

明 細 書

発明の名称：造血幹細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、造血幹細胞の培養方法に関する。本発明はまた、造血幹細胞の製造方法に関する。本発明はさらに、生体外で造血幹細胞を増殖させるための造血幹細胞用培地に関する。

背景技術

[0002] 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC) は、主に骨髄に存在し、自己複製能及び多分化能をもつ血液細胞と定義され、造血幹細胞移植などに利用されている。しかしながら、造血幹細胞移植には質の良い骨髄ソースの不足という課題がある。この課題の解決策の1つとして、質の良い造血幹細胞（例えば、長期造血幹細胞）を純化し、*in vitro*で大量に増殖させることが考えられるが、長期造血幹細胞 (long-term HSC: LT-HSC) の純化を可能とする特異的マーカーは知られておらず、培養する方法も確立していなかった。

[0003] 一方、近年、マウス長期造血幹細胞に特異的に発現するマーカーとして、ホメオボックスB5 (Hoxb5) が同定された（特許文献1、非特許文献1）。

[0004] 造血幹細胞の増殖を促進する化合物として、インドール誘導体が報告されている（特許文献2、非特許文献2を参照）ものの、造血幹細胞、特に長期造血幹細胞を維持培養する方法が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許出願公開第2017/0350879号明細書

特許文献2：WO2013/110198

非特許文献

[0006] 非特許文献1：James Y.Chen et al., “Hoxb5 marks long-term haematopoie

tic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche", Nature, Vol 530, 223-227 (2016)

非特許文献2: Fares I et al. (2014) Science 345, 1509-1512

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、造血幹細胞移植に利用することができる造血幹細胞の培養方法及び製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

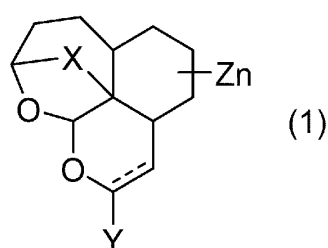
[0008] 本発明者らは、上記課題をマウス長期造血幹細胞の特異的マーカーである $Hoxb5$ 遺伝子の内在性のプロモーターの蛍光タンパク質 (mCherry) を発現するレポーターマウスから単離した $Hoxb5$ 陽性造血幹細胞を用いて、長期造血幹細胞の増殖に有効な低分子化合物のスクリーニングを実施した。その結果、後述のアルテメテル (Artemether) 等の化合物を含む培地を用いることで、長期造血幹細胞を増殖させることができることを見出し、本発明の完成に至った。

[0009] すなわち、本発明は、例えば、以下の各発明に関する。

[1]

造血幹細胞を含む細胞集団を、式(1)で表される化合物、又はその塩を1以上含む培地中で培養することを含む、造血幹細胞の培養方法。

[化1]



[式中、

[化2]

==

は単結合又は二重結合であり、

XはO—O又はOであり、

Yは、水素原子、ヒドロキシ、オキソ、メルカプト、カルボキシ、カルバモイル、シアノ、OR¹、SR¹、SOR¹、SO₂R¹、COR¹、OCOR¹、R²、COOR¹、NR³R⁴、NR⁵COR¹、NR⁵SO₂R¹、NR⁵CONR³R⁴又はハロゲンであり、

Zは、縮合環の任意の位置の炭素に結合しており、各々独立してC₁₋₆アルキルであり、

nは、0～10の整数であり、

R¹は、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリール、又は置換されていてもよい脂肪族複素環基であり、

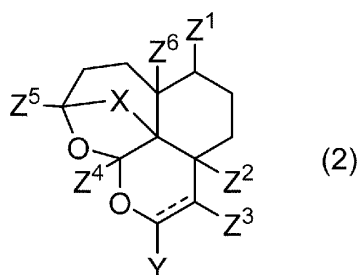
R²は、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリール、又は置換されていてもよい脂肪族複素環基であり、

R³、R⁴及びR⁵は、独立して、水素原子、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよい脂肪族複素環基、置換されていてもよいアリール、又は置換されていてもよいヘテロアリールであり、ここにおいてR³とR⁴は、隣接する窒素原子と一緒に、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい4～10員の含窒素脂肪族複素環を形成してよく、当該含窒素脂肪族複素環は置換されていてもよい]

[2]

式(1)の化合物が、式(2)で表される化合物である、[1]に記載の培養方法。

[化3]



[式中、

[化4]

==

は単結合又は二重結合であり、

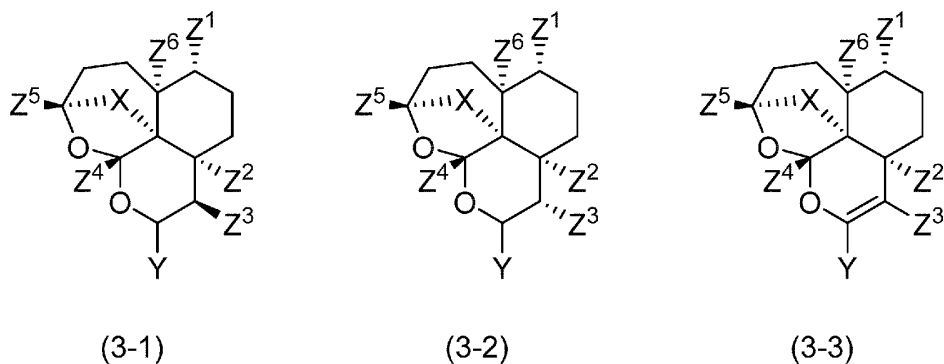
X及びYは式(1)における定義と同じであり、

Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶は、独立して水素原子又はC₁₋₆アルキルである]

[3]

式(2)の化合物が、式(3-1)、(3-2)又は(3-3)で表される化合物である、[2]に記載の培養方法。

[化5]



[式中、

X及びYは式(1)における定義と同じであり、

Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶は、独立して水素原子又はC₁₋₆アルキルである]

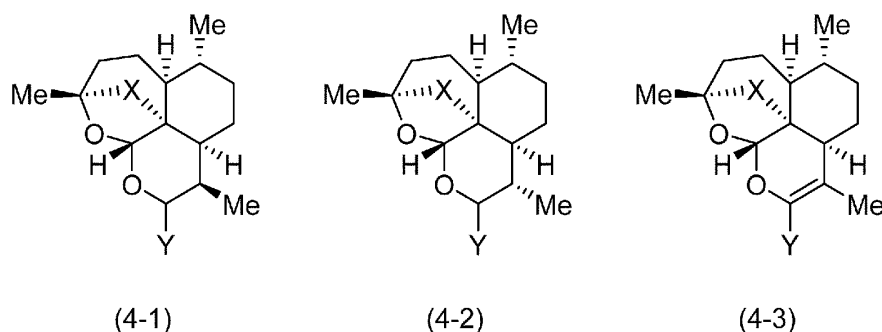
[4]

式(3-1)、(3-2)又は(3-3)において、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、及び Z^6 が、独立して水素原子又はメチルである、[3]に記載の培養方法。

[5]

式(1)の化合物が、式(4-1)、(4-2)又は(4-3)で表される化合物である、[1]に記載の培養方法。

[化6]



[式中、

X及びYは、式(1)における定義と同じである]

[6]

Yは水素原子、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、カルバモイル、 OR^1 、 SR^1 、 SO_2R^1 、 COR^1 、 $OCOR^1$ 、 R^2 、 NR^3R^4 、 NR^5COR^1 、 $NR^5SO_2R^1$ 、又はフッ素原子である、[1]～[5]のいずれか一項に記載の培養方法。

[7]

[化7]

==

が二重結合の場合、Yは水素原子又はヒドロキシであり、

[化8]

==

が単結合である場合、

Yは、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、カルバモイル、OR¹、SR¹、SO₂R¹、OCOR¹、R²、NR³R⁴、NR⁵COR¹、又はフッ素原子であり、

、

R¹が、群1から選択される1～7の置換基で置換されていてもよいC₁₋₈アルキル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル、群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～10員の脂肪族複素環基、又は群1から選択される1～4の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～10員のヘテロアリアルであり、

R²が、群2から選択される1～7の置換基で置換されていてもよいC₁₋₈アルキル、群2から選択される1～7の置換基で置換されていてもよいC₁₋₈アルケニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₃₋₈シクロアルキル、群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～10員の脂肪族複素環基、又は群1から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～10員のヘテロアリアルであり、

R³及びR⁴は独立して、水素原子、群1から選択される1～7の置換基で置換されていてもよいC₁₋₆アルキル、又は群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニルであり、ここにおいてR³とR⁴は、隣接する窒素原子と一緒にあって、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい3～8員の含窒素脂肪族複素環を形成してよく、当該含窒素脂肪族複素環は以下の群1の置換基から選択される1～3の置換基で置換されていてもよく、

R⁵が、水素原子又はC₁₋₃アルキルである、[1]～[6]のいずれかに記

載の培養方法。

<群 1>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカルボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいアミノ、 C_{1-8} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-8} アルキルスルホニルアミノ、群3から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群3から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリール、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～10員の脂肪族複素環基、ハロゲン

<群 2>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカルボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、アミノ、群3から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群3から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリール、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{3-8} シクロアルキル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～8員の脂肪族複素環基、ハロゲン

<群 3>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} のアルキル、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} ア

ルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカルボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいアミノ、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、 C_{1-8} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-8} アルキルスルホニルアミノ、ハロゲン

[8]

[化9]

＝＝＝

が単結合であり、

Yは、ヒドロキシ、オキシ、カルボキシ、カルバモイル、 OR^1 、 SR^1 、 SO_2R^1 、 $OCOR^1$ 、 R^2 、 NR^3R^4 、 NR^5COR^1 、 $NR^5SO_2R^1$ 、又はフッ素原子であり、

R^1 は、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{3-6} シクロアルキル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基、又は群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリールであり、

R^2 は、群2'から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよい C_{3-6} シクロアルキル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基、又は群1'から選択される1～3の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリールであり、

R³は、水素原子又はC₁₋₃アルキルであり

R⁴は、水素原子、群1' から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₁₋₄アルキル、群1' から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₃₋₆シクロアルキル、群1' から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群1' から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基、又は群1' から選択される1～3の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリールであり、

ここにおいてR³とR⁴は、隣接する窒素原子と一緒にあって、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい3～8員の含窒素脂肪族複素環を形成してよく、当該含窒素脂肪族複素環は以下の群1' の置換基から選択される1～3の基で置換されていてもよく、

R⁵が、水素原子である、[1]～[7]のいずれかに記載の培養方法。

<群1' >

フッ素原子、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、C₁₋₄アルコキシ、C₁₋₄アルキルカルボニルオキシ、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₃₋₆のシクロアルキル、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基

<群2' >

フッ素原子、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、C₁₋₄アルコキシ、C₁₋₄アルキルカルボニルオキシ、C₁₋₄アルコキシカルボニル、1若しくは2のC₁₋₈アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよいC₃₋₆シクロアルキル、群3' から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択され

る1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基

<群3'>

フッ素原子、ヒドロキシ、C₁₋₄のアルキル

[9]

XがO-Oである、[1]～[8]のいずれかに記載の培養方法。

[10]

式(1)の化合物が、以下の化合物からなる群から選択される化合物である、[1]に記載の培養方法。

アルテメテル (Artemether)、

アルテミシニン (Artemisinin)、

アルテニモール (Artenimol)、

アルテモチル (Artemotil)、

アルテスネイト (Artesunate)、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12S, 12aR) - 10-フルオロ-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-フェニルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12S, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-(メチルスルファニル)デカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12S, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-(メチルスルファニル)デカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12S, 12aR) - 10-(メタンシルホニル) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9, 10-テトラメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 10- (フラン-2-イル) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボン酸、

4-フェニル-1- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] - 1H-1, 2, 3-トリアゾール、

N- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] アセトアミド、

N- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] メタンスルホンアミド、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - N, N, 3, 6, 9-ペンタメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-アミン、

4- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] モルホリン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3,

6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル アセテート、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、
1- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] メタンアミン、
1- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] メタンアミン、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチル-10- [(プロパン-2-イル) オキシ] デカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -10- (シクロヘキシルオキシ) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチル-10-フェノキシデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3,

6, 9-トリメチル-10-(2, 2, 2-トリフルオロエトキシ)デカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-10-(2-メトキシエトキシ)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-10-(ベンジルオキシ)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチル-10-フェノキシデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

2- {[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] オキシ} エチル アセテート、

2- {[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] オキシ} エチル アセテート、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチル-3, 4, 5, 5a, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン、

(3R, 3aS, 6R, 6aS, 9S, 10aS, 10bR)-3, 6, 9-トリメチルオクタヒドロ-10aH-9, 10b-エポキシピラノ [4, 3, 2-jk] [2] ベンゾキセピン-2 (3H)-オン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-10

ーメトキシ-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン
[10-2]

式(1)の化合物が、以下の群から選択される化合物である、[1]に記載の培養方法。

アルテメテル (Artemether)、

アルテミシニン (Artemisinin)、

アルテニモール (Artenimol)、

アルテモチル (Artemotil)、

アルテスネイト (Artesunate)

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、

1-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル]メタンアミン、

1-[3R, (5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル]メタンアミン、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-10-(2-メトキシエトキシ)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン
[11]

式(1)の化合物が、アルテメテル(Artemether)、アルテミシニン(Artemisinin)、アルテニモール(Artenimol)、アルテモチル(Artemotil)、及び、アルテスネイト(Artesunate)からなる群から選択される、[1]に記載の培養方法。

[12]

上記造血幹細胞が、CD34陽性細胞である、[1]～[11]のいずれかに記載の培養方法。

[13]

上記造血幹細胞が、長期造血幹細胞である、[1]～[12]のいずれかに記載の培養方法。

[14]

上記造血幹細胞が、Hoxb5陽性のマウス造血幹細胞である、[1]～[12]のいずれかに記載の培養方法。

[15]

培養後の細胞集団における総細胞数に対する造血幹細胞の割合が、培養前の細胞集団における総細胞数に対する造血幹細胞の割合の10%以上である、[1]～[14]のいずれかに記載の培養方法。

[16]

培養後の細胞集団における造血幹細胞の数が、培養前の細胞集団における造血幹細胞の数の3倍以上である、[1]～[15]のいずれかに記載の培養方法。

[16-2]

培養後の細胞集団における造血幹細胞の数が、培養前の細胞集団における造血幹細胞の数の10倍以上である、[1]～[15]のいずれかに記載の培養方法。

[17]

上記培地が、さらにUM171又はその誘導体を含む培地である、[1]～[16]のいずれかに記載の培養方法。

[1 8]

造血幹細胞を含む細胞集団を準備する工程と、
造血幹細胞を含む細胞集団を培養する工程であって、[1] ~ [1 7] の
いずれかの培養方法によって上記造血幹細胞を含む細胞集団を培養する工程
と
を含む、造血幹細胞の製造方法。

[1 9]

[1] ~ [1 7] のいずれかに記載の培養方法によって培養して得られた
、造血幹細胞。

[2 0]

[1 8] に記載の製造方法によって製造された造血幹細胞。

[2 1]

式(1)で表される化合物、又はその塩を少なくとも1つ含む、造血幹細胞培養用試薬。

発明の効果

[0010] 本発明の培養方法によれば、造血幹細胞、特に長期造血幹細胞を、自己複製能及び多分化能を維持したまま培養し、増殖させ、そして、移植に適する長期造血幹細胞を製造することができる。該培養方法によって得られた造血幹細胞は、造血幹細胞移植に利用することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を培養した結果を示し、(A)はアルテメテルのみを含む培地で、(B)はアルテメテルに加えて、UM171を含む培地で培養した後の生細胞数を示す。

[図2]ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を培養した結果を示し、(A)はアルテメテルのみを含む培地で、(B)はアルテメテルに加えて、UM171を含む培地で培養した後のCD34陽性細胞数を示す。

[図3]ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を培養した結果を示し、(A)はアルテメテルのみを含む培地で、(B)はアルテメテルに加えて、UM171を含む

む培地で培養した後のCFU-GEMMコロニーの数を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 〔培養方法〕

一態様として、本発明の造血幹細胞の培養方法は、造血幹細胞を含む細胞集団を、式（１）で表される化合物、又はその塩を１以上含む培地中で培養することを含む。

[0013] 一態様として、本発明の造血幹細胞の培養方法は、造血幹細胞を含む細胞集団を、アルテメテル（Artemether）、アルテミシニン（Artemisinin）、アルテニモール（Artenimol）、アルテモチル（Artemotil）、及び、アルテスネイト（Artesunate）からなる群から選択される１以上の化合物若しくはその誘導体、又はこれらの塩を含む培地中で培養することを含む。

[0014] <造血幹細胞>

「造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）」は、主に骨髓に存在し、自己複製能（self-renewal capacity）及び、全ての血液細胞に分化できる多分化能（multipotency）を有する血液細胞である。ここで、自己複製とは、細胞分裂により自らと同じ機能・性質を有する細胞を産生することをいう。すなわち、造血幹細胞の自己複製により産生された細胞は、全ての血液細胞への多分化能及び自己複製能を有する。

[0015] 造血幹細胞は、その造血維持能力により、短期造血幹細胞と長期造血幹細胞に分類される。一般的に、長期造血幹細胞は短期造血幹細胞に比して、自己複製能をより長期に持続可能な造血幹細胞を指し、長期造血幹細胞は、長期骨髓再構築能（例えば、２次移植においても骨髓を再構築する能力）を有する。一方、短期造血幹細胞は、in vitro又は１次移植では骨髓を再構築することができるが、２次移植ではこの能力を維持できない。ここで、２次移植とは、１次移植により再構築された骨髓由来の造血幹細胞を、別の個体に移植することを意味する。本明細書において、特に言及しない限り

、造血幹細胞とは、短期造血幹細胞と長期造血幹細胞の両方を指す。

[0016] 造血幹細胞の分化とは、長期造血幹細胞（long-term HSC: LT-HSC）が短期造血幹細胞へ、短期造血幹細胞が多能性造血前駆細胞へ、多能性造血前駆細胞が少能性造血前駆細胞へ、少能性造血前駆細胞が単能性造血前駆細胞へ、単能性造血前駆細胞が特有の機能を有する成熟細胞、すなわち、赤血球、白血球、巨核球、血小板などの成熟血液細胞に変換していくことをいう。これら一連の造血幹細胞の分化に関連した細胞種のうち、自己複製能を有しているのは、長期造血幹細胞及び短期造血幹細胞に限られ、多能性造血前駆細胞より下流の細胞は、分化に伴う細胞分裂能は有するものの、自己複製能は有しないとされている。

[0017] 本明細書において、造血幹細胞の「増殖」とは、通常生体外で、造血幹細胞を培養する等によって、当該造血幹細胞の数が増加することを意味する。このような造血幹細胞の増殖は、少なくとも一部の造血幹細胞から同一の性質を有する造血幹細胞の自己複製により達成されうる。造血幹細胞は、生体内において自己複製することが知られているが、この自己複製を誘導する特定の因子は同定されておらず、生体外において造血幹細胞に対し生体内と同様の自己複製を誘導し、これを増殖させることは困難であった。本発明の培養方法により、生体外において造血幹細胞を自己複製能及び多分化能を維持したまま増殖させることができる。

[0018] 造血幹細胞は、発現するマーカー、好ましくは造血幹細胞に特異的に発現するマーカー、及び造血幹細胞で発現が認められないマーカー（ネガティブマーカー）を指標として同定することができる。

[0019] 例えば、マウス長期造血幹細胞に特異的に発現するマーカーとしては、Hoxb5が挙げられる（非特許文献1）。一態様として、マウス長期造血幹細胞は、Lineage陰性、c-Kit陽性、Sca-1陽性、Flk2陰性、CD34陰性若しくは弱陽性、CD150陽性及びHoxb5陽性からなる群から選択される1以上を指標に識別される細胞であってよい。

[0020] 一方、マウス短期造血幹細胞は、Hoxb5が発現していないことが確認

されている。一態様として、マウス短期造血幹細胞は、Lineage陰性、c-Kit陽性、Sca-1陽性、Flk2陰性、CD34陰性若しくは弱陽性、CD150陽性及びHoxb5陰性からなる群から選択される1以上を指標に識別される細胞であってよい。

[0021] 細胞系譜マーカー (Lineage marker) とは、成熟した血液系細胞で発現している抗原の総称をいう。例えば、Ter-119 (赤血球)、B220 (B細胞) などが挙げられるが、これに限らない。ヒト細胞系譜マーカーの一例は、例えば、Notta F et al., Science, 2011 Jul 8; 333 (6039) : 218-21、Sugimura R. et al., Nature, 2017 May 25; 545 (7655) : 432-438、及び、Taya Y. et al., Science, 2016 Dec 2; 354 (6316) : 1152-1155などに報告されている。細胞系譜マーカーの全部又は一部を発現していない細胞をLineage陰性 (Lin陰性若しくはLin-) 細胞と表現することがある。一態様として、マウスLineage陰性細胞は、Ter-119、B220、CD3、CD4、CD8a、Gr-1、CD11b及びIL-7R等を発現していない細胞であってよい。

[0022] 一態様として、ヒト造血幹細胞は、CD34、CD38、Lineage、CD90、CD45RA、CD49fからなる群から選択される1以上のマーカーの発現の有無を指標に識別される細胞 (例: CD34陽性細胞、CD34陽性かつCD38陰性細胞、CD34陽性、CD38陰性、CD90陽性かつCD45RA陰性細胞、CD34陽性、CD38陰性細胞、CD90陰性かつCD45RA陰性細胞、CD34陽性、CD38陰性、CD90陰性かつCD45RA陽性細胞) であってよい。CD34陽性細胞集団のうち、CD34陽性かつCD38陰性細胞集団中に長期造血幹細胞がより多くの割合で存在すると考えられている。

[0023] 本明細書において、「陽性」細胞とは、特定のマーカータンパク質を発現している細胞を意味し、「陰性」細胞とは特定のマーカータンパク質を発現

していない細胞を意味する。例えば、CD34陽性とは、CD (cluster of differentiation) 34抗原を細胞表面上に発現している細胞のことをいう。また、CD38陰性とは、細胞表面上にCD38抗原を発現していない細胞のことをいう。

[0024] 特定のマーカータンパク質の発現の有無は、当業者であれば周知の方法を用いて確認する事ができる。一態様として、蛍光標識したコントロール抗体を用いて細胞を処理した場合に比べ、当該マーカーに対する蛍光標識抗体を用いて細胞を処理した場合に、有意な蛍光強度の増加が認められるか否かで判断できる。

[0025] ここで、上述したマーカーは当業者にとって周知のマーカーであるが、各種マーカーの遺伝子配列及びアミノ酸配列は、GenBank等により確認することが可能である。例えば、マウスHoxb5遺伝子として、GenBank Accession No. : 15413 (NC_000077.6) が挙げられ、マウスHoxb5タンパク質として、GenBank Accession No. : NP_032294.2) 等が挙げられる。また、各種マーカーに対する抗体なども市販品を入手することができ、当該抗体を用いて、マーカーの発現又は発現量を検出することができる。

[0026] 造血幹細胞の自己複製能は当業者に公知の方法で測定することができる。例えば、ヒト造血幹細胞は、上述したマーカー（例：CD34陽性かつCD38陰性）の発現の有無により識別される細胞数の増加を指標として測定することができる。また、一態様として、マウス造血幹細胞の自己複製能は、cKit陽性Lin陰性Sca1陽性細胞数の増加を指標として測定することができる。また、マウス長期造血幹細胞の自己複製能も測定することができる。例えば、Hoxb5陽性の細胞数の増加を指標として測定することができる。

[0027] 造血幹細胞の多分化能は、培養して得られた細胞に対して、少なくとも2種類以上の異なる造血前駆細胞又はそれらから派生する血液細胞への分化誘導処理を施し、所望の造血前駆細胞又は血液細胞への分化を確認することで

測定することができる。

[0028] ヒトの造血幹細胞又は長期造血幹細胞としての機能を確認する方法には、免疫不全マウスへ移植する方法がよく用いられている。例えば、ヒト造血細胞を移植するとほぼすべてのヒト成熟血液細胞を産生することができる免疫不全マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic : 以下、「NOGマウス」、Blood (2012), 100(9):113-1124) を用いることができる。培養した造血幹細胞をこのマウスに移植することにより、移植された細胞の骨髄への生着能、多分化能、骨髄再構築能を測定することが可能である。さらに、一度移植が成立した免疫不全マウスの骨髄を採取し、別のNOGマウスに再度移植 (2次移植) することによって、移植した細胞の自己複製能及び長期骨髄再構築能の測定が可能である。また、長期骨髄再構築能は、致死量の放射線照射した免疫無防備状態のNOGマウスに造血幹細胞を移植し、長期 (移植後1か月以上、好ましくは、2か月以上、3か月以上、4か月以上) に移植した細胞が生着していることによっても確認できる。ヒト細胞を移植する場合、NOGマウス血液中のヒトマーカーを発現する細胞を検出することにより、移植細胞の生着を確認すればよい。具体的には、白血球共通抗原であるヒトCD45をその抗体等により検出すればよい。移植後1か月 (好ましくは、2か月、3か月、4か月) における、血液中のヒト白血球細胞 (例: ヒトCD45陽性細胞) の割合が、比較対象と比べて増加していればよい。すなわち、比較対象に対し当該割合が維持又は増加している場合、対象の長期造血幹細胞が維持又は増幅していることを確認できる。ここで、比較対象とは、例えば、本発明の化合物を含まないこと以外、培養条件を一致させた培養方法により得られた細胞集団、又は、培養前の細胞集団であってよい。移植後1か月 (好ましくは、2か月、3か月、4か月) における、血液中のヒト白血球細胞 (例: ヒトCD45陽性細胞) の割合は、移植細胞数などの実験条件に大きく依存する。従って、血液中のヒト白血球細胞 (例: ヒトCD45陽性細胞) の割合の高低は問題にはならないが、例えば、当該割合は0.1%以上、0.5%以上、1%以上、5%以上、10%以上であってよい。

なお、レシピエントにおいて、ドナー由来の細胞（例：白血球細胞）に一部置き換わることをキメリズム（又は、ドナーキメリズム）、ドナー由来の細胞（例：白血球細胞）の割合を、キメラ率と呼ぶこともある。すなわち、上述のNOGマウスへのヒト細胞の移植実験においては、マウス血液中においてヒト白血球細胞（例：ヒトCD45陽性細胞）に一部置き換わることをキメリズム、ヒト白血球細胞の割合をキメラ率と呼ぶことがある。この方法により、造血幹細胞としての機能が確認された細胞は、実際の造血幹細胞移植への適用に適した細胞であるといえる。

[0029] すなわち、上記[1]～[11]に記載の培養方法は、哺乳動物に移植された場合に、成熟血液細胞を産生する能力を上昇させる細胞集団の培養方法でもある。

[0030] また、上記[1]～[11]に記載の培養方法は、骨髓への生着能、多分化能及び骨髓再構築能の少なくとも1つ、好ましくは全ての能力を上昇させる細胞集団の培養方法でもある。

[0031] 本明細書における造血幹細胞は、ほ乳動物由来であってよく、例えばヒト、サル、ラット、マウス等由来の造血幹細胞であってよい。造血幹細胞（造血幹細胞を含む細胞集団）は、「製造方法」（工程（1））に記載した方法によって準備することができる。

[0032] <培養対象である造血幹細胞を含む細胞集団>

本明細書における「細胞集団」とは、同一種類又は異なる種類の細胞が2以上存在している集団を意味する。好ましくは、細胞集団は培地等の媒体中に存在する。細胞集団は、細胞懸濁液及び細胞凝集体を含み、細胞懸濁液又は細胞凝集体の形態であることが好ましい。

[0033] 培養対象である造血幹細胞を含む細胞集団は、造血幹細胞を含む、2以上の細胞の集団であれば特に限定されず、造血幹細胞（長期造血幹細胞及び／又は短期造血幹細胞）のみを含む細胞集団であってよく、造血幹細胞とそれ以外の細胞を含む細胞集団であってよい。本明細書において、特に言及しない限り、「造血幹細胞を含む細胞集団」とは、造血幹細胞のみを含む細胞集

