

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534774
(P2024-534774A)

(43)公表日 令和6年9月26日(2024.9.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 C	217/64 (2006.01)	C 0 7 C	217/64	C S P	2 G 0 4 3
C 0 9 K	11/06 (2006.01)	C 0 9 K	11/06		2 G 0 4 5
C 0 7 D	417/14 (2006.01)	C 0 9 K	11/06	6 1 5	4 H 0 0 6
C 0 7 D	519/00 (2006.01)	C 0 9 K	11/06	6 5 5	
C 0 7 D	421/14 (2006.01)	C 0 9 K	11/06	6 5 0	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全103頁) 最終頁に続く

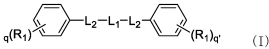
(21)出願番号	特願2024-508679(P2024-508679)	(71)出願人	509034605
(86)(22)出願日	令和4年8月16日(2022.8.16)		ナショナル ユニバーシティ オブ シン
(85)翻訳文提出日	令和6年4月11日(2024.4.11)		ガポール
(86)国際出願番号	PCT/SG2022/050582		シンガポール共和国 シンガポール 1 1
(87)国際公開番号	WO2023/022658		9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロー
(87)国際公開日	令和5年2月23日(2023.2.23)		ド 2 1
(31)優先権主張番号	10202108936X	(74)代理人	100115808
(32)優先日	令和3年8月16日(2021.8.16)		弁理士 加藤 真司
(33)優先権主張国・地域又は機関	シンガポール(SG)	(74)代理人	100113549
			弁理士 鈴木 守
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	230111590
	最終頁に続く		弁護士 金本 恵子
		(72)発明者	バザン ギレルモ カルロス
			シンガポール共和国 シンガポール 1 1
			9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞標識化のための供与体－受容体共役オリゴ電解質およびその使用

(57)【要約】

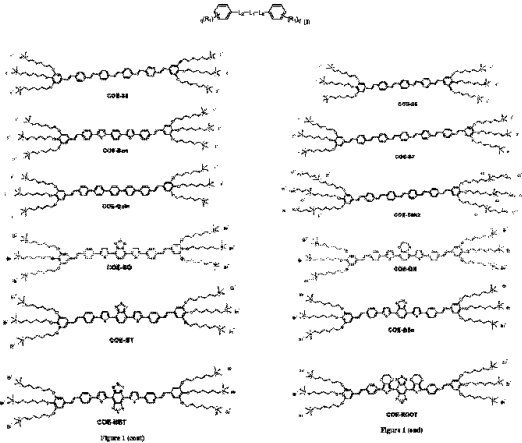
本開示は、式 (I) の化合物およびその使用方法に関する。

【化1】



式 (I) の化合物は、共役オリゴ電解質であり、細胞 および／または脂質ベシクルを標識化および／または検 出するための膜プローブとしての使用に好適であり、し たがってフローサイトメトリー用途に好適である。本開 示はまた、細胞および／または脂質ベシクルを検出およ び／または定量するためのフローシステムに関する。

【選択図】 図1

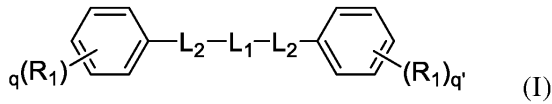


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物：

【化 1】



式中、

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

10

q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

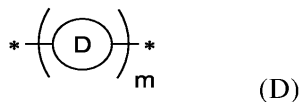
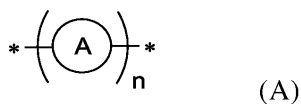
q' は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

各 L_2 は独立して、置換されていてもよいエチレンまたは置換されていてもよいフェニルエチレンから選択され；

20

L_1 は、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり：

【化 2】



30

式中、

各 A は独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

各 D は独立してアルケニレン、フェニレン、置換されていてもよい縮合アリーレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

n は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* は、別の単量体単位に対する、または L_2 に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D は互いに交替し合って結合しており；

40

式 (I) の化合物は実質的に直鎖状のトポロジーを示し；

L_1 はブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、およびポリフェニルアルケニレンではない。

【請求項 2】

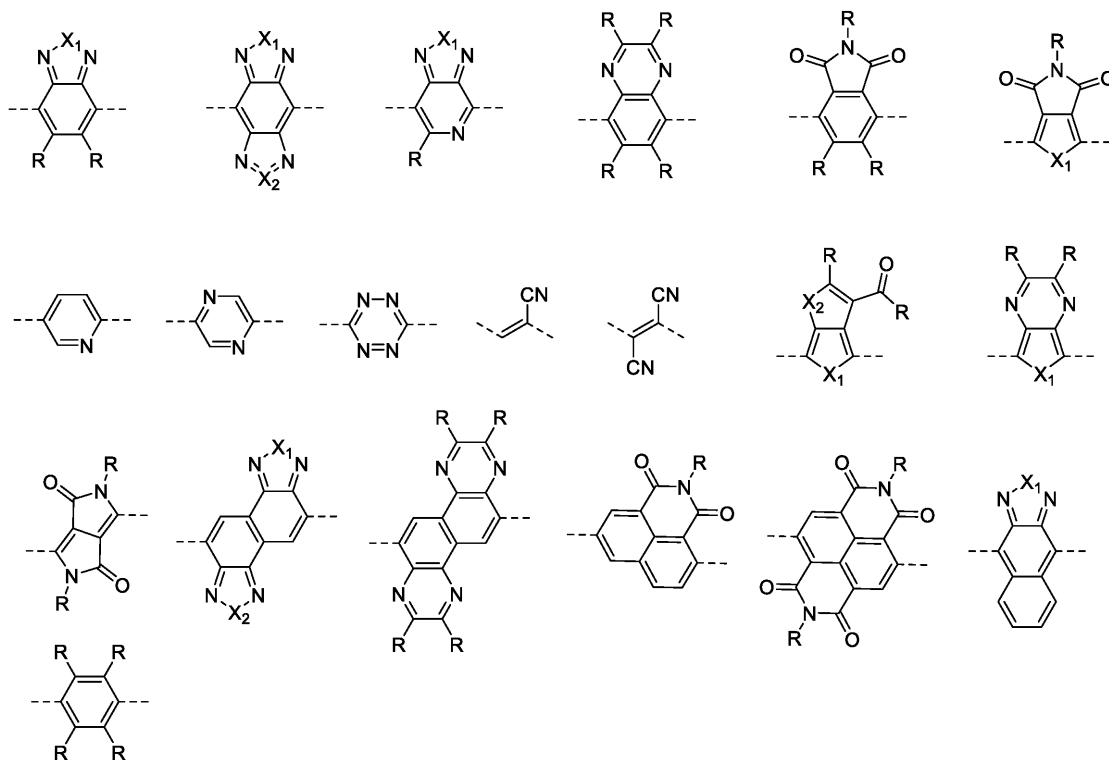
A が電子受容性部分である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

A が、

50

【化 3】



10

20

から選択され、式中、

【化 4】

が D に対する、または L₂ に対する結合を表し；各 X₁ が独立して C、O、N、S、および Se から選択され；各 X₂ が、存在する場合、独立して C、O、N、S、および Se から選択され；X₂ が存在する場合、X₁ および X₂ のうち少なくとも一方が O、N、または S であり；

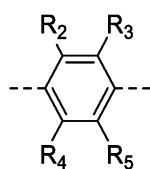
各 R が独立して H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

30

【請求項 4】

A が式 (I I) の部分であり：

【化 5】



(II)

40

式中、

【化 6】

が D に対する、または L₂ に対する結合を表し；

R₂、R₃、R₄、および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

50

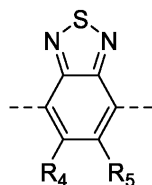
R₂ および R₃ が連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成するか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

A が、

【化 7】



10

であり、式中、R₄ および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

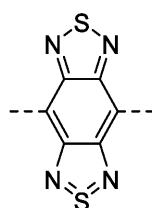
R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 6】

A が、

【化 8】



30

である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

D が電子供与性部分である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の化合物。

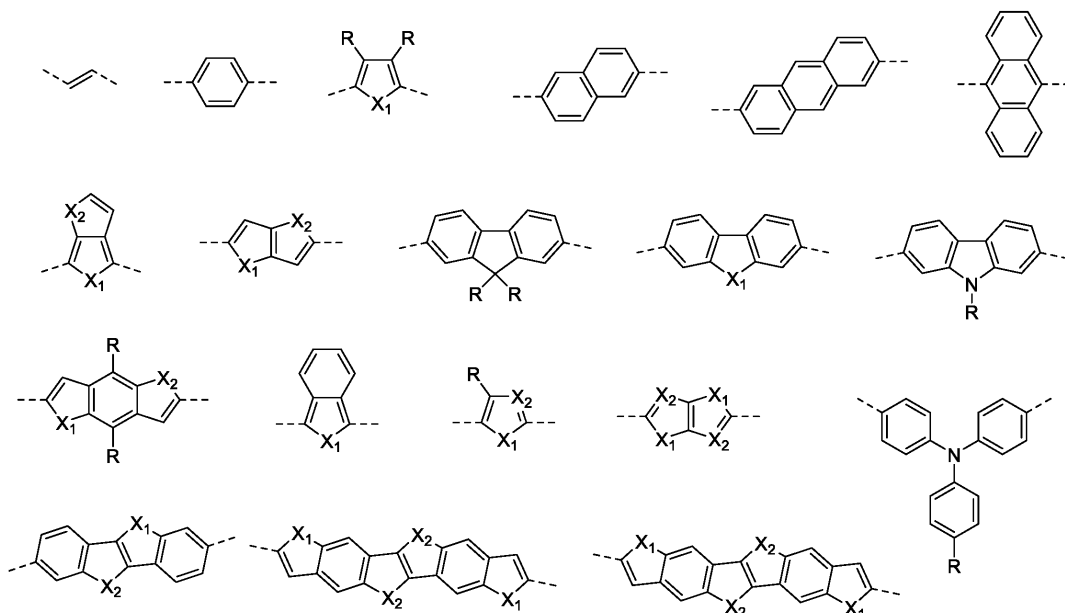
【請求項 8】

D が、

40

50

【化 9】



10

から選択される部分であり、式中、

20

【化 10】

が A に対する、または L₂ に対する結合を表し；各 X₁ が独立して C、O、N、S、および Se から選択され；各 X₂ が、存在する場合、独立して C、O、N、S、および Se から選択され；X₂ が存在する場合、X₁ および X₂ のうち少なくとも一方が O、N、または S であり；

各 R が独立して H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 9】

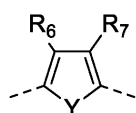
D が、置換されていてもよい 5 員ヘテロアリーレンである、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 10】

D が式 (III) の部分であり：

【化 11】



(III)

式中、Y が NR、O、または S であり；

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

40

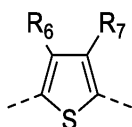
R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R が H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

50

D が、
【化 1 2】



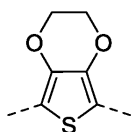
であり、式中、R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 1 2】

D が、
【化 1 3】



20

である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 3】

L₁ が、
【化 1 4】

-A-D-A-	*-D-A-D-*
-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-*
-A-D-A-D-A-	*-D-A-D-A-D-*
-A-D-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-D-A-*
-A-D-A-D-A-D-A-	*-D-A-D-A-D-A-D-*
-A-D-A-D-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-D-A-D-A-*

30

から選択される、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 4】

R₁ が独立して、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルコキシから選択される、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 5】

R₁ が独立してアルキルおよびアルコキシから選択され、それぞれアミノまたはアルキルアミノで置換されていてもよい、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 6】

R₁ が独立して、アミノまたはアルキルアミノで置換された C₃ ～ C₈ アルコキシである、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 1 7】

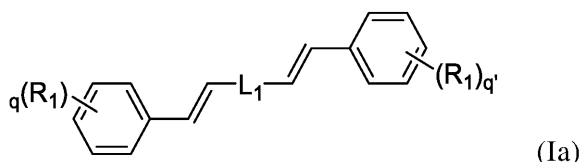
L₁ の任意選択の置換基が独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択される、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 8】

式 (I) の化合物が式 (I a) の化合物であり：

50

【化 1 5】



式中、

各 R_1 が独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

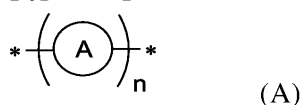
10

q が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

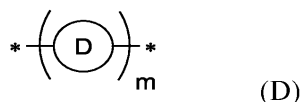
q' が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

L_1 が、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり；

【化 1 6】



20



式中、

各 A が独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

各 D が独立してアルケニレン、フェニレン、置換されていてもよい縮合アリーレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

30

n が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* が、別の単量体単位に対する、または L_2 に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D が互いに交替し合って結合しており；

式 (I) の化合物が実質的に直鎖状のトポロジーを示し；

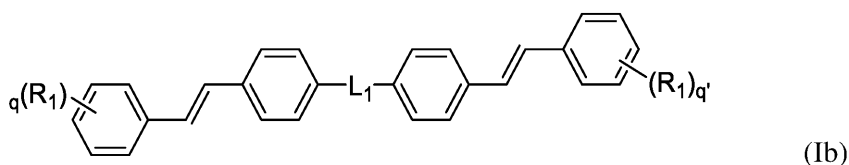
L_1 がブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、およびポリフェニルアルケニレンではない、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 9】

40

式 (I) の化合物が式 (I b) の化合物であり；

【化 1 7】



式中、

各 R_1 が独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換され

50

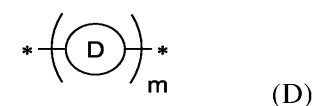
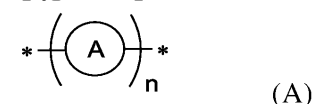
ていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

q が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

L₁ が、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり；

【化 1 8】



式中、

各 A が独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

各 D が独立してアルケニレン、フェニレン、置換されていてもよい縮合アリーレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

n が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* が、別の単量体単位に対する、または L₂ に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D が互いに交替し合って結合しており；

式 (I) の化合物が実質的に直鎖状のトポロジーを示し；

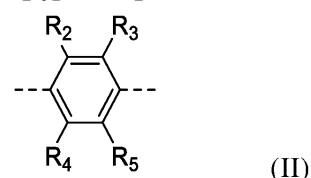
L₁ がブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、およびポリフェニルアルケニレンではない、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 20】

式 (I) の化合物が式 (I b) の化合物であり、式中、

A が式 (I I) の部分であり；

【化 1 9】



式中、

【化 2 0】

が D に対する、または L₂ に対する結合を表し；

R₂ および R₃ が連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリアルを形成し；

R₄ および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシか

10

20

30

40

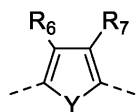
50

ら選択されるか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

D が式 (I I I) の部分であり：

【化 2 1】



(III)

10

式中、Y が N R、O、または S であり；

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

20

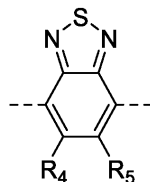
R が H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される、請求項 1 ～ 1 7 および 1 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2 1】

式 (I) の化合物が式 (I b) の化合物であり、式中、

A が、

【化 2 2】



30

であり、式中、

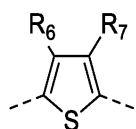
R₄ および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

40

D が、

【化 2 3】



であり、式中、

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ

50

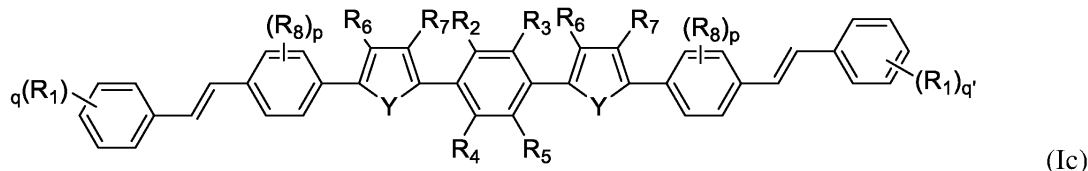
シ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する、請求項 1～17、19 および 20 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 22】

式 (I) の化合物が式 (Ic) の化合物であり：

【化 24】



10

各 R₁ が独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

20

R₂、R₃、R₄、および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₂ および R₃ が連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成するか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

30

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

40

各 R₈ が独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

Y が N R、O、または S であり；

各 p が 0～4 から独立して選択される整数であり；

q が 1～5 から選択される整数であり；

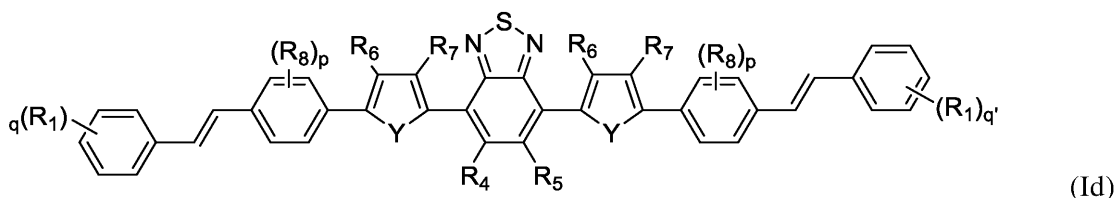
q' が 1～5 から選択される整数である、請求項 1～17 および 19～21 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 23】

式 (I) の化合物が式 (Id) の化合物であり：

50

【化 2 5】



式中、

各 R_1 が独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

10

q が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

R_4 および R_5 が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

20

R_4 および R_5 が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R_6 および R_7 が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

30

R_6 および R_7 が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

各 R_8 が独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

Y が N R、O、または S であり；

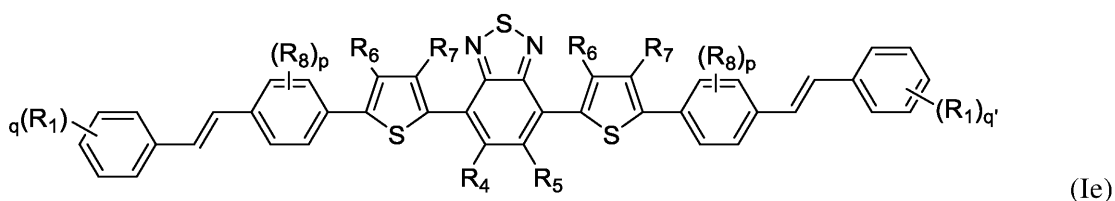
各 p が 0 ～ 4 から独立して選択される整数である、請求項 1 ～ 17 および 19 ～ 22 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 2 4】

式 (I) の化合物が式 (I e) の化合物であり；

【化 2 6】



式中、

各 R_1 が独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアル

50

ケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

q が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

R₄ および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

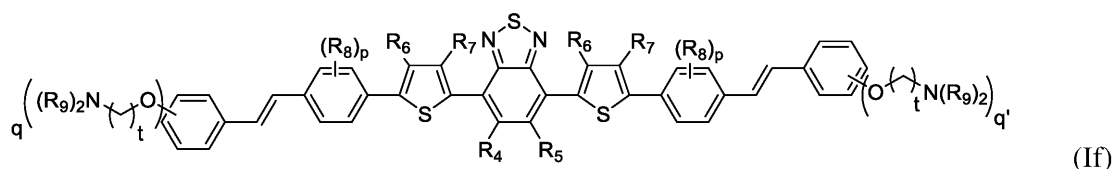
各 R₈ が独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

各 p が 0 ～ 4 から独立して選択される整数である、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 25】

式 (I) の化合物が式 (If) の化合物であり；

【化 27】



式中、

q が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' が 1 ～ 5 から選択される整数であり；

R₄ および R₅ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₄ および R₅ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R₆ および R₇ が独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されてい

てもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ が連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

各 R₈ が独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

各 p が 0 ～ 4 から独立して選択される整数であり；

各 R₉ が独立して H または置換されていてもよいアルキルであり；

各 t が 1 ～ 8 から独立して選択される整数である、請求項 1 ～ 24 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 26】

式 (I) の化合物が、

10

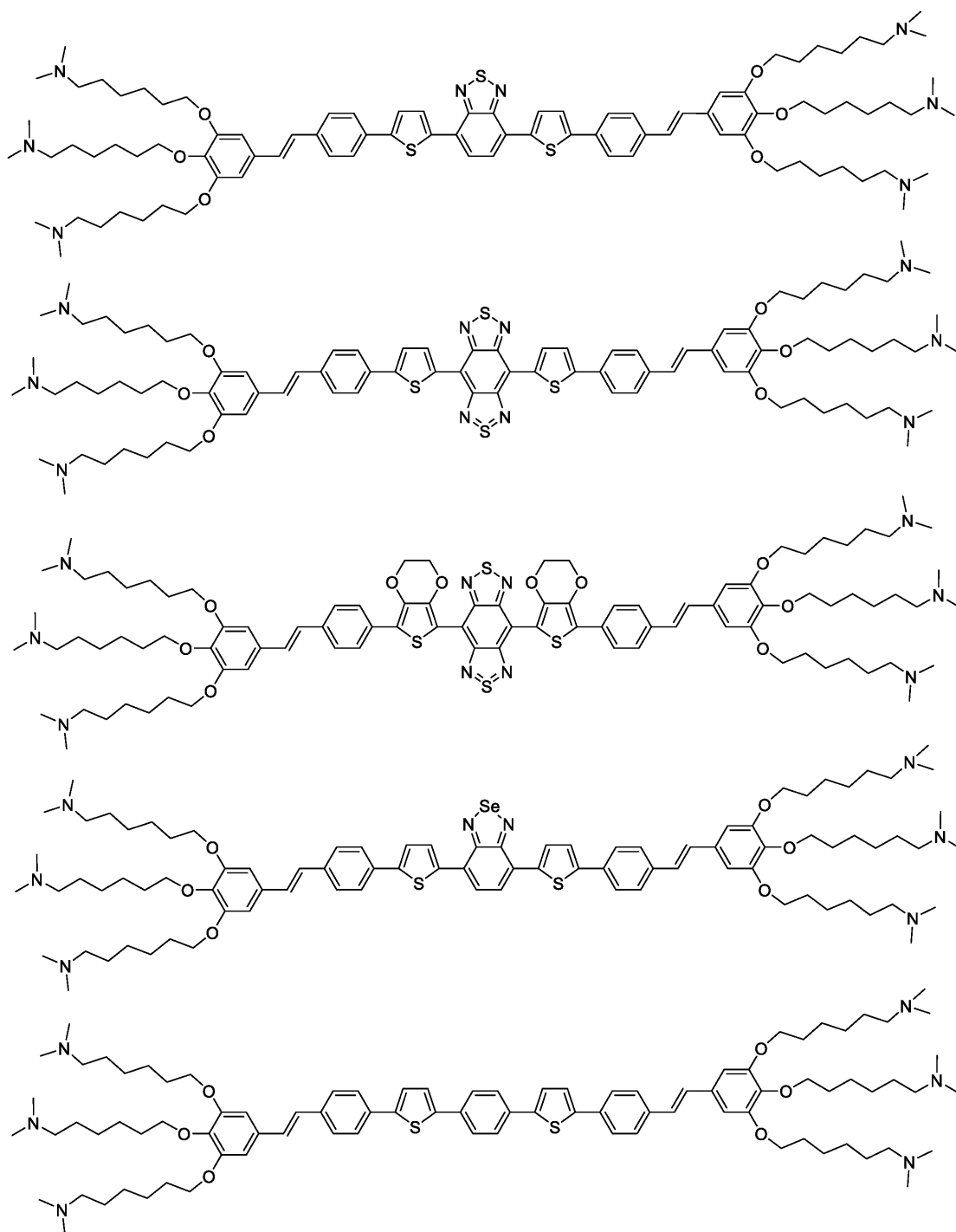
20

30

40

50

【化 2 8】



10

20

30

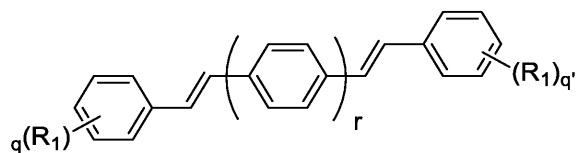
から選択される、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 2 7】

式 (I g) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物：

【化 2 9】



(Ig)

式中、

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアル

50

ケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

各 q は 1 ～ 5 から独立して選択される整数であり；

q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

r は 1 ～ 5 から選択される整数である。

10

【請求項 28】

細胞および／または脂質ベシクルを標識化する方法であって、

a) 式 (I)、下位式 (I a ～ I g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程を含む、方法。

【請求項 29】

蛍光検出器を使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式 (I)、下位式 (I a ～ I g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞を蛍光検出器に通す工程を含む、方法。

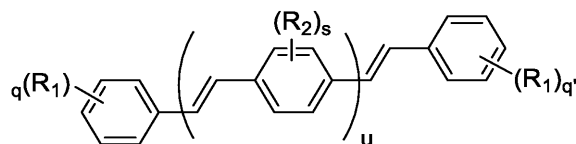
20

【請求項 30】

フローサイトメーターを使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式 (I V) ；

【化 30】



(IV)

30

(式中、

R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

40

R_2 は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

u は 3 ～ 15 から選択される整数であり；

各 s は 0 ～ 4 から独立して選択される整数であり；

q は 2 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 2 ～ 5 から選択される整数である)

の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞および／または脂質ベシクルをフローサイトメーターに流す工程を含む、方法。

50

【請求項 3 1】

細胞および／または脂質ベシクルが懸濁状態である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

細胞が付着細胞である、請求項 2 9 または 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

インキュベーション期間が約 1 分～約 1 2 日である、請求項 2 9 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

細胞および／または脂質ベシクルが精製工程なしにフローサイトメーターに流される、請求項 2 9 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

式 (I)、下位式 (I a ～ I g)、および／もしくは式 (I V) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が波長約 3 0 0 nm ～ 約 1 0 0 0 nm で蛍光励起を示す、請求項 2 9 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

式 (I)、下位式 (I a ～ I g)、および／もしくは式 (I V) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が波長約 3 0 0 nm ～ 約 2 0 0 0 nm で蛍光発光を示す、請求項 2 9 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

式 (I)、下位式 (I a ～ I g)、および／もしくは式 (I V) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物と共にインキュベートされた細胞および／または脂質ベシクルが、式 (I)、下位式 (I a ～ I g)、および／もしくは式 (I V) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物の対照試料に比べて約 2 倍超～約 5 0 0 倍の発光強度を示す、請求項 2 9 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 8】

細胞および／または脂質ベシクルと別の色素とを接触させる工程をさらに含む、請求項 2 9 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

細胞および／または脂質ベシクルを検出および／または定量するためのフローシステムであって、

30

a) 細胞および／または脂質ベシクルを標識化するための、式 (I)、下位式 (I a ～ I g)、および／もしくは式 (I V) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物；

b) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルをフローシステムに導入するための入口；

c) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルからの蛍光発光を検出するための、入口と流体連通した検出手段；および

任意選択で d) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルを定量するための計数手段を含む、フローシステム。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0 0 0 1】

分野

本開示は、共役オリゴ電解質およびその使用方法に関する。特に、共役オリゴ電解質は膜プローブとしての使用に好適であり、したがってフローサイトメトリー用途に好適である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

フローサイトメトリーは、個々の細胞、微生物、および粒子を速やかに計数、認識、お

50

よび選別するためのハイスループット実験技術である。がん生物学、免疫学、微生物学、およびウイルス学を含む多くの学問分野における臨床および研究での特徴づけにおいて使用される。フローサイトメトリーではマイクロ流体システムが利用され、このシステムでは、個々の細胞または粒子が流れに流入して、レーザー光源を速やかに通過した後、蛍光または光散乱によって分析される。蛍光タンパク質、蛍光標識化抗体、または構造に特異的な色素、例えばDNAもしくは脂質膜に特異的な色素を、個々の細胞または粒子の独自の特性を測定するために使用することができる。蛍光標識化は、少し例を挙げれば、細胞生存率の理解、不均質混合物中での様々な細胞型の同定、抗原またはタンパク質の発現の測定、細胞周期分析、および膜完全性の理解を含む種々の目的のために重要である。

【0003】

フローサイトメトリーが蛍光タグに大きく依存することから、技術者は、使用される蛍光標識によっては、または複数の蛍光標識が必要になる場合は、多くの問題に直面することがある。例えば、蛍光強度が弱い場合もあり、または光への曝露により蛍光標識が分解される場合もある。さらに、認識プローブにはフルオロフォア結合部位、または色素の有効数がほとんどない。蛍光標識と所望の細胞成分との結合が弱いことがある。蛍光標識が細胞によって適切に内在化されないとき、蛍光シグナルが過度に飽和することがある。不適切なインキュベーション条件下では、蛍光標識は凝集することがあり、したがって自己消光することがある。また、高いバックグラウンドまたは非特異的な染色によって検査法が妨害されることがある。2つ以上の蛍光標識が使用されるとき、放出されるシグナルが重複することで結果が混乱を招き、さらには解釈不能になることがある。また、いくつかの蛍光標識は細胞に対して毒性があり、したがってフローサイトメトリーを行うために短い作業時間帯しか設定されない。

【0004】

したがって、フローサイトメトリーにおける使用のための蛍光標識または蛍光色素として働くことができる分子が求められている。さらに、微生物、特に細菌細胞を優先的に標的化することができる蛍光分子が求められている。

【0005】

したがって、上記問題のうち少なくとも1つを克服または改善することが望ましいであろう。

【発明の概要】

【0006】

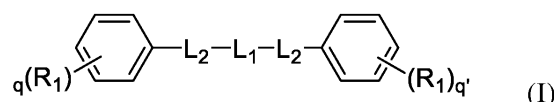
概要

本発明は、特定の共役オリゴ電解質(COE)が他とは違った膜結合を示し、したがって蛍光膜プローブとしての使用に有利であるという発見に基づく。特に、本発明者らは、COEの骨格に沿った共役部分が修飾されるときに、放出される蛍光シグナルを特定の波長に調整することができることを発見した。さらに、ストークスシフト(ピークの励起とピークの発光との間の差)を調整することができる。共役骨格の末端のペンダント鎖をさらに修飾することで、特定の細胞膜に対する選択性を調整することができる。これらのCOE化合物が細胞膜に侵入することで、細胞、リボソーム、ベシクル、および他の膜含有マクロ構造をフローサイトメトリーを使用して分析することが可能になる。

【0007】

本発明は、式(I)の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する：

【化1】



式中、

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換され

ていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

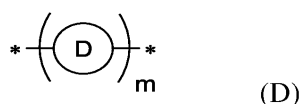
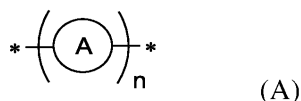
q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

各 L₂ は独立して、置換されていてもよいエチレンまたは置換されていてもよいフェニルエチレンから選択され；

L₁ は、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり；

【化 2】



式中、

各 A は独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

各 D は独立してアルケニレン、フェニレン、置換されていてもよい縮合アリーレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

n は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* は、別の単量体単位に対する、または L₂ に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D は互いに交替し合って結合しており；

式 (I) の化合物は実質的に直鎖状のトポロジーを示し；

L₁ はブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、ポリフェニルアルケニレンではない。

【0008】

式 (I) の共役化合物は、供与体 (D) / 受容体 (A) が (互いに) 交替し合う構造単位の組成を含み、そのため、発光、量子収率、およびストークスシフトは、ポリアルケニレンまたはポリフェニルアルケニレンのみの π 共役に依存するものに比べてはるかに広い範囲にわたって調整可能である。さらに、分子の分子トポロジーによって、様々な細胞型および脂質型の膜内で速やかな自己集合を行うことができる。特定の分子断片、例えばフェニレンは、隣接する基の電子親和力またはイオン化電位に応じて、単量体単位 D または単量体単位 A となることができる。

【0009】

いくつかの実施形態では、A は電子受容性部分である。

【0010】

いくつかの実施形態では、A は、

10

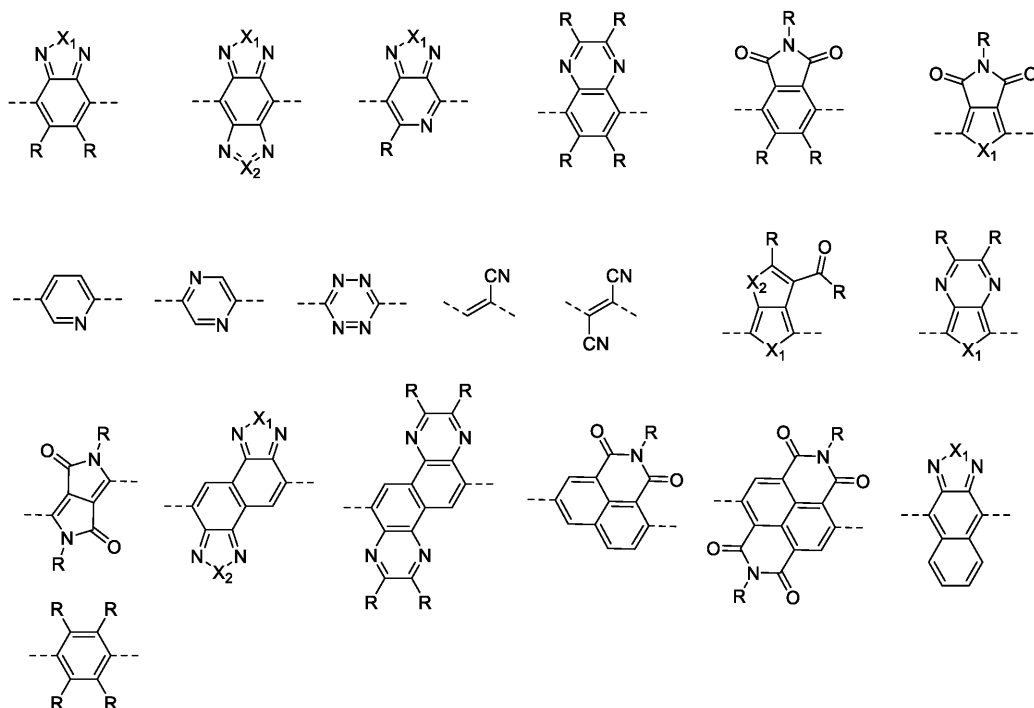
20

30

40

50

【化 3】



10

20

から選択され、式中、

【化 4】

は D に対する、または L₂ に対する結合を表し；各 X₁ は独立して C、O、N、S、および Se から選択され；各 X₂ は、存在する場合、独立して C、O、N、S、および Se から選択され；X₂ が存在する場合、X₁ および X₂ のうち少なくとも一方は O、N、または S であり；

