pMEK および MEK 量を示すイムノプロット写真であり、図10(B)は、pMEK 相対値のグラフである。

【図11】図11(A)は、実施例6における、PD98059 による ERK 活性化阻害を示すイムノプロット写真であり、図11(B)は、pERK 相対値のグラフである。

【図12】図12は、本発明の実施例7における、PD98059 による管腔形成阻害を示す管腔面積相対値のグラフである。

【図13】図13(A)は、実施例8における、SU5416 による ERK 活性化阻害を示すイムノプロット写真であり、図13(B)は、pERK 相対値のグラフである。

【図14】図14は、本発明の実施例9における、SU5416 による管腔形成阻害を示す管腔面積相対値のグラフである。

【図15】図15は、実施例10における PC12 細胞の顕微鏡写真である。図15(A)は PBS、図15(B)は NGF、図15(C)は 2-CL-C.OXT-A 50 μ mol/L、図15(D)は 2-CL-C.OXT-A 100 μ mol/L を添加した

10

20

30

40

50

PC12細胞の顕微鏡写真である。

【図16】図16は、実施例10におけるACE活性の測定結果を示すグラフである。

【図17】図17は、実施例11における、ウサギ角膜法による血管新生試験結果を示す写真である。図17(A)は、生理食塩水投与後の結果を示す写真であり、図17(B)は、2-Cl-C.OCT-A投与後の結果を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_1 が、クロロ基であるのが好ましい。

10

【0010】

本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_2 が、アミノ基であるのが好ましい。

【0011】

本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、前記一般式(1)において、例えば、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基であるのが好ましい。

【0012】

本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_1 が、クロロ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基であってもよい。

20

【0013】

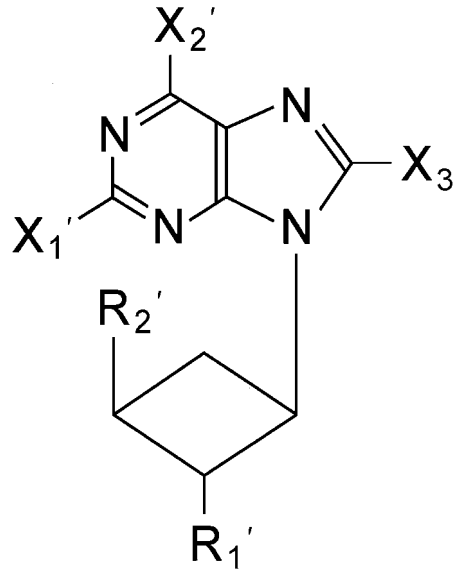
本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、例えば、6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリンもしくは6-アミノ-2-チオメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物であってもよい。

30

【0014】

本発明の促進剤は、下記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤である。

【化 2】



10

前記一般式(1)中、

X_1 は、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

20

X_2 は、ハロゲノ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、

X_3 は、水素原子、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、ヒドロキシフェニル基またはカルバモイル基であり、

R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲノ基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホオキシアルキル基であり、

X_1 がアミノ基かつ X_3 が水素原子である場合は、 R_1 および R_2 は、ヒドロキシアルキル基以外の原子または置換基であり、

30

前記 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_1 および R_2 において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基(チオール基)、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記ヒドロキシフェニル基、前記カルバモイル基、前記カルボキシル基、前記アシル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

【0015】

本発明の促進剤は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_1 が、クロロ基であってもよい。

【0016】

本発明の促進剤は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_2 が、アミノ基であってもよい。

40

【0017】

本発明の促進剤は、前記一般式(1)において、例えば、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基であってもよい。

【0018】

本発明の促進剤は、前記一般式(1)において、例えば、前記 X_1 が、クロロ基またはチオメトキシ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 X_3 が、水素原子であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基であってもよい。

【0019】

50

本発明の促進剤は、例えば、6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリンもしくは6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含んでいてもよい。

【0020】

本発明の医薬品は、本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体および立体異性体、およびそれらの塩、溶媒和物および水和物、ならびに本発明の促進剤からなる群から選択される少なくとも一つを含み、血管新生促進用、管腔形成促進用および神経細胞成長促進用からなる群から選択される少なくとも一つの用途を有する。

10

【0021】

本発明の医薬品は、例えば、創傷治癒薬、アルツハイマー治療薬、アルツハイマー予防薬、梗塞性疾患治療薬、梗塞性疾患予防薬および育毛剤からなる群から選択される少なくとも一つであってもよい。

【0022】

つぎに、本発明について、さらに詳しく説明する。

【0023】

本発明において、ハロゲノ基とは、特に限定されないが、例えば、フルオロ基 (フッ素原子)、クロロ基 (塩素原子)、プロモ基 (臭素原子) およびヨード基 (ヨウ素原子) 等が挙げられる。なお、前記ハロゲノ基とは、置換基としてのハロゲン原子の名称である。

20

【0024】

本発明において、アルキル基としては、特に限定されないが、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基等が挙げられ、アルキルアミノ基、アルコキシ基等のアルキル基を構造中に含む基においても同様である。本発明において、前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0025】

本発明において、アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられる。本発明において、前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基等が挙げられる。

30

【0026】

本発明において、チオ基 (チオール基) は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記チオ基 (チオール基) における置換基としては、特に制限されないが、例えば、メチル基、*tert*-ブチル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、メトキシメチル基、アセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、ピクシル基等が挙げられる。

40

【0027】

本発明において、ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基 (=O) として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシ基における置換基としては、酸で脱保護することが可能なものを含み、特に制限されないが、例えば、メチル基、*tert*-ブチル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、メトキシメチル基、アセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、ピクシル基等が挙げられる。

【0028】

50

本発明において、アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。本発明において、前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としても、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0029】

本発明において、アルキニル基としては、特に制限されないが、例えば、下記一般式(2)で表される置換基(式中のRは、水素原子または直鎖もしくは分枝アルキル基)等が挙げられ、具体的には、例えば、エチニル基、プロパルギル基等が挙げられる。本発明において、前記アルキニル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキニル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基等が挙げられる。

10

【0030】

【化3】



【0031】

本発明において、アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アミノ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、メチル基、エチル基等のアルキル基；アセチル基、エチルカルボニル等の炭素数が1~6のアルキルカルボニル基；炭素数が1~6のアルキルスルホニル基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭素数が1~6のアルコキシカルボニル基；フェニルカルボニル基、ナフチルカルボニル基等のアリールカルボニル基；フェニルスルホニル基、ナフチルスルホニル基等のアリールスルホニル基；ベンジルカルボニル基等の炭素数が7~10のアラルキルカルボニル基；ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリチル基等のアラルキル基；オキシカルボニル基；tert-ブチルオキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル基；フルオレニルメチルオキシカルボニル基；トリフルオロアセチル基；ホルミル基等が挙げられる。これらの置換基は、1~3個のハロゲノ基、ニトロ基等で置換されていてもよい。その具体例としては、例えば、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-クロロベンジルオキシカルボニル基、m-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。

20

30

【0032】

本発明において、カルボキシル基は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルボキシル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、メチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、メトキシメチル基、アセチル基、ピパロイル基、ベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、ピクシル基等が挙げられる。

【0033】

本発明において、アシル基としては、特に限定されないが、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、イソブチリル基、パレリル基、イソパレリル基、ピパロイル基、ヘキサノイル基、シクロヘキサノイル基、ベンゾイル基、エトキシカルボニル基等が挙げられ、アシル基を構造中に含む基(アシルオキシ基、アルカノイルオキシ基等)においても同様である。また、本発明において、アシル基の炭素数にはカルボニル炭素を含み、例えば、炭素数1のアシル基とはホルミル基を指すものとする。本発明において、前記アシル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

40

【0034】

50

本発明において、カルバモイル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルバモイル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、メチル基、エチル基等のアルキル基；アセチル基、エチルカルボニル等の炭素数が1～6のアルキルカルボニル基；炭素数が1～6のアルキルスルホニル基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭素数が1～6のアルコキシカルボニル基；フェニルカルボニル基、ナフチルカルボニル基等のアリールカルボニル基；フェニルスルホニル基、ナフチルスルホニル基等のアリールスルホニル基；ベンジルカルボニル基等の炭素数が7～10のアラルキルカルボニル基；ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリチル基等のアラルキル基；オキシカルボニル基；tert-ブチルオキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル基；フルオレニルメチルオキシカルボニル基；トリフルオロアセチル基；ホルミル基等が挙げられる。これらの置換基は、1～3個のハロゲン基、ニトロ基等で置換されていてもよい。その具体例としては、例えば、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-クロロベンジルオキシカルボニル基、m-クロロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明において、アシルオキシ基としては、特に限定されないが、例えば、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ブタノイルオキシ基、3-クロロブチリルオキシ基等が挙げられる。本発明において、前記アシルオキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲン基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基が挙げられる。

【0036】

本発明において、ヒドロキシアルキル基としては、特に限定されないが、例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。本発明において、前記ヒドロキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲン基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0037】

本発明において、アシルオキシアルキル基としては、特に限定されないが、例えば、前記アシルオキシ基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。前記アシルオキシアルキル基としては、例えば、アセトキシエチル基、プロピオニルオキシエチル基、ブタノイルオキシエチル基、3-クロロブチリルオキシエチル基等が挙げられる。本発明において、前記アシルオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲン基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0038】

本発明において、アルコキシアルキル基としては、特に限定されないが、例えば、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、プロポキシエチル基等が挙げられる。本発明において、前記アルコキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲン基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0039】

本発明において、ハロアルキル基としては、特に限定されないが、例えば、前記ハロゲン基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。前記ハロアルキル基としては、具体的には、例えば、クロロメチル基、クロロエチル基、クロロブチル基、ジクロロメチル基、トリフルオロメチル基、プロモメチル基、プロモエチル基、フルオロメチル基、トリフルオ

ロエチル基等が挙げられる。

【0040】

本発明において、ホスホノオキシアルキル基としては、特に限定されないが、例えば、ホスホノオキシメチル基、ホスホノオキシエチル基、ホスホノオキシプロピル基等が挙げられる。本発明において、前記ホスホノオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ホスホノオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、ヒドロキシ基、ハロゲノ基、アシル基、アシルオキシ基、アルコキシ基、カルバモイル基等が挙げられる。

【0041】

本発明において、ヒドロキシフェニル基は、例えば、ヒドロキシ基が、異性化し、オキソ基(=O)として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシフェニル基における置換基としては、酸で脱保護することが可能なものを含み、特に制限されないが、例えば、メチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、メトキシメチル基、アセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、ピクシル基等が挙げられる。

【0042】

<シクロブチルプリン誘導体>

本発明において、前記一般式(1)中の前記 X_1 は、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、好ましくは、ハロゲノ基である。

前記 X_1 が前記ハロゲノ基である場合、前記ハロゲノ基としては、特に制限されないが、例えば、フルオロ基(フッ素原子)、クロロ基(塩素原子)、ブロモ基(臭素原子)、ヨード基(ヨウ素原子)等が挙げられ、好ましくは、クロロ基(塩素原子)である。

そして、前記 X_1 が前記アルキル基である場合、前記アルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1~8の直鎖もしくは分枝アルキル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基等が挙げられ、好ましくは、メチル基である。前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキル基における置換基等が挙げられる。

また、前記 X_1 が前記アルキルチオ基である場合、前記アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1~8の直鎖もしくは分枝アルキルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基としては、具体的には、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられ、好ましくは、メチルチオ基である。前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキルチオ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記チオ基(チオール基)である場合、前記チオ基(チオール基)は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記チオ基(チオール基)における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のチオ基(チオール基)における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アミノ基である場合、前記アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が別の置換基に置換されていてもよい。アミノ基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアミノ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 がアミノ基である場合は、 X_2 および X_3 がともにハロゲノ基であるか、 X_2 および X_3 がともにアルコキシ基であるか、または、 X_2 がヒドロキシ基であり、 X_3 がハロゲノ基であり、かつ、 R_1 および R_2 がともにアシルオキシアルキル基である。

前記 X_1 が前記ヒドロキシ基である場合、前記ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基(=O)として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい

10

20

30

40

50

。前記ヒドロキシ基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。前記 X_1 が前記アルキニル基である場合、前記アルキニル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキニル基等が挙げられる。前記アルキニル基としては、具体的には、例えば、エチニル基、プロパルギル基等が挙げられる。前記アルキニル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキニル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキニル基における置換基等が挙げられる。

10

【0043】

本発明において、前記一般式(1)中の前記 X_2 は、ハロゲノ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、好ましくは、アミノ基である。

前記 X_2 が前記ハロゲノ基である場合、前記ハロゲノ基としては、特に制限されないが、例えば、フルオロ基(フッ素原子)、クロロ基(塩素原子)、プロモ基(臭素原子)、ヨード基(ヨウ素原子)等が挙げられ、好ましくは、クロロ基(塩素原子)である。

20

前記 X_2 が前記アミノ基である場合、前記アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が別の置換基に置換されていてもよい。アミノ基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアミノ基における置換基等が挙げられる。

また、前記 X_2 が前記ヒドロキシ基である場合、前記ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基(=O)として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。

30

前記 X_2 が前記チオ基(チオール基)である場合、前記チオ基(チオール基)は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記チオ基(チオール基)における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のチオ基(チオール基)における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記アルキルチオ基である場合、前記アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基としては、具体的には、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、 n -プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられ、好ましくは、メチルチオ基である。前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキルチオ基における置換基等が挙げられる。

40

【0044】

本発明において、前記一般式(1)中の前記 X_3 は、水素原子、ハロゲノ基またはアルコキシ基である。

【0045】

前記 X_3 が前記ハロゲノ基である場合、前記ハロゲノ基としては、特に制限されないが

50

、例えば、フルオロ基（フッ素原子）、クロロ基（塩素原子）、プロモ基（臭素原子）、ヨード基（ヨウ素原子）等が挙げられ、好ましくは、クロロ基（塩素原子）である。

【0046】

前記 X_3 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。

【0047】

本発明において、前記一般式(1)中の前記 R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲン基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホノオキシアルキル基であり、好ましくは、ヒドロキシアルキル基である。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ヒドロキシアルキル基である場合、前記ヒドロキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖または分枝ヒドロキシアルキル基等が挙げられる。前記ヒドロキシアルキル基としては、具体的には、例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、ホスホノオキシアルキル基等が挙げられ、好ましくは、ヒドロキシメチル基である。また、前記ヒドロキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ハロゲン基である場合、前記ハロゲン基としては、特に制限されないが、例えば、フルオロ基（フッ素原子）、クロロ基（塩素原子）、プロモ基（臭素原子）、ヨード基（ヨウ素原子）等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記カルボキシル基である場合、前記カルボキシル基は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルボキシル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のカルボキシル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アルキル基である場合、前記アルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、 sec -ブチル基、 $tert$ -ブチル基、 n -ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、 $tert$ -ペンチル基等が挙げられる。また、前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。アルキル基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アシル基である場合、前記アシル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖または分枝アシル基等が挙げられる。前記アシル基としては、具体的には、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、イソブチリル基、パレリル基、イソパレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、シクロヘキサノイル基、ベンゾイル基、エトキシカルボニル基等が挙げられる。また、前記アシル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。アシル基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記カルバモイル基である場合、前記カルバモイル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルバモイル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のカルバモイル基における置換基等が挙げられる。前記水素原子が置換基に置換されたカルバモ

10

20

30

40

50

イル基としては、具体的には、例えば、前述の置換カルバモイル基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アシルオキシ基である場合、前記アシルオキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝アシルオキシ基等が挙げられる。前記アシルオキシ基としては、具体的には、例えば、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ブタノイルオキシ基、3 - クロロブチリルオキシ基等が挙げられる。また、前記アシルオキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシルオキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アシルオキシアルキル基である場合、前記アシルオキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 2 ~ 8 の直鎖または分枝アシルオキシアルキル基等が挙げられる。前記アシルオキシアルキル基としては、例えば、前記アシルオキシ基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。前記アシルオキシアルキル基としては、具体的には、例えば、アセトキシエチル基、プロピオニルオキシエチル基、ブタノイルオキシエチル基、3 - クロロブチリルオキシエチル基等が挙げられる。また、前記アシルオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシルオキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アルコキシアルキル基である場合、前記アルコキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 2 ~ 8 の直鎖または分枝アルコキシアルキル基等が挙げられる。前記アルコキシアルキル基としては、具体的には、例えば、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、プロポキシエチル基等のアルコキシ基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。また、前記アルコキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ハロアルキル基である場合、前記ハロアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝ハロアルキル基等が挙げられる。前記ハロアルキル基としては、具体的には、例えば、クロロメチル基、クロロエチル基、クロロブチル基、ジクロロメチル基、トリフルオロメチル基、プロモメチル基、プロモエチル基、フルオロメチル基、トリフルオロエチル基等の前記ハロゲノ基で置換したアルキル基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ホスホノオキシアルキル基である場合、前記ホスホノオキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝ホスホノオキシアルキル基等が挙げられる。前記ホスホノオキシアルキル基としては、具体的には、例えば、ホスホノオキシメチル基、ホスホノオキシエチル基、ホスホノオキシプロピル基等が挙げられる。また、前記ホスホノオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ホスホノオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のホスホノオキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

