

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6469096号
(P6469096)

(45) 発行日 平成31年2月20日(2019.2.20)

(24) 登録日 平成31年1月25日(2019.1.25)

(51) Int. Cl. F I
C 0 7 F 9/6584 (2006.01) C O 7 F 9/6584 C S P
A 6 1 K 31/675 (2006.01) A 6 1 K 31/675
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 4 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2016-517852 (P2016-517852)	(73) 特許権者	304023318 国立大学法人静岡大学 静岡県静岡市駿河区大谷836
(86) (22) 出願日	平成27年4月16日 (2015.4.16)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/061717	(74) 代理人	100124800 弁理士 諏澤 勇司
(87) 国際公開番号	W02015/170562	(74) 代理人	100140578 弁理士 沖田 英樹
(87) 国際公開日	平成27年11月12日 (2015.11.12)	(72) 発明者	平川 和貴 静岡県浜松市中区城北3丁目5-1 国立 大学法人静岡大学大学院工学研究科内
審査請求日	平成30年3月8日 (2018.3.8)	(72) 発明者	欧陽 東彦 静岡県浜松市中区城北3丁目5-1 国立 大学法人静岡大学大学院工学研究科内 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2014-97016 (P2014-97016)		
(32) 優先日	平成26年5月8日 (2014.5.8)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

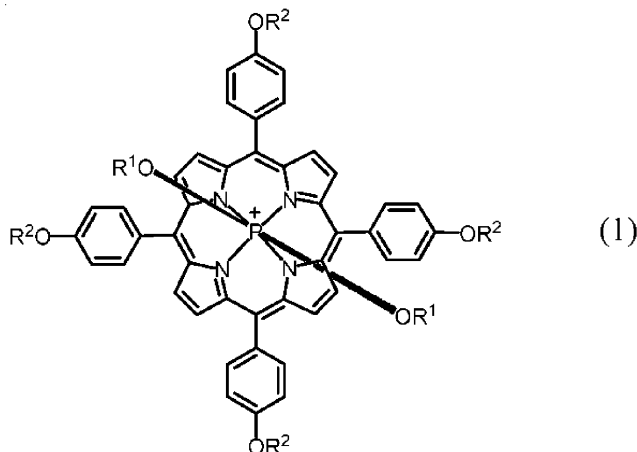
(54) 【発明の名称】 リンポルフィリン化合物及びその製造方法、並びに生体分子損傷剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)で表されるカチオンを有するリンポルフィリン化合物。

【化1】



【式(1)中、R¹はメチル基、又は、水酸基で置換されている炭素数1~4の飽和脂肪族炭化水素基を示し、R²は炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示し、

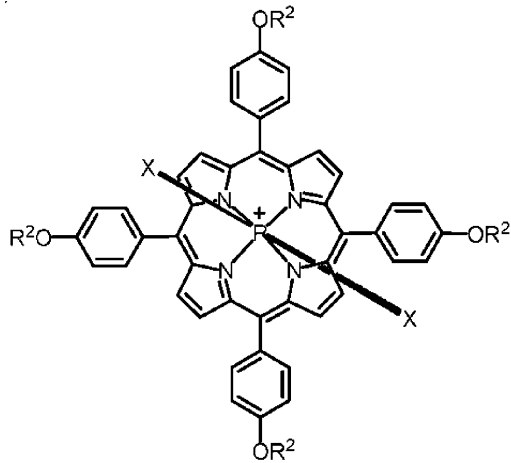
同一分子中の複数の R^1 及び R^2 は、それぞれ同一でも異なってもよい。]

【請求項 2】

請求項 1 に記載のリンポルフィリン化合物を製造する方法であって、

下記一般式 (2) で表されるカチオンを有する化合物と、 R^1OH で表される化合物 (R^1 はメチル基、又は、水酸基で置換されている炭素数 1 ~ 4 の飽和脂肪族炭化水素基を示す。) とを反応させて、前記一般式 (1) で表される カチオンを有するリンポルフィリン化合物 を生成させる工程を備える、方法。

【化 2】



10

20

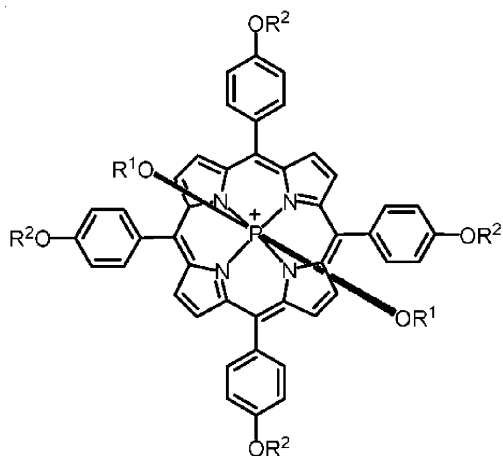
[式 (2) 中、X はプロモ基又はクロロ基を示し、 R^2 は炭素数 1 ~ 4 の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示し、同一分子中の複数の R^2 は、同一でも異なってもよい。

]

