

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7587292号
(P7587292)

(45)発行日 令和6年11月20日(2024.11.20)

(24)登録日 令和6年11月12日(2024.11.12)

(51)国際特許分類

F I

C O 7 D 403/14 (2006.01)

C O 7 D 403/14

C S P

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/00

A 6 1 K 31/4045(2006.01)

A 6 1 K 31/4045

C O 9 K 11/06 (2006.01)

C O 9 K 11/06

請求項の数 3 (全15頁)

(21)出願番号	特願2022-548531(P2022-548531)	(73)特許権者	522316940
(86)(22)出願日	令和2年2月10日(2020.2.10)		シーバイオメックス カンパニー リミテ
(65)公表番号	特表2023-513285(P2023-513285		ッド
	A)		大韓民国 3 7 6 7 3 キョンサンブッド
(43)公表日	令和5年3月30日(2023.3.30)		ポハンシ ナムグ チョンアムロ 7 7 #
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/001852		7 2 3
(87)国際公開番号	WO2021/162133	(74)代理人	110002321
(87)国際公開日	令和3年8月19日(2021.8.19)		弁理士法人永井国際特許事務所
審査請求日	令和4年10月6日(2022.10.6)	(72)発明者	チャ, ジュンフエ
			大韓民国 0 6 2 9 4 ソウル カンナムグ
			オンジュロ 3 0 ギル 2 6 #ジー-3
			5 0 8
		(72)発明者	チェ, ハクス
			大韓民国 5 4 6 0 4 ジョンラブッド
			イクサンシ ピョンドンロ 1 3 ギル 1
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体物質と連結し得る両性蛍光物質

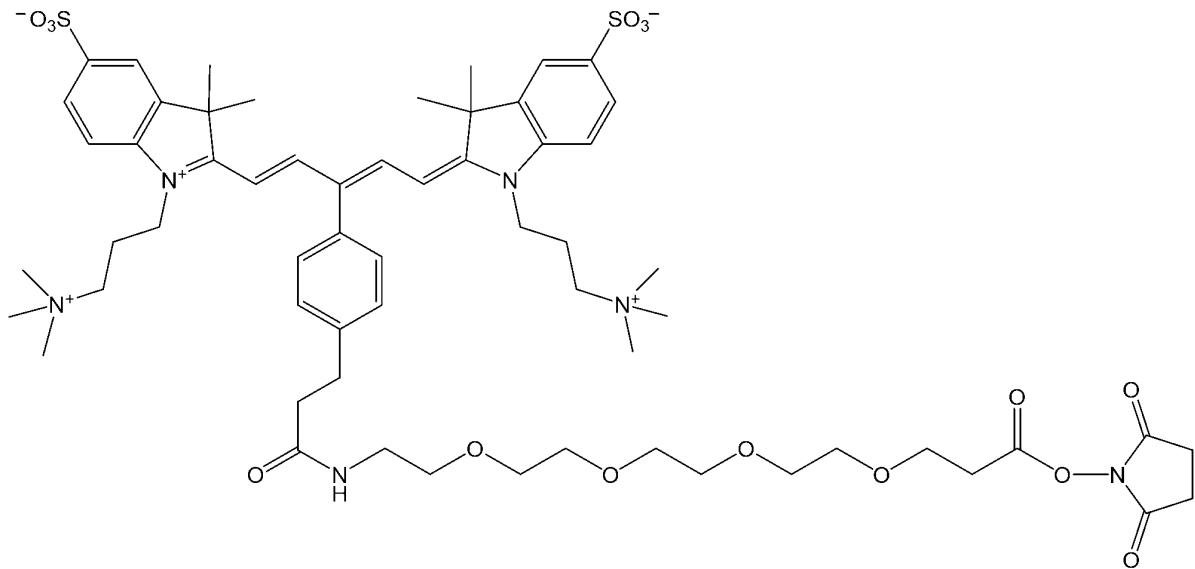
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造式4で表される、生体物質と連結し得る両性蛍光物質。

<構造式4>

【化 2 3】



10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の両性蛍光物質を用いてタンパク質を検出する方法であって、前記タンパク質を、前記両性蛍光物質への特異的結合により検出する、タンパク質の検出方法。

20

【請求項 3】

請求項 1 に記載の両性蛍光物質を用いてタンパク質を分析する方法であって、前記タンパク質を、前記両性蛍光物質への特異的結合により検出し、検出したタンパク質を分析する、タンパク質の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体物質と連結し得る両性蛍光物質に関する。

【背景技術】

【0002】

蛍光染料 (fluorescent dye) は、生物学的研究において幅広く使用されてきており、最近では、臨床診断 (免疫化学、分子診断等) のみならず、癌治療といった特殊な手術に活用されている。

30

【0003】

オーミクスに関連するマイクロアレイ技術、細胞分析研究等に蛍光染料が使用されてきており、最近では、ウェスタンブロット (western blot)、real-time PCR 等、分子生物学的研究にも蛍光染料が活用されている。

【0004】

蛍光染料は、伝統的な免疫化学診断から最近開発された POCT (point of care testing)、分子診断 (バイオセンサ等) までに幅広く活用されている。

