

(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2014-101358

(P2014-101358A)

(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 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/4725 (2006.01)	A 6 1 K 31/4725	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2013-222025 (P2013-222025)	(71) 出願人	304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7
(22) 出願日	平成25年10月25日 (2013. 10. 25)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(31) 優先権主張番号	特願2012-236977 (P2012-236977)	(74) 代理人	100094112 弁理士 岡部 譲
(32) 優先日	平成24年10月26日 (2012. 10. 26)	(74) 代理人	100096943 弁理士 臼井 伸一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(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

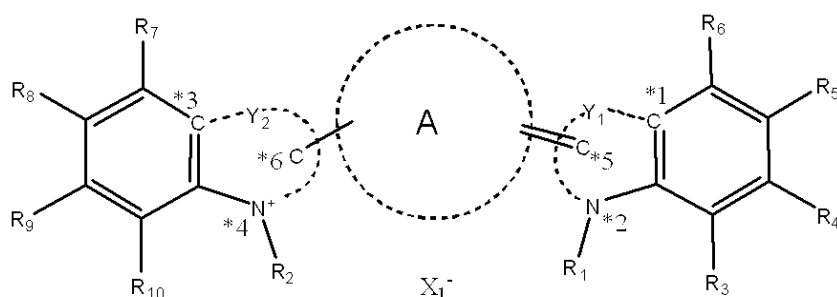
最終頁に続く

(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。

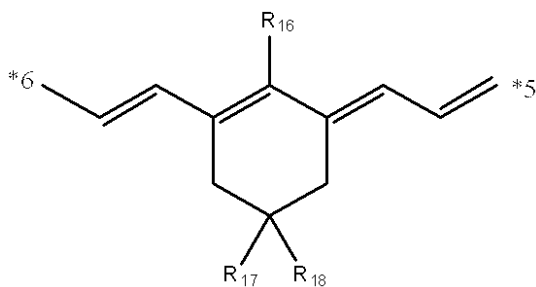
【解決手段】一般式(1)で表わされる化合物を1種類以上有効成分として含むことを特徴とするがん細胞阻害薬。



一般式(1)

【選択図】なし

【化 3】



一般式(3)

10

(一般式(2)中、 $R_{13} \sim R_{15}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基を表し、 n は0~2の数字を表し、

一般式(3)中、 R_{16} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ハロゲン原子を表し、

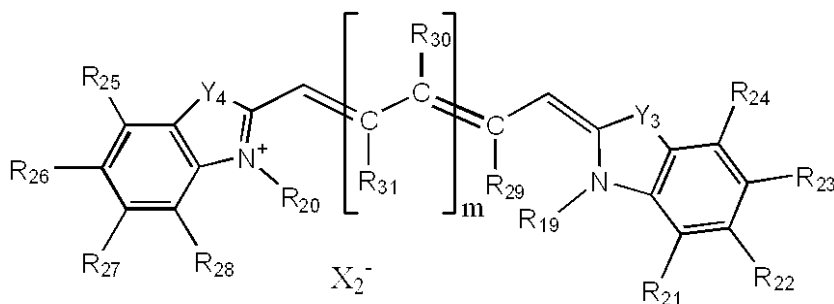
R_{17} 、 R_{18} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アルキルオキシカルボニル基を表す。)

【請求項 2】

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

20

【化 4】



一般式(4)

30

一般式(4)中、 R_{19} 、 R_{20} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{21} \sim R_{28}$ 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_{21} と R_{22} 、 R_{23} と R_{24} 、 R_{25} と R_{26} 及び R_{27} と R_{28} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、

$R_{29} \sim R_{31}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基を表し、 m は0~2の数字を表す。

40

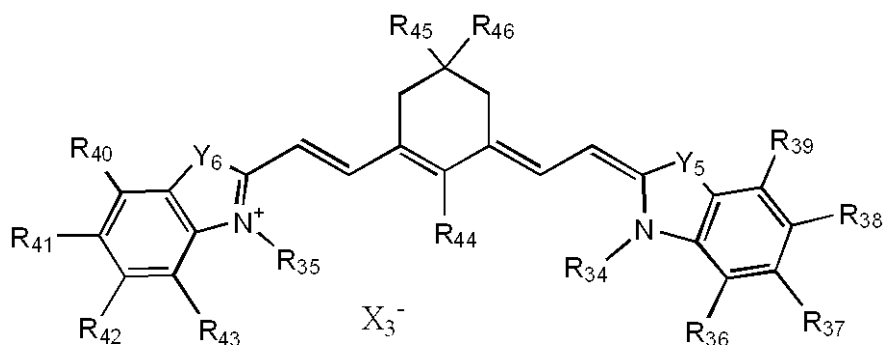
X_2^- は陰イオン性基を表し、

Y_3 、 Y_4 は酸素原子、硫黄原子、アルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基どうしが結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【請求項 3】

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

【化 5】



10

一般式(5)

一般式(5)中、 R_{34} 、 R_{35} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{36} \sim R_{43}$ 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、アルキルオシカルボニル基、N-アルキルカルバモイル基を表す。 R_{36} と R_{37} 、 R_{38} と R_{39} 、 R_{40} と R_{41} 及び R_{42} と R_{43} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、

R_{44} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ハロゲン原子を表し、 R_{45} 、 R_{46} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アルキルオシカルボニル基を表し、

20

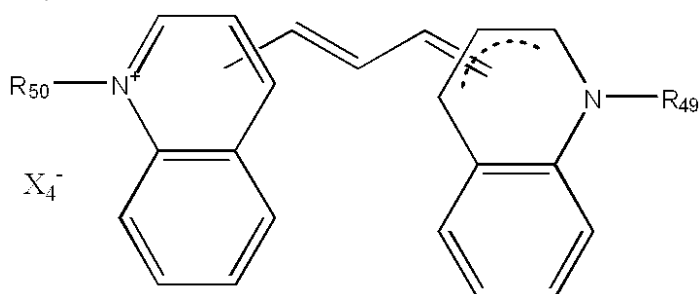
X_3^- は陰イオン性基を表し、

Y_5 、 Y_6 は酸素原子、硫黄原子、アルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基同士が結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【請求項 4】

一般式(1)で表わされる化合物が、一般式(6)である請求項1に記載のがん細胞阻害薬、

【化 6】



30

一般式(6)

一般式(6)中、 R_{49} 、 R_{50} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルキルカルボニルオシアルキル基、アルコシカルボニルアルキル基を表し、

40

X_4^- は陰イオン性基を表す。

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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

【請求項 7】

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】

50

【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】

10

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 Cell）といわれる。

【0005】

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）。

20

【0006】

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。

【0007】

30

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）。

【0008】

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。

【0009】

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。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2010-13380号公報

【非特許文献】

【0011】

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

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

50

【非特許文献3】Journal of the American Chemical Society, Vol. 133, p.p. 6626 - 6635, 2011

【非特許文献4】Dye and Pigments, Vol. 71, p.p. 28 - 36, 2005

【非特許文献5】Organic & Biomolecular Chemistry, Vol. 9, p.p. 4199 - 4204, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

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。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

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。

【0014】

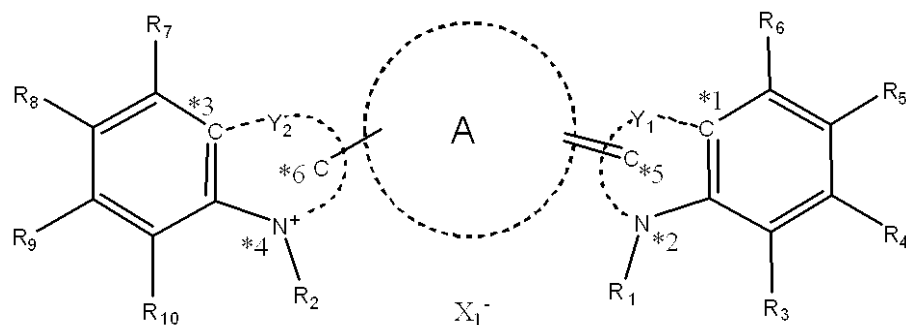
また、本発明の化合物は発光特性を有する。そのため、がん細胞に選択的に取り込まれた化合物の発光を検出することによって、がん細胞の位置を同定(検出)が出来ることを見出し、本発明に至った。なお、本明細書中、発光とは、蛍光及び燐光を含む。本発明の化合物は、特に、がん幹細胞に関する取り込まれる割合が大きいいため、選択的にがん幹細胞を検出することが可能である。

20

【0015】

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

【化1】



30

一般式(1)

一般式(1)中、 R_1 、 R_2 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、 $R_3 \sim R_{10}$ 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、カルバモイル基、N-アルキルカルバモイル基を表し、 R_3 と R_4 、 R_5 と R_6 、 R_7 と R_8 及び R_9 と R_{10} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、 X_1^- は陰イオン性基を表し、

40

Y_1 は*1, *2, *5を含む基で、 Y_1 は以下のいずれかで表わされ、
 *1 - S - *5 - *2、*1 - O - *5 - *2、*1 - C(- R_{11} , - R_{12}) - *5 - *2、*1 - *5 - CH=CH - *2、

ただし、 R_{11} 、 R_{12} は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{11} と R_{12} は互いに

50

結合して、環を形成してもよく、

Y_2 は $*3$, $*4$, $*6$ を含む基で、 Y_2 は以下のいずれかを表し、

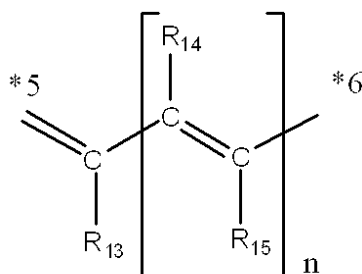
$*4 = *6 - S - *3$ 、 $*4 = *6 - O - *3$ 、 $*4 = *6 - C(- R_{51} , - R_{52}) - *3$ 、
 $*4 = *6 - CH = CH - *3$ 、 $*4 = CH - CH = *6 - *3$ 、

ただし、 R_{51} 、 R_{52} は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{51} と R_{52} は互いに結合して、環を形成してもよく、

A から $*5$ 、 $*6$ で示される炭素原子までを含む基は一般式 (2) または、(3) で示される。

【化2】

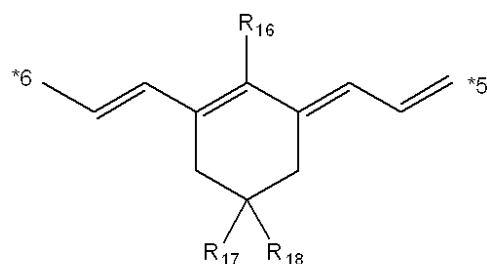
10



一般式(2)

20

【化3】



一般式(3)

30

(一般式(2)中、 $R_{13} \sim R_{15}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基を表し、 n は 0 ~ 2 の数字を表し、

