

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 1 日(01.09.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/136718 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/055199
- (22) 国際出願日: 2016 年 2 月 23 日(23.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-037519 2015 年 2 月 27 日(27.02.2015) JP
PCT/JP2016/051314 2016 年 1 月 18 日(18.01.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 浦野 泰照(URANO Yasuteru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 神谷 真子(KAMIYA

Mako); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 両角明彦(MOROZUMI Akihiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宇野 真之介(UNO Shinnosuke); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 梅澤 啓太郎(UMEZAWA Keitaro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

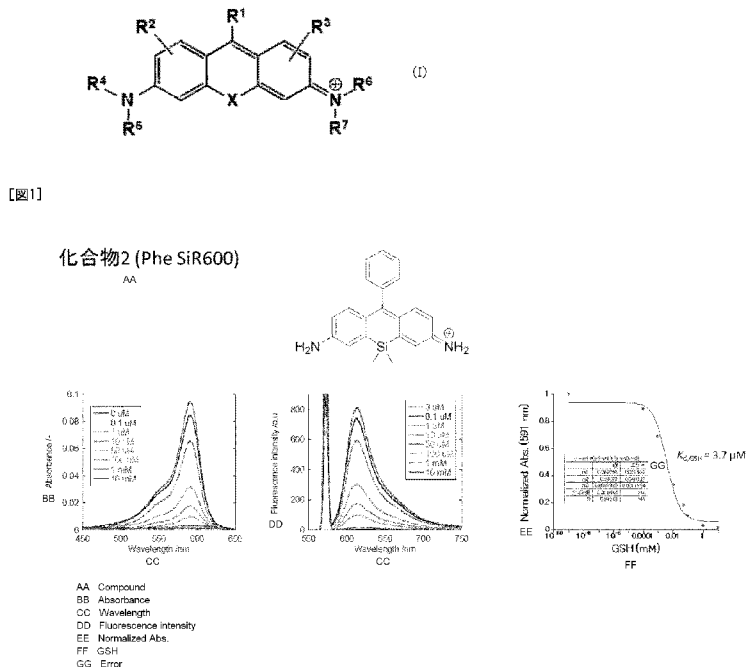
(74) 代理人: 小野 誠, 外(ONO Makoto et al.); 〒1070051 東京都港区元赤坂一丁目 2 番 7 号 赤坂Kタワー アンダーソン・毛利・友常法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,

[続葉有]

(54) Title: SUPER-RESOLUTION FLUORESCENT IMAGING PROBE

(54) 発明の名称: 超解像蛍光イメージング用プローブ



optionally substituted amide groups, and optionally substituted azide groups, R^4 and R^5 each independently represent a hydrogen atom or an optionally substituted alkyl group or $N(R^4)(R^5)$ forms an amide group or a carbamate group (provided that, if R^4 or R^5 is an alkyl group, each may form, together with R^2 , a ring structure that includes the nitrogen atom that is bonded thereto), and R^6 and R^7 each independently represent a hydrogen atom or an optionally substituted alkyl group or $N(R^6)(R^7)$ forms an amide group or a carbamate group (provided that, if R^6 or R^7 is an alkyl group, each may form, together with R^3 , a ring structure that includes the nitrogen atom that is bonded thereto)] or a salt thereof, the super-resolution fluorescent imaging probe being characterized in that the compound represented by formula (I) or the salt thereof performs a nucleophilic addition-dissociation equilibrium reaction with a nucleophilic compound that contains an -SH group.

(57) 要約:

[続葉有]



IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

【課題】分子間求核付加－解離平衡反応による蛍光発光特性を利用した新規な超解像蛍光イメージング用プローブ、及び当該プローブを用いた超解像蛍光イメージング方法の提供。【解決手段】以下の式 (I) で表される化合物〔式中、Xは、酸素原子又はC (R^a) (R^b) 又はS i (R^a) (R^b) を表し (ここで、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素原子、又はアルキル基を表す) ; R¹は、水素原子又は置換されていてもよいアリアルを表し (ただし、R¹がフェニル基の場合、当該フェニル基のベンゼン環における2位又は6位の位置に置換基を有しない) ; R²及びR³は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～3個の同一又は異なる置換基を表し ; R⁴及びR⁵は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、N (R⁴) (R⁵) がアミド基もしくはカルバメート基を形成する (ここで、R⁴又はR⁵がアルキル基である場合、それぞれR²と一緒に、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい) ; 及び、R⁶及びR⁷は、それぞれ独立に水素原子もしくは置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、N (R⁶) (R⁷) がアミド基もしくはカルバメート基を形成する (ここで、R⁶又はR⁷がアルキル基である場合、それぞれR³と一緒に、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい) 。] 又はその塩を含む超解像蛍光イメージング用プローブであって、式 (I) で表される化合物又はその塩が、－SH基を含有する求核性化合物との間で求核付加－解離平衡反応を行うことを特徴とする、該超解像蛍光イメージング用プローブ。

明 細 書

発明の名称：超解像蛍光イメージング用プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、分子間求核付加－解離平衡反応による蛍光発光特性を利用した新規な超解像蛍光イメージング用プローブ、及び当該プローブを用いた超解像蛍光イメージング方法に関する。

背景技術

[0002] 一般に、光の回折により点像は波長の半分程度に広がってしまうため、光学顕微鏡の空間分解能は、Abbeの回折限界に制限され、点像の広がりよりも近接に位置する2点を分離してイメージングすることは不可能と考えられてきた。しかしながら、1990年代から回折限界を上回る分解能での超解像イメージング手法がいくつか報告されてきており（例えば、非特許文献1等）、生細胞に適用することで従来法では観測できなかった生物学的現象を捉える可能性が広がりつつある。

[0003] 超解像イメージング法の1種であるSTORM (stochastic optical reconstruction microscopy) やPALM (photo-activated localization microscopy) に代表されるSMLM法 (single-molecule localization microscopy) では、試料内にある蛍光分子を十分距離が離れた1分子ずつ確率的に発光させ、各分子の位置を正確に特定し、重ね合わせることで数10nmの解像度の蛍光画像を構築することができる（例えば、特許文献1等）。

[0004] このようなSMLMでは、主に、市販の蛍光色素や蛍光蛋白質が用いられている。しかしながら、このような市販の有機蛍光色素を確率的に発光させるためには、一般的に10～100mM程度のチオール存在下で、0.8kW/cm²程度の高強度のレーザーにより励起し、三重項等の長寿命の無蛍光状態を作り出すことが必須であり、このような条件は生細胞におけるイメー

ジングには適さない。

[0005] また、これまでの、超解像蛍光イメージング法の開発は、主に光学系や解析ソフトウェアの観点からの開発がほとんどであり、重要な蛍光プローブの開発が遅れているのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：Z h u a n g ら、米国特許公開公報US 2 0 0 8 / 0 0 3 2 4 1 4

非特許文献

[0007] 非特許文献1：M. F e r n a n d e z - S u a r e z ら、N a t . R e v . M o l . C e l l . B i o l . , 9 , 9 2 9 , 2 0 0 8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、本発明は、プローブ化合物以外の添加物が不要であって、また、データ取得前に蛍光性のプローブを無蛍光性状態にするために必要であったレーザー照射を省くことができ、かつ低出力のレーザー照射でも機能する超解像蛍光イメージングに適した蛍光プローブ化合物を開発し、生細胞にも適用可能な超解像蛍光イメージング手法を提供することを課題とするものである。さらに、かかる蛍光プローブ化合物を用いて、同一視野で観察可能な多色での超解像イメージング手法を提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

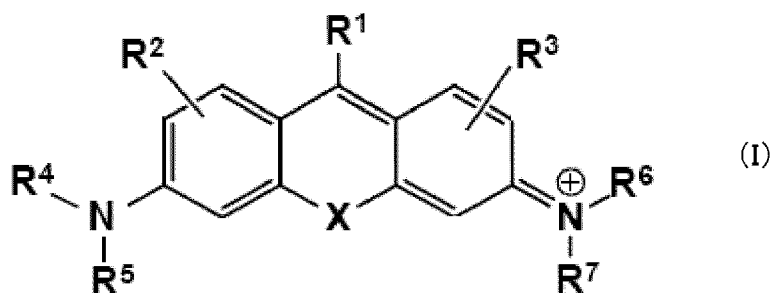
[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するべく鋭意検討を行った結果、生細胞内に内在的に存在する求核性化合物であるグルタチオン等の-SH基含有化合物と、ピロニン及びピロニン類似骨格（以下、まとめて「ピロニン骨格」という。）を有する蛍光団との分子間求核付加－解離平衡反応に着目し、当該反応による光明滅を動作原理とすることで、生細胞にも適用可能な条件下における超解像蛍光イメージングを可能とする蛍光プローブ分子を見出した。

より具体的には、上記求核付加－解離平衡反応における解離定数及び求核付加反応速度を最適化することによって、従来のような高濃度のチオール添加や高強度のレーザー照射に依らずに、生細胞内におけるグルタチオンの濃度範囲で超解像蛍光イメージングに適した確率的な発光が得られることを見出した。これらの知見に基づき、本発明を完成するに至ったものである。

[0010] すなわち、本発明は、一態様において、

(1) 以下の式 (I) で表される化合物

[化1]



〔式中、

Xは、酸素原子又はC (R^a) (R^b) 又はSi (R^a) (R^b) を表し（ここで、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素原子、又はアルキル基を表す）；

R¹は、水素原子又は置換されていてもよいアリールを表し（ただし、R¹がフェニル基の場合、当該フェニル基のベンゼン環における2位又は6位の位置に置換基を有しない）；

R²及びR³は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～3個の同一又は異なる置換基を表し；

R⁴及びR⁵は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、N (R⁴) (R⁵) がアミド基もしくはカルバメート基を形成する（ここで、R⁴又はR⁵がアルキル基である場合、それぞれR²と一緒に、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい）；及び

、

R^6 及び R^7 は、それぞれ独立に水素原子もしくは置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、 $N(R^6)(R^7)$ がアミド基もしくはカルバメート基を形成する（ここで、 R^6 又は R^7 がアルキル基である場合、それぞれ R^3 と一緒にあって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。）

又はその塩を含む超解像蛍光イメージング用プローブであって、

式（１）で表される化合物又はその塩が、 $-SH$ 基を含有する求核性化合物との間で求核付加－解離平衡反応を行うことを特徴とする、

該超解像蛍光イメージング用プローブ；

（２）前記求核付加－解離平衡反応が、 R^1 が結合する炭素原子において行われる、上記（１）に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（３）前記求核付加－解離平衡反応における解離定数が、 $0.1\ \mu M \sim 10\ mM$ の範囲内であることを特徴とする、上記（１）又は（２）に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（４）前記求核付加－解離平衡反応における求核付加反応速度定数が、中性条件の水系溶液中において、 $1 \sim 1.0 \times 10^6\ s^{-1}$ であることを特徴とする、上記（１）～（３）のいずれか１に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（５） X が、 $C(R^a)(R^b)$ 又は $Si(R^a)(R^b)$ である、上記（１）～（４）のいずれか１に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（６） R^a 及び R^b が、いずれもメチル基である、上記（５）に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（７） R^1 は、水素原子又は置換されていてもよいフェニル基である（ただし、当該フェニル基のベンゼン環における２位又は６位の位置に置換基を有しない）、上記（１）～（６）のいずれか１に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

（８） R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれも水素原子である、上記（１）～（７）のいずれか１に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

(9) R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれもメチル基である、上記(1)～(7)のいずれか1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

(10) R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 のうち少なくとも1つが、生体分子と共有結合又は非共有結合によって結合し得るラベル化置換基を含む、上記(1)～(7)のいずれか1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

(11) 前記-SH基を含有する化合物が、システイン残基を有する化合物である、上記(1)～(10)のいずれか1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；

(12) 前記-SH基を含有する化合物が、グルタチオンである、上記(1)～(10)のいずれか1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ；及び

(13) 式(1)で表される化合物が以下の群から選択される化合物である、上記(1)に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ

を提供するものである。

[0011] 別の態様において、本発明は、

(14) 上記(1)～(13)のいずれか1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブを用いる超解像蛍光イメージング方法であって、
生体分子にプローブ分子を結合させ、－S H基を含有する化合物の存在下でレーザー光を照射して前記プローブ分子からの蛍光発光を撮影した画像データを取得し、一定の時間間隔でこれを繰り返して得られた複数の前記画像データを解析したうえで重ね合わせることによって、前記生体分子の構造に対する超高解像のイメージ画像を得ることを含む、該方法
を提供するものである。

発明の効果

[0012] 本発明は、グルタチオン等の細胞内物質とプローブ分子の分子間平衡反応を確率的な蛍光発光の原理とするため、従来法のように高濃度のチオールを別途添加する必要はなく、データ取得前に蛍光性のプローブを無蛍光性状態にするために必要であったレーザー照射を省くことができ、かつ、レーザー強度を従来の1／10程度まで低減した条件下で 사용할 ことができ、細胞毒性を低減することができる。また、本発明の蛍光プローブ化合物を組み合わせることで、同一視野で観察可能な多色での超解像イメージング手法を提供することもできる。

[0013] さらに、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブが、その分子内にタンパク質等への結合部位（カルボキシル基等）を有する場合には、目標タンパク質等へのラベル化にも適しており、固定細胞だけでなく、生細胞系における広範な研究に利用できると期待できる。また、当該プローブに基づく超解像蛍光イメージング法は、市販の顕微鏡を光学系として利用することができるため、汎用性の高い手法であると考えられる。このように、開発したプローブの基礎研究上、産業上の利用価値、経済効果は極めて大きいものといえる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物2の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図2]図2は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物5の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図3]図3は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物12の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図4]図4は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物14の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図5]図5は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物16の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図6]図6は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物28の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度及び蛍光強度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図7]図7は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物32の各グルタチオン濃度における吸収スペクトル変化（左）、蛍光スペクトル変化（中央）、吸光度及び蛍光強度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）を示したものである。

[図8]図8は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物17でラベル化した抗体を用いた、固定ペロ細胞中における微小管のSMLMイメージングの結果を示したものである。図8aにおける右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。図8bは、図8aの平均化画像の上図（スケールバー：3 μ m）中の帯状領域における規格化された蛍光強度の横断プロファイル及び超解像度画像の上図（スケールバー：3 μ m）中の帯状領域における規格化された認識輝点数の横断プロファイルを示したものである。図8cは、図8aの平均化画像の下図（スケールバー：1 μ m）中の枠内領域における規格化された蛍光強度の横断プロファイル及び超解像度画像の下図（スケールバー：1 μ m）中の枠内領域における規格化された認識輝点数の横断プロファイルを示したものである。図8dは、図8aの超解像度画像の上図を構成する輝点に関してその位置決定精度の度数分布を示したものである。

[図9]図9は、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物33でラベル化した抗体を用いた、固定ペロ細胞中における微小管のSMLMイメージングの結果を示したものである。図9における右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。

[図10]図10は、化合物17でラベル化した抗体及び化合物33でラベル化した抗体を組み合わせる用いることによって得られた、固定ペロ細胞中における微小管及びミトコンドリアの2色でのSMLMイメージングの結果を示したものである。図10における右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施形態について説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。

[0016] 1. 定義

本明細書中において、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を意味する。

[0017] 本明細書中において、「アルキル」は直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせからなる脂肪族炭化水素基のいずれであってもよい。アルキル基の炭素数は特に限定されないが、例えば、炭素数1～20個 ($C_{1\sim 20}$)、炭素数3～15個 ($C_{3\sim 15}$)、炭素数5～10個 ($C_{5\sim 10}$) である。炭素数を指定した場合は、その数の範囲の炭素数を有する「アルキル」を意味する。例えば、 $C_{1\sim 8}$ アルキルには、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、*neo*-ペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル等が含まれる。本明細書において、アルキル基は任意の置換基を1個以上有していてもよい。該置換基としては、例えば、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、モノ若しくはジ置換アミノ基、置換シリル基、又はアシルなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。アルキル基が2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。アルキル部分を含む他の置換基（例えばアルコキシ基、アリールアルキル基など）のアルキル部分についても同様である。

[0018] 本明細書において、ある官能基について「置換されていてもよい」と定義されている場合には、置換基の種類、置換位置、及び置換基の個数は特に限定されず、2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、スルホ基、アミノ基、アルコキシカルボニル基、オキソ基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの置換基にはさらに置換基が存在していてもよい。このような例として、例えば、ハロゲン化アルキル基、ジアルキルアミノ基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0019] 本明細書中において、「アリール」は単環式又は縮合多環式の芳香族炭化水素基のいずれであってもよく、環構成原子としてヘテロ原子（例えば、酸

