

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5222158号
(P5222158)

(45) 発行日 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)

(24) 登録日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 471/04 (2006. 01)

C O 7 D 471/04 1 1 2 Z

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

C O 9 K 11/06 (2006. 01)

C O 9 K 11/06 6 5 O

C O 9 B 57/00 (2006. 01)

C O 9 B 57/00 C S P V

請求項の数 27 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2008-555888 (P2008-555888)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月15日 (2007. 2. 15)
 (65) 公表番号 特表2009-528287 (P2009-528287A)
 (43) 公表日 平成21年8月6日 (2009. 8. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2007/000360
 (87) 国際公開番号 W02007/096728
 (87) 国際公開日 平成19年8月30日 (2007. 8. 30)
 審査請求日 平成21年12月8日 (2009. 12. 8)
 (31) 優先権主張番号 06290322. 4
 (32) 優先日 平成18年2月27日 (2006. 2. 27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500056471
 アンスティテュ キュリイ
 フランス国 エフー 7 5 2 4 8 パリ セ
 デックス 0 5 リュ デュルム 2 6
 (73) 特許権者 501089863
 サントル ナシオナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシェサイアンティフィク (セエヌエール
 エス)
 フランス国, エフー 7 5 0 1 6 パリ, リ
 ュ ミッシェル アンジュ 3
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬

最終頁に続く

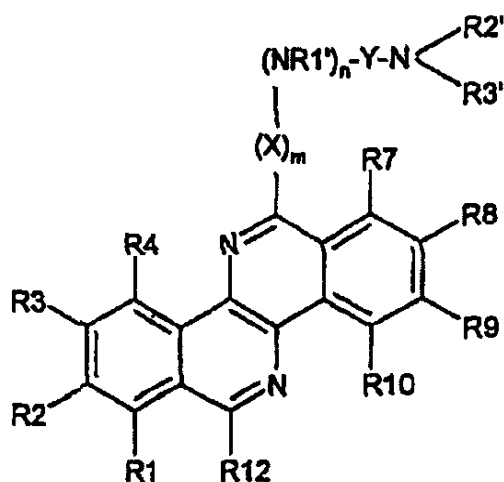
(54) 【発明の名称】 新規なジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン及びDNAプローブとしてのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) :

【化 1】



(I)

(式中、

R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子から選択され；

R2 = H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子であり；

R1' = H；アルキル又は(C2-C10)アルキルが-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子であり；

n = 0 若しくは 1；

X = 直鎖状アルキル；

m = 0 若しくは 1；

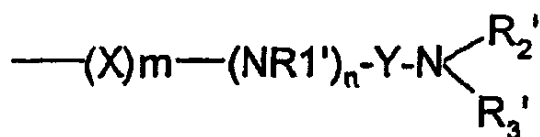
Y = 直鎖状アルキル；

R2' と R3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2-C10)アルキルが、-OH、-NRR'、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキルから選択され；

R8 = H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子であり；

R12 = H；随意に、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【化 2】



10

20

30

40

50

であり、ここで、X、R¹'、R²'、R³'、Y、m、nは上記と同様に定義され；

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂-C₁₀)アルキルを表す)

で表される化合物、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーであるが、R¹=R³=R⁴=R⁷=R⁹=R¹⁰=H、m=0、n=1、R¹'=H、R²'=R³'=メチル、R²、R⁸が独立してH又はO-メチルを表し、R¹²=H又はメチルであり、そしてY=- (CH₂)₂-又は-(CH₂)₃-である化合物を除く。

10

【請求項2】

式中、R¹=R³=R⁴=R⁷=R⁹=R¹⁰=H；

R²=H又は-O-アルキル；

R¹'=H；

n=0又は1；

X=直鎖状アルキル；

m=0又は1；

Y=直鎖状アルキル；

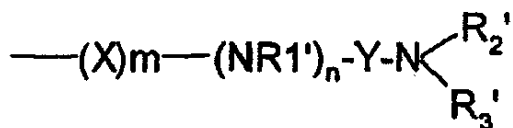
R²'とR³'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は1若しくは2つ以上の-OHで置換された(C₂-C₁₀)アルキルから選択され、かつ同時にHではなく；

20

R⁸=H、O-アルキル；

R¹²=H、アルキル又は

【化3】



30

であり、ここで、X、R¹'、R²'、R³'、Y、m、nは請求項1と同様に定義され；

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル又は-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂-C₁₀)アルキルを表す請求項1に記載の化合物、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーであるが、R¹=R³=R⁴=R⁷=R⁹=R¹⁰=H、m=0、n=1、R¹'=H、R²'=R³'=メチル、R²、R⁸が独立してH又はO-メチルを表し、R¹²=H又はメチルであり、そしてY=- (CH₂)₂-又は-(CH₂)₃-である化合物を除く。

40

【請求項3】

N'-ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イルメチル-N,N-ジエチルプロパン-1,3-ジアミン、

N'-2-[2-(ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イルアミノ)エチルアミノ]エタノール、

N'-ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イルメチル-N,N-ジメチルエタン-1,2-ジアミン、

N'-ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イルメチル-N,N-ジメチ

50

ルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール、

N' - (2 - メトキシ - 1, 2 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N 6, N 1, 2 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 1, 2 - ジアミン、

N 6, N 1, 2 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 1, 2 - ジアミン、

N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 1, 2 - ジアミン、

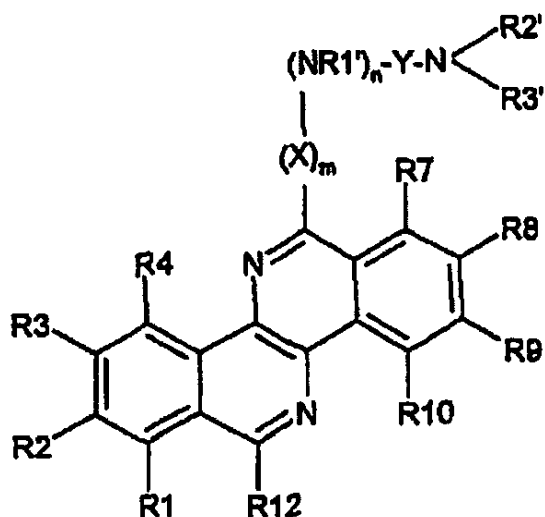
N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 1, 2 - ジアミン、

又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーから選択される、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

一般式 (I) :

【化 4】



(I)

(式中、

R 1、R 3、R 4、R 7、R 9 及び R 10 は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H；随意に - NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子から選択され；

R 2 = H；O - アルキル；(C 2 - C 10) アルキルが、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換された O (C 2 - C 10) アルキル；ハロゲン原子であり；

R 1' = H；アルキル又は (C 2 - C 10) アルキルが - NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換された (C 2 - C 10) アルキル；ハロゲン原子であり；

n = 0 若しくは 1；

X = 直鎖状アルキル；

m = 0 若しくは 1；

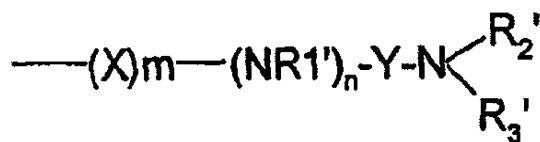
Y = 直鎖状アルキル；

R₂' と R₃' は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H；アルキル又は (C₂ - C₁₀) アルキルが、-OH、-NRR'、O-アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換された (C₂ - C₁₀) アルキルから選択され；

R₈ = H；O-アルキル；(C₂ - C₁₀) アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換された O (C₂ - C₁₀) アルキル；ハロゲン原子であり；

R₁₂ = H；随意に、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【化 5】



であり、ここで、X、R₁'、R₂'、R₃'、Y、m、n は上記と同様に定義され；R、R' は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H、アルキル、又は -OH、O-アルキル、CF₃ の 1 若しくは 2 つ以上で置換されている (C₂ - C₁₀) アルキルを表す)

で表される化合物、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーの DNA プローブとしての使用。

【請求項 5】

前記一般式 (I) で表される化合物が、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 2 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール、

N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N₆, N₁₂ - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N₆, N₁₂ - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、

又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーから選択される、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記プローブが選択的である、請求項 4 又は 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記プローブが DNA 蛍光染色プローブである、請求項 4 又は 5 に記載の使用。

【請求項 8】

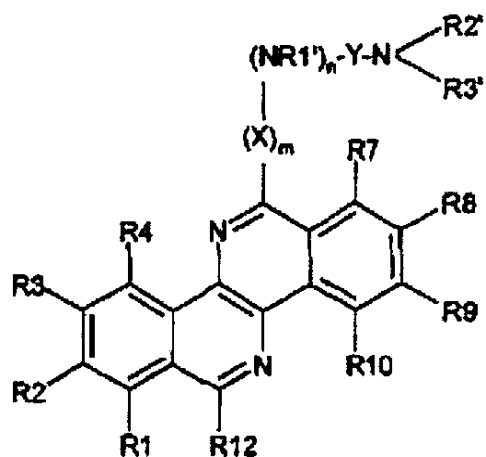
前記 DNA 蛍光染色プローブが、光活性化性である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

請求項 4 と同様に定義される一般式 (I) :

10

【化 6】



20

(I)

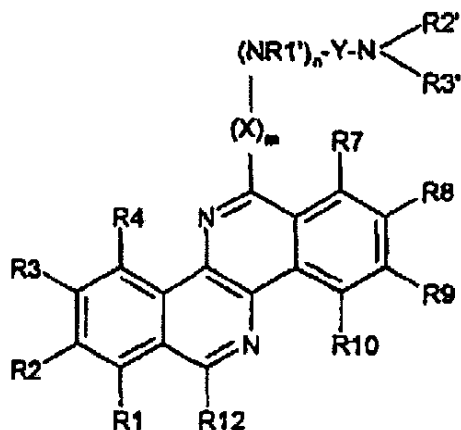
で表される化合物、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーを、適切な標識用溶媒中に含む DNA 標識用溶液。

30

【請求項 10】

a) 試験サンプルを、請求項 4 と同様に定義される一般式 (I) :

【化 7】



(I)

で表される誘導体、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーと接触させること；

b) 前記試験サンプルと一般式 (I) に示す誘導体との接触により得られる混合物を、一定の時間、前記一般式 (I) に示す誘導体が、前記試験サンプル中に存在するであろう DNA と複合体を形成するのに十分な条件下でインキュベートすること；

c) 前記混合物を適切な波長で照射し、そして前記照射された混合物から放出される光を観察することによって前記 DNA を検出すること、
から成る工程を含む、試験サンプル中の DNA を *in vitro* で検出するための方法。

【請求項 11】

定量的であり、前記照射された混合物から放出される光が、前記試験サンプル中の DNA の量と相関性を示す、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試験サンプルが、生体サンプルである、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試験サンプルが、尿、血清、血液、血漿、脳脊髄液、唾液、涙液、粘液、随意に固定若しくは固相化されていてもよい組織、随意に固定若しくは固相化されていてもよい真核細胞若しくは原核細胞、細胞溶解物、微生物、電気泳動用マトリックス若しくはポリマーゲル、又は緩衝溶液から成る群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 DNA が、合成 DNA である、請求項 10 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記一般式 (I) で表される化合物が、

N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール、

N' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 2 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1 , 3 - ジオール、

N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン、

N6 , N12 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 12 - ジアミン、

N6 , N12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 12 - ジアミン、

N , N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 , 8 - ジメトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 12 - ジアミン、

N' - (2 , 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン、

N' - (2 , 8 - ジメトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン、

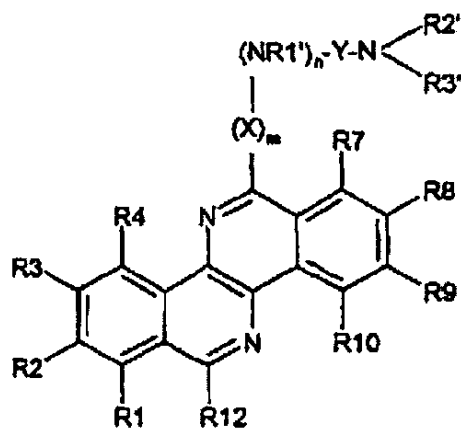
N , N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2 , 8 - ジメトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 12 - ジアミン、

又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーから選択される、請求項 10 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

a) 試験サンプルを、請求項 4 と同様に定義される一般式 (I) :

【化 8】



(I)

で表される誘導体、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーと接触させること；

b) 前記試験サンプルと一般式 (I) に示す誘導体との接触により得られる混合物を、一定の時間、前記一般式 (I) に示す誘導体が、前記試験サンプル中に存在するであろう

DNAと複合体を形成するのに十分な条件下でインキュベートすること；

c) 前記混合物を適切な波長で照射し、そして前記照射された混合物から放出される光を観察することによって前記DNAを検出すること、
から成る工程を含む、試験サンプル中のDNAを*in vivo*で検出するための方法におけるDNAプローブの調製のための、請求項4と同様に定義される一般式(I)で表される誘導体の使用。

【請求項17】

定量的であり、前記照射された混合物から放出される光が、前記試験サンプル中のDNAの量と相関性を示す、請求項16に記載の使用。

【請求項18】

前記試験サンプルが、生体サンプルである、請求項16又は17に記載の使用。

【請求項19】

前記試験サンプルが、尿、血清、血液、血漿、脳脊髄液、唾液、涙液、粘液、随意に固定若しくは固相化されていてもよい組織、随意に固定若しくは固相化されていてもよい真核細胞若しくは原核細胞、細胞溶解物、微生物、電気泳動用マトリックス若しくはポリマーゲル、又は緩衝溶液から成る群から選択される、請求項18に記載の使用。

【請求項20】

前記DNAが、合成DNAである、請求項16ないし19のいずれか1項に記載の使用。

【請求項21】

前記一般式(I)で表される化合物が、

N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 2 - ジアミン、

N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール、

N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン、

N6, N12 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N6, N12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン、

N' - (2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン、

N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン、

又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、

10

20

30

40

50

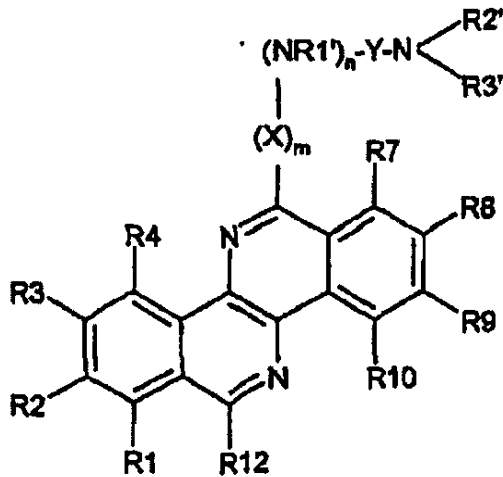
又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーから選択される、請求項 16 ないし 20 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 22】

標識用溶媒、及び

請求項 4 と同様に定義される一般式 (I) :

【化 9】



(I)

で表される化合物、又はその許容可能な塩、水和物若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー

を含む、DNA 標識用キット。

【請求項 23】

前記標識用溶媒が、水性溶媒、緩衝溶液及び有機溶媒から成る群から選択される、請求項 22 に記載のキット。

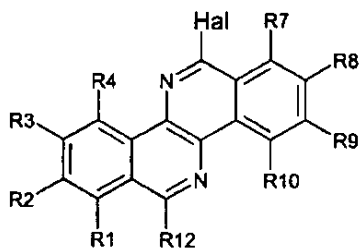
【請求項 24】

前記標識用溶媒が、界面活性剤及び/又は安定化剤を更に含む、請求項 22 又は 23 に記載のキット。

【請求項 25】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の一般式 (I) で表される化合物 (式中、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である) を調製する方法であって、一般式 (II) で表される化合物 :

【化 1 0】



(II)

10

(式中、 $R_1 \sim R_{12}$ は、請求項1と同様に定義され、 Hal は、ハロゲン原子を表す)と、一般式(II')で表される化合物:

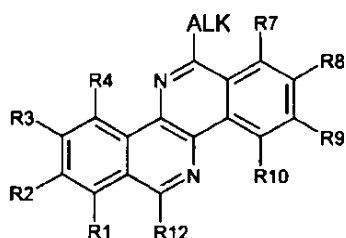


(式中、 $R_1' \sim R_3'$ 及び Y は、請求項1と同様に定義される)とを反応させることを含む、方法。

【請求項 2 6】

請求項1ないし3のいずれか1項に記載の一般式(I)で表される化合物(式中、 $m = 1$ である)を調製する方法であって、一般式(III)で表される化合物:

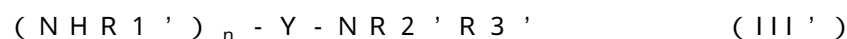
【化 1 1】



(III)

30

(式中、 $R_1 \sim R_{12}$ は、請求項1と同様に定義され、 ALK は、アルキル基を表す)を酸化し、得られた酸化物を、一般式(III')で表される化合物:



(式中、 $R_1' \sim R_3'$ 、 n 、及び Y は、請求項1と同様に定義される)を用いて還元的にアミノ化することを含む方法。

【請求項 2 7】

40

請求項4と同様に定義される一般式(I)で表される少なくとも一つの誘導体が、非共有結合的にDNA分子と結合する、複合体。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

核酸結合性蛍光化合物は、DNAの可視化、精製及び定量化に広く用いられている。最も頻繁に用いられる用途は、ゲル電気泳動、フローサイトメトリー、PCRにおける生成物のリアルタイム定量化、固定細胞上での間接的なエピ蛍光におけるDNAの顕色(核と有糸分裂時の染色体の染色)及び変異導入である(Haugland, R. P. (編集) 2002, Nucleic Acid Detection and Genomics

50

Technology, chapter 8, Ninth ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). 1950年代から、様々なDNA及びRNAに非共有結合的に結合するプローブが発見されてきた。これらは、その分子構造、結合する核酸のクラス、及びその結合様式に従って分類できる。最も頻繁に用いられる蛍光色素(Hoechst、DAPI、エチジウムブロマイド)は、dsDNAに強固に優先的に結合し、他の色素(例えば、SYTO色素)は、条件に応じて全ての種類の核酸を染色する(上述のHaughland et al.)。こういった特性は、これらの試薬の分子構造と高い相関性を有する。例えば、エチジウムブロマイドとヨウ化プロビジウムは、dsDNA内にインターカレートし(Lerman, L.S., 1961, J Mol Biol, 3, 18-3)、陽イオン性色素のHoechstとDAPIは、dsDNAのマイナーグループと相互作用を起こし、全体としてdA/dTリッチな配列に優先的に結合する(Kopka, M.L., et al., 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82, 1376-1380; Kubista, M. et al., 1987, Biochemistry, 26, 4545-4553)。興味深いことに、特定のDNAマーカーは、核酸に対するその濃度に応じて、両方の種類の結合を示す(Zipper, H. et al., 2004, Nucleic Acids Res, 32, e103)。TOTO色素については、独自の結合様式が提案されており、ssDNAの同一鎖上の塩基間にインターカレートするものと考えられている(Rye, H.S. et al., 1995, Nucleic Acids Res, 23, 1215-1222)。

【0002】

今日では生細胞を用いた実験が広く興味の対象となっているが、これは主にタンパク質、核酸及び細胞小器官を蛍光低分子又は種々のタイプのGFPで被膜して標識する技術の開発に起因するものである(Zhang, J. et al., 2002, Nat Rev Mol Cell Biol, 3, 906-918; Shav-Tal Y. et al., 2004, Nat Rev Mol Cell Biol, 5, 855-861; Zink D. et al., 2003, Methods, 29, 42-50)。これらの用途は、細胞に比較的長期間に渡って損傷を与えることなく光を照射可能であることによるものである。しかしながら、細胞生物学で用いられる殆どの従来からの細胞透過性DNA結合性色素(DAPI、Hoechst 33342又は33258)では、スペクトルの紫外線部分(UV、200-400nm)での光を用いた照射が必要とされる。この波長では、とりわけフリーラジカルの形成とDNA及び/又はDNA関連タンパク質内の架橋が原因となって、多くの光損傷が生じてしまう(Alexander, P. et al., 1962, Nature, 194, 882-883; Pfeiffer, G. P. et al., 2005, Mutat Res, 571, 19-31)。これらの現象により、DNAの複製に障害が生じ、そして/又は有糸分裂への進入(Palitti, F., 2004, Cytogenet Genome Res, 104, 95-99)と完了にも障害が起こる。これにより、最終的には細胞はその周期が停止して死滅することになる(Kulms, D. et al., 2002, Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 15, 342-347)。エチジウムブロマイドとヨウ化プロビジウムは、両方ともUVの波長より長い波長で励起できる。しかしながら、臭化プロビジウムは、細胞内へ透過せず、エチジウムブロマイドは、非常に限られた範囲でしか生きた哺乳動物細胞のDNAにインターカレートしない(Tramier, M., et al., 2000, Biophys J, 78, 2614-2627)。従って、生細胞ビデオ顕微鏡観察と細胞ソーティング用の新たな蛍光DNAプローブであって：(i)細胞膜透過性で非毒性であり；(ii)UV波長よりも長い波長で励起され；そして/又は(iii)長時間の照射に渡り安定性を示す、蛍光DNAプローブを開発する必要がある。

【0003】

本発明者らは、dsDNA結合性の細胞透過性蛍光色素特性を示すジベンゾ[c,h]

[1 , 5] ナフチリジン誘導体を発見した。これらは、*in vivo*での実験でDNAを可視化するために非常に魅力的な試薬である。

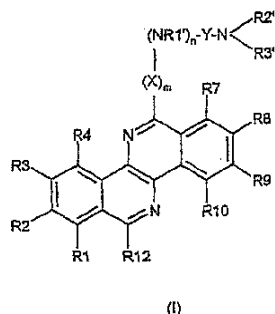
【発明の開示】

【 0 0 0 4 】

第一の目的によれば、本発明は、以下の一般式 (I) に示す誘導体に関する：

【 0 0 0 5 】

【化 1】



10

【 0 0 0 6 】

式中、R 1、R 3、R 4、R 7、R 9 及び R 10 は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H；随意に - NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R 1 = R 3 = R 4 = R 7 = R 9 = R 10 = H であり；

20

R 2 = H；O - アルキル；(C 2 - C 10) アルキルが、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換された O (C 2 - C 10) アルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃であり；好ましくは、H 若しくは - O - アルキルであり；より好ましくは O - アルキルであり；

R 1' = H；アルキル又は (C 2 - C 10) アルキルが - NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換された (C 2 - C 10) アルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃であり；好ましくは、H であり；

30

n = 0 若しくは 1；好ましくは n = 1 であり；

X = 直鎖状アルキル；

m = 0 若しくは 1；好ましくは m = 0 であり；

Y = 直鎖状アルキルであり；好ましくは、3 個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

R 2' と R 3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H；アルキル又は (C 2 - C 10) アルキルが、- OH、- NRR'、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換された (C 2 - C 10) アルキルから選択され；好ましくは、R 2' と R 3' は、同時に H ではなく；より好ましくは、R 2' と R 3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立して H；随意に 1 つ以上の OH で置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R 2' = R 3' = アルキルであり；

40

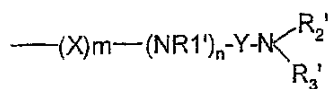
R 8 = H；O - アルキル；(C 2 - C 10) アルキルが、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換された O (C 2 - C 10) アルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃であり；好ましくは、H、- O - アルキルであり；より好ましくは、O - アルキルであり；最も好ましくは、O - メチルであり；

R 12 = H；随意に、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の 1 若しくは 2 つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【 0 0 0 7 】

50

【化2】



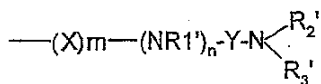
【0008】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R¹² = H、アルキル若しくは

10

【0009】

【化3】



【0010】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R¹² = アルキルであり；

20

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は-NR^{1'}、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂-C₁₀)アルキルを表し；好ましくは、R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、H若しくはアルキルである；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマーであるが、R¹ = R³ = R⁴ = R⁷ = R⁹ = R¹⁰ = H、m = 0、n = 1、R^{1'} = H、R^{2'} = R^{3'} = メチル、R²、R⁸が独立してH又はO-メチルを表し、R¹² = H又はメチルであり、そしてY = -(CH₂)₂ - 又は -(CH₂)₃ - である化合物は除かれる。

【0011】

30

より詳細には、本発明の化合物は、以下から選択される：

- N' - ジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物2)、

- 2 - [2 - (ジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イルアミノ)エチルアミノ]エタノール (化合物3)、

- N' - ジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 2 - ジアミン (化合物5)、

- N' - ジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物6)、

- N' - ジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール (化合物7)、

40

- N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物8)、

- N6, N12 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物9)、

- N6, N12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物10)、

- N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ[c, h][1, 5]ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物11)、

- N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ[c

50

、h][1,5]ナフチリジン-6,12-ジアミン(化合物14)、
又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、
又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー。

【0012】

以上又は以下の記載で用いる場合：

「アルキル」とは、その鎖内に1ないし20個の炭素原子を有する直鎖又は分枝鎖であってもよい脂肪族炭化水素基である。好ましくは、アルキル基は、その鎖内に1ないし12個の炭素原子を有する。分枝鎖とは、1個以上の低級アルキル基、例えば、メチル、エチル又はプロピルが直鎖状アルキル鎖に結合していることを意味する。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、3-ペンチル、オクチル、ノニル、デシルが含まれる。

10

【0013】

「ハロゲン原子」は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素原子を指し；好ましくは、フッ素及び塩素原子である。

【0014】

「アルキル」は、2つの水素元素を取り除くことで形成する、対応する「アルキレン」、例えば、メチレン等も指す。

【0015】

本明細書で用いる場合、「許容可能」という用語は、確かな医学的判断の範囲において、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、又はその他の妥当な利点/リスク比に見合う他の問題となる合併症を伴うことなく、ヒト及び動物の組織との接触に適した化合物、物質、組成物又は剤形を指す。

20

【0016】

本明細書で用いる場合、「許容可能な塩」は、開示される化合物の誘導体であって、親化合物を、その酸塩又は塩基塩を作ることにより改変した誘導体を指す。医薬的に許容可能な塩には、例えば、非毒性の無機酸又は有機酸から形成された親化合物の従来の非毒性の塩又は4級アンモニウム塩が含まれる。例えば、このような従来の非毒性塩には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸等の無機酸から誘導された塩；及び酢酸、プロピオン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、トルエンスルホン酸、シュウ酸、フマル酸、マレイン酸等から誘導される塩が含まれる。更なる添加塩としては、トロメタミン、メグルミン、エボラミン等のアンモニウム塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、亜鉛又はマグネシウム等の金属塩が含まれる。

30

【0017】

本発明の許容可能な塩は、塩基性又は酸性部分を含む親化合物から従来の化学的方法により合成することができる。一般的に、このような塩は、遊離酸型又は遊離塩基型にあるこれらの化合物を、水若しくは有機溶媒中で、又はこれら2つの混合物中で化学量論量の適切な塩基又は酸と反応させることで調製可能である。一般的に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノール又はアセトニトリル等の非水性媒体が好ましい。適切な塩のリストは、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(第17版, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985年)の1418頁に見出される(この参考文献の開示は、参照により本明細書に援用される)。

40

【0018】

幾何異性体及び立体異性体を有する一般式(I)に示す化合物も、本発明に含まれる。

【0019】

更なる目的において、本発明は、一般式(I)に示す化合物の調製方法に関する。

【0020】

本発明の化合物と方法は、当業者に知られる数多くの方法で調製可能である。例えば、化合物は、当業者に理解されるように、以下に記載する方法、又はその変更を加えた方法

50

を応用又は適用することにより合成できる。適切な変更や置換は、当業者にとって、直ちに明確となってよく理解されるか、又は科学論文から直ちに入手可能となるであろう。

【0021】

特に、このような方法は、R. C. Larock 著「Comprehensive Organic Transformations」(VCH publishers, 1989年)に見出すことができる。

【0022】

より詳細には、本発明の化合物は、Bisagni et al (1996) Tetrahedron 53, 10427-10440に開示される方法を応用又は適用することにより調製可能である。

10

【0023】

本発明の化合物は、1又は2つ以上の非対称的に置換された炭素原子を含んでいてもよく、光学活性型又はラセミ型で単離されてもよいことが理解されるであろう。従って、具体的な立体化学又は異性型が特に示されていない場合には、構造物の全てのキラル、ジアステレオマー、ラセミ型及び全ての幾何異性型が意図されている。当該技術分野においては、このような光学活性型の調製及び単離方法はよく知られている。例えば、立体異性体の混合物は、ラセミ型の分割、通常、逆相及びキラルクロマトグラフィー、選択的な塩形成、再結晶等を含む標準的な技術、又はキラル活性を示す出発物質からのキラル合成又は標的キラル中心の慎重な合成により分離できるが、これらに限定されるわけではない。

【0024】

本発明の化合物は、様々な合成経路により調製可能である。試薬と出発物質は、市販されているか、当業者によく知られる方法により直ちに合成される。他に表示がない限り、全ての置換基は、先行技術に定義される通りである。

20

【0025】

以下に記載する反応では、例えば、ヒドロキシ、アミノ、イミノ、チオ又はカルボキシ基のような反応性の高い官能基が最終生成物に残っていることを望む場合には、反応におけるこれらの不所望の沈澱を回避するため、これらの官能基を保護することが必要な場合もある。従来からの保護基を標準的な実施に従って用いてもよい(例として、T. W. Greene and P. G. M. Wuts in Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley and Sons, 1991; J. F. W. McOmie in Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973を参照)。

30

【0026】

反応によっては、塩基の存在下で行うことができる。この反応に用いる塩基の特性については、その分子の他の部分に悪影響しない限りにおいて、特に制限がなく、このような種類の反応に従来から用いられてきたいずれの塩基も、ここで同様に用いることができる。適切な塩基の例には、以下が含まれる：水酸化ナトリウム、炭酸カリウム、トリエチルアミン、水素化ナトリウム及び水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物；メチルチリウム及びブチルリチウム等のアルカリリチウム化合物；並びにナトリウムメトキシド及びナトリウムエトキシド等のアルカリ金属アルコキシド。

40

【0027】

通常は、反応は、適切な溶媒中で行われる。反応又はこれに含まれる試薬に対して悪影響を与えない限り、種々の溶媒を用いることができる。適切な溶媒の例には、以下が含まれる：例えば、ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン及びキシレン等の芳香族、脂肪族又は脂環式炭化水素であってもよい炭化水素；ジメチルホルムアミド等のアミド；エタノール及びメタノール等のアルコール並びにジエチルエーテル及びテトラヒドロフラン等のエーテル。

【0028】

反応は、広範囲な温度で行うことができる。通常においては、本発明者らは、0 ない

50

し 150 の温度で反応を行うことが都合がよいことを見出している（より好ましくは、室温ないし 100 前後）。反応に必要な時間についても、多くの要因、特に反応温度と試薬の特性に応じて、大きく変化する場合がある。しかしながら、反応が、上で述べた好ましい条件下で行われる場合には、通常は 3 時間ないし 20 時間の時間で十分であろう。

【0029】

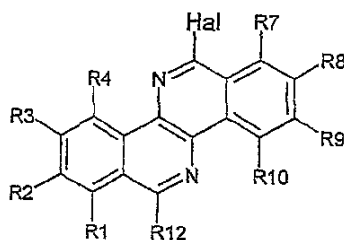
このように調製された化合物は、従来の手法により反応混合物から回収できる。例えば、化合物は、反応混合物から溶媒を蒸留除去することにより回収可能であり、必要とあらば、反応混合物から溶媒を蒸留除去した後に残渣を水に注入し、その後、非水混和性有機溶媒で抽出してその抽出物から溶媒を蒸留により除去することもできる。上記に加え、所望の場合には、生成物は、再結晶、再沈又は種々のクロマトグラフィー技術、特にカラムクロマトグラフィー若しくは調製薄層クロマトグラフィーといったよく知られる種々の技術により、更に精製することができる。

【0030】

本発明の方法の一局面によれば、一般式 (I) に示す化合物であって、式中、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である化合物は、一般式 (II) に示す対応化合物：

【0031】

【化 4】



(II)

【0032】

を下記の一般式 (II') に示す対応化合物と反応させることにより得ることができる：

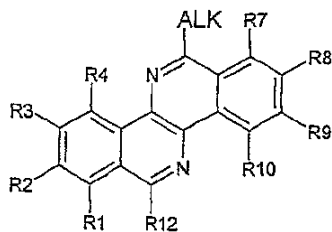
$\text{NHR}1' - \text{Y} - \text{NR}2' \text{R}3' \text{ (II')}$
 式中、 $\text{R}1 \sim \text{D}12$ 、 $\text{R}1' \sim \text{R}3'$ 及び Y は、一般式 (I) と同様に定義され、Hal は、塩素等のハロゲン原子を表す。

【0033】

本発明の方法の更なる局面によれば、一般式 (I) に示す化合物であって、式中、 $m = 1$ である化合物は、一般式 (III) に示す対応化合物：

【0034】

【化 5】



(III)

【0035】

を酸化して、その後、下記の一般式 (I I I ') に示す対応化合物を用いて還元的にアミノ化することにより得ることができる：



式中、R1 ~ D12、R1' ~ R3' 及び Y は、一般式 (I) と同様に定義され、ALK は、アルキル基を表す。

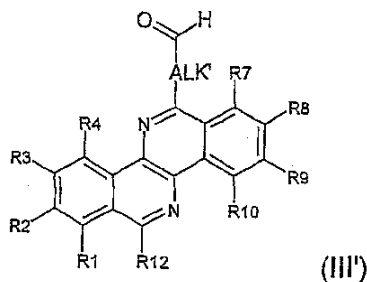
【0036】

一般的に、酸化工程は、SeO₂又はその同等物を用いて行われる。

還元的アミノ化は、ワンポット (one - pot) で、又は下記の化合物 (I I I ' ') を中間単離した後に行ってもよい。

【0037】

【化6】



【0038】

式中、R1 ~ D12 は、一般式 (I) と同様に定義され、ALK' は、ALK に対応する前駆体を表す。

【0039】

一般式 (I I) 及び (I I ')、(I I I) 及び (I I I ') に示す化合物は、Bisagnetteal に教示される方法を応用又は適用することにより入手可能であり、そして / 又は市販されている可能性もある。