各 R は独立して H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される

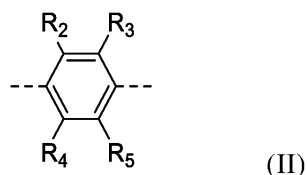
。

30

【0011】

いくつかの実施形態では、A は式 (II) の部分であり：

【化 5】



(II)

式中、

40

【化 6】

は D に対する、または L₂ に対する結合を表し；R₂、R₃、R₄、および R₅ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；またはR₂ および R₃ は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリアルを形成するか；または

50

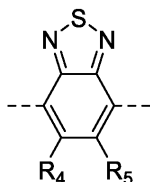
R 4 および R 5 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、Aは、

【 0 0 1 3 】

【化 7】

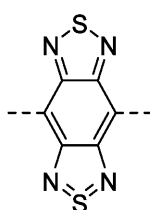


であり、式中、 R_4 および R_5 は本明細書に開示の通りである。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、Aは、

【化 8】



である。

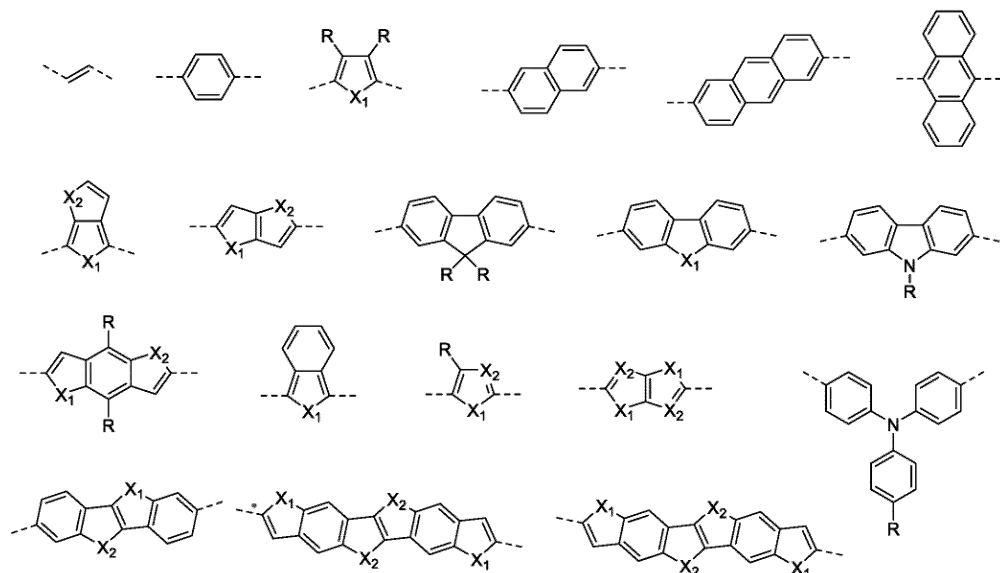
【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、Dは電子供与性部分である。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、Dは、

【化 9】



から選択される部分であり、式中、

【化 1 0】

は A に対する、または L_2 に対する結合を表し；

各 X_1 は独立して C、O、N、S、および Se から選択され；

各 X_2 は、存在する場合、独立して C、O、N、S、および Se から選択され；

X_2 が存在する場合、 X_1 および X_2 のうち少なくとも一方は O、N、または S であり；

R は独立して H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

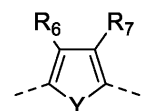
【0017】

いくつかの実施形態では、D は、置換されていてもよい 5 員ヘテロアリーレンである。

【0018】

いくつかの実施形態では、D は式 (III) の部分であり：

【化 11】



(III)

式中、Y は NR、O、または S であり；

R_6 および R_7 は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

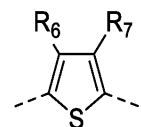
R_6 および R_7 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R は H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

【0019】

いくつかの実施形態では、D は、

【化 12】

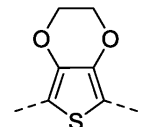


であり、式中、 R_6 および R_7 は本明細書に開示の通りである。

【0020】

いくつかの実施形態では、D は、

【化 13】



である。

【0021】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、

【化 14】

-A-D-A-	*-D-A-D-*
-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-*
-A-D-A-D-A-	*-D-A-D-A-D-*
-A-D-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-D-A-*
-A-D-A-D-A-D-A-	*-D-A-D-A-D-A-D-*
-A-D-A-D-A-D-A-D-	*-D-A-D-A-D-A-D-A-*

10

20

30

40

50

から選択される。

【0022】

いくつかの実施形態では、各 R_1 は独立して、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルコキシから選択される。

【0023】

いくつかの実施形態では、各 R_1 は独立してアルキルおよびアルコキシから選択され、それぞれアミノまたはアルキルアミノで置換されていてもよい。

【0024】

いくつかの実施形態では、各 R_1 は独立して、アミノまたはアルキルアミノで置換された $C_3 \sim C_8$ アルコキシである。

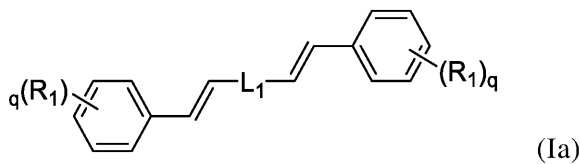
【0025】

いくつかの実施形態では、 L_1 の任意選択の置換基は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択される。

【0026】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ia) の化合物であり：

【化15】

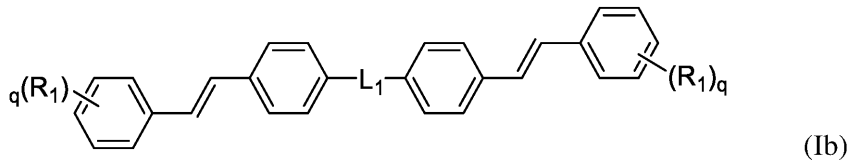


式中、 L_1 、 A 、 D 、 R_1 、 n 、 m 、および q は本明細書に開示の通りである。

【0027】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ib) の化合物であり：

【化16】

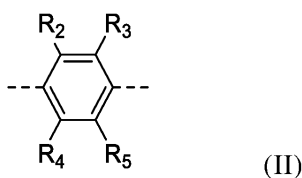


式中、 L_1 、 A 、 D 、 R_1 、 n 、 m 、および q は本明細書に開示の通りである。

【0028】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ib) の化合物であり、式中、 A は式 (II) の部分であり：

【化17】



式中、

【化18】

は D に対する、または L_2 に対する結合を表し；

R_2 、 R_3 、 R_4 、および R_5 は独立して H 、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアル

10

20

30

40

50

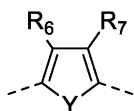
キニルオキシから選択されるか；または

R_2 および R_3 は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成するか；または

R_4 および R_5 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

D は式 (III) の部分であり：

【化 19】



(III)

10

式中、Y は NR、O、または S であり；

R_6 および R_7 は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

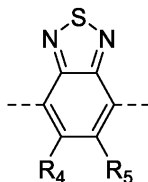
R_6 および R_7 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ib) の化合物であり、式中、A は、

【化 20】

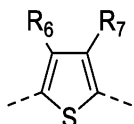


30

であり、式中、 R_4 および R_5 は本明細書に開示の通りであり；

D は、

【化 21】



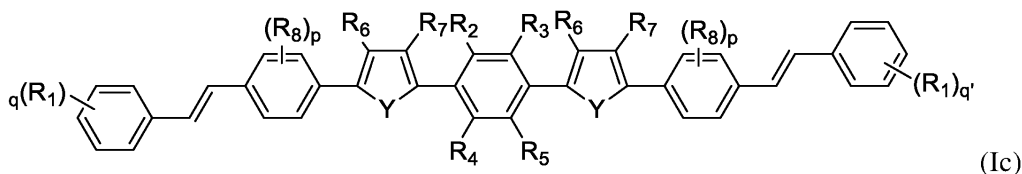
であり、式中、 R_6 および R_7 は本明細書に開示の通りである。

40

【0030】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ic) の化合物であり：

【化 22】



(Ic)

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアル

50

ケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

R₂、R₃、R₄、およびR₅は独立してH、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₂およびR₃は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成するか；または

R₄およびR₅は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R₆およびR₇は独立してH、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆およびR₇は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

各R₈は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

YはNR、O、またはSであり；

各pは0～4から独立して選択される整数であり；

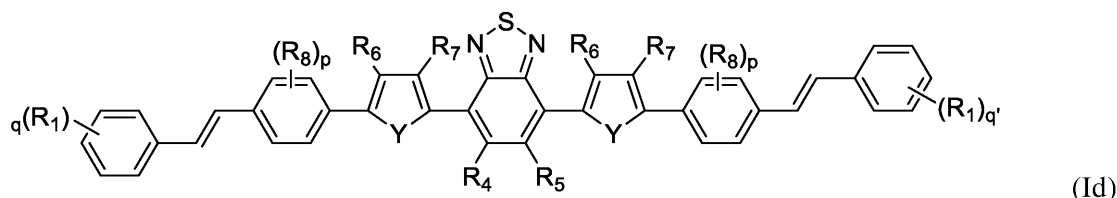
qは1～5から選択される整数であり；

q'は1～5から選択される整数である。

【0031】

いくつかの実施形態では、式(I)の化合物は式(Id)の化合物であり：

【化23】



式中、R₁、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、Y、p、q、およびq'は本明細書に開示の通りである。

【0032】

いくつかの実施形態では、式(I)の化合物は式(Ie)の化合物であり：

10

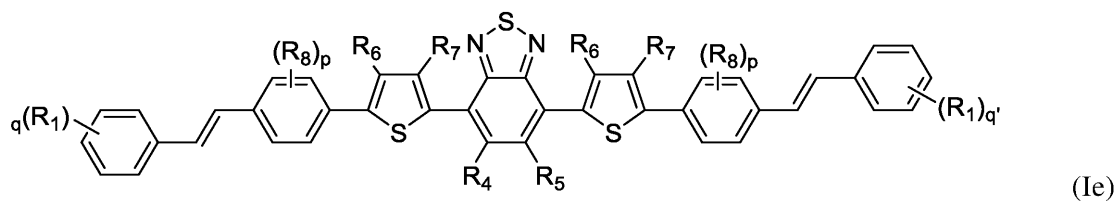
20

30

40

50

【化 2 4】

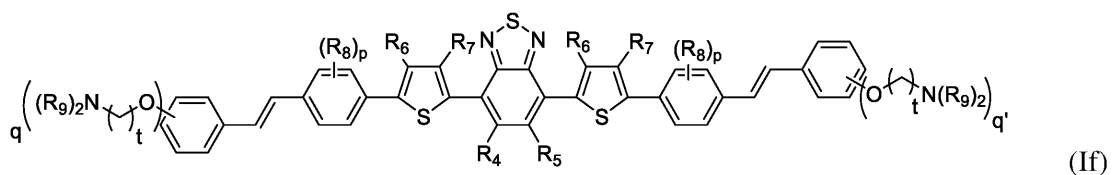


式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 p 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りである。

【0033】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (If) の化合物であり：

【化 2 5】



式中、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 p 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りであり；

各 R_9 は独立して H または置換されていてもよいアルキルであり；

各 t は 1 ～ 8 から独立して選択される整数である。

【0034】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は、

10

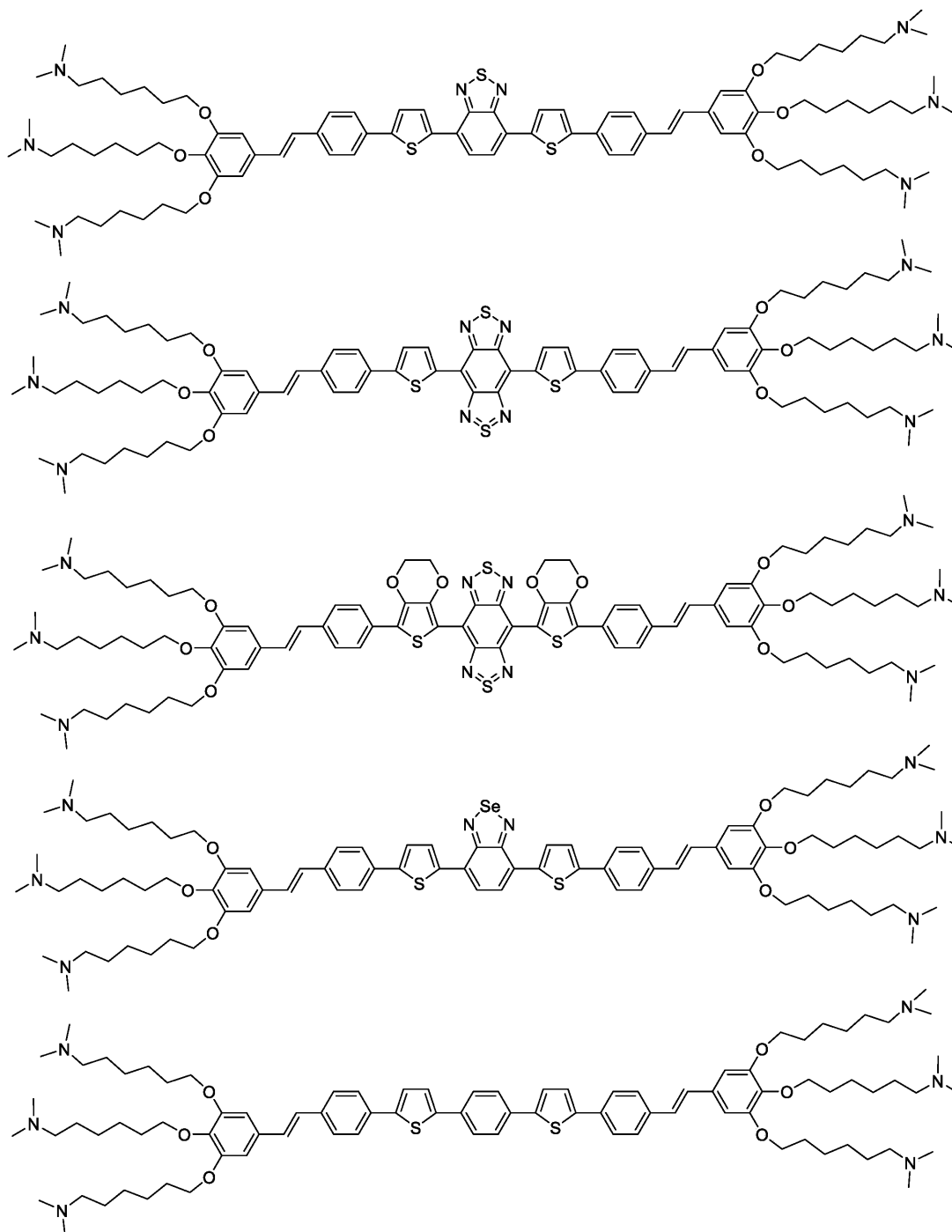
20

30

40

50

【化 2 6】

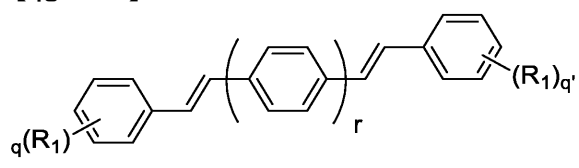


から選択される。

【 0 0 3 5 】

本発明はまた、式 (I g) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する：

【化 2 7】



(Ig)

式中、

各 R₁ は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換され

ていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

r は 1 ～ 5 から選択される整数である。

【0036】

本発明はまた、細胞および／または脂質ベシクルを標識化する方法であって、

a) 式 (I)、下位式 (I a ～ I g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程を含む、方法を提供する。

【0037】

本発明はまた、蛍光検出器を使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式 (I)、下位式 (I a ～ I g) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

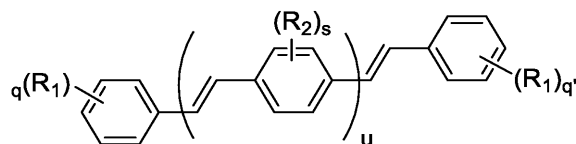
b) 細胞を蛍光検出器に通す工程を含む、方法を提供する。

【0038】

本発明はまた、フローサイトメーターを使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式 (I V) ；

【化 28】



(IV)

(式中、

R₁ は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

R₂ は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

u は 3 ～ 15 から選択される整数であり；

各 s は 0 ～ 4 から独立して選択される整数であり；

q は 2 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 2 ～ 5 から選択される整数である)

の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞および／または脂質ベシクルをフローサイトメーターに流す工程を含む、方法を提供する。

【0039】

いくつかの実施形態では、細胞および／または脂質ベシクルは懸濁状態である。

【0040】

いくつかの実施形態では、細胞は付着細胞である。

【0041】

いくつかの実施形態では、インキュベーション期間は約1分～約12日である。

【0042】

いくつかの実施形態では、細胞および／または脂質ベシクルは精製工程なしにフローサイトメーターに流される。

【0043】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia～Ig)、および／または式(IV)の化合物は波長約300nm～約1000nmで蛍光励起を示す。

【0044】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia～Ig)、および／または式(IV)の化合物は波長約300nm～約2000nmで蛍光発光を示す。

【0045】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia～Ig)、および／または式(IV)の化合物と共にインキュベートされた細胞および／または脂質ベシクルは、式(I)、下位式(Ia～Ig)、および／または式(IV)の化合物の対照試料に比べて約2倍超～約500倍の発光強度を示す。

【0046】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞および／または脂質ベシクルと別の色素とを接触させる工程をさらに含む。

【0047】

本発明はまた、細胞および／または脂質ベシクルを検出および／または定量するためのフローシステムであって、

a) 細胞および／または脂質ベシクルを標識化するための、式(I)、下位式(Ia～Ig)、および／もしくは式(IV)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物；

b) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルをフローシステムに導入するための入口；

c) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルからの蛍光発光を検出するための、入口と流体連通した検出手段；および

任意選択でd) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルを定量するための計数手段を含む、フローシステムを提供する。

【0048】

以下、図面を参照しながら、非限定的な例として本発明の実施形態を説明する。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】本発明の共役オリゴ電解質の例を示す。

【図2】グラム陰性菌からグラム陽性菌を選択的に標識化するための式(I)および／または式(IV)の化合物を使用したフローサイトメトリ測定値を示す。

【図3】式(I)および／または式(IV)の化合物(a～f)ならびに非標識化エキソソーム(h)のフローサイトメトリ測定値を示す。

【図4】式(I)および／または式(IV)の化合物で標識化されたエキソソームのフローサイトメトリ測定値を示す。

【図5】エキソソーム(a)、式(I)および／または式(IV)の化合物で標識化されたエキソソーム(b)、ならびに式(I)および／または式(IV)の化合物で標識化されてFACS後に収集されたエキソソーム(c)のTEM写真を示す。

【図6】式(I)および／または式(IV)の化合物で標識化されたRBCのフローサイトメトリ測定値を示す。

10

20

30

40

50

【図 7】様々な比の式 (I) および／または式 (IV) の化合物で標識化された R B C 対非染色 R B C のゲーティング領域において生じたフローサイトメトリー事象の割合を示す。

【図 8】式 (I) および／または式 (IV) の化合物で標識化された H e p - G 2 細胞のフローサイトメトリー測定値を示す。

【図 9】様々な比の式 (I) および／または式 (IV) の化合物で染色された H e p - G 2 対非染色 H e p - G 2 のゲーティング領域において生じたフローサイトメトリー事象の割合を示す。

【図 10】式 (I) および／または式 (IV) の化合物で標識化された A 5 4 9 細胞、ならびに非標識化細胞という 2 つの別個の集団のフローサイトメトリー測定値を示す。

【図 11】式 (I) および／または式 (IV) の化合物で標識化された A 5 4 9 細胞の継代のフローサイトメトリー測定値を示す。

【図 12】4 μ M の式 (I) の化合物および 4 μ M の市販の膜色素 F M 4 - 6 4 で染色された後の H e p G 2 細胞の共焦点顕微鏡写真を示す：(a) 式 (I) の化合物のチャネル、(b) F M 4 - 6 4 チャネル、(c) 明視野チャネル、(d) 統合されたチャネル。スケールバーは 20 μ m とする。

【図 13】式 (I) および／または式 (IV) の化合物で染色された A 5 4 9 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。

【図 14】(a ~ b) P B S 緩衝液中での S U V、式 (I) および／または式 (IV) の化合物、ならびに P B S 緩衝液中での S U V と該化合物との組み合わせ、(c) P B S 中の S U V の添加後の様々な発光ピークを示す式 (I) および／または式 (IV) の 3 つの化合物の光ルミネセンス (P L) スペクトルを示す。

【図 15】式 (I) および／または式 (IV) の化合物の様々な発光波長を示す。

【図 16】強度による動的光散乱法粒径分布曲線を、式 (I) および／または式 (IV) の化合物で標識化されていないリポソーム (灰色の実線) ならびに該化合物で標識化されたリポソーム (濃い破線) に関して示す。

【図 17】色素のみの対照の粒径分布プロット、およびそれらに対応するゲーティングされたドットプロットを示す。

【図 18】C O E 標識化 S W 4 8 0 エキソソーム (10 μ M) の粒径分布プロット、およびそれらに対応するゲーティングされたドットプロットを示す。

【図 19】超遠心分離を使用して過剰の色素を取り除いた後の色素標識化 S W 4 8 0 エキソソーム (10 μ M および 20 μ M) の粒径分布プロット、およびそれらに対応するゲーティングされたドットプロットを示す。

【図 20】C O E - B e n 染色エキソソームで様々な処理および時点で染色された A 5 4 9 細胞の画像化フローサイトメトリー画像、ならびにそれらに対応するフローサイトメトリー分析を示す。

【図 21】2 μ M C O E - B T と共にインキュベートされた後に、初期もしくは後期エンドソーム - G F P 試薬 (B a c M a m 2 . 0) または 100 n M リソソーム特異的色素 L y s o T r a c k e r (登録商標) G r e e n D N D - 2 6 で染色された、A 5 4 9 細胞の共局在 (c o l l o c a l i z a t i o n) 顕微鏡写真を示す。

【図 22】C O E - B T 染色 A 5 4 9 細胞で分泌された E V の透過型電子顕微鏡画像、および最初の 24 時間のインキュベーション後の、C O E - B T 染色 A 5 4 9 細胞で分泌された E V のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 23】図 23 a - b は、限外濾過前および限外濾過後の P B S 中 50 μ M の C O E または D i R 溶液の写真および吸収スペクトルを示す。

【図 24】動的光散乱法 (D L S) により測定された純粋な P B S、P B S 中の 1 μ M の C O E - B T、1 μ M の D i R もしくは 1 m M の S U V、または P B S 中 1 μ M の他の C O E の相関係数曲線および D L S 測定により導出された平均計数率を示す。

【図 25】赤色レーザーポインターを使用して照射された後の純粋な P B S または P B S 中 10 μ M の C O E のティンダル効果の写真を示す。

10

20

30

40

50

【図26】室温で16時間の静置の前および後の96ウェルマイクロプレート中でのPBS中COE溶液200 μ Lおよび色素溶液200 μ Lの写真を示す。

【図27】様々な混合比でのPBS中の、1時間および24時間インキュベートされ、Cyt of lexで分析された、COE-BT染色およびCOE-Ben染色SUV(130nm)の混合物のフローサイトメトリー測定値を示す。

【図28】1時間または24時間混合後の様々なゲートにおける図27によるSUV集団の割合を示す。

【図29】0.5mol%のCOE-BenおよびCOE-BTで標識化された粒径100nm、200nm、400nm、および800nmのPOPCリポソームがCyt of lexで分析された、色素陽性事象のドットプロットプロファイルを示す。

【図30】PBS中、室温で15 μ M COE-Benおよび15 μ M FM 4-64によって30分間染色された後の6.25mg mL⁻¹のLMV(大きな多重層ベシクル)の共焦点顕微鏡写真を示し、濃淡値曲線は、左側の両チャンネルの蛍光顕微鏡写真中の白線の蛍光強度プロファイルを表す。

【図31】携帯式紫外線ランプを使用しての紫外線(365nm)照射下でのPBS中1mMのSUVによる処理なし(-)または処理あり(+)のCOEの写真を示す。

【図32】DI水中で5 μ Mの様々なCOEによって染色された1mM POPCのみのSUVのゼータ電位測定値、ならびにDI水中で5 μ Mの様々なCOEによって染色された1mM POPCのみのSUVのDLS測定によるZ平均径およびPDIを示す。

【図33】(a)非染色の、(b)2 μ M COE-S6で標識化された、および(c)1 μ g/mL Cell Mask Deep Redで標識化された、新鮮な赤血球(RBC)の共焦点顕微鏡写真を示す。

【図34】22日間保存されて、(a)非染色の、(b)2 μ M COE-S6で標識化された、および(c)1 μ g/mL Cell Mask Deep Redで標識化された、赤血球(RBC)の共焦点顕微鏡写真を示す。

【図35】(a~c)非染色の、1 μ M COE-S6で標識化された、および0.5 μ g mL⁻¹ Cell Mask Deep Redで標識化された、フローサイトメトリーで測定された赤血球(RBC)のFSC/SSCドットプロット、ならびに(d)RBCが漸増濃度のCOE-S6で標識化された際の蛍光の増加を示すヒストグラム、および(e)RBCが漸増するCell Mask Deep Redで標識化された際の消光効果による蛍光の減少を示すヒストグラムを示す。ヒストグラムデータの変動係数(CV)を(f)に示す。

【図36】808nmレーザーを使用しての励起および950nmロングパスフィルターを使用しての発光の収集によるCOE-BBT染色A549細胞のフローサイトメトリー測定値を示す。非染色A549細胞を陰性対照として使用した。

【図37】A549細胞に対するCOEの細胞毒性の測定値を示す。

【図38】PBS中でのウシ赤血球に対するCOEの溶血の測定値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

詳細な説明

「アルキル」とは、直鎖状または分岐状であり得て、好ましくは1~10個の炭素原子、より好ましくは1~6個の炭素原子を有する、一価のアルキル基を意味する。これらのアルキル基の例としてはメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、n-ヘキシルなどが挙げられる。

【0051】

「アルケニル」とは、直鎖状または分岐状であり得て、好ましくは2~10個の炭素原子、より好ましくは2~6個の炭素原子を有し、少なくとも1個、好ましくは1~2個の炭素対炭素の二重結合を有する、一価のアルケニル基を意味する。例としてはエテニル(-CH=CH₂)、n-プロペニル(-CH₂CH=CH₂)、イソプロペニル(-C(CH₃)=CH₂)、ブター-2-エニル(-CH₂CH=CHCH₃)などが挙げられる

10

20

30

40

50

。

【0052】

「アルキニル」とは、好ましくは2～10個の炭素原子、より好ましくは2～6個の炭素原子を有し、少なくとも1個、好ましくは1～2個の炭素対炭素の三重結合を有する、アルキニル基を意味する。アルキニル基の例としてはエチニル ($-C \equiv CH$)、プロパルギル ($-CH_2C \equiv CH$)、ペンタ-2-イニル ($-CH_2C \equiv CCH_2-CH_3$) などが挙げられる。

【0053】

「アルコキシ」とは、アルキル基が上記の通りであるアルキル-O-基を意味する。例としてはメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、tert-ブトキシ、sec-ブトキシ、n-ペントキシ、n-ヘキソキシ、1,2-ジメチルブトキシなどが挙げられる。

10

【0054】

「アルケニルオキシ」とは、アルケニル基が上記の通りであるアルケニル-O-基を意味する。

【0055】

「アルキニルオキシ」とは、アルキニル基が上記の通りであるアルキニル-O-基を意味する。

【0056】

「ハロ」または「ハロゲン」とはフルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを意味する

20

。

【0057】

「アシル」とは、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルが本明細書に記載の通りである、 $H-C(O)-$ 基、アルキル-C(O)-基、シクロアルキル-C(O)-基、アリール-C(O)-基、ヘテロアリール-C(O)-基、およびヘテロシクリル-C(O)-基を意味する。

【0058】

「オキシアシル」とは、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルが本明細書に記載の通りである、 $HO-C(O)-$ 基、アルキル-OC(O)-基、シクロアルキル-OC(O)-基、アリール-OC(O)-基、ヘテロアリール-OC(O)-基、およびヘテロシクリル-OC(O)-基を意味する。

30

【0059】

「アミノ」とは、各 R' が独立して水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルであって、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルがそれぞれ本明細書に記載の通りである、 $-NR', R'$ 基を意味する。

【0060】

「アミノアシル」とは、各 R' が独立して水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルであって、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルがそれぞれ本明細書に記載の通りである、 $-C(O)NR', R'$ 基を意味する。

40

【0061】

「アシルアミノ」とは、各 R' が独立して水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルであって、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルがそれぞれ本明細書に記載の通りである、 $-NR', C(O)R'$ 基を意味する。

【0062】

「アシルオキシ」とは、アルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルが本明細書に記載の通りである、 $-OC(O)-$ アルキル基、 $-OC(O)-$ アリール基、 $-C(O)O-$ ヘテロアリール基、および $-C(O)O-$ ヘテロシクリル基を意味する

50

。

【0063】

「アミノアシルオキシ」とは、 R' が独立して水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルであって、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルがそれぞれ本明細書に記載の通りである、 $-OC(O)NR'$ -アルキル基、 $-OC(O)NR'$ -アリール基、 $-OC(O)NR'$ -ヘテロアリール基、および $-OC(O)NR'$ -ヘテロシクリル基を意味する。

【0064】

「シアノ」とは $-CN$ 基を意味する。

【0065】

「オキシアシルアミノ」とは、 R' が独立して水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルであって、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルがそれぞれ本明細書に記載の通りである、 $-NR' C(O)O$ -アルキル基、 $-NR' C(O)O$ -アリール基、 $-NR' C(O)O$ -ヘテロアリール基、および $-NR' C(O)O$ -ヘテロシクリル基を意味する。

10

【0066】

「オキシアシルオキシ」とは、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルが本明細書に記載の通りである、 $-OC(O)O$ -アルキル基、 $-OC(O)O$ -アリール基、 $-OC(O)O$ -ヘテロアリール基、および $-OC(O)O$ -ヘテロシクリル基を意味する。

20

【0067】

「チオ」とは、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルが本明細書に記載の通りである、 $H-S$ -基、アルキル $-S$ -基、シクロアルキル $-S$ -基、アリール $-S$ -基、ヘテロアリール $-S$ -基、およびヘテロシクリル $-S$ -基を意味する。

【0068】

「ホスホリル」とは、 R'' が OR'' を表すかまたはヒドロキシル、アルキル、もしくはアミノであり、 R'' がアルキル、シクロアルキル、アリール、またはアリールアルキルであり、アルキル、アミノ、アルケニル、アリール、シクロアルキル、およびアリールアルキルが本明細書に記載の通りである、 $-P(O)(R'')(OR'')$ 基を意味する。

。

【0069】

「アリール」とは、1個の環を有する（例えばフェニル）かまたは複数の縮合環を有し（例えばナフチルもしくはアントリル）、好ましくは6～14個の炭素原子を有する、不飽和芳香族炭素環基を意味する。アリール基の例としてはフェニル、ナフチルなどが挙げられる。

【0070】

「ヘテロアリール」とは、芳香族性に関するヒュッケル則を満たし（すなわち $4n+2$ 個の π 電子を含み）、好ましくは2～10個の炭素原子ならびに酸素、窒素、セレン、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を環内に有する、一価の芳香族複素環基を意味する（硫黄、セレン、および窒素の酸化物を含む）。これらのヘテロアリール基は1個の環を有することもあれば（例えばピリジル、ピロリル、もしくはそれらの N -オキシド、またはフリル）、複数の縮合環を有することもある（例えばインドリジニル、ベンゾイミダゾリル、クマリニル、キノリニル、イソキノリニル、またはベンゾチエニル）。

40

【0071】

ヘテロアリール基の例としてはオキサゾール、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチルピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナントロリン、イソチアゾール、フェナジン、イソオ

50

キサゾール、イソチアゾール、フェノキサジン、フェノチアジン、チアゾール、チアジアゾール、オキサジアゾール、オキサトリアゾール、テトラゾール、チオフエン、ベンゾ [b] チオフエン、トリアゾール、イミダゾピリジンなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0072】

「アリーレン」とは、アリール基が上記の通りである二価のアリール基を意味する。

【0073】

「ヘテロアリーレン」とは、アリール基が上記の通りである二価のヘテロアリール基を意味する。

【0074】

「ヘテロシクリル」とは、1個の環または複数の縮合環を有し、好ましくは1～8個の炭素原子ならびに窒素、硫黄、酸素、セレン、またはリンから選択される1～4個のヘテロ原子を環内に有する、一価の飽和基または不飽和基を意味する。最も好ましいヘテロ原子は窒素である。例えばR₂またはR'が、1個または複数の環ヘテロ原子を有する置換されていてもよいヘテロシクリルである場合、ヘテロシクリル基がC-CまたはC-ヘテロ原子結合、特にC-N結合を通じて本発明の化合物のコア分子に接続されていてもよいということが理解されよう。

【0075】

ヘテロシクリル基およびヘテロアリール基の例としてはオキサゾール、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチルピリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナントロリン、イソチアゾール、フェナジン、イソオキサゾール、イソチアゾール、フェノキサジン、フェノチアジン、イミダゾリジン、イミダゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドリン、フタルイミド、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、4, 5, 6, 7-テトラヒドロベンゾ [b] チオフエン、チアゾール、チアジアゾール、オキサジアゾール、オキサトリアゾール、テトラゾール、チアゾリジン、チオフエン、ベンゾ [b] チオフエン、モルホリノ、ピペリジニル、ピロリジン、テトラヒドロフラニル、トリアゾールなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0076】

