

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6580552号  
(P6580552)

(45) 発行日 令和1年9月25日 (2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日 (2019.9.6)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 209/24 (2006.01)

C O 7 D 209/24 C S P

C O 7 D 277/64 (2006.01)

C O 7 D 277/64

C O 7 D 263/56 (2006.01)

C O 7 D 263/56

C O 7 D 209/58 (2006.01)

C O 7 D 209/58

C O 7 D 417/08 (2006.01)

C O 7 D 417/08

請求項の数 62 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-503019 (P2016-503019)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)  
 (65) 公表番号 特表2016-519080 (P2016-519080A)  
 (43) 公表日 平成28年6月30日 (2016.6.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/029224  
 (87) 国際公開番号 W02014/144702  
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)  
 審査請求日 平成29年3月14日 (2017.3.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/798,562  
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 508064849  
 ビセン メディカル、 インコーポレイテ  
 ッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2  
 4 5 1, ウォーザン, ウィンター ス  
 トリート 9 4 0  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

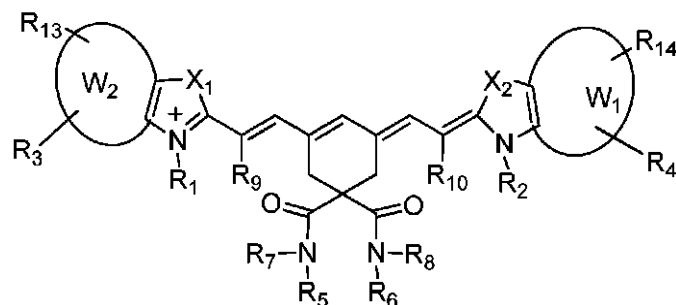
(54) 【発明の名称】 4, 4-二置換シクロヘキシル架橋ヘプタメチンシアニン色素およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I - A によって表される蛍光性化合物

【化 5 7】



(I-A)

またはその塩であって、式中、

X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、それぞれ独立に、O、S、Se、または C (C<sub>1</sub> ~ 4 アルキル)<sub>2</sub> であり、W<sub>1</sub> および W<sub>2</sub> は、ベンゾ環またはナフト環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、ハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_1 \sim C_{10}$  アルキルであり、

$R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、 $H$  または  $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $H$ 、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、 $H$ 、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル、 $N$ -ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-$  (ハロゲン)、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

【請求項2】

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-C_2 \sim C_8$  アルキレン- $X_3$  である、請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$  または  $-COOH$  によって置換されている  $-C_2 \sim C_8$  アルキレンである、請求項1に記載の化合物。

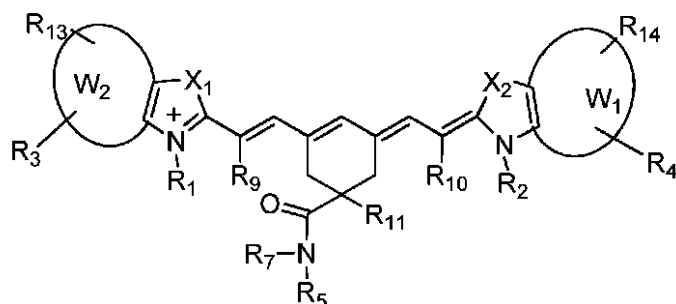
【請求項5】

$R_7$  および  $R_8$  が水素である、請求項1から4のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項6】

式 I - B によって表される蛍光性化合物

【化58】



(I-B)

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、 $O$ 、 $S$ 、 $Se$ 、または  $C(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環またはナフト環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、ハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_1 \sim C_{10}$  アルキルであり、

$R_5$  および  $R_7$  は、それぞれ独立に、水素または  $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン -  $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、水素、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン -  $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$  - アルキレン -  $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、 $H$ 、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル、 $N$ -ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、 $H$ 、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{11}$  は、 $-COOH$ 、 $-CN$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-C(O)$ -ハロアルキル、ハロアルキル、 $-COOR_{15}$ 、 $-CON(H)R_{15}$ 、または  $-CO(CH_2)_nR_{15}$  であり、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$R_{15}$  は、 $H$ 、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、アルキル、または  $X_3$  で任意選択により置換されているアリール、および / またはポリエチレングリコールであり、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

$n$  は、出現するごとに独立に、1～10を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

#### 【請求項 7】

$R_5$  が、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン -  $X_3$  であり、 $R_7$  が水素である、請求項 6 に記載の化合物。

#### 【請求項 8】

$R_5$  が、 $-C_2 \sim C_8$  アルキレン -  $X_3$  であり、 $R_7$  が水素である、請求項 6 に記載の化合物。

#### 【請求項 9】

$R_5$  が、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$  または  $-COOH$  によって置換されている  $-C_2 \sim C_8$  アルキレンであり、 $R_7$  が水素である、請求項 6 に記載の化合物。

#### 【請求項 10】

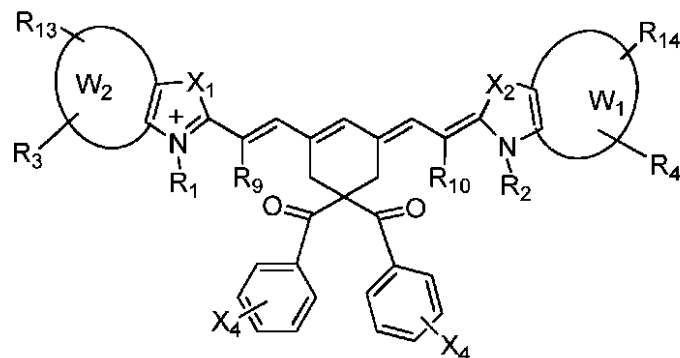
式 I - C によって表される蛍光性化合物

10

20

30

## 【化 5 9】



(I-C)

10

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_{1-4} \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環またはナフト環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、ハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_{1-10}$  アルキルであり、

20

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、水素、 $-C_{1-22}$  アルキレン、 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ 、 $-アルキレン-X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

30

$X_4$  は、出現するごとに独立に、水素、ハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、または  $-CO_2^-$  を表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、H、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表す、

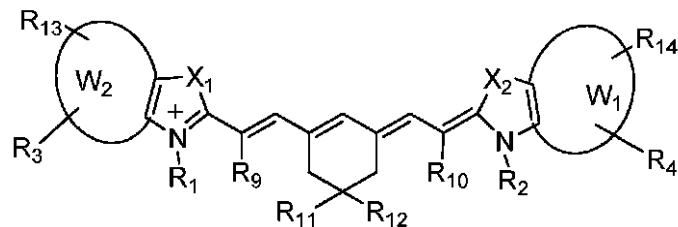
蛍光性化合物またはその塩。

40

## 【請求項 11】

式 I - D によって表される蛍光性化合物

## 【化 60】



(I-D)

10

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_{1-4} \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環またはナフト環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、ハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_{1-10}$  アルキルであり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、 $-C_{1-22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

20

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{13}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または

30

7員環を形成し、  
 $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、それぞれ独立に、 $-C(O)-$ アリールまたは  $-CON(H)R_{15}$  であり、

$R_{13}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$R_{15}$  は、出現するごとに独立に、H、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、アルキル、ポリエチレングリコール、または  $X_3$  で任意選択により置換されていてもよいアリール、および/またはポリエチレングリコールを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

## 【請求項 12】

40

$X_1$  および  $X_2$  が、 $C(CH_3)_2$  である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 13】

$W_1$  および  $W_2$  が、ベンゾ環である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 14】

$W_1$  および  $W_2$  が、ナフト環である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項 15】

$R_1$  および  $R_2$  が、独立に、 $-SO_3H$  または  $-SO_3^-$  で任意選択により置換されて

50

いる - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルである、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 16】

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、独立に C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 17】

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> が、それぞれ独立に、H、-SO<sub>3</sub>H または -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> である、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 18】

R<sub>7</sub> が、水素である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の化合物。

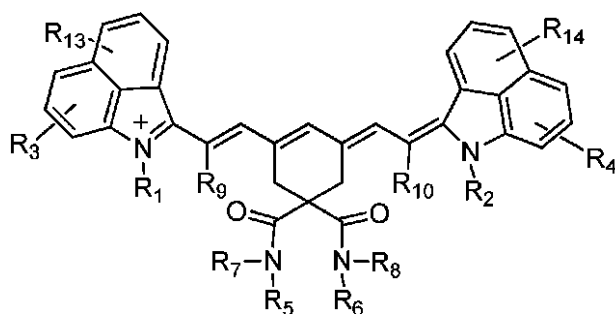
【請求項 19】

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> が、水素である、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 20】

式 I I によって表される蛍光性化合物

【化 61】



(II)

またはその塩であって、式中、

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、ハロゲン、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-COOH、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> および -OH からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている -C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルであり、

R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> および R<sub>8</sub> は、それぞれ独立に、H または -C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン-X<sub>3</sub> であり、

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> は、それぞれ独立に、H、-C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン-X<sub>3</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sub>12</sub>)-アルキレン-X<sub>3</sub>、ハロゲンまたは -NO<sub>2</sub> であり、

X<sub>3</sub> は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、-CH<sub>3</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-COOH、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-NCS、-NCO、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、-OH、-SH、マレイミド、フタルイミド、-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(ハロゲン)、-CONHNH<sub>2</sub>、-CN、-NH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-CON(H)R<sub>12</sub>、アルキニル、-N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または R<sub>1</sub> および R<sub>9</sub> もしくは R<sub>2</sub> および R<sub>10</sub> は、それらの相互接続原子と一緒に、5員、6員または 7員環を形成し、

R<sub>12</sub> は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

m は、出現するごとに独立に、0、1、2、3 または 4 を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

【請求項 21】

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、独立に、-SO<sub>3</sub>H または -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> で任意選択により置換されて

いる - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルである、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 22】

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、独立に、-SO<sub>3</sub>H または -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> で任意選択により置換されている - C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 23】

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> が、独立に、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 24】

R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> が、それぞれ独立に、-C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> である、請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 25】

R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> が、それぞれ独立に、-C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> である、請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 26】

R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> が、それぞれ独立に、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> または -COOH により置換されている -C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキレンである、請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 27】

R<sub>7</sub> および R<sub>8</sub> が、水素である、請求項 20 から 26 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 28】

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> が、水素である、請求項 20 から 27 のいずれか一項に記載の化合物

10

20

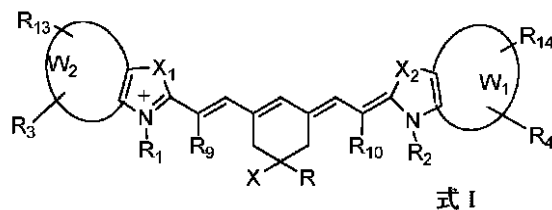
【請求項 29】

請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の化合物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 30】

以下の構造式すなわち式 I によって表される蛍光性化合物であって、

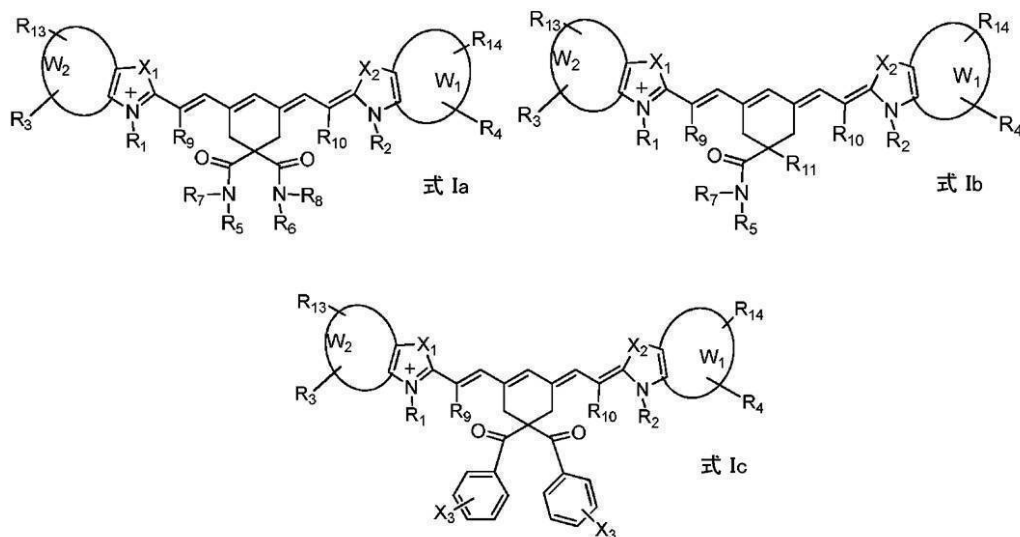
【化 62】



30

式中、以下に示す通り、X = CO - NR<sub>5</sub>R<sub>7</sub> であり、R = CO - NR<sub>6</sub>R<sub>8</sub> である場合 (式 I a)、X = CO - NR<sub>5</sub>R<sub>7</sub> かつ R = R<sub>11</sub> である場合 (式 I b)、X = CO - Ph - X<sub>3</sub> であり、R = CO - Ph - X<sub>3</sub> である場合 (式 I c) に、

## 【化 6 3】



10

式中、 $X_1$  および  $X_2$  は、独立に、O、S、Se、 $C(CH_2R_3CH_2R_4)$  から選択され、

$R_1$  および  $R_2$  は、それぞれ独立に、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 1 \sim 20$ ) であり、

20

$R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、H、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 1 \sim 20$ ) から選択され、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 0 \sim 20$ ) から選択され、

$X_3$  は、独立に、H、ハロゲン、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $SO_3^-$ 、 $COOH$ 、 $NCS$  (イソチオシアネート)、 $NCO$  (イソシアネート)、N-ヒドロキシスクシンイミジル (NHS) エステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル (NHSS) エステル、ヒドロキシ (OH)、チオール (SH)、マレイミド、フタルイミド、ヨードアセトアミド、 $CONHNH_2$  (ヒドラジド)、 $CN$ 、 $NH_2$ 、 $CONHR$ 、アルキン、アジド ( $N_3$ )、 $SO_2NX_3R_7$ 、 $X_3$  で任意選択によりさらに置換されているアリールから選択され、

30

$R_9$  および  $R_{10}$  は、H または ハロゲン または アルキル基であり、

$R_1$  および  $R_9$  または  $R_2$  および  $R_{10}$  は、任意選択により、一緒になって 5 員または 6 員または 7 員の環を形成し、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾまたはナフトであり、

$R_{11}$  は、独立に、 $COOH$ 、 $CN$ 、F、 $NO_2$ 、 $COCF_3$ 、 $CF_3$ 、 $COOR$ 、および  $CONHR$  から選択され、

R は、H または  $COOH$  または  $SO_3H$  または  $NH_2$  または SH または アルキル、または  $X_3$  で任意選択によりさらに置換されているアリール、またはポリエチレングリコール (PEG) である、

蛍光性化合物。

40

## 【請求項 3 1】

前記分子が、約 500 nm ~ 約 1100 nm の範囲の吸収および発光波長を有する、請求項 3 0 に記載の化合物。

## 【請求項 3 2】

前記分子が、約 600 nm ~ 約 900 nm の範囲の吸収および発光波長を有する、請求項 3 0 に記載の化合物。

## 【請求項 3 3】

X および R が、カルボン酸基 ( $COOH$ ) である、請求項 3 0 に記載の化合物。

## 【請求項 3 4】

X または R のいずれかが、カルボン酸基 ( $COOH$ ) である、請求項 3 0 に記載の化合

50



物。

【請求項 35】

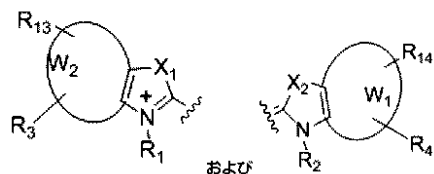
$X_3$  が、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $COOH$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル、 $N$ -ヒドロキシルホスシンイミジルエステル、アジド、 $-NCS$ 、フタルイミド、ならびにマレイミドからなる群から選択される、請求項 30 に記載の化合物。

【請求項 36】

$W_1$  および  $W_2$  が、同じである、請求項 30 に記載の化合物。

【請求項 37】

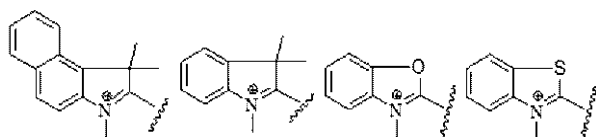
【化 73】



10

が、

【化 74】



20

からなる群から選択される、請求項 30 に記載の化合物。

【請求項 38】

$X_1$  および  $X_2$  が、 $C(CH_3)_2$  である、請求項 30 に記載の化合物。

【請求項 39】

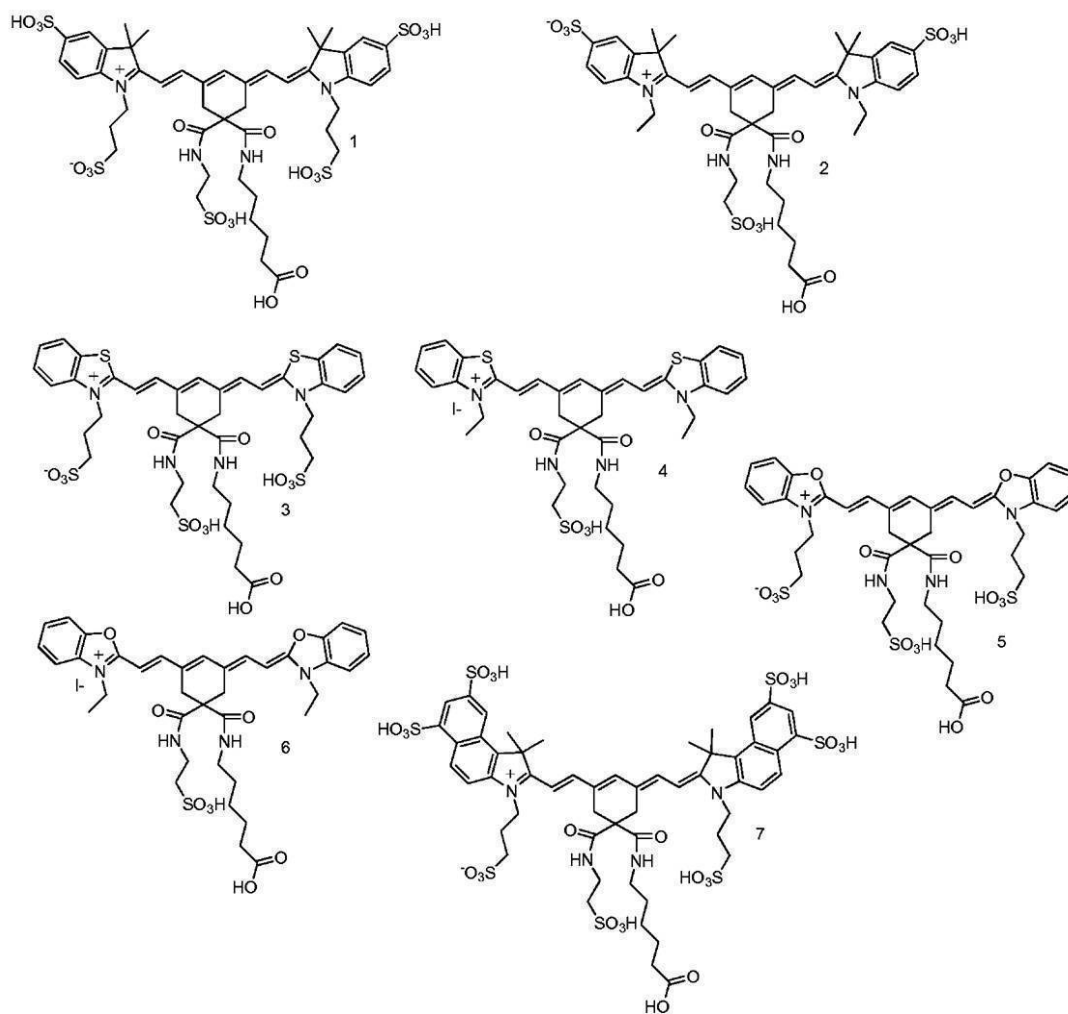
前記剤が、遠赤または近赤外において蛍光性である、請求項 30 から 38 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 40】

以下のうちの一つから選択される化合物

## 【化 6 6 - 1】

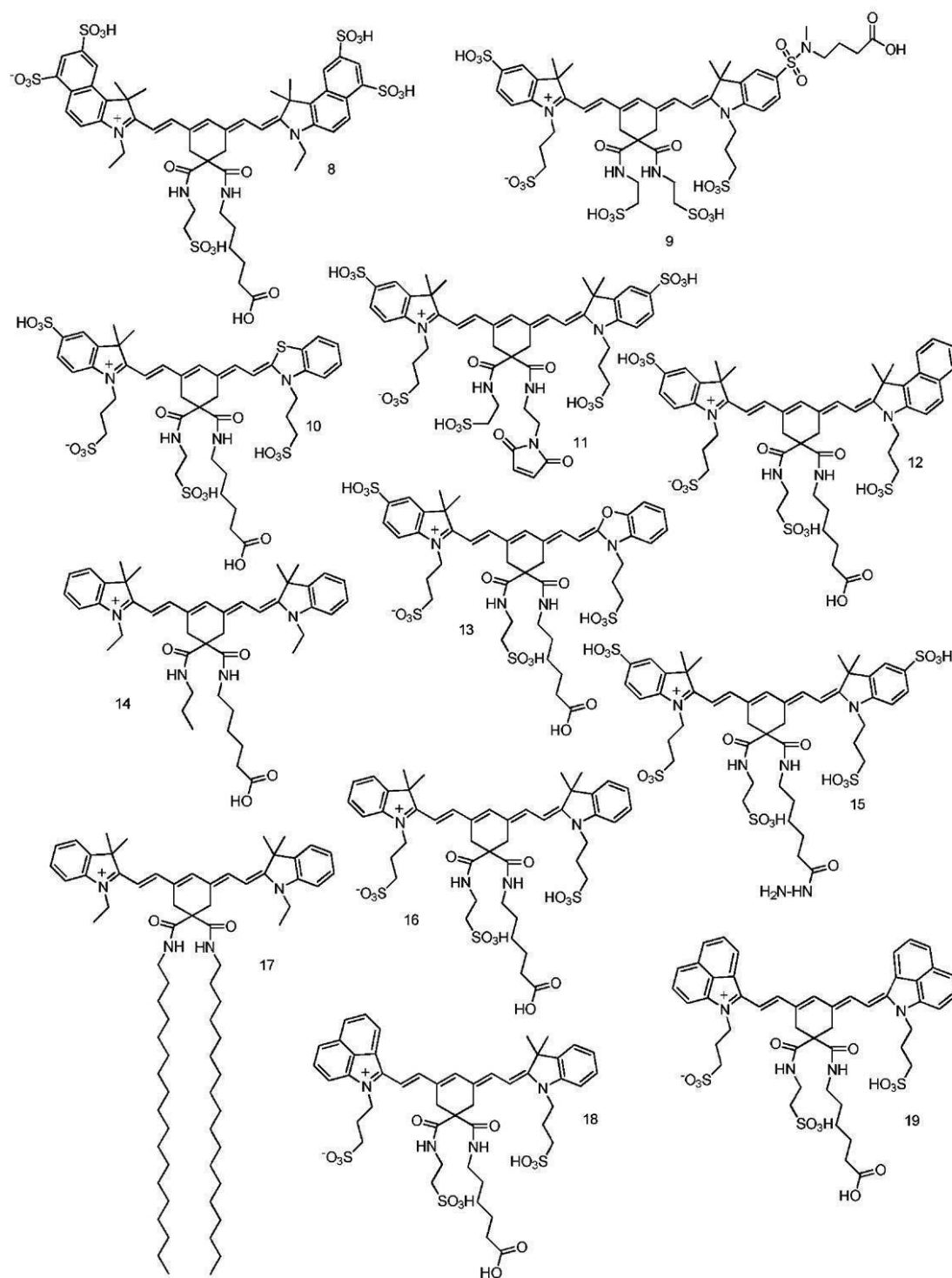


10

20

30

## 【化 6 6 - 2】



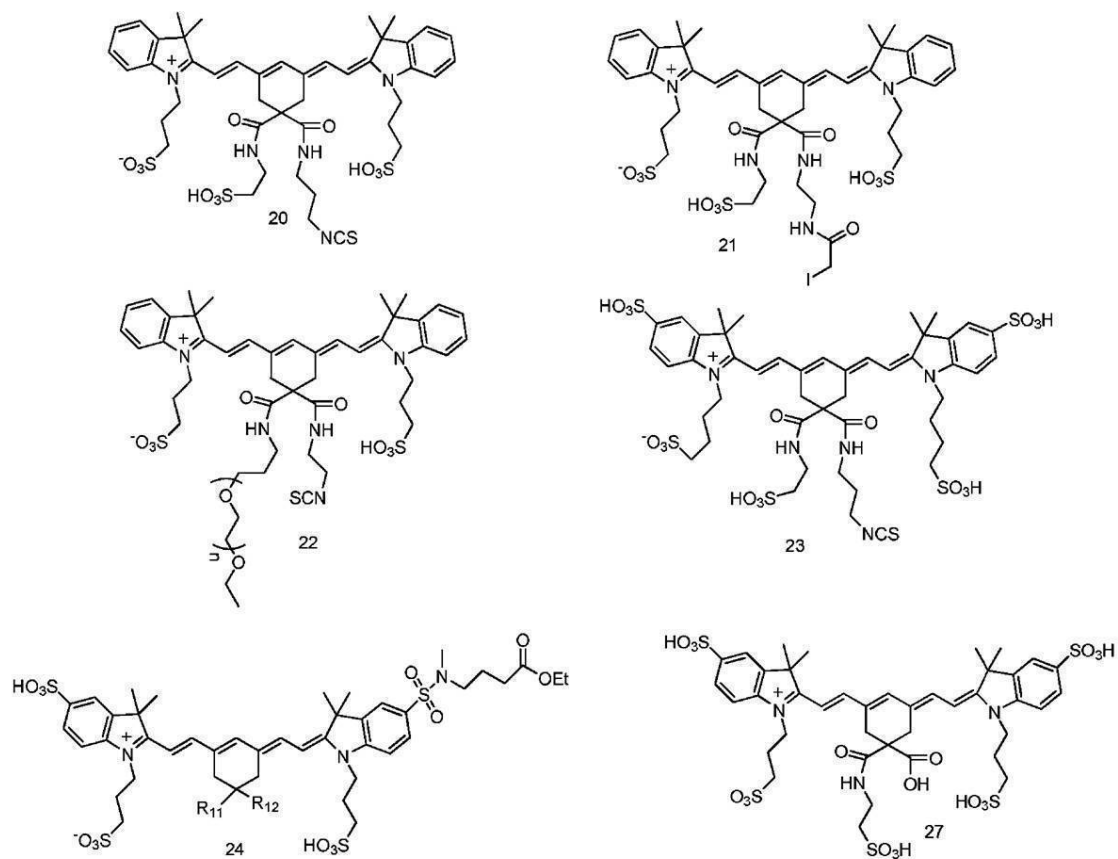
10

20

30

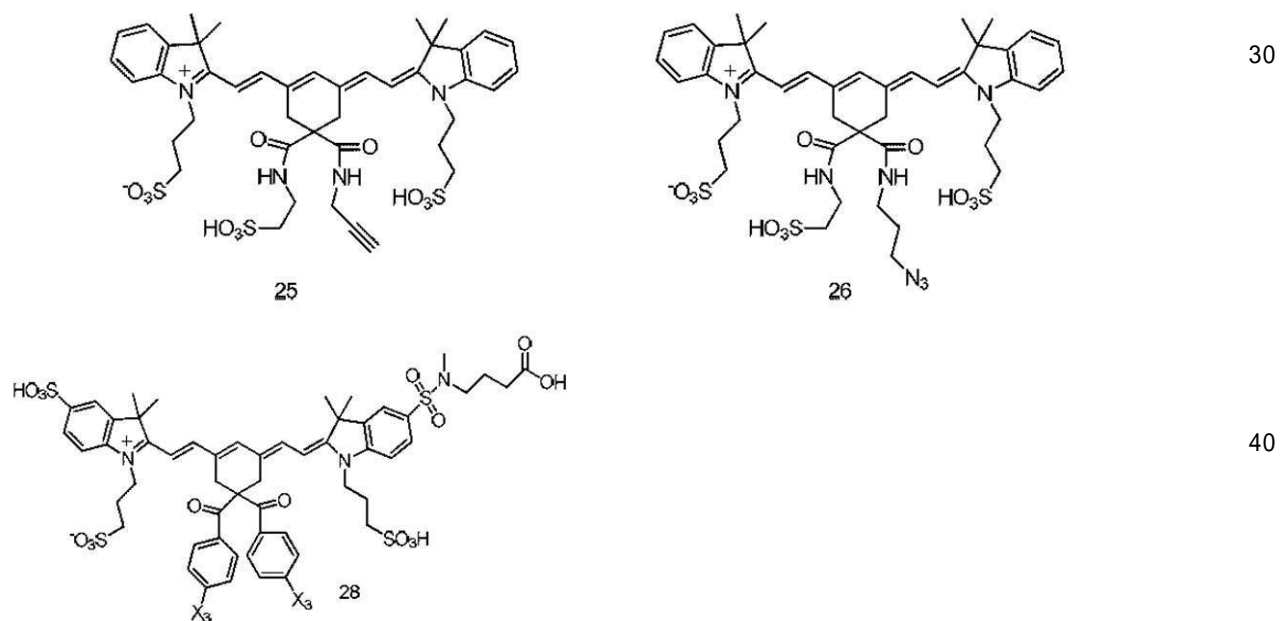
40

## 【化 6 6 - 3】



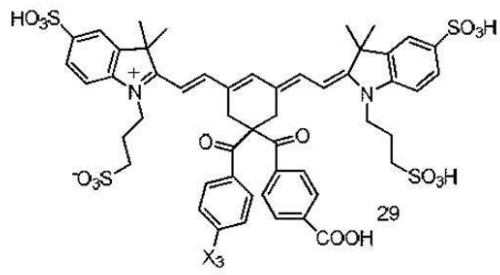
[  $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、独立に、 $CONHR$ 、または  $O=C$ -フェニルであり、ここで、 $R=H$ である ]

## 【化 6 7 A】



[ 両方の  $X_3$  が同時に、 $H$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $F$ 、 $I$ 、 $SO_3H$ 、または  $COOH$ である ]

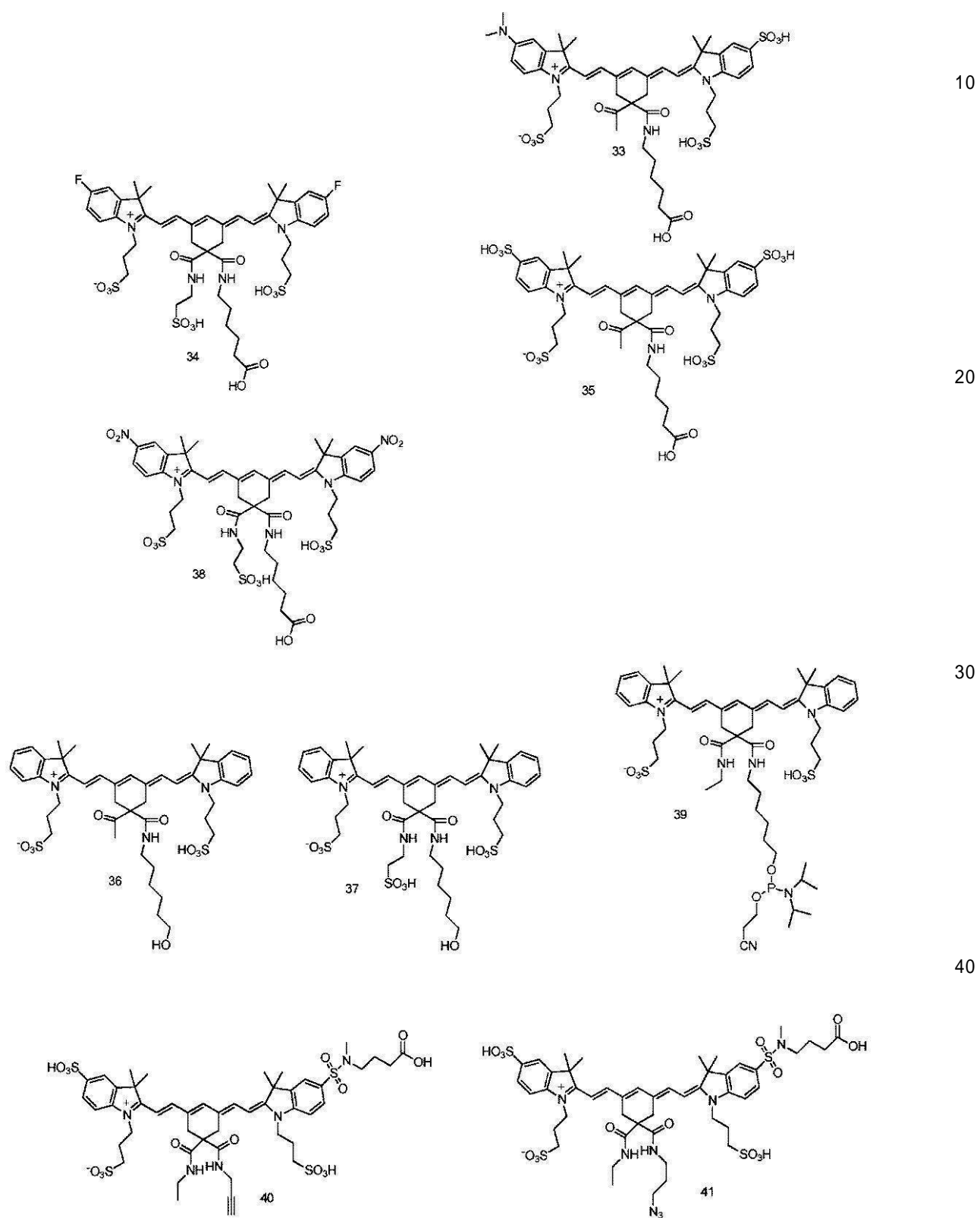
## 【化 6 7 B】



10

[  $\text{X}_3$  は、 $\text{H}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、または  $\text{COOH}$ である ]

## 【化 6 7 - 2】



10

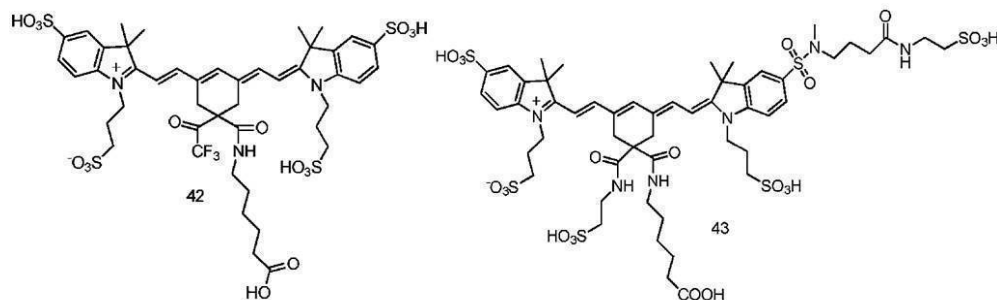
20

30

40

50

## 【化 6 7 - 3】



10

またはその塩。

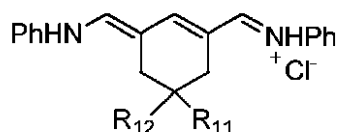
## 【請求項 4 1】

請求項 1 ～ 2 8 および 3 0 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

## 【請求項 4 2】

以下の式 V によって表される化合物であって、

## 【化 7 1】



式 V

20

式中、 $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、独立に、 $\text{COOH}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CF}_3$ 、ハロゲン、 $\text{CN}$ 、 $\text{O}=\text{C}$ -フェニル、 $\text{COCH}_2\text{R}$  であり、 $\text{R}=\text{H}$  であり、 $\text{Ph}$  は、フェニル基であり、前記フェニル基は、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{OMe}$ 、 $\text{NMe}_2$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{CF}_3$ 、アルキルのうちの一つで任意選択により置換されている、化合物。

## 【請求項 4 3】

$R_{11}$  が  $\text{COOH}$  であり、 $R_{12}$  が  $\text{COOH}$  である、請求項 4 2 に記載の化合物。

30

## 【請求項 4 4】

*in vivo* イメージングのための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 ～ 2 8 および 3 0 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物を含み、

前記組成物は対象に投与され、そして前記組成物は前記対象内に分布させられることを特徴とし、ここで、前記化合物によって放出されたシグナルが検出される、組成物。

## 【請求項 4 5】

*in vivo* 光学イメージングのための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 ～ 2 8 および 3 0 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物を含み、ここで、前記化合物は、蛍光色素を含み、

前記組成物は対象に投与され、そして前記組成物は前記対象内に分布させられることを特徴とし、ここで、前記対象は、前記蛍光色素によって吸収可能な波長の光に曝露されることを特徴とし、ここで、前記化合物によって放出されたシグナルが検出される、組成物。

40

## 【請求項 4 6】

前記化合物によって放出された前記シグナルが、画像を構築するために使用される、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

## 【請求項 4 7】

前記画像が、断層画像である、請求項 4 6 に記載の組成物。

## 【請求項 4 8】

前記組成物が所定の時間間隔で反復して投与されることを特徴とし、それによって前記

50

対象において前記タンパク質標識化合物の前記放出されたシグナルの経時的評価を可能にする、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記組成物が所定の時間間隔で反復して投与されることを特徴とし、それによって前記対象において前記タンパク質標識化合物の前記放出されたシグナルの経時的評価を可能にする、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記対象が、動物またはヒトである、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

シグナル特性が互いに識別可能な 2 種類またはそれより多くの種類のイメージングプローブが、対象に投与されることを特徴とし、前記イメージングプローブの少なくとも一つが、タンパク質標識化合物である、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

10

【請求項 5 2】

前記対象の前記蛍光色素によって吸収可能な波長の光への曝露および前記化合物によって放出されたシグナルの検出が、内視鏡、カテーテル、断層撮影システム、手持ち式の光学イメージングシステム、または術中顕微鏡を使用して実施される、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

放出されたシグナルの存在、非存在またはレベルが、病状を示す、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

20

【請求項 5 4】

前記組成物は、疾患を検出および / またはモニタするために使用される、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記疾患が、骨疾患、がん、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心虚血、心筋再かん流傷害、環境疾患、皮膚疾患、免疫疾患、遺伝性疾患、感染性疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、および呼吸器疾患からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記蛍光性化合物で標識された細胞が、前記対象に投与されることを特徴とする、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