団と、造血幹細胞とそれ以外の細胞を含む細胞集団の両方をいう。造血幹細胞は好ましくは、長期造血幹細胞であってよい。すなわち、本明細書における培養対象の「造血幹細胞を含む細胞集団」には、長期造血幹細胞を含む。

[0034] 本明細書において、上記細胞集団に含まれ得る造血幹細胞以外の細胞として、造血前駆細胞、成熟血液細胞などが挙げられる。

[0035] 造血前駆細胞には、多能性造血前駆細胞、少能性造血前駆細胞及び単能性造血前駆細胞がある。多能性、少能性及び単能性の区別は、血液細胞への分化能の程度による区別である。

[0036] 多能性造血前駆細胞とは、全ての血液細胞に分化できる多分化能を有した細胞であるが、自己複製できない細胞である。このため、血液細胞を一時的に産生することができるが、細胞が全て分化してしまうと造血前駆細胞が枯渇してしまい、破壊された骨髄を再構築することができない。

[0037] 少能性造血前駆細胞とは、全てではないが複数の血液細胞に分化できるが、自己複製できない細胞である。例えば、顆粒球・単球系前駆細胞（CFU-GEMM）、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）などがある。GEMMは、顆粒球（granulocyte）、赤血球（erythrocyte）、単球（monocyte）、巨核球（megakaryocyte）の頭文字を表す。

[0038] 単能性造血前駆細胞とは、特定の、単一の血液細胞に分化できるが、自己複製能を持たない細胞である。例えば単能性造血前駆細胞には、赤芽球系前駆細胞である赤芽球バースト形成細胞（BFU-E）などがある。

[0039] 機能的な方法による造血前駆細胞の測定法としてコロニー法（例えば、Ueda T. et al, J.Clin. Invest. (2000) 105:101013-1021）が古くから用いられている。コロニー法（CFUアッセイともいう）により測定される最も未熟なコロニーは赤血球と白血球が混在した混合コロニー（以下、「CFU-GEMM」という）である。造血幹細胞を含む細胞集団を用いてコロニー法を行った場合、造血幹細胞は分化しながら各種コロニーを形成する。従って、特定の造血幹細胞を含む細胞集団から多くの混合コロニー（CFU-GE

MM) が形成される場合、当該細胞集団中は造血幹細胞又は長期造血幹細胞を含む未分化細胞分画を多く含むといえる。

[0040] すなわち、上記 [1] ～[1 1] に記載の培養方法は、造血幹細胞由来の混合コロニー (C F U - G E M M) を形成する能力を有する細胞又は細胞集団の培養方法でもある。

[0041] 成熟血液細胞とは、造血幹細胞から造血前駆細胞を経て形成される成熟した細胞集団のことをいう。赤血球、好中球、単球、好酸球、好塩基球、マクロファージ、血小板、マスト細胞、T細胞、B細胞、NK細胞、NK T細胞などがあり、造血幹細胞又は当該成熟血液細胞の上流に位置する造血前駆細胞を分化させて得ることができる。また、これら成熟血液細胞は、公知の方法を用いて細胞に発現している特異的なマーカーによって判別することができる。例えば、単球、マクロファージ及び顆粒球系のマーカーとしてC D 3 3、巨核球系・血小板マーカーとしてC D 4 1、赤血球系マーカーとしてC D 2 3 5 a、B細胞系マーカーとしてC D 1 9、T細胞系マーカーとしてC D 3 などが知られている。

[0042] 本明細書において培養対象である造血幹細胞を含む細胞集団は、例えば、血液や骨髄から採集される細胞集団であってもよく、多能性幹細胞 (例 : i P S 細胞、E S 細胞) から人工的に作製されたものであってもよい。具体的な方法として、〔製造方法〕に記載した方法が挙げられる。

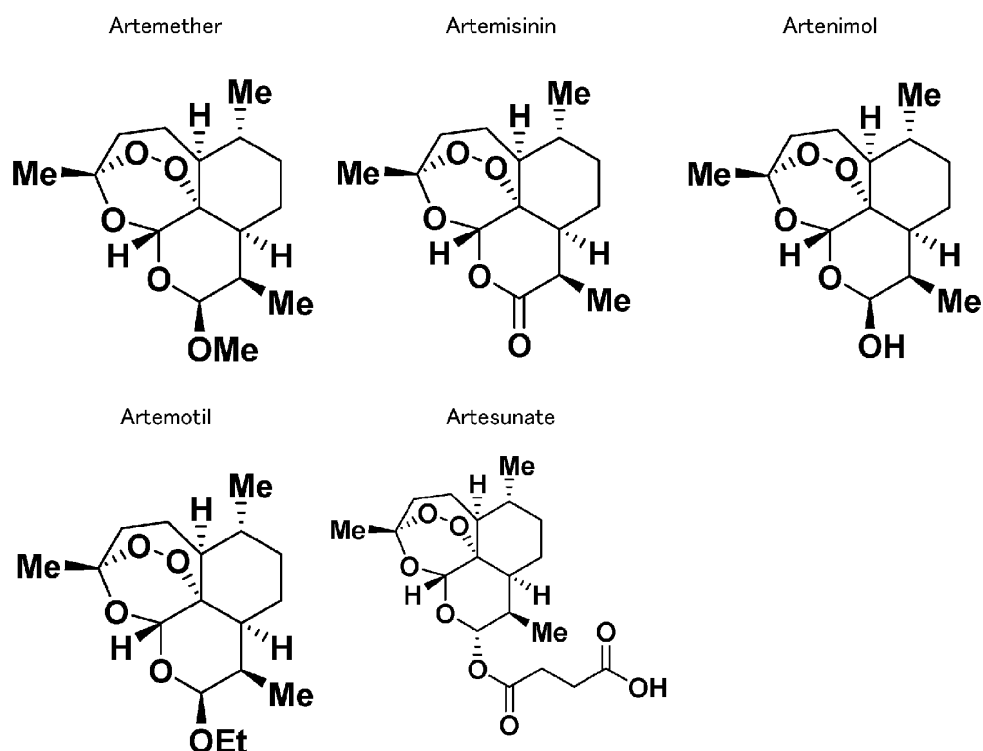
[0043] <化合物>

一態様として、本発明の化合物は、上述の式 (1) の化合物又はその塩であり、好ましくは式 (2) 、又は式 (3 - 1) 、式 (3 - 2) 若しくは式 (3 - 2) 、更に好ましくは式 (4 - 1) 、式 (4 - 2) 若しくは式 (4 - 3) の化合物又はその塩を挙げることができる。

[0044] 一態様として、本発明の化合物は、以下の化学式に示される化合物又はその塩である。これらの化合物のいずれも、抗マラリア活性を有するセスキテルペンラクトン化合物であり、多薬剤耐性をもつ熱帯熱マラリアにも効果的であるとされている (J i g a n g W a n g e t a l . , N A T U

RE COMMUNICATIONS 2015 6:10111 DOI : 10.1038)。そのうち、アルテミシニン (Artemisinin) は古くから漢方薬として利用されていたヨモギ属の植物であるクソニンジン (*Artemisia annua*、中国名: チンハオス (Qinghaosu)) から分離・命名された化合物である。

[化10]



(各式中、Meはメチル基を表し、Etはエチル基を表す。)

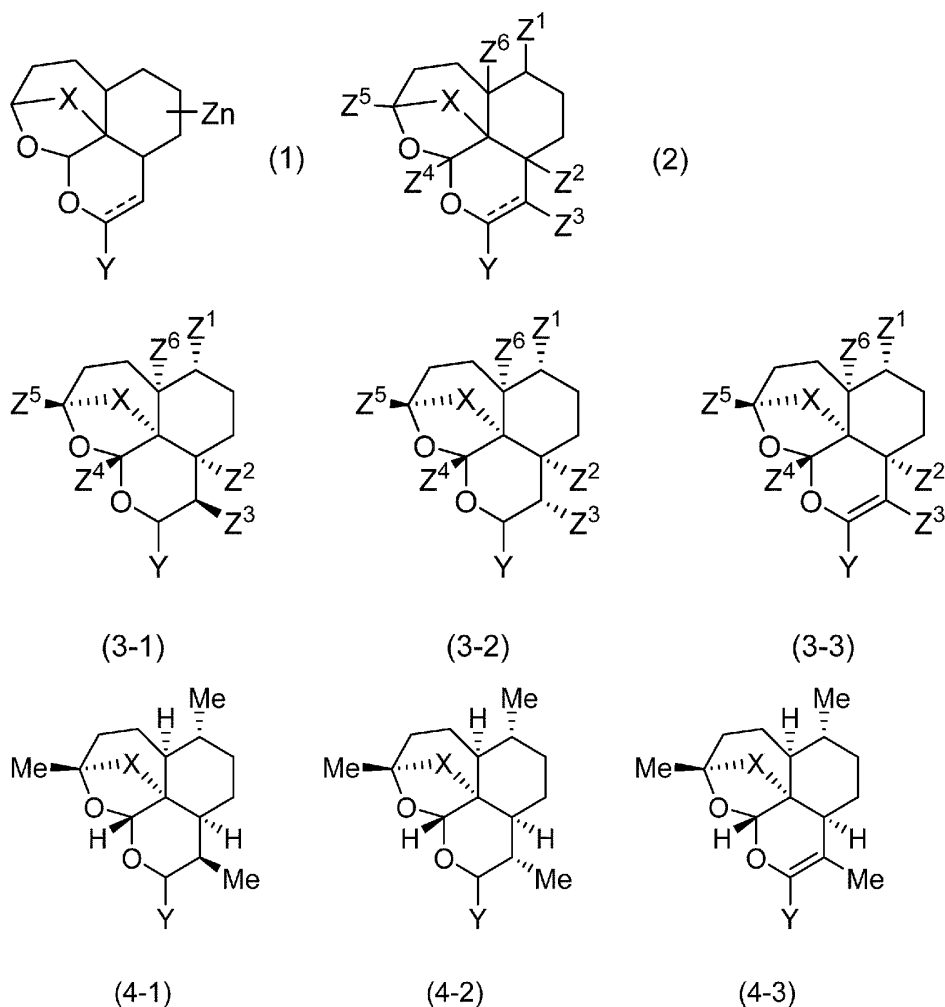
[0045] Artemisinin及びその誘導体は、抗ガン作用を有することも報告されている (YinKwanWong et al., Med Res Rev 2017; 37:1492-1517)。上記文献によれば、抗マラリア作用の IC_{50} は数 nM オーダーであり、抗ガン作用の IC_{50} は約 $100 \mu M$ である。これまでは、これらの化合物による造血幹細胞への作用が報告されていない。

[0046] 本発明の培養方法に使用できる化合物は、アルテメテル (Artemether)

her)、アルテミシニン (Artemisinin)、アルテニモール (Artenimol)、アルテモチル (Artemotil)、及び、アルテスネイト (Artesunate) からなる群から選択される1以上の化合物若しくはその塩であってよく、また、アルテメテル (Artemether)、アルテミシニン (Artemisinin)、アルテニモール (Artenimol)、アルテモチル (Artemotil)、及び、アルテスネイト (Artesunate) からなる群から選択される1以上の化合物の誘導体若しくはその塩あってもよい。なお、式(1)の化合物は、アルテメテル、アルテミシニン、アルテニモール、アルテモチル、又はアルテスネイトの誘導体であるといえる。

[0047] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)及び式(4-3)の化合物又はその塩について、以下に説明する。

[化11]



[0048] 式(1)中、

[化12]

==

は単結合又は二重結合であり、

XはO-O又はOであり、

Yは、水素原子、ヒドロキシ、オキソ、メルカプト、カルボキシ、カルバモ
 イル、OR¹、SR¹、SOR¹、SO₂R¹、COR¹、OCOR¹、R²、CO
 OR¹、NR³R⁴、NR⁵COR¹、NR⁵SO₂R¹、NR⁵CONR³R⁴又は
 ハロゲンであり、

Zは、縮合環の任意の位置の炭素に結合しており、各々独立してC₁₋₆アルキルであり、

nは、0～10の整数であり、

R¹は、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリール、又は置換されていてもよい脂肪族複素環基であり、

R²は、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリール、又は置換されていてもよい脂肪族複素環基であり、

R³、R⁴及びR⁵は、独立して、水素原子、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよい脂肪族複素環基、置換されていてもよいアリール、又は置換されていてもよいヘテロアリールであり、ここにおいてR³とR⁴は、隣接する窒素原子と一緒にあって、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい3～8員の含窒素脂肪族複素環を形成してよく、当該含窒素脂肪族複素環は置換されていてもよい。

nは、0～10の整数であってよく、好ましくは0～6、更に好ましくは0～3の整数である。

[0049] 式(2)中、

[化13]

==

は単結合又は二重結合であり、

X及びYは式(1)における定義と同じであり、

Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶は、独立して水素原子又はC₁₋₆アルキルである。式(2)において、Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶が、独立して水素原子又はメチルであることが好ましい。

[0050] 式(3-1)、式(3-2)及び式(3-3)中、

X及びYは式(1)における定義と同じであり、

Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶は、独立して水素原子又はC₁₋₆アルキルである。ここで、Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶が、独立して水素原子又はメチルであることが好ましい。

式(4-1)、式(4-2)及び式(4-3)中、

X及びYは、式(1)における定義と同じである。

[0051] 「置換されていてよい」又は「置換されている」で定義される基における置換基の数は、置換可能であれば特に制限はない。また、特に指示した場合を除き、各々の基の説明はその基が他の基の一部分又は置換基である場合にも該当する。

[0052] 「ハロゲン」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素が挙げられる。好ましくはフッ素、又は塩素である。さらに好ましくは、フッ素である。

[0053] 「アルキル」とは、直鎖状又は分枝鎖状の飽和炭化水素基を意味し、炭素数1～25のアルキル、好ましくは炭素数1～10のアルキルが挙げられる。更に好ましいアルキルとして、「C₁₋₈アルキル」、「C₁₋₆アルキル」又は「C₁₋₄アルキル」が挙げられる。

[0054] 「C₁₋₁₀アルキル」とは、炭素原子数が1～10の直鎖状又は分枝鎖状の飽和炭化水素基を意味する。尚、他の数字の場合も同様である。

「C₁₋₁₀アルキル」として、好ましくは「C₁₋₈アルキル」が挙げられ、より好ましくは「C₁₋₆アルキル」、更に好ましくは「C₁₋₄アルキル」が挙げられる。

「C₁₋₈アルキル」として、好ましくは「C₁₋₆アルキル」、更に好ましくは「C₁₋₄アルキル」が挙げられる。

「C₁₋₆アルキル」として、好ましくは「C₁₋₄アルキル」が挙げられる。「C₁₋₄アルキル」の具体例としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、1-メチルエチル、ブチル、1、1-ジメチルエチル、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル等が挙げられる。「C₁₋₆アルキル」の具体例としては

、例えば、上記「C₁₋₄アルキル」の具体例として挙げたものに加え、4-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2-メチルペンチル、1-メチルペンチル、ヘキシル等が挙げられる。「C₁₋₈アルキル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキル」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチル、オクチル等が挙げられる。

[0055] 「アルケニル」とは、二重結合を1又は複数、好ましくは1～3個有する直鎖状又は分枝鎖状の不飽和炭化水素基を意味し、炭素数2～7のアルケニルが挙げられる。本明細書において、アルケニルとしては、ビニル、アリル、ブタジエニル等が挙げられる。

[0056] 「アルキニル」とは、三重結合を1又は複数、好ましくは1～2個有する直鎖状又は分枝鎖状の不飽和炭化水素基を意味し、炭素数2～5のアルキニルが挙げられる。本明細書において、アルキニルとしては、エチニル、プロピニル等が挙げられる。

[0057] 「シクロアルキル」とは、飽和の環状アルキルを意味し、一部架橋された構造のものも含まれる。シクロアルキルとして、「C₃₋₈シクロアルキル」、又は「C₃₋₆シクロアルキル」が挙げられる。

[0058] 「C₃₋₈シクロアルキル」とは、環を構成する炭素原子数が3～8のシクロアルキルを意味する。「C₃₋₈シクロアルキル」として、好ましくは「C₃₋₆シクロアルキル」が挙げられる。「C₃₋₆シクロアルキル」の具体例としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等が挙げられる。「C₃₋₈シクロアルキル」の具体例としては、例えば、上記「C₃₋₆シクロアルキル」の具体例として挙げたものに加え、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。

[0059] 「アリール」とは、単環式又は二環式の芳香族炭化水素を意味し、「C₆₋₁₀アリール」が挙げられる。

「C₆₋₁₀アリール」とは、炭素原子数が6～10のアリールを意味する。「C₆₋₁₀アリール」の具体例としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル等が挙げられる。「C₆₋₁₀アリール」として、好ましくはフェ

ニルが挙げられる。

- [0060] 「ヘテロアリアル」とは、単環式又は複環式の1～4個の窒素原子、1個の酸素原子及び1個の硫黄原子からなる群から独立して選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む、芳香族複素環基を意味する。

尚、ヘテロアリアルが置換している場合、化学的に安定である限り、任意の炭素原子又は窒素原子上で置換していてもよい。

- [0061] 「5～10員のヘテロアリアル」とは、5～10個の原子で構成される単環式又は二環式のヘテロアリアルを意味する。「5～10員のヘテロアリアル」として、好ましくは「5～6員のヘテロアリアル」が挙げられ、具体的には、フリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアゾリル、ピリジル、ピリミジニル、ピラジニル、プリダジニル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアジニル、トリアゾリル、イミダゾリジニル、オキサジアゾリル等が挙げられる。「5～10員のヘテロアリアル」の具体例としては、例えば、上記「5～6員のヘテロアリアル」の具体例として挙げたものに加え、インドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンズイソオキサゾリル、ベンズイソチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイミダゾリル、6, 11-ジヒドロジベンゾ [b, e] チエピニル等が挙げられる。

- [0062] 「脂肪族複素環基」とは、単環式又は二環式の炭素原子以外に1～2個の窒素原子、1～2個の酸素原子及び1～2個の硫黄原子からなる群から独立して選択される1～4個のヘテロ原子を含む、飽和又は不飽和の脂肪族複素環基を意味する。

尚、脂肪族複素環基が置換している場合、化学的に安定である限り、任意の炭素原子又は窒素原子上で置換していてもよい。

- [0063] 「4～10員の脂肪族複素環基」とは、4～10個の原子で構成される脂肪族複素環基を意味し、一部架橋された構造のもの、一部スピロ化されたもの、又は C_{6-10} アリアル若しくは C_{5-10} ヘテロアリアルと縮環を形成したもの

のも含まれる。「4～10員の脂肪族複素環基」として、好ましくは4～6員の単環式飽和複素環基が挙げられる。「4～6員の単環式飽和複素環基」の具体例としては、例えば、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、テトラヒドロフリル、テトラヒドロピラニル等が挙げられる。「4～10員の飽和複素環基」の具体例としては、例えば、上記「4～6員の単環式飽和複素環基」の具体例として挙げたものに加え、アゼパニル、オキセパニル、ジアゼパニル、ホモピペリジニル等が挙げられる。

[0064] 「4～10員の含窒素脂肪族複素環」としては、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい4～10員の含窒素脂肪族複素環が挙げられる。当該含窒素脂肪族複素環は、単環式又は二環式であってよく、飽和若しくは不飽和の含窒素脂肪族複素環であってよい。「4～10員の含窒素脂肪族複素環」として、好ましくは4～6員の単環式飽和含窒素複素環が挙げられる。「4～6員の単環式飽和含窒素複素環」の具体例としては、例えば、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン等が挙げられる。「4～10員の飽和複素環」の具体例としては、例えば、上記「4～6員の単環式飽和複素環」の具体例として挙げたものに加え、アゼパン、オキセパンニル、ジアゼパン、ホモピペリジン等が挙げられる

[0065] 「アルコキシ」とは、アルキルによって置換されたオキシ基を意味し、好ましいアルコキシとして、「C₁₋₈アルコキシ」、「C₁₋₆アルコキシ」又は「C₁₋₄アルコキシ」が挙げられる。

「C₁₋₈アルコキシ」とは、上記「C₁₋₈アルキル」によって置換されたオキシ基を意味する。「C₁₋₈アルコキシ」として、好ましくは「C₁₋₆アルコキシ」、又は「C₁₋₄アルコキシ」が挙げられる。「C₁₋₄アルコキシ」の具体例としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、1-メチルエトキシ、ブトキシ、1, 1-ジメチルエトキシ、1-メチルプロポキシ、2-メチルプロポキシが挙げられる。「C₁₋₆アルコキシ」の具体例としては、例

例えば、上記「C₁₋₄アルコキシ」の具体例として挙げたものに加え、ペンチロキシ、3-メチルブトキシ、2-メチルブトキシ、2, 2-ジメチルプロポキシ、1-エチルプロポキシ、1, 1-ジメチルプロポキシ、ヘキシロキシ、4-メチルペンチロキシ、3-メチルペンチロキシ、2-メチルペンチロキシ、1-メチルペンチロキシ、3, 3-ジメチルブトキシ、2, 2-ジメチルブトキシ、1, 1-ジメチルブトキシ、1, 2-ジメチルブトキシ等が挙げられる。「C₁₋₈アルコキシ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルコキシ」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ等が挙げられる。

- [0066] 「C₁₋₈アルキルカルボニル」とは、上記「C₁₋₈アルキル」によって置換されたカルボニル基を意味する。「C₁₋₈アルキルカルボニル」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルカルボニル」、又は「C₁₋₄アルキルカルボニル」が挙げられる。「C₁₋₄アルキルカルボニル」の具体例としては、例えば、メチルカルボニル、エチルカルボニル、プロピルカルボニル、1-メチルエチルカルボニル、ブチルカルボニル、1, 1-ジメチルエチルカルボニル、1-メチルプロピルカルボニル、2-メチルプロピルカルボニル等が挙げられる。「C₁₋₆アルキルカルボニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルカルボニル」の具体例として挙げたものに加え、4-メチルペンチルカルボニル、3-メチルペンチルカルボニル、2-メチルペンチルカルボニル、1-メチルペンチルカルボニル、ヘキシルカルボニル等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルカルボニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルカルボニル」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルカルボニル、オクチルカルボニル等が挙げられる。

- [0067] 「C₁₋₈アルキルカルボニルオキシ」とは、上記「C₁₋₈アルキルカルボニル」によって置換されたオキシ基を意味する。「C₁₋₈アルキルカルボニルオキシ」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルカルボニルオキシ」、又は「C₁₋₄アルキルカルボニルオキシ」が挙げられる。「C₁₋₄アルキルカルボニルオキシ」の具体例としては、例えば、例えば、アセトキシ、プロパノイルオキシ

、ブタノイルオキシ、2-メチルプロパノイルオキシ、ペンタノイルオキシ、2, 2-ジメチルプロパノイルオキシ、2-メチルブタノイルオキシ、3-メチルブタノイルオキシが挙げられる。「C₁₋₆アルキルカルボニルオキシ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルカルボニルオキシ」の具体例として挙げたものに加え、ヘキサノイルオキシ、3, 3-ジメチルブタノイルオキシ、3-メチルペンタノイルオキシ、4-メチルペンタノイルオキシ、2, 2-ジメチルブタノイルオキシ、2, 3-ジメチルブタノイルオキシ、2-エチルブタノイルオキシ、3-エチルブタノイルオキシ、ヘプタノイルオキシ、2-メチルヘキサノイルオキシ、3-メチルヘキサノイルオキシ、4-メチルヘキサノイルオキシ、5-メチルヘキサノイルオキシ、2, 2-ジメチルペンタノイルオキシ、3, 3-ジメチルペンタノイルオキシ、4, 4-ジメチルペンタノイルオキシ、2, 3-ジメチルペンタノイルオキシ、2, 4-ジメチルペンタノイルオキシ、2-エチルペンタノイルオキシ、3-エチルペンタノイルオキシ、4-エチルペンタノイルオキシ等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルカルボニルオキシ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルカルボニルオキシ」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルカルボニルオキシ、オクチルカルボニルオキシ等が挙げられる。

[0068] 「C₁₋₈アルコキシカルボニル」とは、上記「C₁₋₈アルコキシ」によって置換されたカルボニル基を意味する。「C₁₋₈アルコキシカルボニル」として、好ましくは「C₁₋₆アルコキシカルボニル」、又は「C₁₋₄アルコキシカルボニル」が挙げられる。「C₁₋₄アルコキシカルボニル」の具体例としては、例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、1-メチルエトキシカルボニル、ブトキシカルボニル、1, 1-ジメチルエトキシカルボニル、1-メチルプロポキシカルボニル、2-メチルプロポキシカルボニルが挙げられる。「C₁₋₆アルコキシカルボニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルコキシカルボニル」の具体例として挙げたものに加え、ペンチロキシカルボニル、3-メチルブトキシカルボニル、2-メチルブトキシカルボニル、2, 2-ジメチルプロポキシカルボニル、1-

エチルプロポキシカルボニル、1, 1-ジメチルプロポキシカルボニル、ヘキシロキシカルボニル、4-メチルペンチロキシカルボニル、3-メチルペンチロキシカルボニル、2-メチルペンチロキシカルボニル、1-メチルペンチロキシカルボニル、3, 3-ジメチルブトキシカルボニル、2, 2-ジメチルブトキシカルボニル、1, 1-ジメチルブトキシカルボニル、1, 2-ジメチルブトキシカルボニル等が挙げられる。「C₁₋₈アルコキシカルボニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルコキシカルボニル」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルオキシカルボニル、オクチルオキシカルボニル等が挙げられる。

[0069] 「C₁₋₈アルキルスルファニル」とは、上記「C₁₋₈アルキル」によって置換されたスルファニル基を意味する。「C₁₋₈アルキルスルファニル」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルスルファニル」、又は「C₁₋₄アルキルスルファニル」が挙げられる。「C₁₋₄アルキルスルファニル」の具体例としては、例えば、メチルスルファニル、エチルスルファニル、プロピルスルファニル、1-メチルエチルスルファニル、ブチルスルファニル、1, 1-ジメチルエチルスルファニル、1-メチルプロピルスルファニル、2-メチルプロピルスルファニルが挙げられる。「C₁₋₆アルキルスルファニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルスルファニル」の具体例として挙げたものに加え、ペンチルスルファニル、3-メチルブチルスルファニル、2-メチルブチルスルファニル、2, 2-ジメチルプロピルスルファニル、1-エチルプロピルスルファニル、1, 1-ジメチルプロピルスルファニル、ヘキシルスルファニル、4-メチルペンチルスルファニル、3-メチルペンチルスルファニル、2-メチルペンチルスルファニル、1-メチルペンチルスルファニル、3, 3-ジメチルブチルスルファニル、2, 2-ジメチルブチルスルファニル、1, 1-ジメチルブチルスルファニル、1, 2-ジメチルブチルスルファニル等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルスルファニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルスルファニル」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルスルファニル、オクチルスルファニル等が挙げ

られる。

- [0070] 「C₁₋₈アルキルスルホニル」とは、上記「C₁₋₈アルキル」によって置換されたスルホニル基を意味する。「C₁₋₈アルキルスルホニル」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルスルホニル」、又は「C₁₋₄アルキルスルホニル」が挙げられる。「C₁₋₄アルキルスルホニル」の具体例としては、例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、1-メチルエチルスルホニル、ブチルスルホニル、1, 1-ジメチルエチルスルホニル、1-メチルプロピルスルホニル、2-メチルプロピルスルホニルが挙げられる。
- 「C₁₋₆アルキルスルホニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルスルホニル」の具体例として挙げたものに加え、ペンチルスルホニル、3-メチルブチルスルホニル、2-メチルブチルスルホニル、2, 2-ジメチルプロピルスルホニル、1-エチルプロピルスルホニル、1, 1-ジメチルプロピルスルホニル、ヘキシルスルホニル、4-メチルペンチルスルホニル、3-メチルペンチルスルホニル、2-メチルペンチルスルホニル、1-メチルペンチルスルホニル、3, 3-ジメチルブチルスルホニル、2, 2-ジメチルブチルスルホニル、1, 1-ジメチルブチルスルホニル、1, 2-ジメチルブチルスルホニル等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルスルホニル」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルスルホニル」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルスルホニル、オクチルスルホニル等が挙げられる。

