

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-510462
(P2009-510462A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/84 (2006.01)	GO 1 N 33/84 Z	2 GO 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 3	2 GO 5 4
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 C 0 6 9
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 C 0 7 1
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	4 H 0 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-533849 (P2008-533849)	(71) 出願人	504404227 ザ ユニバーシティ オブ ホンコン 中華人民共和国、ホンコン、ポクフラン ロード
(86) (22) 出願日	平成18年8月25日 (2006.8.25)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月29日 (2008.5.29)	(72) 発明者	ダン ヤング 中華人民共和国 ホンコン ルイッテルト ン ロード 52 グロリ ヘイグフロ ート 16デイー
(86) 國際出願番号	PCT/CN2006/002177	(72) 発明者	ファリ ワング 中華人民共和国 ホンコン ウオオ ホブ ストリート 2 ポ タク ブイルディ ング フラット 20ビー
(87) 國際公開番号	W02007/041923		
(87) 國際公開日	平成19年4月19日 (2007.4.19)		
(31) 優先権主張番号	11/245,529		
(32) 優先日	平成17年10月7日 (2005.10.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペルオキシナイトライトの高特異的検出のための試薬

(57) 【要約】

本発明は、他の活性酸素種及び活性窒素種よりもむしろペルオキシナイトライトと特異的に反応する組成物を提供する。本発明は、ペルオキシナイトライトの測定に関連した作用剤も提供する。本発明は、そのような組成物及び作用剤を使用することを含む、試料中のペルオキシナイトライトの測定に関連した方法、ペルオキシナイトライトの検出のためのハイ-スループットスクリーニング蛍光法、及びペルオキシナイトライトの生成を増加又は減少する化合物のスクリーニングのためのハイ-スループット法も提供する。

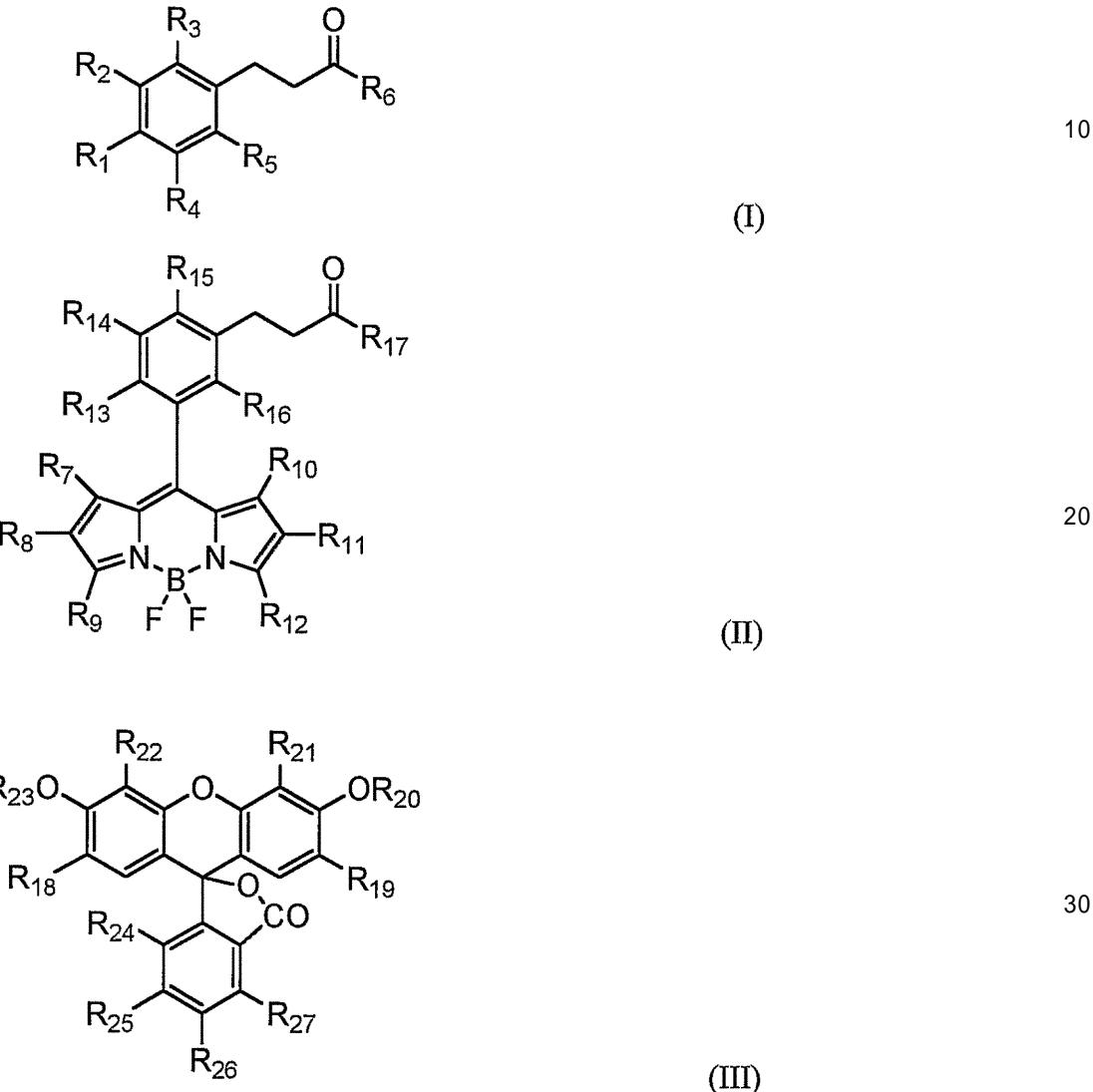
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(I)、(II)、(III)の化合物、又はそれらの塩を含有する、他の活性酸素種及び活性窒素種よりもむしろペルオキシナイトライドと特異的に反応する組成物：

【化 1】



(式中、

R₁は、OR'₁、又はNR'₂R'₃であり、ここでR'₁、R'₂及びR'₃は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、もしくはポリエーテルから選択される基であり；

R₂、R₃、R₄、及びR₅は、独立して、水素、又は、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ポリエーテルから選択される基であるか、R₂及びR₃は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR₄及びR₅は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R₆は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₁(式中、W₁は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択され

40

50

る電子求引基であり；

発蛍光団は、R_i(i=1~5)のひとつに共有結合されてよく；

R₇及びR₁₀は、独立して、水素、又は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルケニル、ハロゲン化アルキル、CN、もしくはNO₂から選択される基であり；

R₈、R₉、R₁₁、及びR₁₂は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、又は、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、もしくは(C=O)-Y又は-(C=O)-X-Yの形態(式中、Xは、低級アルキル又はアルケニル鎖であり、かつYは、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、無機エステル、もしくはその環原子が、炭素、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択され、該環原子が、3~6個の炭素原子、及び2個を超えないヘテロ原子を含む、5~7員の複素環式環から選択される基である。)から選択される基であり；

R₁₃は、OR'₄又はNR'₅R'₆であり(式中、R'₄、R'₅、及びR'₆は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、もしくはポリエーテルから選択される基である。)；

R₁₄及びR₁₅は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ポリエーテルであるか、又はR₁₄及びR₁₅は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R₁₆は、水素、アルキル、アルコキシ、又はポリエーテルであり；

R₁₇は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₂(式中、W₂は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基であり；

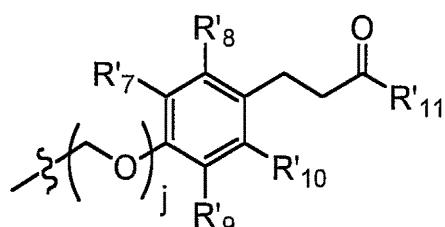
R₁₈及びR₁₉は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、又はアルコキシであり；

R₂₀は、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、カルボキシアルキル、カルボン酸エステル、もしくはアミノアルキルから選択される基であり；

R₂₁及びR₂₂は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、カルボキシアルキル、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、もしくは無機エステルから選択される基であり；並びに

R₂₃は、以下から選択され：

【化2】



(式中、j=0又は1；

R'₇、R'₈、R'₉、及びR'₁₀は、独立して、水素、又は、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、アルキルオキシ、ポリエーテルから選択される基であるか、R'₇及びR'₈は一緒に、ア

10

20

30

40

50

リール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR'₉及びR'₁₀は、一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R'₁₁は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₃(式中、W₃は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基である。)；並びに

R₂₄、R₂₅、R₂₆、及びR₂₇は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、無機エステルから選択される基であるか、R₂₄及びR₂₅は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成するか、R₂₅及びR₂₆は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR₂₆及びR₂₇は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成する。)。

10

20

30

40

50

【請求項 2】

R'₁が、CH₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

R'₁が、OCH₂OZ₁である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4】

Z₁が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、又はポリエーテルから選択される基である、請求項3記載の化合物。

【請求項 5】

Z₁が、CH₃である、請求項4記載の化合物。

【請求項 6】

R₁が、NR'₂R'₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 7】

R'₂が、水素である、請求項6記載の化合物。

【請求項 8】

R'₃が、(C=O)Z₂である、請求項7記載の化合物。

【請求項 9】

Z₂が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、又はポリエーテルから選択される基である、請求項8記載の化合物。

【請求項 10】

R₂及びR₃が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 11】

R₄及びR₅が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 12】

R₆が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 13】

R_6 が、 CF_nH_{3-n} である、 請求項12記載の化合物。

【請求項 14】

"n" が、 1又は2である、 請求項13記載の化合物。

【請求項 15】

W_1 が、 CH_3 である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 16】

W_1 が、 $tert$ -Bu である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 17】

R_7 が、 CH_3 である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 18】

前記発蛍光団が、 アクリジンオレンジ、 アントラセン環、 アロフィコシアニン、 BODIPY、 シアニン類、 クマリン、 エダンス (Edans)、 エオシン、 エリトロシン、 フルオレスカミン、 フルオレセイン、 FAM(カルボキシフルオレセイン)、 HEX(ヘキサクロロフルオレセイン)、 JOE(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシ-フルオレセイン)、 Oregon Green、 フィコシアニン、 フィコエリトリン、 ローダミン、 ROX(カルボキシ-X-ローダミン)、 TAMRA(カルボキシテトラメチルローダミン)、 TET(テトラクロロ-フルオレセイン)、 Texas red、 テトラメチルローダミン、 及びキサンチン類から選択される、 請求項1記載の化合物。

【請求項 19】

R_9 が、 $(C=O)NR''_1R''_2$ である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 20】

R''_1 が、 $-(CH_2)_k-CH_3$ である、 請求項19記載の化合物。

【請求項 21】

$k=0 \sim 24$ である、 請求項20記載の化合物。

【請求項 22】

R''_2 が、 $-(CH_2)_l-CH_3$ である、 請求項19記載の化合物。

【請求項 23】

$l=0 \sim 24$ である、 請求項22記載の化合物。

【請求項 24】

R_8 及び R_9 が一緒に、 シクロアルキル、 シクロアルケニル、 シクロアルキニル、 アリール、 複素環式、 ヘテロアリール、 又は複素芳香族から選択される、 5、 6、 又は7-員の環を形成する、 請求項1記載の化合物。

【請求項 25】

R_{12} が、 $(C=O)NR''_3R''_4$ である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 26】

R''_3 が、 $-(CH_2)_p-CH_3$ である、 請求項25記載の化合物。

【請求項 27】

$p=0 \sim 24$ である、 請求項26記載の化合物。

【請求項 28】

R''_4 が、 $-(CH_2)_q-CH_3$ である、 請求項25記載の化合物。

【請求項 29】

$q=0 \sim 24$ である、 請求項28記載の化合物。

【請求項 30】

R_{11} 及び R_{12} が一緒に、 シクロアルキル、 シクロアルケニル、 シクロアルキニル、 アリール、 複素環式、 ヘテロアリール、 又は複素芳香族から選択される、 5、 6、 又は7-員の環を形成する、 請求項1記載の化合物。

【請求項 31】

R'_4 が、 CH_3 である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 32】

R'_4 が、 OCH_2OZ_3 である、 請求項1記載の化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 3】

Z_3 が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、又はポリエーテルから選択される基である、請求項32記載の化合物。

【請求項 3 4】

Z_3 が、 CH_3 である、請求項33記載の化合物。

【請求項 3 5】

R_{13}' が、 $NR_5'R_6'$ である、請求項1記載の化合物。

【請求項 3 6】

R_5' が、水素である、請求項35記載の化合物。

【請求項 3 7】

R_6' が、 $(C=O)Z_4$ である、請求項36記載の化合物。

【請求項 3 8】

Z_4 が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ポリエーテルから選択される基である、請求項37記載の化合物。

【請求項 3 9】

R_{14}' 及び R_{15}' が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 0】

R_{17}' が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 1】

R_{17}' が、 CF_nH_{3-n} である、請求項40記載の化合物。

【請求項 4 2】

"n"が、1又は2である、請求項41記載の化合物。

【請求項 4 3】

W_2 が、 CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 4】

W_2 が、tert-Buである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 5】

R_{18}' が、Cl、Br、又はIである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 6】

R_{18}' が、 CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 7】

R_{19}' が、Cl、Br、又はIである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 8】

R_{19}' が、 CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 9】

R_{20}' が、 $-(CH_2)_m-COOH$ である、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 0】

$m=1 \sim 24$ である、請求項49記載の化合物。

【請求項 5 1】

R_7' 及び R_8' が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 2】

R_9' 及び R_{10}' が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 3】

R_{11}' が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

R'_{11} が、 CF_nH_{3-n} である、 請求項40記載の化合物。

【請求項 5 5】

"n" が、 1 又は 2 である、 請求項41記載の化合物。

【請求項 5 6】

W_3 が、 CH_3 である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 5 7】

W_3 が、 *tert*-Bu である、 請求項1記載の化合物。

【請求項 5 8】

R_{24} 及び R_{25} が一緒に、 シクロアルキル、 シクロアルケニル、 シクロアルキニル、 アリール、 複素環式、 ヘテロアリール、 又は複素芳香族から選択される、 5、 6、 又は7-員の環を形成する、 請求項1記載の化合物。 10

【請求項 5 9】

R_{25} 及び R_{26} が一緒に、 シクロアルキル、 シクロアルケニル、 シクロアルキニル、 アリール、 複素環式、 ヘテロアリール、 又は複素芳香族から選択される、 5、 6、 又は7-員の環を形成する、 請求項1記載の化合物。

【請求項 6 0】

R_{26} 及び R_{27} が一緒に、 シクロアルキル、 シクロアルケニル、 シクロアルキニル、 アリール、 複素環式、 ヘテロアリール、 又は複素芳香族から選択される、 5、 6、 又は7-員の環を形成する、 請求項1記載の化合物。 20