素原子、窒素原子、又は硫黄原子など）を1個以上含む芳香族複素環であってもよい。この場合、これを「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香族」と呼ぶ場合もある。アリールが単環及び縮合環のいずれである場合も、すべての可能な位置で結合しうる。単環式のアリールの非限定的な例としては、フェニル基（Ph）、チエニル基（2-又は3-チエニル基）、ピリジル基、フリル基、チアゾリル基、オキサゾリル基、ピラゾリル基、2-ピラジニル基、ピリミジニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピリダジニル基、3-イソチアゾリル基、3-イソオキサゾリル基、1, 2, 4-オキサジアゾール-5-イル基又は1, 2, 4-オキサジアゾール-3-イル基等が挙げられる。縮合多環式のアリールの非限定的な例としては、1-ナフチル基、2-ナフチル基、1-インデニル基、2-インデニル基、2, 3-ジヒドロインデン-1-イル基、2, 3-ジヒドロインデン-2-イル基、2-アンソリル基、インダゾリル基、キノリル基、イソキノリル基、1, 2-ジヒドロイソキノリル基、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリル基、インドリル基、イソインドリル基、フタラジニル基、キノキサリニル基、ベンゾフラニル基、2, 3-ジヒドロベンゾフラン-1-イル基、2, 3-ジヒドロベンゾフラン-2-イル基、2, 3-ジヒドロベンゾチオフェン-1-イル基、2, 3-ジヒドロベンゾチオフェン-2-イル基、ベンゾチアゾリル基、ベンズイミダゾリル基、フルオレニル基又はチオキサンテニル基等が挙げられる。本明細書において、アリール基はその環上に任意の置換基を1個以上有していてもよい。該置換基としては、例えば、アルコキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、モノ若しくはジ置換アミノ基、置換シリル基、又はアシルなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。アリール基が2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。アリール部分を含む他の置換基（例えばアリールオキシ基やアリールアルキル基など）のアリール部分についても同様である。

[0020] 本明細書中において、「アルコキシ基」とは、前記アルキル基が酸素原子に結合した構造であり、例えば直鎖状、分枝状、環状又はそれらの組み合わせ

せである飽和アルコキシ基が挙げられる。例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、シクロプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、イソブトキシ基、*s*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、シクロブトキシ基、シクロプロピルメトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロプロピルエチルオキシ基、シクロブチルメチルオキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロプロピルプロピルオキシ基、シクロブチルエチルオキシ基又はシクロペンチルメチルオキシ基等が好適な例として挙げられる。

[0021] 本明細書中において用いられる「アミド」とは、 $RNR'CO-$ (R =アルキルの場合、アルカミノカルボニル) 及び $RCONR'-$ (R =アルキルの場合、アルキルカルボニルアミノ) の両方を含む。

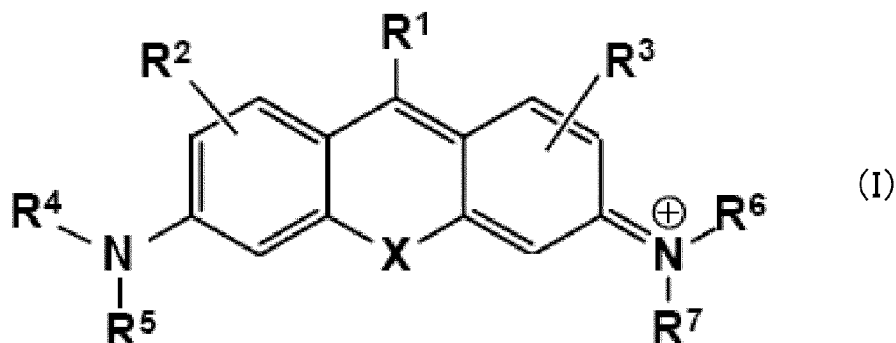
[0022] 本明細書中において用いられる「エステル」とは、 $ROCO-$ (R =アルキルの場合、アルコキシカルボニル) 及び $RCOO-$ (R =アルキルの場合、アルキルカルボニルオキシ) の両方を含む。

[0023] 本明細書中において、「環構造」という用語は、二つの置換基の組み合わせによって形成される場合、複素環または炭素環基を意味し、そのような基は飽和、不飽和、または芳香族であることができる。従って、上記において定義した、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、及びヘテロアリールを含むものである。例えば、シクロアルキル、フェニル、ナフチル、モルホリニル、ピペリジニル、イミダゾリル、ピロリジニル、及びピリジルなどが挙げられる。本明細書中において、置換基は、別の置換基と環構造を形成することができ、そのような置換基同士が結合する場合、当業者であれば、特定の置換、例えば水素への結合が形成されることを理解できる。従って、特定の置換基が共に環構造を形成すると記載されている場合、当業者であれば、当該環構造は通常の化学反応によって形成することができ、また容易に生成することを理解できる。かかる環構造及びそれらの形成過程はいずれも、当業者の認識範囲内である。

[0024] 2. 超解像蛍光イメージング用プローブ

本発明の超解像蛍光イメージング用プローブは、一態様において、以下の一般式（I）で表される構造を有する化合物を含むものである。

[化2]



[0025] 上記一般式（I）において、 X は、酸素原子又は $C(R^a)(R^b)$ 又は $Si(R^a)(R^b)$ を表す。 X の置換により励起波長がシフトするため、一般的なレーザーで励起可能な多色イメージングプローブの提供が可能となる。ここで、 R^a 及び R^b は、それぞれ独立に水素原子、又はアルキル基を表す。 R^a 及び R^b が、アルキル基である場合、それらは1以上の置換基を有することができ、そのような置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基などを1個又は2個以上有していてもよい。 R^a 及び R^b は、いずれもメチル基であることが好ましい。また、場合によっては、 R^a 及び R^b は互いに結合して環構造を形成していてもよい。例えば、 R^a 及び R^b がともにアルキル基である場合に、 R^a 及び R^b が互いに結合してスピロ環を形成することができる。形成される環は、例えば5ないし8員環程度であることが好ましい。

[0026] R^1 は、水素原子又は置換されていてもよいアリールを表す。置換されていてもよいアリールにおける置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、ハロゲン原子、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、スルホ基などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。また、当該置換基を1個又は2個以上有していてもよい。好ましくは、 R^1 は、水素原子又は置換されていてもよいフェニル基である。ただし、 R^1 がフェニル基の場合、当該フェニル基のベンゼン環における2位又は6位の位置（すなわち、 R^1 がベンゼン

環上の置換基としてのキサンテン環部分に対してオルト位になる位置)に置換基を有しないことが求核性化合物との反応性の観点から好ましい。R¹が水素原子の場合、一般式(1)の化合物はピロニンに類似する構造を有し、R¹がフェニルの場合、一般式(1)の化合物はロザミン(rosamine)に類似する構造を有する。

[0027] R²及びR³は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～3個の同一又は異なる置換基を表す。好ましくは、R²及びR³は、いずれも水素原子である。場合によっては、R²及びR³のいずれかが、後述するタンパク質等の生体分子と共有結合し得るラベル化置換基を含むこともできる。その場合、それら自身がラベル化置換基であってもよいし、又はラベル化置換基を含む置換基によって置換されていてもよい。

[0028] R⁴及びR⁵は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を示し、又は、N(R⁴)(R⁵)がアミド基もしくはカルバメート基を形成するものであることができる。R⁴及びR⁵がともにアルキル基を示す場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、R⁴及びR⁵はそれぞれ独立に、水素原子、メチル基又はエチル基であることが-SH基を含有する求核性化合物との間で求核付加反応速度の観点から好ましく、R⁴及びR⁵がいずれも水素原子であるか、またはいずれもメチル基である場合がさらに好ましい。R⁴又はR⁵の一方が水素原子であって、他方がカルボニル基であることも好ましい。この場合、N(R⁴)(R⁵)はアミド結合を形成する。カルボニル基に結合する他の置換基は特に限定されないが、アルキル基が好ましく、メチル基がより好ましい。場合によっては、N(R⁴)(R⁵)が、タンパク質等の生体分子と共有結合又は非共有結合等により結合し得る置換基(ラベル化置換基)を含むことが好ましい。その場合、それら自身がラベル化置換基であってもよいし、又はラベル化置換基を含む置換基によって置換されていてもよい。例えば、R⁴とR⁵のいずれか又は両方がN-ヒドロキシスクシンイミド等の脱

離基やS N A P - t a gの基質であるベンジルグアニン誘導体やH a l o T a g（登録商標）で用いられるリガンドを含む置換基で置換されていてもよい。又は、微小管と結合するパクリタキセルやドセタキセル等のタキサン類やアクチンフィラメントに結合するファロイジン等の環状ペプチドを含む置換基で置換されていてもよい。又は、細胞膜に存在するタンパク質のリジン残基等のアミノ基と結合を形成するN-ヒドロキシスクシンイミドで置換されていてもよい。さらには、N-ヒドロキシスクシンイミドを介したアミノ基との結合等により、タンパク質に導入したアルキン構造とクリックケミストリーにより共有結合を形成するアジド基で置換されていてもよい。そのようなラベル化置換基は、特に限定されず、当該技術分野において公知のものであれば用いることができる。

[0029] また、 R^4 又は R^5 がアルキル基である場合、それぞれ R^2 と一緒にあって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。その場合、 R^4 と R^2 、又は R^5 と R^2 の組み合わせのいずれか一方のみが環構造を形成してもよいし、いずれもが環構造を形成してもよい。

[0030] R^6 及び R^7 は、それぞれ独立に水素原子、アルキル基を示し、又は、N (R^6) (R^7) がアミド基もしくはカルバメート基を形成するものであることができる。 R^6 及び R^7 がともにアルキル基を示す場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、 R^6 及び R^7 はそれぞれ独立に、水素原子、メチル基又はエチル基であることが好ましく、 R^6 及び R^7 がいずれも水素原子であるか、またはいずれもメチル基である場合がさらに好ましい。 R^6 又は R^7 の一方が水素原子であって、他方がカルボニル基であることも好ましい。この場合、N (R^6) (R^7) はアミド結合を形成する。カルボニル基に結合する他の置換基は特に限定されないが、アルキル基が好ましく、メチル基がより好ましい。場合によっては、N (R^6) (R^7) が、上述したラベル化置換基を含むことが好ましい。その場合、それら自身がラベル化置換基であってもよいし、又はラベル化置換基を含む置換基によって置換されていてもよい。上述のとおり、そのようなラベル化置換基は、特に限定されず、当該技

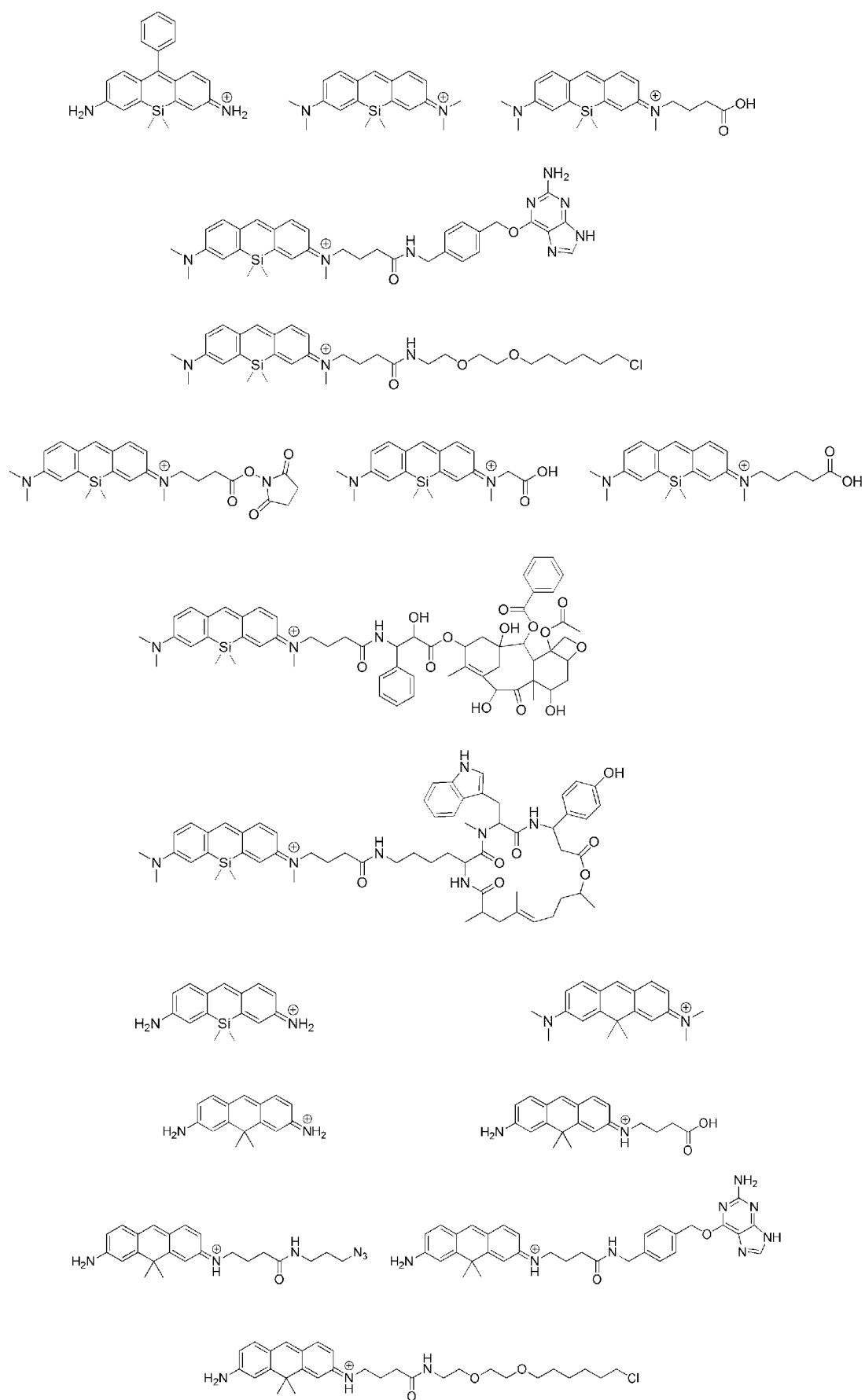
術分野において公知のものであれば用いることができる。

[0031] また、 R^6 又は R^7 がアルキル基である場合、それぞれ R^3 と一緒にあって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。その場合、 R^6 と R^3 、又は R^7 と R^3 の組み合わせのいずれか一方のみが環構造を形成してもよいし、いずれもが環構造を形成してもよい。

[0032] 上記各置換基の好ましい組み合わせとしては、例えば、 X が、 $C(R^a)(R^b)$ 又は $Si(R^a)(R^b)$ であり、 R^a 及び R^b は、いずれもメチル基であり、 R^1 が水素原子又はフェニル基であり、 R^2 及び R^3 は、いずれも水素原子であり、 R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれも水素原子又はいずれもメチル基である場合が挙げられる。同様に、 X が、酸素原子であり、 R^1 が水素原子又はフェニル基であり、 R^2 及び R^3 は、いずれも水素原子であり、 R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれも水素原子又はいずれもメチル基である場合も好ましい。

[0033] 本発明の超解像蛍光イメージング用プローブとして代表的な式(1)の化合物の具体例としては、

[化3]



を挙げることができる。ただし、これらに限定されるものではない。また、当該化合物は、任意の位置にラベル化置換基を有することができる。

[0034] 上記式(1)で表される化合物は、 R^6 及び R^7 が連結するN原子において1価の正電荷を有するため、通常は塩として存在する。そのような塩としては、塩基付加塩、酸付加塩、アミノ酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩、ピペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩を挙げることができ、酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、トリフルオロ酢酸塩などのカルボン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。アミノ酸塩としてはグリシン塩などを例示することができる。もっとも、これらの塩に限定されることはない。

[0035] 式(1)で表される化合物は、置換基の種類に応じて1個または2個以上の不斉炭素を有する場合があります、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。

[0036] 式(1)で表される化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。

[0037] 上記の蛍光プローブは、必要に応じて、生理的環境で用いるための添加剤を配合して組成物として用いてもよい。そのような添加剤としては、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供され得る。

[0038] 本明細書の実施例には、式(1)で表される本発明の化合物に包含される

代表的化合物についての製造方法が具体的に示されているので、当業者は本明細書の開示を参照することにより、及び必要に応じて出発原料や試薬、反応条件などを適宜選択することにより、式（１）に包含される任意の化合物を容易に製造することができる。

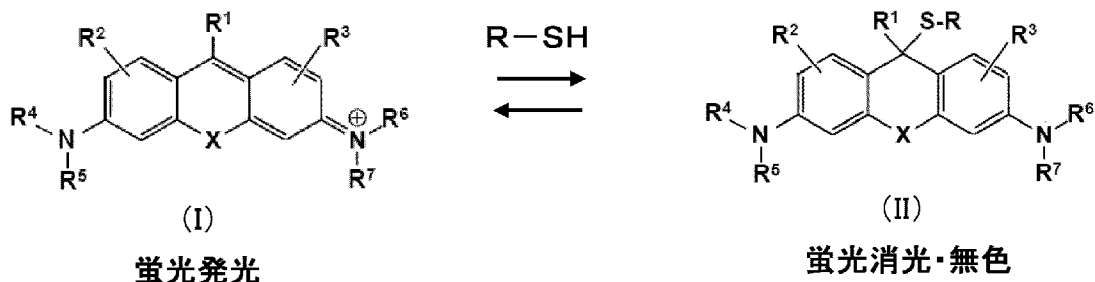
[0039] ３．本発明のプロープを用いた超解像蛍光イメージング方法

本発明の超解像蛍光イメージング方法は、生体分子に上記で説明した式（１）のプロープ分子を接触させ、－ＳＨ基を含有する化合物の存在下で、これにレーザー光を照射して前記プロープ分子からの蛍光発光を撮影したＣＣＤカメラ等によって画像データを取得し、一定の時間間隔でこれを繰り返して得られた複数の前記画像データを解析したうえで重ね合わせることで、前記生体分子の構造に対する超高解像のイメージ画像を得ることを含むものである。観測対象となる生体分子としては、細胞膜（脂質）、タンパク質、ＤＮＡ、ＲＮＡ等が挙げられる。

