

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-506462  
(P2015-506462A)

(43) 公表日 平成27年3月2日(2015.3.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/58 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/58	Z N A Z 2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/533 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/533	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A
<b>C 1 2 Q 1/34 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/34	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-548193 (P2014-548193)  
 (86) (22) 出願日 平成24年12月20日 (2012.12.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月23日 (2014.6.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/053214  
 (87) 国際公開番号 W02013/093481  
 (87) 国際公開日 平成25年6月27日 (2013.6.27)  
 (31) 優先権主張番号 1122099.3  
 (32) 優先日 平成23年12月22日 (2011.12.22)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

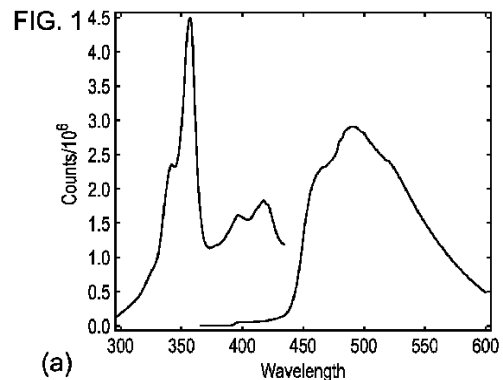
(71) 出願人 514159689  
 アルマック サイエンシーズ (スコット  
 ランド) リミテッド  
 イギリス イーエイチ33 1イーエイチ  
 イースト ロージアン グレズミュア  
 エルヴィングストーン サイエンス センタ  
 ー  
 (74) 代理人 100092093  
 弁理士 辻居 幸一  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤  
 (74) 代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アクリジンおよびアクリジニウム誘導体ベースの蛍光色素

(57) 【要約】

本発明は、アクリジンおよびアクリジニウム誘導体ベースの蛍光色素、およびこのような色素の、例えば、生化学的アッセイおよび/または細胞ベースのアッセイでの使用に関する。

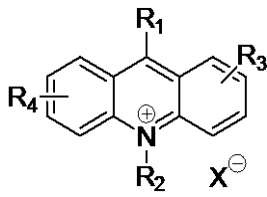


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

蛍光寿命の測定を含む、ターゲット分子を検出するための方法における試薬としての、式 (I) の蛍光色素の使用。

## 【化 1】



(I)

10

(式中：

R<sup>1</sup>は水素または J - L であり、

R<sup>2</sup>は不在、水素または J - L であり、

R<sup>3</sup>および R<sup>4</sup>は、独立して、各々、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ - C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、カルボキシ、アシル、ホルミル、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - K から選択され、

R<sup>2</sup>が不在である場合、X は不在であり、R<sup>2</sup>が存在する場合、R<sub>2</sub>に結合している窒素原子は正に帯電しており、X は対イオンであり、

各 J は、独立して、リンカー基であり、

各 L は、独立して、水素または K であり、

各 K は、独立して、ターゲット結合基であるが、

ただし、少なくとも 1 つの基 K が存在するものとする )

20

## 【請求項 2】

各 J が、独立して、炭素を含み、ならびに窒素、酸素、硫黄および / またはリンを含んでもよい 1 ~ 40 個の鎖原子を含む、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

各 J が、独立して、置換もしくは非置換のアルキレン、アルケニレン、アルキレンオキシ鎖またはアルキレンアノカルボキサミド (alkylene ane carbox amido) 鎖である、請求項 2 に記載の使用。

30

## 【請求項 4】

各 J が、独立して、2 ~ 6 個の炭素原子を含む非置換のアルキレン鎖である、請求項 3 に記載の使用。

## 【請求項 5】

各 K が、独立して、スクシンイミジルエステル、スルホ - スクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミド、酸ハロゲン化物、ビニルスルホン、ジクロロトリアジン、カルボジイミド (carbodiimide)、ヒドラジド、ホスホラミダイトペンタフルオロフェニルエステル、およびハロゲン化アルキル、ヒドロキシ、アミノ、スルフヒドリル、イミダゾール、カルボキシル、カルボニル、ホスフェート、チオホスフェートならびにアミノオキシからなる群から選択される、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の使用。

40

## 【請求項 6】

1 つの基 K が存在する、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の使用。

## 【請求項 7】

基 K がカルボキシルである、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 8】

( i ) 基 R<sub>2</sub> が存在し、式 - J - L のものであり、および / または

( i i ) 基 R<sub>1</sub> が水素であるか、または式 - J - L のものである、請求項 1 から 7 までの

50

いずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 9】

( i ) 基  $R_2$  が非置換のアルキル基または式 - J - K のもののいずれかであり、および  
/あるいは

( i i ) 基  $R_1$  が式 - J - K のものである、請求項 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 10】

$R^1$  が水素または J - H であり、 $R^2$  が J - L であり、 $R^3$  が水素または J - K である、  
請求項 8 に記載の使用。

【請求項 11】

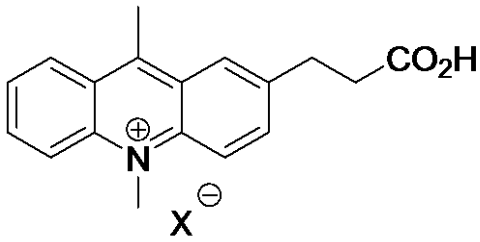
$R_2$  および対イオン X が存在する、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項に記載の使用

10

【請求項 12】

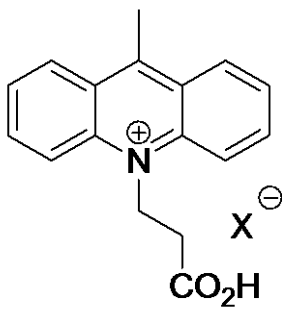
化合物が、式 ( I I I )、( I V )、( V )、( V I ) または ( V I I ) のうちの 1 つ  
を有する、請求項 1 に記載の使用。

【化 2】

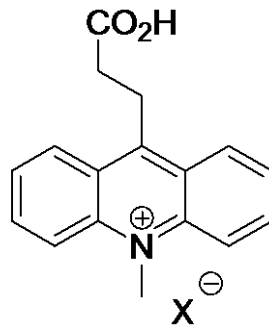


(III)

10

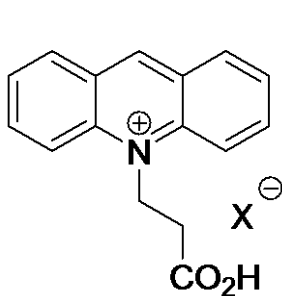


(IV)

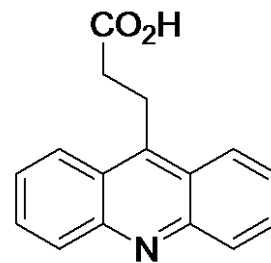


(V)

20



(VI)



(VII)

30

【請求項 1 3】

ターゲット分子が生体分子である、請求項 1 から 1 2 までのいずれか 1 項に記載の使用。

40

【請求項 1 4】

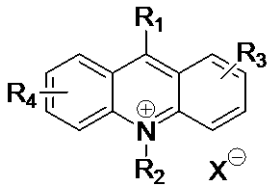
生体分子が、抗体、脂質、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ヌクレオチドおよびオキシまたはデオキシポリ核酸からなる群から選択され、これらが、1 個または複数のアミノ、スルフィドリル、カルボニル、ヒドロキシルおよびカルボキシル、ホスフェート、チオホスフェートアミノオキシおよびヒドラジド基を含有するか、または誘導体化されて含有する、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

試料中の分析物の存在を判定するための方法であって、

( i ) 試料を、分析物の公知の結合パートナーと式 ( I ) の蛍光色素：

## 【化 3】



(I)

(式中：

R<sup>1</sup>は水素またはJ - Lであり、R<sup>2</sup>は不在、水素またはJ - Lであり、

R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、独立して、出現ごとに、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ - C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、カルボキシ、アシル、ホルミル、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - Kから選択され、

Xは対イオン (R<sup>2</sup>が不在である場合不在である) であり

各Jは、独立して、リンカー基であり、

各Lは、独立して、水素またはKであり、

各Kは、独立して、ターゲット結合基であるが、

ただし、少なくとも1つの基Kが存在するものとする)のコンジュゲートと、分析物の少なくとも一部分をコンジュゲート内の公知の結合パートナーと結合させて分析物とコンジュゲートの複合体を形成するのに有効な条件下で、接触させるステップと、

(ii) 分析物との接触前に、コンジュゲートの蛍光寿命または蛍光強度を測定するステップと、

(iv) 接触により生成した混合物の蛍光性寿命または蛍光強度を測定するステップとを含む方法。

## 【請求項 16】

分析物および公知の結合パートナーが、抗体 / 抗原、レクチン / 糖タンパク質、ビオチン / ストレプトアビジン、ホルモン / 受容体、酵素 / 基質または共同因子、DNA / DNA、DNA / RNAおよびDNA / 結合タンパク質からなる群から選択される、請求項 15に記載の方法。

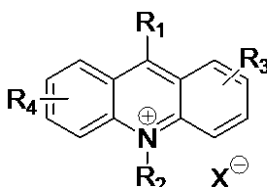
## 【請求項 17】

分析物が酵素であり、公知の結合パートナーがこれに対する基質もしくは共同因子であるか、または分析物が酵素に対する基質もしくは共同因子であり、この酵素が公知の結合パートナーである、請求項 15に記載の方法。

## 【請求項 18】

コンジュゲートの存在下で酵素の活性を測定する方法であって、このコンジュゲートが化合物と式 (I) の蛍光色素：

## 【化 4】



(I)

(式中、

R<sup>1</sup>は水素またはJ - Lであり、R<sup>2</sup>は不在、水素またはJ - Lであり、

R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、独立して、出現ごとに、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール

ル、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ -  $C_1 - C_4$ アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、アシル、ホルミル、カルボキシ、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - K から選択され、

X は対イオン ( $R^2$  が不在である場合、不在である) であり、

各 J は、独立して、リンカー基であり、

各 L は、独立して、水素または K であり、

各 K は、独立して、ターゲット結合基であり、

ただし、少なくとも 1 つの基 K が存在するものとする) の間のコンジュゲーションから生成したコンジュゲートであり、

( i ) 酵素との接触前に、コンジュゲートの蛍光寿命または蛍光強度を測定するステップと、

( i i ) 酵素をコンジュゲートと接触させるステップと、

( i i i ) 接触により生成した混合物の蛍光性寿命または蛍光強度を測定するステップとを含む方法。

【請求項 19】

コンジュゲートの化合物が生体分子である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

酵素が、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ペプチダーゼ、アミダーゼ、ヌクレアーゼおよびグリコシダーゼからなる群から選択される、請求項 17 から 19 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

生体分子が、酵素に対する基質であり、酵素により切断が可能である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

基質が、酵素による基質の切断により式 ( I ) の蛍光色素から分離する部分である蛍光モジュレート部分を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

蛍光モジュレート部分が、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、ナフチルアラニンまたはフェニルアラニン残基またはナフチル、インドリルまたはフェノキシ基である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

酵素がキナーゼであり、生体分子がキナーゼに対する基質である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

基質が、キナーゼによる基質のリン酸化により変化する蛍光モジュレート部分を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

鉄 ( I I I ) イオンに配位した多座の配位子で構成される蛍光モジュレート部分の存在下で行われ、キナーゼによる基質のリン酸化により、鉄 ( I I I ) イオンが配位するホスフェート基が得られる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

試験化合物の存在下と不在下との両方で行われる、請求項 18 から 26 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

各測定が、蛍光寿命の測定である、請求項 15 から 27 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 15 から 28 までのいずれか 1 項に記載の方法を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 30】

請求項 10 に記載の式 ( I ) の蛍光色素。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 1】

請求項 1 0 に記載の式 ( I ) の蛍光色素と生体分子のコンジュゲート。

## 【請求項 3 2】

( i ) 請求項 1 0 に記載の式 ( I ) の蛍光色素と生体分子のコンジュゲートと、  
( i i ) 生体分子の公知の結合パートナーと  
を含むキット。

## 【請求項 3 3】

公知の結合パートナーが酵素であり、生体分子が酵素に対する基質または共同因子である、請求項 3 2 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アクリジンおよびアクリジニウム誘導体ベースの蛍光色素、ならびにこのような色素の、例えば、生化学的アッセイおよび/または細胞ベースのアッセイにおける使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

色素を含む蛍光性分子は、長い間、無細胞生化学的アッセイならびに細胞ベースのアッセイにおいて生体分子を標識および検出するための薬剤として使用されてきた。しかし、多くの系において、背景蛍光が存在し、関連する蛍光シグナルをうまく検出するためには、良好なシグナル/ノイズ比を有することが必要である。

20

多くの高度な蛍光色素が公知であり、シグナル/ノイズ比を改善するために使用されている。背景蛍光の問題に取り組む変質性方式は、試験対象の系と異なる蛍光寿命を示す蛍光性分子を使用することである。こうすることによって、蛍光性分子の検出を背景と見分けることができる。

以前に、発明者らは、バイオアッセイにおける長い寿命の蛍光レポーターとして 9 - アミノアクリジン誘導体の使用について記載した ( 国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 9 0 5 7 号 ; G. Cotton et al., Chem. Commun., 2010, 46, 6929 ; および A. Gray et al., Anal. Biochem., 2010, 402, 54 を参照されたい ) 。しかし、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイにおいて使用するのに有用な蛍光特性、例えば蛍光寿命を有する、新規な蛍光性分子および/または公知の分子の同定に対する必要性が絶えず存在する。

30

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

発明者らは驚くことに、9 位にアミノ基が結合しておらず、むしろ主にヒドロカルビル性の特徴を有する基が存在するアクリジンおよびアクリジニウム誘導体ベースの一連の蛍光体が、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイにおける使用に対して適切であることを見出した。この発見は、9 - アミノアクリジンおよびその誘導体は蛍光性が強いという当技術分野での知識を考えると特に驚くべきものである。

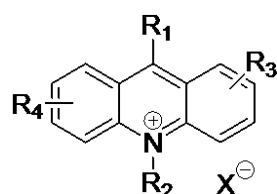
## 【課題を解決するための手段】

40

## 【0004】

したがって、第 1 の態様から見た場合、本発明は、ターゲット分子を検出するための方法における試薬としての、式 ( I ) :

## 【化 1】



(I)

50

(式中、

$R^1$ は水素またはJ - Lであり、

$R^2$ は不在、水素またはJ - Lであり、

$R^3$ および $R^4$ は、独立して、出現ごとに、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ -  $C_1 - C_4$ アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、カルボキシ、アシル、ホルミル、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - Kから選択され、

$R^2$ が不在である場合、Xは不在であり、 $R^2$ が存在する場合、 $R^2$ に結合している窒素原子は正に帯電しており、Xは対イオンであり、

10

各Jは、独立して、リンカー基であり、

各Lは、独立して、水素またはKであり、

各Kは、独立して、ターゲット結合基であるが、

ただし、少なくとも1つの基Kが存在するものとする)の蛍光色素の使用を提供し、この方法は、寿命蛍光の測定を含む。

【0005】

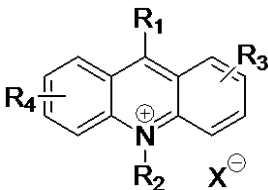
第2の態様から見た場合、本発明は、試料中の分析物の存在を判定するための方法であって、

(i) 試料を、分析物の公知の結合パートナーと式(I)の蛍光色素：

【0006】

20

【化2】



(I)