- [0071] 「C₁₋₈アルキルスルホニルアミノ」とは、上記「C₁₋₈アルキルスルホニル」によって置換されたアミノ基を意味する。「C₁₋₈アルキルスルホニルアミノ」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルスルホニルアミノ」、又は「C₁₋₄アルキルスルホニルアミノ」が挙げられる。「C₁₋₄アルキルスルホニルアミノ」の具体例としては、例えば、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノ、プロピルスルホニルアミノ、1-メチルエチルスルホニルアミノ、ブチルスルホニルアミノ、1, 1-ジメチルエチルスルホニルアミノ、1-メチルプロピルスルホニルアミノ、2-メチルプロピルスルホニルアミノ

ノが挙げられる。「C₁₋₆アルキルスルホニルアミノ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルスルホニルアミノ」の具体例として挙げたものに加え、ペンチルスルホニルアミノ、3-メチルブチルスルホニルアミノ、2-メチルブチルスルホニルアミノ、2, 2-ジメチルプロピルスルホニルアミノ、1-エチルプロピルスルホニルアミノ、1, 1-ジメチルプロピルスルホニルアミノ、ヘキシルスルホニルアミノ、4-メチルペンチルスルホニルアミノ、3-メチルペンチルスルホニルアミノ、2-メチルペンチルスルホニルアミノ、1-メチルペンチルスルホニルアミノ、3, 3-ジメチルブチルスルホニルアミノ、2, 2-ジメチルブチルスルホニル、1, 1-ジメチルブチルスルホニル、1, 2-ジメチルブチルスルホニルアミノ等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルスルホニルアミノ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルスルホニルアミノ」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルスルホニルアミノ、オクチルスルホニルアミノ等が挙げられる。

[0072] 「C₁₋₈アルキルカルボニルアミノ」とは、上記「C₁₋₈アルキルカルボニル」によって置換されたアミノ基を意味する。「C₁₋₈アルキルカルボニルアミノ」として、好ましくは「C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ」、又は「C₁₋₄アルキルカルボニルアミノ」挙げられる。「C₁₋₄アルキルカルボニルアミノ」の具体例としては、例えば、例えば、アセチルアミノ、プロパノイルアミノ、ブタノイルアミノ、2-メチルプロパノイルアミノ、ペンタノイルアミノ、2, 2-ジメチルプロパノイルアミノ、2-メチルブタノイルアミノ、3-メチルブタノイルアミノが挙げられる。「C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₄アルキルカルボニルアミノ」の具体例として挙げたものに加え、ヘキサノイルアミノ、3, 3-ジメチルブタノイルアミノ、3-メチルペンタノイルアミノ、4-メチルペンタノイルアミノ、2, 2-ジメチルブタノイルアミノ、2, 3-ジメチルブタノイルアミノ、2-エチルブタノイルアミノ、3-エチルブタノイルアミノ、ヘプタノイルアミノ、2-メチルヘキサノイルアミノ、3-メチルヘキサノイルアミノ、4-メチルヘキサノイルアミノ、5-メチルヘキサノイルアミノ

、2, 2-ジメチルペンタノイルアミノ、3, 3-ジメチルペンタノイルアミノ、4, 4-ジメチルペンタノイルアミノ、2, 3-ジメチルペンタノイルアミノ、2, 4-ジメチルペンタノイルアミノ、2-エチルペンタノイルアミノ、3-エチルペンタノイルアミノ、4-エチルペンタノイルアミノ等が挙げられる。「C₁₋₈アルキルカルボニルアミノ」の具体例としては、例えば、上記「C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ」の具体例として挙げたものに加え、ヘプチルカルボニルアミノ、オクチルカルボニルアミノ等が挙げられる。

[0073] 1若しくは2のC₁₋₈アルキルで置換されていてもよいアミノの一態様として、例えば、アミノ、又は1若しくは2の同一又は異なる上記「C₁₋₆アルキル」、又は「C₁₋₄アルキル」で置換されたアミノが挙げられる。具体的には、例えば、アミノ、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、2-プロピルアミノ、ブチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルエチルアミノ、ジプロピルアミノ等が挙げられる。

1若しくは2のC₁₋₈アルキルで置換されていてもよいアミノの一態様として、アミノ基の2つの置換基が隣接する窒素原子と一緒にあって、4～10員の含窒素脂肪族複素環を形成していてもよい。当該含窒素脂肪族複素環として、好ましくは、ピペリジン、ピロリジン、ピペラジン、モルホリン等が挙げられる。

[0074] 1若しくは2のC₁₋₈アルキルで置換されていてもよいカルバモイルの一態様として、例えば、カルバモイル、又は1若しくは2の同一又は異なる上記「C₁₋₆アルキル」、又は「C₁₋₄アルキル」で置換されたカルバモイルが挙げられる。具体的には、例えば、カルバモイル、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル、プロピルカルバモイル、2-プロピルカルバモイル、ブチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、メチルエチルカルバモイル、ジプロピルカルバモイル等が挙げられる。

1若しくは2のC₁₋₈アルキルで置換されていてもよいカルバモイルの一態様として、カルバモイル基の2つの置換基が隣接する窒素原子と一緒にあ

て、4～10員の含窒素脂肪族複素環を形成していてもよい。当該含窒素脂肪族複素環として、好ましくは、ピペリジン、ピロリジン、ピペラジン、モルホリン等が挙げられる。

[0075] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)におけるYは、水素原子、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、カルバモイル、OR¹、SR¹、SO₂R¹、COR¹、OCOR¹、R²、NR³R⁴、NR⁵COR¹、NR⁵SO₂R¹、又はフッ素原子であることが好ましい。

[0076] 本発明の一態様として、式(1)、又は式(2)において、

[化14]



で表される結合は、単結合又は二重結合を意味する。ここで、上記結合は、Yがオキソ基の場合は単結合である。

[0077] 本発明の一態様として、式(1)、又は式(2)において、

[化15]



が二重結合の場合、Yは水素原子又はヒドロキシであり、

[化16]



が単結合である場合、

Yは、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、カルバモイル、OR¹、SR¹、SO₂R¹、OCOR¹、R²、NR³R⁴、NR⁵COR¹、NR⁵SO₂R¹又はフッ素原子であり、

R¹が、群1から選択される1～7の置換基で置換されていてもよいC₁₋₈アルキル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～8員のシクロアルキル、群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4

～10員の脂肪族複素環基、又は群1から選択される1～4の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～10員のヘテロアリールであり、

R^2 が、群2から選択される1～7の置換基で置換されていてもよい C_{1-8} アルキル、群2から選択される1～7の置換基で置換されていてもよい C_{1-8} アルケニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～8員のシクロアルキル、群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群1から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～10員の脂肪族複素環基、又は群1から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～10員のヘテロアリールであり、

R^3 及び R^4 は独立して、水素原子、群1から選択される1～7の置換基で置換されていてもよい C_{1-6} アルキル、又は群1から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニルであり、ここにおいて R^3 と R^4 は、隣接する窒素原子と一緒に、更に1又は2の環を構成する酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含んでよい3～8員の含窒素脂肪族複素環を形成してよく、当該含窒素脂肪族複素環は以下の群1の置換基から選択される1～3の置換基で置換されていてもよく、

R^5 が、水素原子又は C_{1-3} アルキルであることが好ましい。

本発明の一態様として、XがO—Oであることが好ましい。

[0078] 本明細書において、 R^1 、 R^3 、 R^4 及び R^5 におけるアルキルが置換されている場合、以下の群1から選択される1～7、好ましくは1～3の置換基で置換されていてもよい。

[0079] 本明細書において、 R^2 におけるアルキル、アルケニル又はアルキニルが置換されている場合、以下の群2から選択される1～7、好ましくは1～3の置換基で置換されていてもよい。

[0080] <群1>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカルボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいアミノ、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、 C_{1-8} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-8} アルキルスルホニルアミノ、群3から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリアル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～8員のシクロアルキル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～10員の脂肪族複素環基、ハロゲン

<群2>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカルボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、アミノ、群3から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群3から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリアル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～8員のシクロアルキル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～8員の脂肪族複素環基、ハロゲン

<群3>

カルボキシ、ヒドロキシ、 C_{1-8} のアルキル、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニル、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-8} アルコキシカル

ボニル、メルカプト、 C_{1-8} アルキルスルファニル、 C_{1-8} アルキルスルホニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいアミノ、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、 C_{1-8} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-8} アルキルスルホニルアミノ、ハロゲン

[0081] シクロアルキルが置換されている場合、上記の群1から選択される1～3、好ましくは1～2の置換基で置換されていてもよい。シクロアルキル基の置換基として、好ましくは、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、ハロゲンが挙げられる。

[0082] 脂肪族複素環基が置換されている場合、上記の群1から選択される1～3、好ましくは1～2の置換基で置換されていてもよい。脂肪族複素環基の置換基として、好ましくは、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、ハロゲンが挙げられる。

[0083] アリールが置換されている場合、上記の群1から選択される1～5、好ましくは1～3の置換基で置換されていてもよい。アリール基の置換基として、好ましくは、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、ハロゲンが挙げられる。

[0084] ヘテロアリールが置換されている場合、上記の群1から選択される1～4、好ましくは1～3の置換基で置換されていてもよい。ヘテロアリール基の置換基として、好ましくは、ヒドロキシ、 C_{1-8} アルコキシ、ハロゲンが挙げられる。

[0085] 群1、群1及び群3は好ましくは、それぞれ、下記の群1'、群2'及び群3'である。

<群1'>

フッ素原子、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{2-4} アルキルカルボニルオキシ、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～6員のシクロアルキル、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基

＜群2'＞

フッ素原子、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{2-4} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、1若しくは2の C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよいフェニル、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～6員のシクロアルキル、群3'から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む4～6員の脂肪族複素環基

＜群3'＞

フッ素原子、ヒドロキシ、 C_{1-4} のアルキル

- [0086] アルケニル又はアルキニルが置換されている場合、下記の群3' 'から選択される1～3、好ましくは1～2の置換基で置換されていてもよい。

＜群3' '＞

フッ素原子

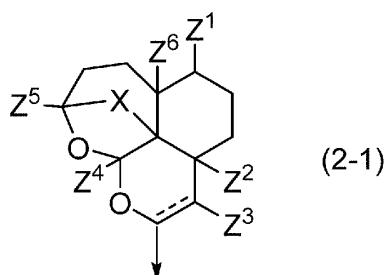
- [0087] X、Y、Z、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^6 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 で、好ましいものは以下のとおりであるが、本発明の技術的範囲は下記に挙げる化合物の範囲に限定されるものではない。

- [0088] 式(1)におけるZとして、好ましくは、 C_{1-4} アルキル、更に好ましくは C_{1-3} アルキル、より好ましくはメチル又はエチルが挙げられる。

式(1)においてZは、縮合環を構成する任意の炭素原子に結合していてもよく、化学的に安定である限り同一の炭素原子上に結合していてもよく、複数の環に属する炭素原子上に結合していてもよく、Zは同一であって又は異なってもよい。

- [0089] 式(1)におけるZが結合する環(縮合環)を構成する炭素原子の立体配置は、化学的に安定な構造を取り得る限り特に限定はないが、例えば式(2-1)

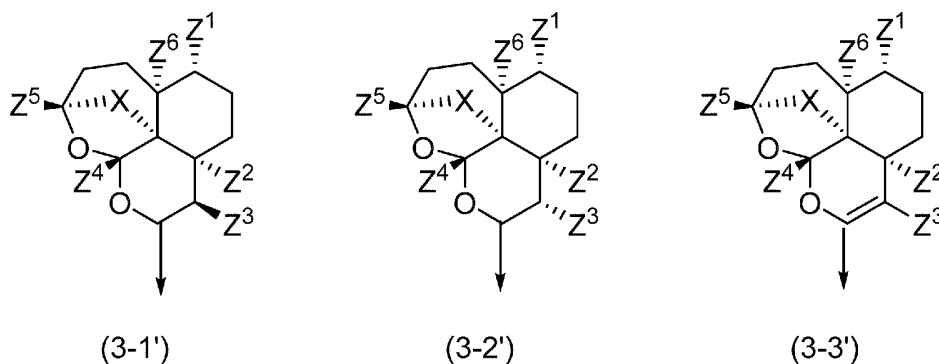
[化17]



(式中、X、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 及び Z^6 は式(1)又は式(2)における定義と同じである)

で表される基の具体例として、下記の式(3-1')、式(3-2')及び式(3-3')

[化18]



(式中、X、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 及び Z^6 は式(1)又は式(2)における定義と同じである)

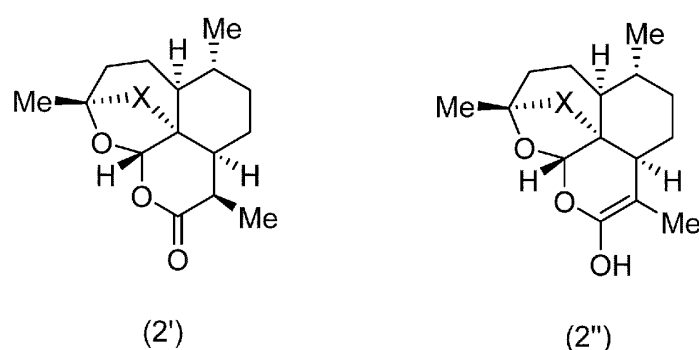
で表される基が挙げられる。

[0090] 式(2)における Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 及び Z^6 として、好ましくは水素原子又は C_{1-4} アルキルが挙げられ、更に好ましくは、水素原子又は C_{1-3} アルキル、より好ましくは水素原子又はメチル若しくはエチルが挙げられる。

[0091] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)の化合物の一態様として、XがO—Oである化合物が挙げられる。

[0092] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)の化合物の一態様として、Yがオキソである場合、以下の式(2')で表される化合物が例示される。式(2')の化合物には式(2'')で表される互変異性体が存在するが、化学的に安定に存在し得る限り、本発明はこれらの物質を共に包含する。

[化19]



(式中、Xは式(1)における定義と同じである)

式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)の化合物の一態様として、XがOである場合、好ましくは、上記式(2')又は式(2'')で表される化合物が挙げられる。

[0093] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)におけるYの態様について、以下に説明する。

Yの好ましい態様として、水素原子、ヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイル又はハロゲンが挙げられる。

Yがハロゲンである場合、好ましくはフッ素原子である。

YがOR¹、SR¹、SOR¹、SO₂R¹、又はCOR¹である場合、R¹としては、好ましくは置換されていてもよいC₁₋₄アルキル、置換されていてもよいフェニル、又は置換されていてもよいシクロアルキルが挙げられる。

[0094] ここにおいて、R¹の一態様として、置換されていてもよいC₁₋₃アルキル

、より好ましくは、それぞれ置換されていてもよいメチル又はエチルが挙げられる。置換基としては、ハロゲン、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、又は C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ等、上述の群2から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいアリール等が挙げられ、それぞれ独立して1又は複数、1～3個置換していてもよい。上記ハロゲンとして好ましくはフッ素原子が挙げられる。

[0095] Yが $OCOR^1$ である場合の R^1 として、置換されていてもよい C_{1-4} アルキルが挙げられる。置換基としては、ハロゲン、カルボキシ、1若しくは2の同一若しくは異なる C_{1-3} アルキルで置換されていてもよいアミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ、上述の群3から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいアリール等が挙げられ、それぞれ独立して1又は複数、1～3個置換していてもよい。上記ハロゲンとして好ましくはフッ素原子が挙げられる。

[0096] Yが $OCOR^1$ である場合の R^1 の一態様として、カルボキシで置換された C_{1-4} アルキルが挙げられる。

[0097] Yが NR^3R^4 である場合、 R^3 及び R^4 は、好ましくは、独立して、水素原子又は C_{1-4} アルキルであるか、 R^3 と R^4 が隣接する窒素原子とともに、4～10員の含窒素脂肪族複素環を形成していてもよい。当該4～10員の含窒素脂肪族複素環として、好ましくは4～6員の単環式飽和含窒素複素環が挙げられ、具体的には、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリンが挙げられる。

[0098] Yが NR^5COR^1 又は $NR^5SO_2R^1$ である場合、 R^1 として、置換されていてもよい C_{1-4} アルキルが挙げられる。置換基としては、ハロゲン、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ、上述の群3から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいアリールが挙げられ、それぞれ独立して1又は複数、1～3個置換していてもよい。上記ハロゲンとして好ましくはフッ素原子が挙げられる。

また、 R^5 は、好ましくは水素原子又は C_{1-4} アルキル、更に好ましくは、

水素原子、メチル又はエチルである。

[0099] Yが $\text{NR}^5\text{CONR}^3\text{R}^4$ である場合、 R^3 及び R^4 は、好ましくは、独立して、水素原子、置換されていてもよい C_{1-4} アルキル、又は群3から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいフェニルが挙げられる。上記 C_{1-4} アルキルの置換基としては、ハロゲン、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ、上述の群3から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいアリールが挙げられ、それぞれ独立して1又は複数、1～3個置換していてもよい。上記ハロゲンとして好ましくはフッ素原子が挙げられる。また、 R^3 と R^4 が隣接する窒素原子と一緒にあって、4～10員の含窒素脂肪族複素環を形成していてもよい。当該4～10員の含窒素脂肪族複素環として、好ましくは4～6員の単環式飽和含窒素複素環が挙げられ、具体的には、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリンが挙げられる。上記置換されていてもよい C_{1-4} アルキルの置換基として、好ましくは、ハロゲン、カルボキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ等、それぞれ上述の群2から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル及び脂肪族複素環基が挙げられ、それぞれ独立して1又は複数、1～3個置換していてもよい。上記ハロゲンとして好ましくはフッ素原子が挙げられる。

また、 R^5 は、好ましくは水素原子又は C_{1-4} アルキル、更に好ましくは、水素原子、メチル又はエチルである。

[0100] Yが R^2 である場合、 R^2 として、好ましくは、上述の群2又は群2'から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよい C_{1-4} アルキル、上述の群3又は群3'から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよいフェニル、上述の[6]又は[7]における群3から選択される1又は複数の置換基で置換されていてもよい5若しくは6員のヘテロアリールが挙げられる。上記ヘテロアリールとして具体的には、それぞれ置換されていてもよいフラン-2-イル、トリアジン-1-イル等が挙げられる。

- [0101] 一態様において、Yが R^2 の場合、 R^2 として C_{1-4} アルキル、好ましくは、メチル又はエチルが挙げられる。
- [0102] 一態様において、Yが R^2 の場合、 R^2 として、以下の群4から選択される1又は複数、好ましくは1～3の置換基で置換された C_{1-4} アルキル、好ましくはそれぞれ以下の群4から選択される1～3の置換基で置換された C_{1-4} アルキル、メチル又はエチルが挙げられる。
- [0103] <群4>
カルボキシ、ヒドロキシ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} アルキルカルボニル、 C_{1-4} アルキルカルボニルオキシ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、1若しくは2の C_{1-4} アルキルで置換されていてもよいカルバモイル、群3から選択される1～5の基で置換されていてもよいフェニル、群3から選択される1～4の基で置換されていてもよく酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～3個の環内のヘテロ原子を含む5～6員のヘテロアリール、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい3～6員のシクロアルキル、群3から選択される1～3の基で置換されていてもよい酸素原子、窒素原子及び硫黄原子から選択される1～4個の環内のヘテロ原子を含む4～8員の脂肪族複素環基、フッ素原子
- [0104] 式(2)で表される化合物の1つの態様としては、以下の(A1)～(A5)の特徴を有する化合物又はその塩が挙げられる：
- (A1) Z^1 、 Z^3 及び Z^5 がメチルであり、 Z^2 、 Z^4 及び Z^6 が水素原子であり；
- (A2) XがO又はO—Oであり；
- (A3) Yがヒドロキシ、オキシ、カルボキシ、カルバモイル、フッ素原子、 OR^1 、 $OCOR^1$ 、 SR^1 、 SO_2R^1 、 R^2 、 $NHCOR^1$ 、又は、 NR^3R^4 であり；
- (A4) R^1 又は R^2 が、置換されていてもよい C_{1-8} アルキル、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよい5～6員のシクロアルキル、置換されていてもよい5～6員のヘテロアリールであり、置換基がフッ素原子、

アミノ、カルボキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ及びフェニルから選択され；

(A5) R^3 及び R^4 は、メチル基を表すか、隣接する窒素原子と一緒にあって、モルホリン、チオモルホリン、チオモルホリン-1-オキシド、チオモルホリン-1,1-ジオキシド、ピペラジン、インドリン、テトラヒドロイソキノリンを形成している。

[0105] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)で表される化合物の1つの態様としては、以下の(B1)～(B2)の特徴を有する化合物又はその塩が挙げられる：

(B1) XがO-Oであり；

(B2) Yが $NR^5SO_2R^1$ である。

式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)で表される化合物の1つの態様としては、上記(B1)～(B2)に加えて、以下の(B3)～(B4)の特徴を有する化合物又はその塩が挙げられる：

(B3) R^1 が、置換されていてもよい C_{1-8} アルキル、置換されていてもよいフェニル、置換されていてもよい5-6員のシクロアルキル、置換されていてもよい5-6員のヘテロアリールであり、置換基がフッ素原子、アミノ、カルボキシ、 C_{1-8} アルコキシ、 C_{1-8} アルキルカルボニルオキシ及びフェニルから選択され；

(B4) R^5 が水素原子である。

[0106] 式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)で表される化合物の具体例としては、実施例1-1～1-35の化合物である。

[0107] 本発明の化合物は、上述の式(1)で表される化合物の塩を含む。当該塩としては、細胞培養において細胞の生存や分化等に影響を与えない限り特に限定はないが、医薬品原料として許容し得る塩が挙げられる。

- [0108] 「塩」としては、酸付加塩及び塩基付加塩が挙げられる。例えば、酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、又はクエン酸塩、シュウ酸塩、フタル酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*para*-トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。また、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩、アルミニウム塩等の無機塩基塩、又はトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン]、*tert*-ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、*N,N*-ジベンジルエチルアミン等の有機塩基塩等が挙げられる。さらに、「塩」としては、アルギニン、リジン、オルニチン、アスパラギン酸、又はグルタミン酸等の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸とのアミノ酸塩も挙げられる。
- [0109] 本発明の化合物の塩を取得したいとき、本発明の化合物が塩の形で得られる場合には、そのまま精製すればよく、また、遊離の形で得られる場合には、適当な有機溶媒に溶解若しくは懸濁させ、酸又は塩基を加えて通常の方法により塩を形成させればよい。
- [0110] 本発明の化合物のいずれか1つ又は2つ以上の ^1H を ^2H (D)に変換した重水素変換体も、本発明の化合物に包含される。
- [0111] 本発明の化合物は、水和物及び／又は各種溶媒との溶媒和物(エタノール和物等)の形で存在することもあるので、これらの水和物及び／又は溶媒和物も本発明の化合物に含まれる。さらに、本発明には、本発明の化合物のあらゆる互変異性体、存在するあらゆる立体異性体、及びあらゆる様態の結晶形のもの、さらにこれらの混合物も含まれる。
- [0112] 例えば、式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3

）、式（４－１）、式（４－２）及び式（４－３）において、Ｙがオキソ又はヒドロキシを表す場合において、以下の式で示される互変異性体が存在する場合、Ｙがヒドロキシを表す化合物、又はＹがオキソを表す化合物は、それぞれ互変異性体を含む概念である。

[化20]



[0113] 本発明の化合物の中には、光学活性中心に基づく光学異性体、分子内回転の束縛により生じた軸性又は面性キラリティーに基づくアトロプ異性体、その他の立体異性体、互変異性体、及び幾何異性体等が存在し得るものがあるが、これらを含め、全ての可能な異性体及びそれらの混合物は本発明の範囲に包含される。

[0114] 具体的には、式（１）、式（２）、式（３－１）、式（３－２）、式（３－３）、式（４－１）、式（４－２）及び式（４－３）で表される化合物は、立体配置が明示されていない光学活性中心を有する場合、単一の立体異体及び複数の立体異性体の混合物を含み得る。

[0115] また、例えば、式（３－１）、式（３－２）、式（３－３）、式（４－１）、式（４－２）及び式（４－３）で表される化合物の光学異性体や、当該化合物とその光学異性体との混合物（例えばラセミ体）もまた、本発明の範疇である。

[0116] 特に光学異性体やアトロプ異性体は、ラセミ体として、又は光学活性の出発原料や中間体が用いられた場合には光学活性体として、それぞれ得ることができる。必要であれば、下記製造法の適切な段階で、対応する原料、中間体又は最終品のラセミ体を、光学活性カラムを用いた方法、分別結晶化法等の公知の分離方法によって、物理的に又は化学的にそれらの光学対掌体に分割することができる。具体的には、例えばジアステレオマー法では、光学活性分割剤を用いる反応によってラセミ体から２種のジアステレオマーを形成

する。この異なるジアステレオマーは一般に物理的性質が異なるため、分別結晶化等の公知の方法によって分割することができる。

＜化合物の製造方法＞

[0117] 本発明の化合物の製造方法について以下に述べるが、本発明の化合物の製造法はこれらに限定されるものではない。

[0118] 式(1)で表される化合物は、公知化合物であるか、公知化合物から当業者に周知の化学合成法で製造することができる。

[0119] 具体的な公知化合物としては、本明細書実施例に記載のアルテミシニン (Artemisinin) (実施例1-33)、アルテメテル (Artemether) (実施例1-30)、アルテニモール (Artenimol) (実施例1-29)、アルテモチル (Artemotil) (実施例1-31)、アルテスネイト (Artesunate) (実施例1-32)、及び実施例1-1～実施例1-28, 1-34、及び1-35で示される化合物が挙げられる。アルテメテル (Artemether)、アルテニモール (Artenimol)、アルテモチル (Artemotil)、及びアルテスネイト (Artesunate) はいずれも Artemisinin の誘導物であり、Artemisinin から半合成によって製造することができる。例えば、Artemether 及び Artemotil は Tetrahedron Letters 2002, 43, 7235-7237 に記載の方法にしたがって、Artesunate は J. Med. Chem. 1988, 31, 645-650 に記載の方法にしたがって、Artenimol は Chem Commun 2014, 50, 12652-12655 に記載の方法にしたがって合成することができる。他の化合物も文献公知であるか、アルテミシニンから半合成によって製造することができる。

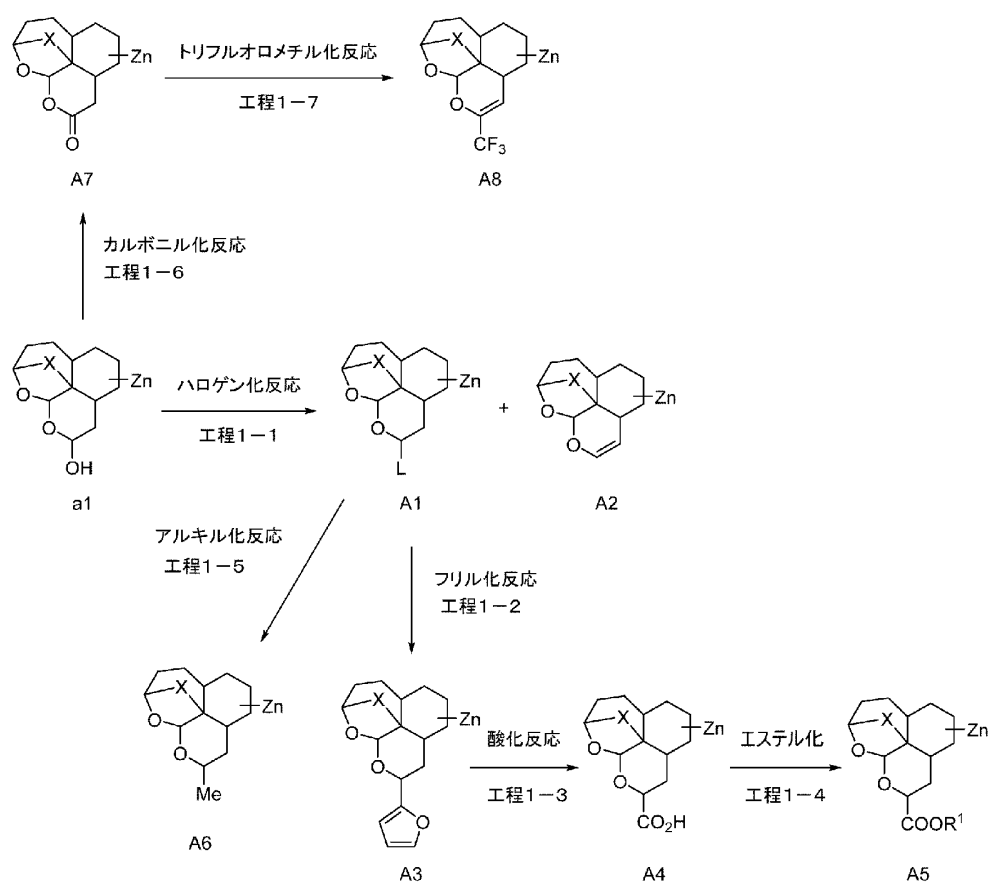
[0120] 例えば、式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)で表される化合物は、アルテニモール又はアルテミシニン等の公知化合物から半合成によって製造す

