

(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  
2010年8月12日(12.08.2010)

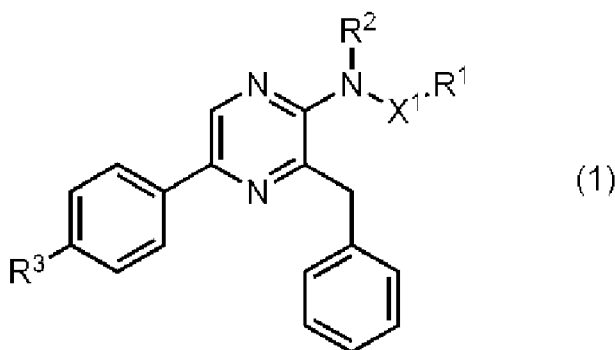
(10) 国際公開番号  
WO 2010/090318 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07D 241/20 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051806
- (22) 国際出願日: 2010年2月8日(08.02.2010)
- (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 2009-027904 2009年2月9日(09.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):  
チッソ株式会社 (CHISSO CORPORATION)  
[JP/JP]; 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目3番23号 Osaka (JP). 国立大学法人東京工業大学(TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 細谷 孝充 (HOSOYA Takamitsu) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP). 岡 光平 (OKA Kohei) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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,

[続葉有]

(54) Title: COELENTERAMIDE ANALOGS

(54) 発明の名称: セレンテラミド類縁体



(57) Abstract: There has been a need for coelenteramide analogs or the like that produce fluorescent proteins which exhibit fluorescent characteristics different from those of existing fluorescent proteins. Disclosed is a compound represented by general formula (1) [wherein R<sup>1</sup> represents a substituted or unsubstituted aryl, a substituted or unsubstituted arylalkyl, a straight-chain or branched alkyl optionally substituted by an alicyclic group, an alicyclic group or a heterocyclic group; R<sup>2</sup> represents hydrogen or - (SO<sub>2</sub>)R<sup>4</sup> (wherein R<sup>4</sup> represents a substituted or unsubstituted aryl, a substituted or unsubstituted arylalkyl or a straight-chain or branched alkyl optionally substituted by an alicyclic group); R<sup>3</sup> represents hydrogen, a hydroxyl group, methoxy or acetoxy; and X<sup>1</sup> represents -C(=S)- or -SO<sub>2</sub>-].

(57) 要約: 従来のもとは異なる蛍光特性を示す蛍光蛋白質を製造するためのセレンテラミド類縁体等が求められていた。一般式(1)で表わされる化合物(式中、R

[続葉有]

WO 2010/090318 A1



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

---

<sup>1</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、脂肪族環式基、又は複素環式基であり、R<sup>2</sup>は、水素、又は-(SO<sub>2</sub>)R<sup>4</sup>であり、R<sup>3</sup>は、水素、水酸基、メトキシ、又はアセトキシであり、R<sup>4</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、又は脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキルであり、X<sup>1</sup>は、-C(=S)-、又は-SO<sub>2</sub>-である。)

## 明 細 書

### 発明の名称：セレンテラミド類縁体

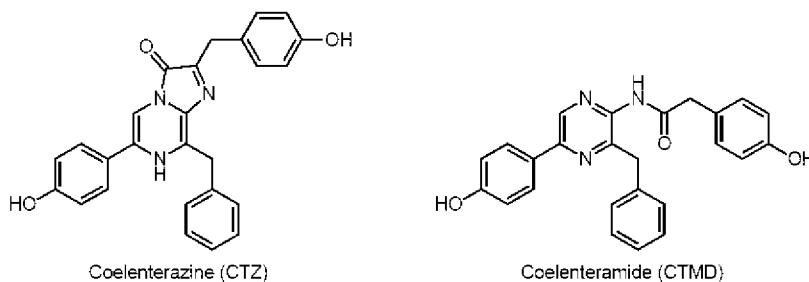
#### 技術分野

[0001] 本発明は、セレンテラミド類縁体、及びそのセレンテラミド類縁体を含む蛍光蛋白質等に関する。

#### 背景技術

[0002] セレンテラミド (CTMD) は、セレンテラジンの酸化生成物である。腔腸動物由来のカルシウム結合型蛍光蛋白質の発光過程や、ウミシイタケ (Renilla) やガウシア (Gaussia) などのセレンテラジン (CTZ) 系ルシフェラーゼによる発光過程において生成する。

[0003] [化1]

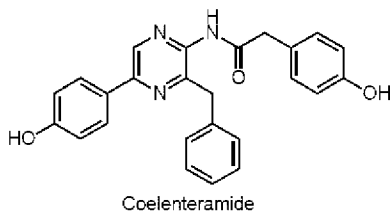


[0004] カルシウム結合型蛍光蛋白質は、 $\text{Ca}^{2+}$ と特異的に結合し瞬間的に発光する発光蛋白質であり、セレンテラジンのペルオキシドとアポ蛋白質の複合体から構成されている(非特許文献1. Head, J. F. et al. (2000) Nature 405: 372-376)。このようなカルシウム結合型蛍光蛋白質の中で、代表的な発光蛋白質は発光オワンクラゲ由来のイクオリンである。イクオリンの他に、オベリン、マイトロコミン、クライティン-I、及びクライティン-II等が知られている。その発光機構は、基本的に同じと考えられている。 $\text{Ca}^{2+}$ 添加により発光反応したイクオリン溶液は、青色の蛍光を発することから、CTZの酸化生成物であるCTMDとアポイクオリン- $\text{Ca}^{2+}$ との複合体が形成される推定され、その複合体は、BFP (Blue Fluorescent Protein) と呼ばれていた。近年、BFPは、

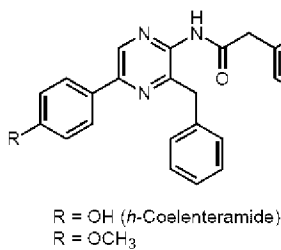
組換えイクオリンより定量的に調製する方法が確立された（非特許文献2及び3：Inouye, S. (2004) FEBS Lett. 577:105–110, Inouye, S. and Sasaki, S (2006) FEBS Lett. 580: 1977–1982）。BFPは、熱安定性を有する蛍光蛋白質であり、しかも、GTZを基質としてルシフェラーゼ活性を有することも証明された。一方、キレート剤を添加し、アポイクオリン-Ca<sup>2+</sup>からCa<sup>2+</sup>を取り除くことにより、緑色様蛍光蛋白質 (gFP) が生成することも示された。さらに、このgFPにGTZを添加することによる、発光能をもつイクオリンへの再生法も確立された。発光能をもち且つルシフェラーゼ活性を有する蛋白質は、BFPのみであり、イクオリンへ再生できることから、細胞生物学の領域でレポーター蛋白質として用いられる可能性があり、注目されている。

[0005] ここで、非特許文献4-21には、下記の蛍光性セレンテラミド関連化合物が開示されている。

[0006] [化2]

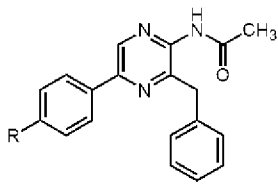


[0007] [化3]



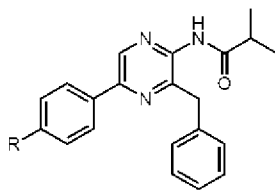
[0008]

[化4]



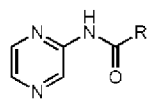
R = OH (Coelenteracetamide)  
 R = OCH<sub>3</sub>  
 R = H  
 R = F  
 R = CF<sub>3</sub>  
 R = N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

[0009] [化5]



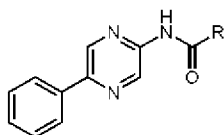
R = OCH<sub>2</sub>Ph  
 R = OH  
 R = H

[0010] [化6]



R = methyl or benzyl

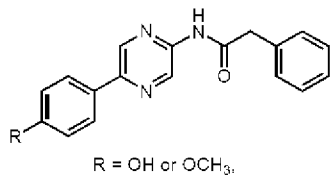
[0011] [化7]



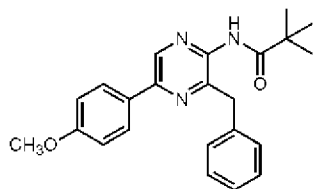
R = methyl or benzyl

[0012]

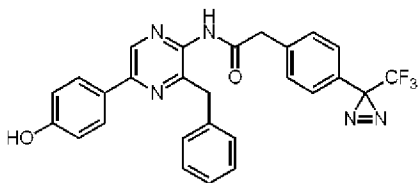
[化8]



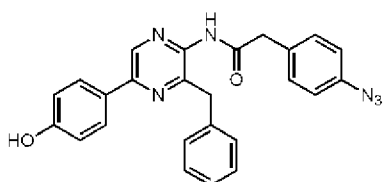
[0013] [化9]



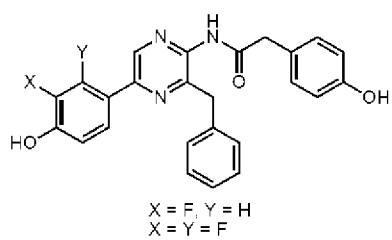
[0014] [化10]



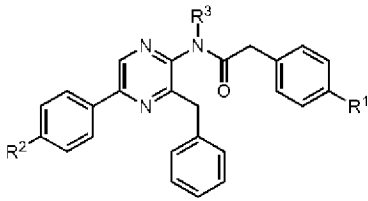
[0015] [化11]



[0016] [化12]

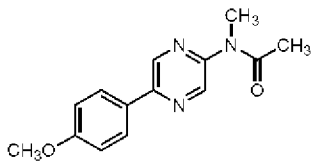


[0017] [化13]

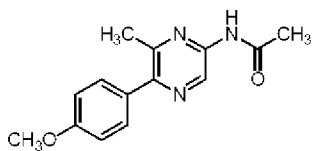


$R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OCH}_3, R^3 = \text{H}$   
 $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OH}, R^3 = \text{CH}_3$

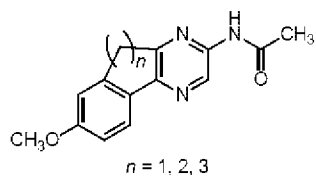
[0018] [化14]



[0019] [化15]

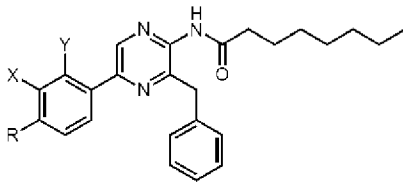


[0020] [化16]



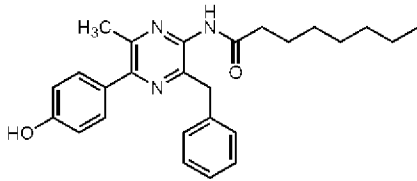
[0021]

[化17]

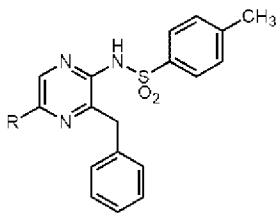


R = OH, X = H, Y = H  
 R = OCH<sub>3</sub>, X = H, Y = H  
 R = OH, X = F, Y = H  
 R = OH, X = H, Y = F  
 R = OH, X = F, Y = F

[0022] [化18]

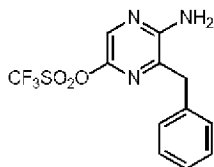


[0023] [化19]



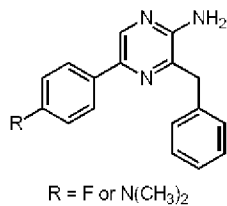
R = OH or OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>

[0024] [化20]



[0025]

[化21]



[0026] また、非特許文献4-21には、前記したセレンテラミド関連化合物の構造とそれらの蛍光特性が開示されている。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0027] 特許文献1：国際公開第W02005/014633号パンフレット

### 非特許文献

[0028] 非特許文献1：Head, J. F. et al. Nature 405, 372-376 (2000)

非特許文献2：Inouye, S. FEBS Lett. 577, 105-110 (2004)

非特許文献3：Inouye, S. and Sasaki, S. FEBS Lett. 580, 1977-1982 (2006)

非特許文献4：O. Shimomura, F. H. Johnson, Tetrahedron Lett., 31, 2963 (1973).

非特許文献5：K. Hori, J. E. Wampler, J. C. Matthews, M. J. Cormier, Biochemistry, 12, 4463 (1973).

非特許文献6：F. McCapra, M. J. Manning, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 467 (1973).

非特許文献7：K. Hori, J. E. Wampler, M. J. Cormier, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 492 (1973).

非特許文献8：K. Teranishi, T. Goto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 63, 3132 (1990).

非特許文献9：T. Hirano, Y. Gomi, T. Takahashi, K. Kitahara, C. F.

Qi, I. Mizogushi, S. Kyushin, M. Ohashi, *Tetrahedron Lett.*, 33, 5771 (1992).

非特許文献10 : K. Teranishi, K. Ueda, H. Nakao, M. Hisamatsu, T. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, 35, 8181 (1994).

非特許文献11 : F. Q. Chen, J. L. Zheng, T. Hirano, H. Niwa, Y. Ohmiya, M. Ohashi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2129 (1995).

非特許文献12 : R. Saito, T. Hirano, H. Niwa, M. Ohashi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1711 (1997).

非特許文献13 : K. Teranishi, M. Hisamatsu, T. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, 38, 2689 (1997).

非特許文献14 : T. Hirano, Y. Ohmiya, S. Maki, H. Niwa, M. Ohashi, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5541 (1998).

非特許文献15 : F. Q. Chen, J. L. Zheng, T. Hirano, Y. Ohmiya, S. Maki, H. Niwa, M. Ohashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 73, 465 (2000).

非特許文献16 : O. Shimomura, K. Teranishi, *Luminescence*, 15, 51 (2000).

非特許文献17 : K. Teranishi, *Luminescence*, 16, 367 (2001).

非特許文献18 : Y. Imai, T. Shibata, S. Maki, H. Niwa, M. Ohashi, T. Hirano, *J. Photochem. Photobiol., A*, 146, 95 (2001).

非特許文献19 : M. Kuse, N. Kondo, Y. Ohyabu, M. Isobe, *Tetrahedron*, 60, 835 (2004).

非特許文献20 : N. Kondo, M. Kuse, T. Mutarapat, N. Thasana, M. Isobe, *Heterocycles*, 65, 843 (2005).

非特許文献21 : K. Mori, S. Maki, H. Niwa, H. Ikeda, T. Hirano, *Tetrahedron*, 62, 6272 (2006).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0029] 上記状況において、従来のもとは異なる蛍光特性を示すセレンテラミド類

縁体、及びそのようなセレンテラミド類縁体を含有する蛍光蛋白質等が求められていた。

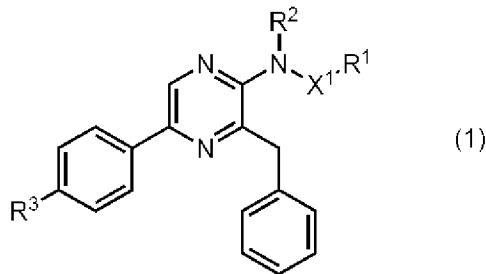
### 課題を解決するための手段

[0030] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、特定のチオアミド系セレンテラミド類縁体、及び特定のスルホンアミド系セレンテラミド類縁体が、従来のもとは異なる蛍光特性を示すことなどを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下に示す、セレンテラミド類縁体、及び蛍光蛋白質などを提供する。

[0031] (1) 下記一般式(1)

[化22]



で表わされる化合物

(式中、

R<sup>1</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、脂肪族環式基、又は複素環式基であり、

R<sup>2</sup>は、水素、又は-(SO<sub>2</sub>)R<sup>4</sup>であり、

R<sup>3</sup>は、水素、水酸基、メトキシ、又はアセトキシであり、

R<sup>4</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、又は脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキルであり、

X<sup>1</sup>は、-C(=S)-、又は-SO<sub>2</sub>-である。)

(2) 一般式 (1) において、

R<sup>1</sup>は、フェニル、p-メチルフェニル、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、フェニルエチル、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシル、又はチオフェン-2-イルであること、

を特徴とする、上記 (1) に記載の化合物。

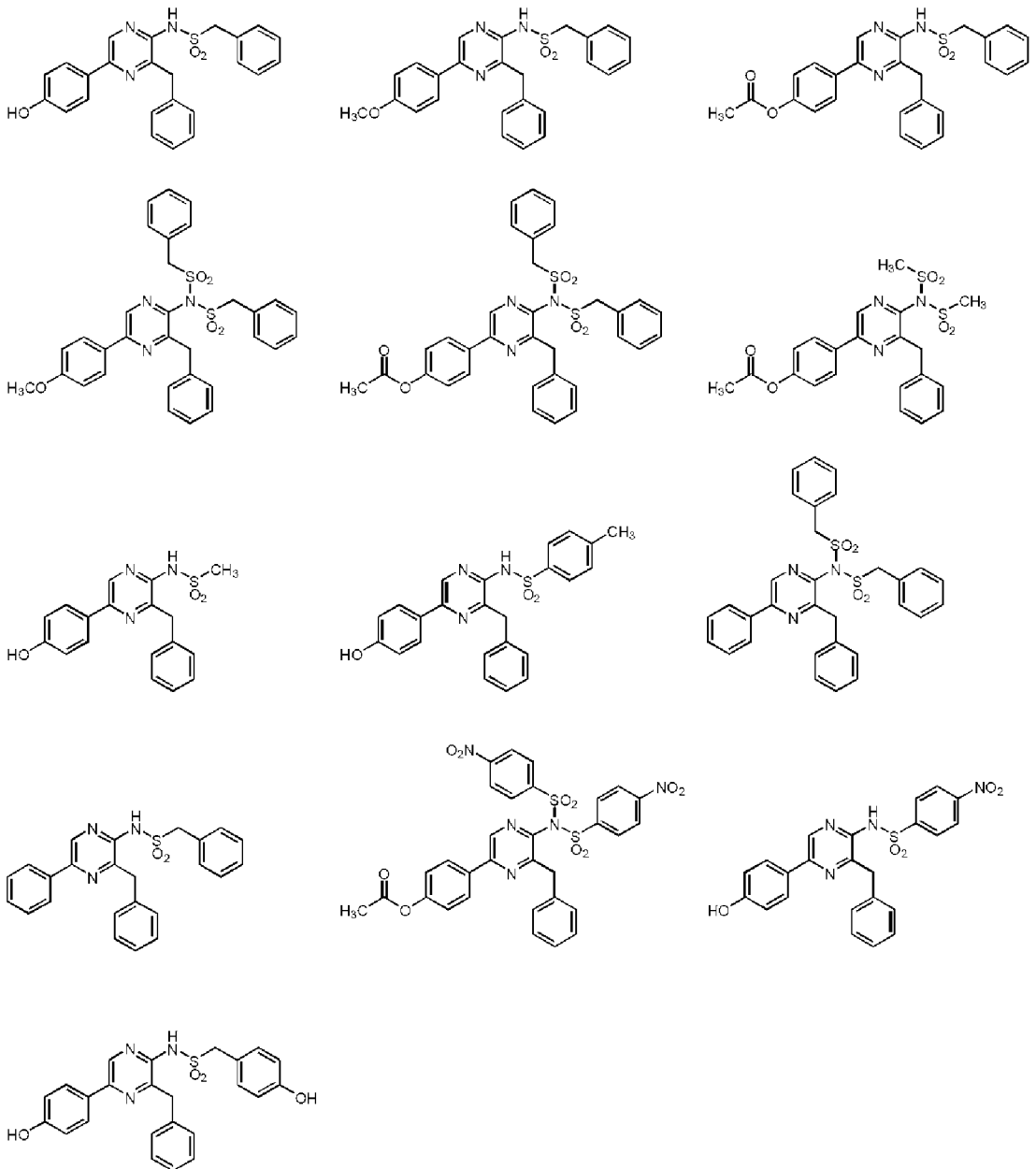
(3) 一般式 (1) において、

R<sup>2</sup>は、水素、ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニル、4-ヒドロキシフェニルスルホニル、4-メトキシフェニルスルホニル、4-アセトキシフェニルスルホニル、4-ニトロフェニルスルホニル、ベンジルスルホニル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジルスルホニル、4-メチルベンジルスルホニル、4-ヒドロキシベンジルスルホニル、4-メトキシベンジルスルホニル、4-アセトキシベンジルスルホニル、4-ニトロベンジルスルホニル、フェニルエチルスルホニル、メタンスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、2-メチルプロピルスルホニル、2-メチルプロパニルスルホニル、シクロヘキシルメチルスルホニル、シクロヘキシルエチルスルホニル、アダマンチルメチルスルホニル、又はシクロペンチルメチルスルホニルであること、

を特徴とする、上記 (1) 又は (2) に記載の化合物。

(4) 下記化合物

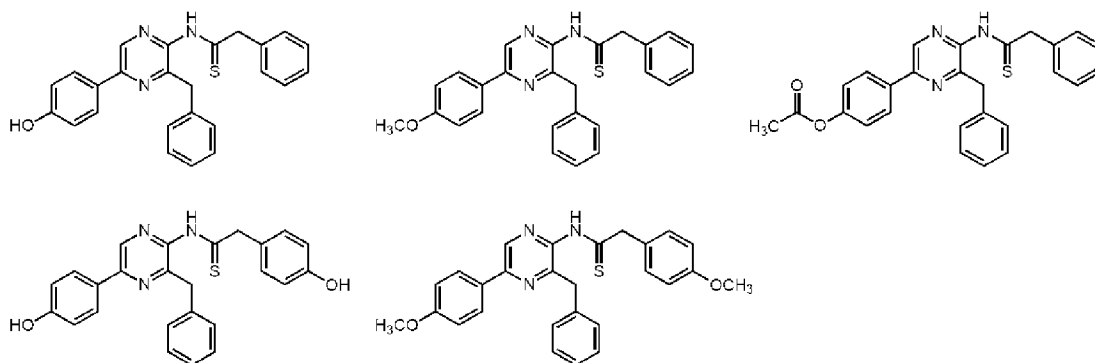
[化23]



からなる群から選択される、上記（１）～（３）のいずれか１項に記載の化合物。

（５）下記化合物

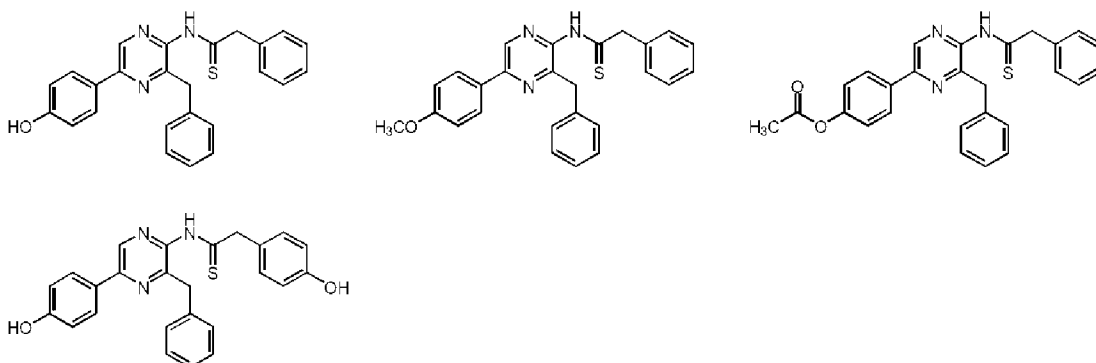
## [化24]



からなる群から選択される、上記（１）～（３）のいずれか１項に記載の化合物。

（５a）下記化合物

## [化25]



からなる群から選択される、上記（１）～（３）のいずれか１項に記載の化合物。

（６）上記（１）～（５a）のいずれか１項に記載の化合物、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質、及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な２価若しくは３価のイオンを含む、青色蛍光蛋白質。

（７）カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な２価若しくは３価のイオンの存在下、上記（１）～（５a）のいずれか１項に記載の化合物と、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とを反応させることを含む、

青色蛍光蛋白質の製造方法。

(8) 前記反応を、還元剤の存在下において行う、上記(7)に記載の方法。

(9) 上記(1)～(5a)のいずれか1項に記載の化合物、及びカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質を含む、緑色蛍光蛋白質。

(10) 上記(6)に記載の青色蛍光蛋白質を、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤で処理することを含む、緑色蛍光蛋白質の製造方法。

(11) 上記(9)に記載の緑色蛍光蛋白質に、セレンテラジン又はその類縁体を反応させることを含む、カルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

(12) 蛍光蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体との反応を、還元剤の存在下において行う、上記(11)に記載の方法。

### 発明の効果

[0032] 本発明のいくつかの態様のセレンテラミド類縁体は、従来のものと異なる蛍光特性を示す。本発明の好ましい態様のセレンテラミド類縁体は、水溶媒中で比較的高い蛍光能を示す。