(式中、

$R^1$ は水素またはJ - Lであり、

$R^2$ は不在、水素またはJ - Lであり、

30

$R^3$ および $R^4$ は、独立して、出現ごとに、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ -  $C_1 - C_4$ アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、カルボキシ、アシル、ホルミル、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - Kから選択され、

Xは対イオン( $R^2$ が不在である場合不在である)であり、

各Jは、独立して、リンカー基であり、

各Lは、独立して、水素またはKであり、

各Kは、独立して、ターゲット結合基であるが、

ただし、少なくとも1つの基Kが存在するものとする)のコンジュゲートと、分析物の少なくとも一部分をコンジュゲート内の公知の結合パートナーと結合させて分析物とコンジュゲートの複合体を形成するのに有効な条件下で、接触させるステップと、

40

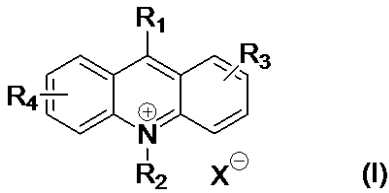
(ii) 分析物との接触前に、コンジュゲートの蛍光寿命または蛍光強度を測定するステップと、

(iv) 接触により生成した混合物の蛍光性寿命または蛍光強度を測定するステップとを含む方法を提供する。

【0007】

第3の態様から見た場合、本発明は、コンジュゲートの存在下で、酵素の活性を測定する方法であって、このコンジュゲートが、化合物と式(I)の蛍光色素：

## 【化 3】



(式中、

$R^1$ は水素またはJ - Lであり、

$R^2$ は、不在、水素またはJ - Lであり、

$R^3$ および $R^4$ は、独立して、出現ごとに、水素、ハロ、アミド、ヒドロキシル、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアリール、アルコキシ、アルキルチオ、アミノ、モノ - もしくはジ -  $C_1 - C_4$ アルキル - 置換アミノ、スルフヒドリル、アシル、ホルミル、カルボキシ、スルホネート、第四級アンモニウム、J - L、または - Kから選択され、

Xは対イオン ( $R^2$ が不在である場合不在である) であり、

各Jは、独立して、リンカー基であり、

各Lは、独立して、水素またはKであり、

各Kは、独立して、ターゲット結合基であるが、

ただし、少なくとも1つの基Kが存在するものとする)の間のコンジュゲーションから生成したコンジュゲートであり、

(i) 酵素との接触前に、コンジュゲートの蛍光寿命または蛍光強度を測定するステップと、

(ii) 酵素をコンジュゲートと接触させるステップと、

(iii) 接触により生成した混合物の蛍光性寿命または蛍光強度を測定するステップとを含む方法を提供する。

## 【0008】

第4の態様から見た場合、本発明は、本明細書中で以前に定義された通りの式(I)の蛍光色素(式中、

$R^1$ は水素またはJ - Hであり、

$R^2$ はJ - Lであり、

$R^3$ は水素またはJ - Kである)を提供する。

第5の態様から見た場合、本発明は、本発明の第4の態様による蛍光色素と生体分子のコンジュゲートを提供する。

## 【0009】

第6の態様から見た場合、本発明は、

(i) 本発明の第5の態様によるコンジュゲートと、

(ii) 生体分子の公知の結合パートナー、例えば酵素とを含むキットを提供する。

## 【0010】

本発明のさらなる態様および実施形態は、以下に続く考察から明らかとなる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの蛍光特性 (a) 蛍光励起および蛍光発光スペクトル、(b) 蛍光寿命減衰曲線 (26.2 ns) を示している。測定は、10 mM PBS pH 7.4中、定常状態に対して、励起波長350 nmおよび発光波長490 nmで、ならびに蛍光寿命に対して、励起波長405 nmおよび発光波長473 nmロングパスフィルターで実施した；

【図2】pHの関数として測定したリン酸塩緩衝液中の9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの蛍光寿命を示している。0.2 Mリン酸ナトリウム

10

20

30

40

50

および 0.2 M 二塩基性リン酸ナトリウム緩衝液混合物を使用して、9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中 1  $\mu$  溶液を調製し、0.1 M HCl 溶液を使用して、pH を < 6 に調整し、0.1 M NaOH 溶液を使用して、pH を > 8 に調整した；

【図 3】405 nm での励起による、pH の関数として測定された 9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートに対する蛍光発光スペクトルを示している；

【図 4】LLD - DEVDSK および LLD - DEVDSW (LLD = 2 - (2 - カルボキシエチル) - 9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムを有する) に対する蛍光発光スペクトルを示している。測定は、10 mM PBS、pH 7.4 中 500 nM の濃度、励起波長 405 nm で実施した。実線は LLD - DEVDSK であり、破線は LLD - DEVDSW である；

【図 5】LLD - DEVDSW を基質として、および組換え型カスパーゼ 3 を酵素として (ウェル 1 つ当たり 1.25 および 2.5 U) を使用するカスパーゼ 3 アッセイについての、時間に対する平均寿命のプロットを示している。

【図 6】AcDEV D - CHO によるカスパーゼ 3 の阻害、すなわち LLD - DEVDSW を基質として使用した、組換え型カスパーゼ 3 に対する AcDEV D - CHO の阻害剤滴定を示している。

【図 7】LLD - PLGLNa1AR を基質として、および組換え型 MMP 2 を酵素として使用し、異なる濃度の酵素での MMP 2 プロテアーゼアッセイについての、時間に対する平均寿命のプロットを示している。

【図 8】LLD - EPEGIYGVL F を基質として、および組換え型 Lck を酵素として使用し、異なる濃度の酵素での Lck キナーゼアッセイについての、時間に対する平均寿命のプロットを示している。

【図 9】LLD - EPEGIYGVL F を基質として使用する組換え型 Lck キナーゼに対するスタウロsporin の阻害剤滴定を示している。

【図 10】アッセイした系に対する ATP  $K_m$  を求めるために、LLD - EPEGIYGVL F を基質として使用する組換え型 Lck キナーゼに対する様々な濃度の ATP の滴定を示している。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、9 位にアミノ基が結合しておらず、むしろ主にヒドロカルビル性の特徴を有する基がこの位置に存在する、アクリジンおよびアクリジニウム誘導体ベースの蛍光体が、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイに使用するのに適切であるという発見から生じている。特に、本発明の様々な態様による蛍光体および/または使用のいくつかは、有利なことに長い蛍光寿命を有する (例えば 25 ~ 30 ns)。これらは、およそ 15 ~ 17 ns の蛍光寿命を一般的に有する 9 - アミノアクリジンと有利に対比することができる。

【0013】

当技術分野で知られているように、より長い蛍光寿命を使用することによって、シグナル/ノイズ比を改善することができ、これによって、アッセイにおいてさらに感受性の高い応答能力が可能となる。蛍光強度とは異なり、蛍光寿命は一般にプローブ濃度および量とは無関係で、自家蛍光、光散乱および内部フィルター作用により影響を受けない。追加的に、蛍光寿命の測定は、蛍光化合物ライブラリーおよび細胞の構成成分からの背景干渉を最小限に抑えることを可能にし、薬物スクリーニング用途における偽陽性が少なくなる。したがって、本発明の第 2 および第 3 の態様に従い蛍光寿命 (蛍光強度とは対照的に) を測定することは、必ずではないが、一般的である。

第 1 に、文脈により反対であると決定されない限り、以下の定義を適用させて、式 (I) 化合物が記載されている。

アルキルとは、本明細書中で飽和したヒドロカルビル基を意味し、このヒドロカルビル基は、直鎖、環式または分枝であってよい (文脈により反対であると決定されない限り、

10

20

30

40

50

一般的には直鎖である)。アルキレン基は、正式には、アルキル基からの水素原子の抽出により形成されるジラジカルである。一般的にアルキルおよびアルキレン基は、1～25個の炭素原子、さらに普通は1～10個の炭素原子、よりさらに普通は1～6個の炭素原子を含み、当然のことながら、シクロアルキルおよびシクロアルキレン基内の炭素原子の数の下限が3であることは理解されている。

#### 【0014】

アルケニルおよびアルキニル基は、炭素-炭素二重結合または炭素-炭素三重結合で構成される、1つまたは複数の不飽和の部位を有することでアルキル基と異なる。炭素-炭素二重結合の存在がアルケニル基を提供し、炭素-炭素三重結合の存在がアルキニル基を提供する。アルケニレンおよびアルキニレン基は、正式には、それぞれアルケニルおよびアルキニル基からの水素原子の抽出により形成されるジラジカルである。一般的に、アルケニル、アルケニレン、アルキニルおよびアルキニレン基は、2～25個の炭素原子、さらに普通は2～10個の炭素原子、よりさらに普通は2～6個の炭素原子を含む。アルケニル基の例として、ビニル、スチリルおよびアクリレートが挙げられる；アルキニル基の例はプロパルギルである。いかなる疑いもないように、炭素-炭素二重結合と炭素-炭素三重結合の両方を含むヒドロカルビル基は、アルケニルとアルキニル基の両方であるとみなすことができる。

10

#### 【0015】

アルキル、アルケニルまたはアルキニル(およびアルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン)基は、例えば1回、2回、または3回、例えば1回置換されていてもよく、すなわち正式には基の1個または複数の水素原子を置き換えている。このような置換基の例は、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アリール、(ヘテロアリールを含む)、ニトロ、アルコキシ、アルキルチオ、シアノ、スルフヒドリル、アシルおよびホルミルである。アルキル基がアリール基で置換されている場合、これは、時にはアラルキル基と呼ばれる。一般的に、アラルキル基は、置換されていてもよいアリール基で置換されている $C_{1-6}$ アルキル基を含む。

20

#### 【0016】

直前に言及された置換基の代わりにまたはこれに加えて、アルキル、アルケニルまたはアルキニル(ならびにアルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン)基の置換基が、一部の実施形態において、式(I)の化合物に注目すべき有利な水溶化特性を付与し得る。適当な可溶化置換基(これらのうちのもう1つ、一般的にはこれらのうちの1つは、置換されている基のみで存在し得る)は、例えば、スルホネート、第四級アンモニウム、スルフェート、ホスホネート、ホスフェートおよびカルボキシルを含む群から選択することができる。代わりに、可溶化基は、炭水化物の残基、例えば、単糖であってもよい。水溶化置換基が存在する場合、これは、アルキル基の置換基、一般的には、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ または $R_4$ を構成する $C_{1-6}$ アルキル基として存在することができる。したがって、水溶化置換されているアルキル基の例として、 $C_{1-6}$ アルキルカルボキシレートおよびスルホネート、例えば、 $-(CH_2)_{2-4}-SO_3^-$ および $-(CH_2)_{2-4}-CO_2^-$ 、例えば $-(CH_2)_2-CO_2^-$ などが挙げられるが、ただし、このような可溶化置換基は、式(I)の化合物の三環式コアに直接結合することができるものとする(置換基 $R_3$ および $R_4$ への可能性として)ことに注目されたい。水溶性は、式(I)の化合物がタンパク質またはペプチドとコンジュゲートする、すなわちこれらを標識するために使用される場合特に有利となり得る。

30

40

#### 【0017】

アリールとは、本明細書中で、正式には、芳香族化合物からの水素原子の抽出により形成される基を意味する。アリール基は、一般的に、文脈により反対であると具体的に決定されない限り、単環式基、例えばフェニルであるが、ただし、二環式アリール基、例えばナフチルなど、および三環式アリール基、例えばフェナントレンおよびアントラセンなどもまた、アリールという用語に包含される。当業者には公知のように、ヘテロ芳香族部分は、1個または複数の炭素原子およびこれに結合していてもよい任意の水素原子の代わり

50

に、1個または複数のヘテロ原子、一般的にはO、NまたはSを含む芳香族部分のサブセットである。その結果、ヘテロアリアル基はアリアル基のサブセットであることを理解されたい。例示的ヘテロ芳香族部分として、ピリジン、フラン、ピロールおよびピリミジンが挙げられる。ヘテロ芳香族環のさらなる例として、ピリダジン（2個の窒素原子が芳香族6員環内で隣接している）；ピラジン（2個の窒素が6員の芳香族環内で1, 4 - 配置されている）；ピリミジン（2個の窒素原子が6員の芳香族環内で1, 3 - 配置されている）；または1, 3, 5 - トリアジン（3個の窒素原子が6員の芳香族環内で1, 3, 5 - 配置されている）が挙げられる。

#### 【0018】

アリアル基は、例えば、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルキル、アリール、（ヘテロアリアルを含む）、ニトロ、アルコキシ、アルキルチオ、シアノ、スルフヒドリル、アシルおよびホルミルからなる群から選択される置換基で1回または複数回置換されていてもよい。

アミドとは、本明細書中で、官能基 - NHCO R、または - CONHR（式中、Rは水素または置換されていてもよいアルキル基である）のいずれかを意味する。

アシルとは、式 - C(O)R（式中、Rは置換されていてもよいアルキル基である）の官能基を意味する。

エステルとは、部分 - OC(=O) - を含む官能基を意味する。

アルコキシ（アルキルオキシと同じ意味）およびアルキルチオ部分は、それぞれ式 - ORおよび - SR（式中、Rは置換されていてもよいアルキル基である）のものである。

カルボキシとは、本明細書中で、官能基 - CO<sub>2</sub>Hを意味し、これは、脱プロトン化した形態（CO<sub>2</sub>）であってもよい。

スルホネートとは、本明細書中で、官能基 - SO<sub>3</sub><sup>-</sup>（スルホン酸（-SO<sub>3</sub>H）の脱プロトン化した形態）を意味し、これは、プロトン化した形態であってもよい。

ホルミルとは、式 - CHOの基を意味する。

ハロは、フルオロ、プロモ、クロロまたはヨードである。

#### 【0019】

アミノ基とは、本明細書中で、式 - NH<sub>2</sub>の基を意味する。アミノ基の水素原子のうち1つまたは両方がアルキル基で置換されている場合、これは、モノアルキル置換アミノ基またはジアルキル置換アミノ基を提供する。ジアルキル置換アミノ基の一例は、2つのアルキル基が結合することによって、アルキレンジラジカルを形成する場合であり、このアルキレンジラジカルは、正式には2個の水素原子が、一般的には末端炭素原子から抽出されているアルカンから誘導され、これによって、アミンの窒素原子と一緒に環を形成する。知られているように、環式アミンのジラジカルは必ずしもアルキレンである必要はない：モルホリン（この中でアルキレンは - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - である）は、このような一例であり、これから環式アミノ置換基を調製することができる。

アミノおよびモノ置換アミノ基またはジアルキル置換アミノ基についての本明細書中の言及はまた、これらの範囲内に、このようなアミノ基を含む化合物から生成したアミンのプロトン化誘導体を包含すると理解されたい。後者の例は、塩、例えば塩酸塩などであると理解してもよい。

第四級アンモニウム基は、窒素原子および3つの置換されていてもよいアルキル基を含む置換基であり、生成した窒素原子への4つの結合が永久的正電荷を付与している。

#### 【0020】

1個または複数のリンカー基が、式(I)の化合物の三環式コアに結合していてもよい。これらは、非置換（Lが水素の場合）であっても、またはターゲット結合基Kで置換されていてもよい。一般的には、連結基Jは、基Lを式(I)の化合物の三環式コアに接続している原子の非分枝の鎖を含む。各連結基Jは、一般的に炭素を含み、ならびに窒素、酸素、硫黄および/またはリンを含んでもよい、1~40個（例えば1~10個の）鎖原子を含む。例えば、鎖は、置換もしくは非置換の（一般的に非置換の）アルキレン（例えばメチレン、エチレンまたはプロピレン）、アルケニレン（例えばエテニレンまたはプロ

