(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年3月8日(08.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/043567 A1

(51) 国際特許分類:
C07D 311/80 (2006.01) *C12N 5/0789* (2010.01)
C07D 491/22 (2006.01) *C12N 5/0797* (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2017/031165

(22) 国際出願日： 2017年8月30日(30.08.2017)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-169721 2016年8月31日(31.08.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

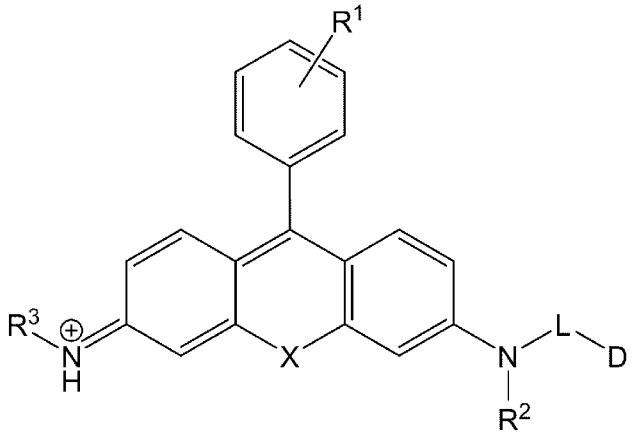
(72) 発明者: 上杉 志成 (**UESUGI Motonari**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 茅迪(**Di Mao**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 川瀬 栄八郎(**KAWASE Eihachiro**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 中谷 智子 (**NAKATANI Tomoko**); 〒1010063 東京都千代田区神田淡路町２－８ プロステック淡路町３階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

(54) **Title:** COMPOUND FOR REMOVING HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称： ヒト多能性幹細胞を除去する化合物



(I)

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to discover a cytotoxic anticancer drug that serves as a common substrate for both ABCB1 and ABCG2 which are suppressed in human pluripotent stem cells, and to provide a method for efficiently removing undifferentiated cells using said drug. Specifically, the present invention pertains to: a compound represented by formula (I); synthesis intermediates thereof; a method in which said compound is used to remove undifferentiated cells in a cell population in which the differentiation of stem cells has been induced; and a drug that selectively damages cells that express ABCB1 and ABCG2 transporters, the drug containing said compound as an active ingredient.

WO 2018/043567 A1

[続葉有]

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 本発明は, ヒト多能性幹細胞において抑制されるＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質となる細胞障害性抗がん剤を見出すこと, 及び当該薬剤を用いた未分化細胞の効率的な除去方法を提供することを目的とする。具体的には, 本発明は以下の式(Ｉ)で表される化合物, その合成中間体, 当該化合物を用いた幹細胞を分化誘導した細胞集団中の未分化細胞の除去方法, 及び当該化合物を有効成分として含有する, ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターを発現している細胞に選択的に障害を与える薬剤に関する。

明　細　書

発明の名称 ： ヒト多能性幹細胞を除去する化合物

技術分野

[0001] 本発明は，ｉＰＳ細胞やＥＳ細胞等のヒト多能性幹細胞を分化誘導した後に残存する未分化細胞を除去する化合物及びその利用方法に関する。

背景技術

[0002] ヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣｓ）は，基礎研究や再生治療の両方において大変貴重な資源となると考えられている。しかし，その臨床応用には多くの制限があり，例えば，移植中に未分化細胞が腫瘍化するリスクが指摘されている（非特許文献１，２）。幹細胞治療の安全性のために，完全な分化または未分化細胞の選択的除去が求められている。選択的な除去のためのいくつかの方法が既に報告されている：幹細胞表面抗原に対する抗体を用いた細胞選択と沈殿（非特許文献３，４）；ヒト多能性幹細胞に特異的な細胞障害性抗体（非特許文献５）；細胞培養条件の変形（非特許文献６，７）；及び，ヒト多能性幹細胞に特異的なｌｅｃｔｉｎ－ｔｏｘｉｎ融合タンパク質（非特許文献８）。ステアロイルＣｏＡデサチュラーゼ（ＳＣＤ１）の低分子阻害剤（非特許文献９）及びサバイビンの低分子阻害剤（非特許文献１０）など，いくつかの化学的方法も有効であることが示されている。これらの有望な検討がなされているにもかかわらず，これらの除去方法のいずれも，再生医療の臨床応用段階に至っていない。異なる除去メカニズムを有する新たな化学物質の開発は，単独又は他の方法を補完することにより，腫瘍を起こしやすい未分化細胞の完全な除去を確実にするために求められている。

[0003] 本発明者らは以前，蛍光分子である京都プローブ１（ＫＰ－１）が選択的にｈｉＰＳＣｓを標識することを報告した（非特許文献１１，特許文献１）。メカニズムの研究により，その選択は，ヒト多能性幹細胞におけるＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）トランスポーターの異なる発現パターンおよびＫＰ－１のトランスポーター選択性に主に起因することが示された。ＫＰ－１の

流出を引き起こす，２種類のＡＢＣトランスポーター，ＡＢＣＢ１（ＭＤＲ１）およびＡＢＣＧ２（ＢＣＲＰ）は，ヒト多能性幹細胞において抑制されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第ＷＯ２０１３／０５０５１号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｋ．Ｍｉｕｒａら，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２００９）２７：７４３－７４５

非特許文献2：Ｕ．Ｂｅｎ－Ｄａｖｉｄら，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ（２０１１）１１：２６８－２７７

非特許文献3：Ｃ．Ｔａｎｇら，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２０１１）２９：８２９－８３４

非特許文献4：Ｋ．Ｓｃｈｒｉｅｂｌら，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ Ｐａｒｔ Ａ（２０１２）１８：８９９－９０９

非特許文献5：Ａ．Ｂ．Ｃｈｏｏら，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ（２００８）２６：１４５４－１４６３

非特許文献6：Ｓ．Ｔｏｈｙａｍａら，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ（２０１３）１２：１２７－１３７

非特許文献7：Ｋ．Ｍａｔｓｕｕｒａら，Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇ Ｐａｒｔ Ｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ（２０１５）２１：３３０－３３８

非特許文献8：Ｈ．Ｔａｔｅｎｏら，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ（２０１５）４：８１１－８２０

非特許文献9：Ｕ．Ｂｅｎ－Ｄａｖｉｄら，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ（２０１３）１２：１６７－１７９

非特許文献10：Ｍ．Ｏ．Ｌｅｅら，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ（２０１３）１１０：Ｅ３２８１－３２９０

非特許文献11：Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ（２０１４）６：１

１６５－１１７４

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ＡＢＣトランスポーターは癌治療における薬物耐性メカニズムにおいて重要な役割を果たす（Ｋ．Ｕｅｄａら，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ（１９８７）８４：３００４－３００８；Ｓ．Ｐ．Ｃ．Ｃｏｌｅら，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９２）２５８：１６５０－１６５４；Ｊ．Ｉ．Ｆｌｅｔｃｈｅｒら，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ（２０１０）１０：１４７－１５６）。広範囲の細胞障害性抗癌剤がＡＢＣトランスポーターの基質として報告されている。しかし，以前の研究には，そのトランスポーター選択性について矛盾した結果も含まれていた。そこで，本発明者らは最初に，ヒト多能性幹細胞において抑制されるＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質となる細胞障害性抗がん剤を開発することを目的とする。

[0007] 最初に，本発明者らは，既存の抗がん剤の中からＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質を見出すべく，１３種類の細胞障害性抗がん剤について４つの細胞株に対する効果を分析し，トランスポーター選択性を比較した。ＫＢ３－１細胞は，検出可能なレベルでＡＢＣトランスポーターを発現していない。ＫＢ３－１由来細胞（ＫＢ／ＡＢＣＢ１（Ｙ．Ｔａｇｕｃｈｉら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９７）３６：８８８３－８８８９），ＫＢ／ＡＢＣＣ１（Ｋ．Ｎａｇａｔａら，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ（２０００）２７５：１７６２６－１７６３０），及び，ＫＢ／ＡＢＣＧ２（Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ（２０１４）６：１１６５－１１７４．））は，それぞれ，ＡＢＣＢ１，ＡＢＣＣ１，及びＡＢＣＧ２を過剰発現する。ほとんどの薬は少なくとも一つのＡＢＣトランスポーター－媒介性の抵抗を示した。

[0008] 例えば，カンプトテシンとエトポシドは，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＣ１の両

方の基質であった。これらの結果は，本発明者らの以前の研究結果（Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ（２０１４）６：１１６５－１１７４）及び報告された結果（Ｊ．Ｊ．Ｓｔｒｏｕｓｅら，Ａｎａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ（２０１３）４３７：７７－８７）と一致した。しかし，試験した化合物の中からＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質を見出すことができなかった。この結果は，ＡＢＣＢ１とＡＢＣＣ１が基質を共有し，ＡＢＣＣ１とＡＢＣＧ２が基質を共有しているにもかかわらず，ＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質を見出すことが非常に困難であることを意味していた。

[0009] ＷＯ２０１３／１０３５０１に記載された物質（以下，総称して「ＫＰ－１等」という）は，ヒト多能性幹細胞に対して優れた選択性を示すが，ＫＰ－１等には細胞障害性がないため，ヒト多能性幹細胞を除去することはできない。そこで，本発明者らは，ＫＰ－１等を細胞障害性物質に結合させることにより，得られた複合体が，ＫＰ－１等のＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質としての特性と，細胞障害性抗がん剤の細胞障害性の両方を維持することができれば，選択的かつ比較的安全な物質を見出すことができると考え，ＫＰ－１等と様々な細胞障害性抗がん剤とを共有結合で結合させて検討を行った。最初に発明者らは，細胞障害性抗がん剤であるコンブレタスタチンＡ－４（ＣＡ４）を含む５種類の抗がん剤とＫＰ－１等とを結合させ，トランスポーターの基質としての特異性と，細胞障害活性を分析した。その結果，これらの細胞障害性抗がん剤と結合させることにより，ＫＰ－１等のＡＢＣＧ２に対する基質特異性が失われることを見出した。よって，本発明は，ＫＰ－１等と組み合わせることにより，ＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質となる，細胞障害性抗がん剤の複合体を与える化合物を見出すことを課題とした。

課題を解決するための手段

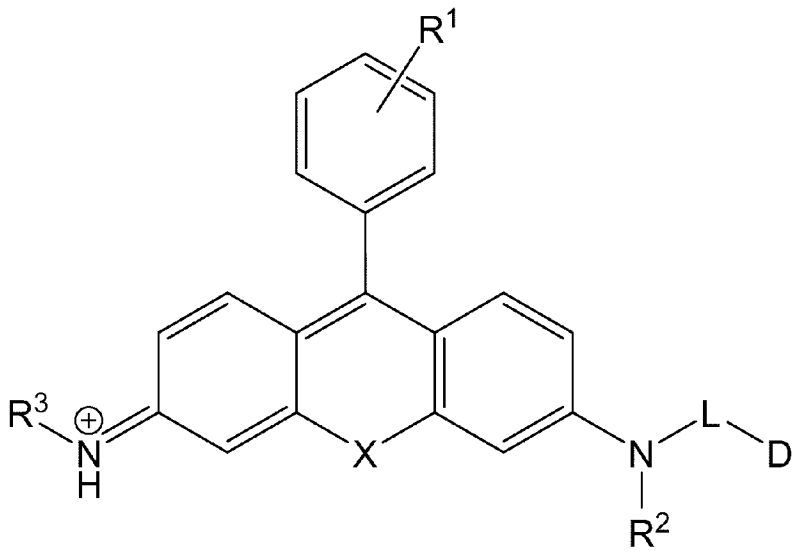
[0010] 本発明者らは，ＡＢＣＧ２の基質である細胞障害性抗がん剤をＫＰ－１等と結合させることにより，ＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基

質であり，かつ細胞障害性を有する物質を創出できることを見出し，本発明を完成させた。

[0011] よって，本発明は，ＡＢＣＧ２の基質である細胞障害性抗がん剤とＫＰ－１等とが結合した複合体に関する。特に，当該複合体はＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対する共通の基質であると共に，細胞障害性を有する物質である。より具体的には，本発明は以下に関する：

（１） 下記式（Ｉ）で表される化合物

[0012] [化1]



(I)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｒ[2]及びＲ[3]は，同一又は異なって，それぞれ，水素原子，又はＣ１～６アルキル基であり，

Ｘは，酸素原子，硫黄原子，又はＮＲ[7]であり，

ここで，Ｒ[7]は，水素原子又はＣ１～６アルキル基であり，

Ｌは，－（ＣＨ$_2$）$_k$（ＮＨ）$_m$（ＣＯ）$_n$（ＣＨ$_2$）$_p$－で表されるリンカー部

分を表し，

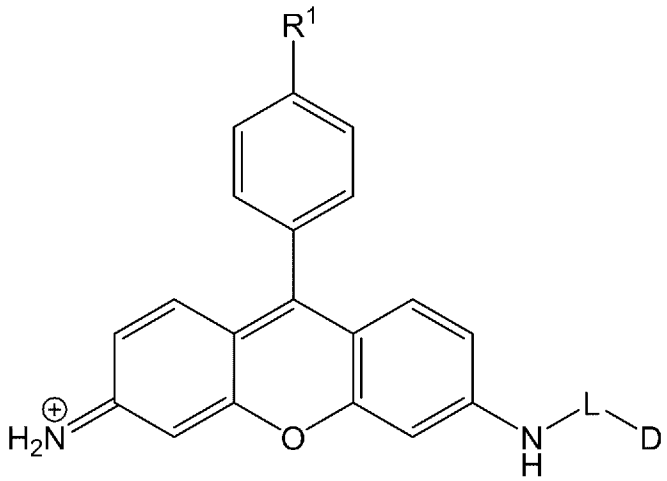
ここで，ｋは３～７の整数を表し，ｍは０又は１であり，ｎは０又は１であり，ｐは０又は１であり，

Ｄは，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質を表し，

ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質は，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ Ｉ 阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びＬａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である］。

（２） 下記式（ＩＩ）で表される，（１）に記載の化合物

[0013] [化2]



(II)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｌは，－（ＣＨ$_2$）$_k$（ＮＨ）$_m$（ＣＯ）$_n$（ＣＨ$_2$）$_p$－で表されるリンカー部分を表し，

ここで，ｋは３～７の整数を表し，ｍは０又は１であり，ｎは０又は１であり，ｐは０又は１であり，

Ｄは，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質を表し，

ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質は，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ Ｉ 阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びｌａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である］。

（３） Ｒ^{1}が，ハロゲン原子又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ^5）（ＯＲ^6）基である，（１）又は（２）に記載の化合物（Ｒ^{5}及びＲ^{6}は，（１）又は（２）の定義に従う）。

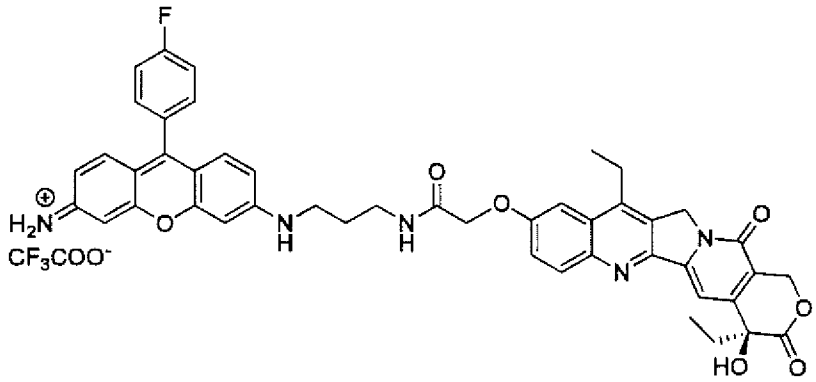
（４） Ｌが，－（ＣＨ$_2$）$_k$（ＮＨ）（ＣＯ）（ＣＨ$_2$）－で表されるリンカー部分を表し，ここで，ｋは３～５の整数を表す，（１）～（３）のいずれか１項に記載の化合物。

（５） Ｄが，トポイソメラーゼ阻害剤であるＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質である，（１）～（４）のいずれか１項に記載の化合物。

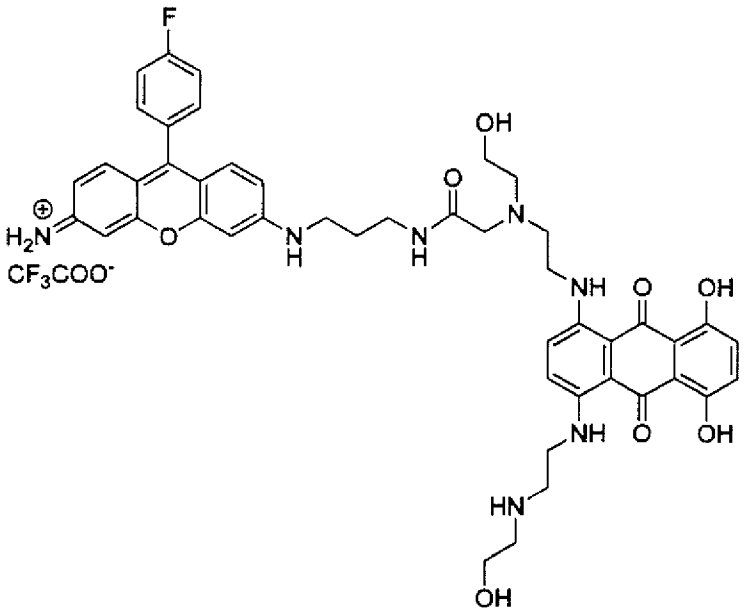
（６） Ｄが，ＳＮ３８，又はＭｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅである，（１）～（５）のいずれか１項に記載の化合物。

（７） 下記のいずれかの式で表される化合物（式中，原子を明示していない末端は，ＣＨ$_3$を表す）。

[化3]

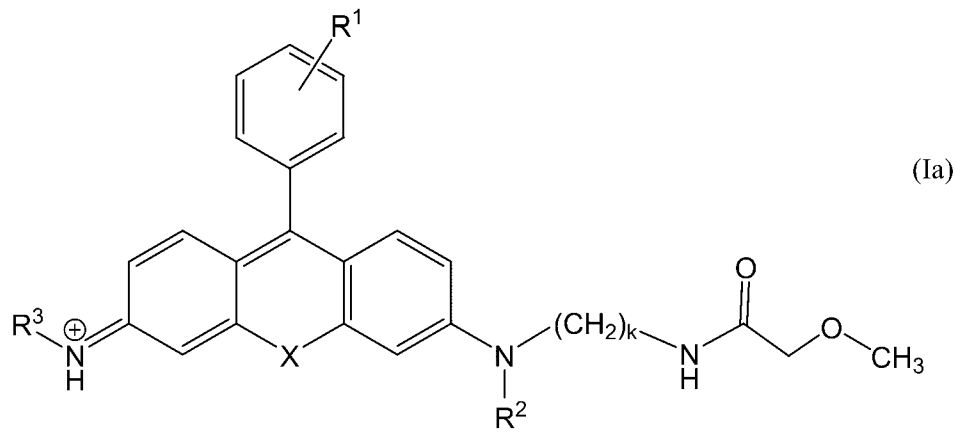


[化4]



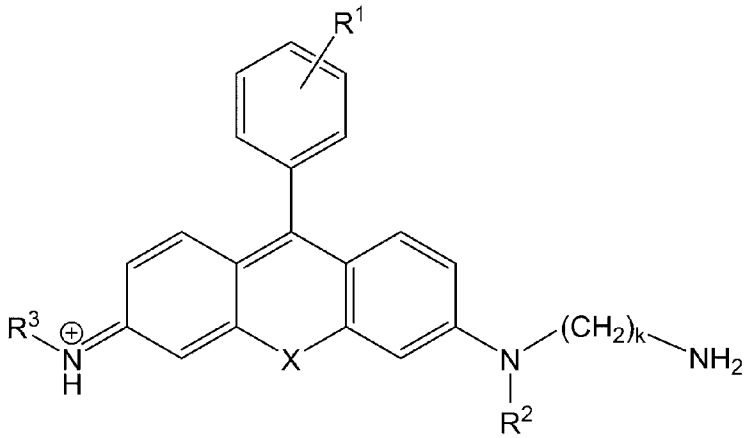
（８）　下記式（Ｉａ）又は（Ｉｂ）で表される化合物

[化5]



(Ia)

[化6]



(Ib)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｒ[2]及びＲ[3]は，同一又は異なって，それぞれ，水素原子，又はＣ１～６アルキル基であり，

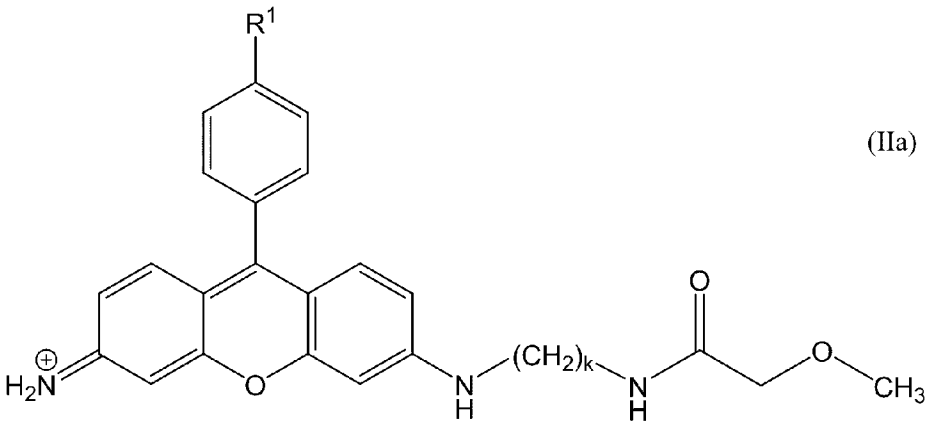
Ｘは，酸素原子，硫黄原子，又はＮＲ[7]であり，

ここで，Ｒ[7]は，水素原子又はＣ１～６アルキル基であり，

ｋは３～７の整数を表す］。

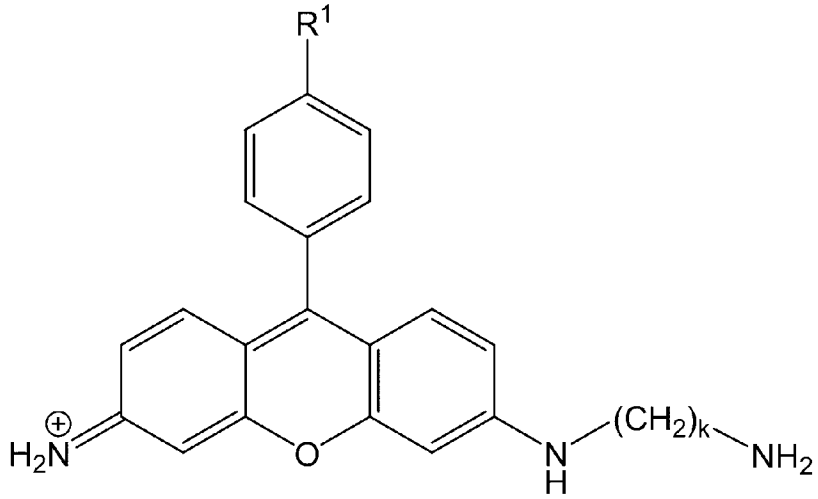
（９）　下記式（ＩＩａ）又は（ＩＩｂ）で表される化合物

[化7]