【請求項 6 1】

請求項1記載の化合物を含む、 ペルオキシナイトライトの測定のための、 作用剤。

【請求項 6 2】

a) 請求項1記載の化合物を、 試料と接触させる工程； 及び
 b) 前記化合物と前記試料中に存在するペルオキシナイトライトの間の反応により生成される化合物の蛍光を測定する工程； を含む、 試料中のペルオキシナイトライトの測定方法。
 。 30

【請求項 6 3】

前記試料が、 化学試料又は生物学的試料である、 請求項62記載の方法。

【請求項 6 4】

前記生物学的試料が、 動物細胞、 動物組織、 植物細胞、 植物組織、 又は微生物である、 請求項63記載の方法。 30

【請求項 6 5】

請求項61記載の作用剤を使用することを含む、 ペルオキシナイトライトの検出のための、 ハイ-スループットスクリーニング蛍光法。

【請求項 6 6】

請求項1記載の化合物を使用することを含む、 ペルオキシナイトライトの生成を増加又は減少する化合物のスクリーニングのための、 ハイ-スループット法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願を通じ、 様々な参考文献が引用されている。これらの参考文献の開示は、 それらの内容全体が、 本発明が属する技術分野の状況をより完全に説明するために、 引用により本出願に組み込まれている。 40

【0 0 0 2】

(発明の技術分野)

本発明は概して、 ペルオキシナイトライトの検出及び測定の分野に関する。より詳細に述べると、 本発明は、 特にペルオキシナイトライトを検出及び測定するための作用剤として有用な化合物に関する。本発明は、 生存細胞及び生存組織内のペルオキシナイトライトを検出及び測定するための、 プローブ分子、 それらの調製法及び作用剤としての使用を含 50

む。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

硝酸イオンの異性体であるペルオキシナイトライト(ONOO⁻)は、ほぼ一世紀にわたり公知である。過去10年間に、ペルオキシナイトライトは、生物学及び医学におけるその可能性のある重要な役割のために、広く研究されてきた: Beckman, J. S. の論文、Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1996, 271, C1424-1437; Goldstein, S. らの論文、Free Radical Biol. & Med., 1996, 21, 965-974; Groves, J. T. の論文、Curr. Opin. Chem. Biol. 1999, 3, 226; Radi, R. らの論文、Free Radical Biol. & Med. 2001, 30, 463-488; Tarpey, M. M. らの論文、Circ. Res. 2001, 89, 224-236; 及び、Koppenol, W. H. の論文、Redox Report 2001, 6, 339-341。インビボにおいてペルオキシナイトライトは、化学量論的に1対1の、一酸化窒素(NO)とスーパーオキシド(O₂^{·-})の拡散-制御反応($k = 0.4 \sim 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$)から形成され(Kissner, R. らの論文、Chem. Res. Toxicol. 1997, 10, 1285-1292)、またNOの濃度は、ペルオキシナイトライト生成プロセスにおける重要な制御因子である。一酸化窒素とスーパーオキシドの間の反応は、NO濃度が増大すると進行し、かつスーパーオキシドジスムターゼによる不均化を超えることができる。この状況は、一酸化窒素(NO)が、サイトカイン刺激性誘導型NO合成酵素(iNOS)により過生成された場合に生じる。ONOO⁻の病理学的活性は、生物学的に遍在するCO₂とONOO⁻の反応に関連しており、これにより高度に反応性のラジカルCO₃[·]及びNO₂[·]を約35%の収率で生じる(Radi, R. らの論文、Free Radical Biol. & Med. 2001, 30, 463-488)。結果的にペルオキシナイトライトは、チロシンをニトロ化し(Ischiropoulos, H. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1998, 356, 1-11、及びBeckman J. S. らの論文、Arch Biochem Biophys, 1992, 298, 438-445)、並びにタンパク質、脂質を酸化し(Radi, R. らの論文、Arch. Biochem. Biophys. 1991, 288, 481、及びShi, H. らの論文、Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 257, 651)、並びに生物学的分子の鉄及び硫黄クラスターを酸化することができる(Radi R. らの論文、J. Biol. Chem, 1991, 266, 4244-4250)。ペルオキシナイトライト及びそのプロトン化された形は、生存生物中の他の酸化剤と同様に、有益な作用及び有害な作用の両方に関連している。マクロファージは、細菌侵入に対する宿主-防御反応としてペルオキシナイトライトを生じる。しかしいくつかの研究は、ペルオキシナイトライトが、虚血性再灌流傷害、関節リウマチ、敗血性ショック、多発性硬化症、アテローム硬化症、卒中、炎症性腸疾患、癌、及びいくつかの神経変性疾患のような多くのヒト疾患における組織損傷に寄与することを暗に示している(MacMillan-Crow, L. A. らの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 11853; Rodenas, J. らの論文、Free Radical. Biol. & Med. 2000, 28, 374; Cuzzocrea, S. らの論文、Pharmacol Rev. 2001, 53, 135; Szabo, C. Toxicol. Lett. 2003, 140, 105; White, C. R. らの論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 1044; Lipton, S. A. らの論文、Nature, 1993, 364, 626; Pappolla, M. A. らの論文、J. Neural Transm. 2000, 107, 203; 及び、Beal, M. F. の論文、Free Radical Biol. & Med. 2002, 32, 797-803)。

【0004】

生存生物におけるペルオキシナイトライトの重要な役割を説明することは、重要性を増してきている。ペルオキシナイトライトはアルカリ溶液中で安定しているが、これは生理的pHでのプロトン化時に迅速に減衰する。生物学的システムにおけるペルオキシナイトライトの短い半減期(中性pH値の緩衝液中で1秒、及び細胞内で100ミリ秒未満)は、その直接の単離を不可能にしている(Radi, R. の論文、Chem. Res. Toxicol. 1998, 11, 720-721; Denicola, A. らの論文、Arch. Biochem. Biophys. 1996, 333, 49-58)。例えペルオキシナイトライトのインビボにおける形成に関する確固たる証拠が示されたとしても、細胞及び組織内のペルオキシナイトライトの明確な検出及び定量のための手段は、依然利用できない。

【0005】

10

20

30

40

50

現在までに、ペルオキシナイトライトを検出及び測定するための利用可能な分析方法は、3型に分類することができる。第一の型は、電気化学センサーであり、これは酸化的ストレスの下で細胞内で生成されたペルオキシナイトライトの量を推定するために使用される(Augusto, O. らの論文、J. Methods Enzymol. 1996, 269, 346-354 ; Gatti, R. M. らの論文、FEBS Lett. 1994, 348, 287-290 ; Gatti, R. M. らの論文、Arch. Biochem. Biophys. 1998, 349, 36-46 ; 及び、Karoui, H. らの論文、J. Biol. Chem. 1996, 271, 6000-6009)。この方法は精巧な装置の操作を必要とするが、ペルオキシナイトライトの空間的イメージングはもたらさない。

【0006】

第二の型は、酸化プローブの利用に頼っている。例えば、ペルオキシナイトライトにより酸化され高度の蛍光分子を生じる、DCFH(2',7'-ジクロルジヒドロフルオレセイン)及びDHR123(ジヒドロローダミン123)は、細胞及び組織内のペルオキシナイトライトをモニタリングするために使用される(Royall, J. A. らの論文、Arch. Biochem. Biophys. 1993, 302, 348-355 ; Kooy, N. W. らの論文、Free Radic. Biol. Med. 1994, 16, 149-156 ; Kooy, N. W. らの論文、Free Radic. Res. 1997, 27, 245-254 ; Crow, J. P. の論文、Nitric Oxide, 1997, 1, 145-157 ; Ischiropoulos, H. らの論文、Methods Enzymol. 1999, 301, 367-373 ; 及び、Miles, A. M. らの論文、J. Biol. Chem. 1996, 271, 40-47)。しかし、ペルオキシナイトライトによるDCFH及びDHRの酸化の機構は、大半不明のままであり、これらのプローブは、細胞により生成された多くの他のROS(活性酸素種)によっても酸化され得る。同様の問題点が、細胞培養液中でペルオキシナイトライトを検出するルミナル化学発光(luminal chemiluminescence)システムにおいても認められ得る。HPF(ヒドロキシフェニルフルオレセイン)は、ペルオキシナイトライトと一酸化窒素を識別することができるが、これはペルオキシナイトライトによるよりも、ヒドロキシルラジカルにより、より高度の蛍光シグナルを発する(Setsukinai, K. らの論文、J. Biol. Chem. 2003, 278, 3170-3175 ; 国際公開公報第01/64664号(Naganoら)；及び、国際公開公報第2004040296号(Naganoら))。

【0007】

第三の型は、生物学的分子のフットプリンティング反応を利用する。例えば、生物学的システムにおけるペルオキシナイトライトによるタンパク質のチロシン残基の酸化後に生成されるニトロ化産物である、3-ニトロチロシンは、免疫化学的方法により検出することができる(Kaur, H. らの論文、FEBS Lett. 1994, 350, 9-12)。NADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)も、蛍光による緩衝液中のペルオキシナイトライト濃度のモニタリングに最近使用されている。しかし現時点で、明確に細胞内のペルオキシナイトライトの生成を直接示すことができる、完全に特異的な化学修飾は、プローブ又は生体分子のいずれについても存在しない。これは、生物学的システム内に存在する他の活性酸素種及び活性窒素種が、ペルオキシナイトライトと競合しつつその結果を妨害することを暗示している。

【0008】

電気化学的方法、化学発光法及びフットプリンティング法を含む、ペルオキシナイトライトの検出/測定に関するいくつかの方法が知られている。しかしこれらの方法は、スカベンジャー及び阻害剤の組合せを使用する単調で時間のかかる対照実験を必要とし、かつ感度及び特異性が低い。従って生物学的システム内のペルオキシナイトライトの直接研究を促進するために、高感度でかつ操作が容易である、ペルオキシナイトライトの検出及び測定に特異的な方法を開発することが非常に重要である。

【発明の開示】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、ペルオキシナイトライトの明確な検出及び測定に使用される新規化合物に関する。より詳細に述べると、本発明は、下記一般式(I)、(II)、(III)又はそれらの塩により表される、他の活性酸素種及び活性窒素種よりもむしろペルオキシナイトライトと特異

10

20

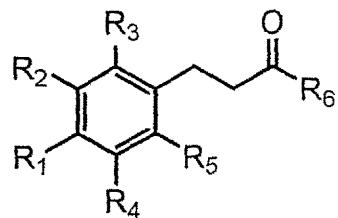
30

40

50

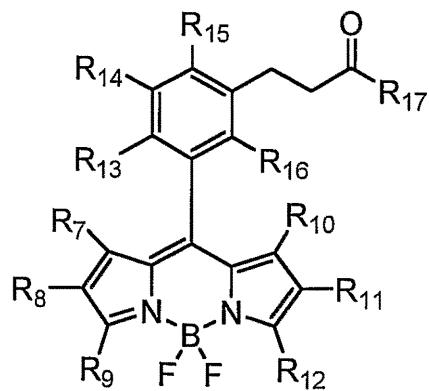
的に反応する化合物を提供する：

【化1】



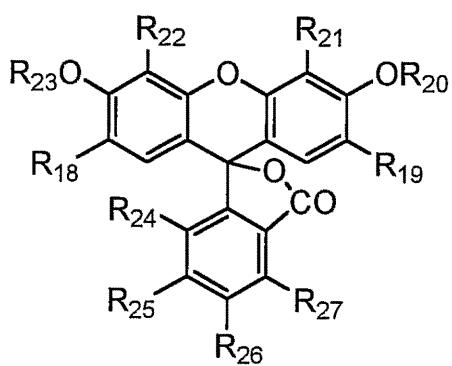
(I)

10



(II)

20



(III)

30

(式中、R_i (i=1~22) は、下記「発明の詳細な説明」において定義されるものである。)。

【0010】

本発明は、前述の化合物のいずれかを含む、ペルオキシナイトライトを測定するための作用剤も提供する。

40

【0011】

本発明は、試料中のペルオキシナイトライトを測定する方法であって：

- 前述の化合物のいずれかを、試料と接触させる工程；及び
- 前記化合物と試料中に存在するペルオキシナイトライトとの反応により生成される化合物の蛍光を測定する工程；を含む前記方法も提供する。

【0012】

本発明は、ペルオキシナイトライトの測定のために作用剤を使用することを含む、ペルオキシナイトライトの検出のための、ハイ-スループットスクリーニング蛍光法も提供し、ここで該作用剤は、前述の化合物のいずれかを含む。

【0013】

50

本発明は、前述の化合物のいずれかを使用することを含む、ペルオキシナイトライトの生成を増加又は減少させる化合物のスクリーニングのためのハイ-スループット法も提供する。

【0014】

(発明の詳細な説明)

(定義)

本明細書中に明確に提示されない限りは、本出願において使用される下記の用語は各々、以下に記した意味を有するものとする。

【0015】

「アルキル」は、炭素及び水素を含む完全に飽和された非環式の一価の基を意味し、これは分枝鎖又は直鎖であってよい。アルキル基の例は、メチル、エチル、n-ブチル、t-ブチル、n-ヘブチル、及びイソブロピルである。「低級アルキル」は、メチル、エチル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、イソアミル、n-ペンチル、及びイソペンチルにより例証されるような、1~6個の炭素原子のアルキル基を意味する。

【0016】

「アルケニル」は、炭素及び水素を含む、一価又は二価の不飽和の、好ましくは一不飽和の基を意味し、これは環式、分枝鎖又は直鎖であってよい。「低級アルケニル」は、1~5個の炭素原子を有するそのような基を意味する。

【0017】

「アリール」は、一般に単環(例えばベンゼン)又は二縮合環(例えばナフチル)を有する、置換又は非置換の一価の芳香族基を意味する。単環式アリール基が一般に好ましい。この用語は、例えばフリル、ピロール、ピリジル、及びインドールのような、環内に1個以上の窒素、酸素、又は硫黄原子を有する芳香環基である、ヘテロアリール基を含む。「置換された」は、アリール基の1個以上の環水素が、好ましくはフッ素、塩素、臭素、ヨウ素、メチル、エチル、ヒドロキシル、ヒドロキシメチル、ニトロ、アミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、メトキシ、ハロメトキシ、及びハロメチルから選択された1個又は複数の基と交換されていることを意味する。