ペニレン)、アルキレンオキシ鎖(例えば $-O(CH_2)_4-$ )、またはアルキレンアンカルボキサミド(alkyleneanecarboxamido)鎖、例えばアセトアミドなどであってよい。基 $R_1$ がリンカー基 $J$ を含む場合、式(I)の化合物の三環式コアに結合するリンカー基 $J$ の原子は一般に炭素原子である。

#### 【0021】

ターゲット結合基 $K$ は、反応性基または官能基であり、これによって、式(I)の化合物が、適切な条件下で、ターゲット分子、例えば生体分子と反応することを可能となる。式(I)による化合物の反応性基は、適切な条件下で、例えば、生体分子の官能基と反応させることができ;式(I)による化合物の官能基は適切な条件下で、例えば、生体分子の反応性基と反応させることができる。これらのコンジュゲーション戦略のいずれかに従い、式(I)の化合物を用いて、ターゲット化合物、例えば所望の生体分子を標識することが可能である。

10

#### 【0022】

$K$ が反応性基である場合、 $K$ は、スクシンイミジルエステル、スルホ-スクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、マレイミド、ハロアセトアミド、酸ハロゲン化物、ビニルスルホン、ジクロロトリアジン、カルボジイミド(carbodiimide)、ヒドラジド、ホスホラミダイトペンタフルオロフェニルエステルおよびハロゲン化アルキルから選択することができる。 $K$ が官能基である場合、 $K$ は、ヒドロキシ、アミノ、スルフィドリル、イミダゾール、カルボキシル、カルボニル(アルデヒド、ケトンおよびチオエステルを含む)、ホスフェート、チオホスフェートおよびアミノオキシから選択することができる。生体分子とコンジュゲートした場合、 $K$ は修飾され得る、例えば、アミノ基は、アミド基の一部となることができ、またはカルボキシルは、エステル基の一部となることができ、これを理解されたい。これらの反応性基および官能基により式(I)の化合物は、生体分子と反応し、生体分子と共有結合することができる。当業者であれば、官能基/反応性基が、式(I)の化合物のカップリング/コンジュゲート対象である生体分子の対応する反応性基/官能基と反応することが可能であることを容易に承知している。

20

基 $R_2$ が存在する場合、対イオン $X$ もまた存在することになる。対イオン $X$ の性質に関して特定の制限はなく、これらは、任意の便利な対イオンであってよい。例えば、 $X$ は、ハロゲン化物イオン、特に、塩化物イオン、臭化物イオンまたはヨウ化物イオン、トシル酸イオン、スルホン酸メチルイオンまたはアルキルカルボン酸イオン、例えば酢酸イオンまたはトリフルオロ酢酸イオンなどであってよい。他の例は、当業者には明らかである。本発明の特定の実施形態によると、 $R_2$ および対イオン $X$ は存在する。

30

#### 【0023】

本発明のすべて態様の実施形態による式(I)の特定の化合物は、本発明の第4の態様として上記に定義された通りであり、これによると、式(I)の化合物は、 $R^1 =$ 水素または $J-H$ ;  $R^2 = J-L$ ; および  $R^3 =$ 水素または $J-K$ を含む。他の実施形態によると、化合物は、以下を含む:

(i) 基 $R_2$ 、これは、アルキル基、例えば $C_{1-6}$ アルキル基、例えばメチル、エチルもしくはプロピルなど、例えばメチルであるか、または式 $-J-K$ のもの、例えば、 $J$ が1~6個の炭素原子を含むアルキレンリンカー基、例えばメチレン、エチレン、プロピレンまたはブチレンであり、特定の実施形態によるとエチレンであり、および/または、ターゲット結合基がカルボキシルであるもの;ならびに/あるいは

40

(ii) 基 $R_1$ 、これは式 $-J-K$ のものであり、例えば、 $J$ が1~6個の炭素原子を含むアルキレンリンカー基、例えばメチレン、エチレン、プロピレンまたはブチレンであり、特定の実施形態によると、エチレンであり;および/または、ターゲット結合基がカルボキシルであるもの。

#### 【0024】

本発明の第4の態様の化合物の前述の実施形態のさらに特定の実施形態は、基 $R_2$ を含み、この基 $R_2$ は、アルキル基、例えば $C_{1-6}$ アルキル基、例えばメチル、エチルまたはプロピル、例えばメチルなどであるか、または式 $-J-K$ のもの、例えば $J$ が1~6個の炭

50

素原子を含むアルキレンリンカー基、例えばメチレン、エチレン、プロピレンまたはブチレンであり、特定の実施形態によるとエチレンであり；ターゲット結合基がカルボキシルであってもよいものである。

【0025】

(i) および (ii) により本明細書中で直前に定義された化合物の特定およびさらに特定の実施形態は、(iii) 1つの $R^3$ もしくは $R^4$ は、式 - J - K の基、例えば J が、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキレンリンカー基、例えばメチレン、エチレン、プロピレンもしくはブチレンであり、特定の実施形態によるとエチレンであり、および / またはターゲット結合基がカルボキシルであるものをさらに含み得る。

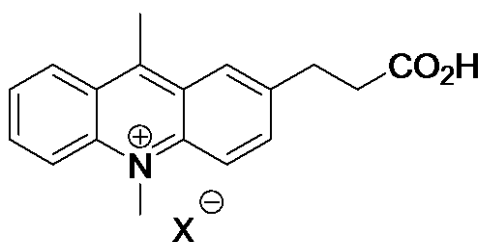
【0026】

本明細書中で直前に記載されている (i) ~ (iii) の特定の実施形態によると、1 つのターゲット結合基、例えばカルボキシルしか存在しない。一般的に、本発明のこれらおよび他の実施形態におけるターゲット結合基は、基 J を介して化合物の残りに接続している。

【0027】

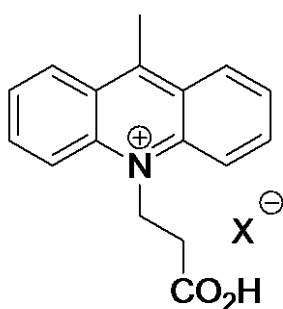
本発明のすべて態様の特定の実施形態によると、式 (I) の化合物は、以下に示す式 (III)、(IV)、(V)、(VI) または (VII) (式中、 $X^1$  は本明細書中に以前に記載されている通りである) のうちの 1 つを有する色素である。

【化 4】

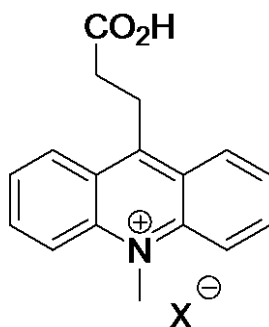


(III)

10

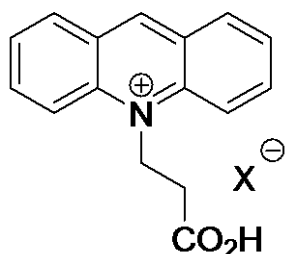


(IV)

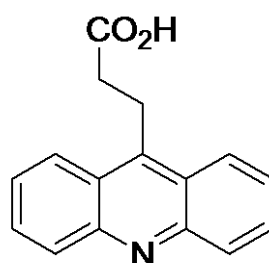


(V)

20



(VI)



(VII)

30

【0028】

本明細書中に記載されている蛍光色素の一部は、例えば第四級のアミノ基において電荷を含有することができ、これを使用することによって、塩を形成するか、または負に帯電した分子、例えば、DNAおよび/もしくはRNAに結合することができることを理解されたい。

40

【0029】

本明細書中に記載されている式(I)の化合物は、当業者により容易に合成することができる。ターゲット結合基は、化合物の合成開始時点で式(I)の化合物に導入してもよいし(例えば、三環式コアの構築以前)、または三環式に導入してもよいし、またはその構築後に導入してもよい。例えば、置換基R<sup>2</sup>がターゲット結合基を含む場合、これは、R<sup>2</sup>基の不在下で、R<sup>2</sup>(およびX<sup>-</sup>)への適当な前駆体を有する三輪系の中心窒素の四級化により、前駆体を式(I)の化合物と反応させることによって導入してもよい。代表的な合成は、当業者であれば、これらを容易に適合させることによって、必要に応じて式(

50

I)の他の化合物を作製することができ、これらを以下に記載する。

式(I)の化合物とコンジュゲートすることによって、例えば、本発明の第1、第2、第3および第6の態様、ならびに第5の態様に従い有用なコンジュゲートを提供することができる適切な生体分子として、これらに限定されないが、抗体、脂質、タンパク質、ペプチド、炭水化物、ヌクレオチドおよびオキシまたはデオキシポリ核酸からなる群が挙げられ、これらは、1つまたは複数のアミノ、スルフィドリル、カルボニル(アルデヒドおよびケトンを含む)、ヒドロキシル、カルボキシル、ホスフェート、チオホスフェート、アミノキシおよびヒドラジド基、微生物の物質、薬物、ホルモン、細胞、細胞膜および毒素を含有または誘導体化して含有する。

#### 【0030】

本明細書中に記載されている式(I)の蛍光色素を用いて標識するために特に好ましい生体分子はペプチドまたはタンパク質である。当業者であれば、合成されたペプチドの特異的な部位における標識を可能にする方法を認識している(例えば、Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press (1996)を参照されたい)。本明細書中に記載されているコンジュゲートは、細胞移入ペプチドを含み得る。細胞移入ペプチドは、Penetration(Cyclacel, UK)、例えばTATまたはChariotであってよい。

式(I)の色素は、蛍光寿命色素として使用するのが特に適切である。本発明によると、寿命色素という用語は、励起に続いて、色素がその励起状態のままである平均時間として定義される、測定可能な蛍光寿命を色素が有することを意味することを意図する(Lackowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, (1999))。

#### 【0031】

本発明の第1の態様に関して、本明細書中に記載されている式(I)の色素は、蛍光寿命を測定することができ、これによって、ターゲット物質、例えば、式(I)の色素がコンジュゲートすることができる生体分子の検出を可能にする多くの生化学的アッセイおよび/または細胞ベースのアッセイにおいて特に使用される。その結果として、本発明の第1の態様の代替の記載は、式(I)の化合物とターゲット分子(このターゲット分子は本明細書中に記載されているような生体分子であってよい)のコンジュゲートの蛍光寿命を測定することを含む方法とみなすことができる。例えば、本発明の第1の態様による使用および方法はアッセイ、例えば、国際公開第02/099424号および国際公開第03/089665号に記載されているものなど、または以下に記載されている実施形態を含めて、本発明の第2または第3の態様の方法などを含んでもよい。

#### 【0032】

本発明の第2の態様によるアッセイにおいて、例えば、式(I)の蛍光色素を使用することによって、試料中に分析物が存在するかどうかを検出することができる。これは、(i)分析物の公知の結合パートナーと、(ii)本明細書中で定義された通りの式(I)の化合物(例えば、必ずしも本発明の第4の態様によるものではない)のコンジュゲートを、分析物を含んでも、含まなくてもよい試料と接触させることによって達成する。コンジュゲート内の式(I)の蛍光色素の存在に起因する蛍光強度/蛍光寿命を、試料との接触の前後に測定する。測定した蛍光強度または蛍光寿命の任意のモジュレーションは、分析物の存在と相関させることができ、したがってこれをアッセイするために使用することができる。

#### 【0033】

一部の実施形態によると、本発明の第2の態様に従い使用されるコンジュゲートは、その存在を検出できることが望まれている分析物の特異結合パートナーを含むことができる。分析物と特異結合パートナーの例示的ペアとして、タンパク質/タンパク質、タンパク質/核酸、核酸/核酸、タンパク質/小分子および核酸/小分子のパートナー;または抗体/抗原、レクチン/糖タンパク質、ビオチン/ストレプトアビジン、ホルモン/受容体、酵素/基質または共同因子、DNA/DNA、DNA/RNAおよびDNA/結合タン

10

20

30

40

50

パク質が挙げられる。このリストは完全ではなく、他の組合せは当業者には明らかである。各組合せに対して、組合せのメンバーが分析物または分析物の公知の結合パートナーのいずれであってもよいことを理解されたい。したがって、例えば、本発明の第2の態様の実施形態によると、分析物は酵素であってよく、公知の結合パートナーは、これに対する基質もしくは共同因子であってよい、または分析物が、酵素に対する基質もしくは共同因子であってよく、この酵素が公知の結合パートナーである。

#### 【0034】

本発明の第3の態様によるアッセイにおいて、例えば、式(I)の蛍光色素を使用することによって、対象となる化合物と式(I)の色素とを含むコンジュゲートの存在下、酵素の活性を測定することができる。これは、このようなコンジュゲートを酵素に接触させることによって達成される。コンジュゲート内の式(I)の蛍光色素の存在に起因する蛍光強度/蛍光寿命を酵素との接触の前後に測定する。測定した蛍光強度または蛍光寿命の任意のモジュレーションは、酵素の活性と相関し得る。

10

#### 【0035】

一部の実施形態に従い、本発明の第3の態様により使用されるコンジュゲートの化合物は、生体分子、例えば、酵素に対する基質または共同因子、例えば酵素に対する基質であってよい。例えば、生体分子は、リン酸化および酵素キナーゼの影響を受けやすい。基質は、ペプチド基質、例えば4~20の間のアミノ酸残基を含むものであってよい。このようなペプチド基質はまた、本発明の第2の態様に従い分析物または公知の結合パートナーを構成してもよい。

20

このような基質または共同因子は、式(I)の化合物の蛍光および/または蛍光寿命をモジュレート(一般的に、必ずではないが、減少させる)する部分を含み得るが、その一方でコンジュゲートはインタクトなままである。式(I)の化合物からの蛍光(寿命)をモジュレートする部分の分離により、例えば、酵素によるコンジュゲートの切断により、蛍光強度および/または蛍光寿命は次いで一般的に増加する可能性があり、このような増加を使用して酵素の活性を測定する。

#### 【0036】

例えば、芳香族アミノ酸、例えば、トリプトファンなどを使用することによって、式(I)の色素の蛍光強度および/または蛍光寿命をモジュレートすることができる。式(I)の色素、およびトリプトファン残基(この残基は、ペプチダーゼ酵素の作用でペプチド基質から切断される)を含むペプチダーゼ酵素に対するペプチド基質のコンジュゲートを使用することによって、酵素の活性を測定することができる。蛍光標識したペプチドの蛍光をクエンチするための追加の方法が開示されている。したがって国際公開第02/081509号は、例えば、蛍光標識したペプチド内の蛍光強度を内部でクエンチするためのトリプトファン、チロシンまたはヒスチジン残基の使用について記載している。フェニルアラニンもまた、この目的のために使用することができ、ナフチルアラニン、その非天然アミノ酸変異体、またはむしろ非天然の芳香族アミノ酸であってよい。ペプチドを使用することによって、エンド-およびエキソ-ペプチダーゼ活性を検出することができる。蛍光性寿命測定に関する追加の方法は、当業者らが対象とする国際公開第03/089663号に記載されている。この中に記載されている技法は、本明細書中に開示されている方法に適用することができる。