「置換されていてもよい」は、1つの基が、ヒドロキシル、アシル、アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルケニルオキシ、アルキニル、アルキニルオキシ、アミノ、アミノアシル、チオ、アリールアルキル、アリールアルコキシ、アリール、アリールオキシ、カルボキシル、アシルアミノ、シアノ、ハロゲン、ニトロ、ホスホノ、スルホ、ホスホリルアミノ、ホスフィニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルオキシ、オキシアシル、オキシム、オキシムエーテル、ヒドラゾン、オキシアシルアミノ、オキシスルホニルアミノ、アミノアシルオキシ、トリハロメチル、トリアルキルシリル、ペンタフルオロエチル、トリフルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメタンチオ、トリフルオロエテニル、モノーおよびジールキルアミノ、モノーおよびジール（置換アルキル）アミノ、モノーおよびジールアリールアミノ、モノーおよびジールヘテロアリールアミノ、モノーおよびジールヘテロシクリルアミノ、ならびに、アルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルから選択される様々な置換基を有する非対称二置換アミンなどから選択される1個もしくは複数の基でさらに置換されていても置換されていなくてもよく、またはそれと（縮合多環式基を形成するように）縮合していても縮合していなくてもよく、かつ、固体支持体材料に対する結合を含んでもよい（例えばポリマー樹脂に対して置換されていてもよい）ことを意味するように取られる。例えば、「置換されていてもよいアミノ」基はアミノ酸残基およびペプチド残基を含みうる。

【0077】

「親水性」とは、水に対する親和性、したがって溶解性が有機溶媒に対するよりも大きい、分子または部分を意味する。例えば、化合物の親水性は、水（または緩衝水溶液）とオクタノール、酢酸エチル、塩化メチレン、またはメチル *tert*-ブチルエーテルなどの水不混和性有機溶媒との間でのその分配係数を測定することで定量化することができる。平衡化後に化合物の水中濃度が有機溶媒中濃度よりも大きくなる場合、化合物は親水性であると見なされうる。

【0078】

「疎水性」とは、有機溶媒に対する親和性、したがって溶解性が水に対するよりも大きい、分子または部分を意味する。例えば、化合物の疎水性は、水（または緩衝水溶液）とオクタノール、酢酸エチル、塩化メチレン、またはメチル *tert*-ブチルエーテルなどの水不混和性有機溶媒との間でのその分配係数を測定することで定量化することができる。平衡化後に化合物の有機溶媒中濃度が水中濃度よりも大きくなる場合、化合物は疎水性であると見なされうる。

【0079】

共役オリゴ電解質（COE）は、末端極性イオン性ペンダントを有する疎水性共役コアによって規定される分子のクラスである。特定の実施形態では、COE中の疎水性部分および親水性部分は、两部分が脂質二重層中の親水性ドメインおよび疎水性ドメインの組織化を反映している分子として合理的に設計されうる。通常、この構造設計は、2つの末端に荷電基を有する非分岐状の内部構造のみを包含して、COEと脂質との間の静電相互作用および疎水性相互作用により引き起こされる細胞膜へのCOEの自発的な挿入を促進する。本発明者らは、骨格において π - π 共役から生じる蛍光が、紫外領域、可視領域、および赤外領域を含む電磁スペクトル全体にわたる様々な波長で生じるように調整可能であると仮定した。これは、構造誘導によって共役コアの光電子特性を微調整することで実現することができる。例えば、骨格共役 π 系を、供与体部分および受容体部分に基づいて、300~2000 nmの発光波長範囲を実現するように調節することができる。この目的に向けて蛍光励起、発光、およびストークスシフトを調整することができる。さらに、COEを、その膜挿入能力を制御する様々な化学基の機能化を通じて、特定の膜に対する選択性を示すように修飾することができる。これにより標的特異的な機能性が得られる。

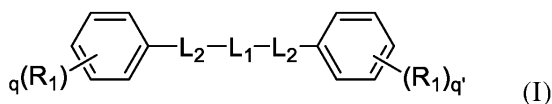
【0080】

特徴的には、COEの蛍光発光は、COEが水溶液から脂質二重層に挿入されるときに著しく増強される。COEが脂質二重層の疎水性が高い方の環境内に局在化されるときに、この「ライトアップ」機構によってCOEのシグナル対ノイズ比が高くなる。さらに、COEは多くの市販の親油性色素（通常は界面活性剤様の構造を含み、すなわち、分子の一方の側が疎水性であり、他方の側が親水性である）とは異なった化学構造を有している。これらの界面活性剤様の構造は水溶液中でミセル様の凝集を誘発する。例えば、一般的に使用される膜色素PKH-26は、エキソソームなどの小さな粒子と同様の粒径および蛍光強度を有する凝集体を形成し、それにより偽陽性シグナルを生じさせることが示されている。これらの現象は、COEの場合において、COEの発光が脂質二重層への挿入後に大きく強化され、すなわちシグナル対ノイズ比が高くなることから、回避することができる。

【0081】

したがって、本発明は、式（I）の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する：

【化29】



式中、

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアル

ケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオもしくは置換されていてもよいホスホリルから選択され；

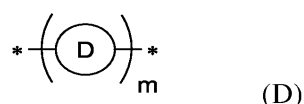
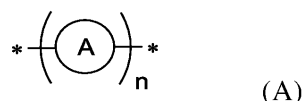
q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

各 L₂ は独立して、置換されていてもよいエチレンまたは置換されていてもよいフェニルエチレンから選択され；

L₁ は、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり；

【化 3 0】



式中、

各 A は独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよいアリーレン、または置換されていてもよいヘテロアリーレンから選択され；

各 D は独立して、置換されていてもよいアルケニレン、置換されていてもよいアリーレン、または置換されていてもよいヘテロアリーレンから選択され；

n は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* は、別の単量体単位に対する、または L₂ に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D は互いに交替し合って結合しており；

式 (I) の化合物は実質的に直鎖状のトポロジーを示す。

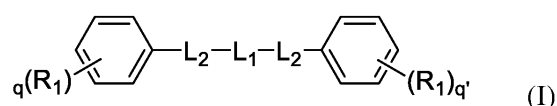
【0082】

いくつかの実施形態では、A および D がいずれもアルケニレンであるわけではない。他の実施形態では、A および D がいずれもフェニレンであるわけではない。他の実施形態では、A および D がいずれもアルケニレンおよびフェニレンであるわけではない。いくつかの実施形態では、L₁ はブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、およびポリフェニルアルケニレンではない。

【0083】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物：

【化 3 1】



式中、

各 R₁ は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよい

オキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオもしくは置換されていてもよいホスホリルから選択され；

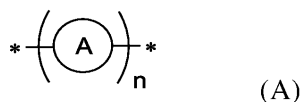
q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

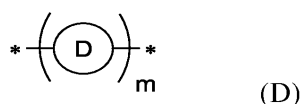
各 L₂ は独立して、置換されていてもよいエチレンまたは置換されていてもよいフェニルエチレンから選択され；

L₁ は、単量体単位 A および単量体単位 D を含む π 共役コアであり；

【化 3 2】



10



式中、

各 A は独立して、シアノで置換されたアルケニレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

各 D は独立してアルケニレン、フェニレン、置換されていてもよい縮合アリーレン、置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレン、または置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンから選択され；

20

n は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

m は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

* は、別の単量体単位に対する、または L₂ に対する結合を表し；

単量体単位 A および単量体単位 D は互いに交替し合って結合しており；

式 (I) の化合物は実質的に直鎖状のトポロジーを示す。

【0084】

さらなる利点は、これらの化合物が、蛍光標識として使用される上で生体共役化学反応、例えば抗体を標識化するために求められる反応を必要としないということである。

【0085】

30

式 (I) の化合物は実質的に直鎖状のトポロジーを示す。トポロジーとは、三次元 (3D) 空間の制約内の化合物の分子構造を意味する。この直鎖状のトポロジーは末端として 2 つのノードを有しており、接合ノード (junction nodes) を有さない。直鎖状のトポロジーは脂質膜挿入を容易にするために有利である。

【0086】

いくつかの実施形態では、L₁ 中の単量体単位 A と単量体単位 D とを接続する結合は、本化合物の縦軸に実質的に並んでいる。他の実施形態では、L₁ 中の単量体単位 A および単量体単位 D は、本化合物の縦軸に実質的に並んでいる。これに関して、本化合物の縦軸の中心から外れたときの、単量体単位 A と単量体単位 D とを接続する結合は、本発明の範囲内である。

40

【0087】

式 (I) の化合物は、脂質二重層内にその位置を収めるために直鎖状である。いくつかの実施形態では、本化合物は分岐状ではなく、すなわち、単量体単位は 1 個の鎖にのみ沿って延びる。いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は対称性である。化合物の対称性は、32 個の点群 (point groups) のうち少なくとも 1 つによって記述可能である。1 つの点群は、元の立体構造とは区別がつかない立体構造を生じさせる、分子上で実行可能なすべての対称操作を記述するものである。これに関して、いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は C_{2v} 点群を有する。

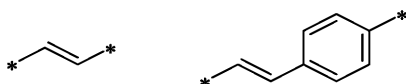
【0088】

いくつかの実施形態では、各 L₂ は独立して、置換されていてもよいエチレンまたは置

50

換されていてもよいフェニルエチレンから選択される。他の実施形態では、 L_2 は独立して

【化 3 3】



から選択され、式中、*は単量体単位に対する、および式（I）の化合物中の末端フェニル部分に対する結合を表す。

【0089】

L_1 は π 共役コアである。共役系とは、一般に分子の全体的なエネルギーを低下させ、安定性を増加させる、分子中に非局在化電子を有する接続されたp軌道の系のことである。孤立電子対、ラジカル、またはカルベニウムイオンがこの系の一部でありうる。この系は環状、非環状、直鎖状、または混合型でありうる。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、 L_1 が6員アリールもしくはヘテロアリールを含む場合、または L_1 が6員環を有する縮合アリールもしくは縮合ヘテロアリールを含む場合、単量体単位は6員環上で1, 4-共役している。他の実施形態では、 L_1 が5員アリールもしくはヘテロアリールを含む場合、または L_1 が5員環を有する縮合アリールもしくは縮合ヘテロアリールを含む場合、単量体単位は5員環上で1, 4-共役または2, 5-共役している。

20

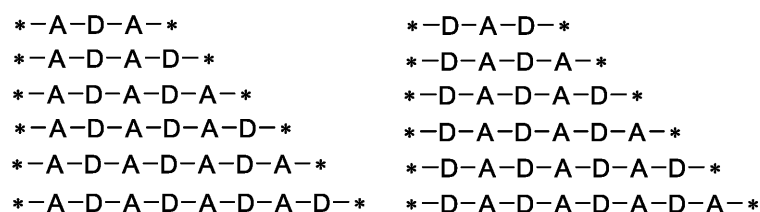
【0091】

あるいは、 L_1 は少なくとも1個の単量体単位Aおよび少なくとも1個の単量体単位Dで表されることもある。いくつかの実施形態では、nとmとの組み合わせは2~10、3~10、3~9、3~8、3~10、または3~7から選択される整数である。

【0092】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、

【化 3 4】



30

から選択される。

【0093】

上記のように、AおよびDはそれぞれ、 L_1 が交替型の π 共役コアとなるように、同じ部分であってもよい。あるいは、AおよびDはそれぞれ異なってもよい。 L_1 が、供与体／受容体が（互いに）交替し合う構造単位の組成を含むことから、供与体／受容体が交替し合う組成が付着していない構造は本発明の範囲から除外される。例えば、ブタジエニレン、ポリアルケニレン、フェニルアルケニレン、およびポリフェニルアルケニレンが除外される。

40

【0094】

いくつかの実施形態では、 L_1 の任意選択の置換基はハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、および置換されていてもよいアルキニルオキシから選択される。他の実施形態では、Dの任意選択の置換基はハロゲン、シアノ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、およびアルケニルオキシから選択される。いくつかの実施形態では、 L_1 の任意選択の置換基は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、また

50

は置換されていてもよいアルキニルから選択される。

【0095】

本明細書において使用される単量体単位Dとは、単量体単位Aとの対比で電子供与性（電子リッチ）である部分のことである。これに関して、単量体単位Aは電子求引性／受容性（電子プア）である部分である。順に並んでいるとき、D-A組み合わせは、共役状態である同様の部分の順列（ $-D_n-$ または $-A_n-$ ）に比べて吸光および発光がさらに赤色に向かった、分子内電荷移動励起状態を生じさせる。

【0096】

いくつかの実施形態では、Aは電子受容性部分である。電子受容体とは、別の部分または化合物から移された電子を受容する化学的実体のことである。いくつかの実施形態では、Aは電子受容性置換基を有する。他の実施形態では、Aは電子求引性置換基を有する。

10

【0097】

いくつかの実施形態では、Aは独立して、置換されていてもよいアルケニレンまたは置換されていてもよいヘテロアリーレンから選択される。いくつかの実施形態では、Aは独立してシアノ置換アルケニレンまたは置換されていてもよいヘテロアリーレンから選択される。いくつかの実施形態では、シアノ置換アルケニレンは一置換アルケニレンまたは二置換アルケニレンである。他の実施形態では、置換されていてもよいヘテロアリーレンは置換されていてもよい単環式ヘテロアリーレンまたは置換されていてもよい縮合ヘテロアリーレンである。ヘテロアリーレンは5員ヘテロアリーレンまたは6員ヘテロアリーレンでありうる。ヘテロアリーレンは縮合ヘテロアリーレンでありうる。いくつかの実施形態では、ヘテロアリーレンは縮合5，5員ヘテロアリーレン、縮合5，6員ヘテロアリーレン、縮合6，6員ヘテロアリーレン、縮合5，5，6員ヘテロアリーレン、縮合5，6，6員ヘテロアリーレン、縮合6，6，6員ヘテロアリーレン、縮合5，5，6，6員ヘテロアリーレン、縮合5，6，6，6員ヘテロアリーレン、または縮合6，6，6，6員ヘテロアリーレンである。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、Aの任意選択の置換基はハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、および置換されていてもよいアルキニルオキシから選択される。他の実施形態では、Aの任意選択の置換基はハロゲン、シアノ、アルキル、アルケニル、アルコキシ、およびアルケニルオキシから選択される。

30

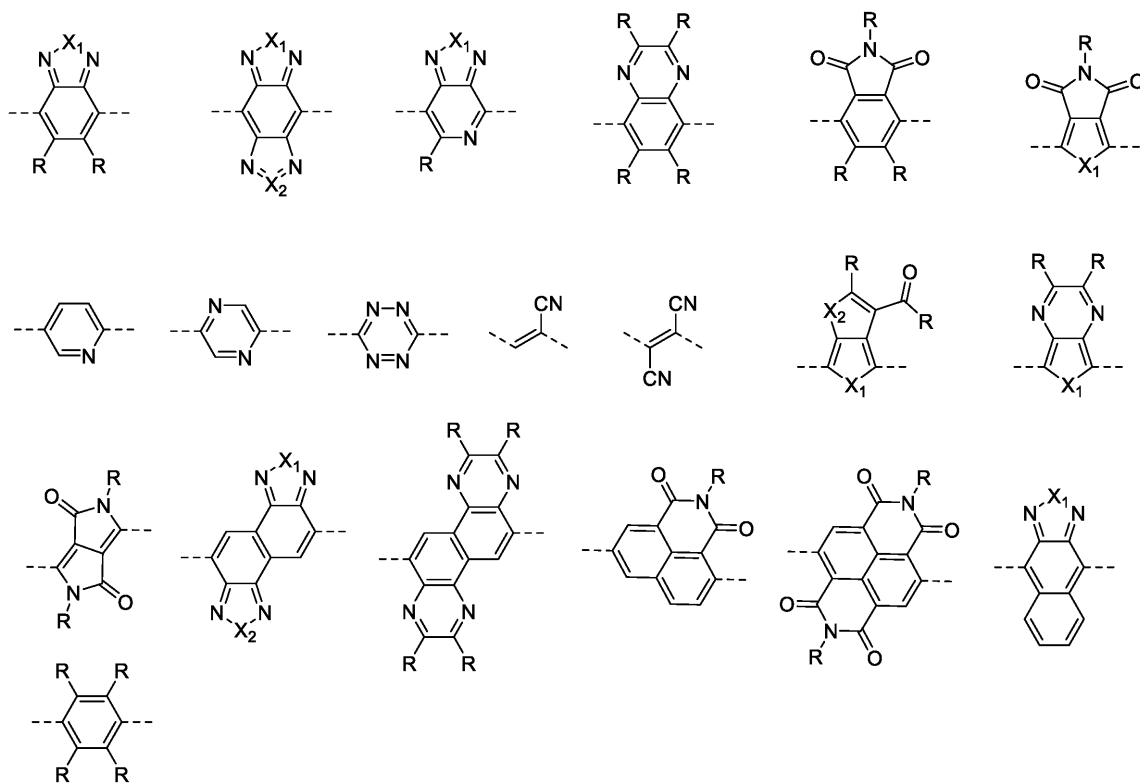
【0099】

いくつかの実施形態では、Aは、

40

50

【化 3 5】



から選択され、式中、

【化 3 6】

は D に対する、または L_2 に対する結合を表し；

各 X_1 は独立して C、O、N、S、および Se から選択され；

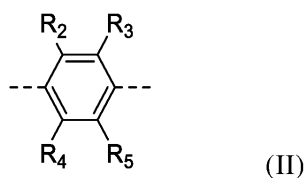
各 X₂ は、存在する場合、独立して C、O、N、S、および Se から選択され；

X_2 が存在する場合、 X_1 および X_2 のうち少なくとも一方はO、N、またはSであり；Rは独立してH、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態では、Aは式(II)の部分であり：

【化 3 7】



式中、

【化 3 8】

は D に対する、または L_2 に対する結合を表し；

R₂、R₃、R₄、およびR₅は独立してH、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₂ および R₃ は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていても

よいヘテロアリールを形成するか；または

R₄ および R₅ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

【0101】

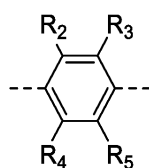
いくつかの実施形態では、R₂ および R₃ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニルから選択される。他の実施形態では、R₂ および R₃ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニルから選択される。他の実施形態では、R₂ および R₃ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキル、置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニル、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルコキシ、および置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニルオキシから選択される。他の実施形態では、R₂ および R₃ は独立して H、ハロゲン、および C₁ ~ C₆ アルキルから選択される。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、A は式 (II) の部分であり：

【化39】



(II)

20

式中、

【化40】

は D に対する、または L₂ に対する結合を表し；

R₂ および R₃ は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

30

R₄ および R₅ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₄ および R₅ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

【0103】

40

いくつかの実施形態では、R₂ および R₃ は連結されて、フェニル部分との共役 π 系を形成する置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

【0104】

いくつかの実施形態では、R₄ および R₅ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニルから選択される。他の実施形態では、R₄ および R₅ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキル、置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニル、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルコキシ、および置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニルオキシから選択される。他の実施

50

形態では、 R_4 および R_5 は独立して H、ハロゲン、および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される。

【0105】

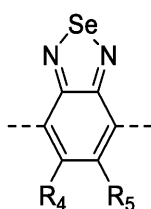
いくつかの実施形態では、 R_4 および R_5 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。他の実施形態では、 R_4 および R_5 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。いくつかの実施形態では、 R_4 および R_5 は連結されて、置換されていてもよいアリールまたは置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。いくつかの実施形態では、 R_4 および R_5 は連結されて、フェニル部分との共役 π 系を形成する置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、A は、

【化41】



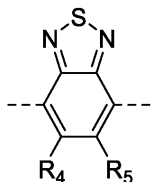
20

であり、式中、 R_4 および R_5 は本明細書に開示の通りである。

【0107】

いくつかの実施形態では、A は、

【化42】



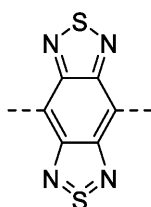
30

であり、式中、 R_4 および R_5 は本明細書に開示の通りである。

【0108】

いくつかの実施形態では、A は、

【化43】



40

である。

【0109】

いくつかの実施形態では、 n は 1 ~ 4、1 ~ 3、1 ~ 2、2 ~ 4、3 ~ 4、または 3 ~ 5 から選択される整数である。

【0110】

いくつかの実施形態では、D は電子供与性部分である。電子供与体とは、別の部分または化合物に移される電子を供与する化学的実体のことである。いくつかの実施形態では、

50

【 0 1 1 1 】

10

20

【 0 1 1 3 】

【化 4 4】



40

【化 4 5】

50

X_2 が存在する場合、 X_1 および X_2 のうち少なくとも一方は O、N、または S であり；
R は独立して H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

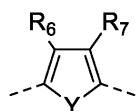
【0114】

いくつかの実施形態では、D は、置換されていてもよい 5 員ヘテロアリーレンである。

【0115】

いくつかの実施形態では、D は式 (III) の部分であり：

【化 46】



(III)

10

式中、Y は N、O、S、または Se であり；

R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₆ および R₇ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

20

R は H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

【0116】

いくつかの実施形態では、R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルコキシ、または置換されていてもよいアルケニルオキシから選択される。他の実施形態では、R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、または置換されていてもよいアルコキシから選択される。他の実施形態では、R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキル、置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニル、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルコキシ、または置換されていてもよい C₂ ~ C₆ アルケニルオキシから選択される。他の実施形態では、R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキル、または置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルコキシから選択される。他の実施形態では、R₆ および R₇ は独立して H、ハロゲン、または置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキルから選択される。

30

【0117】

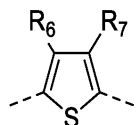
いくつかの実施形態では、R₆ および R₇ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。他の実施形態では、R₆ および R₇ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、または置換されていてもよいヘテロアリールを形成する。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、D は、

【化 47】



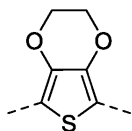
であり、式中、R₆ および R₇ は本明細書に開示の通りである。

【0119】

いくつかの実施形態では、D は、

50

【化 48】



である。

【0120】

いくつかの実施形態では、 m は1～4、1～3、1～2、2～4、3～4、または3～5から選択される整数である。

【0121】

いくつかの実施形態では、 n および m は合計で少なくとも3である。他の実施形態では、 n および m は合計で少なくとも4または5である。

【0122】

いくつかの実施形態では、各 R_1 は独立して置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択される。他の実施形態では、 R_1 は置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいオキシアシル、または置換されていてもよいアミノである。別の実施形態では、 R_1 は、単量体単位が3～10である置換されていてもよいポリエトキシである。他の実施形態では、 R_1 の鎖長は約3～約10である。他の実施形態では、 R_1 は置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ アルコキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ アルキルアミノ、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ ジアルキルアミノ、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ アルキルオキシアシル、または置換されていてもよいポリエトキシである。いくつかの実施形態では、 R_1 は独立して、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルコキシから選択される。いくつかの実施形態では、 R_1 は独立してアルキルおよびアルコキシから選択され、それぞれアミノまたはアルキルアミノで置換されていてもよい。

【0123】

いくつかの実施形態では、 R_1 の任意選択の置換基は独立してオキシ、オキシアシル、アシル、アミノ、ホスホリル、チオール、アルキル、アルケニル、アルキニル、オキシアルキル、アルキルアシルオキシ、スルホニル、クロレート、またはその荷電化学種から選択される。いくつかの実施形態では、 R_1 の任意選択の置換基は独立してヒドロキシル、カルボキシル、ホスフェート、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、クロレート、スルフェート、アセテート、またはその荷電化学種から選択される。いくつかの実施形態では、 R_1 の任意選択の置換基は第三級アミノである。第三級アミノは、ハロゲン化物でありうる対イオンで中和可能である。

【0124】

他の実施形態では、 R_1 の任意選択の置換基は親水性部分である。他の実施形態では、 R_1 の任意選択の置換基は荷電部分である。親水性部分および／または荷電部分の例としてはハロゲン化トリアルキルアンモニウムがある。例えば、荷電部分はヨウ化トリメチルアンモニウムでありうる。本実施形態では、 R_1 はトリメチルアンモニウムを末端とし、それにより、置換される際に R_1 （例えばアルキル）に正の電荷を付与する。他のカチオン性荷電基としてはピリジニウム、ピロリジニウム、イミダゾリウム、グアニジウム、スルホニウム、チオウロニウム、およびホスホニウムが挙げられるがそれに限定されない。他のアニオン性荷電基としてはクロレート、スルフェート、ホスフェート、アセテート、カルボキシル、水酸化物が挙げられるがそれに限定されない。親水性部分および／または荷電部分は、共有結合を通じてカチオン性荷電基およびアニオン性荷電基の両方を含む双性イオン形であってもよい。過剰の電荷は許容されるカチオンまたはアニオンによって中

【 0 1 2 5 】

【化 4 9】



【 0 1 2 6 】

30

【 0 1 2 7 】

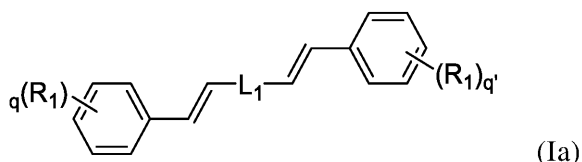
40

【 0 1 2 8 】

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (I a) の化合物であり：

【化 5 0】

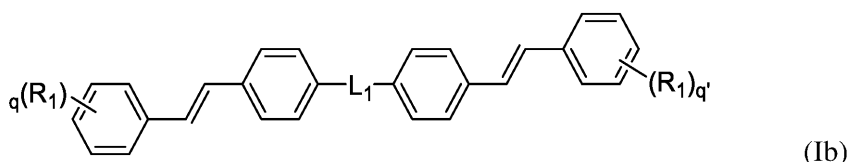


式中、 L_1 、 A 、 D 、 R_1 、 n 、 m 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りである。

【0 1 3 0】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (I b) の化合物であり：

【化 5 1】

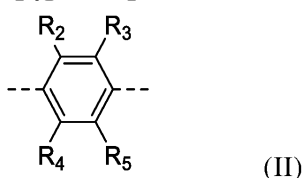


式中、 L_1 、 A 、 D 、 R_1 、 n 、 m 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りである。

【0 1 3 1】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (I b) の化合物であり、式中、 A は式 (I I) の部分であり：

【化 5 2】



式中、

【化 5 3】

は D に対する、または L_2 に対する結合を表し；

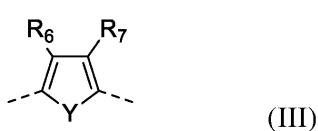
R_2 および R_3 は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R_4 および R_5 は独立して H 、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R_4 および R_5 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

D は式 (I I I) の部分であり：

【化 5 4】



式中、 Y は NR 、 O 、または S であり；

R_6 および R_7 は独立して H 、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ

シ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

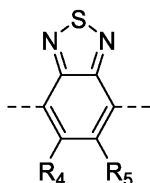
R₆ および R₇ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R は H、ハロ、シアノ、および置換されていてもよいアルキルから選択される。

【0132】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ib) の化合物であり、式中、A は、

【化55】



であり、式中、R₄ および R₅ は本明細書に開示の通りであり；

D は、

【化56】

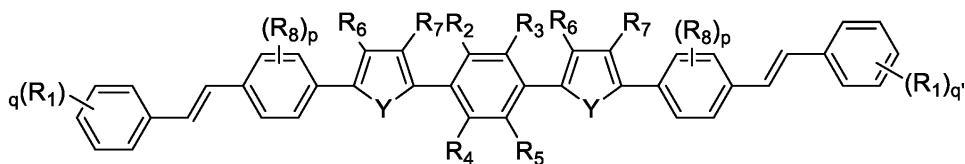


であり、式中、R₆ および R₇ は本明細書に開示の通りである。

【0133】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ic) の化合物であり：

【化57】



(Ic)

各 R₁ は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

R₂ および R₃ は連結されて、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R₄ および R₅ は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R₄ および R₅ は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよい

10

20

30

40

50

ヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

R_6 および R_7 は独立して H、ハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシから選択されるか；または

R_6 および R_7 は連結されて、置換されていてもよいシクロアルキル、置換されていてもよいシクロアルケニル、置換されていてもよいシクロアルキニル、置換されていてもよいヘテロシクリル、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールを形成し；

各 R_8 は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

Y は N R、O、または S であり；

各 p は 0 ～ 4 から独立して選択される整数であり；

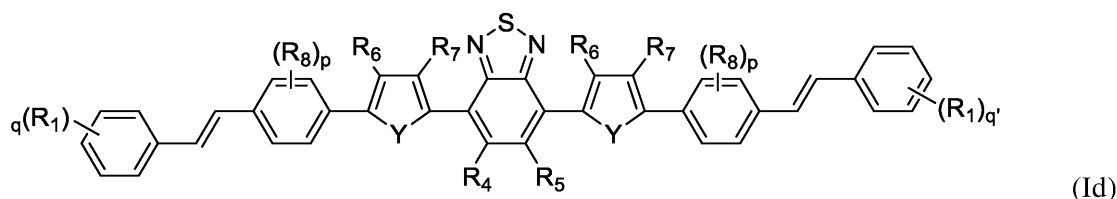
q は 1 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 1 ～ 5 から選択される整数である。

【0134】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Id) の化合物であり：

【化58】

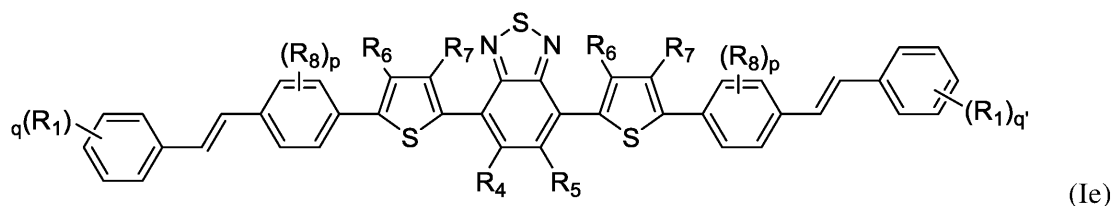


式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 Y 、 p 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りである。

【0135】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (Ie) の化合物であり：

【化59】

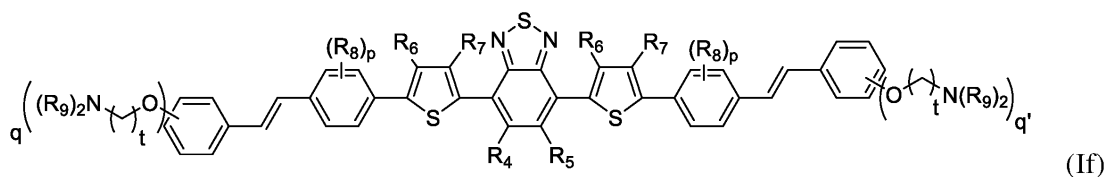


式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 p 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りである。

【0136】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物は式 (If) の化合物であり：

【化60】



式中、 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 p 、 q 、および q' は本明細書に開示の通りであり；

各 R_9 は独立して H または置換されていてもよいアルキルであり；
各 t は 1 ～ 8 から独立して選択される整数である。

【0137】

いくつかの実施形態では、各 R_8 は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択される。他の実施形態では、各 R_8 は独立してハロゲン、シアノ、または置換されていてもよいアルキルから選択される。他の実施形態では、各 R_8 は独立してハロゲン、シアノ、メチル、エチル、またはプロピルから選択される。

【0138】

いくつかの実施形態では、各 R_8 は独立して H または置換されていてもよい $C_1 \sim C_5$ アルキルから選択される。他の実施形態では、各 R_8 は独立して H または $C_1 \sim C_5$ アルキルから選択される。他の実施形態では、各 R_8 は独立して H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、または *tert*-ブチルから選択される。

10

【0139】

いくつかの実施形態では、各 R_9 は置換されていてもよいアルキルである。他の実施形態では、各 R_9 は $C_1 \sim C_5$ アルキルである。他の実施形態では、各 R_9 は独立してメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、または *tert*-ブチルから選択される。