【請求項 3】

下記一般式 (1) 又は (2) で表されるカチオンを有するリンポルフィリン化合物を含む、生体分子損傷剤。

【化 3】

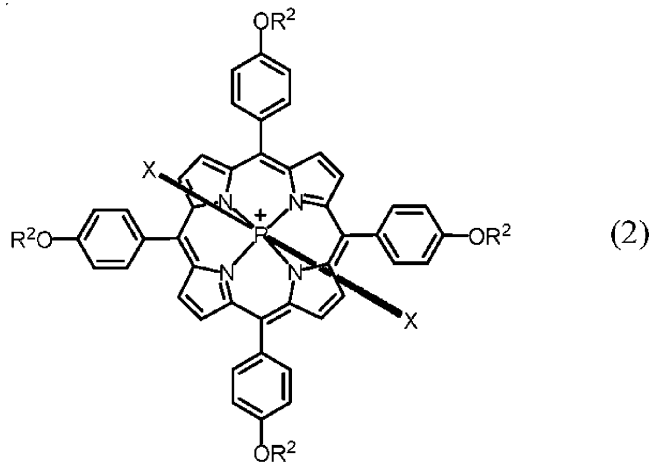


30

40

[式 (1) 中、 R^1 はメチル基、又は、水酸基で置換されている炭素数 1 ~ 4 の飽和脂肪族炭化水素基を示し、 R^2 は炭素数 1 ~ 4 の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示し、同一分子中の複数の R^1 及び R^2 は、それぞれ同一でも異なってもよい。]

【化4】



10

【式(2)中、Xはブロモ基又はクロロ基を示し、R²は炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示し、同一分子中の複数のR²は、同一でも異なってもよい。】

【請求項4】

550~670nmの光を照射することを含む方法によって生体分子を損傷させるために用いられる、請求項3に記載の生体分子損傷剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リンポルフィリン化合物及びその製造方法、並びに生体分子損傷剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、がんを低侵襲的に治療できる療法として光線力学的療法が注目されている。非特許文献1には、光線力学的療法において用いられることを想定した光増感剤として、ジメトキシリン(V)テトラフェニルポルフィリンクロライド(MeO₂P(V)TPP)及びテトラキス(1-メチル-4-ピリジニオ)ポルフィリン(H₂TMPyP)といったポルフィリン化合物が開示されている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23, 2704-2707

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

医療分野での適用を考慮すると、人体に影響の少ない550~670nm程度の長波長の光を用いることが望まれる。また、例えばがん細胞内の生体分子の場合、低酸素の環境下で生体分子を損傷させることが必要なこともある。しかし、従来、550~670nm程度の長波長の光を用いながら、低酸素下で生体分子を十分効率的に損傷させることは困難であった。

【0005】

そこで、本発明の主な目的は、長波長の光を用いた場合であっても、低酸素下で高い効率で生体分子を損傷させることができる生体分子損傷剤を提供することにある。

50

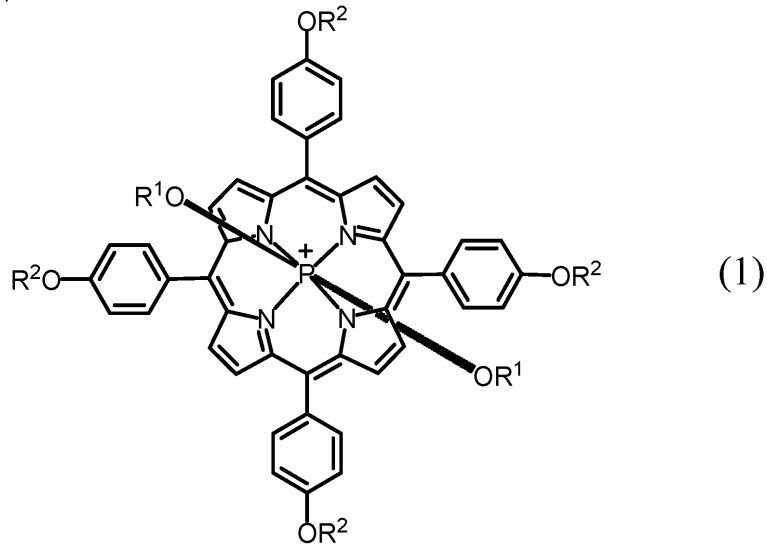
【課題を解決するための手段】

【0006】

一つの側面において、本発明は、下記一般式(1)で表されるカチオンを有するリンポルフィリン化合物に関する。

【0007】

【化1】



10

20

【0008】

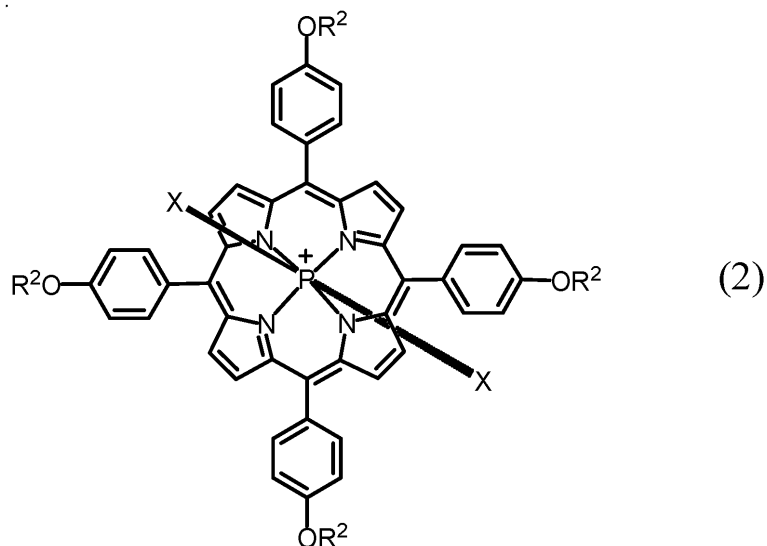
式(1)中、R¹は水酸基、アミノ基、アンモニウム基及びフルオロ基から選ばれる少なくとも1種の置換基で置換されていてもよい炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示し、R²は炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示す。同一分子中の複数のR¹及びR²は、それぞれ同一でも異なっていてもよい。

