

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-44059

(P2010-44059A)

(43) 公開日 平成22年2月25日(2010.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
GO 1 N 31/00 (2006.01)	GO 1 N 31/00 K	2GO42
GO 1 N 31/22 (2006.01)	GO 1 N 31/22 124	2GO45
GO 1 N 33/84 (2006.01)	GO 1 N 33/84 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2009-166878 (P2009-166878)
 (22) 出願日 平成21年7月15日(2009.7.15)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-185151 (P2008-185151)
 (32) 優先日 平成20年7月16日(2008.7.16)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 発行所 社団法人
 日本化学会 日本化学会第88春季年会(2008)講
 演予稿集 平成20年3月12日 発行

(71) 出願人 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (72) 発明者 吉原 利忠
 群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立
 大学法人群馬大学内

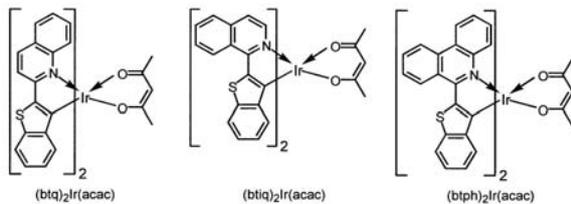
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規錯体化合物、並びにそれを用いた酸素濃度測定試薬および癌の診断薬

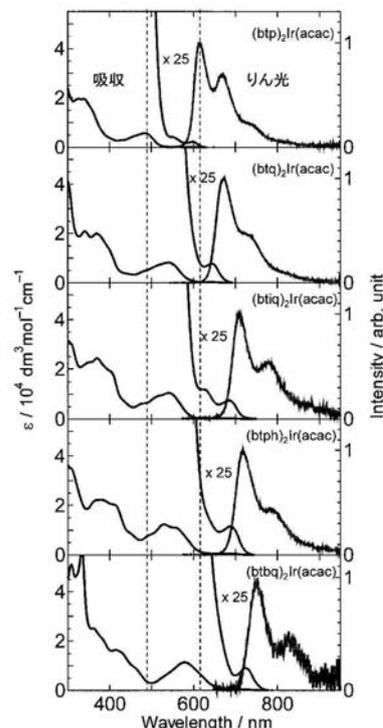
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規なイリジウム錯体及びそれを用いた酸素濃度検出試薬を提供する。

【解決手段】下記の、Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を細胞や組織に投与して、同錯体が発するりん光に基づいて細胞や組織内の酸素濃度を測定する。



【選択図】図1

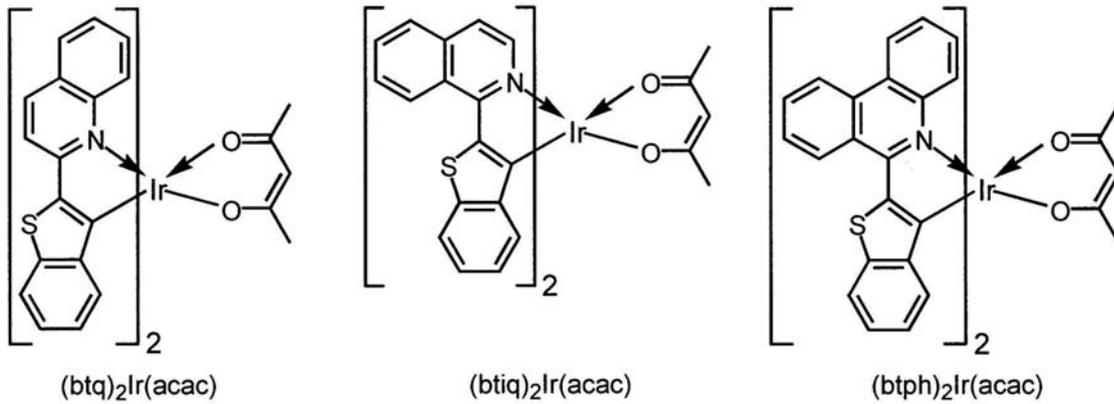


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を含む酸素濃度測定試薬であって、前記錯体下記いずれかである、酸素濃度測定試薬。

【化 1】

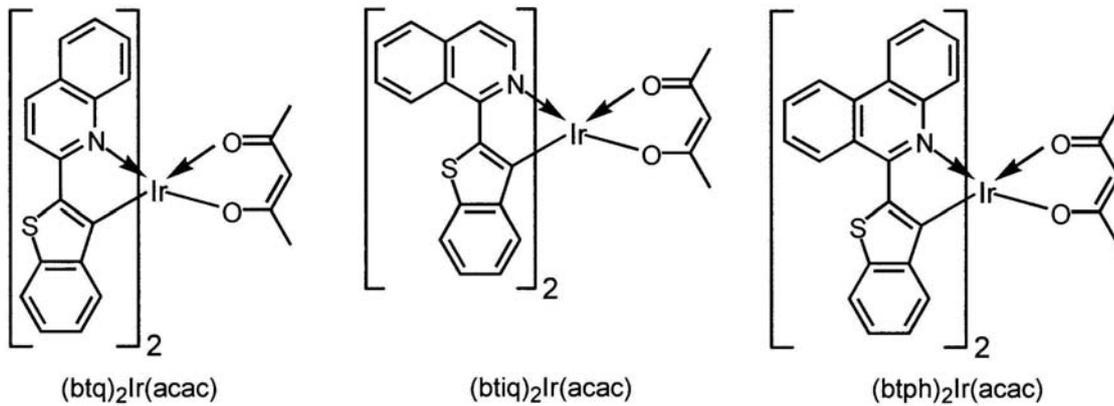


10

【請求項 2】

Ir(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を含む癌の診断薬であって、前記錯体下記いずれかである、癌の診断薬。

【化 2】



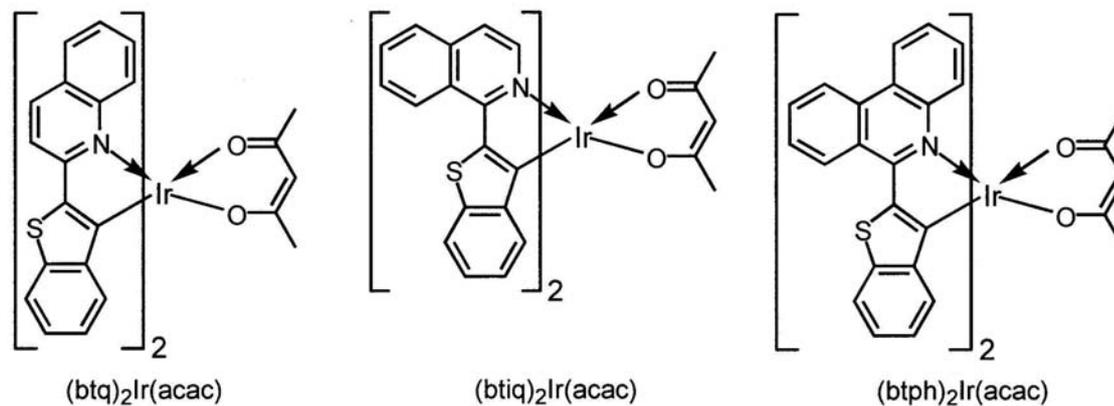
20

30

【請求項 3】

下記いずれかの錯体。

【化 3】

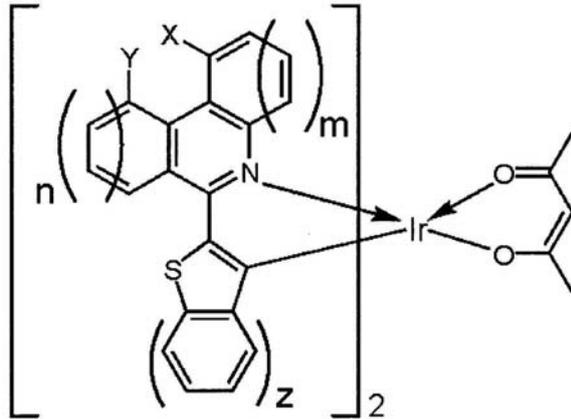


40

【請求項 4】

下記一般式で表わされる錯体。

【化 4】



10

mが2または3、かつnが0～3の整数であるか、mが0～3の整数、かつnが2または3である。zは0～3の整数である。

XおよびYは 水素、またはアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、ジメチルアミノ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、アセチル基、カルボキシ基、アルキルエステル基、およびアルキルアミド基から選択される置換基を示す。