30

40

代わりに、コンジュゲートが、キナーゼに対する基質と式(I)の蛍光色素のものであってもよく、すなわちコンジュゲートがキナーゼでリン酸化されてもよい。このようなコンジュゲートは、本明細書中に記載されている、例えば芳香族アミノ酸(直前に記載されている)などのような蛍光-モジュレートした部分を含み得る。蛍光モジュレートする部分がチロシンである場合、例えば、そのフェノールのヒドロキシル基のリン酸化は、これをホスフェート部分に変換する働きをし、これによって、チロシンの芳香族環の蛍光-モジュレート作用がモジュレートされて、基質の蛍光の増加が生じる。

#### 【0037】

直前に記載されている本発明の実施形態の変異形として、コンジュゲートは、キナーゼ

50

によるリン酸化に影響を受けやすい基質を含んでもよく、このリン酸化が蛍光モジュレートする部分の導入を許す働きをする。例えば、蛍光モジュレートする必要のないアミノ酸残基の側鎖のリン酸化（例えばセリンまたはトレオニン）は、国際公開第2009/001051号に記載されているように、鉄（III）イオンに配位した多座の配位子で構成される蛍光モジュレート部分へ曝露させて、タンデムで使用することができる。例えば、多座の配位子は、芳香族またはヘテロ芳香族を含有し、および/または二座配位もしくは三座配位であってよい。こうして、本発明の第3の態様による接触は、鉄（III）イオンとこのような配位子の間に形成されるキレートが存在下で（コンジュゲートに加えて）行うことができる。特定の実施形態によると、キレートは、フェニルマロン酸または2-ヒドロキシアセトフェノンのものであってよい。理論に制約されることを望むことなく、鉄（III）イオンは、本発明のこれらの実施形態に従い、静電相互作用を介してホスフェート部分に結合し、芳香族配位子を蛍光体と近接させ、これによって、蛍光モジュレーションが生じ、したがって基質の蛍光を低減させることを理解されたい。

10

20

30

40

50

#### 【0038】

本発明の第3の態様の代替の実施形態に従い、酵素を使用することによって、化合物とコンジュゲートの間のライゲーションを生じることができ、このライゲーションが、ライゲーションの際に式（I）の化合物の蛍光および/または蛍光寿命をモジュレートする（一般的に、必ずではないが、減少させる）。したがって、酵素の反応により、蛍光強度および/または蛍光寿命は、次いで一般的に低減する可能性があり、このような低減を使用して、酵素の活性を測定する。例えば、モジュレートする化合物は、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、ナフチルアラニンまたはフェニルアラニン残基を含むペプチドであってよく、ライゲーションが、残基を式（I）の色素に近接させる働きをすることによって、生成したライゲーション生成物の蛍光強度および/または蛍光寿命が生じるようになる。他の蛍光モジュレートする部分として、例えば、ナフチル、インドリルおよびフェノキシ基が挙げられる。

#### 【0039】

本発明の第2の態様（分析物または公知の結合パートナーのいずれかが酵素である場合）および本発明の第3の態様の実施形態に従い、酵素は、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、ペプチダーゼ、アミダーゼ、ヌクレアーゼおよびグリコシダーゼ、例えばキナーゼおよびホスファターゼからなる群から選択することができる。例えば、酵素は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）、カスパーゼ、カテプシンD、キモトリプシン、ペプシン、スプチリシン、プロテアーゼK、エラスターゼ、ネプリライシン、サーモリシン、asp-n、マトリクスメタロタンパク質1~20、パパイン、プラスミン、トリプシン、エンテロキナーゼおよびウロキナーゼからなる群から選択される。

#### 【0040】

本発明の第3の態様の特定の実施形態に従い、本方法を使用することによって、もしある場合には、酵素の活性の際に試験化合物が有する作用を求めることができる。これらの実施形態に従い、本発明の第3の態様の方法を試験化合物の存在下および不在下の両方で行う。見出された酵素の活性の何らかの相違点は、化合物により示される酵素の活性の際の作用を示している。例えば、化合物は、酵素の阻害剤または助触媒として作用し得る。特定の実施形態に従い、本発明の第3の態様よる複数の方法を試験化合物の異なる量または濃度で行うことができる。こうして、例えば、IC<sub>50</sub>値を求めることができ、この場合、試験化合物は酵素の阻害剤である。

#### 【0041】

細胞ベースのアッセイに関して、アッセイは、生細胞上でまたは細胞構成成分、例えば、細胞壁フラグメントなどを使用して行うことができる。原核のおよび真核細胞を含めた任意の細胞、特に哺乳動物のおよびヒト細胞を採用することができる。

本発明の方法および使用は、液体培地、一般には溶液中で、任意の便利なpHで（一般的にはおよそ5~9の範囲）行うことができる。液体培地は、一般的に水性である。例えば、水または適当な酸性またはアルカリ性溶液、例えば緩衝溶液、例えば、リン酸緩衝生

理食塩水（PBS）溶液などを使用することができる。

本発明の特定の実施形態によると、式（I）の異なる色素、例えば異なる化合物へのコンジュゲートを、本発明の様々な態様に従い同時に使用することができる。色素の蛍光強度および/または蛍光寿命により互いに区別することが可能である場合、これによって多重化が可能となる。さらなる詳細は、国際公開第03/089663号において見出すことができる（以下）。

【0042】

本発明の方法は、マルチウェルプレートのウェル、例えば、24、96、384またはより高い密度のウェル、例えば864または1536ウェルを有するマイクロタイタープレートの中で一般的に実施することができる。適切な装置は、Edinburgh Instruments Nanotaurus Fluorescence Lifetime Plater readerである。代わりに、本方法は、アッセイ管内または多流体デバイスのマイクロチャンネル内で行うこともできる。

10

【0043】

従来を検出方法を採用して、標識の蛍光強度および/または寿命を測定することができる。これらの方法は、検出デバイスとして光電子増倍管を使用する装置を含む。これらの方法、例えば：

i) 時間相関単一光子計数に基づく方法 (Principles of Fluorescence Spectroscopy, (Chapter 4) ed. J R Lakowicz, Second Edition, 1999, Kluwer/Academic Pressを参照)

20

ii) 周波数領域/位相変調に基づく方法 (Principles of Fluorescence Spectroscopy, (Chapter 5) ed. J R Lakowicz, Second Edition, 1999, Kluwer/Academic Pressを参照) ; および

iii) 時間ゲーティングに基づく方法 (Sanders et al., (1995) Analytical Biochemistry, 227 (2), 302-308を参照)

を使用するいくつかの手法が可能である。

適切なデバイスは、Edinburgh Instruments FLS920 蛍光光度計、Edinburgh Instruments、UKである。

【0044】

蛍光性強度の測定を電荷結合素子（CCD）撮像装置、例えば、走査型撮像装置またはエリアイメージャーなどを用いて実施することによって、マルチウェルプレートのすべてのウェルを撮像することができる。LEADseeker（商標）システムは、単一パスでの高密度マイクロタイタープレートの画像化を可能にするCCDカメラを特徴として備えている。画像化は、定量的で、急速であり、画像化用途に対して適切な装置類は、現在ではマルチウェルプレート全体を同時に撮像することができる。

30

本明細書中で言及されたすべての刊行物（特許および非特許）は、これらの全体が、各言及の全体の内容が、本明細書中に全体として記載されているかのように、参照により組み込まれている。

本発明はここで以下の非限定的例により例示される。

【実施例】

40

【0045】

(例1)

試験した様々なアクリジン誘導体に対する蛍光寿命が表1に報告されている。蛍光寿命は、Edinburgh Instruments Nanotaurus 蛍光寿命プレートリーダーを使用して、検出用の励起レーザー405nmおよび438nmバンドパス、450nmバンドパスまたは473nmロングパス発光フィルターのいずれかを使用して、時間相関単一光子計数（TCSPC）の取得により求めた。

【0046】

【表 1】

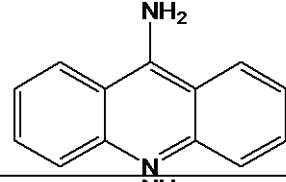
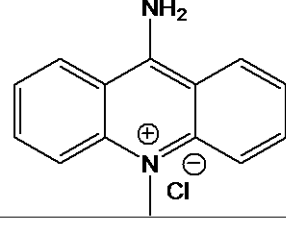
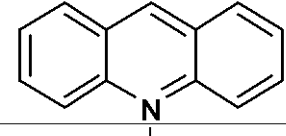
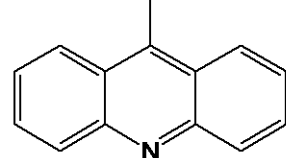
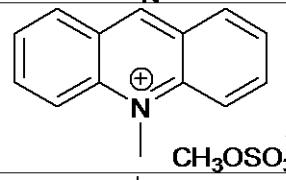
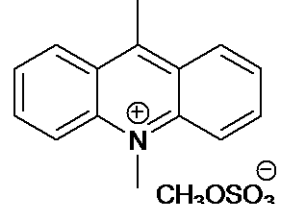
エントリー	構造	蛍光寿命(ns)		
		1 $\mu$ M in P BS	水中1 $\mu$ M	50mM AcOH溶液中1 $\mu$ M
1		15.6	15.7	15.6
2		16.3	16.4	16.4
3		18.8	10.5	29.4
4		11.7	29.1	29.1
5		31.9	14.1	32.1
6		26.2	30.0	29.8

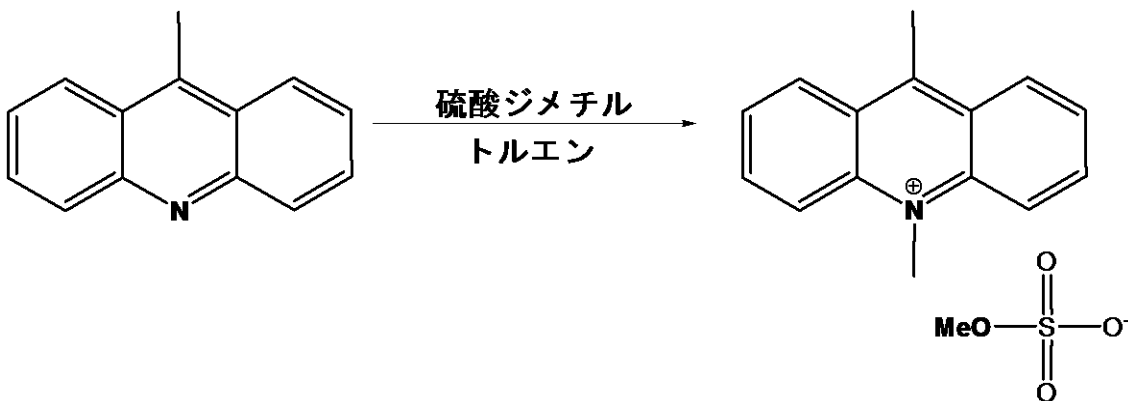
表1:長い寿命の蛍光色素

【 0 0 4 7 】

(例 2)

9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの合成

【化 5】



10

20

30

40

50

9 - メチルアクリジン (440 mg、2.3 mmol) をトルエン (10 ml) 中に溶解し、次いでジメチルスルフェート (652  $\mu$ l、6.9 mmol) を加えた。混合物を2時間加熱還流し、次いで室温まで冷却させておいた。黄色の沈殿物を濾過で単離し、ジエチルエーテル、続いてジエチルエーテル/ジクロロメタンで洗浄することによって、黄緑色の粉末として、生成物を得た (720 mg、定量的収量)。<sup>1</sup>H NMR および MS による分析は構造に一致した。

【0048】

(例3)

9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの蛍光分析

励起波長 350 nm および発光波長 490 nm を用いて、定常状態測定を Edinburgh Instruments FLS 920 定常状態蛍光光度計で実施した。Edinburgh Instruments Nanotaurus 蛍光寿命プレートリーダーを使用して、検出用の励起レーザー 405 nm および 473 nm ロングパス発光フィルターを使用して、時間相関単一光子計数 (TCSPC) の取得により蛍光寿命を求めた。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液、pH 7.4 中、1  $\mu$  の 9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの濃度で蛍光励起および発光スペクトルを測定した。蛍光励起および発光スペクトル、ならびに蛍光寿命減衰曲線がそれぞれ図 1 (a) および図 1 (b) に示されている。

9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートは、有利なことに、およそ 25 ~ 30 ns という長い蛍光寿命を有する。加えて、蛍光寿命の規模は、試験した 3 つの緩衝系にわたり維持された (表 1、エントリー 6 を参照されたい)。

【0049】

(例4)

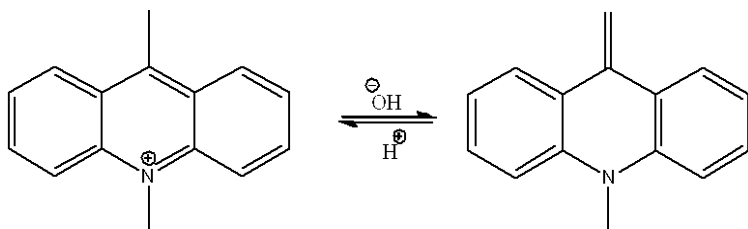
pH 安定性の実験

生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイにおける使用に対して適切な蛍光色素の重要な基準は、蛍光寿命が、pH に関係なく、生理学的範囲の 5 ~ 9 内にあるという利点である。9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの蛍光寿命は、pH 範囲 3 ~ 10 にわたり安定している (図 2 を参照されたい)。

405 nm での励起において、pH の関数として蛍光発光プロファイルを測定した (図 3)。最大発光である 460 nm および 490 nm を pH 3 ~ 10 のすべての溶液に対して観察したが、pH > 10 の溶液に対して、最大発光が 425 および 450 nm にシフトした。pH > 10 に対する蛍光発光プロファイルおよび蛍光寿命のこの変化は、塩基性条件下での、9 位での酸性メチルプロトンの脱プロトン化を表している可能性があり、以下のスキーム 1 で示されているように 9 - メチレンアクリジンが供給される。：これらのメチルプロトンは、普通と違い酸性であり、酢酸と同種の pKa を有することがことを報告されている (Tanaka, Y. et al., J. Org. Chem., 2001, 66, 2227)。

【0050】

【化6】



スキーム 1

【0051】

(例5)

カルボン酸部分を用いた、9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムメチルスルフェートの誘導化

蛍光体の生体分子、例えば、ペプチドおよびタンパク質などへの付着を促進するために

は、多くの場合、蛍光体のカルボン酸誘導体が望ましい。このような化合物は、ペプチドおよびタンパク質上のアミノ官能基と反応することによって、アミド結合形成を介したコンジュゲーションを可能にする。一連のアクリジンおよびアクリジニウム化合物が設計され、これらすべては、カルボン酸部分を取り込むことによって、アミド結合連結を介したペプチドへの付着を可能にしている（表2を参照されたい）。