【0040】

更にまた、本発明の方法には、一般式 (I) に示す化合物を単離する追加の工程が含まれていてもよい。この工程は、当業者であれば、既知の従来手段、例えば、上記の回収方法等により行うことが可能である。

【0041】

「核酸分子」は、リン酸エステルポリマー型のリボヌクレオシド (アデノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン；「RNA 分子」) 又はデオキシリボヌクレオシド (デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン又はデオキシシチジン；「DNA 分子」)、又はこれらのリン酸エステル類似体、例えば、ホスホロチオエート及びチオエステル等を指し、これらは 1 本鎖型又は 2 本鎖若しくは 3 本以上の鎖から成るヘリックスであってもよい。DNA - DNA、DNA - RNA 及び RNA - RNA の 2 本鎖ヘリックスも可能である。核酸分子、特に DNA 又は RNA 分子という用語は、これら分子の 1 次構造及び 2 次構造のみを指しており、いずれかの特定の 3 次構造にある分子に限定するものではない。従って、この用語には、2 本鎖 DNA に関連する物質、とりわけ、直鎖状 DNA (例えば、制限酵素処理断片) 又は環状 DNA 分子、プラスミド及び染色体が含まれる。特定の 2 本鎖 DNA 分子の構造について議論する際には、配列は、DNA の非転写鎖 (即ち、mRNA と相同的な配列を有する鎖) の 5' から 3' の方向にある配列のみを提示する、通常の慣習に従った記載が認められる。

【0042】

更なる目的によれば、本発明は、以下の一般式 (I) に示す化合物：

【0043】

10

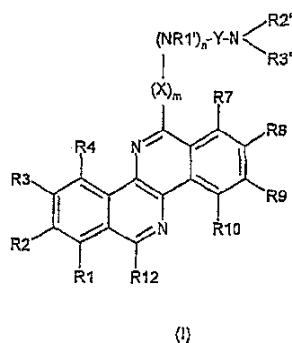
20

30

40

50

【化 7】



10

【0044】

式中、 R_1 、 R_3 、 R_4 、 R_7 、 R_9 及び R_{10} は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に $-NRR'$ 、 $-OH$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子； $-NRR'$ ； $-OH$ ；O-アルキル； CF_3 から選択され；好ましくは、 $R_1 = R_3 = R_4 = R_7 = R_9 = R_{10} = H$ であり；

$R_2 = H$ ；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、 $-NRR'$ 、 $-OH$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子； $-NRR'$ ； $-OH$ ；O-アルキル； CF_3 であり；好ましくは、H若しくはO-アルキルであり；より好ましくはO-アルキルであり；

20

$R_{1'} = H$ ；アルキル又は(C2-C10)アルキルが $-NRR'$ 、 $-OH$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子； $-NRR'$ ； $-OH$ ；O-アルキル； CF_3 であり；好ましくは、Hであり；

$n = 0$ 若しくは1；好ましくは $n = 1$ であり；

X = 直鎖状アルキル；

$m = 0$ 若しくは1；好ましくは $m = 0$ であり；

Y = 直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

30

【0045】

R_2' と R_3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2-C10)アルキルが、 $-OH$ 、 $-NRR'$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキルから選択され；好ましくは、 R_2' と R_3' は、同時にHではなく；より好ましくは、 R_2' と R_3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、 $R_2' = R_3' = \text{アルキル}$ であり；

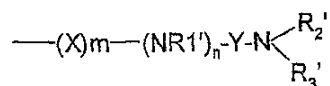
$R_8 = H$ ；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、 $-NRR'$ 、 $-OH$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子； $-NRR'$ ； $-OH$ ；O-アルキル； CF_3 であり；好ましくは、H、O-アルキルであり；より好ましくは、O-アルキルであり；最も好ましくは、O-メチルであり；

40

$R_{12} = H$ ；随意に、 $-NRR'$ 、 $-OH$ 、O-アルキル、 CF_3 の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【0046】

【化 8】

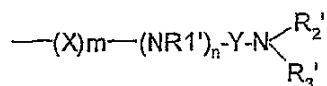


【 0 0 4 7 】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R^{1 2} = H、アルキル若しくは

【 0 0 4 8 】

【化 9】



【 0 0 4 9 】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R^{1 2} = アルキルであり；

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は-NR^{1'}、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂-C₁₀)アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、のDNAプローブとしての使用に関する。

【 0 0 5 0 】

本発明の前記使用のための化合物は、以下から選択できる：

- N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 1)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 2)、

- N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール (化合物 3)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 4)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 5)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 2 - ジアミン (化合物 6)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール (化合物 7)、

- N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 8)、

- N 6, N 12 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 9)、

- N 6, N 12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 10)、

- N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 11)、

- N' - (2 , 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 12) 、
 - N' - (2 , 8 - ジメトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 13) 、
 - N , N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2 , 8 - ジメトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 12 - ジアミン (化合物 14) 、
 又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー。

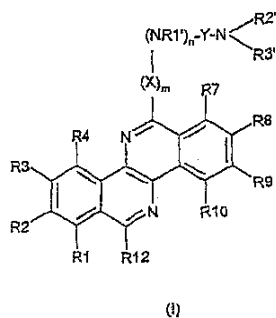
【 0051 】

更なる目的によれば、本発明は、以下の一般式 (I) に示す化合物：

10

【 0052 】

【 化 10 】



20

【 0053 】

式中、R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に - NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R1 = R3 = R4 = R7 = R9 = R10 = Hであり；

R2 = H；O - アルキル；(C2 - C10)アルキルが、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2 - C10)アルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃であり；好ましくは、H若しくはO - アルキルであり；より好ましくはO - アルキルであり；

30

R1' = H；アルキル又は(C2 - C10)アルキルが- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2 - C10)アルキル；ハロゲン原子；- NRR'；- OH；O - アルキル；CF₃であり；好ましくは、Hであり；

n = 0若しくは1；好ましくはn = 1であり；

X = 直鎖状アルキル；

m = 0若しくは1；好ましくはm = 0であり；

Y = 直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

40

【 0054 】

R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2 - C10)アルキルが、- OH、- NRR'、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2 - C10)アルキルから選択され；好ましくは、R2'とR3'は、同時にHではなく；より好ましくは、R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R2' = R3' = アルキルであり；

R8 = H；O - アルキル；(C2 - C10)アルキルが、- NRR'、- OH、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2 - C10)アルキル；ハロゲ

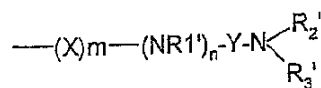
50

ン原子； - N R R ' ； - O H ； O - アルキル； C F₃であり；好ましくは、H、 - O - アルキルであり；より好ましくは、O - アルキルであり；最も好ましくは、O - メチルであり；

R 1 2 = H ； 随意に、 - N R R ' 、 - O H 、 O - アルキル、 C F₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【 0 0 5 5 】

【 化 1 1 】

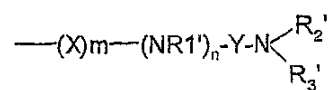


10

【 0 0 5 6 】

であり、ここで、X、R 1 '、R 2 '、R 3 '、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R 1 2 = H、アルキル若しくは

【 化 1 2 】



20

であり、ここで、X、R 1 '、R 2 '、R 3 '、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R 1 2 = アルキルであり；

R、R ' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は - N R R '、 - O H、O - アルキル、C F₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C 2 - C 1 0)アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、のDNAプローブの調製のための使用にも関する。

【 0 0 5 7 】

30

本発明の前記使用のための化合物は、以下から選択できる：

- N ' - (2 , 8 - ジメトキシ - 1 2 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 1)、

- N ' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジエチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 2)、

- N ' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール (化合物 3)、

- N ' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 4)、

- N ' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジメチルエタン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 5)、

40

- N ' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 2 - ジアミン (化合物 6)、

- N ' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1 , 3 - ジオール (化合物 7)、

- N ' - (2 - メトキシ - 1 2 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 8)、

- N 6 , N 1 2 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 , 1 2 - ジアミン (化合物 9)、

- N 6 , N 1 2 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c

50

、h][1,5]ナフチリジン-6,12-ジアミン(化合物10)、
 -N,N'-ビス-(3-ジメチルアミノプロピル)-2,8-ジメトキシジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6,12-ジアミン(化合物11)、
 -N'-(2,8-ジメトキシ-12-メチルジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イル)-N,N-ジメチルエタン-1,3-ジアミン(化合物12)、
 -N'-(2,8-ジメトキシジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イル)-N,N-ジメチルエタン-1,3-ジアミン(化合物13)、
 -N,N'-ビス-(3-ジメチルアミノエチル)-2,8-ジメトキシジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6,12-ジアミン(化合物14)、
 又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー。

10

【0058】

好ましい局面では、一般式(I)に示す化合物は、選択的なDNAプローブである。

更なる局面では、一般式(I)に示す化合物は、DNA蛍光染色プローブであり、より好ましくは、光活性化性(photoactivable)プローブである。

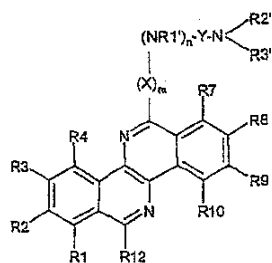
【0059】

本発明は、更に、以下の一般式(I)に示す化合物：

【0060】

【化13】

20



(I)

30

【0061】

式中、R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R1=R3=R4=R7=R9=R10=Hであり；

R2=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H若しくは-O-アルキルであり；より好ましくはO-アルキルであり；

40

R1'=H；アルキル又は(C2-C10)アルキルが-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、Hであり；

n=0若しくは1；好ましくはn=1であり；

X=直鎖状アルキル；

m=0若しくは1；好ましくはm=0であり；

Y=直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

【0062】

R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(

50

(C 2 - C 1 0) アルキルが、- O H、- N R R'、O - アルキル、C F₃の1若しくは2つ以上で置換された(C 2 - C 1 0) アルキルから選択され；好ましくは、R 2' と R 3' は、同時にHではなく；より好ましくは、R 2' と R 3' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R 2' = R 3' = アルキルであり；

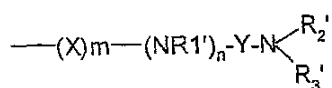
R 8 = H；O - アルキル；(C 2 - C 1 0) アルキルが、- N R R'、- O H、O - アルキル、C F₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C 2 - C 1 0) アルキル；ハロゲン原子；- N R R'；- O H；O - アルキル；C F₃であり；好ましくは、H、- O - アルキルであり；より好ましくは、O - アルキルであり；最も好ましくは、O - メチルであり；

10

R 1 2 = H；随意に、- N R R'、- O H、O - アルキル、C F₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【0063】

【化14】



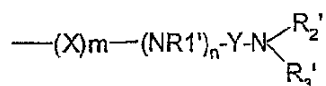
20

【0064】

であり、ここで、X、R 1'、R 2'、R 3'、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R 1 2 = H、アルキル若しくは

【0065】

【化15】



30

【0066】

であり、ここで、X、R 1'、R 2'、R 3'、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R 1 2 = アルキルであり；

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は- N R R'、- O H、O - アルキル、C F₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C 2 - C 1 0) アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、の試験サンプル中のDNAを検出するための使用にも関する。

40

【0067】

実際に、本発明の誘導体は選択的なDNA色素である。詳細には、これらは、RNA又はその他の細胞構成物、例えば、ミトコンドリアやタンパク質等よりもDNAに対する選択性を示す。

【0068】

これらのDNA色素はDNAと非共有結合により複合体を形成することが可能であり、DNA - 色素複合体の形成の後に蛍光シグナルの増加を示す。

【0069】

従って、本発明は、一般式(I)に示す誘導体の少なくとも1つがDNA分子と非共有結合的に結合した複合体にも関する。

50

【 0 0 7 0 】

前記DNA分子は、2本鎖DNA (dsDNA) 若しくはより多くの鎖から成るDNAヘリックス、又はDNA-RNA混合ヘリックスであってもよい。好ましくは、前記DNA分子はdsDNAである。

【 0 0 7 1 】

本発明の化合物は、膜透過性である。従って、これらの化合物を用いることで、例えば、組織、細胞、細胞小器官内のDNAをプローブするため等、細胞内でDNAを探索したり、又は、例えば、細胞溶解物中若しくは増幅混合物中のDNAを探索するため等、細胞外でDNAを探索することができる。従って、DNA分子は、例えば、染色体、プラスミド、環状DNA分子、オリゴヌクレオチドの形態にある核内ゲノムDNAであってもよく、又はこれらの断片、例えば、制限酵素処理断片等であってもよい。

10

【 0 0 7 2 】

ある態様では、前記試験サンプルは、生物サンプルであり、即ち、前記DNAは、生物由来のものである。

【 0 0 7 3 】

「サンプル」という用語は、本明細書で用いる場合、核酸、特にDNAを含む可能性のある、あらゆる生物由来の物質を包含する、あらゆる物質を指す。サンプルには、希釈剤、緩衝剤、界面活性剤、及び混入種 (contaminating species)、例えば、標的DNA分子と混合した状態で見い出されるであろうタンパク質又は細胞又は組織のデブリが含まれる場合もある。サンプルは、in vitroでDNAを単離するための当該技術分野でよく知られる方法及び半固体若しくは溶液系検出アッセイ、又は生細胞若しくは固定細胞におけるin vivo及び/又は細胞内でのDNA検出により調製可能である。

20

【 0 0 7 4 】

生体サンプルの例には、尿、血清、血液、血漿、脳脊髄液、唾液、涙液、バイオブシー等により入手可能な組織、粘液又は細胞若しくは微生物が含まれる。詳細には、サンプルは、随意に、バッファー、抽出溶液、溶媒等の液体物質中で培養、分解又は懸濁された細胞であってもよい。細胞は、これらに限定されるものではないが、細菌、酵母、菌類等の原核細胞、そして初代細胞培養系と不死化セルラインを含む植物細胞及び動物細胞等の真核細胞を含む。

30

【 0 0 7 5 】

サンプルは、例えば、固体又は半固体の支持体上に固相化された組織又は細胞であってもよい。詳細には、一般式 (I) に示す化合物は、従来の組織化学的又は細胞化学的手法により固定及び処理された細胞内でDNA色素として用いることができる。代表的な固体支持体には、アレイ (特にマイクロアレイ)、マイクロタイタープレート、ニトロセルロースメンブレン等のプロットティングメンブレン、ビーズ又はスライドが含まれる。半固体支持体は、例えば、ポリマーゲル、又は細胞の培養又は懸濁に使用可能なアガー、アガロース、メチルセルロースであってもよい。

【 0 0 7 6 】

更に、サンプルは、随意に細胞デブリから分離されていてもよい細胞溶解物であってもよく、この細胞溶解物は、バッファー、抽出溶液、溶媒等の液体物質中に溶解又は懸濁されたものであってもよい。

40

また、前記DNAは合成DNAであってもよい。合成DNAは、既に、例えば、RNAマトリックスの逆転写 (RT)、RT-PCR、若しくはDNAマトリックスのPCR、又は当該技術分野で知られる他のいずれかの核酸増幅方法によって人工的に調製されている。従って、試験サンプルには、例えば、PCR反応混合物のようなDNAが添加された材料、電気泳動用マトリックスとして典型的に使用される (ポリ) アクリルアミドゲル又はアガロースゲル等のゲル、又はDNAを含有する緩衝溶液が含まれる場合がある。従って、検出すべきDNA分子、即ち、誘導体/DNA複合体は、電気泳動用マトリックス又はポリマーゲル中に存在する場合がある。

50

【 0 0 7 7 】

従って、試験サンプルは、尿、血清、血液、血漿、脳脊髄液、唾液、涙液、粘液、随意に固定若しくは固相化されていてもよい組織、随意に固定若しくは固相化されていてもよい真核細胞若しくは原核細胞、細胞溶解物、微生物、電気泳動用マトリックス若しくはポリマーゲル、又はPCR反応混合物等の緩衝溶液から成る群から選択することができる。

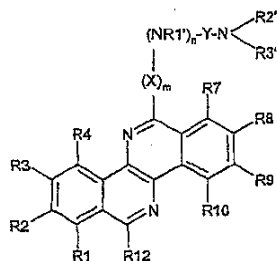
【 0 0 7 8 】

本発明は、

a) 試験サンプルを一般式 (I) に示す誘導体：

【 0 0 7 9 】

【 化 1 6 】



(I)