### 図面の簡単な説明

[0033] [図1]セレンテラミドからBFP、gFP及びイクオリンなどを製造するためのスキームを示す図である。

[図2]最終濃度30  $\mu$ Mセレンテラミド類縁体のメタノール中での蛍光スペクトルを示す図である(実施例2)。

[図3]最終濃度30  $\mu$ Mセレンテラミド類縁体のリン酸緩衝液中での蛍光スペクトルを示す図である(実施例2)。

[図4]最終濃度18  $\mu$ Mのc-38化合物(GTSD)の10 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む50 mM Tris-HCl (pH7.6)中での蛍光スペクトルを示す図である(実施例3)。

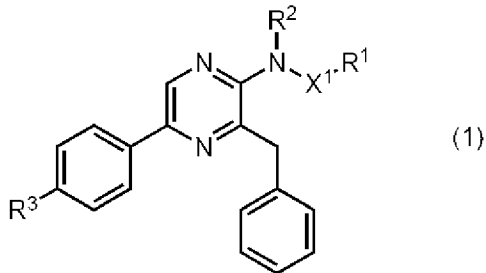
### 発明を実施するための形態

[0034] 以下、本発明について詳細に説明する。

#### 1. セレンテラミド類縁体

本発明は、下記一般式（１）で表わされる化合物（本発明のセレンテラミド類縁体）を提供する。

[0035] [化26]



（式中、

R<sup>1</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、脂肪族環式基、又は複素環式基であり、

R<sup>2</sup>は、水素、又は－（SO<sub>2</sub>）R<sup>4</sup>であり、

R<sup>3</sup>は、水素、水酸基、メトキシ、又はアセトキシであり、

R<sup>4</sup>は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、又は脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキルであり、

X<sup>1</sup>は、－C（＝S）－、又は－SO<sub>2</sub>－である。）。

[0036] R<sup>1</sup>の「置換若しくは非置換のアリール」は、例えば１～５個の置換基を有するアリール、又は非置換のアリールである。置換基としては、例えば、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素など）、水酸基、炭素数１～６個のアルキル、炭素数１～６個のアルコキシル、アミノ、及び炭素数１～６個のジアルキルアミノなどからなる群から選択される少なくとも１つが挙げられる。本発明のいくつかの態様では、置換基は水酸基である。「置換若しくは非置換のアリール」は、具体的には、フェニル、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、p-ニトロフェニル、p-アミノフェニル、又はp-ジメチルアミノフェニルなどであり、好まし

くは、フェニル、*p*-ヒドロキシフェニル、*p*-メトキシフェニル、*p*-アセトキシフェニル、又は*p*-ニトロフェニルなどである。本発明のいくつかの態様では、「置換若しくは非置換のアリール」は、置換のアリールであり、例えば、*p*-ヒドロキシフェニル、*p*-メトキシフェニル、*p*-アセトキシフェニル、又は*p*-ニトロフェニルなどである。

[0037] R<sup>1</sup>の「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、例えば1~5個の置換基を有するアリールアルキル、又は非置換のアリールアルキルである。置換基としては、例えば、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素など）、水酸基、炭素数1~6個のアルキル、炭素数1~6個のアルコキシル、アミノ、又は炭素数1~6個のジアルキルアミノなどが挙げられる。「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、例えば、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、フェニルエチル4-ヒドロキシベンジル、又は4-ジメチルアミノベンジルなどであり、好ましくは、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、又はフェニルエチルなどである。本発明のいくつかの態様では、「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、水酸基で置換されたアリールアルキルであり、例えば、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、又は4-ヒドロキシベンジルなどである。本発明の別の態様では、「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、非置換のアリールアルキルであり、例えば、ベンジル、又はフェニルエチルなどである。

[0038] R<sup>1</sup>の「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、非置換の直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、又は例えば1~10個の脂肪族環式基によって置換された直鎖若しくは分枝鎖のアルキルである。脂肪族環式基としては、例えば、シクロヘキシル、シクロペンチル、アダマンチル、シクロブチル、又はシクロプロピルなどが挙げられる。好ましくは、脂肪族環式基は、シクロヘキシル、シクロペンチル、又はアダマンチ

ルなどである。「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロブチルメチル、又はシクロプロピルメチルなどであり、好ましくは、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、又はシクロペンチルメチルなどである。本発明のいくつかの態様では、「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキルであり、例えば、メチル、エチル、プロピル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルメチル、又はシクロヘキシルエチルなどである。

[0039] R<sup>1</sup>の「脂肪族環式基」は、例えば、シクロヘキシル、シクロペンチル、アダマンチル、シクロブチル、又はシクロプロピルなどが挙げられる。好ましくは、脂肪族環式基は、シクロヘキシルなどである。

[0040] R<sup>1</sup>の「複素環式基」は、環を構成する原子として炭素以外にN、O、及びSからなる群から選択される1~3個の原子を含む例えば5~7員環であって炭素を介して結合する基、又は2つ以上のそのような環が縮環したものであって炭素を介して結合する基、若しくは、そのような環とベンゼン環が縮環したものであって炭素を介して結合する基である。「複素環式基」は、例えば、チオフェン-2-イル、2-フラニル、又は4-ピリジルなどである。本発明のいくつかの態様では、「複素環式基」は、硫黄を含む複素環式基であり、例えば、チオフェン-2-イルである。

[0041] 本発明の好ましい態様によれば、R<sup>1</sup>は、フェニル、p-メチルフェニル、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、フェニルエチル、メチル、エチル、プロピ

ル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシル、又はチオフェン-2-イルなどである。本発明のさらに好ましい態様によれば、R<sup>1</sup>は、p-メチルフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、又はメチルなどである。

[0042] R<sup>2</sup>の「-(SO<sub>2</sub>)R<sup>4</sup>」において、R<sup>4</sup>の「置換若しくは非置換のアリール」は、例えば1~5個の置換基を有するアリール、又は非置換のアリールである。置換基としては、例えば、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素など）、水酸基、炭素数1~6個のアルキル、炭素数1~6個のアルコキシル、アミノ、及び炭素数1~6個のジアルキルアミノなどからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。本発明のいくつかの態様では、置換基は水酸基である。「置換若しくは非置換のアリール」は、具体的には、フェニル、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、p-ニトロフェニル、p-ヒドロキシベンジル、又はp-ジメチルアミノベンジルなどであり、好ましくは、フェニル、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、又はp-ニトロフェニルなどである。本発明のいくつかの態様では、「置換若しくは非置換のアリール」は、置換のアリールであり、例えば、p-ヒドロキシフェニル、p-メトキシフェニル、p-アセトキシフェニル、又はp-ニトロフェニルなどである。

[0043] R<sup>4</sup>の「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、例えば1~6個の置換基を有するアリールアルキル、又は非置換のアリールアルキルである。置換基としては、例えば、ハロゲン（フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素など）、水酸基、炭素数1~6個のアルキル、炭素数1~6個のアルコキシル、アミノ、及び炭素数1~6個のジアルキルアミノなどが挙げられる。「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、例えば、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、フェニルエチル、

4-ヒドロキシベンジル、又は4-ジメチルアミノベンジルなどであり、好ましくは、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、又はフェニルエチルなどである。本発明のいくつかの態様では、「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、水酸基で置換されたアリールアルキルであり、例えば、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、又は4-ヒドロキシベンジルなどである。本発明の別の態様では、「置換若しくは非置換のアリールアルキル」は、非置換のアリールアルキルであり、例えば、ベンジル、又はフェニルエチルなどである。

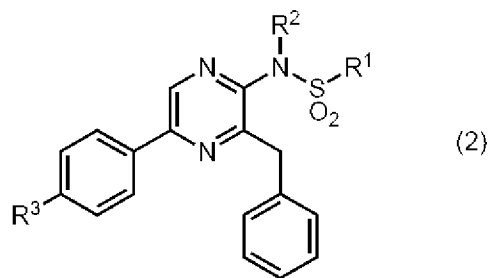
[0044]  $R^4$ の「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、非置換の直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、又は例えば1~10個の脂肪族環式基によって置換された直鎖若しくは分枝鎖のアルキルである。脂肪族環式基としては、例えば、シクロヘキシル、シクロペンチル、アダマンチル、シクロブチル、又はシクロプロピルなどが挙げられる。好ましくは、脂肪族環式基は、シクロヘキシル、シクロペンチル、又はアダマンチルなどである。「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロブチルメチル、又はシクロプロピルメチルなどであり、好ましくは、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、又はシクロペンチルメチルなどである。本発明のいくつかの態様では、「脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル」は、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖のアルキルであり、例えば、メチル、エチル、プロピル、アダマンチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルメチル、又はシクロヘキシルエチルなどである。

[0045] 本発明の好ましい態様によれば、 $R^2$ は、水素、ベンゼンスルホニル、 $p$ -

トルエンシルホニル、4-ヒドロキシフェニルシルホニル、4-メトキシフェニルシルホニル、4-アセトキシフェニルシルホニル、4-ニトロフェニルシルホニル、ベンジルシルホニル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジルシルホニル、4-メチルベンジルシルホニル、4-ヒドロキシベンジルシルホニル、4-メトキシベンジルシルホニル、4-アセトキシベンジルシルホニル、4-ニトロベンジルシルホニル、フェニルエチルシルホニル、メタンシルホニル、エチルシルホニル、プロピルシルホニル、2-メチルプロピルシルホニル、2-メチルプロパニルシルホニル、シクロヘキシルメチルシルホニル、シクロヘキシルエチルシルホニル、アダマンチルメチルシルホニル、又はシクロペンチルメチルシルホニルなどである。本発明のさらに好ましい態様によれば、 $R^2$ は、水素、ベンジルシルホニル、メタンシルホニル、又はニトロベンゼンシルホニルなどである。

[0046] 本発明のいくつかの態様によれば、一般式(1)で表わされる化合物は、下記一般式(2)で表わされる化合物(本発明のスルホンアミド系セレンテラミド)である。

[0047] [化27]

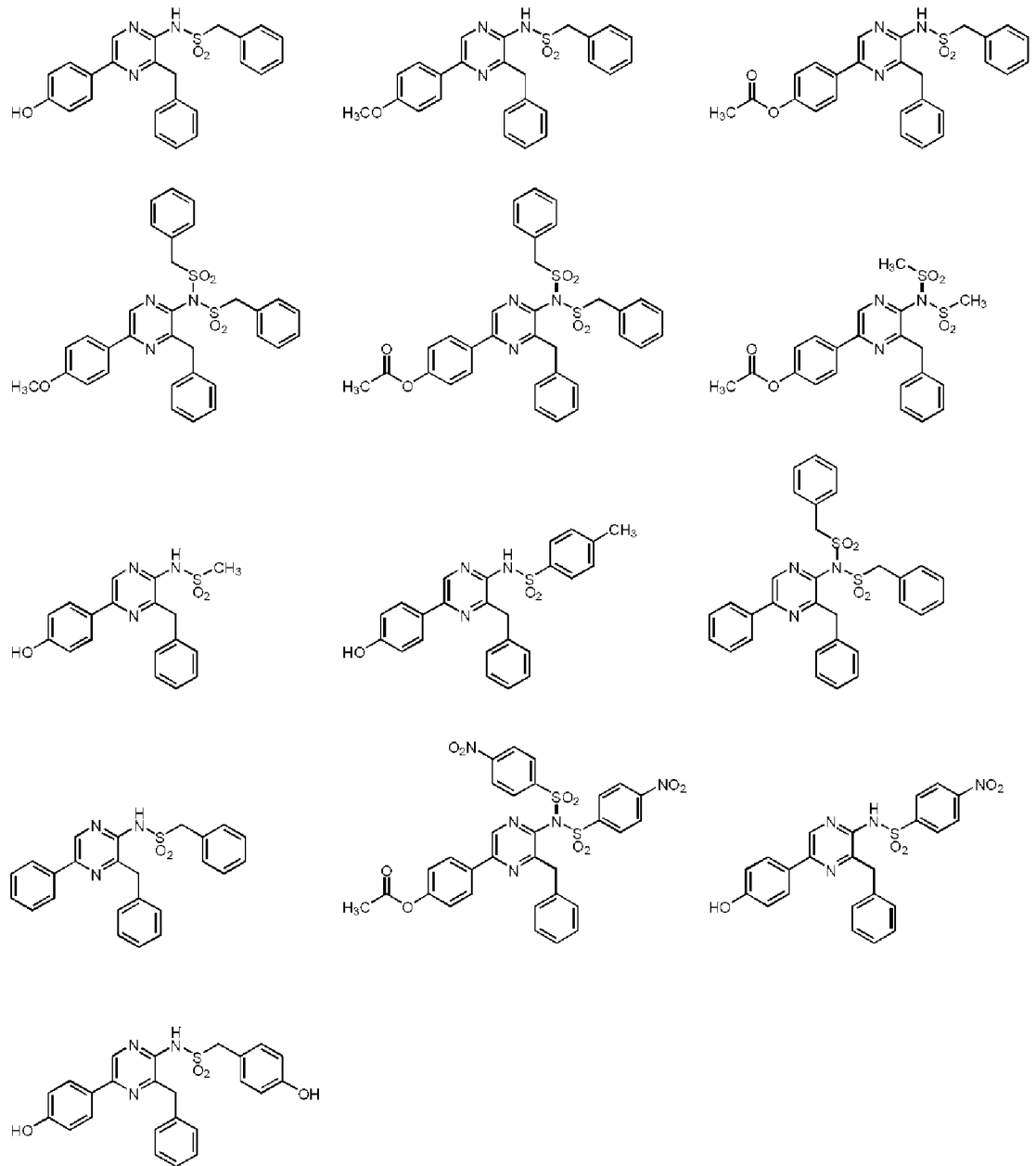


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、前記の通りである。)

[0048] 好ましくは、一般式(2)で表わされる化合物は、下記化合物からなる群から選択される化合物である。

[0049]

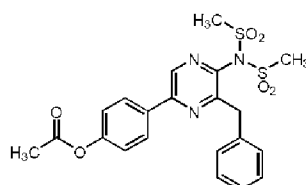
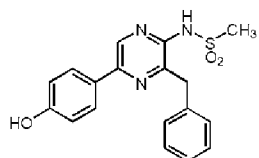
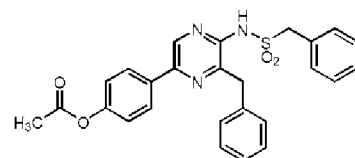
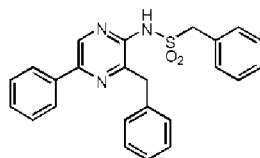
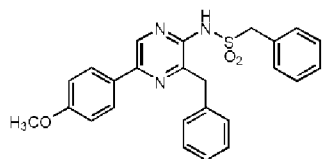
[化28]



[0050] より好ましくは、一般式（2）で表わされる化合物は、下記化合物からなる群から選択される化合物である。

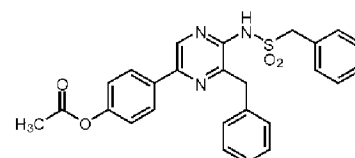
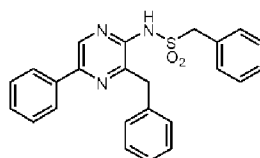
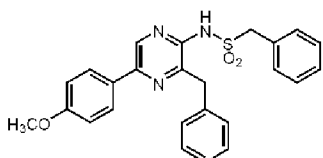
[0051]

[化29]



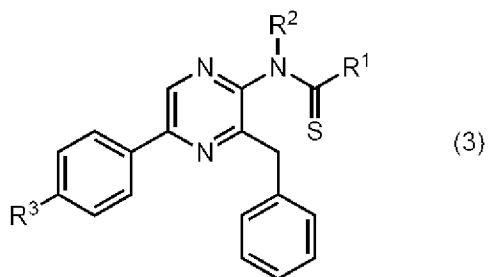
[0052] さらに好ましくは、一般式（2）で表わされる化合物は、下記化合物からなる群から選択される化合物である。

[0053] [化30]



[0054] 本発明の別の態様によれば、一般式（1）で表わされる化合物は、下記一般式（3）で表わされる化合物（本発明のチオアミド系セレンテラミド）である。

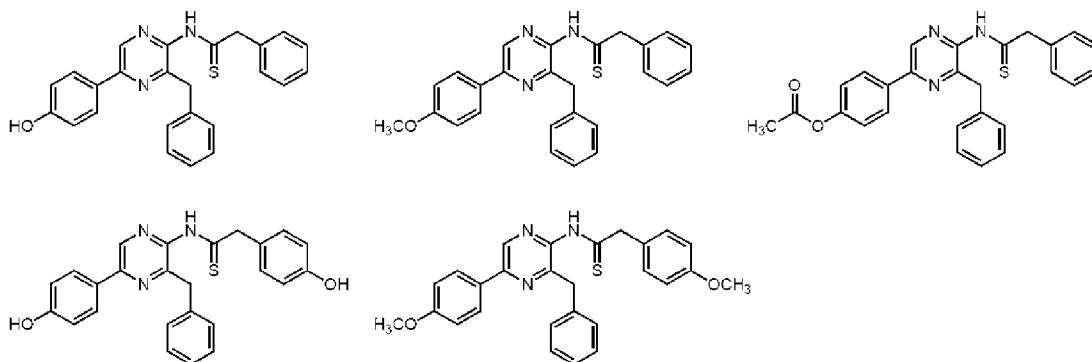
[0055] [化31]



（式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、前記の通りである。）

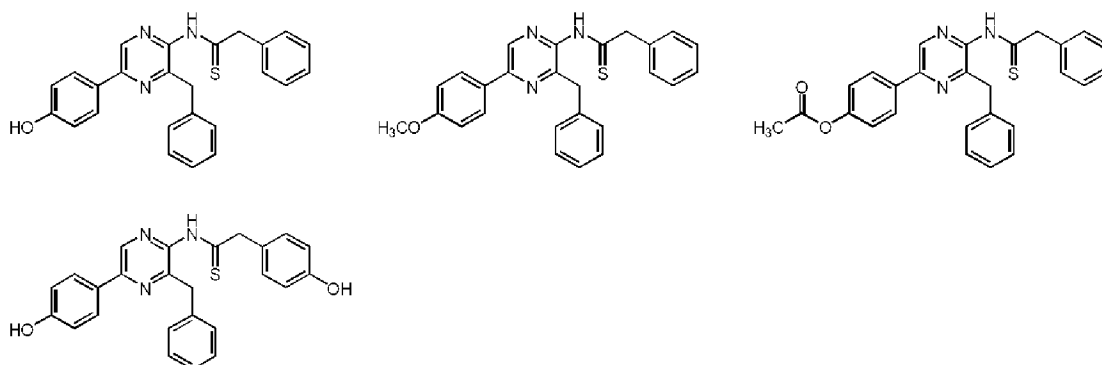
[0056] 好ましくは、一般式（3）で表わされる化合物は、下記式で表わされる化合物からなる群から選択される化合物である。

[0057] [化32]



[0058] さらに好ましくは、一般式（3）で表わされる化合物は、下記式で表わされる化合物からなる群から選択される化合物である。

[0059] [化33]



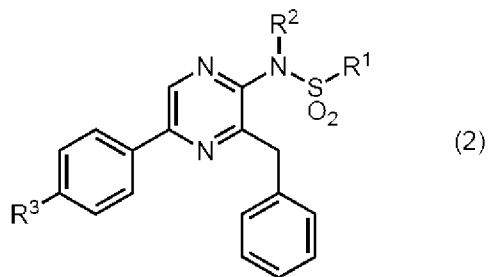
[0060] 2. セレンテラミド類縁体の製造方法

2. 1. スルホンアミド系セレンテラミド類縁体の製造方法

本発明のセレンテラミド類縁体のうち、下記一般式（2）で表わされるスルホンアミド系セレンテラミドの製造方法について説明する。

[0061]

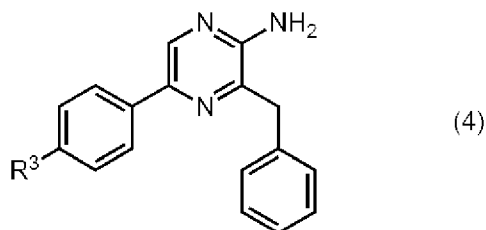
[化34]



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、及び $R^3$ は、前記の通りである。)

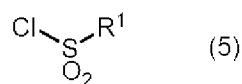
[0062] 一般式(2)で表わされるスルホンアミド系セレンテラミドは、例えば、  
一般式(4)

[化35]



で表わされる化合物(式中、 $R^3$ は、前記の通りである。)と、  
一般式(5)

[化36]



で表わされる化合物(式中、 $R^1$ は、前記の通りである。)を反応させること  
により、製造することができる。

[0063] 一般式(4)で表わされる化合物は、公知の製造方法で製造することがで  
きる。例えば、一般式(4)で表わされる化合物は、Kishi, Y. et al., Tet  
rahedron Lett., 13, 2747-2748 (1972)、又はAdamczyk, M. et al., Org.

Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法又はそれに準ずる方法で製造することができる。より具体的には、次のようにして、一般式(4)で表わされる化合物を製造することができる。すなわち、まず、4塩化チタンなどのルイス酸触媒を用いて置換フェニルグリオキサールアルドキシムとグリシノニトリル誘導体との環化反応を行い、ピラジンオキシドを形成した後、Raney Ni等を触媒として用いた接触水素還元により製造するか、又は2-アミノ-5-ブロモピラジン誘導体と置換フェニルホウ酸或は置換フェニルホウ酸ピナコールエステルとの鈴木-宮浦カップリング反応を行うことで製造できる。

[0064] 一般式(5)で表わされる化合物も、公知の製造方法で製造することができる、或いは、市販のものを入手することができる。具体的には、例えば、1) 対応する置換ベンジルスルホン酸又はその塩に対して過剰の塩化チオニルを作用させて加熱還流した後、減圧濃縮するか、又は、2) 対応する置換ベンジルスルホン酸又はその塩に対してジクロロメタンなどの溶媒中、触媒量のN、N-ジメチルホルムアミド(DMF)存在下、対応するカルボン酸に対して二塩化オキサリルをさせた後、減圧濃縮することにより、或いは3) 置換ベンジルGrignard試薬に対し塩化スルフリルを反応させるか、のいずれかの方法又はそれらに準ずる方法で製造することができる。また、ベンジルスルホニルクロリドは東京化成工業株式会社、和光純薬工業株式会社、関東化学株式会社、などから購入することができる。

[0065] ここで、一般式(2)で表わされる化合物の製造方法において使用される溶媒は、水系、又はアルコール類以外であればであれば特に限定されず、種々のものを使用できる。例えば、ピリジン、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、アセトン、トルエン、ジオキサン又はエーテル等であり、これらは単独で又は混合して使用することができる。

[0066] また、一般式(2)で表わされる化合物の製造方法において、反応温度及び反応時間は、特に限定されないが、例えば、-20℃~200℃で、0.