【請求項 5】

zが1であり、mが2かつnが0であるか、またはmが0かつnが2である、請求項4に記載の錯体。

20

【請求項 6】

XおよびYが水素である、請求項5に記載の錯体。

【請求項 7】

請求項4～6のいずれか一項に記載の錯体を含む酸素濃度測定試薬。

【請求項 8】

請求項4～6のいずれか一項に記載の錯体を含む癌の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は新規錯体化合物、並びにそれを用いた細胞や組織中の酸素濃度をリアルタイムで可視化し定量することのできる試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

生体組織あるいは細胞中の酸素濃度を非侵襲的にリアルタイムで検出する方法の開発は、細胞生物学や医療の分野において重要な課題となっている。生体組織中の酸素濃度を定量するための従来法としては、(1)微小電極を組織に挿入して測定する方法、(2)常磁性プローブ分子のESR信号幅が周辺の酸素濃度に依存して変化することを利用する方法、(3)ニトロイミダゾール系低酸素組織診断薬剤を使う方法、(4)水溶性ポルフィリン誘導体、ルテニウム錯体等の発光測定に基づく酸素濃度測定法、などが知られている。(1)の微小電極を用いる方法は、電極近傍の一点における酸素分圧しか測定できない。また、侵襲性であるという欠点を持つ。(2)のESR信号に基づく方法では、リアルタイムでの酸素濃度計測はできない、(3)のニトロイミダゾール系薬剤を用いる方法は、低酸素細胞内でニトロイミダゾールが還元されて細胞内タンパク質に結合しトラップされることを利用する。この方法では、薬剤の代謝に時間を要するため、薬剤投与後数時間経過しないとデータが得られない、という欠点をもつ。(4)の方法は、水溶性ポルフィリン誘導体やルテニウム錯体のりん光寿命が血中酸素濃度に依存して変化(消光を受ける)ことを利用して酸素濃度を定量する方法である。この方法は、非侵襲で組織における酸素分圧を可視化できるという大きな利点を有するが、試薬が水溶性であるため、得られるデータは血中酸素濃度に限られる。

40

50

【 0 0 0 3 】

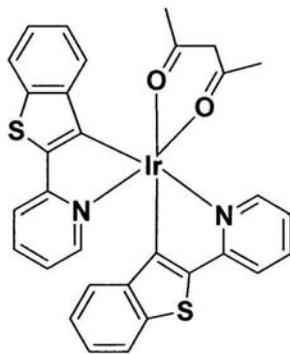
イリジウム(III)錯体(非特許文献1~4)はりん光を発することが知られており、有機ELディスプレイなどへの応用が期待されている。しかしながら、イリジウム(III)錯体のりん光に基づいて酸素濃度を測定することや、癌の診断への応用は知られていない。

【 0 0 0 4 】

そこで、本発明者らは、下記式(A)で示されるイリジウム錯体($(btp)_2Ir(acac)$)の室温りん光(強度, 寿命)を用いた生体組織中における酸素濃度計測方法を開発した(特許文献1)。また、 $(btp)_2Ir(acac)$ のりん光強度, 寿命の測定から、リポソーム膜中の酸素濃度の定量, 癌細胞中の酸素濃度の可視化, 担癌マウス中の腫瘍の可視化に成功した(特許文献1)。

10

【化1】



$(btp)_2Ir(acac)$... (A)

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】飛田成史, 吉原利忠, 竹内利行, 穂坂正博, 「酸素濃度測定試薬および酸素濃度測定方法」, 特願2007-126518

【非特許文献】

30

【 0 0 0 6 】

【非特許文献1】S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, H. Lee, C. Adachi, P. E. Burrows, S. R. Forrest, and M. E. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 123, 4303 (2001).

【非特許文献2】H. Konno, Chem. Times, 199, 13 (2006).

【非特許文献3】M. Nonoyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., 47, 767 (1974).

【非特許文献4】S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, and R. J. Watts, J. Am. Chem. Soc., 106, 6647 (1984).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【 0 0 0 7 】

しかしながら、 $(btp)_2Ir(acac)$ は、吸収極大波長483nm, りん光極大波長616nmであるため、生体組織内部の酸素濃度や皮膚から深い位置にある腫瘍の可視化は十分ではない。これまで、近赤外光領域にりん光を示すイリジウム錯体は報告されているが、りん光量子収率が0.02と非常に小さく、また、りん光寿命も短いため、酸素濃度定量試薬として用いることは困難である。

そこで、本発明は、新規な近赤外光領域にりん光を示す新規イリジウム錯体及びそれを用いた酸素濃度測定試薬を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

50

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、下記のイリジウム錯体 $(btq)_2Ir(acac)$ 、 $(btq)_2Ir(acac)$ 、 $(btph)_2Ir(acac)$ 、 $(btbq)_2Ir(acac)$ を合成することに成功し、該錯体が近赤外光領域にりん光を示すこと、さらには、そのりん光を検出することで細胞や組織内の酸素濃度が測定できることを見出した。また、同錯体を生体に投与したときに、そのりん光に基づいて癌組織を特異的に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

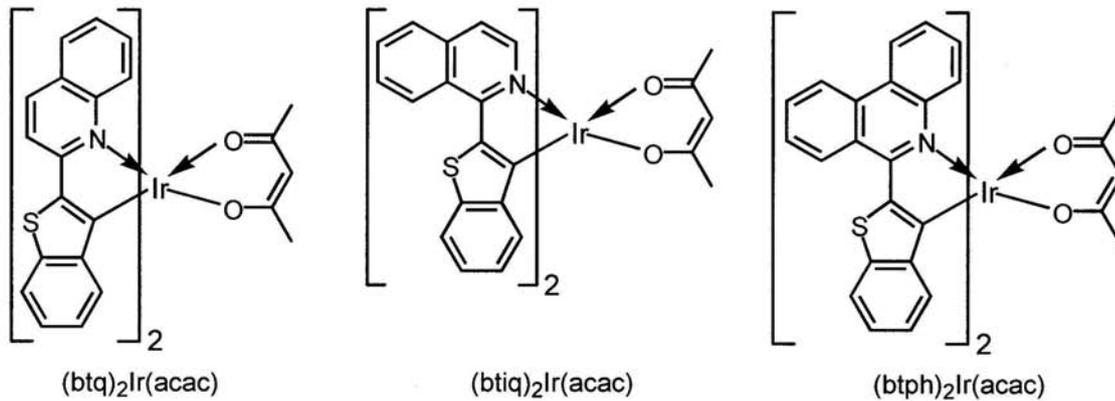
【0009】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) Ir(III) を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする錯体を含む、酸素濃度測定試薬であって、前記錯体が下記のいずれかの錯体である、酸素濃度測定試薬。

10

【化2】



20

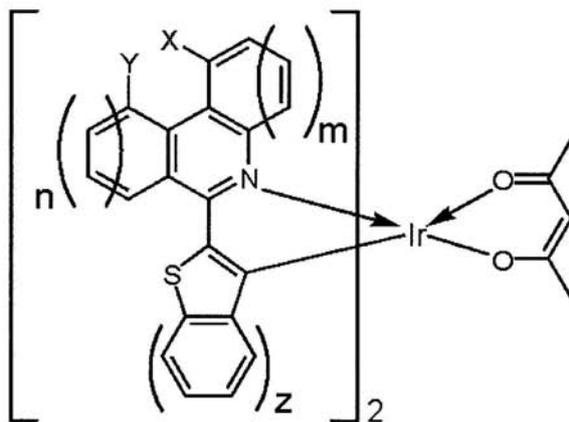
(2) 前記いずれかの錯体を含む、癌の診断薬。

(3) 前記いずれかの錯体。

【0010】

(4) 下記一般式で表わされる錯体。

【化3】



30

z は 0 ~ 3 の整数であり、m が 2 または 3、かつ n が 0 ~ 3 の整数であるか、m が 0 ~ 3 の整数、かつ n が 2 または 3 である。

X および Y は 水素、またはアルキル基、アルコキシ基、アミノ基、ジメチルアミノ基、トリフルオロメチル基、シアノ基、アセチル基、カルボキシル基、アルキルエステル基、およびアルキルアミド基から選択される置換基を示す。