【0048】

本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、前記一般式 (1) において、例えば、前記 X_1 が、クロロ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基であってもよい。このようなシクロブチルプリン誘導体としては、例えば、6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリンもしくは 6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン等が挙げられる。

【0049】

本発明において、前記一般式 (1) で表されるシクロブチルプリン誘導体の理論上可能

10

20

30

40

50

なすべての互変異性体もしくは立体異性体は、本発明の範囲内である。以下、本明細書においては、一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、そのすべての互変異性体および立体異性体を総称して、単に一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体ということもある。

【0050】

本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩としては、特に制限されないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジクロヘキシルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、プロカイン塩等の脂肪族アミン塩、N,N-ジベンジルエチレンジアミン等のアラルキルアミン塩；ピリジン塩、ピコリン塩、キノリン塩、イソキノリン塩等の複素環芳香族アミン塩；テトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアンモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルトリブチルアンモニウム塩、メチルトリオクチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等の第4級アンモニウム塩；アルギニン塩、リジン塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩；塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、過塩素酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、プロピオン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩等の有機酸塩、メタンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等のスルホン酸塩等が挙げられる。また、本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の溶媒和物もしくは水和物も、本発明の範囲内である。

10

20

【0051】

前記一般式(1)で表される本発明のシクロブチルプリン誘導体の製造方法は、特に限定されないが、例えば、以下のとおりである。

【0052】

<製造例1>

X₁がハロゲノ基の場合、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の製造方法は、特に限定されないが、例えば、下記(a)および(b)工程を含む製造方法等が挙げられる。

【0053】

(a)まず、Basacchiらの方法(G. S. Basacchi, A. Braitman, C. W. Cianci, J. M. Clark, A. K. Field, M. E. Hagen, D. R. Hockstein, M. F. Malley, T. Mitt, W. A. Slusarchyk, J. E. Sundeen, B. J. Terry, A. V. Tuomari, E. R. Weaver, M. G. Young and R. Zahler, J. Med. Chem., 1991, 34, 1415)等により、下記一般式(3)に示すシクロブタノール誘導体を合成する。

30

【0054】

(b)つぎに、前記シクロブタノール誘導体に、下記一般式(4)で表されるプリン誘導体(Haloはハロゲノ基)を反応させ、さらに、X₂の置換基に応じた置換反応を実施し、下記一般式(5)で表されるX₁がハロゲノ基である化合物(Haloはハロゲノ基)を得る。前記プリン誘導体の反応に用いる溶媒としては、特に限定されないが、例えば、テトラヒドロフラン(THF)、ジエチルエーテル、1,4-ジオキサン、トルエン、ジクロルメタン等が挙げられ、好ましくは、THFである。そして、前記プリン誘導体の反応温度としては、特に制限されないが、例えば、30~100の範囲が挙げられ、好ましくは、45~55の範囲である。また、前記プリン誘導体の反応時間としては、特に制限されないが、例えば、5~50時間の範囲であり、好ましくは、12~18時間の範囲である。X₂の置換基に応じた置換反応における前記置換基としては、前述のX₂の置換基であれば、特に制限されない。また、X₂の置換基に応じた置換反応における溶媒、反応温度および反応時間は、前記置換基により適宜設定でき、特に制限されない。例え

40

50

ば、前記 X_2 の置換基がアミノ基の場合には、前記プリン誘導体の反応後に、アンモニアで飽和したメタノールを反応させてもよい。なお、これらの反応前には、例えば、官能基 R_1 および R_2 に対する保護反応を適宜実施し、反応後には、脱保護反応、脱水反応等の反応を適宜実施してもよい。

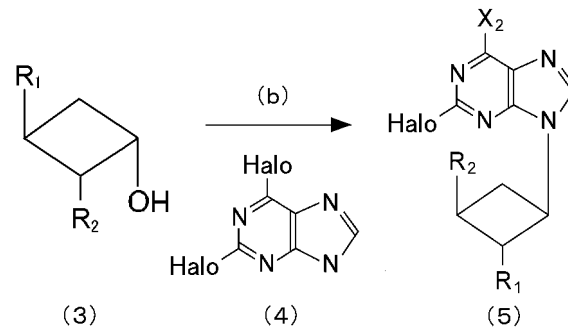
【0055】

下記工程反応式 1 に、前記 (b) 工程のスキームを示す。

【0056】

(工程反応式 1)

【化 4】



10

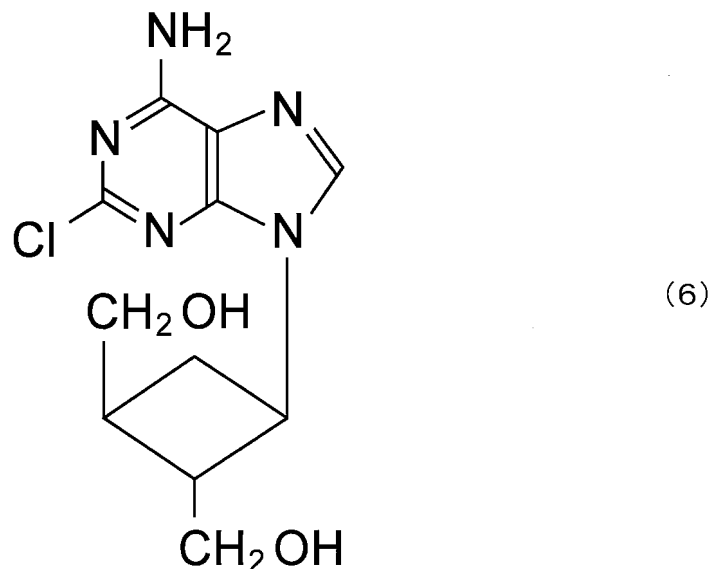
【0057】

本製造例により製造されるシクロブチルプリン誘導体としては、特に限定されないが、例えば、下記化学式 (6) に示す 6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン ($C_{11}H_{14}ClN_5O_2$) 等が挙げられる。

20

【0058】

【化 5】



30

40

【0059】

< 製造例 2 >

本発明のシクロブチルプリン誘導体の製造方法において、 X_1 は、前記製造例 1 のように、最初から導入してもよいが、例えば、前記製造例 1 のような方法が困難である場合には、目的の X_1 とは別の置換基をカップリング反応後に X_1 に変換してもよい。例えば、 X_1 がアルキルチオ基の場合、前記一般式 (1) で表されるシクロブチルプリン誘導体の製造方法は、特に限定されないが、例えば、以下の工程を含む製造方法等が挙げられる

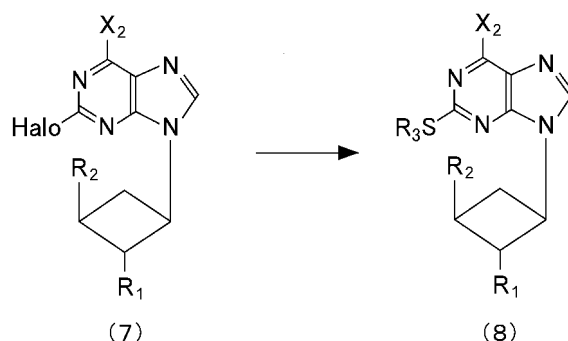
50

。下記工程反応式 2 に、本製造例のスキームを示す。なお、下記工程反応式 2 において、H a l o は、ハロゲン基であり、R₃ は、アルキル基である。

【 0 0 6 0 】

(工程反応式 2)

【化 6】



10

【 0 0 6 1 】

まず、製造例 1 の製造方法を用いて、X₁ がハロゲン基である前記一般式 (7) で表される化合物を得る。そして、前記化合物を、溶媒存在下で、チオアルキル化剤と反応させ、前記一般式 (8) で表される化合物 (R₃ はアルキル基) を得る。前記チオアルキル化剤としては、特に制限されないが、例えば、チオメトキシドナトリウム、チオエトキシドナトリウム、チオフェノキシドナトリウム等が挙げられ、好ましくは、チオメトキシドナトリウムである。前記溶媒としては、特に限定されないが、例えば、N, N - ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、1, 4 - ジオキサン等が挙げられ、好ましくは、DMF である。そして、前記反応温度としては、特に制限されないが、例えば、10 ~ 80 の範囲が挙げられ、好ましくは、15 ~ 25 の範囲である。また、前記反応時間としては、特に制限されないが、例えば、10 ~ 48 時間の範囲であり、好ましくは、12 ~ 18 時間の範囲である。なお、前記反応前には、例えば、官能基 R₁ および R₂ に対する保護反応を適宜実施し、前記反応後には、脱保護反応、脱水反応等の反応を適宜実施してもよい。

20

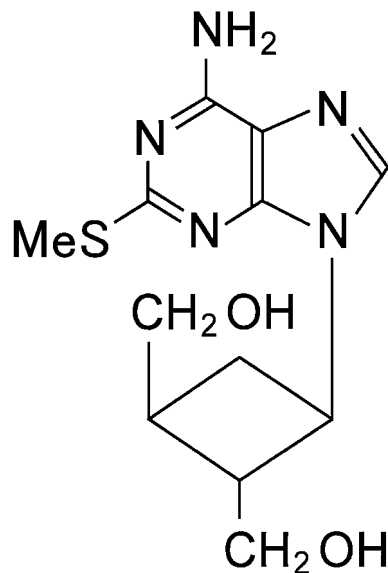
30

【 0 0 6 2 】

本製造例により製造されるシクロブチルプリン誘導体としては、特に限定されないが、例えば、下記化学式 (9) に示す 6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン (C₁₂H₁₇N₅O₂S) 等が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

【化 7】



(9)

10

【0064】

本発明のシクロブチルプリン誘導体の製造方法は、例えば、前記製造例の工程に加えて、さらに、各工程で得られた反応生成物の分離工程、精製工程等の他の工程を含んでもよい。前記分離工程および前記精製工程としては、特に制限されず、例えば、カラムクロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー等の従来公知の方法を適宜用いることができる。このように、本発明のシクロブチルプリン誘導体は、工業的に生産可能であり、かつ低分子であるため、安価に安定して供給できる。

20

【0065】

本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩、溶媒和物もしくは水和物の製造方法としては、特に制限されず、前述の製造方法例等により得られたシクロブチルプリン誘導体等を用いて、従来公知の方法を適宜使用することができる。

30

【0066】

< 促進剤 >

本発明の促進剤は、前述のように、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤である。

【0067】

本発明において、前記一般式(1)中の X_1 は、ハロゲン基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基である。

40

前記 X_1 が前記ハロゲン基である場合、前記ハロゲン基としては、特に制限されず、例えば、フルオロ基(フッ素原子)、クロロ基(塩素原子)、プロモ基(臭素原子)およびヨード基(ヨウ素原子)等が挙げられ、好ましくは、クロロ基(塩素原子)である。

前記 X_1 が前記アルキル基である場合、前記アルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1~8の直鎖もしくは分枝アルキル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基等が挙げられ、好ましくは、メチル基である。また、前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてもよい。アルキル基における前記置換基としては、とくに

50

制限されないが、例えば、前述のアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アルキルチオ基である場合、前記アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖もしくは分枝アルキルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基としては、具体的には、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、 n -プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられ、好ましくは、メチルチオ基である。前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキルチオ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記チオ基（チオール基）である場合、前記チオ基（チオール基）は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。前記チオ基（チオール基）における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のチオ基（チオール基）における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アミノ基である場合、前記アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてよく、特に制限されない。アミノ基における前記置換基としては、特に制限されず、例えば、前述のアミノ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記ヒドロキシ基である場合、前記ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基（=O）として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。前記ヒドロキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_1 が前記アルキニル基である場合、前記アルキニル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖もしくは分枝アルキニル基等が挙げられる。前記アルキニル基としては、具体的には、例えば、エチニル基、プロパルギル基等が挙げられる。前記アルキニル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。前記アルキニル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキニル基における置換基等が挙げられる。

【0068】

前記一般式（1）中の

X_2 は、ハロゲノ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基（チオール基）またはアルキルチオ基である。

前記 X_2 が前記ハロゲノ基である場合、前記ハロゲノ基としては、特に制限されず、例えば、フルオロ基（フッ素原子）、クロロ基（塩素原子）、プロモ基（臭素原子）およびヨード基（ヨウ素原子）等が挙げられ、好ましくは、クロロ基（塩素原子）である。

前記 X_2 が前記アミノ基である場合、前記アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてよく、特に制限されない。アミノ基における前記置換基としては、特に制限されず、例えば、前述のアミノ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記ヒドロキシ基である場合、前記ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基（=O）として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてよい。ヒドロキシ基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、

10

20

30

40

50

プトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記チオ基（チオール基）である場合、前記チオ基（チオール基）は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記チオ基（チオール基）における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のチオ基（チオール基）における置換基等が挙げられる。

前記 X_2 が前記アルキルチオ基である場合、前記アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基としては、具体的には、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられ、好ましくは、メチルチオ基である。前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキルチオ基における置換基等が挙げられる。

【0069】

本発明において、前記一般式(1)中の X_3 は、水素原子、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、ヒドロキシフェニル基またはカルバモイル基である。

前記 X_3 が前記ハロゲノ基である場合、前記ハロゲノ基としては、特に制限されず、例えば、フルオロ基（フッ素原子）、クロロ基（塩素原子）、プロモ基（臭素原子）およびヨード基（ヨウ素原子）等が挙げられる。

前記 X_3 が前記アルキル基である場合、前記アルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、*tert*-ペンチル基等が挙げられ、好ましくは、メチル基である。また、前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてもよい。アルキル基における前記置換基としては、とくに制限されないが、例えば、前述のアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 X_3 が前記アルキルチオ基である場合、前記アルキルチオ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルキルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基としては、具体的には、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-プロピルチオ基、イソプロピルチオ基等が挙げられる。前記アルキルチオ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルキルチオ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルキルチオ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_3 が前記アミノ基である場合、前記アミノ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。アミノ基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアミノ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_3 が前記ヒドロキシ基である場合、前記ヒドロキシ基は、例えば、異性化し、オキソ基(=O)として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_3 が前記アルコキシ基である場合、前記アルコキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が1～8の直鎖もしくは分枝アルコキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、プトキシ基等が挙げられる。前記アルコキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシ基における置換基等が挙げられる。

前記 X_3 が前記ヒドロキシフェニル基である場合、前記ヒドロキシフェニル基内のヒ

10

20

30

40

50

ドロキシ基は、例えば、異性化し、オキシ基 (= O) として存在してもよく、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ヒドロキシフェニル基における置換基としては、酸で脱保護することが可能なものを含み、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシフェニル基における置換基等が挙げられる。

前記 X₃ が前記カルバモイル基である場合、前記カルバモイル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルバモイル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のカルバモイル基における置換基等が挙げられる。前記水素原子が置換基に置換されたカルバモイル基としては、具体的には、例えば、前述の置換カルバモイル基等が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

前記一般式 (1) 中の R₁ および R₂ は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲン基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホノオキシアルキル基である。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記ハロゲン基である場合、前記ハロゲン基としては、特に制限されず、例えば、フルオロ基 (フッ素原子)、クロロ基 (塩素原子)、ブロモ基 (臭素原子) およびヨード基 (ヨウ素原子) 等が挙げられる。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記カルボキシル基である場合、前記カルボキシル基は、例えば、水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルボキシル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のカルボキシル基における置換基等が挙げられる。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記アルキル基である場合、前記アルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖もしくは分枝アルキル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、n - プロピル基、イソプロピル基、n - ブチル基、イソブチル基、sec - ブチル基、tert - ブチル基、n - ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert - ペンチル基等が挙げられ、好ましくは、メチル基である。また、前記アルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が、任意の置換基に置換されていてもよい。アルキル基における前記置換基としては、とくに制限されないが、例えば、前述のアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記アシル基である場合、前記アシル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝アシル基等が挙げられる。前記アシル基としては、具体的には、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、イソブチリル基、パレリル基、イソパレリル基、ピバロイル基、ヘキサノイル基、シクロヘキサノイル基、ベンゾイル基、エトキシカルボニル基等が挙げられる。また、前記アシル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。アシル基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシル基における置換基等が挙げられる。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記カルバモイル基である場合、前記カルバモイル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記カルバモイル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のカルバモイル基における置換基等が挙げられる。前記水素原子が置換基に置換されたカルバモイル基としては、具体的には、例えば、前述の置換カルバモイル基等が挙げられる。

前記 R₁ および R₂ の少なくとも一方が、前記アシルオキシ基である場合、前記アシルオキシ基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝アシルオキシ基等が挙げられる。前記アシルオキシ基としては、具体的には、例えば、アセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ブタノイルオキシ基、3 - クロロブチリルオキシ基等が挙げられる。また、前記アシルオキシ基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシ基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシルオキシ基における置換基等が挙げられる。