40

【0005】

また、最近、標的治療剤及びそれに伴う診断技術が発達しつつ、蛍光染料を用いて癌手術と同時に癌細胞の転移の程度が確認できる技術が開発されている。

【0006】

既存に開発されて商品化したほとんどの蛍光染料は、電荷を帯びており、電荷を有するタンパク質、核酸、脂質等、バイオ巨大分子との非特異的結合を誘導する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

完璧な中性蛍光染料の場合、強い芳香性及び疎水性により、芳香性の大きいアミノ酸を

50

多数含むタンパク質や、疎水性の大きい巨大生体分子との非特異的結合による偽陽性反応 (false positive) を示す。これら偽陽性反応は、タンパク質の特異的ペプチド技術の免疫化学診断及びバイオチップの活用における信頼性の減少を引き起こす。

【0008】

一方、ペプチド、アプタマー等といった微細生体分子 (small biomolecule) は、分子量が少なく、既存の蛍光染料と結合する場合、蛍光染料の有する電荷的特性に支配されるようになる。

【0009】

蛍光染料と生体分子との非特異的結合を最小化するために、緩衝溶液や中性界面活性剤を用いる方法等が考えられるが、最近、蛍光染料がバイオセンサ、外科手術に使用されつつ、分析の精密性が要求されている。

【0010】

本発明は、上記した従来技術の問題点を解決するために発明されたものであり、本願発明者らは、蛍光染料をアミノ酸及びタンパク質の基本特性である両性物質として開発し、蛍光染料の生体分子に対する非特異的反応性自体を最小化し得ることに着目して、本発明を完成した。

【0011】

本発明が解決しようとする課題は、タンパク質の検出・分析の正確性を向上させることのできる新規な蛍光染料を提供することである。

【0012】

本発明の課題は、以上に言及した技術的課題に制限されず、言及していないさらに他の技術的課題は、下記の記載から当業者にとって明確に理解することができる。

【課題を解決するための手段】

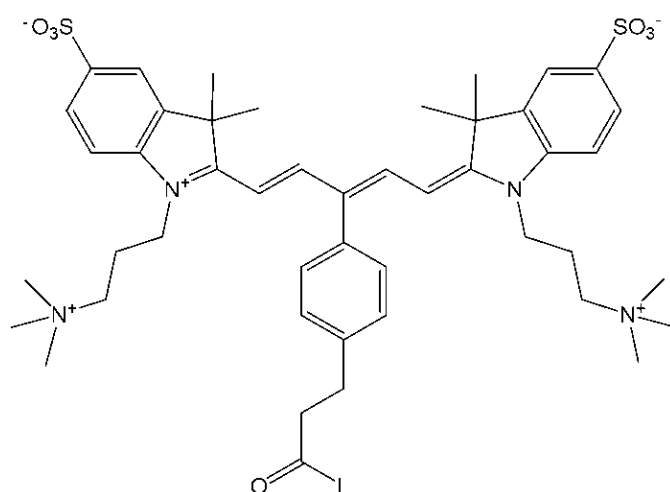
【0013】

発明による生体物質と連結し得る両性蛍光物質は、下記の構造式1で表される化合物のうち少なくとも一つを含む。

【0014】

<構造式1>

【化1】



【0015】

上記構造式1において、Lは、 $-(L1)_n-(L2)$ である。

【0016】

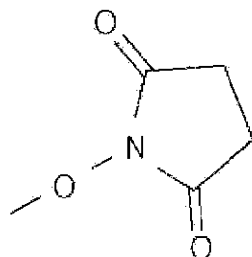
上記構造式1において、L1は、 $-NH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_m-CH_2-C(=O)-$ である。

【0017】

上記構造式1において、L2は、アジド (azide)、アセチレン (acetylene)

ne)、マレイミド (maleimide)、ビオチン (biotin)、ヒドラジド (hydrazide)、

【化3】



10

、 $-R_3-(C(=O)_2-NH-NH_2)$ 、及び $-R_4-(S(=O)_2-NH-NH_2)$ のうち一つであり、 R^1 、 R^2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれC1～6の2価脂肪族炭化水素、C1～6のアルキレン又は2価芳香族炭化水素である。

【0018】

上記構造式1において、 n は、0又は1である。

【0019】

上記構造式1において、 m は、0～4の定数である。

【0020】

その他実施例の具体的な事項は、詳細な説明及び図面に含まれている。

20

【発明の効果】

【0021】

本発明は、少なくとも次のような効果がある。

【0022】

本発明による両性蛍光物質は、生体物質に対する非特異的反応を最小化して、タンパク質の検出・分析の正確性を向上させることができる。

【0023】

本発明による効果は、以上に例示の内容によって制限されず、より多様な効果が本明細書内に含まれている。

30

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明の一実施例による両性蛍光物質のUPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) 分析結果。

【発明を実施するための最善の形態】

【0025】

本発明の利点及び特徴、そしてそれらを達成する方法は、詳細に後述される実施例を参照すれば明確になる。本発明は、以下に開示の実施例に限定されるものではなく、互いに異なる様々な形態に具現されるものである。ただし、実施例は、本発明の開示を完全にし、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者に発明の範疇を完全に知らせるために提供されるものであり、本発明は、請求項の範疇によって定義されるだけである。