【 0 0 8 0 】

式中、R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R1=R3=R4=R7=R9=R10=Hであり；

R2=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H若しくは-O-アルキルであり；より好ましくはO-アルキルであり；

R1'=H；アルキル又は(C2-C10)アルキルが-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、Hであり；

n=0若しくは1；好ましくはn=1であり；

X=直鎖状アルキル；

m=0若しくは1；好ましくはm=0であり；

Y=直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

【 0 0 8 1 】

R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2-C10)アルキルが、-OH、-NRR'、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキルから選択され；好ましくは、R2'とR3'は、同時にHではなく；より好ましくは、R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R2'=R3'=アルキルであり；

R8=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H、-O-ア

10

20

30

40

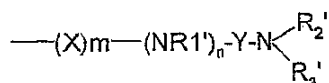
50

ルキルであり；より好ましくは、O - アルキルであり；最も好ましくは、O - メチルであり；

R 1 2 = H；随意に、- N R R'、- O H、O - アルキル、C F 3 の 1 若しくは 2 つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【 0 0 8 2 】

【 化 1 7 】



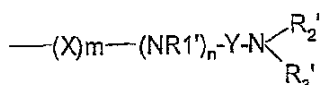
10

【 0 0 8 3 】

であり、ここで、X、R 1'、R 2'、R 3'、Y、m、n は上記と同様に定義され；好ましくは、R 1 2 = H、アルキル若しくは

【 0 0 8 4 】

【 化 1 8 】



20

【 0 0 8 5 】

であり、ここで、X、R 1'、R 2'、R 3'、Y、m、n は上記と同様に定義され；より好ましくは、R 1 2 = アルキルであり；

R、R' は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は - N R R'、- O H、O - アルキル、C F 3 の 1 若しくは 2 つ以上で置換されている (C 2 - C 10) アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、と接触させること；

30

【 0 0 8 6 】

b) 前記試験サンプルと前記一般式 (I) に示す誘導体との接触により得られる混合物を、一定の時間、前記一般式 (I) に示す誘導体が、前記試験サンプル中に存在するであろう DNA と複合体を形成するのに十分な条件下でインキュベートすること；

【 0 0 8 7 】

c) 前記混合物を適切な波長で照射し、そして前記照射された混合物から放出される光を観察することによって前記 DNA を検出すること

から成る工程を含む、試験サンプル中の DNA を *in vivo* 及び / 又は *in vitro* で検出するための方法、にも関する。

40

【 0 0 8 8 】

一般式 (I) に示す誘導体は、「標識用溶液」の形態にある試験サンプルと接触させてもよい。このような標識用溶液には、典型的には、水等の水性溶媒、リン酸緩衝食塩水 (P B S) 等の緩衝溶液、又はジメチルスルホキシド (D M S O)、ジメチルホルムアミド (D M F)、メタノール、エタノール若しくはアセトニトリル等の有機溶媒であってもよい適切な「標識溶媒」に溶解した一般式 (I) に示す誘導体が含まれており、随意に界面活性剤及び / 又は安定化剤が存在していてもよい。適切な界面活性剤の例には、S D S、T w e e n 20、C H A P S 又は T r i t o n - X が含まれる。界面活性剤は、典型的には、約 0 . 1 % ないし約 0 . 5 % (w / v) の濃度で水溶液中に存在する。

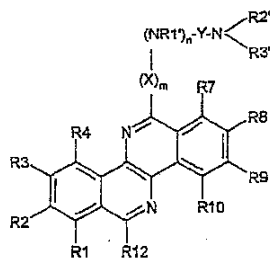
【 0 0 8 9 】

50

更なる目的によれば、本発明は、一般式 (I) に示す化合物：

【0090】

【化19】



(I)

10

【0091】

式中、R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R1=R3=R4=R7=R9=R10=Hであり；

20

R2=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H若しくは-O-アルキルであり；より好ましくはO-アルキルであり；

R1'=H；アルキル又は(C2-C10)アルキルが-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、Hであり；
n=0若しくは1；好ましくはn=1であり；

X=直鎖状アルキル；

m=0若しくは1；好ましくはm=0であり；

30

Y=直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

【0092】

R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2-C10)アルキルが、-OH、-NRR'、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキルから選択され；好ましくは、R2'とR3'は、同時にHではなく；より好ましくは、R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R2'=R3'=アルキルであり；

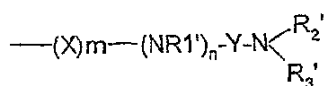
R8=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H、-O-アルキルであり；より好ましくは、O-アルキルであり；最も好ましくは、O-メチルであり；

40

R12=H；随意に、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【0093】

【化 2 0】

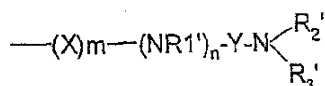


【0094】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R^{1 2} = H、アルキル若しくは

【0095】

【化 2 1】



【0096】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R^{1 2} = アルキルであり；

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は - NR^{1'}、- OH、O - アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂ - C₁₀)アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、を適切な標識溶媒中に含むDNA標識用溶液に関する。

【0097】

当業者であれば、DNA検出を容易化するために、直ちに照射と混合物からの放出光の観察に適切な励起波長又は放出波長を決定できる。これらの波長は、複合体の蛍光特性に依存する。典型的には、励起は、色素/核酸複合体の極大吸光波長又はその前後の光を生じる光源を用いて行われる。好ましくは、照射は、サンプルを400ないし450nmからなる波長、好ましくは435nmの波長で照射することにより行う。

【0098】

更なる好ましい局面では、放出光は、5秒間ないし1分間、好ましくは10ないし20秒間からなる反応潜伏時間の後に観察することができるが、正確な時間は、種々の要因、例えば、以下に限定される訳ではないが、細胞の種類、培地中の本発明の化合物の濃度、照射/観察前の本発明の化合物への細胞の曝露時間、顕微鏡の電球の強さ、蛍光フィルターの特性、使用する対物レンズの特性等に依存するであろう。好ましくは、放出光は、470ないし490nm、好ましくは484nmからなる波長を有するが、正確な極大値は、種々の要因、例えば、以下に限定される訳ではないが、励起波長等に依存するであろう。

【0099】

好ましくは、励起波長は、400ないし450nm、より好ましくは435nmからなり、放出波長は、470ないし490nm、より好ましくは484nmからなる。

【0100】

放出光は、CCDカメラ、蛍光光度計、プレートリーダー、蛍光顕微鏡を含む、いずれかの適切な手段により検出できる。放出光は、更に、サンプルの一部をその蛍光反応性によってソーティング可能なフローサイトメーターを用いて検出することもできる。

【0101】

更なる局面では、DNAの検出方法は、定量的であり、DNAの定量化を可能にするものであり、即ち、放出光が、試験サンプル中のDNAと相関性を有する。放出光とDNA

10

20

30

40

50

量とを相関させることは、既知のDNA含有量を有するコントロールサンプル（又はコントロールサンプルの希釈物）から放出される光の比較を行うことで可能である。このことは、例えば、リアルタイムPCR等のリアルタイム増幅方法に有用であろう。

【0102】

更なる目的によれば、本発明は、本発明によりDNAを標識する定量的方法によりDNA量を定量することを含む、試験細胞の細胞周期段階を決定する方法に関する。

【0103】

本発明の前記使用のための化合物は、以下から選択できる：

- N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 1)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 2)、

- N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール (化合物 3)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 4)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 5)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 2 - ジアミン (化合物 6)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール (化合物 7)、

- N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 8)、

- N6, N12 - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 9)、

- N6, N12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 10)、

- N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 11)、

- N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 12)、

- N' - (2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 13)、

- N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 14)、

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー。

【0104】

更なる目的では、本発明は、

- 上記に定義される標識用溶媒、及び

- 下記の一般式 (I) に示す化合物：

【0105】

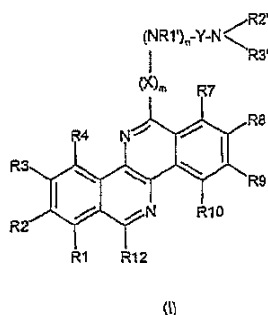
10

20

30

40

【化 2 2】



10

【0106】

式中、R1、R3、R4、R7、R9及びR10は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃から選択され；好ましくは、R1=R3=R4=R7=R9=R10=Hであり；

R2=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H若しくは-O-アルキルであり；より好ましくはO-アルキルであり；

20

R1'=H；アルキル又は(C2-C10)アルキルが-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、Hであり；

n=0若しくは1；好ましくはn=1であり；

X=直鎖状アルキル；

m=0若しくは1；好ましくはm=0であり；

Y=直鎖状アルキルであり；好ましくは、3個以上の炭素原子を含む直鎖状アルキルであり；

30

【0107】

R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；アルキル又は(C2-C10)アルキルが、-OH、-NRR'、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換された(C2-C10)アルキルから選択され；好ましくは、R2'とR3'は、同時にHではなく；より好ましくは、R2'とR3'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH；随意に1つ以上のOHで置換されていてもよいアルキルから選択され；最も好ましくは、R2'=R3'=アルキルであり；

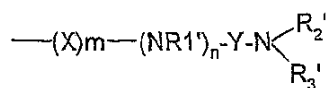
R8=H；O-アルキル；(C2-C10)アルキルが、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されたO(C2-C10)アルキル；ハロゲン原子；-NRR'；-OH；O-アルキル；CF₃であり；好ましくは、H、-O-アルキルであり；より好ましくは、O-アルキルであり；最も好ましくは、O-メチルであり；

40

R12=H；随意に、-NRR'、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されていてもよいアルキル；

【0108】

【化 2 3】



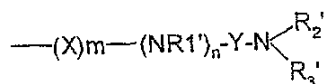
【0109】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；好ましくは、R^{1 2} = H、アルキル若しくは

10

【0110】

【化 2 4】



【0111】

であり、ここで、X、R^{1'}、R^{2'}、R^{3'}、Y、m、nは上記と同様に定義され；より好ましくは、R^{1 2} = アルキルであり；

20

R、R'は、同一であるか若しくは異なっており、独立してH、アルキル、又は-NR^{1'}、-OH、O-アルキル、CF₃の1若しくは2つ以上で置換されている(C₂-C₁₀)アルキルを表す；

又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー、を含むDNAの標識用キットに関する。

【0112】

当業者であれば、前記キットには、適切な使用説明書と、前記キットが使用されるアクセプトプロトコルに応じた試薬が含まれるであろうことを直ちに理解するであろう。しかしながら、前記キットには、随意にサンプル調製用試薬、緩衝剤又はDNAスタンダードが更に含まれていてもよい。

30

【0113】

本発明の前記使用のための化合物は、以下から選択できる：

- N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 1)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジエチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 2)、

- N' - 2 - [2 - (ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルアミノ) エチルアミノ] エタノール (化合物 3)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 4)、

40

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 5)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N, N - ジメチルプロパン - 1, 2 - ジアミン (化合物 6)、

- N' - ジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イルメチルアミノ - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール (化合物 7)、

- N' - (2 - メトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルプロパン - 1, 3 - ジアミン (化合物 8)、

- N₆, N₁₂ - ビス - (2 - ジメチルアミノエチル) - 2 - メトキシジベンゾ [c,

50

h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 9)、
 - N 6, N 12 - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2 - メトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 10)、
 - N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 11)、
 - N' - (2, 8 - ジメトキシ - 12 - メチルジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 12)、
 - N' - (2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6 - イル) - N, N - ジメチルエタン - 1, 3 - ジアミン (化合物 13)、
 - N, N' - ビス - (3 - ジメチルアミノエチル) - 2, 8 - ジメトキシジベンゾ [c, h] [1, 5] ナフチリジン - 6, 12 - ジアミン (化合物 14)、
 又はその許容可能な塩、水和物、若しくは水和塩、又はこれらの化合物の多形結晶構造物、又はその光学異性体、ラセミ体、ジアステレオマー若しくはエナンチオマー。

【0114】

本発明の化合物は、細胞生物学において DNA プローブとして使用されることが報告されるものとしては、初めての、長い波長で、毒性を示すことなく光活性化される蛍光 DNA 色素である。

【0115】

本発明の化合物の蛍光特性

本発明の化合物が示す吸光 / 放出特性により、これらの化合物は、DNA の蛍光染色用試薬として非常に魅力的なものとなる。アクリジンホモ 2 量体 (励起 / 放出 431 / 498 nm) 及び特定の低親和性の DNA 結合性 SYTO 色素も、同一の領域において吸光 / 放出極大を有する。しかしながら、本発明の化合物とは異なり、アクリジン色素は、細胞膜を透過できず (Haughland et al.; Lepcq, J. B., et al., 1975, PNAS, 72, 291, 5-2919)、そして SYTO 色素は、非選択的な DNA 染色試薬として知られており、in vivo で RNA 及びミトコンドリアを含む他の構造物も染色する (上述の Haughland et al.)。実際には、全ての DNA 色素は、RNA 及び / 又は 1 本鎖 DNA (ssDNA) にも一定の範囲で結合することから、上記のことは驚くべきことではない。例えば、チアゾールオレンジホモ 2 量体 (TO TO) 及びエチジウムブロマイドは、in vitro で、同程度の親和性をもって dsDNA 及び ssDNA と相互作用を起こす (Rye et al.)。

【0116】

本発明者らが得た in vitro 及び in vivo での結果は、本発明の化合物が、RNA よりも 2 本鎖 DNA (dsDNA) に結合した際に、選択的に蛍光を発することを示している。本発明の化合物を用いた dsDNA と RNA の滴定により、低い色素 / 塩基 (b) 比又は色素 / 塩基対 (bp) 比では、差異が最も著しく、本発明の化合物 / DNA の蛍光は、本発明の化合物 / RNA 複合体の蛍光よりも、少なくとも 6 倍高いものであったことが示された。本発明の化合物の量を一定にして、異なる量の dsDNA 及び RNA で中和を行った反対の実験では、本発明の化合物 / dsDNA の蛍光が、本発明の化合物 / RNA の化合物の蛍光よりも一層強いことも見出された。更にまた、本発明者らが、5 μ M の本発明の化合物を、DNA 及び RNA を用いて、これらの量を増加させながら滴定すると、DNA は、色素と ~ 30 bp / 色素で飽和したが、RNA は、250 b / 色素の比率であっても飽和できなかったことが判明した。一方で、色素 / b (bp) 比を増加した場合に、DNA 又は RNA と結合した本発明の化合物の蛍光の差が、より小さくなったという事実 (図 2A) は、本発明の化合物が、インターカレーション以外の機構を通じて核酸と相互作用できることを意味する可能性がある。

【0117】

特に、インターカレート性 DNA プローブであるエチジウムブロマイドと比較した場合、本発明の化合物は、驚くべきことに、RNA との比較において DNA に対して同程度の

選択性を示す。DNAと結合した場合の本発明の化合物の量子収量(13.8%)は、エチジウムブロマイドについて報告された量子収量に非常に近似するものであった(15%)(Le Pecq, J. B., 1971, *Methods Biochem Anal*, 20, 41-86)。まとめると、これらの*in vitro*での結果は、低い色素/bp比においては、本発明の化合物が、RNAと比べてDNAに対して良好な選択性を示すことを意味している。本発明の化合物は、*in vivo*及び固定細胞上で、核のみを染色し、大量のRNAが局在する細胞質は染色しない。これにより、染色に用いられる本発明の化合物の濃度と条件が、dsDNAとRNAとを効果的に区別するのに最適であることが示される。

【0118】

興味深いことに、DNAを滴定すると、本発明の化合物の蛍光は0.2の色素/bp比まで増加して、その後に減少したが(図3B)、DNA分子の長さは、色素/bp比が1になるまで増加し続けた。この蛍光の低下は、静的消光による可能性が最も高い(Lakowicz, J. R., (1991年)「*Fluorescence Quenching: Theory and Applications*」、第2版、Kluwer Academic/Plenum編集、ニューヨーク市、ニューヨーク州)。

【0119】

本発明者らは、本発明の化合物が、dG/dC領域よりもdA/dT領域に結合した場合に、選択的に蛍光を発することを見出した。このことは、DNAと複合体形成した際に反対にふるまい、dA/dTホモポリマーよりもdG/dCホモポリマーと複合体形成した場合に量子収量の全体的な増加を示すYOとは異なっている(Larsson, A., et al., 1995, *Biopolymers*, 36, 153-167)。SYBR Green I(Zipper H. et al.)やシプロフロキサシン(Vilfan, I. D., et al., 2003, *Biochim Biophys Acta*, 1628, 111-122)のような他のインターカレーターは、本発明の化合物と同様の選択性を示す。しかしながら、dA/dTホモポリマーとdG/dCホモポリマーに結合したこれら色素の蛍光の差異は、本発明の化合物の場合と比べて随分と小さなものである。この差異の程度は、遊離した本発明の化合物の蛍光のピークも実際に消滅してしまうことから、dG/dC領域への結合力の不足として説明することができない。また、吸光実験では、本発明の化合物が、dG/dC領域とdA/dT領域に同程度に良好に結合することが示されている。上記は、全て、本発明の化合物が、ヌクレオチドのdA/dTペア及びdG/dCペアに結合可能であるが、異なる相互作用を起こすことを示している。観察されたdG/dC領域による消光作用は、グアニンについて報告される低い酸化電位、又は他の蛍光インターカレーター分子について報告されたような、本発明の化合物とグアニン残基間での電子伝達に起因する可能性がある。(上述のVilfan, I. D., et al.; 上述のLarsson, A. et al.; Ihmels, H., et al., 2003, *Org Biomol Chem*, 1, 2999-3001)。

【0120】

構造と機能の相関性

その構造にもよるが、融合ポリ(ヘテロ)芳香族分子は、インターカレーション(Lerman, L. S. et al.)又はマイナー/メジャーグループへの結合(Johnson, D. S. et al.による総説(1996年)、Murakami, Y. (編集)、「*Comprehensive Supramolecular Chemistry*」、Elsevier, Oxford, 73-176頁)を通じてDNAに結合できる。本発明の化合物は、アルカロイドフガロニン(alkaloid fagaronine)の天然のアザ類似体であり(上述のBisagni, E., et al.)、DNA内にインターカレートすることが知られているが、蛍光DNAマーカーであることは報告されていない。本発明の化合物のDNAへの結合は、恐らく、生理学的pHにおいて正に帯電する側鎖を有するジアルキルアミンの存在に助けられている。他の陽イオン性色素について示されたように(Zipper, H. et al.; Blackburn, G.

