(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
2015 年 9 月 3 日(03.09.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/129705 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/055276

(22) 国際出願日: 2015 年 2 月 24 日(24.02.2015)

(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 2014-037640 2014 年 2 月 28 日(28.02.2014) 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). 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). 吉田 昌史(YOSHIDA Masafumi); 〒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).

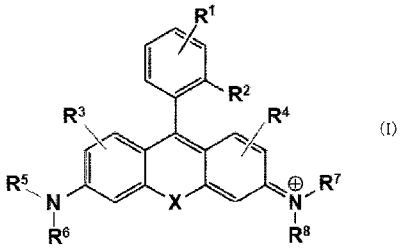
(74) 代理人: 小野 誠, 外(ONO Makoto et al.); 〒1070051 東京都港区元赤坂一丁目２番７号 赤坂Ｋタワー アンダーソン・毛利・友常法律事務所 Tokyo (JP).

(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, 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,

[続葉有]

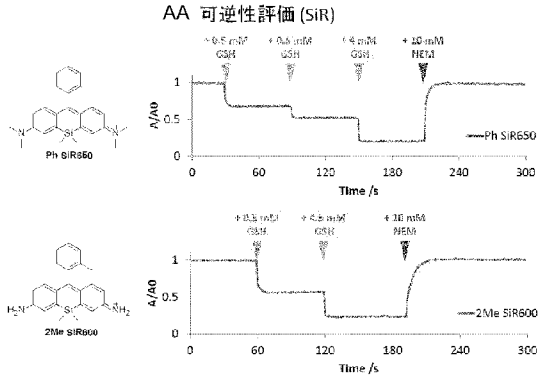
(54) **Title**: GLUTATHIONE-DETECTING FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称 : グルタチオン検出用蛍光プローブ



(I)

[図3]



AA Reversibility evaluation

(57) **Abstract**: [Problem] To provide the following: a novel fluorescent probe for detecting a compound, such as glutathione, that contains a -SH group; a detection method using said fluorescent probe; and a detection kit containing said probe. [Solution] A fluorescent probe for detecting a compound that contains a -SH group, said fluorescent probe containing either a compound that can be represented by formula (I) or a salt thereof. (In the formula, X represents $Si(R^a)(R^b)$, $Ge(R^a)(R^b)$, $Sn(R^a)(R^b)$, $C(R^a)(R^b)$, or O (with R^a and R^b each independently representing either a hydrogen atom or an alkyl group); R^1 represents a hydrogen atom, a cyano group, or one to four identical or different substituents independently selected from the set consisting of alkyl groups, the carboxyl group, ester groups, alkoxy groups, amide groups, and the azide group, each of which may be substituted; R^2 represents a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, a cyano group, or an alkyl group, an alkynyl group, an alkoxy group, an aryl, or a heteroaryl, each of which may be substituted; R^3 and R^4 each independently represent either a hydrogen atom or one to three identical or different substituents independently selected from the set consisting of the hydroxyl group, halogen atoms, and alkyl groups, the sulfo group, the carboxyl group, ester groups, amide groups, and the azide group, each of which may be substituted; R^5, R^6, R^7, and R^8 each independently represent either a hydrogen atom or an alkyl group; either R^5 or R^6 may, together with R^3, form a ring structure containing the nitrogen atom bound thereto; and either R^7 or R^8 may, together with R^4, form a ring structure containing the nitrogen atom bound thereto.)

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2015/129705 A1

SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

【課題】 グルタチオン等の－ＳＨ基を含有する化合物の検出用の新規な蛍光プローブ、当該蛍光プローブを用いた検出方法、及び当該プローブを含む検出キットを提供する。 【解決手段】 以下の式（Ｉ）で表される化合物又はその塩を含む、－ＳＨ基を含有する化合物の検出用蛍光プローブ：［式中、Ｘは、Ｓｉ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｇｅ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｓｎ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｃ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、又はＯ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）；Ｒ^{1}は、水素原子、シアノ基、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、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１～４個の同一又は異なる置換基を表し；Ｒ^{2}は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルキニル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表し；Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それぞれ独立に、水素原子、又はヒドロキシル基、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；Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}及びＲ^{8}は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を示し、ここで、Ｒ^{5}又はＲ^{6}は、それぞれＲ^{3}と一緒になって、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く、 Ｒ^{7}又はＲ^{8}は、それぞれＲ^{4}と一緒になって、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。］

明　細　書

発明の名称 ： グルタチオン検出用蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、グルタチオン等の－ＳＨ基を含有する化合物の検出用の新規な蛍光プローブに関する。より詳細には、可逆的に細胞内のグルタチオン濃度を検出するための蛍光プローブ、当該蛍光プローブを用いた検出方法、及び当該プローブを含む検出キットに関する。

背景技術

[0002] グルタチオン（ＧＳＨ）は細胞内において主要な抗酸化剤として機能しており、酸化ストレスの関わる種々の病態生理において重要な役目を担っている。また、癌細胞においてグルタチオン濃度は正常細胞より高く維持されているとされており、放射線や抗がん剤に対する治療抵抗性の一因と考えらえている。

[0003] 従って、かかるグルタチオンの細胞内濃度を測定することは種々の病態における酸化ストレスの関与等を明らかにするにあたり重要である。さらには癌細胞のグルタチオン濃度を推定することにより治療抵抗性の予測を可能とするなど実診療において非常に有用なツールとなりうる。

[0004] そのため、グルタチオンとの反応前後において蛍光強度や発光強度が変化する試薬を用いてグルタチオン濃度を測定する方法が研究されている。しかしながら、既存のグルタチオン測定試薬および文献報告されている手法（非特許分文献１等）は、細胞内のグルタチオンと反応させるために細胞を破砕する必要があるため、生細胞においては測定が不可能である。また、生細胞に適用可能なグルタチオン感受性蛍光プローブの報告はあるがいずれも定量性には乏しく、またグルタチオンとの不可逆的な反応を利用しているため経時的な測定ができないといった問題点が存在する。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ａｎｄｅｒｓｏｎ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ.、１９８５、１１３，５４８

発明の開示

発明が解決しようとする課題

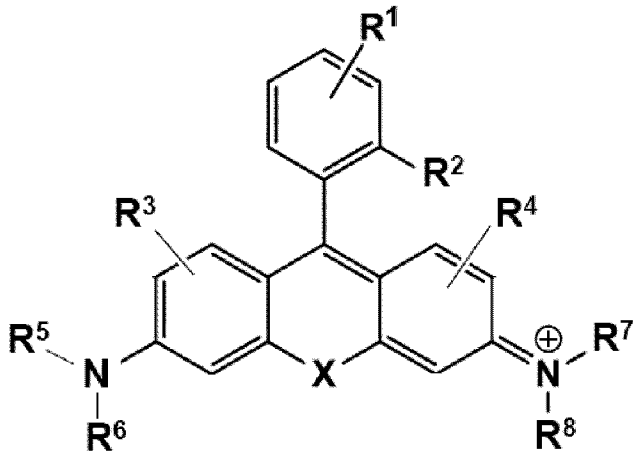
[0006] そこで、本発明は、生細胞において可逆的に細胞内グルタチオン濃度を測定する手法を開発することを目的とし、グルタチオンとの可逆的な反応を利用した蛍光制御機構を開発し、生細胞において適用可能な新規蛍光プローブを開発することを課題とするものである。

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、グルタチオン等の－ＳＨ基を含有する化合物が濃度依存的にローダミンおよびローダミン類似骨格（以下、まとめて「ローダミン類似骨格」という。）のキサンテン環９位へ求核攻撃を起こし、ローダミン類似骨格を有する化合物の可視光領域の吸収及び蛍光を消失させるという事象に着目し、生理的グルタチオン濃度において可逆的かつ濃度依存的に蛍光強度が変化する蛍光団を見出し、本発明を完成するに至った。また、当該蛍光団をアクセプターとする蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）型蛍光プローブを開発し、生細胞におけるグルタチオン濃度変化の可逆的な検出を達成できることを見出した。本発明は、－ＳＨ基を含有する化合物であればグルタチオン以外の化合物の検出にも適用可能である。

[0008] すなわち、本発明は、一態様において、

（１）以下の式（Ｉ）で表される化合物又はその塩を含む、－ＳＨ基を含有する化合物の検出用蛍光プローブを提供するものである。

[化1]



(I)

〔式中、

Xは、Ｓｉ（Ｒ[a]）（Ｒ[b]）、Ｇｅ（Ｒ[a]）（Ｒ[b]）、Ｓｎ（Ｒ[a]）（Ｒ[b]）、Ｃ（Ｒ[a]）（Ｒ[b]）、又はＯ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）；

Ｒ[1]は、水素原子、シアノ基、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、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１～４個の同一又は異なる置換基を表し；

Ｒ[2]は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルキニル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表し；

Ｒ[3]及びＲ[4]は、それぞれ独立に、水素原子又はヒドロキシル基、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；

Ｒ[5]、Ｒ[6]、Ｒ[7]及びＲ[8]は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を示し、ここで、Ｒ[5]又はＲ[6]は、それぞれＲ[3]と一緒になって、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く、

Ｒ[7]又はＲ[8]は、それぞれＲ[4]と一緒になって、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。〕

[0009] 本発明は、好ましい態様において、

（２）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）に記載の蛍光プローブ；

（３）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）に記載の蛍光プローブ；

（４）Ｘが、Ｓｉ（R^a）（R^b）である、上記（１）～（３）のいずれか１に記載の蛍光プローブ；

（５）R^2が、水素原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいC_1－C_4アルキル基、C_1－C_4アルコキシ基、又はフェニル基であり；R^5、R^6、R^7及びR^8は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基である、

上記（１）～（４）のいずれか１に記載の蛍光プローブ；

（６）R^1が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有する、上記（１）～（５）のいずれか１に記載の蛍光プローブ；

（７）R^5、R^6、R^7又はR^8が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有する、上記（１）～（５）のいずれか１に記載の蛍光プローブ；及び

（８）前記蛍光団が、キサンテン骨格を有する化合物である、上記（６）又は（７）に記載の蛍光プローブ

を提供するものである。

[0010] また、別の側面において、本発明は、

（９）上記（１）～（８）のいずれか１に記載の蛍光プローブを用いる、－ＳＨ基を含有する化合物の検出方法；

（１０）前記－ＳＨ基を含有する化合物と前記蛍光プローブとの反応による蛍光応答又は吸光度変化を観測することにより、－ＳＨ基を含有する化合物の存在を検出することを特徴とする、上記（９）に記載の検出方法；

（１１）前記蛍光応答が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）による蛍光

変化である上記（１０）に記載の検出方法；

（１２）蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光応答を可視化することを特徴とする、上記（１０）に記載の検出方法；

（１３）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（９）～（１２）のいずれか１に記載の検出方法；及び

（１４）前記－ＳＨ基を含有する化合物が、グルタチオンである、上記（９）～（１２）のいずれか１に記載の検出方法

を提供するものである。

[0011] さらに、別の側面において、本発明は、

（１５）上記（１）～（８）のいずれか１に記載の蛍光プローブを含む、－ＳＨ基を含有する化合物の検出用キット；

（１６）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（１５）に記載のキット；及び

（１７）前記－ＳＨ基を含有する化合物が、グルタチオンである、上記（１５）に記載のキット

を提供するものである。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、グルタチオンを可逆的かつ濃度依存的に蛍光応答により検出することができるため、生細胞において可逆的かつ経時的に正確なグルタチオン濃度測定を行なう可能となる。また、本発明の検出方法は、通常の細胞イメージングが行える顕微鏡で施行可能であり、特別な機器を必要としない。また経時的な定量が可能であることより同一細胞において種々の刺激を与えたり、繰り返し付加した場合のグルタチオンの低下や酸化ストレス暴露からの回復の経過をとらえることができる。本発明は、－ＳＨ基を含有する化合物であればグルタチオン以外のシステイン残基を有する化合物やペプチドの検出にも適用できる。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

[0013] [図1]図１は、本発明の蛍光プローブである「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００」のグルタチオン添加に伴う吸収スペクトル変化を示した図である。

[図2]図２は、本発明の蛍光プローブである化合物１「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００」のグルタチオン添加に伴う蛍光スペクトル変化を示した図である。

[図3]図３は、本発明の蛍光プローブ化合物１および化合物２にグルタチオンを添加し、その後、Ｎ－エチルマレイミド(ＮＥＭ)を添加した際の吸収スペクトル強度変化の時間依存性を示したグラフである。

[図4]図４は、本発明の蛍光プローブである化合物１「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００」を用いて癌培養細胞における蛍光イメージングを行った結果を示す画像である。

[図5]図５は、本発明の蛍光プローブである化合物８「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００－ＴＭＲ」のグルタチオン添加に伴う吸収スペクトル変化を示した図である。

[図6]図６は、本発明の蛍光プローブである化合物８「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００－ＴＭＲ」のグルタチオン添加に伴う蛍光スペクトル変化を示した図である。

[図7]図７は、図６の蛍光スペクトルにおいて、アクセプターのピーク波長（６１５ｎｍ）とドナーのピーク波長（５８４ｎｍ）の強度変化をそれぞれプロットしたグラフである。

[図8]図８は、本発明の蛍光プローブである化合物８「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００－ＴＭＲ」を用いて癌培養細胞における蛍光イメージングを行った結果を示す画像である。

[図9]図９は、本発明の蛍光プローブである化合物９「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００－ＴＭＲ（Ｍｅ）」を用いて癌培養細胞における蛍光イメージングを行った結果を示す画像である。

発明を実施するための形態

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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（$C_{1\sim20}$）、炭素数３～１５個（$C_{3\sim15}$）、炭素数５～１０個（$C_{5\sim10}$）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、$C_{1\sim8}$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いてもよい。アルキル部分を含む他の置換基（例えばアルコシ基、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。

[0017] 本明細書において、ある官能基について「置換基を有していてもよい」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いてもよい。置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、水酸基、カルボキシル基、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。

[0018] 本明細書中において、「アルケニル」は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有している直鎖又は分枝鎖の炭化水素基をいう。例えば、その非限定的な例として、ビニル、アリル、１－プロペニル、イソプロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、１，３－ブタンジエニル、１－ペンテニル、２－ペンテニル、３－ペンテニル、４－ペンテニル、１，３－ペンタンジエニル、１－ヘキセニル、２－ヘキセニル、３－ヘキセニル、４－ヘキセニル、５－ヘキセニル及び１，４－ヘキサンジエニル）を含む。二重結合についてシス配座またはトランス配座のいずれであってもよい。

[0019] 本明細書中において、「アルキニル」は、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有している直鎖又は分枝鎖の炭化水素基をいう。例えば、その非限定的な例として、エチニル、プロピニル、２－ブチニルおよび３－メチルブチニルなどがあるを含む。

[0020] 本明細書中において、「シクロアルキル」は、上記のアルキルよりなる単環または多環式の非芳香環系をいう。当該シクロアルキルは、置換されていないか同一もしくは異なっても良い１以上の置換基によって置換されていることができ、単環式シクロアルキルの非限定的な例には、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルおよびシクロヘプチルなどがあり、多環式のシクロアルキルの非限定的な例には、１－デカリニル、２－デカリニル、ノルボルニル、アダマンチルなどが挙げられる。また、当該シクロアルキルは、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個以上含むヘテロシクロアルキルであってもよい。ヘテロシクロアルキル環中の任意の－ＮＨは、例えば－Ｎ（Ｂｏｃ）基、－Ｎ（ＣＢｚ）基および－Ｎ（Ｔｏｓ）基としてのように保護されていてもよく、環中の窒素原子または硫黄原子が対応するＮ－オキシド、Ｓ－オキシドまたはＳ，Ｓ－ジオキシドへ酸化されたものであってもよい。例えば、単環式ヘテロシクロアルキルの非限定的な例には、ジアザパニル、ピペリジニル、ピロリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリジニル、１，４－ジオキサニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、

テトラヒドロチオフェニル、ラクタムおよびラクトン等が挙げられる。

[0021] 本明細書中において、「シクロアルケニル」は、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を含む、単環または多環式の非芳香環系をいう。当該シクロアルケニルは、置換されていないか同一もしくは異なっても良い１以上の置換基によって置換されていることができ、単環式のシクロアルケニルの非限定的な例には、シクロペンテニル、シクロヘキセニルおよびシクロヘプタ－１，３－ジエニルなどがあり、多環式のシクロアルケニルの非限定的な例には、ノルボルニレニル等が挙げられる。また、当該シクロアルキルは、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個以上含むヘテロシクロアルケニルであってもよいヘテロシクロアルケニル環中の窒素原子または硫黄原子を、対応するＮ－オキシド、Ｓ－オキシドまたはＳ，Ｓ－ジオキシドへ酸化してもよい。

[0022] 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。アリールが単環およ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－アンスリル基、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いてもよい。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。

[0023] 本明細書中において、「アリールアルキル」は、上記アリールで置換されたアルキルを表す。アリールアルキルは、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。アシル基が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いてもよい。アリールアルキルの非限定的な例としては、ベンジル基、２－チエニルメチル基、３－チエニルメチル基、２－ピリジルメチル基、３－ピリジルメチル基、４－ピリジルメチル基、２－フリルメチル基、３－フリルメチル基、２－チアゾリルメチル基、４－チアゾリルメチル基、５－チアゾリルメチル基、２－オキサゾリルメチル基、４－オキサゾリルメチル基、５－オキサゾリルメチル基、１－ピラゾリルメチル基、３－ピラゾリルメチル基、４－ピラゾリルメチル基、２－ピラジニルメチル基、２－ピリミジニルメチル基、４－ピリミジニルメチル基、５－ピリミジニルメチル基、１－ピロリルメチル基、２－ピロリルメチル基、３－ピロリルメチル基、１－イミダゾリルメチル基、２－イミダゾリルメチル基、４－イミダゾリルメチル基、３－ピリダジニル

メチル基、４－ピリダジニルメチル基、３－イソチアゾリルメチル基、３－イソオキサゾリルメチル基、１，２，４－オキサジアゾール－５－イルメチル基又は１，２，４－オキサジアゾール－３－イルメチル基等が挙げられる。

[0024] 同様に、本明細書中において、「アリールアルケニル」は、上記アリールで置換されたアルケニルを表す。

[0025] 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。

[0026] 本明細書中において、「アリールオキシ基」とは、前記アリール基が酸素原子を介して結合する基である。アリールオキシ基としては、例えば、フェノキシ基、２－チエニルオキシ基、３－チエニルオキシ基、２－ピリジルオキシ基、３－ピリジルオキシ基、４－ピリジルオキシ基、２－フリルオキシ基、３－フリルオキシ基、２－チアゾリルオキシ基、４－チアゾリルオキシ基、５－チアゾリルオキシ基、２－オキサゾリルオキシ基、４－オキサゾリルオキシ基、５－オキサゾリルオキシ基、１－ピラゾリルオキシ基、３－ピラゾリルオキシ基、４－ピラゾリルオキシ基、２－ピラジニルオキシ基、２－ピリミジニルオキシ基、４－ピリミジニルオキシ基、５－ピリミジニルオキシ基、１－ピロリルオキシ基、２－ピロリルオキシ基、３－ピロリルオキシ基、１－イミダゾリルオキシ基、２－イミダゾリルオキシ基、４－イミダゾリルオキシ基、３－ピリダジニルオキシ基、４－ピリダジニルオキシ基、

３－イソチアゾリルオキシ基、３－イソオキサゾリルオキシ基、１，２，４－オキサジアゾール－５－イルオキシ基、又は１，２，４－オキサジアゾール－３－イルオキシ基等が例示される。

[0027] 本明細書中において、「アルキレン」とは、直鎖状または分枝状の飽和炭化水素からなる二価の基であり、例えば、メチレン、１－メチルメチレン、１，１－ジメチルメチレン、エチレン、１－メチルエチレン、１－エチルエチレン、１，１－ジメチルエチレン、１，２－ジメチルエチレン、１，１－ジエチルエチレン、１，２－ジエチルエチレン、１－エチル－２－メチルエチレン、トリメチレン、１－メチルトリメチレン、２－メチルトリメチレン、１，１－ジメチルトリメチレン、１，２－ジメチルトリメチレン、２，２－ジメチルトリメチレン、１－エチルトリメチレン、２－エチルトリメチレン、１，１－ジエチルトリメチレン、１，２－ジエチルトリメチレン、２，２－ジエチルトリメチレン、２－エチル－２－メチルトリメチレン、テトラメチレン、１－メチルテトラメチレン、２－メチルテトラメチレン、１，１－ジメチルテトラメチレン、１，２－ジメチルテトラメチレン、２，２－ジメチルテトラメチレン、２，２－ジ－ｎ－プロピルトリメチレン等が挙げられる。

[0028] 本明細書中において、「アルケニレン」とは、直鎖状または分枝状の少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有している不飽和炭化水素からなる二価の基であり、例えば、エテニレン、１－メチルエテニレン、１－エチルエテニレン、１，２－ジメチルエテニレン、１，２－ジエチルエテニレン、１－エチル－２－メチルエテニレン、プロペニレン、１－メチル－２－プロペニレン、２－メチル－２－プロペニレン、１，１－ジメチル－２－プロペニレン、１，２－ジメチル－２－プロペニレン、１－エチル－２－プロペニレン、２－エチル－２－プロペニレン、１，１－ジエチル－２－プロペニレン、１，２－ジエチル－２－プロペニレン、１－ブテニレン、２－ブテニレン、１－メチル－２－ブテニレン、２－メチル－２－ブテニレン、１，１－ジメチル－２－ブテニレン、１，２－ジメチル－２－ブテニレン等が挙げられる

。

[0029] 本明細書中において、「アリーレン」及び「アリールアルキレン」は、それぞれ上記「アリール」及び「アリールアルキル」に基づく二価の基を意味する。同様に、「オキシアルキレン」及び「アリーレンオキシ」は、それぞれ上記「アルコキシ」及び「アリールオキシ」に基づく二価の基を意味する。

[0030] 本明細書中において、「アルキルアミノ」及び「アリールアミノ」は、－NH_2基の水素原子が上記アルキル又はアリールの１又は２で置換されたアミノ基を意味する。例えば、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノ、ベンジルアミノ等が挙げられる。同様に、「アルキルチオ」及び「アリールチオ」は、－ＳＨ基の水素原子が上記アルキル又はアリールで置換された基を意味する。例えば、メチルチオ、エチルチオ、ベンジルチオ等が挙げられる。

[0031] 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－）および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。