30

【請求項 5 7】

前記化合物によって放出された前記シグナルが、前記細胞の輸送および局在をモニタするために使用される、請求項 5 6 に記載の組成物。

【請求項 5 8】

対象の疾患を処置するための組成物であって、前記組成物は、請求項 1 ~ 2 8 および 3 0 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物、または請求項 2 9 に記載の組成物を含み、ここで、前記化合物は、疾患のエリアに局在し、実効線量の放射線を送達する放射標識を含み、前記組成物は、対象に全身的または局所的にのいずれかで投与されることを特徴とする、組成物。

40

【請求項 5 9】

a . 試料を、請求項 1 ~ 2 8 および 3 0 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の化合物と接触させるステップと、

b . 前記化合物を、生物学的標的に結合させるステップと、

c . 任意選択により、結合していない化合物を除去するステップと、

d . 前記化合物から放出されたシグナルを検出し、それによって前記化合物が前記生物学的標的によって活性化されたか、または前記生物学的標的に結合したかを決定するステップと

を含む、in vitro イメージング方法。

【請求項 6 0】

50

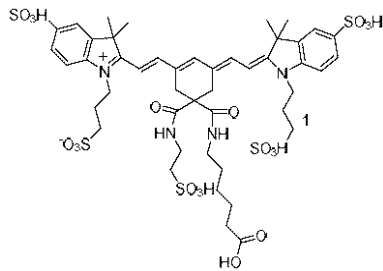


前記試料が、生物学的試料である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記化合物が、

【化 7 5】



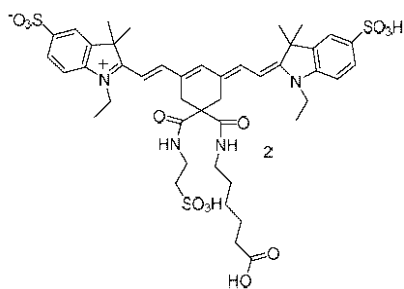
10

である、請求項 4 0 に記載の化合物。

【請求項 6 2】

前記化合物が、

【化 7 6】



20

である、請求項 4 0 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

30

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/798,562号の利益および優先権を主張する。この米国仮特許出願の全内容が、参考として本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、4,4-二置換シクロヘキシル架橋部分を含むポリメチン架橋となる新しい蛍光性色素のための組成物および方法を提供する。新しい組成物は、一般に、色素に高い親水性を付与する複数のスルホン酸またはスルホネート基を含有しており、様々な医学的、診断的および生物学的用途において使用され得る。

40

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

光学イメージング方法には、他のイメージング方法を上回るいくつかの利点がある。このようなイメージングでは、典型的に、赤色および近赤外（NIR）範囲（600～1200nm）の光を使用して、組織透過性を最大限にし、天然の生物学的吸収剤、例えばヘモグロビンおよび水による吸収を最小限に抑える。光学イメージングにより、高い感受性を提供することができ、試験対象または実験技師を電離放射線に曝露する必要がなくなり、複数の識別可能なプローブ（分子イメージングにおいて重要となり得る）を同時に使用され得、機能的イメージングおよび *in vivo* 顕微鏡においてそれぞれ重要な、高い

50

時間および空間分解能が提供される。

#### 【 0 0 0 4 】

蛍光イメージングでは、規定帯域幅を有するフィルタ光またはレーザーが、励起光源として使用される。励起光は、身体組織中を移動し、レポーター分子（例えば、コントラスト剤またはイメージングプローブ）に遭遇すると、その光は吸収される。次に、レポーター分子は、励起光とは検出可能に異なる特性を有する光を放出する。次に、放出されて生じた光を使用して、画像を構築することができる。ほとんどの光学イメージング技術は、レポーター分子として有機および無機蛍光性色素を使用することに依存している。

#### 【 0 0 0 5 】

蛍光性色素は、一般に公知であり、蛍光顕微鏡法、蛍光免疫アッセイおよびフローサイトメトリーなどの手順によって、様々な生物学および非生物学の材料の蛍光標識および検出に使用される。このような材料を蛍光性色素で標識するための典型的な方法は、色素分子上の適切な基と、標識される材料上の適合性のある基との結合を用いて蛍光性複合体を作り出すことである。このように、例えば細胞、組織、アミノ酸、タンパク質、抗体、薬物、ホルモン、ヌクレオチド、核酸、脂質および多糖等の材料は、化学的に標識され、検出もしくは定量化されてよい、または標的材料に特異的に結合することができ、かつ蛍光検出方法によって検出され得る蛍光プローブとして使用されてよい。明るい蛍光性色素によって、高い感度を有する結合材料の検出または局在化が可能になる。

#### 【 0 0 0 6 】

生物学および生物医学的研究のための検出可能な標識が必要である。*in vivo*で使用されるクエンチされたプローブのために十分に働く色素は、*in vitro*での利用において常に有効であるわけではない。ある場合には、タンパク質または生体分子上にこれらのフルオロフォアの二つ以上が存在することによって、検出を妨害する著しいクエンチが生じる。*in vitro*および*in vivo*の両方で使用することができ、分子を過剰にクエンチしない色素が必要である。高い可溶性の親水性蛍光性色素は、目的の標識細胞、タンパク質および他の生体分子の移動および機能を追跡することもできる。*in vivo*または*in vitro*で過剰にクエンチしない新しいクラスの色素により、生物学的研究に利用可能なツールを増やすことができる。

#### 【 0 0 0 7 】

それにも関わらず、様々な医学的、診断的および生物学的用途で利用できる新しい色素が、現在も必要とされている。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 0 8 】

##### 発明の概要

本発明は、4, 4 - 二置換シクロヘキシル架橋部分を含むポリメチン架橋を有する新しい蛍光性色素を生成可能であるという発見に、部分的に基づく。これらの色素は、様々な*in vitro*および*in vivo*イメージング用途で使用され得る。

#### 【 0 0 0 9 】

ある特定の実施形態では、本発明の化合物は、式 ( I I )



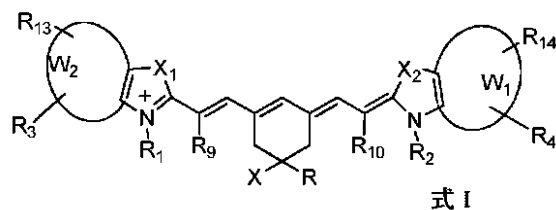
およびその塩によって表され得る

[  $Z^1$  および  $Z^2$  は、それぞれ独立に、置換または非置換インドリニウムまたはベンゾインドリニウム (benzindolinium) 環から選択することができ、PMBは、4, 4 - 二置換シクロヘキシル架橋部分を含むポリメチン架橋を表す ]。他の実施形態では、化合物は、約 500 nm ~ 約 1100 nm の範囲、好ましくは約 600 nm ~ 約 900 nm の範囲の吸収および発光波長を有する。ある特定の実施形態では、色素は、約 600 nm ~ 約 850 nm、約 650 nm ~ 約 900 nm、または約 650 nm ~ 約 850 nm の範囲の波長を有する光を吸収および / または放出する。

#### 【 0 0 1 0 】

一態様では、本発明は、一般に式 I によって表され得る蛍光色素化合物のファミリーを提供する。

【化 1】



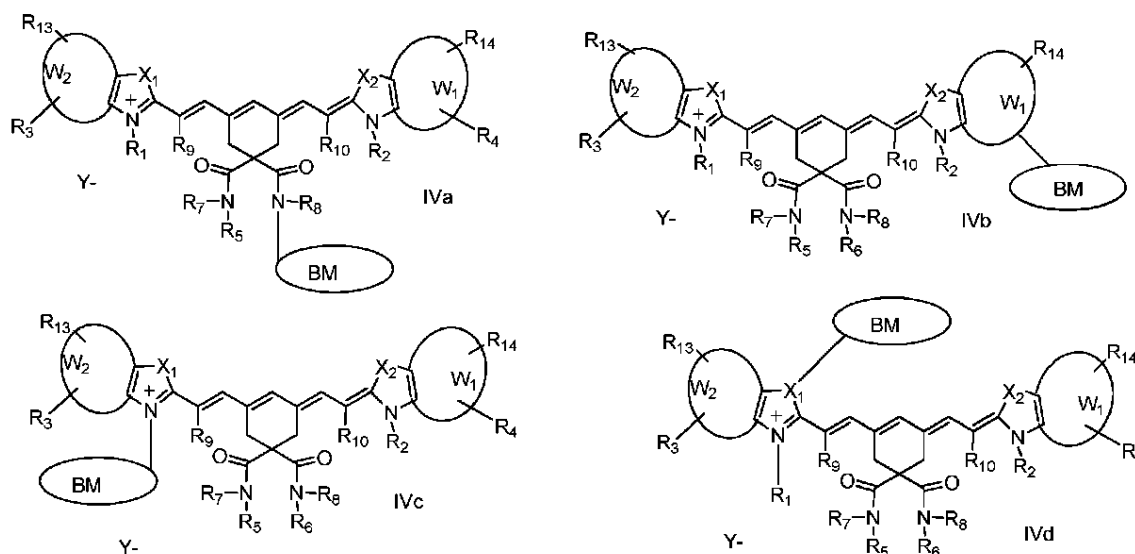
10

【0011】

ある特定の実施形態では、本発明は、式 I I I : [ B M ]<sub>n</sub> - F<sub>m</sub> によって表される生体適合性のある蛍光性分子であり、B M は、生体分子であり、F は、既に記載したフルオロフォアである。他の実施形態では、本発明は、以下の構造式 I V a ~ I V d のいずれか一つによって表される、生体適合性のある蛍光性生体分子であり、B M は、生体分子である。

【化 2】

生体分子が結合しているフルオロフォア



20

30

【0012】

別の実施形態では、本発明は、*in vivo* 光学イメージング方法を提供する。該方法は、(a) 対象、例えば動物またはヒトに、本発明の蛍光色素化合物を投与するステップと、(b) 蛍光色素化合物を、対象内に分布させるか、または生物学的標的と接触させ、もしくは相互作用させるステップと、(c) 対象を、電磁放射線、例えば蛍光色素化合物によって吸収可能な波長の光に曝露するステップと、(d) 蛍光色素化合物によって放出された光学シグナルを、例えば内視鏡、カテーテル、断層撮影システム、平面もしくは反射システム、手持ち式の光学イメージングシステム、または術中システムおよび顕微鏡を用いて検出するステップとを含む。化合物によって放出されたシグナルは、画像化される領域または構造の画像、例えば断層画像を構築するために使用され得る。蛍光色素化合物は、生体分子に化学的に連結されている蛍光色素を含み得ると理解される。

40

【0013】

先のステップは、所定の間隔で反復され、それによって対象における蛍光性化合物の放出されたシグナルを経時的に評価することができる。ある特定の実施形態では、シグナル特性が識別可能な 2 種類またはそれより多くの種類の化合物を対象に投与することができ、それらの化合物の発光特性は、対象における二つまたはそれより多くの特色を画像化するために使用され得る。

50

## 【 0 0 1 4 】

開示の方法は、疾患、例えば骨疾患、がん、心血管疾患、皮膚疾患、環境疾患、免疫疾患、感染性疾患、炎症、遺伝性疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、および呼吸器疾患を検出および/またはモニタするために使用され得る。

## 【 0 0 1 5 】

ある特定の実施形態では、細胞は、本明細書に記載の蛍光色素化合物で標識され、得られた標識細胞は、対象に投与される。蛍光色素化合物によって放出されたシグナルは、細胞の輸送および局在をモニタするか、または細胞治療の有効性を評価するために使用され得る。

## 【 0 0 1 6 】

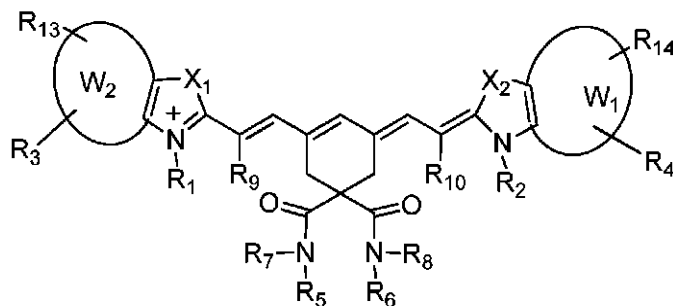
別の実施形態では、本発明は、*in vitro* 光学イメージング方法を提供する。該方法は、(a) 試料、例えば生物学的試料を、本発明の蛍光色素化合物と接触させるステップと、(b) 蛍光色素化合物を、生物学的標的によって活性化するか、または生物学的標的に結合させるステップと、(c) 任意選択により、結合していない蛍光色素化合物を除去するステップと、(d) 試料を、電磁放射線、例えば蛍光色素化合物によって吸収可能な波長の光に曝露するステップと、(e) 蛍光色素化合物から放出されたシグナルを検出し、それによって蛍光色素化合物が生物学的標的によって活性化されたか、または生物学的標的に結合したかを決定するステップとを含む。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

## (項目 1)

式 I - A によって表される蛍光性化合物

## 【 化 5 7 】



(I-A)

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_{1-4} \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ、ナフトまたはピリジル環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_{1-10}$  アルキルであり、

$R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、Hまたは  $-C_{1-22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、 $-C_{1-22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N$

$H_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒に、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

$n$  は、出現するごとに独立に、1～10を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

10

(項目2)

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  である、項目1に記載の化合物。

(項目3)

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-C_2 \sim C_8$  アルキレン- $X_3$  である、項目1に記載の化合物。

(項目4)

$R_5$  および  $R_6$  が、それぞれ独立に、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$  または  $-COOH$  によって置換されている  $-C_2 \sim C_8$  アルキレンである、項目1に記載の化合物。

20

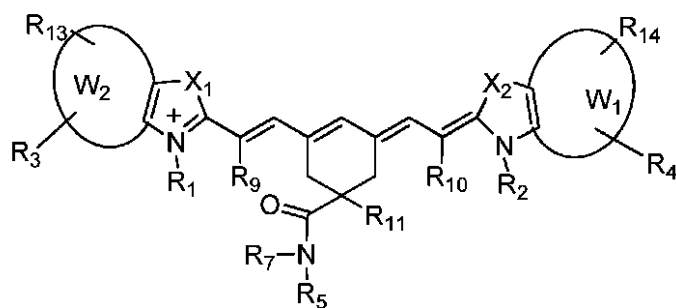
(項目5)

$R_7$  および  $R_8$  が水素である、項目1から4のいずれか一項に記載の化合物。

(項目6)

式 I - B によって表される蛍光性化合物

【化58】



30

(I-B)

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ、ナフトまたはピリジル環であり、

40

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_1 \sim C_{10}$  アルキルであり、

$R_5$  および  $R_7$  は、それぞれ独立に、水素または  $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、水素、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル

50

、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、- OH、- SH、マレイミド、フタ  
ルイミド、- NHCO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - (ハロゲン)、- CONHNH<sub>2</sub>、- CN、- N  
H<sub>2</sub>、- NO<sub>2</sub>、- CON(H)R<sub>12</sub>、アルキニル、- N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、  
任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシ  
クリルを表し、

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、H、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または R<sub>1</sub> および R<sub>9</sub> も  
しくは R<sub>2</sub> および R<sub>10</sub> は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7  
員環を形成し、

R<sub>11</sub> は、- COOH、- CN、ハロゲン、- NO<sub>2</sub>、- C(O) - ハロアルキル、ハロ  
アルキル、- COOR<sub>15</sub>、- CON(H)R<sub>15</sub>、または - CO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sub>15</sub> で 10

あり、

R<sub>12</sub> は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

R<sub>15</sub> は、H、- COOH、- SO<sub>3</sub>H、- NH<sub>2</sub>、- SH、アルキル、または X<sub>3</sub> で任  
意選択により置換されているアリール、および / またはポリエチレングリコールであり、  
m は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

n は、出現するごとに独立に、1 ~ 10を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

(項目7)

R<sub>5</sub> が、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> であり、R<sub>7</sub> が水素である、項目6に記載の  
化合物。 20

(項目8)

R<sub>5</sub> が、- C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> であり、R<sub>7</sub> が水素である、項目6に記載の化  
合物。

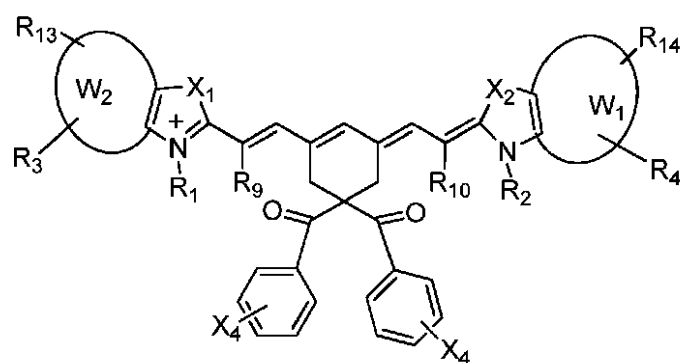
(項目9)

R<sub>5</sub> が、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup> または - COOH によって置換されている - C<sub>2</sub> ~ C  
8 アルキレンであり、R<sub>7</sub> が水素である、項目6に記載の化合物。

(項目10)

式 I - C によって表される蛍光性化合物

【化59】



(I-C)

またはその塩であって、式中、

X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、それぞれ独立に、O、S、Se、または C(C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル)<sub>2</sub> で  
あり、

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、  
- COOH、- CO<sub>2</sub><sup>-</sup> および - OH からなる群から独立に選択される一つまたは二つの  
置換基で任意選択により置換されている - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルであり、

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> は、それぞれ独立に、水素、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン 50

-  $X_3$ 、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $SO_2N(R_{12})$  - アルキレン -  $X_3$ 、ハロゲンまたは -  $NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、-  $CH_3$ 、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $COOH$ 、-  $CO_2^-$ 、-  $NCS$ 、-  $NCO$ 、N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N - ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、-  $OH$ 、-  $SH$ 、マレイミド、フタルイミド、-  $NHCO-(CH_2)_m-(ハロゲン)$ 、-  $CONHNH_2$ 、-  $CN$ 、-  $NH_2$ 、-  $NO_2$ 、-  $CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、-  $N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$X_4$  は、出現するごとに独立に、水素、ハロゲン、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $COOH$ 、または -  $CO_2^-$  を表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、H、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

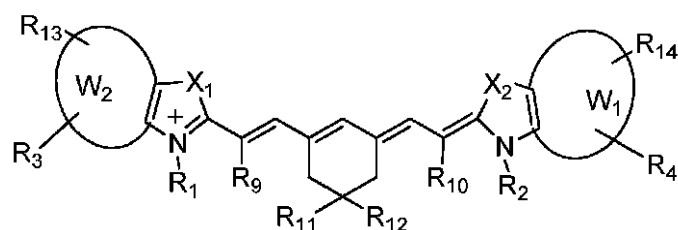
$n$  は、出現するごとに独立に、1 ~ 10を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

(項目 11)

式 I - D によって表される蛍光性化合物

【化 60】



(I-D)

またはその塩であって、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_{1-4} \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ、ナフトまたはピリジル環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $COOH$ 、-  $CO_2^-$  および -  $OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている -  $C_{1-10}$  アルキルであり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、-  $C_{1-22}$  アルキレン -  $X_3$ 、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $SO_2N(R_{12})$  - アルキレン -  $X_3$ 、ハロゲンまたは -  $NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、-  $CH_3$ 、-  $SO_3H$ 、-  $SO_3^-$ 、-  $COOH$ 、-  $CO_2^-$ 、-  $NCS$ 、-  $NCO$ 、N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N - ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、-  $OH$ 、-  $SH$ 、マレイミド、フタルイミド、-  $NHCO-(CH_2)_m-(ハロゲン)$ 、-  $CONHNH_2$ 、-  $CN$ 、-  $NH_2$ 、-  $NO_2$ 、-  $CON(H)R_{13}$ 、アルキニル、-  $N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または

10

20

30

40

50

7員環を形成し、

$R_{11}$  および  $R_{12}$  は、それぞれ独立に、アルキル、ハロアルキル、アリール、アラルキル、シアノ、ハロゲン、ニトロ、 $-COOH$ 、 $-C(O)-$ ハロアルキル、 $-C(O)-$ アリール、 $-C(O)OR_{15}$ 、 $-CON(H)R_{15}$ 、 $-(CH_2)_n C(O)OR_{15}$ 、 $-(CH_2)_n CONHR_{15}$ 、 $-CO(CH_2)_n R_{15}$ 、 $-(CH_2)_n SO_3H$ 、または  $-(CH_2)_n SO_3^-$  であり、

$R_{13}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$R_{15}$  は、出現するごとに独立に、 $H$ 、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、アルキル、ポリエチレングリコール、または  $X_3$  で任意選択により置換されていてもよいアリール、および/またはポリエチレングリコールを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

$n$  は、出現するごとに独立に、1～10を表す、

蛍光性化合物またはその塩。

(項目12)

$X_1$  および  $X_2$  が、 $C(CH_3)_2$  である、項目1から11のいずれか一項に記載の化合物。

(項目13)

$W_1$  および  $W_2$  が、ベンゾ環である、項目1から12のいずれか一項に記載の化合物。

(項目14)

$W_1$  および  $W_2$  が、ナフト環である、項目1から12のいずれか一項に記載の化合物。

(項目15)

$R_1$  および  $R_2$  が、独立に、 $-SO_3H$  または  $-SO_3^-$  で任意選択により置換されている  $C_1 \sim C_{10}$  アルキルである、項目1から14のいずれか一項に記載の化合物。

(項目16)

$R_1$  および  $R_2$  が、独立に  $C_1 \sim C_6$  アルキルである、項目1から14のいずれか一項に記載の化合物。

(項目17)

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  が、それぞれ独立に、 $H$ 、 $-SO_3H$  または  $-SO_3^-$  である、項目1から16のいずれか一項に記載の化合物。

(項目18)

$R_7$  が、水素である、項目1から17のいずれか一項に記載の化合物。

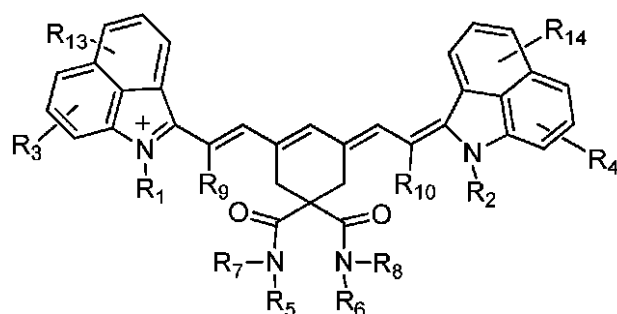
(項目19)

$R_9$  および  $R_{10}$  が、水素である、項目1から18のいずれか一項に記載の化合物。

(項目20)

式IIによって表される蛍光性化合物

【化61】



(II)

またはその塩であって、式中、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、



-COOH、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>および-OHからなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルであり、

R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>およびR<sub>8</sub>は、それぞれ独立に、Hまたは-C<sub>1</sub>~C<sub>22</sub>アルキレン-X<sub>3</sub>であり、

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub>およびR<sub>14</sub>は、それぞれ独立に、H、-C<sub>1</sub>~C<sub>22</sub>アルキレン-X<sub>3</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sub>12</sub>)-アルキレン-X<sub>3</sub>、ハロゲンまたは-NO<sub>2</sub>であり、

X<sub>3</sub>は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、-CH<sub>3</sub>、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-COOH、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-NCS、-NCO、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、-OH、-SH、マレイミド、フタルイミド、-NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(ハロゲン)、-CONHNH<sub>2</sub>、-CN、-NH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-CON(H)R<sub>12</sub>、アルキニル、-N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

R<sub>9</sub>およびR<sub>10</sub>は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、またはR<sub>1</sub>およびR<sub>9</sub>もしくはR<sub>2</sub>およびR<sub>10</sub>は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

R<sub>12</sub>は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

mは、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

nは、出現するごとに独立に、1~10を表す、蛍光性化合物またはその塩。

(項目21)

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が、独立に、-SO<sub>3</sub>Hまたは-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>で任意選択により置換されている-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルである、項目20に記載の化合物。

(項目22)

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が、独立に、-SO<sub>3</sub>Hまたは-SO<sub>3</sub>で任意選択により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである、項目20に記載の化合物。

(項目23)

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が、独立に、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである、項目20に記載の化合物。

(項目24)

R<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>が、それぞれ独立に、-C<sub>1</sub>~C<sub>22</sub>アルキレン-X<sub>3</sub>である、項目20から23のいずれか一項に記載の化合物。

(項目25)

R<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>が、それぞれ独立に、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキレン-X<sub>3</sub>である、項目20から23のいずれか一項に記載の化合物。

(項目26)

R<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>が、それぞれ独立に、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>または-COOHにより置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキレンである、項目20から23のいずれか一項に記載の化合物。

(項目27)

R<sub>7</sub>およびR<sub>8</sub>が、水素である、項目20から26のいずれか一項に記載の化合物。

(項目28)

R<sub>9</sub>およびR<sub>10</sub>が、水素である、項目20から27のいずれか一項に記載の化合物。

(項目29)

生物学的分子と、項目1から28のいずれか一項に記載の化合物の反応によって形成された、コンジュゲート化合物。

(項目30)

-L-BMによって定義される1、2または3個の基でさらに置換されている、項目1から28のいずれか一項に記載の化合物である、コンジュゲート化合物であって、Lは結合またはリンカーであり、-BMは生物学的分子のラジカルである、コンジュゲート化合物。

10

20

30

40

50

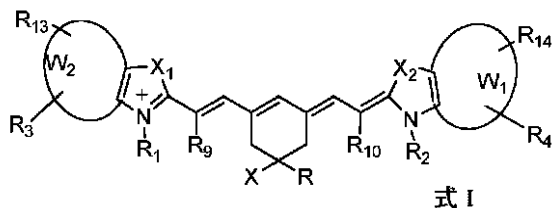
## (項目 3 1)

項目 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の化合物、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

## (項目 3 2)

以下の構造式すなわち式 I によって表される蛍光性化合物であって、

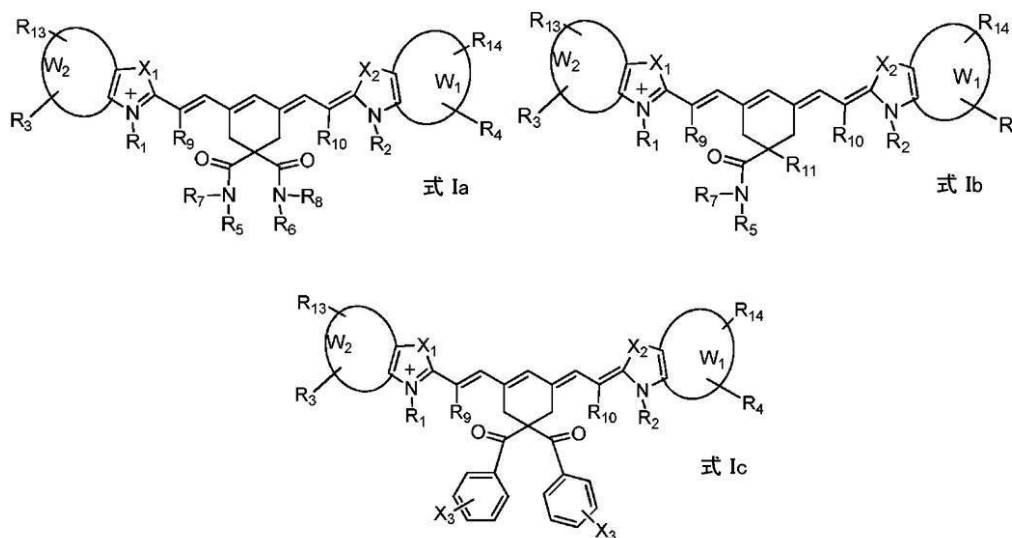
## 【化 6 2】



10

式中、以下に示す通り、 $X = R = CO - NR_5R_7$  (式 Ia) である場合、 $X = CO - NR_5R_7$  かつ  $R = R_{11}$  (式 Ib) である場合、 $X = R = CO - Ph - X_3$  (式 Ic) である場合に、

## 【化 6 3】



20

30

式中、 $X_1$  および  $X_2$  は、独立に、O、S、Se、 $C(CH_2R_3CH_2R_4)$  から選択され、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、 $H$ 、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 1 \sim 20$ ) から選択され、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $H$ 、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 0 \sim 20$ ) から選択され、

40

$X_3$  は、独立に、 $H$ 、ハロゲン、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $SO_3^-$ 、 $COOH$ 、 $NCS$  (イソチオシアネート)、 $NCO$  (イソシアネート)、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミジル ( $NHS$ ) エステル、 $N$ -ヒドロキシスルホスクシンイミジル ( $NHSs$ ) エステル、ヒドロキシ ( $OH$ )、チオール ( $SH$ )、マレイミド、フタルイミド、ヨードアセトアミド、 $CONHNH_2$  (ヒドラジド)、 $CN$ 、 $NH_2$ 、 $CONHR$ 、アルキン、アジド ( $N_3$ )、 $SO_2NX_3R_7$ 、 $X_3$  で任意選択によりさらに置換されているアリールから選択され、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、 $H$  またはハロゲンまたはアルキル基であり、

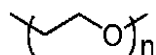
$R_1$  および  $R_9$  または  $R_2$  および  $R_{10}$  は、任意選択により、一緒になって 5 員または 6 員または 7 員の環を形成し、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾまたはナフトまたはピリジルを含むアリール環を形成するのに

50

必要な原子であり、 $R_{11}$ は、独立に、 $\text{COOH}$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{COCF}_3$ 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{R}$ から選択され、 $\text{R}$ は、 $\text{H}$ または $\text{COOH}$ または $\text{SO}_3\text{H}$ または $\text{NH}_2$ または $\text{SH}$ またはアルキル、または $\text{X}_3$ で任意選択によりさらに置換されているアリール、またはポリエチレングリコール(PEG)単位

【化64】



である、  
蛍光性化合物。

10

(項目33)

前記分子が、約500nm～約1100nmの範囲の吸収および発光波長を有する、項目32に記載の化合物。

(項目34)

前記分子が、約600nm～約900nmの範囲の吸収および発光波長を有する、項目32に記載の化合物。

(項目35)

$\text{X}$ および $\text{R}$ が、カルボン酸基( $\text{COOH}$ )である、項目32に記載の化合物。

(項目36)

$\text{X}$ または $\text{R}$ のいずれかが、カルボン酸基( $\text{COOH}$ )である、項目32に記載の化合物

20

。  
(項目37)

$\text{X}_3$ が、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、カルボキシル、 $-\text{COCl}$ 、 $-(\text{CO})\text{O}(\text{CO})\text{R}_a$ 、 $-\text{CONHNH}_2$ 、置換および非置換 $\text{N}$ -ヒドロキシスクシンイミドエステル、置換および非置換 $\text{N}$ -ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、ニトロ-またはフルオロ-フェノールエステル、アジド、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{CHO}$ 、アジド、 $-\text{COCH}_2\text{I}$ 、ホスホルアミダイト、フタルアミド、ならびにマレイミドからなる群から選択され、 $\text{R}_a$ が、 $\text{H}$ 、アルキルおよびアリールからなる群から選択される、項目32に記載の化合物。

(項目38)

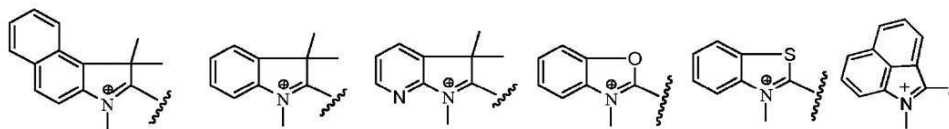
$\text{W}_1$ および $\text{W}_2$ が、同じである、項目32に記載の化合物。

30

(項目39)

$\text{W}_1$ および $\text{W}_2$ が、

【化65】



40

からなる群から選択される、項目32に記載の化合物。

(項目40)

$\text{X}_1$ および $\text{X}_2$ が、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ である、項目32に記載の化合物。

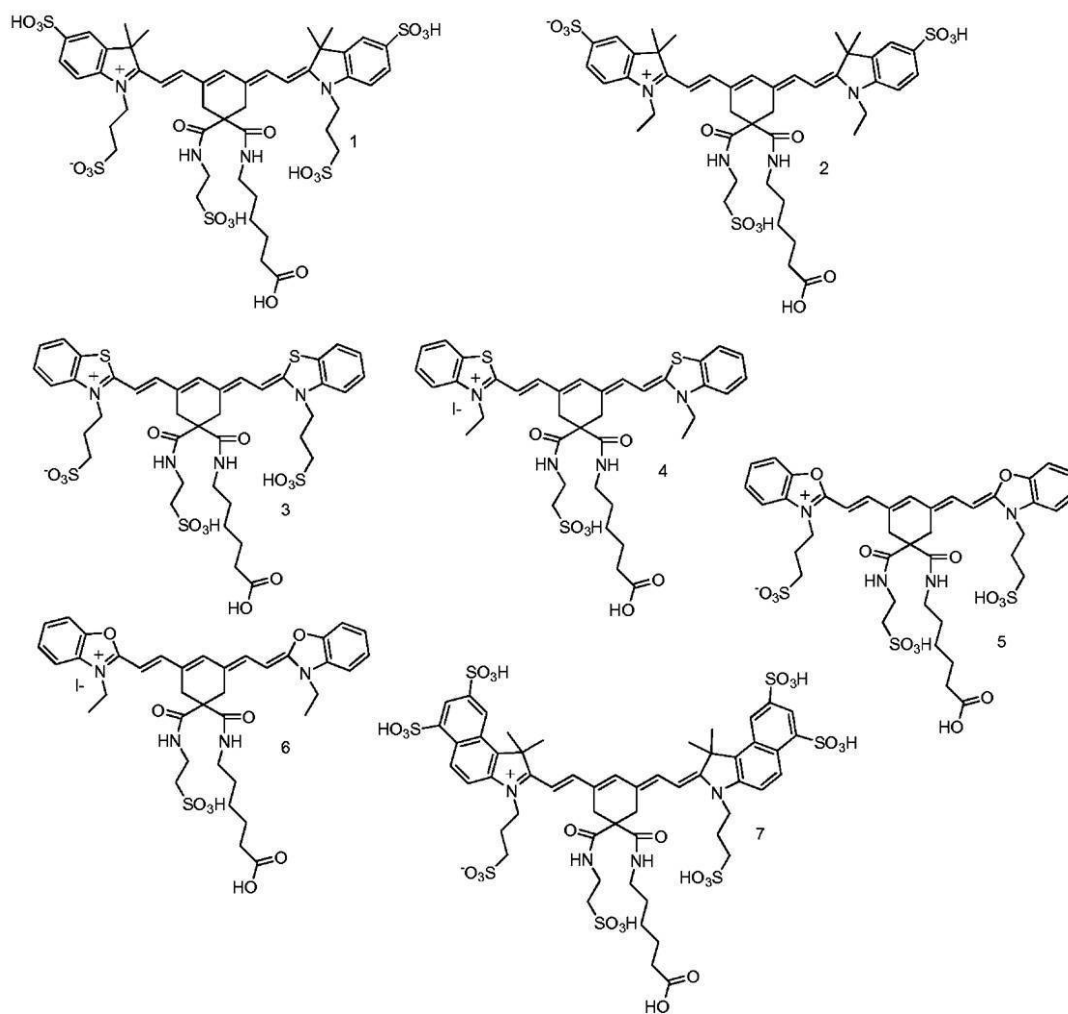
(項目41)

前記剤が、遠赤または近赤外において蛍光性である、項目32から40に記載の化合物

。  
(項目42)

