

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-534241

(P2014-534241A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 49/00 (2006.01)	A61K 49/00	Z 2G043
C07D 403/12 (2006.01)	C07D 403/12	4C063
G01N 21/64 (2006.01)	G01N 21/64	F 4C065
C09K 11/06 (2006.01)	C09K 11/06	4C085
C07D 401/06 (2006.01)	C07D 401/06	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-541508 (P2014-541508)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月5日 (2012.3.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月14日 (2014.5.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2012/071940
 (87) 国際公開番号 W02013/131235
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)

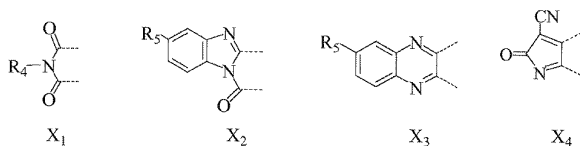
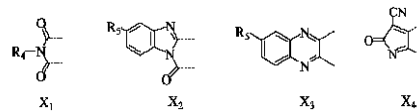
(71) 出願人 513324321
 大連理工大学
 中華人民共和国 116024 遼寧省
 大連市 高新園區凌工路2号
 (71) 出願人 514121387
 大連科栄生物技術有限公司
 中華人民共和国 116000 遼寧省大
 連市高新技术産業園區火炬路43号綜合樓
 201
 (74) 代理人 100095407
 弁理士 木村 満
 (74) 代理人 100109449
 弁理士 毛受 隆典
 (74) 代理人 100132883
 弁理士 森川 泰司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ、その製造方法及びその利用

(57) 【要約】

本発明は一般式 I で示される構造 (図 1) を有するナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブを提供する。式 I において、X は、X₁、X₂、X₃ 及び X₄ から選択される。当該二光子蛍光染料は、非腫瘍細胞と組織内では蛍光バックグラウンドが低い、腫瘍細胞と組織内では蛍光信号が強く、且つ腫瘍細胞と組織に対して特異的な高い標識性能を示す。該化合物は、ある程度の水溶性を有すると共に、細胞膜透過性が良好であり、更に有効な二光子を吸収する断面が大きい。本発明のこの種類の化合物は更に生体毒性、光毒性、光による漂白性が低く、そのスペクトル範囲と生体試料のスペクトル範囲とは、かなり大きく異なる。



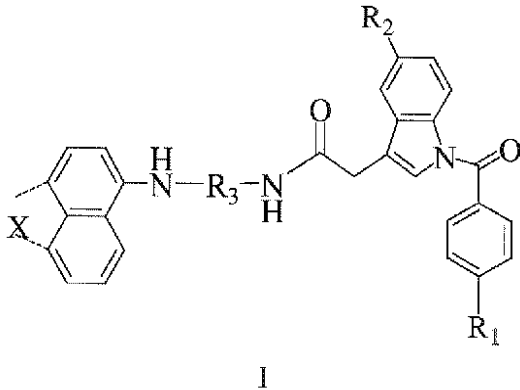
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I で示される構造を有する、ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ。

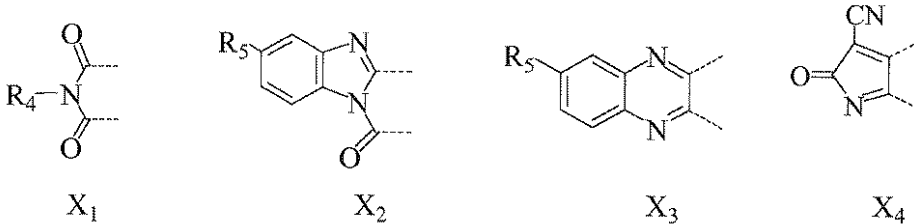
【化 1】



10

ここで、X は、 X_1 、 X_2 、 X_3 及び X_4 から選択されるものであり、点線で示される結合によって一般式 I と結合され、

【化 2】



20

R_1 及び R_2 は、それぞれ $-OCH_3$ 、 $-OCOCH_3$ 、またはハロゲンから独立して選択されるものであり、

R_3 は、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、または $-(CH_2)_8-$ から選択され、

R_4 は、 C_{1-6} アルキル基、 $HOCH_2-$ 、 $HO(CH_2)_2-$ 、 $HO(CH_2)_3-$ 、 $HO(CH_2)_4-$ 、 $HO(CH_2)_5-$ 、または $HO(CH_2)_6-$ から選択され、

R_5 は、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、または $-SH$ から選択される。

【請求項 2】

R_1 及び R_2 は、それぞれ $-OCH_3$ 及びハロゲンから独立して選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ。

【請求項 3】

R_3 は $-(CH_2)_5-$ 又は $-(CH_2)_6-$ である、ことを特徴とする請求項 1 に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ。

【請求項 4】

R_4 は C_{1-4} アルキル基から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ。

【請求項 5】

R_5 は $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 又は $-NO_2$ から選択される、ことを特徴とする請求項 1 に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ。

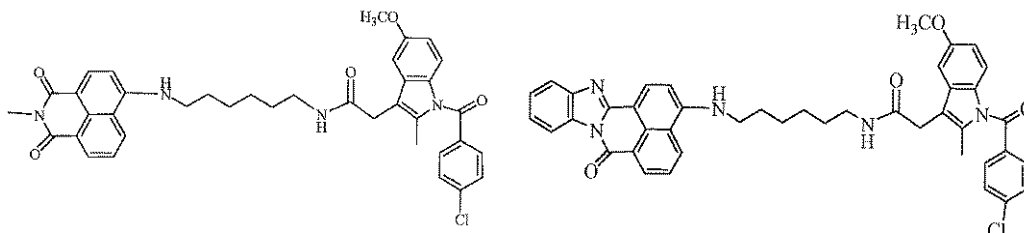
【請求項 6】

以下の化合物 $A_1 \sim A_6$ から選択される、請求項 1 に記載のナフタレンを基本骨格とす

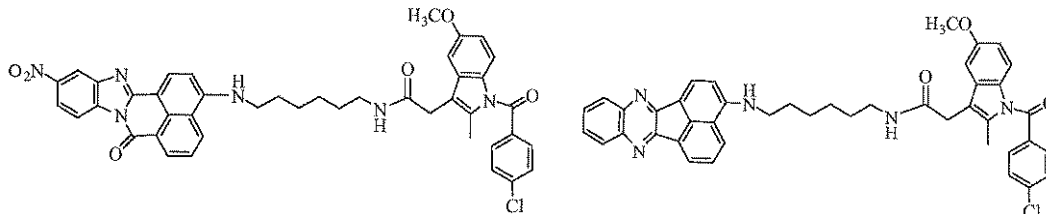
50

る二光子蛍光プローブ。

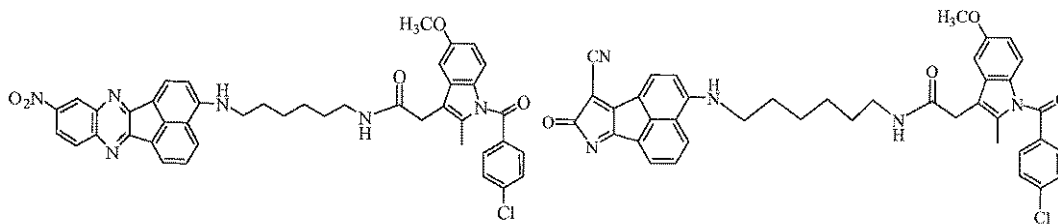
【化 3】

A₁A₂

10

A₃A₄

20

A₅A₆

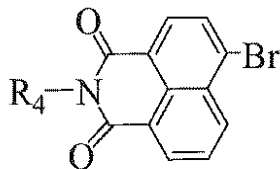
【請求項 7】

請求項 1 に記載するナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの製造方法であって、下記のステップ、つまり、

30

1) 4 - プロモ - 1,8 - ナフタル酸無水物 (4 - bromo - 1,8 - naphthalic anhydride) と、 $R_4 - NH_3$ とを 1 : 1 ~ 1 : 5 のモル比で反応させて、化合物 V を製造するステップ、

【化 4】



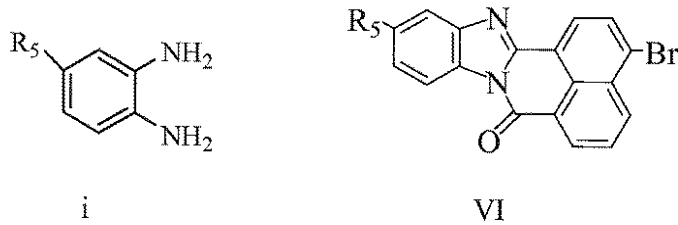
V

40

ここで、反応温度は 70 ~ 150 、反応時間は 1 ~ 12 時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される、

2) 4 - プロモ - 1,8 - ナフタル酸無水物と、式 i の化合物とを 1 : 1 ~ 1 : 5 のモル比で反応させて、化合物 VI を製造するステップ、

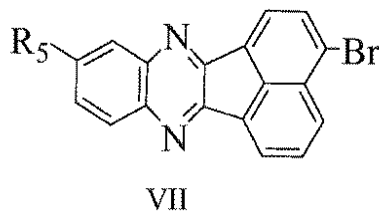
【化5】



ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される、 10

3) 4-ブロモアセナフテンキノン(4-bromoacenaphthenequinone)と、式iの化合物とを1:1～1:5のモル比で反応させて、化合物VIIを製造するステップ、

【化6】

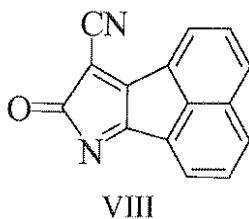


20

ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される、

4) アセナフテンキノンと、マロノニトリル(malononitrile)と、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)とを1:1:5のモル比で反応させて、化合物VIIIを製造するステップ、

【化7】

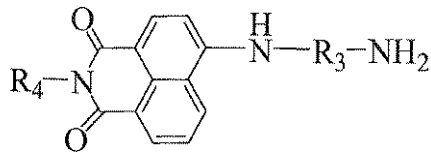


30

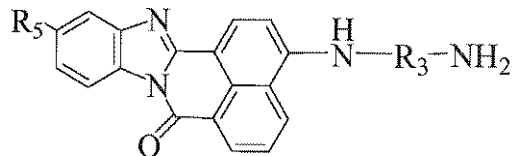
まず室温で0.5時間反応させてから、反応温度を徐々に70～180まで上昇させ、この温度を保ちながら4～12時間反応させ、反応溶媒はジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン(tetrahydrofuran)、又はそれらと水からなる混合物から選択される、

5) ステップ1)～4)で製造された化合物V、VI、VII、VIIIをそれぞれNH₂R₃NH₂と1:1～1:2.5のモル比で反応させて、化合物IX、X、XI、XIIを製造するステップ、 40

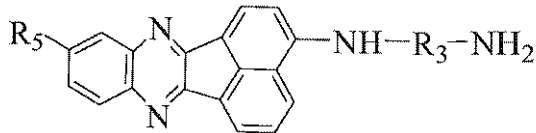
【化 8】



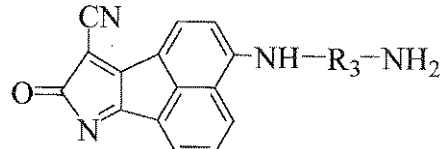
IX



X



XI



XII

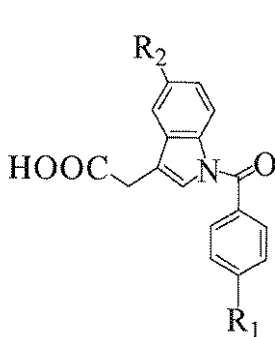
10

ここで、反応温度は 100 ~ 175、反応時間は 1 ~ 7 時間、反応溶媒はエタノール、2 - メトキシエタノール (2 - methoxyethanol)、またはそれらの混合物である、

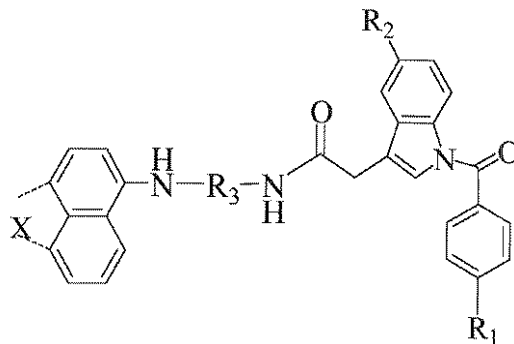
6) 化合物 IX、X、XI、XII と、式 ii の化合物とを 1 : 1 ~ 1 : 3 のモル比で反応させて、化合物 I を製造するステップ、

