

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/133218

発行日 平成29年11月30日(2017.11.30)

(43) 国際公開日 平成28年8月25日(2016.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C09B 11/28 (2006.01)	C09B 11/28	CSPB 2G043
C09K 11/06 (2006.01)	C09K 11/06	2G045
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48	M
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 21/64	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁)

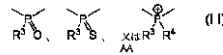
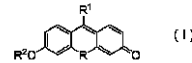
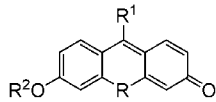
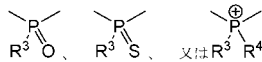
出願番号	特願2017-500770 (P2017-500770)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/054964	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成28年2月19日(2016.2.19)	(72) 発明者	山口 茂弘 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
(31) 優先権主張番号	特願2015-32322 (P2015-32322)	(72) 発明者	中 愛子 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
(32) 優先日	平成27年2月20日(2015.2.20)	(72) 発明者	須田 真司 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスファフルオレセイン化合物若しくはその塩、又はそれを用いた蛍光色素

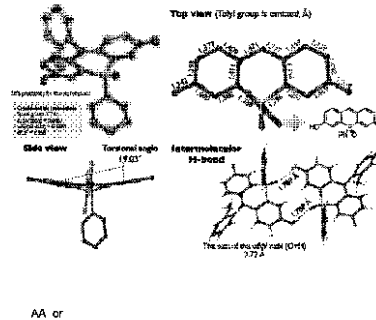
(57) 【要約】

一般式：

[式中、R¹は置換されていてもよいアリール基を示す。R²は水素原子又は有機基を示す。Rは一般式：

(式中、R³は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。R⁴は置換されていてもよいアルキル基を示す。) で表される基である。] で示されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物は、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、十分な量子収率を得ることができるとともに、十分にHOMOを低減することができる。

【例】



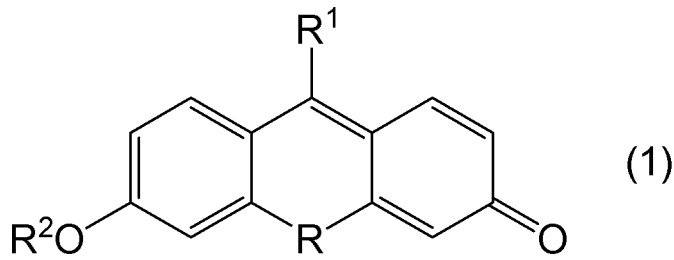
AA or

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (1) :

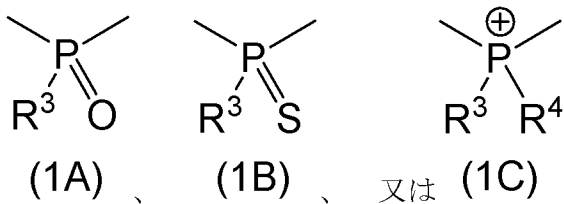
【化 1】



10

[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式 (1A) ~ (1C) :

【化 2】



20

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 2】

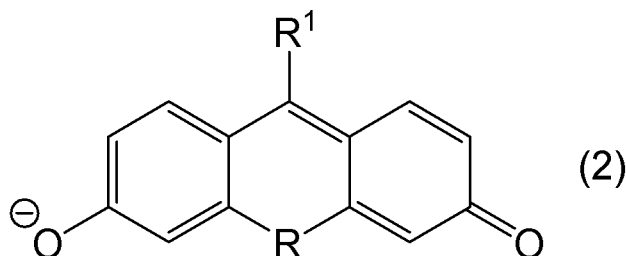
前記一般式 (1) において、 R が一般式 (1A) で表される基である、請求項 1 に記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

30

【請求項 3】

前記一般式 (1) で表されるホスファフルオレセイン化合物の塩が、一般式 (2) :

【化 3】



40

[式中、 R^1 及び R は前記に同じである。]

で表されるアニオンを有する、請求項 1 又は 2 に記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 4】

600 ~ 700 nm に最大吸収波長を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 5】

600 ~ 700 nm に最大吸収波長を有し、且つ、蛍光量子収率が 0.25 ~ 0.60 である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒

50

和物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する蛍光色素。

【請求項 7】

バイオイメージング用蛍光色素である、請求項 6 に記載の蛍光色素。

【請求項 8】

癌細胞のバイオイメージング用蛍光色素である、請求項 7 に記載の蛍光色素。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の蛍光色素を含有する、細胞検出剤。

10

【請求項 10】

癌細胞検出剤である、請求項 9 に記載の細胞検出剤。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の蛍光色素、又は請求項 9 若しくは 10 に記載の細胞検出剤を用いる、細胞のバイオイメージング方法。

【請求項 12】

前記細胞が癌細胞である、請求項 11 に記載のバイオイメージング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、ホスファフルオレセイン化合物若しくはその塩、又はそれを用いた蛍光色素に関する。

【背景技術】

【0002】

赤色から近赤外領域の光は高い組織浸透性があるため、この領域（620 nm以上）に吸収及び蛍光極大波長を有する色素が、生体組織の深部観察において注目されている。この生体組織の深部観察においては、細胞の自己蛍光を抑制し、細胞へのダメージを抑制するためには、600~700 nm程度の位置に蛍光極大波長を有しつつも、蛍光量子収率を向上させることが好ましい。特に、水溶性を示す蛍光色素のうち650 nm以上に蛍光極大を有する色素は、緑色又は黄色蛍光体（495~570 nmに蛍光極大を有する色素）と比較してそれほど多くない。これらは、例えば、拡張したキサンテン系色素、ケイ素置換ローダミン（Si-rhodamine）、フルオレセイン系色素、シアニン系色素（Cy5等）等が挙げられる。いずれの蛍光色素についても、生体試料の可視化において実用例が報告されている。

30

【0003】

例えば、フルオレセイン系色素は、吸収極大波長は491 nm、蛍光極大波長は510 nm、量子収率は0.85である（非特許文献1）が、バイオイメージングのためは、深赤色~近赤外領域の波長に対して吸収及び蛍光を示す必要があることから、600~700 nm程度の波長において吸収極大及び蛍光極大を有する色素が求められている。

【0004】

40

このフルオレセイン系色素のキサンテン骨格の酸素原子をケイ素原子に置換すると、吸収極大波長は582 nm、蛍光極大波長は598 nm、量子収率0.42と、長波長側にシフトさせることができることが知られている（非特許文献2）。しかしながら、その効果は不十分であり、さらなる長波長シフトが必要である。

【0005】

一方、吸収極大波長及び蛍光極大波長をさらに長波長シフトさせるべく、キサンテン骨格の共役を拡張した構造を有する化合物が、吸収極大波長は595 nmと600 nm未満であるものの、蛍光極大波長を660 nmとすることができることも知られているが、この色素は、量子収率が0.14と著しく小さいことから、バイオイメージング用途には不十分である（非特許文献3）。

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】JACS, 2005, 127, 4888.

【非特許文献2】Chem. Commun. 2011, 47, 4162.

【非特許文献3】Cytometry, 1989, 10, 151.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記のように、一般に、長波長領域に吸収極大及び蛍光極大を有する色素は、量子収率が低く、十分に高くすることが困難であった。また、これらの蛍光色素は、最高被占軌道（HOMO）が高いため、光照射下において酸素と反応し、活性酸素種を与えることから、光に対する安定性も低かった。

【0008】

このため、本発明は、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、十分な量子収率を得ることができるとともに、十分にHOMOを低減することができる化合物（蛍光色素）を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

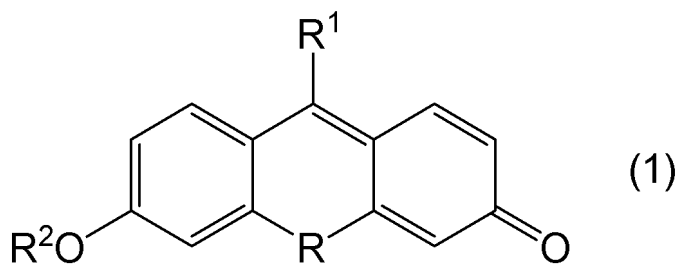
上記目的を鑑み、鋭意検討した結果、本発明者らは、フルオレセインのキサンテン環部位の10位の酸素原子をリン原子に置換した一連の赤色蛍光色素（ホスファフルオレセイン化合物）を開発した。この化合物は、中性条件下又はアルカリ条件下に置いてアニオン化することにより、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、生理的条件下でも十分に高い蛍光量子収率が得られることを見出した。また、この化合物は、リン置換基の電子的効果によりHOMO準位が下がるため、光照射に対する著しい安定化効果も認められた。本発明は、このような知見に基づきさらに研究を重ね、完成させたものである。すなわち、本発明は以下の構成を包含する。

【0010】

項1. 一般式(1)：

【0011】

【化1】



【0012】

[式中、R¹は置換されていてもよいアール基を示す。R²は水素原子又は有機基を示す。Rは一般式(1A)~(1C)：

【0013】

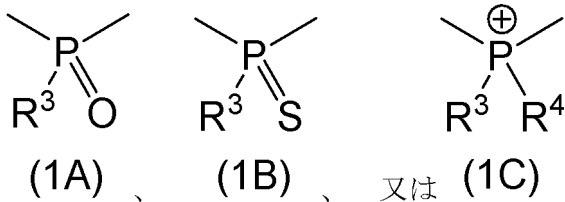
10

20

30

40

【化2】



【0014】

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【0015】

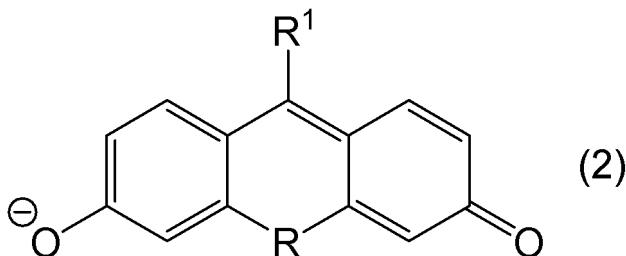
項2．前記一般式(1)において、 R が一般式(1A)で表される基である、項1に記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【0016】

項3．前記一般式(1)で表されるホスファフルオレセイン化合物の塩が、一般式(2)

【0017】

【化3】



【0018】

[式中、 R^1 及び R は前記に同じである。]

で表されるアニオンを有する、項1又は2に記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【0019】

項4．600~700 nmに最大吸収波長を有する、項1~3のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【0020】

項5．600~700 nmに最大吸収波長を有し、且つ、蛍光量子収率が0.25~0.60である、項1~4のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【0021】

項6．項1~5のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する蛍光色素。

【0022】

項7．バイオイメージング用蛍光色素である、項6に記載の蛍光色素。

【0023】

項8．癌細胞のバイオイメージング用蛍光色素である、項7に記載の蛍光色素。

【0024】

項9．項6~8のいずれかに記載の蛍光色素を含有する、細胞検出剤。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

項 1 0 . 癌細胞検出剤である、項 9 に記載の細胞検出剤。

【 0 0 2 6 】

項 1 1 . 項 6 ~ 8 のいずれかに記載の蛍光色素、又は項 9 若しくは 1 0 に記載の細胞検出剤を用いる、細胞のバイオイメージング方法。

【 0 0 2 7 】

項 1 2 . 前記細胞が癌細胞である、項 1 1 に記載のバイオイメージング方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 8 】

本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物は、フルオレセインのキサンテン環部位の10位の酸素原子をリン原子に置換したため、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、生理的条件下でも十分に高い蛍光量子収率が得られる。特に、実施例における吸収極大波長627 nmは、レーザー顕微鏡が通常備えているHeNeレーザーの励起波長633 nmとほぼ一致していることから、蛍光色素としての励起効率が極めて高い。

10

【 0 0 2 9 】

また、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、この領域に極大波長を有する従来の蛍光色素にはなかった高い蛍光量子収率を有することから、バイオイメージングに必要な蛍光色素濃度を低く抑えることができ、生体へのダメージを大幅に低減することができる。

20

【 0 0 3 0 】

さらに、本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、リン置換基の電子的効果によりHOMO準位を低下させることができ、光に対する安定性を飛躍的に向上させることができるため、生体深部の観測を長時間にわたって行うことが可能である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 1 】

【 図 1 】 実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物（化合物POF）のX線結晶構造解析の結果である。

【 図 2 】 試験例3で調製したpH3、pH7、pH9とした場合の本発明のホスファフルオレセイン化合物（化合物POF）の吸収スペクトル及び蛍光スペクトルである。

30

【 図 3 】 各pHにおける本発明のホスファフルオレセイン化合物（化合物POF）の吸収スペクトル（上図）、627 nmにおける相対吸収とpHとの関係を示すグラフ（下図）である。

【 図 4 】 各pHにおける本発明のホスファフルオレセイン化合物（化合物POF）の励起スペクトル（上図）、627 nmにおける励起強度と532 nmにおける励起強度の比と、pHとの関係を示すグラフ（下図）である。

【 図 5 】 試験例5の結果を示すグラフである。（a）は本発明のホスファフルオレセイン化合物と、公知のフルオレセイン化合物（TokyoGreen及びTokyoMagenta）を用いた場合の吸収極大波長における吸光度の維持率を示すグラフである。（b）は試験例5で調製した試験液7~10の630 nmにおける吸光度の維持率を示すグラフである。