10

20

30

40

50

M. et al., 1996, Oxford University Press, Oxford, pp. 329 - 370; Eriksson, M., et al., 2003, Nucleic Acids Res, 31, 6235 - 6242)、塩は *in vitro* で本発明の化合物 / DNA の蛍光に著しく悪影響を及ぼした。このデータにより、陽イオン性側鎖が、2 本鎖ヘリックスへの色素の結合に寄与するという考えが支持される。仮説としては、前記側鎖は、バックボーンのリン酸残基上の負の電荷と相互作用する可能性がある。

【0121】

色素の *in silico* での DNA へのドッキングは、殆どの既存のドッキング用プログラムでは、フレキシブルなリガンドの剛性分子 (DNA) へのドッキングしかできないという事実により、複雑なものとなる。このようなモデリングの明らかな制限は、ドッキング前に、DNA から既にドッキングした分子 (今回はアクチノマイシン D) を抽出する必要があることである。この方法では、固い DNA 構造内の塩基対の間に空間が残る、これが、恐らく後の別の分子のドッキングに適したものとなる。DNA に挿入されたアクチノマイシン D の部分は、平坦なコンフォメーションを有しており、本発明の化合物のコンフォメーションに近似していることから、本研究者らは、DNA / アクチノマイシン D の原子座標をモデリングすることを選択した。提案されたモデルは、実験データと一致するものであり、低い色素 / bp 比においては、本発明の化合物は、塩基対の間にインターカレートできることが示唆された。しかしながら、より高濃度の本発明の化合物の存在下で、該色素が、他の DNA プローブにも見られるように (Zipper H, et al. 2020)、外側において結合を示す場合が排除されたわけではない。実際、(本発明の化合物がインターカレート可能な) 塩基対間の空間を持たない DNA 構造を用いたモデリングでは、本発明の化合物は、容易にマイナーグループにフィットできることが示されている。

【0122】

光活性化

生物学においては、2 種対の光活性化蛍光トレーサーが一般的に用いられる：照射後に「活性化」される「ケージド (caged)」低分子化合物及び蛍光タンパク質である。光活性化蛍光タンパク質は、しばしば、造影波長 (imaging wavelength) で励起した場合には、全く又は殆ど蛍光を示さないが、異なる (通常はより短い) 波長で照射して活性化した後では、その蛍光を劇的に増加させる (Patterson, G. H. et al., 2002, Science, 297, 1873 - 1877)。多くの場合、このような活性化は、蛍光放出の波長の変化を生じる。

【0123】

ケージド蛍光化合物は、該化合物を非蛍光性にする官能基の付加により共有結合的に修飾された非ペプチド型蛍光分子である。光暴露によりこの「保護」基との結合が切断され、本来のフルオロフォアが遊離する。ケージド化合物に伴う問題は、この反応を起こさせるのに紫外線が必要となることである。UV による細胞へのダメージを最小化するため、光への曝露時間は必要最小限に留めなければならない。このような種類の化合物に対する本発明の化合物の優位性は、より長い波長の光で活性化されることである。従って、照射時間と DNA へのダメージは、問題とならない。

【0124】

本発明の化合物の光活性化の本質はどのようなものであろうか。本発明者らが示したように、光活性化は固定細胞内で起こり、本発明の化合物は、*in vivo* で何らの構造変化も起こさないことが示されている。更にまた、本発明の化合物の *in vitro* 及び細胞内でのスペクトル放出は、事実上同一のものである。一方で、光活性化は、純粋なプラスミド DNA では観察されない。従って、この現象は、タンパク質と結合した DNA (クロマチン) に依存しているものと考えられる。実際に、DAPI 等のマイナーグループ結合性プローブ又はエチジウムブロマイド若しくはクロモマイシン A3 等のインターカレート性分子は、ヌクレオソームを破壊し、そして / 又はそのアセンブリー形成を妨害することが示されている。上記の作用については、少なくとも、2 種類の異なるメカニズム

が関与している可能性がある。外部に結合する色素は、ヒストン又は他のクロマチンタンパク質と、dA/dTリッチな結合部位に対して競合するか、又はDNAの動き/柔軟性を阻害し、その結果、マイナーグループ内でのヒストン-DNA接触を低下させる場合がある(Fitzgerald, D. J. et al., 1999, J Biol Chem, 274, 27128-27138)。インターカレーターは、DNAヘリックスをほどこき、DNAの長さを伸ばして硬化させることが可能である(McMurray, C T. et al., 1986, Proc Natl Acad Sci USA, 83, 8472-8476)及びこの文献内の参考文献)。本発明者らが、本発明の化合物のin vitroでのDNA依存的蛍光発光は、D1により阻害されることを証明したことは重要である。このことにより、観察された本発明の化合物の細胞内での光活性化が、実際にDNAと結合したヒストン及び/又は他のクロマチンタンパク質のDNAと置き換わりながらゆっくりとDNAと結合することを反映している可能性があることが示唆される。この仮説は、本発明の化合物が、生細胞の場合とは異なり、固定化された細胞上では、直ちに蛍光を発し、その強度が時間と共に更に増加するという事実により裏付けられる。このことは、固定により、クロマチンタンパク質が部分的に変性し、生細胞内の場合よりも本発明の化合物がDNAに接近しやすくなるという事実により説明できる。最後に、何故、本発明の化合物のDNAへの結合により、発光が促進されるのかを示す必要がある。

【0125】

本発明は、以下の実施例の記載により更に例示されるが、これに制限されるものではない。

【実施例】

【0126】

Institut CurieのPharmacochemistry Laboratory(UMR 176 CNRS-IC)により合成された分子に相当する、4080種類の化合物からなる非常に広範囲の特許ライブラリーをスクリーニングアッセイにおける一連の化合物として用いた。この集団には、広範囲の異なる複素環式化合物が含まれるが、これらの大部分は、元々はその抗ガン活性の測定用に調製されたものである。ライブラリーの構成成分は、96ウェルマイクロプレートにて、10 mMの無水DMSO中にフォーマットされ、暗室で+4℃にて保存された。全ての操作は、過剰量の光から化合物を保護するように注意して行った。

【0127】

化合物Iは、視覚的表現型スクリーニング(visual phenotypic screen)において蛍光核染色色素として同定された。上記の結果に基づき、化合物ライブラリー内に存在する14種類の密接に関連した化合物I型分子を、in vitro及びin vivoテストでより詳細に試験して、構造-機能関連性を立証した(表1)。化合物I並びに関連する6個のアミノ酸残基が置換されたジベンゾナフチリジン4、12、13の剛性は、既に、上述のBisagni, E. et al.に記載されている。しかしながら、化合物Iの完全なキャラクタリゼーションは完了している。他の新たな化合物の全ては、以下に記載するように得られた。

【0128】

化合物I(遊離塩基、淡黄色の結晶)収率88%、融点162℃(軟化)ないし210℃(分解)(Et₂O):1H NMR(DMSO-d₆) 1.95(m, 2H, CH₂-), 2.32(s, 6H, N(CH₃)₂), 2.50(m, 2H, CH₂-), 2.97(s, 3H, 12-CH₃), 3.76(m, 2H, CH₂-), 3.99&3.96(2*s, 2*3H, 2*OCH₃), 7.45-7.60(m, 3H, H-3+H-9+H-10), 7.75(d, 1H, H-1, J=1.8Hz), 7.85(t, 1H, N-H), 8.93(m, 2H, H-4+H-7), 9.09.分析.(C₂₄H₂₈N₄O₂.0.5H₂O)計算値:C, 69.71;H, 7.07;N, 13.55;測定値:C, 70.01;H, 7.09;N, 13.73。

【0129】

化合物 I

(6 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン)

DMF (1 0 0 m l) 中の 6 - クロロ - 1 2 - メチルジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン (1 . 1 0 g 、 3 . 9 m m o l) の混合物を、1 0 0 で、1 気圧の H₂ 圧力下において、1 0 % P d - C (3 0 0 m g) を触媒として用いて水素化した。水素の取り込みが完了すると、混合物が熱いうちに触媒をろ過により除去し、熱い DMF で洗浄した。ろ液を蒸発乾固した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (C H₂ C l₂) とエタノールからの再結晶 (融点、1 5 3) を行うと、黄色い結晶性固体の化合物 I (2 5 0 m g , 2 8 %) が得られた :

【 0 1 3 0 】

¹ H NMR (C D C l₃) 3 . 1 3 (s , 3 H , C H₃) , 7 . 7 2 (m , 2 H , H - 2 + H - 3) , 7 . 8 8 (m , 2 H , H - 8 + H - 9) , 8 . 0 7 (d , 1 H , H - 1 , J = 8 . 0 H z) , 8 . 2 1 (d , 1 H , H - 7 , J = 8 . 3 H z) , 9 . 2 4 (m , 2 H , H - 4 + H - 1 0) , 9 . 3 9 (s , 1 H , H - 1 2) . 分析 . (C₁₇ H₁₂ N₂) 計算値 : C , 8 3 . 5 8 ; H , 4 . 9 5 ; N , 1 1 . 4 7 ; 測定値 : C , 8 3 , 0 9 ; H , 4 , 8 6 ; N , 1 1 , 4 0 .

【 0 1 3 1 】

化合物 2、5、6 及び 7

(6 - アミノメチルで置換されたジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン誘導体)

工程 1 : S e O₂ 酸化 : 化合物 1 (6 6 7 m g ; 3 m m o l) のジオキサン溶液 (9 0 m l) に S e O₂ (3 8 0 m g) をゆっくりと添加した。反応混合物を 3 時間還流し、次いで、熱い溶液をろ過して、熱いジオキサンで洗浄した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をトルエン中で再結晶させると、ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - カルバルデヒド (4 5 0 m g , 5 7 %) が得られた :

【 0 1 3 2 】

分析 . (C₁₇ H₁₂ N₂ O) 計算値 : C , 7 9 . 0 6 ; H , 3 . 9 0 ; N , 1 0 . 8 5 ; 測定値 : C , 7 8 , 6 1 ; H , 3 , 7 7 ; N , 1 0 , 4 1 .

【 0 1 3 3 】

工程 2 : 還元的アミノ化 :

N' - ジベンゾ [c , h] [1 , 5] ナフチリジン - 6 - イルメチル - N , N - ジメチルプロパン - 1 , 3 - ジアミン (化合物 2) : 共通する方法の例。

【 0 1 3 4 】

上記アルデヒド中間体 (5 0 0 m g 、 2 m m o l) 及び N , N - ジエチルアミノプロピル - 1 , 3 - ジアミン (6 2 0 m g 、 6 m m o l) の還流 M e O H 溶液 (1 0 m l) に、N a B H₄ (2 9 3 m g 、 7 . 8 m m o l) を数回に分けて添加した。混合物を 1 時間還流した。次いで冷水を添加し、得られた混合物は、C H₂ C l₂ を用いて抽出した。混合有機溶媒を M g S O₄ 上で乾燥させ、濃縮し、そして残渣を中性アルミナ (水 7 %) カラムクロマトグラフィー (C H₂ C l₂ / E t O H : 1 0 0 / 0 ないし 9 5 / 5 の勾配) に付した。黄色の油として得られた化合物 2 の遊離塩基を、H C l / M e O H に溶解し、濃縮乾燥させた。エーテルを添加し、化合物 2 · H C l の黄色沈殿物を回収した (6 1 0 m g , 3 0 %) , 融点 1 4 5 (軟化)

【 0 1 3 5 】

¹ H NMR (D M S O - d₆) 1 . 2 9 (t , 6 H , 2 * C H₃) , 2 . 4 3 (m , 2 H , C H₂ -) , 3 . 1 9 (m , 4 H , 2 * C H₂ C H₃) , 3 . 3 1 (m , 2 H , C H₂ -) , 3 . 4 3 (m , 2 H , C H₂ -) , 5 . 2 9 (b r s , 2 H , C H₂ - 6) , 8 . 0 2 (m , 2 H , H - 2 + H - 3) , 8 . 1 6 (m , 2 H , H - 8 + H - 9) , 8 . 4 7 (m , 2 H , H - 1 + H - 7) , 9 . 3 5 (d , 1 H , H - 4 , J = 8 . 2 H z) , 9 . 5 4 (d , 1 H , H - 1 0 , J = 8 . 2 H z) , 9 . 7 5 (s , 1 H , H - 1 2) , 1 0 . 0 0 (b r s , 2 H , H - 塩酸塩) , 1 0 . 9 2 (b r s , 1 H , H - 塩酸塩) . 分析 (C₂₄ H₂₉ N₄ · 3 H C l · 1 . 5 H₂ O) 計算値 : C 1 , 5 6 . 6 4 ; H , 6 . 7 3 ; N

10

20

30

40

50

, 11.01; 測定値: C, 56.43; H, 6.38; N, 10.78。

【0136】

必要なアミンを用いることで、化合物5、6及び7も、還元的アミノ化により調製した。

【0137】

化合物5 (黄色の粉末、収率56%) 融点160 (軟化)

^1H NMR (CDCl_3) 2.22 (s, 6H, 2°CH_3), 2.54 (t, 2H, CH_2 -, $J = 2.9\text{ Hz}$), 2.91 (m, 2H, CH_2 -, $J = 2.9\text{ Hz}$), 4.58 (s, 2H, CH_2 -6), 7.69 (m, 2H, H-2 + H-3), 7.86 (m, 2H, H-8 + H-9), 8.05 (d, 1H, H-1, $J = 7.8\text{ Hz}$), 8.20 (d, 1H, H-7, $J = 8.1\text{ Hz}$), 9.23 (m, 2H, H-4 + H-10), 9.37 (s, 1H, H-12). 分析: ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 計算値: C, 65.60; H, 7.34; N, 14.57; 測定値: C, 65.84; H, 6.95; N, 14.60。

10

【0138】

化合物6 (黄色の粉末、収率50%): 融点45 (軟化);

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 1.72 (m, 2H, CH_2 -, $J = 2.9\text{ Hz}$), 2.15 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.32 (t, 2H, CH_2 -, $J = 2.9\text{ Hz}$), 2.82 (m, 2H, CH_2 -, $J = 2.9\text{ Hz}$), 4.58 (s, 2H, CH_2 -6), 7.93 (m, 2H, H-2 + H-3), 8.09 (m, 2H, H-8 + H-9), 8.40 (d, 1H, H-1, $J = 8.0\text{ Hz}$), 8.59 (d, 1H, H-7, $J = 8.3\text{ Hz}$), 9.27 (m, 2H, H-4 + H-10), 9.65 (s, 1H, H-12). 分析: ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 計算値: C, 66.31; H, 7.59; N, 14.06; 測定値: C, 66.62; H, 7.57; N, 14.12。

20

【0139】

化合物7 (淡い桃色の粉末、収率57%): 融点156 ;

^1H NMR (CDCl_3) 1.15 (s, 3H, CH_3), 3.40 - 3.65 (m, 4H, $2^\circ\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.67 (s, 2H, CH_2 -6), 7.72 (m, 2H, H-2 + H-3), 7.92 (m, 2H, H-8 + H-9), 8.09 (d, 1H, H-1, $J = 7.8\text{ Hz}$), 8.22 (d, 1H, H-7, $J = 7.9\text{ Hz}$), 9.10 (d, 1H, H-4, $J = 8.4\text{ Hz}$), 9.28 (d, 1H, H-10, $J = 8.4\text{ Hz}$), 9.41 (s, 1H, H-12). 分析: ($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 計算値: C, 69.02; H, 6.34; N, 11.50; 測定値: C, 69.15; H, 6.32; N, 11.33。