(5) z が 1 であり、m が 2 かつ n が 0 であるか、または m が 0 かつ n が 2 である、(4) に記載の錯体。

(6) X および Y が水素である、(5) に記載の錯体。

(7) (4) ~ (6) のいずれかに記載の錯体を含む酸素濃度測定試薬。

(8) (4) ~ (6) のいずれかに記載の錯体を含む癌の診断薬。

40

50

【0011】

なお、各略称は以下の化合物名の略称である。

(btq)₂Ir(acac) : ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート-N,C^{3'}]イリジウム(アセチルアセトン)

(btiq)₂Ir(acac) : ビス[1-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート-N,C^{3'}]イリジウム(アセチルアセトン)

(btph)₂Ir(acac) : ビス[9-(2'-ベンゾチエニル)-フェナンスリナート-N,C^{3'}]イリジウム(アセチルアセトン)

(btbq)₂Ir(acac) : ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-ベンゾキノリナート-N,C^{3'}]イリジウム(アセチルアセトン)

10

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、細胞や組織中の低酸素領域を可視化することができ、さらにりん光寿命の値から酸素濃度を定量することができる。また、癌組織を特異的に検出することができるため、癌の診断に使用することもできる。本発明の錯体は、(btq)₂Ir(acac)よりも長波長領域にりん光を発するため、癌の診断薬として用いたときに、皮膚から深い低酸素領域を可視化できると期待される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】(btq)₂Ir(acac)、(btiq)₂Ir(acac)、(btph)₂Ir(acac)、(btbq)₂Ir(acac)と、対照の(btp)₂Ir(acac)の吸収、りん光スペクトルを示す図。

20

【図2】Ar置換溶液、空気飽和溶液、1atm酸素飽和溶液中の(btq)₂Ir(acac)のりん光スペクトル。

【図3】5% O₂または20% O₂の条件下における、Hela細胞に取り込まれた(btq)₂Ir(acac)のりん光画像(写真)。

【図4】扁平上皮癌を移植したマウスのりん光画像(写真)。(btq)₂Ir(acac)の投与前(左)、投与30分後(右)を示し、投与30分後に(btq)₂Ir(acac)がリンパ腫に濃縮している様子が観察できる。

【発明を実施するための形態】

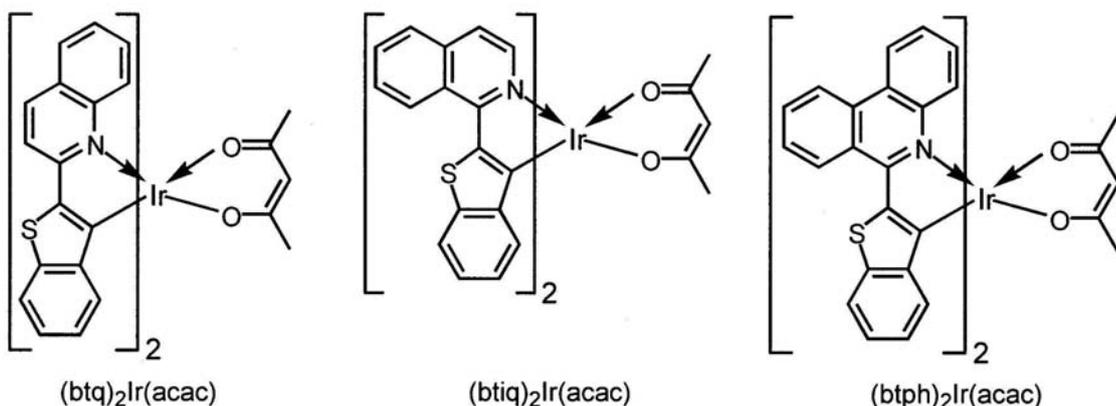
【0014】

30

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明の酸素濃度測定試薬は、下記のIr(III)を中心金属とし、芳香族系分子を配位子とする金属錯体(以下、イリジウム錯体と呼ぶ)を含む。

【化4】



40

これらのイリジウム錯体は、後述の実施例に記載の方法に従って合成することができる。

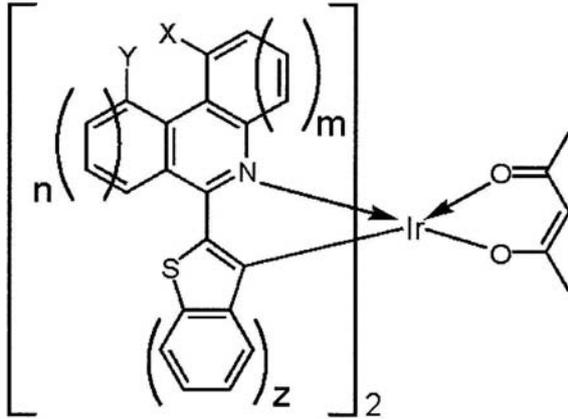
なお、これらのイリジウム錯体においてキノリナート基やフェナンスリナート基の水素

50

原子はアルキル基，アルコキシ基，アミノ基，ジメチルアミノ基，トリフルオロメチル基，シアノ基，アセチル基、カルボキシル基，アルキルエステル基，およびアルキルアミド基などで置換されてもよい。

【0015】

【化5】



10

z は 0 ~ 3 の整数であり、m が 2 または 3、かつ n が 0 ~ 3 の整数であるか、m が 0 ~ 3 の整数、かつ n が 2 または 3 である。

X および Y は 水素、またはアルキル基，アルコキシ基，アミノ基，ジメチルアミノ基，トリフルオロメチル基，シアノ基，アセチル基、カルボキシル基，アルキルエステル基，およびアルキルアミド基から選択される置換基を示す。

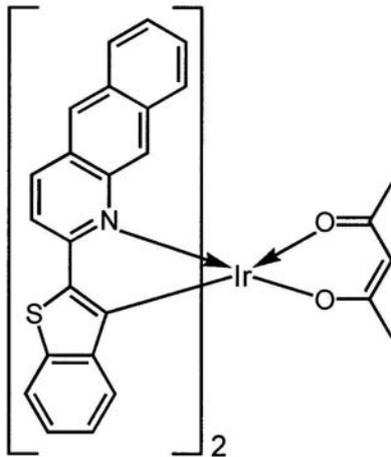
20

これらのイリジウム錯体は、後述の実施例に記載の方法またはそれに準ずる方法に従って合成することができる。

【0016】

この中では、以下のイリジウム錯体が例示される。

【化6】



(btbq)₂Ir(acac)

30

40

【0017】

上記のようなイリジウム錯体は、細胞や組織、特に、それらの生体膜に集積し、酸素濃度が低いときにより強いりん光を発する。したがって、りん光の強度に基づいて細胞や組織の酸素濃度を測定することができる。すなわち、りん光が強いときに酸素濃度が低いというような判定ができる。また、あらかじめ酸素濃度とりん光強度の関係を求めておくことにより、酸素濃度を定量的に測定することも可能である。

【0018】

測定対象としての細胞の種類は特に制限されず、株化培養細胞や初代培養細胞などが例示される。

50

また、マウスやラットなどの実験動物にイリジウム錯体を投与し、酸素濃度が低下している部位の検出などを行うこともできる。

細胞や組織にイリジウム錯体を添加する場合、イリジウム錯体を適当な溶媒に溶解して添加すればよく、添加濃度は使用するイリジウム錯体の種類にもよるが、5~500 μM が好ましく、25~75 μM が特に好ましい。

イリジウム錯体を添加してインキュベートした後、イリジウム錯体を励起してりん光を観察できるような蛍光顕微鏡、蛍光測定装置、蛍光イメージング装置などを用いてりん光を観察することができる。

【0019】

また、イリジウム錯体は、生体に投与したときに、癌組織を特異的に染色できるため、癌の検出に使用できる。これは、癌組織では酸素供給が不足しているためイリジウム錯体のりん光が癌組織で特異的に観察できることによると考えられる。

したがって、上記イリジウム錯体は癌の診断薬として使用することもできる。

例えば、イリジウム錯体を検体に投与し、検体に生体外から可視光を照射することでりん光を観察することができる。これにより、癌組織を非侵襲的かつ高感度・選択的に可視化できる。また、りん光は画像化できるため、癌検出用のイメージング試薬としても使用できる。