【0009】

別の側面において、本発明は、上記リンポルフィリン化合物を製造する方法に関する。一形態に係る方法は、下記一般式(2)で表されるカチオンを有する化合物と、R¹OHで表される化合物(R¹は水酸基、アミノ基、アンモニウム基及びフルオロ基から選ばれる少なくとも1種の置換基で置換されていてもよい炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示す。)とを反応させて、式(1)で表されるリンポルフィリン化合物を生成させる工程を備える。

【0010】

【化2】



30

40

50

【0011】

式(2)中、Xはプロモ基又はクロロ基を示し、 R^2 は炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示す。同一分子中の複数の R^2 は、同一でも異なってもよい。

【0012】

別の側面において、本発明は、上記一般式(1)又は(2)で表されるカチオンを有するリンポルフィリン化合物を含む、生体分子損傷剤に関する。この生体分子損傷剤によれば、長波長の光を用いた場合であっても、生体分子からの電子移動機構によって、生体分子を損傷させるための光増感剤として機能することができる。したがって、主として一重項酸素(活性酸素)の生成に基づく反応によって生体分子を損傷させる光増感剤と比較して、低酸素下においてより高い効率で生体分子を損傷させることができる。

10

【0013】

上記生体分子損傷剤は、550~670nmの光によって生体分子を損傷させるために用いることができる。したがって、本発明の生体分子損傷剤は、550~670nmの光を照射することを含む方法によって生体分子を損傷させるために用いることができる。生体分子の損傷のためにこのような長波長の光を用いることは、人体への影響を抑えるとともに、生体内組織の深部に到達する点で有利である。

【発明の効果】

【0014】

本発明の生体分子損傷剤によれば、長波長の光を用いた場合であっても、低酸素下で高い効率で生体分子を損傷させることができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】リンポルフィリン化合物の吸収スペクトルである。

【図2】リンポルフィリン化合物に対する照射時間とヒト血清アルブミン(HSA)の損傷量との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

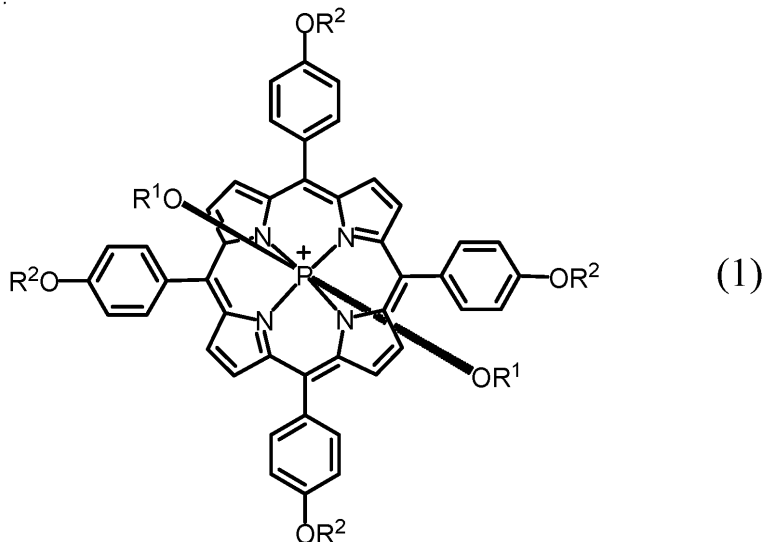
【0017】

30

いくつかの実施形態に係る生体分子損傷剤は、下記一般式(1)で表されるカチオンと、任意のアニオンとから構成されるリンポルフィリン化合物を含む。

【0018】

【化3】



40

【0019】

50

式(1)中、 R^1 は水酸基、アミノ基、アンモニウム基及びフルオロ基から選ばれる少なくとも1種の置換基で置換されていてもよい炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示す。同一分子中の複数の R^1 及び R^2 は、それぞれ同一でも異なってもよい。リンポルフィリン化合物がリン原子に結合するアルコキシ基(-OR¹)等を有していることにより、光増感剤としての高い感度を維持しながら、水に対する溶解性を高めることができる。生体内で生体分子を損傷させるためには、光増感剤が高い水溶性を有していることが望ましい。

【0020】

R^1 は、炭素数1~4のアルキル基であってもよく、直鎖、分岐又は環状のアルキル基であってもよい。これらは上記置換基によって置換されていてもよい。 R^1 は、例えば、メチル基、エチル基、2-ヒドロキシエチル基(-CH₂CH₂OH)、*n*-プロピル基、イソプロピル基、3-ヒドロキシプロピル基(-CH₂CH₂CH₂OH)、*n*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基及びこれらの基の1個以上の水素原子をフッ素原子に置換して形成される基であってもよい。フッ素原子を有する R^1 の例としては、ジフルオロエチル基(-CH₂CHF₂)、トリフルオロエチル基(-CH₂CF₃)、トリフルオロプロピル基(-CH₂CH₂CF₃等の異性体を含む)、ヘキサフルオロプロピル基(-CH₂(CF₃)₂等の異性体を含む)、トリフルオロブチル基(-CH₂CH₂CH₂CF₃等の異性体を含む)、ヘキサフルオロブチル基(-CH₂CF₂CHF₂CF₃等の異性体を含む)、ヘプタフルオロブチル基(-CH₂CF₂CF₂CF₃等の異性体を含む)、及びノナフルオロブチル基(-C(CF₃)₃等の異性体を含む)が挙げられる。リンポルフィリン化合物の水溶性の観点からは、 R^1 は、メチル基、炭素数1~4のヒドロキシアルキル基(2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等)、アミノメチル基、2-アミノエチル基、3-アミノ-1-プロピル基、及び4-アミノ-1-ブチル基から選ぶことができる。

