

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/100720

発行日 平成24年9月6日(2012.9.6)

(43) 国際公開日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C07D 211/20	(2006.01)	C O 7 D 211/20	C S P	4 B O 6 3
C12Q 1/46	(2006.01)	C 1 2 Q 1/46		4 C O 5 4

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

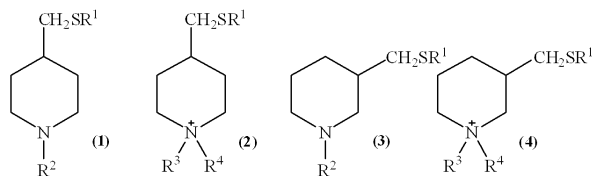
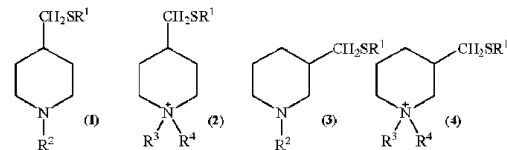
出願番号	特願2010-514739 (P2010-514739)	(71) 出願人	301032942
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/053928		独立行政法人放射線医学総合研究所
(22) 国際出願日	平成21年3月3日(2009.3.3)		千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(81) 指定国	AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫
		(74) 代理人	100123777
			弁理士 市川 さつき

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コリンエステラーゼ活性測定用試薬

(57) 【要約】

アセチルコリンエステラーゼあるいはブチリルコリンエステラーゼに特異性を示し、Ellman法によるコリンエステラーゼ活性測定用試薬として有用な、一般式(1)~(4)で表されるN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を見いだした。

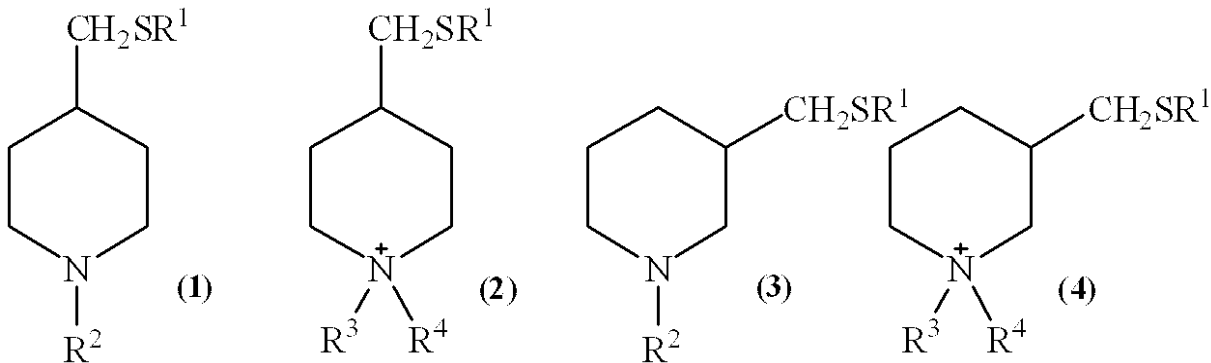


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式(1)～(4)のいずれかで表されるN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

【化 1】



10

式中、 R^1 は $\text{COR}^{1'}$ で表されるアシル基($\text{R}^{1'}$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示す)を示し、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素又は炭素原子数1又は2のアルキル基を示す。

【請求項 2】

R^1 がアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基又はバレリル基である、請求項1記載のN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

20

【請求項 3】

R^2 、 R^3 及び R^4 がメチル基である、請求項1または2に記載のN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

【請求項 4】

R^1 がアセチル基であり、かつ R^2 、 R^3 及び R^4 がメチル基である、請求項3記載のN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか1項に記載のN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を含む、コリンエステラーゼ活性測定用試薬。

30

【請求項 6】

請求項4に記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を含む、アセチルコリンエステラーゼ活性測定用試薬。

【請求項 7】

請求項1～4のいずれか1項に記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩の、コリンエステラーゼ活性を測定するための試薬としての使用。

【請求項 8】

請求項4に記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩の、アセチルコリンエステラーゼ活性を測定するための試薬としての使用。

【請求項 9】

請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物(1)または(3)の製造方法であって、1-アルキル-4-ピペリジンメタノールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタノールから、1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを得る工程(a)、

40

前記1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(3)を製造する工程(b)、を含む方法。

【請求項 10】

50

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物 (2) または (4) の製造方法であって、
1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタノールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタノールから、1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを得る工程 (a)、

前記 1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1 - アルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (1) または 1 - アルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) を製造する工程 (b)、

前記 1 - アルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (1) または 1 - アルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) をアルキル化剤存在下、溶媒中で加熱することにより、1, 1 - ジアルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (2) または 1, 1 - ジアルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (4) を得る工程 (c)、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なピペリジンメタンチオールエステル誘導体及びその塩並びにその製造法に関し、更に前記化合物のコリンエステラーゼ活性測定用試薬としての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

