

(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
2012 年 10 月 26 日(26.10.2012)



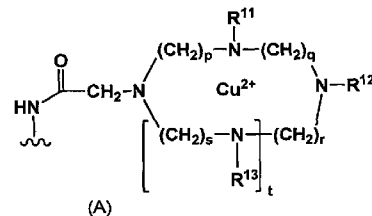
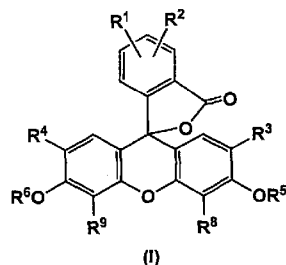
(10) 国際公開番号

WO 2012/144654 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 405/12 (2006.01) G01N 31/00 (2006.01)
C07D 493/10 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/061300
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 20 日(20.04.2012)
- (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 2011-095598 2011 年 4 月 22 日(22.04.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 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: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長野 哲雄
(NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒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). 花岡 健二郎 (HANAOKA, Kenjiro)
[JP/JP]; 〒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). 篠
倉 潔 (SASAKURA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒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: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS
& Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番
7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, 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, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: FLUORESCENT PROBE FOR MEASURING HYDROGEN SULFIDE

(54) 発明の名称: 硫化水素測定用蛍光プローブ



(57) Abstract: A compound represented by formula (I) (wherein R^1 represents a group represented by formula (A); R^2 represents a hydrogen atom or a univalent substituent; R^3 and R^4 independently represent a hydrogen atom or a halogen atom; R^5 and R^6 independently represent a hydrogen atom, an alkylcarbonyl group or the like; R^7 represents a hydrogen atom, an alkyl group or an alkoxyalkyl group; and R^8 and R^9 independently represent a hydrogen atom, a halogen atom or the like), which is useful as a fluorescent probe that can measure hydrogen sulfide specifically and with high sensitivity without being subjected to the influence of reduced glutathione.

(57) 要約: 還元型グルタチオンの影響を受けることなく高感度かつ特異的に硫化水素を測定することができる蛍光プローブとして有用な式(I)で表される化合物(R^1 は式(A)で表される基; R^2 は水素原子又は一価の置換基; R^3 及び R^4 は素原子又はハロゲン原子; R^5 及び R^6 は水素原子又はアルキルカルボニル基など; R^7 は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基; R^8 及び R^9 は水素原子、ハロゲン原子など)。

明 細 書

発明の名称： 硫化水素測定用蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は硫化水素測定用の蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] 硫化水素(H_2S)の毒性については300年前から知られており、今までに数多くの毒性に関する報告がなされてきた。一方、近年、 H_2S が生理的シグナル伝達物質として機能していることが明らかとなっており、一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)に次ぐ第三のガス性シグナル伝達物質として注目されている。

[0003] H_2S が果たす役割は H_2S ドナーである NaHS や Na_2S を用いて種々検討されているが、最もよく研究されている役割は平滑筋の弛緩に関する作用である。 H_2S は血管平滑筋及び腸管平滑筋などの弛緩をもたらす、個体レベルでは頭痛や血圧低下などの症状を引き起こす。一方、神経細胞においては H_2S が記憶形成に関与することが報告されており、さらに頸動脈小体における O_2 sensingやインスリンの分泌制御に H_2S が関与しているという報告もある。

[0004] このように、 H_2S が細胞内シグナル伝達に寄与していることが示唆されているが、生理的な H_2S が本当に存在しているかについてもまだ疑いの余地がある。また、 H_2S のターゲットとなる分子の同定も進んでおらず、具体的な細胞内のシグナル伝達機構には未解決の点が多い。このような背景から、生体内の H_2S を可視化する手段の開発が切望されている。

[0005] 蛍光プローブを用いて生体内の H_2S を特異的に可視化して高感度な測定を行うためには、水中で H_2S を測定することができること、他のアニオン種との間に選択性を有すること、及び還元型グルタチオン(GSH)との間で選択性を有することなどの条件が必須となる。従来、 H_2S を可視化して測定するための蛍光プローブとしてp-位にアミノ基を有する吸収変化型プローブである2,4,6-トリアリールピリリウムカチオン(Journal of the American Chemical Society

, 125, 9000, 2003)が提案されているが、GSHとの反応の競合を避けられないという問題がある。また、蛍光増大型プローブとして2,4-ジニトロベンゼンスルホニルフルオレセインを用いる方法も提案されているが(*Analytica Chimica Acta*, 631, 91, 2009)、経時的にスルホン酸エステルが加水分解して蛍光強度が変化するという問題を有している。

[0006] また、別の蛍光増大型プローブとして、二価銅イオン(Cu^{2+})を配位させた2,2'-ジピコリルアミン部分を有するアミノフルオレセイン化合物(DPA-4-AF)が提案されている(*Chem. Commun.*, pp.7390-7392, 2009)。この化合物では、 Cu^{2+} の配位によって蛍光が消光されているが、スルフィドイオン(HS^-)が作用すると Cu^{2+} が CuS となって不溶化し、消光が解除されて強蛍光を発する。この蛍光プローブは水中においてスルフィドイオンを検出することができ、種々のアニオン(ハロゲンイオン、硫酸イオン、酢酸イオン、硝酸イオン、次亜塩素酸イオンなど)の存在下においても特異的かつ高感度に H_2S を測定できるという特徴がある。しかしながら、本発明者らの追試によれば、この化合物は還元型グルタチオンとの間で選択性が低く、生体内に大量に存在するグルタチオンによりイン・ビボにおいて細胞内などに存在する H_2S を特異的かつ高感度に測定することができないという問題がある。なお、環状ポリアミンを亜鉛イオンの捕捉基として用いた化合物が知られているが(ダンシルアミノエチルサイクレン: *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 12696, 1996)、この捕捉基に銅イオンを配位させた化合物は知られておらず、 H_2S との反応性についても全く報告がない。また、環状ポリアミンをカドミウムイオンの捕捉基として用いた化合物も知られているが、この化合物と H_2S との反応性についても知られていない(*J. Am. Chem. Soc.*, 124, pp.3920-3925, 2002)。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: *Journal of the American Chemical Society*, 125, 9000, 2003

3

非特許文献2: *Analytica Chimica Acta*, 631, 91, 2009

非特許文献3 : Chem. Commun., pp.7390-7392, 2009

非特許文献4 : J. Am. Chem. Soc., 118, 12696, 1996

非特許文献5 : J. Am. Chem. Soc., 124, pp.3920-3925, 2002

発明の概要

発明が解決しようとする課題

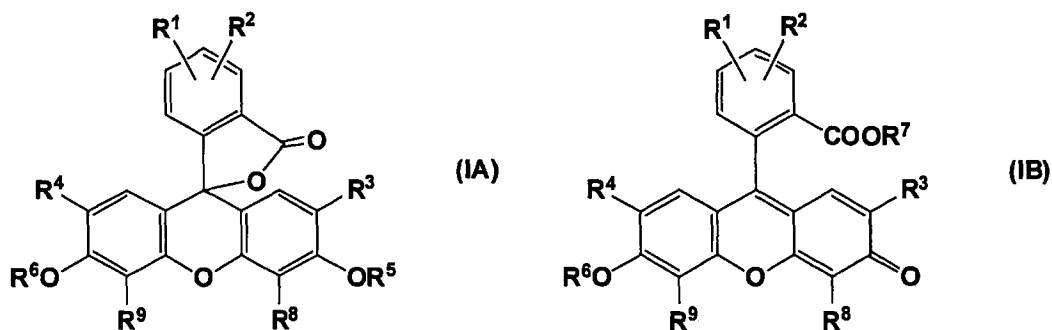
[0008] 本発明の課題は、生体内の硫化水素を特異的に可視化して高感度な測定を行うことができる蛍光プローブを提供することにある。特に、生体内に大量に存在する還元型グルタチオンの影響を受けることなく高感度かつ特異的に硫化水素を測定することができる蛍光プローブを提供することが本発明の課題である。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、下記の一般式(I)で表される化合物を硫化水素測定用の蛍光プローブとして用いると、還元型グルタチオンの存在下においても極めて高感度かつ特異的に硫化水素を測定することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

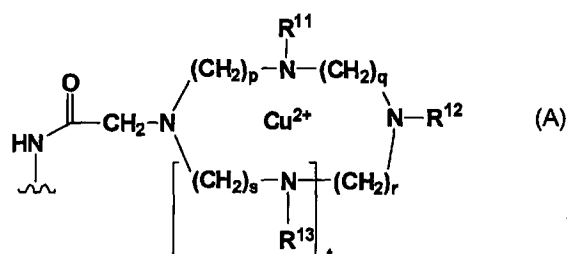
[0010] すなわち、本発明により、下記の一般式(IA)又は(IB) :

[化1]



[式中、R¹は下記式(A) :

[化2]



(式中、 p 、 q 、 r 、及び s はそれぞれ独立に2又は3の整数を示し、 t は0又は1を示し、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} はそれぞれ独立に水素原子又は炭素原子数1～6のアルキル基を示す)で表される基を示し； R^2 は水素原子又はベンゼン環上に置換する1個ないし3個の一価の置換基を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^5 及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示し； R^7 は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基を示し； R^8 及び R^9 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は $-(CH_2)_x-N(R^{14})(R^{15})$ (式中、 x は1ないし4の整数を示し、 R^{14} 及び R^{15} はそれぞれ独立に $-(CH_2)_y-COOR^{16}$ (式中、 y は1ないし4の整数を示し、 R^{16} は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示す)で表される基を示す)で表される基を示す]で表される化合物又はその塩が提供される。