【 図 6 】 試験例6の細胞インキュベーション及びイメージングの結果を示す写真である。左図(a)は、633 nmの励起で得られたConfocal fluorescence imageである。中図(b)は、明視野像である。右図(c)は、(a)及び(b)の併合イメージである。図中、スケールバーは50 μmである。

40

【 図 7 】 試験例6の細胞毒性の結果を示すグラフである。

【 発明を実施するための形態 】

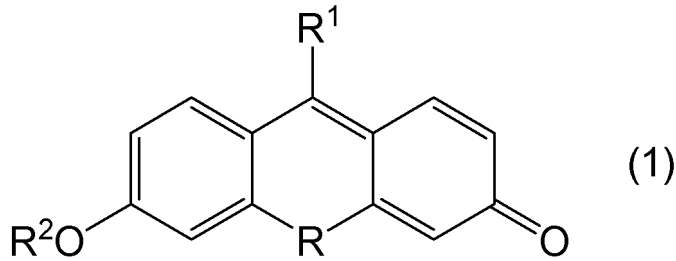
【 0 0 3 2 】

1. ホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物

本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、一般式(1)：

【 0 0 3 3 】

【化4】



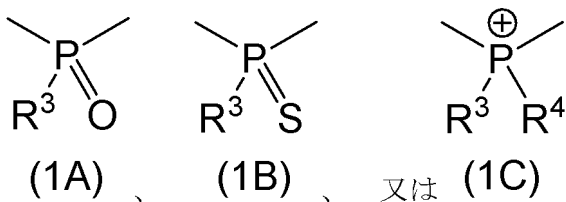
【0034】

10

[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式(1A)~(1C)：

【0035】

【化5】



20

【0036】

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表される化合物、又はその塩である。この一般式(1)で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、文献未記載の新規化合物である。

【0037】

上記一般式(1)において、 R^1 で示されるアリール基としては、単環アリール基、多環アリール基、及び複素芳香環基のいずれも採用することができ、例えば、フェニル基、オリゴアリール基(ナフチル基、アントリル基等)、ピフェニル基、ターフェニル基、ピレニル基、フェナンスレニル基、フルオレニル基、チエニル基、フリル基、ピリジル基等が挙げられる。

30

【0038】

R^1 で示されるアリール基が有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)、アルキル基(メチル基、エチル基、*n*-プロピル基等)、ホルミル基、カルボキシル基、エステル基、アミド基(アミド基、メチルアミド基、ジメチルアミド基等)、アジド基(アジドフェニル基等)、アルキニル基(エチニル基、プロパルギル基等)、アルケニル基(ビニル基、アリル基等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されず、0~6個が好ましく、0~3個がより好ましい。

40

【0039】

なかでも、 R^1 としては、蛍光量子収率をより向上させるとともに、バイオイメージングの際により認識しやすくする観点から、置換又は非置換単環アリール基(置換又は非置換フェニル基)が好ましく、オルト位に置換基を有する置換単環アリール基(置換フェニル基)がより好ましく、*o*-トリル基がさらに好ましい。

【0040】

上記一般式(1)において、 R^2 で示される有機基としては、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有していてもよい環状エーテル基等が挙げられる。

50

【0041】

上記一般式(1)において、 R^2 で示される有機基としてのアルキル基としては、直鎖アルキル基及び分岐鎖アルキル基のいずれも採用できる。

【0042】

直鎖アルキル基としては、炭素数1~6(特に1~4)の直鎖アルキル基が好ましく、具体的には、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基等が挙げられる。

【0043】

分岐鎖アルキル基としては、炭素数3~6(特に3~5)の分岐鎖アルキル基が好ましく、具体的には、イソプロピル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、*s*-ブチル基、ネオペンチル基、イソヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

10

【0044】

R^2 で示される有機基としてのアルキル基が有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されず、0~6個が好ましく、0~3個がより好ましい。

【0045】

上記一般式(1)において、 R^2 で示される有機基としてのアシル基としては、例えば、メタノイル基、エタノイル基等が挙げられる。

【0046】

上記一般式(1)において、 R^2 で示される有機基としての環状エーテル基としては、例えば、テトラヒドロピラニル基、テトラヒドロフラニル基等が挙げられる。

20

【0047】

R^2 で示される有機基としての環状エーテルが有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)、アシル基(メタノイル基、エタノイル基等)、シリル基(トリメチルシリル基、トリエチルシリル基等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されないが、0~2個が好ましく、0~1個がより好ましい。

【0048】

なかでも、 R^2 としては、アニオン化させやすく、吸収極大波長及び蛍光極大波長を長波長シフトさせやすくする観点から、水素原子、アシル基、又は置換環状エーテル基が好ましく、水素原子がより好ましい。

30

【0049】

一般式(1)(一般式(1A)~(1C))において、 R で示される基のうち、 R^3 で示されるアリール基としては、単環アリール基及び多環アリール基のいずれも採用することができ、例えば、フェニル基、オリゴアリール基(ナフチル基、アントリル基等)、ビフェニル基、ターフェニル基、ピレニル基、フェナンスレニル基、フルオレニル基等が挙げられる。

【0050】

R^3 で示されるアリール基が有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)、アルキル基(メチル基、エチル基、*n*-プロピル基等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されないが、0~6個が好ましく、0~3個がより好ましい。

40

【0051】

一般式(1)(一般式(1A)~(1C))において、 R で示される基のうち、 R^3 で示されるアルキル基としては、直鎖アルキル基及び分岐鎖アルキル基のいずれも採用できる。

【0052】

直鎖アルキル基としては、炭素数1~6(特に1~4)の直鎖アルキル基が好ましく、具体的には、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基等が挙げられる。

50

【0053】

分岐鎖アルキル基としては、炭素数3~6(特に3~5)の分岐鎖アルキル基が好ましく、具体的には、イソプロピル基、イソブチル基、t-ブチル基、s-ブチル基、ネオペンチル基、イソヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

【0054】

R²で示される有機基としてのアルキル基が有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されないが、0~6個が好ましく、0~3個がより好ましい。

【0055】

一般式(1)(一般式(1A)~(1C))において、Rで示される基のうち、R³で示されるアルケニル基としては、例えば、ビニル基、アリル基等が挙げられる。

10

【0056】

一般式(1)(一般式(1A)~(1C))において、Rで示される基のうち、R³で示されるアルキニル基としては、例えば、アルキニル基、プロパルギル基等が挙げられる。

【0057】

このR³の種類によっては、電子構造の微調整や物理特性(溶解性、細胞透過性等)の調整を行うことも可能である。

【0058】

一般式(1)(一般式(1C))において、Rで示される基のうち、R⁴で示されるアルキル基としては、直鎖アルキル基及び分岐鎖アルキル基のいずれも採用できる。

20

【0059】

直鎖アルキル基としては、炭素数1~6(特に1~4)の直鎖アルキル基が好ましく、具体的には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基等が挙げられる。

【0060】

分岐鎖アルキル基としては、炭素数3~6(特に3~5)の分岐鎖アルキル基が好ましく、具体的には、イソプロピル基、イソブチル基、t-ブチル基、s-ブチル基、ネオペンチル基、イソヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。

【0061】

R²で示される有機基としてのアルキル基が有していてもよい置換基としては、特に制限はなく、水酸基、ハロゲン原子(フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等)等が挙げられる。このような置換基の数は、特に制限されないが、0~6個が好ましく、0~3個がより好ましい。

30

【0062】

なかでも、Rとしては、より電子求引性が高く、HOMO準位(最高被占有軌道のエネルギー準位)及びLUMO準位(最低空軌道のエネルギー準位)をより低減させやすいために光に対する安定性をより向上させやすい観点から、一般式(1A)で示される基が好ましい。

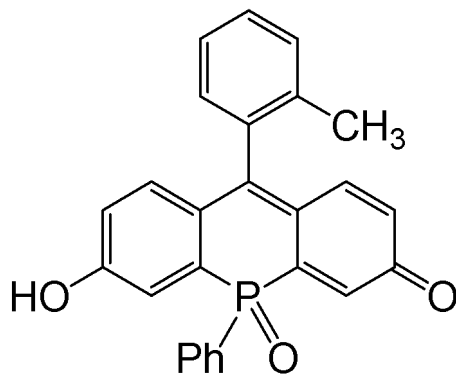
【0063】

このような条件を満たす本発明の化合物としては、例えば、

40

【0064】

【化6】



10

【0065】

[式中、Phはフェニル基を示す。以下同様である。]

等で表されるホスファフルオレセイン化合物、又はその塩、水和物若しくは溶媒和物が好ましい。

【0066】

このような構造を有する本発明の化合物は、リン含有基の存在により電子求引性が高く、HOMO準位（最高被占有軌道のエネルギー準位）及びLUMO準位（最低空軌道のエネルギー準位）を低下することができる。特に、HOMO準位と比較してLUMO準位を効果的に低下させることができるため、アニオン型に変化させた場合のHOMO-LUMOエネルギーギャップを、2.00~2.50 eV、特に2.25~2.48 eVに低減することも可能である（B3LYP/6-31+G レベルでおこなった量子化学計算により求めた値）。このため、吸収極大波長及び蛍光極大波長をより長波長シフトさせることも可能である。HOMO準位及びLUMO準位は、Gaussian 09 プログラムを用いた構造最適化により測定する。

20

【0067】

なお、本発明の化合物としては、中性型化合物（一般式（1）で表される化合物）であっても、蛍光極大波長を600~650 nm程度、特に610~640 nmに有することができるが、アニオン化して一般式（1）で表される化合物の塩の形態とすれば、吸収極大波長をより長波長シフトして600~700 nm（特に600~650 nm程度）の範囲とするとともに、蛍光極大波長をさらに長波長シフトさせ（650~700 nm程度、特に655~670 nm程度）、蛍光量子収率をさらに向上させる（0.25~0.60程度、特に0.35~0.50）ことも可能である。

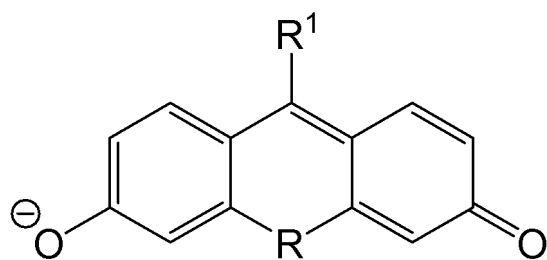
30

【0068】

このような観点から、本発明の化合物は、上記一般式（1）で示される化合物の塩が好ましく、一般式（2）：

【0069】

【化7】



(2)

40

【0070】

[式中、R¹及びRは前記に同じである。]

で表されるアニオンを有することがより好ましい。

【0071】

一般式（2）において、R¹及びRは前記説明したものと同様である。

【0072】

50

また、一般式(2)で示されるアニオンと対のイオン(カチオン)としては特に制限はなく、例えば、塩基付加塩として、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等の金属塩；アンモニウム塩；トリエチルアンモニウム等の有機アンモニウム塩等を挙げることができる。

【0073】

また、本発明の化合物は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。

【0074】

2. ホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物の製造方法

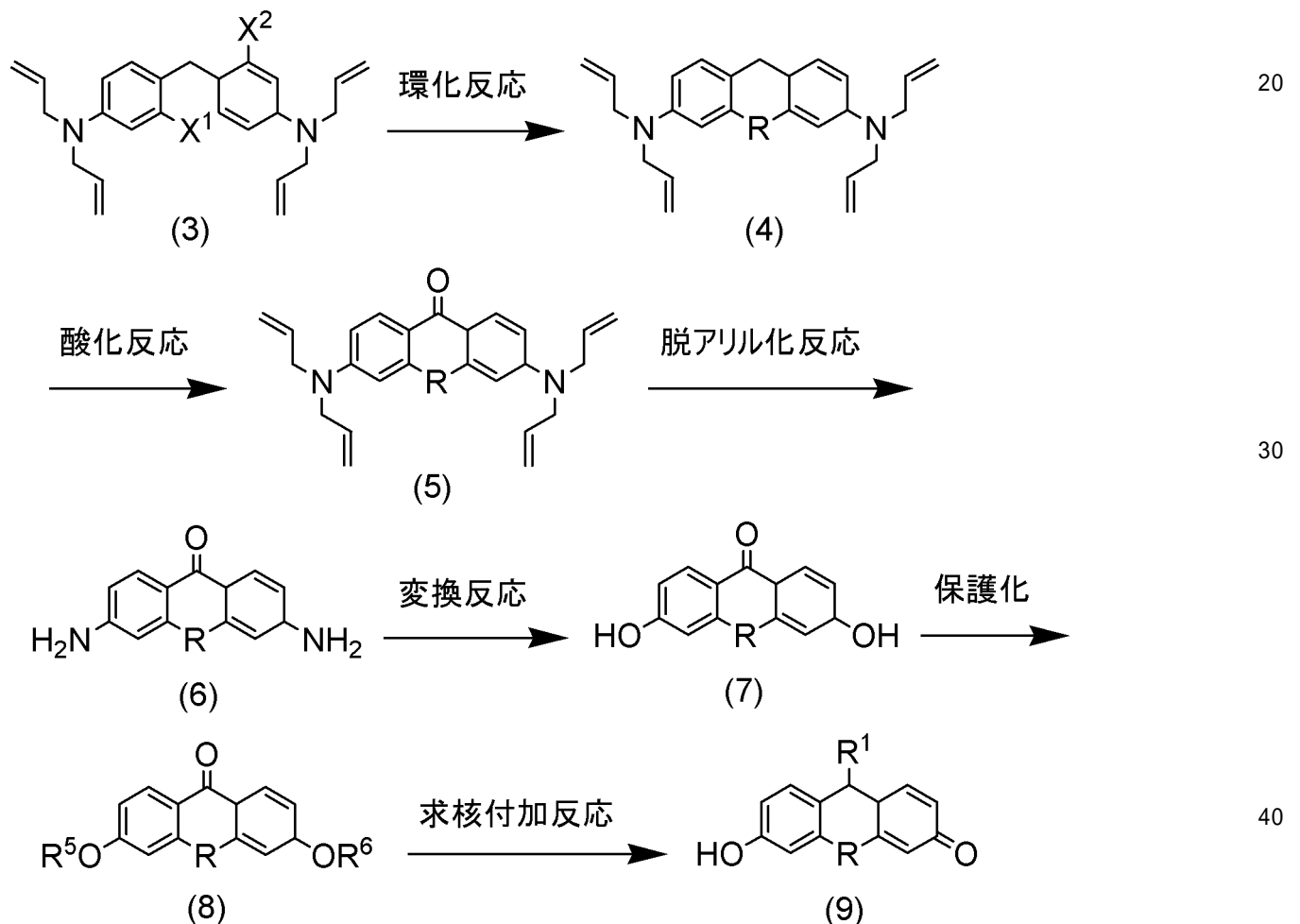
本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物は、特に制限されず、例えば、ケイ素置換フルオレセイン化合物の製造方法について報告されている既報(Chem. Commun. 2011, 47, 4162.)の方法に準じて(原料化合物を変更すること以外は同様に)合成することが可能である。