また、イリジウム錯体は、実験動物を用いた癌の研究や癌治療薬の評価などにも使用することができる。

【実施例】

【0020】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0021】

合成例 1

ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N,C^3']イリジウム(アセチルアセトン)((btq)₂Ir(acac))の合成

【0022】

2-ベンゾチエニルキノリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルボロン酸(990mg, 5.6mmol), 2-クロロキノリン(937mg, 5.7mmol)をトルエン(20ml), エタノール(10ml)に溶解させ、パラジウム触媒(200mg, 0.17mmol), 2M炭酸ナトリウム水溶液(20ml)を加え、 N_2 置換下、5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ、クロロホルムで抽出を行い、クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、ろ液を減圧乾固した。得られた固体をトルエンで洗浄した(収量: 888mg, 収率: 61%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 8.20-8.17(1H, d), 8.15-8.12(1H, d), 7.98(1H, s), 7.96-7.93(1H, d), 7.91-7.88(1H, q), 7.86-7.83(1H, q), 7.82-7.79(1H, d), 7.75-7.70(1H, t), 7.55-7.50(1H, t), 7.39-7.36(2H, q)

【化7】



【0023】

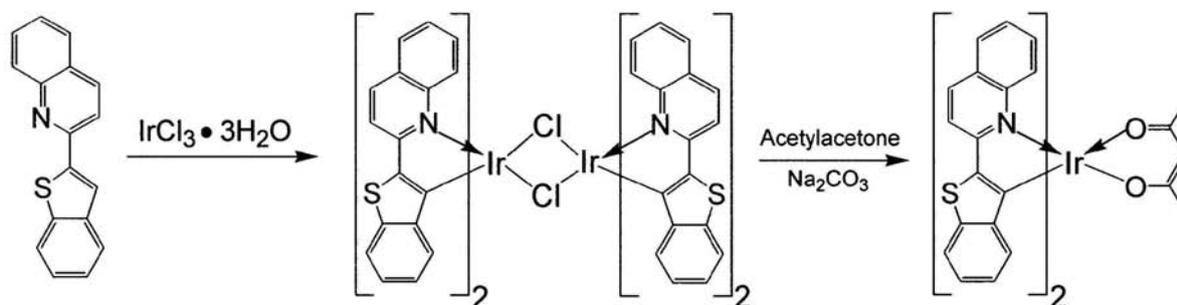
ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- N,C^3']イリジウム(アセチルアセトン)の合成

2-ベンゾチエニルキノリン(581mg, 2.2mmol), 塩化イリジウム三水和物(純度: 90%, 392mg, 1.0mmol)に2-エトキシエタノール(30ml), 水(10ml)を加え、16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体(304mg, 0.20mmol)

に2-メトキシエタノール (25ml) , アセチルアセトン (1ml) , 炭酸ナトリウム (170mg) を加え還流を加え2時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 262mg, 収率: 79%) 。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.17-8.14(2H, d), 8.01-7.98(2H, d), 7.85-7.83(2H, d), 7.75-7.73(2H, d), 7.71-7.68(2H, d), 7.37-7.32(2H, t), 7.73-7.23(2H, t), 7.02-6.97(2H, t), 6.57-6.52(2H, t), 6.32-6.30(2H, d), 4.63(1H, s), 1.55(6H, s)

【化 8】



10

【 0 0 2 4】

合成例 2

ビス[1-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- $\text{N,C}^3'$]イリジウム (アセチルアセトン) ((btiq) $_2$ Ir(acac)) の合成

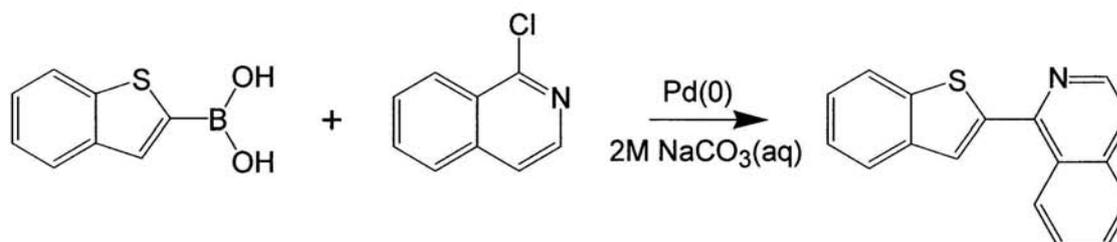
【 0 0 2 5】

1-ベンゾチエニルイソキノリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルボロン酸 (997mg, 5.6mmol) , 1-クロロイソキノリン (946mg, 5.8mmol) をトルエン (20ml) , エタノール (10ml) に溶解させ, パラジウム触媒 (220mg, 0.19mmol) , 2M炭酸ナトリウム水溶液 (20ml) を加え, N_2 置換下, 5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ, クロロホルムで抽出を行い, クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 1.16g, 収率: 79%) 。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.62-8.60(2H, d), 7.96-7.87(3H, m), 7.84(1H, s), 7.78-7.73(1H, d), 7.71-7.67(1H, d), 7.65-7.63(1H, d), 7.42-7.39(2H, m)

【化 9】



40

【 0 0 2 6】

ビス[1-(2'-ベンゾチエニル)-キノリナート- $\text{N,C}^3'$]イリジウム (アセチルアセトン) の合成

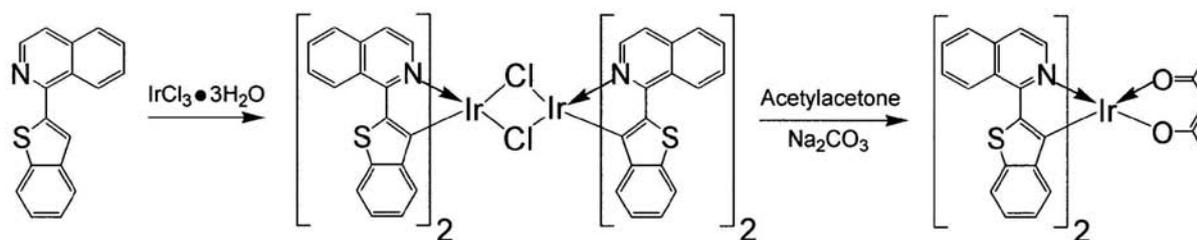
1-ベンゾチエニルイソキノリン (574mg, 2.2mmol) , 塩化イリジウム三水和物 (純度: 90% , 398mg, 1.0mmol) に2-エトキシエタノール (30ml) , 水 (10ml) を加え, 16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (250mg, 0.17mmol) に2-メトキシエタノール (30ml) , アセチルアセトン (1ml) , 炭酸ナトリウム (150mg) を加え還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) を用いて生成した (収量: 50mg, 収

50

率：18%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.92-8.88(2H, d), 8.22-8.19(2H, d), 7.88-7.84(2H, m), 7.68-7.64(4H, m), 7.56-7.54(2H, d), 7.32-7.27(2H, m), 6.94-6.91(2H, d), 6.56-6.53(2H, m), 6.18-6.14(2H, d), 5.12(1H, s), 1.63(6H, s)

【化10】



10

【0027】

合成例3

ビス[9-(2'-ベンゾチエニル)-フェナンスリナート-N, C^{3'}]イリジウム(アセチルアセトン) ($(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$) の合成

【0028】

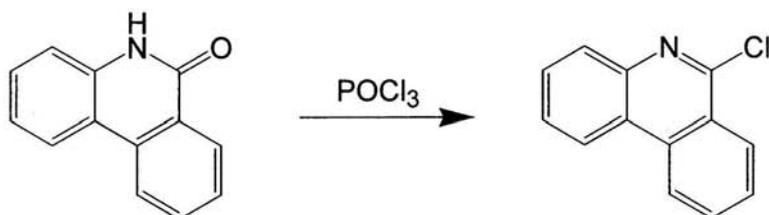
9-クロロフェナンスリジンの合成

フェナンスリジノン(2.0g)にオキシ塩化リン(15ml), ジメチルアニリン(0.63ml)を加え, 3時間還流した。溶液を水に注ぎクロロホルムで抽出を行い, クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム)を用いて生成した(収量: 2.1g, 収率: 96%)