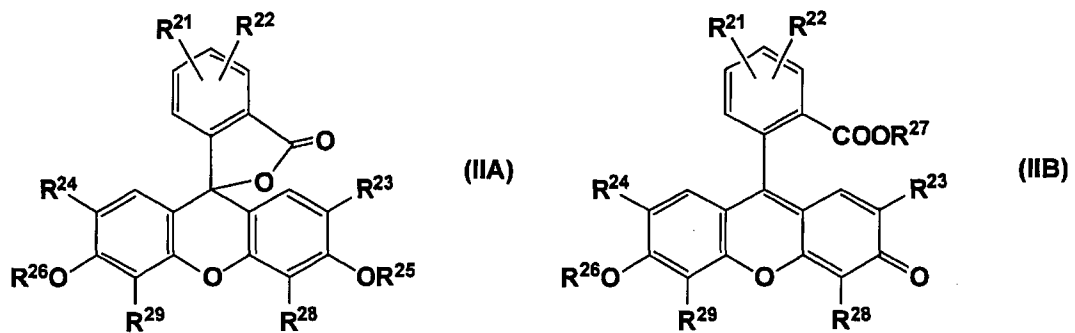
[0011] 上記発明の好ましい態様によれば、 p 、 q 、 r 、及び s が2であり、 t が1であり、かつ R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が水素原子である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩； p 、 q 、 r 、及び s が2であり、 t が1であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が水素原子であり、かつ R^2 が水素原子である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩；並びに、ベンゼン環上に存在する R^1 がキサンテン環の結合部位に対してパラ位に結合しており、 p 、 q 、 r 、及び s が2であり、 t が1であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が水素原子であり、かつ R^2 が水素原子である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩が提供される。

[0012] さらに好ましい態様によれば、 R^3 及び R^4 が水素原子である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩； R^5 及び R^6 がそれぞれ独立に水素原子、ア

セチル基、又はアセチルオキシメチル基である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩； R^7 が水素原子、アルキル基、又はメトキシメチル基である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩；並びに R^8 及び R^9 がともに水素原子である上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩が提供される。

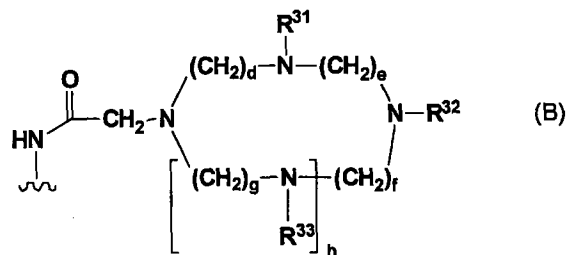
[0013] また、本発明により、下記の一般式(IIA)又は(IIB)：

[化3]



〔式中、 R^{21} は下記式(B)：

[化4]



(式中、 d 、 e 、 f 、及び g はそれぞれ独立に2又は3の整数を示し、 h は0又は1を示し、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} はそれぞれ独立に水素原子又は炭素原子数1～6のアルキル基を示す)で表される基を示し； R^{22} は水素原子又はベンゼン環上に置換する1個ないし3個の一価の置換基を示し； R^{23} 及び R^{24} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{25} 及び R^{26} はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示し； R^{27} は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基を示し； R^{28} 及び R^{29} はそれぞれ

独立に水素原子、ハロゲン原子、又は $-(CH_2)_m-N(R^{34})(R^{35})$ (式中、 m は1ないし4の整数を示し、 R^{34} 及び R^{35} はそれぞれ独立に $-(CH_2)_n-COOR^{36}$ (式中、 n は1ないし4の整数を示し、 R^{36} は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示す) で表される基を示す) で表される基を示す) で表される化合物又はその塩が提供される。

[0014] 上記発明の好ましい態様によれば、 d 、 e 、 f 、及び g が2であり、 h が1であり、かつ R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} が水素原子である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩； d 、 e 、 f 、及び g が2であり、 h が1であり、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} が水素原子であり、かつ R^{22} が水素原子である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩；並びに、ベンゼン環上に存在する R^{21} がキサンテン環の結合部位に対してパラ位に結合しており、 d 、 e 、 f 、及び g が2であり、 h が1であり、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} が水素原子であり、かつ R^{22} が水素原子である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩が提供される。

[0015] さらに好ましい態様によれば、 R^{23} 及び R^{24} が水素原子である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩； R^{25} 及び R^{26} がそれぞれ独立に水素原子、アセチル基、又はアセチルオキシメチル基である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩； R^{27} が水素原子、アルキル基、又はメトキシメチル基である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩；並びに R^{28} 及び R^{29} がともに水素原子である上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩が提供される。

[0016] 別の観点からは、本発明により、上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用蛍光プローブ、及び上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用試薬が提供される。また、硫化水素測定用蛍光プローブ又は硫化水素測定用試薬の製造のための上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩の使用も本発明により提供される。

[0017] また、本発明により、上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用蛍光プローブ、及び上記一般式(IIA)又は(IIB)で

表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用試薬が提供される。また、硫化水素測定用蛍光プローブ又は硫化水素測定用試薬の製造のための上記上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩の使用も本発明により提供される。この蛍光プローブ及び試薬は、測定系内において二価銅イオンと反応させて上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を測定系内において生成させるin situ型の硫化水素測定用蛍光プローブ又は試薬として有用である。

[0018] さらに別の観点からは、本発明により、硫化水素の測定方法であって、下記の工程：(a)上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を硫化水素と接触させる工程；及び(b)上記工程(a)で生成した上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法が提供される。

[0019] また、本発明により、硫化水素の測定方法であって、下記の工程：(a)上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩と二価銅イオンとを反応させて上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を生成させる工程；(b)上記工程(a)で生成した上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩と硫化水素とを接触させる工程；及び(c)上記工程(b)で生成した上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法が提供される。

発明の効果

[0020] 本発明により提供される一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩は硫化水素に対して高い反応性を有しており、硫化水素の存在下において強蛍光性の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩を生成する性質を有している。また、一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩は還元型グルタチオンに対しては実質的に反応性を有しないことから、還元型グルタチオンの存在下においても高感度に硫化水素を測定することができる。さらに、一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩は種々のアニオン(ハロゲンイオン、硫酸イオン、酢酸イオン、硝酸イオン、次亜塩素酸イオン

など)の存在下においても特異的かつ高感度に硫化水素と反応することができ
る。従って、一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水
素測定用蛍光プローブは、生体内に存在する微量の硫化水素を高感度かつ高
精度に測定するための蛍光プローブとして有用であり、イン・ビボ環境下
において細胞内や組織内における硫化水素をイメージングするための試薬とし
て極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]Cyclen-4-AF-Cu(左側)及びCyclen-4-AF(右側)の吸光及び蛍光スペク
トルを測定した結果を示した図である。

[図2]TACN-4-AF(左側)及びCyclam-4-AF(右側)の吸光及び蛍光スペクトルを測
定した結果を示した図である。

[図3]TMCyclen-4-AF(左側)及びTMCyclen-4-AF-Cu(右側)の吸光及び蛍光スペ
クトルを測定した結果を示した図である。

[図4]Cyclen-4-AF-Cuの反応性の評価を行った結果を示した図である。10 μ M
Na₂S(赤)、10 μ M Na₂Sと10 mM GSH (緑)、又は 10 mM GSH (黄)を添加した
結果、及び無添加のネガティブコントロール(青)の結果を示した。

[図5]Cyclen-4-AF-CuをHeLa細胞内にマイクロインジェクションにより導入し
て硫化水素を測定した結果を示した図である。上段はNa₂S添加前(0 sec)、中
段はNa₂S添加後(360 sec)、及び下段は蛍光強度の経時変化を示し、領域5及び
6はマイクロインジェクションをしていない領域を示す。

[図6]Cyclen-4-AF-Cu diacetateを用いてHeLa細胞への取り込みによる硫化水
素の測定を行った結果を示した図である。上段はNa₂S添加前(0 sec)、中段はN
a₂S添加後(240 sec)、及び下段は蛍光強度の経時変化を示す。

[図7]TACN-4-AF単独、及び2当量のCu²⁺を加えたTACN-4-AFの吸収スペクトル(
上段左)と蛍光スペクトル(上段右)を測定した結果、及びTACN-4-AFにCuSO₄を
加えて100 μ M Na₂S (赤)、10 μ M Na₂S (緑)、又は10 mM GSH (黄)を添加し
、無添加の実験をネガティブコントロール (青)として反応性を調べた結果(
下段)を示した図である。

[図8]Cyclam-4-AF単独、及び2当量の Cu^{2+} を加えたCyclam-4-AFの吸収スペクトル(左)と蛍光スペクトル(右)を測定した結果を示した図である。

[図9]Cyclam-4-AF(上段)に CuSO_4 を加え、又はTMCyclen-4-AF-Cu(下段)に100 μM Na_2S (赤)、10 μM Na_2S (緑)、又は10 mM GSH (黄)を添加し、無添加の実験をネガティブコントロール (青) として反応性を調べた結果を示した図である。

[図10]3-メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ(3MST)発現細胞のセルライゼートを用いて硫化水素を検出した結果を示した図である。

[図11]グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ融合3-メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ(3MST)精製タンパク質を用いて、3-メルカプトピルビン酸(3MP)を基質として産生される硫化水素をCyclen-4-AF-Cuによって検出した結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0022] 一般式(IA)又は(IB)において R^1 は式(A)で表される基を示す。式(A)で表される基において、 p 、 q 、 r 、及び s はそれぞれ独立に2又は3の整数を示すが、好ましくは p 、 q 、 r 、及び s がいずれも2の場合である。 t は0又は1を示すが、1であることが好ましい。 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} はそれぞれ独立に水素原子又は炭素原子数1～6のアルキル基を示すが、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} のうちいずれか又は全部が水素原子であることが好ましく、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が全て水素原子であることが好ましい。式(A)で表される基はベンゼン環上の任意の位置に結合することができるが、好ましくは R^1 とキサンテン環が結合するベンゼン環において、 R^1 とキサンテン環との結合位置がパラ位になることが好ましい。

[0023] 本明細書において、アルキル基の用語は直鎖状、分枝鎖状、環状、及びそれらの組み合わせからなるアルキル基を包含する。アルキル部分を有する他の置換基(例えばアルキルカルボニル基やアルコキシアルキル基)のアルキル部分についても同様である。

[0024] R^2 は水素原子又はベンゼン環上に置換する1個ないし3個の一価の置換基を示し、好ましくは水素原子又はベンゼン環上に置換する1個又は2個の一価の置

換基を示し、さらに好ましくは水素原子又はベンゼン環上に置換する1個の一価の置換基を示す。 R^2 が一価の置換基である場合、置換基としては、例えば、ハロゲン原子(本明細書においてハロゲン原子の用語はフッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を包含する)、水酸基、オキシ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アシル基、アミノ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、アリール基、又はアラルキル基などが挙げられるが、これらに限定されることはない。これらの置換基はさらに別の置換基で置換されていてもよい。このような例として、例えば、フルオロアルキル基、フルオロアセチル基、メトキシベンジル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。 R^2 は水素原子であることが特に好ましい。