【0075】

具体的には、以下の反応式1:

【0076】

【化8】



【0077】

[式中、R及びR¹は前記に同じである。R⁵及びR⁶は同一又は異なって、保護基を示す。X¹及びX²は同一又は異なって、ハロゲン原子を示す。]にしたがって合成することができる。

【0078】

反応式1において、R⁵及びR⁶で示される保護基は、水酸基を保護することができる基であれば特に制限されず、どのようなものでも使用できるが、例えば、アルカノイル基(ホ

10

20

30

40

50

ルミル基、アセチル基、プロピオニル等の炭素数1~4のアルカノイル基)、置換されていてもよいアラキル基(ベンジル基、p-メトキシベンジル基、p-ニトロベンジル基等)、シリル基(トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基等)、アルコキシアルキル基(メトキシメチル基等)、テトラヒドロピラニル(THP)基等が挙げられる。本発明では、水酸基の保護及び求核付加反応の進行のしやすさの観点から、シリル基が好ましく、t-ブチルジメチルシリル基等がより好ましい。

【0079】

反応式1において、 X^1 及び X^2 で示されるハロゲン原子は、フッ素原子、塩素原子、臭素原子及びヨウ素原子をいずれも採用できるが、環化反応の進行のしやすさの観点から、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が好ましく、臭素原子がより好ましい。

10

【0080】

(2-1) 環化反応

本工程では、例えば、Rとして一般式(1A)で表される基を有する化合物を得ようとする場合は、原料としてケイ素化合物を用いる代わりに特定のリン化合物及び過酸化水素を用いること以外は、既報(Chem. Commun. 2011, 47, 4162.)と同様に行うことができる。具体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物(3)と、有機リチウム化合物とを反応させた後に、有機リン化合物を添加し、次いで、過酸化水素水を添加することにより、所望の環化反応を進行させることができる。Rとして一般式(1B)又は(1C)で表される基を有する化合物を得ようとする場合は、過酸化水素水の代わりに得ようとする置換基に応じて所望の原料化合物を使用することが好ましい。

20

【0081】

なお、上記反応式1における化合物(3)は、公知又は市販の化合物を用いることもでき、合成することもできる。合成する場合は、3-ハロゲン化アニリンとアリルハライドとを反応させ得られる3-ハロゲン化-N,N-ジアリルアニリンとホルムアルデヒドとを反応させることで合成することができる。

【0082】

有機リチウム化合物としては、特に制限はなく、公知のものが採用でき、例えば、エチルリチウム、n-プロピルリチウム、イソプロピルリチウム、n-ブチルリチウム、s-ブチルリチウム、t-ブチルリチウム、ペンチルリチウム、ヘキシルリチウム等のアルキルリチウム；シクロヘキシルリチウム等のシクロアルキルリチウム；フェニルリチウム等のアリールリチウム等が挙げられる。これらのうち、本工程では、収率の観点から、アルキルリチウムが好ましく、n-ブチルリチウムがより好ましい。

30

【0083】

有機リン化合物としては、本工程でRで表される基を有する化合物が得られれば特に制限はなく、公知のものが採用でき、例えば、ジクロロフェニルホスフィン、ジプロモフェニルホスフィン等のジハロゲン化アリールホスフィン等を使用することができる。

【0084】

上記有機リチウム化合物、有機リン化合物及び過酸化水素の使用量は、特に制限はなく、収率等の観点から、化合物(3)1モルに対して、有機リチウム化合物を1~20モル(特に2~10モル)、有機リン化合物を0.1~10モル(特に0.5~5モル)使用することが好ましい。また、過酸化水素は水溶液を過剰量用いることが好ましい。

40

【0085】

本工程において使用され得る有機溶媒としては、公知のものを採用することができ、本工程では、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテル類が好ましい。また、反応条件は、反応が十分に進行する程度が好ましく、例えば、-150~0、特に-100~-50において5分~12時間、特に10分~6時間とすることができる。

【0086】

(2-2) 酸化反応

本工程では、既報(Chem. Commun. 2011, 47, 4162.)と同様に行うことができる。具体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物(4)に対して、酸化剤を用いて酸

50

化反応を引き起こすことができる。

【0087】

酸化剤としては、特に制限はなく、過マンガン酸塩（過マンガン酸カリウム等）等を使用することができる。

【0088】

上記酸化剤の使用量は、特に制限はなく、収率等の観点から、化合物（4）1モルに対して、1~10モル（特に2~5モル）使用することが好ましい。

【0089】

本工程において使用され得る有機溶媒としては、公知のものを採用すればよく、本工程では、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテル類が好ましい。なお、上記環化工程と同じ溶媒を使用することができる。また、反応条件は、反応が十分に進行する程度とすることができ、例えば、-50~100、特に0~50において1~48時間、特に2~24時間とすることができる。

10

【0090】

（2-3）脱アリル化反応

本工程では、既報（Chem. Commun. 2011, 47, 4162.）と同様に行うことができる。具体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物（6）に対して、パラジウム触媒（テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム等）の存在下で、1,3-ジメチルバルビツール酸等を用いて、脱アリル化反応を引き起こすことができる。

【0091】

上記パラジウム触媒及び1,3-ジメチルバルビツール酸の使用量は、特に制限はなく、収率等の観点から、化合物（5）1モルに対して、パラジウム触媒を0.1~1モル（特に0.2~0.5モル）、1,3-ジメチルバルビツール酸を2~50モル（特に5~30モル）使用することが好ましい。

20

【0092】

本工程において使用され得る有機溶媒としては、公知のものを採用すればよく、本工程では、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテル類が好ましい。なお、上記環化工程と同じ溶媒を使用することができる。また、反応条件は、反応が十分に進行する程度とすることができ、例えば、0~150、特に50~100において1~96時間、特に2~72時間とすることができる。

30

【0093】

（2-4）変換反応

本工程では、既報（Chem. Commun. 2011, 47, 4162.）と同様に行うことができる。具体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物（6）に対して、亜硝酸又はその塩を用いて、水酸基への変換反応を引き起こすことができる。

【0094】

亜硝酸又はその塩としては、亜硝酸のほか、亜硝酸塩（亜硝酸ナトリウム）等を採用できる。

【0095】

上記亜硝酸又はその塩の使用量は、特に制限はないが、収率等の観点から、化合物（6）1モルに対して、1~10モル（特に2~5モル）使用することが好ましい。

40

【0096】

本工程において使用され得る有機溶媒としては、公知のものを採用でき、本工程では、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテル類が好ましい。なお、上記環化工程と同じ溶媒を使用することができる。また、反応条件は、反応が十分に進行する程度とすることができ、例えば、50~200、特に100~150において5分~5時間、特に10分~2時間とすることができる。

【0097】

（2-5）保護化

本工程では、既報（Chem. Commun. 2011, 47, 4162.）と同様に行うことができる。具

50

体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物(7)に対して、公知の方法で保護化することができる。保護化の方法及び条件は、従来公知の方法及び条件をいずれも採用することができる。

【0098】

(2-6) 求核付加反応

本工程では、具体的には、有機溶媒中で、上記反応式1における化合物(7)とグリニャール試薬とを反応させ、次いで、酸化剤を用いて酸化反応を起こすことで、求核付加反応を引き起こすことができる。

【0099】

グリニャール試薬としては、本発明の化合物において所望のR¹を導入できるものが好ましく、R¹MgX³ (R¹は前記に同じである。X³はハロゲン原子を示す。) で表される有機マグネシウム化合物が好ましい。

10

【0100】

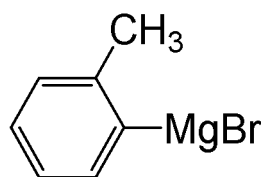
X³で示されるハロゲン原子としては、上記したものを採用できる。好ましい具体例も同様である。

【0101】

このような条件を満たすグリニャール試薬としては、例えば、

【0102】

【化9】



20

【0103】

等が挙げられる。

【0104】

酸化剤としては、特に制限はなく、塩化水素(塩酸)等を使用することができる。

【0105】

上記グリニャール試薬及び酸化剤の使用量は、特に制限はなく、収率等の観点から、化合物(5)1モルに対して、グリニャール試薬を1~10モル(特に2~5モル)使用することが好ましい。また、酸化剤は水溶液として過剰量使用することが好ましい。

30

【0106】

本工程において使用され得る有機溶媒としては、公知のものを採用でき、本工程では、例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の環状エーテル類が好ましい。なお、上記環化工程と同じ溶媒を使用することができる。また、反応条件は、反応が十分に進行する程度とすることができ、例えば、-50~100、特に0~50において30分~10時間、特に1~5時間とすることができる。

【0107】

このようにして、一般式(1)で表されるホスファフルオレセイン化合物を得ることができ、必要に応じて通常の単離及び精製工程を経て使用することもできる。この一般式(1)で表されるホスファフルオレセイン化合物は、酸性条件下(例えばpH1~5)では中性型化合物であるが、中性条件下又はアルカリ性条件化(例えばpH6~14)とすることで、容易に一般式(2)で表されるアニオンを有する塩に変換し、必要に応じて通常の単離及び精製工程を経て使用することもできる。これにより、吸収極大波長をより長波長シフトして600~700nm(特に600~650nm程度)の範囲とするとともに、蛍光極大波長をさらに長波長シフトさせ(650~700nm程度、特に655~670nm程度)、蛍光量子収率をさらに向上させる(0.25~0.60程度、特に0.35~0.50)ことも可能である。

40

【0108】

なお、上記では、本発明のホスファフルオレセイン化合物の一態様の合成方法の一例に

50

ついて記載したが、この製造方法に限定されることはなく、様々な合成方法で合成することができる。また、他のホスファフルオレセイン化合物についても同様の方法により合成することができる。

【0109】

3. 蛍光色素及び細胞検出剤

本発明の蛍光色素は、上記の本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩を含有する。

【0110】

本発明の蛍光色素は、フルオレセインのキサンテン環部位の10位の酸素原子をリン原子に置換したため、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、生理的条件下でも十分に高い蛍光量子収率が得られる。特に、実施例における吸収極大波長627 nmは、レーザー顕微鏡が通常備わっているHeNeレーザーの励起波長633 nmとほぼ一致していることから、蛍光色素としての励起効率が極めて高い。特に、本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、細胞内への透過性が高いとともに、R¹として所望の置換基を導入すれば、生体内で所望の細胞（例えばHeLa細胞等の癌細胞）中に選択的に局在させることができる。つまり、所望の細胞（例えばHeLa細胞等の癌細胞）のみを発光させることも可能である。特に、本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、この領域に極大波長を有する従来の蛍光色素にはなかった高い蛍光量子収率を有することから、所望の細胞（例えばHeLa細胞等の癌細胞）のバイオイメージングをやすくすることができるとともに、バイオイメージングに必要な蛍光色素濃度を低く抑えることができ、生体へのダメージを大幅に低減することができる。さらに、本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩は、リン置換基の電子的効果によりHOMO準位を低減させることができ、光に対する安定性を飛躍的に向上させることができるため、生体深部の観測を長時間にわたって行うことが可能である。

【0111】

本発明の細胞検出剤（特にHeLa細胞等の癌細胞検出剤）は、本発明のホスファフルオレセイン化合物又はその塩を含有しているが、有機溶媒中に溶解させて溶液とすることが好ましく、より所望の細胞（例えばHeLa細胞等の癌細胞）を検出し、より場所選択的に所望の細胞（例えばHeLa細胞等の癌細胞）を染色（リアルタイムで視覚化）する観点から、本発明のホスファフルオレセイン化合物の含有量は、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/Lが好ましく、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/Lがより好ましい。このように、本発明では、従来の蛍光色素と比較し、ホスファフルオレセイン化合物の含有量を低く抑えることができる。