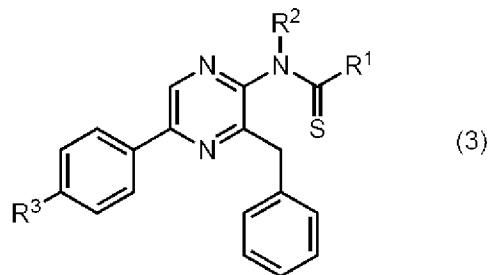
25時間～72時間、好ましくは、 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $100^{\circ}\text{C}$ で、0.5時間～36時間、より好ましくは、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ で、1時間～24時間である。

[0067] さらに、一般式(2)で表わされる化合物のうち $\text{R}^2=\text{H}$ である一部の化合物については、 $\text{R}^2=\text{SO}_2\text{R}^1$ である化合物、すなわちジスルホン酸アミド化合物のアルカリ加水分解を行い、一方のスルホン酸アミド結合のみを選択的に切断するか、又はそれに準ずる方法で製造することができる。

[0068] 2. 2. チオアミド系セレンテラミド類縁体

本発明のセレンテラミド類縁体のうち、下記一般式(3)で表わされるスルホンアミド系セレンテラミドの製造方法について説明する。

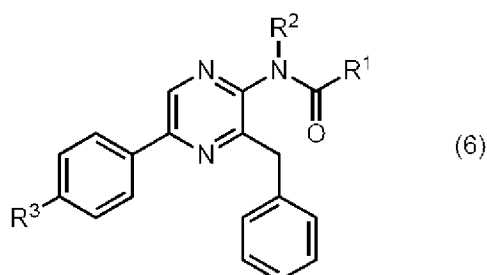
[0069] [化37]



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、及び $\text{R}^3$ は、前記の通りである。)

[0070] 一般式(3)で表わされるチオアミド系セレンテラミドは、例えば、  
一般式(6)

[化38]

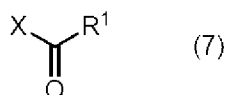


で表わされる化合物(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、及び $\text{R}^3$ は、前記の通りである。)に

、ローソン試薬、又は五硫化二リン（十硫化四リン）を反応させることにより、製造することができる。

[0071] 一般式（6）で表わされる化合物は、公知の製造方法で製造することができる。具体的には、例えば、一般式（4）で表わされる化合物、及び一般式（7）で表わされる酸ハライド又はその類縁体とを有機溶媒中、塩基の存在下、又は塩基性有機溶媒中で反応させる方法か、又はそれらに準ずる方法で製造することができる。

[0072] [化39]



（式中、R<sup>1</sup>は前記の通りであり、Xはハロゲン（例えば、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素）、又はR<sup>1</sup>C(=O)−である。）

[0073] ここで、一般式（3）で表わされる化合物の製造方法において使用される溶媒は、水系、又はアルコール類、ケトン類、エステル類以外であれば特に限定されず、種々のものを使用できる。例えば、トルエン、ベンゼン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、エーテル、ジクロロメタン、クロロホルム、又はピリジン等であり、これらは単独で又は混合して使用することができる。

[0074] また、一般式（3）で表わされる化合物の製造方法において、反応温度及び反応時間は、特に限定されないが、例えば、0℃～200℃で、0.5時間～72時間、好ましくは、室温～200℃で、1時間～48時間、より好ましくは、60℃～150℃で、2時間～24時間である。

[0075] 3. 蛍光蛋白質

図1に示すように、青色蛍光蛋白質（BFP）は、セレンテラミド又はその類縁体に、アポイクオリン等のアポ蛋白質を反応させることにより製造することができる。一方、緑色蛍光蛋白質（GFP）は、BFPを、EDTA等のカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去す

るためのキレート剤で処理することにより製造することができる。

[0076] 3. 1. 青色蛍光蛋白質 (BFP)

3. 1. 1. 青色蛍光蛋白質 (BFP) の製造方法

本発明の青色蛍光蛋白質 (BFP) は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質に、本発明のセレンテラミド類縁体が配位した複合体である。すなわち、本発明のBFPは、本発明のセレンテラミド類縁体、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質、及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを含む。BFPは、光の励起を受けて蛍光を発生することができるとともに、BFPとセレンテラジン又はその類縁体と接触させることで、発光を生じさせることもできる。

[0077] 本発明では、BFPを、本発明のセレンテラミド類縁体から次のように製造する。すなわち、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンの存在下、本発明のセレンテラミド類縁体（例えば、一般式(1)で表わされる化合物）、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質に反応させることで、BFPを製造する。

[0078] 本発明においてBFPを製造するのに用いる本発明のセレンテラミド類縁体は、前記で説明した通りである。本発明のセレンテラミド類縁体として、例えば、前記製造方法により製造した化合物を挙げるができる。

[0079] 本発明においてBFPを製造するのに用いるカルシウムイオンと置換可能な2価又は3価のイオンとは、カルシウムイオンに代えてカルシウム結合型発光蛋白質と反応させた場合に、発光反応を起こす2価又は3価のイオンのことである。つまり、カルシウム結合型発光蛋白質に対して、カルシウムイオンと同等の作用をするものである。カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価又は3価のイオンは、例えば、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ )、マグネシウムイオン ( $\text{Mg}^{2+}$ )、ストロンチウムイオン ( $\text{Sr}^{2+}$ )、バリウムイオン ( $\text{Ba}^{2+}$ )、鉛イオン ( $\text{Pb}^{2+}$ )、コバルトイオン ( $\text{Co}^{2+}$ )、ニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ )、カドミウムイオン ( $\text{Cd}^{2+}$ )、イットリウムイオン ( $\text{Y}^{3+}$ )、ランタンイオン ( $\text{La}^{3+}$ )、サマリウムイオン ( $\text{Sm}^{3+}$ )、ユ

ウロピウムイオン ( $\text{Eu}^{3+}$ )、ジスプロシウムイオン ( $\text{Dy}^{3+}$ )、ツリウムイオン ( $\text{Tm}^{3+}$ )、又はイットリビウムイオン ( $\text{Yb}^{3+}$ ) 等を挙げることができる。これらのうち、2価の金属イオンが好ましい。より好ましくは遷移金属以外の2価の金属イオン、例えば  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、又は  $\text{Pb}^{2+}$  等である。

[0080] 本発明においてBFPを製造するのに用いるカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質は、例えば、アポイクオリン、アポクライティン-Ⅰ、アポクライティン-Ⅱ、アポオベリン、アポマイトロコミン、アポミネオプシン、又はアポベルポイン等である。本発明のいくつかの態様では、アポ蛋白質は、アポイクオリン、アポクライティン-Ⅰ、アポクライティン-Ⅱ、又はアポマイトロコミン等であり、例えば、アポイクオリンである。アポ蛋白質は、天然から採取したものであっても、遺伝子工学的に製造したものであってもよい。さらに、アポ蛋白質は、BFPを形成できるものであれば、そのアミノ酸配列を天然のものから遺伝子組換え技術によって変異させたものであってもよい。

[0081] 天然から採取した発光蛋白質のアポ蛋白質（天然型アポ蛋白質）の塩基配列及びアミノ酸配列は、次の通りである。すなわち、天然型アポイクオリンの塩基配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に示す。天然型アポクライティン-Ⅰの塩基配列を配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4に示す。天然型アポクライティン-Ⅱの塩基配列を配列番号5に、アミノ酸配列を配列番号6に示す。天然型アポマイトロコミンの塩基配列を配列番号7に、アミノ酸配列を配列番号8に示す。天然型アポオベリンの塩基配列を配列番号9に、アミノ酸配列を配列番号10に示す。天然型アポベルポインの塩基配列を配列番号11に、アミノ酸配列を配列番号12に示す。

[0082] 組換え技術によって変異させたアポ蛋白質は、例えば、以下の(a)～(c)からなる群から選択される蛋白質である。

(a) 天然型アポ蛋白質のアミノ酸配列において1～複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列からなり、かつ、カルシウ

ム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質活性若しくは機能を有する蛋白質、

(b) 天然型アポ蛋白質のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質活性若しくは機能を有する蛋白質、及び

(c) 天然型アポ蛋白質の塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列からなり、かつ、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質活性若しくは機能を有する蛋白質。

[0083] 上記「天然型アポ蛋白質」は、例えば、アポイクオリン、アポクライティン-Ⅰ、アポクライティン-ⅠⅠ、アポオベリン、アポマイトロコミン、アポミネオプシン、又はアポベルポイン等である。本発明のある態様では、アポ蛋白質は、アポイクオリン、アポクライティン-Ⅰ、アポクライティン-ⅠⅠ、又はアポマイトロコミン等であり、好ましくは、アポイクオリンである。これらの天然型アポ蛋白質のアミノ酸配列又は塩基配列は、前記の通りである。

[0084] 上記「カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質活性又は機能」とは、例えば、蛋白質がセレンテラジンのペルオキシド若しくはセレンテラジン類縁体のペルオキシドと結合してカルシウム結合型発光蛋白質を形成する活性又は機能を意味する。「蛋白質がセレンテラジンのペルオキシド若しくはセレンテラジン類縁体のペルオキシドと結合してカルシウム結合型発光蛋白質を形成する」とは、具体的には、(1)蛋白質が、セレンテラジンのペルオキシド若しくはセレンテラジン類縁体のペルオキシドと結合して発光蛋白質を形成すること、だけでなく(2)蛋白質が、酸素存在下に、セレンテラジン若しくはその誘導体と接触することにより、蛋白質とセレンテラジンのペルオキシド若しくはセレンテラジン類縁体のペルオキシドとを含有する発光蛋白質(複合体)を形成すること、をも意味する。ここで、「接触」とは、蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体とを同一の反応系に存在させることを意味し、例えば、セレンテラジン又はその類縁体を収容した容器に蛋白質

を添加すること、蛋白質を収容した容器にセレンテラジン又はその類縁体を添加すること、又は蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体とを混合すること、などが含まれる。また、「セレンテラジン類縁体」は、セレンテラジンと同様に、アポ蛋白質として、イクオリン等のカルシウム結合型発光蛋白質を構成しうる化合物を指す。セレンテラジン又はその類縁体は、例えば、セレンテラジン、h-セレンテラジン、f-セレンテラジン、c l-セレンテラジン、n-セレンテラジン、c p-セレンテラジン、c h-セレンテラジン、h c h-セレンテラジン、f c h-セレンテラジン、e-セレンテラジン、e f-セレンテラジン、e c h-セレンテラジン、又はh c p-セレンテラジン等である。これらのセレンテラジン又はその類縁体の入手方法は、後に記載する。

[0085] 上記「1～複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列」における「1～複数個」の範囲は、例えば、1～20個、1～15個、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個（1～数個）、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、1個である。欠失、置換、挿入若しくは付加したアミノ酸の数は、一般的に少ないほど好ましい。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上が同時に生じてもよい。このような領域は、“Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)”、“Ausbel F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley and Sons (1987—1997)”、“Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)”、“Gene, 34, 315 (1985)”、“Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)”、又は“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)”等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、取得することができる。

[0086] また、上記「90%以上の同一性を有するアミノ酸配列」における「90%以上」の範囲は、例えば、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、9

9%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、又は99.9%以上である。上記同一性の数値は、一般的に大きいほど好ましい。なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、BLAST（例えば、Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol. 215, 403 (1990)、など参照）等の解析プログラムを用いて決定できる。BLASTを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

[0087] また、上記「ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、天然型アポ蛋白質の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド又は天然型アポ蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの全部又は一部をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法又はサザンハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチド（例えば、DNA）をいう。具体的には、コロニー或いはプラーク由来のポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/LのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (Saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)、Ausbel F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Supplement 1~38, John Wiley and Sons (1987-1997)、又はGlover D. M. and Hames B. D., *DNA Cloning 1: Core Techniques, A practical Approach*, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0088] ここで言う「ストリンジентな条件」は、低ストリンジентな条件、

中ストリンジेंटな条件及び高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。「低ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS、50% (v/v) ホルムアミド、32°Cの条件である。また、「中ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS、50% (v/v) ホルムアミド、42°Cの条件である。「高ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5 (w/v) %SDS、50% (v/v) ホルムアミド、50°Cの条件である。条件を厳しくするほど、二本鎖形成に必要とする相補性が高くなる。具体的には、例えば、これらの条件において、温度を上げるほど高い相同性を有するポリヌクレオチド（例えば、DNA）が効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0089] なお、ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えばAlk phos Direct Labelling Reagents（アマシャムファルマシア社製）を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコールにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを55°Cの条件下で0.1% (w/v) SDSを含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたDNAを検出することができる。

[0090] これ以外にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、BLAST等の解析プログラムにより、デフォルトのパラメータを用いて計算したときに、アポ蛋白質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと約60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、92%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.3%以上、99.5%以上、99.7%以上、99.8%以上、99.9%以上の同一性を有するDNAをあげることができる。なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、前述した方法を用いて決定できる。

- [0091] 本発明で使用することができる組換えアポ蛋白質として、例えば、Shimomura, O. and Inouye, S. *Protein Express. Purif.* (1999) 16: 91–95に記載の組換えイクオリン、Inouye, S. and Sahara, Y. *Protein Express. Purif.* (2007) 53: 384–389に記載の組換えクライティン-I、又はInouye, S. *J. Biochem.* (2008) 143: 711–717に記載の組換えクライティン-IIなどを挙げるることができる。
- [0092] 本発明のいくつかの態様において、アポ蛋白質は、全てのシステイン残基をセリン残基で置換したものである。BFPは、アポ蛋白質中のシステイン残基の遊離SH基が酸化されてS-S結合を生成すると、化学発光活性を失う。したがって、システイン残基がセリン残基で置換されS-S結合を生じることができなくなったアポ蛋白質は、化学発光活性をほとんど失わず、S-S結合を生じないため活性が持続する。
- [0093] BFPの製造のために用いる本発明のセレンテラミド類縁体の量は、特に制限されないが、アポ蛋白質1molに対して、例えば、1mol~5mol、好ましくは、1mol~2mol、さらに好ましくは、1mol~1.2molである。
- [0094] BFPの製造において、本発明のセレンテラミド類縁体とアポ蛋白質とカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンとの反応は、還元剤の存在下で行うのが好ましい。ここで用いる還元剤としては、例えば、ジチオトレイトール(DTT)、又はメルカプトエタノール等を挙げるることができる。BFPの再生に影響しなければ、BFPの製造のために用いる還元剤の量は、特に制限されないが、アポイクオリンには、3カ所のシステイン残基が存在することにより、S-S結合形成を防ぐ濃度であるのが好ましい。例えば、最終濃度が、1mMジチオトレイトールや0.1% (v/v)メルカプトエタノールである。
- [0095] BFPの製造における反応温度及び反応時間は、特に限定されないが、例えば、0°C~42°Cで0.1時間~2時間、4°C~37°Cで0.1時間~2時間、又は、4°C~15°Cで0.1時間~24時間である。
- [0096] このようにして得たBFPは、さらに精製に供しても良い。BFPの精製は、通

常の分離・精製方法に従って行うことができる。分離・精製方法としては、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、透析法、限外ろ過法などを単独で、又は適宜組み合わせ用いることができる。

[0097] 3. 1. 2. 青色蛍光蛋白質(BFP)の利用

(1) 発光触媒としての利用

本発明のBFPは、発光基質に作用しそれを発光させるので、発光触媒として利用できる。そこで、本発明は、本発明のBFPに、セレンテラジン又はその類縁体を接触させることを含む、発光方法を提供する。ここで、「接触」とは、BFPとセレンテラジン又はその類縁体とを同一の反応系に存在させることを意味し、例えば、セレンテラジン又はその類縁体を収容した容器にBFPを添加すること、BFPを収容した容器にセレンテラジン又はその類縁体を添加すること、又はBFPとセレンテラジン又はその類縁体とを混合すること、などが含まれる。

[0098] 本発明の発光方法に用いる発光基質は、例えばセレンテラジン又はその類縁体である。「セレンテラジンの類縁体」とは、セレンテラジンと同様に、アポ蛋白質として、イクオリン等のカルシウム結合型発光蛋白質を構成する化合物を指す。発光基質として用いるセレンテラジン又はその類縁体は、例えば、セレンテラジン、h-セレンテラジン、f-セレンテラジン、c l-セレンテラジン、n-セレンテラジン、c p-セレンテラジン、c h-セレンテラジン、h c h-セレンテラジン、f c h-セレンテラジン、e-セレンテラジン、e f-セレンテラジン、e c h-セレンテラジン、又はh c p-セレンテラジン等であり、好ましくは、セレンテラジン、h-セレンテラジン、又はe-セレンテラジンである。これらのセレンテラジン又はその類縁体は、例えば、Shimomura et al. (1988) Biochem. J. 251, 405-410、Shimomura et al. (1989) Biochem. J. 261, 913-920、又はShimomura et al. (1990) Biochem. J. 270, 309-312に記載の方法又はそれに準ずる方法で

製造することができる。或いは、チッソ株式会社、和光純薬社、又はプロメガ社等から各種市販されているので、これらの市販のものを、本発明の発光方法に用いても良い。

[0099] これらのセレンテラジン及びその類縁体をBFPに接触させ、接触させたBFPの触媒作用によって、セレンテラジン又はその類縁体に対応するセレンテラミド又はその類縁体に酸化される際（この時、二酸化炭素が放出される）、発光が生じる。通常発光時間は、0.5～3時間であるが、条件の選択により、発光時間を更に長時間とすることも、又は発光時間を更に短時間とすることも可能である。

[0100] (2) レポーター蛋白質としての利用

本発明のBFPは、レポーター蛋白質としてプロモーターなどの転写活性の測定に利用することもできる。アポ蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、目的のプロモーター又は他の発現制御配列（例えば、エンハンサーなど）に融合したベクターを構築する。前記ベクターを宿主細胞に導入し、さらに、これに、本発明のセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを接触させ、本発明の蛍光蛋白質に由来する蛍光を検出することにより、目的のプロモーター又は他の発現制御配列の活性を測定することができる。ここで、「接触」とは、宿主細胞とセレンテラミド類縁体とカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンとを同一の培養系・反応系に存在させることを意味し、例えば、宿主細胞の培養容器にセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを添加すること、宿主細胞とセレンテラミド類縁体とカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンとを混合すること、宿主細胞をセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンの存在下で培養することなどが含まれる。

[0101] (3) 検出マーカとしての利用

本発明のBFPは、蛍光による検出マーカとして利用することができる。本発明の検出マーカは、例えば、免疫アッセイ又はハイブリダイゼーションアッセイなどにおける目的物質の検出に利用することができる。本発明のBFPを化学修飾法など通常用いられる方法により目的物質（蛋白質或いは核酸など）と結合させて使用することができる。このような検出マーカを用いた検出方法は、通常の方法によって行うことができる。

[0102] また、本発明の検出マーカは、例えば、アポ蛋白質と目的物質との融合蛋白質として発現させ、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、さらに、これに本発明のセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを接触させること等によって、前記目的物質の分布を測定するために利用することもできる。ここで、「接触」とは、細胞とセレンテラミド類縁体とカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンとを同一の培養系・反応系に存在させることを意味し、例えば、細胞の培養容器にセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを添加すること、細胞とセレンテラミド類縁体とカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンとを混合すること、宿主細胞をセレンテラミド類縁体及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンの存在下で培養することなどが含まれる。

[0103] このような目的物質などの分布の測定は、蛍光イメージング等の検出法などを利用して行うこともできる。なお、アポ蛋白質は、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることもできる。

[0104] (4) アミューズメント用品の材料

本発明のBFPは、光の励起をうけて蛍光を生じる。よって、本発明のBFPは、アミューズメント用品の材料の蛍光基材として好適に使用することができる。アミューズメント用品としては、たとえば、蛍光シャボン玉、蛍光アイ

ス、蛍光飴、蛍光絵の具等があげられる。本発明のアミューズメント用品は、通常の方法によって製造することができる。

[0105] 3. 2. 緑色蛍光蛋白質 (gFP)

3. 2. 1. 緑色蛍光蛋白質 (gFP) の製造

本発明の緑色蛍光蛋白質 (gFP) は、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質に、本発明のセレンテラミド類縁体が配位した複合体である。すなわち、本発明のgFPは、本発明のセレンテラミド類縁体、及びカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質を含む。gFPは、光の励起を受けて蛍光を発生することができる。

[0106] 本発明のgFPは、前述のBFPからカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを取り除くことによって、得られる。カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンは、BFPを、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤で処理することによって、BFPから取り除くことができる。

[0107] 本発明においてgFPを製造するのに用いるキレート剤は、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2若しくは3価のイオンと強く結合するものであれば良く、特に制限されない。キレート剤の例として、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、エチレングリコールビス ( $\beta$ -アミノエチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸 (EGTA)、trans-1, 2-ジアミノシクロヘキサン N, N, N', N'-四酢酸 (CyDTA)、又は N-(2-ヒドロキシエチル) イミノ二酢酸 (HIDA) 等を挙げることができる。ここで、カルシウムイオンと置換可能な2価又は3価のイオンは、前記の通りである。

[0108] gFPの製造のために用いるキレート剤の量は、gFP再生に影響しなければ、その濃度は特に制限されない。イオンアポイクオリン1molには、3molのカルシウムイオンが結合することが示されていることより、例えば、3mol以上が好ましい。

[0109] gFPの製造における反応温度及び反応時間は、特に限定されないが、例えば、0℃～42℃で0.1時間～2時間、4℃～37℃で0.1時間～2時間、又は、4℃～15℃で0.1時間～24時間である。

[0110] このようにして得たgFPは、さらに精製に供しても良い。gFPの精製は、通常分離・精製方法に従って行うことができる。分離・精製方法としては、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、透析法、限外ろ過法などを単独で、又は適宜組み合わせ用いることができる。

[0111] 3. 2. 2. 緑色蛍光蛋白質 (gFP) の利用

(1) レポーター蛋白質としての利用

本発明のgFPは、レポーター蛋白質としてプロモーターなどの転写活性の測定に利用することもできる。アポ蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、目的のプロモーター又は他の発現制御配列（例えば、エンハンサーなど）に融合したベクターを構築する。前記ベクターを宿主細胞に導入し、さらに、これに、本発明のセレンテラミド類縁体を接触させてBFPを生成させた後、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤を接触させることでgFPを生成させ、本発明のgFPに由来する蛍光を検出することにより、目的のプロモーター又は他の発現制御配列の活性を測定することができる。

[0112] (2) 検出マーカとしての利用

本発明のgFPは、蛍光による検出マーカとして利用することができる。本発明の検出マーカは、例えば、免疫アッセイ又はハイブリダイゼーションアッセイなどにおける目的物質の検出に利用することができる。本発明のgFPを化学修飾法など通常用いられる方法により目的物質（蛋白質或いは核酸など）と結合させて使用することができる。このような検出マーカを用いた検出方法は、通常の方法によって行うことができる。また、本発明の検出マーカは、例えば、アポ蛋白質と目的物質との融合蛋白質として発現させ、マイク

ロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、さらに、これに、本発明のセレンテラミド類縁体を接触させてBFPを生成させた後、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤を接触させることでgFPを生成させること等によって、前記目的物質の分布を測定するために利用することもできる。このような目的物質などの分布の測定は、蛍光イメージング等の検出法などを利用して行うこともできる。なお、アポ蛋白質は、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることもできる。

[0113] (3) アミューズメント用品の材料

本発明のgFPは、アミューズメント用品の材料の蛍光材として好適に使用することができる。アミューズメント用品としては、たとえば、蛍光シャボン玉、蛍光アイス、蛍光飴、蛍光絵の具等があげられる。本発明のアミューズメント用品は、通常の方法によって製造することができる。

[0114] 4. カルシウム結合型発光蛋白質

図1に示すように、イクオリン等のカルシウム結合型発光蛋白質は、EDTA等のカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤の存在下、gFPに、セレンテラジン又はその類縁体を反応させることで、製造することが出来る。

[0115] 4. 1. カルシウム結合型発光蛋白質の製造

本発明のカルシウム結合型発光蛋白質は、本発明のgFPから製造することができる。すなわち、本発明のカルシウム結合型発光蛋白質は、gFPに、発光基質であるセレンテラジン又はその類縁体を反応させることによって、得ることができる。

[0116] gFPとセレンテラジン又はその類縁体の反応は、gFPとセレンテラジン又はその類縁体を接触させることにより行う。「接触」とは、本発明のgFPとセレンテラジン又はその類縁体とを同一の反応系に存在させることを意味し、例えば、セレンテラジン又はその類縁体を収容した容器に本発明のgFPを添加す

ること、本発明のgFPを収容した容器に本発明のセレンテラジン又はその類縁体を添加すること、又は本発明のgFPとセレンテラジン又はその類縁体とを混合すること、などが含まれる。

[0117] 本発明のカルシウム結合型発光蛋白質の製造に用いるセレンテラジン又はその類縁体は、例えば、セレンテラジン、h-セレンテラジン、f-セレンテラジン、c1-セレンテラジン、n-セレンテラジン、cp-セレンテラジン、ch-セレンテラジン、hch-セレンテラジン、fch-セレンテラジン、e-セレンテラジン、ef-セレンテラジン、ech-セレンテラジン、又はhcp-セレンテラジン等であり、好ましくは、セレンテラジン、h-セレンテラジン、又はe-セレンテラジンである。これらのセレンテラジン又はその類縁体の入手方法は、前記の通りである。

[0118] カルシウム結合型発光蛋白質の製造のために用いるセレンテラジン又はその類縁体の量は、特に制限されないが、gFP1molに対して、例えば、1.2mol以上であれば良い。

[0119] カルシウム結合型発光蛋白質の製造における反応温度及び反応時間は、特に限定されないが、例えば、0℃～42℃で0.1時間～2時間、4℃～37℃で0.1時間～2時間、又は4℃～15℃で0.1時間～24時間である。

蛍光蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体との反応を、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な2価若しくは3価のイオンを除去するためのキレート剤の存在下において行うのが好ましい。本発明においてgFPを製造するのに用いるキレート剤は、前記と同様である。

[0120] 本発明のさらに好ましい態様では、蛍光蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体との反応を、還元剤の存在下において行う。このとき用いる還元剤は、例えば、ジチオトレイトール (DTT)、又はメルカプトエタノール等である。カルシウム結合型発光蛋白質の製造のために用いる還元剤の量は、再生に影響しなければ、特に制限されないが、アポイクオリンには、3カ所のシステイン残基が存在することより、S-S結合形成を防ぐ濃度であるのが好ましい。例えば、最終濃度が、1 mMジチオトレイトールや0.1% (v/v)メルカプ

