

(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



(10) 国際公開番号

WO 2012/023487 A1

(43) 国際公開日
2012年2月23日(23.02.2012)

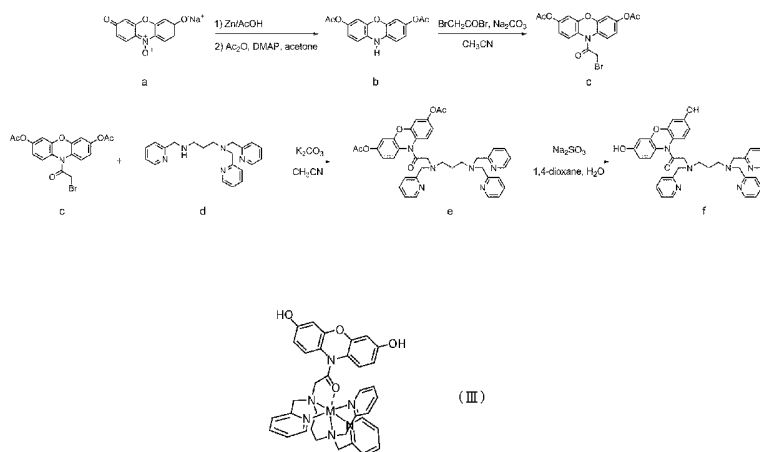
- (51) 国際特許分類:
C07D 413/14 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/068360
- (22) 国際出願日: 2011年8月11日(11.08.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-183083 2010年8月18日(18.08.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人同志社(THE DOSHISHA) [JP/JP]; 〒6028580 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町601番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 人見 穠 (HITOMI Yutaka) [JP/JP]; 〒6100394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内 Kyoto (JP). 小寺 政人(KODERA Masahito) [JP/JP]; 〒6100394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内 Kyoto (JP). 武安 俊幸(TAKEYASU Toshiyuki) [JP/JP]; 〒6100394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内 Kyoto (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, 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, 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, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[続葉有]

(54) Title: METAL COMPLEX, FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: 金属錯体、蛍光プローブ

[図1]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a fluorescent probe which has a high reaction rate and a metal complex which can be used as the main component of the fluorescent probe. This metal complex is composed of a metal complex having a ligand penta-coordinated with a center metal and a fluorescent compound bound to the metal complex through an amide bond. Specifically, a metal complex represented by general formula (III) is exemplified. This fluorescent probe utilizes the metal complex. (In the formula, M represents any one of Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co and Ru.)

(57) 要約: この発明は、反応速度が速い蛍光プローブ及びその主成分となる金属錯体を提供することを課題とする。この発明に係る金属錯体は、中心金属に配位子が五座配位してなる金属錯体に蛍光化合物をアミド結合したものである。具体的には、下記一般式(III)で表される金属錯体が例示できる。なお、この発明に係る蛍光プローブは前記金属錯体を使用するものである。(式中、MはFe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Ruの何れかを表す。)

WO 2012/023487 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称： 金属錯体、蛍光プローブ

技術分野

[0001] この発明は、金属錯体及びこれを使用して過酸化水素を検出する蛍光プローブなどに関するものである。

背景技術

[0002] 近年、生体内での過酸化水素などの活性酸素種の発生による細胞の酸化ストレスが、癌やパーキンソン病などの神経疾患と関連していることが明らかになってきている。また、活性酸素種が情報伝達物質として働く、具体的には、循環器系などで血圧を制御する、など多様な生理作用を発揮していることが知られている。そこで、これら疾患の病因、病態や作用機序を解明するため、生体内における過酸化水素の発生をダイナミックに解析することが求められている。

[0003] このような活性酸素種をダイナミックに解析するため、蛍光プローブを使用するバイオイメージング法が主に利用されている。そして、過酸化水素に対する蛍光プローブとしては、従来から「炭素-ホウ素の酸化的開裂によって蛍光強度が強くなる分子」などが使用されてきている（特許文献1～2、非特許文献1～10を参照。）。

[0004] しかし、前記分子を過酸化水素検出用の蛍光プローブに使用すると、反応開始から蛍光強度が最大強度に達するまでに約100分かかり、最大値の半分の強度に達するまでに約22分かかってしまう。そのため、前記分子を蛍光プローブとして使用しても、過酸化水素の発生や消滅をタイミングよく、ダイナミックに検出することはできないという問題点があった。

[0005] また、酸化還元酵素が基質を酸化する際に、過酸化水素が生じる反応、例えば、グルコースオキシダーゼが β -D-グルコースをグルコノラクトンに酸化する反応では、過酸化水素が生じることが既に知られている。そして、この知見とレゾルフィン系複素環式化合物からなる過酸化水素検出用蛍光プロ

ープとを組み合わせ、サンプル中の生体分子の濃度を測定する方法が開発されている。なお、この方法に使用する測定キット、例えば、Amplex Red（登録商標）Assay Kit（Invitrogen製）も既に販売されている（非特許文献11参照。）。

[0006] この測定方法では、サンプル中の生体分子から酸化還元酵素によって過酸化水素を発生させたのち、発生した過酸化水素と蛍光プローブとをペルオキシダーゼの存在下で反応させ、その蛍光量を測定することによって、間接的に測定している。また、この蛍光プローブは、過酸化水素だけでは蛍光せず、ペルオキシダーゼと過酸化水素によって生じる強酸化物によって蛍光する。

[0007] そのため、この測定方法には、酸化還元酵素の基質特異性、ペルオキシダーゼの基質特性に大きく依存し、過酸化水素濃度を直接測定できないため、サンプル中の阻害剤により影響を受け易いとの問題点があった。

[0008] そこで、発明者らは、これら従来技術の問題点を解決するため、非特許文献11に記載の複素環式化合物と、遷移金属からなる中心金属に含窒素配位子が三座配位してなる金属錯体とがアミド結合してなる化合物を既に合成している。しかし、この化合物は耐水性がなく、水中で利用できないため、過酸化水素の検出には利用できないとの問題点があった（非特許文献12及び非特許文献13参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第W007/050810号パンフレット

特許文献2：国際公開第W009/152102号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Dickinson, B. C.; Srikun, D.; Chang, C. J. "Mitochondrial-Targeted Fluorescent Probes for Reactive Oxygen Species", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, 14, 50-56.

非特許文献2：Bao, L.; Avshalumov, M. V.; Miller, E. W.; Chang, C. J.;

- Rice, M. E. J. "Mitochondria are the Source of Hydrogen Peroxide for Dynamic Brain-Cell Signaling", *J. Neurosci.* 2009, 29, 9002-9010.
- 非特許文献3: Albers, A. E.; Dickinson, B. C.; Miller, E. W.; Chang, C. J. "A Red-Emitting Naphthofluorescein-Based Fluorescent Probe for Selective Detection of Hydrogen Peroxide in Living Cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 5948-5950 (Special Issue in Honor of Benjamin F. Cravatt).
- 非特許文献4: Dickinson, B. C.; Chang, C. J. "A Targetable Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in the Mitochondria of Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 9638-9639.
- 非特許文献5: Miller, E. W.; He, Q.; Chang, C. J. "Preparation and Use of Leadfluor-1, a Synthetic Fluorophore for Live-Cell Lead Imaging", *Nature Protocols* 2008, 3, 777-783.
- 非特許文献6: Srikun, D.; Miller, E. W.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. "An ICT-Based Approach to Ratiometric Fluorescence Imaging of Hydrogen Peroxide Produced in Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4596-4597.
- 非特許文献7: Miller, E. W.; Tulyathan, O.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. "Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling", *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 263-267.
- 非特許文献8: Albers, A. E.; Okreglak, V. S.; Chang, C. J. "A FRET-Based Approach to Ratiometric Fluorescence Detection of Hydrogen Peroxide", *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 9640-9641.
- 非特許文献9: Miller, E. W.; Albers, A. E.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. "Boronate-Based Fluorescent Probes for Imaging Cellular Hydrogen Peroxide", *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 16652-16659.
- 非特許文献10: Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. "A Selective, Cell-Permeable Optical Probe for Hydrogen Peroxide i

n Living Cells”, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15392-15393.