(IIa)

[化8]



(IIb)

［式中，Ｒ１は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ^{5}）（ＯＲ^{6}）基であり，

ここで，Ｒ５及びＲ６は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ５及びＲ６は存在せず，

ｋは３～７の整数を表す］。

（１０）　Ｒ^{1}が，ハロゲン原子又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ^{5}）（ＯＲ^{6}）基である，（８）又は（９）に記載の化合物。

（１１）　ｋが３～５の整数を表す，（８）～（１０）のいずれか１項に記載の化合物。

（１２）　（８）～（１１）のいずれか１項に記載の化合物と，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質とを反応させることを備える，（１）～（７）のいずれか１項に記載の化合物の合成方法であって，ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質が，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌ

ｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ　Ｉ　阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びｌａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である，方法。

（１３）　幹細胞を分化誘導した細胞集団に（１）～（７）のいずれか１項に記載の化合物を未分化細胞が死滅する時間接触させること，及び，残存した（１）～（７）のいずれか１項に記載の化合物を洗浄により除去することを含む，幹細胞を分化誘導した後に残存する未分化細胞の除去方法。

（１４）　幹細胞がｉＰＳ細胞である，（１３）に記載の除去方法。

（１５）　（１）～（７）のいずれか１項に記載の化合物を有効成分として含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与える薬剤。

（１６）　ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞が未分化細胞である，（１５）に記載の薬剤。

（１７）　（１）～（７）のいずれか１項に記載の化合物を含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与えるためのキット。

[0014]　本明細書において，「ハロゲン原子」とは，フッ素原子，塩素原子，臭素原子，又はヨウ素原子を意味し，好ましくは，フッ素原子である。

[0015]　本明細書において，「Ｃ１～６アルキル基」とは，直鎖又は分岐状の炭素数が１～６個の飽和炭化水素基を意味し，例えば，メチル基，エチル基，ｎ－プロピル基，ｉ－プロピル基，ｎ－ブチル基，ｓｅｃ－ブチル基，ｔ－ブチル基，イソブチル基，ペンチル基，イソペンチル基，２，３－ジメチルプロピル基，ヘキシル基，及びシクロヘキシル基などが挙げられ，好ましくは，Ｃ１～５アルキル基であり，より好ましくは，メチル基，エチル基，ｎ－プロピル基，ｉ－プロピル基，ｎ－ブチル基，ｓｅｃ－ブチル基，ｔ－ブチル基，イソブチル基，ペンチル基，イソペンチル基，又は２，３－ジメチルプロピル基である。更に好ましくは，Ｃ１～３アルキル基であり，例えば，メチル基，エチル基，ｎ－プロピル基，及びｉ－プロピル基，であり，最も

好ましくは，メチル基又はエチル基である。

[0016] 本明細書において，「Ｃ１～６アルコキシ基」とは，前記Ｃ１～６アルキル基と酸素原子を介して結合する基（（Ｃ１～６アルキル基）－Ｏ－基）のことであり，該アルキル基部分は直鎖状であっても分岐状であってもよい。Ｃ１～６アルコキシ基とは，該アルキル基部分の炭素原子数が１～６個であることを意味する。アルコキシ基としては，例えば，メトキシ基，エトキシ基，１－プロピルオキシ基，２－プロピルオキシ基，２－メチル－１－プロピルオキシ基，２－メチル－２－プロピルオキシ基，２，２－ジメチル－１－プロピルオキシ基，１－ブチルオキシ基，２－ブチルオキシ基，２－メチル－１－ブチルオキシ基，３－メチル－１－ブチルオキシ基，２－メチル－２－ブチルオキシ基，３－メチル－２－ブチルオキシ基，１－ペンチルオキシ基，２－ペンチルオキシ基，３－ペンチルオキシ基，２－メチル－１－ペンチルオキシ基，３－メチル－１－ペンチルオキシ基，２－メチル－２－ペンチルオキシ基，３－メチル－２－ペンチルオキシ基，１－ヘキシルオキシ基，２－ヘキシルオキシ基，３－ヘキシルオキシ基などが挙げられる。Ｃ１～６アルコキシ基として，好ましくはＣ１～５アルコキシ基であり，より好ましくは，メトキシ基，エトキシ基，ｎ－プロピルオキシ基，ｉ－プロピルオキシ基，ｎ－ブチルオキシ基，ｓｅｃ－ブチルオキシ基，ｔ－ブチルオキシ基，イソブチルオキシ基，ペンチルオキシ基，イソペンチルオキシ基，及び２，３－ジメチルプロピルオキシ基であり，更に好ましくは，Ｃ１～３アルコキシ基（メトキシ基，エトキシ基，及びプロピルオキシ基）であり，より更に好ましくは，メトキシ基又はエトキシ基である。

[0017] 本明細書において，「フェニルオキシ基」とは，フェニル基と酸素原子を介して結合する基（Ｐｈ－Ｏ－基）を意味する。

[0018] 本明細書において，「－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ^{5}）（ＯＲ^{6}）基」として，好ましくは，Ｒ^{5}とＲ^{6}は同一であり，より好ましくは，－ＯＰ（Ｏ）（ＯＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）（ＯＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{3}$）基，－ＯＰ（Ｏ）（ＯＣＨ$_{2}$Ｐｈ）（ＯＣＨ$_{2}$Ｐｈ）基，又は「－ＯＰＯ$_{3}^{2-}$基」である。

[0019] 本発明の化合物においてR[1]として好ましくは，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，水酸基又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基で（ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在しない）であり，より好ましくは，水素原子，フッ素原子，塩素原子，プロピル基，及び水酸基であり，最も好ましくは，フッ素原子である。Ｒ[1]がリン酸基の場合には，リン酸基の負電化を利用して，アルカリフォスファターゼを利用することにより細胞への取り込みを促進させることができる。また，Ｒ１の置換位置として好ましくはパラ位である。

[0020] Ｒ[2]の置換は，トランスポーター選択性に与える影響は低く，水素原子とＣ１～６アルキル基のいかなる基であっても良いが，好ましくは，水素原子，メチル基，又はエチル基であり，最も好ましくは水素原子である。

[0021] Ｒ[3]の置換も，トランスポーター選択性に与える影響は低く，水素原子とＣ１～６アルキル基のいかなる基であっても良いが，好ましくは，水素原子，メチル基，又はエチル基であり，最も好ましくは水素原子である。

[0022] Ｘは，酸素原子，硫黄原子，又はＮＲ[7]（ここで，Ｒ[7]は，水素原子又はＣ１～６アルキル基）であり，好ましくは，酸素原子又は硫黄原子であり，最も好ましくは酸素原子である。

[0023] Ｒ[1]～Ｒ[3]及びＸとして，好ましくは，Ｒ[1]がフッ素原子であり，Ｒ[2]及びＲ[3]が水素原子であり，Ｘが酸素原子である組み合わせである。

[0024] 本明細書において，Ｌは，ＫＰ－１等部分と，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質部分を結合するリンカーを表しており，－$(CH_2)_k$（ＮＨ）$_m$（ＣＯ）$_n$$(CH_2)_p$－で表される。ここで，ｋは３～７の整数を表し，好ましくは，３～６であり，より好ましくは，３～５又は３～４であり，もっとも好ましくは３である。ｍは０又は１であり，好ましくは１である。ｎは０又は１であり，好ましくは１である。ｐは０又は１であり，好ましくは１である。ｋ，ｍ，ｎ，ｐの組み合わせとして，好ましくは，それぞれ，３～５，１，１，１であり，より好ましくは，３，１，１，１である。

[0025] 本明細書において，Ｄで表される「ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質」とは，ＡＢＣＧ２の選択的な基質であり，かつ細胞障害性を有する物質を意味し，具体的には，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ Ｉ 阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びＬａｍｉｖｕｄｉｎｅを挙げることができる（Ｌ．Ｄｏｙｌｅら，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ（２００３）２２：７３４０－７３５８）。ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質として，好ましくは，ＳＮ３８，及びＭｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅである。

[0026] ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質側の結合部位は，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質のＡＢＣＧ２選択性と細胞障害性を失わせにくい部位であれば特に限定されるものではなく，適宜，有機化学の分野における技術常識を参酌して，これらの化合物が有する，水酸基，アシル基，アセチル基，ホルミル基，ベンゾイル基，カルボキシル基，アミド基，イミド基，シアノ基，スルホン酸基，ウレア基，イソニトリル基（－ＮＣ），アレン基（＞Ｃ＝Ｃ＝Ｃ＜），ケテン基（－Ｃ＝Ｃ＝Ｏ），ジイミド基（－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－），イソシアネート基（－Ｎ＝Ｃ＝Ｏ），イソチオシアネート基（－Ｎ＝Ｃ＝Ｓ），カルボニル基，アミノ基，イミノ基，シアノ基，アゾ基，アジ基，チオール基，スルホ基，ニトロ基，エーテル結合，エステル結合，アミド結合，及びウレタン結合などの官能基を利用して結合させることができる。

[0027] 本発明はまた、本発明の化合物を有効成分として含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与える薬剤に関する。本明細書全体に亘って、ある細胞が、ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されているか否かは、被験細胞におけるＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーター遺伝子の発現をｍＲＮ

Ａ又はタンパク質レベルで確認することにより決定することができる。あるいは、ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２のそれぞれのトランスポーター特異的マーカー分子の細胞外への輸送を確認し、輸送しない細胞はＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されているとして決定することができる。好ましくは、ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞は、未分化細胞である。本明細書全体に亘って、「ＡＢＣＢ１及び／又はＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている」とは、ＡＢＣＢ１及び／又はＡＢＣＧ２トランスポーターが発現していないことを必要とするものではなく、同じ環境中（例えば、同じ培養液中）に存在する他の細胞と比較して、ＡＢＣＢ１及び／又はＡＢＣＧ２トランスポーターの発現レベルが低いことを含む。例えば、同じ環境中（例えば、同じ培養液中）に存在する他の細胞と比較して、ＡＢＣＢ１及び／又はＡＢＣＧ２トランスポーターの発現レベルが２５％以下、２０％以下、１５％以下、１０％以下、９％以下、８％以下、７％以下、６％以下、又は５％以下であることを意味していても良い。また、本明細書全体に亘って「選択的に障害を与える」とは、障害を与える目的細胞以外の細胞に障害を全く与えないことを意味する必要はなく、他の細胞と比較して目的の細胞により強く障害を与えることを含む。一例として、選択的に障害を与えるとは、選択的に殺傷を与えることを意味してもよく、すなわち、目的の細胞を殺傷することができるが、他の細胞は殺傷しないことを意味していても良い。また、本発明の選択性は、トランスポーターによりもたらされるのみならず、これに加えて結合する薬物の毒性メカニズム（例えば、トポイソメラーゼ阻害活性など）によりもたらされてもよい。

[0028] 本発明の化合物を含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与えるためのキットは，前記化合物に加えて，当該化合物を封入する容器や説明書を含んでいても良い。

発明の効果

[0029] 本発明の式（Ｉ）又は式（ＩＩ）で表される化合物は，ＡＢＣＢ１及びＡ

ＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与えることができることから，これらのトランスポーターの発現が抑制されている未分化細胞の除去に有用である。特に本発明の式（Ｉ）又は式（ＩＩ）で表される化合物は，蛍光物質であることから，未分化細胞除去後の残存状況を蛍光を利用して検出することができるため，確実なクリアランス評価が可能となる。また，本発明の式（Ｉａ），（Ｉｂ），（ＩＩａ）又は（ＩＩｂ）で表される化合物は，本発明の式（Ｉ）又は式（ＩＩ）で表される化合物を合成するための合成中間体として有用である。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]ＫＰ－１の構造活性相関の概要を示す図である。数値はそれぞれ，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞（ＡＢＣＢ１），ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞（ＡＢＣＣ１），及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞（ＡＢＣＧ２）のＩｍａｇｅＪによる蛍光イメージから計算して得られた蛍光強度を示す。

[図2]複合体１６の選択性を示す。（Ａ）複合体１６の化学構造を示す。（Ｂ）ＣＡ４，化合物１４（１４），及び複合体１６（Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ　１６）の，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞に対するＩＣ５０値を示す表である。（Ｃ）複合体１６（１μＭ）で処理した，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞の蛍光顕微鏡画像の写真である。スケールバーは２００μｍを表す。

[図3]複合体１７の選択性を示す。（Ａ）複合体１７の化学構造を示す。（Ｂ）ＳＮ３８及び複合体１７（Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ　１７）の，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞に対するＩＣ５０値を示す表である（ｎ＝２）。（Ｃ）ＣｓＡ（１０μＭ）又はＫｏ１４３（１０μＭ）の存在下または非存在下で，複合体１７（１μＭ）で処理した，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞の蛍光顕微鏡画像の写真である。スケールバーは２００μｍを表す。

[図4]複合体１８の選択性を示す。（Ａ）複合体１８の化学構造を示す。（Ｂ）ミトキサントロン及び複合体１７（Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ　１７）の，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞に対するＩＣ５０値を示す表である（ｎ＝２）。（Ｃ）ＣｓＡ（１０μＭ）又はＫｏ１４３（１０μＭ）の存在下または非存在下で，複合体１８（１μＭ）で処理した，ＫＢ３－１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞，ＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞の蛍光顕微鏡画像の写真である。スケールバーは２００μｍを表す。

[図5A]部分的に分化したｈｉＰＳＣｓコロニーを，ＫＰ－１（１μＭ），複合体１７（１μＭ），または複合体１８（１μＭ）で標識した写真である。コロニー中央部が分化細胞を表す。スケールバーは２００μｍを表す。

[図5B]複合体１７（５μＭ），複合体１８（５μＭ），又はコントロールであるＤＭＳＯ（０．１％）が，ｉＰＳコロニー及び部分的に分化したｉＰＳＣｓのアルカリフォスファターゼ活性に対して与える影響を示す写真である。細胞は複合体で７２時間処理した後，アルカリフォスファターゼ比色染色を行った。

[図5C]複合体１７，複合体１８，又はＤＭＳＯで処理された，部分的に分化したｉＰＳＣｓにおける，ｎａｎｏｇのｑＰＣＲ解析の結果を表すグラフである。ｈｉＰＳＣｓをオールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間培養することにより部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを調製し，ついで各化合物（５μＭ）で７２時間処理した。ｎａｎｏｇの発現レベルは，ｇａｄｐｈにより正規化した。縦軸はＧＡＰＤＨに対する割合（％）を示し，横軸は処理した各化合物を示す。

[図5D]複合体１７，複合体１８，又はＤＭＳＯで処理された，部分的に分化したｉＰＳＣｓにおける，ｓｏｘ２のｑＰＣＲ解析の結果を表すグラフである。ｈｉＰＳＣｓをオールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間培養することにより部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを調製し，ついで各化合物（５μＭ）で７２時間処理した。ｓｏｘ２の発現レベルは，ｇａｄｐ

ｈにより正規化した。縦軸はＧＡＰＤＨに対する割合（％）を示し，横軸は処理した各化合物を示す。

[図5E]複合体１７，複合体１８，又はＤＭＳＯで処理された，部分的に分化したｉＰＳＣｓにおける，ｏｃｔ３／４のｑＰＣＲ解析の結果を表すグラフである。ｈｉＰＳＣｓをオールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間培養することにより部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを調製し，ついで各化合物（５μＭ）で７２時間処理した。ｏｃｔ３／４の発現レベルは，ｇａｄｐｈにより正規化した。縦軸はＧＡＰＤＨに対する割合（％）を示し，横軸は処理した各化合物を示す。

[図5F]複合体１７で７２時間処理された，ｈｉＰＳＣｓ（２０１Ｂ７及び２５３Ｇ１）並びにヒト初代細胞の生存率を表すグラフである。濃いグレーの丸はｉＰＳ２０１Ｂ７を表し，濃いグレーの四角はｉＰＳ２５３Ｇ１を表し，薄いグレーの四角は副腎微小血管細胞を表し，薄いグレーの丸はアストロサイトを表し，ひし形は脳微小血管細胞を表し，下向き三角は前立腺上皮細胞を表し，かつ，上向き三角は肝細胞を表す。縦軸は生存率（％）を表し，横軸は複合体１７の濃度（μＭ）の対数値（Ｌｏｇ）を表す。

[図6]シクロスポリン（黒四角）若しくはＫｏ１４３（黒三角）の存在下，又は非存在下（黒丸），複合体１７で処理したヒト初代細胞の生存率を表すグラフである。生存率は，ＷＳＴ－８ベースの比色アッセイ（Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇキット－８，同仁化学）により決定した。４５０ｎｍにおける吸光度を測定した。トランスポーター阻害剤である，シクロスポリンＡ（１０μＭ）またはＫｏ１４３（１０μＭ）は，複合体１７とのインキュベーションの１時間前に添加した。縦軸は生存率（％）を表し，横軸は複合体１７の濃度（μＭ）の対数値（Ｌｏｇ）を表す。

[図7]ＳＮ３８と複合体１７の選択性を表すグラフである。ｈｉＰＳまたはヒト初代体細胞（副腎微小血管，アストロサイト，脳微小血管細胞，前立腺上皮細胞，および肝細胞）を，ＳＮ３８（０．１または１μＭ）または複合体１７（１または１０μＭ）で７２時間処理した。（Ａ）ｈｉＰＳＣｓの生存

率レベルが～２０％である場合における，ＳＮ３８（０．１μＭ）と複合体１７（１μＭ）との比較を表す。（Ｂ）ｈｉＰＳＣｓの生存率レベルが～５％である場合における，ＳＮ３８（１μＭ）と複合体１７（１０μＭ）との比較を表す。いずれも生存率はＷＳＴ－８ベースの比色アッセイによって決定した。複合体１７がＳＮ３８よりも高い選択性を示すことが明らかとなった。縦軸は生存率（％）を表し，横軸は左から順に，ｉＰＳ２０１Ｂ７細胞，副腎微小血管細胞，アストロサイト，脳微小血管，前立腺上皮細胞，および肝細胞の結果を表す。

[図8]ＳＮ３８と複合体１７による阻害を表す写真である。ＳＮ３８（０，１，または１０μＭ）または複合体１７（０，１または１０μＭ）と予め混合した，スーパーコイルＤＮＡを，組換えヒトトポイソメラーゼＩと共に３７℃で３０分間インキュベートした。「Ｓｕｐｅｒ　Ｃｏｉｌｅｄ」はスーパーコイルドＤＮＡを表し，「ＴＯＰＯ　Ｉ」は，ヒト組換えトポイソメラーゼＩを表す。反応混合物を１％アガロースゲル上に負荷した。電気泳動後，ゲルをＴＡＥ緩衝液中の臭化エチジウムで染色し，ＵＶ照明下で撮影した。

[図9]複合体１７の除去を表すグラフである。部分的に分化ｈｉＰＳＣｓは，オールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間インキュベートすることによって調製し，次いで複合体１７（５μＭ）で７２時間処理した。複合体１７で細胞を３日間処理した後，培地を回収した。その後，細胞を２ｍＬの新鮮なＥＳ培地で３回洗浄し，洗浄培地を回収した。培地試料を遠心分離し，蛍光強度（５２８ｎｍでの励起）を分析した。グラフの縦軸は蛍光強度を示し，横軸は波長（ｎｍ）を示す。

発明を実施するための形態

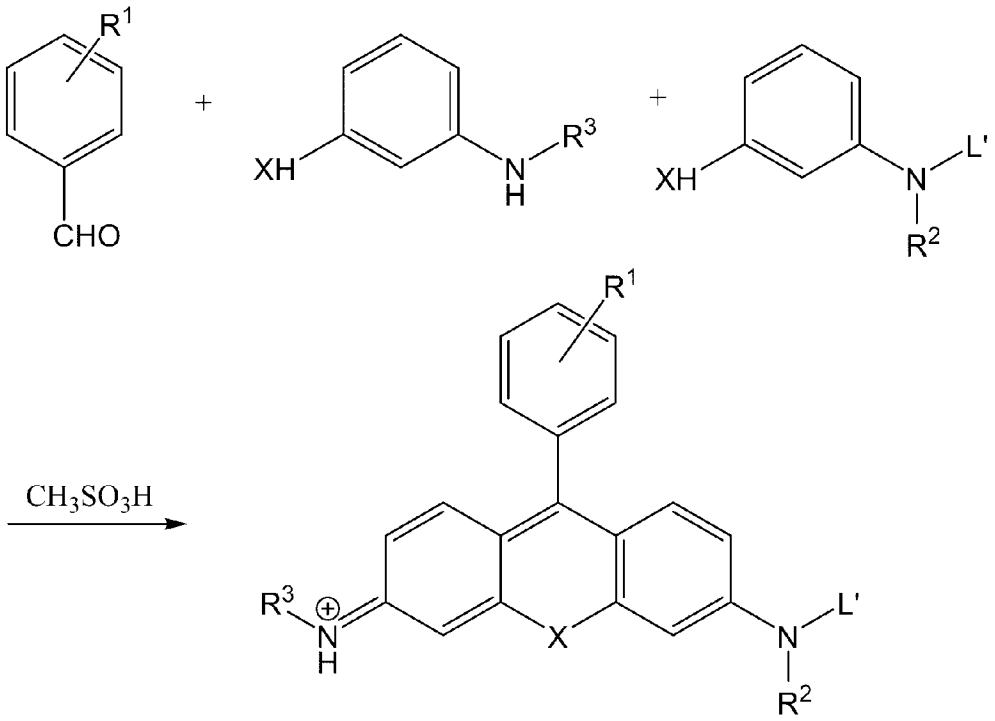
[0031]（本発明の化合物の製造方法）

本発明の化合物は，本願実施例における化合物１～１３の合成を参酌して，ＫＰ－１等由来の中間体を合成し，次いで，必要に応じてＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質由来の中間体を合成し，最後にＫＰ－１等の中間体とＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質またはそれ由来の中間体とを反応させることに

より製造することができる。

[0032] 例えば，本発明のＫＰ－１等由来の中間体は，以下の工程により合成することができる。

[0033] [化9]



［式中，Ｒ[1]，Ｒ[2]，Ｒ[3]，及びＸは，上記定義に従う。Ｌ’は，リンカーＬと同じ又はその一部であっても良い］

[0034] ＫＰ－１等の中間体とＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質との反応は，Ｌ’の末端の基，及びＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質が有する官能基の種類に応じて，適宜有機化学の分野で周知の方法で結合させることにより達成することができる。また，必要に応じて，Ｌ’の末端の基と結合しやすい基を予めＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質に導入して，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質由来の中間体を合成してから，ＫＰ－１等の中間体と反応させても良い。