[0025] R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示すが、 R^3 及び R^4 がともに水素原子であることが好ましい。

R^5 及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示す。アルキルカルボニル基としては、炭素数2~7個程度のアルキルカルボニル基が好ましく、例えば、アセチル基などを好ましく用いることができる。アルキルカルボニルオキシアルキル基としては、例えば、炭素数2~7個程度のアルキルカルボニルオキシ基が炭素数1~6個程度のアルキル基に置換したアルキルカルボニルオキシアルキル基が好ましいが、例えば、アセトキシメチル基などを好ましく用いることができる。

[0026] R^7 は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基を示す。アルコキシアルキル基としては、炭素数1~6個程度のアルコキシ基が炭素数1~6程度のアルキル基に置換したアルコキシアルキル基が好ましいが、例えば、メトキシメチル基やエトキシメチル基などを好ましく用いることができる。

[0027] R^8 及び R^9 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は $-(CH_2)_x-N(R^{14})(R^{15})$ で表される基を示す。 x は1ないし4の整数を示すが、 x は1又は2であることが好ましく、 x が1であることが特に好ましい。 R^{14} 及び R^{15} はそれぞれ独立に $-(CH_2)_y-COOR^{16}$ で表される基を示す。 y は1ないし4の整数を示すが、 y は1又は2である

ことが好ましく、 y が1であることが特に好ましい。 R^{16} は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示すが、アルキルカルボニル基及びアルキルカルボニルオキシアルキル基は上記 R^5 について説明したものと同様である。好ましくは R^{16} として水素原子又はアセトキシメチル基などを用いることができる。

[0028] 一般式(IIA)又は(IIB)における式(B)で表される基、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、 R^{31} 、 R^{32} 、 R^{33} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 m 、 R^{34} 、 R^{35} 、 n 、 R^{36} は、それぞれ、一般式(IA)又は(IB)において対応する式(A)で表される基、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 x 、 R^{14} 、 R^{15} 、 n 、及び R^{16} と同様である。

[0029] 一般式(IA)又は(IB)、あるいは一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物は酸付加塩又は塩基付加塩を形成する場合がある。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、 p -トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、リンゴ酸塩などの有機酸塩などを用いることができるが、これらに限定されることはない。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、若しくはカル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若しくはエタノールアミン塩などの有機アミン塩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。これらの塩のうち、生理学的に許容される塩は本発明の化合物を生体内や細胞又は組織内の硫化水素測定用試薬として用いる場合に好ましい。

[0030] また、一般式(IA)又は(IB)、あるいは一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物は、置換基の種類に応じて1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、これらの不斉炭素に基づく任意の光学異性体、光学異性体の任意の混合物、ラセミ体、2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体、ジアステレオ異性体の任意の混合物などは、いずれも本発明の範囲に包含される。遊離化合物又は塩の形態の化合物の任意の水和物又は溶媒和物も本発明の範囲に包含される。また、 R^7 が水素原子の場合にはカルボキシ基がラク톤を形成する場合もあるが、本発明の範囲にはこのような構造異性体も包含される。

一般式(IA)においてR⁵が水素原子である化合物と一般式(IB)においてR⁷が水素原子である化合物は互変異性体に相当しているが、このような互変異性体の存在は当業者に容易に理解されることであり、いずれの互変異性体も本発明の範囲に包含される。

[0031] 本発明の化合物の代表的化合物の製造方法を本明細書の実施例に詳細かつ具体的に示した。当業者は、本実施例の説明を基にして反応原料、反応条件、及び反応試薬などを適宜選択し、必要に応じてこれらの方法に修飾や改変を加えることによって、上記一般式で表される本発明の化合物をいずれも製造することができる。なお、原料化合物として用いることができる4-アミノフルオレセインなどのフルオレセイン誘導体は、例えば、亀谷哲治著、有機合成化学IX、南江堂、215頁(1977年)等に記載の方法に準じて製造できる。また、環状ポリアミン部分構造に関してはJ. Am. Chem. Soc., 118, 12696, 1996に開示された亜鉛プローブの部分構造の合成を参照することができる。

[0032] 本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明による硫化水素の測定方法は、一般的には、(a)一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩と硫化水素とを反応させる工程、及び(b)上記工程(a)で生成した一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩に由来する蛍光を測定する工程を含んでいる。上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物は二価銅イオンの配位により消光されており、それ自体は無蛍光性又は弱蛍光性であるが、硫化水素と接触すると二価銅イオンが硫化水素と反応して不溶性のCuSとなり環状ポリアミン部分から脱落し、強蛍光性の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩を生成する。

[0033] 硫化水素測定用の試薬としては、二価銅イオンが配位した状態の一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を水などの適宜の水性媒体に溶解して使用することができるが、測定系内で一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩と二価銅イオンとを反応させてin situに一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を測定系内で生成させ、その一般式(IA)又は(IB)

で表される化合物又はその塩と硫化水素とを反応させてもよい。このような測定方法も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。

[0034] 本発明の硫化水素測定用試薬を用いた蛍光測定手段は特に限定されないが、イン・ビトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメーシングの手法を用いてイン・ビボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ましい。本発明の試薬をマイクロインジェクション法等により細胞内に取り込ませれば、個々の細胞内に局在する硫化水素をバイオイメーシング手法により高感度にリアルタイムで測定することができるほか、細胞培養液又は組織切片等の培養液又は灌流液中に用いることで細胞や生体組織が放出する硫化水素を測定できる。従って、本発明の硫化水素測定用試薬を用いることにより、細胞又は生体組織での硫化水素の挙動をリアルタイムに測定することが可能であり、硫化水素によるシグナル伝達のメカニズムの解明のほか、疾患病態の原因究明や治療薬の開発などに好適に利用することができる。

[0035] また、例えば、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、又は R^9 のいずれか又は2箇所以上にエステラーゼなどにより加水分解可能なエステル基を導入しておくこと、分子全体が脂溶性になって細胞膜を容易に透過して細胞質内に到達するが、細胞質内においてエステラーゼにより加水分解を受けて親水性のカルボキシル基が生成すると細胞膜を容易に透過できなくなる。従って、このようなエステル導入型の化合物(例えばエステルとしてアセトキシメチルエステルやメトキシメチルエステルなどを導入した化合物)は、細胞質内における硫化水素の濃度を測定するための試薬として極めて有用である。

[0036] 本発明の試薬は、必要に応じて試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、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る。

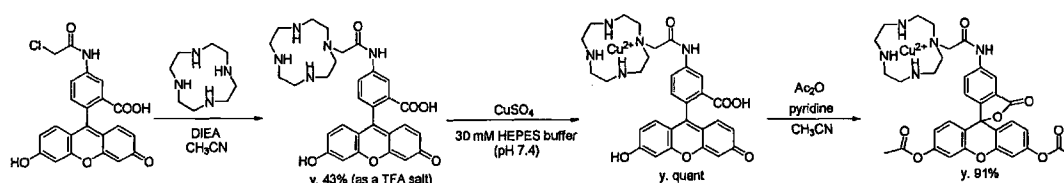
実施例

[0037] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1

下記合成スキームによりCyclen-4-AF及びCyclen-4-AF-Cuを合成した。

[化5]



[0038] (a) クロロアセチルアミド-4-AF

4-アミノフルオレセイン (948.5 mg, 2.73 mmol) を脱水テトラヒドロフラン (THF) 30 mL に溶解し、 NaHCO_3 (761.5 mg, 9.06 mmol) を加えた。脱水 THF 40 mL に溶解した ClCH_2COCl (436.8 mg, 3.87 mmol) を攪拌しながら 10 分以上かけて滴下した。その後、室温にてアルゴン下で一晩攪拌し、濾過後に溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィー (silica gel、酢酸エチル/ヘキサン = 6/4) で精製して目的物 (756.9 mg, 1.79 mmol, y. 65%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.34 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 7.86 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 7.16 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.67 (d, 2H, $J = 2.9$ Hz), 6.61 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.52 (dd, 2H, $J = 8.8, 2.9$ Hz), 4.24 (s, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 171.1, 167.8, 161.4, 154.1, 149.5, 141.2, 130.2, 129.1, 128.3, 125.9, 116.4, 113.6, 111.3, 103.5, 44.0

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 424.0588, Found, 424.0578 (-1.0 mmu)

[0039] (b) Cyclen-4-AF

クロロアセチルアミド-4-アミノフルオレセイン (106.6 mg, 251.5 μmol) を脱水アセトニトリル 30 mL に溶解し、cyclen (368.0 mg, 2.14 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (DIEA, 300 μL , 1.72 mmol) を加え、アルゴン

下において70℃で8時間攪拌した。溶媒を除去した後、HPLCにて精製してCyclen-4-AF (TFA塩) (103.3 mg, 109.0 μ mol, y. 43%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.34 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.83 (dd, 1H, $J = 8.1, 2.2$ Hz), 7.28 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.92 (dd, 2H, $J = 8.8, 2.2$ Hz), 6.86 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 3.69 (s, 2H), 3.05-3.16 (m, 16H)

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ 170.9, 167.5, 165.9, 155.8, 137.8, 131.7, 130.5, 129.2, 128.1, 124.1, 120.2, 116.8, 116.3, 113.7, 113.4, 100.9, 54.5, 48.3, 42.9, 41.2, 40.7

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 560.2509, Found, 560.2506 (-0.3 mmu)

[0040] (c)Cyclen-4-AF-Cu

CuSO_4 五水和物を30 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、1M CuSO_4 水溶液を調製した。Cyclen-4-AF (73.8 mg, 77.9 μ mol) を CuSO_4 水溶液 (7792 μL , 7.79 mmol) に溶解し、室温にて一晩攪拌し、HPLCで精製してCyclen-4-AF-Cu (65.2 mg, quant yield) を得た。

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}-\text{H}]^+$, 621.1649, Found, 621.1690 (4.1 mmu)