[0032] 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－）および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。

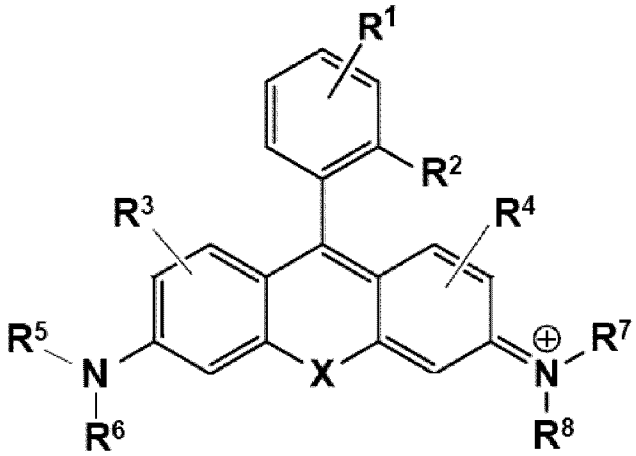
[0033] 本明細書中において、「環構造」という用語は、二つの置換基の組み合わせによって形成される場合、複素環または炭素環基を意味し、そのような基は飽和、不飽和、または芳香族であることができる。従って、上記において定義した、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、及びヘテロアリールを含むものである。例えば、シクロアルキル、フェニル、ナフチル、モルホリニル、ピペルジニル、イミダゾリル、ピロリジニル、およびピリジルなどが挙げられる。本明細書中において、置換基は、別の置換基と環構造を形成することができ、そのような置換基同士が結合する場合、当業者であれば、特定の置換、例えば水素への結合が形成され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。かかる環構造およ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。

[0034] ２．本発明の－ＳＨ基含有化合物の検出用蛍光プローブ

本発明の蛍光プローブは、一態様において、以下の式（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]



(I)

[0035] 上記式（Ｉ）において、Ｘは、Ｓｉ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｇｅ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｓｎ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、又はＣ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）を表す。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炭素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。Ｘは、好ましくは、Ｓｉ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）であり、より好ましくはＳｉ（ＣＨ$_{3}$）$_{2}$である。

[0036] R^1は、水素原子、シアノ基、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基（例えば、「置換されていてもよいアルキル基」には、フルオロアルキル等のハロアルキルが含まれ得る）、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、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１～４個の同一又は異なる置換基を表す。R^1が水素原子以外である場合、そのベンゼン環における位置は特に限定されないが、R^2を有する置換基に対してメタ位であることが好ましい。また、ベンゼン環上に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いてもよい。細胞内におけるプローブ分子の局在化を抑制する観点からは、R^1は、例えば、イミノ二酢酸エステルであることが好ましい。

[0037] また、後述のように、R^1が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有することもできる。この場合、典型的には、R^1はアミド基であることが好適である。かかる蛍光団としては、式（Ｉ）におけるローダミン類似骨格部位をアクセプターとして、それに対するドナーとなり得る蛍光団であれば、ＦＲＥＴに関する技術分野において公知の蛍光団を用いることができ、その非限定的な例として、ピレン、ペリレン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、シアニン、ボロンジピロメテン（ＢＯＤＩＰＹ）、オキサジンなどを挙げることができる。好ましくは、そのような蛍光団はキサンテン骨格を有する化合物である。

[0038] R^2は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルキニル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表す。好ましくは、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいC_1－C_4アルキル基、C_1－C_4アルコキシ基、又はフェニル基である。より好ましくは、ヒドロキシル基、シアノ基、メチル基、メトキシ基である。

[0039] R^3及びR^4は、それぞれ独立に、水素原子、又はヒドロキシル基、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

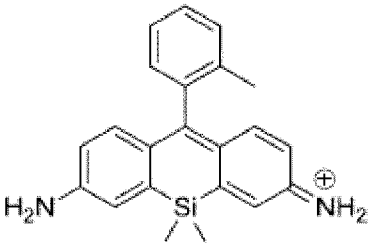
１～３個の同一又は異なる置換基を表す。好ましくは、R^3及びR^4は、いずれも水素原子である。また、上記R^1と同様に、R^3又はR^4が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有することもできる。

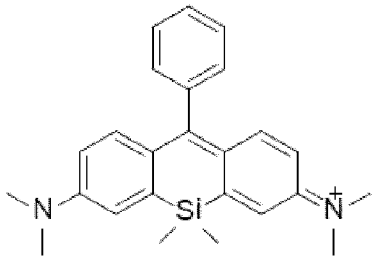
[0040] R^5、R^6、R^7及びR^8は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基を示す。上記R^1と同様に、R^5、R^6、R^7又はR^8が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有することもできる。ここで、R^5又はR^6のいずれかがアルキル基の場合に、R^3と一緒になって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。その場合、R^5とR^3、又はR^6とR^3の組み合わせのいずれか一方のみが環構造を形成してもよいし、いずれもが環構造を形成してもよい。当該環構造には、上記窒素原子以外の更なるヘテロ原子を含むこともできる。

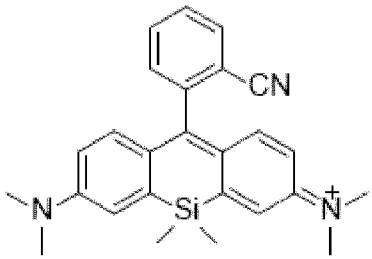
[0041] 同様に、R^7又はR^8のいずれかがアルキル基の場合に、R^4と一緒になって、それらが結合する窒素原子を含む環構造を形成してもよい。その場合、R^7とR^4、又はR^8とR^4の組み合わせのいずれか一方のみが環構造を形成してもよいし、いずれもが環構造を形成してもよい。当該環構造には、上記窒素原子以外の更なるヘテロ原子を含むこともできる。

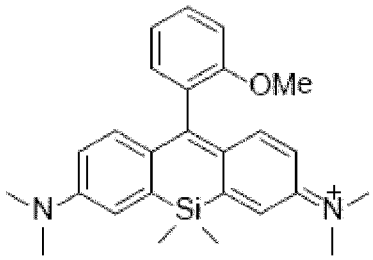
[0042] 本発明の－ＳＨ基含有化合物の蛍光イメージング用プローブとして特に適切な式（Ｉ）の化合物の具体例としては、

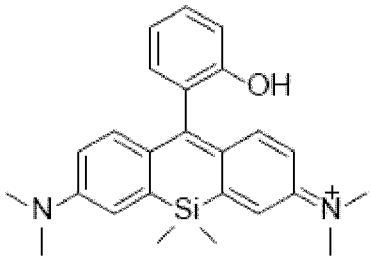
[化3]

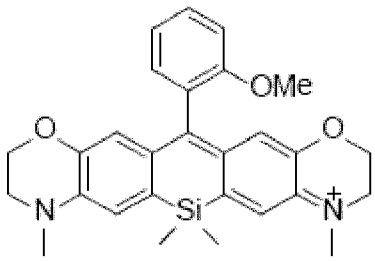


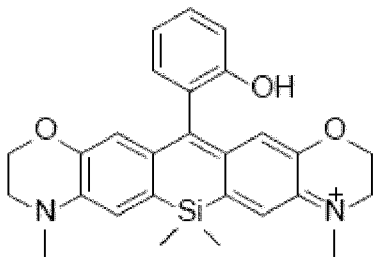


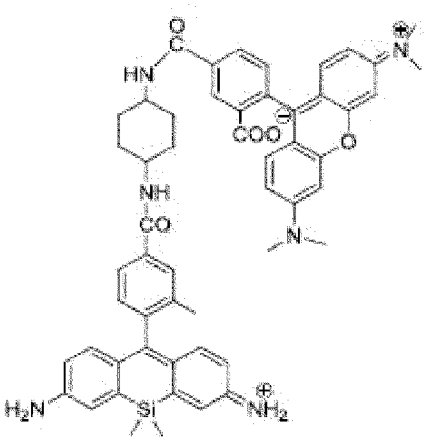
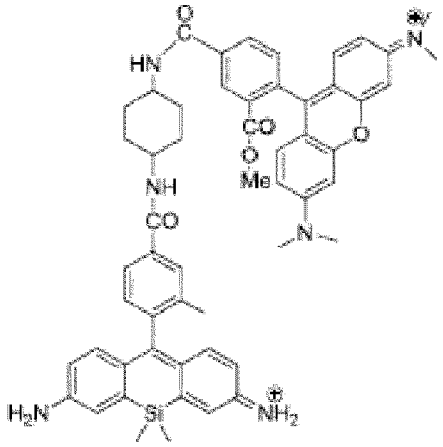
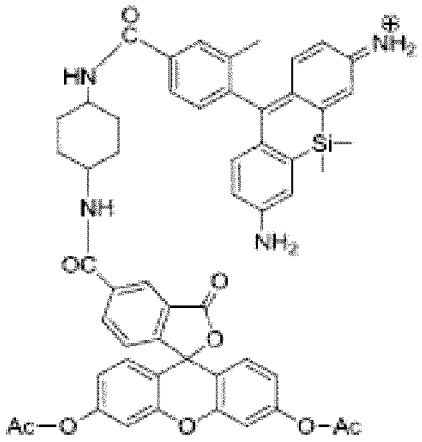










が挙げられる。ただし、これらに限定されるものではない。

[0043] 上記式（Ｉ）で表される化合物は、Ｒ[7]及びＲ[8]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。

[0044] 式（Ｉ）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、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。

[0045] 式（Ｉ）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。

[0046] 上記の蛍光プローブは、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得る。

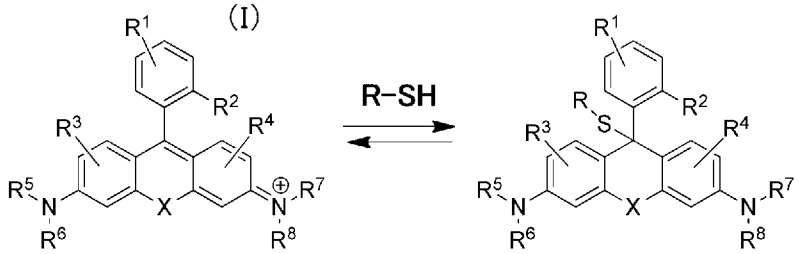
[0047] 本明細書の実施例には、式（Ｉ）で表される本発明の化合物に包含される代表的化合物についての製造方法が具体的に示されているので、当業者は本明細書の開示を参照することにより、及び必要に応じて出発原料や試薬、反応条件などを適宜選択することにより、式（Ｉ）に包含される任意の化合物を容易に製造することができる。

[0048] ３．本発明の蛍光プローブを用いた－ＳＨ基含有化合物の検出方法

本発明の蛍光プローブは、式（Ｉ）で示されるキサンテン様の縮合環の９位が、以下に示すように、グルタチオン等におけるチオール（ＳＨ）基によって求核攻撃されると可視光領域の吸収及び蛍光とも消失するという機構を用いるものである（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。）。当該反応は可逆性を有する。これにより、グルタチオン等の－ＳＨ基を有する化合物を可逆的、経時的、かつ定量的に検出をすることができるのである。なお、当該「-ＳＨ基を含有する化合物」の例としては、ここで挙げたグルタチオンに限らず、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、以下の反応が進行する限り、これらの化合物等についても本発明の蛍光プローブが適用可能である。

[化4]



[0049] また、式（Ｉ）の分子内に蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなり得る更なる蛍光団を設けることによって、式（Ｉ）のローダミン類似骨格がアクセプターとなる蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）によって、－ＳＨ基含有化合物との反応を発光波長変化として検出することも可能となる。すなわち、－ＳＨ基含有化合物が存在しない環境では、ローダミン類似骨格に固有の蛍光波長における発光が見られるが、式（Ｉ）の化合物と－ＳＨ基含有化合物との反応によって、当該ローダミン類似骨格由来の蛍光が消光するとともに、上記ドナー蛍光団に固有の蛍光波長における発光が増大することによって、－ＳＨ基含有化合物の検出を蛍光発光として検出することができるのである。そのため、ドナー蛍光団の蛍光スペクトルは、ローダミン類似骨格の吸収スペクトルと重なり、また、ドナー蛍光団の蛍光波長は、ローダミン類似骨格の蛍光波長とは異なる波長領域であることが好ましい。上記のように、かかるドナー蛍光団は、式（Ｉ）におけるR^1、R^3～R^8のいずれかに存在することができ、好ましくは、R^1、R^5、R^6、R^7又はR^8に存在することができる。

[0050] 以上の発光機構に従い、本発明の－ＳＨ基含有化合物の検出方法では、ＳＨ基を含有する化合物と前記蛍光プローブとの反応による蛍光応答又は吸光度変化を観測することにより、－ＳＨ基を含有する化合物の存在を検出することを特徴とする。本明細書において「検出」という用語は、定量、定性な

ど種々の目的の測定を含めて最も広義に解釈されるべきである。上述のように、前記蛍光応答が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）による蛍光変化であることが好ましい。

[0051] 蛍光応答を観測する手段は、広い測定波長を有する蛍光光度計を用いることができるが、前記蛍光応答を２次元画像として表示可能な蛍光イメージング手段を用いて可視化することもできる。蛍光イメージングの手段を用いることによって、蛍光応答を二次元で可視化できるため、グルタチオン等の瞬時に視認することが可能となる。蛍光イメージング装置としては、当該技術分野において公知の装置を用いることができる。

[0052] 測定対象である－ＳＨ基含有化合物試料と蛍光プローブを接触させる手段としては、代表的には、蛍光プローブを含む溶液を試料添加、塗布、或いは噴霧することが挙げられるが、上記試料の形態や測定環境等に応じて適宜選択することが可能である。

[0053] 本発明の蛍光プローブの適用濃度は特に限定されないが、例えば０．１～１，０μＭ程度の濃度の溶液を適用することができる。

[0054] 本発明の蛍光プローブとしては、上記式（Ｉ）で表される化合物又はその塩をそのまま用いてもよいが、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、一般的には、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が、使用時に注射用蒸留水や適宜の緩衝液に溶解して適用すればよい。

[0055] ４．本発明の蛍光プローブを用いた－ＳＨ基含有化合物の検出用キット

本発明の検出方法においては、上記蛍光プローブを含む－ＳＨ基含有化合物の検出用キットを用いることが好ましい。当該キットにおいて、通常、本発明の蛍光プローブは溶液として調製されているが、例えば、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、使用時に注射用蒸留水や適宜の緩衝液に溶解して適用することもできる。

[0056] また、当該キットには、必要に応じてそれ以外の試薬等を適宜含んでいてもよい。例えば、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。

実施例

[0057] 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。

[0058] ［試薬、装置等］

以下に示す反応に用いる有機溶媒は、すべて脱水グレードのものを用いた。市販の原料は試薬メーカー（和光純薬株式会社、東京化成工業株式会社、関東化学株式会社、Sigma-Aldrich Co. Ltd., Acros Co. Ltd.）より購入した。

[0059] 高速液体クロマトグラフィーによる精製は、以下の装置およびカラムを用いた。

・ポンプ：PU-2080およびPU-2087（日本分光株式会社）

・検出器：MD-2010（日本分光株式会社）

・カラム：Inertsil ODS-3（10 x 250 mm or 20 x 250 mm, GL Science Inc.）

[0060] ＨＰＬＣによる分離精製に際しては、特に断りがない限り以下の溶媒Ａおよびｂを用い、これらを任意の組成で混合して精製を行った。

Ａ：精製水（1%アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸を含む）

Ｂ：アセトニトリル（1%精製水を含む）

Ｃ：精製水（0.2M 酢酸-トリエチルアミンを含む）

ＨＰＬＣ分離における送液は、それぞれ25 ml/min（ポンプ：PU-2087, カラム：20 x 250 mm)、5 ml/min（ポンプ：PU-2080, カラム：10 x 250 mm)、1 ml/min（ポンプ：PU-2080, カラム：4.6 x 200 mm)にて行った。中圧カラ

ムクロマトグラフィーによる精製は、YFLC-Al580（山善株式会社）を用いて行った。

[0061] NMR測定は、AVANCE III 400 Nanobay (Bruker, Co. Ltd.) を用いて行った（400 MHz for 1H NMR, 101 MHz for 13C NMR）。質量分析測定は、MicrOTOF (ESI-TOF, Bruker, Co. Ltd.)を用いて行った。High-resolution MS (HRMS) 測定に際しては、外部標準物質としてギ酸ナトリウムを用いた。

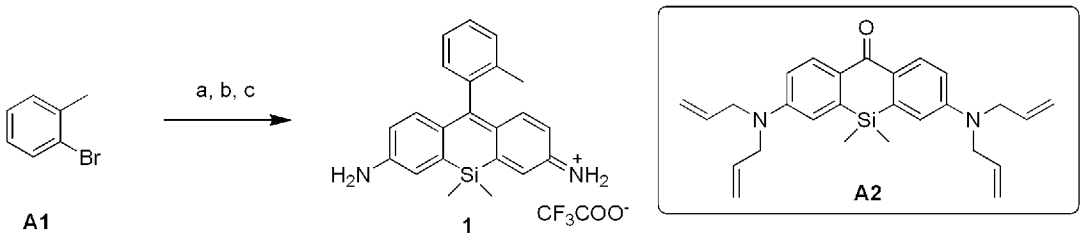
実施例 1

[0062] 1．蛍光プローブの合成

化合物１（２Ｍｅ　ＳｉＲ６００）の合成

以下のスキーム１に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１（２Ｍｅ　ＳｉＲ６００）を合成した。なお、化合物A2の合成については、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15]



a) i) -78°C, THF, ii) compound A2 in THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq. b) $NaBH_4$, MeOH, rt., c) 1,3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, 35°C, d) *p*-chloranil, CH_2Cl_2, rt.

スキーム１

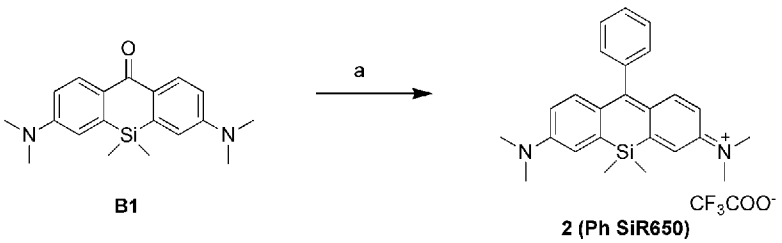
[0063] 2-ブロモトルエン(化合物A1 34.2 mg, 0.2 mmol, 6 eq) をTHF(5ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78℃で10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（ 0.2 ml,0.2 mmol,6 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物A2（14.5 mg, 0.034 mmol, 1 eq.）をTHF（3 ml）に溶かして加え、-78℃で1時間、室温で2時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し

、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 45min）、化合物A3（13.3mg 73.0 %）を青色個体として得た。ついで化合物A3（7.7 mg, 0.014 mmol)をメタノール（5 ml）に溶かし氷浴し、次いで水素化ホウ素ナトリウムを徐々に加え、濃青色の溶液が無色になったところで水を加えて反応を終了させた。そこにジクロロメタンを加えて抽出し、有機相を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。得られた残渣をアルゴン雰囲気下にて脱酸素ジクロロメタン（5 ml）に溶かし、これを1,3-ジメチルバルビツール酸（54.3 mg, 0.35 mmol, 24 eq.）およびテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（3.2 mg, 0.0028 mmol, 0.2 eq.）を含むに試験管に加え、アルゴン雰囲気下、35℃にて60 分間撹拌した。さらにクロラニル（5.0 mg, 0.02 mmol, 1.5 eq.）を加えて室温にて60 分間撹拌した。溶媒を減圧留去したのち、HPLCにて精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 45min）、目的化合物１（1.2 mg, 18.4 %)を青紫色固体として得た。

[0064] 化合物２（Ｐｈ　ＳｉＲ６５０）の合成

以下のスキーム２に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２（ＰｈＳｉＲ６５０）を合成した。なお、化合物 B1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16]



B1　　2 (Ph SiR650)

a) i) PhLi, THF, -78°C to rt., ii) 1N HClaq.

スキーム２

[0065] 化合物B1（12.5 mg, 0.039 mmol, 1.0 eq.）をTHF（2 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 ℃で撹拌した。1.9 M フェニルリチウム ジブチルエーテ

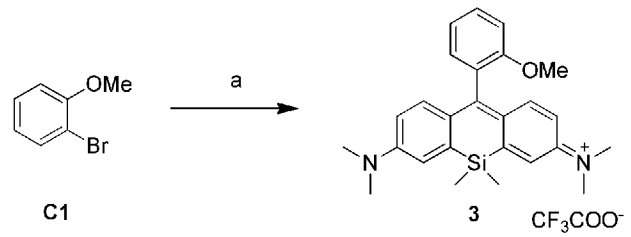
ル溶液（100 μl, 0.193 mmol, 5.0 eq.）をゆっくり加え、-78 °Cで10分、室温で２時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物2（15.8 mg, 82%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.58 - 7.56 (m, 3H), 7.36 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.29 - 7.26 (m, 2H), 7.15 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.34 (s, 12H), 0.60 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 171.1 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 143.3 (CH), 140.6 (C), 130.4 (CH), 129.8 (CH), 129.3 (CH), 129.0 (C), 122.1 (CH), 114.8 (CH), 40.8 (CH_3), -1.1 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{25}H_{29}N_2Si$: 385.20945; found: 385.20719 (2.3 mDa, 5.9 ppm).

[0066] 化合物３（２OMe SiR650）の合成

以下のスキーム３に従って、本発明の蛍光プローブである化合物３（２OMe ＳｉＲ６５０）を合成した。

[化17]



a) i) -78°C, THF, ii) compound B1 in THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.

スキーム３

[0067] 2-ブロモアニソール（化合物C1, 50 mg, 0.293 mmol, 8.4 eq.）をTHF（2 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 °Cで10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（250 μl, 0.250 mmol, 7.1 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物B1(10 mg, 0.035 mmol, 1 eq.)をTHF（2 ml）に溶かして加え、-78 °Cで1時間、室温で6時間撹拌した。1 N

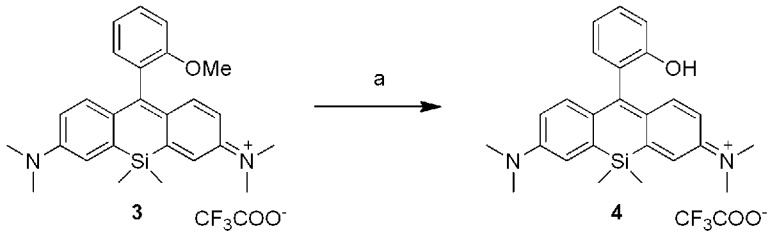
塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物3（15.3 mg, 94%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.56 (dt, J = 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.22-7.16 (m, 3H) 7.15 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.34 (s, 12H), 0.61 (s, 3H), 0.58 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 169.5, 158.1, 155.7, 149.4, 142.7, 131.8, 131.4, 129.2, 129.1, 121.8, 121.4, 114.9, 112.3, 56.2, 40.8, -1.0, -1.4 ppm.

