

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5422821号  
(P5422821)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 0 7 D 2 1 1 / 2 0** (2006. 01) C O 7 D 2 1 1 / 2 0 C S P  
**C 1 2 Q 1 / 4 6** (2006. 01) C 1 2 Q 1 / 4 6

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2010-514739 (P2010-514739)	(73) 特許権者	301032942
(86) (22) 出願日	平成21年3月3日(2009.3.3)		独立行政法人放射線医学総合研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/053928		千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
(87) 国際公開番号	W02010/100720	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成22年9月10日(2010.9.10)		弁理士 熊倉 禎男
審査請求日	平成24年3月5日(2012.3.5)	(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

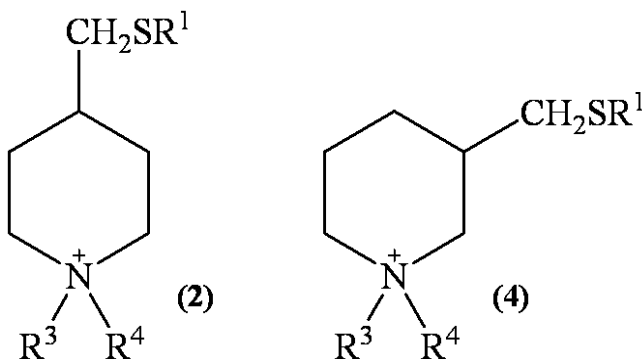
(54) 【発明の名称】 コリンエステラーゼ活性測定用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式(2)または(4)で表される化合物またはその塩。

【化 1】



式中、 $\text{R}^1$ 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、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は炭素原子数1又は2のアルキル基を示す。

【請求項 2】

$\text{R}^1$ 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記載の化合物またはその塩。

【請求項 3】

R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>がメチル基である、請求項1または2に記載の化合物またはその塩。

【請求項4】

R<sup>1</sup>がアセチル基であり、かつR<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>がメチル基である、請求項3に記載の化合物またはその塩。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物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。

【請求項6】

請求項4に記載の化合物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項に記載の化合物またはその塩の、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に記載の化合物またはその塩の、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・治療上等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。

10

20

30

40

50

## 【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の実施ができない等、利便性、安全性及び経済性の面で問題があった。

## 【0006】

【特許文献1】特開平10-253611号

【特許文献2】特開2005-22996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)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

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。

【課題を解決するための手段】

## 【0008】

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、従来の製造方法では製造できなかった、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、R<sup>1</sup>がアセチル基であり、かつR<sup>2</sup>~R<sup>4</sup>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。

10

20

30

40

50

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。

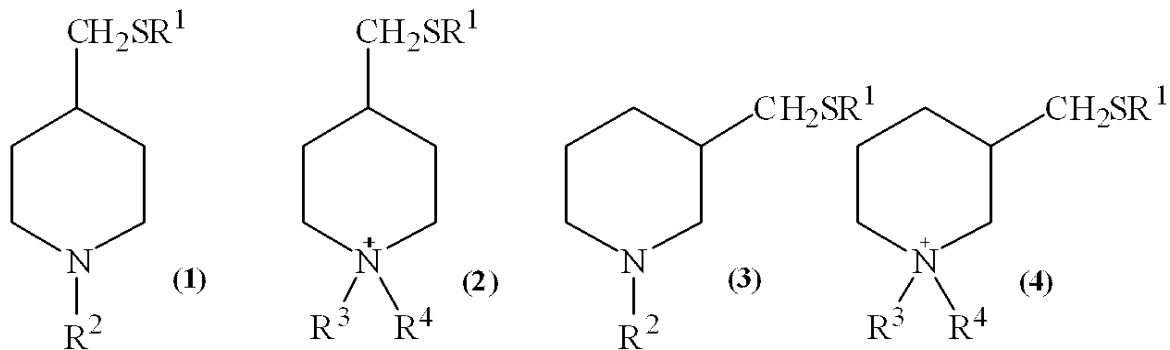
本発明のチオエステル構造を有するピペリジン化合物は、従来、有効な製造方法が報告されておらず、本発明者らにより初めて見いだされた化合物である。