非特許文献11：「Amplex Red酵素アッセイ」、[online]、Invitrogen、[平成23年8月1日検索]、インターネット<URL:http://productsja.invitrogen.com/site/jp/ja/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Amplex-Red-Enzyme-Assays.html>

非特許文献12：武安俊幸，船引卓三，小寺政人，人見穰，金属錯体を基盤とする過酸化水素蛍光プローブの開発，錯体化学討論会講演要旨集，Vol.59th，Page.361，(2009.09.04)

非特許文献13：武安俊幸，久保達也，人見穰，船引卓三，小寺政人，金属イオン反応点を有する過酸化水素プローブの開発，日本化学会講演予稿集，Vol.90th，No.2，Page.213，(2010.03.12).

発明の概要

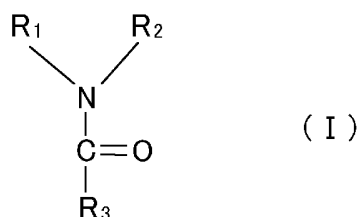
発明が解決しようとする課題

[0011] そこで、この発明は、従来からあるものよりも、反応速度が速く、阻害剤による影響を受け難い過酸化水素検出用蛍光プローブを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 発明者らは、鋭意検討の結果、特定の金属錯体と過酸化水素との反応速度が、従来からある過酸化水素蛍光プローブと過酸化水素との反応速度と比べて速いことを見出し、この発明を完成させた。すなわち、この発明は、下記一般式(1)で表される構造を有する金属錯体を過酸化水素検出用蛍光プローブに使用することを主な特徴とする。

[化1]

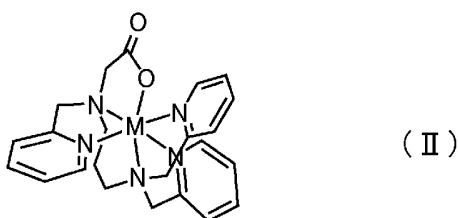


式中、原子団R₁R₂Nは、カルボニル基との共有結合が切断されると、蛍光性

化合物を形成する原子団を表す。また、 R_3CO は、原子団 R_1R_2N とカルボニル基との共有結合が切断されると、五座配位子が中心金属に配位結合してなる金属錯体を形成する原子団を表す。なお、カルボニル基中の酸素原子は、 R_3 中の中心金属と配位結合している。

[0013] なお、原子団 R_3CO を構成する五座配位子は含窒素配位子であってもよい。中でも、原子団 R_1R_2N とカルボニル基との共有結合が切断されると形成される金属錯体が、下記化学式(II)で表される金属錯体であってもよい。

[化2]

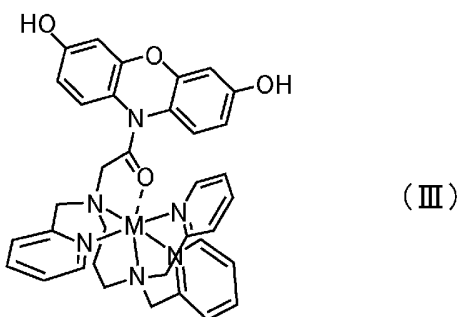


(式中、MはFe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Ruの何れかを表す。)

[0014] また、原子団 R_1R_2N から形成される蛍光性化合物は、レゾルフィン(7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one)、及びレゾルフィン誘導体(2,8-Difluoro-7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one、2,8-Dichloro-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one等)などの複素環式化合物であってもよい。

[0015] なお、この発明に係る金属錯体のより具体的な例としては、下記一般式(III)で表される構造を有する金属錯体が挙げられる。

[化3]



(式中、MはFe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Ruの何れかを表す。)

発明の効果

[0016] この発明の金属錯体を蛍光プローブに使用することによって、過酸化水素

の発生メカニズムや発生のタイミングをより正確に捕捉して、生体内における過酸化水素の役割をより詳細に解明できる。また、この蛍光プローブをバイオアッセイやバイオイメージングに使用すれば、検体の処理時間が短縮でき、検査効率を向上できる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、この発明の金属錯体の一例を構成する配位子の合成経路を示す図である。

[図2]図2は、この発明の金属錯体のin vitroにおける蛍光応答結果を示すグラフである。

[図3]図3は、この発明の金属錯体と過酸化水素との反応速度を調べた結果を示すグラフである。

[図4]図4は、酵素反応による過酸化水素の発生とカタラーゼの存在が蛍光強度に与える影響を示すグラフである。

[図5]図5は、この発明の蛍光プローブと酵素を利用して、蛍光プローブによるD-グルコースの検出感度を調べた結果を示すグラフである。

[図6]図6は、この発明の蛍光プローブの反応性に他のペルオキシダーゼ基質の存在が与える影響を、従来からある蛍光プローブと比較した結果を示すグラフである。

[図7]図7は、この発明の蛍光プローブの活性酸素種に対する反応性を、従来からある蛍光プローブと比較した結果を示すグラフである。

[図8]図8は、この発明の蛍光プローブの蛍光強度と分子内酸化とが関係していることを調べた結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

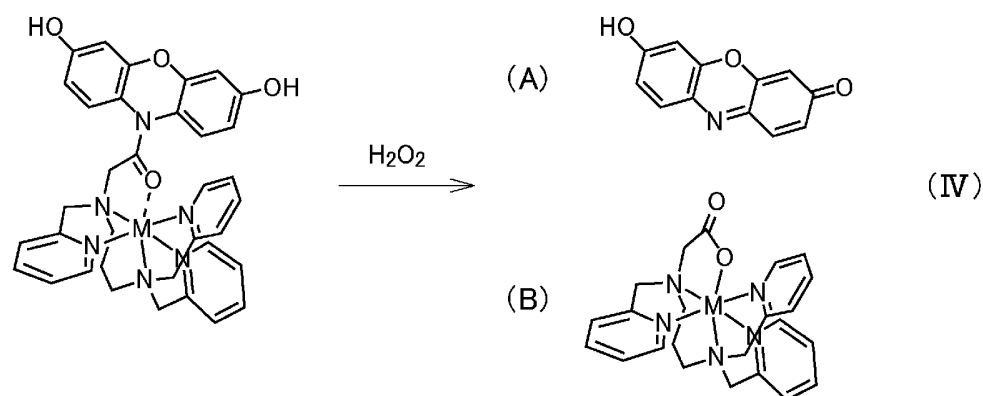
[0018] 以下、この発明の実施の形態について説明する。

[0019] この発明の金属錯体は、前記一般式(1)や前記一般式(1-1)等で表される金属錯体である。なお、前記一般式(1)等で表される金属錯体に互変異性体、立体異性体、光学異性体等の異性体が存在する場合は、それら異性体もこの発明の金属錯体に含まれる。また、前記一般式(1)等の金属錯

体が塩を形成する場合には、その塩もこの発明の金属錯体に含まれる。前記塩は、酸付加塩でも塩基付加塩でもよく、前記酸付加塩を形成する酸は公知の無機酸又は有機酸であればよく、前記塩基付加塩を形成する塩基は公知の無機塩基又は有機塩基であればよい。

[0020] この発明の金属錯体は、例えば、下記的一般式(IV)のように、ヒドロキシルラジカル、ペルオキシナイトライト、過酸化水素等の活性酸素種と反応すると迅速に、(A) 蛍光性化合物と(B) 金属錯体とに分解する。そして、この蛍光性化合物を可視紫外線強度計などによって検出すれば、活性酸素種の発生を検出できる。そのため、この発明の金属錯体は、活性酸素種、中でも過酸化水素を検出する蛍光プローブとして使用できる。また、この蛍光プローブは、公知の方法によって、モノクローナル又はポリクローナル抗体と結合させることができ、この蛍光プローブによって標識された抗体は、蛍光プローブとして使用できる。

[化4]



