

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6815038号
(P6815038)

(45) 発行日 令和3年1月27日 (2021.1.27)

(24) 登録日 令和2年12月24日 (2020.12.24)

(51) Int. Cl.

F I

C O 9 B 57/00 (2006.01)

C O 9 B 57/00

C S P Z

G O 1 N 33/48 (2006.01)

G O 1 N 33/48

P

G O 1 N 21/64 (2006.01)

G O 1 N 21/64

F

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

C O 7 D 491/22 (2006.01)

C O 7 D 491/22

請求項の数 9 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-501233 (P2018-501233)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月18日 (2016.7.18)
 (65) 公表番号 特表2018-530630 (P2018-530630A)
 (43) 公表日 平成30年10月18日 (2018.10.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/007801
 (87) 国際公開番号 W02017/010852
 (87) 国際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
 審査請求日 令和1年6月20日 (2019.6.20)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0100820
 (32) 優先日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0100822
 (32) 優先日 平成27年7月16日 (2015.7.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

(73) 特許権者 507074834
 エスエフシー カンパニー リミテッド
 大韓民国, チュンチョンブクド, チョン
 ジューシ, チョンウォンク, オチャン
 ウプ, グワハクサンオブ5089
 (74) 代理人 110000800
 特許業務法人創成国際特許事務所
 (72) 発明者 ソン, ジュマン
 大韓民国 58746 チョルラナムド
 モクポーシ ピョンファーロ 153ボ
 ンギル 9 304-1002

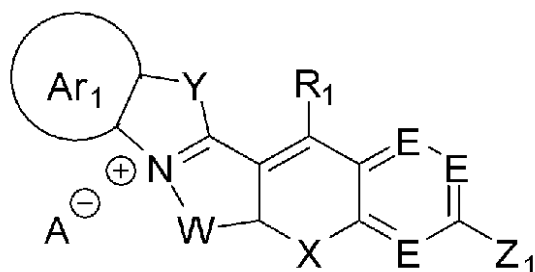
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染料化合物

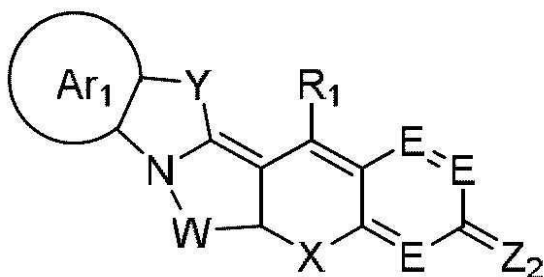
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記化学式 I 又は化学式 II で表される染料化合物であって、
 【化 1】



【化 2】



前記化学式 I 又は化学式 I I において、

Ar_1 は、置換または非置換の炭素数 6 ~ 20 のアリール、あるいは置換または非置換の炭素数 2 ~ 20 のヘテロアリールであり、

前記 Ar_1 は、それぞれ 1 種以上の置換基で置換されていてもよく、前記 1 種以上の置換基は、水素、重水素、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のアリールアルキル、置換または非置換のアリールオキシ、置換または非置換のアリールオキシアルキル、置換または非置換のアルコキシ、置換または非置換のアルコキシアルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び 4 次アンモニウムから選択されるいずれか 1 つであり、

前記 1 種以上の置換基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、アルコキシ、及びアルコキシアルキルから選択されるいずれか 1 つである場合、1 種以上の置換基でさらに置換されていてもよく、前記 1 種以上の置換基は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び 4 次アンモニウムから選択され、

E は、 CR_1 または N であり、

Z_1 は、 NR_2R_3 、 OR_4 、または SR_5 であり、 Z_2 は、 NR_6 、 O 、 S 、または O^+R_7 であり、

X は、 O 、 S 、 NR_8R_9 、 $SiR_{10}R_{11}$ 、 $CR_{12}R_{13}$ 、または Se であり、

Y は、 $CR_{14}R_{15}$ 、 NR_{16} 、 O 、 S 、 Se 、 $SiR_{17}R_{18}$ 、または CR_{19} 、 $R_{20} = CR_{21}R_{22}$ であり、

W は、 $CR_{23}R_{24}$ 、 $CR_{25}R_{26} = CR_{27}R_{28}$ 、 O 、 $-[CR_{29}R_{30} - CR_{31}R_{32}] -$ 、または $-[CR_{33}R_{34} - O] -$ であり、

前記 $R_{23} \sim R_{34}$ は、互いに同一または異なり、それぞれ独立に、水素、重水素、アルキル、またはアシルオキシであり、隣接する 2 つは互いに選択的に連結されて脂環族炭化水素を形成し、

前記 $R_1 \sim R_3$ のうちの 2 つは隣接する置換基のうちの 2 つと脂環族炭化水素環、または単環又は多環の芳香族炭化水素環を選択的に形成し、前記形成された脂環族または芳香族炭化水素環の炭素原子は、 N 、 S 、 O 、 Se 、 Te 、 Po 、 NR_{35} 、 $SiR_{36}R_{37}$ 、 $GeR_{38}R_{39}$ 、 PR_{40} 、及び BR_{41} から選択されるいずれか 1 つによって選

10

20

30

40

50

択的に置換されていて、

前記 $R_1 \sim R_{2,2}$ 及び $R_{3,5} \sim R_{4,1}$ は、互いに同一または異なり、それぞれ独立に、水素、重水素、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のアリールアルキル、置換または非置換のアリールオキシ、置換または非置換のアリールオキシアルキル、置換または非置換のアルコキシ、置換または非置換のアルコキシアルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び4次アンモニウムから選択されるいずれか1つであり、

前記 $R_1 \sim R_{2,2}$ 及び $R_{3,5} \sim R_{4,1}$ が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、アルコキシ及びアルコキシアルキルから選択されるいずれか1つである場合、1種以上の置換基でさらに置換されていてもよく、前記1種以上の置換基は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び4次アンモニウムから選択され、

A^- は、有機又は無機イオンであって、アニオン又は A^+ で表されるカチオンであり、 A^- は、存在してもよく、存在しなくてもよい染料化合物。

【請求項2】

前記 $R_1 \sim R_{2,2}$ 及び $R_{3,5} \sim R_{4,1}$ 、及びこれらの置換基は、前記染料化合物が標識される標識対象物質に結合する反応性置換基 (R_x) であって、

前記反応性置換基 (R_x) は、活性エステル (activated esters)、カルボキシル (carboxyl)、アミド (amide)、アクリルアミド (acrylamides)、アジド (azide)、アシルアジド (acyl azides)、ハロゲン化アシル (acyl halides)、アルキン (alkyne)、アミン (amine)、アルデヒド (aldehydes)、ケトン (ketones)、ハロゲン化アルキル (alkyl halides)、スルホン酸アルキル (alkyl sulfonates)、ハロゲン化アリール (aryl halides)、アジリジン (aziridines)、ボロネート (boronates)、ジアゾアルカン (diazalkanes)、エポキシド (epoxides)、ハロプラチネート (ハロ白金酸塩、haloplatinate)、ハロトリアジン (halotriazines)、イミドエステル (imido esters)、イソシアネート (isocyanates)、シリルハライド (silyl halides)、スルホン酸エステル (sulfonate esters)、ハロゲン化スルホニル (sulfonyl halides)、スクシンイミジルエステル (succinimidylyl ester)、スルホスクシンイミジルエステル (sulpho-succinimidylyl ester)、無水物 (anhydrides)、酸ハロゲン化物 (酸ハライド、acid halides)、イソチオシアネート (isothiocyanate)、ビニルスルホン (vinyl sulphone)、ジクロロトリアジン (dichlorotriazines)、ハロアセトアミド (haloacetamides)、マレイミド (maleimides)、カルボジイミド (carbodiimide)、ホスホラミダイト (phosphoramidites)、ヒドラジン (hydrazines)、及びヒドラジド (hydrazide) から選択されるいずれか1つであり、

前記活性エステルは -COR' であり、前記 R' は、スクシンイミジルオキシ (succinimidyloxy、-OC₄H₄O₂)、スルホスクシンイミジルオキシ (sulfosuccinimidyloxy、-OC₄H₃O₂-SO₃H)、または -1-オキシベンゾトリアゾリル (-1-oxybenzotriazolyl、-OC₆H₄N₃) であるか；又は、非置換のアリールオキシ、またはニトロ、ハロゲン、シアノ及びハロゲンアルキルから選択された 1 種以上で置換されたアリールオキシであるか；又は、カルボン酸であることを特徴とする、請求項 1 に記載の染料化合物。

【請求項 3】

前記反応性置換基 (R_x) は、リンカー (L) に共有結合で連結された -L-R_x 構造であり、前記 L は、単一結合であるか、又は、炭素 (C)、窒素 (N)、酸素 (O) 及び硫黄 (S) 原子から構成される群から選択された原子が 1 ~ 20 個連結された直鎖又は分岐鎖の鎖であるか、又は、脂肪族炭化水素環、芳香族炭化水素環、脂肪族ヘテロ環及び芳香族ヘテロ環から選択されたいずれか 1 つであり、前記 L は、+ 又は - 電荷を有することができることを特徴とする、請求項 2 に記載の染料化合物。

10

【請求項 4】

前記標識対象物質は、アミノ基、スルフヒドリル基、カルボニル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、リン酸基及びチオリン酸基から選択される 1 種以上を含む生体分子、ナノ粒子、または有機化合物であり、

前記生体分子は、抗体 (antibody)；抗原 (antigen)；脂質 (lipid)；タンパク質 (protein)；ペプチド (peptide)；炭水化物 (carbohydrate)；デキストラン (dextran)；脂肪酸 (fatty acid)；リン脂質 (phospholipid)；リポ多糖類 (lipopolysaccharide)；アミノ基、スルフヒドリル基、カルボニル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、リン酸基及びチオリン酸基のうちの 1 つ以上を含むか、または含むように誘導化されたヌクレオチド (nucleotides) 又はオリゴヌクレオチド (oligonucleotide)；アミノ基、スルフヒドリル基、カルボニル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、リン酸基及びチオリン酸基のうちの 1 つ以上を含むか、または含むように誘導化されたオキシポリ核酸 (oxypolynucleotide) 又はデオキシポリ核酸 (deoxypolynucleotide)；微生物；薬物；ホルモン；細胞；細胞膜；及び毒素 (toxins)；からなる群から選択されるいずれか 1 つ以上であることを特徴とする、請求項 2 に記載の染料化合物。

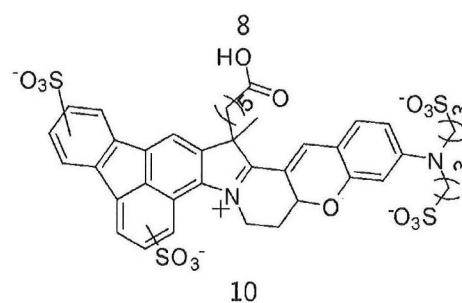
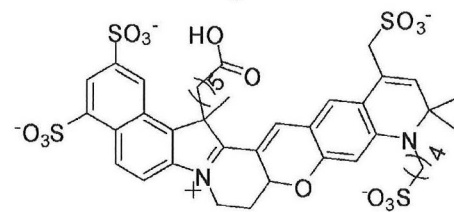
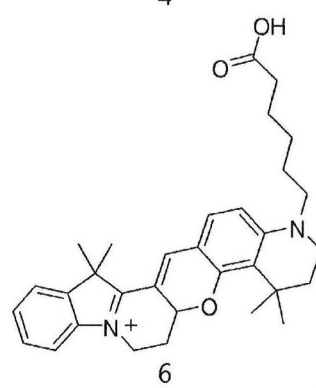
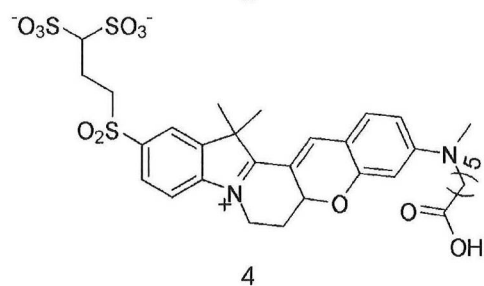
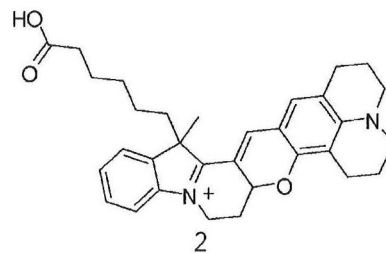
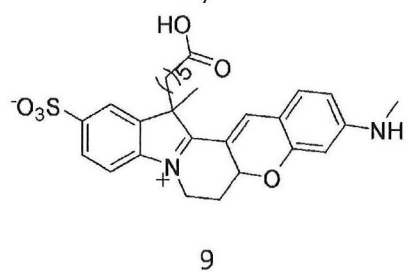
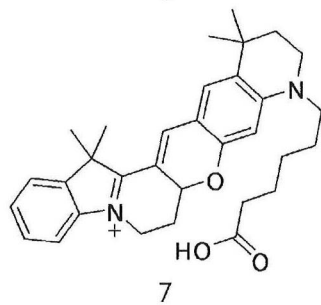
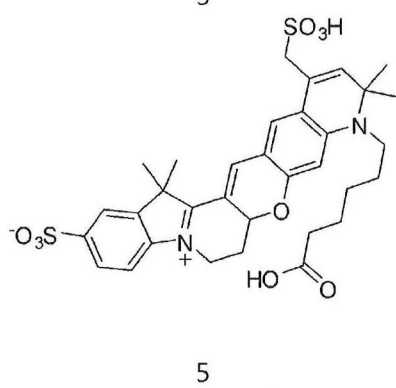
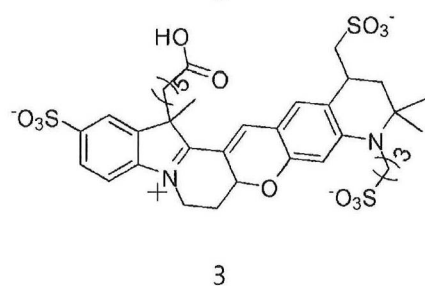
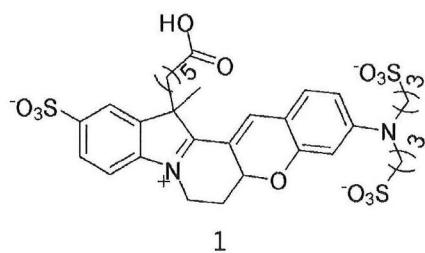
20

30

【請求項 5】

前記化学式 I 又は化学式 II で表される染料化合物は、下記 [化学式 1] ~ [化学式 13] から選択されるいずれか 1 つであることを特徴とする、請求項 1 に記載の染料化合物。

【化 3】



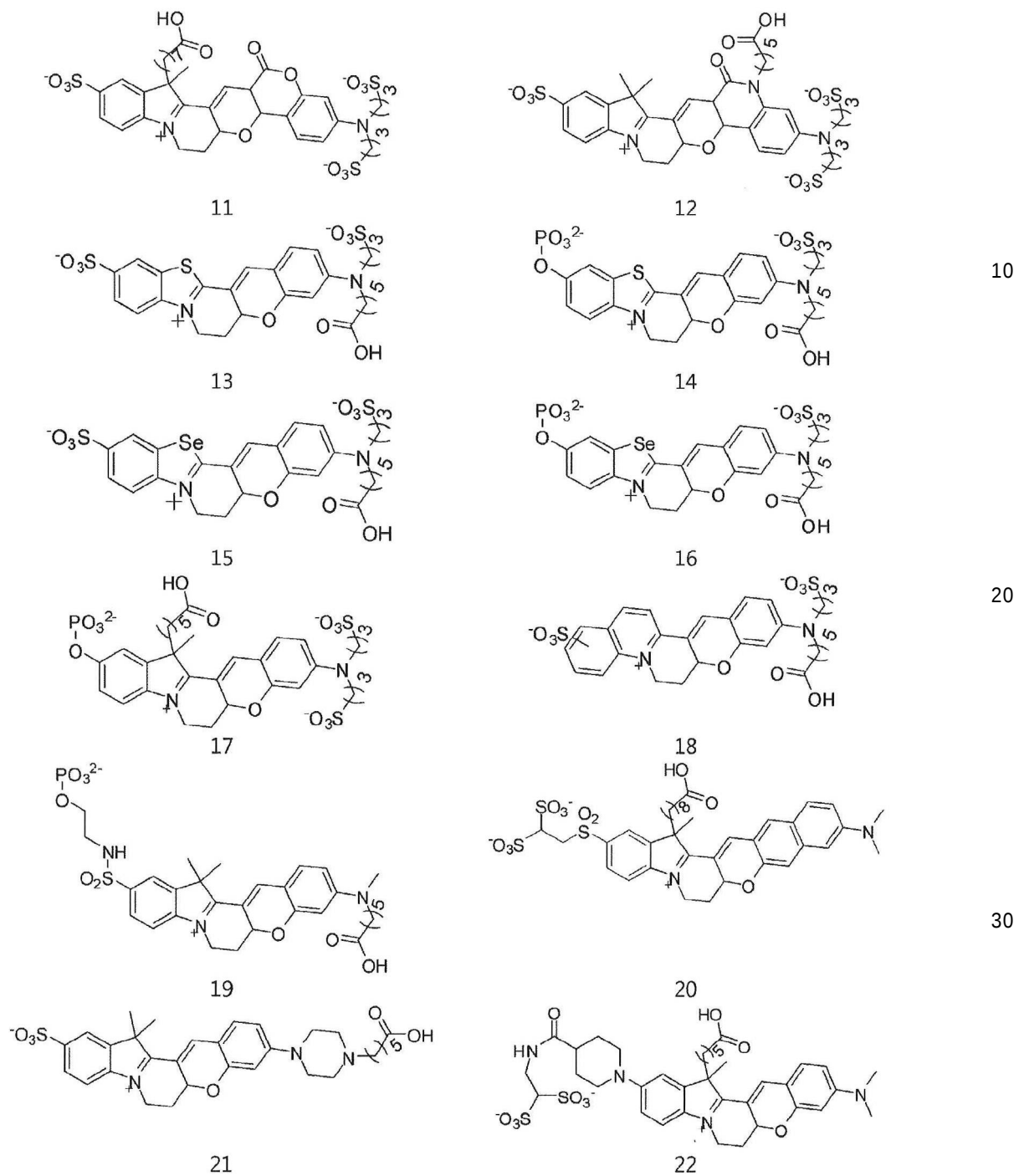
10

20

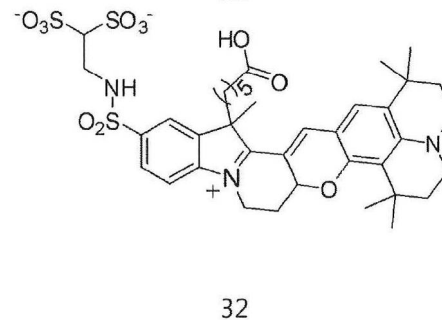
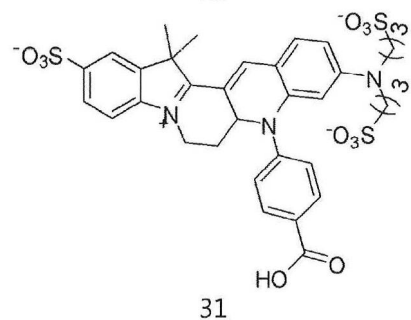
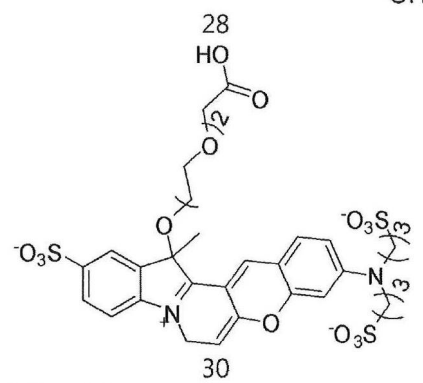
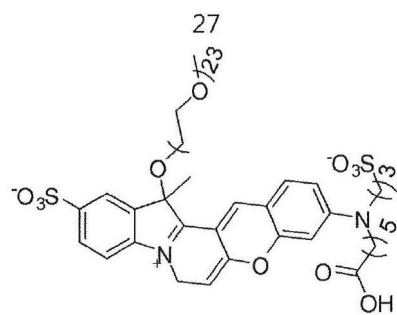
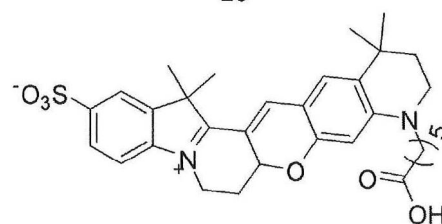
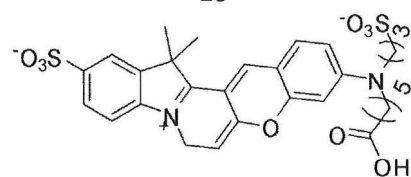
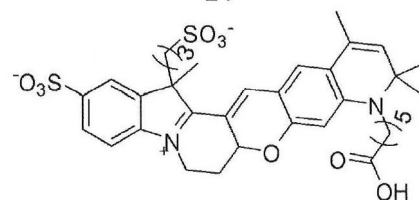
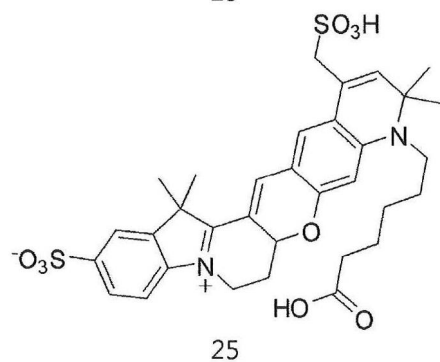
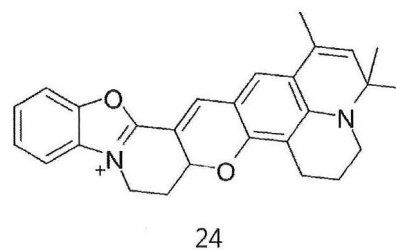
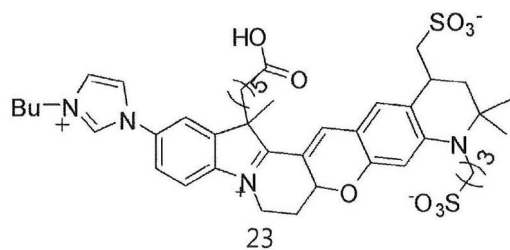
30

40

【化 4】



【化 5】



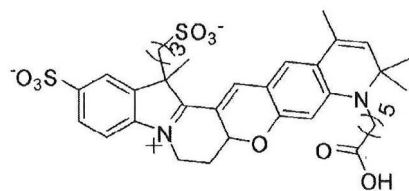
10

20

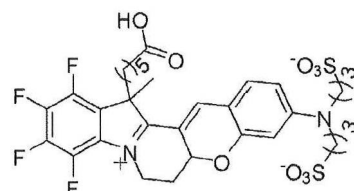
30

40

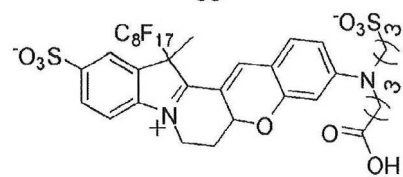
【化 6】



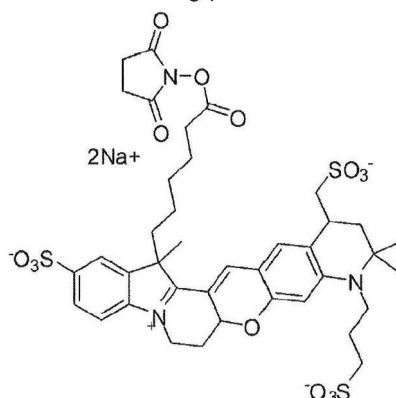
33



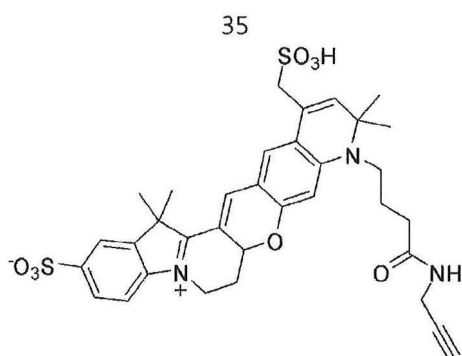
34



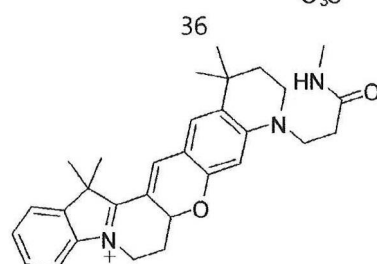
35



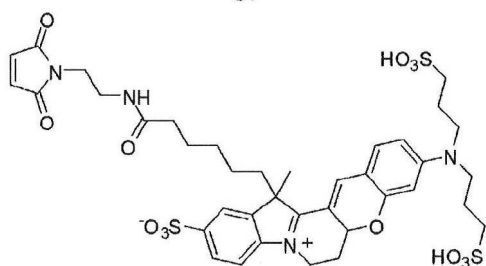
36



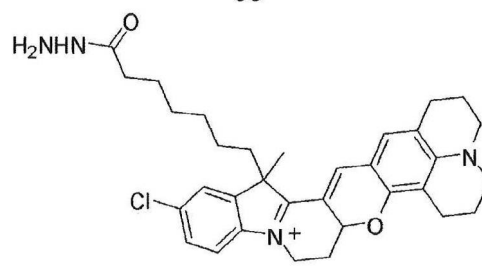
37



38



39



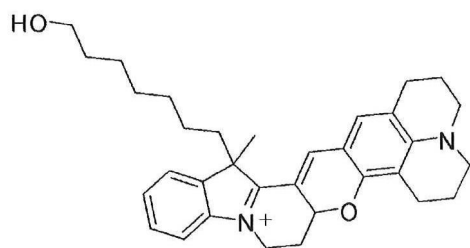
40

10

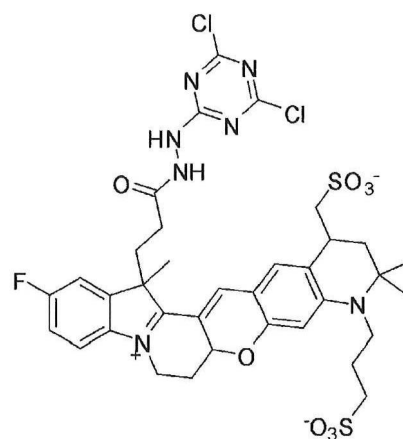
20

30

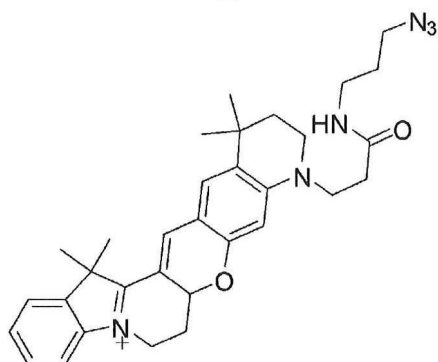
【化 7】



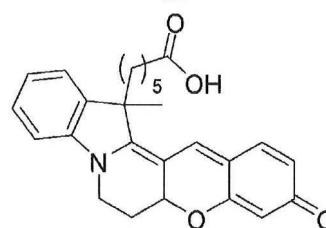
41



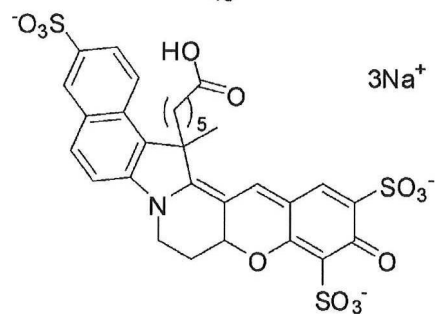
42



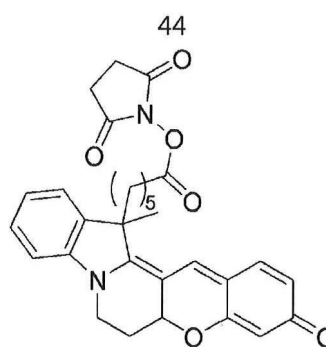
43



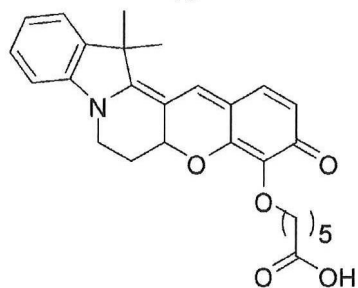
44



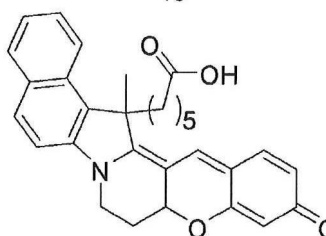
45



46



47



48

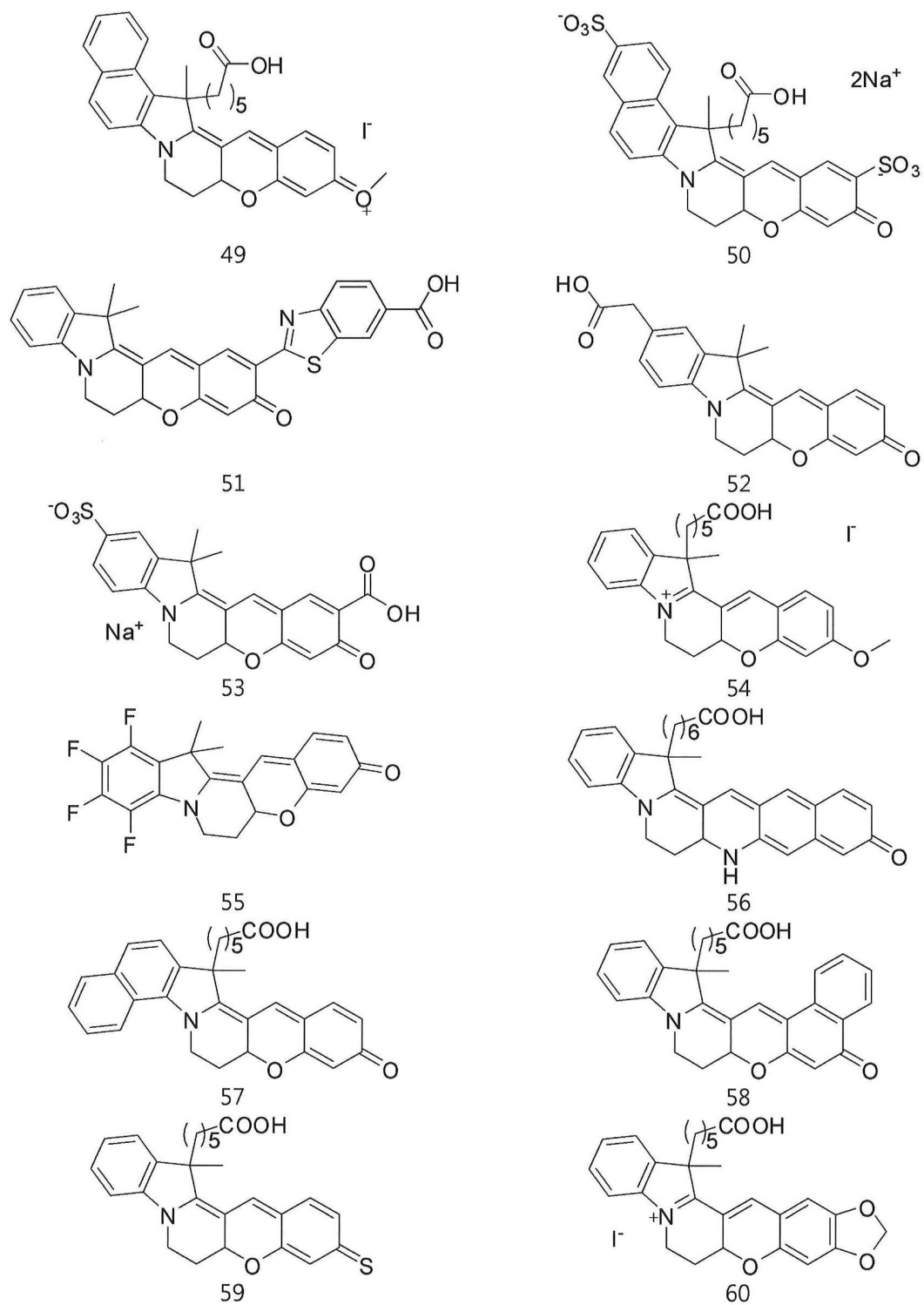
10

20

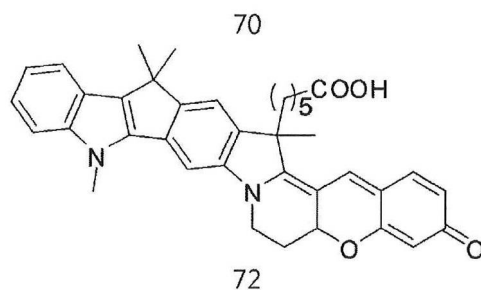
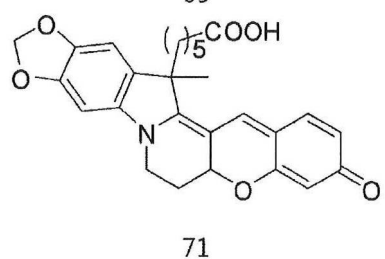
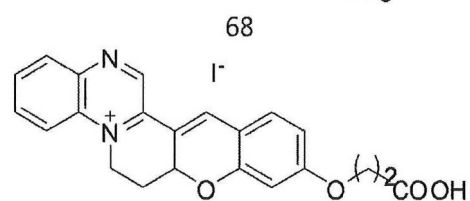
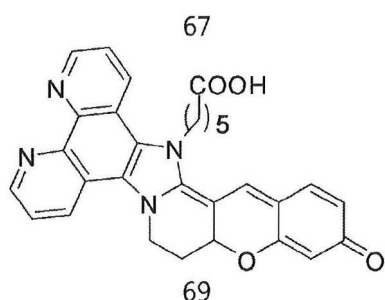
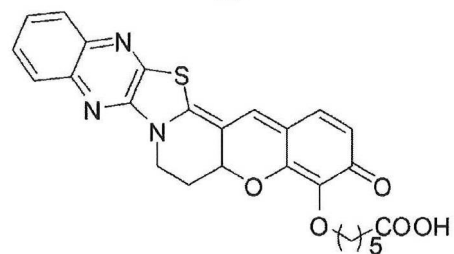
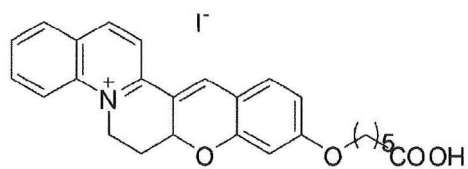
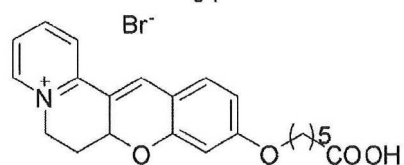
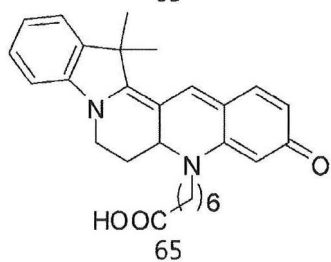
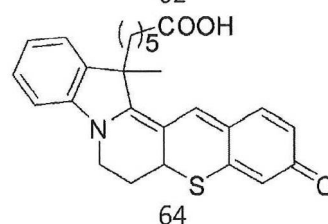
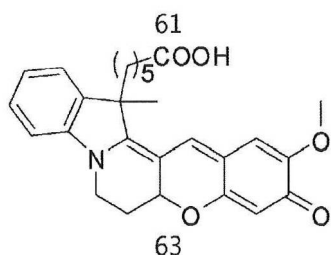
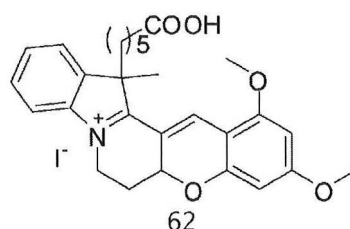
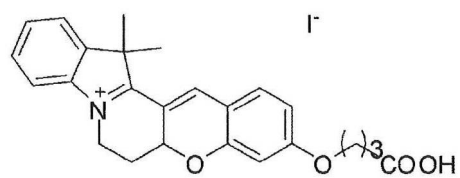
30