【0052】

【表2】

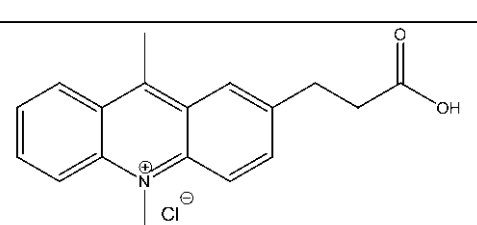
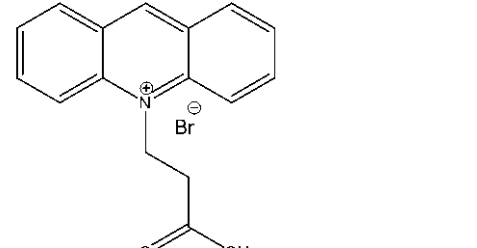
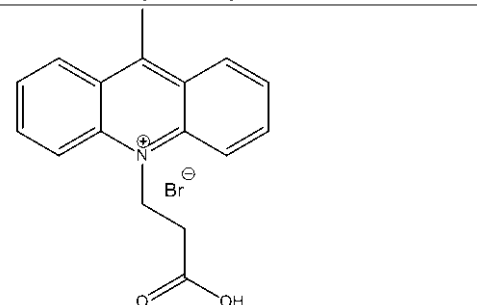
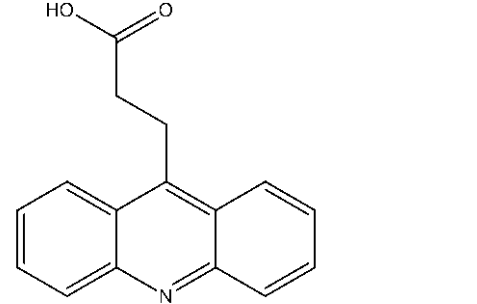
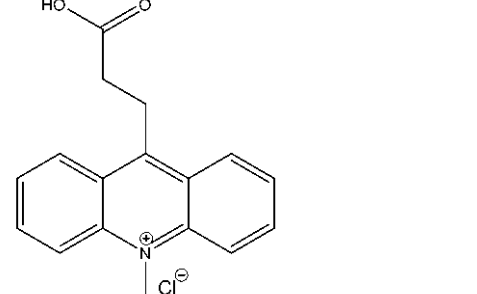
ターゲット	構造	名称
1 (III)		2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムクロリド
2 (VI)		10-(2-カルボキシエチル)アクリジン-10-イウムブロミド
3 (IV)		10-(2-カルボキシエチル)-9-メチルアクリジン-10-イウムブロミド
4 (VII)		3-(アクリジン-9-イル)プロピオン酸
5 (V)		9-(2-カルボキシエチル)-10-メチルアクリジン-10-イウムクロリド

表2 カルボン酸誘導体化されたアクリジン/アクリジニウム色素

【0053】

カルボン酸を用いた、9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムメチルスルフェート

10

20

30

40

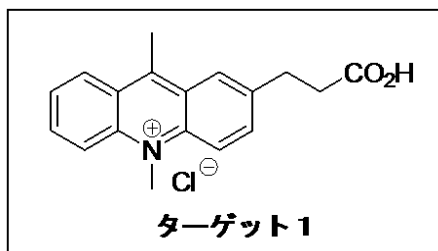
50

の 2 位での誘導化

【 0 0 5 4 】

ターゲット 1 : 2 - ( 2 - カルボキシエチル ) - 9 , 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムクロリド

【 化 7 】



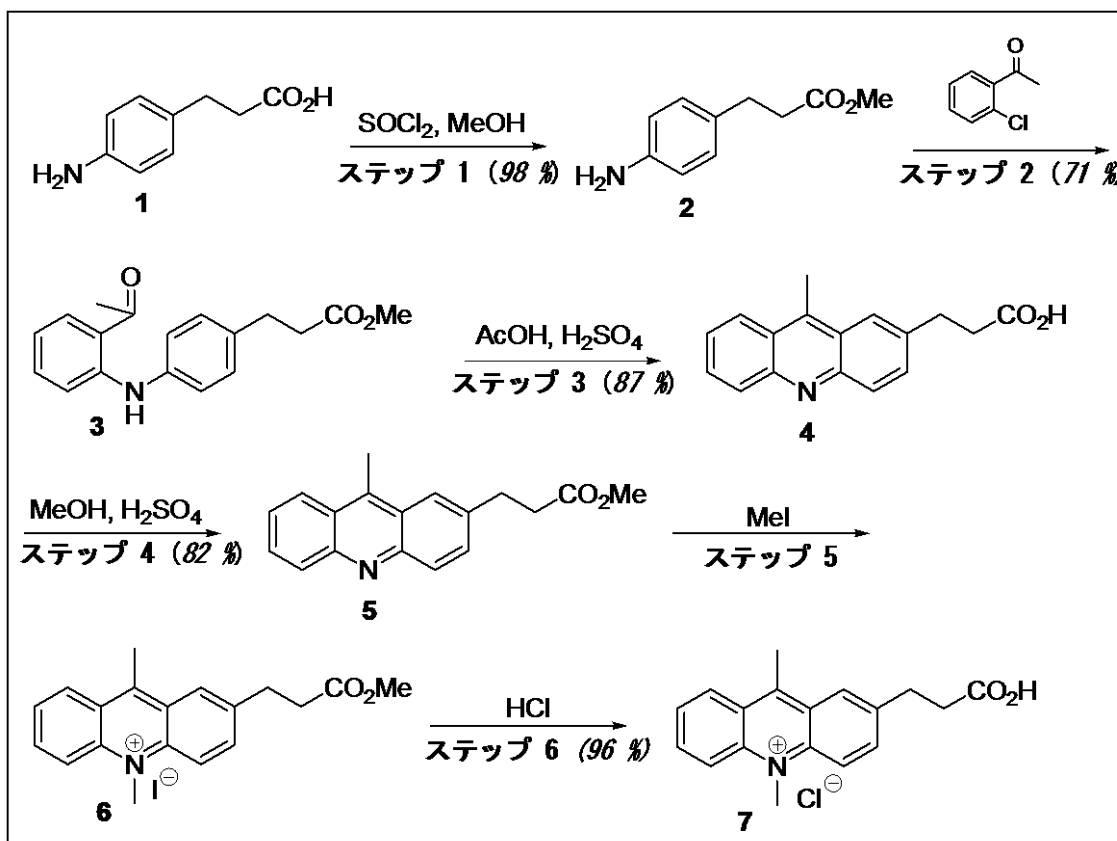
10

ターゲット 1 を 6 ステップで合成することによって、塩化物塩として、2 - ( 2 - カルボキシエチル ) - 9 , 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムを得た ( スキーム 2 ) 。最初の 3 ステップはうまく進行して、所望のプロピオン酸リンカーが結合しているアクリジン環骨格が得られた。しかし残念なことに、メチルエステル基は最後の環化ステップ ( ステップ 3 ) で加水分解され、取扱いを簡単にするために酸をエステルに変換し戻し、それに続くステップのために溶解度を補強することを決定した。封管内でヨウ化メチルを使用して N - メチル化を行い、最後にエステルの加水分解により、所望のターゲットを得た。

20

【 0 0 5 5 】

【 化 8 】



30

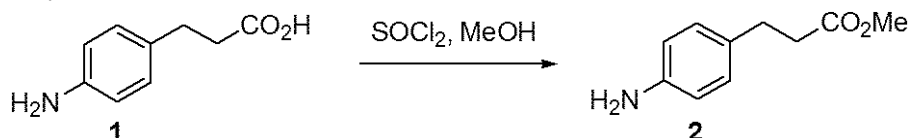
40

スキーム 2

【 0 0 5 6 】

ステップ 1

## 【化9】



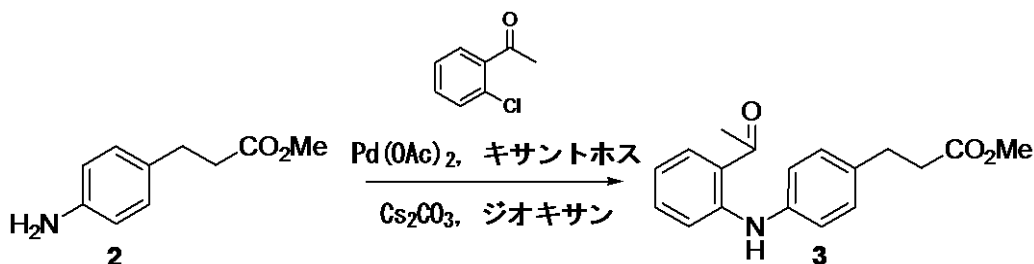
3 - ( 4 - アミノ - フェニル ) - プロピオン酸 **1** ( 5 g、30.3 mmol ) を  $\text{SOCl}_2$  ( 20 mL ) 中、室温で3時間攪拌した。 $\text{SOCl}_2$ を真空中で除去し、残渣を  $\text{MeOH}$  中で慎重に再溶解し、5分間攪拌した。 $\text{MeOH}$ を真空中で除去し、残渣を  $\text{DCM}$  中に溶解し、10%  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液中で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で乾燥させ、真空中で濃縮した。カラムクロマトグラフィー ( ヘプタン /  $\text{EtOAc}$ 、70 : 30 ) での精製により、無色の固体として、3 - ( 4 - アミノ - フェニル ) - プロピオン酸メチルエステル **2** を得た ( 5.37 g、29.9 mmol、98% )。 $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 6.98(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 2H, ar), 6.62(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 2H, ar), 3.66(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.83(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.57(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 173.56(C=O), 144.64(C), 130.54(C), 129.10(CH x 2), 115.30(CH x 2), 51.54( $\text{OCH}_3$ ), 36.15( $\text{CH}_2$ ), 30.18( $\text{CH}_2$ ); ESI  $m/z=180.17(\text{M}+\text{H})^+$ , 計算値 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2=179.09$

10

## 【0057】

ステップ2

## 【化10】



20

## 【0058】

3 - ( 4 - アミノ - フェニル ) - プロピオン酸メチルエステル **2** ( 5.37 g、29.9 mmol )、2 - クロロアセトフェノン ( 4.09 mL、31.5 mmol )、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  ( 338 mg、1.51 mmol、5モル% )、キサントホス ( 864 mg、1.49 mmol、5モル% ) および  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  ( 14.6 g、44.8 mmol ) をジオキサン ( 60 mL ) 中に溶解した。混合物を110で20時間攪拌した。冷却後、セライトを介して混合物を濾過し、 $\text{DCM}$  で洗浄し、溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー ( ヘプタン /  $\text{EtOAc}$ 、80 : 20 ) での精製により、黄色の油として、3 - [ 4 - ( 2 - アセチル - フェニルアミノ ) - フェニル ] - プロピオン酸メチルエステル **3** を得た ( 6.26 g、21.1 mmol、71% )。 $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 10.41(br, NH), 7.73(dd,  $J=8.1, 1.4\text{Hz}$ , 1H, ar), 7.22(dt,  $J=8.5, 1.4\text{Hz}$ , 1H, ar), 7.11(m, 5H, ar), 6.63(dt,  $J=7.5, 1.1\text{Hz}$ , 1H, ar), 3.61(s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.87(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.57(t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.55(s, 3H,  $\text{COCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 201.16(C), 173.34(C), 148.24(C), 138.49(C), 136.31(C), 134.55(CH), 132.53(CH), 129.21(CH x 2), 123.56(CH x 2), 118.83(C), 116.29(CH), 114.08(CH), 51.64( $\text{OC H}_3$ ), 35.75( $\text{CH}_2$ ), 30.42( $\text{CH}_2$ ), 28.11( $\text{COCH}_3$ ); ESI  $m/z=280.25(\text{M}+\text{H})^+$ , 計算値 $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3=279.35$

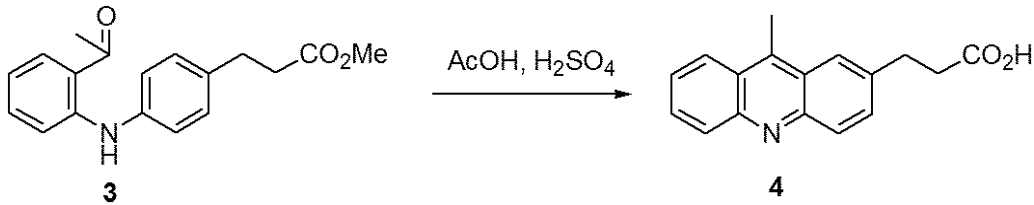
30

40

## 【0059】

ステップ3:

## 【化11】

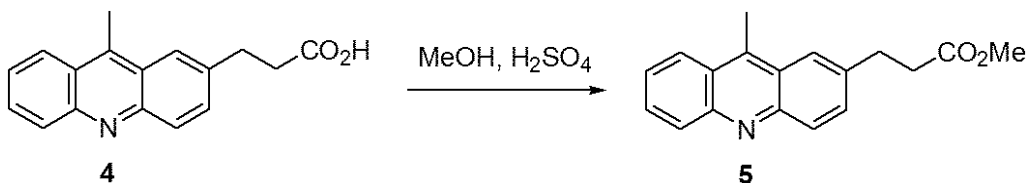


3 - [ 4 - ( 2 - アセチル - フェニルアミノ ) - フェニル ] - プロピオン酸メチルエステル 3 ( 2 . 2 0 g、7 . 4 0 m m o l ) を酢酸 ( 3 0 m L ) 中に溶解した。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( 2 m L ) を加え、混合物を攪拌しながら 3 時間還流させた。室温まで冷却後、pH 6 が得られるまで固体 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えた。固体を濾過で単離し、真空下で乾燥させることによって、淡黄色の固体として、3 - ( 9 - メチル - アクリジン - 2 - イル ) プロピオン酸 4 を得た ( 1 . 7 1 g、6 . 4 5 m m o l、8 7 % )。この物質をさらなる精製なしで使用した。

## 【0060】

ステップ 4 :

## 【化12】

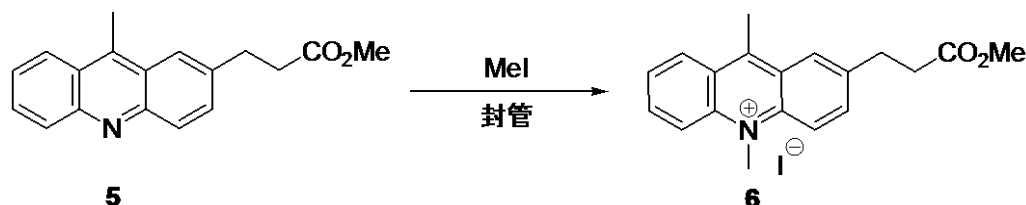


3 - ( 9 - メチル - アクリジン - 2 - イル ) プロピオン酸 4 ( 1 . 3 5 g、5 . 0 9 m m o l ) を MeOH ( 5 0 m L ) 中に溶解し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( 2 m L ) を加えた。混合物を 4 時間還流で攪拌し、次いで水の中に注ぎ入れた。生成物を DCM で抽出し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、真空中で濃縮することによって、淡褐色の固体として、3 - ( 9 - メチル - アクリジン - 2 - イル ) - プロピオン酸メチルエステル 5 を得た ( 1 . 1 6 g、4 . 1 5 m m o l、8 2 % )。<sup>1</sup>H NMR ( 5 0 0 M H z、C D C l<sub>3</sub> ) 8.14 ( m、3 H、ar )、7.96 ( s、1 H、ar )、7.68 ( m、1 H、ar )、7.57 ( m、1 H、ar )、7.47 ( m、1 H、ar )、3.62 ( s、3 H、OCH<sub>3</sub> )、3.14 ( t、J=7.8 Hz、2 H、CH<sub>2</sub> )、3.04 ( s、1 H、CH<sub>3</sub> )、2.72 ( t、J=7.8 Hz、2 H、CH<sub>2</sub> )；<sup>13</sup>C NMR ( 1 2 5 M H z、C D C l<sub>3</sub> ) 173.18 ( C )、184.21 ( C )、147.61 ( C )、141.43 ( C )、137.53 ( C )、131.19 ( C H )、130.50 ( C H )、130.26 ( C H )、129.48 ( C H )、125.70 ( C )、125.47 ( C H )、124.48 ( C H )、122.65 ( C H )、51.73 ( OCH<sub>3</sub> )、35.39 ( CH<sub>2</sub> )、31.47 ( CH<sub>2</sub> )、13.60 ( CH<sub>3</sub> )；ESI m/z=280.25 ( M+H )<sup>+</sup>、計算値 C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>=279.33

## 【0061】

ステップ 5 :

## 【化13】



## 【0062】

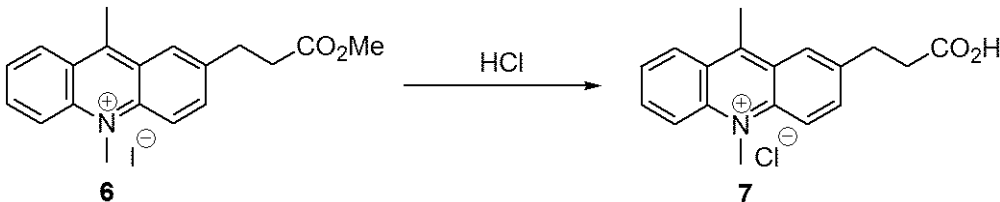
3 - ( 9 - メチル - アクリジン - 2 - イル ) プロピオン酸メチルエステル 5 ( 1 2 0 m g、0 . 4 3 m m o l ) を MeI ( 3 m L ) 中に溶解した。混合物を封管内、90 で 2 0 時間攪拌した。沈殿物を濾過で収集し、真空下で乾燥させることによって、未反応の 5 および 2 - ( 2 - メトキシカルボニル - エチル ) - 9 , 1 0 - ジメチル - アクリジニウムヨウ化物 6 の混合物を得た ( 1 5 / 8 5 )。この混合物をカラムクロマトグラフィーで精製した ( D C M / E t O H、9 0 : 1 0 )。<sup>1</sup>H NMR ( 5 0 0 M H z、( C D<sub>3</sub> )<sub>2</sub>S O<sub>2</sub> ) 8.88 ( d、J=8.