一般式(3)中、 R_{16} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ハロゲン原子を表し、

R_{17} 、 R_{18} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アルキルオキシカルボニル基を表す。)

【発明の効果】

【0016】

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、殺細胞が可能となった。すなわち、本発明は、がん細胞阻害剤を提供する。また、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。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の実施形態について説明する。

【0018】

本発明のがん細胞阻害薬、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がん幹細胞阻害薬、がん幹細胞検出用プローブを例示するもの

50

であり、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 1 9 】

がん細胞阻害薬

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。

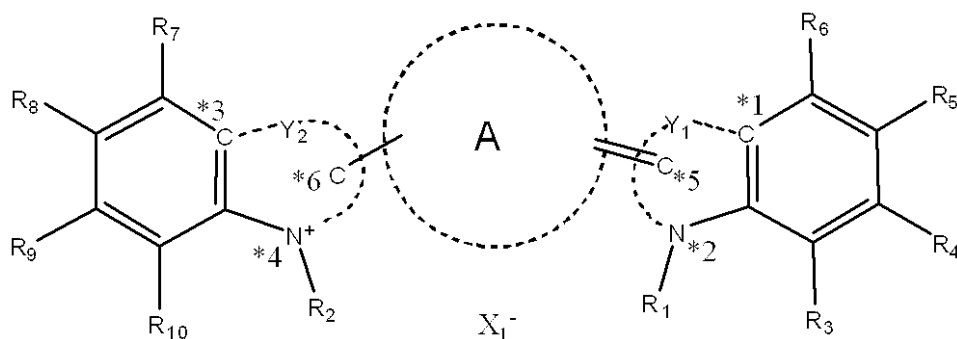
本発明の化合物は、一般式 (1) で表される化合物を含むことを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

一般式 (1) で表される化合物について

【 化 4 】

10



20

一般式(1)

一般式 (1) 中、 R_1 、 R_2 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、 $R_3 \sim R_{10}$ 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、カルバモイル基、N - アルキルカルバモイル基を表し、 R_3 と R_4 、 R_5 と R_6 、 R_7 と R_8 及び R_9 と R_{10} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、 X_1^- は陰イオン性基を表し、

Y_1 は $*1$ 、 $*2$ 、 $*5$ を含む基で、 Y_1 は以下のいずれかを表し、

$*1 - S - *5 - *2$ (化合物 1 から 12, 29, 39, 42 に例示される)

30

$*1 - O - *5 - *2$ (化合物 13 から 19, 23, 28, 33, 38, 41, 44, 56, 57 に例示される)

$*1 - C(-R_{11}, -R_{12}) - *5 - *2$ (化合物 20 から 22, 24 から 27, 30 から 32, 37, 40, 43, 49 から 55, 58 に例示される)

$*1 - *5 - CH = CH - *2$ (化合物 34 から 36, 45 から 48 に例示される)

ただし、 R_{11} 、 R_{12} は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{11} と R_{12} は互いに結合して、環を形成してもよく、

Y_2 は $*3$ 、 $*4$ 、 $*6$ を含む基で、 Y_2 は以下のいずれかを表し、

$*4 = *6 - S - *3$ (化合物 1 から 12, 29, 34, 39, 42 に例示される)

$*4 = *6 - O - *3$ (化合物 13 から 19, 23, 28, 33, 35, 38, 41, 44, 56, 57 に例示される)

40

$*4 = *6 - C(-R_{51}, -R_{52}) - *3$ (化合物 20 から 22, 24 から 27, 30 から 32, 36, 37, 40, 43, 49 から 55, 58 に例示される)

$*4 = *6 - CH = CH - *3$ (化合物 45, 47, 48 に例示される)

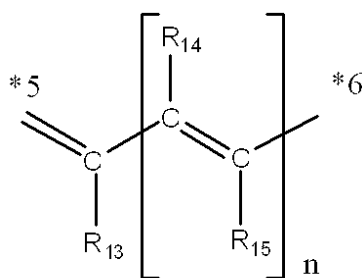
$*4 = CH - CH = *6 - *3$ (化合物 46 に例示される)

ただし、 R_{51} 、 R_{52} は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{51} と R_{52} は互いに結合して、環を形成してもよく、

A から $*5$ 、 $*6$ で示される炭素原子までを含む基は一般式 (2) または、(3) で示され、

50

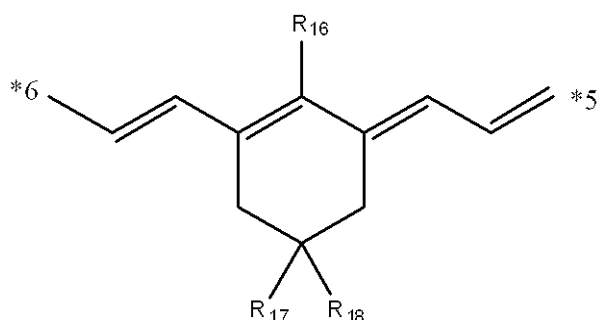
【化 5】



一般式(2)

10

【化 6】



一般式(3)

20

一般式(2)中、 $R_{13} \sim R_{15}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基を表し、 n は0～2の数字を表し、

一般式(3)中、 R_{16} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ハロゲン原子を表し、

R_{17} 、 R_{18} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アルキルオキシカルボニル基を表す。

【0021】

30

前記一般式(1)中の R_1 、 R_2 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。

【0022】

前記一般式(1)中の R_1 、 R_2 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。

【0023】

前記一般式(1)中の R_1 、 R_2 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、

40

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。

【0024】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

50

【0025】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

【0026】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

10

【0027】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

【0028】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

【0029】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

20

【0030】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

【0031】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ 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。

30

【0032】

前記一般式(1)中の $R_3 \sim R_{10}$ として好ましくは、各々独立して、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。

【0033】

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、p-トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン等が挙げられる。

40

【0034】

前記一般式(1)中の Y_1 、 Y_2 の R_{11} 、 R_{12} 、 R_{51} 、 R_{52} 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_{11} と R_{12} は同じであることが好ましいが、異なってもよい。また、 R_{51} と R_{52} は同じであることが好ましいが、異なってもよい。

【0035】

前記一般式(1)中の R_{11} と R_{12} または R_{51} と R_{52} は互いに結合して脂肪族環を形成してもよく、その例として、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。

50

【0036】

前記一般式(2)中の $R_{13} \sim R_{15}$ 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。

【0037】

前記一般式(2)中の $R_{13} \sim R_{15}$ 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等が挙げられる。

10

【0038】

前記一般式(3)中の R_{16} におけるチオール基としては、例えば、メタンチオール基、ブタンチオール基、ベンゼンチオール基等が挙げられ、また、 R_{16} のチオール基はフェニルチオ基であってもよい。

【0039】

前記一般式(3)中の R_{16} におけるアルコキシ基としては、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。

【0040】

前記一般式(3)中の R_{16} におけるアリールオキシ基としては、例えば、フェノキシ基、置換基を有していても良いフェノキシ基が挙げられる。

20

【0041】

前記一般式(3)中の R_{16} 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。

【0042】

前記一般式(3)中の R_{17} 、 R_{18} 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。

【0043】

前記一般式(3)中の R_{17} 、 R_{18} 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。

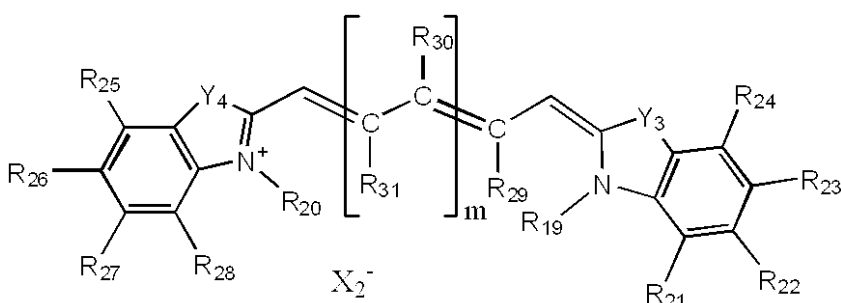
30

【0044】

一般式(4)で表される化合物について

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

【化7】



40

一般式(4)

一般式(4)中、 R_{19} 、 R_{20} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{21} \sim R_{28}$ 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

50

カルボニル基、N - アルキルカルバモイル基を表す。R₂₁とR₂₂、R₂₃とR₂₄、R₂₅とR₂₆及びR₂₇とR₂₈はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、

R₂₉ ~ R₃₁は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基を表し、mは0 ~ 2の数字を表す。

X₂⁻は陰イオン性基を表し、

Y₃、Y₄は酸素原子、硫黄原子、アルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基が複数ある場合には、置換基どうしが結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【0045】

前記一般式(4)中のR₁₉、R₂₀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。

【0046】

前記一般式(4)中のR₁₉、R₂₀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等が挙げられる。

【0047】

前記一般式(4)中のR₁₉、R₂₀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る。

【0048】

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。

【0049】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈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。

【0050】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈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。

【0051】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈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。

【0052】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈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。

【0053】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈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。

【0054】

前記一般式(4)中のR₂₁ ~ R₂₈におけるN - アルキルスルファモイル基としては

10

20

30

40

50

、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 5 5 】

前記一般式 (4) 中の $R_{21} \sim R_{28}$ 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。

【 0 0 5 6 】

前記一般式 (4) 中の $R_{21} \sim R_{28}$ 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

【 0 0 5 7 】

前記一般式 (4) 中の $R_{21} \sim R_{28}$ 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 5 8 】

前記一般式 (4) 中の $R_{29} \sim R_{31}$ 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

【 0 0 5 9 】

前記一般式 (4) 中の $R_{29} \sim R_{31}$ 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等が挙げられる。

【 0 0 6 0 】

前記一般式 (4) 中の X_2^- 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、p - トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン等が挙げられる。

30

前記一般式 (4) 中の Y_3 、 Y_4 は、それぞれ独立して、酸素原子、硫黄原子、アルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基が複数ある場合には、置換基同士が結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【 0 0 6 1 】

ここでのアルキレン基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、2 - エチルヘキシレン基等が挙げられる。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。

【 0 0 6 2 】

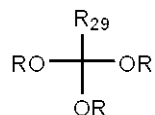
本発明における一般式 (4) で表わされる化合物は、多くが市販されており、入手可能である。また、公知の方法 (例えば、非特許文献 3) と同様の方法で合成することができる。

