

(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
2020年9月10日(10.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/179865 A1

(51) 国際特許分類:
C07D 493/10 (2006.01) C12Q 1/6876 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/009391

(22) 国際出願日: 2020年3月5日(05.03.2020)

(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 2019-039095 2019年3月5日(05.03.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 浦野 泰照 (URANO Yasuteru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 神谷 真子 (KAMIYA Mako); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). ライバス シャーロット (RIVAS Charlotte); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小野 誠, 外 (ONO Makoto et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目1番1号 大手町パークビルディング アンダーソン・毛利・友常法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

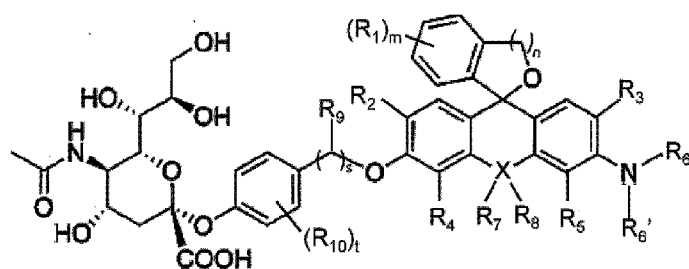
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,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

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING ACTIVATION OF SIALIDASE

(54) 発明の名称: シアリダーゼ活性検出蛍光プローブ



(I)

(57) Abstract: [Problem] To provide a fluorescent probe for detecting the activation of novel sialidase. [Solution] Provided is a compound represented by general formula (I) or a salt thereof.

(57) 要約: 【解決課題】 新規なシアリダーゼ活性検出蛍光プローブを提供すること。【解決手段】 以下の一般式 (I) で表される化合物又はその塩。

WO 2020/179865 A1

明 細 書

発明の名称：シアリダーゼ活性検出蛍光プローブ

技術分野

[0001] 本発明は、新規なシアリダーゼ活性検出蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] シアリダーゼ（ノイラミニダーゼ）は、糖鎖の非還元末端からシアル酸を遊離するエキソ型糖分解酵素で、細胞増殖・分化、アポトーシス等の重要な細胞機能に関わっている他、インフルエンザウィルスの表面に存在しウィルス増殖に関与している。そのため、シアリダーゼは病態やウィルス感染を検出するためのバイオマーカーとなりうる。しかしながら、既存のシアリダーゼ活性検出する蛍光プローブはいずれも紫外光領域で機能するものや、酵素反応生成物が沈殿するなどの性質があり、生体適合性に乏しいといった問題点があった。

[0003] 例えば、4MU-NANA（2' -（4 -メチルウンベリフェリル） - α -D -N -アセチルノイラミン酸）は、シアリダーゼの蛍光検出のために広く使用されている人工シアリダーゼ基質であるが、その励起および発光波長が高エネルギー波長にあるため、このプローブは生体内の蛍光イメージングにはむしろ適していない。また、2014年には、Suzukiらは改良された蛍光特性を有する新規の蛍光シアリダーゼプローブ（BTP3-Neu5Ac）を報告しているが、その加水分解産物の水不溶性の性質のために、プローブは組織化学染色にのみ適している（非特許文献4）。したがって、*in-vivo*イメージング用の蛍光シアリダーゼ基質が緊急に必要とされている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Int. J. Cancer, 201

5, 136, E359.

非特許文献2: J. Vansteenkiste, L. Crino, C. Doms, J.Y. Douillard, C. Faivre-Finn, E. Lim, G. Rocco, S. Senan, P. Van Schil, G. Veronesi, R. Stahel, S. Peters, E.F. Felip and Panel Members, Ann. Oncol. 2014, 25, 1462.

非特許文献3: D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano, Nat. Commun. 2015, 6, 6463.

非特許文献4: A. Minami, T. Otsubo, D. Ieno, K. Ikeda, H. Kanazawa, K. Shimizu, K. Ohata, T. Yokochi, Y. Horii, H. Fukmoto, R. Taguchi, T. Takahashi, N. Oku, T. Suzuki, PLoS One, 2014, 9, e81941.

発明の開示

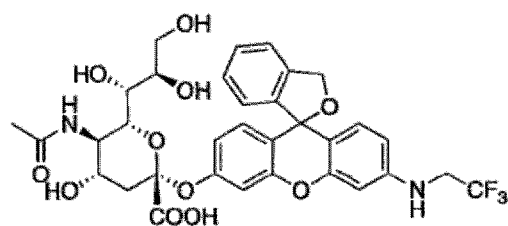
発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、新規なシアリダーゼ活性検出蛍光プローブを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] シアル酸は、細胞表面グリカンを終結させる酸性単糖であり、その除去はシアリダーゼによって触媒される。シアリダーゼの発現は様々な癌において増加することが知られており、本発明者らはHMR e f -シアル酸複合体がシアリダーゼ活性検出する蛍光プローブとして使用できるかどうかを検討した。

[0007] 本発明者らは、当初、本発明者らが最近開発した β -ガラクトシダーゼのプローブであるHMR e f - β Galのシアル酸(Neu5Ac)の β -ガラクトシド部分を置換することにより、シアリダーゼの新規な蛍光プローブである、HMR e f -Neu5Acを合成しその光学特性を調べた。

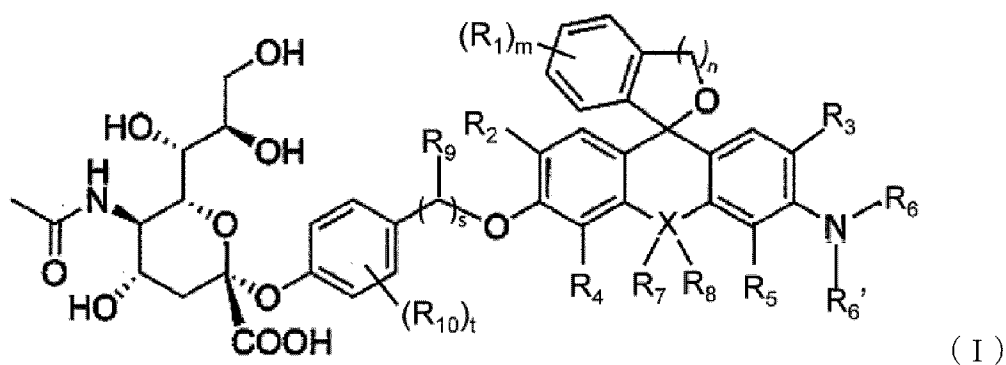


HMR e f - N e u 5 A c

[0008] しかしながら、HMR e f - N e u 5 A c は非蛍光型から高蛍光性の特性を示すものの、時間の経過に伴い本プローブが不安定性を示すことに気付いた。本発明者らは、その原因を調べたところ、シアル酸のグリコシド結合が酸加水分解に非常に敏感であることが判明した。そこで、本発明者らは、鋭意検討した結果、シアル酸（N e u 5 A c）部分とHMR e f の骨格構造の間に特定の構造を有するスペーサー（自己分解性リンカー）を導入することにより、シアル酸のグリコシド結合の酸加水分解を抑制でき、シアリダーゼの活性を有効に検出することができるプローブを提供できることを見出し、本発明を完成した。

[0009] 即ち、本発明は、

[1] 以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩。



（式中、

R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、又は炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基を示し；

R_6' は、水素原子又は炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基を示し、

R_6' は、 R_3 又は R_5 と一緒になって、 R_6' が結合している窒素原子を含む 5 ～ 7 員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく；

R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、 X が酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

R_9 は、各出現において独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、アルコキシ基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、スルホ基、アミノ基、アルコキシカルボニル基、オキソ基から選択され；