[0041] (d)Cyclen-4-AF-Cu diacetate

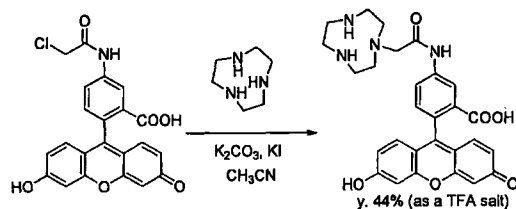
Cyclen-4-AF-Cu (5.60 μ mol) を脱水アセトニトリル 4 mLに溶解し、ピリジン (4.14 mmol)と無水酢酸 (41.9 mmol)を加え、アルゴン下、60℃で6時間攪拌した。溶媒を除去後、HPLCで精製してCyclen-4-AF-Cu diacetate (3.6 mg, 5.1 μ mol, y. 91%) を得た。

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}-\text{H}]^+$, 705.1860, Found, 705.1843 (-1.7 mmu)

[0042] 例2

TACN-4-AFを以下のスキームで合成した。

[化6]



[0043] クロロアセチルアミド-4-アミノフルオレセイン (53.8 mg, 126.9 μmol) を脱水アセトニトリル 8 mLに溶解し、1,4,7-トリアザシクロノナン (TACN, 101.4 mg, 784.8 μmol)、ヨウ化カリウム (6.8 mg, 41.0 μmol) 及び、 K_2CO_3 (111.0 mg, 803.1 μmol) を加え、アルゴン下において室温で一晩攪拌した。溶媒を除去後、HPLCで精製し、TACN-4-AF (TFA塩) (47.4 mg, 55.2 μmol , y. 44%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.35 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.84 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 7.27–7.30 (m, 3H), 6.98 (d, 2H, $J = 1.5$ Hz), 6.93 (dd, 2H, $J = 9.2, 1.5$ Hz), 3.80 (s, 2H), 3.71 (s, 4H), 3.36 (t, 4H, $J = 5.5$ Hz), 3.15 (t, 4H, $J = 5.5$ Hz)

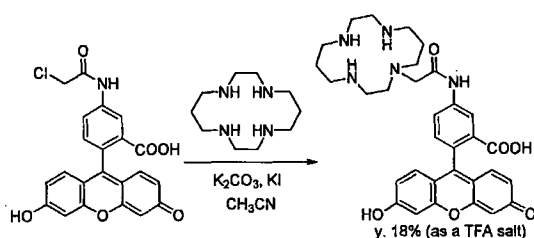
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ 171.4, 168.1, 165.4, 155.6, 137.5, 132.6, 130.2, 129.6, 127.8, 123.9, 119.6, 116.3, 116.2, 113.3, 113.3, 100.9, 55.1, 47.6, 42.8, 41.5

HRMS (ESI $^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 517.2087, Found, 517.2106 (1.9 mmu)

[0044] 例3

Cyclam-4-AFを以下のスキームで合成した。

[化7]



[0045] クロロアセチルアミド-4-アミノフルオレセイン (51.5 mg, 121.5 μmol)

を脱水アセトニトリル 8 mL に溶解し、1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン (cyclam, 191.2 mg, 954.5 μmol)、ヨウ化カリウム (8.7 mg, 52.4 μmol) 及び、 K_2CO_3 (136.7 mg, 989.1 μmol) を加え、アルゴン下において室温で一晩攪拌した。溶媒を除去後、HPLCで精製し、Cyclam-4-AF (TFA塩) (22.5 mg, 21.6 μmol , y. 18%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.53 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.89 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.2$ Hz), 7.49 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.37 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 7.09 (dd, 2H, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 3.56 (s, 2H), 3.13–3.25 (m, 12H), 2.86–2.91 (m, 4H), 1.94–1.98 (m, 4H)

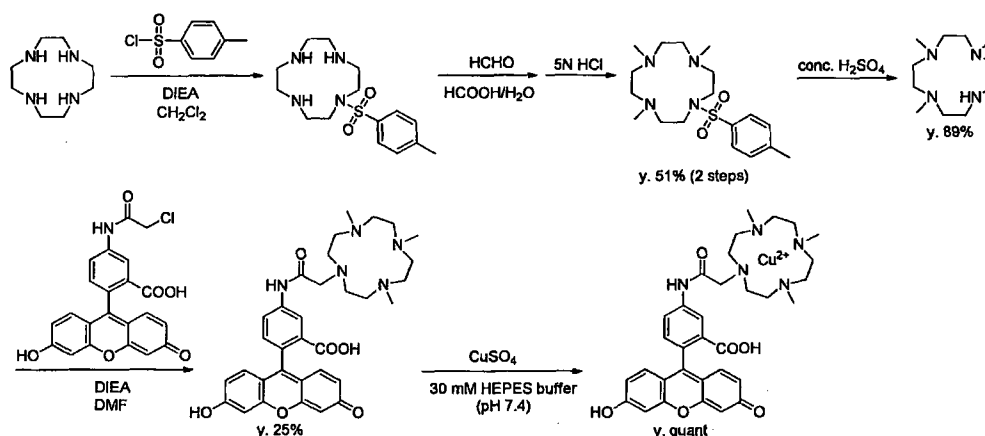
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O): δ 171.1, 167.2, 166.7, 156.4, 138.1, 130.7, 130.5, 128.6, 123.6, 120.4, 117.3, 116.3, 114.3, 113.4, 100.9, 54.4, 53.6, 52.7, 46.5, 46.0, 45.7, 44.8, 43.6, 42.0, 22.7, 21.4

HRMS (ESI $^+$): Calcd for $[\text{M}+\text{M}]^+$, 588.2822, Found, 588.2794 (−2.8 mmu).

[0046] 例4

TMcyclen-4-AF及びTMcyclen-4-AF-Cuを以下のスキームで合成した。

[化8]



[0047] (a) 1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン (cyclen, 614.6 mg, 3.57 mmol) を脱水ジクロロメタン 15 mL に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (1.86 g, 14.35 mmol) を加え、0°Cにて攪拌した。そして、脱水ジクロロメタン 10 mL に溶解したp-トルエンスルホン酸クロリド (699.2 mg, 3.67 mmol) を10分

以上かけて滴下した。その後室温にて、アルゴン下で16時間攪拌し、2 N NaOH水溶液で液性を塩基性にし、ジクロロメタンで抽出後に脱水し、溶媒を除去した。99%ギ酸 (1.83 g) に溶解し、37% ホルムアルデヒド水溶液 (3.10 mL, 41.6 mmol) を加え、110°Cにおいて8.5時間攪拌した。塩酸を加え、50°Cで3.5時間攪拌した後、液性を塩基性にし、ジクロロメタンで抽出後脱水し、溶媒を除去した。さらに、HPLCで精製して、液性を塩基性にした後、ジクロロメタンで抽出後に脱水し、溶媒を除去して目的物 (669.7 mg, 1.82 mmol, y. 51%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.14 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 3.10 (t, 4H, $J = 6.2$ Hz), 2.65 (t, 4H, $J = 6.2$ Hz), 2.32–2.36 (m, 8H), 2.26 (s, 3H), 2.11 (s, 6H), 2.07 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 142.8, 135.8, 129.4, 126.9, 56.0, 55.3, 55.1, 47.5, 43.5, 43.0, 21.2

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 369.2324, Found, 369.2298 (−2.6 mmu)

[0048] (b)上記工程(a)で得られた化合物 (669.7 mg, 1.82 mmol) を濃硫酸 5 mLに溶解し、アルゴン下において110°Cで11時間攪拌した。水で希釈後、2 N NaOH溶液で液性を塩基性にしてジクロロメタンで抽出し、脱水後、溶媒を除去して目的物 (348.7 mg, 1.63 mmol, y. 89%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.80 (t, 4H, $J = 5.0$ Hz), 2.61 (t, 4H, $J = 5.0$ Hz), 2.45–2.48 (m, 8H), 2.36 (s, 6H), 2.20 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 55.6, 53.6, 53.3, 47.0, 45.2, 21.4

LRMS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$, 215

[0049] (c)TMCyclen-4-AF

クロロアセチルアミド-4-アミノフルオレセイン (73.2 mg, 172.7 μmol) を脱水ジメチルホルムアミド 40 mLに溶解し、工程(b)で得られた化合物 (117.4 mg, 547.7 μmol) とジイソプロピルエチルアミン (371 mg, 2.87 mmol) を加え、アルゴン下で加熱還流下に1晩攪拌した。溶媒を除去後、HPLCで精製してTMCyclen-4-AF (TFA塩) (42.2 mg, 42.6 μmol , y. 25%) を得た。

^1H NMR (300MHz, D_2O) δ : 8.41 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.85 (dd, 1H, $J = 8.8, 2.2$ Hz), 7.27 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 6.90 (dd, 2H, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 6.85 (d, 2H, $J = 2.2$ Hz), 3.75 (s, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.62–3.67 (m, 16H), 2.41 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ : 171.8, 167.4, 166.4, 156.4, 137.6, 131.4, 130.7, 129.4, 128.6, 124.1, 120.6, 117.1, 116.8, 114.1, 112.9, 101.0, 55.6, 52.3, 52.0, 49.0, 48.2, 40.5, 40.4

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 602.2979, Found, 602.2939 (−4.0 mmu)

[0050] (d)TMCyclen-4-AF-Cu

CuSO_4 五水和物を30 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、1 M CuSO_4 水溶液を調製した。TMCyclen-4-AF (12.1 mg, 12.2 μmol) を CuSO_4 水溶液 (1220 μL , 1.22 mmol) に溶解し、室温にて4時間攪拌し、HPLCにて精製してTMCyclen-4-AF-Cu (9.52 mg, y. quant) を得た。

HRMS (ESI⁺): Calcd for $[\text{M}-\text{H}]^+$, 663.2118, Found, 663.2106 (−1.2 mmu)

[0051] 例5

Cyclen-4-AF-Cuの吸光及び蛍光スペクトルを測定した。吸収及び蛍光スペクトルは30 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) 中で測定した。蛍光スペクトルの測定ではCyclen-4-AF-Cuを491 nmで励起した。蛍光量子収率測定では0.1N NaOH溶液中でフルオレセイン ($\Phi_{\text{fl}} = 0.85$) を蛍光標準として用いた。結果を図1(左側)及び表1に示す。Cyclen-4-AF-Cuの蛍光量子収率は低下していることが示された。同様にCyclen-4-AF(図1、右側)、TACN-4-AF(図2左側)、Cyclam-4-AF(図2、右側)、TMCyclen-4-AF(図3、左側)、及びTMCyclen-4-AF-Cu(図3、右側)の吸光及び蛍光スペクトルを測定した。