40

【0026】

また、本明細書に開示の技術を説明することにおいて、関連する公知の技術に対する具体的な説明が本明細書に開示の技術の要旨を曖昧にすると判断される場合には、その詳細な説明を省略する。

【0027】

本明細書の全体において、ある部分がある構成要素を「含む」、「有する」とするとき、これは特に逆に記載されない限り、他の構成要素を除くものではなく、他の構成要素をさらに含むことができることを意味する。

【0028】

50

また、本明細書の全体において、「A～B」は、A以上かつB以下の範囲内であることを意味し、「A以上～B未満」は、A以上かつB未満の範囲内であることを意味し、「A超～B以下」は、A超かつB以下の範囲内であることを意味する。本明細書において、「C a～b」は、炭素数がa～bであることを意味する。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の両性蛍光物質は、カチオンとアニオンとが共存する両性イオン部分（m o i e t y）を含むため、アミノ酸、ペプチド、又はタンパク質等といった生体物質に対する非特異的反応を最小化することができる。

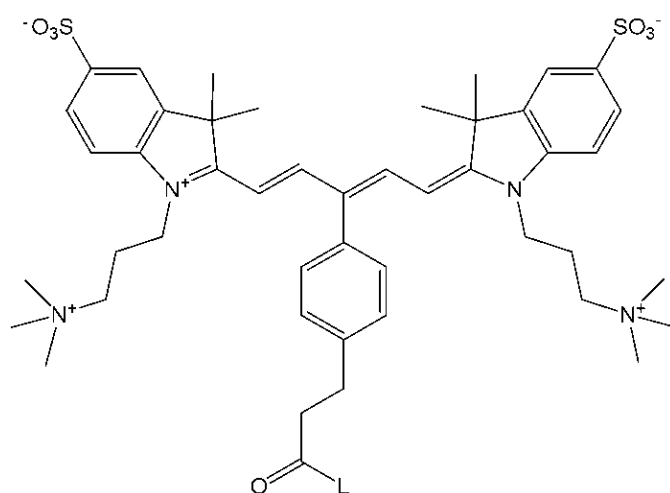
【0030】

発明による生体物質と連結し得る両性蛍光物質（以下、「発明の両性蛍光物質」と言う）は、下記の構造式1で表される化合物のうち少なくとも一つを含む。

【0031】

<構造式1>

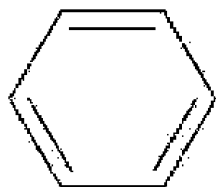
【化4】



【0032】

上記構造式1で表される化合物は、ペンタメチンシアニン染料（p e n t a m e t h i n e c y a n i n e d y e）に対する両性イオン部分と、アミノ酸、ペプチド、又はタンパク質等といった生体物質に連結し得るリンカーとして、 $-Ph-CH_2-CH_2-C(=O)-L$ を導入した化合物である。Phは、

【化5】



である。

【0033】

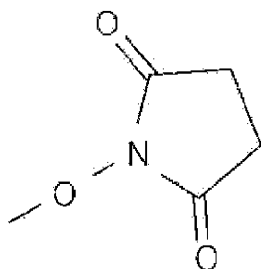
発明者らが確認したところによれば、リンカーとして $-O-Ph-CH_2-CH_2-C(=O)-L$ が導入された対照群は、バッファ水溶液（b u f f e r a q u e o u s s o l u t i o n）における構造が不安定であったし、タンパク質等の生体物質にラベル付け（l a b e l i n g）したとき、時間が経過するにつれて、スクリーン時、蛍光強さが弱くなった。他方、リンカーとして $-Ph-CH_2-CH_2-C(=O)-L$ が導入された発明の両性蛍光物質は、前記対照群に比べてバッファ水溶液における構造的安全性が高

かった。

【0034】

上記構造式1において、Lは、 $-(L1)_n-(L2)$ である。L1は、 $-NH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_m-CH_2-C(=O)-$ であり、L2は、アジド (azide)、アセチレン (acetylene)、マレイミド (maleimide)、ビオチン (biotin)、ヒドラジド (hydrazide)、

【化7】



10

、 $-R_3-(C(=O))_2-NH-NH_2$ 、及び $-R_4-(S(=O))_2-NH-NH_2$ のうちの一つである。 R^1 、 R^2 、 R_3 、 R_4 は、それぞれC1～6の2価脂肪族炭化水素、C1～6のアルキレン又は2価芳香族炭化水素である。

【0035】

上記構造式1において、nは、0又は1である。前記nが0である場合、 $-Ph-CH_2-CH_2-C(=O)-L$ において、 $-L$ は、 $-L2$ である。前記nが1である場合、 $-Ph-CH_2-CH_2-C(=O)-L$ において、 $-L$ は、 $-L1-L2$ である。