40

【 0 0 6 3 】

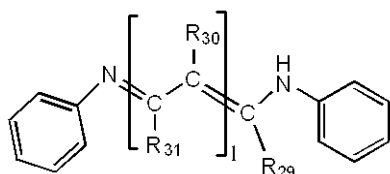
【化 8】

m=0

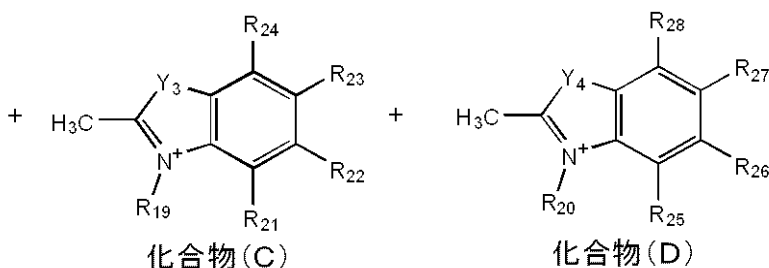


化合物(A)

あるいは



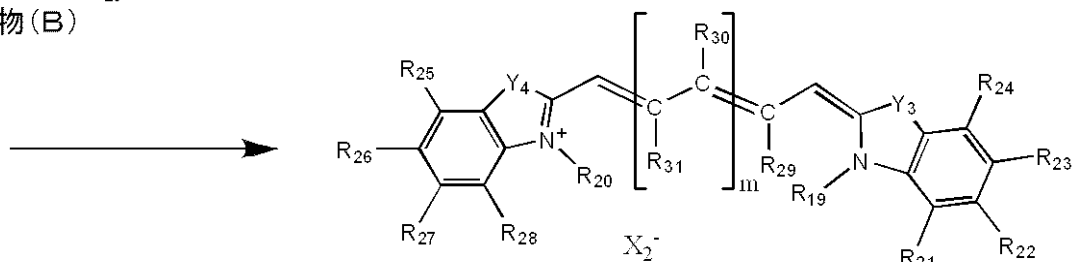
化合物(B)



化合物(C)

化合物(D)

10



一般式(4)

20

【0064】

上記の、化合物(A)～(D)中の $\text{R}_{19} \sim \text{R}_{31}$ 、 X_2^- 、 Y_3 、及び Y_4 は、一般式(4)における化合物(A)～(D)中の $\text{R}_{19} \sim \text{R}_{31}$ 、 X_2^- 、 Y_3 、及び Y_4 の場合と同義である。また、化合物(A)中のRはメチル基、エチル基等のアルキル基を表す。

【0065】

即ち、一般式(4)中、mが0を表す化合物は、化合物(A)、化合物(C)、化合物(D)をカップリングさせて得られる。一般式(4)中mが0～2を表す化合物は、化合物(B)、化合物(C)、化合物(D)をカップリングさせて得られる。

30

【0066】

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、下記に示すがmが0を表す時の化合物(A)を用いる方法を一態様として挙げる。

【0067】

カップリング工程の化合物(C)の使用量は、化合物(A)1モルに対し、0.1～1.2倍モル、好ましくは0.5～1.1倍モル、より好ましくは0.8～1.0倍モルである。

【0068】

カップリング工程の化合物(D)の使用量は、化合物(A)1モルに対し、0.1～2倍モル、好ましくは0.5～1.5倍モル、より好ましくは0.8～1.2倍モルである。

40

【0069】

化合物(C)と化合物(D)は同一でも異なるものでも制限はされないが、製法上の観点から同一の化合物であることがこのましい。化合物(C)と化合物(D)は同一である場合の使用量は、化合物(A)1モルに対し、0.1～3倍モル、好ましくは0.5～2倍モル、より好ましくは0.8～1.5倍モルである。

【0070】

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

50

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。

10

【0071】

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 ~ 100 0 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。

【0072】

カップリング工程は、- 80 ~ 250 の温度範囲で行われ、好ましくは - 20 ~ 200 、より好ましくは 10 ~ 170 である。通常、反応は 24 時間以内に完結する。

20

【0073】

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、及び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。

30

【0074】

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 (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。

40

【0075】

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

【0076】

得られた化合物は、通常の有機化合物の単離・精製方法により単離・精製することができる。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得られる固体をろ別し、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

50

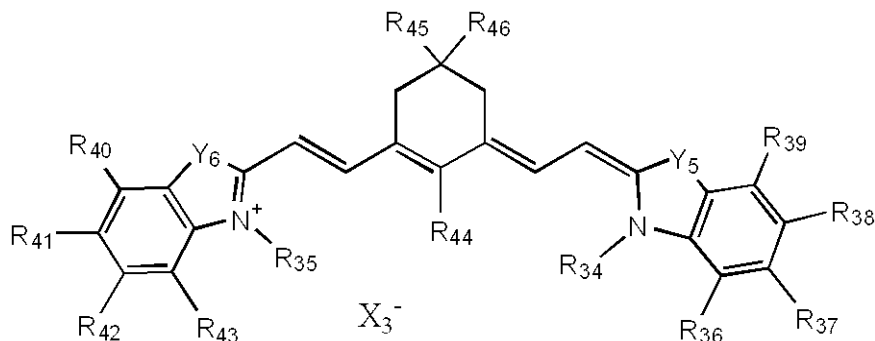
トン、メタノール等を用いた再結晶、シリカゲルを用いたカラム精製等により精製する。これらの方法は、単独または2つ以上組み合わせて精製を行うことにより高純度に精製することが可能である。

【0077】

一般式(5)で表される化合物について

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あげることができる

【化9】



一般式(5)

10

一般式(5)中、 R_{34} 、 R_{35} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルコシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{36} \sim R_{43}$ 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_{36} と R_{37} 、 R_{38} と R_{39} 、 R_{40} と R_{41} 及び R_{42} と R_{43} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良い。

20

R_{44} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、ハロゲン原子を表し、 R_{45} 、 R_{46} は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アルキルカルボニルオキシ基を表す。

X_3^- は陰イオン性基を表し、

Y_5 、 Y_6 は酸素原子、硫黄原子、アルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基同士が結合して、脂肪族環を形成してもよい。

30

【0078】

前記一般式(5)中の R_{34} 、 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。

【0079】

前記一般式(5)中の R_{34} 、 R_{35} 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。

40

【0080】

前記一般式(5)中の R_{34} 、 R_{35} におけるアルコ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、

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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。

【0081】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ におけるアリール基としては、特に限定されるも

50

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。

【0082】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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。

【0083】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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。

10

【0084】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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、スルホン酸メチルエステル基、スルホン酸エチルエステル基等が挙げられる。

【0085】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ における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、スルホン酸モノメチルアミド基、スルホン酸モノエチルアミド基、スルホン酸ジメチルアミド基、スルホン酸ジエチルアミド基等が挙げられる。

20

【0086】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ における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、例えば、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。

【0087】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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。

30

【0088】

前記一般式(5)中の $R_{36} \sim R_{43}$ 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。

【0089】

前記一般式(5)中の R_{44} におけるチオール基としては、例えば、メルカプトメチル基、メルカプトブチル基、メルカプトフェニル基等が挙げられ、また、 R_{44} のチオール基はフェニルチオ基であってもよい。

【0090】

前記一般式(5)中の R_{44} におけるアルコキシ基としては、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。

40

【0091】

前記一般式(5)中の R_{44} におけるアリールオキシ基としては、例えば、フェノキシ基、置換基を有していても良いフェノキシ基が挙げられる。

【0092】

前記一般式(5)中の 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。

【0093】

前記一般式(5)中の R_{45} 、 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

50

シル基等のアルキル基が挙げられる。

【 0 0 9 4 】

前記一般式 (5) 中の R_{45} 、 R_{46} 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。

【 0 0 9 5 】

前記一般式 (5) 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、*p*-トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロボロ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン等が挙げられる。

10

【 0 0 9 6 】

前記一般式 (5) 中の Y_5 、 Y_6 のアルキレン基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、2-エチレンヘキシル基等が挙げられる。アルキレン基の置換基として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。

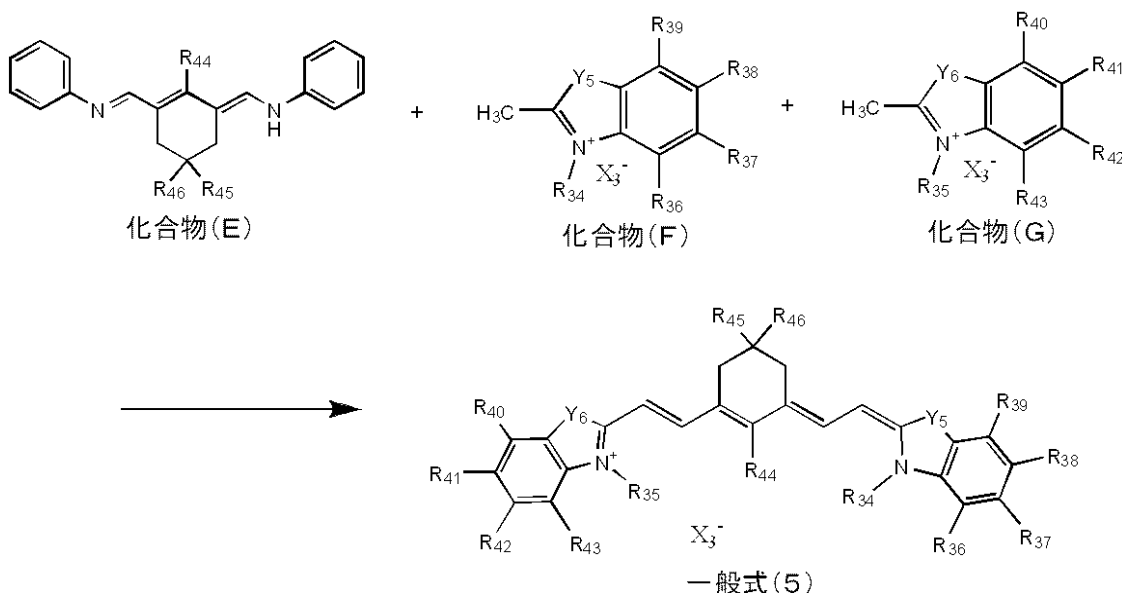
【 0 0 9 7 】

本発明における一般式 (5) で表わされる化合物は、多くが市販されており、容易に入手可能である。また、公知の方法 (例えば、非特許文献 4) により同様の方法で容易に合成することができる。

20

【 0 0 9 8 】

【 化 1 0 】



30

【 0 0 9 9 】

化合物 (E) ~ (G) 中の $R_{35} \sim R_{44}$ 、及び X_3^- 、 Y_5 、 Y_6 は、一般式 (5) における化合物 (E) ~ (G) 中の $R_{35} \sim R_{44}$ 、及び X_3^- 、 Y_5 、 Y_6 と同義である。

40

【 0 1 0 0 】

即ち、化合物 (E) ~ (G) をカップリングさせて、一般式 (5) の化合物を得ることができる。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。

【 0 1 0 1 】

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 ~ 1.2 倍モル、好ましくは 0.5 ~ 1.1 倍モル、より好ましくは 0.8 ~ 1.0 倍モルである。