【0018】

「アラルキル」は、更にアリール基により置換された、アルキル、好ましくは低級アルキル置換基を意味し；例は、ベンジル及びフェネチルである。

【0019】

「発蛍光団」は、光により励起され、蛍光を発することができる、小型分子、又は大型分子の一部を意味する。好ましくは発蛍光団は、約200~約1000nmの範囲、好ましくは約500~800nmの範囲の波長を有する光による励起時に、蛍光を効率的に生じる。発蛍光団は好ましくは、アクリジンオレンジ、アントラセン環、アロフィコシアニン、BODIPY、シアニン類、クマリン、エダンス(Edans)、エオシン、エリトロシン、フルオレスカミン、フルオレセイン、FAM(カルボキシフルオレセイン)、HEX(ヘキサクロロフルオレセイン)、JOE(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシ-フルオレセイン)、Oregon Green、フィコシアニン、フィコエリトリン、ローダミン、ROX(カルボキシ-X-ローダミン)、TAMRA(カルボキシテトラメチルローダミン)、TET(テトラクロロフルオレセイン)、Texas red、テトラメチルローダミン、及びキサンチン類から選択される。このようなグループは、「蛍光プローブ及び研究成果のハンドブック(Handbook of Fluorescent Probes and Research Products)」第9版、Molecular Probes、ユージーン、オレゴン州、Haughland、2003年に報告されている。

【0020】

「無機エステル」は、無機酸とアルコールの反応の生成物を意味する。無機エステルは、主に無機酸及びアルコールの縮合から生じる。

【0021】

用語「塩」は、アミノ基のような塩基性基との標準的な酸-塩基反応により形成されるものであって、有機酸又は無機酸に由来する対イオンを有するものを意味する。このよう

10

20

30

40

50

な対イオンは、塩化物イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、酢酸イオン、コハク酸イオン、クエン酸イオン、乳酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、パルミチン酸イオン、コール酸イオン、グルタミン酸イオン、グルタル酸イオン、酒石酸イオン、ステアリン酸イオン、サリチル酸イオン、メタンスルホン酸イオン、ベンゼンスルホン酸イオン、ソルビン酸イオン、ピクリン酸イオン、安息香酸イオン、ケイヒ酸イオンなどを含む。

【0022】

用語「生理的に許容し得る塩」は、アルカリ金属及びアルカリ土類金属陽イオン(例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム及びカルシウム)；アンモニウム；又は、例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニウム、ビス(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム、フェニルエチルベンジルアンモニウムなどの有機陽イオンのような有機及び無機の陽イオンを有するカルボン酸塩を包含している。前述の用語に包含されるその他の陽イオンは、プロカイン、キニーネ、及びN-メチルグルコサミンのプロトン化された形、並びにグリシン、オルニチン、ヒスチジン、フェニルアラニン、リシン、及びアルギニンなどの塩基性アミノ酸のプロトン化された形を含む。

10

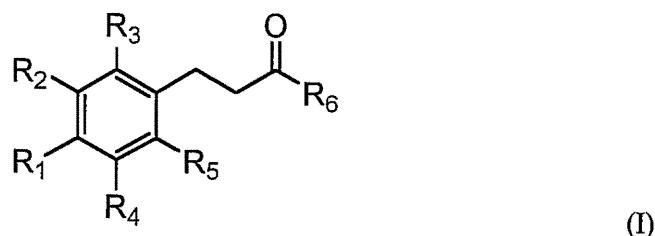
【0023】

(発明の実施態様)

前述のように、本発明は、他の活性酸素種及び活性窒素種よりもむしろペルオキシナイトライトと特異的に反応する化合物を提供する。これらの化合物は、下記一般式(I)を有する：

20

【化2】



【0024】

30

(式中、

R_1 は、 OR'_1 、又は $NR'_2R'_3$ であり、ここで R'_1 、 R'_2 及び R'_3 は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、もしくはポリエーテルから選択される基であり；

R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 は、独立して、水素、又は、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、アルキルオキシ、ポリエーテルから選択される基であるか、 R_2 及び R_3 は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又は R_4 及び R_5 は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

40

R_6 は、 CF_3 、ハロゲン-置換された低級アルキル(例えば、 CF_nH_{3-n} 、ここで n は1又は2である。)、又は $(C=O)-O-W_1$ (式中、 W_1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基であり；かつ

発蛍光団又は遮蔽された発蛍光団は、 R_i ($i=1 \sim 5$)のひとつに共有結合されてよい。)。

【0025】

加えて、直前で考察された化合物は、以下の更なる実施態様を有する：

R_2 及び R_3 は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成し；

50

R_4 及び R_5 は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成し；

R'_1 は、 CH_3 又は OCH_2OZ_1 であり、ここで Z_1 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、又はポリエーテルから選択される基であり；

R'_3 は、 $(C=O)Z_2$ であり、ここで Z_2 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、又はポリエーテルから選択される基であり；及び/又は

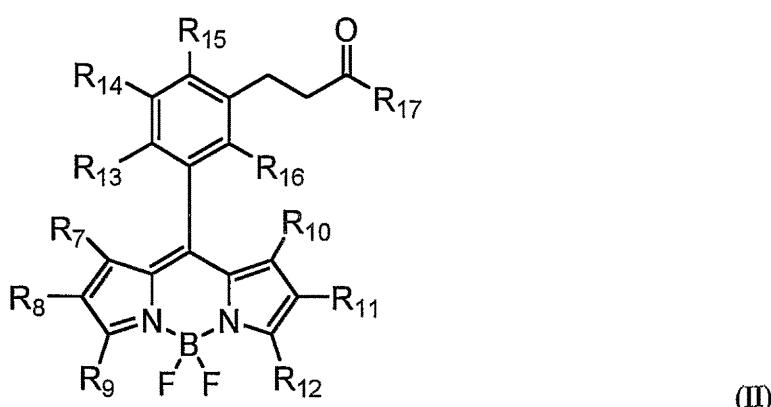
発蛍光団は、アクリジンオレンジ、アントラセン環、アロフィコシアニン、BODIPY、シアニン類、クマリン、エダンス、エオシン、エリトロシン、フルオレスカミン、フルオレセイン、FAM(カルボキシフルオレセイン)、HEX(ヘキサクロロフルオレセイン)、JOE(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシ-フルオレセイン)、Oregon Green、フィコシアニン、フィコエリトリン、ローダミン、ROX(カルボキシ-X-ローダミン)、TAMRA(カルボキシテトラメチルローダミン)、TET(テトラクロロフルオレセイン)、Texas red、テトラメチルローダミン、及びキサンチン類からなる群から選択される。
10

【0026】

本発明は、ペルオキシナイトライトの測定に高い特異性及び選択性を有する化合物も提供する。ひとつの実施態様において、これらの化合物は、下記一般式(II)を有する：

【化3】

20



【0027】

(式中：

R_7 及び R_{10} は、独立して、水素、又は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルケニル、ハロゲン化アルキル、CN、もしくは NO_2 から選択される基であり；

R_8 、 R_9 、 R_{11} 、及び R_{12} は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、又は、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、もしくは $(C=O)-Y$ 又は $(C=O)-X-Y$ の形態(式中、Xは、低級アルキル又はアルケニル鎖であり、かつYは、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、無機エステル、もしくはその環原子が、炭素、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択され、該環原子が、3~6個の炭素原子、及び典型的には2個を超えないヘテロ原子を更に含む、5~7-員の複素環式環から選択される基である。)から選択される基であり；

R_{13} は、 OR'_4 又は $NR'_5R'_6$ であり(式中、 R'_4 、 R'_5 、及び R'_6 は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル

40

50

、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、もしくはポリエーテルから選択される基である。)；

R_{14} 及び R_{15} は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ポリエーテルであるか、又は R_{14} 及び R_{15} は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R_{16} は、水素、アルキル、アルコキシ、又はポリエーテルであり；並びに

R_{17} は、 CF_3 、ハロゲン-置換された低級アルキル(例えば、 CF_nH_{3-n} 、ここで n は1又は2である。)、又は $(C=O)-O-W_2$ (式中、 W_2 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基である。)。

10

【0028】

加えて、先に考察された一般式(II)を有する化合物は、下記の更なる実施態様を有する：

R_9 は、 $(C=O)NR''_1R''_2$ であり、ここで、 R''_1 及び R''_2 は、アルキルであり(例えば、 $k=0 \sim 24$ である $-(CH_2)_k-CH_3$ 、及び $l=0 \sim 24$ である $-(CH_2)_l-CH_3$ である。)；

R_8 及び R_9 は一緒に環、好ましくは5、6、又は7-員の環を形成して、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族を形成し；

R_{12} は、 $(C=O)NR''_3R''_4$ であり、ここで R''_3 及び R''_4 は、アルキルであり(例えば、 $p=0 \sim 24$ である $-(CH_2)_p-CH_3$ 、及び $q=0 \sim 24$ である $-(CH_2)_q-CH_3$ である。)；

R_{11} 及び R_{12} は一緒に環、好ましくは5、6、又は7-員の環を形成して、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族を形成し；及び/又は

R'_4 は、 CH_3 又は OCH_2OZ_3 であり、ここで Z_3 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、又はポリエーテルから選択される基である。

【0029】

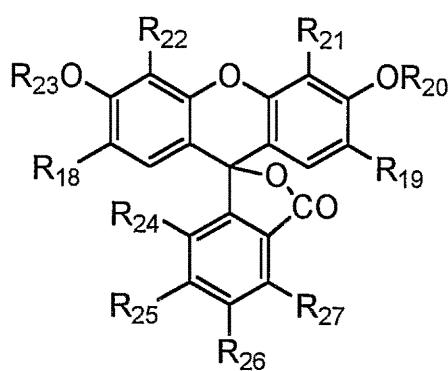
一般式(II)で表される化合物は、塩として存在することができる。そして生理的に許容し得る水溶性塩は、好適なことに、本発明の作用剤及び測定法のために使用することができる。更に遊離型の一般式(II)で表される化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在してもよく、これらの物質はいずれも、本発明の範囲に含まれる。溶媒和物を形成する溶媒の種類は、特に限定されない。例えば、アセトニトリル、エタノール、水、又はアセトニトリル-水混合液のような溶媒を、例とすることができます。

30

【0030】

別の実施態様において、ペルオキシナイトライドの測定に高い特異性及び選択性を有する化合物は、下記一般式(III)を有する：

【化4】



(III)

40

50

【0031】

(式中：

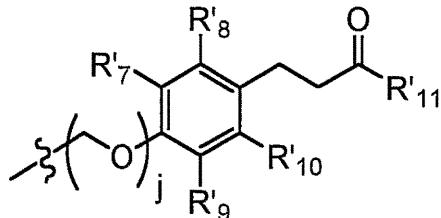
R_{18} 及び R_{19} は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、又はアルコキシであり；

R_{20} は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、カルボキシアルキル、カルボン酸エステル、もしくはアミノアルキルであり；

R_{21} 及び R_{22} は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、カルボキシアルキル、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、もしくは無機エステルから選択される基であり；

R_{23} は、以下から選択され：

【化5】



10

20

(式中、 $j=0$ 又は1であり；

$R'7$ 、 $R'8$ 、 $R'9$ 、及び $R'10$ は、独立して、水素、又は、ハロゲン(例えば、Cl、Br、又はI)、アルキル(例えば、 CH_3)、アルコキシ、アルキルオキシ、もしくはポリエーテルから選択される基であり；

$R'11$ は、 CF_3 、ハロゲン-置換された低級アルキル(例えば、 CF_nH_{3-n} 、ここで n は1又は2である。)、又は $(C=O)-O-W_3$ (式中、 W_3 は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、又はアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基である。)；並びに

R_{24} 、 R_{25} 、 R_{26} 、及び R_{27} は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、無機エステルから選択される基であるか、 R_{24} 及び R_{25} は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成するか、 R_{25} 及び R_{26} は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又は R_{26} 及び R_{27} は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成する。)。

30

【0032】

加えて、先に考察した一般式(III)を有する化合物は、下記の更なる実施態様を有する：

$R'7$ 及び $R'8$ は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、又は7-員の環を形成し；

$R'9$ 及び $R'10$ は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、又は7-員の環を形成し；

R_{20} は、 $-(CH_2)_m-COOH$ であり、ここで $m=1 \sim 24$ であり；

R_{24} 及び R_{25} は一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、又は7-員の環を形

40

50

成し；

R_{25} 及び R_{26} は一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、又は7-員の環を形成し；及び／又は

R_{26} 及び R_{27} は一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、又は複素芳香族から選択される5、6、又は7-員の環を形成する。

【0033】

一般式(III)により表される化合物は、塩として存在することもできる。そして生理的に許容し得る水溶性塩は、好適なことに、本発明の作用剤及び測定法のために使用することができます。更に遊離型の一般式(III)で表される化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在してもよく、これらの物質はいずれも、本発明の範囲に含まれる。溶媒和物を形成する溶媒の種類は、特に限定されない。例えば、アセトニトリル、エタノール、水、又はアセトニトリル-水混合液のような溶媒を、例とすることができます。

【0034】

ペルオキシナイトライトが、その市販の給源がオキソン(登録商標)($2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$)であるペルオキソ-硫酸塩との反応に類似した方式で、一般式(I)により表されるいくつかの特定のケトンを酸化することが見出されている(収率30～55%、転換率100%)(図1)。この反応は、ジオキシラン中間体を介して進行する。ジオキシランの形成及びそれに続く分子内様式のフェノール誘導体の酸化は、細胞内のペルオキシナイトライトの特異的な検出のためのプローブをデザインする上での基礎を提供する。加えて、同様の反応が、ケトンと生物学的システム内に存在する他の活性酸素種又は活性窒素種との間では進行しないことが見出されている。更に、ペルオキシナイトライトのための蛍光プローブは、ケトン内的一部の基を発蛍光団と交換することにより、合成することができる見出されている。ひとつの実施態様において、BODIPY-ベースのプローブの蛍光特性は、PET(光誘起電子移動)機構により制御することができる。PM3計算法を基に、PET-依存型(光誘起電子移動)蛍光オフ/オンスイッチ機構(図2)により制御される蛍光プローブがデザインされている。別の実施態様において、ペルオキシナイトライトによる酸化の前に、発蛍光団は遮蔽され、プローブは非-蛍光となる。しかしひペルオキシナイトライトとの反応時に、発蛍光団は解放され、強力な蛍光となり始める。例えば、フルオレセイン/ジクロロフルオレセインのフェノール性ヒドロキシル基での誘導体化は、著しい蛍光強度の減少につながり得る。従って様々なフルオレセイン/ジクロロフルオレセイン-ベースのプローブがデザインされた。一般式(II)又は(III)により表される実質的に非-蛍光の化合物が、生理的条件下でペルオキシナイトライトと効率的に反応し、強力な蛍光シグナルを生じることも見出されている。従ってペルオキシナイトライトは、一般式(II)又は(III)で表される該非-蛍光化合物と、生存細胞又は生存組織内のペルオキシナイトライトとの間の反応から生じる酸化された蛍光化合物の蛍光を測定することにより、非常に高い特異性及び選択性で測定することができる。