[0068] 化合物４（２OH SiR650）の合成

以下のスキーム４に従って、本発明の蛍光プローブである化合物４（２OH ＳｉＲ６５０）を合成した。

[化18]



スキーム４

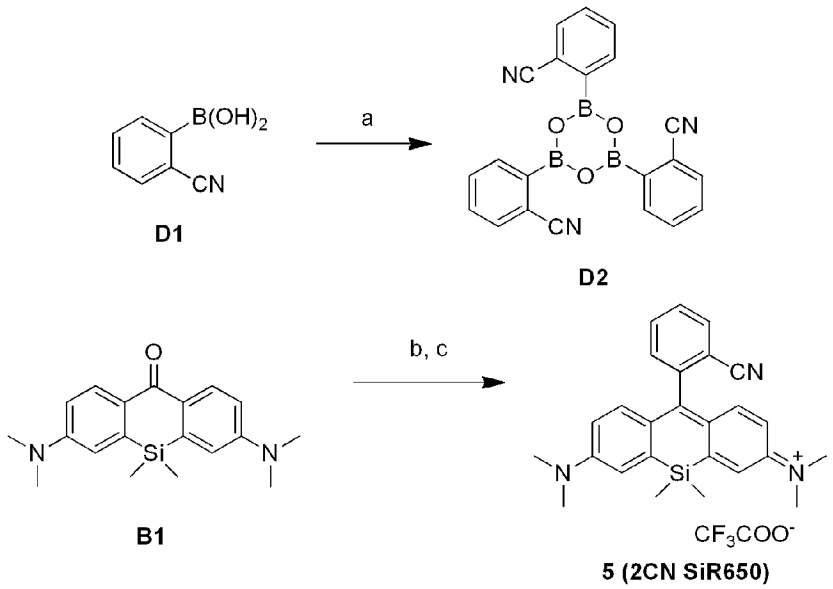
[0069] 化合物３（8.8 mg, 16.7 μmol, 1 eq.）をジクロロメタン（500 μl）に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 ℃で撹拌した。三臭化ホウ素（8 μl, 84.6 μmol, 5.1 eq.）をゆっくり加え、-78 ℃で撹拌し、徐々に室温に戻して終夜撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物４（8.2 mg, 95%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.42-7.38 (m, 1H), 7.32 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 9.6Hz, 2H), 7.03 - 7.01 (m, 2H), 6.98 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.34 (s, 12H), 0.62 (s, 3H), 0.58 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 170.2, 155.8, 155.7, 149.6, 143.0, 131.6, 131.5, 129.3, 127.5, 121.8, 120.3, 116.6, 114.9, 40.8, -0.9, -1.4 ppm.

[0070] 化合物５（2CN SiR650）の合成

以下のスキーム５に従って、本発明の蛍光プローブである化合物５（2CNＳｉＲ６５０）を合成した。

[化19]



a) 110°C, b) Tf_2O, MeCN, rt. c) compound **E2**, $PdCl_2(PPh_3)_2$, Na_2CO_3, MeCN

スキーム５

[0071] ［化合物D2の合成］

2-シアノフェニルボロン酸（化合物 D1, 162 mg, 1.10 mmol）を110℃にて6時間減圧乾燥させ、化合物D2（140 mg, 0.367 mmol, 100%）を白色固体として得た。化合物Ｄ２は分離精製せず、そのまま次の反応に用いた。

[0072] ［化合物５（2CN SiR650）の合成］

化合物B1（55.6 mg, 0.171 mmol, 1 eq.）を脱酸素アセトニトリル（10 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、室温にて撹拌した。トリフルオロメタンス

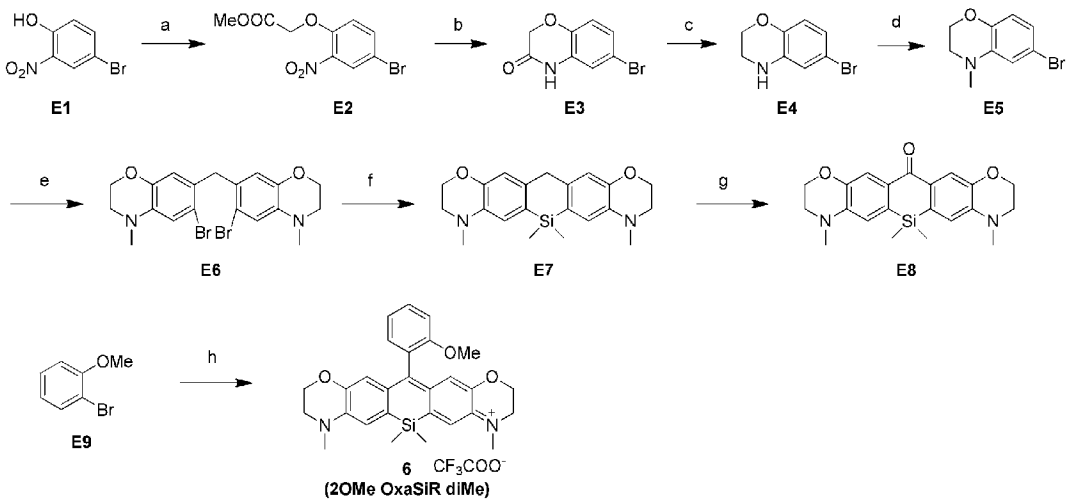
ルホン酸無水物（40 μl,
0.238 mmol, 1.4 eq.）をゆっくり加え、室温にてさらに15分撹拌した後、化合物D2（82.3 mg, 0.210 mmol, 1.2 eq.）、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド（23.7 mg, 0.034 mmol, 0.2 eq.）および炭酸ナトリウム（53.2 mg, 0.503 mmol, 3.0eq.）を加え、60℃にて終夜撹拌した。室温に戻し、セライト濾過にて不溶物を除去し、濾液を減圧留去し、得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物５（12.4 mg, 13%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ7.97 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.90 (dt, J = 1.2 Hz, 7.7 Hz, 1H), 7.77 (dt, J = 1.2 Hz, 7.8 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 2.8 Hz,2H), 6.95 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.81 (dd, J = 9.7 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.37 (s, 12H), 0.64 (s, 3H), 0.60 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 164.8 (C), 155.8 (C), 149.6 (C), 14.4 (C), 141.8 (CH), 134.10 (CH), 134.06 (CH), 131.7 (CH), 130.7 (CH), 128.5 (C), 122.7 (CH), 117.8 (C), 115.5 (CH), 114.4 (C), 41.0 (CH_3), -0.8 (CH_3), -1.8 (CH_3).

[0073] 化合物６（20Me OxaSiR diMe）の合成

以下のスキーム６に従って、本発明の蛍光プローブである化合物６（20Me OxaSiR diMe）を合成した。

[化20]



a) $BrCH_2COOMe$, K_2CO_3, DMF, 70°C; b) Fe powder, AcOH, reflux; c) BH_3-THF complex, THF, reflux; d) MeI, K_2CO_3, MeCN, 80°C.; e) 37% HCHOaq., AcOH, 90°C; f) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) $SiCl_2Me_2$, -78°C to rt iii) 0.1N HClaq.; g) $KMnO_4$, acetone, -15 °C; h) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **E8**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.

スキーム６

[0074] ［化合物Ｅ２の合成］

アルゴン雰囲気下、4-ブロモ 2-ニトロフェノール（化合物E1, 15.0 g, 68.8 mmol, 1 eq.）、ブロモ酢酸メチル（6.7 ml, 72.2 mmol, 1.05 eq.）および炭酸カリウム（11.4 g, 82.6 mmol, 1.2 eq.）をDMF（70 ml）に溶かし、70°Cにて終夜撹拌した。室温に戻し、溶媒を減圧留去したのちに酢酸エチルを加え、水およ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 90/10）、目的化合物E2 (19.6 g, 98%)を薄黄色固体として得た。

^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.01 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 2.5 Hz, 8.9 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 168.0(C), 150.5 (C), 140.8 (C), 136.9 (CH), 128.6 (CH), 117.0 (CH), 113.6 (C), 66.6 (CH_2), 52.7 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_8BrNNaO_5$: 311.94781; found: 311.94834 (-0.5 mDa, -1.7 ppm).

[0075] [化合物E3の合成]

化合物E2 (13.1 g, 68.8 mmol, 1 eq.) を酢酸 (50 ml) に溶かして氷浴し、そこに鉄粉 (15.0 g, 271 mmol, 6 eq.) を5回に分けて20分かけて加えた。さらに20分室温にて撹拌し、次いで酢酸 (50 ml) を新たに加え、加熱還流にて3時間撹拌した。反応終了後、反応系を室温に戻して鉄粉を減圧濾過にて除去し、濾液を減圧留去した。得られた残渣に少量のメタノールを加え、得られた固体を減圧濾過し、濾物を水およびメタノールにて洗浄し、目的化合物E3 (9.02 g, 88%)を薄茶色針状結晶として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 10.8 (s, 1H), 7.07 (dd, J = 2.4 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.02 (d, J= 2.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H).; ^{13}C NMR (DMSO-d_6): δ 164.7 (C), 142.6 (C), 129.1 (C), 125.3 (CH), 118.1 (CH), 118.0 (CH), 113.3 (C), 66.6 (CH_2).

[0076] [化合物E4の合成]

アルゴン雰囲気下、化合物E3 (1.0 g, 4.4 mmol, 1 eq.) をTHF (20 ml) に溶かして氷浴し、そこに1M ボラン-THF錯体　THF溶液 (7.0 ml, 7.0 mmol, 1.6 eq.) を加え、加熱還流にて終夜撹拌した。反応系を室温に戻し、メタノールを少しずつ加え、溶媒を減圧留去したのち酢酸エチルで希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液およ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：ジクロロメタン/メタノール = 98/2) 、目的化合物E4 (817 mg, 87%)を無色液体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.71 (dd, J = 2.3 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.20 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.80 (br s, 1H), 3.38 (t, J = 4.4 Hz, 2H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 143.1 (C), 135.2 (C), 121.2 (CH), 118.1 (CH), 117.7 (CH), 113.2 (C), 65.1 (CH_2), 40.6 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for C_8H_9BrNO: 213.98620; found: 213.98626 (-0.1 mDa, -0.3 ppm).

[0077] [化合物E5の合成]

アルゴン雰囲気下、化合物E４（1.90 g, 8.88 mmol, 1 eq.）をアセトニトリル（20 ml）に溶かし、そこに炭酸カリウム（1.98 g, 14.3 mmol, 1.6 eq.）およびヨウ化メチル（3.0 ml, 47.5 mmol, 5 eq.）を加え、50°Cにて終夜撹拌した。反応系を室温に戻し、溶媒を減圧留去したのちに酢酸エチルで希釈し、不溶物を減圧濾過にて留去し、濾液を減圧除去した。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 = 98/2 to 90/10）、目的化合物E5 （1.77 g, 87%)を薄黄色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.73-6.70 (m, 2H), 6.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.25 (t, J = 4.4Hz, 2H), 3.26 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 2.86 (s, 3H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 143.3 (C), 137.9 (C), 120.5 (CH), 117.2 (CH), 114.9 (CH), 113.8 (C), 64.8 (CH_2), 48.8 (CH_2), 38.7 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_9H_{11}BrNO$: 228.00185; found: 228.00168 (0.2 mDa, 0.8 ppm).

[0078] ［化合物E6の合成］

化合物E5（360 mg, 1.58 mmol, 2 eq.）を酢酸（1 ml）に溶かし、そこに37%ホルムアルデヒド水溶液（320 μl, 3.96 mmol, 5 eq.）を加え、90°Cにて40分加熱撹拌した。反応系を室温に戻し、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に少しずつ加えて中和し、次いで酢酸エチルを加えて2回抽出した。得られた有機層を水およ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 = 85/15 to 70/30）、目的化合物E6（280 mg, 76%)を白色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.81 (s, 2H), 6.43 (s, 2H), 4.23 (t, J = 4.4 Hz, 4H), 3.88 (s, 2H), 3.21 (t, J = 4.4 Hz, 4H), 2.84 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 143.7 (C), 136.2 (C), 128.7 (C), 117.7 (CH), 115.9 (CH), 115.7 (C), 65.0 (CH_2), 48.9 (CH_2), 40.3 (CH_2), 38.8 (CH_3).

[0079] ［化合物E7の合成］

アルゴン雰囲気下、化合物E6（253 mg, 540 mmol, 1 eq.）をTHF（20 ml）

に溶かし、-78°Cにて10分間撹拌した。そこに1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（1.2 ml, 1.32 mmol, 2.4 eq.）をゆっくり加え、30分間撹拌した。次いでジクロロジメチルシラン（80 μl, 0.651 mmol, 1.2 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を減圧留去した。得られた水層を酢酸エチルで抽出し、次いで有機相を水およ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E7（123 mg, 62%)を薄黄色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.85 (s, 2H), 6.72 (s, 2H), 4.29 (t, J = 4.4 Hz, 4H), 3.86 (s, 2H), 3.21 (t, J = 4.4 Hz, 4H), 2.89 (s, 6H), 0.41 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 145.3 (C), 137.3 (C), 134.7 (C), 127.3 (C), 117.3 (CH), 115.8 (CH), 65.2 (CH_2), 49.7 (CH_2), 39.39 (CH_2), 39.2 (CH_3), -2.0 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{27}N_2O_2Si$: 367.18363; found: 367.18354 (0.1 mDa, 0.3 ppm).

[0080] ［化合物E8の合成］

化合物E7（75.0 mg, 0.205 mmol, 1 eq.）をアセトン（2 ml）に溶かし、-15°Cにて10分間撹拌した。そこに過マンガン酸カリウム（70.0 mg, 0.443 mmol, 2.0 eq.）を2回に分けて10分おきに加え、反応の終了をTLCにて確認した。反応系をセライト濾過し、ジクロロメタンにて洗浄し、濾液を減圧留去した。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：ジクロロメタン/酢酸エチル = 95/5）、目的化合物E8（49.5mg, 64%)を黄色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.88 (s, 2H), 6.72 (s, 2H), 4.27 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.39 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.03 (s, 6H), 0.42 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 184.8 (C), 145.2 (C), 139.5 (C), 133.0 (C), 131.9 (C), 117.0 (CH), 114.4 (CH), 64.3 (CH_2), 49.0 (CH_2), 38.4 (CH_3), -0.7 (CH_3).; HRMS-

ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{25}N_2O_3Si$: 380.16290; found: 381.16209 (0.8 mDa, 2.1 ppm).

[0081] [化合物６の合成]

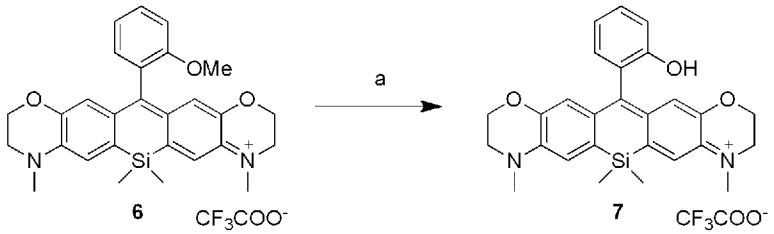
2-ブロモアニソール（化合物E9, 40 μl, 0.318 mmol, 11 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 °Cで10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（250 μl, 0.250 mmol, 8.6 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物E8（11.0 mg, 0.029 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、徐々に室温に戻しながら2時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで3回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物６(13.4 mg, 79%)を青緑色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3CN): δ 7.55 (ddd, J = 8.4 Hz, 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.22 (s, 2H), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.13 (dt, J = 7.4 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 4.13 (m, 4H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (t, J = 4.6 Hz, 4H),3.30 (s, 6H), 0.55 (s, 3H), 0.53 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3CN): δ 167.9 (C), 157.3(C), 145.5 (C), 144.64 (C), 144.56 (C), 131.6 (CH), 130.9 (CH), 130.4 (C), 128.9 (C), 123.6 (CH), 121.3 (CH), 121.0 (CH), 112.4 (CH), 64.0 (CH_2), 56.4 (CH_3), 50.4 (CH_2), 39.6 (CH_3), -1.0 (CH_3), -1.2 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{28}H_{31}N_2O_3Si$: 471.20985; found: 471.20890 (0.9 mDa, 2.0 ppm).

[0082] 化合物７（２OH OxaSiR diMe）の合成

以下のスキーム７に従って、本発明の蛍光プローブである化合物７（２OH OxaSiR diMe）を合成した。

[化21]



a)BBr_3, CH_2Cl_2, -78°C to rt.

スキーム７

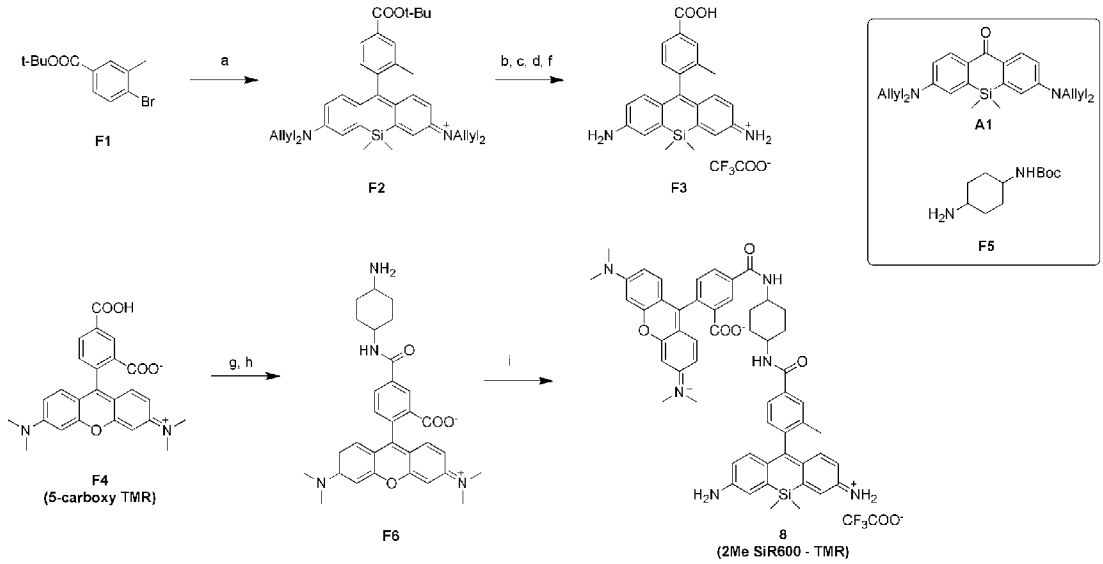
[0083] 化合物６（4.0 mg, 6.85 μmol, 1 eq.）をジクロロメタン（2 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 °Cで撹拌した。三臭化ホウ素（2滴）をゆっくり加え、-78 °Cで撹拌し、徐々に室温に戻して終夜撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで2回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、化合物７（3.2 mg, 82%)を青緑色固体として得た。

^1H NMR (CD_3CN): δ 7.40 (m, 1H), 7.21 (s, 2H), 7.07-7.02 (m, 3H), 6.51 (s, 2H), 4.14 (m, 4H), 3.64 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.30 (s, 6H), 0.55 (s, 3H), 0.52 (s, 3H); ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.9 (C), 155.5 (C), 145.8 (C), 145.5 (C), 145.1 (C), 131.5 (CH), 131.32 (CH), 131.20 (C), 127.8 (C), 124.9 (CH), 120.7 (CH), 120.3 (CH), 116.7 (CH), 64.3 (CH_2), 50.7 (CH_2), 39.0 (CH_3), -1.0 (CH_3), -1.4 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{27}H_{29}N_2O_3Si$: 457.19420; found: 457.19403 (0.2 mDa, 0.4 ppm).

[0084] 化合物８（2Me SiR600 - TMR）の合成

以下のスキーム８に従って、本発明の蛍光プローブである化合物８（2Me SiR600 - TMR）を合成した。なお、化合物F1、F5の合成については、それぞれAlfons Smeets et al. Macromolecules, 2011, 44, 6017-6025、Karine Caron et al. Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 185-197に開示されており、これらに基づいて合成を行なった。

[化22]



a) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **A1**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.; b) $NaBH_4$, MeOH, 0°C, c) 1.3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, 35°C; d) chloranil, CH_2Cl_2, rt.; e) TFA, CH_2Cl_2, rt.; f) compound **F5**, TSTU, DIEA, DMF, rt.; g) TFA, CH_2Cl_2, rt.; i) compound **F3**, TSTU, DIEA, DMSO, rt.

スキーム８

[0085] [化合物F3の合成]

4-ブロモ-3-メチル tert-ブチル安息香酸(化合物F1 54.2 mg, 0.2 mmol, 10 eq) をTHF(5ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 ℃で10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液 (0.2 ml,0.2 mmol, 10 eq.) をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物A1 (8.6 mg, 0.02 mmol, 1 eq.) をTHF (3 ml) に溶かして加え、-78 ℃で1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 25 min) 、化合物F2(5.1 mg,42.2 %)を青色固体として得た。ついで化合物F2 (29.3 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) をメタノール (10 ml) に溶かし氷浴し、次いで水素化ホウ素ナトリウムを徐々に加え、濃青色の溶液が無色になったところで水を加えて反応を終了させた。そこにジクロロメタンを加えて抽出し、有機相を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。得られた

残渣をアルゴン雰囲気下にて脱酸素ジクロロメタン（7 ml）に溶かし、これを1,3-ジメチルバルビツール酸（187.4 mg, 1.20 mmol, 24 eq.）およびテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（40.1 mg, 0.034 mmol, 0.7 eq.）を含むに試験管に加え、アルゴン雰囲気下、35℃にて60 分間撹拌した。さらにクロラニル（14.3 mg, 0.058 mmol, 1.2 eq.）を加えて室温にて60分間撹拌し、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た。残渣をジクロロメタン(5 ml)に溶かし、トリフルオロ酢酸(5 ml)を加え室温で2 時間撹拌した。溶媒を減圧留去したのち、HPLCにて精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物F3（8.5 mg, 45 %)を青緑色固体として得た。

^{1}H NMR (MeOD): δ 8.06-8.02 (m, 2H), 7.26 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.58 (dd, J = 2.4 Hz, 9.3 Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 0.54 (s, 3H). ; ^{13}C NMR (MeOD) δ 170.2, 169.2, 158.6, 150.4, 144.8, 143.5, 137.6, 132.6, 132.5, 130.5, 128.1, 127.9, 124.6, 117.1, 19.4, -1.5, -1.7 ppm. HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{23}N_2O_2Si$: 387.15233; found: 387.15225 (0.1 mDa, 0.2 ppm).