20

【化 9】



ii



I

30

ここで、反応温度は 0 ~ 100、反応時間は 12 ~ 48 時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、またはそれらの混合物であり、反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4 - ジメチルアミノピリジン (Dimethylaminopyridine) を触媒とする、

を含む二光子蛍光プローブの製造方法。

【請求項 8】

前記ステップ 4) において、水と、ジメチルスルホキシド又はテトラヒドロフランとのモル比はそれぞれ 1 : 1 ~ 1 : 1.25 である、

40

ことを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの生体試料の標識への利用。

【請求項 10】

前記生体試料は、腫瘍組織又は腫瘍細胞である、

ことを特徴とする請求項 9 に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの生体試料の標識への利用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブ、その製造方法及び腫瘍細胞又は組織を標識するものとして、該蛍光プローブを利用することに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、腫瘍の発症率は急増しており、「爆発」的に増加する寸前の状態である。世界保健機関(WHO)の国際がん研究機関が公開した「世界がん報告」では、近年のがん発症率の増加傾向によれば、2020年には全世界のがんの発症率は現在より50%増加し、新たに発症するがん患者数は毎年1500万人になると説明されている。そこで、簡単、迅速、有効、且つ高感度のがん標識技術の開発が、重要な任務になっている。X線による検出技術、超音波による検出技術、CTによる検出技術、核磁気共鳴(MRI)による検出技術、赤外線サーモグラフィによる検出技術、近赤外線スキャンニングによる検出技術、PET-CTによる検出技術などが従来の標識を用いるイメージング法として用いられている。しかしながら、上記方法は、イメージングの実行時に、イメージングの特異性に欠け、放射線による損害が大きく、腫瘍を個別に標識により診断できず、腫瘍に対して深度イメージングができない等の欠点がある。蛍光標識の光学分子イメージング法により、既存の問題を解決するのに優れた方法が提供される。現在、フェナントリジン(phenanthridine)系(EB、PI)、アクリジン(acridine)系(AO)、イミダゾール(iminazole)系(Hoechst、DAPI)とシアニン(cyanine)族染料系(Cy、TOTO、SYTO)等の商品化された蛍光染料は、ゲノミクス技術、核酸の定量検出、血液細胞分析等の分野で大きな役割を果たしている。しかしながら、腫瘍細胞及び組織を標識するための蛍光染料は、プローブと比べてまだ少なく、標識性能も低い。

10

20

【0003】

二光子技術の進展に伴って、二光子励起蛍光顕微鏡がライフサイエンスに関する研究でもっとも重要なイメージング手段になっている。従来の一光子励起型の共焦点蛍光顕微鏡に比べて、二光子励起蛍光顕微鏡は、近赤外線による励起、暗視野イメージング、蛍光漂白と光毒性の回避、固定されたターゲットの励起、横方向分解能及び縦方向分解能の高さ、生体組織の光吸収係数の低下及び組織からの自発蛍光の干渉の減少等(Helmchen F, Svoboda K, Denk W et al. Nature, 1999, 2: 989-996. Maiti S, Shear J B, Williams R M et al. Science, 1997, 275: 530. Ventelon L, Charrier S, Moreaux L et al. Angewandte Chemie International Edition, 2001, 40: 2098.)の面で極めて優れている。そのため、二光子励起顕微鏡によるイメージング技術により、生体イメージングにおいて新たな議論の場が提供される。しかしながら、腫瘍の標識イメージング、生体内での腫瘍の分布のイメージング及び腫瘍の深度イメージング等に対応する特異的な蛍光プローブはまだ少なく、腫瘍標識用の特異性に優れた二光子蛍光プローブの開発は、二光子腫瘍イメージングを実現する要となっている。

30

【発明の概要】

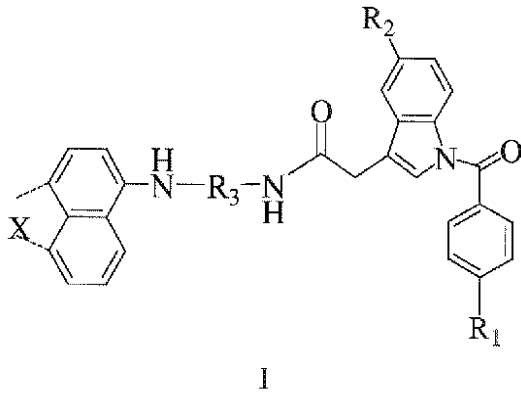
40

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブを提供する。前記蛍光プローブは下記的一般式Iで示される構造(図1を参照)を有する。

【化1】

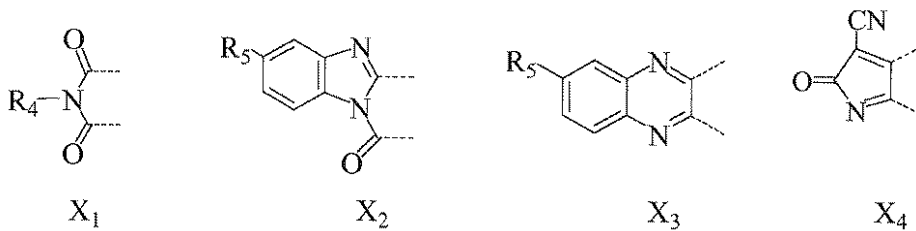


10

【0005】

ここで、Xは、 X_1 、 X_2 、 X_3 及び X_4 から選択され、点線で示される結合によって一般式 I と結合され、

【化2】



20

R_1 及び R_2 は、それぞれ $-OCH_3$ 、 $-OCOCH_3$ 、またはハロゲンから独立して選択され、

R_3 は、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、または $-(CH_2)_8-$ から選択され、

R_4 は、 C_{1-6} アルキル基、 $HOCH_2-$ 、 $HO(CH_2)_2-$ 、 $HO(CH_2)_3-$ 、 $HO(CH_2)_4-$ 、 $HO(CH_2)_5-$ 、または $HO(CH_2)_6-$ から選択され、

30

R_5 は、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、または $-SH$ から選択される。

【0006】

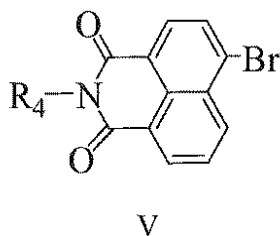
一方、本発明は、さらに以下のステップを含む前記ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの製造方法を提供する。

【0007】

1) 4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物 (4-bromo-1,8-naphthalic anhydride) と、 R_4-NH_3 と、を 1:1 ~ 1:5 のモル比で反応させて、化合物 V を製造するステップ。

40

【化3】



【0008】

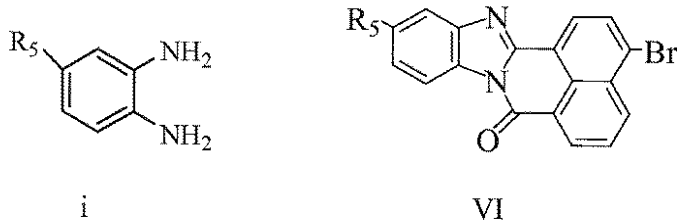
50

ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

【0009】

2) 4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、式iの化合物と、を1:1～1:5のモル比で反応させて、化合物VIを製造するステップ。

【化4】



10

【0010】

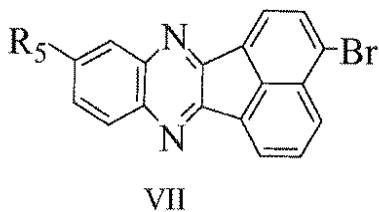
ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

【0011】

3) 4-プロモアセナフテンキノン(4-bromoacenaphthenequinone)と、式iの化合物と、を1:1～1:5のモル比で反応させて、化合物VIIを製造するステップ。

20

【化5】



【0012】

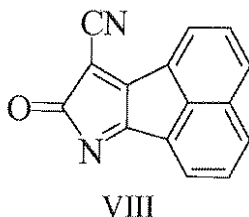
ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

30

【0013】

4) アセナフテンキノンと、マロノニトリル(malononitrile)と、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)と、を1:1:5のモル比で反応させて、化合物VIIIを製造するステップ。

【化6】



40

【0014】

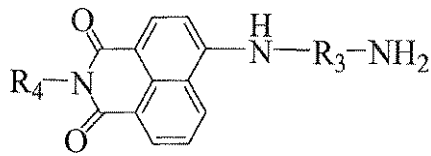
まず室温で0.5時間反応させてから、反応温度を徐々に70～180まで上昇させ、この温度を保ちながら4～12時間反応させる。反応溶媒はジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン(tetrahydrofuran)、又はそれらと水からなる混合物から選択される。

【0015】

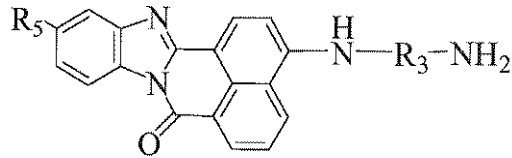
50

5) ステップ 1) ~ 4) で製造された化合物 V、VI、VII、VIII をそれぞれ $\text{NH}_2\text{R}_3\text{NH}_2$ と 1 : 1 ~ 1 : 2 . 5 のモル比で反応させて、化合物 IX、X、XI、XII を製造するステップ。

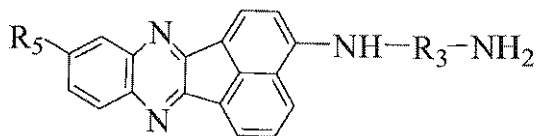
【化 7】



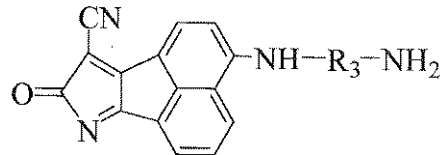
IX



X



XI



XII

10

【0016】

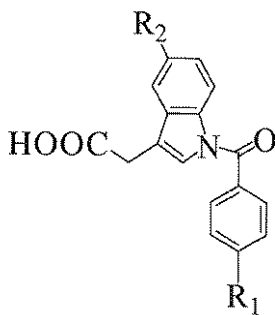
ここで、反応温度は 100 ~ 175、反応時間は 1 ~ 7 時間、反応溶媒はエタノール、2-メトキシエタノール (2-methoxyethanol)、またはそれらの混合物である。

20

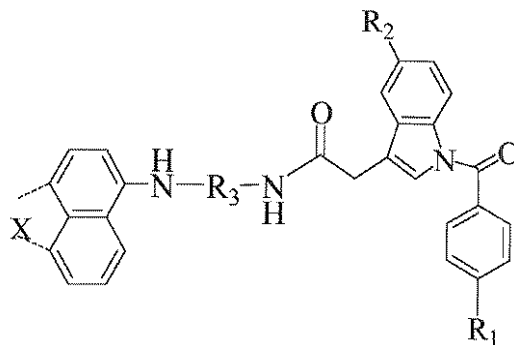
【0017】

6) 化合物 IX、X、XI、XII と、式 ii の化合物と、を 1 : 1 ~ 1 : 3 のモル比で反応させて、化合物 I を製造するステップ。

【化 8】



ii



I

30

【0018】

ここで、反応温度は 0 ~ 100、反応時間は 12 ~ 48 時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、またはそれらの混合物であり、反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4-ジメチルアミノピリジン (Dimethylaminopyridine) を触媒とする。

40

【0019】

本発明のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの製造方法に対する上記記載において、各置換基の定義、即ち R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 及び R_5 の定義は上記化合物に対する定義と同じである。

【0020】

一方、本発明は、さらに上記ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの生体試料の標識、特に腫瘍細胞及び組織標識への利用を提供する。