コリンエステラーゼは、コリンエステルをコリンとカルボン酸に分解する酵素であり、アセチルコリンエステラーゼとブチリルコリンエステラーゼの 2 種類が知られている。

アセチルコリンエステラーゼは、アセチルコリンを分解する酵素である。アセチルコリンエステラーゼ活性の測定は、農薬、殺虫剤及び化学兵器などの暴露スクリーニングや、当該酵素活性が低下するアルツハイマー病治療薬開発や神経系障害の評価に広く用いられており、近年、その重要性が増している。

ブチリルコリンエステラーゼは、アセチルコリンを含む他のコリンエステル類を分解する酵素である。ブチリルコリンエステラーゼの生合成は肝臓で行われて血中に放出されるため、血中の当該酵素を測定すれば、肝機能、抗コリンエステラーゼ剤使用時の体調、有機リン中毒、ネフローゼ症候群、又は甲状腺機能亢進症等の診断・治療上に対して有益な指標を得ることができるので、ブチリルコリンエステラーゼ活性の測定は、臨床診断分野において重要な測定項目となっている。

【0003】

コリンエステラーゼ活性の測定には、チオコリン誘導体を用いて、加水分解代謝物の生成量を 5, 5' - ジチオ - ビス (2 - ニトロ安息香酸) との反応を通して遊離する 2 - ニトロ - 5 - メルカプト安息香酸の黄色を吸光度により測定する Ellman 法 (非特許文献 1) が広く用いられている。

その他に放射能標識のコリンエステル誘導体を用いて、放射性加水分解代謝物の生成量を液体シンチレーションにより測定する方法や、非放射能標識のコリンエステルの加水分解で生じるカルボン酸の量を、pH 指示薬であるフェノールフタレインやイオンクロマトグラフィーなどで測定する方法がある (例えば、特許文献 1 参照) 。

【0004】

しかしながら、これらのアセチルコリンエステラーゼ活性測定に用いる従来公知の基質は、どれも特異性が悪いため、ブチリルコリンエステラーゼを阻害する試薬の添加が不可欠であり、測定が煩雑で不安定である。

【0005】

この特異性の問題を克服するために、炭素 14 やフッ素 18 で標識した 1 - メチル - 4 - ピペリジノールアセチルエステル等を用いた測定法があるが (例えば、特許文献 2、非特許文献 2 ~ 5 参照)、ラジオアイソトープを用いることは、測定操作や試料の取扱いを煩

10

20

30

40

50

雑にする上、不測の危険を防止するため設備コストのかかる放射線取扱い許可施設内では実施ができない等、利便性、安全性及び経済性の面で問題があった。

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】特開平 1 0 - 2 5 3 6 1 1 号

【特許文献 2】特開 2 0 0 5 - 2 2 9 9 6 号

【非特許文献 1】Biochemical Pharmacology 7、88-95(1961)

【非特許文献 2】Nucl. Med. Biol. Vol. 21, NO.6, pp.801-808 (1994)

【非特許文献 3】J. Labelled Cpd. Radiopharm, 44, 31-41 (2001)

【非特許文献 4】Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, 1927-1930 (2004)

【非特許文献 5】J. Nucl. Med. 37: 649-655 (1996)

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、アセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼを含むコリンエステラーゼ類、特にアセチルコリンエステラーゼ活性の特異的な測定を可能とする、試薬として有用な新規化合物及びその製造方法を提供することである。

本発明の他の目的は、ラジオアイソトープを用いることなく、利便性、安全性及び経済性の面において優れたアセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼを含むコリンエステラーゼ類の活性測定用試薬及びそれを用いるコリンエステラーゼ類の活性を測定する方法を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは上記目的を達成するために、放射性物質を用いることなくコリンエステラーゼ活性を測定するための基質について研究を行った。その結果、従来製造できなかった、1級チオエステルである下記一般式(1)~(4)で表されるN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を製造することができ、前記化合物が、アセチルコリンエステラーゼあるいはブチリルコリンエステラーゼに特異性を示す基質であること、すなわち、いずれかの酵素に特異的に加水分解されることを見いだした。

また、特に下記一般式(1)~(4)の化合物において、R¹がアセチル基であり、かつR²~R⁴がメチル基である化合物はアセチルコリンエステラーゼに加水分解される一方でブチリルコリンエステラーゼにはほとんど加水分解されない性質(すなわち、アセチルコリンエステラーゼに対して特異性を示すこと)を示すことを見いだした。