40

【化 8】



【化 9】



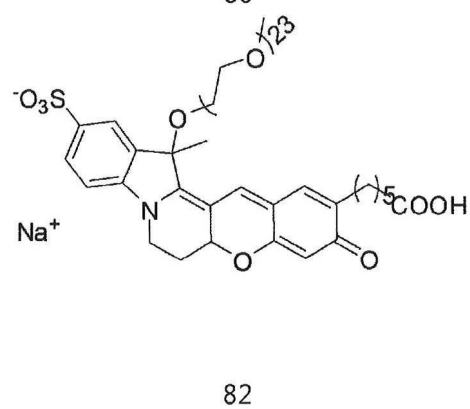
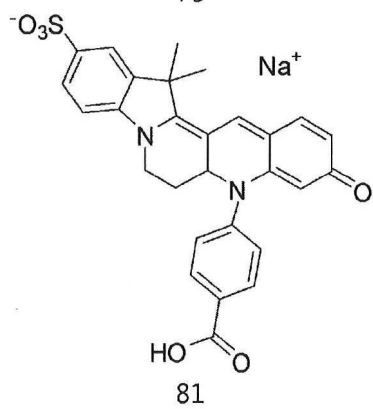
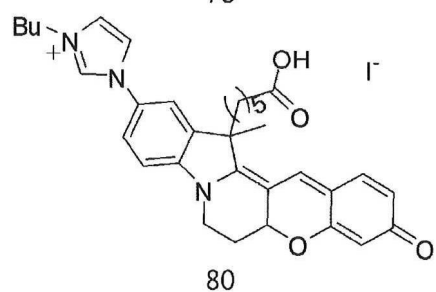
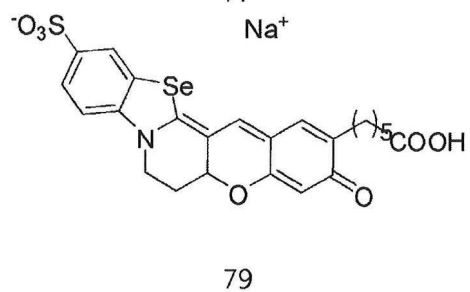
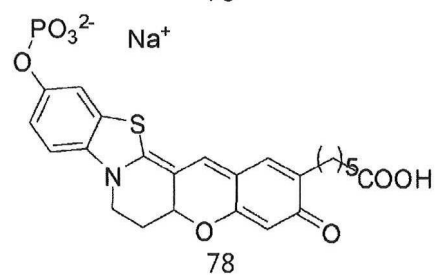
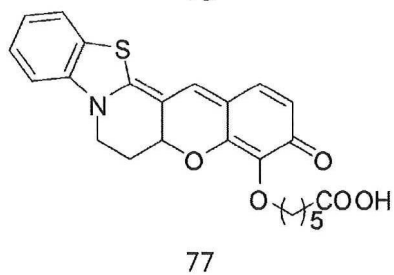
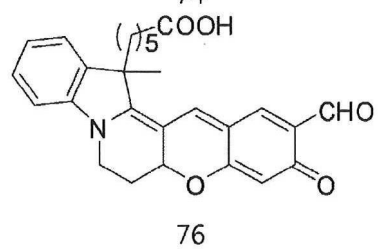
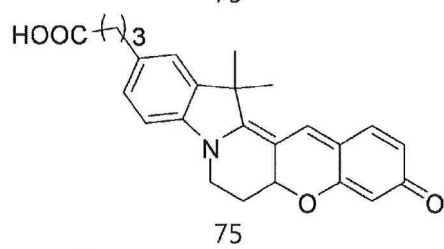
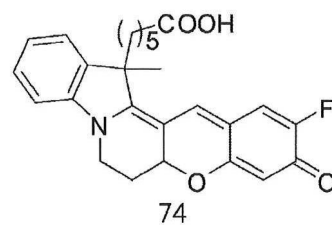
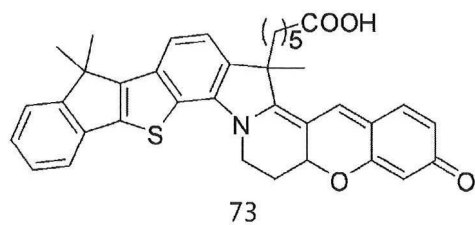
10

20

30

40

【化 10】

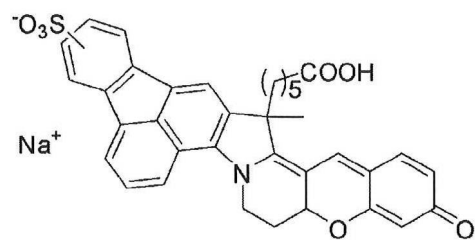
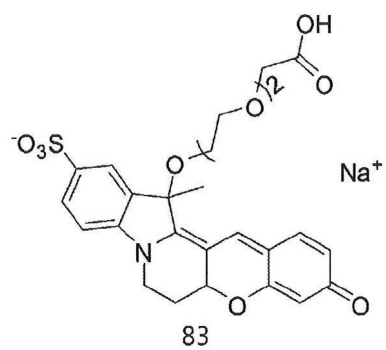


10

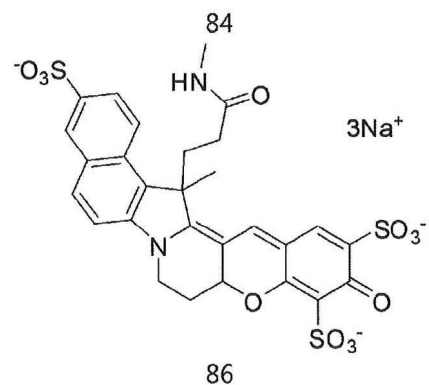
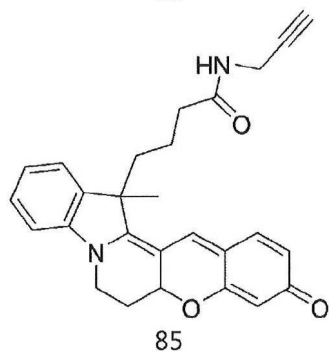
20

30

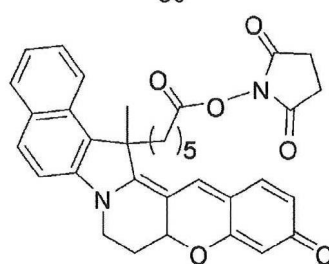
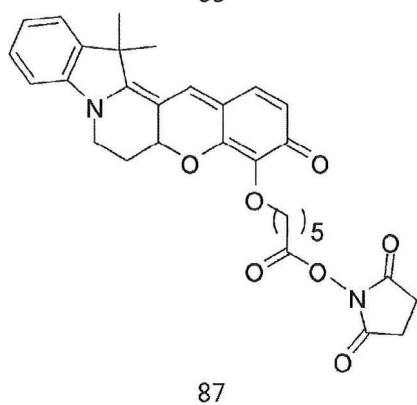
【化 1 1】



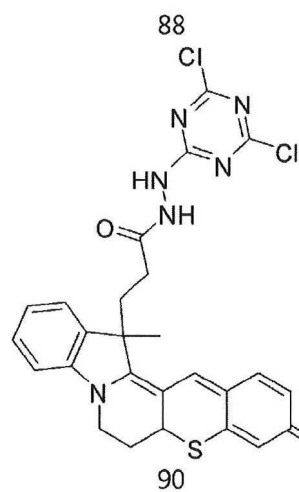
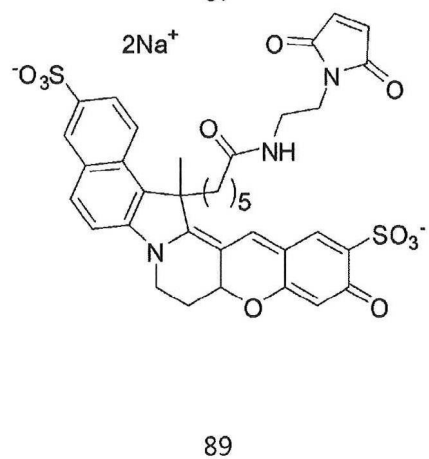
10



20

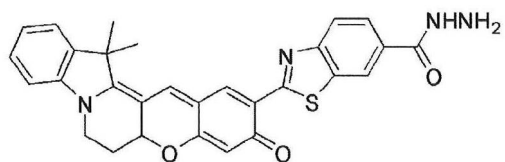


30

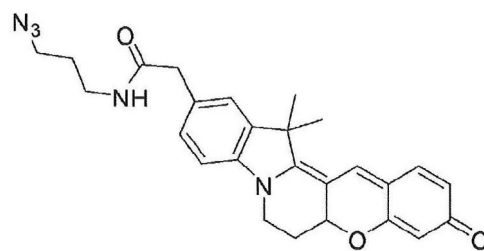


40

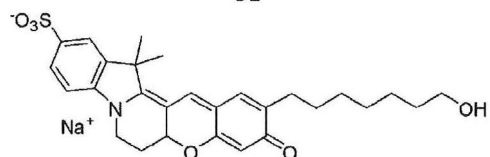
【化 1 2】



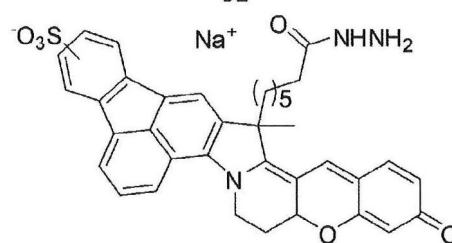
91



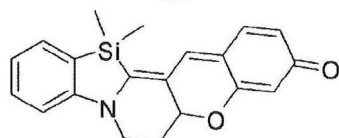
92

Na⁺

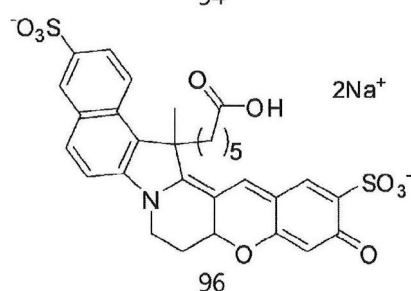
93



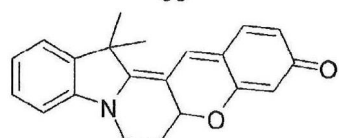
94



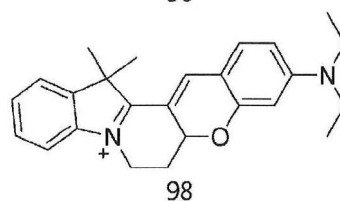
95



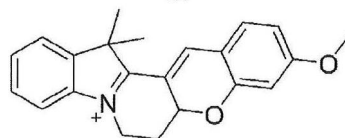
96



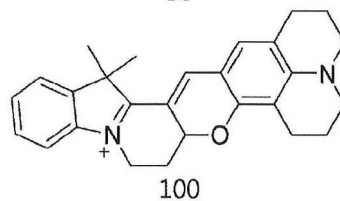
97



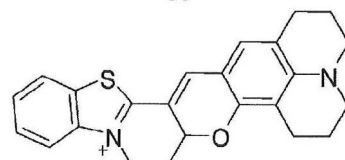
98



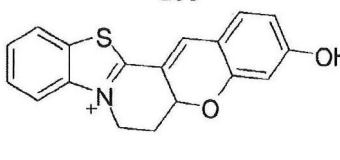
99



100

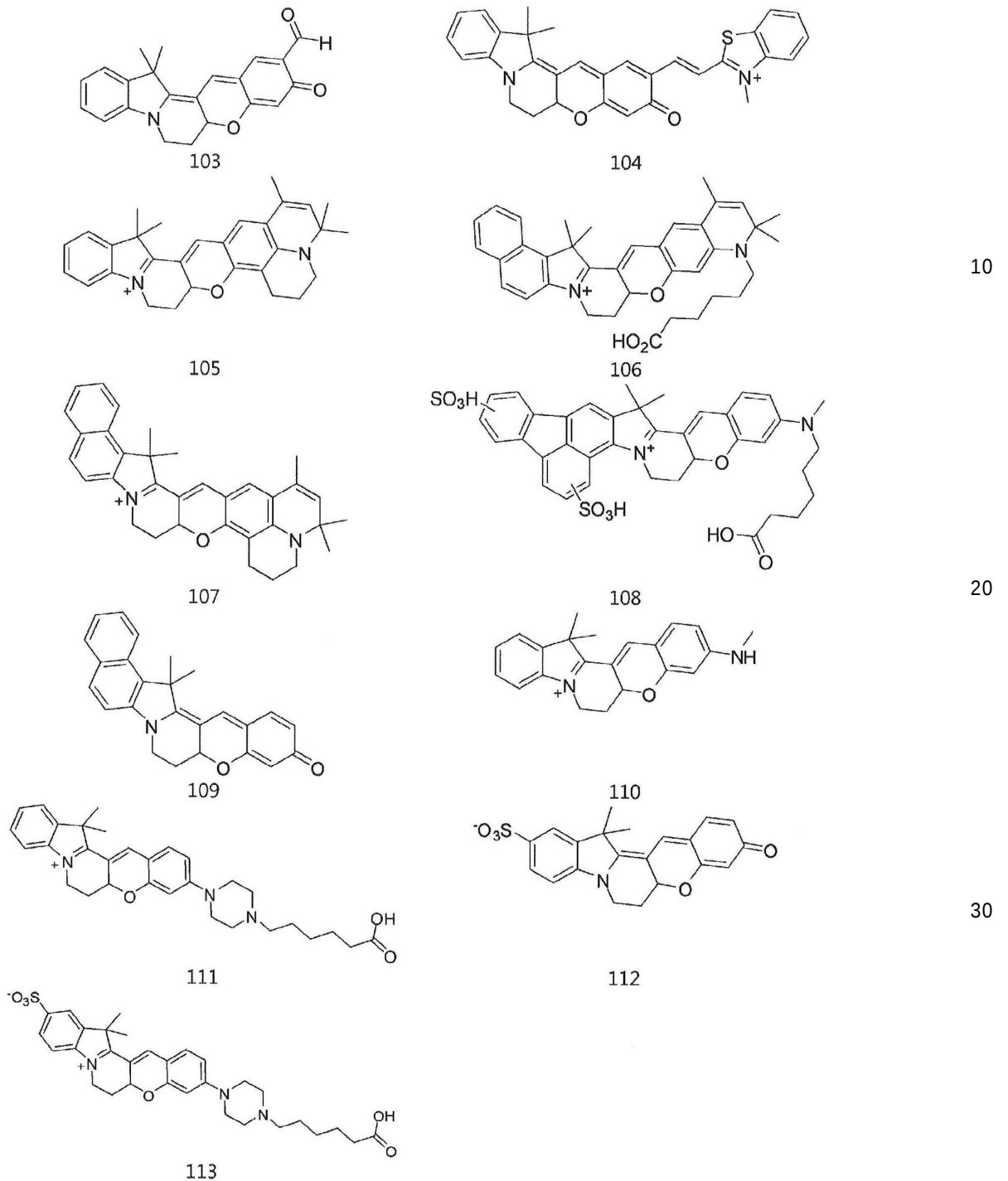


101



102

【化 13】



【請求項 6】

前記染料化合物は、細胞内のミトコンドリアに選択的に染色されることを特徴とする、
請求項 1 に記載の染料化合物。 40

【請求項 7】

前記染料化合物は、細胞内 pH に応じて蛍光の強度が変わることを特徴とする、請求項
1 に記載の染料化合物。

【請求項 8】

(a) 標識対象物質を含む試料に請求項 1 に記載の染料化合物を注入し、インキュベート
するステップを含む、化合物標識方法。

【請求項 9】

(b) 前記標識対象物質と結合された染料化合物の蛍光発光を測定するステップをさら
に含み、蛍光強度によって標識対象物質を定量化することを特徴とする、請求項 8 に記載 50

の化合物標識方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、染料化合物に関し、より詳細には、量子効率、蛍光強度及び光安定性などの光特性に優れ、高水溶性であり、生体分子との結合又は生体分子内で優れた光特性の維持が可能な新規な染料化合物に関する。(本研究は、大韓民国産業通商資源部の優秀技術研究センタ(ATC)事業(10076988、蛍光体及び分子の診断のためのこれらの応用技術の開発)の研究費の支援を受けて行われた。)

10

【背景技術】

【0002】

蛍光は、生命科学分野において非破壊的に生物学的分子を追跡又は分析する際に最も一般的に用いられる技法である。自発光するタンパク質や自発光する分子も知られているが、一般に、タンパク質(proteins)、核酸(nucleic acids)、脂質(lipids)、小さな分子に発光特性を有する染料を標識(labeling)すれば、光学的追跡及び分析が可能となる。単なる発光特性の変化、発光特性の変化に基づく画像、エネルギー移動、周辺環境の変化による発光特性の変化、化学反応による構造の変化による発光特性の変化など、様々な化学的・光学的特性の変化を分析することによって、生命科学分野における有用な情報を得ることができる。

20

【0003】

このような現象を分析するシステムとして、細胞観察のための蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、流細胞分析機、マイクロアレイ、重合酵素連鎖反応装置、核酸やタンパク質の分離のための電気泳動装置、リアルタイムバイオイメーシングシステム、免疫測定システム、DNA序列分析システム、PCR分析システム、核酸及びタンパク質用の診断キット及び診断装備、画像支援手術用の内視鏡装備などの診断及び治療のためのシステムが挙げられる。より正確かつ簡易に分析するために新たな応用分野及び数多くのシステムが、現在も開発・改良されている。

【0004】

30

分析技術に適した蛍光染料として使用されるためには、生体分子が存在する媒質、すなわち、水溶性媒質における高輝度特性、様々なpH条件における安定性、光安定性、蛍光システムに適した励起及び発光波長特性などが要求される。このような要求条件に合致する蛍光染料として、キサントラン(xanthane)系列のフルオレセイン及びローダミン、及びポリメチン(polymethine)系列のシアニン誘導体染料化合物が広く知られている。特に、シアニン発色団を有する蛍光染料は、代表的な染料のカテゴリーに属するものとして広く活用されている。

【0005】

但し、現在知られているインドカルボシアニン、インドジカルボシアニン及びインドトリカルボシアニン骨格を有するカルボシアニンは、モル吸光係数は高く、蛍光量子効率は低いことが知られており、このような欠点により、生体分子にカップリングされた後、低い輝度(brightness)しか示さないと報告されている。

40

【0006】

したがって、前記のような問題点を改善して、より強い蛍光を発することによって有効に光学画像を得ることができる新たな染料に対する開発が必要であるのが現状である。

【0007】

また、ポリメチンシアニン染料は、1856年以来、染料が適用される様々な分野において不変の地位を占めており、このような課題に対して、様々な領域において毎年数多くの適用例が報告されている。

【0008】

50

一般に、シアニン染料は、2つの窒素を中心に構成されており、そのうちの一方は正に帯電されて、奇数個の炭素原子からなる接合鎖によって他方の窒素原子に連結されている。このような特徴は、「プッシュ-プル」アルケンとして研究されており、ポリメチン染料の基礎を形成するところ、ポリメチン染料は、発色団としてストレプトポリメチン単位を含む。ストレプトポリメチン単位の電荷に応じて、これらの染料は、以下のように分類される。

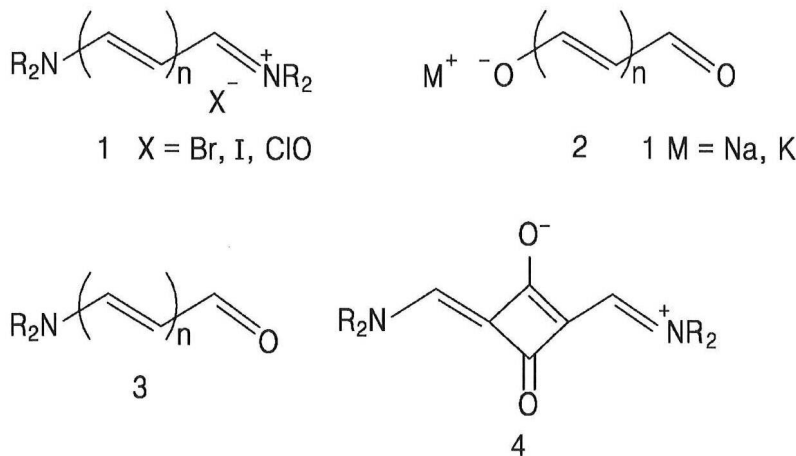
【0009】

カチオン性ストレプトポリメチンシアニン及びヘミシアニン染料(1)、アニオン性ストレプトポリメチンオキソノール染料(2)、中性ストレプトポリメチンメロシアニン染料(3)、双性イオン性スクアライン系シアニン染料(4)。

10

【0010】

【化1】



20

【0011】

一般に、前記染料は、安定した形態でオールトランスジオメトリを有する。ときには、このような染料は、光異性化(photoisomerization)過程を経る。これらの種の生成は、閃光光分解(flash photolysis)、一時的吸収(transient absorption)、及びピコ秒時間-分解スペクトロスコピー(picoseconds time-resolved spectroscopy)のような様々な技術を用いて調べることができる。また、前記染料は、ハロゲン化銀フォトグラフィ及びバンド-ギャップ半導体物質におけるスペクトル増減剤、光ディスクにおける記録媒体、太陽エネルギーを捕獲するための産業用ペイント、レーザー物質、光合成の光捕獲システム、光屈折物質、抗癌剤及び生物学的システムに対するプローブなどの広範囲な分野において活用されている。

30

【0012】

一般に、前記染料は、高いモル吸光係数を有するため、濃い色を示すが、量子効率(Quantum yield)が低いという致命的な欠点がある。その理由は、シアニン染料は、回転(rotational)、並進(translational)、振動(vibrational)モードがあるため、励起状態のエネルギーを蛍光ではなく非放射過程(non-radiative process)において損失するためである(D. F. O'Brien, T. M. Kelly, and L. F. Costa(1974). Excited state Properties of some Carbocyanine dyes and the energy transfer mechanism of spectral sensitisation. Photogr. Sci. Eng. 18(1), 76-84.)。したがって、本発明の発明者は、このような蛍光損失を低減するために、シアニン染料のポリメチン鎖を強固(Rigid)にデザインすることによって、蛍光量子効率を著しく増加させた。

40

【0013】

また、市販のMitotracker染料は、正に帯電しているため、細胞内のミトコンドリアに選択的に結合する特性を有しており、高い蛍光輝度及び優れた光安定性のため

50

Mitotrackerとして使用するのに適しており、ミトコンドリアを標識するために簡単なインキュベーション (Incubation) 過程のみでも十分な染色が行われる。

【0014】

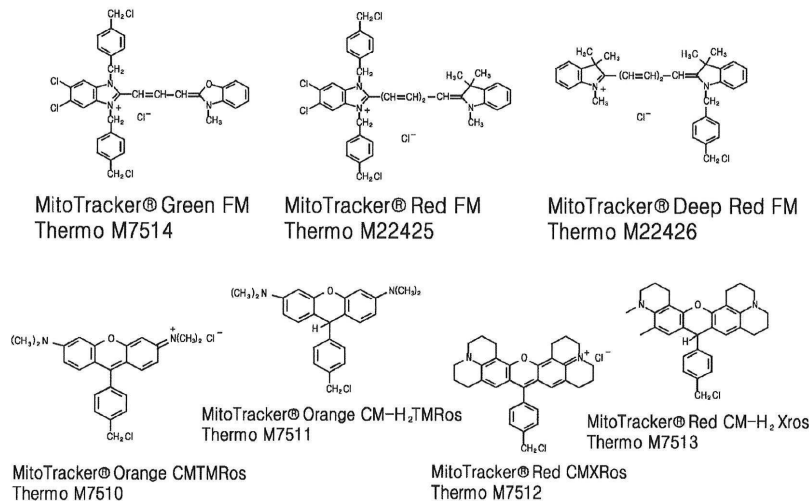
しかし、その後の実験では、細胞をホルムアルデヒド (formaldehyde) のような試薬中にフィクセーション (fixation) させる作業が必要であり、この作業において、市販されているいくつかのMitotrackerは蛍光が維持されないという欠点を有している。

【0015】

<Thermo Fisher Scientific社が販売するMitotracker製品> 10

【0016】

【化2】



20

【0017】

そこで、本発明の発明者は、フィクセーション後も蛍光が安定的に維持される染料を開発し、また、様々な波長において蛍光を発するように設計して、望みの波長を発光するMitotrackerを選択できるようにした。 30

【0018】

他のプローブ (Probe) と蛍光の波長が重なる場合、分析を行うことが困難であるため、狭いバンド幅 (Bandwidth) で様々な波長において蛍光を発する材料は、重要な要素である。そこで、本発明の発明者は、様々な波長を有するMitotrackerの開発を試みた。

【0019】

また、細胞内 pH (Intracellular pH) や細胞質 pH (Cytosolic pH) を測定すれば、細胞の機能を非常に簡単に確認することができる (Methods Mol Biol 637, 311 (2010); Nanotechnology 24, 365 (2013))。細胞内 pH の変化を通じて、イオンホメオスタシス (ionic homeostasis)、活性酸素種のバランス (reactive oxygen species balance)、アポトーシス (apoptosis)、細胞周期 (cell cycle)、細胞モビリティ (cellular mobility) など多くの細胞活動を測定することができる (Circulation 124, 1806 (2011); Yonsei Med J 6, 473 (1995); J Bacteriol 185, 1190 (2003))。 40

【0020】

細胞内 pH を測定するために pH 検出プローブ (pH detecting probe) が使用される。本発明の発明者は、pH の変化に応じて蛍光強度が変わる染料を開発し、この特性を用いて、生細胞の pH を測定可能な pH プローブとしての染料の使用を提供する。 50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

したがって、本発明は、上記の問題を解決するために、より強い蛍光を発することによって有効な光学画像を得ることができる新たな染料を提供する。

【0022】

また、本発明は、従来の *Mitotracker* が有している問題点であるフィクセーション過程後にも蛍光が安定的に維持される染料、及び様々な波長において蛍光を発光するように設計して、使用者が望みの波長を発光する *Mitotracker* を選択することができる染料を提供する。

10

【0023】

また、本発明は、pHの変化に応じて蛍光強度が変わり、生細胞のpHを測定するpHプローブとして活用できる染料を提供する。

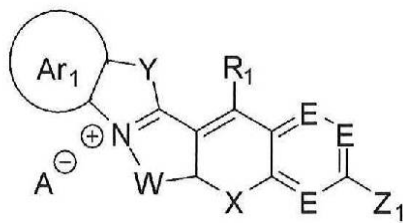
【課題を解決するための手段】

【0024】

本発明は、上記課題を解決するために、下記化学式 I 及び化学式 II から選択されるいずれか1つの染料化合物を提供する。

【0025】

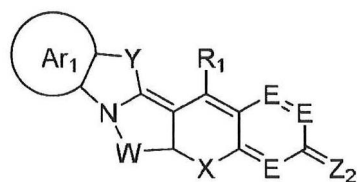
【化3】



20

【0026】

【化4】



30

【0027】

前記化学式 I 及び化学式 II の置換基についての具体的な説明は後述する。

【0028】

また、本発明は、前記染料化合物と標識対象物質を結合させるステップを含む化合物標識方法を提供する。

【発明の効果】

40

【0029】

本発明に係る染料化合物は、従来のシアニン染料に比べて量子効率が著しく改善され、より強い蛍光を発する。これにより、本発明に係る染料化合物は、光学画像が必要な様々な生物学的システムに対するプローブなどに広範囲な分野において有効に活用することができる。

【0030】

特に、本発明に係る染料化合物は、ミトコンドリアを標識して追跡できる *Mitotracker* として活用できる。これにより、本発明に係る染料化合物は、生体又は細胞組織内においてミトコンドリアを定量的に画像化することができる。また、生細胞のpHを測定するためのpHプローブ (probe) としても適用することができる。

50

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1A】本発明に係る[化学式1]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収(Absorption)スペクトルである。

【図1B】Alexa Fluor(登録商標)568をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルである。

