

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月25日(25.08.2016)

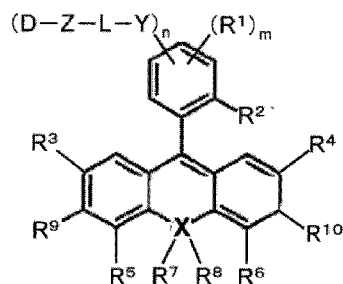


(10) 国際公開番号
WO 2016/132802 A1

- (51) 国際特許分類:
C09B 11/28 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/84* (2006.01)
D06P 1/44 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/051702
- (22) 国際出願日: 2016年1月21日(21.01.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
62/118,558 2015年2月20日(20.02.2015) US
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 花岡 健二郎(HANAOKA Kenjiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 島本 一史(SHIMAMOTO Kazuhito); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 浦野 泰照(URANO Yasuteru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 高野 陽子(TAKANO Yoko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小野 誠, 外(ONO Makoto et al.); 〒1070051 東京都港区元赤坂一丁目2番7号 赤坂Kタワー アンダーソン・毛利・友常法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: SULFANE SULFUR-SELECTIVE FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: sulfane sulfur 選択的蛍光プローブ



(I)

(57) Abstract: [Problem] To provide a novel fluorescent probe that shows a sufficient solubility in water and is capable of detecting sulfane sulfur *in vivo*. [Solution] A compound represented by general formula (I) or a salt thereof.

(57) 要約: 【解決課題】 十分な水溶性を示し、かつ生体内で sulfane sulfur を検出する新たな蛍光プローブを提供すること。 【解決手段】 以下の一般式 (I) で表される化合物又はその塩。

WO 2016/132802 A1

明 細 書

発明の名称 : sulfane sulfur 選択的蛍光プローブ 技術分野

[0001] 本発明は、sulfane sulfurを選択的に検出できる新規蛍光プローブに関する。

背景技術

[0002] 生体内において産生される活性イオウ分子はその反応性の高さからタンパク質やシグナル分子を修飾し、様々な生理機能に関与することが報告されており、近年注目されている。ここで、活性イオウ分子とは、硫化水素 (H_2S) や0価の硫黄原子 (S^0 、sulfane sulfur) を初めとした反応性の高い硫黄原子を持った分子のことを意味する。

1990年頃から H_2S が活性イオウ分子として注目を集め、研究が行われてきた。(非特許文献1及び2)さらに近年、 H_2S に加えて、0価の硫黄原子 (S^0 、sulfane sulfur) がより反応性の高い硫黄原子として注目を集めている(非特許文献3)。生体内で活性イオウ分子を産生する酵素はcystathionine β -synthase (CBS)、cystathionine γ -lyase (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) などが報告されている(図1参照)。生体内で H_2S とsulfane sulfurのどちらがどの程度重要なのか、そしてこれら酵素が生体内で H_2S とsulfane sulfurをそれぞれどの程度産生するのかは未だ議論の渦中である。そのため、生体内で活性イオウ分子を選択的かつ感度良く検出する技術などの研究用ツールの開発は本研究分野の進展に極めて重要である。

[0003] 2014年に、cystineを基質としたとき、CSEからsulfane sulfurを含むcysteine persulfideが産生されることが明らかになり、実際に生体内でsulfane sulfur

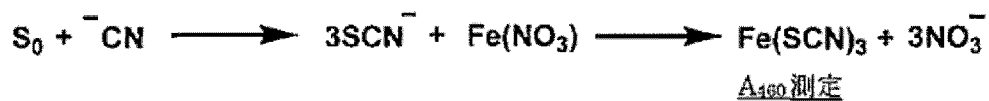
が存在することが示された。(非特許文献4) そのため、近年、細胞内の sulfane sulfurを検出する技術に注目が集まっている。

[0004] Sulfane sulfurの検出方法として、吸光法、モノブロモビマン法、蛍光プローブの3つがあげられる。

[0005] 吸光法

吸光法は、cyanideとsulfane sulfurから産生されるチオシアネートを Fe^{3+} で定量する方法であり、以下のスキームにより sulfane sulfurが検出される。吸光法は感度の低さが問題となる。

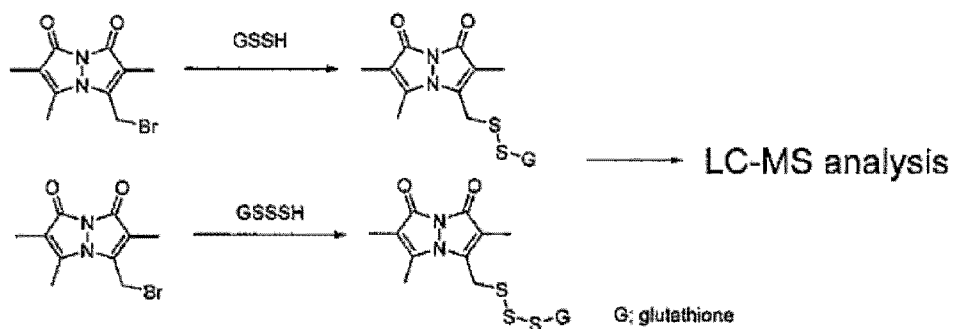
[0006] スキーム1 ; シアニドを用いたsulfane sulfurの検出スキーム



[0007] モノブロモビマン法

モノブロモビマンによる検出法は、親電子性の蛍光試薬であるモノブロモビマンと活性イオウ分子との反応産物をLC-MSにより解析する手法である(スキーム2)。この手法は、どのような活性イオウ分子がどの程度存在するかを同時に感度良く定量できる利点があるものの、吸光法と同様にホモジナイズなどの侵襲的な操作が必要であるため、リアルタイム測定には不向きである。

[0008] スキーム2 : モノブロモビマンを用いたsulfane sulfurの検出スキーム



[0009] 蛍光プローブ

蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法は、細胞を生きたままの状態で感度良く簡便に時空間分解能高く測定することができる点で優れており、汎用されている方法である。これまで *Sulfane sulfur* 選択的な蛍光プローブについて以下の2種類の報告があり、いずれも *Ming* らのグループが報告している（図2参照）。（非特許文献5及び6）

(1) SSP

Sulfane sulfur の求電子反応で *persulfide* が生成し、近傍のエステル構造に求核攻撃することで蛍光団が放出される。

(2) DSP

Hydrogen persulfide ($\text{H}-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}-\text{H}$) の求核反応を利用したプローブである。求核置換反応により *persulfide* が生成し、近傍のエステル構造に求核攻撃することで蛍光団が放出される。*DSP* は硫黄原子の末端が修飾された分子 ($\text{R}-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}-\text{R}$ 、 $\text{R}-\text{S}-\text{S}_n-\text{H}$) には応答せず、硫黄原子の末端が修飾されていない *hydrogen persulfide* に選択的に応答する蛍光プローブである。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1: *Neurosci.*, 1996, 16, 1066-1071

非特許文献2: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237, 527-531.

非特許文献3: *Anal. Biochem.*, 2011, 413, 1-7.

非特許文献4: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111, 7606-7611.

非特許文献5: *Chem. Sci.*, 2013, 4, 2892-2896.

非特許文献6: *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 7257-7260.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上記の従来技術の蛍光プローブは培養細胞での *sulfane sulfur* のイメージングに成功しているが、フルオレセインのキサンテン環状のフェノール性水酸基を両側修飾しており、その分子構造から水溶性が非常に悪いため、大量の界面活性剤を添加した条件下で実験を行っている。また蛍光団が放出される不可逆型の蛍光プローブであり、生細胞への応用には改善の余地は多いと考えられる。

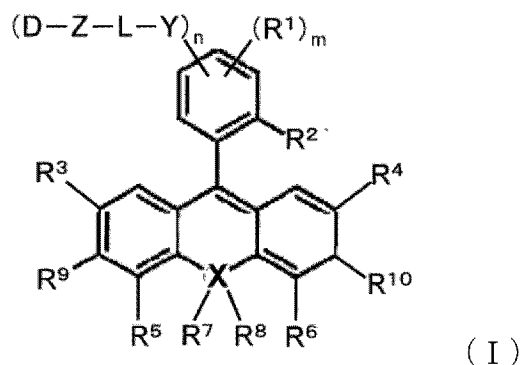
本発明は、十分な水溶性を示し、かつ生体内で *sulfane sulfur* を検出する新たな蛍光プローブを提供することを目的とするものである。

課題を解決する手段

[0012] 本発明者等は、キサンテン骨格を母核とする蛍光色素に、これに FRET (Fluorescence resonance energy transfer (蛍光共鳴エネルギー移動)) を起こすことができるドナーとしての色素分子を結合し、更に、*sulfane sulfur* と反応後はキサンテン系色素に由来する蛍光を発しない構造を有する新規蛍光色素を設計する目的で鋭意検討したところ、キサンテン骨格に結合したベンゼン環に特定の置換基を導入することにより、上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

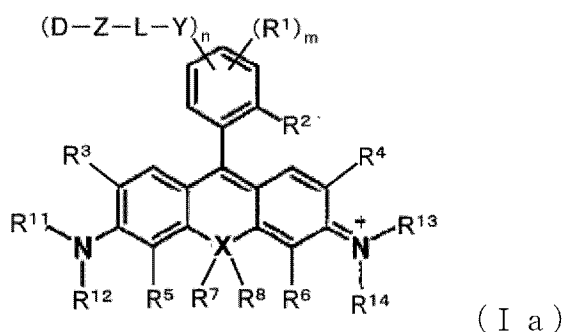
[0013] 即ち、本発明は、

[1] 以下の一般式 (I) :



(式中、
R¹は、水素原子を示すか、又はベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；
R²は、SH又はS-S-R（Rは、炭素数1～6のアルキル基を示し；
R³及びR⁴は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；
R⁵及びR⁶は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し
R⁷及びR⁸は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリール基を示し、
ここで、Xが酸素原子の場合は、R⁷及びR⁸は存在せず、
Xがリン原子の場合は、-R⁷及び-R⁸の一方は、=Oであってもよい；
R⁹及びR¹⁰は、
 (i) それぞれ独立に、NH₂、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基から選択され、又は
 (ii) それぞれ独立に、ヒドロキシル基又はアルコキシ基から選択され
；
Xは、酸素原子、珪素原子、錫原子、ゲルマニウム原子又はリン原子を示し
；
Yは、Lとの結合基aを示し；
Lは、リンカーを示し；
Zは、Lとの結合基bを示し；
Dは、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、クマリン、クマリン誘導体、ローダミン又はローダミン誘導体を示し；
mは、0～3の整数であり、nは、1～4の整数であり、m+n=4である。
。)
で表される化合物又はその塩。

[2] 以下の一般式 (I a) :



(式中、

$R^1 \sim R^8$ 、 X 、 Y 、 L 、 Z 、 D 、 m 及び n は、一般式(1)で定義した通りであり；

R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示し、

R^{11} 又は R^{12} は、 R^3 又は R^5 と一緒にあって、 R^{11} 又は R^{12} が結合している窒素原子を含む5～7員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される1～3個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数1～6個のアルキル、炭素数2～6個のアルケニル、又は炭素数2～6個のアルキニル、炭素数6～10個のアラルキル基、炭素数6～10個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい；

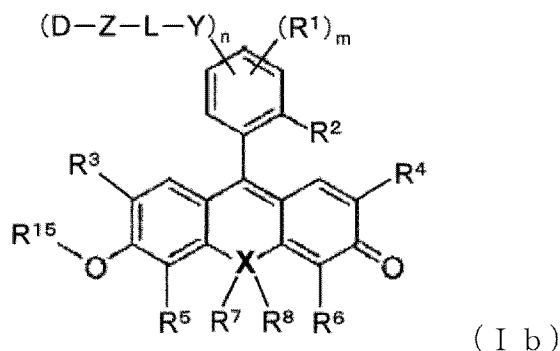
R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示し、

R^{13} 又は R^{14} は、 R^4 又は R^6 と一緒にあって、 R^{13} 又は R^{14} が結合している窒素原子を含む5～7員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される1～3個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数1～6個のアルキル、炭素数2～6個のアルケニル、又は炭素数2～6個のアルキニル、炭素数6～10個のアラルキル基、炭素数6～10個のアルキル置換アルケニル基で置換され

ていてもよい。)

で表される、[1]に記載の化合物又はその塩。

[3] 以下の一般式 (I b) :



(式中、

$R^1 \sim R^8$ 、X、Y、L、Z、D、m及びnは、一般式 (I) で定義した通りであり；

R^{15} は、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示す。)

で表される、[1]に記載の化合物又はその塩。

[4] 前記リンカーは、シクロアルキル基又はアリール基から選択される、[1]～[3]のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

[5] 結合基aは、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基又はアルキニル基から選択される、[1]～[4]のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

[6] 結合基bは、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基又はアルキニル基から選択される、[1]～[5]のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

[7] [1]～[6]のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む蛍光

プローブ。

[8] 細胞内の *sulfane sulfur* を検出する方法であって、
(a) [1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び
(b) 当該化合物又はその塩が細胞内で発する蛍光を測定する工程を含む方法。
を、提供するものである。

発明の効果

[0014] 本発明により、十分な水溶性を示し、かつ生体内で *sulfane sulfur* を検出する蛍光プローブを提供することが可能である。

特に、本発明により、*sulfane sulfur* との反応前は、FRET 効果によりドナーの色素分子からは蛍光が発せられないのに対して、反応後は、ドナーの色素分子由来の強い蛍光が発せられることから、優れた OFF/ON 型の蛍光プローブを提供することが可能である。

また、本発明の蛍光プローブは、*sulfane sulfur* との反応前は、ドナーの色素分子からは蛍光が発せられないのに対して、反応後は、ドナーの色素分子由来の強い蛍光が発せられることから、アクセプターとなるキサンテン骨格を母核とする蛍光色素の蛍光が減少することと組み合わせ、レシオ測定にも用いることができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] 酵素により反応性イオウ種の生成とその選択的検出の概略図

[図2] 従来技術の蛍光イメージング法の概略図

[図3] 化合物 8 (SSi p-1) に Na_2S_4 を添加した後の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果

[図4] $50\ \mu\text{M}$ の Na_2S_4 添加後における、 $5\ \text{mM}$ の GSH 存在下での $0.1\ \text{M}$ ナトリウムリン酸バッファー中における $1\ \mu\text{M}$ SSi p-1 の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果

[図5] SSi p-1 の H_2S との選択性を調べた結果

[図6] S S i p - 1 による生細胞 (A 5 4 9 細胞) のイメージングの結果

[図7] 化合物 a 1 に N a₂ S₄ を添加した前後の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果

[図8] 化合物 a 2 に N a₂ S₄ を添加した前後の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果

[図9] 化合物 2 5 に N a₂ S₄ を添加した前後の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルの測定結果

[図10] 2 5 0 μ M の N a₂ S₄ を添加した S S i p - 1 を用いた A 5 4 9 生細胞の共焦点顕微鏡像

[図11] S S i p - 1 の生細胞中での可逆性の観察結果 (共焦点顕微鏡像)

[図12] S S i p - 1 の生細胞中での可逆性の観察結果 (蛍光強度の変化)

[図13] 2 5 0 μ M の N a₂ S₄ を繰り返し添加した後の S S i p - 1 でインキュベートした A 5 4 9 生細胞の比 (F L / R B) の変化及びはそのレシオ像

[図14] S S i p - 1 と L y s o t r a c k e r 又は M i t o t r a c k e r との共染色の結果

[図15] 2 5 0 μ M の N a₂ S₄ を添加した化合物 a 4 を用いた A 5 4 9 生細胞の共焦点顕微鏡像

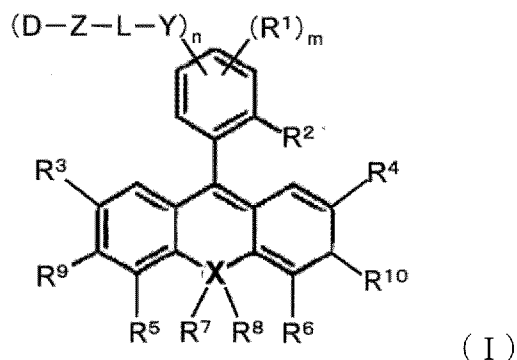
発明を実施するための形態

[0016] 本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基 (例えばアルコキシ基など) のアルキル部分は、特に言及しない場合には例えば炭素数 1 ~ 6 個、好ましくは炭素数 1 ~ 4 個、更に好ましくは炭素数 1 ~ 3 個程度の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、シクロプロピルメチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを挙げることができる。

[0017] 本明細書において「ハロゲン原子」という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、

塩素原子、又は臭素原子である。

[0018] 本発明の1つの実施態様は、下記の一般式(Ⅰ)で表される化合物又はその塩である。



[0019] 一般式(Ⅰ)において、 R^1 は、水素原子を示すか、又はベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示す。

R^1 がベンゼン環上に存在する一価の置換基を示す場合には、ベンゼン環上に同一又は異なる置換基が1ないし2個程度存在していることが好ましい。

R^1 が1個又は2個以上の一価の置換基を示す場合には、該置換基はベンゼン環上の任意の位置に置換することができる。好ましくは、 R^1 の全てが水素原子であるか、 R^1 の1つが一価の置換基であり、それ以外の R^1 は水素原子である。

[0020] R^1 が示す一価の置換基の種類は特に限定されないが、例えば、炭素数1～6個のアルキル基、炭素数1～6個のアルケニル基、炭素数1～6個のアルキニル基、炭素数1～6個のアルコキシ基、水酸基、カルボキシ基、スルホニル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン原子、又はアミノ基からなる群から選ばれることが好ましい。これらの一価の置換基は更に任意の置換基を1個又は2個以上有していてもよい。例えば、 R^1 が示すアルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが1個又は2個以上存在していてもよく、例えば R^1 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基、又はアミノアルキル基などであってもよい。また、例えば R^1 が示すアミノ基には1個又は2個のアルキル基が存在していてもよく、 R^1 が示すアミノ基はモ

ノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基であってもよい。更に、 R^1 が示すアルコキシ基が置換基を有する場合としては、例えば、カルボキシ置換アルコキシ基又はアルコキシカルボニル置換アルコキシ基などが挙げられ、より具体的には4-カルボキシブトキシ基又は4-アセトキシメチルオキシカルボニルブトキシ基などを挙げるができる。

[0021] 一つの好ましい側面において、 R^1 が炭素数1～6個のアルキル基などの一価の置換基であり、該置換基はベンゼン環上の3位から6位に存在する。

[0022] R^2 は、SH又はS-S-R（Rは、炭素数1～6、好ましくは1～2のアルキル基を示す）。

理論に拘束されることを意図するものではないが、一般式（1）の化合物においては、DとしてFRETを起こすことができるドナーの色素分子が導入されていることから、sulfane sulfur添加前は、ドナー色素に由来する蛍光は発せられないが、sulfane sulfurを添加すると、sulfane sulfurと R^2 のSH又はS-S-Rが反応して閉環構造を形成することにより、FRETが起こらないため、Dに由来する蛍光強度が上昇することで、OFF/ON型のプローブを提供することができる。従って、一般式（1）の化合物において、 R^2 の位置にSH又はS-S-Rが導入されていることが重要である。

[0023] 一般式（1）において、 R^3 及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示す。 R^3 又は R^4 がアルキル基を示す場合には、該アルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが1個又は2個以上存在していてもよく、例えば R^3 又は R^4 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。 R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子であることが好ましく、 R^3 及び R^4 がともに水素原子である場合、又は R^3 及び R^4 がともにフッ素原子又は塩素原子である場合がより好ましい。

[0024] 一般式（1）において、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素

数 1 ～ 6 個のアルキル基、又はハロゲン原子を示すが、 R^3 及び R^4 について説明したものと同様である。 R^5 及び R^6 が共に水素原子であるか、共に塩素原子であるか、又は共にフッ素原子であることが好ましい。

[0025] 一般式 (1) において、 R^7 及び R^8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示すが、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立に、炭素数 1 ～ 3 個のアルキル基であることが好ましく、 R^7 及び R^8 がともにメチル基であることがより好ましい。 R^7 及び R^8 が示すアルキル基にはハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよく、例えば R^7 又は R^8 が示すアルキル基はハロゲン化アルキル基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシアルキル基などであってもよい。 R^7 又は R^8 がアリール基を示す場合には、アリール基は単環の芳香族基又は縮合芳香族基のいずれであってもよく、アリール環は 1 個又は 2 個以上の環構成ヘテロ原子（例えば窒素原子、酸素原子、又は硫黄原子など）を含んでいてもよい。アリール基としてはフェニル基が好ましい。アリール環上には 1 個又は 2 個以上の置換基が存在していてもよい。置換基としては、例えばハロゲン原子、カルボキシ基、スルホニル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基などが 1 個又は 2 個以上存在していてもよい。

[0026] また、後述する X が酸素原子の場合は、 R^7 及び R^8 は存在しない。

[0027] また、X がリン原子の場合は、 $-R^7$ 及び $-R^8$ の一方は、 $=O$ であってもよい。X がリン原子の場合の好ましい側面においては、 $-R^5$ 及び $-R^6$ の一方は、 $=O$ であり、他方は、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基又はアリール基を示す。

[0028] R^9 及び R^{10} としては、(i) それぞれ独立に、 NH_2 、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基から選択される態様、又は、(ii) それぞれ独立に、ヒドロキシル基又はアルコキシ基から選択される態様がある。

モノアルキルアミノ基及びジアルキルアミノ基は、炭素数 1 ～ 6 の置換又は無置換のアルキル基を有することが好ましい。置換基としては、メチル基

、エチル基、エチルカルボキシ基などが挙げられる。

アルコキシ基は、炭素数 1 ～ 6 のアルコキシ基が好ましく、メトキシ基、エトキシ基がより好ましい。

[0029] 上記 (i) の態様において、 R^9 、 R^{10} の少なくとも 1 つが、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基である場合、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基は、 $R^4 \sim R^6$ のいずれかと一緒になって、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基の窒素原子を含む 5 ～ 7 員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される 1 ～ 3 個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル、炭素数 2 ～ 6 個のアルケニル、又は炭素数 2 ～ 6 個のアルキニル、炭素数 6 ～ 10 個のアラルキル基、炭素数 6 ～ 10 個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい。

[0030] 一般式 (I) において、X は、酸素原子、珪素原子、錫原子、ゲルマニウム原子又はリン原子を示す。本発明の好ましい態様においては、X は酸素原子である。

[0031] Y は、ベンゼン環と L とを連結させる結合基 a を示す。結合基 a としては、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基、アルキニル基などが挙げられ、特にカルボニル基、アミド基、アルキルアミド基が好ましい。

[0032] L は、リンカーを示す。リンカーとしては、キサンテン骨格を母核とする蛍光色素と、FRET を起こすことができるドナーとしての色素分子が近づくことを妨げる構造的に堅い構造から選択される。

また、リンカーとして、シクロアルキル基、アリール基が好ましい。

シクロアルキル基としてはトランスーシクロヘキシル基が好ましい。アリール基としては、フェニル基が好ましい。

[0033] Zは、LとDとを連結させる結合基bを示す。結合基bとしては、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基、アルキニル基などが挙げられ、特にカルボニル基、アミド基、アルキルアミド基が好ましい。

[0034] Dは、母核であるキサンテン系色素に対してFRET現象を引き起こすドナー色素を表す。このような色素としては、好ましくは、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、クマリン、クマリン誘導体、ローダミン、ローダミン誘導体が挙げられる。

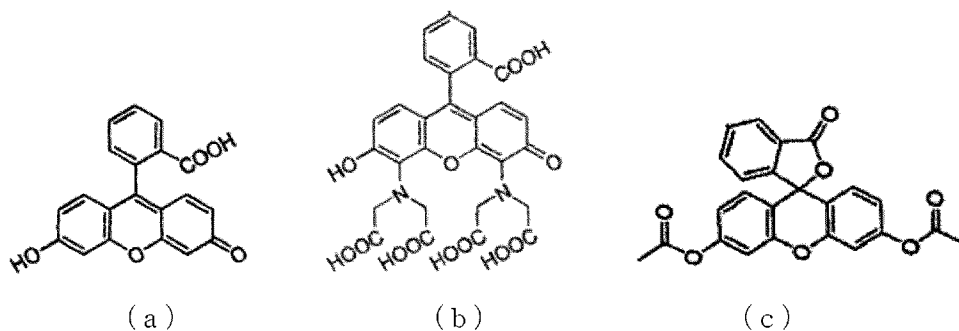
[0035] フルオレセイン誘導体としては、置換基を有するフルオレセイン、キサンテン骨格の水酸基がアセチル化されたフルオレセイン誘導体（当該誘導体はその他の置換基を有していてもよい）、キサンテン骨格に結合したフェニル基上のCOOHがキサンテン骨格と閉環構造を形成したフルオレセイン誘導体（当該誘導体はその他の置換基を有していてもよい）等が挙げられる。置換基としては、カルボキシ基を有するアルキルアミン、カルボキシエステル基（例えば、 $-\text{COOCH}_2\text{COCH}_3$ ）を有するアルキルアミン、クロロ基、フルオロ基、メチル基等が好ましい。置換基の導入位置としては特に限定されないが、キサンテン環2位、4位、5位、7位が好ましい。

クマリン誘導体としては、置換基を有するクマリンであり、置換基としては、ヒドロキシ基、塩素原子、アセトキシ基、アセトキシ基を有するアルコキシ基、トリフルオロメチル基等が好ましい。置換基の導入位置としては、クマリン3位、4位、6位が好ましい。

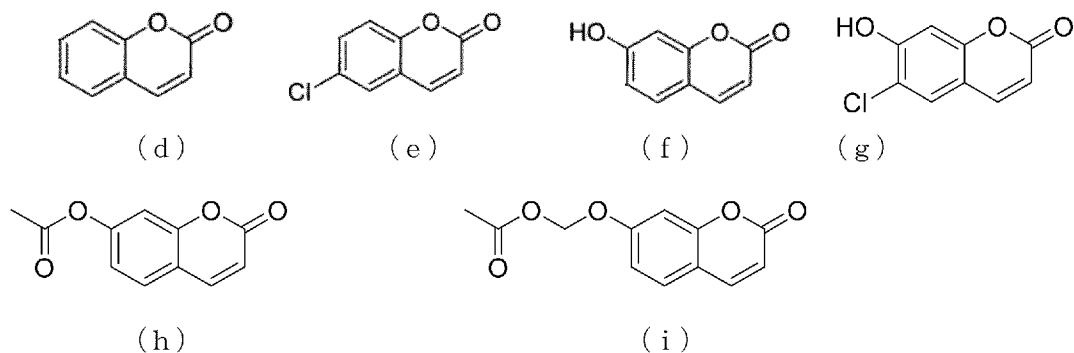
ローダミン誘導体としては、置換基を有するローダミン、キサンテン骨格のアミノ基がアルキル化されたローダミン誘導体（当該誘導体はその他の置換基を有していてもよい）、キサンテン骨格に結合したフェニル基上のCOOHがキサンテン骨格と閉環構造を形成したローダミン誘導体（当該誘導体はその他の置換基を有していてもよい）等が挙げられる。置換基としては、

クロロ基、フルオロ基等が好ましい。

[0036] フルオレセイン、及びフルオレセイン誘導体の非限定的な例としては、以下が挙げられる。



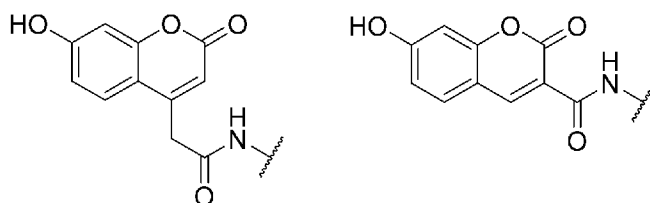
[0037] クマリン、及びクマリン誘導体の非限定的な例としては以下が挙げられる。



[0038] フルオレセイン又はフルオレセイン誘導体を連結基 b を介してリンカーにつなげる場合、連結基 b はフルオレセイン又はフルオレセイン誘導体のキサントン骨格に結合したフェニル基上の 4 位又は 5 位に導入するのが好ましい。

クマリン又はクマリン誘導体を連結基 b を介してリンカーにつなげる場合、連結基 b はクマリン又はクマリン誘導体の 3 位又は 4 位に導入するのが好ましい。

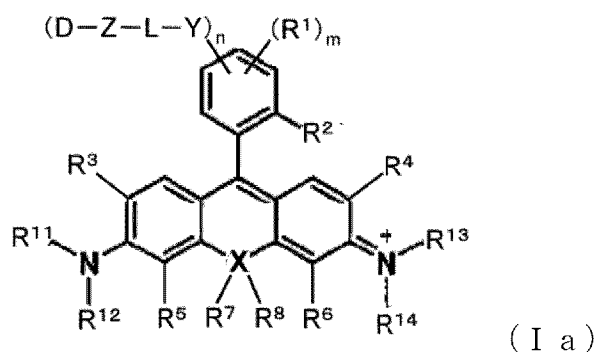
クマリン誘導体をリンカーにつなげる場合の非限定的例を以下に示す。



[0039] 一般式 (I) において、 m は、0～3 の整数であり、 n は、1～4 の整数であり、 $m+n=4$ である。

本発明の好ましい態様において、 m が 3 であり、 n は 1 である。

[0040] 本発明の 1 つの側面は、以下の一般式 (I a) で表される化合物又はその塩である。



[0041] 一般式 (I a) において、 $R^1 \sim R^8$ 、 X 、 Y 、 L 、 Z 、 D 、 m 及び n は、一般式 (I) で定義した通りである。

[0042] 一般式 (I a) において、 R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数 1～6 個のアルキル基を示す。

R^{11} 又は R^{12} は、 R^3 又は R^5 と一緒になって、 R^{11} 又は R^{12} が結合している窒素原子を含む 5～7 員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成してもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される 1～3 個の更なるヘテロ原子を含有してもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数 1～6 個のアルキル、炭素数 2～6 個のアルケニル、又は炭素数 2～6 個のアルキニル、炭素数 6～10 個のアラルキル基、炭素数 6～10 個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい。

好ましくは、 R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立に、水素原子、メチル基、エ

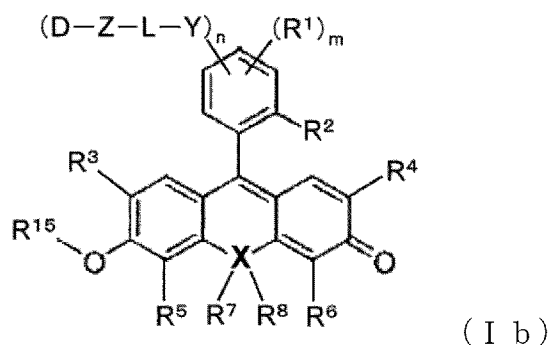
チル基である。

[0043] 一般式 (I a) において、 R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基を示す。

R^{13} 又は R^{14} は、 R^4 又は R^6 と一緒になって、 R^{13} 又は R^{14} が結合している窒素原子を含む 5 ～ 7 員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される 1 ～ 3 個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数 1 ～ 6 個のアルキル、炭素数 2 ～ 6 個のアルケニル、又は炭素数 2 ～ 6 個のアルキニル、炭素数 6 ～ 10 個のアラルキル基、炭素数 6 ～ 10 個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい。

好ましくは、 R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立に、水素原子、メチル基、エチル基である。

[0044] 本発明の 1 つの側面は、以下の一般式 (I b) で表される化合物又はその塩である。

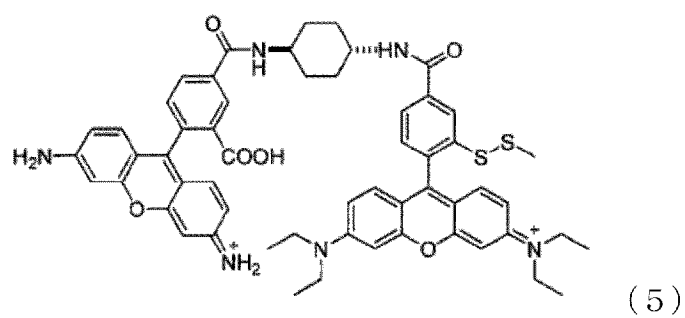
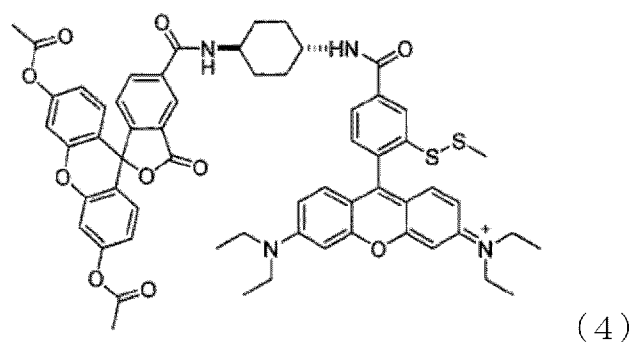
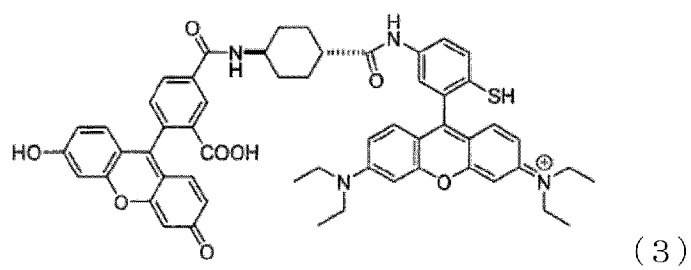
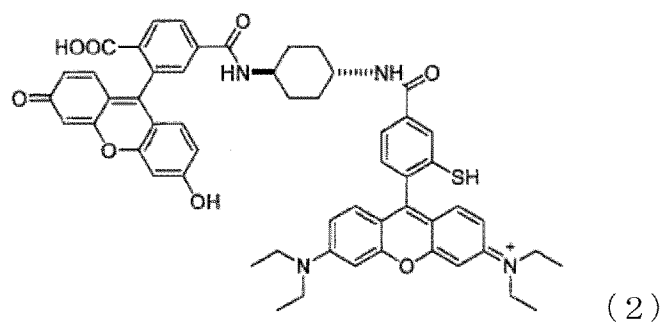
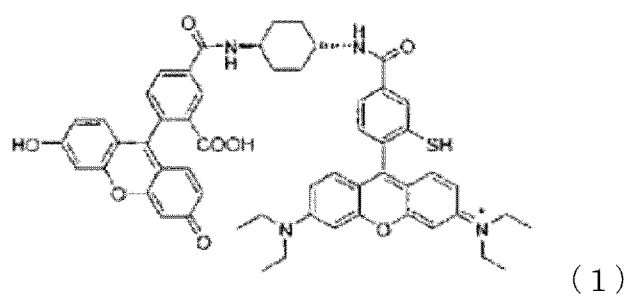