[0021] この発明の蛍光プローブ及びこの蛍光プローブによって標識した抗体は、その用途を特に限定することなく、あらゆる用途に使用できる。例えば、この蛍光プローブ又はこの蛍光プローブによって標識した抗体と公知の試薬等とを組み合わせ、バイオアッセイ用キット、バイオイメージング用キット、臨床検査用キットなどを構築し、バイオアッセイ、バイオイメージング、臨床検査などに使用することが可能である。これらのキットは蛍光プローブが蛍光するまでの反応時間が短く、阻害剤による影響を受け難い。そのため

、これらのキットを使用することによって、従来からあるキットと比べて、検査時間を短縮でき、精度の高い検査結果が得られる。

[0022] バイオアッセイ用キットとしては、例えば、グルコースオキシダーゼ標識抗体を使用するELISA法用キット、グルコースオキシダーゼ、ホスホリパーゼ、コレステロールオキシダーゼ、スフィンゴメリナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、アセチルコリンオキシダーゼ、モノアミン酸化酵素、ガラクトースオキシダーゼ、キサンチン酸化酵素等の過酸化水素を発生する酵素の定量用キット等が挙げられる。

[0023] バイオイメージング用キットとしては、例えば、上記の過酸化水素を発生する酵素の細胞内での蛍光イメージング剤としての利用等が挙げられる。

[0024] 臨床検査用キットとしては、例えば、過酸化水素の発生を検出する臨床検査用キット、例えば、ヒトや動物の体液中のカタラーゼ定量用キット、食品中のカタラーゼ定量用キット、コレステロールオキシダーゼと併用するコレステロールの定量定量用キット、アセチルコリンエステラーゼ、アセチルコリンオキシダーゼと併用するアセチルコリンの定量用キット等が挙げられる。

[0025] また、この発明の蛍光プローブは酸化還元酵素によって基質から生じる酸化力の弱い過酸化水素によっても蛍光を生じる。そのため、この発明の蛍光プローブと酸化還元酵素等とを組み合わせれば、グルコース、ガラクトース、コレステロール、尿酸、無機リン酸、無機ピロリン酸等の測定に使用することができる。中でも、阻害剤の影響を受け難いことから、薬物治療中の糖尿病患者の血中グルコース濃度定量用キットに適している。

[0026] なお、これらのキットに使用する試薬、キットによる試料の処理手順等については、この発明の蛍光プローブ等を使用する以外は特に限定することなく、公知の試薬、処理手順等を適宜組み合わせ使用すればよい。

[0027] 以下、この発明について実施例に基づいてより詳細に説明する。ただし、以下の実施例によって、この発明の特許請求の範囲は如何なる意味においても制限されない。

実施例 1

[0028] 1. 金属錯体の調製

この発明に係る金属錯体を調製した。具体的には、図1の反応経路に沿って配位子を合成したのち、鉄錯体を調製した。なお、理解しやすくするため、以下の説明では、同じ化合物については図1と同じ記号を使用した。

[0029] (1) 試薬

N,N,N'-Tris(2-pyridyl-methyl)propane-1,3-diamine (以下、化合物dと省略する。)は既報 (Hureau, C.; Groni, S.; Guillot, R.; Blondin, G.; Duboc, C.; Anxolabehere-Mallart, E. "Syntheses, X-ray Structures, Solid State High-Field Electron Paramagnetic Resonance, and Density-Functional Theory Investigations on Chloro and Aqua MnII Mononuclear3Complexes with Amino-Pyridine Pentadentate Ligands", Inorg. Chem. 2008, 47, 9238-9247.) に従って合成したものをを使用した。これ以外の試薬については市販のものを使用した。

[0030] (2) 3,7-diacetoxy-10H-phenoxazine (以下、化合物bと省略する。)の合成

窒素雰囲気下、Resazurinナトリウム塩 (化合物a, 1.50g, 5.97mmol) の氷酢酸溶液 (10ml) に亜鉛粉末 (1.29g, 29.6mmol) を加え、一時間攪拌した。反応液から溶媒を除去して、N,N-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.73g, 5.97mmol) を加え、アセトン (40ml) に溶解した。反応溶液に無水酢酸 (1.21g, 11.9mmol) を加え、室温で攪拌した。反応終了はTLCにて確認した ($R_f=0.28$, SiO_2 , 酢酸エチル : ヘキサン = 1:2)。

[0031] 反応終了後、反応溶液をCelite (Celite Corporation) を使用してろ過し、ろ液を濃縮・真空乾燥して褐色固体を得た。これをカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 酢酸エチル : ヘキサン = 1:5~) によって精製し、淡黄色の固体を得た (1.1g, 収率62%)。なお、この化合物は核磁気共鳴分光法 (^1H NMR及び ^{13}C NMR)、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) の測定結果から同定した。その結果を以下に示す。

[0032] ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm)=2.25(6H, $-\text{COCH}_3$, s), 5.26(1H, NH, s), 6.28(2H, $J=8.5\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H}-1}$, dd), 6.41(2H, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H}-3}$, d), 6.47(2H, $J=8.3, 2.6\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H}-2}$, dd); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz): δ (ppm)=22.3(2C, OCOCH_3), 110.4(2C, Ar), 113.2(2C, Ar), 116.5(2C, Ar), 129.4(2C, Ar), 143.1(2C, Ar), 144.9(2C, Ar), 169.9(OCOCH_3); FT-IR(KBr) 1755cm^{-1} (C=O), 3379cm^{-1} (NH).

[0033] (3) N-Bromoacetyl-3,7-diacetoxy-phenoxazine (以下、化合物 c と省略する。) の合成

窒素雰囲気下、化合物 b (1.0g, 3.34mmol) 及び炭酸ナトリウム (0.425g, 4.07mmol) の乾燥アセトニトリル溶液 (40ml) に bromoacetyl bromide ($318\mu\text{l}$, 3.68mmol) を加え、3時間攪拌した。溶液の色が淡黄色から深緑色へ変化した。反応終了後、Celiteにより反応溶液をろ過し、ろ液を濃縮・真空乾燥して深緑色固体を得た (1.3g, 収率94%)。この化合物は精製せずに次の反応に使用した。なお、この化合物は核磁気共鳴分光法 (^1H NMR 及び ^{13}C NMR)、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) の測定結果から同定した。その結果を以下に示す。

[0034] ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz): δ (ppm)=2.31(6H, $-\text{COCH}_3$), 4.12(s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Br}$), 6.93(d, $J=8.6, 2.3\text{Hz}$, 2H, $\text{Ar}_{\text{H}-1}$), 6.95(d, $J=2.3\text{Hz}$, 2H, $\text{Ar}_{\text{H}-3}$), 7.62(d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H, $\text{Ar}_{\text{H}-2}$); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz): δ (ppm)=21.2($-\text{CH}_2\text{Br}$), 26.7(2C, $-\text{COCH}_3$), 111.2(2C, Ar), 117.2(2C, Ar), 124.5(2C, Ar), 126.3(2C, Ar), 149.5(2C, Ar), 151.8(2C, Ar), 165.9($-\text{COCH}_2\text{Br}$), 169.2($-\text{COCH}_3$); FT-IR(KBr) 1676.0cm^{-1} (C=O), 1762.8cm^{-1} (C=O).