以下のうちの一つから選択される化合物

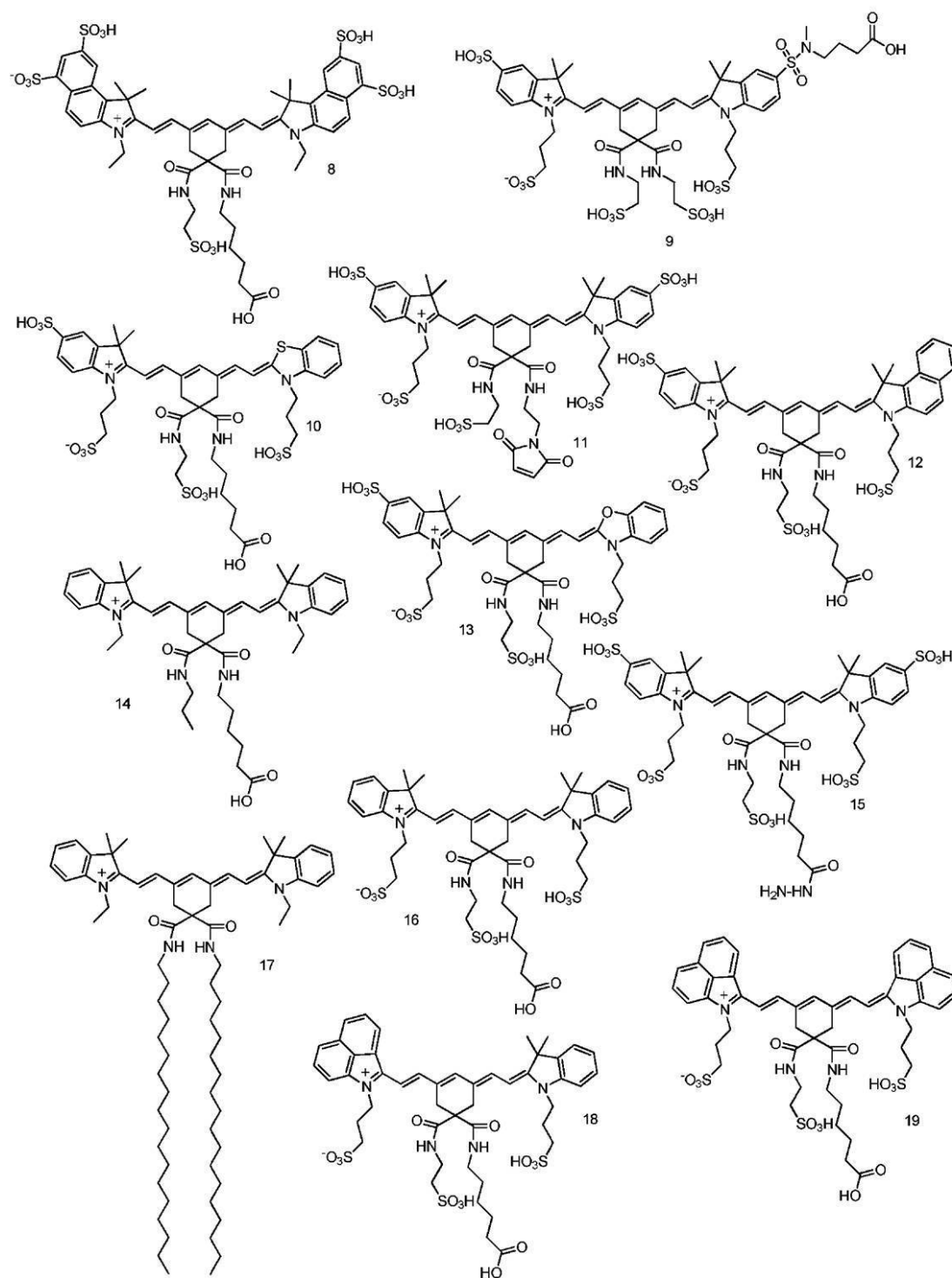
## 【化 6 6 - 1】



10

20

## 【化 6 6 - 2】



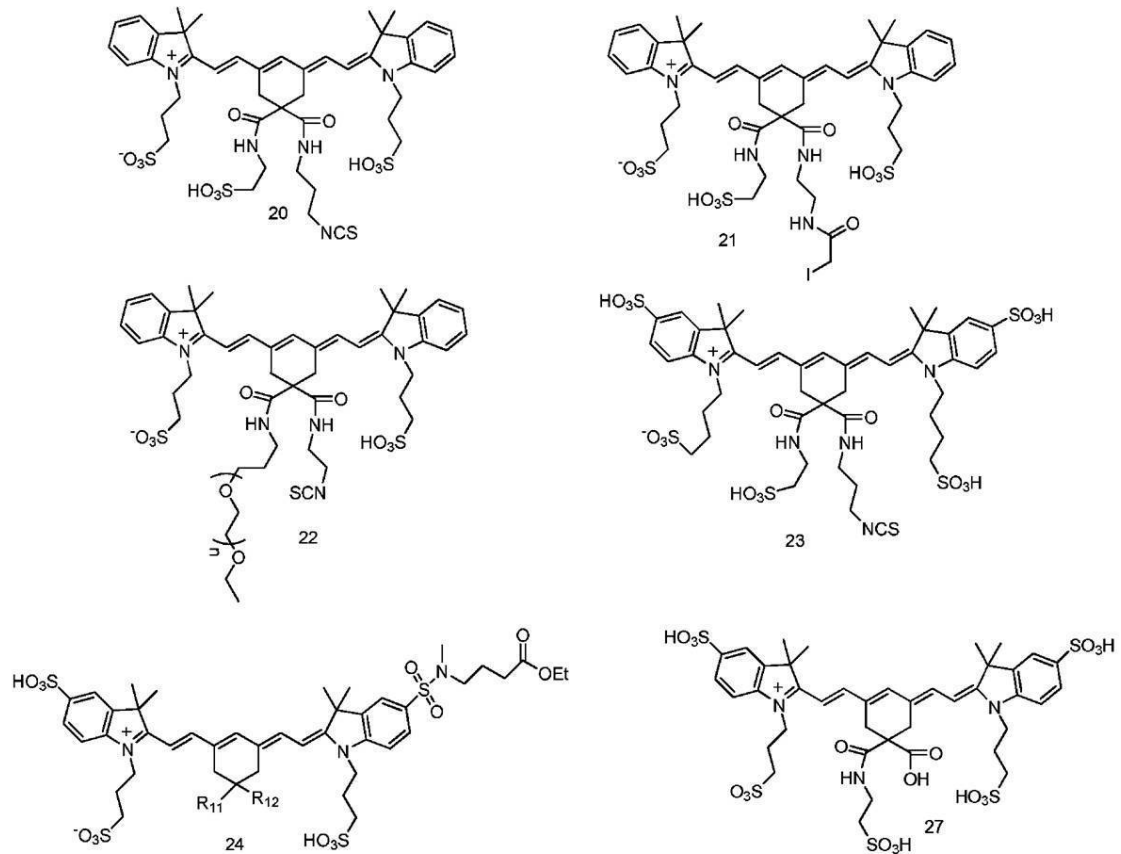
10

20

30

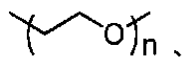
40

## 【化 6 6 - 3】



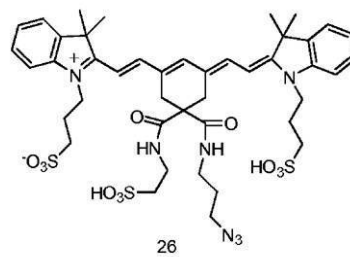
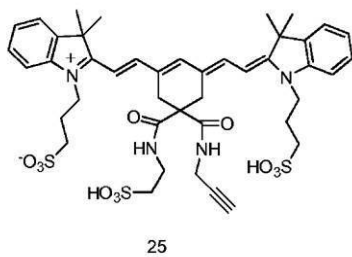
[  $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、独立に、 $\text{COOH}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{O}=\text{C}$ -フェニル、 $\text{COCH}_2\text{R}$  であり、ここで、 $\text{R} = \text{H}$ 、または

## 【化 6 6 - 4】

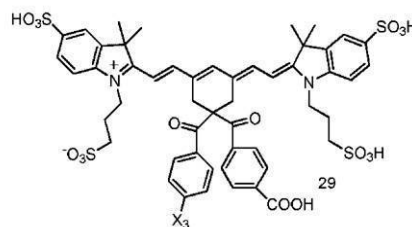
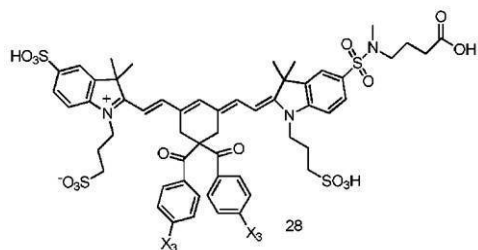


$(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$  であり、ここで、 $\text{R}' = \text{アルキル}$  または  $\text{アリール}$  である]

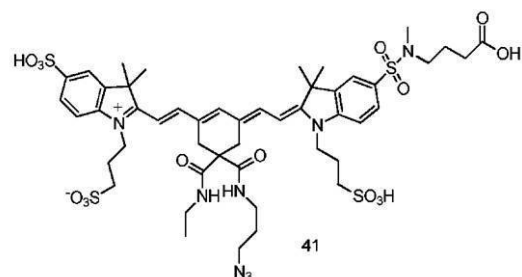
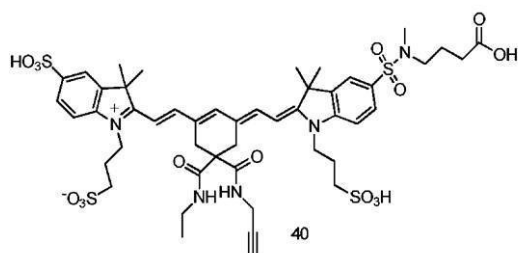
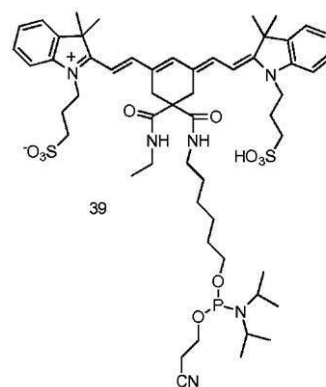
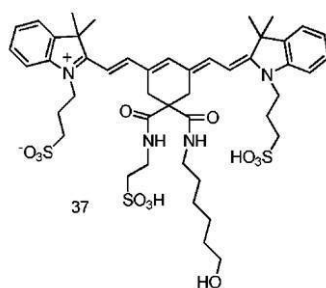
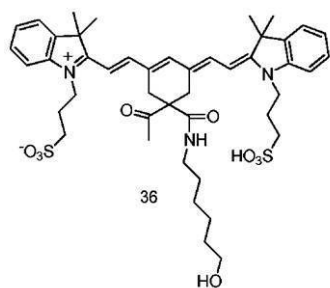
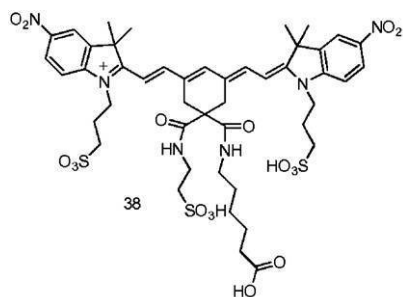
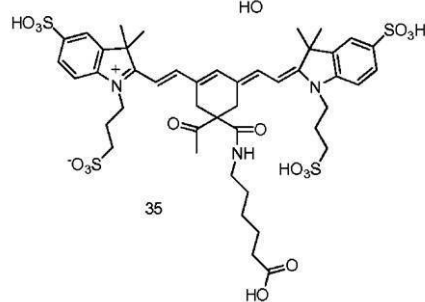
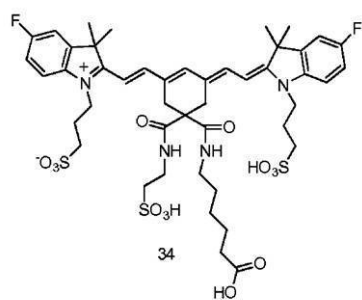
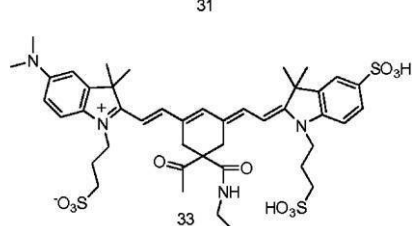
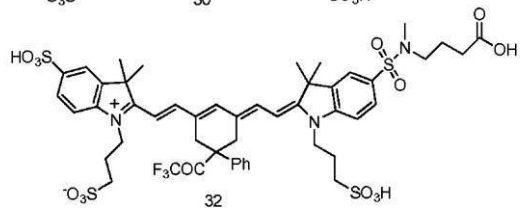
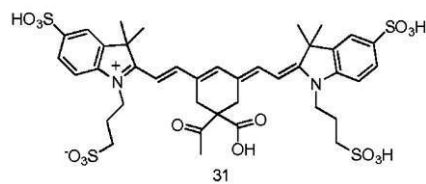
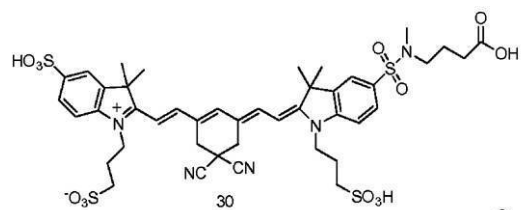
## 【化 6 7 - 1】



X3		
28A	H	29A
28B	Cl	29B
28C	Br	29C
28D	F	29D
28E	I	29E
28F	SO <sub>3</sub> H	29F
28G	COOH	29G

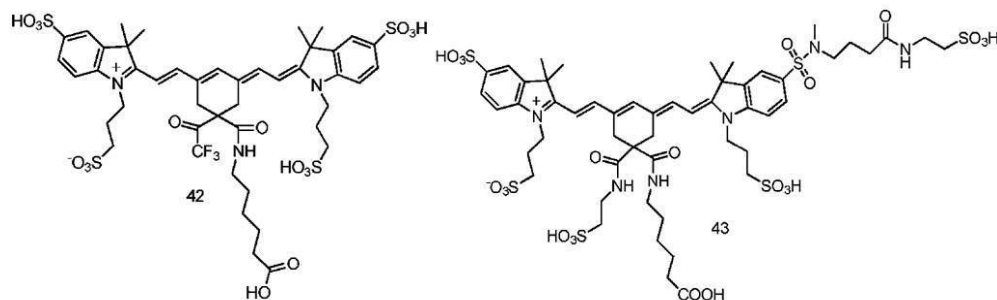


## 【化 67 - 2】





## 【化 6 7 - 3】



10

またはその塩。

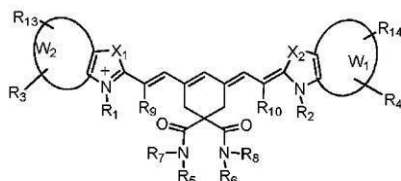
( 項 目 4 3 )

式 I I I によって表される、生体適合性のある蛍光性分子であって、

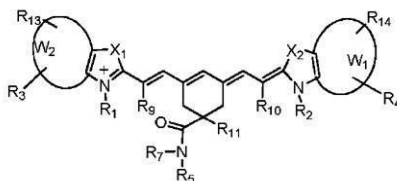
[ B M ]<sub>n</sub> - F<sub>m</sub> 式 I I I

式中、B Mは、生体分子であり、Fは、式 I a、I bまたはI cによって表されるフルオロフォアであり、n = 1 ~ 4であり、m = 1 ~ 1 0 0であり、

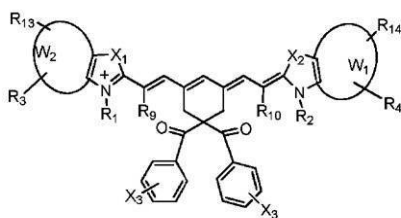
## 【化 6 8】



式 Ia



式 Ib



式 Ic

20

30

式中、X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、独立に、O、S、Se、C(CH<sub>2</sub>R<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>R<sub>4</sub>) から選択され、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub> および R<sub>8</sub> は、それぞれ独立に、H、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X<sub>3</sub> (n = 1 ~ 2 0) から選択され、

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> は、それぞれ独立に、H、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X<sub>3</sub> (n = 0 ~ 2 0) から選択され、

X<sub>3</sub> は、独立に、H、ハロゲン、CH<sub>3</sub>、SO<sub>3</sub>H、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、COOH、NCS (イソチオシアネート)、NCO (イソシアネート)、N-ヒドロキシスクシンイミジル (NHSS) エステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル (NHSSS) エステル、ヒドロキシ (OH)、チオール (SH)、マレイミド、フタルイミド、ヨードアセトアミド、CN、NH<sub>2</sub>、CONHR、アルキン、アジド (N<sub>3</sub>)、SO<sub>2</sub>NX<sub>3</sub>R<sub>7</sub>、X<sub>3</sub> で任意選択によりさらに置換されているアリールから選択され、

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、Hまたはハロゲンまたはアルキル基であり、

R<sub>1</sub> および R<sub>9</sub> または R<sub>2</sub> および R<sub>10</sub> は、任意選択により、一緒になって5員または6員または7員の環を形成し、

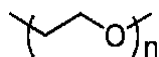
W<sub>1</sub> および W<sub>2</sub> は、ベンゾまたはナフトまたはピリジルを含むアリール環を形成するのに必要な原子であり、R<sub>11</sub> は、独立に、COOH、CN、F、NO<sub>2</sub>、COCF<sub>3</sub>、CF

40

50

$_3$ 、 $\text{COOR}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{R}$ から選択され、 $\text{R}$ は、 $\text{H}$ または $\text{COOH}$ または $\text{SO}_3\text{H}$ または $\text{NH}_2$ または $\text{SH}$ またはアルキル、または $\text{X}_3$ で任意選択によりさらに置換されているアリール、またはポリエチレングリコール(PEG)単位

【化69】



である、

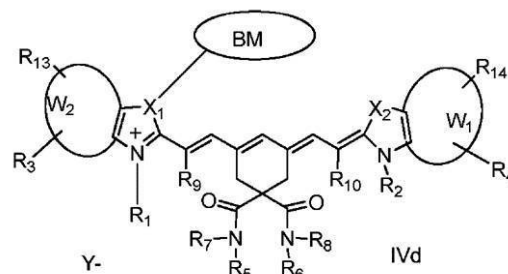
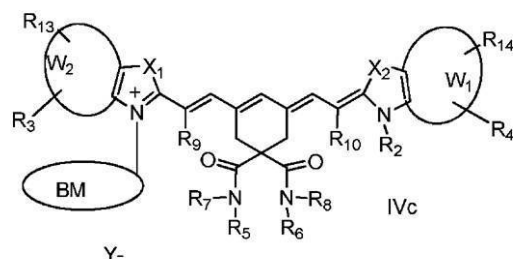
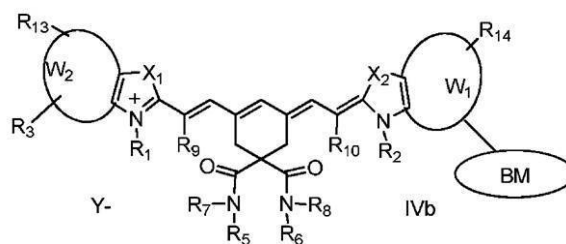
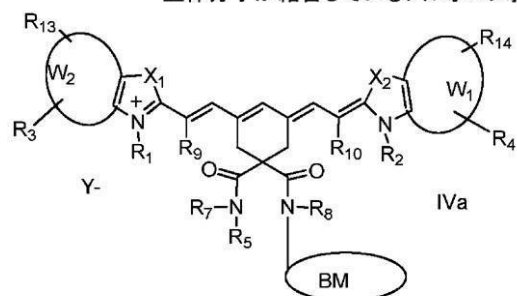
生体適合性のある蛍光性分子。

(項目44)

以下の構造式IVa~IVdのうち任意の一つによって表される、生体適合性のある蛍光性生体分子であって、

【化70】

生体分子が結合しているフルオロフォア



BM=生体分子

式中、BMは生体分子である、

生体適合性のある蛍光性生体分子。

(項目45)

BMが、タンパク質、核酸(DNA、RNA)、酵素、抗体、細胞、脂質、脂肪酸、炭水化物、糖、グルコース、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸から構成される、項目44に記載の生体適合性のある蛍光性生体分子。

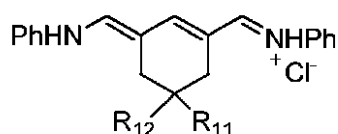
(項目46)

先行する項目のいずれか一項に記載の剤、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

(項目47)

以下の式Vによって表される化合物であって、

【化71】



式V

10

20

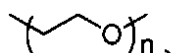
30

40

50

式中、 $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、独立に、 $\text{COOH}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CF}_3$ 、ハロゲン、 $\text{CN}$ 、 $\text{O}=\text{C}$ -フェニル、 $\text{COCH}_2\text{R}$  であり、 $\text{R}=\text{H}$ 、または

【化 72】



$(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$  であり、 $\text{R}'$  = アルキルまたはアリールであり、 $\text{Ph}$  は、フェニル基であり、前記フェニル基は、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{OMe}$ 、 $\text{NMe}_2$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{CF}_3$ 、アルキルのうちの一つで任意選択により置換されている、化合物。

(項目 48)

$R_{11}$  が  $\text{COOH}$  であり、 $R_{12}$  が  $\text{COOH}$  である、項目 47 に記載の化合物。

(項目 49)

$R_{11}$  が  $\text{COOH}$  である場合、 $R_{12}$  は  $\text{COOR}'$  であり、 $R_{12}$  が  $\text{COOH}$  である場合、 $R_{11}$  は  $\text{COOR}'$  であり、ここで、 $\text{R}'$  はアルキルまたはアリールである、項目 47 に記載の化合物。

(項目 50)

a. 対象に、先行する項目のいずれか一項に記載の剤を投与するステップと、  
b. 前記剤を、前記対象内に分布させるステップと、  
c. 前記タンパク質標識化剤によって放出されたシグナルを検出するステップとを含む、*in vivo* イメージング方法。

(項目 51)

d. 対象に、蛍光色素を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の剤を投与するステップと、  
e. 前記剤を、前記対象内に分布させるステップと、  
f. 前記対象を、前記蛍光色素によって吸収可能な波長の光に曝露するステップと、  
g. 前記剤によって放出されたシグナルを検出するステップとを含む、*in vivo* 光学イメージング方法。

(項目 52)

前記剤によって放出された前記シグナルが、画像を構築するために使用される、項目 50 または 51 に記載の方法。

(項目 53)

前記画像が、断層画像である、項目 50 または 51 に記載の方法。

(項目 54)

ステップ (a) ~ (c) が、所定の時間間隔で反復され、それによって前記対象において前記タンパク質標識化剤の前記放出されたシグナルの経時的評価を可能にする、項目 50 に記載の方法。

(項目 55)

ステップ (a) ~ (d) が、所定の時間間隔で反復され、それによって前記対象において前記タンパク質標識化剤の前記放出されたシグナルの経時的評価を可能にする、項目 51 に記載の方法。

(項目 56)

前記対象が、動物またはヒトである、項目 50 または 51 に記載の方法。

(項目 57)

ステップ (a) において、シグナル特性が互いに識別可能な 2 種類またはそれより多くの種類のイメージングプローブが、対象に投与され、前記イメージングプローブの少なくとも一つが、タンパク質標識化剤である、項目 50 または 51 に記載の方法。

(項目 58)

前記照射および検出ステップが、内視鏡、カテーテル、断層撮影システム、手持ち式の光学イメージングシステム、または術中顕微鏡を使用して実施される、項目 51 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 9)

放出されたシグナルの存在、非存在またはレベルが、病状を示す、項目 5 0 または 5 1 に記載の方法。

(項目 6 0)

疾患を検出および / またはモニタするために使用される、項目 5 0 または 5 1 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記疾患が、骨疾患、がん、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、心虚血、心筋再かん流傷害、環境疾患、皮膚疾患、免疫疾患、遺伝性疾患、感染性疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、眼疾患、および呼吸器疾患からなる群から選択される、項目 6 0 に記載の方法。

10

(項目 6 2)

ステップ ( a ) において、前記蛍光性化合物で標識された細胞が、前記対象に投与される、項目 5 0 または 5 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記剤によって放出された前記シグナルが、前記細胞の輸送および局在をモニタするために使用される、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

疾患のエリアに局在し、実効線量の放射線を送達する放射標識を含む、項目 1 から 4 9 のいずれか一項に記載の剤を、対象に全身的または局所的に投与するステップを含む、対象の疾患を処置する方法。

20

(項目 6 5)

h . 試料を、項目 1 から 4 9 のいずれか一項に記載の剤と接触させるステップと、  
i . 前記剤を、生物学的標的に結合させるステップと、  
j . 任意選択により、結合していない剤を除去するステップと、  
k . 前記剤から放出されたシグナルを検出し、それによって前記剤が前記生物学的標的に  
よって活性化されたか、または前記生物学的標的に結合したかを決定するステップと  
を含む、*in vitro* イメージング方法。

(項目 6 6)

前記試料が、生物学的試料である、項目 6 5 に記載の方法。

30

【図面の簡単な説明】【0017】

【図 1 A】図 1 は、本発明のウシ血清アルブミン ( B S A ) とコンジュゲートした色素の  
蛍光および吸光度スペクトルを示す図である。図 1 A は、化合物 1 b の B S A - コンジュ  
ゲートによって放出された蛍光のグラフである。

【図 1 B】図 1 は、本発明のウシ血清アルブミン ( B S A ) とコンジュゲートした色素の  
蛍光および吸光度スペクトルを示す図である。図 1 B は、B S A とコンジュゲートした化  
合物 1 b の B S A - コンジュゲートの蛍光吸光度を示す図である。

【発明を実施するための形態】【0018】

## 発明の詳細な説明

本発明は、約 5 0 0 n m ~ 約 1 1 0 0 n m の範囲、より好ましくは約 6 0 0 n m ~ 約 9  
0 0 n m の範囲の波長を有する光を吸収および / または放出する蛍光色素化合物 ( 色素 )  
のファミリーを提供する。ある特定の実施形態では、色素は、約 6 0 0 n m ~ 約 8 5 0 n  
m、約 6 5 0 n m ~ 約 9 0 0 n m、または約 6 5 0 n m ~ 約 8 5 0 n m の範囲の波長を有  
する光を吸収および / または放出する。蛍光色素化合物は、様々な *in vitro* およ  
び *in vivo* イメージング用途において特に有用である。

【0019】

ある特定の実施形態では、本発明の蛍光色素化合物は、式  $Z^1 - P M B - Z^2$  およびそ  
の塩によって表すことができ、 $Z^1$  および  $Z^2$  は、それぞれ独立に、複素環式部分を含有

40

50

する同じまたは異なる多環式基を表し、PMBは、4,4-二置換シクロヘキシル架橋部分を含むポリメチン架橋を表す。蛍光色素化合物を、本明細書で以下により詳細に論じる。しかし、本発明をさらに説明する前に、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲で用いられる特定の用語を、以下のセクションにまとめて示す。

#### 【0020】

##### I. 定義

本明細書に列挙した定義は、本開示の残りの部分に照らして読まれ、当業者によるように理解されるべきである。別段定義されない限り、本明細書で使用されるあらゆる技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の技術者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。

#### 【0021】

「化学的に連結されている」は、組み合わされた凝集体が一単位として機能し得るほど十分に強力な原子間の引力によって、接続されていることを意味する。これには、化学結合、例えば共有結合、非共有結合、例えばイオン結合、金属結合、および架橋結合、疎水性相互作用、水素結合、およびファンデルワールス相互作用が含まれるが、これらに限定されない。これには、架橋またはケーシング(caging)も含まれる。

#### 【0022】

用語「アルキル」は、当技術分野で認識されており、これには、直鎖アルキル基、分岐鎖アルキル基、シクロアルキル(脂環式)基、アルキル置換シクロアルキル基、およびシクロアルキル置換アルキル基を含む飽和脂肪族基が含まれる。ある特定の実施形態では、直鎖または分岐鎖アルキルは、その骨格内に約30個またはそれ未満の炭素原子を有しており(例えば、直鎖では $C_1 \sim C_{30}$ 、分岐鎖では $C_3 \sim C_{30}$ )、あるいは約20個またはそれ未満の炭素原子を有している。同様に、シクロアルキルは、それらの環構造内に約3~約10個の炭素原子を有しており、あるいは環構造内に約5、6または7個の炭素を有している。用語「アルキル」には、ハロ置換アルキルも含まれる。

#### 【0023】

さらに、用語「アルキル」には、「置換アルキル」が含まれ、これは、炭化水素骨格の一つまたは複数の炭素上の水素と置き換わっている置換基を有するアルキル部分を指す。このような置換基には、例えば、ヒドロキシル、カルボニル(例えば、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミルまたはアシル)、チオカルボニル(例えば、チオエステル、チオアセテートまたはチオホルメート)、アルコキシル、ホスホリル、ホスホネート、ホスフィネート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、サルフェート、スルホネート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラキル、または芳香族もしくは複素芳香族部分が含まれ得る。適切な場合、炭化水素鎖上の置換部分は、それら自体置換されていてもよいことが、当業者には理解される。例えば、置換アルキルの置換基には、アミノ、アジド、イミノ、アミド、ホスホリル(ホスホネートおよびホスフィネートを含む)、スルホニル(サルフェート、スルホンアミド、スルファモイルおよびスルホネートを含む)、およびシリル基、ならびにエーテル、アルキルチオ、カルボニル(ケトン、アルデヒド、カルボキシレートおよびエステルを含む)、 $-CN$ 等の置換および非置換形態が含まれ得る。例示的な置換アルキルを以下に記載する。シクロアルキルは、アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルキルチオ、アミノアルキル、カルボニル置換アルキル、 $-CN$ 等でさらに置換されていてもよい。ある特定の実施形態では、アルキルは非置換である。ある特定の実施形態では、アルキルは、非置換の直鎖または分岐鎖アルキル基である。

#### 【0024】

用語「ハロアルキル」は、一つまたは複数の水素原子がハロゲンで置き換えられていることを除き、先に定義されているアルキル基を指す。

#### 【0025】

用語「アルキレン」は、非置換の直鎖または分岐鎖アルキル基のジラジカルを指す。

#### 【0026】

用語「アラルキル」および「アルキルアリール」は、当技術分野で認識されており、アリール基（例えば、芳香族または複素芳香族基）で置換されているアルキル基を指す。

【0027】

用語「アルケニル」および「アルキニル」は、当技術分野で認識されており、前述のアルキルに対して長さおよび可能な置換が類似している不飽和脂肪族基を指すが、それぞれ少なくとも1個の二重結合または三重結合を含有している。

【0028】

用語「ヘテロ原子」は、当技術分野で認識されており、炭素または水素以外の任意の元素の原子を指す。例示的なヘテロ原子として、ホウ素、窒素、酸素、リン、硫黄およびセレンが挙げられる。

【0029】

用語「アリール」は、当技術分野で認識されており、0～4個のヘテロ原子を含み得る5員、6員および7員の単環芳香族基、例えば、ベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジンおよびピリミジン等を指す。環構造内にヘテロ原子を有するアリール基は、「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香族」と呼ぶこともできる。芳香環は、前述のような置換基、例えばハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族または複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等で、一つまたは複数の環の位置において置換されていてもよい。用語「アリール」には、2個またはそれより多くの炭素が二つの隣接する環（この環は「縮合環」である）に共通しており、環の少なくとも一つが芳香族であり、例えば他の環式環が、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリールおよび/またはヘテロシクリルであり得る、二つまたはそれより多くの環式環を有する多環式環系も含まれる。

【0030】

用語「ヘテロシクリル」、「複素環式基」または「複素環式部分」は、当技術分野で認識されており、その環構造には1～4個のヘテロ原子が含まれる、3員～約10員の環構造あるいは3員～約7員環を指す。複素環は、多環（polycycle）であってもよい。ヘテロシクリル基には、例えばチオフェン、チアントレン、フラン、ピラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサントエン、フェノキサントエン（phenoxanthene）、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インドゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、ピリミジン、フェナントロリン、フェナジン、フェナルサジン、フェノチアジン、フラザン、フェノキサジン、ピロリジン、オキサラン、チオラン、オキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、ラクトン、ラクタム、例えばアゼチジノンおよびピロリジノン、スルタム、スルトン等が含まれる。複素環式環は、前述のような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族または複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等で、一つまたは複数の位置において置換されていてもよい。

【0031】

用語「ポリシクリル（polycyclic）」、「多環式基」または「ポリシクロ（polycyclic）部分」は、当技術分野で認識されており、2個またはそれより多くの炭素が二つの隣接する環に共通しており、例えばその環が「縮合環」である、二つまた

10

20

30

40

50

はそれより多くの環（例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリールおよび/またはヘテロシクリル）を指す。隣り合っていない原子を介して結合されている環は、「架橋」環と呼ばれる。多環の環のそれぞれは、前述のような置換基、例えばハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族または複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等で置換されていてもよい。

#### 【0032】

用語「ニトロ」は、当技術分野で認識されており、 $-NO_2$ を指す。用語「ハロゲン」は、当技術分野で認識されており、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ または $-I$ を指す。用語「スルフヒドリル」は、当技術分野で認識されており、 $-SH$ を指す。用語「ヒドロキシル」は、 $-OH$ を意味する。用語「スルホニル」は、当技術分野で認識されており、 $-SO_2$ を指す。「ハロゲン化物」は、ハロゲンの対応するアニオンを指し、「擬ハロゲン化物」は、CottonおよびWilkinsonによる「Advanced Inorganic Chemistry」に記載の定義を有する。

#### 【0033】

用語「アミン」および「アミノ」は、当技術分野で認識されており、非置換および置換アミンの両方を指し、例えば、以下の一般式によって表され得る部分を指す。

#### 【化3】

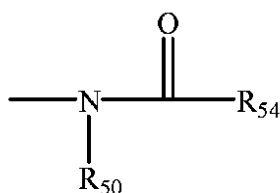


式中、 $R_{50}$ 、 $R_{51}$ 、 $R_{52}$  および  $R_{53}$  は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アルケニル、 $-(CH_2)_m-R_{61}$ を表すか、または  $R_{50}$  および  $R_{51}$  は、それらが結合しているN原子と一緒に、環構造内に4～8個の原子を有する複素環を完成し、 $R_{61}$ は、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、複素環または多環を表し、 $m$ は、0または1～8の範囲の整数である。ある特定の実施形態では、 $R_{50}$ または $R_{51}$ の一方のみがカルボニルであってもよく、例えば  $R_{50}$ 、 $R_{51}$  および窒素は、一緒になってイミドを形成しない。他の実施形態では、 $R_{50}$  および  $R_{51}$ （および任意選択により  $R_{52}$ ）は、それぞれ独立に、水素、アルキル、アルケニル、または  $-(CH_2)_m-R_{61}$ を表す。したがって、用語「アルキルアミン」には、置換または非置換アルキルが結合している、先に定義したアミン基が含まれ、すなわち、 $R_{50}$  および  $R_{51}$  の少なくとも一つは、アルキル基である。

#### 【0034】

用語「アシルアミノ」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る部分を指す。

#### 【化4】

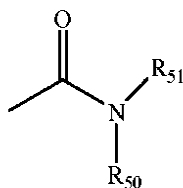


式中、 $R_{50}$  は、先に定義した通りであり、 $R_{54}$  は、水素、アルキル、アルケニルまたは  $-(CH_2)_m-R_{61}$ を表し、 $m$  および  $R_{61}$  は、先に定義した通りである。

#### 【0035】

用語「アミド」は、当技術分野ではアミノ置換カルボニルと認識されており、これには、以下の一般式によって表され得る部分が含まれる。

【化 5】



式中、 $R_{50}$  および  $R_{51}$  は、先に定義した通りである。本発明では、アミドのある特定の  
10 実施形態は、不安定であり得るイミドは含まない。

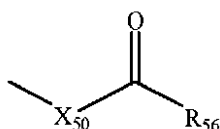
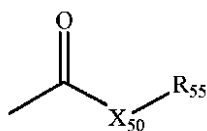
【0036】

用語「アルキルチオ」は、硫黄ラジカルが結合している、先に定義したアルキル基を指す。ある特定の  
実施形態では、「アルキルチオ」部分は、 $-S-$ アルキル、 $-S-$ アルケニル、 $-S-$ アルキニル、および  
 $-S-(CH_2)_m-R_{61}$  のうちの一つによって表され、 $m$  および  $R_{61}$  は、先に定義されている。代表的なアルキルチオ基には、メチルチオ、エチルチオ等が含まれる。

【0037】

用語「カルボニル」は、当技術分野で認識されており、これには、以下の一般式によ  
て表され得るような部分が含まれる。  
20

【化 6】



式中、 $X_{50}$  は、結合であるかまたは酸素もしくは硫黄を表し、 $R_{55}$  および  $R_{56}$  は、水素、アルキル、アルケニル、 $-(CH_2)_m-R_{61}$  または薬学的に許容される塩を表し、 $R_{56}$  は、水素、アルキル、アルケニルまたは  $-(CH_2)_m-R_{61}$  を表し、 $m$  および  $R_{61}$  は、先に定義されている。 $X_{50}$  が酸素であり、 $R_{55}$  または  $R_{56}$  が水素ではない場合、式は、「エステル」を表す。 $X_{50}$  が酸素であり、 $R_{55}$  が、先に定義した通りである場合、部分は、本明細書ではカルボキシル基と呼ばれ、特に  $R_{55}$  が水素である場合、式は、「カルボン酸」を表す。 $X_{50}$  が酸素であり、 $R_{56}$  が水素である場合、式は、「ホルメート」を表す。一般に、先の式の酸素原子が硫黄に置き換えられた場合、式は、「チオールカルボニル」基を表す。 $X_{50}$  が硫黄であり、 $R_{55}$  または  $R_{56}$  が水素ではない場合、式は、「チオールエステル」を表す。 $X_{50}$  が硫黄であり、 $R_{55}$  が水素である場合、式は、「チオールカルボン酸」を表す。 $X_{50}$  が硫黄であり、 $R_{56}$  が水素である場合、式は、「チオールホルメート」を表す。他方では、 $X_{50}$  が結合であり、 $R_{55}$  が水素ではない場合、先の式は、「ケトン」基を表す。 $X_{50}$  が結合であり、 $R_{55}$  が水素である場合、先の式は、「アルデヒド」基を表す。  
40

【0038】

用語「アルコキシル」または「アルコキシ」は、当技術分野で認識されており、酸素が結合している、先に定義したアルキル基を指す。代表的なアルコキシル基には、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、tert-ブトキシ等が含まれる。「エーテル」は、酸素によって、共有結合で連結されている二つの炭化水素である。したがって、アルキルをエ  
50

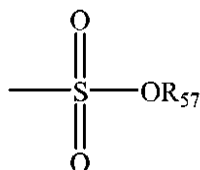


ーテルにするアルキルの置換基は、- O - アルキル、- O - アルケニル、- O - アルキニル、- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - R<sub>61</sub> (mおよびR<sub>61</sub>は、前述の通りである) のうちの一つによって表され得るものなどのアルコキシルであるか、またはアルコキシルに似ている。

【0039】

用語「スルホネート」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る部分を指す。

【化7】



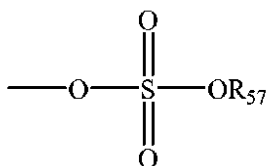
10

式中、R<sub>57</sub>は、電子対、水素、アルキル、シクロアルキルまたはアリールである。

【0040】

用語「サルフェート」は、当技術分野で認識されており、これには、以下の一般式によって表され得る部分が含まれる。

【化8】



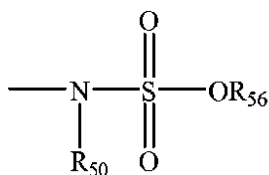
20

式中、R<sub>57</sub>は、先に定義した通りである。

【0041】

用語「スルホンアミド」は、当技術分野で認識されており、これには、以下の一般式によって表され得る部分が含まれる。

【化9】



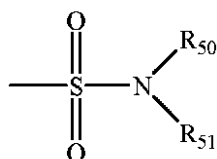
30

式中、R<sub>50</sub>およびR<sub>56</sub>は、先に定義した通りである。

【0042】

用語「スルファモイル」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る部分を指す。

【化10】



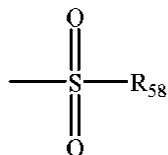
40

式中、R<sub>50</sub>およびR<sub>51</sub>は、先に定義した通りである。

【0043】

用語「スルホニル」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る部分を指す。

## 【化 1 1】

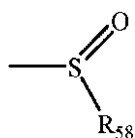


式中、 $\text{R}_{58}$  は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリールまたはヘテロアリールのうちの一つである。

## 【0044】

用語「スルホキシド(sulfoxido)」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る部分を指す。 10

## 【化 1 2】

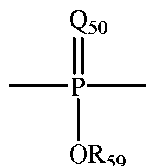


式中、 $\text{R}_{58}$  は、先に定義されている。

## 【0045】

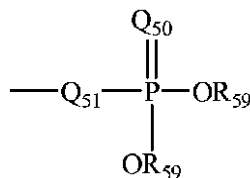
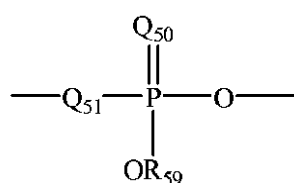
用語「ホスホリル」は、当技術分野で認識されており、一般に以下の式によって表され得る。 20

## 【化 1 3】



式中、 $\text{Q}_{50}$  は、SまたはOを表し、 $\text{R}_{59}$  は、水素、低級アルキルまたはアリールを表す。例えばアルキルを置換するために使用される場合、ホスホリルアルキルのホスホリル基は、以下の一般式によって表され得る。 30