【図1C】本発明に係る[化学式1]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光(Fluorescence Emission)スペクトルである。

【図1D】Alexa Fluor(登録商標)568をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光スペクトルである。 10

【図1E】本発明に係る[化学式1]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)568をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の輝度(brightness)を確認した結果である。

【図1F】本発明に係る[化学式1]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)568の生体活性(bioactivity)を比較確認したグラフである。

【図2A】本発明に係る[化学式3]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルである。

【図2B】Alexa Fluor(登録商標)594をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルである。 20

【図2C】本発明に係る[化学式3]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光スペクトルである。

【図2D】Alexa Fluor(登録商標)594をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光スペクトルである。

【図2E】本発明に係る[化学式3]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)594をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の輝度を確認した結果である。

【図2F】本発明に係る[化学式3]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)594の生体活性を比較確認したグラフである。

【図3A】本発明に係る[化学式50]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルである。 30

【図3B】本発明に係る[化学式50]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)546をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の輝度を確認した結果である。

【図3C】[化学式50]の化合物とAlexa Fluor(登録商標)546の生体活性を比較確認したグラフである。

【図4A】本発明に係る[化学式110]の化合物で標識されたRaw 264.7細胞の画像イメージであって、励起波長は552nmであり、560-600nmの放出波長で取得した。

【図4B】MTG(Mitotracker Green FM)で標識されたRaw 264.7細胞の画像イメージであって、励起波長は488nmであり、470-520nmの放出波長で取得した。 40

【図4C】図4Aと図4Bを重ね合わせた画像であり、ピアソンの共局在化(co-localization)効率を示す係数($A = 0.73$)は、LAS AFソフトウェアを用いて計算された値である。

【図5】本発明に係る[化学式110]の化合物($1.0 \mu\text{M}$)で染色されたHeLa A431細胞の3つの領域(A, B, C)の蛍光強度を2秒間隔で3500秒間測定したグラフである。

【図6A】本発明に係る[化学式97]の化合物で標識されたHeLa A431細胞の画像であって、励起波長は552nmであり、571-650nmの放出波長で取得した 50

。

【図 6 B】M T G で標識された H e L a A 4 3 1 細胞の画像であって、励起波長は 4 8 8 n m であり、4 9 8 - 5 4 0 n m の放出波長で取得した。

【図 6 C】図 6 A と図 6 B を重ね合わせた画像である。

【図 7】本発明に係る [化学式 9 8] の化合物 (1 . 0 μ M) で染色された H e L a A 4 3 1 細胞の 4 つ領域 (A , B , C , D) の蛍光強度を 2 秒間隔で 3 5 0 0 秒間測定したグラフである。

【図 8】比較実験の結果であって、C y 3 B (1 . 0 μ M) で染色された H e L a A 4 3 1 細胞の A 、 B の 2 つの部分の蛍光強度を 2 秒間隔で 2 0 0 0 秒間測定したグラフである。

10

【図 9】本発明に係る [化学式 1 1 1] の化合物の p H プローブとしての特性を確認したグラフである。

【図 1 0】本発明に係る [化学式 9 7] の化合物の p H プローブとしての特性を確認したグラフである。

【図 1 1】P B S 緩衝溶液及びエタノールにおける本発明に係る [化学式 9 7] 、及び [化学式 1 0 0] ~ [化学式 1 0 2] の化合物の二光子活性スペクトルである。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 2 】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【 0 0 3 3 】

20

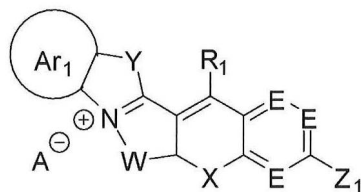
本発明は、蛍光量子効率が著しく改善され、強い蛍光を発して光学画像を効果的に得ることができるように設計されて、様々な生物学的システムに対するプローブなどとして活用できる新規な構造の染料化合物に関する。

【 0 0 3 4 】

本発明の一態様は、下記化学式 I 及び化学式 I I で表される新規な染料化合物に関する。

【 0 0 3 5 】

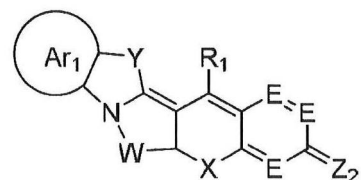
【化 3】



30

【 0 0 3 6 】

【化 4】



40

【 0 0 3 7 】

前記化学式 I 及び化学式 I I において、A r ₁ は、置換または非置換の炭素数 6 ~ 2 0 のアリール、あるいは置換または非置換の炭素数 2 ~ 2 0 のヘテロアリールである。

【 0 0 3 8 】

前記 A r ₁ は、それぞれ 1 種以上の置換基で置換されていてもよく、前記 1 種以上の置換基は、水素、重水素、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のアリールアルキル、置換または非置換のアリールオキシ、置換または非置換のアリールオキシアルキル、置換または非置換のアルコキシ、置換ま

50

たは非置換のアルコキシアルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び4次アンモニウムから選択される。

【0039】

また、前記1種以上の置換基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、アルコキシ、及びアルコキシアルキルから選択されるいずれか1つである場合、1種以上の置換基でさらに置換されていてもよく、前記1種以上の置換基は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び4次アンモニウムから選択される。

【0040】

Eは、 CR_1 またはNであり、 Z_1 は、 NR_2R_3 、 OR_4 、または SR_5 である。

【0041】

Xは、O、S、 NR_8R_9 、 $SiR_{10}R_{11}$ 、 $CR_{12}R_{13}$ 、またはSeである。

【0042】

Yは、 $CR_{14}R_{15}$ 、 NR_{16} 、O、S、Se、 $SiR_{17}R_{18}$ 、または $CR_{19}R_{20} = CR_{21}R_{22}$ である。

【0043】

Wは、 $CR_{23}R_{24}$ 、 $CR_{25}R_{26} = CR_{27}R_{28}$ 、O、 $-[CR_{29}R_{30} - CR_{31}R_{32}] -$ 、または $-[CR_{33}R_{34} - O] -$ である。

【0044】

前記 $R_{23} \sim R_{34}$ は、互いに同一または異なり、それぞれ独立に、水素、重水素、アルキル、またはアシルオキシであり、隣接する2つの置換基は互いに連結して脂環族炭化水素を形成していてもよい。

【0045】

前記 $R_1 \sim R_3$ 及びこれと隣接する置換基から選択される2つは互いに連結して脂環族炭化水素環、または単環又は多環の芳香族炭化水素環を形成していてもよく、前記形成された脂環族又は芳香族炭化水素環の炭素原子は、N、S、O、Se、Te、Po、 NR_3 、 $SiR_{36}R_{37}$ 、 $GeR_{38}R_{39}$ 、 PR_{40} 、及び BR_{41} から選択されるいずれか1つによって置換されてもよい。

【0046】

前記 $R_1 \sim R_{22}$ 及び $R_{35} \sim R_{41}$ は、互いに同一または異なり、それぞれ独立に、水素、重水素、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換のアリールアルキル、置換または非置換のアリールオキシ、置換または非置換のアリールオキシアルキル、置換または非置換のアルコキシ、置換または非置換のアルコキシアルキル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び4次アンモ

10

20

30

40

50

ニウムから選択されるいずれか 1 つである。

【0047】

前記 $R_1 \sim R_{22}$ 及び $R_{35} \sim R_{41}$ がアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、アリールオキシ、アリールオキシアルキル、アルコキシ及びアルコキシアルキルから選択されるいずれか 1 つである場合、1 種以上の置換基でさらに置換されていてもよく、前記 1 種以上の置換基は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、ヒドロキシ、アルデヒド、アミノ、アミド、ヒドラジン、チオール、アセタール、ケタール、ホスホリル、ホスフェート、ホスホネート、スルホヒドロキシ、スルホニル、スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、アジド、グアニジウム、カルボニル、チオカルボニル、アミノチオカルボニル、カルボキシル、カルボン酸、ケトン、スルフヒドリル、アシルクロリド、スルホン酸、エステル、ポリアルキレンオキシド、ポリエチレングリコール、及び 4 次アンモニウムから選択される。

10

【0048】

A^- は、有機又は無機イオンであって、特に制限されず、用途に応じて、有機溶剤内で本発明に係る染料の溶解性や安定性の観点で適切に選択すればよく、また、アニオン、または必要に応じてはカチオン A^+ であってもよい。

【0049】

一般に、化学式 I 及び化学式 II における A^- は、六フッ化リン酸イオン、ハロゲンイオン、リン酸イオン、過塩素酸イオン、過ヨウ素酸イオン、六フッ化アンチモン酸イオン、六フッ化錫酸イオン、ホウフッ化水素酸イオン、テトラフルオロボレートイオンなどのような無機酸アニオンであってもよく、チオシアン酸イオン、ベンゼンスルホン酸イオン、ナフタレンスルホン酸イオン、p-トルエンスルホン酸イオン、アルキルスルホン酸イオン、ベンゼンカルボン酸イオン、アルキルカルボン酸イオン、トリハロアルキルカルボン酸イオン、アルキルスルホン酸イオン、トリハロアルキルスルホン酸、ニコチン酸イオンなどのような有機酸イオンであってもよく、ビスフェニルジチオール、チオビスフェノールキレート、ビスジオール- α -ジケトンなどのような金属化合物イオンであってもよい。また、化学式 I 及び化学式 II における A^- は、ナトリウム及びカリウムなどのような金属イオンまたは 4 次アンモニウムイオンであってもよい。

20

【0050】

本発明の一実施例によれば、化学式 I 及び化学式 II における A^- は、ハロゲンイオン、 $-SO_4^{2-}$ 、 $-S_2O_3^{2-}$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-ClO_4^-$ 、 $-BF_4^-$ 、 $-PF_6^-$ 、 $-SbF_6^-$ 、 $-BiCl_5^-$ 、 $-AsF_6^-$ 、 $-SbCl_6^-$ 、 $-SnCl_6^-$ 、 $-COO^-$ 、 $-HSO_4^-$ 、 $-SO_3CH_3^-$ 、 Na^+ 、 K^+ 、4 次アンモニウムイオン、アセテート、プロピオネート、及びシアネート並びにこれらの組み合わせから選択される 1 種以上であってもよく、カチオンと置換されたアニオンのイオン価数に応じて、 A^- は、存在してもよく、存在しなくてもよい。

30

【0051】

一方、本発明に係る化学式 I 及び化学式 II の各染料化合物は、上述したように、標識対象物質と結合できるように 1 以上の反応性置換基を含むことができ、水に対する溶解性の増加、蛍光染料間の相互作用の防止、及び染料と様々な標識因子との間の望まない標識発生の防止のために、1 以上の極性電荷置換基を含むことができる。

40

【0052】

本発明の好ましい一実施例によれば、置換基のうちの少なくとも 1 つは、アミン、チオール、アルコール、アルデヒド、ケトンなどの 1 以上の置換基を有する標識対象物質と結合 (conjugation) してもよい。

【0053】

前記標識対象物質は、生体分子、ナノ粒子、または有機化合物などから選択され得るが、特に制限されない。前記標識対象物質は、具体的には、抗体 (antibody) ; 抗原 (antigen) ; 脂質 (lipid) ; タンパク質 (protein) ; ペプチド (peptide) ; 炭水化物 (carbohydrate) ; デキストラン (dext

50

ran); 脂肪酸(fatty acid); リン脂質(phospholipid); リポ多糖類(lipopoly saccharide); アミノ基、スルフヒドリル基、カルボニル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、リン酸基及びチオリン酸基のうちの1つ以上を含むか、または含むように誘導化されたヌクレオチド(nucleotides)又はオリゴヌクレオチド(oligonucleotide); アミノ基、スルフヒドリル基、カルボニル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、チオール基、リン酸基及びチオリン酸基のうちの1つ以上を含むか、または含むように誘導化されたオキシポリ核酸(oxypolynuceotide)又はデオキシポリ核酸(deoxypolynuceotide); 微生物; 薬物; ホルモン; 細胞; 細胞膜; 及び毒素(toxins); 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるいずれか1つ以上であ

10

【0054】

具体的に、本発明に係る反応性置換基は、活性エステル(activated esters)、カルボキシル(carboxyl)、アミド(amide)、アクリルアミド(acrylamides)、アジド(azide)、アシルアジド(acylazides)、ハロゲン化アシル(acyl halides)、アルキン(alkyne)、アミン(amine)、アルデヒド(aldehydes)、ケトン(ketones)、ハロゲン化アルキル(alkyl halides)、スルホン酸アルキル(alkyl sulfonates)、ハロゲン化アリール(aryl halides)、アジリジン(aziridines)、ボロネート(boronates)、ジアゾアルカン(diazoalkanes)、エポキシド(epoxides)、ハロプラチネート(ハロ白金酸塩、haloplatinate)、ハロトリアジン(halotriazines)、イミドエステル(imido esters)、イソシアネート(isocyanates)、シリルハライド(silyl halides)、スルホン酸エステル(sulfonate esters)、ハロゲン化スルホニル(sulfonyl halides)、スクシンイミジルエステル(succinimidyl ester)、スルホスクシンイミジルエステル(sulpho-succinimidyl ester)、無水物(anhydrides)、酸ハロゲン化物(酸ハライド、acid halides)、イソチオシアネート(isothiocyanate)、ビニルスルホン(vinyl sulphone)、ジクロロトリアジン(dichlorotriazines)、ハロアセトアミド(haloacetamides)、マレイミド(maleimides)、カルボジイミド(carbodiimide)、ホスホラミダイト(phosphoramidites)、ヒドラジン(hydrazines)、ヒドラジド(hydrazide)などであってもよく、好ましくは、カルボン酸のスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミドなどであってもよい。

20

30

【0055】

前記活性エステルは、構造式 -COR' によって表され、前記R'は、本発明の属する技術分野において既知の置換反応における優れた脱離基であって、例えば、スクシンイミジルオキシ(succinimidyl oxy、-OC₄H₄O₂)、スルホスクシンイミジルオキシ(sulfosuccinimidyl oxy、-OC₄H₃O₂-SO₃H)、又は-1-オキシベンゾトリアゾリル(-1-oxybenzotriazolyl、-OC₆H₄N₃)であるか; 又は、アリールオキシ、又は電子吸引性基に属するニトロ、ハロゲン、シアノ、ハロゲンアルキルなどを1種以上含むアリールオキシであるか、; 又は、無水物(anhydrides、-OCOR_a又は-OCNR_aNHR_b)を構成するカルボジイミド(carbodiimide)によって活性化されたカルボン酸(carboxylic acid)であってもよく、前記R_a又はR_bは、炭素数1~6のアルキル、炭素数1~6のアルコキシ、シクロヘキシル、3-ジメチルアミノプロピル、N-モルホリノエチルなどである。

40

【0056】

50

また、本発明に係る反応性置換基 R_x は、様々なリンカー L に共有結合で連結され、 $R_x - L$ - 構造を形成するものであってもよい。

【0057】

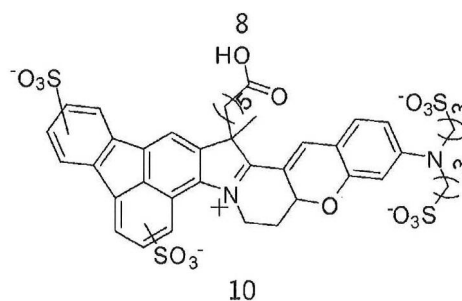
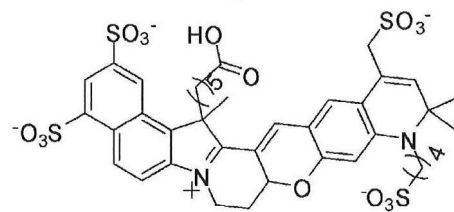
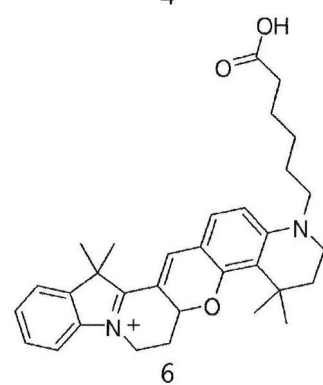
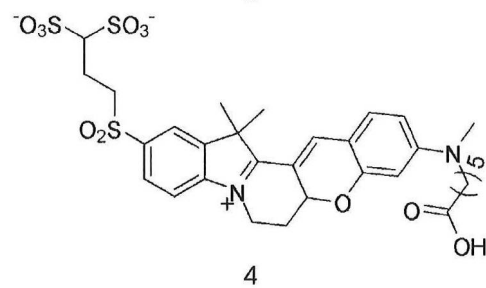
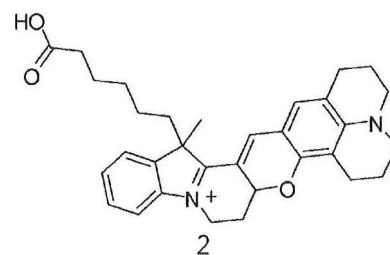
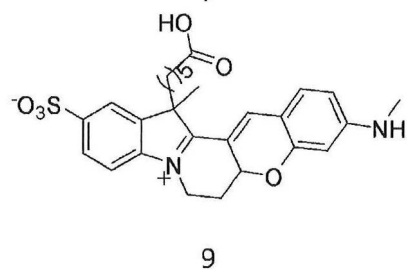
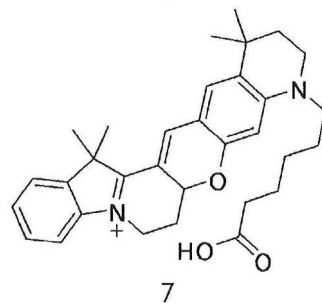
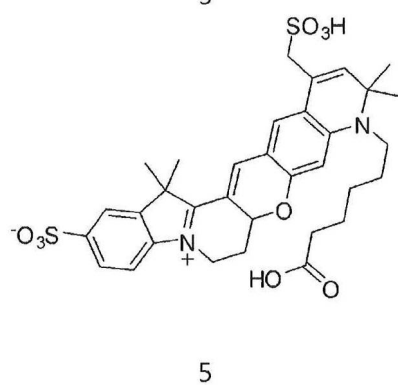
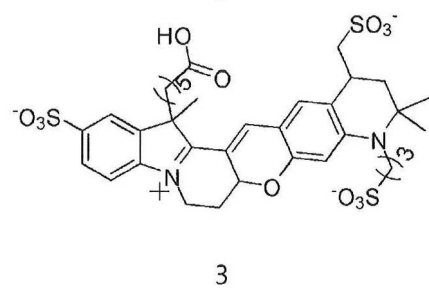
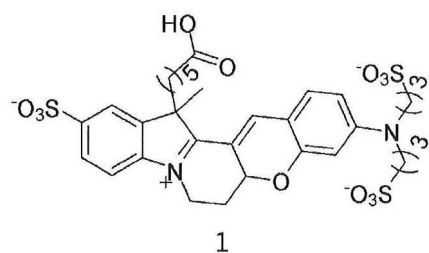
このようなリンカーは、単一結合、又は好ましくは、炭素（C）、窒素（N）、酸素（O）及び硫黄（S）原子から構成される群から選択された原子が1～20個連結された直鎖又は分岐鎖の鎖であってもよく、脂肪族炭化水素環、芳香族炭化水素環、脂肪族ヘテロ環、又は芳香族ヘテロ環であってもよい。また、このようなリンカーは、正（+）又は負（-）の電荷を有していてもよい。

【0058】

本発明によれば、前記化学式 I 及び化学式 II で表される染料化合物は、下記の化学式 1～化学式 113 から選択されるいずれか1つ以上であってもよい。但し、これによって本発明の化学式 I 及び化学式 II の範囲が限定されるものではない。

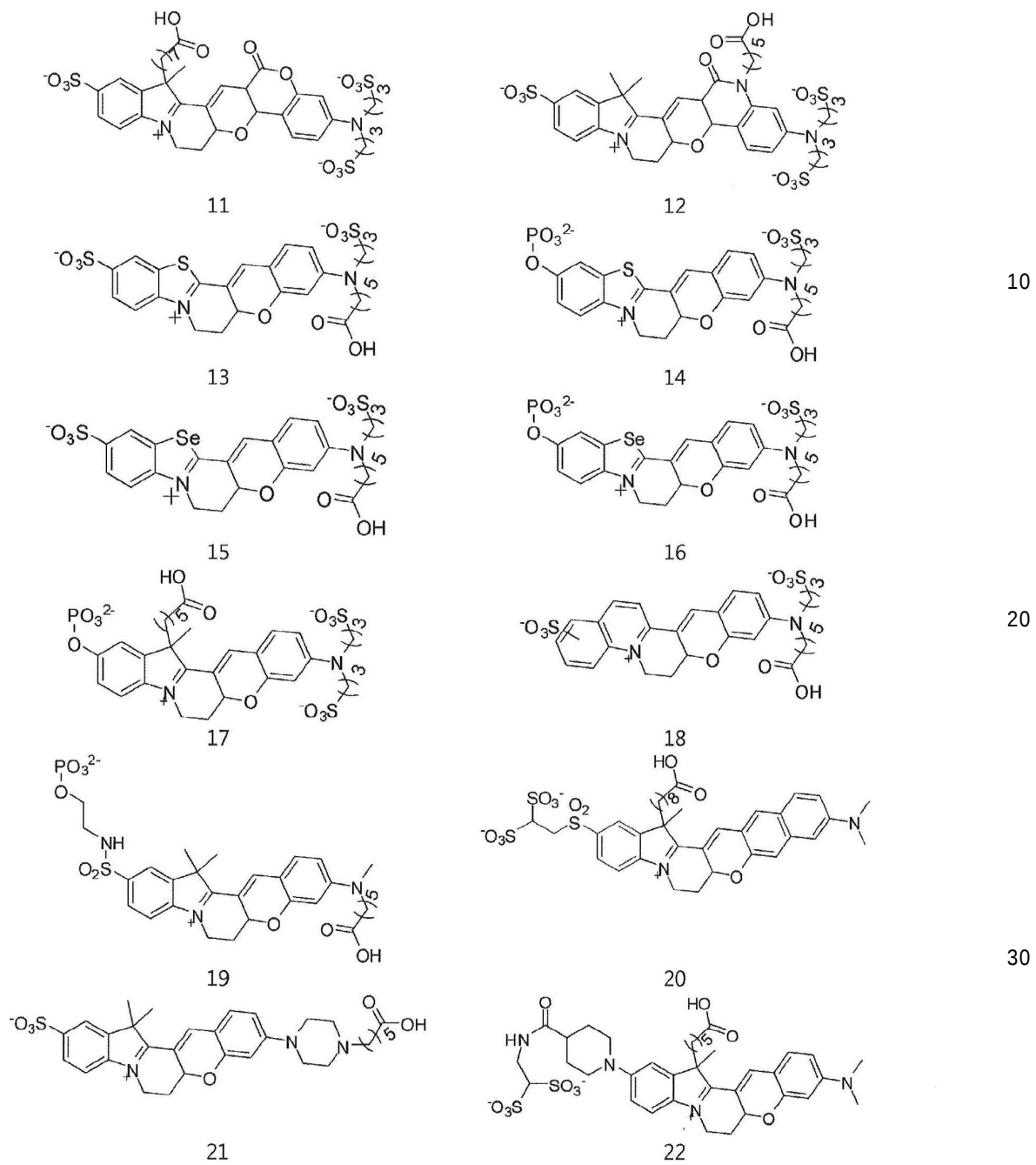
【0059】

【化 5】



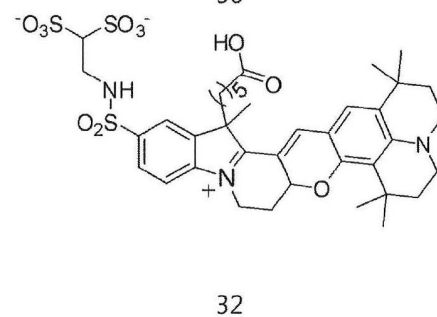
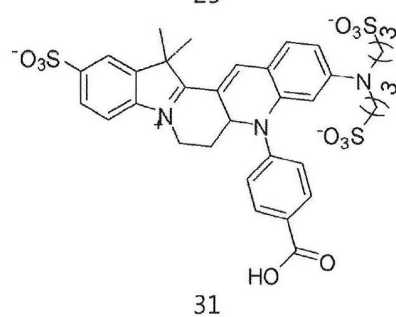
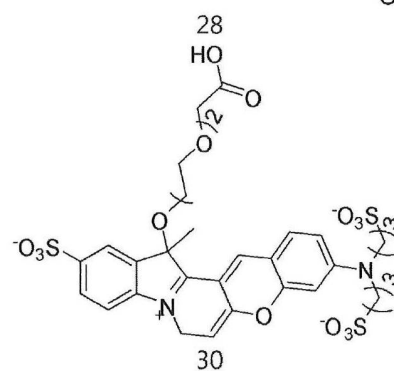
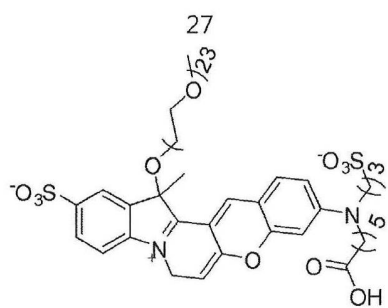
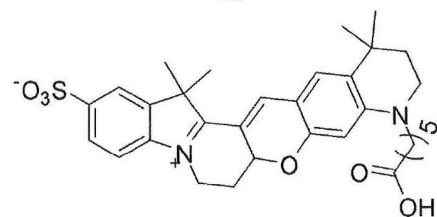
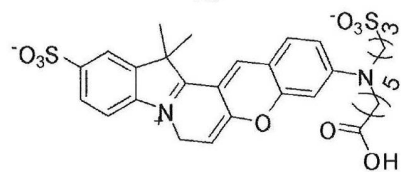
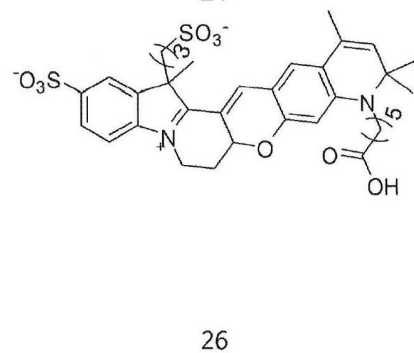
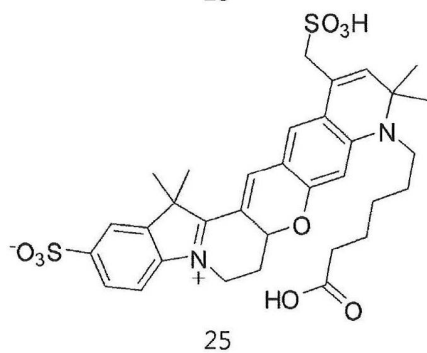
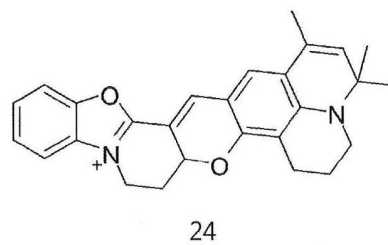
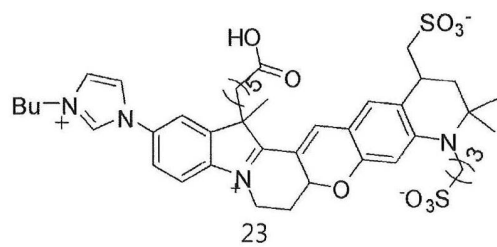
【 0 0 6 0 】

【化 6】



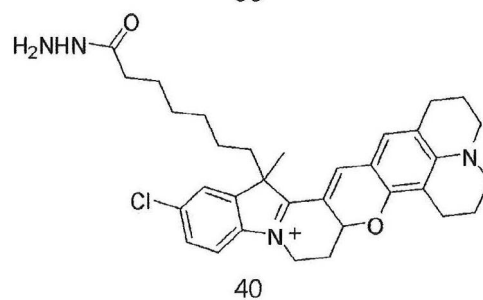
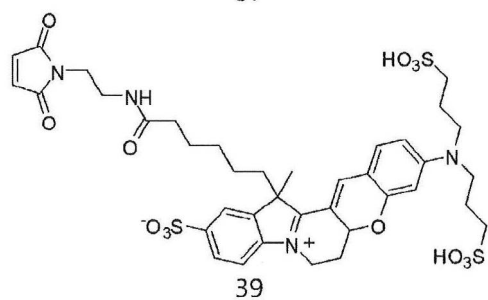
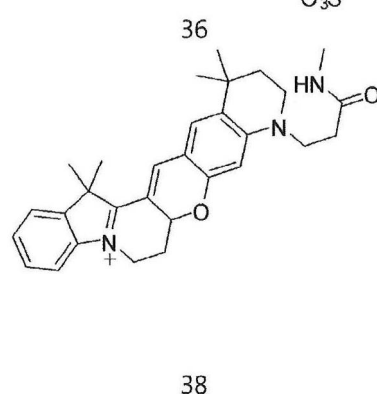
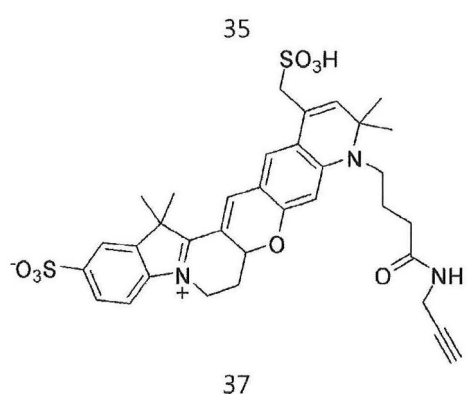
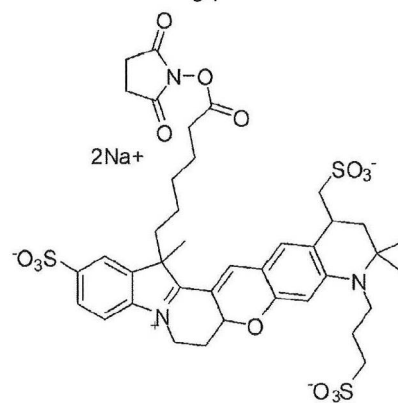
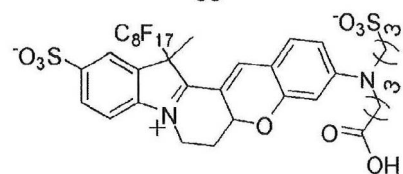
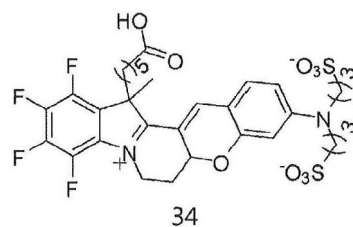
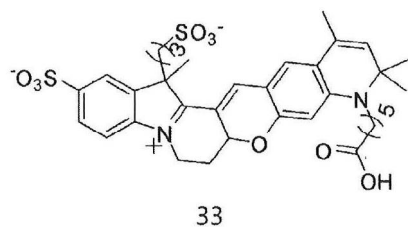
【 0 0 6 1 】