【0021】

50

本発明により、従来の腫瘍標識用の蛍光プローブの機能上の欠点を改善し、二光子励起され、生がん細胞と発がん組織を有効且つ特異的に標識するのに適用できる二光子蛍光プローブが設計され、合成された。このような種類の二光子蛍光染料は、非腫瘍細胞と組織内では蛍光バックグラウンドが低いが、腫瘍細胞と組織内では蛍光信号が高く、且つ腫瘍細胞と組織に対して特異的な高い標識性能を有する。この種の化合物は、ある程度の水溶性を有すると共に、細胞膜透過性が良好であり、更に有効な二光子を吸収する断面が大きい。本発明のこの種の化合物は、更に生体毒性、光毒性、光による漂白性が低く、そのスペクトル範囲と生体サンプルのスペクトル範囲とは、かなり大きく異なる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

10

【図1】本発明のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブを示す一般式Iである。

【図2】二光子共焦点イメージングによる、実施例2に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₁の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の写真である。濃度が4 μMであるA₁-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。写真を撮像した波長は500~550 nmである。図2(a)はHeLa細胞であり、図2(b)はHEK293細胞である。

【図3】実施例3に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₁の異なる溶媒での二光子を吸収する断面の測定結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセイン(fluorescein)を含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₁を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴ Mである。レーザーパルス幅(laser pulse width)は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)である。調節可能な波長範囲は700~980 nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

20

【図4】二光子共焦点イメージングによる、実施例5に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₂の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の写真である。濃度が4 μMであるA₂-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。写真を撮像した波長は500~550 nmである。図4(a)はHeLa細胞であり、図4(b)はHEK293細胞である。

30

【図5】実施例6に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₂を水溶液に溶かしたときの結果を示す。濃度が異なる化合物A₂の水溶液を用いて、最大吸収波長での吸光度を測定する。測定は三回繰り返される。

【図6】実施例8に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₃の溶媒効果の結果を示す。化合物A₃をジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランにそれぞれ添加し、異なる溶媒での紫外吸収スペクトル(a)と蛍光発光スペクトル(b)を測定する。

【図7】実施例9に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₃の異なる溶媒での二光子を吸収する断面の結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₃を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴ Mである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)である。調節可能な波長範囲は700~980 nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

40

【図8】実施例11に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₄のマウスの肺部の腫瘍組織とマウスの肺部の非腫瘍組織での二光子共焦点イメージングによる写真を示す。濃度が10 μMであるA₄-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたマウスの肺部の腫瘍組織の切片およびマウスの肺部の非腫瘍組織の切片から代表的な領域を選択して、油浸レンズ(1

50

00x)で観察する。観察は三回繰り返される。図8(a1)と(a2)はプローブA₄が加えられた後のマウスの肺部の腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真であり、図8(b1)と図8(b2)はプローブA₄が加えられた後のマウスの肺部の非腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真である。ここで、図8(a1)と図8(b1)で適用した波長は500~550nmであり、図8(a2)と図8(b2)で適用した波長は570~650nmである。

【図9】実施例12に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₄を水溶液に溶かしたときの結果を示す。濃度が異なる化合物A₄の水溶液を使用して、最大吸収波長での吸光度を測定する。当該試験は三回繰り返される。

【図10】実施例14に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₅の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の二光子共焦点結像による写真を示す。濃度が4μMであるA₅-DMSO溶液4μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37℃、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100x)で観察する。観察は三回繰り返される。図10(a1)および図10(a2)はHeLa細胞であり、図10(b1)および図10(b2)はHEK293細胞である。ここで、図10(a1)および図10(b1)で適用した波長は500~550nmであり、図10(a2)および図10(b2)で適用した波長は570~650nmである。

【図11】実施例15に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₅のマウスの肺部の腫瘍組織とマウスの肺部の非腫瘍組織の二光子共焦点イメージングによる写真を示す。濃度が10μMであるA₅-DMSO溶液4μLがそれぞれ添加されたマウスの肺部の腫瘍組織の切片とマウスの肺部の非腫瘍組織の切片から代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100x)で観察する。観察は三回繰り返される。図11(a1)および図11(a2)は、マウスの肺部の腫瘍組織であり、図11(b1)および図11(b2)は、マウスの肺部の非腫瘍組織である。ここで、図11(a1)および図11(b1)で適用した波長は500~550nmであり、図11(a2)および図11(b2)で適用した波長は570~650nmである。

【図12】実施例17に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₆の溶媒効果の結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドである。異なる溶媒での紫外吸収スペクトルと蛍光発光スペクトルを測定する。

【図13】実施例18に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₆の異なる溶媒での二光子を吸収する断面の測定結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₁を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴Mである。レーザーパルス幅は70fsであり、重複周波数は80MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5W(780nm)である。調節可能な波長範囲は700~980nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明には、13枚の図面が含まれる。

【0024】

別途に説明する場合を除き、本明細書で使用されている用語の定義は下記の通りである。

【0025】

本明細書で使用されている「アルキル基」は、直鎖アルキル基と分枝鎖アルキル基を含む。単体のアルキル基、例えば「プロピル(propyl)」と言う場合には、直鎖アルキル基だけを指す。単体の分枝鎖アルキル基、例えば「イソプロピル(isopropyl)」と言う場合には、分枝鎖アルキル基だけを指す。例えば、「C₁₋₆アルキル基」には、C₁₋₄アルキル基、C₁₋₃アルキル基、メチル基、エチル、n-プロピル、イソプロピルとターシャリーブチル(tertiary-butyl)基が含まれる。こ

10

20

30

40

50

のような規則は、本明細書で使用された他のラジカルにも適用される。

【0026】

本明細書で使用されている「ハロゲン」には、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素が含まれる。

【0027】

本発明の一般式の化合物において、上記 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立に $-OCH_3$ 、 $-OCOCH_3$ 、またはハロゲンから選択される。好ましい態様では、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立に $-OCH_3$ またはハロゲンから選択される。より好ましくは、 R_1 及び R_2 は、それぞれ独立に $-OCH_3$ または $-Cl$ である。最適には、 R_1 は $-OCH_3$ であり、 R_2 は全て $-Cl$ である。

10

【0028】

好ましくは、上記 R_3 は $-(CH_2)_{3-7}$ - であり、最適には、 R_3 は $-(CH_2)_{5-}$ 、または $-(CH_2)_6-$ である。

【0029】

上記 R_4 は、 C_{1-6} アルキル基、 $HOCH_2-$ 、 $HO(CH_2)_2-$ 、 $HO(CH_2)_3-$ 、 $HO(CH_2)_4-$ 、 $HO(CH_2)_5-$ 、または $HO(CH_2)_6-$ から選択される。好ましい態様では、 R_4 は C_{1-6} アルキル基である。最適には、 R_4 は C_{1-4} アルキル基である。

【0030】

上記 R_5 は $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-OH$ 、または $-SH$ から選択される。好ましくは、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、または $-NO_2$ である。より好ましくは、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-COOH$ 、または $-NO_2$ である。最適には、 $-H$ 、または $-NO_2$ である。

20

【0031】

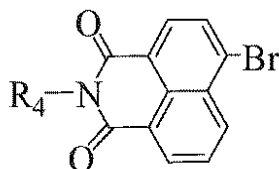
一方、本発明は、さらに以下のステップを含む前記ナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの製造方法を提供する。

【0032】

1) 4-ブロモ-1,8-ナフタル酸無水物(4-bromo-1,8-naphthalic anhydride)と、 R_4-NH_3 とを1:1~1:5のモル比で反応させて、化合物Vを製造するステップ。

30

【化9】



V

【0033】

ここで、反応温度は $70 \sim 150$ 、反応時間は $1 \sim 12$ 時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

40

【0034】

好ましい実施形態では、反応温度は $80 \sim 140$ 、反応時間は $2 \sim 10$ 時間、反応溶媒はエタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-ブロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は $1:1 \sim 1:4$ である。

【0035】

より好ましい実施形態では、反応温度は $90 \sim 120$ 、反応時間は $3 \sim 10$ 時間、反応溶媒は酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-ブロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は $1:1 \sim 1:3$ である。

【0036】

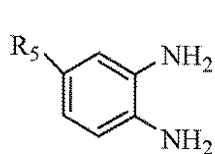
50

最適な実施形態では、反応温度は95～110、反応時間は4～8時間、反応溶媒は酢酸である。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1：1～1：2である。

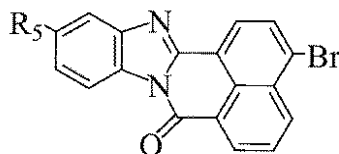
【0037】

2) 4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、式iの化合物とを1：1～1：5のモル比で反応させて、化合物VIを製造するステップ。

【化10】



i



VI

10

【0038】

ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

【0039】

好ましい実施形態では、反応温度は80～140、反応時間は2～10時間、反応溶媒はエタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1：1～1：4である。

20

【0040】

より好ましい実施形態では、反応温度は90～120、反応時間は3～10時間、反応溶媒は酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1：1～1：3である。

【0041】

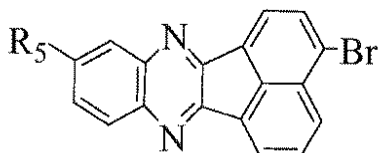
最適な実施形態では、反応温度は95～110、反応時間は4～8時間、反応溶媒は酢酸である。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1：1～1：2である。

30

【0042】

3) 4-プロモアセナフテンキノン(4-bromoacenaphthenequinone)と、式iの化合物とを1：1～1：5のモル比で反応させて、化合物VIIを製造するステップ。

【化11】



VII

40

【0043】

ここで、反応温度は70～150、反応時間は1～12時間、反応溶媒はジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。

【0044】

好ましい実施形態では、反応温度は80～140、反応時間は2～10時間、反応溶媒はエタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1：1～1：4である。

【0045】

50

より好ましい実施形態では、反応温度は90～120、反応時間は3～10時間、反応溶媒は酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1:1～1:3である。

【0046】

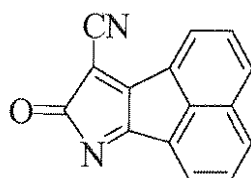
最適な実施形態では、反応温度は95～110、反応時間は4～8時間、反応溶媒は酢酸である。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、 R_4-NH_3 とのモル比は1:1～1:2である。

【0047】

4) アセナフテンキノンと、マロノニトリル(malononitrile)と、ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)とを1:1:5のモル比で反応させて、化合物VIIIを製造するステップ。

10

【化12】



VIII

【0048】

20

まず室温で0.5時間反応させた後、反応温度を徐々に70～180まで上昇させ、この温度を保ちながら4～12時間反応させる。反応溶媒は、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン(tetrahydrofuran)、又はそれらと水からなる混合物から選択される。

【0049】

好ましい実施形態では、まず室温で0.5時間反応させた後、反応温度を徐々に80～160まで上昇させ、この温度を保ちながら4～10時間反応させる。反応溶媒は、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、又はそれらと水からなる混合物から選択される。

【0050】

30

より好ましい実施形態では、まず室温で0.5時間反応させた後、反応温度を徐々に90～140まで上昇させ、この温度を保ちながら4～8時間反応させる。反応溶媒は、ジメチルスルホキシド、又はそれと水からなる混合物から選択される。

【0051】

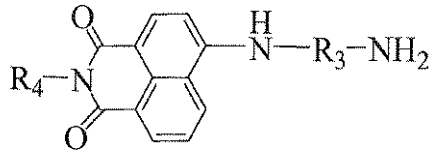
最適な実施形態では、まず室温で0.5時間反応させた後、反応温度を徐々に100～120まで上昇させ、この温度を保ちながら4～6時間反応させる。反応溶媒は、ジメチルスルホキシドである。

【0052】

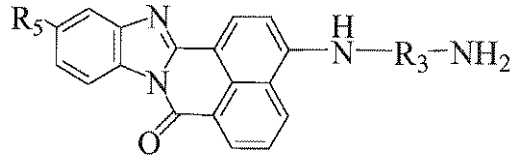
5) ステップ1)～4)で製造された化合物V、VI、VII、VIIIをそれぞれ $H_2R_3NH_2$ と1:1～1:2.5のモル比で反応させて、化合物IX、X、XI、XIIを製造するステップ。

40

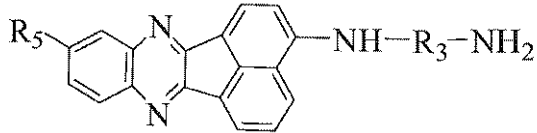
【化 1 3】



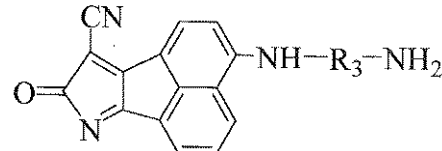
IX



X



XI



XII

10

【0053】

ここで、反応温度は100～175、反応時間は1～7時間、反応溶媒は、エタノール、2-メトキシエタノール(2-methoxyethanol)、またはそれらの混合物である。