30

また、更に下記一般式(1)~(4)の化合物は、水溶液中で安定性が高いため、Ellman法における基質として用いることができる化合物であることを見いだした。

本発明の化合物は上述のとおり、水溶液中で安定である一方、アセチルコリンエステラーゼあるいはブチリルコリンエステラーゼにより特異的に加水分解され、更に1級チオエステルを分子内にもつため、吸光度分析によりコリンエステラーゼ活性を測定できるEllman法における試薬として特に有用である。

本発明のチオエステル構造を有するピペリジン化合物は、従来、有効な製造方法が報告されておらず、本発明者らにより初めて見いだされた化合物である。

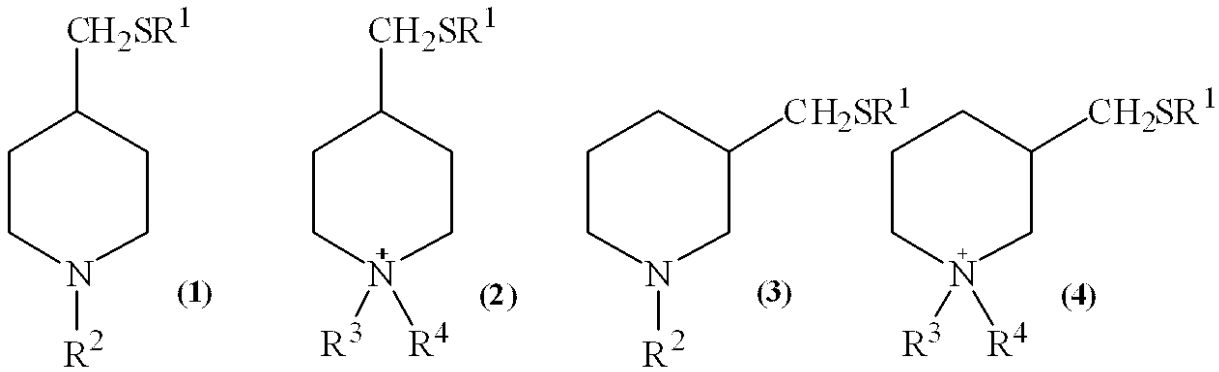
40

【 0 0 0 9 】

本発明は以下を提供する。

1. 下記一般式(1)~(4)のいずれかで表されるN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

【化 1】



10

式中、 R^1 は $COR^{1'}$ で表されるアシル基 ($R^{1'}$ は炭素原子数 1 ~ 4 のアルキル基を示す) を示し、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素又は炭素原子数 1 又は 2 のアルキル基を示す。

2 . R^1 がアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基又はバレリル基である、上記 2 記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

3 . R^2 、 R^3 及び R^4 がメチル基である上記 1 または 2 記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

4 . R^1 がアセチル基であり、かつ R^2 、 R^3 及び R^4 がメチル基である上記 3 記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩。

20

5 . 上記 1 ~ 4 のいずれか 1 記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を含む、アセチルコリンエステラーゼまたはブチリルコリンエステラーゼ活性測定用試薬。

6 . 上記 4 に記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩を含む、アセチルコリンエステラーゼ活性測定用試薬。

7 . 上記 1 ~ 4 のいずれか 1 記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩の、アセチルコリンエステラーゼまたはブチリルコリンエステラーゼ活性を測定するための試薬としての使用。

8 . 上記 4 に記載のピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩の、アセチルコリンエステラーゼ活性を測定するための試薬としての使用。

30

9 . 上記 1 ~ 4 のいずれか 1 記載の化合物 (1) または (3) の製造方法であって、

1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタノールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタノールから、1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを得る工程 (a)、

前記 1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1 - アルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (1) または 1 - アルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) を製造する工程 (b)、

を含む方法。

40

10 . 上記 1 ~ 4 のいずれか 1 記載の化合物 (2) または (4) の製造方法であって、

1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタノールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタノールから、1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを得る工程 (a)、

前記 1 - アルキル - 4 - ピペリジンメタンチオールまたは 1 - アルキル - 3 - ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1 - アルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (1) または 1 - アルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) を製造する工程 (b)、

前記 1 - アルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (1) または 1 - アルキルピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) をアルキル化剤存在下、溶媒中で

50

加熱することにより、1,1-ジアルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(2)または1,1-ジアルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(4)を得る工程(c)、を含む方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明の化合物、特に下記式(1)~(4)の R^1 がアセチル基である化合物は、アセチルコリンエステラーゼ特異性が高い。また、 R^1 のアシル基の炭素数を増やすことでブチリルコリンエステラーゼ特異性をも付与することができ、両酵素活性を特異的に測定するための試薬としても有用である。