[0035] （未分化細胞除去方法）

一態様において，本発明は，幹細胞を分化誘導した細胞集団に本発明の化合物を未分化細胞が死滅する時間接触させること，及び，残存した前記化合

物を洗浄により除去することを含む，幹細胞を分化誘導した後に残存する未分化細胞の除去方法に関する。

[0036] 本明細書において，「幹細胞」とは，多能性及び自己複製能を有する細胞を意味する。本明細書において，「多能性」とは，多分化能と同義であり，分化により複数の系統の細胞に分化可能な細胞の状態を意味する。本明細書における，多能性は，生体を構成する全ての種類の細胞に分化可能な状態（分化全能性（ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｃｙ）），胚体外組織を除く全ての種類の細胞に分化可能な状態（分化万能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ）），一部の細胞系列に属する細胞に分化可能な状態（分化多能性（ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｃｙ）），及び１種類の細胞に分化可能な状態（分化単能性（ｕｎｉｐｏｔｅｎｃｙ））を含む。よって，本明細書における「幹細胞」は，幹細胞，ＥＳ細胞，ｉＰＳ細胞，神経幹細胞，造血幹細胞，間葉系幹細胞，肝幹細胞，膵幹細胞，皮膚幹細胞，筋幹細胞，又は生殖幹細胞を含む。好ましくは，本明細書における「幹細胞」は，分化万能性を有する細胞であり，より好ましくは，胚性幹細胞（ＥＳ細胞）及び人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）である。ある細胞が幹細胞であるかどうかは，たとえば，体外培養系において胚様体（ｅｍｂｒｙｏｉｄ　ｂｏｄｙ）を形成する細胞，又は，分化誘導条件下で培養（分化処理）した後に所望の細胞に分化する細胞が幹細胞であるとして確認することができる。または，幹細胞であるかどうかは，生体を用いて，免疫不全マウスへ移植することにより奇形種（テラトーマ）を形成する細胞，胚盤胞への注入によりキメラ胚を形成する細胞，生体組織への移植や腹水への注入により増殖する細胞が幹細胞であるとして確認することができる。あるいは，幹細胞であるかどうかは，アルカリフォスファターゼ染色，ＳＳＥＡ３染色，ＳＳＥＡ４染色，ＴＲＡ－１－６０染色，及び／又はＴＲＡ－１－８１染色に陽性を示す細胞；ｏｃｔ３／４，ｎａｎｏｇ，ｓｏｘ２，ｃｒｉｐｔｏ，ｄａｘ１，ｅｒａｓ，ｆｇｆ４，ｅｓｇ１，ｒｅｘ１，ｚｆｐ２９６，ｕｔｆ１，ｇｄｆ３，ｓａｌｌ４，ｔｂｘ３，ｔｃｆ３，ｄｎｍｔ３ｌ，及び／又はｄｎｍｔ３ｂ遺伝子を発現している細胞；ｍｉＲ－

２９０，及び／又はｍｉＲ－３０２を発現している細胞が幹細胞であるとして確認することもできる。あるいは，ある細胞が幹細胞であるか否かは，例えば，テロメラーゼ逆転写酵素，又はサバイビンの発現レベルが高い細胞が幹細胞であるとして判定することができる。

[0037] 好ましくは，幹細胞は，生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し，かつ，増殖能をも併せもつ。該多能性幹細胞の例としては，胚性幹（ＥＳ）細胞，核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（「ｎｔＥＳ細胞」），生殖幹細胞（「ＧＳ細胞」），胚性生殖細胞（「ＥＧ細胞」），および人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞が挙げられるが，これらに限定されない。好ましい前記多能性幹細胞の例として，ＥＳ細胞，ｎｔＥＳ細胞，およびｉＰＳ細胞が挙げられる。

[0038] 本明細書において，「分化」とは，多能性細胞の分裂によって特定の機能的又は形態的特徴を有する娘細胞を生じる現象をいう。本明細書において「分化処理」及び「分化誘導処理」とは同義であり，幹細胞を分化細胞へと誘導させるための処理を意味する。細胞の分化は，様々な方法により誘導されることが報告されている。多能性細胞は，分化させる細胞の種類等に応じて，分化誘導物質などを利用した分化誘導処理により分化させることができる。既に多くの分化誘導方法が当業者に知られているが，例えば，特開２００２－２９１４６９に記載される神経幹細胞への分化誘導法，特開２００４－１２１１６５に記載される膵幹様細胞への分化誘導法，および特表２００３－５０５００６に記載される造血細胞への分化誘導法を挙げることができる。さらに，胚様体の形成による分化誘導法の例として，特表２００３－５２３７６６等に記載される方法等が挙げられる。「分化細胞」とは，分化して生じた特定の機能的又は形態的特徴を有する娘細胞を意味する。分化細胞は通常安定しており，その増殖能は低く，別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。

[0039] 「未分化細胞」とは，分化していない細胞，もしくは分化途中の未分化細胞，および分化が不完全な細胞を意味する。本明細書においては，特にその

ように解することが不整合である場合を除き，「未分化細胞」とは，分化誘導処理したにもかかわらず，分化細胞とならなかった細胞を意味する。本明細書における未分化細胞は必ずしも前述の幹細胞の性質を完全に有することを必要とするものではなく，分化細胞と比較して（自己）増殖能が高い（例えば，増殖速度が２倍以上，３倍以上，５倍以上，１０倍以上など）細胞を意味する。ある細胞が未分化細胞であるか否かは，例えば，ｃ－Ｍｙｃ等の未分化を示すマーカーが活性化している細胞，あるいは，テロメラーゼ逆転写酵素の発現レベルが高い細胞として判定することができる。本発明の未分化細胞除去方法において、未分化細胞はＡＢＣＢ１及び／又はＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている。

[0040] 幹細胞を分化誘導した細胞集団に本発明の化合物を接触させる時間は，未分化細胞が死滅する時間であれば特に制限されるものではないが，例えば，２４～１２０時間，３６～９６時間，又は７２時間とすることができる。細胞集団への化合物の接触は，通常の当該細胞の培養条件下に本発明の化合物を共存させることで行うことができる。

[0041] 未分化細胞を殺傷した後，残存した前記化合物の除去は，培地やＰＢＳによる洗浄等により簡便に達成することが出来る。洗浄は，２回以上行うことが好ましい。また，洗浄に使用した培地やＰＢＳをサンプルとして，蛍光強度を測定することにより，除去された化合物量を測定することができる。あるいは，回収した分化細胞の蛍光を直接測定することにより，残存化合物量を測定することができる。望ましくは，洗浄は，洗浄に使用した培地やＰＢＳをサンプル，及び／又は分化細胞における蛍光強度が，バックグラウンドと同程度となるまで行う。

[0042] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが，これは本発明の範囲を限定するものではない。なお，本願明細書全体を通じて引用する文献は，参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

実施例

[0043] （材料と方法）

化学試薬は，シグマアルドリッチジャパン株式会社，和光純薬株式会社，東京化成工業（ＴＣＩ）から購入し，そのまま使用した。化学合成のために使用した溶媒は，使用前に乾燥させた。高速液体クロマトグラフィーは，島津ＬＣ－２０１０Ｃ及び日立ＨＰＬＣシステム（Ｌ－７２６０　オートサンプラー，Ｌ－７１５０　ポンプ，Ｄ－７６００　インターフェース，Ｌ－７４１０　ＵＶ検出器）を用いて行った。マススペクトルは，島津ＬＣＭＳ－２０１０を用いてＥＳＩモードで記録した。３つの複合体の高分解能質量スペクトルは，ＪＥＯＬ　ＪＭＳ　ＬＧ－２０００をＦＡＢモードで使用して得た。溶液１Ｈ－ＮＭＲスペクトルはＪＥＯＬ　ＪＮＭ－ＥＣＰ　３００ＭＨｚまたはＪＥＯＬ　ＪＮＭ－ＥＣＡ　６００ＭＨｚのスペクトロメーターで収集した。蛍光スペクトルは，ＬＳ５５蛍光分光計（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ社）を用いて記録した。

[0044]（細胞培養）

ＫＢ３－１及びＫＢ３－１由来細胞（ＡＢＣＢ１を安定的に発現するＫＢ／ＡＢＣＢ１（Ｙ．Ｔａｇｕｃｈｉら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９７）３６：８８８３－８８８９），ＡＢＣＣ１を安定的に発現するＫＢ／ＡＢＣＣ１（Ｋ．Ｎａｇａｔａら，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ（２０００）２７５：１７６２６－１７６３０），及び，ＡＢＣＧ２を安定的に発現するＫＢ／ＡＢＣＧ２（Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ（２０１４）６：１１６５－１１７４．））を，１０％熱不活化ウシ胎児血清（Ｅｑｕｉｔｅｃｈ－Ｂｉｏ社，カーヴィル，テキサス州）および１％抗生物質（シグマアルドリッチ社，セントルイス，ミズーリ州）含有ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ，Ｇｉｂｃｏ社）中で培養した。ＳＮＬフィーダー細胞を，７％の熱不活化ウシ胎児血清（Ｅｑｕｉｔｅｃｈバイオ社，カーヴィル，テキサス州），１％のＬ－グルタミン（２００ｍＭ，ギブコ社），及び１％の抗生物質を含む，４．５ｇ／Ｌのグルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ高グルコース，ナカライテスク，日本）を含有する培地で培養した。ヒト体初代細胞を，セルシステムズ社から購入した，ＭＳＣＭ（気管支上

皮細胞），ＢＥＧＭ（副腎微小血管細胞），又はＣＳＣ（星状膠細胞，脳微小血管細胞，前立腺上皮細胞，及び肝細胞）中で培養した。ｈｉＰＳＣｓについては，ＳＮＬフィーダー細胞を播種したゼラチンプレコートディッシュ，および，４ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（リプロセル）を含むＥＳ霊長類培地（リプロセル）を定期的なメンテナンスのために使用した。全ての細胞を３７℃，５％CO_2の加湿インキュベーター中で維持した。

[0045]（部分的に分化したｈｉＰＳＣｓの調製）

ｈｉＰＳＣｓを２４時間継代培養した後，０．５μＭのオールトランスレチノイン酸を添加し，細胞を更に４８または７２時間インキュベートした。その後，部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを，被験化合物で７２時間処理した。

[0046]（細胞ベースアッセイ）

被験細胞を，１ウェルあたり５０００細胞となるように９６ウェルプレートに播種した。播種から２４時間後，被験化合物を様々な濃度で添加した。２４または７２時間インキュベーション後，細胞をＰＢＳで洗浄した。生存率（％）はＷＳＴ－８ベースの比色アッセイ（細胞計数キット－８，同仁化学）により決定した。４５０ｎｍにおける吸光度を測定し，ＩＣ５０を用量応答値に基づいて計算した。生存率（％）は，５０００細胞を播種した時の値を１００として求めた。トランスポーター阻害剤を用いた実験のため，シクロスポリンＡ（１０μＭ）またはＫｏ１４３（１０μＭ）を，被験化合物とのインキュベーションの１時間前に添加した。

[0047]（ｈｉＰＳＣ－コロニー形成アッセイ）

ヒトＥＳＣｓまたはｈｉＰＳＣｓを６ウェルプレートに播種し，７２時間増殖させた後，被験化合物で７２時間処理した。細胞を４％パラホルムアルデヒドで１時間固定し，ＰＢＳで２回洗浄し，１％クリスタルバイオレット溶液（シグマアルドリッチ社）で１５分間染色した。次いで，プレートをＰＢＳ及び蒸留水で３～５回洗浄し，画像を撮影する前に空気乾燥させた。定量のため，１％ＳＤＳ溶液を各ウェルに添加し，１５分間インキュベートし

た。溶出液の５７０ｎｍにおける吸光度を測定した。

[0048]（ＫＢ３－１細胞株およびｈｉＰＳＣコロニーの蛍光顕微鏡イメージング）

ＫＢ３－１とＫＢ３－１由来細胞株を１ウェルあたり５０００細胞となるように９６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ　１６５３０５，サーモフィッシャーサイエンティフィック社）上に播種した。細胞播種の２４時間後に被験化合物（１μＭまたは１０μＭ）を添加し，細胞を３７℃で２時間インキュベートした。処理した細胞をＰＢＳで洗浄し，１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥＭ中，レーザ励起波長４０５，４８８，及び５６１ｎｍの共焦点顕微鏡を使用して観察した（Ｃｅｌｌ　Ｖｏｙａｇｅｒ　１０００，横河電機株式会社）。定量分析は，蛍光強度を測定し，ＮＩＨ　ＩｍａｇｅＪ，バージョン１．３０をもちいて分析することにより行った。ｈｉＰＳＣｓ（クローン＃２０１Ｂ７）を，μ－ディッシュ（高さ３５ｍｍ，ｉｂｉｄｉ社）中のＳＮＬフィーダー細胞上に播種した。インキュベーション６日後に，ｉＰＳ細胞のドーナツ状のコロニーが得られた。コロニーをＫＰ－１（１μＭ），複合体１７（１μＭ），または複合体１８（１０μＭ）と共に，３７℃で２時間インキュベートした。処理した細胞をＰＢＳで洗浄し，４ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含むＥＳ霊長類培地中で観察した。蛍光イメージングは，レーザー励起波長４０５，４８８，および５６１ｎｍの共焦点顕微鏡（Ｃｅｌｌ　Ｖｏｙａｇｅｒ　１０００，横河電機株式会社）を用いて撮影した。

[0049]（チューブリン重合アッセイ）

チューブリン重合アッセイキットは，Ｃｙｔｏｓｋｅｌｅｔｏｎ（ＢＫ００６Ｐ）から購入し，製造業者の指示に従ってアッセイを行った。各成分の最終濃度は，ＰＩＰＥＳ（ｐＨ６．９）　８０ｍＭ，$MgCl_2$　２ｍＭ，ＥＧＴＡ　０．５ｍＭ，グリセロール　１０．２％，ＧＴＰ　１ｍＭ，及びチューブリン　３ｍｇ／ｍＬであった。反応系を，チューブリンを含有しない状態で３７℃に予備加温し，次いでチューブリンの添加により反応を開始した。チューブリンの添加直後，及び，その後１分間隔で６０分間，３４０ｎｍにおける吸収をＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ５（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅ

ｖｉｃｅｓ社）を用いて測定した。ＣＡ４およびタキソールを陽性対照として用い，分子１４及びＤＭＳＯ単独を陰性対照として用いた。

[0050]（アルカリホスファターゼアッセイ）

ｈｉＰＳＣｓのアルカリフォスファターゼ活性は，アルカリフォスファターゼ基質キット（ＳＫ－５３００，Ｖｅｃｔｏｒ（登録商標）ブルー）を用いて測定した。ｈｉＰＳＣコロニーと部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを上述の方法で調製した。次いで，細胞をＳＫ－５３００で処理し，室温で１時間インキュベートして洗浄し，最後にＰＢＳ緩衝液中で維持した。

[0051]（定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ＱＰＣＲ））

オールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間インキュベートすることにより部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを調製した後，被験化合物と共に７２時間処理した。トータルｍＲＮＡをＩＳＯＧＥＮ（株式会社ニッポンジーン）を用いて単離し，ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ（宝酒造社）を用いてｃＤＮＡを合成した。ＱＰＣＲは，高速ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎマスターミックスを用い，７５００ＦａｓｔリアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）で行った。プライマー配列を以下の表１に示す。

[0052] [表1]

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
NANOG	CCTGTGATTTGTGGGCCTGA	CTCTGCAGAAGTGGGTTGTTTG
Oct3/4	TTCAGCCAAACGACCATCTG	CACGAGGGTTTCTGCTTTGC
Sox2	CCCACCTACAGCATGTCCTACTC	TGGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC

[0053]（トポイソメラーゼＩ阻害アッセイ）

複合体１７のトポイソメラーゼＩが阻害活性は，スーパーコイルＤＮＡ緩

和アッセイにより試験した。スーパーコイルＤＮＡ（ＴｏｐｏＧＥＮ社）を，複合体１７（０，１，若しくは１０μＭ）又は対照としてＳＮ３８（０，１，若しくは１０μＭ）と予め混合された，組換えヒトトポイソメラーゼＩ（野生型タンパク質，ＴｏｐｏＧＥＮ社）と共に３７℃で３０分間インキュベートした。反応を停止緩衝液（ＴｏｐｏＧＥＮ社）で終了させ，反応混合物を１％アガロースゲルにロードした。電気泳動後，ゲルを，ＴＡＥ緩衝液中の臭化エチジウムで染色し，ＵＶ照明下で撮影した。

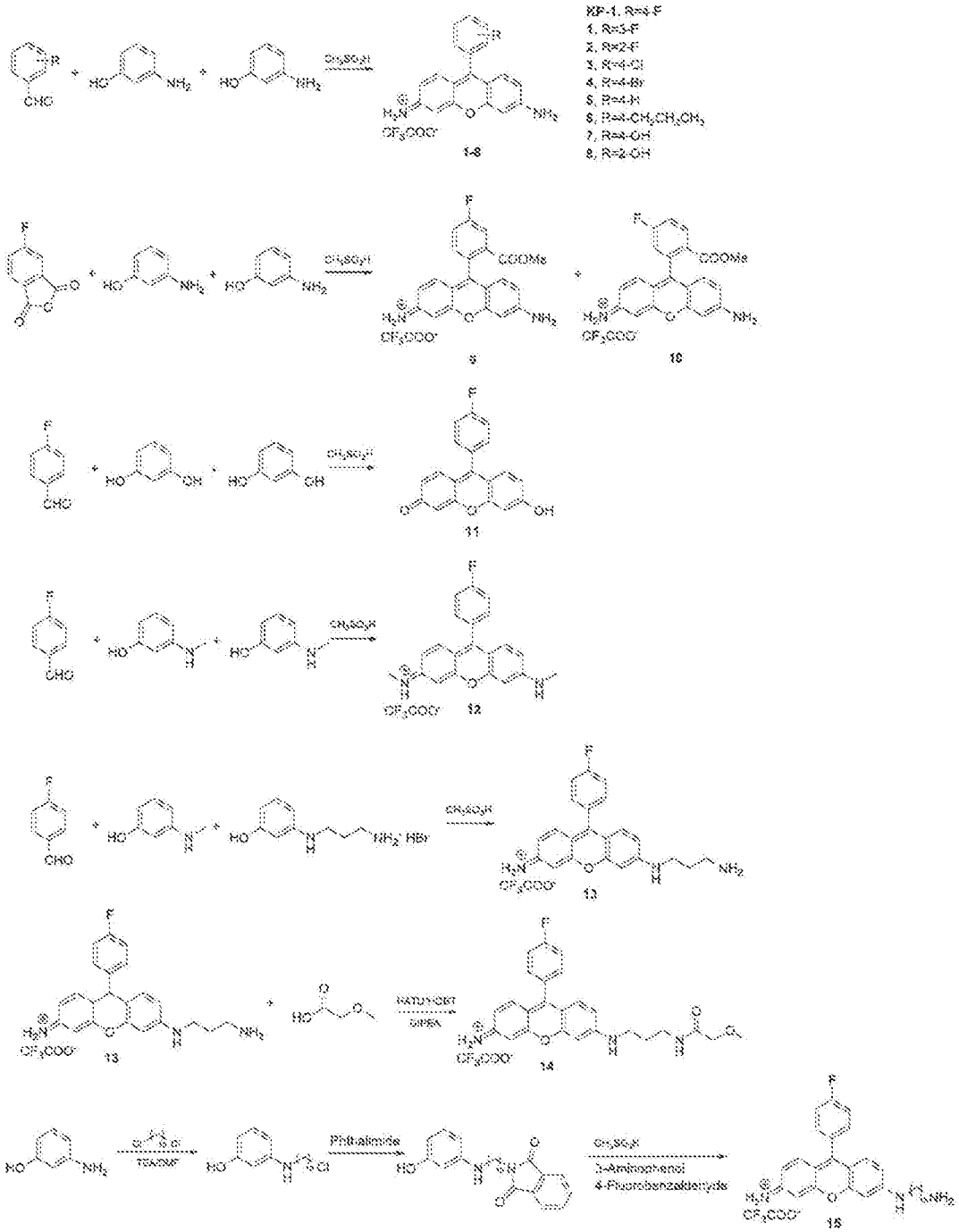
[0054]（複合体１７の除去）

オールトランスレチノイン酸（０．５μＭ）と共に４８時間インキュベートすることにより部分的に分化したｈｉＰＳＣｓを調製し，その後複合体１７（５μＭ）で７２時間処理した。複合体１７で細胞処理した３日後，培地を回収した。細胞を２ｍｌの新鮮なＥＳ培地で３回洗浄し，洗浄培地を回収した。得られた培地試料を遠心分離し，蛍光強度（励起波長５２８ｎｍ）を分析した。

[0055]（化合物１～１５の合成）

[0056]

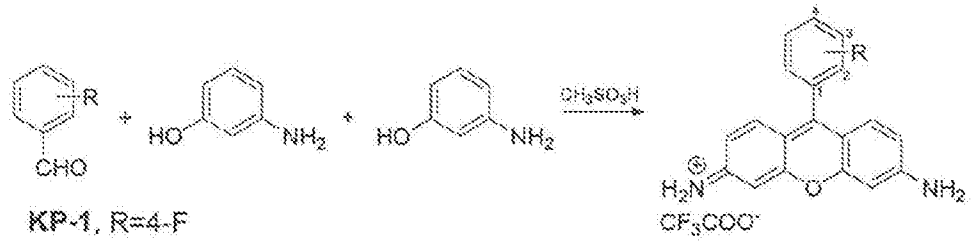
[化10]



（実施例１）化合物１～８の合成

[0057]

[化11]



KP-1, R=4-F
1, R=3-F
2, R=2-F
3, R=4-Cl
4, R=4-Br
5, R=4-H
6, R=4-$CH_2CH_2CH_3$
7, R=4-OH
8, R=2-OH

[0058] 化合物１－８は，いずれも以下の方法に従って合成した。３－アミノフェノール（３．０当量）および置換されたベンズアルデヒド（１．０当量）のメタンスルホン酸懸濁液を１３０℃で２４時間撹拌した。次いで，反応混合物を周囲温度まで冷却し，氷水で希釈し，K_2CO_3で約ｐＨ６となるように調整して濾過した。沈殿物を水で洗浄し，メタノールに溶解して減圧下で濃縮した。残留物をＨＰＬＣにより精製した（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０）。

[0059] 化合物１．紫色の油状物．収率：０．５％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．７２－７．６４（ｍ，１Ｈ），７．４４－７．３９（ｍ，１Ｈ），７．２９－７．２４（ｍ，４Ｈ），６．８６（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２　Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｄ，Ｊ＝２．２　Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝３０５［Ｍ］＋

[0060] 化合物２．紫色の油状物．収率：０．６％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．７６－７．６９（ｍ，１Ｈ），７．５１－７．４０（ｍ，３Ｈ），７．２３（ｄｄ，Ｊ＝６．３，１．１　Ｈｚ，２Ｈ），６．８７（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２　Ｈｚ，２Ｈ），６．８３（ｄ，Ｊ＝２．２　Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝３０５［Ｍ］＋

[0061] 化合物３．紫色の油状物．収率：１．８％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ

，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．６８（ｄｄ，Ｊ＝５．５，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），７．４６（ｄｄ，Ｊ＝６．５，２．１ Ｈｚ，２Ｈ），７．２８（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），６．８７（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３２１［Ｍ］＋

[0062] 化合物４．紫色の油状物．収率：１．５ ％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．８４（ｄｄ，Ｊ＝６．６，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），７．３９（ｄｄ，Ｊ＝６．６，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），７．２８（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），６．８６（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．８１（ｄ，Ｊ＝２．２ Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３６５［Ｍ］＋

[0063] 化合物５．紫色の油状物．収率：１．３％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．６７－７．６４（ｍ，３Ｈ），７．４７－７．４４（ｍ，２Ｈ），７．２９（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），６．８６（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｄ，Ｊ＝１．９ Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝２８７［Ｍ］＋