20

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.63-8.60(1H, d), 8.55-8.52(1H, d), 8.50-8.48(1H, d), 8.11-8.09(1H, d), 7.94-7.92(1H, t), 7.79-7.66(3H, m)

【化11】



30

【0029】

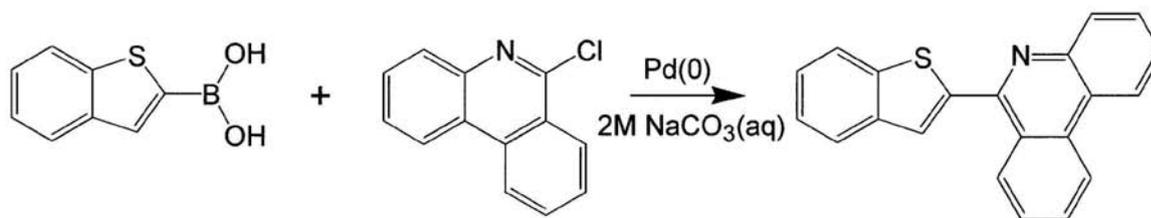
9-ベンゾチエニルフェナンスリジリンの合成

ベンゾ[b]チオフェン-2-イルボロン酸(884mg, 5.0mmol), 9-クロロフェナンスリジリン(1.0g, 4.8mmol)をテトラヒドロフラン(30ml), パラジウム触媒(160mg, 0.14mmol), 2M炭酸ナトリウム水溶液(20ml)を加え, N_2 置換下, 5時間還流した。反応溶液を水に注ぎ, クロロホルムで抽出を行い, クロロホルム溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム)を用いて生成した(収量: 1.15g, 収率: 78%)。

40

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.74-8.71(1H, d), 8.67-8.65(1H, d), 8.62-8.59(1H), 8.26-8.23(1H, d), 7.97-7.88(3H, m), 7.86(1H, s), 7.80-7.67(3H, m), 7.44-7.41(2H)

【化 1 2】



【 0 0 3 0】

ビス[9-(2'-ベンゾチエニル)-フェナンスリナート- N,C^3']イリジウム(アセチルアセトン)の合成

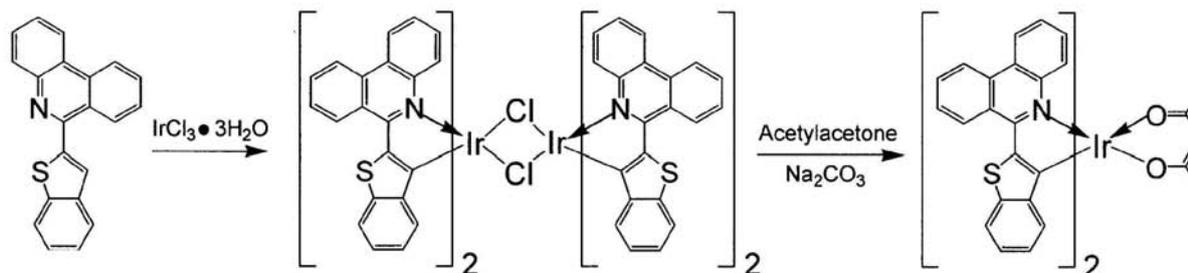
10

9-ベンゾチエニルフェナンスリジリン(706mg, 2.3mmol), 塩化イリジウム三水和物(純度:90%, 398mg, 1.0mmol)に2-エトキシエタノール(30ml), 水(10ml)を加え, 16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体(343mg, 0.20mmol)に2-メトキシエタノール(20ml), アセチルアセトン(1ml), 炭酸ナトリウム(180mg)を加え2時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム)を用いて生成した(収量:293mg, 収率:80%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 9.35-9.33(2H, d), 8.72-8.70(2H, d), 8.46-8.44(2H, d), 7.98-7.87(4H, m), 7.85-7.82(2H, d), 7.73-7.70(2H, d), 7.43-7.38(2H, t), 7.20-7.15(2H, t), 7.04-6.99(2H, m), 6.52-6.51(4H, d), 4.50(1H, s), 1.39(6H, s)

20

【化 1 3】



30

【 0 0 3 1】

(合成例 4)

ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-ベンゾキノリナート- N,C^3']イリジウム(アセチルアセトン)((btbq) $_2$ Ir(acac))の合成

【 0 0 3 2】

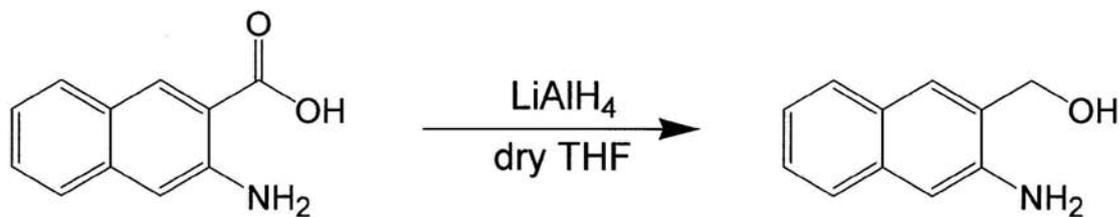
3-アミノ-2-(ヒドロキシルメチル)ナフタレンの合成

3-アミノ-2-ナフトエ酸(1g, 5.3mmol)を乾燥テトラヒドロフラン(40ml)に溶解させ, 水素化アルミニウムリチウム(0.46g, 12mmol)をゆっくりと加え, N_2 置換下, 3時間還流した。反応溶液に水を加え, ろ過し, ろ液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:酢酸エチル)を用いて精製した(収量:910mg, 収率:99%)。

40

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 7.69-7.67(1H, d), 7.61-7.58(1H, d), 7.58(1H, s), 7.39-7.34(1H, t), 7.26-7.20(1H, t), 7.03(1H, s), 4.86-4.84(2H, d), 4.38(2H, br), 3.50-3.48(1H, s)

【化14】



【0033】

3-(トリメチルアセトアミド)-2-(ヒドロキシメチル)ナフタレンの合成

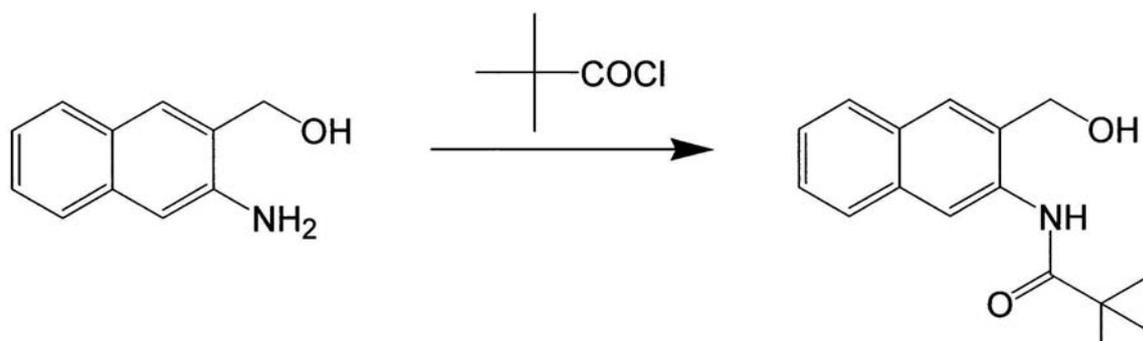
10

3-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)ナフタレン (1g, 5.5mmol), ジイソプロピルエチルアミン (0.86g, 8.6mmol) をクロロホルム (40ml) に溶解させ, 0 に冷却し, トリメチルアセチルクロリド (0.84g, 7.0mmol) のクロロホルム溶液 (10ml) を約15分かけて滴下した。0 で1時間攪拌し, さらに室温で1晩攪拌した。反応液に水を加え, クロロホルムで抽出し, 硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: 酢酸エチル: クロロホルム (9:1)) を用いて精製した (収量: 795mg, 収率: 56%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 9.14(1H, br), 8.72(1H, s), 7.82-7.80(1H, d), 7.75-7.72(1H, d), 7.64(1H, s), 7.46-7.42(2H, m), 4.90-4.89(2H, d), 1.38(9H, s)