【0054】

好ましい実施形態では、反応温度は100～165、反応時間は1～6時間、反応溶媒は、エタノール、2-メトキシエタノール、またはそれらの混合物であり、それぞれの化合物V、VI、VII、VIIIと、NH₂R₃NH₂とのモル比は1：1～1：2.5である。

20

【0055】

より好ましい実施形態では、反応温度は100～150、反応時間は1～5時間、反応溶媒は、エタノール、2-メトキシエタノール、またはそれらの混合物であり、それぞれの化合物V、VI、VII、VIIIと、NH₂R₃NH₂とのモル比は1：1～1：2である。

【0056】

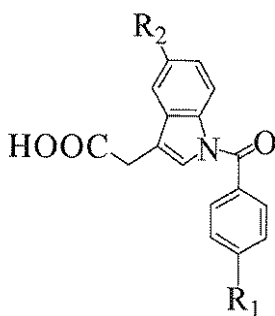
最適な実施形態では、反応温度は100～130、反応時間は1～4時間、反応溶媒は2-メトキシエタノールであり、それぞれの化合物V、VI、VII、VIIIと、NH₂R₃NH₂とのモル比は1：1～1：1.5である。

30

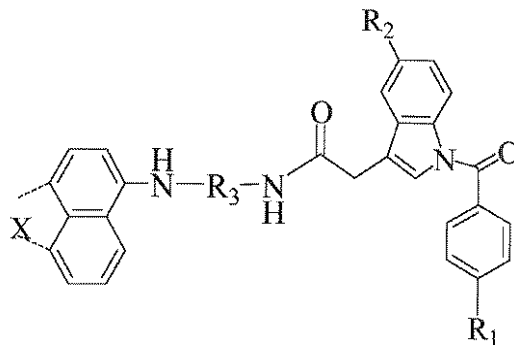
【0057】

6) 化合物IX、X、XI、XIIと、式iiの化合物とを1：1～1：3のモル比で反応させて、化合物Iを製造するステップ。

【化 1 4】



ii



I

40

【0058】

ここで、反応温度は0～100、反応時間は1.2～4.8時間、反応溶媒は、ジクロロ

50

メタン、エタノール、酢酸エチル、またはそれらの混合物である。反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4 - ジメチルアミノピリジン (Dimethylaminopyridine) を触媒とする。

【0059】

好ましい実施形態では、反応温度は10 ~ 80、反応時間は12 ~ 32時間、反応溶媒は、ジクロロメタン、エタノール、酢酸エチル、またはそれらの混合物である。反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4 - ジメチルアミノピリジンを触媒とし、化合物IX、X、XI、XIIと、式iiの化合物とのモル比は1 : 1 ~ 1 : 3である。

【0060】

より好ましい実施形態では、反応温度は20 ~ 70、反応時間は12 ~ 24時間、反応溶媒は、ジクロロメタン、酢酸エチル、またはそれらの混合物である。反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4 - ジメチルアミノピリジンを触媒とし、化合物IX、X、XI、XIIと、式iiの化合物とのモル比は1 : 1 ~ 1 : 2.5である。

10

【0061】

最適な実施形態では、反応温度は25 ~ 40、反応時間は12 ~ 24時間、反応溶媒はジクロロメタンである。反応は有機塩基の存在する条件下で行われ、4 - ジメチルアミノピリジンを触媒とし、化合物IX、X、XI、XIIと、式iiの化合物とのモル比は1 : 1 ~ 1 : 1.5である。

【0062】

上記本発明のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブの製造方法に記載の各置換基 (R₁、R₂、R₃、R₄ および R₅) の定義及び好ましい態様は、本発明の記載における化合物に対する定義、およびその好ましい態様と同じである。

20

【0063】

本発明の上記方法で合成された二光子蛍光プローブ化合物に対して、核磁気共鳴スペクトルまたはマスペクトルを利用して、その構造を確認し、且つ補助的に、¹³C - NMRスペクトル、融点試験によりその構造を確認する。

【0064】

本発明に記載のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブは下記の利点を有する。

【0065】

上記化合物に特有の標的点が導入されることによって、腫瘍細胞と組織に対する標識の特異性、特殊性が高められた。

30

【0066】

上記化合物は二光子を吸収する機能に優れるので、生体試料のイメージングに利用する際に、光による生体の漂白性、光損傷、生体への毒性が低く、且つ生成される蛍光信号は生体組織の深くまで透過できる。

【0067】

上記化合物の一部の分子は、600nmより大きい蛍光発光波長を有し、動物の生体イメージングに利用できる。

【0068】

上記化合物においてニトロ (nitro) 基を有する分子は、比例型プローブとして、腫瘍細胞および組織の標識に利用でき、定量的な標識を良好に実現でき、更に外部環境にある要素が、蛍光強度に及ぼす影響を防止できる。

40

【0069】

上記化合物は毒性が低く、原料が入手しやすく、構造が簡単であり、製造しやすく、産業化しやすい。

【0070】

上記に鑑みて、本発明に記載の二光子蛍光プローブ化合物は、腫瘍細胞および組織の標識に適用できる。本明細書に記載の形で腫瘍細胞および組織の染色に直接使用されるだけでなく、本発明に記載の二光子蛍光プローブ化合物を含む組成物も腫瘍細胞および組織の

50

染色に使用できる。前記組成物は、本発明で提供される二光子蛍光プローブ化合物のうちの一つを有効量含むべきである。また、例えば、溶媒、pH調整剤等のような、生体試料の染色に必要な他の成分を含んでもよい。これらの成分はすべて当該技術分野で公知のものである。上記組成物は、水溶液中で存在してもよく、又は使用直前に水で溶液を調合する等、他の適切な形で存在してもよい。

【0071】

本発明は、更に上記本発明の二光子蛍光プローブ化合物により腫瘍細胞および組織の生体試料を標識する方法を提供する。該当方法は、前記化合物を生体試料に接触させるステップを含む。本明細書で使用される「接触」は溶液または固相中での接触を指してもよい。

10

【0072】

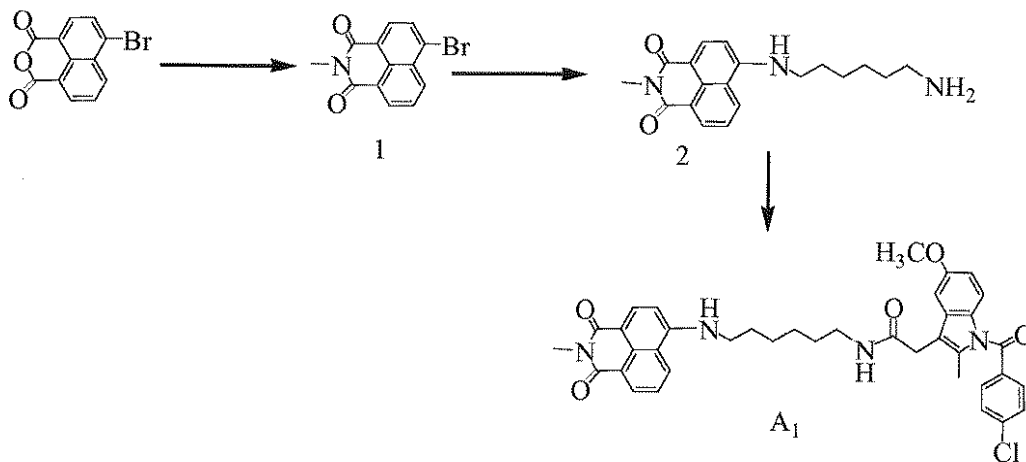
下記の非限定的な実施例は、当業者に本発明の全体を理解させるものであって、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0073】

(実施例1：プローブ化合物A₁の製造)

【化15】



20

30

【0074】

(1) 中間体1の合成

20 mmolの4-ブromo-1,8-ナフタル酸無水物と、25 mmolのメチルアミン(methylamine)とを、10 mlの酢酸溶液が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を100で2hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、白い固体粉末の粗生成物である中間製品1を得た。収率は96%であった。

【0075】

(2) 中間体2の合成

ステップ(1)で得られた、20 mmolの粗生成物1と、30 mmolのヘキサメチレンジアミン(hexamethylenediamine)とを、20 mlの2-メトキシエタノール(2-methoxyethanol)が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を125で5hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって黄色い固体粉末の中間体2を得た。収率は55%であった。

40

【0076】

(3) プローブ化合物A₁の合成

20 mmolの黄色い固体粉末の中間体2と、25 mmolのインドメタシン(indomethacin)と、25 mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチ

50

ルカルボジイミド(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide)(EDC)と、少量の4-メチルピリジン(4-methylpyridine)とを、無水ジクロロメタン(dichloromethane)溶液に入れ、室温下で攪拌しながら24時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによって山吹色の生成品を得た。収率は84%であった。

【0077】

図1は化合物A₁の核磁気共鳴スペクトル(NMR)である。ここで、¹H NMR (400 MHz、DMSO) 8.69 (d、J = 8.3 Hz、1H)、8.43 (d、J = 7.2 Hz、1H)、8.25 (d、J = 8.5 Hz、1H)、8.03 (s、1H)、7.72 (d、J = 3.5 Hz、2H)、7.64 (dt、J = 20.8、6.4 Hz、5H)、7.12 (d、J = 2.4 Hz、1H)、6.91 (d、J = 9.0 Hz、1H)、6.72 (d、J = 8.6 Hz、1H)、6.68 (dd、J = 9.0、2.5 Hz、1H)、4.22 (s、1H)、3.74 (s、3H)、3.48 (s、2H)、3.37 3.12 (m、16H)、3.08 (d、J = 6.1 Hz、2H)、2.51 (d、J = 1.6 Hz、6H)、2.22 (s、3H)、1.71 1.57 (m、3H)、1.37 (ddd、J = 24.7、14.6、6.8 Hz、8H)、1.23 (s、1H)である。

10

【0078】

(実施例2:プローブ化合物A₁で腫瘍細胞および非腫瘍細胞を標識する試験)

20

実施例1で合成された化合物A₁を使用して、濃度が4 μMのA₁-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、培地において、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養する。そして、PBSで5 min × 3回振とう洗浄した後、更に細胞培地を加えて、二光子を用いた共焦点レーザー法によりイメージングを行う。代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。イメージングにより、HeLa細胞内で強い蛍光信号が得られるが、HEK293細胞内では蛍光信号が得られないことが分かった。図2(a)はプローブA₁を加えた後のHeLa細胞の焦準を合わせて撮った写真であり、図2(b)はプローブA₁を加えた後のHeLa細胞の焦準を合わせて撮った写真である。写真を撮った波長は500~550 nmであった。

30

【0079】

(実施例3:プローブA₁の二光子を吸収する有効断面の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含むNaOH溶液(pH 11)を参照とし、実施例1で合成された化合物A₁をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル(acetonitrile)、ジオキサン(dioxane)、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド(N,N-dimethylformamide)、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面の測定を行った。使用される溶液の濃度は全て1 × 10⁻⁴ Mであり、以下の式で算出する。

40

【数1】

$$\delta_s = \delta_r \frac{C_r n_r F_s \Phi_r}{C_s n_s F_r \Phi_s}$$

【0080】

式中、Cは溶液の濃度、nは溶媒の屈折率を示し、表を調べることによって得られる。Fは転換された蛍光強度を示し、実験によって得られる。は二光子を吸収する断面である。参照溶液の物理量は全て下付き文字rで示す。