R_{10} は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

X は、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

m は、0 ～ 4 の整数であり；

n は、1 ～ 3 の整数であり；

s は、1 の整数であり；

t は、0 ～ 4 の整数である。）

[2] R_6 が $-CH_2-CF_3$ である、[1] に記載の化合物又はその塩。

[3] [1] 又は [2] に記載の化合物又はその塩を含むシアリダーゼ活性検出蛍光プローブ。

[4] シアリダーゼの活性を検出する方法であって、

(a) [1] 又は [2] に記載の化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び

(b) 当該化合物又はその塩が細胞内でシアリダーゼと反応することにより発せられる蛍光を測定する工程

を含む方法。

を提供するものである。

発明の効果

[0010] 本発明のシアリダーゼ活性検出蛍光プローブは、可視光での励起が可能である上、酵素反応生成物が沈殿することなく蛍光を発するため、生体適合性が高い。また、自己分解性のリンカーを介して基質となるシアル酸を導入することで、化合物の安定性を改善するという効果も有する。

[0011] これらの効果は、本発明のプローブがシアリダーゼに関する様々な生物学研究及び医学研究に適用できることを示唆するものであり、シアリダーゼに関する研究ツール。診断ツールとして大きく貢献することが期待される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]シアリダーゼの存在下での、 $\text{HMR e f - N e u 5 A c}$ 及び本発明の化合物の一例である $\text{HMR e f - S - N e u 5 A c}$ の酵素加水分解のスキームを示す。

[図2a]酵素反応に伴う $\text{HMR e f - N e u 5 A c}$ の蛍光強度変化の経時変化。

[図2b] $\text{HMR e f - N e u 5 A c}$ の種々のpH値での吸収スペクトルを測定した結果。

[図3a]酵素反応に伴う $\text{HMR e f - S - N e u 5 A c}$ の蛍光強度変化の経時変化。

[図3b] $\text{HMR e f - S - N e u 5 A c}$ の種々のpH値での吸収スペクトルを測定した結果。

[図4]種々のpHで $\text{HMR e f - N e u 5 A c}$ 及び $\text{HMR e f - S - N e u 5 A c}$ の蛍光強度を経時的に測定した結果を示す。

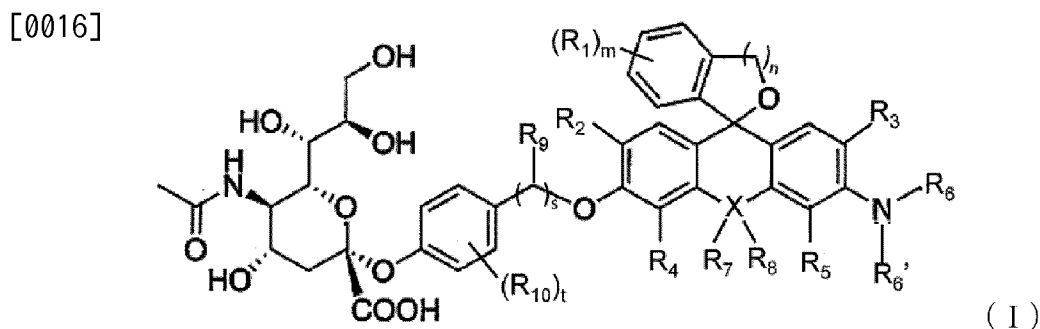
発明を実施するための形態

[0013] 本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基（例えばアルコキシ基など）のアルキル部分は、特に言及しない場合には例えば炭素数1～6個、好ましくは炭素数1～4個、更に好ましくは炭素数1～3個

程度の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基などを挙げることができる。

[0014] 本明細書において「ハロゲン原子」という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、塩素原子、又は臭素原子である。

[0015] 本発明の1つの態様は、以下の一般式(1)で表される化合物又はその塩である。



[0017] 本発明においては、シアル酸(Neu5Ac)部分とHMRefの骨格構造の間に特定の構造を有するスペーサー(自己分解性リンカー)を導入することが重要である。これにより、シアル酸のグリコシド結合の酸加水分解を抑制でき、シアリダーゼの活性を有効に検出することが可能なプローブを提供することができる。

[0018] 一般式(1)において、 R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示す。一価の置換基としては、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル基等が挙げられる。

[0019] m は、0~4の整数である。

本発明の1つの好ましい側面においては、 m が0であり、 R_1 存在せずに無置換のベンゼン環である。

[0020] 一般式(1)において、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素

数 1 ～ 6 個のアルキル基又はハロゲン原子を示す。

R_2 及び R_3 がアルキル基を示す場合には、該アルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよく、例えば R_2 又は R_3 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。 R_2 及び R_3 がそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、 R_2 及び R_3 がともにフッ素原子であるか、塩素原子である場合がより好ましい。

[0021] R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基、又はハロゲン原子を示し、 R_2 及び R_3 について説明したものと同様である。 R_4 及び R_5 が共に水素原子であることが好ましい。

[0022] R_6 は、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、又は炭素数 1 ～ 5 個のフッ化アルキル基を示す。 R_6 のアルキル基としては、メチル基、エチル基が好ましい。 R_6 のフッ化アルキル基としては、 $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ が好ましい。

本発明の 1 つの好ましい側面においては、 R_6 は、 $-\text{CH}_2-\text{CF}_3$ である。

[0023] R_6' は、水素原子又は炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基を示す。 R_6' がアルキル基を示す場合には、該アルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよく、例えば R_5 又は R_6 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。

本発明の化合物の 1 つの好ましい側面においては、 R_6' は、水素原子である。

[0024] R_6' は、 R_3 又は R_5 と一緒になって、 R_6' が結合している窒素原子を含む 5 ～ 7 員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよい。

ヘテロシクリル又はヘテロアリールは環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される 1 ～ 3 個の更なるヘテロ原子を含有していてもよい。

ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基、炭素数 2 ～ 6 個のアルケニル基、又は炭素数 2 ～ 6 個のアルキニル基、炭素数 6 ～ 10 個のアラルキル基（ベンジル基、フェネチル基等）、炭素数 6 ～ 10 個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい。

このようにして形成されるヘテロシクリル又はヘテロアリールとしては、例えば、ピロリジン、ピペリジン、ヘキサメチレンイミン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、チアゾールなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0025] 一般式 (1) において、 R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示すが、 R_7 及び R_8 は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 3 個のアルキル基であることが好ましく、 R_7 及び R_8 がともにメチル基であることがより好ましい。 R_7 及び R_8 が示すアルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよく、例えば R_7 又は R_8 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。

R_7 又は R_8 がアリール基を示す場合には、アリール基は単環の芳香族基又は縮合芳香族基のいずれであってもよく、アリール環は 1 個又は 2 個以上の環構成ヘテロ原子（例えば窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子など）を含んでいてもよい。アリール基としてはフェニル基が好ましい。アリール環上には 1 個又は 2 個以上の置換基が存在していてもよい。置換基としては、例えばハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよい。

[0026] また、後述する X が酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在しない。

[0027] R_9 は、各出現において独立に、水素原子、炭素数 1 ～ 5 個のアルキル基、アルコキシ基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、スルホ基、アミノ基、アルコキシカルボニル基、オキソ基から選択され、好ましくは、水素原子である。

[0028] s は、1 の整数である。

[0029] R_{10} は、存在する場合、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示す。

一価の置換基としては、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル基等が挙げられる。

[0030] t は、0～4 の整数である。

本発明の1つの好ましい側面においては、 t が0であり、 R_{10} は存在せず、無置換のベンゼン環である。

[0031] X は、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示す。

本発明の1つの好ましい側面においては、 X は酸素原子である。

[0032] n は、1～3 の整数であり、好ましくは、 n は1である。

[0033] 本発明の一般式(1)で表される化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩として存在することができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。本発明の化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質も本発明の範囲内である。

[0034] 本発明の一般式(1)で表される化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などは、いずれも本発明の範囲に包含される。

[0035] 本発明の化合物の代表的化合物の製造方法を本明細書の実施例に具体的に示した。従って、当業者は、これらの説明をもとにして、反応原料、反応条

件、及び反応試薬などを適宜選択して、必要に応じてこれらの方法に修飾や改変を加えることにより、一般式（１）で表される本発明の化合物を製造することができる。

[0036] 本発明の一般式（１）で表される本発明の化合物は、シアリダーゼ活性を検出する蛍光プローブとして有用である。

即ち、本発明のもう１つの態様は、一般式（１）で表される化合物又はその塩を含む蛍光プローブである。

また、本発明のもう１つの態様は、細胞内のシアリダーゼ活性を検出する方法であって、（a）一般式（１）で表される化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び（b）当該化合物又はその塩が細胞内でシアリダーゼと反応することにより発せられる蛍光を測定する工程を含む方法、である。