[0064] 化合物６．紫色の油状物．収率：０．７％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．４９（ｄ，Ｊ＝８．３ Ｈｚ，２Ｈ），７．３８（ｄｄ，Ｊ＝８．３，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），７．２９（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），６．８５（ｄｄ，Ｊ＝９．１，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｄ，Ｊ＝２．２ Ｈｚ，２Ｈ），２．７６（ｔ，Ｊ＝７．７ Ｈｚ，２Ｈ），１．８２－１．７０（ｍ，２Ｈ），１．０３（ｔ，Ｊ＝７．４ Ｈｚ，３Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３２９［Ｍ］＋

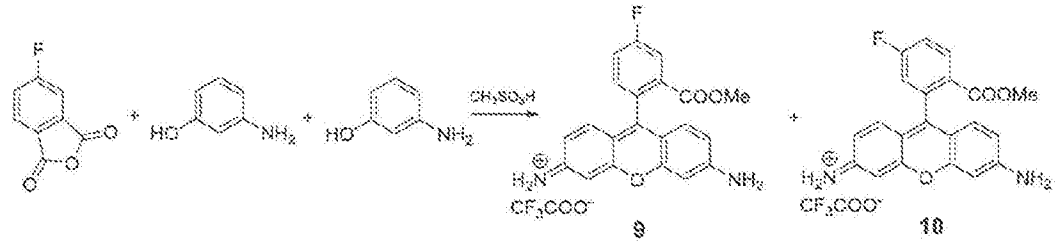
[0065] 化合物７．紫色の油状物．収率：０．２％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．４４（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），７．３１（ｄｄ，Ｊ＝６．６，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），７．０５（ｄｄ，Ｊ＝６．６，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），６．８６（ｄｄ，Ｊ＝９．１，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），６．８０（ｄ，Ｊ＝２．２ Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３

０３［Ｍ］＋

[0066] 化合物８．紫色の油状物．収率：０．２％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．４２（ｄ，Ｊ＝８．７ Ｈｚ，２Ｈ），７．３１（ｄｄ，Ｊ＝６．６，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），７．０５（ｄｄ，Ｊ＝６．６，１．９ Ｈｚ，２Ｈ），６．８５（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．７８（ｄ，Ｊ＝２．２ Ｈｚ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３０３［Ｍ］＋

[0067]（実施例２）化合物９及び１０の合成

[0068] [化12]



[0069] ５－フルオロ－１，３－イソベンゾフランジオン（５－ｆｌｕｏｒｏ－１，３－ｉｓｏｂｅｎｚｏｆｕｒａｎｄｉｏｎｅ）（４９８ｍｇ，３ｍｍｏｌ）および３－アミノフェノール（９８２ｍｇ，９ｍｍｏｌ）のメタンスルホン酸（９ｍＬ）懸濁液を１３０℃で２４時間撹拌した。周囲温度まで冷却した後，メタノール（２５ｍＬ）を反応物に添加し，一晩還流した。次いで，反応混合物を周囲温度まで冷却し，氷水で希釈し，K_2CO_3で約ｐＨ６に調整した後，濾過した。沈殿物を水で洗浄してからメタノールに溶解し，減圧下で濃縮した。残留物をＨＰＬＣにより精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），０．９ｍｇの化合物９と，紫色の油状物として０．８ｍｇの化合物１０を得た。

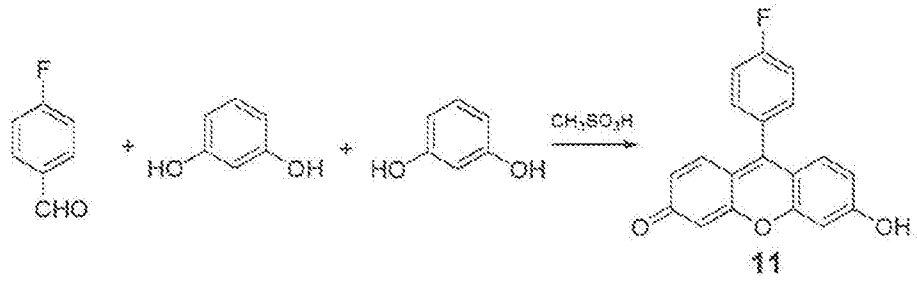
[0070] 化合物９．紫色の油状物．収率：０．８％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ８．０６（ｄｄ，Ｊ＝９．６，２．１ Ｈｚ，１Ｈ），７．６６（ｄｄｄ，Ｊ＝８．１，８．１，２．８ Ｈｚ，１Ｈ），７．４９（ｄｄ，Ｊ＝８．９，５．５ Ｈｚ，１Ｈ），７．２２（ｄ，Ｊ＝８．９

Ｈｚ，２Ｈ），７．１５（ｄ，Ｊ＝２．１　Ｈｚ，１Ｈ），６．９９（ｄｄ，Ｊ＝９．０，２．０　Ｈｚ，１Ｈ），６．９６（ｄｄ，Ｊ＝９．６，２．０　Ｈｚ，１Ｈ），６．９２（ｄ，Ｊ＝２．０　Ｈｚ，２Ｈ），３．６５（ｓ，３Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝３６３［Ｍ］＋

[0071] 化合物１０．紫色の油状物．収率：０．７％．１Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　８．４０（ｄｄ，Ｊ＝８．９，５．５　Ｈｚ，１Ｈ），７．５７（ｄｄｄ，Ｊ＝８．３，８．３，２．８　Ｈｚ，１Ｈ），７．３２（ｄｄ，Ｊ＝８．３，２．８　Ｈｚ，１Ｈ），７．２３（ｄ，Ｊ＝９．６　Ｈｚ，２Ｈ），７．１６（ｄ，Ｊ＝２．１　Ｈｚ，１Ｈ），６．９９（ｄｄ，Ｊ＝９．６，２．１　Ｈｚ，１Ｈ），６．９７（ｄｄ，Ｊ＝９．６，２．１　Ｈｚ，１Ｈ），６．９２（ｄ，Ｊ＝２．１　Ｈｚ，１Ｈ），３．６２（ｓ，３Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝３６３［Ｍ］＋

[0072] （実施例３）化合物１１の合成

[0073] [化13]



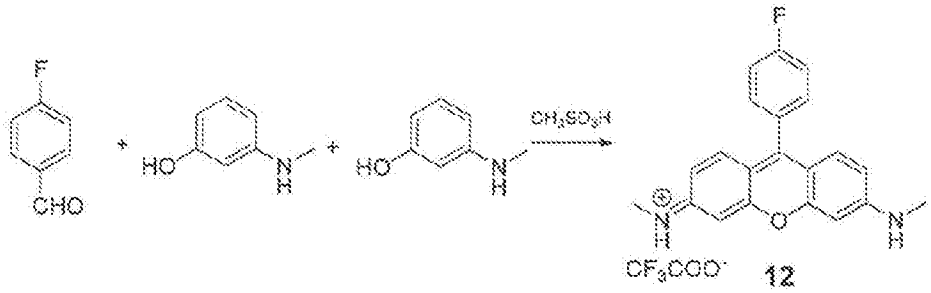
11

[0074] レゾルシノール（１．３２ｇ，１２ｍｍｏｌ）および４－フルオロベンズアルデヒド（４２２μＬ，４ｍｍｏｌ）のメタンスルホン酸（１２ｍＬ）懸濁液を１３０℃で２４時間撹拌した。次いで，反応混合物を周囲温度まで冷却してから氷水で希釈し，K_2CO_3で約ｐＨ６に調整した後，濾過した。沈殿物を水で洗浄し，メタノールに溶解し，減圧下で濃縮した。残留物をＨＰＬＣで精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１から１：０），紫色の油状物として３ｍｇの化合物１１を得た。収率：０．１％。

[0075] １Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．７０－７．６１（ｍ，４Ｈ）；７．５１－７．４８（ｍ，２Ｈ），７．２４－７．１５（ｍ，４Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３０７［Ｍ＋Ｈ］＋

[0076] （実施例４）化合物１２の合成

[0077] [化14]



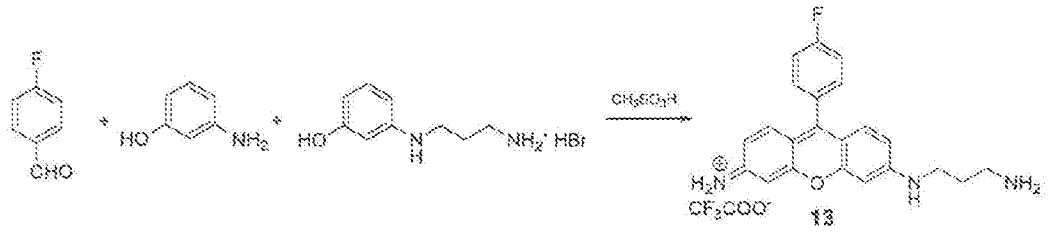
[0078] ３－（メチルアミノ）フェノール（４１１ｍｇ，３．３ｍｍｏｌ）および４－フルオロベンズアルデヒド（１７６μＬ，１．６７ｍｍｏｌ）のメタンスルホン酸（１１ｍＬ）懸濁液を，１３０℃で２４時間撹拌した。次いで，反応混合物を周囲温度に冷却してから氷水で希釈し，K_2CO_3により約ｐＨ６に調整した後濾過した。沈殿物を水で洗浄してからメタノールに溶解し，減圧下で濃縮した。残留物をＨＰＬＣにより精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），紫色の油状物として２３ｍｇの化合物１２を得た。収率：３．１％

[0079] １Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．４８－７．３６（ｍ，２Ｈ）；７．２１（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），７．０４－６．９０（ｍ，２Ｈ），６．８３（ｄｄ，Ｊ＝９．３，１．７ Ｈｚ，２Ｈ），６．６９（ｓ，２Ｈ），２．９９（ｓ，６Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝３３３［Ｍ］＋

[0080] （実施例５）化合物１３の合成

[0081]

[化15]

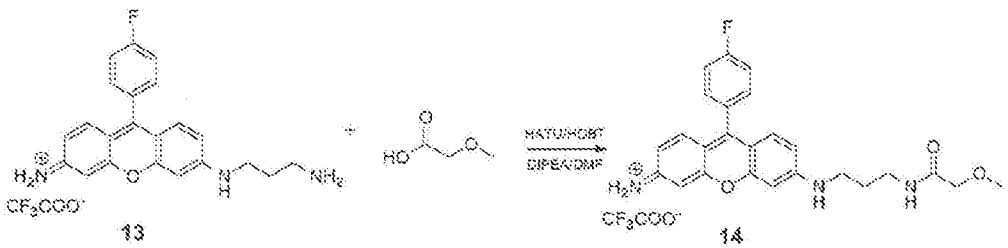


[0082] ３－（（３－アミノプロピル）アミノ）フェノール臭化水素酸塩（２．５ｇ，１０ｍｍｏｌ）（Ｆｉｒｍｉｎｏ，Ａ．Ｄ．Ｇ．；Ｇｏｎｃａｌｖｅｓ，Ｍ．Ｓ．Ｔ．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．２０１２，５３，４９４６．），３－アミノフェノール（１．１ｇ，１０ｍｍｏｌ），及び４－フルオロベンズアルデヒド（７１０μＬ，６．７ｍｍｏｌ）のメタンスルホン酸（２５ｍＬ）懸濁液を１３０℃で２４時間撹拌した。次いで，反応混合物を周囲温度まで冷却してから氷水で希釈し，K_2CO_3で約ｐＨ６に調整した後，濾過した。沈殿物を水で洗浄してからメタノールに溶解し，減圧下で濃縮した。残留物をＨＰＬＣで精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），紫色の油状物として１５０ｍｇの化合物１３を得た。収率：４．７％。

[0083] １Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．５３－７．４８（ｍ，２Ｈ）；７．４５－７．３９（ｍ，２Ｈ），７．３１（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．２　Ｈｚ，２Ｈ），６．９３－６．９０（ｍ，２Ｈ），６．８６（ｄｄ，Ｊ＝１０．４，２．２　Ｈｚ，２Ｈ），３．５１（ｔ，Ｊ＝７．１　Ｈｚ，２Ｈ），３．０９（ｔ，Ｊ＝７．７　Ｈｚ，２Ｈ），２．１２－２．００（ｍ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝３６２［Ｍ］＋

[0084] （実施例６）化合物１４の合成

[0085] [化16]

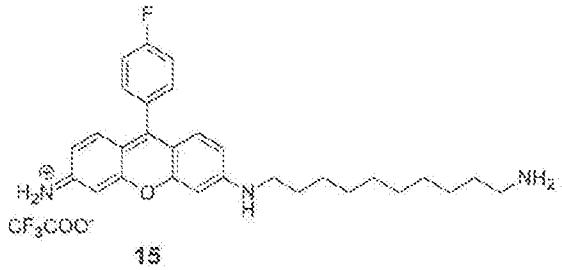


[0086] 化合物１３（２０ｍｇ，４２μｍｏｌ）の乾燥ＤＭＦ（６００μＬ）溶液に，２－メトキシ酢酸（３．８ｍｇ，４２μｍｏｌ），ＨＡＴＵ（１９ｍｇ，５４μｍｏｌ），ＨＯＢＴ（７ｍｇ，５４μｍｏｌ），およびＤＩＰＥＡ（２０ｍｇ，１５５μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で３時間撹拌した。反応終了後，混合物をメタノールで希釈し，ＨＰＬＣで精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），紫色の油状物として８．８　ｍｇの化合物１４を得た。収率：３８．３％。

[0087] １Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．５２－７．４８（ｍ，２Ｈ）；７．４４－７．３８（ｍ，２Ｈ），７．２９（ｄｄ，Ｊ＝９．１，１．１　Ｈｚ，２Ｈ），６．８８－６．８２（ｍ，４Ｈ），３．８９（ｓ，２Ｈ），３．４４－３．３３（ｍ，７Ｈ），１．８７－１．９７（ｍ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝４３４［Ｍ］＋

[0088] （実施例７）化合物１５の合成

[0089] [化17]



15

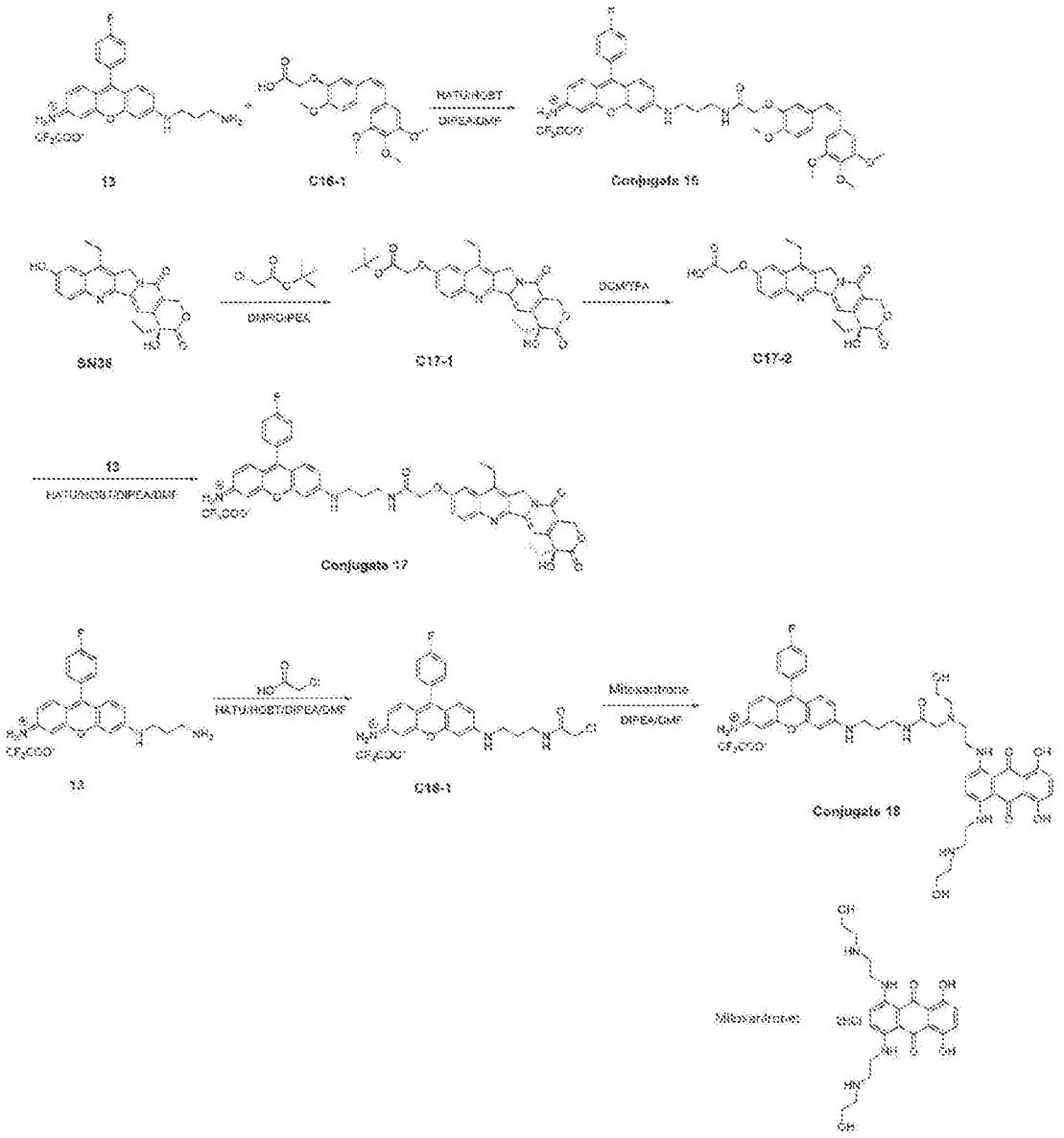
[0090] 化合物１５は既に報告された方法により合成した（Ｈｉｒａｔａ，Ｎ．ら，Ｍ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ（２０１４）６，１１６５．）。紫色の油状物。収率：２．４％。

[0091] １Ｈ－ＮＭＲ（６００　ＭＨｚ，ａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ－ｄ４）　δ　７．５１（ｄｄ，Ｊ＝８．９，５．５　Ｈｚ，２Ｈ），７．４０（ｄｄ，Ｊ＝８．９，８．９　Ｈｚ，２Ｈ），７．３１（ｄ，Ｊ＝８．９　Ｈｚ，２Ｈ），６．９８－６．９３（ｍ，４Ｈ），３．４０（ｍ，２Ｈ），３．０４（ｍ，２Ｈ），１．７４－１．６７（ｍ，２Ｈ），１．４４－１．３２（ｍ，１

４Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝４６０［Ｍ］＋

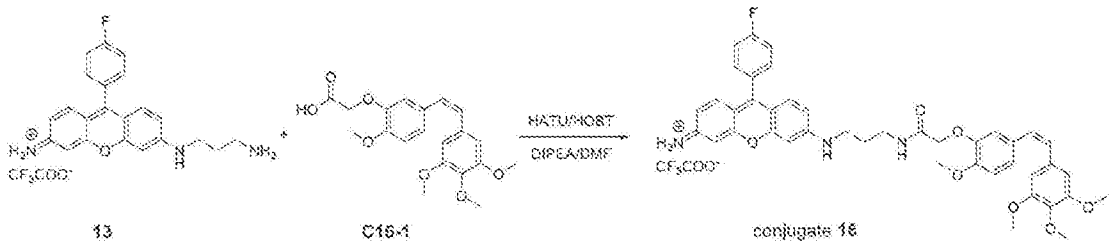
[0092]（複合体１６～１８の合成）

[0093][化18]



[0094]（実施例８）複合体１６の合成

[0095][化19]

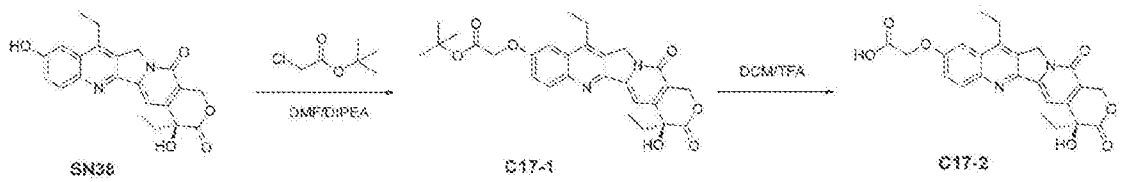


[0096] 化合物１３（１８ｍｇ，３７μｍｏｌ）の乾燥ＤＭＦ（６００μｌ）溶液に，Ｃ１６－１（Ｋａｍａｌ，Ａ．；Ｍａｌｌａｒｅｄｄｙ，Ａ．；Ｊａｎａｋｉ Ｒａｍａｉａｈ，Ｍ．；Ｐｕｓｈｐａｖａｌｌｉ，Ｓ．Ｎ．；Ｓｕｒｅｓｈ，Ｐ．；Ｋｉｓｈｏｒ，Ｃ．；Ｍｕｒｔｙ，Ｊ．Ｎ．；Ｒａｏ，Ｎ．Ｓ．；Ｇｈｏｓｈ，Ｓ．；Ａｄｄｌａｇａｔｔａ，Ａ．；Ｐａｌ－Ｂｈａｄｒａ，Ｍ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０１２，５６，１６６．）（１４ｍｇ，３７μｍｏｌ），ＨＡＴＵ（１６ｍｇ，４１μｍｏｌ），ＨＯＢＴ（６ｍｇ，４１μｍｏｌ），およびＤＩＰＥＡ（１６ｍｇを，１２４μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で３時間撹拌した。反応終了後，混合物をメタノールで希釈し，ＨＰＬＣにより精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），紫色の油状物として１４ｍｇの複合体１６を得た。収率：４４．４％。

[0097] １Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ７．５０－７．３７（ｍ，４Ｈ），７．２７（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，１Ｈ），７．２４－７．１５（ｍ，１Ｈ），６．９２（ｓ，２Ｈ），６．８９－６．８２（ｍ，３Ｈ），６．７８（ｄｄ，Ｊ＝８．２，２．２ Ｈｚ，２Ｈ），６．５０－６．４３（ｍ，４Ｈ），４．３５（ｓ，２Ｈ），３．８３（ｓ，３Ｈ），３．６９（ｓ，３Ｈ），３．５９（ｓ，６Ｈ），３．４１－３．３４（ｍ，４Ｈ），１．９４－１．８９（ｍ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝７１８［Ｍ］＋；ＨＲＭＳ（ＦＡＢ） ｃａｌｃｄ ｆｏｒ［Ｍ］＋ ｍ／ｚ＝７１８．２９２３，ｆｏｕｎｄ ７１８．２９４６．

[0098] （実施例９）複合体１７の合成

[0099] [化20]