6Hz, 1H, ar), 8.72(m, 3H, ar), 8.40(dt, J=9.9, 7.5Hz, 2H, ar), 8.01(t, J=7.6Hz, 1H, ar), 4.80(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.62(s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.50(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.25(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.91(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 172.46(C), 159.65(C), 140.24(C), 139.93(C), 139.65(CH), 139.32(C), 137.79(CH), 128.05(CH), 127.28(CH), 126.07(CH), 125.60(C x 2), 119.29(CH), 119.20(CH), 51.43(OCH<sub>3</sub>), 38.67(CH<sub>3</sub>), 34.13(CH<sub>2</sub>), 29.78(CH<sub>2</sub>), 16.40(CH<sub>3</sub>); ESI m/z=294.25(M)<sup>+</sup>, 計算値C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>=294.37

【0063】

ステップ6:

【化14】



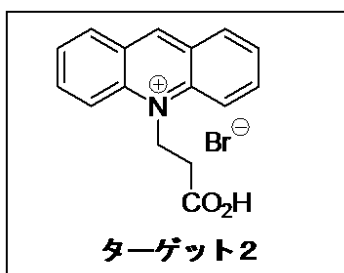
2 - (2 - メトキシカルボニル - エチル) - 9 , 10 - ジメチル - アクリジニウムヨウ化物6 (250mg、0.594mmol) を6M HCl (10mL) 中に溶解し、混合物を撹拌しながら3.5時間還流させた。真空中での濃縮により、淡褐色の固体として、2 - (2 - カルボキシ - エチル) - 9 , 10 - ジメチル - アクリジニウムクロリド7を得た(180mg、0.570mmol、96%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 8.88(d, J=8.7Hz, 1H, ar), 8.72(m, 3H, ar), 8.40(m, 2H, ar), 8.01(t, J=7.6Hz, 1H, ar), 4.80(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.50(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.22(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.31(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 173.52(C), 159.56(C), 140.63(C), 139.88(C), 139.74(CH), 139.29(C), 137.45(CH), 128.04(CH), 127.26(CH), 125.97(CH), 125.60(C), 125.55(C), 119.24(CH), 119.19(CH), 38.68(CH<sub>3</sub>), 34.53(CH<sub>2</sub>), 29.91(CH<sub>2</sub>), 16.40(CH<sub>3</sub>); ESI m/z=280.26(M)<sup>+</sup>, 計算値C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>=280.34

【0064】

10位での誘導化

ターゲット2: 10 - (2 - カルボキシエチル) アクリジン - 10 - イウムブロミド

【化15】



ターゲット2を4ステップで合成することによって、10 - (2 - カルボキシエチル) アクリジン - 10 - イウムブロミドを得た(スキーム3)。Omura, S. et al., J. Antibiotics, 1992, 45, 1139に記載されているように、プロピオラクトン8を3 - トリフルオロメタンスルホニルオキシ - プロピオン酸ベンジルエステル10に変換した。それに続いて、アクリジンとの反応を、Fukuzumi, S. et al., J. Mater. Chem., 2005, 15, 372に記載のプロトコルに従い実施した。

【0065】

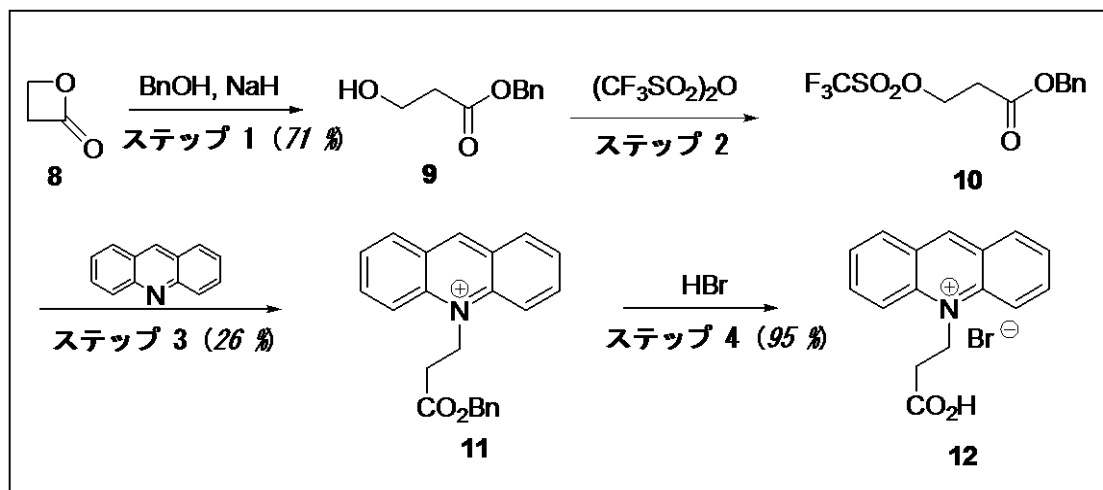
10

20

30

40

## 【化 1 6】



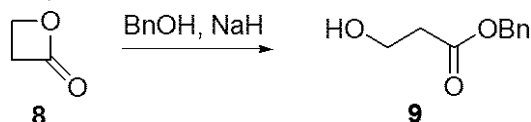
10

## スキーム3

【0066】

## ステップ1

【化17】



20

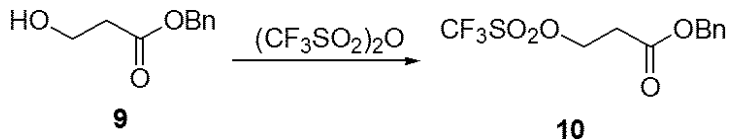
ベンジルアルコール (5 mL、48.3 mmol) を、氷浴内で冷却し、60% NaH (50 mg、1.25 mmol) を少しずつ加え、混合物を 0 で 30 分間攪拌した。次いで、プロピオラクトン 8 (0.5 mL、7.97 mmol) を滴加し、混合物を 0 でさらに 30 分間攪拌した。2 M HCl (2 mL) の添加により反応をクエンチした。混合物を DCM で抽出し、水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製することによって (ヘプタン/EtOAc、80:20)、無色の油として、3-ヒドロキシ-プロピオン酸ベンジルエステル 9 を得た (1.02 g、5.66 mmol、71%)。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR および MS による分析は構造と一致した。

30

【0067】

## ステップ2

【化18】



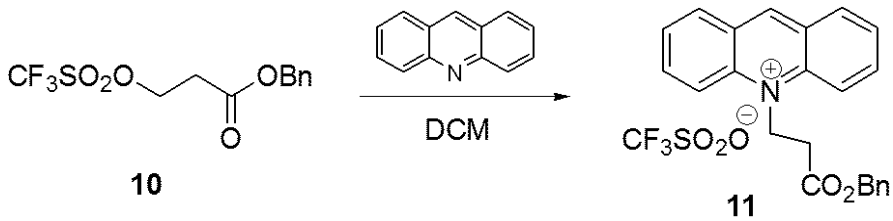
40

3-ヒドロキシ-プロピオン酸ベンジルエステル 9 (360 mg、2.0 mmol) およびピリジン (178 μL、2.2 mmol) を DCM (8 mL) 中に溶解した。溶液を -20 に冷却し、トリフル無水物 (368 μL、2.2 mmol) を滴加した。混合物を -20 で 30 分間攪拌し、次いで室温で 1 時間攪拌した。真空中での濃縮および急速なカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/EtOAc、80:20) での精製により、3-トリフルオロメタンスルホニルオキシ-プロピオン酸ベンジルエステル 10 を得た。これを次のステップでそのまま使用した (2 mmol と推測)。

【0068】

## ステップ3

## 【化19】

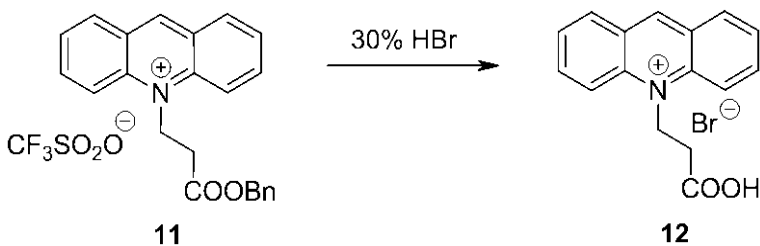


3 - トリフルオロメタンスルホニルオキシ - プロピオン酸ベンジルエステル 10 (2 mmol と推測) およびアクリジン (360 mg、2 mmol) を DCM (10 mL) 中に溶解し、混合物を室温で 24 時間撹拌した。真空中での濃縮により、黒色油を得た。これを、ヘプタン中に沈殿させ、濾過で単離した。カラムクロマトグラフィー (DCM / EtOH、95 : 5) での精製により、黄色の固体として、10 - (3 - (ベンジルオキシ) - 3 - オキソプロピル) アクリジン - 10 - イウムトリフルオロメタンスルホネート 11 を得た (260 mg、0.529 mmol、26%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.99 (s, 1H, ar), 8.54 (dd, 4H, ar), 8.29 (t, 2H, ar), 7.83 (t, 2H, ar), 7.23 (m, 5H, ar), 5.70 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.25 (t, 3H, CH<sub>2</sub>)。 10

## 【0069】

## ステップ 4

## 【化20】

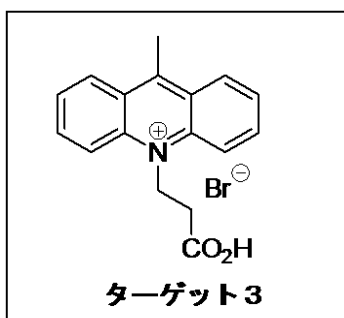


10 - (3 - (ベンジルオキシ) - 3 - オキソプロピル) アクリジン - 10 - イウムトリフルオロメタンスルホネート 11 (250 mg、0.508 mmol) を、酢酸中 30% HBr の中に溶解し、混合物を 50 で 2 時間撹拌した。真空中での濃縮により、淡褐色固体として、10 - (2 - カルボキシエチル) アクリジン - 10 - イウムプロミド 13 を得た (160 mg、0.482 mmol、95%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 10.25 (s, 1H, ar), 8.76 (d, 2H, ar), 8.67 (d, 2H, ar), 8.49 (t, 2H, ar), 8.06 (t, 2H, ar), 5.60 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.13 (t, 3H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 171.40 (C), 151.49 (CH), 140.30 (C), 139.53 (CH), 130.00 (CH), 127.76 (CH), 126.43 (C), 118.42 (CH), 46.16 (CH<sub>2</sub>), 32.52 (CH<sub>2</sub>); ESI m/z=252.24 (M)<sup>+</sup>, 計算値 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>=252.29 30

## 【0070】

ターゲット 3 : 10 - (2 - カルボキシエチル) - 9 - メチルアクリジン - 10 - イウムプロミド

## 【化21】

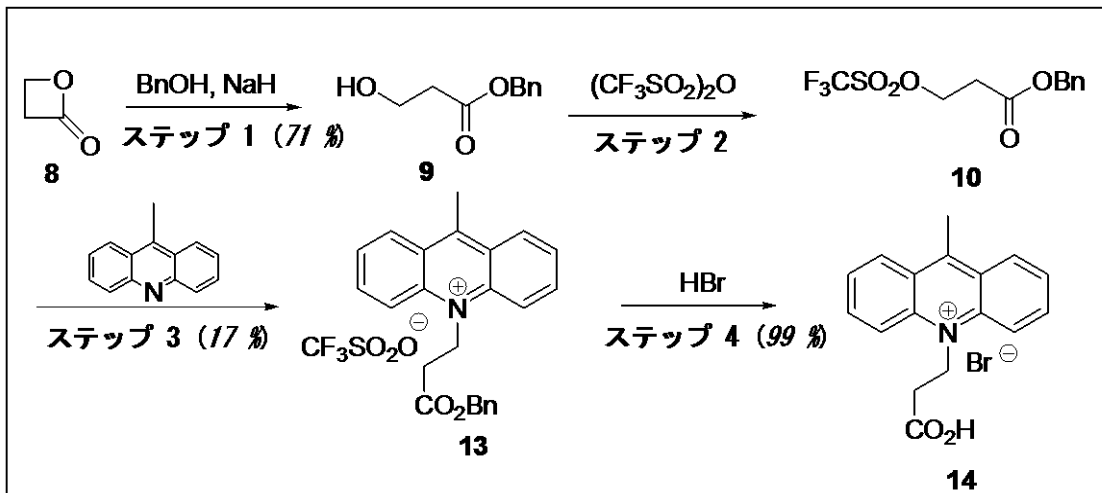


## 【0071】

ターゲット 2 と同様の方式でターゲット 3 を得たが、9 - メチルアクリジンをアクリジ 50

ンの代わりに使用した（スキーム 4）。

【化 2 2】



10

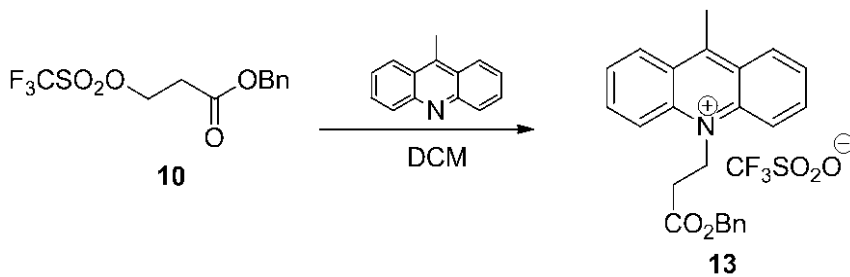
スキーム 4

【 0 0 7 2 】

ステップ 3

【化 2 3】

20



3 - トリフルオロメタンスルホニルオキシ - プロピオン酸ベンジルエステル 10 ( 3 . 5 mmol と推測 ) および 9 - メチルアクリジン ( 386 mg、2 mmol ) を DCM ( 10 mL ) 中に溶解し、混合物を室温で 24 時間攪拌した。真空中での濃縮により、黒色油を得て、カラムクロマトグラフィー ( DCM / EtOH、100 ~ 95 : 0 ~ 5 ) での精製により、黄色の固体として、所望の 10 - ( 3 - ( ベンジルオキシ ) - 3 - オキソプロピル ) - 9 - メチルアクリジン - 10 - イウムトリフルオロメタンスルホネート 13 を得た ( 120 mg、0 . 232 mmol、12% )。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.69(d, 2H, ar), 8.60(d, 2H, ar), 8.32(t, 2H, ar), 7.92(t, 2H, ar), 7.27(m, 5H, ar), 5.69(t, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.06(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.46(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.27(t, 3H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, CDCl<sub>3</sub>) 169.79(C), 161.32(C), 139.93(CH), 138.51(C), 135.02(C), 128.57(C H), 128.44(CH), 128.42(CH), 128.21(CH), 128.03(CH), 126.10(C), 118.52(CH), 67.53(CH<sub>2</sub>), 46.08(CH<sub>2</sub>), 33.28(CH<sub>2</sub>), 16.25(CH<sub>3</sub>); ESI m/z=356.20 計算値 C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>=356.44