本発明の化合物は、加水分解されるとチオール基を生じるため、Ellman法(Biochemical Pharmacology 7, 88-95(1961))によりコリンエステラーゼ類の活性測定に特に有利に使用することができる。従って、測定操作や試料の取扱いが煩雑な上、不測の危険を防止するため設備コストのかかる放射線取扱い許可施設内では実施ができなかった放射性物質を使用する必要が無く、利便性、安全性及び経済性の面で優れる。

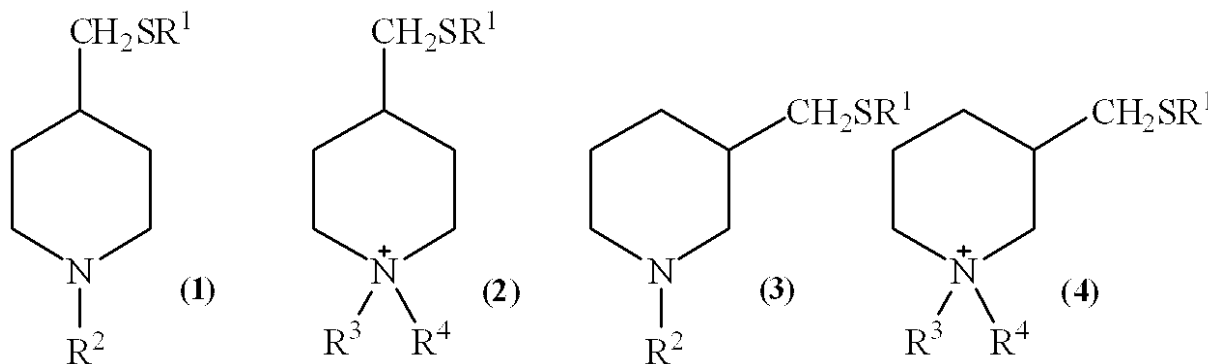
【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

<化合物>

本発明の化合物は、下記的一般式(1)~(4)のいずれかで表されるN-アルキルピペリジンメタンチオールエステル誘導体またはその塩である。

【化2】



式中、 R^1 は $CO R^{1'}$ で表されるアシル基($R^{1'}$ は炭素原子数1~4のアルキル基を示す)を示し、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素又は炭素原子数1又は2のアルキル基を示す。

【0012】

R^2 ~ R^4 は、 ^{14}C 等の放射性元素を含むアルキル基であってもよい。本願発明は、放射性元素を用いなくてもコリンエステラーゼの活性を測定できるという利点があるが、放射能標識した化合物を用いてもコリンエステラーゼの活性を測定できることは当業者が当然に理解することである。

式(3)及び(4)の化合物のピペリジン環上の3位の炭素原子の立体は、S, R, あるいはラセミ体であってもよい。

R^1 のアシル基としては、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基又はバレリル基が挙げられ、特にアセチル基であることが好ましい。また、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、メチル基であることが好ましい。

R^1 がアセチル基であり、かつ R^2 ~ R^4 がメチル基である式1または2の化合物は、アセチルコリンエステラーゼに対する特異性が非常に高く、特に好ましい。

また、 R^1 のアシル基の炭素数を増やすことでブチリルコリンエステラーゼ特異性をも付与することができる。特に、 R^1 がブチリル基又はバレリル基である場合には、ブチリルコリンエステラーゼ特異性が高くなり、好ましい。

【0013】

10

20

30

40

50

本発明の化合物(1)または(3)の塩としては、塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩等の薬理的に許容される塩が挙げられ、本発明の化合物(2)または(4)の塩としては、塩素塩、臭素塩、ヨウ素塩等の薬理的に許容される塩が挙げられる。

【0014】

<アセチルコリンエステラーゼまたはブチリルコリンエステラーゼ活性測定方法>

本発明の化合物は、アセチルコリンエステラーゼまたはブチリルコリンエステラーゼ活性を測定する方法の試薬として使用することができる。

アセチルコリンエステラーゼまたはブチリルコリンエステラーゼ活性を測定する方法として、5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)溶液を用いる点に特徴を有するEllman法(Biochemical Pharmacology 7, 88-95(1961))による測定方法が挙げられる。

10

【0015】

Ellman法は、簡単に述べると、コリンエステラーゼ類を含む試験溶液と、本発明の化合物と、5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)溶液とを混合する工程、前記5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)溶液由来の5-チオ-2-ニトロ安息香酸による発色を定量する工程を含む方法である。

より詳細には以下のとおりである。コリンエステラーゼ類を含む試験溶液と、本発明の化合物と、5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)溶液とを混合すると、本発明の化合物が、コリンエステラーゼ類により加水分解されて、チオール化合物が生成する。このチオール化合物と、5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)とが反応することにより、残基の5-チオ-2-ニトロ安息香酸が溶液中に溶解して、発色する。この発色を定量することにより、本発明の化合物の加水分解速度あるいは加水分解率を定量し、コリンエステラーゼの活性を測定することができる。