[0052]

[表1]

化合物	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	Φ_{fl}
Cyclen-4-AF-Cu	491	515	0.019
Cyclen-4-AF	492	516	0.78
TACN-4-AF	492	515	0.68
Cyclam-4-AF	492	516	0.75
TMCyclen-4-AF	492	516	0.78
TMCyclen-4-AF-Cu	491	516	0.026

[0053] 例6

Cyclen-4-AF-Cuの反応性の評価を行った。1 μM Cyclen-4-AF-Cuに、300秒後に10 μM Na_2S (赤), 10 μM Na_2S と10 mM GSH (緑), 10 mM GSH (黄)を添加し、また、無添加の実験をネガティブコントロール (青)として反応性を調べた。30 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) 中において491 nmで励起し、516 nmの蛍光強度を測定した。結果を図4に示す。Cyclen-4-AF-Cuは Na_2S と反応後に蛍光上昇を示し、GSHと比較して選択性を有することが示された。また、Cyclen-4-AF-Cuは10 mM GSH共存下中においても10 μM Na_2S 添加によって蛍光強度が上昇することが明らかとなった。

[0054] 例7

Cyclen-4-AF-Cuを用いて生体内の硫化水素の測定が可能であるか否かを評価した。HeLa細胞を37°C、5% CO_2 混合空気中にてダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)に10% ウシ胎児血清(FBS)、1% ペニシリン、及び1% ストレプトマイシンを添加した培地中で培養した。ハanks平衡塩溶液(HBSS)にて2回洗浄した。HBSS中のHeLa細胞に対して100 μM Cyclen-4-AF-Cuを含むHBSS (0.1% DMSO)をマイクロインジェクション(領域1-4)した。蛍光顕微鏡にて470-490 nmで励起し、515-550 nmの蛍光強度を測定した。測定開始5分後に細胞外液に10 mM Na_2S を添加した。この結果、マイクロインジェクションしたHeLa細胞内の領域1-4で蛍光強度の増大が観察された。図5の上段は Na_2S 添加前(0 sec)、中段は Na_2S 添加後(360 sec)、及び下段は蛍光強度の経時変化を示し、領域5及び6はマイクロインジェクションをしていない領域を示す。

[0055] 同様に、Cyclen-4-AF-Cu diacetateを用いてHeLa細胞への取り込みによる硫化水素の測定を行った結果を図6に示す。上記と同様にして培養したHeLa細胞を100 μ M Cyclen-4-AF-Cu diacetateを含むHBSSで37°C、2時間インキュベーションした。蛍光顕微鏡にて470-490 nmで励起し、515-550 nmの蛍光強度を測定した。測定開始210秒後に細胞外液に10 mM Na_2S を添加した。HeLa細胞内外で蛍光強度の増大が観察された。図6の上段は Na_2S 添加前(0 sec)、中段は Na_2S 添加後(240 sec)、及び下段は蛍光強度の経時変化を示す。

[0056] 例8

TACN-4-AF単独、及び2当量の Cu^{2+} を加えたTACN-4-AFの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。測定は30 mM HEPESバッファ（pH 7.4）中で行い、蛍光スペクトルの測定では491 nmで励起した。 Cu^{2+} の添加により蛍光強度は著しく減少した（図7、上段左側：吸収スペクトル、上段右側：蛍光スペクトル）。また、1 μ M TACN-4-AFに2 μ M CuSO_4 を加え、300秒後に100 μ M Na_2S （赤）、10 μ M Na_2S （緑）、又は10 mM GSH（黄）を添加し、無添加の実験をネガティブコントロール（青）として反応性を調べた。30 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）中において491 nmで励起し、516 nmの蛍光強度を測定した。この結果、TACN-4-AF+ Cu^{2+} は Na_2S と反応後、大きな蛍光上昇を示し、GSHと比較して硫化水素に対して高い選択性を有することが示された（図7、下段）。

[0057] 例9

Cyclam-4-AF単独、及び2当量の Cu^{2+} を加えたCyclam-4-AFの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。測定は30 mM HEPESバッファ（pH 7.4）中で行い、蛍光スペクトルの測定では491 nmで励起した。 Cu^{2+} の添加により蛍光強度は著しく減少した（図8）。

[0058] 例10

1 μ M Cyclam-4-AFに2 μ M CuSO_4 を加え、300秒後に100 μ M Na_2S （赤）、10 μ M Na_2S （緑）、又は10 mM GSH（黄）を添加し、無添加の実験をネガティブコントロール（青）として反応性を調べた。30 mM HEPES緩衝液（pH 7.4）中において491 nmで励起し、516 nmの蛍光強度を測定した。この結果、Cyclam-4-

AF+Cu²⁺はNa₂Sと反応後、蛍光上昇を示し、GSHと比較して選択性を有することが示された(図9上段)。同様に、1 μ M TMCyclen-4-AF-Cuに対して、300秒後に100 μ M Na₂S (赤)、10 μ M Na₂S (緑)、又は10 mM GSH (黄)を添加し、無添加の実験をネガティブコントロール (青) として反応性を調べたところ、TMCyclen-4-AF-CuもNa₂Sと反応後に蛍光上昇を示し、GSHと比較して選択性を有することが示された(図9下段)。

[0059] 例11：3MST発現細胞のセルライセートを用いた硫化水素の検出

3-メルカプトピルビン酸 (3MP) を基質としてH₂Sを産生する酵素である、3-メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ (3MST) を発現するプラスミドをHEK293細胞に文献記載の方法により導入した(Antioxid. Redox Signal, 11, 703, 2009)。そして100 μ M ジチオトレイトール、1% プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を含んだ30 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4) に細胞を懸濁させ、超音波破碎機を用いてライセートにし、実験に用いた。同様にプラスミドを導入しないHEK293細胞もライセートにして実験に用いた。その後、1 μ M Cyclen-4-AF-Cuを加え、180秒後に100 μ M 3MPを添加し応答性を評価した。491 nmで励起し、516 nmの蛍光強度を測定した結果、3MSTを含むライセートに3MPを添加した場合において、顕著に蛍光強度が上昇することが示された (図10左図)。また、3-メルカプトピルビン酸の存在下10分後において、3MSTの有無によって有意な差 (p<0.05) をもって、蛍光強度に差異が認められた(図10右図)。

[0060] 例12：精製3MSTを用いた硫化水素の検出

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) タグ融合3-メルカプトピルビン酸スルファートランスフェラーゼ (3MST) 精製タンパク質を用いて、3-メルカプトピルビン酸 (3MP) を基質として産生されるH₂SがCyclen-4-AF-Cuによって検出可能かを評価した。1 μ M Cyclen-4-AF-Cuを加え、60秒後にGSTタグ融合3MST (赤、緑)、またはGSTタグ (黄、青) を添加した。さらに、120秒後に100 μ M 3MPまたは同量のHEPES緩衝液 (pH 7.4) を添加し、491 nmで励起し、516 nmの蛍光強度を測定した。その結果、Cyclen-4-AF-Cuは精製タンパク質で

あるGSTタグ融合3MSTと3MPの添加によって産生された H_2S に応答して、顕著な蛍光強度上昇を示した(図11左図)。また、ハイスループットスクリーニングを目指して96ウェルプレートにおいても酵素反応によって産生される H_2S を検出可能かを評価した。そして3MPまたは同量のHEPES緩衝液(pH 7.4)を添加し37°Cで60分間インキュベーションし、蛍光を測定した。その結果、キュベット中と同様の結果を示し、Cyclen-4-AF-Cuを用いることで、96ウェルプレートにおいても H_2S 産生を検出可能であることが示された(図11右図)。

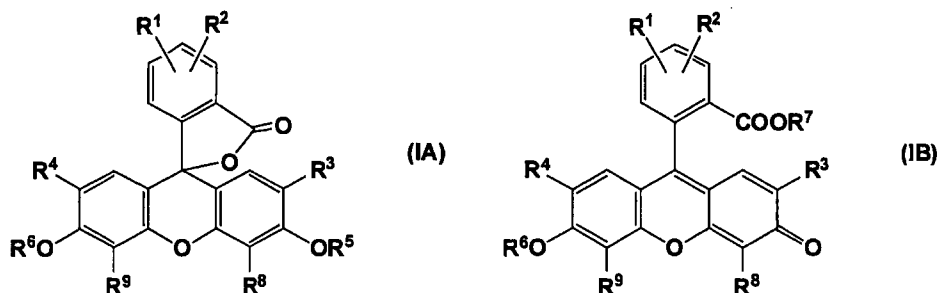
産業上の利用可能性

- [0061] 本発明の化合物は、生体内に大量に存在する還元型グルタチオンの影響を受けることなく高感度かつ特異的に硫化水素を測定することができる蛍光プローブとして利用することができる。

請求の範囲

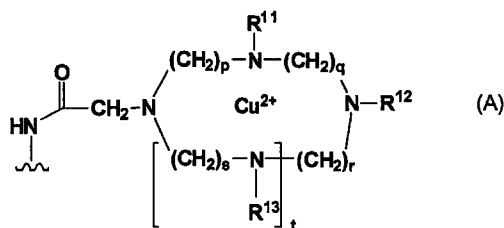
〔請求項1〕 下記的一般式(IA)又は(IB)：

〔化1〕



〔式中、R¹は下記式(A)：

〔化2〕



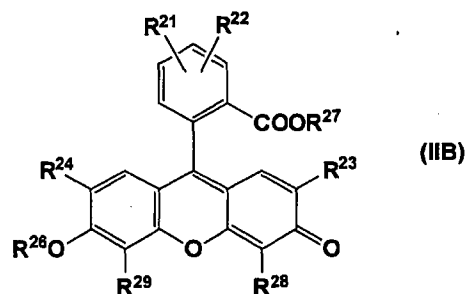
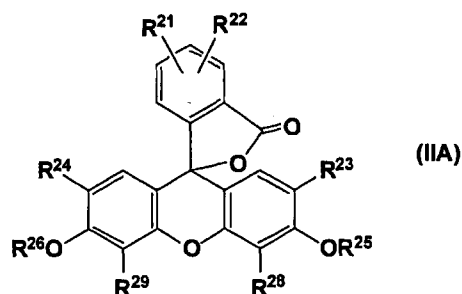
(式中、p、q、r、及びsはそれぞれ独立に2又は3の整数を示し、tは0又は1を示し、R¹¹、R¹²、及びR¹³はそれぞれ独立に水素原子又は炭素原子数1～6のアルキル基を示す)で表される基を示し；R²は水素原子又はベンゼン環上に置換する1個ないし3個の一価の置換基を示し；R³及びR⁴はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し；R⁵及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示し；R⁷は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基を示し；R⁸及びR⁹はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は-(CH₂)_x-N(R¹⁴)(R¹⁵)(式中、xは1ないし4の整数を示し、R¹⁴及びR¹⁵はそれぞれ独立に-(CH₂)_y-COOR¹⁶(式中、yは1ないし4の整数を示し、R¹⁶は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示す)で表される基を示す)で表される基を示す)で表される化合物又はその塩。