[0040] かかるイメージング方法としては、典型的には、ＳＭＬＭ（single-molecule localization microscopy）による超解像蛍光イメージングを用いることができ、その原理については、非特許文献１に詳述されている。従って、本発明の超解像蛍光イメージング方法における基本手順は、式（１）のプロープを用いる点以外は、当該文献に記載された超解像蛍光イメージング手法を参照することができる。

[0041] 本発明の超解像蛍光イメージング方法は、水溶液中の式（１）の化合物が、グルタチオン等の－ＳＨ基含有化合物の求核付加を受けると可視光領域の吸収及び蛍光が消失し、当該付加した－ＳＨ基含有化合物が解離すると吸収及び蛍光が回復する現象を光明滅機構として利用するものである。かかる求核付加－解離平衡反応の機構を以下に示す。

[化4]



[0042] 反応前（左側）の化合物（I）では400～700nm程度の励起光を吸収して強い蛍光を発光するのに対し、求核性化合物（ここで、グルタチオン等の-SH基を含有する化合物を「R-SH」と示している。）によりキサンテン様の縮合環の9位が求核攻撃されると化合物（II）では可視光領域の吸収及び蛍光とも消失する。そして、この分子間の求核付加反応が、可逆性を有する求核付加－解離平衡反応となることから、所定の解離定数及び求核付加反応速度となるプローブ分子を用いることで、超解像蛍光イメージングに適した蛍光明滅が得られることを利用したものである。なお、かかる求核付加－解離平衡反応をもたらす求核性化合物としては、ここで示した-SH基含有化合物以外にも、例えば、水や水酸化物イオン等の-OH基を含有する化合物、或いはタンパク質におけるリジン残基等の-NH基含有化合物を用いることができる。

[0043] 特に、グルタチオンは、細胞内に数mMオーダー前後の濃度で存在することが知られているため、かかる濃度範囲のグルタチオンの存在下で上記平衡反応による好ましい蛍光明滅が一般に用いられる検出器であるCCDカメラ等のフレームレートに最適化することによって、従来のように高濃度のチオール又は還元剤の別途添加や高強度のレーザー照射など、プローブ分子を無蛍光状態とするために外部刺激を用いることなく、生理的条件下の生細胞中において超解像蛍光イメージングを行うことができる。

[0044] さらに、本発明では、用いるレーザーの強度を従来の1/10程度で行うことができるため、細胞毒性を低減することができるという利点も有する。当該レーザーの強度は、0.0001～10kW/cm²程度であることが好

ましく、シグナル対ノイズ比（ S/N 比）や細胞毒性等の観点から、 $0.01 \sim 0.5 \text{ kW/cm}^2$ 程度であることがより好ましい。

[0045] SMLMによる超解像蛍光イメージングでは、光の回折限界よりも近接した場所において蛍光プローブ分子が発光することは好ましくないため、一度の測定において蛍光を発する状態のプローブ分子は、一定割合以下である必要がある。従って、上記平衡における化合物（I）と化合物（II）の存在比は、中性条件の水系溶液中において、室温で、 $1:10000 \sim 1:10$ であることが好ましく、 $1:1000 \sim 1:100$ がより好ましい。特に、プローブ分子と求核付加－解離平衡反応を行う求核性化合物が、細胞内に数mMオーダー前後の濃度で存在するグルタチオンである場合、このような存在比となるためには、上記求核付加－解離平衡の解離定数 K_d が、 $0.1 \mu\text{M} \sim 10 \text{ mM}$ の範囲内が好ましく、ラベル化密度の向上の観点から $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲内となることがより好ましい。当該解離定数は、 $K_d = [\text{平衡状態における（I）の濃度}] [\text{グルタチオンの濃度}] / [\text{平衡状態における（II）の濃度}]$ で表され、当該技術分野における周知の手法によって実験的に算出することができる。

[0046] また、検出器であるCCDカメラ等のフレームレートに対応させるためには、蛍光状態の式（I）の化合物の寿命は、1マイクロ秒～1秒の範囲であることが好ましく、シグナル対ノイズ比（ S/N 比）の向上の観点から1ミリ秒～1秒の範囲であることがより好ましい。そのような寿命の範囲となるためには、上記平衡における求核付加反応速度定数が、中性条件の水系溶液中において、室温で、 $1 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ の範囲であることが好ましく、 $1 \sim 1000 \text{ s}^{-1}$ の範囲であることがより好ましい。当該反応速度については、当該技術分野において公知のレーザーフラッシュフォトリシス等のシステムを用いて、ナノ秒レーザーによって蛍光プローブを励起し、ナノ秒～ミリ秒オーダーの過渡吸収を測定することによって算出することができる。

[0047] 上記求核付加－解離平衡反応において求核性分子として機能する化合物は、－SH基を含有する化合物であって、好ましくは、細胞内に存在する求核

性分子であるグルタチオンである。ただし、ここで挙げたグルタチオンに限らず、分子内に－S H基を有する分子であれば、広くシステイン残基を有する化合物やペプチドを含むことができ、上記平衡反応が得られる限り、これらの化合物等についても本発明において用いることが可能である。また、上述のとおり、－S H基を含有する化合物に代えて、分子内に－O H基や－N H基等の求核性官能基を有する化合物、例えば、水、リジン残基等を有する化合物やペプチドを含むことができ、上記平衡反応が得られるものであれば本発明における求核性化合物として用いることが可能である。

[0048] 上述のとおり、これら解離定数及び求核付加反応速度定数は、式（１）の化合物における置換基等として適切な組み合わせを選択する分子設計によって、より最適な解離定数及び反応速度を得ることもできる。

実施例

[0049] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

実施例 1

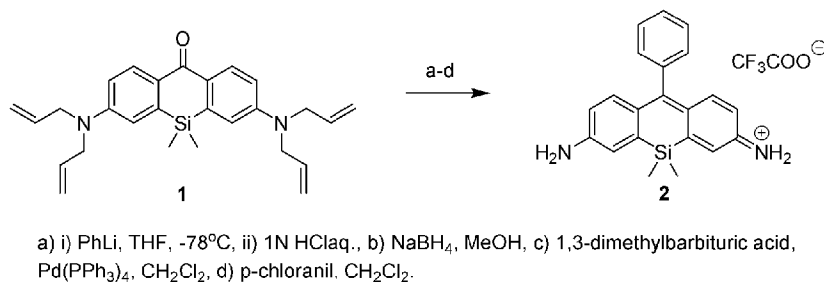
[0050] １．プローブ分子の合成

以下に示すとおり、本発明の超解像蛍光イメージング用プローブである化合物 2、5、12、14、16、17、28、32、33、34、及び35をそれぞれ合成した。

[0051] [化合物2の合成]

以下のスキームに従って化合物2を合成した。なお、化合物1はKushida K et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22 (2012) 3908-3911に開示されており、これに基づいて合成を行なった。

[化5]

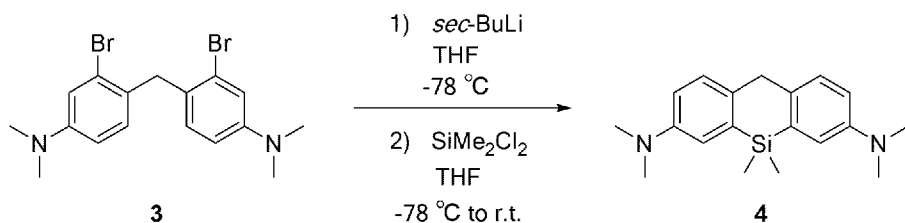


[0052] 化合物1 (23.8 mg, 0.056 mmol, 1 eq.) をTHF (5 ml) に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 ° Cで撹拌した。1.9 M フェニルリチウム ジブチルエーテル溶液 (200 μ l, 0.380 mmol, 7 eq.) をゆっくり加え、室温で1時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで3回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた化合物をメタノール (2 ml) に溶かし、水素化ホウ素ナトリウムを溶液の色が淡黄色になるまで加えた。水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた化合物を脱酸素したジクロロメタン (5 ml) に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸 (185 mg, 1.17 mmol, 21 eq.) 及びテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (11 mg, 9 μ mol, 0.2 eq.) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた化合物をクロラニル (23 mg, 0.094 mmol, 1.7 eq.) を加えて室温にて5分撹拌し、濃青紫色の反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: ジクロロメタン/メタノール = 100/0 to 80/20) にて分離し、青紫色のフラクションを回収して溶媒を減圧留去し、さらにHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (1回目: A/B = 90/10 to 10/90, 25 min、2回目: A/B = 70/30 to 30/70, 25 min)、目的化合物2 (10.2 mg, 41%)を青紫色固体として得た。

[0053] [化合物 4の合成]

以下のスキームに従って化合物4を合成した。なお、化合物3及び化合物4の合成については、Y. Koide et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 5029-5031. に開示されており、これに基づいて合成を行なった。

[化6]



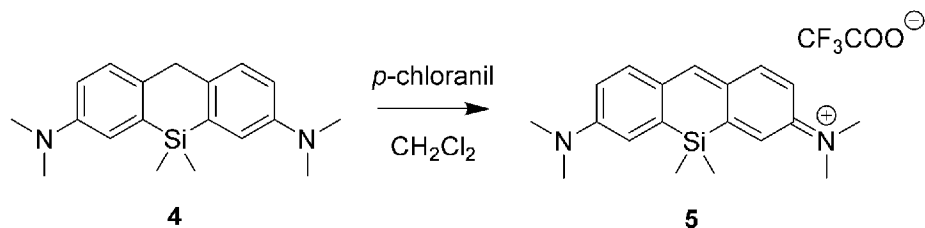
化合物3 (1.80 g, 4.37 mmol, 1 eq.) をTHF (100 ml) に溶かし、アルゴン雰囲気下、 -78°C で15分間撹拌した。1.1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液 (9 ml, 9.9 mmol, 2.3 eq.) を15分間かけてゆっくり加えた。次いでジクロロジメチルシラン (700 μl , 5.75 mmol, 1.3 eq.) をTHF (5 ml) に希釈して加えて徐々に室温に戻し、2時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、THFを減圧除去した。得られた水層を酢酸エチルで抽出し、次いで有機相を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 95/5 to 80/20)、目的化合物4 (852 mg, 63%) を薄黄色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.28 (s, 3H), 2.96 (s, 12H), 3.98 (s, 2H), 6.76 (dd, J = 8.4, 2.8 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ -2.6, 39.3, 41.3, 114.2, 117.7, 128.6, 135.3, 136.2, 148.8.

[0054] [化合物5の合成]

以下のスキームに従って化合物5を合成した。

[化7]



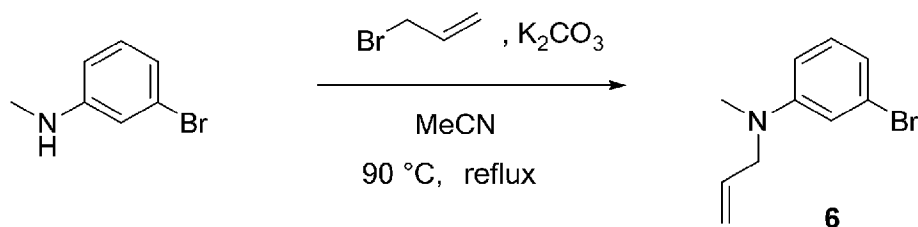
化合物4 (36.5 mg, 0.115 mmol, 1 eq.) をクロラニル (27 mg, 0.115 mmol, 1 eq.) を加えて室温にて10分攪拌し、濃青色の反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: ジクロロメタン/メタノール = 100/0 to 80/20) にて分離し、青色のフラクションを回収して溶媒を減圧留去し、さらにHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 10/90, 25 min)、目的化合物5 (53.6 mg, 96%)を青色固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 0.50 (s, 6H), 3.30 (s, 12H), 6.89 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 2.7 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.80 (s, 1H); HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 309.17815, Found, 309.17801 (-0.1 mmu).

[0055] [化合物6の合成]

以下のスキームに従って化合物6を合成した。

[化8]



炭酸カリウム (7.46 g, 54.0 mmol, 2.0 eq.) をアセトニトリル (20 ml) に懸濁させ、3-ブromo-N-メチルアニリン (4.96 g, 26.7 mmol, 1 eq.) 及び臭化アリル (3.87 g, 31.3 mmol, 1.2 eq.) を加え、攪拌しながら90 ° Cで終夜加熱還流した。反応混合物をセライトで濾過した後、濾物及びセライト

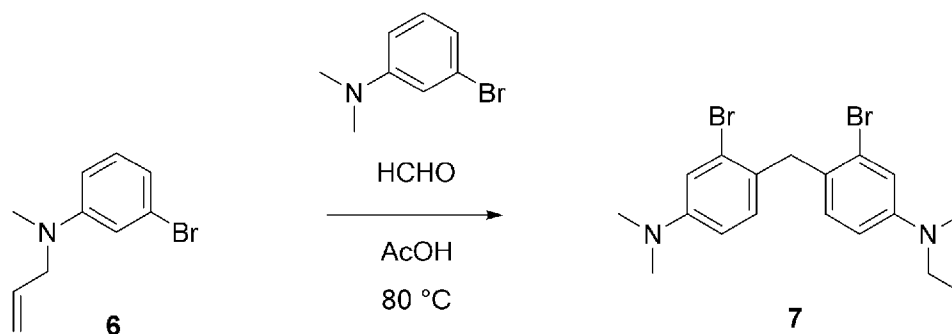
を酢酸エチルで洗浄し、濾液及び洗浄液の混合液から溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 98/2）、目的化合物6（5.98 g, 99 %）を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.95 (s, 3H), 3.91–3.93 (m, 2H), 5.15–5.21 (m, 2H), 5.79–5.89 (m, 1H), 6.63–6.65 (m, 1H), 6.82–6.86 (m, 2H), 7.06–7.10 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 38.1, 55.0, 110.9, 115.0, 116.4, 119.1, 123.5, 130.4, 133.1, 150.7; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 226.02259, Found, 226.02210 (−0.5 mmu).

[0056] [化合物7の合成]

以下のスキームに従って化合物7を合成した。

[化9]



化合物6（4.60 g, 20.4 mmol, 1 eq.）及び3-ブromo-N,N-ジメチルアニリン（5.00 g, 25.0 mmol, 1.2 eq.）を酢酸（10 ml）に溶かし、37 %ホルムアルデヒド水溶液（6.30 ml, 227 mmol, 11 eq.）を加え、80 °Cまで徐々に昇温させた後、3時間加熱した。反応混合液から酢酸を減圧除去し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、有機相を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ノルマルヘキサン/ジクロロメタン = 80/20 to 70/30 to 60/40 to 50/50）、目的化合物7を得た。

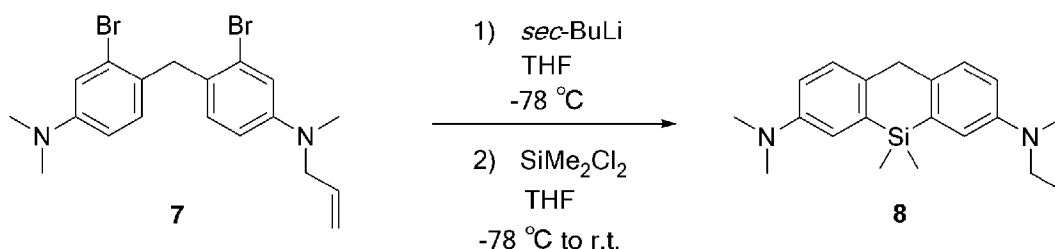
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.92 (s, 3H), 2.93 (s, 6H), 3.88–3.90 (m,

2H), 4.02 (s, 2H), 5.15–5.20 (m, 2H), 5.83 (ddt, 1H, $J = 14.8, 12.6, 4.9$ Hz), 6.57–6.62 (m, 2H), 6.85 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.88 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.95 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, THF-d_8): δ 38.2, 40.5, 40.6, 55.7, 112.6, 112.7, 116.3, 116.7, 116.8, 126.16, 126.17, 127.6, 127.7, 131.5, 131.6, 134.7, 150.1, 151.2; HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 437.02225, Found, 437.02225 (± 0.0 mmu).

[0057] [化合物8の合成]

以下のスキームに従って化合物8を合成した。

[化10]



化合物7 (900 mg, 2.05mmol, 1 eq.) をTHF (60 ml) に溶かし、アルゴン雰囲気下、 -78°C で15分間攪拌した。1 M *sec*-ブチルリチウム シクロヘキサン/*n*-ヘキサン溶液 (6.50 ml, 6.50 mmol, 3.2 eq.) を8分間かけてゆっくり加え、22分間攪拌した。次いでジクロロジメチルシラン (500 μl , 4.18 mmol, 2.0 eq.) のTHF (13 ml) 溶液を加えて徐々に室温に戻し、3時間攪拌した。2 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、THFを減圧除去した。得られた水層をジクロロメタンで抽出し、次いで有機相を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 94/6)、目的化合物8 (382 mg, 55 %)を得た。

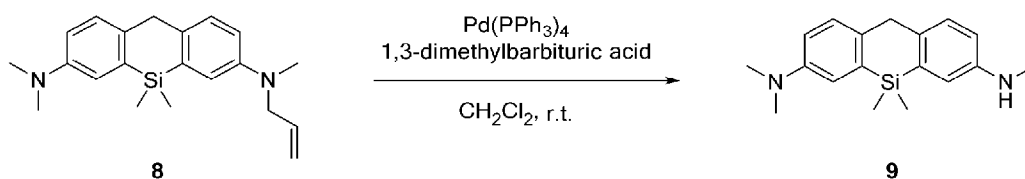
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.44 (s, 6H), 2.927–2.93 (m, 9H), 3.90–3.91 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 5.12–5.20 (m, 2H), 5.85 (ddt, 1H, $J = 17.2,$

10.2, 5.2 Hz), 6.69–6.74 (m, 2H), 6.97 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 7.15–7.19 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ -2.7, 38.3, 39.2, 41.2, 55.9, 114.0, 114.2, 116.4, 117.4, 117.6, 128.56, 128.58, 134.3, 134.9, 135.3, 136.09, 136.13, 147.5, 148.8; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 337.20945, Found, 337.20957 (+0.1 mmu).