20

【0016】

5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)は通常、例えば、リン酸緩衝液等の溶媒に溶解して0.2~1mM程度の濃度で使用するが、これに限定されない。

また、本発明の化合物は通常、リン酸緩衝液等の溶媒に溶解して0.5~1mM程度の濃度で使用するが、これに限定されない。

5-チオ-2-ニトロ安息香酸の発色は従来公知の方法で定量することができる。例えば、波長412nmもしくは436nm(Clinica Chimica Acta 288, 73-90(1999))の吸光度(mAbs)を測定することにより定量することができる。

30

なお、Ellman法には他の変法も報告されており、この方法では、5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)に代わり、2, 2'-あるいは4, 4'-ジチオジピリジン溶液(臨床病理 350-354(1971))を用いることによって、測定を行うことができる。

【0017】

本発明の化合物は、上記の測定方法において使用する他に、アセチルコリンエステラーゼ活性又はブチリルコリンエステラーゼ活性測定用試薬として従来使用されるアセチルチオコリンと同様の方法で使用することができる。

【0018】

<本発明の化合物の製造方法>

本発明のチオール化合物は、下記製造ルートにより初めて合成することができたものである。

40

従来、ピペリジンメタノール化合物への置換基の導入は、ピペリジン環上のアミノ基を予め保護しておき、3位あるいは4位のヒドロキシメチル基をアシル化等した後、前記保護基を脱保護して、アミノ基にアルキル基を導入することにより、行われていた(例えば、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, 1927-1930(2004))。しかし、ピペリジンメタンチオール化合物への置換基の導入はかかる方法により行うことができなかった。すなわち、前記導入方法では、合成の出発原料としてピペリジンメタンチオール化合物を用いる必要があるが、従来、ピペリジンメタンチオール化合物を得る方法は知られていなかったからである。本発明者らは、R. Cao, Jr等(J. Am. Chem. Soc., 129, 6927-6930, 2007)の報告したピペリジンメタンチオール合成法を応用し、1-アルキルピペリ

50

ジンメタンチオールを経由することにより下記工程により本発明のチオール化合物を製造することができることを見いだした。

化合物(1)または(3)の製造方法は以下の工程を含む方法により製造することができる: 1-アルキル-4-ピペリジンメタノールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタノールから、1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを得る工程(a)、及び前記1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(3)を製造する工程(b)。

10

【0019】

化合物(2)または(4)の製造方法は以下の工程を含む方法により製造することができる: 1-アルキル-4-ピペリジンメタノールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタノールから、1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを得る工程(a)、前記1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールを塩基存在下、アシル化剤によりアシル化し、1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(3)を製造する工程(b)、及び、前記1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(3)をアルキル化剤存在下、溶媒中で加熱することにより、1,1-ジアルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(2)または1,1-ジアルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(4)を得る工程(c)。

20

【0020】

各工程について詳細に説明する。

工程(a)

市販、もしくは下記工程(c)と同様に4-ピペリジンメタノールまたは3-ピペリジンメタノールを任意のハロゲン化アルキルと塩基存在下で反応させることで得られる1-アルキル-4-ピペリジンメタノールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタノールを出発物質として、前記化合物を、アセトニトリル、ジイソプロピルエーテル等の有機溶媒に溶解し、これに1~1.5モル当量の硫化ナトリウムを添加し、室温~70において1~12時間攪拌し、その後リン酸(50~85%)を溶液が黄色になるまで滴下する。8~24時間後、溶媒を減圧留去し、得られた残さにpH6.8~7.4の緩衝液を添加し、ジクロロメタン等の溶媒により抽出し、さらに溶媒を減圧留去することにより1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールは、更に精製してもよく、また精製せずにそのまま次の工程(b)に用いてもよい。

30

【0021】**工程(b)**

1-アルキル-4-ピペリジンメタンチオールまたは1-アルキル-3-ピペリジンメタンチオールをピリジン、トリエチルアミン等の塩基存在下、無水酢酸あるいは塩化アセチル等のアシル化剤により、溶媒中で、室温~80程度の温度にて1~6時間程度反応させる。このとき溶媒としてはジクロロメタン等が挙げられる。次にアンモニア含有クロロホルム等の無水塩基にて脱塩することにより、1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキルピペリジン-3-イルメチルアシルスルフィド(3)が得られる。