【0009】

本発明は以下を提供する。

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】



式中、 $\text{R}^1$ 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、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ は水素又は炭素原子数1又は2のアルキル基を示す。

2.  $\text{R}^1$ 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.  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ 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.  $\text{R}^1$ がアセチル基であり、かつ $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 及び $\text{R}^4$ 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。

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。

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。

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しか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。

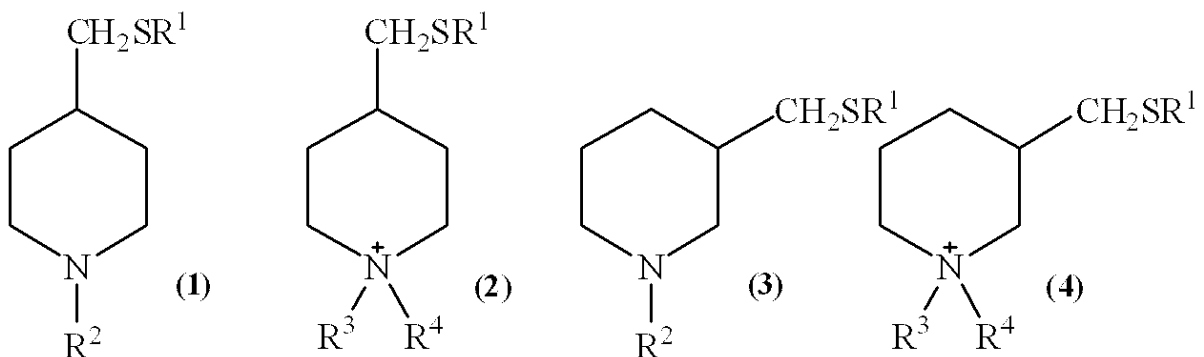
【発明を実施するための最良の形態】

【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  $COR^{1'}$  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。

【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。

10

20

30

40

50

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<sup>1</sup>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<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、メチル基であることが好ましい。

R<sup>1</sup>がアセチル基であり、かつR<sup>2</sup>~R<sup>4</sup>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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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。

10

#### 【0013】

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。

20

#### 【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。

30

#### 【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。

40

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>

50

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。

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）。

#### 【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）。

#### 【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を得る。得られた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。

#### 【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。

## 【0022】

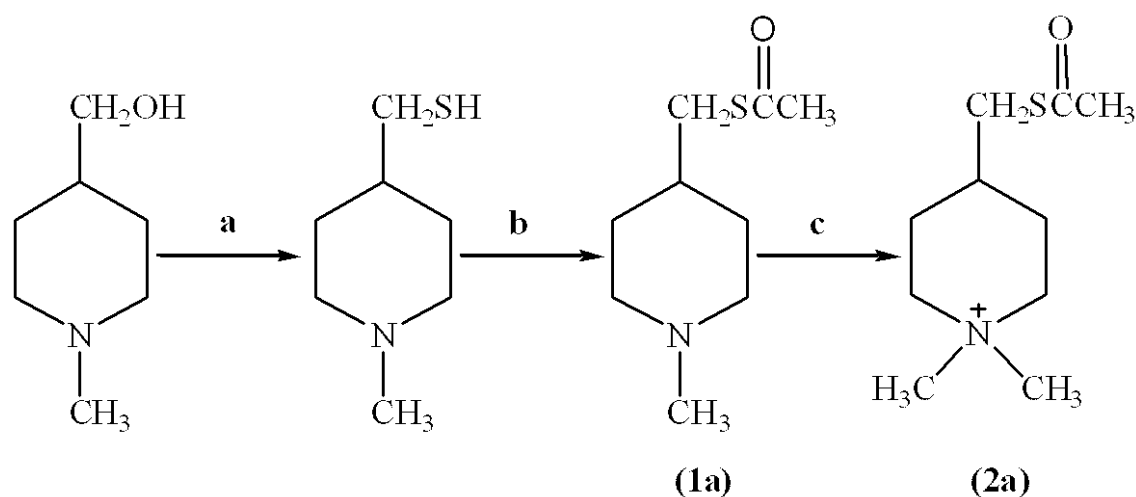
## 工程 (c)