【0081】

異なる溶媒において、異なる波長で測定した二光子を吸収する有効な断面()の結

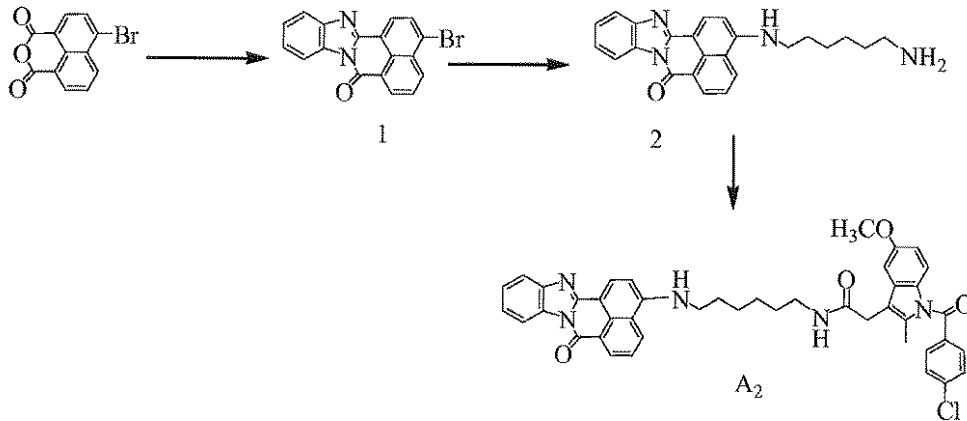
50

果を図3に示す。二光子励起蛍光スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W (780 nm)であり、調節可能な波長範囲は700 ~ 980 nmであった。実験中に、フェムト秒レーザー波長は、所望の測定波長に調節された。

【0082】

(実施例4：プローブ化合物A₂の製造)

【化16】



10

20

【0083】

(1) 中間体1の合成

20 mmolの4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、25 mmolのo-フェニレンジアミン(o-phenylenediamine)とを、10 mlの酢酸溶液が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を95 で4 hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物である中間製品1を得た。収率は90%であった。

【0084】

(2) 中間体2の合成

ステップ(1)で得られた、20 mmolの粗生成物1と、25 mmolのヘキサメチレンジアミンとを、20 mlの2-メトキシエタノールが入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を125 で5 hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって黄色い固体粉末の中間体2を得た。収率は63%であった。

30

【0085】

(3) プローブA₂の合成

20 mmolの黄色い固体粉末の中間体2と、25 mmolのインドメタシンと、25 mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)と、少量の4-メチルピリジンとを、無水ジクロロメタン溶液に入れ、室温下で攪拌しながら24時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによってインディアンイエロー色の生成物A₂を得た。収率は84%であった。ここで、¹H NMR(400 MHz、DMSO) 8.99(d、J = 7.2 Hz、2H)、8.69(d、J = 8.3 Hz、1H)、8.43(d、J = 7.2 Hz、1H)、8.25(d、J = 8.5 Hz、1H)、8.19(d、J = 6.3 Hz、2H)、8.03(s、1H)、7.85(d、J = 4.6 Hz、1H)、7.72(d、J = 3.5 Hz、2H)、7.64(dt、J = 20.8、6.4 Hz、5H)、7.12(d、J = 2.4 Hz、1H)、6.91(d、J = 9.0 Hz、1H)、6

40

50

. 72 (d、 $J = 8.6$ Hz、1 H)、6.68 (dd、 $J = 9.0$ 、 2.5 Hz、1 H)、4.22 (s、1 H)、3.48 (s、2 H)、3.37 3.12 (m、16 H)、3.08 (d、 $J = 6.1$ Hz、2 H)、2.51 (d、 $J = 1.6$ Hz、6 H)、2.22 (s、3 H)、1.71 1.57 (m、3 H)、1.37 (ddd、 $J = 24.7$ 、 14.6 、 6.8 Hz、8 H)、1.23 (s、1 H)であった。

【0086】

(実施例5：プローブ化合物A₂で腫瘍細胞および非腫瘍細胞を標識する試験)

マウスの肺部の腫瘍組織の切片およびマウスの肺部の非腫瘍組織の切片を、上記実施例4で合成された化合物A₂を含む10 μMのPBS溶液に浸す。30分後に取り出し、マウティング及びシーリングしてから、二光子を用いた共焦点レーザー法により蛍光写真を撮った。二光子を用いた共焦点レーザー法によるイメージングにより、マウスの肺部の腫瘍組織の切片では強い蛍光信号が得られたが、マウスの肺部の非腫瘍組織の切片では蛍光信号が得られないことが分かった。図4(a)はプローブA₂を添加した後のマウスの肺部の腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真であり、図4(b)はプローブA₂を添加した後のマウスの肺部の非腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真である。写真を撮った波長は500~550 nmであった。

10

【0087】

(実施例6：プローブ化合物A₂の水溶性測定試験)

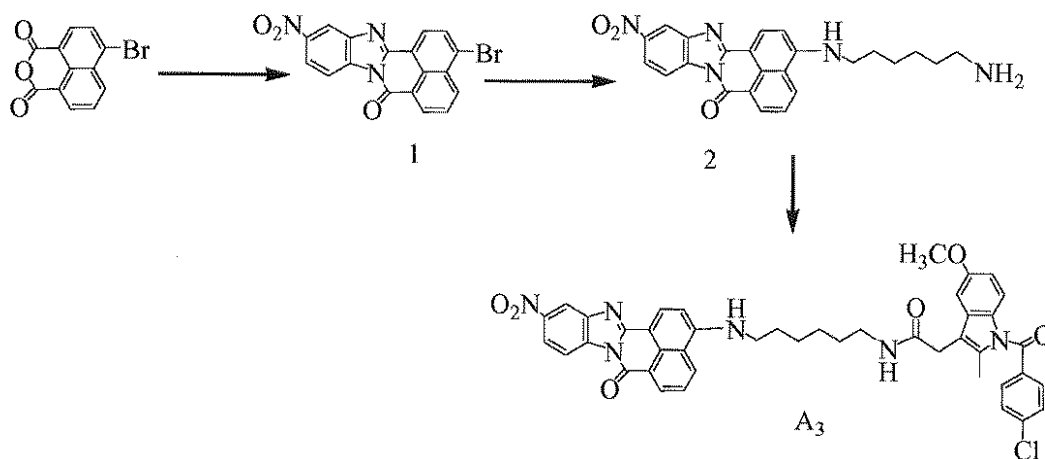
上記実施例4で合成された化合物A₂を水に入れて、異なる濃度でA₂を含む水溶液の、最大吸収波長での吸光度を測定した。測定結果により、化合物A₂の濃度が5 μMである場合、吸光度に変化が見られないことが分かった。即ち、化合物A₂の水に対する溶解度は5 μMであった。図5は、異なる濃度のプローブA₂の最大吸収波長での吸光度を示す。使用される測定機器は、それぞれAgilent 8453紫外分光光度計である。

20

【0088】

(実施例7：プローブ化合物A₃の製造)

【化17】



30

【0089】

(1) 中間体1の合成

20 mmolの4-ブロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、25 mmolの4-ニトロフェニレンジアミン(4-Nitro-o-phenylenediamine)とを、10 mlの酢酸溶液が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を105 °Cで3 hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物である中間製品1を得た。収率は87%であった。

40

【0090】

(2) 中間体2の合成

ステップ(1)で得られた、20 mmolの粗生成物1と、25 mmolのヘキサメチ

50

レンジアミンとを、20 ml の 2 - メトキシエタノールが入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を 125 °C で 4 h 継続した後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、橙赤色の固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって橙赤色の固体粉末の中間体 2 を得た。収率は 5.4 % であった。

【0091】

(3) プローブ A₃ の合成

20 mmol の橙赤色の固体粉末の中間体 2 と、25 mmol のインドメタシンと、25 mmol の 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド (EDC) と、少量の 4 - メチルピリジンとを、無水ジクロロメタン溶液に入れ、室温下で攪拌しながら 28 時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除き、カラムクロマトグラフィーによって橙赤色の生成品 A₃ を得た。収率は 8.4 % であった。ここで、¹H NMR (400 MHz, DMSO) 8.99 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、8.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H)、8.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H)、8.19 (d, J = 6.3 Hz, 1H)、8.03 (s, 1H)、7.85 (d, J = 4.6 Hz, 1H)、7.72 (d, J = 3.5 Hz, 2H)、7.64 (dt, J = 20.8, 6.4 Hz, 5H)、7.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H)、6.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H)、6.72 (d, J = 8.6 Hz, 1H)、6.68 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H)、4.22 (s, 1H)、3.48 (s, 2H)、3.37 - 3.12 (m, 16H)、3.08 (d, J = 6.1 Hz, 2H)、2.51 (d, J = 1.6 Hz, 6H)、2.22 (s, 3H)、1.71 - 1.57 (m, 3H)、1.37 (ddd, J = 24.7, 14.6, 6.8 Hz, 8H)、1.23 (s, 1H) であった。

【0092】

(実施例 8 : プローブ化合物 A₃ の溶媒効果の測定試験)

上記実施例 7 で合成された化合物 A₃ をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソラン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N - ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、異なる溶媒での紫外吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルを測定した。測定結果により、溶媒の極性の変化に伴って、紫外吸収スペクトルでの最大吸収波長も変化し、蛍光発光スペクトルでも最大吸収波長が変化することが分かった。図 6 (a) は異なる溶媒でのプローブ A₃ の紫外吸収スペクトルであり、図 6 (b) は異なる溶媒でのプローブ A₃ の蛍光発光スペクトルである。使用される測定機器は、それぞれ Agilent 8453 紫外分光光度計、および Agilent Cary Eclipse 蛍光分光光度計である。

【0093】

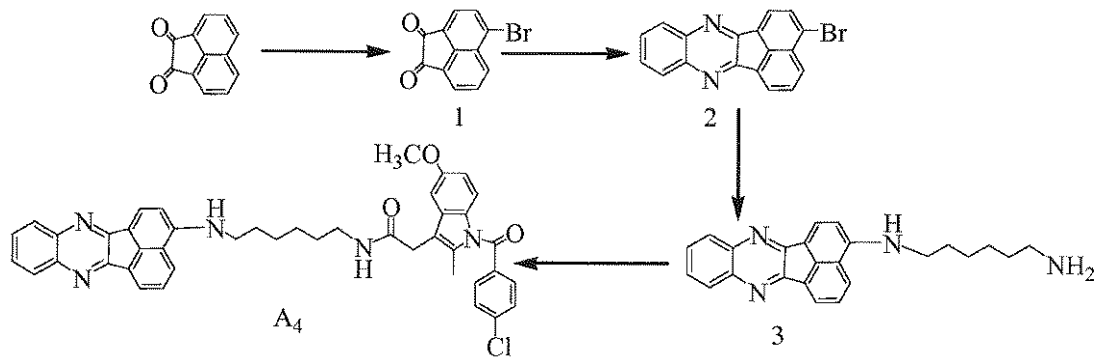
(実施例 9 : プローブ化合物 A₃ の二光子を吸収する有効断面の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含む NaOH 溶液 (pH 11) を参照とし、実施例 7 で合成された化合物 A₃ をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソラン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N - ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面を測定する。使用される溶媒の濃度は全て 1×10^{-4} M であり、式 2.2 により二光子を吸収する断面の値を得た。使用した異なる溶媒において、異なる波長で二光子を吸収する有効断面 () を測定した結果を図 7 に示す。二光子励起蛍光スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は 70 fs であり、重複周波数は 80 MHz であり、レーザーの平均出力電力は 1.5 W (780 nm) であり、調節可能な波長範囲は 700 ~ 980 nm であった。実験中にフェムト秒レーザー波長が所望の測定波長に調節された。

【0094】

(実施例 10 : プローブ化合物 A₄ の製造)

【化18】



10

【0095】

(1) 中間体1の合成

33 mmolのアセナフテンキノン、および180 mmolの液体臭素をシングルネック(Single neck)フラスコに入れて、攪拌しながら、65℃までゆっくりと温度を上げた後、一定温度で3h攪拌し続けた。反応を停止してから、少量のH₂SO₄を含む300 mlの蒸留水を加えると、黄色い固体が析出し、水溶液がインディアンイエロー色になった。更に、液体が無色になるまで加熱沸騰させて臭素と臭化水素を除去した。ろ過して、ろ過液が中性になるまで複数回溶解した。乾燥してから粗生成物である中間体1を得た。粗収率は90%であり、M.p.は、236~238℃であった。

20

【0096】

(2) 中間体2の合成

20 mmolの中間体1と、25 mmolのo-フェニレンジアミンとを10 mlの酢酸を含む溶液が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を105℃で6hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物である中間製品2を得た。収率は79%であった。