【0036】

上記構造式1において、mは、0～4の定数である。前記mが0である場合、L1は、 $-NH-CH_2-CH_2-C(=O)-$ であり、前記mが1である場合、L1は、 $-NH-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-C(=O)-$ であり、前記mが2である場合、L1は、 $-NH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-CH_2-C(=O)-$ であり、前記mが3である場合、L1は、 $-NH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-CH_2-C(=O)-$ であり、前記mが4である場合、L1は、 $-NH-CH_2-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-(CH_2-O-CH_2)-CH_2-C(=O)-$ である。

30

【0037】

前記mの値が大きくなるほど、バッファ水溶液における発明の両性蛍光物質の溶解度が増加して、ラベル付け (labeling) を効果的に行うことができ、タンパク質等の生体物質と発明の両性蛍光物質との間の距離を空けて、発明の両性蛍光物質がタンパク質等の生体物質に及ぼす影響を最小化することができる。

【0038】

例えば、上記構造式1で表される化合物は、下記の構造式2で表される化合物のうち少なくとも一つであってもよい。

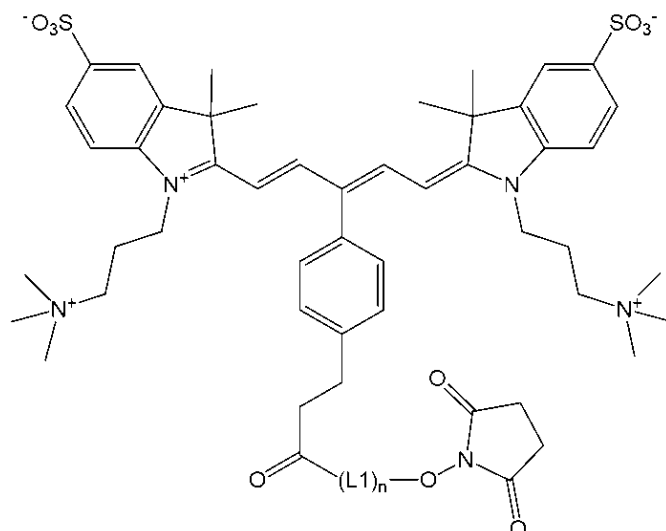
40

【0039】

<構造式2>

50

【化 8】



10

【 0 0 4 0】

上記構造式 2 において、L 1、n は、それぞれ上記構造式 1 に定義したとおりである。

【 0 0 4 1】

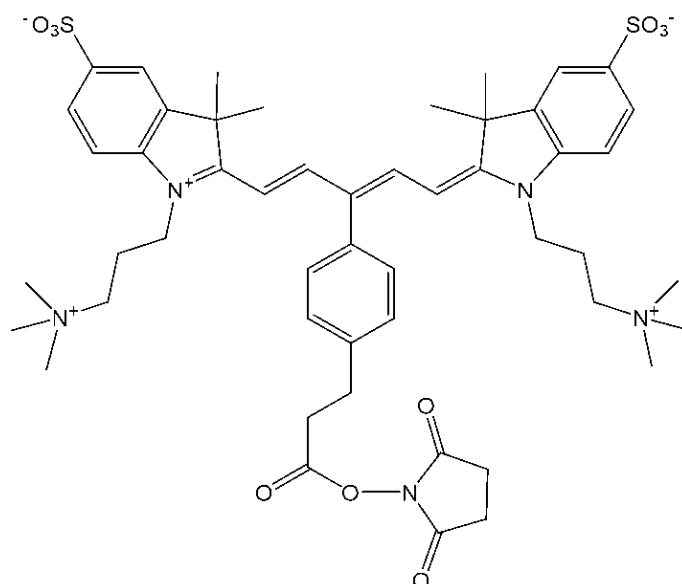
例えば、上記構造式 2 で表される化合物のうち一つは、下記の構造式 3 で表される化合物、又は下記の構造式 4 で表される化合物であってもよい。