ることができる。

[0121] 以下式（１）で表される化合物の例を挙げて説明するが、式（２）、式（３－１）、式（３－２）、式（３－３）、式（４－１）、式（４－２）又は式（４－３）で表される化合物も以下の製造方法に準じて製造することができる。

[0122] 例えば、Ｙがヒドロキシ、ハロゲン、水素原子、カルボキシ、 COOR^1 、 R^2 （フラン等のヘテロアリール、又はメチル等のアルキル）である化合物は、以下の反応式又は類似の方法で製造することができる。

[化21]



（式中、X、Z、n及び R^1 は式（１）における定義と同じであり、Lはハロゲン等の脱離基を意味する。）

[0123] 出発原料である化合物 **a1** としては、アルテニモール、デオキシジヒドロ

アルテミシニン等が公知化合物であり入手可能である。アルテニモールは、例えば、Chem Commun 2014, 50, 12652-12655に記載の方法に従って合成することができ、該文献中に記載のジヒドロアルテミシン酸は、例えば、Tetrahedron 2016, 72 (32), 4931-4937に記載の方法にしたがって化学合成することができる。デオキシジヒドロアルテミシニンは、アルテニモールを原料に、例えば、ChemMedChem 2012, 7 (12), 2204-2226に記載の方法に従って化学合成することができる。よって、これらに記載の方法を参考に種々の a 1 を製造することができる。

[0124] 化合物 A 1 及び A 2 は、化合物 a 1 にフッ素化試薬を反応させることにより製造することができる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンが挙げられる。フッ素化試薬としては三フッ化 N, N-ジエチルアミノ硫黄が挙げられる。反応時間は、通常、5 分～72 時間であり、好ましくは30 分～24 時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 100°C 、好ましくは、 -30°C ～ 40°C である。

[0125] 化合物 A 3 は、化合物 A 1 に、適当な溶媒中、ルイス酸存在下、フランを反応させることにより製造することができる。ルイス酸としては三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体が挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5 分～72 時間であり、好ましくは30 分～24 時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 20°C 、好ましくは、 -78°C ～ -20°C である。尚、ここでフランの代わりに他のヘテロアリアルを用いることにより、式 (1) における R^2 がヘテロアリアルである化合物を製造することができる。

[0126] 化合物 A 4 は、化合物 A 3 に、金属触媒存在下、種々の過ヨウ素酸と反応させることにより製造することができる。金属触媒としては、二酸化ルテニウムが挙げられる。過ヨウ素酸としては、過ヨウ素酸ナトリウムや過ヨウ素酸カリウムが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはアセトニトリル、四塩化炭素、水が挙げ

られる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 -20°C ～ 70°C 、好ましくは、 -0°C ～ 40°C である。

[0127] 化合物A5は、化合物A4に種々の縮合剤及び／又は塩基の存在下又は非存在下、適当な溶媒中、対応するアルコールを反応させることにより製造され、必要に応じて触媒が用いられる。縮合剤としては、常法で使用される種々の縮合剤を使用することができるが、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(塩酸塩を含む)が挙げられる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、好ましくはジイソプロピルエチルアミン又はトリエチルアミンが挙げられる。触媒としては4-ジメチルアミノピリジンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド又はジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 0°C ～ 200°C 、好ましくは、 0°C ～ 100°C である。

[0128] 化合物A6は、化合物A1に、適当な溶媒中、トリメチルアルミニウムを反応させることにより製造することができる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはトルエン又はジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 50°C 、好ましくは、 -40°C ～ 30°C である。同様に当業者に周知のアルキル化剤等の試薬を用いることにより、式(1)における R^2 がアルキルである化合物等を製造することができる。

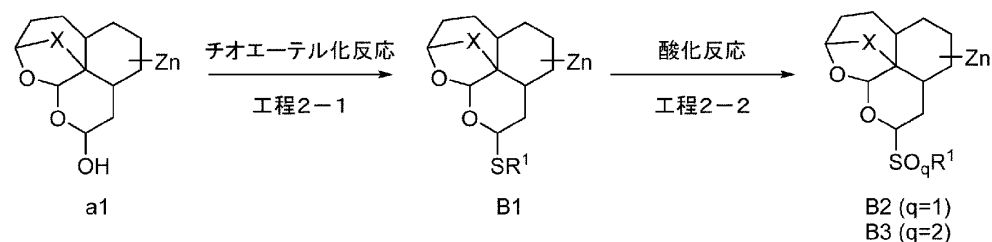
[0129] 化合物A7は、例えば、Organic Letters 2007, 9, 21, 4107-4110やACS Catalysis 2017, 7, 3, 1998-2001に記載の方法又はその組み合わせによって製造することができる。

[0130] 化合物A8は、例えば、J. Org. Chem. 2002, 67, 4, 1253-1260方法に従って製造することができる。すなわち、適切な添加剤存在下又は非存在下、

種々の求核試薬を化合物 A 7 のカルボニル基と反応させ、成績体の 3 級アルコールを脱離基へと変換した後脱水する方法である。求核試薬としてはトリフルオロメチルトリメチルシランや Grignard 試薬等が挙げられる。添加剤としてはテトラブチルアンモニウムフルオライドが挙げられる。脱離基への変換し薬としては塩化チオニルが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ピリジンが挙げられる。反応時間は、通常、5 分～72 時間であり、好ましくは 30 分～24 時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 150°C 、好ましくは、 -40°C ～ 120°C である。

[0131] 例えば、Y が SR^1 、 SOR^1 、又は SO_2R^1 である化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化22]



(式中、X、Z、n 及び R^1 は式 (1) における定義と同じであり、q は 1 又は 2 である。)

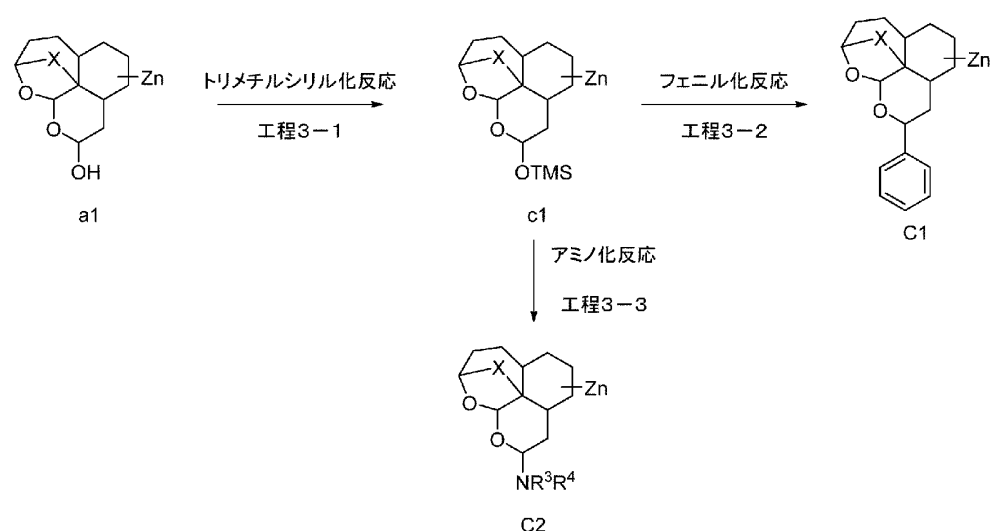
[0132] 化合物 B 1 は、化合物 a 1 に、適当な溶媒中、ルイス酸及び還元剤存在下、対応するジスルフィド化合物を反応させることにより製造することができる。ルイス酸としては三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体が挙げられる。還元剤としてはトリフェニルホスフィンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはアセトニトリルが挙げられる。反応時間は、通常、5 分～72 時間であり、好ましくは 30 分～24 時間である。反応温度は、通常、 -50°C ～ 100°C 、好ましくは、 -20°C ～ 50°C である。

[0133] 化合物 B 2 及び B 3 は、化合物 B 1 に、適当な溶媒中、塩基存在下、トリ

フルオロ酢酸無水物及び尿素／過酸化水素水試薬を反応させることにより製造することができる。塩基としては炭酸水素ナトリウムが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはアセトニトリルが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 -40°C ～ 50°C 、好ましくは、 -30°C ～ 30°C である。

[0134] 例えば、Yが R^2 （フェニル等のアリール）、又は NR^3R^4 である化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化23]



（式中、X、Z、n、 R^3 及び R^4 は式（1）における定義と同じであり、TMSはトリメチルシリルを意味する。）

[0135] 化合物c1は、化合物a1に、適当な溶媒中、塩基存在下、トリメチルシリルクロライドを反応させることにより製造することができる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、好ましくはジイソプロピルエチルアミン又はトリエチルアミンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 -50°C ～ 100°C 、好ましくは、 $-$

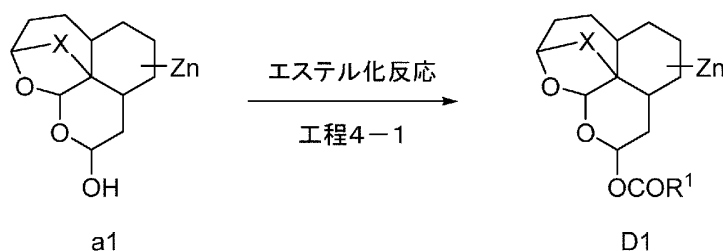
20℃～50℃である。

[0136] 化合物C1は、化合物c1に、適当な溶媒中、トリメチルシリルブロマイド存在下、フェニルマグネシウムブロマイドを反応させることにより製造することができる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフランが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、-50℃～100℃、好ましくは、-20℃～70℃である。同様に当業者に周知のアリールマグネシウムブロマイド等の試薬を用いることにより、式(1)におけるR²がアリールである化合物等を製造することができる。

[0137] 化合物C2は、化合物c1に、適当な溶媒中、トリメチルシリルブロマイド存在下、対応するアミンを反応させることにより製造することができる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、-50℃～100℃、好ましくは、-20℃～70℃である。

[0138] 例えば、YがOCOR¹である化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化24]



(式中、X、Z、n又はR¹は式(1)における定義と同じである。)

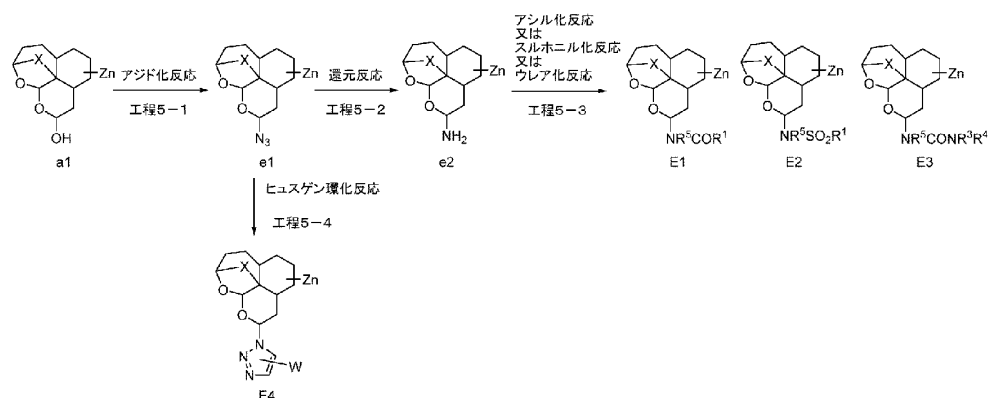
[0139] 例えば、化合物D1は、化合物a1に、種々の塩基存在下、適当な溶媒中、イミデート化試薬を反応させることによりイミデート化合物を得た後、ルイス酸存在下また非存在下で、カルボン酸で処理することにより製造される。イミデート化の工程において使用されるイミデート化試薬は、トリクロロ

アセトニトリルやトリフルオロ-N-フェニルアセトイミドイルクロライドが挙げられる。また、イミドイル化工程において使用される塩基はジアザビシクロウンデセンやトリエチルアミン等の有機塩基や水素化ナトリウムや炭酸カリウム等の無機塩基が挙げられるが、使用されるイミドイル化試薬によって適宜選択される。カルボン酸処理の工程において使用されるカルボン酸は好ましくは安息香酸又は酢酸が好ましく、より好ましくは安息香酸が挙げられる。カルボン酸処理の工程において使用されるルイス酸は好ましくは三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体が挙げられる。イミドイル化工程において使用される溶媒は、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはハロゲン系溶媒やエーテル系溶媒で、より好ましくはジクロロメタンやテトラヒドロフランが挙げられる。反応時間は、通常、5分～48時間であり、好ましくは10分～2時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 100°C 、好ましくは、 -10°C ～ 30°C である。あるいは、種々の塩基の存在下又は非存在下、対応するアシルハライド、対応するカルボン酸又は対応する酸無水物等を反応させることにより製造され、必要に応じて縮合剤及び触媒が用いられる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、好ましくはジイソプロピルエチルアミン又はトリエチルアミンが挙げられる。縮合剤としては、常法で使用される種々の縮合剤を使用することができるが、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(塩酸塩を含む)が挙げられる。触媒としては4-ジメチルアミノピリジンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド又はジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 0°C ～ 200°C 、好ましくは、 0°C ～ 100°C である。本反応は、Eur. J. Org. Chem. 2002, 113-132等に記載されている方法を用い同様に製造することができる。

[0140] 例えば、Yが NR^5COR^1 、 $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^1$ 、 $\text{NR}^5\text{CONR}^3\text{R}^4$ 、又は1, 2, 3-トリアゾールである化合物は、以下の方法で製造することができる。

る。

[化25]



(式中、X、Z、n、R¹、R³、R⁴及びR⁵は式(1)における定義と同じであり、Wは[6]の<群1>に記載の置換基である。)

[0141] 化合物e1は、化合物a1に、適当な溶媒中、トリメチルシリルプロマイド存在下、アジ化ナトリウムを反応させることにより製造することができる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、-50℃～70℃、好ましくは、-20℃～40℃である。

[0142] 化合物e2は、化合物e1に、適当な溶媒中、適当な還元剤を反応させることにより製造することができる。還元剤としてはトリフェニルホスフィンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、水が挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、-20℃～120℃、好ましくは、0℃～80℃である。

[0143] 化合物E1は、化合物e2に種々の塩基の存在下又は非存在下、対応するアシルハライド、対応するカルボン酸又は対応するカルボン酸無水物等を反応させることにより製造され、必要に応じて縮合剤及び触媒が用いられる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、好ましくはジイソプロピルエチルアミン又はトリエチルアミンが挙げられる。縮合剤と

しては、常法で使用される種々の縮合剤を使用することができるが、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(塩酸塩を含む)が挙げられる。触媒としては4-ジメチルアミノピリジンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド又はジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～200℃、好ましくは、0℃～100℃である。

[0144] 化合物E2は、化合物e2に、種々の塩基存在下、適当な溶媒中、対応するスルホニルクロライドを反応させることにより製造される。塩基としてはトリエチルアミン、ピリジン、2,4,6-コリジンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～200℃、好ましくは、0℃～80℃である。

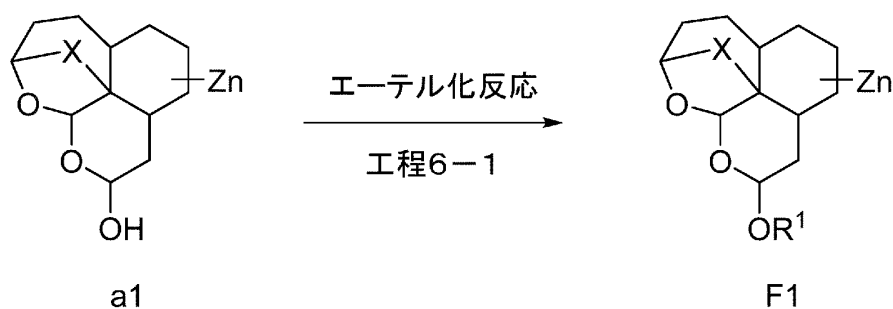
[0145] 化合物E3は、化合物e2に、塩基存在下又は非存在下、適当な溶媒中、対応するイソシアネートを反応させる、又は、ホスゲン誘導体、カルボニルジイミダゾール、クロロホルメート等のカルボニル化試薬で処理した後に対応するアミンと反応させることにより製造される。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタン、テトラヒドロフランが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～200℃、好ましくは、0℃～80℃である。

[0146] 化合物E1、E2及びE3において、R⁵が水素原子以外である場合、当業者に周知の方法で化合物e2に対応するR⁵を導入した後、上記と同様の方法で処理する、又は、塩基の存在下に適宜R⁵-Cl、R⁵-Br等の反応剤で化合物E1、E2若しくはE3においてR³が水素原子である化合物を処理することにより、製造することができる。

[0147] 化合物E 4は、化合物e 1に、適当な溶媒中、対応するアルキン化合物を反応させることにより製造される、いわゆるヒュスゲン環化反応である。本反応の条件は種々報告されているが、適当な溶媒中、金属触媒を作用させることでより円滑に反応が進行する。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタン、水が挙げられる。金属触媒としては一価の銅が好ましく、硫酸銅（Ⅱ）にアスコルビン酸を処理し系中で一価の銅を発生させる方法がより好ましい。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～200℃、好ましくは、20℃～80℃である。

[0148] 例えば、YがOR¹である化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化26]

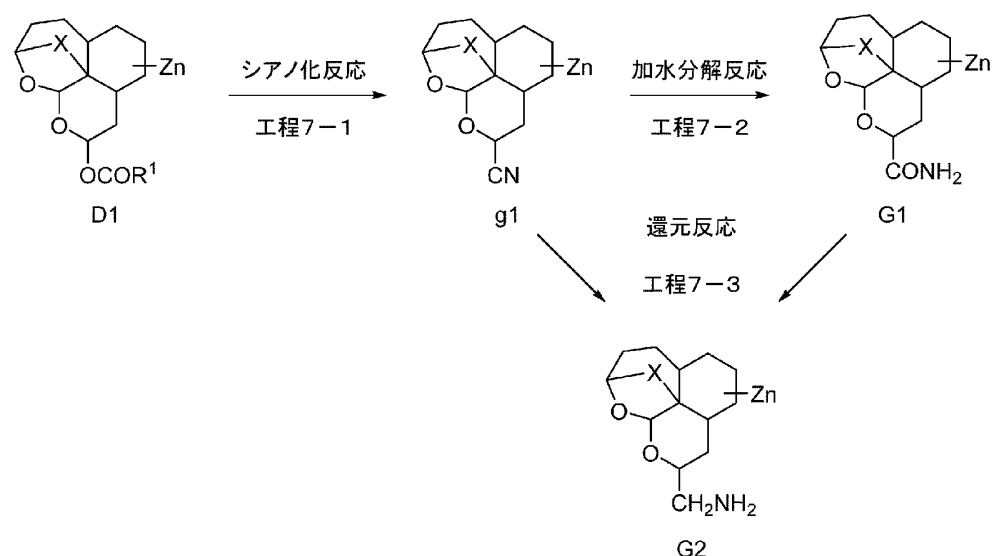


（式中、X、Z、n又はR¹は式（1）における定義と同じである。）

[0149] 化合物F 1は、化合物a 1を種々のルイス酸存在下、適当な溶媒中、対応するアルコールと反応させることにより製造される。ルイス酸としては、後記に例示されるルイス酸等から適宜選択されるが、好ましくは三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、トリメチルシリルクロライド、過塩素酸銀が挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンやジエチルエーテルが挙げられる。反応時間は、通常、5分～48時間であり、好ましくは10分～24時間である。反応温度は、通常、-78℃～100℃、好ましくは、-78℃～50℃である。

[0150] 例えば、Yがシアノ、カルバモイル、又はアミノメチルである化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化27]



(式中、X、Z、n、及びR¹は式(1)における定義と同じであり、この場合、R¹はフェニル又はメチルが好ましく、より好ましくはフェニルである。)

[0151] 化合物g 1は、化合物D 1を種々のルイス酸存在下又は非存在下、適当な溶媒中、種々のシアノ化試薬と反応させることにより製造される。ルイス酸としては、後記に例示されるルイス酸等から適宜選択されるが、好ましくは四塩化スズが挙げられる。シアノ化試薬としては、トリメチルシリルシアニドやシアン化ナトリウム、シアン化カリウムが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはハロゲン系溶媒、ジメチルホルムアミドが挙げられる。反応時間は、通常、5分～48時間であり、好ましくは10分～24時間である。反応温度は、通常、-78℃～100℃、好ましくは、-78℃～50℃である。

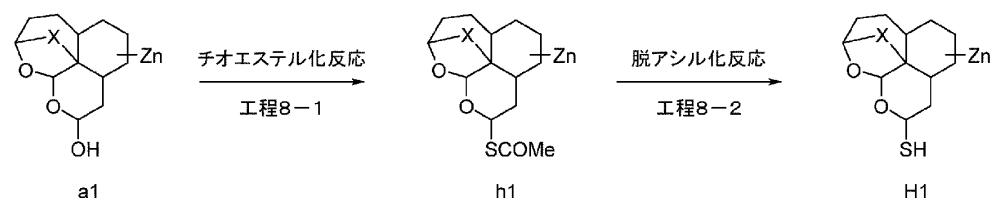
[0152] 化合物G 1は、化合物g 1に、適当な溶媒中、過酸化水素の存在下又は非存在下、種々の塩基を反応させることにより製造することができる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、炭酸カリウム、水酸化カリウムが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、tert-ブチルアルコ

ール、水が挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～100℃、好ましくは、20℃～70℃である。

[0153] 化合物G2は、化合物g1又は化合物G1に、適当な溶媒中、ルイス酸存在下、種々の還元剤を反応させることにより製造することができる。ルイス酸としては、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体やドデカカルボニルニルテニウムが挙げられる。還元剤としてはヒドリド還元剤やヒドロシラン系還元剤が挙げられ、より好ましくは水素化ホウ素ナトリウムや1,1,3,3-テトラメチルジシロキサンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、トルエンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、0℃～200℃、好ましくは、20℃～100℃である。

[0154] 例えば、Yがメルカプトである化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化28]



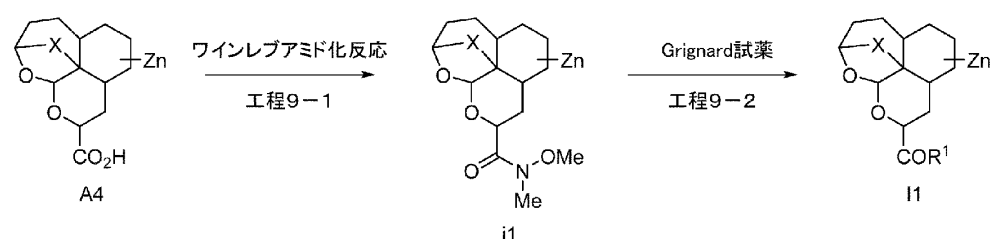
(式中、X、Z、又はnは式(1)における定義と同じである。)

[0155] 化合物h1は、化合物a1を種々のルイス酸存在下、適当な溶媒中、チオ酢酸と反応させることにより製造される。ルイス酸としては、後記に例示されるルイス酸等から適宜選択されるが、好ましくは三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体が挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～48時間であり、好ましくは10分～24時間である。反応温度は、通常、-78℃～100℃、好ましくは、-78℃～50℃である。

[0156] 化合物H 1は、化合物h 1を適当な溶媒中、塩基を反応させることにより製造される。塩基としては、後記に例示される塩基から適宜選択されるが、好ましくはナトリウムエトキシドが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはエタノールが挙げられる。反応時間は、通常、5分～48時間であり、好ましくは10分～24時間である。反応温度は、通常、 -78°C ～ 150°C 、好ましくは、 -20°C ～ 80°C である。

[0157] 例えば、YがCOR¹で表される化合物は、以下の方法で製造することができる。

[化29]



(式中、X、Z、n及びR¹は式(1)における定義と同じである。)

[0158] 化合物i 1は、化合物A 4に種々の縮合剤及び／又は塩基の存在下又は非存在下、適当な溶媒中、N，O－ジメチルヒドロキシルアミン又はその塩を反応させることにより製造され、必要に応じて触媒が用いられる。縮合剤としては、常法で使用される種々の縮合剤を使用することができるが、好ましくは1－エチル－3－(3－ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(塩酸塩を含む)が挙げられる。塩基としては、後記に例示される塩基等から適宜選択されるが、好ましくはジイソプロピルエチルアミン又はトリエチルアミンが挙げられる。触媒としては4－ジメチルアミノピリジンが挙げられる。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド又はジクロロメタンが挙げられる。反応時間は、通常、5分～72時間であり、好ましくは30分～24時間である。反応温度は、通常、 0°C ～ 200°C 、好ましくは、 0°C ～ 100°C である。

0℃である。

[0159] 化合物 I 1 は、化合物 i 1 を適当な溶媒中、G r i g n a r d 試薬を反応させることにより製造される。溶媒としては、後記に例示される溶媒等から適宜選択されるが、好ましくはテトラヒドロフラン、ジエチルエーテルが挙げられる。反応時間は、通常、5 分～4 8 時間であり、好ましくは1 0 分～2 4 時間である。反応温度は、通常、- 7 8℃～1 5 0℃、好ましくは、- 2 0℃～8 0℃である。

[0160] 上記の各製造法の各工程において使用される塩基は、反応や原料化合物の種類等によって適時選択されるべきであるが、例えば重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウムのような重炭酸アルカリ類、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムのような炭酸アルカリ類、水素化ナトリウム、水素化カリウムのような金属水素化類、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのようなアルカリ金属水酸化物、ナトリウムメトキシド、ナトリウム t -ブトキシドのようなアルカリ金属アルコキシド類、ブチルリチウム、リチウムジイソプロピルアミドのような有機金属塩基類、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4 -ジメチルアミノピリジン (D M A P)、1, 8 -ジアザビシクロ [5, 4, 0] -7 -ウンデセン (D B U) のような有機塩基類が挙げられる。

[0161] 上記の各製造法の各工程において使用される溶媒は、反応や原料化合物の種類等によって適時選択されるべきであるが、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノールのようなアルコール類、アセトン、メチルケトンのようなケトン類、塩化メチレン、クロロホルムのようなハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン (T H F)、ジオキサンのようなエーテル類、トルエン、ベンゼンのような芳香族炭化水素類、ヘキサン、ヘプタンのような脂肪族炭化水素類、酢酸エチル、酢酸プロピルのようなエステル類、N, N -ジメチルホルムアミド (D M F)、N -メチル-2 -ピロリドンのようなアミド類、ジメチルスルホキシド (D M S O) のようなスルホキシド類、アセトニトリルのようなニトリル類が挙げられ、これらの溶媒は単独又は2 種類以