一般式（１）で表される本発明の化合物又はその塩は、シアリダーゼのない環境において実質的に無蛍光であるか、弱い蛍光のみを有するが、シアリダーゼのある環境において強い蛍光を発する特徴を有する。図１に、シアリダーゼの存在下でのHMR e f - N e u 5 A c、及び本発明の化合物の一例であるHMR e f - S - N e u 5 A cの酵素加水分解のスキームを示す。

[0037] 本発明の蛍光プローブが検出することができるシアリダーゼとしては、種々のシアリダーゼ、例えば、哺乳類細胞に存在するシアリダーゼ（NEU 1、NEU 2、NEU 3、NEU 4）、バクテリアのシアリダーゼ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0038] 本発明の蛍光プローブの使用方法は特に限定されず、従来公知の蛍光プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに上記式（１）で表される化合物又はそれらの塩を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。本発明の蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いてもよい。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤などの添加

物と組み合わせることができる。

実施例

[0039] 以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0040] [原料]

合成に使用した全ての化学物質は、東京化成工業（株）、和光純薬工業（株）、シグマアルドリッチ（株）から購入した。さらに精製することなく使用した。

[0041] [測定機器]

NMRスペクトルは、重水素化溶媒中を用い、B r u k e r N M R A V A N C E I I I 4 0 0 分光計 [^1H (400MHz)、 ^{13}C (101MHz)] で得た。

高分解能ESI質量スペクトルは、m i c r o O T O F I I (B r u k e r) で得た。

HPLC精製は、I n e r t s t i l - O D S - 3 カラム ($\Phi 10 \times 250$ mm (セミ分取) および $\Phi 20 \times 250$ mm (分取)) を備えた J A S C O P U - 2 0 8 7 P l u s ポンプ (G L S c i e n c e C o . , L t d .) および U V I D E C - 1 0 0 - V 検出器 (J A S C O) で行った。

HPLCに使用した溶媒は、和光（株）より入手した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル60N（球状、中性、 $63 \sim 210 \mu\text{m}$ ；関東化学株式会社製）を用いて行った。

TLCは、シリカゲルプレートF254（0.25mm（分析）；M e r c k、A K G）で行った。

UV-visスペクトルは、S h i m a d z u U V - 2 4 5 0 分光光度計で得た。

[0042] [光学特性および i n v i t r o 酵素反応]

蛍光スペクトルは日立F-7000で得た。絶対PL量子収率測定装置、Q u a n t u a r u s - Q Y（浜松ホトニクス）を用いて絶対蛍光量子効率を

測定した。プローブをジメチルスルホキシド（DMSO、蛍光測定グレード、同仁化学研究所）に溶解してストック溶液を得た。

プローブの光学特性は、0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液、または、100 mM NaOAc、2 mM CaCl₂、pH 6.5 緩衝液または50 mM NaOAc、2 mM CaCl₂、100 μg/mL BSA、pH 7.4 緩衝液中で取得した。インビトロでの酵素反応では、100 mM NaOAc、2 mM CaCl₂、pH 7.4 緩衝液に、最終濃度1 μMになるように、プローブDMSOストック溶液を希釈した。まず、シアリダーゼ添加前の溶液の蛍光を1秒ごとに測定した（励起波長490 nm、発光波長520 nm）。さらに、アルスロバクター・ウレアファシエンス由来のノイラミニダーゼ（0.01 U）をこのアッセイに使用した。

[0043] [HMR e f - N e u 5 A c、HMR e f - S - N e u 5 A cおよび4-MUNANAの動的パラメータ]

様々な濃度のプローブを、50 mM NaOAc、2 mM CaCl₂、100 μg/mL BSA緩衝液（pH 6.5）200 μL（全容量）に溶解した。ノイラミニダーゼ（アルスロバクター・ウレアファシエンス由来、50 μM）を添加し、60分間の蛍光増加を評価した。動的パラメータV_{max}およびK_mは、補正されたデータを以下の式を用いて計算した。

$$V_0 = \frac{(V_{max})X}{K_m + X}$$

[0044] V₀はノイラミニダーゼによるプローブ基質回転の定常状態速度であり、V_{max}は最大速度（mM/分）であり、Xは反応混合物中のプローブ濃度（mM）であり、K_mは、反応速度がV_{max}の半分となるMichaelis定数（mM）である。KaleidaGraph 4.5.2ソフトウェア（Synergy Software）を使用して、式1をデータに適合させた。

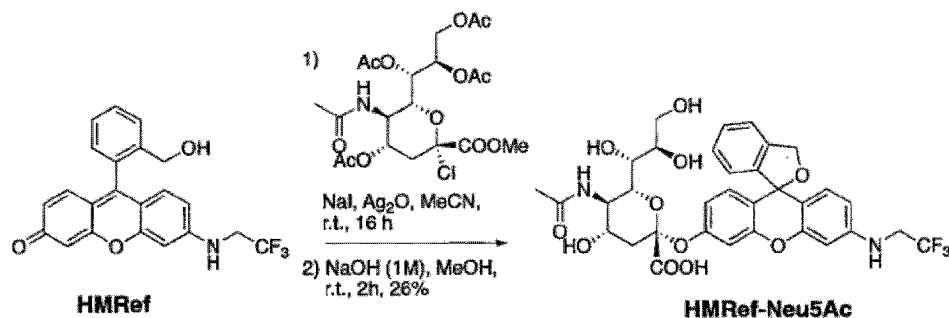
[0045] [合成実施例1]

HMR e f - N e u 5 A cの合成

以下の反応スキームの手順に従って、HMR e f - N e u 5 A cを合成し

た。

[0046]



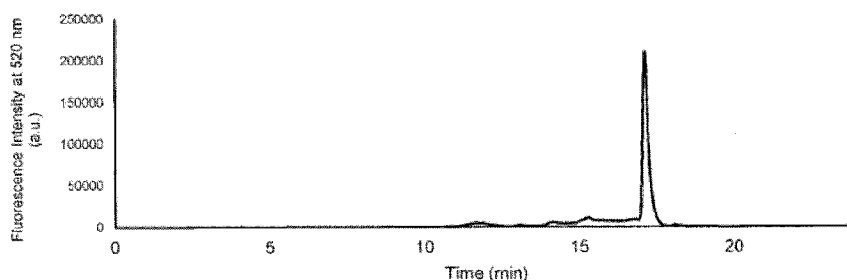
[0047] HMRefを文献 (D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano, Nat. Commun., 2015, 6, 6463.) に従って合成した。N-アセチル-2-クロロ-2-デジノイラミン酸メチルエステル 4, 7, 8, 9-テトラアセテート (393 mg、0.77 mmol、6.0当量)、Ag₂O (488 mg、2.1 mmol、16.4当量)、NaI (150 mg、1.0 mmol、7.8当量) および十分量の無水Na₂SO₄を入れたフラスコに、20 mLの乾燥MeCNに溶解したHMRef (51.2 mg、0.13 mmol、1.0当量) を加えた。反応混合物を室温で16時間撹拌したのち、濾過し、ろ液を減圧留去した。残渣をMeOH (6 mL) に溶解し、1 M NaOH水溶液を加えた (3 mL)。混合物を室温で5時間撹拌し、その後、有機溶媒を減圧留去した。残留水溶液を2 MのHClで中和し、次いで凍結乾燥した。次いで、残留物をMeOH : DCM、1 : 4 溶液に溶解し、濾過して不溶性塩を除去した。この溶液を減圧留去し、残渣をHPLCで精製後 (A液 : 100 mM TEAA緩衝液、B液 : CH₃CN 99%、H₂O 1%。A/B = 90/10で5分間、その後15分で10/90に勾配をかけ、次いで10/90で15分間)、凍結乾燥し、28 mgの橙色粉末を得た (2工程で26%)。