トエタノールである。

[0121] 4. 2. カルシウム結合型発光蛋白質の利用

(1) カルシウムイオンの検出又は定量

本発明のカルシウム結合型発光蛋白質は、カルシウムイオンの作用によって発光する発光蛋白質（ホロ蛋白質）である。よって、本発明の発光蛋白質は、カルシウムイオンの検出又は定量に使用することができる。

[0122] カルシウムイオンの検出又は定量を行う場合には、アポ蛋白質とセレンテラジン類縁体のペルオキシドとからなる発光蛋白質を使用する。発光蛋白質は、前述した方法に従って製造することができる。カルシウムイオンの検出又は定量は、検体溶液を直接発光蛋白質溶液に添加し、発生する発光を測定することにより行うことができる。或いは、検体溶液に発光蛋白質溶液を添加し、発生する発光を測定することにより、カルシウムイオンを検出又は定量することもできる。

[0123] カルシウムイオンの検出又は定量は、カルシウムイオンによる本発明の発光蛋白質の発光を、発光測定装置を用いて測定することにより行うことができる。発光測定装置としては、市販されている装置、例えば、C e n t r o L B 9 6 0（ベルトールド社製）などを使用することができる。カルシウムイオン濃度の定量は、発光蛋白質を用いて、既知のカルシウムイオン濃度に対する発光標準曲線を作成することにより、測定可能である。

[0124] (2) 生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）法

本発明のカルシウム結合型発光蛋白質は、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）法による分子間相互作用の原理を利用した生理機能の解析や酵素活性の測定等の分析方法に利用することができる。

[0125] 例えば、本発明の発光蛋白質をドナー蛋白質として使用し、有機化合物又は蛍光蛋白質をアクセプターとして使用して、両者の間で生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）を起こすことにより蛋白質間の相互作用を検出することができる。本発明のある態様では、アクセプターとして使用する有機化合物は、Hoechst33342、Indo-1又はDAP1などである。本発明の別の態様では

、アクセプターとして使用する蛍光蛋白質は、緑色蛍光蛋白質（GFP）、青色蛍光蛋白質（BFP）、変異GFP蛍光蛋白質又はフィコビルリンなどである。本発明の好ましい態様において、解析する生理機能は、オーファン受容体（特にG蛋白質共役受容体）、アポトーシス、又は遺伝子発現による転写調節などである。また、本発明の好ましい態様において、分析する酵素は、プロテアーゼ、エステラーゼ又はリン酸化酵素などである。

[0126] BRET法による生理機能の解析は、公知の方法で行うことができ、例えば、Biochem. J. 2005, 385, 625–637、又はExpert Opin. Ther Targets, 2007, 11: 541–556などに記載の方法に準じて行うことができる。また、酵素活性の測定も、公知の方法で行うことができ、例えば、Nat Methods 2006, 3: 165–174、又はBiotechnol J. 2008, 3: 311–324などに記載の方法に準じて行うことができる。

[0127] なお、本明細書に記載した全ての文献及び刊行物は、その目的にかかわらず参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願である特願2009–27904号（2009年2月9日出願）の特許請求の範囲、明細書、および図面の開示内容を包含する。

[0128] また、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を実施できる。発明を実施するための最良の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

## 実施例

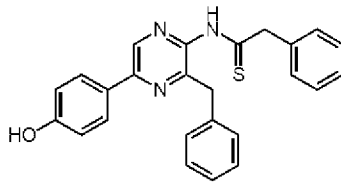
[0129] 1. 概要

CTMDの基本骨格をベースとして、h-セレンテラチオアミドとh-セレンテラスルホンアミドを、下記合成スキームにより合成した。また、比較として

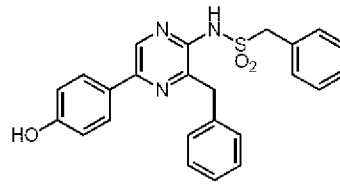
、*h*-セレンテラミドも合成した。

[0130] <*h*-セレンテラチオアミドと*h*-セレンテラスルホンアミド>

[化40]



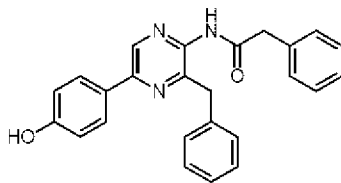
*h*-Coelenterathioamide (c-14)



*h*-Coelenterasulfonamide (c-15)

[0131] <*h*-セレンテラミド>

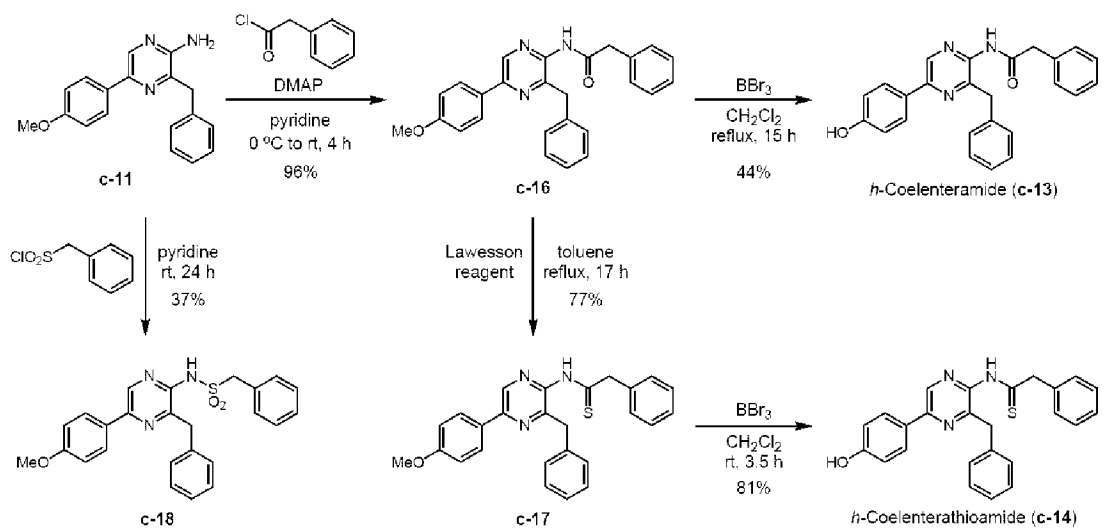
[化41]



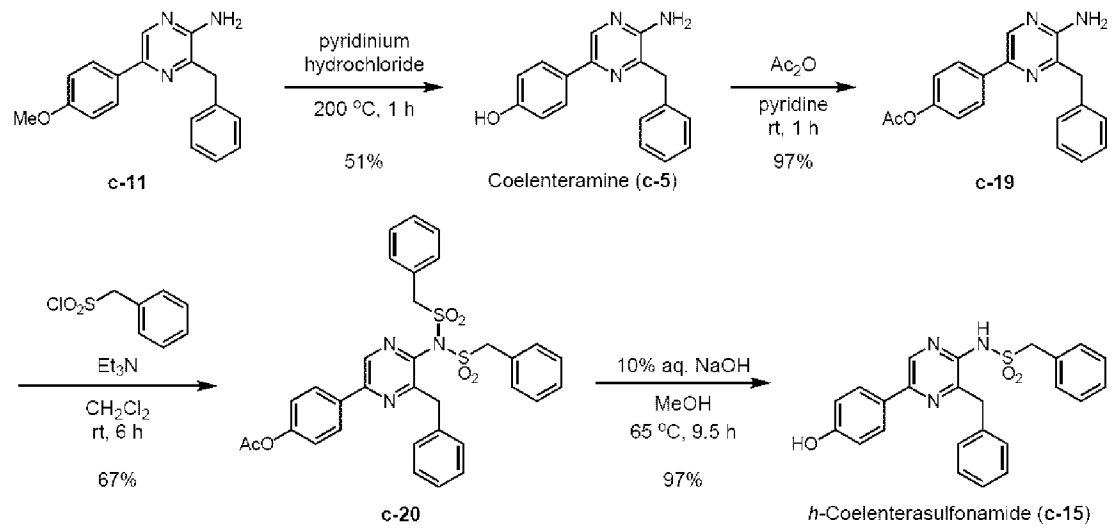
*h*-Coelenteramide (c-13)

[0132] <合成ルート>

[化42]



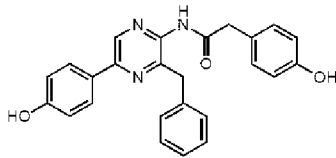
[0133] [化43]



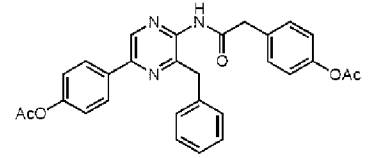
[0134] さらに、*h*-セレンテラチオアミド、*h*-セレンテラスルホンアミド、及び*h*-セレンテラミドをベースとして、様々なGTMD誘導体を、下記合成法により合成した。

[0135] <GTMD誘導体>

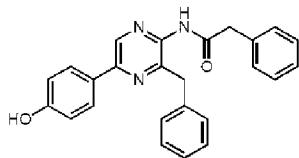
[化44]



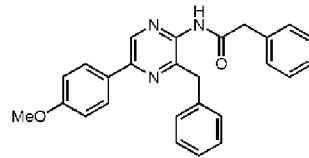
Coelenteramide (c-4)



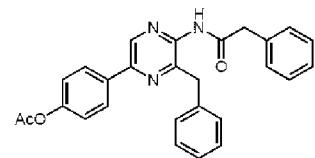
c-29



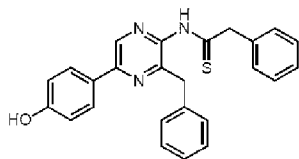
*h*-Coelenteramide (c-13)



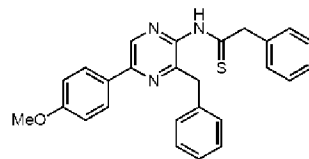
c-16



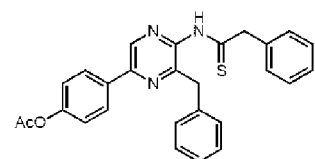
c-30



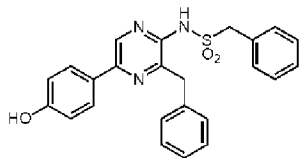
*h*-Coelenterathioamide (c-14)



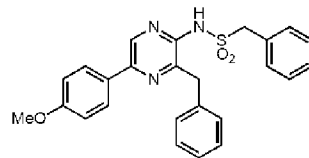
c-17



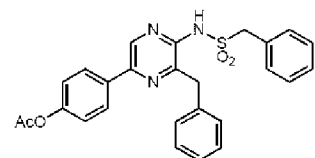
c-31



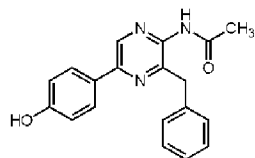
*h*-Coelenterasulfonamide (c-15)



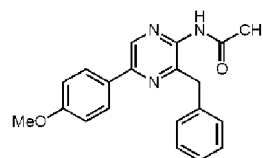
c-18



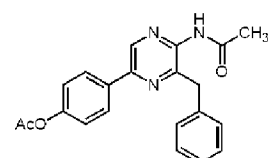
c-32



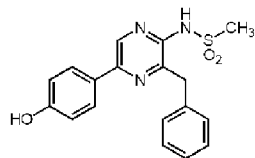
Coelenteracetamide (c-25)



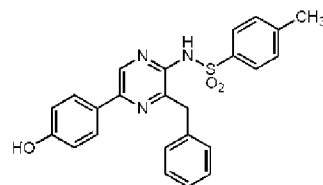
c-24



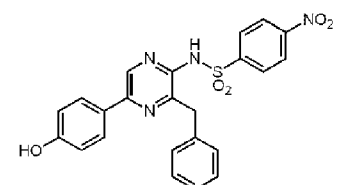
c-33



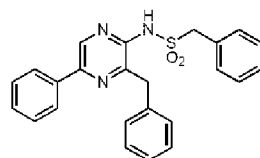
Coelenteramesylamide (c-34)



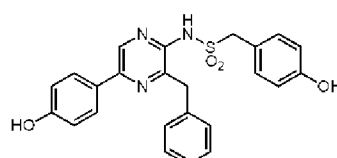
Coelentera-*p*-tosylamide (c-35)



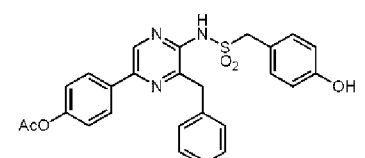
Coelentera-*p*-nosylamide (c-36)



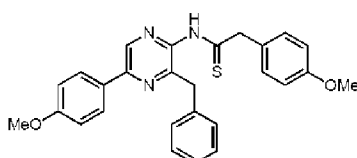
Dideoxycoelenterasulfonamide (c-37)



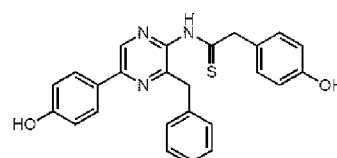
Coelenterasulfonamide (c-38)



c-48

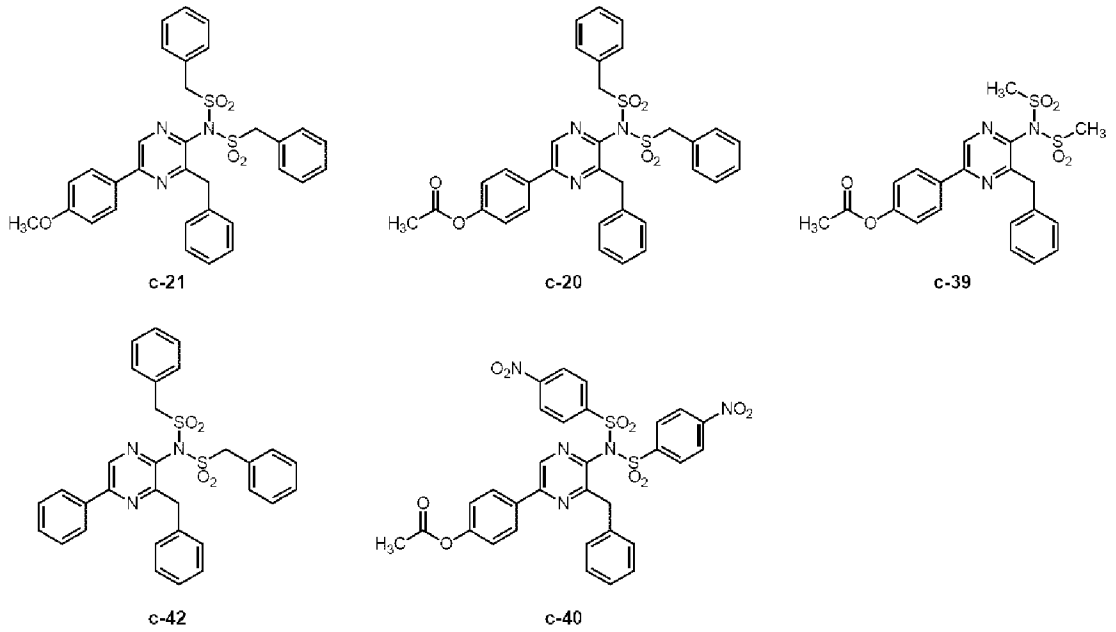


c-44



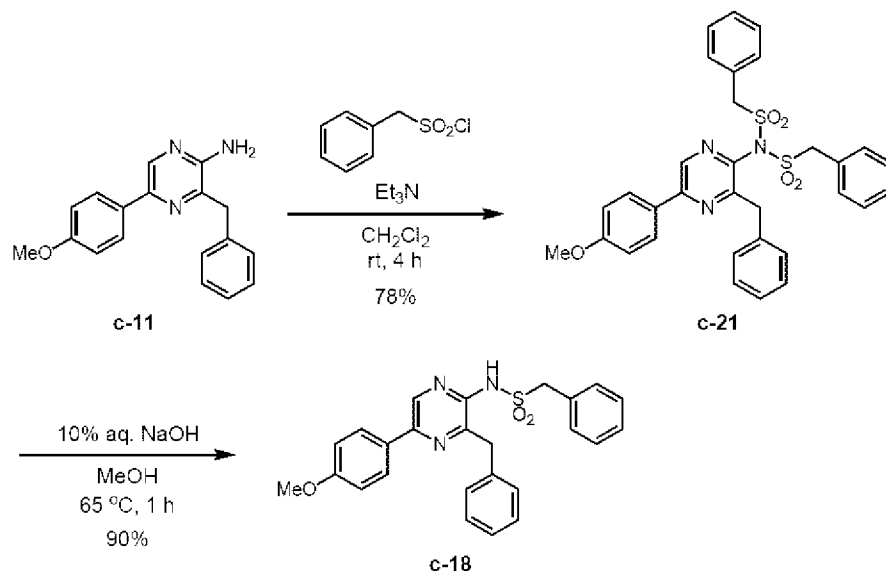
Coelenterathioamide (c-45)

[0136] [化45]



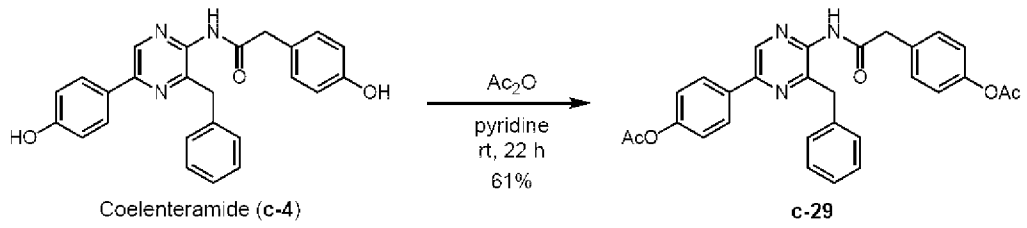
[0137] <CTMD誘導体の合成法>

[化46]

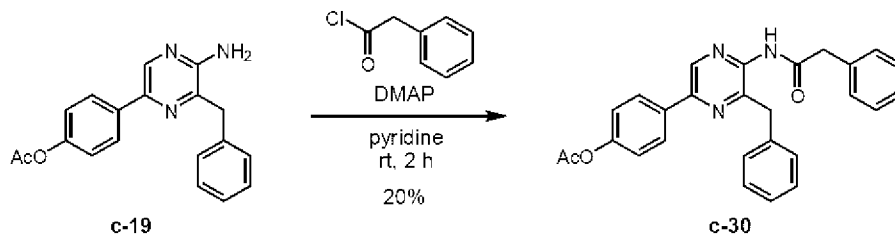


[0138]

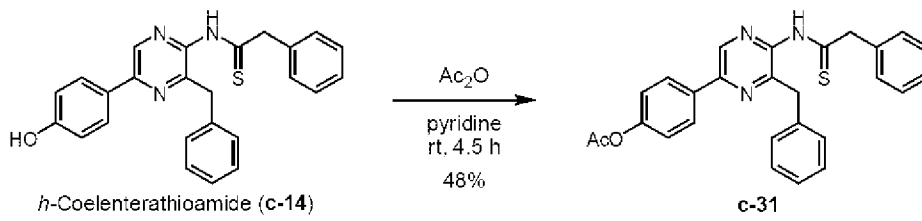
[化47]



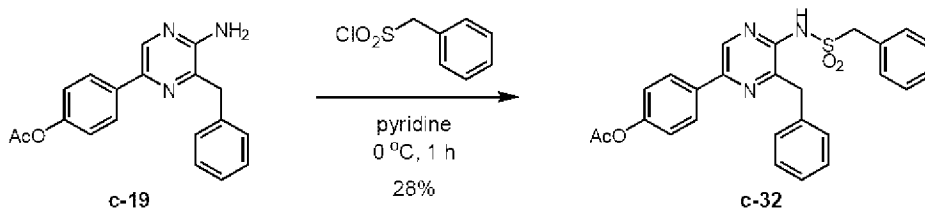
[0139] [化48]



[0140] [化49]

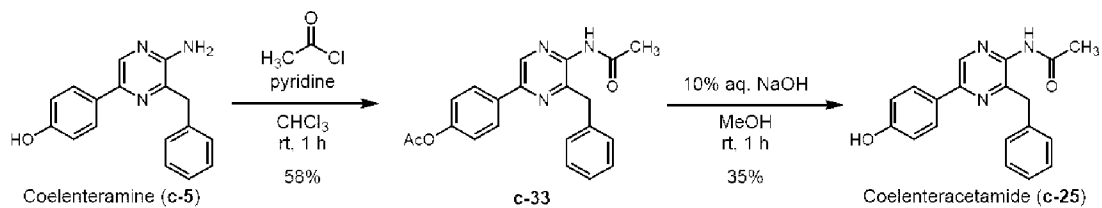


[0141] [化50]

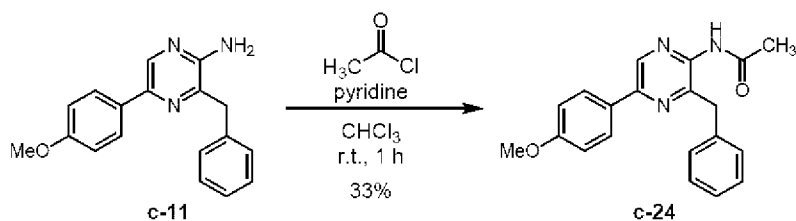


[0142]

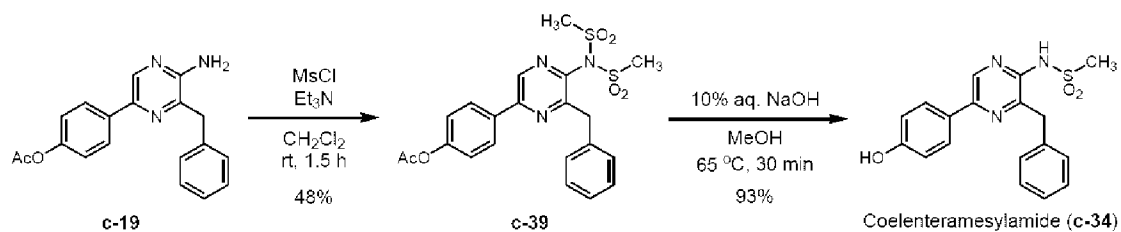
[化51]



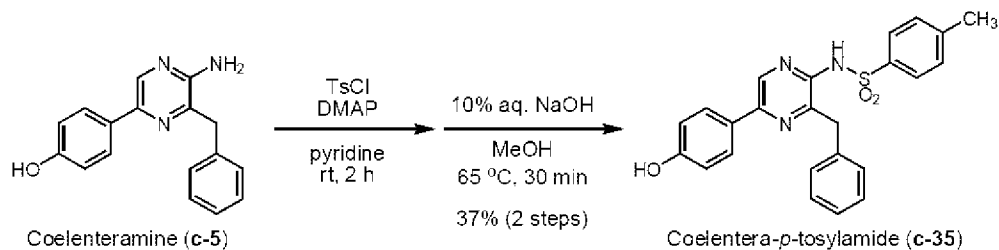
[0143] [化52]



[0144] [化53]

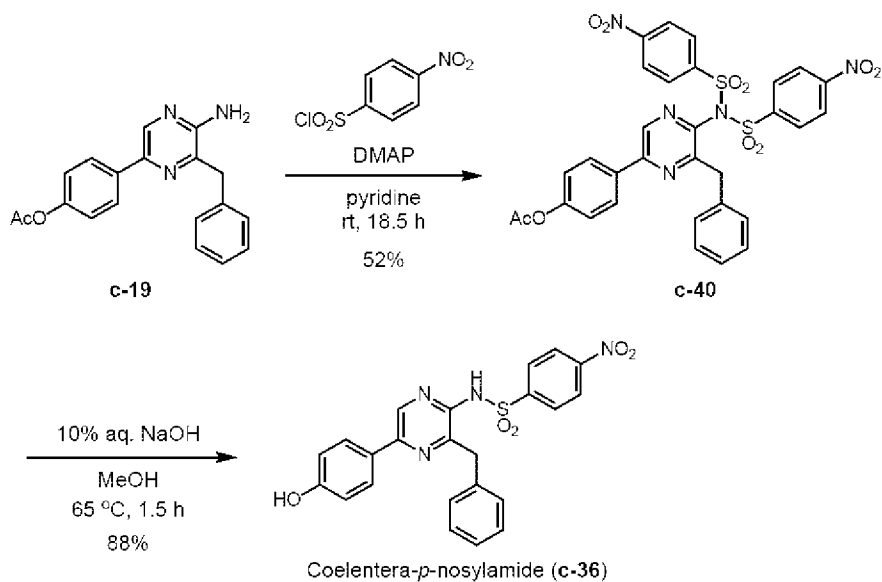


[0145] [化54]