【化 7】



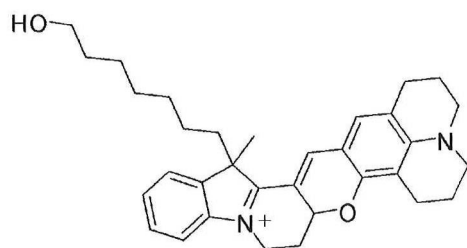
【 0 0 6 2 】

【化 8】

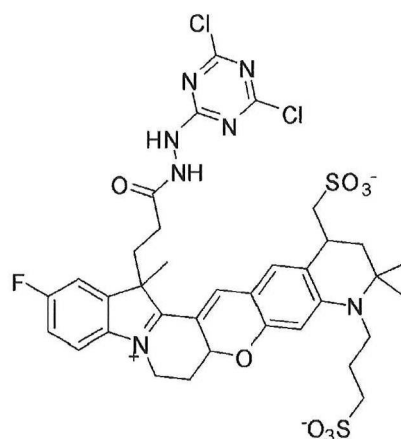


【 0 0 6 3 】

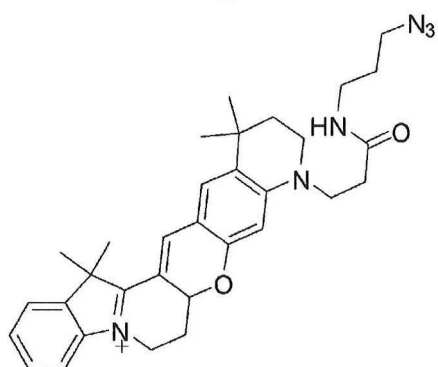
【化 9】



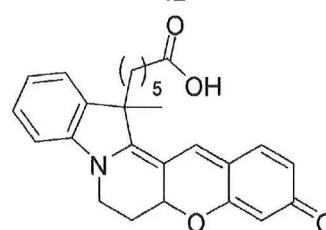
41



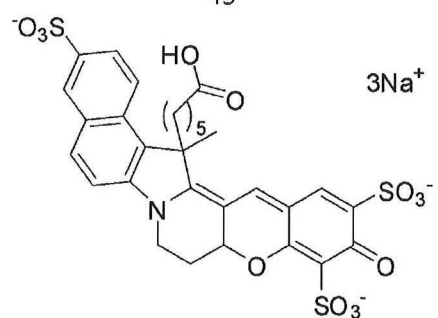
42



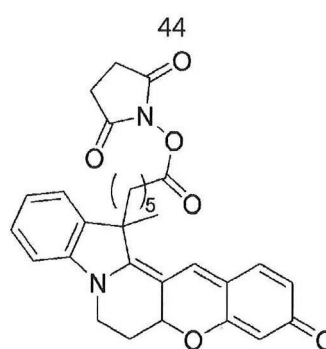
43



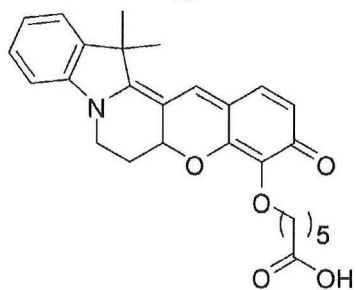
44



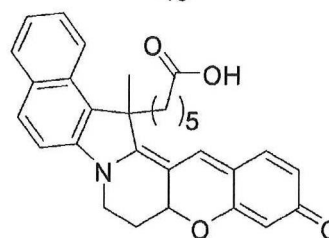
45



46



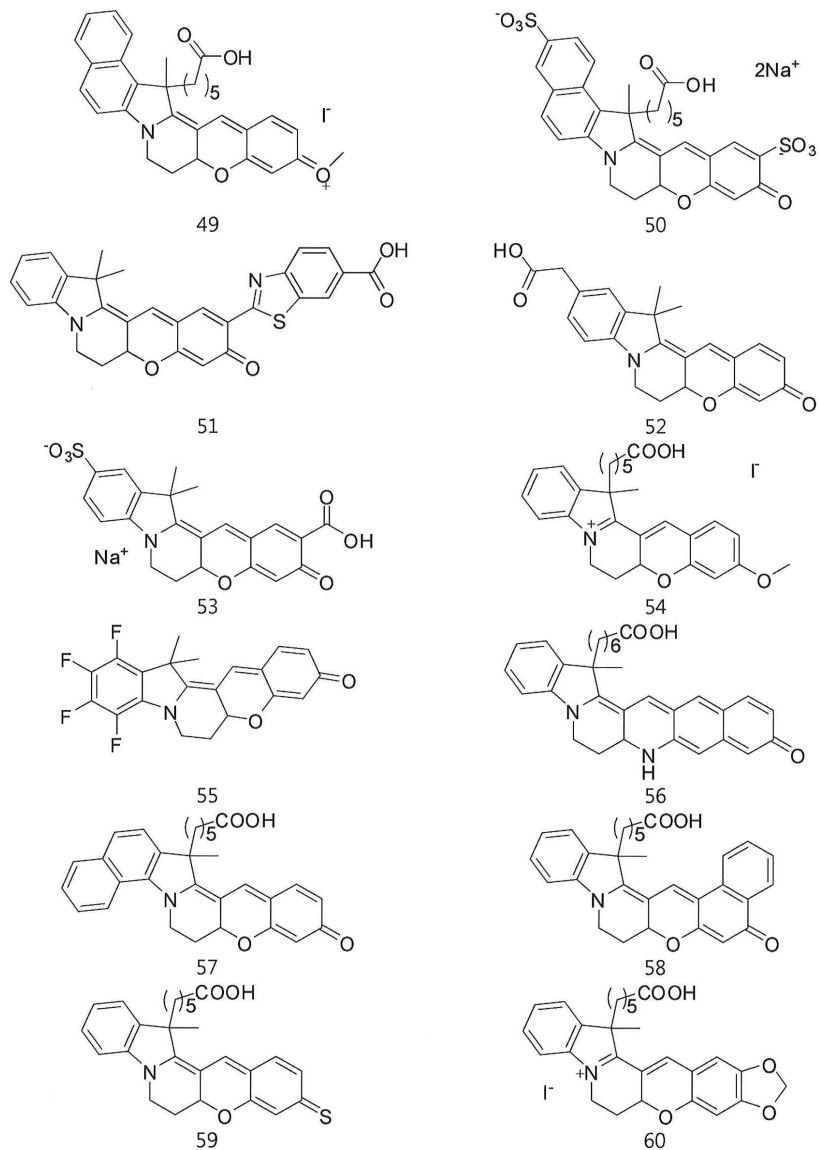
47



48

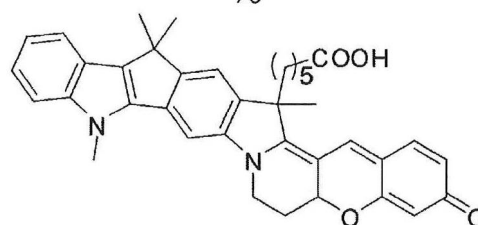
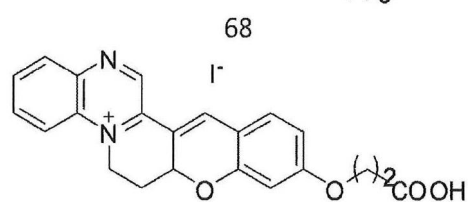
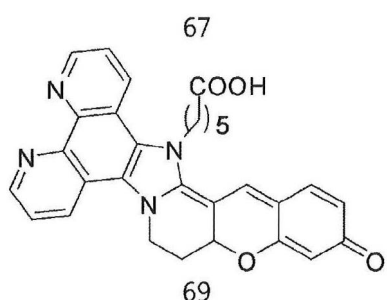
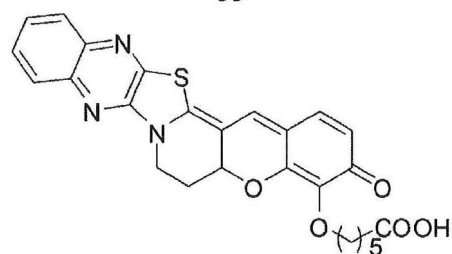
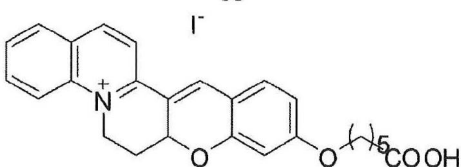
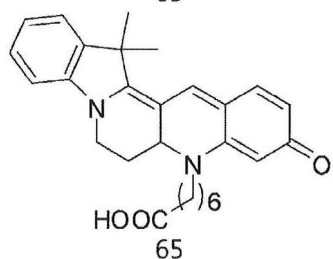
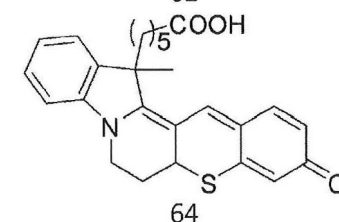
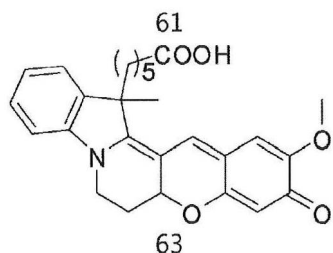
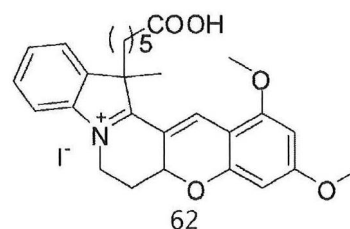
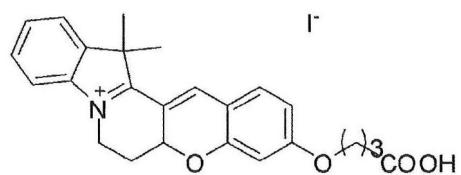
【 0 0 6 4 】

【化 10】



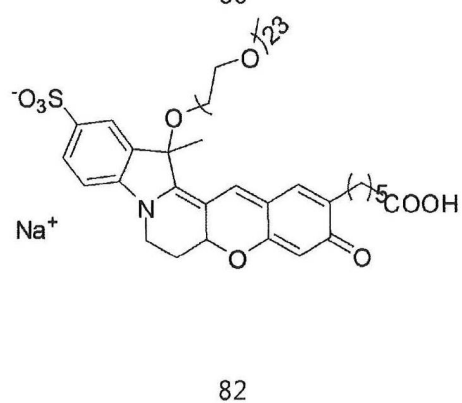
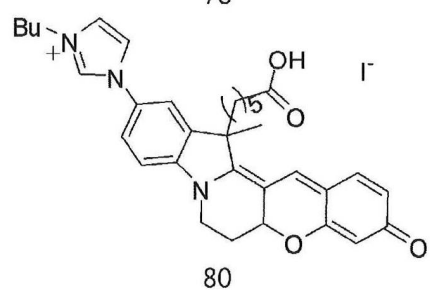
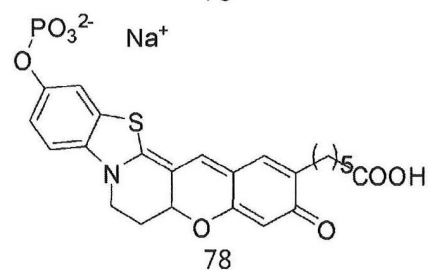
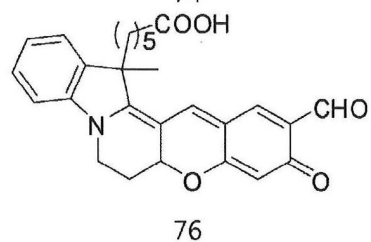
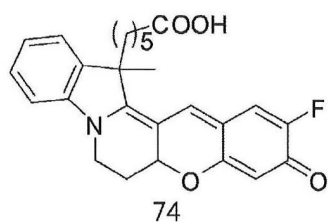
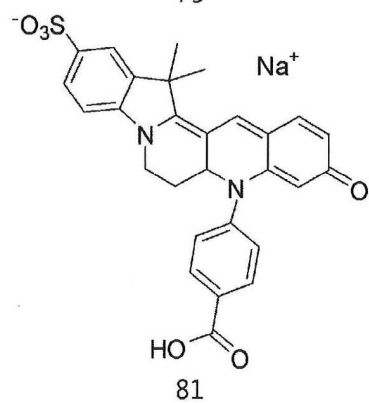
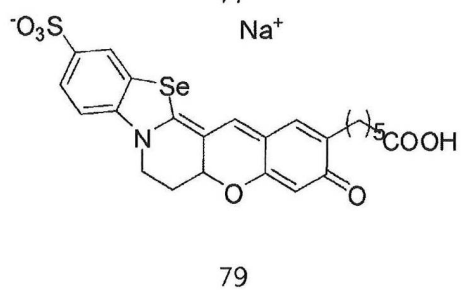
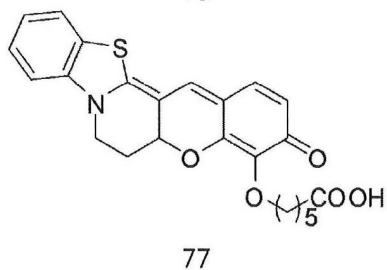
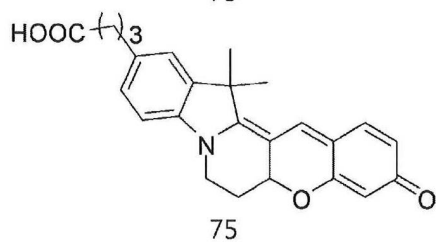
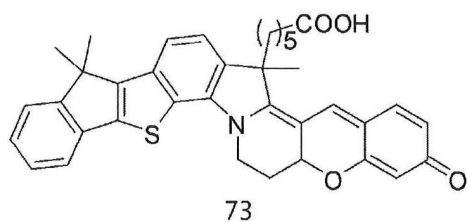
【 0 0 6 5 】

【化 1 1】



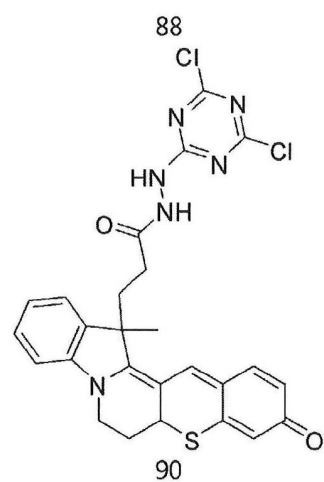
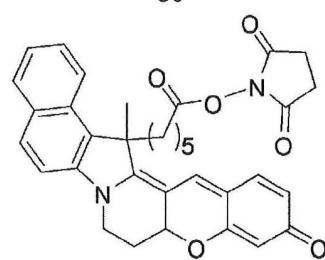
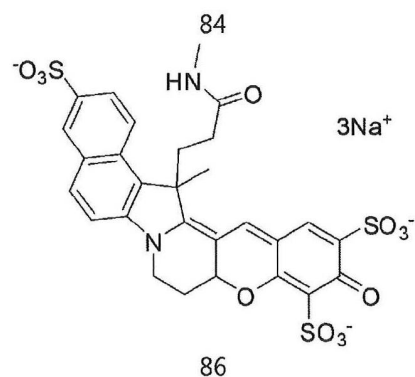
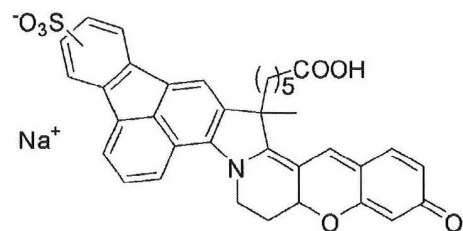
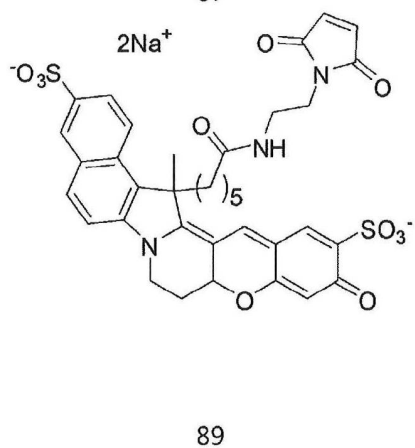
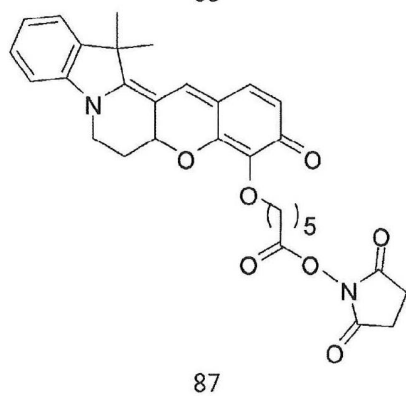
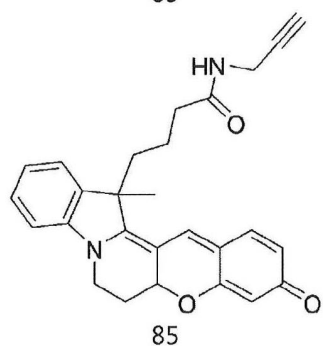
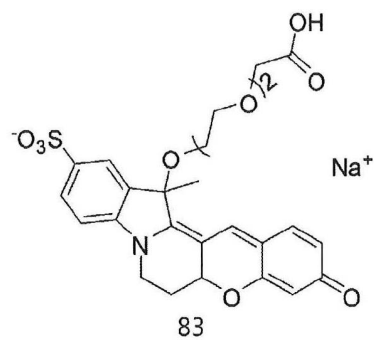
【 0 0 6 6 】

【化 1 2】



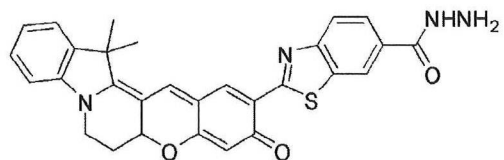
【 0 0 6 7 】

【化 1 3】

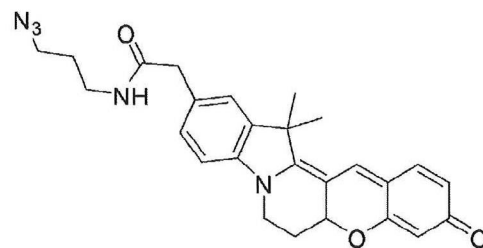


【 0 0 6 8 】

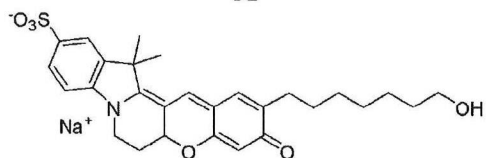
【化 1 4】



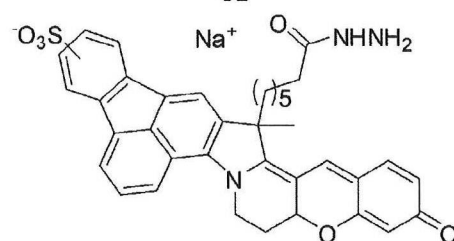
91



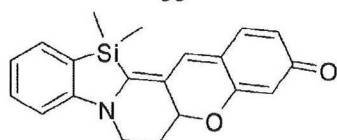
92



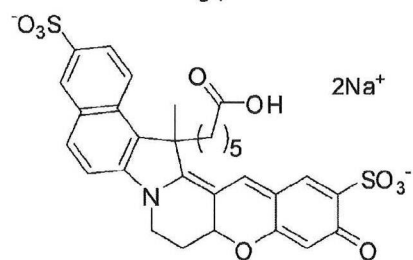
93



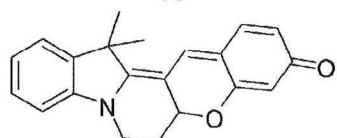
94



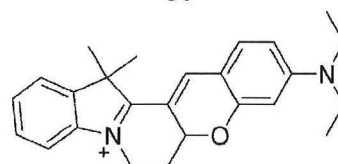
95



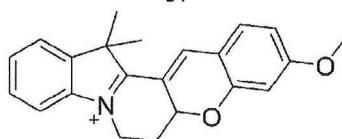
96



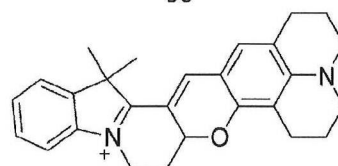
97



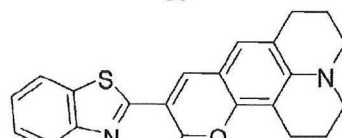
98



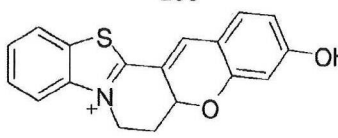
99



100



101



102

【 0 0 6 9 】

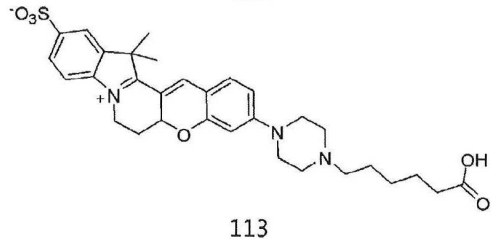
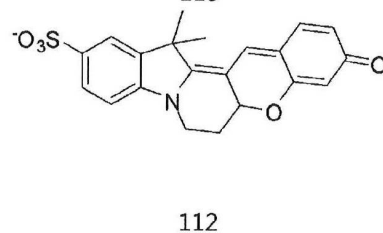
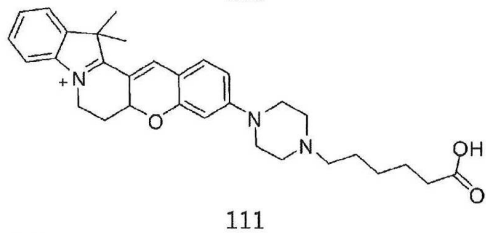
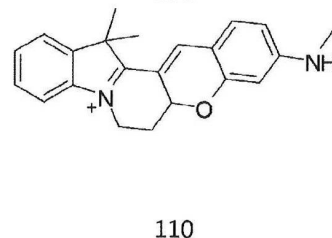
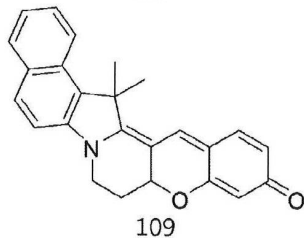
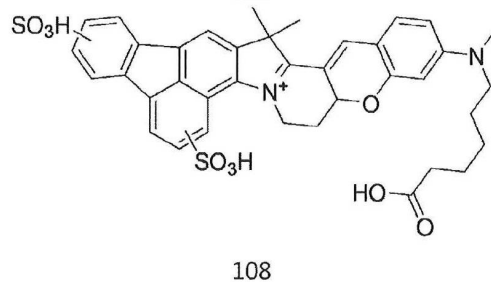
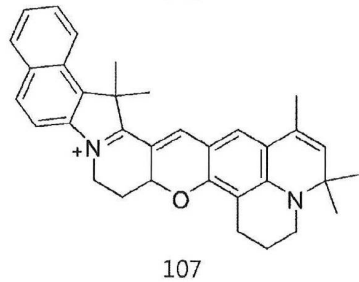
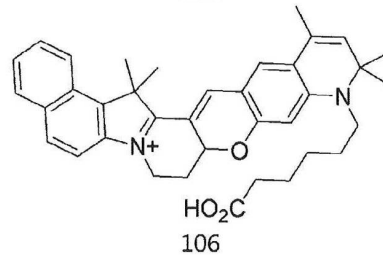
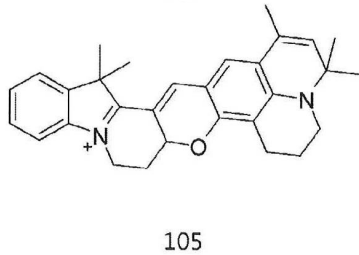
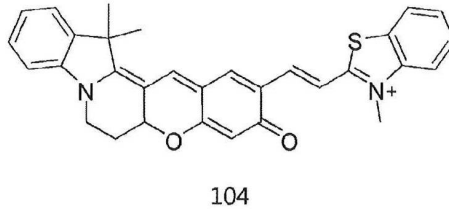
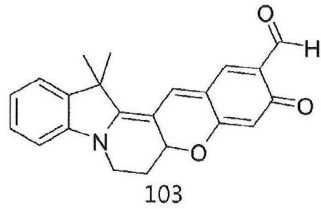
10

20

30

40

【化 1 5】



【0070】

しかしながら、本発明の化学式 I 及び化学式 II の範囲は、化学式 1 ~ 化学式 113 の化合物に限定されるものではない。

【0071】

また、本発明に係る染料化合物は、細胞内のミトコンドリアを選択的に染色して画像化できるので、ミトコンドリアの標識及び追跡プローブ (Mitotracker) に適用することができる。

【0072】

特に、本発明に係る染料化合物は、様々な波長の蛍光を発するように設計できるので、使用者が望みの波長の蛍光を発する染料化合物を選択して使用することにより、Mit

10

20

30

40

50

o t r a c k e rとして活用することができる。このような様々な波長を有するM i t o t r a c k e rが必要な理由は、他のプローブ(P r o b e)と蛍光の波長が重なると、分析が困難であるので、狭いバンド幅を有する様々な波長の蛍光を発することを選択的に設計できることは、商業的に非常に重要な要素であるからである。

【 0 0 7 3 】

また、本発明に係る染料化合物は、細胞内pHの変化に応じて蛍光の強度が変わることを特徴としており、これにより、生細胞のpHを測定するpHプローブ、さらに、これを含む細胞内pH測定センサなどに活用することができる。

【 0 0 7 4 】

本発明に係る染料化合物を用いて、細胞内pH(I n t r a c e l l u l a r p H)や細胞質pH(C y t o s o l i c p H)を測定すれば、イオンホメオスタシス(i o n i c h o m e o s t a s i s)、活性酸素種のバランス(r e a c t i v e o x y g e n s p e c i e s b a l a n c e)、アポトーシス(a p o p t o s i s)、細胞周期(c e l l c y c l e)、細胞モビリティ(c e l l u l a r m o b i l i t y)などの細胞活動を直接的又は間接的に識別することができる。

【 0 0 7 5 】

特に、本発明に係る染料化合物は、使用目的に応じて、pH 2 ~ 6の間の酸性条件で強い蛍光を発するタイプ、又はpH 8 ~ 12の間の塩基性条件で強い蛍光を発するタイプを選択して使用可能であるので、pHプローブとしてさらに有用に活用することができる。

【 0 0 7 6 】

さらに、生細胞の染色を通じてpHを測定する方法以外に、最近では、プレートリーダー(p l a t e r e a d e r)を用いて細胞のpHを測定する方法が活用されており、本発明に係る染料化合物は、これにも適用可能であり、pHを測定することが必要な様々な適用分野において多様に用いることができる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 7 7 】

以下では、本発明に係る具体的な染料化合物の合成方法について説明する。実施例及び比較実験を通じてさらに詳細に本発明を説明する。但し、実施例は、本発明の例示に過ぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 7 8 】

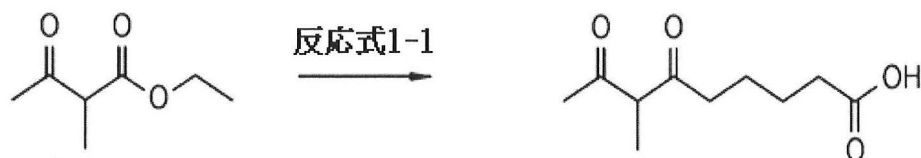
合成例1：[化学式1]で表される化合物の合成

(1) [化学式1-a]で表される化合物の合成

下記[反応式1-1]によって[化学式1-a]で表される化合物を合成した。

【 0 0 7 9 】

【化16】



【 0 0 8 0 】

2-メチルアセト酢酸エチル(E t h y l 2 - m e t h y l a c e t o a c e t a t e) (2 3 . 5 g , 1 6 3 m m o l) と 6 - ブロモヘキサン酸エチル(E t h y l 6 - b r o m o h e x a n o a t e) (4 0 . 0 g , 1 7 9 m m o l) をエタノール200 mLに入れ、攪拌した。そして、液体ナトリウムエトキシドを滴加し、80 で10時間攪拌した。反応終了後、固体は濾過し、濾過された溶液を減圧蒸留した。残留物をジクロロメタンと2N塩酸水溶液とで抽出した。有機層を乾燥硫酸ナトリウムで処理した後、濾過して減圧蒸留した(4 7 . 7 g)。溶媒を除去した後、水300 mLを添加して、10時間還流攪拌した。反応終了後、ジクロロメタンで抽出した後、硫酸ナトリウムで処理し

て濾過し、減圧蒸留した(25 g、71%)。

LC-MS: $m/z = 185.84 [M^+]$

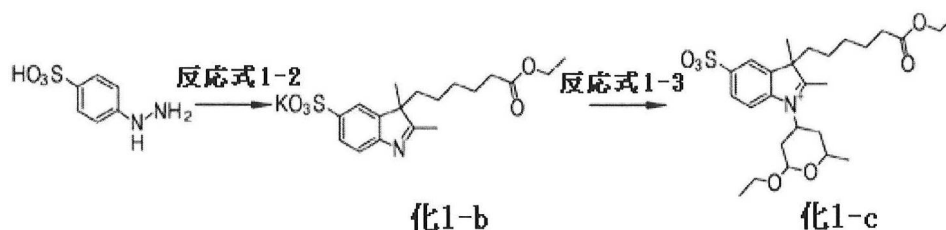
【0081】

(2) [化学式1-b]で表される化合物の合成

下記[反応式1-2]によって[化学式1-b]で表される化合物を合成した。

【0082】

【化17】



10

【0083】

p-ヒドラジノベンゼンスルホン酸(p-Hydrazinobenzenesulfonic acid)(20 g、106 mmol)と[反応式1-1]から得た[化学式1-a]で表される化合物(59.4 g、319 mmol)を6 N塩酸水溶液30 mL/エタノール60 mLに加えた後、12時間還流撹拌した。そして、常温まで冷却し、生成された固体を濾過した。この固体を酢酸エチルで洗浄した後、減圧乾燥した。水酸化カリウム(1.4 g、25.4 mmol)をプロパノール35 mLに溶解させ、濾過された固体(5.1 g、21.2 mmol)をメタノール35 mLに溶解させ、滴加した後、常温で12時間撹拌した。固体を濾過した後、乾燥させ、C18逆相クロマトグラフィーを用いて水/メタノールで精製した(11.1 g、30%)。

20

LC-MS: $m/z = 404.86 [M^+]$

【0084】

(3) [化学式1-c]で表される化合物の合成

前記[反応式1-3]によって[化学式1-c]で表される化合物を合成した。

【0085】

前記[反応式1-2]から得た[化学式1-b]で表される化合物(3.0 g、7.4 mmol)を常温、窒素気流下でエタノールと共に撹拌し、48%塩酸水溶液(10.0 mL)を滴加した。1時間後、反応液を減圧蒸留した。反応器にアセトニトリル(120.0 mL)、酢酸(3.0 mL)及びアクロレインジエチルアセタール(17.3 g、133.0 mmol)を添加した。70℃で2時間反応させた。反応液を減圧蒸留し、HPLC(Rainin Dynamax C18)8 μmカラム、水/アセトニトリル(0.1%トリフルオロ酢酸)の展開液で60分間、10~100%まで20 mL/minで精製した(1.2 g、30%)。

30

LC-MS: $m/z = 496.96 [M^+]$

【0086】

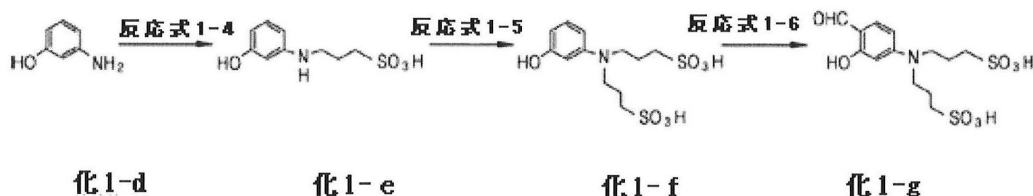
(4) [化学式1-d]で表される化合物の合成

下記[反応式1-4]によって[化学式1-d]で表される化合物を合成した。

40

【0087】

【化18】



【0088】

50

3 - アミノフェノール (3 - A m i n o p h e n o l) (5 . 0 g 、 4 . 5 m m o l) と 1 , 3 - プロパンスルトン (1 , 3 - p r o p a n e s u l t o n e) (0 . 5 6 g 、 4 . 6 m m o l) を n - ブタノールに入れ、30分間還流撹拌した。反応液を常温に冷却させた後、一晚撹拌した。反応液を濾過して灰色の固体を分離した後、メタノールで洗浄した (0 . 8 g 、 8 0 %) 。

LC - MS : $m/z = 231.30 [M+]$

【0089】

(5) [化学式1 - e] で表される化合物の合成

前記 [反応式1 - 5] によって [化学式1 - e] で表される化合物を合成した。

【0090】

前記 [反応式1 - 4] から得た [化学式1 - d] で表される化合物 (1 g 、 4 . 3 m m o l) と 1 , 3 - プロパンスルトン (0 . 5 4 g 、 4 . 4 m m o l) を N , N - ジメチルホルムアミド 5 m L に入れた後、130 で2時間撹拌した。常温まで冷却した後、減圧蒸留し、逆相クロマトグラフィーで精製した (1 . 4 8 g 、 9 5 %) 。