[0048] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.04 (t, 18H, TEAA), 1.86 (1H, t, ³J_{HH} = 11.2 Hz, H_{3_{ax}}), 1.90 (s, 3H, TEAA), 2.02 (s, 3H, NHCOCH₃), 2.55 (q, 12 H, TEAA), 2.95 (dd, 1H, ³J_{HH} = 12.6, 4.4 Hz, H_{3_{eq}}), 3.35 (s, 6H, TEAA), 3.56

(dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$, 1.6 Hz, H7), 3.67 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 11.3$, 5.2 Hz, H9), 3.74 (m, 1H, H5), 3.76 (m, 1H, H4), 3.82 (m, 1H, H9'), 3.84 (m, 2H, NHCH_2CF_3), 3.87 (m, 1H, H8), 3.90 (m, 1H, H6), 5.22 (s, 2H, ArCH_2O), 6.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, Ar), 6.48 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, Ar), 6.67 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, Ar), 6.74 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, Ar), 6.78 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, Ar), 6.93 (dt, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$, $^4J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, Ar), 7.07 (dd, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 5.6$, 2.3 Hz, Ar), 7.26 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, Ar), 7.38 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, Ar), 7.42 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, Ar). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 11.2 (TEAA) 22.9, 24.4 (TEAA), 43.1, 45.8, 49.9 (TEAA), 54.3, 64.0, 69.3, 70.2, 72.6, 73.1, 75.3, 85.5, 99.3, 104.1, 109.7, 110.8, 114.7, 117.8, 118.1, 121.9, 124.8, 126.9 (q, CF_3), 129.3, 129.5, 130.2, 130.9, 140.2, 146.0, 150.3, 152.1, 153.0, 157.0, 174.6, 175.6, 180.7 (TEAA). HRMS (ESI^+) calcd for $[\text{M}]^+$ 691.21092; found 691.21104 (-0.1 mDa).

HPLC分析: A/B=80/20=0/100 (15 min); flow rate=1.0 mL/min)。検出蛍光波長: 520 nm。

[0049]



[0050] [参考例1]

合成実施例1で得られたHMR e f - N e u 5 A cについて、ノイラミニダーゼ (arthrobacter ureafaciens) との酵素反応に伴うHMR e f - N e u 5 A cの蛍光強度変化の経時変化を調べた。100 mM NaOAc 2 mM CaCl_2 緩衝液 (pH 7.4) にHMR e f - N e u 5 A cを溶解して1 μM 溶液を作成し、測定開始後60秒で酵素0.01 Uを添加した。測定時の温度は37℃、酵素阻害剤 (DANA) の濃度は100 μM とした。そ

の結果を図 2 a に示す。

また、HMR e f - N e u 5 A c を、種々の pH 値の 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液に溶解した直後および 1.5 時間後における吸収スペクトルを測定した結果を図 2 b に示す。

[0051] HMR e f - N e u 5 A c は、pH 7.4 ではスピロ環化体 (pK_{cyc}l = 4.8) が優先するため、ほとんど蛍光を示さなかった。シアリダーゼと反応すると、40 倍までの適度な蛍光増強が観察された (図 2 a)。酵素の非存在下で同じ反応をモニターすると、蛍光増強の 3 倍の増加が観察され、時間の経過に伴うプローブの不安定性を示した。また、各種 pH の緩衝溶液でプローブの吸光スペクトルを測定し、プローブ溶解直後、1.5 時間後で比較すると、(1.5 時間後ではスペクトル形状が大きく変化した (図 2 b))。つまり、1.5 時間の間に、吸収極大のシフトがみられ、つまり、加水分解生成物である HMR e f に変換されることが明らかなスペクトル形状の変化が観察された。

[0052] 本発明者らが以前に開発した HMR e f の単糖誘導体はこのような不安定性を示さなかったため、この差異はシアル酸部分自体から生じたはずであると考えられた。更なる調査の結果、シアル酸のグリコシド結合は、他の単糖に比べて酸加水分解に非常に敏感であることが判明した (J.L. Sonnenburg, H. van Halbeek, A. Varki, J. Biol. Chem., 2002, 277, 17502.)。シアル酸残基の酸加水分解のメカニズムは、ケトシド酸素原子のプロトン化、アルコールと共鳴安定化されたカルボニウムオキソニウムイオンに分解する。このイオンは水と反応して遊離糖を生成する。グリコシド酸素のプロトン化は、中間体のカルボニウムイオンを安定化させるイオン化カルボキシル基の近接によって促進される。従って、シアル酸残基のこの固有の不安定性を誘発するのは隣接するカルボン酸である。

そこで、これに対処し、カルボニウムイオンの安定化を防ぐために、カルボキシル基を置換することを検討した。この戦略は Ch a r g a f f e t a l により以前に研究されたものであり、カルボン酸部分をメチルエステ

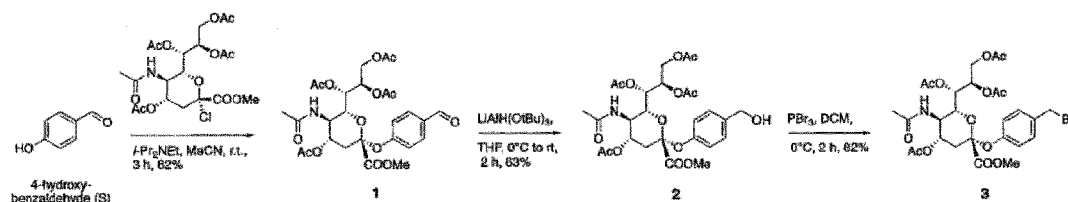
ルに変換した。この誘導体中のグリコシド結合の安定性は実際に非常に高められたが、シアリダーゼによる処理ではシアル酸の遊離は観察されなかった。これは、シアリダーゼ感受性プローブを設計する際にカルボン酸保護のこの戦略を用いることができないことを意味していた。

[0053] 次に、本発明者らは、スペーサー基の取り込みが、酸加水分解に対するプローブの安定性を増加させる可能性があるかと仮定した。自己分解性スペーサーの使用は、プロドラッグおよび蛍光センサーで使用されて成功した適用により、ごく比較的最近において有効であることが判明している (A. Alouane, R. Labruere, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 7492.)。そのように、P h i l l i p s らによって最初に報告されたフェノールスペーサー基を、シアル酸部分およびHMR e f フルオロフォアの上に組み込んで、以下の合成実施例2に示すようにHMR e f -S -N e u 5 A cを得た。

[0054] [合成実施例2]

以下の反応スキームの手順に従って、化合物3を合成した。

[0055]



[0056] (1) 化合物1の合成

4-ヒドロキシベンズアルデヒド (S、479 mg、3.9 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (5 mL) の溶液に、N-アセチル-2-クロロ-2-デオイズノイラミン酸メチルエステル4, 7, 8, 9-テトラアセテート3 (0.5 mL、3.1 mmol) のMeCN溶液に加え、反応混合物を室温で3時間攪拌した。その後、すべての溶媒を除去し、トルエン (×3) で希釈した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc : DCM、1 : 1 ~ EtOAc) を用いて精製して、化合物1を白色

泡状物として得た (145 mg、62%)。

[0057] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.93 (s, 3H, NHOAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.30 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.5$ Hz, $\text{H}_{3_{\text{ax}}}$), 2.74 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 13, 4.7$ Hz, $\text{H}_{3_{\text{eq}}}$), 3.65 (s, 3H, COOMe), 4.11 (m, 1H, H9), 4.13 (m, 1H, H5), 4.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.4, 2.4$ Hz, $\text{H}_{9'}$), 4.60 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10.8, 1.6$ Hz, H6), 4.98 (td, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10.4, 4.6, 1.8$ Hz, H4), 5.23 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10$ Hz, H7), 5.35 (m, 1H, NH), 5.37 (m, 1H, H8), 7.18 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, Ar), 7.83 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, Ar), 9.93 (s, 1H, CHO). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 20.7, 20.7, 20.8, 21.0, 23.2, 38.7, 49.5, 53.2, 62.0, 67.1, 68.4, 68.7, 73.6, 99.5, 118.9, 131.7, 132.0, 158.9, 168.2, 169.9, 170.1, 170.2, 170.6, 170.9, 190.9. HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 618.17933, found 618.18094 (-1.6 mDa) for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NaNO}_{14}$.