[0058] [化合物9の合成]

以下のスキームに従って化合物9を合成した。

[化11]



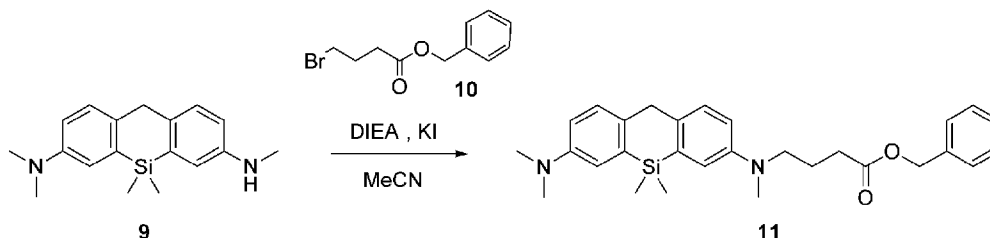
化合物8 (382 mg, 1.13 mmol, 1 eq.)を脱酸素したジクロロメタン (14 ml) に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸 (1.48 g, 9.48 mmol, 8.4 eq.) 及びテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (274 mg, 237 μmol , 0.2 eq.) を加え、室温にて終夜撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 91/9 to 70/30)、目的化合物9 (289 mg, 86 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.44 (s, 6H), 2.85 (s, 3H), 2.93 (s, 6H), 3.94 (s, 2H), 6.58 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.6$ Hz), 6.73 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.8$ Hz), 6.85 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 7.14 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.18 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ -2.7, 31.2, 39.4, 41.3, 113.3, 114.3, 117.4, 117.7, 128.6, 128.7, 135.4, 135.7, 136.1, 136.4, 147.1, 148.8; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 297.17815, Found, 297.17853 (+0.4 mmu).

[0059] [化合物11の合成]

以下のスキームに従って化合物11を合成した。なお、化合物10の合成については、J. Le Notre et al., Adv. Synth. Catal. 349, 432 (2007). に開示されており、これに基づいて合成を行なった。

[化12]



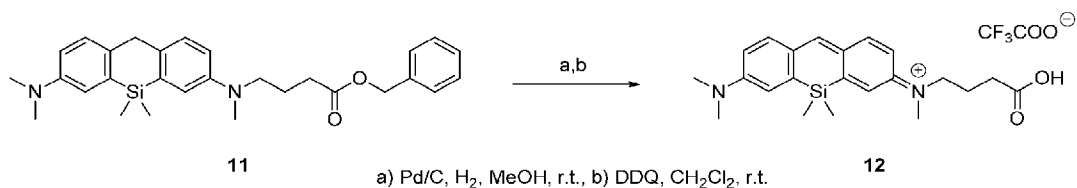
化合物9 (102.8 mg, 0.347 mmol, 1 eq.) 及び化合物10 (756.9 mg, 2.94 mmol, 8.5 eq.) をアセトニトリル (4 ml) に溶かし、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (512 μ l, 2.94 mmol, 8.5 eq.) 及び少量のヨウ化カリウムを加え、80 °Cで5.5時間加熱還流した。水を加え、ジクロロメタンで抽出し、有機相を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 86/14 to 65/35)、目的化合物11 (91.7 mg, 56 %)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.45 (s, 6H), 1.93 (quin, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.41 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.90 (s, 3H), 2.94 (s, 6H), 3.34 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.95 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.68 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.8$ Hz), 6.74 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.8$ Hz), 6.95 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.18 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.31–7.36 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ -2.7, 22.4, 31.8, 38.6, 39.2, 41.2, 52.4, 66.4, 113.8, 114.2, 117.2, 117.3, 117.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.65, 128.67, 134.8, 136.0, 136.1, 136.2, 147.3, 148.8, 173.2; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 473.26188, Found, 473.26185 (-0.0 mmu).

[0060] [化合物12の合成]

以下のスキームに従って化合物12を合成した。

[化13]



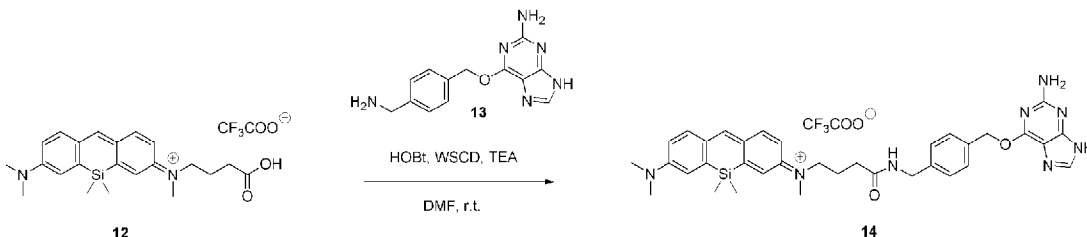
化合物11 (171 mg, 0.361 mmol, 1 eq.) をメタノールに溶かし、パラジウム炭素を加え、水素雰囲気下、室温で2日間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液から溶媒を減圧除去した。得られた残渣をジクロロメタンに溶かし、2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-p-ベンゾキノン (180.3 mg, 0.794 mmol, 2.2 eq.) を加え、室温で終夜撹拌した。水を加え、ジクロロメタンで抽出し、有機相を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物12 (110 mg, 61 %)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.54 (s, 6H), 1.95–2.02 (m, 2H), 2.45 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 3.34 (s, 3H), 3.37 (s, 6H), 3.73–3.77 (m, 2H), 6.98 (dd, 1H, J = 9.2, 2.7 Hz), 7.02 (dd, 1H, J = 9.1, 2.6 Hz), 7.33 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 7.51 (m, 1H), 7.71–7.73 (m, 2H, g), 7.87 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN): δ -1.3, 23.0, 31.1, 39.8, 41.4, 53.1, 115.06, 115.12, 122.3, 122.4, 128.25, 128.31, 144.0, 144.1, 148.42, 148.44, 155.68, 156.17, 160.6, 174.8; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 381.19928, Found, 381.19929 (+0.0 mmu).

[0061] [化合物14の合成]

以下のスキームに従って化合物14を合成した。なお、化合物13の合成については、Nat. Biotech., 2003, 21, 86–89に開示されており、これに基づいて合成を行なった。

[化14]



化合物12 (9.40 mg, 0.0190 mmol, 1 eq.) を脱水N,N-ジメチルホルムアミドに溶かし、化合物13 (7.5 mg, 0.0277 mmol, 1.5 eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.1 mg, 0.0594 mmol, 3.1 eq.)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (6.6 mg, 0.0344 mmol, 1.8 eq.)、及びトリエチルアミン (10 μ l, 0.0717 mmol, 3.8 eq.)を加え、アルゴン雰囲気下、室温で21時間撹拌した後、化合物13 (2.3 mg, 0.00850 mmol, 0.45 eq.)を加え、さらに24時間撹拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し(溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物14 (7.5 mg, 53 %)を得た。

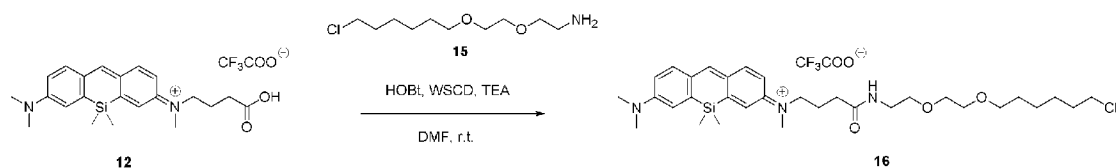
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.52 (s, 6H), 1.99–2.06 (m, 2H), 2.38 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 3.33 (s, 3H), 3.37 (s, 6H), 3.70–3.74 (m, 2H), 4.41 (s, 2H), 5.63 (s, 2H), 6.96–7.00 (m, 2H), 7.31 (d, 1H, J = 2.3 Hz), 7.35 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.41 (br s, 1H), 7.52 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.68–7.72 (m, 2H), 7.86 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ -1.4, 24.0, 33.1, 39.5, 41.0, 43.8, 53.4, 70.8, 108.2, 115.3, 122.3, 122.4, 128.86, 128.95, 128.98, 130.2, 135.4, 141.0, 143.5, 144.5, 144.6, 149.0, 149.1, 153.7, 156.2, 156.8, 158.3, 161.09, 161.11, 161.7, 174.6; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 633.31163, Found, 633.31169 (+ 0.1 mmu).

[0062] [化合物16の合成]

以下のスキームに従って化合物16を合成した。なお、化合物15の合成については、J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 6184–61

9 1 に開示されており、これに基づいて合成を行なった。

[化15]



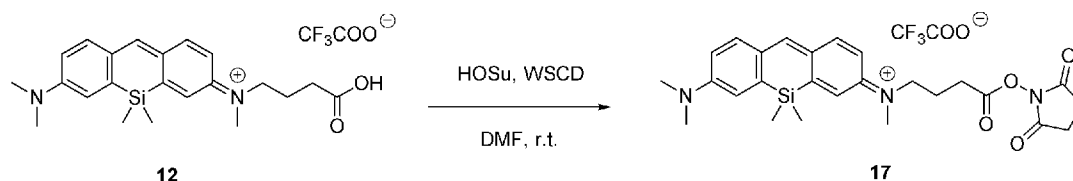
化合物12 (11.3 mg, 0.0228 mmol, 1 eq.) を脱水N,N-ジメチルホルムアミド (1.5 ml) に溶かし、化合物15 (9.1 mg, 0.0407 mmol, 1.8 eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.1 mg, 0.0451 mmol, 2.0 eq.)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (7.2 mg, 0.0375 mmol, 1.6 eq.)、及びトリエチルアミン (14.3 μ l, 0.103 mmol, 4.5 eq.) を0 °Cで加え、アルゴン雰囲気下で徐々に室温に戻し、終夜撹拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物16 (9.21 mg, 58 %)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.55 (s, 6H), 1.32–1.44 (m, 4H), 1.55 (quin, 2H, J = 7.0 Hz), 1.72 (quin, 2H, J = 7.0 Hz), 1.98–2.05 (m, 2H), 2.33 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 3.34 (s, 3H), 3.38 (s, 6H), 3.44 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 3.50–3.60 (m, 10H), 3.73 (t, 2H, J = 7.7 Hz), 6.98–7.03 (m, 2H), 7.33 (d, 1H, J = 2.5 Hz), 7.41 (br s, 1H), 7.71–7.73 (m, 2H), 7.88 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ -1.4, 24.0, 26.5, 27.7, 30.5, 33.2, 33.7, 39.6, 40.4, 41.0, 45.7, 53.4, 70.5, 71.21, 71.24, 72.2, 115.26, 115.29, 122.3, 122.4, 128.97, 129.00, 144.57, 144.60, 149.0, 149.1, 156.2, 156.8, 161.1, 174.8; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 586.32262, Found, 586.32267 (+0.0 mmu).

[0063] [化合物17の合成]

以下のスキームに従って化合物17を合成した。

[化16]



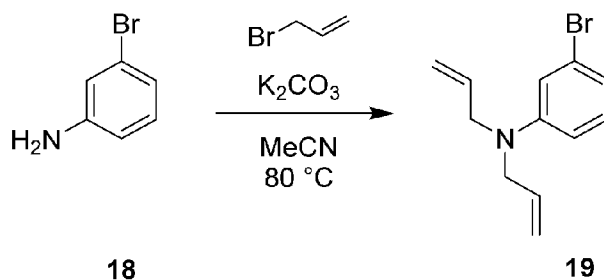
化合物12 (7.0 mg, 0.0142 mmol, 1 eq.) を脱水N,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) に溶かし、N-ヒドロキシコハク酸イミド (8.7 mg, 0.0756 mmol, 5.3 eq.) 及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (6.1 mg, 0.0318 mmol, 2.2 eq.) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で33時間攪拌した後、N-ヒドロキシコハク酸イミド (9.8 mg, 0.0852 mmol, 6.0 eq.) 及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (11.1 mg, 0.0579 mmol, 4.1 eq.) を加え、さらに43時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物17 (1.7 mg, 20 %)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.53 (s, 6H), 2.10–2.17 (m, 2H), 2.82 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 2.87 (s, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.38 (s, 6H), 3.80–3.84 (m, 2H), 6.98–7.04 (m, 2H), 7.34 (d, 1H, J = 2.6 Hz), 7.38 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.71–7.74 (m, 2H), 7.89 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ -1.5, 23.2, 26.5, 28.7, 39.5, 41.1, 52.6, 115.3, 115.4, 122.1, 122.4, 129.0, 129.1, 144.6, 144.8, 148.9, 149.4, 156.1, 156.9, 161.4, 170.2, 171.8; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 478.21566, Found, 478.21559 (−0.1 mmu).

[0064] [化合物19の合成]

以下のスキームに従って化合物19を合成した。

[化17]



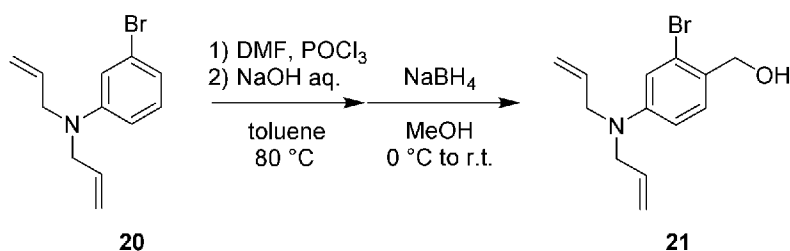
炭酸カリウム (11.96 g, 86.54 mmol, 2.5 eq.) をアセトニトリル (40 ml) に懸濁させ、3-ブロモアニリン (5.96 g, 34.65 mmol, 1 eq.) 及び臭化アリル (21.89 g, 180.9 mmol, 5.2 eq.) を加え、攪拌しながら 80°C で26時間加熱還流した。室温に戻した後、反応混合物をセライトで濾過し、濾物及びセライトを酢酸エチルで洗浄し、濾液及び洗浄液の混合液から溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 89/11)、目的化合物19 (5.68 g, 22.5 mmol, 65 %) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.93–3.95 (m, 4H), 5.20–5.25 (m, 4H), 5.83–5.93 (m, 2H), 6.64–6.67 (m, 1H), 6.84–6.89 (m, 2H), 7.06–7.10 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 52.7, 110.9, 115.0, 116.3, 119.1, 123.4, 130.3, 133.3, 149.9; HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 252.03824, Found, 252.03819 (−0.1 mmu).

[0065] [化合物21の合成]

以下のスキームに従って化合物21を合成した。

[化18]



アルゴンガスを封入したフラスコ内で化合物20 (1.57 g, 6.22 mmol, 1 eq.

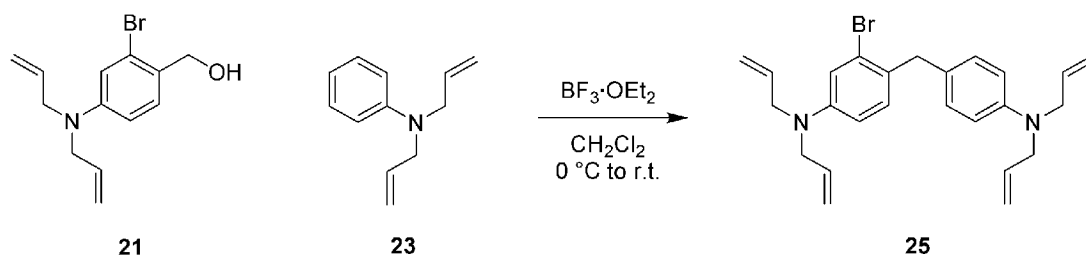
た。臭化アリル (2.58 g, 21.29 mmol, 0.6 eq.) を追加した後、80 ° Cでさらに13時間攪拌及び加熱還流した。室温に戻した後、反応混合物をセライトで濾過し、濾物及びセライトを酢酸エチルで洗浄し、濾液及び洗浄液の混合液から溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 97/3)、目的化合物23 (5.35 g, 30.9 mmol, 94 %) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.86–3.88 (m, 4H), 5.10–5.18 (m, 4H), 5.82 (ddt, 2H, $J = 17.2, 10.3, 4.9$ Hz), 6.64–6.68 (m, 3H), 7.14–7.19 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 52.8, 112.4, 116.0, 116.4, 129.1, 134.1, 148.7; HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 174.12773, Found, 174.12867 (+0.9 mmu).