[0035] (4) N-acetyl-3,7-diacetoxyphenoxazine-N',N'',N'''-tris(2-pyridylmethyl)propane-1,3-diamine (以下、化合物 e と省略する。) の合成

窒素雰囲気下、化合物 c (67mg, 0.16mmol) 及び炭酸カリウム (19mg, 0.18mmol) の乾燥アセトニトリル溶液 (10ml) に化合物 d (50mg, 0.14mmol) を徐々に加え、室温で24時間攪拌した。Celiteにより反応溶液をろ過し、ろ液を濃縮・真空乾燥させ、赤褐色の油状物質を得た。油状物質をカラムクロマトグラフィー ($R_f=0.10$, SiO_2 , 酢酸エチル : ヘキサン = 1:1) を使用して精製し、赤褐色固体を得た (76mg, 収率71%)。なお、この化合物は核磁気共鳴分光法 (^1H NMR) の測定結果から同定した。その結果を以下に示す。

[0036] $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$: δ (ppm)=1.68(2H, m, $J=8.0, 7.5, 6.9\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.52(2H, t, $J=7.4, 6.9\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.69(2H, t, $J=7.1\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.61(2H, s, $-\text{CH}_2-\text{Py}'$), 3.75(4H, s, $-\text{CH}_2-\text{Py}$), 3.86(2H, s, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.81(2H, dd, $J=8.6, 2.3\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-3}}$), 6.88(2H, d, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-2}}$), 7.09(2H, t, $J=8.0\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-5}}$), 7.42(8H, m, $\text{Py}_{\text{H-3,5}}$, $\text{Py}'_{\text{H-3,5}}$), 7.54(1H, td, $J=7.4, 5.7\text{Hz}$, $\text{Py}'_{\text{H-4}}$), 7.56(2H, td, $J=9.1, 6.3\text{Hz}$, $\text{Py}_{\text{H-4}}$), 8.47(3H, t, $J=5.7, 5.1\text{Hz}$, $\text{Py}_{\text{H-6}}$, $\text{Py}'_{\text{H-6}}$).

[0037] (5) N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine-N',N'',N'''-tris(2-pyridylmethyl)propane-1,3-diamine (化合物 f) の合成

化合物 e (22mg, 0.032mmol) 及び亜硫酸ナトリウム (8.2mg, 0.065mmol) を 1,4-dioxane/水混合溶液 (2ml) に溶解し、24時間加熱還流した。反応溶液は赤色蛍光を発していた。溶媒を濃縮したのち、水を 1ml 加えて、再結晶し、赤色固体を得た (15mg, 収率 82%)。なお、この化合物は核磁気共鳴分光法 ($^1\text{H NMR}$ 及び $^{13}\text{C NMR}$) の測定結果から同定した。その結果を以下に示す。

[0038] $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 500\text{MHz})$: δ (ppm)=1.61(2H, m, $J=6.9\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.50(2H, t, $J=7.4, 6.3\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.59(2H, t, $J=6.9\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.64(2H, s, $-\text{CH}_2\text{Py}'$), 8.39(2H, d, $J=5.2\text{Hz}$, $\text{Py}_{\text{H-6}}$), 3.73(4H, s, $-\text{CH}_2\text{Py}$), 3.81(2H, s, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.51(2H, d, $J=2.9\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-3}}$), 6.53(2H, d, $J=2.3\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-2}}$), 7.24(8H, m, $\text{Py}_{\text{H-3,5}}$, $\text{Py}'_{\text{H-3,5}}$), 7.47(2H, d, $J=8.0\text{Hz}$, $\text{Ar}_{\text{H-5}}$), 7.67(1H, td, $J=7.4, 5.7\text{Hz}$, $\text{Py}'_{\text{H-4}}$), 7.72(2H, td, $J=9.1, 6.3\text{Hz}$, $\text{Py}_{\text{H-4}}$), 8.35(1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, $\text{Py}'_{\text{H-6}}$); $^{13}\text{C NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 125\text{MHz})$: δ (ppm)=22.6(6C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 53.5(2C, $\text{CH}_2\text{Py}'$), 59.8(4C, CH_2Py), 68.1(2C, CH_2CO), 104.5(2C, Ar), 111.2(2C, Ar), 122.9(3C, Py, Py'), 123.8(2C, Ar), 124.9(2C, Ar), 126.5(3C, Py, Py'), 138.7(2C, Ar), 149.5(2C, Ar), 153.2(3C, Py, Py'), 158.0(3C, Py, Py'), 160.1(3C, Py, Py'), 178.0(CO).

[0039] (6) 鉄錯体の合成

化合物 f (60mg, 0.1mmol) のメタノール/アセトニトリル溶液 (2ml, v/v = 1/1) に $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{OTf})_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$ (46mg, 0.1mmol) を加え、1時間攪拌した。溶液の色は褐色へと変化した。1時間後、ジエチルエーテル (2ml) を加え、析出した沈殿をろ過したのち、真空乾燥して茶褐色の固体を得た (38mg, 収率 35%)。なお、

この化合物は、高分解能質量分析計(HRMS)の測定結果から同定した。その結果、HRMS(ESI, pos)m/z=329.1(M²⁺)であった。

実施例 2

[0040] 2. 反応速度の測定 (1)

この発明に係る蛍光プローブ(以下、MBFh1と省略する。)の反応速度を調べた。具体的には以下のようにして調べた。MBFh1(5 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO)を4面セルに調製した。これに、終濃度が2.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ Mとなるように過酸化水素水を添加して、最大蛍光波長である590nm(励起波長:570nm)における蛍光強度の時間変化を25 $^{\circ}$ Cで測定した。その結果を図2に示す。

[0041] 図2から、過酸化水素の濃度が微量(5 μ M)であっても800秒で蛍光強度が最大値に達すること、同濃度で蛍光強度が最大値の半分には3分(180秒)で済むことが分かった。以上の結果から、MBFh1は、従来からある蛍光プローブに比べて、反応速度が約100倍速いことが確認できた。

実施例 3

[0042] 3. 反応速度の測定 (2)

MBFh1の反応速度をより精密に調べた。具体的には以下のようにして調べた。MBFh1(5 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO)を4面セルに調製した。これに、終濃度が1.25 μ M, 3.75 μ M, 5 μ M, 12.5 μ M, 25 μ Mとなるように過酸化水素水を添加して、590nm(励起波長:570nm)における蛍光強度の時間変化を25 $^{\circ}$ Cで測定した。その結果を図3に示す。

[0043] 図3から、添加した過酸化水素の濃度が高くなるにつれて、グラフの傾きが大きくなっていることが確認できた。また、グラフの傾きから、反応速度を計算したところ、 $38.1 \pm 0.2 \text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$ であることが分かった。そして、この反応速度は、天然のペルオキシダーゼよりは遅いものの、既存の蛍光プローブよりは速いことが分かった。

実施例 4

[0044] 4. 酵素によって発生した過酸化水素の検出

酵素によって発生した過酸化水素が検出できるかどうか調べた。具体的には以下のようにして調べた。MBFh1(5 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO, 125 μ M D-グルコース)を4面セルに調製した。これに、終濃度が0.008mg/mlとなるようにグルコースオキシダーゼを添加したのち、590 nm (励起波長:570nm)における蛍光強度の時間変化を25 $^{\circ}$ Cで測定した。また、MBFh1のMOPS buffer溶液にグルコースオキシダーゼを添加してから、100秒後に終濃度が0.08mg/mlとなるようにカタラーゼを添加し、蛍光強度の時間変化を同様にして測定した。これらの測定結果を図4に示す。

[0045] 図4から、グルコースオキシダーゼを添加すると、蛍光強度が直ぐに強くなることが確認できた。また、カタラーゼを添加して、過酸化水素を減少させると、蛍光強度の増強を完全に抑制できることが確認できた。これらの結果から、MBFh1は、酵素反応によって生じる酸化力の弱い過酸化水素を検出できることが分かった。

実施例 5

[0046] 5.D-グルコース検出感度の確認

MBFh1が、D-グルコースを検出できることは、実施例4で確認した。そこで、MBFh1のD-グルコースの検出感度について調べた。具体的には次のようにして調べた。MBFh1(50 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO)に、終濃度が2.5 μ M、5 μ M、19 μ M、25 μ Mとなるようにグルコースを添加し、添加した溶液を4面セルに収納した。これに、終濃度が0.008mg/mlとなるようにグルコースオキシダーゼを添加して50秒攪拌したのち、590nmにおける蛍光強度(励起波長:570nm)を25 $^{\circ}$ Cで測定した。その結果を図5に示す。

[0047] 図5から、蛍光強度とグルコース濃度との間に強い相関性があるとともに、MBFh1を蛍光プローブとして使用することによって、2.5 μ Mという低濃度でも、グルコースを検出できることが確認できた。このことから、MBFh1はサンプル中のグルコースを測定するための蛍光プローブとして使用できることが分かった。