【0021】

式(1)中の R^2 は炭素数1~4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基である。ポルフィリン環がこのような特定の置換フェニル基で置換されているリンポルフィリン化合物は、吸収極大波長が、より長波長にシフトし得るため、長波長の光的作用により、低酸素下でも電子移動反応によって生体分子を効率的に損傷させることができる。生体分子の特に効率的な損傷のために、 R^2 は、メチル基、エチル基、及びトリフルオロエチル基から選ばれる基であってもよい。

【0022】

他の実施形態に係る生体分子損傷剤は、下記一般式(2)で表されるカチオンと、任意のアニオンとから構成されるリンポルフィリン化合物を含む。

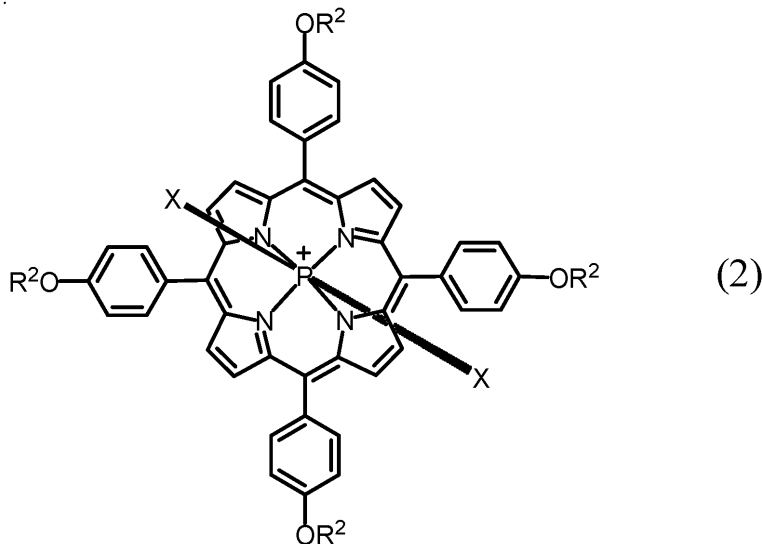
【0023】

10

20

30

【化4】



10

【0024】

式(2)中の R^2 は、式(1)中の R^2 と、その好適な態様も含めて同義である。Xはプロモ基又はクロロ基を示す。式(2)のカチオンを有するリンポルフィリン化合物も、ポルフィリン環が特定の置換フェニル基で置換されていることから、長波長の光の作用により、低酸素下でも電子移動反応によって生体分子を効率的に損傷させることができる。

20

【0025】

リンポルフィリン化合物を構成するアニオンは、式(1)又は(2)のカチオンの対アニオンとして機能し得るものであれば制限はないが、生体分子損傷剤が生体に投与される場合、薬学的に許容される塩を形成するアニオンが選択される。アニオンの具体例としては、 Cl^- 、 Br^- 等のハロゲン化物イオンがある。

【0026】

生体分子損傷剤は、上記リンポルフィリン化合物のみを有効成分として含んでもよい。当業者には理解されるように、生体分子損傷剤は、水等の溶媒を含んでもよいし、他の任意の成分を更に含んでもよい。生体分子損傷剤におけるリンポルフィリン化合物の濃度は、生体分子損傷剤の質量を基準として、例えば0.01質量%以上又は90質量%以上であってもよいし、100質量%以下であってもよい。

30

【0027】

生体分子損傷剤は、光の照射により標的とする細胞の生体分子を損傷させるための光増感剤として用いることができる。例えば、生体分子損傷剤を患者に投与すること、及び生体内の標的細胞が有する生体分子を光の照射により選択的に損傷させることの両方を含む、光線力学的療法のための光増感剤として生体分子損傷剤を用いることができる。あるいは、生体分子損傷剤を、細菌感染した歯又は歯肉の光殺菌治療等のための光殺菌剤として用いることもできる。

【0028】

本実施形態に係る生体分子損傷剤によれば、低酸素下であっても、電子移動機構によって効率的に標的細胞のタンパク質分子等の生体分子を攻撃し、標的細胞を死滅させることができる。電子移動機構は、光の照射により励起された分子が、生体分子から直接電子を引き抜くことにより、生体分子を酸化損傷させる機構である。電子移動機構は、酸素を必要とする一重項酸素機構と比較して、低酸素下でも生体分子に対してより有効に作用することができる。腫瘍細胞(がん細胞)を含む腫瘍組織は一般に低酸素下にあるが、電子移動機構によれば、腫瘍細胞のような低酸素下の標的細胞を効率的に攻撃することができる。

40

【0029】

加えて、本実施形態に係る生体分子損傷剤は、人体への影響が少なく、生体内組織の深

50

部に到達する550～670nm程度の長波長の光の照射によって、生体分子を効率的に損傷させることができる。言い換えると、生体分子損傷剤を、550～670nmの波長の光を照射することを含む方法により、生体分子を損傷させるための光増感剤として用いることができる。用いられる光の波長は、600～670nmであってもよい。