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】



## 【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)

10

20

30

40

50



)が得られる。

【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1g(7.7ミリモル)をアセトニトリル150mlに溶かし、これに硫化ナトリウム800mg(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pH7.4のリン酸緩衝液(0.1M)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400mg(5.1ミリモル)を加え1時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5mlに溶かし、飽和したアンモニア/クロロホルム溶液5ml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143mg(収率10%)得た。

10

【0028】

FAB-MS(m/z); C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NOS 計算値(M<sup>+</sup>+1):188;実測値:188  
<sup>1</sup>H NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) (ppm):1.21-1.44(3H, m, CH, CH×2), 1.71(2H, d, CH<sub>2</sub>, J=15.0 Hz), 1.82-1.90(2H, m, CH×2), 2.21(3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.28(3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.76-2.81(4H, m, CH×4);  
<sup>13</sup>C NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) (ppm):30.58, 31.45, 35.03, 35.45, 46.17, 55.41, 195.70.

20

【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)250mg(1.3ミリモル)をジイソプロピルエーテル15mlに溶かし、ヨウ化メチル500mg(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76.2mg(収率18%)得た。

30

FAB-MS(m/z); C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>NOS 計算値(M<sup>+</sup>):202;実測値:202  
<sup>1</sup>H NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD) (ppm):1.67-1.97(5H, m, CH, CH×4), 2.34(3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.96(2H, d, CH<sub>2</sub>, J=6.0 Hz), 3.12(3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.18(3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.36-3.53(4H, m, CH×4);  
<sup>13</sup>C NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD) (ppm):26.52, 30.50, 34.18, 34.76, 56.38, 63.26, 196.78.

40

【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(0.1M, pH7.4)で濃度調整した両酵素溶液3mlに、0.1mlの5,5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸)溶液(5mM)を加えた。これに各基質0.02ml(75mM)を加え、波長412nmの吸光度(mAbs)を測定した。

【0031】

50

測定結果を表 1 に示す。

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 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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 ± 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 ( 1 a )	3.7±0.098	0.47±0.026	0.47±0.0096
化合物 ( 2 a )	3.1±0.15	0.15±0.0077	0.13±0.027

10

### 【 0 0 3 2 】

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。

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 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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

### 【 0 0 3 3 】

実施例 4 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) の経時的酵素反応

( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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 4 1 2 nm の吸光度を測定した。その結果、1 2 0 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 ( 1 a ) の加水分解速度を表し、“ ” は化合物 ( 2 a ) の加水分解速度を表す。

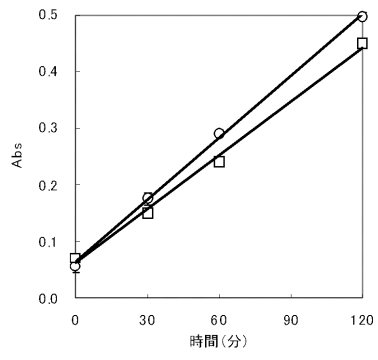
30

### 【 図面の簡単な説明 】

### 【 0 0 3 4 】

【 図 1 】 化合物 ( 1 a ) 及び ( 2 a ) 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。

【 図 1 】



---

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 福土 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

審査官 江間 正起

- (56)参考文献 特表2001-521033(JP,A)  
Neil J. Lewis et al., Journal of Medicinal Chemistry, 1973年, Vol.16, No.2, p.156-159  
Patrick Masson et al., Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics, 2007年 1月, Vol.1774, No.1, p.16-34

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07D 211/20 - 211/24  
C12Q 1/46  
CAplus/REGISTRY(STN)