40

【0022】**工程(c)**

1-アルキルピペリジン-4-イルメチルアシルスルフィド(1)または1-アルキル

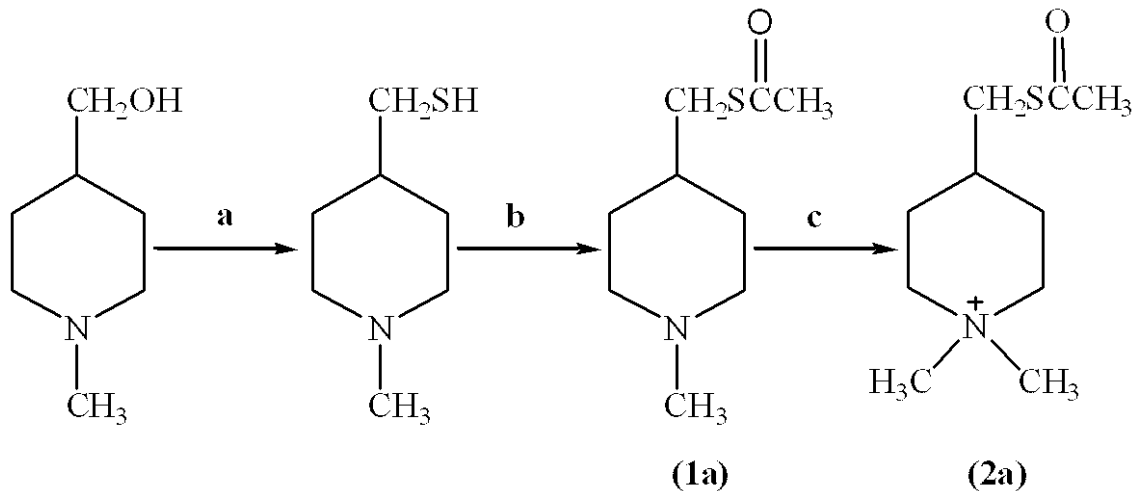
50

ピペリジン - 3 - イルメチルアシルスルフィド (3) をハロゲン化メチル等のアルキル化剤と、例えば、ジイソプロピルエーテル、ジメチルホルムアミド等の溶媒中、例えば、室温 ~ 130 (例、40) で 6 ~ 24 時間加熱することにより 1, 1 - ジアルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (2) または 1, 1 - ジアルキルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (4) が得られる。

【0023】

上述した製造方法により、例えば、1, 1 - ジメチルピペリジン - 4 - イルメチルアシルスルフィド (2a) を得ることができた。

【化3】



10

20

【0024】

化合物 (2a) の合成ルートを簡単に説明する。

工程 (a)

市販の 1 - メチル - 4 - ピペリジンメタノールから、文献既知の方法 (R. Cao, Jr, et al., J. Am. Chem. Soc., 129, 6927-6930, 2007) により 1 - メチル - 4 - ピペリジンメタンチオールが得られる。

【0025】

工程 (b)

1 - メチル - 4 - ピペリジンメタンチオールをピリジン、トリエチルアミン等の存在下、無水酢酸あるいは塩化アセチルと室温にて 1 ~ 2 時間程度反応させ、アンモニア含有クロロホルムにて脱塩することにより、1 - メチルピペリジン - 4 - イルメチルアセチルスルフィド (1a) が得られる。

【0026】

工程 (c)

1 - メチルピペリジン - 4 - イルメチルアセチルスルフィド (1a) をヨウ化メチル等と、例えば、ジイソプロピルエーテル等の溶媒中、例えば、40 で 12 ~ 14 時間加熱することにより 1, 1 - ジメチルピペリジン - 4 - イルメチルアセチルスルフィド (2a) が得られる。

30

40

【実施例】

【0027】

次に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

市販の 1 - メチル - 4 - ピペリジンメタノール 1 g (7.7 ミリモル) をアセトニトリル 150 ml に溶かし、これに硫化ナトリウム 800 mg (10.3 ミリモル) を加え、40 にて 2 時間攪拌したのち、リン酸を溶液が黄色になるまで滴下した。12 時間後、溶媒を減圧留去して得られた残さに pH 7.4 のリン酸緩衝液 (0.1 M) を加え、ジクロロメタンで 4 回抽出を行なった。ジクロロメタン溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧留去により濃縮したのち、塩化アセチル 400 mg (5.1 ミリモル) を加え 1 時

50

間室温にて攪拌した。反応溶液の溶媒を減圧留去して得られた残さをクロロホルム 5 ml に溶かし、飽和したアンモニア/クロロホルム溶液 5 ml を氷冷下加えた。不溶物をろ過して除き、溶媒を減圧留去して得られた残さをカラムクロマトグラフィー (NHシリカゲル, 溶出液: ヘキサン: 酢酸エチル = 4: 1) にて精製し、1-メチルピペリジン-4-イルメチルアセチルスルフィド (1a) を褐色の油状物として 143 mg (収率 10%) 得た。

【0028】

FAB-MS (m/z); $C_9H_{17}NOS$ 計算値 ($M^+ + 1$): 188; 実測値: 188
 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) (ppm): 1.21 - 1.44 (3H, m, CH, $CH \times 2$), 1.71 (2H, d, CH_2 , $J = 15.0$ Hz), 1.82 - 1.90 (2H, m, $CH \times 2$), 2.21 (3H, s, CH_3), 2.28 (3H, s, CH_3), 2.76 - 2.81 (4H, m, $CH \times 4$);
 ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) (ppm): 30.58, 31.45, 35.03, 35.45, 46.17, 55.41, 195.70.