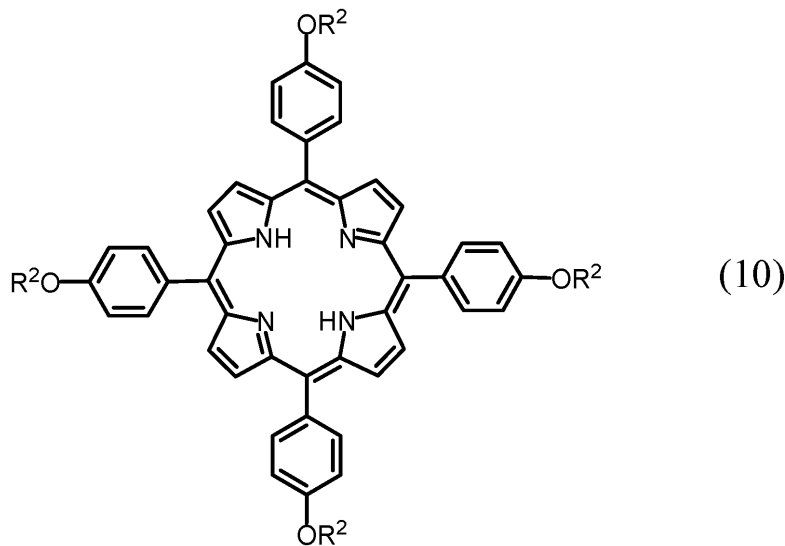
【0030】

式(2)で表されるリンポルフィリン化合物は、例えば、下記一般式(10)で表される置換テトラフェニルポルフィリンと塩化ホスホリル又は臭化ホスホリルとの反応により得ることができる。式(10)の置換テトラフェニルポルフィリンは、当業者であれば、置換ベンズアルデヒド及びピロール、又は、ポルフィリン等を出発物質とする公知の合成経路により容易に製造することができる。

10

【0031】

【化5】



20

【0032】

式(1)で表されるリンポルフィリン化合物は、例えば、式(2)で表されるカチオンを有するリンポルフィリン化合物とR¹OHで表される化合物(R¹は水酸基、アミノ基、アンモニウム基及びフルオロ基から選ばれる少なくとも1種の置換基で置換されていてもよい炭素数1～4の飽和又は不飽和の脂肪族炭化水素基を示す。)とを反応させて、リンポルフィリン化合物を生成させる工程を備える方法により、製造することができる。この反応は、メタノール等の溶媒中で行ってもよく、そこに塩基を加えてもよい。用いられる塩基としては、特に限定されないが、例えば、ピリジンが挙げられる。塩基は、乾燥処理されたものであってもよい。R¹OHとの反応性の観点からは、式(2)中のXはクロロ基であってもよい。

30

【0033】

上記工程は、必要により加熱しながら行うことができる。加熱温度は出発原料、塩基、R¹OHで表される化合物、その他反応に用いる試薬によって異なるが、加熱還流しながら反応を行うことができる。反応時間は、通常、数時間～数日程度である。また、本工程は、乾燥条件下で行うことができる。

40

【実施例】

【0034】

以下、実施例を挙げて本発明について更に具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0035】

実施例1～3において得られた化合物の構造は、¹H-NMR(JEOL, JNM-AL-300)、質量分析(FAB-MS, JEOL, The MStation JMS-700)で確認した。

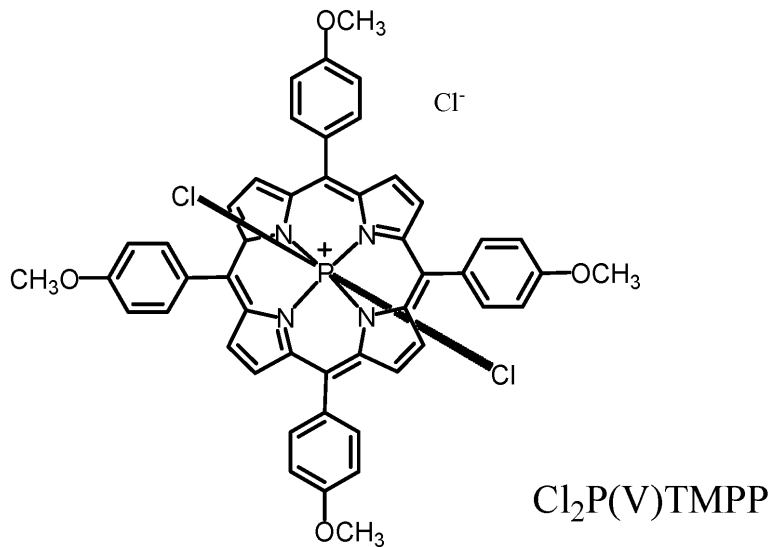
50

【 0 0 3 6 】

実施例 1 : ジクロロリン (V) テトラキス (4 - メトキシフェニル) ポルフィリンクロライド ($Cl_2P(V)TMPP$) の合成

【 0 0 3 7 】

【 化 6 】



10

20

【 0 0 3 8 】

5 , 1 0 , 1 5 , 2 0 - テトラキス (4 - メトキシフェニル) ポルフィリン (東京化成工業株式会社製) 2 0 0 m g を 1 2 m L の乾燥ピリジンに溶かした。そこに、4 . 2 g の塩化ホスホリルを加え、7 2 時間加熱還流した。このとき、塩化カルシウム管を還流管上部に取り付け、空気中の水分の混入を避けた。その後、反応液の溶媒をロータリーエバポレーターを用いて留去した。展開溶媒をクロロホルム : メタノール = 4 : 1 としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて反応物を精製し、ジクロロリン (V) テトラキス (4 - メトキシフェニル) ポルフィリンクロライド ($Cl_2P(V)TMPP$) を 2 3 0 m g 得た。

1H -NMR ($CDCl_3$, TMS) : 4 . 03 (s , 12 H , meso - phenyl - OCH_3) , 7 . 30 (d , 8 H , $J_{H-H} = 7 . 5$ Hz , meso - m - phenyl - H) , 7 . 90 (d , 8 H , $J_{H-H} = 7 . 5$ Hz , meso - o - phenyl - H) , 9 . 12 (d , 8 H , $J_{H-H} = 3 . 0$ Hz , H) .