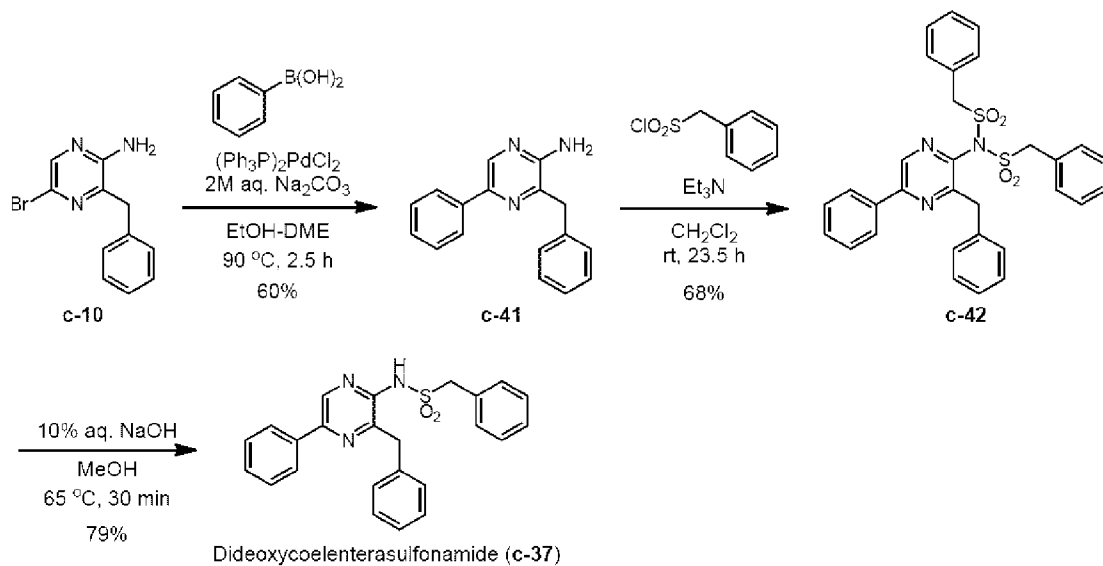


[0146]

[化55]

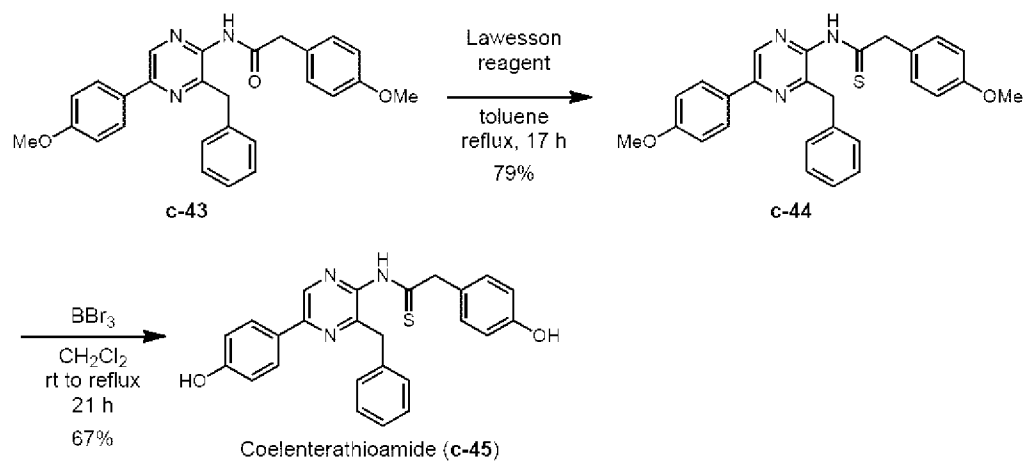


[0147] [化56]

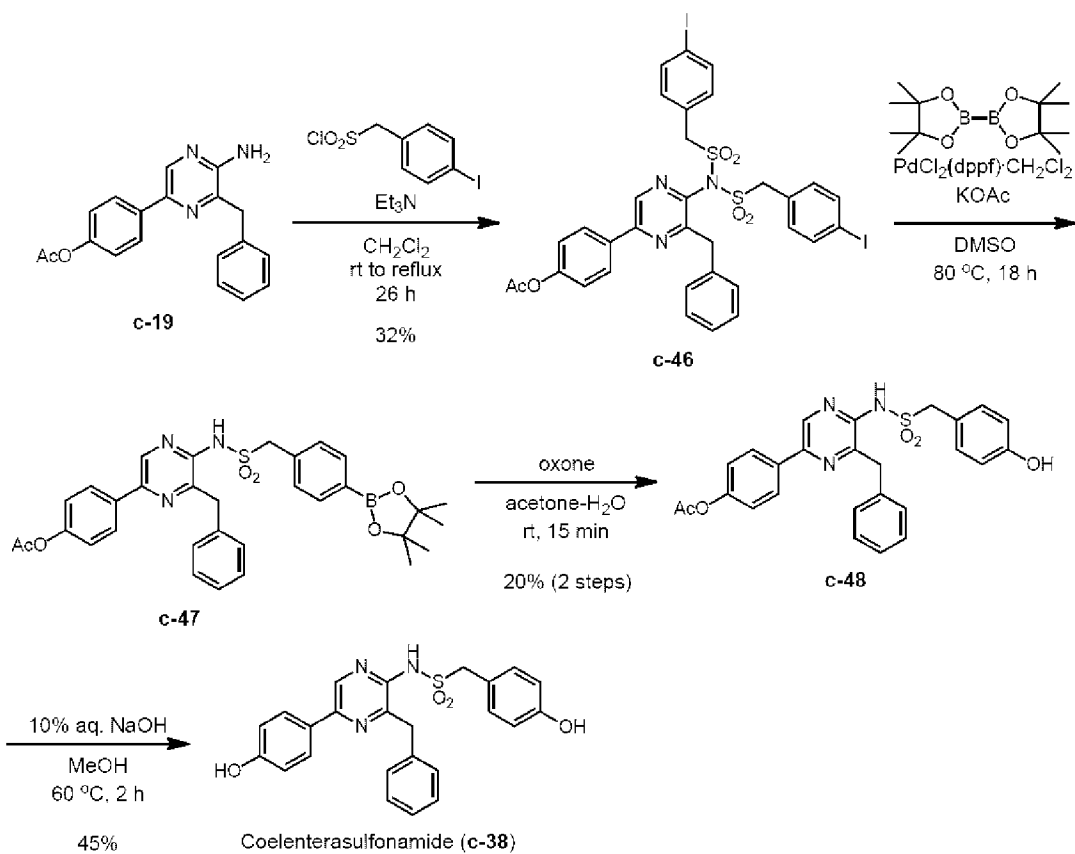


[0148]

[化57]



[0149] [化58]



[0150] さらに、水溶媒における溶解性と、水溶媒又は有機溶媒における蛍光量子収率とを決定することにより、合成化合物の蛍光能の評価を行なった。

## [0151] 2. 合成例

## [材料及び方法]

## (1) 化学薬品

全ての化学薬品は特に記さない限り、市販のものをそのまま使用した。

反応、抽出、及びクロマトグラフィー用の溶媒には、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、ジクロロメタン、脱水ジクロロメタン、クロロホルム、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル、アセトン、トルエン、及び1,2-ジメトキシエタンの市販品 (Wako) をそのまま用いた。

反応試薬は以下に挙げるものを使用した。

フェニルアセチルクロリド (Wako)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (Wako)、1.0 M 三臭化ホウ素/ジクロロメタン溶液 (Aldrich)、ローソン試薬 (Aldrich)、ベンジルスホニルクロリド (Wako)、無水酢酸 (Wako)、トリエチルアミン (Wako)、水酸化ナトリウム (Wako)、脱水ピリジン (Wako)、アセチルクロリド (Wako)、メタンスルホニルクロリド (Wako)、*p*-トルエンスルホニルクロリド (Kanto)、*p*-ニトロベンゼンスルホニルクロリド (Aldrich)、フェニルボロン酸 (Acros organics)、炭酸ナトリウム (Wako)、及びジクロロビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) (Aldrich)。

## [0152] (2) クロマトグラフィー

分析用薄層クロマトグラフィー (TLC) には、MERCK社製、Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Cat. No. 1.05715.) を用いた。スポットの検出は、紫外線ランプ (254 nm 又は365 nm) による方法、ヨウ素吸着、及びリンモリブデン酸の酸性水溶液に浸した後にホットプレートで焼くことで行った。分取用フラッシュカラムクロマトグラフィーには、順相シリカゲルとして関東化学社製、Silicagel 60N Cat. No. 37563-85、メッシュ40-50  $\mu\text{m}$ 、又は関東化学社製、Silicagel 60N Cat. No. 37565-84、メッシュ63-200  $\mu\text{m}$ を使用した。なお、本実施例においてクロマトグラフィー用の混合溶媒の比率は、特に説明が無い限り *v/v* である。

## [0153] (3) 物性測定

融点 (Mp.) は、YANACO社製、微量融点測定装置MP-J3を用いて測定した。

紫外吸収スペクトル (UV) 及びOD値 (330 nm) の測定には、日本分光社製、V-560を用いて25 °Cで測定した。各サンプルの30  $\mu$ Mメタノール溶液及びpH. 7.4リン酸緩衝水溶液 (PB) を調製し、石英セル (光路長10 mm) 中で測定した。難溶性の化合物は、はじめに少量のDMSOに溶解し、それを各溶媒で希釈することでサンプル調製を行った。DMSOを用いた場合には、その含有割合を記載した。全ての測定は、バンド幅0.5 nm、レスポンスMedium、スキャン速度200 nm/minの条件で測定した。

$^1\text{H}$  (400 MHz) 核磁気共鳴スペクトル (NMRスペクトル) は、Varian社製、Unity Plus 400を用いてDMSO-d<sub>6</sub>中で測定した。 $^1\text{H}$  NMRの化学シフトの基準には、測定溶媒であるDMSO-d<sub>6</sub>中の残存非重水素化ジメチルスルホキシドのピークを $\delta$  2.49とした。

$^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) 核磁気共鳴スペクトル (NMRスペクトル) は、Varian社製、MERCURY 300を用いてDMSO-d<sub>6</sub>中で測定した。 $^{13}\text{C}$  NMRの化学シフトの基準には、測定溶媒であるDMSO-d<sub>6</sub>のピークを $\delta$  39.5とし、ピークが重複した化合物についてはピークを分離するために重メタノールを加え、その旨を記載した。

赤外分光計スペクトル (IR) は、DRS-8000を装着したSHIMADZU社製、IRPrestige-21 spectrophotometerを用いて、拡散反射法により測定した。

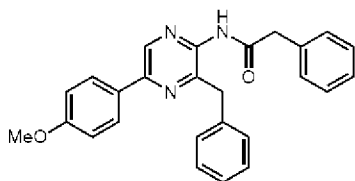
高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は、JEOL社製JMS-700を用いて、電子衝撃イオン化 (EI) 法、又は高速原子衝突 (FAB<sup>+</sup>) 法、又はBrucker社製MicroTOFを用いてエレクトロスプレーイオン化法 (ESI<sup>+</sup>) により測定した。

元素分析は、YANACO社製CHN CORDER MT-5を用いて行った。

[0154] [合成例 1]

3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン(c-16)

[化59]



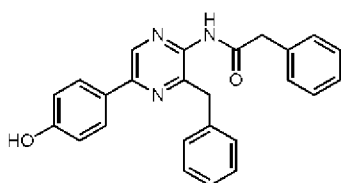
[0155] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-11) (Adamczyk, M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (400 mg, 1.37 mmol)をピリジン (4 mL)に溶解し、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (17.3 mg, 142  $\mu$ mol)を加えて0  $^{\circ}$ Cに冷却した。これにフェニルアセチルクロリド (540  $\mu$ L, 4.08 mmol)を加えて、室温に昇温し3.5時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, ジクロロメタン/酢酸エチル= 15/1)で精製し、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン(c-16)を淡黄色固体として得た (540 mg, 96.2%)。R<sub>f</sub> = 0.25 (ジクロロメタン/酢酸エチル= 15/1)。Mp. 197.5-202  $^{\circ}$ C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 330 (4.20), 293 (4.20), 274 (4.18)。UV (pH 7.4 PB, 1% DMSO)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 333.5 (3.73), 280.5 (3.85)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.68 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.03 (s, 2H), 7.01-7.08 (m, 4H), 7.11-7.24 (m, 3H), 7.24-7.30 (m, 1H), 7.32-7.38 (m, 4H), 8.01-8.06 (AA' BB', 2H), 8.88 (s, 1H), 10.52 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 2/1)  $\delta$  40.2, 42.9, 55.5, 114.8 (2C), 126.7, 127.2, 128.4 (2C), 128.6, 128.7 (2C), 128.8 (2C), 129.4 (2C), 129.7 (2C), 136.0, 137.5, 138.7, 143.9, 149.0, 151.2, 161.3, 170.6。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 706, 837, 1034, 1179, 1248, 1296, 1413, 1439,

1449, 1497, 1545, 1574, 1609, 1670, 3281, 3381。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z410.1876 (M+H, C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> requires 410.1869)。

[0156] [合成例 2]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン (h-セレンテラミド) (c-13)

[化60]



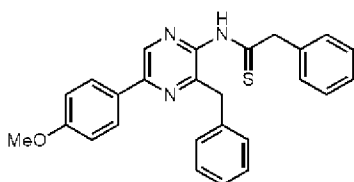
[0157] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン(c-16) (250 mg, 611  $\mu$ mol)を脱水ジクロロメタン (15 mL)に溶解し、室温で攪拌しながらこれに1.0 M 三臭化ホウ素/ジクロロメタン溶液(2.15 mL, 2.15 mmol)を加え、15時間加熱還流した。還流後、室温まで放冷し、これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、ジクロロメタンを除去した。懸濁液をろ過し残渣を乾燥することで粗生成物である淡黄色固体270 mgを得た。これをメタノールを用いて再結晶し、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン (h-セレンテラミド) (c-13)を無色固体として得た(107 mg, 44.1%)。R<sub>f</sub> = 0.20 (ジクロロメタン/酢酸エチル= 4/1)。Mp. 259–261 °C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 332 (4.38), 294.5 (4.38), 276 (4.35)。UV (pH 7.4 PB, 1% DMSO)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 345.5 (3.52), 303 (3.57)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.67 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 6.84–6.89 (AA' BB' , 2H), 7.02 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.11–7.23 (m, 4H), 7.23–7.30 (m, 1H), 7.32–7.37 (m, 4H), 7.90–7.95 (AA' BB' , 2H), 8.82 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 10.48 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  39.7, 42.4, 115.8 (2C), 126.2, 126.4, 126.7, 128.1

(2C), 128.3 (2C), 128.4 (2C), 128.9 (2C), 129.3 (2C), 135.6, 136.9, 138.3, 143.3, 148.6, 150.5, 159.1, 169.9。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 662, 702, 712, 727, 843, 1157, 1173, 1231, 1281, 1321, 1355, 1368, 1452, 1495, 1523, 1541, 1584, 1595, 1611, 1668, 3063, 3169, 3264。HRMS (FAB<sup>+</sup>)  $m/z$  396.1706 (M+H,  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$  requires 396.1712)。

[0158] [合成例 3]

3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン(c-17)

[化61]



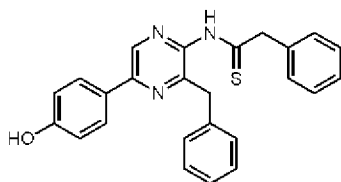
[0159] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン(c-16) (539 mg, 1.32 mmol)を脱水トルエン (50 mL)に懸濁し、室温で攪拌しながらこれにLawesson試薬 (320 mg, 790  $\mu\text{mol}$ )を加え、17時間加熱還流した。還流後、室温まで放冷し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/1)で精製し、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン(c-17)を黄色アモルファスとして得た (430 mg, 76.6%)。R<sub>f</sub> = 0.33 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 7/3)。Mp. 45-47 °C。UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 334 (4.23), 295 (4.16), 272 (4.25)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 360.5 (4.22), 283.5 (4.16)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.81 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 7.01 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.04-7.10 (AA' BB', 2H), 7.12-7.24 (m, 3H), 7.29 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.37 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 8.05-8.10 (AA' BB', 2H), 8.99 (s, 1H), 12.20 (s,

1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 39.3, 51.6, 55.3, 114.5 (2C), 126.3, 127.0, 127.6, 128.2 (2C), 128.3 (2C), 128.4 (2C), 128.9 (2C), 129.0 (2C), 136.9, 137.9, 138.0, 145.0, 149.6, 152.1, 160.9, 204.6。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 700, 835, 1028, 1115, 1175, 1252, 1292, 1319, 1369, 1422, 1437, 1493, 1516, 1607, 2961, 3395。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z426.1646 (M+H, C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>OS requires 426.1640)。

[0160] [合成例 4]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン (h-セレンテラチオアミド) (c-14)

[化62]



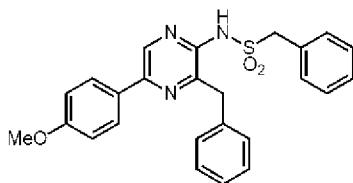
[0161] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン(c-17) (114 mg, 267 μmol)を脱水ジクロロメタン (2 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これに1.0 M 三臭化ホウ素/ジクロロメタン溶液(1.35 mL, 1.35 mmol)を加えた後、反応溶液を室温に昇温し、3.5時間攪拌した。これに、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、ジクロロメタンを除去した。懸濁液をろ過し残渣を乾燥し、粗生成物である赤色固体105 mgを得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (8.2 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)で精製し、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン (h-セレンテラチオアミド) (c-14)を橙色固体として得た(88.9 mg, 80.9%)。R<sub>f</sub> = 0.21 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 195-198 °C。UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 336.5 (4.24), 297 (4.18), 273.5 (4.26)。UV (pH 7.4 PB) λ<sub>max</sub> (log ε) 336.5 (4.12), 270

(4.20)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.90 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 6.84–6.90 (AA' BB', 2H), 6.99 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.10–7.24 (m, 3H), 7.26 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.36 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.93–7.99 (AA' BB', 2H), 8.91 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 12.17 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 39.4, 51.6, 115.9 (2C), 126.1, 126.3, 127.0, 128.3 (2C), 128.36 (2C), 126.44 (2C), 128.9 (2C), 129.0 (2C), 136.9, 137.6, 138.1, 144.6, 150.0, 152.0, 159.5, 204.5。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 702, 839, 1140, 1169, 1207, 1234, 1283, 1319, 1360, 1435, 1450, 1472, 1491, 1522, 1607, 3069, 3478。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 412.1490 (M+H, C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>OS requires 412.1484)。

[0162] [合成例 5]

3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-18)

[化63]



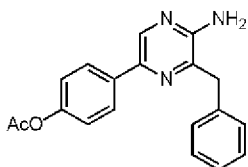
[0163] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-11) (Adamczyk M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477–485 (2001)に記載の方法によって製造) (99.5 mg, 342 μmol)をピリジン (1 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これに、ベンジルスルホニルクロリド (84.7 mg, 444 μmol)を加えて室温に昇温後、1時間攪拌した。これにベンジルスルホニルクロリド (13.8 mg, 72.3 μmol)を加え、2.5時間攪拌した。さらにこれにベンジルスルホニルクロリド (13.9 mg, 72.9 μmol)を加え、15時間攪拌した。さらにこれにベンジルスルホニルクロリド (13.1 mg, 68.7 μmol)を加え、5.5時間攪拌した。これに、2 M 塩酸を加え反応を停止し、水層

と有機層を分離した後ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、有機層をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (7 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 7/3 → 酢酸エチル) で精製した。得られた固体を酢酸エチルで再結晶し、3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン(c-18)を無色固体として得た (56.0 mg, 36.8%)。R<sub>f</sub> = 0.32 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 7/3)。Mp. 213–215 °C。UV (MeOH, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 334.5 (4.04), 290 (4.21), 276.5 (4.23)。UV (pH 7.4 PB, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 348.5 (3.90), 293 (3.95)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.80 (s, 3H), 4.22 (s, 2H), 4.91 (s, 2H), 7.02–7.07 (AA' BB', 2H), 7.14–7.21 (m, 1H), 7.24–7.27 (m, 4H), 7.36 (s, 5H), 7.99 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 8.88 (s, 1H), 10.46 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 38.0, 55.3, 59.6, 114.4 (2C), 126.3, 127.6 (2C), 128.1, 128.3 (2C), 128.4, 128.5 (2C), 129.0 (2C), 129.9, 130.9 (2C), 136.2, 138.1, 144.6, 145.8, 146.0, 160.3。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 459, 538, 586, 698, 748, 785, 831, 893, 912, 926, 1032, 1121, 1132, 1177, 1215, 1256, 1287, 1319, 1395, 1452, 1495, 1516, 1609, 3231。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 446.1548 (M+H, C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S requires 446.1548)。

## [0164] [合成例 6]

5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19)

[化64]



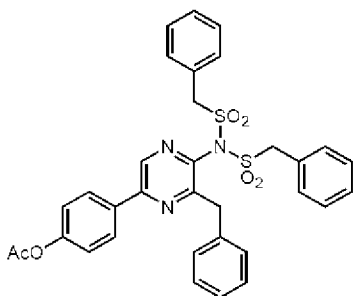
アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル

)ピラジン (セレンテラミン) (c-5) (Adamczyk, M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (303 mg, 1.09 mmol)をピリジン (2 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これに、無水酢酸 (133  $\mu$ L, 1.40 mmol)を加え、室温に昇温後1時間攪拌した。これに、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルを加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、酢酸エチルで3回抽出した。有機層を水で3回、飽和食塩水で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (50 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン(c-19)を淡黄色固体として得た (337 mg, 96.7%)。R<sub>f</sub> = 0.31 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 183.5-185.5 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.27 (s, 3H), 4.07 (s, 2H), 6.42 (s, 2H), 7.12-7.17 (AA' BB', 2H), 7.19 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.90-7.95 (AA' BB', 2H), 8.41 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 513, 596, 640, 654, 710, 746, 851, 910, 1016, 1136, 1167, 1198, 1217, 1373, 1423, 1452, 1466, 1493, 1508, 1535, 1630, 1746, 3148, 3289。

[0165] [合成例7]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノピラジン (c-20)

[化65]



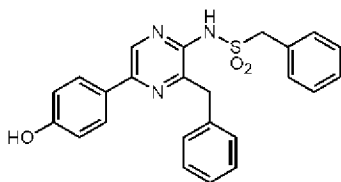
[0166] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジ

ルピラジン (c-19) (367 mg, 1.15 mmol) を脱水ジクロロメタン (9 mL) に溶解し、これにトリエチルアミン (480  $\mu$ L, 3.44 mmol) を加え、0 °C に冷却した。これに、ベンジルスルホニルクロリド (658 mg, 3.45 mmol) を加え、室温に昇温後4.5時間攪拌した。さらにこれにベンジルスルホニルクロリド (658 mg, 3.45 mmol) を加え、1.5時間攪拌した。これに、2 M 塩酸を加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、有機層を水で1回、飽和食塩水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (23 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1  $\rightarrow$  7/3) で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノピラジン (c-20) を黄色アモルファスとして得た (487 mg, 67.4%)。R<sub>f</sub> = 0.53 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 84–86.5 °C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 307 (4.26), 293.5 (4.21), 259.5 (4.19)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 320 (4.30), 298.5 (4.25), 265 (4.29)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.29 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 5.00 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 7.13–7.17 (m, 2H), 7.18–7.23 (m, 1H), 7.25–7.33 (m, 4H), 7.39–7.45 (m, 10H), 8.09–8.14 (AA' BB', 2H), 9.21 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  20.9, 37.4, 61.0 (1C $\times$ 2), 122.7 (2C), 126.4, 126.8 (1C $\times$ 2), 128.2 (2C), 128.5 (2C), 128.8 (2C $\times$ 2), 129.3, 129.6 (2C), 131.6 (2C $\times$ 2), 132.1, 137.5, 139.2, 141.0, 151.3, 152.5, 155.6, 169.0。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 509, 534, 611, 696, 777, 876, 912, 1144, 1163, 1198, 1354, 1375, 1416, 1433, 1757。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 628.1582 (M+H, C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> requires 628.1576)。

[0167] [合成例 8]

3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (h-セレンテラスルホンアミド) (c-15)

[化66]