【0035】

本発明は、前述の化合物のいずれかを含む、ペルオキシナイトライトを測定するための作用剤も提供する。

【0036】

本発明は：

- 前述の化合物のいずれかを、化学試料又は生物学的試料と接触させる工程、並びに
- 化合物と試料中に存在するペルオキシナイトライトとの間の反応により生成される化合物の蛍光を測定する工程：を含む、化学試料又は生物学的試料(動物又は植物からの細胞及び組織、並びに微生物など)中のペルオキシナイトライトを測定するための方法も提供する。

【0037】

本発明は、前述のペルオキシナイトライトの測定のための作用剤を使用することを含む

10

20

30

40

50

、ペルオキシナイトライトの検出のための、ハイ-スループットスクリーニング蛍光法も提供する。

【0038】

本発明は、前述の化合物のいずれかを使用することを含む、ペルオキシナイトライトの生成を増加又は減少させる化合物のスクリーニングのための、ハイ-スループット法も提供する。

【0039】

(一般的合成手順)

本発明の化合物は、本明細書に明らかにされた一般的合成手順に加え、公知の技術により、有機合成の技術者により生成することができる。例えば、一般式(I)により表された化合物の一部は、一般にYang らの論文に概説された手順を使用し、合成することができる(J. Org. Chem, 2000, 65, 4179-4184)。

10

【0040】

一般式(I)の化合物は、一般に下記の手順により合成することができる(Nagano, T. らの論文、J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 3357-3367)。一般的合成スキームは、図2に示されている。対応するピロール部分及びアルデヒド部分を、ジクロロメタン又は1,2-ジクロロエタンなどの適当な溶媒中の触媒量のTFA(トリフルオロ酢酸)で、室温～80 の温度範囲で処理する。TLCモニタリングが、対応するアルデヒドの完全な消費を示した時点で、DDQ(2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン)の溶液を添加し、攪拌を15～30分間継続する。純粋な中間体を、後処理及びカラム精製により単離することができる。その後中間体を、ジクロロメタン中の三フッ化ホウ素エチルエーテル及びトリエチルアミンで処理する。この溶液を、室温で1～4時間攪拌する。一般式(I)で表される本発明の化合物は、後処理、それに続く精製により単離することができる。合成反応を実行するための好ましい化合物は、「実施例」のセクションに示している。

20

【0041】

中でも、対応するピロール部分及びアルデヒド部分は、独立して調製することができ、並びに一部の官能基は、保護基により保護することができる。前記合成スキームは、時には様々な保護基を選択することにより、最適化され得る。保護基の詳細な説明及び好適な保護基を選択する技術は、例えば書籍「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」、Greene, T. W, John Wiley & Sons, Inc., 1999年において認めることができる。

30

【0042】

一般式(II)の化合物は、一般に下記の手順により合成することができる(John, E. T. らの論文、J. Chem. Soc, Perkin Trans I, 1995, 1993 ; McWatt, M. らの論文、Eur. J. Org. Chem. 2001, 2535-2545 ; Rychnovsky, S.D. らの論文、J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 671-677)。一般的合成スキームは、図3に示されている。対応するフルオレセイン誘導体は、ベンゼン及びメタノールの混合液のような好適な溶媒中のカリウムtert-ブトキシドの溶液で処理される。フルオレセイン誘導体の固体物が完全に溶解する時点で、溶媒を真空で蒸発し、対応するカリウム塩を生じる。その後、好適な溶媒(ピリジンなど)中のR₂₃I(式中、R₂₃は先に定義されている。)及びCuClを添加する。得られる混合物を、アルゴン下で24時間還流する。室温へ冷却後、一般式(II)で表される本発明の化合物を、後処理、それに続く精製により単離することができる。合成反応を行う好ましい化合物は、「実施例」のセクションに示されている。

40

【0043】

中でも、対応するフルオレセイン誘導体及びR₂₃Iは、独立して調製することができ、並びに一部の官能基は、保護基により保護することができる。一般式(II)により表される化合物の一般的合成スキームと同じように、先の合成スキームは、時には様々な保護基を選択することにより最適化され得る。

【0044】

用語「後処理」及び「精製」は、例えば、洗浄、濾過、抽出、蒸発、蒸留、結晶化、ク

50

クロマトグラフィーなどの、有機合成に使用される技術の組合せを意味する。この中間体は、精製することなく、引き続きの反応に使用してもよい。

【実施例】

【0045】

(実施例)

下記実施例1-4は、一般式(II)により表される化合物を生成及び使用する方法の詳細な説明である。この詳細な開示は、本発明の一部をなす先に説明された「一般的合成手順」の範囲に含まれ、かつその例示の一助となる。これらの「実施例」及び実施例5-9は、単に例証を目的として提示されており、本発明の範囲を限定することは意図されていない。

【0046】

(実施例1-ss-6の合成スキーム)

1)ピロール-2-カルボン酸の合成(図4に示す)

ピロール-2-カルボキシアルデヒド(10.0g, 105mmol)を、メタノール50mLに溶解し、その後蒸留水500mLで希釈した。新鮮な酸化銀(48.3g, 210mmol)及び水酸化ナトリウム(8.5g, 212mmol)を添加した。その後反応混合液を、1時間室温で攪拌した。沈殿を濾過し、熱水で洗浄した。一緒にした濾液及び洗浄液を、ジエチルエーテル(500mL)で抽出し、その後37%塩酸で0°で酸性とした。この溶液をジエチルエーテル(200mL×4)で抽出した。一緒にした有機抽出液を、硫酸マグネシウム上で乾燥した。溶媒を減圧下で蒸発させ、ピロール-2-カルボン酸[634-97-9]を得た(9.9g, 収率85%)。

【0047】

2)N,N-ジエチル-1H-ピロール-2-カルボキシアミド(ss-1)の合成(図4に示す)

ピロール-2-カルボン酸(10.0g, 90mmol)を、ジクロロメタン250mLに溶解した。その後DCC(N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)(20.4g, 99mmol)、DMAP(4-ジメチルアミノピリジン)(2.2g, 18mmol)及びジエチルアミン(10.2mL, 99mmol)を、0°でアルゴン雰囲気下で添加した。反応混合液を、0°で30分間攪拌し、次に室温で8時間攪拌した。溶液を、ジクロロメタンで希釈し、固体を濾過した。濾液を、希塩酸、引き続き飽和炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥し、その後溶媒を減圧下で蒸発した。残渣を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(溶離液:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/2)により精製し、N,N-ジエチル-1H-ピロール-2-カルボキシアミドを白色固体として得た(10.5g, 収率70%)。融点78.6-79.9°; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 10.1 (b, 1H), 6.94-6.88 (m, 1H), 6.57-6.51 (m, 1H), 6.26-6.21 (m, 1H), 3.95-3.86 (m, 4H), 1.31-1.24 (m, 6H); ¹³C NMR (75.5Hz, CDCl₃): δ 161.9, 120.7, 111.3, 110.1, 109.5, 41.9, 13.4; IR (CH₂Cl₂) 3442, 2981, 2937, 1716, 1600 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 166 (M⁺; 100); HRMS (EI) : C₉H₁₄N₂Oの計算値: 166.1106, 実測値: 116.1106。

【0048】

3)メチル-4-メトキシシンナメートの合成(図5に示す)

p-ヒドロキシケイヒ酸(10.0g, 61mmol)を、アセトン200mLに溶解した。炭酸カリウム(8.7g, 213mmol)を室温で添加した。15分後、硫酸ジメチル(16.4mL, 213mmol)を、アルゴン下で室温で添加し、その後アルゴン雰囲気下で8時間還流加熱した。固体を濾過し、その後水50mLを濾液へ添加した。溶媒を減圧下で蒸発させ、混合物を酢酸エチル200mLで2回抽出した。一緒にした有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥し、その後溶媒を減圧下で蒸発した。残渣を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(溶離液:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/10)により精製し、メチル-4-メトキシシンナメート[832-01-9]を得た(11.7g, 収率99%)。

【0049】

4)3-(4-メトキシフェニル)プロパン酸メチルの合成(図5に示す)

メチル-4-メトキシシンナメート(11.7g, 61mmol)を、メタノール300mLに溶解した。パラジウム(粉末活性炭上5%; 1.1g)を、強いアルゴン流下でゆっくり添加した。水素ガスを、反応混合液中で泡立て、これを2時間激しく攪拌した。固体を濾過し、濾液を硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶媒を減圧下で蒸発させ、3-(4-メトキシフェニル)プロパン酸

10

20

30

40

50

メチル[15823-04-8]を得た(11.7g, 99%)。

【0050】

5)3-(3-ホルミル-4-メトキシフェニル)プロパン酸メチル(ss-2)の合成(図5に示す)

3-(4-メトキシフェニル)プロパン酸メチル(500mg, 2.56mmol)を、無水ジクロロメタン30mLに溶解した。その後TiCl₄(2.1mL, 19mmol)及びMeOCHCl₂(0.81mL, 9.0mmol)を、アルゴン下-20℃で添加した。反応混合液を、-20℃で6時間攪拌した。その後反応混合物を、希塩酸溶液にゆっくり注いだ。ジクロロメタン層を分離し、水で、引き続きブラインで洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥した。溶媒を減圧下で蒸発した。その後粗残渣を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィーにより精製し(溶離液：酢酸エチル/n-ヘキサン=1/10)、3-(3-ホルミル-4-メトキシフェニル)プロパン酸メチル(ss-2)を無色の油状物として得た(429mg, 収率75%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 10.4 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.40 (dd, J=6.3, 1.6Hz, 1H), 6.92 (d, J=6.4Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 2.92 (t, J=5.6Hz, 2H), 2.61 (t, J=5.6Hz, 2H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) : 189.7, 173.0, 160.4, 135.9, 132.7, 127.8, 124.6, 111.8, 55.7, 51.6, 35.4, 29.7; IR (CH₂Cl₂) 3055, 2945, 1734, 1682 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 222 (M⁺; 61), 149 (100); HRMS (EI) : C₁₂H₁₄O₄の計算値：222.0892, 実測値：222.0892。

【0051】

6)N,N-ジエチル-5-[2-メトキシ-5-(3-メトキシ-3-オキソプロピル)フェニル]-10H-ジピリン-1,9-ジカルボキシアミド(ss-3)の合成(図6に示す)

化合物ss-1(134mg, 0.81mmol)及びss-2(90mg, 0.41mmol)を、無水1,2-ジクロロエタン30mL中にアルゴン雰囲気下で溶解した。TFA(トリフルオロ酢酸)1滴を添加し、この溶液を還流加熱した。TLCモニタリング(シリカ; CH₂Cl₂)がアルデヒドの完全な消費を示した時点で、CH₂Cl₂中のDDQ(2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン)(189mg, 0.81mmol)の溶液を添加し、攪拌を15分間継続した。反応混合液を水で洗浄し、MgSO₄上で乾燥し、濾過し、蒸発した。粗化合物を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(溶離液：酢酸エチル/ジクロロメタン/n-ヘキサン=1/1/1)により精製し、化合物ss-3を赤褐色油状物として得た(289mg, 67%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.27 (dd, J=8.4, 1.9Hz, 1H), 7.07 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.92 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.62 (d, J=4.3Hz, 2H), 6.45 (d, J=4.3Hz, 2H), 3.72-3.60 (m, 14H), 2.93 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.64 (t, J=7.5Hz, 2H), 1.30-1.23 (m, 12H); ¹³C NMR (75.5MHz, CDCl₃) : 172.8, 162.8, 155.7, 148.6, 141.7, 139.4, 131.5, 131.3, 129.8, 128.0, 125.1, 119.1, 111.0, 55.5, 51.3, 41.0 (br), 35.5, 29.6, 12.5 (br); IR (CH₂Cl₂) 3483, 2938, 1639 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 534 (M⁺; 21), 463 (100); HRMS (EI) : C₃₀H₃₈N₄O₅の計算値：534.2842, 実測値：534.2842。

【0052】

7)N,N-ジエチル-8-[2-メトキシ-5-(3-メトキシ-3-オキソプロピル)フェニル]-4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3,5-ジカルボキシアミド(ss-4)の合成(図7に示す)

化合物ss-3(100mg, 0.19mmol)及びトリエチルアミン(0.73mL, 5.2mmol)を、無水ジクロロメタン20mL中にアルゴン雰囲気下で溶解し、この溶液を室温で10分間攪拌した。BF₃-OEt₂(0.73mL, 5.8mmol)を添加し、攪拌を40分間継続した。反応混合液を、水及び2N NaOHで洗浄した。水溶液をCH₂Cl₂で抽出した。一緒にした有機抽出液を、Na₂SO₄上で乾燥し、濾過し、蒸発した。粗化合物を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィーにより精製し(溶離液：酢酸エチル/ジクロロメタン=1/1)、化合物ss-4をオレンジ色結晶として得た(74mg, 収率70%)。融点77.0-77.9℃; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.33 (dd, J=8.2, 2.2Hz, 1H), 7.12 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.98 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.78 (d, J=4.2Hz, 2H), 6.44 (d, J=4.2Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.58 (q, J=7.1Hz, 4H), 3.29 (q, J=7.1Hz, 4H), 2.95 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.64 (t, J=7.5Hz, 2H), 1.25 (t, J=7.1Hz, 6H), 1.10 (t, J=7.1Hz, 6H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) : 172.7, 162.6, 155.4, 151.0, 145.1, 135.2, 131.9, 131.3, 131.2, 131.1, 121.9, 116.6, 111.3, 55.4, 51.4, 42.50

.8, 38.4, 35.4, 29.5, 13.7, 11.9; ^{19}F NMR (376.5MHz, CDCl_3): -144.2 (m, $J=30\text{Hz}$), -145.2 (m, $J=30\text{Hz}$); IR (CH_2Cl_2) 2980, 1734, 1640 cm^{-1} ; LRMS (EI) m/z (%) 582 (M^+ ; 21), 551 (100); HRMS (EI) : $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_5$ の計算値 : 582.2825, 実測値 : 582.2831。