LC - MS : $m/z = 353.19 [M+]$

【0091】

(5) [化学式1 - f] で表される化合物の合成

前記 [反応式1 - 6] によって [化学式1 - f] で表される化合物を合成した。

【0092】

前記 [反応式1 - 5] によって得た [化学式1 - e] で表される化合物 (3 . 0 g 、 8 . 0 m m o l) を、N , N - ジメチルホルムアミド (1 . 3 g 、 8 . 0 m m o l) が入っている反応器に投入した。50 で12時間反応させた。反応終了後、水で希釈した後、中和した。溶媒を除去した後、逆相クロマトグラフィーで精製した (0 . 8 g 、 2 5 %) 。

LC - MS : $m/z = 380.84 [M+]$

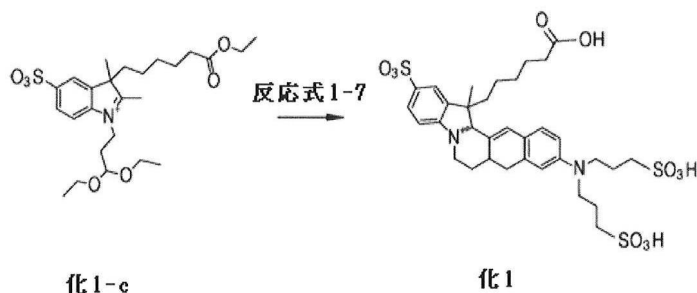
【0093】

(5) [化学式1] で表される化合物の合成

下記 [反応式1 - 7] によって [化学式1] で表される化合物を合成した。

【0094】

【化19】



【0095】

前記 [反応式1 - 3] によって合成した [化学式1 - c] で表される化合物 (1 . 0 g 、 1 . 9 m m o l) と [反応式1 - 6] によって合成した [化学式1 - f] で表される化合物 (0 . 8 g 、 1 . 9 m m o l) をエタノール 20 m L に溶解した後、80 で8時間撹拌した。反応終了後、減圧濃縮して溶媒を除去した。濃縮された反応物をクロロホルム 50 m L に溶解した後、50%硫酸 1 m L を滴加した。ジクロロメタンで希釈して、水で抽出した。有機層を減圧濃縮した後、HPLC (R a i n i n D y n a m a x C 1 8) 8 μ m カラム、水 / アセトニトリル (0 . 1 % トリフルオロ酢酸) の展開液で60分間、10 ~ 100%まで20 mL / minで精製した (0 . 4 g 、 5 1 %) 。

LC - MS : $m/z = 739.79 [M+]$

【0096】

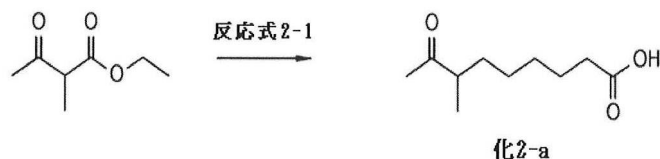
合成例2 : [化学式2] で表される化合物の合成

(1) [化学式2-a]で表される化合物の合成

下記[反応式2-1]によって[化学式2-a]で表される化合物を合成した。

【0097】

【化20】



【0098】

2-メチルアセト酢酸エチル(Ethyl 2-methylacetoacetate)(23.5g、163mmol)と6-ブロモヘキサン酸エチル(Ethyl 6-bromohexanoate)(40.0g、179mmol)をエタノール200mLに入れ、攪拌し、これに液体ナトリウムエトキシドを滴加した。80℃で10時間攪拌した。反応終了後、固体は濾過し、濾過された溶液を減圧蒸留した。残留物をジクロロメタンと2N塩酸水溶液で抽出した。有機層を乾燥硫酸ナトリウムで処理後、濾過して減圧蒸留した(47.7g)。溶媒を除去した後、水溶液300mLを添加し、10時間還流攪拌した。反応終了後、ジクロロメタンで抽出した後、硫酸ナトリウムで処理して濾過し、減圧蒸留した(25g、71%)。

LC-MS: m/z = 185.84 [M+]

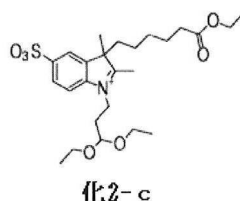
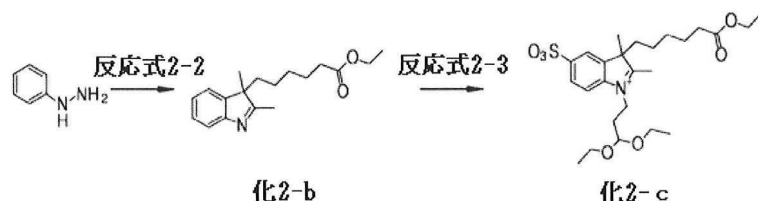
【0099】

(2) [化学式2-b]で表される化合物の合成

下記[反応式2-2]によって[化学式2-b]で表される化合物を合成した。

【0100】

【化21】



【0101】

フェニルヒドラジン塩酸塩(5.0g、34.6mmol)と[反応式2-1]によって得た[化学式2-a]で表される化合物(32.2g、173mmol)を6N塩酸水溶液30mL/エタノール60mLに加えた後、12時間還流攪拌した。常温まで冷却した後、反応液に酢酸エチルを滴加した。固体が析出されると、濾過した後、濾過液を減圧蒸留した後、シリカゲルカラムで精製して、液状化合物を得た(3.2g、61%)。

LC-MS: m/z = 296.89 [M+]

【0102】

(3) [化学式2-c]で表される化合物の合成

前記[反応式2-3]によって[化学式2-c]で表される化合物を合成した。

【0103】

前記[反応式2-2]によって得た[化学式2-b]で表される化合物(3.0g、7.4mmol)を常温、窒素気流下でエタノールと共に攪拌し、48%塩酸水溶液(10.0mL)を滴加した。1時間後、反応液を減圧蒸留した。反応器にアセトニトリル(120.0mL)、酢酸(3.0mL)及びアクロレインジエチルアセタール(17.3g、133.0mmol)を添加した。これを70℃で2時間反応させた。反応液を減圧蒸留し、HPLC(Rainin Dynamax C18)8μmカラム、水/アセトニトリル(0.1%トリフルオロ酢酸)の展開液で60分間、10~100%まで20mL/minで精製した(1.2g、30%)。

LC - MS : $m/z = 418.01 [M+]$

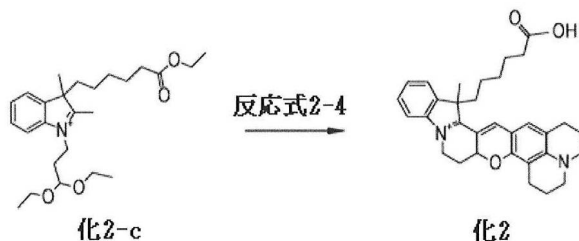
【0104】

(4) [化学式2]で表される化合物の合成

下記[反応式2-4]によって[化学式2]で表される化合物を合成した。

【0105】

【化22】



10

【0106】

前記[反応式2-3]によって合成した[化学式2-c]で表される化合物(1.0 g、1.9 mmol)と9-ホルミル-8-ヒドロキシジユロリジン(0.8 g、1.9 mmol)をエタノール20 mLに溶解した後、80℃で8時間攪拌した。反応終了後、減圧濃縮して溶媒を除去した。濃縮された反応物をクロロホルム50 mLに溶解した後、50%硫酸1 mLを滴加した。これをジクロロメタンで希釈して水で抽出した。抽出物を減圧蒸留した後、反応液をシリカゲルカラムで精製した(0.3 g、40%)。

20

LC - MS : $m/z = 496.91 [M+]$

【0107】

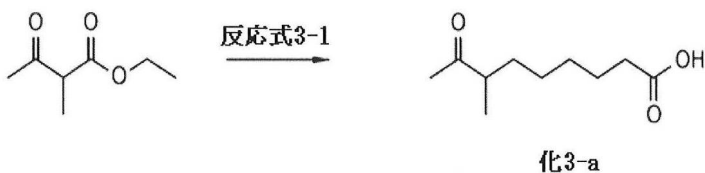
合成例3 : [化学式3]で表される化合物の合成

(1) [化学式3-a]で表される化合物の合成

下記[反応式3-1]によって[化学式3-a]で表される化合物を合成した。

【0108】

【化23】



30

【0109】

2-メチルアセト酢酸エチル(Ethyl 2-methylacetoacetate)(23.5 g、163 mmol)と6-ブロモヘキサン酸エチル(Ethyl 6-bromohexanoate)(40.0 g、179 mmol)をエタノール200 mLに入れ、攪拌し、液体ナトリウムエトキシドを滴加した。これを80℃で10時間攪拌した。反応終了後、固体は濾過し、濾過された溶液を減圧蒸留した。残留物をジクロロメタンと2N塩酸水溶液で抽出した。有機層を乾燥硫酸ナトリウムで処理後、濾過して減圧蒸留し(47.7 g)、溶媒を除去した。これに水溶液300 mLを添加して10時間還流攪拌した。反応終了後、ジクロロメタンで抽出した後、硫酸ナトリウムで処理して濾過し、減圧蒸留した(25 g、71%)。

40

LC - MS : $m/z = 185.84 [M+]$

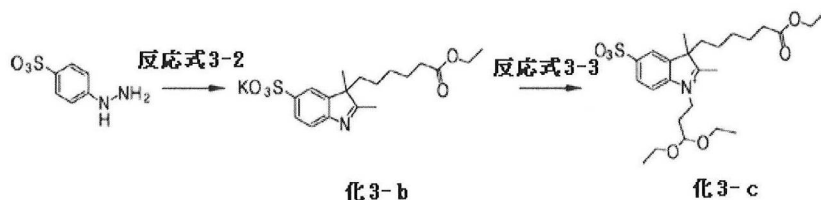
【0110】

(2) [化学式3-b]で表される化合物の合成

下記[反応式3-2]によって[化学式3-b]で表される化合物を合成した。

【0111】

【化 2 4】



【 0 1 1 2 】

p - ヒドラジノベンゼンスルホン酸 (p - Hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g、106 mmol) と [反応式 3 - 1] によって得た [化学式 3 - a] で表される化合物 (59.4 g、319 mmol) を 6 N 塩酸水溶液 30 mL / エタノール 60 mL に加えた後、12 時間還流撹拌した。これを常温まで冷却し、生成された固体を濾過し、酢酸エチルで洗浄した後、減圧乾燥した。水酸化カリウム (1.4 g、25.4 mmol) をプロパノール 35 mL に溶解させ、濾過された固体 (5.1 g、21.2 mmol) をメタノール 35 mL に溶解させて滴加した後、常温で 12 時間撹拌した。固体を濾過した後、乾燥した。C18 逆相クロマトグラフィーを用いて水 / メタノールで精製した (11.1 g、30%)。

LC - MS : m / z = 404.86 [M +]

【 0 1 1 3 】

(3) [化学式 3 - c] で表される化合物の合成

前記 [反応式 3 - 3] によって [化学式 3 - c] で表される化合物を合成した。

【 0 1 1 4 】

前記 [反応式 3 - 2] によって得た [化学式 3 - b] で表される化合物 (3.0 g、7.4 mmol) を常温、窒素気流下でエタノールと共に撹拌し、48% 塩酸水溶液 (10.0 mL) を滴加した。1 時間後、反応液を減圧蒸留した。減圧蒸留された反応物にアセトニトリル (120.0 mL)、酢酸 (3.0 mL) 及びアクロレインジエチルアセタール (17.3 g、133.0 mmol) を添加した。これを 70 °C で 2 時間反応させた。反応液を減圧蒸留し、HPLC (Rainin Dynamax C18) 8 μm カラム、水 / アセトニトリル (0.1% トリフルオロ酢酸) の展開液で 60 分間、10 ~ 100 % まで 20 mL / min で精製した (1.2 g、30%)。

LC - MS : m / z = 496.96 [M +]

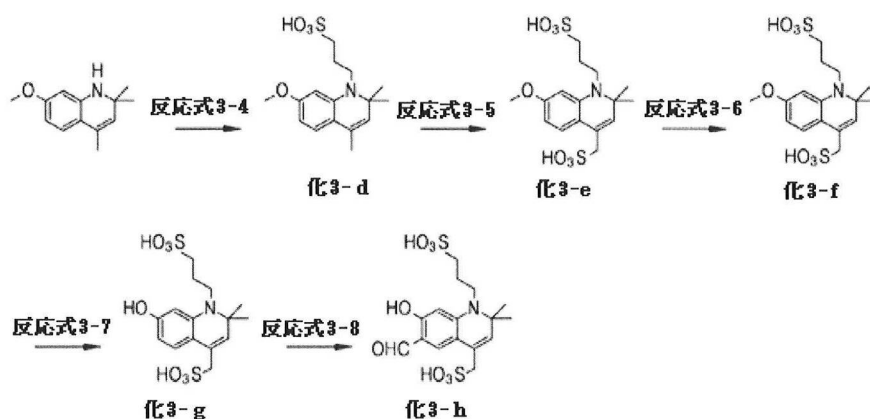
【 0 1 1 5 】

(4) [化学式 3 - d] で表される化合物の合成

下記 [反応式 3 - 4] によって [化学式 3 - d] で表される化合物を合成した。

【 0 1 1 6 】

【化 2 5】



【 0 1 1 7 】

7 - メトキシ - 2 , 2 , 4 - トリメチル - 1 , 2 - ヒドロキノリン (10.0 g、49

10

20

30

40

50

mmol)と1,3-プロパンスルホン(6.6g、54mmol)を145で3時間攪拌した。反応終了後、カラム精製した。このときジクロロメタンとメタノールを使用した(10.0g、63%)。

LC-MS: m/z = 325.01 [M+]

【0118】

(5) [化学式3-e]で表される化合物の合成

前記[反応式3-5]によって[化学式3-e]で表される化合物を合成した。

【0119】

前記[反応式3-4]によって[化学式3-d]で表される化合物(10.0g、31mmol)が入っている反応器にスルホン酸(9.8mL)を滴加した。これを30分間攪拌した後、0で20.0%オレウム(3.9mL)を滴加した。48時間反応させた。反応終了後、低温状態の水に投入し、水酸化ナトリウムで中和し、エタノールを用いて再結晶させた(11.0g、88%)。

LC-MS: m/z = 404.88 [M+]

【0120】

(6) [化学式3-f]で表される化合物の合成

前記[反応式3-6]によって[化学式3-f]で表される化合物を合成した。

前記[反応式3-5]によって得た[化学式3-e]で表される化合物(12.0g、30.0mmol)、10%Pd/C(0.9g)及びメタノール120mLを入れ、水素雰囲気下で常温攪拌した。12時間攪拌した後、固体を濾過した。濾過された溶液を減圧蒸留し、エタノールを用いて再結晶させた(11.5g、95%)。

LC-MS: m/z = 406.78 [M+]

【0121】

(7) [化学式3-g]で表される化合物の合成

前記[反応式3-7]によって[化学式3-g]で表される化合物を合成した。

【0122】

前記[反応式3-6]によって得た[化学式3-f]で表される化合物(12.0g、29.0mmol)、ヨウ化ナトリウム(11.0g、74.0mmol)及び臭化水素(72.0g、174.0mmol)を反応器に入れ、105で12時間攪拌した。反応終了後、炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて中和させた。溶媒を除去し、水/アセトン/エタノールを用いて結晶を生成させた。メタノール/アセトンを用いて再結晶させ、アセトンで洗浄した(3.0g、27%)。

LC-MS: m/z = 392.93 [M+]

【0123】

(8) [化学式3-h]で表される化合物の合成

前記[反応式3-8]によって[化学式3-h]で表される化合物を合成した。

【0124】

前記[反応式3-7]によって得た[化学式3-g]で表される化合物(3.0g、8.0mmol)を、N,N-ジメチルホルムアミド(1.3g、8.0mmol)が入っている反応器に投入した。50で12時間反応させた。反応終了後、水で希釈した後、中和した。溶媒を除去した後、メタノール/アセトンを用いて結晶を生成し、エタノールを用いて再結晶させた(0.8g、25%)。

LC-MS: m/z = 420.74 [M+]

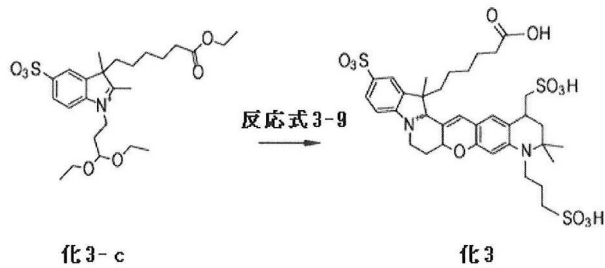
【0125】

(9) [化学式3]で表される化合物の合成

下記[反応式3-9]によって[化学式3]で表される化合物を合成した。

【0126】

【化26】



【0127】

10

前記【反応式3-3】によって合成した【化学式3-c】で表される化合物（1.0 g、1.9 mmol）と【反応式3-8】によって合成した【化学式3-h】で表される化合物（0.8 g、1.9 mmol）をエタノール20 mLに溶解した後、80℃で8時間攪拌した。反応終了後、減圧濃縮して溶媒を除去した。濃縮された反応物をクロロホルム50 mLに溶解した後、50%硫酸1 mLを滴加した。これをジクロロメタンで希釈して水で抽出した。有機層を減圧濃縮した後、HPLC（Rainin Dynamax C18）8 μmカラム、水/アセトニトリル（0.1%トリフルオロ酢酸）の展開液で60分間、10～100%まで20 mL/minで精製した（0.4 g、51%）。

LC-MS：m/z = 780.01 [M+]

【0128】

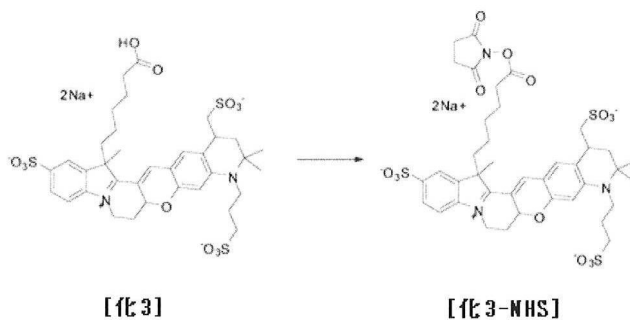
20

（10）【化学式36；化学式3-NHS】で表される化合物の合成

下記反応式によって【化学式3-NHS】で表される化合物を合成した。

【0129】

【化27】



30

【0130】

前記【反応式3-9】によって得た【化学式3】で表される化合物（0.24 g、0.5 mmol）、N-ヒドロキシコハク酸イミド（0.03 g、0.03 mmol）、及びN,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.054 g、0.03 mmol）を、N,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解して、1時間常温で攪拌した。反応終了後、HPLC（Rainin Dynamax C18）8 μmカラム、水/アセトニトリル（0.1%トリフルオロ酢酸）の展開液で60分間、10～100%まで20 mL/minで精製した（0.15 g、56.6%）。

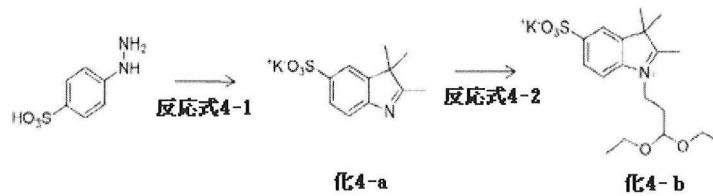
40

【0131】

合成例4：【化学式4】で表される化合物の合成

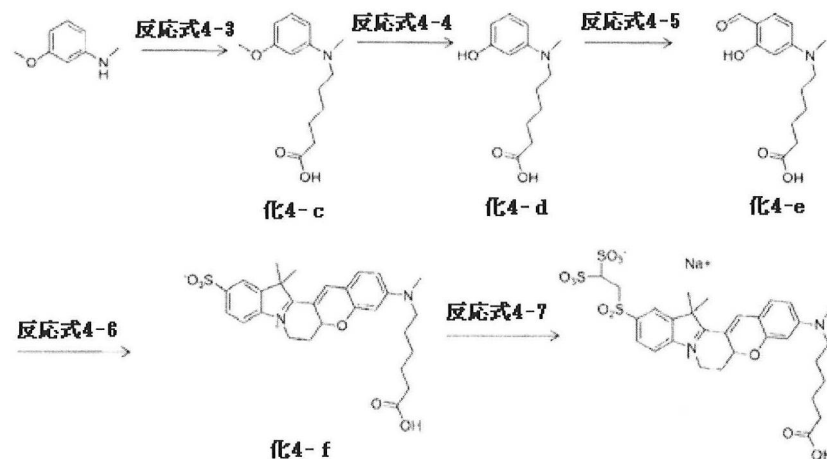
【0132】

【化 2 8】



【 0 1 3 3 】

【化 2 9】



【 0 1 3 4 】

(1) [化学式 4 - a] で表される化合物の合成

前記 [反応式 4 - 1] によって [化学式 4 - a] で表される化合物を合成した。

【 0 1 3 5 】

P - ヒドラジノベンゼンスルホン酸 (p - hydrazinobenzenesulfonic acid) (20 g、106 mmol) と 3 - メチル - 2 - プタノン (27.48 g、319 mmol) を用いて、[反応式 1 - 2] によって合成した (11.1 g、30%)。

LC - MS : m / z = 277.02 [M +]

【 0 1 3 6 】

(2) [化学式 4 - b] で表される化合物の合成

前記 [反応式 4 - 2] によって [化学式 4 - b] で表される化合物を合成した。

【 0 1 3 7 】

前記 [反応式 4 - 1] によって得た [化学式 4 - a] で表される化合物を [反応式 1 - 3] によって合成した (5.0 g、34.0%)。

LC - MS : m / z = 408.12 [M +]

【 0 1 3 8 】

(3) [化学式 4 - c] で表される化合物の合成

前記 [反応式 4 - 3] によって [化学式 4 - c] で表される化合物を合成した。

【 0 1 3 9 】

3 - メトキシ - N - メチルアニリン (10.0 g、73.0 mmol) と 6 - ブロモヘキサン酸 (17.1 g、87.5 mmol) を N, N - ジメチルホルムアミド 100 ml で還流撹拌した。反応終了後、カラム精製した (13.6 g、74.3%)。

LC - MS : m / z = 252.15 [M +]

【 0 1 4 0 】

(4) [化学式 4 - d] で表される化合物の合成

前記 [反応式 4 - 4] によって [化学式 4 - d] で表される化合物を合成した。

【 0 1 4 1 】

10

20

30

40

50

前記〔反応式 4 - 4 〕によって得た〔化学式 4 - d 〕で表される化合物を用いて、〔反応式 3 - 7 〕によって合成した（5 . 1 g、45 . 6 %）。

LC - MS : $m/z = 238 . 14$ [M +]

【 0 1 4 2 】

（ 5 ）〔化学式 4 - e 〕で表される化合物の合成

前記〔反応式 4 - 5 〕によって〔化学式 4 - e 〕で表される化合物を合成した。

【 0 1 4 3 】

前記〔反応式 4 - 5 〕によって得た〔化学式 4 - d 〕で表される化合物を用いて、〔反応式 1 - 6 〕によって合成した（2 . 0 g、35 . 1 %）。

LC - MS : $m/z = 266 . 13$ [M +]

10

【 0 1 4 4 】

（ 6 ）〔化学式 4 - f 〕で表される化合物の合成

前記〔反応式 4 - 6 〕によって〔化学式 4 - f 〕で表される化合物を合成した。

【 0 1 4 5 】

前記〔反応式 4 - 2 〕によって合成した〔化学式 4 - b 〕で表される化合物及び〔反応式 4 - 5 〕によって合成した〔化学式 4 - e 〕で表される化合物を用いて、〔反応式 1 - 7 〕によって合成した（0 . 46 g、23 . 5 %）。

LC - MS : $m/z = 525 . 20$ [M +]

【 0 1 4 6 】

（ 7 ）〔化学式 4 〕で表される化合物の合成

20

前記〔反応式 4 - 7 〕によって〔化学式 4 〕で表される化合物を合成した。

【 0 1 4 7 】

前記〔反応式 4 - 2 〕によって合成した〔化学式 4 - b 〕で表される化合物（1 . 0 g、1 . 9 mmol）を N , N - ジメチルホルムアミド 1 . 0 ml に溶解した後、塩化ホスホリル 0 . 5 ml を添加して加熱した。これに 2 - アミノエタン - 1 , 1 - ジスルホン酸を投入し、常温攪拌した後、カラム精製した（0 . 2 g、15 . 2 %）。

LC - MS : $m/z = 696 . 14$ [M +]

【 0 1 4 8 】

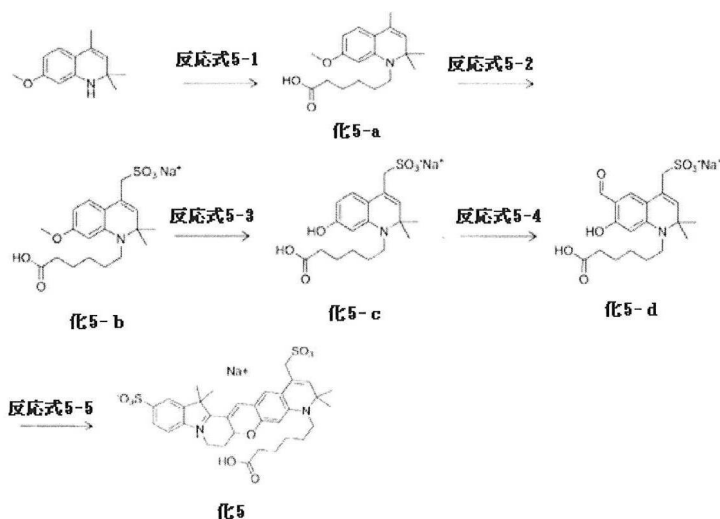
合成例 5 : 〔化学式 5 〕で表される化合物の合成

（ 1 ）〔化学式 5 - a 〕で表される化合物の合成

30

【 0 1 4 9 】

【 化 3 0 】



40

【 0 1 5 0 】

〔化学式 5 - a 〕で表される化合物を 7 - メトキシ - 2 , 2 - 4 - トリメチル - 1 , 2 - ジヒドロキノリンを用いて〔反応式 5 - 1 〕のように合成した（15 . 0 g、52 . 6 %）。

50

LC - MS : $m/z = 318.20 [M^+]$

【0151】

(2) [化学式5-b]で表される化合物の合成

前記[反応式5-2]によって[化学式5-b]で表される化合物を合成した。

【0152】

前記[反応式5-1]によって得た[化学式5-a]で表される化合物を用いて[反応式5-2]によって合成した。(13.0g、65.0%)

LC - MS : $m/z = 420.14 [M^+]$

【0153】

(3) [化学式5-c]で表される化合物の合成

前記[反応式5-3]によって[化学式5-c]で表される化合物を合成した。

【0154】

前記[反応式5-2]によって得た[化学式5-b]で表される化合物を用いて[反応式5-3]によって[化学式5-c]で表される化合物を合成した(7.2g、56.0%)。

LC - MS : $m/z = 406.12 [M^+]$

【0155】

(4) [化学式5-d]で表される化合物の合成

前記[反応式5-4]によって[化学式5-d]で表される化合物を合成した。

【0156】

前記[反応式5-3]によって得た[化学式5-c]で表される化合物を用いて[反応式3-8]によって[化学式5-d]で表される化合物を合成した(2.5g、30%)。

LC - MS : $m/z = 434.12 [M^+]$

【0157】

(5) [化学式5]で表される化合物の合成

前記[反応式5-5]によって[化学式5]で表される化合物を合成した。

【0158】

前記[反応式4-2]によって合成した[化学式4-b]で表される化合物及び[反応式5-4]によって合成した[化学式5-d]で表される化合物を用いて、[反応式4-6]によって[化学式5]で表される化合物を合成した(0.51g、32.0%)。

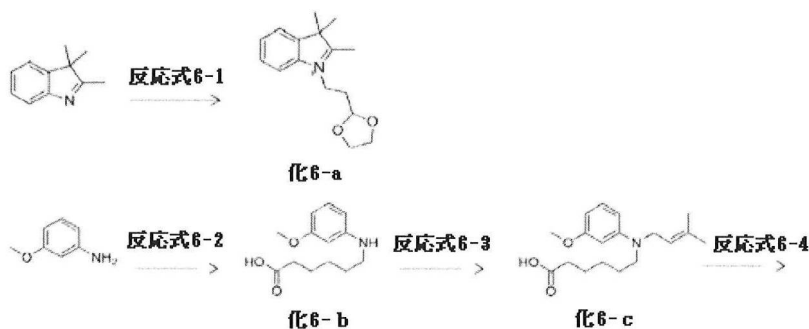
LC - MS : $m/z = 693.18 [M^+]$

【0159】

合成例6：[化学式6]で表される化合物の合成

【0160】

【化31】



【0161】

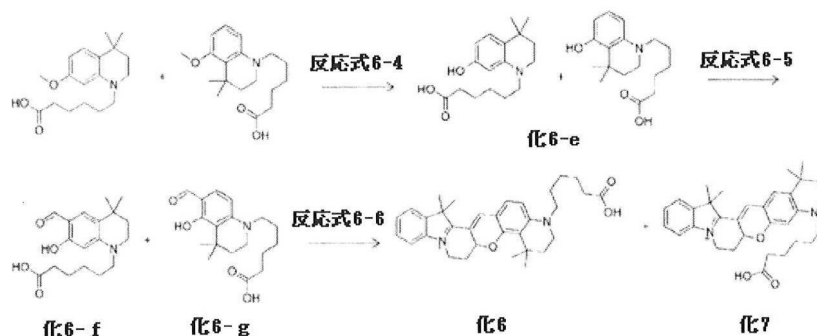
10

20

30

40

【化 3 2】



10

【0162】

(1) [化学式 6 - a] で表される化合物の合成

前記 [反応式 6 - 1] によって [化学式 6 - a] で表される化合物を合成した。2, 3, 3 - トリエチルインドレニンを用いて [反応式 1 - 3] によって [化学式 6 - a] で表される化合物を合成した (10.0 g、62.5%)。

LC - MS : $m/z = 261.16 [M^+]$

【0163】

(2) [化学式 6 - b] で表される化合物の合成

前記 [反応式 6 - 2] によって [化学式 6 - b] で表される化合物を合成した。m - アニシジンを用いて [反応式 4 - 3] によって [化学式 6 - b] で表される化合物を合成した (8.1 g、42.1%)。

LC - MS : $m/z = 238.14 [M^+]$

【0164】

(3) [化学式 6 - c] で表される化合物の合成

前記 [反応式 6 - 3] によって [化学式 6 - c] で表される化合物を合成した。

【0165】

前記 [反応式 6 - 2] によって合成した [化学式 6 - b] で表される化合物 (5.0 g、21.0 mmol)、1 - クロロ - 3 - メチル - 2 - ブタン (5.2 g、25.3 mmol)、炭酸カリウム (3.5 g、25.3 mmol) 及びアセトニトリル 25.0 ml を還流撹拌した。反応終了後、カラム精製した (4.0 g、62.0%)。

LC - MS : $m/z = 306.20 [M^+]$

【0166】

(4) [化学式 6 - d] で表される化合物の合成

前記 [反応式 6 - 4] によって [化学式 6 - d] で表される化合物を合成した。

【0167】

前記 [反応式 6 - 3] によって合成した [化学式 6 - c] で表される化合物 (4.0 g、13.1 mmol) とメタンスルホン酸 4.0 ml を入れ、還流撹拌した。反応終了後、中和して抽出し、カラム精製した (3.0 g、75.2%)。

LC - MS : $m/z = 306.20 [M^+]$

【0168】

(5) [化学式 6 - e] で表される化合物の合成

前記 [反応式 6 - 4] によって [化学式 6 - e] で表される化合物を合成した。

【0169】

前記 [反応式 6 - 4] によって合成した [化学式 6 - d] で表される化合物を用いて [反応式 3 - 7] によって [化学式 6 - e] で表される化合物を合成した (2.5 g、87.3%)。