10

20

30

40

50

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ヒドロキシアルキル基である場合、前記ヒドロキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝ヒドロキシアルキル基等が挙げられる。前記ヒドロキシアルキル基としては、具体的には、例えば、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基等が挙げられ、好ましくは、ヒドロキシメチル基である。また、前記ヒドロキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。ヒドロキシアルキル基における前記置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のヒドロキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アシルオキシアルキル基である場合、前記アシルオキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 2 ~ 8 の直鎖または分枝アシルオキシアルキル基等が挙げられる。前記アシルオキシアルキル基としては、例えば、前記アシルオキシ基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。前記アシルオキシアルキル基としては、具体的には、例えば、アセトキシエチル基、プロピオニルオキシエチル基、ブタノイルオキシエチル基、3 - クロロブチルオキシエチル基等が挙げられる。また、前記アシルオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アシルオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアシルオキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記アルコキシアルキル基である場合、前記アルコキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 2 ~ 8 の直鎖または分枝アルコキシアルキル基等が挙げられる。前記アルコキシアルキル基としては、具体的には、例えば、メトキシメチル基、エトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、プロポキシエチル基等のアルコキシ基で置換した前記アルキル基等が挙げられる。また、前記アルコキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記アルコキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のアルコキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ハロアルキル基である場合、前記ハロアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝ハロアルキル基等が挙げられる。前記ハロアルキル基としては、具体的には、例えば、クロロメチル基、クロロエチル基、クロロブチル基、ジクロロメチル基、トリフルオロメチル基、プロモメチル基、プロモエチル基、フルオロメチル基、トリフルオロエチル基等の前記ハロゲノ基で置換したアルキル基等が挙げられる。

前記 R_1 および R_2 の少なくとも一方が、前記ホスホノオキシアルキル基である場合、前記ホスホノオキシアルキル基としては、特に制限されないが、例えば、炭素数が 1 ~ 8 の直鎖または分枝ホスホノオキシアルキル基等が挙げられる。前記ホスホノオキシアルキル基としては、具体的には、例えば、ホスホノオキシメチル基、ホスホノオキシエチル基、ホスホノオキシプロピル基等が挙げられる。また、前記ホスホノオキシアルキル基は、例えば、その一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。前記ホスホノオキシアルキル基における置換基としては、特に制限されないが、例えば、前述のホスホノオキシアルキル基における置換基等が挙げられる。

【0071】

なお、 X_1 がアミノ基かつ X_3 が水素原子である場合は、 R_1 および R_2 は、ヒドロキシアルキル基以外の原子または置換基である。

【0072】

本発明の促進剤は、前記一般式 (1') において、例えば、前記 X_1' が、クロロ基であり、前記 X_2' が、アミノ基であり、前記 R_1' および R_2' が、ヒドロキシメチル基であってもよい。このような促進剤としては、例えば、6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリンもしくは 6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ヒドロキシ

10

20

30

40

50

メチル)シクロブチル]プリン、それらの互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤等が挙げられる。

【0073】

本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の理論上可能なすべての互変異性体もしくは立体異性体を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤は、本発明の範囲内である。以下、本明細書においては、一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、そのすべての互変異性体および立体異性体を総称して、単

10

【0074】

本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩としては、特に制限されないが、例えば、前述の、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩等が挙げられる。また、本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤も、本発明の範囲内である。

【0075】

前記一般式(1)で表される本発明のシクロブチルプリン誘導体の製造方法は、特に制限されず、例えば、前述の、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体と同様の製造方法等が挙げられる。本発明において、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の塩、溶媒和物もしくは水和物の製造方法も、特に制限されず、前記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体の製造方法等により得られたシクロブチルプリン誘導体等を用いて、従来公知の方法を適宜使用することができる。

20

【0076】

本発明の促進剤は、前述のように、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤である。前記促進剤としては、具体的には、例えば、血管新生促進剤、管腔形成促進剤、神経細胞成長促進剤等が挙げられる。前記血管新生促進剤は、血管新生を促進させる機能を有し、例えば、血管内皮細胞の細胞増殖促進機能、血管内皮細胞の細胞遊走促進機能等を有していてもよい。前記管腔形成促進剤としては、特に制限されないが、例えば、血管内皮細胞による管腔形成促進剤、消化管由来細胞による管腔形成促進剤、肝臓由来細胞による管腔形成促進剤、リンパ管形成促進剤等が挙げられ、好ましくは、血管内皮細胞による管腔形成促進剤である。前記神経細胞成長促進剤としては、特に制限されないが、例えば、神経細胞増殖促進剤、神経細胞分化促進剤等が挙げられ、好ましくは、神経細胞増殖促進剤である。なお、本発明の促進剤は、前記血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有するが、同時に、前記血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能以外の他の機能を有していてもよい。本発明の促進剤の有する前記他の機能としては、特に制限されない。

30

40

【0077】

<医薬品>

本発明の医薬品は、前述のように、本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体および立体異性体、およびその塩、溶媒和物および水和物、ならびに本発明の促進剤からなる群から選択される少なくとも一つを含み、血管新生促進用、管腔形成促進用および神経細胞成長促進用からなる群から選択される少なくとも一つの用途を有する。なお、本発明において、医薬品とは、医薬品、医薬部外品を含む。本発明の医薬品としては、特に制限されないが、例えば、外傷治療薬、火傷治療薬、瘢痕治療薬、褥瘡治療薬等の創傷治療薬、アルツハイマー治療薬、アルツハイマー予防薬、梗塞性疾患治療薬、梗塞性疾患予防薬、育毛剤等が挙げられる。

50

【0078】

本発明の医薬品は、経口的または非経口的に投与可能である。経口的に投与する場合、本発明の医薬品の剤形としては、特に限定されないが、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤、トローチ剤、液剤等が挙げられる。非経口的に投与する場合、本発明の医薬品の剤形としては、特に限定されないが、例えば、注射剤、点鼻剤、軟膏剤、貼付剤、パップ剤、ローション剤、坐剤等が挙げられる。また、前記医薬品の組成は、特に制限されず、前記促進剤以外に、例えば、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、吸収促進剤、乳化剤、安定化剤、防腐剤等の各種添加剤等を含んでいてもよい。また、前記医薬品は、通常用いられる製剤化技術等により製造可能である。

【0079】

本発明の医薬品において、本発明のシクロブチルプリン誘導体の投与量は、剤形、投与方法、対象疾患、投与する患者等により適宜設定でき、特に制限されない。

【実施例】

【0080】

つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記の実施例により限定および制限されない。

【0081】

(実施例1)

本例では、前記化学式(6)に示す6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン(C₁₁H₁₄ClN₅O₂、以下、「2-Cl-C.OXT-A」という。)が、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性に与える影響を調べた。

【0082】

<2-Cl-C.OXT-Aの合成>

前記2-Cl-C.OXT-Aは、以下の工程1~3により合成した。なお、本例において、¹H NMRおよび¹³C NMRスペクトルは、UltraShieldTM 400 Plus FT NMR System(BRUKER社製)を用いて測定した。ケミカルシフトは、 δ で表し、カップリング定数(J)は、Hzで表した。融点は、微量融点測定装置MP-500D(ヤナコ機器開発研究所製)により測定した。元素分析は、2400 Series II CHNS/O(Perkin Elmer社製)を用いて測定した。高分解能質量分析は、APEX IV mass spectrometer(BRUKER社製)を用い、エレクトロスプレイイオン化質量分析(ESI-MS)法により測定した。

【0083】

(工程1:シス-トランス-2,3-ビス(ベンゾイルオキシメチル)-1-シクロブタノールの合成)

本例において、シス-トランス-2,3-ビス(ベンゾイルオキシメチル)-1-シクロブタノールは、Basacchiらの方法(G.S.Basacchi, A.Braitman, C.W.Cianci, J.M.Clark, A.K.Field, M.E.Hagen, D.R.Hockstein, M.F.Malley, T.Mitt, W.A.Slusarchyk, J.E.Sundeen, B.J.Terry, A.V.Tumari, E.R.Weaver, M.G.Young and R.Zahler, J.Med.Chem., 1991, 34, 1415)に基づき、以下のようにして合成した。まず、トランス-2,3-ビス(ベンゾイルオキシメチル)-1-シクロブタノール14.00g(41.40mmol)を、乾燥THF350mLに溶解し、窒素気流下で-78に冷却した。冷却後、攪拌しながら、1mmol/LのLS-セレクトリドTHF溶液42mLを前記溶液に滴下し、2時間後、さらに酢酸6mLを滴下した。この溶液を、室温に戻るまで静置後、20mLに濃縮した。前記濃縮液に、トルエン250mLおよび水100mLを加え、分液ロート中で震盪した。得られた有機層を水100mLで洗浄後、硫酸マグネシウムを用いて乾燥した。乾燥後、ろ過により固形物を除き、ろ液を2

10

20

30

40

50

0 mL に濃縮した。この濃縮液（残渣液）を、シリカゲルカラムを用いたクロマトグラフィー法により分離し、あめ状のシス - トランス - 2, 3 - ビス(ベンゾイルオキシメチル) - 1 - シクロブタノール (10.15 g、収率 72%) を得た。

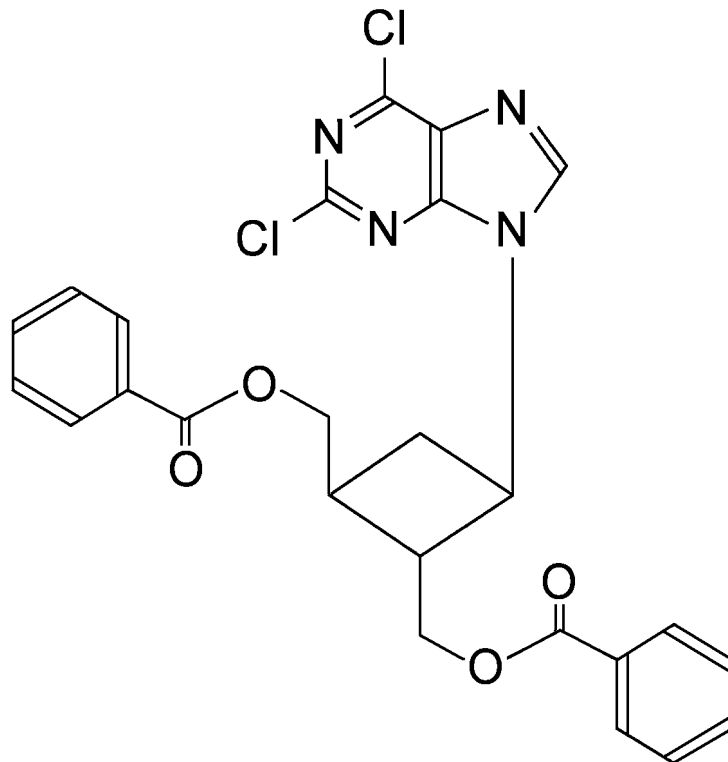
【0084】

(工程 2 : 2, 6 - ジクロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ベンゾイルオキシメチル)シクロブチル]プリン の合成)

つぎに、前記シス - トランス - 2, 3 - ビス(ベンゾイルオキシメチル) - 1 - シクロブタノール (5.20 g、15.28 mmol) および 2, 6 - ジクロロプリン (4.33 g、22.9 mmol) を、THF 100 mL に溶解し、氷冷下、トリフェニルフォスフィリン (7.87 g、30 mmol) を添加した。添加後、さらに、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (5.9 mL、30 mmol) を加え、一晚、50 に保持した。この溶液を濃縮した後、残渣液を、シリカゲルカラムを用いたクロマトグラフィー法により分離し、下記化学式 (10) に示す 2, 6 - ジクロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ベンゾイルオキシメチル)シクロブチル]プリン の白い結晶 (4.44 g、収率 57%) を得た。

【0085】

【化 8】



【0086】

以下に、この化合物の物性値を示す。

【0087】

Mp 146.8 - 147.4, MS $m/z = 510, 512, 514 (M^+)$.
 HR-MS. calcd. for $C_{25}H_{20}Cl_2N_4O_4$: 510.0862. Found; 510.0846. Anal. calcd. for $C_{25}H_{20}Cl_2N_4O_4 \cdot 0.3H_2O$. C; 58.11, H; 4.02, N; 10.84. Found. C; 57.79, H; 3.94, N; 10.87.

【0088】

(工程 3 : 6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン の合成)

前記 2, 6 - ジクロロ - 9 - [トランス - トランス - 2, 3 - ビス(ベンゾイルオキシ

メチル)シクロブチル]プリン(3.73g、7.29mmol)を、MeOH50mLに懸濁し、アンモニアで飽和させた。この溶液を、200mLの鋼鉄製封管内で、一晚、100℃に加熱した。加熱終了後、溶液を氷冷し、エバポレーターを用いて減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣に水50mLを加え、CHCl₃30mLで2度洗浄した。洗浄後、水層を採取し、10mLに濃縮し、前記化学式(6)に示す6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン(2-Cl-C.OXT-A)の白い結晶(1.49g、72%)を得た。以下に、この化合物の物性値を示す。

【0089】

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): 8.25(1H, s), 7.68(2H, br s), 4.63(1H, dd, J 5.2 and 4.6), 4.53-4.60(2H, m), 3.46-3.56(4H, m), 2.72-2.82(1H, m), 2.38-2.46(1H, m), 2.14(1H, dd, J 19.2 and 9.6), 2.03-2.12(1H, m); ¹³C NMR(100MHz, DMSO-d₆): 156.7, 152.6, 150.4, 140.2, 118.0, 63.5, 61.4, 47.6, 47.3, 33.0, 29.4. Mp 172-173.5. Anal. calcd. for C₁₁H₁₄ClN₅O₂·0.2H₂O: C; 45.98, H; 5.05, N; 24.37. Found: C; 45.83, H; 5.01, N; 24.23.

10

【0090】

20

<細胞増殖測定>

前記2-Cl-C.OXT-Aを、所定濃度(0.5、1、5、10、50、100mmol/L)になるように生理食塩水に溶解し、試料液を調製した。そして、前記所定濃度の試料液を、それぞれ10v/v%濃度になるように、2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)に加え、細胞増殖用培地を調製した。なお、前記細胞増殖用培地中の2-Cl-C.OXT-Aの最終濃度は、50、100、500μmol/L、1、5および10mmol/Lであった。

【0091】

ゼラチンコートした96ウェルプレートの各ウェルに、HuMedia-EG2培地(クラボウ社製)に懸濁したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、3×10³細胞ずつ播種し、24時間培養した。培養開始24時間後に、培地を除去し、各ウェルに前記細胞増殖用培地100μLを加え、さらに48時間培養した。培養終了後、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所社製)を用いて呈色反応を行い、反応開始2時間後に、マイクロプレートリーダーを用いて450nmにおける吸光度を測定した。なお、前記細胞増殖用培地に代えて、2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)を用いて培養し、前述と同様に呈色反応を行い、吸光度を測定したものを、コントロールとした。そして、下記式(I)を用いて、前記各濃度の2-Cl-C.OXT-Aを添加した細胞増殖用培地を用いた培養における相対吸光度を、それぞれ算出した。

30

【数1】

40

$$\text{相対吸光度} = \frac{\text{2-Cl-C.OXT-A添加培養の吸光度}}{\text{コントロールの吸光度}} \quad \dots (I)$$

【0092】

<管腔形成測定>

管腔形成測定は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)および正常ヒト皮膚線維芽細胞から構成された市販の血管新生キット(クラボウ社製)を用い、以下のようにして行った。

50

まず、2-Cl-C.OXT-Aを、所定濃度(1、10、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 、1、5、10、50 mmol/L)になるように生理食塩水に溶解し、試料液を調製した。そして、前記所定濃度の試料液を、それぞれ10v/v%濃度になるように、前記キット付属の培地に添加し、管腔形成用培地を調製した。なお、前記管腔形成用培地中の2-Cl-C.OXT-Aの最終濃度は、0.1、1、10、50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 、1および5 mmol/L であった。

【0093】

前記管腔形成用培地を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)および正常ヒト皮膚線維芽細胞を10日間培養した。培養後、管腔染色キット(CD31染色用、クラボウ社製)を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の免疫染色を行った。そして、NIH image(画像処理解析ソフトウェア)を用いて、前記免疫染色による染色部分の面積(管腔面積)を測定した。なお、前記管腔形成用培地に代えて、前記キット付属の培地を用いて培養し、前述と同様に免疫染色して管腔面積を測定したものを、コントロールとした。そして、下記式(II)を用いて、前記各濃度の2-Cl-C.OXT-Aを添加した管腔形成用培地を用いた培養における管腔面積相対値を、それぞれ算出した。

10

【数2】

$$\text{管腔面積相対値} = \frac{\text{2-Cl-C.OXT-A添加培養の管腔面積}}{\text{コントロールの管腔面積}} \dots \text{(II)}$$

20

【0094】

<細胞遊走性測定>

細胞遊走性測定は、Cytoselect 24-well Cell Migration Assay(CBA-100、Cell Biolabs社製)キットを用いて、以下のようにして行った。まず、2-Cl-C.OXT-Aを、所定濃度(0.1、0.5、1 mmol/L)になるように生理食塩水に溶解し、試料液を調製した。そして、前記所定濃度の試料液を、それぞれ10v/v%濃度になるように、2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)に加え、細胞遊走用培地を調製した。なお、前記細胞遊走用培地中の2-Cl-C.OXT-Aの最終濃度は、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ であった。