[0086] ［化合物F6の合成］

5-carboxyl TMR（化合物F4, 5.0 mg, 0.012 mmol,1 eq)をDMF(2 ml)に溶かしN,N-ジイソプロピルエチルアミン(4.5 mg,0.036 mmol,3 eq)およびN,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラート（TSTU）(5.25 mg,0.018 mmol,1.5 eq)を加え、撹拌した後、トランス-N-Boc-1,4-シクロヘキサンジアミン(化合物Ｆ５, 3.8 mg, 0.018 mmol,1.5 eq)を加え、アルゴン雰囲気下に室温で1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、真空乾燥したのち残渣をジクロロメタン(5 ml)に溶かし、トリフルオロ酢酸(5 ml)を加え室温にて2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（A/B = 90/10 to 10/90, 40 min）、化合物F6（4.5 mg,71.0 %)を

暗赤色固体として得た。

^{1}H NMR (MeOD): δ 8.76 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 1.8 Hz, 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.06 (dd, J = 2.4 Hz, 9.5 Hz,2H), 7.00 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.99-3.98 (m, 1H), 3.31 (s, 12H), 3.18-3.13 (m,1H), 2.18-2.16 (m, 4H), 1.65-1.55 (m, 4H). HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{31}H_{35}N_4O_4$: 527.26528; found: 527.26265 (2.6 mDa, 5.0 ppm).

[0087] [化合物8 (2Me SiR600 - TMR) の合成]

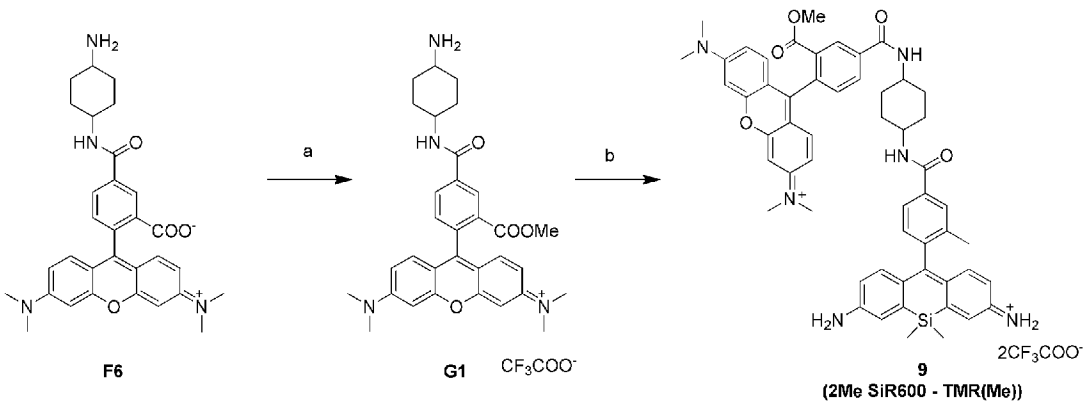
化合物F6 (0.45 mg,0.0011 mmol, 1.5 eq)をDMSO(0.3 ml)に溶かしN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.12 mg,0.0009 mmol,1.2 eq)およびN,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラート (TSTU) (0.3 mg,0.0009 mmol,1.2 eq)を加え、撹拌した後、化合物Ｆ３(0.4 mg,0.00076 mmol, 1eq)を加え、アルゴン雰囲気下に室温で24時間撹拌した。反応溶液をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 、化合物８(0.24 mg,35.2 %)を紫色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{54}H_{55}N_6O_5Si$: 895.39977; found: 895.39688 (2.9 mDa, 3.2 ppm).

[0088] 化合物９ (2Me SiR600 - TMR (Me)) の合成

以下のスキーム９に従って、本発明の蛍光プローブである化合物９ (2Me SiR600 - TMR(Me)) を合成した。

[化23]



a) H_2SO_4, MeOH, reflux; b) compound **F3**, TSTU, DIEA, DMSO, rt.

スキーム９

[0089] [化合物G1の合成]

化合物F6 (3.0 mg,0.006 mmol,1 eq)をメタノール(5 ml)に溶かし、濃硫酸を1滴加え、加熱還流にて終夜撹拌した。反応系を室温に戻し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 、化合物G1 (2.8 mg,86.2 %)を暗赤色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{37}N_4O_4$: 541.28093; found: 541.28234 (-1.4 mDa, -2.6 ppm).

[0090] [化合物9の合成]

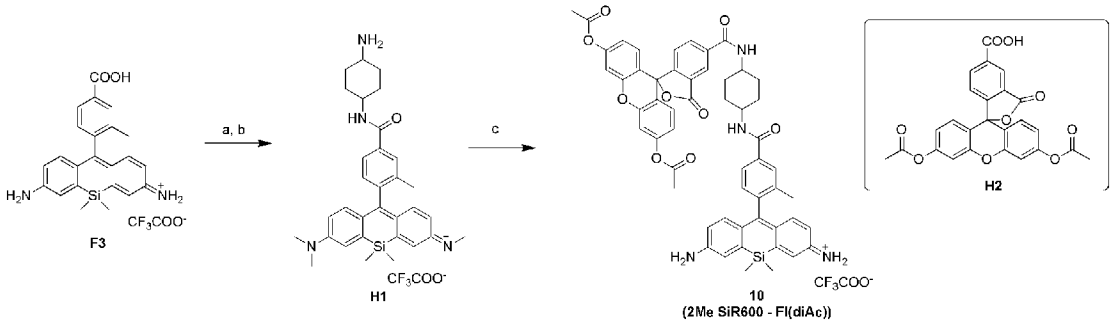
化合物G1 (0.23 mg, 0.0006 mmol,1.1 eq)をDMSO(0.3 ml)に溶かしN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.107 mg,0.00082 mmol,1.5 eq)およびN,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラート (TSTU) (0.25 mg,0.00082 mmol,1.5eq)を加え、撹拌した後、DMSO(0.2ml)に溶かした化合物6(0.3 mg,0.00055 mmol, 1eq)を加え、アルゴン雰囲気下に室温で24時間撹拌した。反応溶液をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 、化合物9 (0.3 mg,55.3 %)を紫色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M+2H]^{2+}$ calcd for $C_{55}H_{58}N_6O_5Si$: 455.21135; found: 455.21238 (-1.0 mDa, -2.3 ppm).

[0091] 化合物１０ (2Me SiR600 - Fl(diAc)) の合成

以下のスキーム１０に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１０（2 Me SiR600 -ＦＩ(diAc)）を合成した。

[化24]



a) compound **F5**, TSTU, DIEA, DMF, rt.; b) TFA, CH_2Cl_2, rt.; i) compound **H2**, TSTU, DIEA, DMSO, rt.

スキーム１０

[0092] ［化合物H1の合成］

化合物F3 (3.1 mg, 0.008 mmol,1 eq)をDMF(2 ml)に溶かしN,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.55 mg,0.024 mmol,3 eq)およびN,N,N’,N’-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラート (TSTU) (3.6 mg,0.012 mmol,1.5 eq)を加え、

撹拌した後、トランス-N-Boc-1,4-シクロヘキサンジアミン(2.6 mg,0.012 mmol,1.5 eq)を加え、アルゴン雰囲気下に室温で1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、真空乾燥したのち残渣をジクロロメタン(2 ml)に溶かし、トリフルオロ酢酸(2 ml)を加え室温にて2時間撹拌した。飽和重曹水を加えて溶液を中和した後これを減圧除去し真空乾燥した。得られた残渣をメタノールで溶解し、塩をろ過したのちろ液を減圧除去し、これをHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 、化合物H1(2.9 mg,74 %)を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (MeOD): δ 8.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.85-7.80 (m, 2H), 7.24 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.57 (dd, J = 2.4 Hz, 9.3Hz, 2H), 2.16-2.14 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 1.60-1.55 (m, 4H), 0.55 (s, 3H), 0.54 (s, 3H).

HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{29}H_{35}N_4OSi$: 483.25746; found: 483.25559 (1.9 mDa, 3.9 ppm).

[0093] [化合物１０（2Me SiR600 - Fl(diAc)）の合成]

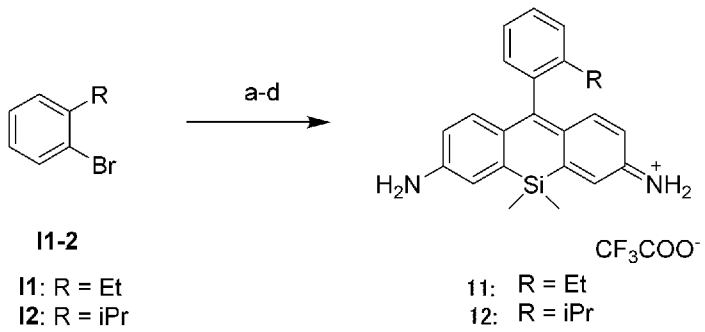
化合物H1（0.45 mg,0.0009 mmol,1 eq)をDMSO(0.3 ml)に溶かしN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.22 mg,0.0016 mmol,1.8 eq)およびN,N,N’,N’-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウロニウムテトラフルオロボラート（TSTU）(0.56 mg,0.0018 mmol,2 eq)を加え、撹拌した後、5-カルボキシ-フルオレセインジアセタート（化合物H2、0.64 mg,0.0014 mmol,1.5 eq)を加え、アルゴン雰囲気下に室温で24時間撹拌した。反応溶液をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 40 min）、化合物10（0.1 mg, 12 %)を紫色固体として得た。

MS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{54}H_{49}N_4O_9Si$: 925.32633; found: 925.32230 (4.0 mDa, 4.4 ppm).

[0094] [化合物１１の合成]

以下のスキーム１１に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１１を合成した。

[化25]



I1-2

I1: R = Et
I2: R = iPr

11: R = Et
12: R = iPr

a) i) sec-BuLi, -78°C, THF, ii) compound A2 in THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq., b) $NaBH_4$, MeOH, c) 1,3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, d) *p*-chloranil, CH_2Cl_2.

スキーム１１

[0095] 1-ブロモ-2-エチルベンゼン（化合物I1, 100 μl, 0.728 mmol, 15.5 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 ℃で10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（250 μl, 0.275 mmol, 5.9 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物A2（20 mg, 0.047

mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 ℃で1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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, 25 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（8.0 mg, 6 μmol, 0.1 eq.）を加え、40℃にて90分撹拌した。室温まで冷却した後、クロラニル（15.1 mg, 0.062 mmol, 1.3 eq.）を加えて室温にて10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 50/50）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た。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１１（14.4 mg, 66%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.53 － 7.34 (m, 2H), 7.51 (dt, J = 1.4 Hz, 7.3 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.08 (dd, J = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.56 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 2H), 2.37 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.04 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 0.55 (s, 3H), 0.53 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 172.0 (C), 158.5 (C), 150.4 (C), 144.2 (CH), 142.9 (C), 139.4 (C), 130.27 (CH), 130.16 (CH), 129.7 (CH), 128.9 (C), 126.6 (CH), 124.4 (CH), 116.7 (CH), 27.1 (CH_2), 15.2 (CH_3), －1.4 (CH_3), －1.9 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{23}H_{25}N_2Si$: 357.17815; found: 357.17900 (－0.8 mDa, －2.4 ppm).

[0096] ［化合物１２の合成］

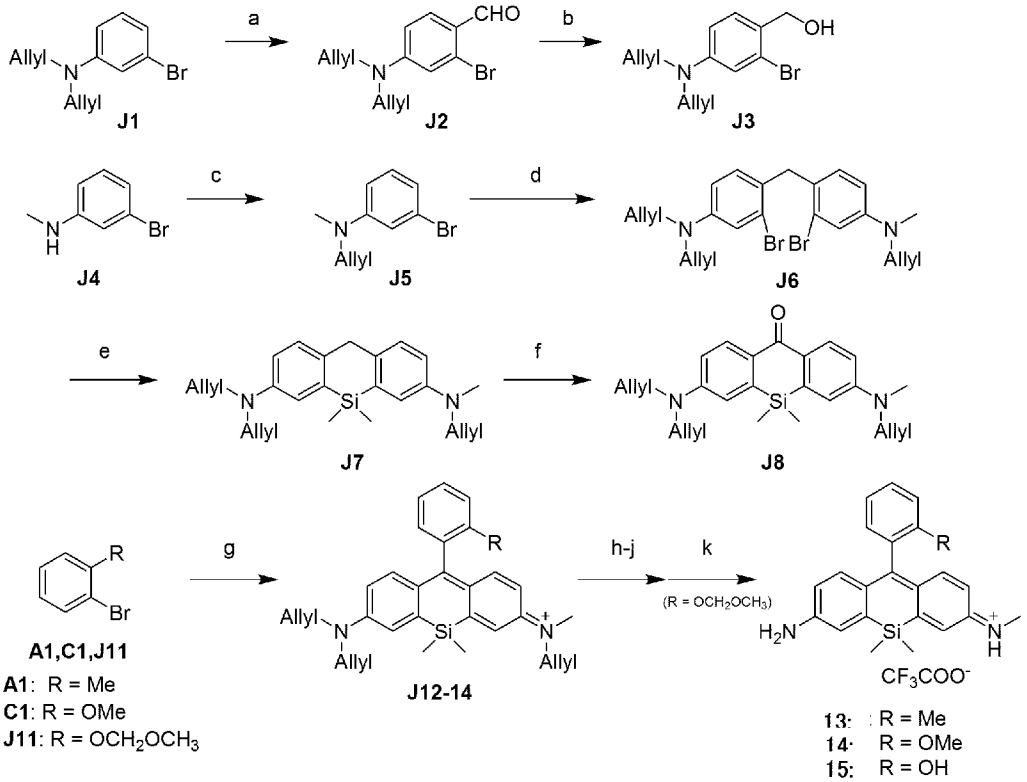
同様に上記スキーム１１に従って合成を行い、目的化合物１２（16.7 mg, 74%）を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.56 － 7.54 (m, 2H), 7.36 － 7.32 (m, 1H), 7.19 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.08 － 7.07 (m, 1H), 7.06 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.57 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 2H), 2.62 (sept, J = 6.8 Hz, 1H), 1.08 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.548 (s, 3H), 0.540 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 172.2 (C), 158.5 (C), 150.3 (C), 147.7 (C), 144.2 (CH), 138.6 (C), 130.5 (CH), 129.9 (CH), 129.1 (C), 127.1 (CH), 126.6 (CH), 124.4 (CH), 116.5 (CH), 32.3 (CH_3), 24.2 (CH_3), －1.5 (CH_3), －1.7 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{24}H_{27}N_2Si$: 371.19380; found: 371.19394 (－0.1 mDa, －0.4 ppm).

[0097] ［化合物１３～１５の合成］

以下のスキーム１２に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１３～１５を合成した。

[化26]



a) i) DMF, $POCl_3$, $(CH_2Cl)_2$, reflux, ii) 1N NaOHaq., b) $NaBH_4$, CH_2Cl_2/MeOH, rt, c) AllylBr, K_2CO_3, THF, reflux, d) compound J3, $BF_3{\cdot}OEt_2$ complex, CH_2Cl_2, reflux, e) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) $SiCl_2Me_2$, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq. f) $KMnO_4$, acetone, -15°C, g) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound J8, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq., h) $NaBH_4$, MeOH, i) 1,3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, j) p-chloranil, CH_2Cl_2, k) TFA, rt.

スキーム１２

[0098] ［化合物J3の合成］

N,N-ジメチルホルムアミド（4.5 ml, 58.4 mmol, 4.4 eq.）を1,2-ジクロロエタン（10 ml）に溶かし、氷浴下にて撹拌した。次いで塩化ホスホリル（2.5 ml, 26.7 mmol, 2 eq.）を加え、さらに15分間撹拌した。化合物J1（3.35 g, 13.3 mmol, 1 eq.）を1,2-ジクロロエタン（10 ml）に溶かし、反応溶液に加え、3時間加熱還流した。室温まで冷却後、氷浴下にて1N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチル/ジエチルエーテル混合溶媒にて2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、溶媒を減圧除去した。得られた化合物をジクロロメタン/メタノール混合溶媒（10 ml/10 ml）に溶かし、氷浴下にて撹拌した。水素化ホウ素ナトリウム（785 mg, 20.0 mmol, 1.5 eq.）を加え、室温にて30分撹拌した。水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルにて抽出し、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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン/酢酸エチル = 90/10 to 70/30）にて分離精製し、化合物J3（3.13 g, 84%)を無色透明の液体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.5 Hz, 2.6 Hz, 1H), 5.82 (ddt, J = 15.2 Hz, 10.4 Hz, 4.8 Hz, 2H), 5.19 － 5.13 (m, 4H), 4.62 (s, 2H), 3.90 － 3.89 (m, 4H), 1.86 (s, 1H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 149.5 (C), 133.2 (CH), 130.6 (CH), 127.1 (C), 124.6 (C), 116.5 (CH_2), 116.0 (CH), 111.5 (CH), 65.2 (CH_2), 52.9 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{13}H_{16}NBrNNaO$: 304.03075; found: 304.03036 (0.4 mDa, 1.3 ppm).

[0099] ［化合物J5の合成］

化合物J4（5.00 g, 26.9 mmol, 1 eq.）をテトラヒドロフラン（50 ml）に溶かし、次いで炭酸ナトリウム（7.85 g, 56.9 mmol, 2.1 eq.）および臭化アリル（3.5 ml, 40.3 mmol, 1.5 eq.）を加えて終夜加熱還流し、さらに臭化

アリル（3.5 ml, 40.3 mmol, 1.5 eq.）を加えて2日間加熱還流した。空冷後、反応液を濾別して濾液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 90/10）にて分離精製し、化合物J5（5.53 g, 72%)を無色透明の液体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.05 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.83 － 6.79 (m, 2H), 6.61 (dd, J = 8.4 Hz, 2.2 Hz, 1H), 5.81 (ddt, J = 17.0 Hz, 10.4 Hz, 4.9 Hz, 1H), 5.16 (dq, J = 10.4 Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.14 (dq, J = 17.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.90 (dt, J = 4.9 Hz, 1.6 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 150.7 (C), 133.1 (CH), 130.4 (CH), 123.5 (C), 119.1 (CH), 116.5 (CH_2), 115.1 (CH), 111.0 (CH), 55.1 (CH_2), 38.2 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{10}H_{13}NBrN$: 226.02259; found: 226.02478 (－2.2 mDa, －9.7 ppm).

[0100] ［化合物J6の合成］

化合物J3（1.00 g, 3.54 mmol, 1 eq.）および化合物J5（0.800 g, 3.54 mmol, 1 eq.）をジクロロメタン（20 ml）に溶かし、氷浴下にて撹拌した。三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（650 μl, 5.46 mmol, 1.5 eq.）を加え、反応液を終夜加熱還流した。空冷後、飽和炭酸ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンにて抽出し、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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン/酢酸エチル = 85/15 to 70/30）にて分離精製し、化合物J6（1.58 g, 91%)を無色透明の液体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.92 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 8.6 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 8.6 Hz, 2.7 Hz, 1H), 5.87 － 5.76 (m, 3H), 5.19 － 5.12 (m, 6H), 3.70 (s, 2H), 3.88 － 3.87 (m, 6H), 2.90 (s, 3H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 149.1 (C), 148.3 (C), 133.7 (CH), 133.5 (CH), 130.99 (CH), 130.89 (CH), 127.10 (C), 127.07 (C), 125.78 (C), 125.68 (C), 116.52 (CH_2), 116.41 (CH_2), 116.20 (CH), 116.13 (CH), 111.8

7 (CH), 111.79 (CH), 55.3 (CH_2), 52.9 (CH_2), 39.9 (CH_2), 38.2 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{27}Br_2N_2$: 489.05355; found: 489.05309 (0.5 mDa, 0.9 ppm).

[0101] [化合物J8の合成]

アルゴン雰囲気下、化合物J6（765 mg, 1.56 mmol, 1 eq.）をTHF（20 ml）に溶かし、-78°Cにて10分間撹拌した。そこに1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（3.5 ml, 3.5 mmol, 2.2 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。次いでジクロロジメチルシラン（250 μl, 2.05 mmol, 1.3 eq.）をTHF（5 ml）に希釈して加えて徐々に室温に戻し、2.5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を減圧留去した。得られた水層を酢酸エチルで抽出し、次いで有機相を水およ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（溶離液：ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 90/10）で精製した。得られた化合物をアセトン（15 ml）に溶かし、-15°Cにて10分間撹拌した。そこに過マンガン酸カリウム（400 mg, 2.53 mmol, 1.6 eq.）を４回に分けて10分おきに加え、反応の終了をTLCにて確認した。反応系をセライト濾過し、ジクロロメタンにて洗浄し、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ヘキサン/ジクロロメタン = 40/60 to 0/100）、目的化合物J8（78.1 mg, 12%)を黄色固体として得た。

^1H NMR ($CDCl_3$): δ 8.39 － 8.35 (m, 2H), 6.85 － 6.80 (m, 4H), 5.93 － 5.82 (m, 3H), 5.23 － 5.16 (m, 6H), 4.04 － 4.02 (m, 6H), 3.08 (s, 3H), 0.44 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 185.1 (C), 150.7 (C), 150.2 (C), 140.52 (C), 140.47 (C), 133.1 (CH), 132.8 (CH), 131.70 (CH), 131.67 (CH), 130.0 (C), 129,8 (C), 116.6 (CH_2), 114.8 (CH), 114.5 (CH), 113.5 (CH), 113.3 (CH), 54.7 (CH_2), 52.7 (CH_2), 38.1 (CH_3), －1.1 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{25}H_{31}N_2OSi$: 403.22002; found: 403.21907 (0.9 mDa, 2.3 ppm).