[請求項2] ベンゼン環上に存在する R^1 がキサンテン環の結合部位に対してパラ位に結合しており、 p 、 q 、 r 、及び s が2であり、 t が1であり、 R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} が水素原子であり、かつ R^2 が水素原子である請求項1に記載の一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩。

[請求項3] R^3 及び R^4 が水素原子であり、 R^5 及び R^6 がそれぞれ独立に水素原子、アセチル基、又はアセチルオキシメチル基であり、 R^7 が水素原子、アルキル基、又はメトキシメチル基であり、 R^8 及び R^9 がともに水素原子である請求項1又は2に記載の一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩。

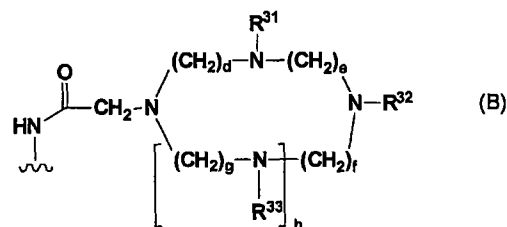
[請求項4] 下記の一般式(IIA)又は(IIB)：

[化3]



[式中、 R^{21} は下記式(B)：

[化4]



(式中、 d 、 e 、 f 、及び g はそれぞれ独立に2又は3の整数を示し、 h は0又は1を示し、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} はそれぞれ独立に水素原子又は炭素原子数1～6のアルキル基を示す)で表される基を示し； R^{22} は水素原子又はベンゼン環上に置換する1個ないし3個の一価の置換基を示し； R^{23} 及び R^{24} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{25} 及び R^{26}

はそれぞれ独立に水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示し； R^{27} は水素原子、アルキル基、又はアルコキシアルキル基を示し； R^{28} 及び R^{29} はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又は $-(CH_2)_m-N(R^{34})(R^{35})$ （式中、 m は1ないし4の整数を示し、 R^{34} 及び R^{35} はそれぞれ独立に $-(CH_2)_n-COOR^{36}$ （式中、 n は1ないし4の整数を示し、 R^{36} は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシアルキル基を示す）で表される基を示す）で表される基を示す）で表される化合物又はその塩。

〔請求項5〕 ベンゼン環上に存在する R^{21} がキサンテン環の結合部位に対してパラ位に結合しており、 d 、 e 、 f 、及び g が2であり、 h が1であり、 R^{31} 、 R^{32} 、及び R^{33} が水素原子であり、かつ R^{22} が水素原子である請求項4に記載の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩。

〔請求項6〕 R^{23} 及び R^{24} が水素原子であり、 R^{25} 及び R^{26} がそれぞれ独立に水素原子、アセチル基、又はアセチルオキシメチル基であり、 R^{27} が水素原子、アルキル基、又はメトキシメチル基であり、 R^{28} 及び R^{29} がともに水素原子である請求項4又は5に記載の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩。

〔請求項7〕 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用蛍光プローブ。

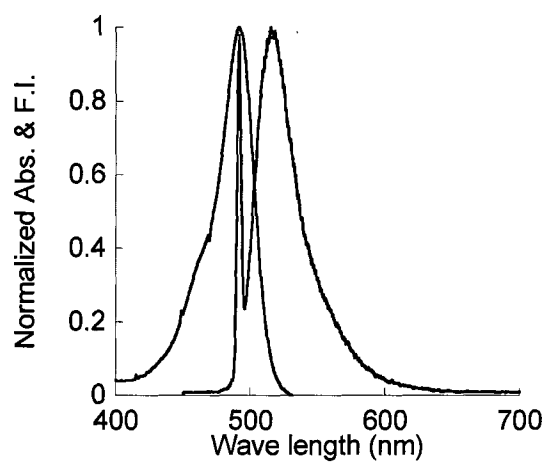
〔請求項8〕 請求項4ないし6のいずれか1項に記載の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩を含む硫化水素測定用蛍光プローブ。

〔請求項9〕 硫化水素の測定方法であって、下記の工程：
 (a)請求項1ないし3のいずれか1項に記載の一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を硫化水素と接触させる工程；及び
 (b)上記工程(a)で生成した上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法。

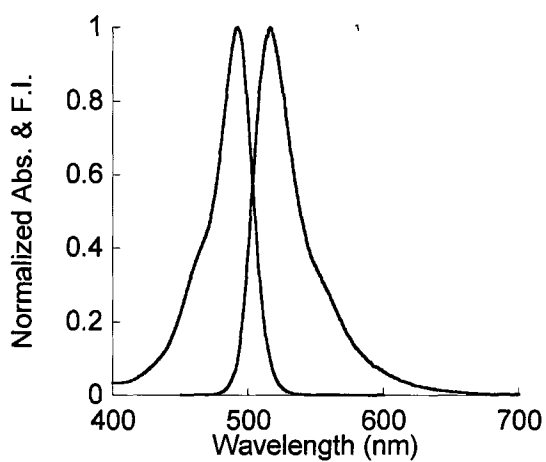
〔請求項10〕 硫化水素の測定方法であって、下記の工程：

- (a)請求項4ないし6のいずれか1項に記載の一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩と二価銅イオンとを反応させて上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩を生成させる工程；
- (b)上記工程(a)で生成した上記一般式(IA)又は(IB)で表される化合物又はその塩と硫化水素とを接触させる工程；及び
- (c)上記工程(b)で生成した上記一般式(IIA)又は(IIB)で表される化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法。

[図 1]

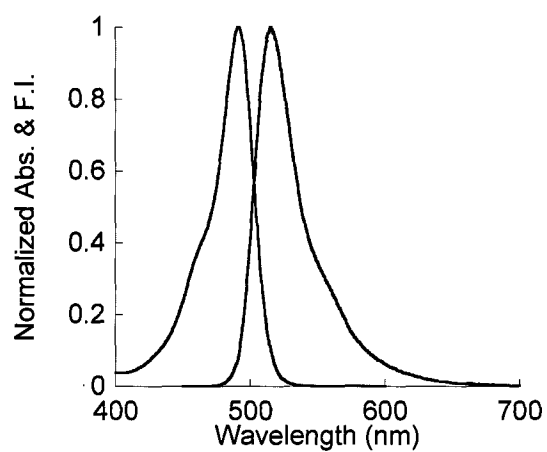


Cyclen-4-AF-Cu

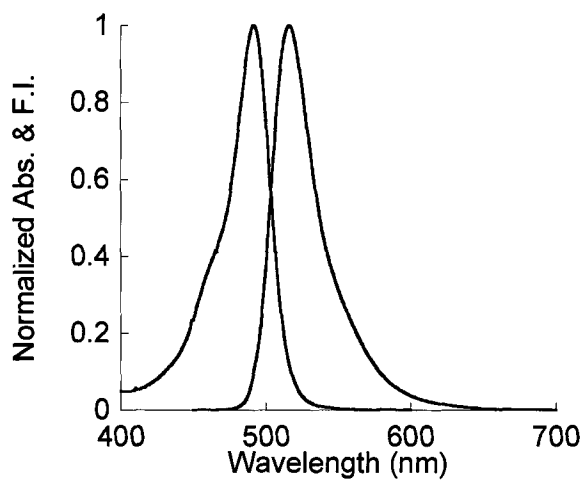


Cyclen-4-AF

[図 2]