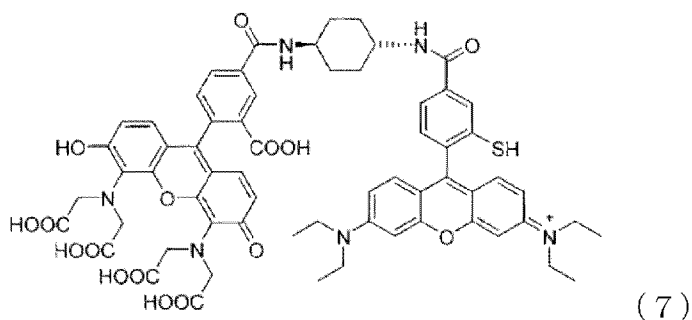
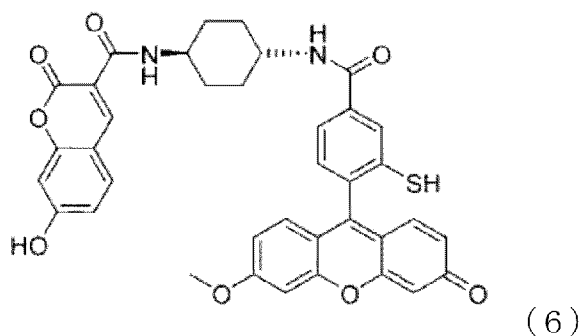
[0045] 一般式 (I b) において、 $R^1 \sim R^8$ 、X、Y、L、Z、D、m 及び n は、一般式 (I) で定義した通りである。

[0046] 一般式 (I b) において、 R^{15} は、水素原子又は炭素数 1 ～ 6 個のアルキル基を示す。

好ましくは、 R^{15} は、水素原子、メチル基、エチル基である。

[0047] 一般式 (I)、(I a) 又は (I b) に含まれる化合物の非限定的例を以下に示す。





[0048] 式(1)、(1a)及び(1b)で表される本発明の化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩として存在することができる。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。本発明の化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質も本発明の範囲内である。

[0049] 本発明の式(1)、(1a)及び(1b)で表される化合物は、置換基の種類により、1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、1個又は2個以上の不斉炭素に基づく光学活性体や2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体などの立体異性体のほか、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などは、いずれも本発明の範囲に包含される。

[0050] 本発明の化合物の代表的化合物の製造方法を本明細書の実施例に具体的に

示した。従って、当業者は、これらの説明をもとにして、反応原料、反応条件、及び反応試薬などを適宜選択して、必要に応じてこれらの方法に修飾や改変を加えることにより、一般式 (I)、(I a) 及び (I b) で表される本発明の化合物を製造することができる。

[0051] 本発明の式 (I)、(I a) 及び (I b) で表される本発明の化合物は、細胞内の *sulfane sulfur* を検出する蛍光プローブとして有用である。

即ち、本発明のもう1つの態様は、式 (I) で表される化合物又はその塩を含む蛍光プローブである。

また、本発明のもう1つの態様は、細胞内の *sulfane sulfur* を検出する方法であって、(a) 式 (I)、(I a) 又は (I b) で表される化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び (b) 当該化合物又はその塩が細胞内で発する蛍光を測定する工程を含む方法、である。

式 (I)、(I a) 及び (I b) で表される本発明の化合物又はその塩は、*sulfane sulfur* のない環境において実質的に無蛍光であるか、弱い蛍光のみを有するが、*sulfane sulfur* のある環境においてドナー色素に由来する強い蛍光を発する特徴を有する。従って、式 (I)、(I a) 及び (I b) で表される本発明の化合物又はその塩は、細胞内での *sulfane sulfur* を生理条件下で検出するための優れた OFF/ON 型の蛍光プローブを提供できる点で極めて有用である。

[0052] 本発明の蛍光プローブの使用方法は特に限定されず、従来公知の蛍光プローブと同様に用いることが可能である。通常は、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに上記式 (I)、(I a) 及び (I b) で表される化合物又はそれらの塩を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。本発明の蛍光プローブを適切な添加物と組み合わせて組成物の形態で用いてもよい。例えば、緩衝剤、溶解補助

剤、pH調節剤などの添加物と組み合わせることができる。

実施例

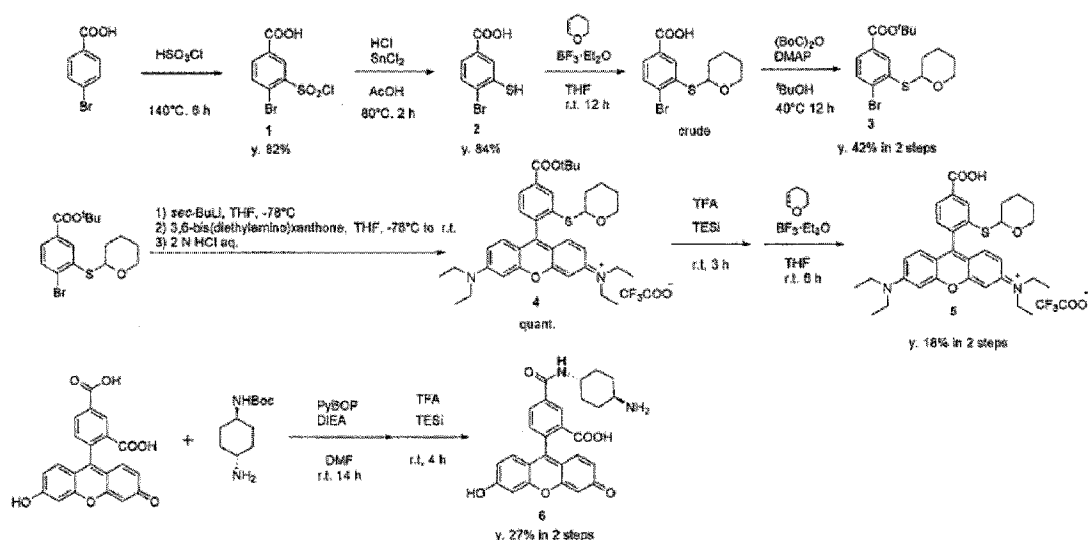
[0053] 以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0054] [合成実施例 1]

本発明の化合物 8 (S S i p - 1) の合成

以下のスキーム 1 により、本発明の化合物 8 を合成するのに用いる合成中間体を合成した。

[0055] スキーム 1 (合成中間体を合成する工程まで)



[0056] (1) 化合物 1 の合成

フラスコに 4-ブromo安息香酸 (5.06 g、25.3 mmol) を入れ、クロロスルホン酸 (12 mL) をゆっくりと滴下した。140°C で 6 時間加熱還流した。室温まで冷却後、反応溶液を氷水へゆっくりと滴下した。そのときに目的物の沈殿を生じた。ブフナー漏斗で沈殿をろ取、漏斗上で H₂O にて洗浄し、4-ブromo-3-クロロスルホニル安息香酸 (化合物 1、6.17 g、20.7 mmol、収率 82%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆): δ 8.23 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.33 (dd, 1H, J = 8.3, 2.0 Hz), 8.74 (d, 1H, J = 2.0 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆): δ 125.8, 132.1, 132.2, 137.8, 138.4, 143.8, 165.0.

HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M-H]⁻ 298.8604, Found 298.8589 (-1.5 mmu)

[0057] (2) 化合物2の合成

4-ブロモ-3-クロロスルホニル安息香酸 (化合物1、6.17 g、20.7 mmol) を酢酸 (60 mL) に溶解させ、そこへ 10 N HCl aq. (25 mL) に溶解させた塩化スズ (II) (27.8 g m、123.6 mmol) を加え、アルゴン下で 80 °C で 2 時間攪拌した。室温まで冷却後、生じた目的物の沈殿をブフナー漏斗でろ取、漏斗上で H₂O にて洗浄し 4-ブロモ-3-メルカプト安息香酸 (化合物2、4.03 g、17.0 mmol、収率 84%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆): δ 5.04 (1H, s), 7.66 (dd, 1H, J = 8.3, 2.0 Hz), 7.72 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.14 (d, 1H, J = 2.0 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆): δ 126.7, 128.2, 131.4, 131.5, 134.0, 136.7, 166.5.

HRMS (ESI⁻): Calcd. for [M-H]⁻ 232.9095, Found 232.9139 (-4.4 mmu).

[0058] (3) 化合物3の合成

4-ブロモ-3-メルカプト安息香酸 (化合物2、500 mg、2.20 mmol) と 3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (360 mg、4.3 mmol) を脱水テトラヒドロフラン (20 mL) に溶解させ、アルゴン下で 0 °C で冷却した。そこへ、三フッ化ホウ素-エチルエーテル錯体 (312 mg、2.20 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に残渣に水を加え、この混合物を酢酸エチルで抽出し、食塩水で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥して溶媒を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル/n-ヘキサン) で一部の副生成物を除いた。

粗精製した化合物を tert-ブチルアルコール (15 mL) に溶解させ、4-ジメチルアミノピリジン (38 mg、0.31 mmol) と di-tert-ブチルジ炭酸塩 (239 mg、1.10 mmol) を加え、アルゴン下で 40 °C で 12 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に残渣に水を加

え、この混合物を酢酸エチルで抽出し、食塩水で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥して溶媒を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン／*n*-ヘキサン）で *tert*-ブチル 4-ブロモ-3-（テトラヒドロピラン-2-イルチオ）ベンゾエート（化合物3、338 mg、0.91 mmol、収率42%）を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.59 (s, 9H), 1.64-1.77 (m, 3H), 1.87-1.98 (m, 2H), 2.05-2.13 (m, 1H), 3.63-3.71 (m, 1H), 4.13-4.20 (m, 1H), 5.35-5.38 (m, 1H), 7.56 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.62 (dd, 1H, $J = 1.8, 8.4$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 21.5, 25.2, 28.0, 31.0, 64.6, 81.3, 83.6, 127.5, 128.0, 130.2, 131.6, 132.4, 137.6, 164.6.

[0059] (4) 化合物4の合成

乾燥させアルゴン置換したフラスコに *tert*-ブチル 4-ブロモ-3-（テトラヒドロピラン-2-イルチオ）ベンゾエート（化合物3、600 mg、1.61 mmol）と脱水テトラヒドロフラン（15 mL）を加えた。−78°Cに冷却後、1M *sec*-ブチルリチウム（1.0 mL、1.0 mmol）を加え、20分間攪拌した。そのままの温度で3,6-ビス（ジエチルアミノ）キサントン（100 mg、0.30 mmol）を脱水テトラヒドロフラン（5 mL）に溶解してゆっくりと加え、室温に戻して1時間攪拌した。2N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して食塩水で洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した後、残渣をHPLC（溶離液、20%アセトニトリル／0.1%トリフルオロ酢酸／水（0分）から80%アセトニトリル／0.1%TFA／水（15分）；流速=25.0 mL/min）で精製し、2-S-THP-4-*tert*-ブトキシカルボニル-テトラエチルローダミン（化合物4、190 mg、0.30 mmol、quant.）を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.32 (t, 12H, $J = 6.8$ Hz), 1.43-1.62 (m, 4H), 1.65 (s, 1H), 1.82-1.85 (m, 2H), 3.47-3.52 (m, 1H), 3.68-3.72 (m,

8H), 3.86–3.89 (m, 1H), 5.27–5.29 (m, 1H), 7.00 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 7.06–7.09 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H, $J = 2.2, 9.5$ Hz), 7.42 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 8.05 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.1$ Hz), 8.48 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 12.8, 22.4, 26.4, 28.4, 32.4, 46.9, 65.6, 83.2, 86.4, 97.4, 114.4, 115.7, 128.5, 131.0, 132.5, 132.9, 135.3, 137.7, 138.4, 156.7, 157.4, 159.4, 166.1. HRMS (ESI⁺): Calcd. for $[\text{M}]^+$ 615.3257, Found 615.3223 (−3.4 mmu).

[0060] (5) 化合物5の合成

化合物4 (20 mg, 0.033 mmol) に TFA (3 mL) とトリエチルシラン (20 μL) を加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で一部の副生成物を除いた。

粗精製した化合物を脱水THF (5 mL) に溶解させ、そこへ、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (6 mg, 0.07 mmol) と三フッ化ホウ素-エチルエーテル錯体 (10 mg, 0.07 mmol) を加え、室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で精製し、2-S-THP-4-カルボキシテトラエチルローダミン (化合物5、3.3 mg, 0.0059 mmol、収率18%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.32 (t, 12H, $J = 7.0$ Hz), 1.49–1.58 (m, 5H), 1.86–1.99 (m, 1H), 3.45–3.53 (m, 1H), 3.70 (q, 8H, $J = 6.8$ Hz), 3.84–3.88 (m, 1H), 5.33 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz), 7.01 (d, 2H, $J = 3.0$ Hz), 7.08 (d, 2H, $J = 10.2$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J = 3.6, 9.6$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 8.12 (dd, 1H, $J = 1.5, 8.1$ Hz), 8.53 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 12.8, 22.2, 26.4, 32.5, 46.9, 65.3, 86.5, 97.5, 114.6, 115.7, 128.9, 131.1, 132.8, 133.4, 134.4, 137.7, 13

8.8, 156.7, 157.4, 159.4, 168.4. HRMS (ESI⁺): Calcd. For [M+H]⁺ 559.2631, Found 559.2593 (-3.8 mmu).

[0061] (6) 化合物6の合成

5-カルボキシフルオレsein (36 mg, 0.096 mmol) と N-Boc-trans-1,4-シクロヘキサンジアミン (36 mg, 0.17 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (65 mg, 0.50 mmol) と 1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (60 mg, 0.12 mmol) を脱水DMF (5 mL) に溶解させ、室温で14時間攪拌させた。2N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して食塩水で洗浄し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した後、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で一部の副生成物を除いた。

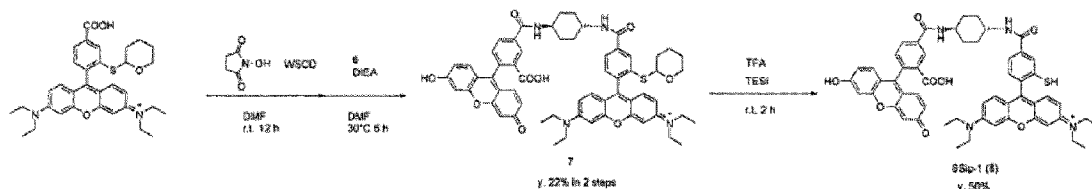
粗精製した化合物にTFA (4 mL) とトリエチルシラン (100 μL) を加え、室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で精製し、5-アミノシクロヘキシルアミドフルオレsein (化合物6、12.4 mg, 0.026 mmol、収率27%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.51-1.63 (m, 4H), 2.13-2.18 (m, 4H), 3.10-3.19 (m, 1H), 3.89-3.96 (m, 1H), 6.59 (dd, 2H, J = 2.4, 8.8 Hz), 6.66 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.75 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.33 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.20 (dd, 1H, J = 1.5, 8.3 Hz), 8.45 (d, 1H, J = 1.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 29.2, 29.7, 47.5, 48.6, 102.2, 109.0, 112.6, 123.3, 124.1, 126.4, 129.0, 134.7, 136.3, 151.8, 154.6, 157.9, 159.6, 163.9, 168.1. HRMS (ESI⁺): Calcd. for [M+H]⁺ 473.1713, Found 473.1699

(-1.4 mmu).

[0062] 次に以下のスキーム 2 により、本発明の化合物 8 を合成した。

[0063] スキーム 2 (中間体からプローブの合成)



[0064] (7) 化合物 7 の合成

化合物 5 (10 mg、0.018 mmol) と N-ヒドロキシスクシンイミド (16.1 mg、0.14 mmol) と 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (13.5 mg、0.07 mmol) を脱水 DMF (4 mL) に溶解させ、アルゴン下で室温で 12 時間撹拌させた。0.1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して食塩水で洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した後、残渣を HPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から 80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で一部の副生成物を除いた。

粗精製した化合物と化合物 6 (14 mg、0.030 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (22 mg、0.17 mmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解させ、アルゴン下で 30°C で 6 時間撹拌した。0.1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して食塩水で洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した後、残渣を HPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から 80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=5.0 mL/min) で精製し、S-pyran SSip-1 (化合物 7、4.0 mg、0.0039 mmol、収率 22%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.31 (t, 12H, $J = 6.4$ Hz), 1.45–1.58 (m, 5H), 1.65–1.69 (m, 4H), 1.83–1.84 (m, 1H), 2.16–2.18 (m, 4H), 3.42–3.43 (m, 1H), 3.69 (q, 8H, $J = 4.0$ Hz), 3.76–3.78 (m, 1H), 4.00–4.07 (m, 2H), 5.32–5.34 (m, 1H), 6.52–6.54 (m, 2H), 6.62 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.71 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 6.98 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz), 7.03–7.06 (m, 2H), 7.14–7.16 (m, 2H), 7.30–7.40 (m, 2H), 7.94 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.7$ Hz), 8.23 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.5$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 12.8, 22.1, 26.4, 32.3, 32.5, 46.9, 50.1, 50.2, 65.2, 86.7, 97.4, 103.7, 111.1, 113.8, 114.8, 115.7, 125.1, 125.8, 126.9, 128.7, 130.2, 131.1, 132.6, 132.9, 135.5, 137.4, 137.8, 138.2, 138.4, 154.2, 156.9, 157.3, 157.4, 159.4, 159.5, 167.9, 168.3, 170.5. HRMS (ESI^+): Calcd. for $[\text{M}]^+$: 1013.4159, Found 1013.4137 (–2.2 mmu).