【化15】

20



【0034】

30

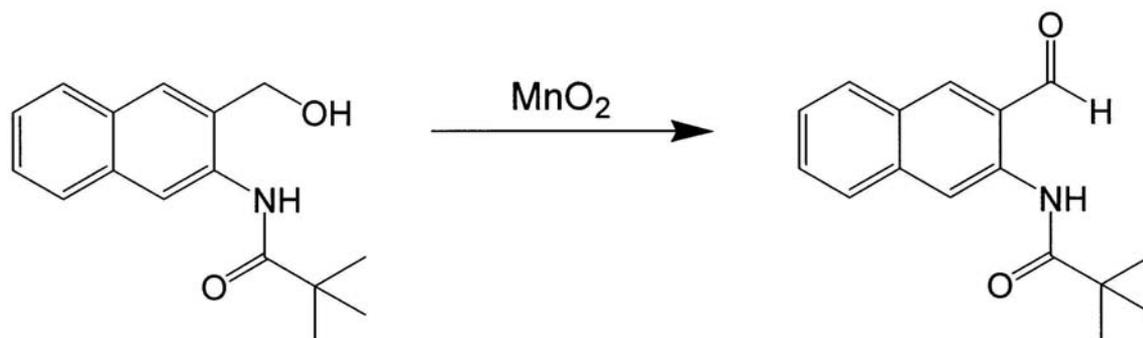
3-(トリメチルアセトアミド)-2-ナフトアルデヒドの合成

3-(トリメチルアセトアミド)-2-(ヒドロキシメチル)ナフタレン (0.8g, 2.9mmol) をクロロホルム (90ml) に溶解させ二酸化マンガン (3.6g, 41mmol) を加え攪拌した。薄層クロマトグラフで反応を追跡し, 適宜, 二酸化マンガン (総量5.47g, 63mmol) を加え, 室温で1晩攪拌した。反応溶液をセライトでろ過し, ろ液を減圧乾固した (収量: 753mg, 収率: 99%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 11.24(1H, br), 10.11(1H, s), 9.22(1H, s), 8.23(1H, s), 7.92-7.89(1H, d), 7.86-7.83(1H, d), 7.64-7.60(1H, t), 7.47-7.44(1H, t), 1.40(9H, s)

【化16】

40

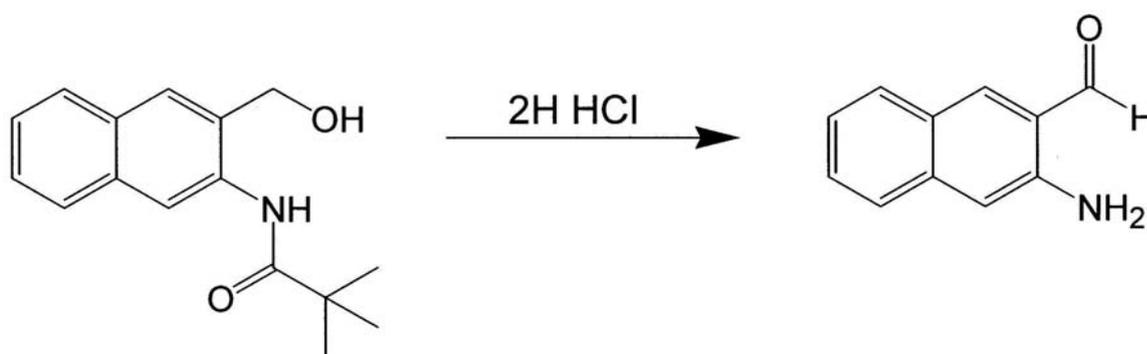


50

【0035】

3-アミノ-2-ナフトアルデヒドの合成

3-(トリメチルアセトアミド)-2-ナフトアルデヒド (0.8g, 3.1mmol) を2NHCl (120ml), エタノール (60ml) に溶解させ1晩 (15時間) 還流した。溶液を室温まで空冷し, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でpH8にした。析出物をろ過し, ろ液をクロロホルムで抽出し, 硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した (収量: 300mg, 収率: 57%)。
 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 10.09(1H, s), 8.08(1H, s), 7.78-7.75(1H, d), 7.57-7.53(1H, d), 7.47-7.43(1H, t), 7.22-7.20(1H, t), 6.93(1H, s), 5.77(2H, br)
 【化17】



10

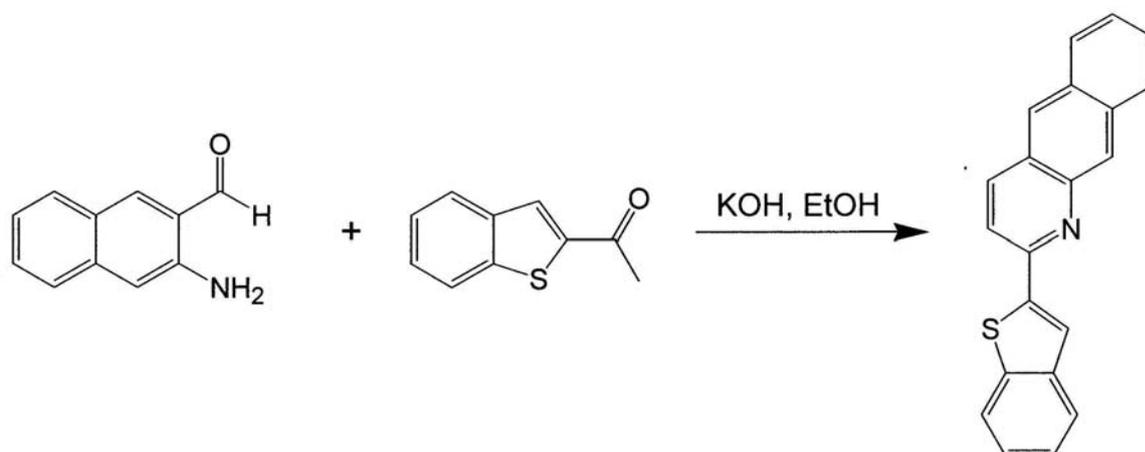
【0036】

2-ベンゾチエニルベンゾキノリンの合成

2-アセチルベンゾチオフェン (0.37g, 2.1mmol), 3-アミノ-2-ナフトアルデヒド (0.35g, 2mmol) をエタノール (45ml) に溶解させ, 飽和水酸化カリウムのエタノール溶液 (1ml) を加え, N_2 置換下, 1晩還流した。反応液に水を加え, クロロホルムで抽出し, 硫酸ナトリウムで乾燥し, ろ過後, ろ液を減圧乾固した。得られた固体をトルエンに溶かし, 大量のヘキサンを加え析出させた (収量: 500mg, 収率: 80%)。
 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT): 8.73(1H, s), 8.37(1H, s), 8.37-8.34(1H, d), 8.11-8.08(1H, d), 8.04-8.00(1H, t), 8.02(1H, s), 7.95-7.92(2H, d), 7.88-7.85(1H, m), 7.55-7.54(2H, m), 7.40-7.38(2H, m)

20

【化18】



30

40

【0037】

ビス[2-(2'-ベンゾチエニル)-ベンゾキノリナート-N, C^{3'}]イリジウム (アセチルアセトン) の合成

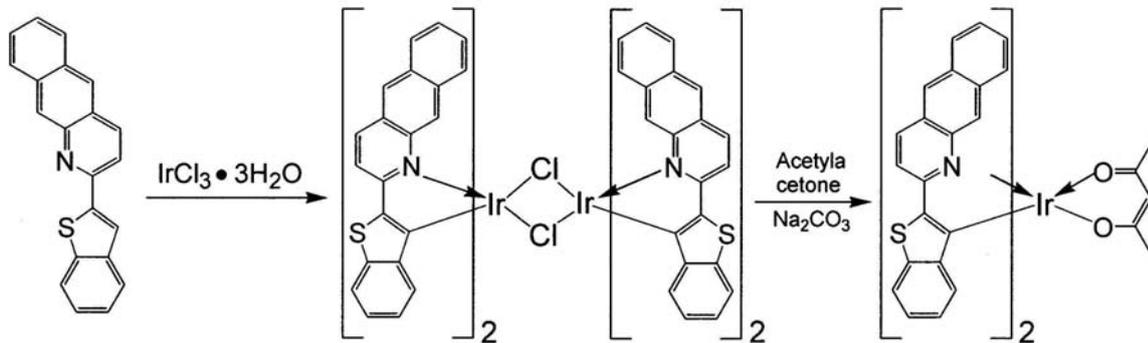
2-ベンゾチエニルベンゾキノリン (500mg, 1.61mmol), 塩化イリジウム三水和物 (純度: 90%, 300mg, 0.77mmol) に2-エトキシエタノール (30ml), 水 (10ml) を加え, 16時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体 (340mg, 0.2mmol) に2-メトキシエタノール (20ml), アセチルアセトン (1ml), 炭酸ナトリウム