30

【0095】

2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、 0.5×10^6 細胞/mLの密度で懸濁し、細胞懸濁液を調製した。前記キット付属のポリカーボネート膜プレートの上段(インサート内)に、前記細胞懸濁液300 μL を加え、前記プレートの下段(ウェル内)に、前記細胞遊走用培地500 μL を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間培養した。培養終了後、綿棒を用いて前記インサート内部底面の膜上を拭い、膜上の細胞を除去した。そして、前記膜の裏側(インサート外部底面の膜上)に遊走した細胞を、キット付属の染色液を用いて染色し、インサート下方から写真撮影した。撮影後、キット付属の抽出液で色素を抽出し、マイクロプレートリーダーを用いて560nmにおける吸光度を測定した。なお、前記細胞遊走用培地に代えて、2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)を用いて培養し、前述と同様に染色して吸光度を測定したものを、コントロールとした。そして、前記式(I)を用いて、前記各濃度の2-Cl-C.OXT-Aを添加した細胞遊走用培地を用いた培養における相対吸光度を、それぞれ算出した。

40

【0096】

(比較例1)

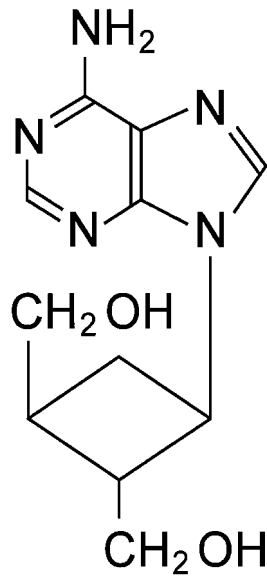
本例では、下記化学式(11)に示す6-アミノ-9-[トランス-トランス-2,3

50

- ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン(以下、「C.OXT-A」という。)による血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OXT-Aに代えて、C.OXT-Aを用い、前記管腔形成用培地中のC.OXT-Aの最終濃度を、1、5、10、50、および100 $\mu\text{mol/L}$ としたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

【0097】

【化9】



(11)

10

20

【0098】

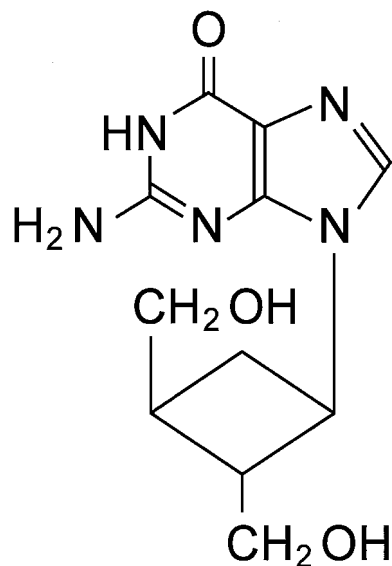
(比較例2)

本例では、下記化学式(12)に示す2-アミノ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]-3H-プリン-6-オン(以下、「C.OXT-G」という。)による血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OXT-Aに代えて、C.OXT-Gを用い、前記管腔形成用培地中のC.OXT-Gの最終濃度を、1、5、10、50、および100 $\mu\text{mol/L}$ としたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

30

40

50



(12)

【 0 1 0 0 】

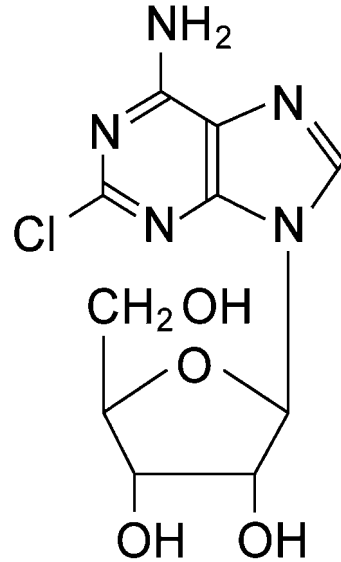
(比較例 3)

本例では、下記化学式(13)に示す2-クロロ-6-アミノ-9-[3,4-ジヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]プリン(以下、「2-Cl-ADN」という。)による血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OX.T-Aに代えて、2-Cl-ADNを用い、前記管腔形成用培地中の2-Cl-ADNの最終濃度を、500nmol/L、1、5、および10 μ mol/Lとしたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

【 0 1 0 1 】

【化11】

10



(13)

20

【 0 1 0 2 】

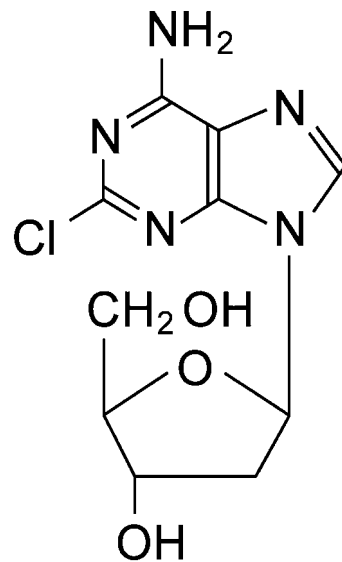
(比較例 4)

本例では、下記化学式(14)に示す2-クロロ-6-アミノ-9-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]プリン(以下、「2-Cl-DAD」という。)による血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OX.T-Aに代えて、2-Cl-DADを用い、前記管腔形成用培地中の2-Cl-DADの最終濃度を、500nmol/L、1、5および10 μ mol/Lとしたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

30

【 0 1 0 3 】

【化 1 2】



(14)

10

【0104】

(比較例5)

本例では、アデノシンによる血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OXT-Aに代えて、アデノシンを用い、前記管腔形成用培地中のアデノシンの最終濃度を、 $100\mu\text{mol/L}$ 、 1 、 2.5 および 5mmol/L としたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

20

【0105】

(比較例6)

本例では、デオキシアデノシンによる血管内皮細胞の管腔形成への影響を調べた。前記管腔形成の測定は、前記2-Cl-C.OXT-Aに代えて、デオキシアデノシンを用い、前記管腔形成用培地中のデオキシアデノシンの最終濃度を、 100 、 $500\mu\text{mol/L}$ 、 1 および 2.5mmol/L としたこと以外は、実施例1と同様にして行った。

【0106】

(比較例7)

本例では、前記2-Cl-C.OXT-Aに代えて、ポジティブコントロールとしてVEGFを用い、前記細胞増殖用培地、前記管腔形成用培地および前記遊走性測定用培地中のVEGFの最終濃度を、 10ng/mL としたこと以外は、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。

30

【0107】

(比較例8)

本例では、前記試料液に代えて、生理食塩水を、前記細胞増殖用培地、前記管腔形成用培地および前記遊走性測定用培地へ添加したこと以外は、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。

40

【0108】

(比較例9)

本例では、前記試料液に代えて、牛胎児血清(FBS)を前記遊走性測定用培地に添加し、FBSの前記培地中の最終濃度を $5\text{v/v}\%$ としたこと以外は、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞遊走性への影響を調べた。

【0109】

(比較例10)

本例では、前記試料液に代えて、牛胎児血清(FBS)を前記遊走性測定用培地に添加し、FBSの前記培地中の最終濃度を $10\text{v/v}\%$ としたこと以外は、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞遊走性への影響を調べた。

50

【0110】

<細胞増殖の測定結果>

図2に、細胞増殖測定における前記相対吸光度を比較したグラフを示す。同図のグラフにおいて、縦軸は、前記相対吸光度であり、各バーは、左から順に、比較例8（生理食塩水）、比較例7（VEGF）、実施例1（2-CL-C.OXT-A）の結果である。なお、横軸下に記載した各濃度は、実施例1における細胞増殖用培地中の試料の最終濃度を示す。

【0111】

図2のグラフに示すように、実施例1では、2-CL-C.OXT-Aの最終濃度が50 $\mu\text{mol/L}$ から1 mmol/L の範囲において、相対吸光度がほぼ1より高く、2-CL-C.OXT-Aにより増殖がやや促進され、5 mmol/L 以上の高濃度範囲において、濃度依存的に増殖が抑制された。

10

【0112】

<管腔形成の測定結果>

図3(A)～(F)に、管腔形成測定における免疫染色の写真を示す。図3(A)は、比較例8（生理食塩水）の写真であり、図3(B)は、比較例7（VEGF）の写真であり、図3(C)は、実施例1（2-CL-C.OXT-A 1 $\mu\text{mol/L}$ ）の写真であり、図3(D)は、実施例1（2-CL-C.OXT-A 10 $\mu\text{mol/L}$ ）の写真であり、図3(E)は、実施例1（2-CL-C.OXT-A 100 $\mu\text{mol/L}$ ）の写真であり、図3(F)は、実施例1（2-CL-C.OXT-A 1 mmol/L ）の写真である。同図において、各写真の横幅は、1.6 mmである。同図の各写真において、黒色の線状物が免疫染色されたヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）であり、黒色部分の面積が大きい程、管腔形成が促進されていることを示している。

20

【0113】

図3(D)～(F)の写真に示すように、前記管腔形成用培地中の2-CL-C.OXT-Aの最終濃度が10 $\mu\text{mol/L}$ から1 mmol/L の範囲において、染色された面積がコントロールより大きく、2-CL-C.OXT-Aによる管腔形成の促進活性が確認された。そして、同図(D)および(E)に示すように、前記最終濃度が10および100 $\mu\text{mol/L}$ において、VEGFを添加した比較例7よりも高い管腔形成促進活性を示した。

30

【0114】

図1に、管腔面積相対値を比較したグラフを示す。同図のグラフにおいて、縦軸は、前記管腔面積相対値であり、各バーは、左から順に、比較例8（生理食塩水）、比較例7（VEGF）、実施例1（2-CL-C.OXT-A）、比較例1（C.OXT-A）、比較例2（C.OXT-G）、比較例3（2-CL-ADN）、比較例4（2-CL-DAD）、比較例5（アデノシン）、比較例6（デオキシアデノシン）の結果である。なお、横軸下に記載した各濃度は、各例における管腔形成培養用培地中の試料の最終濃度を示す。

【0115】

図1のグラフに示すように、2-CL-C.OXT-Aの前記最終濃度が100 nmol/L から1 mmol/L の範囲において、管腔面積相対値がコントロールより高く、2-CL-C.OXT-Aによる管腔形成の促進活性が確認された。そして、前記最終濃度が10～500 $\mu\text{mol/L}$ の範囲において、VEGFを添加した比較例7よりも高い管腔形成促進活性を示した。特に、前記最終濃度100 $\mu\text{mol/L}$ において、前記管腔面積相対値が3.8となり、最も高い管腔形成促進活性を示した。

40

【0116】

<細胞遊走性の測定結果>

図4(A)～(H)および図5(A)～(H)に、細胞遊走測定における染色写真を示す。図4(A)および図5(A)は、コントロールの写真であり、図4(B)および図5(B)は、比較例8（生理食塩水）の写真であり、図4(C)および図5(C)は、比較

50

例 9 (5 v / v % F B S) の写真であり、図 4 (D) および図 5 (D) は、比較例 10 (10 v / v % F B S) の写真であり、図 4 (E) および図 5 (E) は、比較例 7 (V E G F) の写真であり、図 4 (F) および図 5 (F) は、実施例 1 (2 - C 1 - C . O X T - A 10 μ m o l / L) の写真であり、図 4 (G) および図 5 (G) は、実施例 1 (2 - C 1 - C . O X T - A 50 μ m o l / L) の写真であり、図 4 (H) および図 5 (H) は、実施例 1 (2 - C 1 - C . O X T - A 100 μ m o l / L) の写真である。両図において、各写真の横幅は、1.6 mm である。両図の各写真において、黒色染色部分が、遊走したヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) であり、黒色部分の面積が大きい程、細胞遊走が促進されていることを示している。

【 0 1 1 7 】

図 4 (F) ~ (H) および図 5 (F) ~ (H) の写真に示すように、培養液中の 2 - C 1 - C . O X T - A の最終濃度が 10 μ m o l / L から 100 μ m o l / L の範囲において、染色された面積がコントロールより大きく、2 - C 1 - C . O X T - A による細胞遊走の促進活性が確認された。

【 0 1 1 8 】

図 6 に、細胞遊走性測定における相対吸光度を比較したグラフを示す。同図のグラフにおいて、縦軸は、前記相対吸光度であり、各バーは、左から順に、コントロール (細胞遊走用培地)、比較例 8 (生理食塩水)、比較例 9 (5 v / v % F B S)、比較例 10 (10 v / v % F B S)、比較例 7 (V E G F) および実施例 1 (2 - C I - C . O X T - A) の結果である。なお、実施例 1 の結果を示すバーにおいて、横軸下に記載した各濃度は、細胞遊走用培地中の 2 - C 1 - C . O X T - A の最終濃度を示す。

【 0 1 1 9 】

図 6 のグラフに示すように、2 - C 1 - C . O X T - A の前記最終濃度が 10 ~ 100 μ m o l / L の範囲において、相対吸光度がコントロールより高く、2 - C 1 - C . O X T - A による細胞遊走性の促進活性が確認された。そして、前記最終濃度が 50 および 100 μ m o l / L の場合に、生理食塩水を添加した比較例 8 に比べて有意に高い細胞遊走促進活性を示した ($p < 0.02$)。特に、前記最終濃度 50 μ m o l / L において、前記相対吸光度が 2.1 となり、V E G F を添加した比較例 7 よりも高い細胞遊走促進活性を示した。

【 0 1 2 0 】

(実施例 2)

本例では、前記化学式 (9) に示す 6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン ($C_{12}H_{17}N_5O_2S$ 、以下、「2 - S M e - C . O X T - A」という。) を合成した。なお、前記化学式 (9) において、S M e は、メチルチオ基である。

【 0 1 2 1 】

< 2 - S M e - C . O X T - A の合成 >

本例では、実施例 1 と同様にして、前記工程 1 ~ 3 を行い、6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン (2 - C 1 - C . O X T - A) を合成した。そして、前記 2 - C 1 - C . O X T - A を用いて、さらに下記工程 4 ~ 6 を実施し、前記 2 - S M e - C . O X T - A を合成した。なお、本例では、実施例 1 と同様にして、各化合物を測定した。

【 0 1 2 2 】

(工程 4 : 6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (トリフェニルメトキシメチル) シクロブチル] プリンの合成)

前記 6 - アミノ - 2 - クロロ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン (170.4 mg、0.60 mmol) 溶液、トリチルクロライド (501.8 mg、1.80 mmol)、トリエチルアミン (0.4 mL) および 4 - ジメチルアミノピリジン (11.6 mg、0.06 mmol) を DMF 2.0 mL に溶解させ、室温で一晩攪拌した。攪拌開始 12 時間後、得られた黄濁液を、氷水に加え

10

20

30

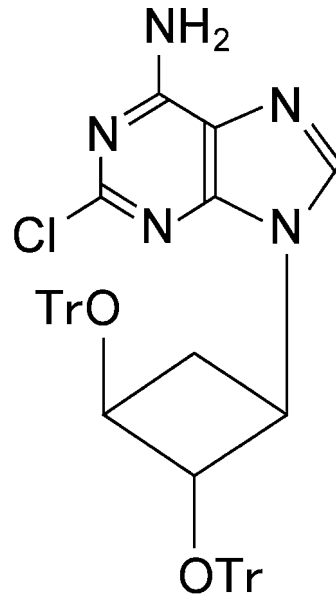
40

50

、酢酸エチルで抽出した。この有機抽出物を、飽和塩化アンモニウム溶液および水で洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、下記化学式(15)に示す6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(トリフェニルメトキシメチル)シクロブチル]プリン¹の白い結晶(273.9 mg、収率59%)を得た。なお、下記化学式(15)において、Trは、トリチル基である。

【0123】

【化13】



(15)

10

20

【0124】

以下に、この化合物の物性値を示す。

30

【0125】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.91 (1 H, s), 7.15 - 7.41 (30 H, m), 5.70 (2 H, br s), 4.73 (1 H, dd, J 17.2 and 9.2), 3.70 (1 H, dd, J 10.0 and 4.8), 3.18 - 3.30 (4 H, m), 2.87 - 2.90 (1 H, m), 2.53 - 2.67 (1 H, m), 2.20 - 2.33 (2 H, m).