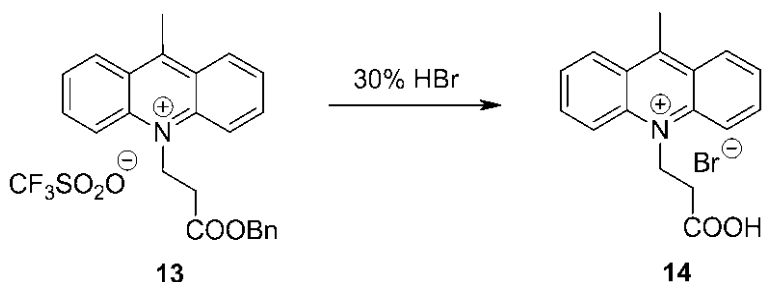
30

40

【 0 0 7 3 】

ステップ 4

【化24】



10 - (3 - (ベンジルオキシ) - 3 - オキソプロピル) - 9 - メチルアクリジン - 10 - イウムトリフルオロメタンスルホネート 13 (100 mg、0.193 mmol) を酢酸中 30% HBr の中に溶解し、混合物を 50 で 2 時間撹拌した。真空中での濃縮により、淡褐色の固体として、10 - (2 - カルボキシエチル) - 9 - メチルアクリジン - 10 - イウムプロミド 14 を得た (65 mg、0.187 mmol、99%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 8.93(d, 2H, ar), 8.72(d, 2H, ar), 8.44(t, 2H, ar), 8.03(t, 2H, ar), 5.54(t, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.49(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.13(t, 3H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) 171.41(C), 161.71(C), 139.72(CH), 138.76(C), 128.32(CH), 127.40(CH), 125.67(C), 118.70(CH), 46.08(CH<sub>2</sub>), 32.48(CH<sub>2</sub>), 16.59(CH<sub>3</sub>); ESI m/z=266.26 計算値 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>=266.32.

10

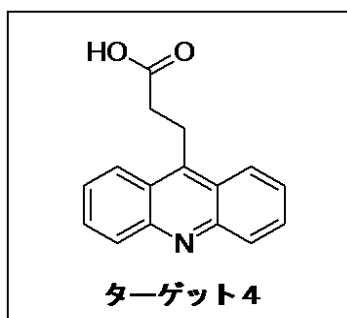
【0074】

20

9 位での誘導化

ターゲット 4 : 3 - (アクリジン - 9 - イル) プロピオン酸

【化25】

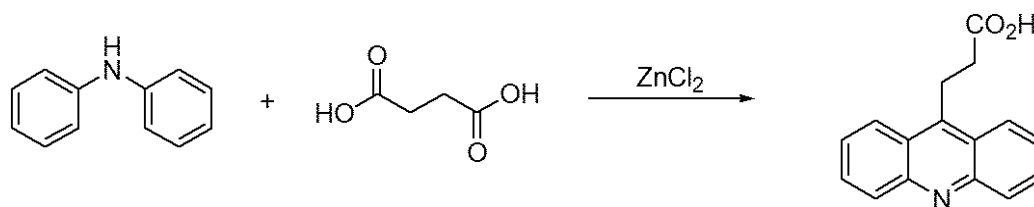


30

【0075】

提案された合成経路 - Jensen, H., J. Am. Chem. Soc, 1926, 48, 1988に記載されている通り。

【化26】



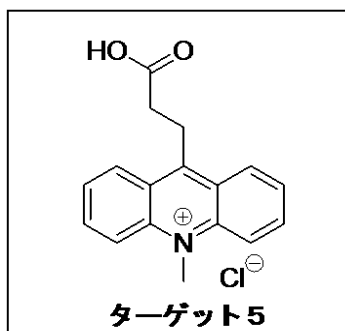
40

Toma, S. et al., Syn. Commun, 2002, 32, 729

【0076】

ターゲット 5 : 9 - (2 - カルボキシエチル) - 10 - メチルアクリジン - 10 - イウムクロリド

## 【化 2 7】



10

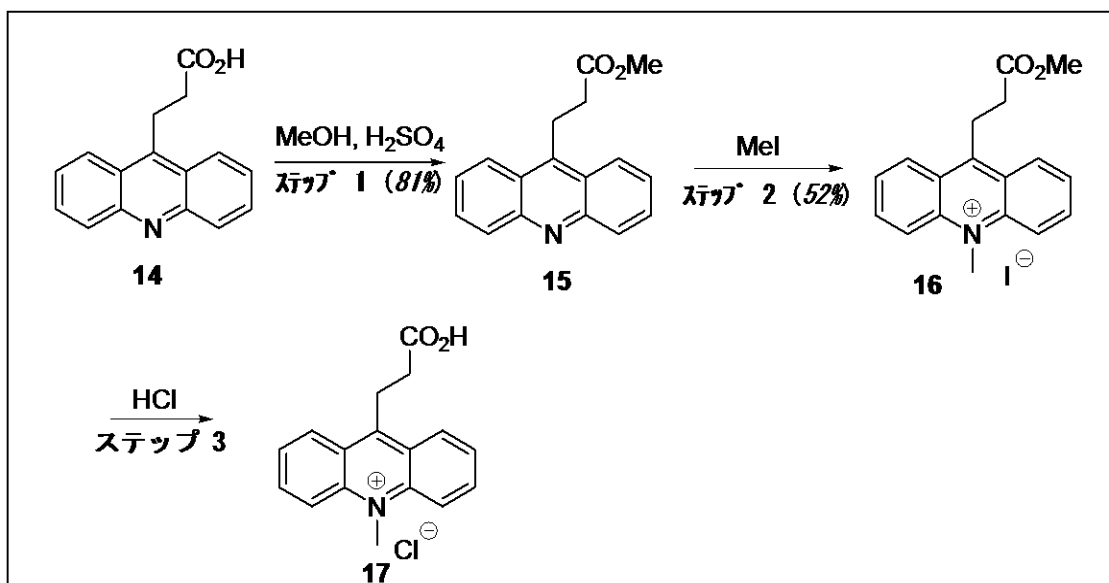
ターゲット5は、蛍光強度技法を使用して、水性緩衝液中のアニオンを判定するために以前に使用された (Geddes, C. D., Meas. Sci. Technol., 2001, 12, R53; Wolfbeis, O. S., et al., Anal. Chem., 1984, 56, 427; Chen, C.-T. et al., Org. Letters 2009, 11, 4858)。しかし、ターゲット5が蛍光寿命リポーターとして使用されたという報告は知られていない。

## 【0077】

ターゲット5の合成は以前に記述されているが (Wolfbeis, O. S., et al., Anal. Chem., 1984, 56, 427)、合成経路は以前のターゲットに対する発明者らの合成戦略に基づいて提案された (スキーム5)。

20

## 【化 2 8】



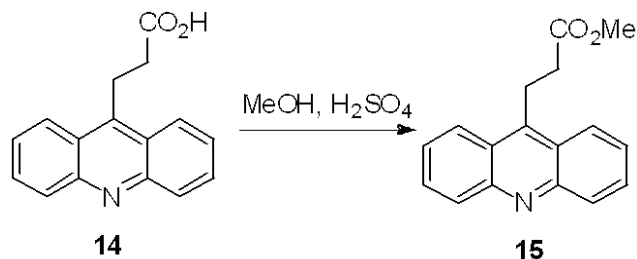
30

## スキーム5

## 【0078】

## ステップ1

## 【化 2 9】



40

3 - (アクリジン - 9 - イル) プロピオン酸 14 (200 mg、0.796 mmol) を MeOH (3 mL) 中に溶解し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mL) を加えた。混合物を4時間還流で攪拌し、次いで水の中に注ぎ入れた。生成物をDCMで抽出し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥

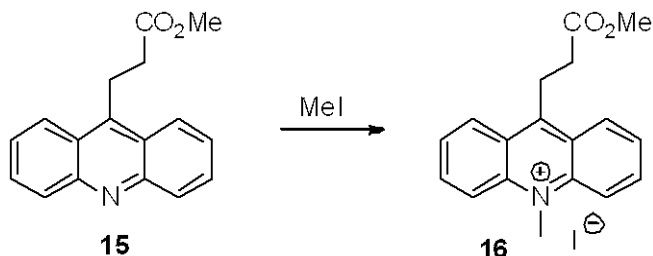
50

させ、真空中で濃縮することによって、メチル 3 - (アクリジン - 9 - イル) プロパノエート 15 (170 mg、0.641 mmol、81%) を得た。 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR および MS による分析は構造と一致した。

【0079】

ステップ 2

【化 30】



10

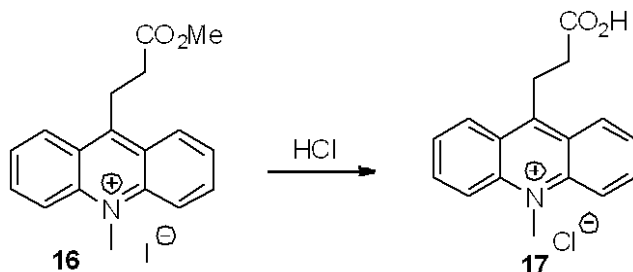
メチル 3 - (アクリジン - 9 - イル) プロパノエート 15 (150 mg、0.565 mmol) を MeI (3 ml) 中に溶解した。混合物を封管内で、90 で 20 時間攪拌した。沈殿物を濾過で収集し、真空下で乾燥させた。カラムクロマトグラフィー (DCM / EtOH、90 : 10) での精製により、9 - (3 - メトキシ - 3 オキソプロピル) - 10 - メチルアクリジン - 10 - イウムヨード 16 を得た (120 mg、0.295 mmol、52%)。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8.89(d, 2H, ar), 8.71(d, 2H, ar), 8.43(t, 2H, ar), 8.00(t, 2H, ar), 5.15(s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.27(t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.70(s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.95(t, 2H,  $\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 171.46(C), 160.91(C), 141.10(C), 139.22(CH), 128.55(CH), 127.0(CH), 125.34(C), 120.25(CH), 52.45( $\text{CH}_3$ ), 41.47( $\text{CH}_3$ ), 35.15( $\text{CH}_2$ ), 24.91; ESI  $m/z=280.19(\text{M})^+$ , 計算値  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_2=280.28$ .

20

【0080】

ステップ 3 :

【化 31】



30

所望の酸へのエステル化は、ターゲット 1 の合成に対して以前に記述されたプロトコルを使用することができることが予測された (ステップ 6)。

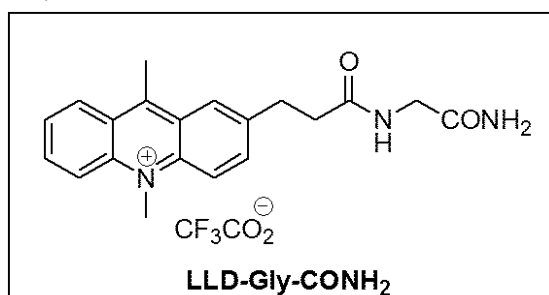
【0081】

(例 6)

2 - [2 - (カルバモイルメチル - カルバモイル) - エチル] - 9、10 - ジメチル - アクリジニウムトリフルオロ酢酸塩の合成および蛍光特性

40

【化 32】



【0082】

50

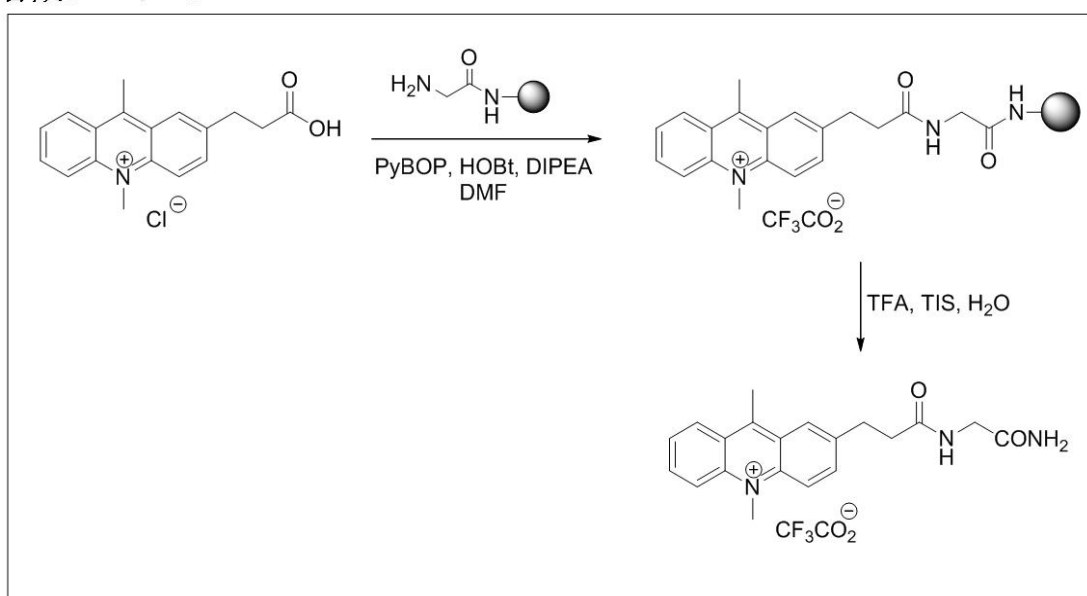
生体分子、例えばペプチドなどとのコンジュゲーションを可能にするために基を用いて官能化した色素の重要な特徴とは、コンジュゲーション反応中に使用される条件に対してできる限り安定していることである。この場合、9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムメチルアクリジウム(acridium)コアは、アミノ基とのアミド結合形成を可能にするためのカルボン酸部分の活性化に必要とされる条件に対して安定していなければならない。結果的に、グリシンは、PyBOPカップリング条件を使用して、固形支持体上の2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム色素で標識することによって、ターゲット、LLD-Gly-CONH<sub>2</sub>を得た(スキーム6)。色素の安定性を確認するための<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMRおよびMSにより容易に特徴づけることができるため、このターゲットが選択された。実際に、<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMRおよびMSによる特徴付けにより、所望のターゲット、LLD-Gly-CONH<sub>2</sub>が逆相HPLC精製後に得られたことが確認された。