30

【0140】

化合物3:

(2-[2-(ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン-6-イルアミノ)エチルアミノ]エタノール)

6-クロロジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン (500 mg、2 mmol) を 2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (10 ml) 中で還流と共に3時間加熱した。過剰量のジアミンは、減圧下で蒸発乾固し、残渣を抽出した ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$)。混合有機相を MgSO_4 上で乾燥させ、濃縮し、そして残渣を中性アルミナ (水7%) カラムクロマトグラフィー (EtOH- CH_2Cl_2 , 0ないし10%の勾配; 次いで $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{NEt}_3$ 90/10/0.5) に付した。化合物3はベージュ色の粉末として得られた (65 mg, 10%), 融点100 (軟化):

40

【0141】

^1H NMR (CDCl_3) 2.86 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J = 5.1\text{ Hz}$), 3.12 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHAr}$, $J = 5.7\text{ Hz}$), 3.67 (t, 2H, CH_2NHAr , $J = 5.0\text{ Hz}$), 3.98 (m, 2H, CH_2OH), 7.62 (m, 2H, H-2 + H-3), 7.78 (m, 2H, H-8 + H-9), 7.88 (d, 1H, H-1, $J = 8.1\text{ Hz}$), 7.99 (d, 1H, H-7, $J = 8.1\text{ Hz}$), 9.0

50

2 (d, 1H, H-4, J = 8.0 Hz), 9.12 (m, 2H, H-10 + H-12). 分析 (C₂₀H₂₀N₄O · 0.33 H₂O) 計算値: C, 71.00; H, 6.11; 測定値: C, 71.34; H, 6.33。

【0142】

化合物8、9、10、11及び14

(6-ジメチルアミノアルキルアミノ-及び6,12-ビス[ジメチルアミノアルキルアミノ]ジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン)。共通する方法:

【0143】

必要な塩化中間体(chloro intermediate) [6-クロロ-2-メトキシ-12-メチルジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン(化合物8用); 6,12-ジクロロ-2-メトキシジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン(化合物9及び10用); 6,12-ジクロロ-2,8-ジメトキシジベンゾ[c,h][1,5]ナフチリジン(26)(化合物11及び14用)]を、大量の過剰量のN,N-ジメチルエタン-1,2-ジアミン又はN,N-ジメチルプロパン-1,3-ジアミンの存在下で、出発物質の塩化化合物が消失するまで(12-48時間)、還流しながら加熱した。次いで、この混合物を減圧下で濃縮し、水に溶解し、そしてCH₂Cl₂で抽出した。混合有機溶媒をMgSO₄上で乾燥させ、濃縮し、そして残渣を中性アルミナ(水7%)カラムクロマトグラフィー(EtOH-CH₂Cl₂, 0ないし1%の勾配)に付したところ、6,12-ジアミノで置換されたジベンゾナフチリジンが得られた。

【0144】

化合物8(黄色の粉末、収率33%): 融点139 ;

¹H NMR(CDCl₃) 1.94 (m, 2H, CH₂-), 2.36 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.57 (t, 2H, CH₂-), 3.00 (s, 3H, 12-CH₃), 3.88 (m, 2H, CH₂-), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 7.36 (m, 2H, H-1 + H-3), 7.52 (m, 1H, H-8), 7.74 (m, 3H, H-7 + H-9 + N-H), 9.00 (d, 1H, H-4, J = 8.9 Hz), 9.09 (d, 1H, H-10, J = 8.2 Hz). 分析 (C₂₃H₂₆N₄O) 計算値: C, 73.77; H, 7.00; N, 14.96; 測定値: C, 73.28; H, 6.92; N, 14.56。

【0145】

化合物9(黄色の粉末、収率18%): 融点169 ;

¹H NMR(DMSO-d₆) 2.29 (2*s, 2*6H, 2*N(CH₃)₂), 2.67 (m, 4H, 2*CH₂-), 3.78 (m, 4H, 2*CH₂-), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 7.22 (m, 2H, H-8 + H-9), 7.44 (dd, 1H, H-3, J = 2.0 & 8.9 Hz), 7.60 (t, 1H, N-H), 7.70 (d, 1H, H-1, J = 2.0 Hz), 7.78 (t, 1H, N-H), 8.24 (d, 1H, H-7, J = 8.2 Hz), 8.82 (d, 1H, H-4, J = 8.9 Hz), 8.88 (d, 1H, H-10, J = 8.2 Hz). 分析 (C₂₅H₃₂N₆O · 0.5 H₂O) 計算値: C, 68.00; H, 7.53; 測定値: C, 68.39; H, 7.37。

【0146】

化合物10(黄色の粉末、収率50%): 融点155 ;

¹H NMR(DMSO-d₆) 1.96 (m, 4H, 2*CH₂-), 2.24 (2*s, 2*6H, 2*N(CH₃)₂), 2.46 (m, 4H, 2*CH₂-), 3.74 (m, 4H, 2*CH₂-), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 7.44 (m, 3H, H-3 + H-8 + H-9), 7.63 (t, 1H, N-H), 7.71 (d, 1H, H-1, J = 2.0 Hz), 7.81 (t, 1H, N-H), 8.29 (d, 1H, H-7, J = 8.2 Hz), 8.86 (d, 1H, H-4, J = 8.9 Hz), 8.95 (d, 1H, H-10, J = 8.0 Hz). 分析 (C₂₇H₃₆N₆O) 計算値: C, 70.40; H, 7.88; 測定値: C, 70.03; H, 7.66。

【0147】

化合物 11 (黄色の粉末、収率 70%) : 融点 216 ;
 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) 1.97 (m, 4H, 2°CH_2 -), 2.25 (s, 12H, $2^\circ\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.45 (t, 4H, 2°CH_2 -), 3.73 (m, 4H, 2°CH_2 -), 3.98 (s, 6H, 2°OCH_3), 7.37 (t, 2H, $2^\circ\text{N}-\text{H}$), 7.45 (dd, 2H, H-3 + H-9, $J = 9.0 \& 2.2 \text{ Hz}$), 7.69 (d, 2H, H-1 + H-7, $J = 2.2 \text{ Hz}$), 8.83 (d, 2H, H-4 + H-10, $J = 9.0 \text{ Hz}$). 分析: ($\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2$) 計算値: C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13; 測定値: C, 68.35; H, 7.67; N, 17.07.

【0148】

化合物 14 (黄色の粉末、収率 16%) : 融点 209 ;
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 2.31 (s, 12H, $2^\circ\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.73 (t, 4H, 2°CH_2 -), 3.84 (m, 4H, 2°CH_2 -), 3.93 (s, 6H, 2°OCH_3), 5.81 (brs, 2H, $2^\circ\text{N}-\text{H}$), 7.20 (d, 2H, H-1 + H-7, $J = 2.3 \text{ Hz}$), 7.33 (dd, 2H, H-3 + H-9, $J = 9.0 \& 2.3 \text{ Hz}$), 8.90 (d, 2H, H-4 + H-10, $J = 9.0 \text{ Hz}$). 分析: ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 計算値: C, 64.98; H, 7.55; 測定値: C, 64.43; H, 7.41.

【0149】

化合物 I の安定性: 暗室で、無水 DMSO 中に -25 で保存した場合、化合物 I は、最長で 3 年間安定である (LC-MS)。暗室で DMSO 中に 4 で保存した場合、化合物 I は少なくとも 1 年間安定である。周囲温度では、化合物 I は、暗室で保存した場合には、DMSO 溶液中で少なくとも 48 時間安定であることが判明した。

【0150】

化合物 I の溶解性: DMSO 中では、化合物 I (遊離塩基) は、~7 mM で飽和するまで溶解できる。7 mM を 1 当量とした場合、7 当量の H_2O と混合された DMSO 中の化合物 I (~12% DMSO 中に 0.875 mM の化合物 I) は、混濁液を形成する。1 分間超音波処理を行うと、この溶液は、透明になり、更に水溶液中に溶解できるようになる。

【0151】

化合物 I の汚染除去: 75 mM の化合物 I の水溶液 2 ml を 100 mg の活性炭と共に室温で 5 分間インキュベートした。ろ過した後には、化合物 I はスペクトロメトリーでは検出できなくなる。

【0152】

細胞培養とスクリーニング

本試験では、異なる 3 種類の細胞を用いた: YFP- -チューブリン発現コンストラクト (pEYFP-Tub, Clontech) で安定に形質転換されたアフリカツメガエル上皮セルライン XL177 (Miller, L. et al., 1977, In Vitro, 13, 557-563)、マウス線維芽細胞及びヒト初代線維芽細胞。XL177 細胞は、抗生物質、10% のウシ胎児血清 (FCS) 及び 10 mM の HEPES が補充され (pH 7.2)、更に 0.7 mg/ml の G418 が添加された 60% Leibowitz-15 培地中で、20 で増殖させた。細胞は、底部がガラス製の 96 ウェルプレート (Greiner、独国) 内に播種し、24 時間増殖させた後に、Curie-CNRS 低分子ライブラリーの試験化合物の存在下 (25 又は 50 μM の終濃度) で更に 20 ~ 24 時間インキュベートした。マウス及びヒトの線維芽細胞は、抗生物質と 10% の FCS を含む DMEM 中で 5% の CO_2 の存在下で 37 で増殖させた。細胞は、40x 油浸対物レンズと標準的な Alexa488/FITC フィルター (Omega、XF100-2; Ex475AF40/Em535AF45/Dichroic505) を備えた Zeiss Axiovert 200M 顕微鏡を用いて観察した。その後の実験は、より低濃度の化合物 I と本明細書と図の説明文に記載されるインキュベーション時間を用いて行った。化合物 I 様化合物の in vivo 試験においては、前記分子を細胞培養培

10

20

30

40

50

地に終濃度 $10 \mu\text{M}$ で添加し、細胞と共に $10 \sim 60$ 分間（最長で 24 時間）インキュベートした後にスコア付けした。

【0153】

試薬

Qiagen Maxiprep kit を用いてプラスミド dsDNA を精製し、スーパーコイルド (supercoiled) の形態で吸光度及び蛍光試験に用いた。E. coli のトータル RNA は、Ambion から購入し、dA/dT 及び dG/dC ホモポリマーは、Amersham Biosciences から購入した。ウシ胸腺 (CT) 高分子量 DNA と Hoechst 33258 は、Sigma-Aldrich から入手した。エチジウムブロマイドは、Amresco から購入した。

10

【0154】

分光測定及び蛍光測定

分光測定及び蛍光測定は、SpectraMax 384 (Molecular Devices) 及び Luminescence Spectrometer LS50B (Perkin Elmer) を用いて行った。DNA 及び RNA と複合体形成した化合物 I の蛍光放出は、 50 mM の Na リン酸バッファー ($\text{pH } 7.2$) 中で、室温にて測定した。使用する前に、E. coli のトータル RNA を 100°C で 1 分間加熱して直ちに氷上に移して 5 分間静置し、その後、化合物 I の溶液と混合した。全ての測定は、室温 ($20 \sim 30^\circ\text{C}$) にて、光から保護され、希釈した後に $10 \sim 15$ 分間インキュベートした溶液中で行った。b / 色素及び bp / 色素という単位は、色素 1 モル当たりの RNA の塩基又は DNA の塩基対のモル数として定義される。量子収量は、FLUOROMAX-3 Spex Spectrofluorometer (HORIBA) と UVIKON XL Spectrophotometer (SECOMAM) を用いて、「Lupac Commission on Photochemistry, EPA Newsletter of November 1986, 21-29」の記載に従って、硫酸キナーゼをスタンダードとして用いて測定した。

20

【0155】

粘度測定

図 3 A 及び B の説明文に記載されるように、ウシ胸腺 (CT) DNA を、その塩基対数で 0.1 又は 0.5 mM の濃度になるように 50 mM の Na リン酸バッファー ($\text{pH } 7.2$) に溶解させた。特注のキャピラリー粘度測定器に DNA 溶液を通過させ、メニスカスが一定の距離を通過するのに要する時間をストップウォッチを用いて測定した。全ての実験は、 23°C で行った。粘性度は、以下の等式を用いて計算した：

30

$$= (t - t_0) / t_0$$

ここで、 t は DNA 溶液（色素含有又は不含）の流動時間であり、 t_0 は Na リン酸バッファー単独での流動時間である。各コントロールと色素含有 DNA 溶液につき、流動時間は、 3 回ないし 5 回測定した。色素含有 DNA 溶液の粘度は、 $(\eta / \eta_0)^{1/3}$ として計算され、ここで、 η_0 及び η は、それぞれ、色素の不存在下及び存在下での CT DNA 溶液の相対粘度である。この計算は、相対溶液粘度と相対輪郭長の間にある以下の関係に基づく：

40

$$(\eta / \eta_0) : L / L_0 = (\eta / \eta_0)^{1/3}$$

ここで、 L は、見かけの分子長を表す (Muller, W. et al., 1968, J Mol Biol, 35, 251-290)。平均粘度と平均値の標準誤差 (SEM) は、各時間流動測定について計算した $(\eta / \eta_0)^{1/3}$ を用いて決定した。

【0156】

化合物 I で染色した生細胞内での核蛍光測定

100 W の水銀ランプを備えた倒立顕微鏡 Zeiss Axiovert 200M で観察を行う 10 分前に、 $5 \mu\text{M}$ の化合物 I を直接細胞用培地に添加した。Metamorph ソフトウェア (Universal Imaging) で駆動される CoolSnap HQ (Photometrics, Inc.) 白黒カメラを用いてコマ撮り画像

50

を入手した。全ての実験は40倍又は63倍の(図1C及びD)油浸Apochromat Zeiss対物レンズを用いて行った。蛍光強度を測定するため、Metamorphソフトウェアを用いてそれぞれの核の内側に楕円形の領域を描き、積分した強度(平均ピクセル値で乗じた核表面積)を、各画像について記録した。

【0157】

化合物Iで染色した固定細胞内での核蛍光測定

ヒト初代皮膚線維芽細胞を、ポリ-D-リジンコーティングガラスカバースリップ上で増殖させ、冷却(-20)無水メタノール中で15分間かけて固定した。サンプルをPBS(150mM NaCl、20mM Na-リン酸、pH7.2)中で再水和させ、10%PBS(水で希釈)でリンスし、10%PBS中に120μMの化合物Iで、暗室内で室温で15分間かけて染色した。サンプルは、洗浄することなく、FluorSave(商標)マウント用媒体(Calbiochem)又はMowiolを用いてマウントし、3時間以内に分析した。画像入手のため(図5B、D)、OmegaフィルターセットXF100-2(上記参照)を用いて、細胞を連続して(開放シャッター)30分間照射した。画像は、10秒間の間隔を空けて入手し、16ビットのフォーマットでスタックとして保存した。核蛍光を積分した強度を、上記のように測定し、180枚の画像毎に記録した。各領域の最終時点での蛍光を100%と定め、同一の領域の先の時点における蛍光強度(フレーム)を、Microsoft Excelソフトウェアを用いて計算した。

【0158】

生細胞内での化合物Iの蛍光のスペクトル分析

Leica TCS-SP2レーザー走査性共焦点顕微鏡を用いて観察を行う直前に、化合物Iを、終濃度5μMでDMEM培地中の3T3マウス生細胞に添加した。「走査」モードを用いて、連続して405又は458nmで励起しながら、20分間かけて細胞蛍光量を観察し、化合物Iの放出スペクトルを記録した。

【0159】

分子モデリング

ウェブから入手可能なソフトウェアCORINA(<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/software/corina/corina.html>)(Sadowski, J., 2004, Gasteiger, J.(編集), Handbook of Chemoinformatics - From Data to Knowledge. Wiley-VCH, Weinheim, 231-261頁)を用いて、pdbフォーマットで化合物Iの3次元原子配置を入手した。コンピューターに基づくモデリングには、本発明者らは、低エネルギー結合様式を見つけだすAscore又はLamarckian遺伝的アルゴリズム(Morris, G. M., et al., 1998, J. Computational Chemistry, 19, 1639-1662)によるスコアリング機能を用いたArgusLabソフトウェア(Thompson, M. A. (2004) ArgusLab 4.0.1. Planaria Software LLC, シアトル、ワシントン州)を採用した。dsDNA内への化合物Iのドッキングには、本発明者らは、Aa/Tt塩基ステップ(Base Step)にインターカレートしたアクリジン-ペプチド薬物と共に結晶化されたDNA12量体5'-D(CGCGAATTCGCG)-3'(配列番号1)の3次元配置を用いた(protein data bank PDB ID-1G3X(Malinina, L., et al., 2002, Biochemistry, 41, 9341-9348))。化合物Iのドッキングに先立ち、N()-(9-アクリジノイル)テトラアルギニンアミドをDNAとの複合体から取り除き、化合物IとDNAの両方に水素を付加した。カリフォルニア大学サンフランシスコ校のResource for Biocomputing, Visualization, and Informaticsが作製したUCSF Chimeraパッケージ(Pettersen, E. F., et al., 2004, J. Comput Chem, 25, 1605-1612)を用いて分子グラフ

