

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-101359

(P2014-101359A)

(43) 公開日 平成26年6月5日 (2014. 6. 5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/427 (2006.01)	A 6 1 K 31/427	4 C 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 42 頁) 最終頁に続く		

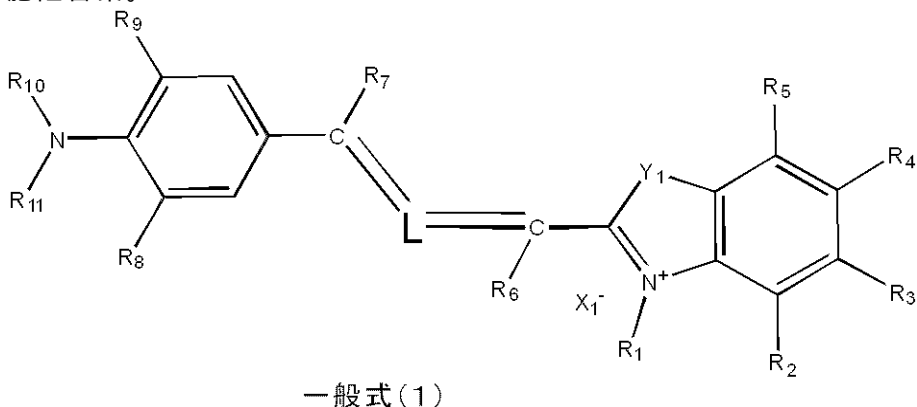
(21) 出願番号	特願2013-222030 (P2013-222030)	(71) 出願人	304026696
(22) 出願日	平成25年10月25日 (2013. 10. 25)		国立大学法人三重大学
(31) 優先権主張番号	特願2012-236981 (P2012-236981)		三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7
(32) 優先日	平成24年10月26日 (2012. 10. 26)	(71) 出願人	000001007
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		キヤノン株式会社
			東京都大田区下丸子 3 丁目 3 O 番 2 号
		(74) 代理人	100094112
			弁理士 岡部 譲
		(74) 代理人	100096943
			弁理士 臼井 伸一
		(74) 代理人	100101498
			弁理士 越智 隆夫
		(74) 代理人	100107401
			弁理士 高橋 誠一郎
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 がん細胞阻害薬、がん幹細胞検出用プローブ

(57) 【要約】

【課題】本発明の目的は、がん細胞阻害薬、特に、がん幹細胞阻害薬、または、がん幹細胞検出プローブを提供すること。

【解決手段】少なくとも、一般式 (1) で表される化合物を含むことを特徴とするがん細胞阻害薬。



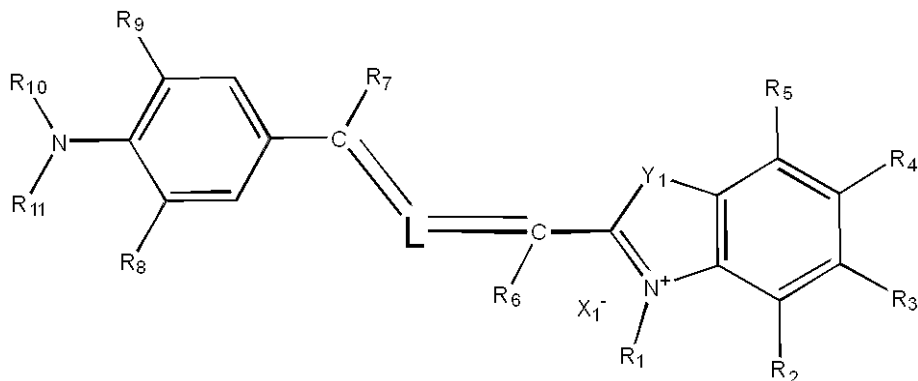
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも、一般式(1)で表される化合物を含むことを特徴とするがん細胞阻害薬、

【化 1】



一般式(1)

10

一般式(1)中、 R_1 は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_2 \sim R_5$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表し、 $R_6 \sim R_7$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 $R_8 \sim R_9$ は各々独立して、水素原子、アルキル基、アルケニル基、ハロゲン原子を表し、 $R_{10} \sim R_{11}$ は各々独立して、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表し、また、 R_9 と R_{10} は互いに結合して窒素原子を含んだヘテロ環を形成しても良い。 X_1^- は陰イオン性基を表し、

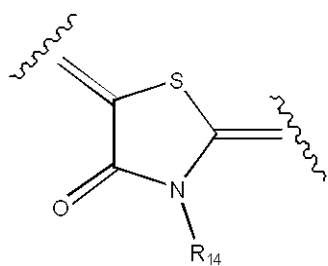
20

Y_1 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{12})(R_{13})-$ を表し、 $R_{12} \sim R_{13}$ は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{12} と R_{13} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよく、

L は存在しない(その場合 L の両側の炭素が二重結合で結合している)、一般式(2)で表される、または、 $=C(R_{15})-C(R_{16})=$ を表し、 $R_{15} \sim R_{16}$ は水素原子、アルキル基を表す、

30

【化 2】



一般式(2)

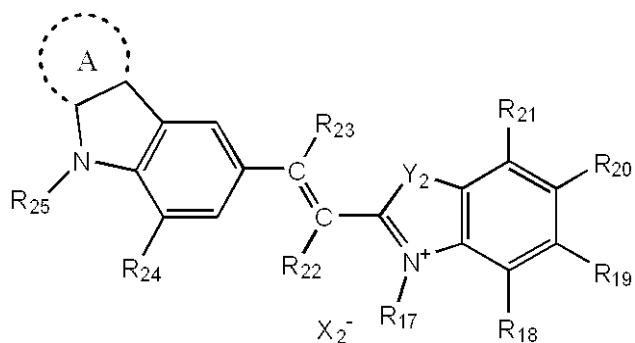
一般式(2)において、 R_{14} はアルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表す。

40

【請求項 2】

一般式(1)で表される化合物が、一般式(3)である請求項1に記載のがん細胞阻害薬、

【化 3】



10

一般式(3)

一般式(3)中、 R_{17} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{18} \sim R_{21}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表し、 $R_{22} \sim R_{23}$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 R_{24} は、水素原子、または、ハロゲン原子を表し、 R_{25} は、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表し、 X_2^- は陰イオン性基を表し、

Y_2 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{26})(R_{27})-$ を表し、 $R_{26} \sim R_{27}$ は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{26} と R_{27} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよく、

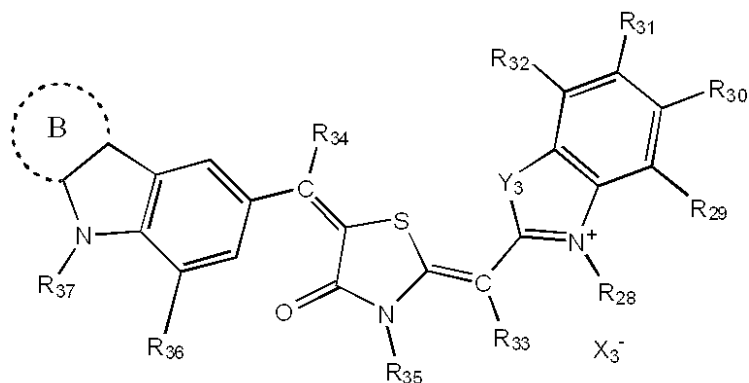
20

Aはシクロペンタン環、または、ベンゼン環を表す。

【請求項 3】

一般式(1)で表される化合物が、一般式(4)である請求項1に記載のがん細胞阻害薬、

【化 4】



30

一般式(4)

一般式(4)中、 R_{28} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{29} \sim R_{32}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表し、 $R_{33} \sim R_{34}$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 R_{35} は、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 R_{36} は、水素原子、または、ハロゲン原子を表し、 R_{37} は、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表す。 X_3^- は陰イオン性基を表し、

40

Y_3 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{38})(R_{39})-$ を表し、 $R_{38} \sim R_{39}$ は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{38} と R_{39} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよく、

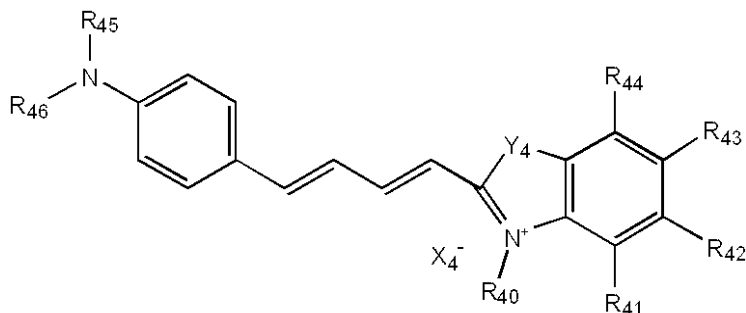
50

Bはシクロペンタン環、または、ベンゼン環を表す。

【請求項 4】

一般式(1)で表される化合物が、一般式(5)である請求項1に記載のがん細胞阻害薬、

【化 5】



一般式(5)

一般式(5)中、 R_{40} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{41} \sim R_{44}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表し、 $R_{45} \sim R_{46}$ は、アルキル基、アリール基を表し、 R_{35} は、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表し、 X_4^- は陰イオン性基を表し、

Y_4 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{47})(R_{48})-$ を表し、 $R_{47} \sim R_{48}$ は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{47} と R_{48} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【請求項 5】

前記一般式(1)で表される化合物が、蛍光を有する化合物であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のがん細胞阻害薬。

【請求項 6】

前記がん細胞が、がん幹細胞である請求項1～5のいずれか1項に記載のがん細胞阻害薬。

【請求項 7】

少なくとも、請求項6に記載のがん細胞阻害薬を有効成分として含むがん幹細胞検出用プローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん細胞阻害薬、特にがん幹細胞阻害薬、がん幹細胞検出用プローブに関する。

【背景技術】

【0002】

現在、一般的ながんの治療法は、放射線療法、化学療法、免疫療法、外科的(摘出)療法等が挙げられる。化学療法は、様々な低分子化合物からなる抗がん剤治療薬を用いてがんを抑制する方法である。

【0003】

抗がん剤治療薬を用いた治療は、固形腫瘍を縮小させることを目的としている。一方、腫瘍の大部分は、がん幹細胞としての機能を持たない分化したがん細胞が占めているとされており、一般的な抗がん剤治療は、この分化したがん細胞を標的として縮小させているだけと指摘されている。

【0004】

がんには幹細胞の性質をもった細胞があるとされ、がん幹細胞(Cancer Stem

10

20

30

40

50

m Cell)といわれる。がん幹細胞は1997年、急性骨髄性白血病において初めて同定され、現在では、固形がんを含め、様々ながんにおいてがん幹細胞が発見されつつある。そして、近年、がんは、がん幹細胞を起源として発生するのではないかという「がん幹細胞仮説」という新しい考えが提唱されている(非特許文献1)。

【0005】

この仮説によると、上記に示した療法による治療を行い、大部分のがん細胞を死滅、または、摘出したとしても、ごく少数の自己再生能を持つがん幹細胞の存在が残っている場合、がんの再発、転移が起こると考えられる。そして、がんの再発、転移の原因は、少数の残っているがん幹細胞にあると考えられる。がん幹細胞を標的として完全に根絶することができれば、がんの転移や再発の防止に有用な治療法の開発につながることを期待されている。

10

【0006】

がん幹細胞の中には、抗がん剤治療薬に対して、薬剤耐性を獲得している細胞が存在することが指摘されている(非特許文献2)。

【0007】

現状では、がん幹細胞の検出及び治療剤のために用いられる低分子化合物としては、放射性Cu-ATSMを含有する化合物が知られている(特許文献1)。しかし、放射性化合物を用いる場合は正常細胞に影響を及ぼす可能性があり、安全性が懸念される。また、がん幹細胞は、放射線に強い抵抗性を示すことも指摘されている。

20

【0008】

このようなことから、がん幹細胞を阻害する薬剤並びに検出可能な化合物の開発が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2010-13380号公報

【特許文献2】特開2010-169678号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Carcinogenesis, Vol. 26, p. p. 703 - 711, 2005

30

【非特許文献2】Nature Review Cancer, Vol. 5, p. p. 275 - 284, 2005

【非特許文献3】Yakugaku Zasshi, Vol. 69, p. p. 237 - 239, 1949

【非特許文献4】Indian Journal of Chemistry, Vol. 6, p. p. 136 - 139, 1968

【非特許文献5】Synthesis, p. p. 37 - 38, 1976

【非特許文献6】Dye and Pigments, Vol. 90, p. p. 201 - 210, 2011

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

がん幹細胞は、従来の放射線療法や化学療法に対して高い抵抗性があり、がんの増殖、再発、転移の原因となる細胞である。これまでがん幹細胞の存在部位が明確に検出することが出来ないことが課題であった。がんを根治するために、がん幹細胞の検出、及び、がん細胞、特にがん幹細胞を阻害する薬剤の開発が強く望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らは、前記した課題を解決すべく鋭意検討の結果、下記一般式(1)で表される

50

化合物が、がん細胞に対し阻害を示すこと、特にがん細胞の中でも、がん幹細胞に選択的に取り込まれ、阻害することを見出し、本発明に至った。

【0013】

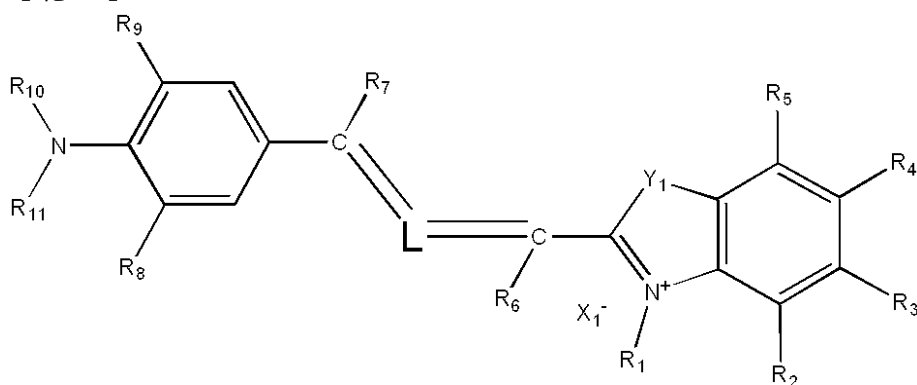
また、本発明の化合物は発光特性を有する。そのため、がん細胞に選択的に取り込まれた化合物の発光を検出することによって、がん細胞の位置を同定（検出）が出来ることを見出し、本発明に至った。なお、本明細書中、発光とは、蛍光及び燐光を含む。本発明の化合物は、特に、がん幹細胞に関する取り込まれる割合が大きいため、選択的にがん幹細胞を検出することが可能である。