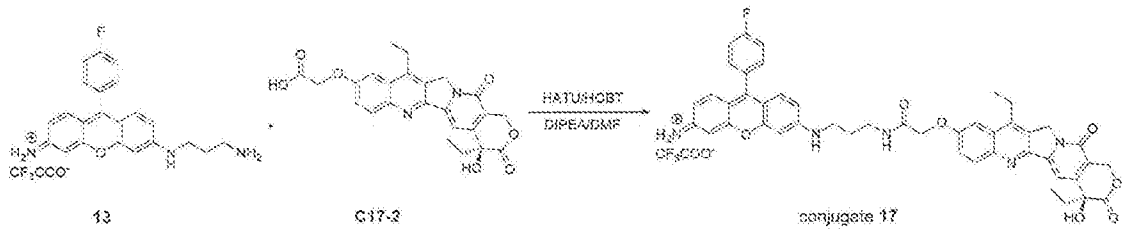


[0100] ＳＮ３８（３０ｍｇ，７６μｍｏｌ），ｔｅｒｔ－ブチルクロロ酢酸（４

６ｍｇ，３０７ｍｍｏｌ），およびＤＩＰＥＡ（６５ｍｇ，５０４μｍｏｌ）のＤＭＦ（１．５ｍＬ）懸濁液を７０℃で４８時間撹拌した。溶媒を真空除去し，残留物をフラッシュカラム（ＤＣＭ：メタノール＝２０：１）により精製して，黄色固体として３０ｍｇのＣ１７－１を得た。Ｃ１７－１（１１ｍｇ，２２μｍｏｌ）のＤＣＭ（５００μＬ）溶液に，トリフルオロ酢酸（５００μｌ）を滴下した。反応混合物を室温で一晩撹拌した後，メタノールで希釈し，ＨＰＬＣで精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０），黄色固体として５．５ｍｇのＣ１７－２を得た。２ステップの収率：４３．３％。

[0101] １Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．９９（ｄ，Ｊ＝９．１　Ｈｚ，１Ｈ），７．５４（ｓ，１Ｈ），７．４９（ｄｄ，Ｊ＝９．４，２．８　Ｈｚ，１Ｈ），７．３４（ｄ，Ｊ＝２．５　Ｈｚ，１Ｈ），５．５５（ｄ，Ｊ＝１６　Ｈｚ，１Ｈ），５．３５（ｄ，Ｊ＝１６　Ｈｚ，１Ｈ），５．１６（ｓ，２Ｈ），４．８６（ｓ，２Ｈ），３．１４（ｑ，Ｊ＝７．７　Ｈｚ，２Ｈ），１．９４（ｑ，Ｊ＝７．１　Ｈｚ，２Ｈ），１．３６（ｔ，Ｊ＝７．４　Ｈｚ，３Ｈ），１．００（ｔ，Ｊ＝７．４　Ｈｚ，３Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝４５１［Ｍ＋Ｈ］＋

[0102] [化21]



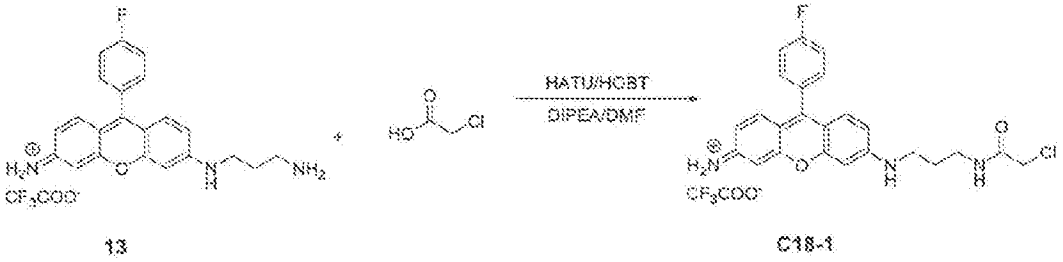
[0103] 化合物１３（１０ｍｇ，２１μｍｏｌ）の乾燥ＤＭＦ（６００μｌ）溶液に，Ｃ１７－２（１２ｍｇ，２１μｍｏｌ），ＨＡＴＵ（８．８ｍｇ，２３μｍｏｌ），ＨＯＢＴ（４ｍｇ，２３μｍｏｌ），及びＤＩＰＥＡ（１３．５ｍｇ，１０５μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で３時間撹拌した。反応終了後，混合物をメタノールで希釈し，ＨＰＬＣにより精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2

０＝０：１～１：０），紫色の油状物として５ｍｇの複合体１７を得た。収率：２６．２％。

[0104] １Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ８．０３（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，１Ｈ），７．５７（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），７．３８（ｂｒｓ，４Ｈ），７．２８（ｓ，２Ｈ），７．０９（ｄ，Ｊ＝９．３ Ｈｚ，２Ｈ），６．６７（ｄ，Ｊ＝８．８ Ｈｚ，２Ｈ），６．５５（ｄ，Ｊ＝１．７ Ｈｚ，２Ｈ），５．４２（ｂｒｓ，１Ｈ），５．２６（ｂｒｓ，１Ｈ），５．１６－５．０５（ｍ，２Ｈ），４．８３（ｓ，２Ｈ），３．６４（ｂｒｓ，２Ｈ），３．１３－２．８５（ｍ，６Ｈ），１．９３（ｂｒｓ，４Ｈ），１．３８（ｔ，Ｊ＝７．４ Ｈｚ，３Ｈ），０．８９（ｂｒｓ，３Ｈ）；ＥＳＩＭＳ ｍ／ｚ＝７９４［Ｍ］＋；ＨＲＭＳ（ＦＡＢ） ｃａｌｃｄ ｆｏｒ［Ｍ］＋ｍ／ｚ＝７９４．２９８５，ｆｏｕｎｄ ７９４．２９６２．

[0105] （実施例１０）複合体１８の合成

[0106] [化22]

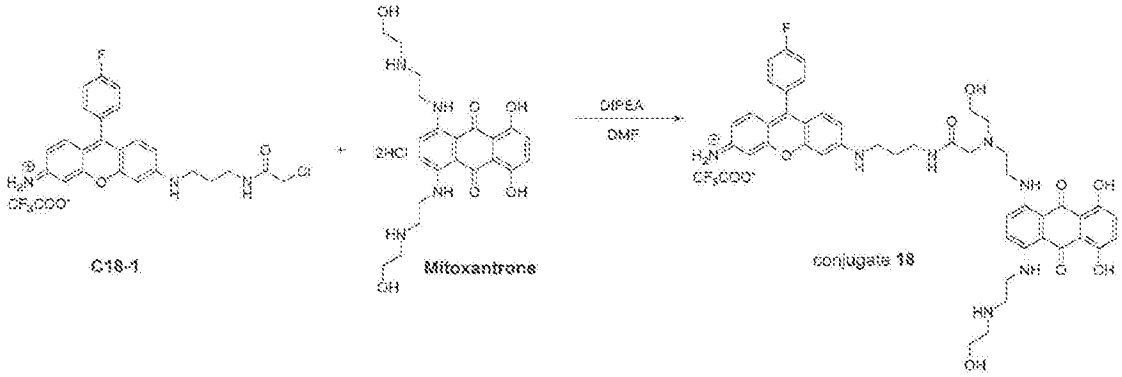


[0107] 化合物１３（３０ｍｇ，６３μｍｏｌ）の乾燥ＤＭＦ（６００μＬ）溶液に，クロロ酢酸（６ｍｇ，６３μｍｏｌ），ＨＡＴＵ（２６．３ｍｇ，６９μｍｏｌ），ＨＯＢＴ（９．４ｍｇ，７１μｍｏｌ），及びＤＩＰＥＡ（２６．７ｍｇ，２０７μｍｏｌ）を添加した。反応混合物を室温で３時間撹拌した。反応終了後，混合物をメタノールで希釈し，ＨＰＬＣ（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－H_2O＝０：１～１：０）で精製し，紫色の油状物として１２ｍｇのＣ１８－１を得た。収率：３４．６％。

[0108] １Ｈ－ＮＭＲ（３００ ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ） δ ７．５６－７．４８

（ｍ，２Ｈ），７．４４－７．３８（ｍ，２Ｈ），７．２９（ｄｄ，Ｊ＝９．１，２．５　Ｈｚ，２Ｈ），６．８９－６．８２（ｍ，４Ｈ），４．０６（ｓ，２Ｈ），３．４９－３．３２（ｍ，４Ｈ），１．９５－１．９１（ｍ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝４３８［Ｍ］＋

[0109] [化23]



[0110] Ｃ１８－１（１２ｍｇ，２２μｍｏｌ），ミトキサントロン二塩酸塩（２２．８ｍｇ，４４μｍｏｌ），およびＤＩＰＥＡ（５６．４ｍｇを，４４０μｍｏｌ）のＤＭＦ（３００μＬ）懸濁液を４０℃で２４時間撹拌した。次いで，反応混合物を周囲温度に冷却し，メタノールで希釈し，ＨＰＬＣにより精製し（Ｉｎｅｒｔｓｉｌ　ＯＤＳ－３，メタノール：０．１％（ｖ／ｖ），ＴＦＡ－$Ｈ_2Ｏ$＝０：１～１：０），濃い紫色の油状物として，９．９ｍｇの複合体１８を得た。収率：４６．９％。

[0111] １Ｈ－ＮＭＲ（３００　ＭＨｚ，ＣＤ３ＯＤ）　δ　７．４８－７．３５（ｍ，６Ｈ），７．１６－６．９４（ｍ，４Ｈ），６．７４－６．６６（ｍ，２Ｈ），６．４９（ｓ，１Ｈ），６．４２（ｓ，１Ｈ），４．１３（ｓ，２Ｈ），３．９７（ｓ，２Ｈ），３．９２（ｂｒｔ，Ｊ＝４．７　Ｈｚ，２Ｈ），３．８２－３．７９（ｍ，６Ｈ），３．７２（ｂｒｓ，２Ｈ），３．５３（ｂｒｓ，２Ｈ），３．４７（ｂｒｓ，２Ｈ），３．３８（ｂｒｓ，２Ｈ），１．９３（ｂｒｓ，２Ｈ）；ＥＳＩＭＳ　ｍ／ｚ＝８４６［Ｍ］＋；ＨＲＭＳ（ＦＡＢ）　ｃａｌｃｄ　ｆｏｒ［Ｍ］＋　ｍ／ｚ＝８４６．３６２１，ｆｏｕｎｄ　８４６．３６１１．

[0112] （実施例１１）細胞障害性抗がん剤のトランスポーター選択性比較

細胞障害性抗がん剤として，ＳＮ３８，Ｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，９－ｎｉｔｒｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，７－ｅｔｈｙｌｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ，Ｍｉｔｏｍｙｃｉｎ Ｃ，５－ＦＵｄＲ，Ｄａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ，Ｔａｘｏｌ，及びＶｉｎｂｌａｓｔｉｎを用いた。ＫＢ３－１及びＫＢ３－１由来細胞（ＫＢ／ＡＢＣＢ１，ＫＢ／ＡＢＣＣ１，及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞を用いて，上述の（細胞ベースアッセイ）を行い，各化合物のＩＣ５０値を求めた（ｎ≧２）。

[0113] 結果を表２に示す。ＫＢ３－１は薬剤耐性のないコントロールを示す。７－ｅｔｈｙｌｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ及びＭｉｔｏｍｙｃｉｎ Ｃに対しては，いずれの細胞も耐性を示さなかった。Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ，Ｔａｘｏｌ，及びＶｉｎｂｌａｓｔｉｎは，ＫＢ／ＡＢＣＢ１が耐性を示した。ＳＮ３８，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，９－ｎｉｔｒｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，及び５－ＦＵｄＲは，ＫＢ／ＡＢＣＧ２が耐性を示した。Ｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ及びＥｔｏｐｏｓｉｄｅは，ＫＢ／ＡＢＣＢ１及びＫＢ／ＡＢＣＣ１が耐性を示した。Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅは，ＫＢ／ＡＢＣＣ１及びＫＢ／ＡＢＣＧ２が耐性を示した。Ｂ／ＡＢＣＢ１及びＫＢ／ＡＢＣＧ２が耐性を示す化合物は見出せなかった。

[0114]

[表2]

細胞傷害性抗癌剤	細胞株			
	KB3-1	KB/ABCB1	KB/ABCC1	KB/ABCG2
SN38	0.42	0.54	0.78	4.7
Camptothecin	0.11	0.37	0.4	0.18
9-Aminocamptothecin	0.4	0.2	0.4	4.5
9-nitrocamptothecin	0.8	0.6	0.7	2.3
7-ethylcamptothecin	0.8	0.5	0.7	1.7
Doxorubicin	0.39	5.23	0.58	0.29
Mitoxantrone	0.19	0.4	0.94	1.15
Etoposide	5.6	32.7	42.1	4.8
Mitomycin C	1.4	1.9	1.3	0.9
5-FUdR	4	10.3	10.6	23.2
Dactinomycin	0.01	0.09	0.01	0.004
Taxol	0.005	2.78	0.002	0.01
Vinblastin	0.006	0.21	0.007	0.005

[0115] （実施例１２）ＫＰ－１の構造活性相関

ＫＰ－１における結合可能な部位を調べるため，構造活性相関を調べた。最初にＫＰ－１のベンゼン「ヘッド」及びキサントン「アーム」上に異なる置換機を有するＫＰ－１誘導体を上述の方法に従って１５種類合成し（化合物１～１５），それらの蛍光スペクトル（λ_{ex}及びλ_{em}）を測定した。次いで，化合物１～１５のＡＢＣトランスポーターに対する選択性を４種類の細胞株（ＫＢ３－１，ＫＢ／ＡＢＣＢ１，ＫＢ／ＡＢＣＣ１，およびＫＢ／ＡＢＣＧ２）の染色パターンにより評価した。

[0116] 化合物１～１５の蛍光スペクトルを表３に示す。また，化合物１～１５のＡＢＣトランスポーターに対する選択性を図１に示す。化合物９および化合物１１を除くＫＰ－１誘導体は，親ＫＢ３－１細胞を明確に蛍光染色し，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞をほとんど染色しなかった。このことから，ベンゼン「ヘッド」及びキサントン「アーム」の修飾はＫＰ－１のＡＢＣＢ１に対する選択性を損なわないことが示された。ＡＢＣＧ２に対する選択性は，ＡＢＣＢ１と比較して構造変換に対してより敏感であり，特にベンゼン「ヘッド」上の置換基の影響を受けた。化合物１及び化合物２は，ＫＰ－１のようなＡ

ＢＣＧ２に媒介された流出を示さず，ＡＢＣＧ２選択性のためにパラ置換基が重要であることを示した塩素原子（ＣＩ）（化合物３），臭素原子（Ｂｒ）（化合物４），水素原子（Ｈ）（化合物５），プロピル基（化合物６），または水酸基（化合物７）でフッ素原子（Ｆ）を置換することにより，ＡＢＣＧ２に対する選択性が様々な程度に減少した。アミン「アーム」の修飾は，選択性への影響はより小さかった。同様に，ＫＰ－１，化合物１２，及び化合物１４は，ＡＢＣＢ１とＡＢＣＧ２の両方に対して優れた選択性を示し，ＡＢＣＣ１に対しては低い選択性を示した。化合物１４を，細胞障害性抗がん剤との結合のために選択した。

[0117] [表3]

(nm)

	Excitation max	Emission max
KP-1	502	518
1	504	522
2	508	525
3	503	520
4	503	521
5	500	518
6	499	519
7	498	516
8	499	515
9	500	519
10	501	521
11	497	511
12	517	542
13	512	528
14	514	531
15	514	528

a: solvent: PBS, pH=7.4; concentration: 1 μM

[0118] （実施例１３）複合体１６の細胞障害性及びＡＢＣトランスポーター選択性

化合物１４と細胞障害性抗がん剤であるコンブレタスタチンＡ－４（ＣＡ４）との結合物（複合体１６）が，ＫＰ－１のＡＢＣ輸送体選択性を維持するか否かを，化合物１４とＣＡ４を結合させて調べた。この天然に存在するチューブリン阻害剤は，高度にＡＢＣＢ１およびＡＢＣＧ２を発現する細胞株に対して効果的であり，このことはＣＡ４が，ＡＢＣＢ１またはＡＢＣＧ２のいずれかの基質ではないことを示している（Ｌ．Ｍ．Ｇｒｅｅｎｅら，

Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｅｘｐ Ｔｈｅｒ（２０１０）３３５：３０２－３１３）。化合物１６の構造を図２Ａに示す。化合物１６のチューブリン重合阻害能を確認するため，チューブリン重合アッセイを行った。また，複合体１６のＡＢＣトランスポーター選択性を調べるため，細胞生存率アッセイと蛍光イメージングアッセイの２種類の細胞ベースのアッセイを同時に行った。

[0119] チューブリン重合アッセイでは，ＣＡ４がチューブリン重合を阻害するのに対し，化合物１４は，３０μＭまでの濃度でチューブリン重合の検出可能な阻害を示さなかった。化合物１４とは対照的に，複合体１６はチューブリン重合を阻害した。

[0120] 細胞生存率アッセイにおいて，複合体１６は化合物１４よりも有意に優れた細胞障害性を示した。このことは複合体１６の毒性がＣＡ４部分によるものであることを示唆している。複合体１６はＡＢＣＢ１に対する基質としての性質は維持したものの，ＡＢＣＧ２に対する選択性を維持することはできなかった（図２Ｂ）。蛍光イメージングアッセイの結果は，細胞生存率アッセイの結果と一致した（図２Ｃ）。複合体１６はＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞を染色した一方，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞からは排出された。これらの結果から，化合物１４とＣＡ４の複合体は，ＡＢＣＢ１に対する選択性を維持するが，ＡＢＣＧ２への選択性を維持しないことが示唆された。

[0121] 同様に，ＣＡ４以外の４種類の細胞障害性抗がん剤と化合物１４との複合体を合成して細胞生存率アッセイと蛍光イメージングアッセイを行ったが，結果は複合体１６と同様であった。

[0122]（実施例１４）複合体１７の細胞障害性及びＡＢＣトランスポーター選択性

ＡＢＣＧ２は，一般に，ＡＢＣＢ１よりも狭い排出基質プロファイルを持つと考えられている（Ｊ．Ｊ．Ｓｔｒｏｕｓｅら，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ（２０１３）４３７：７７－８７）。実施例１３におけるＣＡ４の代わりにＡＢＣＧ２選択的細胞障害性薬剤を用いることにより，得られる複合体がＡＢＣＢ１およびＡＢＣＧ２の両方の基質となるか調べた。いくつかの細胞

障害性抗がん剤が，ＡＢＣＧ２の基質として報告されている（Ｌ．Ｄｏｙｌｅら，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ（２００３）２２：７３４０－７３５８）。この中から長い使用暦を持つ抗癌剤ＳＮ３８を選択して複合体１７を合成した（図３Ａ）。複合体１７のＡＢＣトランスポーター選択性を調べるため，細胞生存率アッセイと蛍光イメージングアッセイの２種類の細胞ベースのアッセイを同時に行った。

[0123] 細胞生存率アッセイにおいて，以前に報告されたように，ＳＮ３８に対してＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞は抵抗性を示したが，ＳＮ３８はＫＢ／ＡＢＣＢ１およびＫＢ／ＡＢＣＣ１細胞において強力な細胞障害性を示した。複合体１７は，ＳＮ３８と比較してわずかに細胞障害性は弱まったが，ＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞及びＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞の両方において抵抗性が確認された（図３Ｂ）。

[0124] ＫＰ－１と同様に，複合体１７の蛍光強度は，ＫＢ３－１細胞に比べＫＢ／ＡＢＣＢ１細胞およびＫＢ／ＡＢＣＧ２細胞において有意に低かった。蛍光は，ＡＢＣＢ１の選択的阻害剤（シクロスポリンＡ，１０μＭ）又はＡＢＣＧ２の選択的阻害剤（Ｋｏ１４３，１０μＭ）で処理することにより回復した（図３Ｃ）。これらの結果は，複合体１７がＡＢＣＢ１およびＡＢＣＧ２の両方に対する優れた細胞障害性基質であることを示している。

[0125]（実施例１５）複合体１８の細胞障害性及びＡＢＣトランスポーター選択性

化合物１４とＡＢＣＧ２選択的細胞障害性薬剤との組み合わせが，ＡＢＣＢ１およびＡＢＣＧ２の両方に対する細胞障害性基質となりうることをさらに検証するため，化合物１４と別のＡＢＣＧ２選択的細胞障害性薬剤ミトキサントロンとを結合させて，複合体１８（図５Ａ）を合成した。複合体１８のＡＢＣトランスポーター選択性を調べるため，細胞生存率アッセイと蛍光イメージングアッセイの２種類の細胞ベースのアッセイを同時に行った。

[0126] 細胞生存率および蛍光画像解析の結果，ミトキサントロンはＡＢＣＣ１とＡＢＣＧ２に対して優れた選択性を有することを示すが，ＡＢＣＢ１への選択性が低いことが示された。対照的に，複合体１８は，ＡＢＣＢ１およびＡ

ＢＣＧ２の両方の基質であったが，ＡＢＣＣ１の基質ではなかった（図４Ｂ，Ｃ）。

[0127]（実施例１６）複合体１７及び複合体１８の未分化細胞標識能及び除去能

複合体１７と複合体１８が，細胞混合物中のｈｉＰＳＣｓを標識し，排除することができるかどうかを確認した。ｈｉＰＳＣｓは，過増殖すると細胞がドーナツ状のコロニーを形成する。コロニーの中央部は分化した細胞を表す（Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ（２０１４）６：１１６５－１１７４）。まず，ドーナツ状のコロニーを形成したｈｉＰＳＣｓを複合体１７（１μＭ）又は複合体１８（１０μＭ）で処理し，直後に共焦点顕微鏡で観察した。

[0128] 次に，ＳＮＬフィーダー細胞上で部分的に分化したｈｉＰＳＣｓ，又はｈｉＰＳＣｓを，複合体１７（５μＭ）または複合体１８（５μＭ）存在下で７２時間培養した。未分化ｈｉＰＳＣｓは，多能性マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）活性に比色染色で検出した（Ｍ．Ｄ．Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒら，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ（２００８）２６：１１０９－１１１６）。未分化細胞の除去を確認するため，各複合体又はＤＭＳＯコントロール存在下で培養された細胞における，３種類の代表的な多分化能マーカー（Ｊ．Ｃａｉら，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ（２００６）２４：５１６－５３０；Ｍ．Ｓｔａｄｔｆｅｌｄら，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ（２０１０）２４：２２３９－２２６３）の発現レベルを定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）で量った。ｎａｎｏｇ，ｓｏｘ２，およびｏｃｔ３の／４の相対的な発現レベルは，ハウスキーピング遺伝子であるＧＡＰＤＨにより正規化した。

[0129] ＫＰ－１と同様に，複合体１７および複合体１８は，分化細胞よりも未分化細胞を強く

蛍光標識した（図５Ａ）。また，複合体１７又は複合体１８存在下での培養により，ＡＬＰ－陽性細胞が除去されたが，ＡＬＰ－陰性細胞はほとんど影響を受けなかった（図５Ｂ）。ｈｉＰＳＣｓが細胞混合物から除去された。ＤＭＳＯ単独で処理した細胞混合物は，ｎａｎｏｇ（０．７％），ｏｃｔ３

／４（６．７％），およびｓｏｘ２（０．４％）を比較的高く発現した。複合体１７または複合体１８存在下での培養により，ｎａｎｏｇの発現レベルを０．１％に，ｏｃｔ３／４の発現レベルを０．８％に，かつｓｏｘ２の発現レベルを０．０３％に減少させ（図５Ｃ，５Ｄ，５Ｅ），多能性細胞の選択的な除去と一致した。