20

【 0 0 4 2】

< 構造式 3 >

【化 9】



30

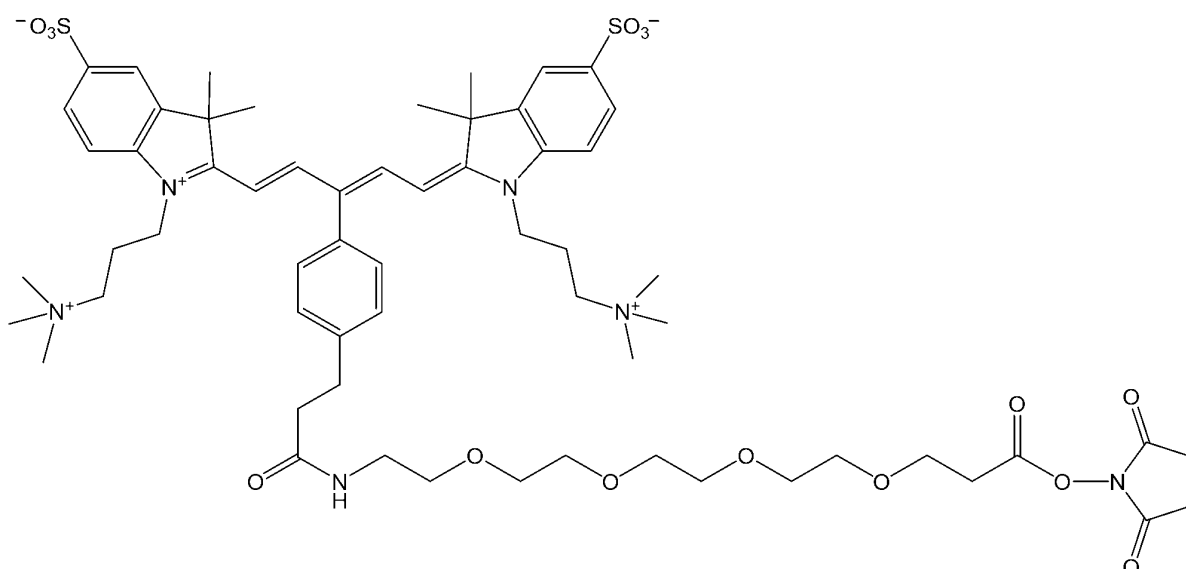
【 0 0 4 3】

< 構造式 4 >

40

50

【化 10】



10

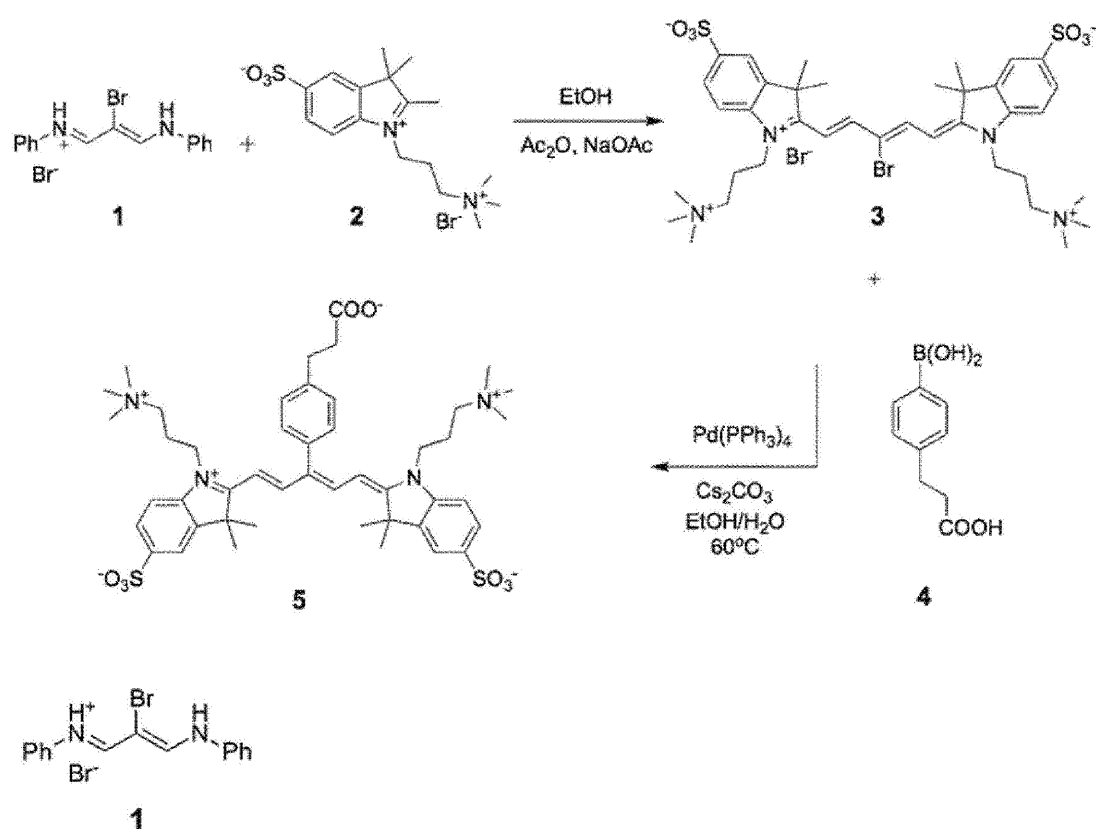
【0044】

<合成例>

下記の合成スキーム (scheme) によって構造式 4 で表される化合物を合成した。

20

【化 11】



30

40

【0045】

(E)-N-((Z)-2-Bromo-3-(phenylamino)allylidene)benzenaminium bromide (1)。

【0046】

ムコブロム酸 (Mucobromic acid) (5.940 g、23.04 mmol) をエタノール (40 mL) に溶解させた後、10 分以上エタノール (20 mL) で希