【0014】

すなわち、本発明の化合物は、一般式（1）で表される化合物を含むことを特徴とする。

10

【化1】



20

一般式(1)

一般式（1）中、 R_1 は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を保有するアルキル基を表し、 $R_2 \sim R_5$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表す。 $R_6 \sim R_7$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 $R_8 \sim R_9$ は各々独立して、水素原子、アルキル基、アルケニル基、ハロゲン原子を表し、 $R_{10} \sim R_{11}$ は各々独立して、アルキル基、アリール基、アラキル基を表す。また、 R_9 と R_{10} は互いに結合して窒素原子を含んだヘテロ環を形成しても良い。 X_1^- は陰イオン性基を表す。

30

【0015】

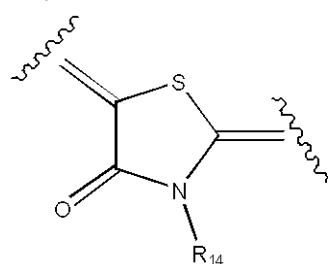
Y_1 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{12})(R_{13})-$ を表し、 $R_{12} \sim R_{13}$ は各々独立して、アルキル基を表す。 R_{12} と R_{13} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【0016】

L は、存在しない（その場合 L の両側の炭素が二重結合で結合している）、一般式（2）で表される、または、 $=C(R_{15})-C(R_{16})=$ を表し、 $R_{15} \sim R_{16}$ は水素原子、アルキル基を表す。

40

【化2】



一般式(2)

一般式（2）において、 R_{14} はアルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカ

50

ルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表す。

【発明の効果】

【0017】

本発明によって提供される化合物により、外科的な摘出の見逃しや摘出が難解な部位でも、がん細胞の増殖抑制、分裂抑制、転移抑制、機能障害、殺細胞が可能になる。特に、がん細胞の中でも、がん幹細胞に対して上記記載の効果が顕著である。また、がん幹細胞の検出が簡便となり、その部位を明確にすることが可能になる。すなわち、本発明はがん幹細胞検出用プローブを提供する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

10

以下、本発明の実施形態について説明する。

【0019】

本発明の化合物は、がん細胞阻害薬として有効である。特に、特にがん細胞の中でも、がん幹細胞に選択的に取り込まれることにより阻害する。また、本発明の化合物は、がん幹細胞検出用プローブとして有効である。

【0020】

がん細胞阻害薬は、がん細胞の増殖、生存を阻害する効果を有する。がん幹細胞検出用プローブは、選択的にがん幹細胞に取り込まれ、がん幹細胞を検出することを可能とする。

【0021】

20

がん細胞阻害薬

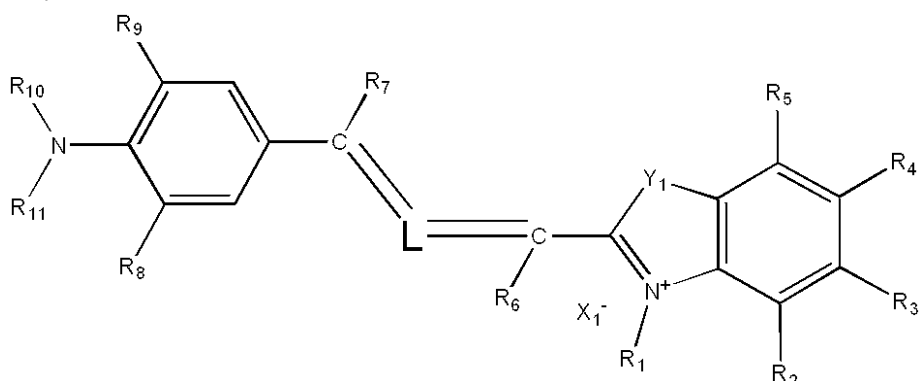
本発明の第一実施形態であるがん細胞阻害薬は、一般式(1)で表される化合物を含むことを特徴とする。

がん細胞阻害薬とは、がん細胞の増殖、分裂、転移、機能を抑制したり、がん細胞を殺傷する機能を有する組成物をいう。また、本発明の化合物は、その発光を測定することにより、がん細胞の検出及び観察が可能である。

【0022】

一般式(1)で表される化合物

【化3】



30

一般式(1)

40

一般式(1)中、 R_1 は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_2 \sim R_5$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表す。 $R_6 \sim R_7$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 $R_8 \sim R_9$ は各々独立して、水素原子、アルキル基、アルケニル基、ハロゲン原子を表し、 $R_{10} \sim R_{11}$ は各々独立して、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表す。また、 R_9 と R_{10} は互いに結合して窒素原子を含んだヘテロ環を形成しても良い。 X_1^- は陰イオン性基を表す。

【0023】

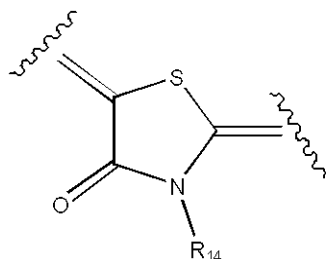
50

Y_1 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{12})(R_{13})-$ を表し、 $R_{12} \sim R_{13}$ は各々独立して、アルキル基を表す。 R_{12} と R_{13} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【0024】

L は存在しない（その場合 L の両側の炭素が二重結合で結合している）、一般式（2）で表される、または、 $=C(R_{15})-C(R_{16})=$ を表し、 $R_{15} \sim R_{16}$ は水素原子、アルキル基を表す。

【化4】



一般式(2)

10

一般式（2）において、 R_{14} はアルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表す。

【0025】

前記一般式（1）中の R_1 におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

20

【0026】

前記一般式（1）中の R_1 におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、カルボキシルプロピル基等が挙げられる。

【0027】

前記一般式（1）中の R_1 におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、

30

アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基が挙げられる。

【0028】

前記一般式（1）中の $R_2 \sim R_5$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

【0029】

40

前記一般式（1）中の $R_2 \sim R_5$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-チオメチルフェニル基、3-チオメチルフェニル基、4-チオメチルフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

【0030】

前記一般式（1）中の $R_2 \sim R_5$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、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。

【0031】

50

前記一般式(1)中の $R_2 \sim R_5$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0032】

前記一般式(1)中の $R_2 \sim R_5$ におけるアルコキシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシスルホニル基、エトキシスルホニル基等が挙げられる。

【0033】

前記一般式(1)中の $R_2 \sim R_5$ におけるN-アルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルスルファモイル、N-エチルスルファモイル基、N,N-ジメチルスルファモイル基、N,N-ジエチルスルファモイル基等が挙げられる。

10

【0034】

前記一般式(1)中の $R_2 \sim R_5$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、ブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0035】

前記一般式(1)中の $R_2 \sim R_5$ におけるN-アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルカルバモイル基、N-エチルカルバモイル基、N,N-ジメチルカルバモイル基、N,N-ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

20

【0036】

$R_2 \sim R_5$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【0037】

前記一般式(1)中の $R_6 \sim R_7$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

【0038】

前記一般式(1)中の $R_8 \sim R_9$ におけるアルキル基、アルケニル基、としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、メチレン基、エチレン基、プロピレン基等が挙げられる。また、アルキル基、アルケニル基の側鎖はさらにアルキル基、アルケニル基等で置換されていてもよい。

30

前記一般式(1)中の $R_8 \sim R_9$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0039】

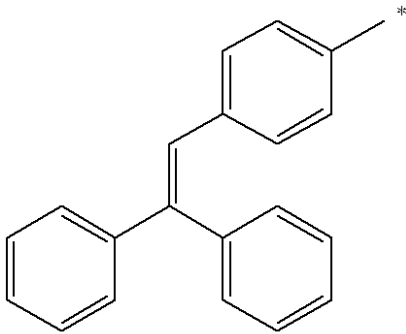
前記一般式(1)中の $R_{10} \sim R_{11}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。

【0040】

前記一般式(1)中の $R_{10} \sim R_{11}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-メチルチオフェニル基、3-メチルチオフェニル基、4-メチルチオフェニル基、ナフチル基、または、一般式(6)で表わされる基等が挙げられる。一般式(6)中、*は結合部位を示す。

40

【化 5】



一般式(6)

【0041】

前記一般式(1)中の $R_{10} \sim R_{11}$ におけるアラルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ベンジル基、またはフェネチル基等が挙げられる。

【0042】

前記一般式(1)中の R_9 と R_{10} が互いに結合して窒素原子を含んだヘテロ環としては、特に限定されるものではないが、例えば、ピロリジン環、ピロール環、ピロリジン環、インドール環、シクロペンタピロール環等を挙げることができる。

【0043】

前記一般式(1)中の X_1^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン等が挙げられる。

【0044】

前記一般式(1)中の Y_1 におけるアルキル基と結合した窒素原子のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

【0045】

前記一般式(1)中の Y_1 の $R_{12} \sim R_{13}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。 R_{12} と R_{13} は、同じ置換基であることが好ましい。

【0046】

前記一般式(1)中の Y_1 の $R_{12} \sim R_{13}$ が互いに結合して形成される脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、シクロヘキサン環、シクロペンタン環を挙げることができる。

【0047】

一般式(1)中のLに示される $R_{15} \sim R_{16}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。

【0048】

一般式(2)中の R_{14} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。

【0049】

一般式(2)中の R_{14} におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、カルボキシルプロピル基等が挙げられる。

【0050】

一般式(2)中の R_{14} におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定

10

20

30

40

50

されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、

アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

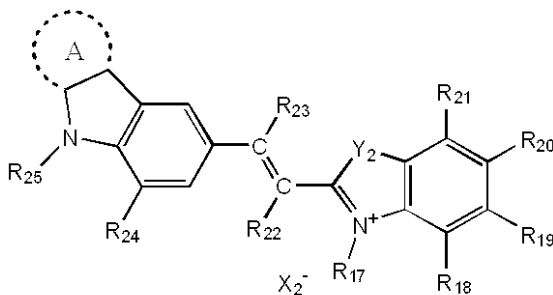
【0051】

一般式(3)で表される化合物

本発明の化合物の好ましい一例として、一般式(3)で表される化合物を挙げることが

10

【化6】



一般式(3)

20

一般式(3)中、 R_{17} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{18} \sim R_{21}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表す。 $R_{22} \sim R_{23}$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 R_{24} は、水素原子、または、ハロゲン原子を表し、 R_{25} は、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表す。 X_2^- は陰イオン性基を表す。

【0052】

Y_2 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{26})(R_{27})-$ を表し、 $R_{26} \sim R_{27}$ は各々独立して、アルキル基を表す。 R_{26} と R_{27} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

30

【0053】

Aはシクロペンタン環、または、ベンゼン環を表す。

【0054】

前記一般式(3)中の R_{17} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【0055】

前記一般式(3)中の R_{17} におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、カルボキシルプロピル基等が挙げられる。

40

【0056】

前記一般式(3)中の R_{17} におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、

アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基等が

50

挙げられる。

【 0 0 5 7 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2 - プロモフェニル基、3 - プロモフェニル基、4 - プロモフェニル基、2 - メトキシフェニル基、3 - メトキシフェニル基、4 - メトキシフェニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、4 - チオメチルフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

10

【 0 0 5 9 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、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。

【 0 0 6 0 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるアルコキシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシスルホニル基、エトキシスルホニル基等が挙げられる。

20

【 0 0 6 2 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ における N - アルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N - メチルスルファモイル基、N - エチルスルファモイル基、N , N - ジメチルスルファモイル基、N , N - ジエチルスルファモイル基等が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、ブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

30

【 0 0 6 4 】

前記一般式 (3) 中の $R_{18} \sim R_{21}$ における N - アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N - メチルカルバモイル基、N - エチルカルバモイル基、N , N - ジメチルカルバモイル基、N , N - ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

【 0 0 6 5 】

$R_{18} \sim R_{21}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【 0 0 6 6 】

前記一般式 (3) 中の $R_{22} \sim R_{23}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

40

【 0 0 6 7 】

前記一般式 (3) 中の R_{24} におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

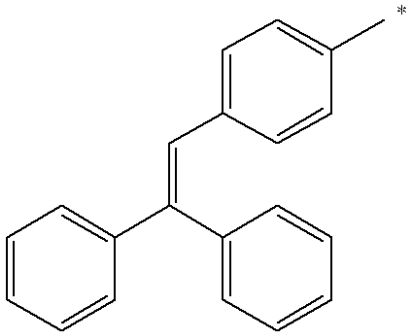
前記一般式 (3) 中の R_{25} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2 - エチルヘキシル基等が挙げられる。

【 0 0 6 9 】

50

前記一般式(3)中の R_{25} におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-メチルチオフェニル基、3-メチルチオフェニル基、4-メチルチオフェニル基、ナフチル基、または、一般式(6)で表わされる基等が挙げられる。一般式(6)中、*は結合部位を示す。

【化7】



一般式(6)

10

【0070】

前記一般式(3)中の R_{25} におけるアラルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ベンジル基、またはフェネチル基等が挙げられる。

20

【0071】

前記一般式(3)中の X_{21} における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン等が挙げられる。

【0072】

前記一般式(3)中の Y_2 におけるアルキル基と結合した窒素原子のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

【0073】

前記一般式(3)中の Y_2 の $R_{26} \sim R_{27}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。 R_{26} と R_{27} は、同じ置換基であることが好ましい。

30

【0074】

前記一般式(3)中の Y_2 の R_{26} と R_{27} が互いに結合して形成される脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、シクロヘキサン環、シクロペンタン環を挙げることができる。