【0053】

8) N,N-ジエチル-8-(5-カルボキシエチル-2-メトキシフェニル)-4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3,5-ジカルボキシアミド(ss-5)の合成(図7に示す)

化合物ss-4(100mg, 0.17mmol)を、THF 3mLに溶解した。その後メタノール1mL及び蒸留水1mLを、添加した。水酸化リチウム一水和物(22mg, 0.52mmol)を添加し、攪拌を6時間継続し、次にブライン1mLを添加した。溶液を Et_2O 10mLで3回抽出した。一緒にした有機抽出液を、 Na_2SO_4 上で乾燥し、濾過し、蒸発した。粗化合物を、更に精製することなく、引き続きの反応において使用した。

10

【0054】

9) N,N-ジエチル-8-[2-メトキシ-(4,4,4-トリフルオロ-3-オキソブチル)フェニル]-4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3,5-ジカルボキシアミド(ss-6)の合成(図7に示す)

粗化合物ss-5(560mg, 約1.0mmol)を、無水ジクロロメタン20mLに溶解した。その後塩化オキサリル及びDMF 1滴をアルゴン雰囲気下0°で添加した。その後反応混合液を室温で30分間攪拌した。溶媒を蒸発させ、微量の水分及び溶媒を、高真空中でポンプ排出した。その後固体を、無水ジクロロメタン20mL中に再度溶解した。その後無水トリフルオロ酢酸(0.84mL, 6.0mmol)及び無水ピリジン(0.65mL, 8.0mmol)を-40°でAr雰囲気下で添加した。その後反応混合液を-20°で4時間攪拌した。水5mLを添加することにより、反応を停止し、溶液をジクロロメタン20mLで2回抽出した。一緒にした有機抽出液を、 MgSO_4 上で乾燥し、濾過し、蒸発した。粗化合物を、シリカゲル上のカラムクロマトグラフィーにより精製し(溶離液: 酢酸エチル/ジクロロメタン=1/2)、化合物ss-6を赤色結晶として得た(210mg, 約34%)。融点83.6-84.6°; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): 7.32 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H) 7.12 (dd, $J=6.5$, 2.2Hz, 1H), 6.96 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.73 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 2H), 6.43 (d, $J=4.6\text{Hz}$, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.59 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 4H), 3.31 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 4H), 3.06-3.00 (m, 2H), 2.83-2.77 (m, 1H), 2.08-2.03 (m, 1H), 1.25 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 6H), 1.09 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): 190.4 (q, $J_{\text{C}-\text{F}}=35.4\text{Hz}$), 162.9, 155.8, 151.2, 145.0, 135.3, 131.4, 131.2, 122.3, 116.8, 111.6 (q, $J_{\text{C}-\text{F}}=285\text{Hz}$), 55.6, 43.0, 38.7, 37.8, 36.1, 29.6, 27.2, 13.8, 12.0; ^{19}F NMR (376.5MHz, CDCl_3): -79.3 (m, $J=11\text{Hz}$), -144.0 (m, $J=30\text{Hz}$), -145.3 (m, $J=30\text{Hz}$); IR (CH_2Cl_2) 2980, 1639, 1565 cm^{-1} ; LRMS (EI) m/z (%) 620 (M^+ ; 30), 589 (100); HRMS (EI) : $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{BF}_5\text{N}_4\text{O}_4$ の計算値 : 620.2593, 実測値 : 620.2598。

20

【0055】

(実施例2)

1) ss-6の蛍光スペクトル

実施例1で得られた化合物ss-6を、 CH_3CN に濃度2mMとなるよう溶解し、その後この溶液を、最終濃度20 μM となるよう溶解するために100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。この20 μM ss-6溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、Perkin Elmer LS50蛍光分光計を用いて測定した。励起スペクトル及び蛍光スペクトルの両方についてスリット幅は5nmであり、光電子増倍管電圧は775Vであった。この測定は、励起波長515nmで行った。これらの結果は、図8に示した。

40

【0056】

ss-6とペルオキシナイトライド(ONOO^-)の間の反応を調べるために、 ONOO^- の溶液を、Keith及びPowellの方法により調製した(Keith, W. G. 及び Powell, R. E. の論文; 「Kinetics of decomposition of peroxyxnitrous acid」; J. Chem. Soc. A, 1969, 1, 90)。簡単に述べると、亜硝酸ナトリウム(0.6mol/L)、及び過酸化水素(0.7mol/L)の混合液を、塩酸(0.6mol/L)で酸性とし、1~2秒以内に水酸化ナトリウム(1.5mol/L)を添加し、この酸を中

50

和し、溶液をアルカリとした。過剰な過酸化水素を、この溶液を二酸化マンガンを通過させることにより破壊した。その後溶液を凍結した。ペルオキシナイトライトの濃縮された暗黄色溶液を分離し、全ての実験に使用した。

【0057】

使用したストック溶液中のペルオキシナイトライト濃度を、302nmでの吸光係数1670cm⁻¹ (mol/L)⁻¹を使用し概算した(Hughes and Nicklin; 「The chemistry of pernitrites」 Part I、「Kinetics of decomposition of pernitrious acid」; J. Chem. Soc. A, 1968, 2, 450-452)。調製されたペルオキシナイトライト溶液は通常非常に塩基性であった(pH1.2)。比較的多量のペルオキシナイトライトを添加する場合、その塩基の過剰部分は、実験当日に中和した。この比較的低い塩基度のペルオキシナイトライト溶液は、試験の開始時及び終了時にその吸収をチェックし、インキュベーションに必要な時間の間にペルオキシナイトライトが分解されなかったことを確認した。インキュベーションチューブも、ペルオキシナイトライトの添加後に、最終pHが変化しなかったことを確認するために、定期的にチェックした。

10

【0058】

次に、異なる濃度の15当量のONOO⁻溶液を、室温で激しく攪拌している20 μM ss-6溶液に、ゆっくり添加した。その容積の変化は、1%未満でなければならない。蛍光強度の変化を、30分後に測定した。これらの結果を、図9に示した。反応の完了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、先に説明したものと同じ条件を用いて測定した。図8と比べて、蛍光強度の劇的増加が認められた。

20

【0059】

2)ss-6のUV-Vis吸収スペクトル

化合物ss-6を、濃度20 μMとなるようジクロロメタン中に溶解し、得られる20 μM ss-6溶液の吸収スペクトルを測定した。これらの結果を図10に示した。この結果は、ss-6は、515nm前後に最大吸収を持つことを証明した。

30

【0060】

(実施例3-様々な活性酸素種によるss-6特異性の比較)

実施例1において得た化合物ss-6を、CH₃CN中に濃度2mMとなるよう溶解し、その後この溶液に、最終濃度20 μMで溶解するように、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。様々な活性酸素種50 μL(10当量)を、対応するss-6溶液5mLへ独立して添加した。この処理の前後の蛍光強度の変化を測定した。蛍光強度は、実施例2と同じ条件下で測定した。蛍光プローブの各濃度は、20 μMであった(100mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)。これらの結果を表1に示した。ss-6は非常に高い選択性を有することが、この結果から証明された。

40

【0061】

【表1】

表1

ROS プローブ	ONOO ⁻	SIN-1 ^a	·OH ^b	¹O ₂ ^c	O ₂ ^{·-d}	H ₂ O ₂ ^e
ss-6	750%	166%	2%	3%	-1%	-5%

(a)SIN-1は、緩衝液中でゆっくりONOO⁻を発生することができる。

(b)Fe(ClO₄)₂ (25 μL, 緩衝液中40mM)及びH₂O₂ (25 μL, 80mM)を添加した。

(c)37 の[3-(1,4-ジヒドロ-1,4-エピジオキシ-1-ナフチル)プロピオン酸(50 μL, 20mM)を添加した。

(d)最初にキサンチンオキシダーゼ(XO)を添加した。全てのXOが溶解した後、キサンチン(50 μL, 20mM)を添加した。

50

【0062】

(実施例4-ss-6によるペルオキシナイトライトの特異的検出)

実施例1で得られた化合物ss-6を、濃度2mMとなるようCH₃CN中に溶解し、その後この溶液に、最終濃度20 μMで溶解するように、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。次にペルオキシナイトライトを、最終濃度0、20、60、100、200、240及び300 μMとなるよう添加し、30分後に蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは、実施例2と同じ条件下で測定した。結果を、図11に示した。図11に明確に示されたように、ss-6は、蛍光強度の大きい増加を生じ、この蛍光強度は、ONOO⁻濃度と良好な直線関係を有した(図12に示す)。

【0063】

下記実施例は、一般式(III)により表される化合物を生成及び使用する方法の詳細な説明である。この詳細な開示は、本発明の一部を成す先に説明された「一般的合成手順」の範囲に含まれ、その例示の一助となる。これらの実施例は、単に例証を目的として提示され、本発明の範囲を限定することは意図されてはいない。

【0064】

(実施例5ss-12の合成スキーム)

1)ss-7の合成(図13に示す)

DMF(ジメチルホルムアミド)中の2,7-ジクロロフルオレセイン(1.0g, 2.5mmol)の溶液へ、臭化アリル(0.47mL, 5.0mmol)を添加した。反応混合液を60℃で3時間攪拌した後、水を添加し、赤色固体物が形成された。化合物ss-7を、濾過により、収率>99%で得た。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 8.33 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.78 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.74 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.30 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.03 (d, J=2.8Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.12-6.00 (m, 1H), 5.74-5.58 (m, 1H), 5.56-5.38 (m, 2H), 5.21-5.13 (m, 2H), 4.75 (d, J=6.2Hz, 2H), 4.53 (d, J=5.8Hz, 2H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 177.71, 164.54, 158.16, 157.79, 152.35, 149.52, 135.28, 133.55, 133.12, 131.59, 131.05, 130.97, 130.38, 130.27, 130.13, 128.03, 127.29, 120.43, 119.29, 119.08, 117.71, 115.04, 105.67, 101.14, 70.35, 66.10; IR (CH₂Cl₂) 1718, 1589 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 480 (M⁺; 100); HRMS (EI) C₂₆H₁₇C₁₂O₅の計算値: 480.0453, 実測値: 480.0447。

【0065】

2)ss-8の合成(図14に示す)

化合物ss-7 (1.2g, 2.5mmol)を、アセトン(50mL)及びNaOH(1.25M; 50mL)の混合液に溶解した。溶液を1時間還流加熱した。室温へ冷却後、1N HClを反応混合液に添加し、この溶液をpH2に中和した。酢酸エチルをこの抽出物へ添加した。有機層を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中で蒸発した。残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物ss-8を得た(760mg, 収率68%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.30 (br, 1H), 8.07 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.72 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.68 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.16 (d, J=7.4Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.10-6.03 (m, 1H), 5.48 (d, J=17.2Hz, 1H), 5.36 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.12 (d, J=7.2Hz, 2H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 168.27, 155.21, 155.04, 151.51, 150.30, 149.98, 135.96, 132.59, 130.59, 128.27, 128.09, 125.83, 125.18, 123.95, 118.10, 117.26, 116.44, 111.48, 110.34, 103.62, 102.39, 81.23, 69.53; IR (CH₂Cl₂) 2955, 1771, 1597 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 440 (M⁺; 3), 361 (100); HRMS (EI) C₂₃H₁₄Cl₂O₅の計算値: 440.0218; 実測値: 440.0222。

【0066】

3) ss-9の合成(図15に示す)

ベンゼン(8mL)及びメタノール(3mL)の混合液中のカリウムtert-ブトキシド(230mg, 2.0mmol)の溶液へ、室温でss-8を添加した。固体物が完全に溶解した時点で、溶媒を真空中で蒸発させ、対応するカリウム塩を得た。次にピリジン(9mL)中のCuCl(204mg, 1.9mmol)及び化合物ss-8(980mg, 3.4mmol)を添加した。得られた混合液を、アルゴン下で24時間還

流した。室温へ冷却後、反応混合液を、HCl水溶液で酸性とした。混合物を酢酸エチルで抽出した。有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中で蒸発した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ss-9を得た(200mg、収率20%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) 8.07 (d, J=6.6Hz, 1H), 7.74 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.71 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.24 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.18 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.00 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.08-6.01 (m, 1H), 5.46 (d, J=17.2Hz, 1H), 5.34 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.62 (d, J=5.0Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.98 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.66 (t, J=7.5Hz, 2H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) 173.16, 168.74, 155.62, 155.33, 153.67, 151.91, 150.43, 150.37, 137.21, 135.51, 131.65, 130.38, 129.94, 129.36, 128.74, 126.34, 125.50, 123.81, 119.78, 118.83, 118.47, 115.29, 114.10, 111.32, 106.29, 101.52, 81.53, 69.83, 51.68, 35.64, 30.19; IR (CH₂Cl₂) 3055, 2928, 1765, 1589, 1475, 1412 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 602 (M⁺, 100); HRMS (EI) C₃₃H₂₄Cl₂O₇の計算値: 602.0899; 実測値: 602.0890。

【0067】

4) ss-10の合成(図16に示す)

THF (10mL)及び水(3mL)中の化合物ss-9(874mg, 1.44mmol)の溶液へ、LiOH·H₂O (300mg, 7.2mmol)を室温で添加した。40 で3時間攪拌後、反応混合液を、1N HClで酸性とした。この溶液を、NaClで飽和し、酢酸エチルで抽出した。一緒にした有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濃縮し、ss-10を得た(500mg、収率60%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 8.30 (br, 1H), 8.08 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.74 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.70 (t, J=7.3Hz, 1H), 7.26 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.18 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.01 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.06-6.00 (m, 1H), 5.46 (d, J=17.2Hz, 1H), 5.33 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.61 (d, J=5.0Hz, 2H), 2.99 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.72 (t, J=7.5Hz, 2H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) 177.77, 168.81, 155.67, 155.30, 154.83, 151.93, 150.46, 150.42, 136.87, 135.55, 131.67, 130.42, 129.97, 129.41, 128.78, 126.38, 125.55, 123.83, 119.80, 118.89, 118.50, 115.37, 114.21, 111.35, 106.42, 101.56, 81.59, 69.87, 35.76, 29.93; IR (CH₂Cl₂) 3421, 3055, 1765, 1624, 1416 cm⁻¹; FAB m/z 589 (M⁺); HRMS (EI) C₃₂H₂₂Cl₂O₇の計算値: 589.0821、実測値: 589.0820。

【0068】

5) ss-11の合成(図17に示す)