50

【 0 1 0 2 】

カップリング工程の化合物 (G) の使用量は、化合物 (E) 1 モルに対し、 0 . 1 ~ 2 倍モル、好ましくは 0 . 5 ~ 1 . 5 倍モル、より好ましくは 0 . 8 ~ 1 . 2 倍モルである。

【 0 1 0 3 】

化合物 (F) と化合物 (G) は同一でも異なるものでも制限はされないが、製法上の観点から同一の化合物であることがこのましい。化合物 (F) と化合物 (G) は同一である場合の使用量は、化合物 (E) 1 モルに対し、 0 . 1 ~ 3 倍モル、好ましくは 0 . 5 ~ 2 倍モル、より好ましくは 0 . 8 ~ 1 . 5 倍モルである。

【 0 1 0 4 】

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 - t e r t - 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、i s o - 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 (D M F)、ジメチルスルホキシド (D M S O)、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、i s o - 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、i s o - 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。

【 0 1 0 5 】

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 ~ 1 0 0 0 倍重量の範囲で用いられ、好ましくは 0 . 5 ~ 5 0 0 倍重量、より好ましくは 1 . 0 ~ 1 5 0 倍重量である。

【 0 1 0 6 】

カップリング工程における反応温度は、 - 8 0 ~ 2 5 0 の範囲で行われ、好ましくは - 2 0 ~ 2 0 0 、より好ましくは 1 0 ~ 1 7 0 である。通常反応は 2 4 時間以内に完結する。

【 0 1 0 7 】

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 . 0 0 1 ~ 5 0 倍モル、好ましくは 0 . 0 1 ~ 1 0 倍モル、より好ましくは 0 . 1 ~ 5 倍モルである。

【 0 1 0 8 】

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 t e r t - ブトキシド、ナトリウム t e r t - 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、D B U 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、t e r t - 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、

10

20

30

40

50

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。

【0109】

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

【0110】

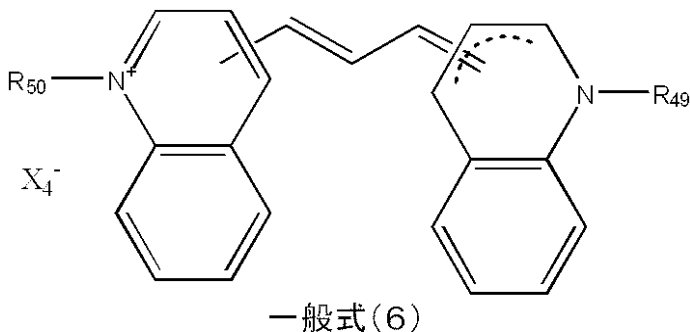
得られた化合物は、通常の有機化合物の単離・精製方法を用いることができる。例えば、反応液を塩酸等で酸性にして、酸析することによって固体をろ別し、水酸化ナトリウム等で中和し、濃縮すれば、粗成物を得られる。更に、粗成物をアセトン、メタノール等を用いた再結晶、シリカゲルを用いたカラム精製等により精製する。これらの方法は、単独または2つ以上組み合わせて精製を行うことにより高純度で得ることが可能である。

【0111】

一般式(6)で表される化合物について

また、本発明の化合物の好ましい一例として、一般式(6)で表わされる化合物をあげることができる。

【化11】



一般式(6)中、 R_{49} 、 R_{50} は、各々独立して、アルキル基、カルボキシアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基を表す。

X_4^- は陰イオン性基を表す。

【0112】

前記一般式(6)中の R_{49} 、 R_{50} 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。

【0113】

前記一般式(6)中の R_{49} 、 R_{50} 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等が挙げられる。

【0114】

前記一般式(6)中の R_{49} 、 R_{50} 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。

【0115】

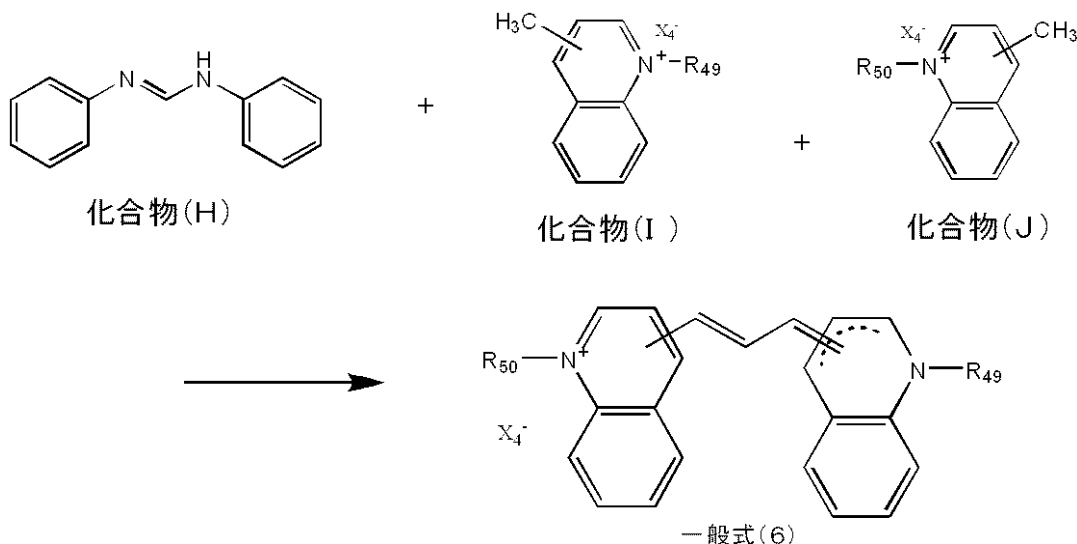
前記一般式(6)中の X_4^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン等が挙げられる。

【0116】

本発明における一般式(6)で表わされる化合物は、多くが市販されており、容易に入手可能である。また、公知の方法(例えば、非特許文献5)により同様の方法で容易に合成することができる。

【0117】

【化12】



10

20

【0118】

化合物(H)～(J)中の R_{49} 、 R_{50} 、及び X_4^- は、一般式(6)における化合物(H)～(J)中の R_{49} 、 R_{50} 、及び X_4^- と同義である。

【0119】

即ち、化合物(H)～(J)をカップリングさせて、一般式(6)の化合物を得ることができる。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。

30

【0120】

カップリング工程の化合物(I)の使用量は、化合物(H)1モルに対し、0.1～1.2倍モル、好ましくは0.5～1.1倍モル、より好ましくは0.8～1.0倍モルである。

【0121】

カップリング工程の化合物(J)の使用量は、化合物(H)1モルに対し、0.1～2倍モル、好ましくは0.5～1.5倍モル、より好ましくは0.8～1.2倍モルである。

【0122】

化合物(I)と化合物(J)は同一でも異なるものでも制限はされないが、製法上の観点から同一の化合物であることがこのましい。化合物(I)と化合物(J)は同一である場合の使用量は、化合物(H)1モルに対し、0.1～3倍モル、好ましくは0.5～2倍モル、より好ましくは0.8～1.5倍モルである。

40

【0123】

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

50

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。

【0124】

カップリング工程における反応溶媒の使用量は、化合物(H)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。

10

【0125】

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10~170である。通常反応は24時間以内に完結する。

【0126】

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(H)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。

20

【0127】

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(H)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。

30

40

【0128】

反応終了後、水で希釈するか、あるいは、塩酸等による酸析を行うことによって一般式(6)で表わされる化合物を得ることができる。

【0129】

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。

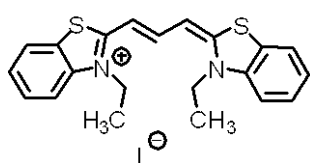
【0130】

50

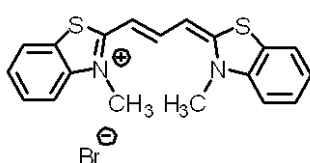
以下に、本発明の化合物の好ましい具体例として化合物(1)から(60)を示す。本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0131】

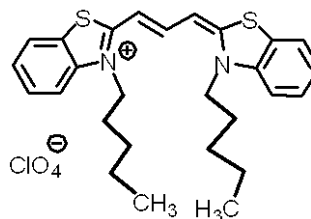
【化13】



(1)

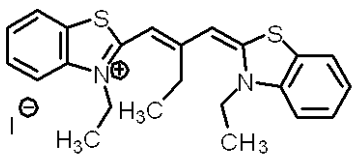


(2)

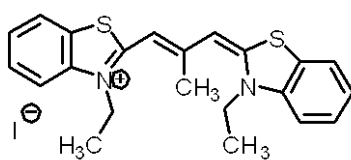


(3)

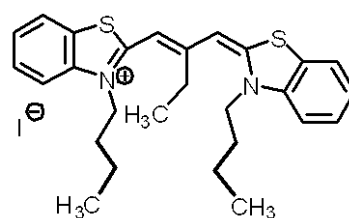
10



(4)

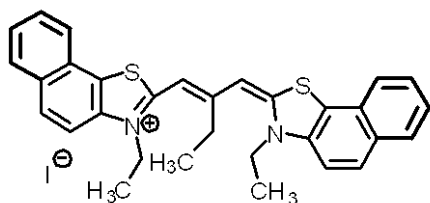


(5)

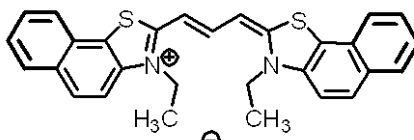


(6)

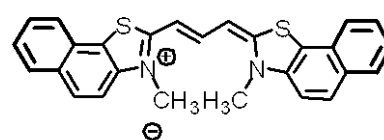
20



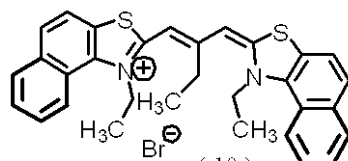
(7)



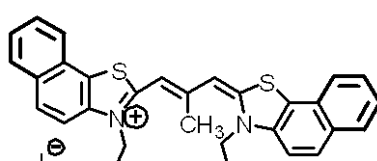
(8)



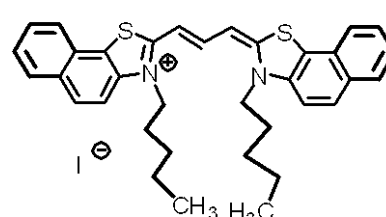
(9)



(10)



(11)