【0075】

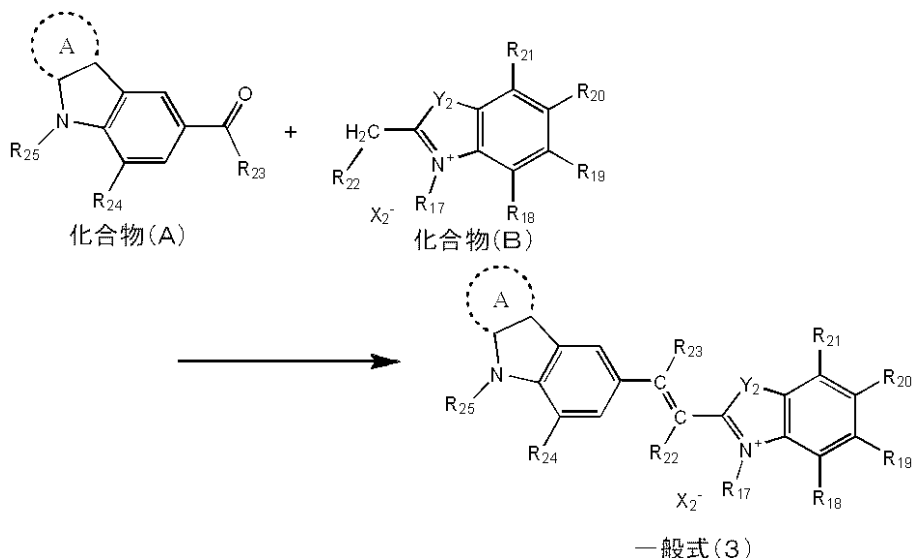
本発明における一般式(3)で表される化合物は、公知の方法(例えば非特許文献3から5)により同様の方法で容易に合成することができる。

40

【0076】

以下に本発明の合成スキームの一例を示すが、これに限定されるわけではない。

【化 8】



10

上記一般式(3)、化合物(A)、化合物(B)中の $R_{17} \sim R_{25}$ 、及び X_2^- 、 Y_2 、Aは、前記一般式(3)における $R_{17} \sim R_{25}$ 、及び X_2^- 、 Y_2 、Aの場合と同義である。

20

【0077】

即ち、化合物(A)と化合物(B)をカップリングさせて、一般式(3)で合わされる化合物を得る。具体的なカップリング方法としては、特に制限はないが、例えば、下記に示す方法が一態様として挙げられる。

【0078】

カップリング工程の化合物(B)の使用量は、化合物(A)1モルに対し、0.1~10倍モル、好ましくは0.5~3倍モル、より好ましくは0.8~2倍モルである。

【0079】

カップリング工程は無溶媒で行うことも可能であるが、溶媒の存在下で行うことが好ましい。溶媒としては、反応に関与しないものであれば特に限定されるものではないが、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒、アセトニトリル、プロピオニトリル、ベンゾニトリル等のニトリル系溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、クロロベンゼンメシチレン等の芳香族系溶媒、ジイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、水、酢酸等があげられる。好ましくは、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、水、酢酸等であり、より好ましくはエタノール、iso-プロピルアルコール、ジエチレングリコール、酢酸等である。また、2種以上の溶媒を混合して用いることができ、混合使用の際の混合比は任意に定めることができる。

30

40

【0080】

カップリング工程における反応溶媒の使用量は、化合物(A)に対し、0.1~1000倍重量の範囲で用いられ、好ましくは0.5~500倍重量、より好ましくは1.0~150倍重量である。

【0081】

カップリング工程における反応温度は、-80~250の範囲で行われ、好ましくは-20~200、より好ましくは-5~150である。通常反応は24時間以内に完結する。

【0082】

50

カップリング工程では、必要に応じて酸または塩基の添加を行うと反応が速やかに進行する。用いる酸は特に制限されないが、例えば、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸；p-トルエンスルホン酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、無水酢酸等の有機酸；アンバーライト（ローム・アンド・ハース株式会社）、アンバーリスト（ローム・アンド・ハース株式会社）等の強酸性イオン交換樹脂；ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩等があげられる。より好ましくは、ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩であり、より好ましくは、酢酸アンモニウムである。酸の使用量は、化合物（A）1モルに対し、0.001～50倍モル、好ましくは0.01～10倍モル、より好ましくは0.1～5倍モルである。

【0083】

カップリング工程において用いる塩基としては、具体的には、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド等の金属アルコキシド；ピペリジン、ピリジン、2-メチルピリジン、ジメチルアミノピリジン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルエチルアミン、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン（以下、DBUと略記する）、酢酸アンモニウム等の有機塩基；n-ブチルリチウム、tert-マグネシウムクロリド等の有機塩基；水素化ホウ素ナトリウム、金属ナトリウム、水素化ナトリウム、炭酸ナトリウム等の無機塩基等が用いられる。好ましくは、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ピペリジン、ジメチルアミノピリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等であり、より好ましくは、ナトリウムメトキシド、ピペリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等が挙げられる。上記塩基の使用量は、化合物（A）1モルに対し、0.1～20倍モル、好ましくは0.5～8倍モル、より好ましくは1.0～4倍モルである。

【0084】

反応終了後、水で希釈するか或いは塩酸等による酸析を行うことによって一般式（3）で表される化合物を得ることができる。

【0085】

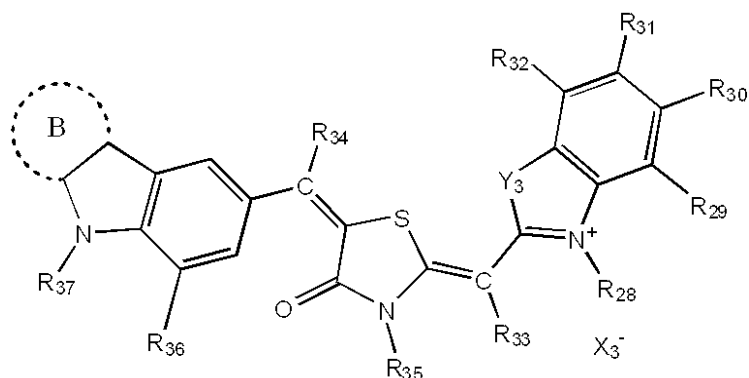
得られた化合物は、通常の有機化合物の単離・精製方法を用いることができる。例えば、反応液を塩酸等で酸性にして、酸析することによって固体をろ別し、水酸化ナトリウム等で中和し、濃縮すれば、粗成物が得られる。更に、粗成物をアセトン、メタノール等を用いた再結晶、シリカゲルを用いたカラム精製等により精製する。これらの方法は、単独または2つ以上組み合わせることで精製を行うことにより高純度で得ることが可能である。

【0086】

一般式（4）で表される化合物

本発明の化合物の好ましい一例として、一般式（4）で表される化合物を挙げることができる。

【化9】



一般式(4)

一般式（4）中、 R_{28} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{29} \sim$

R_{32} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N - アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N - アルキルカルバモイル基を表す。 $R_{33} \sim R_{34}$ は、水素原子、アルキル基、フェニル基を表し、 R_{35} は、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 R_{36} は、水素原子、または、ハロゲン原子を表し、 R_{37} は、アルキル基、アリール基、アラルキル基を表す。 X_3^- は陰イオン性基を表す。

【0087】

Y_3 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{38})(R_{39})-$ を表し、 $R_{38} \sim R_{39}$ は各々独立して、アルキル基を表す。 R_{38} と R_{39} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

10

【0088】

B はシクロペンタン環、または、ベンゼン環を表す。

【0089】

前記一般式(4)中の R_{28} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【0090】

前記一般式(4)中の R_{28} におけるカルボキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、カルボキシプロピル基等が挙げられる。

20

【0091】

前記一般式(4)中の R_{28} におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

30

【0092】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

【0093】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2 - プロモフェニル基、3 - プロモフェニル基、4 - プロモフェニル基、2 - メトキシフェニル基、3 - メトキシフェニル基、4 - メトキシフェニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、4 - チオメチルフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

40

【0094】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロボキシ基、ブトキシ基等が挙げられる。

【0095】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0096】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるアルコキシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシスルホニル基、エトキシスルホニル基等が

50

挙げられる。

【0097】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるN-アルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルスルファモイル基、N-エチルスルファモイル基、N,N-ジメチルスルファモイル基、N,N-エチルスルファモイル基等が挙げられる。

【0098】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、ブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

10

【0099】

前記一般式(4)中の $R_{29} \sim R_{32}$ におけるN-アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルカルバモイル基、N-エチルカルバモイル基、N,N-ジメチルカルバモイル基、N,N-ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

【0100】

$R_{29} \sim R_{32}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【0101】

前記一般式(4)中の $R_{33} \sim R_{34}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

20

【0102】

前記一般式(4)中の R_{35} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【0103】

前記一般式(4)中の R_{35} におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、カルボキシルプロピル基等が挙げられる。

【0104】

前記一般式(4)中の R_{35} におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、

30

アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

【0105】

前記一般式(4)中の R_{36} におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

40

【0106】

前記一般式(4)中の R_{37} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。

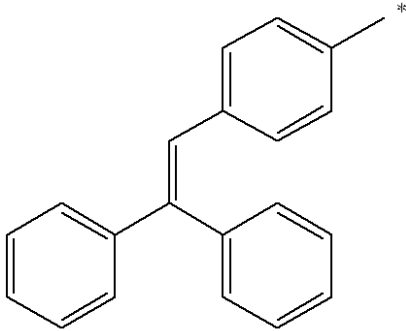
【0107】

前記一般式(4)中の R_{37} におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-メチルチオフェニル基、3-メチルチオフェニル基、4-メチルチオフェニル基

50

、ナフチル基、または、一般式(6)で表わされる基等が挙げられる。一般式(6)中、*は結合部位を示す。

【化10】



一般式(6)

10

【0108】

前記一般式(4)中の R_{37} におけるアラルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ベンジル基、またはフェネチル基等が挙げられる。

【0109】

前記一般式(4)中の X_3^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン等が挙げられる。

20

【0110】

前記一般式(4)中の Y_3 におけるアルキル基と結合した窒素原子のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

【0111】

前記一般式(4)中の Y_3 の $R_{38} \sim R_{39}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。 R_{38} と R_{39} は、同じ置換基であることが好ましい。

30

【0112】

前記一般式(4)中の Y_3 の $R_{38} \sim R_{39}$ が互いに結合して形成される脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、シクロヘキサン環、シクロペンタン環を挙げることができる。

【0113】

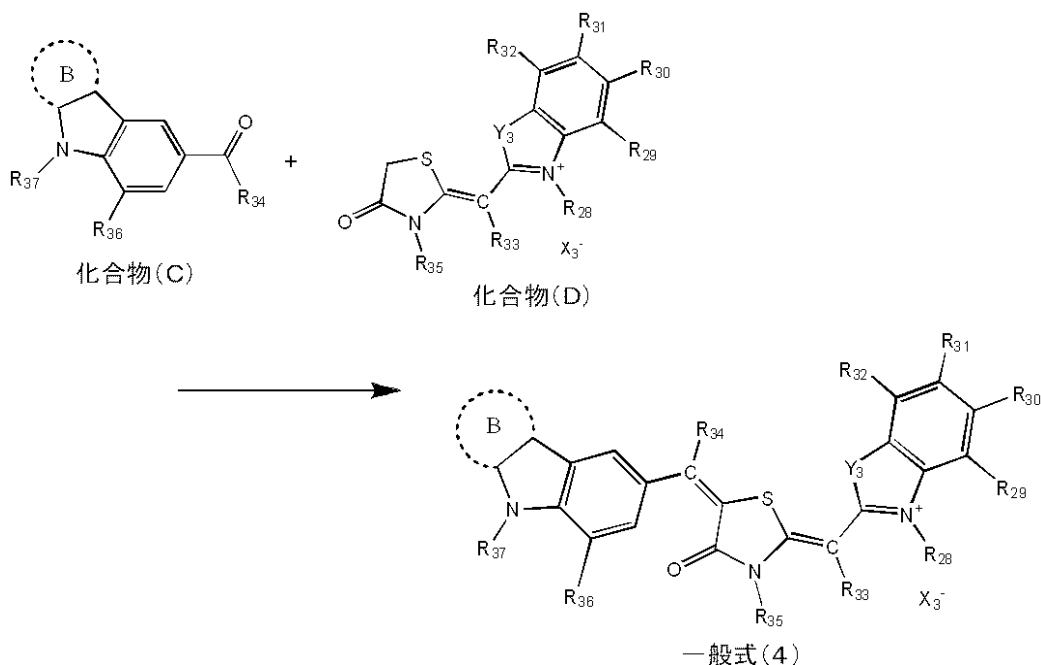
本発明における一般式(4)で表される化合物は、公知の方法(例えば特許文献2)により同様の方法で容易に合成することができる。

【0114】

以下に本発明の合成スキームの一例を示すが、これに限定されるわけではない。

40

【化 1 1】



10

上記一般式(4)、化合物(C)、化合物(D)中の $R_{28} \sim R_{36}$ 、及び X_3^- 、 Y_3 、Bは、前記一般式(4)における $R_{28} \sim R_{36}$ 、及び X_3^- 、 Y_3 、Bの場合と同義である。

20

【0115】

即ち、化合物(C)と化合物(D)をカップリングさせて、一般式(4)で表される化合物を得る。具体的なカップリング方法としては、特に制限はないが、例えば、下記に示す方法が一態様として挙げられる。

【0116】

カップリング工程の化合物(D)の使用量は、化合物(C)1モルに対し、0.1～10倍モル、好ましくは0.5～3倍モル、より好ましくは0.8～2倍モルである。

【0117】

カップリング工程は無溶媒で行うことも可能であるが、溶媒の存在下で行うことが好ましい。溶媒としては、反応に関与しないものであれば特に限定されるものではないが、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒、アセトニトリル、プロピオニトリル、ベンゾニトリル等のニトリル系溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、クロロベンゼンメシチレン等の芳香族系溶媒、ジイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、水、酢酸等があげられる。好ましくは、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、水、酢酸等であり、より好ましくはエタノール、iso-プロピルアルコール、ジエチレングリコール、酢酸等である。また、2種以上の溶媒を混合して用いることができ、混合使用の際の混合比は任意に定めることができる。

30

40

【0118】

カップリング工程における反応溶媒の使用量は、化合物(C)に対し、0.1～1000倍重量の範囲で用いられ、好ましくは0.5～500倍重量、より好ましくは1.0～150倍重量である。

【0119】

カップリング工程における反応温度は、 $-80 \sim 250$ の範囲で行われ、好ましくは $-20 \sim 200$ 、より好ましくは $-5 \sim 150$ である。通常反応は24時間以内に完

50

結する。

【0120】

カップリング工程では、必要に応じて酸または塩基の添加を行うと反応が速やかに進行する。用いる酸は特に制限されないが、例えば、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸；p-トルエンスルホン酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、無水酢酸等の有機酸；アンバーライト（ローム・アンド・ハース株式会社）、アンバーリスト（ローム・アンド・ハース株式会社）等の強酸性イオン交換樹脂；ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩等があげられる。より好ましくは、ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩であり、より好ましくは、酢酸アンモニウムである。酸の使用量は、化合物（C）1モルに対し、0.001～50倍モル、好ましくは0.01～10倍モル、より好ましくは0.1～5倍モルである。