50

釈したアニリン（4.286 g、4.2 mL、46.1 mmol）を滴下した。

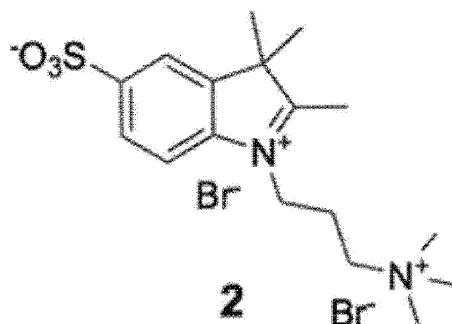
【0047】

反応槽を激しく攪拌して、40℃まで徐々に加熱した。アニリンの滴下を完了した後、反応が終了していないことを示す二酸化炭素（CO₂）がさらに生成された。二酸化炭素の放出を完了後、黄金～茶色反応混合物を氷槽（ice bath）で冷凍させた。明るい黄色固体が沈殿するまでに低温で攪拌しつつ、ジエチルエーテル（50 mL）を添加した。生成された固体を濾過し、エーテルで洗浄しており、乾燥した後、精製せずに後続反応で使用した。

【0048】

収率（Yield）75%；融点（mp）189℃～191℃；¹H NMR（400 MHz、DMSO-d₆）：δ 7.330（t、J=7.2 Hz、2H）、7.496（t、J=8 Hz、4H）、7.708（d、J=8 Hz、4H）、9.559（s、2H）、11.513（s、2H）；¹³C NMR（100 MHz、DMSO-d₆）：δ 89.3、119.5、123.9、126.0、129.2、129.6、138.5、157.4。

【化12】



【0049】

2,3,3-Trimethyl-1-[(3-(trimethylammonio)propyl)-3H-indolium-5-sulfonate]dibromide (2)。

【0050】

2,3,3-トリメチル-3H-インドール-5-スルホン酸（2,3,3-trimethyl-3H-indole-5-sulfonic acid）（7.17 g、36.4 mmol）と、（3-ブロモプロピル）トリメチルアンモニウムブロム化物（（3-bromopropyl）trimethyl ammonium bromide）（10.5 g、40 mmol）の混合物のトルエン（60 mL）溶液を窒素雰囲気下で、72時間、130℃で加熱した。混合物を室温まで冷却して、溶媒を注いだ。粗生成物（crude product）をメタノール及びMTBEから結晶化し、桃色結晶を得て、これをさらに精製せずに後続段階で使用した。

【0051】

収率（Yield）81%；融点（mp）232℃～235℃；¹H NMR（400 MHz、DMSO-d₆）：δ 1.56（s、6H）、2.51（s、3H）、3.07（m、2H）、3.12（s、9H）、3.62（t、J=7.2 Hz、2H）、4.50（t、J=7.2 Hz、2H）、7.71（d、J=8.0 Hz、1H）、7.79（d、J=8.0 Hz、1H）、8.01（s、1H）。¹³C NMR（100 MHz、DMSO-d₆）：δ 15.0、21.6、22.3、45.2、53.1、55.0、62.4、115.4、121.2、126.8、141.3、142.0、149.9、199.1。C₁₇H₂₇N₂O₃S [M]⁺に対するHRMS（ESI）m/z 計算値 339.1740、m/z 実測値 339.1742。

10

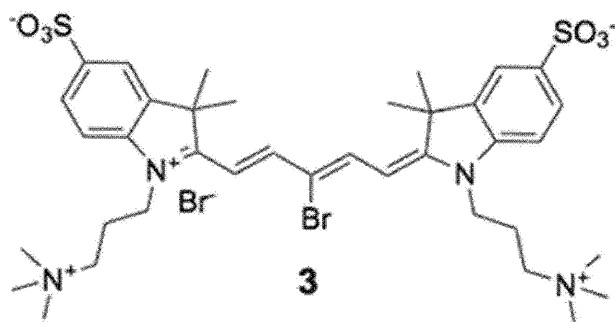
20

30

40

50

【化13】



10

【0052】

2-((1E, 3Z)-3-bromo-5-((E)-3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-(trimethylammonio)propyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(3-(trimethylammonio)propyl)-3H-indol-1-ium-5-sulfonate bromide (3)。

【0053】

無水酢酸 (acetic anhydride) (8mL) と酢酸ナトリウム (sodium acetate) (4mol eq) の存在下、70℃で、N-ヘテロサイクリク 4級アンモニウム部分 2 (N-heterocyclic quaternary ammonium moiety 2) (2mol eq) を有する、置換された 2,3,3-トリメチルインドレニン塩 (Substituted 2,3,3-trimethyl indolenine salts) をブロム化メチン試薬 1 (1mol eq) と反応させた。

20

【0054】

メタノール中の UV-Vis-NIR 吸収分光法及び LC-MS を利用して反応をモニタリングした。2~4 時間後、反応を完了した。溶媒を真空下で除去した。粗物質 (crude material) をメタノールと水の勾配溶媒組成を利用したフルカ (Fluka) シリカゲル 90 Å C18 逆相クロマトグラフィーを用いて精製して、高純度の最終化合物を得た。