【0140】

いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物は、

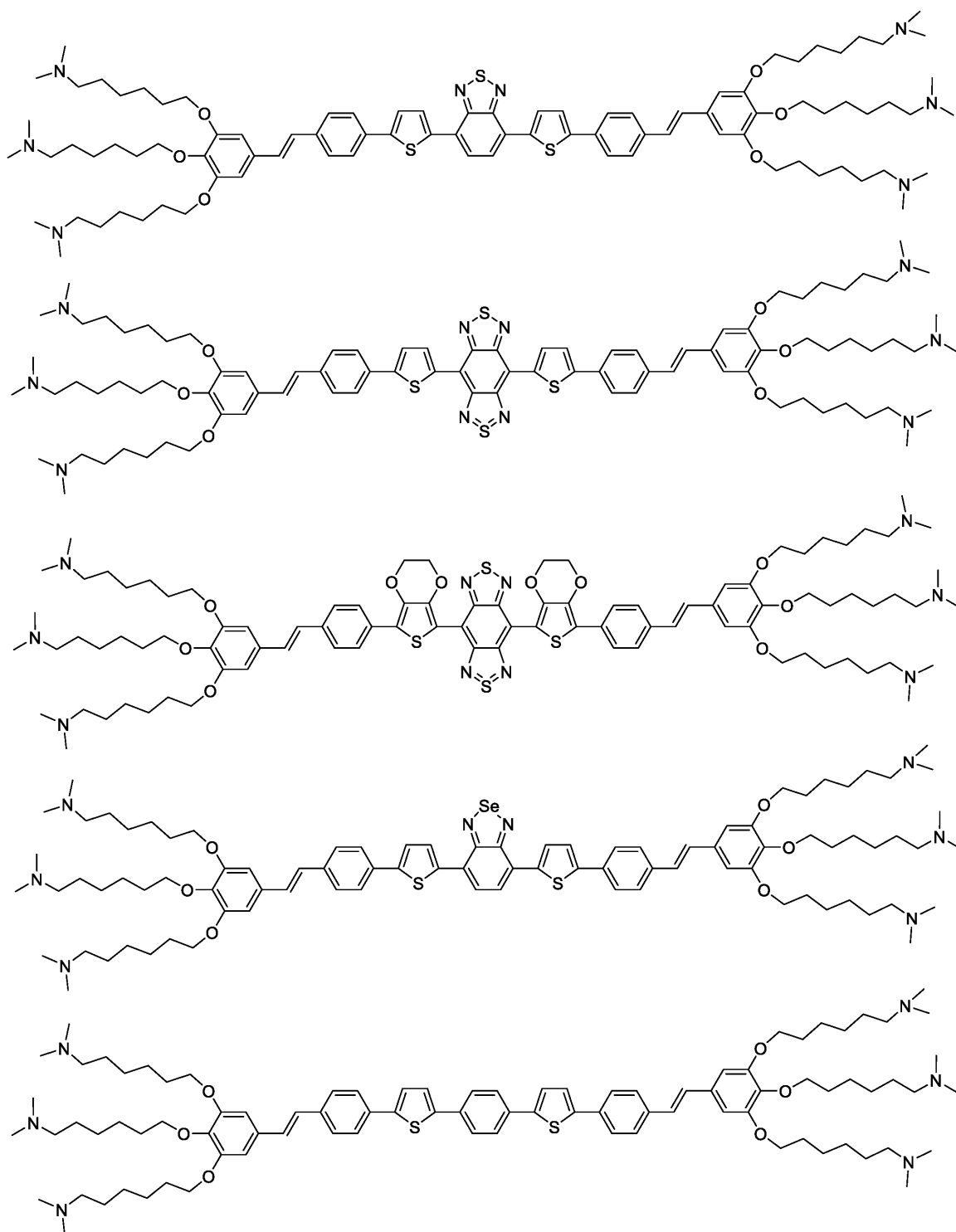
20

30

40

50

【化 6 1】



10

20

30

40

から選択される。

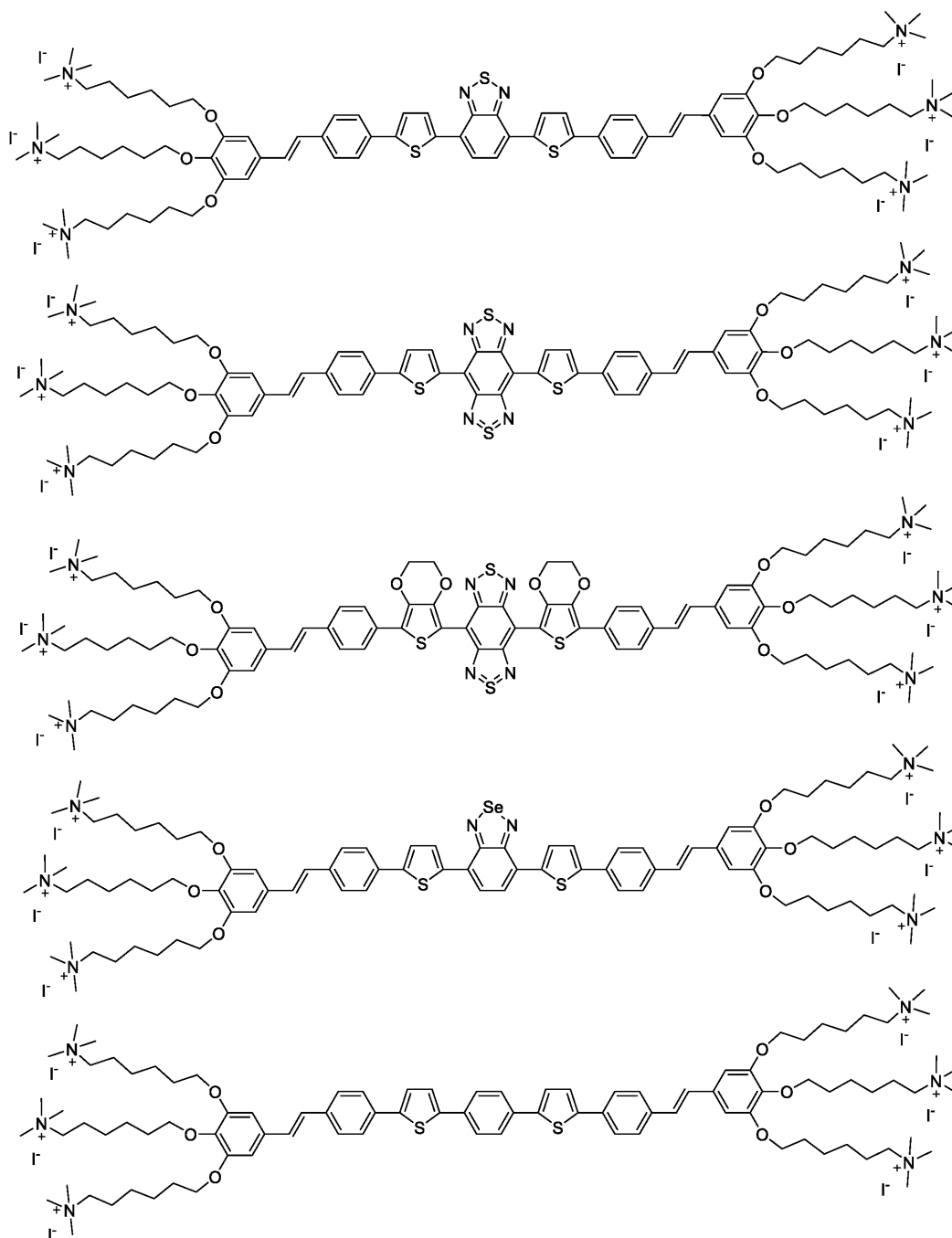
【0141】

いくつかの実施形態では、式（I）の化合物はその塩である。塩形態はプロトン化塩であることもあれば、式（I）の化合物をハロゲン化炭素でアルキル化することで生成されることもある。例えば、ハロゲン化アルキル（例えば CH_3Br または CH_3I ）が使用されることがある。いくつかの実施形態では、式（I）の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物は第四級アンモニウム塩である。これに関して、 R_1 が置換されていてもよいアミノである場合、各 R_1 はそれぞれの末端において少なくとも正の電荷を示すようにアルキル化されることがある。

【0142】

50

例えば、式（Ⅰ）の化合物の第四級アンモニウム塩は、
【化 6 2】



10

20

30

でありうる。

【0143】

本発明の化合物は、遊離化合物として、または溶媒和物（例えば水和物）として、結晶形であってもよく、いずれの形態も本発明の範囲内であるように意図されている。溶媒和の方法は当技術分野で一般的に知られている。

【0144】

本発明の化合物は固体または溶液として提供することができる。例えば、本化合物を凍結乾燥粉末として提供することができる。

【0145】

本発明の化合物は組成物として提供することができる。組成物は、本化合物を極性媒体中に1つの実体として含む。本明細書において使用される「極性媒体」は極性プロトン性溶媒および極性非プロトン性溶媒を含む。極性溶媒は、大きな双極子モーメントまた

40

50

は部分電荷を有しており、酸素および水素などの非常に様々な電気陰性度を有する原子間の結合を含む。プロトン性溶媒はO-HまたはN-H結合を有する。これらの結合によって水素結合への関与が可能になる。さらに、これらのO-HまたはN-H結合はプロトン(H^+)の供給源の役割を果たしうる。非プロトン性溶媒は、そのどこかに水素を有しているが、O-HまたはN-H結合を欠いており、したがってそれ自体との水素結合を形成することができない。極性溶媒としてはジクロロメタン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、アセトン、N,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、アンモニア、ブタノール、プロパノール、エタノール、メタノール、酢酸、および水が挙げられるがそれに限定されない。溶媒混合物の主成分が極性溶媒である溶媒混合物も本定義内に含まれる。例えば、水ベースの溶媒または溶媒系は、溶解しているイオン、塩、ならびにアミノ酸、タンパク質、糖、およびリン脂質などの分子を含んでもよい。これらの塩は塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸アンモニウム、酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化亜鉛、HEPESナトリウム、塩化カルシウム、硝酸第二鉄、炭酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、およびリン酸ナトリウムでありうるがそれに限定されない。したがって、生体液、生理的溶液、および培地も本定義内にある。

10

20

30

40

50

【0146】

いくつかの実施形態では、組成物は、式(I)または下位式(Ia~Ig)の化合物と、極性媒体とを含む。例えば、他の実施形態では、MIC値が $256\mu M$ である場合、組成物は、式(I)または下位式(Ia~Ig)の化合物と、極性媒体とを含み、式(I)または下位式(Ia~Ig)の化合物の最終濃度は約 $130\mu M$ である。他の実施形態では、濃度は約 $10\mu M$ 、約 $20\mu M$ 、約 $30\mu M$ 、約 $40\mu M$ 、約 $50\mu M$ 、約 $100\mu M$ 、約 $150\mu M$ 、約 $200\mu M$ 、約 $250\mu M$ 、約 $300\mu M$ 、約 $350\mu M$ 、または約 $400\mu M$ である。他の実施形態では、濃度は $10\mu M$ 以下、 $20\mu M$ 以下、 $30\mu M$ 以下、 $40\mu M$ 以下、 $50\mu M$ 以下、 $100\mu M$ 以下、 $150\mu M$ 以下、 $200\mu M$ 以下、 $250\mu M$ 以下、 $300\mu M$ 以下、 $350\mu M$ 以下、または $400\mu M$ 以下である。

【0147】

あるいは、本化合物をキットとして提供することもできる。キットは本化合物および極性媒体を含みうる。本化合物および極性媒体は、使用前に混合されるように、別々の容器に入れてもよく、別々に包装された構成要素としてもよい。あるいは、キットは、第1の極性媒体中の本化合物の組成物と、これとは別に第2の媒体とを、別々の容器に収容された構成要素として含んでもよい。キットは、細菌細胞の別の成分を染色するための別の色素をさらに含んでもよい。例えば、キットはFM 4-64をさらに含んでもよい。キットは賦形剤をさらに含んでもよい。賦形剤は、本化合物をさらに安定化させるように、かつ／または、本化合物が細菌細胞膜に侵入する前にその蛍光をさらに消光することでバックグラウンドノイズを減少させるように働きうる。

【0148】

フローサイトメトリーは、生体細胞、細菌細胞、および細胞外ベシクル(例えば脂質ベシクル、エキソソーム)を調べるための技術であり、学術機関および産業施設の両方の研究所において使用されている。これらの生物学的試料は、脂質二重層(膜)が不可欠であると特徴付けられ、COEは脂質二重層(膜)との高い親和性を維持するように設計される。したがって、脂質二重層内で結合する際の本発明の化合物の物理化学特性および光子特性によって、本化合物はフローサイトメトリー用途の色素として使用できる。

【0149】

本発明の化合物は蛍光プローブとしての使用に好適である。例えば、本化合物の骨格を、一定の長さ(約 $3.4nm$)を有するように、さらには特定の膜挿入に好適なトポロジーを有するように調整することができる。このように骨格の長さが延長されることで、脂質二重層の厚さ(約 $4nm$)に対応することができ、したがって細胞、ならびに大腸菌(*E. coli*)および黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)などの細菌に対する毒性がごくわずかになりうる(MIC値が $256\mu M$ を超える)。これに関して、本化合物を、細

胞生存率を低下させることなく、生体系中で色素として使用することができる。第二に、水性媒体中での十分な溶解性を実現するために、6個の正に帯電した側鎖を本化合物に末端基として含めることができる。疎水性共役コアの長さが増加するときに、COE化合物に良好な水溶性を与えるために荷電側鎖の数のバランスを取らなければならないということが分かった。好ましくない親水性／疎水性プロファイルおよび強力な凝集傾向は、有効な膜挿入に影響を及ぼし、蛍光安定性に影響を及ぼす（蛍光消光が生じやすくなる）であろう。例えば、両末端に4個の正に帯電した側鎖を有する5ベンゼン環オリゴフェニレンビニレン骨格は何らかの凝集傾向を示す。濃度 1 mg mL^{-1} では、水溶液が混濁しているのが肉眼でも見られるであろう。このことは、不完全に溶解した懸濁液中に多くの凝集体が存在することを示唆している。6個の荷電側鎖により修飾される際に、COE化合物は水溶液中での優れた溶解性 ($> 50 \text{ mg mL}^{-1}$) を示す。COE化合物の水溶液が透明かつ均一であるという特徴は、特に、希釈および使用の前に高濃度で保存することが求められる場合に、その実用的価値を高める。第三に、COE化合物の骨格が延長されることで膜安定性の向上が促されると予想され、一方、親水性基が多くなることで水溶性が高くなると予想される。加えて、これらの物理的特徴を組み合わせることで、疎水性相互作用および静電相互作用の両方が増加し、それにより二重層内での挿入が促進されることが想定された。したがって、COE化合物は、膜標識化色素として使用される場合に、長時間の染色のために強力な結合力によって脂質二重層内に安定して取り込まれうる。

10

【0150】

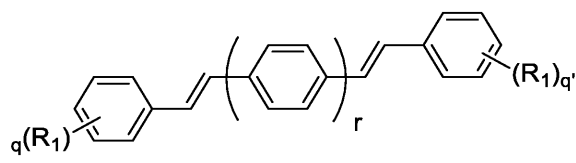
図16は、本化合物のA単位およびD単位を変化させたときの蛍光発光の変化を示す。交互に配置されたフェニル部分が弱い電子受容性および電子供与性を示すCOE-Quinを参照して、A単位およびD単位の電子受容性および電子供与性を調節することで、蛍光励起、したがって発光を特定の波長に較正することができる。また、これらの単位を選択によって、FWHMが狭くなり、したがって特異性が向上する。

20

【0151】

したがって、本発明はまた、式(Ig)の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を提供する：

【化63】



30

(Ig)

式中、

各 R_1 は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオ、または置換されていてもよいホスホリルから選択され；

40

q は1～5から選択される整数であり；

q' は1～5から選択される整数であり；

r は1～5から選択される整数である。

【0152】

これらの化合物を、細菌細胞、哺乳動物細胞（A549がん細胞および赤血球を含むがそれに限定されない）、ならびにエキソソーム（特に未結合エキソソーム）の染色に適用することができる。

【0153】

50

したがって、本発明は、細胞および／または脂質ベシクルを標識化する方法であって、
a) 式 (I)、下位式 (I a ~ I g) の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を細胞
および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程を含む、方法を提供する。

【0154】

細胞は哺乳動物細胞または細菌細胞でありうる。いくつかの実施形態では、細菌細胞は
グラム陽性菌細胞またはグラム陰性菌細胞である。他の実施形態では、グラム陰性菌細胞
またはグラム陽性菌細胞は大腸菌、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、黄色ブドウ球
菌、フェカリス菌 (*E. faecalis*)、シュワネラ・オネイデンシス (*S. one
idensis*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、またはそれ
らの組み合わせからなる群から選択される。哺乳動物細胞は細胞株からのもの、または対
象から得られた試料からのものでありうる。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、細菌細胞の試料は浮遊菌細胞 (*planktonic bacterial cells*) の試料である。

【0156】

本明細書において使用される「浮遊菌細胞」とは、懸濁状態である自由流動性の細菌細胞
を意味する。これは、細菌細胞の構造化集合体が自己生成型ポリマーマトリックスに封
入されて不活性表面または生体表面に付着する、固着状態 (またはバイオフィルム) とは
対照的である。これに関して、浮遊菌は自由に生育する細菌であって、実験室における試
験管およびフラスコ培養物中で成長する集団を構成する。

20

【0157】

脂質ベシクルとは、脂質二重層で封入された液体または細胞質からなる、細胞の内側ま
たは外側の構造のことである。ベシクルは、形質膜内の物質の分泌 (エキソサイトーシス)
、取り込み (エンドサイトーシス) 、および輸送の過程に自然に形成される。あるいは、
人工的に調製されることもあり、その場合はリポソームと呼ばれる。単層脂質ベシクル
は1個のリン脂質二重層を有し、一方、多層脂質ベシクルは2個以上の二重層を有する
。ベシクルは細胞内の他のオルガネラと融合することもある。細胞から放出されたベシクル
は細胞外ベシクルである。例えば、脂質ベシクルはエキソソームでありうる。エキソソ
ームとは、大部分の真核細胞のエンドソーム区画において産生される膜結合細胞外ベシクル
のことである。これらの脂質ベシクルは範囲内に含まれる。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、脂質ベシクルは細胞外ベシクルである。他の実施形態では、
脂質ベシクルはエキソソームである。

【0159】

いくつかの実施形態では、本方法は、

所定の条件下で細胞および／または脂質ベシクルの試料と式 (I)、下位式 (I a ~ I
g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物とを接触させる工程
を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、細胞および／または脂質ベシクルは、そのMIC値未満であ
る化合物濃度の式 (I)、下位式 (I a ~ I g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶
媒和物と共にインキュベートされる。他の実施形態では、細胞および／または脂質ベシクル
は、そのMIC値の半分未満である化合物濃度の式 (I)、下位式 (I a ~ I g) の化
合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物と共にインキュベートされる。いくつかの実施
形態では、細胞および／または脂質ベシクルは、そのMIC値の3分の1未満である化
合物濃度の式 (I)、下位式 (I a ~ I g) の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物
と共にインキュベートされる。最小阻害濃度 (MIC) とは、1個または複数の細菌の目
に見える増殖を防止する、化学物質の最低濃度のことである。MICは微生物および化学
物質に依存する。化合物のMICは、液体培地中または固体増殖培地 (例えば寒天) プレ
ート上で細胞を様々な濃度の該化合物と共にインキュベートし、細菌が増殖しなかった化

40

50

合物濃度、および細菌増殖を可能にした次に低い用量を同定することにより確定することができる。この情報は、化合物濃度に対する濁度プロットからも導出することができる。MIC値を確定する他の方法が利用可能であり、例えばEtest試験またはKirby-Bauer試験を使用してもよい。

【0161】

いくつかの実施形態では、MIC値は約1 μ M超である。他の実施形態では、MIC値は約5 μ M超、約10 μ M超、約20 μ M超、約30 μ M超、約40 μ M超、約50 μ M超、約60 μ M超、約70 μ M超、約80 μ M超、約90 μ M超、約100 μ M超、約150 μ M超、約200 μ M超、約250 μ M超、約300 μ M超、約350 μ M超、約400 μ M超、または約500 μ M超である。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia~Ig)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は濃度約1 nM~約100 μ Mで実現される。他の実施形態では、濃度は約1 nM~約90 μ M、約1 nM~約80 μ M、約1 nM~約70 μ M、約1 nM~約60 μ M、約1 nM~約50 μ M、約1 nM~約40 μ M、約1 nM~約30 μ M、約1 nM~約20 μ M、約1 nM~約10 μ M、約1 nM~約5 μ M、約1 nM~約1 μ M、約1 nM~約900 nM、約1 nM~約800 nM、約1 nM~約700 nM、約1 nM~約600 nM、約1 nM~約500 nM、約1 nM~約400 nM、約1 nM~約300 nM、約1 nM~約200 nM、約1 nM~約100 nM、約1 nM~約50 nM、または約1 nM~約20 nMである。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia~Ig)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は細胞および／または脂質ベシクルと共に約5℃~約50℃でインキュベートされる。他の実施形態では、温度は約5℃~約45℃、約5℃~約40℃、約5℃~約35℃、約10℃~約35℃、約15℃~約35℃、または約15℃~約30℃である。他の実施形態では、温度は室温または周囲温度である。

【0164】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(Ia~Ig)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は細胞および／または脂質ベシクルと共に約5分間~約120分間インキュベートされる。他の実施形態では、期間は約5分~約110分、約5分~約100分、約5分~約90分、約5分~約80分、約5分~約70分、約5分~約60分、約5分~約50分、約5分~約40分、約5分~約30分、約5分~約20分、または約5分~約10分である。

30

【0165】

式(I)、下位式(Ia~Ig)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物、ならびに細胞および／または脂質ベシクルは水性媒体中でインキュベートされうる。

【0166】

本明細書において使用される「水性媒体」という用語は、水ベースの溶媒または溶媒系、および水で主に構成される溶媒または溶媒系を意味する。これらの溶媒は極性もしくは非極性、および／またはプロトン性もしくは非プロトン性でありうる。溶媒系とは、最終的な1つの相を生じさせる溶媒の組み合わせを意味する。「溶媒」および「溶媒系」の両方としてはペンタン、シクロペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、ジオキサン、クロロホルム、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、アセトン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ニトロメタン、炭酸プロピレン、ギ酸、ブタノール、イソプロパノール、プロパノール、エタノール、メタノール、酢酸、エチレングリコール、ジエチレングリコール、または水を挙げることができるがそれに限定されない。水ベースの溶媒または溶媒系は、溶解しているイオン、塩、ならびにアミノ酸、タンパク質、糖、およびリン脂質などの分子を含んでもよい。これらの塩は塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸アンモニウム、酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸カリウム、塩化カリウム、酢酸

40

50

ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化亜鉛、H E P E S ナトリウム、塩化カルシウム、硝酸第二鉄、炭酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、およびリン酸ナトリウムでありうるがそれに限定されない。したがって、生体液、生理的溶液、および培地も本定義内にある。

【0167】

本発明はまた、蛍光検出器を使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式(I)、下位式(I a ~ I g)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞および／または脂質ベシクルを蛍光検出器に通す工程を含む、方法を提供する。

10

【0168】

式(I)、下位式(I a ~ I g)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が細胞膜または脂質二重層に挿入される際に蛍光を発光することから、蛍光ベースの技術を使用して、式(I)、下位式(I a ~ I g)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を取り込まれた細胞および／または脂質ベシクルを検出することができる。蛍光ベースの技術の例としては蛍光顕微鏡観察、共焦点顕微鏡観察、プレートリーダー、蛍光光度計、蛍光分光法、およびフローサイトメトリー（例えば蛍光活性化細胞選別）が挙げられるがそれに限定されない。

【0169】

いくつかの実施形態では、フローサイトメーターを使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法は、

a) 式(I)、下位式(I a ~ I g)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞および／または脂質ベシクルをフローサイトメーターに流す工程を含む。

20

【0170】

式(I)、下位式(I a ~ I g)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を取り込まれた場合の細胞および／または脂質ベシクルは、約300nm~約1000nmの波長範囲の電磁放射線（源）により励起することができる。

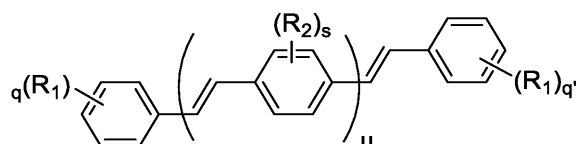
30

【0171】

本発明はまた、フローサイトメーターを使用して細胞および／または脂質ベシクルを検出する方法であって、

a) 式(IV)；

【化64】



(IV)

40

(式中、

R₁は独立してハロゲン、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、置換されていてもよいアルキニル、置換されていてもよいアルコキシ、置換されていてもよいアルケニルオキシ、置換されていてもよいアルキニルオキシ、置換されていてもよいアシル、置換されていてもよいオキシアシル、置換されていてもよいアシルオキシ、置換されていてもよいアミノ、置換されていてもよいアミノアシル、置換されていてもよいアシルアミノ、置換されていてもよいアミノアシルオキシ、置換されていてもよいオキシアシルアミノ、置換されていてもよいオキシアシルオキシ、または置換されていてもよいチオもしくは置換されていてもよいホスホリルから選択され；

R₂は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよ

50

いアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択され；

u は 3 ～ 15 から選択される整数であり；

各 s は 0 ～ 4 から独立して選択される整数であり；

q は 2 ～ 5 から選択される整数であり；

q' は 2 ～ 5 から選択される整数である）

の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物を細胞および／または脂質ベシクルと共にインキュベートする工程；および

b) 細胞および／または脂質ベシクルをフローサイトメーターに流す工程を含む、方法を提供する。

【0172】

いくつかの実施形態では、R₂ は独立してハロゲン、シアノ、置換されていてもよいアルキル、置換されていてもよいアルケニル、または置換されていてもよいアルキニルから選択される。他の実施形態では、R₂ は独立してハロゲン、シアノ、または置換されていてもよいアルキルから選択される。他の実施形態では、R₂ は独立してハロゲン、シアノ、メチル、エチル、またはプロピルから選択される。

【0173】

いくつかの実施形態では、u は 3 ～ 14 から選択される整数である。他の実施形態では、u は 3 ～ 12、3 ～ 10、3 ～ 9、3 ～ 8、3 ～ 7、4 ～ 7、または 4 ～ 6 から選択される整数である。他の実施形態では、u は 3、4、5、6、または 7 である。いくつかの実施形態では、u は 4、5、または 6 である。他の実施形態では、u は 4 である。