【0112】

本発明の蛍光色素（ホスファフルオレセイン化合物）を、本発明の細胞検出剤を含有する溶液とする場合、使用し得る有機溶媒としては、特に制限はなく、極性溶媒及び非極性溶媒のいずれも使用できる。

【0113】

極性溶媒としては、例えば、エーテル化合物（テトラヒドロフラン、アニソール、1,4-ジオキサン、シクロペンチルメチルエーテル等）、アルコール（メタノール、エタノール、アリルアルコール等）、エステル化合物（酢酸エチル等）、ケトン（アセトン等）、ハロゲン化炭化水素（ジクロロメタン、クロロホルム）、ジメチルスルホキシド、アミド系溶媒（N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N-メチルピロリドン等）等が挙げられる。

【0114】

非極性溶媒としては、例えば、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン等の脂肪族有機溶媒；ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族溶媒等が挙げられる。

【0115】

本発明の細胞検出剤は、上記のとおり、溶液の形態が好ましいが、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600~700 nmに有しつつも、生理的条件下でもより十分に高い蛍光量子収率

10

20

30

40

50

としつつ、細胞中に投入する観点から、pHは5~11程度が好ましく、6.5~7.5程度がより好ましい。本発明の細胞検出剤のpHを調整するために、緩衝剤（ヘプス緩衝剤、トリス緩衝剤、トリシン-水酸化ナトリウム緩衝剤、リン酸系緩衝剤、リン酸緩衝生理食塩水等）等を使用してもよい。

【実施例】

【0116】

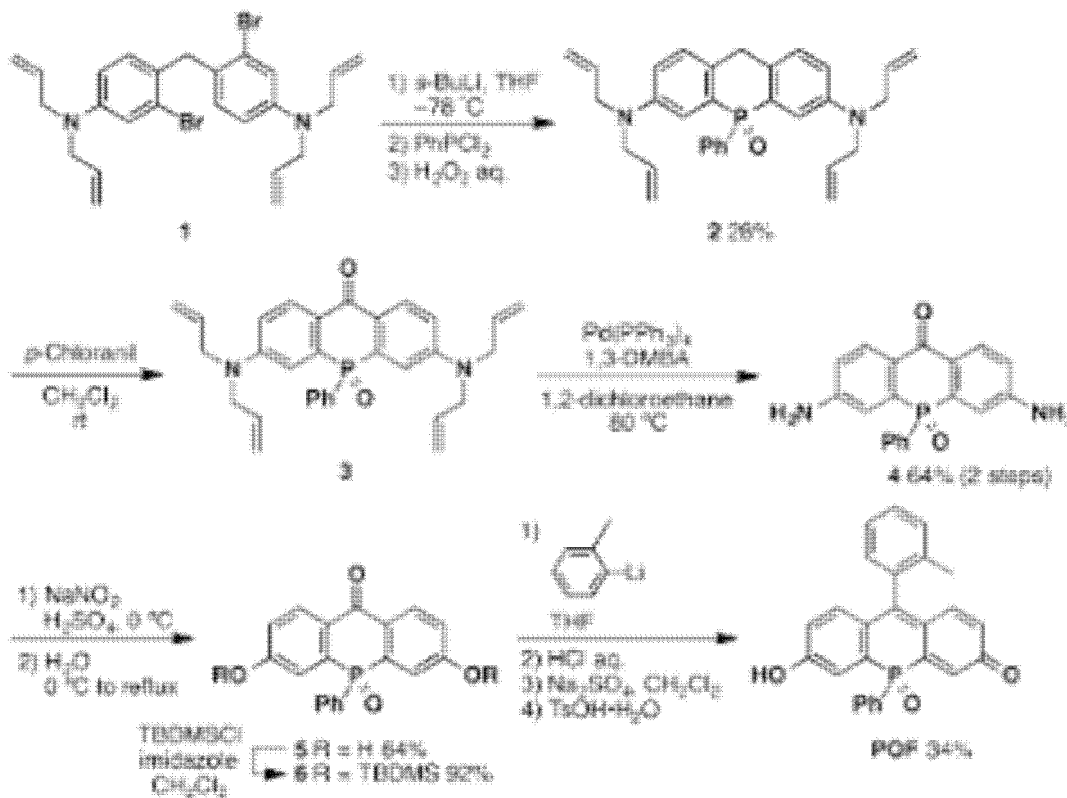
実施例に基づいて、本発明を具体的に説明するが、本発明は、これらだけに限定されるものではない。

【0117】

[実施例1]

【0118】

【化10】



【0119】

一般操作

融点 (mp) 又は分解温度は、Yanaco MP-S3 instrument (MP-S3) で測定した。 ^1H 、 ^{13}C (^1H) 及び ^{31}P (^1H) NMRスペクトルは、JEOL AL-400 spectrometer (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C 及び 161.70 MHz for ^{31}P)、JEOL JNM-ECS400 (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C 及び 161.70 MHz for ^{31}P)、又は JEOL A-600 spectrometer (600 MHz for ^1H 及び 150 MHz for ^{13}C) を用いて、 CDCl_3 、 CD_2Cl_2 又は CD_3OD 中で測定した。 ^1H NMRスペクトルのケミカルシフトは、内部標準として溶媒の残留プロトンを用いて ppm で表記し (CHCl_3 7.26、 CH_2Cl_2 5.32、 CD_3OD 3.31)、 ^{13}C NMRスペクトルのケミカルシフトは、内部標準としての溶媒のシグナルを用いて ppm で表記した (CDCl_3 77.16、 CD_2Cl_2 53.84、 CD_3OD 49.0)。また、 ^{31}P NMRスペクトルのケミカルシフト値は H_3PO_4 のシグナル (0.00) を外部標準として用いた。マススペクトルは、Bruker micrOTOF Focus spectrometry system を用いて、大気圧化学イオン化法 (APCI) 又は Thermo Fisher Scientific Exactive を用いて、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) で測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) はシリカゲル 60 F_{254} (Merck) を塗布したガラス板を用いて行った。カラムクロマトグラフィーは、中性シリカゲル PSQ100B (富士シリシア化学) 又はシリカゲル 60 (関東化学) を用いて行った。分取リサイクル HPLC は、逆相カラム (YMC-Actus Triart C18) を備えた

YMC LC-forte/Rを用いて行った。特に記述のない限り、全ての反応は窒素雰囲気下でおこなった。特に断りのない限り、溶媒及び試薬は市販品を精製せずに使用した。脱水THF及びCH₂Cl₂は、関東化学から購入し、Glass Contour Solvent Systemsで精製した。ビス(2-プロモ-4-N,N-ジアリルアミノフェニル)メタン(化合物1)及びTokyoMagentaは既報(Chem. Commun., 2011, 47, 4162-4164.)に従って合成し、TokyoGreenは既報(J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 4888-4894.)にしたがって合成した。

【0120】

化合物2の合成

ビス[2-プロモ-4-(N,N-ジアリルアミノ)フェニル]メタン(化合物1)(1.01 g, 1.96 mmol)を脱水THF(20 mL)に溶解させた。-78℃にてt-ブチルリチウムのペンタン溶液(1.63 M, 4.80 mL, 7.82 mmol)を20分間かけて滴下し、そのまま1時間攪拌した。ジクロロフェニルホスフィン(PhPCl₂; 0.318 mL, 2.34 mmol)を25分間かけて滴下し、滴下終了から1.5時間後に0℃で30% H₂O₂溶液(1.0 mL)を加え、そのまま1時間攪拌した。反応混合物に次亜塩素酸ナトリウム水溶液と飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加えた後、CH₂Cl₂で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂/メタノール 20/1, R_f = 0.4)で精製することにより、化合物2を黄色液体として761 mg(1.58 mmol, 収率81%)得た。化合物2のスペクトルデータは以下のとおりである。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 7.47-7.42 (m, 4H), 7.39-7.31 (m, 3H), 7.18 (dd, J = 8.2 Hz, 6.2 Hz, 2H), 6.80 (bs, 2H), 5.89-5.80 (m, 4H) 5.18-5.13 (m, 8H), 4.03-3.90 (m, 8H), 3.84 (d, J = 18Hz, 1H), 3.66 (d, J = 18 Hz, 3.6 Hz, 1H). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃): 147.5 (d, J_{CP} = 13.3 Hz, C), 134.7 (d, J_{CP} = 104.1 Hz, C), 133.7 (s, CH), 131.1 (d, J_{CP} = 2.5 Hz, CH), 130.9 (d, J_{CP} = 9.9 Hz, CH), 129.8 (d, J_{CP} = 100.1 Hz, C), 129.3 (d, J_{CP} = 8.3 Hz, C), 129.0 (d, J_{CP} = 11.5 Hz, CH), 128.4 (d, J_{CP} = 12.4 Hz, CH), 116.4 (s, CH₂), 115.8 (s, CH), 114.2 (d, J_{CP} = 8.2 Hz, CH), 52.9 (s, CH₂), 35.3 (d, J_{CP} = 9.1 Hz, CH₂). ³¹P{¹H} NMR (161.70MHz, CDCl₃): 14.33. HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₁H₃₃N₂NaOP: 503.2228 ([M+Na]⁺); found. 503.2224.

【0121】

その他、以下の方法でも化合物2を得た。ビス[2-プロモ-4-(N,N-ジアリルアミノ)フェニル]メタン(化合物1)(0.978 g, 1.89 mmol)の脱水THF(9 mL)溶液に対して、-78℃にてs-ブチルリチウムのシクロヘキサン及びヘキサン溶液(0.99 M, 4.00 mL, 3.96 mmol)を5分間かけて滴下した。1時間攪拌した後、ジクロロフェニルホスフィン(PhPCl₂; 0.290 mL, 0.383 g, 2.14 mmol)を10分間かけて滴下した。同じ温度で3時間攪拌した後、溶液を0℃まで昇温し、30% H₂O₂溶液(1.0 mL)を加えた。混合物を1時間攪拌し、亜硫酸ナトリウム水溶液でクエンチした。その後、得られた溶液を酢酸エチル(AcOEt)で抽出した。合わせた有機層を食塩水で洗浄し、脱水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。揮発物質を減圧下に除去し、得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂/メタノール 20/1, R_f = 0.4)で精製することにより、化合物2を黄色液体として0.257 g(0.525 mmol, 収率28%)得た。

【0122】

化合物3及び化合物4の合成

空气中で化合物2(761 mg, 1.58 mmol)をCH₂Cl₂(16 mL)に溶解させた。室温でクロラニル(1.19 g, 4.84 mmol)を加え、そのまま12.5時間攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂/メタノール 20/1, R_f = 0.44)で精製することにより、化合物3を黄色液体として304 mg(0.61 mmol, 収率39%)得た。化合物3のスペクトルデータは以下のとおりである。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.27 (dd, J = 9.0 Hz, 6.2 Hz, 2H), 7.59-7.54 (m, 2H), 7.39-7.32 (m, 3H), 7.14 (dd, J = 15 Hz, 2.6 Hz, 2H), 6.86 (dd, J = 9.0 Hz, 2.6 Hz

z, 2H), 5.82-5.74 (m, 4H), 5.15-5.09 (m, 8H), 4.08-3.93 (m, 8H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CDCl_3): 6.84. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NaN}_2\text{O}_2\text{P}$: 517.2021 ([M+Na] $^+$); found. 517.2013.

【0123】

トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$; 50.4 mg, 0.055 mmol)、1,4-ビス(ジフェニルホスフィノ)ブタン (464 mg, 1.08 mmol) を脱気した脱水1,2-ジクロロエタン (1.0 mL) に溶解させ、室温で1時間攪拌した。得られた溶液を、脱気した脱水1,2-ジクロロエタン (0.4 mL) に化合物3 (71.0 mg, 0.144 mmol) と1,3-ジメチルバルビツール酸 (265 mg, 1.70 mmol) を溶解させた溶液に対して加え、80 °C で2日間攪拌したのち、 CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / メタノール 10 / 1, $R_f = 0.35$) で精製することにより、化合物4を黄色固体として31 mg (0.0927 mmol, 収率65%) 得た。化合物4のスペクトルデータは以下のとおりである。

Mp: 151 °C. ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 8.15 (dd, $J = 8.8$ Hz, 6.0 Hz, 2H), 7.60-7.42 (m, 5H), 6.99 (dd, $J = 14.8$ Hz, 2.2 Hz, 2H), 6.91 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2.2 Hz, 2H). The signal corresponding to NH_2 moiety was not observed. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100MHz, CD_3OD): 181.38 (d, $J_{\text{CP}} = 9.0$ Hz, C), 154.84 (d, $J_{\text{CP}} = 13.3$ Hz, C), 135.14 (d, $J_{\text{CP}} = 97.6$ Hz, C), 134.49 (d, $J_{\text{CP}} = 108.3$ Hz, C), 133.29 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 132.59 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 131.64 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 129.94 (d, $J_{\text{CP}} = 13.3$ Hz, CH), 125.7 (d, $J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, C), 118.57 (CH), 115.25 (d, $J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, CH). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CD_3OD): 7.83. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$: 335.0944 ([M+H] $^+$); found. 335.0947.