【0097】

(3) 中間体3の合成

ステップ(2)で得られた、20 mmolの中間製品2と、25 mmolのヘキサメチレンジアミンとを、20 mlの2-メトキシエタノールが入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を125℃で6hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって黄色い固体粉末の中間体3を得た。収率は66%であった。

30

【0098】

(4) プロープA₄の合成

20 mmolの黄色い固体粉末の中間体3と、30 mmolのインドメタシンと、25 mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)と、少量の4-メチルピリジンとを、無水ジクロロメタン溶液に入れ、室温下で攪拌しながら25時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによって黄色い生成品A₄を得た。収率は74%であった。ここで、¹H NMR (400 MHz, DMSO) 8.86 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 8.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 8.03 (s, 1H), 7.72 (d, J = 3.5 Hz, 2H), 7.64 (dt, J = 20.8, 6.4 Hz, 5H), 7.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.22 (s, 1H), 3.48 (s, 2H), 3.37-3.12 (m, 16H), 3.08 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.51 (d, J = 1.6 Hz, 6H), 2.22 (s, 3H), 1.71-1.57 (m, 3H), 1.3

40

50

7 (d d d、J = 24 . 7、14 . 6、6 . 8 H z、8 H)、1 . 2 3 (s、1 H) であ
った。

【0099】

(実施例11：プローブA₄の腫瘍組織および非腫瘍組織に対する標識試験)

マウスの肺部の腫瘍組織の切片およびマウスの肺部の非腫瘍組織の切片を、上記実施例
10で合成された化合物A₄を10 μM含むPBS溶液に浸した。30分後に取り出し、
マウンティング及びシーリングしてから、二光子を用いた共焦点レーザー法により蛍光写真
を撮った。二光子を用いた共焦点レーザー法によるイメージングにより、マウスの肺部の
腫瘍組織の切片では強い蛍光信号が得られたが、マウスの肺部の非腫瘍組織の切片では蛍
光信号が得られないことが分かった。図8(a1)および(a2)はプローブA₄を添加
10した後のマウスの肺部の腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真であり、図8(b1)
および(b2)は、プローブA₄を添加した後のマウスの肺部の非腫瘍組織の切片の焦
準を合わせて撮った写真である。ここで、図8(a1)および図8(b1)の撮像波長は
500~550nmであり、図8(a2)および図8(b2)の撮像波長は570~65
0nmである。

10

【0100】

(実施例12：プローブA₄の水溶性測定試験)

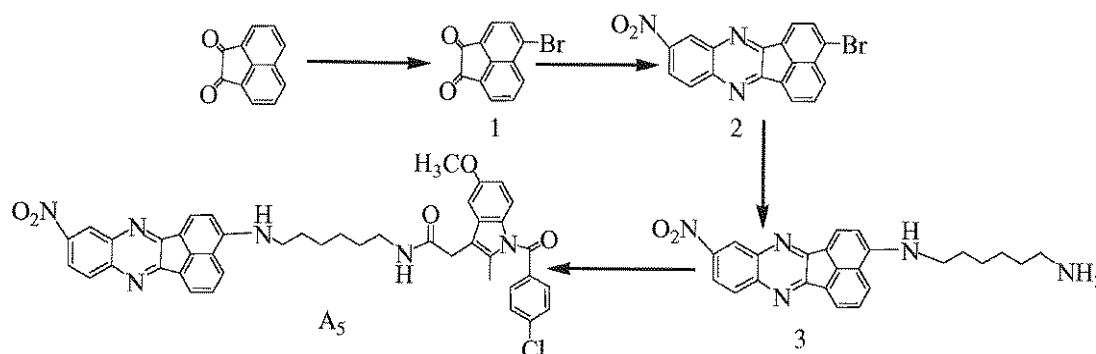
上記合成された化合物A₄を水に入れて、異なる濃度のA₄の最大吸収波長での吸光度
を測定した。測定結果により、化合物A₄の濃度が24 μMである場合、吸光度の変化が
ないことが分かった。即ち、化合物A₄の水に対する溶解度は24 μMであった。図9は
異なる濃度のプローブA₄の最大吸収波長での吸光度である。使用される測定機器はそれ
20ぞれAgilent 8453紫外分光光度計である。

20

【0101】

(実施例13：プローブ化合物A₅の合成)

【化19】



30

【0102】

(1) 中間体1の合成

33 mmolのアセナフテンキノン、および180 mmolの液体臭素をシングルネッ
クフラスコに入れて、攪拌しながら、65℃までゆっくりと温度を上げた後、一定温度で
3h攪拌し続けた。反応を停止した後、少量のH₂SO₄を含む300 mlの蒸留水を加
えると、黄色い固体が析出し、水溶液がインディアンイエロー色になった。更に、液体が
無色になるまで加熱沸騰させて臭素と臭化水素を除去した。ろ過して、ろ過液が中性にな
るまで複数回溶解させた。乾燥した後、粗生成物である中間体1を得た。粗収率は90%
40であり、M.p.は236~238℃であった。

40

【0103】

(2) 中間体2の合成

20 mmolの中間体1と、30 mmolのO-フェニレンジアミンとを10 mlの酢
酸を含む溶液が入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を100℃で
5hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、沈殿物を析出させ、吸引ろ
過して、赤い固体粉末の粗生成物である中間製品2を得た。収率は83%であった。

50

【0104】

(3) 中間体3の合成

ステップ(2)で得られた、20 mmolの中間製品2と、25 mmolのヘキサメチレンジアミンとを、20 mlの2-メトキシエタノールが入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を125℃で5.5 hし続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、橙赤色の沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、黄色い固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって橙赤色の固体粉末の中間体3を得た。収率は72%であった。

【0105】

(4) プローブA₅の合成

20 mmolの橙赤色の固体粉末の中間体3と、30 mmolのインドメタシンと、25 mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)と、少量の4-メチルピリジンとを、無水ジクロロメタン溶液に入れ、室温下で撹拌しながら25時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによって黄色い生成物A₄を得た。収率は74%であった。ここで、¹H NMR (400 MHz, DMSO) 8.86 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.72 (d, J = 3.5 Hz, 1.62 H), 7.64 (dt, J = 20.8, 6.4 Hz, 5H), 7.12 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 4.22 (s, 1H), 3.48 (s, 2H), 3.37 - 3.12 (m, 1.6 H), 3.08 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.51 (d, J = 1.6 Hz, 6H), 2.22 (s, 3H), 1.71 - 1.57 (m, 3H), 1.37 (ddd, J = 24.7, 4.6, 6.8 Hz, 8H), 1.23 (s, 1H)であった。

【0106】

(実施例14: プローブA₅の腫瘍細胞および非腫瘍細胞に対する標識試験I)

実施例13で合成された化合物A₅を使用して、濃度が4 μMのA₅-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、培地において、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した。そして、PBSで5 min × 3回振とう洗浄した後、更に細胞培地を加えて、二光子を用いた共焦点レーザー法によりイメージングを行った。代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察した。観察は三回繰り返された。イメージングにより、HeLa細胞内では強い蛍光信号が得られるが、HEK293細胞内では蛍光信号が得られないことが分かった。図10(a1)および図10(a2)はHeLa細胞であり、図10(b1)および図10(b2)はHEK293細胞である。ここで、図10(a1)および図10(b1)の撮像波長は500~550 nmであり、図10(a2)および図10(b2)の撮像波長は570~650 nmであった。

【0107】

(実施例15: プローブA₅の腫瘍組織および非腫瘍組織に対する標識試験II)

マウスの肺部の腫瘍組織の切片およびマウスの肺部の非腫瘍組織の切片を上記実施例13で合成された化合物A₅を含むPBS溶液(濃度は10 μMである)に浸した。30分後に取り出し、マウンティング及びシーリングしてから、二光子を用いた共焦点レーザー法により蛍光写真を撮った。二光子を用いた共焦点レーザーによるイメージングにより、マウスの肺部の腫瘍組織の切片では強い蛍光信号が得られるが、マウスの肺部の非腫瘍組織の切片では蛍光信号が得られないことが分かった。図11(a1)および図11(a2)はマウスの肺部の腫瘍組織であり、図11(b1)および図11(b2)はマウスの肺部の非腫瘍組織である。ここで、図11(a1)および図11(b1)の撮像波長は500~550 nmであり、図11(a2)および図11(b2)の撮像波長は570~650

10

20

30

40

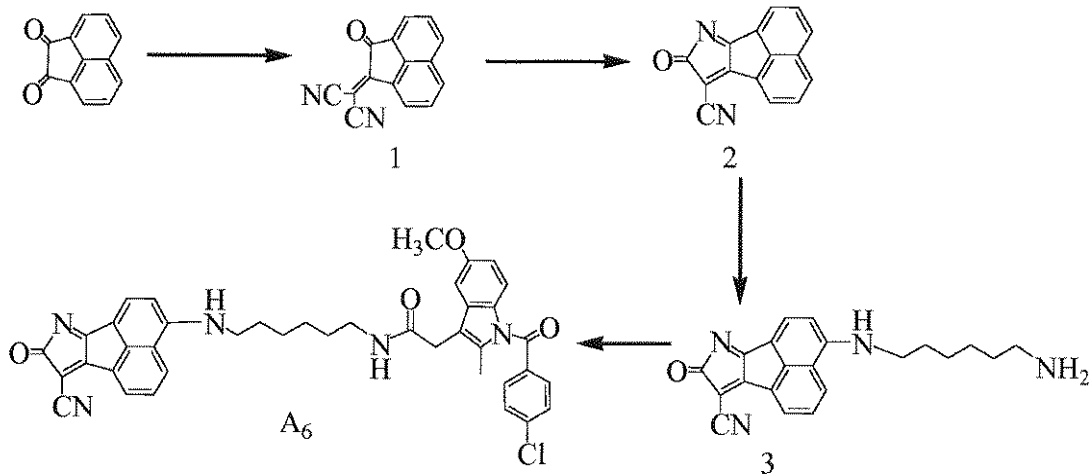
50

nmである。

【0108】

(実施例16：プローブ化合物A₆の合成)

【化20】



10

【0109】

(1) 中間体1の合成

20

0.5gのアセナフトキノンおよび0.2gのマロノニトリル(Malononitrile)を50mlのジクロロメタンに溶解させて、寸胴のシリカゲルカラム(直径は50mmであり、シリカゲルの充填高さは約100mmである)に直接加え、ジクロロメタンで素早く連続的にカラム洗浄して、Rf=0.8の橙色バンドを収集して、ジクロロメタンを蒸発させて、橙赤色の固体の中間製品1を得た。収率は97%より高かった。

【0110】

(2) 中間体2の合成

30

1.1gの中間製品1と、0.2gの炭酸カリウムとを20mlに入れて、加熱還流した。数分後に大量の褐色結晶が現れた後、冷却を過ぎ、水洗して炭酸カリウムおよび溶媒を除去した。更に、乾燥して純粋な中間製品2を得た。収率は93%より高かった。

【0111】

(3) 中間体3の合成

ステップ(2)で得られた、20mmolの中間体2と、25mmolのヘキサンジアミンとを20mlのアセトニトリル(acetonitrile)が入った丸底フラスコに入れて、常温で攪拌しながら1h反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により溶媒を除去し、シリカゲルカラム・クロマトグラフィーによって分離を行い、Rf=0.25の赤色バンドを収集して、溶媒を除去し、純粋な中間製品3を得た。収率は73%であった。

【0112】

(4) プローブA₆の合成

40

20mmolの赤色の固体粉末の中間体3と、30mmolのインドメタシンと、25mmolの1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)と、少量の4-メチルピリジンとを、無水ジクロロメタン溶液に入れ、室温下で攪拌しながら24時間反応させた後、反応を停止した。減圧蒸留により大部分の溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィーによって赤色の生成品A₆を得た。収率は69%であった。ここで、¹H NMR(400MHz、DMSO) 8.95(d、J=7.6Hz、1H)、8.58(d、J=7.2Hz、1H)、7.98(d、J=8.8Hz、1H)、7.88(t、J=7.8Hz、1H)、7.72(d、J=3.5Hz、2H)、7.64(dt、J=20.8、6.4Hz、5H)、7.12(d、J=2.4Hz、1H)、7.03(d、J=9.2Hz、1H)、6.91(d、J=9.0Hz、1H)