【0174】

式 (IV) の化合物の塩または溶媒和物の形態の例を以下に示す。式 (IV) の化合物のこれらの例も本開示の範囲内である。

10

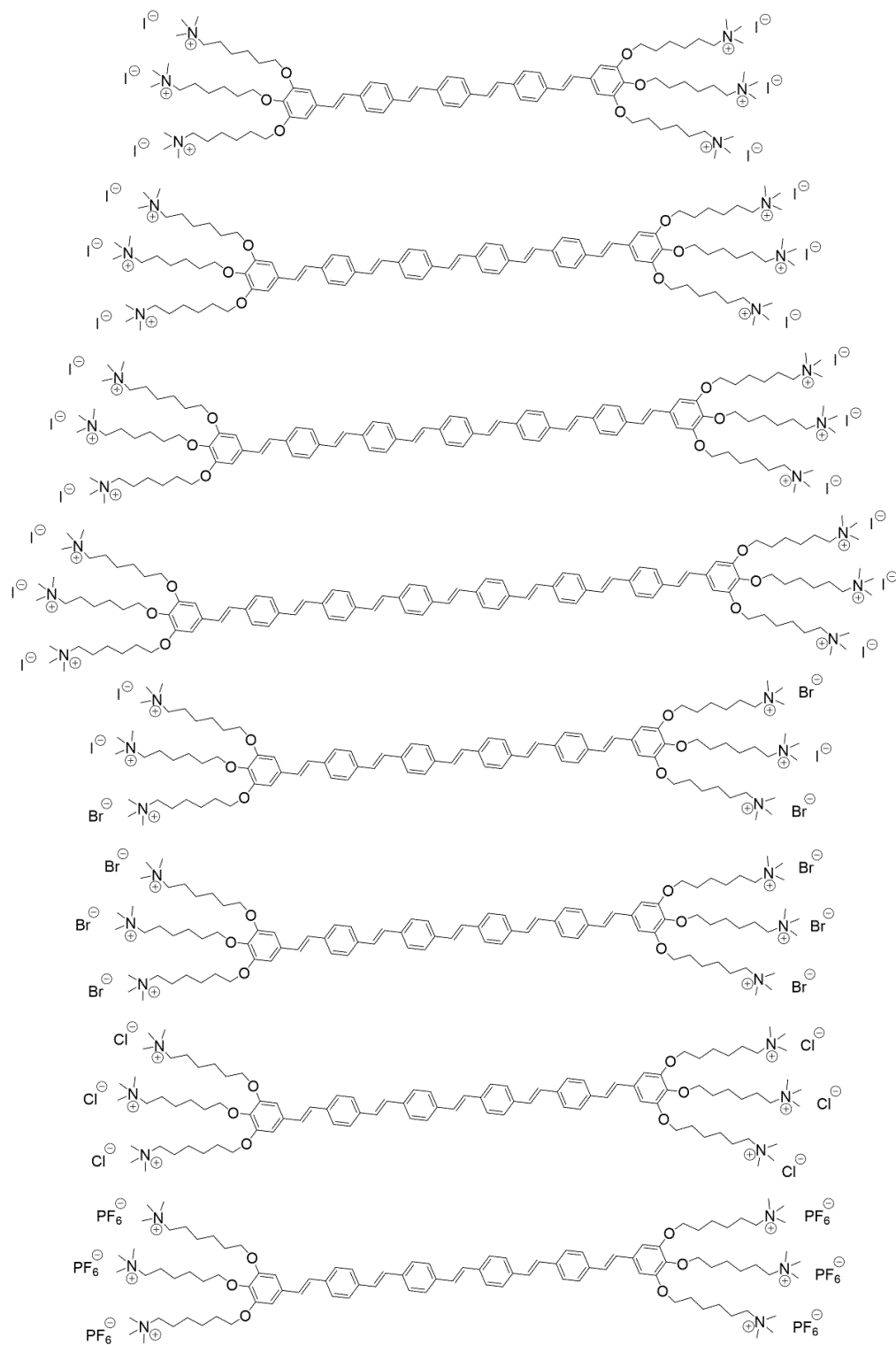
20

30

40

50

【化 6 5】



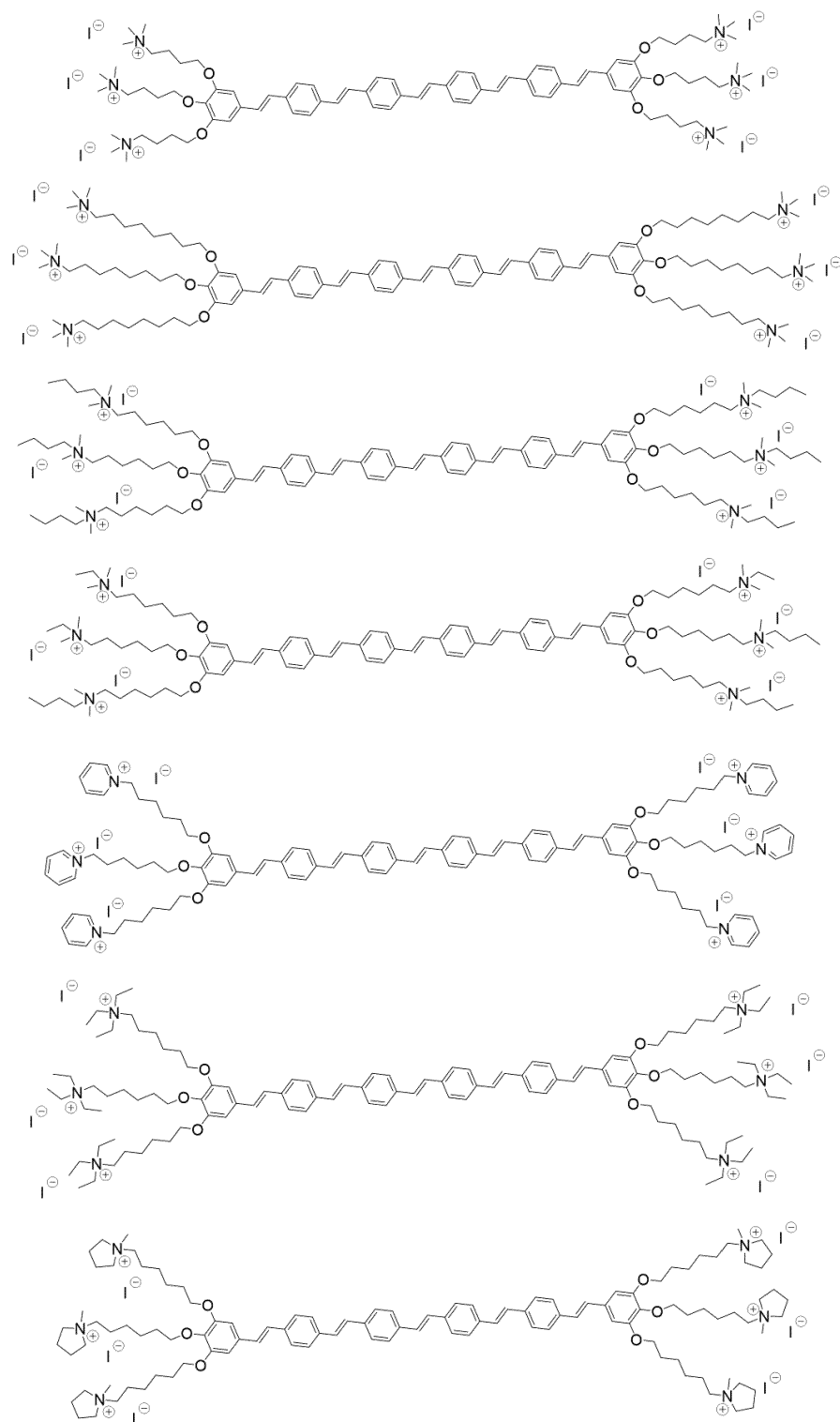
10

20

30

40

50



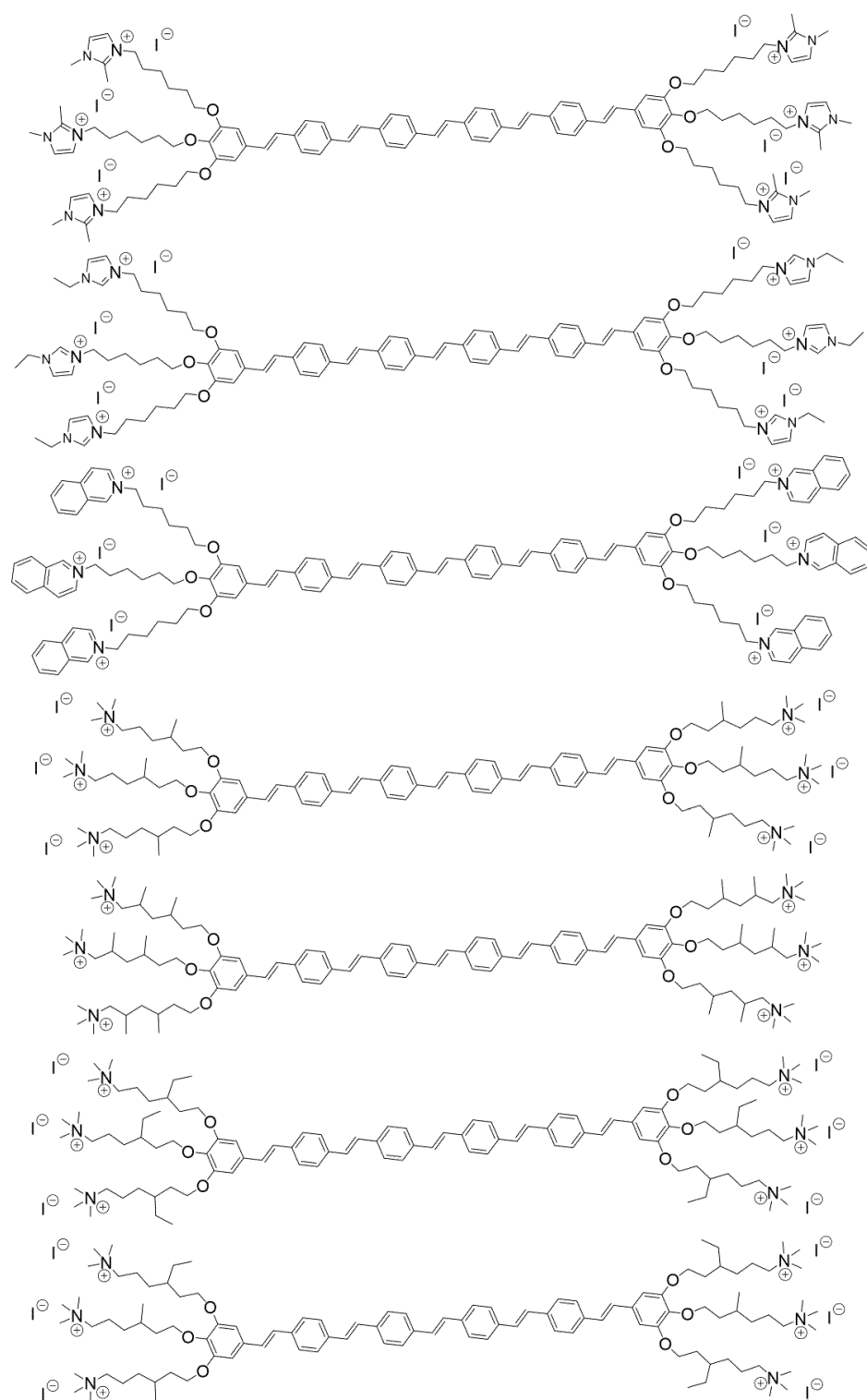
10

20

30

40

50



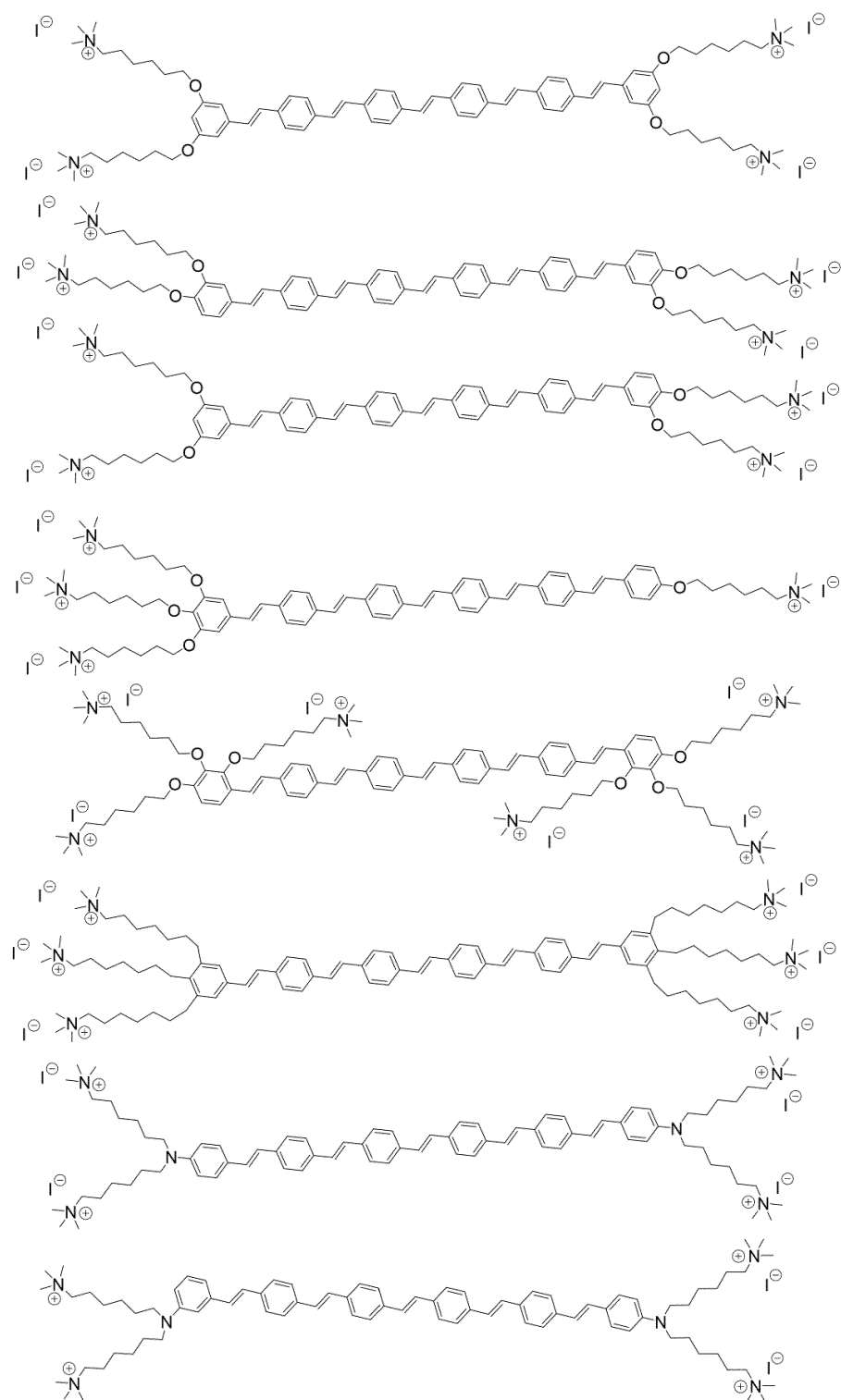
10

20

30

40

50



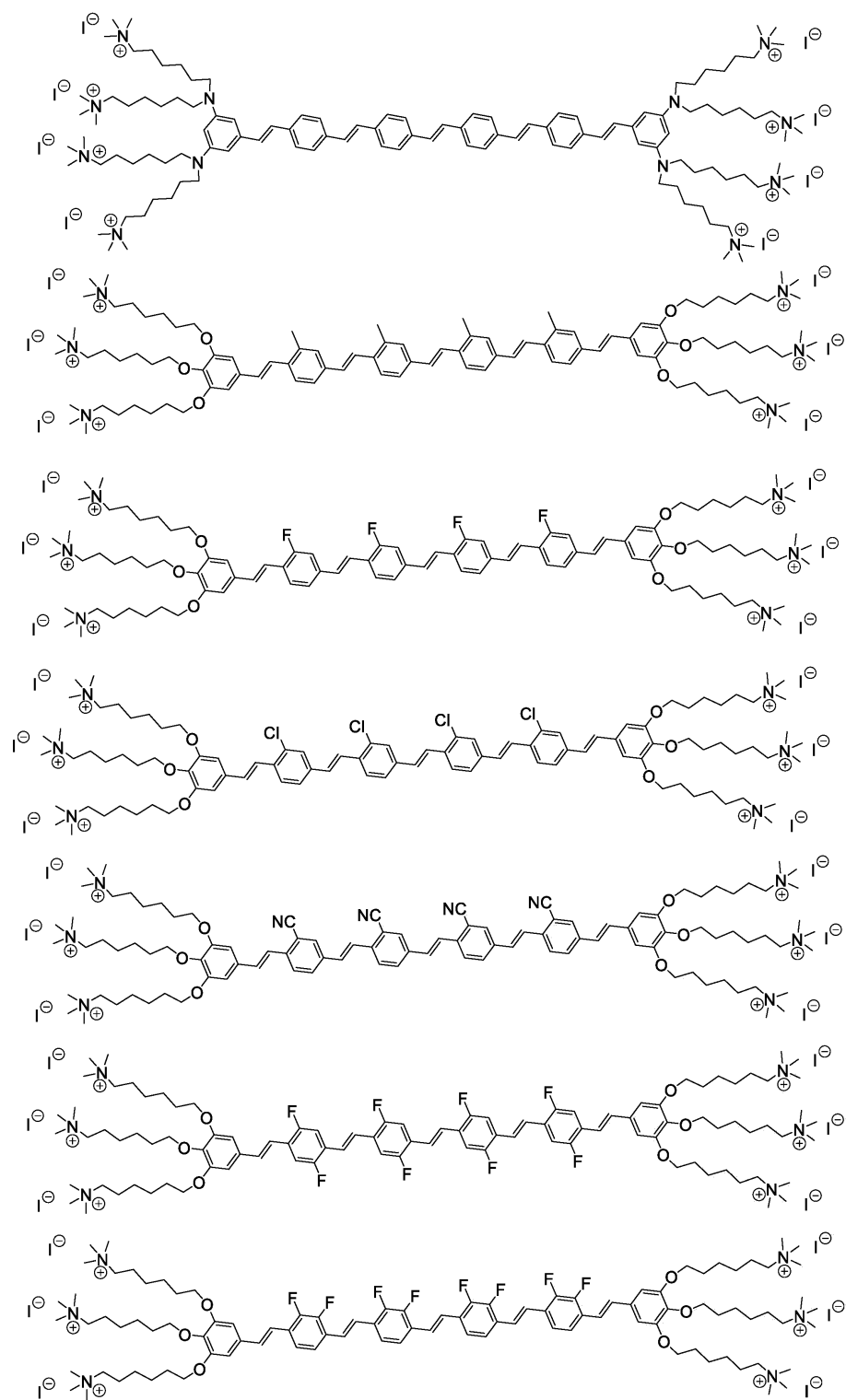
10

20

30

40

50



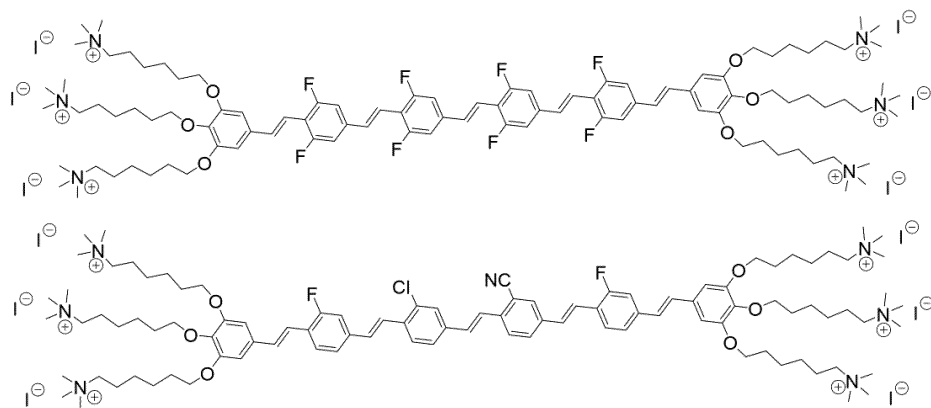
10

20

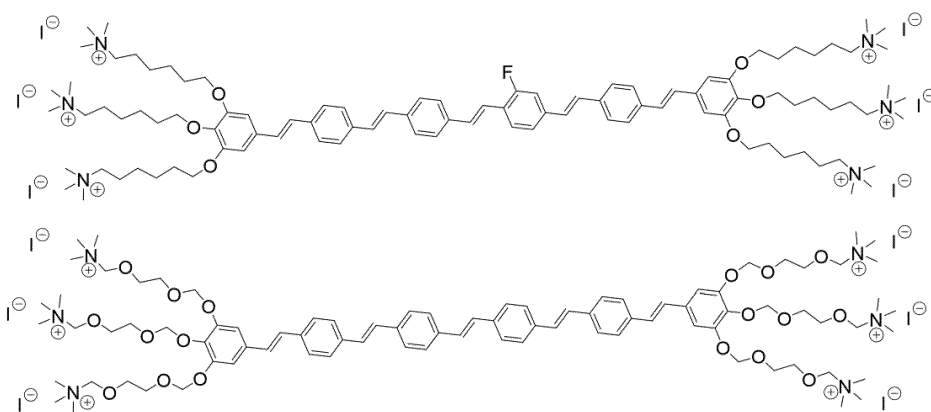
30

40

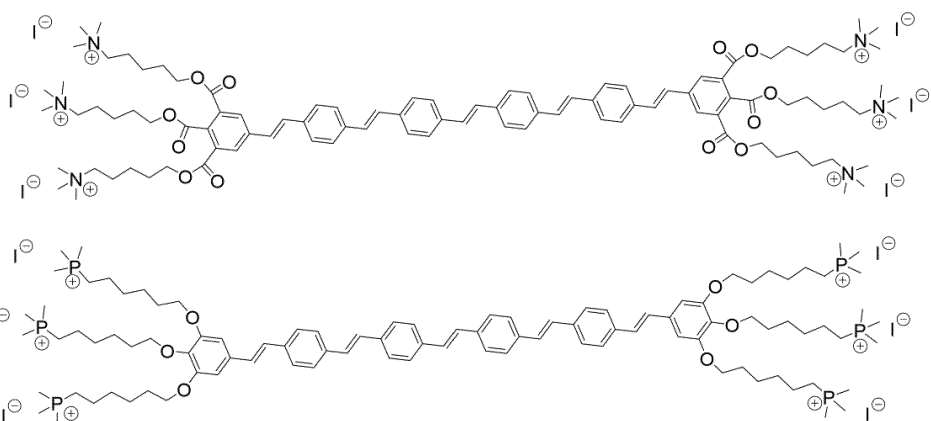
50



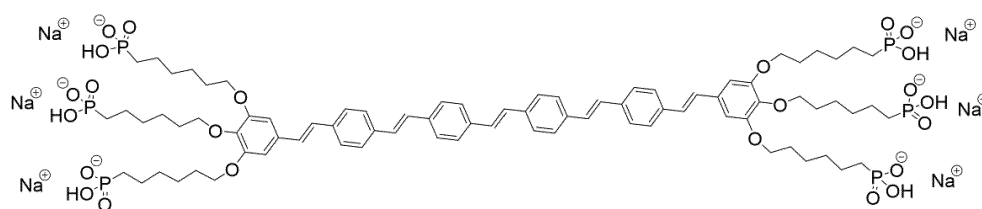
10



20

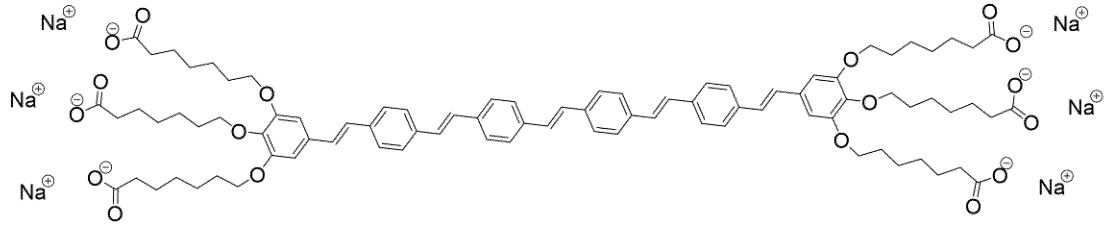
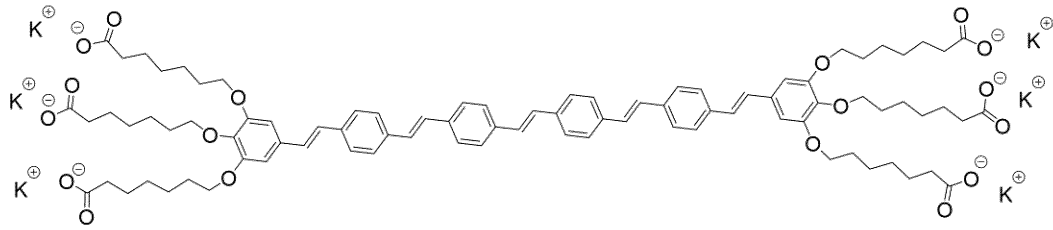


30

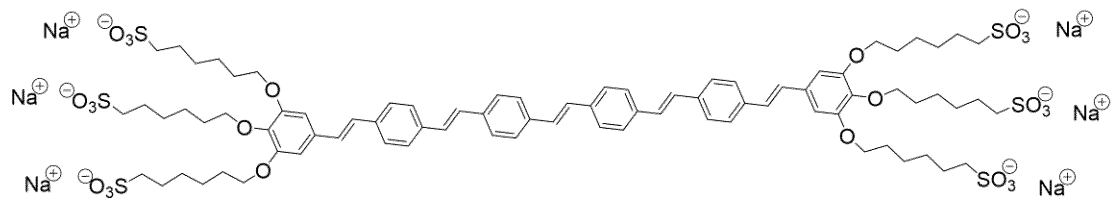


40

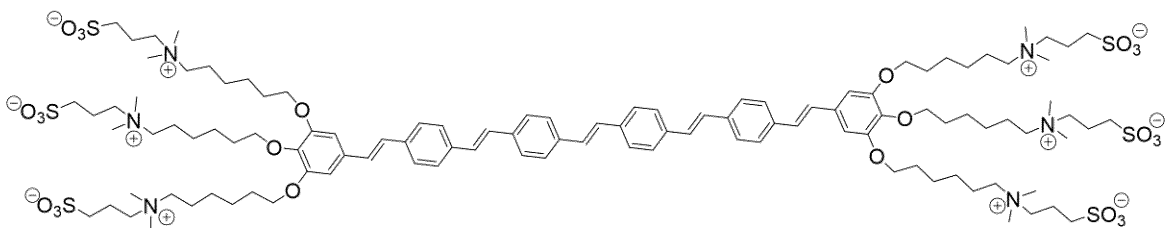
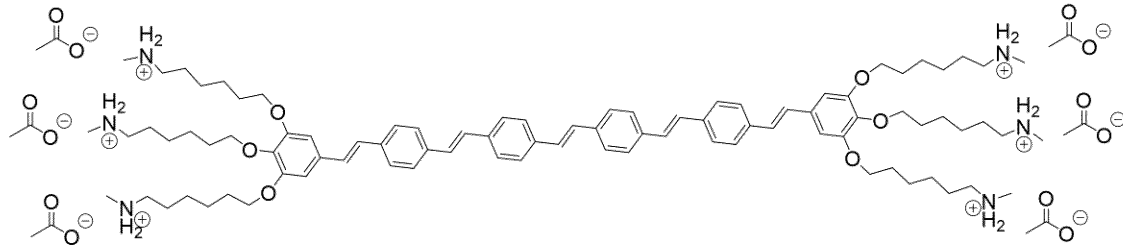
50



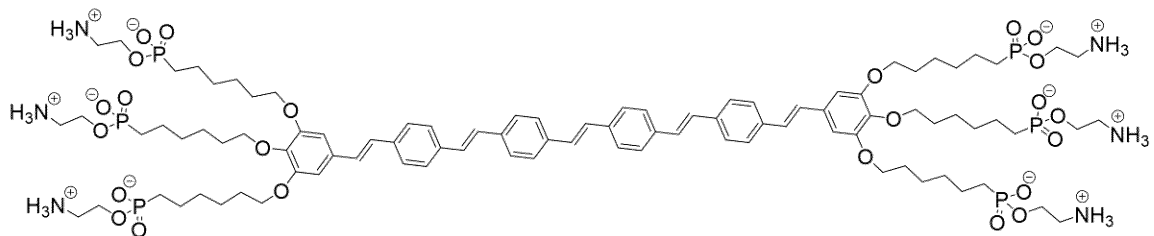
10



20



30



40

【0175】

細胞は付着細胞であることもあれば、懸濁状態であることもある。脂質ベシクルはエキソソーム（真核細胞のエンドソーム区画において産生される膜結合細胞外ベシクル）、合成および非合成リポソーム、または脂質ナノ粒子（低pHで正に帯電し、生理的pHで中性である、イオン化可能な脂質でできた球状のベシクル）でありうる。有利なことに、蛍光プローブによる細胞膜挿入後に、蛍光プローブが後の細胞集団に侵入することができることが分かった。

【0176】

細胞および／または脂質ベシクルは、インキュベーション工程後に式（I）、下位式（

50

I a～I g)、および／もしくは式(I V)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物で染色される。いくつかの実施形態では、インキュベーション期間は約1分～約12日間、約1分～約10日、約1分～約8日、約1分～約6日、約1分～約5日、約1分～約4日、約1分～約3日、約1分～約2日、約1分～約24時間、約1分～約20時間、約1分～約16時間、約1分～約12時間、約1分～約10時間、約1分～約9時間、約1分～約8時間、約1分～約7時間、約1分～約6時間、約5分～約6時間、約5分～約5.5時間、約5分～約5時間、約5分～約4.5時間、約5分～約4時間、約5分～約3.5時間、約5分～約3時間、約5分～約2.5時間、約5分～約2時間、約5分～約1.5時間、約5分～約1時間、約5分～約50分、約5分～約40分、約5分～約30分、約5分～約20分、または約5分～約10分である。他の実施形態では、インキュベーション期間は約10分である。

10

【0177】

式(I)、下位式(I a～I g)、および／もしくは式(I V)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物の濃度を制御することで、試料の分析に十分な量の時間を得ることができる。いくつかの実施形態では、細胞および／または脂質ベシクルは、式(I)および／または式(I V)の化合物を試料に接触させてから30分以内にフローサイトメーターに通される。他の実施形態では、時間は10分以内、20分以内、30分以内、40分以内、50分以内、1時間以内、2時間以内、3時間以内、4時間以内、5時間以内、6時間以内、8時間以内、10時間以内、12時間以内、16時間以内、20時間以内、24時間以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、8日以内、10日以内、または12日以内である。他の実施形態では、時間は約30分超、約1時間超、約2時間超、約3時間超、約4時間超、約5時間超、約6時間超、約8時間超、約10時間超、約12時間超、約16時間超、約20時間超、約24時間超、約2日超、約3日超、約4日超、約5日超、約6日超、約8日超、約10日超、または約12日超である。

20

【0178】

いくつかの実施形態では、細胞および／または脂質ベシクルは精製工程なしにフローサイトメーターに流され得る。これが可能であるのは、式(I)、下位式(I a～I g)、および／もしくは式(I V)の遊離化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が弱発光性であって、生じさせるバックグラウンドが比較的低いことが理由である。

【0179】

細胞および／または脂質ベシクルをフローサイトメーターに流すことで、細胞および／または脂質ベシクルを電磁放射線により励起し、続いて検出器により検出することができる。したがって、本方法は、細胞および／または脂質ベシクルを波長約2500nm未満または約1000nm未満を有する電磁放射線に曝露する工程をさらに含む。

30

【0180】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(I a～I g)、および／もしくは式(I V)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は波長約300nm～約1000nm、または約400nm～約700nmで蛍光励起を示す。DとAとの組み合わせに応じて、励起がこの波長範囲内で調整可能でありうる。

【0181】

いくつかの実施形態では、式(I)、下位式(I a～I g)、および／もしくは式(I V)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は半値全幅(FWHM)約10nm～約200nmで蛍光励起ピークを示す。他の実施形態では、FWHMは約10nm～約190nm、約10nm～約180nm、約10nm～約170nm、約10nm～約160nm、約10nm～約150nm、約10nm～約140nm、約10nm～約130nm、約10nm～約120nm、約10nm～約110nm、または約10nm～約100nmである。他の実施形態では、FWHMは約20nm～約200nm、約30nm～約200nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約60nm～約200nm、約70nm～約200nm、約80nm～約200nm、約90nm～約200nm、または約100nm～約200nmである。

40

50

【0182】

いくつかの実施形態では、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は波長約300nm～約2000nmで蛍光発光を示す。他の実施形態では、範囲は約300nm～約1900nm、約300nm～約1800nm、約300nm～約1700nm、約300nm～約1600nm、または約300nm～約1500nmである。DとAとの組み合わせに応じて、励起がこの波長範囲内で調整可能でありうる。

【0183】

いくつかの実施形態では、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は半値全幅（FWHM）約10nm～約200nmで蛍光発光ピークを示す。他の実施形態では、FWHMは約10nm～約190nm、約10nm～約180nm、約10nm～約170nm、約10nm～約160nm、約10nm～約150nm、約10nm～約140nm、約10nm～約130nm、約10nm～約120nm、約10nm～約110nm、または約10nm～約100nmである。他の実施形態では、FWHMは約20nm～約200nm、約30nm～約200nm、約40nm～約200nm、約50nm～約200nm、約60nm～約200nm、約70nm～約200nm、約80nm～約200nm、約90nm～約200nm、または約100nm～約200nmである。

【0184】

いくつかの実施形態では、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が細胞膜および／または脂質膜に挿入されるとき、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物は、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物の対照試料に比べて約2倍超～約500倍の発光強度を示す。他の実施形態では、発光強度は約10倍超～約500倍、約20倍超～約500倍、約30倍超～約500倍、約40倍超～約500倍、約50倍超～約500倍、約60倍超～約500倍、約70倍超～約500倍、約80倍超～約500倍、約90倍超～約500倍、約100倍超～約500倍、約100倍超～約450倍、約150倍超～約450倍、約200倍超～約450倍、約250倍超～約450倍、約300倍超～約450倍、または約350倍超～約450倍である。

【0185】

実験における対照とは、試験される独立変数が結果に影響を与え得ない、実験の残りから切り離された群のことである。細胞および／または脂質ベシクルの試料を試験する場合、少なくとも1つの対照試料は式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物を水性媒体／水媒体中に含む。この点において、対照試料は細胞および／または脂質ベシクルを含まない。

【0186】

有利なことに、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が水性媒体に溶解している際に示す光ルミネセンスは、低い（またはごくわずか）。しかし、脂質二重層に分配されると、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物の光ルミネセンスは増強される。局所環境が疎水性の環境（脂質二重層のアルキル鎖）に変化することで、蛍光が増強されると考えられる。蛍光とは、光または他の電磁放射線を吸収した物質による光の発光のことである。一般に、発光された光は、吸収された光よりも長い波長を有する。

【0187】

有利なことに、式（I）、下位式（Ia～Ig）、および／もしくは式（IV）の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が無毒であり（もしくは低い毒性を示し）、かつ／または励起に対して安定であることから、一定の励起下で光ルミネセンス強度をある程度の期間維持することができる。これに関して、画像化のために本化合物を適切な波長下

で励起させるとき、光ルミネセンス強度はある程度の時間減少しない。これは、エネルギーを散逸および移動させて、それにより本化合物の局所的な加熱および分解を防止する、共役系が理由であると考えられる。いくつかの実施形態では、光ルミネセンス強度は少なくとも20分間、少なくとも30分間、少なくとも40分間、少なくとも50分間、少なくとも60分間、少なくとも1.5時間、少なくとも2時間、少なくとも3時間、少なくとも4時間、少なくとも6時間、少なくとも10時間、または少なくとも24時間維持されうる。

【0188】

式(I)、下位式(Ia~Ig)、および／もしくは式(IV)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物は他の色素、例えば膜色素との組み合わせで働きうる。例えば、細菌混合物中でその場で細菌エンベロープの種類を認識するために、市販の色素FM4-64を加えることができる。これに関して、多微生物試料を認識可能な二重色素系も開示される。これらの方法は、使用が容易であり、色素混合物の単純な適用しか必要ではなく、定着または他の前処理も必要ではなく、式(I)、下位式(Ia~Ig)、および／もしくは式(IV)の化合物、またはその塩もしくは溶媒和物は、水溶液中で安定であり、生体系中で細胞をモニタリングするために使用可能である。

10

【0189】

したがって、1つの実施形態では、本方法は、細胞および／または脂質ベシクルと別の色素とを接触させる工程をさらに含む。色素は、細胞中の細胞膜、核、DNA、RNA、または他のオルガネラを染色するために使用可能である。色素は蛍光プローブ、例えばFM4-64、FM 2-10、FM 1-43、ヨウ化プロピジウム、SYTO 82、SYTO 83、SYTO 84、SYTO 85、YOYO（登録商標）-3ヨウ化物、YO-PRO（商標）-3ヨウ化物、BOBO（商標）-3ヨウ化物、エチジウムホモダイマー1、エチジウムホモダイマー2、エチジウムモノアジド、アクリジンオレンジ、CellMask（商標）形質膜染色、またはDi-4-ANEPPSでありうる。

20

【0190】

本発明はまた、細胞および／または脂質ベシクルを検出および／または定量するためのフローシステムであって、

a) 細胞および／または脂質ベシクルを標識化するための、式(I)、下位式(Ia~Ig)、および／もしくは式(IV)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物；

30

b) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルをフローシステムに導入するための入口；

c) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルからの蛍光発光を検出するための、入口と流体連通した検出手段；ならびに

任意選択でd) 標識化された細胞および／または脂質ベシクルを定量するための計数手段を含む、フローシステムを提供する。

【0191】

フローシステムは例えばマイクロ流体チップでありうる。

【0192】

いくつかの実施形態では、フローシステムはインキュベーション手段をさらに含む。インキュベーション手段によって、式(I)、下位式(Ia~Ig)、および／もしくは式(IV)の化合物、またはそれらの塩もしくは溶媒和物が細胞膜にまたは脂質二重層内に挿入される。

40

【0193】

いくつかの実施形態では、検出手段は蛍光検出器である。

【0194】

記載される実施形態の様々な態様に関して、多くのさらなる修正形態および交換形態が可能であることが認識されよう。したがって、記載される態様は、添付の特許請求の範囲の真意および範囲内にあるすべてのこれらの改変形態、修正形態、および変形形態を包含するように意図されている。

50

【0195】

以下の本明細書および特許請求の範囲全体を通じて、文脈が別途必要としない限り、「含む (comprise)」という用語、ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprising)」などの変形は、記載される整数もしくは工程、または整数群もしくは工程群の包含を含意するが、任意の他の整数もしくは工程、または整数群もしくは工程群の排除を含意しないものと理解されよう。

【0196】

本明細書における、任意の先行刊行物（もしくはそれから導かれる情報）に対する、または公知である任意の事項に対する言及は、当該の先行刊行物（もしくはそれから導かれる情報）または公知事項が、本明細書が関連する事業分野における共通の一般的知識の一部を形成することの認知もしくは承認、または任意の形態の示唆ではなく、また、そう解釈されるべきではない。

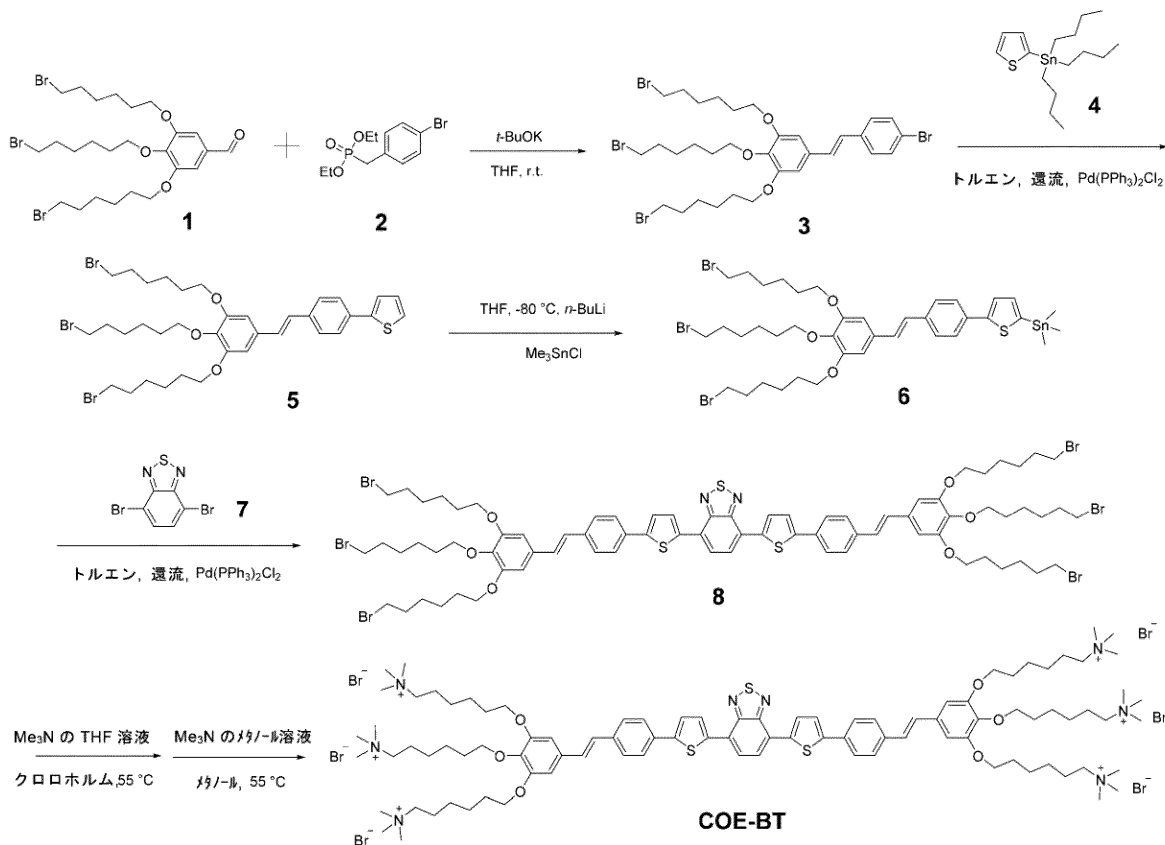
【実施例】

【0197】

式 (I) の化合物の合成のための一般的プロトコル

【0198】

【化66】



化合物 COE-BT の合成経路

【0199】

10

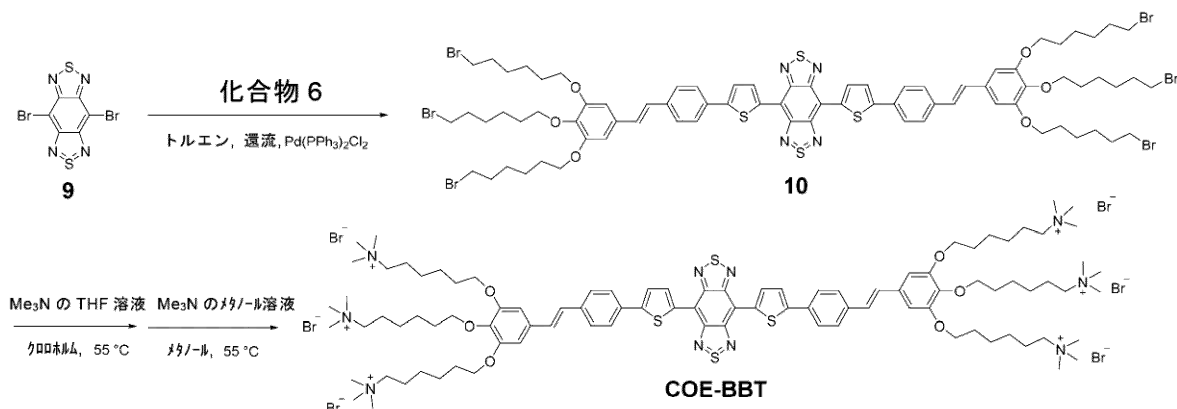
20

30

40

50

【化 6 7】

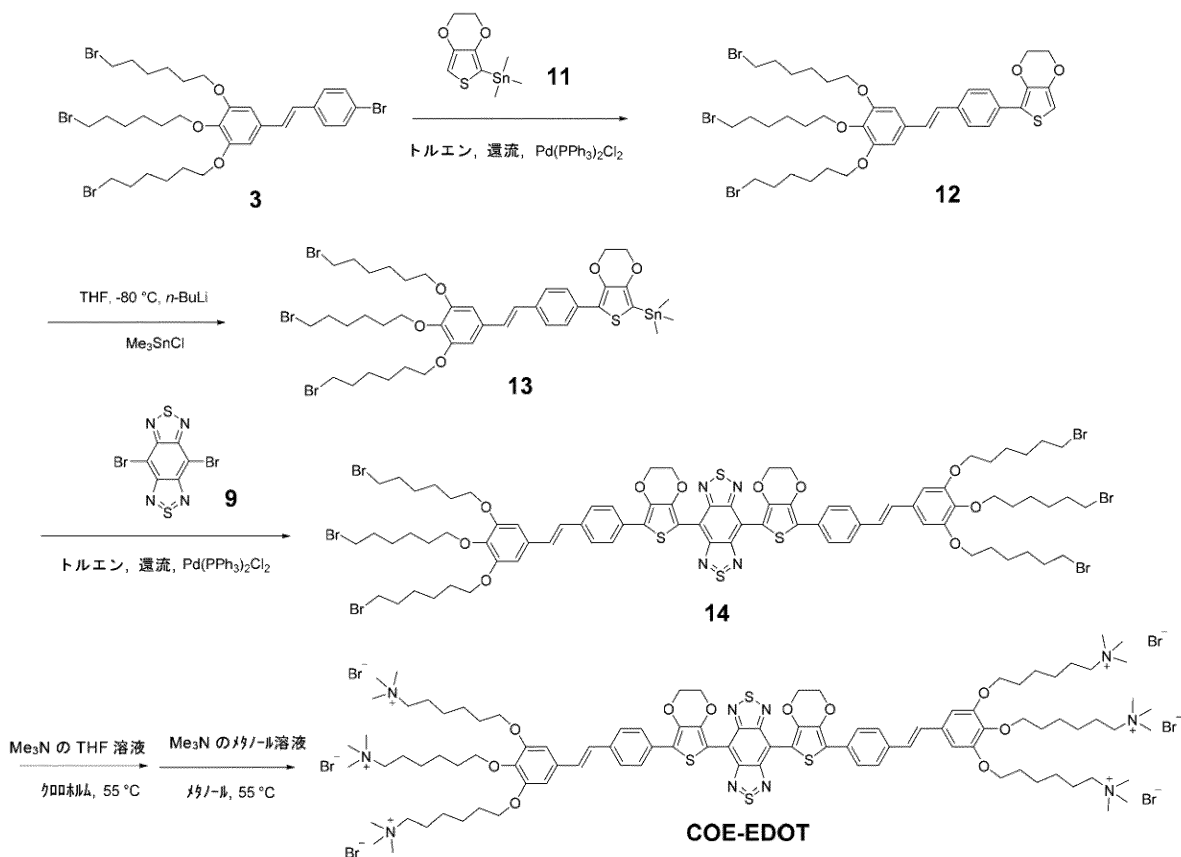


10

化合物 COE-BBT の合成経路

【0200】

【化 6 8】



20

30

化合物 COE-EDOT の合成経路

40

【0201】

(E)-1,2,3-トリス((6-ブロモヘキシル)オキシ)-5-(4-ブロモスチリル)ベンゼン(化合物 3)