FAB-MS : m / z 833 . 2 (M^+) .

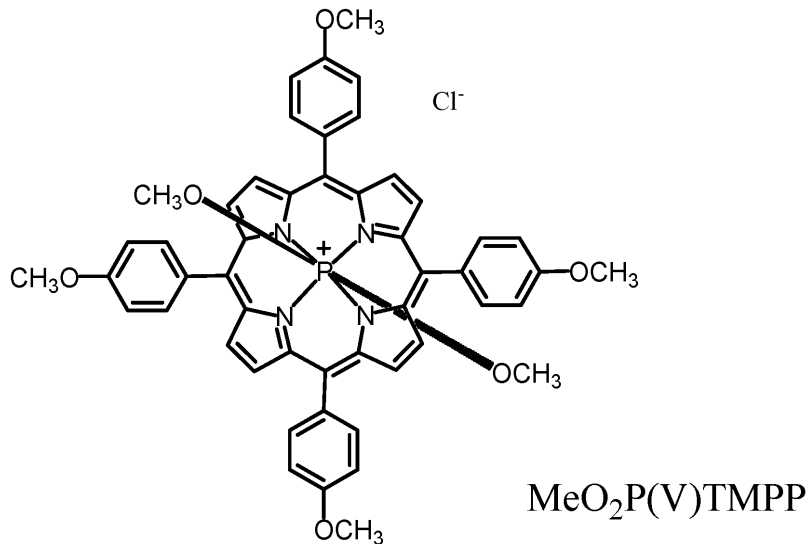
30

【 0 0 3 9 】

実施例 2 : ジメトキシリン (V) テトラキス (4 - メトキシフェニル) ポルフィリンクロライド ($MeO_2P(V)TMPP$) の合成

【 0 0 4 0 】

【化7】



10

【0041】

実施例1で得られたCl₂P(V)TMPP(55mg)を、0.5mLの乾燥ピリジンを含む5mLの乾燥メタノールの混合液に溶かし、78℃で10時間加熱還流した。その後、反応液の溶媒をロータリーエバポレーターを用いて留去した。展開溶媒をクロロホルム：メタノール=5：1としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、反応物を精製し、ジメトキシリン(V)テトラキス(4-メトキシフェニル)ポルフィリンクロライド(MeO₂P(V)TMPP)を52mg得た。

20

¹H-NMR(CDCl₃, TMS): -1.86(d, 6H, J_{P-H}=27Hz, P-OCH₃), 4.04(s, 12H, meso-phenyl-OCH₃), 7.30(d, 8H, J_{H-H}=9.0Hz, meso-m-phenyl-H), 7.86(d, 8H, J_{H-H}=9.0Hz, meso-o-phenyl-H), 9.06(d, 8H, J_{H-H}=3.0Hz, H).

FAB-MS: m/z825.3(M⁺).

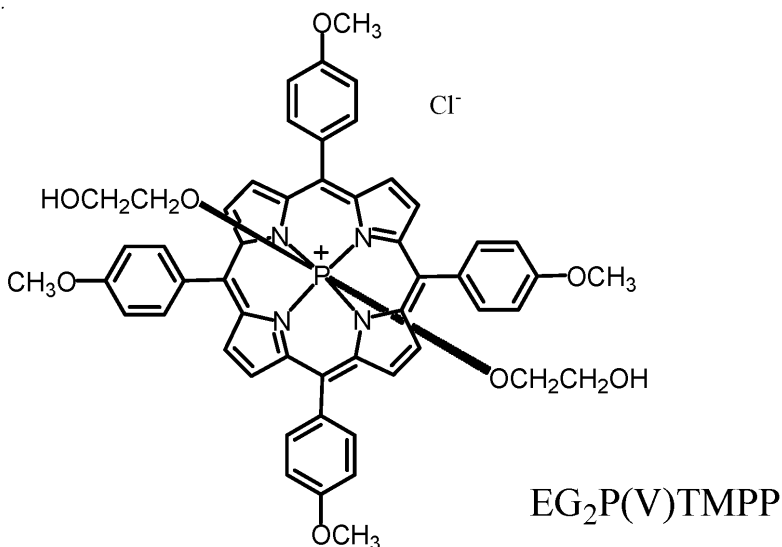
【0042】

実施例3：ジエチレングリコキシリン(V)テトラキス(4-メトキシフェニル)ポルフィリンクロライド(EG₂P(V)TMPP)の合成

30

【0043】

【化8】



40

【0044】

実施例1で得られたCl₂P(V)TMPP(70mg)を2mLの乾燥エチレングリコールと1mLの乾燥ピリジンとの混合液に溶かし、145℃で3時間加熱還流した。そ

50

の後、反応液の溶媒をロータリーエバポレーターを用いて留去した。次いで、分液ロートを用いた水とクロロホルムの液-液抽出により、残渣から反応物を分離した。展開溶媒をクロロホルム：メタノール = 5 : 1 としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、反応物を精製し、ジエチレングリコキシリン(V)テトラキス(4-メトキシフェニル)ポルフィリンクロライド(EG₂P(V)TMPP)を73mg得た。

¹H-NMR(CDCl₃, TMS): -2.30 ~ -2.22(m, 4H, P-OCH₂CO), 0.71(brs, 4H, P-OCCH₂O), 1.25(s, 2H, P-OCCOH), 3.99(s, 12H, meso-phenyl-OCH₃), 7.25(d, 8H, J_{H-H}=9.0Hz, meso-m-phenyl-H), 7.91(d, 8H, J_{H-H}=9.0Hz, meso-o-phenyl-H), 9.00(brs, 8H, H).

FAB-MS:m/z885.3(M⁺).