【0124】

その他、以下の方法でも化合物3及び4を得た。化合物2 (5.37 g, 11.2 mmol) の CH_2Cl_2 (112 mL) 溶液に対して、空気中でクロラニル (8.26 g, 33.6 mmol) を加えた。混合物を3時間攪拌し、亜硫酸ナトリウム水溶液でクエンチした。その後、得られた溶液を CH_2Cl_2 で抽出した。合わせた有機層を食塩水で洗浄し、脱水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。揮発物質を減圧下に除去し、得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / メタノール 20 / 1, $R_f = 0.4$) で精製することにより、化合物3を黄色固体として得た。単離できない不純物も存在したが、そのまま次の工程に使用した。

【0125】

化合物3 (4.39 g) の脱気した1,2-ジクロロエタン (370 mL) 溶液に、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$; 1.34 g, 1.16 mmol)、及び1,3-ジメチルバルビツール酸 (6.39 g, 40.9 mmol) を添加した。混合物を80 °C で24時間攪拌した。反応を進行するため、得られた混合物に、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.34 g, 1.16 mmol)、及び1,3-ジメチルバルビツール酸 (6.39 g, 40.9 mmol) をさらに添加した。80 °C でさらに23時間攪拌した後、全ての揮発物質を減圧下に除去した。得られた橙色固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 / メタノール 10 / 1, $R_f = 0.30$) で精製することにより、化合物4を黄色固体として2.39 g (7.15 mmol, 収率64%) 得た。

【0126】

化合物5の合成

空気中で化合物4 (52.0 mg, 0.156 mmol) を96%硫酸 (0.46 mL) に溶解させた。0 °C で NaNO_2 (33.0 mg, 0.478 mmol) を加え、そのまま3時間攪拌した。得られた反応溶液を適量の氷に対して滴下し、110 °C で0.5時間攪拌した。得られた固体を濾別し、残渣を蒸留水で洗浄し粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 / メタノール 10 / 1, $R_f = 0.25$) で精製することにより、化合物5を黄色固体として28.0 mg (0.832 mmol, 収率54%) 得た。化合物5のスペクトルデータは以下のとおりである。

^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 8.33 (dd, $J = 8.8$ Hz, 6.0 Hz, 2H), 7.59-7.45 (m, 5H), 7.21 (dd, $J = 14.2$ Hz, 2.4 Hz, 2H), 7.16 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2.4 Hz, 2H). The signa

l corresponding to the OH moiety was not observed. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100MHz, CD_3OD): 181.48 (d, $J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, C), 163.96 (d, $J_{\text{CP}} = 13.2$ Hz, C), 135.58 (d, $J_{\text{CP}} = 9.7.5$ Hz, C), 133.68 (d, $J_{\text{CP}} = 3.3$ Hz, CH), 133.64 (d, $J_{\text{CP}} = 109.9$ Hz, C), 133.32 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 131.69 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 130.20 (d, $J_{\text{CP}} = 12.3$ Hz, CH), 129.07 (d, $J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, C), 121.56 (d, $J_{\text{CP}} = 1.6$ Hz, CH), 117.60 (d, $J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, CH). $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CD_3OD): 6.44. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{P}$: 337.0624 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 337.0640.

【 0 1 2 7 】

その他、以下の方法でも化合物5を得た。空气中で化合物4 (247 mg, 0.739 mmol) の96%硫酸 (2.5 mL) 溶液に対して、 NaNO_2 (171 mg, 2.48 mmol) を空气中、0 で添加した。3時間攪拌した後、混合物をゆっくりと氷に滴下し、110 で0.5時間攪拌した。得られた沈殿をろ過して集め、蒸留水で洗浄し、メタノール中に分散させた。得られた暗褐色の沈殿をろ過し、ろ液を減圧下に濃縮することにより、化合物5を黄色固体として158 mg (0.470 mmol, 収率64%) 得た。

10

【 0 1 2 8 】

化合物6の合成

化合物5 (195 mg, 0.580 mmol) とイミダゾール (197 mg, 2.89 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 (50 mL) に溶解させ、15分間攪拌した。t-ブチルククロジメチルシラン (505 mg, 3.35 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 (35 mL) に溶解させたものを、化合物5を含む溶液に対して滴下した。3時間攪拌した後、水を加え、 CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / 酢酸エチル 30 / 1, $R_f = 0.53$) で精製することにより、化合物6を無色液体として265 mg (0.469 mmol, 収率81%) 得た。化合物6のスペクトルデータは以下のとおりである。

20

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.36 (dd, $J = 8.7$ Hz, 5.8 Hz, 2H), 7.59-7.53 (m, 2H), 7.46-7.36 (m, 5H), 7.10 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.4 Hz, 2H), 0.95 (s, 18H), 0.21 (s, 6H), 0.20 (s, 6H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100MHz, CDCl_3): 181.08 (d, $J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, C), 160.57 (d, $J_{\text{CP}} = 14.1$ Hz, C), 135.55 (d, $J_{\text{CP}} = 95.9$ Hz, C), 133.60 (d, $J_{\text{CP}} = 107.4$ Hz, C), 132.08 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 131.99 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 130.78 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 129.64 (d, $J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, C), 128.87 (d, $J_{\text{CP}} = 12.3$ Hz, CH), 124.34 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 121.91 (d, $J_{\text{CP}} = 6.6$ Hz, CH), 25.69 (s, CH_3), 18.35 (s, C), -4.20 (s, CH_3), -4.30 (s, CH_3). $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70 MHz, CDCl_3): 4.50. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NaO}_4\text{PSi}_2$: 587.2179 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 587.2167.

30

【 0 1 2 9 】

その他、以下の方法でも化合物6を得た。化合物5 (229 mg, 0.680 mmol) とイミダゾール (232 mg, 3.40 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (25 mL) 溶液に対して、t-ブチルククロジメチルシラン (512 mg, 3.40 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (7 mL) 溶液を添加した。3時間攪拌した後、水を加え、2層を分離した。水層を CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を脱水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。揮発物質を減圧下に除去した後、得られた混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / 酢酸エチル 30 / 1, $R_f = 0.53$) で精製することにより、化合物6を無色液体として354 mg (0.627 mmol, 収率92%) 得た。

40

【 0 1 3 0 】

化合物POFの合成

化合物6 (230 mg, 0.407 mmol) を脱水THF (70 mL) に溶解させた。室温にて2-メチルフェニルマグネシウムプロミドのTHF溶液 (1.03 M, 1.43 mL, 1.47 mmol) を滴下し、4時間攪拌した。1N HCl水溶液 (50 mL) を加え、2時間攪拌し、反応混合物を CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 / メタノール 5 / 1 (TEA 10%), $R_f = 0.48$) にて

50

分離した後、HPLCで精製することにより、55 mgの青色固体を得た。得られた固体をトルエンに溶解させ分液漏斗にいれ、1N HCl水溶液を加えて分液漏斗を振った。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで化合物POFを赤色固体として30 mg (0.0730 mmol, 収率18%) で得た。化合物POFのスペクトルデータは以下のとおりである。

Mp. > 300 . ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.76-7.36 (m, 8H), 7.27-7.13 (m, 3H), 7.03-6.94 (m, 2H), 6.58 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 2.12 and 2.06 (two signals, 3H, tolyl-methyl group signals from two diastereoisomers). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 140.0 (CH), 140.0 (CH), 138.3 (C), 138.2 (C), 137.9 (C), 137.7 (C), 137.6 (C), 137.3 (C), 137.2 (C), 137.1 (C), 134.1 (CH), 131.6 (CH), 131.6 (CH), 131.5 (CH), 131.4 (CH), 130.8 (CH), 130.5 (CH), 130.4 (CH), 130.4 (CH), 130.3 (CH), 129.9 (CH), 129.1 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (CH), 125.9 (C), 125.8 (C), 125.7 (C), 125.3 (CH), 19.7 (CH_3), 19.6 (CH_3). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70 MHz, CDCl_3): 11.1, 11.0. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{NaO}_3\text{P}$: 433.0970 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 433.0960.

【0131】

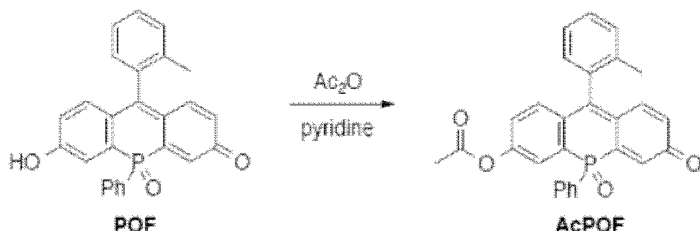
その他、以下の方法でも化合物POFを得た。2-プロモトルエン (89 μL , 0.74 mmol) の脱水THF (3 mL) 溶液に対して、*s*-BuLiのシクロヘキサン及びヘキサン溶液 (0.99 M, 0.90 mL, 0.89 mmol) を-78 で添加した。混合物を-78 で2時間攪拌し、化合物6 (139 mg, 0.246 mmol) の脱水THF (3 mL) 溶液をゆっくりと添加した。室温まで昇温させ、反応混合物を1.5時間攪拌した。その後、0.5 M塩酸 (20 mL) を添加して反応をクエンチした。45分間激しく攪拌した後、混合物を水及び CH_2Cl_2 で希釈した。層を分離し、水層を CH_2Cl_2 で5回抽出した。あわせた有機層を食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。ろ過した後、揮発物質を減圧下に除去し、得られた混合物を CH_2Cl_2 (10 mL) に分散させた。得られた黄色液体に対して、*p*-トルエンスルホン酸・一水和物 (47 mg, 0.25 mmol) を添加し、得られた混合物を室温で45分間攪拌し、脱ヒドロキシ化を完了した。得られた深赤色溶液を直接シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / 酢酸エチル 95 / 5) で精製した。溶離液を減圧下に除去した後、トルエンの添加と同時に凝固した赤色液体を得た。得られた懸濁液を0 まで冷却し、得られた沈殿をろ過により集め、真空下に乾燥し、粗生成物を朱色固体として得た。その後、逆相HPLC (溶離液: 炭酸アンモニウムを5 mMで含む $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 混合溶媒 (混合比20 / 80 ~ 100 / 0) で精製することにより、化合物POFを茶色粉末として34 mg (0.083 mmol, 収率34%) 得た。

【0132】

[実施例2]

【0133】

【化11】



【0134】

窒素雰囲気下、実施例1で得た化合物POF (37 mg, 0.090 mmol) を、5 mLの乾燥ピリジンに溶解させた。室温で無水酢酸 (85 μL , 0.90 mmol) を添加し、混合物を3時間攪拌した。減圧下に溶媒を除去し、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / 酢酸エチル 3 / 1 to 2 / 1) で精製し、その後さらに、 CH_2Cl_2 / ヘキサンからの再結晶により精製し、化合物AcPOFを黄色粉末として33 mg (0.073 mmol, 収率81%) 得た。化合物AcPOFのスペクトルデータは以下のとおりである。

Mp. 175-179 . ^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): 7.75-7.60 (m, 3H), 7.60-7.52 (m, 1H),

7.52-7.30 (m, 5H), 7.30-7.06 (m, 3H), 7.06-6.91 (m, 2H), 6.26 (dd, $J = 9.8, 1.8$ Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.13 and 2.08 (two singlets, 3H, tolyl-methyl group signals from two diastereoisomers). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_2Cl_2): 184.3 (s, C), 184.2 (s, C), 168.9 (s, C), 153.0 (d, $J_{\text{CP}} = 14.4$ Hz, C), 150.6 (d, $J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, C), 150.5 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, C), 140.7 (d, $J_{\text{CP}} = 90.5$ Hz, C), 140.33 (d, $J_{\text{CP}} = 90.5$ Hz, CH), 139.7 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 139.62 (d, $J_{\text{CP}} = 8.6$ Hz, CH), 137.2 (s, C), 137.2 (d, $J_{\text{CP}} = 4.4$ Hz, CH), 137.0 (d, $J_{\text{CP}} = 2.9$ Hz, CH), 136.5 (s, C), 136.4 (s, C), 136.4 (s, C), 135.0 (d, $J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, C), 134.9 (d, $J_{\text{CP}} = 5.7$ Hz, C), 134.3 (d, $J_{\text{CP}} = 11.6$ Hz, CH), 134.3 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 133.7 (d, $J_{\text{CP}} = 102.0$ Hz, C), 133.5 (d, $J_{\text{CP}} = 107.7$ Hz, C), 133.0 (d, $J_{\text{CP}} = 89.1$ Hz, C), 132.9 (s, CH), 131.0 (s, CH), 130.8 (d, $J_{\text{CP}} = 10.1$ Hz, CH), 130.8 (d, $J_{\text{CP}} = 11.4$ Hz, CH), 130.3 (s, CH), 129.62 (CH), 129.61 (CH), 129.51 (CH), 129.46 (CH), 129.42 (CH), 129.39 (CH), 129.38 (d, $J_{\text{CP}} = 8.6$ Hz, C), 129.2 (s, CH), 127.73 (d, $J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, C), 126.62 (s, CH), 126.59 (s, CH), 126.56 (s, CH), 125.94 (d, $J_{\text{CP}} = 5.7$ Hz, CH), 125.87 (d, $J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, CH), 21.2 (s, CH_3), 19.8 (s, CH_3). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): 5.8, 5.7. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{NaO}_4\text{P}$: 475.1075 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); found. 475.1066.