ック画像を作製した。

【0160】

結果

化合物 I は生細胞内で分裂間期にある核を染色する

アフリカツノガエル X L 177 生細胞上での Curie - CNRS 化合物ライブラリーの視覚的表現型スクリーニング (Alexa 488 / FITC フィルターを使用) において、化合物 I は、明るい緑色の核シグナルを生み出すことが判明した (図 1 C)。このシグナルは 10 ~ 20 秒間の照射の後に現れ、その後、何分間にも渡って安定であった (下記を参照)。培養細胞内で観察された核染色は、以下のことを示している: (1) 薬物が細胞膜透過性であること; (2) 標準的な細胞培養条件下で非毒性である (培養系で最大 6 日間); (3) DNA 若しくはクロマチンタンパク質を染色するか、又は単に核内に蓄積する。

【0161】

化合物 I のスペクトル特性は DNA への結合により変化する

色素は単に核内に蓄積する可能性もあることから、核染色自体は、色素が DNA に結合することを証明するものではない。また、化合物 I は、有糸分裂期の染色体も染色する (図 1 D)、理論上は、化合物 I が、核酸ではなく、DNA 関連タンパク質 (例えばヒストン) に特異的に結合している可能性も考えられた。この問題を明らかにするため、ds DNA を添加する前後において、遊離した化合物 I の吸光及び放出スペクトルを記録した。遊離した化合物 I は、224、245、283、326、373 及び 391 nm に極大を有する複雑な吸光プロファイルを示す (図 1 E は、300 ないし 550 nm のスペクトル部分を示す)。391 nm における遊離した化合物 I のモル吸光係数を測定すると $10,800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ であった。2 本鎖プラスミド DNA の存在下では、373 と 391 nm での化合物 I の吸光ピークが減少し、435 nm に新たなピークが現れた (図 1 E)。色素に対して異なる bp 比にある ds DNA との複合体の吸光スペクトルをオーバーレイすると、398 nm に単一の等吸収点を得られる。遊離した化合物 I は、438 nm 前後で蛍光を発する (正確なピークの位置は、励起波長に依存する)。DNA に結合すると、438 nm の放出ピークは減少し、426 nm への浅色シフトが起こる。同時に、484 nm 前後の極大に新たなピークが発達する (図 1 F)。化合物 I / DNA 複合体の蛍光の正確な極大は、色素 / bp 比及び / 又は核酸の塩基対の組成の関数として、僅かに変化する。例えば、図 1 F に示すように、bp / 色素比 40 のプラスミド DNA は 472 nm で極大を示すが、同一の bp / 色素比にある化合物 I は、dA / dT ホモポリマーの存在下では、484 nm で極大を示す (以下も参照)。化合物 I / ds DNA 溶液を 300 nm ないし 500 nm の範囲の異なる波長で励起した際に、本発明者らは、蛍光強度は (435 nm で励起した際に認められる極大と共に) 大きく変化するが、放出では、常に 484 nm 前後に主な蛍光ピークが示され、そして (より短い励起波長 323、348、373、391 では) 420 nm に別の肩が示されることを発見した。50 mM の Na - リン酸 (pH 7.2) における 5 μM の化合物 I (435 nm で励起) の量子収率は、遊離色素が 2.7% であり、50 μM の CT DNA との混合状態のものが 13.8% であった。これらの結果は、化合物 I が、可視光スペクトルの青色 / 緑色領域で励起されて放出する、新たな DNA 結合性蛍光プローブであることを示している。

【0162】

化合物 I は RNA と比べて ds DNA に優先的に結合する

数多くの既知の蛍光色素が、ds DNA に優先的に結合し、SYTO 色素等の他の色素は、ds DNA、ss DNA 及び RNA に同程度によく結合する (上述の Haugland, R. P. et al.)。このような特性を知るとは、1 種類又は別の種類 (又は複数種類) の核酸が存在する可能性のある実験の設計において重要である。化合物 I の選択性を調べるため、本発明者らは、2 本鎖プラスミド DNA 又は熱変性させた E. coli の RNA とインキュベートした色素の 484 nm での蛍光強度を比較した。この比較のため、50 μM (塩基又は塩基対に対して) の DNA 又は RNA を異なる量の化合物 I

10

20

30

40

50

で滴定した。図2Aに示すように、低い色素/bp比及び色素/b比では、化合物Iの放出強度は、RNAよりもDNAと混合した場合に有意に強くなった(6倍)。高い色素/bp比及び色素/b比では、その差は小さくなり(色素/b(bp)比が0.2において1.8倍)、このことは、大量の色素により、両方の種類の核酸が飽和される場合があることを意味している。次いで、本発明者らは、反対方向の実験を行った。即ち、1μMに固定された量の化合物Iを、DNA及びRNAを用いて、これらの量を増加させながら滴定した。図2Bに示すように、dsDNAと混合した化合物Iの蛍光は、同一のb(bp)/色素比のRNAと比較して、今回も同様に、有意に強いものであった(2.5~3.6)。更にまた、固定量の化合物Iは、dsDNA量を~30bp/色素比に増加することで飽和できたが、RNA量を増加させても(最大で250b/色素比まで)飽和できなかった。以上をまとめると、これらの結果は、化合物Iが、RNAと比べてdsDNAに対して高い選択性を有することを示しており、細胞内に観察された核染色(図1C)を殆ど完全に説明している。

【0163】

化合物Iの流体力学試験では、化合物IがDNA鎖間にインターカレート可能なことが示される。

DNA結合性色素は、インターカレーション若しくは外部結合、又はその両方によってdsDNAと相互作用する。外部結合には、殆どの場合、DNAのマイナーグループが関与している(Kopka et al.; Pjura, P. E., et al., 1987, J Mol Biol, 197, 257-271)。インターカレーションは、リガンドが、逆行するDNA鎖の間に挿入された場合に起こる。化合物IがdsDNAに結合するメカニズムを決定するため、本発明者らは流体力学試験を行った。このアプローチは、インターカレートする分子は、DNA断片の長さを増加させ、その結果、DNA溶液の粘性が増加するという知見に基づくものである(Muller W. et al.; Suh, D. et al., 1995, Bioorg Med Chem, 3, 723-728)。この実験では、化合物Iを既知のDNAインターカレーターであるエチジウムブロマイド及び外部マイナーグループ結合剤のHoechst 33258と比較した。0.5 mMのCT DNAを0.1 mMの濃度の薬物と混合し(0.2の色素/bp比)、粘度測定に用いた。図3Aに示すように、化合物Iはエチジウムブロマイドと同様の挙動を示し、DNA溶液の粘性を増加させる。対称的に、先に記載されるように(上述のZippner, H. et al.)、Hoechst 33258の場合には、粘性が僅かに低下することが判明した。

【0164】

次に、本発明者らは、粘性の増加が、蛍光強度の増加と同じように一致するかということに疑問を抱いた。この問題に対する回答を得るため、0.1 mM(bp)のCT DNAを化合物Iと化合物Iの量を増加させながら混合し、上記と同様に粘度測定を行った。DNA/化合物Iの粘性は、色素/bp比1まで増加した(図3B)。粘性の増加を蛍光と相関させるため、本発明者らは、粘度測定に用いた化合物I/DNA溶液の484 nmにおける蛍光強度を測定した。色素bp比0.2において極大蛍光強度に達し、その後、急速に減退した(図3B)。DNA/化合物Iの粘性が色素/bp比1まで増加することから、後者の結果は「クエンチング」効果(上述のLakowicz, J. R. et al.)を示唆するものである。結論として、流体力学試験により、化合物IがdsDNA内にインターカレートできることが示された。

【0165】

化合物Iは、dG/dC DNA領域よりもdA/dT DNA領域に結合した際に、選択的に蛍光を発する

【0166】

多くのインターカレート性色素及びマイナーグループ結合性DNA色素は、dA/dT又はdG/dC DNA領域と異なる態様で相互作用を起こす場合がある。更に興味深いことに、dA/dT配列及びdG/dC配列と同程度に良好に結合する色素であっても、

そのヌクレオチドの特性により、蛍光強度が影響を受ける（上述のLarsson A. et al.）。異なるDNA領域に結合した場合の化合物Iの特性を調べるため、本発明者らは、過剰量のプラスミドDNAと、dA/dT又はdG/dCのいずれかのホモポリマーと混合された状態での化合物Iの蛍光を調べた。図3Cには、プラスミドDNAとの結合に伴い、化合物Iが484nmにピークを生じさせ、同時に438nmのピークが有意に減少することを示している。484nmのピークは、プラスミドDNAをdA/dTホモポリマーと置き換えた場合により一層顕著なものとなった（図1Fも参照）。驚くべきことに、dG/dCホモポリマーと混合された状態では、484nmでの化合物Iの蛍光強度は、化合物I - dA/dTの場合と比べて9.5倍低いものであった。この効果については、438nmでの蛍光ピークが急激に減少していることから（12, 7分の1への減少：ピークも426nmにシフトしている）、DNAへの結合力不足によって説明することができない。図3Cにおいて、グラフは、371nmでの励起による放出スペクトルを示しており、遊離した化合物Iの放出がプロットされている。また、DNA/化合物I複合体を391及び435nmで励起した場合にも、類似する結果が得られた。本発明者らは、1塩基対に対して異なる色素の比率で、dA/dT及びdG/dCホモポリマーに結合した場合の化合物Iの蛍光量の差異を定量し、その差異が、色素/bp比8において23倍であったことを見出した（図3D）。興味深いことに、dA/dT及びdG/dCホモポリマーに結合した化合物Iの吸光スペクトルは、色素/bp比1までは非常に近似していた。しかしながら、より高い色素/bp比では、435nmでの化合物I - dG/dC吸光度は、化合物I - dA/dTよりも~30%優れており、このことは、化合物Iが、両方のDNAに同程度に良好に結合し、蛍光強度の差異はdG/dC領域への結合力不足を反映するものではないことを示唆している。

【0167】

以上をまとめると、これらの結果は、化合物Iは、dA/dTとdG/dCの両方の領域に同程度に良好に結合するが、dA/dT配列と複合体形成した場合に選択的に蛍光を発することを示している。

【0168】

化合物I系列の構造 - 活性関連性

化合物Iの構造特性がどのようにしてそのDNAへの結合に寄与しているのかということに対して更なる洞察を得るため、本発明者らは、化合物ライブラリーに存在する14種類の構造類似体を分析した。これらの化合物のいくつかは、*in vivo*で蛍光を発するが、この特性は、最初のスクリーニングでは検知されず、このことは恐らく、シグナルが現れる前の反応潜伏時間に起因するものと考えられる（下記参照）。化合物I様分子の活性を評価するため、3種類の試験を用いた：（1）本発明者らは、*in vivo*で、前記分子の存在下でヒト線維芽細胞をインキュベートし、顕微鏡において核蛍光のスコアリングを行った；（2及び3）本発明者らは*in vitro*でプラスミドDNAの添加の前後で遊離分子の吸光と蛍光を観察した。表1に結果をまとめる。細胞は、油浸対物レンズとAlexa488/FITCフィルターを用いた倒立エピ蛍光顕微鏡で観察した。遊離分子の放出ピークは、DNAに結合した色素の放出ピークとあまりにも近似していたため、化合物Iと類似体8及び12を除き、*in vitro*での正確な蛍光強度測定は不可能であった。これにより、色素/DNAピークの高さが影響を受けた。

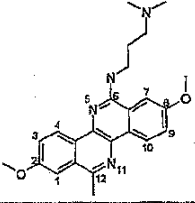
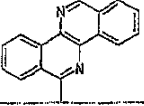
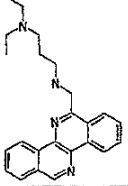
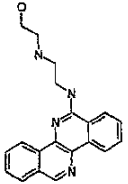
【0169】

表1：14種類の化合物I関連分子の特性のまとめ

* - 染色は、核シグナル/バックグラウンド比に基づき、「弱い」、「中程度」又は「強い」として定義した。[§] - これらの分子の存在下では、Alexa488/FITCフィルターで可視化した場合であっても核は最初は蛍光を発しなかったが、UV光による短時間（10秒間）の事前照射の後に視認可能になった（DAPI/Hoechstフィルター、Omega）XF03。ND - 未測定（測定不可能）。

【0170】

【表 1 A】

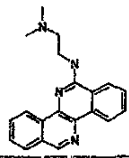
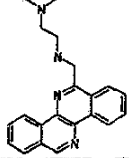
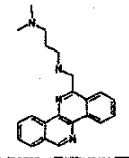
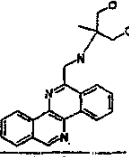
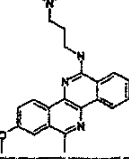
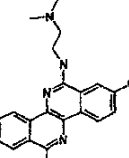
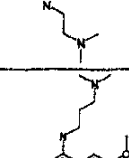
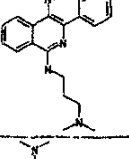
分子	化学式	構造	吸収極大 遊離/DNA 結合色素	蛍光極大 遊離/DNA 結合色素	in vivo 核染色 に画像*
I	$C_{24}H_{28}N_4O_2$ 404.5		394/435	438/484	強い
1	$C_{17}H_{12}N_2$ 244.3		ND/ND	ND/ND	-
2	$C_{24}H_{28}N_4$ 372.5		360/365	ND/ND	-
3	$C_{20}H_{20}N_4O$ 332.4		375/375	ND/ND	-

10

20

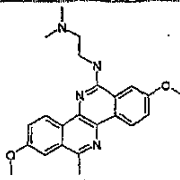
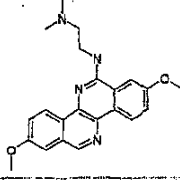
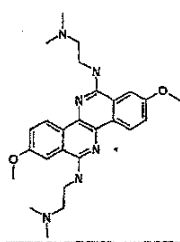
【 0 1 7 1 】

【表 1 B】

4	$C_{20}H_{20}N_4$ 316.4		370/375	404/ND	-
5	$C_{21}H_{22}N_4$ 330.4		365/ND	392/ND	-
6	$C_{22}H_{24}N_4$ 344.5		360/365	385/ND	-
7	$C_{21}H_{21}N_3O_2$ 347.4		365/ND	ND/ND	-
8	$C_{23}H_{26}N_4O$ 374.5		385/425	427/468	-
9	$C_{25}H_{32}N_6O$ 432.6		375/395	468/472	弱い
10	$C_{27}H_{36}N_6O$ 460.6		380/402	478/485	中程度 /強い
11	$C_{28}H_{38}N_6O_2$ 490.7		390/405	484/500	中程度 /強い

【 0 1 7 2 】

【表 1 C】

12	$C_{23}H_{26}N_4O_2$ 390.5		390/435	435/475	弱い
13	$C_{22}H_{24}N_4O_2$ 376.5		390/394	425/407	中程度 §
14	$C_{26}H_{34}N_6O_2$ 462.6		400/400	468/482	弱い

【0173】

化合物 I の DNA への結合の分子モデリング

化合物 I の構造のモデリングにより、フレキシブルな正に帯電した側鎖を有する平坦で強固な複素環コアが予測される（図 1 B）。流体力学試験により化合物 I が DNA 鎖の間にインターカレートすることが示されたことから、本発明者らは、DNA 構造に挿入された化合物 I の推定上のモデルを提唱した。このため、本発明者らは Argus Lab 4.0.1 ソフトウェア並びにアクリジン - ペプチド薬物と複合体形成した dsDNA 12 量体 5' - D (CGCGAATTCGCG) - 3'（配列番号 1）の原子配置を用いた。ドッキングについては、本発明者らは、Argus Lab スコアリング機能 AScore と前記 12 量体全体を包み込むグリッドを用いた。図 4 に示す最もエネルギーの低いコンフォメーション（-4.00 kcal/mol）では、2 組のヌクレオチド（AT/AT）の間にスタックした化合物 I が表されている。遺伝的アルゴリズムによるスコアリング機能又は 2 組の GC ヌクレオチドを用いて同様の結果を得た。

【0174】

化合物 I は光により活性化される

化合物 I で処理した細胞の最初の *in vivo* の観察では、10～20 秒間の反応潜伏時間（濃度に依存する）の後に緑色の核染色が現れたことが示され、光活性化現象が示唆された。この効果を定量化するため、マウスの生線維芽細胞を 5 μM の化合物 I の存在下でインキュベートし、コマ抜きビデオ顕微鏡を用いて細胞を撮影した。核蛍光は、化合物 I で処理し、標準的な Alexa 488 / FITC フィルターセット（475 AF 40、535 AF 45）（図 5 A）を用いて連続照射した細胞の核内でゆっくりと発生した。蛍光は照射の 8 分後にピークに達し、その後に消え始め（図 5 C）、最も恐らくは、化合物 I の「退色」を反映していたものと考えられる。照射領域の直ぐ外側にある細胞の核は認知不可能（非蛍光）な状態で残っており、光活性化は、照射領域内にある細胞のみに関するものであった。理論上は、光活性が、生細胞により触媒される化合物 I の構造の化学修飾に起因するという可能性もあった。この可能性を試験するため、本発明者らは、固定した細胞の核を化合物 I で染色し、30 分間の連続照射の間に核蛍光を測定した。図 5 B 及び D は、固定細胞内で化合物 I / DNA の蛍光が長時間に渡って直線的に増加することを示している。照射領域の直ぐ外側に位置する細胞の核は殆ど視認できなかった。化合物