【0045】

<Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの物性値評価>

(吸収スペクトル)

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの吸収スペクトルを、分光光度計(島津製作所, UV-1650PC)を用いて測定した。測定には、10mMリン酸緩衝液(pH7.6)を使用した。

【0046】

(蛍光分析)

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPについて、蛍光極大波長、蛍光量子収率を測定した。測定は、分光蛍光光度計(株式会社日立ハイテクフィールドインテグレーション製, F-4500)を用い、10mMリン酸緩衝液(pH7.6)中で行った。

【0047】

(蛍光寿命測定)

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPについて、蛍光寿命τ_fを測定した。測定は、蛍光寿命測定装置(株式会社堀場製作所製、TempPro)を用い、10mMリン酸緩衝液(pH7.6)中で行った。

【0048】

(一重項酸素生成量子収率)

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの一重項酸素生成量子収率を、以下の方法により算出した。すなわち、近赤外発光分光測定装置(浜松ホトニクス株式会社製, NIR-PIIシステム)により、蒸留水中における一重項酸素の発光強度を測定した。測定された発光強度の、メチレンブルーによる一重項酸素の発光強度(蒸留水中での一重項酸素生成量子収率0.52)に対する相対的な比率を一重項酸素生成量子収率とした。なお、発光強度の測定には、10mMリン酸緩衝液(pH7.6)を使用した。

【0049】

(水への溶解性)

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの25の蒸留水に対する溶解度を測定した。

【0050】

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの水に対する溶解度C、吸収極大波長^A_{max}、蛍光極大波長^f_{max}、蛍光量子収率_f、蛍光寿命_f、一重項酸素生成量子収率を表1に示す。また、測定した吸収スペクトルを図1に示す。

【0051】

10

20

30

40

【表 1】

	Cl ₂ P(V)TMPP	MeO ₂ P(V)TMPP	EG ₂ P(V)TMPP
水に対する溶解度 C (mM)	0.13	18.3	24.5
吸収極大波長 λ_{\max}^A (nm)	432, 559, 604	441, 566, 612	440, 564, 611
蛍光極大波長 λ_{\max}^f (nm)	616	627, 690 ^{a)}	628
蛍光量子収率 Φ_f	0.029	0.024	0.031
蛍光寿命 τ_f (ns)	2.8	2.0	2.1
一重項酸素生成量子収率 Φ_{Δ}	0.97	0.86	0.83

a) = 肩の値を示す

【0052】

表 1 及び図 1 に示すように、Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP は、550 ~ 670 nm 付近に吸収極大波長を有していることが確認された。また、MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP の吸収波長は、Cl₂P(V)TMPP よりも更に長波長側にシフトしていることが確認された。さらに、表 1 に示すように、いずれの化合物も高い蛍光量子収率を有し、蛍光寿命も十分長いことが確認された。また、一重項酸素生成量子収率の値から、いずれの化合物も、赤色光を照射することにより一重項酸素を発生できることが確認された。MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP は、水に対する高い溶解度を有することも確認された。

【0053】

< タンパク質に対する光損傷作用の評価 >

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP の光損傷作用を以下の方法により評価した。

【0054】

(電子移動寄与率)

5 μM の Cl₂P(V)TMPP と 10 μM のヒト血清アルブミン (水溶性タンパク質、HSA) をそれぞれ含む 1.2 mL の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) を、Cl₂P(V)TMPP の評価用溶液 1 として調製した。同様に、MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP それぞれについて、評価用溶液 1 を調製した。

【0055】

光損傷作用の作用機構を確認するため、上記評価用溶液 1 (1.2 mL) それぞれに一重項酸素の消去剤であるアジ化ナトリウム (0.78 mg) を添加し、評価用溶液 2 を作製した。

【0056】

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP 及び EG₂P(V)TMPP の評価用溶液 1 及び 2 に対し、赤色発光ダイオード光源 (CCS 株式会社製、ISL-150 X 150-RR、極大波長: 659 nm、2 mW · cm⁻²) を用いて赤色光を照射し、そのときの HSA 中のトリプトファン残基の自家蛍光を分光蛍光光度計 (株式会社日立ハイテクフィールドインテグレーション製、650-60) を用いて測定した。この自家蛍光強度は、評価用溶液に含まれる損傷されていない HSA 量に比例する。赤色光の照射前の自家蛍光強度と比較した自家蛍光強度の減少量から、HSA の損傷量を求めた。図 2 は、評価用溶液 1 に対する赤色光の照射時間と HSA の損傷量との関係を示すグラフである。赤色光の照射時間と自家蛍光強度との関係から、HSA の単位時間当たりの損傷量 (損傷速度、図 2 のグラフの傾き) を算出した。評価用液 2 における HSA 損傷が全て電子移動機構によるものとみなし、評価用液 1 における HSA 損傷速度に対する、評価用液 2 における HSA 損傷速度の比率を、電子移動寄与率として算出した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

(タンパク質損傷の量子収率)

下記式により、タンパク質損傷の量子収率 Φ_D を算出した。

$\Phi_D = (\text{HSAの損傷速度}) / (\text{リンポルフィリン化合物が単位時間当たりに吸収する光子数})$

HSAの損傷速度は、図2のグラフの近似直線の傾きから計算した。Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPが単位時間当たりに吸収する光子数は、各化合物の吸収スペクトルと赤色発光ダイオード光源の発光スペクトルの重なりから計算した。

【 0 0 5 8 】

表2に評価結果を示す。表2には、非特許文献1に記載されている光増感剤(MeO₂P(V)TPP及びH₂TMPyP)のタンパク質損傷の量子収率 Φ_D をあわせて示す。