[0058] (2) 化合物2の合成

化合物1 (247 mg、0.42 mmol) を乾燥THF (5 mL) に溶解し、0℃でLiAlH(OtBu)₃ (0.83 mLの1.0M THF溶液) を加えた。0℃で1時間攪拌した後、飽和NH₄Cl (aq) (5 mL) およびEtOAc (10 mL) を混合物に加え、室温でさらに1時間攪拌した。これにロッシェル塩 (水性) (10 mL) の飽和溶液を加え、粗生成物をCHCl₃ (×3) で抽出したのち、有機層を減圧残去した。次いで残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (MeOH : DCM 1 : 99から5 : 95) を用いて精製して、化合物2を白色泡状物として得た (156 mg、63%)。

[0059] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.90 (s, 3H, NHOAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.21 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $\text{H}_{3_{\text{ax}}}$), 2.72 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.9, 4.6$ Hz, $\text{H}_{3_{\text{eq}}}$), 3.68 (s, 3H, COOMe), 4.10 (m, 1H, H5), 4.14 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5$ Hz, H9), 4.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 12.6, 2.6$ Hz, $\text{H}_{9'}$), 4.38 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 10.8, 1.6$ Hz, H6), 4.

63 (s, 2H, CH₂OH), 4.95 (td, 1H, ³J_{HH} = 10.4, 4.6, 1.8 Hz, H4), 5.27 (m, 1H, NH), 5.35 (m, 2H, H7, H8), 7.03 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, Ar), 7.27 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, Ar). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 20.7, 20.8, 20.8, 21.0, 23.2, 38.2, 49.5, 52.9, 62.1, 64.9, 67.4, 68.8, 69.4, 73.4, 99.9, 120.3, 128.3, 136.7, 153.1, 168.1, 170.0, 170.1, 170.3, 170.7, 170.9. HRMS (ESI⁺): calcd for [M+Na⁺] 620.19498, found 620.19672 (-1.7 mDa) C₂₇H₃₆NaNO₁₄.

[0060] (3) 化合物3の合成

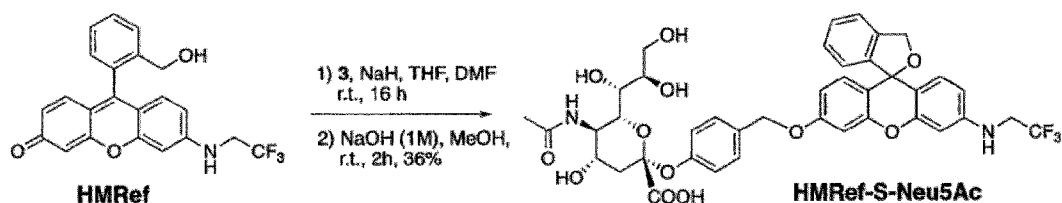
化合物2 (150 mg、0.25 mmol) をDCM (3 mL) に溶解し、三臭化リン (12 μL、0.13 mmol) を0℃で溶液に添加した。0℃で2時間攪拌後、溶液を飽和NaHCO₃水溶液 (×3) および飽和食塩水 (×1) で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧残去して化合物3を白色泡状物 (136 mg、82%) として得た。

[0061] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.84 (s, 3H, NHOAc), 1.97 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.15 (t, 1H, ³J_{HH} = 12.6 Hz, H3ax), 2.63 (dd, 1H, ³J_{HH} = 13, 4.7 Hz, H3eq), 3.58 (s, 3H, COOMe), 4.03 (m, 1H, H9), 4.10 (m, 1H, H5), 4.23 (m, 1H, H9'), 4.37 (m, 1H, H6), 4.40 (s, 2H, CH₂Br), 4.89 (td, 1H, ³J_{HH} = 10.4, 4.6, 1.8 Hz, H4), 5.29 (m, 3H, H7, H8, NH), 6.95 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, Ar), 7.23 (d, 2H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, Ar). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 19.7, 19.8, 19.8, 20, 22.2, 32.3, 37.2, 48.4, 52.0, 70.0, 66.3, 67.7, 68.1, 72.4, 98.8, 118.7, 129.2, 132.1, 152.8, 167.1, 169.0, 169.1, 169.2, 169.6, 169.9. HRMS (ESI⁺): calcd for [M+Na⁺] 682.11057, found 682.10666 (3.9 mDa) C₂₇H₃₄BrNNaO₁₃.

[0062] (4) HMRef-S-Neu5Acの合成

以下の反応スキームの手順に従って、HMRef-S-Neu5Acを合成した。

[0063]



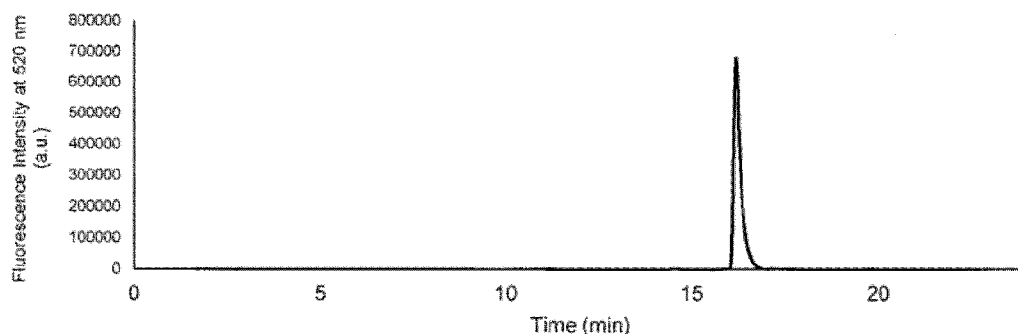
[0064] HMRef (79 mg、0.2 mmol) および NaH (6 mg、0.26 mmol) に乾燥 THF (3 mL) および乾燥 DMF (1 mL) を添加し、この混合物をアルゴン気下で 0℃ で撹拌した。化合物 3 (130 mg、0.2 mmol) の乾燥 THF (3 mL) 溶液を加え、反応混合物を室温で 16 時間撹拌した。この後、EtOAc (20 mL) を加え、この混合物を飽和 NH₄Cl 溶液 (×2) および飽和食塩水 (×1) で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧留去した。残渣を MeOH (6 mL) に溶解し、1 M NaOH (水溶液) を加えた (3 mL)。混合物を室温で 5 時間撹拌し、その後、有機溶媒を蒸発させた。残留水溶液を 2 M の HCl で中和し、次いで凍結乾燥させた。次いで、残留物を MeOH : DCM、1 : 4 溶液に溶解し、濾過して不溶性塩を除去した。この溶液を減圧留去させ、残渣を HPLC (A 液 : 100 mM TEAA 緩衝液、B 液 : CH₃CN 99 %、H₂O 1 %。A/B = 90/10 で 5 分間、その後 15 分で 10/90 に勾配をかけ、次いで 10/90 で 15 分間) で精製し、凍結乾燥後に橙色の粉末 (2 ステップで 36 %) を得た。

[0065] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.04 (t, 26H, TEAA), 1.84 (1H, t, ³J_{HH} = 11.9 Hz, H_{3ax}), 1.90 (s, 3H, TEAA), 2.02 (s, 3H, NHC(O)CH₃), 2.55 (q, 17 H, TEAA), 2.94 (dd, 1H, ³J_{HH} = 12.2, 4.0 Hz, H_{3eq}), 3.54 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.0, 1.6 Hz, H7), 3.66 (dd, 1H, ³J_{HH} = 11.3, 5.4 Hz, H9), 3.74 (m, 1H, H5), 3.77 (m, 1H, H4), 3.81 (m, 1H, H9'), 3.85 (m, 2H, NHCH₂CF₃), 3.86 (m, 1H, H8), 3.91 (m, 1H, H6), 5.01 (s, 2H, ArCH₂O), 5.23 (s, 2H, ArCH₂O), 6.45 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.6, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, Ar), 6.50 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, Ar), 6.65 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7, ⁴J_{HH} = 2.6 Hz, Ar), 6.67 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.6, Ar), 6.78 (m, 1H, Ar), 6.79 (m, 1H, Ar), 6.82 (m, 1H, Ar), 7.24

(d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, Ar), 7.30 (m, 1H, Ar), 7.31 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, Ar), 7.39 (m, 1H, Ar), 7.43 (m, 1H, Ar). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 11.2 (TEAA) 22.9, 24.4 (TEAA), 43.1, 45.8, 46.9 (TEAA), 54.3, 64.0, 69.3, 70.2, 72.6, 72.7, 73.1, 75.3, 85.5, 99.3, 104.0, 104.1, 109.7, 110.8, 114.7, 117.8, 118.1, 120.8, 121.9, 124.7, 124.8, 126.9 (q, CF_3), 129.3, 129.4, 130.2, 130.2, 130.9, 140.3, 146.0, 150.3, 152.1, 153.0, 157.0, 173.6, 175.6, 180.7 (TEAA). HRMS (ESI^+) L calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 797.75163; found 797.75043 (-1.2 mDa).