実施例 6

[0048] 6. 他のペルオキシダーゼ基質が反応性に与える影響の比較

MBFh1の反応性と、従来技術である非特許文献11に記載のAmplex Red（登録商標）酵素アッセイキットの反応性とを、他のペルオキシダーゼ基質の存在下で比較した。具体的には次のようにして比較した。

[0049] MBFh1(5 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO)を調製し、5つの4面セルに収納した。各4面セルに過酸化水素(5 μ M、コントロール)、過酸化水素(5 μ M)とp-クレゾール(25 μ M)、過酸化水素(5 μ M)とフェノール(25 μ M)、過酸化水素(5 μ M)とチロシン(25 μ M)、過酸化水素(5 μ M)とチラミン(25 μ M)を添加し、590nm(励起波長:570nm)における蛍光強度の時間変化を25°Cで測定した。得られた蛍光強度の相対値を、コントロールを100%として計算した。また、蛍光色素Amplex Red(5 μ M)と西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下、HRPと省略する。22nM)をMBFh1の代わりに使用して、蛍光強度の相対値を同様にして調べた。その結果を図6に示す。

[0050] 図6から、MBFh1は、他のペルオキシダーゼ基質が存在していても、過酸化水素による蛍光強度がそれほど低下しないこと、が分かった。これに対して、比較に使用した蛍光色素とペルオキシダーゼは、他のペルオキシダーゼ基質が存在すると、過酸化水素による蛍光強度がかなり低下することが確認できた。このことから、MBFh1による反応系は、従来からある反応系に比べて、過酸化水素以外のペルオキシダーゼ基質による影響を受け難い、すなわち、これらによって阻害され難いことが分かった。

実施例 7

[0051] 7. 活性酸素種に対する反応性の比較

MBFh1と、非特許文献11に記載のAmplex Red（登録商標）酵素アッセイキットの活性酸素種に対する反応性を調べた。具体的には、次のようにして調べた。

[0052] MBFh1(5 μ M)又はAmplex Red(5 μ M)の20mM MOPS buffer溶液(pH=7.2, 2.5% DMSO)を調製し、それぞれ5つの4面セルに入れた。酸化剤である過酸化水素、t-ブチルヒドロペルオキシド、次亜塩素酸ナトリウム、酸化カリウムを

終濃度が50 μM となるように各セルに添加して、25°Cで500秒間攪拌したのち、590nm (励起波長:570nm) における蛍光強度を25°Cで測定した。なお、比較のため、酸化剤を添加しないセルの蛍光強度も同様に測定した。その結果を図7に示す。

[0053] 図7から、MBFh1は過酸化水素、 t -ブチルヒドロペルオキシドによって蛍光強度が極めて増強し、それらに比べれば低いものの、スーパーオキシドアニオンラジカルによっても蛍光強度が強くなることが確認できた。これに対して、Amplex Redは実験した活性酸素種に対して僅かに反応するだけであり、蛍光強度は殆ど増強しないことが確認できた。このことから、MBFh1は過酸化水素以外の活性酸素種の検出にも使用できることが分かった。

実施例 8

[0054] 8. 反応機構について

発明者らは、MBFh1が蛍光プローブとして優れている理由について、MBFh1が鉄錯体と蛍光色素Amplex Redモチーフとが共有結合している化合物だからである、と考えた。そこで、MBFh1を使用した場合と、Amplex Red及びMBFh1の鉄錯体部分と構造的に類似する化合物 $[\text{Fe}(5)](\text{OTf})_3$ を使用した場合の蛍光強度の時間変化の違いを比較して調べた。具体的には、次のようにして調べた。

[0055] まず、MBFh1(5 μM)の20mM MOPS buffer溶液 (pH=7.2, 2.5% DMSO)を4面セルに調製した。つぎに、4面セルに終濃度が500 μM となるように過酸化水素水を添加して、590nm (励起波長:570nm) における蛍光強度の時間変化を25°Cで測定した。また、MBFh1(5 μM)の代わりに、蛍光色素Amplex Red (5 μM) 及び $[\text{Fe}(5)](\text{OTf})_3$ (5 μM) を使用して、蛍光強度の時間変化を同様にして調べた。これらの結果を図8に示す。

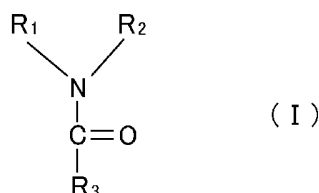
[0056] 図8から、MBFh1を使用した場合には過酸化水素を添加してから直ぐに蛍光強度が強くなることが確認できた。これに対して、蛍光色素Amplex Red及び $[\text{Fe}(5)](\text{OTf})_3$ を使用した場合には、蛍光強度は殆ど強くないことが確認できた。この結果から、MBFh1の分子内酸化が、MBFh1の蛍光強度の強さに関係

していることが分かった。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（I）で表される構造を有する金属錯体。

[化1]

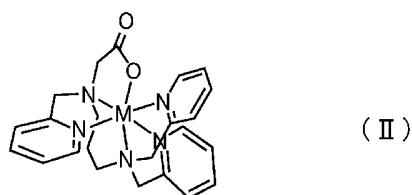


式中、原子団 R_1R_2N は、カルボニル基との共有結合が切断されると、蛍光性化合物を形成する原子団を表す。また、 R_3CO は、原子団 R_1R_2N とカルボニル基との共有結合が切断されると、五座配位子が遷移金属からなる中心金属に配位結合してなる金属錯体を形成する原子団を表す。なお、カルボニル基中の酸素原子は、 R_3 中の中心金属と配位結合している。

[請求項2] 原子団 R_3CO を構成する五座配位子が、含窒素配位子である請求項1に記載の金属錯体。

[請求項3] 原子団 R_1R_2N とカルボニル基との共有結合が切断されると形成される金属錯体が、下記化学式（II）で表される金属錯体である請求項2に記載の金属錯体。

[化2]



（式中、MはFe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Ruの何れかを表す。）

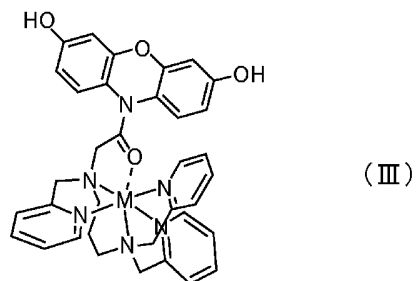
[請求項4] 原子団 R_1R_2N から形成される蛍光性化合物が、複素環式化合物である請求項1に記載の金属錯体。

[請求項5] 複素環式化合物が、レゾルフィン（7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one）である請求項4に記載の金属錯体。

[請求項6] 下記一般式（III）で表される構造を有する請求項1に記載の金

属錯体。

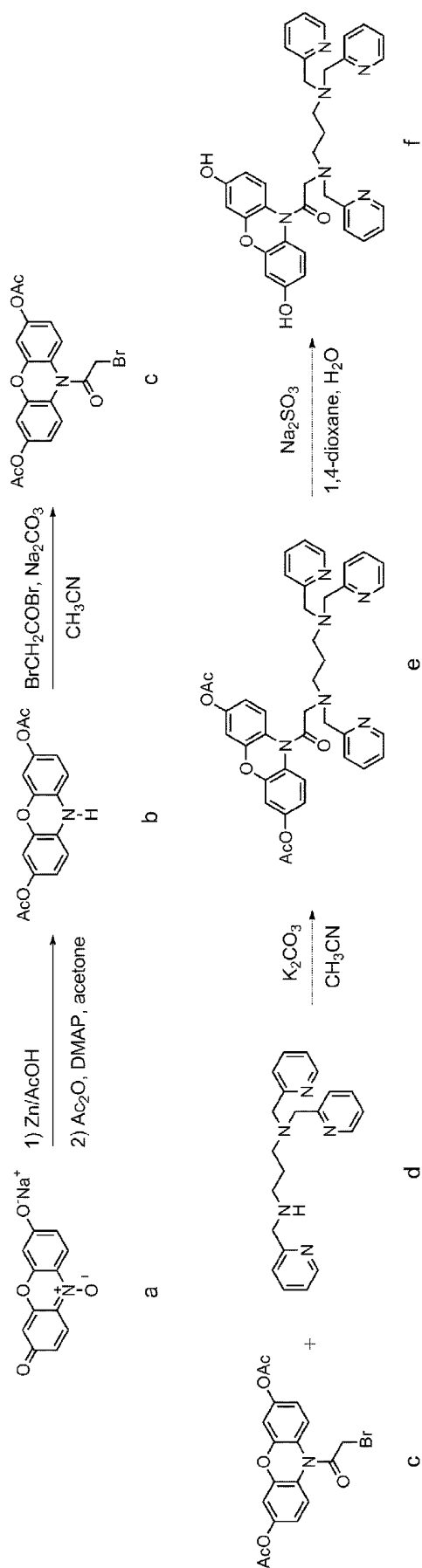
[化3]