[0102] ［化合物１３の合成］

2-ブロモトルエン（化合物A1, 50 μl, 0.417 mmol, 12 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 ℃で10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（200 μl, 0.200 mmol, 5.7 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物J8（14 mg, 0.035 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 ℃で1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、溶媒を減圧除去した。得られた化合物をメタノール（3 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、酢酸エチルで抽出し、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（3 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（108 mg, 0.697 mmol, 20 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（4.5 mg, 4 μmol, 0.1 eq.）を加え、40℃にて4時間撹拌した。クロラニル（11.0 mg, 0.045 mmol, 1.2 eq.）を加えて室温にて10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 60/40）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た。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１３（5.9 mg, 36%)を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.48 － 7.35 (m, 3H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.12 － 6.80 (m, 2H), 7.00 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 9.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 0.54 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 171.6 (C), 158.3 (C), 157.5 (C), 150.1 (C), 143.5 (CH), 140.1 (C), 136.9 (C), 131.3 (CH), 130.10 (CH), 130.04 (CH), 128.63 (C), 128.57 (C), 126.8 (CH), 124.2 (CH), 116.8 (CH), 30.0 (CH_3), 19.4 (CH_3),

－1.4 (CH_3), －1.6 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{23}H_{25}N_2Si$: 357.17815; found: 357.17925 (－1.1 mDa, －3.1 ppm).

[0103] ［化合物１４の合成］

2-ブロモアニソール（化合物C1, 50 μl, 0.408 mmol, 16 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10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（200 μl, 0.220 mmol, 9 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物J8（10 mg, 0.025 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 °Cで1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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（2 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（78.0 mg, 0.500 mmol, 20 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（2.0 mg, 2 μmol, 0.1 eq.）を加え、室温にて終夜撹拌した。クロラニル（10.1 mg, 0.042 mmol, 1.7 eq.）を加えて室温にて10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 60/40）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た。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１４（4.5 mg, 37%）を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.56 (ddd, J = 8.5 Hz, 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.17 － 7.07 (m, 6H), 6.59 (dd, J = 9.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 0.55 (s, 3H), 0.52 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 170.1 (C), 158.16 (C), 158.06 (C), 157.4 (C), 149.9 (C), 143.8 (CH), 131.7 (CH), 131.4 (CH

), 129.22 (C), 129.17 (C), 129.13 (C), 123.9 (CH), 121.4 (CH), 116.5 (CH), 112.3 (CH), 56.2 (CH_3), 30.0 (CH_3), −1.3 (CH_3), −1.7 (CH_3).; HR MS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{23}H_{25}N_2OSi$: 373.17307; found: 373.17276 (0.3 mDa, 0.8 ppm).

[0104] ［化合物１５の合成］

1-ブロモ-2-(メトキシメトキシ)ベンゼン（化合物J11, 86 mg, 0.398 mmol, 16 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、−78 ºCで10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（200 μl, 0.220 mmol, 9 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物J8（10 mg, 0.025 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、−78 ºCで1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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（2 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（72.8 mg, 0.468 mmol, 19 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（3.5 mg, 2 μmol, 0.1 eq.）を加え、室温にて終夜撹拌した。クロラニル（11.3 mg, 0.046 mmol, 1.8 eq.）を加えて室温にて10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 60/40）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た。得られた化合物をトリフルオロ酢酸（2 ml）および水（200 μl）に溶かし、室温にて1時間撹拌した。溶媒を濃縮後、得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１５（0.5 mg, 4%)を青紫色固体として得た。

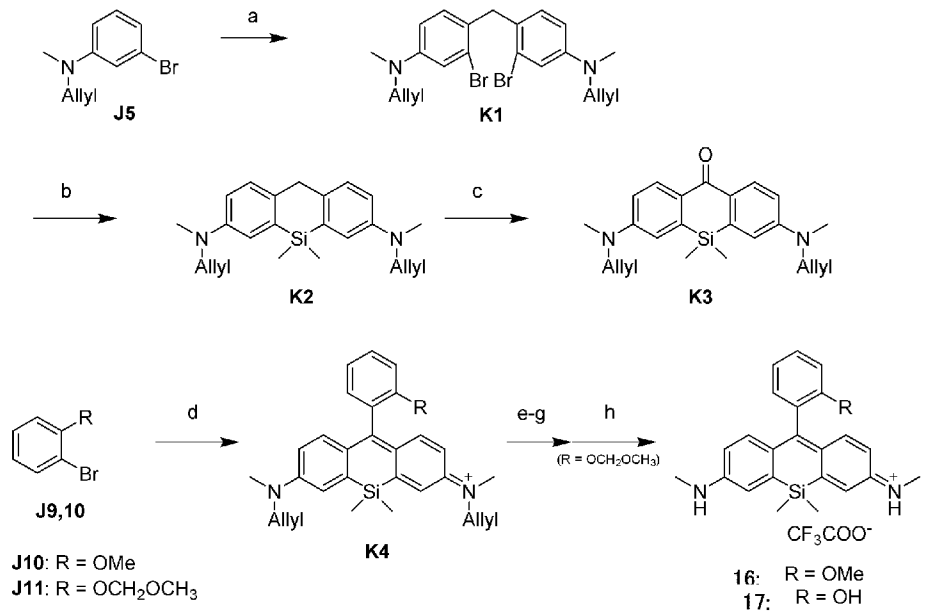
^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.42 − 7.37 (m, 1H), 7.27 (br s, 1H), 7.18 (d, J =

9.3 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.0 4 － 7.02 (m, 2H), 6.98 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 9.6 Hz, 2. 0 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 0.52 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 170.1 (C), 158.2 (C), 157.4 (C), 155.6 (C), 144.0 (C), 131.51 (CH), 131.44 (CH), 129.3 5 (C), 129.30 (C), 127.5 (C), 123.9 (CH), 120.3 (CH), 116.6 (CH), 116 .5 (CH), 30.0 (CH_3), －1.2 (CH_3), －1.7 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ ca lcd for $C_{22}H_{23}N_2OSi$: 359.15742; found: 359.15767 (－0.3 mDa, －0.7 ppm).

[0105] ［化合物１６及び１７の合成］

以下のスキーム１３に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１６及び１７を合成した。

[化27]



a) HCHOaq. AcOH, b) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) $SiCl_2Me_2$, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq. c) $KMnO_4$, acetone, -15°C, d) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound K3, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq., e) $NaBH_4$, MeOH, f) 1,3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, g) p-chloranil, CH_2Cl_2, h) TFA, rt.

スキーム１３

[0106] ［化合物K1の合成］

化合物J5（3.00 g, 13.3 mmol, 1 eq.）を酢酸（12 ml）に溶かし、そこに37%ホルムアルデヒド水溶液（1.81 g, 66.3 mmol, 5 eq.）を加え、80°Cにて1

時間加熱撹拌した。反応系を室温に戻し、溶媒を減圧留去し、そこに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に少しずつ加えて中和し、次いでジクロロメタンを加えて3回抽出した。得られた有機層を水およ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 80/20）、目的化合物K1（1.85 g, 60%)を淡黄色液体として得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 2.92 (s, 6H), 3.89 (d, 4H, J = 5.0 Hz), 4.01 (s, 2H,), 5.15-5.19 (m, 4H), 5.83 (ddt, 2H, J = 5.0, 9.8, 17.6 Hz), 6.59 (dd, 2H, J = 2.7, 8.6 Hz), 6.86 (d, 2H, J = 8.6 Hz), 6.95 (d, 2H, J = 2.7 Hz)。; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl3): δ 38.1, 39.9, 55.2, 111.8, 116.1, 116.5, 125.7, 127.0, 130.9, 133.4, 149.0; HRMS-ESI: Calcd for $[M+H]^+$, 463.03790, Found, 463.03830 (+0.4 mDa).

[0107] ［化合物K3の合成］

アルゴン雰囲気下、化合物K1（1.01 g, 2.18 mmol, 1 eq.）をTHF（60 ml）に溶かし、-78°Cにて10分間撹拌した。そこに1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（6.53 ml, 6.53 mmol, 3 eq.）をゆっくり加え、20分間撹拌した。次いでジクロロジメチルシラン（400 μl, 4.35 mmol, 2 eq.）をTHF（10 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を減圧留去した。得られた水層を酢酸エチルで抽出し、次いで有機相を水およ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（溶離液：ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 88/12）で精製した。得られた化合物をアセトン（20 ml）に溶かし、0°Cにて10分間撹拌した。そこに過マンガン酸カリウム（1.00 g, 6.10 mmol, 2.8 eq.）を４回に分けて10分おきに加え、反応の終了をTLCにて確認した。反応系をセライト濾過し、ジクロロメタンにて洗浄し、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ヘキサン/酢酸エチル = 80/20 to 60/40）、目的化合

物K3 (93.9 mg, 11%)を黄色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 0.44 (m, 6H), 3.08 (s, 6H), 4.03-4.04 (m, 4H), 5.16-5.21 (m, 4H), 5.86 (ddt, 2H, J = 4.9, 10.5, 16.9 Hz), 6.79 (d, 2H, J = 2.8 Hz), 6.83 (dd, 2H, J = 2.8, 9.0 Hz), 8.37 (d, 2H, J = 9.0 Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ -0.95, 38.1, 54.8, 113.4, 114.6, 116.7, 130.0, 131.8, 132.9, 140.6, 150.8, 185.3; HRMS-ESI: Calcd for $[M+H]^+$, 377.20437, Found, 377.20544 (+1.1 mDa).

[0108] [化合物１６の合成]

2-ブロモアニソール（化合物J9, 50 μl, 0.408 mmol, 16 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 ℃で10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（200 μl, 0.200 mmol, 5.7 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物K3（15 mg, 0.040 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 ℃で1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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（3 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（78.9 mg, 0.508 mmol, 13 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（6.4 mg, 5 μmol, 0.1 eq.）を加え、40℃にて1.5時間撹拌した。クロラニル（13.1 mg, 0.053 mmol, 1.3 eq.）を加えて室温にて10分撹拌し、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 60/40）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た。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１６（12.5 mg, 63%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.55 (dt, J = 1.5 Hz, 7.5 Hz, 1H), 7.22 － 7.07 (m, 5H), 7.16 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.58 (dd, J = 9.4 Hz, 2.4 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.05 (s, 6H), 0.56 (s, 3H), 0.53 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.7 (C), 158.1 (C), 157.2 (C), 143.7 (C), 131.7 (CH), 131.4 (CH), 129.26 (C), 129.16 (C), 121.4 (CH), 112.3 (CH), 56.2 (CH_3), 29.9 (CH_3), －1.2 (CH_3), －1.6 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{24}H_{27}N_2OSi$: 387.18872; found: 387.18804 (0.7 mDa, 1.7 ppm).

[0109] ［化合物１７の合成］

1-ブロモ-2-(メトキシメトキシ)ベンゼン（化合物J10, 100 mg, 0.462 mmol, 12 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 ºCで10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（250 μl, 0.275 mmol, 7 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物K3（15 mg, 0.040 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 ºCで1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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（3 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（80.4 mg, 0.517 mmol, 13 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（5.0 mg, 4 μmol, 0.1 eq.）を加え、室温にて1.5時間撹拌した。クロラニル（12.2 mg, 0.050 mmol, 1.2 eq.）を加えて室温にて10分撹拌し、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 60/40）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た。得られた化合物をトリフルオロ酢酸（2 ml）および水（200 μl）に溶かし、室温にて1時間撹拌した。溶媒を濃縮後、得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90

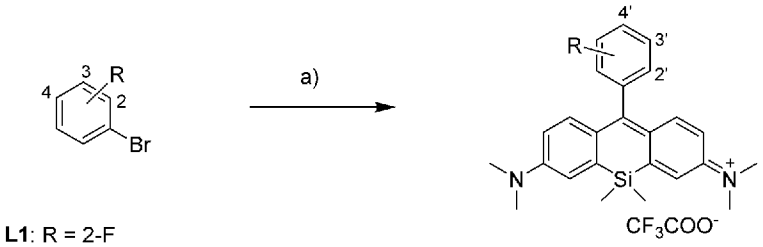
/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１７（12.7 mg, 66%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.40 － 7.37 (m, 1H), 7.25 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.02 － 6.98 (m, 3H), 6.59 (dd, J = 9.4 Hz, 2.4 Hz, 2H), 3.04 (s, 6H), 0.56 (s, 3H), 0.53 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 170.3 (C), 157.2 (C), 155.6 (C), 131.52 (CH), 131.39 (CH), 129.4 (C), 127.5 (C), 120.2 (CH), 116.6 (CH), 29.9 (CH_3), －1.1 (CH_3), －1.6 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{23}H_{25}N_2OSi$: 373.17307; found: 373.17252 (0.5 mDa, 1.5 ppm).

[0110] 化合物１８～２２の合成

以下のスキーム１４に従って、本発明の蛍光プローブである化合物１８～２２を合成した。

[化28]



L1: R = 2-F
L2: R = 2-C≡C-TMS
L3: R = 3-CF_3
L4: R = 4-CF_3

18: R = 2'-Me
19: R = 2'-C≡CH
20: R = 2'-C≡C-TMS
21: R = 3'-CF_3
22: R = 4'-CF_3

a) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound B1, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.

スキーム１４

[0111] [化合物１８の合成]

1-ブロモ-2-フルオロベンゼン（化合物L1, 100 μl, 0.925 mmol, 15 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10分間撹拌した。1.9 M フェニルリチウム ジブチルエーテル溶液（200 μl, 0.380 mmol, 6.1 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物B1 （20 mg, 0.062 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 °Cで10分間、室温で4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2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物１８（23.8 mg, 75%)を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.66 － 7.60 (m, 1H), 7.40 (dt, J = 7.5 Hz (t), $^4J_{H-F}$ = 1.0 Hz (d), 1H), 7.37 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.33 (ddd, J = 8.3 Hz, 0.8 Hz, $^4J_{H-F}$ = 8.6 Hz, 1H), 7.28 (ddd, J = 7.4 Hz, 1.7 Hz, $^3J_{H-F}$ = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.6 Hz, $^6J_{H-F}$ = 0.9 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 9.6 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 12H), 0.614 (s, 3H), 0.602 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 164.0 (C), 160.7 (d, $^1J_{C-F}$ = 245 Hz, C), 155.8 (C), 149.4 (C), 142.2 (CH), 132.53 (d, $^4J_{C-F}$ = 2.5 Hz, CH), 132.48 (d, $^3J_{C-F}$ = 2.9 Hz, CH), 128.8 (C), 127.8 (d, $^2J_{C-F}$ = 17.0 Hz, C), 125.5 (d, $^3J_{C-F}$ = 3.6 Hz, CH), 122.4 (CH), 116.8 (d, $^2J_{C-F}$ = 21.7 Hz, CH), 115.3 (CH), 40.9 (CH_3), －1.10 (CH_3), －1.22 (CH_3).; ^{19}F{^{1}H} NMR (CD_3OD): δ －114.1.; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{25}H_{28}FN_2Si$: 403.20003; found: 403.20007 (0.0 mDa, －0.1 ppm).

[0112] [化合物１９及び２０の合成]

化合物L2（100 μl, 0.470 mmol, 5 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10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（400 μl, 0.440 mmol, 4.8 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物B1 （30 mg, 0.092 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 °Cで1時間、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2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、化合物１９（4.3 mg, 9%）および化合物２０（48.1 mg, 87%）をそれぞれ青色固体として得た。

化合物１９：^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.70 － 7.68 (m, 1H), 7.61 － 7.55 (m, 2H), 7.35 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 7.30 － 7.28 (m, 1H), 7.05 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 9.6 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.35 (s, 12H), 0.63 (s, 3H), 0.57 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.3 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 143.5 (C), 142.5 (CH), 133.9 (CH), 130.6 (CH), 129.9 (CH), 129.6 (CH), 128.9 (C), 123.6 (C), 122.1 (CH), 115.1 (CH), 83.4 (CH), 82.0 (C), 40.9 (CH_3), －0.8 (CH_3), －1,7 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{27}H_{29}N_2Si$: 409.20945; found: 409.20922 (0.2 mDa, 0.6 ppm).

化合物２０：^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.63 － 7.61 (m, 1H), 7.57 － 7.54 (m, 2H), 7.37 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.30 － 7.27 (m, 1H), 7.07 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.78 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.35 (s, 12H), 0.620 (s, 3H), 0.604 (s, 3H), －0.12 (s, 9H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.6 (C), 155.7 (C), 149.5 (C), 143.6 (C), 142.7 (CH), 133.1 (CH), 130.6 (CH), 130.0 (CH), 129.5 (CH), 128.9 (C), 124.4 (C), 122.0 (CH), 115.0 (CH), 104.0 (C), 100.2 (C), 40.9 (CH_3), －0.3 (CH_3), －0.93 (CH_3), －0.99 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{30}H_{37}N_2Si_2$: 481.24898; found: 481.24886 (0.1 mDa, 0.2 ppm).

[0113] [化合物２１の合成]

1-ブロモ-3-(トリフルオロメチル)ベンゼン（化合物L3, 100 μl, 0.470 mmol, 5 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10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（500 μl, 0.550 mmol, 9 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物B1 （20 mg, 0.062 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 °Cで10分間、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2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、化合物２１（13.8

mg, 40%）を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.90 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.57 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 9.7 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 12H), 0.617 (s, 3H), 0.613 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 168.0 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 142.7 (CH), 141.7 (C), 134.2 (CH), 132.1 (q, $^2J_{C-F}$ = 36 Hz, C), 130.5 (CH), 128.7 (C), 127.0 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz, CH), 126.6 (q, $^3J_{C-F}$ = 4.1 Hz, CH), 122.5 (CH), 115.2 (CH), 40.9 (CH_3), −1.2 (CH_3).;^{19}F NMR (CD_3OD): δ −61.7.; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{26}H_{28}F_3N_2Si$: 453.19684; found: 453.19603 (0.8 mDa, 1.8 ppm).

[0114] [化合物２２の合成]

1-ブロモ-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン（化合物L4, 100 μl, 0.470 mmol, 5 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、−78 °Cで10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（500 μl, 0.550 mmol, 9 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物B1 （20 mg, 0.062 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、−78 °Cで10分間、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2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、化合物２２（10.0 mg, 29%）を青色固体として得た。

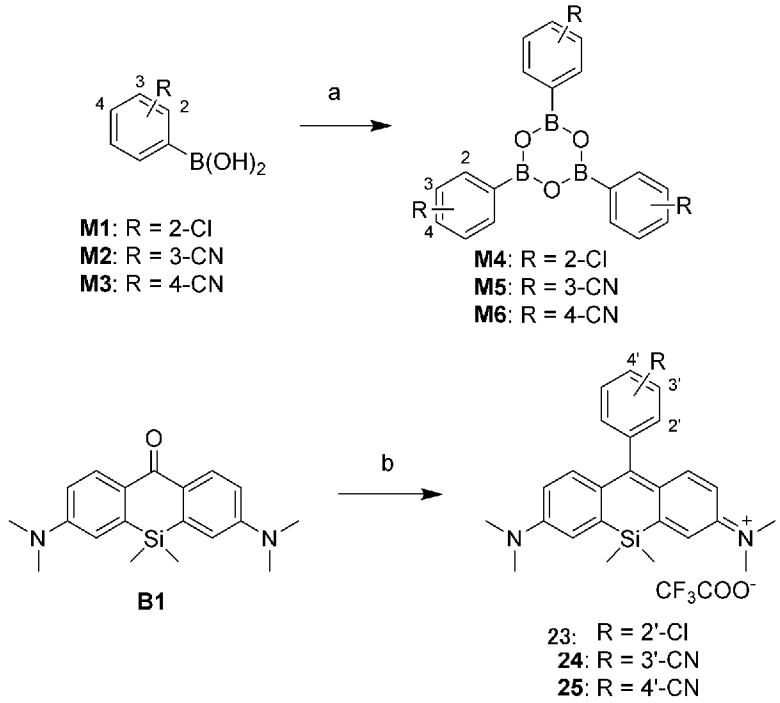
^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.89 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.79 (dd, J = 9.7 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.35 (s, 12H), 0.61 (s, 6H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 168.4 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 144.8 (C), 142.7 (CH), 131.8 (q, $^2J_{C-F}$ = 33 Hz, C), 131.3 (CH), 126.4 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.7 Hz, CH), 125.5 (q, $^1J_{C-F}$ = 273 Hz, C), 122.5 (CH), 115.2 (CH), 40.9 (CH_3), −1.1 (CH_3).; ^{19}F{^{1}H} NMR (CD_3OD): δ −61.7.; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{26}H_{28}F_3N_2Si$: 453.

19684; found: 453.19653 (0.3 mDa, 0.7 ppm).

[0115] 化合物２３～２５の合成

以下のスキーム１５に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２３～２５を合成した。

[化29]



スキーム１５

[0116] ［化合物２３の合成］

2-クロロフェニルボロン酸（化合物M1）を110℃にて6時間減圧乾燥させ、化合物M4を白色固体として得た。化合物M4は分離精製せず、そのまま次の反応に用いた。

化合物B1（30 mg, 0.092 mmol, 1 eq.)を脱酸素アセトニトリル（10 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、室温にて撹拌した。トリフルオロメタンスルホン酸無水物（20 μl, 0.112 mmol, 1.2 eq.）をゆっくり加え、室温にてさらに15分撹拌した後、化合物M4（61.1 mg, 0.144 mmol, 1.6 eq.）、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド（13.1 mg, 0.018 mmol, 0.2 eq.)、および炭酸ナトリウム（62.3 mg, 0.587 mmol, 6.2 eq.）を加え、70

℃にて終夜撹拌した。室温に戻し、反応溶液に水を加え、ジクロロメタンで2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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ジクロロメタン/メタノール = 100/0 to 90/10）およびHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物２３（3.0 mg, 6%）を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.65 (dd, J = 8.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.59 (ddd, J = 8.0 Hz, 7.3 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (dt, J = 1.4 Hz. 7.3 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 7.3 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 2H), 3.36 (s, 12H), 0.613 (s, 3H), 0.598 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 167.0 (C), 155.8 (C), 149.5 (C), 142.0 (CH), 139.3 (C), 134.1 (C), 132.2 (CH), 131.7 (CH), 130.9 (CH), 128.4 (C), 128.1 (CH), 122.3 (CH), 115.3 (CH), 40.9 (CH_3), −1.1 (CH_3), −1.4 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{25}H_{28}ClN_2Si$: 419.17048; found: 419.16962 (0.9 mDa, 2.0 ppm).