## 【化 1 4】

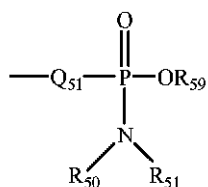
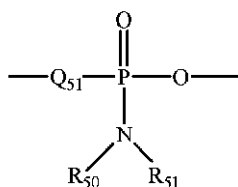


式中、 $\text{Q}_{50}$  および  $\text{R}_{59}$  は、それぞれ独立に、先に定義されており、 $\text{Q}_{51}$  は、O、SまたはNを表す。 $\text{Q}_{50}$  がSである場合、ホスホリル部分は、「ホスホロチオエート」である。 40

## 【0046】

用語「ホスホルアミダイト」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る。

## 【化 1 5】

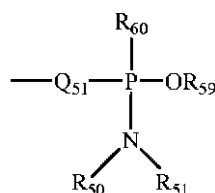
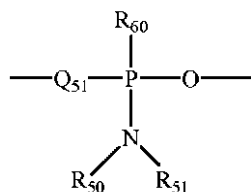


式中、 $Q_{51}$ 、 $R_{50}$ 、 $R_{51}$  および  $R_{59}$  は、先に定義した通りである。

【0047】

用語「ホスホルアミダイト (phosphonamidite)」は、当技術分野で認識されており、以下の一般式によって表され得る。

【化16】



10

式中、 $Q_{51}$ 、 $R_{50}$ 、 $R_{51}$  および  $R_{59}$  は、先に定義した通りであり、 $R_{60}$  は、低級アルキルまたはアリールを表す。

【0048】

アルケニルおよびアルキニル基に対して類似の置換を行って、例えば、アミノアルケニル、アミノアルキニル、アミドアルケニル、アミドアルキニル、イミノアルケニル、イミノアルキニル、チオアルケニル、チオアルキニル、カルボニル置換アルケニルまたはアルキニルを生成することができる。

【0049】

各表現、例えばアルキル、 $m$ 、 $n$ 等の定義は、任意の構造において一回より多くの回数生じる場合、同構造の他所におけるその定義とは独立であるものとする。

20

【0050】

「置換」または「で置換されている」は、このような置換が、置換された原子および置換基の許容される原子価に従い、置換によって、例えば転移、環化、脱離または他の反応などによる変換を自然発生的に受けない安定な化合物が得られるという暗黙の条件を含むことが理解される。

【0051】

また用語「置換」は、有機化合物のあらゆる許容可能な置換基を含むことが企図される。例示的な置換基として、例えばハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、ヘテロシクリル、芳香族または複素芳香族部分、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等が挙げられる。広範な一態様では、許容可能な置換基には、有機化合物の非環式および環式、分枝鎖および非分枝鎖、炭素環式および複素環式、芳香族および非芳香族置換基が含まれる。例示的な置換基として、例えば、本明細書に先に記載したものが挙げられる。許容可能な置換基は、適切な有機化合物に対して一つであっても複数であってもよく、そして同じであっても異なってもよい。本発明の目的では、窒素などのヘテロ原子は、ヘテロ原子の価数を満たす、本明細書に記載の有機化合物の水素置換基および/または任意の許容可能な置換基を有することができる。本発明は、有機化合物の許容可能な置換基によって、いかなる方式でも制限されないものとする。

30

40

【0052】

用語「ポリメチン架橋」は、奇数の炭素を含む、コンジュゲートした二重結合メチレン鎖を指す。このような架橋は、コンジュゲートした二重結合メチレン鎖の一部として、環構造を含み得る。

【0053】

用語「生理的に許容される担体」は、本発明の化合物の一つまたは複数、分散、溶解、懸濁、混合し、かつ生理的に容認される、すなわち過度の不快感も、刺激感も、毒性もなしに、対象の身体に、体内に、または身体上に投与され得る担体を指す。

【0054】

50

本説明を通して、組成物が特定の成分を有する、含む ( i n c l u d i n g ) または含む ( c o m p r i s i n g ) と説明される場合、その組成物はまた、列挙した成分から本質的になるかまたは列挙した成分からなることが企図される。同様に、プロセスが特定のプロセスステップを有する、含む ( i n c l u d i n g ) または含む ( c o m p r i s i n g ) と説明される場合、そのプロセスはまた、列挙したプロセスステップから本質的になるかまたは列挙したプロセスステップからなる。さらに、ステップの順序または特定の動作を実施する順序は、本発明が操作可能である限り、重要ではないことを理解すべきである。さらに、二つまたはそれより多くのステップまたは動作は、同時に実施することができる。

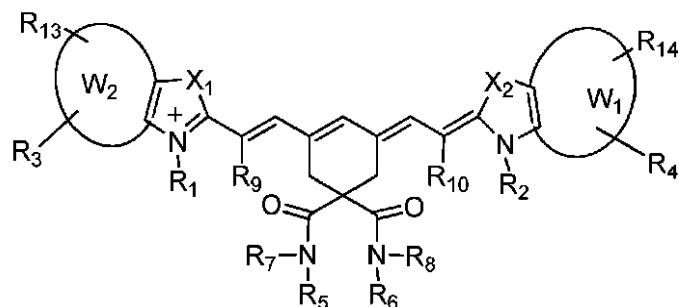
【 0 0 5 5 】

10

II . 本発明の蛍光色素化合物

本発明の一態様は、式 I - A によって表される蛍光性化合物

【 化 1 7 】



20

(I-A)

またはその塩を提供し、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、O、S、Se、または  $C(C_{1-4} \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ、ナフト ( n a p h t h a ) またはピリジル環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_{1-10}$  アルキルであり、

30

$R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、Hまたは  $-C_{1-22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、 $-C_{1-22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

40

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

mは、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

nは、出現するごとに独立に、1~10を表す。

【 0 0 5 6 】

50

ある特定の実施形態では、 $X_1$  および  $X_2$  は、 $C(CH_3)_2$  である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ナフト(naphtha)環である。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に、 $-SO_3H$  または  $-SO_3^-$  で任意選択により置換されている  $-C_1 \sim C_{10}$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $H$ 、 $-SO_3H$  または  $-SO_3^-$  である。ある特定の実施形態では、 $R_7$  は、水素である。ある特定の実施形態では、 $R_9$  および  $R_{10}$  は、水素である。

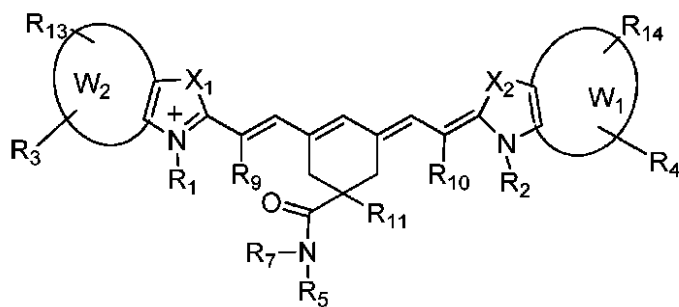
【0057】

ある特定の実施形態では、 $R_5$  および  $R_6$  は、それぞれ独立に、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  である。ある特定の実施形態では、 $R_5$  および  $R_6$  は、それぞれ独立に、 $-C_2 \sim C_8$  アルキレン- $X_3$  である。ある特定の実施形態では、 $R_5$  および  $R_6$  は、それぞれ独立に、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$  または  $-COOH$  で置換されている  $-C_2 \sim C_8$  アルキレンである。ある特定の実施形態では、 $R_7$  および  $R_8$  は、水素である。

【0058】

本発明の別の態様は、式 I - B によって表される蛍光性化合物

【化18】



(I-B)

またはその塩を提供し、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、 $O$ 、 $S$ 、 $Se$ 、または  $C(C_1 \sim C_4 \text{ アルキル})_2$  であり、

$W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ、ナフトまたはピリジル環であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$  および  $-OH$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-C_1 \sim C_{10}$  アルキルであり、

$R_5$  および  $R_7$  は、それぞれ独立に、水素または  $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、水素、 $-C_1 \sim C_{22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-NO_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、 $H$ 、ハロゲン、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル、 $N$ -ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、 $-OH$ 、 $-SH$ 、マレイミド、フタルイミド、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{ハロゲン})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、アルキニル、 $-N_3$ 、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、 $H$ 、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7

員環を形成し、

$R_{11}$  は、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CN}$ 、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})$ -ハロアルキル、ハロアルキル、 $-\text{COOR}_{15}$ 、 $-\text{CON}(\text{H})R_{15}$ 、または $-\text{CO}(\text{CH}_2)_nR_{15}$ であり、

$R_{12}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$R_{15}$  は、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、アルキル、または $X_3$ で任意選択により置換されているアリール、および/またはポリエチレングリコールであり、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

$n$  は、出現するごとに独立に、1～10を表す。

【0059】

ある特定の実施形態では、 $X_1$  および  $X_2$  は、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ナフト環である。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に、 $-\text{SO}_3\text{H}$  または  $-\text{SO}_3^-$  で任意選択により置換されている  $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$  または  $-\text{SO}_3^-$  である。ある特定の実施形態では、 $R_7$  は、水素である。ある特定の実施形態では、 $R_9$  および  $R_{10}$  は、水素である。

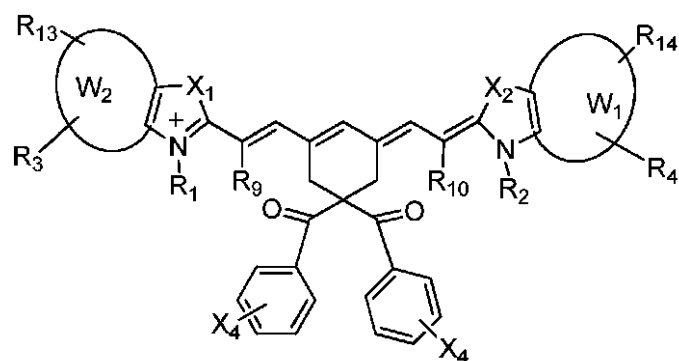
【0060】

ある特定の実施形態では、 $R_5$  は、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$  アルキレン- $X_3$  であり、 $R_7$  は水素である。ある特定の実施形態では、 $R_5$  は、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$  アルキレン- $X_3$  であり、 $R_7$  は水素である。ある特定の実施形態では、 $R_5$  は、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$  または  $-\text{COOH}$  によって置換されている  $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$  アルキレンであり、 $R_7$  は水素である。

【0061】

本発明の別の態様は、式 I - C によって表される蛍光性化合物

【化19】



(I-C)

またはその塩を提供し、式中、

$X_1$  および  $X_2$  は、それぞれ独立に、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ 、 $\text{Se}$ 、または  $\text{C}(\text{C}_1 \sim \text{C}_4 \text{ アルキル})_2$  であり、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2^-$  および  $-\text{OH}$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  アルキルであり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、水素、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-\text{NO}_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、 $\text{H}$ 、ハロゲン、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $\text{N}$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル

、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、- OH、- SH、マレイミド、フタルイミド、- NHCO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - (ハロゲン)、- CONHNH<sub>2</sub>、- CN、- NH<sub>2</sub>、- NO<sub>2</sub>、- CON(H)R<sub>12</sub>、アルキニル、- N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

X<sub>4</sub> は、出現するごとに独立に、水素、ハロゲン、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、- COOH、または- CO<sub>2</sub><sup>-</sup>を表し、

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、H、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または R<sub>1</sub> および R<sub>9</sub> もしくは R<sub>2</sub> および R<sub>10</sub> は、それらの相互接続原子と一緒に、5 員、6 員または 7 員環を形成し、

R<sub>12</sub> は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

m は、出現するごとに独立に、0、1、2、3 または 4 を表し、

n は、出現するごとに独立に、1 ~ 10 を表す。

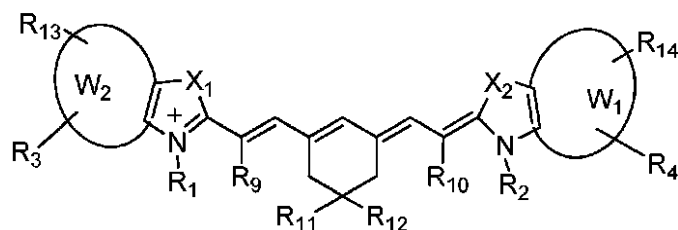
#### 【0062】

ある特定の実施形態では、X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> である。ある特定の実施形態では、W<sub>1</sub> および W<sub>2</sub> は、ベンゾ環である。ある特定の実施形態では、W<sub>1</sub> および W<sub>2</sub> は、ナフト環である。ある特定の実施形態では、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、- SO<sub>3</sub>H または - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> で任意選択により置換されている - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> は、それぞれ独立に、H、- SO<sub>3</sub>H または - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> である。ある特定の実施形態では、R<sub>7</sub> は、水素である。ある特定の実施形態では、R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、水素である。

#### 【0063】

本発明の別の態様は、式 I - D によって表される蛍光性化合物

#### 【化20】



(I-D)

またはその塩を提供し、式中、

X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、それぞれ独立に、O、S、Se、または C(C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル)<sub>2</sub> であり、

W<sub>1</sub> および W<sub>2</sub> は、ベンゾ、ナフトまたはピリジル環であり、

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、- COOH、- CO<sub>2</sub><sup>-</sup> および - OH からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルであり、

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>13</sub> および R<sub>14</sub> は、それぞれ独立に、H、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン - X<sub>3</sub>、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、- SO<sub>2</sub>N(R<sub>12</sub>) - アルキレン - X<sub>3</sub>、ハロゲンまたは - NO<sub>2</sub> であり、

X<sub>3</sub> は、出現するごとに独立に、H、ハロゲン、- CH<sub>3</sub>、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、- COOH、- CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、- NCS、- NCO、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、- OH、- SH、マレイミド、フタルイミド、- NHCO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - (ハロゲン)、- CONHNH<sub>2</sub>、- CN、- NH<sub>2</sub>、- NO<sub>2</sub>、- CON(H)R<sub>13</sub>、アルキニル、- N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシ

クリルを表し、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または  $R_1$  および  $R_9$  もしくは  $R_2$  および  $R_{10}$  は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

$R_{11}$  および  $R_{12}$  は、それぞれ独立に、アルキル、ハロアルキル、アリール、アラキル、シアノ、ハロゲン、ニトロ、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})$ -ハロアルキル、 $-\text{C}(\text{O})$ -アリール、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_{15}$ 、 $-\text{CON}(\text{H})\text{R}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OR}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}_{15}$ 、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{R}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ 、または  $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$  であり、

$R_{13}$  は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

$R_{15}$  は、出現するごとに独立に、 $\text{H}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、アルキル、ポリエチレングリコール、または  $X_3$  で任意選択により置換されていてもよいアリール、および/またはポリエチレングリコールを表し、

$m$  は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

$n$  は、出現するごとに独立に、1~10を表す。

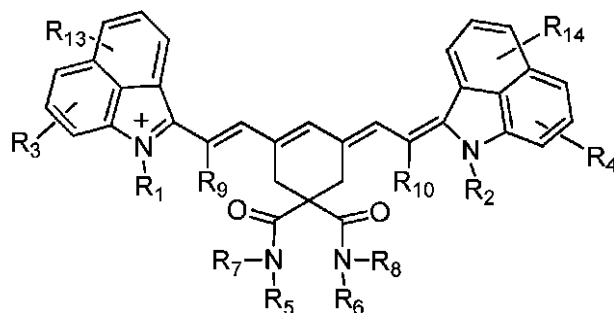
#### 【0064】

ある特定の実施形態では、 $X_1$  および  $X_2$  は、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾ環である。ある特定の実施形態では、 $W_1$  および  $W_2$  は、ナフト環である。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に、 $-\text{SO}_3\text{H}$  または  $-\text{SO}_3^-$  で任意選択により置換されている  $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_1$  および  $R_2$  は、独立に  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$  または  $-\text{SO}_3^-$  である。ある特定の実施形態では、 $R_7$  は、水素である。ある特定の実施形態では、 $R_9$  および  $R_{10}$  は、水素である。

#### 【0065】

本発明の別の態様は、式 II によって表される蛍光性化合物

#### 【化21】



(II)

またはその塩を提供し、式中、

$R_1$  および  $R_2$  は、独立に、水素であるか、またはハロゲン、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2^-$  および  $-\text{OH}$  からなる群から独立に選択される一つまたは二つの置換基で任意選択により置換されている  $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$  アルキルであり、

$R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、 $\text{H}$  または  $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$  アルキレン- $X_3$  であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、 $\text{H}$ 、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{22}$  アルキレン- $X_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_{12})$ -アルキレン- $X_3$ 、ハロゲンまたは  $-\text{NO}_2$  であり、

$X_3$  は、出現するごとに独立に、 $\text{H}$ 、ハロゲン、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、 $\text{N}$ -ヒドロキシスクシンイミジルエステル



、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、- OH、- SH、マレイミド、フタルイミド、- NHCO - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - (ハロゲン)、- CONHNH<sub>2</sub>、- CN、- NH<sub>2</sub>、- NO<sub>2</sub>、- CON(H)R<sub>12</sub>、アルキニル、- N<sub>3</sub>、ポリエチルグリコール、任意選択により置換されているアリール、または任意選択により置換されているヘテロシクリルを表し、

R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、水素、ハロゲンもしくはアルキルであるか、または R<sub>1</sub> および R<sub>9</sub> もしくは R<sub>2</sub> および R<sub>10</sub> は、それらの相互接続原子と一緒にあって、5員、6員または7員環を形成し、

R<sub>12</sub> は、出現するごとに独立に、水素またはアルキルを表し、

m は、出現するごとに独立に、0、1、2、3または4を表し、

n は、出現するごとに独立に、1～10を表す。

10

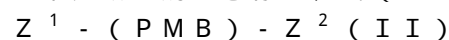
#### 【0066】

ある特定の実施形態では、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、- SO<sub>3</sub>H または - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> で任意選択により置換されている - C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、- SO<sub>3</sub>H または - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> で任意選択により置換されている - C<sub>2</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立に、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> は、それぞれ独立に、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>22</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> である。ある特定の実施形態では、R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> は、それぞれ独立に、- C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキレン - X<sub>3</sub> である。ある特定の実施形態では、R<sub>5</sub> および R<sub>6</sub> は、それぞれ独立に、- SO<sub>3</sub>H、- SO<sub>3</sub><sup>-</sup> または - COOH で置換されている - C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキレンである。ある特定の実施形態では、R<sub>7</sub> および R<sub>8</sub> は、水素である。ある特定の実施形態では、R<sub>9</sub> および R<sub>10</sub> は、水素である。

20

#### 【0067】

本発明の別の態様は、式 (II) によって表される化合物



およびその塩を提供する。

#### 【0068】

Z<sup>1</sup> および Z<sup>2</sup> は、それぞれ独立に、複素環式部分を含む多環式基を表す。例えば、Z<sup>1</sup> および Z<sup>2</sup> は、それぞれ独立に、置換または非置換インドリニウムまたはベンゾインドリウム環から選択することができる。PMB は、4, 4 - 二置換シクロヘキシ架橋部分を含むポリメチン架橋を表す。化合物は、約 500 nm ~ 約 1100 nm の範囲、好ましくは約 600 nm ~ 約 900 nm の範囲の吸収および発光波長を有する。ある特定の実施形態では、色素は、約 600 nm ~ 約 850 nm、約 650 nm ~ 約 900 nm、または約 650 nm ~ 約 850 nm の範囲の波長を有する光を吸収および / または放出する。

30

#### 【0069】

Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、および / または PMB は、任意選択により、生体分子と共有結合および / または化学的連結を形成することができるリンカー部分を含み得る。このようなリンカー部分は、異なる化合物上の官能基と化学的に反応して、共有結合性連結を形成することができる反応基、または異なる化合物上の反応基と化学的に反応して、共有結合性連結を形成することができる官能基を含み得る。このような反応基には、例えば、それぞれ求核試薬または求電子試薬である対応する官能基への曝露によって共有結合性連結を形成することができる求電子試薬または求核試薬が含まれ得る。あるいは、反応基は、光で活性化可能な基であり、適切な波長の光を照射した後のみ化学的に反応性になる。本発明の化合物と連結される生体分子との反応の結果、コンジュゲート物質に本発明の化合物を結合させる新しい連結に、反応基の一つまたは複数の原子が組み込まれ得る。

40

#### 【0070】

本明細書で企図される生体分子として、タンパク質 (例えば、酵素、ホルモン、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに単鎖抗体)、ペプチド、アミノ酸、糖タンパク質、細胞受容体のリガンド、ポリサッカライド、炭水化物、核酸 (例えば、DNA および RNA)、ヌクレオシド、ヌクレオチド、アプタマー、ペプチジル核酸、細胞受容体、酵

50

素基質、酵素補因子、ビオチン、ホルモン、神経伝達物質、増殖因子、サイトカイン、リンホカイン、レクチン、セレクチン、脂質、脂質集合体（例えば、ミセルまたは小胞）、および毒素が挙げられるが、これらに限定されない。限定されるものではないが、アシアロ糖タンパク質受容体、ソマトスタチン、神経成長因子、オキシトシン、ボンベシン、カルシトニン、アルギニンバソプレシン、アンジオテンシンII、心房性ナトリウム利尿ペプチド、インスリン、グルカゴン、プロラクチン、ゴナドトロピン、様々なオピオイドおよびウロキナーゼタイプのプラスミノゲン活性化因子を含む、トランスフェリン、ビタミン、炭水化物および内部移行（internalizing）受容体を標的化するリガンドの標的化および送達、例えば葉酸媒介性標的化（Leamon & Low, Drug Discovery Today, 6巻：44～51頁、2001年）に關与するものなどの他の生体分子を使用することができる。また、限定されるものではないが、ウイルスおよび細菌を含むいくつかの供給源に由来し得る膜、膜透過および核移行シグナル配列も企図される。生体分子には、有機分子、ポリマー、デンドリマー、細胞（例えば、哺乳動物細胞、非哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、胚細胞）、細菌、バクテリオファージ、ウイルス、生物、粒子、微粒子、またはナノ粒子も含まれ得る。生体分子には、限定されるものではないが、光線療法または放射線療法分子を含む治療用薬物分子も含まれ得る。

10

#### 【0071】

本発明の蛍光色素化合物は、以下のタイプの造影剤またはプローブ：分子プローブ、活性化可能なプローブ、酵素活性化可能なプローブ、量子ドットベースのイメージングプローブ、ナノ粒子ベースのイメージングプローブ、生体分子を標的化したプローブ、波長偏移ピーコン、多色プローブ、標的に高い結合親和性を有するプローブ、非特異的イメージングプローブ、細胞ベースのプローブ、二重様式（dual modality）剤、光学/CT二重様式剤（例えば、CT剤に物理的または化学的に結合した光学的剤）、光学/MR二重様式剤（例えば、MR剤に物理的または化学的に結合した光学的剤）、光学/核二重様式剤（例えば、放射性原子にまたは放射性原子と物理的または化学的に結合した光学的剤）、および/またはそれらの任意の組合せ、の一つまたは複数を作り出すために使用され得る。

20

#### 【0072】

化学的に連結された生体分子を含む本発明の化合物は、生体分子に化学的に連結されていない化合物と比較して、増強された蛍光を有することができる。ある特定の実施形態では、蛍光は、連結されていない化合物と比較して、約10%、約25%または約50%増強されている。本発明の化合物に化学的に連結されている生体分子は、in vivoおよび/またはin vitroでの分子の蓄積、体内分布、排除、標的化、結合および/または認識を変えてもよく、増強させてもよい。

30

#### 【0073】

一つまたは複数の生体分子は、いくつかの反応性官能基を含有する多価の連結またはリンカーを介して $Z^1$ 、PMB、および/または $Z^2$ に化学的に連結されて、構造（ $Z^1 - (PMB) - Z^2$ ）-（（L）<sub>v</sub>（BM）<sub>r</sub>）<sub>t</sub> [Lは、リンカーもしくはスペーサ、または多価のスペーサもしくはリンカーであり、BMは、生体分子であり、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、およびPMBは、既に定義されている通りであり、 $t = 1 \sim 6$ 、 $v = 1 \sim 500$ および $r = 1 \sim 500$ であり、（L）<sub>v</sub>は、 $v$ が1を超える場合、同じリンカーのコピーまたは異なるリンカーの組合せを表す]の生体適合性である蛍光性分子を形成することができる。

40

#### 【0074】

本発明の化合物に適したリンカー部分の例は、既に文献（米国特許出願第2002/0064794号（2002年）、米国特許第6,086,737号、米国特許第6,048,982号、米国特許第6,747,159号、および米国特許第6,448,008号参照）に記載されている。

#### 【0075】

本発明の1種超の蛍光色素化合物は、単一の生体分子に化学的に連結され得ると理解さ

50

れる。このような構造の一例は、 $[Z^1 - (PMB) - Z^2]_u - BM$  ( $u = 1 \sim 500$  であり、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $PMB$ 、および  $BM$  は、先に定義した通りである) と表され得る。

【0076】

開示の化合物の塩も企図され、それには、塩基付加塩および酸付加塩の両方が含まれる。本発明の化合物は、適切な有機または無機塩基と反応して塩基付加塩を形成することができる、一つまたは複数の十分に酸性のプロトンを有することができる。塩基付加塩には、無機塩基、例えばアンモニウム、またはアルカリもしくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等、ならびに有機塩基、例えばアルコキシド、アルキルアミド、アルキルおよびアリールアミン等に由来する塩が含まれる。したがって、本発明の塩を調製するのに有用なこのような塩基には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、炭酸カリウム等が含まれる。

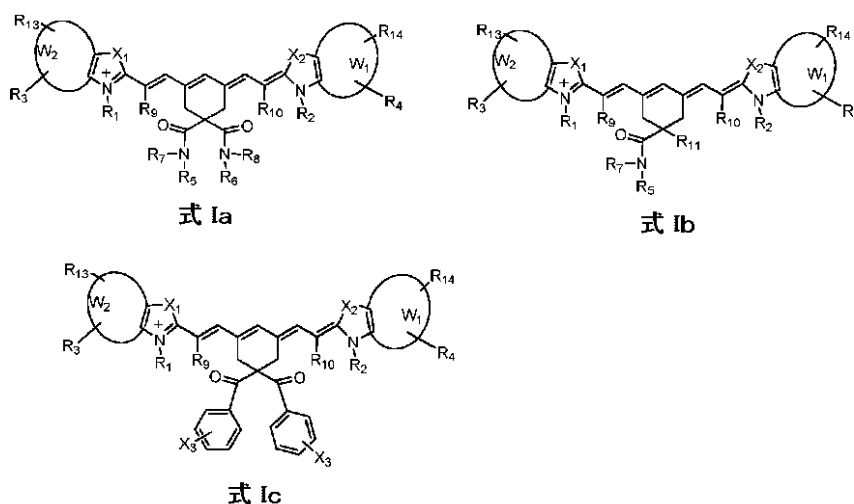
【0077】

十分に塩基性の基、例えばアミンを有する本発明の化合物は、有機または無機酸と反応して、酸付加塩を形成することができる。塩基性の基を有する化合物から酸付加塩を形成するために一般に用いられる酸は、無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等、および有機酸、例えば *p*-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、*p*-ブロモフェニル-スルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等である。このような塩の例として、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1,4-二酸塩、ヘキシン-1,6-二酸塩、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ガンマ-ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マンデル酸塩等が挙げられる。

【0078】

例えば、式 I の化合物は、式 Ia、Ib および Ic

【化 2 2】



またはその塩によって表され得、式中、

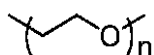
$X_1$  および  $X_2$  は、独立に、O、S、Se、 $C(CH_2R_3CH_2R_4)$  から選択され、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$  および  $R_8$  は、それぞれ独立に、H、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 1 \sim 20$ ) から選択され、

$R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_{13}$  および  $R_{14}$  は、それぞれ独立に、H、 $(CH_2)_nX_3$  ( $n = 0 \sim$

20) から選択され、 $X_3$  は、独立に、H、ハロゲン、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $SO_3^-$ 、 $COOH$ 、 $NCS$  (イソチオシアネート)、 $NCO$  (イソシアネート (isocyanate))、N-ヒドロキシスクシンイミジル (NHS) エステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル (NHSS) エステル、ヒドロキシ (OH)、チオール (SH)、マレイミド、フタルイミド、ヨードアセトアミド、 $CN$ 、 $NH_2$ 、 $CONHR$ 、アルキン、アジド ( $N_3$ )、 $SO_2NX_3R_7$ 、 $X_3$  で任意選択によりさらに置換されているアリールから選択され、

$R_9$  および  $R_{10}$  は、H または ハロゲン または アルキル基であり、 $R_1$  および  $R_9$  または  $R_2$  および  $R_{10}$  は、任意選択により、一緒になって 5 員または 6 員または 7 員の環を形成し、 $W_1$  および  $W_2$  は、ベンゾまたはナフトまたはピリジルを含むアリール環を形成するのに必要な原子であり、 $R_{11}$  は、独立に、 $COOH$ 、 $CN$ 、 $F$ 、 $NO_2$ 、 $COCF_3$ 、 $CF_3$ 、 $COOR$ 、 $CONHR$ 、 $CO(CH_2)_nR$  から選択され、 $R$  は、H または  $COOH$  または  $SO_3H$  または  $NH_2$  または  $SH$  または アルキル、または  $X_3$  で任意選択によりさらに置換されているアリール、またはポリエチレングリコール (PEG) 単位

【化 23】



である。

【0079】

ある特定の実施形態では、 $X_3$  は、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、カルボキシル、 $-COCl$ 、 $-(CO)O(CO)R_{16}$ 、 $-CONHNH_2$ 、置換および非置換 N-ヒドロキシスクシンイミド (hydroxysuccinimido) エステル、置換および非置換 N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、ニトロ-またはフルオロ-フェノールエステル、アジド、 $-NCS$ 、 $-CHO$ 、アジド、 $-COCH_2I$ 、ホスホルアミダイト、フタルアミド、ならびにマレイミドからなる群から選択され、 $R_{16}$  は、H、アルキルおよびアリールからなる群から選択される。

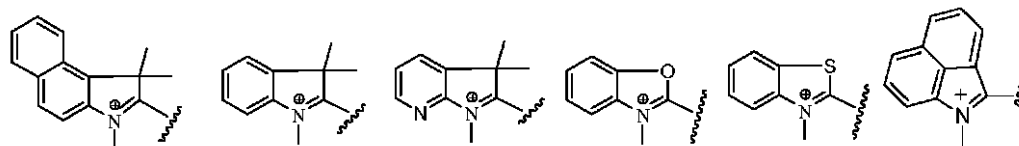
【0080】

他の実施形態では、 $X_1$  および  $X_2$  は、 $-C(CH_3)_2$  である。

【0081】

$W_1$  および  $W_2$  は、同じであっても異なってもよいと理解される。例えば、 $W_1$  および  $W_2$  は、

【化 24】



からなる群から選択され得る。縮合環上に一つまたは複数の非水素置換基を組み込むことを使用して、得られる色素の吸収および発光スペクトルを調整することができる。

【0082】

ある特定の実施形態では、化合物は、以下のうちの一つまたはその塩である。

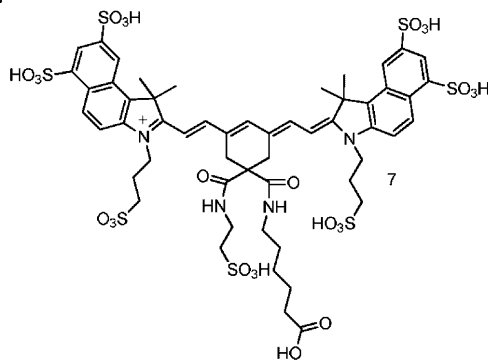
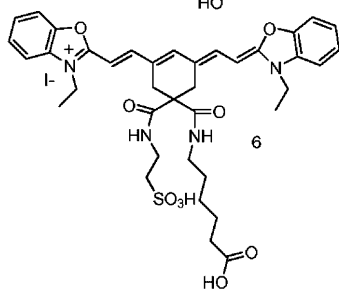
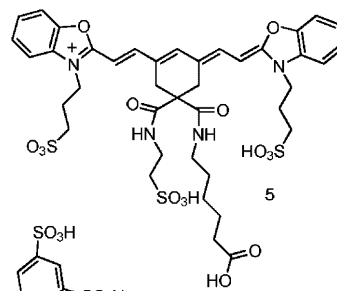
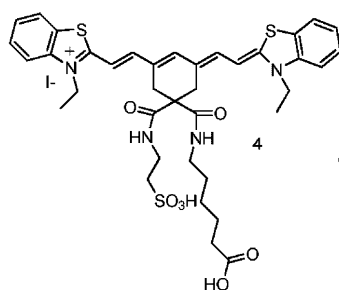
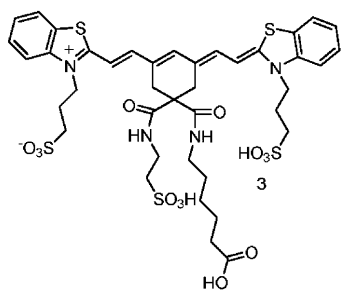
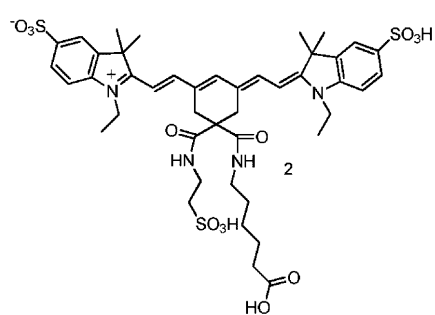
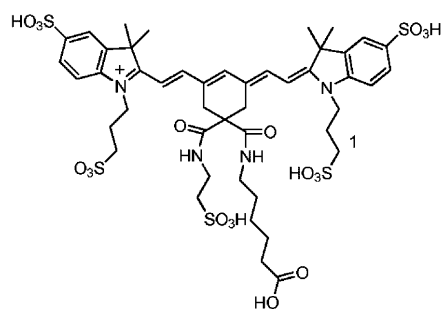
10

20

30

40

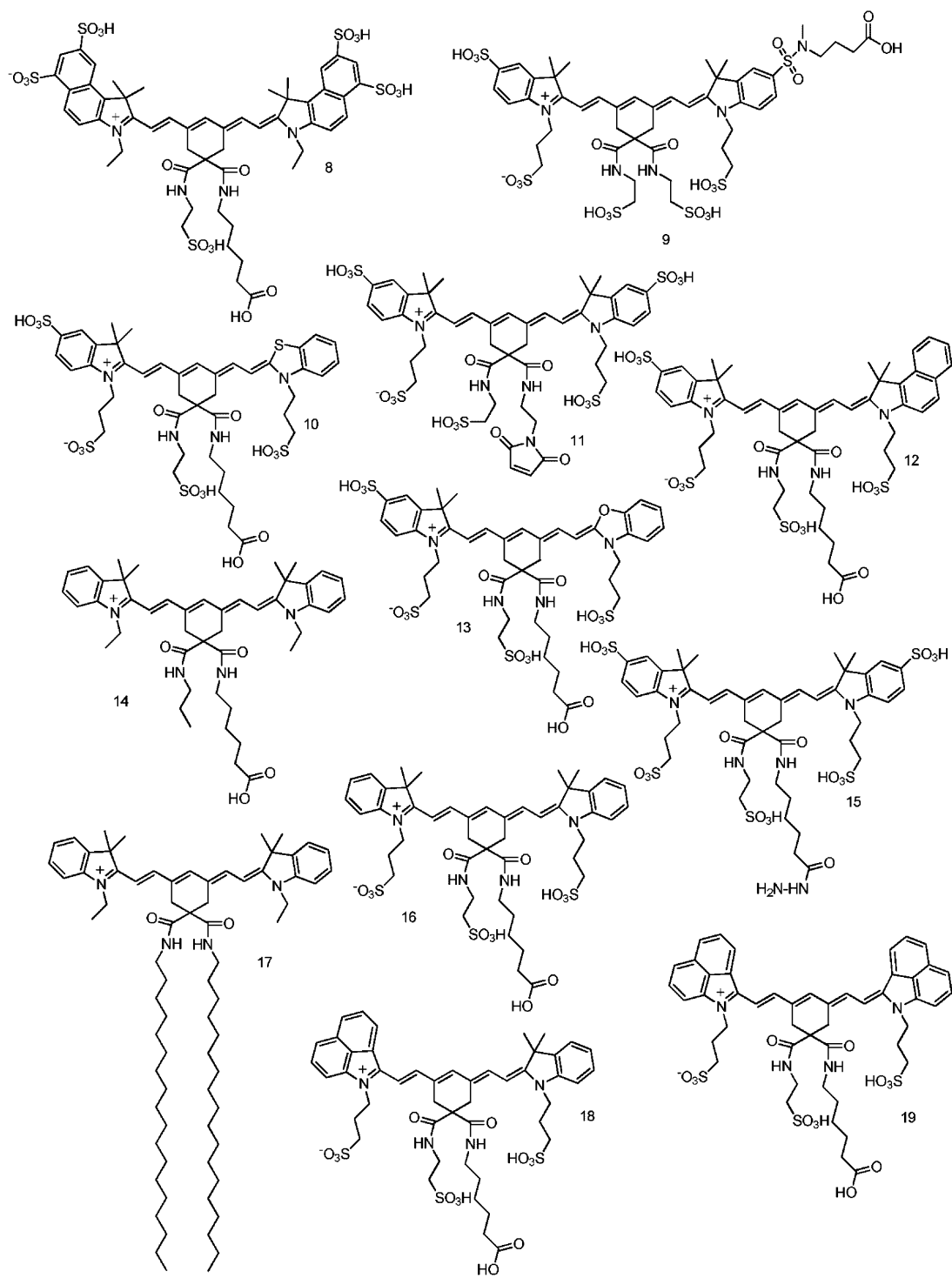
## 【化 25 - 1】



10

20

## 【化 25 - 2】



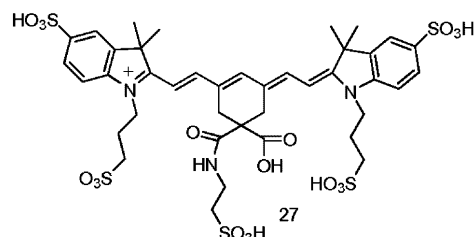
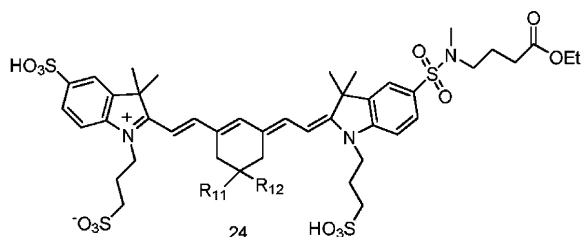
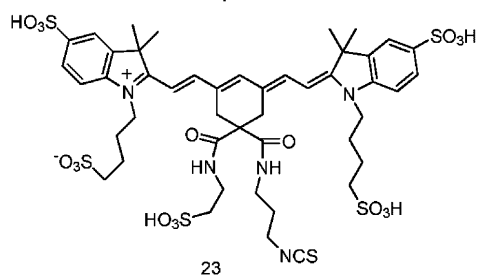
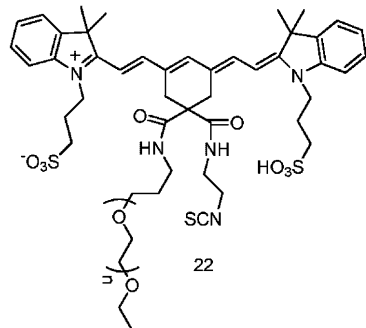
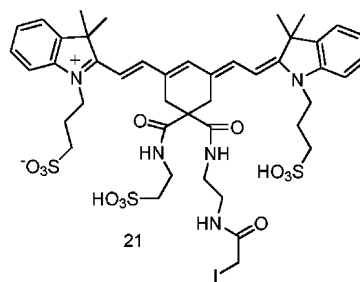
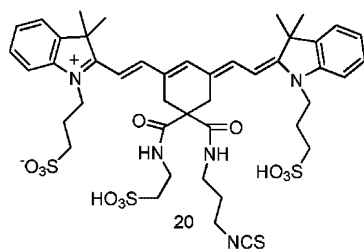
10