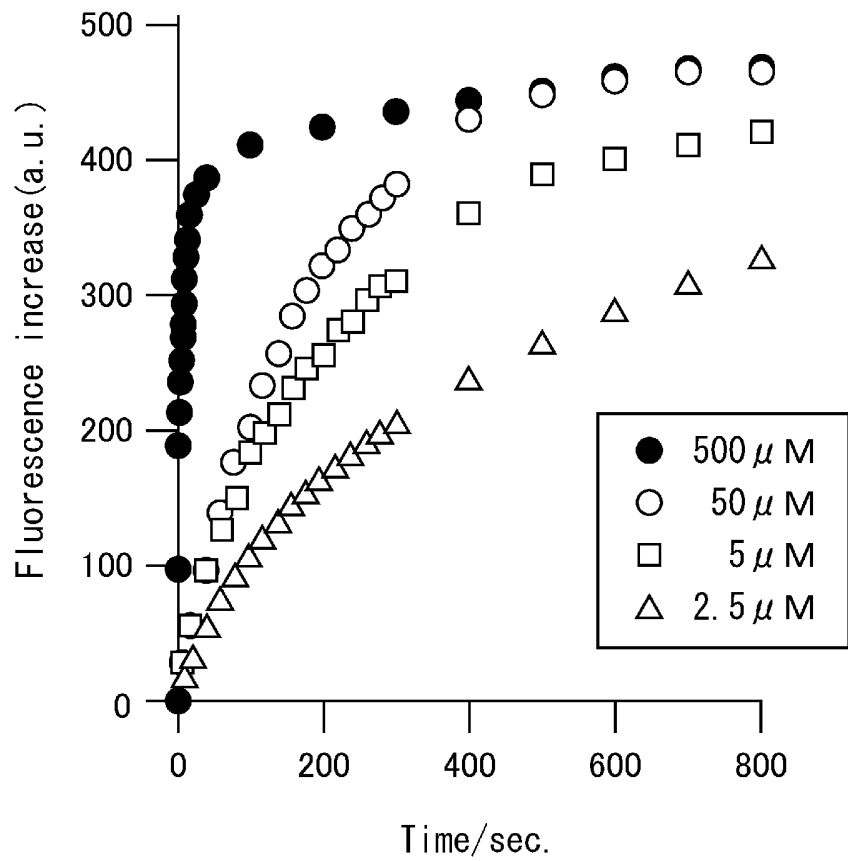
(式中、MはFe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Ruの何れかを表す。)

- [請求項7] 請求項 1 ～ 6 に記載の金属錯体を含む蛍光プローブ。
- [請求項8] 過酸化水素の検出に使用する請求項 7 に記載の蛍光プローブ
- [請求項9] 請求項 7 に記載の蛍光プローブを含むバイオアッセイ用キット。
- [請求項10] 請求項 7 に記載の蛍光プローブを含むバイオイメージング用キット
- 。
- [請求項11] 請求項 7 に記載の蛍光プローブを含む臨床分析用キット。
- [請求項12] 請求項 7 に記載の蛍光プローブで標識した標識抗体。
- [請求項13] 請求項 1 2 に記載の標識抗体を含むバイオアッセイ用キット。
- [請求項14] 請求項 1 2 に記載の標識抗体を含むバイオイメージング用キット。
- [請求項15] 請求項 1 2 に記載の標識抗体を含む臨床分析用キット。

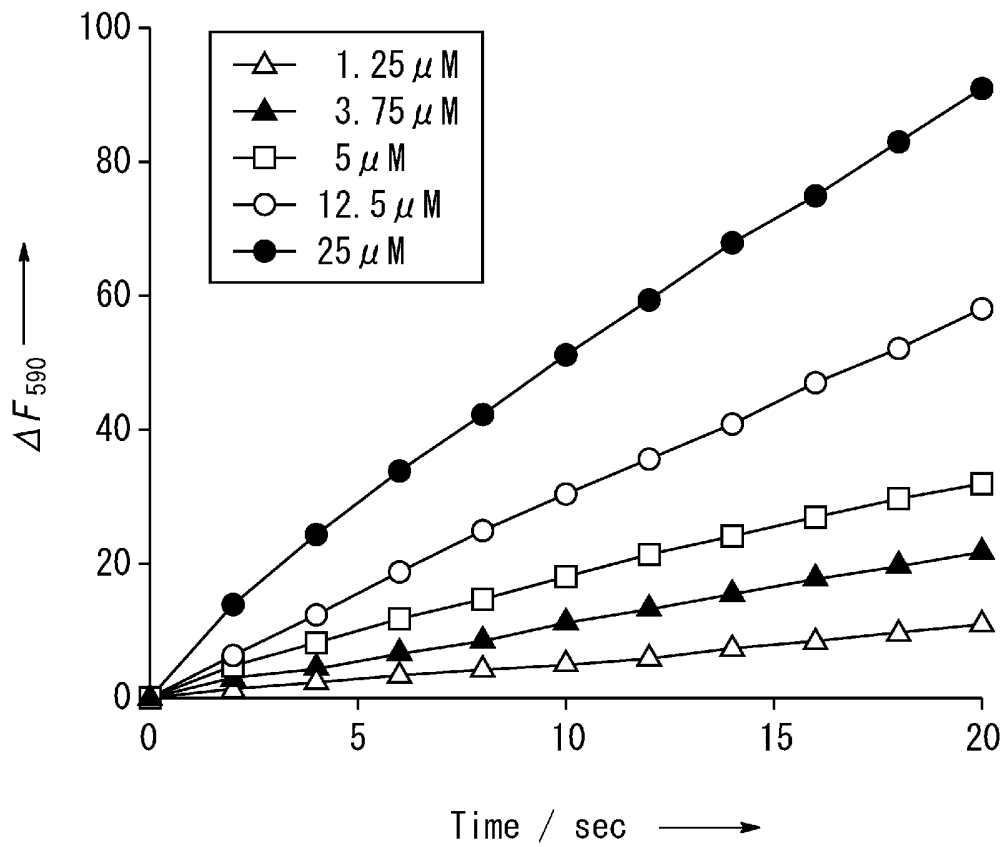
[1]