50

(170mg) を加え還流を加え2時間還流した。溶液を室温まで冷却し生成した固体をろ過した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：クロロホルム）を用いて精製した（収量：60mg，収率：33%）。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, RT) : 8.61-8.60(2H, d), 8.34-8.32(4H, m), 7.95-7.88(4H, m), 7.89(2H, s), 7.67-7.65(4H, d), 6.98-6.95(4H, m), 6.49-6.47(4H, d), 4.51(1H, s), 1.60(6H, s)

【化19】



10

【0038】

りん光スペクトルの測定

上記で合成された $(\text{btq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ と、対照の $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ を 1, 2 - ジクロロエタンに溶解し、室温で吸収、りん光スペクトルの測定を行った。結果を図1と表1に示す。

20

【0039】

【表1】

表1. 各イリジウム錯体の1,2-ジクロロエタン中におけるスペクトル特性およびりん光量子収率

化合物	吸収極大波長 $\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	吸収極大波長における分子吸光係数 $\varepsilon / \text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	りん光極大波長 $\lambda_{\text{p}} / \text{nm}$	りん光量子収率 Φ_{p}
$(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$	483	6100	616	0.30
$(\text{btq})_2\text{Ir}(\text{acac})$	540	8200	673	0.38
$(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$	542	10500	710	0.12
$(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$	560	11700	719	0.29
$(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$	580	11700	753	0.083

30

【0040】

$(\text{btq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ の吸収帯は、 $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ の吸収帯と比較して、約60nm長波長側に観測され（図1），また分子吸光係数も増加しており、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ においては約2倍に増加している。 $(\text{btq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ のりん光は、 $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ のりん光と比較して長波長側に観測され、特に $(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ においては、りん光極大波長が近赤外領域に観測される。 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ のりん光量子収率は0.29（ $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ では0.32）であり、りん光量子収率をほとんど減少させることなく、長波長化に成功している。以上のことから、 $(\text{btq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btiq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btph})_2\text{Ir}(\text{acac})$ 、 $(\text{btbq})_2\text{Ir}(\text{acac})$ は、 $(\text{btp})_2\text{Ir}(\text{acac})$ を用いたときよりも、皮膚から深い低酸素領域を可視化できると期待される。

40

50

【0041】

(btq)₂lr(acac)のりん光強度に対する溶存酸素の効果

細胞膜のモデルとしてリン脂質DMPC (dimyristoyl-phosphatidylcholine) でできた単層ベシクル (ULV; unilamellar vesicle) を用い、(btq)₂lr(acac)のりん光強度に対する溶存酸素の効果調べた。図2にDMPC膜存在下(1mM)における(btq)₂lr(acac) (10 μM)のりん光スペクトルを、Ar(アルゴン)置換溶液、空気飽和溶液、1atm酸素飽和溶液で測定した結果を比較して示す。その結果、35 と15 のいずれの場合においても、Ar置換溶液に比べて溶存酸素存在下では(btq)₂lr(acac)のりん光強度が著しく減少し、酸素による消光を大きく受けていることが分かる。35 でのこれらの溶液中におけるりん光強度比は、6:1:0.2、15 では3:1:0.3であった。

10

なお、DMPC単層膜はエタノールインジェクション法を用いて作成した。DMPC膜は温度23 で相転移し、23 以下ではゲル状態、23 以上では液晶状態を取る。

【0042】

癌細胞中における酸素濃度の可視化

癌細胞(Hela細胞)を低酸素(5%O₂)の状態と、通常の状態(20%O₂)で培養し、(btq)₂lr(acac) (5% DMSO溶液:最終濃度50 μM)を加えて37 で2時間培養し、けい光顕微鏡でりん光を観測した。りん光測定結果を図3に示す。

その結果、低酸素状態では通常の状態に比べてより強く明瞭な赤色りん光が観測された。(btq)₂lr(acac)投与後、4時間でも明瞭な赤色りん光が見られることから、(btq)₂lr(acac)の細胞に対する毒性は低く、細胞内での安定性も高いことが分かる。

20

【0043】

以上より、(btq)₂lr(acac)のりん光を測定することにより、低酸素細胞(hypoxia)を可視化することができ、さらにFLIM(Fluorescence Lifetime Imaging)法等の技術を用いてりん光寿命を測定することにより、細胞内や組織の酸素濃度を非侵襲的に定量することができることが示唆された。

また、(btiq)₂lr(acac)、(btph)₂lr(acac)、(btbq)₂lr(acac)についても同様の効果が予測された。

【0044】

癌組織の可視化

図4に扁平上皮癌を移植したマウスの尻尾の静脈から(btq)₂lr(acac) (10% DMSO溶液:最終濃度50 μM)を投与し、投与直後と投与30分後にin vivo イメージングシステムMaestro(Krabo社)を用いて発光を観測した結果を示す。励起波長は503~555nm、検出波長は>580nmである。

30

投与後30分に腫瘍部からりん光が観測された。癌細胞は正常細胞に比べて低酸素状態にあるため、酸素による消光を受けにくく、より強い発光が現れている。なお、(btq)₂lr(acac)を投与していないコントロールマウスの各臓器では、胃、腸の一部を除き上記環境下ではりん光、けい光は観測できなかった。胃、腸のけい光は餌によるものである。

【0045】

以上の実験結果が示すように、(btq)₂lr(acac)を投与しそのりん光を測定することにより、低酸素状態にある癌組織を非侵襲的かつ高感度・選択的に可視化できる。また、(btq)₂lr(acac)を用いた場合、(btph)₂lr(acac)で用いる励起光(445~490nm)よりも長波長の光を用いることができ、皮膚から深い場所にある腫瘍の可視化が期待される。また、(btiq)₂lr(acac)、(btph)₂lr(acac)、(btbq)₂lr(acac)についても同様の効果が予測された。