10

【0029】

実施例 2

1-メチルピペリジン-4-イルメチルアセチルスルフィド (1a) 250 mg (1.3 ミリモル) をジイソプロピルエーテル 15 ml に溶かし、ヨウ化メチル 500 mg (3.5 ミリモル) を加え、40 で 12 時間反応した。溶媒を減圧留去して得られた残さをエタノールにて再結晶を行ない、吸引ろ過にて 1, 1-ジメチルピペリジン-4-イルメチルアセチルスルフィド (2a) のヨウ素塩を淡褐色結晶として 76.2 mg (収率 18%) 得た。

20

FAB-MS (m/z); $C_{10}H_{20}NOS$ 計算値 (M^+): 202; 実測値: 202
 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) (ppm): 1.67 - 1.97 (5H, m, CH, $CH \times 4$), 2.34 (3H, s, CH_3), 2.96 (2H, d, CH_2 , $J = 6.0$ Hz), 3.12 (3H, s, CH_3), 3.18 (3H, s, CH_3), 3.36 - 3.53 (4H, m, $CH \times 4$);
 ^{13}C NMR (300 MHz, CD_3OD) (ppm): 26.52, 30.50, 34.18, 34.76, 56.38, 63.26, 196.78.

30

【0030】

実施例 3 化合物 (1a) 及び (2a) を用いた酵素反応及び特異性

(1a) 及び (2a) の加水分解速度と特異性を調べるため、ヒト精製アセチルコリンエステラーゼ又はブチリルコリンエステラーゼ溶液における加水分解速度をEllman法にて測定し、アセチルチオコリン及びアセチル-メチル-チオコリンと比較した。0.1% Tween 20 含有のリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) で濃度調整した両酵素溶液 3 ml に、0.1 ml の 5, 5'-ジチオ-ビス (2-ニトロ安息香酸) 溶液 (5 mM) を加えた。これに各基質 0.02 ml (75 mM) を加え、波長 412 nm の吸光度 (mAbs) を測定した。

【0031】

測定結果を表 1 に示す。

40

表 1 は、アセチルチオコリン、アセチル-メチル-チオコリン、化合物 (1a) 及び (2a) について、アセチルコリンエステラーゼ及びブチリルコリンエステラーゼによる加水分解速度及び自然加水分解速度を表している。表中の値は、3 回計測した 1 分当たりの吸光度変化を平均値 \pm 標準偏差で表している。

表 1

	アセチルコリン エステラーゼ	ブチリルコリン エステラーゼ	自然加水分解
アセチルチオコリン	37±0.37	18±0.11	0.21±0.021
アセチル-βメチル-チオコリン	29±0.24	7.1±0.22	0.48±0.020
化合物(1a)	3.7±0.098	0.47±0.026	0.47±0.0096
化合物(2a)	3.1±0.15	0.15±0.0077	0.13±0.027

【0032】

表1に示されるように、各基質とも緩衝液中の自然加水分解速度 (m A b s / 分) は低かった。 10

また、アセチルチオコリン及びアセチル-メチル-チオコリンのブチリルコリンエステラーゼによる加水分解速度は、緩衝液中の自然加水分解よりも有意に速い一方で、化合物(1a)及び(2a)のブチリルコリンエステラーゼによる加水分解速度は、自然加水分解速度に対して有意差が無かった。これは、化合物(1a)及び(2a)のブチリルコリンエステラーゼによる加水分解が殆ど起こらないことを示している。また、化合物(1a)及び(2a)のアセチルコリンエステラーゼによる加水分解速度は、アセチルチオコリン及びアセチル-メチル-チオコリンの加水分解速度と比較すると遅いが、良好なアセチルコリンエステラーゼ基質であることが示された。以上から、化合物(1a)及び(2a)はアセチルコリンエステラーゼに極めて特異性が高いことが示された。 20