【0126】

(工程5: 6-アミノ-2-チオメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(トリフェニルメトキシメチル)シクロブチル]プリン¹の合成)

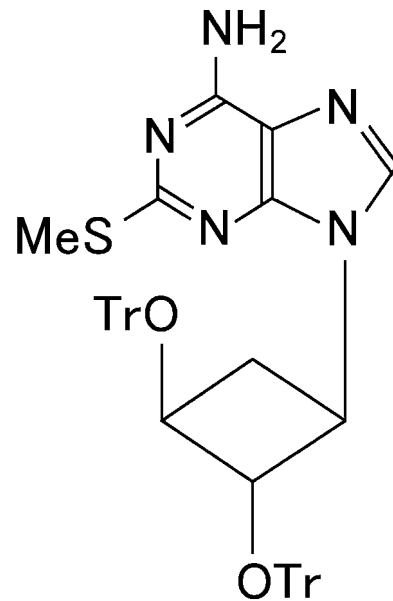
40

前記6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(トリフェニルメトキシメチル)シクロブチル]プリン(92.2 mg、0.12 mmol)およびチオメトキシドナトリウム(84.1 mg、1.20 mmol)をDMF 3.1 mLに溶解し、110℃で3.5時間加熱した。加熱終了後、減圧下で溶媒を留去し、得られた残渣を酢酸エチルで抽出した。得られた有機抽出物を、水および飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(エチルアセテート:ヘキサン=1:1)により精製し、下記化学式(16)に示す6-アミノ-2-チオメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(トリフェニルメトキシメチル)シクロブチル]プリン¹の黄色味を帯びた結晶(66.3 mg、収率71%)を得た。なお、下記化学式(16)において、SMeは、メチルチオ基であり、Trは、トリチル基である。

50

【 0 1 2 7 】

【 化 1 4 】



(16)

10

20

【 0 1 2 8 】

以下に、この化合物の物性値を示す。

【 0 1 2 9 】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.68 (1 H, s), 7.14 - 7.41 (30 H, m), 5.43 (2 H, br s), 4.74 (1 H, dd, J 17.6 and 8.8), 3.18 - 3.33 (4 H, m), 2.90 - 3.03 (1 H, m), 2.53 - 2.65 (1 H, m), 2.33 - 2.48 (2 H, m), 2.29 (3 H, s).

30

【 0 1 3 0 】

(工程 6 : 2 - S Me - C . O X T - A の合成)

前記 6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (トリフェニルメトキシメチル) シクロブチル] プリン (65.0 mg、0.08 mmol) を、ギ酸 1.7 mL およびジエチルエーテル 1.7 mL の混合液に溶解し、室温で 15 分間攪拌した。攪拌終了後、この混合液を酢酸エチルに溶解し、抽出した。得られた有機抽出物を、飽和炭酸水素ナトリウム溶液および飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。有機溶媒留去後、残渣を薄層クロマトグラフィー (ジクロロメタン : エタノール = 5 : 1) により精製し、前記化学式 (9) に示す 2 - S Me - C . O X T - A (6 - アミノ - 2 - チオメトキシ - 9 - [トランス - トランス - 2 , 3 - ビス (ヒドロキシメチル) シクロブチル] プリン) の黄色味を帯びた結晶 (9.4 mg、収率 38%) を得た。以下に、この化合物の物性値を示す。

40

【 0 1 3 1 】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_4): 8.04 (1 H, s), 4.64 (1 H, dd, J 17.6 and 8.8), 3.62 - 3.87 (4 H, m), 2.85 - 3.00 (1 H, m), 2.54 (1 H, s), 2.42 - 2.61 (2 H, m), 2.18 - 2.24 (1 H, m); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOH-d_4): 167.5, 165.5, 155.2, 138.9, 118.2, 64.1, 62.2, 48.6, 33.5, 29.3, 28.2, 13.1. Mp 209.4 - 211.0. HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}$

50

$5 \text{ NaO}_2 \text{ S [M + Na]}^+ : 318.0995 . \text{ Found } 318.1052 .$
 【0132】

本例の 2 - S Me - C . O X T - A について、実施例 1 と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、2 - S Me - C . O X T - A は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

【0133】

(実施例 3)

本例では、実施例 1 で用いた 2 - C l - C . O X T - A が、ERK、Akt、JNK および p 3 8 の酵素の活性化(リン酸化)に与える影響を調べた。なお、これらのタンパク質は、前記 ERK は、内皮細胞における最も代表的な血管新生促進系タンパク質リン酸化酵素の一つである。前記 Akt は、ERK 経路と並ぶ、内皮細胞における最も代表的な血管新生促進系タンパク質リン酸化酵素の一つである。また、JNK および p 3 8 は、ERK 経路以外の、代表的な MAP キナーゼタンパク質リン酸化酵素である。

10

【0134】

まず、2 v / v % 非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加した Hu Media - EB 2 培地(クラボウ社製)に、2 - C l - C . O X T - A を 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ となるように添加し、培地を調製した。前記培地を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を所定時間(0、10、20、30、45 および 60 分間)培養した。

【0135】

培養後、細胞を回収し、Cell l y s i s b u f f e r (SDS - l y s i s b u f f e r) を加えて溶解し、95 で 5 分間熱変性させた。熱変性させた細胞溶解液の 5 v / v % に相当する分量の可溶化タンパク質を、10% SDS - ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、ニトロセルロースメンブレン(Amersham Biosciences 社製)にトランスファーした。下記組成の TBS - T 20 ml に、スキムミルク(ワコー社製)を 5% となるように添加し、ブロッキング液を調製した。前記ブロッキング液に、得られたニトロセルロースメンブレンを浸漬し、室温で 1 時間振とうした。

20

【0136】

(TBS - T の組成)

10 mmol / L Tris
 0.15 mol / L NaCl
 0.1% Tween (登録商標) - 20

30

【0137】

下記に示す 1 次抗体を、5% ウシ血清アルブミン(Sigma 社製)含有 TBS - T に添加して 1000 倍希釈し、1 次抗体液を調製した。ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを、前記 1 次抗体液に浸漬し、室温で 1 時間振とうした。得られたニトロセルロースメンブレンを、前記 TBS - T に浸漬し、10 分間振とうして洗浄した。この洗浄操作を、合わせて 3 回行った。

【0138】

(1 次抗体)

抗 phospho ERK ポリクローナル抗体(カタログ番号 9101、Cell Signaling Technology 社製)

抗 phospho Akt ポリクローナル抗体(カタログ番号 9271、Cell Signaling Technology 社製)

抗 phospho p38 ポリクローナル抗体(カタログ番号 9211、Cell Signaling Technology 社製)

抗 phospho JNK ポリクローナル抗体(カタログ番号 9251、Cell Signaling Technology 社製)

抗総 ERK モノクローナル抗体(カタログ番号 610408、BD Transduc

40

50

tion Laboratory 社製)

抗総Aktポリクローナル抗体(カタログ番号9272、Cell Signaling Technology 社製)

【0139】

下記に示す2次抗体を、TBS-Tに添加して20000倍希釈し、2次抗体液を調製した。1次抗体反応後のニトロセルロースメンブレンを、前記2次抗体液に浸漬し、室温で1時間振とうした。得られたニトロセルロースメンブレンを、前記TBS-Tに浸漬し、10分間振とうして洗浄した。この洗浄操作を、合わせて3回行った。

【0140】

(2次抗体)

ERK:

ヒツジHRP標識抗マウスIgG抗体(Pierce社製)

pERK、Akt、pAkt、pJNK、およびpp38:

ヒツジHRP標識抗ラビットIgG抗体(Pierce社製)

【0141】

SuperSignal(登録商標) West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce社製)により発色し、RX-U X線フィルム(富士フィルム社製)に露光して検出した。検出されたバンドから、NIHイメージソフトウェアを用いて、各リン酸化型酵素と総酵素とをそれぞれ定量した。また、リン酸化型酵素の測定値を下記式(III)に代入し、リン酸化型酵素相対値(倍)を算出した。

リン酸化型酵素相対値(倍) = (B/D) / (A/C) ··· (III)

A = 添加前における各リン酸化型酵素の測定値

B = 各添加後時間における各リン酸化型酵素の測定値

C = 添加前における各総酵素の測定値

D = 各添加後時間における各総酵素の測定値

【0142】

図7および図8に、経時的にERK、Akt、JNKおよびp38のリン酸化型酵素量を測定した結果を示す。図7(A)は、上から順に、リン酸化ERK(pERK)、ERKのイムノプロットの写真であり、左から順に、2-Cl-C.OXT-A添加0、10、20、30、45および60分後の測定結果である。図7(B)は、図7(A)に示すpERKの定量結果を示すグラフである。図7(B)において、横軸は、2-Cl-C.OXT-A添加後の培養時間(分)であり、縦軸は、pERK相対値(倍)である。また、図8は、上から順に、リン酸化Akt(pAkt)、Akt、リン酸化JNK(pJNK)およびリン酸化p38(pp38)のイムノプロットの写真であり、左から順に、2-Cl-C.OXT-A添加0、10、20、30、45および60分後の測定結果である。

【0143】

図7に示すように、pERKは、培養時間と共に増加し、2-Cl-C.OXT-A添加20分後には、約11倍に増加した。これに対して、図8に示すように、pAkt、pJNKおよびpp38は、2-Cl-C.OXT-A添加により変化しなかった。このように、2-Cl-C.OXT-Aにより、血管新生のシグナル伝達物質であるERKの活性化(リン酸化)が促進された。

【0144】

(実施例4)

本例では、実施例1の2-Cl-C.OXT-Aおよび比較例2のC.OXT-Gが、ERK活性化(リン酸化)に与える影響を調べた。本例では、2-Cl-C.OXT-Aを所定濃度(0、10および100μmol/L)で添加した培地と、100μmol/L C.OXT-Gを添加した培地とを用い、添加後の培養時間を20分とし、1次抗体として、抗phosphoERKポリクローナル抗体(カタログ番号9101、Ce

10

20

30

40

50

11 Signaling Technology社製)および抗総ERKモノクローナル抗体(カタログ番号610408、BD Transduction Laboratory社製)のみを用い、ERKの2次抗体として、ヒツジHRP標識抗マウスIgG抗体(Pierce社製)を用い、pERKの2次抗体として、ヒツジHRP標識抗ラビットIgG抗体(Pierce社製)を用いた以外は、実施例3と同様にして、各酵素量を測定し、リン酸化型酵素相対値(倍)を算出した。

【0145】

図9に、各添加濃度におけるリン酸化ERKの測定結果を示す。図9(A)は、上段がリン酸化ERK(pERK)、下段がERKのイムノプロットの写真であり、左から順に、2-Cl-C.OXT-A 0、10および100 $\mu\text{mmol/L}$ 、ならびにC.OCT-Gの結果である。図9(B)は、図9(A)に示すpERKの定量結果を示すグラフである。図9(B)において、縦軸は、pERK相対値(倍)であり、左から順に、2-Cl-C.OXT-A 0、10および100 $\mu\text{mmol/L}$ 、ならびにC.OCT-Gの結果である。

10

【0146】

図9に示すように、pERKは、2-Cl-C.OXT-Aの添加濃度に依存して増加し、100 $\mu\text{mol/L}$ 濃度添加により、約10倍に増加した。これに対して、前記C.OCT-G添加により、pERK量は増加しなかった。このように、10 $\mu\text{mmol/L}$ または100 $\mu\text{mmol/L}$ 濃度の2-Cl-C.OXT-A添加により、血管新生のシグナル伝達物質であるERKが活性化された。

20

【0147】

(実施例5)

本例では、実施例1で用いた2-Cl-C.OXT-Aが、MEKのリン酸化に与える影響を調べた。なお、前記MEKは、実施例3において測定したERKの上流側に位置する、血管新生のシグナル伝達経路のタンパク質リン酸化酵素であり、血管新生促進に作用する。本例では、2-Cl-C.OXT-A添加後の培養時間を、所定時間(0、5、10、15および20分)とし、1次抗体として、抗phospho MEKポリクローナル抗体(カタログ番号9121、Cell Signaling Technology社製)および抗総MEKポリクローナル抗体(カタログ番号9122、Cell Signaling Technology社製)を用い、2次抗体として、ヒツジHRP標識抗ラビットIgG抗体(Pierce社製)を用いた以外は、実施例3と同様にして、各酵素量を測定し、リン酸化型酵素相対値(倍)を算出した。

30

【0148】

図10(A)は、上段がpMEK(リン酸化MEK)、下段がMEKのイムノプロットの写真であり、左から順に、2-Cl-C.OXT-A添加0、5、10、15および20分後の測定結果である。図10(B)は、図10(A)に示すpMEKの定量結果を示すグラフである。図10(B)において、横軸は、2-Cl-C.OXT-A添加後の培養時間(分)であり、縦軸は、pMEK相対値(倍)である。図10に示すように、pMEKは、培養時間と共に増加し、2-Cl-C.OXT-A添加15分後には、約3.5倍に増加した。このように、2-Cl-C.OXT-Aにより、血管新生のシグナル伝達物質であるMEKの活性化(リン酸化)が促進された。

40

【0149】

(実施例6)

本例では、MEK阻害剤であるPD98059が、実施例1で用いた2-Cl-C.OXT-AによるERK活性化(リン酸化)に与える影響を調べた。本例では、2v/v%非働化ウシ胎児血清(FBS)を添加したHuMedia-EB2培地(クラボウ社製)に、下記表1に示す濃度で2-Cl-C.OXT-AおよびPD98059を添加した培地No.1~4を用いた以外は、実施例4と同様にして、各酵素量を測定し、リン酸化型酵素相対値(倍)を算出した。

【0150】

50

(表1)

培地 No.	2 - C1 - C . O X T - A ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	P D 9 8 0 5 9 (nmol / L)
1	0	0
2	100	0
3	0	100
4	100	100

【0151】

図11に、PD98059による、ERK活性化(リン酸化)の阻害効果の測定結果を示す。図11(A)は、上段がpERK(リン酸化ERK)、下段がERK全体のイムノプロットの写真であり、左から順に、培地No.1、No.2、No.3およびNo.4の測定結果である。図11(B)は、図11(A)に示すpERKの定量結果を示すグラフである。図11(B)において、縦軸は、pERK(pERK1およびpERK2)相対値(倍)であり、左から順に、培地No.1、No.2、No.3およびNo.4の測定結果である。

10

【0152】

図11に示すように、2-C1-C.OXT-Aを添加したNo.2では、pERKが増加したが、PD95059を共存させたNo.4では、pERKの増加は認められなかった。また、2-C1-C.OXT-A無添加のNo.1、およびPD95059のみ添加したNo.3においても、pERKの増加は認められなかった。このように、PD95059により、2-C1-C.OXT-AによるERK活性化が阻害された。このことから、2-C1-C.OXT-AによるERK活性化は、MEKを介した特異的なMAPキナーゼ経路を介していることが示唆された。

20

【0153】

(実施例7)

本例では、MEK阻害剤であるPD98059が、実施例1で用いた2-C1-C.OXT-Aによる管腔形成に与える影響を調べた。

【0154】

本例では、前記血管新生キット(クラボウ社製)付属の培地に、下記表2に示す濃度で2-C1-C.OXT-AおよびPD98059を添加した培地No.5~8を用いた4群について測定した以外は、実施例1の管腔形成測定と同様にして、管腔面積相対値を算出した。また、No.7群では、培養1~3日目はNo.7を用い、培養4~10日目はNo.5を用いて培養し、No.8群では、培養1~3日目はNo.8を用い、培養4~10日目はNo.6を用いて培養した。

30

【0155】

(表2)

培地 No.	2 - C1 - C . O X T - A ($\mu\text{mol} / \text{L}$)	P D 9 8 0 5 9 (nmol / L)
5 (コントロール)	0	0
6	10	0
7	0	10
8	10	10

40

【0156】

図12に、管腔面積相対値を比較したグラフを示す。図12において、縦軸は、管腔面積相対値であり、左から順に、培地No.5、No.6、No.7およびNo.8群の測定結果である。2-C1-C.OXT-Aのみを添加したNo.6群では、管腔面積相対値が、No.5群(コントロール)の約3倍になったが、前記PD98059の併用により、約1倍に抑制された。このように、2-C1-C.OXT-Aによる管腔形成促進は、前述のERKの活性化と同様に、PD95059により阻害されることが示された。

50

【0157】

(実施例 8)

本例では、VEGFR 阻害剤である SU5416 が、実施例 1 で用いた 2-CL-C. OXT-A による ERK 活性化 (リン酸化) に与える影響を調べた。本例では、2 v/v % 非働化ウシ胎児血清 (FBS) を添加した HuMedia-EB2 培地 (クラボウ社製) に、下記表 3 に示す濃度で 2-CL-C. OXT-A および PD98059 を添加した培地 No. 9 ~ 14 を用いた以外は、実施例 4 と同様にして、各酵素量を測定し、リン酸化型酵素相対値 (倍) を算出した。

【0158】

(表 3)

培地 No.	2-CL-C. OXT-A ($\mu\text{mol/L}$)	VEGF (ng/mL)	SU5416 (nmol/L)
9	0	0	0
10	0	0	100
11	100	0	0
12	100	0	100
13	0	10	0
14	0	10	100

10

【0159】

図 13 に、SU5416 による、ERK 活性化 (リン酸化) の阻害効果の測定結果を示す。図 13 (A) は、pERK (リン酸化 ERK) のイムノプロットの写真であり、左から順に、培地 No. 9、No. 10、No. 11、No. 12、No. 13 および No. 14 の測定結果である。図 13 (B) は、図 13 (A) に示す pERK (pERK1 および pERK2) の定量結果を示すグラフである。図 13 (B) において、縦軸は、pERK (pERK1 および pERK2) 相対値 (倍) であり、左から順に、培地 No. 9、No. 10、No. 11、No. 12、No. 13 および No. 14 の測定結果である。