10

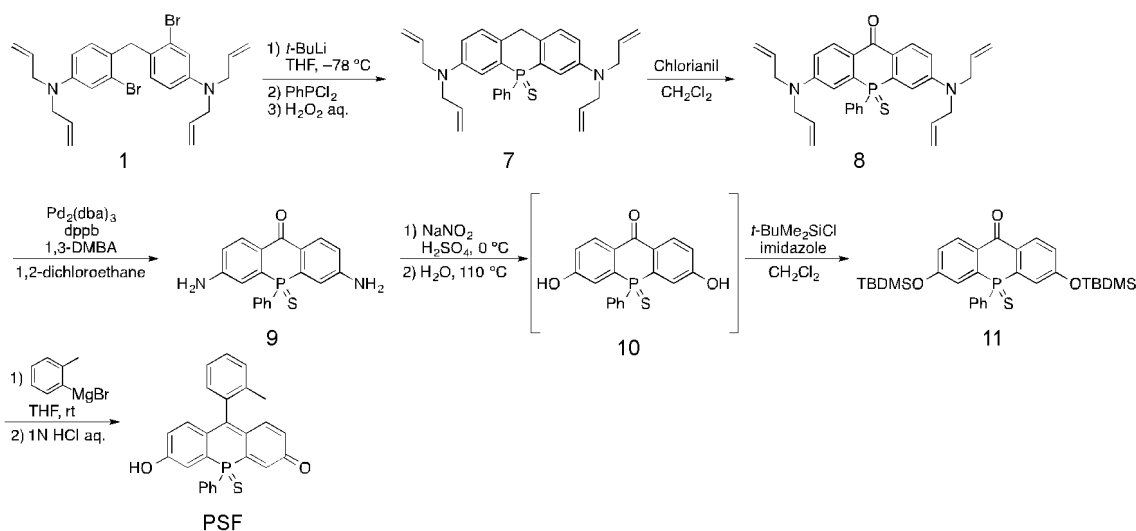
【 0 1 3 5 】

[実施例3]

【 0 1 3 6 】

20

【 化 1 2 】



30

【 0 1 3 7 】

化合物7の合成

ビス[2-プロモ-4-(N,N-ジアリルアミノ)フェニル]メタン (化合物1) (5.70 g, 11.0 mmol) を脱水THF (110 mL) に溶解させた。-78 °Cにてt-ブチルリチウムのペンタン溶液 (1.61 M, 27.0 mL, 43.5 mmol) を35分間かけて滴下し、そのまま2時間攪拌した。ジクロロフェニルホスフィン (PhPCl₂; 1.80 mL, 13.2 mmol) を90分間かけて滴下し、滴下終了後、終夜攪拌を行った。S₈ (705 mg) を加え、そのまま30分間攪拌した。反応溶媒を減圧化で濃縮し、得られた混合物をジクロロメタンで抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ / ヘキサン 1 / 1, R_f = 0.25) で精製することにより、化合物7を黄色液体として2.84 mg (5.72 mmol, 収率52%) で得た。化合物7のスペクトルデータは以下のとおりである。

40

^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2): 7.67 (dd, $J = 16.4$ Hz, 2.4 Hz, 2H), 7.36-7.29 (m, 5H), 7.17 (dd, $J = 8.2$ Hz, 6.4 Hz, 2H), 6.80 (dd, $J = 8.2$ Hz, 2.4 Hz, 2H), 5.94-5.

50

85 (m, 4H), 5.23-5.17 (m, 8H), 4.05-3.97 (m, 8H), 3.81 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 18$ Hz, 3.4 Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100MHz, CD_2Cl_2): 147.92 (d, $J_{\text{CP}} = 14.9$ Hz, C), 136.04 (d, $J_{\text{CP}} = 84.3$ Hz, C), 134.12 (s, CH), 131.01 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 130.62 (d, $J_{\text{CP}} = 11.5$ Hz, CH), 129.42 (d, $J_{\text{CP}} = 81.8$ Hz, C), 129.32 (d, $J_{\text{CP}} = 5.7$ Hz, C), 129.09 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 128.80 (d, $J_{\text{CP}} = 12.4$ Hz,), 116.50 (s, CH_2), 115.84 (d, $J_{\text{CP}} = 12.3$ Hz, CH), 115.66 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 53.44 (s, CH_2), 35.77 (d, $J_{\text{CP}} = 9.0$ Hz, CH_2). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CD_2Cl_2): 26.9. HRMS (APCI) : m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{PS}$: 497.2175 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; found. 497.2153.

【 0 1 3 8 】

化合物8の合成

空气中で化合物7 (2.79 g, 5.62 mmol) を CH_2Cl_2 (56 mL) に溶解させた。室温でクロラニル (6.22 g, 25.3 mmol) を加え、そのまま8.5時間攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (CH_2Cl_2 , $R_f = 0.45$) で精製することにより、化合物8を黄色液体として849 mg (1.66 mmol, 収率30%) 得た。化合物8のスペクトルデータは以下のとおりである。

^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2): 8.21 (dd, $J = 9.0$ Hz, 6.2 Hz, 2H), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 5H), 6.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 5.88-5.79 (m, 4H), 5.18-5.13 (m, 8H), 4.08-3.97 (m, 8H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100MHz, CD_2Cl_2): 179.73 (d, $J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, C), 151.94 (d, $J_{\text{CP}} = 14.1$ Hz, C), 136.31 (d, $J_{\text{CP}} = 83.5$ Hz, C), 135.35 (d, $J_{\text{CP}} = 80.9$, C), 132.71 (s, CH), 131.35 (d, $J_{\text{CP}} = 3.3$ Hz, CH), 131.20 (d, $J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, CH), 130.63 (d, $J_{\text{CP}} = 11.5$ Hz, CH), 128.78 (d, $J_{\text{CP}} = 12.4$ Hz, CH), 124.30 (d, $J_{\text{CP}} = 4.9$ Hz, C), 117.10 (s, CH_2), 115.27 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 114.03 (d, $J_{\text{CP}} = 12.4$ Hz, CH), 53.30 (s, CH_2). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CD_2Cl_2) : 18.9. HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{OPS}$: 510.1889 ($[\text{M}]^+$) ; found. 510.1870.

【 0 1 3 9 】

化合物9の合成

化合物8 (800 mg, 1.57 mmol)、1,3-ジメチルバルピツール酸 (1.14 g, 7.30 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$; 1.01 g, 0.874 mmol) を脱気した脱水1,2-ジクロロエタン (16.0 mL) に溶解させ、85 で3日間攪拌したのち、 CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (CH_2Cl_2 / メタノール 30 / 1, $R_f = 0.28$) で精製することにより、化合物9を黄色固体として312 mg (0.890 mmol, 収率57%) 得た。化合物9のスペクトルデータは以下のとおりである。

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 8.13 (dd, $J = 8.6$ Hz, 5.8 Hz, 2H), 7.65-7.60 (m, 2H), 7.43-7.34 (m, 2H), 7.19 (dd, $J = 17.2$ Hz, 2.2 Hz, 2H), 6.85 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2.2 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CD_3OD): 181.58 (d, $J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, C), 154.95 (d, $J_{\text{CP}} = 14.9$ Hz, C), 137.27 (d, $J_{\text{CP}} = 80.1$ Hz, C), 136.54 (d, $J_{\text{CP}} = 83.4$ Hz, C), 132.41 (d, $J_{\text{CP}} = 3.3$ Hz, CH), 132.25 (d, $J_{\text{CP}} = 9.9$ Hz, CH), 131.50 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH), 129.58 (d, $J_{\text{CP}} = 12.3$ Hz, CH), 124.84 (d, $J_{\text{CP}} = 4.9$ Hz, C), 117.90 (d, $J_{\text{CP}} = 2.5$ Hz, CH), 116.40 (d, $J_{\text{CP}} = 10.7$ Hz, CH). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70 MHz, CD_3OD): 16.35. HRMS (APCI) : m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OPS}$: 351.0715 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ; found. 351.0725.

【 0 1 4 0 】

化合物10及び11の合成

空气中で化合物9 (101 mg, 0.288 mmol) を硫酸 (0.83 mL) に溶解させた。0 で亜硝酸ナトリウム (60.0 mg, 0.869 mmol) を加え、そのまま3時間攪拌した。得られた反応液を適量の氷に対して滴下し、110 で30分間攪拌した。得られた固体を濾別し、残渣を

10

20

30

40

50

蒸留水で洗浄し、化合物10を含む粗生成物を黄色固体として87.0 mg得た。窒素雰囲気下で得られた組成物とイミダゾール (85.0 mg, 1.25 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 (21 mL) に溶解させ、30分間攪拌した。t-ブチルジメチルクロロシラン (TBDMSCl; 230 mg, 1.52 mmol) を脱水 CH_2Cl_2 (15 mL) に溶解させたものを、化合物10を含む溶液に対して滴下した。4時間攪拌した後、水を加え、 CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 / ヘキサン 3/2, $R_f = 0.53$) で精製することにより、化合物11を無色液体として98 mg (0.169 mmol, 収率59% (2段階)) 得た。化合物11のスペクトルデータは以下のとおりである

10

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.34 (dd, $J = 8.6$ Hz, 5.8 Hz, 2H), 7.63-7.53 (m, 4H), 7.39-7.30 (m, 3H), 7.086 (ddd, $J = 8.8$ Hz, 2.5 Hz, 0.60 Hz, 2H), 0.95 (s, 18H), 0.23 (s, 6H), 0.22 (s, 6H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.70MHz, CDCl_3): 17.1。

【0141】

化合物PSFの合成

化合物11 (78.0 mg, 0.134 mmol) を脱水THF (23 mL) に溶解させた。室温にて2-メチルフェニルマグネシウムブロミドのTHF溶液 (1.03 M, 0.50 mL, 0.515 mmol) を滴下し、4時間攪拌した。1N HCl水溶液 (16 mL) 加え、2時間攪拌し、反応混合物を CH_2Cl_2 で抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、脱水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 / メタノール 5/1 (トリエチルアミン10%), $R_f = 0.50$) にて分離した後、HPLCで精製することにより、28 mgの青色固体を得た。得られた固体をトルエンに溶解させ分液漏斗にいれ、1N HCl水溶液を加えて抽出した。あわせた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムを濾別し、濾液を減圧下で濃縮することで化合物PSFを赤紫色固体として18 mg (0.0422 mmol, 収率32%) で得た。化合物PSFのスペクトルデータは以下のとおりである。

20

^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2): 7.73-7.60 (m, 4H), 7.54-7.35 (m, 16H), 7.13 (dd, $J = 21$ Hz, 7.4 Hz, 2H), 6.97-6.91 (m, 4H), 6.56 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H), 2.10 (s, 3H), 1.99 (s, 3H). (2つの回転異性体の混合物) HRMS (APCI): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{PS}$: 427.0916 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); found. 427.0936。

30

【0142】

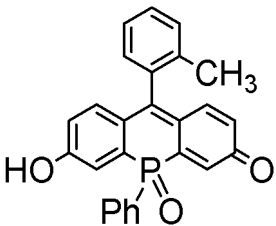
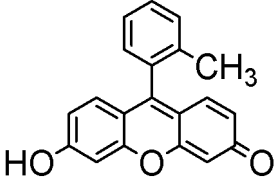
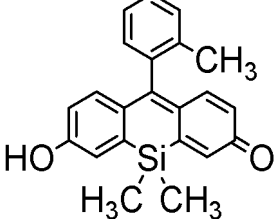
[試験例1: LUMO及びHOMO]

実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物 (10位がリン原子)、公知のフルオレセイン化合物 (10位が酸素原子; TokyoGreen; JACS, 2005, 127, 4888)、及び公知のケイ素置換フルオレセイン化合物 (10位がケイ素原子; TokyoMagenta; Chem. Commun. 2011, 47, 4162) について、Gaussian 09 プログラムを用いた構造最適化により、HOMO準位及びLUMO準位を算出した。計算は B3LYP/6-31+G レベルでおこなった。結果を表1に示す。この結果、従来の化合物と比較し、本発明のホスファフルオレセイン化合物は、LUMO及びHOMO (特にLUMO) を低減することができるとともに、エネルギーギャップも低減することができることが理解できる。このため、光に対する安定性がより向上することが期待される

40

【0143】

【表1】

	化合物	LUMO (eV)	HOMO (eV)	ギャップ (eV)
実施例1		0.20	-2.25	2.45
TokyoGreen		0.91	-1.93	2.84
TokyoMagenta		0.63	-1.90	2.53

10

20

【0144】

[試験例2: X線結晶構造解析]