【0033】

実施例4 (1a)及び(2a)の経時的酵素反応

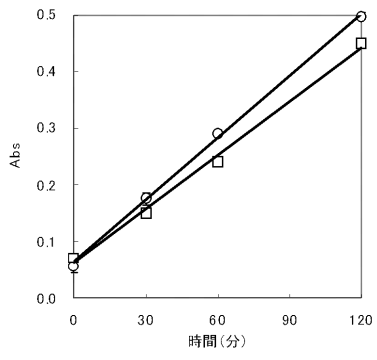
(1a)及び(2a)の加水分解速度がゼロ次反応に従うことを確認するため、上記実施例と同様に反応を行ない、経時的に波長412nmの吸光度を測定した。その結果、120分間に約0.4Absの吸光度変化を示し、この経時的な変化は良好な直線性を示したことから、本基質濃度においてゼロ次反応に従うことが明らかとなった(図1)。値は3回計測した吸光度(Abs)の平均値±標準偏差で表している。図1において、“ ”は化合物(1a)の加水分解速度を表し、“ ”は化合物(2a)の加水分解速度を表す。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】化合物(1a)及び(2a)のアセチルコリンエステラーゼによる経時的な加水分解速度を示す。 30

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/053928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D211/20 (2006.01) i, C12Q1/46 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D211/20, C12Q1/46		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2001-521033 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 06 November, 2001 (06.11.01), & WO 99/021855 A1 & AU 9896361 A & ZA 9809767 A & EP 1028961 A1 & NO 200002173 A & CZ 200001551 A3 & CN 1283197 A & HU 200004040 A2 & US 6281226 B1 & KR 2001031654 A & BR 9814747 A & AU 742167 B & MX 2000004202 A1 & NZ 504203 A & EP 1452534 A1 & EP 1028961 B1 & DE 69826704 E & ES 2229538 T3 & MX 224940 B & DE 69826704 T2 & US 39128 E & CN 1205211 C & TW 232861 B1 & KR 538721 B & CA 2307551 C & IL 135811 A & CZ 298543 B6 & EP 1930330 A1 & PH 1199802772 B1 & EP 1028961 B3	1-4 5-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May, 2009 (14.05.09)		Date of mailing of the international search report 02 June, 2009 (02.06.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/053928

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& JP 4227729 B2 & JP 2009-040789 A	
Y	Chemical Abstracts, 1961, Vol.55, 23655i	5-8
Y	JP 56-062000 A (TOSHIBA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 27 May, 1981 (27.05.81), & JP 87051119 B	5-8
Y	JP 2005-022996 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN HOSHASEN IGAKU SO), 27 January, 2005 (27.01.05), (Family: none)	5-8
Y	CAO, R. et al., Building Layer-by-Layer a Bis(dithiocarbamate)copper(II) Complex on Au{111} Surfaces, J. Am. Chem. Soc., 2007, Vol.129, No.21, pp 6927-6930	9-10
Y	SMITH, M.B. et al., March's Advanced Organic Chemistry, 5th Ed., p.497-498	9-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 3 9 2 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D211/20(2006.01)i, C12Q1/46(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D211/20, C12Q1/46											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 2001-521033 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 2001.11.06, & WO 99/021855 A1 & AU 9896361 A & ZA 9809767 A & EP 1028961 A1 & NO 200002173 A & CZ 200001551 A3 & CN 1283197 A & HU 200004040 A2 & US 6281226 B1 & KR 2001031654 A & BR 9814747 A & AU 742167 B & MX 200004202 A1 & NZ 504203 A & EP 1452534 A1 & EP 1028961 B1 & DE 69826704 E & ES 2229538 T3 & MX 224940 B & DE 69826704 T2 & US 39128 E & CN 1205211 C & TW 232861 B1 & KR 538721 B	1-4 5-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 14.05.2009		国際調査報告の発送日 02.06.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 恵	4 P 9164								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 3 9 2 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	& CA 2307551 C & IL 135811 A & CZ 298543 B6 & EP 1930330 A1 & PH 1199802772 B1 & EP 1028961 B3 & JP 4227729 B2 & JP 2009-040789 A	
Y	Chemical Abstracts, 1961, Vol.55, 23655i	5-8
Y	JP 56-062000 A (TOSHIBA KAGAKU KOGYO KK) 1981.05.27, & JP 87051119 B	5-8
Y	JP 2005-022996 A (DOKURITSU GYOSEI HOJIN HOSHASSEN IGAKU SO) 2005.01.27, (ファミリーなし)	5-8
Y	CAO, R. et al., Building Layer-by-Layer a Bis(dithiocarbamate)copper(II) Complex on Au{111} Surfaces, J. Am. Chem. Soc., 2007, Vol.129, No.21, pp 6927-6930	9-10
Y	SMITH, M. B. et al., March's Advanced Organic Chemistry, 5th Ed., p.497-498	9-10

フロントページの続き

- (72)発明者 菊池 達矢
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 入江 俊章
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 福士 清
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- (72)発明者 岡村 敏充
千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内
- Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ32 QR57 QR66 QS36 QX01
4C054 AA02 CC02 DD01 EE01 EE04 EE15 FF04 FF15

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。