直線勾配 (0 min、20% CH_3CN / 0.1% TFA aq. To 15 min, 100% CH_3CN 0.1% TFA aq; flow rate = 1.0 mL/min) を用いて HPLC 分析を行った。520 nm での蛍光を調べた。

[0066]



[0067] [実施例 1]

HMRef-Neu5Ac について評価したように、HMRef-S-Neu5Ac についてシアリダーゼとの反応および各 pH での吸光スペクトルを取得した (図 3 a 及び図 3 b)。

pH 7.4 では、プローブは、スピロ環化体 ($\text{pK}_{\text{cycl}} = 5.3$) で存在するため非常にわずかな蛍光を示した。しかし、このプローブは、シアリダーゼとの反応で 130 倍の蛍光増強を示し、これは主としてその安定性の増加に起因する。酵素を添加しない場合に見られるように、蛍光強度は一定の低レベルのままであり、プローブ溶解後 1.5 時間経過しても吸光スペクトルが殆ど変化しないことが明らかとなった。

[0068] [実施例 2]

HMR e f - N e u 5 A c 及び HMR e f - S - N e u 5 A c について、シアリダーゼ阻害剤 D A N A の存在下でのシアリダーゼとの反応性も評価した。

表 1 に、HMR e f - N e u 5 A c および HMR e f - S - N e u 5 A c の光化学的性質を示す。いずれの場合も、p H 7. 4 において低い蛍光強度値を示す。これは、HMR e f - S - N e u 5 A c の方が安定性が優れているが、両方のプローブがシアリダーゼ活性化蛍光プローブとして機能することを示す。

[0069] [表 1]

	Absorption max. (nm)		Emission max. (nm)		Fluorescence quantum yield ^c		pK _a	pK _{cycl}
	pH 2 ^a	pH 7.4 ^b	pH 2 ^a	pH 7.4 ^b	pH 2 ^a	pH 7.4 ^b		
HMR e f ^{ref}	479	498	515	518	0.716	0.777	4.4	10.2
HMR e f - N e u 5 A c	484	-----	522	-----	0.650	0.323	---	4.8
HMR e f - S - N e u 5 A c	484	-----	522	-----	0.537	0.271	---	5.3

a : 0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 2. 0) 中で測定した。

b : 0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝液、p H 7. 4 中で測定した。

c : 絶対蛍光量子効率。

[0070] [実施例 3]

HMR e f - N e u 5 A c 及び HMR e f - S - N e u 5 A c の安定性を、ある範囲の p H で経時的な蛍光強度の変化を記録することによって直接比較した。両方のプローブの蛍光強度初期値は、それらの p K c y c l 値の結果として p H 値で異なる、すなわち、p H が低いほど蛍光強度初期値が大きい。

[0071] 種々の p H で HMR e f - N e u 5 A c および HMR e f - S - N e u 5 A c の蛍光強度を経時的に測定した結果を図 4 に示す。37℃で 0. 2 M リン酸ナトリウム緩衝溶液中で測定し、5 分ごとに測定値を採取した。それぞれ 485 nm / 535 nm の励起 / 発光波長を使用した。

[0072] 図 4 から分かるように、HMR e f - N e u 5 A c は、実験の 2 時間の時間範囲にわたって、すべての p H にわたって明確な不安定性を示した。これは p H 2 および 4 で特に顕著であり、約 40 分後に完全な加水分解が観察さ

れた。一方、HMR e f - S - Neu 5 A c の蛍光強度は、その改善された安定性を確認する2時間にわたってほとんど変化しなかった。哺乳動物シアリダーゼによる効率的な触媒作用のための至適pHは、4.4～6.5の範囲の広い範囲である (T. Miyagi, K. Yamaguchi, Glycobiology, 2012, 22, 880.)。従って、これらの関連するpH値にわたるプローブの安定性を決定することは極めて重要であり、HMR e f - S - Neu 5 A c が酸加水分解による蛍光強度の増加を示さないことが確認された。

[0073] HMR e f - Neu 5 A c 及びHMR e f - S - Neu 5 A c の動的パラメータを、以前にGovorkovaらによって記載された方法に従って決定し、市販のシアリダーゼ基質4-MUNANAのそれと比較した。 k_{cat}/K_m 値 (表2) はHMR e f - Neu 5 A c 及びHMR e f - S - Neu 5 A c の方が4-MUNANAよりも夫々16倍および13倍近く多く、新規プローブはシアリダーゼ活性の感受性および定量的検出にさらに適していることが実証された。

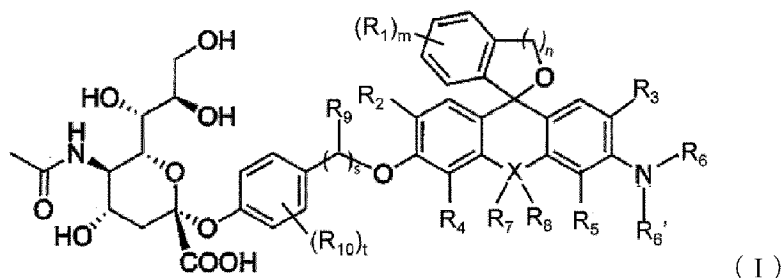
[0074] [表2]

	4-MUNANA	HMR e f - Neu 5 A c	HMR e f - S - Neu 5 A c
K_m (μM)	37	19	11
V_{max} ($nM s^{-1}$)	1.73	13.5	7.03
k_{cat} (s^{-1})	2.6	20.6	10.7
k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	0.07	1.1	0.9

[0075] 本研究では、糖タンパク質および糖脂質上の複合糖質から最終シアル酸を切断することが知られている酵素群の大部分であるシアリダーゼを標的酵素とした。シアリダーゼを検出するために開発した最初のプローブであるHMR e f - Neu 5 A c は、シアル酸残基のカルボキシル酸部分がグリコシド結合に隣接しているために、不安定になることが示された。この隣接するカルボキシル基は、中間的なカルボニウムイオンを安定化させ、酸加水分解機構を促進する。シアル酸とHMR e f フルオロフォアの間にスペーサー基を導入してHMR e f - S - Neu 5 A c を得ることにより、本発明者らはこの望ましくない加水分解経路の効率を低下させることができ、従ってプローブの安定性を改善することができた。

請求の範囲

[請求項1] 以下の一般式（I）で表される化合物又はその塩。



（式中、

R_1 は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R_2 及び R_3 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_4 及び R_5 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R_6 は、水素原子、炭素数1～5個のアルキル基、又は炭素数1～5個のフッ化アルキル基を示し；

R_6' は、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示し、

R_6' は、 R_3 又は R_5 と一緒にあって、 R_6' が結合している窒素原子を含む5～7員のヘテロシクリル又はヘテロアリアルを形成していてもよく；

R_7 及び R_8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリアル基を示し、

ここで、Xが酸素原子の場合は、 R_7 及び R_8 は存在せず；

R_9 は、各出現において独立に、水素原子、炭素数1～5個のアルキル基、アルコキシ基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、スルホ基、アミノ基、アルコキシカルボニル基、オキソ基から選択され；