20

30

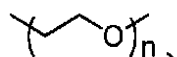
40

## 【化 2 5 - 3】



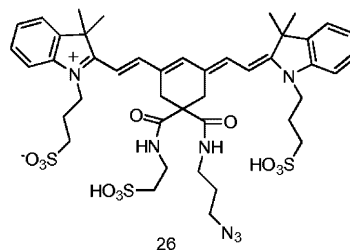
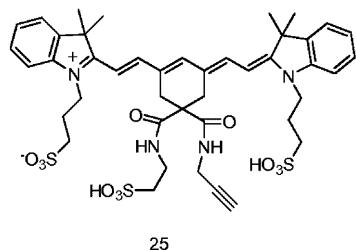
[ R<sub>11</sub> および R<sub>12</sub> は、独立に、COOH、CONHR、CN、O=C-フェニル、COCH<sub>2</sub>Rであり、R = Hまたは

## 【化 2 5 - 4】



(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOR' または (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> または (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H または (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> であり、R' = アルキルまたはアリールである。]

## 【化 2 6 - 1】



<p>28</p>	X3 および/または X4		<p>29</p>
	28A	H	29A
	28B	Cl	29B
	28C	Br	29C
	28D	F	29D
	28E	I	29E
	28F	SO <sub>3</sub> H	29F
	28G	COOH	29G

10

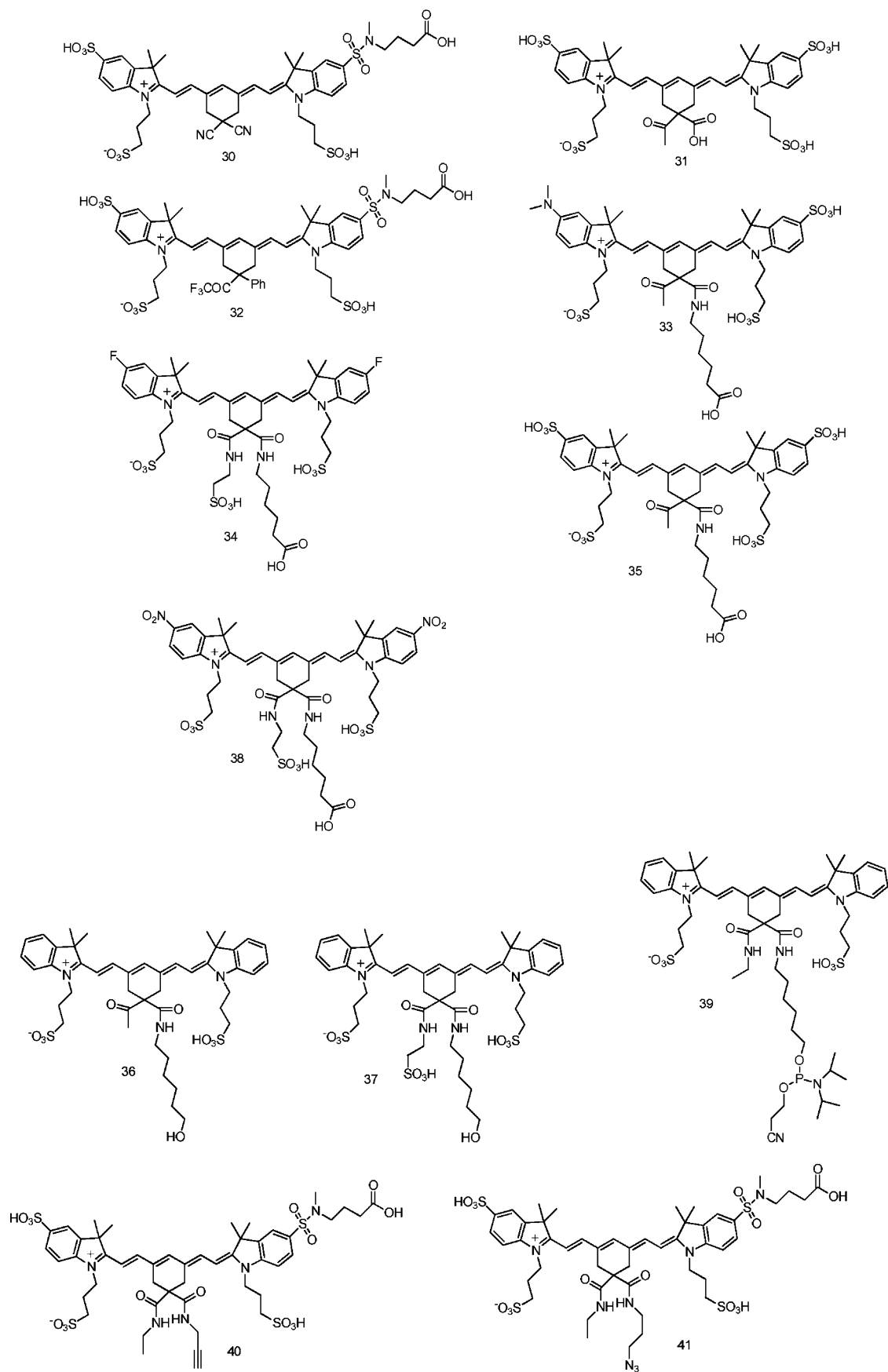
20

30

40

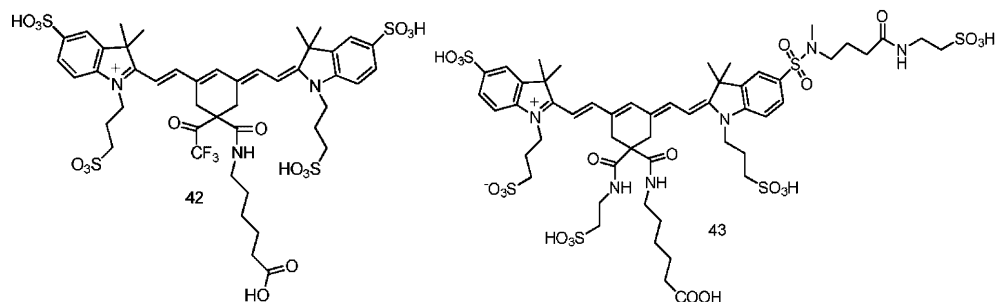
50

## 【化 26 - 2】





## 【化 26 - 3】

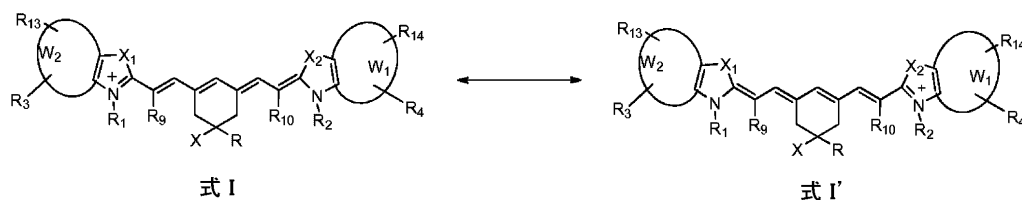


10

## 【0083】

本発明の化合物が、環およびポリメチン架橋における二重結合の位置を示す構造によって本明細書に図示される場合、その構造は、例えば以下の図に示されている通り、任意の共鳴構造を包含することも理解されたい。

## 【化 27】



20

式中、先の構造のそれぞれにおいて、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $W_1$ 、 $W_2$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  および  $X_3$  は、本明細書で定義の通りである。

## 【0084】

一般に、本明細書に開示の化合物は、以下の通り合成することができる。まず、四級化複素環である  $Z^1$  を調製する。次に、複素環式塩基を、求電子試薬であるポリメチン架橋 (PMB)、例えば  $PhNH-PMB-CH=NHPh \cdot HCl$ 、または  $RO-PMB-CH(OR)_2$  (PMBは、コンジュゲートした二重結合鎖  $(CH=CH)_n$  - からなり、このような鎖は、その一部として4,4-二置換シクロヘキシル架橋部分を含み、Phはフェニル環であり、Rは、メチルまたはエチル基である) と反応させると、ヘミシアニン、例えば  $Z^1-PMB-CH=NHPh$  または  $Z^1-PMB-CH=NAcPh$  (Acはアセチルラジカルである) または  $Z^1-(CH=CH)_n-OR$  が得られる。次に、これらの中間体を、異なる第四級複素環である  $Z^2$  と反応させる。官能化されたサイドアームは、第1 ( $Z^1$ ) または第2 ( $Z^2$ ) の四級化複素環のいずれかに結合している。最終的に、非対称性ポリメチン標識試薬、 $Z^1-PMB-Z^2$  が得られる。ヘミシアニン中間体の例は、F. M. Hamer, 「Some Unsymmetrical Pentamethincyanine Dyes and their Tetramethin Intermediates」、J. Chem. Soc., 32巻(1949年)、ならびに R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, Swati R. Mujumdar, C. J. Lewis および A. S. Waggoner, 「Cyanine Dye Labelling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidy Ester」、Bioconjugate Chemistry, 4巻、105頁(1993年)に記載されている。

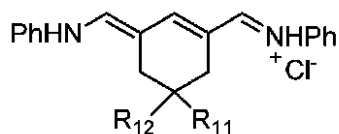
30

40

## 【0085】

別の態様では、本発明は、一般構造式 V の化合物を提供する。

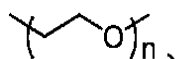
## 【化 28 - 1】



式 V

式中、 $R_{11}$  および  $R_{12}$  は、独立に、 $\text{COOH}$ 、 $\text{CONHR}$ 、 $\text{CF}_3$ 、ハロゲン、 $\text{CN}$ 、 $\text{O}=\text{C}$ -フェニル、 $\text{COCH}_2\text{R}$  であり、 $\text{R} = \text{H}$  または

## 【化 28 - 2】

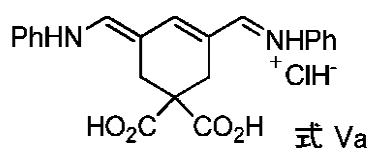


$(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$  または  $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$  であり、 $\text{R}' = \text{アルキル}$  または  $\text{アリール}$  であり、 $\text{Ph}$  はフェニル基であり、これは、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{OMe}$ 、 $\text{NMe}_2$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{CF}_3$ 、アルキルのうちの一つで任意選択により置換されている。

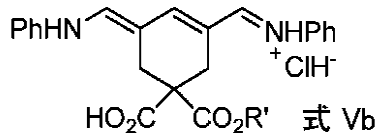
## 【0086】

ある特定の他の実施形態では、式 45a および 45b によって表される以下の構造が企図され、式中、 $\text{R}'$  は、アルキルまたはアリールである。

## 【化 29】



式 Va



式 Vb

## 【0087】

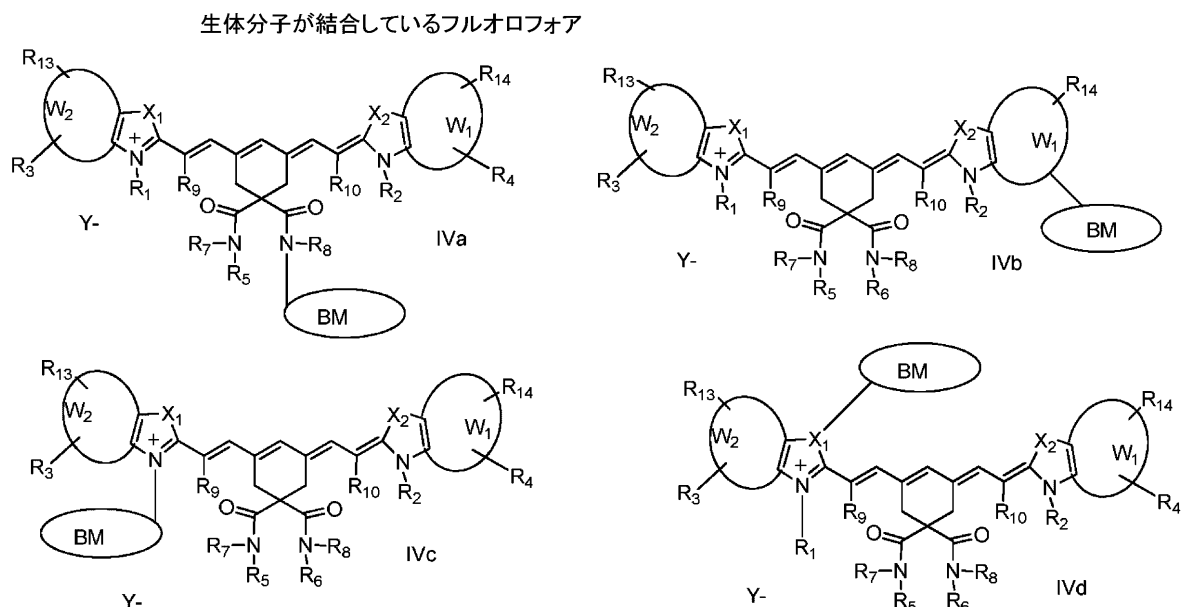
ある特定の他の実施形態では、本発明の化合物は、式  $\text{III} - [\text{BM}]_n - \text{F}_m$  ( $\text{BM}$  は、生体分子であり、 $\text{F}$  は、式 1a、1b または 1c (前述の通り) によって表されるフルオロフォアであり、 $n = 1 \sim 4$  であり、 $m = 1 \sim 100$  である) によって表される通り、生物学的分子または生体分子 ( $\text{BM}$ ) に化学的に連結され得る。得られた化合物 - 生体分子のコンジュゲートは、例えば生物学的分子と標的の相互作用に起因して、例えば受容体 - リガンドの相互作用、酵素 - 基質の相互作用、抗体 - 抗原の相互作用等を介して、標的に高い結合親和性を有することができる。他の実施形態では、一般形態  $[\text{Z}^1 - (\text{PMB}) - \text{Z}^2] - \text{BM}$  の、化学的に連結されているこのような化合物は、例えば以下の通りに表され得る。

10

20

30

【化 3 0】



式中、先の構造のそれぞれにおいて、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $W_1$ 、 $W_2$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  および  $X_3$  は、本明細書で定義の通りであり、 $Y^-$  は、対イオンであり、 $BM$  は、生体分子である。先の構造は例示的であり、生体分子 ( $BM$ ) は、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $W_1$ 、 $W_2$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  および  $X_3$  と同定される基の任意の一つまたは複数を介して、このような化合物に化学的に連結され得ると理解される。

【 0 0 8 8 】

本発明の別の態様は、生物学的分子と、式 I - A、I - B、I - C、I - D または I I の化合物などの本明細書に記載の化合物との反応によって形成されたコンジュゲート化合物を提供する。

【 0 0 8 9 】

本発明の別の態様は、 $-L-BM$ によって定義される1、2または3個の基でさらに置換されている、本明細書に記載の化合物（例えば、式I-A、I-B、I-C、I-DまたはIIの化合物）であるコンジュゲート化合物を提供し、ここで、 $L$ は結合またはリンカーであり、 $-BM$ は生物学的分子のラジカルである。

【 0 0 9 0 】

化合物は、以下の通り生体分子または細胞で標識され得る。本発明の化合物（蛍光色素）は、様々な濃度において約 5 分間 ~ 24 時間またはそれより長く、約 4 ~ 約 37 の温度で一つまたは複数の生体分子と共にインキュベートされる。インキュベーション後、遊離蛍光色素、または生体分子に化学的に連結されなかった蛍光色素は、例えばクロマトグラフィーまたは限外濾過法などの当業者に公知の方法を使用して除去され得る。

【 0 0 9 1 】

細胞を、インキュベーション後に遠心分離して、上清が除去されている細胞ペレットを作り出すことができる。細胞を、培養培地または生理食塩水に再度懸濁させて、残留蛍光色素、結合していない蛍光色素、または遊離蛍光色素を洗い流すことができる。これを数回反復してもよい。この方式では、内部もしくは外部の細胞分子への直接的なコンジュゲートによって、または限定されるものではないがサイトゾル、エンドソーム、核、ゴルジ装置、および他の細胞内小器官を含む様々な細胞内区画への非特異的な細胞取込みによって、細胞を標識することができる。

【 0 0 9 2 】

開示の化合物および/または組成物を、キットとしてパッケージングすることができ、このキットは任意選択により、化合物を使用するための指示を含むことができる。非限定

的な例として、例えば粉末または凍結乾燥形態の組成物、ならびに *in vivo* および / または *in vitro* での利用のための再構成、投与量情報および保存情報を含む使用のための指示を含有するキットが挙げられる。キットは、任意選択により、使える状態のまたは投与のために溶液とさらに混合する必要がある液体形態の組成物の容器、例えば粉末形態を再構成するためのバイアル、注射のためのシリンジ、特製の IV 送達システム、吸入器等を含有することができる。このような容器は、対象への単一または複数用量を含有することができる。さらにキットは、*in vivo* または *in vitro* における組成物の検出に役立つ構成要素、例えば特殊内視鏡、光フィルタを含有することができる。

#### 【0093】

10

生体分子に化学的に連結されている化合物を含む、本明細書に開示の化合物は、対象、例えば動物またはヒト対象に投与するのに適した医薬組成物に製剤化することができる。したがって製剤は、化合物を、投与の所望の形態および / または用量に適した生理的に許容される担体と一緒に含む。生理的に許容される担体として、水、食塩水を挙げることができる、これには、緩衝剤などの剤、および医薬製剤における使用に適合する保存剤などの他の剤がさらに含まれ得る。好ましい担体は、流体、好ましくは液体、より好ましくは水溶液であるが、固体製剤、局所製剤、吸入製剤、眼科用製剤、および経皮製剤のための担体も、本発明の範囲に含まれることが企図される。

#### 【0094】

さらに医薬組成物は、生理的に許容される担体に一つまたは複数の安定剤を含むことができる。このような組成物における使用に適した安定剤の例として、例えば、低分子量炭水化物、例えば直鎖多価アルコール、例えばソルビトールおよびグリセロールが挙げられる。イノシトールなどの他の低分子量炭水化物を使用することもできる。

20

#### 【0095】

本発明の化合物は、経口または非経口投与され得ることが企図される。非経口投与では、化合物は、静脈内、筋肉内、皮膚、経皮、皮下、直腸内、経鼻、腔内、および眼に投与され得る。したがって組成物は、例えば、固体錠剤、カプセル、丸剤、凍結乾燥散剤を含む散剤、コロイド懸濁液、ミクロスフェア、リポソーム顆粒、懸濁液、エマルション、溶液、ヒドロゲルを含むゲル、ペースト、軟膏、クリーム、ギプス、灌注溶液、水薬、浸透圧送達デバイス、坐剤、浣腸、注射剤、移植片、スプレー、またはエアロゾルの形態であ

30

#### 【0096】

##### III. 本発明の蛍光色素化合物の利用

本発明の化合物は、様々な *in vivo* および *in vitro* での用途において使用され得る。これらの用途を、以下の部分に論じる。

40

##### (a) *in vivo* での用途

#### 【0097】

本発明は、様々なイメージング用途、例えば光学イメージング用途で使用する事ができる新規蛍光性化合物を提供する。光学イメージング技術の総説については、例えば、Alfano ら、Ann. NY Acad. Sci. 820 巻: 248 ~ 270 頁、1997 年; Weissleder、Nature Biotechnology 19 巻、316 ~ 317 頁 (2001 年); Ntziachristos ら、Eur. Radiol. 13 巻: 195 ~ 208 頁 (2003 年); Graves ら、Curr. Mol. Med. 4 巻: 419 ~ 430 頁 (2004 年); Citrin ら、Exp

50

ert Rev. Anticancer Ther. 4巻: 857~864頁(2004年); Ntziachristos, Ann. Rev. Biomed. Eng. 8巻: 1~33頁(2006年); Koor, Cell Oncol. 28巻: 127~139頁(2006年); および Rao, Curr. Opin. Biotechnol. 18巻: 17~25頁(2007年)参照。

#### 【0098】

本発明の実施に有用なイメージングシステムは、典型的に、三つの基本的な構成要素、(1)本発明の蛍光色素化合物を励起するのに適切な光源、(2)蛍光色素の励起を誘発するために使用した光による発光を分離または識別するためのシステム、および(3)検出システムを含む。この検出システムは、手持ち式であってもよく、他の有用なイメージングデバイス、例えば内視鏡、カテーテル、術中顕微鏡および/もしくはビューアーに組み込むことができる。

10

#### 【0099】

好ましくは、光源は、単色(または実質的に単色)光を提供する。光源は、適切にフィルタをかけた白色光、すなわち広帯域供給源からのバンドパス光であり得る。例えば、150ワットのハロゲンランプからの光を、Omega Optical(バーモント州Brattleboro)から市販されている適切なバンドパスフィルタに通過させることができる。システムに応じて、光源はレーザーであってもよい。例えば、Boas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻: 4887~4891頁、1994年; Ntziachristos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97巻: 2767~2772頁、2000年; および Alexander, J. Clin. Laser Med. Surg. 9巻: 416~418頁、1991年参照。イメージングのためのレーザーに関する情報は、例えば Imaging Diagnostic Systems, Inc.(フロリダ州Plantation)および様々な他の供給源に見出され得る。高域または高バンドパスフィルタを使用して、励起光から光学発光を分離することができる。適切な高域または高バンドパスフィルタは、Omega Optical(バーモント州Burlington)から市販されている。

20

#### 【0100】

一般に、光検出システムは、集光/画像形成構成要素および光検出/画像記録構成要素を含むとみなすことができる。光検出システムは、両方の構成要素を組み込む単一の集積デバイスであってもよいが、集光/画像形成構成要素および光検出/画像記録構成要素を、別個に論じる。

30

#### 【0101】

特に有用な集光/画像形成構成要素は、内視鏡である。腹膜(Gahlen, J. Photochem. Photobiol. B 52巻: 131~135頁、1999年)、卵巣がん(Major, Gynecol. Oncol. 66巻: 122~132頁、1997年)、結腸および直腸(Mycek, Gastrointest. Endosc. 48巻: 390~394頁、1998年; および Stepp, Endoscopy 30巻: 379~386頁、1998年)、胆管(Izuishi, Hepatogastroenterology 46巻: 804~807頁、1999年)、胃(Abe, Endoscopy 32巻: 281~286頁、2000年)、膀胱(Kriegmaier, Urol. Int. 63巻: 27~31頁、1999年; および Riedl, J. Endourol. 13巻: 755~759頁、1999年)、肺(Hirsch, Clin Cancer Res 7巻: 5~220頁、2001年)、脳(Ward, J. Laser Appl. 10巻: 224~228頁、1998年)、食道、および頭頸部領域を含む数々の組織および臓器のin vivo光学イメージングに使用されている内視鏡デバイスおよび技術を、本発明の実施において用いることができる。

40

#### 【0102】

50

他のタイプの集光構成要素は、光ファイバーデバイスを含むカテーテルベースのデバイスである。このようなデバイスは、血管内イメージングに特に適している。例えば、Te arneyら、Science 276巻：2037～2039頁、1997年；およびCirculation 94巻：3013頁、1996年参照。

#### 【0103】

フェーズドアレイ技術(Boasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：4887～4891頁、1994年；Chance、Ann. NY Acad. Sci. 838巻：29～45頁、1998年)、光学断層撮影法(Chengら、Optics Express 3巻：118～123頁、1998年；およびSiegelら、Optics Express 4巻：287～298頁、1999年)、生体内顕微鏡法(Dellianら、Br. J. Cancer 82巻：1513～1518頁、2000年；Monskyら、Cancer Res. 59巻：4129～4135頁、1999年；およびFukumuraら、Cell 94巻：715～725頁、1998年)、共焦点イメージング(Korlachら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96巻：8461～8466頁、1999年；Rajadhyaksharaら、J. Invest. Dermatol. 104巻：946～952頁、1995年；およびGonzalezら、J. Med. 30巻：337～356頁、1999年)ならびに蛍光分子断層撮影法(FMT)(Nziachristosら、Nature Medicine 8巻：757～760頁、2002年；米国特許第6,615,063号、PCT出願第WO03/102558号、およびPCT US/03/07579)を含むさらに他のイメージング技術を、本発明の蛍光色素化合物と共に使用することができる。同様に、蛍光色素化合物は、様々なイメージングシステム、例えば、[1]IVIS(登録商標)イメージングシステム：100シリーズ、200シリーズ(Xenogen、カルフォルニア州Alameda)、[2]SPECTRUMおよびLUMINA(Xenogen、カルフォルニア州Alameda)、[3]SoftScan(登録商標)またはeXplore Optix(商標)(GE Healthcare、英国)、[4]Maestro(商標)およびNuance(商標)-2 Systems(CRi、マサチューセッツ州Woburn)、[5]Carestream Molecular Imaging(ニューヨーク州Rochester)製のImage Station In-Vivo FX(かつてのKodak Molecular Imaging Systems)、[6]OV100、IV100(Olympus Corporation、日本)、[7]Cellvizio Mauna Kea Technologies、フランス)[8]NanoSPECT/CTまたはHiSPECT(Bioscan、ワシントンDC)、[9]CTLM(登録商標)またはLILATM(Imaging Diagnostic Systems、フロリダ州Plantation)、[10]DYNOTTM(NIRx Medical Technologies、ニューヨーク州Glen Head)、ならびに[11]Berthold Technologies(ドイツ)によるNight Owlイメージングシステムにおいて使用され得る。

#### 【0104】

このようなシステムでは、様々な光検出/画像記録構成要素、例えば電荷結合素子(CCD)システムまたは写真フィルムを使用することができる。光検出/画像記録の選択は、使用される集光/画像形成構成要素のタイプを含む因子に応じて決まる。しかし、適切な構成要素の選択、光学イメージングシステムへの構成要素の組入れ、およびシステムの操作は、当技術分野の通常の技術の範囲内であると理解される。

#### 【0105】

光学イメージングおよび測定技術として、蛍光イメージング、ルミネッセンスイメージング、内視鏡検査、蛍光内視鏡検査、光干渉断層計、透過イメージング、時間分解透過イメージング、共焦点イメージング、非線形顕微鏡法、光音響イメージング、音響光学型イメージング、分光法、反射分光法、生体内イメージング、二光子イメージング、干渉法、

コヒーレンス干渉法、拡散光学断層撮影法、および蛍光分子断層撮影法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0106】

注射の蛍光色素化合物は、固体支持体、例えば粒子にカップリングされるか、またはそれらの内部に組み込まれ得ることが企図される。したがって、蛍光色素化合物は、蛍光性でもある粒子を生成するために、磁気特性を有する金属酸化物ナノ粒子にカップリングされ得ると理解される。したがって、得られた粒子は、当技術分野で公知の技術を使用して、MRIイメージングで使用されてもよい。MRI技術の総説については、Westbrook、Handbook of MRI Technique、第2版、1999年、Blackwell Science参照。例えば、蛍光性分子断層撮影法および磁気共鳴イメージングによって得られた画像が、互いに位置合わせされるか(c o - r e g i s t e r)または融合されて、画像化される項目に関する追加の情報を提供し得ることは可能である。さらに、多重様式のイメージングシステム(すなわち、光学およびMRIイメージングシステムを組み合わせたもの)を使用して、組み合わせられた光学的MR画像を作り出すことができる。

10

【0107】

さらに、本発明の組成物および方法は、他のイメージング組成物および方法と組み合わせて使用され得る。例えば、本発明の蛍光色素化合物は、単独で、または他の従来のイメージング様式、例えばX線、コンピュータ断層撮影法(CT)、MRイメージング、超音波、陽電子放出断層撮影法(PET)、および単光子コンピュータ断層撮影法(SPECT)と組み合わせて、光学イメージングプロトコルを介して目的の領域を画像化するために使用され得る。例えば、本発明の組成物および方法を、CTまたはMRイメージングと組み合わせて使用して、例えば別のイメージング様式によって生成された画像を位置合わせすることによって、解剖学的および分子的情報の両方を同時に得ることができる。本発明の組成物および方法は、X線、CT、PET、超音波、SPECT、MRおよび他の光学コントラスト剤と組み合わせて使用されてもよいが、または代わりに本発明の蛍光色素化合物は、光学イメージングと組み合わせてCT、PET、SPECTおよびMRイメージング様式を使用して検出することができる、ヨウ素、ガドリニウム原子および放射性同位元素などの造影剤を含有することもできる。

20

【0108】

i n v i v o 光学イメージングの例示的な方法は、(a)対象、例えばヒトまたは動物に、本発明の蛍光性化合物を投与するステップと、(b)蛍光色素化合物が対象内に分布するか、または生物学的標的と接触もしくは相互作用するのに十分な時間を設けるステップと、(c)対象を、電磁放射線、例えば蛍光色素化合物によって吸収可能な波長の光に曝露するステップと、(d)蛍光色素化合物によって放出された光学シグナルを検出するステップとを含む。

30

【0109】

対象は、脊椎動物、例えばヒトを含む哺乳動物であり得ると理解される。また動物は、非脊椎動物(例えば、C . e l e g a n s、D r o s o p h i l aまたは他のモデル研究生物等)であってもよい。生物学的標的として、細胞、細胞培養物、組織、組織切片、臓器、臓器切片、サイトスピン試料、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質等を挙げることができるが、これらに限定されない。

40

【0110】

例えばステップ(a)~(d)を含む上述のステップは、所定の時間間隔で反復され得、それによって対象において放出された蛍光色素化合物のシグナルの経時的な評価を可能にし得る。照射および検出ステップ(それぞれステップ(c)および(d))は、平面イメージングシステム、内視鏡、カテテル、断層撮影システム、手持ち式の光学イメージングシステム、ゴーグル、または術中顕微鏡を使用して実施され得る。蛍光色素化合物によって放出されたシグナルは、画像、例えば断層画像を構築するために使用され得る。

【0111】

50

これらのステップの前または最中に、検出システムは、対象から放出された光学的および/または他のシグナル（例えばMR、核、X線）を検出するために、対象（例えば動物またはヒト）の周りまたはその近傍に位置することができる。放出された光学的および/または他のシグナルは、画像、例えば断層画像または平面画像を構築するために処理され得る。さらに、処理されたシグナルは、単独で、または融合（組み合わせられた）画像のいずれかの画像として表示され得る。

#### 【0112】

さらに、一つまたは複数の造影剤を選択的に検出し、同時に画像化する *in vivo* イメージング方法を実施することが可能である。このような手法では、例えば前述のステップ（a）において、シグナル特性が互いに識別可能な2種類またはそれより多くの種類の造影剤が、同時または連続的に対象に投与され、造影剤の少なくとも一つは、本発明の蛍光色素化合物を含有する。複数の剤を使用すると、複数の生物学的プロセス、機能または標的の記録が可能になる。

10

#### 【0113】

本発明はまた、標識された細胞が対象に投与される *in vivo* イメージング方法を特色とする。細胞は、*ex vivo* で蛍光色素化合物により標識することができる。細胞は、対象に直接由来してもよく、別の供給源（例えば、別の対象、細胞培養物等）に由来してもよい。蛍光色素化合物は、細胞と混合されて、細胞を有効に標識することができ、得られた標識細胞はステップ（a）で対象に投与されて生じる標識細胞を有効に標識することができる。次に、ステップ（b）～（d）を下記の通りに行う。この方法は、T細胞、腫瘍細胞、免疫細胞および幹細胞を含む特定の細胞型、ならびに他の細胞型の輸送および局在をモニタするために使用され得る。特に、この方法は、細胞ベースの治療をモニタするために使用され得る。

20

#### 【0114】

蛍光色素化合物の製剤化、投与方法の選択、対象に投与される蛍光色素化合物の投薬量、および蛍光色素化合物の投与と光（および、その環境下で適切な場合、他の形態の電磁放射線も）へのそれらの曝露との間のタイミングは、当技術分野の技術レベルの範囲内であると理解される。

#### 【0115】

本発明の方法は、対象における蛍光色素化合物の局在を経時的に追跡するか、または対象における蛍光色素化合物の代謝および/もしくは排泄の変化もしくは変質を経時的に評価することを含み、いくつかの兆候を決定するために使用され得る。上記方法はまた、限定されるものではないが、有効性、最適なタイミング、最適な投与レベル（個々の患者または試験対象に合わせることを含む）、および治療の組合せの相乗効果を決定することを含めて、このような治療によってモジュレートされた分子的事象および生物学的経路を画像化することによって、このような疾患の治療の次に来るように使用されてもよい。

30

#### 【0116】

本発明の方法および組成物はまた、医師または外科医が、疾患領域、例えば関節炎、がん、特に結腸ポリープ、または脆弱もしくは不安定なプラークを同定し、特徴付けて、疾患状態の組織と通常の組織を識別する（例えば、通常の手術用顕微鏡を使用して検出することが困難な腫瘍境界を検出すること）のを助ける、例えば、脳外科手術において、例えば病変ががん性であり除去されるべきかもしくは非がん性であり静置されるべきかを決定することによる、または疾患の外科的ステージ分類（例えば、術中のリンパ節のステージ分類、センチネルリンパ節マッピング、もしくは術中出血の評価）における治療的もしくは外科的介入の決定を助けるためか、または腫瘍境界を描くために使用され得る。

40

#### 【0117】

本発明の方法および組成物はまた、疾患、特に初期疾患の局在、疾患もしくは疾患関連状態の重症度、疾患のステージ分類の検出、特徴付けおよび/もしくは決定、ならびに/または疾患のモニタリングに使用され得る。放出されたシグナルの存在、非存在またはレベルは、病状を示し得る。本発明の方法および組成物はまた、様々な治療介入、例えば外

50



科手順をモニタおよび／または案内し、細胞ベースの治療を含む薬物治療をモニタするために使用され得る。本発明の方法はまた、疾患または疾患状態の予後において使用され得る。

#### 【0118】

前述のそれぞれに関して、（治療の前、最中または後に）検出またはモニタされ得るこのような疾患または疾患状態の例として、例えば、炎症（例えば、関節炎によって引き起こされた炎症、例えば関節リウマチ）、がん（例えば、結腸直腸、卵巣、肺、乳房、前立腺、子宮頸部、精巣、皮膚、脳、胃腸管、脾臓、肝臓、腎臓、膀胱、胃、白血病、口、食道、骨）、心血管疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症および血管の炎症状態、虚血、脳卒中、血栓症、播種性血管内凝固）、皮膚疾患（例えば、カポジ肉腫、乾癬、アレルギー性皮膚炎）、眼疾患（例えば、黄斑変性症、糖尿病性網膜症）、感染性疾患（例えば、後天性免疫不全症候群、マラリア、シャーガス病、住血吸虫症を含む、細菌、ウイルス、真菌および寄生虫の感染症）、免疫疾患（例えば、自己免疫性障害、リンパ腫、多発性硬化症、関節リウマチ、真性糖尿病、紅斑性狼瘡（*lupus erythematosus*）、重症筋無力症、グレーブス病）、中枢神経系疾患（例えば神経変性疾患、例えばパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病）、遺伝性疾患、代謝性疾患、環境疾患（例えば、鉛、水銀および放射能の中毒症、皮膚がん）、骨に関係する疾患（例えば、骨粗鬆症、原発性および転移性骨腫瘍、変形性関節症）、神経変性疾患、および外科手術に関係する合併症（例えば、移植片拒絶、臓器拒絶反応、創傷治癒の変質、線維症、または外科的移植に関係する他の合併症）が挙げられる。

#### 【0119】

したがって、本発明の方法および組成物は、例えば、腫瘍細胞の存在および／または局在、例えばアテローム性動脈硬化症または関節炎における活性化マクロファージの存在を含む、炎症の存在および／または局在、冠動脈および末梢動脈において急性閉塞の危険性がある領域（すなわち、脆弱なプラーク）、拡大動脈瘤の領域、頸動脈の不安定なプラークおよび虚血領域を含む、血管疾患の存在および局在を決定するために使用され得る。本発明の開示の方法は、例えばアポトーシス、壊死、低酸素症および血管新生の同定および評価において使用され得る。あるいは、開示の方法はまた、例えば治療用化合物または治療で処置する前、および処置した後の対象を画像化し、対応する画像を比較することによって、特定の分子標的に対する治療用化合物または治療の効果を評価するために使用され得る。

#### 【0120】

##### （b）*in vitro*での用途

さらに、蛍光色素化合物は、様々な*in vitro*アッセイ、例えば結合実験および*in vitro*イメージング実験でもまた使用され得ると理解される。先のセクションで論じたイメージング技術は、*in vitro*イメージング実験にも利用できると理解される。

#### 【0121】

例示的な*in vitro*イメージング方法は、（a）試料を、本発明の蛍光色素化合物を含むプローブと接触させるステップと、（b）蛍光色素化合物を、（i）生物学的標的によって活性化し、かつ／または（ii）生物学的標的に結合させるステップと、（c）任意選択により、活性化していないかまたは結合していない蛍光色素化合物を除去するステップと、（d）試料を、蛍光色素化合物によって吸収可能な波長の電磁放射線、例えば光に曝露するステップと、（e）蛍光色素化合物から放出されたシグナルを検出し、それによってプローブが生物学的標的によって活性化されたか、または結合されたかを決定するステップとを含む。

#### 【0122】

試料は、例えば初代細胞、細胞培養物または組織を含有する液体または固体試料であり得る。生物学的標的は、例えば細胞、細胞凝集体、組織もしくは組織試料、構造（マクロセルレベル（例えば、骨または組織）または細胞内レベル（例えば、ミトコンドリアまた