20

【0160】

図 13 に示すように、pERK は、2-CL-C. OXT-A を添加した No. 11 において増加し、SU5416 を共存させた No. 12 においても増加した。また、2-CL-C. OXT-A 無添加の No. 9、および SU5416 のみ添加した No. 10 において、pERK は増加しなかった。一方、pERK は、ポジティブコントロールである VEGF を添加した No. 13 において増加したが、SU5416 を共存させた No. 14 においては増加が抑制された。このように、2-CL-C. OXT-A による ERK 活性化は、SU5416 により阻害されなかった。このことから、2-CL-C. OXT-A による ERK 活性化機構は、ポジティブコントロールの VEGF と異なり、VEGF 受容体の活性には依存しないことが示された。

30

【0161】

(実施例 9)

本例では、VEGFR 阻害剤である SU5416 が、実施例 1 で用いた 2-CL-C. OXT-A による管腔形成に与える影響を調べた。

【0162】

本例では、前記血管新生キット (クラボウ社製) 付属の培地に、下記表 4 に示す濃度で 2-CL-C. OXT-A、VEGF (ポジティブコントロール) および SU5416 を添加した培地 No. 15 ~ 20 を用いた 6 群について測定した以外は、実施例 1 の管腔形成測定と同様にして、管腔面積相対値を算出した。また、No. 16 群では、培養 1 ~ 3 日目は No. 16 を用い、培養 4 ~ 10 日目は No. 15 を用いて培養し、No. 18 群では、培養 1 ~ 3 日目は No. 18 を用い、培養 4 ~ 10 日目は No. 17 を用いて培養し、No. 20 群では、培養 1 ~ 3 日目は No. 20 を用い、培養 4 ~ 10 日目は No. 19 を用いて培養した。

40

【0163】

(表 4)

50

培地 No.	2 - C 1 - C . O X T - A (μ m o l / L)	V E G F (n g / m L)	S U 5 4 1 6 (μ m o l / L)
15 (コントロール)	0	0	0
16	0	0	2.5
17	10	0	0
18	10	0	2.5
19	0	10	0
20	0	10	2.5

【0164】

図14に、管腔面積相対値を比較したグラフを示す。図14において、縦軸は、管腔面積相対値であり、左から順に、培地No.15、No.16、No.17、No.18、No.19およびNo.20群の測定結果である。図14に示すように、VEGFを添加したNo.19において、管腔面積は増加したが、VEGFとSU5416とを併用したNo.20においては、減少した。これに対して、2-C1-C.OXT-Aを添加したNo.17において、管腔面積は著しく増加し、2-C1-C.OXT-AとSU5416とを併用したNo.18においては、前記No.17と比べると増加率は低いが、増加した。このように、2-C1-C.OXT-Aによる管腔形成促進は、SU5416により阻害されなかった。なお、SU5416のみを添加しているNo.16の管腔形成は、無添加のNo.15(コントロール)に比べて減少した。この理由は、この評価系に用いた線維芽細胞由来のVEGFによる管腔形成促進が、SU5416添加により抑制されたためと考えられる。したがって、No.18における増加抑制は、線維芽細胞由来VEGFによる管腔形成が抑制されていることによると推察される。このように、2-C1-C.OXT-Aによる管腔形成促進機構は、ERKの活性化促進機構と同様に、VEGF受容体の活性に依存しないことが示された。

【0165】

(実施例10)

本例では、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した、神経細胞モデル細胞であるラット副腎髄質由来株化細胞PC12を用いて、実施例1の2-C1-C.OXT-Aが、PC12細胞の分化に与える影響を調べた。

【0166】

PBSに、下記表5に示す添加物を所定濃度となるように添加し、3つのサンプルを調製した。DMEM(無血清)に、各サンプルまたはPBSを10v/v%となるように添加し、評価用培地を調製した。また、コントロール用培地として、DMEM(無血清)のみの培地を調製した。前記PC12細胞を、 5×10^4 細胞/mLとなるように、5v/v%ウシ血清および10v/v%ウマ血清添加DMEMに懸濁し、細胞懸濁液を調製した。前記細胞懸濁液3mLを、6cmシャーレに播種し、培養2日目に、前記評価用培地に交換し、4日間培養した。培養6日目に、顕微鏡下で細胞を写真撮影し、エルマン法(Elleman, G.L., et al., Biochem. Pharmacol., 7, 88-95, (1961))を用いて、AChE活性を測定した。前記AChE活性は、具体的には、以下のようにして測定した。培養後、PC12細胞を、セルスクレーパを用いて剥がし、回収した。回収した細胞を、軽く遠心分離(1200rpm、15分)し、上清を除去したのち、0.1w/v% Triton(登録商標)X-100水溶液150 μ Lを添加し、試料溶液を調製した。75 μ L吸光度測定用のキュベットに、前記試料溶液、10mmol/L DTNB 75 μ L、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH8.0)3.0mLを加え、最後に、100mmol/L アセチルチオコリン50 μ Lを添加して反応させ、添加直後から5分間、412nmにおける前記反応液の吸光度を測定した。前記吸光度から、1分あたりの吸光度の増加量(C)を求めた。また、PIERCE(登録商標)BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて、前記試料溶液のタンパク質濃度(D)を測定した。前記吸光度増加量(C)およびタンパク質濃度(D)を、下記式(IV

10

20

30

40

50

) に代入して、AChE活性を算出した。なお、1Uは、1分あたりに1 μ molの反応生成物を産生する酵素量(μ mol/分)である。そして、AChEの測定値を下記式(V)に代入し、AChE活性相対値(倍)を算出した。

$$\text{AChE活性 (U/mg)} = 3.14 \times (C/D) \dots (IV)$$

$$\text{AChE相対値 (倍)} = F/E \dots (V)$$

E = コントロール用培地におけるAChEの測定値

F = 各添加物含有培地におけるAChEの測定値

【0167】

(表5)

サンプル	添加物	濃度
サンプル1	NGF	1 μ g/mL
サンプル2	2-Cl-C.OXT-A	500 μ mol/L
サンプル3	2-Cl-C.OXT-A	1mmol/L

10

【0168】

<形態変化>

図15(A)~(D)に、PC12細胞の顕微鏡写真を示す。図15(A)は、PBS、図15(B)は、NGF(神経成長因子、ポジティブコントロール)、図15(C)は、2-Cl-C.OXT-A 50 μ mol/L、図15(D)は、2-Cl-C.OXT-A 100 μ mol/Lを添加して培養した細胞の写真である。図15(A)に示すバーの長さは、100 μ mである。図15において、線状の軸策が伸長した細胞は、PC12細胞が神経細胞様に分化した細胞である。図15(A)に示すように、コントロールでは、線状の軸策が伸長した細胞はほぼ観察されなかった。これに対して、図15(C)および(D)に示すように、図15(B)のNGFと同様に、2-Cl-C.OXT-A添加により、線状の軸策が伸長した細胞が観察された。

20

【0169】

<AChE活性>

図16に、AChE(アセチルコリンエステラーゼ)活性の測定結果を示す。AChE活性はPC12細胞の分化のマーカーである。図16において、縦軸は、AChE活性相対値であり、各バーは、左から順に、PBS、NGF(ポジティブコントロール)、2-Cl-C.OXT-A 50 μ mol/Lおよび2-Cl-C.OXT-A 100 μ mol/Lの結果である。図16に示すように、2-Cl-C.OXT-Aにより、NGFと同様に、AChE酵素活性が増加した。このように、2-Cl-C.OXT-Aによる神経細胞様への分化促進活性が示され、神経細胞成長促進活性が確認された。

30

【0170】

(実施例11)

本例では、ウサギ角膜法による、実施例1の2-Cl-C.OXT-Aが、血管新生に与える影響を調べた。

【0171】

30 μ Lの生理食塩水に、2-Cl-C.OXT-Aを16mmol/Lとなるように添加し、試料を調製した。セボフルラン麻酔下で、日本白色家兔(雄、2.8kg)の角膜内に前記試料を注射し、7日後に観察した。

40

【0172】

図17に、ウサギ眼球の観察結果を示す。図17(A)は、生理食塩水、図17(B)は、2-Cl-C.OXT-Aの投与結果を示す写真である。図17(A)に示すように、生理食塩水投与により、血管新生は確認されなかった。これに対して、図17(B)に示すように、2-Cl-C.OXT-Aの投与により、角膜内に、多くの血管新生が確認された。このように、ウサギ角膜法による*in vivo*試験において、2-Cl-C.OXT-Aによる血管新生促進活性が確認された。

【0173】

以上の実施例1~11および比較例1~10から明らかなように、本発明のシクロプチ

50

ルプリン誘導体による細胞増殖促進活性、血管新生促進活性、管腔形成促進活性、細胞遊走促進活性および神経細胞成長促進活性が確認された。

【0174】

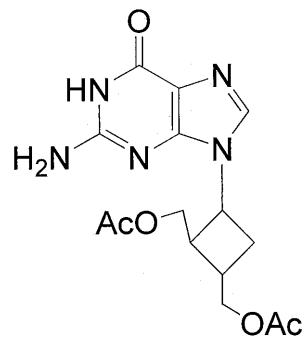
(実施例12)

下記化学式(17)に示す9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニンについて、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、下記化学式(17)の化合物は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

【0175】

【化15】

10



(17)

20

【0176】

なお、前記化学式(17)に示す9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニンは、公知の方法により適宜合成できる。具体的には、例えば、前記化学式(12)に示すC.OX T-G(2-アミノ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]-3H-プリン-6-オン、すなわち9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]グアニン)を、アセトニトリル溶媒中、トリエチルアミンおよび4-ジメチルアミノピリジンの存在下、無水酢酸でアセチル化して得ることができる。この合成方法は、例えば、特開平03-047169号公報、米国特許第5153352号公報(US5153352A)、および欧州特許出願公開第0366059号明細書(EP0366059A2)に記載されている。また、前記化学式(12)のC.OX T-G(2-アミノ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]-3H-プリン-6-オン、すなわち9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]グアニン)も、公知の方法により適宜合成可能であり、例えば、前記特開平03-047169号公報、米国特許第5153352号公報(US5153352A)、および欧州特許出願公開第0366059号明細書(EP0366059A2)に合成法が記載されている。

30

40

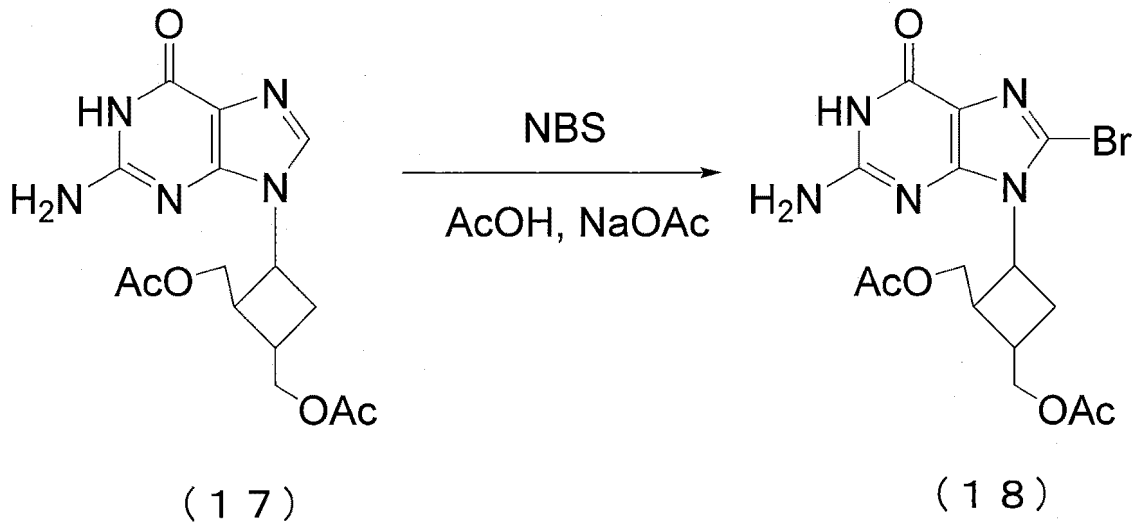
【0177】

(実施例13)

本例では、下記化学式(18)に示す8-プロモ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニンを合成した。

【0178】

【化 16】



10

【0179】

まず、前記化学式(17)で表される9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロプロチル]グアニン175mg(0.5mmol)を酢酸3.5mLに溶かし、さらに酢酸ナトリウム175mgを加えて溶かした。この溶液を、A液とする。一方、N-ブロムコハク酸イミド110mg(0.62mmol)を2mLの酢酸に溶かした。この溶液をB液とする。前記A液に、攪拌しながらB液を滴下した。この混合溶液を室温で30分放置し、さらに4で一晩放置した。その後、溶媒を減圧下で留去し、残渣を酢酸エチル20mLと水10mLの混液に溶かした。この混合液から水層を分離し、有機層を濃縮すると、結晶が析出した。また、分離した水層からも結晶が析出した。前記有機層および水相から析出した結晶を、それぞれろ過により採取し、乾燥させて、目的の8-ブromo-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロプロチル]グアニン(18)を、収量154mg(0.40mmol、収率80%)で得た。以下に、この化合物の物性値を示す。

20

【0180】

FT-MS $m/z = 450, 452 (M^+ + Na)$; 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): 10.76 (1H, br s), 6.48 (2H, br s), 4.58 (1H, m), 4.21 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 4.07 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.42 (1H, m), 2.81 (1H, m), 2.35 (1H, m), 2.22 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.92 (3H, s)

30

【0181】

この8-ブromo-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロプロチル]グアニン(化学式(18))について、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、この化合物は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

40

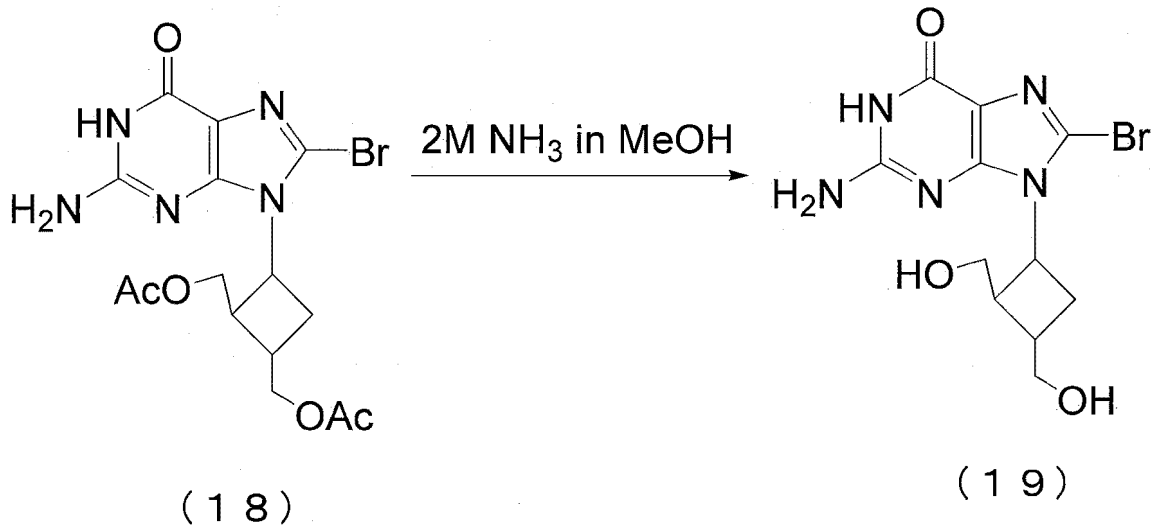
【0182】

(実施例14)

下記化学式(19)で表される8-ブromo-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロプロチル]グアニンを合成した。

【0183】

【化 17】



10

【0184】

前記化学式(18)で表される8-ブロモ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニン39mg(0.091mmol)を、5mLの2Mアンモニアメタノール溶液に溶かし、25℃で1日放置した。この溶液を濃縮すると、目的物の8-ブロモ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]グアニン(19)が、やや黄色みがかった結晶として得られた。収量は、21mg(0.061mmol, 収率67%)であった。以下に、この化合物の物性を示す。

20

【0185】

FT-MS $m/z = 366, 368 (M^+ + Na)$; 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): 8.52 (1H, br s), 6.47 (2H, br s), 4.60 (2H, m), 4.50 (1H, t, $J = 5.2$ Hz), 3.59 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 3.43 (2H, t, $J = 4.8$ Hz), 3.25 (1H, m), 2.57 (1H, q, $J = 10.0$ Hz), 2.26 (1H, m), 2.02 (1H, m).