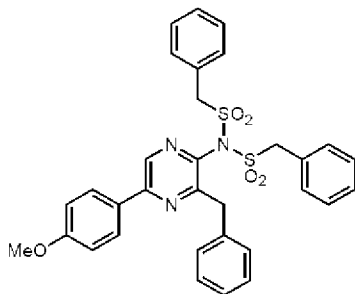


[0168] 5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノピラジン(c-20) (435 mg, 694  $\mu\text{mol}$ )をメタノール (8 mL)に溶解し、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (1.9 mL)を加え、65  $^{\circ}\text{C}$ で9.5時間攪拌した。室温まで放冷後、これに2 M 塩酸を加え反応を停止した後、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (35 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/1  $\rightarrow$  2/1)で精製し、3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (h-セレンテラスルホンアミド) (c-15)を淡黄色固体として得た (286 mg, 95.6%)。R<sub>f</sub> = 0.27 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。M p. 144–147  $^{\circ}\text{C}$  (dec.)。UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 336 (4.06), 290 (4.23), 277.5 (4.25)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 351.5 (4.09), 283 (4.34)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.22 (s, 2H), 4.91 (s, 2H), 6.83–6.88 (AA' BB', 2H), 7.14–7.20 (m, 1H), 7.22–7.29 (m, 4H), 7.36 (s, 5H), 7.86–7.93 (AA' BB', 2H), 8.83 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 10.40 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  38.0, 59.6, 115.8 (2C), 126.2, 126.5, 127.7, 128.28 (2C), 128.33 (2C), 128.5 (2C), 128.9 (2C), 129.9, 130.9 (2C), 136.0, 138.2, 144.2, 145.8, 146.5, 158.8。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 527, 542, 604, 698, 835, 893, 912, 926, 935, 1117, 1130, 1188, 1213, 1244, 1267, 1321, 1402, 1452, 1495, 1516, 1595, 1609, 3055, 3221, 3522。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 432.1385 (M+H, C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S requires 432.1382)。

## [0169] [合成例 9]

3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノ-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-21)

[化67]



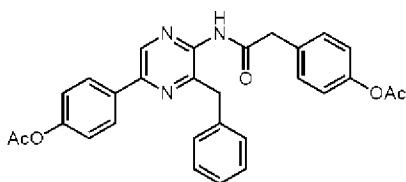
[0170] 2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-11) (Adamczyk M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (200 mg, 687  $\mu$ mol)を脱水ジクロロメタン (2 mL)に溶解し、これにトリエチルアミン (145  $\mu$ L, 1.04 mmol)を加え、0  $^{\circ}$ Cに冷却した。これにベンジルスルホニルクロリド (196 mg, 1.03 mmol)を加え、室温に昇温し1時間攪拌した。さらにこれにトリエチルアミン (145  $\mu$ L, 1.04 mmol)、脱水ジクロロメタン (1.0 mL)、ベンジルスルホニルクロリド (131 mg, 687  $\mu$ mol)を順次加え、1時間攪拌した。さらにこれにトリエチルアミン (145  $\mu$ L, 1.04 mmol)、脱水ジクロロメタン (1.0 mL)、ベンジルスルホニルクロリド (131 mg, 687  $\mu$ mol)を順次加え、2時間攪拌した。これに2 M 塩酸を加え反応を停止し、水層と有機層を分離し飽和食塩水で1回、飽和硫酸ナトリウム水溶液で1回洗浄した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (23 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1)で精製し、3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノ-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-21)を黄色アモルファスとして得た (320 mg, 77.6%)。R<sub>f</sub> = 0.63 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 78-80  $^{\circ}$ C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 332.5 (4.31), 299.5 (4.20),

277.5 (4.06)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 342.5 (4.29), 303 (4.18), 280.5 (4.15)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.87 (s, 3H), 3.97 (s, 2H), 4.78 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 6.96–7.02 (AA' BB', 2H), 7.17 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.19–7.33 (m, 3H), 7.34–7.44 (m, 10H), 7.92–7.98 (AA' BB', 2H), 8.80 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  37.4, 55.4, 61.0 (1C×2), 114.7 (2C), 126.4, 126.8 (1C×2), 128.1 (2C), 128.78 (2C), 128.84 (2C×2), 129.0, 129.3, 129.6 (2C), 131.6 (2C×2), 137.6, 138.5, 140.1, 151.9, 155.4, 161.5。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 501, 611, 696, 773, 876, 922, 1028, 1144, 1163, 1250, 1354, 1373, 1422, 1431, 1454, 1495, 1514, 1607。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 600.1639 (M+H, C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> requires 600.1627)。

[0171] [合成例 10]

5-(4-アセトキシフェニル)-2-(4-アセトキシフェニル)アセチルアミノ-3-ベンジルピラジン (c-29)

[化68]



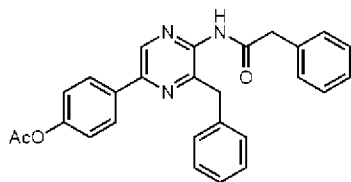
[0172] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-ヒドロキシフェニル)アセチルアミノ]ピラジン (セレンテラミド) (c-4) (Inouye, S. & Hosoya, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 386, 617–622 (2009) に記載の方法によって製造) (410 mg, 997  $\mu$ mol) をピリジン (11 mL) に溶解し、0 °C に冷却した。これに、無水酢酸 (475  $\mu$ L, 5.02 mmol) を加え、室温に昇温後 22 時間攪拌した。これに、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルを加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した。有機層に残った沈殿物をろ過した後、真

空乾燥行い、5-(4-アセトキシフェニル)-2-(4-アセトキシフェニル)アセチルアミノ-3-ベンジルピラジン (c-29) を無色固体として得た (300 mg, 60.7%)。R<sub>f</sub> = 0.28 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp. 225-227 °C。UV (MeOH, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 318 (4.14), 290 (4.12), 259 (4.19)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.26 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 7.08 (t, J = 8.6 Hz, 4H), 7.15 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.21 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.24-7.29 (AA' BB', 2H), 7.34-7.40 (AA' BB', 2H), 8.08-8.14 (AA' BB', 2H), 8.95 (s, 1H), 10.67 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20.89, 20.92, 41.6, 121.8 (2C), 122.5 (2C), 126.3, 127.8 (2C), 128.3 (2C), 128.9 (2C), 130.3 (2C), 132.9, 133.2, 137.9, 138.1, 144.4, 147.5, 149.3, 150.6, 151.7, 169.1, 169.3, 169.9 (one carbon at benzyl position was unobservable due to overlapping with septet peak of DMSO)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 515, 590, 654, 704, 854, 918, 1016, 1157, 1190, 1211, 1238, 1346, 1371, 1418, 1449, 1493, 1543, 1672, 1751, 3287。HRMS (FAB+) m/z 496.1863 (M+H, C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> requires 496.1872)。

[0173] [合成例 11]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン (c-30)

[化69]



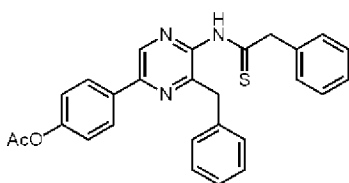
[0174] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19) (194 mg, 607 μmol) をピリジン (2 mL) に溶解し、4-(ジメチルアミノ)ピリジン (7.8 mg, 64 μmol) を加えて 0 °C に冷却した。こ

れにフェニルアセチルクロリド (160  $\mu$ L, 1.21 mmol)を加えて、室温に昇温し2時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、桐山ロートを用いて沈殿物をろ過した後、残渣を真空乾燥し5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(フェニルアセチルアミノ)ピラジン(c-30)を無色固体として得た (53.9 mg, 20.3%)。R<sub>f</sub> = 0.24 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 228–231 °C。UV (MeOH, 0.3% DMSO)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 318 (4.19), 290 (4.17), 259 (4.24)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.29 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 7.01–7.08 (AA' BB', 2H), 7.11–7.22 (m, 3H), 7.23–7.29 (m, 3H), 7.31–7.38 (m, 4H), 8.07–8.14 (AA' BB', 2H), 8.93 (s, 1H), 10.57 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 706, 851, 918, 1157, 1206, 1223, 1346, 1366, 1410, 1449, 1495, 1543, 1576, 1670, 1755, 3248。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z438.1806 (M+H, C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> requires 438.1818)。

[0175] [合成例 1 2]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン (c-31)

[化70]



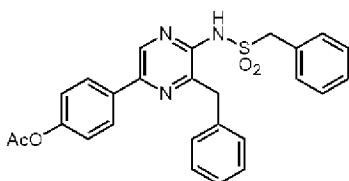
[0176] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン (h-セレンテラチオアミド) (c-14) (183 mg, 444  $\mu$ mol)をピリジン (2 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これに、無水酢酸 (55  $\mu$ L, 0.58 mmol)を加え、室温に昇温後2時間攪拌した。さらにこれに、無水酢酸 (25  $\mu$ L, 0.26 mmol)を加え、室温で2.5時間攪拌した。これに、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と酢酸エチルを加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、有機層を水で3回、飽和食塩水で1回洗浄し、無水

硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (22 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製した後、得られた固体をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー (7 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(フェニルチオアセチルアミノ)ピラジン(c-31)を淡黄色固体として得た (96.3 mg, 47.8%)。R<sub>f</sub> = 0.36 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 2/1)。Mp. 143-145 °C。UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 320 (4.30), 258 (4.41)。UV (pH 7.4 PB) λ<sub>max</sub> (log ε) 346 (4.36), 274 (4.35)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.29 (s, 3H), 3.95 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 7.00 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.12-7.24 (m, 3H), 7.26-7.32 (AA' BB', 3H), 7.36 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.12-8.18 (AA' BB', 2H), 9.04 (s, 1H), 12.23 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20.9, 39.4, 51.6, 122.6 (2C), 126.4, 127.0, 128.0 (2C), 128.3 (2C), 128.4 (2C), 128.9 (2C), 129.0 (2C), 132.8, 136.8, 137.9, 138.6, 145.9, 149.0, 151.9, 152.4, 169.1, 204.7。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 700, 1128, 1165, 1179, 1200, 1238, 1368, 1389, 1416, 1441, 1493, 1508, 1730, 3265。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 454.1583 (M+H, C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S requires 454.1589)。

[0177] [合成例 13]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(ベンジルスルホニルアミノ)ピラジン (c-32)

[化71]



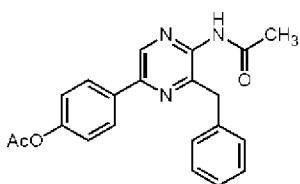
[0178] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19) (303 mg, 949 μmol) をピリジン (3 mL) に溶解し、0 °C

に冷却した。これにベンジルスルホニルクロリド (362 mg, 1.90 mmol) を加えて、そのまま30分間攪拌した。さらにこれに、ベンジルスルホニルクロリド (89.7 mg, 470  $\mu$ mol) を加え、そのまま30分間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した後、ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を水で1回、2 M 塩酸で1回、飽和硫酸ナトリウム水溶液で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣を桐山ロートを用いてろ過した後、残渣を酢酸エチル/メタノール (1/1) で再結晶し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-(ベンジルスルホニルアミノ)ピラジン (c-32) を無色固体として得た (124 mg, 27.6%)。R<sub>f</sub> = 0.56 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp. 240–241 °C。UV (MeOH, 0.3% DMSO)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 324 (4.06), 286.5 (4.13), 264 (4.19)。UV (pH PB, 0.3% DMSO)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 338.5 (4.01), 290 (4.01), 273.5 (4.02)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.29 (s, 3H), 4.25 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 7.14–7.21 (m, 1H), 7.23–7.28 (m, 6H), 7.35 (s, 5H), 8.03–8.12 (AA' BB', 2H), 8.93 (s, 1H), 10.55 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 530, 700, 889, 920, 1157, 1179, 1204, 1223, 1325, 1420, 1454, 1748, 3267。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 474.1486 (M+H, C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requires 474.1488)。

[0179] [合成例 1 4]

5-(4-アセトキシフェニル)-2-アセチルアミノ-3-ベンジルピラジン (c-33)

[化72]



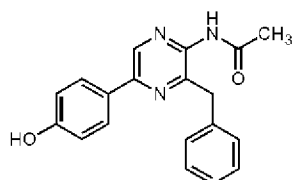
[0180] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル

)ピラジン (セレンテラミン) (c-5) (Adamczyk, M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (471 mg, 1.70 mmol)をピリジン (3.6 mL)、クロロホルム(9 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これにアセチルクロリド (910  $\mu$ L, 12.8 mmol)を加えて、室温に昇温後、1時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した後、ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (45 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1  $\rightarrow$  1/3)で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アセチルアミノ-3-ベンジルピラジン (c-33)を淡黄色固体として得た(355 mg, 57.8%)。R<sub>f</sub> = 0.17 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp. 215.5-217 °C (dec.)。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 317 (4.09), 290 (4.08), 259 (4.15)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 315 (4.07), 292 (3.98), 253.5 (4.08)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.05 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 4.18 (s, 2H), 7.15-7.22 (m, 3H), 7.23-7.29 (m, 4H), 8.09-8.14 (AA' BB' , 2H), 8.94 (s, 1H), 10.31 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  20.9, 23.0, 39.9, 122.5 (2C), 126.3, 127.7 (2C), 128.3 (2C), 129.0 (2C), 133.2, 137.8, 138.2, 144.7, 147.3, 150.5, 151.6, 169.1, 169.2。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 706, 916, 1016, 1159, 1223, 1260, 1369, 1450, 1497, 1545, 1578, 1670, 1751, 3279。H RMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 362.1509 (M+H, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>requires 362.1505)。

[0181] [合成例 15]

2-アセチルアミノ-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (セレンテラアセトアミド) (c-25)

[化73]

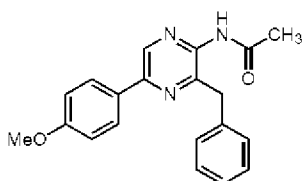


[0182] 5-(4-アセトキシフェニル)-2-アセチルアミノ-3-ベンジルピラジン(c-33) (355 mg, 982  $\mu$ mol)をメタノール (8 mL)に溶解し、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (1.8 mL)を加え、1時間攪拌した。これに2 M 塩酸を加え反応を停止した後、酢酸エチルで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (37 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/2)で精製した後、得られた固体をメタノールを用いて再結晶し、2-アセチルアミノ-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン(セレンテラアセトアミド)(c-25)を無色固体として得た (109 mg, 34.8%)。R<sub>f</sub> = 0.23 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/2)。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 332 (4.14), 294 (4.15), 275.5 (4.12)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 328 (4.14), 289.5 (4.03), 270 (4.08)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.03 (s, 3H), 4.13 (s, 2H), 6.84-6.89 (AA' BB', 2H), 7.14-7.21 (m, 3H), 7.23-7.29 (m, 2H), 7.89-7.94 (AA' BB', 2H), 8.80 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 10.21 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 592, 631, 702, 746, 837, 1128, 1157, 1173, 1211, 1231, 1279, 1314, 1368, 1435, 1497, 1518, 1543, 1582, 1591, 1611, 1672, 3026, 3073, 3254。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 320.1399 (M+H, C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> requires 320.1399)。

[0183] [合成例 16]

2-アセチルアミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-24)

[化74]

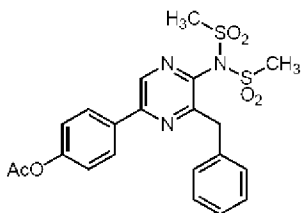


[0184] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-11) (Adamczyk, M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (199 mg, 681  $\mu$ mol)を脱水ピリジン (1.4 mL)、およびクロロホルム (4 mL)に溶解し、0 °Cに冷却した。これにアセチルクロリド (365  $\mu$ L, 5.13 mmol)を加えて、室温に昇温後、1時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した後、ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をメタノールを用いて再結晶し、2-アセチルアミノ-3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)ピラジン (c-24)を無色固体として得た (74.6 mg, 32.9%)。R<sub>f</sub> = 0.14 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 329.5 (4.18), 293 (4.18), 274 (4.16)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 328 (4.11), 289.5 (4.01), 270.5 (4.05)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.04 (s, 3 H), 3.81 (s, 3H), 4.15 (s, 2H), 7.02-7.08 (AA' BB' , 2H), 7.15-7.22 (m, 3H), 7.23-7.29 (m, 2H), 8.00-8.05 (AA' BB' , 2H), 8.87 (s, 1H), 10.25 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 698, 744, 833, 1032, 1157, 1175, 1213, 1256, 1285, 1327, 1368, 1416, 1450, 1499, 1543, 1587, 1609, 1670, 3258。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 334.1557 (M+H, C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> requires 334.1556)。

[0185] [合成例 17]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(メタンシルホニル)アミノピラジン (c-39)

[化75]

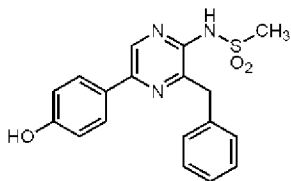


[0186] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19) (337 mg, 1.05 mmol) を脱水ジクロロメタン (9 mL) に溶解し、これにトリエチルアミン (220  $\mu$ L, 1.58 mmol) を加え、室温で攪拌した。これに、メタンスルホニルクロリド (245  $\mu$ L, 3.16 mmol) を加え、そのまま1.5時間攪拌した。これに、2 M 塩酸を加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、有機層を飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (28 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/1  $\rightarrow$  3/2) で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(メタンスルホニル)アミノピラジン (c-39) を黄色アモルファスとして得た (241 mg, 48.3%)。R<sub>f</sub> = 0.32 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 165.5–167 °C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 306 (4.29), 293 (4.25), 259 (4.21)。UV (pH PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 336.5 (4.19), 264 (4.09)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2.29 (s, 3H), 3.59 (s, 6H), 4.36 (s, 2H), 7.20–7.26 (m, 1H), 7.26–7.35 (m, 6H), 8.11–8.17 (AA' BB', 2H), 9.14 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  20.9, 38.5, 43.1 (1C $\times$ 2), 122.7 (2C), 126.6, 128.3 (2C), 128.6 (2C), 129.5 (2C), 132.1, 137.6, 139.2, 141.5, 151.4, 152.5, 155.6, 169.0。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 509, 523, 706, 756, 766, 912, 974, 1015, 1163, 1200, 1321, 1368, 1418, 1435, 1528, 1603, 1755, 3032。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 476.0936 (M+H, C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> requires 476.0950)。

[0187] [合成例 18]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(メタンスルホニルアミノ)ピラジン (セレンテラメシルアミド) (c-34)

[化76]

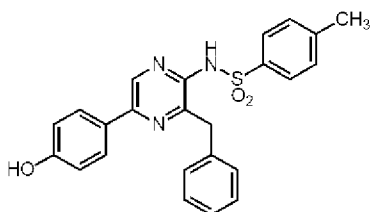


[0188] 5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(メタンシルホニル)アミノピラジン (c-39) (239 mg, 503  $\mu$ mol) をメタノール (5 mL) に懸濁させ、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (1.2 mL) を加え、65  $^{\circ}$ Cで30分間攪拌した。室温まで放冷後、これに2 M 塩酸を加え反応を停止した後、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (23 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) で精製し、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)2-(メタンシルホニルアミノ)ピラジン (セレンテラメシルアミド) (c-34) を淡黄色固体として得た (166 mg, 92.6%)。R<sub>f</sub> = 0.30 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp. 208–209  $^{\circ}$ C (dec.)。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 335 (4.12), 290 (4.25), 276 (4.27)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 349 (4.14), 281 (4.38)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3.36 (s, 3H), 4.25 (s, 2H), 6.82–6.87 (AA' BB', 2H), 7.15–7.23 (m, 1H), 7.29 (d, J = 5.0 Hz, 4H), 7.83–7.88 (AA' BB', 2H), 8.73 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 10.41 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  38.2, 42.7, 115.8 (2C), 126.4, 126.6, 127.7 (2C), 128.4 (2C), 129.0 (2C), 135.9, 138.1, 144.3, 146.0, 146.4, 158.8。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 521, 538, 588, 606, 700, 750, 827, 841, 889, 916, 939, 970, 1118, 1138, 1153, 1175, 1213, 1273, 1314, 1400, 1456, 1495, 1609, 3206。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 356.1060 (M+H, C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S requires 356.1069)。

[0189] [合成例 19]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-メチルフェニル)スルホニルアミノ]ピラジン (セレンテラ-p-トシルアミド) (c-35)

[化77]



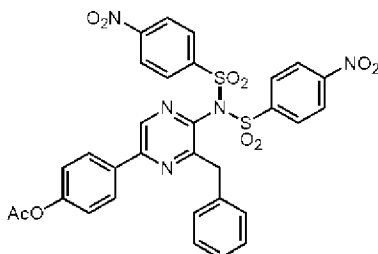
[0190] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (セレンテラミン) (c-5) (Adamczyk M. et al., Org. Prep. Proced. Int., 33, 477-485 (2001)に記載の方法によって製造) (199 mg, 718  $\mu$ mol)をピリジン (1.5 mL)に溶解し、これに4-(ジメチルアミノ)ピリジン (9.0 mg, 74  $\mu$ mol)を加え、0 °Cに冷却した。これに、p-トルエンスルホニルクロリド (410 mg, 2.15 mmol)を加え、室温まで昇温後2時間攪拌した。これに、2 M 塩酸とジクロロメタンを加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、ジクロロメタンで3回抽出した。飽和硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をメタノール (5 mL)に溶解し、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (1.2 mL)を加え、65 °Cで30分間攪拌した。室温まで放冷後、これに2 M 塩酸を加え反応を停止した後、酢酸エチルで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (23 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)で精製し、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-メチルフェニル)スルホニルアミノ]ピラジン (セレンテラ-p-トシルアミド) (c-35)を黄色固体として得た (155 mg, 37.1% (2 steps))。R<sub>f</sub> = 0.25 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 181-182.5 °C。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log

$\epsilon$ ) 336.5 (4.10), 291.5 (4.26), 277 (4.27)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 351 (4.14), 282.5 (4.37)。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.36 (s, 3 H), 4.27 (s, 2H), 6.81 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.17–7.24 (m, 1H), 7.25–7.32 (m, 4H), 7.36 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.79 (t,  $J = 8.7$  Hz, 4H), 8.53 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 10.74 (s, 1H)。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 474, 525, 546, 567, 610, 667, 698, 743, 816, 839, 876, 941, 1088, 1148, 1165, 1215, 1269, 1321, 1364, 1404, 1447, 1495, 1516, 1593, 1609, 3283。HRMS (FAB<sup>+</sup>)  $m/z$  432.1382 (M+H,  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$  requires 432.1382)。

[0191] [合成例 20]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ニトロフェニルスルホニル)アミノピラジン(c-40)

[化78]



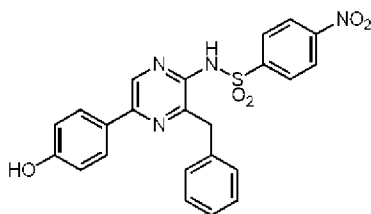
[0192] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19) (140 mg, 438  $\mu\text{mol}$ )をピリジン (2 mL)に溶解し、これに4-(ジメチルアミノ)ピリジン (6.0 mg, 49  $\mu\text{mol}$ )を加えた。これに室温で攪拌しながら、p-ニトロベンゼンスルホニルクロリド (293 mg, 1.32 mmol)を加えて、そのまま1.5時間攪拌した。さらにこれに、p-ニトロベンゼンスルホニルクロリド (195 mg, 880  $\mu\text{mol}$ )を加え、17時間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した後、ジクロロメタンで2回抽出した。有機層を水で1回、飽和硫酸ナトリウム水溶液で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラム

クロマトグラフィー (24 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1 → 3/1 → 7/3 → 酢酸エチルのみ) で精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ニトロフェニルスルホニル)アミノピラジン(c-40)を暗褐色固体として得た (157 mg, 52.1%)。R<sub>f</sub> = 0.62 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 227-229.5 °C (dec.)。UV (MeOH, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 309 (3.99), 258 (4.21)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.30 (s, 3H), 4.22 (s, 2H), 7.19-7.27 (m, 1H), 7.29-7.35 (m, 6H), 8.05-8.10 (AA' BB', 4H), 8.14-8.19 (AA' BB', 2H), 8.39-8.44 (AA' BB', 4H), 9.13 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20.9, 38.0, 122.8 (2C), 124.8 (2C×2), 126.6, 128.3 (2C), 128.7 (2C), 129.6 (2C), 130.7 (2C×2), 131.9, 137.3, 139.8, 140.3, 142.1 (1C×2), 151.1 (1C×2), 151.9, 152.7, 156.2, 169.0。I, R (KBr, cm<sup>-1</sup>) 548, 598, 617, 687, 737, 775, 810, 854, 880, 897, 916, 935, 1013, 1165, 1180, 1206, 1315, 1348, 1368, 1385, 1404, 1418, 1435, 1530, 1603, 1755, 3107。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 690.0975 (M+H, C<sub>31</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> requires 690.0965)。