R_{10} は、存在する場合は、ベンゼン環上に存在する同一又は異なる

一価の置換基を示し；

Xは、酸素原子、珪素原子又は炭素原子を示し；

mは、0～4の整数であり；

nは、1～3の整数であり；

sは、1の整数であり；

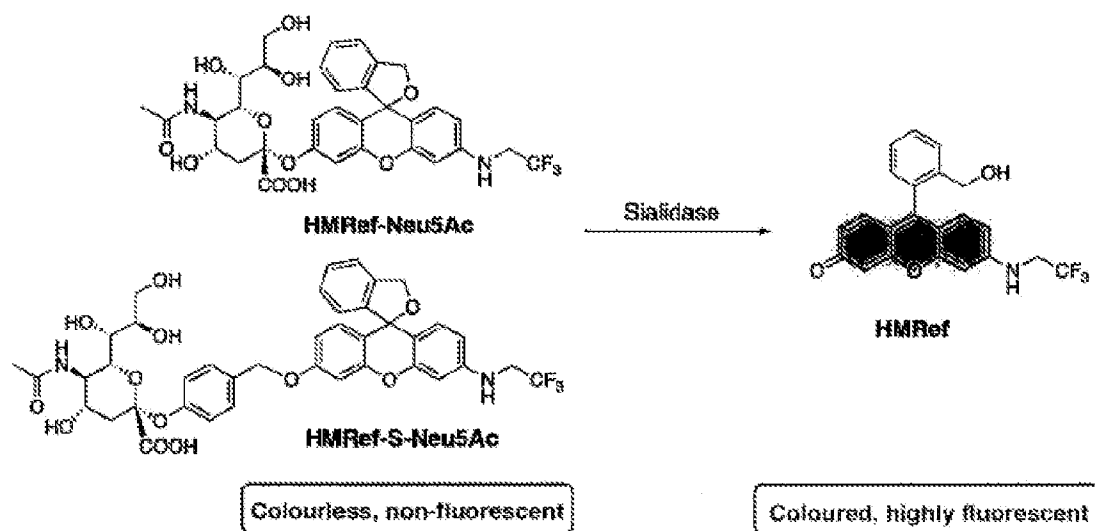
tは、0～4の整数である。）

[請求項2] R_6 が $-CH_2-CF_3$ である、請求項1に記載の化合物又はその塩。

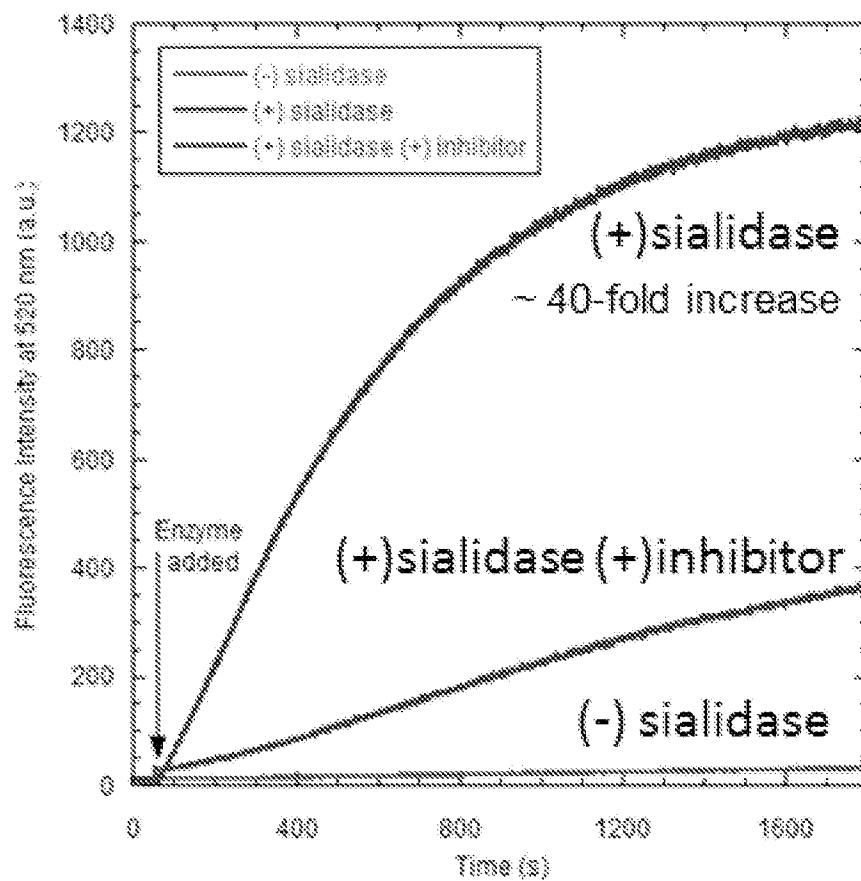
[請求項3] 請求項1又は2に記載の化合物又はその塩を含むシアリダーゼ活性検出蛍光プローブ。

[請求項4] シアリダーゼの活性を検出する方法であって、
(a) 請求項1又は2に記載の化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び
(b) 当該化合物又はその塩が細胞内でシアリダーゼと反応することにより発せられる蛍光を測定する工程を含む方法。

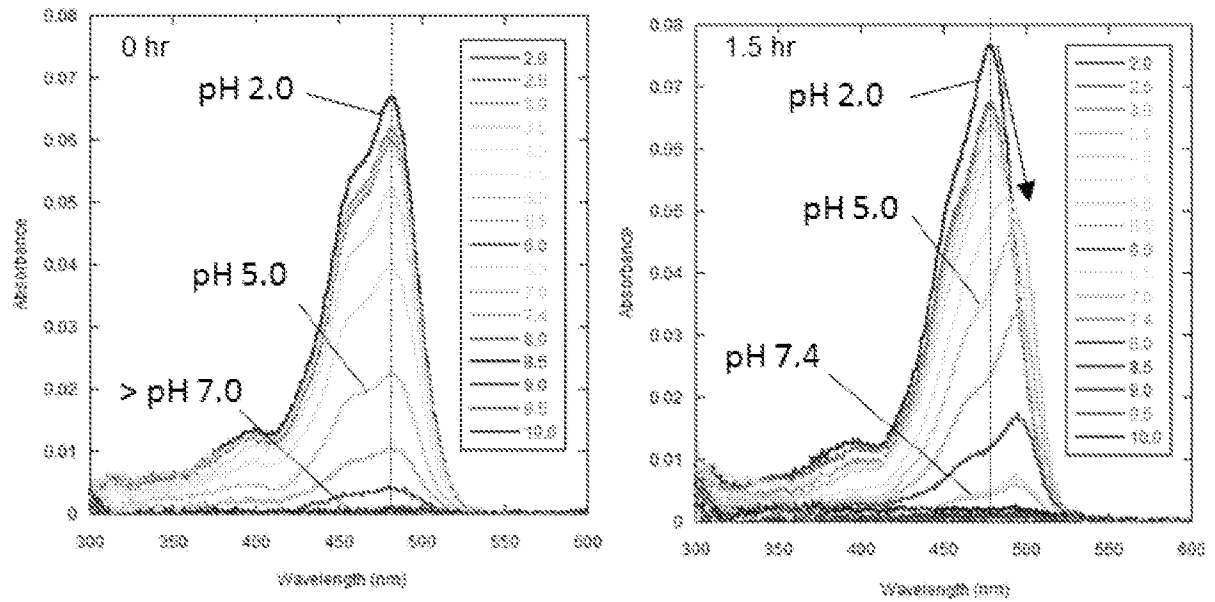
[図1]