10

【0121】

カップリング工程において用いる塩基としては、具体的には、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド等の金属アルコキシド；ピペリジン、ピリジン、2-メチルピリジン、ジメチルアミノピリジン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルエチルアミン、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン（以下、DBUと略記する）、酢酸アンモニウム等の有機塩基；n-ブチルリチウム、tert-マグネシウムクロリド等の有機塩基；水素化ホウ素ナトリウム、金属ナトリウム、水素化ナトリウム、炭酸ナトリウム等の無機塩基等が用いられる。好ましくは、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ピペリジン、ジメチルアミノピリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等であり、より好ましくは、ナトリウムメトキシド、ピペリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等が挙げられる。上記塩基の使用量は、化合物（C）1モルに対し、0.1～20倍モル、好ましくは0.5～8倍モル、より好ましくは1.0～4倍モルである。

20

【0122】

反応終了後、水で希釈するか或いは塩酸等による酸析を行うことによって一般式（4）で表される化合物を得ることができる。

【0123】

得られた化合物は、通常の有機化合物の単離・精製方法を用いることができる。例えば、反応液を塩酸等で酸性にして、酸析することによって固体をろ別し、水酸化ナトリウム等で中和し、濃縮すれば、粗成物が得られる。更に、粗成物をアセトン、メタノール等を用いた再結晶、シリカゲルを用いたカラム精製等により精製する。これらの方法は、単独または2つ以上組み合わせて精製を行うことにより高純度で得ることが可能である。

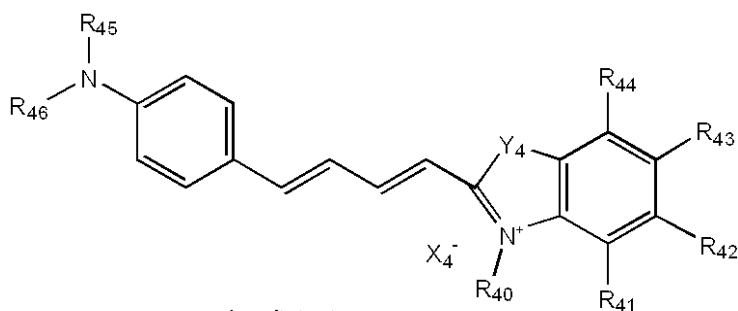
30

【0124】

一般式（5）で表される化合物

本発明の化合物の好ましい一例として、一般式（5）で表わされる化合物を挙げるができる。

【化12】



一般式(5)

40

一般式（5）中、 R_{40} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、 $R_{41} \sim$

50

R_{44} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N - アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、N - アルキルカルバモイル基を表す。 $R_{45} \sim R_{46}$ は、アルキル基、アリール基を表す。

【0125】

Y_4 は酸素原子、硫黄原子、アルキル基と結合した窒素原子、 $-C(R_{47})(R_{48})-$ を表し、 $R_{47} \sim R_{48}$ は各々独立して、アルキル基を表す。 R_{47} と R_{48} は互いに結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【0126】

前記一般式(5)中の R_{40} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

10

【0127】

前記一般式(5)中の R_{40} におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、カルボキシルプロピル基等が挙げられる。

【0128】

前記一般式(5)中の R_{40} におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロ

20

ピル基などが挙げられ、アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル基、プロピルカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

【0129】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。

【0130】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2 - プロモフェニル基、3 - プロモフェニル基、4 - プロモフェニル基、2 - メトキシフェニル基、3 - メトキシフェニル基、4 - メトキシフェニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、4 - チオメチルフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

30

【0131】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、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。

【0132】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

40

【0133】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるアルコキシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシスルホニル基、エトキシスルホニル基等が挙げられる。

【0134】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ における N - アルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N - メチルスルファモイル基、N - エチルスルファモイル基、N, N - ジメチルスルファモイル基、N, N - エチルスルファモイル基

50

等が挙げられる。

【0135】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、ブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0136】

前記一般式(5)中の $R_{41} \sim R_{44}$ におけるN-アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルカルバモイル基、N-エチルカルバモイル基、N,N-ジメチルカルバモイル基、N,N-ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

10

【0137】

$R_{41} \sim R_{44}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【0138】

前記一般式(5)中の $R_{45} \sim R_{46}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。

【0139】

前記一般式(5)中の $R_{45} \sim R_{46}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-チオメチルフェニル基、3-チオメチルフェニル基、4-チオメチルフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

20

【0140】

前記一般式(5)中の X_4 における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオンが挙げられる。

【0141】

前記一般式(5)中の Y_4 におけるアルキル基と結合した窒素原子のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等が挙げられる。

30

【0142】

前記一般式(5)中の Y_4 の $R_{47} \sim R_{48}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、2-エチルヘキシル基等が挙げられる。 R_{47} と R_{48} は、同じ置換基であることが好ましい。

【0143】

前記一般式(5)中の Y_4 の R_{47} と R_{48} が互いに結合して形成される脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、シクロヘキサン環、シクロペンタン環を挙げることができる。

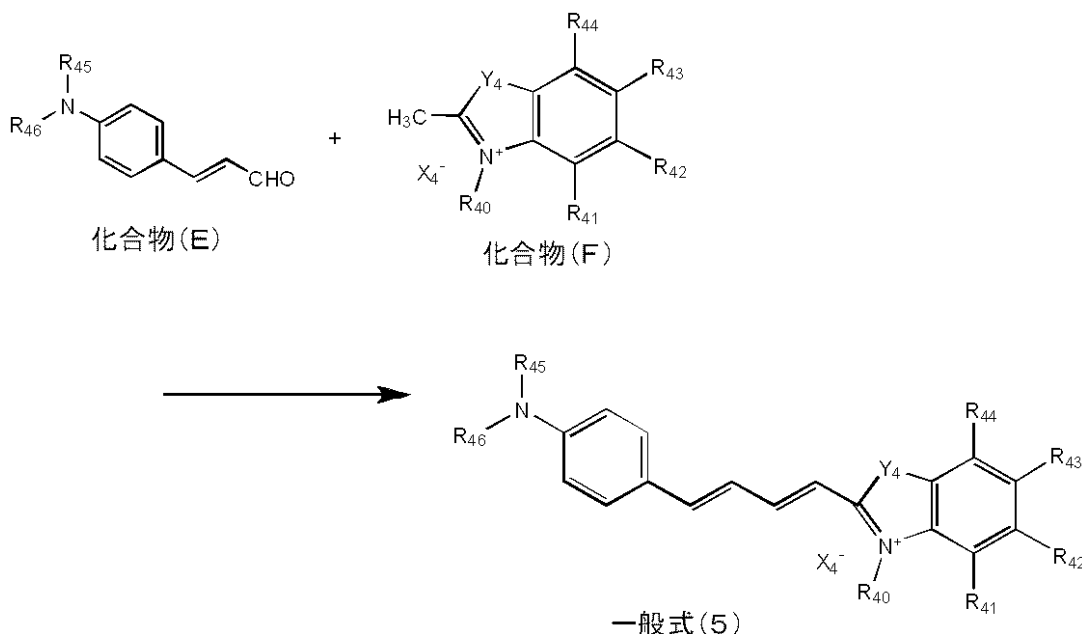
40

【0144】

本発明における一般式(5)で表される化合物は、公知の方法(例えば、非特許文献6)により同様の方法で容易に合成することができる。

以下に本発明の合成スキームの一例を示すが、これに限定されるわけではない。

【化 1 3】



10

上記一般式(5)、化合物(E)、化合物(F)中の $R_{40} \sim R_{46}$ 、及び X_4^- 、 Y_4 は、前記一般式(5)における $R_{40} \sim R_{46}$ 、及び X_4^- 、 Y_4 の場合と同義である。

20

【0145】

即ち、化合物(E)と化合物(F)をカップリングさせて、一般式(5)で表される化合物を得る。具体的なカップリング方法としては、特に制限はないが、例えば、下記に示す方法が一態様として挙げられる。

【0146】

カップリング工程の化合物(F)の使用量は、化合物(E)1モルに対し、0.1~10倍モル、好ましくは0.5~3倍モル、より好ましくは0.8~2倍モルである。

【0147】

カップリング工程は無溶媒で行うことも可能であるが、溶媒の存在下で行うことが好ましい。溶媒としては、反応に関与しないものであれば特に限定されるものではないが、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒、アセトニトリル、プロピオニトリル、ベンゾニトリル等のニトリル系溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、クロロベンゼンメシチレン等の芳香族系溶媒、ジイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル系溶媒、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、水、酢酸等があげられる。好ましくは、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、iso-プロピルアルコール、ブチルアルコール、ジエチレングリコール等のアルコール系溶媒、水、酢酸等であり、より好ましくはエタノール、iso-プロピルアルコール、ジエチレングリコール、酢酸等である。また、2種以上の溶媒を混合して用いることができ、混合使用の際の混合比は任意に定めることができる。

30

40

【0148】

カップリング工程における反応溶媒の使用量は、化合物(E)に対し、0.1~1000倍重量の範囲で用いられ、好ましくは0.5~500倍重量、より好ましくは1.0~150倍重量である。

【0149】

カップリング工程における反応温度は、-80~250の範囲で行われ、好ましくは-20~200、より好ましくは-5~150である。通常反応は24時間以内に完

50

結する。

【0150】

カップリング工程では、必要に応じて酸または塩基の添加を行うと反応が速やかに進行する。用いる酸は特に制限されないが、例えば、塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸；p-トルエンスルホン酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、無水酢酸等の有機酸；アンバーライト（ローム・アンド・ハース株式会社）、アンバーリスト（ローム・アンド・ハース株式会社）等の強酸性イオン交換樹脂；ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩等があげられる。より好ましくは、ギ酸アンモニウム、または酢酸アンモニウム等の無機酸塩であり、より好ましくは、酢酸アンモニウムである。酸の使用量は、化合物（E）1モルに対し、0.001～50倍モル、好ましくは0.01～10倍モル、より好ましくは0.1～5倍モルである。

10

【0151】

カップリング工程において用いる塩基としては、具体的には、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド等の金属アルコキシド；ピペリジン、ピリジン、2-メチルピリジン、ジメチルアミノピリジン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルエチルアミン、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデカ-7-エン（以下、DBUと略記する）、酢酸アンモニウム等の有機塩基；n-ブチルリチウム、tert-ブチルマグネシウムクロリド等の有機塩基；水素化ホウ素ナトリウム、金属ナトリウム、水素化ナトリウム、炭酸ナトリウム等の無機塩基等が用いられる。好ましくは、カリウムtert-ブトキシド、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、ピペリジン、ジメチルアミノピリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等であり、より好ましくは、ナトリウムメトキシド、ピペリジン、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等が挙げられる。上記塩基の使用量は、化合物（E）1モルに対し、0.1～20倍モル、好ましくは0.5～8倍モル、より好ましくは1.0～4倍モルである。

20

【0152】

反応終了後、水で希釈するか或いは塩酸等による酸析を行うことによって一般式（5）で表される化合物を得ることができる。

得られた化合物は、通常の有機化合物の単離・精製方法を用いることができる。例えば、反応液を塩酸等で酸性にして、酸析することによって固体をろ別し、水酸化ナトリウム等で中和し、濃縮すれば、粗成物が得られる。更に、粗成物をアセトン、メタノール等を用いた再結晶、シリカゲルを用いたカラム精製等により精製する。これらの方法は、単独または2つ以上組み合わせることで精製を行うことにより高純度で得ることが可能である。

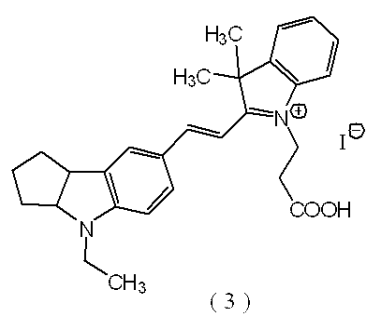
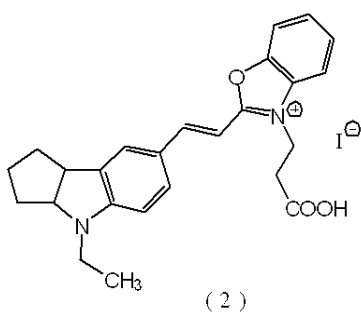
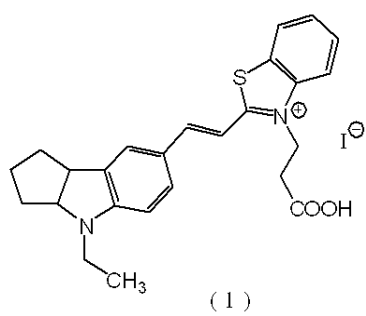
30

【0153】

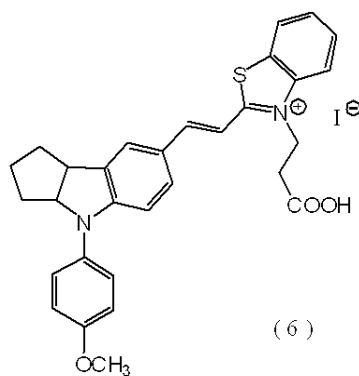
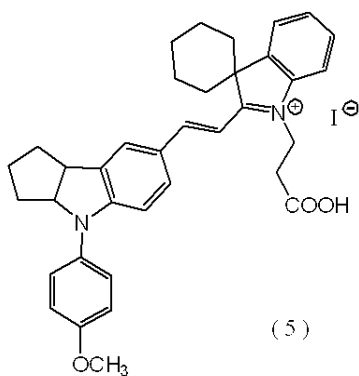
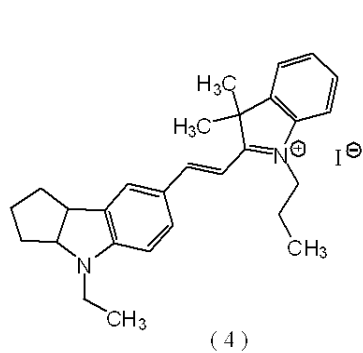
以下に、本発明の一般式（1）～（5）で表される化合物の好ましい具体例として化合物（1）～（46）を示すが、下記の例に限定されるものではない。