上混合して用いることができる。また反応の種類によっては、有機塩基類を溶媒として用いてもよい。

[0162] 式(1)等で表される本発明の化合物又はその中間体は、当業者に公知の方法で分離、精製することができる。例えば、抽出、分配、再沈殿、カラムクロマトグラフィー（例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー若しくは分取液体クロマトグラフィー）又は再結晶等が挙げられる。

[0163] 再結晶溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール若しくは2-プロパノール等のアルコール系溶媒、ジエチルエーテル等のエーテル系溶媒、酢酸エチル等のエステル系溶媒、ベンゼン若しくはトルエン等の芳香族炭化水素系溶媒、アセトン等のケトン系溶媒、ジクロロメタン若しくはクロロホルム等のハロゲン系溶媒、ヘキサン等の炭化水素系溶媒、ジメチルホルムアミド若しくはアセトニトリル等の非プロトン系溶媒、水、又はこれらの混合溶媒等を用いることができる。その他の精製方法としては、実験化学講座（日本化学会編、丸善）1巻等に記載された方法等を用いることができる。また、本発明の化合物の分子構造の決定は、それぞれの原料化合物に由来する構造を参照して、核磁気共鳴法、赤外吸収法、円二色性スペクトル分析法等の分光学的手法、及び質量分析法により容易に行える。

[0164] また、上記製造方法における中間体又は最終生成物は、その官能基を適宜変換すること、また特に、アミノ、水酸基、カルボニル、ハロゲン等から種々の側鎖を伸張すること、及び、その際に必要に応じて上記の保護、脱保護を行うことによって、本発明に含まれる別の化合物へ導く事もできる。すなわち、式(1)、式(2)、式(3-1)、式(3-2)、式(3-3)、式(4-1)、式(4-2)又は式(4-3)で表される化合物において、各基が置換されていてもよい場合、当業者に周知の方法で原料に用いる試薬を適宜選択したり、官能基を変換したり、又は側鎖を慎重してりすることにより製造することができる。官能基の変換及び側鎖の伸張は、通常行われる一般的方法（例えば、Comprehensive Organic Tr

ansformations, R. C. Larock, John Wiley & Sons Inc. (1999) 等を参照) によって行うことができる。また、Protective Groups in Organic Synthesis (Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts 著、John Wiley & Sons, Inc. 発行、1999 年) に記載されている方法等に準じて適宜保護・脱保護を行うことができる。

- [0165] 式(1)等で表される本発明の化合物又はその製薬学的に許容される塩には、不斉が生じる場合又は不斉炭素を有する置換基を有する場合があります、そのような化合物にあつては光学異性体が存在する。本発明の化合物にはこれらの各異性体の混合物や単離されたものも含まれ、通常の方法に従って製造することができる。製造方法としては例えば、不斉点を有する原料を用いる方法か、又は途中の段階で不斉を導入する方法が挙げられる。
- [0166] 例えば、式(3-1)で表される化合物の光学異性体は、Angewandte Chemie International Edition 2018, 57, 8293-8296に記載の方法で製造することができる(例えば、Yがオキソである化合物)。また、式(3-2)で表される化合物は、Organic Process Research & Development 2007, 11, 3, 336-340、又はBioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2010, 20, 14, 4112-4115等に記載された方法で製造することができる。
- [0167] 例えば、光学異性体の場合、光学活性な原料を用いるか、製造工程の適当な段階で光学分割等を行うことで、光学異性体を得ることができる。光学分割法としては例えば、式(1)で表される化合物又はその中間体が、塩基性官能基を有する場合には、不活性溶媒中(例えばメタノール、エタノール、2-プロパノール等のアルコール系溶媒、ジエチルエーテル等のエーテル系溶媒、酢酸エチル等のエステル系溶媒、トルエン等の炭化水素系溶媒、アセトニトリル等の非プロトン系溶媒、又は上記溶媒から選択される2種以上の混合溶媒)、光学活性な酸(例えば、マンデル酸、N-ベンジルオキシアラニン、乳酸等のモノカルボン酸、酒石酸、o-ジイソプロピリデン酒石酸、

リンゴ酸等のジカルボン酸、カンファースルホン酸、ブロモカンファースルホン酸等のスルホン酸）を用いて塩を形成させるジアステレオマー法が挙げられる。式（１）で表される本発明の化合物又はその中間体が、カルボキシル基等の酸性官能基を有する場合には、光学活性なアミン（例えば１－フェニルエチルアミン、キニン、キニジン、シンコニジン、シンコニン、ストリキニーネ等の有機アミン）を用いて、塩を形成させることにより、光学分割を行うこともできる。

[0168] 塩を形成させる温度としては、－５０℃から溶媒の沸点までの範囲、好ましくは０℃から沸点までの範囲、より好ましくは室温から溶媒の沸点までの範囲から選択される。光学純度を向上させるためには、一旦、溶媒の沸点付近まで温度を上げることが望ましい。析出した塩を濾取する際、必要に応じて冷却し、収率を向上させることができる。光学活性な酸又はアミンの使用量は、基質に対し約０．５～約２．０当量の範囲、好ましくは１当量前後の範囲が適当である。必要に応じ結晶を不活性溶媒中（例えば、メタノール、エタノール、２－プロパノール等のアルコール系溶媒；ジエチルエーテル等のエーテル系溶媒；酢酸エチル等のエステル系溶媒；トルエン等の炭化水素系溶媒；アセトニトリル等の非プロトン系溶媒；又は上記溶媒から選択される２種以上の混合溶媒）で再結晶し、高純度の光学活性な塩を得ることもできる。また、必要に応じて光学分割した塩を通常の方法で酸又は塩基で処理し、フリー体として得ることもできる。

[0169] 以上説明した各々の製造法における原料、中間体のうち、特にあらためてその製造法を記載しなかったものについては、市販化合物であるか、又は市販化合物から当業者に公知の方法、若しくはそれに準じた方法によって合成することができる

[0170] ＜培地及び培養条件＞

造血幹細胞を含む細胞集団を培養する培地として、造血幹細胞の維持培養に適した培地であればよく、例えば、StemSpan SFEM培地（STEMCELL Technologies社製）、StemPro34（

ライフテクノロジーズ社製)、HemEx-Type 9A (ニプロ社製)、ハムF12培地 (Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、RPMI 1640培地、IMDM培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) などにStem Cell Factor (SCF、Peprotech社製) とThrombopoietin (TPO、Peprotech社製) を添加して調製したものであってよい。

[0171] 上記培地は、式(1)で表される化合物又はその塩を含む。式(1)で表される化合物の例として、アルテメテル (Artemether)、アルテミシニン (Artemisinin)、アルテニモール (Artenimol)、アルテモチル (Artemotil)、及び、アルテスネイト (Artesunate) が挙げられる。各化合物の培地における濃度は、造血幹細胞を、自己複製能及び多分化能を維持したまま増殖させることができる濃度であればよく、例えば、 $0.01\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.03\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}\sim 3\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}\sim 1\mu\text{M}$ であってよい。アルテメテル (Artemether) 及びアルテミシニン (Artemisinin) は、 $0.1\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.3\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ であってもよい。ヒト造血幹細胞に対しては、より低濃度であってもよい。例えば、アルテメテルは、 $0.001\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $0.003\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ 、 $0.03\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ であってもよい。

[0172] 上記培地は、上記化合物以外に、適宜、血清、脂肪酸又は脂質、アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、インスリン、トランスフェリン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、抗生物質等の成分を含んでもよい。血清濃度は25%以下、好ましくは5%から15%、より好ましくは8%から10%で添加してもよい。

[0173] 本明細書において、「血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含む培

地を意味し、「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。無血清培地は血清代替物を含有していてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール若しくは3-チオグリセロール、又はこれらの均等物などを適宜含有するものを挙げることができる。血清代替物は市販品を利用してもよい。例えば、Knockout（商標）Serum Replacement（KSR:Life Technologies社製）、Chemically-defined Lipid concentrated（Life Technologies社製）、Glutamax（商標、Life Technologies社製）などが挙げられる。

[0174] 造血幹細胞を培養する条件は、特に限定されないが、例えば、CO₂インキュベーターで37℃、5%CO₂で培養してもよい。造血幹細胞を含む細胞集団を播種する際に、10細胞/mL～1×10⁸細胞/mLであってもよい。好ましくは、100細胞/mL～1×10⁷細胞/mLであってもよい。

[0175] <培養後の細胞集団>

本発明の培養方法によって培養して得られた細胞集団（本明細書において、「培養後の細胞集団」という場合がある）は、造血幹細胞を含む細胞集団である。従来の培養方法では、殆どの造血幹細胞が分化することによってなくなるのに対して、本発明の培養方法によれば、少なくとも一部の造血幹細胞が分化せず、自己複製能及び多分化能を維持したまま増殖することができる。

[0176] 一態様として、培養後の細胞集団における総細胞数に対する造血幹細胞数の割合は、培養前の細胞集団における総細胞数に対する造血幹細胞数の割合の0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上である。好ましくは、培養後の細胞集団における総細胞数に対する長期造血幹細胞数の割合は、培養前の細胞集団における総細胞数に対する造血幹細胞数の割合の0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上である。

胞数に対する長期造血幹細胞数の割合の0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上である。なお、本発明の培養方法によって培養して得られた細胞集団中の造血幹細胞の割合は、培養前における細胞集団中の造血幹細胞の割合によって変化し得る。また、上述した方法により、造血幹細胞の存在を機能的（例えば、多分化能）に評価することも可能である。単離した造血幹細胞との比較により、細胞集団中の造血幹細胞のおおよその割合を評価することも可能である。

[0177] すなわち、本発明は、長期造血幹細胞を含む細胞集団における長期造血幹細胞の割合を、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上維持する方法を包含する。

[0178] また一態様として、培養後の細胞集団における造血幹細胞の数は、培養前の細胞集団における造血幹細胞の数の1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上である。一態様として、培養後の細胞集団における造血幹細胞の数は、本発明の化合物を含まないこと以外、培養条件を一致させた培養方法により得られた細胞集団における造血幹細胞の数に比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上である。好ましくは、培養後の細胞集団における長期造血幹細胞の数は、培養前の細胞集団における長期造血幹細胞の数の1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上である。一態様として、培養後の細胞集団における長期造血幹細胞の数は、本発明の化合物を含まないこと以外、培養条件を一致させた培養方法により得られた細胞集団における長期造血幹細胞の数に比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上である。すなわち、適切な比較対象と比べて、造血幹細胞数又は長期造

血幹細胞数が、維持又は増加していればよい。

- [0179] すなわち、本発明は、造血幹細胞を含む細胞集団において、造血幹細胞の細胞数を、上述の比較対象と比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上に増大させる方法を包含する。また、本発明は、長期造血幹細胞を含む細胞集団において、長期造血幹細胞の細胞数を、上述の比較対象と比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上に増大させる方法を包含する。
- [0180] 本発明はまた、造血幹細胞を含む細胞集団において、造血幹細胞数を、上述の比較対象と比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上に増大させ、かつ造血幹細胞の総細胞数に対する割合を0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上に維持する培養方法を包含する。
- [0181] また、本発明は、長期造血幹細胞を含む細胞集団において、長期造血幹細胞の細胞数を、上述の比較対象と比べ、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上に増大させ、かつ長期造血幹細胞の総細胞数に対する割合を0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上に維持する培養方法を包含する。
- [0182] また、本発明は、CFUアッセイにおけるCFU-GEMMコロニーを形成させる細胞を増幅させる培養方法を包含する。一態様として、本発明の培養方法により得られた細胞集団から得られるCFU-GEMMコロニー数が、比較対象から得られるCFU-GEMMコロニー数に対し、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上増加する培養方法を包含す

る。ここで、比較対象とは、例えば、本発明の化合物を含まないこと以外、培養条件を一致させた培養方法により得られた細胞集団、又は培養前の細胞集団であってよい。すなわち、上記 [1] ～[11] に記載の培養方法は、造血幹細胞由来の混合コロニー (CFU-GEMM) を形成する能力を有する細胞又は細胞集団の培養方法でもある。

[0183] また、本発明は、致死量の放射線照射した免疫無防備状態のNOGマウスへの移植実験において、長期（移植後1か月以上、好ましくは、2か月以上、3か月以上、4か月以上）に生着することができる細胞を増幅させる培養方法を包含する。ヒト造血幹細胞の培養方法の場合、上述の通りNOGマウス血液中のヒトCD45陽性細胞の割合を指標とすることができ、その評価を実施する移植後の日数は、当業者であれば任意に設定することができる（例：移植後1か月後、2か月後、3か月後又は4か月後）。一態様として、本発明の培養方法により得られた細胞集団を移植した場合のヒトCD45陽性細胞の割合が、比較対象を移植した場合のヒトCD45陽性細胞の割合に対し、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、10倍以上増加する培養方法を包含する。ここで、比較対象とは、例えば、本発明の化合物を含まないこと以外、培養条件を一致させた培養方法により得られた細胞集団、又は培養前の細胞集団であってよい。すなわち、上記 [1] ～[11] に記載の培養方法は、哺乳動物に移植された場合に、成熟血液細胞を産生する能力を上昇させる細胞集団の培養方法でもある。また、上記 [1] ～[11] に記載の培養方法は、骨髓への生着能、多分化能及び骨髓再構築能の少なくとも1つ、好ましくは全ての能力を上昇させる細胞集団の培養方法でもある。

[0184] 本発明の培養方法によって培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団は、すぐに移植に使用してもよく、すぐに使用しない場合は凍結保存してよい。凍結保存方法は、例えば血液から採取した細胞を凍結する場合、赤血球、血漿及び白血球分画を分離除去し、8%ジメチルスルフォキシドと0.8%デキストランを含む保存液又は、HSC-BANKER GMP grade (ZENOAQ社製) を用いてもよい。

[0185] 移植治療において、移植受容者（レシピエント）の体内で、移植された細胞が継続的に機能することが重要であり、そのためには、自己複製能、特に長期にわたる自己複製能を有する造血幹細胞を多く含む細胞が移植されることが重要である。本発明の培養方法によって培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団は造血幹細胞、特に長期造血幹細胞を多く含み、自己増殖能が高く、多分化能を有しているため、これを造血幹細胞移植に用いる場合、長期にわたる生着能、多分化能、骨髓再構築能が優れている。長期造血幹細胞等未分化細胞分画を移植することで、GVHD抑制作用が期待できる。

[0186] 〔培養物〕

本発明の一態様は、造血幹細胞を含む細胞集団の培養物であって、（１）本発明の培養方法によって培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団と、（２）造血幹細胞集団の生存能力を維持するために必要な媒体と、を含む、培養物を提供する。造血幹細胞は長期造血幹細胞であることが好ましい。

[0187] 本明細書における「培養物（culture）」とは、生存能力を維持するために必要な媒体及び細胞集団を含み、更に添加した又は細胞集団から産生された生物学的物質を含んでもよい液体を意味する。生物学的物質としては、例えばサイトカイン、ケモカイン等が含まれるが、これらに限定されない。

[0188] 一態様において、培養物における細胞集団において、造血幹細胞（上述したマーカーを発現する細胞、例：CD34陽性CD38陰性細胞）の総細胞数に対する割合は、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上である。別の一態様として、培養物における細胞集団において、長期造血幹細胞数の総細胞数に対する割合は、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、好ましくは50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上である。

[0189] 本明細書における「生存能力を維持するために必要な媒体」としては、培地、生理学的緩衝溶液等が挙げられるが、造血幹細胞を含む細胞集団が生存

する限りにおいて特に限定されず、当業者であれば適宜選択することができる。一例として、動物細胞の培養に通常用いられる培地を基礎培地として、上述した培地が挙げられる。当該培地には、ウシ胎仔血清、ヒト血清、ウマ血清、インスリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、コレステロール、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、2-メルカプトエタノール、ウシ血清アルブミン、ピルビン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、各種ビタミン、各種アミノ酸、寒天、アガロース、コラーゲン、メチルセルロースなどが含まれ得る。また、当該媒体には、式(1)に表される化合物又はこれらの塩を含んでよい。これらの化合物若しくはその誘導体、又はこれらの塩の濃度は、上述した濃度範囲であってよい。例えば、 $0.001\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.003\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、 $0.03\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ であってよい。

[0190] 本明細書における「生存能力を維持するために必要な媒体」には、さらにサイトカインや造血幹細胞に作用する物質を含んでもよい。サイトカインとして、IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、SCF、FLT3-L、トロンボポエチン(TPO)、エリスロポエチン、及びそれらの類似体などを含むが、これらに限定されない。本明細書において“類似体”とは、天然型のような生物活性を有するサイトカイン及び増殖因子のあらゆる構造的変異形を含む。造血幹細胞に作用する物質として、UM171 ((1r,4r)-N1-(2-benzyl-7-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)-9H-pyrimido[4,5-b]indol-4-yl)cyclohexane-1,4-diamine) 及びその誘導体である、特許文献2に記載のピリミド[4,5-b]インドール誘導体(例えば、UM729 (Methyl 4-((3-(piperidin-1-yl)propyl)amino)-9H-pyrimido[4,5-b]indole-7-carboxylate) などが挙げられるが、これらに限定されない。UM171等による造血幹細胞の維持又は増幅効果が報告されている(特許文献2、非特許文献2)。

[0191] 本発明の培養方法において用いられる培地は、UM171 及びその誘導体を含んでいてもよい。当該誘導体としては、例えば、特許文献2(WO20

13／110198)を参照することができる。

[0192] 〔製造方法〕

本発明の造血幹細胞の製造方法は、造血幹細胞を含む細胞集団を準備する工程と、造血幹細胞を含む細胞集団を培養する工程であって、本発明の培養方法によって造血幹細胞を含む細胞集団を培養する工程とを含む。

[0193] 本発明の造血幹細胞の製造方法の一態様として、

- (1) 造血幹細胞を含む細胞集団を準備する工程、
- (2) 前記細胞集団を含む細胞集団を培養する工程、及び
- (3) 造血幹細胞を回収する工程、を含む。

[0194] <工程(1)>

本発明の製造方法における工程(1)、すなわち、造血幹細胞を含む細胞集団を準備する工程において、造血幹細胞を含む細胞集団は、当業者であれば周知の方法を用いて準備することができる。例えば、血液(末梢血、又は、臍帯血)や骨髓から採集すること、又は多能性幹細胞(例:iPS細胞、ES細胞)から人工的に作製することによって準備することができる。また、造血幹細胞を含む細胞集団は市販品として入手することも可能である。

[0195] 骨髓から採集する方法としては、ほ乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット等の動物から適量の骨髓を採集し、 Ca^{2+} フリー及び Mg^{2+} フリーのPBSに、終濃度2%熱処理不活化牛血清(Gibco社製)及び終濃度2mM EDTA溶液を添加した緩衝液を添加し、機械的に骨髓組織を破壊し、造血幹細胞を含む細胞集団を得ることができる。

[0196] 血液から採集する方法としては、ほ乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット等の動物から適量の血液を採集し、常法に従いPBMC画分を調製することにより、造血幹細胞を含む細胞集団を得ることができる。血液は、末梢血、臍帯血のいずれを用いてもよい。血液は、常法に従い、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの薬剤を投与した動員血液であってもよい。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの薬剤を投与することにより、末梢血中に造血幹細胞を動員することが可能である。

[0197] 臍帯血から採集する方法としては、当業者であれば既知の方法を用いることができる。一例として、ほ乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット等の動物から、新生児と臍帯を切り離したのち、臍帯血管に採取用の針を刺し、臍帯血を採取用バックに採取する。次に、ヒドロキシエチルスターチを加え赤血球を凝集させて遠心後、赤血球や血漿を取り除き、造血幹細胞を含む細胞集団を得ることができる。

[0198] 上記造血幹細胞を含む細胞集団を $100\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$ のろ過機によって濾過してもよい。また、濾過した細胞集団を蛍光標識された上記の造血幹細胞マーカーに対する抗体によって染色し、MACS (Magnetic-activated cell sorting) 又はFACS (Fluorescence activated cell sorter) などによって造血幹細胞マーカー陽性細胞を回収することによって、造血幹細胞及び前駆体細胞集団を富化させてもよい。

[0199] 得られる造血幹細胞を含む細胞集団における造血幹細胞、造血前駆細胞等の細胞種は、フローサイトメトリー又はqRT-PCRにより、造血幹細胞、造血前駆細胞等のマーカー発現解析を行うことによって確認することができる。また、マーカー遺伝子プロモーターの下流にmCherry等の蛍光タンパク質を発現するシステムを用いて蛍光タンパク質発現を指標として、マーカー遺伝子陽性細胞（すなわち、長期造血幹細胞）を回収してもよい。マーカー遺伝子として、上述した遺伝子を用いることができる。

[0200] このように得られた造血幹細胞を含む細胞集団における造血幹細胞の割合は問わないが、その割合は高い方が好ましく、例えば、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、又は90%以上の造血幹細胞を含むことが好ましい。マウス造血幹細胞は、上述したように、フローサイトメトリー又はqRT-PCRにより、造血幹細胞マーカーの発現解析を行うことによって確認することができる。

[0201] このように得られた造血幹細胞を含む細胞集団は、長期造血幹細胞を含む

ことが好ましく、例えば、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、又は90%以上の長期造血幹細胞を含むことが好ましい。長期造血幹細胞は、上述したように、例えば、Hoxb5などのマーカーの発現によって確認することができる。

[0202] 多能性幹細胞（例：iPS細胞、ES細胞）から人工的に造血幹細胞を含む細胞集団を作製する方法としては、公知の方法を用いることができる。一態様として、下記の非特許文献に記載された方法が挙げられる。具体的には、iPS細胞から胚様体を作製後にCD34陽性FLK1陽性細胞を単離する。その後、転写因子としてERG、HoxA5、HoxA9、HoxA10、LCOR、RUNX1、SPI1を発現させて、造血幹細胞を含む細胞集団を得ることができる（Nature, 2017 25:545 (7655) 432-438）。

[0203] 工程（1）には、造血幹細胞を含む細胞集団を予備培養する工程、及び／又は特定のマーカーを用いた造血幹細胞（長期造血幹細胞）を回収する工程などを含んでもよい。

[0204] <工程（2）>

本発明の製造方法における工程（2）、すなわち、培養工程は、本発明の培養方法に記載の方法のとおりである。すなわち、培養工程は、本発明の化合物を含む培地中で培養することを含む。工程（2）で得られるのは、造血幹細胞を含む細胞集団（以下、「本発明の製造方法によって製造された造血幹細胞を含む細胞集団」という場合がある）である。本発明の製造方法によって製造された造血幹細胞を含む細胞集団は、本発明の培養方法によって培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団のとおりである。

[0205] 本発明の培養方法による造血幹細胞を含む細胞集団の培養条件は、当業者であれば適宜設定することができる。本発明の化合物の濃度は、上述した濃度の範囲で設定すればよい。また、培養日数も特に限定されないが、例えば、1日間から30日間、好ましくは、21日間、14日間、7日間、3日間

あってよい。これらの培養条件は、必要とする造血幹細胞の増幅の状態に基づいて設定してもよい。一態様として、造血幹細胞数（上述した各種マーカーの陽性及び陰性の状態で定義した細胞集団であってよい）を、上述の比較対象と比べて1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、好ましくは10倍以上、より好ましくは、20倍以上、50倍以上、100倍以上に増大させるまで培養してもよい。一態様として、CFUアッセイにおいて、CFU-GEMMコロニー数が増加する条件（例：比較対象に対し、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、10倍以上、CFU-GEMMコロニー数が増加する条件）を設定してもよい。

[0206] 上述したサイトカインをさらに含む培地を用いて培養してもよい。具体的には、IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、SCF、FLT3-L、トロンボポエチン（TPO）、エリスロポエチン、及びそれらの類似体からなる群から選択される1以上を含む培地であってよい。一態様として、IL-6、SCF、FLT3-L及びTPOを含む培地を使用してもよい。

[0207] 本発明の化合物の効果を阻害しない範囲で、造血幹細胞を維持・増幅させることが知られている公知物質と組み合わせて培養してもよい。例えば、UM171又はその誘導体をさらに含む培地を用いて培養してもよい。UM171又はその誘導体の濃度は、培養条件によって異なり、当業者であれば適宜設定することができる。一態様として、UM171又はその誘導体の濃度は、1 nM～10 μ Mであってよい。上述した通り、造血幹細胞数やCFU-GEMMコロニー数を指標に濃度を設定することもできる。

[0208] <工程（3）>

本発明の製造方法における工程（3）、すなわち、回収工程において、工程（2）で培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団から、特定のマーカーを用いて造血幹細胞（長期造血幹細胞）を回収する工程である。例えば工程（2）で培養して得られた造血幹細胞を含む細胞集団を、上述した造血幹細胞のマーカーを用い、MACS又はFACSなどにより、造血幹細胞又は

長期造血幹細胞を回収してもよい。

[0209] 本発明の製造方法は、工程（３）で回収した造血幹細胞を容器（輸注バッグなど）に充填する工程及び／又は得られた細胞を凍結する工程などをさらに含んでもよい。

[0210] 〔造血幹細胞培養用試薬〕

本発明の一態様は、式（１）、式（２）、式（３－１）、式（３－２）、式（３－３）、式（４－１）、式（４－２）及び式（４－３）のいずれかで表される化合物、又はその塩を少なくとも１つ含む、造血幹細胞培養用試薬を提供する。

[0211] 〔キット〕

本発明の一態様は、（１）造血幹細胞の維持培養に適した培地と、（２）式（１）、式（２）、式（３－１）、式（３－２）、式（３－３）、式（４－１）、式（４－２）及び式（４－３）のいずれかで表される化合物、又はこれらの塩（本明細書において、「本発明の化合物」という）と、を含む、造血幹細胞培養キットを提供する。

[0212] 式（１）で表される化合物の一例、すなわち本発明の化合物の好ましい例として、以下の化合物が挙げられる。

アルテメテル（Artemether）、

アルテミシニン（Artemisinin）、

アルテニモール（Artenimol）、

アルテモチル（Artemotil）、

アルテスネイト（Artesunate）、並びに、実施例１－１～１－２８の化合物及び実施例１－３３～１－３４の化合物。

式（１）で表される化合物の好ましい例として、以下の化合物が挙げられる。

アルテメテル（Artemether）、

アルテミシニン（Artemisinin）、

アルテニモール（Artenimol）、

アルテモチル (Artemotil)、

アルテスネイト (Artesunate)

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド、

1- [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] メタンアミン

、

1- [3R, (5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] メタンアミン

、

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 10- (2-メトキシエトキシ) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

[0213] 当該キットには、UM171又はその誘導体を含んでもよい。UM171又はその誘導体は上述した通りである。

[0214] 造血幹細胞の維持培養に適した培地は、上述した培地であれば特に限定はない。

[0215] 当該キットには、造血幹細胞を単離するための抗体及び／又は細胞のソーティングを行うための試薬を含んでもよい。造血幹細胞を単離するための抗体は、上述したマーカーに対する抗体であればよく、蛍光タンパクなどにより標識されていることが好ましい。細胞のソーティングを行うための試薬として、例えば、MACSやFACSに用いる標識された二次抗体や分離用の

カラムなどが含まれる。

[0216] 当該キットは、(1) 造血幹細胞の維持培養に適した培地と、(2) 式(1)で表される化合物、又はこれらの塩とを、単一の組成物として含んでもよく、別々の組成物として含んでもよい。

[0217] 一態様において、(2) 式(1)で表される化合物、又はこれらの塩とを含む組成物は、造血幹細胞を維持培養するための培養補助組成物として、(1) 造血幹細胞の維持培養に適した培地と別個に提供することができる。

[0218] 〔移植〕

上述の方法等によって製造した造血幹細胞を含む細胞集団は、移植を必要とする対象（例：哺乳動物）に移植することができ、移植後造血幹細胞は対象（レシピエント）の骨髓の中で生着し、血液を作り出すことができる。対象となりうる哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル等が挙げられる。造血幹細胞を含む細胞集団は、好ましくは医薬組成物に調製したうえ、移植する。

[0219] 造血幹細胞を含む細胞集団の移植は、例えば、静脈内投与（点滴静注など）などにより実施される。

[0220] 白血病等の血液がん治療のための移植の場合、体内に残存するがん細胞をできるだけ壊滅させ、患者自身の免疫力を低下させ移植細胞を生着しやすくするために、抗がん剤、CAR-T細胞療法、又は全身放射線照射、さらに免疫抑制剤を組み合わせた処置などの移植前処置を行うことがある。