LC - MS : $m/z = 292.18 [M^+]$

【0170】

(6) [化学式 6 - f] で表される化合物の合成

50

前記〔反応式 6 - 5〕によって〔化学式 6 - f〕及び〔化学式 6 - g〕で表される化合物を合成した。

【0171】

前記〔反応式 6 - 4〕によって合成した化合物を用いて〔反応式 3 - 8〕によって〔化学式 6 - e〕（0.84 g、31.8%）及び〔化学式 6 - g〕（0.56 g、21.2%）で表される化合物を合成した。

LC - MS : $m/z = 320.4$ [M+]

【0172】

（7）〔化学式 6〕で表される化合物の合成

前記〔反応式 6 - 6〕によって〔化学式 6〕で表される化合物を合成した。

10

【0173】

前記〔反応式 6 - 1〕によって合成した〔化学式 6 - a〕で表される化合物及び〔反応式 6 - 5〕によって合成した〔化学式 6 - f〕で表される化合物を用いて、〔反応式 1 - 7〕によって〔化学式 6〕で表される化合物を合成した（0.35 g、32.0%）。

LC - MS : $m/z = 500.30$ [M+]

【0174】

合成例 7 : 〔化学式 7〕で表される化合物の合成

（1）〔化学式 7〕で表される化合物の合成

前記〔反応式 6 - 6〕によって〔化学式 7〕で表される化合物を合成した。

【0175】

20

前記〔反応式 6 - 1〕によって合成した〔化学式 6 - a〕で表される化合物及び〔反応式 6 - 5〕によって合成した〔化学式 6 - g〕で表される化合物を用いて、〔反応式 1 - 7〕によって〔化学式 7〕で表される化合物を合成した（0.24 g、35.0%）。

LC - MS : $m/z = 500.30$ [M+]

【0176】

合成例 8 : 〔化学式 4 4〕で表される化合物の合成

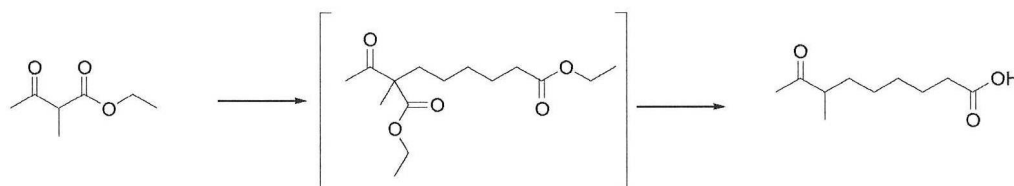
（1）〔化学式 8 - a〕で表される化合物の合成

下記〔反応式 8 - 1〕によって〔化学式 8 - a〕で表される化合物を合成した。

【0177】

【化 3 3】

30



【0178】

2 - メチルアセト酢酸エチル (Ethyl 2 - methylacetoacetate) (23.5 g、163 mmol) と 6 - ブロモヘキサン酸エチル (ethyl 6 - bromohexanoate) (40.0 g、179 mmol) をエタノール 200 ml に入れて攪拌し、液体ナトリウムエトキシドを滴加した。これを 80 で 10 時間攪拌した。反応終了後、固体は濾過し、濾過された溶液を減圧蒸留し、ジクロロメタンと 2 N 塩酸水溶液で抽出した。有機層を乾燥硫酸ナトリウムで処理後、濾過して減圧蒸留した（47.7 g）。溶媒を除去した後、水 300 ml を添加して、10 時間還流攪拌した。反応終了後、反応液をジクロロメタンで抽出した後、硫酸ナトリウムで処理して濾過し、減圧蒸留した（25 g、71%）。

40

【0179】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 10.85$ (1 H, s), 2.52 (1 H, m), 2.36 (2 H, m), 2.30 (3 H, s), 1.65 (4 H, m), 1.35 (4 H, m), 1.09 (3 H, d)

50

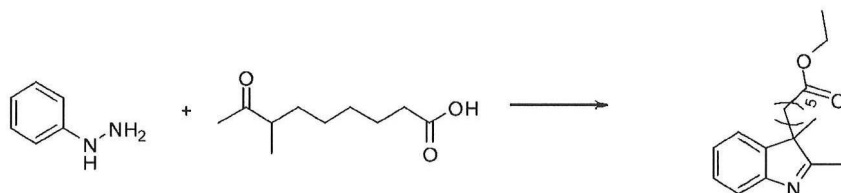
【 0 1 8 0 】

(2) [化学式 8 - b] で表される化合物の合成

下記 [反応式 8 - 2] によって [化学式 8 - b] で表される化合物を合成した。

【 0 1 8 1 】

【 化 3 4 】



10

【 0 1 8 2 】

フェニルヒドラジン塩酸塩 (phenylhydrazine hydrochloride) (8 . 6 g 、 7 5 m m o l) と [化学式 8 - a] で表される化合物 (4 2 g 、 2 2 5 m m o l) をエタノール 8 6 m l に入れ、塩酸 2 1 . 5 m l を加えた後、1 2 時間還流撹拌した。これを常温に冷却させ、酢酸エチル 5 0 m l を添加した。生成された固体を濾過し、酢酸エチルで洗浄した後、減圧乾燥した。残留物をジクロロメタンと 2 N 水酸化ナトリウム水溶液で抽出した。有機層を減圧乾燥し、シリカカラムで精製した (8 . 5 g 、 4 0 %) 。

【 0 1 8 3 】

^1H NMR (4 0 0 M H z , CDCl_3) : δ = 7 . 9 2 (1 H , q) , 7 . 5 1 (2 H , m) , 7 . 4 2 (1 H , q) , 4 . 0 9 (2 H , q) , 2 . 8 2 (3 H , s) , 2 . 1 8 (2 H , t) , 2 . 1 2 (2 H , m) , 1 . 9 7 (2 H , m) , 1 . 4 9 (3 H , s) , 1 . 4 6 (2 H , m) , 1 . 2 6 (2 H , m) , 1 . 2 3 (3 H , t) , 0 . 7 3 (2 H , m)

20

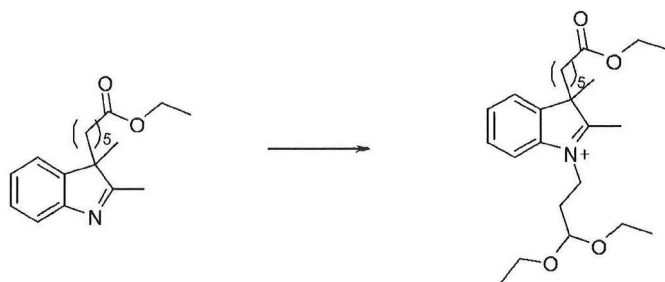
【 0 1 8 4 】

(3) [化学式 8 - c] で表される化合物の合成

下記 [反応式 8 - 3] によって [化学式 8 - c] で表される化合物を合成した。

【 0 1 8 5 】

【 化 3 5 】



30

【 0 1 8 6 】

前記 [反応式 8 - 2] によって得た [化学式 8 - b] で表される化合物 8 g (2 8 m m o l) を、常温、窒素気流下でエタノール 4 0 0 m l と共に撹拌し、4 8 % 塩酸水溶液 (8 0 m l) を滴加した。1 時間後、反応液を減圧蒸留した。反応器にアセトニトリル (3 2 0 m l) 、酢酸 (8 m l) 及びアクロレインジエチルアセタール (6 5 . 7 2 g 、 5 0 5 m m o l) を添加した。これを 7 0 °C で 2 時間反応させた。反応液を減圧蒸留し、H P L C (R a i n i n D y n a m a x C 1 8) 8 μ m カラム、水 / アセトニトリル (0 . 1 % トリフルオロ酢酸) の展開液で 6 0 分間、1 0 ~ 1 0 0 % まで 2 0 m l / m i n で精製した。

40

【 0 1 8 7 】

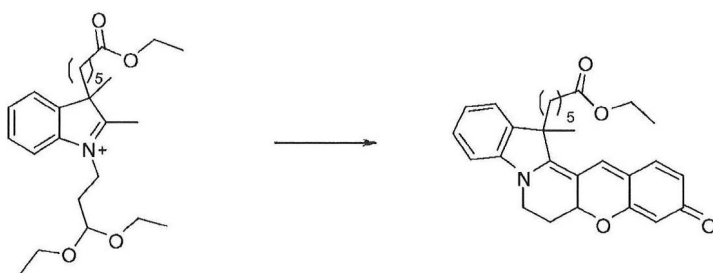
(4) [化学式 8 - d] で表される化合物の合成

下記 [反応式 8 - 4] によって [化学式 8 - d] で表される化合物を合成した。

50

【 0 1 8 8 】

【 化 3 6 】



10

【 0 1 8 9 】

前記〔反応式 8 - 3〕によって得た〔化学式 8 - c〕で表される化合物 2 g (4 . 7 mmol) と 2 , 4 - ジヒドロキシベンズアルデヒド 0 . 5 8 g (4 . 7 mmol) をエタノール 2 0 ml に入れ、3 時間還流撹拌した。これを常温に冷却して減圧蒸留した後、シリカカラムで精製した。精製した物質にクロロホルム 1 0 ml と 5 0 % 硫酸水溶液 1 ml を入れ、常温で 2 0 分間撹拌した。2 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 7 ~ 8 に調整し、塩化メチレンで抽出し、減圧蒸留後、シリカカラムで精製した (0 . 3 g 、 1 5 %) 。

【 0 1 9 0 】

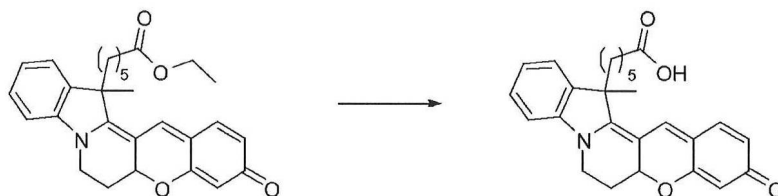
(5) 〔化学式 4 4 〕で表される化合物の合成

20

下記〔反応式 8 - 5〕によって〔化学式 4 4 〕で表される化合物を合成した。

【 0 1 9 1 】

【 化 3 7 】



【 0 1 9 2 】

30

前記〔反応式 8 - 4〕によって得た〔化学式 8 - d〕で表される化合物 0 . 3 g (0 . 6 7 mmol) をアセトニトリル 1 . 3 ml に入れ、6 N 塩酸溶液 1 . 3 ml を添加して 1 2 時間撹拌した。これを 2 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7 ~ 8 に調整し、減圧蒸留し、HPLC (Rainin Dynamax C18) 8 μm カラム、水 / アセトニトリル (0 . 1 % トリフルオロ酢酸) の展開液で精製した (9 0 mg 、 3 2 %) 。

【 0 1 9 3 】

^1H NMR (4 0 0 MHz , MeOD) : δ = 8 . 2 8 (1 H , s) , 7 . 6 8 (2 H , m) , 7 . 6 1 (2 H , m) , 7 . 4 8 (1 H , d) , 6 . 5 8 (1 H , d) , 6 . 4 0 (1 H , s) , 5 . 4 2 (1 H , m) , 6 . 7 0 (1 H , m) , 4 . 3 0 (1 H , m) , 2 . 8 7 (1 H , m) , 2 . 5 4 (1 H , m) , 2 . 1 4 (2 H , m) , 1 . 8 0 (2 H , m) , 1 . 2 9 (3 H , s) , 0 - 3 (6 H , m)

40

【 0 1 9 4 】

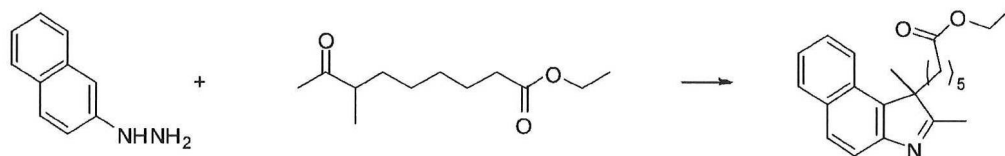
合成例 9 : 〔化学式 4 5 〕で表される化合物の合成

(1) 〔化学式 9 - a 〕で表される化合物の合成

下記〔反応式 9 - 1〕によって前記〔反応式 8 - 2〕と同様の方法で〔化学式 9 - a 〕で表される化合物を合成した。

【 0 1 9 5 】

【化38】



【0196】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.92 (2H, dd), 7.81 (1H, d), 7.76 (1H, d), 7.49 (1H, t), 7.39 (1H, t), 4.01 (2H, q), 2.38 (1H, m), 2.32 (3H, s), 2.04 (2H, t), 1.97 (1H, m), 1.47 (3H, s), 1.35 (2H, m), 1.16 (3H, t), 1.07 (2H, m), 0.58 (1H, m), 0.39 (1H, m)

10

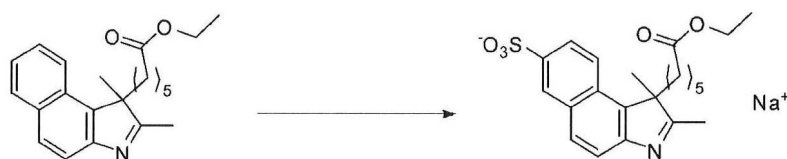
【0197】

(2) [化学式9-b]で表される化合物の合成

下記[反応式9-2]によって[化学式9-b]で表される化合物を合成した。

【0198】

【化39】



20

【0199】

前記[反応式9-1]によって得た[化学式9-a]で表される化合物10g (30 mmol)と硫酸溶液5mlを入れ、180℃で2時間加熱撹拌した。常温に冷却した後、これこれに氷を入れ、50%水酸化ナトリウム溶液5mlをゆっくり滴加した。常温で24時間撹拌した後、生成された沈殿物を濾過し、濾液に飽和硫酸ナトリウム水溶液5mlを添加した。生成された沈殿物を濾過し、固体を水で2回再結晶した。得られた固体を真空乾燥した(8g、60%)。

【0200】

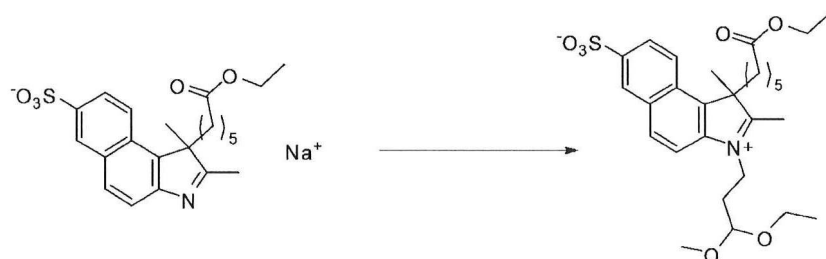
30

(3) [化学式9-c]で表される化合物の合成

下記[反応式9-3]によって、前記[反応式8-3]と同様の方法で[化学式9-c]で表される化合物を合成した。

【0201】

【化40】



40

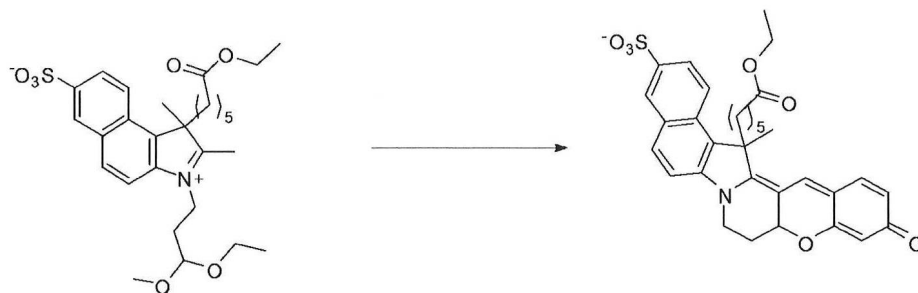
【0202】

(4) [化学式9-d]で表される化合物の合成

下記[反応式9-4]によって、前記[反応式8-4]と同様の方法で[化学式9-d]で表される化合物を合成した。

【0203】

【化 4 1】



【 0 2 0 4 】

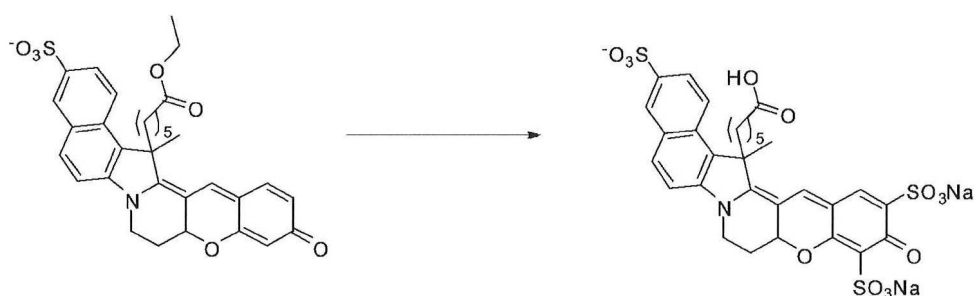
10

(5) [化学式 4 5] で表される化合物の合成

下記 [反応式 9 - 5] によって [化学式 4 5] で表される化合物を合成した。

【 0 2 0 5 】

【化 4 2】



20

【 0 2 0 6 】

前記 [反応式 9 - 4] によって得た [化学式 9 - d] で表される化合物 0 . 3 g (3 0 m m o l) に硫酸溶液 1 m l を入れ、4 0 で 2 時間加熱攪拌した。これを常温に冷却し、氷を入れ、5 0 % 水酸化ナトリウム溶液をゆっくり滴加して中性に調整した。H P L C (R a i n i n D y n a m a x C 1 8) 8 μ m カラム、水 / アセトニトリル (0 . 1 % トリフルオロ酢酸) の展開液で 6 0 分間、1 0 ~ 1 0 0 % まで 2 0 m l / m i n で精製した。

【 0 2 0 7 】

30

^1H NMR (4 0 0 M H z , M e O D) : δ = 8 . 1 3 (2 H , m) , 7 . 9 7 (3 h , m) , 7 . 7 2 (2 H , m) , 5 . 4 8 (1 H , m) , 4 . 6 5 (1 H , m) 4 . 4 3 (1 H , m) , 2 . 9 8 (1 H , m) , 2 . 6 1 (1 H , m) , 2 . 4 4 (1 H , m) , 2 . 2 4 (1 H , m) , 1 . 7 7 (3 H , d) , 1 . 7 0 (2 H , m) , 0 . 8 5 (4 H , m) 0 . 4 6 (1 H , m) , - 0 . 0 1 (1 H , m)

【 0 2 0 8 】

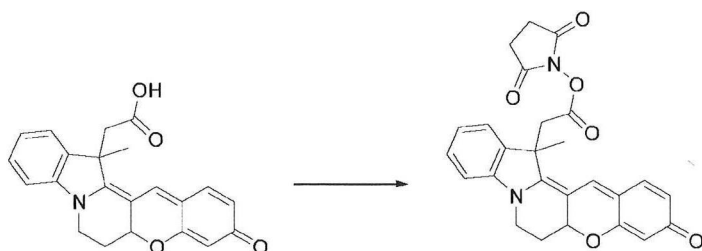
合成例 1 0 : [化学式 4 6] で表される化合物の合成

下記反応式によって [化学式 4 6] で表される化合物を合成した。

【 0 2 0 9 】

【化 4 3】

40



【 0 2 1 0 】

前記 [反応式 8 - 5] によって得た [化学式 4 4] で表される化合物 (0 . 5 g 、 0 . 1 3 8 m m o l) 、 N - ヒドロキシコハク酸イミド (0 . 0 8 g 、 0 . 0 6 9 m m o l

50

)、及びN,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド(0.142g、0.069mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1ml)に溶解し、1時間常温で攪拌した。反応終了後、これをHPLC(Rainin Dynamax C18)8 μ mカラム、水/アセトニトリル(0.1%トリフルオロ酢酸)の展開液で60分間、10~100%まで20ml/minで精製した(0.38g、60.0%)。

【0211】

合成例11:[化学式47]で表される化合物の合成

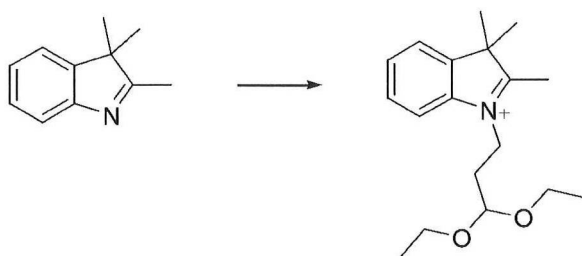
(1)[化学式11-a]で表される化合物の合成

下記[反応式11-1]によって、前記[反応式8-3]と同様の方法で[化学式11-a]で表される化合物を合成した。

10

【0212】

【化44】



20

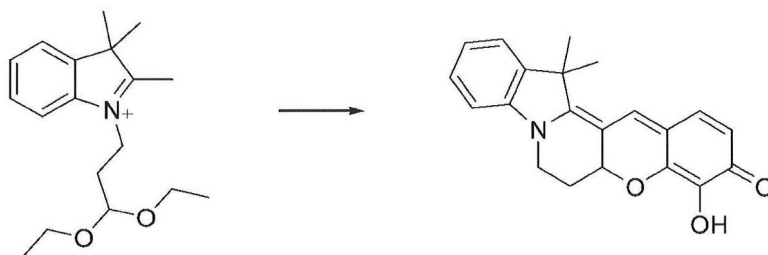
【0213】

(2)[化学式11-b]で表される化合物の合成

下記[反応式11-2]によって、前記[反応式8-4]と同様の方法で[化学式11-b]で表される化合物を合成した。

【0214】

【化45】



30

【0215】

^1H NMR(400MHz, MeOD): δ = 7.90(1H, s), 7.45(2H, m), 7.25(2H, m), 7.00(1H, d), 6.31(1H, d), 5.15(1H, m), 4.36(1H, m), 3.92(1H, m), 2.78(1H, m), 2.41(1H, m), 1.73(6H, d)

【0216】

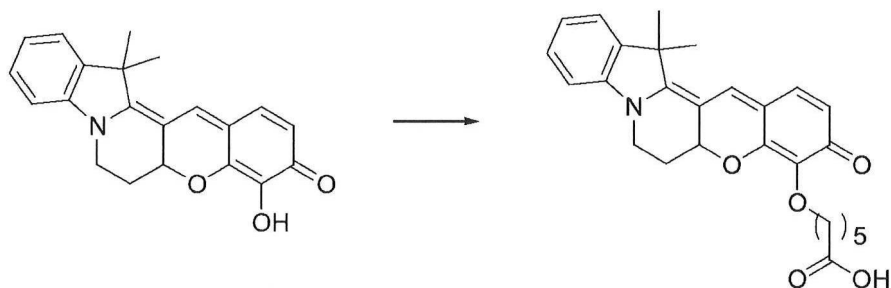
(3)[化学式47]で表される化合物の合成

下記[反応式11-3]によって[化学式47]で表される化合物を合成した。

40

【0217】

【化 4 6】



【 0 2 1 8】

10

前記〔反応式 11 - 2〕によって得た〔化学式 11 - b〕で表される化合物 0.3 g (1 mmol) を、50 、窒素気流下で水酸化カリウム 0.1 g (2 mmol)、エタノール 3 ml と共に 30 分間加熱撹拌した。これに 5 - ヨードペンタン酸エチルエステル 0.3 g (1 mmol) を添加し、3 時間還流撹拌した。反応終了後、減圧濃縮した。HPLC (Rainin Dynamax C18) 8 μ m カラム、水 / アセトニトリル (0.1 % トリフルオロ酢酸) の展開液で 60 分間、10 ~ 100 % まで 20 mL / min で精製した。

【 0 2 1 9】

$M^+ = 448.2$, 1H NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.28$ (1H, s), 7.55 - 7.80 (4H, m), 7.31 (1H, s), 6.60 (1H, s), 5.51 (1H, s), 4.74 (1H, m), 4.08 (1H, m), 2.94 (1H, m), 2.66 (1H, m), 1.82 (6H, d), 1 - 4.5 (10H, m)

20

【 0 2 2 0】

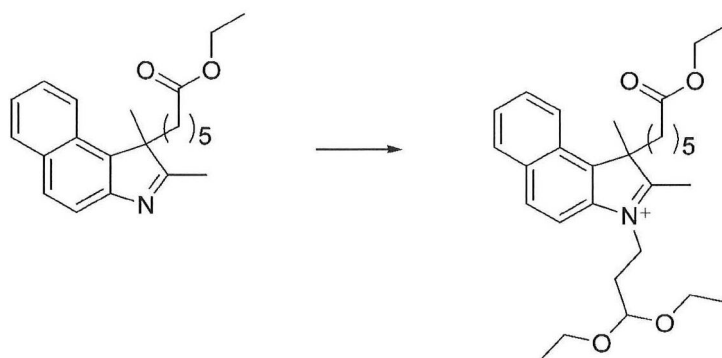
合成例 12: 〔化学式 48〕で表される化合物の合成

(1) 〔化学式 12 - a〕で表される化合物の合成

下記〔反応式 12 - 1〕によって、前記〔反応式 8 - 3〕と同様の方法で〔化学式 12 - a〕で表される化合物を合成した。

【 0 2 2 1】

【化 4 7】



30

【 0 2 2 2】

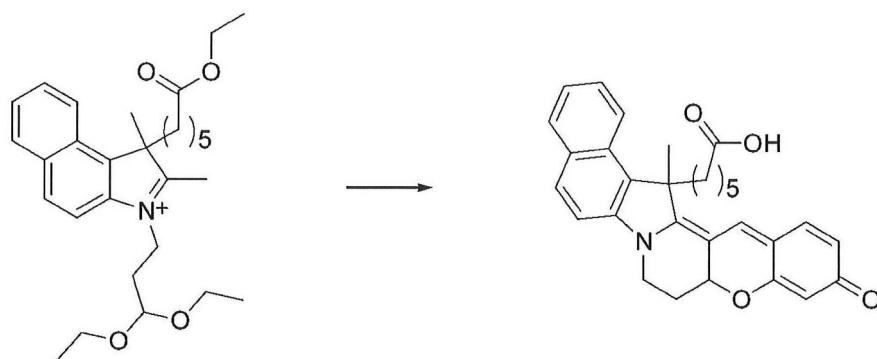
40

(2) 〔化学式 48〕で表される化合物の合成

下記〔反応式 12 - 2〕によって、前記〔反応式 8 - 4〕と同様の方法で〔化学式 48〕で表される化合物を合成した。

【 0 2 2 3】

【化 48】



10

【0224】

^1H NMR (400 MHz, MeOD) : δ = 7.40 (1H, s), 8.37 (1H, d), 8.20 (1H, d), 8.13 (1H, d), 7.84 (1H, d), 7.77 (1H, t), 7.67 (1H, t), 7.49 (1H, dd), 6.59 (1H, dt), 6.41 (1H, s), 5.46 (1H, m), 4.82 (1H, m), 4.42 (1H, m), 2.92 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.10 (2H, m), 2.01 (2H, t), 1.29 (3H, s), 1.33 (2H, m), 1.11 (2H, m), 0.84 (1H, m), 0.43 (1H, m)

【0225】

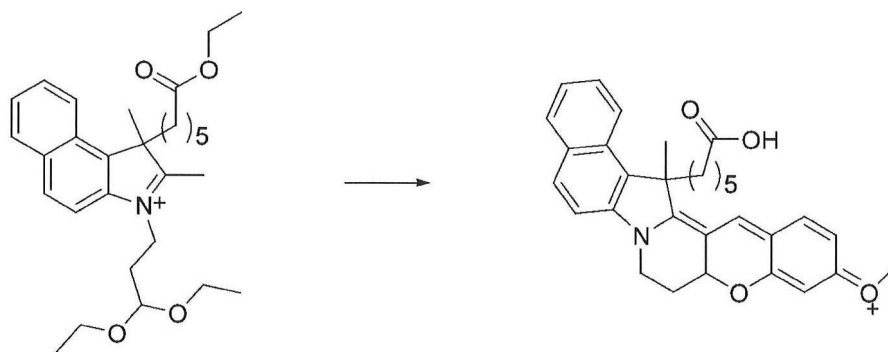
合成例 13 : [化学式 49] で表される化合物の合成

(1) [化学式 49] で表される化合物の合成

下記 [反応式 13 - 1] によって、前記 [反応式 8 - 4] と同様の方法で [化学式 49] で表される化合物を合成した。

【0226】

【化 49】



30

【0227】

^1H NMR (400 MHz, MeOD) : δ = 8.39 (1H, s), 8.33 (1H, d), 8.17 (1H, dd), 8.09 (1H, d), 7.83 (1H, dd), 7.74 (1H, t), 7.64 (1H, t), 7.54 (1H, dd), 6.70 (1H, dt), 6.56 (1H, m), 5.46 (1H, m), 4.84 (1H, m), 4.41 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.70 (1H, m), 2.90 (2H, m), 2.63 (3H, m), 1.94 (2H, t), 1.25 (3H, s), 1.07 (2H, t), 0.80 (1H, m), 0.40 (1H, m)

40

【0228】

合成例 14 : [化学式 50] で表される化合物の合成

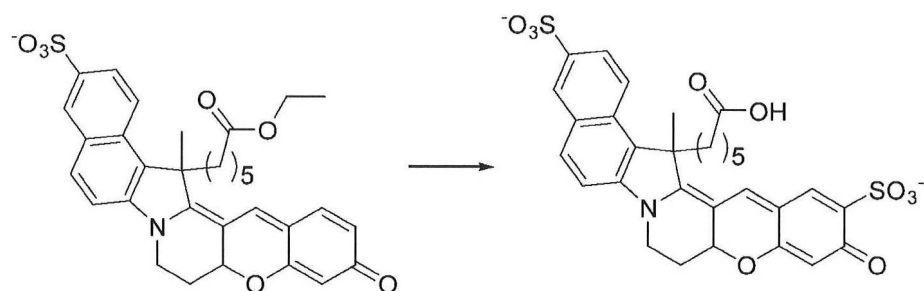
(1) [化学式 50] で表される化合物の合成

下記 [反応式 14 - 1] によって、前記 [反応式 9 - 5] と同様の方法で [化学式 50] で表される化合物を合成した。

【0229】

50

【化 5 0】



【 0 2 3 0】

10

^1H NMR (400 MHz, DMSO) : δ = 8.62 (1H, s), 8.40 (1H, m), 8.31 (1H, m), 8.37 (1H, d), 7.99 (1H, dd), 7.92 (1H, d), 8.05 (1H, s), 6.43 (1H, s), 5.48 (1H, m), 4.84 (1H, m), 4.42 (1H, m), 2.80 (5H, m), 2.58 (1H, m), 1.98 (3H, s), 1.95 (2H, t), 1.20 (1H, m), 1.04 (1H, m), 0.76 (1H, m), 0.25 (1H, m)

【 0 2 3 1】

合成例 15 : [化学式 5 1] で表される化合物の合成

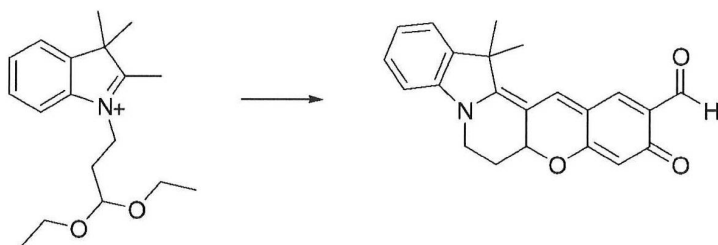
(1) [化学式 15 - a] で表される化合物の合成

下記 [反応式 15 - 1] によって、前記 [反応式 8 - 4] と同様の方法で [化学式 5 1] で表される化合物を合成した。

20

【 0 2 3 2】

【化 5 1】



30

【 0 2 3 3】

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 10.15 (1H, s), 7.80 (1H, s), 7.66 (1H, s), 7.36 (2H, m), 7.28 (1H, d), 7.12 (1H, d), 5.97 (1H, s), 5.12 (1H, m), 4.25 (1H, m), 3.93 (1H, m), 2.73 (1H, m), 2.33 (1H, m), 1.68 (3H, s), 1.63 (3H, s)