【0154】

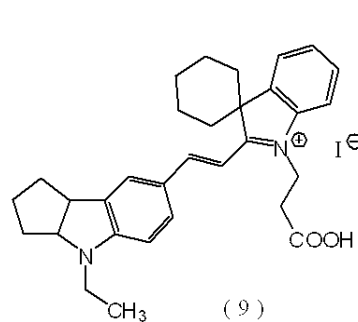
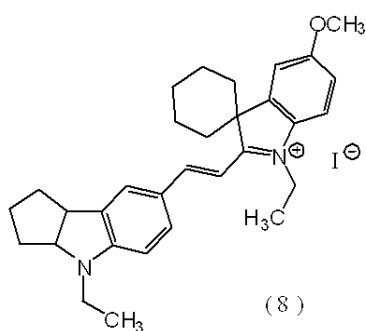
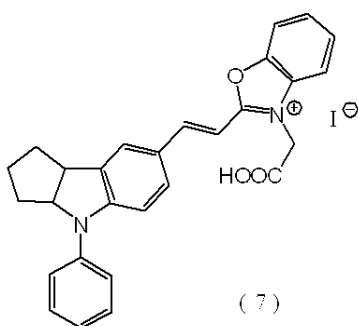
【化 1 4】



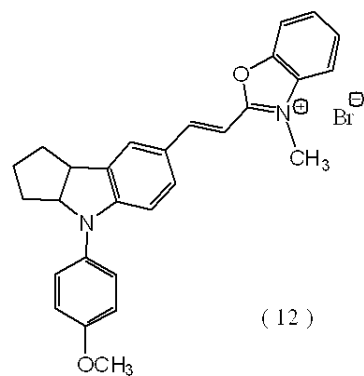
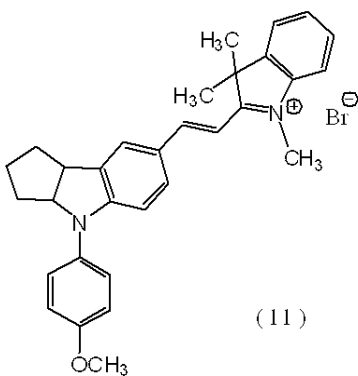
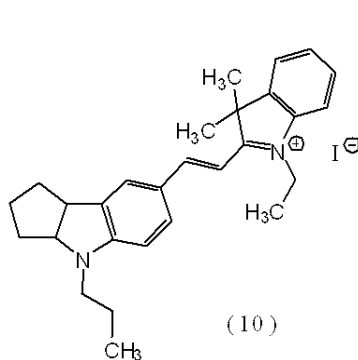
10



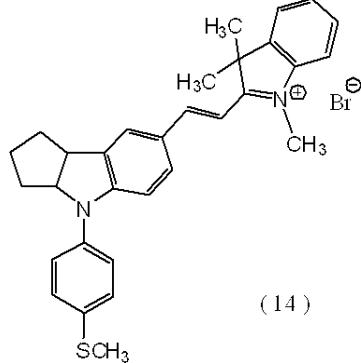
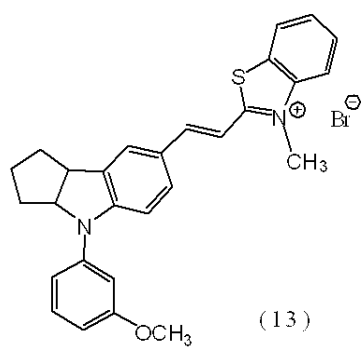
20



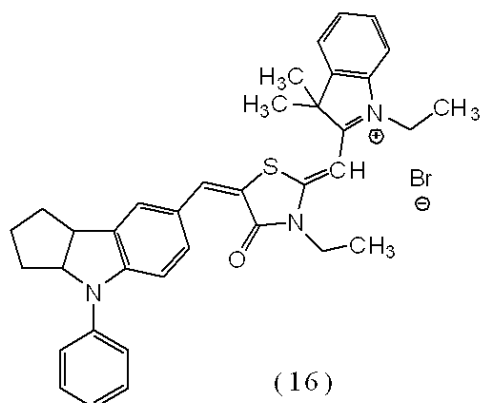
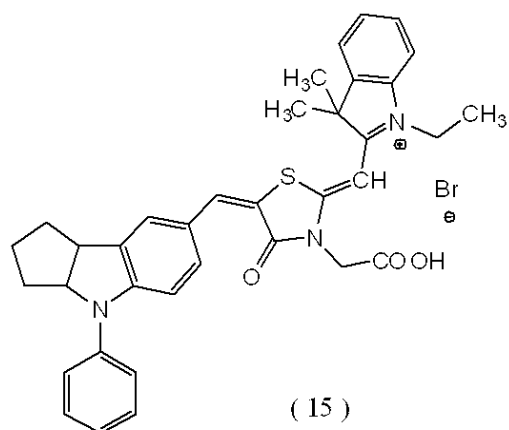
30



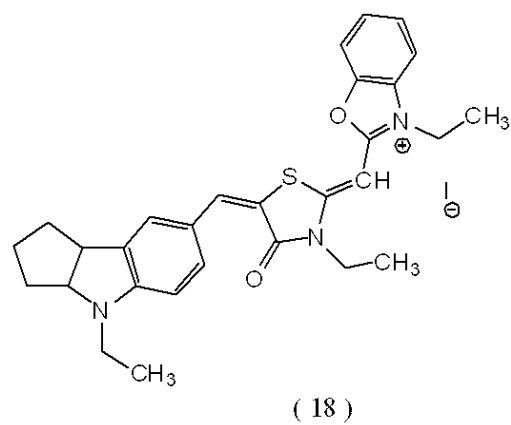
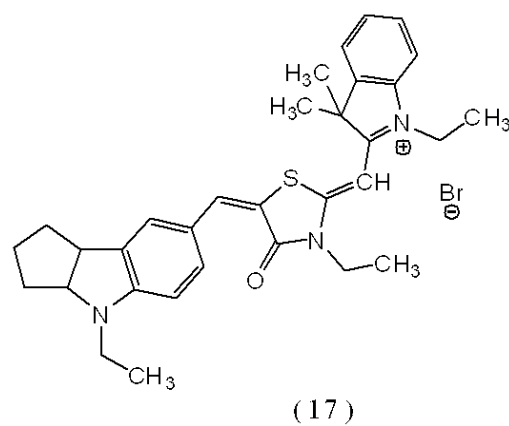
40



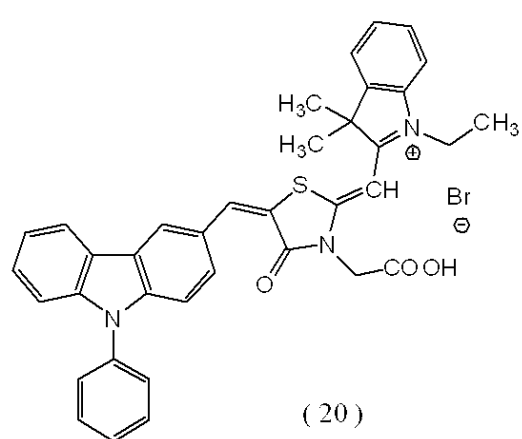
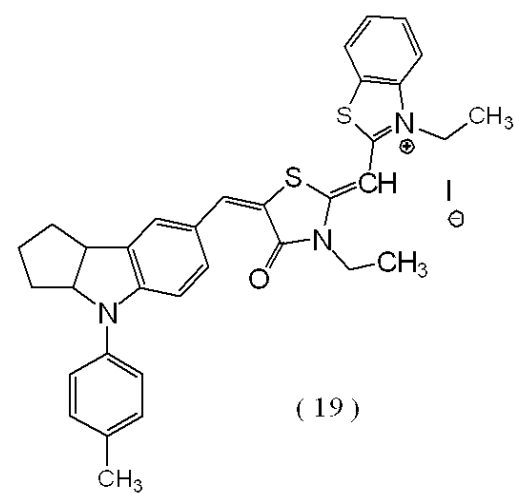
【化 15】



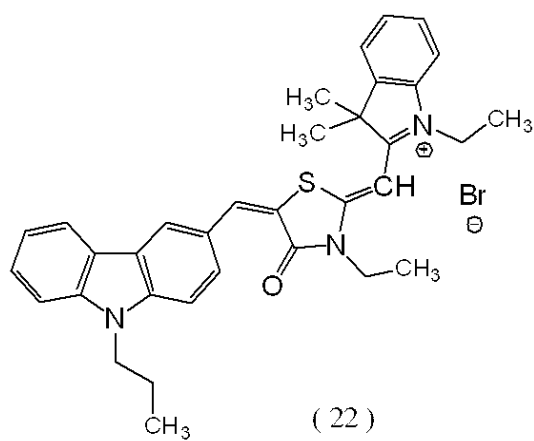
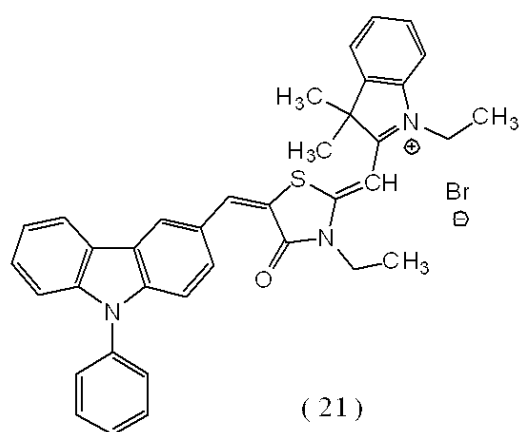
10



20

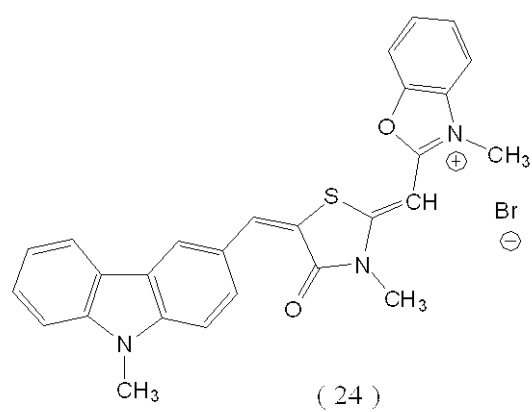
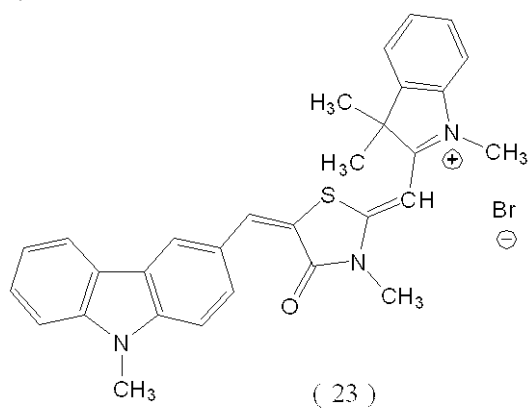


30

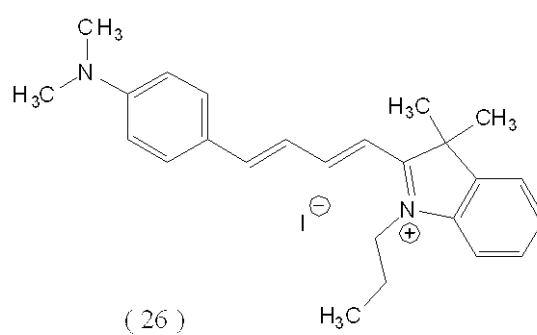
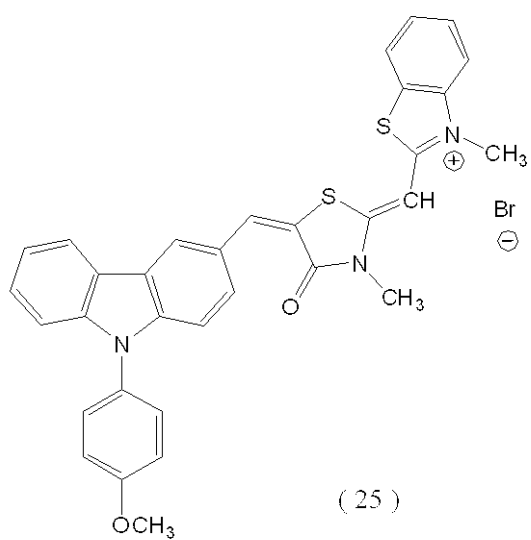


40

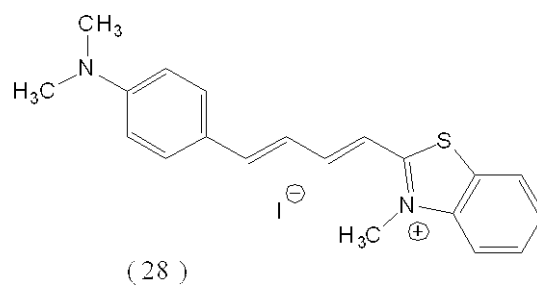
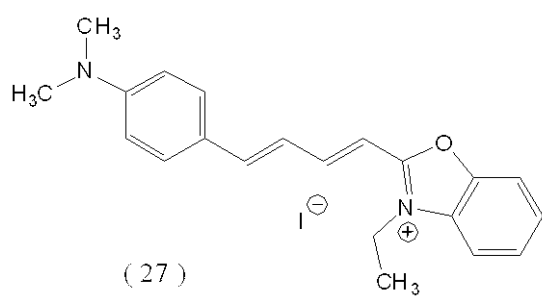
【化 16】



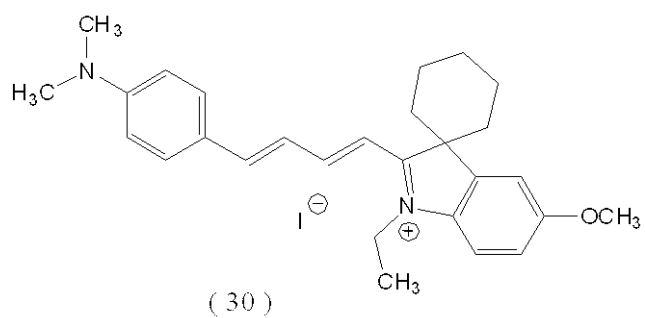
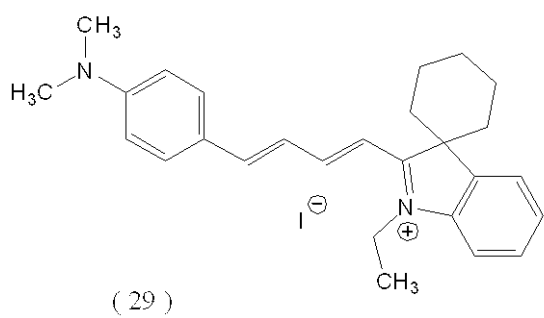
10