[0221] 〔医薬組成物〕

本発明の一態様は、上記製造方法によって製造される造血幹細胞の細胞集団の有効量を含む、医薬組成物を提供する。移植用細胞集団の有効量は、投与の目的、投与方法、及び投与対象の状況（性別、年齢、体重、病状等）によって異なるが、例えば、細胞数として、患者体重当たり 1×10^7 個 $\sim 1 \times 10^{10}$ 個/kg とすることができる。

[0222] 一態様の医薬組成物は、本発明の製造方法によって製造される上記移植用

細胞集団の有効量、及び医薬として許容される担体を含む。

[0223] 医薬として許容される担体としては、生理的な水性溶媒（生理食塩水、緩衝液、無血清培地等）を用いることができる。必要に応じて、医薬組成物には、移植医療において、移植する組織又は細胞を含む医薬に、副成分として通常使用される保存剤、安定剤、還元剤、等張化剤等を含んでいてもよい。例えば、ジメチルスルフォキシド、デキストラン、ヒト血清アルブミン、アセチルトリプトファンナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム水和物、塩化マグネシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸ナトリウム水和物、二酸化炭素などが挙げられるが、これに限定されない。

[0224] 本明細書における医薬組成物の一態様として、細胞懸濁液として静脈内投与（点滴静注）することができる。一態様として、造血幹細胞の細胞集団を含む輸注バッグを提供する。当該輸注バッグには、上述した副成分を含んでもよい。例えば、当該バッグを生理食塩水等で希釈して使用することができる。

[0225] 本明細書における医薬組成物の一態様として、凍結状態で提供される。例えば37℃の水浴で解凍することにより使用することができる。解凍後に生理食塩水等で希釈してもよい。

[0226] 本発明の一態様は、本発明の化合物自体を含む、造血幹細胞の再生や増強が求められる疾患、具体的には白血病等の血液がん治療のための医薬組成物を提供する。一態様の医薬組成物は、本発明の化合物の有効量、及び医薬として許容される担体を含む。

[0227] 〔治療薬及び治療方法〕

本発明の製造方法によって製造される造血幹細胞の細胞集団は、血液がん等の造血幹細胞の機能が失われた患者に対して、造血幹細胞を補充する移植医療に有用である。そこで、本発明の一態様は、本発明の製造方法によって製造される造血幹細胞を含む、造血幹細胞補充のための治療薬（例：血液がんの治療薬）を提供する。移植を必要とする、血液がん、再生不良性貧血、先天性造血障害、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の免疫不全症候群、

無ガンマグロブリン血症、骨髄障害性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、鎌状赤血球等の先天性貧血などの疾患に罹患した患者に、本発明の製造方法によって製造された造血幹細胞を含む細胞集団を移植し、当該造血幹細胞が新しい血液を作ることによって、当該患者を治療することができる。血液がんとして、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などが挙げられる。白血病としては、例えば急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、成人T細胞性ATL、慢性リンパ性白血病などが挙げられる。悪性リンパ腫としては、例えば、濾胞性リンパ腫、アグレッシブリンパ腫、ホジキンリンパ腫などが挙げられる。

また、本発明の一態様は、本発明の化合物自体を対象に投与することを含む、造血幹細胞の再生や増強が求められる疾患、具体的には白血病等の血液がんの治良方法を提供する。

[0228] 以下に本発明を、参考例、実施例及び試験例により、さらに具体的に説明するが、本発明はもとよりこれに限定されるものではない。尚、以下の参考例及び実施例において示された化合物名はACD/Labs 2016.2.2を用いて命名したものであり、必ずしもIUPAC命名法に従うものではない。

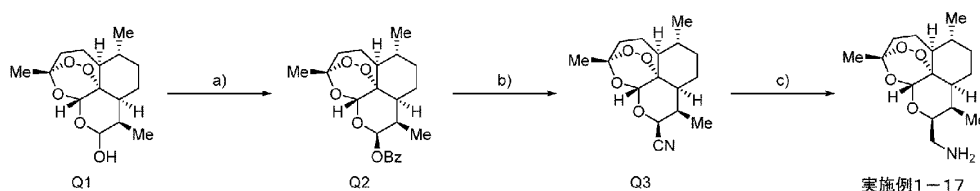
[0229] 明細書の記載を簡略化するために参考例、実施例及び実施例中の表において以下に示すような略号を用いることもある。置換基として用いられる略号としては、Meはメチル、CNはシアノ、Bzはベンゾイル、TMSはトリメチルシリル、N₃はアジド、tertはtertiaryを意味する。NMRに用いられる記号としては、sは一重線、dは二重線、tは三重線、mは多重線及びJは結合定数を意味する。単位に用いられる記号としては、Mはモル濃度を意味する。

[0230] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

実施例

[0231] 実施例1－17

1-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-イル]メタンアミン
[化30]



[0232] a) (3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-イル ベンゾエート (化合物Q2) の製造

市販のジヒドロアルテミニシン (Q1、Adams Reagent Ltd. (カタログコード01108787)、284mg)、トリクロロアセトニトリル (156mg)、ジアザビスクロウンデセン (7.58mg) のジクロロメタン溶液 (5mL) を室温にて、終夜攪拌した。反応溶液に安息香酸 (365mg) のジクロロメタン溶液 (5mL) を添加し、室温にて2時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水 (10mL)、水 (10mL) を加え、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、化合物Q2 (250mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03-8.01 (2H, m), 7.61 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.49 (2H, d, J = 4.6 Hz), 6.53 (1H, d, J = 3.2 Hz), 5.59 (1H, s), 2.98-2.94 (1H, m), 2.46-2.38 (1H, m), 2.10-1.89 (4H, m), 1.83-1.79 (1H, m), 1.68-1.64 (1H, m), 1.64-1.49 (5H, m), 1.45-1.35 (1H, m), 1.08-1.02 (4H, m), 0.98 (3H, d, J = 7.6 Hz).

[0233] b) (3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-カルボニトリル (化合

物Q3)の製造

上記の実験で得られた化合物Q2 (100 mg)、トリメチルシリルシアニド (76.4 mg) のジクロロメタン溶液 (2 mL) を -78°C にて、5分攪拌した。その後、四塩化スズ (26.7 mg) を加え、 -78°C にて、2時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去し、得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ペンタン: 酢酸エチル) で精製することにより化合物Q3 (40 mg) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.55 (1H, s), 4.79 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 2.93–2.88 (1H, m), 2.43–2.35 (1H, m), 2.12–2.06 (1H, m), 2.01–1.91 (2H, m), 1.87–1.76 (2H, m), 1.67–1.62 (1H, m), 1.56–1.43 (5H, m), 1.42–1.41 (1H, m), 1.09 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.10–0.99 (4H, m).

[0234] c) 1 – [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) – 3, 6, 9 – トリメチルデカヒドロ – 12H – 3, 12 – エポキシピラノ [4, 3 – j] [1, 2] ベンゾジオキセピン – 10 – イル] メタンアミン (実施例 1 – 17) の製造

化合物Q3 (100 mg)、水素化ホウ素ナトリウム (64.6 mg)、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (115 mg) のテトラヒドロフラン溶液 (4 mL) を 65°C にて、2時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン – 重曹水で分液抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残査、二炭酸ジ – *tert* – ブチル (110 mg)、トリエチルアミン (101 mg) のテトラヒドロフラン溶液 (3 mL) を、室温にて2時間攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ペンタン: 酢酸エチル) で精製することにより成績体 (45 mg) を得た。その成績体 (25 mg)、3 M 塩酸 – 酢酸エチル (1 mL) のジクロロメタン溶液 (2 mL) を室温にて、2時間攪拌した。反応溶媒を留去し、実施例 1 – 17 の化合物 (10 mg) を塩酸塩として得た。

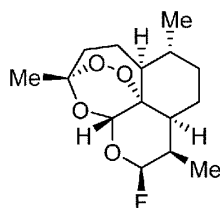
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.36 (3H, s), 5.56–5.36 (1H, m), 4.65–4.44

(1H, m), 3.26 (2H, s), 3.01-2.78 (1H, m), 2.43-2.11 (1H, m), 2.02-1.91 (2H, m), 1.78-1.76 (1H, m), 1.66 (3H, s), 1.48 (3H, s), 1.30-1.19 (3H, m), 0.98-0.87 (7H, m).

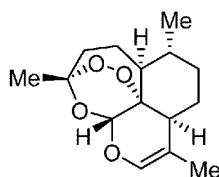
[0235] 実施例 1-1 及び 1-28

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12S, 12aR) - 10-フルオロ-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン (実施例 1-1)、及び (3R, 5aS, 6R, 8aS, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-3, 4, 5, 5a, 6, 7, 8, 8a-オクタヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン (実施例 1-28)

[化31]



実施例 1-1



実施例 1-28

[0236] Q1 (1.136 g) のジクロロメタン溶液 (24 mL) に、0℃にて三フッ化N, N-ジエチルアミノ硫黄 (0.6 mL) を滴下し、室温にて16時間攪拌した。反応終了後、0℃に冷却し、5%炭酸ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え、室温にて2時間攪拌した。有機層を1M塩酸水溶液、重曹水、水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ペンタン: 酢酸エチル) で精製することにより実施例 1-1 の化合物 (283 mg) 及び実施例 1-28 の化合物 (59 mg) を得た。

実施例 1-1

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 5.60 (1H, d, J = 54.4, 2.0 Hz), 5.56 (1H, d, J = 1.6 Hz), 2.72-2.56 (1H, m), 2.38 (1H, m), 2.09-2.02 (1H, m), 1.

95–1.81 (2H, m), 1.72–1.65 (1H, m), 1.62–1.58 (1H, m), 1.55–1.50 (2H, m), 1.50–1.45 (1H, m), 1.43 (3H, s), 1.40–1.32 (1H, m), 1.32–1.23 (1H, m), 0.99 (3H, d, $J = 7.6$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz).

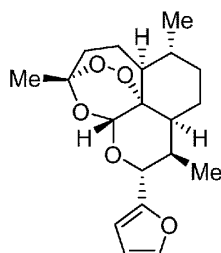
実施例 1 – 28

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.19 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 5.54 (1H, s), 2.40 (1H, m), 2.10–2.00 (2H, m), 1.95–1.86 (1H, m), 1.73–1.62 (2H, m), 1.59 (3H, s), 1.54–1.51 (1H, m), 1.48–1.38 (5H, m), 1.26–1.03 (2H, m), 0.98 (3H, d, $J = 5.6$ Hz).

[0237] 実施例 1 – 7

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) – 10 – (フラン–2–イル) – 3, 6, 9–トリメチルデカヒドロ–12H–3, 12–エポキシピラノ [4, 3–j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

[化32]



上記の実験で得られた実施例 1 – 1 の化合物 (285 mg)、フラン (38 mg) のジクロロメタン溶液 (10 mL) を窒素雰囲気下、 -78°C にて、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (16.8 mg) を添加し、 -50°C にて 5 時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン–重曹水で分液抽出した。有機層の溶媒を減圧留去し、得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (溶出溶媒；アセトニトリル：水 (ギ酸添加)) で精製することにより実施例 1 – 7 の化合物 (33 mg) を得た。

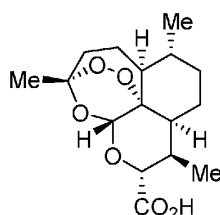
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.39 (1H, s), 6.33–6.31 (1H, m), 5.38 (1H, s), 4.46 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 2.90–2.82 (1H, m), 2.39 (1H, m), 2.08–2.01 (1H, m), 1.93–1.83 (1H, m), 1.77–1.71 (2H, m), 1.66–1.60 (1H, m)

, 1.53-1.47 (2H, m), 1.42-1.34 (4H, m), 1.33-1.24 (1H, m), 1.11-1.02 (1H, m), 0.98 (4H, d, J = 5.5 Hz), 0.93 (3H, d, J = 7.5 Hz).

[0238] 実施例 1-8

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボン酸

[化33]



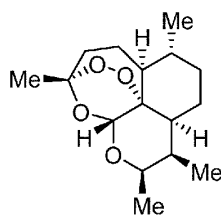
[0239] 実施例 1-7 (90 mg) をアセトニトリル (1 mL)、四塩化炭素 (1 mL) 及び水 (1 mL) の混合物に溶解した。過ヨウ素酸ナトリウム (286 mg) を加え、続いて塩化ロジウム (III) 三水和物 (7 mg) を添加し、室温にて3時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン-重曹水で分液抽出し、有機層の溶媒を減圧留去した。得られた残査を逆相カラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; アセトニトリル: 水 (ギ酸添加)) で精製することにより実施例 1-8 の化合物 (35 mg) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.37 (1H, s), 4.06 (1H, d, J = 11.5 Hz), 2.61-2.53 (1H, m), 2.39 (1H, m), 2.08-2.02 (1H, m), 1.95- 1.88 (1H, m), 1.80-1.73 (2H, m), 1.64-1.37 (1H, m), 1.50-1.44 (1H, m), 1.43 (3H, s), 1.39-1.25 (3H, m), 1.10-1.02 (1H, m), 0.98 (3H, d, J = 1.5 Hz), 0.97 (3H, s).

[0240] 実施例 1-6

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9, 10-テトラメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

[化34]



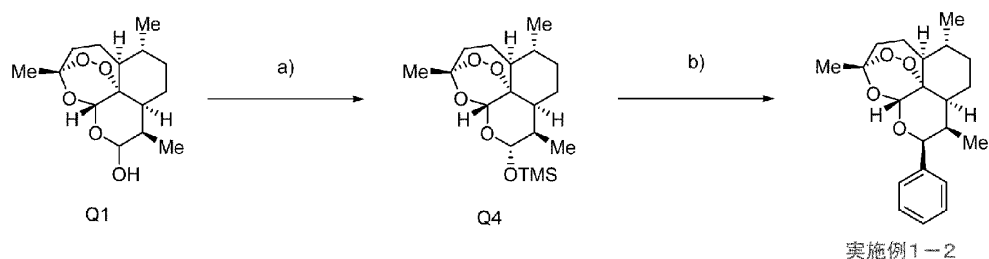
Tetrahedron Lett. 1998, 39, 1533-1536
 に記載の方法を用いて、実施例1-1の化合物(70mg)から実施例1-6の化合物(11mg)を製造した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.36 (1H, s), 4.36-4.33 (1H, m), 2.73-2.66 (1H, m), 2.34 (1H, m), 2.06-2.01 (1H, m), 1.93-1.78 (2H, m), 1.70-1.62 (1H, m), 1.60-1.51 (1H, m), 1.51-1.45 (1H, m), 1.45-1.39 (4H, m), 1.36-1.28 (1H, m), 1.26-1.22 (4H, m), 0.99-0.92 (4H, m), 0.86 (3H, d, J = 7.6 Hz).

[0241] 実施例1-2

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチル-10-フェニルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン

[化35]



[0242] a) トリメチル{[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-イル]オキシ} シラン (化合物Q4) の製造

Q1 (300mg)、トリエチルアミン (132mg) のジクロロメタン

溶液（4 mL）に、0℃にて、クロロトリメチルシラン（142 mg）を加え、0℃にて1.5時間攪拌した。反応終了後、氷水（5 g）を加え、水層をジクロロメタンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去した後、得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒；ペンタン：酢酸エチル）で精製することにより化合物Q4（70 mg）を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.34 (1H, s), 4.78 (1H, d, J = 9.2 Hz), 2.42-2.31 (2H, m), 2.06-2.01 (1H, m), 1.93-1.86 (1H, m), 1.79-1.67 (2H, m), 1.57-1.47 (2H, m), 1.44 (3H, s), 1.40-1.30 (3H, m), 1.05-0.95 (4H, m), 0.88 (3H, d, J = 7.2 Hz), 0.21 (9H, s).

[0243] b) (3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-フェニルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン（実施例1-2）の製造

Eur. J. Org. Chem. 2003, 2098-2114に記載の方法を用いて、化合物Q4（200 mg）から実施例1-2の化合物（24.2 mg）を製造した。

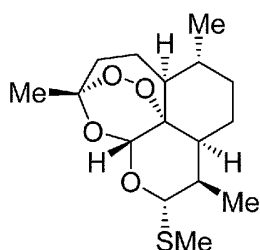
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.34-7.31 (4H, m), 7.27-7.22 (1H, m), 5.74 (1H, d, J = 6.8 Hz), 5.60 (1H, s), 2.80-2.74 (1H, m), 2.40-2.32 (1H, m), 2.11-2.00 (2H, m), 1.91-1.85 (1H, m), 1.78-1.67 (2H, m), 1.47-1.43 (1H, m), 1.41 (3H, s), 1.37-1.26 (4H, m), 1.01 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.53 (3H, d, J = 7.6 Hz).

[0244] 実施例1-3及び実施例1-4

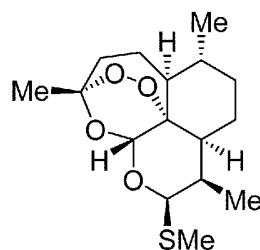
(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12S, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-(メチルスルファニル)デカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン（実施例1-3）と(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12S, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチル-10-(メチルスルファニル)デカ

ヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベン
ゾジオキセピン（実施例1-4）

[化36]



実施例1-3



実施例1-4

[0245] J. Org. Chem. 2004, 69, 984-986に記載の方法を用
いて、Q1（100mg）から実施例1-3の化合物（50mg）と実施例
1-4の化合物（6.8mg）を製造した。

実施例1-3

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.34 (1H, s), 4.48 (1H, d, J = 5.2 Hz), 2.
65-2.60 (1H, m), 2.43-2.35 (1H, m), 2.21 (3H, s), 2.07-2.01 (1H, m),
1.94-1.87 (1H, m), 1.78-1.71 (2H, m), 1.64-1.62 (1H, m), 1.56-1.48 (1
H, m), 1.45 (3H, s), 1.42-1.33 (2H, m), 1.31-1.23 (1H, m), 1.07-1.03
(1H, m), 0.99-0.94 (6H, m).

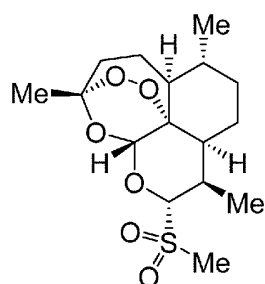
実施例1-4

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.60 (1H, s), 5.19 (1H, d, J = 5.2 Hz), 3.
07-3.03 (1H, m), 2.42-2.34 (1H, m), 2.21 (3H, s), 2.08-2.02 (1H, m),
1.92-1.81 (2H, m), 1.74-1.65 (2H, m), 1.54-1.44 (2H, m), 1.40 (3H, s)
, 1.39-1.35 (1H, m), 1.26-1.25 (1H, m), 0.98-0.92 (7H, m).

[0246] 実施例1-5

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12S, 12aR)-10
-(メタンシルホニル)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3
, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン

[化37]



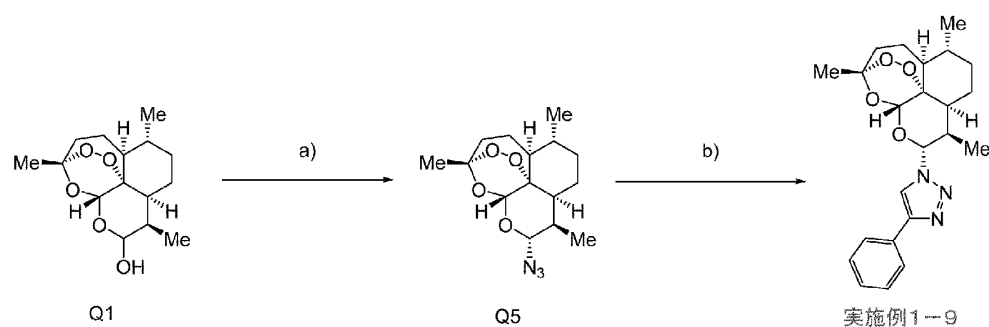
J. Org. Chem. 2004, 69, 984–986に記載の方法を用いて、実施例1–3の化合物（55 mg）から実施例1–5の化合物（18.5 mg）を製造した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.40 (1H, s), 4.35 (1H, d, J = 11.2 Hz), 2.96 (3H, s), 2.87–2.82 (1H, m), 2.42–2.34 (1H, m), 2.06–2.01 (1H, m), 1.95–1.88 (1H, m), 1.84–1.73 (2H, m), 1.50–1.40 (4H, m), 1.37–1.26 (4H, m), 1.14 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.10–1.03 (1H, m), 0.97 (3H, d, J = 6.0 Hz).

[0247] 実施例1–9

4-フェニル-1-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-12H-3,12-エポキシピラノ[4,3-j][1,2]ベンゾジオキセピン-10-イル]-1H-1,2,3-トリアゾール

[化38]



[0248] a) (3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-

10-アジド-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン (化合物Q5) の製造

Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 382-385に記載の方法を用いて、Q1 (100mg) から化合物Q5 (30mg) を製造した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.41 (1H, s), 4.63 (1H, d, J = 10.0 Hz), 2.37-2.47 (2H, m), 2.03-2.09 (1H, m), 1.89-1.95 (1H, m), 1.71-1.81 (2H, m), 1.48-1.57 (1H, m), 1.47 (3H, s), 1.25-1.37 (4H, m), 0.89-1.09 (1H, m), 0.86 (3H, d, J = 4.0 Hz), 0.86 (3H, d, J = 2.4 Hz).

[0249] b) 4-フェニル-1-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル]-1H-1, 2, 3-トリアゾール (実施例1-9) の製造

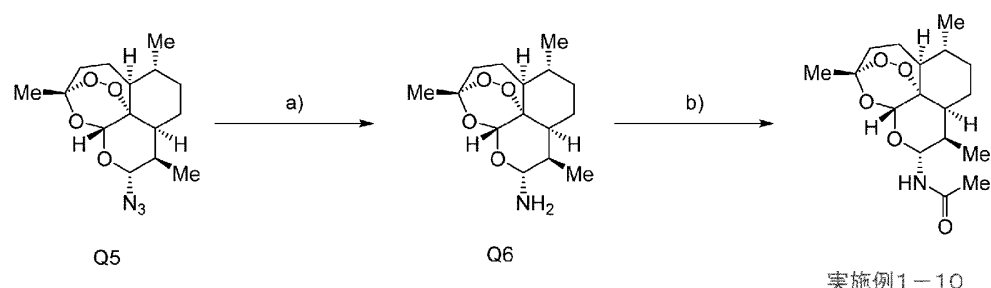
Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 382-385に記載の方法を用いて、化合物Q5 (90mg) から実施例1-9の化合物 (20mg) を製造した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (1H, s), 7.86-7.84 (2H, m), 7.45-7.41 (2H, m), 7.36-7.32 (1H, m), 5.89 (1H, d, J = 10.4 Hz), 5.49 (1H, s), 3.63-3.60 (1H, m), 2.97-2.92 (1H, m), 2.14-1.88 (5H, m), 1.67-1.60 (4H, m), 1.35-1.15 (4H, m), 0.94 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.85 (3H, d, J = 7.2 Hz).

[0250] 実施例1-10

N-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] アセトアミド

[化39]



[0251] a) (3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-アミン (化合物Q6) の製造

Bioorg. Chem. 2016, 66, 63-71, に記載の方法を用いて、化合物Q5 (100mg) から化合物Q6 (87mg) を製造した。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.33 (1H, s), 4.20 (1H, d, J = 9.7Hz), 1.94-1.84 (2H, m), 1.75 (3H, m), 1.52 (2H, m), 1.46-1.41 (4H, m), 1.31-1.22 (4H, m), 0.98-0.90 (6H, m).

[0252] b) N-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] アセトアミド (実施例1-10) の製造

化合物Q6 (87mg)、無水酢酸 (15.6mg) と4-ジメチルアミノピリジン (44.9mg) のジクロロメタン溶液 (5.0mL) を室温で15時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン-5%塩酸水で分液抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ジクロロメタン: メタノール) で精製することにより実施例1-10の化合物 (43mg) を得た。

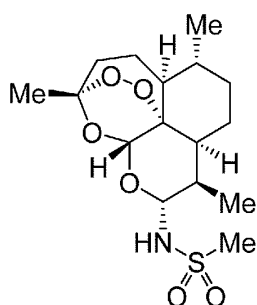
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.01 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.42 (1H, s), 5.34 (1H, t, J = 10.2 Hz), 2.42-2.34 (2H, m), 2.03 (3H, s), 1.92-1.88 (1H, m), 1.80-1.77 (2H, m), 1.72 (1H, d, J = 3.3 Hz), 1.57-1.52 (1H, m)

, 1.44 (3H, s), 1.29 (1H, d, J = 4.2 Hz), 1.28–1.25 (2H, m), 1.13–1.04 (1H, m), 1.02 (1H, d, J = 12.2 Hz), 0.97 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.87 (3H, d, J = 7.2 Hz).

[0253] 実施例 1 – 1 1

N – [(3 R , 5 a S , 6 R , 8 a S , 9 R , 1 0 R , 1 2 R , 1 2 a R)
– 3 , 6 , 9 – トリメチルデカヒドロ – 1 2 H – 3 , 1 2 – エポキシピラノ
[4 , 3 – j] [1 , 2] ベンゾジオキセピン – 1 0 – イル] メタンスルホ
ンアミド

[化40]

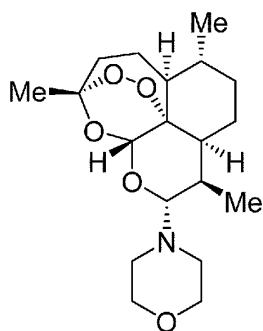


化合物 Q 6 (2 0 m g) のジクロロメタン溶液に、メタンスルホンクロ
リド (2 4 . 1 m g) とトリエチルアミン (2 1 . 3 m g) を 0 ° C にて加え
、室温で 1 7 時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン – 飽和重曹水で分
液抽出し、有機層を 1 M 塩酸水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減
圧留去した。得られた残査を逆相カラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 ; ア
セトニトリル : 水 (ギ酸添加)) で精製することにより実施例 1 – 1 1 の化
合物 (1 4 m g) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 5.37 (1H, s) , 5.05 (1H, d, J = 10.5 Hz) , 4
.78 (1H, t, J = 10.4 Hz) , 3.18 (3H, s) , 2.44–2.33 (2H, m) , 2.08–2.01
(1H, m) , 1.95–1.88 (1H, m) , 1.78–1.73 (2H, m) , 1.53–1.49 (2H, m) , 1.4
2 (3H, s) , 1.39–1.28 (3H, m) , 1.02 (1H, d, J = 14.9 Hz) , 0.96 (6H, m)

[0254] 実施例 1 – 1 3

4-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-イル]モルホリン
[化41]



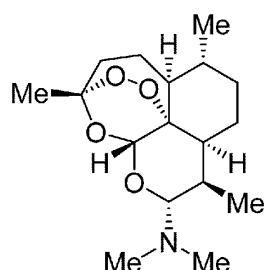
Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 2082-2088に記載の方法を用いて、化合物Q4 (150mg) から実施例1-13の化合物 (24mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.30 (1H, s), 4.00 (1H, d, J = 10.0 Hz), 3.76-3.66 (4H, m), 3.03-2.98 (2H, m), 2.71-2.66 (2H, m), 2.63-2.57 (1H, m), 2.41-2.33 (1H, m), 2.06-2.00 (1H, m), 1.92-1.85 (1H, m), 1.77-1.69 (2H, m), 1.58-1.48 (2H, m), 1.42 (3H, s), 1.40-1.32 (2H, m), 1.26-1.22 (1H, m), 1.08-1.01 (1H, m), 0.97 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.84 (3H, d, J = 7.6 Hz).