丸底フラスコに窒素雰囲気の下で化合物 1 (5.69 g、8.46 mmol)、化合物 2 (4.07 g、13.27 mmol)、カリウム *tert*-ブトキシド (0.99 g、8.46 mmol)、および乾燥 THF 100 mL を加えた。室温での攪拌下で 16 時間の反応後、反応混合物を水に注ぎ、クロロホルムで抽出した。透明な有機相を Na_2SO_4 で乾燥させた後、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物をヘキサンおよびジクロロメタンを溶離液として使用するカラムクロマトグラフィーで精製した後、生成物を白色固体 (6.63 g、収率 94%) として得た。¹H NMR (400 M

50

Hz, クロロホルム-d) δ 7.49 - 7.44 (m, 2H), 7.37 - 7.33 (m, 2H), 6.99 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.06 - 4.00 (m, 4H), 3.99 - 3.95 (m, 2H), 3.49 - 3.39 (m, 6H), 1.96 - 1.71 (m, 12H), 1.60 - 1.47 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 153.56, 138.68, 136.62, 132.69, 132.12, 129.82, 128.18, 126.95, 121.51, 105.65, 73.58, 69.27, 34.25, 34.12, 33.20, 33.07, 30.48, 29.61, 28.44, 28.27, 25.70, 25.68. 【0202】

(E)-2-(4-(3,4,5-トリス((6-ブロモヘキシル)オキシ)スチリル)フェニル)チオフェン(化合物5)

丸底フラスコに窒素雰囲気の下で化合物3(4.44g、5.58mmol)、化合物4(4.16g、11.15mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (157mg、0.223mmol)を加えた。窒素を使用してパージした後、反応混合物に乾燥トルエン50mLを加え、次にこれを攪拌下、120℃で16時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物を水に注ぎ、クロロホルムで抽出した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させた後、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物をヘキサンおよびジクロロメタンを溶離液として使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、生成物を明黄色固体(4.02g、収率90%)として得た。 ^1H NMR(400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.63 - 7.58 (m, 2H), 7.52 - 7.48 (m, 2H), 7.33 (dd, J = 3.6, 1.2 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 5.1, 1.1 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 5.1, 3.6 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.72 (s, 2H), 4.09 - 3.95 (m, 6H), 3.49 - 3.39 (m, 6H), 1.97 - 1.73 (m, 12H), 1.62 - 1.48 (m, 12H). ^{13}C NMR(101 MHz, CDCl_3) δ 153.55, 144.48, 138.57, 136.85, 133.85, 133.03, 129.11, 128.44, 127.64, 127.20, 126.45, 125.15, 123.34, 105.65, 73.59, 69.29, 34.24, 34.11, 33.21, 33.09, 30.50, 29.64, 28.46, 28.28, 25.72, 25.70.

10

20

【0203】

(E)-トリメチル(5-(4-(3,4,5-トリス((6-ブロモヘキシル)オキシ)スチリル)フェニル)チオフェン-2-イル)スタンナン(化合物6)

フラスコに窒素保護下で化合物5(2.88g、3.60mmol)および乾燥THF40mLを加えた。超低温反応浴を利用して混合物を-80℃に冷却した。次に、反応混合物にn-ブチルリチウムのシクロヘキサン溶液(2M、7.2mmol)3.6mLを滴下した。-80℃で2時間攪拌した後、塩化トリメチルスズのヘキサン溶液(1M、14.4mmol)14.4mLを加え、次に反応混合物を室温に昇温させた。室温で終夜(約16時間)攪拌した後、反応混合物を水に注ぎ、ヘキサンで抽出した。有機相を水を使用して4回洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒をロータリーエバポレーターおよび真空ポンプを使用して除去した後、粗生成物を無色油状物として得た。これをさらに精製せずに次の反応に使用する(3.34g、収率96%)。 ^1H NMR(400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.63 - 7.58 (m, 2H), 7.52 - 7.47 (m, 2H), 7.44 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.05 - 6.93 (m, 2H), 6.72 (s, 2H), 4.09 - 3.92 (m, 6H), 3.51 - 3.36 (m, 6H), 1.97 - 1.71 (m, 12H), 1.62 - 1.47 (m, 12H), 0.40 (s, 9H). ^{13}C NMR(101 MHz, CDCl_3) δ 153.54, 150.19, 138.51, 138.18, 136.61, 136.59, 133.97, 133.09, 128.92, 127.74, 127.17, 126.47, 124.59, 105.60, 73.59, 69.27, 34.25, 34.12, 33.22, 33.09, 30.50, 29.64, 28.46, 28.29, 25.72, 25.70, -7.87.

30

40

【0204】

4,7-ビス(5-(4-(E)-3,4,5-トリス((6-ブロモヘキシル)オキシ)スチリル)フェニル)チオフェン-2-イル)ベンゾ[c][1,2,5]チアジアゾール(化合物8)

丸底フラスコに窒素雰囲気の下で化合物6(2.76g、2.87mmol)、化合物7(281mg、0.88mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (27mg、0.

50

0.38 mmol)を加えた。窒素を使用してパージした後、反応混合物に乾燥トルエン10 mLを加え、次にこれを攪拌下、120℃で16時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物を水に注ぎ、クロロホルムで抽出した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させた後、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物をヘキサンおよびジクロロメタンを溶離液として使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物をクロロホルムに溶解させ、メタノールを使用して析出させ、析出物を濾取し、メタノールを使用して洗浄した。減圧乾燥させた後、生成物を濃赤色固体(1.29 g、収率78%)として得た。 ^1H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 8.12 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.89 (s, 2H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.43 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 6.73 (s, 4H), 4.08 - 4.02 (m, 8H), 4.01 - 3.96 (m, 4H), 3.47 - 3.40 (m, 12H), 1.96 - 1.74 (m, 24H), 1.60 - 1.47 (m, 24H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.55, 152.90, 145.65, 138.96, 138.57, 137.22, 133.48, 132.96, 129.31, 129.03, 127.54, 127.26, 126.30, 126.06, 125.64, 124.36, 105.60, 73.60, 69.26, 34.28, 34.15, 33.21, 33.09, 30.50, 29.64, 28.46, 28.29, 25.72, 25.71.

10

【0205】

化合物COE-BT

一つ口丸底フラスコに化合物8(557 mg、0.322 mmol)およびクロロホルム(40 mL)を加えた。化合物8を溶解させた後、反応混合物中にトリメチルアミンのTHF溶液(2 M) 5 mLを加え、55℃で16時間攪拌した。反応後、粗生成物を析出させ、フラスコの底に付着させた。比較的颜色が薄い溶液を注ぎ出し、固体析出物をクロロホルムを使用して5回穏やかにリンスした。次に固体析出物をメタノール40 mLを使用して溶解させた。反応混合物中にトリメチルアミンのメタノール溶液(3.2 M) 5 mLを加え、55℃でさらに16時間攪拌した。溶媒を回転蒸発によって除去し、固体を減圧乾燥させた。最終生成物を濃赤色固体(605 mg、収率90%)として得た。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.29 - 8.18 (m, 4H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.75 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.27 (s, 4H), 6.96 (s, 4H), 4.12 - 4.00 (m, 8H), 3.95 - 3.87 (m, 4H), 3.37 - 3.27 (m, 12H), 3.09 (s, 54H), 1.84 - 1.62 (m, 24H), 1.58 - 1.47 (m, 12H), 1.42 - 1.28 (m, 12H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 153.57, 152.56, 145.89, 138.53, 138.02, 137.88, 133.42, 133.28, 129.93, 129.76, 128.01, 127.88, 126.56, 126.49, 125.68, 125.60, 106.00, 73.27, 69.11, 66.13, 60.82, 53.09, 30.40, 29.56, 26.54, 26.42, 26.02, 25.97, 23.01.

20

30

【0206】

化合物10

丸底フラスコに窒素雰囲気の下で化合物6(2.54 g、2.64 mmol)、化合物9(0.31 g、0.88 mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (25 mg、0.035 mmol)を加えた。窒素を使用してパージした後、反応混合物に乾燥トルエン10 mLを加え、次にこれを攪拌下、120℃で16時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物を水に注ぎ、クロロホルムで抽出した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させた後、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物をヘキサンおよびジクロロメタンを溶離液として使用するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。生成物をクロロホルムに溶解させ、メタノールを使用して析出させ、析出物を濾取し、メタノールを使用して洗浄した。減圧乾燥させた後、生成物を褐色固体(0.69 g、収率44%)として得た。 ^1H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 8.91 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.46 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 6.72 (s, 4H), 4.11 - 3.94 (m, 12H), 3.51 - 3.39 (m, 12H), 1.97 - 1.73 (m, 24H), 1.63 - 1.45 (m, 24H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 153.56, 151.49, 149.12, 1

40

50

38.58, 137.90, 137.43, 134.40, 133.48, 132.94, 129.36, 127.50, 127.23, 126.32, 124.54, 113.50, 105.58, 73.61, 69.26, 34.29, 34.17, 33.22, 33.11, 30.53, 29.66, 28.48, 28.32, 25.74, 25.72.

【0207】

化合物COE-BBT

一つ口丸底フラスコに化合物10 (196 mg、0.110 mmol) およびクロロホルム (20 mL) を加えた。化合物10を溶解させた後、反応混合物中にトリメチルアミンのTHF溶液 (2 M) 2 mLを加え、55℃で16時間攪拌した。反応後、粗生成物が析出し、フラスコの底に付着した。比較的颜色が薄い溶液を注ぎ出し、固体析出物をクロロホルムを使用して5回穏やかにリンスした。次に固体析出物をメタノール20 mLを使用して溶解させた。反応混合物中にトリメチルアミンのメタノール溶液 (3.2 M) 2 mLを加え、55℃でさらに16時間攪拌した。溶媒を回転蒸発によって除去し、固体を減圧乾燥させた。最終生成物を褐色固体 (219 mg、収率93%) として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.13 - 9.04 (m, 2H), 7.97 - 7.83 (m, 6H), 7.77 - 7.66 (m, 4H), 7.29 (br, 4H), 6.97 (br, 4H), 4.12 - 3.99 (m, 8H), 3.95 - 3.85 (m, 4H), 3.39 - 3.23 (m, 12H), 3.09 (s, 54H), 1.86 - 1.63 (m, 24H), 1.59 - 1.47 (m, 12H), 1.43 - 1.28 (m, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 153.57, 151.50, 148.78, 138.24, 138.06, 137.70, 134.93, 133.40, 133.29, 130.12, 128.08, 127.89, 126.72, 125.98, 113.24, 106.01, 73.27, 69.10, 66.11, 58.48, 55.32, 55.29, 55.26, 53.07, 30.41, 29.56, 26.55, 26.43, 26.02, 25.98, 23.00.

10

20

【0208】

化合物12

合成手順および精製手順は化合物5と同様とする。反応物トリブチル (チオフェン-2-イル) スタンナン (化合物4) を (3, 4-エチレンジオキシチエン-2-イル) トリメチルスタンナン (化合物11) に変更したが、供給比は同一に維持した。生成物を無色油状物 (5.49 g、収率86%) として得た。¹H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.31 (s, 1H), 4.36 - 4.31 (m, 2H), 4.29 - 4.23 (m, 2H), 4.08 - 4.01 (m, 4H), 3.99 - 3.94 (m, 2H), 3.48 - 3.39 (m, 6H), 1.96 - 1.72 (m, 12H), 1.62 - 1.46 (m, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 153.50, 142.61, 138.62, 138.36, 135.80, 133.13, 132.72, 128.67, 127.87, 126.93, 126.42, 117.68, 105.48, 98.04, 73.57, 69.22, 65.14, 64.79, 34.28, 34.16, 33.20, 33.07, 30.48, 29.61, 28.44, 28.27, 25.70, 25.69.

30

【0209】

化合物13

合成手順および精製手順は化合物6と同様とする。粗生成物を無色油状物として得た。これをさらに精製せずに次の反応に使用する (2.55 g、収率94%)。 ¹H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 7.72 - 7.68 (m, 2H), 7.49 - 7.45 (m, 2H), 6.99 - 6.95 (m, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.34 - 4.20 (m, 4H), 4.07 - 3.94 (m, 6H), 3.47 - 3.39 (m, 6H), 1.96 - 1.79 (m, 12H), 1.60 - 1.45 (m, 12H), 0.38 (s, 9H).

40

【0210】

化合物14

合成手順および精製手順は化合物8と同様とする。生成物を濃緑色固体 (431 mg、収率40%) として得た。¹H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 7.85 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.04 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 6.73 (s, 4H), 4.53 - 4.46 (m, 4H), 4.39 - 4.32 (m, 4H), 4.09 - 3.95 (m, 12H), 3.48 - 3.40 (m, 12H), 1.96 - 1.72 (m, 24H), 1.60 - 1.48 (m, 24H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 153.51, 152.84, 142.17, 1

50

38.93, 138.45, 136.43, 133.07, 132.35, 129.01, 127.80, 126.97, 126.90, 122.06, 113.41, 109.52, 105.55, 73.57, 69.23, 65.03, 64.87, 34.26, 34.14, 33.19, 33.07, 30.48, 29.61, 28.44, 28.27, 25.70, 25.68.

【0211】

化合物 COE-EDOT :

合成手順および精製手順は化合物 COE-BBT と同様とする。生成物を濃緑色固体 (181 mg、収率 93%) として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 353K) δ 7.85 - 7.80 (m, 4H), 7.69 - 7.65 (m, 4H), 7.21 (br, 4H), 6.94 (br, 4H), 4.50 (br, 4H), 4.37 (br, 4H), 4.13 - 4.04 (m, 8H), 3.99 - 3.91 (m, 4H), 3.45 - 3.35 (m, 12H), 3.13 (s, 54H), 1.86 - 1.66 (m, 24H), 1.60 - 1.49 (m, 12H), 1.46 - 1.34 (m, 12H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆, 353K) δ 153.30, 152.36, 142.64, 139.29, 138.53, 136.80, 133.09, 132.01, 129.49, 127.77, 127.38, 126.53, 120.37, 112.86, 109.21, 106.52, 73.05, 69.29, 66.19, 65.34, 64.90, 53.04, 53.01, 30.05, 29.26, 26.23, 26.10, 25.58, 25.53, 22.70.

10

【0212】

上記プロトコルを使用して他の COE 化合物 (例えば COE-BO および COE-QX) を同様に合成することができる。それらの構造を図 1 に示す。

【0213】

フローサイトメトリーにおける細菌細胞の標識化および検出

20

COE 色素の適用をフローサイトメトリー測定における細菌の標識化に広げることができる。図 2 に示すように、グラム陽性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) (MRSA) およびグラム陰性菌である大腸菌 (*Escherichia coli* (E. coli)) を PBS 中で 5:0、4:1、3:2、2:3、1:4、および 0:5 という様々な体積比で予め混合した。グラム選択性を有していてグラム陽性菌を特に標識化することができる COE 色素を使用して、これらの細菌混合物を染色した。フローサイトメトリー測定中に 2 つの孤立した集団が見られた。グラム陽性菌の割合が減少するに従って、陽性シグナルを示す集団は徐々に減少し、細菌混合物がグラム陰性菌のみを含むときに消失する。これらの結果は、本化合物が各グラム型の細菌比を識別する能力があるということを証明しているだけでなく、本化合物が

30

【0214】

フローサイトメトリーを使用したエキソソームの標識化および検出

エキソソームを以下のプロトコルによって調製した: エキソソームを ATCC から購入し、アリコートし、-80℃で保存した。1つのアリコートを-80℃から取り出し、氷上に置いた。エキソソームを細胞培養グレードの PBS 中で 10 倍希釈した。エキソソーム懸濁液 8 μL を 25~1 μM の COE 化合物と混合した。これを氷上に 10 分間置いた後、PBS 中で 100 倍希釈して粒子 6 x 10⁶ 個/mL のエキソソームおよび 25~1 nM の COE というおおよその最終濃度とした。試料を短時間ボルテックスしてフローサイトメトリーに使用した。バイオレットレーザーの側方散乱光 (x 軸) を測定し、蛍光強度 (y 軸: λ_{励起} = 405 nm、488 nm、λ_{発光} = 525 nm、690 nm) を測定することで、フローサイトメトリー測定値を得た。図 3 および図 4 の実験は、COE 化合物を使用してエキソソームを成功裏に標識化および検出することができることを示す。COE 化合物を使用することで、エキソソームを低濃度の色素で染色することができ、追加の精製なしに直接使用することができる。図 1 は本化合物の構造を示す。

40

【0215】

50

【表 1】

表 1. フローサイトメトリーに使用したエクソソーム

エクソソーム名	細胞株	細胞型	粒子数	粒径	疾患
HCT 116エクソソーム(ATCC(登録商標)CCL-247-EXM(商標))	HCT 116	上皮	粒子 1.3×10^9 個 /バイアル	50～200 nm	結腸直腸がん

10

【 0 2 1 6 】

【表 2】

表 2. エクソソームのフローサイトメトリーにより測定された事象の数

試料	全事象/ μ L	関心対象の領域 中の事象数/ μ L	関心対象の領域 中の事象%
PBS	595.59	NA	NA
エクソソーム	6115.79	NA	NA
COE-S6	2909.37	41.08	1.41
COE-S7	1137.64	60.45	5.31
COE-S6N2	4334.17	74.96	1.73
COE-Ben	1480.33	99.48	6.72
COE-Quin	1438.47	114.78	7.98
COE-BT	3424.14	257.39	7.52
エクソソーム + COE-S6	5113.31	3255.41	63.67
エクソソーム + COE-S7	5143.77	3008.20	58.48
エクソソーム + COE-S6N2	6173.19	2409.60	39.03
エクソソーム + COE-Ben	6071.19	3314.72	54.69
エクソソーム + COE-Quin	6088.97	3878.99	63.71
エクソソーム + COE-BT	3813.49	1790.48	46.95

20

30

【 0 2 1 7 】

別の例では、NanoFCM（英国）のご厚意により、SW480結腸がん細胞株から単離されてサイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製されたエクソソームの提供を受けた。標識化およびフローサイトメトリー分析もNanoFCM（英国）の訓練された技術者が行った。簡潔に言えば、エクソソームを1 mL当たり粒子約 $10e^{10}$ 個の粒子濃度で標識化し、ここでは試料9 μ Lに10 μ M COE色素溶液またはPKH-26（希釈液C中）1 μ Lを加えて最終染色濃度1 μ Mを実現した。混合物を室温で30分間インキュベートした後、PBSを使用して100倍希釈し、次にNanoAnalyzer（NanoFCM）で分析した。エクソソームの検出を小閾値設定（68～155 S16 M-Exo）で行い、標識化集団の分析をPC5チャンネルで行った（Ex488 / Em670）。エクソソーム溶液9 μ Lの代わりにPBSを使用して色素対照試料を調製した後

40

50

、フロー分析のためにエキソソーム試料と同じ工程を行った。結果は、少なくとも測定を2回繰り返して行い確認した。また、別の実験では、上記のように分析する前に標準的な超遠心分離法を使用して標識化エキソソームから過剰の色素を取り除いた。

【0218】

図17は、(a~e) COE-BO、COE-BT、COE-QX、COE-BSe、およびPKH26の色素のみの対照(10μM)の粒径分布プロット、ならびに(f~j)それらに対応するゲーティングされたドットプロットを示す。図18は、(a~d) COE標識化SW480エキソソーム(10μM)の粒径分布プロット、および(e~h)それらに対応するゲーティングされたドットプロットを示す。表3および表4は、NanoAnalyzerを使用して分析した際のCOEのみの緩衝剤対照およびCOE標識化エキソソームの結果をまとめたものである。

10

【0219】

【表3】

表3. NanoAnalyzerで分析された色素のみの対照の試料中の粒子数

色素対照	10uM	
	合計	陽性
COE-BO	181	2
COE-BT	174	2
COE-QX	220	3
COE-BSe	194	3
PKH-26	637	636

20

【0348】

【表4】

表4. NanoAnalyzerで分析されたCOE標識化SW480エキソソーム中での陽性事象の割合

30

染色EV	割合 + (N=2)
	10uM
COE-BO	66.55%
COE-BT	73.65%
COE-QX	63.40%
COE-BSe	70.05%

40

【0220】

図19および表5は、COE標識化SW480エキソソームから過剰のCOE化合物を取り除いた後の結果を示す。

【0221】

50

【表 5】

表 5. NanoAnalyzerで分析された超遠心分離を使用して過剰の色素を取り除いた後のC
OE標識化SW480エキソソーム(10および20 μ M)中での陽性事象の割合

	色素陽性%	
	10uM	20uM
COE-BO	43.10%	47.60%
COE-BT	52.90%	65.30%
PKH-26	22.00%	19.90%

10

【0222】

エキソソームの透過型電子顕微鏡観察（TEM）

フローサイトメトリーのために調製したまたは蛍光活性化細胞選別（FACS）により収集した試料を液体窒素に浸し、凍結乾燥させた。粉末を冷MilliQ水50 μ Lに再懸濁させた。グルタルアルデヒドを最終濃度2.5%まで加えた。試料10 μ Lを新たにグロー放電処理された200メッシュCu炭素／Formvarグリッドに加え、10分間付着させた。過剰の液体を濾紙で吸い取り、グリッドをMilliQ水で2回洗浄した。グリッドを2.5%三酢酸ガドリニウム染色で1分間染色した後、過剰の液体を濾紙で吸い取った。試料をTecnaig2によって100kVで倍率を30,000倍として画像化した。図5は、（a）エキソソーム、COE-BTで標識化されたエキソソーム、およびc）COE-S6で標識化されFACS後に収集されたエキソソームのTEM顕微鏡写真を示す。

20

【0223】

フローサイトメトリーを使用した赤血球（RBC）の標識化および検出

図6に示すように、COE化合物を使用してフローセルサイトメトリーのためにRBCを標識化することができる。RBC（ウシ全血から単離、Innovative Research, Inc.）をストックからPBS中で10倍希釈し、3,000RPMで5分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットをPBSに再懸濁させた。これを合計3回繰り返した。最終ペレットをPBSに再懸濁させて1体積%とした。10 μ M COE化合物をRBC懸濁液に加え、室温で20分間インキュベートした。次にRBC COE化合物混合物を再度3,000RPMで5分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを新たなPBSに再懸濁させた。COE化合物染色RBCと非染色RBCとをそれぞれ0：5、1：4、2：3、3：2、4：1、および5：0という様々な体積比で混合した。得られたRBC混合物をフローサイトメトリー実験のためにPBS中で100倍希釈した。前方散乱光（x軸）を測定し、蛍光強度（（y軸：λ励起=405nm、λ発光=525nm）を測定することで、フローサイトメトリー測定値を得た。図6は、COE化合物標識化RBCおよび非標識化RBCについて2つの別々の集団を見ることができることを示す。COE化合物で染色されたRBCの比率が増加するに従って、蛍光強度が高い方の集団の割合も増加する。このことは、COE化合物でのRBCの標識化の成功、およびフローサイトメトリーによる検出の成功を示している（図6）。

30

40

【0224】

50

【表 6】

表 6. 様々な比のCOE-S6染色RBC対非染色RBCのゲーティング領域においてフローサイトメトリーにより測定された事象の数

染色RBC対非染色 RBCの比	RBC + COE-S6 事象/ μ L	RBC事象/ μ L	総事象/ μ L
0:5	1.9	1318.27	1320
1:4	207.2	891.58	1098
2:3	312.27	812.03	1124
3:2	767.09	470.71	1237
4:1	1039.71	225.64	1265
5:0	450.48	2.98	453

10

【0225】

フローサイトメトリーを使用した哺乳動物細胞の標識化および検出

図 8 ～ 図 11 に示すように、COE を使用して細胞フローサイトメトリーのために哺乳動物細胞を標識化することができる。Hep-G2 および A549 (ATCC HB-8065、CCL-185) を ATCC から購入した。凍結細胞を受け取ってから、細胞を 37℃ の水浴中で穏やかに撹拌することで解凍し、次に DMEM + 10% FBS の温めた培地 9 mL を収容する遠心分離管に移した。次に管を 200 x g で 5 分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを培養フラスコ中で培地に再懸濁させた。細胞を 37℃ および 5% CO₂ でインキュベートした。細胞コンフルエンスが約 90% に達したとき、細胞を 1 x トリプシンで浮遊させ、同量の培地で中和した。200 x g で 5 分間遠心分離した後、上清を廃棄し、細胞ペレットを 5 ～ 10 μ M COE を含む温めた PBS に再懸濁させた。懸濁液を室温で 20 分間インキュベートした後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して過剰の COE 化合物を取り除いた。上清を廃棄した後、ペレットを温めた PBS に再懸濁させた。COE 化合物染色細胞と非染色細胞とをそれぞれ 0:5、1:4、2:3、3:2、4:1、および 5:0 という様々な体積比で混合した。得られた懸濁液をフローサイトメトリー実験に直接使用した。前方散乱光 (x 軸) を測定し、蛍光強度 (y 軸: λ 励起 = 561 nm、 λ 発光 = 610 nm) を測定することで、フローサイトメトリー測定値を得た。図 8 は、COE 標識化細胞および非標識化細胞について 2 つの別々の集団を見ることができることを示す。各 COE 化合物で染色された細胞の比率が増加するに従って、蛍光強度が高い方の集団の割合も増加する。このことは、COE での細胞の標識化の成功、およびフローサイトメトリーによる検出の成功を示している (図 8 および図 10)。図 9 は、様々な比の式 (I) の化合物で染色された Hep-G2 対非染色 Hep-G2 のゲーティング領域において生じたフローサイトメトリー事象の割合を示す。図 11 は、5 μ M COE-BSe で標識化された A549 細胞のフローサイトメトリー測定値を示す。前方散乱光 (x 軸) を測定し、蛍光強度 (y 軸: λ 励起 = 638 nm、 λ 発光 = 712 nm) を測定することで、フローサイトメトリー測定値を得た。コンフルエント細胞を PBS 中、室温で 5 μ M COE によって 20 分間染色した。COE 溶液を吸引し、コンフルエント細胞を新たな PBS で洗浄した。細胞を 1 x トリプシンで浮遊させ、同量の培地で中和した。200 x g で 5 分間遠心分離した後、上清を廃棄し、細胞ペレットを温めた PBS に再懸濁させ、フローサイトメトリーに使用した。20% の COE 標識細胞懸濁液を播種し、90% コンフルエンスに到達させた。細胞を収集し、播種した後、4 継代にわたって COE を追加せずにフローサイトメトリーに使用した。(図 11)

20

30

40

【0226】

50

【表 7】

表 7. 様々な比の染色Hep-G2細胞対非染色Hep-G2細胞のゲーティング領域においてフローサイトメトリーにより測定された事象の数

染色Hep-G2対 非染色Hep-G2の比	非染色Hep-G2 事象/ μ L	染色Hep-G2 事象/ μ L	総事象/ μ L
0:5 (COE-BT)	3024.06	10.05	3046
1:5 (COE-BT)	2496.09	322.10	2823
2:3 (COE-BT)	2171.05	752.07	2947
3:2 (COE-BT)	1577.08	1221.90	2837
4:1 (COE-BT)	564.97	1363.07	1959
5:0 (COE-BT)	57.08	1898.85	2010

【0227】

哺乳動物細胞の蛍光顕微鏡観察

上記実験では、COE色素を使用してフローサイトメトリーにおいて細胞外ベシクル（エキソソームを含む）、細菌、RBC、および哺乳動物細胞を標識化することができることが確認された。これらの試料はいずれも膜中に脂質二重層構造を含んでいる。COE色素の結合標的が脂質膜であることをさらに確認するために、共焦点顕微鏡観察を使用してCOE化合物と市販の膜色素FM 4-64との共局在を行った。図12に示すように、哺乳動物Hep-G2細胞を4 μ M COE化合物（緑色チャンネル）および4 μ M FM 4-64（赤色チャンネル）の両方で染色し、405 nmでの励起後に450～490 nmの範囲のCOE化合物からの発光を収集することで、細胞膜を描線する明確な染色パターンが観察された。COE化合物とFM 4-64とが十分一致して共局在していることは、COE色素の結合標的が脂質膜であることを証明している。A549細胞をPBS中で5 μ MのCOE化合物によって染色し、37℃および5% CO₂で1時間インキュベートした後、蛍光顕微鏡で可視化した。（図13）

【0228】

蛍光計を使用した脂質二重層へのCOE挿入の評価

以下のプロトコルを使用してリポソームを調製した。リン脂質（例えばPOPC、POPE、およびPOPG）のクロロホルム溶液を適切なモル比に混合し、穏やかな窒素流の下で乾燥させた。乾燥脂質を減圧下で終夜さらに乾燥させて薄い脂質フィルムを得た。小さな単層ベシクル（SUV）を調製するために、リン酸緩衝食塩水（PBS）を濃度5 mg mL⁻¹まで加えることで乾燥フィルムの再水和を行い、続いて約300 rpmで一定に攪拌しながら35℃で2時間インキュベートした。次に、ベシクルを100 nm膜を使用して45℃で21回押し出してSUV試料を得た。ベシクルをさらに使用するまで4℃に保持した。

【0229】

COEが脂質二重層に挿入された後、COEの発光は著しく増強される。したがって、水相中の遊離色素は発光が弱く、バックグラウンドが低くなり、高いシグナル対ノイズ比を得るために理想的である。図14に示すように、PBS中のSUV（1 mg/mL）およびCOE-BT（10 μ M）はいずれも弱い発光（ $\lambda_{\text{励起}} = 520$ nm）を示す。SUVとCOE-BTとを混合すると、COEは脂質二重層に挿入される。これは、COEと脂質二重層との間の静電相互作用および疎水性相互作用によって自発的に引き起こされる。結果として著しい発光増強が観察される。例えば、SUVとCOE-BTとの複合体の発光強度は、600～630 nmでCOE-BT溶液に比べて400倍超増加する。同じ現象はCOE-BBTでも同様に見られる（図14および図15）。様々な化学構造を調

整することで、COEは「緑色」から「赤色」、さらには「赤外」まで及ぶ様々な発光波長を実現することができる（図14および図15）。このような様々な色の選択によって、COE色素は、複数の色素を同時に使用する上での高い適合性を示すようになる。

【0230】

リポソームの粒径および均一性に関するCOE添加の評価

COE処理がリポソームの形態を変化させる（例えばリポソームの融合または分裂を誘導する）か否かを確認するために、脂質SUVモデルによる動的光散乱法（DLS）測定を使用した（図16）。SUVは100nm膜による押出の後に得られた。DLS測定中に1mg/mL SUV試料についてZ平均径 104.5 ± 29.45 nmおよびPDI 0.048が観察された。1mg/mL SUV試料に10μM COE-BBTを加えた後、Z平均径は 104.8 ± 32.65 nmとなり、PDIは0.054となる。このDLS結果は、COE添加がリポソームの形態を変化させないことを示す。

10

【0231】

結果は、本発明の化合物が、エキソソーム、赤血球、哺乳動物細胞、および細菌細胞を含む広範な試料にわたって使用可能であることを示す。本化合物は、その蛍光強度の増加を通じて標識化の効率および感度の向上を示す。これらの結果は、COEが、脂質二重層との相互作用に主に依存するフローサイトメトリーにおける蛍光標識として使用可能であることを明らかにする。COEの分子構造が調節可能であって、合成が容易であることにより、発光検出ニーズに合わせて調整する上での広範な可能性および柔軟性が生まれる。