CH₂Cl₂ (15mL)中の化合物ss-10(490mg, 0.83mmol)の溶液へ、塩化オキサリル(0.22mL, 2.5mmol)を添加し、この溶液を室温で3時間攪拌した。溶媒及び過剰な塩化オキサリルを、減圧下で蒸発させた。得られた酸クロリドを、CH₂Cl₂ (20mL)に溶解し、その後無水トリフルオロ酢酸(0.7mL, 5mmol)及びビリジン(0.54mL, 7mmol)を窒素下で-40 で添加した。得られた混合物を、-20 へゆっくり温め、その温度で4時間攪拌を継続した。この反応を水の添加によりゆっくり停止した。反応混合物を、ブラインで洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、ss-11を黄色固体として得た(240mg、収率45%)。融点85.0~86.1; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 8.08 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.76-7.68 (m, 2H), 7.26 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.18 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.02 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.07-6.00 (m, 1H), 5.46 (d, J=17.2Hz, 1H), 5.33 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.62 (d, J=4.4Hz, 2H), 3.10-3.07 (m, 2H), 3.04-3.00 (m, 2H); ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) 190.5 (q, J_{C-F}=35.3Hz), 168.72, 155.67, 155.09, 154.12, 151.91, 150.43, 150.41, 135.79, 135.53, 131.66, 130.41, 129.97, 129.44, 128.76, 126.36, 125.52, 123.81, 120.07, 119.82, 118.92, 118.47, 115.70 (q, J_{C-F}=292Hz), 14.41, 111.34, 106.60, 101.55, 81.49, 69.86, 37.99, 27.61; ¹⁹F (376MHz, CDCl₃) -79.18; IR (CH₂Cl₂) 3055, 1765, 1597, 1475, 1402 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 640 (M⁺), 561 (100); HRMS (EI) C₃₃H₂₁Cl₂F₃O₆の計算値: 640.0665、実測値: 640.0667。

【0069】

6) ss-12の合成(図18に示す)

CH₃CN (4mL)、CCl₄ (4mL)及び水(6mL)の混合溶媒中の化合物ss-11(260mg, 0.4mmol)の溶液へ、触媒RuCl₃ · 3H₂O (5mg)を添加し、引き続きNaIO₄ (865mg, 4.0mmol)を添加した。この混合物を、室温で1時間激しく攪拌し、その後CH₂Cl₂を添加した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濃縮し、残渣を得た。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物ss-12を得た(214mg, 収率80%)。融点105.0-106.0 ; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 8.09 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.76-7.71 (m, 2H), 7.24 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.18 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.01 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.76 (d, J=2.5Hz, 2H), 3.08 (t, J=6.2Hz, 2H), 3.02 (t, J=6.2Hz, 2H) ; ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) 190.48 (q, J_{C-F}=35.3Hz), 172.44, 168.82, 155.23, 154.72, 153.97, 151.77, 150.32, 150.24, 135.88, 135.64, 130.51, 129.99, 129.40, 129.24, 126.21, 125.59, 123.82, 120.16, 119.87, 118.94, 115.46 (q, J_{C-F}=292.2Hz), 114.13, 112.71, 106.44, 101.67, 81.34, 65.49, 37.96, 27.57 ; IR (CH₂Cl₂) 3420, 3055, 1765, 1610, 1408 cm⁻¹ ; LRMS (EI) m/z (%) 614 (M⁺-COOH ; 19), 579 (100) ; HRMS (EI) C₃₁H₁₈Cl₂F₃O₆の計算値：613.0433、実測値：613.0469。

【0070】

(実施例6)

1)ss-12の蛍光スペクトル

実施例5で得られた化合物ss-12を、CH₃CN中に濃度2mMとなるよう溶解し、その後この溶液に、最終濃度20 μMで溶解するように、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。この20 μM ss-12溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、Perkin Elmer(登録商標)LS50蛍光分光計を用いて測定した。励起スペクトル及び蛍光スペクトルの両方についてスリット幅は2.5nmであり、光電子増倍管の電圧は775Vであった。測定は励起波長490nmで行った。結果を、図19に示した。

【0071】

次に、異なる濃度の15当量のONOO⁻溶液を、室温で激しく攪拌している20 μM ss-12溶液に、ゆっくり添加した。その容積の変化は、1%未満でなければならない。蛍光強度の変化を、30分後に測定した。これらの結果を、図20に示した。反応の完了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、先に説明したものと同じ条件を用いて測定した。図19と比べて、蛍光強度の劇的増加が認められた。

【0072】

2)ss-12のUV-Vis吸収スペクトル

化合物ss-12を、濃度20 μMとなるようジクロロメタン中に溶解した。得られた20 μM ss-12溶液の吸収スペクトルを測定した。これらの結果を図21に示した。この結果は、ss-12は、460nm及び490nmの前後に2つの吸収ピークを持つことを証明した。

【0073】

(実施例7-様々な活性酸素種によるss-12特異性の比較)

実施例5において得た化合物ss-12を、CH₃CN中に濃度2mMとなるよう溶解し、その後この溶液に、最終濃度20 μMで溶解するように、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。様々な活性酸素種50 μL(10当量)を、対応するss-12溶液5mLへ独立して添加した。この処理の前後の蛍光強度の変化を測定した。蛍光強度は、実施例2と同じ条件下で測定した。蛍光プローブの各濃度は、20 μMであった(100mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4)。これらの結果を表2に示した。ss-12は非常に高い選択性を有することが、この結果から証明された。

【0074】

【表2】

表2

ROS プローブ	ONOO ⁻	¹ O ₂ ^a	O ₂ ^{•-a}	H ₂ O ₂ ^a	•NO ^b
ss-12	579%	7%	9%	-3%	2%

(a)実施例3、表1のROS発生手順を参照されたい。

(b)NOは、SNP(ニトロフェリシアン化ナトリウム(III)二水和物)により生成した (Feelisch M., Eur Heart J. 1993, 14, 123-132)

【0075】

(実施例8- ss-12によるペルオキシナイトライトの特異的検出)

実施例5で得られた化合物ss-12を、濃度2mMとなるようCH₃CN中に溶解し、その後この溶液に、最終濃度20 μMで溶解するように、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)を添加した。次にペルオキシナイトライトを、最終濃度0、20、60、100、200、240及び300 μMとなるよう添加し、30分後に蛍光スペクトルを測定した。蛍光スペクトルは、実施例6と同じ条件下で測定した。結果を、図22に示した。図22に明確に示されたように、ss-12は、蛍光強度の大きい増加を生じ、この蛍光強度は、ONOO⁻濃度と良好な直線関係を有した(図23に示す)。

【0076】

(実施例9-細胞アッセイ)

本試験を通じ、初代培養した皮質神経細胞は、Sprague-Dawleyラットの15日胚から調製した。簡単に述べると、解離した細胞浮遊液を、グルタミン(0.5mM, Sigma Chemical Company, セントルイス, MO)、ペニシリン(100U/mL)及びストレプトマイシン(100 μg/mL)を含有するNeurobasal/2% B27 (Gibco-BRL, グランドアイランド, NY)と共に、ポリ-L-リシン-コーティングされた6-ウェルプレート(BD Biosciences, サンディエゴ, CA, USA)上に、密度2 × 10⁶個細胞/ウェルで播種した。これらの細胞を、加湿したインキュベーター内で37 °Cで、5%CO₂-95%空気中で維持した。10日目に、培養した皮質細胞を実験に使用した。初代培養した神経細胞を、濃度20 μMのss-6及びss-12と共に15分間インキュベートし、その後リン酸ナトリウム緩衝液(100mM, pH7.4)で3回洗浄した。その後細胞を、10及び100 μM SIN-1(3-モルホリノ-シドノンイミン・HCl)で15分間処理した。リン酸ナトリウム緩衝液(100mM, pH7.4)で洗浄後、細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。結果は、これらのプローブが、細胞内ONOO⁻生成の測定に関して満足できる結果を生じたことを示している(図24に示す)。

【0077】

(参考文献)

1. 国際公開公報第01/64664号、2001年9月7日公開(Naganoら)
2. 国際公開公報第2004040296号、2004年5月31日公開(Naganoら)
3. Augusto, O.; Radi, R. Gatti, R. M.; Vasquez-Vivarの論文、J. Methods Enzymol. 1996, 269, 346-354
4. Beal, M. F. の論文、Free Radical Biol. & Med. 2002, 32, 392
5. Beckman, J. S. の論文、Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1996, 271, C1424
6. Beckman J. S.、Ischiropoulos, H.、Zhu L、van der Woerd M、Smith C、Chen J、Harrison J、Martin J. C.、及びTsai M. の論文、Arch Biochem Biophys, 1992, 298, 438-445
7. Crow, J. P. の論文、Nitric Oxide, 1997, 1, 145-157
8. Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Caputi, A.P.; Salvemini, D. の論文、Pharmacol Rev. 2001, 53, 135

10

20

30

40

50

9. Feelisch M., Eur Heart J. 1993, 14, 123-132
10. Gatti, R. M; Alvarez, B.; Vasquez-Vivar, J.; Radi, R.; Augusto, O. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1998, 349, 36-46
11. Gatti, R. M.; Radi, R.; Augusto, O. の論文、FEBS Lett. 1994, 348, 287-290
12. Groves, J. T. の論文、Curr. Opin. Chem. Biol. 1999, 3, 226
13. Gryglewski, R. の論文、Nature 1986, 320, 454
14. Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. の論文 J. Chem. Soc. A 1968, 450-452
15. Ischiropoulos, H. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1998, 356, 1-11

【0078】

16. Ischiropoulos, H.; Gow, A.; Thom, S. R.; Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ceow, J. P. の論文、Methods Enzymol. 1999, 301, 367-373
17. John, E. T. Corrie; David R. Trentham の論文、J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1995, 1993
18. Kaur, H.; Halliwell, B. の論文、FEBS Lett. 1994, 350, 9-12
19. Keith, W. G.; Powell, R. E. の論文、J. Chem. Soc. A, 1969, 1, 90
20. Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. の論文、Free Radic. Biol. Med. 1994, 16, 149-156
21. Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H. の論文、Free Radic. Biol. Res. 1997, 27, 245-254
22. Koppenol, W. H. の論文、Redox Report 2001, 6, 339-341
23. Lipton, S. A.; Chol, Y.-B.; Pan, Z.-H.; Lei, S.-Z.; Chen, H.-S.V.; Sucher, N. J.; Loscalzo, J.; 24. Singel, D. J.; Stamier, J. S. らの論文、Nature 1993, 364, 626
25. MacMillan-Crow, L. A.; Crow, J. P.; Kerby, J. D.; Beckman, J. S.; Thomson, J. A., の論文、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 11853
26. Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Wink, D. A.; Grisham, M. S. の論文、J. Biol. Chem. 1996, 271, 40-47
27. Nagano, T.; Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi K.; Kojima H. の論文、J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 3357-3367
28. Pappolla, M. A.; Chyan, Y.-J.; Poeggeler, B.; Frangione, B.; Wilson, G., G hiso, J.; Reiter, R. J. の論文、J. Neural Transm. 2000, 107, 203
29. Radi, R. の論文、Chem. Res. Toxicol. 1998, 11, 720-721
30. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B.A. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1991, 288, 481

【0079】

31. Radi R, Beckman, J. S., Bush, K.M. 及び Freeman B.A. の論文、J. Biol. Chem, 1991, 266, 4244-4250
32. Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Naviliat, M.; Cayota, A. の論文、Free Radical Biol. & Med. 2001, 30, 463-488
33. Rodenas, J.; Carbonell, T.; Mitjavila, M. T. の論文、Free Radical. Biol. & Med. 2000, 28, 374
34. Romero, N.; Denicola, A.; Souza, J. M.; Radi, R. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1999, 368, 23-30
35. Royall, J. A.; Ischiropoulos, H. の論文、Arch. Biochem. Biophys. 1993, 302, 348-355
36. Rychnovsky, S.D., Skalitzky, D. J., Pathirana, C., Jensen, P. R., Fenical, W. の論文、J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 1677
37. Setsukinai, K.; Urano, Y; Kakinuma, K.; Nagano, T. の論文、J. Biol. Chem. 2003, 278, 3170-3175

38. Shi, H.; Noguchi, N.; Xu, Y.; Niki, E. の論文、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 257, 651
39. Squadrito, G. L. 及び Pryor, W. A. の論文、*Free Radical Biol. & Med.* 1998, 25, 797
40. Szabo, C. の論文、*Toxicol. Lett.* 2003, 140, 105
41. Tarpey, M. M.; Fridovich, I. の論文、*Circ. Res.* 2001, 89, 224-236
42. White, C. R.; Brock, T. A.; Chang, L. Y.; Crapo, J.; Briscoe, P.; Ku, D.; Bradley, W. A.; Gianturio, S. H.; Gore, J.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M. の論文、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 1044
43. Yang, D.; Wong, M.-K.; Yan, Z. の論文、*J. Org. Chem.* 2000, 65, 4179-4184 10
44. 「蛍光プローブ及び研究成果のハンドブック (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products)」第9版、Molecular Probes、ユージーン、オレゴン州、Haughland、2003年
45. 「有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis)」、Greene, T. W., John Wiley & Sons, Inc., 1999年

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、ペルオキシナイトライト又はオキソン(登録商標)(2KHSO₅・KHSO₄・K₂SO₄)による、ケトン(1a/1b)の酸化反応を図示する。

【図2】図2は、一般式(II)で表される化合物の一般的合成スキームを示し、ここで各R_i(i=7-17)は、「発明の詳細な説明」に定義されている。 20

【図3】図3は、一般式(III)で表される化合物の一般的合成スキームを示し、ここで各R_i(i=18-27)は、「発明の詳細な説明」に定義されている。

【図4-7】図4から図7は、実施例1の合成スキームを示す。

【図8】図8は、実施例1において得られた本発明の化合物(ss-6)の20 μM溶液の蛍光スペクトルを示す。

【図9】図9は、20 μM ss-6の5mLと15当量のONOO⁻との反応後30分の溶液の蛍光スペクトルを示す。

【図10】図10は、20 μM ss-6の吸収スペクトルを示す。

【図11】図11は、ss-6と濃度範囲0~300 μMのONOO⁻の間の反応後30分で得た、蛍光スペクトルを示す。 30

【図12】図12は、蛍光強度とONOO⁻の濃度の間の直線関係を示す。

【図13-18】図13~図18は、実施例5の合成スキームを示す。

【図19】図19は、実施例5で得られた本発明の化合物(ss-12)20 μM溶液の蛍光スペクトルを示す。

【図20】図20は、20 μM ss-12 5mLと15当量のONOO⁻との反応後30分の溶液の蛍光スペクトルを示す。

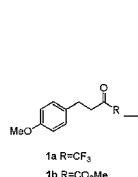
【図21】図21は、20 μM ss-12の吸収スペクトルを示す。

【図22】図22は、ss-6と濃度範囲0~300 μMのONOO⁻の間の反応後30分で得た、蛍光スペクトルを示す。

【図23】図23は、蛍光強度とONOO⁻の濃度の間の直線関係を示す。

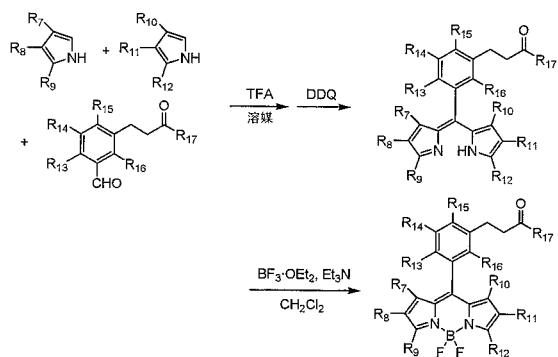
【図24】図24は、濃度20 μMのss-6及びss-12と共にインキュベートされ、その後10 μM及び100 μMのSIN-1(3-モルホリノ-シドノンイミン・HCl)で処理された、初代培養神経細胞の蛍光顕微鏡法の結果を示す。 40