は核)の両方)、および細胞成分、例えばタンパク質(例えば、酵素または構造的タンパク質)、脂質、核酸または多糖であり得る。

#### 【0123】

蛍光色素化合物は、様々な*in vitro*リガンド結合アッセイで使用され得、したがって磁気粒子に組み込まれると、磁気検出ベースのアッセイにおいて使用され得る(米国特許第6,046,585号および同第6,275,031号、米国特許第5,445,970号、米国特許第4,219,335号、Chemlaら(2000年)Proc Natl Acad Sci USA 97巻、14268~72頁参照)。また蛍光色素化合物は、米国特許第5,164,297号およびPerezらNature Biotechnol. 2002年、20巻(8号):816~20頁に記載のものなどの磁気共鳴ベースのリガンド結合アッセイにおいて使用され得る。蛍光色素化合物は、細胞選別および計数用途で使用されてもよい。

10

#### 【0124】

蛍光色素化合物はまた、核酸ベースのアッセイにおいてレポーター基として使用され得る。例えば、蛍光色素化合物は、ハイブリダイゼーションアッセイ、例えば*in situ*ハイブリダイゼーションアッセイ、配列決定反応、増幅反応、例えばリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応増幅反応において使用するために、核酸、例えばDNAまたはRNA、修飾核酸、PNA、分子ビーコン、または他の核酸結合分子(例えば、低分子干渉RNAすなわち*siRNA*)とカップリングさせられ得る。例えば、核酸ハイブリダイゼーション原則によって、試料中の一本鎖核酸(すなわち、mRNA、cDNAまたは変性二本鎖DNA)を検出するために、本発明の蛍光色素化合物を、一本鎖核酸(プローブ)に化学的に連結させ、一つまたは複数の一本鎖核酸(標的核酸)を含有すると疑われる試料と接触させ、任意選択により固体支持体上に固定する。プローブは、プローブが試料中の標的核酸にハイブリダイズして二本鎖を形成することを可能にする条件下で、試料と共にインキュベートされる。非結合プローブは、洗浄によって除去され得、結合したプローブは検出され得、プローブ中の蛍光色素化合物によって放出された蛍光の存在またはレベルは、試料中の標的核酸の存在または量を示す。

20

#### 【0125】

##### (c) *ex vivo*での用途

さらに、蛍光色素化合物は、様々な*ex vivo*アッセイ、例えば結合実験、および*ex vivo*イメージング実験で使用され得ると理解される。先のセクションで論じたイメージング技術は、*ex vivo*イメージング実験にも利用できると理解される。

30

#### 【0126】

例示的な*ex vivo*イメージング方法は、(a)試料を、本発明の蛍光色素化合物を含むプローブと接触させるステップと、(b)蛍光色素化合物を、(i)生物学的標的によって活性化し、かつ/または(ii)生物学的標的に結合させるステップと、(c)任意選択により、活性化していないかまたは結合していない蛍光色素化合物を除去するステップと、(d)試料を、蛍光色素化合物によって吸収可能な波長の電磁放射線、例えば光に曝露するステップと、(e)蛍光色素化合物から放出されたシグナルを検出し、それによってプローブが生物学的標的によって活性化されたか、または結合されたかを決定するステップとを含む。

40

#### 【0127】

試料は、例えば初代細胞、細胞培養物または組織を含有する液体試料または固体試料であり得る。生物学的標的は、例えば細胞、細胞凝集体、組織もしくは組織試料、構造物(マクロセルレベル(例えば、骨臓器または組織)または細胞内レベル(例えば、ミトコンドリアまたは核))の両方、および細胞成分、例えばタンパク質(例えば、酵素または構造的タンパク質)、脂質、核酸または多糖であり得る。

#### 【0128】

ここで本発明を、単に例示する目的で示され、本発明の範囲を制限するものではない以下の実施例を用いて例示する。

50

## 【実施例】

## 【0129】

本発明の化合物の調製に使用できる代表的な材料および方法を、以下にさらに記載する。あらゆる市販の化学薬品および溶媒（試薬グレード）は、一般に、さらなる精製なしに供給されたまま使用される。分析および分取HPLC法は、以下を含む。

A カラム：Agilent Zorbax 80、Extend C18、4.6 × 250 mm (5 μm)。

移動相：アセトニトリル、25 mM 酢酸トリエチルアンモニウム。

B カラム：Varian Dynamax、100、C18、4.1 × 250 mm。

移動相：アセトニトリル、25 mM 酢酸トリエチルアンモニウム。

C カラム：Phenomenex Jupiter、300、C18

移動相：アセトニトリル、25 mM 酢酸トリエチルアンモニウム。

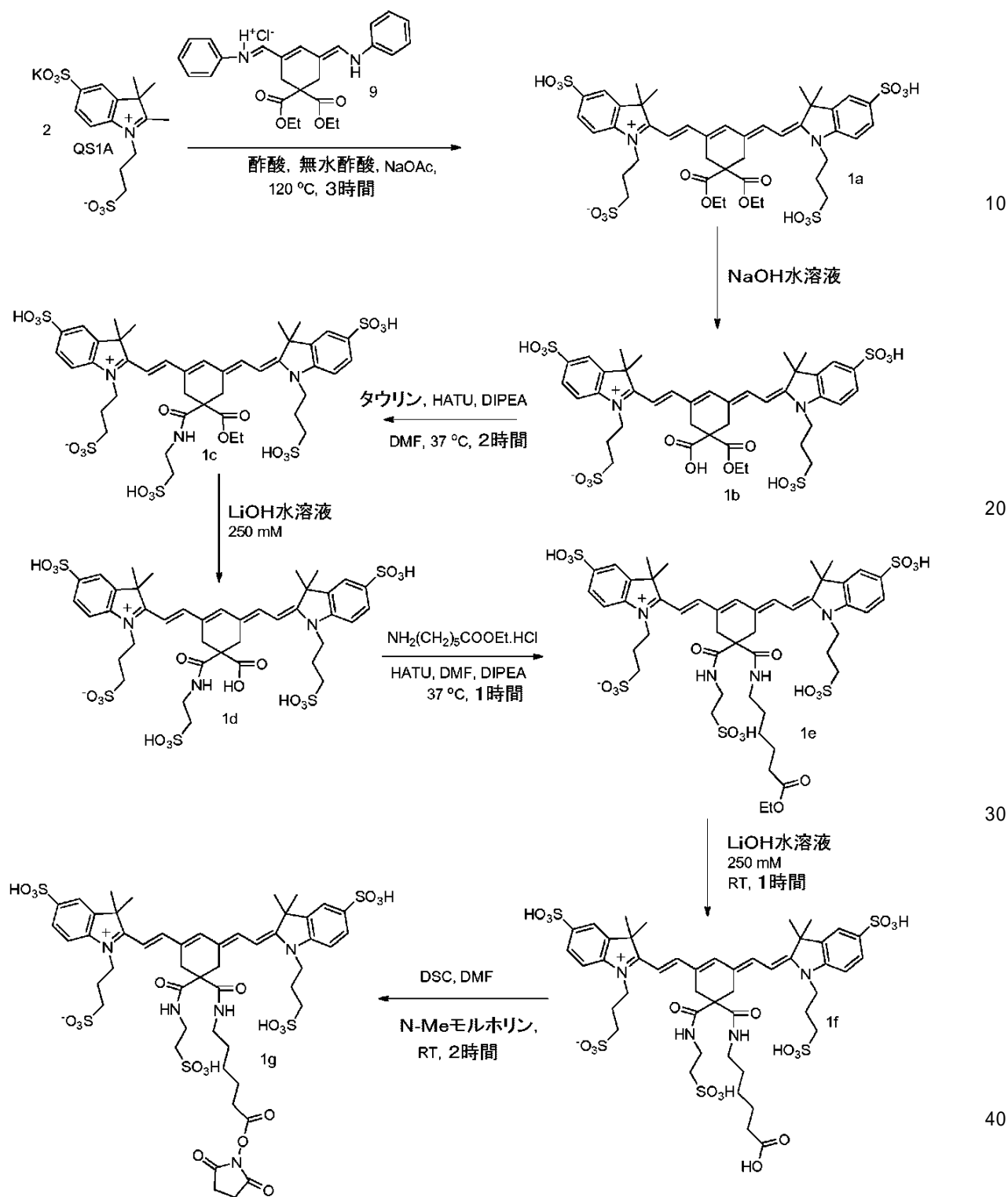
## 【0130】

（実施例1）化合物1 g の合成

式1の反応性N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHSE）としての化合物1 g の合成を、以下のスキーム3Aに図示した複数ステップの合成手順によって達成した。

## 【化 3 1】

スキーム3A. 対称性インドリニウム親水性色素の合成



## 【0131】

QS1Aの調製: 5-スルホ-2,3,3-トリメチルインドレニン(indolinine)を、カリウム塩(1)として、Syntharo Fine Chemicals、ドイツから得た。110のオープンで最短3時間乾燥させたインドレニン(化合物1)10gを、100mLの丸底フラスコ中で、常に磁気により攪拌しながら120の油浴で8時間加熱することによって、N-メチルピロリジノン(Aldrich)10mL中1.5当量の1,3-プロパンスルトン(TCI America)と反応させた。

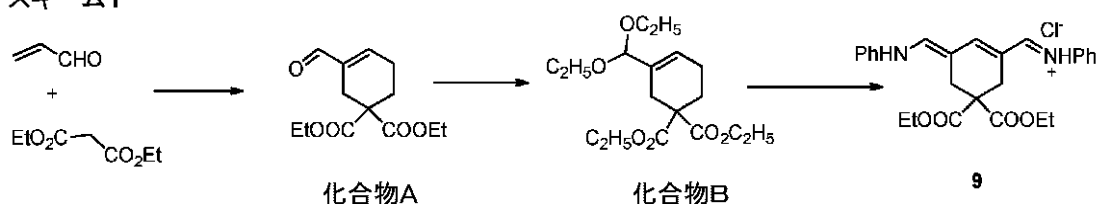
黄色反応混合物が濃い紫色に変わり、生成物が溶液から沈殿した。室温に冷却した後、酢酸エチルを反応混合物 (RM) に添加し、5 分間超音波処理した。沈殿物を濾過し、酢酸エチル (EA) - メタノールの 90% ~ 10% 混合物約 100 mL で 3 回洗浄し、次に真空下で 4 時間乾燥させた。収率 90% で得られた第四級塩 QS1A を、LCMS によって特徴付けた ( $m/e$  算出値: 361 (遊離スルホン酸として); 実測値: 361 ( $M+1$ ))。

#### 【0132】

ビスアニル (bisani1) 9 の調製: 化合物 9 を、米国特許第 5876915 号 (1999 年 3 月 2 日付け) に記載の Derover らの手順に従って、以下のスキームに示されている通り、三つのステップで調製した。中間体 A および B を、蒸留によって単離して、それぞれ 13 g および 10 g を得た。化合物 B を、ビルスマイヤー反応によって化合物 9 に変換し、生成物を、濾過し、真空下で終夜乾燥させることによって、暗赤色固体として単離した。

#### 【化32】

スキーム 1



#### 【0133】

化合物 1a の調製: 化合物 9 (100 mg、0.214 mmol) および化合物 QS1A (171 mg、0.418 mmol) を、酢酸 2.5 mL および無水酢酸 7.5 mL で混合した。2 分間超音波処理した後、酢酸ナトリウム 35 mg を添加し、混合物を 120 で攪拌しながら 4 時間加熱した。酢酸エチル (25 mL) を添加し、固体を遠心分離し、それを追加の EA 5 mL で洗浄し、遠心分離し、固体を speed vac で 30 分間乾燥させた。粗製色素を、HPLC によって、逆相 (RP) C18 カラムにより、10 ~ 50% 重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB) - アセトニトリル (ACN) 系を使用して精製した。精製した生成物を、LCMS によって特徴付けた。質量算出値: 968.2 (遊離スルホン酸として); 質量実測値: 969.2 ( $M+1$ ); 収率: 50%。

#### 【0134】

1b の調製: 蒸留水 0.8 mL に溶解させた 50 mg の精製化合物 1a に、1 M 水酸化ナトリウム 0.8 mL を添加し、反応混合物を暗室内で室温において回転させた。90 分後、50% 酢酸水溶液 1 mL を添加した。薄黄色反応混合物は、酸性化すると緑青色に変わった。それを、RPC18 カラムにより、10 ~ 50% TEAB - ACN 系を使用して精製した。純粋な生成物は、LCMS によって一酸エステルであることが同定された。質量算出値: 940.2 (遊離スルホン酸として); 質量実測値: 941.1 ( $M+1$ ); 吸収 749 nm; 発光 771 nm; 240,000 ( $1 \times PBS$ ); 収率 80%。

#### 【0135】

1c の調製: 40 mg の乾燥させた化合物 1b を、2 mL のポリプロピレン遠心分離管中、乾燥 DMF 0.5 mL に溶解させた。HATU 25 mg、2-アミノエタンスルホン酸 (タウリン) 25 mg および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (diisopropylethylamine) (DIPEA) 25  $\mu$ L を添加し、37 で 1 時間反応させた。反応の完了は、LCMS によって示された。粗製反応混合物を 25% 酢酸水溶液 2 mL で希釈し、RPC18 カラムにより、10 ~ 40% 酢酸トリエチルアンモニウム (TEAAc, pH 6.6) - ACN 系を使用して精製した。質量算出値: 1047.2 (遊離スルホン酸として); 質量実測値: 1048.1 ( $M+1$ )。吸収極大: 水中 749 nm。収率: 70%。

#### 【0136】

1 d の調製：30 mg の化合物 1 c を、250 mM 水酸化リチウム溶液で室温において処理した。けん化は、2 時間で完了した。得られた酸生成物を、R P C 18 カラムによって、5 ~ 25 % T E A A c - A C N 系を使用して精製した。吸収極大：751 nm；発光極大：771 nm（水 / 1 x P B S 中）。質量算出値：1019.2（遊離スルホン酸として）；質量実測値：1020.1（M + 1）；収率：70 %

【0137】

1 e の調製：20 mg の乾燥させた化合物 1 d を、H A T U（20 mg）、エチル - 6 - アミノヘキサノエート塩酸塩（25 mg）および D I P E A（15  $\mu$ L）の D M F（500  $\mu$ L）中混合物と、37 °C で 45 分間反応させた。25 % 酢酸水溶液 1 mL で希釈した後、それを H P L C によって、R P C 18 カラムにより 10 ~ 40 % T E A A c - A C N 系を使用して精製した。質量算出値：1160.3（遊離スルホン酸として）；質量実測値：1161.2（M + 1）。吸収極大：751 nm；発光極大：771 nm（水 / 1 x P B S 中）。収率：75 %。

【0138】

1 f の調製：化合物 1 e を、250 mM 水酸化リチウム溶液で室温において処理した。けん化は、1 時間で完了した。得られた酸生成物を、H P L C によって、R P C 18 カラムにより 5 ~ 30 % T E A A c - A C N 系を使用して精製した。吸収極大：751 nm；発光極大：771 nm（水 / 1 x P B S 中）。質量算出値：1132.2（遊離スルホン酸として）；質量実測値：1133.3（M + 1）。収率：85 %。

【0139】

1 g の調製：5 mg の乾燥させた化合物 1 f に、ジスクシンイミジルジカーボネート（10 mg）を添加し、乾燥 D M F 250  $\mu$ L を添加し、その後 N - メチルモルホリン 5  $\mu$ L を添加した。N H S E エステルの形成は、ブチルアミンとの試験反応によって、および H P L C - L C M S により分析することによって明らかになる通り、約 2 時間で完了した。N H S E を、酢酸エチル中で沈殿させることによって単離し、s p e e d v a c により 60 分間乾燥させた。

【0140】

化合物 1 a ~ 1 g に関して先に記載した手順を、スキーム 3 B ~ 3 S で合成される化合物に対して使用する。

【0141】

第四級塩を調製するための一般手順

インドール、ベンゾインドール（benzindole）、ベンゾオキサゾールおよびベンゾチアゾール（benzthiazole）（化合物 2 ~ 5 および 10）の N - （プロパン - 3 - スルホネート）第四級塩を、スキームに示されている通り、1, 2 - ジクロロベンゼンまたは N - メチルピロリジノン（pyrrolidone）中、複素環（5 mmol）を 1, 3 - プロパンスルトン（7.5 mmol）と反応させることによって調製し、120 °C で攪拌しながら 8 時間加熱した。生成物は、常に固体として形成され、それを濾過によって単離し、適切な有機溶媒混合物（ヘキサンの後に酢酸エチル、または酢酸エチル）で洗浄した。それらを L C M S によって特徴付けた。

【0142】

同様に、化合物 1 ~ 5 および 10 の N - エチル第四級塩を、スキームに示されている通り、1, 2 - ジクロロベンゼンまたは N - メチルピロリジノン中、複素環（5 mmol）をヨウ化エチル（15 mmol）と反応させることによって調製し、120 °C で圧力管中、攪拌しながら 8 時間加熱した。生成物は、常に固体として形成され、それを濾過によって単離し、適切な有機溶媒混合物で洗浄した。1, 2 - ジクロロベンゼンを伴う反応については、ヘキサンの後に酢酸エチルを使用し、N - メチルピロリジノンを伴う反応については、酢酸エチルだけを使用した。生成物を、すべて L C M S によって特徴付けた。

【0143】

化合物 1 a ~ 1 g について先に記載した手順を、合成スキーム 3 B、3 C、3 D、3 E、3 F、3 G、3 H、3 I および 3 J に図示した化合物の合成に対して行う。

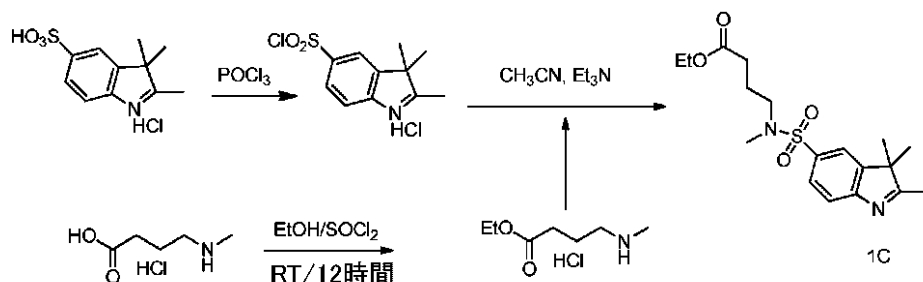
## 【 0 1 4 4 】

( 実施例 2 ) 非対称性色素の合成

Q S 1 C の調製

## 【 化 3 3 】

スキーム3K-1



10

## 【 0 1 4 5 】

10 mmol の化合物 1 ( 酸として ) を、 $\text{POCl}_3$  10 mL と共に加熱して、2 時間還流させた。冷却した反応混合物に、*n*-ヘキサン 25 mL を添加し、有機上清を安全に廃棄した。ゴム状の固体を、rotovap により真空下で数時間乾燥させて、残留オキシ塩化リンを除去した。スルホニルクロリド ( sulfonyl chloride ) を、次のステップでそのまま使用した。収率：99%。

20

## 【 0 1 4 6 】

50 mmol の 4 - ( *N* - メチル ) - アミノ酪酸塩酸塩を、無水エタノール 100 mL に溶解させ、塩化チオニル ( 55 mmol ) を室温で激しく攪拌しながら注意深く添加することによって、エチルエステルに変換した。反応を室温で 12 時間かけて進行させた。窒素を反応フラスコにフラッシュし、溶液中に 10 分間吹き込んだ。溶媒を rotovap によって除去し、得られた白色固体を、高真空下で 12 時間乾燥させた。

## 【 0 1 4 7 】

前述の通り得られたエチル ( 4 - ( *N* - メチル ) ) - アミノブチレート塩酸塩を、乾燥アセトニトリル 100 mL に溶解させ、5℃に冷却した。10 倍過剰のトリエチルアミンを添加し、激しく攪拌した。塩化スルホニルをアセトニトリル 30 mL に溶解させ、それを攪拌溶液に 10 分かけてゆっくり添加すると、その間に溶液が黄色に変わった。反応は 30 分間で完了し、それを室温まで温めた。白色トリエチルアミン塩酸塩を濾別し、冷却したアセトニトリルで洗浄した。濾液を濃縮し、残渣を、溶出のために 3% ACN - 94%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - 3% TEA 混合物を使用して、シリカゲルによるクロマトグラフで処理した。生成物 1C は、使用した溶出剤が 5% ACN - 92%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - 3% TEA だったとき溶出した。それを LCMS によって特徴付けた。収率：75%。

30

## 【 0 1 4 8 】

化合物 1C を、第四級塩の合成について記載した一般手順に従って、1, 2 - ジクロロベンゼンを溶媒として使用して、第四級塩 Q S 1 C に変換した。収率：75%

## 【 0 1 4 9 】

非対称性色素の合成のための一般手順：二つの異なる複素環から導出された二つの異なる第四級塩を使用する、非対称性色素の合成を伴うスキームでは、ビスアニル ( 化合物 9 )、二つの第四級塩を、それぞれ等モル量で使用したことを除き、化合物 1a について記載の手順に従った。その他はすべて本質的に同じであった。

40

## 【 0 1 5 0 】

( 実施例 3 ) B S A との化合物 1b のコンジュゲーション

B S A ( 44.4 nmol ) 3 mg を、0.4 M の M E S 緩衝液 1.5 mL、pH 5.3 に溶解させ、450 nmol の化合物 1b 水溶液 ( 10 mM おいて 45  $\mu\text{L}$  ) を添加し、その後 E D C 25 mg を添加した。混合物を、37℃で終夜 ( 18 時間 ) 静置した。反応混合物を水 5 mL で希釈し、2000 rpm で 30 分間遠心分離することによって、3

50

0 k D カットオフの A m i c o n U l t r a - 4、P L T K U l t a c e l - P L 膜フィルタを介して濾過した。濾液が無色になるまで、生成物を 1 × P B S 緩衝液で数回洗浄した。濃縮された生成物を定量化し、色素 / タンパク質の比を、次式によって決定した。

【数 1】

$$A_{\text{dye}} \epsilon_p / (A_{278} - c\% A_{\text{dye}}) \epsilon_{\text{dye}}$$

式中、 $A_{\text{dye}}$  は、750 nm における色素の吸収であり、 $\epsilon_p$  は、タンパク質 (B S A、43824) の消衰係数であり、 $A_{278}$  は、278 nm におけるタンパク質の吸収であり、 $c\% A_{\text{dye}}$  は、 $\epsilon_{\text{max}}$ 、750 nm (4%) における色素の吸収に関する 278 nm における吸収%であり、 $\epsilon_{\text{dye}}$  は、色素 (1 × P B S 中 240,000) の消衰係数である。また、生成物を、M A L D I (T u f t ' s U n i v e r s i t y C o r e F a c i l i t y、ボストン) によって特徴付け、色素の数を決定すると、B S A 一つ当たり 8.7 であった。B S A にコンジュゲートした化合物 1 b の蛍光および吸光度の決定の結果を、図 1 に示す。

スキーム

【0151】

第四級塩の合成のためのスキーム 1、シッフ塩基としての 4,4 - 二置換シクロヘキシルビスアルデヒドの合成のためのスキーム 2 および 2 A、ならびに様々な式の色素の合成のための 3 B ~ 3 T を、以下の頁に示す。