20

【0232】

COE標識化エキソソーム、および画像化フローサイトメトリーを使用した哺乳動物細胞へのCOE標識化エキソソームの取り込み

6ウェルプレート中で10% FBSを含むDMEM培地にA549細胞を細胞 1×10^5 個/mLの濃度で播種し、実験前に終夜付着させた。翌日、10μg/mLのPC-3エキソソームまたは対照（PBSのみ）4.5mLをCOE-Benと混合して最終色素濃度を1μMとし、またはDiDと混合して最終色素濃度を2.5μMとした。試料を暗所中、室温で1時間インキュベートした。試料を、100kDaカットオフ遠心分離フィルターユニット（Amicon（登録商標）Ultra）を使用しての濾過により洗浄し、2000×gで15分間遠心分離して遊離色素を取り除いた。濃縮試料を回収し、FBSを含まないDMEM培地に再懸濁させ、3つのアリコートに分けた。マイクロプレート中の細胞をFBSを含まないDMEM培地を使用してリンスした後、染色エキソソームまたは対照（残留色素溶液）を様々な時点で、例えば細胞を収集する2時間前、4時間前、および8時間前に加えた。エキソソームまたは色素の取り込みの後、細胞を温めたPBS（37℃）で洗浄し、1×トリプシン-EDTAを加えた。細胞を5% CO₂チャンバー中、37℃で最大5分間インキュベートした。10% FBSを含むDMEMをマイクロプレート中に加え、細胞を200×gで4分間遠心分離した。上清を取り除き、細胞をDMEM培地（10% FBSを含む）に再懸濁させ、Amnis ImageStreamX Mk II画像化フローサイトメーターを使用して、画像化フローサイトメトリーを行った。インタクトな細胞事象のみを選択する明視野チャンネルの面積対アスペクト比を使用して収集ゲートを設定した。COE-Benチャンネル（すなわちCh02）では、細胞を405nmレーザーを使用して励起し、発光を505～560nmの範囲で収集した。DiDチャンネル（すなわちCh05）では、細胞を638nmレーザーを使用して励起し、発光を642～745nmの範囲で収集した。細胞全体の明視野領域を粒径の指標、すなわちM04またはM01チャンネルとして使用した。データをIDEAS v6.3を使用して処理した。明視野チャンネルに対して勾配RMS（二乗平均平方根）を適用して焦点外の細胞を除外した。M04チャンネル（粒径）対Ch02チャンネル（COE-Ben）またはCh05チャンネル（DiD）を使用してフローサイトメトリーの結果を提示した。ゲートを非染色対照試料に従って設定した。IDEAS 6.3ソフトウェアに組み込まれた「スポット計数アルゴリズム」機能を、細胞内の明るいスポットの数を計数するために使用し、エキソソーム取り込みの測定基準として使用した。各群において少

30

40

50

なくとも1000個の細胞を統計的に計数した。

【0233】

図20は、(a) COE-Ben 染色エキソソームで様々な処理および時点で染色されたA549細胞の代表的な画像化フローサイトメトリー画像、ならびに(b~d)それらに対応するフローサイトメトリー分析を示す。(e)各細胞中のCOE-BenまたはDiDプローブ(1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニン 4-クロロベンゼンスルホネート)の平均スポット数。(f)限外濾過を使用して洗浄した後にCOE-BenまたはDiD色素の残基で染色された後のA549細胞の代表的な画像化フローサイトメトリー画像、ならびに(g~h)それらに対応するフローサイトメトリー分析。画像化フローサイトメトリーにおいては、COE-Benチャンネルを405nmを使用して励起し、発光を505~560nmの範囲で収集し、DiDチャンネルを638nmを使用して励起し、発光を642~745nmの範囲で収集し、細胞全体の明視野領域を粒径の指標として使用した。

10

【0234】

COEを使用して予備染色エキソソームを標識化する

A549により産生されるエキソソームと血清から生じるエキソソームとを区別するために、DMEMにエキソソーム枯渇ウシ胎仔血清(Systems Biosciences、カタログ:EXO-FBS-250A-1)を補充することで、エキソソーム産生の新たな細胞培地(CCM-Exo-Dep)を調製した。A549細胞をT75フラスコ内のCCM-Exo-Dep 10mL中に細胞 5×10^5 個 mL^{-1} で播種し、1時間付着させた後、2 μM COE-BTを細胞培養液に導入した。細胞を少なくとも24時間インキュベートした後、細胞培養上清を1回目のエキソソーム産生のために回収し、4℃で保存した後、精製した。標識化細胞を継代することなく、細胞に新たな10mLのCCM-Exo-Depを加え、少なくともさらに24時間インキュベートした。次に、24時間後に細胞培養上清を2回目のエキソソーム産生のために回収した。収集した細胞培養液を最初に室温で30分間、10,000×gで回転させてすべての壊死細胞片を除去した。次にエキソソーム単離を4℃で1時間の100,000×gでの超遠心分離(Optima (商標) XPN-100、Beckman Coulter)によって行った。上清を慎重に取り除き、ペレットが位置していると予想される遠心分離管の底部をPBSで3回リンスした。洗浄後、エキソソームを同じ条件下で再度ペレット化し、次にPBS 100 μL に再懸濁させた。精製エキソソームのアリコートをして-80℃で保存した後、下流分析(フローサイトメトリーまたはTEM)を行った。

20

30

【0235】

図21は、2 μM COE-BTとのインキュベーション後に、初期もしくは後期エンドソーム-GFP試薬(BacMam 2.0)または100nMリソソーム特異的色素LysoTracker (登録商標) Green DND-26で染色された、A549細胞の共局在顕微鏡写真を示す。COE-BTチャンネル(緑色で表される)を561nmでの励起および570~620nmの範囲の発光の収集により観察した。GFP(緑色蛍光タンパク質)およびLysoTracker Greenチャンネル(赤色で表される)を488nmでの励起および500~540nmの範囲の発光の収集により観察した。ピアソンの相関係数(R)を共局在の測定基準としてImageJを使用して分析した。

40

【0236】

エキソソーム試料を透過型電子顕微鏡観察(TEM)を使用して分析した。簡潔に言えば、予備染色A549細胞から得られたエキソソームを、PBS中で2.5%グルタルアルデヒドを使用して室温で30分間固定した。エキソソーム溶液10 μL を新たにグロー放電処理されたFormvar炭素コーティング200メッシュ銅EMグリッド上に15分かけて加えた。試料を濾紙によってブロッキングし、MilliQ水で3回洗浄した。試料を2%酢酸ガドリニウムで30秒間ネガティブ染色した。試料を濾紙によってブロッキングし、デシケーターの真空チャンバー内のグリッドボックス中で終夜保存した後、FEI TENCAI G2機器上で80kVを使用して画像化した。

50

【0237】

図22は、(a) COE-BT染色A549細胞で分泌されたEVの透過型電子顕微鏡画像を示す。(b)最初の24時間のインキュベーション後、COE-BT染色A549細胞で分泌されたEVのフローサイトメトリー分析。励起波長および発光波長はB690チャンネルについて488/690nmとする。

【0238】

COEによるナノ粒子形成の欠如

図23は、相対遠心力4000で100K MWCOタンパク質濃縮管(Pierce (商標)、Thermo Scientific (商標))を使用した限外濾過の前および後のPBS中50μMのCOEまたはDiR(1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 10, 3'-テトラメチルインドトリカルボシアニンヨード)溶液の(a)写真および(b)吸収スペクトルを示す。COE試料の吸収スペクトルのわずかな減少は、おそらく、正に帯電したCOEとポリエーテルスルホンベースの限外濾過膜との非特異的結合が理由である。

【0239】

図24は、(a)動的光散乱法(DLS)により測定された、純粋なPBS、またはPBS中1μMのCOE-BTもしくは1μMのDiRもしくは1mMのSUVの相関係数曲線を示す。(b)純粋なPBS、またはPBS中1μMのCOE-BTもしくは1μMのDiRもしくは1mMのSUVのDLS測定により導出された平均計数率；実験は5回繰り返した。(c)DLSにより測定されたPBS中1μMの他のCOEの相関係数曲線。20 (d)PBS中1μMの他のCOEのDLS測定により導出された平均計数率；実験は5回繰り返した。

【0240】

図25は、赤色レーザーポインターを使用して照射された後の純粋なPBSまたはPBS中10μMのCOEのティンダル効果の写真を示す。

【0241】

図26は、(a)室温で16時間の静置の前および後の96ウェルマイクロプレート(Costar (登録商標)、ポリスチレンベース、Ref: 3599)中でのPBS中COE溶液200μLの写真を示す。(b)室温で16時間の静置の前および後の96ウェルマイクロプレート(Costar (登録商標)、ポリスチレンベース、Ref: 3599)中でのPBS中色素溶液200μLの写真。COE溶液はPBS中1mMストック溶液から希釈して得た。DiI溶液はDiI DMSO溶液(1mM)をPBS中に激しく30 攪拌しながら分散させて得た。同量のPBSを陰性対照として使用した。

【0242】

フローサイトメトリーを使用した標識化ベシクル中でのCOEの安定性

上記のように、15% POPGおよび85% POPCを含むリポソームを、PBS中5mg/mL(または6.564mM)ストックとして調製した。リポソームを200nm膜フィルターを通じて押し出し、さらにDLSによって粒径が約140nmと確認した。次にストックリポソームの別々のアリコート1mMに希釈し、それぞれPBS中で20μM COE-Ben(またはDiO)および40μM COE-BT(またはDiD)によって、60℃まで穏やかに加熱しながら30分間処理した。次に標識化リポソームを4℃で保存した後、フローサイトメトリー実験に使用した。挿入後のリポソーム中の色素の安定性を実証するために、最初にCOE-Ben標識化リポソームおよびCOE-BTリポソームの2つの別々の作業溶液(working solution)を1mL当たり粒子10⁷個という同じ粒子濃度に正規化した。次に、これら2つの標準溶液を0:5、1:4、2:3、3:2、4:1、および5:0という様々な比で混合し、混合物を室温で1時間インキュベートした。次に未希釈混合物をCytometer Flex LX(Beckman Coulter)で分析し、バイオレット側方散乱(VSSC>4000)で検出を開始した。非染色リポソームに関しては、ゲーティングをCOE-Ben標識化リポソームおよびCOE-BT標識化リポソームについて、それぞれV525チャンネル(50

Ex 405 / Em 525) および B 690 チャネル (Ex 488 / Em 690) の両方で行った。ドットプロットの二重陽性領域内での事象の割合を使用して、1つの集団から別の集団への色素の移動を示唆する、COE-Ben色素およびCOE-BT色素の両方を含むリボソームを分析した。さらに、試料を室温で終夜(24時間)インキュベートした後、同じフローサイトメトリー分析を行って色素の安定性および色素の交差流出の程度を点検した。実験は2回繰り返した。

【0243】

図27は、様々な混合比で混合され、(a~f) 1時間および(g~l) 24時間インキュベートされ、Cyt of lexで分析された、PBS中のCOE-BT染色およびCOE-Ben染色SUV(130nm)の混合物のフローサイトメトリー測定値を示す。

10

【0244】

図28は、(a) 1時間または(b) 24時間混合後の様々なゲートにおける図27によるSUV集団の割合を示す。

【0245】

COEを使用した様々な粒径のリボソームの標識化

クロロホルム中POPC溶液をクロロホルム中0.5mol%のCOE-BenまたはCOE-BTの溶液と混合した後、ガラスバイアル中、穏やかなアルゴン流の下で乾燥させた。乾燥脂質を減圧下で終夜さらに乾燥させて薄い脂質フィルムを得た。小さな単層ベシクル(SUV)を調製するために、PBS緩衝液(リン酸緩衝食塩水)を濃度5mg mL⁻¹まで加えることで乾燥フィルムの再水和を行い、続いて約300rpmで一定に攪拌しながら45℃で2時間インキュベートした。次に、ベシクルを100nm、200nm、400nm、および800nm膜を使用して45℃で21回押し出してSUV試料を得た。次に標識化リボソームを1mL当たり粒子10⁷個に希釈した後、Cyt of lexで分析した。

20

【0246】

図29は、0.5mol%のCOE-Ben(a~d)およびCOE-BT(e~f)で標識化された粒径100nm、200nm、400nm、および800nmのPOPCリボソームがCyt of lexで分析された、色素陽性事象のドットプロットプロファイルを示す。

【0247】

図30は、(a) PBS中、室温で15μM COE-Benおよび15μM FM 4-64によって30分間染色された後の6.25mg mL⁻¹のLMV(大きな多重層ベシクル)の共焦点顕微鏡写真を示す。混合物をPBSで5倍希釈した後、共焦点画像化を行った。COE-Ben蛍光チャネルを405nmでの励起および450~490nmの範囲の発光の収集により観察し(緑色で表される)、FM 4-64蛍光チャネルを561nmでの励起および640~700nmの範囲の発光の収集により観察した(赤色で表される)。スケールバーは20μmとする。(b) 濃淡値曲線は、左側の両チャネルの蛍光顕微鏡写真中の白線の蛍光強度プロファイルを表す。

30

【0248】

図31は、携帯式紫外線ランプ(UVP(登録商標)UVLS-24 EL、4ワット)を使用した紫外線(365nm)照射下でのPBS中1mMのSUVによる処理なし(-)または処理あり(+)のCOEの写真を示す。COE-Quinの濃度は0.25μMとし; COE-S6およびCOE-Benの濃度は0.5μMとし; COE-QX、COE-BO、およびCOE-BTの濃度は1μMとし; COE-BSeの濃度は5μMとする。カメラ(SONY、α7R)のパラメータをISO値8000、絞り値F2.8、露出時間1/20に設定する。

40

【0249】

図32は、(a) DI水中で5μMの様々なCOEによって染色された、1mM POPCのみのSUVのゼータ電位測定値を示す。(b) DI水中で5μMの様々なCOEによって染色された1mM POPCのみのSUVのDLS測定によるZ平均径およびPD

50

I。

【0250】

顕微鏡観察およびフローサイトメトリー分析のためのCOEを使用した赤血球の標識化血漿を遠心分離によって除去した後、ドナーの血液から赤血球を得た。RBCは新鮮なもの、または22日間保存されたものを使用した。RBC濃厚液をPBS中で500倍希釈した後、2 μ MのCOE-S6または1 μ g/mLのCell Mask Deep Redで標識化した。細胞を色素と共に10分間インキュベートした後、700gで3分間遠心分離して遊離色素を取り除いた。次に標識化細胞ペレットをPBS 1mLに再懸濁させた。次に細胞をPBS中でさらに10倍希釈した後、8ウェルのibidiチャンバースライド上で画像化し、粒径および蛍光についてフローサイトメトリー (Cytoflex) で分析した。

10

【0251】

図33は、(a) 非染色の、(b) 2 μ M COE-S6で標識化された、および(c) 1 μ g/mL Cell Mask Deep Redで標識化された、新鮮な赤血球(RBC)の共焦点顕微鏡写真を示す。画像はEx405/Em525チャンネル、Ex638/Em660チャンネル、および明視野チャンネルで取得した。

【0252】

図34は、22日間保存されて、(a) 非染色の、(b) 2 μ M COE-S6で標識化された、および(c) 1 μ g/mL Cell Mask Deep Redで標識化された、赤血球(RBC)の共焦点顕微鏡写真を示す。画像はEx405/Em525チャンネル、Ex638/Em660チャンネル、および明視野チャンネルで取得した。

20

【0253】

図35は、(a) 非染色の、(b) 1 μ M COE-S6で標識化された、および(c) 0.5 μ g/mL Cell Mask Deep Redで標識化された、フローサイトメトリーで測定された赤血球(RBC)のFSC/SSCドットプロットを示す。COE-S6標識化は、Cell Mask Deep Redとは異なって、RBCの形態にアーチファクトをもたらさない。(d) RBCが漸増濃度のCOE-S6で標識化された際の蛍光の増加を示すヒストグラム、および(e) RBCが漸増するCell Mask Deep Redで標識化された際の消光効果による蛍光の減少を示すヒストグラム。ヒストグラムデータの変動係数(Cv)、すなわち広がり(f)から分かるように、標識化の均質性および均一性もやはりCOE-S6が上回っている。

30

【0254】

哺乳動物細胞の蛍光プローブとしてのNIR-II COE

近赤外蛍光を使用した細胞検出のために、細胞をDMEM培地中で20 μ M COE-BBTによって直接染色し、終夜インキュベートした。染色細胞を温めたPBS (37°C) を使用してリンスした後、1×トリプシン-EDTAを加えた。細胞を5% CO2チャンバー中、37°Cで最大5分間インキュベートした。10% FBSを含むDMEM培地を加え、細胞を200×gで4分間遠心分離した。上清を取り除いた後、細胞を培地に再懸濁させ、フローサイトメトリーに供した。COE-BBT染色細胞を808nmレーザーを使用して励起した。COE-BBTからの発光シグナルを収集するために、紫外線溶融石英ガラスをベースとする900nmロングパスフィルターをCytotofLEXプラットフォーム光学フィルターの仕様(長さ14.5±0.1mm、幅6.1±0.1mm、厚さ2.0±0.1mm)に従ってカスタマイズした(中国、Chroma, INC.)。このフィルターガラスをホルダーに装着し、IR885チャンネル(Ex808/Em885)の代わりに使用した。COE-BBT蛍光を検出するためのこの新たなチャンネルは「IR1000」と名付けられた。

40

【0255】

図36は、808nmレーザーを使用しての励起およびIR1000チャンネルと名付けられた950nmロングパスフィルターを使用しての発光の収集によるCOE-BBT染色A549細胞のフローサイトメトリー測定値を示す。非染色A549細胞を陰性対照と

50

して使用した。

【0256】

COEの細胞毒性および溶血活性

A549細胞を、10% FBS添加DMEM中に、すなわち細胞培地（CCM）中に通常のやり方で維持した。COEのストック溶液は、固体COEをストック濃度2mMとなるようにPBSに溶解して調製した。さらに、ストック溶液をCCM中で希釈して、256μMのCOE作業溶液を調製した。DIRのストック溶液は、DIRの水溶性が低いことから、エタノール中で調製した。CCM中で希釈して256μMの作業溶液を調製した。この場合、最終エタノール含有量は12.8%（v/v）となる。細胞毒性を試験するために、1000個の細胞を、透明な光学的な底部を有する96ウェル黒色プレートに播種し、5% CO₂チャンバー中、37℃で終夜放置して付着させた。翌日、様々な濃度のCOE／DIR溶液を、CCM中での2倍連続希釈（濃度は0.5～256μMの範囲とした）によって得た後、ウェル中の消費されたCCMを置き換えるために使用した。エタノールに由来する毒性効果を明確にするために、エタノール中DIR色素溶液の代わりに純粋なエタノールを用いて同一の連続希釈を行い、各ウェルにおいて同様のエタノール含有量となるようにした。次に細胞を添加物と共に24時間インキュベートした後、細胞生存率を、CellTiter-Glo（登録商標）（COE-Quin、COE-S6、COE-Ben、COE-BBT、DIR）またはCCK-8（COE-BT、COE-BO、COE-QX、COE-BSe）を製造者のプロトコルに従って使用して測定した。蛍光（CellTiter-Glo（登録商標）アッセイ）および吸光（CCK-8アッセイ）測定値をTECANプレートリーダー（Spark（登録商標））を使用して記録した。細胞毒性アッセイは3回繰り返した。

【0257】

図37は、A549細胞に対するCOEの細胞毒性の測定値を示す。6種のCOEのIC₅₀値は、すべて100μMよりも高い。

【0258】

ウシ全血を米国のInnovative Researchから購入した。血液2mLをPBS 10mLと混合し、1,000rpmで5分間遠心分離した。赤血球ペレットを収集し、続いてPBSで3回洗浄し、次にPBSを使用して濃度2%（v/v）まで希釈した。COE-Quin、COE-S6、およびCOE-Benの540nmでの吸収干渉がわずかであることから、本試験では、COE-Quin、COE-S6、およびCOE-Benのみを選択した。各COEをPBSに溶解させ、96ウェルマイクロプレート中で2倍連続希釈した。各ウェル中で赤血球懸濁液100μLをCOE溶液100μLと混合し、振盪（200rpm）下、37℃で1時間インキュベートした。マイクロプレートを1,000rpmで10分間遠心分離した。上清の150μLアリコート新たな96ウェルマイクロプレートに移した。溶血活性の計算を、マルチモードマイクロプレートリーダー（Spark（登録商標）、Tecan）を使用して540nmでの吸光度を測定することで行った。赤血球を完全に溶解可能なTriton X-100（PBS中0.1%）を陽性対照として使用し、一方、PBS中のウシ赤血球を陰性対照として使用した。溶血の割合を下記式を使用して計算した：

【数1】

$$\text{溶血 (\%)} = \frac{O_c - O_b}{O_t - O_b} \times 100\%$$

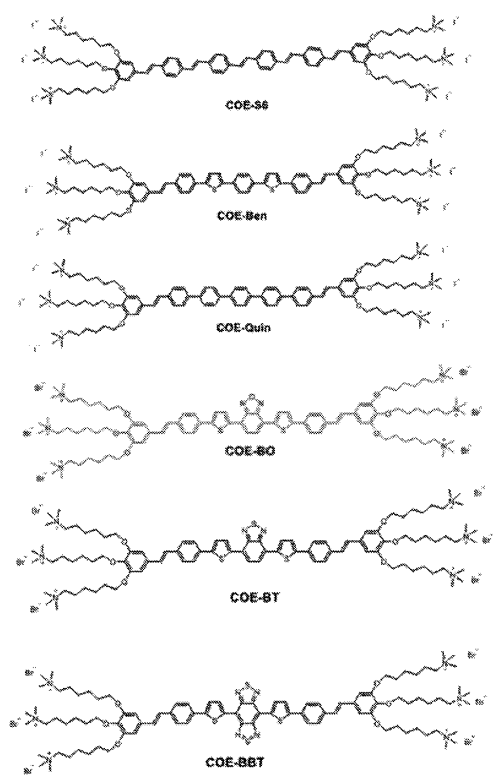
式中、O_cはCOE処理試料の吸光度であり、O_bは陰性対照の吸光度であり、O_tは陽性対照の吸光度である。溶血アッセイは4回繰り返した。

【0259】

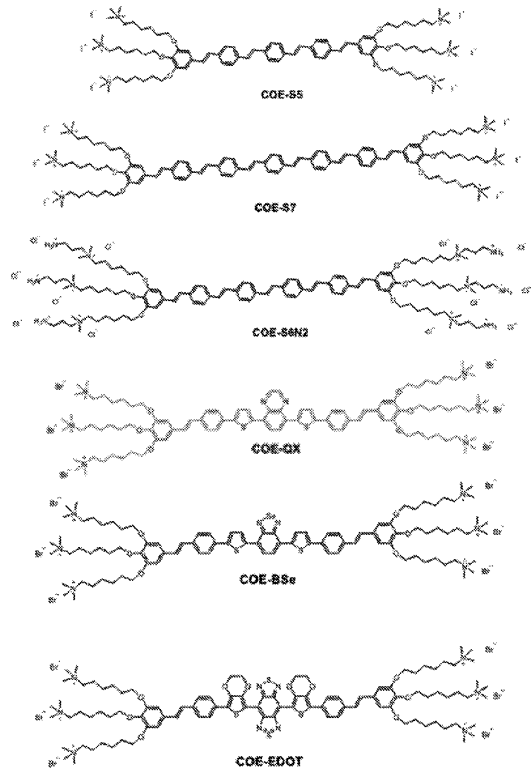
図 3 8 は、P B S 中でのウシ赤血球に対する C O E の溶血の測定値を示す。