【図1】



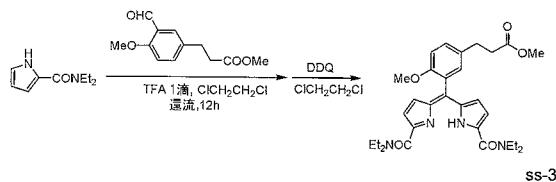
【図2】

図2



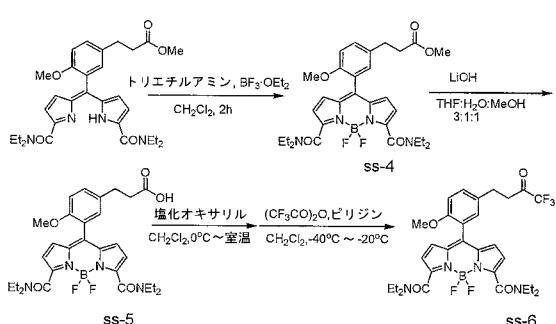
【図6】

図6



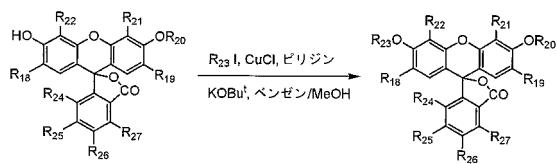
【図7】

図7



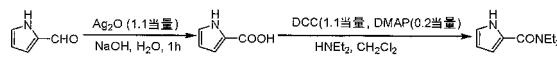
【図3】

図3



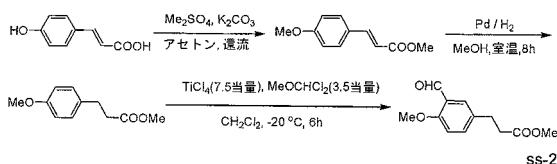
【図4】

図4



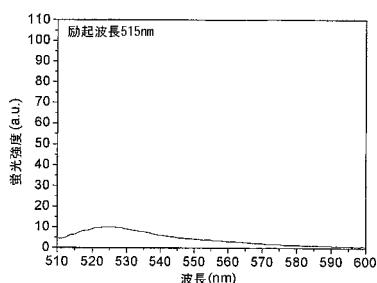
【図5】

図5



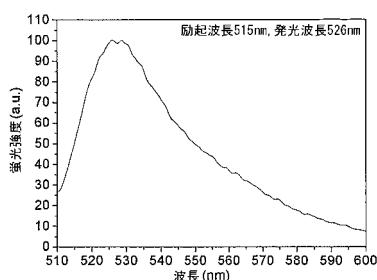
【図8】

図8



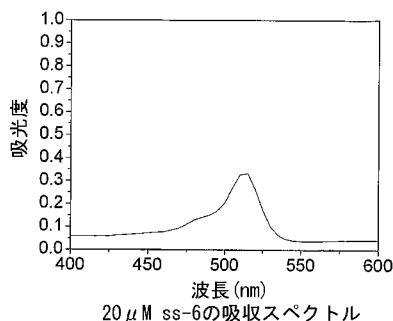
【図9】

図9



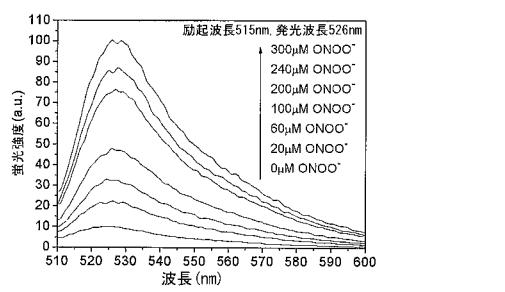
【図10】

図10



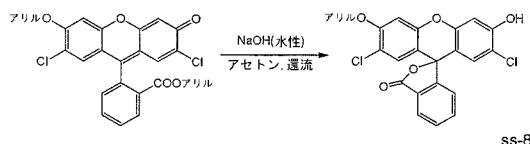
【図11】

図11



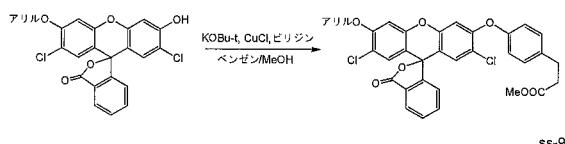
【図14】

図14



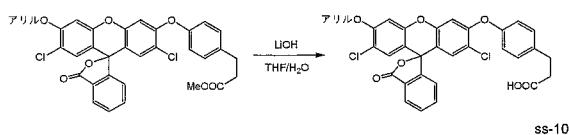
【図15】

図15



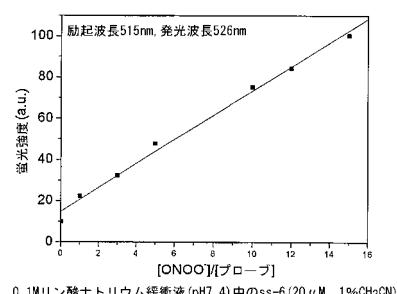
【図16】

図16



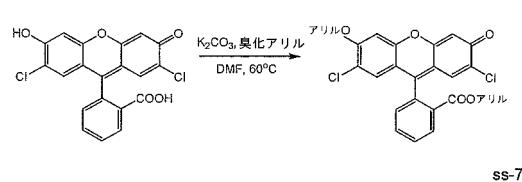
【図12】

図12



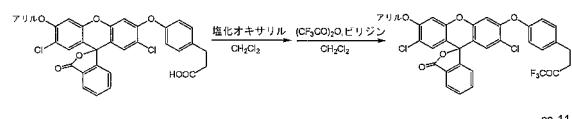
【図13】

図13



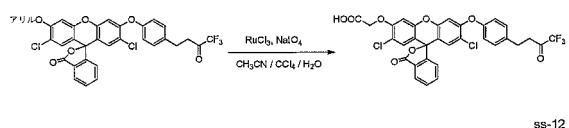
【図17】

図17



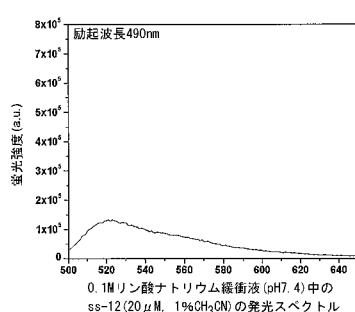
【図18】

図18



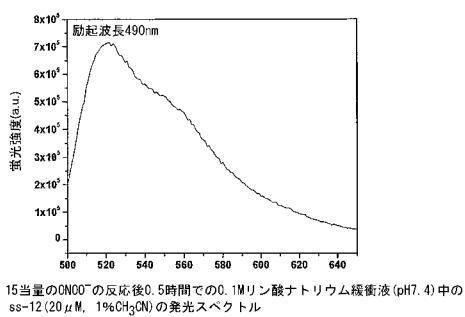
【図19】

図19



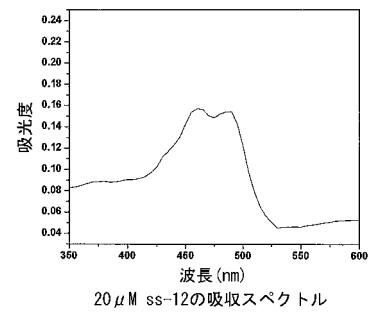
【図20】

図20



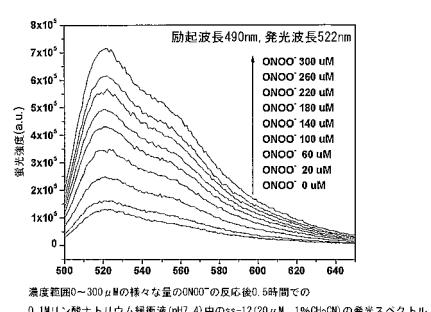
【図21】

図21



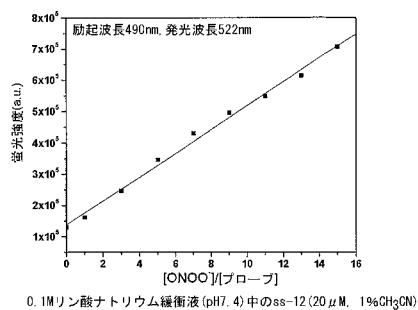
【図22】

図22



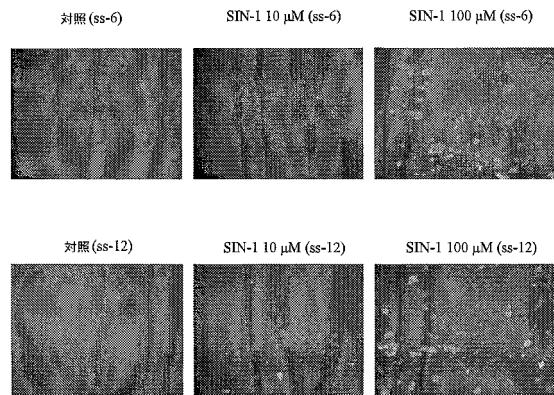
【図23】

図23



【図24】

図24



【手続補正書】

【提出日】平成19年2月12日(2007.2.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

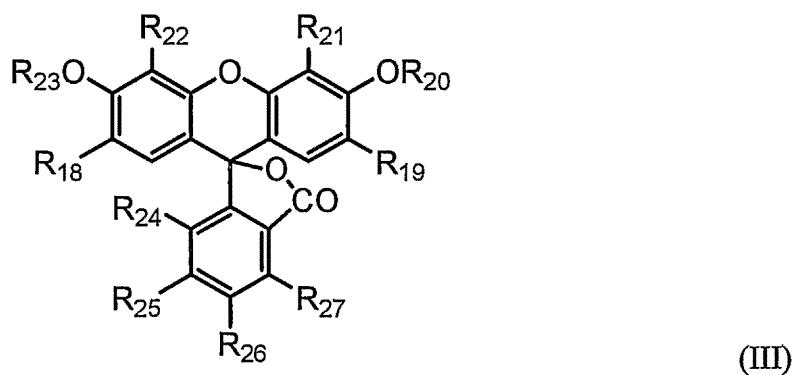
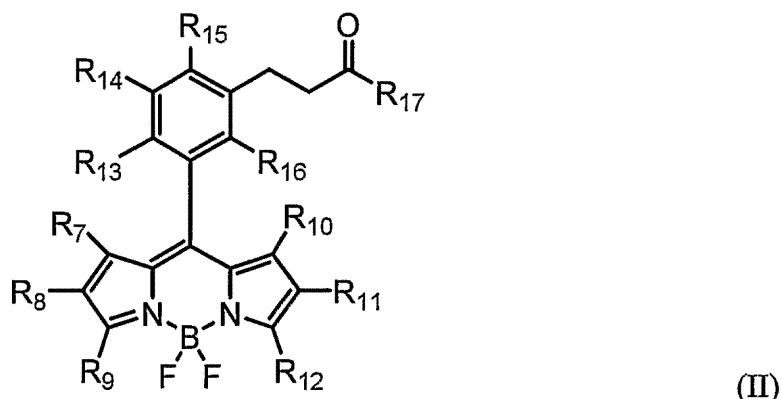
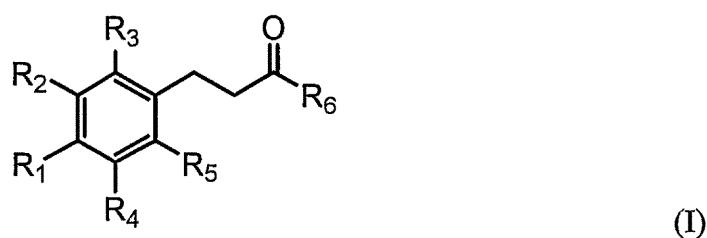
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(I)、(II)、もしくは(III)、又はそれらの塩によって表される、他の活性酸素種及び活性窒素種よりもむしろペルオキシナイトライドと特異的に反応する化合物：

【化1】



(式中、

R_1 は、 OR'_1 、又は $NR'_2R'_3$ であり、ここで R'_1 、 R'_2 及び R'_3 は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基であり；

R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 は、独立して、水素、又は、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、及びポリエーテルから選択される基であるか、 R_2 及び R_3 は一緒に、アリール、複素環式、ヘ

テロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR₄及びR₅は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R₆は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₁(式中、W₁は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、及びアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基であり；

発蛍光団は、R_i(i=1~5)のひとつに共有結合されてよく；

R₇及びR₁₀は、独立して、水素、又は、ハロゲン、低級アルキル、低級アルケニル、ハロゲン化アルキル、CN、及びNO₂から選択される基であり；

R₈、R₉、R₁₁、及びR₁₂は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、ハロゲン化アルキル、もしくはアルケニル、又は、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、もしくは(C=O)-Y又は-(C=O)-X-Yの形態(式中、Xは、低級アルキル又はアルケニル鎖であり、かつYは、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、及び無機エステルから選択される基である。)から選択される基、或いは、その環原子が、炭素、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択され、該環原子が、3~6個の炭素原子、及び2個を超えないヘテロ原子を含む、5~7-員の複素環式環であり；

R₁₃は、OR'₄又はNR'₅R'₆であり(式中、R'₄、R'₅、及びR'₆は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である。)；

R₁₄及びR₁₅は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、ポリエーテルであるか、又はR₁₄及びR₁₅は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R₁₆は、水素、アルキル、アルコキシ、又はポリエーテルであり；