[0065] (8) 化合物8の合成

S-pyran SSip-1 (化合物7、4.0 mg、0.0039 mmol) に TFA (2 mL) と トリエチルシラン (20 μL) を加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 / 水 (0分) から 80% アセトニトリル / 0.1% TFA / 水 (15分) ; 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、SSip-1 (1.8 mg、0.0019 mmol、収率 50%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.33 (t, 12H, $J = 7.1$ Hz), 1.64–1.68 (m, 4H), 2.13–2.19 (m, 4H), 3.71 (q, 8H, $J = 7.0$ Hz), 4.00–4.06 (m, 2H), 6.96–7.05 (m, 4H), 7.10 (dd, 2H, $J = 2.4, 9.6$ Hz), 7.17–7.30 (m, 6H), 7.42 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.53 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 7.86 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.1$ Hz), 8.11 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 8.31 (dd, 1H, $J = 1.5, 7.8$ Hz), 8.73 (m, 1H). HRMS (ESI^+): Calcd. for $[\text{M}]^+$ 929.3584, Found 929.3554 (–3.0 mmu). ;

精製後の HPLC クロマトグラム (20% アセトニトリル / 0.1% トリフ

ルオロ酢酸／水から80％アセトニトリル／0.1％トリフルオロ酢酸／水（流速＝1.0 mL／min）のリニアグラディエント，Abs. 300 nm）では17分に単一ピークを認めた。

[0066] [実施例1]

上記で合成した化合物8に Na_2S_4 を添加し、吸収スペクトル（UV-1650PC、SHIMADZU）および蛍光スペクトル（F-4500、HITACHI）を測定した。

図3の左図は、50 μM の Na_2S_4 （共溶媒として0.1％DMSO及び1 mg／mL BSA含有）添加後における、300 μM のGSH存在下での0.1 Mナトリウムリン酸バッファー（pH 7.4）中における1 μM SSip-1の吸収スペクトルの測定結果を、図3の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は470 nmである。

[0067] SSip-1は50 μM の Na_2S_4 添加後、ローダミン側の吸光減少とフルオレセイン由来の蛍光上昇が見られ、off/on型の蛍光プローブとなった。細胞内のsulfane sulfurを含む分子であるglutathione persulfide (GSSH)の濃度は10–100 μM と報告されており、SSip-1は50 μM の Na_2S_4 添加で約10倍の蛍光強度上昇が起こることから、細胞内のsulfane sulfurを十分に探知できるプローブといえる。

[0068] SSip-1の可逆性（5 mM GSH下でのin vitro assay）

細胞内のGSH濃度である、5 mM GSH存在下においてsulfane sulfurに応答するかを調べた（図4）。

図4の左図は、50 μM の Na_2S_4 （共溶媒として0.1％DMSO及び1 mg／mL BSA含有）添加後における、5 mMのGSH存在下での0.1 Mナトリウムリン酸バッファー（pH 7.4）中における1 μM SSip-1の吸収スペクトルの測定結果を、図4の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は470 nmである。

その結果、5 mMのGSH存在下において、 Na_2S_4 添加後、一度蛍光が上昇した後、経時的に蛍光強度が減少した。そこへ再び Na_2S_4 を添加すると再び蛍光強度が上昇し、可逆性を示した。

[0069] H_2S との選択性

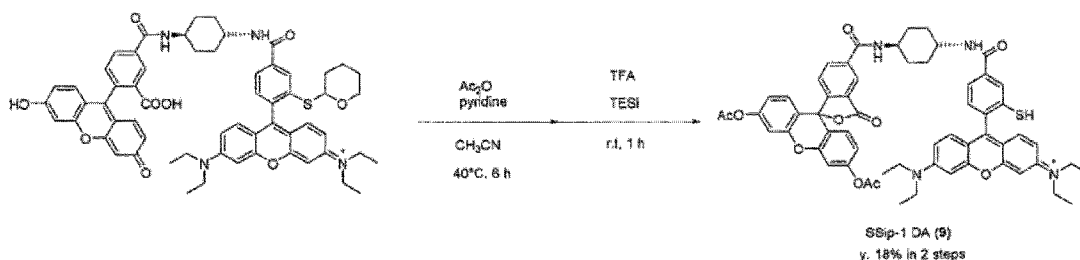
SSip-1の H_2S との選択性を調べた結果を図5に示す。図5の左図は、50 μM のNaHS（共溶媒として0.1% DMSO及び1 mg/mL BSA含有）添加後における、300 μM のGSH存在下での0.1 Mナトリウムリン酸バッファー（pH 7.4）中における0.1 μM SSip-1の吸収スペクトルの測定結果を、図3の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は470 nmである。

図5から分かるように、 H_2S ドナーである50 μM NaHSを添加しても、蛍光強度の上昇はほとんど見られず、選択性を示した。

[0070] 生細胞イメージング

In vitroにおいて、SSip-1はsulfane sulfurに対し優れた応答を示したため、SSip-1の細胞イメージングを行った。SSip-1はフルオレセイン構造を持つため、細胞膜透過性を有していない可能性が考えられた。そこで、フルオレセインを細胞膜透過型にする際に用いられるジアセテート（DA）体をSSip-1に適用し、以下のスキームによりSSip-1 DAの合成を行った。

[0071] スキーム3



[0072] 化合物9（SSip-1 DA）の合成

S-pyran SSip-1（化合物7、10 mg、0.0099 mmol）を脱水アセトニトリル（5 mL）に溶解させ、無水酢酸（1 mL）と

ピリジン (80 mg、1.01 mmol) を加え、アルゴン下で40°Cで6時間攪拌させた。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=5.0 mL/min) で精製し、一部の副生成物を除いた。

粗精製した化合物にTFA (1 mL) とトリエチルシラン (10 µL) に溶解させ、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=5.0 mL/min) で精製し、SSip-1 DA (1.8 mg、0.0018 mmol、収率18%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.32 (t, 12H, $J = 6.8$ Hz), 1.60–1.63 (m, 4H), 2.13–2.15 (m, 4H), 2.30 (s, 6H), 3.71 (q, 8H, $J = 6.7$ Hz), 3.94–4.02 (m, 2H), 6.85–6.94 (m, 4H), 7.01 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 7.10 (dd, 2H, $J = 2.2, 9.5$ Hz), 7.17–7.18 (m, 2H), 7.20–7.21 (m, 2H), 7.34–7.42 (m, 2H), 7.85 (dd, 1H, $J = 7.8, 2.0$ Hz), 8.09 (m, 1H), 8.22–8.24 (m, 1H), 8.47–8.48 (m, 1H). HRMS (ESI⁺): Calcd. for $[\text{M}]^+$ 1013.3795, Found 1013.3764 (–3.1 mmu).

精製後のHPLCクロマトグラム (80%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水から20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (流速=1.0 mL/min) のリニアグラディエント、Abs. 550 nm) では8分に単一ピークを認めた。

[0073] SSip-1 DAをA549細胞に導入し、顕微鏡下で500 µMの Na_2S_4 を細胞外へ添加した。A549細胞は、10 µM SSip-1 DA (0.0003%のpurulonic及び共溶媒として1%DMSOを含有) で3時間インキュベートした。励起波長は488 nmであり、発光波長は500–570 nm及び590–650 nmであった。

その結果、蛍光強度が上昇し、SSip-1は生細胞内でsulfane

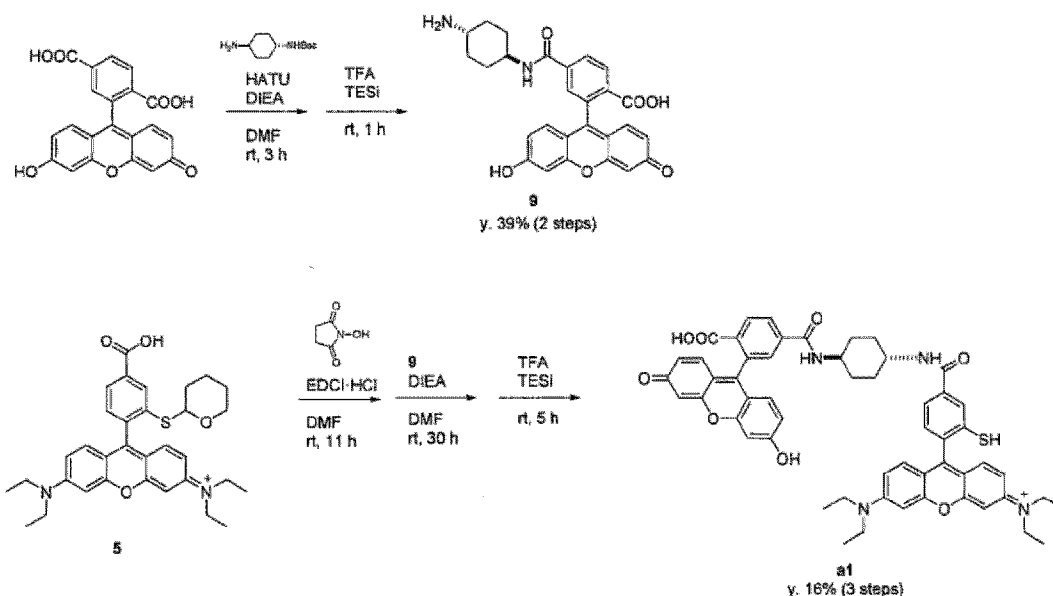
sulfurを検出できた(図6)。なお、プローブの導入の際に、界面活性剤であるpurulonicを使用し、プローブの凝集を防いだ。また、フルオレセイン由来の蛍光波長の領域(500–570nm)とローダミン由来の蛍光波長の領域(590–650nm)の2つの波長の蛍光強度を算出すると、フルオレセイン由来の蛍光波長領域の強度は増加し、ローダミン由来の蛍光波長領域の強度はわずかに減少した。そのため、本測定下ではSSip-1は細胞イメージングにおいて、フルオレセインからの蛍光強度の変化にするイメージングだけでなく、レシオ測定も可能であると考えられた。

[0074] [合成実施例2]

本発明の化合物a1(6-フルオレセイン-SSip-1)の合成

以下のスキーム4により、本発明の化合物a1を合成した。

[0075] スキーム4



[0076] (1) 化合物9の合成

6-カルボキシフルオレセイン(200mg、0.53mmol)とN-Boc-trans-1,4-シクロヘキサジアミン(285mg、1.33mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(686mg、5.32mmol)とO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N

, N', N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート (HATU) (403 mg, 1.06 mmol) を脱水DMF (5 mL) に溶解させ、室温で3時間攪拌した。1N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して、有機層を *brine* で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。その後、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=5.0 mL/min) で一部の副生成物および試薬残渣を除いた。

粗精製した化合物にTFA (4 mL) とトリエチルシラン (100 μ L) を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=25.0 mL/min) で精製し、6-アミノシクロヘキシルアミド-フルオレsein (化合物9、98.3 mg, 0.21 mmol、収率39%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.45-1.52 (4H, m), 2.00-2.07 (4H, m), 3.07 (1H, br m), 3.82 (1H, br m), 6.62 (2H, dd, J = 8.8, 2.2 Hz), 6.71 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.78 (2H, d, J = 2.2 Hz), 7.64 (1H, d, J = 1.5 Hz), 8.11 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.15 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 29.14, 29.61, 47.59, 48.60, 102.26, 109.13, 112.77, 122.16, 124.78, 128.25, 129.23, 129.58, 140.65, 151.82, 152.56, 157.32, 159.65, 163.76, 168.00

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 473.1713, found, 473.1680 (-3.3 mmu)

[0077] (2) 化合物 a 1 の合成

化合物5 (20.0 mg, 0.036 mmol) とN-ヒドロキシスクシンイミド (37.0 mg, 0.32 mmol) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (31.0 mg, 0.16 mmol) を脱水DMF (4 mL) に溶解させ、室温で11時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0

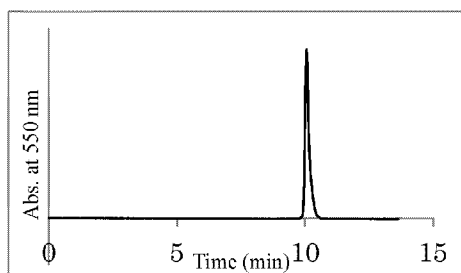
． 1 %トリフルオロ酢酸／水（0分）から80 %アセトニトリル／0.1 % TFA／水（15分）；流速＝5.0 mL/min）で粗精製した。

粗精製した化合物と化合物9（14 mg、0.030 mmol）とN，N－ジイソプロピルエチルアミン（22 mg、0.17 mmol）を脱水DMF（5 mL）に溶解させ、室温で30時間攪拌した。0.1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して有機層をbrineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣にトリフルオロ酢酸（1 mL）、トリエチルシラン（10 μL）を加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC（溶離液、20 %アセトニトリル／0.1 %トリフルオロ酢酸／水（0分）から80 %アセトニトリル／0.1 %TFA／水（15分）；流速＝5.0 mL/min）で精製し、化合物a1（4.3 mg、4.62 μmol、3工程での収率61 %）を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 1.30 (12H, t, J = 7.1 Hz), 1.50–1.52 (4H, m), 2.02–2.03 (4H, m), 3.68 (8H, q, J = 7.3 Hz), 3.88 (2H, br), 6.53–6.56 (4H, m), 6.60–6.62 (2H, m), 6.69–6.70 (2H, m), 6.88 (2H, d, J = 9.2 Hz), 6.93–6.97 (4H, m), 7.43 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.63 (1H, br), 7.99 (1H, dd, J = 8.1, 1.7 Hz), 8.06 (1H, d, J = 7.8 Hz), 8.12–8.14 (1H, m), 8.22 (1H, d, J = 1.5 Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for [M]²⁺, 1857.7045, found, 1857.7021 (−2.4 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).

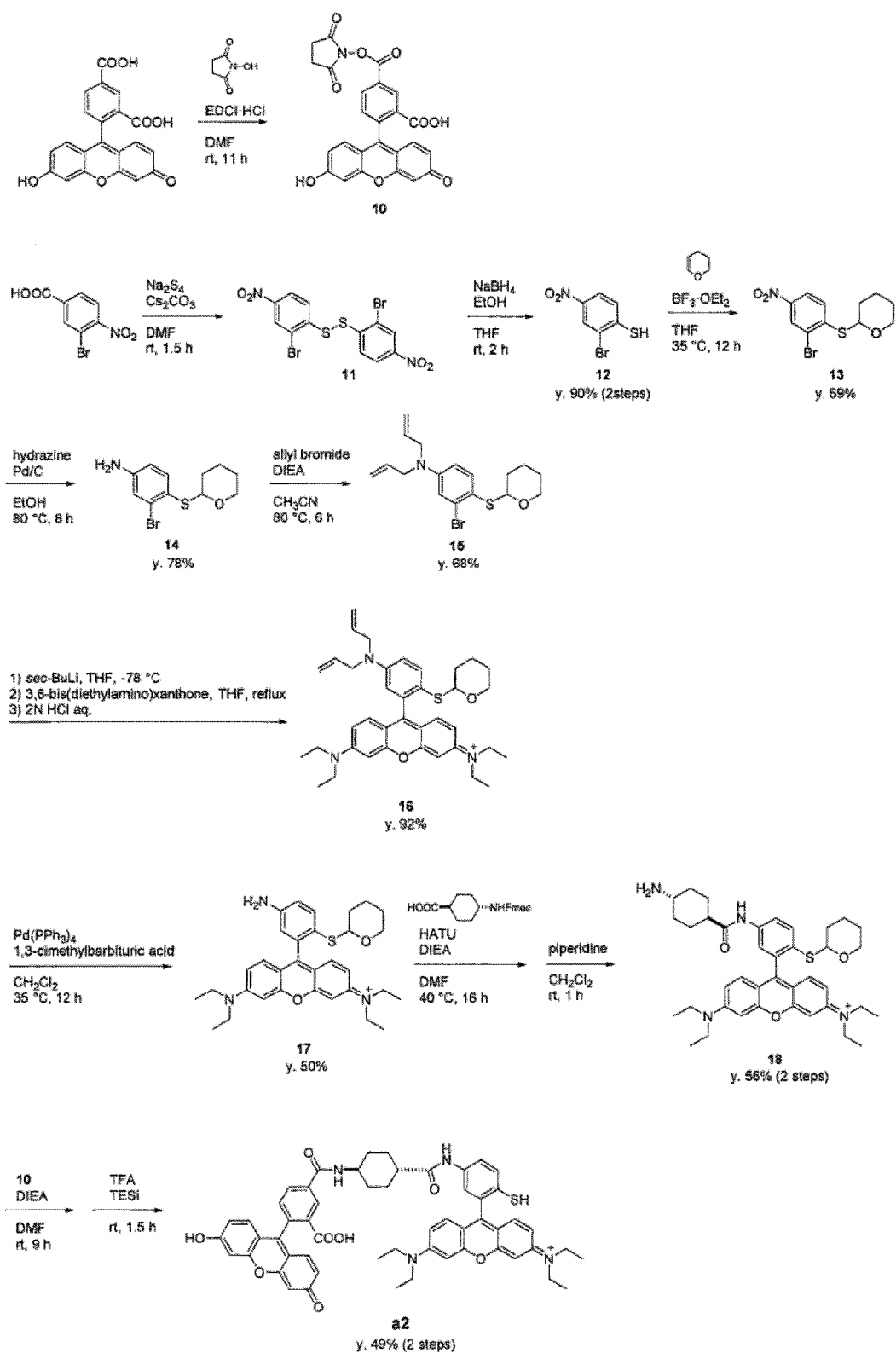


[0078] [合成実施例 3]