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



10

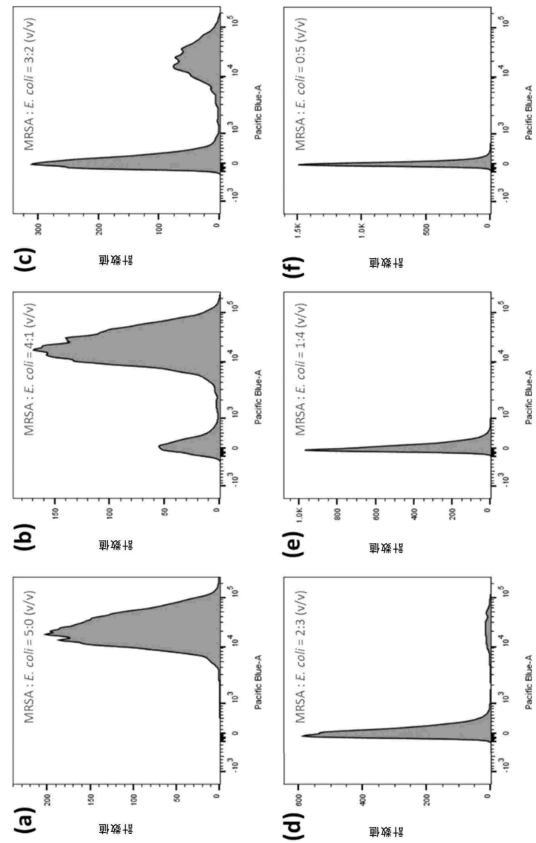
20

30

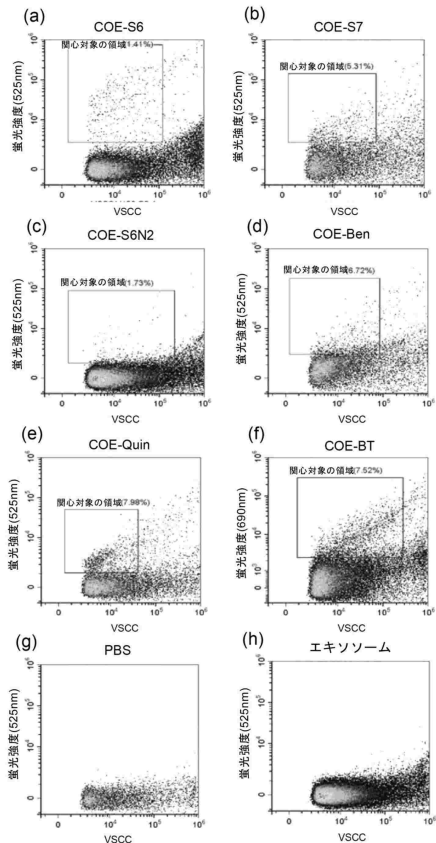
40

50

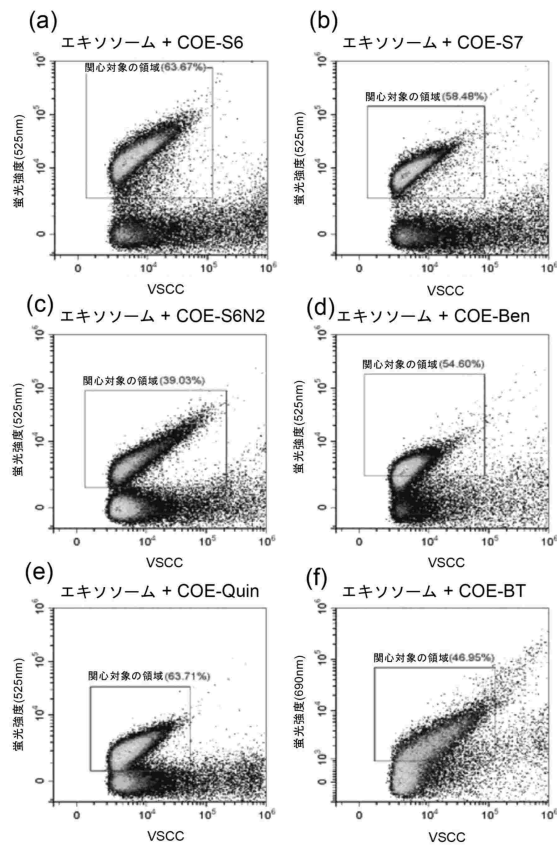
【図 2】



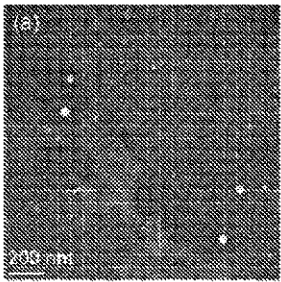
【図 3】



【図 4】



【図 5 (a)】



10

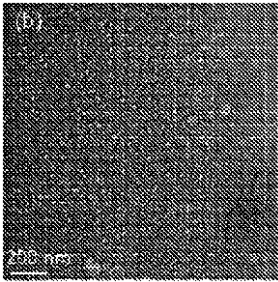
20

30

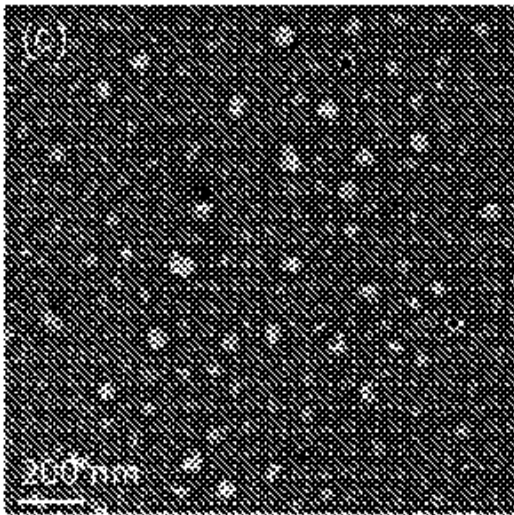
40

50

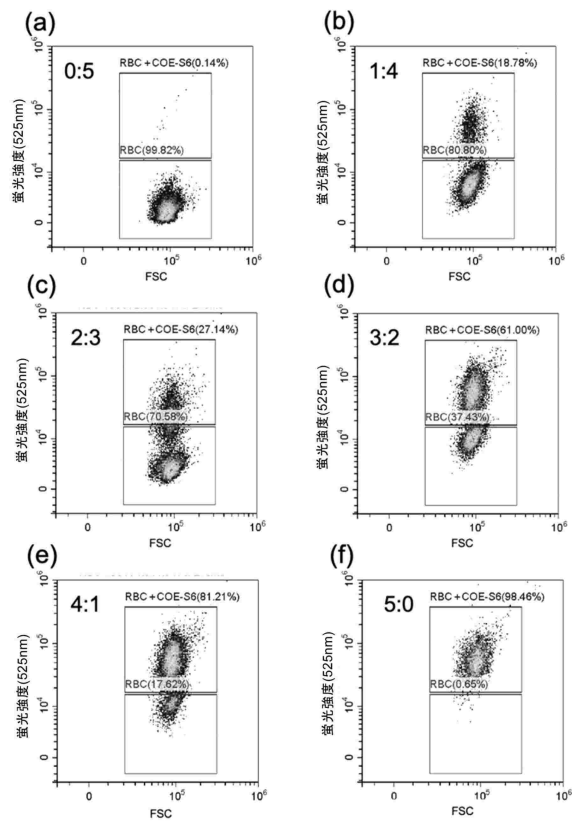
【図 5 (b)】



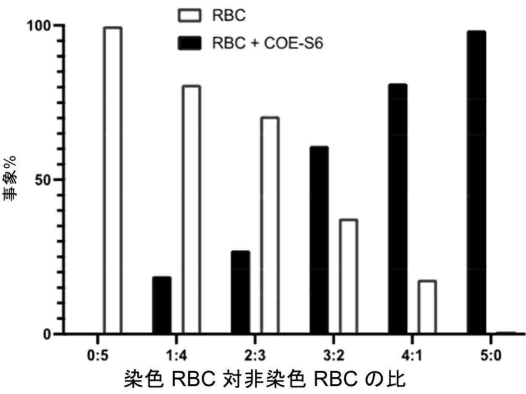
【図 5 (c)】



【図 6】



【図 7】



10

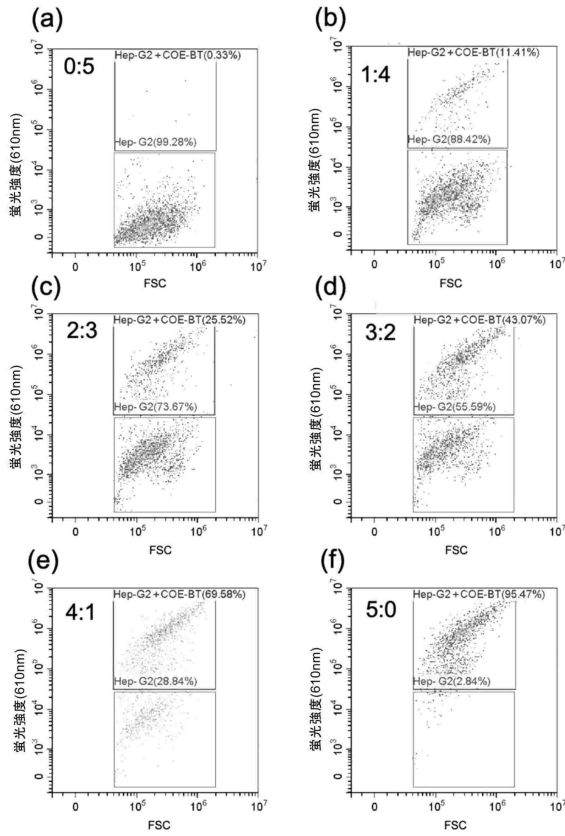
20

30

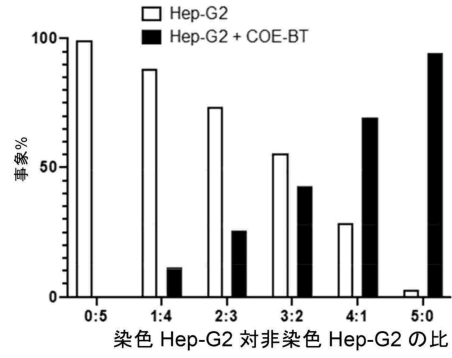
40

50

【図 8】



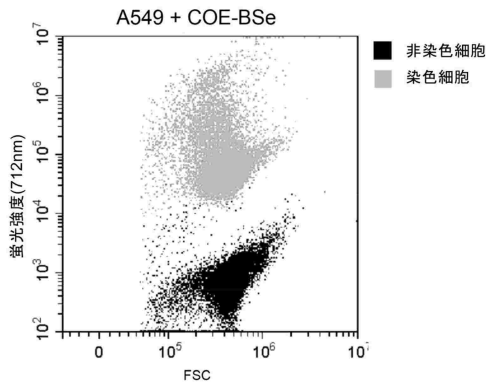
【図 9】



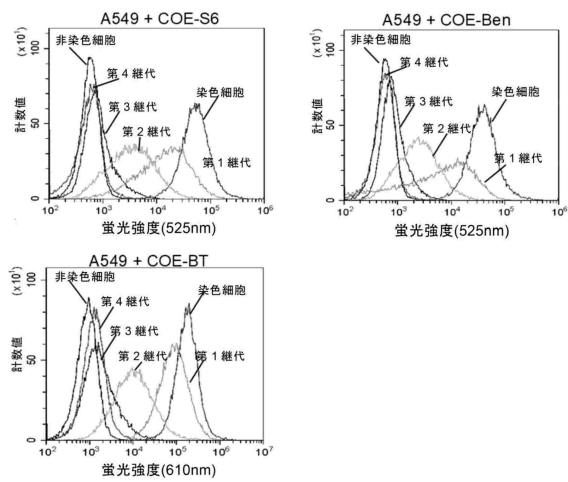
10

20

【図 10】



【図 11】

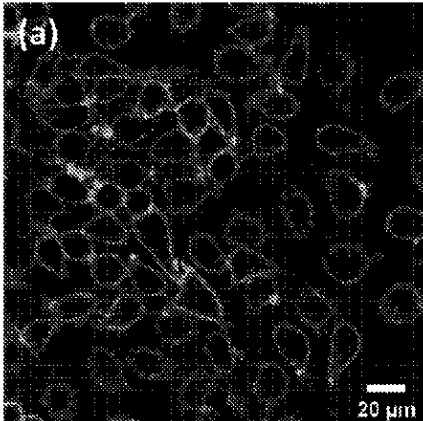


30

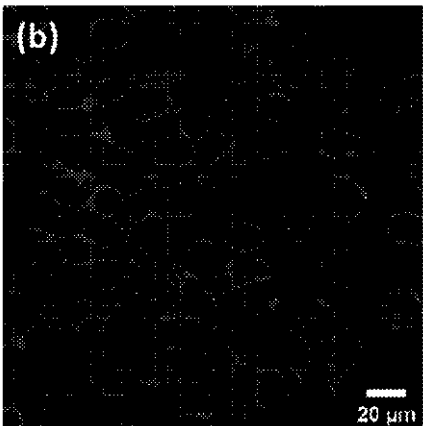
40

50

【図 1 2 (a) 】

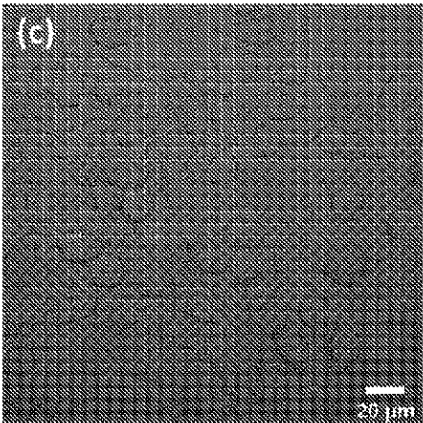


【図 1 2 (b) 】

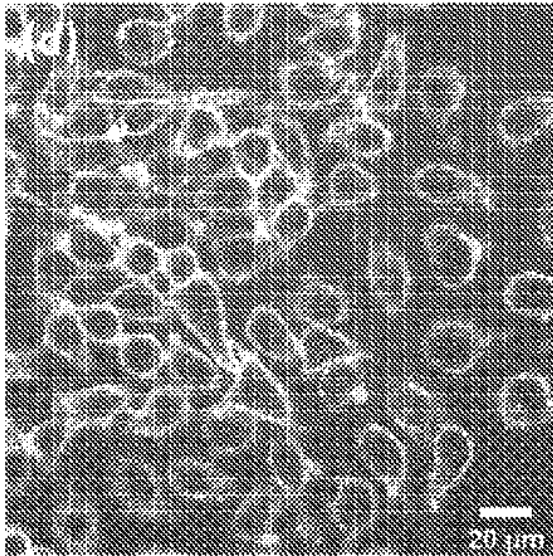


10

【図 1 2 (c) 】



【図 1 2 (d) 】



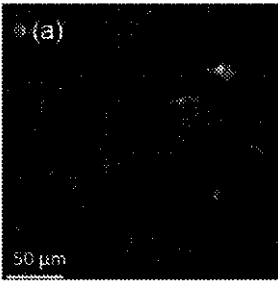
20

30

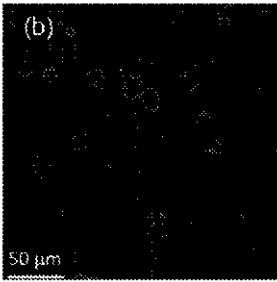
40

50

【図 13 (a)】

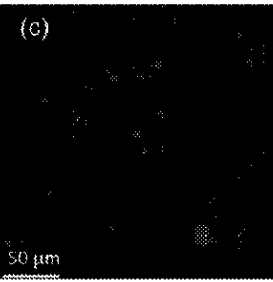


【図 13 (b)】

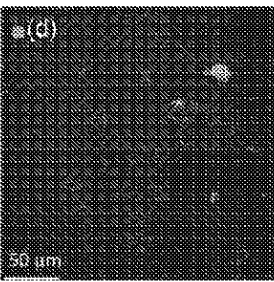


10

【図 13 (c)】

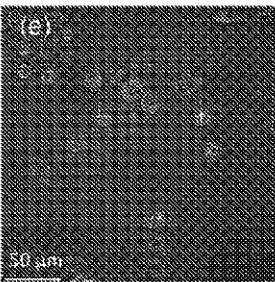


【図 13 (d)】

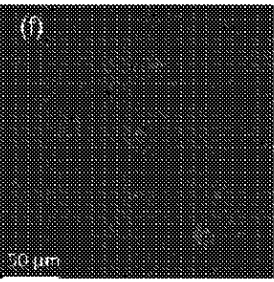


20

【図 13 (e)】



【図 13 (f)】

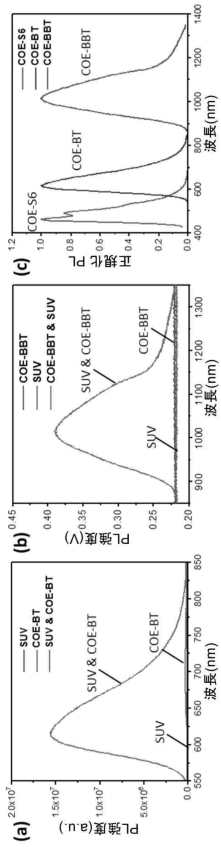


30

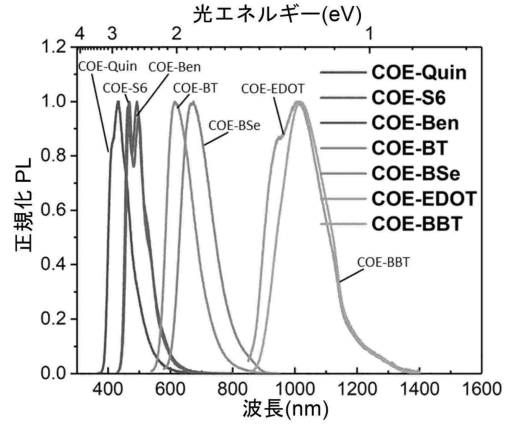
40

50

【図 1 4】



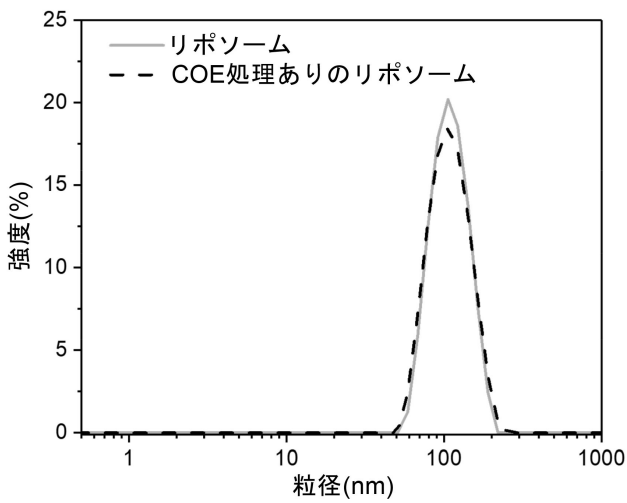
【図 1 5】



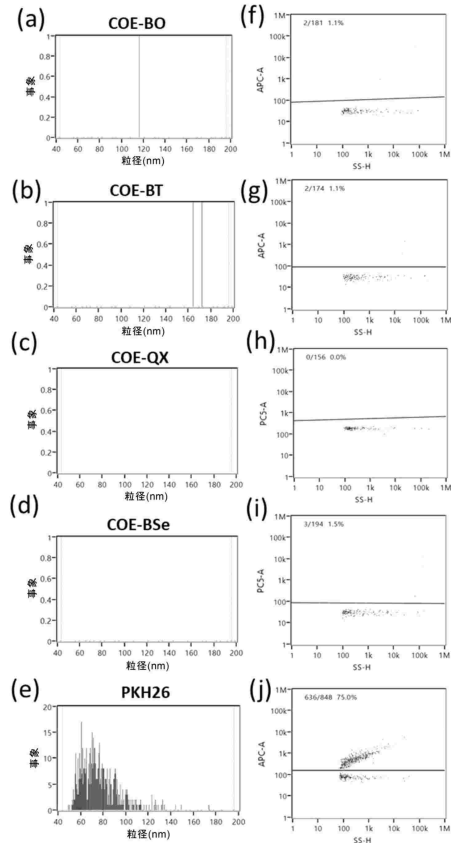
10

20

【図 1 6】



【図 1 7】

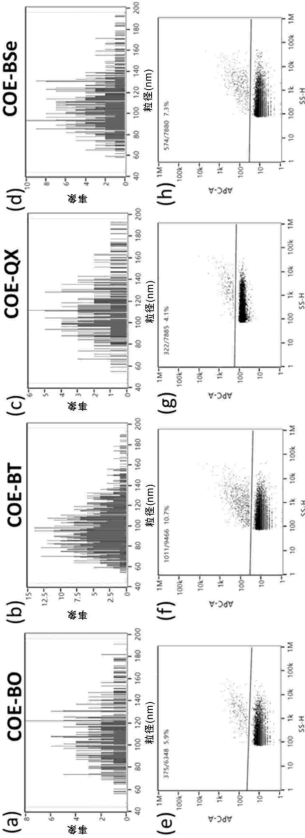


30

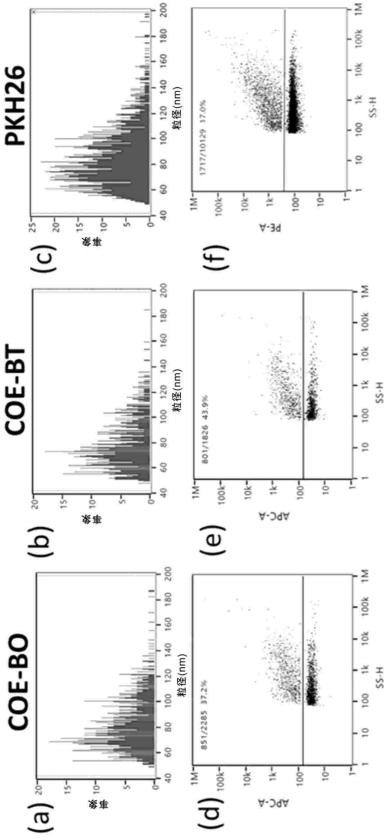
40

50

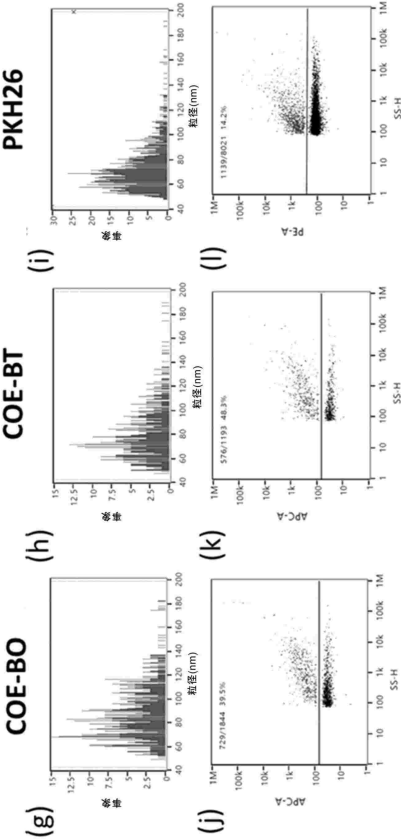
【図 18】



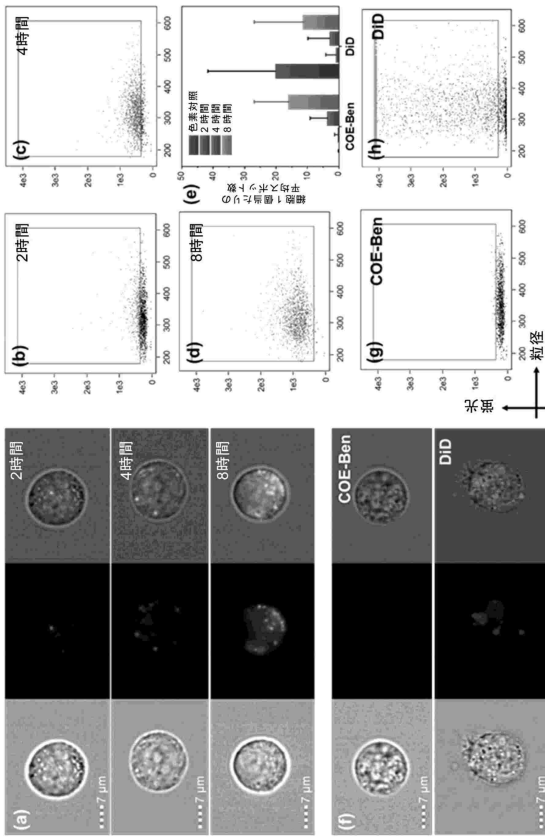
【図 19 - 1】



【図 19 - 2】



【図 20】



10

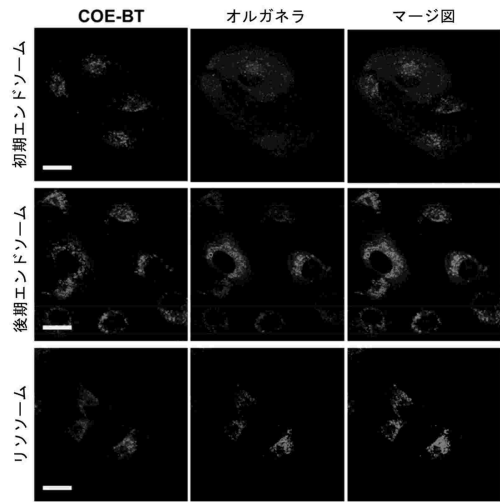
20

30

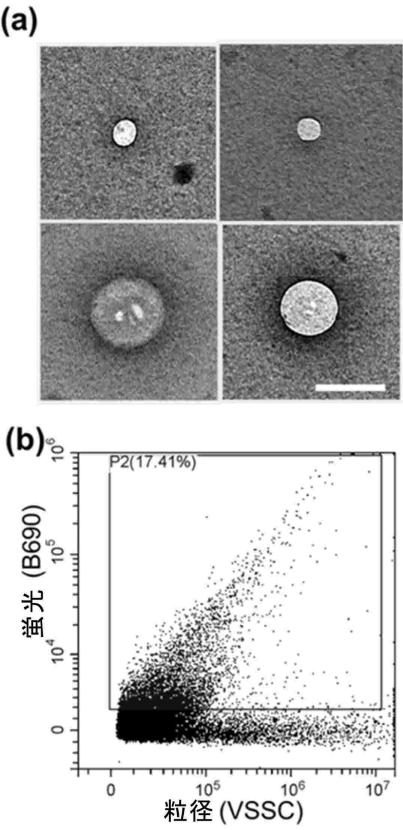
40

50

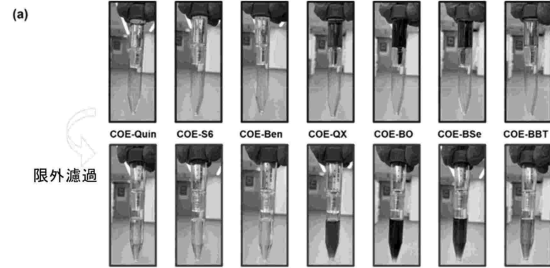
【図 2 1】



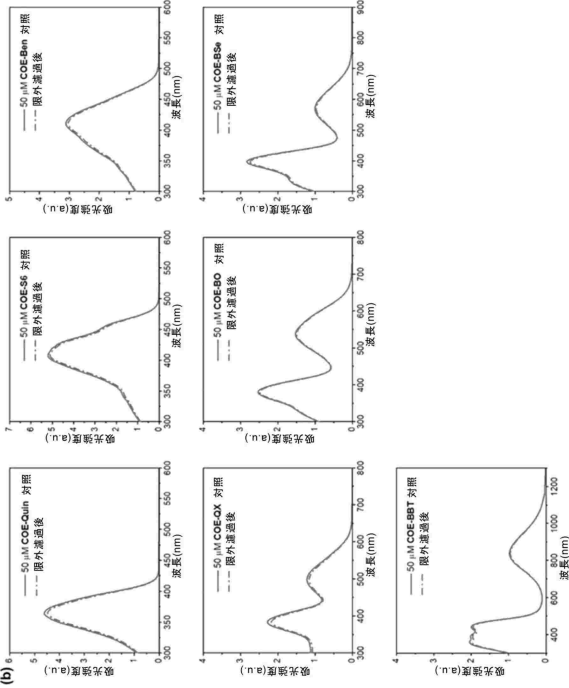
【図 2 2】



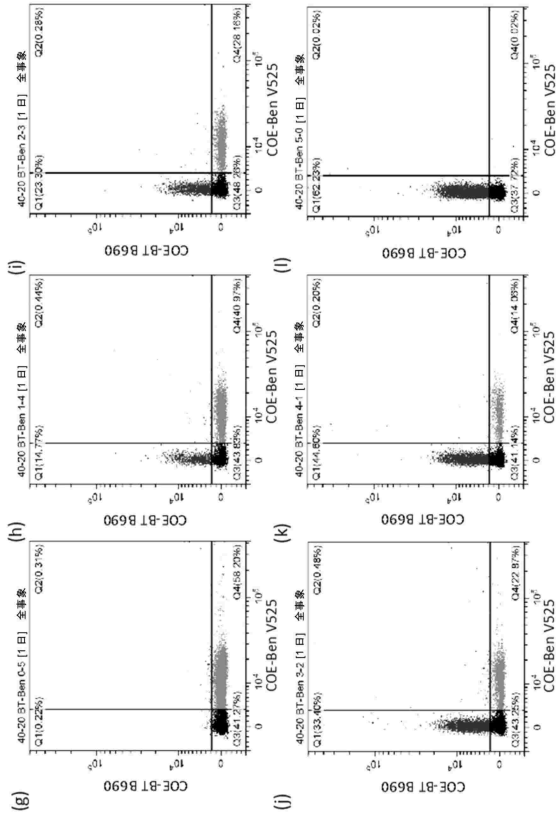
【図 2 3 - 1】



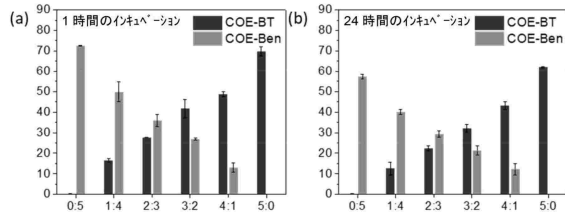
【図 2 3 - 2】



【図 27-2】



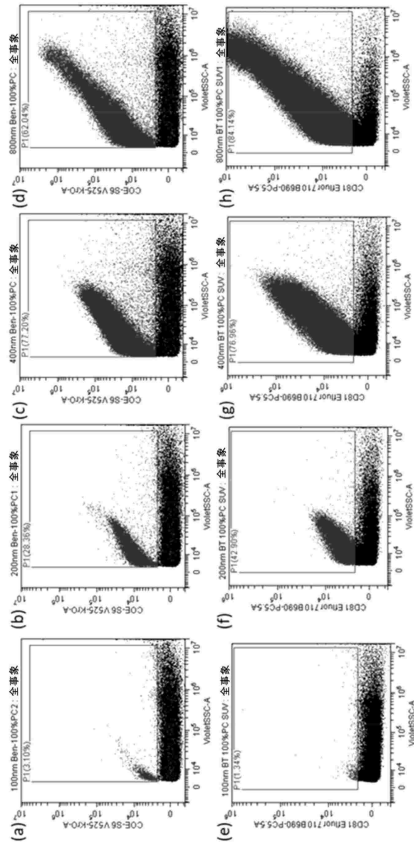
【図 28】



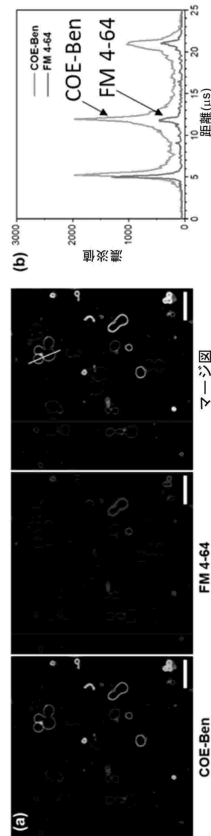
10

20

【図 29】



【図 30】



30

40

50

【 図 3 1 】

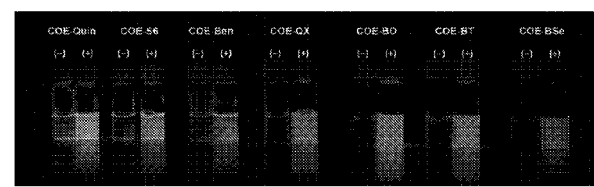
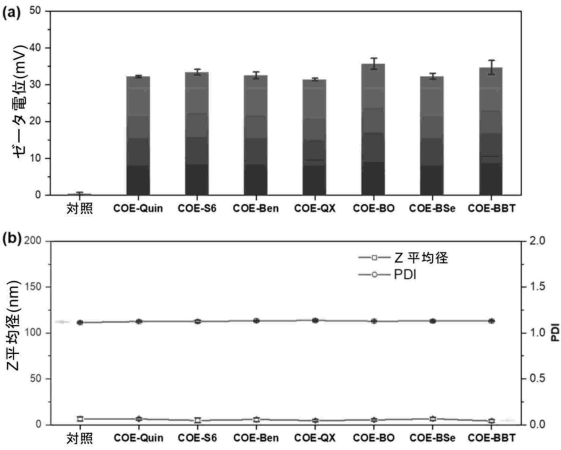
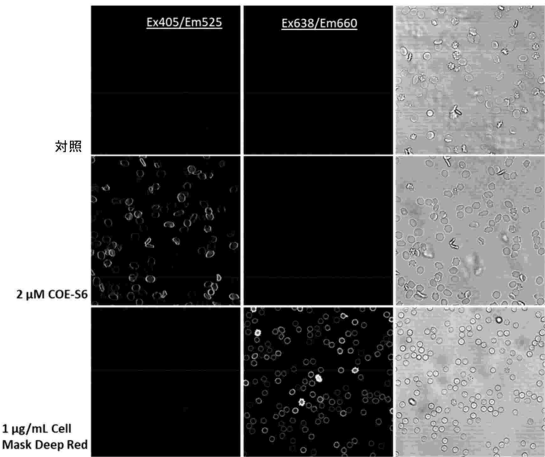


Figure 31

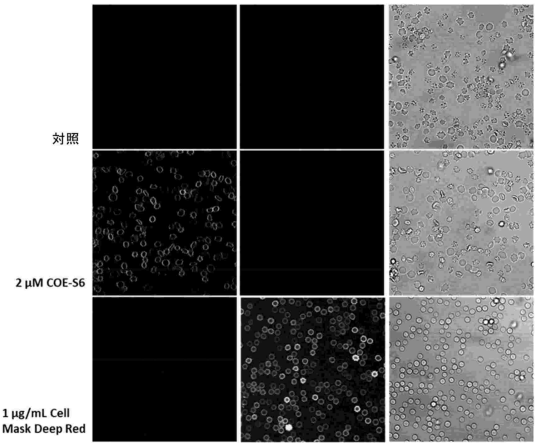
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2022/050582
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See Supplemental Box According to International Patent Classification (IPC)		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS REGISTRY, CAPLUS, FAMPAT and internet: structure search, conjugated oligoelectrolytes, fluorescence probe, flow cytometry, cell membrane, cells, liposomes, vesicles, and related terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIVADAS, A.P. ET AL., Supergelation via Purely Aromatic π - π Driven Self-Assembly of Pseudodiscotic Oxadiazole Mesogens. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 27 March 2014, Vol. 136, No. 14, pages 5416-5423 [Retrieved on 2023-03-08] <DOI: 10.1021/JA500607D> Chart 1 compounds OXD1, OXD4, OXD6, OXD8, OXD10, OXD12	1-4, 7-9, 13-15, 17-19
X	US 3991049 A (ADOLF EMIL SIEGRIST, ET AL.) 9 November 1976 example 1 compounds 101, 112-114; example 4 compounds 142, 145, 148, 149, 153, 155, 156; example 5 compounds 181-184, 190-193; example 9 compounds 225-226, 233-234; example 14 compound 272	1-4, 7-8, 13-15, 17-19, 27
X	US 3642783 A (ADOLF EMIL SIEGRIST, ET AL.) 15 February 1972 example 4 compounds 53-55; example 6 compounds 61-62	1-4, 7-11, 13-15, 17-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
*Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17/03/2023 (day/month/year)		Date of mailing of the international search report 20/03/2023 (day/month/year)
Name and mailing address of the ISA/SG  Intellectual Property Office of Singapore 1 Paya Lebar Link, #11-03 PLQ 1, Paya Lebar Quarter Singapore 408533 Email: pct@ipos.gov.sg		Authorized officer <u>Chen Wei</u> (Dr) IPOS Customer Service Tel. No.: (+65) 6339 8616

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SG2022/050582
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAS REGISTRY. Registry Number 515139-44-3, 14 May 2003 Registry Number 1607819-44-2, 21 May 2014 Registry Number 1622980-85-1, 15 September 2014	1-4, 7-11, 13-15, 17-19, 22
X	US 2014/0312274 A1 (GOTOH YASUYUKI, ET AL.) 23 October 2014 compounds 1-1-73, 1-1-74, 1-1-86, 1-1-92 to 1-1-99, 1-1-112 to 1-1-115, 1-1-118, 1-1-119, 1-1-122, 1-1-128 to 1-1-133, 1-1-135 to 1-1-137, 1-2-37 to 1-2-40, 1-3-25, 1-3-26, 1-3-37 to 1-3-40, 1-4-25, 1-4-26, 1-4-37 to 1-4-40, 1-5-25, 1-5-26, 1-5-37 to 1-5-40, 1-6-25, 1-6-26, 1-6-37 to 1-6-40	1-4, 7-8, 13-15, 17-19, 27
X	ZENG, S. ET AL., D- π -A- π -D type benzothiadiazole-triphenylamine based small molecules containing cyano on the π -bridge for solution-processed organic solar cells with high open-circuit voltage. <i>Chem. Commun.</i> , 11 September 2012, Vol. 48, No. 86, pages 10627-10629 [Retrieved on 2023-03-17] <DOI: 10.1039/C2CC35754B> Fig 1, compounds BDCTBT and BDETET	1-5, 7-11, 13-15, 17-24
X	Catania, Chelsea E., Modifying Membrane Properties with Conjugated Oligoelectrolytes and, Elucidating the Charge Transfer Mechanisms, UC Santa Barbara Electronic Theses and Dissertations. 31 December 2016 [Retrieved on 2023-03-08 from https://escholarship.org/uc/item/2r5537ws] page 8 Figure 1.3 compounds DSSN+ and COE2-3C, page 21 first paragraph, page 23 Cell staining for microscopy, Figure 2.1, page 51 3.2 Experimental Methods, page 74 section 3.5.1, figure 3.2, pages 97-106 Assessing the effect of DSSN+ on cell populations in U-tube MFCs, Figure 4.5, page 132 5.2.4 Future applications	27-29, 31-33, 35-37
X	HINKS, J. ET AL., Oligopolyphenylenevinylene-Conjugated Oligoelectrolyte Membrane Insertion Molecules Selectively Disrupt Cell Envelopes of Gram-Positive Bacteria. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 15 March 2015, Vol. 81, No. 6, pages 1949-1958 [Retrieved on 2023-03-08] <DOI: 10.1128/AEM.03355-14> the whole document in particular Fig 1B, Figs 2 and 5	27-29
X	WO 2019/209182 A1 (UNIV NANYANG TECH ET AL.) 31 October 2019 compounds COD-T4, COE-T8, COE-T42N, COE-T82N, COE-T42, COE-T82; examples 3, 5 and 6, Fig 12	27-29, 31-33, 35-37
X	CN 110283319 A (BEIJING UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 29 September 2019 paragraph [0027] formula IV	1-5
X	WANG, L. ET AL., Tuning the photovoltaic performance of BT-TPA chromophore based solution-processed solar cells through molecular design incorporating of bithiophene unit and fluorine-substitution. <i>Dyes and Pigments</i> , 5 March 2015, Vol. 118, pages 37-44 [Retrieved on 2023-03-17] <DOI: 10.1016/J.DYEPIG.2015.02.017> Scheme 1	1-5
X	SUWARA, J. ET AL., Highly Fluorescent Distyrylnaphthalene Derivatives as a Tool for Visualization of Cellular Membranes. <i>Materials</i> , 20 February 2020, Vol. 13, No. 4, pages 951 [Retrieved on 2023-03-08] <DOI: 10.3390/MA13040951> Figures 1, 3-9, sections 2.6-2.7, 3.5	30-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SG2022/050582

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/97077 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA ET AL.) 20 May 2021 formula I, pages 65-73 formulas F, G, H, formula O- formula SS, pages 73-74 formulas UU, VV and XX, all examples	1-27
X	GARNER, L.E. ET AL., Modification of the Optoelectronic Properties of Membranes via Insertion of Amphiphilic Phenylenevinylene Oligoelectrolytes. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 7 July 2010, Vol. 132, No. 29, pages 10042-10052 [Retrieved on 2023-03-08] <DOI: 10.1021/JA1016156> scheme 1, Figures 2, 4	27-29, 33, 35-37
A	WANG, B. ET AL., A Membrane-Intercalating Conjugated Oligoelectrolyte with High-Efficiency Photodynamic Antimicrobial Activity. <i>Angewandte Chemie</i> , 28 March 2017, Vol. 56, No. 18, pages 5031-5034 [Retrieved on 2023-03-17] <DOI: 10.1002/ANIE.201701146> The whole document	-
A	BAZAN, E. ET AL., Improving the antimicrobial efficacy against resistant <i>Staphylococcus aureus</i> by a combined use of conjugated oligoelectrolytes. <i>PLoS ONE</i> , 15 November 2019, Vol. 14, No. 11, pages e0224816 [Retrieved on 2023-03-17] <DOI: 10.1371/JOURNAL.> a	-
P,X	ZHOU, C. ET AL., Conjugated Oligoelectrolytes for Long-Term Tumor Tracking with Incremental NIR-II Emission. <i>Advanced Materials</i> , 19 March 2022, Vol. 34, No. 20, 2201989 [Retrieved on 2023-03-09] <DOI: 10.1002/ADMA.202201989> Figure 1	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/SG2022/050582

Note: This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in this International Search Report. This Authority is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3991049 A	09/11/1976	NONE	
US 3642783 A	15/02/1972	NL 6606304 A BE 680775 A AT 267460 B CH 476794 A SE 347750 B DE 1594824 A1 GB 1136453 A FR 1479071 A	11/11/1966 09/11/1966 27/12/1968 15/08/1969 14/08/1972 21/01/1971 11/12/1968 19/07/1967
US 2014/0312274 A1	23/10/2014	JP 2014224237 A	04/12/2014
WO 2019/209182 A1	31/10/2019	US 2021/0147340 A1 CN 112313205 A	20/05/2021 02/02/2021
CN 110283319 A	27/09/2019	NONE	
WO 2021/97077 A1	20/05/2021	NONE	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SG2022/050582

Supplemental Box
(Classification of Subject Matter)

Int. Cl.

C07C 217/64 (2006.01)

C07D 409/10 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

C07D 421/14 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 D 333/18 (2006.01)	C 0 9 K 11/06	6 3 5
C 0 7 D 513/04 (2006.01)	C 0 7 D 417/14	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	C 0 7 D 519/00	
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	C 0 7 D 421/14	
	C 0 7 D 333/18	
	C 0 7 D 513/04	3 0 1
	G 0 1 N 33/48	M
	G 0 1 N 33/48	P
	G 0 1 N 21/64	F

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

ド 2 1 ナショナル ユニバーシティ オブ シンガポール ファカルティ オブ サイエンス／デ
パートメント オブ ケミストリー内

(72)発明者 ジョー チェン

シンガポール共和国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロード 2 1 ナショ
ナル ユニバーシティ オブ シンガポール ファカルティ オブ サイエンス／デパートメント オ
ブ ケミストリー内

(72)発明者 コックスーヴァスケ サラ

シンガポール共和国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロード 2 1 ナショ
ナル ユニバーシティ オブ シンガポール ファカルティ オブ サイエンス／デパートメント オ
ブ ケミストリー内

(72)発明者 チア ワン ニー ジェラルディン

シンガポール共和国 シンガポール 1 1 9 0 7 7 ロウワー ケント リッジ ロード 2 1 ナショ
ナル ユニバーシティ オブ シンガポール ファカルティ オブ サイエンス／デパートメント オ
ブ ケミストリー内

F ターム (参考) 2G043 AA03 AA04 BA16 CA04 DA02 EA01 FA01 FA02 JA03 KA01
KA02 KA03 KA09

2G045 BB25 CB01 FA37 FB12

4H006 AA01 AA03 AB92 BJ50 BP30 BU50