R₁₇は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₂(式中、W₂は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、及びアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基であり；

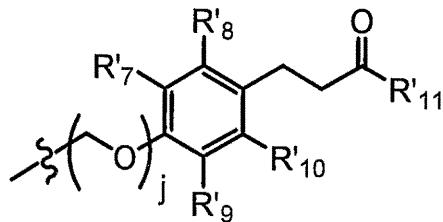
R₁₈及びR₁₉は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、又はアルコキシであり；

R₂₀は、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、カルボキシアルキル、カルボン酸エステル、及びアミノアルキルから選択される基であり；

R₂₁及びR₂₂は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、カルボキシアルキル、カルボキシラート、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、及び無機エステルから選択される基であり；並びに

R₂₃は、以下から選択され：

【化2】



(式中、j=0又は1；

R'7、R'8、R'9、及びR'10は、独立して、水素、又は、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、アルキルオキシ、及びポリエーテルから選択される基であるか、R'7及びR'8は一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR'9及びR'10は、一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成し；

R'11は、CF₃、ハロゲン-置換された低級アルキル、又は(C=O)-O-W₃(式中、W₃は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、及びアリールアルキルから選択される基である。)から選択される電子求引基である。)；並びに

R₂₄、R₂₅、R₂₆、及びR₂₇は、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルキルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、ケト、アルデヒド、カルボキシラート、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルバメート、アミド、アミノ、アルキルアミノ、ポリエーテル、チオール、アルキルチオ、シアノ、ニトロ、スルホニル、及び無機エステルから選択される基であるか、R₂₄及びR₂₅は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される5、6、もしくは7-員の環を形成するか、R₂₅及びR₂₆は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成するか、又はR₂₆及びR₂₇は、一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、もしくは複素芳香族から選択される、5、6、もしくは7-員の環を形成する。)。

【請求項2】

R₁がOR'₁であり、かつR'₁が、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

R'₁が水素である、請求項2記載の化合物。

【請求項4】

R'₁がCH₃である、請求項2記載の化合物。

【請求項5】

R'₁が、OCH₂OZ₁であり、かつZ₁が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項2記載の化合物。

【請求項6】

Z₁が、CH₃である、請求項5記載の化合物。

【請求項7】

R₁が、NR'₂R'₃であり、かつR'₂及びR'₃が、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、

シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項1記載の化合物。

【請求項 8】

R'_2 が、水素である、請求項7記載の化合物。

【請求項 9】

R'_3 が、 $(C=O)Z_2$ であり、かつ Z_2 が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項8記載の化合物。

【請求項 10】

R_2 及び R_3 が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 11】

R_4 及び R_5 が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 12】

R_6 が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 13】

R_6 が CF_nH_{3-n} であり、かつnが1又は2である、請求項12記載の化合物。

【請求項 14】

R_6 が CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 15】

W_1 が CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 16】

W_1 が、tert-Buである、請求項1記載の化合物。

【請求項 17】

R_7 が水素である、請求項1記載の化合物。

【請求項 18】

R_7 が CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 19】

前記発蛍光団が、アクリジンオレンジ、アントラセン環、アロフィコシアニン、BODIPY、シアニン類、クマリン、エダンス(Edans)、エオシン、エリトロシン、フルオレスカミン、フルオレセイン、FAM(カルボキシフルオレセイン)、HEX(ヘキサクロロフルオレセイン)、JOE(6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシ-フルオレセイン)、Oregon Green、フィコシアニン、フィコエリトリン、ローダミン、ROX(カルボキシ-X-ローダミン)、TAMRA(カルボキシテトラメチルローダミン)、TET(テトラクロロ-フルオレセイン)、Texas red、テトラメチルローダミン、及びキサンチン類から選択される、請求項1記載の化合物。

【請求項 20】

R_9 が $(C=O)NR''_1R''_2$ であり、かつ R''_1 及び R''_2 がアルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 21】

R''_1 が $-(CH_2)_k-CH_3$ であり、かつk=0~24である、請求項19記載の化合物。

【請求項 22】

R''_2 が $-(CH_2)_l-CH_3$ であり、かつl=0~24である、請求項19記載の化合物。

【請求項 23】

R_8 及び R_9 が一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 24】

R_{12} が $(C=O)NR''_3R''_4$ であり、かつ R''_3 及び R''_4 がアルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 2 5】

R''_3 が $-(CH_2)_p-CH_3$ であり、かつ $p=0 \sim 24$ である、請求項23記載の化合物。

【請求項 2 6】

R''_4 が $-(CH_2)_q-CH_3$ であり、かつ $q=0 \sim 24$ である、請求項23記載の化合物。

【請求項 2 7】

R_{11} 及び R_{12} が一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 2 8】

R_{13} が OR'_4 であり、かつ R'_4 が、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項1記載の化合物。

【請求項 2 9】

R'_4 が水素である、請求項27記載の化合物。

【請求項 3 0】

R'_4 が CH_3 である、請求項27記載の化合物。

【請求項 3 1】

R'_4 が OCH_2OZ_3 であり、かつ Z_3 が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項27記載の化合物。

【請求項 3 2】

Z_3 が CH_3 である、請求項30記載の化合物。

【請求項 3 3】

R_{13} が $NR'_5R'_6$ であり、かつ R'_5 及び R'_6 が、独立して、水素、又は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アルカノイル、アルケノイル、アルキノイル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、アリーロイル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項1記載の化合物。

【請求項 3 4】

R'_5 が水素である、請求項32記載の化合物。

【請求項 3 5】

R'_6 が $(C=O)Z_4$ であり、かつ Z_4 が、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、アルカリル、アリールアルキル、及びポリエーテルから選択される基である、請求項33記載の化合物。

【請求項 3 6】

R_{14} 及び R_{15} が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 3 7】

R_{17} が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 3 8】

R_{17} が CF_nH_{3-n} であり、かつ n が1又は2である、請求項36記載の化合物。

【請求項 3 9】

R_{17} が CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 0】

W_2 が CH_3 である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 1】

W_2 が $tert$ -Bu である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 2】

R_{18} が、Cl、Br、又はIである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 3】

R_{18} がCH₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 4】

R_{19} が、Cl、Br、又はIである、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 5】

R_{19} がCH₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 6】

R_{20} が-(CH₂)_m-COOHであり、かつm=1～24である、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 7】

R'_7 及び R'_8 が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 8】

R'_9 及び R'_{10} が一緒に、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 4 9】

R'_{11} が、ハロゲン置換された低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 0】

R'_{11} がCF_nH_{3-n}であり、かつnが1又は2である、請求項49記載の化合物。

【請求項 5 1】

R'_{11} がCH₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 2】

W_3 がCH₃である、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 3】

W_3 がtert-Buである、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 4】

R_{24} 及び R_{25} が一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 5】

R_{25} 及び R_{26} が一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 6】

R_{26} 及び R_{27} が一緒に、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、複素環式、ヘテロアリール、及び複素芳香族から選択される、5、6、又は7-員の環を形成する、請求項1記載の化合物。

【請求項 5 7】

請求項1記載の化合物を含む、ペルオキシナイトライトの測定のための、作用剤。

【請求項 5 8】

a)請求項1記載の化合物を、試料と接触させる工程；及び

b)前記化合物と前記試料中に存在するペルオキシナイトライトの間の反応により生成される化合物の蛍光を測定する工程；を含む、試料中のペルオキシナイトライトの測定方法。

【請求項 5 9】

前記試料が、化学試料又は生物学的試料である、請求項58記載の方法。

【請求項 6 0】

前記生物学的試料が、動物細胞、動物組織、植物細胞、植物組織、及び微生物から選択される、請求項59記載の方法。

【請求項 6 1】

請求項57記載の作用剤を使用することを含む、ペルオキシナイトライトの検出のための、ハイ-スループットスクリーニング蛍光法。

【請求項 6 2】

請求項1記載の化合物を使用することを含む、ペルオキシナイトライトの生成を増加又は減少する化合物のスクリーニングのための、ハイ-スループット法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2006/002177																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7: C07D G01N																				
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) WPI EPODOC PAJ CA CNPAT CNKI: peroxy nitrite nitrites nitrous acid nitro compounds detect* monitor mearsur+ fluorophore 19059-14-4 7782-77-6																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">CN1645114A(UNIV ZHEJIANG) 27 July 2005(27.07.2005), the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-66</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US6861262 B2(QUEST DIAGNOSTICS INC) 01. Mar. 2005 (01.03.2005) , the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-66</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">US5185129 A(HARVARD COLLEGE)09. Feb.1993 (09.02.1993) , the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-66</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">Yang, Dan ET AL. "Regioselective Intramolecular Oxidation of Phenols and Anisoles by Dioxiranes Generated in Situ" Journal of Organic Chemistry,2000,Vol. 65, No. 13, Pages 4179-4184</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-66</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">Gabe, Yu; Urano, Yasutera ET AL. "Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyromethene chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe" Journal of the American Chemical Society ,2004, Vol. 126, No. 10,Pages 3357-3367</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-66</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	CN1645114A(UNIV ZHEJIANG) 27 July 2005(27.07.2005), the whole document	1-66	A	US6861262 B2(QUEST DIAGNOSTICS INC) 01. Mar. 2005 (01.03.2005) , the whole document	1-66	A	US5185129 A(HARVARD COLLEGE)09. Feb.1993 (09.02.1993) , the whole document	1-66	A	Yang, Dan ET AL. "Regioselective Intramolecular Oxidation of Phenols and Anisoles by Dioxiranes Generated in Situ" Journal of Organic Chemistry,2000,Vol. 65, No. 13, Pages 4179-4184	1-66	A	Gabe, Yu; Urano, Yasutera ET AL. "Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyromethene chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe" Journal of the American Chemical Society ,2004, Vol. 126, No. 10,Pages 3357-3367	1-66
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	CN1645114A(UNIV ZHEJIANG) 27 July 2005(27.07.2005), the whole document	1-66																		
A	US6861262 B2(QUEST DIAGNOSTICS INC) 01. Mar. 2005 (01.03.2005) , the whole document	1-66																		
A	US5185129 A(HARVARD COLLEGE)09. Feb.1993 (09.02.1993) , the whole document	1-66																		
A	Yang, Dan ET AL. "Regioselective Intramolecular Oxidation of Phenols and Anisoles by Dioxiranes Generated in Situ" Journal of Organic Chemistry,2000,Vol. 65, No. 13, Pages 4179-4184	1-66																		
A	Gabe, Yu; Urano, Yasutera ET AL. "Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyromethene chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe" Journal of the American Chemical Society ,2004, Vol. 126, No. 10,Pages 3357-3367	1-66																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 20.Oct. 2006 (20.10.2006)		Date of mailing of the international search report 4. DEC 2006 (14.12.2006)																		
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer HE Xiaoping Telephone No. 86-10-62085629 																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2006/002177
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Corrie, John E. T.; Trentham, David R. "Synthesis of photoactivatable fluorescein derivatives bearing side chains with varying properties" J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1995, Vol 1, No.16 Pages 1993-2000	1-66
A	McWatt, Martin; Boons, Geert-Jan "Parallel combinatorial synthesis of glycodendrimers and their hydrogelation properties" European Journal of Organic Chemistry, 2001, Vol.13, Pages 2535-2545	1-66
A	JP6054311B(KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD) 20.July 1994 (20.07.1994), the whole document	1-66
A	CN1182128C(DAIICHI PURE CHEM CO LTD) 29.Dec.2004 (29.12.2004), the whole document	1-66
A	CN1152871A(MONSANTO CO) 25.June 1997(25.06.1997), the whole document	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/002177

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1152871A	25.06.1997	WO9531197A1 AU2512095A NO964793A EP0758892A1 FI964537A BRPI9507643A CZ9603234A3 HU76327A JP10500671T KR977003143A NZ285648A AU709553B MX9605560A1 MX215808B CN1222286C	23.11.1995 05.12.1995 06.01.1997 26.02.1997 10.01.1997 23.09.1997 15.10.1997 28.08.1997 20.01.1998 03.07.1997 28.08.1999 02.09.1999 01.02.1998 15.08.2003 12.10.2005
CN1182128C	29.12.2004	WO0164664A1 AU3599801A EP1260508A1 JP2001563504T KR20030031468A CN1418208A US2003153027A1 AU2001235998B2 US7087766B2	07.09.2001 12.09.2001 27.11.2002 02.07.2003 21.04.2003 14.05.2003 14.08.2003 09.06.2005 08.08.2006
US6861262 B2	01.03.2005	US2002106807A1 WO02099419A1 AU2001266785A1	08.08.2002 12.12.2002 16.12.2002
JP6054311B	20.07.1994	JP63111464A	16.05.1988
US5185129A	09.02.1993	none	
CN1645114 A	27.07.2005	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/002177

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 493/10 (2006.01)i

C07D 403/06 (2006.01)i

C07F 5/02 (2006.01)i

C07C49/213 (2006.01)i

G01N31/22 (2006.01)i

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 9 B 57/10 (2006.01)	C 0 9 B 57/10	4 H 0 4 8
G 0 1 N 33/483 (2006.01)	G 0 1 N 33/483	C 4 H 0 5 6
C 0 7 C 69/712 (2006.01)	C 0 7 C 69/712	C S P
C 0 7 F 5/02 (2006.01)	C 0 7 F 5/02	D
C 0 9 B 11/28 (2006.01)	C 0 9 B 11/28	J
C 0 7 D 493/10 (2006.01)	C 0 7 D 493/10	C
C 0 7 D 207/44 (2006.01)	C 0 7 D 207/44	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF, BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO, CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG ,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ズヘンニング スン

中華人民共和国 ホンコン クエエンス ロード ウエスト 533 ウォ ファト ブイルディ
ング フラト 16シー

(72)発明者 ジアンガング スヘン

中華人民共和国 ホンコン ツエン ムン メロドイ ガルデン ブロクク 1 28ティーエイ
チ フロオル フラト エフ

F ターム(参考) 2G045 CB01 DB30 FA11 FB12 GC15

2G054	AA06	AA10	AB01	BB10	CA21	CE02	EA01	EA03	EB03	GA03
GA04	GB02									
4C069	AD02	BB03	BB16	BB34	BB49	BB52	CC05			
4C071	AA04	AA07	BB01	BB07	CC12	DD40	EE04	FF17	HH08	KK01
	LL10									
4H006	AA01	AB92								
4H048	AA01	AA03	VA11	VA20	VA32	VA75	VB10			
4H056	BA02	BB05	BB15	BC02	BD01	BE06	BF07E	BF10F	BF13F	FA08