[0255] 実施例1-12

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-N, N, 3, 6, 9-ペンタメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-j][1, 2]ベンゾジオキセピン-10-アミン

[化42]



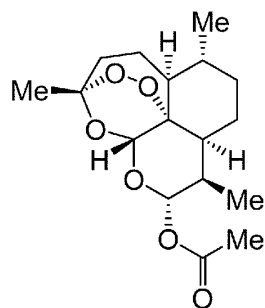
対応する原料化合物を用いて実施例 1 - 13 と同様に反応・処理し、実施例 1 - 12 の化合物を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.31 (1 H, s), 4.05 (1H, d, J = 10.2 Hz), 2.56-2.51 (1H, m), 2.42 (6H, s), 2.40-2.33 (1H, m), 2.06-2.00 (1H, m), 1.91-1.88 (1H, m), 1.76-1.76 (1H, m), 1.57-1.54 (2H, m), 1.42(3H, d, J = 8.8 Hz), 1.42-1.37 (1H, m), 1.27-1.21 (2H, m), 1.09 (1H, m), 1.04-0.98 (1H, m), 0.95 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.82 (3H, d, J = 7.2 Hz).

[0256] 実施例 1 - 14

(3 R, 5 a S, 6 R, 8 a S, 9 R, 10 S, 12 R, 12 a R) - 3, 6, 9 - トリメチルデカヒドロ - 12 H - 3, 12 - エポキシピラノ [4, 3 - j] [1, 2] ベンゾジオキセピン - 10 - イル アセテート

[化43]



Eur. J. Org. Chem. 2002, 113-132に記載の方法を用いて、Q1 (100 mg) から実施例 1 - 14 の化合物 (28 mg) を製造した。

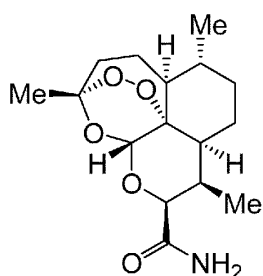
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.81 (1H, d, J = 10.0 Hz), 5.47 (1H, s), 2

.62-2.56 (1H, m), 2.44-2.36 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.09-2.03 (1H, m), 1.95-1.88 (1H, m), 1.83-1.72 (2H, m), 1.68-1.62 (1H, m), 1.56-1.48 (1H, m), 1.46 (3H, s), 1.44-1.40 (1H, m), 1.34-1.27 (2H, m), 1.09-1.02 (1H, m), 0.99 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.88 (3H, d, J = 6.8 Hz).

[0257] 実施例 1 - 15

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド

[化44]



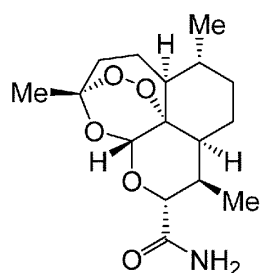
ChemMedChem 2016, 11, 1469-1479に記載の方法を用いて、化合物Q3 (100mg) から実施例 1 - 15 の化合物 (50mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.58 (1H, s), 5.50-5.34 (2H, m), 4.83 (1H, d, J = 6.4 Hz), 2.94-2.88 (1H, m), 2.41-2.33 (1H, m), 2.09-1.95 (2H, m), 1.87-1.67 (3H, m), 1.43 (3H, s), 1.32-1.22 (4H, m), 1.13 (3H, d, J = 7.6 Hz), 1.00-0.97 (4H, m).

[0258] 実施例 1 - 16

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-カルボキサミド

[化45]

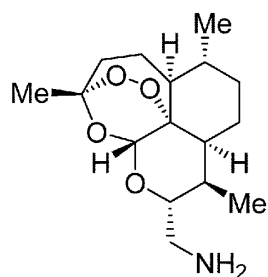


ChemMedChem 2016, 11, 1469–1479に記載の方法を用いて、化合物Q3 (30 mg) から実施例1–16の化合物 (10 mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.58 (1H, s), 5.35–5.34 (2H, m), 3.93 (1H, d, J = 11.2 Hz), 2.56–2.50 (1H, m), 2.43–2.37 (1H, m), 2.09–2.04 (1H, m), 1.97–1.90 (1H, m), 1.81–1.74 (2H, m), 1.56–1.48 (2H, m), 1.45 (3H, s), 1.41–1.28 (3H, m), 1.12–1.05 (1H, m), 1.00–0.97 (6H, m).

[0259] 実施例1–18

1-[(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3,6,9-トリメチルデカヒドロ-12H-3,12-エポキシピラン[4,3-j][1,2]ベンゾジオキセピン-10-イル]メタンアミン
[化46]



実施例1–16の化合物 (400 mg)、ドデカカルボニルニルテニウム (24.5 mg)、1,1,3,3-テトラメチルジシロキサン (686 mg) のトルエン溶液 (8 mL) を50℃にて、終夜攪拌した。反応終了後、水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、

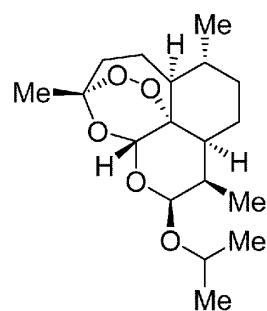
減圧留去した。得られた残査、二炭酸ジ-tert-ブチル（766 mg）、トリエチルアミン（590 mg）のジクロロメタン溶液（8 mL）を、室温にて5時間攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒；ペンタン：酢酸エチル）で精製することにより成績体（150 mg）を得た。その成績体（75 mg）、塩酸-酢酸エチル（1.5 mL）のジクロロメタン溶液（2.5 mL）を室温にて、5時間攪拌した。反応溶媒を留去し、実施例1-18の化合物（28.6 mg）を塩酸塩として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.31 (3H, s), 5.37-5.32 (1H, m), 3.98-3.96 (1H, m), 3.35-3.34 (1H, m), 3.08-3.09 (1H, m), 2.40-2.33 (2H, m), 2.10-2.01 (2H, m), 1.74-1.68 (2H, m), 1.56-1.37 (7H, m), 1.30-1.26 (1H, m), 1.04-1.02 (1H, m), 0.97 (3H, m), 0.90-0.85 (3H, m).

[0260] 実施例1-19

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3,6,9-トリメチル-10-[(プロパン-2-イル)オキシ]デカヒドロ-12H-3,12-エポキシピラノ[4,3-j][1,2]ベンゾジオキセピン

[化47]



Q1（100 mg）、イソプロパノール（42.1 mg）のジクロロメタン溶液（1 mL）に、15℃にて、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（99.6 mg）を添加し、15℃にて、16時間攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒；ペンタン：酢酸エチル）で精

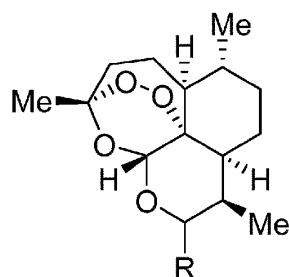
製することにより実施例 1 - 19 の化合物 (22 mg) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 5.46 (1H, s), 4.90 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 4.03–3.97 (1H, m), 2.64–2.60 (1H, m), 2.43–2.35 (1H, m), 2.08–2.03 (1H, m), 1.93–1.82 (2H, m), 1.78–1.72 (1H, m), 1.68–1.62 (1H, m), 1.55–1.51 (1H, m), 1.46 (3H, s), 1.39–1.32 (1H, m), 1.30–1.26 (1H, m), 1.23–1.16 (4H, m), 1.10 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.98–0.93 (4H, m), 0.90 (3H, d, $J = 7.2$ Hz).

[0261] 実施例 1 - 20、1 - 23 及び 1 - 24

対応する原料化合物を用いて実施例 1 - 19 と同様に反応・処理し、表 1 に示す化合物を得た。

[表1]



実施例	R	化合物名
1-20		(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)–10–(シクロヘキシルオキシ)–3, 6, 9–トリメチルデカヒドロ–12H–3, 12–エポキシピラノ[4, 3–j][1, 2]ベンゾジオキセピン
1-23		(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)–10–(2–メトキシエトキシ)–3, 6, 9–トリメチルデカヒドロ–12H–3, 12–エポキシピラノ[4, 3–j][1, 2]ベンゾジオキセピン
1-24		(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)–10–(ベンジルオキシ)–3, 6, 9–トリメチルデカヒドロ–12H–3, 12–エポキシピラノ[4, 3–j][1, 2]ベンゾジオキセピン

実施例 1 - 20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 5.47 (1H, s), 4.94 (1H, d, J = 4.0 Hz), 3.75–3.71 (1H, m), 2.65–2.60 (1H, m), 2.43–2.35 (1H, m), 2.08–2.02 (1H, m), 1.96–1.86 (2H, m), 1.79–1.73 (2H, m), 1.72–1.62 (3H, m), 1.57–1.48 (2H, m), 1.46 (3H, s), 1.40–1.26 (8H, m), 0.97 (3H, d, J = 6.4 Hz), 0.95–0.85 (5H, m).

実施例 1 – 2 3

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.46 (1H, s), 4.85 (1H, d, J = 3.6 Hz), 3.99–3.94 (1H, m), 3.64–3.52 (3H, m), 3.39 (1H, s), 2.67–2.62 (1H, m), 2.43–2.35 (1H, m), 2.08–2.03 (1H, m), 1.94–1.74 (3H, m), 1.67–1.62 (1H, m), 1.51–1.46 (4H, m), 1.40–1.21 (3H, m), 0.98–0.87 (7H, m).

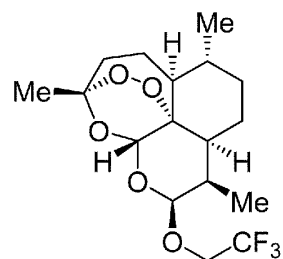
実施例 1 – 2 4

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.39–7.30 (5H, m), 5.49 (1H, s), 4.95–4.92 (2H, m), 4.53 (1H, d, J = 12.0 Hz), 2.72–2.68 (1H, m), 2.45–2.37 (1H, m), 2.10–2.04 (1H, m), 1.94–1.79 (3H, m), 1.67–1.62 (1H, m), 1.56–1.51 (1H, m), 1.49 (3H, s), 1.38–1.24 (3H, m), 0.98–0.96 (6H, m), 0.92–0.88 (1H, m).

[0262] 実施例 1 – 2 2

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) – 3, 6, 9 – トリメチル – 10 – (2, 2, 2 – トリフルオロエトキシ) デカヒドロ – 12H – 3, 12 – エポキシピラノ [4, 3 – j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

[化48]



Q 1 (100 mg)、2, 2, 2 – トリフルオロエタノール (351 mg)

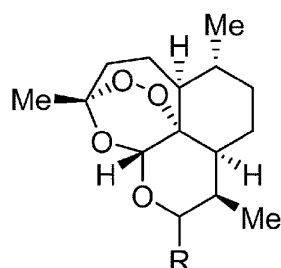
）のトルエン溶液（5 mL）に、0℃にて、トリフェニルホスフィン（184 mg）、アゾジカルボン酸ジエチル（119 mg）を添加し、0℃にて2時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒；ペンタン：酢酸エチル）で精製することにより実施例1-22の化合物（35 mg）を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.43 (1H, s), 4.90 (1H, d, J = 3.2 Hz), 4.20-4.10 (1H, m), 3.95-3.85 (1H, m), 2.74-2.66 (1H, m), 2.44-2.36 (1H, m), 2.10-2.04 (1H, m), 1.95-1.88 (1H, m), 1.84-1.76 (1H, m), 1.74-1.66 (2H, m), 1.57-1.49 (2H, m), 1.46 (3H, s), 1.40-1.24 (2H, m), 0.99-0.97 (6H, m), 0.95-0.89 (1H, m).

[0263] 実施例1-21及び1-25

対応する原料化合物を用いて実施例1-19と同様に反応・処理し、表2に示す化合物を得た。

[表2]



実施例	R	化合物名
1-21		(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチル-10-フェノキシデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-][1, 2]ベンゾジオキセピン
1-25		(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR)-3, 6, 9-トリメチル-10-フェノキシデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ[4, 3-][1, 2]ベンゾジオキセピン

実施例1-21

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33-7.29 (2H, m), 7.15-7.13 (2H, m), 7.03

-7.00 (1H, m), 5.54-5.52 (2H, m), 2.84-2.81 (1H, m), 2.44-2.38 (1H, m), 2.08-1.88 (4H, m), 1.75-1.70 (1H, m), 1.61-1.59 (1H, m), 1.55-1.46 (4H, m), 1.41-1.36 (1H, m), 1.34-1.30 (1H, m), 1.04 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.01-0.96 (4H, m).

実施例 1 - 2 5

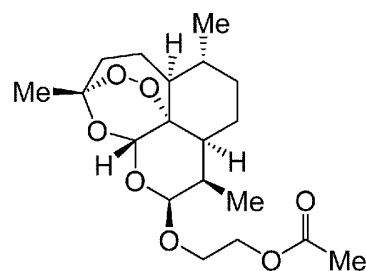
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33-7.28 (2H, m), 7.14-7.12 (2H, m), 7.04-7.00 (1H, m), 5.51 (1H, s), 5.07 (1H, d, J = 10.0 Hz), 2.78-2.73 (1H, m), 2.47-2.39 (1H, m), 2.09-2.04 (1H, m), 1.91-1.97 (1H, m), 1.86-1.80 (1H, m), 1.76-1.71 (1H, m), 1.69-1.65 (1H, m), 1.56-1.49 (1H, m), 1.46 (3H, s), 1.42-1.28 (3H, m), 1.11-1.04 (1H, m), 1.02-1.00 (6H, m).

[0264] 実施例 1 - 2 6 及び実施例 1 - 2 7

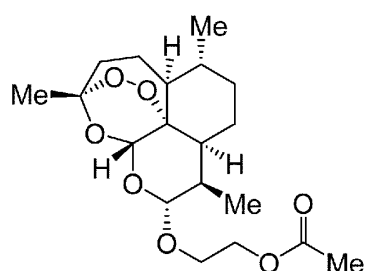
2 - { [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) - 3, 6, 9 - トリメチルデカヒドロ - 12H - 3, 12 - エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン - 10 - イル] オキシ } エチル アセテート (実施例 1 - 2 6) と

2 - { [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 3, 6, 9 - トリメチルデカヒドロ - 12H - 3, 12 - エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン - 10 - イル] オキシ } エチル アセテート (実施例 1 - 2 7)

[化49]



実施例 1 - 2 6

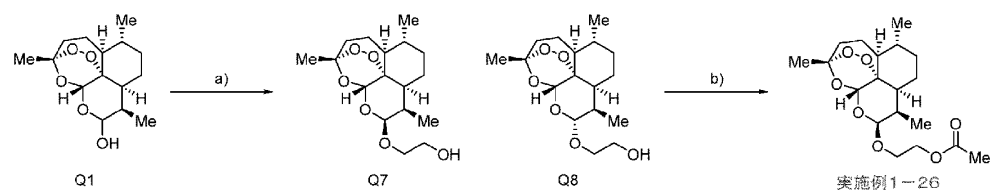


実施例 1 - 2 7

[0265] 実施例 1 - 2 6

2- { [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] オキシ} エチル アセテート

[化50]



[0266] a) 2- { [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10S, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] オキシ} エタン-1-オール (化合物Q7) と 2- { [(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) -3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン-10-イル] オキシ} エタン-1-オール (化合物Q8) の製造

[0267] Q1 (200 mg)、エチレングリコール (130 mg) のジクロロメタン溶液 (4 mL) に、室温にて、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (56.5 mg) を添加し、室温にて、終夜攪拌した。反応終了後、飽和重曹水 (5 mL)、ジクロロメタンを加え、有機層を水で洗浄し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ペンタン: 酢酸エチル) で精製することにより化合物Q7 (54 mg)、化合物Q8 (62 mg) を得た。

化合物Q7

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.46 (1H, s), 4.86 (1H, d, J = 3.6 Hz), 3.93-3.88 (1H, m), 3.78-3.75 (2H, m), 3.68-3.63 (1H, m), 2.73-2.66 (1H, m), 2.39 (1H, m), 2.08-2.03 (1H, m), 1.94-1.87 (1H, m), 1.81-1.78 (2

H, m), 1.75-1.71 (1H, m), 1.69-1.63 (1H, m), 1.54-1.47 (2H, m), 1.45 (3H, s), 1.39-1.30 (2H, m), 1.00-0.93 (7H, m).

化合物 Q 8

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.39 (1H, s), 4.49 (1H, d, J = 9.2 Hz), 3.89-3.87 (2H, m), 3.77-3.71 (2H, m), 2.51-2.36 (2H, m), 2.08-2.02 (1H, m), 1.95-1.88 (1H, m), 1.83-1.77 (1H, m), 1.75-1.70 (1H, m), 1.59-1.64 (1H, m), 1.53-1.49 (1H, m), 1.44 (3H, s), 1.36-1.24 (4H, m), 1.07-1.01 (1H, m), 0.98 (3H, d, J = 5.6 Hz), 0.94 (3H, d, J = 6.8 Hz).

[0268] b) 2 - { [(3 R, 5 a S, 6 R, 8 a S, 9 R, 10 S, 12 R, 12 a R) - 3, 6, 9 - トリメチルデカヒドロ - 12 H - 3, 12 - エポキシピラノ [4, 3 - j] [1, 2] ベンゾジオキセピン - 10 - イル] オキシ } エチル アセテート (実施例 1 - 26) の製造

上記の実験で得られた化合物 Q 7 (54 mg) のジクロロメタン溶液 (3 mL) に、無水酢酸 (83.7 mg) とトリエチルアミン (82.9 mg) を加え、室温にて、終夜攪拌した。反応終了後、ジクロロメタン、水を加え、有機層の溶媒を減圧留去し、得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒; ペンタン: 酢酸エチル) で精製することにより実施例 1 - 26 (29.1 mg) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.45 (1H, s), 4.84 (1H, d, J = 3.2 Hz), 4.30-4.20 (2H, m), 4.05-4.00 (1H, m), 3.69-3.64 (1H, m), 2.69-2.62 (1H, m), 2.39 (1H, m), 2.10-2.03 (4H, m), 1.94-1.88 (1H, m), 1.86-1.75 (2H, m), 1.67-1.64 (1H, m), 1.51-1.49 (1H, m), 1.46 (3H, s), 1.34-1.24 (3H, m), 0.98-0.88 (7H, m).

[0269] 実施例 1 - 27

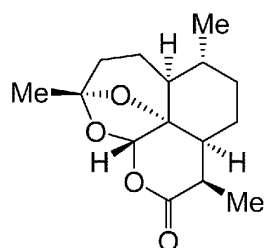
2 - { [(3 R, 5 a S, 6 R, 8 a S, 9 R, 10 R, 12 R, 12 a R) - 3, 6, 9 - トリメチルデカヒドロ - 12 H - 3, 12 - エポキシピラノ [4, 3 - j] [1, 2] ベンゾジオキセピン - 10 - イル] オキシ } エチル アセテート

対応する原料化合物Q8を用いて実施例1-26と同様に反応・処理し、実施例1-27の化合物を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.36 (1H, s), 4.50 (1H, d, J = 9.2 Hz), 4.26 (2H, t, J = 5.0 Hz), 4.14-4.09 (1H, m), 3.76-3.70 (1H, m), 2.49-2.36 (2H, m), 2.09 (3H, s), 2.07-2.02 (1H, m), 1.94-1.87 (1H, m), 1.82-1.76 (1H, m), 1.73-1.69 (1H, m), 1.60-1.55 (1H, m), 1.52-1.51 (1H, m), 1.49 (3H, s), 1.34-1.27 (3H, m), 1.07-0.97 (4H, m), 0.90 (3H, d, J = 7.2 Hz).

[0270] 実施例1-34

(3R, 3aS, 6R, 6aS, 9S, 10aS, 10bR) - 3, 6, 9-トリメチルオクタヒドロ-10aH-9, 10b-エポキシピラノ [4, 3, 2-jk] [2] ベンゾキセピン-2 (3H) -オン
[化51]

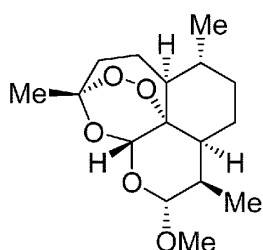


Sigma-Aldrichより購入 (カタログコード: CDS010483) した化合物を使用した。

[0271] 実施例1-35

(3R, 5aS, 6R, 8aS, 9R, 10R, 12R, 12aR) - 10-メトキシ-3, 6, 9-トリメチルデカヒドロ-12H-3, 12-エポキシピラノ [4, 3-j] [1, 2] ベンゾジオキセピン

[化52]



Toronto Research Chemicalsより購入（カタログコード：A777410）した化合物を使用した。

[0272] ＜マウスの飼育＞

マウス内在性HoxB5遺伝子のC末端に、3コピーのmCherry蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む核酸配列（Hoxb5-tri-mCherry）を挿入したマウス（tri-mCherry Hoxb5 knock-in mouse；非特許文献1）を使用した。マウスの飼育は、室温20～26℃、湿度40～70%、明暗各12時間（照明：午前8時～午後8時）の環境条件で飼育した。

[0273] ＜骨髓細胞の採集＞

骨髓細胞は、上記マウスの両側の脛骨、大腿骨、上腕骨及び骨盤から採集し、乳鉢に集めた。Ca²⁺フリー及びMg²⁺フリーのPBSに、終濃度2%熱処理不活化牛血清（Gibco社製）及び終濃度2mM EDTAを添加した緩衝液を添加し、乳棒でこれらを破壊することによって、造血幹細胞を含む細胞集団を得た。

[0274] ＜フローサイトメトリーによるマウス長期造血幹細胞の仕分け＞

まず上記で得られた造血幹細胞を含む細胞集団を、100μm、70μm、40μmのろ過機（メッシュ）に通した。造血幹細胞及び前駆体細胞集団を富化させるため、細胞集団をAPC結合抗c-Kit（2B8）により染色し、抗APC磁力ビーズ及びLSカラム（両方ともMiltenyi Biotec社製）を用いて分画した。

[0275] 次に、c-Kit陽性の細胞を、以下の細胞表面マーカーに対する抗体を

用いて染色した。

細胞表面マーカー：Sca-1、Flk2、CD150、CD34、Ter-119、B220、CD3、CD4、CD8a、Gr-1、CD11b、IL-7R及びCD16/32

[0276] 抗体による染色は4℃で行い、細胞を30分間インキュベートした。CD34抗体による染色は、細胞を90分間インキュベーションした。死細胞染色は、メーカー推奨の方法で、SYTOX Red Dead Cell Stain (Life Technologies社製) によって行った。

[0277] フローサイトメトリー分析及び細胞仕分け（細胞ソート）は、Lineage陰性、c-Kit陽性、Sca-1陽性、Flk2陰性、CD34陰性若しくは弱陽性、CD150陽性、mCherry陽性分画を長期造血幹細胞とし、FACS Aria II cell sorter (BD Bioscience社製) を用いて行い、Flow Joソフトウェア (Tree Star社製) を用いて解析した。

[0278] 仕分け後の細胞は96ウェルプレートに播種した。細胞培養培地は、StemSpan SFEM培地 (STEMCELL Technologies社製) にStem Cell Factor (SCF、Peprotech社製) とThrombopoietin (TPO、Peprotech社製) を添加して調製し、あらかじめ細胞培養用96ウェルプレート (BD Bioscience社製) に100μL/ウェル添加した後に、FACS Aria IIセルソーター (BD Biosciences) でソートした後の細胞を10細胞/ウェルになるように播種した。

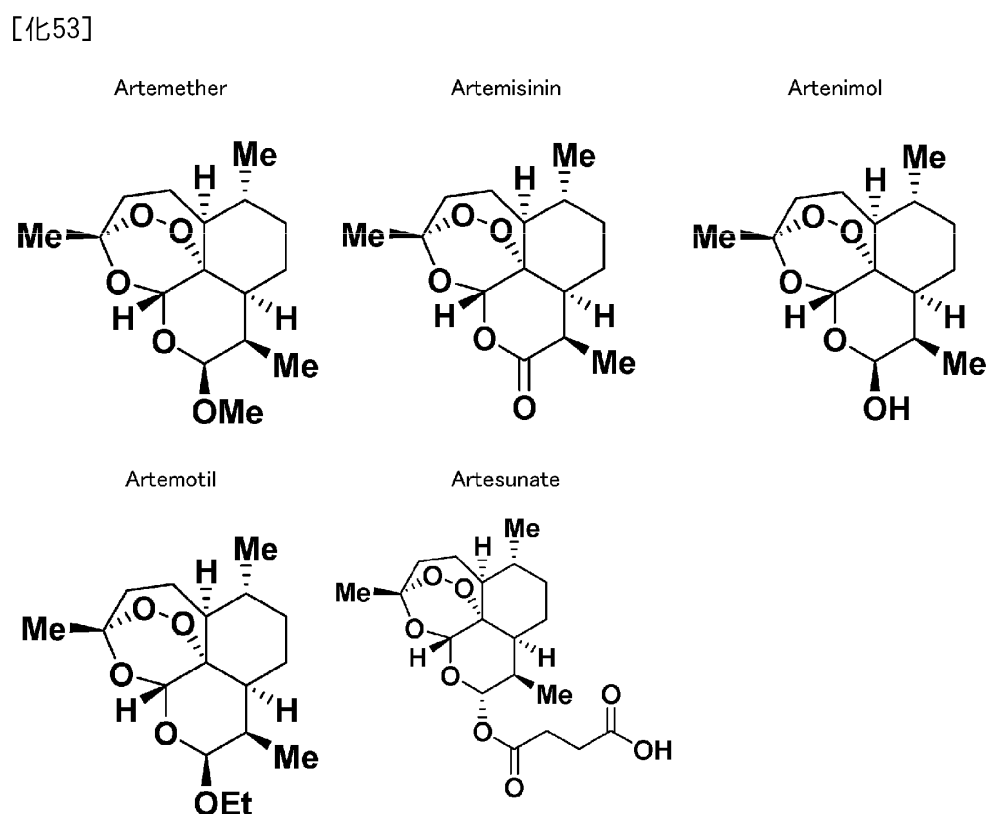
[0279] [実施例2 化合物の1次スクリーニング]

被検化合物は、10mMのDMSO溶液を、細胞培養用培地で終濃度1μMとなるよう希釈して、上記仕分け後播種した細胞に、培地交換によって終容量200μL/ウェルとなるように添加した。その後、細胞はCO₂インキュベーターで、37℃、5%CO₂の条件で1週間培養した。

[0280] 培養後に、細胞を、表面マーカーのc-Kit及びSca-1、Ter-

119、B220、CD3、CD4、CD8a、Gr-1、CD11bに対する抗体で染色し、FACS Aria IIセルソーターを用いて、KLS分画(c-Kit⁺、Lin⁻、Sca-1⁺)又はmCherry陽性分画の比率及び増殖後細胞数を、FlowJo (BD)を用いて解析した。mCherry陽性分画は、Hoxb5遺伝子を発現する細胞分画であり、KLS分画は、c-Kit陽性、Lin陰性かつSca-1陽性の細胞分画であり、造血幹細胞及び多能性前駆細胞を主とする分画である。

[0281] 解析の結果、KLS陽性率が30%以上又はmCherry陽性率が30%以上、細胞数が10細胞以上のものをヒット化合物とした。ヒット化合物は、下記の5つの化合物であった。なお、KLS陽性率は全生細胞数に対するKLS(c-Kit⁺、Lin⁻、Sca-1⁺)の細胞数の割合(%)であり、mCherry陽性は全生細胞数に対するmCherry陽性細胞数の割合(%)である。



(各式中、Meはメチル基を表し、Etはエチル基を表す。)

[0282] [実施例3 ヒット化合物の再現性試験と濃度依存性試験]

5つのヒット化合物のDMSO溶液を、細胞培養用培地で終濃度5点（0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M）に調整し、 $n=2$ で実施例1と同様の方法にて細胞の培養を行った。生細胞数、KLS陽性率、mCherry陽性率を解析し、その結果を表3に示す。細胞の培養と評価指標は、実施例2と同じである。

[表3]