本発明の化合物 a 2 (5-アミド-SSIP-1) の合成

以下のスキーム 5 により、本発明の化合物 a 2 を合成した。

[0079] スキーム 5



[0080] (1) 化合物 12 の合成

四硫化ナトリウム (Na_2S_4 、4.37 g、25.1 mmol) を脱水 DMF に溶解し、2-ブロモ-1-フルオロ-4-ニトロベンゼン (5.0 g

、22.8 mmol)を加えて、室温で1.5時間攪拌した。反応溶液を0°Cに冷やし、2N HCl aq.を加えて反応を停止させた。この混合物にジクロロメタンを加えた後、桐山漏斗でろ過して不溶物を取り除いた。ろ液をジクロロメタンで抽出して、有機層を水、brineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた後にDMF以外の溶媒を減圧留去した。残渣を桐山漏斗でろ過し、DMFに溶解しない固体を取り除いた。ろ液を減圧留去し、残渣をジクロロメタンで洗浄し、粗精製の化合物11を得た。化合物11をTHF(60 mL)、エタノール(20 mL)の混合溶媒に溶解させ、0°Cに冷却し、水素化ホウ素ナトリウム(489 mg、12.9 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応溶液を0°Cに冷却し、2N HCl aq.を加えて反応を停止させた。有機溶媒を減圧留去した後、析出した固体を桐山漏斗でろ取し、水で洗浄し、2-ブロモ-4-ニトロベンゼンチオール(化合物12、4.8 g、20.5 mmol、2工程での収率90%)を得た。
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.37 (1H, s), 7.49 (1H, d, J = 8.8 Hz), 8.04 (1H, dd, J = 8.4, 2.6 Hz), 8.42 (1H, d, J = 2.2 Hz)
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 121.16, 122.57, 127.99, 128.71, 144.51
HRMS (ESI⁻): calcd for [M-H]⁻, 231.9068, found, 231.9064 (-0.4 mmu)

[0081] (2) 化合物13の合成

化合物12(1.36 g、5.81 mmol)を脱水THF(30 mL)に溶解し、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(4.88 g、58.1 mmol)を加えて、アルゴン下で0°Cに冷却した。そこへ、トリフッ化ボロン-エチルエーテル錯体(826 mg、5.81 mmol)を加え、35°Cで12時間攪拌した。反応溶液を室温に戻した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止した。この混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層をbrineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、酢酸エチル/n-ヘキサン)で精製し、2-((2-ブロモ-4-ニトロフェニル)チオ)テトラヒドロ-2H-ピラン(化合物13、1.28 g、4.03 mmol、収率69%)を得た。

得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.67–1.82 (3H, m), 1.92–1.97 (2H, m), 2.14–2.18 (1H, m), 3.66–3.73 (1H, m), 4.09–4.13 (1H, m), 5.53 (1H, m), 7.70 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.11 (1H, dd, $J = 8.8, 2.9$ Hz), 8.37 (1H, d, $J = 2.9$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20.84, 25.27, 30.96, 63.90, 82.98, 121.32, 122.51, 127.14, 127.26, 127.46, 145.09, 148.10

[0082] (3) 化合物 14 の合成

アルゴン下で化合物 13 (1.28 g、4.03 mmol) をエタノール (40 mL) に溶解し、palladium 10% on carbon (128 mg) を加えた。そこへ、エタノール (10 mL) に溶解したヒドラジン水和物 (H_2O 中 50%、644 mg、20.1 mmol) を滴下し、80°C で 8 時間攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、セライトろ過し、パラジウムを取り除いた。ろ液を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー (シリカゲル、 n -ヘキサン/ジクロロメタン) で精製し、3-ブロモ-4-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)チオ)アニリン (化合物 14、0.90 g、3.13 mmol、収率 78%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.57–1.67 (3H, m), 1.83–1.88 (2H, m), 2.01–2.04 (1H, m), 3.52–3.59 (1H, m), 3.75 (2H, s), 4.14–4.22 (1H, m), 5.13 (1H, m), 6.56 (1H, dd, $J = 8.4, 2.6$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 21.27, 25.55, 31.23, 64.23, 85.62, 114.65, 119.04, 122.91, 128.77, 135.65, 147.17

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 288.0058, found, 288.0049 (−0.9 mmu)

[0083] (4) 化合物 15 の合成

化合物 14 (0.80 mg、2.78 mmol) を脱水アセトニトリル (15 mL) に溶解し、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン (3.59 g、27.8 mmol)、臭化アリル (1.68 g、13.9 mmol) を加え

て、アルゴン下 80°C で6時間攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、水を加え、この混合物をジクロロメタンで抽出し、有機層を 1N HCl aq. および brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、 n -ヘキサン／ジクロロメタン）で精製し、 N,N -ジアリル-3-ブロモ-4-（（テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル）チオ）アニリン（化合物15、 0.69g 、 1.87mmol 、収率68%）を得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz , acetone-d_6): δ 1.57–1.63 (3H, m), 1.69–1.85 (2H, m), 1.94–1.99 (1H, m), 3.46–3.53 (1H, m), 3.97–3.98 (4H, m), 4.07–4.14 (1H, m), 5.11–5.17 (4H, m), 5.20 (1H, m), 5.81–5.93 (2H, m), 6.67 (1H, dd, $J = 8.8, 2.9\text{ Hz}$), 6.93 (1H, d, $J = 2.9\text{ Hz}$), 7.40 (1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz , CDCl_3): δ 21.27, 25.59, 31.25, 52.61, 64.19, 85.82, 111.87, 116.22, 116.40, 120.02, 129.55, 132.90, 135.80, 149.22

HRMS (ESI^+): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 368.0684, found, 368.0683 (-0.1 mmu)

[0084] (5) 化合物16の合成

乾燥させアルゴン置換したフラスコに化合物15 (229mg 、 0.62mmol) を加え、脱水テトラヒドロフラン (10mL) に溶解させた。 -78°C に冷却後、 1M sec -ブチルリチウム ($620\mu\text{L}$ 、 0.62mmol) を加え、20分間攪拌した。そのままの温度で3,6-ビス（ジエチルアミノ）キサントン (30mg 、 0.089mmol) を脱水テトラヒドロフラン (5mL) に溶解してゆっくりと加え、室温に戻した後、 70°C で1時間攪拌した。室温まで冷却した後、 2N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して、有機層を brine で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン／メタノール）で精製し、 $5-N$ -ジアリル-2-S-THP-テトラエチルローダミン（化合物16、 50mg 、 0.082mmol 、収率92%）を得た。

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 1.33 (12H, t, J = 7.0 Hz), 1.39–1.54 (5H, m), 1.65–1.69 (1H, m), 3.14–3.21 (1H, m), 3.60–3.67 (1H, m), 3.77 (8H, q, J = 7.1 Hz), 4.04 (4H, d, J = 5.1 Hz), 4.83 (1H, m), 5.15–5.19 (4H, m), 5.83–5.91 (2H, m), 6.71 (1H, d, J = 2.9 Hz), 6.94–6.96 (2H, m), 6.99 (2H, dd, J = 8.8, 2.9 Hz), 7.14–7.20 (2H, m), 7.28 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.30 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.64 (1H, d, J = 8.8 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 12.77, 21.91, 26.08, 32.28, 46.51, 53.41, 64.46, 87.77, 96.70, 96.81, 114.04, 114.64, 114.72, 114.85, 115.04, 115.11, 116.60, 119.25, 132.96, 133.47, 134.31, 137.54, 137.55, 137.85, 149.05, 156.57, 156.69, 158.70, 158.89, 159.25

HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}]^+$, 610.3467, found, 610.3449 (–1.8 mmu)

[0085] (6) 化合物 17 の合成

アルゴン置換したフラスコに 1, 3-ジメチルバルビツール酸 (74 mg、0.48 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) (11 mg、9.5 μmol) を加え、脱水ジクロロメタン (15 mL) に溶解させた化合物 16 (58 mg、0.095 mmol) を加えて、35°C で 12 時間攪拌した。室温まで冷却した後、反応溶液を飽和炭酸ナトリウム水溶液、*brine* で洗浄し Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール) で精製し、5-アミノ-2-S-THP-テトラエチルローダミン (化合物 17、25 mg、0.047 mmol、収率 50%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 1.33 (12H, t, J = 7.0 Hz), 1.45–1.62 (6H, m), 3.15–3.19 (1H, m), 3.59–3.66 (1H, m), 3.77 (8H, q, J = 7.1 Hz), 4.76 (1H, m), 5.61 (2H, s), 6.73 (1H, d, J = 2.2 Hz), 6.96 (3H, m), 6.99 (3H, m), 7.18 (1H, dd, J = 9.5, 2.2 Hz), 7.20 (1H, dd, J = 9.5, 2.2 Hz), 7.30 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.33 (1H, d, J = 9.5 Hz), 7.52 (1H, d, J = 8.1 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 12.80, 22.02, 26.08, 32.31, 46.50, 64.60, 87.92, 96.72, 96.82, 114.60, 114.67, 114.88, 115.06, 115.54, 117.13, 118.61, 132.98, 133.49, 137.97, 138.14, 150.35, 156.55, 156.67, 158.66, 158.84, 159.38

HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}]^+$, 530.2841, found, 530.2830 (-1.0 mmu)

[0086] (7) 化合物 18 の合成

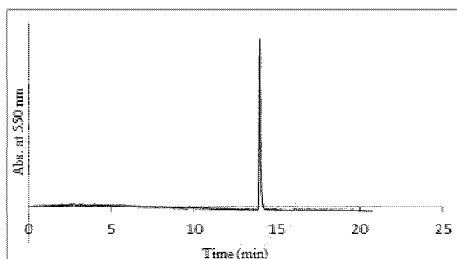
化合物 17 (10 mg、19 μmol)、N-Fmoc-trans-1,4-シクロヘキサンジアミン (21 mg、57 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (25 mg、0.19 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート (HATU) (22 mg、57 μmol) を脱水 DMF (3 mL) に溶解させ、40°C で 16 時間攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出し、有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。粗精製物をジクロロメタン (5 mL) に溶解し、ピペリジン (0.50 mL) を加えて室温で 1 時間攪拌した。1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出し、有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 80% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (20 分); 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、5-アミノシクロヘキシルアミド-2-S-THP-テトラエチルローダミン (化合物 18、6.0 mg、11 μmol 、2 工程での収率 56%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.31 (12H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.48–1.59 (9H, m), 1.76–1.79 (1H, m), 1.94–1.98 (4H, m), 2.34–2.38 (1H, m), 2.72–2.76 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.63 (1H, m), 3.69 (8H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.08–5.09 (1H, m), 6.98–6.99 (2H, m), 7.06–7.08 (2H, m), 7.21 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.69–7.71 (2H, m), 7.82 (1H, d, J

= 8.1 Hz).

HRMS (ESI⁺): calcd for [M]⁺, 571.3107, found, 571.3117 (+1.0 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).



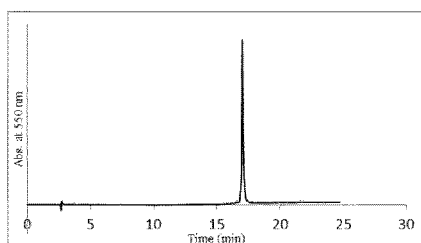
[0087] (8) 化合物 a 2 の合成

5-カルボキシフルオレセイン (50.0 mg, 0.13 mmol) と N-ヒドロシキスクシンイミド (76.0 mg, 0.66 mmol) と 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (77.0 mg, 0.40 mmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解させ、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 80% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (15 分); 流速 = 5.0 mL/min) によって、粗精製した化合物 10 を得た。化合物 18 (3.0 mg, 4.6 μmol) と化合物 10 (6.5 mg, 14 μmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (5.9 mg, 46 μmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解させ、室温で 9 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣にトリフルオロ酢酸 (TFA) 0.50 mL、トリエチルシラン (10 μL) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 80% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (15 分); 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、化合物 a 2 (2.1 mg, 2.2 μmol、2 工程での収率 49%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.30 (12H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.50–1.56 (2H, m), 1.71–1.74 (2H, m), 2.03–2.04 (2H, m), 2.15–2.16 (2H, m), 2.45 (1H, br m), 3.68 (8H, q, $J = 7.0$ Hz), 3.94 (1H, br m), 6.53 (2H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz), 6.58 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.69 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.88 (2H, dd, $J = 9.3, 2.0$ Hz), 6.93 (2H, d, $J = 9.7$ Hz), 6.98 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7.83 (1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz), 8.19 (1H, dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz), 8.41 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}]^{2+}$, 1857.7045, found, 1857.6998 (−4.7 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 80% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).

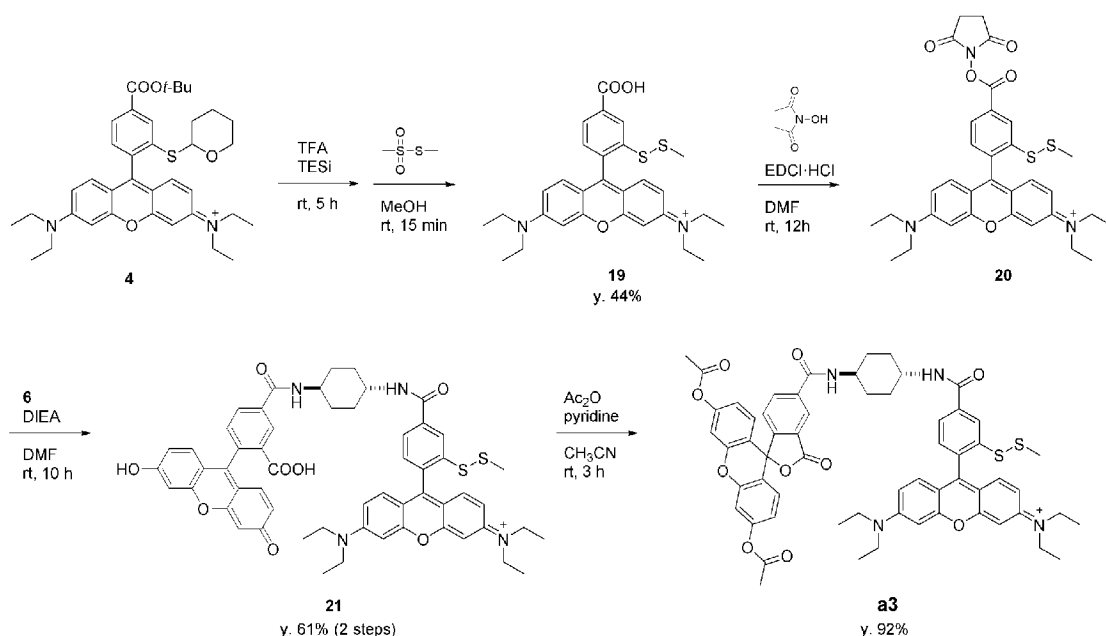


[0088] [合成実施例 4]

本発明の化合物 a 3 (S-メチルジスルファニルーSSi p-1 DA) の合成

以下のスキーム 6 により、本発明の化合物 a 3 を合成した。

[0089] スキーム 6



[0090] (1) 化合物 19 の合成

化合物 4 (12.9 mg、20.9 μmol) にトリフルオロ酢酸 (0.50 mL)、トリエチルシラン (10 μL) を加え、室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 / 水 (0 分) から 80% アセトニトリル / 0.1% TFA / 水 (15 分) ; 流速 = 5.0 mL / min) で粗精製した。メチルメタンチオスルフェート (7.9 mg、63 μmol) をメタノール (3 mL) に溶解し、そこに粗精製した化合物をメタノール (2 mL) に溶解したものを少しずつ加え、室温で 15 分攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 / 水 (0 分) から 80% アセトニトリル / 0.1% TFA / 水 (15 分) ; 流速 = 5.0 mL / min) で精製し、2-メチルジスルファニルー 4-カルボキシテトラエチルローダミン (化合物 19、4.8 mg、9.2 μmol 、収率 44%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.32 (12H, t, J = 7.0 Hz), 2.38 (3H, s), 3.70 (8H, q, J = 7.1 Hz), 7.01 (2H, d, J = 2.2 Hz), 7.09 (2H, dd, J = 9.5, 2.2 Hz), 7.15 (2H, d, J = 9.5 Hz), 7.48 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.1

6 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz), 8.71 (1H, d, J = 1.5 Hz)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 12.80, 23.30, 46.98, 97.61, 114.43, 115.94, 129.40, 130.13, 131.61, 132.42, 134.84, 136.95, 138.71, 155.12, 157.51, 159.38, 168.33

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}]^+$, 521.1933, found, 521.1895 (-3.8 mmu)

[0091] (2) 化合物 21 の合成

化合物 19 (4.8 mg、9.21 μmol) と N-ヒドロキシスクシンイミド (9.5 mg、0.083 mmol) と 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (8.0 mg、0.041 mmol) を脱水 DMF (4 mL) に溶解させ、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣から HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 80% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (15 分); 流速 = 5.0 mL/min) によって、粗精製した化合物 20 を得た。

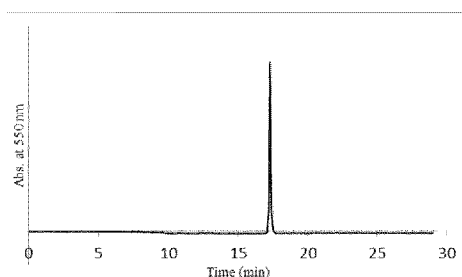
粗精製した化合物 20 と化合物 6 (13.1 mg、0.028 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (12 mg、0.092 mmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解させ、室温で 10 時間攪拌した。その後、0.1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して、有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 80% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (15 分); 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、S-メチルジスルファニル-SSip-1 (化合物 21、4.3 mg、4.62 μmol 、2 工程での収率 61%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 1.32 (12H, t, J = 6.8 Hz), 1.70-1.72 (4H, m), 2.18-2.20 (4H, m), 2.37 (3H, s), 3.69 (8H, q, J = 7.0 Hz), 4.06-4.08 (2H, br), 6.62 (2H, dd, J = 8.8, 2.0 Hz), 6.72 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.79 (2H, d, J = 2.0 Hz), 6.99 (2H, d, J = 2.0 Hz), 7.05 (2H, dd,

$J = 9.8, 2.4 \text{ Hz}$), 7.14 (2H, d, $J = 9.8 \text{ Hz}$), 7.33 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$), 7.98 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5 \text{ Hz}$), 8.24 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5 \text{ Hz}$), 8.52–8.53 (2H, m)

HRMS (ESI⁺): calcd for [M]⁺, 975.3461, found, 975.3444 (–1.7 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).