20

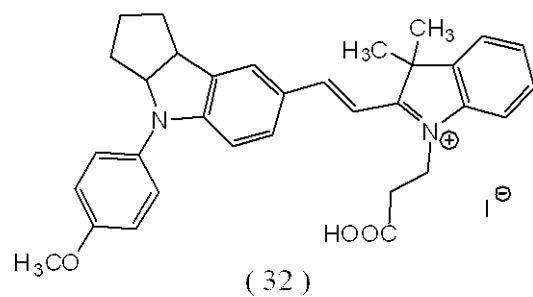
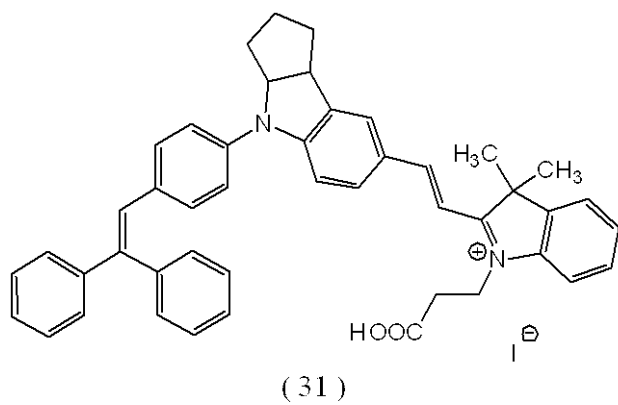


30

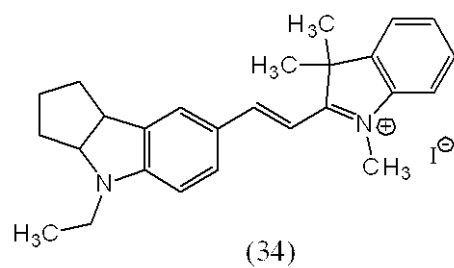
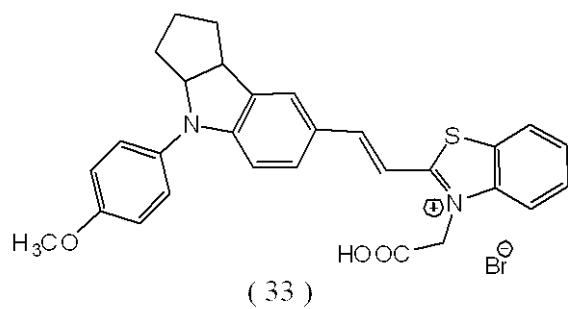


40

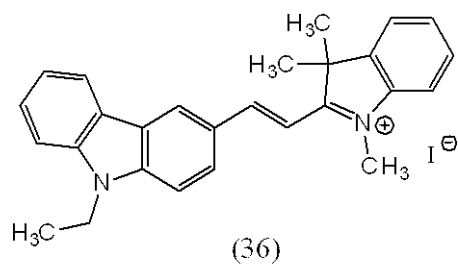
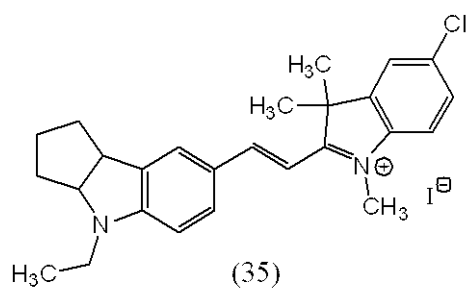
【化 17】



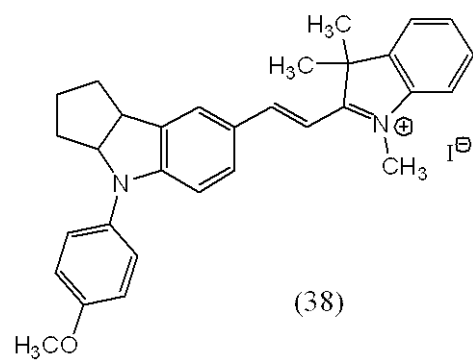
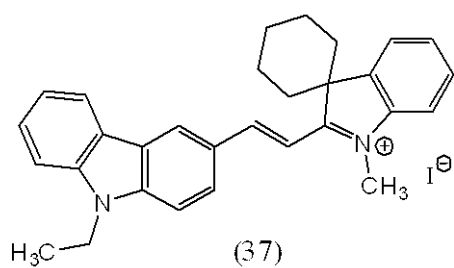
10



20

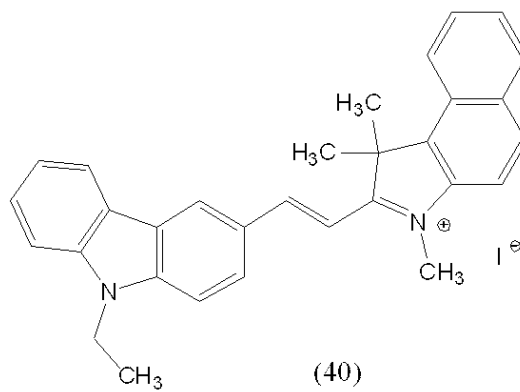
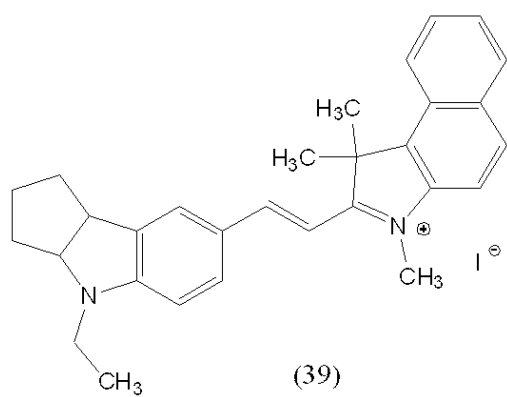


30

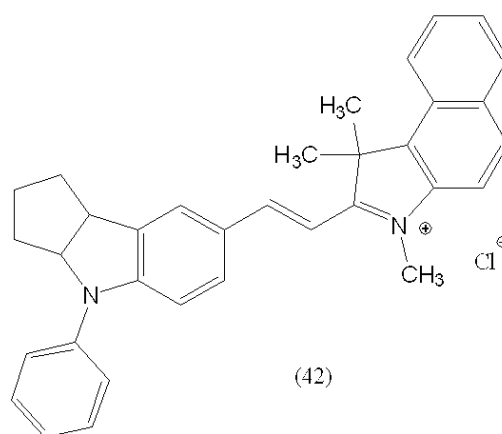
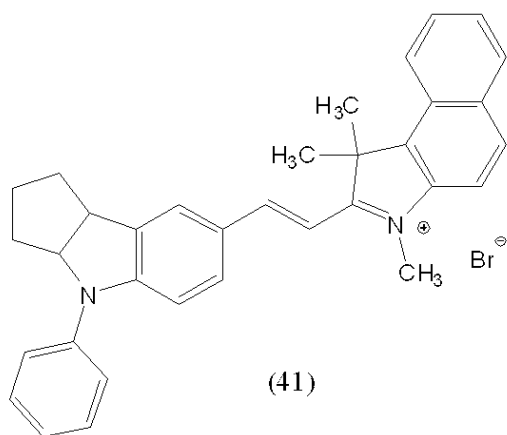


40

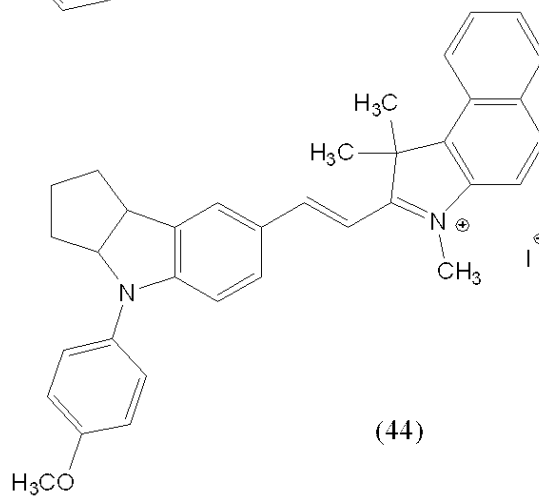
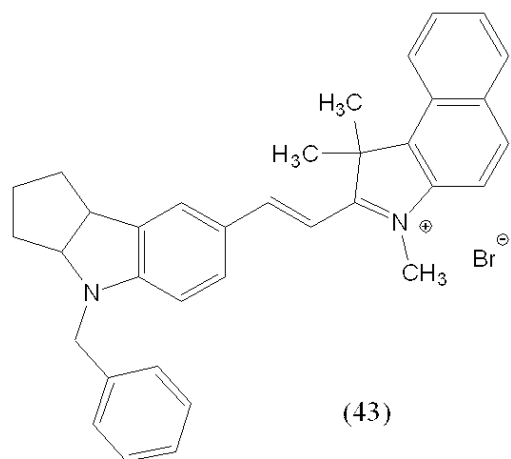
【化 1 8】



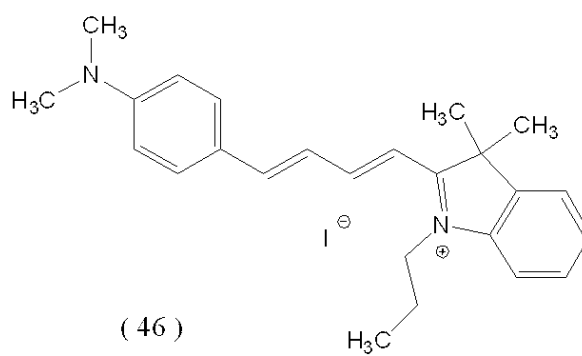
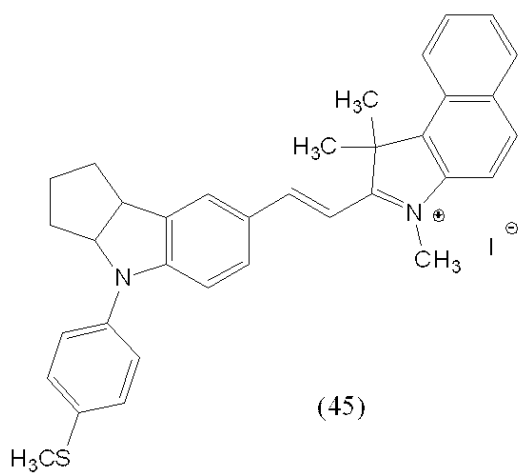
10



20



30



40

【 0 1 5 5】

50

本発明の化合物は、350～800nmの励起光により発光することを特徴とする。本発明で言う発光とは、蛍光、燐光も含めることができる。

【0156】

本発明のがん細胞阻害薬は、本発明の一般式(1)で表される化合物をがん細胞に選択的に取り込まれることにより、がん細胞の増殖抑制、分裂抑制、転移抑制、機能阻害、殺細胞されることを特徴とする。同時に、本発明の化合物の発光を測定することにより、がん細胞の検出及び観察が可能である。

【0157】

本発明のがん細胞阻害薬は、単独、または、2種以上を組み合わせることもできる。また、公知の抗がん薬と併用して用いても良い。

10

【0158】

本発明において、がん細胞の中でも、特にがん幹細胞に関して選択的に効果が大きい。

【0159】

がん幹細胞

本明細書中、がん幹細胞(Cancer Stem Cell)とは、幹細胞の性質を持ったがん細胞である。幹細胞とは、自己複製能と様々な細胞に分化できる多分化能の2つの機能を持つ細胞を意味する。

【0160】

適応可能ながん

本発明におけるがん細胞阻害薬の適応可能ながんは、特に限定はされない。例えば、乳がん、脳腫瘍、胃がん、前立腺がん、膵臓がん、肺がん、大腸がん、小腸がん、結腸がん、直腸がん、食道がん、十二指腸がん、舌がん、咽頭がん、肝臓がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、腎臓がん、胆管がん、卵巣がん、膀胱がん、皮膚がん、血管がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、鼻腔がん、副鼻腔がん、陰茎がん、小児固形がん、悪性リンパ腫、悪性黒色腫、網膜肉腫、精巣腫瘍、骨髄種、肉腫、血管線維腫、白血病等が挙げられ、好ましくは、膵臓がん、前立腺がん、白血病などである。特に、適応可能ながんに、がん幹細胞の含有、または、がん幹細胞に起源するものが含まれていても良い。

20

【0161】

被験体

本発明の化合物により、がんを抑制する際の被験体としては、特に限定されるわけではないが、例えば、脊椎動物としては、トラフグ、クサフグ、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュ等の硬骨魚類、アフリカツメガエル等の両性類、ニワトリ、ウズラ等の鳥類、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、ラット、マウス、ハムスター等の小動物、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ等の大動物、サル、チンパンジー等が挙げられる。好ましくは、マウス、ラット、イヌ、ネコ等である。

30

【0162】

本発明の化合物を医薬品として使用する場合には、その投与経路によって様々な剤型を選択することができる。例えば、液体、シロップ、細粒、顆粒、錠剤、カプセル剤、貼付薬、リポソーム等のドラッグデリバリーシステム(DDS)等の形態で使用するこ

40

【0163】

本発明の化合物の投与法は、限定されることはないが、経口、または、非経口で行うことができる。例えば、生体に暴露(液体等)、経口投与、静脈または動脈等の血管内投与、経口内投与、舌下投与、直腸内投与、腹腔内投与、皮膚投与、皮下投与、皮内投与、膀胱内投与、気管(気管支)投与、眼内投与、鼻内投与、耳内等への注入、噴霧、塗布等を行うことが可能である。

【0164】

本発明の化合物には、必要に応じて薬理的、または、製剤学的に許容する添加物を含んでいても良い。例えば、保湿剤、表面張力調整剤、増粘剤、pH調整剤、pH緩衝剤、

50

防腐剤、抗菌剤、甘味剤、香料、溶解剤、溶解補助剤、コーティング剤、結合剤等である。

【0165】

本発明のがん細胞阻害薬の投与量は、治療または予防の目的、被検体の性別、年齢、体重、投与ルート、疾患等の程度によって、条件によって適宜決定される。

【0166】

移植モデル動物

一般に、転移性のがんに関して挙動追跡する場合は、培養細胞では困難とされている。そのため、本発明では、転移性のがんに関して挙動追跡するために、特に、移植モデル動物を好適に用いる。