30

【0186】

この8-ブロモ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]グアニン(化学式(19))について、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、この化合物は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

【0187】

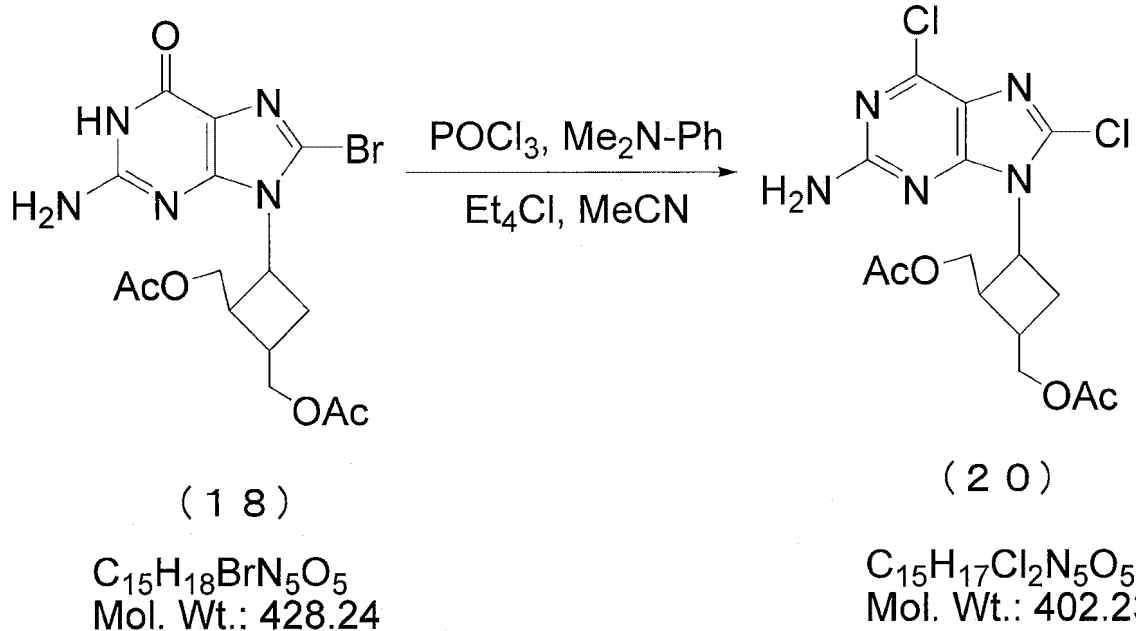
(実施例15)

下記化学式(20)で表される2-アミノ-6,8-ジクロル-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]プリンを合成した。

【0188】

40

【化 18】



10

20

【0189】

まず、前記化学式(18)で表される8-ブromo-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニン154mg(0.4mmol)およびテトラエチルアンモニウムクロリド150mgを、5mLのアセトニトリルに溶かした。この溶液に、さらにN,N-ジメチルアニリン0.16mL(1.3mmol)およびオキシ塩化リン0.7mL(7.7mmol)を加え、室温で30分放置後、100で30分加熱還流して反応させた。その後、前記反応溶液を氷水中に滴下し、15分間攪拌した後、クロロホルムで目的物を抽出した。前記クロロホルム層を、5%炭酸水素ナトリウム水、および水で洗浄後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で分離し、目的物の2-アミノ-6,8-ジクロル-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]プリン(20)を白色結晶として得た。収量は86mg(0.21mmol、収率53%)であった。以下に、この化合物の物性値を示す。

30

【0190】

FT-MS $m/z = 424, 426, 428 (M^+ + Na)$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 5.16 (2H, br s), 4.70 (1H, m), 4.35 (2H, d, $J = 6.4$ Hz), 4.17 (2H, m), 3.62 (1H, m), 2.89 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.33 (1H, m), 2.10 (3H, s), 2.02 (3H, s).

【0191】

この2-アミノ-6,8-ジクロル-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]プリン(化学式(20))について、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、この化合物は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

40

【0192】

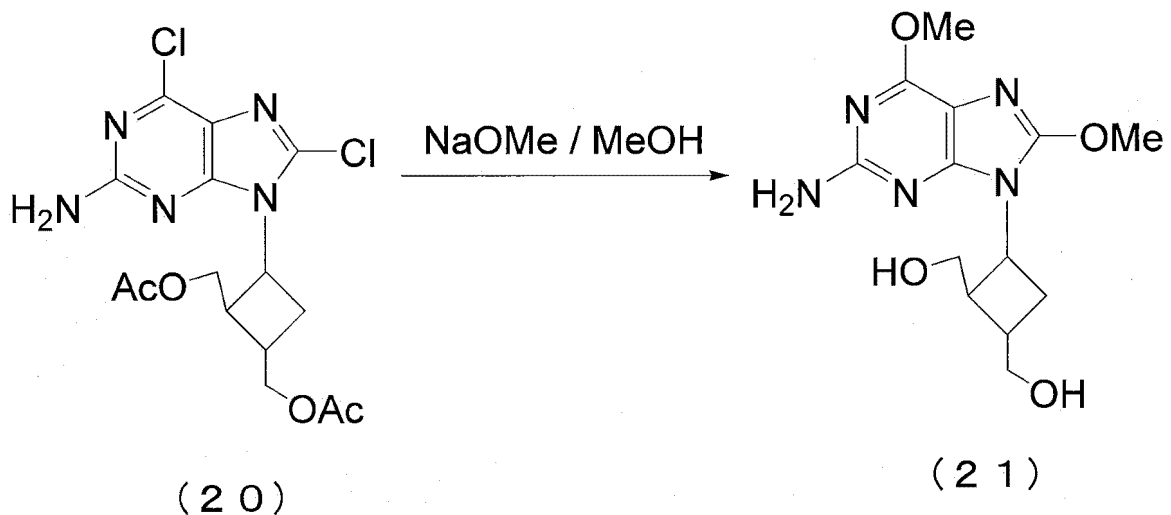
(実施例16)

下記化学式(21)で表される2-アミノ-6,8-ジメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリンを合成した。

【0193】

50

【化 19】



10

【0194】

まず、前記化学式(20)で表される2-アミノ-6,8-ジクロル-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]プリン75mg(0.186mmol)を、6mLのメタノールに懸濁させた。この懸濁液に、さらに23% 20
ナトリウムメトキシド0.5mLを加えて攪拌し、前記原料化合物(20)をメタノールに溶解させた。この溶液を60℃で一晩加熱し、反応させた。反応後、前記溶液を酢酸で中和し、濃縮後、シリカゲルカラム(酢酸エチル:メタノール=12:1)で分離し、溶媒を留去した。得られた残渣を酢酸エチルから結晶化(再結晶)し、目的物の2-アミノ-6,8-ジメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン(21)を、白色結晶として得た。収量は、34.4mg(0.111mmol、収率60%)であった。以下に、この化合物(21)の物性値を示す。

【0195】

FT-MS $m/z = 310 (M^+ + H)$; 1H NMR (400MHz, DMSO-
d₆): 4.44-4.55 (3H, m), 3.99 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.52 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.40 (2H, t, J = 5.2 Hz), 3.01 (1H, m), 2.31 (1H, m), 2.20 (1H, m), 1.98 (1H, m). 30

【0196】

この2-アミノ-6,8-ジメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン(化学式(21))について、実施例1と同様にして、血管内皮細胞の細胞増殖、管腔形成および細胞遊走性への影響を調べた。その結果、この化合物は、血管内皮細胞の細胞増殖促進活性、管腔形成促進活性および細胞遊走性促進活性を示した。

【産業上の利用可能性】

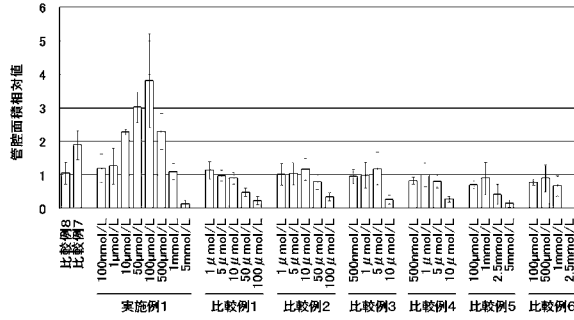
40

【0197】

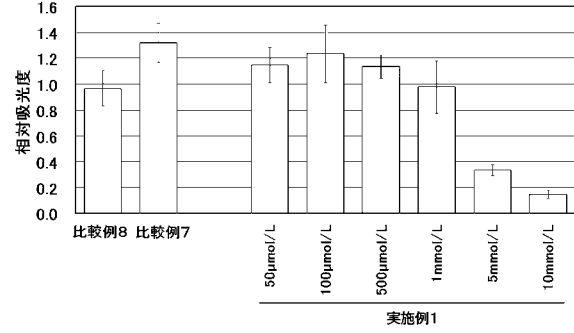
本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、化学的に安定な低分子物質であり、低分子量のため、吸収性が高い。また、本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、工業的に生産可能なため、安価に安定して供給可能である。そして、本発明のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物は、細胞増殖促進活性、血管新生促進活性、管腔形成促進活性、細胞遊走促進活性および神経細胞成長促進活性の少なくとも一つを利用した、種々の医薬品、医薬部外品等に利用可能であり、適用分野は制限されず広い。

50

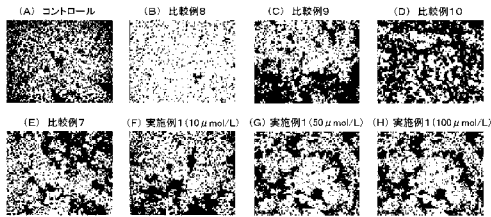
【 図 1 】



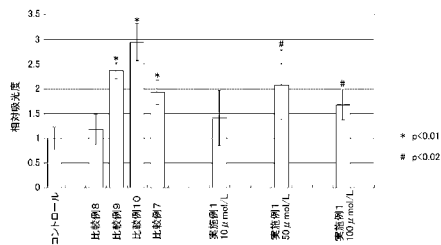
【 図 2 】



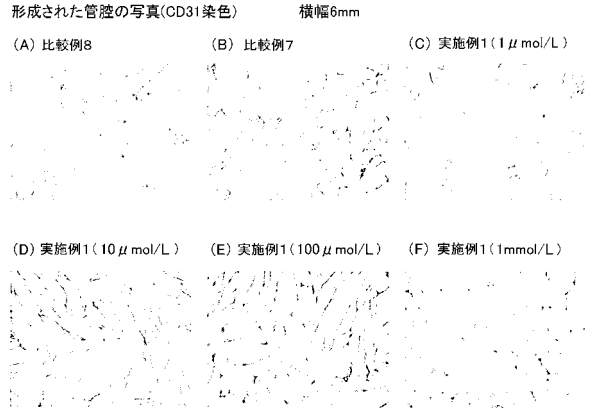
【 図 5 】



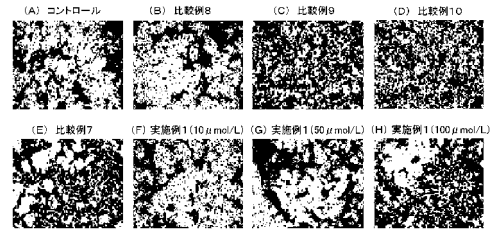
【 図 6 】



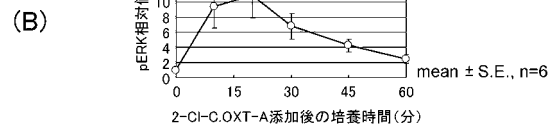
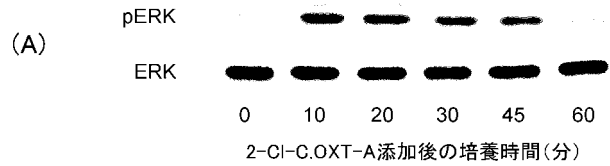
【 図 3 】