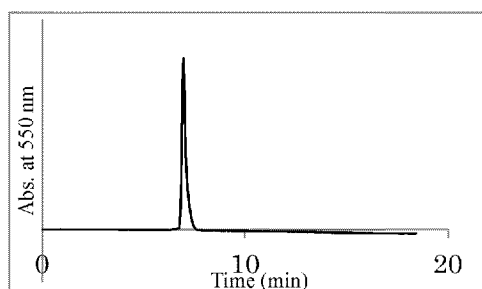
[0092] (3) 化合物 a 3 の合成

化合物 21 (1.8 mg、1.85 μmol) を脱水アセトニトリル (5 mL) に溶解させ、無水酢酸 (15 μL) とピリジン (29 mg、0.037 mmol) を加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣をHPLC (溶離液、20%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸/水 (0分) から80%アセトニトリル/0.1%TFA/水 (15分) ; 流速=5.0 mL/min) で精製し、化合物 a 3 (1.8 mg、170 μmol、収率92%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.32 (12H, t, $J = 7.0 \text{ Hz}$), 1.63–1.67 (4H, m), 2.15–2.17 (4H, m), 2.30 (6H, s), 2.38 (3H, s), 3.71 (8H, q, $J = 6.8 \text{ Hz}$), 4.03 (2H, br), 6.91–6.93 (4H, m), 7.01 (2H, d, $J = 2.2 \text{ Hz}$), 7.09 (2H, dd, $J = 9.5, 2.2 \text{ Hz}$), 7.16 (2H, d, $J = 9.5 \text{ Hz}$), 7.21 (2H, d, $J = 2.2 \text{ Hz}$), 7.38 (1H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$), 7.46 (1H, d, $J = 8.1 \text{ Hz}$), 7.97 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5 \text{ Hz}$), 8.24 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5 \text{ Hz}$), 8.49 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$), 8.53 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$)

HRMS (ESI⁺): calcd for [M]⁺, 1059.3673, found, 1059.3629 (–4.4 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).

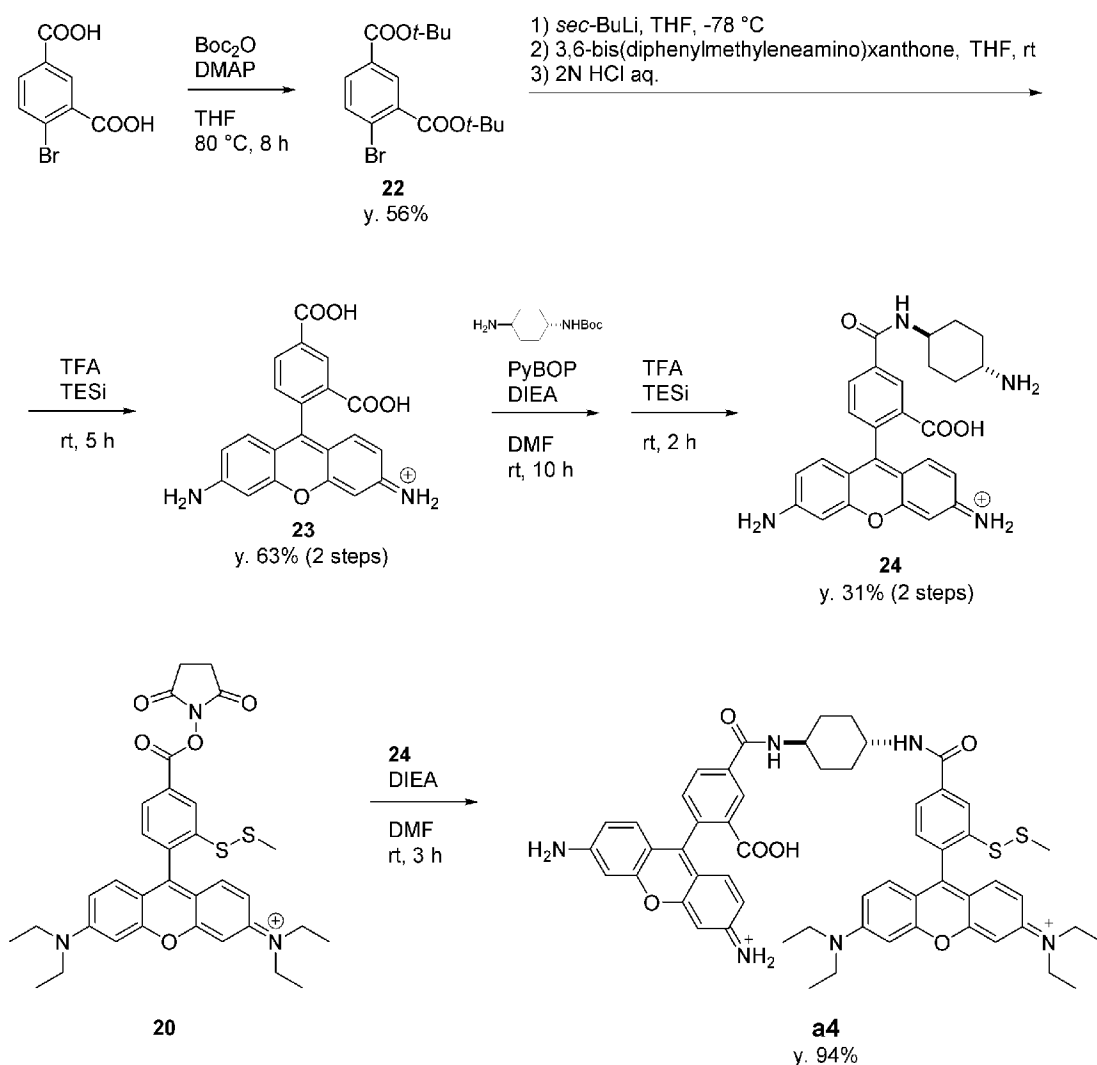


[0093] [合成実施例 5]

本発明の化合物 a 4 (2-*thio*-テトラエチルローダミン-ローダミン
グリーン) の合成

以下のスキーム 7 により、本発明の化合物 a 4 を合成した。

[0094] スキーム 7



[0095] (1) 化合物 22 の合成

4-ブロモイソフタル酸 (2.45 g、10 mmol) を THF (50 mL) に溶解させ、4-ジメチルアミノピリジン (488 mg、4.0 mmol) と *tert*-ブチルジカーボネート (8.72 g、40 mmol) を加え、アルゴン下で 80 °C で 8 時間撹拌した。溶媒を減圧留去した後に残渣に *brine* を加え、この混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、*brine* で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、ジクロロメタン/ *n*-ヘキサン) で精製し、*tert*-ブチル 4-ブロモイソフタル酸 (化合物 22、2.01 g、5.63 mmol、収率 56%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.59 (9H, s), 1.61 (9H, s), 7.66 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.85 (1H, dd, J = 8.1, 2.2 Hz), 8.24 (1H, d, J = 2.2 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 27.86, 28.09, 81.90, 83.01, 125.64, 131.12, 131.55, 132.19, 134.05, 134.43, 164.30, 165.07

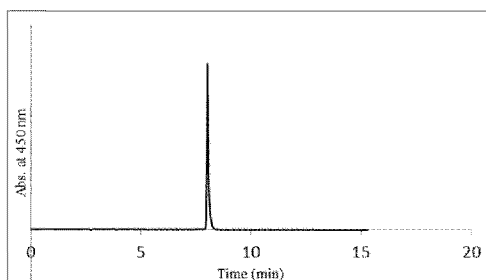
[0096] (2) 化合物 23 の合成

乾燥させアルゴン置換したフラスコに化合物 22 (257 mg、0.72 mmol) を加え、脱水 THF (10 mL) に溶解させた。 -78°C に冷却後、1 M sec-ブチルリチウム (540 μL 、0.54 mmol) を加え、2 分間攪拌した。そのままの温度で 3, 6-ビス (ジフェニルメチレンアミノ) キサントン (20 mg、0.036 mmol) を脱水テトラヒドロフラン (5 mL) に溶解してゆっくりと加え、室温に戻して 1 時間攪拌した。2 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣にトリフルオロ酢酸 (5.0 mL)、トリエチルシラン (100 μL) を加え、室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、HPLC (溶離液、20% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 / 水 (0 分) から 56% アセトニトリル / 0.1% TFA / 水 (15 分); 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、2, 4-ジカルボキシローダミンググリーン (化合物 23、8.5 mg、0.023 mmol、2 工程での収率 63%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 6.80–6.81 (4H, m), 7.04 (2H, d, J = 9.5 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.43 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz), 8.91 (1H, d, J = 1.5 Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}]^+$, 375.0981, found, 375.0958 (−2.3 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH_3CN /0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH_3CN /0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).



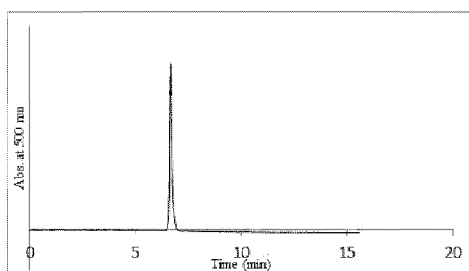
[0097] (3) 化合物 24 の合成

化合物 23 (10 mg、27 μmol) と N-Boc-trans-1,4-シクロヘキサンジアミン (17 mg、80 μmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (35 mg、0.027 mmol) と 1H-ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) (28 mg、54 μmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解させ、室温で 10 時間攪拌した。その後、1N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣に TFA (2 mL) 加え、室温で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸/水 (0 分) から 56% アセトニトリル/0.1% TFA/水 (15 分) ; 流速 = 5.0 mL/min) で精製し、2-カルボキシー-4-アミノシクロヘキシルアミドローダミングリン (化合物 24、4.0 mg、8.5 μmol 、2 工程での収率 31%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.57–1.61 (4H, m), 2.15–2.18 (4H, m), 3.11–3.15 (1H, m), 3.94–3.98 (1H, m), 6.79–6.81 (4H, m), 7.03 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.47 (1H, d, J = 8.1 Hz), 8.23 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz), 8.74 (1H, d, J = 1.5 Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}]^+$, 471.2032, found, 471.2001 (−3.1 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH_3CN /0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH_3CN /0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).



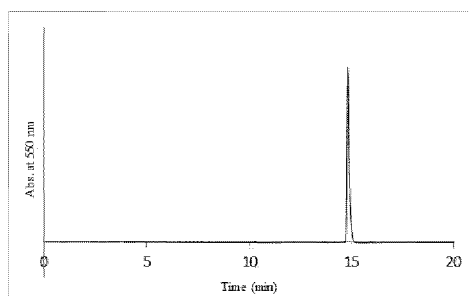
[0098] (4) 化合物 a 4 の合成

化合物 20 (2.2 mg、3.5 μmol) と化合物 24 (2.0 mg、4.2 μmol) と N, N-ジイソプロピルエチルアミン (4.5 mg、35 μmol) を脱水 DMF (1.5 mL) に溶解させ、室温で 3 時間攪拌した。その後、0.1 N HCl aq. で反応を停止させた。この混合物をジクロロメタンで抽出して有機層を brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後に溶媒を減圧留去した。残渣を HPLC (溶離液、20% アセトニトリル / 0.1% トリフルオロ酢酸 / 水 (0 分) から 80% アセトニトリル / 0.1% TFA / 水 (15 分) ; 流速 = 5.0 mL / min) で精製し、化合物 a 4 (3.2 mg、3.29 μmol 、収率 94%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.32 (12H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.66–1.69 (4H, m), 2.16–2.18 (4H, m), 2.39 (3H, s), 3.71 (8H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.05 (2H, br s), 6.80–6.82 (4H, m), 7.03–7.10 (6H, m), 7.16 (2H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.47 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.51 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.98 (1H, d, $J = 7.3, 1.5$ Hz), 8.25 (1H, dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz), 8.54 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 8.76 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)

HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}]^{2+}$, 974.3859, found, 974.3873 (+1.4 mmu)

The HPLC chromatogram after purification was as follows. The solution was done with a liner gradient from 20% CH_3CN /0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH_3CN /0.1% TFA aq. (15 min) (flow rate = 1.0 mL/min).



[0099] [実施例 2]

合成した化合物 a 1、化合物 a 2、及び化合物 a 4 の脱保護の化合物 2 5 に Na_2S_4 を添加し、吸収および蛍光スペクトルを測定した。

[0100] 図 7 の左図は、 $50\ \mu\text{M}$ の Na_2S_4 （共溶媒として 0.1% DMSO 及び $1\ \text{mg}/\text{ml}$ BSA 含有）添加前後における、 $1\ \text{mM}$ の GSH 存在下での 0.1 M NaPi バッファー（pH 7.4）中における $1\ \mu\text{M}$ の化合物 a 1 の吸収スペクトルの測定結果を、図 7 の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は $470\ \text{nm}$ である。

[0101] 図 8 の左図は、 $50\ \mu\text{M}$ の Na_2S_4 （共溶媒として 0.1% DMSO 及び $1\ \text{mg}/\text{ml}$ BSA 含有）添加前後における、 $2.5\ \text{mM}$ の GSH 存在下での 0.1 M NaPi バッファー（pH 7.4）中における $1\ \mu\text{M}$ の化合物 a 2 の吸収スペクトルの測定結果を、図 8 の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は $470\ \text{nm}$ である。

[0102] 図 9 の真中の図は、 $50\ \mu\text{M}$ の Na_2S_4 （共溶媒として 0.1% DMSO 及び $1\ \text{mg}/\text{ml}$ BSA 含有）添加前後における、 $1\ \text{mM}$ の GSH 存在下での 0.1 M NaPi バッファー（pH 7.4）中における $1\ \mu\text{M}$ の化合物 2 5 の吸収スペクトルの測定結果を、図 9 の右図は同じ条件での蛍光スペクトルの測定結果を示す。励起波長は $470\ \text{nm}$ である。

[0103] 化合物 a 1、化合物 a 2 及び化合物 a 4 の脱保護の化合物 2 5 は、 Na_2S_4 添加後、SSi p-1 と同程度のローダミンに由来する吸光度の減少と、フルオレセインに由来する蛍光の上昇がみられた。

[0104] [実施例 3]

化合物 a 3 の生細胞イメージング

化合物 a 3 を生細胞イメージングへと応用した。化合物 a 3 は S S i p - 1 D A の安定性を向上させるため、チオール基をジスルフィドで保護したものであり、細胞内の還元環境下で脱保護される。

[0105] 図 1 0 は、 $250\text{ }\mu\text{M}$ の Na_2S_4 を添加した S S i p - 1 を用いた A 5 4 9 生細胞の共焦点顕微鏡像である。A 5 4 9 細胞は、 $10\text{ }\mu\text{M}$ S S i p - 1 D A (0.03% の p u r u l o n i c 及び共溶媒として 0.1% D M S O を含有) で 3 時間インキュベートした。励起波長は 488 nm である。(レーザー強度 20%) / $500-540\text{ nm}$ (P M T 1 0 0 0) 及び $590-650\text{ nm}$ (H y D 1 0 0)

Na_2S_4 添加後にフルオレセイン由来の蛍光強度の上昇を示した。ローダミン由来の蛍光波長領域でも蛍光強度が上昇しているが、フルオレセイン由来の蛍光が漏れ出しているためであると考えられる。ローダミンの励起波長および蛍光波長 (561 nm / $590-650\text{ nm}$) で蛍光イメージング画像を取得すると、蛍光強度は減少していた。

[0106] S S i p - 1 の生細胞中での可逆性を観察した。

図 1 1 は、 $250\text{ }\mu\text{M}$ の Na_2S_4 を添加した S S i p - 1 を用いた A 5 4 9 生細胞の共焦点顕微鏡像であり、 Na_2S_4 を添加した後、w a s h o u t し、その後、再度 Na_2S_4 を添加し w a s h o u t した場合の共焦点顕微鏡像を示す。A 5 4 9 細胞のインキュベーションの条件及び測定の条件は図 1 0 で示した測定と同じである。

また、図 1 2 は、 $250\text{ }\mu\text{M}$ の Na_2S_4 を繰り返し添加した後の S S i p - 1 でインキュベートした A 5 4 9 生細胞の蛍光強度の変化を示す。

図 1 1 及び 1 2 から、 Na_2S_4 添加後 1 分以内に蛍光が上昇し、w a s h o u t 後は 2 0 分程度で蛍光は減少したことが示される。

[0107] また、S S i p - 1 の蛍光はフルオレセイン由来の蛍光上昇と同時に、ローダミン由来の蛍光の減少を観察できることから、レシオイメージングも可能である。図 1 3 の上図は、 $250\text{ }\mu\text{M}$ の Na_2S_4 を繰り返し添加した後の S S i p - 1 でインキュベートした A 5 4 9 生細胞の比 (F L / R B) の変

化、及び、上図はそのレシオ像を示す。

[0108] 化合物 a 3 について細胞での局在を調べた。図 14 は、SSip-1 と Lysotracker 又は Mitotracker との共染色の結果を示す。細胞を、DMEM (0.03% プルロニック及び共溶媒として 0.1% の DMSO を含有) 中で 10 μ M の化合物 a 3 と 50 nM の Lysotracker Deep red 又は 200 nM の Mitotracker Deep red で 1 時間インキュベートした。Ex/Em = 488 nm (レーザー強度 20%) / 500–540 nm (PMT 1000) 及び 650 nm / 670–700 nm (PMT 600)