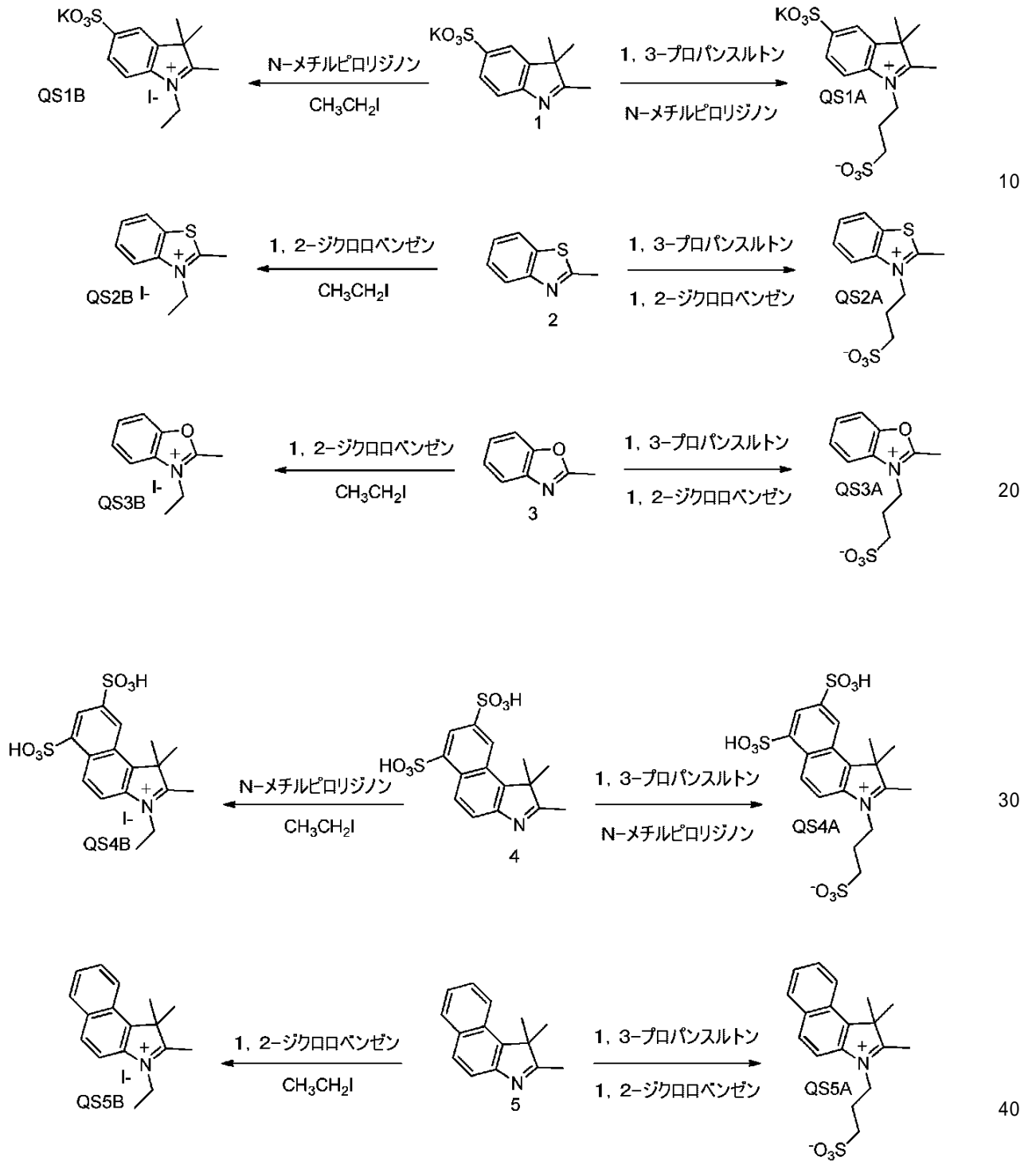
10

20

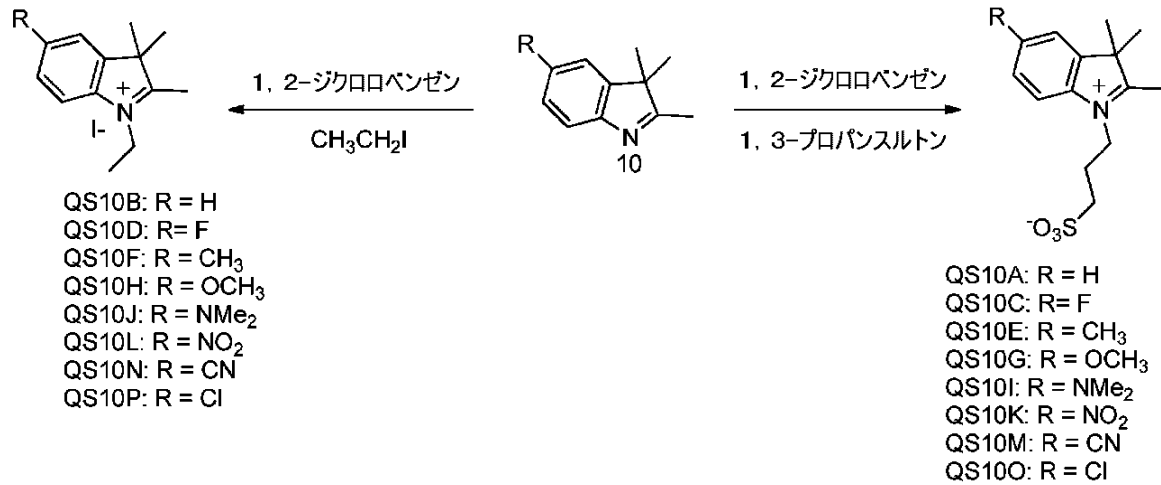


## 【化 3 4 - 1】

スキーム1. 第四級塩の調製



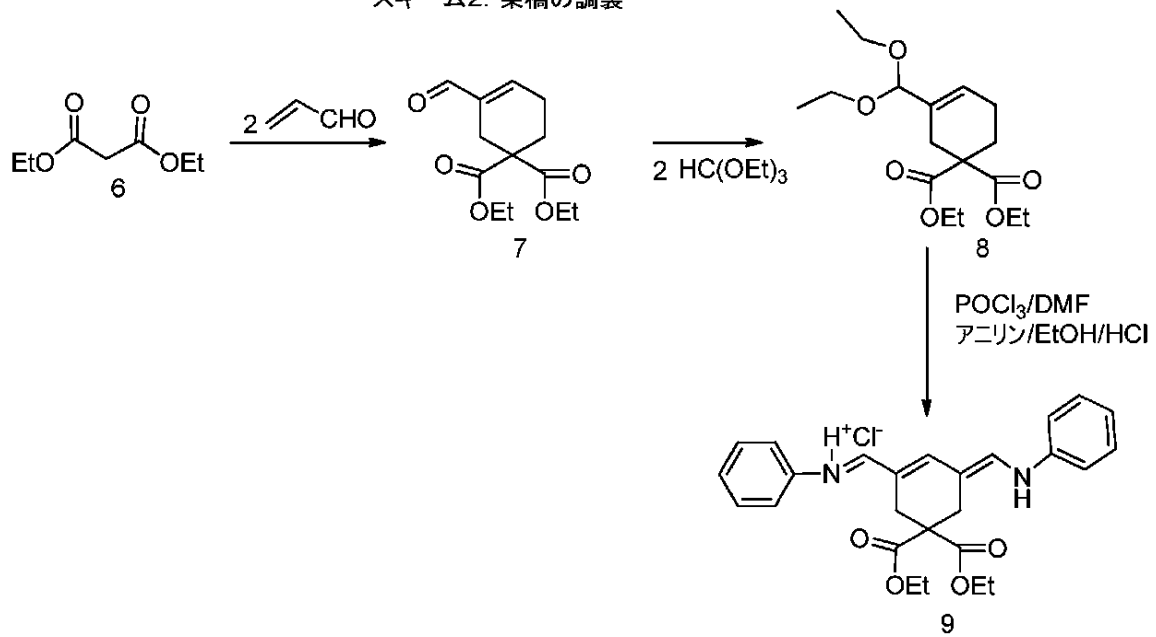
## 【化 3 4 - 2】



10

## 【化 3 5】

## スキーム2. 架橋の調製

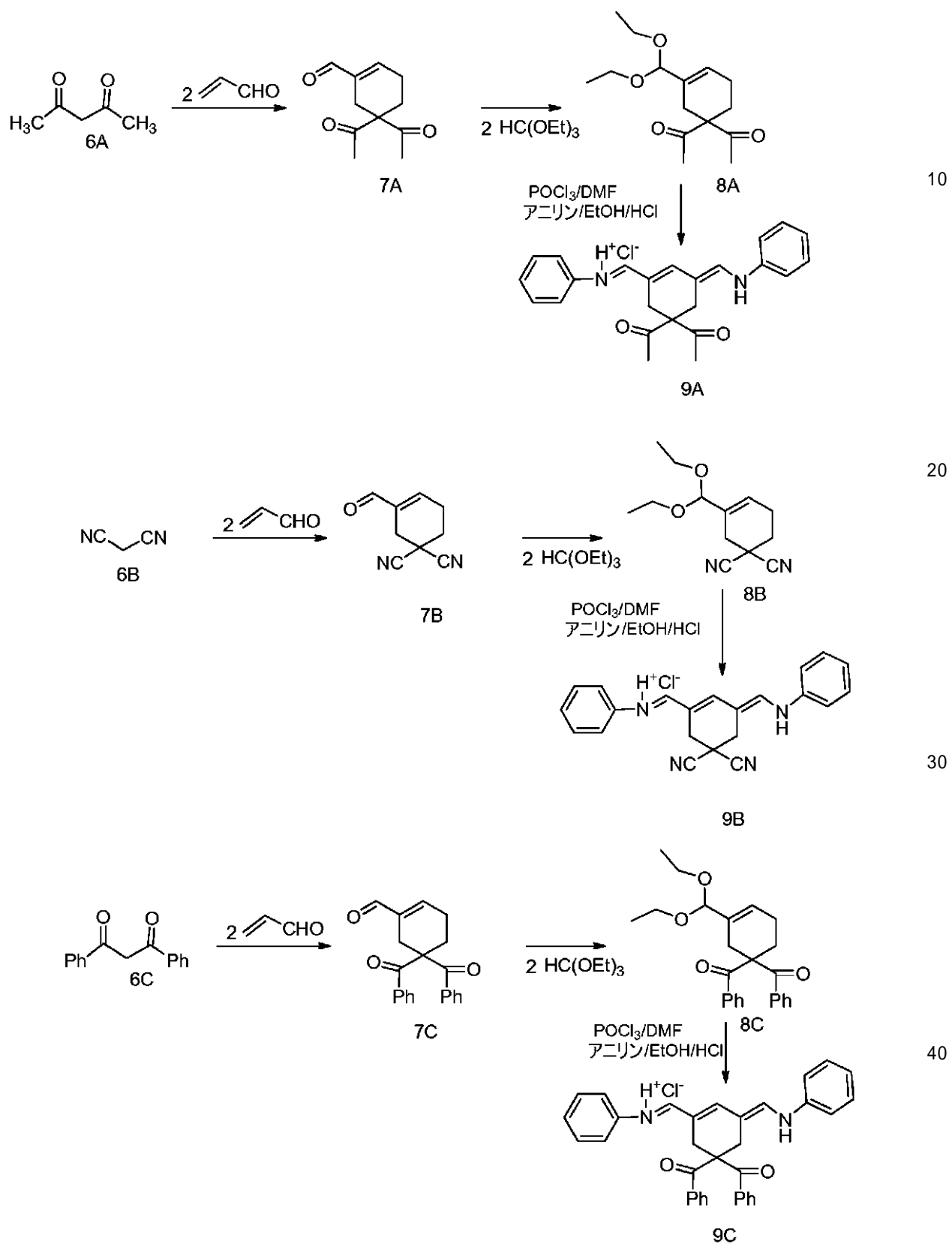


20

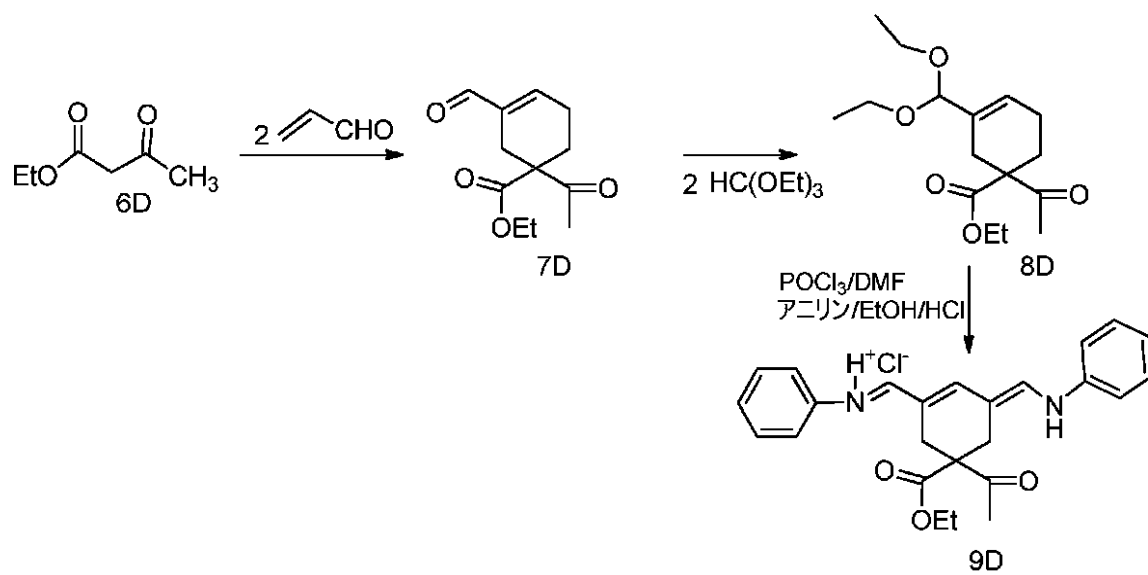
30

## 【化 3 6 - 1】

## スキーム2A. 架橋の調製

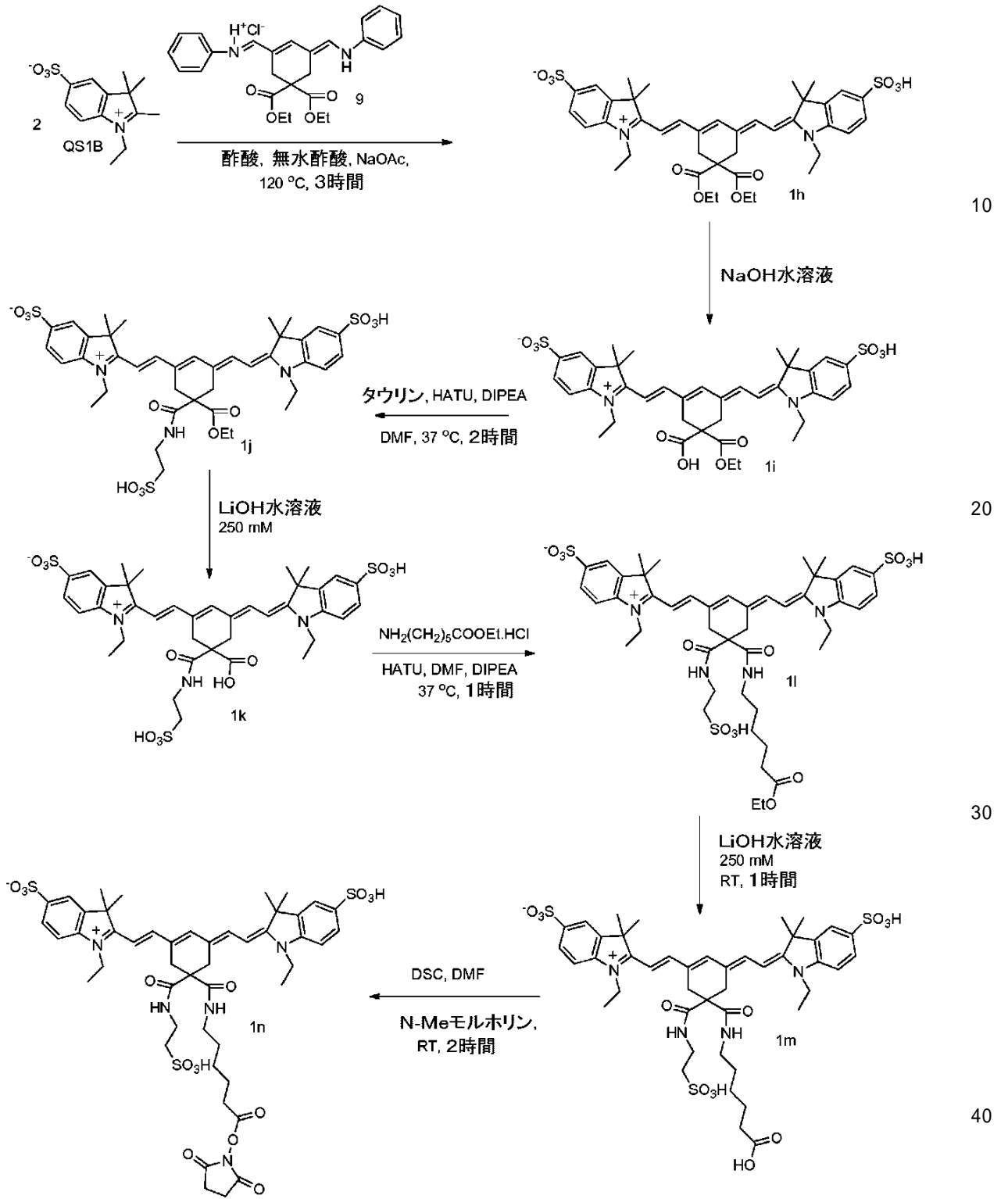


## 【化 3 6 - 2】



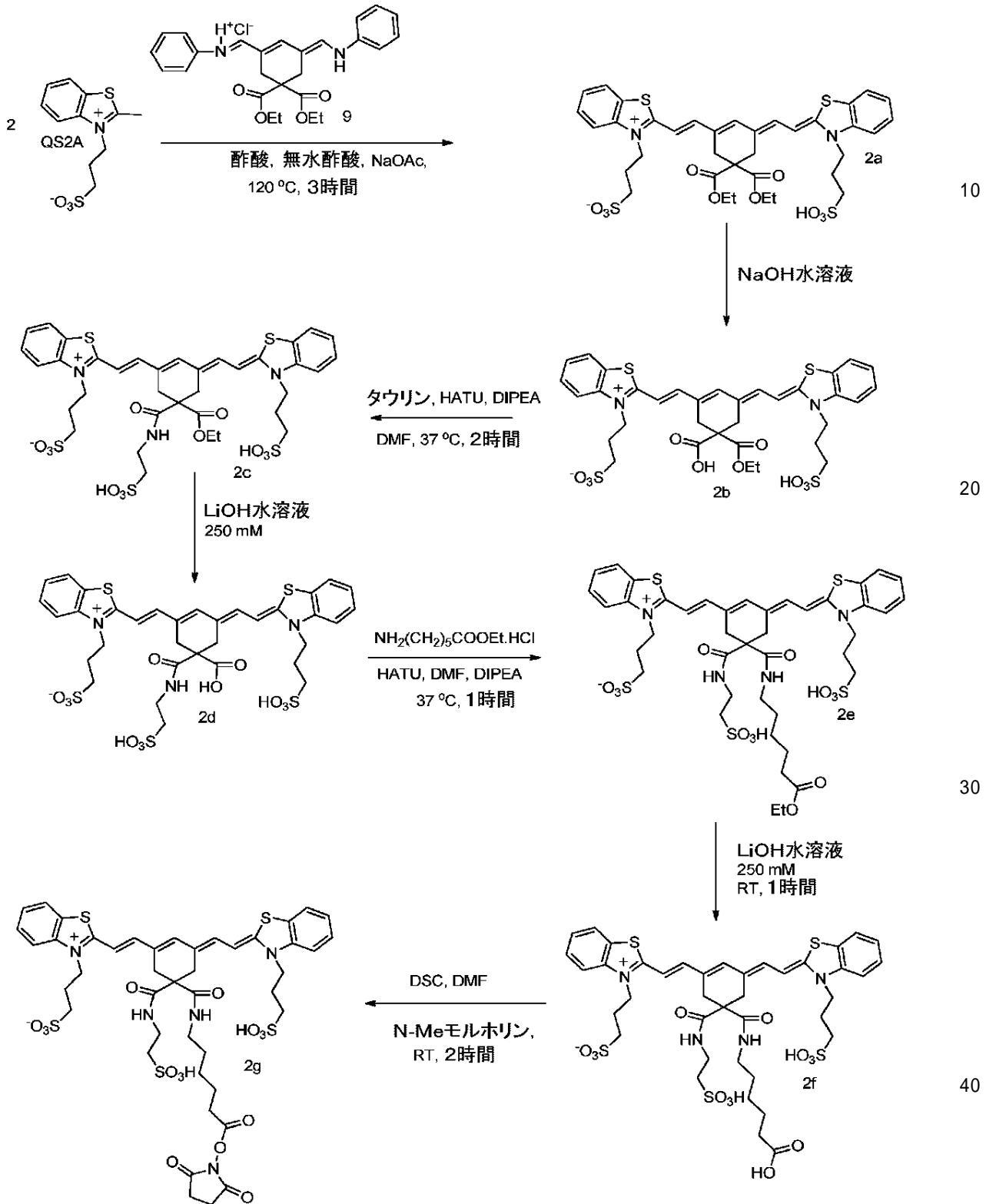
## 【化 3 7】

## スキーム3B. 対称性インドリニウム色素の合成



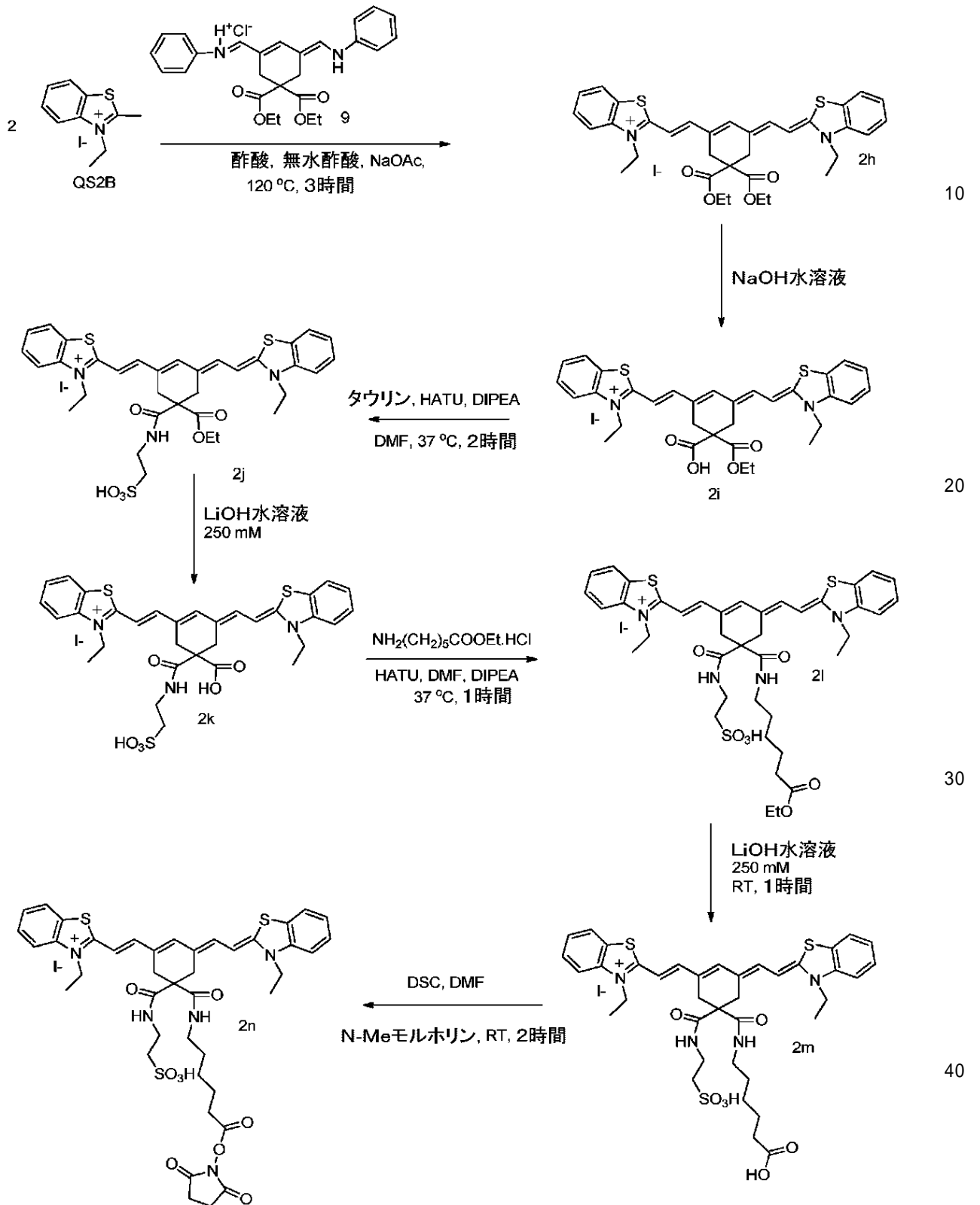
## 【化 3 8】

## スキーム3C. 対称性ベンゾチアゾリウム色素の合成



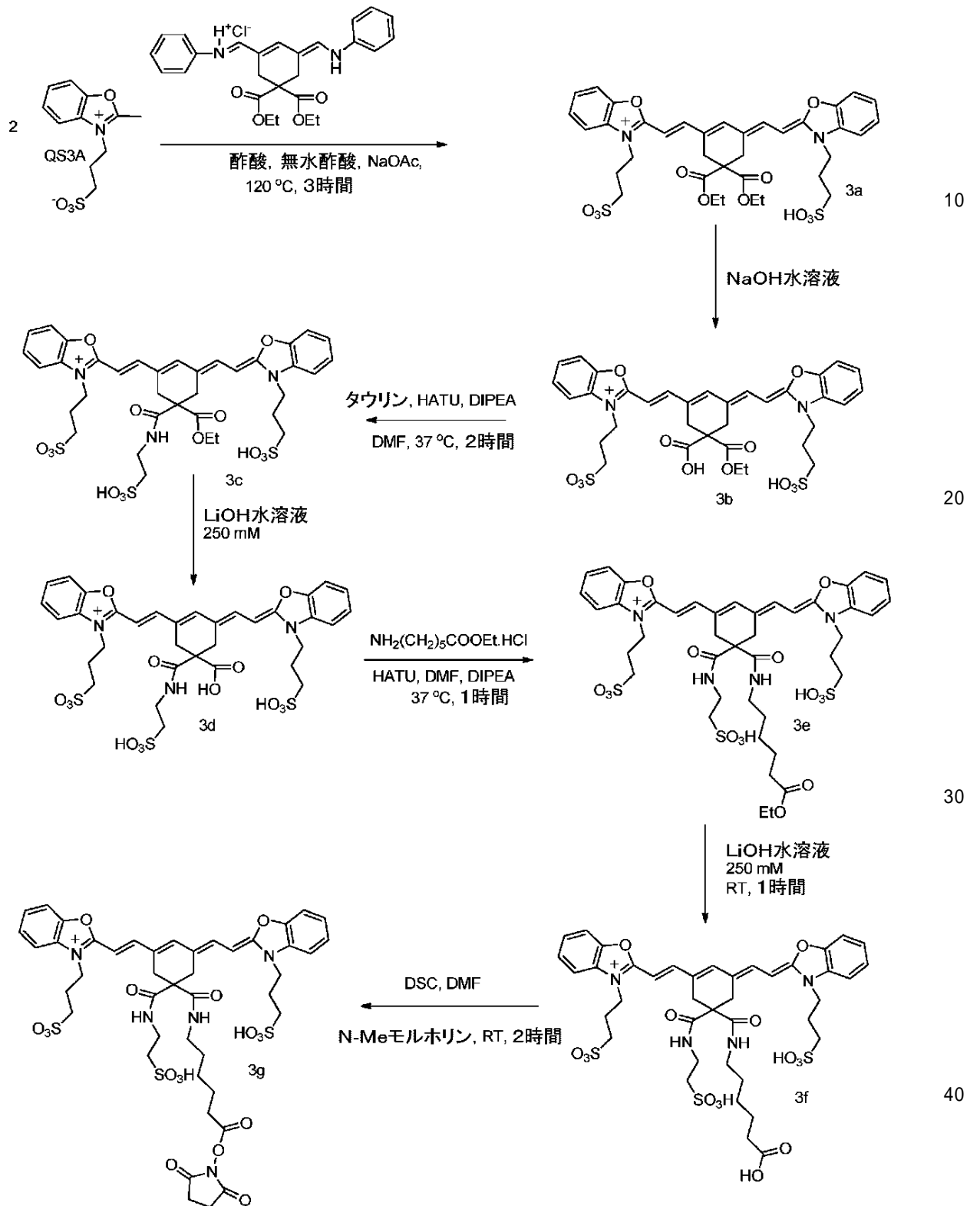
## 【化 3 9】

## スキーム3D. 対称性ベンゾチアゾリウム色素の合成



## 【化40】

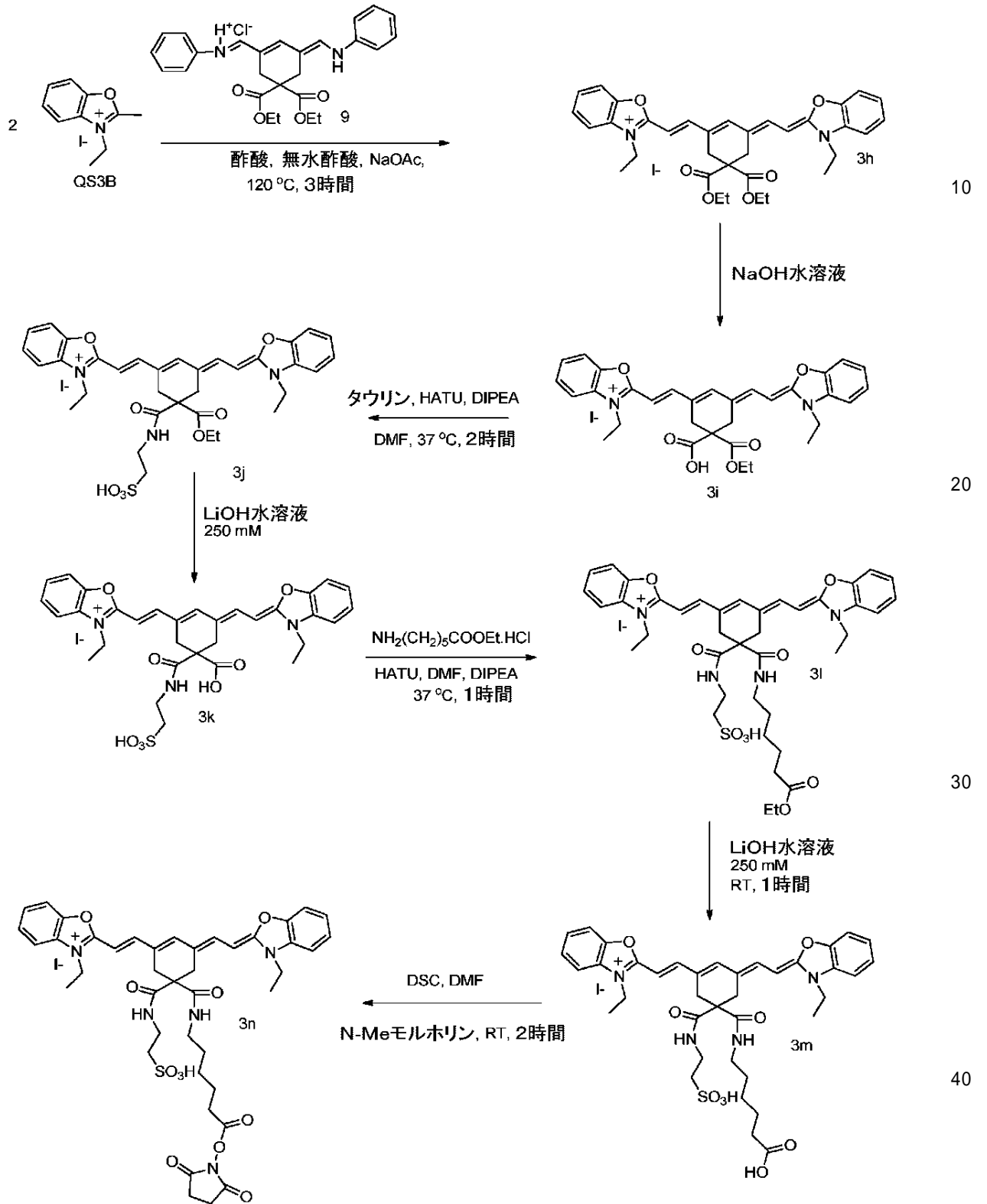
## スキーム3E. 対称性ベンゾオキサゾール色素の合成



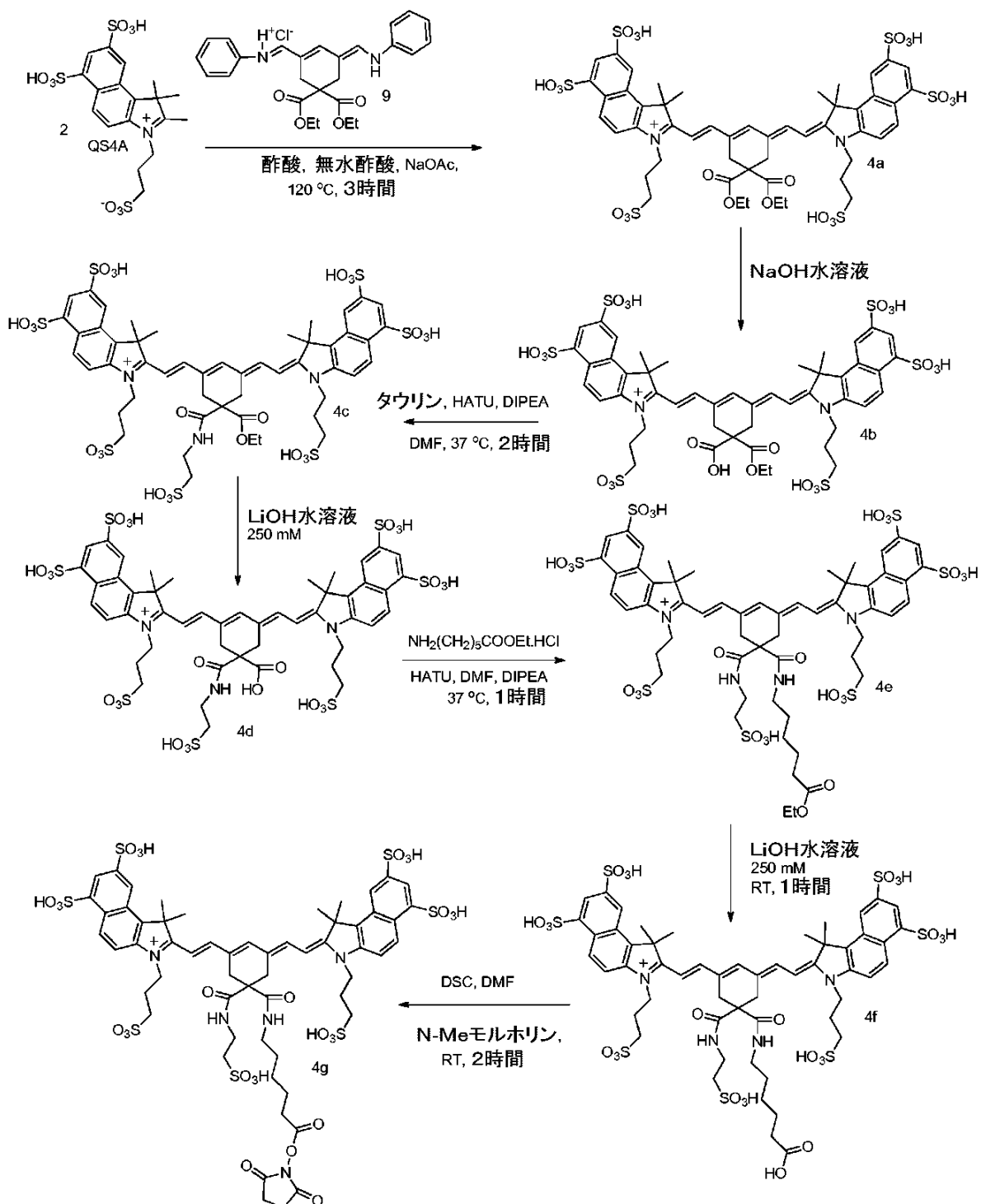


## 【化 4 1】

スキーム3F. 対称性ベンゾチアゾリウム色素の合成

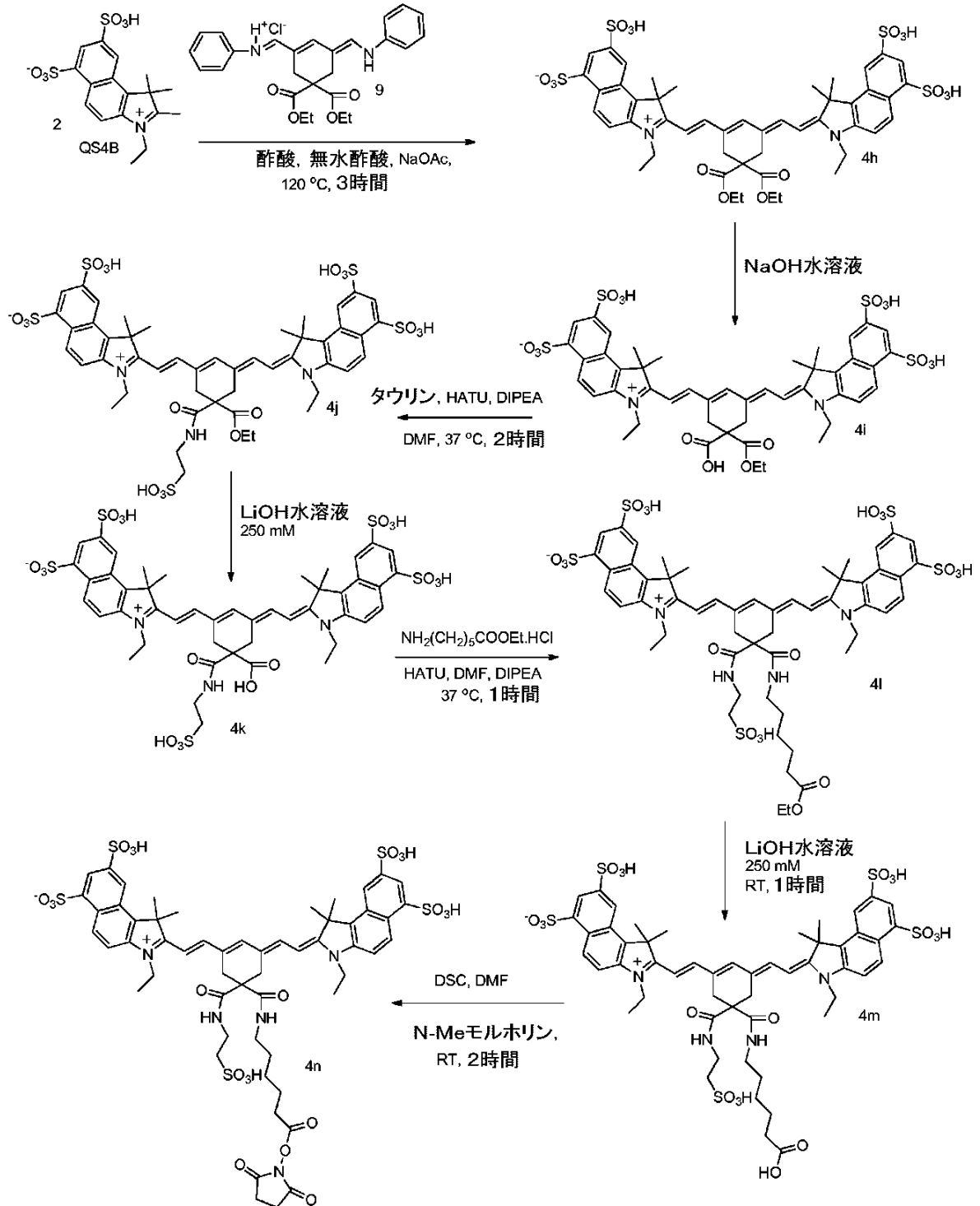


## スキーム3G. 対称性ベンゾインドール色素の合成



## 【化 4 3】

## スキーム3H. 対称性ベンゾインドール色素の合成



10

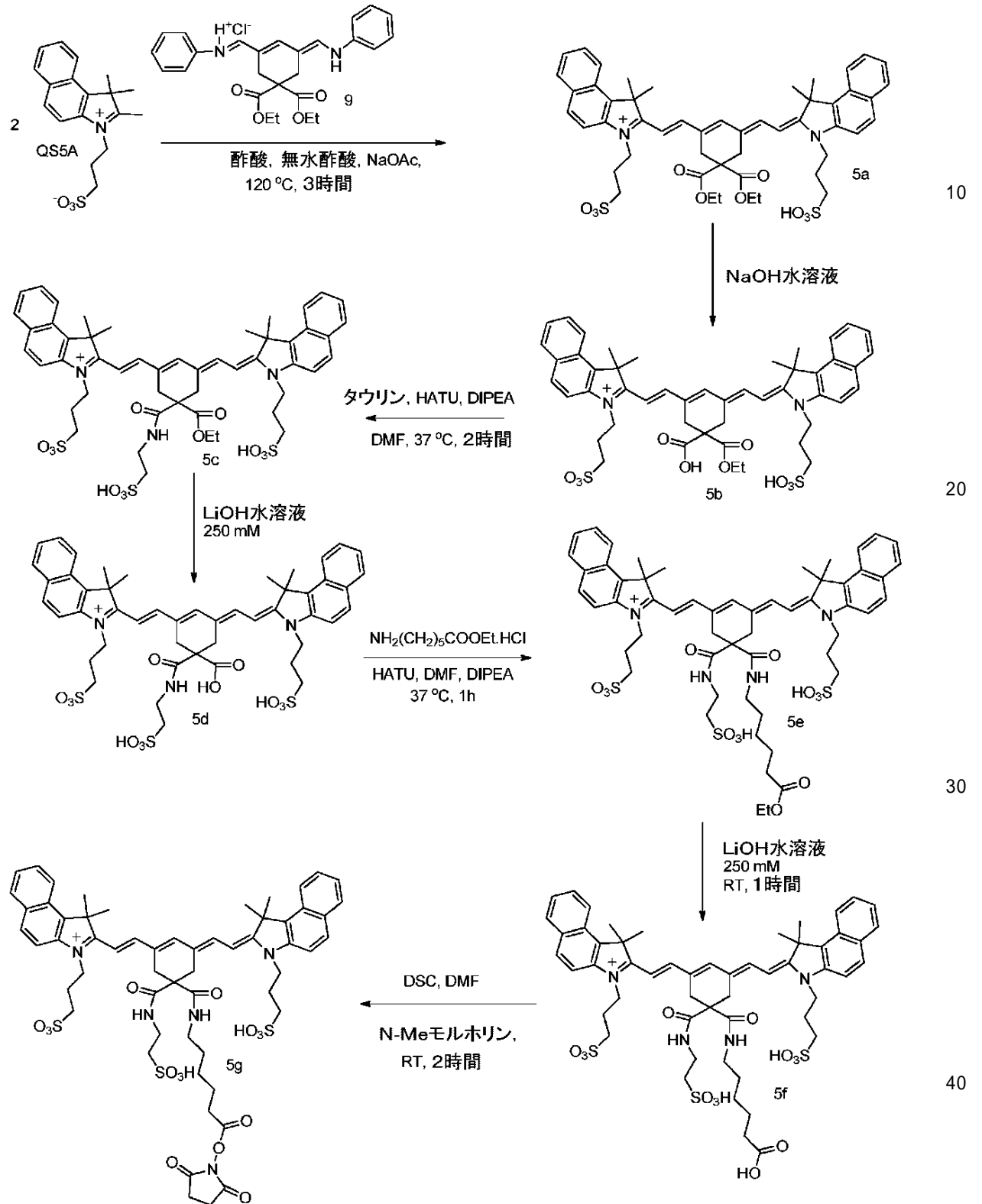
20

30

40

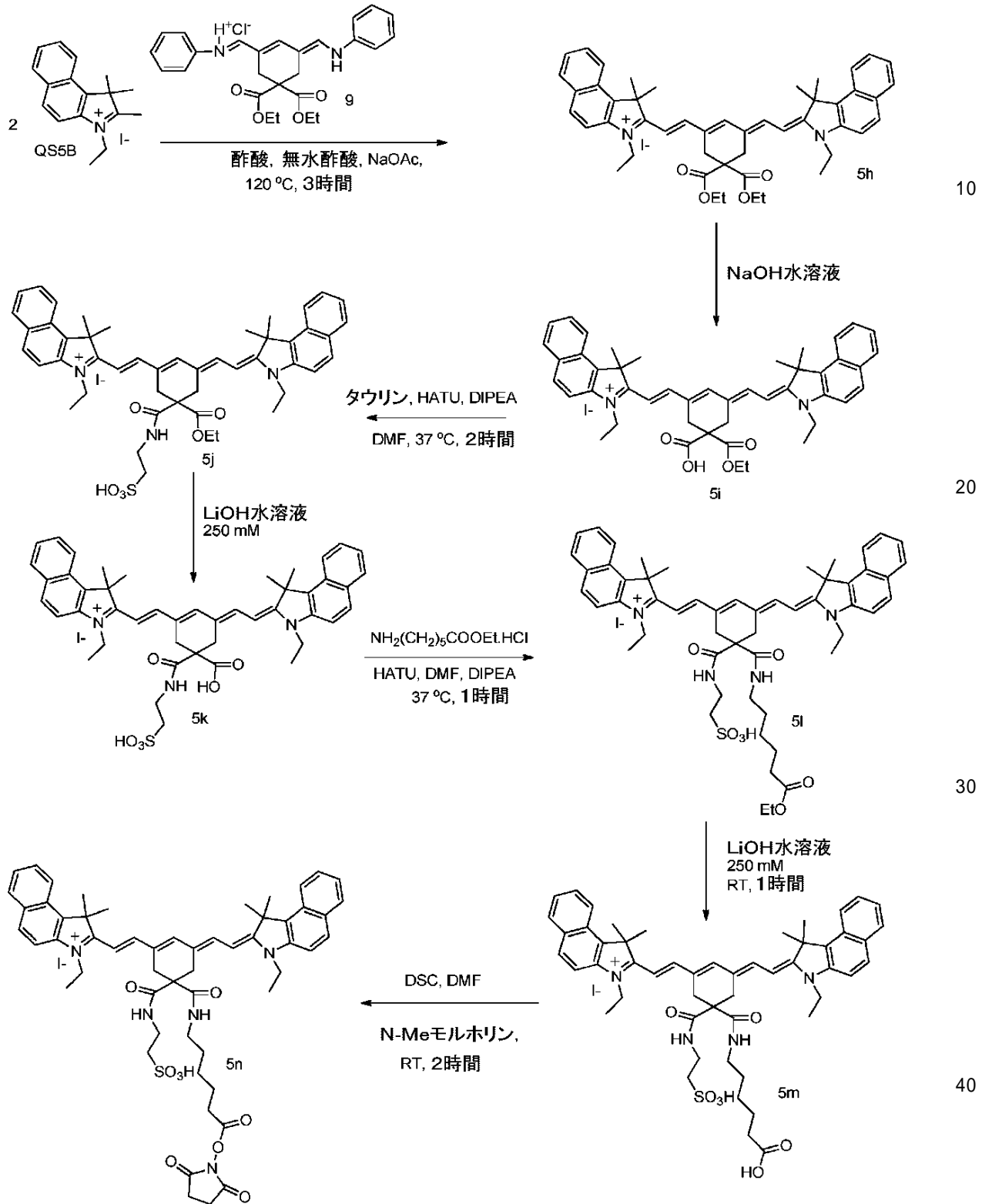
## 【化 4 4】

## スキーム3I. 対称性ベンゾインドール色素の合成



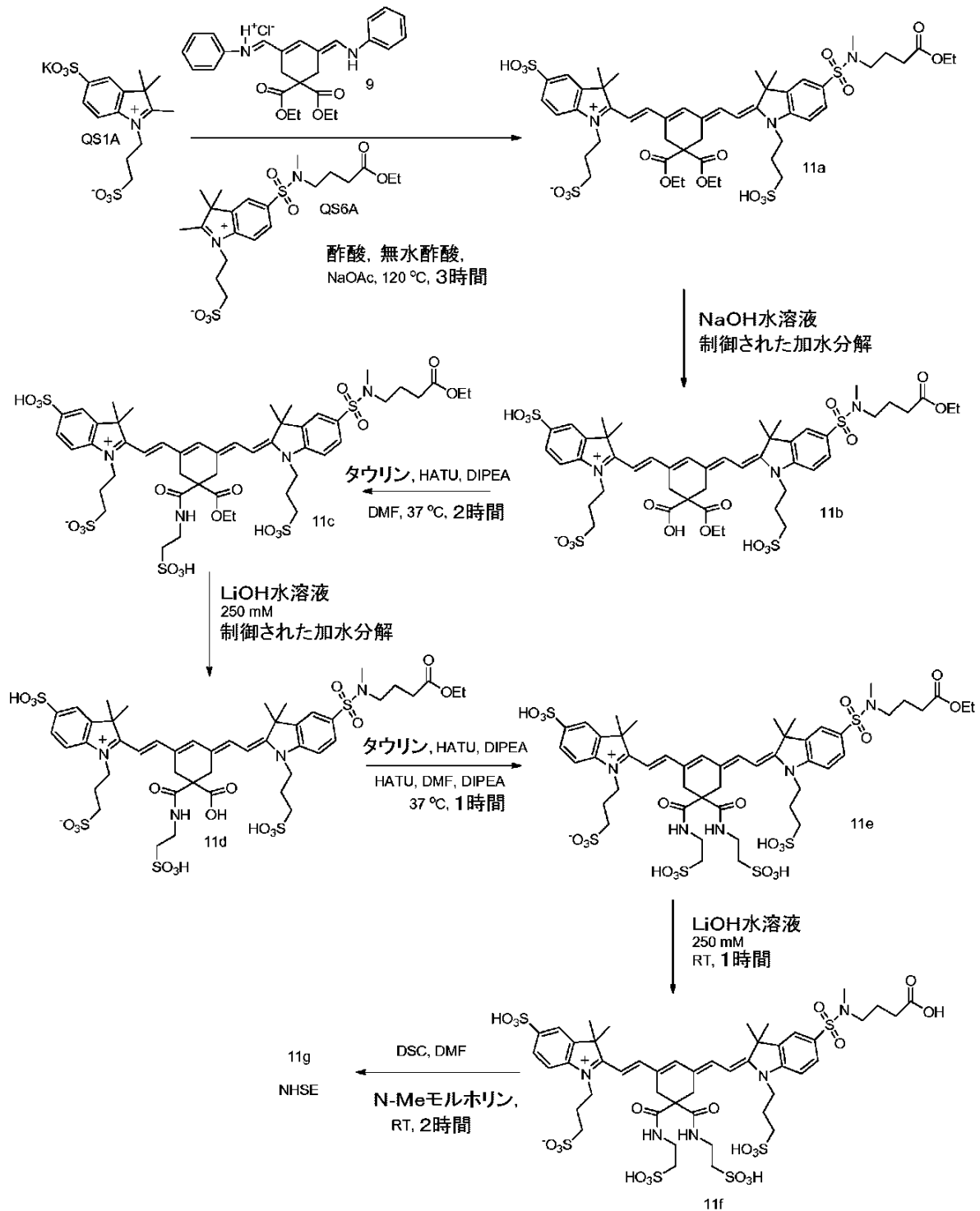
## 【化 4 5】

## スキーム3J. 対称性ベンゾインドール色素の合成



## 【化46】

## スキーム3K. 非対称性インドリニウム色素の合成



10

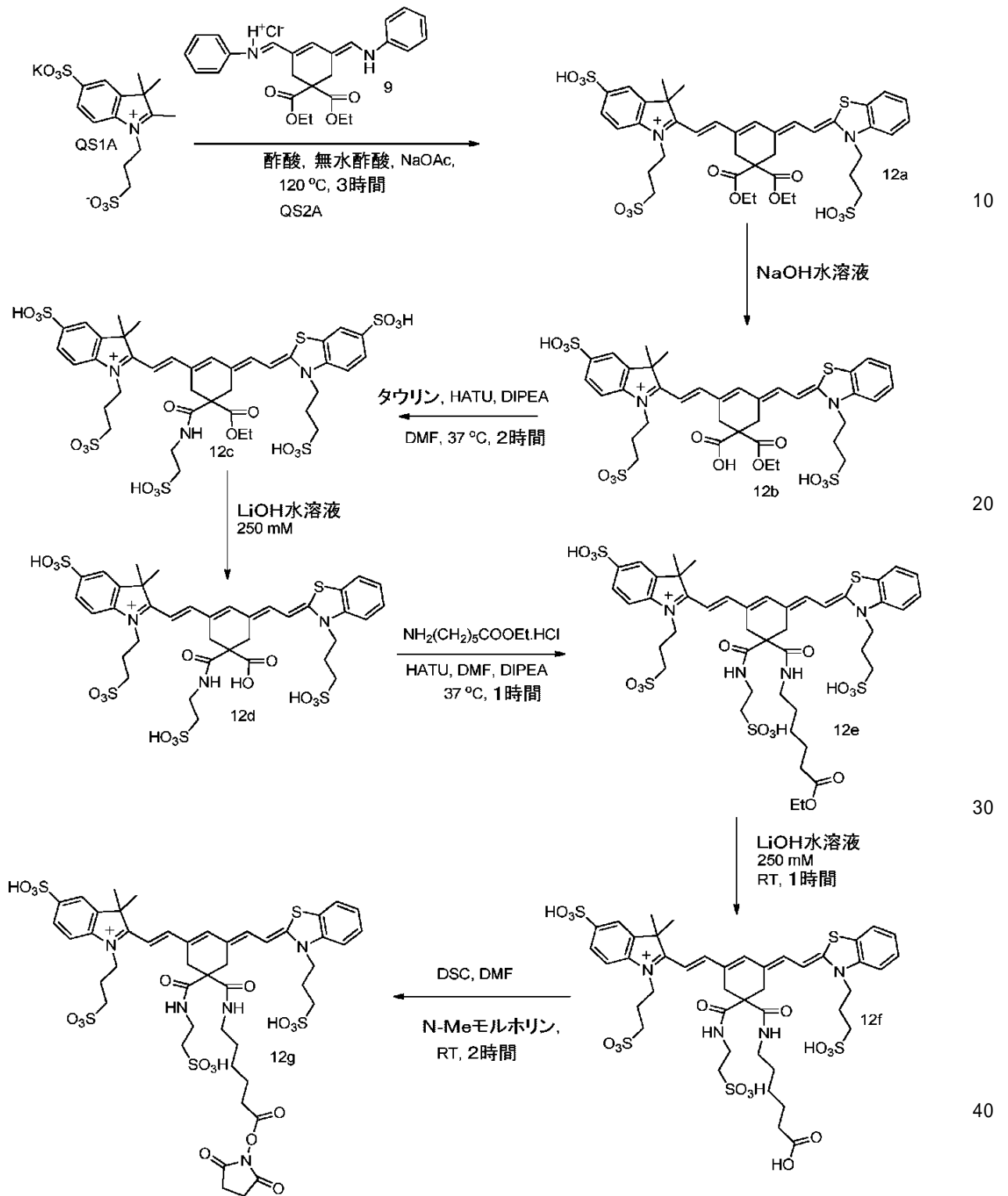
20

30

40

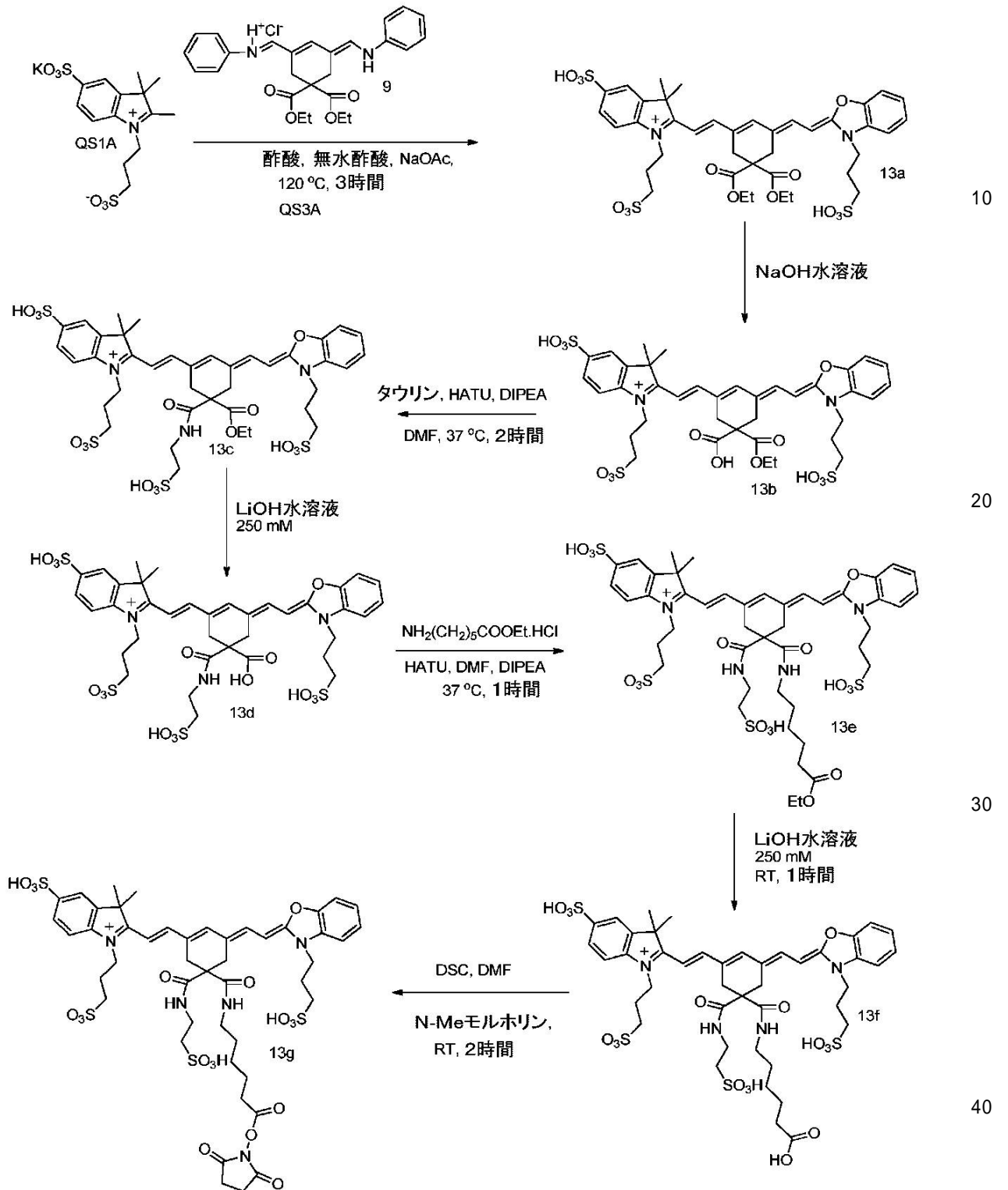
## 【化47】

## スキーム3L. 非対称性インドリニウム-ベンゾチアゾール色素の合成



## 【化48】

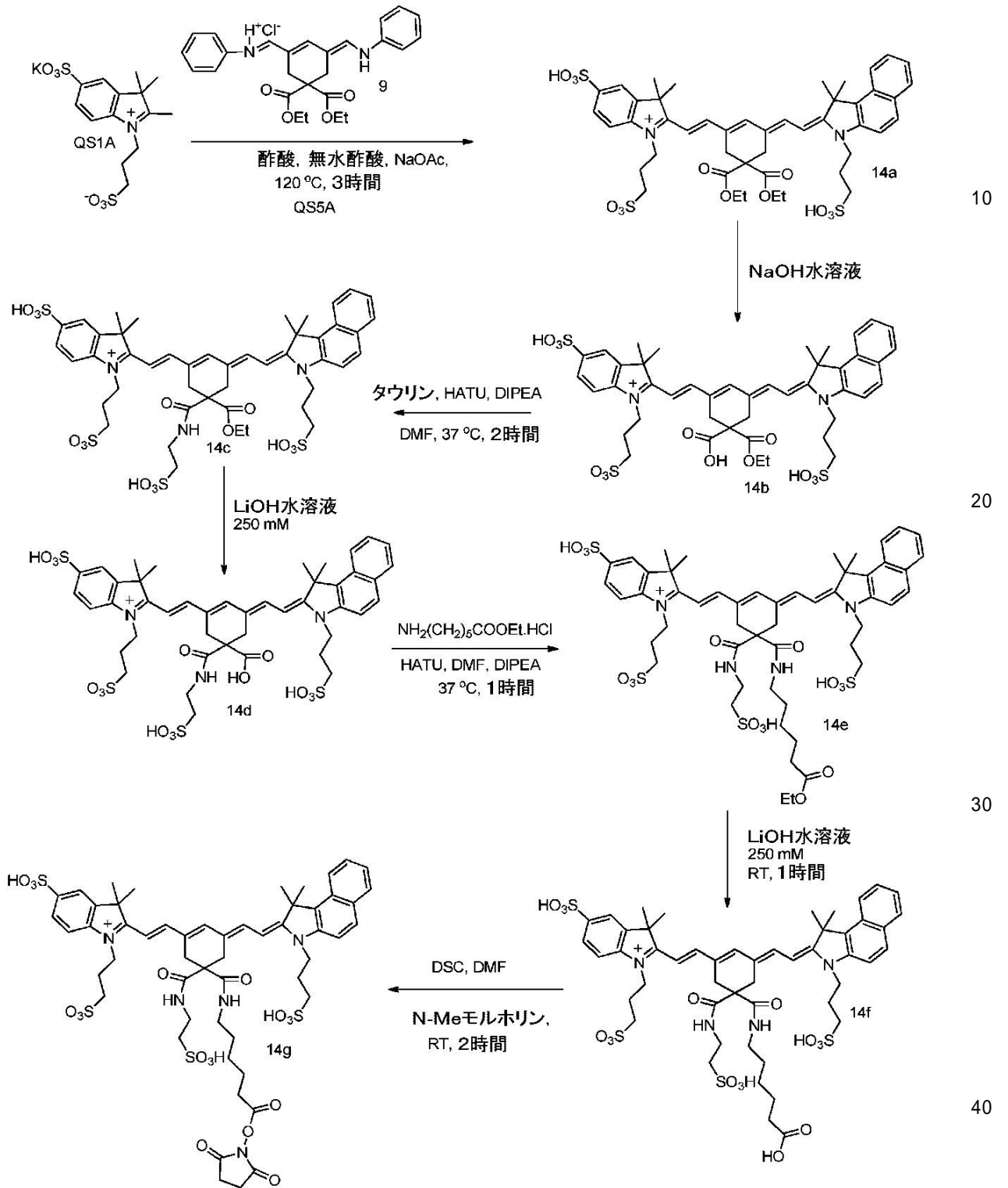
スキーム3M. 非対称性インドリニウム-ベンゾオキサゾール色素の合成





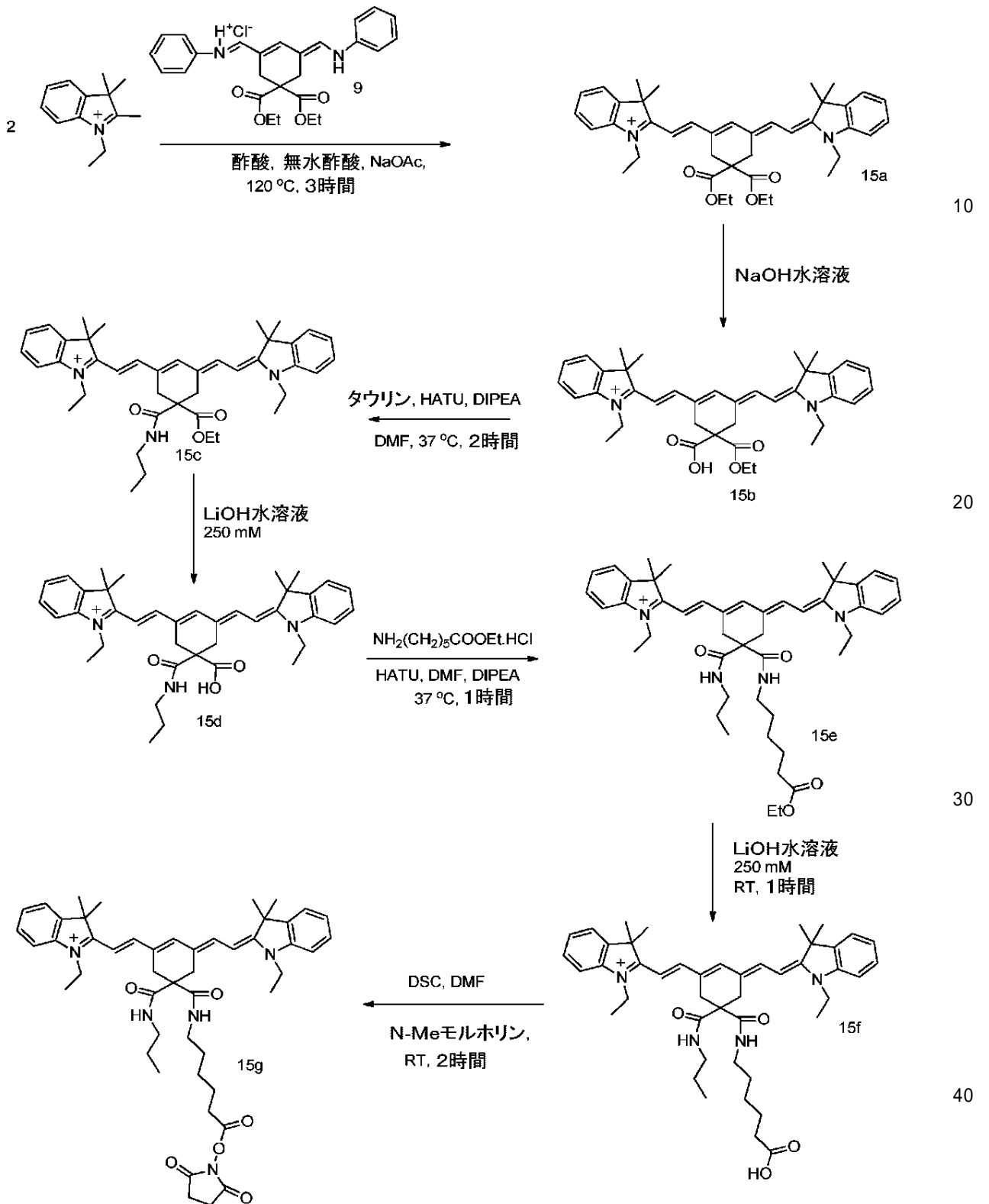
## 【化 4 9】

## スキーム3N. 非対称性インドリニウム-ベンゾインドリニウム色素の合成



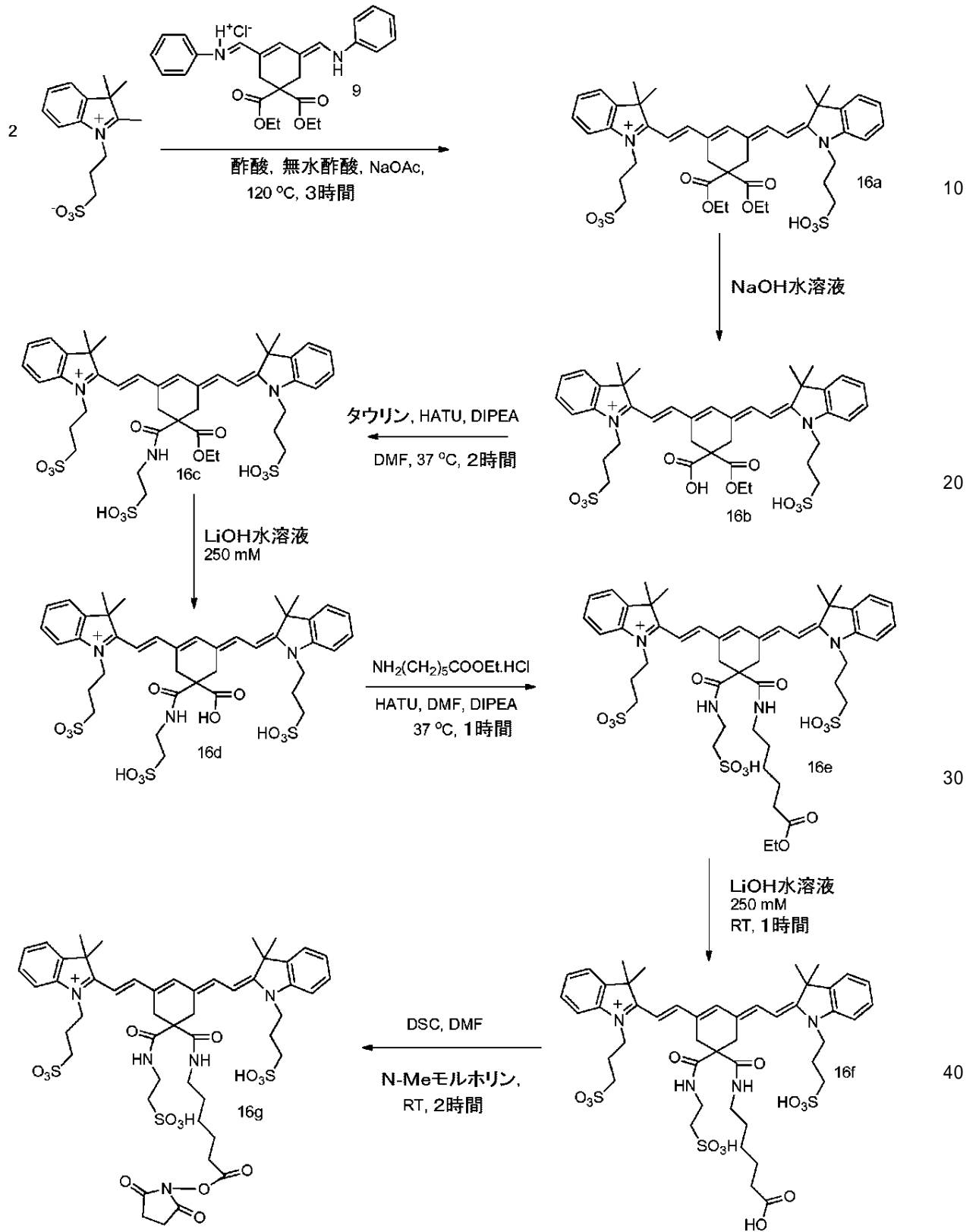
## 【化50】

## スキーム3P. 対称性インドリニウム疎水性色素の合成



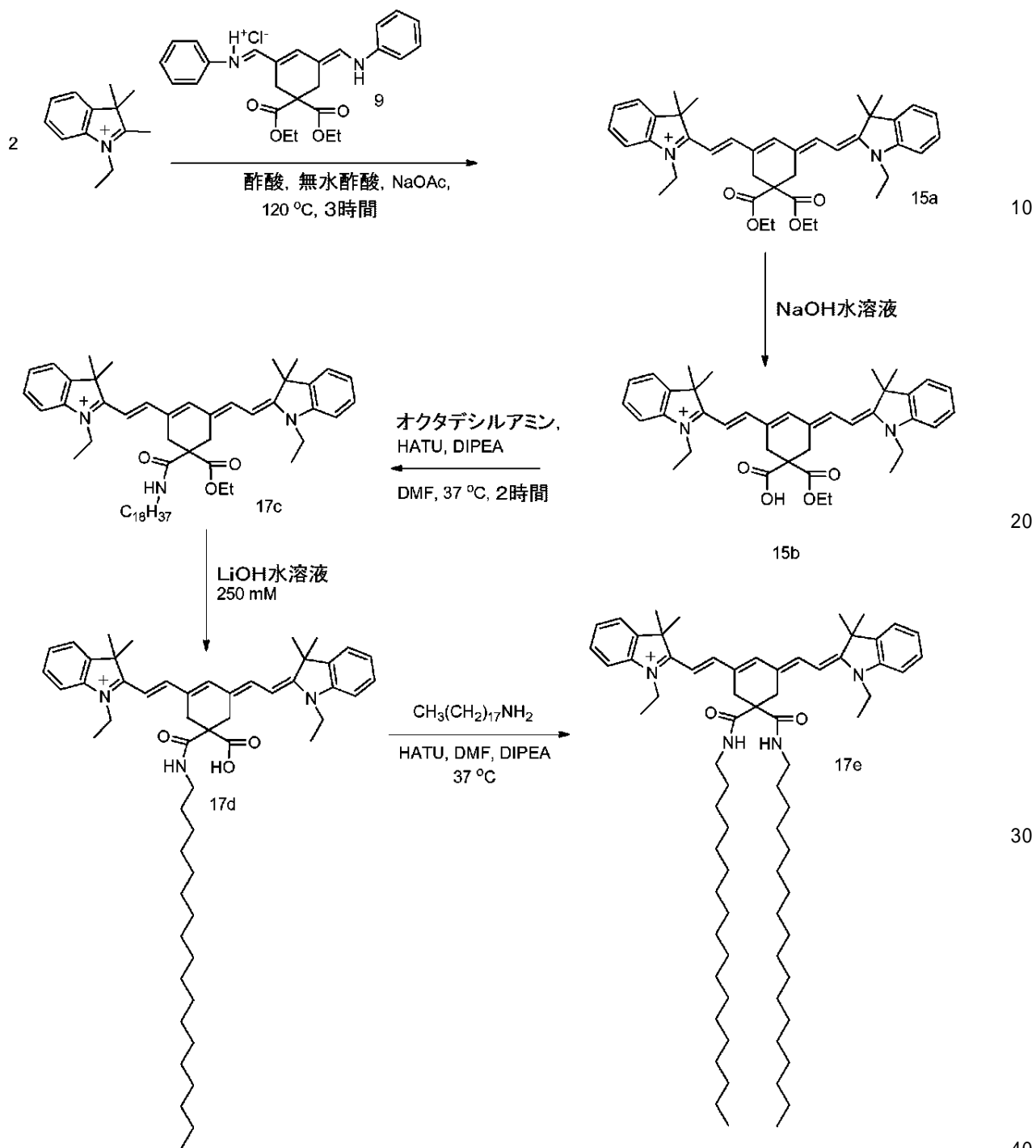
## 【化51】

## スキーム3Q. 対称性インドリニウム色素の合成



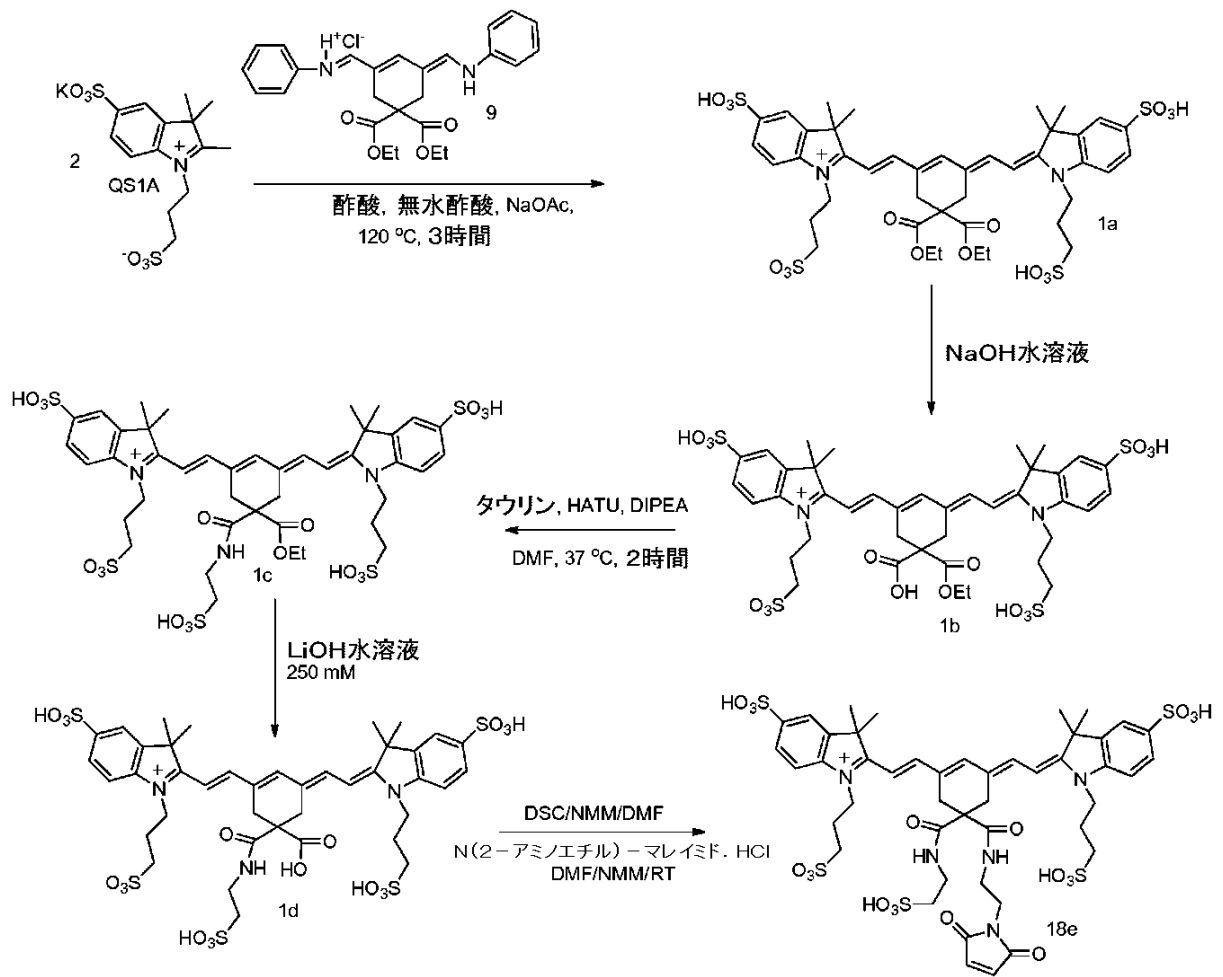
## 【化 5 2】

スキーム3R. 二つの長鎖の尾を有する対称性インドリニウム疎水性色素の合成



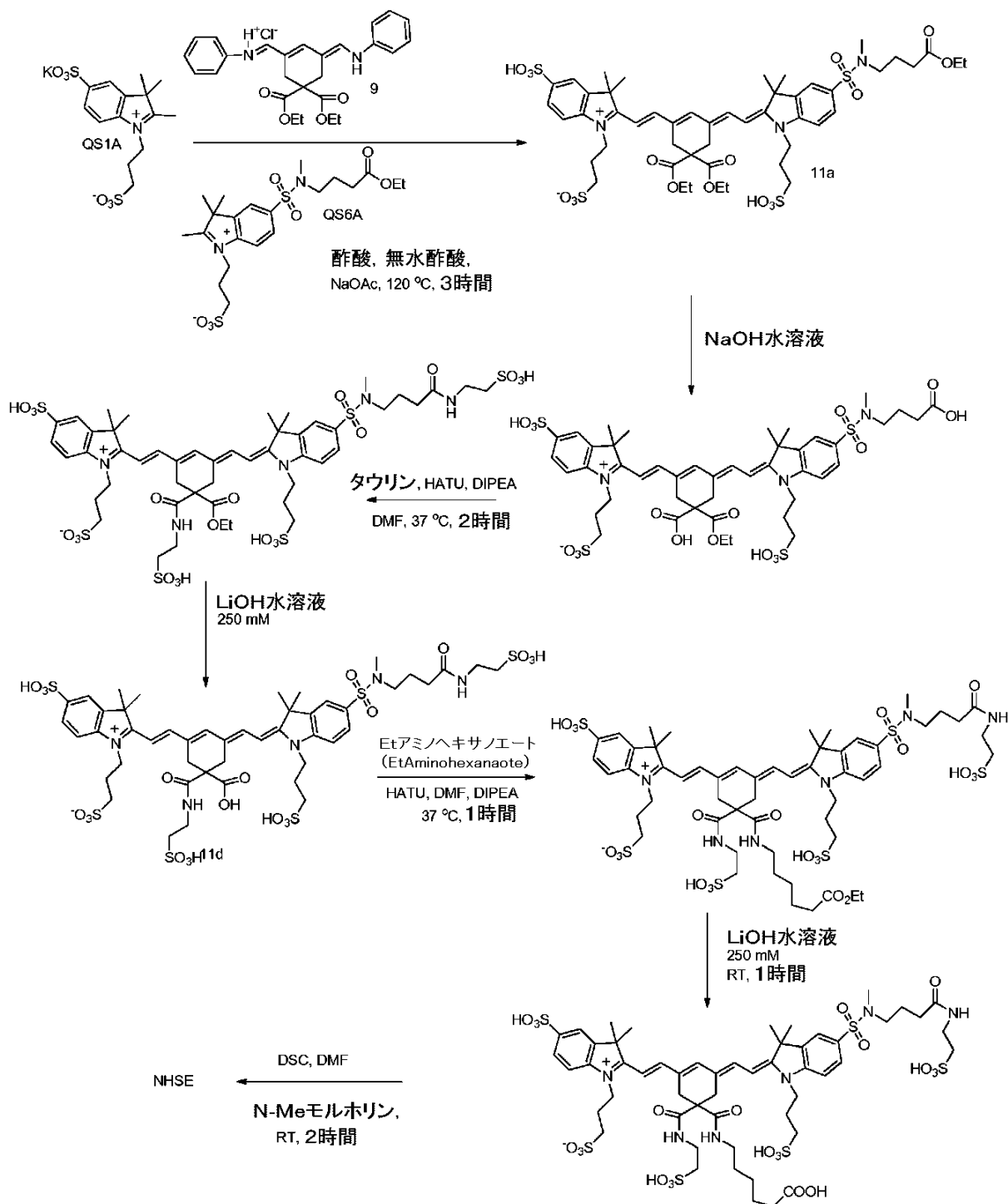
## 【化 5 3】

## スキーム3S. 対称性インドリニウム親水性マレイミド色素の合成



## 【化 5 4】

## スキーム3T. 非対称性インドリニウム色素の合成



## 【 0 1 5 2】

(実施例4) 化合物4mの合成(スキーム3H)

A. 化合物QS4Bの調製

2, 3, 3 - トリメチルベンゾインドール - 5, 7 - ジスルホネート (化合物4, 3 . 1 g, 7 mmol) を、乾燥DMF 25 mL に溶解させて、透明なオレンジ色の溶液を得た。ヨウ化エチル 3 mL (5.85 g, 37.5 mmol, Aldrich) を添加し、溶液を封止管中 130 °C に 16 時間加熱した。濃い紫色に変わった反応混合物を冷却し、エチルエーテル 150 mL に注いだ。混合物を遠心分離し、溶媒をデカントで除去した。固体生成物を、管中、3 部の 25 mL の 2 - プロパノールでさらに洗浄した後、エーテル

10

20

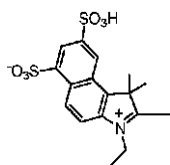
30

40

50

25 mL で洗浄し、真空中で乾燥させた。濃い紫色の固体 (85%) 2.6 g を得、MALDI-TOF-MS によって確認した。 $C_{17}H_{19}NO_6S_2^+$  の  $m/e$  算出値 397.1 [M]<sup>+</sup>、実測値 397.6。

【化 55】



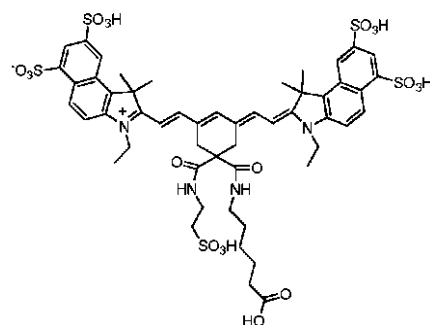
10

B. 化合物 4 m の調製

【0153】

化合物 4 m を、化合物 QS4 B および 9 を使用して、4 h ~ 4 l によって、化合物 1 f の合成について記載した手順と同じ手順に従って合成した。全収率は約 15% であった。吸収極大: 775 nm (水)、780 nm (MeOH); 発光極大: 795 nm (水)、8053 nm (MeOH)。

【化 56】



20

【0154】

(実施例 5) 細胞の標識化

マウス脾細胞を、単一細胞懸濁液として調製し、脾細胞調製物中の T 細胞亜集団を、B 細胞およびマクロファージを除去するカラム (R & D キット、マウス T 細胞濃縮カラム、MTCC500) により、継代によって濃縮する。次に、T 細胞を遠心分離して、細胞  $10^7$  個の細胞ペレットを作製する。上清を細胞ペレットから除去し、10 mg/mL の 1 g (化合物 1 f の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) 溶液 100  $\mu$ L を添加する。細胞を室温で 5 分間インキュベートし、その後 2 回遠心分離し、生理的緩衝液に再懸濁させて、結合していない化合物 1 f を洗い流す。細胞を蛍光顕微鏡法によって評価する。

30

【0155】

(実施例 6) 細胞標識化および *in vivo* イメージング