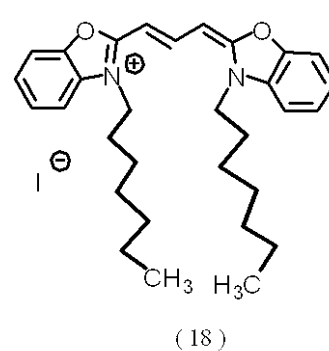
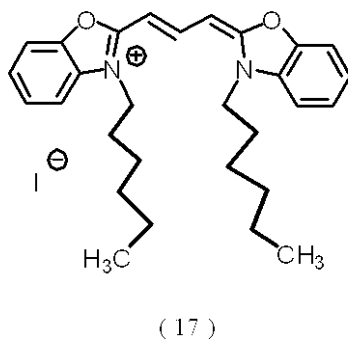
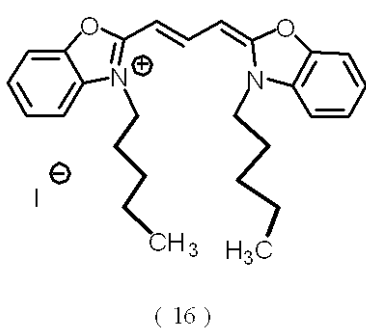
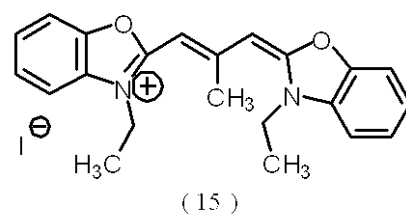
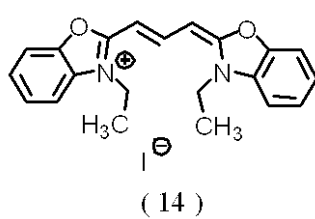
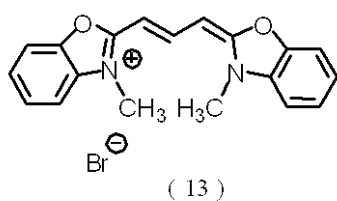


(12)

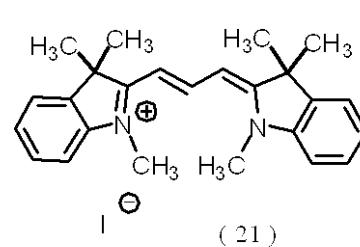
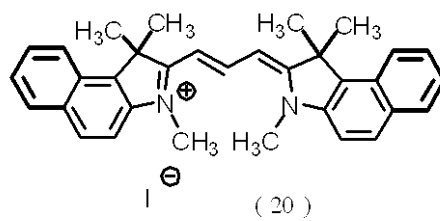
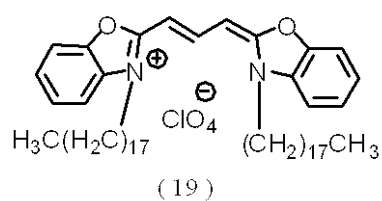
30

【0132】

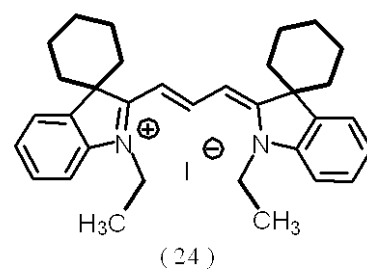
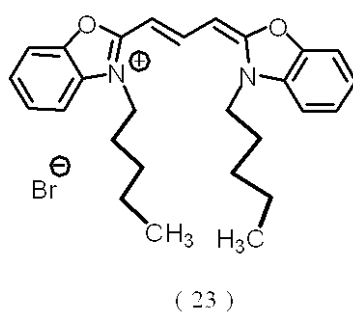
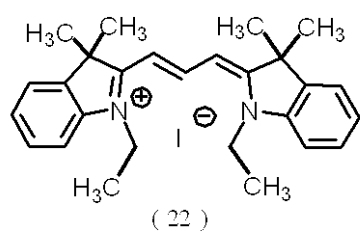
【化 1 4】



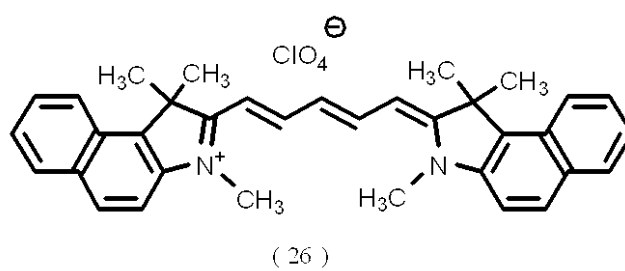
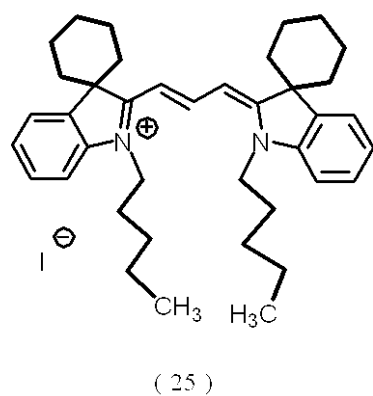
10



20



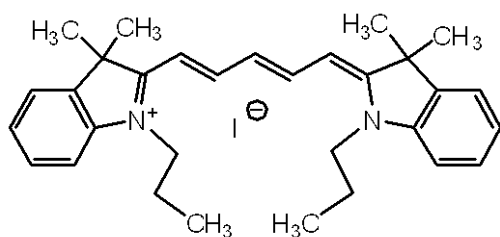
30



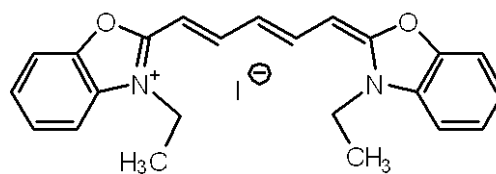
40

【 0 1 3 3 】

【化 1 5】

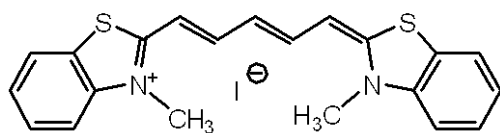


(27)

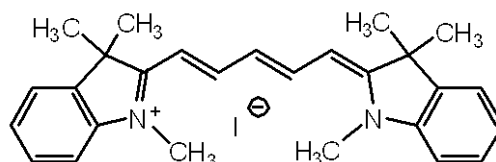


(28)

10

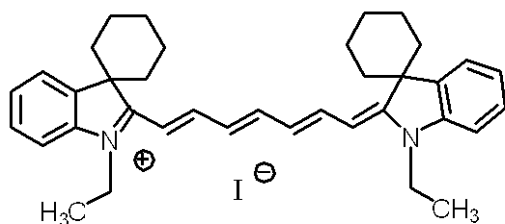


(29)

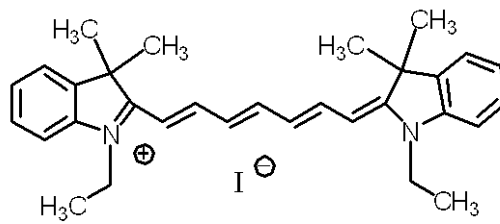


(30)

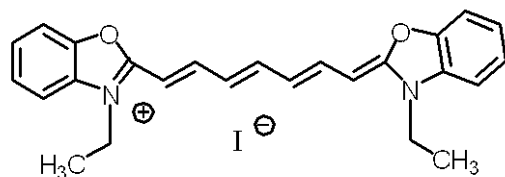
20



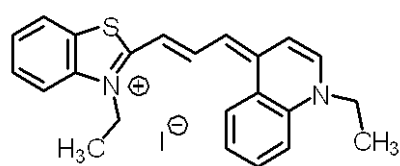
(31)



(32)

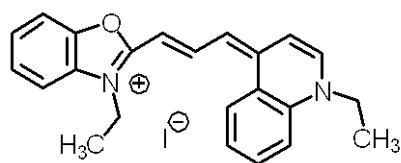


(33)

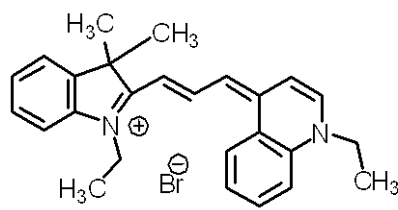


(34)

30



(35)

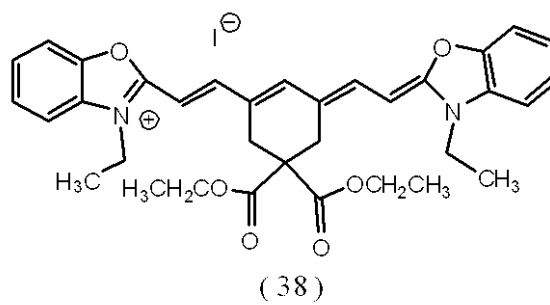
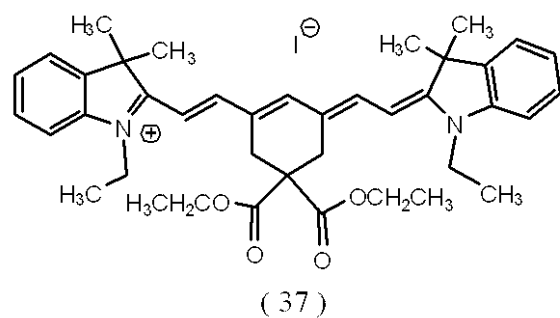


(36)

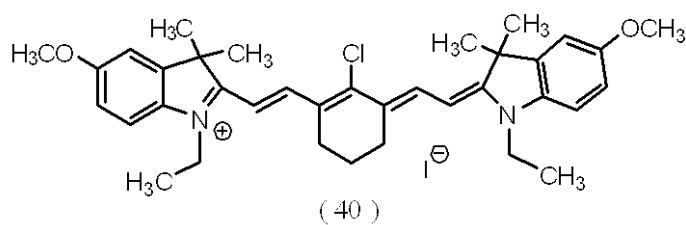
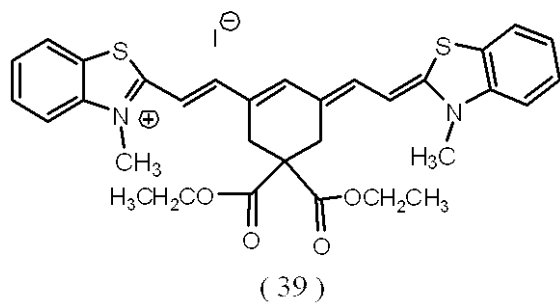
40

【 0 1 3 4 】

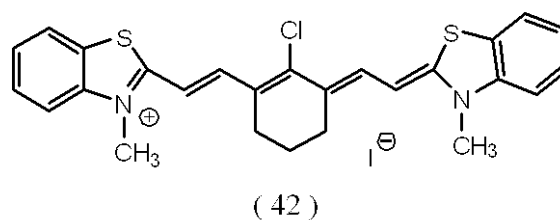
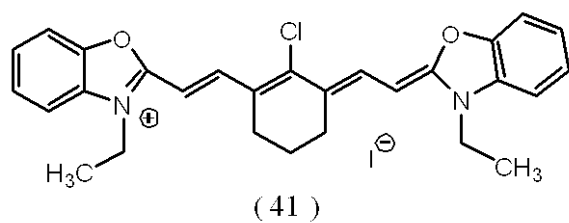
【化 16】