[0193] [合成例 2 1]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-ニトロフェニル)スルホニルアミノ]ピラジン (セレンテラ-p-ノシルアミド) (c-36)

[化79]



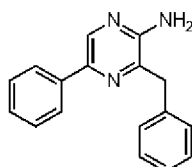
[0194] 5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ニトロフェニルスルホニル)アミノピラジン(c-40) (151 mg, 219 μmol)をメタノール (3 mL)に懸濁させ、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (600 μL)を加え、65 °Cで30分間攪拌した。これにさらにメタノール (1

mL)、10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (400  $\mu$ L) を順次加え、1時間攪拌した。室温まで放冷後、2 M 塩酸を加え反応を停止し、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (8 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2) で精製し、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-ニトロフェニル)スルホニルアミノ]ピラジン (セレンテラー p-ノシルアミド) (c-36) を橙色固体として得た (88.8 mg, 87.7%)。R<sub>f</sub> = 0.13 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 176–177.5 °C (dec.)。UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 338 (4.11), 276.5 (4.42)。UV (pH 7.4 PB)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 347 (4.15), 278.5 (4.49)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.28 (s, 2H), 6.81 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.17–7.25 (m, 1H), 7.29 (s, 4H), 7.81 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.52 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 11.25 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 633, 698, 748, 773, 827, 853, 970, 1084, 1121, 1231, 1263, 1277, 1350, 1395, 1501, 1514, 1528, 1611, 3227。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 463.1086 (M+H, C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S requires 463.1076)。

[0195] [合成例 22]

2-アミノ-3-ベンジル-5-フェニルピラジン (c-41)

[化80]



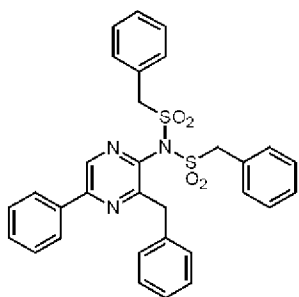
アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-ブロモピラジン (c-10) (1.66 g, 6.27 mmol) を1,2-ジメトキシエタン (17 mL)、エタノール (13 mL) に溶解し、これに室温で攪拌しながら2 M 炭酸ナトリウム水溶液 (31.4 mL, 62.8 mmol)、ジクロロビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) (

221 mg, 315  $\mu$ mol)、フェニルボロン酸 (996 mg, 8.16 mmol) を順次加え、90 °C で2.5時間攪拌した。室温まで放冷後、飽和食塩水と酢酸エチルを加え反応を停止し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (50 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2  $\rightarrow$  1/1) で精製した後、得られた固体を酢酸エチルを用いて2回再結晶し、2-アミノ-3-ベンジル-5-フェニルピラジン (c-41) を黄色固体として得た (982 mg, 59.9%)。R<sub>f</sub> = 0.30 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.07 (s, 2H), 6.41 (s, 2H), 7.18 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.24–7.31 (m, 3H), 7.34 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 8.41 (s, 1H)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 596, 664, 694, 716, 733, 754, 773, 908, 937, 1070, 1152, 1217, 1233, 1396, 1427, 1450, 1462, 1493, 1543, 1636, 3024, 3125, 3291, 3487。HRMS (EI<sup>+</sup>) m/z 261.1269 (M, C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub> requires 261.1266)。

[0196] [合成例 23]

3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノ-5-フェニルピラジン (c-42)

[化81]



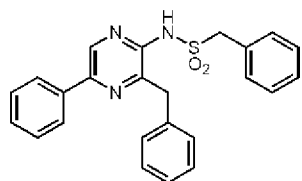
[0197] アルゴン雰囲気下、2-アミノ-3-ベンジル-5-フェニルピラジン (c-41) (852 mg, 3.26 mmol) を脱水ジクロロメタン (25 mL) に溶解し、これにトリエチルアミン (1.38 mL, 9.87 mmol) を加え、0 °C に冷却した。これに、ベ

ンジルスルホニルクロリド (1.87 g, 9.80 mmol) を加え、室温に昇温後23.5時間攪拌した。これに、2 M 塩酸を加え反応を停止し、水層と有機層を分離した後、有機層を水で1回、飽和食塩水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(56 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1)で精製し、3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノ-5-フェニルピラジン (c-42) を赤橙色アモルファスとして得た (1.27 g, 68.2%)。R<sub>f</sub> = 0.70 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 71.5–74.5 °C。UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 304 (4.20), 257 (4.15)。UV (pH 7.4 PB) λ<sub>max</sub> (log ε) 331 (4.13), 269 (4.12)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.89 (s, 2H), 5.00 (s, 1H), 5.04 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 7.15 (d, J= 7.0 Hz, 2H), 7.18–7.24 (m, 1H), 7.25–7.32 (m, 2H), 7.38–7.46 (m, 10H), 7.50–7.55 (m, 3H), 8.04–8.10 (m, 2H), 9.21 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 2/1) δ 38.3, 61.7 (1C×2), 127.0, 127.5, 127.8 (1C×2), 128.8 (2C), 129.4 (2C×2), 129.7 (2C), 129.9 (2C), 130.2 (2C), 131.3, 132.2 (2C), 135.3, 138.3, 139.6, 142.0, 153.0, 156.5。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 507, 538, 557, 611, 629, 694, 723, 748, 766, 779, 876, 920, 1144, 1163, 1252, 1354, 1375, 1427, 1454, 1495, 1530, 3032。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 570.1526 (M+H, C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> requires 570.1521)。

[0198] [合成例 2 4]

3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-フェニルピラジン (ジデオキシセレンテラスルホンアミド) (c-37)

[化82]

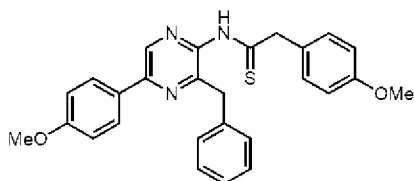


[0199] 3-ベンジル-2-ビス(ベンジルスルホニル)アミノ-5-フェニルピラジン (c-42) (1.15 g, 2.02 mmol) をメタノール (24 mL) に懸濁させ、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (5.7 mL) を加え、65 °C で30分間攪拌した。室温まで放冷後、2 M 塩酸を加え反応を停止し、酢酸エチルで2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルを用いて再結晶し、3-ベンジル-2-ベンジルスルホニルアミノ-5-フェニルピラジン (ジデオキシセレンテラスルホンアミド) (c-37) を無色固体として得た (662 mg, 78.9%)。R<sub>f</sub> = 0.62 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)。Mp. 207–208.5 °C。UV (MeOH, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 322.5 (4.01), 285.5 (4.08), 261 (4.14)。UV (pH 7.4 PB, 0.3% DMSO) λ<sub>max</sub> (log ε) 343 (4.01), 280.5 (4.07)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.26 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 7.15–7.21 (m, 1H), 7.23–7.30 (m, 4H), 7.36 (s, 5H), 7.40–7.53 (m, 3H), 8.04 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 8.95 (s, 1H), 10.55 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 2/1) δ 38.5, 60.1, 126.7 (2C), 126.8, 128.8 (2C), 128.9, 129.0 (2C), 129.4 (2C), 129.5 (2C), 129.7, 130.4, 131.4 (2C), 136.3, 137.3, 138.5, 145.8, 146.3, 146.6。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 447, 515, 532, 546, 615, 664, 692, 748, 783, 889, 1117, 1157, 1179, 1323, 1400, 1425, 1450, 1495, 3034, 3267。HRMS (FAB<sup>+</sup>) m/z 416.1429 (M+H, C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S requires 416.1433)。

[0200] [合成例 25]

3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-[(4-メトキシフェニル)チオアセチルアミノ]ピラジン (c-44)

[化83]



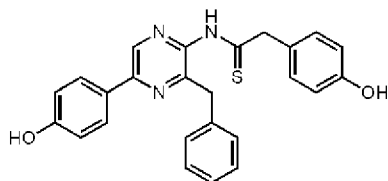
[0201] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-[(4-メトキシフェニル)アセチルアミノ]ピラジン (c-43) (Inouye, S. & Hosoya, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386, 617-622 (2009) に記載の方法によって製造) (1.00 g, 2.28 mmol) を脱水トルエン (30 mL) に懸濁し、室温で攪拌しながらこれにLawesson試薬 (552 mg, 1.37 mmol) を加え、17時間加熱還流した。還流後、室温まで放冷し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (100 g, ジクロロメタン/酢酸エチル = 49/1) で精製し、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-[(4-メトキシフェニル)チオアセチルアミノ]ピラジン (c-44) を黄色油状物質として得た (823 mg, 79.4%)。R<sub>f</sub> = 0.43 (ジクロロメタン/酢酸エチル = 19/1)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 6.90-6.96 (AA' BB', 2H), 6.98-7.04 (AA' BB', 2H), 7.05-7.11 (AA' BB', 2H), 7.13-7.26 (m, 3H), 7.38-7.50 (m, 2H), 8.06-8.11 (AA' BB', 2H), 8.99 (s, 1H), 12.12 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 39.3, 50.8, 55.0, 55.3, 113.8 (2C), 114.5 (2C), 126.3, 127.6, 128.18 (2C), 128.21 (2C), 128.8, 128.9 (2C), 130.0 (2C), 137.8, 138.0, 145.0, 149.6, 152.1, 158.4, 160.8, 205.1。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 704, 835, 1030, 1113, 1175, 1250, 1292, 1304, 1319, 1371, 1422, 1439, 1493, 1510, 1607, 2835, 2932, 2957, 3150。HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z 456.1747 ((M+H)<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup>requires 456.1740)。

[0202] [合成例 26]

3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-ヒドロキシフェニル)

チオアセチルアミノ]ピラジン (セレンテラチオアミド) (c-45)

[化84]



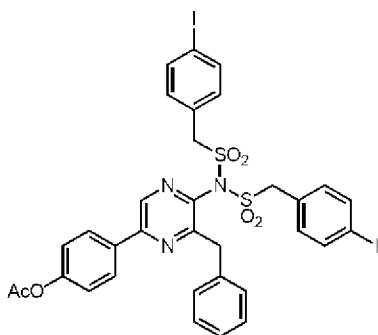
[0203] アルゴン雰囲気下、3-ベンジル-5-(4-メトキシフェニル)-2-[(4-メトキシフェニル)チオアセチルアミノ]ピラジン (c-44) (823 mg, 1.81 mmol) を脱水ジクロロメタン (30 mL) に溶解し、これに室温にて1.0 M 三臭化ホウ素/ジクロロメタン溶液 (6.80 mL, 6.80 mmol) を加えた後、反応溶液を21時間加熱還流した。室温まで放冷後、これに、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、ジクロロメタンを除去した。懸濁液をろ過し残渣を乾燥し、粗生成物である赤色固体591 mgを得た。これを酢酸エチルに溶解し、n-ヘキサンを加え生成物を析出させた。ろ過により析出した固体を回収し、減圧下で乾燥することにより、3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシフェニル)-2-[(4-ヒドロキシフェニル)チオアセチルアミノ]ピラジン (セレンテラチオアミド) (c-45) を橙色固体として得た (514 mg, 66.6%)。R<sub>f</sub> = 0.23 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp. 101–103 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.90 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 6.71–6.77 (AABB', 2H), 6.85–6.91 (AA' BB', 2H), 6.97–7.03 (AA' BB', 2H), 7.12–7.25 (m, 3H), 7.27–7.34 (m, 2H), 7.94–8.00 (AA' BB', 2H), 8.91 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 12.05 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 50.9, 115.1 (2C), 115.8 (2C), 126.0, 126.2, 127.0, 128.18 (2C), 128.24 (2C), 128.9 (2C), 129.9 (2C), 137.4, 138.0, 144.6, 149.9, 152.0, 156.4, 159.3, 205.3 (one carbon at benzyl position was unobservable due to overlapping with septet peak of DMSO)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 515, 561, 706, 731, 837, 908, 935, 1063, 1130, 1171, 1238,

1315, 1371, 1443, 1514, 1609, 2808, 3026, 3159。HRMS (ESI<sup>+</sup>) m/z 428.1434 ((M+H)<sup>+</sup>, C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup>requires 428.1427)。

[0204] [合成例 27]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ヨードベンジルスルホニル)アミノピラジン (c-46)

[化85]



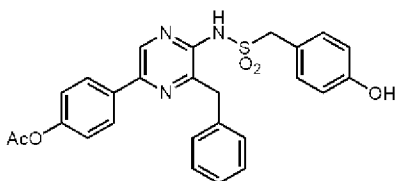
[0205] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-2-アミノ-3-ベンジルピラジン (c-19) (681 mg, 2.13 mmol) を脱水ジクロロメタン (40 mL) に溶解し、これにトリエチルアミン (1.20 mL, 8.53 mmol) を加え、0 °C に冷却した。これに、4-ヨードベンジルスルホニルクロリド (Liu, S. et al., *Org. Lett.*, 3, 1571-1574 (2001) に記載の方法によって製造) (2.70 g, 8.53 mmol) を加え、室温に昇温後、26時間加熱還流した。室温まで放冷後、これに、2 M 塩酸およびジクロロメタンを加え、水層と有機層を分離した後、有機層を水で1回、飽和食塩水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過により除去した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (100 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1) で精製し、得られた生成物にジクロロメタンを加え、ろ過することにより不溶物を除去した。この操作を5回繰り返した後、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルを用いて再結晶し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ヨードベンジルスルホニル)アミノピラジン (c-46) を無色固体として得

た (597 mg, 31.8%)。R<sub>f</sub> = 0.21 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1)。Mp. 166–167 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2.30 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 5.00 (d, 2H, J = 13.6 Hz), 5.19 (d, 2H, J = 13.6 Hz), 7.11–7.17 (AA' BB', 2H), 7.19–7.34 (m, 9H), 7.78–7.83 (AA' BB', 4H), 8.07–8.15 (AA' BB', 2H), 9.19 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 20.9, 37.5, 60.5 (2C), 96.3, 126.4, 126.5 (2C), 128.1 (2C), 128.5 (2C), 129.5 (2C), 132.0, 133.6 (4C), 137.4, 137.7 (4C), 139.2, 140.9, 151.2, 152.5, 155.5, 168.9。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 519, 575, 627, 704, 775, 835, 912, 1013, 1057, 1159, 1200, 1254, 1356, 1377, 1483, 1601, 1757。Anal. Calcd. For C<sub>33</sub>H<sub>27</sub>I<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 45.06; H, 3.09; N, 4.78. Found: C, 45.18; H, 3.24; N, 4.78。

[0206] [合成例 28]

5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-[(4-ヒドロキシベンジル)スルホニルアミノ]ピラジン (c-48)

[化86]



[0207] アルゴン雰囲気下、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-ビス(4-ヨードベンジルスルホニル)アミノピラジン(c-46) (402 mg, 457 μmol) をジメチルスルホキシド (DMSO) (4 mL) に溶解し、これに室温にて bis(pinacolato)diboron (284 mg, 1.12 mmol)、酢酸カリウム (236 mg, 2.41 mmol)、[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II) ジクロロメタン錯体 (1:1) (32.7 mg, 40.1 μmol) を順次加えた後、80 °C で 18 時間攪拌した。室温まで放冷後、これに水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。有機層を水で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて

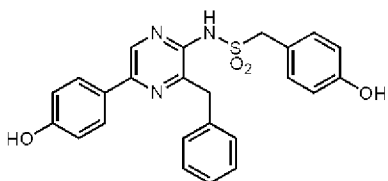
乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(50 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 2/1)にて精製し、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-[4-{4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)ベンジル}スルホニルアミノ]ピラジン (c-47) と5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-[(4-ヨードベンジル)スルホニルアミノ]ピラジンの混合物を得た。

上記で得られた混合物をアセトン(10 mL)に溶解し、これに室温にてoxone(247 mg, 401  $\mu$ mol)を水(3 mL)に溶解したものを加え、そのまま室温で15分間攪拌した。これに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止し、ジクロロメタンで3回抽出した。有機層を水で1回、飽和食塩水で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(50 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 2/1、および50 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 3/2)にて精製し、得られたを無色固体を(68.5 mg)を酢酸エチルに溶解し、n-ヘキサンを加え化合物を析出させた。ろ過により析出した固体を回収し、減圧下で乾燥することにより、5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-[(4-ヒドロキシベンジル)スルホニルアミノ]ピラジン (c-48) を無色固体として得た(44.8 mg, 20.0%, 2 steps)。 $R_f = 0.45$  (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  2.30 (s, 3H), 4.26 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 6.68–6.79 (AA' BB' , 2H), 7.08–7.32 (m, 9H), 8.02–8.14 (AA' BB' , 2H), 8.94 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 10.45 (s, 1H)。 $^{13}\text{C NMR}$  (67.8 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  20.9, 37.9, 59.1, 115.3 (2C), 119.8, 122.4 (2C), 126.3, 127.2 (2C), 128.3 (2C), 128.9 (2C), 132.0 (2C), 133.3, 136.8, 137.9, 145.0, 145.4, 145.5, 151.3, 157.7, 169.1。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 536, 598, 702, 841, 891, 920, 1015, 1153, 1204, 1233, 1327, 1373, 1422, 1454, 1514, 1599, 1746, 3269。

[0208] [合成例 29]

3-ベンジル-2-(4-ヒドロキシベンジル)スルホニルアミノ-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (セレンテラスルホンアミド) (c-38)

[化87]



[0209] 5-(4-アセトキシフェニル)-3-ベンジル-2-[(4-ヒドロキシベンジル)スルホニルアミノ]ピラジン (c-48) (105 mg, 214  $\mu$ mol) をメタノール (2 mL) に溶解し、室温で攪拌しながらこれに10% (w/v) 水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mL) を加え、60  $^{\circ}$ Cで2時間攪拌した。室温まで放冷後、これに2 M 塩酸を加え反応を停止した後、酢酸エチルで3回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過することで除去し、ろ液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー (10 g, n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) およびで精製し、n-ヘキサン/酢酸エチルを用いて再結晶することで、3-ベンジル-2-(4-ヒドロキシベンジル)スルホニルアミノ-5-(4-ヒドロキシフェニル)ピラジン (セレンテラスルホンアミド) (c-38) を黄色固体として得た (43.4 mg, 45.2%)。R<sub>f</sub> = 0.29 (n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/1)。Mp . 194.5–196.5  $^{\circ}$ C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.22 (s, 2H), 4.78 (s, 2H), 6.70–6.77 (AA' BB' , 2H), 6.83–6.90 (AA' BB' , 2H), 7.10–7.21 (m, 3H), 7.23–7.31 (m, 4H), 7.85–7.95 (AA' BB' , 2H), 8.81 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 10.30 (s, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  38.0, 59.1, 115.4 (2C), 115.8 (2C), 119.9, 126.3, 126.6, 127.7 (2C), 128.3 (2C), 129.0 (2C), 132.0 (2C), 135.9, 138.2, 144.4, 145.7, 146.4, 157.7, 158.8。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 536, 602, 700, 835, 889, 1119, 1155, 1177, 1258, 1275, 1327, 1402, 1456, 1514, 1611, 3529, 3412, 3487。

Anal. Calcd. For  $C_{24}H_{21}N_3O_4S$ : C, 64.41; H, 4.73; N, 9.39. Found: C, 64.28; H, 4.74; N, 9.28。

[0210] 3. 蛍光特性の決定

[実施例 1]

合成した各CTMD類縁体の蛍光量子収率決定を以下の手順で行った。蛍光スペクトルは、Jasco（日本分光株式会社、東京）のFP-6500蛍光分光光度計を用いて25°Cで測定した。具体的には、石英セル（光路長10mm）を用い、最終濃度が750 nMになるようにCTMD類縁体をメタノール（MeOH）又は6.7 mMリン酸緩衝液（PB）（pH 7.4）に溶解し、励起波長：330 nm、発光／励起帯域幅：3 nm、レスポンス：0.5 秒、スキャン速度：100 nm/分で3回測定を行い、その平均スペクトルを、化合物蛍光スペクトルとした。蛍光量子収率決定には、スペクトル補正を行った後に使用した。

[0211] 蛍光量子収率の標準対照溶液として、硫酸キニーネを用いた。硫酸キニーネ（和光純薬）を0.1 N硫酸水溶液に溶解したのち、励起光を366 nmで、上記の蛍光測定条件で測定を行った。硫酸キニーネの量子収率を、0.55として、化合物の相対的な蛍光量子収率（蛍光強度）を算出した。

[0212]

[表1-1]

表1

No.	化合物名	$\lambda_{\text{max}}$ (MeOH)/ nm	蛍光量子収率 (MeOH)	$\lambda_{\text{max}}$ (PB) /nm	蛍光量子収率 (PB)
c-4	CTMD	427.5	0.012	451	0.001
c-29	O-Ac2-CTMD	376.5	0.086	386.5	0.029
c-13	hCTMD	424.5	0.010	399	0.003
c-16	O-Me-hCTMD	415	0.342	450	0.181
c-30	O-Ac-hCTMD	373.5	0.008	391	0.040
c-14	hCTTD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
c-17	O-Me-hCTTD	417.5	0.003	445	0.003
c-31	O-Ac-hCTTD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
c-15	hCTSD	429.5	0.066	435.5	0.137
c-18	O-Me-hCTSD	416.5	0.293	429	0.147

[表1-2]

No.	化合物名	$\lambda_{\max}$ (MeOH)/ nm	蛍光量子収率 (MeOH)	$\lambda_{\max}$ (PB) /nm	蛍光量子収率 (PB)
c-32	O-Ac-hCTSD	404	0.234	420	0.239
c-25	CTAD	425.5	0.009	446.5	n.d.
c-24	O-Me-CTAD	415.5	0.345	450.5	0.199
c-33	O-Ac-CTAD	375	0.085	384	0.154
c-21	O-Me-hCTdiSD	417	0.303	421.5	0.059
c-20	O-Ac-hCTdiSD	399.5	0.185	420	0.026
c-39	O-Ac-CTdiMsD	381.5	0.079	419	0.096
c-34	CTMsD	429	0.056	437	0.096
c-35	CTpTsD	430.5	0.069	435	0.107
c-42	deoxy-hCTdiSD	398.5	0.180	420.5	0.011
c-37	dideoxy-CTSD	402.5	0.196	419.5	0.227
c-40	O-Ac-CTdipNsD	407.5	0.004	415	0.021
c-36	CTpNsD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	quinine/0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ex. 366 nm	451	0.55	451	0.55

[0213] 上記表1から、本発明のセレンテラミド類縁体 (c-14、c-17、c-31、c-15、c-18、c-32、c-21、c-20、c-39、c-34、c-35、c-42、c-37、c-40、又はc-36) が、公知のCTMD (c-4) やh-CTMD (c-13) などと異なる蛍光特性を有することが分かった。

[0214] また、本発明のセレンテラミド類縁体のうち、c-15、c-18、c-32、c-21、c-20、c-39、c-34、c-35、c-42、又はc-37は、有機溶媒又は水溶媒

中での蛍光量子収率が0.090以上であり、強い蛍光能を有することが分かった。特に、c-15、c-18、c-32、c-21、c-20、c-35、c-42、又はc-37は、有機溶媒又は水溶媒中での蛍光量子収率が0.100以上であり、特に強い蛍光能を有することが分かった。

[0215] また、多くの蛍光性化合物は、有機溶媒中で強い蛍光能があっても水溶液中では蛍光能が著しく減弱することが知られているが、特に、c-18、c-32、又はc-37については、有機溶媒中でも、水溶媒中でも、蛍光量子収率が0.100以上であり、特に強い蛍光能を保持することが分かった。

[0216] [実施例2]

実施例1で求めた蛍光量子収率は、セレンテラミド類縁体の最終濃度を750 nMとして、蛍光スペクトルを測定し算出した数値であるが、実施例1のように最終濃度を750 nMとした場合、本発明のセレンテラミド類縁体のうち、c-14、c-31、及びc-36については、メタノール中およびリン酸緩衝液中とも蛍光スペクトルを検出できず、c-25は、リン酸緩衝液中で蛍光スペクトルを検出できなかった(n.d.: 検出不可)。そこで、蛍光スペクトルを検出できなかったc-14、c-31、c-25及びc-36について、これらのセレンテラミド類縁体の最終濃度を30  $\mu$ Mとしたことを除いて実施例1と同じ条件で蛍光スペクトルを測定した。また、同様に、c-4についても、最終濃度を30  $\mu$ Mとして蛍光スペクトルを測定した。さらに、c-45についても、最終濃度を18  $\mu$ Mとしたことを除いて実施例1と同じ条件で10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.6)中で蛍光スペクトルを測定した。

c-14 (hCTTD)、c-31 (O-Ac-h-CTTD) 及び c-36 (CT-p-NsD) のメタノール中での蛍光スペクトルを図2示し、また、リン酸緩衝液中での、c-14 (hCTTD)、c-31 (O-Ac-h-CTTD)、c-25 (CTAD) 及び c-36 (CT-p-NsD) の蛍光スペクトルを図3に示す。また、10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.6)中での、c-45 (CTTD) の蛍光スペクトルも図3に示す。