50

、6.72 (d、J = 8.6 Hz、1H)、6.68 (dd、J = 9.0、2.5 Hz、1H)、4.22 (s、1H)、3.48 (s、2H)、3.37 - 3.12 (m、1.6 H)、3.08 (d、J = 6.1 Hz、2H)、2.51 (d、J = 1.6 Hz、6 H)、2.22 (s、3H)、1.71 - 1.57 (m、3H)、1.37 (dddd、J = 24.7、14.6、6.8 Hz、8H)、1.23 (s、1H)であった。

【0113】

(実施例17：プローブ化合物A₆の溶媒化効果の測定試験)

上記の実施例16により合成された化合物A₆を、それぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソ、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、異なる溶媒での紫外吸収スペクトルおよび蛍光発光スペクトルを測定した。測定結果により、溶媒の極性の変化に伴って、紫外吸収スペクトルでの最大吸収波長も変化し、蛍光発光スペクトルでも最大吸収波長が変化することが分かった。図12(a)は異なる溶媒でのプローブA₆の紫外吸収スペクトルであり、図12(b)は異なる溶媒でのプローブA₆の蛍光発光スペクトルである。使用される測定機器はそれぞれAgilent 8453紫外分光光度計およびAgilent Cary Eclipse蛍光分光光度計であった。

10

【0114】

(実施例18：プローブ化合物A₆の二光子を吸収する有効断面の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とし、実施例16で合成された化合物A₆をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソ、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面を測定した。使用される溶媒の濃度は全て 1×10^{-4} Mであった。式2.2により二光子を吸収する断面の値が得られる。使用する異なる溶媒において、異なる波長で二光子を吸収する有効断面()を測定した結果を図13に示す。二光子励起蛍光スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)であり、調節可能な波長範囲は700 ~ 980 nmであった。実験中にフェムト秒レーザー波長が所望の測定波長に調節された。

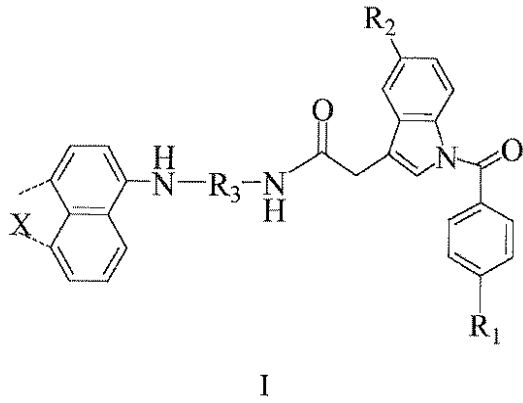
20

【0115】

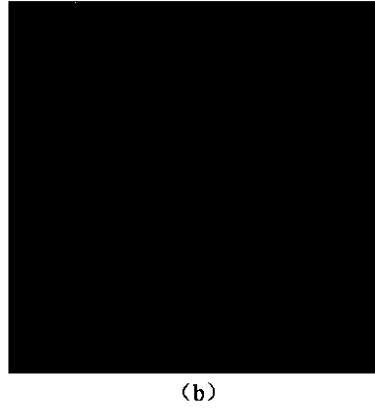
上記内容は、好ましい具体的な実施形態を用いて、本発明を詳細に説明したものであるが、本発明の具体的な実施はこれらの説明に限定されない。本発明が属する技術分野の当業者にとって、本発明の要旨を逸脱しない前提で、いくつかの簡単な推論または置換を行うことも、すべて本発明の保護範囲に含まれるとみなされるべきである。蛍光染料として用いることは本発明の新規な化合物の用途の一つであるが、本発明の化合物は、蛍光染料だけに用いられるものとみなされるべきではなく、本発明が属する技術分野の当業者にとって、本発明における化合物が蛍光染料として用いられる場合と同じメカニズムに基づき、いくつかの簡単な推論を経て得られる本発明の化合物の他の用途も、すべて本発明の保護範囲に含まれる。

30

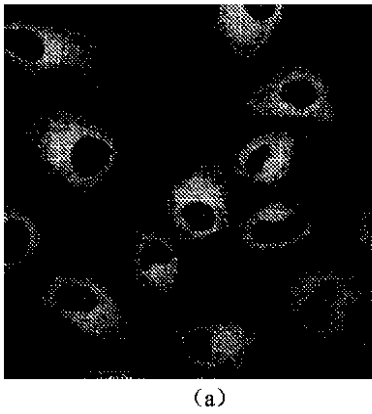
【 図 1 】



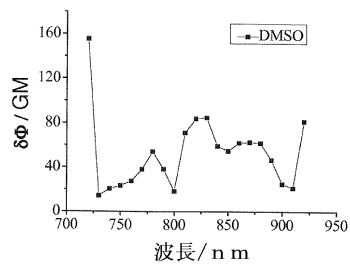
【 図 2 (b) 】



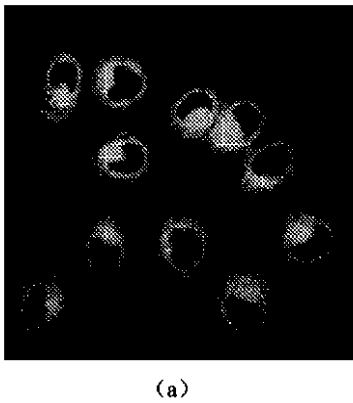
【 図 2 (a) 】



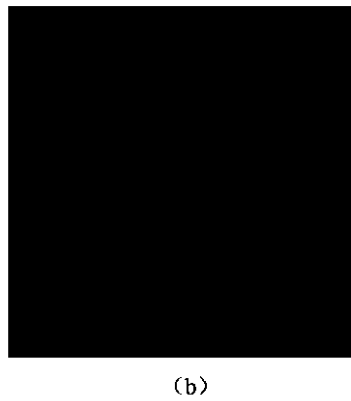
【 図 3 】



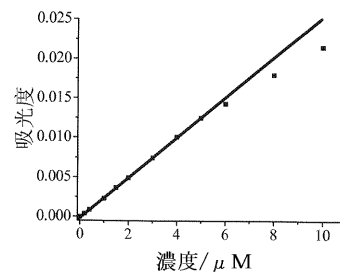
【 図 4 (a) 】



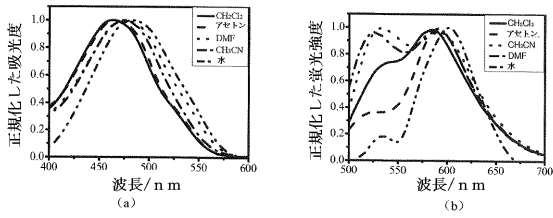
【 図 4 (b) 】



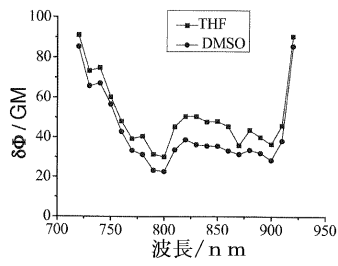
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

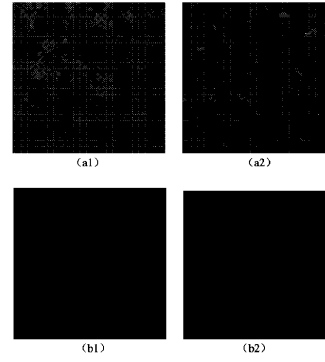
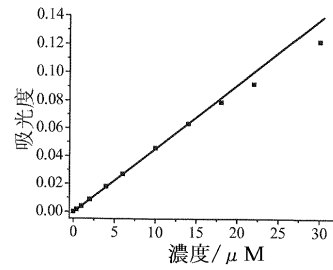


图 8

【 図 9 】



【 図 10 】

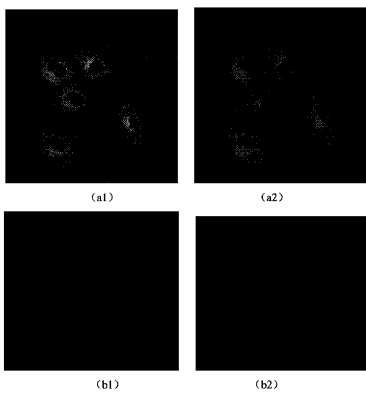


图 10

【 図 11 】

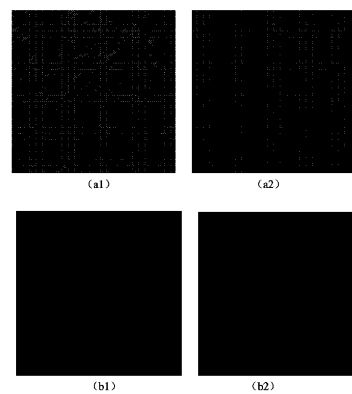
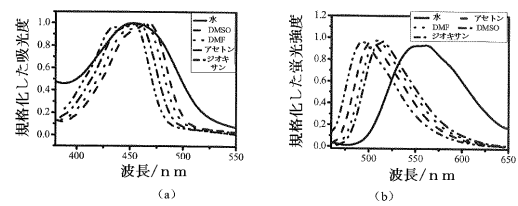
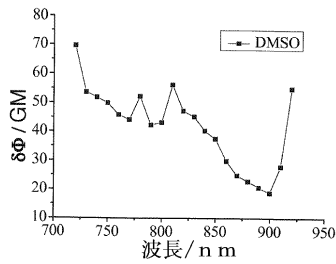


图 11

【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年5月15日(2014.5.15)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】請求項 8

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 請求項 8 】

前記ステップ 4) において、水と、ジメチルスルホキシド又はテトラヒドロフランとのモル比はそれぞれ 1 : 1 ~ 1 : 1 . 25 である、

ことを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 0 2 1

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 0 2 1 】

本発明により、従来の腫瘍標識用の蛍光プローブの機能上の欠点を改善し、二光子励起され、生がん細胞と発がん組織を有効且つ特異的に標識するのに適用できる二光子蛍光プローブが設計され、合成された。このような種類の二光子蛍光染料は、非腫瘍細胞と組織内では蛍光バックグラウンドが低い、腫瘍細胞と組織内では蛍光信号が高く、且つ腫瘍細胞と組織に対して特異的な高い標識性能を有する。この種の化合物は、ある程度の水溶性を有すると共に、細胞膜透過性が良好であり、更に有効な二光子を吸収する断面面積が大きい。本発明のこの種の化合物は、更に生体毒性、光毒性、光による漂白性が低く、そのスペクトル範囲と生体サンプルのスペクトル範囲とは、かなり大きく異なる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

【図1】本発明のナフタレンを基本骨格とする二光子蛍光プローブを示す一般式Iである。

【図2】二光子共焦点イメージングによる、実施例2に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₁の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の写真である。濃度が4 μMであるA₁-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。写真を撮像した波長は500~550 nmである。図2(a)はHeLa細胞であり、図2(b)はHEK293細胞である。

【図3】実施例3に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₁の異なる溶媒での二光子を吸収する断面積の測定結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセイン(fluorescein)を含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₁を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴ Mである。レーザーパルス幅(laser pulse width)は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)である。調節可能な波長範囲は700~980 nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

【図4】二光子共焦点イメージングによる、実施例5に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₂の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の写真である。濃度が4 μMであるA₂-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37度、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。写真を撮像した波長は500~550 nmである。図4(a)はHeLa細胞であり、図4(b)はHEK293細胞である。

【図5】実施例6に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₂を水溶液に溶かしたときの結果を示す。濃度が異なる化合物A₂の水溶液を用いて、最大吸収波長での吸光度を測定する。測定は三回繰り返される。

【図6】実施例8に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₃の溶媒効果の結果を示す。化合物A₃をジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランにそれぞれ添加し、異なる溶媒での紫外吸収スペクトル(a)と蛍光発光スペクトル(b)を測定する。

【図7】実施例9に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₃の異なる溶媒での二光子を吸収する断面積の結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₃を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴ Mである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)である。調節可能な波長範囲は700~980 nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

【図8】実施例11に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₄のマウスの肺部の腫瘍組織とマウスの肺部の非腫瘍組織での二光子共焦点イメージングによる写真を示す。濃度が10 μMであるA₄-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたマウスの肺部の腫瘍組織の切片およびマウスの肺部の非腫瘍組織の切片から代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。図8(a1)と(a2)はプローブA₄が加えられた後のマウスの肺部の腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真であり、図8(b1)と図8(b2)はプローブA₄が加えられた後のマウスの肺部の非腫瘍組織の切片の焦準を合わせて撮った写真である。ここで、図8(a1)と図8(b1)で適用し