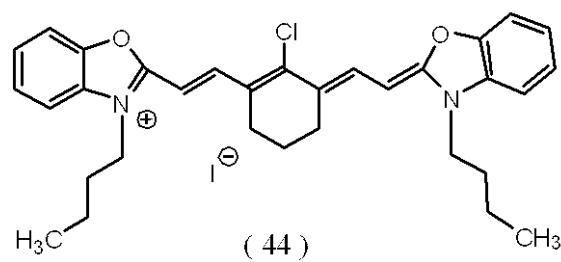
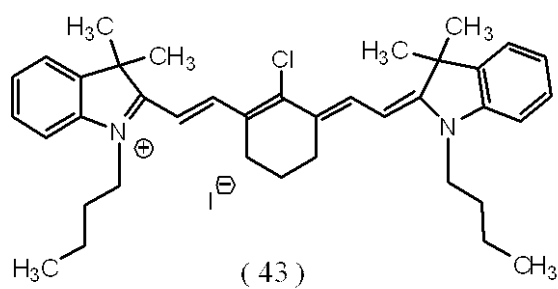
10



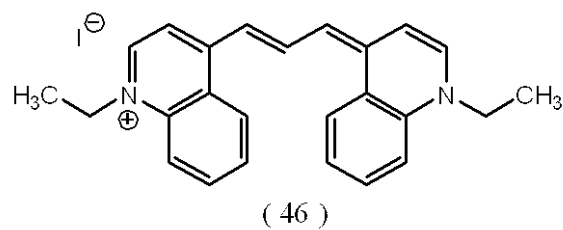
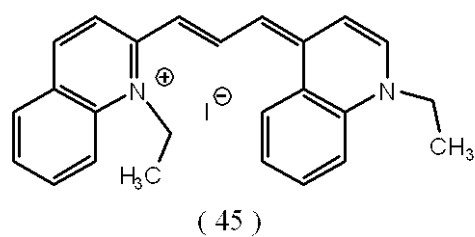
20



30

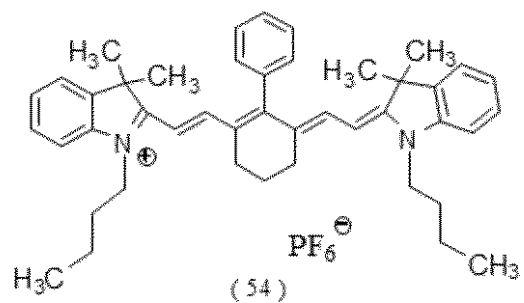
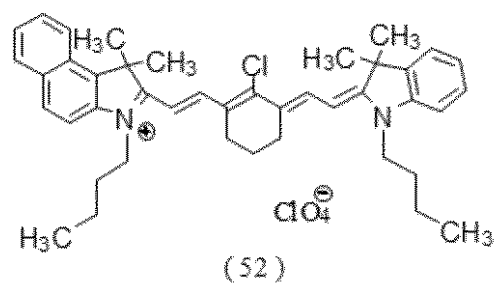
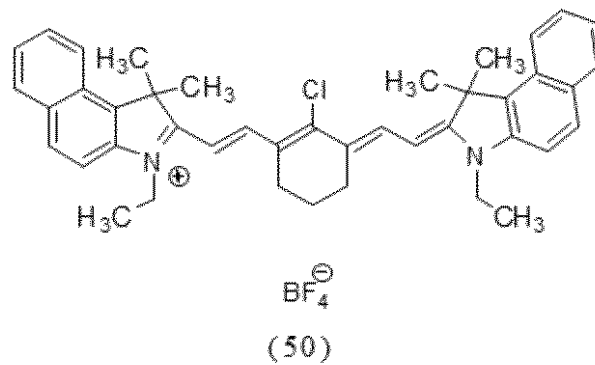
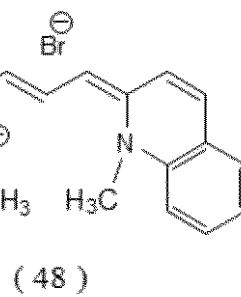


40



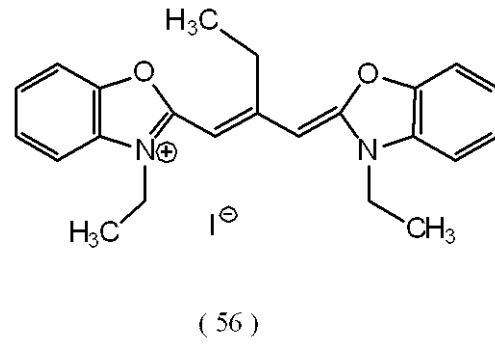
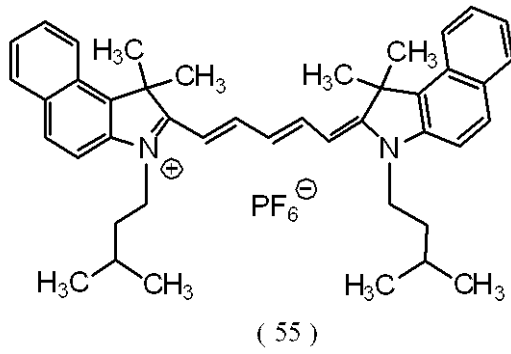
【 0 1 3 5 】

10

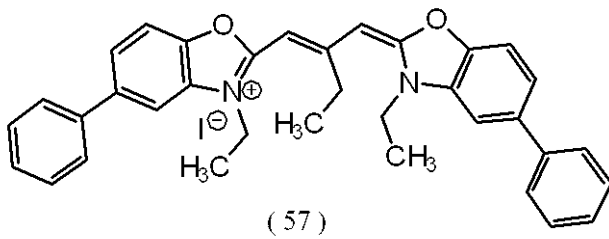


40

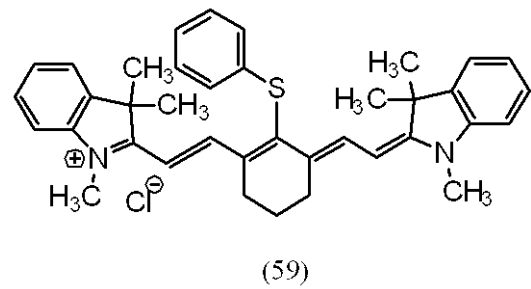
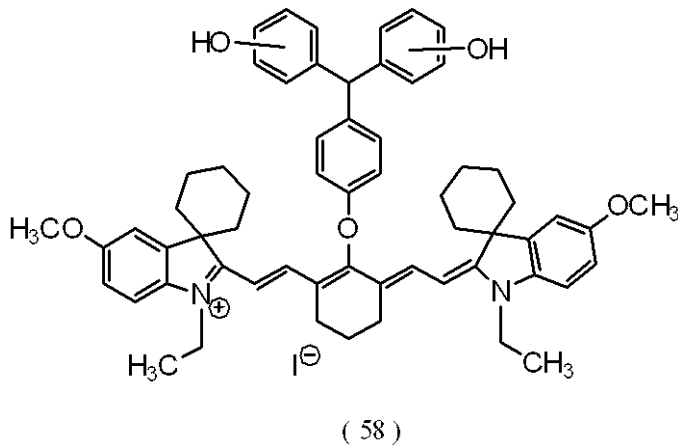
【化 1 8】



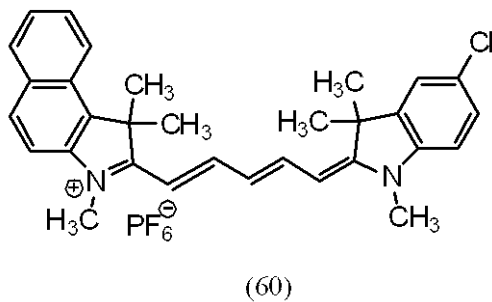
10



20



30



40

【 0 1 3 7 】

本発明の化合物は、好ましくは、波長 350 ~ 800 nm の励起光の照射により発光する。

【 0 1 3 8 】

本発明の化合物は、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、殺細胞することを特徴とする。また、本発明の化合物

50

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。

【0139】

本発明の化合物は、単独、または、2種以上を組み合わせ、がんの阻害に用いることもできる。また、公知の抗がん薬と併用して用いても良い。

【0140】

本発明において、がん細胞の中でも、特にがん幹細胞に選択的に効果を示す。

【0141】

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。

10

【0142】

適応可能ながん

本発明の化合物により阻害されるがんは、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、骨髄腫、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、がん幹細胞が含有され、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

【0143】

被験体

本発明の化合物の、がんを抑制効果を確認する試験に用いる被験体としては、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、ヒト等が挙げられる。好ましくは、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ等である。

30

【0144】

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事ができる。

【0145】

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出来る。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。

40

【0146】

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、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。

【0147】

本発明の化合物の投与量は、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、疾患等などの条件によって適宜決定される。

【0148】

50

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ことは、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。

【0149】

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。

10

【0150】

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。

【0151】

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。

20

【0152】

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。

【0153】

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。

30

【0154】

がん幹細胞検出プローブ

本発明の化合物は、選択的ながん幹細胞の検出に用いること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。

【0155】

本発明の化合物は、がん細胞の中でも、特に、がん幹細胞に取り込まれる割合が大きいので、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。

40

【0156】

本発明の化合物を用いた検出方法は、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

50

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。

【0157】

本発明の化合物を励起するための光の波長は、前記一般式（1）で表される化合物によって異なり、本発明のがん細胞検出用プローブが効率よく蛍光を発すればよく、特に限定されるものではない。

【0158】

励起光の波長は、好ましくは200～1010nm、さらに好ましくは400～900nm、より好ましくは、480～800nmである。また、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、さらには、生体透過性に優れている680～900nmの波長が好ましく用いられる。

10

【0159】

本発明の化合物を励起するために用いられる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りすることができる。

20

【0160】

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。

【0161】

[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。

30

【実施例1】

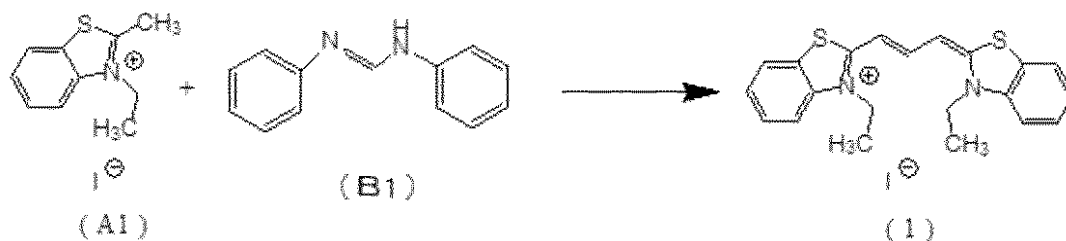
【0162】

本発明の化合物の製造例を示す。

【0163】

化合物（1）の製造

【化19】



40

窒素雰囲気下、化合物（A1）0.61g（2.0mmol）の無水酢酸10mLの溶液に化合物（B1）0.20g（1.0mmol）、無水酢酸ナトリウム0.16g（2.0mmol）を添加して、100℃で1時間撹拌した。反応終了後、冷却させながら、