【 0 2 3 4】

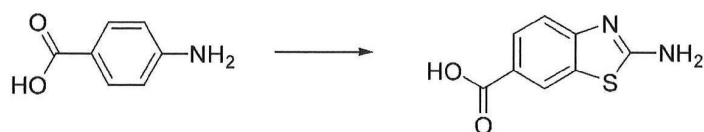
(2) [化学式 15 - b] で表される化合物の合成

下記 [反応式 15 - 2] によって [化学式 15 - b] で表される化合物を合成した。

【 0 2 3 5】

40

【化 5 2】



【 0 2 3 6】

4 - アミノ安息香酸 5 g (36 mmole) とチオシアン酸カリウム 19.03 g (195 mmole) を酢酸 70 ml に入れ、50 分間常温で攪拌した。これに 0 でプロム 2.06 ml (40 mmole) をゆっくり滴加した。得られた混合物を常温で 24 時間攪拌した。反応液に水 200 ml を添加し、70 ~ 80 で 1.5 時間加熱攪拌した。

50

反応混合物を減圧濾過し、濾過液を 0 でアンモニウム溶液を添加して pH を 6 に調整し、減圧濾過し、固体を乾燥した。

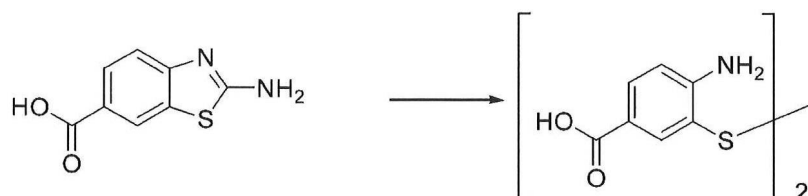
【0237】

(3) [化学式 15 - c] で表される化合物の合成

下記 [反応式 15 - 3] によって [化学式 15 - c] で表される化合物を合成した。

【0238】

【化 5 3】



10

【0239】

水酸化カリウム 20 g を水 60 ml に入れ、30 分間常温で攪拌した。これに前記 [反応式 15 - 2] から得た [化学式 15 - b] で表される化合物 9.4 g を添加し、光を遮断した状態で 120 で 24 時間還流攪拌した。得られた混合物に塩酸を添加して pH を 4 に調整し、濾過した。固体を水で複数回洗浄した後、乾燥させた。

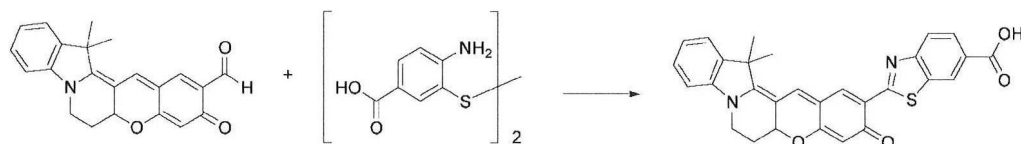
【0240】

(4) [化学式 5 1] で表される化合物の合成

下記 [反応式 15 - 4] によって [化学式 5 1] で表される化合物を合成した。

【0241】

【化 5 4】



【0242】

前記 [反応式 15 - 1] によって得た [化学式 15 - a] で表される化合物 0.2 g (0.58 mmol)、[反応式 15 - 3] によって得た [化学式 15 - c] で表される化合物 0.69 g (0.69 mmol)、及び p - トルエンスルホン酸 0.011 g (0.058 mmol) を、ジメチルホルムアミドに入れ、80 ~ 90 で 24 時間加熱攪拌した。反応終了後、水を添加し、減圧濾過し、水で複数回洗浄した後、乾燥させた。

30

【0243】

^1H NMR (400 MHz, DMSO) : δ = 12.85 (1H, s), 8.78 (1H, s), 8.74 (1H, s), 8.04 (1H, m), 7.80 (1H, q), 7.57 (1H, m), 7.44 (1H, d), 7.08 (1H, d), 6.59 (1H, s), 5.44 (1H, q), 4.68 (1H, q), 4.23 (1H, m), 2.78 (1H, m), 2.26 (1H, m), 1.78 (6H, d)

40

【0244】

合成例 16 : [化学式 5 2] で表される化合物の合成

(1) [化学式 16 - a] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 1] によって [化学式 16 - a] で表される化合物を合成した。

【0245】

【化 5 5】



【0 2 4 6】

4 - アミノフェニル酢酸 15 . 1 g (0 . 1 m o l e) と炭酸ナトリウム 10 . 5 g (0 . 1 m o l) を水 120 m l に入れ、10 分間攪拌した。これに、ナトリウムニトリル 6 . 9 g (0 . 1 m o l e) を溶解させた水 30 m l にゆっくり滴加した。熱が開放され、泡を発した。10 分間攪拌した後、塩酸 140 m l をゆっくり滴加し、30 分間攪拌した。塩化スズ二水和物 45 . 1 g (0 . 2 m o l e) を溶解させた塩酸をゆっくり滴加した後、常温で攪拌した。反応終了後、反応混合物を減圧濾過し、冷水とエタノールで洗浄した (22 g)。

10

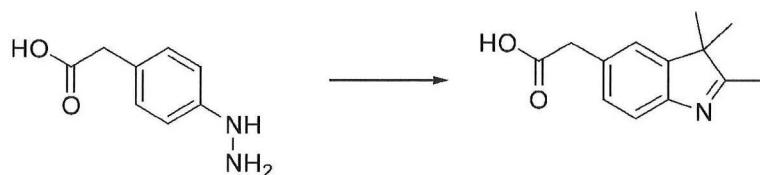
【0 2 4 7】

(2) [化学式 16 - b] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 2] によって [化学式 16 - b] で表される化合物を合成した。

【0 2 4 8】

【化 5 6】



20

【0 2 4 9】

前記 [反応式 15 - 1] によって得た [化学式 15 - a] で表される化合物 22 g (0 . 132 m o l e) を酢酸 220 m l に入れ、攪拌した。これ物に 3 - メチル - 2 - ブタノン 27 . 4 g (0 . 318 m o l e) を添加し、30 分間常温で攪拌した。還流攪拌は完全に溶解するまで続けた。反応液を常温に冷却し、塩化メチレンと水を用いて抽出した。減圧濃縮後、乾燥した (褐色固体 10 g)。

30

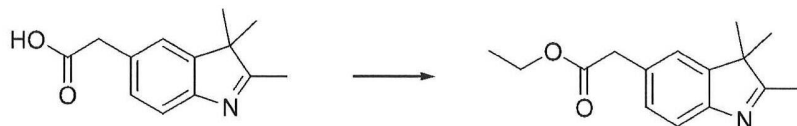
【0 2 5 0】

(3) [化学式 16 - c] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 3] によって [化学式 16 - c] で表される化合物を合成した。

【0 2 5 1】

【化 5 7】



【0 2 5 2】

0 に冷却したエタノール 100 m l に塩化チオニル 7 m l をゆっくり滴加し、10 分間攪拌した。これに前記 [反応式 15 - 1] によって得た [化学式 15 - 1 a] で表される化合物 10 g (0 . 05 m o l e) を溶解させたエタノールをゆっくり滴加し、常温で攪拌した。減圧濃縮後、乾燥した (紫色液状 13 g)。

40

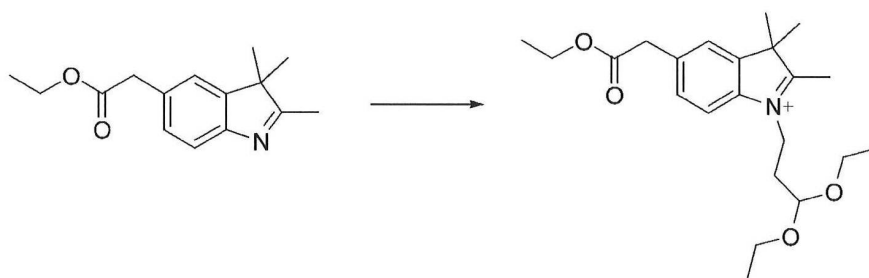
【0 2 5 3】

(4) [化学式 16 - d] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 4] によって、前記 [反応式 8 - 3] と同様の方法で [化学式 16 - d] で表される化合物を合成した。

【0 2 5 4】

【化 5 8】



【 0 2 5 5】

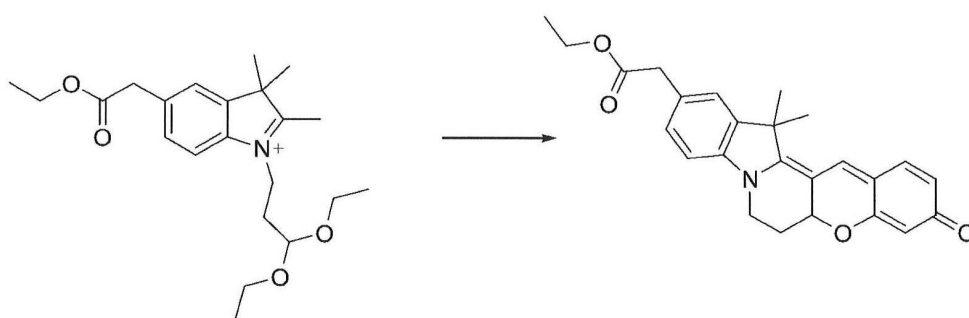
10

(4) [化学式 16 - e] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 5] によって、前記 [反応式 8 - 4] と同様の方法で [化学式 16 - e] で表される化合物を合成した。

【 0 2 5 6】

【化 5 9】



20

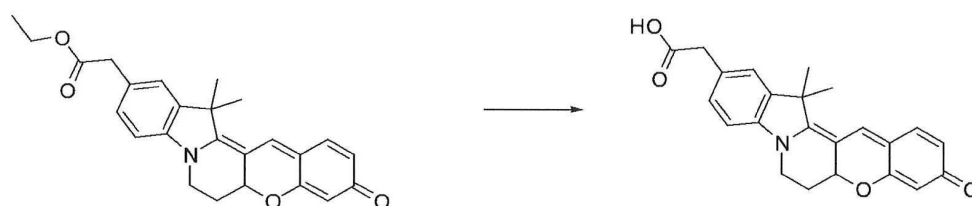
【 0 2 5 7】

(5) [化学式 52] で表される化合物の合成

下記 [反応式 16 - 6] によって [化学式 52] で表される化合物を合成した。

【 0 2 5 8】

【化 6 0】



30

【 0 2 5 9】

前記 [反応式 16 - 5] によって得た [化学式 16 - e] で表される化合物 0.6 g (1 mmol) を、メタノール、テトラヒドロフラン、水がそれぞれ 11 ml ずつ混合されている溶媒に入れ、攪拌した。これに水酸化リチウム水和物 3.8 g (9 mmol) を添加し、24 時間攪拌した。そして、1 N 塩酸水溶液を用いて pH 4 以下に調整し、塩化メチレンを用いて抽出した。抽出物を減圧蒸留した後、シリカカラムで精製した (0.5 g)。

40

【 0 2 6 0】

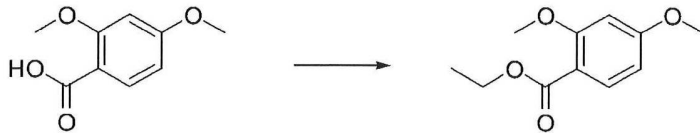
合成例 17: [化学式 53] で表される化合物の合成

(1) [化学式 17 - a] で表される化合物の合成

下記 [反応式 17 - 1] によって、前記 [反応式 16 - 3] と同様の方法で [化学式 17 - a] で表される化合物を合成した。

【 0 2 6 1】

【化 6 1】



【 0 2 6 2】

(2) [化学式 1 7 - b] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 2] によって [化学式 1 7 - b] で表される化合物を合成した。

【 0 2 6 3】

【化 6 2】



【 0 2 6 4】

塩化ホスホリル 4 . 0 1 m l (2 6 m m o l e) にジメトキシホルムアミド 4 . 7 8 m l (6 5 . 4 m m o l e) をゆっくり滴下し、常温で 2 時間攪拌した。これに前記 [反応式 1 7 - 1] によって得た [化学式 1 7 - a] で表される化合物 5 g (2 4 m m o l e) を溶解させたジメトキシホルムアミド 1 2 . 5 m l をゆっくり滴加し、2 4 時間攪拌した。反応液を過量の水にゆっくり滴加した。析出された固体を減圧濾過し、シリカカラムで精製した。

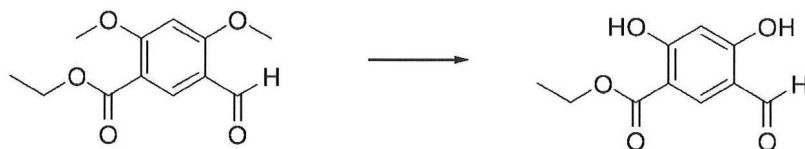
【 0 2 6 5】

(3) [化学式 1 7 - c] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 3] によって [化学式 1 7 - c] で表される化合物を合成した。

【 0 2 6 6】

【化 6 3】



【 0 2 6 7】

前記 [反応式 1 7 - 2] から得た [化学式 1 7 - b] で表される化合物 8 g (3 4 m m o l e) をジクロロメタン 2 0 0 m l に入れ、攪拌した。これに塩化アルミニウム 1 3 . 4 4 g (1 0 1 m m o l e) をゆっくり滴加し、4 0 で 2 4 時間加熱攪拌した。常温に冷却した後、6 N 塩酸水溶液 1 0 0 m l を滴加し、抽出し、シリカカラムで精製した (4 . 3 g , 5 9 %) 。

【 0 2 6 8】

(4) [化学式 1 7 - d] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 4] によって、前記 [反応式 1 6 - 6] と同様の方法で [化学式 1 7 - d] で表される化合物を合成した。

【 0 2 6 9】

【化 6 4】



【 0 2 7 0】

(5) [化学式 1 7 - e] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 5] によって、前記 [反応式 9 - 3] と同様の方法で [化学式 1 7

10

20

30

40

50

- e] で表される化合物を合成した。

【 0 2 7 1 】

【 化 6 5 】



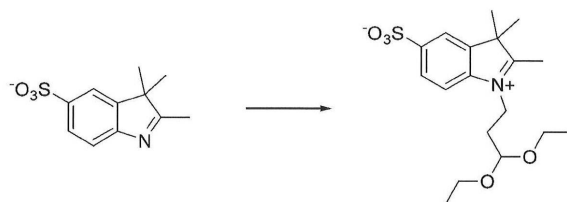
【 0 2 7 2 】

(6) [化学式 1 7 - f] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 6] によって、前記 [反応式 9 - 4] と同様の方法で [化学式 1 7 - f] で表される化合物を合成した。 10

【 0 2 7 3 】

【 化 6 6 】



【 0 2 7 4 】

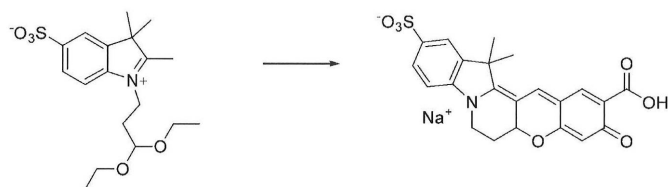
20

(7) [化学式 5 3] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 7 - 7] によって、前記 [反応式 8 - 4] と同様の方法で [化学式 5 3] で表される化合物を合成した。

【 0 2 7 5 】

【 化 6 7 】



30

【 0 2 7 6 】

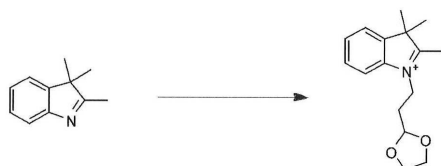
合成例 1 8 : [化学式 9 7] で表される化合物の合成

(1) [化学式 1 8 - a] で表される化合物の合成

下記 [反応式 1 8 - 1] によって [化学式 1 8 - a] で表される化合物を合成した。

【 0 2 7 7 】

【 化 6 8 】



40

【 0 2 7 8 】

2 - (2 - ブロモエチル) - 1 , 3 - ジオキソラン (2 2 m L 、 0 . 1 8 8 m o l) とヨウ化カリウム (6 3 g 、 0 . 3 7 6 m o l) をアセトニトリル 3 0 0 m l に入れ、50 で 1 時間攪拌した。これに 2 , 3 , 3 - トリエチルインドレニン (3 0 g 、 0 . 1 8 8 m o l) を滴加した後、1 2 時間還流攪拌した。冷却後、固体を濾過し、濾過された溶液を減圧蒸留し、シリカカラムで精製した (2 5 g 、 3 4 %) 。

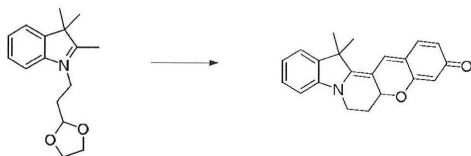
【 0 2 7 9 】

(2) 下記 [反応式 1 8 - 2] によって [化学式 9 7] で表される化合物を合成した 50

。

【0280】

【化69】



【0281】

前記〔反応式18-1〕によって得た〔化学式18-a〕で表される化合物（5 g、1.3 mmol）と2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド（1.8 g、1.3 mmol）をエタノール10 mlに入れ、3時間還流撹拌した。これを常温に冷却して減圧蒸留した後、シリカカラムで精製した。精製した物質にクロロホルム500 mlと50%硫酸水溶液100 mlを入れ、常温で20分間撹拌した。2 N水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7～8に調整し、塩化メチレンで抽出した。減圧蒸留後、シリカカラムで精製した。

10

【0282】

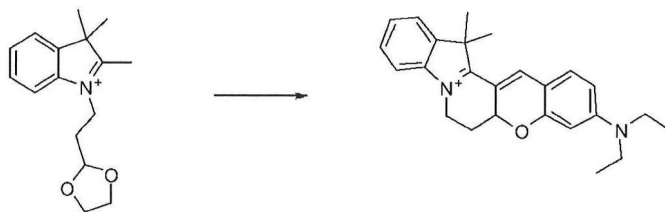
合成例19：〔化学式98〕で表される化合物の合成

下記〔反応式18-3〕によって〔化学式98〕で表される化合物を合成した。

【0283】

【化70】

20



【0284】

前記〔反応式18-1〕によって得た〔化学式18-a〕で表される化合物（1 g、4 mmol）と4-ジメチルアミノサリチルアルデヒド（0.7 g、4 mmol）をエタノール10 mlに入れ、2時間還流撹拌した。これを常温に冷却して減圧蒸留した後、シリカカラムで精製した。精製した物質にクロロホルム100 mlと50%硫酸水溶液10 mlを入れ、常温で20分間撹拌した。2 N水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7～8に調整し、塩化メチレンで抽出した。減圧蒸留した後、シリカカラムで精製した。

30

【0285】

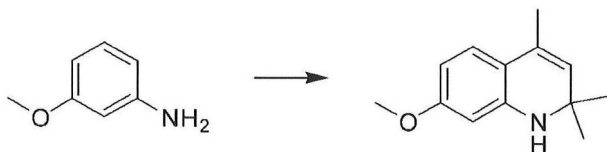
合成例20：〔化学式105〕で表される化合物の合成

（1）Chem. Eur. J. 2012, 18, 16196-16202に記載された合成方法により、下記〔反応式20-1〕によって〔化学式20-a〕で表される化合物を合成した。

【0286】

【化71】

40



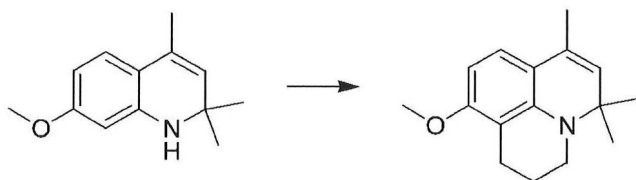
【0287】

（2）Chem. Eur. J. 2010, 16, 158-166に記載された合成方法により、下記〔反応式20-2〕によって〔化学式20-b〕で表される化合物を合成した。

【0288】

50

【化 7 2】



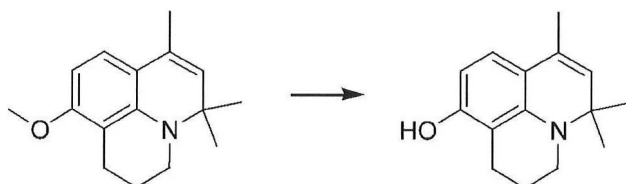
【 0 2 8 9】

(3) Chem. Eur. J. 2010, 16, 158 - 166 に記載された合成方法により、下記 [反応式 20 - 3] によって [化学式 20 - c] で表される化合物を合成した。

10

【 0 2 9 0】

【化 7 3】



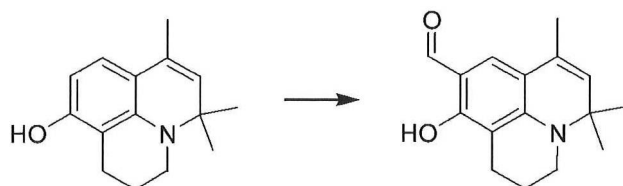
【 0 2 9 1】

(4) 下記 [反応式 20 - 4] によって [化学式 20 - d] で表される化合物を合成した。

20

【 0 2 9 2】

【化 7 4】



【 0 2 9 3】

反応器にて、N - ジメチルホルムアミドを 0 に冷却したオキシ塩化リンに滴加した。これを 10 分間攪拌し、[化学式 4 - c] で表される化合物を N - ジメチルホルムアミドに希釈して滴加した。50 で 12 時間反応させた後、常温に冷却した。反応物を氷水に注ぎ、1 M 水酸化ナトリウム水溶液で中和した後、酢酸エチルで抽出した。溶液を減圧濃縮し、シリカカラムで精製した。

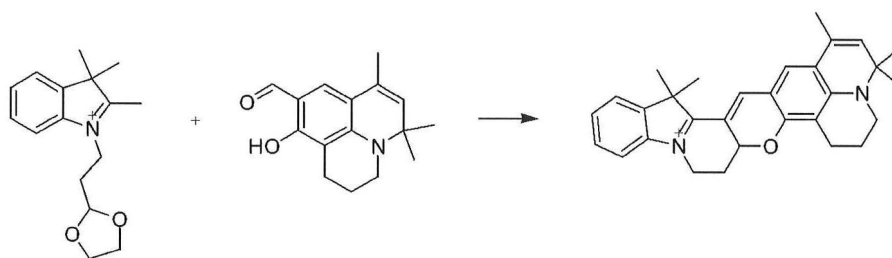
30

【 0 2 9 4】

(5) 下記 [反応式 20 - 5] によって [化学式 105] で表される化合物を合成した。

【 0 2 9 5】

【化 7 5】



40

【 0 2 9 6】

反応器にて、[化学式 20 - a] で表される化合物 (3 g、0.0115 mol) とエタノール 30 ml を入れ、40 で攪拌した。[化学式 4 - d] で表される化合物 (2.88 g、0.0112 mol) をエタノールに希釈して反応物に投入し、12 時間還流攪拌した。常温に冷却し、減圧濃縮した。反応物をクロロホルム 300 ml に希釈した後

50

、50%硫酸水溶液30mlを常温で滴加し、2時間反応させた。1M水酸化ナトリウム水溶液で中和し、塩化メチレンで抽出した。減圧濃縮した後、カラムで精製した(0.8g、16%)。

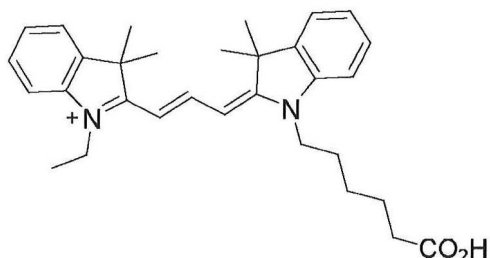
【0297】

実験例1

本発明に係る[化学式1]～[化学式7]の化合物に対して、吸収スペクトル(λ_{abs})、発光スペクトル(λ_{em})、モル吸光係数(ϵ)及び量子効率を測定した。測定結果を下記表1に示す。

【0298】

【化76】



【0299】

【表1】

区分	溶媒	$\lambda_{abs}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	Q.Y.
比較化合物		548	562	150,000	0.04
化学式1	DMSO	584	617	66,000	0.91
化学式2	DMSO	597	623	71,500	0.94
化学式3	DMSO	595	624	64,000	0.87
化学式4	DMSO	584	614	76,000	0.81
化学式5	DMSO	617	659	65,000	0.56
化学式6	DMSO	579	612	12,800	0.72
化学式7	DMSO	584	615	60,000	1.00

【0300】

実験例2

Alexa Fluor(登録商標)568(ThermoFisher社製)と本発明に係る[化学式1]の化合物に対して、それぞれGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収(Absorption)スペクトル及び蛍光発光(Fluorescence Emission)スペクトルを確認した。

【0301】

図1Aは、[化学式1]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルであり、図1Bは、Alexa Fluor(登録商標)568をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の吸収スペクトルであり、図1Cは、[化学式1]の化合物をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光スペクトルであり、図1Dは、Alexa Fluor(登録商標)568をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の蛍光発光スペクトルである。

【0302】

本発明に係る[化学式1]の化合物は、Alexa Fluor(登録商標)568の吸収波長と類似し、Alexa Fluor(登録商標)568よりも凝集(aggregation)の発生が少ないことを確認することができ、Alexa Fluor(登録商標)568よりも蛍光発光強度もまたさらに大きいことが確認できた。

【0303】

実験例3

1. Goat Anti-Mouse IgGを0.1M重炭酸ナトリウムバッファー(sodium bicarbonate buffer)で希釈して、1mg/mlの

タンパク質溶液 (protein solution) を調製した。

【0304】

2. 5個のチューブを準備し、各チューブに125 μlずつタンパク質溶液を入れた。

【0305】

3. Dye solution (5 mg/ml) を1、2、3、4、5 μlずつ、準備されたチューブに入れ、ボルテックス (vortex) させた。

【0306】

4. チューブを常温でロッカー (locker) 内で約30分間振とうした。

【0307】

5. Amicon 遠心分離フィルター (centrifuge filter) に反応溶液を入れた。 10

【0308】

6. 遠心分離で free dye が除去されるまで PBS で洗浄した (14,000 rpm、10分、5回)。

【0309】

7. Amicon tube に遠心分離フィルターを逆さに結合した後、濾液を回収した (1,000 rpm、2分)。

【0310】

8. PBS 1 ml で希釈させた。

【0311】

9. マイクロプレートリーダー (microplate reader) で UV、PL 及び蛍光を測定した。 20

【0312】

標識 (labeling) 後、280 nm における色素 (Dye) の吸光度の値及びタンパク質の吸光度の値を測定し、以下の式を用いて各サンプル中のタンパク質に対する色素の比率を決定した。

【0313】

【数1】

$$\frac{D}{P} = \frac{A_{\text{dye}} \times E_{\text{prot}}}{(A_{280} - X A_{\text{dye}}) \times E_{\text{dye}}}$$

30

【0314】

分母の因子 X は、色素の最大吸光度 (A_{dye}) 及び前記最大吸光度の a % に対応する 280 nm での色素の吸光度を考慮したものである。

【0315】

図1Eは、本発明に係る[化学式1]の化合物及び Alexa Fluor (登録商標) 568 を Goat Anti-Mouse IgG で標識した後の輝度 (brightness) を確認した結果であり、本発明に係る[化学式1]の化合物は Alexa Fluor (登録商標) 568 よりも輝度が高いことが確認できた。

【0316】

実験例4

1. IgG from Mouse Serum (primary) をコーティングバッファー (coating buffer) に溶解して 10 μg/ml の濃度とした。

【0317】

2. FLISA H/B black corning plate に 100 μl ずつウェル (well) に分注した。

【0318】

3. トップシーリング (Top sealing) 後、常温暗所で2時間インキュベーション (Incubation) した。

【0319】

50

4．ウォッシングバッファー (W a s h i n g b u f f e r) を 3 0 0 μ l ずつウェル (w e l l) に入れ、3 回洗浄 (w a s h i n g) した。

【 0 3 2 0 】

5．ブロッキングバッファー (b l o c k i n g b u f f e r) を 3 0 0 μ l ずつウェル (w e l l) に入れ、トップシーリング後、常温暗所で 1 時間インキュベーションした。

【 0 3 2 1 】

6．ブロッキングバッファーを除去した後、ウォッシングバッファーで 3 回洗浄した。

【 0 3 2 2 】

7．色素結合 (D y e - c o n j u g a t i o n) された 2 次抗体 (s e c o n d a r y a n t i b o d y) (1 0 μ u / m l) を 1 0 0 μ l ずつ各ウェルに入れ、トップシーリング後、常温暗所で 1 時間インキュベーションした。

【 0 3 2 3 】

8．溶液の除去後、ウォッシングバッファーを 2 0 0 μ l ずつ各ウェルに入れ、5 回洗浄した。

【 0 3 2 4 】

9．サンプルが入っているウェルに P B S を 1 0 0 μ l ずつ入れた。

【 0 3 2 5 】

1 0．マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。

【 0 3 2 6 】

下記表 2 は、本発明に係る [化学式 1] の化合物と A l e x a F l u o r (登録商標) 5 6 8 に対する D / P 比 (D / P r a t i o) における蛍光測定値を示したものであり、図 1 F は、[化学式 1] の化合物と A l e x a F l u o r (登録商標) 5 6 8 の生体活性 (b i o a c t i v i t y) を比較確認したグラフである。

【 0 3 2 7 】

【表 2】

化学式 1		Alexa Fluor (登録商標) 568	
D/P ratio	Fluorescence	D/P ratio	fluorescence
2.202771	104.026	2.12797	72.0106
4.888795	127.5422	5.465357	68.00017
8.141409	95.40485	7.760384	60.15061
11.30465	91.8519	9.118983	52.02349
12.45994	75.09808	9.673626	41.4303

【 0 3 2 8 】

前記表 2 及び図 1 F に示したように、本発明に係る [化学式 1] の化合物は、D / P 比が ~ 4 . 8 であるとき、D y e - 2 次抗体が 1 次抗体に結合される効率が最も大きいことが確認でき、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 6 8 よりも輝度値が高くて遥かに明るく、生体内の作用活性がさらに優れていることが確認できた。

【 0 3 2 9 】

実験例 5

A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 (T h e r m o F i s h e r 社製) 及び本発明に係る [化学式 3] の化合物に対して、それぞれ G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の吸収スペクトル及び蛍光発光スペクトルを確認した。

【 0 3 3 0 】

図 2 A は、[化学式 3] の化合物を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の吸収スペクトルであり、図 2 B は、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の吸収スペクトルであり、図 2 C は、[化学式 3] を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の蛍光発光スペクトルであり、図 2 D は、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 9 4 を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の蛍光発光スペクトルである。

【0331】

本発明に係る〔化学式3〕の化合物は、Alexa Fluor（登録商標）594の吸収波長と類似し、Alexa Fluor（登録商標）594よりも蛍光発光強度がさらに大きいことが確認できた。

【0332】

実験例6

本発明に係る〔化学式3〕の化合物に対して前記実験例3と同様に行った。

【0333】

図2Eは、本発明に係る〔化学式3〕の化合物及びAlexa Fluor（登録商標）594をGoat Anti-Mouse IgGで標識した後の輝度を確認した結果であって、本発明に係る〔化学式3〕の化合物がAlexa Fluor（登録商標）594よりも輝度が高く、D/P比が大きいほど、〔化学式3〕の化合物はAlexa Fluor（登録商標）594よりも輝度がさらに高いことが確認できた。

10

【0334】

実験例7

本発明に係る〔化学式3〕の化合物に対して前記実験例4と同様に行った。

【0335】

下記表3は、本発明に係る〔化学式3〕の化合物及びAlexa Fluor（登録商標）594に対するD/P比における蛍光測定値を示したものであり、図2Fは、〔化学式3〕の化合物とAlexa Fluor（登録商標）594の生体活性を比較確認したグラフである。

20

【0336】

【表3】

化学式3		Alexa Fluor（登録商標）594	
D/P ratio	fluorescence	D/P ratio	fluorescence
2.54	64.89	2.55	76.07
3.47	83.79	3.81	81.82
4.86	78.61	4.74	80.38
5.18	80.28	5.50	71.62
5.95	68.06	6.08	54.13

30

【0337】

前記表3及び図2Fに示したように、本発明に係る〔化学式3〕の化合物は、D/P比が～3.4であるとき、Dye-2次抗体が1次抗体に結合される効率が最も高いことを確認することができ、D/P比が5以上であるとき、Alexa Fluor（登録商標）594よりも輝度が遥かに高く、生体内の作用活性もさらに優れていることが確認できた。