実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物(10位がリン原子)について、Rigaku Single Crystal CCD X線解析装置(FR-X microfocus generator、VariMax-Mo 光学系、PILATUS 200K 検出器、Mo K 照射($\lambda = 0.71070$))を用いて行った。2 θ 角が50°以下の範囲で19043個の反射を計測し、そのうち4694個が独立した反射であった($R_{int} = 0.0195$)。構造は直接法(SIR-2003)によって決定し、 F^2 のフルマトリクス最小二乗法(SHELXL-2013)によって決定した。結晶データは、以下のとおりである。 $C_{26}H_{19}O_3P$; FW = 410.38, crystal size 0.30 × 0.30 × 0.10 mm³, monoclinic, C2/c, a = 16.295(13), b = 14.157(18), c = 18.637(17), $\beta = 104.42(2)^\circ$, V = 4164(7) Å³, Z = 8, $D_c = 1.309$ g cm⁻³, $\mu = 0.157$ mm⁻¹, $R_1 = 0.0402$ ($I > 2\sigma(I)$), $wR_2 = 0.1095$ (all data), GOF = 1.063. ケンブリッジ結晶構造データベース ID: CCDC 1435421. 結果を図1に示す。

30

【0145】

[試験例3: 光物理特性(その1)]

実施例1で得た化合物POFのUV-vis吸収スペクトルを、1%のDMSOを含有する緩衝水溶液(pH = 3~5.5: クエン酸及びNa₂HPO₄水溶液、pH = 6~8: Na₂HPO₄及びNaH₂PO₄水溶液、pH = 9~11: Na₂CO₃及びNaHCO₃水溶液)に10⁻⁵ M溶解させた試料溶液を用いて、Shimadzu UV-3150 spectrometerにより、解像度0.2 nmで測定した。蛍光スペクトルは、解像度1 nmのHitachi F-4500 spectrometerで、10⁻⁶ M溶解させた試料溶液を用いて測定した。励起スペクトルは、Hamamatsu PMA R5509-73及びcooling system C9940-01を備えたHoriba SPEX Fluorolog 3 spectrofluorometerで、10⁻⁶ M溶解させた試料溶液を用いて測定した。絶対蛍光量子収率は、Hamamatsu photonics PMA-11で測定した。

40

【0146】

例えば、pH3の緩衝水溶液を用いる場合、溶媒として、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させたのち、さらに、pHを3に調整したクエン酸水溶液及びNa₂HPO₄水溶液の混合水溶液で100倍に希釈し、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物を7.4 × 10⁻⁶ Mになるように溶解させた試験液を調製した(pH3の試験液)。

【0147】

50

また、pH7の緩衝水溶液を用いる場合、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させたのち、さらに、pHを7に調整した Na_2HPO_4 水溶液及び Na_2HPO_4 水溶液の混合水溶液で100倍に希釈し、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物を 7.4×10^{-6} Mになるように溶解させた試験液を調製した（pH7の試験液）。

【0148】

さらに、pH9の緩衝水溶液を用いる場合、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させたのち、pHを9に調整した Na_2CO_3 水溶液及び NaHCO_3 水溶液の混合水溶液で100倍に希釈し、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物を 7.4×10^{-6} Mになるように溶解させた試験液を調製した（pH9の試験液）。

【0149】

結果を図2～4に示す。この結果、中性条件下又はアルカリ性条件下とすることで、吸収極大波長及び蛍光極大波長を600～700 nmとすることができるとともに、蛍光量子収率を特に向上させることが可能であった。このことは、図3の下図において、pHの増大とともに627 nmにおける相対吸収が増大しており中性～アルカリ性領域においてはほとんど同程度であること、図4の下図において、pHの増大とともに627 nmにおける励起強度と532 nmにおける励起強度の比が増大しており中性～アルカリ性領域においてはほとんど同程度であること等からも理解できる。この挙動は、pHを大きくすることにより、本発明のホスファフルオレセイン化合物がアニオン化していることに起因すると考えられる。

【0150】

[試験例4：光物理特性（その2）]

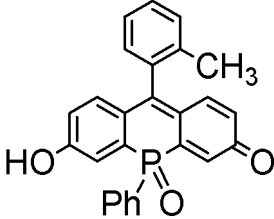
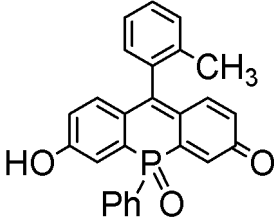
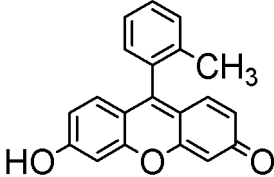
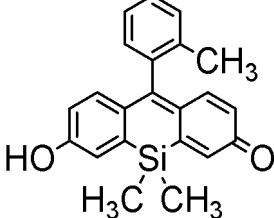
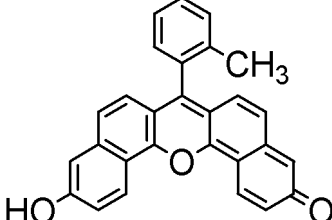
上記試験例3で得られた試験液2及び3の光物理特性を、既報の値（TokyoGreen：JACS, 2005, 127, 4888、TokyoMagenda：Chem. Commun. 2011, 47, 4162、Nap-Fluorescein：Cytometry, 1989, 10, 151）と比較した。結果を表2に示す。この結果、本発明のホスファフルオレセイン化合物は、600 nm以上に吸収極大波長及び蛍光極大波長を有する化合物のうち、最高の蛍光量子収率を有することが理解できる。また、吸収極大波長は最大であり、バイオイメージングにおいて、細胞小器官の自己吸収及び細胞への光によるダメージを最小限に抑えることができる。

【0151】

10

20

【表 2】

	化合物	pH	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ_{FL}
実施例1		7	627		656	0.47
実施例1		9	627	51300	656	0.33
Tokyo Green		13	491	—	510	0.85
Tokyo Magenta		9	582	110000	598	0.42
Nap-Fluorescein		9	595	44000	660	0.14

10

20

30

【0152】

[試験例5：光に対する安定性]

ホスファフルオレセイン化合物をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させたのち、pHを7に調整した Na_2HPO_4 水溶液及び Na_2HPO_4 水溶液の混合水溶液を添加して100倍に希釈し、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物を $7.4 \times 10^{-6}M$ になるように溶解させた試験液4を得た。

40

【0153】

これとは別に、実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物ではなく公知のフルオレセイン化合物 (10位が酸素原子; TokyoGreen; JACS, 2005, 127, 4888) 及びケイ素含有フルオレセイン化合物 (10位がケイ素原子; TokyoMagenta; Chem. Commun., 2010, 47, 4162.) を用いたこと以外は同様に処理を行い、試験液5及び試験液6を得た。

【0154】

試験液4、5及び6に対して、キセノンランプを用いて、350nm以上の波長の白色光を照射し、吸収極大波長 (試験液4: 627 nm; 試験液5: 491 nm; 試験液6: 582 nm) における吸光度の維持率を測定した。結果を図5(a)に示す。図中、上側の線 (POFと併記) は本発明のホスファフルオレセイン化合物、下側の線 (TMと併記) は公知のケイ素含有フルオレ

50

セイン化合物、これらの間の線 (TGと併記) は公知のフルオレセイン化合物である。

【0155】

その他、以下の方法でホスファフルオレセイン化合物の光に対する安定性を評価した。

【0156】

実施例1で得たホスファフルオレセイン化合物、及び公知の赤色蛍光色素である Alexa Fluor (登録商標) 633、Alexa Fluor (登録商標) 647、及びCy5をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた後、pHを7に調整した Na_2HPO_4 水溶液及び Na_2HPO_4 水溶液の混合水溶液を添加して希釈し、630 nmでの吸光度が同一になるように濃度を調整することで、試験液7、試験液8、試験液9及び試験液10を得た。試験液7、試験液8、試験液9及び試験液10に対して、300 Wキセノンランプ (朝日分光 MAX) に630 nm \pm 10 nmの波長の光のみ透過するバンドパスフィルターを装着した状態で光照射を行い、630 nmにおける吸光度の維持率を測定した。結果を図5 (b) に示す。ホスファフルオレセイン色素 (POF) は公知の代表的な赤色蛍光色素であるCy5と比較して高い光安定性をもち、光安定性に優れた赤色蛍光色素として公知のAlexa Fluor (登録商標) 633及びAlexa Fluor (登録商標) 647と同程度の光安定性をもつことが示された。

10

【0157】

[試験例6 : 細胞試験]

細胞インキュベーション及びイメージング

HeLa細胞 (RIKEN Cell Bank、日本) 及びRAW264.7細胞 (JCRB Cell Bank、日本) を、10%ウシ胎児血清 (FBS、Gibco) 及び1%抗生物質 - 抗真菌 (AA、Sigma) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Sigma) で、37 °Cで5%CO₂ / 95%空気のインキュベーター中で24時間インキュベートした。イメージングの2日前に、HeLa細胞及びRAW264.7細胞は、それぞれ、35 mmのガラスボトムと8ウェルガラスボトムディッシュに播種した。染色実験のため、HeLa細胞を、実施例2の化合物AcPOFが5 μM のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液中で、37 °Cで10分間インキュベートし、次いでPBSで2回すすいだ。フェノールレッドを含まないDMEMに培地を交換した後、Olympus FV10i confocal fluorescence microscope を用いて、635 nmの励起レーザーで細胞をイメージングした。一方、RAW264.7細胞の場合は、培養培地としては、実施例2の化合物AcPOFを5 μM 、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES; pH 7.4) を10 mM、DMSOを1%、及びPluronic F-127を0.02%含むDMEMを用いた。細胞を37 °Cで15分間染色し、DMEMで2回洗浄した後、各ウェルに、valinomycinを10 μM 、nigericinを10 μM 含むpHが4.5又は6.5のpH検量緩衝液 (Thermo Fisher Scientific) を充填した。細胞イメージは、HC PL APO 20倍 / 0.75 IMM CORR CS2レンズを備えたTCS SP8 STED (Leica) を用いて得た。細胞は627 nm (白色光レーザー、80 MHz、出力電力70%、AOTF 50%) のレーザー線で励起し、蛍光は485 ~ 527 nm及び635 ~ 750 nmのフィルターを介して記録した。

20

30

【0158】

結果を図6に示す。この結果から、本発明のホスファフルオロセイン化合物は、核膜は透過しなかったものの、細胞膜を透過して細胞の中に侵入し、細胞 (HeLa細胞等) の蛍光色素として使用できることが理解できる。

【0159】

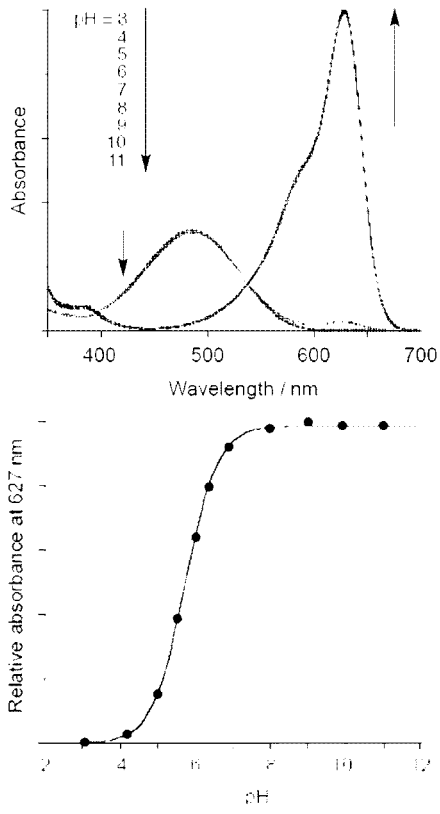
細胞毒性評価

HeLa細胞を平底96ウェルプレート (1 \times 10⁴細胞 / ウェル) に播種し、FBSを10%含むDMEMで、37 °Cで5%CO₂ / 95%空気のインキュベーター中で24時間培養した。次いで、培地を、種々の実施例2の化合物AcPOFの濃度 (1 μM 、5 μM 及び10 μM) 有する培地に置換し、細胞をさらに37 °Cで24時間インキュベートした。培地を除去した後、3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (MTT) 試薬を各ウェルに加え (最終濃度は0.5 mg/mL)、プレートをCO₂インキュベーター中でさらに4時間インキュベートした。過剰のMTTのテトラゾリウム溶液を除去し、細胞をPBSで1回洗浄した。ホルマザン結晶をDMSO (100 μL / ウェル) に室温で30分間可溶化した後、各ウェルの吸光度を波長535 nmでSpectraMax i3 (Molecular Devices) で測定した。