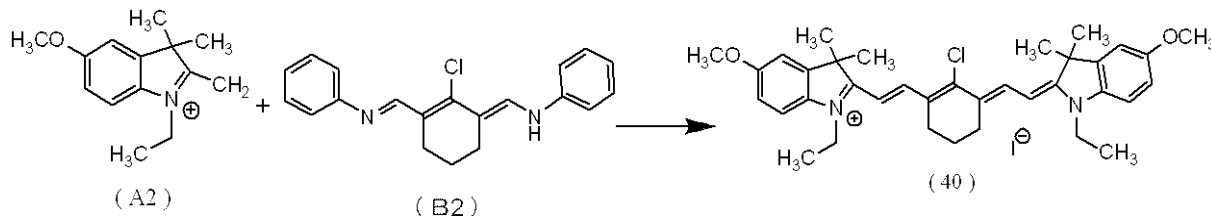
50

ゆっくり飽和食塩水 100 mL を滴下して室温まで冷却した。さらに、ジクロロメタン 50 mL で 2 回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、有機層を減圧下で濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、精製物をジエチルエーテルから再結晶して、化合物 (1) 0.29 g (収率 59%) 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。

【0164】

化合物 (40) の製造

【化20】



10

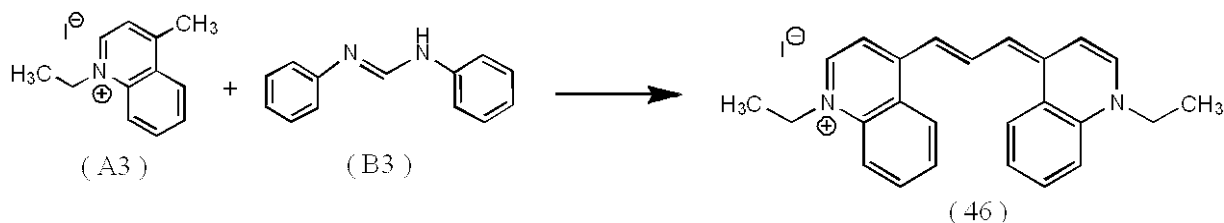
窒素雰囲気下、化合物 (A2) 0.48 g (2.2 mmol) の無水酢酸 10 mL の溶液に化合物 (B2) 0.32 g (1.0 mmol)、無水酢酸ナトリウム 0.25 g (3.0 mmol) を添加して、100 で 1 時間撹拌した。反応終了後、冷却しながら、ゆっくり飽和食塩水 100 mL を滴下して室温まで冷却した。さらに、ジクロロメタン 50 mL で 2 回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、有機層を減圧下で濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジエチルエーテルから再結晶して、化合物 (40) 0.38 g (収率 54%) を得た。目的物であることは、 ^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

【0165】

化合物 (46) の製造

【化21】



30

窒素雰囲気下、化合物 (A3) 0.90 g (3.0 mmol) の無水酢酸 15 mL の溶液に化合物 (B3) 0.29 g (1.5 mmol)、無水酢酸ナトリウム 0.29 g (3.5 mmol) を添加して、100 で 1.5 時間撹拌した。反応終了後、冷却させながら、ゆっくり飽和食塩水 100 mL を滴下して室温まで冷却した。さらに、ジクロロメタン 50 mL で 2 回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、有機層を減圧下で濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジエチルエーテルから再結晶して、化合物 (46) 0.46 g (収率 64%) 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。

40

【0166】

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製造し、表 1 に示す 32 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】

【0167】

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、日立ハイテック社製 FL 4

50

5 0 0 蛍光分光測定機で励起波長及び蛍光波長を測定した。

【 0 1 6 8 】

【 表 1 】

表 1

化合物	励起波長 λ_{ex}	蛍光波長 λ_{em}
化合物1	485	575
化合物4	563	569
化合物5	560	628
化合物7	344	381
化合物10	586	615
化合物11	354	469
化合物14	491	510
化合物16	474	509
化合物17	492	511
化合物18	492	510
化合物20	516	602
化合物21	473	564
化合物22	553	570
化合物24	496	569
化合物26	684	710
化合物27	650	675
化合物28	589	614
化合物30	643	662
化合物34	638	661
化合物35	571	620
化合物37	650	770
化合物40	819	825
化合物43	797	816
化合物45	665	681
化合物46	679	715
化合物47	615	637
化合物49	830	831
化合物50	831	833
化合物54	774	800
化合物55	688	715
化合物59	804	520
化合物60	670	696

10

20

30

40

【 実施例 3 】

【 0 1 6 9 】

膵臓がん細胞に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）作用の確認

【 0 1 7 0 】

実験例 1

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 Viab

50

ility 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)を添加した培地で培養された細胞数を100として用いた。

【0171】

実験例2～23

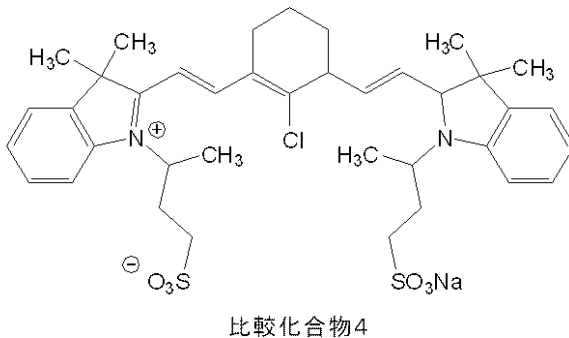
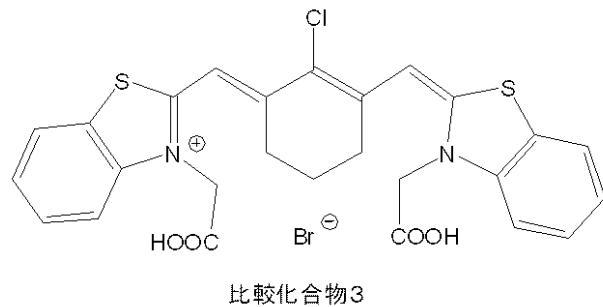
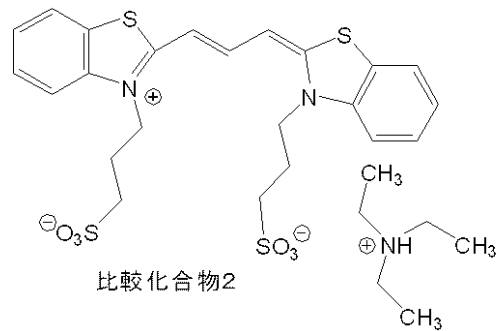
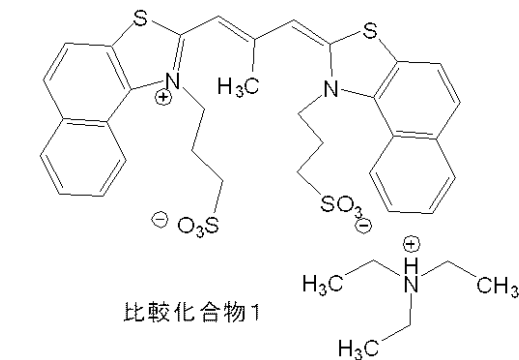
実験例1において化合物(1)を表2で表わされる他の化合物に変更した以外は、実験例1と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

【0172】

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。

【化22】



【0173】

実験例1～23、比較例1～4の生存細胞数の解析し増殖率を求めた結果を表2に示す。

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、培養後の生存細胞数が、培養開始時の細胞数値に占める割合をパーセンテージで示したものである。

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)

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)

【0174】

10

20

30

40

【表 2】

表2

	化合物	がん細胞増殖率(%)	評価
実験例1	化合物1	31.9	B
実験例2	化合物4	3.1	A
実験例3	化合物5	6.4	A
実験例4	化合物7	13.0	A
実験例5	化合物10	13.5	A
実験例6	化合物11	5.0	A
実験例7	化合物16	2.0	A
実験例8	化合物20	1.2	A
実験例9	化合物21	38.2	B
実験例10	化合物24	6.5	A
実験例11	化合物26	8.6	A
実験例12	化合物27	6.0	A
実験例13	化合物30	18.8	A
実験例14	化合物31	30.5	B
実験例15	化合物34	26.6	B
実験例16	化合物35	29.7	B
実験例17	化合物37	4.8	A
実験例18	化合物40	14.1	A
実験例19	化合物43	35.6	B
実験例20	化合物45	28.5	B
実験例21	化合物46	16.7	A
実験例22	化合物47	8.6	A
実験例23	化合物49	12.0	A
比較例1	比較化合物1	87.0	C
比較例2	比較化合物2	86.0	C
比較例3	比較化合物3	93.0	C
比較例4	比較化合物4	75.0	C

10

20

30

【0175】

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（KLM-1）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い。

【実施例4】

40

【0176】

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

【0177】

実験例24

前立腺がん細胞、PC-3をRPMI1640培地に10%FBSを加えた培地で37、5%CO₂環境下、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10μg/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

50

、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１００とした。

【０１７８】

実験例２５～３６

実験例２４において化合物（１）の代わりに、表２で表わされるその他の化合物に変更した以外は、実験例２４と同様な操作を行い、生存細胞数を解析した。

【０１７９】

比較例５～８

実験例２４において、化合物（１）の代わりに、比較化合物１～４に変更した以外は、実験例２４と同様な操作を行い、生存細胞数を解析し、増殖率を求めた。

10

【０１８０】

本実施例の増殖率とは、培養後の生存細胞数が、培養開始時の細胞数値に占める割合をパーセンテージで示したものである。結果を表３に示す。評価基準は上記実験と同様である。がん細胞増殖率が１００％の数値を超えているものは、増殖していることを表す。

【０１８１】

前立腺がん細胞（ＰＣ－３）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。

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）

20

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）

【０１８２】

【表３】

表３

	化合物	がん細胞増殖率 (%)	評価
実験例24	化合物1	13.8	A
実験例25	化合物4	19.5	A
実験例26	化合物5	15.0	A
実験例27	化合物7	15.3	A
実験例28	化合物11	4.3	A
実験例29	化合物16	8.4	A
実験例30	化合物20	13.1	A
実験例31	化合物24	10.0	A
実験例32	化合物27	7.7	A
実験例33	化合物43	12.3	A
実験例34	化合物46	17.7	A
実験例35	化合物47	13.8	A
実験例36	化合物49	5.3	A
比較例5	比較化合物1	105	C
比較例6	比較化合物2	68.0	C
比較例7	比較化合物3	101	C
比較例8	比較化合物4	88.3	C