[0067] [化合物25の合成]

以下のスキームに従って化合物25を合成した。

[化20]



化合物21 (386.0 mg, 1.368 mmol, 1.1 eq.) 及び化合物23 (218.8 mg, 1.263 mmol, 1 eq.) を脱水ジクロロメタン (10 ml) に溶かし、0 ° C下で三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (500 μl , 4.051 mmol, 3.2 eq.) を少しずつ加え、10分間攪拌した後、室温に戻してさらに3時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 88/12)、目的化合物25 (395.2 mg, 0.903 mmol, 72 %) を得た。

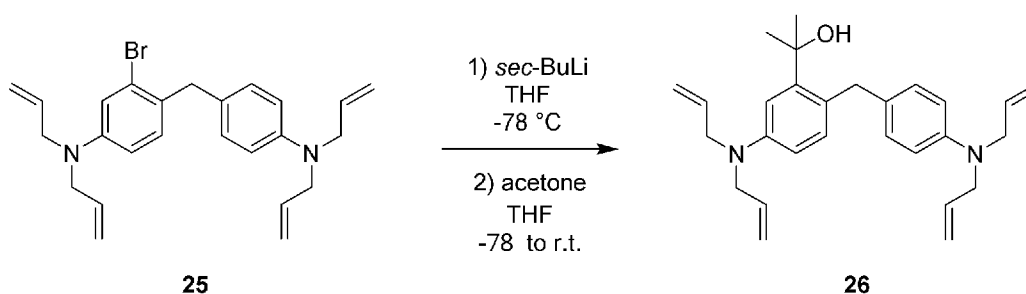
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.90–3.94 (m, 10H), 5.17–5.25 (m, 8H), 5.8

2-5.94 (m, 4H), 6.60 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.7$ Hz), 6.67-6.70 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 6.98 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.08 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 39.7, 52.9, 53.0, 111.9, 112.6, 116.06, 116.12, 116.3, 125.5, 128.4, 128.6, 129.6, 131.1, 133.7, 134.4, 147.2, 148.1; HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 437.15869, Found, 437.15873 (+0.0 mmu).

[0068] [化合物26の合成]

以下のスキームに従って化合物26を合成した。

[化21]



アルゴンを封入したフラスコ内で化合物25 (208.5 mg, 0.477 mmol, 1 eq.) を脱水テトラヒドロフラン (15 ml) に溶かし、攪拌しながら -78°C に冷却した。1 M *sec*-ブチルリチウム シクロヘキサン/ノルマルヘキサン溶液 (1.0 ml, 1.0 mmol, 2.1 eq.) を少しずつ加え、10分間攪拌した。次いで脱水アセトン (210 μl , 2.85 mmol, 6.0 eq.) を少しずつ加え、 -78°C のまま15分間攪拌した後、室温に戻し、さらに5時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、テトラヒドロフランを減圧除去した。得られた水相をジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラフィーで精製し (溶離液: ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 89/11 to 68/32)、目的化合物26 (125.8 mg, 0.302 mmol, 63 %) を得た。

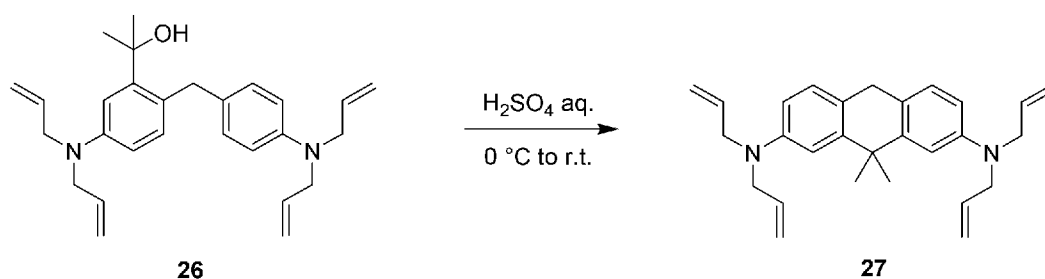
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.61 (s, 6H), 1.77 (s, 1H), 3.87-3.89 (m, 4H), 3.91-3.92 (m, 4H), 4.17 (s, 2H), 5.12-5.23 (m, 8H), 5.80-5.92 (m, 4H), 6.57 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.7$ Hz), 6.62 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 6.83

(d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 6.94–6.98 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 31.9, 38.0, 53.0, 53.2, 74.3, 110.3, 111.4, 112.7, 116.1, 116.2, 126.5, 129.4, 130.9, 134.0, 134.5, 134.6, 146.6, 146.9, 147.0; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 417.29004, Found, 417.29000 (-0.0 mmu).

[0069] [化合物27の合成]

以下のスキームに従って化合物27を合成した。

[化22]



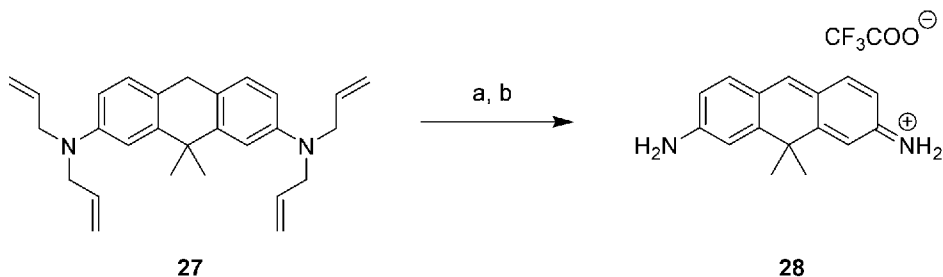
0 ° C下で化合物26 (188.5 mg, 0.452 mmol, 1 eq.) に80 %硫酸を加え、30分間攪拌した後、室温に戻し、さらに30分間激しく攪拌した。水を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去し、目的化合物 (177.2 mg, 0.445 mmol, 98 %) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.49 (s, 6H), 3.80 (s, 2H), 3.91–3.93 (m, 8H), 5.12–5.21 (m, 8H), 5.89 (ddt, 4H, $J = 17.2, 10.3, 5.0$ Hz), 6.57 (dd, 2H, $J = 8.3, 2.6$ Hz), 6.90 (d, 2H, $J = 2.6$ Hz), 7.02 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 29.4, 34.6, 40.6, 54.6, 110.7, 112.2, 116.3, 126.0, 129.1, 136.1, 146.7, 148.8; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 399.27948, Found, 399.27955 ($+0.1$ mmu).

[0070] [化合物28の合成]

以下のスキームに従って化合物28を合成した。

[化23]



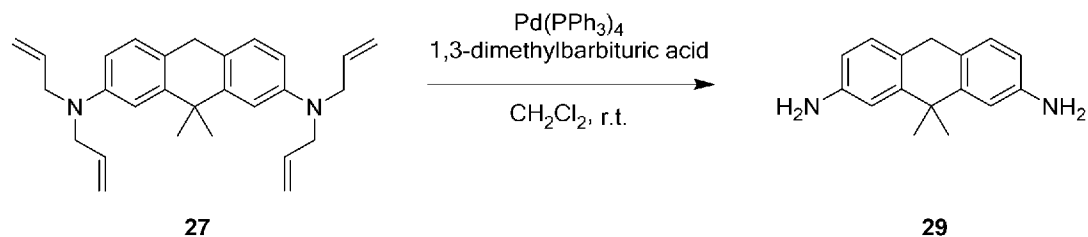
1,3-ジメチルバルビツール酸 (60.55 mg, 0.388 mmol, 27 eq.) 及びテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (7.8 mg, 0.00675 mmol, 0.47 eq.) を入れたフラスコにアルゴンを封入し、脱酸素したジクロロメタン (7 ml) に溶かした化合物27 (5.7 mg, 0.0143 mmol, 1 eq.) を加え、室温で終夜撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をジクロロメタンに溶かし、p-クロラニル (20.0 mg, 0.0813 mmol, 5.7 eq.) を加え、室温で1時間撹拌した。水を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物28 (2.1 mg, 0.00599 mmol, 42 %) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.63 (s, 6H), 6.77 (dd, 2H, J = 8.7, 2.0 Hz), 7.08 (dd, 2H, J = 2.0, 0.8 Hz), 7.63 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.06 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 33.5, 42.6, 114.1, 116.0, 122.1, 141.6, 156.2, 159.5, 161.4; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 237.13862, Found, 237.13854 (-0.1 mmu).

[0071] [化合物29の合成]

以下のスキームに従って化合物29を合成した。

[化24]

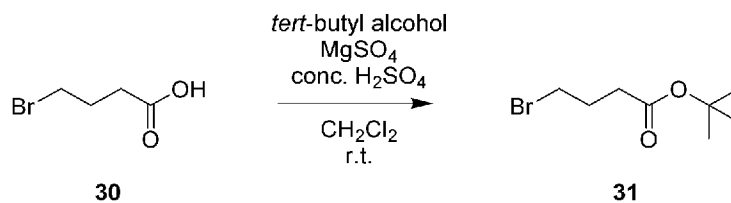


1,3-ジメチルバルビツール酸 (2.99 g, 19.14 mmol, 25 eq.) 及びテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (181.0 mg, 0.157 mmol, 0.2 eq.) を入れたフラスコにアルゴンを封入し、脱酸素したジクロロメタン (15 ml) に溶かした化合物27 (307.0 mg, 0.770 mmol, 1 eq.) を加え、室温で4時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し(溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物29 (157.0 mg, 0.65 mmol, 86 %) を得た。

[0072] [化合物31の合成]

以下のスキームに従って化合物31を合成した。

[化25]



4-ブロモ酪酸 (2.57 g, 15.39 mmol, 1 eq.) をジクロロメタン (20 ml) に溶かし、硫酸マグネシウム (7.74 g, 64.30 mmol, 4.2 eq.)、tert-ブチルアルコール (5.70 g, 76.95 mmol, 5 eq.)、及び濃硫酸 (0.25 ml) を加え、室温で2日間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を中圧シリカゲルクロマトグラ

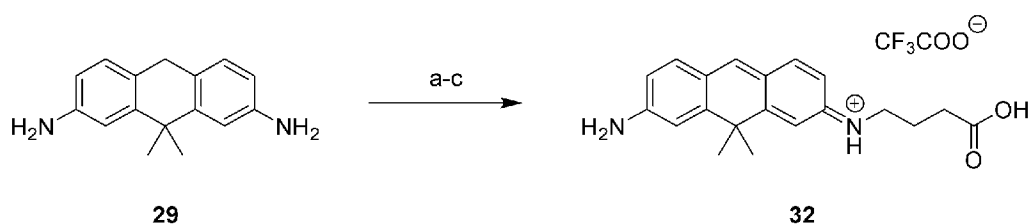
フィーで精製し（溶離液：ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 50/50）、目的化合物31（1.17 g, 5.24 mmol, 47 %）を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.27 (s, 9H), 1.91–1.98 (m, 2H), 2.22 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 27.9, 28.0, 32.8, 33.7, 80.5, 171.7.

[0073] [化合物32の合成]

以下のスキームに従って化合物32を合成した。

[化26]



化合物29（31.0 mg, 0.130 mmol, 1 eq.）をアセトニトリル（2 ml）に溶かし、化合物31（22.3 mg, 0.100 mmol, 0.8 eq.）、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン（113.3 μl , 0.650 mmol, 5 eq.）、及び少量のヨウ化カリウムを加え、60 °Cで21時間攪拌した後、80 °Cでさらに7時間攪拌した。室温に戻した後、水を加え、ジクロロメタンで抽出し、次いで有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をジクロロメタン（10 ml）に溶かし、トリフルオロ酢酸（2 ml）を加え、室温で2時間攪拌した後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をジクロロメタン（5 ml）及びメタノール（2 ml）に溶かし、*p*-クロラニル（34.1 mg, 0.139 mmol, 1.1 eq.）を加え、室温で30分間攪拌した後、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（溶離液A（ H_2O , 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸）、溶離液B（アセトニトリル, 1 % H_2O ）（A/B = 90/10 to 0/100 40 min））、目的化合物29（11.7 mg, 0.0268 mmol, 21 %）を得た。

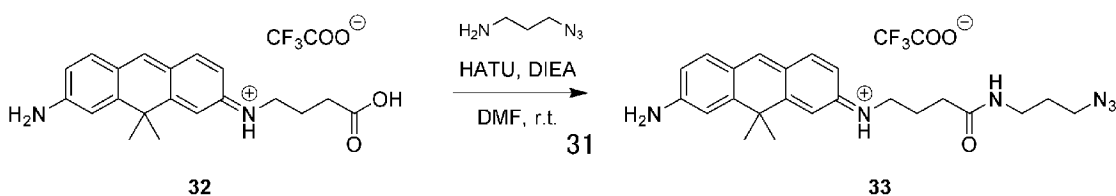
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.65 (s, 6H), 1.94–2.01 (m, 2H), 2.46 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.50 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 6.77 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.7$ Hz), 6.84 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.09 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.15 (br s,

^1H), 7.61–7.66 (m, 2H), 8.05 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 25.2, 31.7, 33.6, 43.5, 114.1, 116.0, 122.2, 122.4, 141.4, 155.9, 159.6, 161.2, 176.6; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}]^+$, 323.17540, Found, 323.17538 (–0.0 mmu).

[0074] [化合物33の合成]

以下のスキームに従って化合物33を合成した。

[化27]



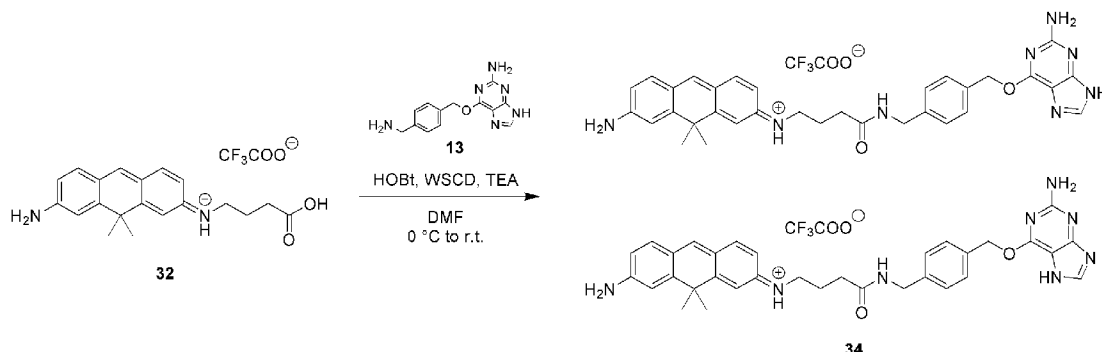
化合物32 (1.1 mg, 0.00252 mmol, 1 eq.) をN,N-ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶かし、0 ° C下で3-アジドプロピルアミン (0.74 μL , 0.00756 mmol, 3 eq.)、N,N-ジイソプロピルアミン (8.8 μL , 0.0504 mmol, 20 eq.)、及び 0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (5.9 mg, 0.0155 mmol, 6.1 eq.) を加え、15分間攪拌した後、室温に戻してさらに13時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H_2O , 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H_2O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物33 (1.0 mg, 0.00193 mmol, 77 %) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.66 (s, 6H), 1.76 (qui, 2H, $J = 6.7$ Hz), 1.99 (qui, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.35 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.27 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.35 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.48 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 6.77 (dd, 1H, $J = 2.1, 8.7$ Hz), 6.83 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.09–7.11 (m, 2H), 7.11 (brs, 1H), 7.62–7.67 (m, 2H), 8.06 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 25.9, 29.7, 33.6, 33.8, 37.8, 40.4, 43.7, 43.7, 50.1, 114.1, 116.0, 122.2, 122.4, 141.5, 155.9, 159.5, 161.3, 175.1; HRMS (ESI^+): Calcd for $[\text{M}]^+$, 405.24028, Found, 405.23991 (–0.4 mmu).

[0075] [化合物34の合成]

以下のスキームに従って化合物34を合成した。

[化28]



化合物32 (1.15 mg, 0.00356 mmol, 1 eq.) 及び化合物13 (3.6 mg, 0.0133 mmol, 3.3 eq.) をN,N-ジメチルホルムアミド (1.5 ml) に溶かし、0 °C下で1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (4.5 mg, 0.0235 mmol, 6.6 eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (2.0 mg, 0.0148 mmol, 4.2 eq.)、及びトリエチルアミン (4.96 μ l, 0.0356, 10 eq.) を加え、10分間攪拌した後、室温に戻してさらに22時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物34 (1.3 mg, 0.00189 mmol, 72 %) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.62 (s, 6H), 1.98–2.05 (m, 2H), 2.40 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 3.44–3.48 (m, 2H), 4.40 (s, 2H), 5.59 (s, 2H), 6.75–6.81 (m, 2H), 7.06–7.08 (m, 2H), 7.33 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.49 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.60–7.65 (m, 2H), 8.03 (s, 1H), 8.16 (s, 1H); HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 575.28775, Found, 575.28769 (–0.1 mmu).