[0130] （実施例１７）複合体１７の分化細胞及び未分化細胞除去能

２種類のｈｉＰＳＣクローン，２０１Ｂ７及び２５３Ｇ１と比較した，５種類の異なるヒト体初代細胞に対する複合体１７の効果を比較した。また，ＳＮ３８自体がｈｉＰＳＣｓに対して選択的であるかどうかを調べるために，ＳＮ３８単独と複合体１７の種々のヒト初代細胞及びｈｉＰＳＣｓに対する効果を比較した。

[0131] 肝細胞（代謝機能），前立腺上皮（生殖器官），脳微小血管細胞（バリア機能），アストロサイト（中枢神経システム），および副腎微小血管細胞（分泌機能）は複合体１７に対して抵抗性（ＩＣ５０＞１０μＭ）を示したが，２種類のｈｉＰＳＣ細胞株は高感度で反応した。（２０１Ｂ７：ＩＣ５０＝０．２μＭ；２５３Ｇ１：ＩＣ５０＝０．４μＭ）（図５Ｆ）。シクロスポリン（ＡＢＣＢ１選択的阻害剤）またはＫｏ１４３（ＡＢＣＧ２選択的阻害剤）の添加により，抵抗性を示した体細胞に対する複合体１７の細胞障害性を増加させた（図６）。培地へのトランスポーター阻害剤の添加は，複合体１７のヒト初代体細胞に対する細胞障害性を復活させたが，この細胞障害性は完全なものではなかった。このことは，複合体１７がＡＢＣトランスポーター媒介排出以外のメカニズムで選択的細胞障害性を発揮していることを示唆している。高レベルのＡＢＣトランスポーターを発現することが知られている（Ｎ．Ｈｉｒａｔａら，Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ（２０１４）６：１１６５－１１７４），肝細胞，前立腺上皮細胞，および脳微小血管細胞は，シクロスポリンまたはＫｏ１４３の存在下でも抵抗性を維持していた（図６）。

[0132] ＳＮ３８は，ｈｉＰＳＣｓに対して穏やかな選択性を示したが，複合体１７ほどの選択性は示さなかった（図７）。ＳＮ３８の投与量１μＭでは，ほ

ほ完全にｉＰＳ細胞を排除し（生存性＜５％），ヒト初代細胞の７０％以上を排除した。これとは対照的に，複合体１７は，１０μＭでもヒト初代細胞に対してＳＮ３８より弱い効果しか示さなかった。これらの結果は，本来ＳＮ３８はｈｉＰＳＣｓに対して選択的ではあるが，ＫＰ－１との結合により選択性が高められることを示唆している。

[0133] （実施例１８）複合体１７のＴｏｐｏｌ阻害活性

ＳＮ３８が元来有する選択性は，その作用メカニズムに由来する可能性がある。（Ｃ．Ｐ．Ｇａｒｃｉａら，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ（２０１４）１２：４００－４１４；Ｏ．Ｍｏｍｃｉｌｏｖｉｃ，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ（２０１０）５：ｅ１３４１０） ＳＮ３８はポイソメラーゼＩ（Ｔｏｐｏｌ）を阻害することによって抗増殖活性を発揮する（Ｂ．Ｌ．Ｓｔａｋｅｒら，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ（２００２）９９：１５３８７－１５３９２）。ＰＳＣｓの多能性と自己再生には高い増殖率が重要であると考えられている（Ｓ．Ｒｕｉｚら，Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ（２０１１）２１：４５－５２）。対照的に，分化細胞は通常，低増殖速度を示し，おそらくこれがある程度のＴｏｐｏｌ阻害剤に対する抵抗性を与え得る。複合体１７が，Ｔｏｐｏｌを阻害するかどうかを調べるため，組換えヒトトポイソメラーゼＩを使用して，インビトロでの生化学アッセイを行った。

[0134] 結果を図８に示す。ＳＮ３８は，１０μＭでＴｏｐｏｌを阻害した。しかし，複合体１７はさらに強くＴｏｐｏｌを阻害した。

[0135] （実施例１９）複合体１７のＴｏｐｏｌ阻害活性

腫瘍を生じやすい未分化細胞が複合体によって除去された後，移植前に細胞試料から複合体を除去する必要がある。その蛍光特性を利用して，複合体１７の残存量をモニターした。

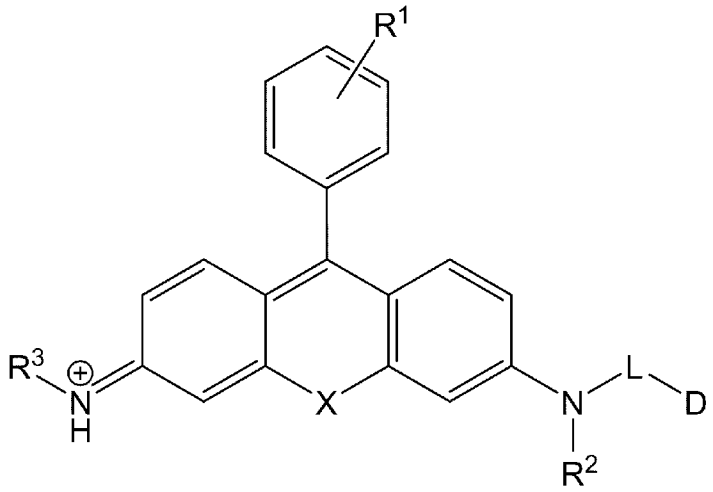
[0136] ５μＭの複合体１７を含む培養培地は，５４８ｎｍで強い蛍光発光を示した。新鮮な培地で簡単に洗浄した後，蛍光強度は有意に減少して約２％となった。更にもう一度簡単な洗浄を行うことにより，バックグラウンドレベル（培地のみ）まで蛍光が減少した。結合体１７または他のＫＰ－１－薬物複

合体の蛍光は，得られた細胞サンプル中の細胞障害性試薬のクリアランスを確実にすることにより，将来のアプリケーションにとって利点となる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（Ｉ）で表される化合物

[化1]



(I)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｒ[2]及びＲ[3]は，同一又は異なって，それぞれ，水素原子，又はＣ１～６アルキル基であり，

Ｘは，酸素原子，硫黄原子，又はＮＲ[7]であり，

ここで，Ｒ[7]は，水素原子又はＣ１～６アルキル基であり，

Ｌは，－（CH_2）$_k$（ＮＨ）$_m$（ＣＯ）$_n$（CH_2）$_p$－で表されるリンカー部分を表し，

ここで，ｋは３～７の整数を表し，ｍは０又は１であり，ｎは０又は１であり，ｐは０又は１であり，

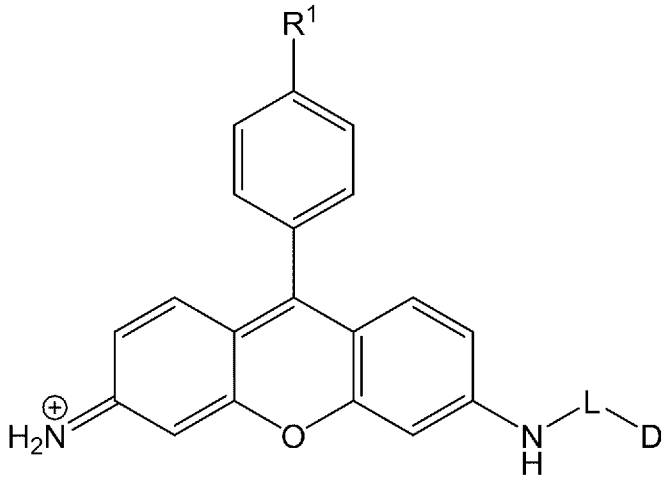
Ｄは，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質を表し，

ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質は，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍ

ｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ　Ｉ　阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びｌａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である］。

［請求項2］　下記式（ＩＩ）で表される，請求項１に記載の化合物

［化2］



(II)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｌは，－（CH_2）$_k$（ＮＨ）$_m$（ＣＯ）$_n$（CH_2）$_p$－で表されるリンカー部分を表し，

ここで，ｋは３～７の整数を表し，ｍは０又は１であり，ｎは０又は１であり，ｐは０又は１であり，

Ｄは，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質を表し，

ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質は，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉｓｏｍｅｒａｓｅ　Ｉ　阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びＬａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である］。

[請求項3] Ｒ[1]が，ハロゲン原子又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基である，請求項１又は請求項２に記載の化合物。

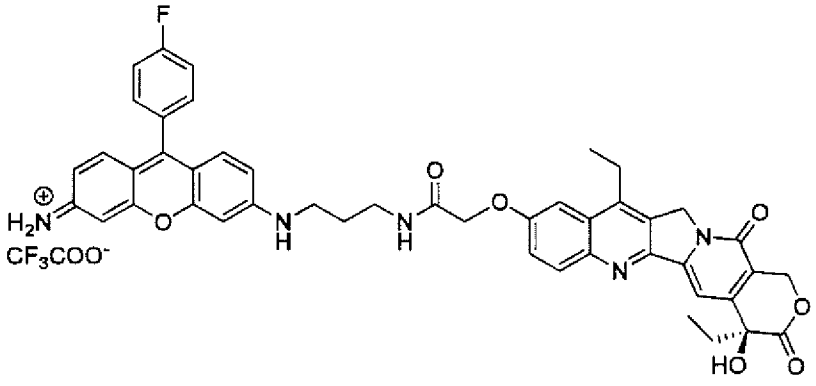
[請求項4] Ｌが，－（CH_2）$_k$（ＮＨ）（ＣＯ）（CH_2）－で表されるリンカー部分を表し，ここで，ｋは３～５の整数を表す，請求項１～請求項３のいずれか１項に記載の化合物。

[請求項5] Ｄが，トポイソメラーゼ阻害剤であるＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質である，請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の化合物。

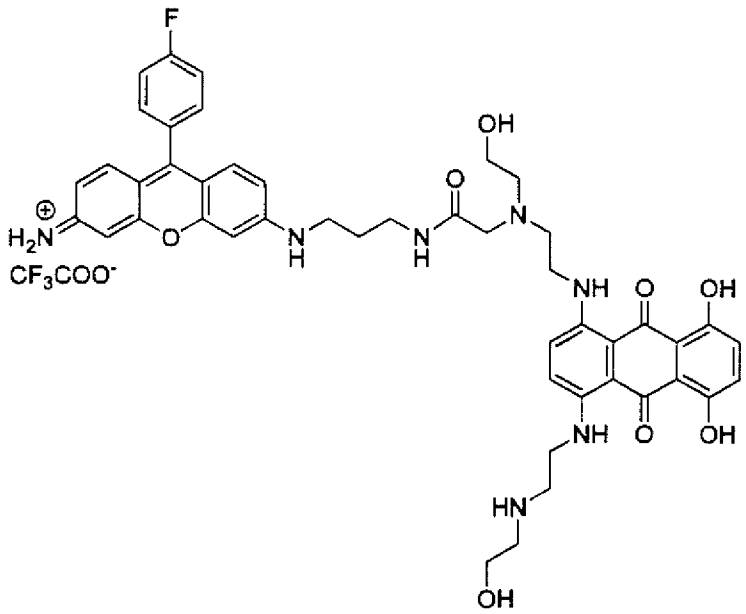
[請求項6] Ｄが，ＳＮ３８，又はＭｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅである，請求項１～請求項５のいずれか１項に記載の化合物。

[請求項7] 下記のいずれかの式で表される化合物。

[化3]

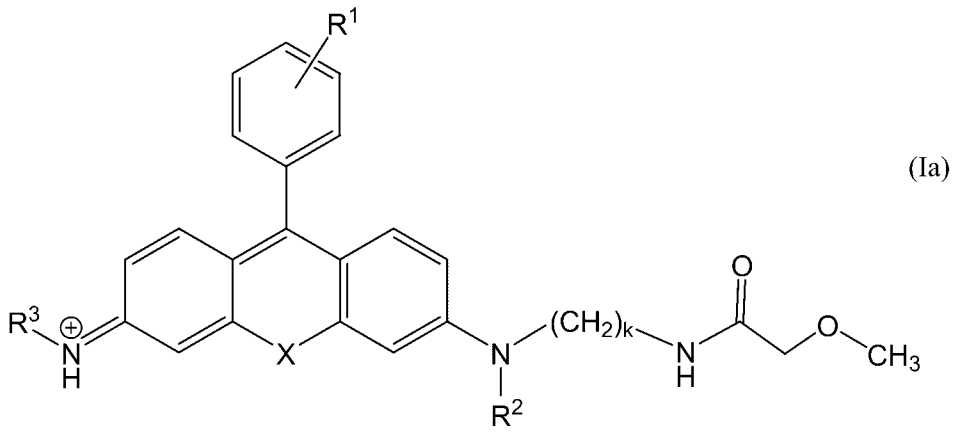


[化4]



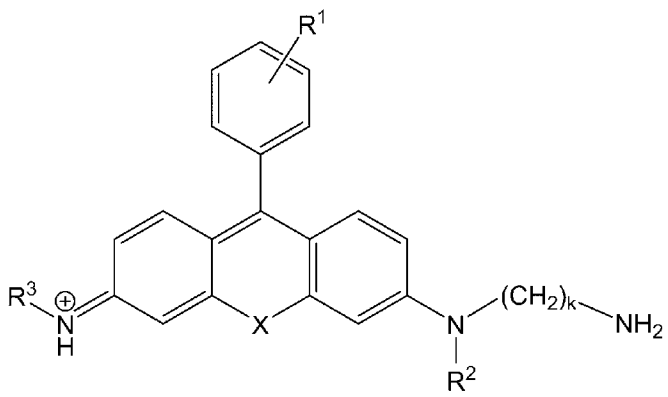
[請求項8] 下記式（Ｉａ）又は（Ｉｂ）で表される化合物

[化5]



(Ia)

[化6]



(Ib)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

Ｒ[2]及びＲ[3]は，同一又は異なって，それぞれ，水素原子，又はＣ１～６アルキル基であり，

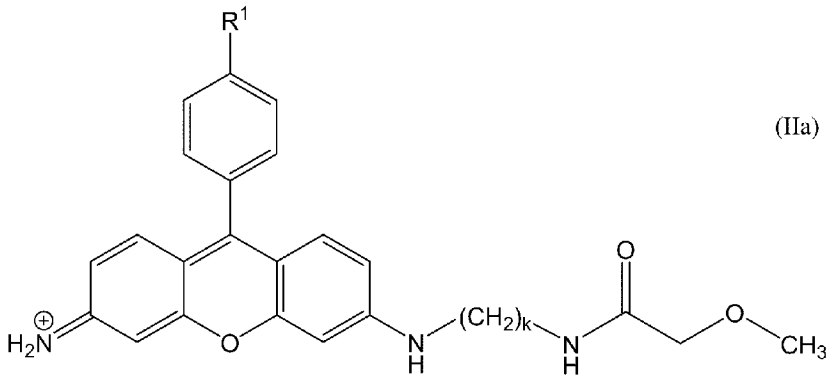
Ｘは，酸素原子，硫黄原子，又はＮＲ[7]であり，

ここで，Ｒ[7]は，水素原子又はＣ１～６アルキル基であり，

ｋは３～７の整数を表す］。

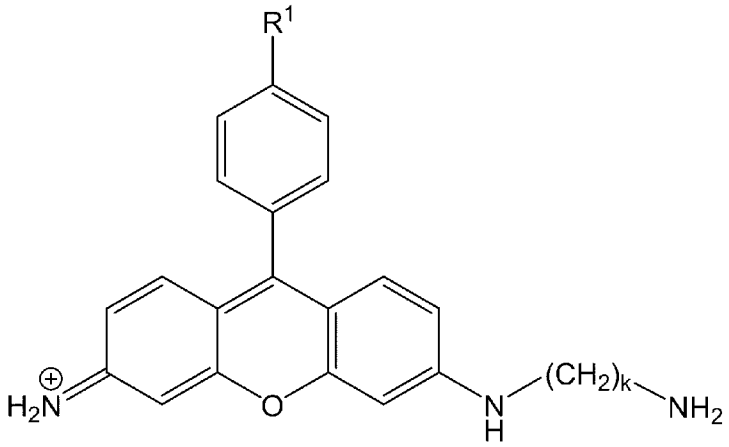
［請求項9］ 下記式（ＩＩａ）又は（ＩＩｂ）で表される，請求項８に記載の化合物

［化7］



(IIa)

[化8]



(IIb)

［式中，Ｒ[1]は，水素原子，ハロゲン原子，Ｃ１～６アルキル基，Ｃ１～６アルコキシ基，フェニル基，フェニルオキシ基，水酸基，又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基であり，

ここで，Ｒ[5]及びＲ[6]は，同一又は異なって，それぞれ，フェニル基で置換されていても良いＣ１～６アルキル基を表すか，又は，Ｒ[5]及びＲ[6]は存在せず，

ｋは３～７の整数を表す］。

［請求項10］ Ｒ[1]が，ハロゲン原子又は－ＯＰ（Ｏ）（ＯＲ[5]）（ＯＲ[6]）基である，請求項８又は請求項９に記載の化合物。

［請求項11］ ｋが３～５の整数を表す，請求項８～請求項１０のいずれか１項に記載の化合物。

［請求項12］ 請求項８～請求項１１のいずれか１項に記載の化合物と，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質とを反応させることを備える，請求項１～請求項７のいずれか１項に記載の化合物の合成方法であって，ここで，ＡＢＣＧ２選択的細胞障害性物質が，ＳＮ３８，Ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ，Ｉｒｉｎｏｔｅｃａｎ，９－Ａｍｉｎｏｃａｍｐｔｏｔｈｅｃｉｎ，Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ，Ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ，Ｉｄａｒｕｂｉｃｉｎｏｌ，Ｆｌａｖｏｐｉｒｉｄｏｌ，ＣＩ１０３３，ＢＢＲ３３９０，Ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ，Ｐｒａｚｏｃｉｎ，Ｉｎｄｏｌｏｃａｒｂａｚｏｌｅ，ｔｏｐｏｉ

ｓｏｍｅｒａｓｅ　Ｉ　阻害剤であるＮＢ－５０６及びＪ－１０７０８８，Ｚｉｄｏｖｕｄｉｎｅ（ＡＺＴ），及びｌａｍｉｖｕｄｉｎｅから選択される物質である，方法。

[請求項13] 幹細胞を分化誘導した細胞集団に請求項１～請求項７のいずれか１項に記載の化合物を未分化細胞が死滅する時間接触させること，及び，残存した請求項１～請求項７のいずれか１項に記載の化合物を洗浄により除去することを含む，幹細胞を分化誘導した後に残存する未分化細胞の除去方法。

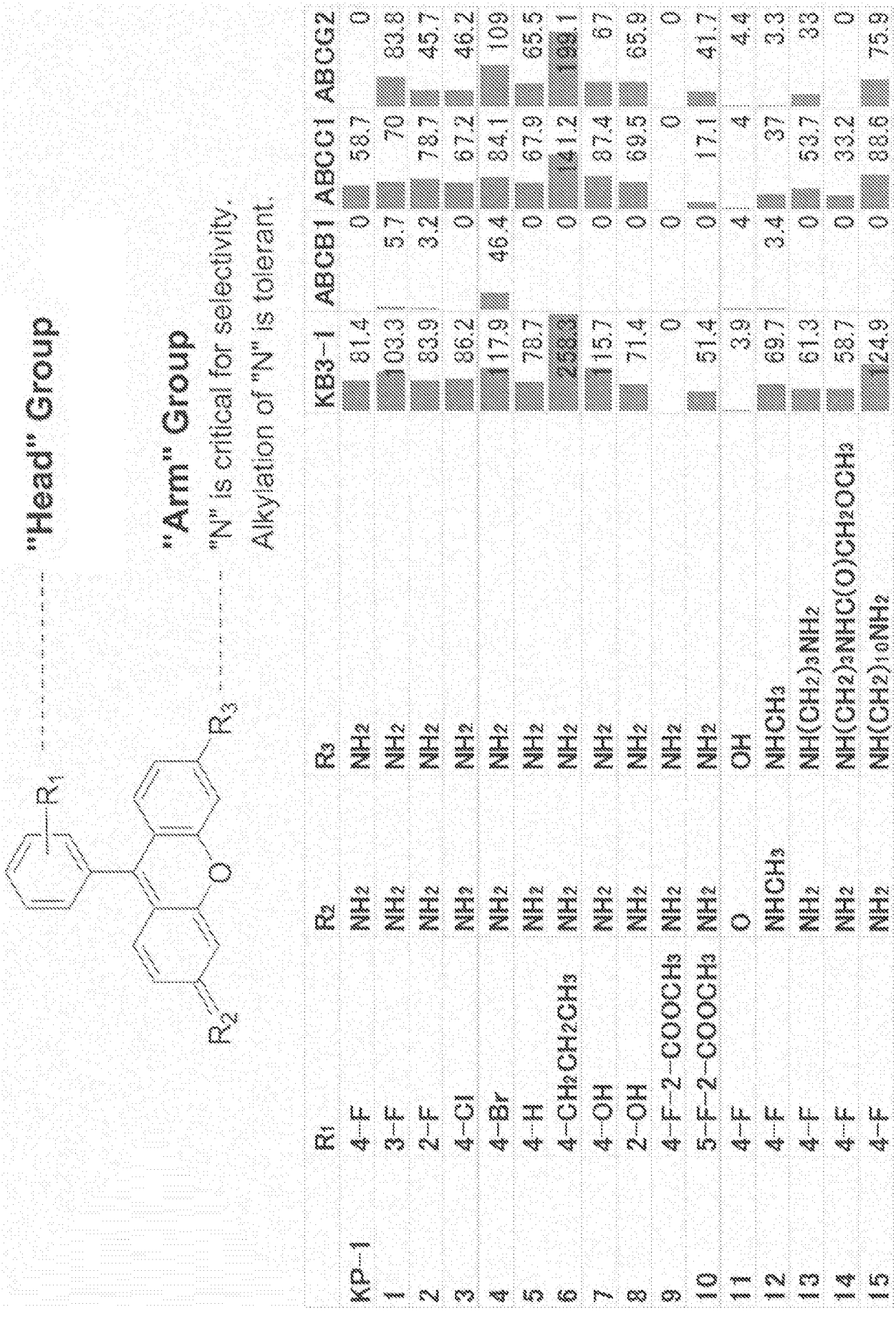
[請求項14] 幹細胞がｉＰＳ細胞である，請求項１３に記載の除去方法。

[請求項15] 請求項１～請求項７のいずれか１項に記載の化合物を有効成分として含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与える薬剤。

[請求項16] ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞が未分化細胞である，請求項１５に記載の薬剤。

[請求項17] 請求項１～請求項７のいずれか１項に記載の化合物を含有する，ＡＢＣＢ１及びＡＢＣＧ２トランスポーターの発現が抑制されている細胞に選択的に障害を与えるためのキット。

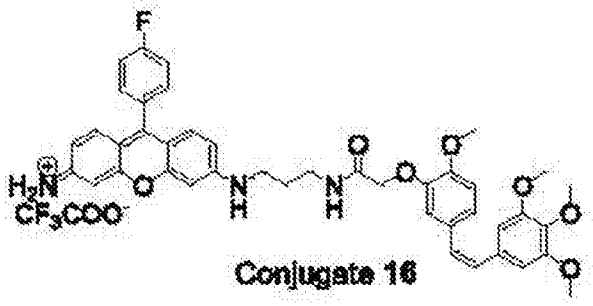
[図1]