【 0 0 5 9 】

【表2】

	Cl ₂ P(V)TMPP	MeO ₂ P(V)TMPP	EG ₂ P(V)TMPP	MeO ₂ P(V)TPP	H ₂ TMPyP
損傷速度 (nmol/min)	0.012	0.023	0.039	-	-
アジ化ナトリウム添加時の 損傷速度 (nmol/min)	0.015	0.029	0.020	-	-
タンパク質損傷の量子収率 Φ_D	5.5×10^{-3}	4.8×10^{-3}	6.6×10^{-3}	1.8×10^{-5}	1.2×10^{-5}
電子移動寄与率(%)	~100	~100	52	-	-

【 0 0 6 0 】

表2に示すように、Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPは高いタンパク質損傷の量子収率を有していることが確認された。Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPのタンパク質損傷の量子収率は、MeO₂P(V)TPP及びH₂TMPyPのタンパク質損傷の量子収率(文献値)よりも遥かに高い。また、一重項酸素の消去剤を用いた測定結果から、Cl₂P(V)TMPP及びMeO₂P(V)TMPPのタンパク質に対する光損傷作用は、主に電子移動機構によるものであり、EG₂P(V)TMPPのタンパク質に対する光損傷作用は、一重項酸素機構及び電子移動機構の両方によるものであることが支持された。

【 0 0 6 1 】

(ヒト血清アルブミン含有時の蛍光寿命測定)

評価用液1を用いて、ヒト血清アルブミン(10 μ M)含有時のCl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの蛍光寿命 τ_f^* (短寿命成分 τ_{f1}^* 、長寿命成分 τ_{f2}^*) を測定した。その結果と、それぞれの化合物単独の蛍光寿命 τ_f に基づいて、下記式を用いて電子移動速度定数 k_{et} を算出した。

【 0 0 6 2 】

【数1】

$$k_{et} = \frac{1}{\tau_{f1}^*} - \frac{1}{\tau_f}$$

【 0 0 6 3 】

Cl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの蛍光寿命 τ_f 、ヒト血清アルブミン(10 μ M)含有時のCl₂P(V)TMPP、MeO₂P(V)TMPP及びEG₂P(V)TMPPの蛍光寿命 τ_f^* (短寿命成分 τ_{f1}^* 、長寿命成分 τ_{f2}^*) 及び電子移動速度定数 k_{et} を表3に示す。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

【表 3】

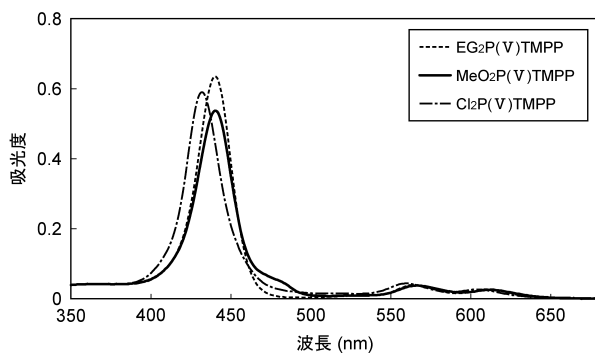
		Cl ₂ P(V)TMPP	MeO ₂ P(V)TMPP	EG ₂ P(V)TMPP
蛍光寿命 τ_f (ns)		2.8	2.0	2.1
HSA(10 μ M)含有時の 蛍光寿命 τ_f^* [割合] (ns)	短寿命成分 τ_{f1}^*	2.2 [52%]	1.4 [38%]	1.6 [42%]
	長寿命成分 τ_{f2}^*	4.2 [48%]	3.3 [62%]	3.4 [58%]
電子移動速度定数 k_{et} ($10^8 s^{-1}$)		1.0	2.1	1.5

10

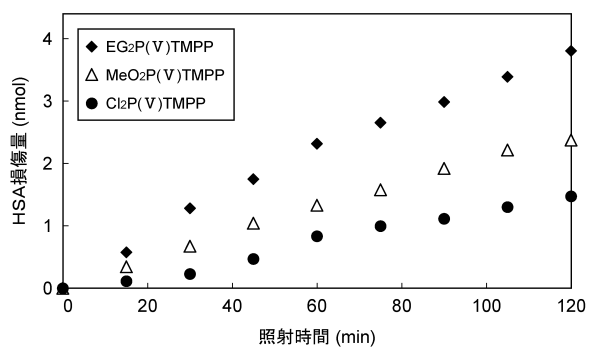
【 0 0 6 5 】

リンポルフィリン化合物単独の試料に関しては、単一の蛍光寿命の成分が確認された。一方、ヒト血清アルブミン (HSA) を含む試料の場合、蛍光寿命 τ_f よりも長い寿命の成分、及び蛍光寿命 τ_f よりも短い寿命の成分が観測された。長い寿命の成分は、リンポルフィリン化合物とタンパク質分子との相互作用により、励起状態の振動緩和が抑制されて寿命が長くなった成分であると考えられる。短い寿命の成分は、ポルフィリンの励起一重項状態の蛍光寿命が、タンパク質のトリプトファン残基から電子を引き抜くことにより短縮された成分であると考えられる。すなわち、これらの結果は、リンポルフィリン化合物が、電子移動機構によるタンパク質の損傷を生じさせていることを支持している。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

審査官 前田 憲彦

- (56)参考文献 国際公開第2011/043369(WO, A1)
特開平04-120085(JP, A)
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013年, 23(9), p.2704-2707, Abstract、図
1
Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2002年, 75(8), p.1757-1760, スキーム1
、第1758 - 1759頁の化合物1a - 1e

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07F 9/00
A61K 31/00
CAplus/REGISTRY(STN)