【0338】

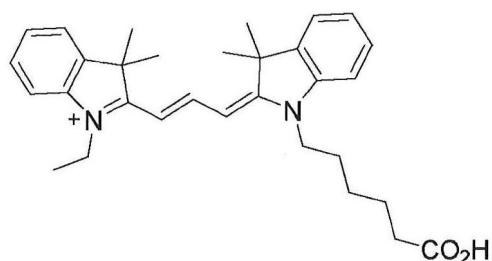
実験例8

本発明に係る〔化学式44〕～〔化学式53〕の化合物に対して、吸収スペクトル（ λ_{abs} ）、発光スペクトル（ λ_{em} ）、モル吸光係数及び量子効率を測定した。測定結果を下記表4に示す。

40

【0339】

【化77】



50

【 0 3 4 0 】

【 表 4 】

区分	溶媒	$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Quantum yield
比較化合物		548	562	150,000	0.04
化学式 44	PBS	544	568	51,000	0.72
化学式 45	DMSO	581	601	55,000	0.73
化学式 47	DMSO	559	580	49,000	0.45
化学式 48	DMSO	570	592	110,000	0.98
化学式 49	DMSO	490	574	28,000	0.35
化学式 50	DMSO	573	596	100,000	0.95
化学式 51	DMSO	595	621	78,800	0.75
化学式 52	PBS	541	564		0.61
化学式 53	DMSO	546	570	33,000	0.95

10

【 0 3 4 1 】

実験例 9

本発明に係る [化学式 5 0] の化合物に対して前記実験例 3 と同様に行った。

【 0 3 4 2 】

下記の図 3 A は、本発明に係る [化学式 5 0] の化合物を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の吸収スペクトルである。

【 0 3 4 3 】

図 3 B は、本発明に係る [化学式 5 0] の化合物及び A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 を G o a t A n t i - M o u s e I g G で標識した後の輝度を確認した結果であり、本発明に係る [化学式 5 0] の化合物が A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 よりも輝度が高いことが確認できた。

20

【 0 3 4 4 】

実験例 1 0

本発明に係る [化学式 5 0] の化合物に対して前記実験例 4 と同様に行った。

【 0 3 4 5 】

下記表 5 は、本発明に係る [化学式 5 0] の化合物及び A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 に対する D / P 比における蛍光測定値を示したものであり、図 3 C は、 [化学式 5 0] の化合物及び A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 の生体活性を比較

30

【 0 3 4 6 】

【 表 5 】

化学式 50	
D/P ratio	Fluorescence
1.995678	59.97054
2.536109	69.32306
3.981585	50.97775
4.954446	43.58956
5.593174	36.24333

40

【 0 3 4 7 】

前記表 5 及び図 3 C に示したように、本発明に係る [化学式 5 0] の化合物は、D / P 比が ~ 2 . 5 であるとき、D y e - 2 次抗体が 1 次抗体に結合される効率が最も高いことを確認することができ、A l e x a F l u o r (登録商標) 5 4 6 よりも輝度が遥かに高いことが確認できた。

【 0 3 4 8 】

実験例 1 1 : 本発明に係る化合物に対する光学特性の評価

本発明に係る染料化合物は、従来のシアニン染料化合物に比べて非常に高い蛍光量子効率を示す。下記表 6 に示すように、下記の比較化合物と比較して、モル吸光係数は低いが

50

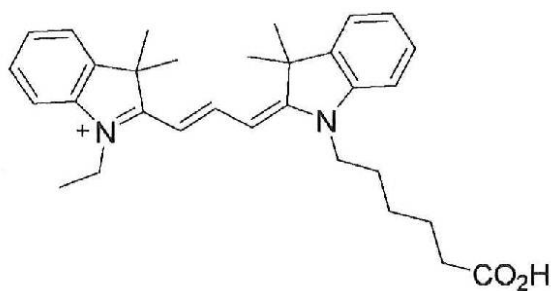
、蛍光量子収率は非常に高いため、（モル吸光係数×蛍光量子効率）の場合、比較化合物に比べて高かった。

【 0 3 4 9 】

本発明の色素化合物の２つの因子（モル吸光係数×蛍光量子収率）の積は、比較化合物よりも遥かに大きかった。

【 0 3 5 0 】

【 化 7 8 】



【 0 3 5 1 】

【表 6】

区分	溶媒	$\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	Quantum yield
化学式 97	PBS	541	565	14,000	0.63
	DMSO	551	568	35,000	0.94
	EtOH	555	567	47,000	0.90
化学式 98	PBS	565	595	57,000	0.51
	DMSO	570	601	57,000	0.77
	EtOH	570	596	64,000	0.78
化学式 99	PBS	463	558	30,000	0.42
	DMSO	467	563	21,000	0.65
	EtOH	474	558	22,000	0.52
化学式 100	PBS	589	608	54,000	0.80
	DMSO	594	618	65,000	0.90
	EtOH	592	612	75,000	0.90
化学式 101	PBS	578	619	49,000	0.61
	DMSO	584	630	54,000	0.70
	EtOH	585	623	66,000	0.87
化学式 102	PBS	524	571	7,100	0.70
	DMSO	570	586	23,000	0.99
	EtOH	557	578	6,800	0.78
化学式 103	PBS	516	563	48,000	0.79
	DMSO	566	586	108,000	0.88
	EtOH	547	574	70,000	0.84
化学式 104	PBS	559	572	28,000	0.09
	DMSO	646	685	52,000	0.38
化学式 105	PBS	604	643	35,000	0.28
	DMSO	613	649	37,000	0.70
	EtOH	611	645	44,000	0.50
化学式 106	PBS	616	652	29,000	0.21
	DMSO	620	660	55,000	0.72
	EtOH	620	657	70,000	0.59
化学式 107	PBS	624	655	37,000	0.29
	DMSO	629	664	40,000	0.70
	EtOH	628	659	50,000	0.52
化学式 108	PBS	630	651	74,000	0.37
	DMSO	627	650	64,000	0.52
化学式 109	PBS	559	582	47,000	0.46
	DMSO	569	590	73,000	0.93
化学式 110	PBS	550	579	37,000	0.78
	DMSO	561	597	37,000	0.86
	EtOH	558	584	50,000	0.80
化学式 111	PBS(pH7.4)	530	585	55,000	0.53
比較化合物		548	562	150,000	0.04

【0352】

実験例 12：本発明に係る化合物のミトコンドリア選択性

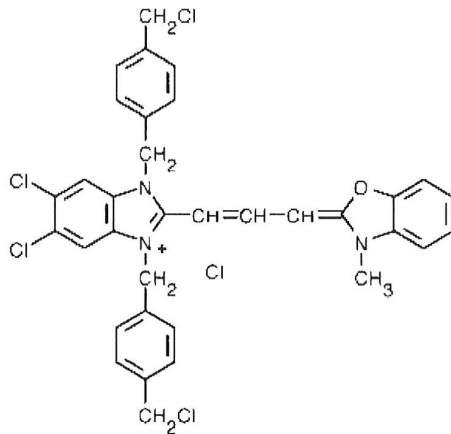
本発明に係る〔化学式 110〕の化合物がミトコンドリアに特異な選択性を示すかを確認するために、Raw 264.7 細胞を〔化学式 110〕の化合物及び市販のミトコンドリアマーカー（MTG、1 μM MitoTracker Green FM for Mitochondria）を用いて共局在化（Co-localization）させた。

【0353】

サーモフィッシャーサイエンティフィック（Thermo Fisher Scientific）社の MitoTracker Green FM の構造式は、以下の通りである。

【0354】

【化 7 9】



10

【0355】

OPM画像は、それぞれ560 - 600 nm (化学式110、 $\lambda_{ex} = 552$ nm) 及び470 - 520 nm (MTG、 $\lambda_{ex} = 488$ nm) で取得し、これらの画像を、それぞれ図4A及び図4Bに示した。また、図4Cは、図4Aと図4Bを重ね合わせた画像であり、ピアソンの共局在化効率を示す係数(A)は、LAS AFソフトウェアを用いて計算した。

[MTG] = 1 μ M for 30 min incubation、 $\lambda_{ex} = 488$ nm 20

[化学式110] = 1 μ M for 30 min incubation、 $\lambda_{ex} = 552$ nm

【0356】

その結果、MTGと[化学式110]の化合物を共に染色して、それぞれの画像を重ね合わせたとき、重複度Aは0.73であり、ミトコンドリアが主として染色されたことが確認された。これは、本発明に係る染料[化学式110]の化合物は細胞内の他のオルガネラ(小器官)よりもミトコンドリアを選択的に染色し、ミトコンドリアを正確に画像化できることが分かった。

【0357】

30

実験例13

本発明に係る[化学式110]の化合物1.0 μ Mで染色されたHeLa A431細胞の3つの領域(A, B, C)の蛍光強度を2秒間隔で3500秒間測定し、その結果を、図5に示した。

【0358】

図5に示したように、蛍光強度が1時間に渡ってほとんど減少せず、本発明に係る[化学式110]の化合物は光安定性が非常に優れていることが確認できた。

【0359】

実験例14：本発明に係る化合物のミトコンドリア選択性

本発明に係る[化学式97]の化合物がミトコンドリアに特異な選択性を示すかを確認するために、HeLa A431細胞を[化学式97]の化合物及び市販のミトコンドリアマーカー(MTG、0.2 μ M MitoTracker Green FM for Mitochondria)を用いて共局在化させた。

40

【0360】

OPM画像は、それぞれ571 - 650 nm (化学式97、 $\lambda_{ex} = 552$ nm) 及び498 - 540 nm (MTG、 $\lambda_{ex} = 488$ nm) で取得し、これらの画像を、それぞれの図6A及び図6Bに示した。また、図6Cは、図6Aと図6Bを重ね合わせた画像であり、ピアソンの共局在化効率を示す係数(A)は、LAS AFソフトウェアを用いて計算した。

【0361】

50

[MTG] = 0.2 μ M for 30 min incubation、 λ_{ex} = 488 nm

[化学式97] = 0.5 μ M for 30 min incubation、 λ_{ex} = 552 nm

その結果、MTGと[化学式97]を共に染色して、それぞれの画像を重ね合わせたとき、重複度Aは0.74であり、ミトコンドリアが主として染色されたことが確認された。これは、本発明に係る染料[化学式97]の化合物は細胞内の他のオルガネラよりもミトコンドリアを選択的に染色し、ミトコンドリアを正確に画像化できることが分かった。

【0362】

10

実験例15

本発明に係る[化学式98]の化合物1.0 μ Mで染色されたHeLa A431細胞の4つの領域(A, B, C, D)の蛍光強度を2秒間隔で3500秒間測定し、その結果を、図7に示した。

【0363】

図7に示したように、蛍光強度が1時間渡ってほとんど減少せず、本発明に係る[化学式98]は光安定性が非常に優れていることが確認できた。

【0364】

比較実験例

Cy3B 1.0 μ Mで染色されたHeLa A431細胞のA、Bの2つの部分の蛍光強度を2秒間隔で2000秒間測定し、その結果を、図8に示した。

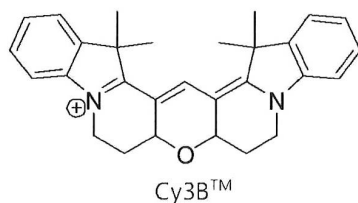
20

【0365】

図8に示したように、蛍光強度が1500秒の間に大きく減少したので、光安定性が非常に劣り、本発明に係る染料化合物に比べて光安定性が非常によくないことが分かった。

【0366】

【化80】



30

【0367】

実験例16及び17：本発明に係る化合物のpHプローブとしての特性確認

図9及び図10に示したように、本発明に係る[化学式111]の化合物は、酸性(Acidic)条件(pH1-6)で蛍光強度が増加し、塩基性(Basic)条件(pH9-12)で蛍光強度が減少するプローブタイプ(probe type)であり、酸性条件の細胞小器官に対する選択性が高いため、生細胞内で酸性オルガネラ(acidic organelles)を標識できることが分かった。一方、[化学式97]の化合物の場合には、酸性条件(pH1-6)で蛍光強度が減少し、塩基性条件(pH9-12)で蛍光強度が増加するプローブタイプであることが分かった。また、[化学式97]の化合物の吸収波長及び蛍光波長は、現在入手可能なレーザーライン(Laser line)(488 nm、532 nm、550 nm)によく一致する。

40

【0368】

すなわち、[化学式111]の化合物のpHプローブタイプは、pH2~6の間で強い蛍光を発し、[化学式97]の化合物のpHプローブタイプは、pH8~12の間で強い蛍光を発する。この2つのタイプの染料を活用して、使用目的に応じて選択して使用することができる。

【0369】

50

したがって、本発明に係る染料化合物は、pHの変化に応じて蛍光強度が変わる特徴を有しているため、この特性を用いて、生細胞(Live cell)のpHを測定できるpHプローブとしても使用可能である。また、生細胞の染色によってpHを測定する方法以外に、最近は、プレートリーダーを用いて細胞のpHを測定する方法が用いられており、本発明に係る染料化合物は、この方法にも用いることができ、pHを測定する様々な分野に適用することができる。

【0370】

実験例18

本発明に係る[化学式97]、[化学式100]～[化学式102]の化合物に対して光物理的特性を評価し、評価結果を下記表7に示した。全ての測定は、DMSO、エタノール及びPBS Bufferに対して行われた。また、二光子断面積(δ)は、フェムト秒単位(femtosecond、fs)の蛍光測定法を用いて測定した。

【0371】

また、図11は、PBS緩衝溶液及びエタノールでの本発明に係る[化学式97]、及び[化学式100]～[化学式102]の化合物の二光子活性スペクトルである。

【0372】

【表7】

区分	Solvent	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	$\lambda_{\max}^{\text{fl}}$	Φ	$e\Phi$	$\lambda_{\max}^{(2)\text{abs}}$	d	$d\Phi$
化学式97	Buffer	541	565	0.63	8820	920	35	22
	EtOH					720		14
	DMSO	551	567	0.94				
化学式102	Buffer	524	571	0.70	4970	910	60	42
	EtOH					750		7.6
	DMSO	570	586	1.00				
化学式100	Buffer	589	611	0.65	61750	740	272	177
	EtOH					750		114
	DMSO	594	618	0.90				
化学式101	Buffer	578	619	0.61	29890	740	89	54
	EtOH					720		54
	DMSO	584	630	0.70				

【0373】

$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$: 一光子吸収スペクトルの最大波長(単位: nm)

$\lambda_{\max}^{\text{fl}}$: 一光子放出スペクトルの最大波長(単位: nm)

Φ : 蛍光量子効率

$e\Phi$: モル吸光係数×蛍光量子効率

$\lambda_{\max}^{(2)\text{abs}}$: 二光子吸収スペクトルの最大波長(単位: nm)

d : $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{photon}$ での光子当たりのピーク二光子断面積(単位: GM)

$d\Phi$: 二光子作用断面積(two photon action cross-section)

【産業上の利用可能性】

【0374】

本発明に係る染料化合物は、従来のシアニン染料に比べて量子効率が著しく改善された効果を有し、より強い蛍光を発するので、光学画像が必要な様々な生物学的システムに対するプローブなどに広範囲な分野で有効に活用することができる。

【0375】

特に、ミトコンドリアを標識して追跡できるMitotrackerとして活用できるので、生体又は細胞組織でミトコンドリアを定量的に画像化することができ、また、生細胞のpHを測定できるpHプローブとしても適用することができる。

【 図 1 A 】

FIG.1A

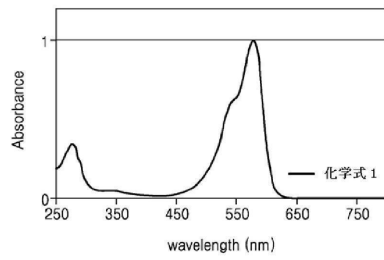


FIG.1B

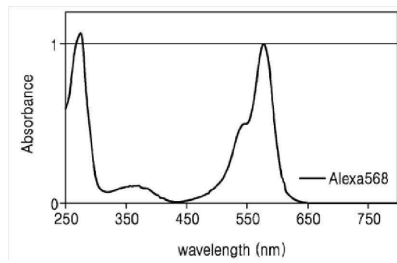
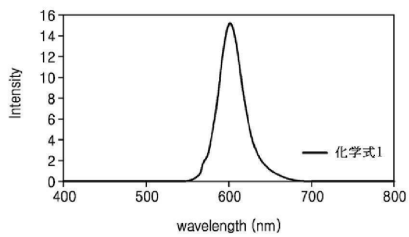


FIG.1C



【 図 1 D 】

FIG.1D

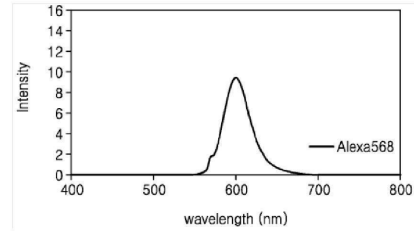


FIG.1E

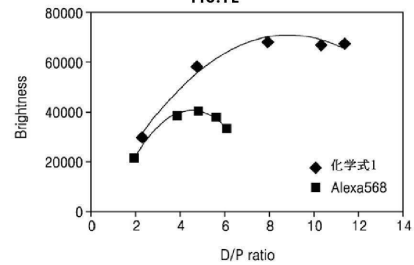
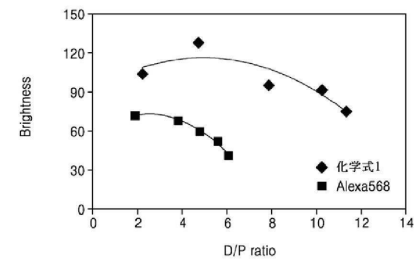


FIG.1F



【 図 2 A 】

FIG.2A

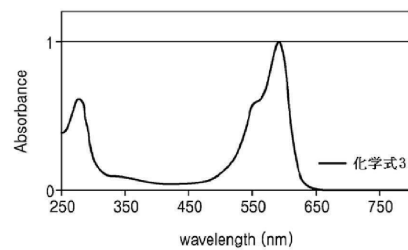


FIG.2B

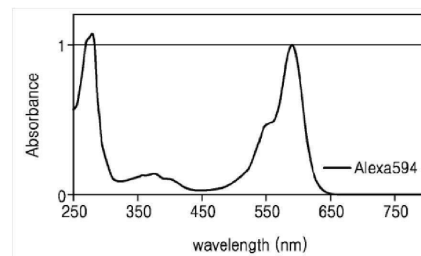
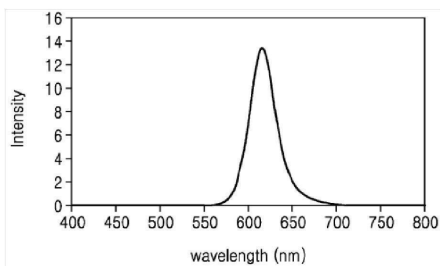


FIG.2C



【 図 2 D 】

FIG.2D

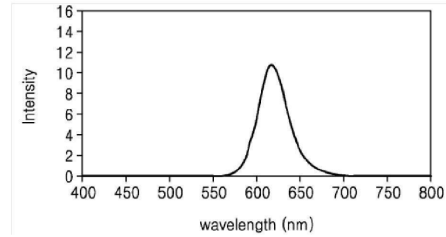


FIG.2E

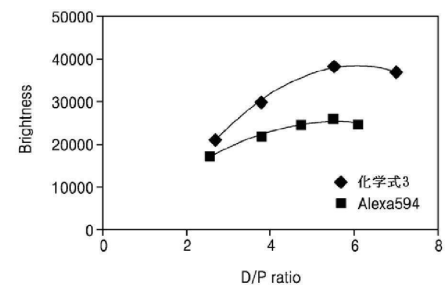
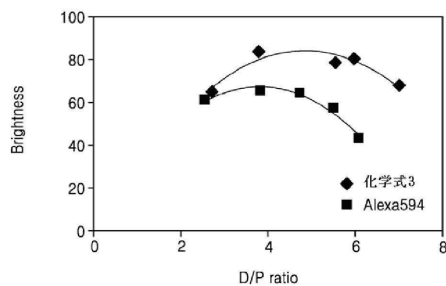
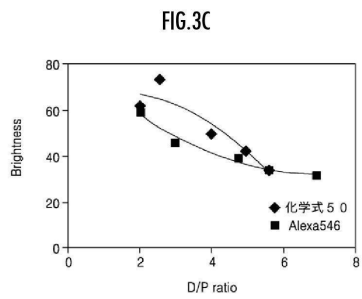
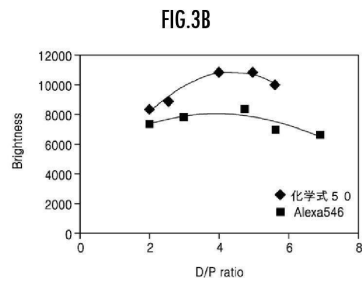
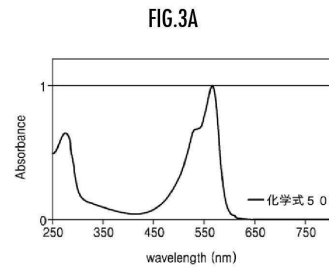


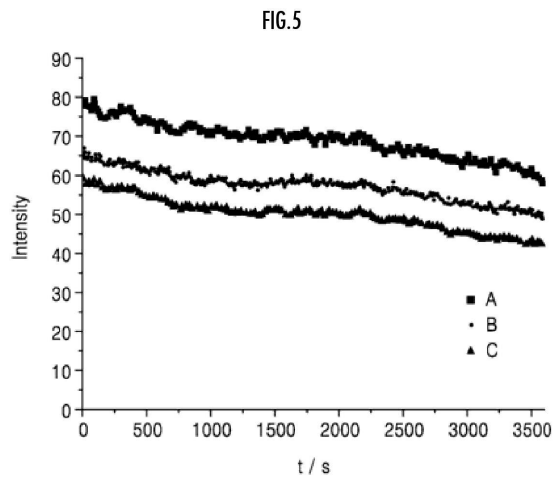
FIG.2F



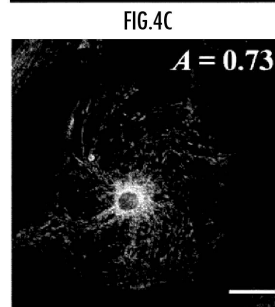
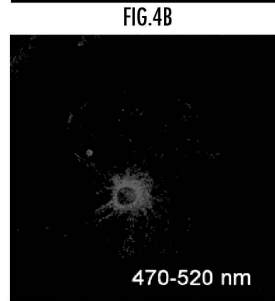
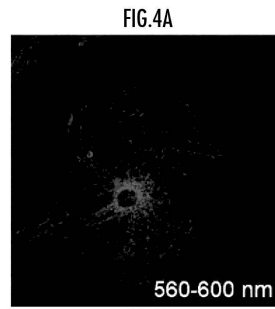
【 図 3 】



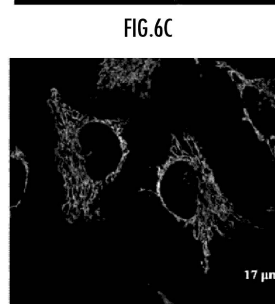
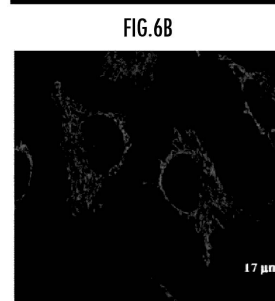
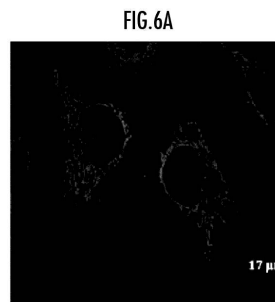
【 図 5 】



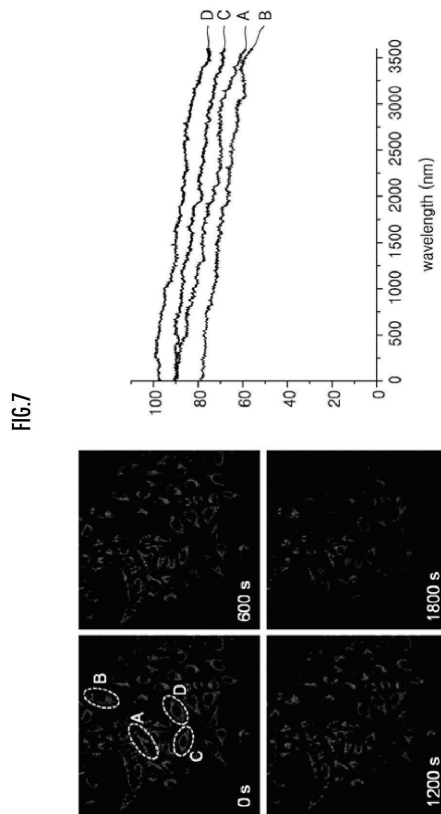
【 図 4 】



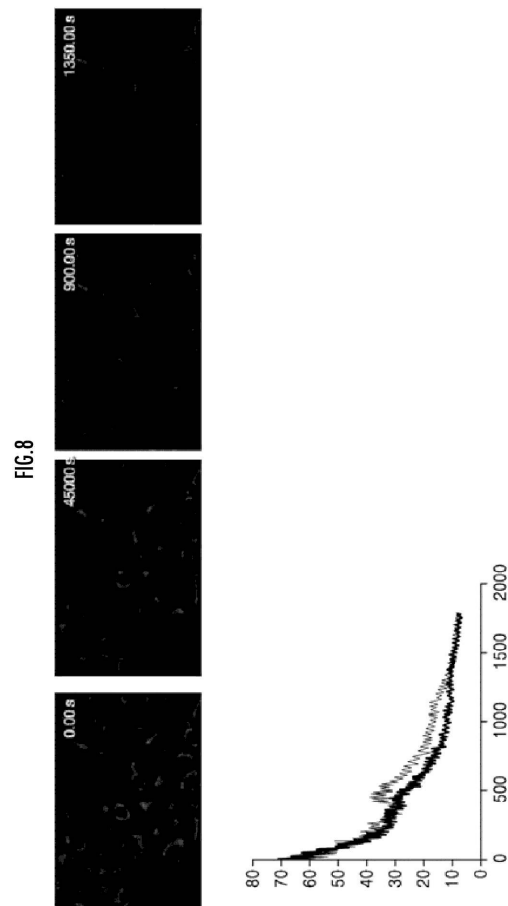
【 図 6 】



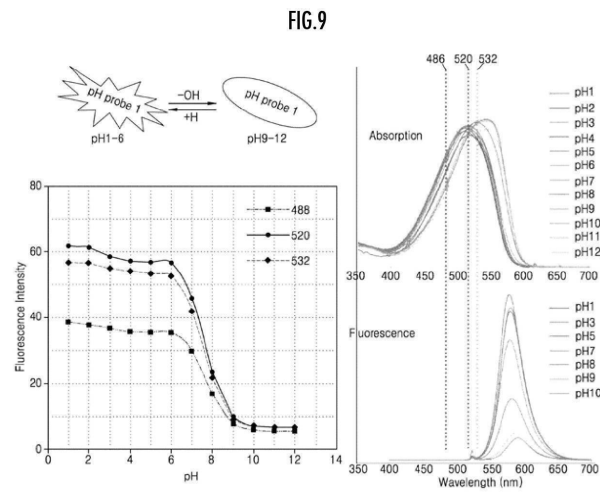
【 図 7 】



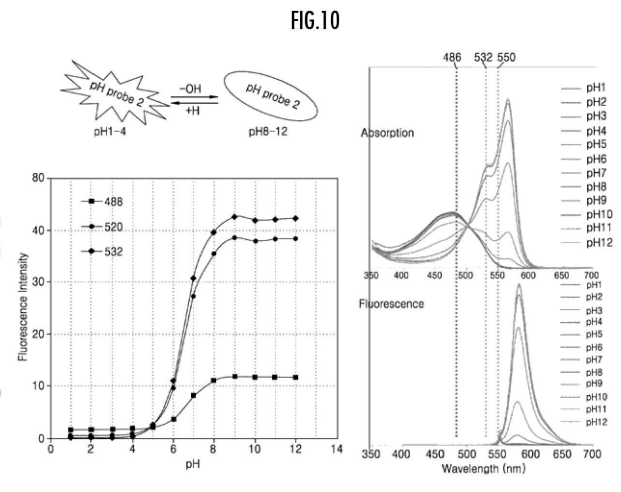
【 図 8 】



【 図 9 】

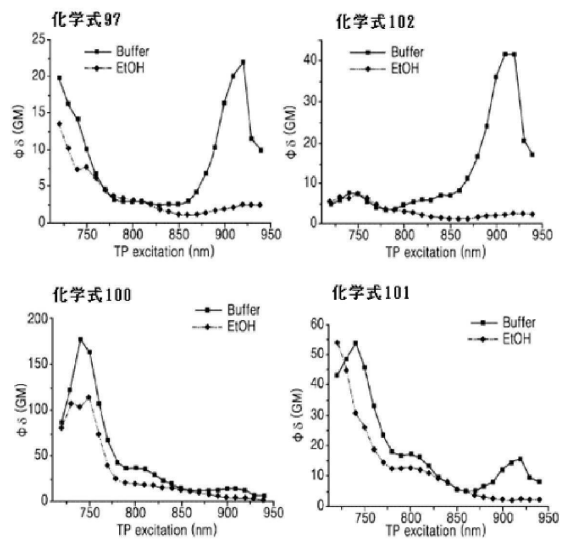


【 図 10 】



【図 11】

FIG.11



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 D 491/147	(2006.01)	C 0 7 D 491/147
C 0 7 D 513/14	(2006.01)	C 0 7 D 513/14
C 0 7 D 498/22	(2006.01)	C 0 7 D 498/22
C 0 7 D 471/14	(2006.01)	C 0 7 D 471/14 1 0 1
C 0 7 D 495/14	(2006.01)	C 0 7 D 495/14 F
C 0 7 D 495/22	(2006.01)	C 0 7 D 495/22
C 0 7 D 513/22	(2006.01)	C 0 7 D 513/22
C 0 7 D 517/14	(2006.01)	C 0 7 D 517/14

(31)優先権主張番号 10-2015-0100821

(32)優先日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

- (72)発明者 ミン, ソンギ
大韓民国 1 6 9 5 4 キョンギ - ド ヨンイン - シ キフン - グ フンドク 2 - ロ 6 5 ボン
- ギル 7 - 1 スイート 2 0 1
- (72)発明者 イ, スンス
大韓民国 3 5 3 1 4 テジョン ソ - グ カルマ - ロ 2 6 2 1 1 1 - 1 7 0 2
- (72)発明者 イ, ドミン
大韓民国 3 1 4 7 2 チュンチョンナム - ド アサン - シ ペバン - ウブ チャンジェ - ロ 2
4 ボン - ギル 3 - 4 スイート 4 0 1
- (72)発明者 パク, キョンファ
大韓民国 2 4 3 4 5 カンウォン - ド チュンチョン - シ コンジ - ロ 1 8 8 - 5 3
- (72)発明者 ファン, ムンチャン
大韓民国 5 1 1 7 0 キョンサンナム - ド チャンウォン - シ ウイチャン - グ トゲ - ロ 1
3 5 1 0 5 - 6 0 1
- (72)発明者 シン, ボンキ
大韓民国 5 6 2 0 8 チョルラブク - ト チョンウブ - シ ヨフン 2 - ギル 1 4 1 0 2 -
8 0 3
- (72)発明者 ジェ, ジョンタエ
大韓民国 2 8 7 7 3 チュンチョンブク - ド チョンジュ - シ サンダン - グ チュフン - ロ
7 1 1 0 6 - 8 0 1

審査官 横山 敏志

- (56)参考文献 特表2 0 0 3 - 5 2 5 3 0 7 (J P , A)
特表2 0 0 5 - 5 3 6 6 2 3 (J P , A)
特表2 0 0 2 - 5 0 8 4 2 8 (J P , A)
特開平0 7 - 1 9 6 9 3 0 (J P , A)
特開2 0 0 6 - 0 8 3 1 7 0 (J P , A)
特許第6 4 0 0 7 7 4 (J P , B 2)
Biophysical Journal , 1 9 8 9 年 , Vol.56 , pp.979-993

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
C 0 9 B , C 1 2 Q , G 0 1 N , C 0 7 D
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)