[0117] ［化合物２４の合成］

化合物２４に関しても同様にスキーム１５に従って合成を行い、目的化合物２４（11.1 mg, 23%）を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.95 (ddd, J = 7.6 Hz, 1.6 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.77 (dt, J = 0.5 Hz, 7.8 Hz, 1H), 7.70 (dt, J = 0.5 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.60 (ddd, J = 7.8 Hz, 1.6 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 9.7 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 12H), 0.610 (s, 3H), 0.605 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 167.1 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 142.7 (CH), 142.0 (C), 135.0 (CH), 133.8 (CH), 133.5 (CH), 130.7 (CH), 128.6 (C), 122.6 (CH), 119.1 (C), 115.2 (CH), 113.9 (C), 40.9 (CH_3), −1.10 (CH_3), −1.15 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{26}H_{28}N_3Si$: 410.20470; found: 410.20416 (0.5 mDa, 1.3 ppm).

[0118] ［化合物２５の合成］

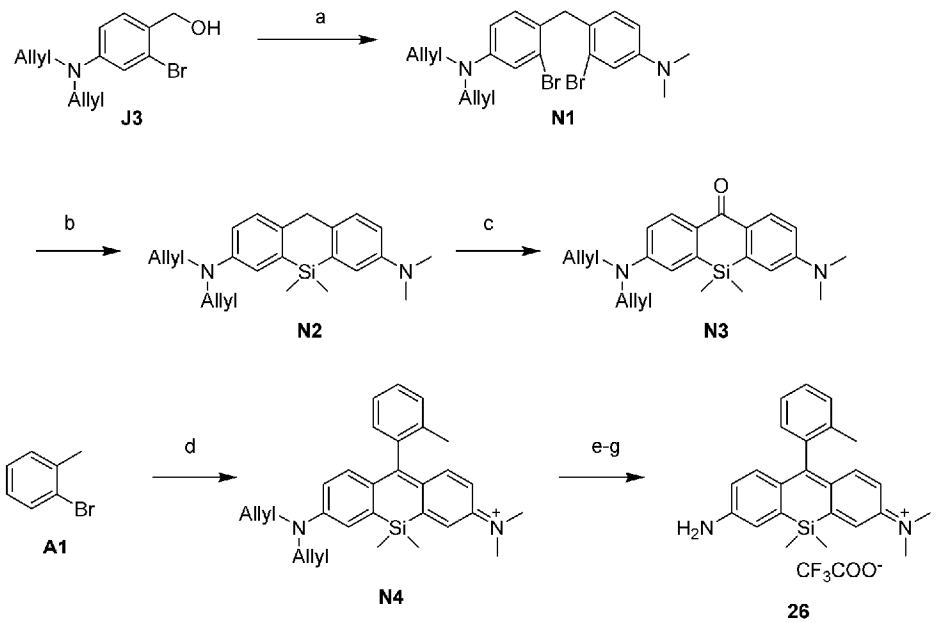
化合物２５に関しても同様にスキーム１５に従って合成を行い、目的化合物２５（9.2 mg, 19%）を青色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.79 (dd, J = 9.7 Hz, 2.9 Hz, 2H), 3.36 (s, 12H), 0.61 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 167.7 (C), 155.7 (C), 149.6 (C), 145.6 (C), 142.6 (CH), 133.3 (CH), 131.6 (CH), 128.3 (C), 122.6 (CH), 119.1 (C), 115.2 (CH), 113.8 (C), 40.9 (CH_3), −1.1 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{26}H_{28}N_3Si$: 410.20470; found: 410.20464 (0.1 mDa, 0.2 ppm).

[0119] ［化合物２６の合成］

以下のスキーム１６に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２６を合成した。

[化30]



a) 3-bromo-*N,N*-dimethylaniline, $BF_3{\cdot}OEt_2$ complex, CH_2Cl_2, reflux, b) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) $SiCl_2Me_2$, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq. c) $KMnO_4$, acetone, -15°C, d) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **N3**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq., e) $NaBH_4$, MeOH, f) 1,3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2, g) p-chloranil, CH_2Cl_2.

スキーム１６

[0120] ［化合物N1の合成］

化合物J3（1.00 g, 3.54 mmol, 1 eq.）および3-ブロモ-N,N-ジメチルアニリン（0.540 μl, 3.72 mmol, 1.05 eq.）をジクロロメタン（15 ml）に溶かし、氷浴下にて撹拌した。三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（650 μl, 5.46 mmol, 1.5 eq.）を加え、反応液を終夜加熱還流した。空冷後、飽和炭酸ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンにて抽出し、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、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 50/50）にて分離精製し、化合物N1（1.39 g, 85%)を無色透明の液体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6.93 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.6 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 8.6 Hz, 2.7 Hz, 1H), 5.83 (ddt, J = 17.5 Hz, 10.0 Hz, 4.9 Hz, 2H), 5.18 － 5.14 (m, 4H), 3.98 (s, 2H), 3.88 － 3.87 (m, 4H), 2.91 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 150.2 (C), 148.3 (C), 133.7 (CH), 130.96 (CH), 130.86 (CH), 127.25 (C), 127.06 (C), 125.75 (C), 125.67 (C), 116.41 (CH_2), 116.39 (CH), 116.1 (CH), 112.0 (CH), 111.8 (CH), 52.9 (CH_2), 40.7 (CH_3), 39.9 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): [M+H]$^+$ calcd for $C_{21}H_{25}Br_2N_2$: 463.03790; found: 463.03667 (1.2 mDa, 2.7 ppm).

[0121] ［化合物N3の合成］

アルゴン雰囲気下、化合物J6（1.05 g, 2.26 mmol, 1 eq.）をTHF（30 ml）に溶かし、-78°Cにて10分間撹拌した。そこに1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（5.0 ml, 5.0 mmol, 2.2 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。次いでジクロロジメチルシラン（350 μl, 2.88 mmol, 1.3 eq.）をTHF（5 ml）に希釈して加えて徐々に室温に戻し、2.5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を減圧留去した。得られた水層を酢酸エチルで抽出し、次いで有機相を水およ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（溶離液：ノルマルヘキサン/酢酸エチル = 100/0 to 90/10）で精製した。得られた化合物をアセトン（15 ml）に溶かし、-15°Cにて10分間撹拌した。そこに過マンガン酸カリウム（450 mg, 2.85 mmol, 1.3 eq.）を3回に分けて10分おきに加え、反応の終了をTLCにて確認した。反応系をセライト濾過し、ジクロロメタンにて洗浄し、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し（溶離液：ヘキサン/ジクロロメタン = 40/60 to 0/100）、目的化合物N3（123 mg, 14%)を黄色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.38 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.83 (dd, J = 9.0 Hz, 2.9 Hz, 1H), 6.83 － 6.80 (m, 2H), 6.78 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.88 (ddt, J = 17.2 Hz, 9.8 Hz, 4.8 Hz, 2H), 5.23 － 5.18 (m, 4H), 4.03 － 4.02 (m, 4H), 3.09 (s, 6H), 0.44 (s, 6H).; ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 185.1 (C), 151.4 (C), 150.1 (C), 140.5 (C), 133.0 (CH), 131.6 (CH), 129.9 (C), 129.6 (C), 116.6 (CH_2), 144.8 (CH), 144.3 (CH), 113.4 (CH), 113.1 (CH), 52.7 (CH_2), 40.0 (CH_3), －1.0 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{29}N_2OSi$: 377.20437; found: 377.20398 (0.4 mDa, 1.0 ppm).

[0122] ［化合物２６の合成］

2-ブロモトルエン（化合物A1, 50 μl, 0.420 mmol, 12 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（200 μl, 0.200 mmol, 5.7 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物N3（13.2 mg, 0.035 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 °Cで1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和

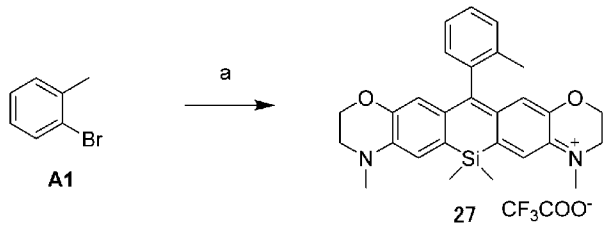
食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた化合物を脱酸素したジクロロメタン（3 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（68.1 mg, 0.436 mmol, 12 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（4.2 mg, 4 μmol, 0.1 eq.）を加え、40°Cにて1.5時間撹拌した。クロラニル（10.5 mg, 0.042 mmol, 1.2 eq.）を加えて室温にて10分撹拌し、濃青色の反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ジクロロメタン/メタノール = 100/0 to 60/40）にて分離し、青色のフラクションを回収して溶媒を減圧留去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物２６（12.0 mg, 71%)を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.47 － 7.37 (m, 3H), 7.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 9.7 Hz, 2.8 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.34 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 0.581 (s, 3H), 0.565 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 171.4 (C), 158.5 (C), 155.8 (C), 150.7 (C), 149.3 (C), 143.6 (CH), 142.6 (CH), 140.1 (C), 136.9 (C), 131.3 (CH), 130.09 (CH), 130.04 (CH), 128.7 (C), 128.3 (C), 126.8 (CH), 124.4 (CH), 122.1 (CH), 116.9 (CH), 115.1 (CH), 40.9 (CH_3), 19.4 (CH_3), －1.3 (CH_3), －1.5 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{24}H_{27}N_2Si$: 371.19380; found: 371.19406 (－0.3 mDa, －0.7 ppm).

[0123] ［化合物２７の合成］

以下のスキーム１７に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２７を合成した。

[化31]



a) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **E8**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.

スキーム１７

[0124] ［化合物２７の合成］

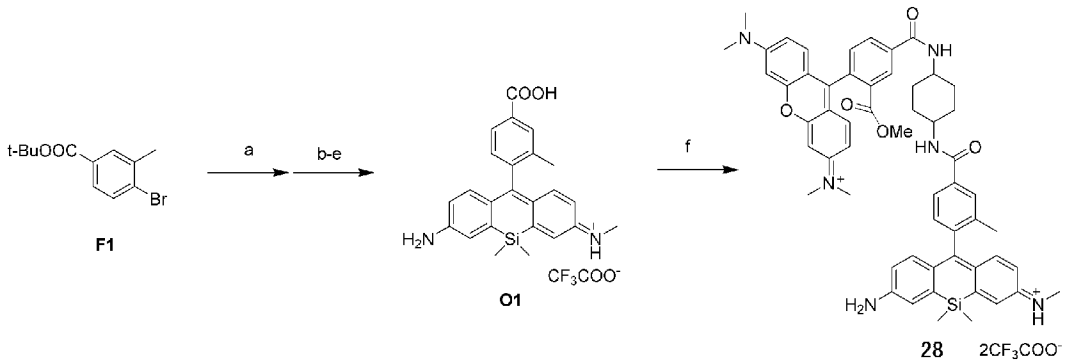
2-ブロモトルエン（化合物A1, 20 μl, 0.180 mmol, 6 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 °Cで10分間撹拌した。1 M sec-ブチルリチウム シクロヘキサン/n-ヘキサン溶液（100 μl, 0.100 mmol, 3.3 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物E8（11.5 mg, 0.030 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、徐々に室温に戻しながら2時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで3回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣をHPLCで精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物２７(9.8 mg, 57%)を青緑色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3CN): δ 7.48 － 7.44 (m, 1H), 7.41 － 7.35 (m, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.34 (s, 2H), 4.12 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.64 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.31 (s, 6H), 2.01 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 0.54 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3CN): δ 169.6 (C), 145.5 (C), 145.0 (C), 144.7 (C), 140.1 (C), 136.5 (C), 131.2 (CH), 129.91 (C), 129.88 (CH), 129.6 (CH), 126.6 (CH), 123.3 (CH), 121,1 (CH), 64.0 (CH_2), 50.4 (CH_2), 39.6 (CH_3), 19.5 (CH_3), －1.1 (CH_3), －1.2 (CH_3). HRMS-ESI (m/z): [M]$^+$ calcd for $C_{28}H_{31}N_2O_2Si$: 455.21493; found: 455.21407 (0.9 mDa, 1.9 ppm).

[0125] ［化合物２８の合成］

以下のスキーム１８に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２８を合成した。

[化32]



a) i) sec-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **J8**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HClaq.; b) $NaBH_4$, MeOH, 0°C, c) 1.3-dimethylbarbituric acid, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2; d) p-chloranil, CH_2Cl_2, rt.; e) TFA, CH_2Cl_2, rt.; f) compound **G1**, PyBOP, DIEA, DMF, rt.

スキーム１８

[0126] ［化合物Ｏ１の合成］

化合物F1（150 mg, 0.550 mmol, 12 eq.）をTHF（5 ml）に溶かし、アルゴン雰囲気下、－78 ℃で10分間撹拌した。1.6 M tert-ブチルリチウム ペンタン溶液（300 μl, 0.472 mmol, 10 eq.）をゆっくり加え、10分間撹拌した。化合物J8（19 mg, 0.047 mmol, 1 eq.）をTHF（5 ml）に溶かして加え、－78 ℃で1時間、室温で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、ジクロロメタンで2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、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、酢酸エチルで抽出し、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（2 ml）に溶かし、1,3-ジメチルバルビツール酸（145 mg, 0.922 mmol, 20 eq.）およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム（6.0 mg, 5 μmol, 0.1 eq.）を加え、40℃にて1時間撹拌した。クロラニル（15.1 mg, 0.

061 mmol, 1.3 eq.）を加えて室温にて10分撹拌し、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 60/40, 0.5% TFA）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た。得られた化合物をトリフルオロ酢酸（1 ml）および水（200 μl）に溶かし、室温にて30分撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCで精製し（1回目: A/B = 90/10 to 10/90, 25 min；2回目: 70/30 to 30/70）、目的化合物Ｏ１（16.2 mg, 67%)を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.06 (s, 1H), 8.02 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.02 (br s, 1H), 6.94 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 9.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.07 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 0.562 (s, 3H), 0.549 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.8 (C), 169.2 (C), 158.4 (C), 157.5 (C), 150.0 (C), 144.9 (C), 143.1 (CH), 137.6 (C), 132.57 (C), 132.47 (CH), 130.5 (C), 128.08 (CH), 128.04 (C), 127.97 (C), 124.5 (CH), 117.0 (CH), 30.1 (CH_3), 19.4 (CH_3), −1.4 (CH_3), −1.6 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{24}H_{25}N_2O_2Si$: 401.16798; found: 401.16723 (0.8 mDa, 1.9 ppm).

[0127] ［化合物２８の合成］

化合物G1 (2.9 mg, 3.8 μmol, 1 eq.)、化合物O1 (2.4 mg, 4.5 μmol, 1.2 eq.）およびヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム(4.0 mg, 7.6 μmol, 2.0 eq.）をDMF (200 μl)に溶かし、室温にて撹拌した. N,N-ジイソプロピルエチルアミン（10 μl, 56 μmol, 15 eq.)を加えてさらに室温で1.5時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCにて分離精製し（1回目; A/B = 90/10 to 10/90, 25 min: 2回目; C/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物２８(2.3 mg, 53%）を濃紫色固体として得た。

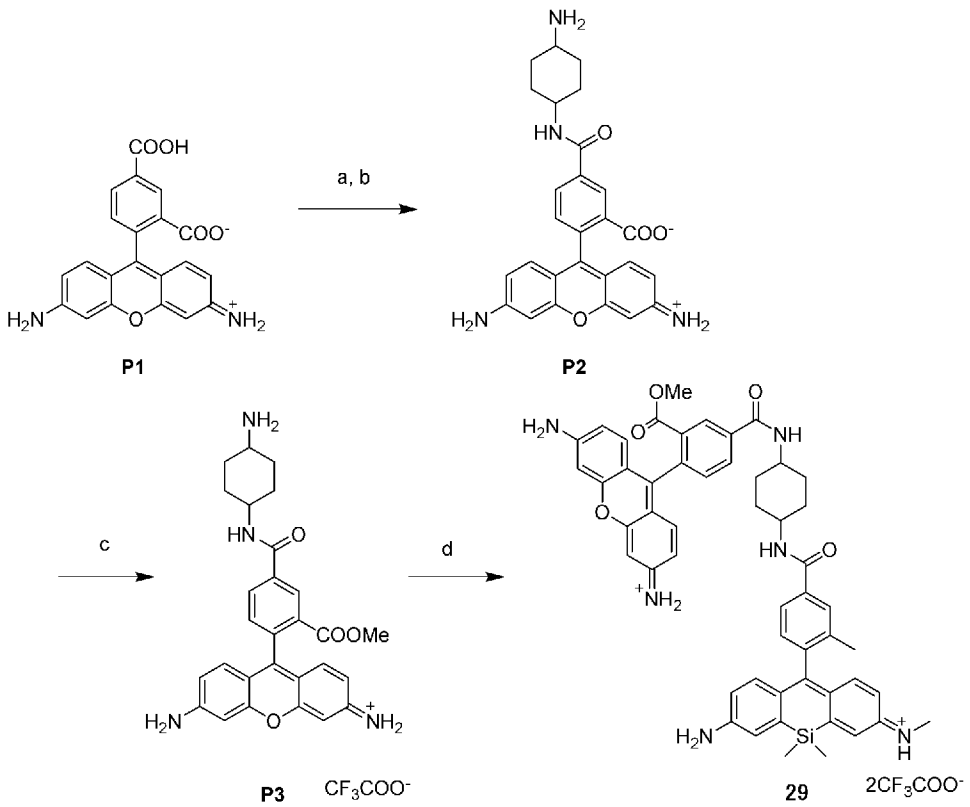
^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.79 − 8.77 (m, 1H, NH), 8.77 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 8.31 (dd, J = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.8

9 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.22 (br s, 1H), 7.21 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 9.5 Hz, 2.3 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 2 .3 Hz, 2H), 7.09 － 7.02 (m, 1H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.3 Hz, 2.4 Hz), 4.03 (m, 2H), 3.66 (s , 3H), 3.33 (s, 12H), 3.08 (s, 3H), 2.18 － 2.16 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 1.72 － 1.61 (m, 4H), 0.571 (s, 3H), 0.558 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD) : δ 170.0 (C), 169.0 (C), 167.5 (C), 166.4 (C), 165.5 (C), 159.9 (C) , 159.09 (C), 159.06 (C), 158.4 (C), 150.2 (C), 143.4 (C), 143.2 (CH) , 138.01 (C), 137.93 (C), 137.6 (C), 136.5 (C), 132.7 (CH), 132.08 (C H), 131.94 (CH), 131.84 (CH), 131.1 (CH), 130.5 (CH), 130.2 (CH), 128 .19 (C), 128.12 (C), 125.8 (CH), 124.4 (CH), 116.9 (CH), 115.7 (CH), 114.7 (C), 97.6 (CH), 53.1 (CH_3), 50.2 (CH), 49.9 (CH), 41.0 (CH_3), 32 .35 (CH_2), 32.32 (CH_2), 30.1 (CH_3), 19.5 (CH_3), －1.44 (CH_3), －1.63 (CH $_3$).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^{2+}/2$ calcd for $C_{56}H_{60}N_6O_5Si$: 462.21917; found: 46 2.21878 (0.4 mDa, 0.9 ppm).

[0128] ［化合物２９の合成］

以下のスキーム１９に従って、本発明の蛍光プローブである化合物２９を合成した。

[化33]



a) compound **F5**, PyBOP, DIEA, DMA, b) TFA, rt., c) conc. H_2SO_4, MeOH, reflux, d) compound **O1**, PyBOP, DIEA, DMF, rt.

スキーム３３

[0129] [化合物P2の合成]

化合物P1 (15.0 mg, 31 μmol, 1 eq.)、化合物F5 (10.5 mg, 49 μmol, 1.6 eq.) およびヘキサフルオロリン酸 (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリピロリジノホスホニウム(26.0 mg, 50 μmol, 1.5 eq.) をDMF (500 μl) に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (40 μl, 230 μmol, 7.5 eq.)を加えてさらに室温で1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCにて分離精製し (1回目; A/B = 90/10 to 10/90, 25 min: 2回目; C/B = 90/10 to 10/90, 25 min) 、目的化合物P2 (5.0 mg, 23 %) を橙色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.74 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 7.4 Hz, 1H, CONH), 8.24 (dd, J = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7

.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.81 (dd, J = 8.9 Hz, 2.1 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 2.18 － 2.15 (m, 4H), 1.65 － 1.54 (m, 4H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 167.8 (C), 167.4 (C), 161.3 (C), 161.1 (C), 160.0 (C), 138.2 (C), 137.7 (C), 132.77 (C), 132.69 (CH), 132.4 (CH), 131.9 (CH), 131.3 (CH), 117.9 (CH), 114.7 (C), 98.4 (CH), 50.6 (CH), 49.5 (CH), 31.1 (CH_2), 30.7 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{27}H_{27}N_4O_4$: 471.20268; found: 471.20113 (1.6 mDa, 3.3 ppm).

[0130] [化合物P3の合成]

化合物P2 (5.0 mg, 7 μmol, 1 eq)をメタノール(2 ml)に溶かし、濃硫酸を3滴加え、加熱還流にて終夜撹拌した。反応系を室温に戻し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 25 min) 、化合物P3 (4.6 mg, 90 %)を橙色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.75 (d, J = 7.9 Hz, 1H, CONH), 8.73 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.81 (dd, J = 9.1 Hz, 2.1 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.67 (s 3H), 3.17 (m, 1H), 2.18 － 2.16 (m, 4H), 1.65 － 1.55 (m, 4H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 167.6 (C), 166.3 (C), 161.4 (C), 160.3 (C), 159.7 (C), 138.0 (C), 137.8 (C), 132.63 (CH), 132.61 (CH), 132.02 (CH), 131.85 (C), 131.1 (CH), 118.0 (CH), 114.6 (C), 98.5 (CH), 53.1 (CH_3), 50.6 (CH), 49.5 (CH), 31.1 (CH_2), 30.7 (CH_2).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{28}H_{29}N_4O_4$: 485.21833; found: 485.21863 (－0.3 mDa, －0.6 ppm).