SSip-1 は Lysotracker および Mitotracker と merge しなかったが、2 つの共染色条件で SSip-1 の分布が異なっていた。SSip-1 のみをロードしたときの局在と比較すると、SSip-1 はミトコンドリアに局在しているといえる。また、Mitotracker による追い出しによって、SSip-1 を細胞質にとどまらせることも可能であり、細胞質の sulfane sulfur のイメージングも可能であると考えられる。

[0109] [実施例 4]

化合物 a 4 の生細胞イメージング

化合物 a 4 を生細胞イメージングへと応用した。化合物 a 4 は SSip-1 のフルオレセイン部位をローダミンググリーンに変えたものであり、光退色耐性が向上すると考えられる。

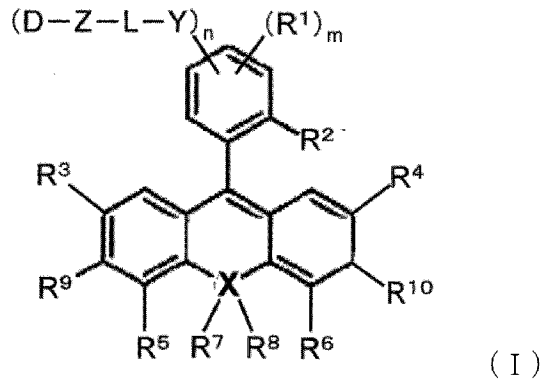
[0110] 図 15 は、250 μ M の Na₂S₄ を添加した化合物 a 4 を用いた A549 生細胞の共焦点顕微鏡像である。A549 細胞は、10 μ M の化合物 a 4 (0.03% の purulonic 及び共溶媒として 0.1% DMSO を含有) で 1 時間インキュベートした。励起波長は 488 nm である。(レーザー強度 20%) / 500–540 nm (PMT 1000) 及び 590–650 nm (HyD 100)

化合物 a 4 は、Na₂S₄ 添加後にローダミンググリーン由来の蛍光強度の上

昇およびローダミン B 由来の蛍光強度の減少を示した。

請求の範囲

[請求項1] 以下の一般式 (I) :



(式中、

R^1 は、水素原子を示すか、又はベンゼン環上に存在する同一又は異なる一価の置換基を示し；

R^2 は、SH又はS-S-R (Rは、炭素数1～6のアルキル基を示し；

R^3 及び R^4 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し；

R^5 及び R^6 は、それぞれ独立に、水素原子、炭素数1～6個のアルキル基又はハロゲン原子を示し

R^7 及び R^8 は、存在する場合は、それぞれ独立に、炭素数1～6個のアルキル基又はアリール基を示し、

ここで、Xが酸素原子の場合は、 R^7 及び R^8 は存在せず、

Xがリン原子の場合は、 $-R^7$ 及び $-R^8$ の一方は、=Oであってもよい；

R^9 及び R^{10} は、

(i) それぞれ独立に、 NH_2 、モノアルキルアミノ基又はジアルキルアミノ基から選択され、又は

(ii) それぞれ独立に、ヒドロキシル基又はアルコキシ基から選択され；

Xは、酸素原子、珪素原子、錫原子、ゲルマニウム原子又はリン原子を示し；

Yは、Lとの結合基aを示し；

Lは、リンカーを示し；

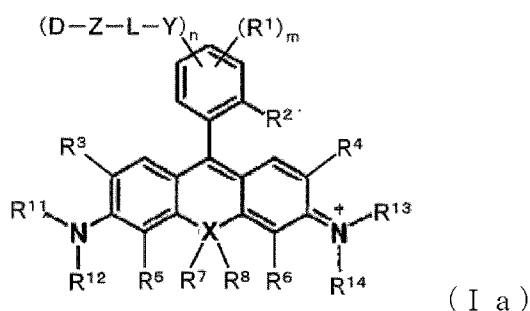
Zは、Lとの結合基bを示し；

Dは、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、クマリン、クマリン誘導体、ローダミン又はローダミン誘導体を示し；

mは、0～3の整数であり、nは、1～4の整数であり、 $m + n = 4$ である。）

で表される化合物又はその塩。

[請求項2] 以下の一般式 (I a)：



(式中、

$R^1 \sim R^8$ 、X、Y、L、Z、D、m及びnは、一般式 (I) で定義した通りであり；

R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示し、

R^{11} 又は R^{12} は、 R^3 又は R^5 と一緒にあって、 R^{11} 又は R^{12} が結合している窒素原子を含む5～7員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される1～3個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数1～6個のアルキル、炭素数2～6個のアルケニル、又は炭素数

2～6個のアルキニル、炭素数6～10個のアラルキル基、炭素数6～10個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい：

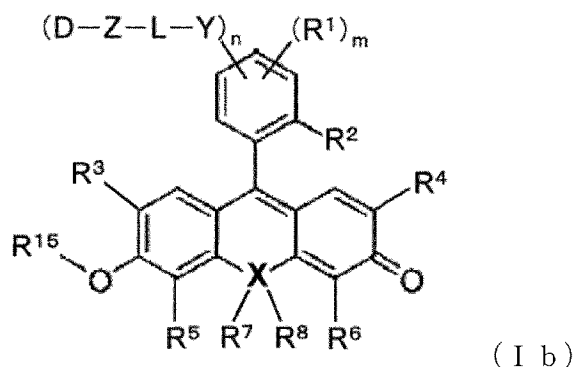
R^{13} 及び R^{14} は、それぞれ独立に、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示し、

R^{13} 又は R^{14} は、 R^4 又は R^6 と一緒にあって、 R^{13} 又は R^{14} が結合している窒素原子を含む5～7員のヘテロシクリル又はヘテロアリールを形成していてもよく、環構成員として酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群から選択される1～3個の更なるヘテロ原子を含有していてもよく、更に該ヘテロシクリル又はヘテロアリールは、炭素数1～6個のアルキル、炭素数2～6個のアルケニル、又は炭素数2～6個のアルキニル、炭素数6～10個のアラルキル基、炭素数6～10個のアルキル置換アルケニル基で置換されていてもよい。）

で表される、請求項1に記載の化合物又はその塩。

[請求項3]

以下の一般式 (I b)：



(式中、

$R^1 \sim R^8$ 、 X 、 Y 、 L 、 Z 、 D 、 m 及び n は、一般式 (I) で定義した通りであり；

R^{15} は、水素原子又は炭素数1～6個のアルキル基を示す。）

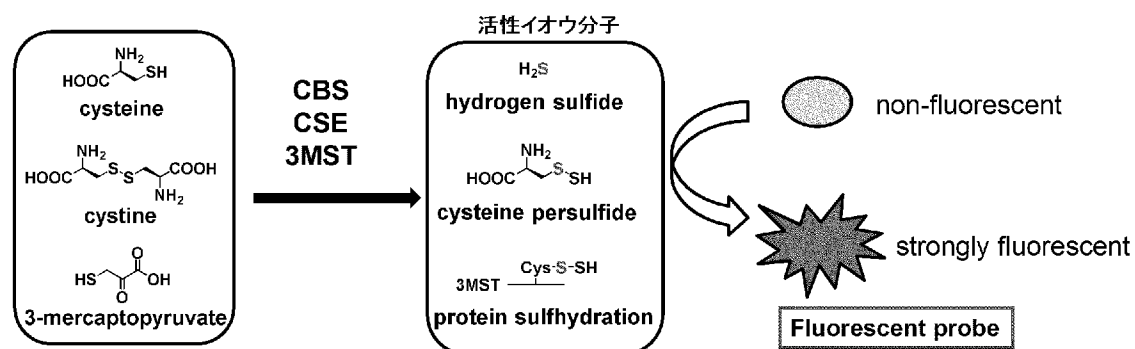
で表される、請求項1に記載の化合物又はその塩。

[請求項4]

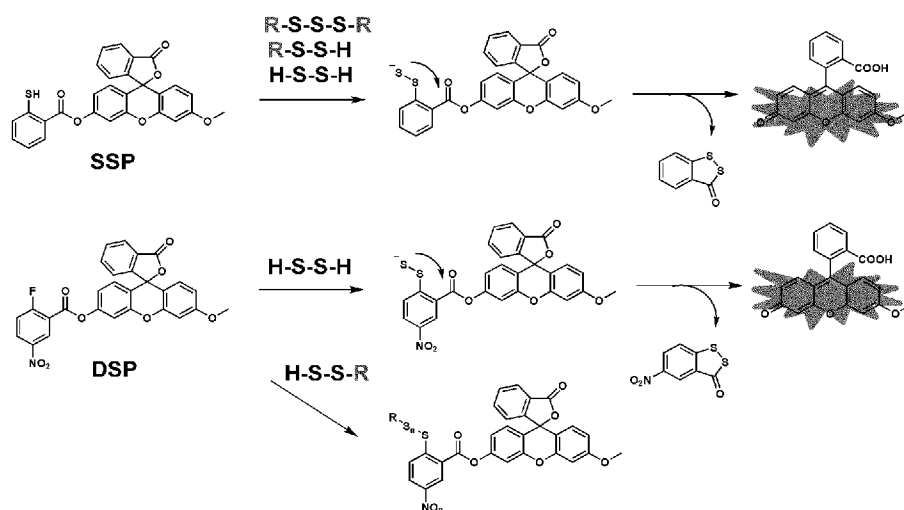
前記リンカーは、シクロアルキル基又はアリール基から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物又はその塩。

- [請求項5] 結合基 a は、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基又はアルキニル基から選択される、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩。
- [請求項6] 結合基 b は、カルボニル基、アルキルカルボニル基、エステル基、アルキルエステル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アミド基、アルキルアミド基、イソチオシアネート基、塩化スルホニル基、ハロアルキル基、ハロアセトアミド基、アジド基又はアルキニル基から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩。
- [請求項7] 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩を含む蛍光プローブ。
- [請求項8] 細胞内の `sulfane sulfur` を検出する方法であって、
 (a) 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物又はその塩を細胞内に導入する工程、及び
 (b) 当該化合物又はその塩が細胞内で発する蛍光を測定する工程を含む方法。

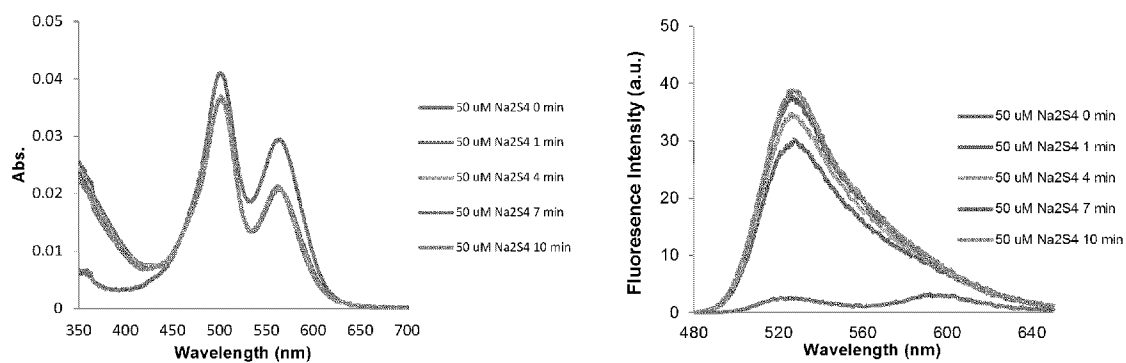
[図1]



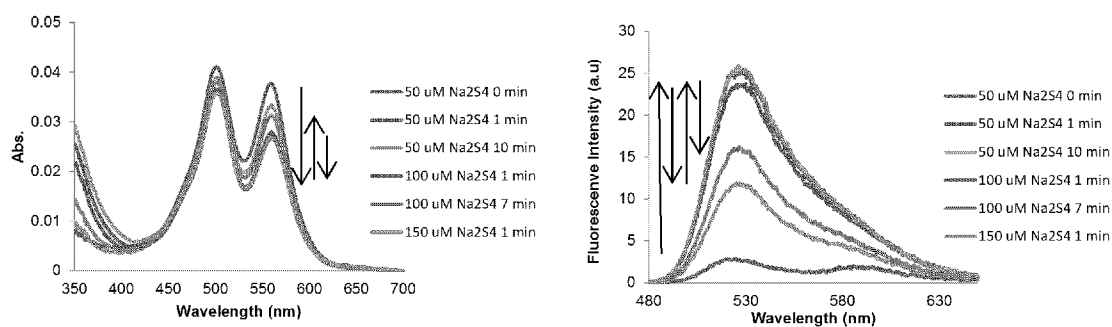
[図2]



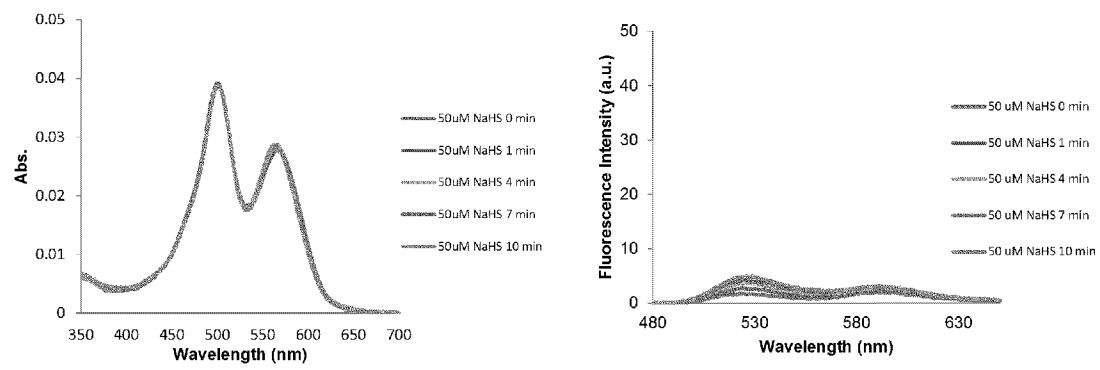
[図3]



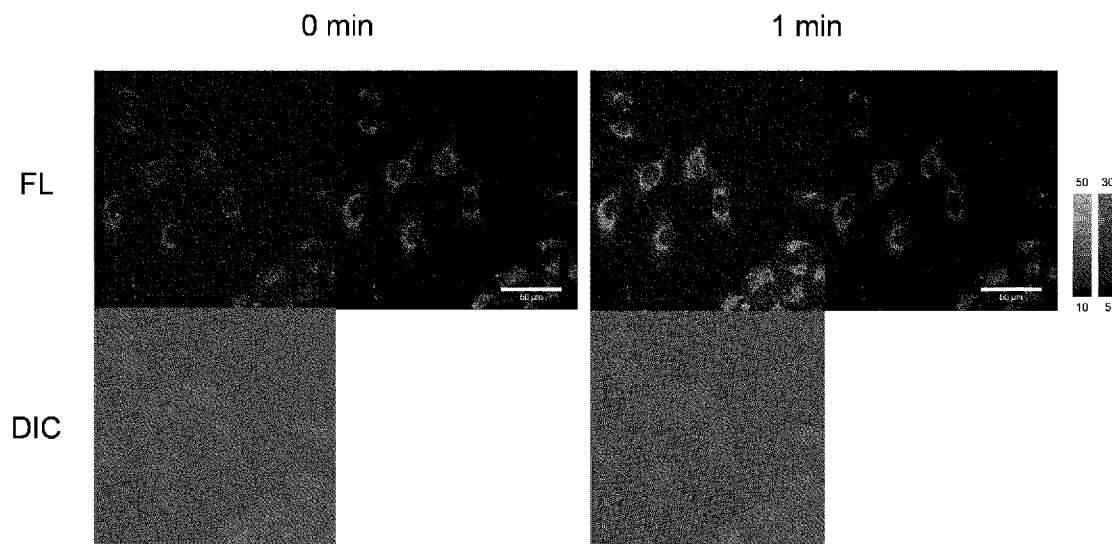
[図4]



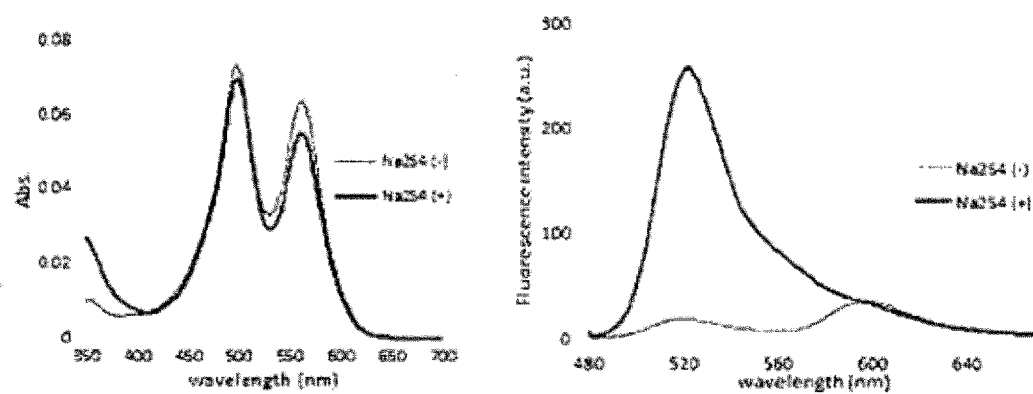
[図5]



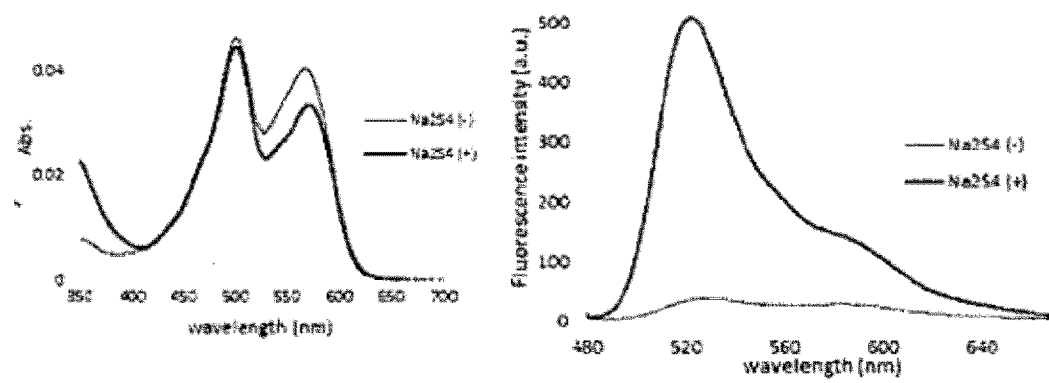
[図6]