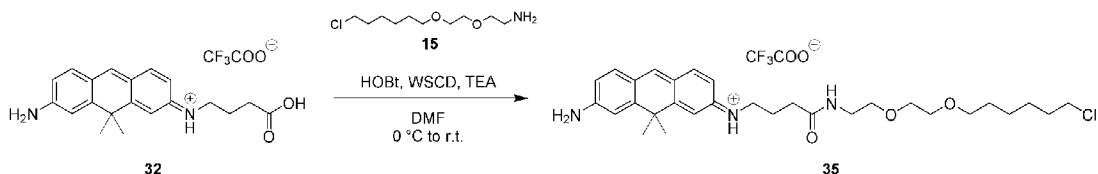
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.62 (s, 6H, f), 1.98–2.05 (m, 2H, l), 2.40 (t, 2H, J = 7.0 Hz, m), 3.44–3.48 (m, 2H, k), 4.39 (s, 2H, o), 5.59 (s, 2H, r), 6.74–6.79 (m, 2H, c, h), 7.06–7.08 (m, 2H, b, i), 7.32 (d, 2H, J = 8.0 Hz, q), 7.48 (d, 2H, J = 8.0 Hz, p), 7.59–7.64 (m, 2H

, d, g), 8.00 (s, 1H, t), 8.02 (s, 1H, e),; HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 575.28775, Found, 575.28769 (−0.1 mmu).

[0076] [化合物35の合成]

以下のスキームに従って化合物35を合成した。

[化29]



化合物32 (2.3 mg, 0.00711 mmol, 1 eq.) 及び化合物15 (5.3 mg, 0.0237 mmol, 3.3 eq.) をN,N-ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶かし、0 °C下で1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (3.2 mg, 0.0167 mmol, 2.3 eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.0 mg, 0.0222 mmol, 3.1 eq.)、及びトリエチルアミン (9.9 μ l, 0.0711, 10 eq.) を加え、15分間攪拌した後、室温に戻してさらに2日間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をHPLCで精製し (溶離液A (H₂O, 1 % アセトニトリル, 0.1 % トリフルオロ酢酸)、溶離液B (アセトニトリル, 1 % H₂O) (A/B = 90/10 to 0/100 40 min))、目的化合物35 (1.2 mg, 0.00187 mmol, 36 % yield) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.29–1.43 (m, 4H), 1.563 (qui, 2H, J = 7.2 Hz), 1.66 (s, 6H), 1.69–1.77 (m, 2H), 2.00 (qui, 2H, J = 7.2 Hz), 2.36 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 3.37–3.61 (m, 14H), 6.77 (dd, 1H, J = 2.0, 8.8 Hz), 6.84 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.09–7.11 (m, 2H), 7.62–7.64 (m, 2H), 8.06 (s, 1H); HRMS (ESI⁺): Calcd for [M]⁺, 528.29875, Found, 528.29876 (+0.0 mmu).

実施例 2

[0077] 解離定数の算出

本発明のプロブ化合物について、グルタチオン添加に伴う吸収スペクト

ル変化及び蛍光スペクトル変化を測定し、本発明のプローブ化合物とグルタチオンとの間の求核付加－解離平衡反応における解離定数を算出した。

[0078] 図1～5に、化合物2、5、12、14、16の吸収スペクトル変化（左図）、蛍光スペクトル変化（中央図；励起波長：化合物2は570nm、化合物5、14及び16は620nm、化合物12は600nm）、及び吸光度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）をそれぞれ示す。測定は、プローブ化合物が1 μ Mの1%DMSO水溶液で行った。得られた解離定数の値を以下の表1-1に示す。

[表1-1]

表1-1

プローブ化合物	解離定数
化合物2	3.7 μ M
化合物5	1.5 μ M
化合物12	3.4 μ M
化合物14	6.0 μ M
化合物16	23 μ M

[0079] 同様に、図6及び7に、化合物28及び32の吸収スペクトル変化（左図）、蛍光スペクトル変化（中央図；励起波長530nm）、及び吸光度及び蛍光強度のグルタチオン濃度依存性のプロット（右図）をそれぞれ示す。測定は、プローブ化合物が1 μ Mの1%DMSO水溶液で行った。得られた解離定数の値を以下の表1-2に示す。

[表1-2]

表1-2

プローブ化合物	解離定数
化合物28	3.6 μ M
化合物32	35 μ M（吸光度）
	37 μ M（蛍光強度）

[0080] これら化合物の解離定数は、いずれも $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の範囲であり、細胞内と同程度である数 mM のグルタチオン濃度下において、その大部分が無蛍光性求核付加体として存在することが分かった。このことは、蛍光を発光する未反応のプローブ化合物と、グルタチオンと反応して消光した化合物との存在比率が SMLM による超解像蛍光イメージングに適した範囲内であることを示している。

実施例 3

[0081] 反応速度の算出

レーザーフラッシュフォトリシスにより、種々のグルタチオン濃度における本発明のプローブ化合物の過渡吸収の経時変化を測定することによって、本発明のプローブ化合物とグルタチオンとの間の求核付加－解離平衡反応における求核付加反応速度定数 k 、求核付加反応速度時定数 τ を算出した。溶液条件は、1% DMSO 水溶液、 $\text{pH } 7.4$ (10 mM NaPi バッファー) である。測定条件は 295 K で、光源は 10 mJ/pulse の XeCl エキシマーレーザー (308 nm) である。化合物 2、5、12、28、及び 32 について得られた結果をそれぞれ表 2～6 に示す。

[表2]

表2:化合物2

グルタチオン濃度 (mM)	k (s^{-1})	τ (ms)
0.5	1.21	823
1	2.05	487
5	11.0	90.7
10	25.0	40.1

[表3]

表3:化合物5

グルタチオン濃度 (mM)	k (s ⁻¹)	τ (ms)
0.1	14.3	69.9
0.5	95.8	10.4
1	176.2	5.67
5	976	1.02
10	2290	0.436

[表4]

表4:化合物12

グルタチオン濃度 (mM)	k (s ⁻¹)	τ (ms)
0.1	7.49	134
0.5	42.8	23.4
1	75.6	13.2
5	444	2.25
10	1080	0.93

[表5]

表5:化合物28

グルタチオン濃度 (mM)	k (s ⁻¹)	τ (ms)
0.1	21.1	47.5
0.5	195	5.12
1	371	2.69
5	2170	0.46
10	5260	0.19

[表6]

表6:化合物32

グルタチオン濃度 (mM)	k (s ⁻¹)	τ (ms)
0.1	15.8	63.1
0.5	61.7	16.2
1	106	9.45
5	592	1.69
10	1410	0.71

[0082] 表2～表6の結果より、本発明のプローブ化合物は、グルタチオンとの間の求核付加がミリ秒オーダーの時定数で進行すること、及び、従来の1/10以下の強度のレーザー照射下で超解像蛍光イメージングに適した蛍光明滅を示すことが明らかとなった。

実施例 4

[0083] 蛍光量子収率の測定

本発明のプローブ化合物について、蛍光量子収率を測定した。溶液条件は、プローブ化合物1 μ M、1%DMSO水溶液、pH7.4(200mM NaPiバッファー)である。化合物5、12、14、16、17、28、及び32について得られた結果を表7に示す。本発明のプローブ化合物は、SMLMによる超解像蛍光イメージングに適した高い蛍光量子収率を示すことが明らかとなった。

[表7]

表7

プローブ化合物	蛍光量子収率
化合物 5	0.39
化合物 12	0.46
化合物 14	0.27
化合物 16	0.49
化合物 17	0.46
化合物 28	0.70
化合物 32	0.69

実施例 5

[0084] 超解像多色イメージング

本発明のプローブ化合物でラベル化した抗体を用いて、細胞の超解像イメージングを行った。

[0085] 1. 抗体へのプローブのラベル化

化合物 5 の末端にスクシンイミジルエステルを導入したプローブ化合物である化合物 17 を DMSO に溶解し、1 mM 及び 10 mM のストック溶液を調製した。 β -チューブリンの間接免疫染色のためのヤギ由来・抗マウス二次抗体 (IgG、Sigma-Aldrich 社) 及び Tom20 の間接免疫染色のためのヤギ由来・抗ウサギ二次抗体 (IgG、Jackson ImmunoResearch 社) をそれぞれ、0.2 M のリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.5) 中で化合物 17 と混和した (室温、30 分間)。プローブ化合物でラベル化した抗体を、溶離液としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.4、GIBCO 社) を用いて PD MiniTrapTM G-25 (GEヘルスケア社) によって精製した。抗体に対するプローブ化合物の標識度 (DOL) として、プローブ化合物 [mol] / 抗体

分子 [mol] の比を算出した。ここで、プローブ化合物の濃度はプローブ化合物に由来する吸光度の測定値から算出し、抗体分子の濃度は、精製処理における抗体分子の損失はなかったものと仮定して、調製に使用した抗体分子の全量から算出した。超解像イメージング (SMLM) においては、標識度が 2.1 であるラベル化抗マウス抗体及び標識度が 1.3 であるラベル化抗ウサギ抗体を使用した。

[0086] 化合物 28 の末端にアジド基を導入したプローブ化合物である化合物 33 についても、同様に抗体へのラベル化を行った。化合物 33 及びジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル (DBCO-NHS、Sigma-Aldrich 社) をそれぞれ DMSO に溶解し、10 mM のストック溶液を調製した。β-チューブリンの間接免疫染色のためのヤギ由来・抗マウス二次抗体 (IgG、Sigma-Aldrich 社) を 0.2 M のリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.5) 中で DBCO-NHS と混和した (室温、30 分間)。DBCO-NHS でラベル化した抗体 (DBCO-IgG) を、溶離液として PBS (pH 7.4、GIBCO 社) を用いて PD MiniTrap™ G-25 (GEヘルスケア社) によって精製した。次いで、得られた DBCO-IgG を含む溶離液に、化合物 33 のストック溶液を加え、PBS (pH 7.4、GIBCO 社) 中で混和した (室温、30 分間)。プローブ化合物でラベル化した抗体 (DBCO-IgG) を、溶離液として PBS (pH 7.4、GIBCO 社) を用いて PD MiniTrap™ G-25 (GEヘルスケア社) によって精製した。

抗体に対するプローブ化合物の標識度 (DOL) として、プローブ化合物 [mol] / 抗体分子 [mol] の比を算出した。ここで、プローブ化合物の濃度はプローブ化合物に由来する吸光度の測定値から算出し、抗体分子の濃度は、精製処理における抗体分子の損失はなかったものと仮定して、調製に使用した抗体分子の全量から算出した。超解像イメージング (SMLM) においては、標識度が 1.4 であるラベル化抗体を使用した。

[0087] 2. 細胞固定及び免疫染色

アフリカミドリザルの腎臓に由来するペロ細胞を、フェノールレッド不含かつL-グルタミン含有のダルベッコ改変イーグル培地（高グルコース）（GIBCO社）にウシ胎仔血清（Invitrogen社）及び1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液（和光純薬工業社）を添加した培地中で培養した（37℃、5%CO₂）。イメージングを行う前日に、当該細胞をLab-Tek 118ウェルチャンバーのカバーガラス（Thermo Fisher Scientific社）に播種した。以下に挙げる文献を参考に、固定と免疫染色を以下のとおり行った。

・M. Bates, G. T. Dempsey, K. H. Chen, X. Zhuang, Multicolor Super-Resolution Fluorescence Imaging via Multi-Parameter Fluorophore Detection. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 13, 99-107 (2012)

・B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg, X. Zhuang, Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nature methods* 5, 1047-1052 (2008)

・C. Dellagiacoma et al., Targeted photoswitchable probe for nanoscopy of biological structures. *Chembiochem* 11, 1361-1363 (2010)

・D. R. Whelan, T. D. Bell, Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters. *Scientific reports* 5, 7924 (2015)

[0088] メタノールによる固定及びβ-チューブリンの免疫染色は以下のとおり行った。事前に37℃に温めたPBSで細胞を洗浄し、5mMのグリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）を含む-20℃のメタノールで5～10分間固定した。BRB80（1mMの塩化マグネシウム及び1mMのEGTAを含む80mMカリウムPIPESバッファー、pH6.8）で2～3回洗浄し、ブロッキングバッファー（1%ウシ血清アルブミンを含むPBS）で20分間ブロッキングした後、ブロッキングバッファーで希釈したマウス

抗 β -チューブリン抗体 (TUB2. 1、Sigma-Aldrich社、T4026、1/100希釈) を加え、1時間振盪した。BRB80で5分間ずつ2回洗浄し、ブロッキングバッファーで20分間ブロッキングした。次いで、ブロッキングバッファーで希釈したラベル化二次抗体 (10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で30分間染色し、BRB80又はPBSで5分間ずつ2回洗浄した。SMLMイメージングを行う前に、バッファーを1~10 mMのGSH (和光純薬工業社) を含む0.2 Mリン酸ナトリウムバッファーに置換した。

[0089] パラホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドによる固定、及び β -チューブリン及びTom20の免疫染色は以下のとおり行った。事前に37℃に温めたPBSで細胞を洗浄し、3%パラホルムアルデヒド及び0.1%グルタルアルデヒドを含むPBSで10分間室温で固定した。直前に調製した0.1%水素化ホウ素ナトリウムのPBS溶液により、未反応のアルデヒド基及び固定操作の間に生成した蛍光性生成物を還元処理した。PBSで洗浄した後、ブロッキングバッファー (3%BSA及び0.5% Triton X-100のPBS溶液) で20分間ブロッキング及び膜透過処理した。次いで、ブロッキングバッファーで希釈したマウス抗 β -チューブリン抗体 (TUB2. 1、Sigma-Aldrich社、T4026、/100希釈) 及び/又はウサギ抗Tom20抗体 (Santa Cruz、sc11415、1/50希釈) を加え、30分間振盪した。その後、試料を洗浄バッファー (0.2%BSA及び0.1% Triton X-100のPBS溶液) で、10分間ずつ3回洗浄した。ブロッキングバッファーで希釈したラベル化二次抗体 (β -チューブリンでは10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Tom20では10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で30分間染色した。洗浄バッファーで10分間ずつ3回洗浄し、さらにPBSで10分間洗浄し、3%パラホルムアルデヒド及び0.1%グルタルアルデヒドを含むPBSで室温で10分間、後固定した。その後、PBSで3回洗浄した。SMLMイメージングを行う前に、バッファーを1~10 mMのGSH (和光純薬工業社) を含む0.2 Mリン酸ナトリウ

ムバッファーに置換した。

[0090] 3. SMLMイメージング

N-STORM装置（ニコン社）を用いて、室温でSMLMイメージングを行った。プローブ化合物である化合物17及び化合物33の励起は、それぞれ647 nm（40～500 W/cm²）及び561 nm（40～500 W/cm²）のレーザー光を用いた全反射照明または全反射照明に近い遮光照明により行った。画像データは、15 ms／フレームまたは30 ms／フレームで記録し、画像統合ソフトウェア（NIS-Elements Advanced Research、ニコン社）により解析することで超解像度画像を構築した。超解像度画像の表示にあたっては、150フォトン以上又は200フォトン以上が検出された輝点のみを表示した。

[0091] 化合物17でラベル化した抗体を用いて、固定ペロ細胞中における微小管のSMLMイメージングを行った結果を図8に示す。図8aにおける右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。図8bは、図8aの平均化画像の上図（スケールバー：3 μm）中の帯状領域における規格化された蛍光強度の横断プロファイル及び超解像度画像の上図（スケールバー：3 μm）中の帯状領域における規格化された認識輝点数の横断プロファイルを示したものである。図8cは、図8aの平均化画像の下図（スケールバー：1 μm）中の枠内領域における規格化された蛍光強度の横断プロファイル及び超解像度画像の下図（スケールバー：1 μm）中の枠内領域における規格化された認識輝点数の横断プロファイルを示したものである。図8dは、図8aの超解像度画像の上図を構成する輝点に関してその位置決定精度の度数分布を示したものである。

[0092] 図8に示した結果は、化合物17でラベル化した抗体を用いて、固定ペロ細胞中における微小管の超解像度イメージングを実証したものである。超解像度画像は、微小管の線幅及び近接する微小管どうしの分離において、平均化画像よりも高い空間分解能を示した。

[0093] 化合物33でラベル化した抗体を用いて、固定ペロ細胞中における微小管

のSMLMイメージングを行った結果を図9に示す。図9における右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。

[0094] 図9に示した結果は、化合物33でラベル化した抗体を用いて、固定ペロ細胞中における微小管の超解像度イメージングを実証したものである。超解像度画像は、微小管の線幅及び近接する微小管どうしの分離において、平均化画像よりも高い空間分解能を示した。

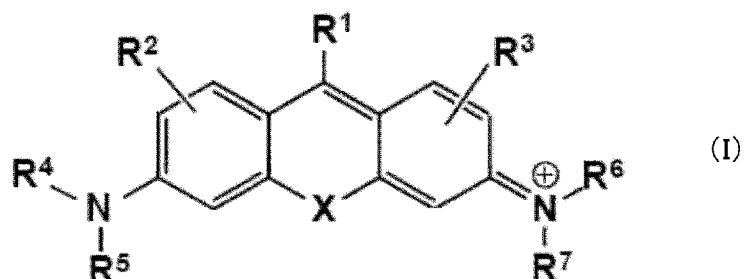
[0095] 化合物17でラベル化した抗体及び化合物33でラベル化した抗体を組み合わせる用いることにより、固定ペロ細胞中における微小管及びミトコンドリアの2色でのSMLMイメージングを行った結果を図10に示す。図10における右図がSMLMによる超解像度画像であり、左図は比較として蛍光強度の平均化画像を示したものである。化合物33でラベル化した抗体が緑色で示される微小管を染色しており、一方、化合物17でラベル化した抗体は赤色で示されるミトコンドリアを染色している。これらの画像をマージすることによって、赤色及び緑色で示される2色での超解像画像が得られた。

[0096] 図10の結果は、上記式(1)におけるXの原子を変えた2種類の本発明のプローブ化合物を用いることによって、2色の超解像イメージングに適用できることを実証するものである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式（I）で表される化合物