た波長は500～550 nmであり、図8(a2)と図8(b2)で適用した波長は570～650 nmである。

【図9】実施例12に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₄を水溶液に溶かしたときの結果を示す。濃度が異なる化合物A₄の水溶液を使用して、最大吸収波長での吸光度を測定する。当該試験は三回繰り返される。

【図10】実施例14に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₅の腫瘍細胞および非腫瘍細胞の二光子共焦点結像による写真を示す。濃度が4 μMであるA₅-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたHeLa細胞とHEK293細胞を、37℃、CO₂が5%存在する条件下で60分培養した後、代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。図10(a1)および図10(a2)はHeLa細胞であり、図10(b1)および図10(b2)はHEK293細胞である。ここで、図10(a1)および図10(b1)で適用した波長は500～550 nmであり、図10(a2)および図10(b2)で適用した波長は570～650 nmである。

【図11】実施例15に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₅のマウスの肺部の腫瘍組織とマウスの肺部の非腫瘍組織の二光子共焦点イメージングによる写真を示す。濃度が10 μMであるA₅-DMSO溶液4 μLがそれぞれ添加されたマウスの肺部の腫瘍組織の切片とマウスの肺部の非腫瘍組織の切片から代表的な領域を選択して、油浸レンズ(100×)で観察する。観察は三回繰り返される。図11(a1)および図11(a2)は、マウスの肺部の腫瘍組織であり、図11(b1)および図11(b2)は、マウスの肺部の非腫瘍組織である。ここで、図11(a1)および図11(b1)で適用した波長は500～550 nmであり、図11(a2)および図11(b2)で適用した波長は570～650 nmである。

【図12】実施例17に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₆の溶媒効果の結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドである。異なる溶媒での紫外吸収スペクトルと蛍光発光スペクトルを測定する。

【図13】実施例18に係る本発明の蛍光プローブ化合物A₆の異なる溶媒での二光子を吸収する断面積の測定結果を示す。測定溶媒はジメチルスルホキシドとテトラヒドロフランである。測定方法は以下の通りである：フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用いる。フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とする。使用するA₁を含む溶液の濃度は全て1×10⁻⁴ Mである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W(780 nm)である。調節可能な波長範囲は700～980 nmである。実験中にフェムト秒レーザーの波長が所望の測定波長に調節される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

好ましい実施形態では、反応温度は80～140℃、反応時間は2～10時間、反応溶媒はエタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-ナフタル酸無水物と、式iの化合物とのモル比は1:1～1:4である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

より好ましい実施形態では、反応温度は90～120℃、反応時間は3～10時間、反応溶媒は酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4-プロモ-1,8-

- ナフタル酸無水物と、式 i の化合物とのモル比は 1 : 1 ~ 1 : 3 である。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

最適な実施形態では、反応温度は 95 ~ 110 、反応時間は 4 ~ 8 時間、反応溶媒は酢酸である。4 - プロモ - 1, 8 - ナフタル酸無水物と、式 i の化合物とのモル比は 1 : 1 ~ 1 : 2 である。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

好ましい実施形態では、反応温度は 80 ~ 140 、反応時間は 2 ~ 10 時間、反応溶媒はエタノール、酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4 - プロモアセナフテンキノンと、式 i の化合物とのモル比は 1 : 1 ~ 1 : 4 である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

より好ましい実施形態では、反応温度は 90 ~ 120 、反応時間は 3 ~ 10 時間、反応溶媒は酢酸エチル、酢酸、またはそれらの混合物から選択される。4 - プロモアセナフテンキノンと、式 i の化合物とのモル比は 1 : 1 ~ 1 : 3 である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

最適な実施形態では、反応温度は 95 ~ 110 、反応時間は 4 ~ 8 時間、反応溶媒は酢酸である。4 - プロモアセナフテンキノンと、式 i の化合物とのモル比は 1 : 1 - 1 : 2 である。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0078】

(実施例 2 : プローブ化合物 A₁ で腫瘍細胞および非腫瘍細胞を標識する試験)

実施例 1 で合成された化合物 A₁ を使用して、濃度が 4 μM の A₁ - DMSO 溶液 4 μL がそれぞれ添加された HeLa 細胞と HEK293 細胞を、培地において、37 度、CO₂ が 5 % 存在する条件下で 60 分培養する。そして、PBS で 5 min × 3 回振とう洗浄した後、更に細胞培地を加えて、二光子を用いた共焦点レーザー法によりイメージングを行う。代表的な領域を選択して、油浸レンズ (100 ×) で観察する。観察は三回繰り返される。イメージングにより、HeLa 細胞内で強い蛍光信号が得られるが、HEK

293細胞内では蛍光信号が得られないことが分かった。図2(a)はプローブA₁を加えた後のHeLa細胞の焦点を合わせて撮った写真であり、図2(b)はプローブA₁を加えた後のHKE293細胞の焦点を合わせて撮った写真である。写真を撮った波長は500～550nmであった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

(実施例3：プローブA₁の二光子を吸収する有効断面積の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含むNaOH溶液(pH11)を参照とし、実施例1で合成された化合物A₁をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル(acetonitrile)、ジオキサン(dioxane)、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N-ジメチルホルムアミド(N,N-dimethylformamide)、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面積の測定を行った。使用される溶液の濃度は全て 1×10^{-4} Mであり、以下の式で算出する。

【数1】

$$\delta_s = \delta_r \frac{C_r n_r F_s \Phi_r}{C_s n_s F_r \Phi_s}$$

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

式中、Cは溶液の濃度、nは溶媒の屈折率を示し、表を調べることによって得られる。Fは転換された蛍光強度を示し、実験によって得られる。 δ は二光子を吸収する断面積である。参照溶液の物理量は全て下付き文字rで示す。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

異なる溶媒において、異なる波長で測定した二光子を吸収する有効な断面積()の結果を図3に示す。二光子励起蛍光スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は70fsであり、重複周波数は80MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5W(780nm)であり、調節可能な波長範囲は700～980nmであった。実験中に、フェムト秒レーザー波長は、所望の測定波長に調節された。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

(実施例 9 : プローブ化合物 A₃ の二光子を吸収する有効断面積の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含む NaOH 溶液 (pH 11) を参照とし、実施例 7 で合成された化合物 A₃ をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソ、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N - ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面積を測定する。使用される溶媒の濃度は全て 1×10^{-4} M であり、式 2.2 により二光子を吸収する断面積の値を得た。使用した異なる溶媒において、異なる波長で二光子を吸収する有効断面積 () を測定した結果を図 7 に示す。二光子励起蛍光スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は 70 fs であり、重複周波数は 80 MHz であり、レーザーの平均出力電力は 1.5 W (780 nm) であり、調節可能な波長範囲は 700 ~ 980 nm であった。実験中にフェムト秒レーザー波長が所望の測定波長に調節された。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

(3) 中間体 3 の合成

ステップ (2) で得られた、20 mmol の中間製品 2 と、25 mmol のヘキサメチレンジアミンとを、20 ml の 2 - メトキシエタノールが入った丸底フラスコに入れて、窒素雰囲気にした。加熱還流を 125 °C で 5.5 h し続けた後、反応を停止した。混合物を氷水に注いだ後、橙赤色の沈殿物を析出させ、吸引ろ過して、橙赤色の固体粉末の粗生成物を得た。更にカラムクロマトグラフィーによって橙赤色の固体粉末の中間体 3 を得た。収率は 72 % であった。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

(2) 中間体 2 の合成

1.1 g の中間製品と、0.2 g の炭酸カリウムとを 20 ml の溶媒に入れて、加熱還流した。数分後に大量の褐色結晶が現れた後、冷却ろ過して、水洗して炭酸カリウムおよび溶媒を除去した。更に、乾燥して純粋な中間製品 2 を得た。収率は 93 % より高かった。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

(実施例 18 : プローブ化合物 A₆ の二光子を吸収する有効断面積の測定試験)

フェムト秒レーザーを用いた二光子誘導蛍光法を用い、フルオレセインを含む NaOH 溶液 (pH 11) を参照とし、実施例 16 で合成された化合物 A₆ をそれぞれメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、ジオキサソ、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン、N,N - ジメチルホルムアミド、水などの溶媒に加えて、二光子を吸収する断面積を測定した。使用される溶媒の濃度は全て 1×10^{-4} M であった。式 2.2 により二光子を吸収する断面積の値が得られる。使用する異なる溶媒において、異なる波長で二光子を吸収する有効断面積 () を測定した結果を図 13 に示す。二光子励起蛍光

スペクトルの励起源はモード同期チタンサファイアレーザーである。レーザーパルス幅は70 fsであり、重複周波数は80 MHzであり、レーザーの平均出力電力は1.5 W (780 nm)であり、調節可能な波長範囲は700 ~ 980 nmであった。実験中にフェムト秒レーザー波長が所望の測定波長に調節された。

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2012/071940
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07D 401/-; C07D 403/-; C07D 471/-; C09K 11/-; C12Q 1/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; CA ON CD; CAPLUS; RBGISTRY; detection; induction; *indo*; *fluorescent*; indicator*; probe; monitor; label; *naphth*; 1392279-9*; 1392280-0*		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101786985 A (SOOCHOW UNIVERSITY), 28 July 2010 (28.07.2010), claims 1-2, and embodiments 1-12	1-10
A	CN 1896074 A (QIQIHAR UNIVERSITY), 17 January 2007 (17.01.2007), claims 1-10, and embodiments 1-18	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 15 November 2012 (15.11.2012)		Date of mailing of the international search report 13 December 2012 (13.12.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451		Authorized officer HE, Xiaoping Telephone No.: (86-10) 62084365

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/071940

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101786985 A	28.07.2010	CN 101786985 B	03.10.2012
CN 1896074 A	17.01.2007	CN 100486976 C	13.05.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/071940

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 401/12 (2006.01) i

C07D 403/12 (2006.01) i

C07D 471/04 (2006.01) i

C09K 11/06 (2006.01) i

C12Q 1/02 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/071940
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07D401/-;C07D403/-;C07D471/-;C09K11/-;C12Q1/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; CA ON CD; CAPLUS; REGISTRY: 吡啶; 蔡; 探针; 检测; 感应; 监视; 标记; 荧光; *indo*; *fluorescent*; indicator*; probe; monitor; label; *naphth*; 1392279-9*; 1392280-0*;		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101786985A(苏州大学), 28.7 月 2010(28.07.2010), 权利要求 1-2, 实施例 1-12	1-10
A	CN1896074A(齐齐哈尔大学), 17.1 月 2007(17.01.2007), 权利要求 1-10, 实施例 1-18	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 15.11 月 2012 (15.11.2012)		国际检索报告邮寄日期 13.12 月 2012 (13.12.2012)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 何小平 电话号码: (86-10) 62084365

国际检索报告
关于同族专利的信息国际申请号
PCT/CN2012/071940

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101786985A	28.07.2010	CN101786985B	03.10.2012
CN1896074A	17.01.2007	CN100486976C	13.05.2009

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/071940

主题的分类

C07D401/12 (2006.01) i
C07D403/12 (2006.01) i
C07D471/04 (2006.01) i
C09K11/06 (2006.01) i
C12Q1/02 (2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00		
C 0 7 D 471/04	(2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 0 7 Z	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100123618

弁理士 雨宮 康仁

(74)代理人 100148633

弁理士 桜田 圭

(74)代理人 100147924

弁理士 美恵 英樹

(72)発明者 彭 孝軍

中華人民共和国 1 1 6 0 2 4 遼寧省大連市高新園區凌工路2号

(72)発明者 ジャン 華

中華人民共和国 1 1 6 0 2 4 遼寧省大連市高新園區凌工路2号

(72)発明者 樊 江莉

中華人民共和国 1 1 6 0 2 4 遼寧省大連市高新園區凌工路2号

(72)発明者 王 静云

中華人民共和国 1 1 6 0 2 4 遼寧省大連市高新園區凌工路2号

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA01 FA02 HA01 KA01 KA02 KA05 KA08
KA09

4C063 AA01 BB09 CC17 CC34 DD06 EE10

4C065 AA03 AA18 BB06 CC01 DD02 EE02 JJ04 KK01 LL01 PP03

PP09

4C085 HH11 KA27 KB56 LL18