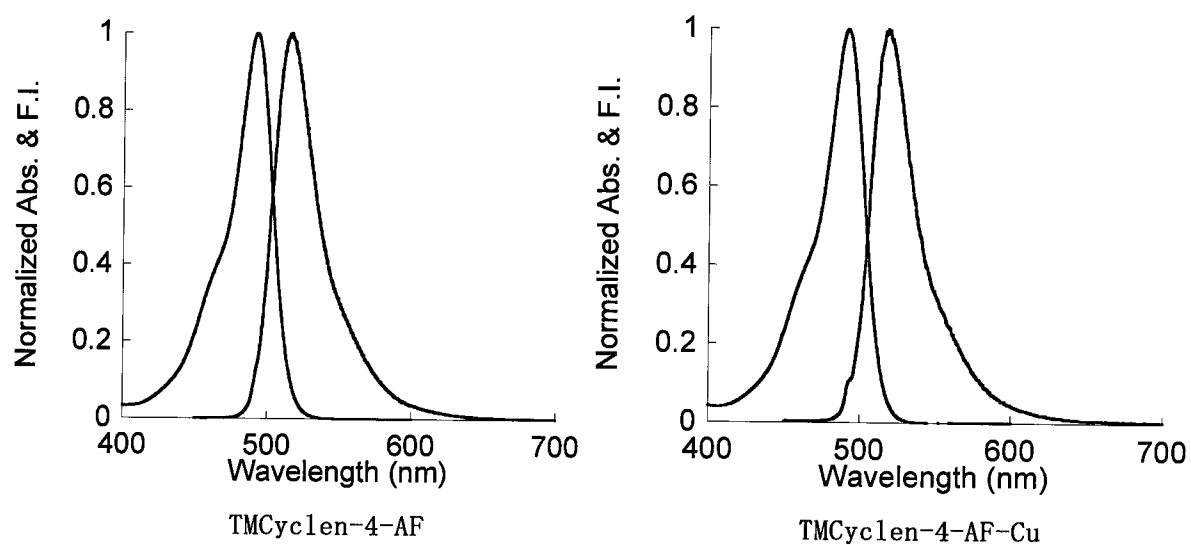
TACN-4-AF



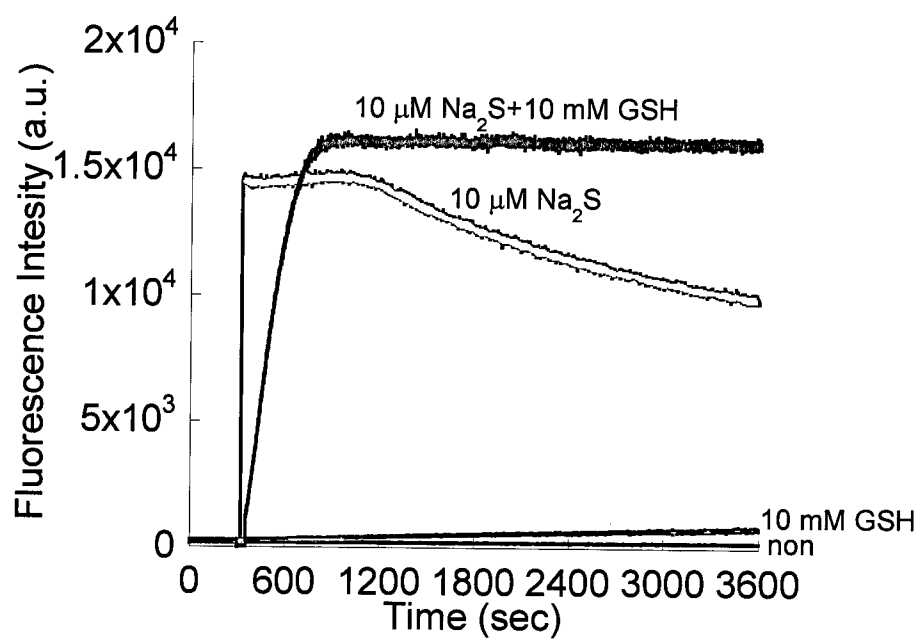
Cyclam-4-AF

2 / 7

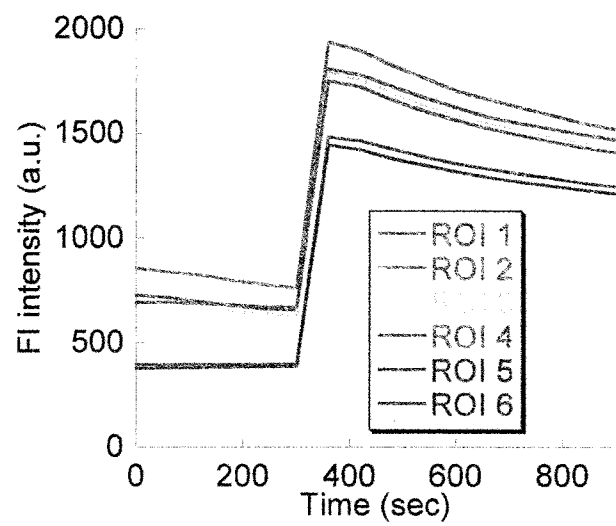
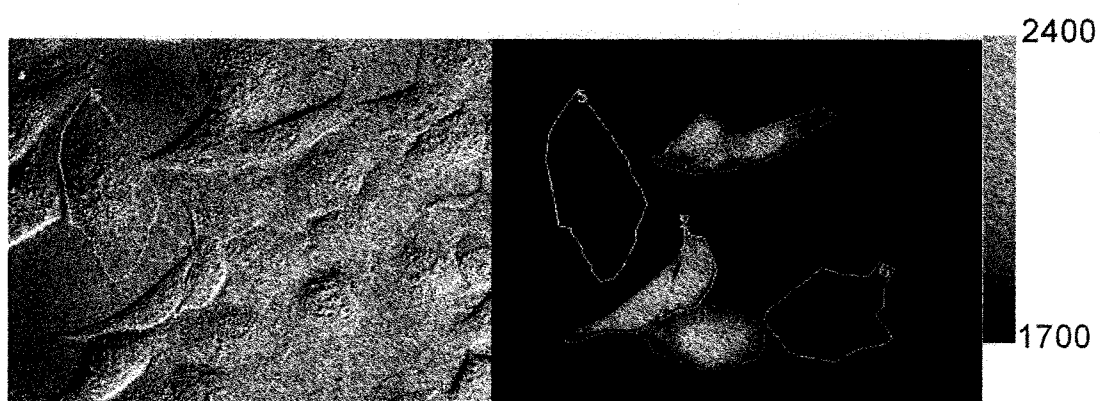
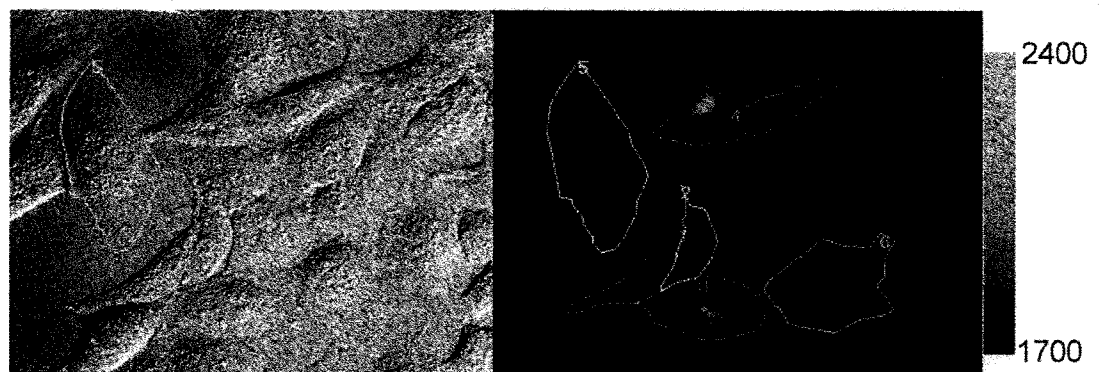
[図 3]



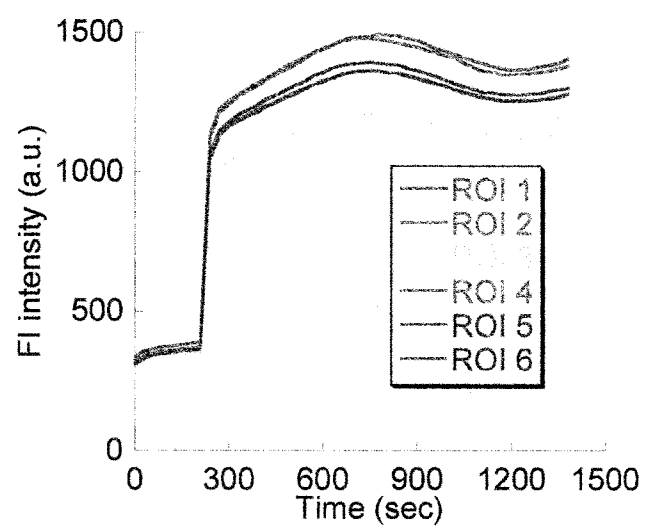
[図 4]



[図 5]

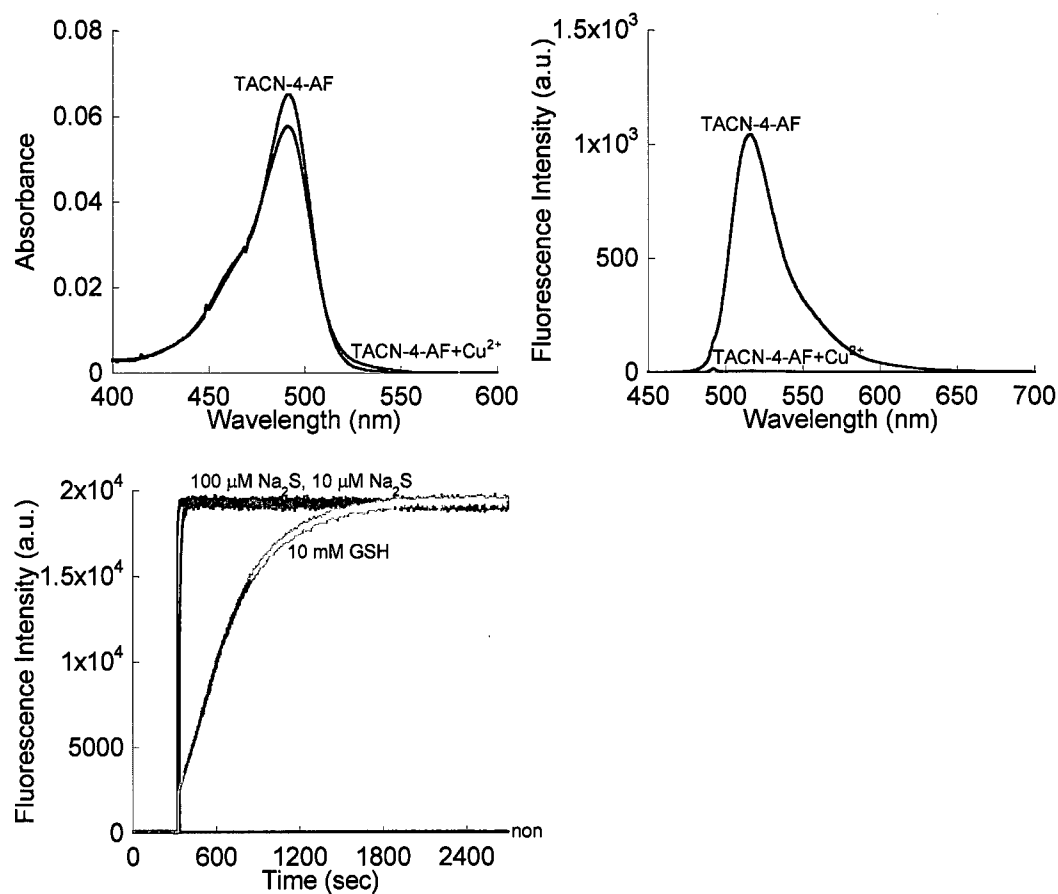


[圖 6]