[0131] [化合物２９の合成]

化合物P3 (2.6 mg, 3.7 μmol, 1 eq.)、化合物O1 (2.3 mg, 4.4 μmol, 1.2 eq.) およびヘキサフルオロリン酸 (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリピロリジノホスホニウム(3.3 mg, 6.3 μmol, 1.7 eq.) をDMF (200 μl) に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (5 μl, 27 μmol, 7.5 eq.)を加えてさらに室温で1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し

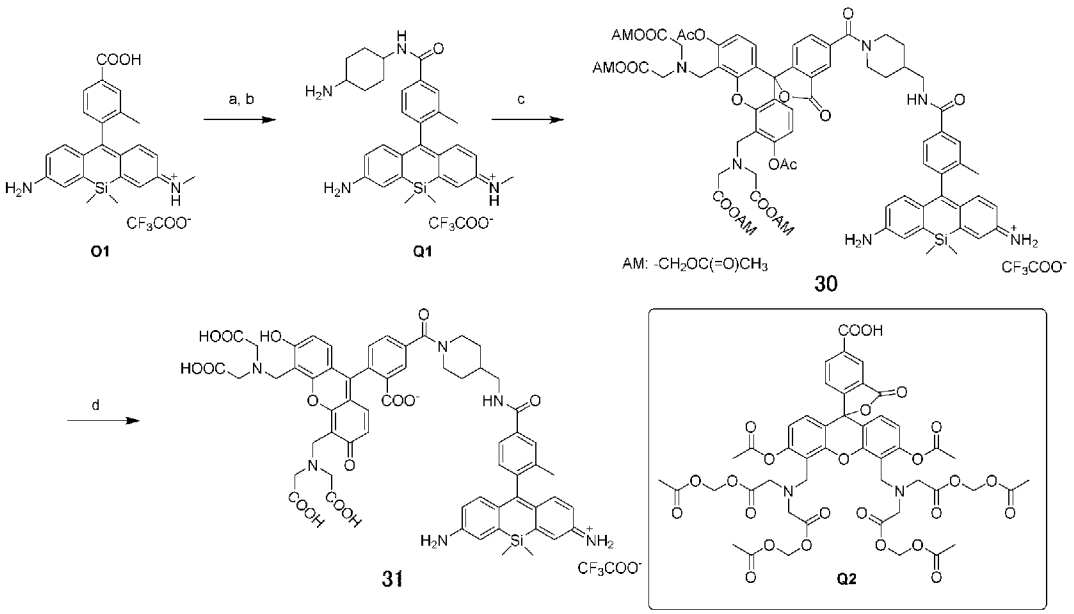
、得られた残渣をHPLCにて分離精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物２９（3.0 mg, 75%）を濃橙色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.76 (d, J = 7.4 Hz, 1H, -CONH-), 8.76 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H, -CONH-), 8.29 (dd, J = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.22 (br s, 1H), 7.20 (d, J = 2.5 Hz), 7.03 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.03 (m, 1H)*, 6.98 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.82 (dd, J = 9.1 Hz, 2.1 Hz, 2H), 6.62 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.17 － 2.15 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 1.72 － 1.60 (m, 4H), 0.570 (s, 3H), 0.558 (s, 3H).; HR MS-ESI (m/z): $[M]^{2+}/2$ calcd for $C_{55}H_{55}N_6O_5Si$: 434.18787; found: 434.18723 (0.6 mDa, 1.5 ppm).

[0132] ［化合物３０及び３１の合成］

以下のスキーム２０に従って、本発明の蛍光プローブである化合物３０及び３１を合成した。

[化34]



a) compound **F5**, PyBOP, DIEA, DMF, rt.; b) TFA, rt.; c) compound **Q2**, PyBOP, DIEA, DMF, rt. d) 1N NaOH, MeOH, rt.

スキーム２０

[0133] ［化合物Q1の合成］

化合物O1 (5.1 mg, 0.010 mmol,1 eq)、トランス-N-Boc-1,4-シクロヘキサンジアミン(化合物F5, 4.0 mg,0.019 mmol,1.9 eq)およびヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム(9.1 mg, 0.018 mmol, 1.7 eq.)をDMF(400 μl)に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(15 μl, 0.088 mmol,8.8 eq)を加え、さらに30分撹拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をトリフルオロ酢酸(1 ml)および水(100 μl)を加え室温にて30分撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 25 min) 、化合物Q1(6.8 mg, 95 %)を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.86 (s, 1H), 7.82 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.02 (br s, 1H), 6.94 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 9.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 2.14 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 2.11 (s, 3H), 1.64 － 1.52 (m, 4H), 0.560 (s, 3H), 0.548 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 169.9 (C), 169.1 (C), 158.3 (C), 157.5 (C), 150.1 (C), 143.5 (C), 143.1 (CH), 137.6 (C), 136.3 (C), 130.45 (CH), 130.19 (CH), 128.15 (C), 128.07 (C), 125.8 (CH), 124.4 (CH), 116.9 (CH), 50.6 (CH), 31.1 (CH_2), 30.7 (CH_2), 30.0 (CH_3), 19.5 (CH_3), －1.46 (CH_3), －1.65 (CH_3).; HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{30}H_{37}N_4OSi$: 497.27311; found: 497.27302 (0.1 mDa, 0.2 ppm).

[0134] ［化合物３０の合成］

化合物Q1 (3.4 mg, 4.7 μmol, 1 eq.)、化合物Q2 (7.4 mg, 7.0 μmol, 1.2 eq.) およびヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム(5.8 mg, 11 μmol, 2.2 eq.) をDMF (300 μl)に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (8 μl, 70

μmol, 10 eq.)を加えてさらに室温で30分間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCにて分離精製し（A/B = 70/30 to 30/70, 25 min）、目的化合物３０（1.8 mg, 24%）を青紫色固体として得た。

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.68 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 8.48 (s, 1H), 8.47 (d, J = 7.9 Hz, 1H, NH), 8.23 (dd, J = 8.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.21 (br s, 1H), 7.20 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.05 (br s, 1H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.93 (s, 4H), 6.62 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.3 Hz, 2.4 Hz, 1H), 5.71 (d, $^2J_{H-H}$ = 7.2 Hz, 4H), 5.70 (d, $^2J_{H-H}$ = 7.2 Hz, 4H), 4.37 (d, $^2J_{H-H}$ = 12.6 Hz, 2H), 4.33 (d, $^2J_{H-H}$ = 12.6 Hz, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.74 (s, 8H), 3.08 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.15 － 2.14 (m, 4H), 2.12 (s, 3H), 1.99 (s, 12H), 1.68 － 1.57 (m, 4H), 0.567 (s, 3H), 0.555 (s, 3H).; HRMS-ESI (m/z): $[M+Na]^{2+}/2$ calcd for $C_{77}H_{81}N_6NaO_{25}Si$: 770.24537; found: 770.24500 (0.4 mDa, 0.5 ppm).

[0135] ［化合物３１の合成］

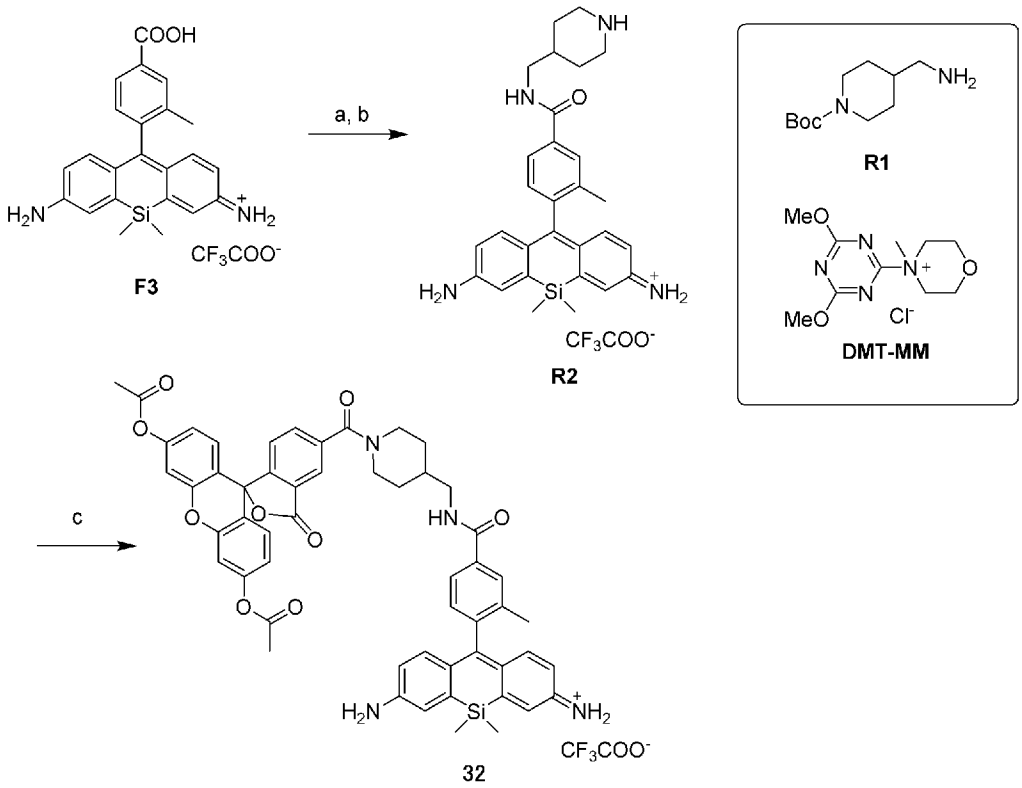
化合物３０（0.24 mg, 0.15 μmol, 1 eq.)をメタノール（40 μl)に溶かし、室温にて撹拌した。1N水酸化ナトリウム水溶液（10 μl）を加え、5分間撹拌した。反応液をメタノール（0.1%トリフルオロ酢酸）を加えて停止し、HPLCにて分離精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 25 min）、目的化合物３１を青紫色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{61}H_{61}N_6O_{15}Si$: 1145.39587; found: 1145.39346 (2.4 mDa, 2.1 ppm).

[0136] ［化合物３２の合成］

以下のスキーム２１に従って、本発明の蛍光プローブである化合物３２を合成した。

[化35]



a) compound **R1**, DMT-MM, DIEA, DMF, rt.; b) TFA, rt.; c) compound **H2**, DMT-MM, DIEA, DMF, rt.

スキーム２１

[0137] ［化合物R2の合成］

化合物F3 (5.9 mg, 15.2 μmol)、N-Boc－4－アミノメチルピペリジン(化合物R1, 6.4 μl, 30.4 μmol)およびDMT-MM (9.0 mg, 30.4 μmol)をDMF(1.5 ml)に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(5.3 μl)を加え、さらに2時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCで精製した (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 。得られた化合物をトリフルオロ酢酸 (5 ml) に溶かし、反応が終了するまで室温にて撹拌した。溶液を減圧留去し、得られた残渣をHPLCで精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) 、化合物R2 (5.1 mg, 69%) を青紫色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{29}H_{35}N_4OSi$: 483.25746; found: 483.25686 (0.6 mDa, 1.2 ppm).

[0138] ［化合物３２の合成］

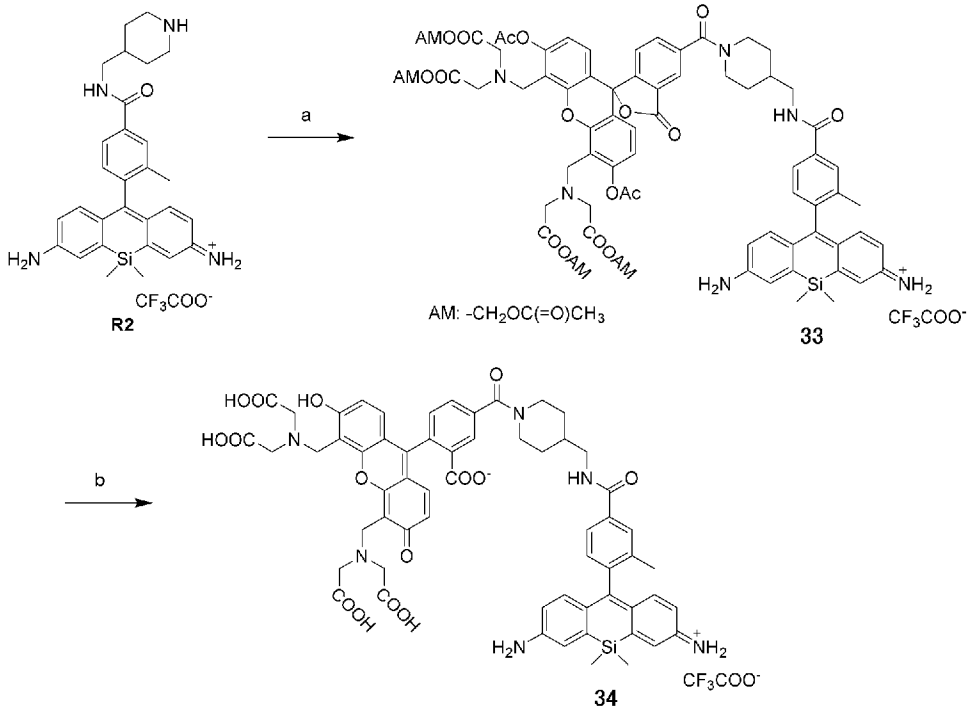
化合物R2（2.3 mg, 4.8 μmol)、化合物H2（2.2 mg, 4.8 μmol）およびDMT-MM（10 mg）をDMF（3 ml)に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン（1.8 μl, 9.6 μmol)を加えてさらに室温で終夜撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCにて分離精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 40 min）、目的化合物３２（4.9 mg, quant.）を青紫色固体として得た。

HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{54}H_{49}N_4O_9Si$: 925.32633; found: 925.32417 (2.2 mDa, 2.3 ppm).

[0139] ［化合物３３及び３４の合成］

以下のスキーム２２に従って、本発明の蛍光プローブである化合物３３及び３４を合成した。

[化36]



a) compound **Q2**, DMT-MM, DIEA, DMF, rt.; b) 1N KOHaq., MeOH, rt.

スキーム２２

[0140] ［化合物３３の合成］

化合物R2（2.8 mg, 5.9 μmol)、化合物Q2（6.1 mg, 5.9 μmol）およびDMT-

MM（10 mg）をDMF（3 ml)に溶かし、室温にて撹拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン（2.0 μl, 11.8 μmol)を加えてさらに室温で終夜撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLCにて分離精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 40 min）、目的化合物３３（5.1 mg, 57%）を青紫色固体として得た。HRMS-ESI (m/z): $[M]^+$ calcd for $C_{76}H_{79}N_6O_{25}Si$: 1503.4858; found: 1503.4872 (-1.3 mDa, -0.9 ppm).

[0141] ［化合物３４の合成］

化合物３３をメタノール（5 ml)および水（3 ml）に溶かし、１N水酸化カリウム水溶液を加えて室温にて撹拌した。溶媒を減圧留去し、HPLCにて分離精製し（A/B = 90/10 to 10/90, 40 min）、目的化合物３４を青紫色固体として得た。

実施例 2

[0142] グルタチオンに対する蛍光アッセイ

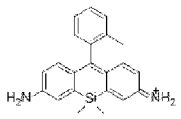
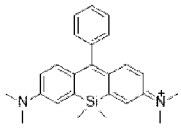
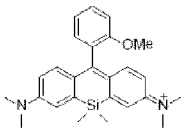
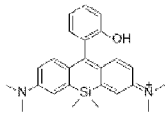
実施例１で合成した蛍光プローブ２Ｍｅ　ＳｉＲ６００（化合物１）にグルタチオンを作用させ、その蛍光アッセイを行った。紫外一可視吸光分光分析および蛍光分光分析は、Shimadzu UV-2450（島津製作所)およびHitachi F-7000（日立製作所）を用いて行った。溶液条件は、蛍光プローブの濃度は1μＭ、０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．４）、０．１～１％のＤＭＳＯを含む溶液を用いた。添加するグルタチオンの濃度を１μＭ～１００ｍＭの範囲で変化させた際の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。励起波長は５９０ｎｍとした。得られた結果を図１及び２に示す。

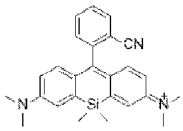
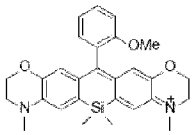
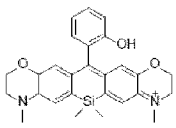
[0143] 図１及び２に示すように、グルタチオンの添加によって吸収及び蛍光強度の顕著な減少が認められた。吸収ピーク波長（５９３ｎｍ）及び蛍光ピーク波長（６１４ｎｍ）の強度変化のグルタチオン濃度依存性をプロットし、解離定数Ｋｄ（ｍＭ）を算出した結果、それぞれ、１．０ｍＭ及び１．１ｍＭが得られた。

[0144] 同様に、他のプローブである化合物２「Ｐｈ　ＳｉＲ６５０」、化合物３「２ＯＭｅ　ＳｉＲ６５０」、化合物４「２ＯＨ　ＳｉＲ６５０」、化合物

５「２ＣＮ　ＳｉＲ６５０」、化合物６「２ＯＭｅ　ＯｘａＳｉＲ　ｄｉＭｅ」、及び化合物７「２ＯＨ　ＯｘａＳｉＲ　ｄｉＭｅ」についても、同様の条件でアッセイを行った結果をあわせて表１に示す（Ｋｄは、蛍光スペクトル変化に基づいて算出した結果である）。

[表1]

	化合物1 2Me SiR600	化合物2 Ph SiR650	化合物3 2OMe SiR650	化合物4 2OH SiR650
				
吸収ピーク(nm)	593	645	649	648
蛍光ピーク(nm)	613	668	672	672
量子収率	0.38	0.14	0.37	0.31
Ｋｄ(mM)	1.1	0.9	41	43

	化合物5 2CN SiR650	化合物6 2OMe OxaSiR diMe	化合物7 2OH OxaSiR diMe
			
吸収ピーク(nm)	658	699	699
蛍光ピーク(nm)	683	740	739
量子収率	0.25	0.08	0.07
Ｋｄ(mM)	1.2	0.7	0.9

[0145] 表１の結果から、グルタチオンに対する解離定数Ｋｄは、蛍光プローブの構造に依存することが分かった。特に、細胞内におけるグルタチオンの存在濃度といわれている、１００μＭ～１０ｍＭ程度のＫｄを有するプローブが好適である。また、蛍光のピーク波長は、６１３～７３９ｎｍの範囲で調節が可能であり、いずれの量子収率も高いことが分かった。すなわち、これらの

蛍光プローブは、細胞内におけるグルタチオンの検出に有用であることが実証された。特に化合物１（2-Me SiR600）の吸収・蛍光の波長ピーク値は、既存の色素（フルオレセインやローダミン等）との波長の重なりが良好であるため、ＦＲＥＴを利用した波長変化型蛍光プローブへの応用にも適していることが示唆された。

[0146] 同様に、実施例１で合成した化合物１１～２７についても同条件でアッセイを行った。その結果を表２に示す。表２の結果から、これらの蛍光プローブも、細胞内におけるグルタチオンの検出に有用であることが実証された。

[表2]

化合物	吸収ピーク [nm]	蛍光ピーク [nm]	蛍光量子収率	K_d [mM]
１１	592	614	0.44	2.3
１２	592	614	0.46	2.3
１３	604	627	0.31	8
１４	607	630	0.28	2.0
１５	607	630	0.21	2.5
１６	620	643	0.34	16
１７	620	643	0.22	21
１８	655	677	0.19	1.3
１９	652	675	0.30	23
２０	653	676	0.31	12
２１	650	673	0.20	0.6
２２	650	673	0.16	0.5
２３	655	676	0.30	27
２４	652	674	0.15	0.4
２５	651	675	0.07	0.4
２６	620	643	0.14	15
２７	695	738	0.06	2.1

実施例 3

[0147] 蛍光応答の可逆性の評価

蛍光プローブとグルタチオンの反応が可逆性であることを、グルタチオンの添加及びチオールのスカベンジャーを添加した際の吸収スペクトル強度変化を観測することにより評価を行なった。測定は化合物１「２Ｍｅ　ＳｉＲ６００」及び化合物２「Ｐｈ　ＳｉＲ６５０」の蛍光プローブを用いて行なった。結果を図３に示す。

[0148] 図３の結果から、これらの蛍光プローブは、グルタチオンと速やかに応答し（平衡に達するまでの時間：１０秒以下）、グルタチオン量に依存して吸収スペクトル強度の変化が生じることが分かった。さらに、チオールのスカベンジャーであるＮ－エチルマレイミド(ＮＥＭ)を加えることで、吸光度がグルタチオン無添加時と同じ値まで戻ることから、グルタチオンに対する応答性が可逆的であることを確認した。

実施例 4

[0149] 化合物１（２Ｍｅ　ＳｉＲ６００）による細胞イメージング

次に、蛍光プローブとして、化合物１（２Ｍｅ　ＳｉＲ６００）を用いて癌培養細胞における蛍光イメージングを行った。測定は、共焦点顕微鏡を用いて行なった。得られた画像を図４に示す。蛍光プローブの投与後速やかに蛍光像が観察され、Ｎ－エチルマレイミド(ＮＥＭ)添加によるグルタチオン枯渇条件下において蛍光強度の増大が認められたことから、細胞内グルタチオン濃度の変化を反映しているものと考えられた。

実施例 5

[0150] ＦＲＥＴを用いる蛍光プローブによるアッセイ

分子内のドナー蛍光団を有するプローブである、実施例１で合成した化合物８（２Me SiR600 - TMR）について、実施例２と同様にグルタチオン添加に伴う吸収及び蛍光スペクトル変化を測定した。溶液条件は、蛍光プローブの濃度は０．５μＭ、０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．４）、０．１％のＤＭＳＯを含む溶液を用いた。添加するグルタチオンの濃度を１μＭ～１０ｍＭの範囲で変化させた。励起波長は５５０ｎｍとした。得られた結

果をそれぞれ図５及び６に示す。また、図６の蛍光スペクトルにおいて、アクセプターのピーク波長（６１５ｎｍ）とドナーのピーク波長（５８４ｎｍ）の強度変化のプロットを図７に示す。

[0151] これらの図６及び７から分かるように、グルタチオン添加に伴って６１５ｎｍのピークの蛍光強度が減少するとともに、５８４ｎｍのピークの蛍光強度の増加がえら得た。この結果は、当該蛍光プローブ（化合物８）では、実施例２のような消光型の検出ではなく、ＦＲＥＴの機構によって発光型（波長変化型）によって生理的濃度のグルタチオン検出が達成されたことを示すものである。