また、c-4、c-14、c-31、c-25 及び c-36の蛍光スペクトルデータを表2にまとめた。

[0217] [表2]

表2

No.	化合物名	$\lambda_{\max}$ (MeOH)/ nm	蛍光強度 (MeOH)	$\lambda_{\max}$ (PB)/ nm	蛍光強度 (PB)
c-4	CTMD	428.0	80.0	444.5	1.7
c-14	hCTTD	428.0	6.5	435.5	1.4
c-31	O-Ac-hCTTD	422.0	5.2	413.5	1.7
c-25	CTAD	-	-	446.0	2.0
c-36	CT-p-NsD	433.0	3.6	433.5	0.8

[0218] この結果、c-14、c-31、及びc-36を含む本発明のセレンテラミド類縁体は、有機溶媒および水溶液中で、蛍光能を有することが明らかとなった。また、c-45については、少なくとも水溶液中で蛍光能を有することが確認できた。

尚、c-44 (CTTD) については、c-17 (hCTTD) に蛍光能があることから、c-17と同様、蛍光能を有すると考えられる。

[0219] 以上の実施例で示したように、本発明の好ましい態様のセレンテラミド類縁体は、有機溶媒中および水溶液中の両方で蛍光能を有することから、バイオアッセイや生体内分子イメージングなど幅広い用途に応用可能である。

[0220] [実施例3]

c-38について、蛍光スペクトルを、Jasco（日本分光株式会社、東京）のF P-6500蛍光分光光度計を用いて25°Cで測定した。具体的には、石英セル（光路長10mm）を用い、最終濃度が18 $\mu$ Mになるようにc-38を10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.6)に溶解し、励起波長：330 nm、発光/励起帯域幅：3 nm、レスポンス：0.5 秒、スキャン速度：100 nm/分で3回測定を行い、その平均スペクトルを、蛍光スペクトルとした。

c-38(CTSD)の10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.6)での蛍光スペクトルを図4に示す。

図 4 から、c-38は蛍光能を有することが分かった。

[0221] [配列表フリーテキスト]

[配列番号： 1] 天然型アポイクオリンの塩基配列である。

[配列番号： 2] 天然型アポイクオリンのアミノ酸配列である。

[配列番号： 3] 天然型アポクライティン- I の塩基配列である。

[配列番号： 4] 天然型アポクライティン- I のアミノ酸配列である。

[配列番号： 5] 天然型アポクライティン- I I の塩基配列である。

[配列番号： 6] 天然型アポクライティン- I I のアミノ酸配列である。

[配列番号： 7] 天然型アポマイトロコミンの塩基配列である。

[配列番号： 8] 天然型アポマイトロコミンのアミノ酸配列である。

[配列番号： 9] 天然型アポオベリンの塩基配列である。

[配列番号： 10] 天然型アポオベリンのアミノ酸配列である。

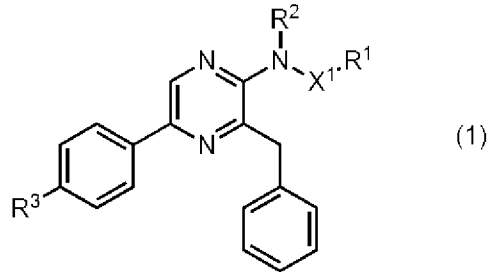
[配列番号： 11] 天然型アポベルポインの塩基配列である。

[配列番号： 12] 天然型アポベルポインのアミノ酸配列である。

## 請求の範囲

[請求項1] 下記一般式 (1)

[化88]



で表わされる化合物

(式中、

$R^1$ は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキル、脂肪族環式基、又は複素環式基であり、

$R^2$ は、水素、又は $-(SO_2)R^4$ であり、

$R^3$ は、水素、水酸基、メトキシ、又はアセトキシであり、

$R^4$ は、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、又は脂肪族環式基によって置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のアルキルであり、

$X^1$ は、 $-C(=S)-$ 、又は $-SO_2-$ である。)

[請求項2] 一般式 (1) において、

$R^1$ は、フェニル、*p*-メチルフェニル、*p*-ヒドロキシフェニル、*p*-メトキシフェニル、*p*-アセトキシフェニル、*p*-ニトロフェニル、ベンジル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジル、4-メチルベンジル、4-ヒドロキシベンジル、4-メトキシベンジル、4-アセトキシベンジル、4-ニトロベンジル、フェニルエチル、メチル、エチル、プロピル、2-メチルプロピル、2-メチルプロパニル、シクロヘキシルメチル、シクロヘキシルエチル、アダマンチルメチル、シクロペンチ

ルメチル、シクロヘキシル、又はチオフェン-2-イルであること、  
を特徴とする、請求項1に記載の化合物。

[請求項3]

一般式(1)において、

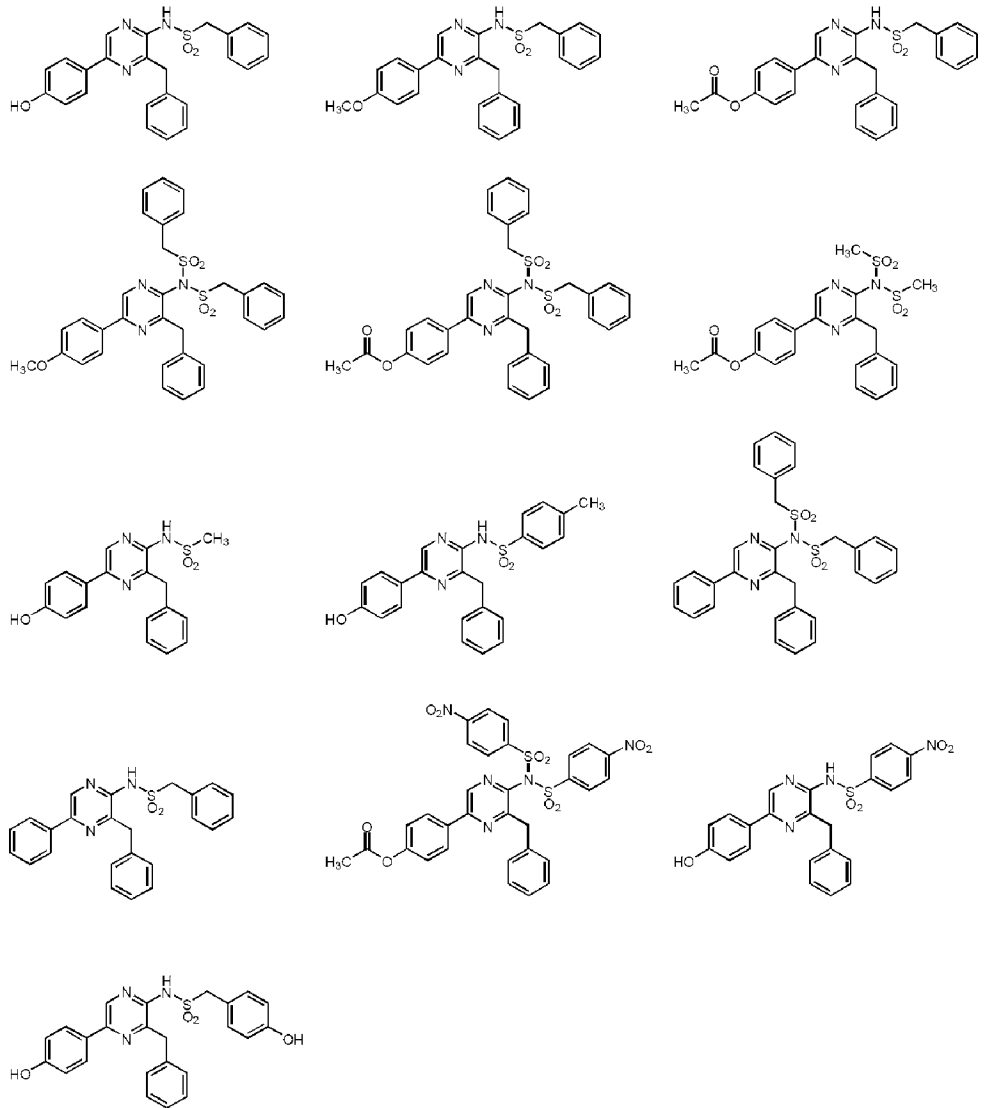
R<sup>2</sup>は、水素、ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニル、4-ヒドロキシフェニルスルホニル、4-メトキシフェニルスルホニル、4-アセトキシフェニルスルホニル、4-ニトロフェニルスルホニル、ベンジルスルホニル、 $\alpha$ -ヒドロキシベンジルスルホニル、4-メチルベンジルスルホニル、4-ヒドロキシベンジルスルホニル、4-メトキシベンジルスルホニル、4-アセトキシベンジルスルホニル、4-ニトロベンジルスルホニル、フェニルエチルスルホニル、メタンスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、2-メチルプロピルスルホニル、2-メチルプロパニルスルホニル、シクロヘキシルメチルスルホニル、シクロヘキシルエチルスルホニル、アダマンチルメチルスルホニル、又はシクロペンチルメチルスルホニルであること、

を特徴とする、請求項1又は2に記載の化合物。

[請求項4]

下記化合物

[化89]

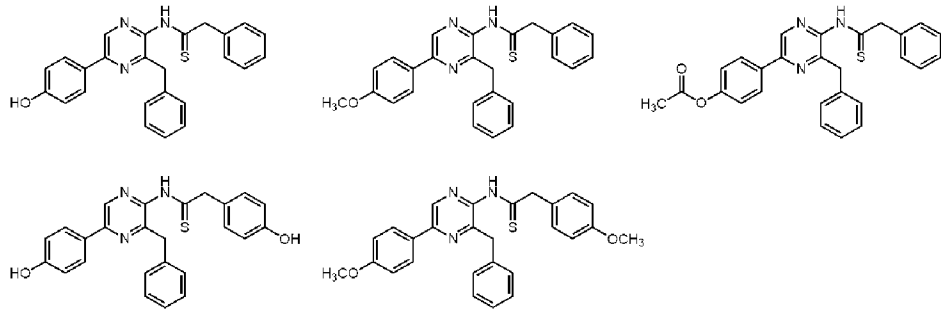


からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項5]

下記化合物

[化90]



からなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項6] 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質、及びカルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な 2 価若しくは 3 価のイオンを含む、青色蛍光蛋白質。

[請求項7] カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な 2 価若しくは 3 価のイオンの存在下、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物と、カルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質とを反応させることを含む、青色蛍光蛋白質の製造方法。

[請求項8] 前記反応を、還元剤の存在下において行う、請求項 7 に記載の方法。

[請求項9] 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の化合物、及びカルシウム結合型発光蛋白質のアポ蛋白質を含む、緑色蛍光蛋白質。

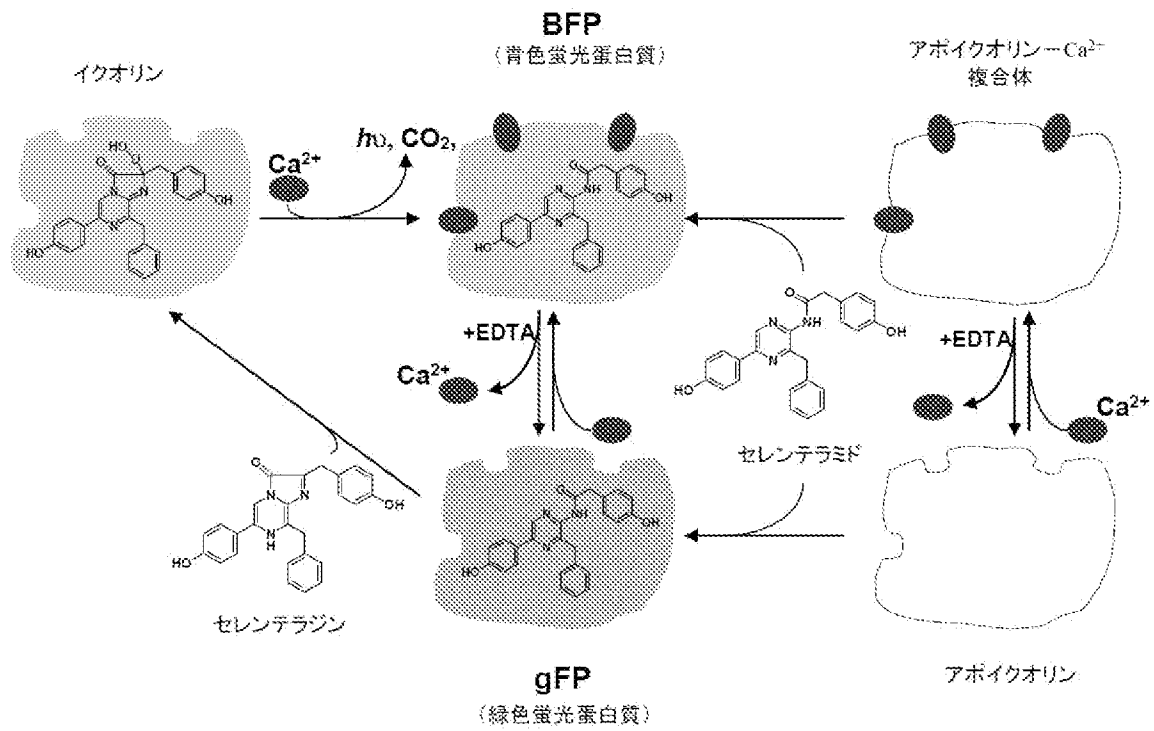
[請求項10] 請求項 6 に記載の青色蛍光蛋白質を、カルシウムイオン又はカルシウムイオンと置換可能な 2 価若しくは 3 価のイオンを除去するためのキレート剤で処理することを含む、緑色蛍光蛋白質の製造方法。

[請求項11] 請求項 9 に記載の緑色蛍光蛋白質に、セレンテラジン又はその類縁体を反応させることを含む、カルシウム結合型発光蛋白質の製造方法。

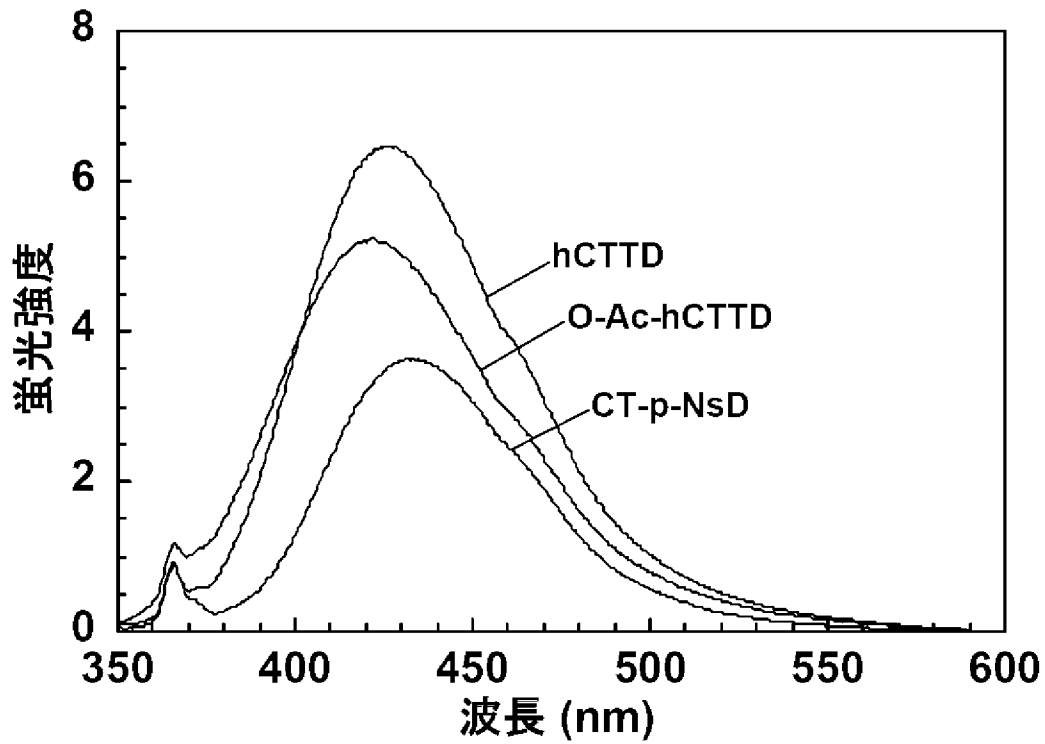
[請求項12] 蛍光蛋白質とセレンテラジン又はその類縁体との反応を、還元剤の

存在下において行う、請求項 1 1 に記載の方法。

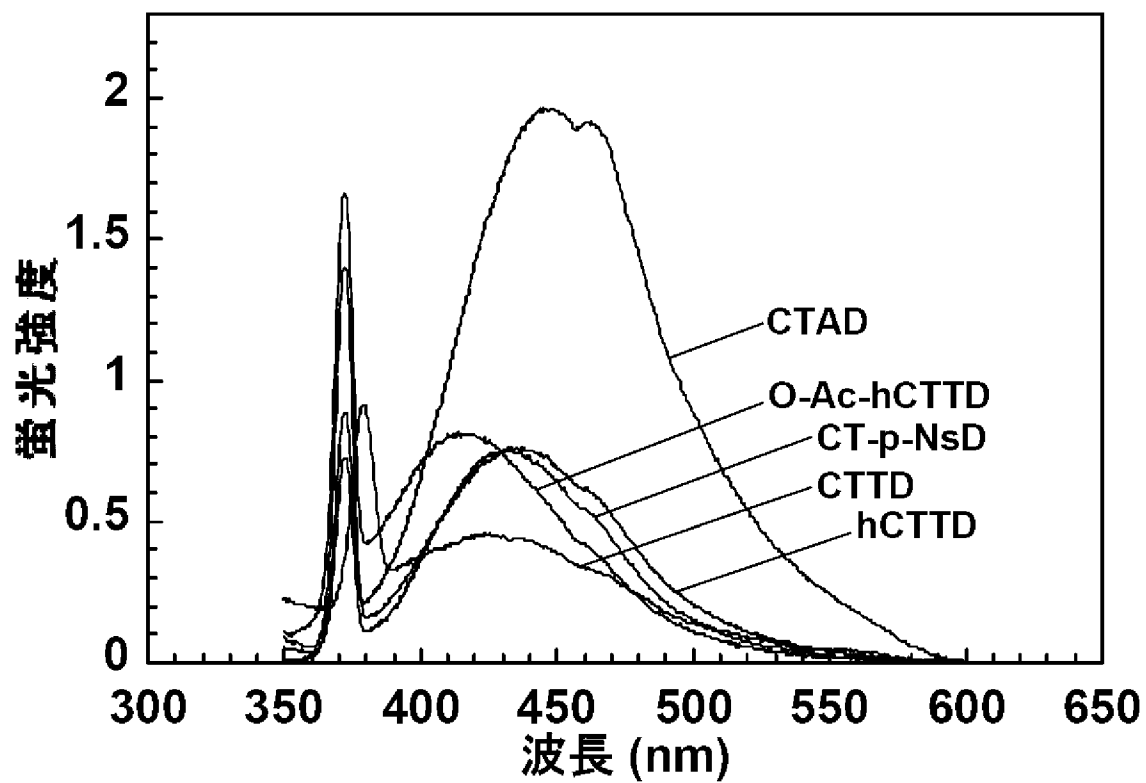
[図1]



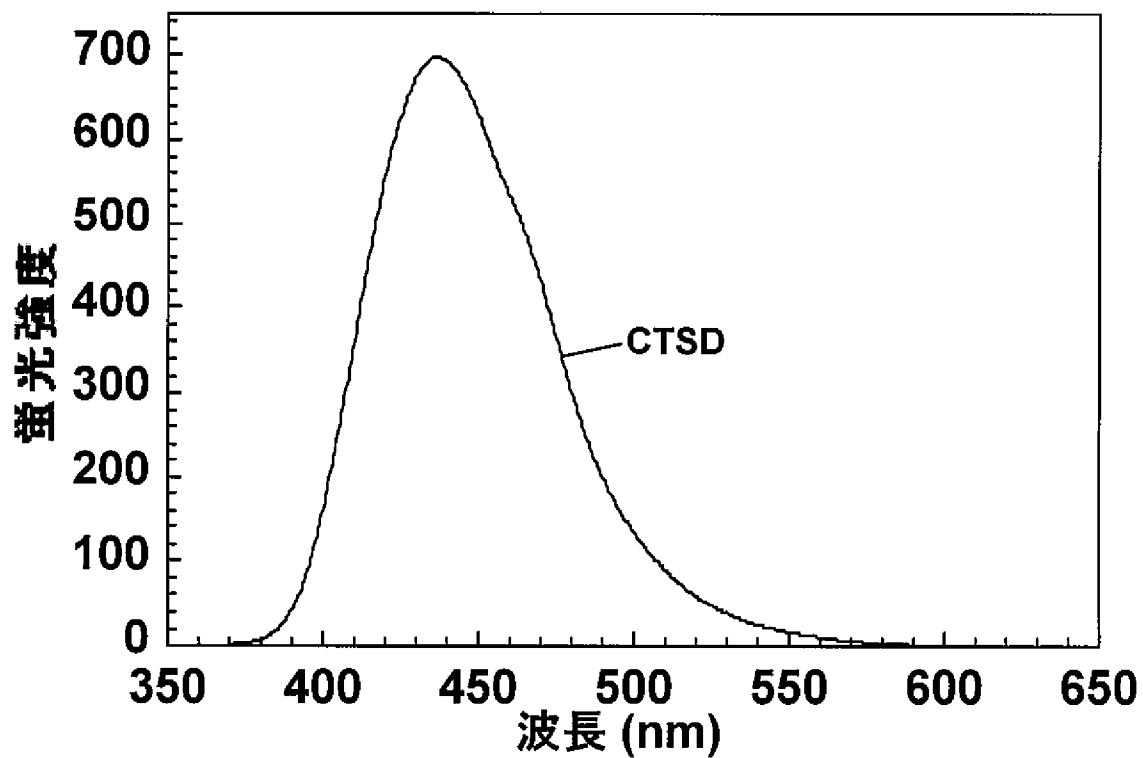
[図2]



[図3]



[図4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051806

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C07D241/20(2006.01) i, C07K14/435(2006.01) n, C12N15/09(2006.01) n</i>										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C07D241/20, C07K14/435, C12N15/09</i>										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2010</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2010</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2010</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010							
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII)</i>										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
A	JP 2006-271327 A (Chisso Corp.), 12 October 2006 (12.10.2006), entire text & US 2006/0234324 A1 & GB 2426761 A	1-12								
A	WO 2005/014633 A1 (Chisso Corp.), 17 February 2005 (17.02.2005), entire text & EP 1666488 A1 & JP 2005-513049 A	1-12								
A	Osamu SHIMOMURA et al., Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine, Luminescence, 2000, Vol.15, No.1, p.51-58	1-12								
A	Masaki KUSE et al., Novel synthetic route of aryl-aminopyrazine, Tetrahedron, 2004, Vol.60, No.4, p.835-840	1-12								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 03 March, 2010 (03.03.10)		Date of mailing of the international search report 16 March, 2010 (16.03.10)								
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer								
Facsimile No.		Telephone No.								

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/051806

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kotaro MORI et al., Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair, Tetrahedron, 2006, Vol.62, No.26, p.6272-6288	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D241/20(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n		
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. C07D241/20, C07K14/435, C12N15/09		
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 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010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) CPlus (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII)		
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
A	JP 2006-271327 A (チッソ株式会社) 2006.10.12, 全文 & US 2006/0234324 A1 & GB 2426761 A	1-12
A	WO 2005/014633 A1 (チッソ株式会社) 2005.02.17, 全文 & EP 1666488 A1 & JP 2005-513049 A	1-12
A	Osamu SHIMOMURA et al., Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine, Luminescence, 2000, Vol.15, No.1, p.51-58	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 03.03.2010	国際調査報告の発送日 16.03.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 大野 晃 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P 3542

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	Masaki KUSE et al., Novel synthetic route of aryl-aminopyrazine, Tetrahedron, 2004, Vol.60, No. 4, p. 835-840	1-12
A	Kotaro MORI et al., Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair, Tetrahedron, 2006, Vol. 62, No. 26, p. 6272-6288	1-12