[化1]



〔式中、

Xは、酸素原子又はC（R^a）（R^b）又はS i（R^a）（R^b）を表し（ここで、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素原子、又はアルキル基を表す）；

R¹は、水素原子又は置換されていてもよいアリールを表し（ただし、R¹がフェニル基の場合、当該フェニル基のベンゼン環における2位又は6位の位置に置換基を有しない）；

R²及びR³は、それぞれ独立に、水素原子、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、スルホ基、カルボキシル基、エステル基、アミド基及びアジド基よりなる群から独立に選択される1～3個の同一又は異なる置換基を表し；

R⁴及びR⁵は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、N（R⁴）（R⁵）がアミド基もしくはカルバメート基を形成する（ここで、R⁴又はR⁵がアルキル基である場合、それぞれR²と一緒に、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい）；及び、

R⁶及びR⁷は、それぞれ独立に水素原子もしくは置換されていてもよいアルキル基を表し、又は、N（R⁶）（R⁷）がアミド基もしくはカルバメート基を形成する（ここで、R⁶又はR⁷がアルキル基で

ある場合、それぞれ R^3 と一緒にあって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。)]

又はその塩を含む超解像蛍光イメージング用プローブであって、式(1)で表される化合物又はその塩が、 $-SH$ 基を含有する求核性化合物との間で求核付加－解離平衡反応を行うことを特徴とする、該超解像蛍光イメージング用プローブ。

- [請求項2] 前記求核付加－解離平衡反応が、 R^1 が結合する炭素原子において行われる、請求項1に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項3] 前記求核付加－解離平衡反応における解離定数が、 $0.1\ \mu M \sim 10\ mM$ の範囲内であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項4] 前記求核付加－解離平衡反応における求核付加反応速度定数が、中性条件の水系溶液中において、 $1 \sim 1.0 \times 10^6\ s^{-1}$ であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項5] X が、 $C(R^a)(R^b)$ 又は $Si(R^a)(R^b)$ である、請求項1～4のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項6] R^a 及び R^b が、いずれもメチル基である、請求項5に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項7] R^1 は、水素原子又は置換されていてもよいフェニル基である(ただし、当該フェニル基のベンゼン環における2位又は6位の位置に置換基を有しない)、請求項1～6のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項8] R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれも水素原子である、請求項1～7のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項9] R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 が、いずれもメチル基である、請求項1～7のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。
- [請求項10] R^4 、 R^5 、 R^6 及び R^7 のうち少なくとも1つが、生体分子と共有結

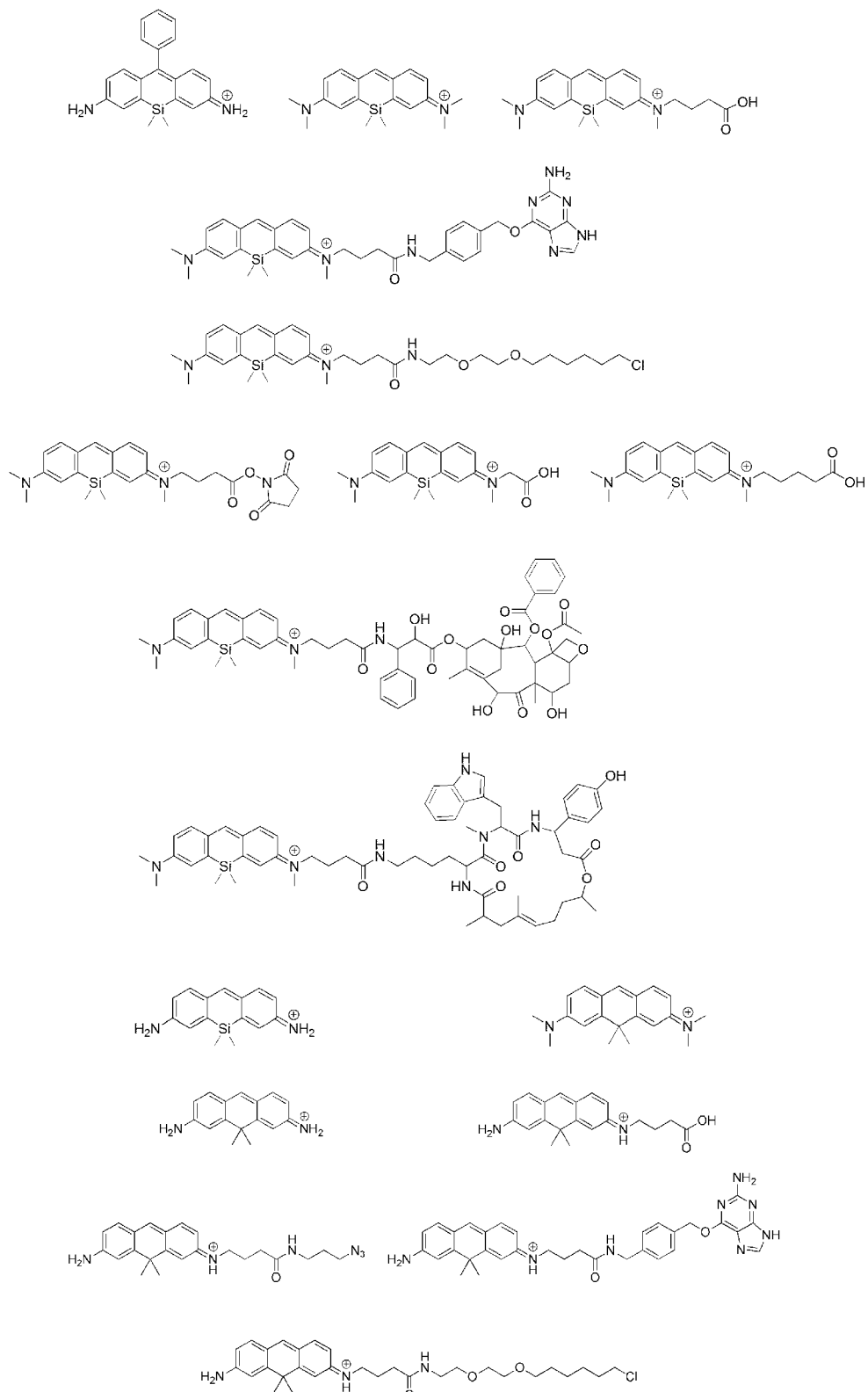
合又は非共有結合によって結合し得るラベル化置換基を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。

[請求項11] 前記－S H基を含有する化合物が、システイン残基を有する化合物である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。

[請求項12] 前記－S H基を含有する化合物が、グルタチオンである、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。

[請求項13] 式（I）で表される化合物が以下の群から選択される化合物である、請求項 1 に記載の超解像蛍光イメージング用プローブ。

[化2]



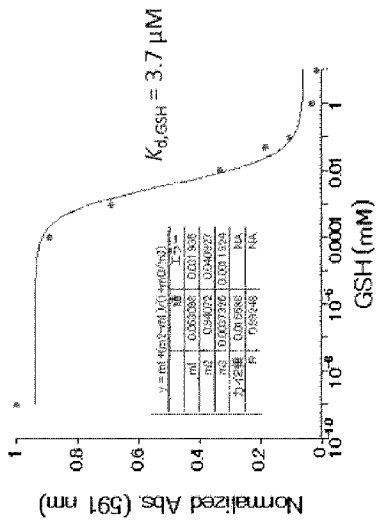
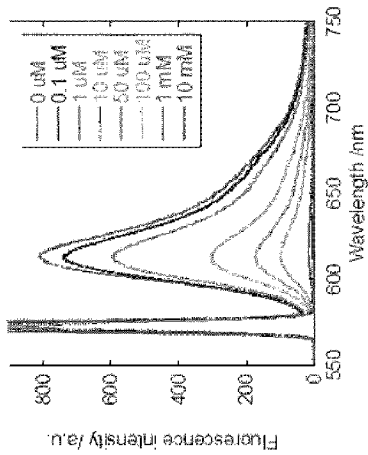
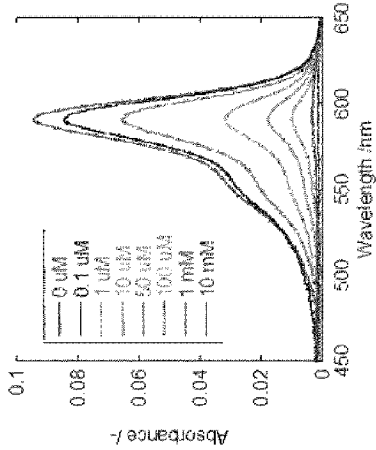
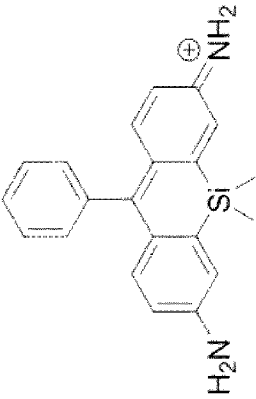
[請求項14]

請求項1～13のいずれか1項に記載の超解像蛍光イメージング用プローブを用いる超解像蛍光イメージング方法であって、

生体分子にプローブ分子を結合させ、 $-SH$ 基を含有する化合物の存在下でレーザー光を照射して前記プローブ分子からの蛍光発光を撮影した画像データを取得し、一定の時間間隔でこれを繰り返して得られた複数の前記画像データを解析したうえで重ね合わせることによって、前記生体分子の構造に対する超高解像のイメージ画像を得ることを含む、該方法。

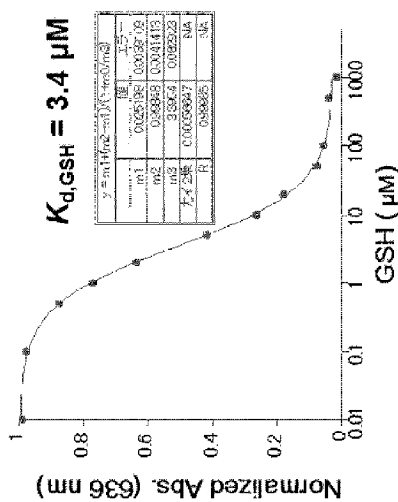
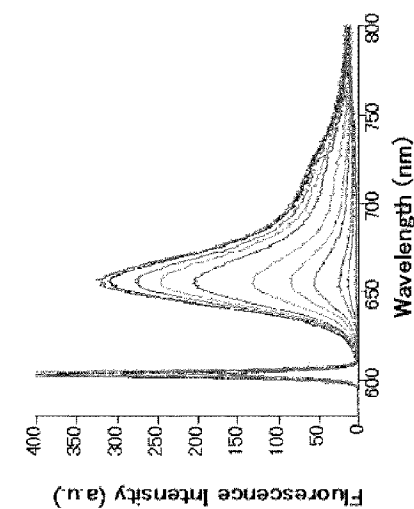
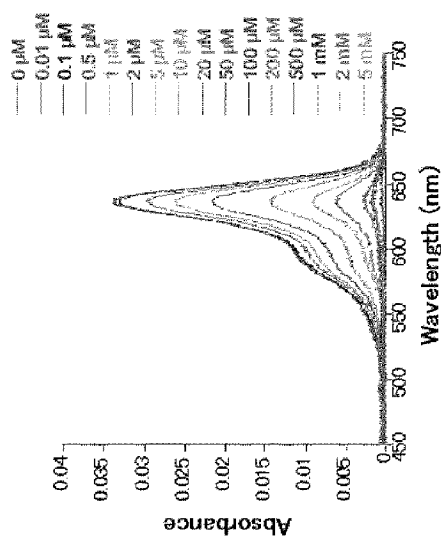
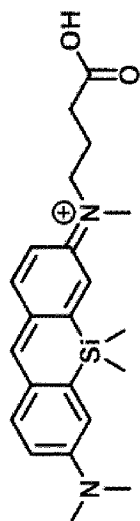
[図1]

化合物2 (Phe SiR600)



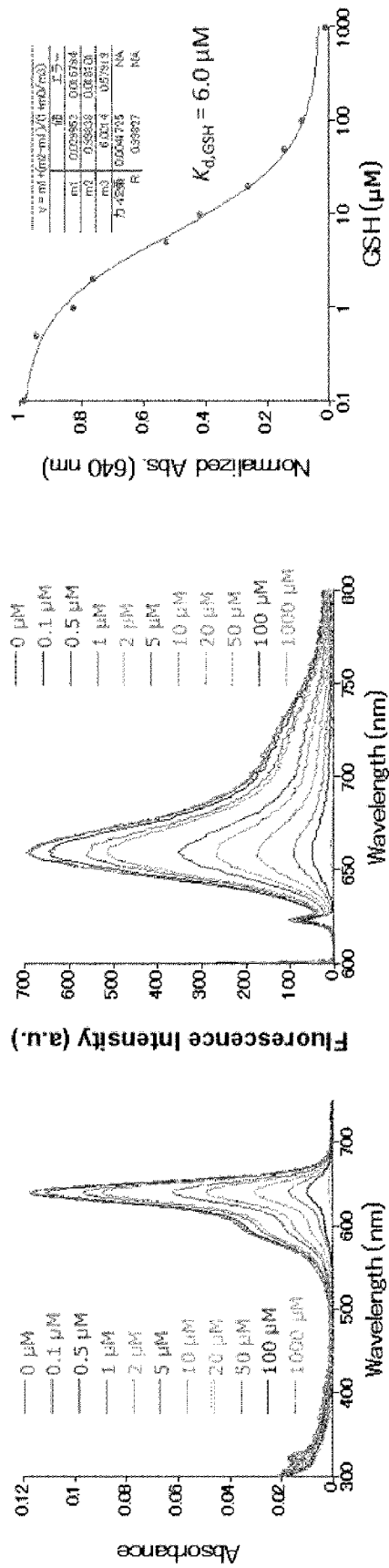
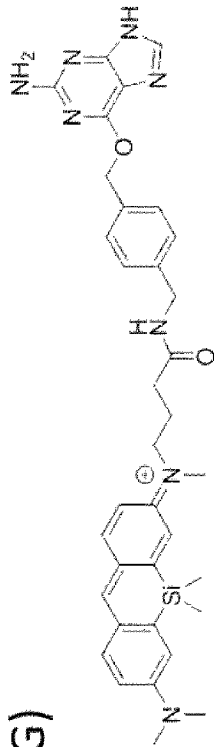
[図3]

化合物12 (SiP650-BA)



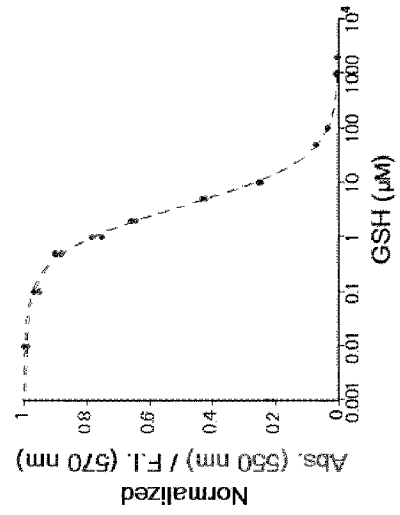
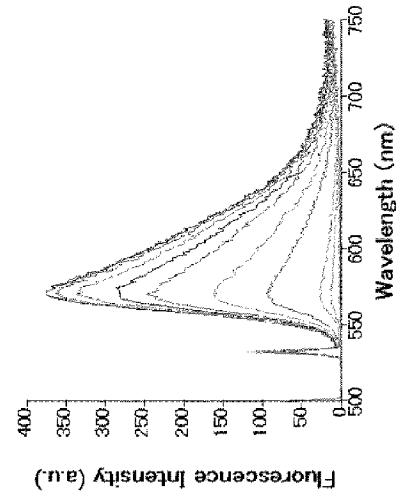
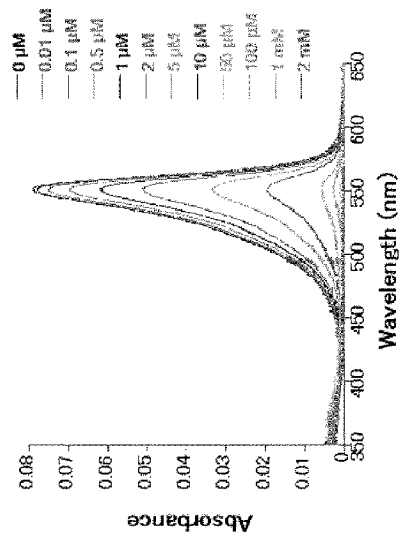
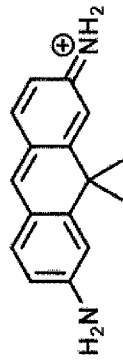
[図4]

化合物14 (SiP650-BG)



[図6]

化合物28 (CP550)