実施例 6

[0152] 化合物８（2Me SiR600 - TMR）による細胞イメージング

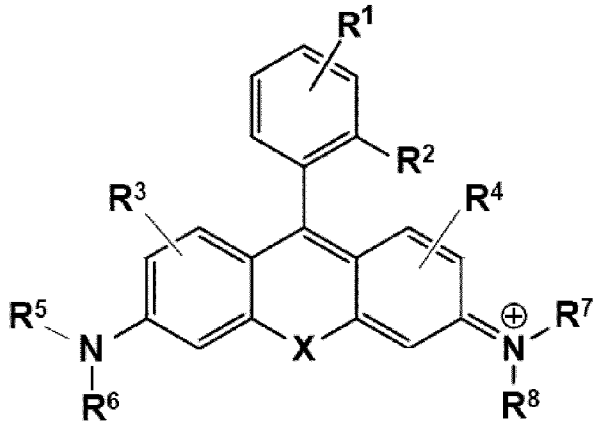
蛍光プローブとして化合物８（2Me SiR600 - TMR）を用いて実施例４と同様に、癌培養細胞における蛍光イメージングを行った（図８）。ＮＥＭ添加による蛍光強度比の変化が観測されたことから、当該蛍光プローブが、細胞内の細胞内グルタチオンと反応していることが示唆される。

同様に、実施例１で合成した化合物９「2Me SiR600 - TMR(Me)」についても細胞イメージングを行なった結果（図９）、ＮＥＭ添加による蛍光強度比の変化が観測された。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式（Ｉ）で表される化合物又はその塩を含む、－ＳＨ基を含有する化合物の検出用蛍光プローブ：

[化1]



(I)

〔式中、

Ｘは、Ｓｉ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｇｅ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｓｎ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、Ｃ（Ｒ^{a}）（Ｒ^{b}）、又はＯ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）；

Ｒ^{1}は、水素原子、シアノ基、又はそれぞれ置換されていてもよいアルキル基、カルボキシル基、エステル基、アルコキシ基、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１～４個の同一又は異なる置換基を表し；

Ｒ^{2}は、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいアルキル基、アルキニル基、アルコキシ基、アリール、又はヘテロアリールを表し；

Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それぞれ独立に、水素原子、又はヒドロキシル基、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；

Ｒ^{5}、Ｒ^{6}、Ｒ^{7}及びＲ^{8}は、それぞれ独立に水素原子又はアルキル基

を示し、

ここで、R^5又はR^6は、それぞれR^3と一緒になって、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く、

R^7又はR^8は、それぞれR^4と一緒になって、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。〕

[請求項2] 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、請求項１に記載の蛍光プローブ。

[請求項3] 前記－ＳＨ基を含有する化合物が、グルタチオンである、請求項１に記載の蛍光プローブ。

[請求項4] Ｘが、Ｓｉ（R^a）（R^b）である、請求項１～３のいずれか１に記載の蛍光プローブ。

[請求項5] R^2が、水素原子、ヒドロキシル基、シアノ基、それぞれ置換されていてもよいC_1－C_4アルキル基、C_1－C_4アルコキシ基、又はフェニル基であり；

R^5、R^6、R^7及びR^8は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基である、

請求項１～４のいずれか１に記載の蛍光プローブ。

[請求項6] R^1が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有する、請求項１～５のいずれか１に記載の蛍光プローブ。

[請求項7] R^5、R^6、R^7又はR^8が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のドナーとなる蛍光団を有する、請求項１～５のいずれか１に記載の蛍光プローブ。

[請求項8] 前記蛍光団が、キサンテン骨格を有する化合物である、請求項６又は７に記載の蛍光プローブ。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか１項に記載の蛍光プローブを用いる、－ＳＨ基を含有する化合物の検出方法。

[請求項10] 前記－ＳＨ基を含有する化合物と前記蛍光プローブとの反応による蛍光応答又は吸光度変化を観測することにより、－ＳＨ基を含有する化

合物の存在を検出することを特徴とする、請求項９に記載の検出方法。

[請求項11] 前記蛍光応答が、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）による蛍光変化である、請求項１０に記載の検出方法。

[請求項12] 蛍光イメージング手段を用いて前記蛍光応答を可視化することを特徴とする、請求項１０に記載の検出方法。

[請求項13] 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、請求項９～１２のいずれか１に記載の検出方法。

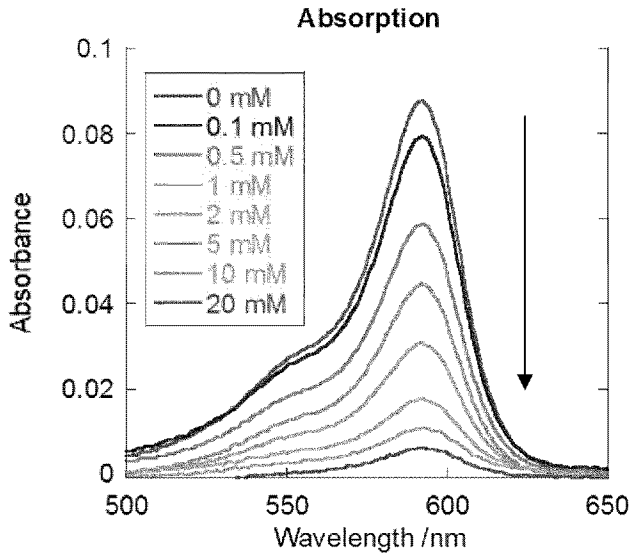
[請求項14] 前記－ＳＨ基を含有する化合物が、グルタチオンである、請求項９～１２のいずれか１に記載の検出方法。

[請求項15] 請求項１～８のいずれか１項に記載の蛍光プローブを含む、－ＳＨ基を含有する化合物の検出用キット。

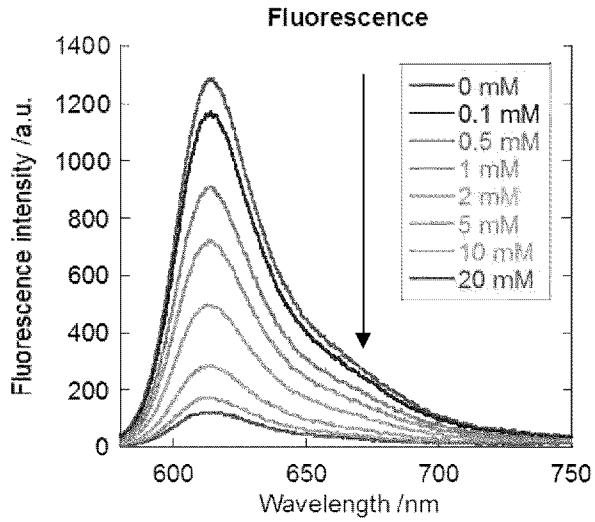
[請求項16] 前記－ＳＨ基を含有する化合物が、システイン残基を有する化合物である、請求項１５に記載のキット。

[請求項17] 前記－ＳＨ基を含有する化合物が、グルタチオンである、請求項１５に記載のキット。

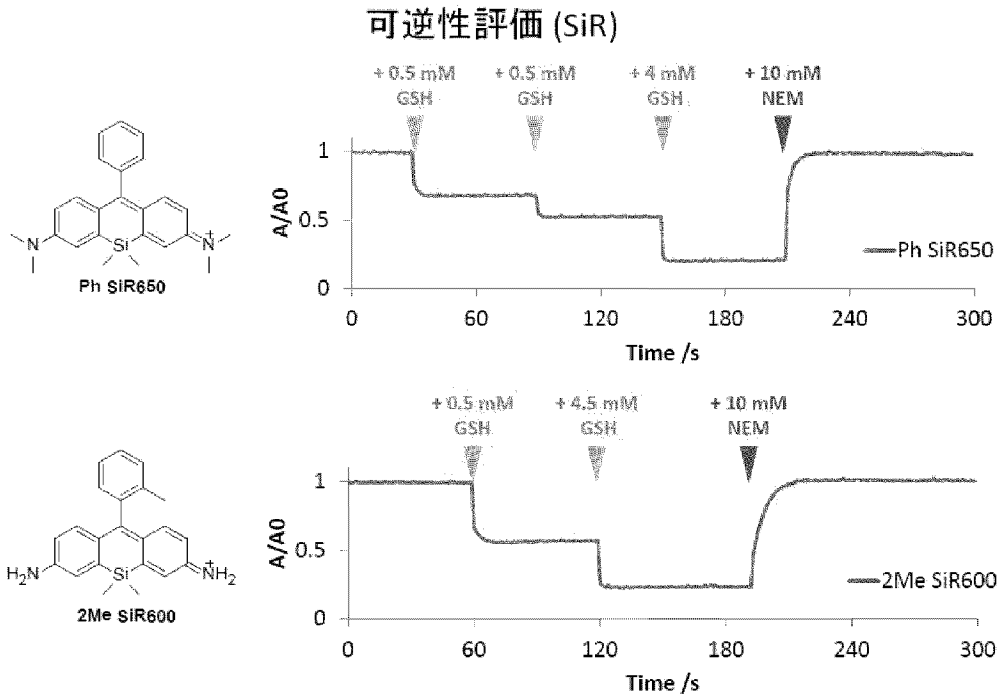
[図1]


Absorption
Absorbance
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
500
550
600
650
Wavelength /nm
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
1 mM
2 mM
5 mM
10 mM
20 mM

[図2]


Fluorescence
Fluorescence intensity /a.u.
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
600
650
700
750
Wavelength /nm
0 mM
0.1 mM
0.5 mM
1 mM
2 mM
5 mM
10 mM
20 mM

[図3]



[図4]

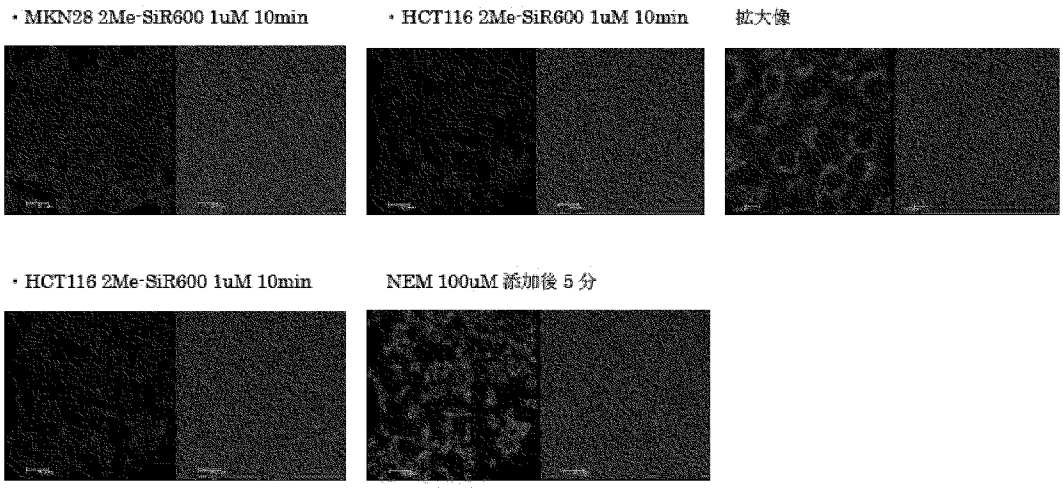
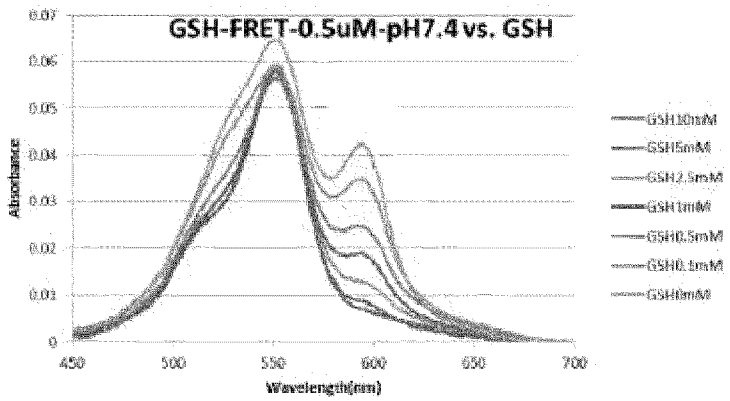


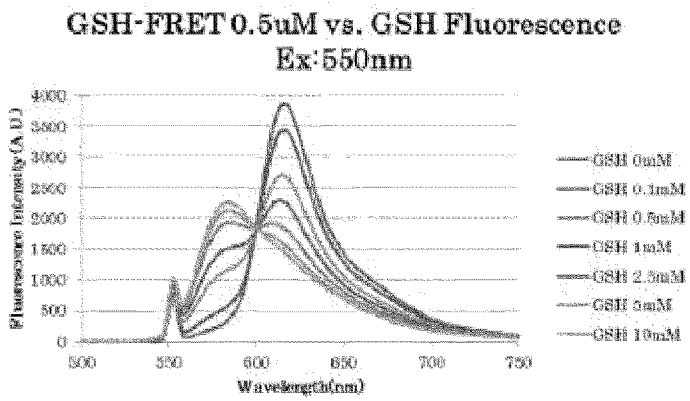
図 3. 2Me-SiR600 による癌培養細胞の共焦点顕微鏡画像

(使用機器：Leika SP5 WhiteLaser-100%-10%-Gain600V Ex-600nm Em-620-650nm)

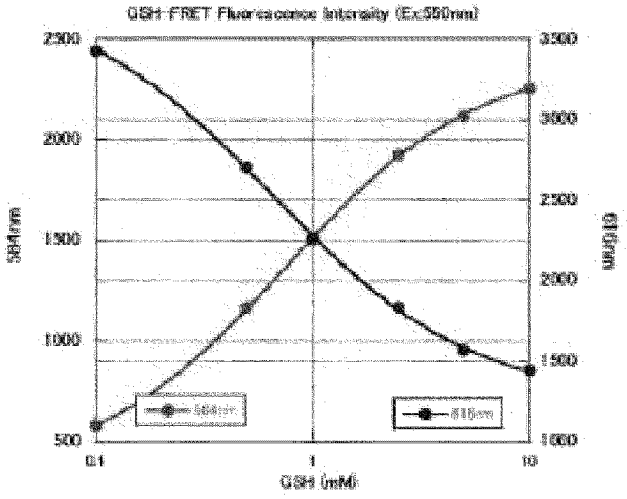
[図5]



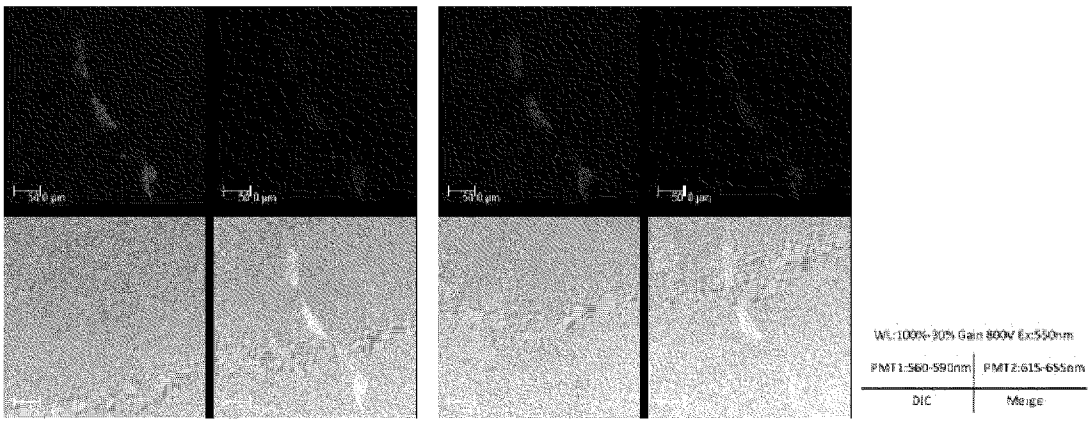
[図6]



[図7]

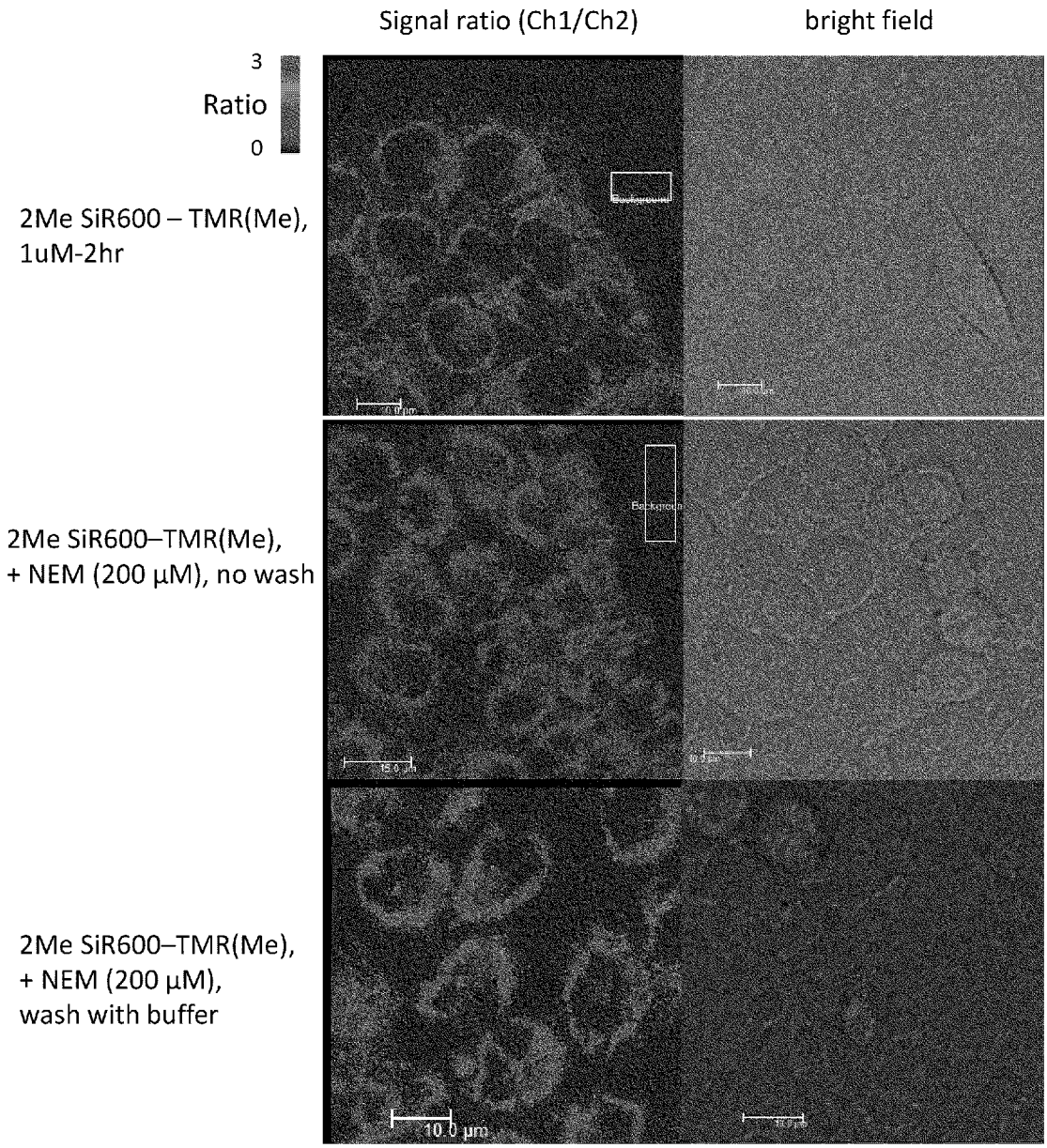


[図8]



OSC-19 OSC-19 NEM 200uM 添加後 10 分

[図9]


Signal ratio (Ch1/Ch2)
bright field
3
Ratio
0
2Me SiR600 – TMR(Me), 1uM-2hr
2Me SiR600–TMR(Me), + NEM (200 μM), no wash
2Me SiR600–TMR(Me), + NEM (200 μM), wash with buffer
10.0 μm
Cell:HCT116
WL-100%-30% Gain800V
Ex550nm Ch1: 560-590nm
Ch2: 615-645nm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/055276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/68(2006.01)i, *G01N21/64*(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, G01N21/64

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2012/111818 A1 (The University of Tokyo), 23 August 2012 (23.08.2012), claims 1, 3, 4, 8; paragraphs [0009], [0077] & US 2014/0342384 A1	1-5,9-17 6-8
A	WO 2005/085811 A1 (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 15 September 2005 (15.09.2005), claims; paragraph [0036] & JP 5090731 B2 & US 2008/0249321 A1 & EP 1731898 A1	1-17
A	CN 101093222 A (Shandong Normal University), 26 December 2007 (26.12.2007), claims; page 4, Background; page 5, scheme (Family: none)	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 May 2015 (07.05.15)	19 May 2015 (19.05.15)
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/JP2015/055276

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 2013/180181 A1 (The University of Tokyo), 05 December 2013 (05.12.2013), claims & JP 2014-50396 A	1-17
A	WO 2009/107448 A1 (Riken, Japan), 03 September 2009 (03.09.2009), claims & JP 5585960 B2 & US 2011/0111446 A1 & EP 2258692 A1	1-17
P,X	WO 2014/106957 A1 (The University of Tokyo), 10 July 2014 (10.07.2014), claim 1; paragraphs [0113], [0297] (Family: none)	1-5,9-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０５５２７６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

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

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/68, G01N21/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

CAplus/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2012/111818 A1 (国立大学法人 東京大学) 2012.08.23, 請求項 1,3,4,8,[0009][0077] & US 2014/0342384 A1	1-5,9-17 6-8
A	WO 2005/085811 A1 (第一化学薬品株式会社) 2005.09.15, 特許請求の範囲, [0036] & JP 5090731 B2 & US 2008/0249321 A1 & EP 1731898 A1	1-17
A	CN 101093222 A (山东师范大学) 2007.12.26, 特許請求の範囲,第４頁背景，第５頁スキーム（ファミリーなし）	1-17

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

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

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

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

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

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

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０７．０５．２０１５	１９．０５．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　９５１５
伊藤　裕美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

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	WO 2013/180181 A1 (国立大学法人 東京大学) 2013.12.05, 特許請求の範囲 & JP 2014-50396 A	1-17
A	WO 2009/107448 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2009.09.03, 特許請求の範囲 & JP 5585960 B2 & US 2011/0111446 A1 & EP 2258692 A1	1-17
P, X	WO 2014/106957 A1 (国立大学法人 東京大学) 2014.07.10, 請求項 1, [0113][0297] (ファミリーなし)	1-5, 9-17