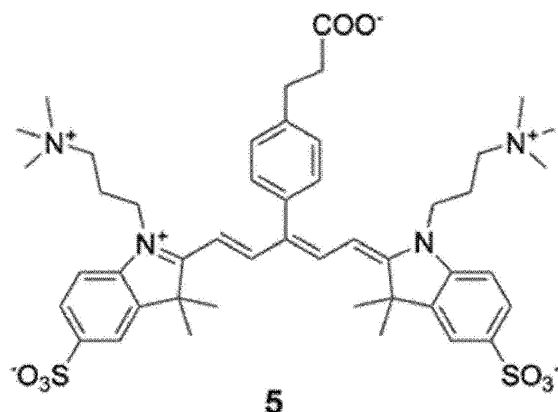
30

【0055】

収率 (Yield) 77% ; 融点 (mp) 252℃~254℃ ; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 2.05 (s, 12H)、2.71 (t, J=7.6 Hz, 4H)、3.47 (s, 18H)、3.86 (tt, J=7.6 Hz, 7.2 Hz, 4H)、4.64 (t, J=7.2 Hz, 4H)、6.78 (d, J=13.2 Hz, 2H)、7.73 (d, J=8.0 Hz, 2H)、8.21 (d, J=8 Hz, 2H)、8.25 (s, 2H)、8.56 (d, J=13.2 Hz, 2H) ; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)、δ : 20.3、26.3、40.6、49.7、52.3、63.6、103.0、110.2、116.4、119.1、126.6、140.3、141.3、142.5、150.6、176.7。理論的組成 : (x 3H₂O) : C (47.95%)、H (6.31%)、N (6.05%) ; 実際組成 : C (47.46%)、H (6.48%)、N (6.05%) ; [C₃₇H₅₂BrN₄O₆S₂]⁺ に対する HRMS (ESI) m/z 理論値 792.8822、m/z 実測値 792.8854。

40

【化 14】



10

【0056】

3-(4-((1E,3Z,5E)-1-(3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-(trimethylammonio)propyl)-3H-indol-1-ium-2-yl)-5-(3,3-dimethyl-5-sulfonato-1-(3-(trimethylammonio)propyl)indolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-3-yl)phenyl)propanoate (5)。

20

【0057】

ブロモ染料前駆体 3 (1.0 mmol) と、3-(4-ボロノフェニル)プロピオン酸 (3-(4-boronophenyl)propanoic acid) 4 (1.8 mmol) の水溶液を 72 時間、Pd(PPh₃)₄ (0.065 mmol) の存在下で、還流下に加熱した。

【0058】

ブロモロシアニン (bromorocyanine) の吸収が消滅するまで、メタノールで希釈した分取量をもって、可視／近赤外線分光法により反応進行をモニタリングした。

【0059】

次いで、反応混合物を室温で冷凍させて、H₂O を減圧下で除去した。固体を MeOH／アセトンで沈殿させて分離し、沈殿物をアセトンでさらに洗浄した。

30

【0060】

開放-逆相コラムクロマトグラフィー (アセトニトリル／水で溶離) を用いて、最終蛍光物質を得た。

【0061】

収率 (Yield) 72% ; 融点 (mp) > 260°C ; λ_{max} = 645 nm in H₂O ; ¹H NMR (DMSO-d₆)、δ : 1.78 (s, 12H)、1.99 (br s, 4H)、2.65 (br s, 2H)、2.93 (br s, 2H)、3.08 (s, 18H)、3.25 (br s, 4H)、3.84 (br s, 4H)、5.65 (d, J = 7.0 Hz, 2H)、7.27 (d, J = 3.8 Hz, 2H)、7.35 (d, J = 4.2 Hz, 2H)、7.42 (d, J = 4.0 Hz, 2H)、7.60 (d, J = 4.2 Hz, 2H)、7.87 (s, 1H)、8.54 (d, J = 7.0 Hz, 2H)、12.33 (s, 1H) ; ¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 70°C)、δ : 21.16、27.51、32.25、39.42、41.30、49.82、53.84、63.95、102.87、111.37、120.49、127.51、129.92、130.67、133.25、137.19、141.23、142.04、143.57、155.23、175.21、181.88 ; C₄₆H₆₀N₄O₈S₂ に対する HRMS (TOF MS ES+) m/z 理論値 860.3853 [M]⁺、m/z 実測値 862.4038 [M+2H]⁺。

40

【0062】

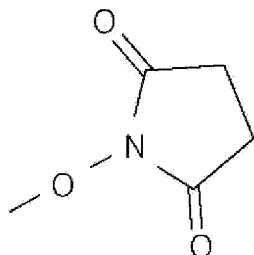
50

化合物 5 に $-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHS}$ を導入して、構造式 4 で表される化合物を得た。