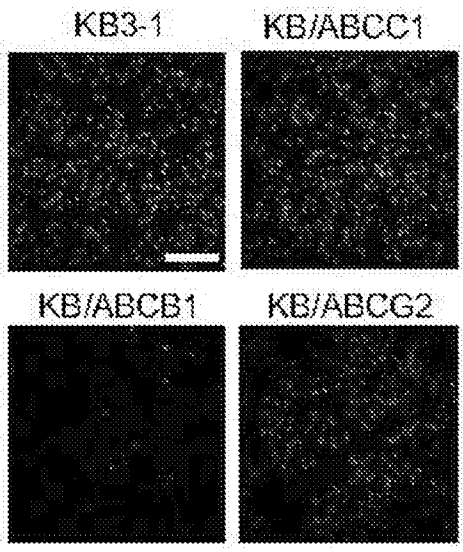
	R1	R2	R3	KB3-1	ABCB1	ABCC1	ABCG2
KP-1	4-F	NH_2	NH_2	81.4	0	58.7	0
1	3-F	NH_2	NH_2	103.3	5.7	70	83.8
2	2-F	NH_2	NH_2	83.9	3.2	78.7	45.7
3	4-Cl	NH_2	NH_2	86.2	0	67.2	46.2
4	4-Br	NH_2	NH_2	117.9	46.4	84.1	109
5	4-H	NH_2	NH_2	78.7	0	67.9	65.5
6	4-$CH_2CH_2CH_3$	NH_2	NH_2	258.3	0	141.2	199.1
7	4-OH	NH_2	NH_2	115.7	0	87.4	67
8	2-OH	NH_2	NH_2	71.4	0	69.5	65.9
9	4-F-2-$COOCH_3$	NH_2	NH_2	0	0	0	0
10	5-F-2-$COOCH_3$	NH_2	NH_2	51.4	0	17.1	41.7
11	4-F	O	OH	3.9	4	4	4.4
12	4-F	$NHCH_3$	$NHCH_3$	69.7	3.4	37	3.3
13	4-F	NH_2	$NH(CH_2)_3NH_2$	61.3	0	63.7	33
14	4-F	NH_2	$NH(CH_2)_2NHC(O)CH_2OCH_3$	58.7	0	33.2	0
15	4-F	NH_2	$NH(CH_2)_{10}NH_2$	124.9	0	88.6	75.9

[図2]

A



C



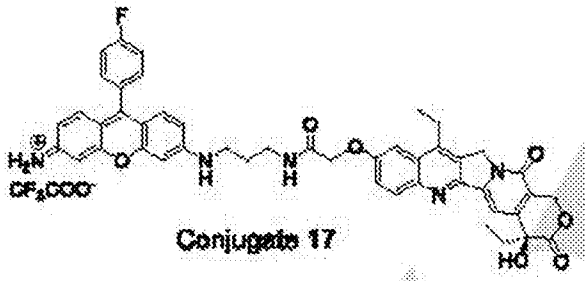
B

μM

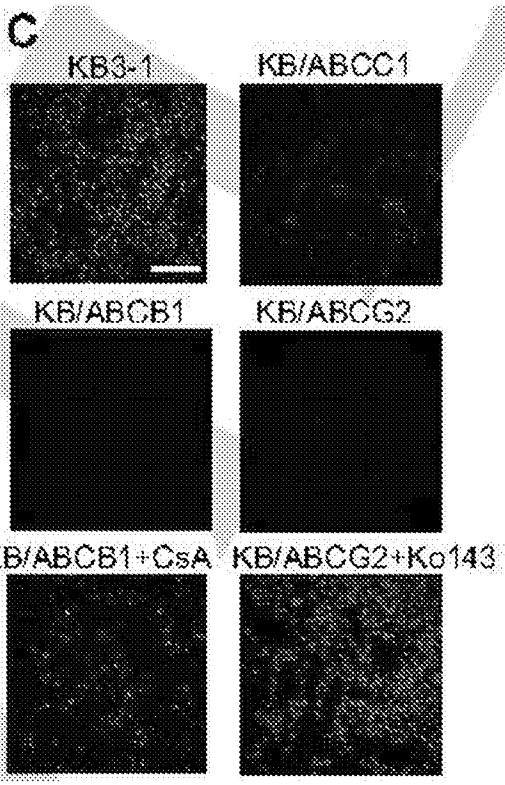
	CA4	**14**	Conjugate **16**
KB3-1	0.008	20	2.0
KB/ABCB1	0.009	>40	8.1
KB/ABCC1	0.010	>40	2.6
KB/ABCG2	0.007	>40	3.8

[図3]

A



C



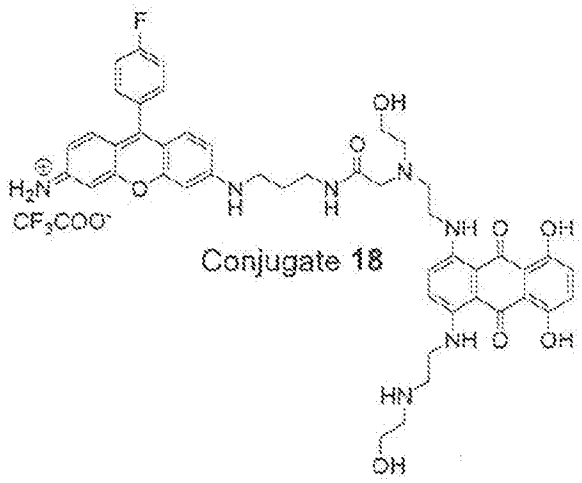
B

μM

	SN38	Conjugate **17**
KB3-1	0.4	0.9
KB/ABCB1	0.5	2.8
KB/ABCC1	0.8	1.2
KB/ABCG2	4.7	5.0

[図4]

A



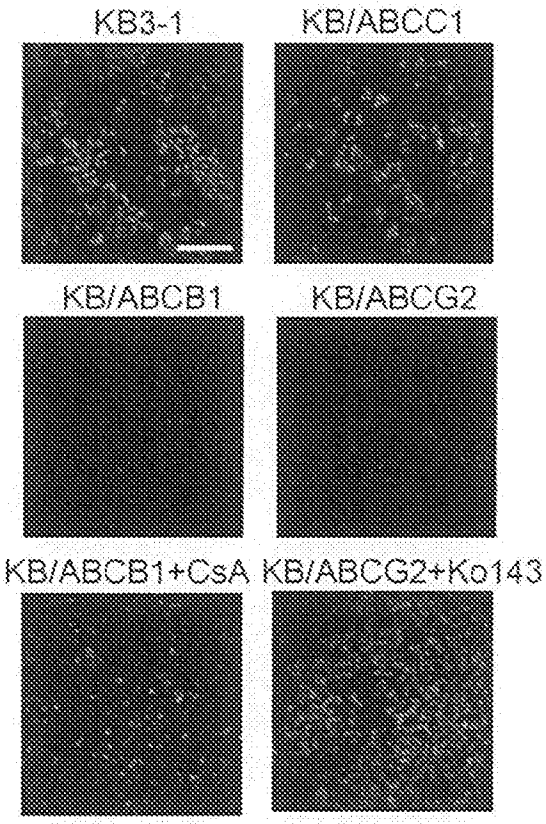
Conjugate 18

B

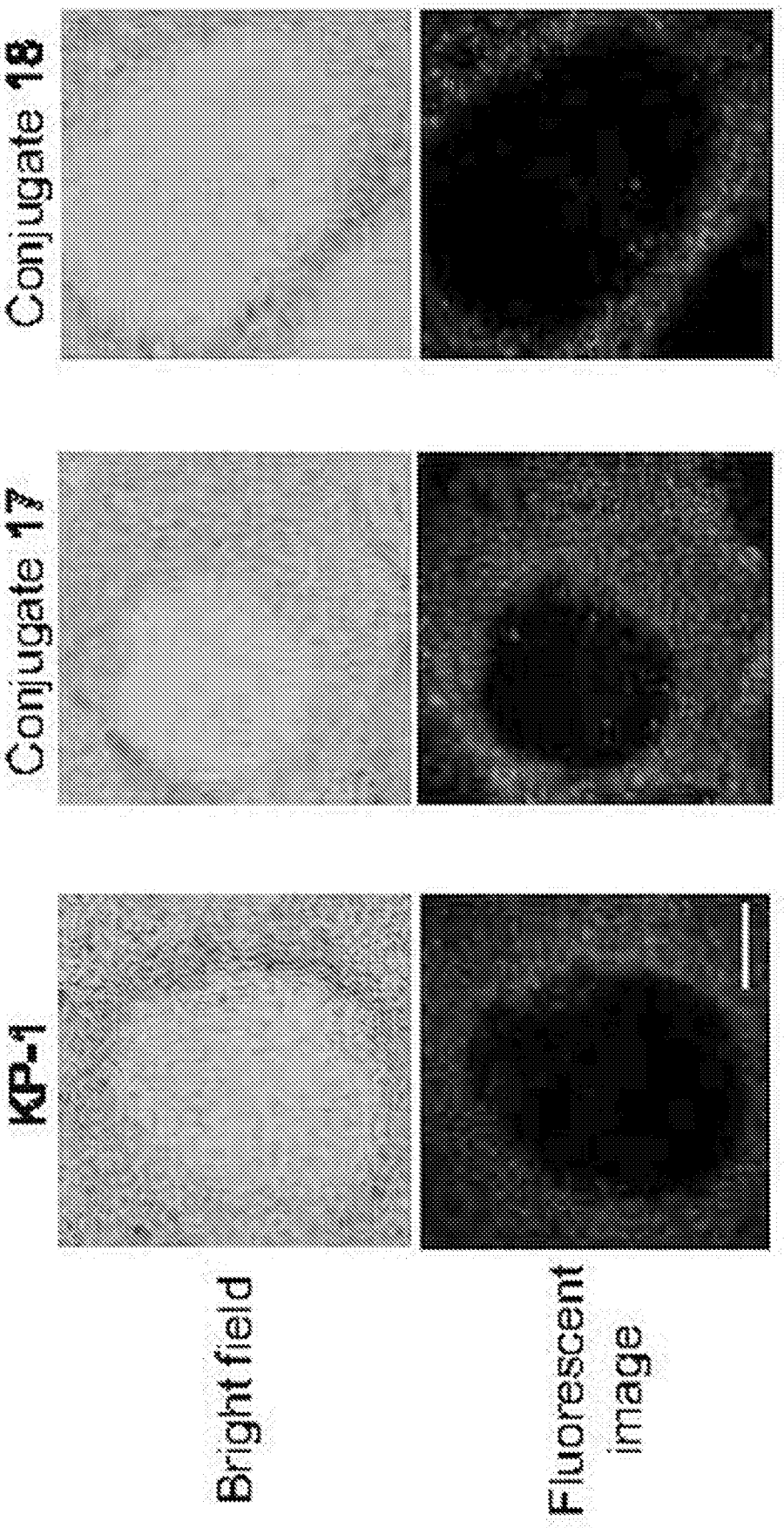
μM

	Mitoxantrone	Conjugate 18
KB3-1	0.2	1.1
KB/ABCB1	0.4	4.0
KB/ABCC1	0.9	1.4
KB/ABCG2	1.2	2.8

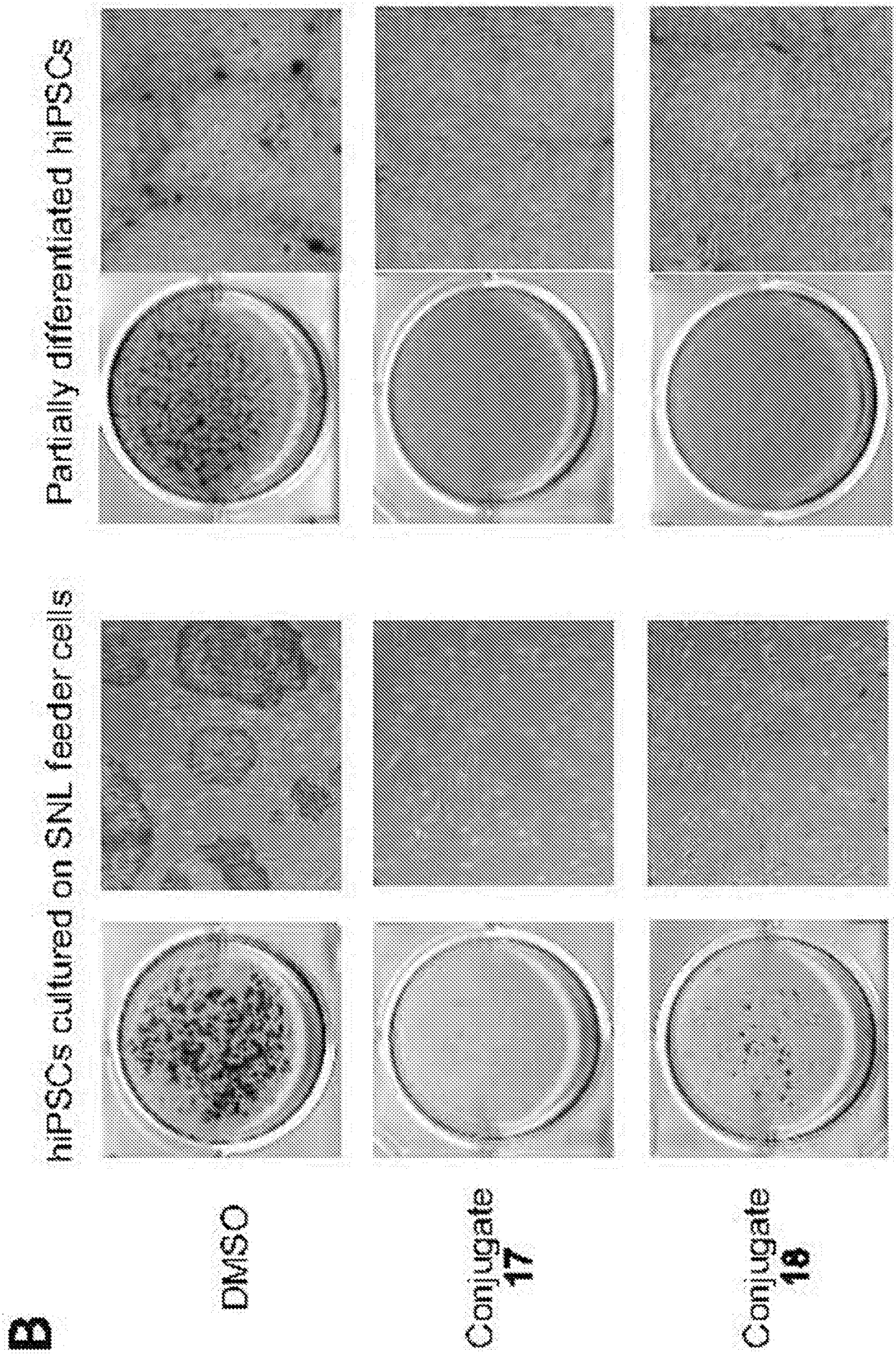
C



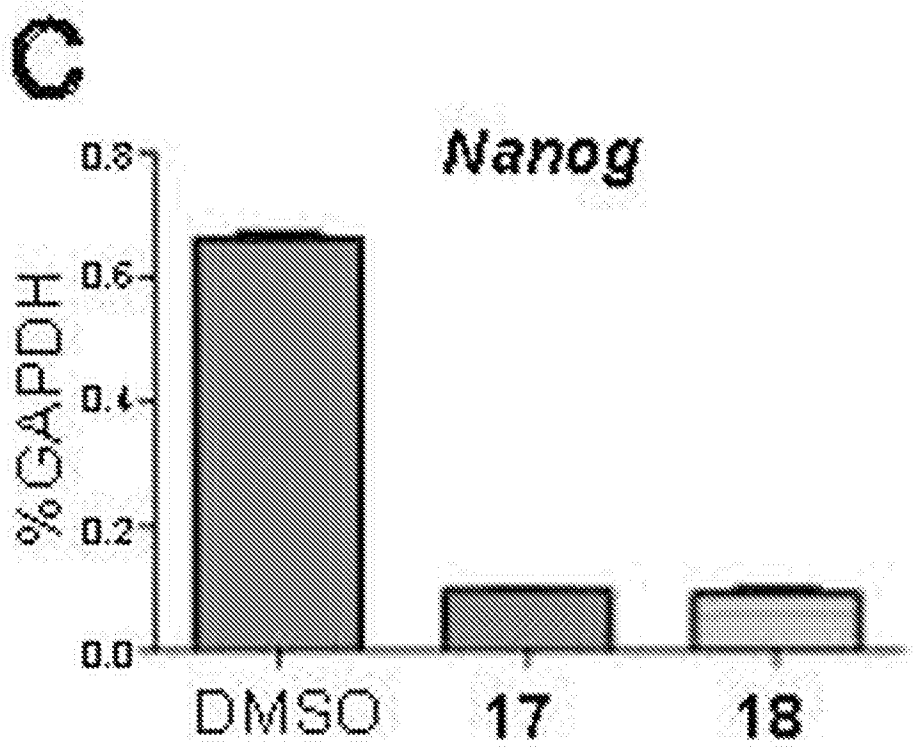
[図5A]


A
Bright field
Fluorescent image
KP-1
Conjugate 17
Conjugate 18

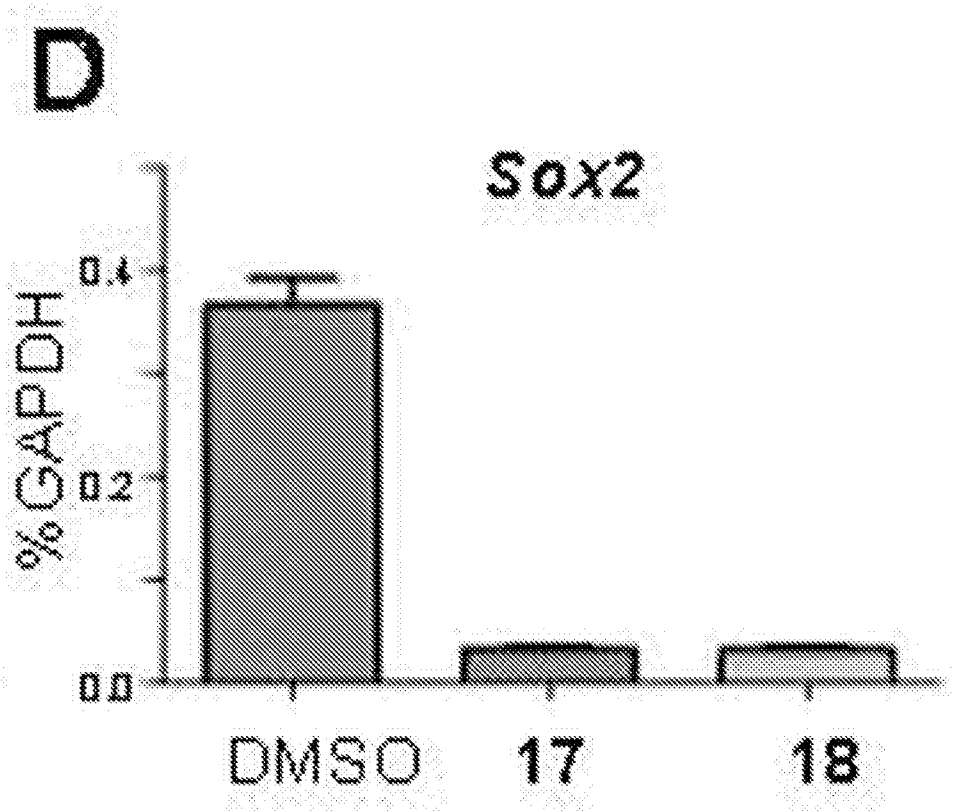
[図5B]


B
hiPSCs cultured on SNL feeder cells
Partially differentiated hiPSCs
DMSO
Conjugate 17
Conjugate 18

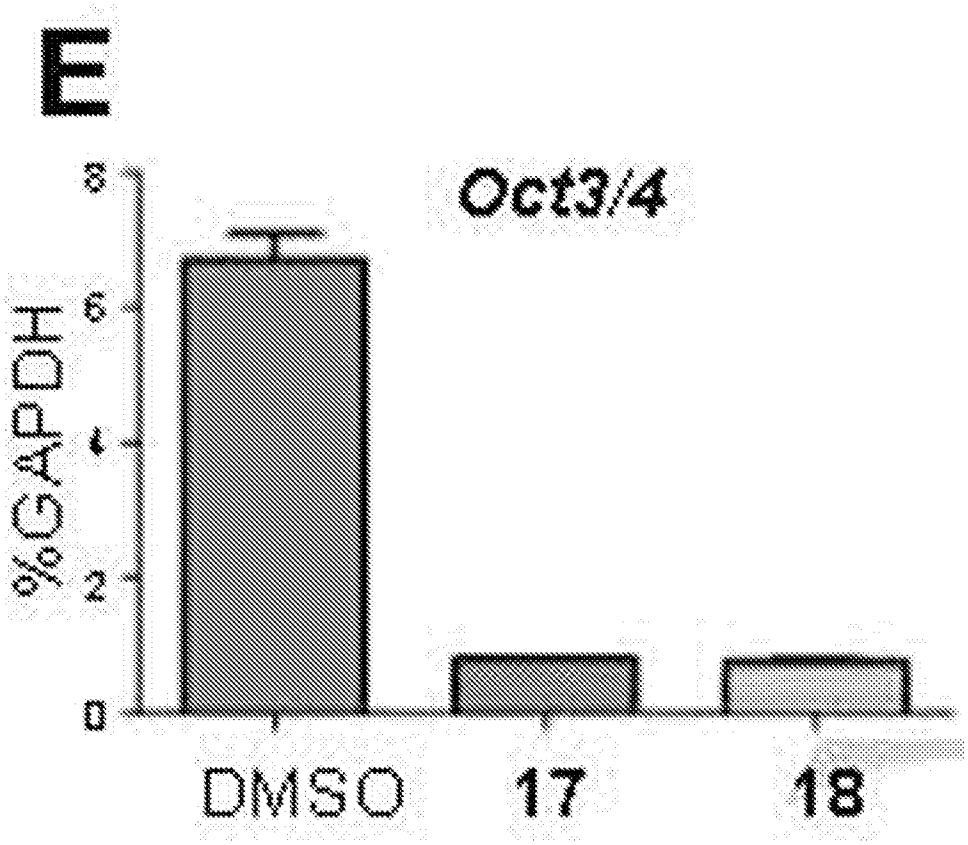
[図5C]