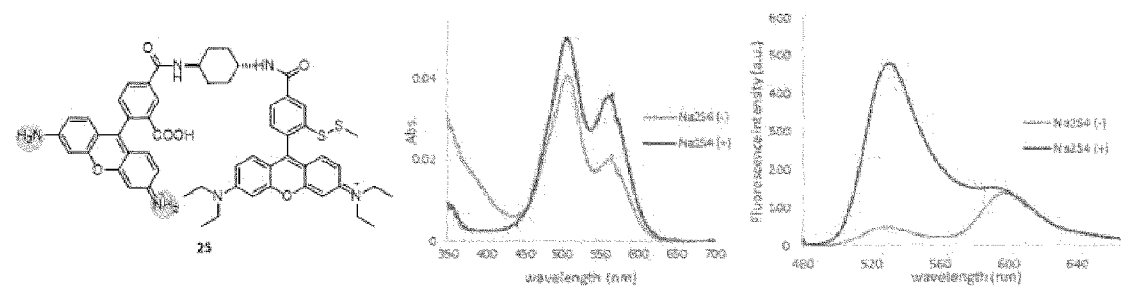
[図7]



[図8]



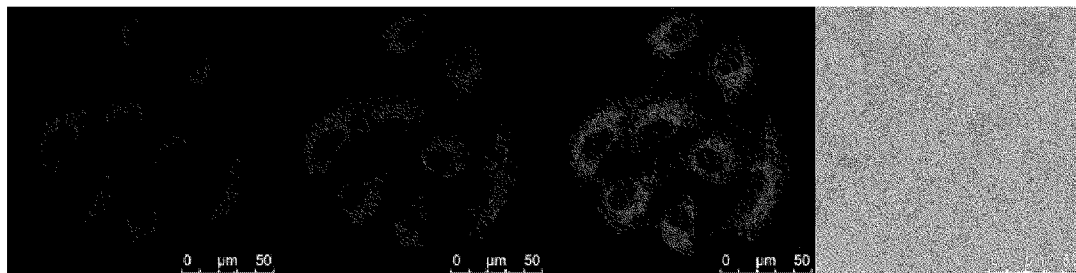
[図9]



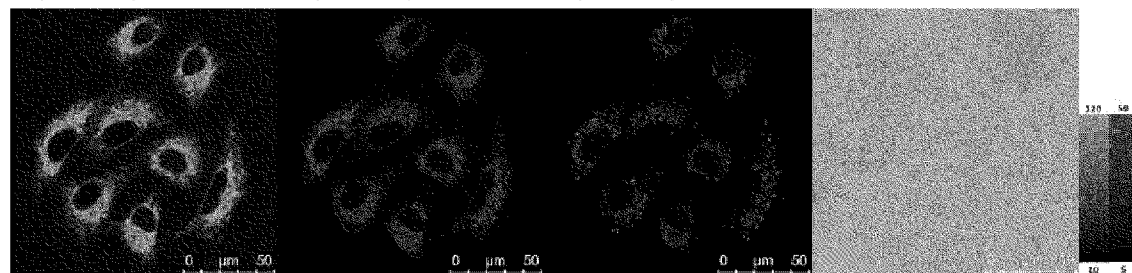
[図10]

(a) Na_2S_4 (-)

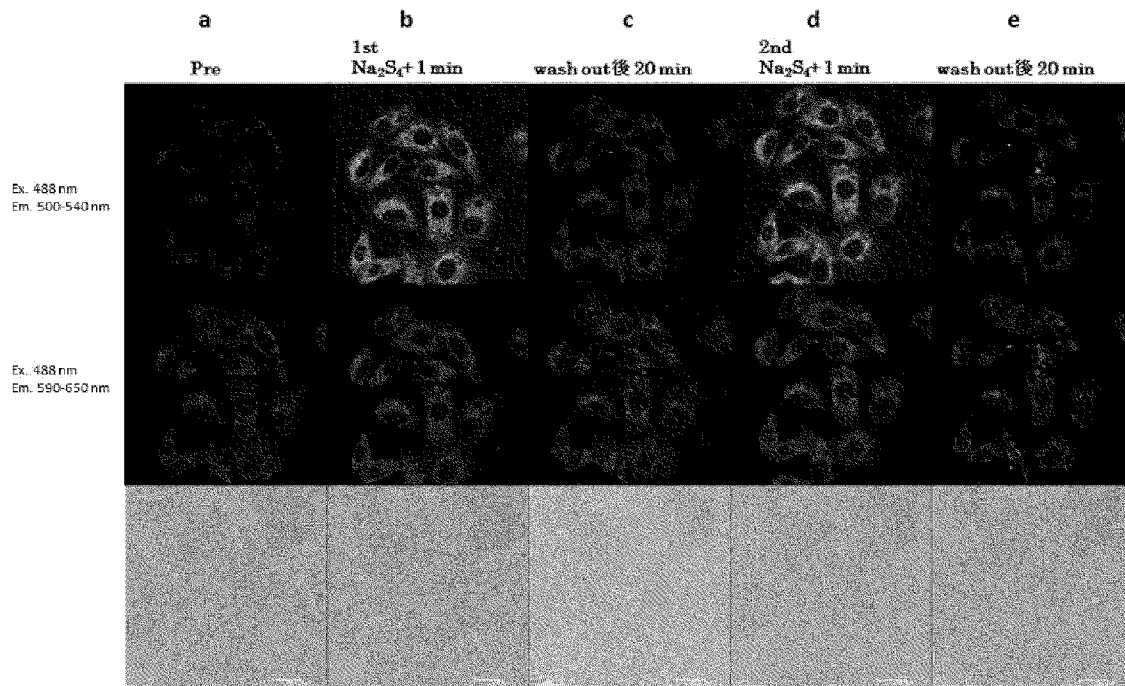
Ex/Em = 488/500-540 nm Ex/Em = 488/590-650 nm Ex/Em = 561/590-650 nm

(b) Na_2S_4 (+)

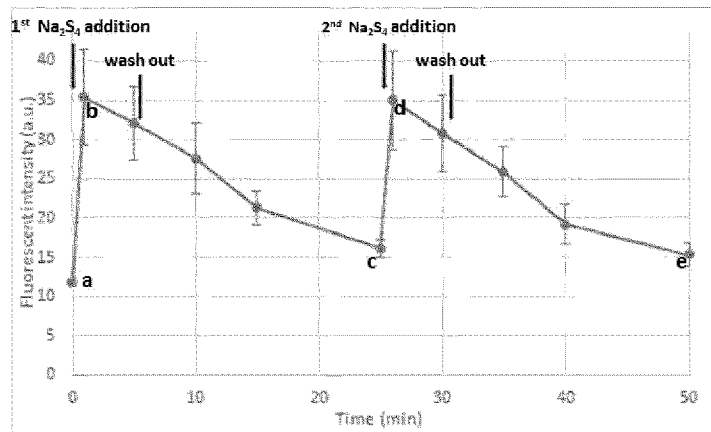
Ex/Em = 488/500-540 nm Ex/Em = 488/590-650 nm Ex/Em = 561/590-650 nm



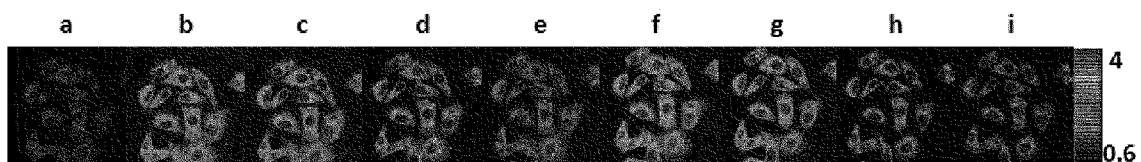
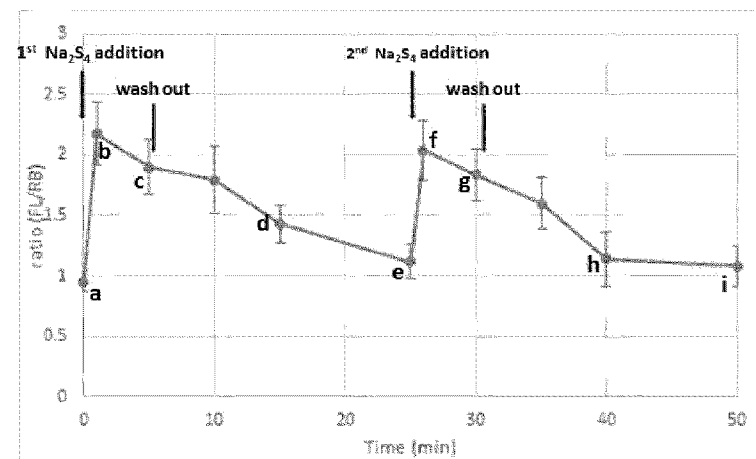
[図11]



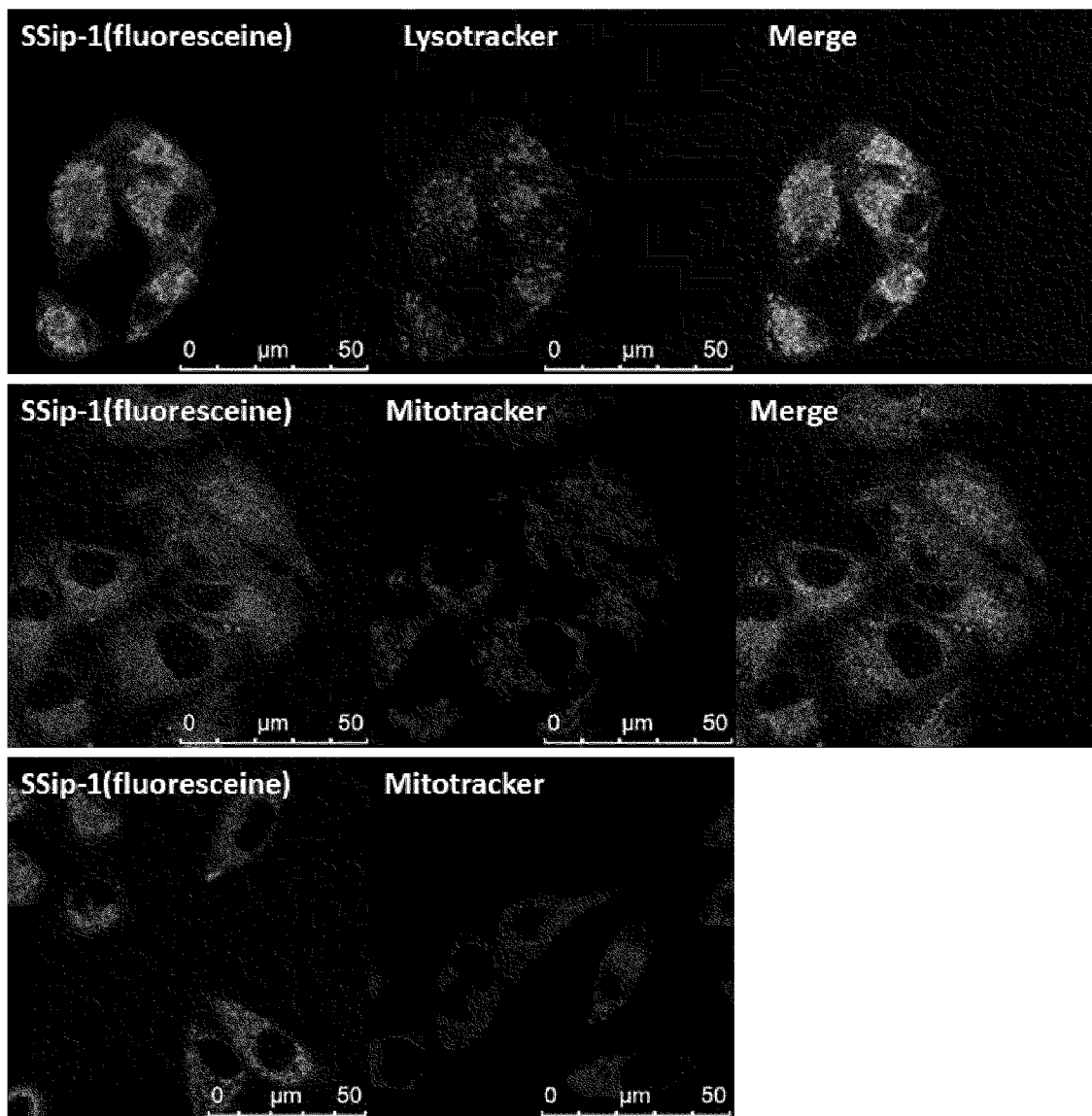
[図12]



[図13]



[図14]



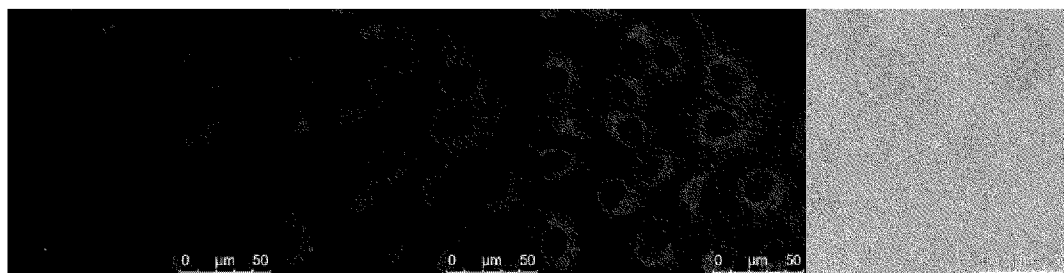
[図15]

(a) Na_2S_4 (-)

Ex/Em = 488/500-540 nm

Ex/Em = 488/590-650 nm

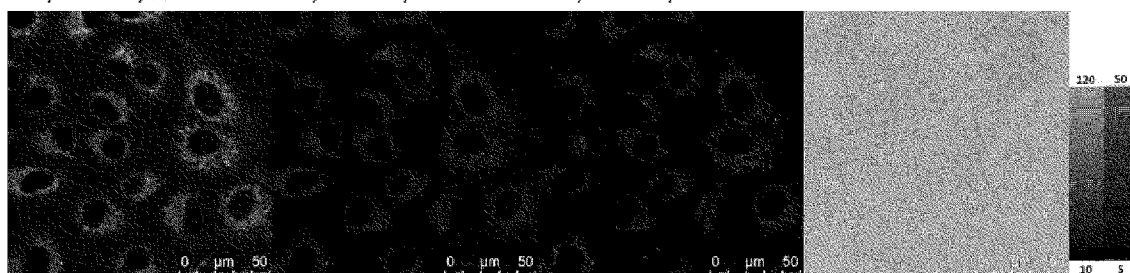
Ex/Em = 561/590-650 nm

(b) Na_2S_4 (+)

Ex/Em = 488/500-540 nm

Ex/Em = 488/590-650 nm

Ex/Em = 561/590-650 nm



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051702

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09B11/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, D06P1/44(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/84(2006.01)i

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)
C09B11/28, C12Q1/02, D06P1/44, G01N33/58, G01N33/84

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-64099 A (Fujifilm Corp.), 11 April 2013 (11.04.2013), claims & US 2014/0176653 A1 & WO 2013/031838 A1 & EP 2752464 A1 & CN 103764767 A & KR 10-2014-0057292 A	1-8
A	JP 2009-513753 A (Ciba Holding Inc.), 02 April 2009 (02.04.2009), claims; paragraphs [0155] to [0156], example A1 & US 2009/0265866 A1 & WO 2007/039502 A2 & EP 1934291 A2 & KR 10-2008-0048501 A & CN 101283051 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March 2016 (16.03.16)

Date of mailing of the international search report
29 March 2016 (29.03.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051702

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0192298 A1 (BURGESS, Kevin), 30 July 2009 (30.07.2009), fig. 6 (Family: none)	1-8
A	US 2007/0238884 A1 (SMITH, G.A. et al.), 11 October 2007 (11.10.2007), claims & WO 2005/098437 A2 & EP 1740947 A2	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C09B11/28(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, D06P1/44(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/84(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C09B11/28, C12Q1/02, D06P1/44, G01N33/58, G01N33/84

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY (STN), JSTplus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-64099 A (富士フイルム株式会社) 2013.04.11, 特許請求の範囲 & US 2014/0176653 A1 & WO 2013/031838 A1 & EP 2752464 A1 & CN 103764767 A & KR 10-2014-0057292 A	1-8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 9 . 0 3 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松本 淳

4 H

5 5 7 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-513753 A (チバ ホールディング インコーポレーテッド) 2009. 04. 02, 特許請求の範囲、段落【0 1 5 5】－【0 1 5 6】の実施例A 1 & US 2009/0265866 A1 & WO 2007/039502 A2 & EP 1934291 A2 & KR 10-2008-0048501 A & CN 101283051 A	1-8
A	US 2009/0192298 A1 (BURGES S, K e v i n) 2009. 07. 30, F i g u r e 6 (ファミリーなし)	1-8
A	US 2007/0238884 A1 (S M I T H, G . A . e t a l) 2007. 10. 11, 請求の範囲 & WO 2005/098437 A2 & EP 1740947 A2	1-8