30

40

【０１８３】

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（ＰＣ－３）に対するがん細胞の阻害（増殖抑制）効果が高い。

50

【実施例 5】

【0184】

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確認

【0185】

実験例 37

ヒト慢性骨髄性白血病細胞、K562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。更に、がん幹細胞マーカーとしての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（16）を最終濃度0.05 µg/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。

10

【0186】

実験例 38～70

実験例 37において、化合物（16）の代わりに、表3に示すその他の化合物及び最終濃度量に変更した以外は、実験例 37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。

20

【0187】

比較例 9～16

実験例 37において、化合物（16）の代わりに、表3に示す一般的な抗がん剤であるImatinib（NOVARTIS社製）、比較化合物及び最終濃度量に変更した以外は、実験例 37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。

【0188】

実験例 37～70、比較例 9～16の結果を表4にまとめる。なお、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、培養後の生存細胞数を、培養開始時の細胞数で除した値である。

30

A：ALDH（+）の増殖率が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（+）の増殖率が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（+）の増殖率が0.95以上（がん幹細胞に増殖抑制効果がない）

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評価を以下の基準に基づいて評価した。

A：ALDH（+）の増殖率 / ALDH（-）の増殖率の値が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）

40

B：ALDH（+）の増殖率 / ALDH（-）の増殖率の値が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（+）の増殖率 / ALDH（-）の増殖率の値が0.95以上（がん幹細胞に選択的阻害効果がない）

【0189】

【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37	35	0.05 $\mu\text{g/mL}$	0.67	B	0.87	0.77	A
実験例38	35	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.43	A	0.66	0.66	A
実験例39	35	1 $\mu\text{g/mL}$	0.44	A	0.49	0.90	B
実験例40	16	0.05 $\mu\text{g/mL}$	0.68	B	0.78	0.87	B
実験例41	16	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.36	A	0.52	0.70	A
実験例42	16	1 $\mu\text{g/mL}$	0.16	A	0.34	0.47	A
実験例43	24	0.05 $\mu\text{g/mL}$	0.61	B	0.75	0.81	B
実験例44	24	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.39	A	0.63	0.61	A
実験例45	24	1 $\mu\text{g/mL}$	0.19	A	0.39	0.48	A
実験例46	27	10 $\mu\text{g/ml}$	0.07	A	0.13	0.56	A
実験例47	32	10 $\mu\text{g/ml}$	0.09	A	0.29	0.32	A
実験例48	21	10 $\mu\text{g/ml}$	0.27	A	0.41	0.66	A
実験例49	1	10 $\mu\text{g/ml}$	0.45	A	0.52	0.87	B
実験例50	34	10 $\mu\text{g/ml}$	0.48	A	0.67	0.72	A
実験例51	35	10 $\mu\text{g/ml}$	0.55	B	0.80	0.69	A
実験例52	5	10 $\mu\text{g/ml}$	0.71	B	0.90	0.79	A
実験例53	33	10 $\mu\text{g/ml}$	0.83	B	1.00	0.84	B
実験例54	56	10 $\mu\text{g/ml}$	0.42	A	0.65	0.65	A
実験例55	57	10 $\mu\text{g/ml}$	0.55	B	0.68	0.81	B
実験例56	58	10 $\mu\text{g/ml}$	0.70	B	0.85	0.82	B
実験例57	14	10 $\mu\text{g/ml}$	0.38	A	0.49	0.77	A
実験例58	17	10 $\mu\text{g/ml}$	0.04	A	0.13	0.30	A
実験例59	17	1 $\mu\text{g/mL}$	0.69	B	0.79	0.87	B
実験例60	18	10 $\mu\text{g/ml}$	0.04	A	0.13	0.29	A
実験例61	22	10 $\mu\text{g/ml}$	0.22	A	0.29	0.75	A
実験例62	28	10 $\mu\text{g/ml}$	0.30	A	0.43	0.69	A
実験例63	28	1 $\mu\text{g/mL}$	0.65	B	0.77	0.83	B
実験例64	54	10 $\mu\text{g/ml}$	0.07	A	0.13	0.50	A
実験例65	55	10 $\mu\text{g/ml}$	0.04	A	0.11	0.33	A
実験例66	59	10 $\mu\text{g/ml}$	0.02	A	0.10	0.22	A
実験例67	59	1 $\mu\text{g/mL}$	0.14	A	0.21	0.67	A
実験例68	60	10 $\mu\text{g/ml}$	0.04	A	0.12	0.34	A
実験例69	50	10 $\mu\text{g/ml}$	0.05	A	0.12	0.42	A
実験例70	51	10 $\mu\text{g/ml}$	0.03	A	0.11	0.27	A
比較例9	Imatinib	0.12 $\mu\text{g/ml}$	0.74	B	0.51	1.47	C
比較例10	Imatinib	0.24 $\mu\text{g/ml}$	0.59	B	0.40	1.48	C
比較例11	Imatinib	0.35 $\mu\text{g/ml}$	0.48	A	0.32	1.51	C
比較例12	Imatinib	0.47 $\mu\text{g/ml}$	0.36	A	0.22	1.63	C
比較例13	Imatinib	0.59 $\mu\text{g/ml}$	0.31	A	0.11	2.80	C
比較例14	比較化合物1	1 $\mu\text{g/mL}$	1.00	C	0.94	1.06	C
比較例15	比較化合物2	1 $\mu\text{g/mL}$	0.99	C	1.21	0.82	C
比較例16	比較化合物3	1 $\mu\text{g/mL}$	1.09	C	1.38	0.79	C

【0190】

なお、比較例14～16の場合、ALDH(+)は、ほぼ1に近いので、抑制効果が全くないことを示している。一方、ALDH(-)で1以上の数値は、がん細胞が増加していることを示している。

【0191】

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

10

20

30

40

50

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 6】

【0192】

慢性骨髄性白血病細胞に対するがん幹細胞選択的染色の確認

【0193】

実験例 71～73

各実験例 39、42、45 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 (カールツァイス社製) を用いて、蛍光画像を撮影した。それぞれの化合物で、*ALDH* (+) の細胞が染色された割合と、*ALDH* (-) の細胞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。

【0194】

【表 5】

表5

	化合物	ALDH(+)	ALDH(-)	がん幹細胞選択的染色
実施例71	35	82.5	21.4	ALDH(+) が選択的に染まる
実施例72	16	99.5	18.6	ALDH(+) が選択的に染まる
実施例73	24	81.2	28.6	ALDH(+) が選択的に染まる

【0195】

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 (*ALDH* (-)) よりもがん幹細胞 (*ALDH* (+)) を選択的に染色することがわかる。

【実施例 7】

【0196】

がん幹細胞移植動物における阻害作用の確認

【0197】

実験例 74

ヒト慢性骨髄性白血病細胞に蛍光タンパク質 *Kusabira-Orange* を恒常発現させた細胞株 *K562-KOr* から、がん幹細胞マーカーとしての *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 (*ALDH* (+)) を抽出した。*ALDH* (+) と通常のがん細胞 *ALDH* (-) をそれぞれ、ゼブラフィッシュ稚魚 (*Mie Komachi* 系統、受精後 2 日齢) に移植し、32 環境で飼育した。また、移植 24 時間後、化合物 (16) を最終濃度 $0.5 \mu\text{M}$ になるよう飼育水に添加し、2 日間、32 環境で飼育した。

ゼブラフィッシュ稚魚に移植された細胞を、*MZ16F* 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 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 (16) を培地に添加する代わりに、0.1% の *DMSO* 溶液を投与したものの蛍光強度を用いた。

【0198】

比較例 17

実験例 74 において、化合物 (16) の代わりに、*Imatinib* に変更した以外は、実験例 74 と同様の操作で蛍光画像を撮影し、蛍光強度を数値化した。

【0199】

実験例 74 及び比較例 17 のゼブラフィッシュ稚魚に移植された *ALDH* (+) / *ALDH* (-) 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 (*DMSO*) 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 0 0 】

【 表 6 】

表6

	化合物	ALDH(+)	ALDH(-)	増殖抑制率
実施例74	16	95.0	82.0	ALDH(+)が高い
比較例17	Imatinib	60.0	80.0	ALDH(-)が高い

【 0 2 0 1 】

表 6 より明らかなように、化合物または I m a t i n i b のいずれも投与しなかった群と比較して腫瘍サイズ（蛍光領域）が小さいことが認められた。特に本発明の化合物を投与した群では、がん幹細胞（A L D H（+））を移植したモデル動物においてより優位に腫瘍サイズを小さく抑える効果が認められた。

10

【 実施例 8 】

【 0 2 0 2 】

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 0 3 】

実験例 7 5

K L M 1 細胞に蛍光タンパク質 K u s a b i r a - O r a n g e を恒常発現させた細胞株 K 5 6 2 - K O r から A L D E F L U O R 試薬（ベリタス社製）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、8 0 % 以上のがん幹細胞を含む分画（A L D H（+））を抽出した。得られた K L M 1 - K O r 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、3 2 環境で飼育した。また、移植 2 4 時間後、化合物（2 6）（7 4 5 μ m o l / K g B W）を卵黄嚢内に投与した。

20

7 2 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。

基準として、上記操作法にて化合物（2 6）を用いる代わりに、0 . 1 % の D M S O 溶液を添加した培地で培養された細胞の蛍光強度を用いた。

30

【 0 2 0 4 】

[比較例 1 8、1 9]

実験例 7 5 において、化合物（2 6）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 6 と同様の操作で蛍光画像を撮影した。

実験例 7 5 及び比較例 1 8、1 9 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（DMSO）を添加したときの蛍光強度を F 0 として、 $100 \times (1 - F1 / F0)$ のように求めた。

【 0 2 0 5 】

がん幹細胞の転移巣（移植腫瘍から 300-450 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

40

A：阻害率の値が 7 0 以上

（がん幹細胞の転移巣（移植腫瘍から 300-450 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 300-450 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 300-450 μ m 領域）に増殖抑制効果が低い）

【 0 2 0 6 】

50

【表 7】

表7

	化合物	阻害率	評価
実施例75	26	80	A
比較例18	Imatinib	60	B
比較例19	Dasatinib	36	C

【 0 2 0 7 】

表 7 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】

【 0 2 0 8 】

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

- (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30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30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30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30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1577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1577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1577番地 国立大学法人三重大学内
- Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QR41 QR56 QR90 QS32 QX02
4C086 AA01 AA02 BC28 BC84 MA01 MA04 NA14