C
Nanog
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
% GAPDH
DMSO
17
18

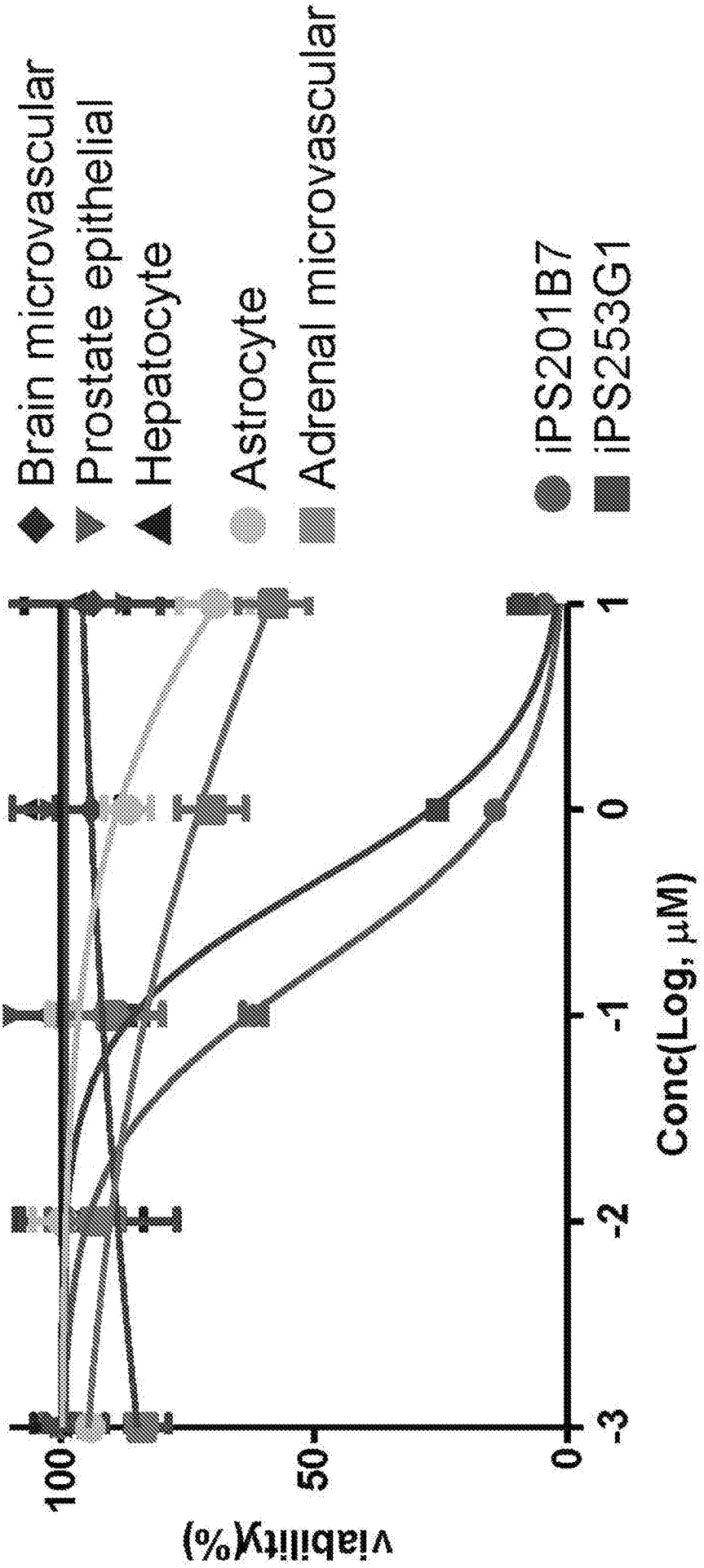
[図5D]


D
Sox2
0.4
0.2
0.0
% GAPDH
DMSO
17
18

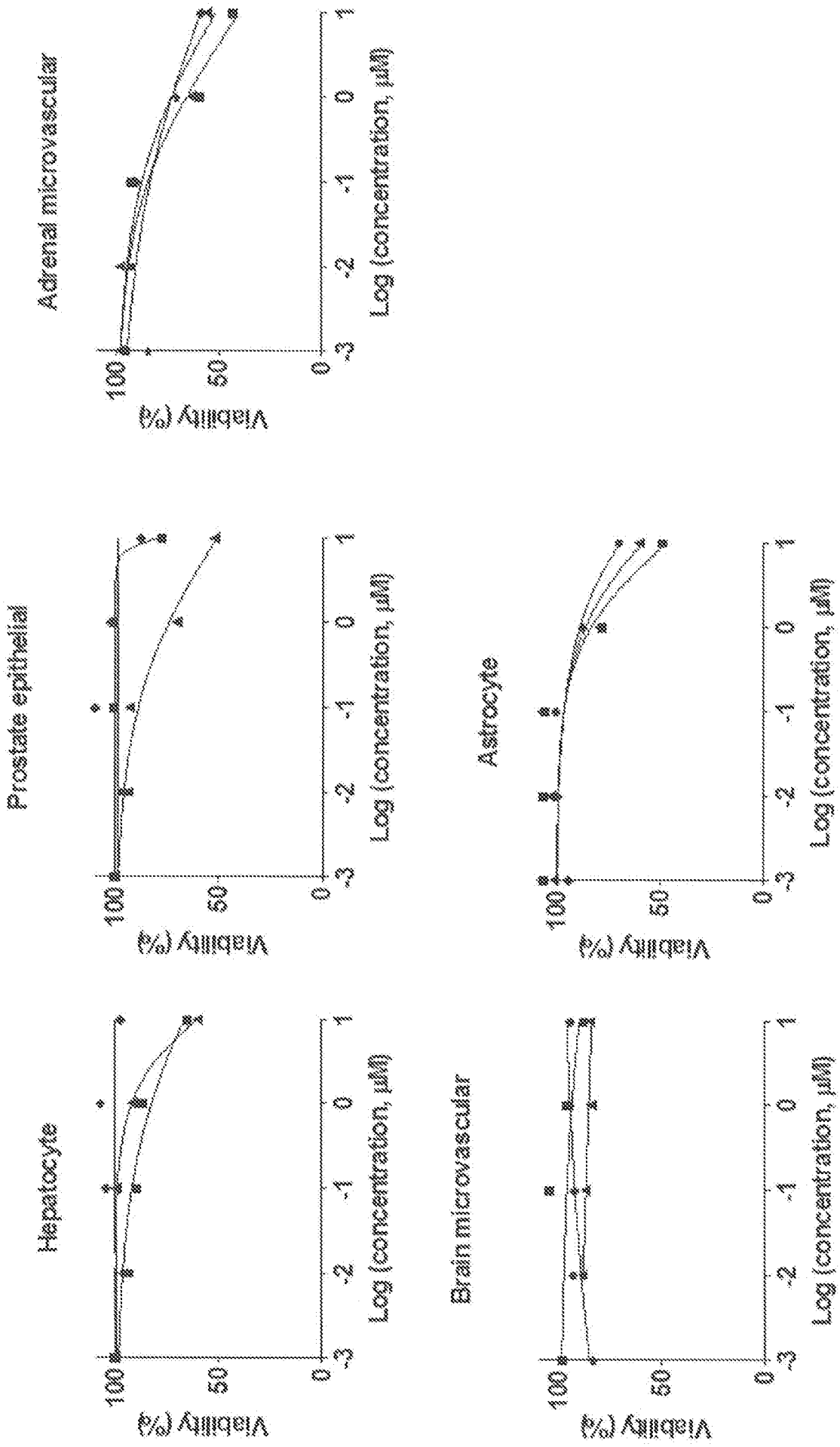
[図5E]



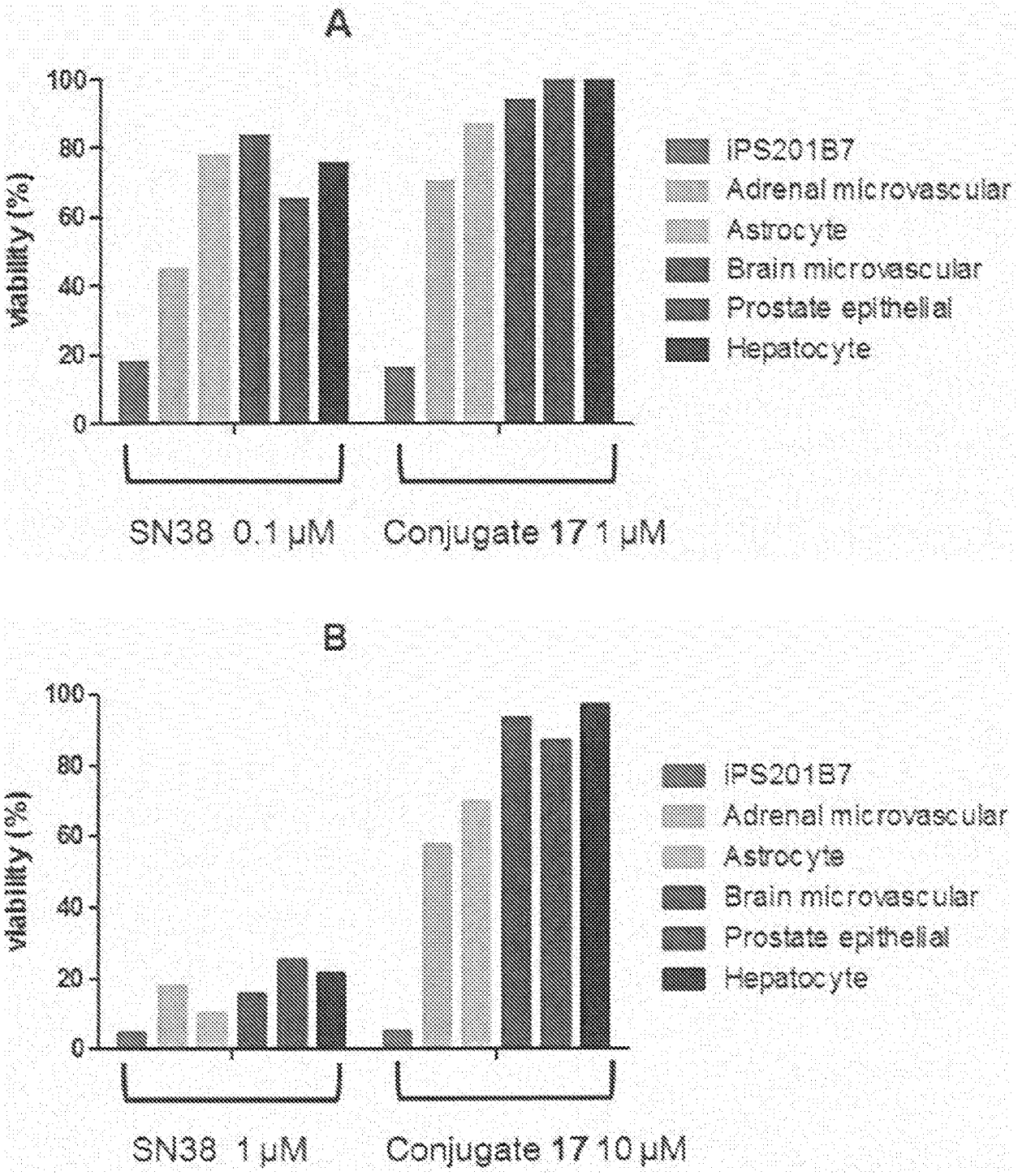
[図5F]


Brain microvascular
Prostate epithelial
Hepatocyte
Astrocyte
Adrenal microvascular
iPS201B7
iPS253G1
viability(%)
100
50
0
1
0
-1
-2
-3
Conc(Log, μM)

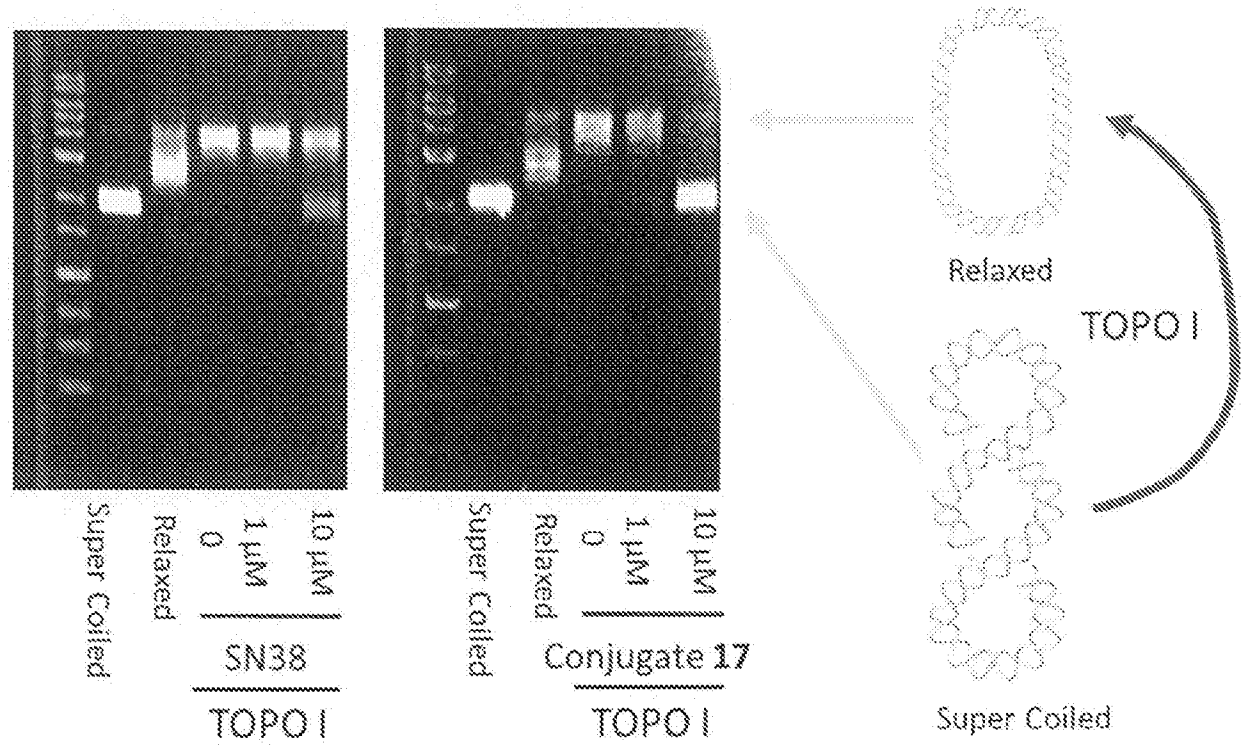
[図6]


Adrenal microvascular
Viability (%)
Log (concentration, μM)
Prostate epithelial
Astrocyte
Hepatocyte
Brain microvascular
100
50
0
1
0
-1
-2
-3

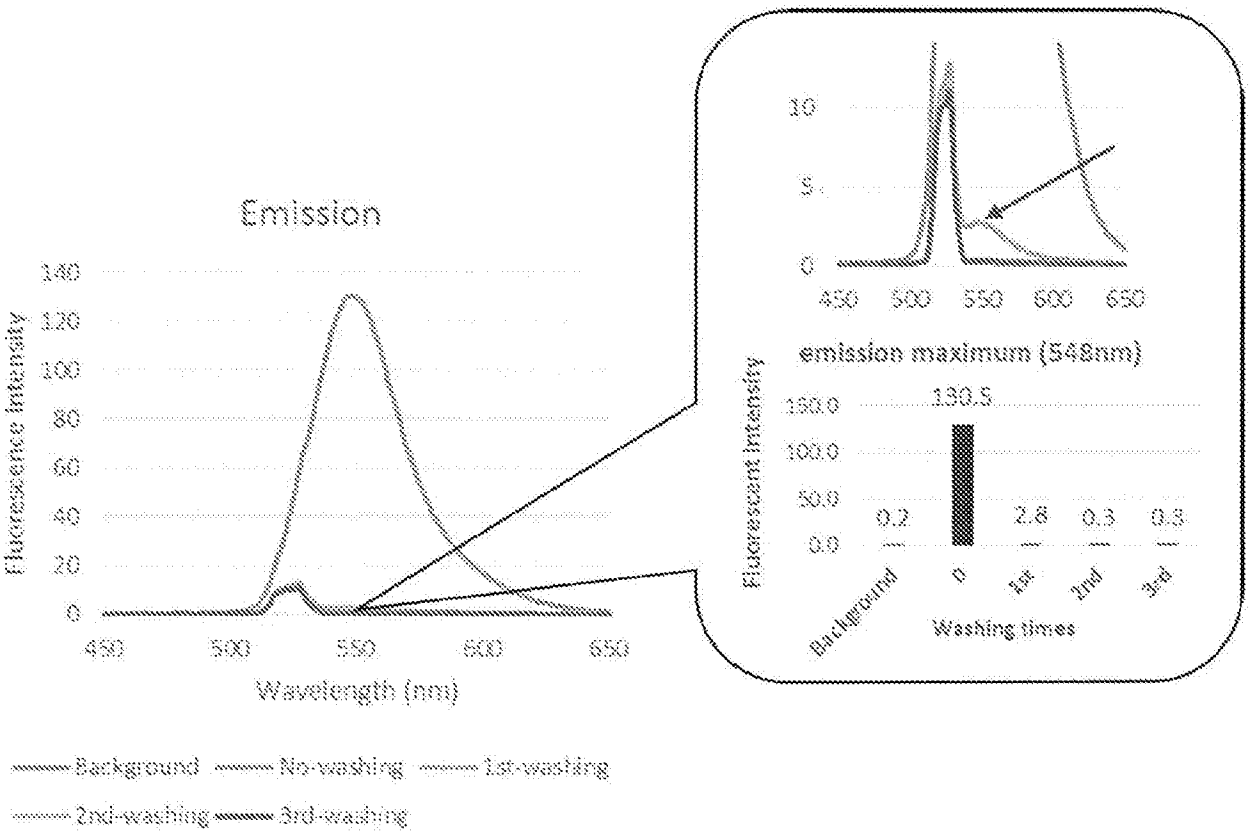
[図7]


A
100
80
60
40
20
0
viability (%)
iPS201B7
Adrenal microvascular
Astrocyte
Brain microvascular
Prostate epithelial
Hepatocyte
SN38 0.1 μM
Conjugate 17 1 μM
B
100
80
60
40
20
0
viability (%)
iPS201B7
Adrenal microvascular
Astrocyte
Brain microvascular
Prostate epithelial
Hepatocyte
SN38 1 μM
Conjugate 17 10 μM

[図8]


Super Coiled
Relaxed
0
1 μM
10 μM
SN38
TOPO I
Super Coiled
Relaxed
0
1 μM
10 μM
Conjugate 17
TOPO I
Relaxed
TOPO I
Super Coiled

[図9]


Emission
Fluorescence Intensity
Wavelength (nm)
Background
No-washing
1st-washing
2nd-washing
3rd-washing
emission maximum (548nm)
Fluorescent Intensity
Washing times
Background
0
1st
2nd
3rd
0.2
130.5
2.8
0.3
0.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/031165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07D311/80(2006.01)i, *C07D491/22*(2006.01)i, *C12N5/0735*(2010.01)i, *C12N5/074*(2010.01)i, *C12N5/0789*(2010.01)i, *C12N5/0797*(2010.01)i, *C12N5/10*(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)
C07D311/80, C07D491/22, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0789, C12N5/0797, C12N5/10

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 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2015-505240 A (Kyoto University), 19 February 2015 (19.02.2015), claims; paragraphs [0001], [0004], [0016], [0034]; compound 22; examples & US 2015/0031062 A1 & WO 2013/103156 A1 claims; paragraphs [0001], [0004], [0016], [0034]; compound 22; examples	1-5,8-17 6-7
Y A	JP 2010-126533 A (BioVerde Inc.), 10 June 2010 (10.06.2010), entire text (Family: none)	1-5,8-17 6-7
Y A	WO 2015/063553 A2 (MITOTECH S.A.), 07 May 2015 (07.05.2015), entire text & US 2016/0279154 A1 & EP 3030267 A2	1-5,8-17 6-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
30 October 2017 (30.10.17)	14 November 2017 (14.11.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/031165

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2001-233883 A (Okayama-ken Shin Gijutsu Shinko Zaidan), 28 August 2001 (28.08.2001), entire text (Family: none)	1-5,8-17 6-7
Y A	JP 2004-138397 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 13 May 2004 (13.05.2004), entire text (Family: none)	1-5,8-17 6-7
Y A	JP 2005-333904 A (Riken, Japan), 08 December 2005 (08.12.2005), paragraphs [0066] to [0067] & US 2007/0178587 A1 paragraphs [0094] to [0095] & WO 2005/116191 A1 & EP 1767619 A1	1-5,8-17 6-7
A	DAVID, U. B. et al., Cell Stem Cell, 2013, Vol. 12, pp. 167-179	1-17
A	HIDENORI, I. et al., Bio Industry, 2016.02.12, Vol. 33, No. 2, pp. 4-10	1-17
A	CHOO, A. B. et al., Stem Cells, 2008, Vol. 26, pp. 1454-1463	1-17
A	US 2009/0227467 A1 (NEW YORK UNIVERSITY), 10 September 2009 (10.09.2009), (Family: none)	1-17
A	WO 2012/027266 A2 (NEW YORK UNIVERSITY), 01 March 2012 (01.03.2012), & US 2012/0052505 A1	1-17
A	SAMORI, C. et al., Chemical Communications, 2010, Vol. 46, pp. 1494-1496	1-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０３１１６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07D311/80(2006.01)i, C07D491/22(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/0789(2010.01)i, C12N5/0797(2010.01)i, C12N5/10(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.　C07D311/80, C07D491/22, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/0789, C12N5/0797, C12N5/10

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

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１７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/REGISTRY (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
Y A	JP 2015-505240 A (国立大学法人京都大学) 2015.02.19, 特許請求の範囲、[0001]、[0004]、[0016]、[0034]、化合物22、実施例 & US 2015/0031062 A1 & WO 2013/103156 A1, Claims, [0001], [0004], [0016], [0034], Compound 22, Examples	1-5, 8-17 6-7
Y A	JP 2010-126533 A (株式会社バイオベルデ) 2010.06.10, 全文（ファミリーなし）	1-5, 8-17 6-7

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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	国際調査報告の発送日
３０．１０．２０１７	１４．１１．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｐ　５８０９
伊佐地　公美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

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
Y A	WO 2015/063553 A2 (MITOTECH S.A.) 2015.05.07, 全文 & US 2016/0279154 A1 & EP 3030267 A2	1-5, 8-17 6-7
Y A	JP 2001-233883 A (岡山県新技術振興財団) 2001.08.28, 全文 (ファミリーなし)	1-5, 8-17 6-7
Y A	JP 2004-138397 A (協和醗酵工業株式会社) 2004.05.13, 全文 (ファミリーなし)	1-5, 8-17 6-7
Y A	JP 2005-333904 A (独立行政法人理化学研究所) 2005.12.08, [0066]-[0067] & US 2007/0178587 A1, [0094]-[0095] & WO 2005/116191 A1 & EP 1767619 A1	1-5, 8-17 6-7
A	DAVID, U. B. et al., Cell Stem Cell, 2013, Vol. 12, pp. 167-179	1-17
A	HIDENORI, I. et al., Bio Industry, 2016.02.12, Vol. 33, No. 2, pp. 4-10	1-17
A	CHOO, A. B. et al., Stem Cells, 2008, Vol. 26, pp. 1454-1463	1-17
A	US 2009/0227467 A1 (NEW YORK UNIVERSITY) 2009.09.10, (ファミリーなし)	1-17
A	WO 2012/027266 A2 (NEW YORK UNIVERSITY) 2012.03.01, & US 2012/0052505 A1	1-17
A	SAMORI, C. et al., Chemical Communications, 2010, Vol. 46, pp. 1494-1496	1-17