10

【0167】

本発明に用いられる適応可能ながん細胞の移植モデル動物として、特に限定されるわけではないが、例えば、脊椎動物としては、トラフグ、クサフグ、ミドリフグ、メダカ、ゼブラフィッシュ等の硬骨魚類、アフリカツメガエル等の両性類、ニワトリ、ウズラ等の鳥類、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、ラット、マウス、ハムスター等の小動物、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ等の大動物、サル、チンパンジー等が挙げられる。好ましくは、マウス、ラット、イヌ、ネコ等である。

【0168】

これらの中で免疫不全のマウス、ラット等が初期検討として一般的に用いられることが多いが、検討を行う際の期間（通常最短3～6カ月）、クリーンルーム等で環境を保持し続ける必要がある。さらに、この期間中、管理するための人件費も膨大にかかる。

20

【0169】

そのため、これらの生物試料の中でも、ゼブラフィッシュを用いることがコスト面、スピード面（通常最短1週間）で特に好ましい。ゼブラフィッシュは、米国及び英国では、近年、既にマウス及びラットに続く第3のモデル動物として認知されており、人と比較して全ゲノム配列が80%の相同性を持ち、遺伝子数もほぼ同じであり、さらに主要臓器・組織の発生・構造も良く似ていることが解明されてきている。各パーツ（心臓、肝臓、腎臓、消化管等の臓器・器官）が受精卵から分化して形成されていく過程が透明な体を通して観察できるため、非侵襲的に生体内部の観察が可能なゼブラフィッシュをモデル動物としてスクリーニングに用いることは特に好ましい。

30

【0170】

また、ゼブラフィッシュは1回の産卵で約200個以上の受精卵が得られるため同じ遺伝的背景を持ったゼブラフィッシュが得られ、スクリーニングには好都合であるという利点がある。

【0171】

本発明の化合物を投与する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、がん細胞阻害薬が適当な界面活性剤との複合体または、エマルジョンの形で飼育水中に懸濁すれば良い。また、餌や食べ物に混ぜて、経口投与しても良く、注射等により非経口投与しても良い。

40

【0172】

がん幹細胞検出プローブ

本発明の化合物は、選択的にがん幹細胞を検出することが可能であるためがん幹細胞検出プローブとして好適に用いることができる。すなわち、本発明はがん細胞検出用プローブを含む。

【0173】

本発明は、がん細胞の中でも、特に、がん幹細胞に関する取り込まれる割合が大きいいため、選択的にがん幹細胞を検出することが可能である。本発明のがん幹細胞の検出及び挙動の確認は、In Vitro、Ex Vivo、または In Vivoのいずれでも実施することが可能である。

50

【 0 1 7 4 】

本発明の化合物を用いた、がん幹細胞検出方法は、がん幹細胞に影響を与えなければ特に限定されるものではないが、生物試料の状態及び変化を画像として捉える方法である。例えば、がん幹細胞に可視光、近赤外光や赤外光を照射してカメラやCCD等で観察する可視光観察、近赤外光観察、赤外光観察、若しくはレーザー顕微鏡観察、蛍光内視鏡等のように生物試料に対して励起光光源から励起光を照射して発光している生物試料の蛍光を観察する蛍光観察、蛍光顕微鏡観察、蛍光内視鏡観察、共焦点蛍光顕微鏡観察、多光子励起蛍光顕微鏡観察、若しくは狭帯域光観察、共光干渉断層画像観察（OCT）、または軟エックス線顕微鏡による観察等が挙げられる。特に、蛍光による観察が好ましい。

【 0 1 7 5 】

本発明の化合物を励起するための波長は、前記一般式（１）で表される化合物によって異なり、本発明の化合物が効率よく発光すればよく、特に限定されるものではない。

【 0 1 7 6 】

好ましくは、200～1010nm、より好ましくは400～900nm、より好ましくは、480～800nmである。近赤外領域の光を用いる場合は、好ましくは600～1000nmで、より好ましくは、生体透過性に優れている680～900nmの波長が用いられる。

【 0 1 7 7 】

本発明の化合物を励起するために用いられる蛍光励起光源としては特に限定されるものではないが、各種レーザー光源を用いることができる。これらのレーザー光源としては、例えば、色素レーザー光源、半導体レーザー光源、イオンレーザー光源、ファイバーレーザー光源、ハロゲンランプ、キセノンランプ、またはタングステンランプ等が挙げられる。また、各種光学フィルターを用いて、好ましい励起波長を得たり、蛍光のみを検出したることができる。

【 0 1 7 8 】

このように生物個体に励起光を照射することにより、がん幹細胞の内部において本発明の化合物を発光させた状態でがん幹細胞を撮像すれば発光部位を容易に検出することができる。また、可視光を照射して得られた明視野画像と励起光を照射して得られた蛍光画像を画像処理手段で組み合わせることで、より詳細にがん幹細胞を観察することもできる。また、共焦点顕微鏡を用いれば、光学的な切片画像を取得することができるため、好ましい。さらに、多光子励起蛍光顕微鏡は、高い深部到達性と空間解像力を持つため、組織内部の観察に好ましく用いられる。

【 0 1 7 9 】

〔 実施例 〕

以下に実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は、本発明のより一層の深い理解のために示される具体例であって、本発明は、これらの具体例に何ら限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 1 8 0 】

本発明の化合物の製造例を示す。

【 0 1 8 1 】

化合物（１）の製造

10

20

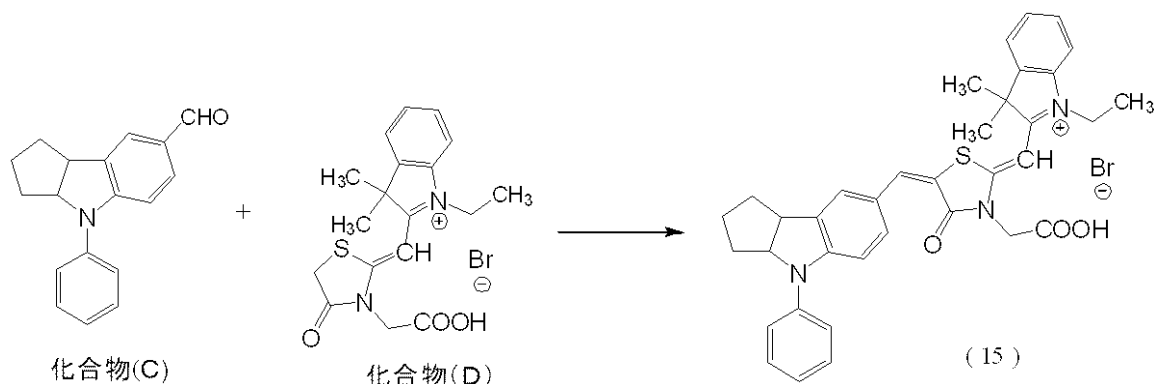
30

40



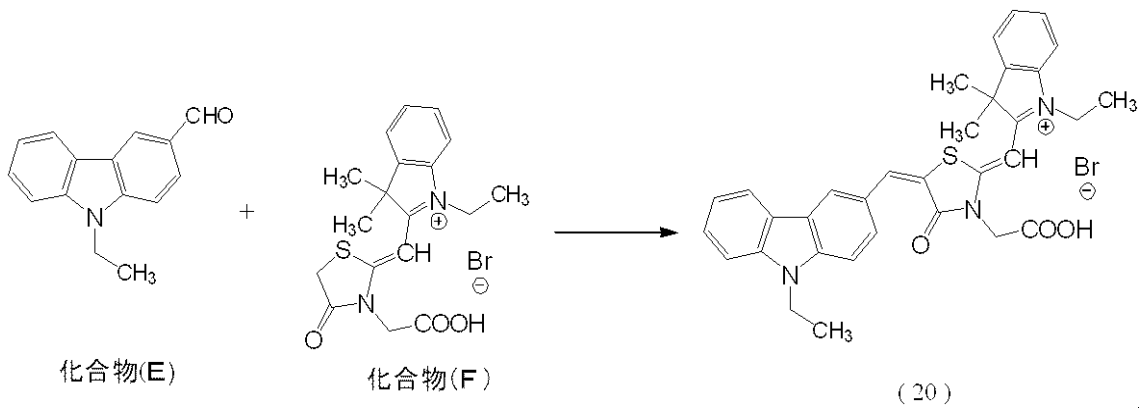
化合物(A) + 化合物(B) $\longrightarrow$ (1)

【化 2 0】



化合物 (2 0) の製造

【化 2 1】



10

化合物(E) 1.2 g (5.4 mmol) の酢酸 25 mL 溶液に化合物(F) 2.5 g (5.9 mmol)、酢酸アンモニウム 1.2 g を添加して、還流下 3 時間撹拌させた。反応終了後、冷却させながら、ゆっくり水 50 mL を滴下して室温まで冷却した。析出した個体をろ過して、水 100 mL で 2 回洗浄し、更に、2 - プロパノール 50 mL で洗浄して、目的物(20) 1.8 g (収率 52.8%) を得た。

目的物であることは、 ^1H 核磁気共鳴分光分析 (ECA-400、日本電子(株)製)、LC/TOF MS (LC/MSD TOF、Agilent Technologies 社製) によって確認した。

20

さらに、市販品を購入し、または、上記製造例の何れかに準じた方法で、下記表 1 に示す 16 種類の化合物を得た。これらの化合物の構造は、前記と同様に分析装置で確認した。

【実施例 2】

【0184】

化合物の蛍光特性の測定

下記表 1 における化合物を、5 μM の DMSO 溶液を調製し、日立ハイテク社製 FL 4500 蛍光分光測定機で励起波長及び蛍光波長を測定した。

【0185】

【表 1】

表 1

化合物	励起波長 λ_{ex}	蛍光波長 λ_{em}
化合物1	560	619
化合物5	582	678
化合物8	586	623
化合物11	614	669
化合物15	568	643
化合物20	493	585
化合物26	609	692
化合物31	611	720
化合物32	592	671
化合物33	560	677
化合物34	575	611
化合物36	488	594
化合物38	573	670
化合物39	591	626
化合物40	498	602
化合物44	588	679

10

20

【0186】

実験例 1

膵臓がん細胞に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）作用の観察

ヒト膵臓がん細胞、KLM-1をRPMI 1640培地に10% FBSを加えた培地で37℃、5% CO₂環境下で前培養した。その後、96-ウェルプレートの各ウェルに4,000個ずつ播種し、更に、24時間培養した。次に、化合物（1）を最終濃度10 µg/mLになるように培地に添加し、37℃、5% CO₂環境下、24時間培養した。培養した細胞をCell Titer - Glo Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ社製）を用いて、生存細胞数を解析した。基準として、上記操作法にて化合物（1）を培地に添加する代わりに、0.1%のジメチルスルホキシド溶液（以下、DMSOと略する）を投与したものを基準（100%）として用いた。

30

【0187】

実験例 2～7

実験例 1において化合物（1）を、表 2 で表される化合物に変更した以外は、実験例 1と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

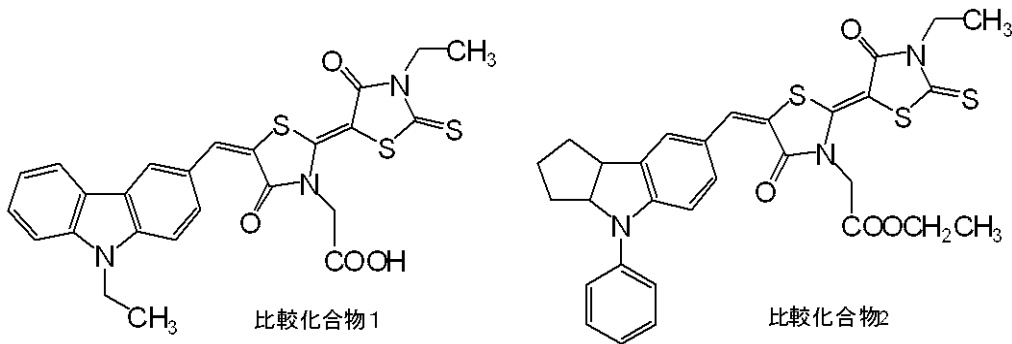
【0188】

比較例 1～4

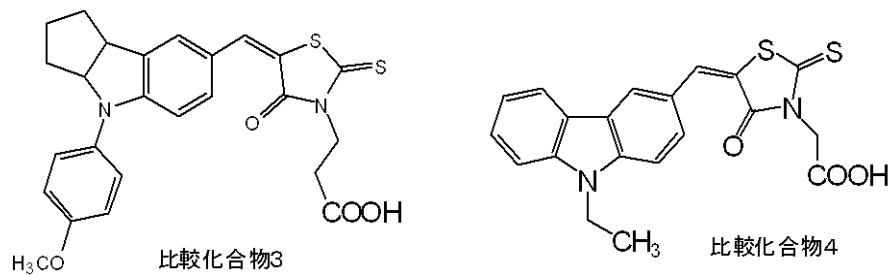
実験例 1において、化合物（1）を、比較化合物 1～4に変更した以外は、実験例 1と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

40

【化 2 2】



10



20

【0189】

実験例1～7、比較例1～4の生存細胞数を解析し増殖率を求めた結果を表2に示す。

【0190】

膵臓がん細胞（KLM-1）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）評価は以下の基準に基づいた。なお本実施例の増殖率とは、培養後の細胞の数について、0.1% DMSOを投与したものを100とした場合の数値である。膵臓がん細胞（KLM-1）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）評価を以下のように行った。

A：がん細胞増殖率が20%未満（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が非常に高い）

B：がん細胞増殖率が20%以上50%未満（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い）

30

C：がん細胞増殖率が50%以上（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が低い）

【0191】

【表2】

表2

	化合物	がん細胞増殖率(%)	評価
実験例1	化合物1	48.8	B
実験例2	化合物5	20.8	B
実験例3	化合物8	24.3	B
実験例4	化合物11	2.6	A
実験例5	化合物15	9.0	A
実験例6	化合物20	22.3	B
実験例7	化合物26	8.9	A
比較例1	比較化合物1	99.0	C
比較例2	比較化合物2	91.0	C
比較例3	比較化合物3	95.0	C
比較例4	比較化合物4	100	C

40

50

【 0 1 9 2 】

表 2 から明らかなように、本発明の化合物は比較化合物に比べて、膵臓がん細胞（K L M - 1）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い。