		各化合物の濃度 (μ M)				
		10	3	1	0.3	0.1
Artemether	生細胞数(個)	108.5	115	1170.5	2632	1109
	KLS 陽性率(%)	65.9	50.3	21.4	22.05	50.25
	mCherry 陽性率(%)	94.45	98.05	57.85	36.85	67.2
Artemisinin	生細胞数(個)	282.5	229	728	1020	445.5
	KLS 陽性率(%)	52	50.8	46.85	18.2	33.2
	mCherry 陽性率(%)	80	81.3	60.85	28.15	49.25
Artenimol	生細胞数(個)	0	0	666.5	2268	1563
	KLS 陽性率(%)	0	0	20.05	18	8.92
	mCherry 陽性率(%)	0	0	84.8	42.4	16.9
Artemotil	生細胞数(個)	0	8	249	1529	1073
	KLS 陽性率(%)	0	66.65	30.8	21.95	28.85
	mCherry 陽性率(%)	0	100	92.85	47.65	57.4
Artesunate	生細胞数(個)	0.5	0.5	266	540	1065.5
	KLS 陽性率(%)	0	0	45.3	46.4	36.3
	mCherry 陽性率(%)	0	50	91.2	35.1	23.59

[0283] 表3から、各化合物をそれぞれ含む培地による培養7日後の細胞で、化合物の異なる濃度による効果の違いがあるものの、高いmCherry陽性細胞比率を確認できた。このことから、これらの化合物によって、長期造血幹細胞を自己複製能及び多分化能を維持したまま培養し、増殖させることができることがわかった。

[0284] 5つの化合物（実施例1-29、1-30、1-31、1-32、1-33：それぞれ、アルテニモール（Artenimol）、アルテメテル（Artemether）、アルテモチル（Artemotil）、アルテスネ

イト (Artesunate)、アルテミシニン (Artemisinin) のほか、実施例 1-1 ~ 1-28、1-34、1-35 の化合物の DMSO 溶液を、細胞培養用培地で終濃度 5 点 (0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M) に調整し、n = 2 で実施例 2 と同様の方法にて細胞の培養を行った。生細胞数、KLS 陽性率、mCherry 陽性率を解析し、その結果を表 4 に示す。細胞の培養と評価指標は、実施例 2 と同じである。

[表4]

実施例	評価項目	各化合物の濃度 (μM)				
		10	3	1	0.3	0.1
1-1	生細胞数 (個)	0.0	0.0	0.5	0.0	477.0
	KLS 陽性率 (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	46.5
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	0.0	50.0	0.0	0.5
1-2	生細胞数 (個)	0.0	0.5	0.5	0.5	340.5
	KLS 陽性率 (%)	0.0	0.0	0.0	50.0	16.0
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	50.0	0.0	50.0	59.9
1-3	生細胞数 (個)	3.5	139.0	299.5	324.0	445.0
	KLS 陽性率 (%)	83.4	24.2	20.3	18.6	15.8
	mCherry 陽性率 (%)	100.0	97.0	38.6	4.7	8.0
1-4	生細胞数 (個)	7.5	87.5	181.5	103.0	353.0
	KLS 陽性率 (%)	61.4	30.7	31.1	37.9	17.2
	mCherry 陽性率 (%)	90.9	100.0	85.2	44.7	8.0
1-5	生細胞数 (個)	1.5	184.0	308.0	221.5	443.5
	KLS 陽性率 (%)	0.0	30.8	20.0	41.7	18.2
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	41.5	4.5	8.5	11.5
1-6	生細胞数 (個)	37.5	215.5	183.5	190.0	147.0
	KLS 陽性率 (%)	47.8	17.6	19.8	20.9	34.8
	mCherry 陽性率 (%)	98.4	80.8	24.4	15.6	2.0
1-7	生細胞数 (個)	0.0	0.0	73.0	269.0	225.0
	KLS 陽性率 (%)	0.0	0.0	36.1	19.6	26.9
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	0.0	96.7	62.2	42.9
1-8	生細胞数 (個)	286.5	204.5	248.0	379.5	396.5
	KLS 陽性率 (%)	20.6	37.3	28.7	18.2	17.3
	mCherry 陽性率 (%)	29.0	12.9	12.0	7.7	3.0
1-9	生細胞数 (個)	491.5	479.0	625.0	500.0	627.5
	KLS 陽性率 (%)	27.1	14.1	34.3	31.1	10.6
	mCherry 陽性率 (%)	11.4	8.1	9.4	4.5	5.9
1-10	生細胞数 (個)	46.5	579.0	325.5	387.0	717.5
	KLS 陽性率 (%)	53.1	33.1	32.9	23.1	19.7
	mCherry 陽性率 (%)	99.3	38.5	9.1	16.5	6.5
1-11	生細胞数 (個)	1.5	31.0	196.0	267.0	452.5
	KLS 陽性率 (%)	100.0	32.4	26.0	17.6	13.2
	mCherry 陽性率 (%)	100.0	86.2	60.4	29.2	14.3
1-12	生細胞数 (個)	234.5	217.0	431.5	262.0	450.5
	KLS 陽性率 (%)	36.6	14.4	19.3	15.8	27.2
	mCherry 陽性率 (%)	12.1	19.4	8.2	15.2	7.3
1-13	生細胞数 (個)	0.0	0.0	136.5	605.0	201.0
	KLS 陽性率 (%)	0.0	0.0	21.0	14.7	22.1
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	0.0	6.7	2.9	24.3
1-14	生細胞数 (個)	0.5	1.0	119.0	340.0	497.5
	KLS 陽性率 (%)	0.0	50.0	47.3	30.1	20.6
	mCherry 陽性率 (%)	0.0	100.0	22.1	9.0	0.2

1-15	生細胞数(個)	42.5	111.0	258.0	540.0	379.0
	KLS 陽性率(%)	54.9	40.0	17.9	13.0	6.8
	mCherry 陽性率(%)	97.6	87.1	47.3	13.3	7.1
1-16	生細胞数(個)	29.0	182.5	310.0	388.5	504.5
	KLS 陽性率(%)	52.6	9.2	33.4	11.6	13.3
	mCherry 陽性率(%)	99.0	92.4	68.2	29.2	6.8
1-17	生細胞数(個)	80.0	315.0	641.5	902.0	947.0
	KLS 陽性率(%)	51.8	24.0	19.4	16.1	15.9
	mCherry 陽性率(%)	100.0	70.1	16.1	2.5	4.9
1-18	生細胞数(個)	72.5	154.0	162.0	191.0	405.0
	KLS 陽性率(%)	49.6	30.9	22.4	16.7	10.9
	mCherry 陽性率(%)	98.6	80.5	19.2	15.4	23.5
1-19	生細胞数(個)	0.5	0.0	6.0	151.0	469.0
	KLS 陽性率(%)	0.0	0.0	4.2	41.7	9.5
	mCherry 陽性率(%)	50.0	0.0	50.0	96.2	56.3
1-20	生細胞数(個)	0.5	0.5	1.0	0.0	0.0
	KLS 陽性率(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	mCherry 陽性率(%)	50.0	50.0	0.0	0.0	0.0
1-21	生細胞数(個)	0.5	0.5	0.5	2.0	0.0
	KLS 陽性率(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	mCherry 陽性率(%)	50.0	50.0	0.0	50.0	0.0
1-22	生細胞数(個)	0.5	0.5	0.5	12.5	216.0
	KLS 陽性率(%)	0.0	50.0	0.0	87.0	26.7
	mCherry 陽性率(%)	0.0	50.0	0.0	100.0	90.9
1-23	生細胞数(個)	63.5	252.0	729.0	509.0	712.5
	KLS 陽性率(%)	42.3	23.2	5.3	15.4	12.4
	mCherry 陽性率(%)	100.0	97.3	72.7	46.5	17.9
1-24	生細胞数(個)	0.5	0.0	0.5	0.5	18.0
	KLS 陽性率(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	73.6
	mCherry 陽性率(%)	0.0	0.0	50.0	50.0	94.1
1-25	生細胞数(個)	0.0	0.5	0.0	0.5	181.5
	KLS 陽性率(%)	0.0	50.0	0.0	0.0	40.0
	mCherry 陽性率(%)	0.0	50.0	0.0	0.0	52.3
1-26	生細胞数(個)	30.5	43.5	20.0	48.5	13.5
	KLS 陽性率(%)	28.9	26.9	55.4	68.5	56.1
	mCherry 陽性率(%)	100.0	100.0	96.7	95.0	80.7
1-27	生細胞数(個)	17.5	6.0	6.0	14.5	122.0
	KLS 陽性率(%)	49.8	90.0	100.0	75.0	45.4
	mCherry 陽性率(%)	100.0	100.0	100.0	94.7	44.3
1-28	生細胞数(個)	138.0	283.0	522.0	305.0	275.5
	KLS 陽性率(%)	41.2	16.5	10.5	13.5	21.5
	mCherry 陽性率(%)	96.4	80.3	35.5	15.0	12.9

1-29	生細胞数(個)	0.5	4.5	248.0	215.0	469.5
	KLS 陽性率(%)	50.0	80.0	11.3	13.7	19.4
	mCherry 陽性率(%)	50.0	100.0	3.9	6.0	13.3
1-30	生細胞数(個)	65.0	44.5	135.5	184.0	238.0
	KLS 陽性率(%)	71.4	57.4	40.1	38.4	35.3
	mCherry 陽性率(%)	98.2	100.0	99.0	100.0	71.2
1-31	生細胞数(個)	1.5	2.5	19.5	194.0	201.5
	KLS 陽性率(%)	25.0	87.5	62.3	19.7	26.5
	mCherry 陽性率(%)	50.0	100.0	98.3	96.3	84.9
1-32	生細胞数(個)	1.0	238.5	9.0	355.5	597.5
	KLS 陽性率(%)	0.0	21.2	90.6	12.4	21.0
	mCherry 陽性率(%)	25.0	53.3	100.0	6.0	9.4
1-33	生細胞数(個)	178.0	85.0	268.0	309.5	268.5
	KLS 陽性率(%)	16.1	26.1	20.3	11.2	20.2
	mCherry 陽性率(%)	78.8	81.8	56.8	23.5	28.1
1-34	生細胞数(個)	70.0	268.0	713.5	389.0	136.5
	KLS 陽性率(%)	27.5	27.7	21.8	28.4	77.3
	mCherry 陽性率(%)	0.4	14.6	15.2	18.3	11.7
1-35	生細胞数(個)	121.5	104.5	554.0	544.5	763.5
	KLS 陽性率(%)	46.7	48.7	17.9	19.9	13.8
	mCherry 陽性率(%)	99.6	92.2	74.0	48.5	3.0

[0285] 表4から、各化合物をそれぞれ含む培地による培養7日後の細胞で、化合物の異なる濃度による効果の違いがあるものの、高いmCherry陽性細胞比率を確認できた。このことから、いずれの化合物によっても、長期造血幹細胞を自己複製能及び多分化能を維持したまま培養し、増殖させることができることが判明した。特に好ましい結果が得られた化合物について、後述の通りヒト細胞を用いて評価を行った。

[0286] [実施例4 マウスHoxB5の遺伝子発現による確認試験]

Artemetherの存在下で培養した細胞は、マウスHoxB5の遺伝子発現によって評価した。実施例3と同様に細胞を培養し、培養後の細胞を、Single Cell to CT qRT-PCRキット(Life Technologies社製)によって、同キットの指示通り処理した。処理後の細胞をPBSで1回洗浄した後に、細胞溶解液を添加し、RNA抽出後にcDNA合成のための逆転写反応に付し、14サイクルのTaqman Gene Expression Assayによって増幅し、1×TE緩衝液(pH8.0)にて希釈した。リアルタイムPCRのためには

、以下のTaqmanプローブを用いて、95℃、3秒及び60℃、30秒で40サイクル行い、サンプルを増幅した（Hoxb5:Mm00657672（ThermoFisherScientific社製）、Gapdh:Mm9999915-g1（ThermoFisherScientific社製））。すべてのサーマルサイクラーは、QuantStudio6（Applied Biosystem社製）を使用して、解析した（表5）。

[表5]

	各化合物の濃度(μM)					
	10	3	1	0.3	0.1	0.03
mHoxB5 Ct 値	27.62	28.99	31.18	28.79	30.57	30.72
mGAPDH Ct 値	17.68	13.90	13.02	14.47	13.23	13.12
Ct 値差	9.94	15.10	18.16	14.31	17.34	17.60

[0287] 表5から、化合物を作用させることにより、培養7日後の細胞で、マウスHoxB5 Ct値30以下、ΔCT値16以下の培養条件にて、長期造血幹細胞マーカーのHoxB5発現を確認することができた。このことから、遺伝子マーカーの発現の点からも、本化合物は、In vitroで長期造血幹細胞を維持する機能を有していることが示唆された。

[0288] [実施例5 UM171との組み合わせ試験]

アルテメテル（Artemether）のDMSO溶液を、細胞培養用培地で終濃度3点（0.1 μM、1 μM、10 μM）、さらにUM171のDMSO溶液を、細胞培養用培地で終濃度4点（0.1 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM）に調整し、n=2で実施例1と同様の方法にて細胞の培養を行った。生細胞数、KLS陽性率、mCherry陽性率を解析し、その結果を表6に示す。細胞の培養と評価指標は、実施例2と同じである。

[表6]

化合物	評価項目	UM171 (μ M)			
		0.1	0.3	1	3
DMSO	生細胞数(個)	508.0	281.0	24.5	82.5
	KLS 陽性率(%)	41.0	71.6	98.0	82.2
	mCherry 陽性率(%)	4.7	17.1	38.9	16.2
Artemether 0.1 μ M	生細胞数(個)	430.0	257.0	28.5	101.5
	KLS 陽性率(%)	52.0	42.0	93.4	60.6
	mCherry 陽性率(%)	51.8	78.1	100.0	82.4
Artemether 1 μ M	生細胞数(個)	269.0	151.0	23.0	23.5
	KLS 陽性率(%)	33.1	48.6	93.7	67.3
	mCherry 陽性率(%)	96.3	99.1	100.0	100.0
Artemether 10 μ M	生細胞数(個)	122.0	38.0	9.5	19.0
	KLS 陽性率(%)	56.7	91.1	95.9	94.7
	mCherry 陽性率(%)	99.6	100.0	100.0	96.9

[0289] 表6から、アルテメテル (Artemether) を含まない場合、UM171により、mCherry陽性細胞比率を高める効果は限定的であった。しかしながら、UM171により、KLS陽性細胞比率を高める効果が認められた。一方、アルテメテル及びUM171を含む培地で培養すると、それぞれ単独で培養した場合と比較して、mCherry陽性細胞比率及びKLS陽性細胞比率が向上することが認められた。このことから、アルテメテル (Artemether) 及びUM171には、組み合わせによる効果が認められる事が判明した。

[0290] [実施例6 ヒト細胞を用いた化合物の確認試験]

<ヒト臍帯血由来単核細胞の採集>

ヒト臍帯血由来単核細胞は、EasySep RBC Depletion Reagent (STEMCELL Technologies社製)を用い赤血球除去、濃縮処理を行い、造血幹細胞を含む細胞集団を得た。

[0291] <フローサイトメトリーによるヒト造血幹細胞 (CD34陽性細胞) の仕分け>

まず上記で得られた造血幹細胞を含む細胞集団を、EASYSep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II (STEMCELL Technologies社

製)を用い、CD34陽性細胞分画を粗精製した。造血幹細胞及び前駆体細胞集団を富化したCD34陽性濃縮細胞に対し以下の細胞表面マーカーに対する抗体を用いて染色した。

細胞表面マーカー：CD34、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD235ab、CD3、CD4、CD56、CD8a。

[0292] 抗体による染色は4℃で行い、細胞を30分間インキュベートした。CD34抗体による染色は、細胞を90分間インキュベーションした。死細胞染色は、メーカー推奨の方法で、SYTOX Blue Dead Cell Stain (Life Technologies社製)によって行った。

[0293] フローサイトメトリー分析及び細胞仕分け(細胞ソート)は、Lineage陰性、CD34陽性の分画を造血幹細胞とし、FACS Aria III cell sorter (BD Bioscience社製)を用いて行い、Flow Joソフトウェア(Tree Star社製)を用いて解析した。

[0294] 仕分け後の細胞は96ウェルプレートに播種した。細胞培養培地は、IMDM培地(ThermoFisher SCIENTIFIC社製)にStem Cell Factor (SCF、Peprotech社製)、Thrombopoietin (TPO、Peprotech社製)、L-Glutamine、Penicillin、Streptomycin (ThermoFisher SCIENTIFIC社製)、Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine (ThermoFisher SCIENTIFIC社製)を添加して調製し、あらかじめ細胞培養用96ウェルプレート(CORNING社製)に200μL/ウェル添加した後に、FACS Aria IIIセルソーター(BD Biosciences)でソートした後の細胞を30細胞/ウェルになるように播種した。

[0295] アルテメテル (Artemether)、または実施例1-23、実施例

1-16、及び実施例1-7の化合物を、細胞培養用培地で終濃度9点（0.001 μ M、0.003 μ M、0.01 μ M、0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M）に調製し、上記仕分けして播種したヒト細胞に、終容量200 μ L／ウェルとなるように添加し、作用させた。一部、UM171（35 nM）を添加し、相乗効果の有無を検討した。その後、細胞はCO₂インキュベーターで、37℃、5%CO₂の条件で1週間培養した。生細胞数、CD34陽性細胞数を解析した。

アルテメテル（Artemether）存在下（UM171+／-）で培養した場合の生細胞数及びCD34陽性細胞数を、図1及び図2に示す。また、各種化合物存在下で培養した場合の生細胞数及びCD34陽性細胞数を表7～11に示す。

[0296] 培養後に、細胞を、表面マーカーのCD34、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD235ab、CD3、CD4、CD56、CD8aに対する抗体で染色し、FACS AriaIIIセルソーターを用いて、生細胞数、CD34分画（CD34⁺、Lin⁻）の比率及び増殖後細胞数を測定し、FlowJo（BD）を用いて解析した。CD34分画は、造血幹細胞及び多能性前駆細胞を主とする分画である。

[0297] 表7～11から、各化合物をそれぞれ含む培地による培養7日後の細胞で、化合物の異なる濃度による効果の違いがあるものの、生細胞数、CD34分画の細胞数増加を確認できた。さらに、UM171併用による相乗効果も確認できた。このことから、これらの化合物によって、造血幹細胞を自己複製能及び多分化能を維持したまま培養し、増殖させることをヒト細胞で確認した。

[表7]

培養条件	生細胞数(個)	CD34陽性細胞数(個)
培養前	180	180
DMSO	786	53
Artemether(0.001 μ M)	484	59
Artemether(0.003 μ M)	921	88
Artemether(0.01 μ M)	498	57
Artemether(0.03 μ M)	298	23
Artemether(0.1 μ M)	555	45
Artemether(0.3 μ M)	550	61
Artemether(1 μ M)	479	35
Artemether(3 μ M)	380	26
Artemether(10 μ M)	250	27

[表8]

培養条件	生細胞数(個)	CD34陽性細胞数(個)
培養前	180	180
DMSO	90	14
UM171(35nM)及び Artemether(0.001 μ M)	301	36
UM171(35nM)及び Artemether(0.003 μ M)	765	102
UM171(35nM)及び Artemether(0.01 μ M)	323	43
UM171(35nM)及び Artemether(0.03 μ M)	216	56
UM171(35nM)及び Artemether(0.1 μ M)	376	93
UM171(35nM)及び Artemether(0.3 μ M)	240	9
UM171(35nM)及び Artemether(1 μ M)	31	0

[表9]

培養条件	生細胞数(個)	CD34陽性細胞数(個)
培養前	180	180
DMSO	665	44
実施例1-23(0.001 μ M)	1581	156
実施例1-23(0.003 μ M)	797	65
実施例1-23(0.01 μ M)	1152	72
実施例1-23(0.03 μ M)	901	63
実施例1-23(0.1 μ M)	537	28
実施例1-23(0.3 μ M)	462	19
実施例1-23(1 μ M)	480	16
実施例1-23(3 μ M)	269	15
実施例1-23(10 μ M)	333	0

[表10]

培養条件	生細胞数(個)	CD34陽性細胞数(個)
培養前	180	180
DMSO	1098	129
実施例1-16(0.001 μ M)	1306	143
実施例1-16(0.003 μ M)	1224	173
実施例1-16(0.01 μ M)	1301	116
実施例1-16(0.03 μ M)	590	130
実施例1-16(0.1 μ M)	811	92
実施例1-16(0.3 μ M)	549	32
実施例1-16(1 μ M)	368	13
実施例1-16(3 μ M)	300	13
実施例1-16(10 μ M)	264	3

[表11]

培養条件	生細胞数(個)	CD34陽性細胞数(個)
培養前	180	180
DMSO	1321	145
実施例1-7(0.001 μ M)	1314	175
実施例1-7(0.003 μ M)	1013	113
実施例1-7(0.01 μ M)	1115	150
実施例1-7(0.03 μ M)	905	86
実施例1-7(0.1 μ M)	693	80
実施例1-7(0.3 μ M)	439	5
実施例1-7(1 μ M)	196	4
実施例1-7(3 μ M)	202	0
実施例1-7(10 μ M)	181	0

[0298] [実施例7 ヒト細胞を用いた化合物の機能試験]

アルテメテル (Artemether)、または実施例1-23、実施例1-16、及び実施例1-7化合物を細胞培養用培地で終濃度9点(0.001 μ M、0.003 μ M、0.01 μ M、0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M)に調製し、上記仕分けして播種したヒト細胞に、終容量200 μ L/ウェルとなるように添加し、作用させた。一部、UM171 35 nMを添加し、相乗効果の有無を検討した。その後、細胞はCO₂インキュベーターで、37℃、5%CO₂の条件で1週間培養し回収した後、96ウェルプレートの1ウェルにCD34陽性細胞を1細胞ずつFACS Aria IIIセルソーターで播種し、Methocult H4435 (StemCell Technologies社)で2週間培

養した。培養後、各ウェルを光学顕微鏡（KEYENCE社製）にて撮像し、コロニー数を目視にてカウントし、コロニー形態を目視にて判別した。コロニーの形態から、骨髓系前駆細胞由来の Colony Formation Unit-Granulocyte、Erythroid、Macrophage、Megakaryocyte（CFU-GEMM）及び、赤芽球バーストコロニー形成細胞 Burst Forming Unit-Erythroid（BFU-E）、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 Colony Formation Unit-Granulocyte、Macrophage（CFU-GM）を判別しカウントした。

[0299] 結果を表12～16に示す。また、アルテメテル（Artemether）存在下（UM171+/-）で培養した場合の、CFU-GEMMのコロニー数を図3に示す。表12～16及び図3から、CFU-GEMMのコロニー数増加を確認できた。さらに、UM171併用による相乗効果も確認できた。このことから、これらの化合物によって、造血幹細胞及び造血前駆細胞を自己複製能及び多分化能を維持したまま培養し、増殖させることをヒト細胞で確認した。

[表12]

培養条件	培養後のコロニー数(個) (CFU-GEMM)
培養前	28.5
DMSO	26.2
Artemether(0.001 μ M)	40.3
Artemether(0.003 μ M)	61.4
Artemether(0.01 μ M)	33.2
Artemether(0.03 μ M)	34.8
Artemether(0.1 μ M)	37.0
Artemether(0.3 μ M)	36.7
Artemether(1 μ M)	63.9
Artemether(3 μ M)	31.7
Artemether(10 μ M)	0.0

[表13]

培養条件	培養後のコロニー数(個) (CFU-GEMM)
培養前	20.3
DMSO	12.6
UM171(35nM)及び Artemether(0.001 μ M)	40.1
UM171(35nM)及び Artemether(0.003 μ M)	204.0
UM171(35nM)及び Artemether(0.01 μ M)	53.8
UM171(35nM)及び Artemether(0.03 μ M)	46.8
UM171(35nM)及び Artemether(0.1 μ M)	94.0
UM171(35nM)及び Artemether(0.3 μ M)	40.0
UM171(35nM)及び Artemether(1 μ M)	0.0

[表14]

培養条件	培養後のコロニー数(個) (CFU-GEMM)
培養前	9.0
DMSO	16.6
実施例1-23(0.001 μ M)	171.3
実施例1-23(0.003 μ M)	39.9
実施例1-23(0.01 μ M)	76.8
実施例1-23(0.03 μ M)	22.5
実施例1-23(0.1 μ M)	13.4
実施例1-23(0.3 μ M)	3.9
実施例1-23(1 μ M)	12.0
実施例1-23(3 μ M)	4.5
実施例1-23(10 μ M)	0.0

[表15]

培養条件	培養後のコロニー数(個) (CFU-GEMM)
培養前	20.3
DMSO	73.2
実施例1-16(0.001 μ M)	130.6
実施例1-16(0.003 μ M)	112.2
実施例1-16(0.01 μ M)	65.1
実施例1-16(0.03 μ M)	68.8
実施例1-16(0.1 μ M)	40.6
実施例1-16(0.3 μ M)	22.9
実施例1-16(1 μ M)	15.7
実施例1-16(3 μ M)	10.0
実施例1-16(10 μ M)	8.8

[表16]

培養条件	培養後のコロニー数(個) (CFU-GEMM)
培養前	20.3
DMSO	33.0
実施例1-7(0.001 μ M)	43.8
実施例1-7(0.003 μ M)	33.8
実施例1-7(0.01 μ M)	74.3
実施例1-7(0.03 μ M)	83.0
実施例1-7(0.1 μ M)	64.1
実施例1-7(0.3 μ M)	19.5
実施例1-7(1 μ M)	0.0
実施例1-7(3 μ M)	0.0
実施例1-7(10 μ M)	0.0

[0300] [実施例8 ヒト細胞を用いた In Vivo 生着試験]

アルテメテル (Artemether)、または実施例1-23の化合物を、細胞培養用培地でそれぞれ終濃度0.003 μ M又は0.01 μ Mに調製し、上記仕分けして播種したヒト細胞(1ウェルあたり166細胞播種)に、終容量200 μ L/ウェルとなるように添加し、作用させた。その後、それぞれの条件について、トータル10000個のCD34陽性画分の細胞をCO₂インキュベーターで、37℃、5%CO₂の条件で1週間培養し、細胞数をカウントした。培養後の細胞のうち、培養前と同数の10000個の細胞を、致死量の放射線照射した免疫無防備状態のNOGマウスに移植した。比較対象として、10000個の新鮮臍帯血由来CD34陽性細胞(無培

養)を移植した。移植後の示された時点での末梢血ドナーキメリズムを、ヒト特異的CD45抗体とマウス特異的CD45抗体を用いてヒトCD45陽性細胞数とマウスCD45陽性細胞数を測定し、ヒトCD45陽性細胞とマウスCD45陽性細胞の合計値に対するヒトCD45陽性細胞の割合(キメラ率)で示した。

[0301] 表17は、移植後1か月、2か月、3か月、表18は、移植後1か月、2か月での末梢血ドナーキメリズムを示す。

[0302] 移植細胞数をそろえた移植実験の結果より、アルテメテル(Artemether)、または実施例1-23の化合物存在下で体外培養した細胞は、培養前細胞と比較して同等のキメラ率、又はDMSOコントロールと比較して高いキメラ率を示した。また、培養前と比較すると、総細胞数が増加した。また、DMSOコントロールと比較すると、大幅にキメラ率が上昇していた(約10倍前後)。従って、本化合物によって、生着能を有する長期造血幹細胞の機能を維持しつつ、増殖培養することができることを、*In vivo*生着試験により確認できた。

[表17]

培養条件	生細胞数 (個)	ドナーキメリズム(%)		
		移植期間(月)		
		1	2	3
新鮮	9960	1.243 ± 0.975	4.251 ± 5.035	4.996 ± 3.932
DMSO	198409	0.081 ± 0.124	0.118 ± 0.184	0.204 ± 0.445
Artemether (0.003 μM)	95954	0.041 ± 0.022	0.605 ± 0.95	2.108 ± 2.479

[表18]

培養条件	生細胞数 (個)	ドナーキメリズム(%)		
		移植期間(月)		
		1	2	3
新鮮	9960	0.286 ± 0.329	1.302 ± 0.926	-
DMSO	20262	0.014※	0.091※	-
実施例1-23 (0.01 μM)	20071	0.299 ± 0.049	0.748 ± 0.585	-

※n=1で実施