Iを異なる色素/bp比で混合し、上記のように顕微鏡内で照射した場合には、光活性化は起こらなかった。理論上は、バンドパスAlexa488/FITCフィルターで観察される蛍光の増加が、時間に伴う放出波長のシフトを表していたという可能性もあった。これが起こったのかどうかを決定するため、本発明者らは、共焦点顕微鏡を用いて生細胞の核内の化合物Iの放出スペクトルを記録した。図5Eは、DNAに結合した化合物Iの放出スペクトルが、405 nmで励起した場合には、時間と共に大きく変化しないことを示している。458 nmでの励起によっても同様の結果が得られ、このことは、蛍光強度の変化が、放出波長の大きな変化の結果として生じるものではないことを意味している。

【0175】

ヒストンやHGM1等のクロマチンタンパク質との競合が、外部結合剤(Fitzgerald D. J. et al.; Churchill, M. E. et al., 1989, *Embo J*, 8, 4189-4195; Reeves, R. et al., 1990, *J Biol Chem*, 265, 8573-8582)及びインターカレート性低分子(McMurray, C. T., et al., 1991, *Biochemistry*, 30, 5644-5652; Mir, M. A. et al., 2001, *Biochemistry*, 40, 11, 578-11, 585; Mir, M. A., et al., 2004, *Biophys Chem*, 109, 121-135)の両方の結合に影響することが示されていることから、本発明者らは、化合物I/DNAの蛍光が、ヒストンの存在により影響を受けるかどうかという疑問を抱いた。1 μ Mのヒトヒストン1(H1)の不存在下又は存在下で化合物Iにより1 μ MのプラスミドDNAを滴定したところ、H1が化合物Iの蛍光に有意に影響を及ぼすことが示された(図5F)。同時に、遊離した化合物Iの蛍光(391 nmで励起)は、H1によってはクエンチングされなかった。

【0176】

従って、本発明者らは、細胞内の化合物Iの蛍光は、光によって活性化され、最も恐らくは、この光活性は、メタノール固定による影響を受けないタンパク質と複合体形成したDNAに依存すると結論付けた。

【0177】

化合物Iにより、細胞内での容易なDNA定量が可能になる

化合物Iで染色した核のいくつかは、他のものよりも明るく見えており(図1C及び図5A、B)、例えば、PicoGreenやSYBR Green I等の他のDNAプローブが示したように、蛍光強度がそのDNA含有量に正比例しており、従って、その細胞周期の状態を反映している可能性が示唆される。既に化合物Iで染色された生細胞内のDNA内容を直接プローブするためには、別のdsDNA結合色素を用いる必要がある。このような2重染色では、結合部位に対する潜在的な競合及び/又は蛍光に対する予想不可能な効果というリスクが伴う。従って、本発明者らは、固定細胞内の化合物Iで染色された核の積分された全蛍光量を、既知の細胞周期タンパク質マーカーと比較することに決定した。本発明者らは、ヒト初代線維芽細胞をメタノールで固定し、抗サイクリンA抗体を用い、その後、Alexa 568標識された2次抗体を用いて間接免疫蛍光法を行い、化合物Iを用いて核を対比染色した。サイクリンAはS期の開始時とG2細胞周期を通して細胞内に蓄積し、サイクリンBとは異なり、事実上全てが核内に存在する(総説: Pines, J. et al., 1992, *Ciba Found Symp*, 170, 187-196; discussion 196-204.)。この事実により、化合物I/DNAの蛍光とサイクリンAの蛍光の相関が容易化される。実際に、本発明者らは、サイクリンA陰性の細胞が、その核内に顕著に低い化合物Iの蛍光を示すことを見出している(図6A)。更にまた、本発明者らは、サイクリンA陽性細胞において、化合物Iの蛍光とサイクリンAの蛍光との正の相関関係を観察している(図6B)。サイクリンA陽性度が強い核(図6B、楕円により示される右上隅の点)には、サイクリンA陰性核の約2倍の量の化合物Iの蛍光が含まれることは注目に値する。このことは、G1及びG2

期の細胞に見出されることが予想される、それぞれ2N及び4NのDNA含有量と十分に一致する。これらの結果は、化合物Iが、細胞周期段階を反映する核内DNA含有量の簡便な定量を可能にすることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】化合物Iは新規な蛍光DNA色素である。A．化合物Iの分子構造及び名称。B．平坦な構造を示す化合物Iの3次元モデルの透視正射図。C．*in vivo*にて化合物Iで染色された分裂間期細胞の核。アフリカツメガエルXL 177細胞を、5 μ Mの化合物Iの存在下でインキュベートし、標準的なAlexa488/FITCフィルターセットを用いて照射した。D．*in vivo*にて化合物Iで染色された有糸分裂時の染色体（分裂後期）。E．プラスミドDNAとbp/色素比8で混合された25 μ Mの遊離及びDNAに結合した化合物Iの吸収スペクトル。F．1 μ Mの遊離状態及びDNAに結合した状態の化合物Iの放出スペクトル。438 nmにおける遊離した化合物Iのピークは、DNAへの結合によって低下し、426 nmにシフトし、新たなピークが、472 - 484 nm前後に発達することに留意すべきである。プラスミドDNA及びdA/dTホモポリマーをbp/色素比20で用いた。両方の場合で、化合物Iは、373 nmで励起し、遊離した化合物Iの蛍光が可視化された。（C）及び（D）のサイズバーは、10 μ mである。

10

【図2】化合物Iは、RNAよりもdsDNAに選択的に結合する。A．50 μ MのdsDNA又はRNAと混合された異なる量の化合物Iの蛍光放出値。B．dsDNA及びRNAで滴定した1 μ Mの化合物Iの蛍光放出値。

20

【図3】化合物IはDNA溶液の粘度を増加させ、DNAのdG/dC領域よりもdA/dT領域に結合した際に選択的に蛍光を発する。A．0.1 mMの濃度での以下の種々の色素の不存在下（コントロール）又は存在下における0.5 mM CT DNAの相対粘度（ $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ）：エチジウムブロマイド（EB）、Hoechst 33258（Ho）及び化合物I。B．種々の量の化合物Iの存在下でのCT DNA溶液の相対粘度（赤色曲線：右側のY軸）。青色曲線は、粘度測定に用いた同一のDNA/化合物I溶液の蛍光強度を示す（左側のY軸）。C．1 μ Mの化合物I並びに、40 μ MのプラスミドDNA、dA/dT及びdG/dCホモポリマーと混合された1 μ Mの化合物Iの蛍光スペクトル。373 nmで励起され、遊離した化合物Iのピークが示された。D．dA/dT及びdG/dCホモポリマーで滴定した5 μ Mの化合物Iの蛍光放出値。グラフには、435 nmで励起した後の484 nmでの放出値が示されている。（A）及び（B）のエラーバーは、標準誤差を示す。

30

【図4】dA/dTの2組の塩基対間にインターカレートした化合物Iの推定モデル。A．マイナーグループ側から見た図。B．側面図（左側にマイナーグループ）。C．2組のdA/dT塩基対間にスタックした化合物I。黄色の線は、水素結合を示す。

【図5】生細胞及び固定細胞内での化合物Iの光活性化。A．生細胞内でのDNAに結合した化合物Iの光活性化を示す画像のパネル。5 μ Mの化合物Iとインキュベートし、Alexa488/FITCを用いて照射した線維芽細胞は、明るい核シグナルを発生させ、このシグナルは8分後にプラトーに達する。数値は各時点（秒）に対応する。B．固定細胞内での化合物Iの活性化を示す画像のパネル。メタノールで固定したヒト初代線維芽細胞を、材料及び方法に記載するように化合物Iで染色し、100 Wの水銀ランプを用いた連続的な30分間の照射の間、10秒間の間隔を設けて画像を撮影した。数値は各時点に対応する。代表的な核では、平均ピクセル値は、平面（1）で512であり、平面（1800）では1434であった。C．（A）に示す蛍光の定量化。グラフは26分間を超える平均的な核の蛍光を示す。D．（B）に示す蛍光の定量化。グラフは30分間を超える平均的な核の蛍光を示す。（B）に示す全ての核を定量化に用いた。E．5 μ Mの化合物Iの存在下でインキュベートし、405 nmで励起した、3T3生細胞内の核の代表的な放出スペクトル。曲線は、提示する時点で行ったスキャンに対応する。右上隅の挿入図は、実験過程において核内で測定された化合物Iの活性化を示す（図5Cと同様）。F．

40

50

1 μ M のヒストン 1 の不存在下又は存在下で 1 μ M のプラスミド DNA と種々の量で混合された化合物 I の蛍光値。435 nm で励起した後の 484 nm での放出。目で追いやすいように各点を通る曲線が示されているが、何らかの等式への適合を表すものではない。(C) と (D) のエラーバーは、標準偏差に対応する。

【図 6】化合物 I の核内蛍光は細胞周期段階を反映する。A. 画像は、抗サイクリン A 抗体で染色され、化合物 I で対比染色されたメタノール固定化線維芽細胞の同一の代表的な顕微鏡視野を示す。画像は、20 倍対物レンズを用いて得られた。B. 化合物 I と抗サイクリン A 抗体で染色された (A に示す実験) 細胞内での核蛍光の定量化 (A に示す実験)。ドットは、無作為選択された 6 つの異なる顕微鏡視野内で測定された 81 個の核を表す。右上隅の領域は、強いサイクリン A 陽性反応を示す細胞を囲んでいる。

10

【図 7】*in vivo* での核染色の画像。a: 化合物 I を用いて得られた核染色。b: 化合物 9 を用いて得られた核染色。c: 化合物 10 を用いて得られた核染色。d: 化合物 11 を用いて得られた核染色。e: 化合物 12 を用いて得られた核染色。f: 化合物 13 を用いて得られた核染色。g: 化合物 14 を用いて得られた核染色。

【図 1】

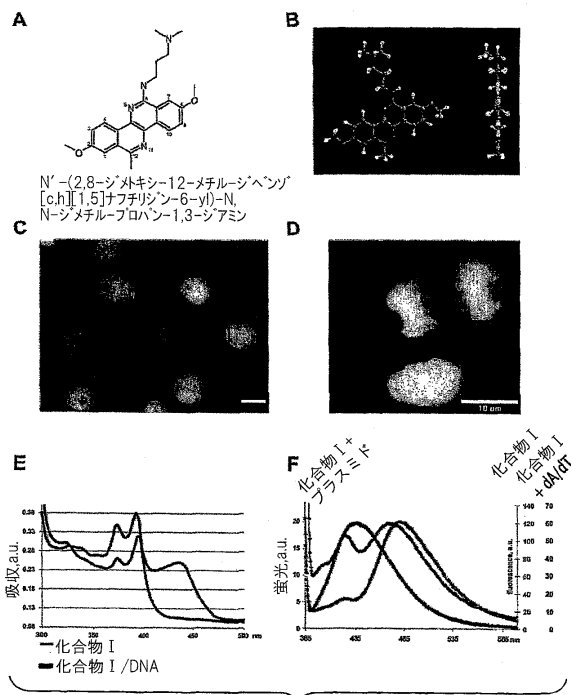


FIG.1

【図 2】

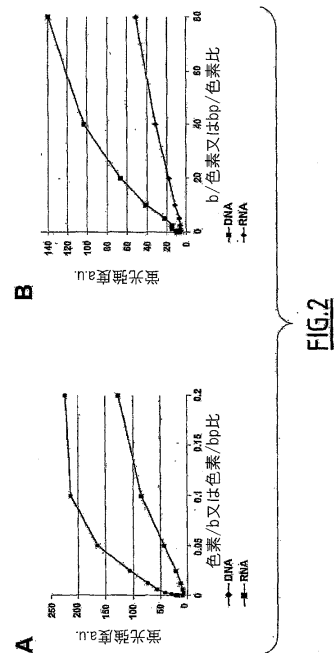
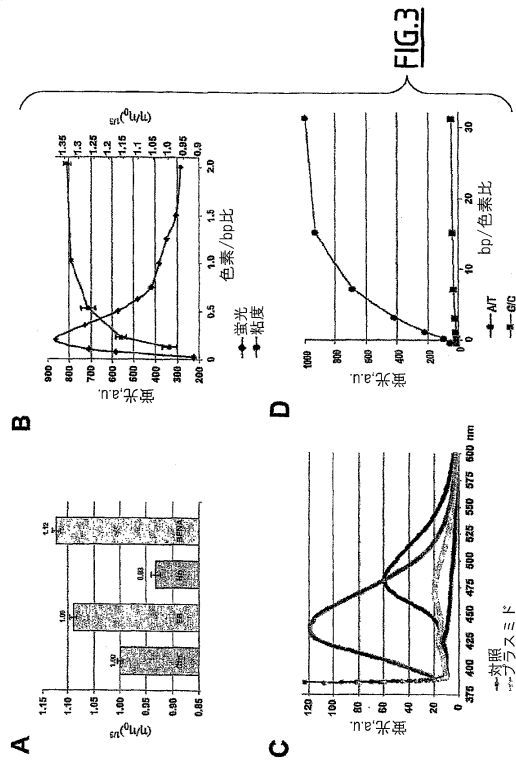
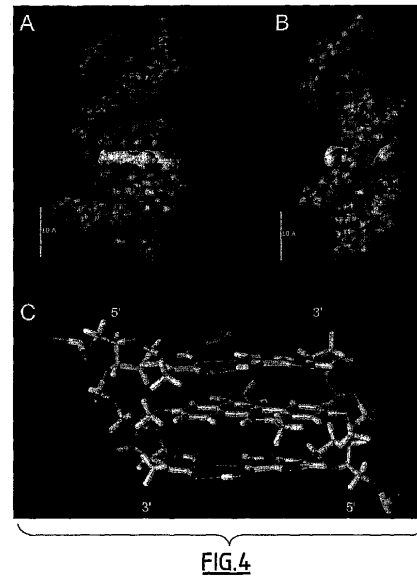


FIG.2

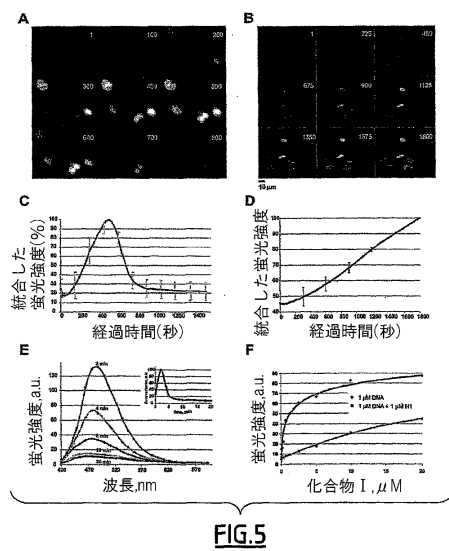
【図3】



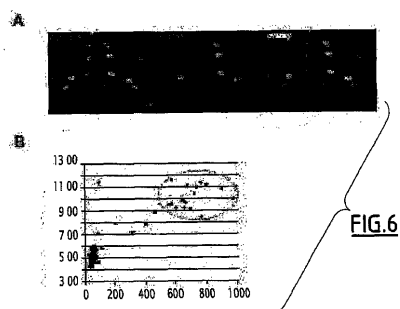
【図4】



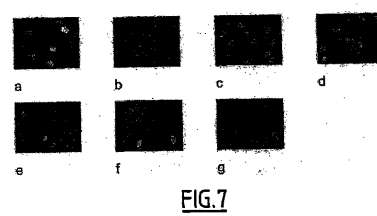
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

- (74)代理人 100087871
弁理士 福本 積
- (74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (72)発明者 ポポフ, アンドレイ
フランス国, エフ - 3 8 3 4 0 ボルupp, ルート ドゥ プレイ, ドメーヌ ドゥ ポプラン,
1 3 2 8
- (72)発明者 グリアソン, デイビッド
フランス国, エフ - 7 8 0 0 0 ベルサイユ, リュ ガブリエル, 2
- (72)発明者 フロラン, ジャン - クロード
フランス国, エフ - 9 1 1 9 0 ジフ シュール イベット, アレ モクスリ, 2 6

審査官 伊藤 幸司

- (56)参考文献 Tetrahedron, 1996年, 52(31), pp. 10427 - 440
Nucleic Acids Research, 2006年, 34(5), e43

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 0 7 D 4 7 1 / 0 4
C 0 9 B 5 7 / 0 0
C 0 9 K 1 1 / 0 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 6 8
CAPLUS / REGISTRY (STN)