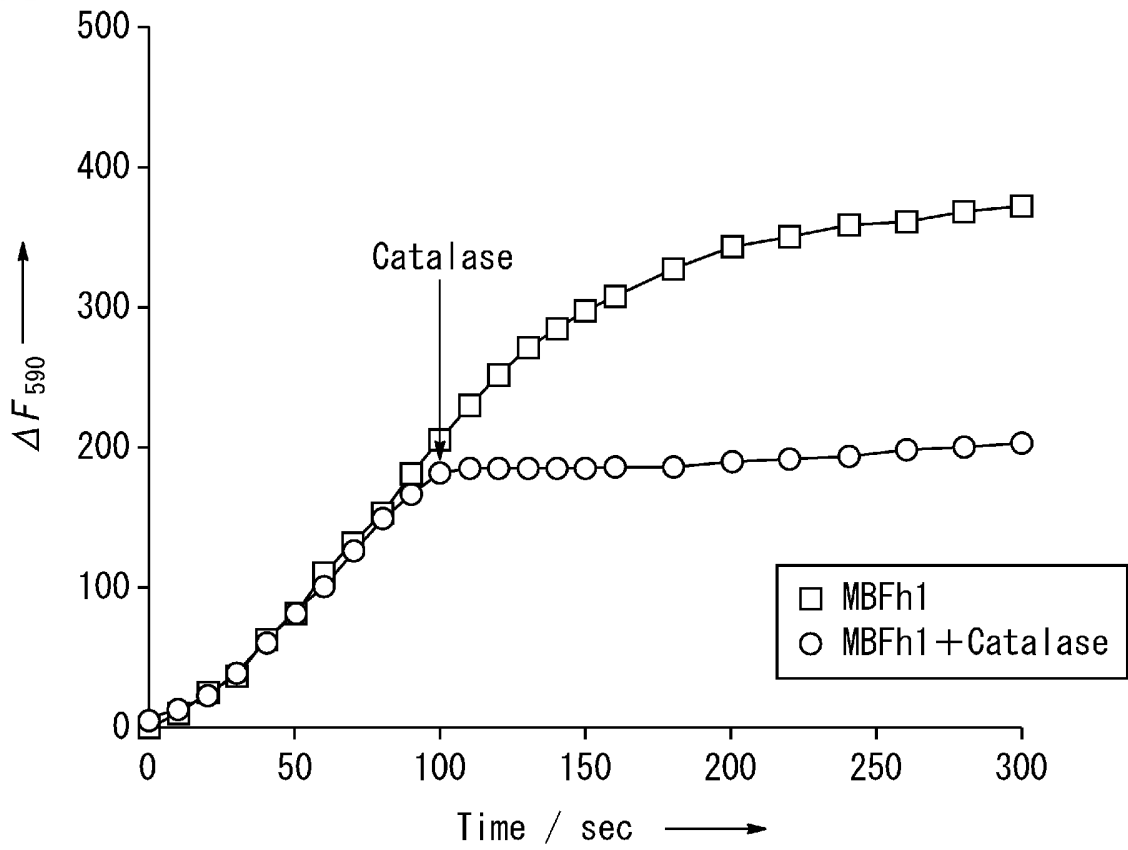
[圖2]



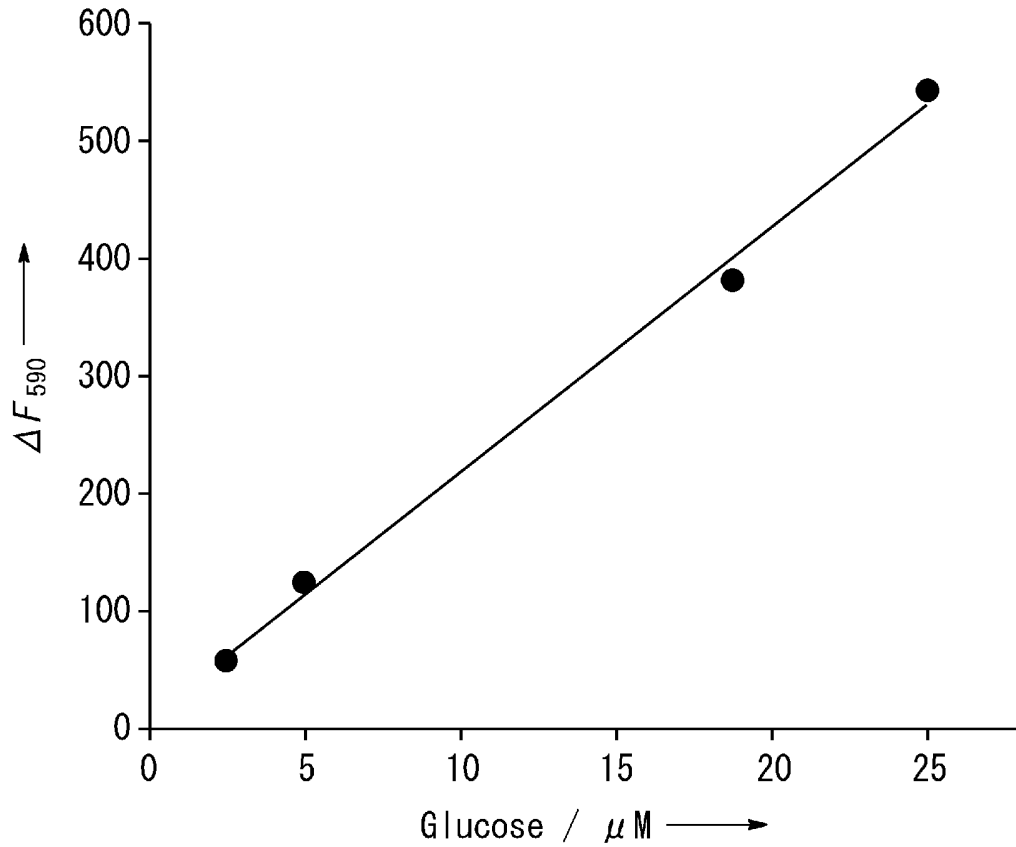
[圖3]



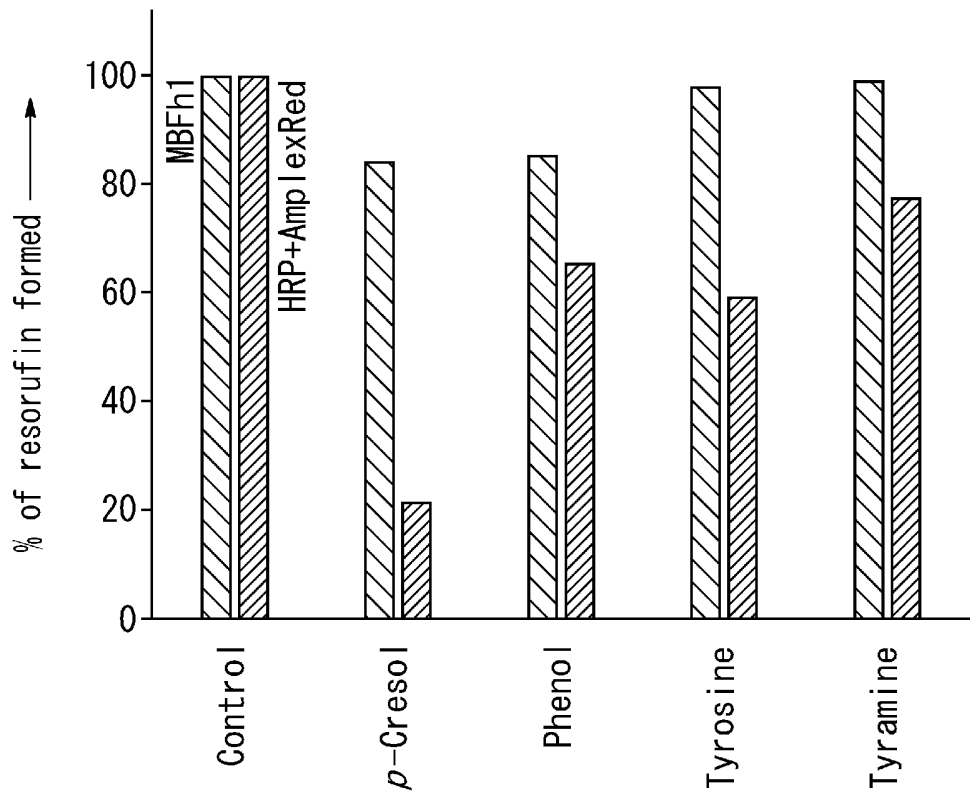
[図4]