【0063】

<NHS>

【化15】

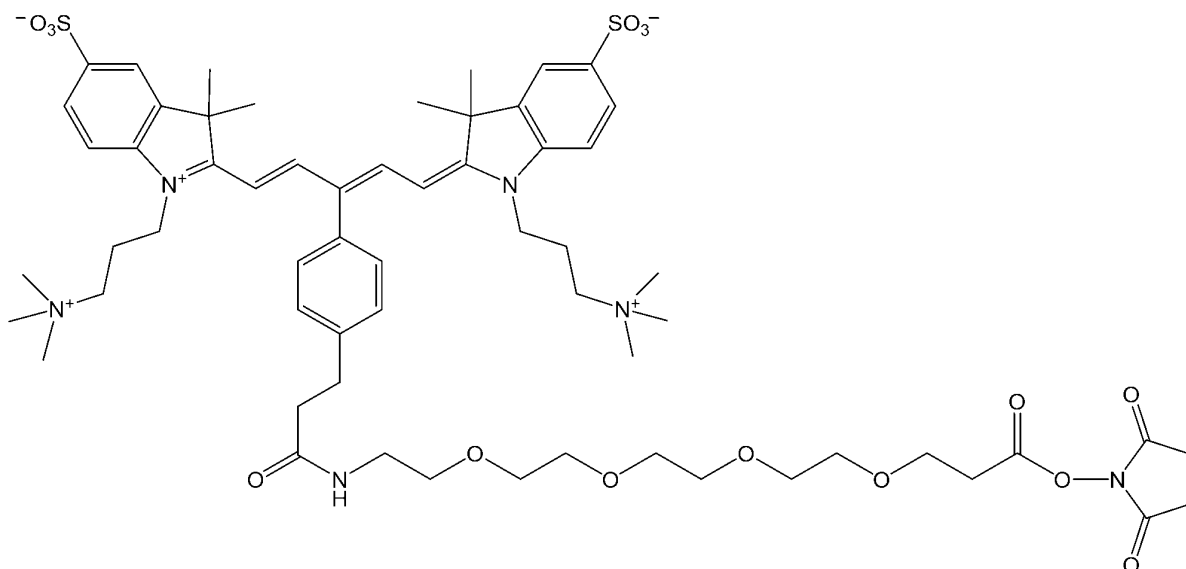


10

【0064】

<構造式 4>

【化16】



20

30

【0065】

図 1 には、構造式 4 で表される化合物の UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) 分析結果が示されている。

【0066】

UPLC 分析

UPLC: ウォーターズ (WATERS)。

カラム (Column): HSS C18 SB 1.8mm 2.1×50mm。

勾配 (Gradient): 3 分以上、5~50% メタノールで行う。

40

【0067】

以上、本発明の実施例を説明したが、本発明は、前記実施例に限定されるものではなく、互いに異なる様々な形態に製造することができ、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術思想や必須特徴を変更せずに、他の具体的な形態に実施できることを理解することができる。よって、以上に記述した実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的ではないと理解しなければならない。

【産業上利用可能性】

【0068】

発明は、生体物質と連結し得る両性蛍光物質を提供する。

【0069】

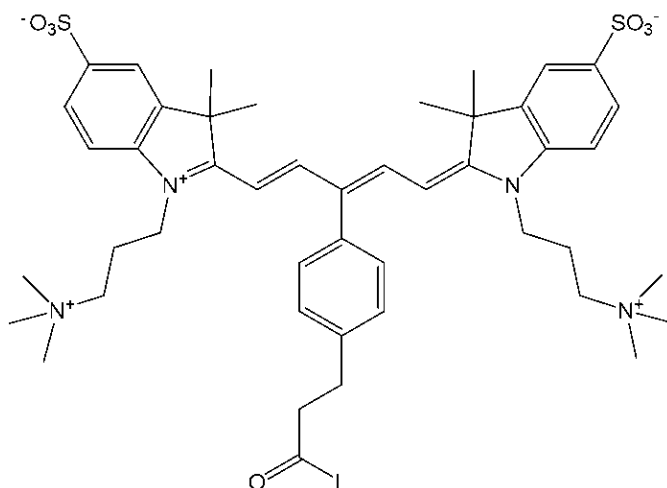
50

前記両性蛍光物質は、下記の構造式 1 で表される化合物のうち少なくとも一つを含む。

【 0 0 7 0 】

< 構造式 1 >

【 化 1 7 】



10

【 0 0 7 1 】

上記構造式 1 において、L は、明細書に定義したとおりである。

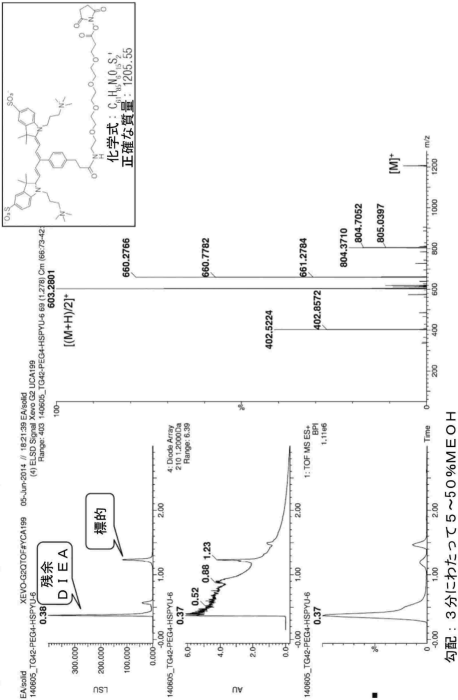
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

5 - 1

審査官 三須 大樹

- (56)参考文献 特表 2012-524153 (JP, A)
特表 2006-513293 (JP, A)
ADVANCED THERAPEUTICS, 2019年, 2, 1900111
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07D
A61K
CAplus/REGISTRY (STN)