【 実施例 3 】

【 0 1 9 3 】

前立腺がん細胞に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）作用の観察

【 0 1 9 4 】

実験例 8

前立腺がん細胞、P C - 3 を R P M I 1 6 4 0 培地に 1 0 % F B S を加えた培地で 3 7 、 5 % C O ₂ 環境下、前培養した。その後、9 6 - ウェルプレートの各ウェルに 4 , 0 0 0 個ずつ播種し、更に、2 4 時間培養した。次に、化合物（1 1）を最終濃度 1 0 μ g / m l になるように培地に添加し、3 7 、 5 % C O ₂ 環境下、2 4 時間培養した。培養した細胞を C e l l T i t e r - G l o L u m i n e s c e n t C e l l V i a b i l i t y A s s a y（プロメガ社製）を用いて、生存細胞数を解析した。基準として、上記操作法にて化合物（1 1）を培地に添加する代わりに、0 . 1 % のジメチルスルホキシド溶液（以下、D M S O と略する）を投与したものを 1 0 0 としして用いた。

【 0 1 9 5 】

実験例 9 ~ 1 1

実験例 8 において化合物（1 1）を、表 3 で表される化合物に変更した以外は、実験例 8 と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

【 0 1 9 6 】

比較例 5 ~ 8

実験例 8 において、化合物（1 1）を、比較化合物 1 ~ 4 に変更した以外は、実験例 8 と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

【 0 1 9 7 】

本実施例の増殖率とは、培養後の細胞の数について、0 . 1 % D M S O を投与したものを 1 0 0 とした場合の数値である。結果を表 3 に示す。

【 0 1 9 8 】

前立腺がん細胞（P C - 3）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）評価は以下のように行った。

A : がん細胞増殖率が 2 0 % 未満（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が非常に高い）

B : がん細胞増殖率が 2 0 % 以上 5 0 % 未満（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い）

C : がん細胞増殖率が 5 0 % 以上（がん細胞の阻害（増殖抑制）効果が低い）

【 0 1 9 9 】

【 表 3 】

表3

	化合物	がん細胞増殖率(%)	評価
実験例8	化合物11	6. 7	A
実験例9	化合物15	7. 1	A
実験例10	化合物20	4. 8	A
実験例11	化合物26	5. 8	A
比較例5	比較化合物1	104	C
比較例6	比較化合物2	88. 8	C
比較例7	比較化合物3	86. 5	C
比較例8	比較化合物4	99. 9	C

【 0 2 0 0 】

表 3 から明らかなように、本発明の化合物は比較化合物に比べて、前立腺がん細胞（P C - 3）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い。

【実施例 4】

【0201】

慢性骨髄性白血病細胞に対するがん幹細胞の選択的阻害作用の観察

【0202】

実験例 12

ヒト慢性骨髄性白血病細胞、K562をRPMI1640培地に10%FBSを加えた培地で37℃、5%CO₂環境下で前培養した。更に、ALDEFLUOR試薬（ベリタス社製）とFACS Ariaフローサイトメトリー（日本ベクトンディッキンソン社製）を用いて、80%以上のがん幹細胞を含む分画を抽出した。次に、化合物（5）を最終濃度10μg/mlになるように培地に添加し、37℃、5%CO₂環境下で24時間培養した。培養した細胞をCell Titer - Glo Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ社製）を用いて、生存細胞数を解析した。基準として、上記操作法にて化合物（1）を培地に添加する代わりに、0.1%のジメチルスルホキシド溶液（以下、DMSOと略する）を投与したものを0.1として用いた。なお、この後、ALDEFLUOR試薬で陽性の分画（がん幹細胞と判断される）をALDH（+）、ALDEFLUOR試薬で陰性の分画（がん幹細胞でないと判断される）をALDH（-）と示す場合がある。

【0203】

実験例 13～27

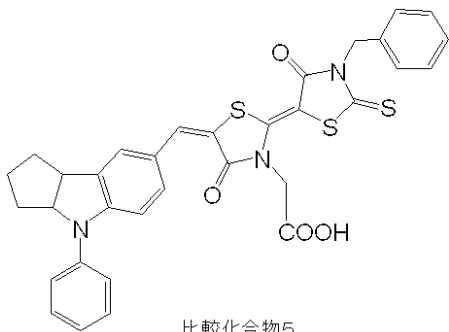
実験例 12において、化合物（5）を、表 4 で示す化合物及び最終濃度量に変更した以外は、実験例 12と同様の操作で実施し、それぞれの生存細胞数を解析した。なお本実施例の増殖率とは、各群の培養後の細胞の数について、0.1%DMSOを投与したものを0.1とした場合の数値である。

【0204】

比較例 9～15

実験例 12において、化合物（5）を、表 4 で示すように、一般的な抗がん剤であるImatinib（NOVARTIS社製）、あるいは比較化合物（5）に変更したこと、及び最終濃度を変更した以外は、実験例 12と同様の操作で実施し、それぞれの生存細胞数を解析した。

【化 23】



比較化合物5

【0205】

実験例 12～27、比較例 9～15の結果を表 4 にまとめる。がん幹細胞の増殖抑制効果は以下の基準に基づいて評価した。なお本実施例での増殖率とは、なお本実施例の増殖率とは、0.1%DMSOを投与したものを0.1とした場合の数値である。

- A：ALDH（+）の値が0.5未満
（がん幹細胞に対して増殖抑制効果が非常に高い）
- B：ALDH（+）の値が0.5以上0.95未満
（がん幹細胞に対して増殖抑制効果が高い）
- C：ALDH（+）の値が0.95以上

10

20

30

40

50

(がん幹細胞に増殖抑制効果がない)

【0206】

また、がん幹細胞とがん細胞を比較し、がん幹細胞の優位性を以下の基準に基づいて評価した。

ALDH(+)はがん幹細胞、ALDH(-)は通常がん細胞を表す。

A: ALDH(+) / ALDH(-) の値が 0.8 未満

(がん幹細胞に対して選択的阻害効果が非常に高い)

B: ALDH(+) / ALDH(-) の値が 0.8 以上 0.95 未満

(がん幹細胞に対して選択的阻害効果が高い)

C: ALDH(+) / ALDH(-) の値が 0.95 以上

(がん幹細胞に選択的阻害効果がない)

【0207】

【表4】

表4

	化合物	色素量	ALDH(+)	増殖抑制 評価	ALDH(-)	ALDH(+)/ALDH(-)	ALDH(+) 優位性評価
実験例12	5	10 μ g/ml	0.35	A	0.40	0.88	B
実験例13	8	10 μ g/ml	0.23	A	0.32	0.72	A
実験例14	11	0.05 μ g/mL	0.65	B	0.77	0.85	B
実験例15	11	0.5 μ g/mL	0.32	A	0.49	0.65	A
実験例16	11	1 μ g/mL	0.12	A	0.22	0.56	A
実験例17	20	10 μ g/ml	0.14	A	0.25	0.56	A
実験例18	15	10 μ g/ml	0.21	A	0.26	0.81	B
実験例19	32	10 μ g/ml	0.78	B	0.90	0.87	B
実験例20	33	10 μ g/ml	0.90	B	1.01	0.89	B
実験例21	34	10 μ g/ml	0.17	A	0.24	0.69	A
実験例22	36	10 μ g/ml	0.13	A	0.20	0.66	A
実験例23	38	10 μ g/ml	0.05	A	0.11	0.46	A
実験例24	39	10 μ g/ml	0.06	A	0.13	0.42	A
実験例25	40	10 μ g/ml	0.06	A	0.13	0.41	A
実験例26	40	1 μ g/mL	0.73	B	0.85	0.86	B
実験例27	44	10 μ g/ml	0.03	A	0.11	0.31	A
比較例9	Imatinib	0.12 μ g/ml	0.74	B	0.51	1.47	C
比較例10	Imatinib	0.24 μ g/ml	0.59	B	0.40	1.48	C
比較例11	Imatinib	0.35 μ g/ml	0.48	A	0.32	1.51	C
比較例12	Imatinib	0.47 μ g/ml	0.36	A	0.22	1.63	C
比較例13	Imatinib	0.59 μ g/ml	0.31	A	0.11	2.80	C
比較例14	比較化合物5	1 μ g/mL	1.06	C	0.97	1.09	C
比較例15	比較化合物5	10 μ g/ml	1.07	C	0.90	1.18	C

【0208】

表4から明らかなように、本発明の化合物は、がん幹細胞に対して選択的に阻害効果が認められる。即ち、一般的な抗がん剤である Imatinib を用いた場合は、通常がん細胞に対して阻害効果があり、また、比較化合物を用いた場合は、阻害効果は認められなかった。

【実施例5】

【0209】

慢性骨髄性白血病細胞に対するがん幹細胞選択的染色

【0210】

実験例28

実験例16において、24時間培養した細胞を Hoechst 33342 (同仁化学研究所製) で核染色し、AXIOVERT 200M 倒立型蛍光顕微鏡 (カルツァイス社製) を用いて、蛍光画像を撮影した。それぞれの化合物で、ALDH(+) が染色された割合と、ALDH(-) が染色された割合をそれぞれパーセンテージで示した値を表5に示す。

【 0 2 1 1 】

【 表 5 】

表5

	化合物	ALDH(+)	ALDH(-)	がん幹細胞選択的染色
実験例28	11	76.7	48.5	ALDH(+)が選択的に染まる

【 0 2 1 2 】

表 5 から明らかなように、本発明の化合物は、通常のがん細胞 (A L D H (-)) よりもがん幹細胞 (A L D H (+)) を選択的に染色することがわかる。従って、がん幹細胞検出用プローブとして本発明の化合物を有効成分として含むことができる。

10

【 実施例 6 】

【 0 2 1 3 】

がん細胞の転移巣 (移植腫瘍部から 3 0 0 ~ 4 5 0 μ m 領域) におけるがん転移抑制効果の確認

【 0 2 1 4 】

実験例 2 9

ヒト慢性骨髄性白血病細胞に蛍光タンパク質 T a g - B F P を恒常発現させた細胞株 K 5 6 2 - K O r から、がん幹細胞マーカーとしての A L D E F L U O R 試薬 (ペリタス社製) と F A C S A r i a フローサイトメトリー (日本ベクトンディッキンソン社製) を用いて、80% 以上のがん幹細胞を含む分画 (A L D H (+)) を抽出した。K 5 6 2 - B F P 細胞をゼブラフィッシュ稚魚 (M i e K o m a c h i 系統、受精後 2 日齢) に移植し、32 環境で飼育した。また、移植 2 4 時間後、化合物 (1 1) (7 4 5 μ m o l / K g B W) を卵黄嚢内に投与した。72 時間後、ゼブラフィッシュ稚魚に移植された細胞を、M Z 1 6 F 蛍光実体顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ社製) を用いて移植腫瘍部から 3 0 0 ~ 4 5 0 μ m 領域の蛍光画像を撮影し、蛍光強度を数値化した。

20

24 時間後の蛍光画像を撮影し、蛍光強度を数値化した。

基準として、上記操作法にて化合物 (1 1) を培地に添加する代わりに、0.1% の D M S O 溶液を投与したものの蛍光強度を用いた。

【 0 2 1 5 】

[比較例 1 6 、 1 7]

30

実験例 2 9 において、化合物 (1 1) を用いる代わりに、I m a t i n i b 、 D a s a t i n i b に変更した以外は、実験例 2 9 と同様の操作で蛍光画像を撮影した。

実験例 2 9 及び比較例 1 6 、 1 7 のゼブラフィッシュ稚魚に移植されたがん細胞の転移巣 (移植腫瘍部から 3 0 0 ~ 4 5 0 μ m 領域) のがん細胞の阻害率を表 6 に示す。

ここで阻害率は、試験物質を添加したときの蛍光強度を F 1 、基準物質 (D M S O) を添加したときの蛍光強度を F 0 として、 $100 \times (1 - F 1 / F 0)$ のように求めた。

【 0 2 1 6 】

がん幹細胞の転移巣 (移植腫瘍から 3 0 0 - 4 5 0 μ m 領域) の増殖抑制効果は以下の基準に基づいて評価した

A : 阻害率の値が 7 0 以上

40

(がん幹細胞の転移巣 (移植腫瘍から 3 0 0 - 4 5 0 μ m 領域) に対して増殖抑制効果が非常に高い)

B : 阻害率の値が 5 0 以上 7 0 未満

(がん幹細胞の転移巣 (移植腫瘍から 3 0 0 - 4 5 0 μ m 領域) に対して増殖抑制効果が高い)

C : 阻害率の値が 5 0 未満

(がん幹細胞の転移巣 (移植腫瘍から 3 0 0 - 4 5 0 μ m 領域) に増殖抑制効果が低い)

【 0 2 1 7 】

【表 6】

表6

	化合物	阻害率	評価
実施例29	11	85	A
比較例16	Imatinib	60	B
比較例17	Dasatinib	36	C

【0218】

表6より、明らかなように、本発明のがん幹細胞阻害薬は比較した公知の抗がん剤よりも、転移抑制効果があることが認められた。 10

【産業上の利用可能性】

【0219】

本発明により提供される化合物は、がん細胞阻害薬として有用である。また、本発明のがん細胞阻害薬の提供により、がん細胞、特になん幹細胞の増殖抑制、分裂抑制、転移抑制、機能阻害、殺細胞されることが可能になる。また、がん幹細胞の検出が簡便となり、その部位を明確にすることが可能になるなど、医療産業に広く貢献することが期待できる。

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 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	
A 6 1 K 31/423 (2006.01)	A 6 1 K 31/423	
A 6 1 K 31/405 (2006.01)	A 6 1 K 31/405	
C 0 7 D 417/06 (2006.01)	C 0 7 D 417/06	
C 0 7 D 417/14 (2006.01)	C 0 7 D 417/14	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D

- (74)代理人 100106183
弁理士 吉澤 弘司
- (74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
- (74)代理人 100134393
弁理士 木村 克彦
- (74)代理人 100174230
弁理士 田中 尚文
- (72)発明者 新藤 太一
東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 野本 毅
東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 渡邊 耕平
東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 宮▲崎▼ 健
東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 田中 利男
三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 番地 国立大学法人三重大学内
- (72)発明者 島田 康人
三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 番地 国立大学法人三重大学内
- (72)発明者 西村 有平
三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 番地 国立大学法人三重大学内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QR56 QR66 QR68 QR77 QS03 QS28
QS32 QS36 QS39 QX02
4C063 AA01 AA03 BB03 CC62 DD08 EE01
4C086 AA01 AA02 BC82 BC84 GA07 GA10 MA01 MA04 NA14 ZB21
ZB26