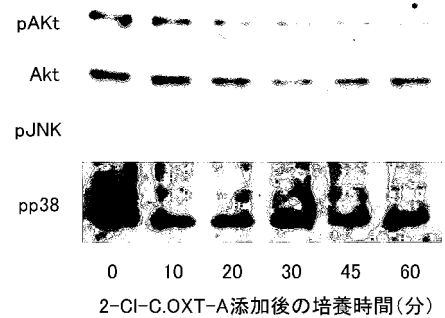
【 図 4 】



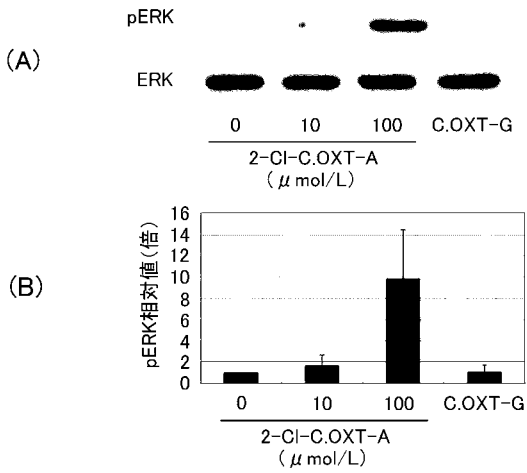
【 図 7 】



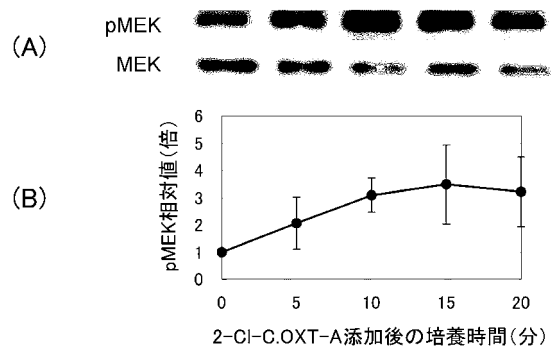
【 図 8 】



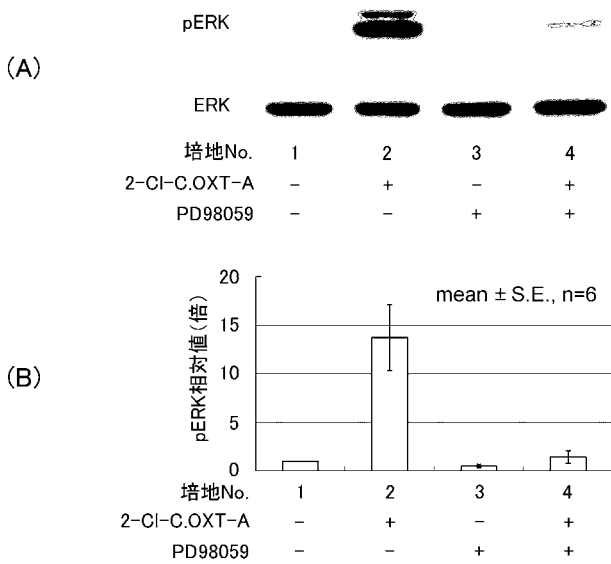
【 図 9 】



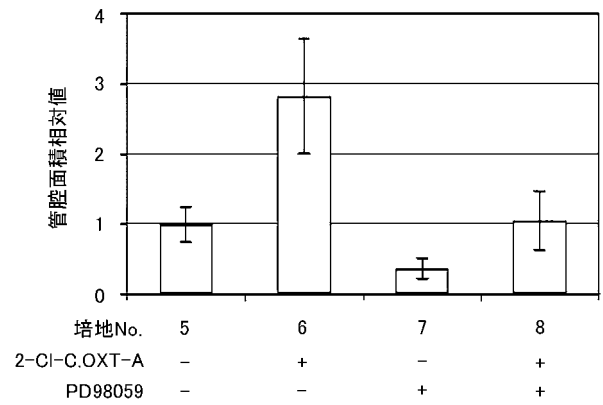
【 図 1 0 】



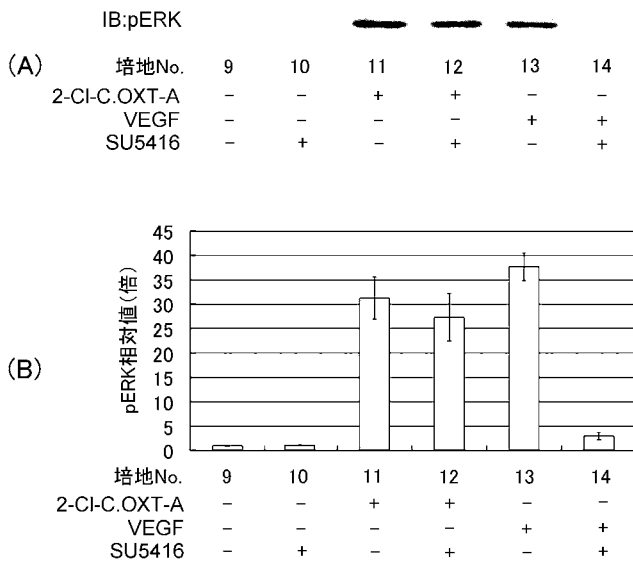
【 図 1 1 】



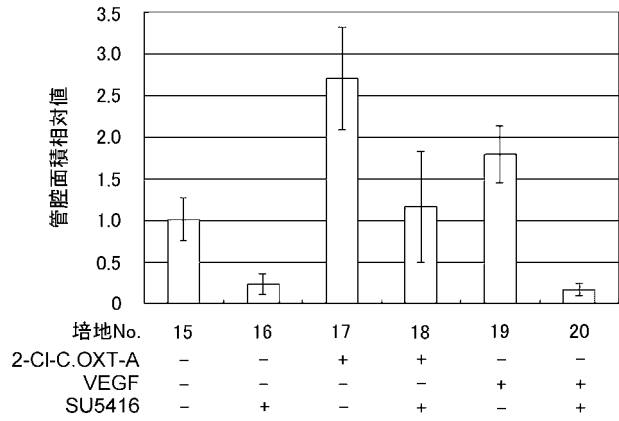
【 図 1 2 】



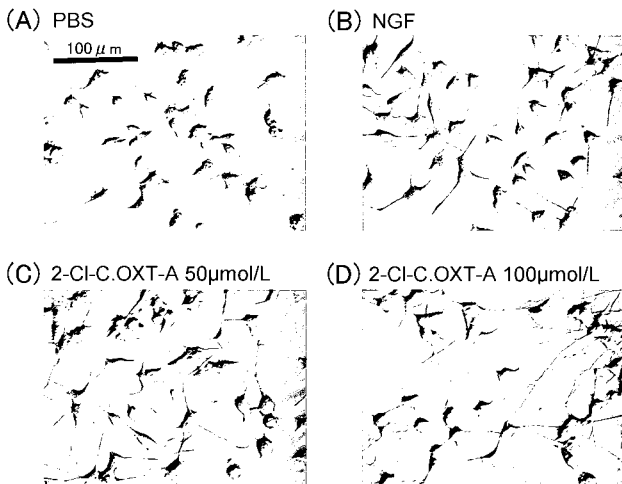
【 图 1 3 】



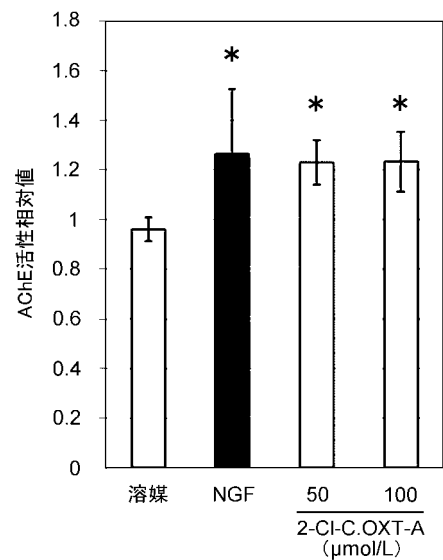
【 图 1 4 】



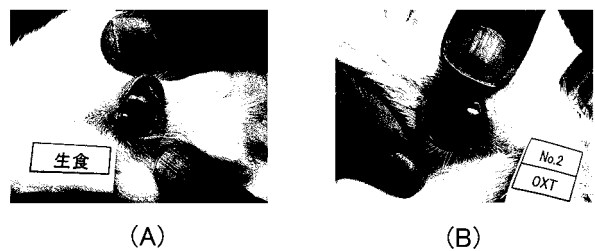
【 图 1 5 】



【 图 1 6 】



【 图 1 7 】



【手続補正書】

【提出日】平成23年4月28日(2011.4.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

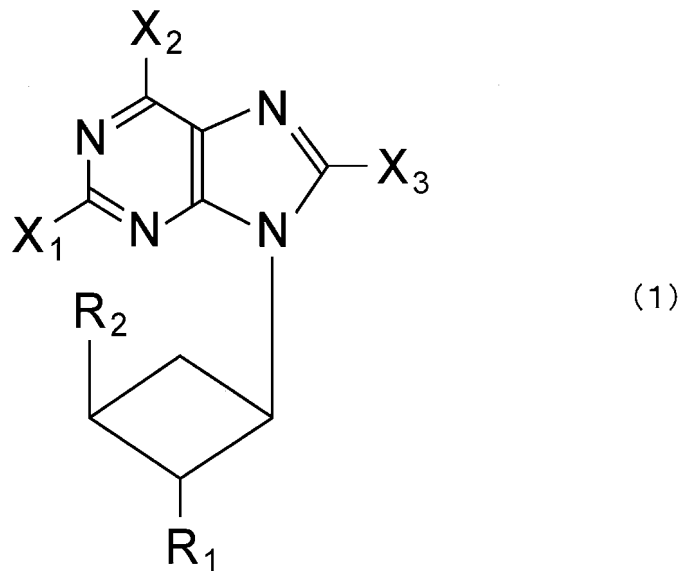
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【化20】



前記一般式(1)中、

X_1 は、ハロゲン基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基(チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

X_2 は、ハロゲン基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基(チオール基)またはアルキルチオ基であり、

X_3 は、水素原子、ハロゲン基またはアルコキシ基であり、

R_1 および R_2 は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲン基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホオキシアルキル基であり、

X_1 がアミノ基である場合は、

X_2 および X_3 がともにハロゲン基であるか、

X_2 および X_3 がともにアルコキシ基であるか、または、

X_2 がヒドロキシ基であり、 X_3 がハロゲン基であり、かつ、 R_1 および R_2 がともにアシルオキシアルキル基であり、

前記 X_1 、 X_2 、 X_3 、 R_1 および R_2 において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基(チオール基)、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記カルボキシル基、前記アシル基、前記カルバモイル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

【請求項2】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基またはチオメトキシ基である請求項1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項3】

前記一般式(1)において、前記 X_2 が、アミノ基である請求項1または2記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項4】

前記一般式(1)において、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である請求項1から3のいずれか一項に記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項5】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、クロロ基またはチオメトキシ基であり、前記 X_2 が、アミノ基であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である、請求項1から4のいずれか一項に記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項6】

6-アミノ-2-クロロ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリンもしくは6-アミノ-2-チオメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である請求項1から5のいずれか一項に記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項7】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、アミノ基である請求項1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項8】

前記一般式(1)において、前記 X_2 および X_3 が、メトキシ基である請求項7記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項9】

前記一般式(1)において、前記 X_1 が、アミノ基であり、前記 X_2 および X_3 が、メトキシ基であり、前記 R_1 および R_2 が、ヒドロキシメチル基である、請求項7または8記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項10】

2-アミノ-6,8-ジメトキシ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(ヒドロキシメチル)シクロブチル]プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である請求項1または7から9のいずれか一項に記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

【請求項11】

8-プロモ-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]グアニンもしくは2-アミノ-6,8-ジクロル-9-[トランス-トランス-2,3-ビス(アセチルオキシメチル)シクロブチル]プリン、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物である請求項1記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物。

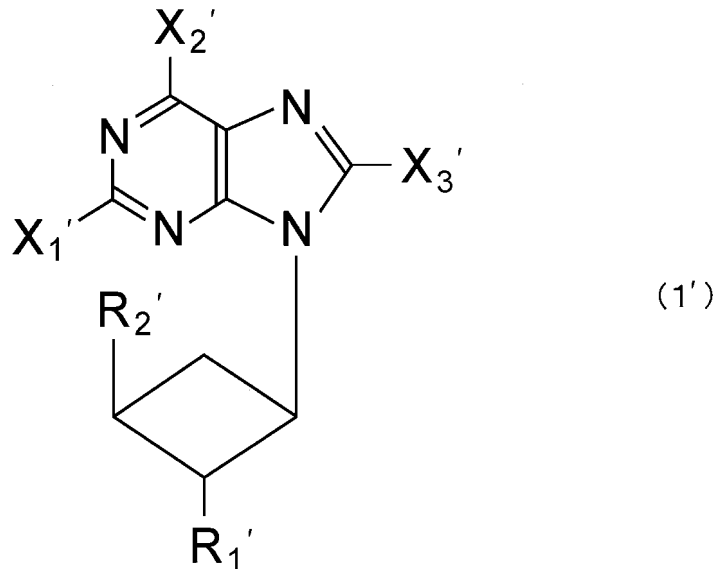
【請求項12】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物および水和物からなる群から選択される少なくとも一つを含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤。

【請求項 1 3】

下記一般式 (1 ') で表されるシクロブチルプリン誘導体、その互変異性体もしくは立体異性体、またはそれらの塩、溶媒和物もしくは水和物を含み、血管新生促進機能、管腔形成促進機能および神経細胞成長促進機能からなる群から選択される少なくとも一つの機能を有する促進剤。

【化 2 1】



前記一般式 (1 ') 中、

X_1' は、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、チオ基 (チオール基)、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アルキニル基またはシアノ基であり、

X_2' は、ハロゲノ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、チオ基 (チオール基) またはアルキルチオ基であり、

X_3' は、水素原子、ハロゲノ基、アルキル基、アルキルチオ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、ヒドロキシフェニル基またはカルバモイル基であり、

R_1' および R_2' は、同一であるかまたは異なり、それぞれ、水素原子、ハロゲノ基、カルボキシル基、アルキル基、アシル基、カルバモイル基、アシルオキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシアルキル基、アルコキシアルキル基、ハロアルキル基またはホスホノオキシアルキル基であり、

X_1' がアミノ基かつ X_3' が水素原子である場合は、 R_1' および R_2' は、ヒドロキシアルキル基以外の原子または置換基であり、

前記 X_1' 、 X_2' 、 X_3' 、 R_1' および R_2' において、前記アルキル基、前記アルキルチオ基、前記チオ基 (チオール基)、前記ヒドロキシ基、前記アルコキシ基、前記アルキニル基、前記アミノ基、前記ヒドロキシフェニル基、前記カルバモイル基、前記カルボキシル基、前記アシル基、前記アシルオキシ基、前記ヒドロキシアルキル基、前記アシルオキシアルキル基、前記アルコキシアルキル基および前記ホスホノオキシアルキル基は、それぞれの一つ以上の水素原子が任意の置換基に置換されていてもよい。

【請求項 1 4】

前記一般式 (1 ') において、前記 X_1' が、クロロ基またはチオメトキシ基である、請求項 1 3 記載の促進剤。

【請求項 1 5】

前記一般式 (1 ') において、前記 X_2' が、アミノ基である、請求項 1 3 または 1 4 記

載の促進剤。

【請求項 16】

前記一般式(1')において、前記 R_1' および R_2' が、ヒドロキシメチル基である、請求項13から15のいずれか一項に記載の促進剤。

【請求項 17】

前記一般式(1')において、前記 X_1' が、クロロ基またはチオメトキシ基であり、前記 X_2' が、アミノ基であり、前記 X_3' が、水素原子であり、前記 R_1' および R_2' が、ヒドロキシメチル基である、請求項13から16のいずれか一項に記載の促進剤。

【請求項 18】

請求項12から17のいずれか一項に記載の促進剤からなる群から選択される少なくとも一つを含み、血管新生促進用、管腔形成促進用および神経細胞成長促進用からなる群から選択される少なくとも一つの用途を有する医薬品。

【請求項 19】

創傷治癒薬、アルツハイマー治療薬、アルツハイマー予防薬、梗塞性疾患治療薬および梗塞性疾患予防薬からなる群から選択される少なくとも一つである請求項18記載の医薬品。

。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

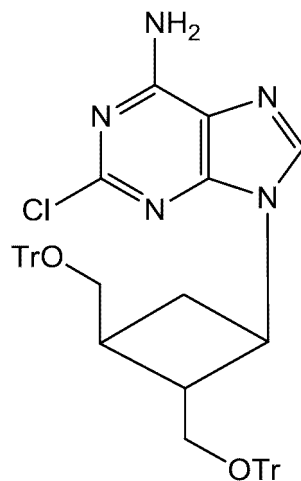
【補正対象項目名】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

【化13】



(15)

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

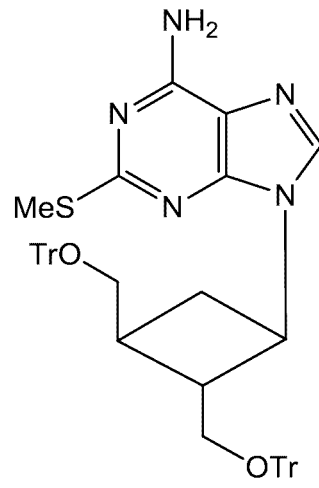
【補正対象項目名】0127

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0127】

【化 1 4】



(16)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D473/34(2006.01)i, A61K31/52(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07D473/40(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D473/34, A61K31/52, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, A61P25/00, A61P25/28, C07D473/40		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOBSON, K.A. et al., Structurally related nucleotides as selective agonists and antagonists at P2Y ₁ receptors, <i>Il Farmaco</i> , 2001, Vol.56, p.71-5, p.74 Fig.2 compound MRS2264	1-3
X	HONZAWA, S. et al., Synthesis and Hybridization Property of Oligonucleotides Containing Carbocyclic Oxetanocins, <i>Tetrahedron</i> , 2000, Vol.56, p.2615-27, p.2615 Fig.1 carbocyclic oxetanocin A	1,3-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 March, 2010 (24.03.10)		Date of mailing of the international search report 06 April, 2010 (06.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070062

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 08-301765 A (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA), 19 November 1996 (19.11.1996), entire text & EP 358154 A2 & WO 90/05730 A2 & WO 90/05730 A3 & JP 03-095165 A & JP 07-149718 A & JP 08-301766 A & JP 2577640 B2 & JP 2632646 B2 & JP 2783531 B2 & EP 358154 B1 & JP 2888333 B2	1-14
A	WO 2003/030925 A1 (NOKIHARA K., JP), 17 April 2003 (17.04.2003), entire text & EP 1452182 A1 & US 2004/266696 A1 & US 7091175 B2 & JP 4338516 B2	1-14
A	WO 99/09992 A1 (MITSUBISHI PHARM. IND. LTD., JP), 04 March 1999 (04.03.1999), entire text & EP 1008349 A1 & US 6288113 B1	1-14
A	JP 11-263770 A (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA), 23 February 1999 (23.02.1999), entire text & WO 99/05091 A1 & JP 11-049718 A & JP 11-100344 A & JP 11-140091 A & JP 11-263759 A & JP 11-263771 A & EP 999204 A1 & US 6384063 B1 & EP 999204 B1	1-14
P,X	Ikuko TSUKAMOTO et al., "Kakusan Ruiji Kagobutsu 2Cl-C.OXT-A no Gosei to sono Kekkan Shinsei Sokushin Sayo", Abstracts of Symposium on Medicinal Chemistry, 10 November 2009 (10.11.2009), vol.28, pages 72 to 73, entire text	1-14
P,X	Ikuko TSUKAMOTO et al., "HUVEC no Kanku Keisei o Sokushin suru Kakusan Ruiji Kagobutsu 2Cl-C.OXT-A no Sayo", The Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, 08 October 2009 (08.10.2009), vol.17, page 63, entire text	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 0 0 6 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D473/34(2006.01)i, A61K31/52(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07D473/40(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D473/34, A61K31/52, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, A61P25/00, A61P25/28, C07D473/40											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
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	関連する 請求項の番号									
X	JACOBSON, K.A. et al., Structurally related nucleotides as selective agonists and antagonists at P2Y ₁ receptors, <i>Il Farmaco</i> , 2001, Vol.56, p.71-5, p.74 Fig.2 化合物 MRS2264	1-3									
X	HONZAWA, S. et al., Synthesis and Hybridization Property of Oligonucleotides Containing Carbocyclic Oxetanocins, <i>Tetrahedron</i> , 2000, Vol.56, p.2615-27, p.2615 Fig.1 carbocyclic oxetanocin A	1,3-4									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「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		「T」国際出願日又は優先日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									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 24.03.2010		国際調査報告の発送日 06.04.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鳥居 福代	4 P 4669								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 0 0 6 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
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	関連する 請求項の番号
A	JP 08-301765 A (NIPPON KAYAKU K. K.) 1996. 11. 19, 全文 & EP 358154 A2 & WO 90/05730 A2 & WO 90/05730 A3 & JP 03-095165 A & JP 07-149718 A & JP 08-301766 A & JP 2577640 B2 & JP 2632646 B2 & JP 2783531 B2 & EP 358154 B1 & JP 2888333 B2	1-14
A	WO 2003/030925 A1 (NOKIHARA K., JP) 2003. 04. 17, 全文 & EP 1452182 A1 & US 2004/266696 A1 & US 7091175 B2 & JP 4338516 B2	1-14
A	WO 99/09992 A1 (MITSUBISHI PHARM. IND. LTD., JP) 1999. 03. 04, 全文 & EP 1008349 A1 & US 6288113 B1	1-14
A	JP 11-263770 A (NIPPON KAYAKU K. K.) 1999. 02. 23, 全文 & WO 99/05091 A1 & JP 11-049718 A & JP 11-100344 A & JP 11-140091 A & JP 11-263759 A & JP 11-263771 A & EP 999204 A1 & US 6384063 B1 & EP 999204 B1	1-14
P, X	塚本郁子ら, 核酸類似化合物 2C1-C. OXT-A の合成とその血管新生促進作用, メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 2009. 11. 10, Vol. 28, p. 72-73 全文	1-14
P, X	塚本郁子ら, HUVEC の管腔形成を促進する核酸類似化合物 2C1-C. OXT-A の作用, 日本血管生物医学会 2009. 10. 08, Vol. 17, p. 63 全文	1-14

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 小西 良士
香川県木田郡三木町大字池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内
- (72) 発明者 徳田 雅明
香川県木田郡三木町大字池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内
- (72) 発明者 窪田 泰夫
香川県木田郡三木町大字池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内
- (72) 発明者 丸山 徳見
香川県さぬき市志度 1 3 1 4 - 1 徳島文理大学香川薬学部内
- (72) 発明者 小坂 博昭
香川県木田郡三木町大字池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内
- (72) 発明者 五十嵐 淳介
香川県木田郡三木町大字池戸 1 7 5 0 - 1 国立大学法人香川大学医学部内
- F ターム (参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 CB07 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA16 ZA36
ZA39 ZA89 ZA92 ZB21

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。