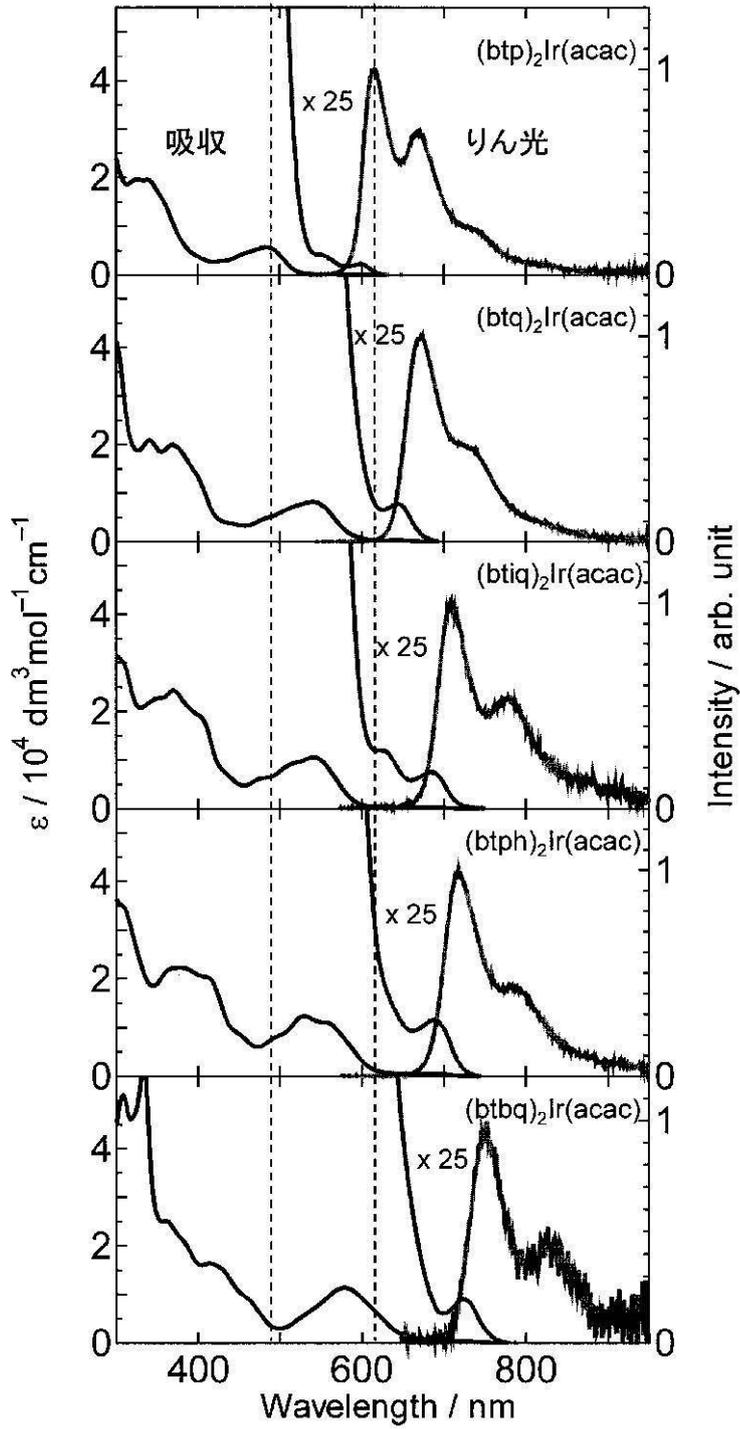
40

【産業上の利用可能性】

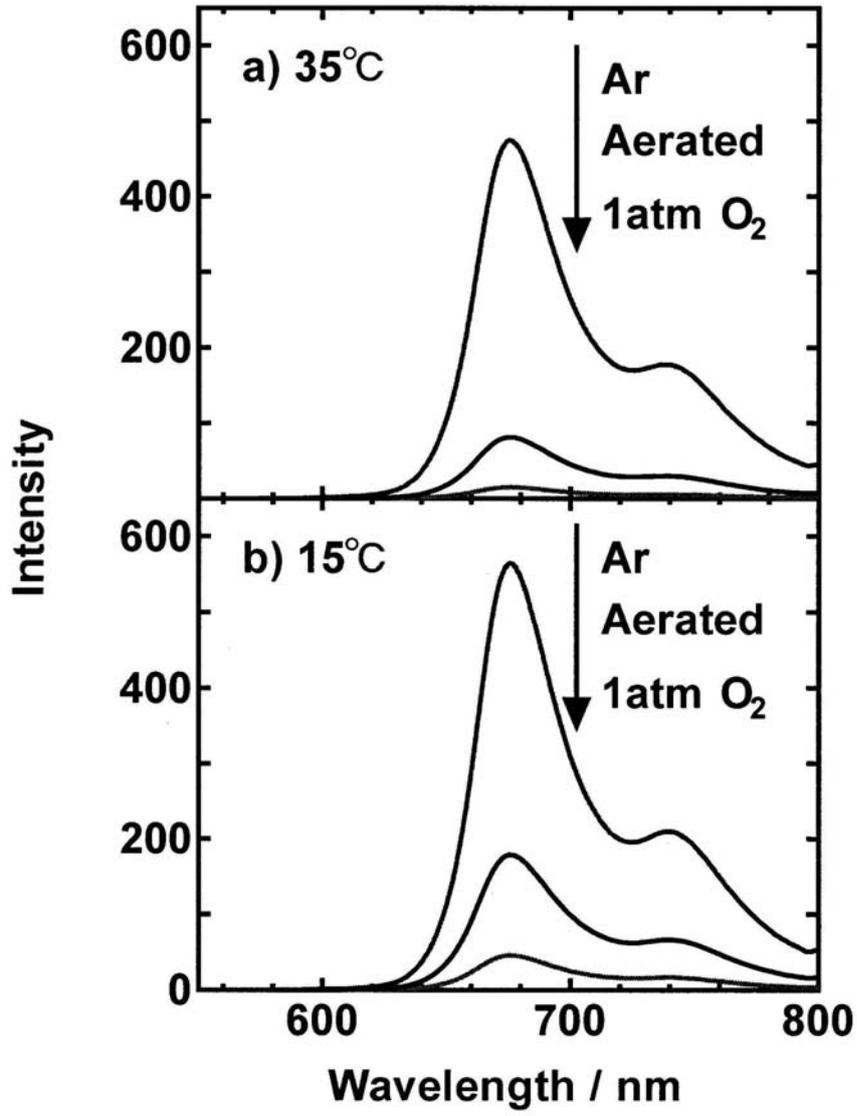
【0046】

本発明の酸素濃度検出試薬によれば、生きた細胞や組織中の酸素濃度を非侵襲的に高感度かつリアルタイムで定量することができ、細胞内酸素濃度定量試薬、低酸素細胞画像化薬などとして有用である。また、癌組織が低酸素状態にあることを利用した癌組織の診断にも利用でき、低酸素腫瘍診断試薬などとしても有用である。

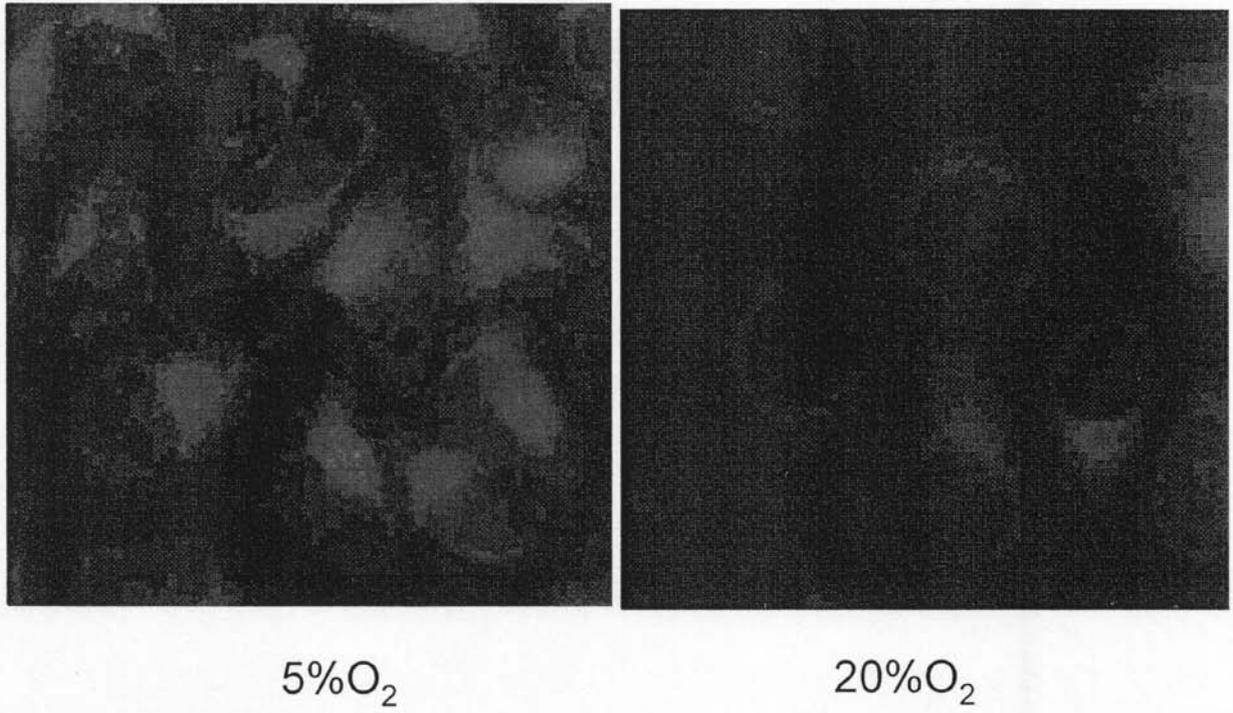
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

投与前

投与後30分



フロントページの続き

- (72)発明者 飛田 成史
群馬県桐生市天神町一丁目5番1号 国立大学法人群馬大学内
- (72)発明者 穂坂 正博
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内
- (72)発明者 竹内 利行
群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内
- Fターム(参考) 2G042 BB09 CA10 DA06 FA06
2G045 CB02 DB30 FA11 FB12