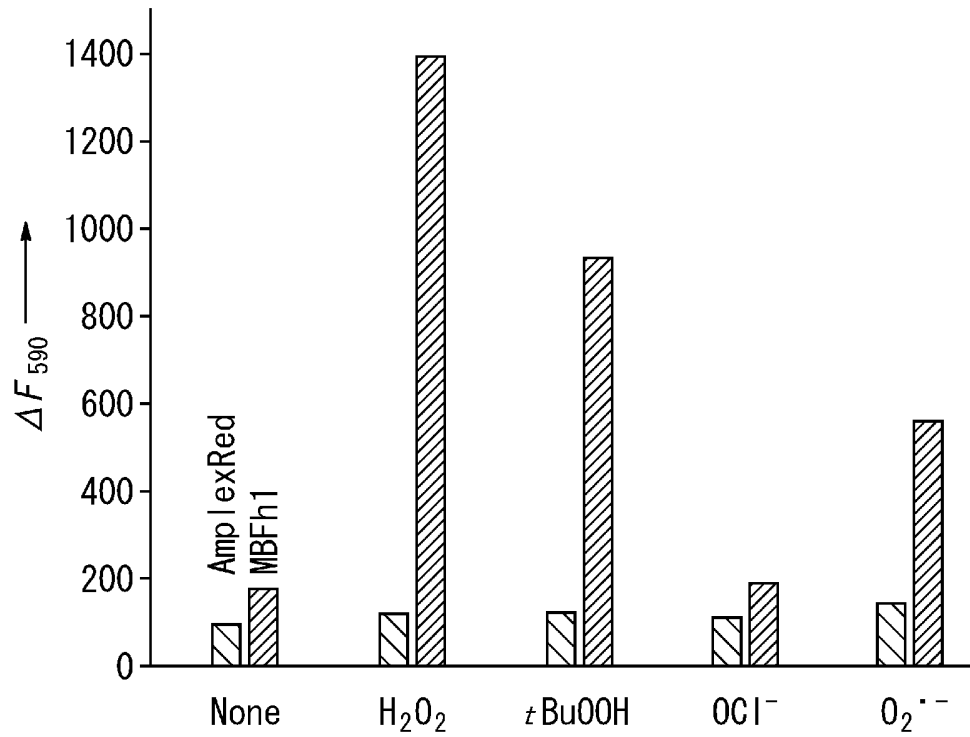
[図5]



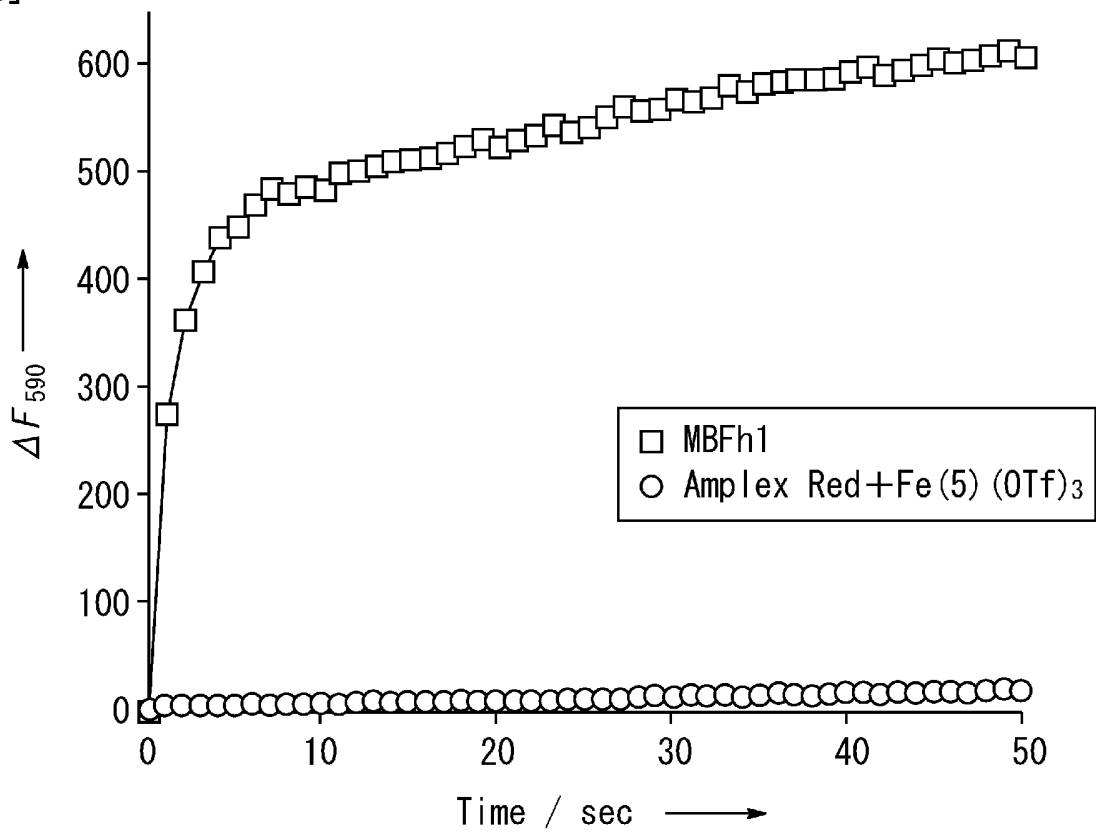
[圖6]



[圖7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D413/14(2006.01) i, C07F15/02(2006.01) i, G01N21/78(2006.01) i,
G01N33/533(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)
C07D413/14, C07F15/02, G01N21/78, G01N33/533

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)
CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/042504 A1 (MOLECULAR PROBES INC.), 12 May 2005 (12.05.2005), entire text & US 2005/096315 A1 & EP 1685117 A1 & US 7432372 B2	1-15
A	Toshiyuki TAKEYASU et al., "Kinzoku Ion Hannoten o Yusuru Kasanka Suiso Probe no Kaihatsu", 90th Annual Meeting of Chemical Society of Japan in Spring (2010) Koen Yokoshu II, 2010/March, page 213	1-15
A	Toshiyuki TAKEYASU et al., "Kinzoku Sakutai o Kiban to suru Kasanka Suiso Keiko Probe no Kaihatsu", 59th Symposium on Coordination Chemistry of Japan Koen Yoshishu, 2009, page 361	1-15

 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
06 October, 2011 (06.10.11)Date of mailing of the international search report
01 November, 2011 (01.11.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068360

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/096728 A1 (CENT NAT RECH SCI), 30 August 2007 (30.08.2007), entire text & EP 1826210 A1 & EP 1991546 A1 & JP 2009-528287 A & US 2009/246772 A1	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068360

<Subject of search>

The compound represented by general formula (I) recited in claim 1 includes a wide variety of substituents as R_1 , R_2 and R_3 . However, those compounds which are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 are only compounds represented by formula (III).

Such being the case, in the present international search, the search was carried out mainly on the compounds represented by formula (III). With regard to claim 6, the search was carried out completely.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07D413/14(2006.01)i, C07F15/02(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/533(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 (IPC))
 Int.Cl. C07D413/14, C07F15/02, G01N21/78, G01N33/533

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

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)

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	WO 2005/042504 A1 (MOLECULAR PROBES INC) 2005.05.12, 全文 & US 2005/096315 A1 & EP 1685117 A1 & US 7432372 B2	1-15
A	武安俊幸ら, 金属イオン反応点を有する過酸化水素プローブの開発, 「日本化学会第90春季年会(2010)講演予稿集II」, 2010/March, p.213	1-15

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
 06.10.2011

国際調査報告の発送日
 01.11.2011

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 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)	4 P	4432
磯部 洋一郎		
電話番号 03-3581-1101 内線	3492	

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	武安俊幸ら, 金属錯体を基盤とする過酸化水素蛍光プローブの開発, 「第59回錯体化学討論会講演要旨集」, 2009, p.361	1-15
A	WO 2007/096728 A1 (CENT NAT RECH SCI) 2007.08.30, 全文 & EP 1826210 A1 & EP 1991546 A1 & JP 2009-528287 A & US 2009/246772 A1	1-15

〈調査対象について〉

請求項1の一般式(I)で示される化合物は、 R_1 、 R_2 及び R_3 として極めて広範な置換基を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられている化合物は、式(III)で示される化合物についてのみである。

よって、本国際調査においては、式(III)で示される化合物を中心に調査を行った。また、請求項6については、完全な調査を行った。