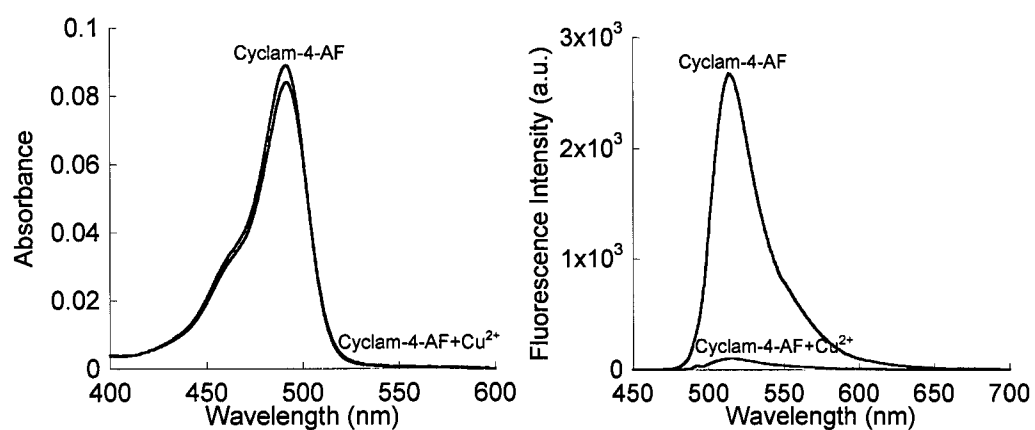


5 / 7

[7]

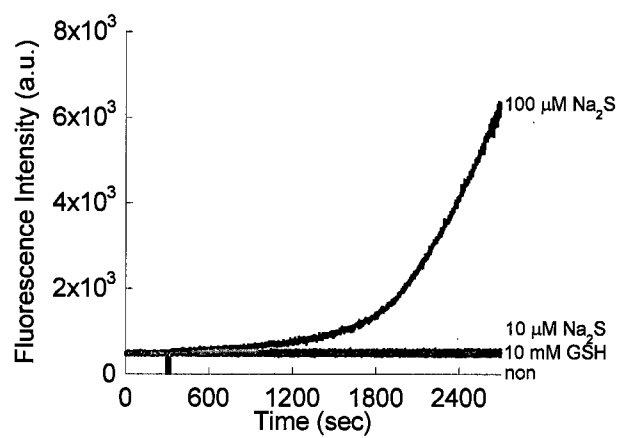
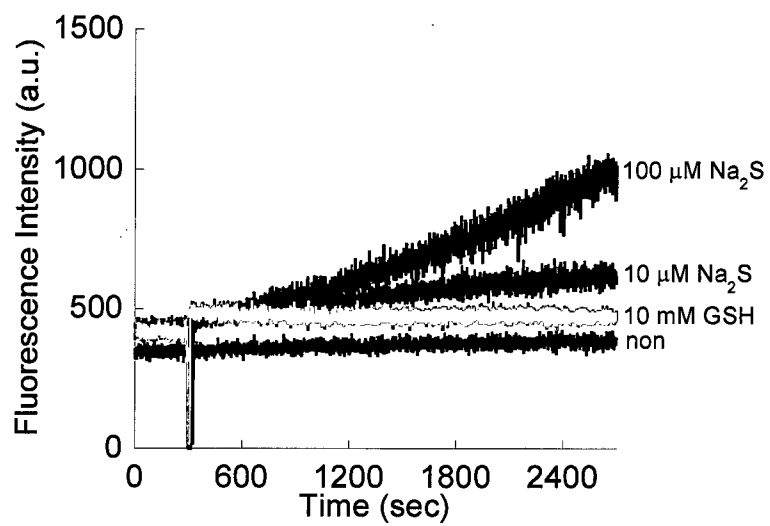


[8]

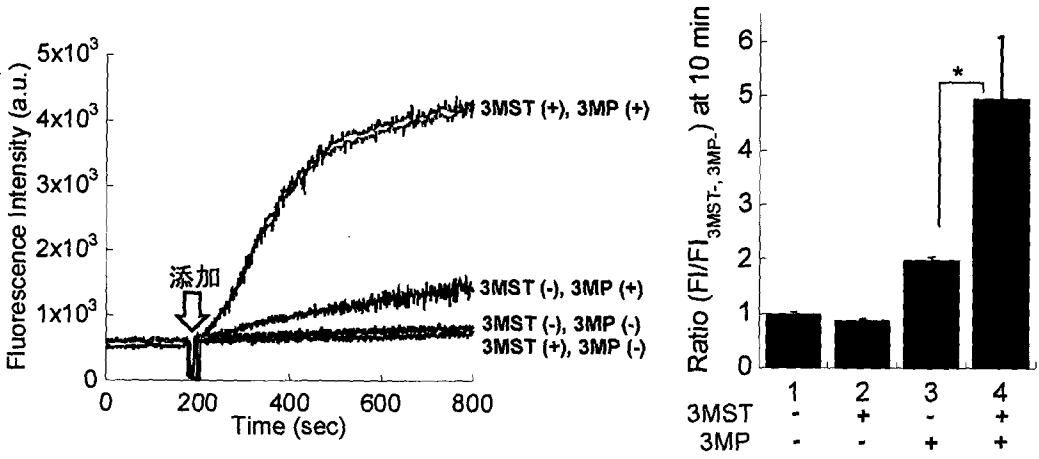


6 / 7

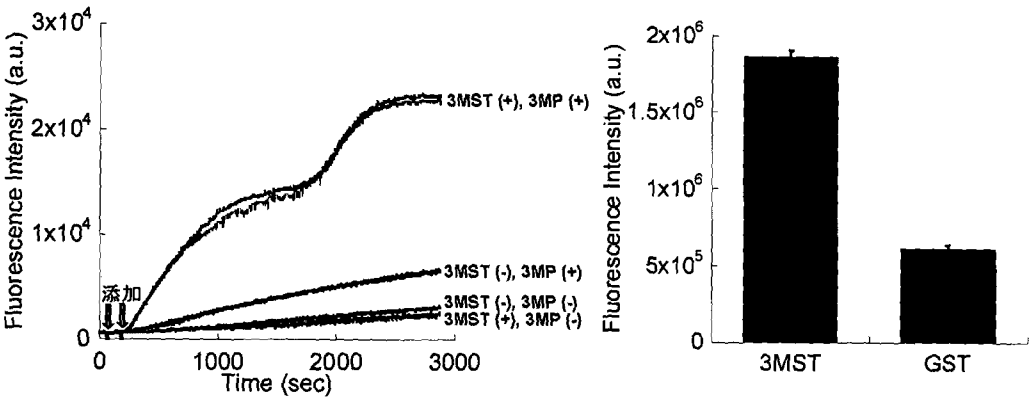
[9]



[図 1 0]



[図 1 1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/061300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D405/12(2006.01)i, C07D493/10(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)i,
G01N31/22(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)

C07D405/12, C07D493/10, G01N31/00, G01N31/22

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2007-238650 A (Kyoto University), 20 September 2007 (20.09.2007), entire text (Family: none)	4-6 1-3, 7-10
X A	Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging, AITA Kazuki, et al., Luminescence, 2007, Vol.22(5), p.455-461	4-6 1-3, 7-10
A	Myung Gil CHOI, et al., Sulfide-selective chemosignaling by a Cu ²⁺ complex of dipicolylamine appended fluorescein, Chem. Commun., 2009, p.7390-7392	1-10

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 May, 2012 (21.05.12)

Date of mailing of the international search report
05 June, 2012 (05.06.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/061300

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Xiao-Feng YANG, et al., A fluorescein-based fluorogenic and chromogenic chemodosimeter for the sensitive detection of sulfide anion in aqueous solution, <i>Analytica Chimica Acta</i> , 2009, Vol.631, p.91-95	1-10
A	Shin MIZUKAMI, et al., A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2002, Vol.124, p.3920-3925	1-10
A	Diego JIMENEZ, et al., A New Chromo-chemodosimeter Selective for Sulfide Anion, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2003, p.9000-9001	1-10
A	Tohru KOIKE, et al., A Novel Biomimetic Zinc(II)-Fluorophore, Dansylamidoethyl-Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen), <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 1996, Vol.118, p.12696-12703	1-10
P,X	Kiyoshi SASAKURA, et al., Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2011.10.14, Vol.133, p.18003-18005	1-10
P,A	Alexander R. LIPPERT, et al., Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2011.06.15, Vol.113, p.10078-10080	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D405/12(2006.01)i, C07D493/10(2006.01)i, G01N31/00(2006.01)i, G01N31/22(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. C07D405/12, C07D493/10, G01N31/00, G01N31/22

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

CA/REGISTRY (STN)

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 A	JP 2007-238650 A (国立大学法人京都大学) 2007.09.20, 全文 (ファミリーなし)	4-6 1-3, 7-10
X A	Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging, AITA Kazuki, et al., Luminescence, 2007, Vol.22(5), p.455-461	4-6 1-3, 7-10

☒ 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 1 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 6 . 2 0 1 2

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)

三木 寛

4 P

4 1 5 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

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
A	Myung Gil CHOI, et al., Sulfide-selective chemosignaling by a Cu ²⁺ complex of dipicolylamine appended fluorescein, Chem. Commun., 2009, p.7390-7392	1-10
A	Xiao-Feng YANG, et al., A fluorescein-based fluorogenic and chromogenic chemodosimeter for the sensitive detection of sulfide anion in aqueous solution, Analytica Chimica Acta, 2009, Vol.631, p.91-95	1-10
A	Shin MIZUKAMI, et al., A Fluorescent Anion Sensor That Works in Neutral Aqueous Solution for Bioanalytical Application, J. Am. Chem. Soc., 2002, Vol.124, p.3920-3925	1-10
A	Diego JIMENEZ, et al., A New Chromo-chemodosimeter Selective for Sulfide Anion, J. Am. Chem. Soc., 2003, p.9000-9001	1-10
A	Tohru KOIKE, et al., A Novel Biomimetic Zinc(II)-Fluorophore, Dansylamidoethyl-Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen), J. Am. Chem. Soc., 1996, Vol.118, p.12696-12703	1-10
P,X	Kiyoshi SASAKURA, et al., Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide, J. Am. Chem. Soc., 2011.10.14, Vol.133, p.18003-18005	1-10
P,A	Alexander R. LIPPERT, et al., Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells, J. Am. Chem. Soc., 2011.06.15, Vol.113, p.10078-10080	1-10