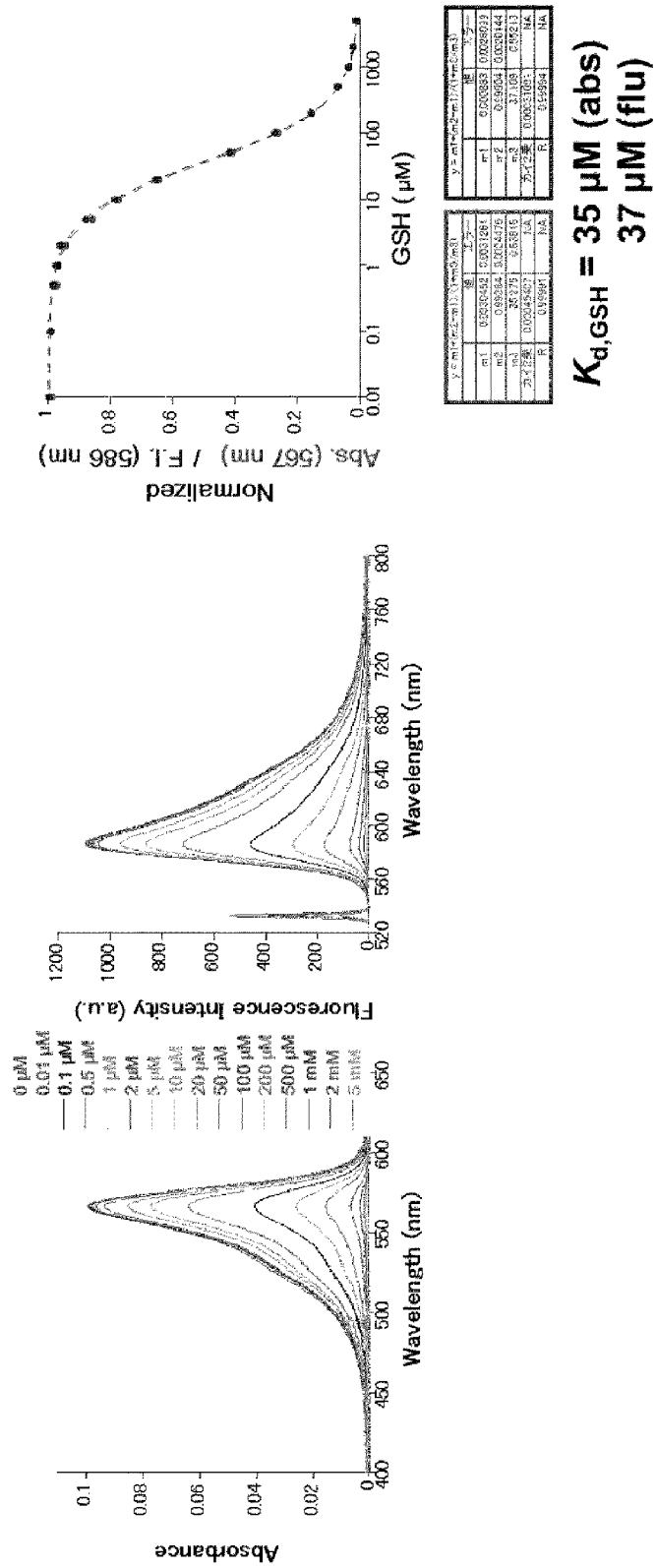
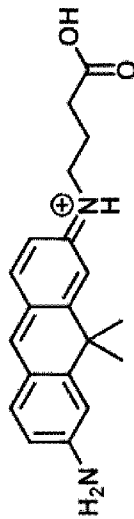


y = m1 * log2(m1) / (1 + exp(-m2))			y = m1 * log2(m1) / (1 + exp(-m2))		
m1	m2	χ²	m1	m2	χ²
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325
0.00071325	0.0048574	0.00071325	0.00071325	0.0048574	0.00071325

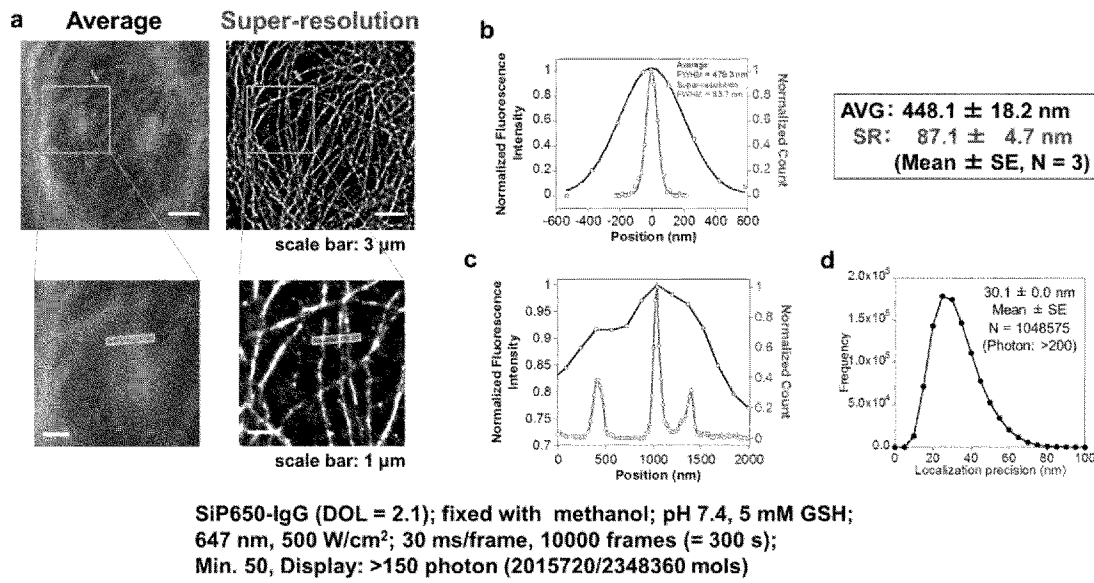
$$K_{d, \text{GSH}} = 3.6 \mu\text{M}$$

[図7]

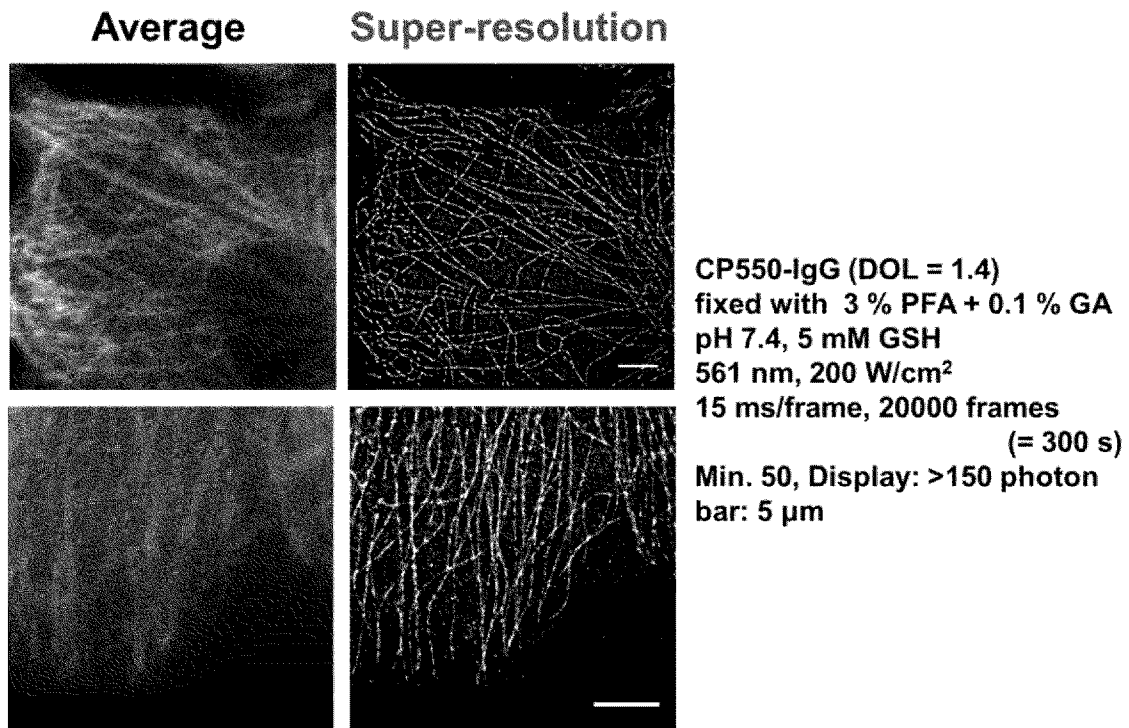
化合物32 (CP550-BA)



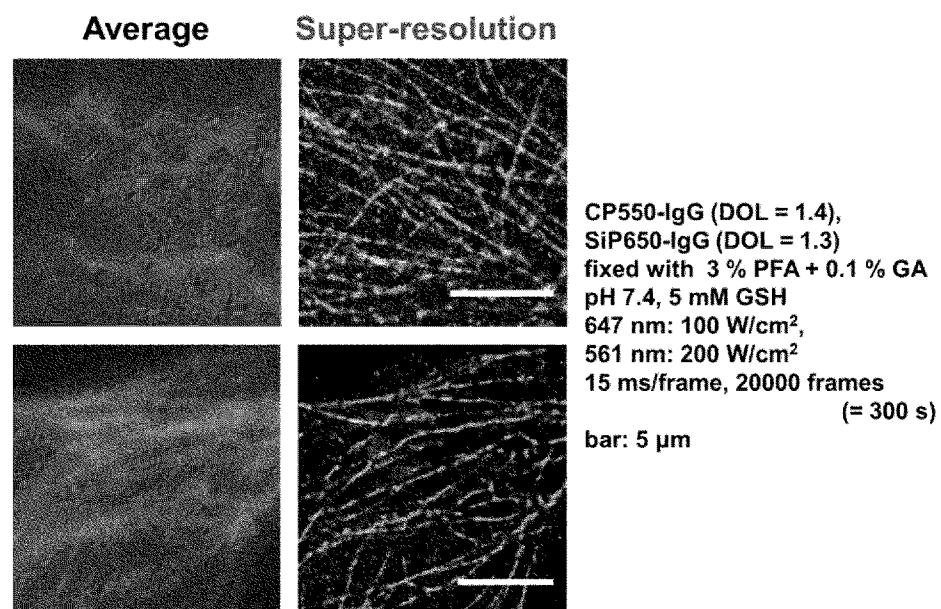
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/68(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/68, C09K11/06, G01N21/64, G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2012/111818 A1 (The University of Tokyo), 23 August 2012 (23.08.2012), claim 4; paragraphs [0001], [0047] to [0057] & US 2014/0342384 A1 claim 4; paragraphs [0001], [0047] to [0057] & JP 5807025 B2	1-7, 10-13 8, 9, 14
P, X P, Y	WO 2015/129705 A1 (The University of Tokyo), 03 September 2015 (03.09.2015), claim 1; paragraphs [0042], [0064], [0110], [0115], [0144] (Family: none)	1-7, 9-13 14
Y	JP 2014-157150 A (The University of Tokyo), 28 August 2014 (28.08.2014), claims 1, 10 (Family: none)	8, 9, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 March 2016 (25.03.16)

Date of mailing of the international search report
12 April 2016 (12.04.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/126816 A1 (OREGON STATE BOARD OF HIGHER EDUCATION ON BEHALF OF PORTLAND STATE UNIVERSITY), 29 August 2013 (29.08.2013), abstract; claims 1, 23 & JP 2015-516470 A & US 2015/0010938 A1 & EP 2817315 A1	1-14
A	WO 2014/106957 A1 (The University of Tokyo), 10 July 2014 (10.07.2014), claim 1; paragraphs [0112], [0113] & EP 2942352 A1 claim 1; paragraphs [0080], [0081] & US 2015/0353585 A1	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055199

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/055199

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Document 1: WO 2012/111818 A1 (The University of Tokyo), 23 August 2012 (23.08.2012), claim 4; paragraphs [0001], [0047] to [0057] & US 2014/0342384 A1, claim 4, paragraphs [0001], [0047] to [0057] & JP 5807025 B2

Claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) In claims 1-14, the parts wherein R^1 in formula (I) as claimed in claim 1 is a hydrogen atom.

(Invention 2) In claims 1-14, the parts wherein R^1 in formula (I) as claimed in claim 1 is an aryl group.

Document 1 discloses a fluorescent probe for detecting glutathione, said fluorescent probe comprising a compound having the same skeleton structure as in the present application wherein the moiety corresponding to R^1 in the present application is a phenyl group and a hydrogen atom is attached to the 2- or 6-position.

In claim 1 of the present invention, the point that R^1 is an aryl group does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in document 1. Thus, this technical feature cannot be considered as a special technical feature.

The part in claim 1 that is regarded as Invention 1 and the part in claim 1 that is regarded as Invention 2 have a common technical feature in the skeleton structure in other points. However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in document 1 and, therefore, cannot be considered as a special technical feature.

Moreover, it cannot be considered that a compound having a hydrogen atom has any properties similar to a compound wherein the hydrogen atom is substituted by an aryl group. Thus, there are neither the same nor corresponding special technical features between these inventions.

Subject to be covered by this search:

Claim 1 describes, in the case where R^1 in formula (I) is an aryl group, "represents an optionally substituted aryl group (provided that when R^1 is a phenyl group, the phenyl group has no substituent at the 2- or 6-position in the benzene ring thereof)". However, the statement in the parentheses has no technical meaning and, therefore, the scope of the supposed groups is unclear. With regard to this point, the description merely discloses "compound 2" that carries an unsubstituted phenyl group.

With regard to X, the description merely discloses the case where X is $>C(CH_3)_2$ or $>Si(CH_3)_2$.

In the case where X is an oxygen atom or X has no or large substituent(s) or where the compound has other large substituent(s), it is estimated that the properties of the compound as a fluorescent probe are largely affected thereby. Thus, claim 1 is not supported under the provision of Article 6 of the PCT.

In the present international search report, therefore, the international search relating to claims 1-14 was practiced exclusively on: (Invention 1) the case wherein R^1 in formula (I) as claimed in claim 1 is a hydrogen atom and X is $>C(CH_3)_2$ or $>Si(CH_3)_2$; and (Invention 2) the case wherein R^1 in formula (I) as claimed in claim 1 is a hydrogen atom and X is $>Si(CH_3)_2$.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/68, C09K11/06, G01N21/64, G01N21/78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2012/111818 A1 (国立大学法人 東京大学) 2012.08.23, 請求項 4, [0001][0047]-[0057] & US 2014/0342384 A1, cl.4, [0001][0047]-[0057] & JP 5807025 B2	1-7, 10-13 8, 9, 14
P, X P, Y	WO 2015/129705 A1 (国立大学法人 東京大学) 2015.09.03, 請求項 1, [0042][0064][0110][0115][0144] (ファミリーなし)	1-7, 9-13 14

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 4 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 裕美

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-157150 A (国立大学法人 東京大学) 2014. 08. 28, 請求項 1, 10 (ファミリーなし)	8, 9, 14
A	WO 2013/126816 A1 (OREGON STATE BOARD OF HIGHER EDUCATION ON BEHALF OF PORTLAND STATE UNIVERSITY) 2013. 08. 29, Abs., cls. 1, 23 & JP 2015-516470 A & US 2015/0010938 A1 & EP 2817315 A1	1-14
A	WO 2014/106957 A1 (国立大学法人 東京大学) 2014. 07. 10, 請求項 1, [0112] [0113] & EP 2942352 A1 , cl. 1, [0080] [0081] & US 2015/0353585 A1	1-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<第Ⅲ欄 の続き>

文献 1 ; WO 2012/111818 A1 (国立大学法人 東京大学) 2012. 08. 23,
請求項 4, [0001][0047]-[0057]
& US 2014/0342384 A1, c1. 4, [0001][0047]-[0057] & JP 5807025 B2

特許請求の範囲は、以下の 2 つの発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1 - 1 4 において、請求項 1 記載の式 (I) における、 R^1 が、水素原子である場合の部分

(発明 2) 請求項 1 - 1 4 において、請求項 1 記載の式 (I) における、 R^1 が、アリール基である場合の部分

文献 1 には、本願と同様の骨格構造を有し、本願の、 R^1 に相当する部分が、フェニル基であって、2 位又は 6 位の位置が水素原子であるものを含む、グルタチオンを検出するための蛍光プローブが記載されている。

本発明の請求項 1 において、 R^1 がアリール基である点は、文献 1 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、発明 1 に区分された請求項 1 の部分と、発明 2 に区分された請求項 1 の部分は、その他の骨格構造で共通の技術的特徴を有しているが、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、水素原子である場合とアリール基置換している場合とに、類似の性質を有するものとも認められないため、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

<調査の対象について>

請求項 1 記載の式 (I) における、 R^1 が、アリール基である場合、「置換されていてもよいアリール基を表し (ただし、 R^1 がフェニルの場合、当該フェニル基のベンゼン環における 2 位又は 6 位の位置に置換基を有しない)」と記載されているが、ただし書きの部分に技術的意義は存在せず、どのような範囲のものを想定しているのか明確でないところ、明細書には、置換基の存在しないフェニル基の「化合物 2」が記載されているにすぎない。

また、X についても、 $>C(CH_3)_2$ 、 $>Si(CH_3)_2$ 、の場合が開示されているにすぎない。

X について、酸素原子である場合や、X が無置換あるいは大きな置換基を有する場合、化合物において、他に大きな置換基を有する場合には、蛍光プローブとしての性質が大きく影響されると予測されるので、PCT 第 6 条の意味での裏付を欠いている。

よって、この国際調査報告においては、請求項 1 - 1 4 において、

(発明 1) 請求項 1 記載の式 (I) における、 R^1 が、水素原子である場合であって、X が $>C(CH_3)_2$ 又は $>Si(CH_3)_2$ 、の場合

(発明 2) 請求項 1 記載の式 (I) における、 R^1 が、水素原子である場合であって、X が $>Si(CH_3)_2$ の場合

について限定的に国際調査を行った。