マウス 4 T 1 の乳腺癌細胞を遠心分離して、細胞  $10^7$  個の細胞ペレットを作製する。上清を細胞ペレットから除去し、10 mg/mL の化合物 1 f の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液 100  $\mu$ L を添加する。細胞を、室温で 5 分間インキュベートし、その後、2 回遠心分離し、生理的緩衝液に再懸濁させて、結合していない化合物 1 f を洗い流す。細胞を、蛍光顕微鏡法によって評価する。

40

【0156】

細胞を、マウス 1 匹あたり細胞  $5 \times 10^5$  個でマウスに静脈内注射し、生存マウスを、注射直後および注射の 24 時間後に蛍光性分子断層撮影法によって画像化する。4 T 1 細胞は、主に肺に転移するので、肺の蛍光を定量化することができる。

【0157】

(実施例 7) 化合物 1 f - ペプチドコンジュゲートによる FMT イメージング

化合物 1 f の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液を、Arg - Gly - Asp

50

を含有するペプチドに塩基条件下で化学的に連結させて、*in vivo* 光学イメージングのために生体適合性のある蛍光性分子を得る。

【0158】

腫瘍細胞株 HT-29 (ヒト結腸癌 / HTB-38) を、ATCC (バージニア州 Manassas) から得る。HT-29 細胞を、5% CO<sub>2</sub> を含有する加湿雰囲気において、10% FBS を補充した McCoy 中、37℃ で増殖させる。指数関数的に増殖する細胞をトリプシン処理し、ハンクス平衡塩類溶液に  $3 \times 10^7$  個の細胞 / mL の濃度で再懸濁させる。雌性 NU/NU マウス 6~8 週齢 (Charles River Laboratory、マサチューセッツ州 Wilmington) において、第 1 の乳房脂肪体の両側に  $3 \times 10^6$  個の HT-29 細胞を皮下注射する。1 週間後、腫瘍はおよそ 30 mm<sup>3</sup> になり、マウスに、蛍光性分子 (1 × PBS 150 μL 中) を静脈内注射し、24 時間後に蛍光反射システム (FRI、Kodak 2000 MM) システムおよび PerkinElmer, Inc. (マサチューセッツ州 Waltham) 製の蛍光断層撮影法システム (FMT 2500) で画像化する。

10

【0159】

(実施例 8) 化合物 1 f による骨成長の *in vivo* イメージング

化合物 1 f の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液を、生体分子を含有するビスホスホネートに塩基条件下で化学的に連結させて、*in vivo* 光学イメージングのための生体適合性のある蛍光性分子を得る。

【0160】

5 日齢の BALB/c × CF-1 F<sub>1</sub> マウスに、蛍光性分子 (1 × PBS 15 μL 中) を皮下注射し、24 時間後に蛍光反射イメージング (FRI) システム (Kodak 2000 MM) を使用して画像化する。骨成長のエリアを画像化する。

20

【0161】

(実施例 9) ナノ粒子の標識化

化合物 1 f の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル溶液を、酸化鉄ナノ粒子のポリマー表面上に配置されたアミン基に化学的に連結させて、*in vivo* 蛍光イメージングのための生体適合性のある蛍光性プラットフォームを得る。その後、ポリエチレングリコールをこれらのナノ粒子にカップリングさせると、蛍光イメージングおよび生体内顕微鏡に適した、生体適合性のある造影剤が得られる。

30

【0162】

参考としての援用

本明細書に引用したあらゆる刊行物、特許文書および特許出願文書は、それぞれがそうして個々に示されている場合と同程度に、それら全体が参考として、かつ、あらゆる目的で本明細書に明確に援用される。

【0163】

均等物

本発明は、本発明の趣旨または必須の特徴から逸脱することなく、他の特定の形態に具体化され得る。したがって、上述の実施形態は、本明細書に記載の本発明を制限するものではなく、例示的なあらゆる観点で考慮されるべきである。したがって、本発明の範囲は、上述の説明ではなく添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の等価物の意味および範囲に含まれるあらゆる変化が、本発明に包含されるものとする。

40



【図 1 A】

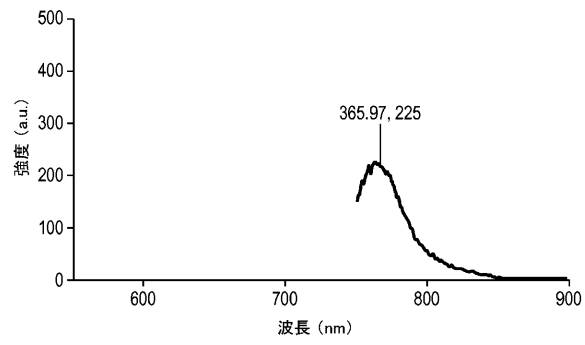


FIG. 1A

【図 1 B】

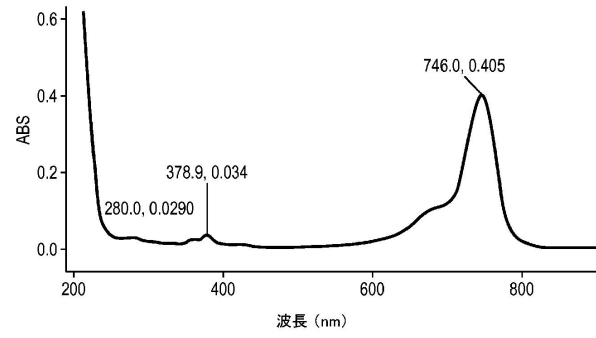


FIG. 1B

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 D 413/08	(2006.01)	C 0 7 D 413/08
C 0 7 D 209/90	(2006.01)	C 0 7 D 209/90
C 0 7 C 251/18	(2006.01)	C 0 7 C 251/18
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 9/08	(2006.01)	A 6 1 P 9/08
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ナラヤナン, ナラシムハチャリ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01886, ウェストフォード, ラッセルズ ウェイ  
73

審査官 三木 寛

(56)参考文献 特開2010-169677(JP,A)  
 特開2004-083799(JP,A)  
 特開2004-067816(JP,A)  
 特開平11-185836(JP,A)  
 特開平10-111543(JP,A)  
 特開平08-234463(JP,A)  
 特開昭62-124986(JP,A)  
 特開昭62-103192(JP,A)  
 特開昭62-050187(JP,A)  
 特開昭62-103190(JP,A)  
 特開昭61-248789(JP,A)  
 特開平10-073900(JP,A)  
 特開2014-101358(JP,A)  
 欧州特許出願公開第01810998(EP,A1)  
 特表2011-506673(JP,A)  
 特開平02-190390(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 2 0 9 / 2 4

C 0 7 C 2 5 1 / 1 8

C 0 7 D 2 0 9 / 5 8  
C 0 7 D 2 0 9 / 9 0  
C 0 7 D 2 6 3 / 5 6  
C 0 7 D 2 7 7 / 6 4  
C 0 7 D 4 1 3 / 0 8  
C 0 7 D 4 1 7 / 0 8