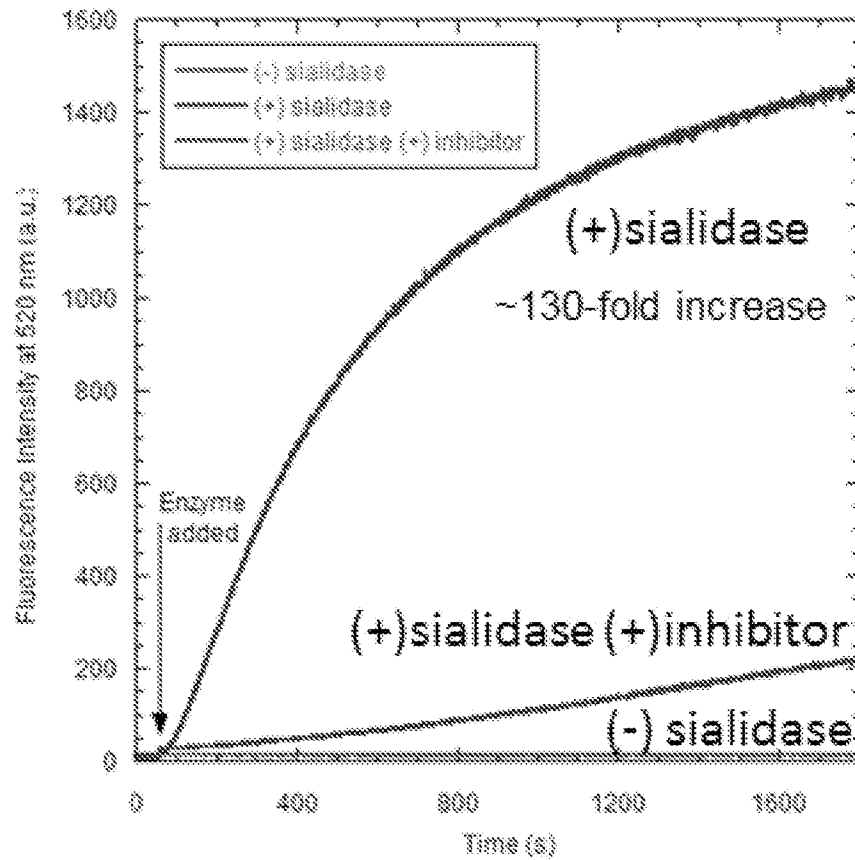
[図2a]



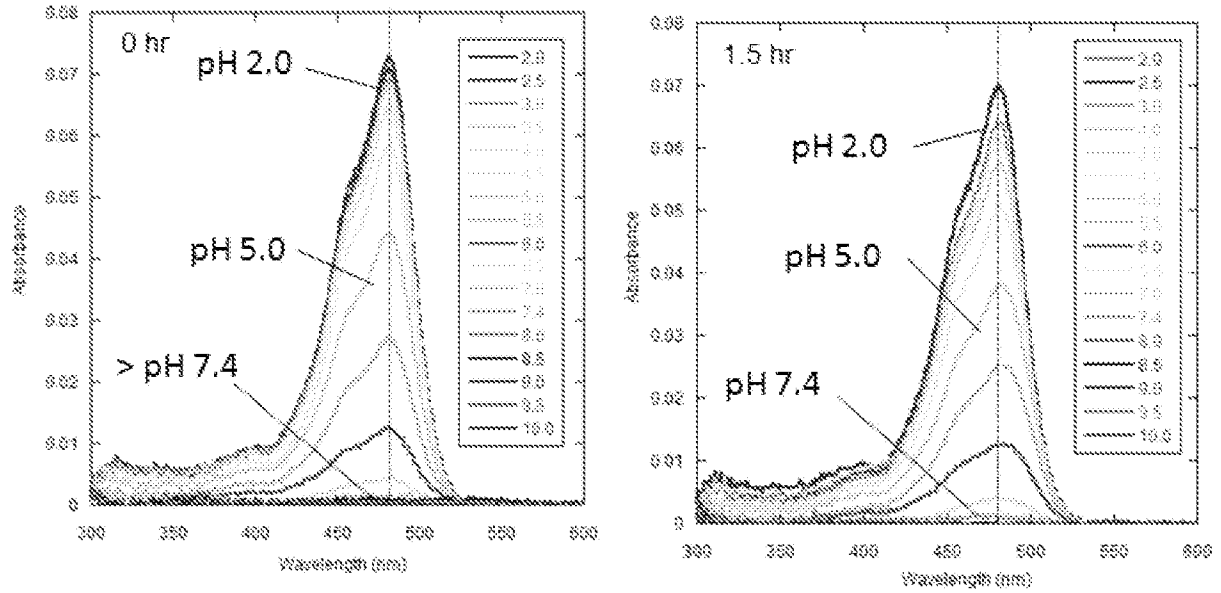
[図2b]



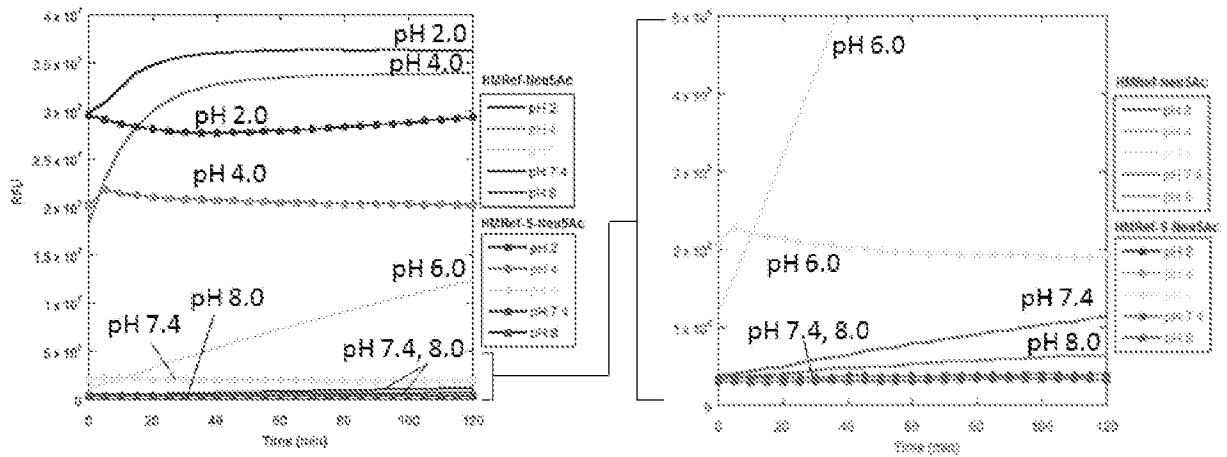
[図3a]



[図3b]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/009391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 493/10 (2006.01) i; C12Q 1/6876 (2018.01) i
FI: C07D493/10 C CSP; C12Q1/6876 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D493/10; C12Q1/6876

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHU, R. et al, "Senescence-associated sialidase revealed by an activatable fluorescence-on labeling probe", Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom), 2018, vol. 54, no. 82, pp. 11566-11569 scheme 1, fig. 1	1-4
P, X	RIVAS, C. et al, "A novel sialidase-activatable fluorescence probe with improved stability for the sensitive detection of sialidase", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15 January 2020, vol. 30, no. 2, p. 126860, pp. 1-4 abstract, scheme 1, fig. 2	1-4

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2020 (20.05.2020)

Date of mailing of the international search report

02 June 2020 (02.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07D 493/10(2006.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i FI: C07D493/10 C CSP; C12Q1/6876 Z														
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）） C07D493/10; C12Q1/6876														
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														
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年													
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY (STN)														
C. 関連すると認められる文献														
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	ZHU,R. et al, Senescence-associated sialidase revealed by an activatable fluorescence-on labeling probe, Chemical Communications(Cambridge, United Kingdom), 2018, Vol.54, No.82, pp.11566-11569 Scheme 1, Fig.1	1-4												
P, X	RIVAS,C. et al, A novel sialidase-activatable fluorescence probe with improved stability for the sensitive detection of sialidase, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2020.01.15, Vol.30, No.2, p.126860, pp.1-4 ABSTRACT, Scheme 1, Fig.2	1-4												
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
“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	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
国際調査を完了した日 20.05.2020	国際調査報告の発送日 02.06.2020													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 三上 晶子 4P 4042 電話番号 03-3581-1101 内線 3492													