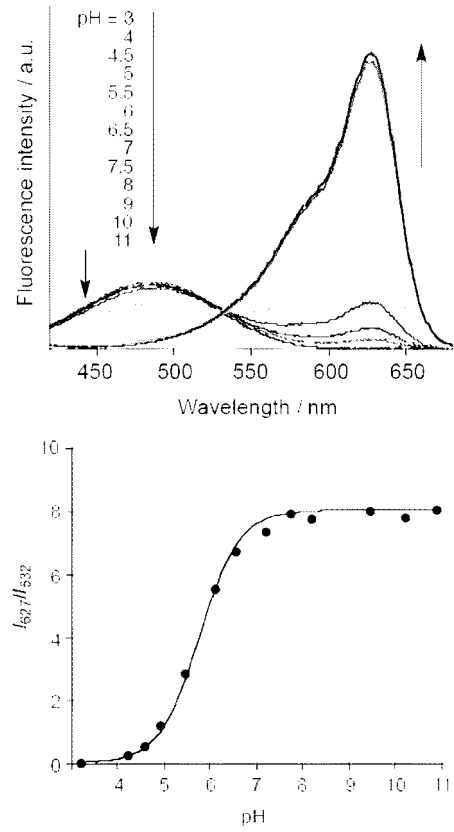
40

50

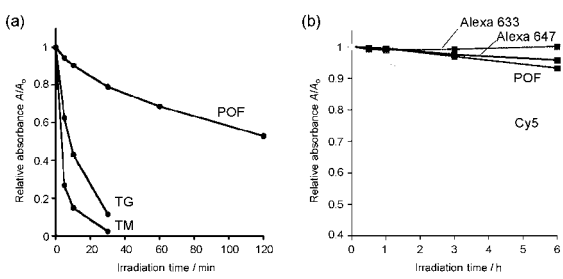
【 3 】



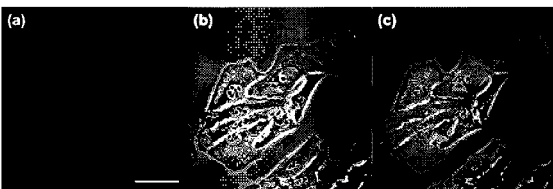
【 4 】



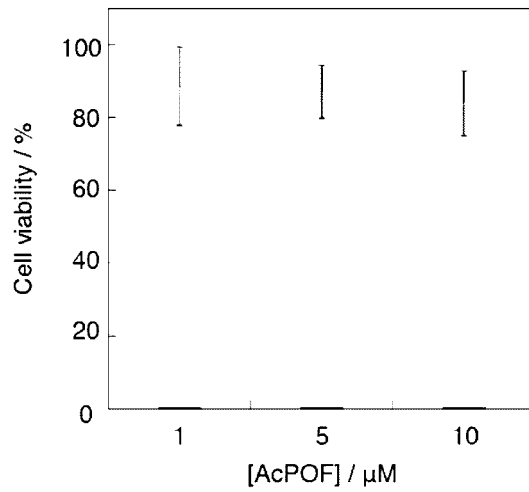
【 5 】



【 6 】



【 7 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年7月12日(2016.7.12)

【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】全文

【補正方法】変更

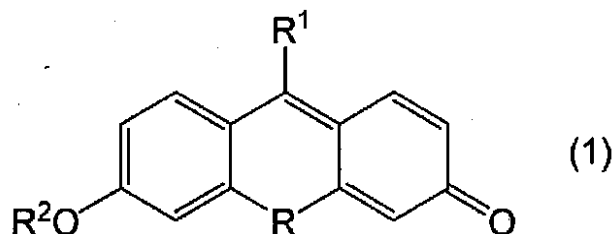
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

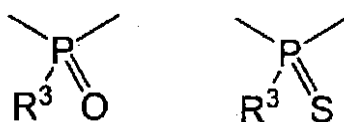
一般式(1)：

【化1】



[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式(1A)~(1B)：

【化2】



(1A)、又は(1B)

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。)

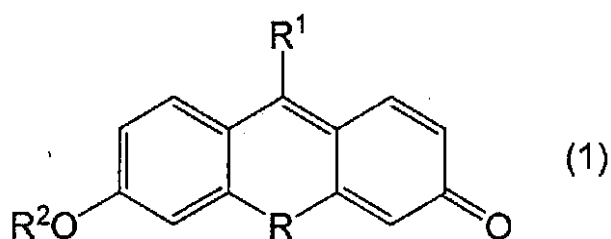
で表される基である。]

で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項2】

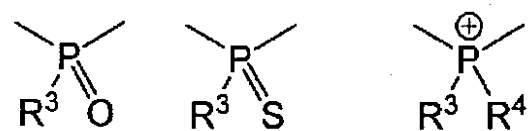
一般式(1)：

【化3】



[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式(1A)~(1C)：

【化4】



(1A)、(1B)、又は(1C)

(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 3】

600 ~ 700 nm に最大吸収波長を有する、請求項 1 又は 2 に記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

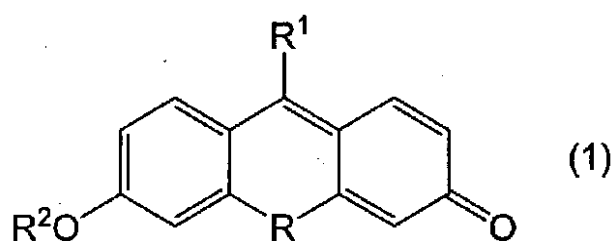
【請求項 4】

600 ~ 700 nm に最大吸収波長を有し、且つ、蛍光量子収率が 0.25 ~ 0.60 である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 5】

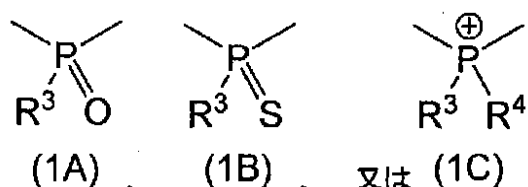
一般式 (1) :

【化 5】



[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式 (1A) ~ (1C) :

【化 6】



(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表され、600 ~ 700 nm に最大吸収波長を有し、且つ、蛍光量子収率が 0.25 ~ 0.60 であるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

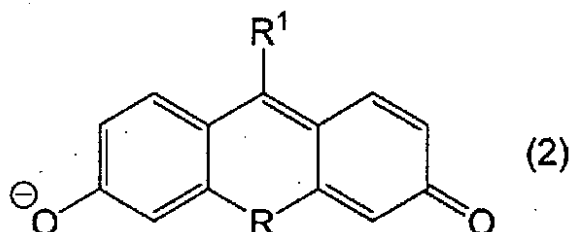
【請求項 6】

前記一般式 (1) において、 R が一般式 (1A) で表される基である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 7】

前記一般式 (1) で表されるホスファフルオレセイン化合物の塩が、一般式 (2) :

【化 7】



[式中、 R^1 及び R は前記に同じである。]

で表されるアニオンを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する蛍光色素。

【請求項 9】

バイオイメージング用蛍光色素である、請求項 8 に記載の蛍光色素。

【請求項 10】

癌細胞のバイオイメージング用蛍光色素である、請求項 9 に記載の蛍光色素。

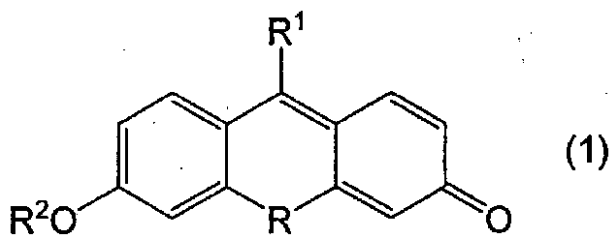
【請求項 11】

請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の蛍光色素を含有する、細胞検出剤。

【請求項 12】

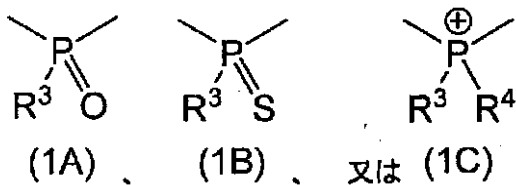
一般式 (1) :

【化 8】



[式中、 R^1 は置換されていてもよいアリール基を示す。 R^2 は水素原子又は有機基を示す。 R は一般式 1 (1A) ~ (1C) :

【化 9】



(式中、 R^3 は置換されていてもよいアリール基、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアルケニル基、又は置換されていてもよいアルキニル基を示す。 R^4 は置換されていてもよいアルキル基を示す。)

で表される基である。]

で表されるホスファフルオレセイン化合物又はその塩、水和物若しくは溶媒和物を含有する、細胞検出剤。

【請求項 13】

癌細胞検出剤である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞検出剤。

【請求項 14】

細胞のリアルタイム視覚化剤である、請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載の細胞検出剤。

【請求項 15】

請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の蛍光色素、又は請求項 11 ~ 14 のいずれかに記載の細胞検出剤を用いる、細胞のバイオイメージング方法。

【請求項 16】

前記細胞が癌細胞である、請求項 15 に記載のバイオイメージング方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/054964
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C09B11/28(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/48(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) C09B1/00-69/10, C09K11/00-11/89, G01N21/75-21/83, G01N33/48-33/98 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CPlus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 8506655 B1 (LI, Zaiguo et al.), 13 August 2013 (13.08.2013), claims; column 1, lines 6 to 47; column 7, line 54 to column 8, line 34; examples (Family: none)	1-7, 9, 11 8, 10, 12
Y	JP 2011-521635 A (Dako Denmark A/S), 28 July 2011 (28.07.2011), claims; examples & US 2011/0229975 A1 claims; examples & WO 2009/144581 A1 & EP 2285979 A1 & CA 2724552 A & RU 2010151493 A	8, 10, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 04 April 2016 (04.04.16)		Date of mailing of the international search report 12 April 2016 (12.04.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054964

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-520962 A (Ventana Medical Systems, Inc.), 10 June 2013 (10.06.2013), claims; paragraph [0006]; examples & US 2012/0301886 A1 claims; paragraph [0006]; examples & WO 2011/106583 A1 & EP 2539355 A1 & AU 2011220578 A & CA 2787487 A	8,10,12
A	CN 103183710 A (KUNSHAN VISIONOX DISPLAY CO., LTD.), 03 July 2013 (03.07.2013), claims; examples (Family: none)	1-12
A	JP 2014-529586 A (Merck Patent GmbH), 13 November 2014 (13.11.2014), claims; examples & US 2014/0183422 A1 & WO 2013/020631 A1 & EP 2742054 A1 & CN 103732602 A & KR 10-2014-0054208 A	1-12
A	WO 2014/106957 A1 (The University of Tokyo), 10 July 2014 (10.07.2014), claims; examples & US 2015/0353585 A1 & EP 2942352 A1	1-12
A	JP 2006-257427 A (Applera Corp.), 28 September 2006 (28.09.2006), claims; examples & US 6221604 B1 & WO 2001/057264 A2 & EP 1196640 A2 & AU 3483901 A & CA 2368495 A	1-12
P,A	CHAI, Xiaoyun et al., Near-Infrared Phosphorus-Substituted Rhodamine with Emission Wavelength above 700 nm for Bioimaging, Chem. Eur. J., 2015.09.30, Vol.21, pp.16754-16758	1-12
P,A	Shinji SUDA et al., "Sekishoku Hakko o Shimesu Phospha-fluorescein Shikiso no Kaihatsu to Saibo Imaging eno Oyo", The 95th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan in Spring (2015) Koen Yokoshu IV, 11 March 2015 (11.03.2015), page 1463	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 9 6 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C09B11/28(2006,01)i, C09K11/06(2006,01)i, G01N21/78(2006,01)i, G01N33/48(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. C09B1/00-69/10, C09K11/00-11/89, G01N21/75-21/83, G01N33/48-33/98											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	US 8506655 B1 (LI, Zaiguo et al.)	1-7, 9, 11									
Y	2013.08.13, Claims, 第1欄第6行~第47行、 第7欄第54行~第8欄第34行、Examples (ファミリーなし)	8, 10, 12									
Y	JP 2011-521635 A (ダコ・デンマーク・エー/エス) 2011.07.28, 特許請求の範囲、実施例 & US 2011/0229975 A1, Claims, Examples & WO 2009/144581 A1 & EP 2285979 A1 & CA 2724552 A & RU 2010151493 A	8, 10, 12									
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 04.04.2016		国際調査報告の発送日 12.04.2016									
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) 松本 淳	4H 4675								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3443									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 4 9 6 4
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
Y	JP 2013-520962 A (ヴェンタナ メディカル システムズ、インク) 2013.06.10, 特許請求の範囲、段落[0006]、実施例 & US 2012/0301886 A1, Claims, 段落[0006], Examples & WO 2011/106583 A1 & EP 2539355 A1 & AU 2011220578 A & CA 2787487 A	8, 10, 12
A	CN 103183710 A (KUNSHAN VISIONOX DISPLAY CO., LTD.) 2013.07.03, 権利要求書、実施例 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2014-529586 A (メルク パテント ゲーエムベーハー) 2014.11.13, 特許請求の範囲、実施例 & US 2014/0183422 A1 & WO 2013/020631 A1 & EP 2742054 A1 & CN 103732602 A & KR 10-2014-0054208 A	1-12
A	WO 2014/106957 A1 (国立大学法人 東京大学) 2014.07.10, 特許請求の範囲、実施例 & US 2015/0353585 A1 & EP 2942352 A1	1-12
A	JP 2006-257427 A (アプレラ コーポレーション) 2006.09.28, 特許請求の範囲、実施例 & US 6221604 B1 & WO 2001/057264 A2 & EP 1196640 A2 & AU 3483901 A & CA 2368495 A	1-12
P, A	CHAI, Xiaoyun et al., Near-Infrared Phosphorus-Substituted Rhodamine with Emission Wavelength above 700 nm for Bioimaging, Chem. Eur. J., 2015.09.30, Vol.21, pp.16754-16758	1-12
P, A	須田 真司 他, 赤色発光を示すホスファフルオレセイン色素の開 発と細胞イメージングへの応用, 日本化学会第95回春季年会(2 015)講演予稿集IV, 2015.03.11, 第1463頁	1-12

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(出願人による申告)平成22年度、科学技術振興機構「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 多喜 正泰

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 2G043 AA03 AA04 BA17 CA04 DA08 EA01 FA01 FA02 GA14 GB07

JA02 JA03 KA02 KA05 KA09 LA03 MA04 MA16

2G045 AA24 CB01 CB02 FB12 GC15

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。