10

【0083】

【化33】

## 合成プロトコル



20

30

## スキーム6

【0084】

2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムクロリド(40mg、0.13mmol)をDMF(500 $\mu$ l)およびPyBOP(66mg、0.13mmol)中に溶解し、次いでHOBT(917mg、0.13mmol)およびDIPEA(88.9 $\mu$ l、0.5mmol)を加えた。混合物を10分間超音波処理した。Rinkアミド結合したグリシン(200mg、0.13mmol)をDMF(1ml)中で膨張させ、次いで予備活性化した色素溶液を樹脂に加え、混合物を4.5時間超音波処理した。樹脂を濾過し、DMFおよびDCMで洗浄し、次いで真空中で乾燥させた。水(250 $\mu$ l)、TIS(125 $\mu$ l)およびTFA(5ml)を乾燥樹脂に加え、混合物を室温で4時間攪拌した。溶液を冷たいジエチルエーテル(30ml)へと濾過したが、沈殿は生じなかった。色素標識した生成物を水(2 $\times$ 30ml)に抽出し、次いで凍結乾燥した。RP-HPLC(Luna C18、250 $\times$ 4.6mmカラム、40分間にわたり10~50%)での精製によって、濃緑色の飛散性固体を得た(9.75mg、23%)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz, (CD<sub>3</sub>)CN) 8.77(d, J=8.4Hz, 1H, ar), 8.59(s, 1H, ar), 8.50(m, 2H, ar), 8.32(m, 2H, ar), 7.96(m, 1H, ar), 4.72(s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.76(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.45(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.28(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.77(t, J=7.5Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CD<sub>3</sub>CN) 174.04(C), 173.43(C), 161.14(C), 142.11(C), 141.37(C), 141.12(CH), 140.74(C), 139.02(CH), 128.97(CH), 128.37(CH), 127.20(CH), 127

40

50

.15(C), 127.10(C), 119.70(CH), 119.63(CH), 42.90(CH<sub>2</sub>), 39.39(CH<sub>3</sub>), 37.04(CH<sub>2</sub>), 31.60(CH<sub>2</sub>), 16.36(CH<sub>3</sub>); ESI m/z=336.25(M)<sup>+</sup>, 計算値C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>=336.41; HRMS 336.17060(M)<sup>+</sup>, 計算値C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>=336.17065

【0085】

(例7)

2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムクロリドを使用して色素標識したペプチドの合成 - 一般のプロトコル

ステップ1: 2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムクロリドのペプチドへの付着

2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムクロリド(22mg、0.07mmol)をDMF(200μl)およびPyBOP(36.4mg、0.07mmol)中に溶解し、次いでHOBt(9.5mg、0.07mmol)およびDIPEA(23μl、0.17mmol)を加えた。混合物を10分間超音波処理した。樹脂結合したペプチド(100mg)をDMF(500μl)中で膨張させ、次いで予備活性化した色素溶液を樹脂に加え、混合物を4.5時間超音波処理した。樹脂を濾過し、DMFおよびDCMで洗浄し、次いで真空中で乾燥させた。

10

【0086】

ステップ2: 色素標識したペプチドの樹脂からの切断

水(125μl)、TIS(62.5μl)およびTFA(2.5ml)を乾燥樹脂(約100mg)に加え、混合物を室温で3時間攪拌した。溶液を冷たいジエチルエーテル(30ml)へと濾過し、沈殿したペプチドを遠心分離し、ジエチルエーテル(30ml)で洗浄し、凍結乾燥させることによって、固体を得た。分取HPLCでの精製により所望の生成物を得た。

20

【0087】

(例8)

カスパーゼ3アッセイに対する2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム標識したペプチド基質の設計

2つの色素標識したペプチド、2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム-DEVDSK(LLD-DEVDSK)および2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム-DEVDSW(LLD-DEVDSW)を、例7に記載の一般のプロトコルを使用して合成した。これらのペプチド基質は、2つの理由から選択された; (1) 2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム蛍光のモジュレーターとしてのトリプトファン(W)の作用を実験するため、および(2) プロテアーゼカスパーゼ3に対してDEVDSXが優れた基質であること。

30

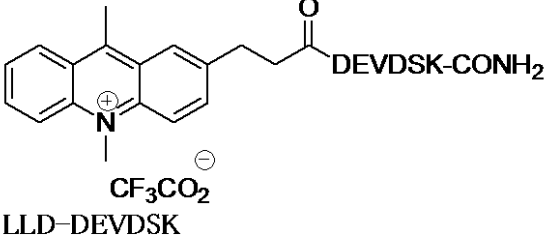
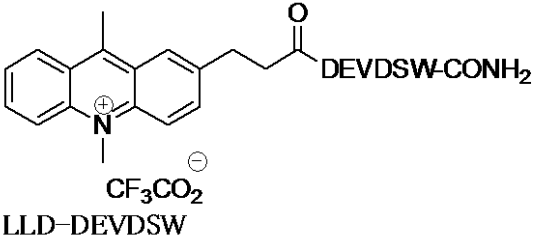
【0088】

色素標識したペプチドの蛍光寿命を、水および50mM TRIS、pH7.5中、1μMのペプチド濃度で測定した(表3)。50mM TRIS、pH7.4において、LLD-DEVDSKの蛍光寿命は29.3nsであった。リシン残基をトリプトファンで置き換えると、蛍光寿命の21.5nsから7.8nsの有意な減少がもたらされ、これは、トリプトファンが9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムの蛍光寿命の優れたモジュレーターであることを示唆している。

40

【0089】

【表 3】

ペプチド基質	平均寿命(ns)	
	水	50mM TRIS pH 7.4
 LLD-DEVDSK	31.1	29.3
 LLD-DEVDSW	7.7	7.8

10

20

表3 蛍光寿命データ

## 【0090】

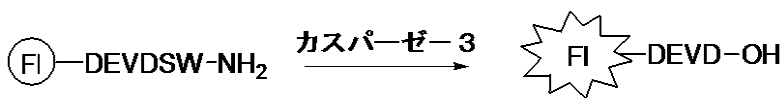
トリプトファンはまた、9, 10 - ジメチルアクリジン - 10 - イウムの蛍光強度をモジュレートすることが示されている。LLD-DEVDSKと比較して、LLD-DEVDSWでは、405 nmでの励起により、蛍光発光が90% (500 nm) 低減することが観察された(図4)。10 mM PBS中、500 nMのペプチド濃度で測定を実施した。

## 【0091】

(例9)

カスパーゼ3アッセイ - LLD-DEVDSWを基質として使用

## 【化34】



部分的にクエンチ

蛍光性

スキーム7

## 【0092】

トリプトファンでクエンチした基質、LLD-DEVDSWの酵素媒介された切断により、蛍光強度(増加)および蛍光寿命の変化(増加)が生じ(スキーム7)、したがってこれによって、生化学的アッセイおよび細胞ベースのアッセイにおいて色素を蛍光性リポーターとして採用することができることが予測された。したがって、部分的にクエンチした2-(2-カルボキシエチル)-9, 10-ジメチルアクリジン-10-イウム-標識したペプチド基質、LLD-DEVDSWを、R&D Systemsから購入した組換え型カスパーゼ-3酵素を使用した生化学的酵素の切断アッセイに採用した。2.5または1.25単位の酵素の存在下、1 mM DTTおよび0.1% CHAPSを含有する50 mM TRIS緩衝液、pH 7.2中、500 nMの基質濃度を使用してアッセイを行った(384ウェルプレート中最終容量30 μl、3回重複)。Edinburgh Instruments Nanotaurus Fluorescence Lifet

40

50



して、時間間隔をおいて、リアルタイムで、アッセイ混合物を分析した。反応の進行中に、反応混合物の蛍光寿命における大規模な変化が観察され（9.7 ns から 20.8 ns）、基質が生成物に変換したことを示した（図7）。

【0097】

（例12）

チロシンキナーゼアッセイのための基質の設計

例7に記載のプロトコルを使用して、以下の色素標識したペプチドを合成した；LLD-EPEGIYGVLF（Lck基質）、LLD-EPEGIpYGVLF（Lck生成物）、LLD-GGEEEEYFELVKK（Jak2/3基質）およびLLD-GGEEEEpYFELVKK（Jak2/3生成物）。これらのペプチドを2つの理由で選択した；（1）2-（2-カルボキシエチル）-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム蛍光のモジュレーターとしてのチロシン（Y）の作用を実験するため、および（2）EPEGIYGVLFは、Lckキナーゼに対する基質であり、GGEEEEYFELVKKは、Jak2およびJak3キナーゼに対する基質である。

10

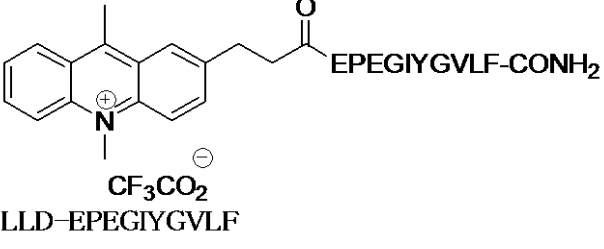
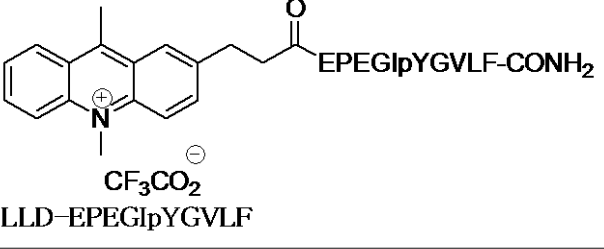
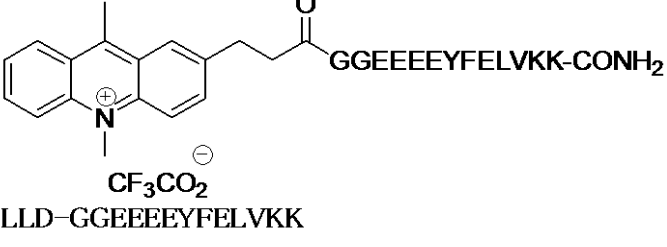
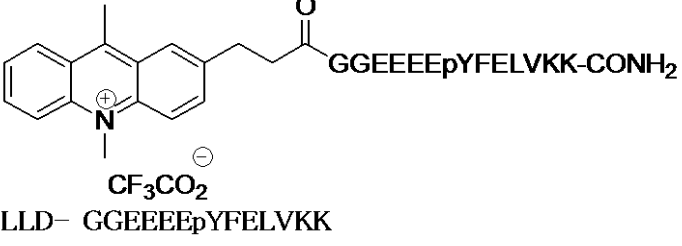
【0098】

40 μM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>および1 mg/ml BSAを含有する50 mM TRIS、pH7.4中、1 μM のペプチド濃度で、色素標識したペプチドの蛍光寿命を測定した（表4）。非リン酸化とリン酸化したLckペプチドの間で5.2 ns（13.0 ns から 18.2 ns）の増加、および非リン酸化とリン酸化したJak2/3ペプチドの間で4.8 ns（11.3 ns から 16.1 ns）の増加を観察し、これは、チロシンもまた9,10-ジメチルアクリジン-10-イウムの蛍光寿命の良好なモジュレーターであることを示唆している。リン酸化により、中性のフェノール部分が負に帯電した種に変換され、これによって、チロシンのモジュレート作用のいくらかが軽減し、結果的に蛍光の増加が観察されている。チロシンにより引き起こされるモジュレート作用は、リン酸化により部分的にしか軽減せず、したがってリン酸化したペプチドの蛍光寿命は、遊離の色素に対する蛍光寿命ほど長くはならない。

20

【0099】

【表4】

ペプチド基質	平均寿命(ns)
 <p>LLD-EPEGIYGVLF</p>	13.0
 <p>LLD-EPEGIpYGVLF</p>	18.2
 <p>LLD-GGEEEEYFELVKK</p>	11.3
 <p>LLD-GGEEEEpYFELVKK</p>	16.1

10

20

30

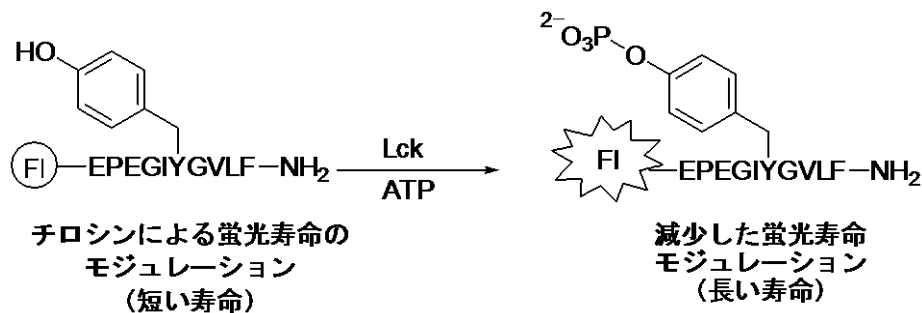
表4 チロシンキナーゼペプチドの蛍光寿命

【0100】

(例13)

Lckチロシンキナーゼアッセイ - LLD-EPEGIYGVLF基質を使用

【化36】



40

スキーム9

【0101】

50

ATPの存在下、LLD-標識した基質のキナーゼ媒介されたリン酸化が、リアルタイムでモニターすることができる蛍光寿命および蛍光強度の増加を生じることが提案された。したがって、部分的にクエンチした2-(2-カルボキシエチル)-9,10-ジメチルアクリジン-10-イウム-標識したペプチド基質、LLD-EPEGIYGVLVを、EnzoLifeSciencesから購入した組換え型Lck(p56lck)酵素を使用する生化学的酵素のリン酸化アッセイに採用した。異なる酵素濃度の存在下、40  $\mu$  ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>および1 mg/ml BSAを含有する50 mM TRIS緩衝液、pH7.2中、1  $\mu$  の基質濃度を使用してアッセイを行った(384ウェルプレート中最終容量30  $\mu$ l、3回重複)。Edinburgh Instruments Nanotaurus Fluorescence Lifetime Plate Reader(Ex405 nmおよび473 nmロングパス発光フィルター)を使用して、時間間隔をおいて、リアルタイムでアッセイ混合物を分析した。反応の進行中に、反応混合物の蛍光寿命における変化が観察され(13.2 nsから17.1 ns)、基質が生成物に変換したことを示した(図8)。

10

## 【0102】

(例14)

Lckチロシンキナーゼアッセイ-スタウロスポリンによるLck阻害

緩衝液A: 1 mg/ml BSAを含有する50 mM TRIS、pH7.2

緩衝液B: 80  $\mu$  ATP、20 mM MgCl<sub>2</sub>および1 mg/ml BSAを含有する50 mM TRIS、pH7.2

阻害剤: スタウロスポリン(1000 nM~0.12 nM、14段階希釈)

基質: LLD-EPEGIYGVLV(1  $\mu$ )

酵素: Lck(p56lck)(EnzoLifeSciences、18 U/ml)、4.5 mU/ウェル

20

## 【0103】

スタウロスポリン溶液(緩衝液A中6000 nM、6 $\times$ 濃縮)を2倍に段階希釈することによって、14の連続した阻害剤濃度範囲を作った。各溶液5  $\mu$ lを384ウェルプレートに3回重複して加えた。次いで、酵素(10  $\mu$ l緩衝液A中4.5 mU)を各ウェルに加え、15分間静置させた。LLD-EPEGIYGVLV(15  $\mu$ l、緩衝液B中2  $\mu$ 、2 $\times$ 濃縮)を各ウェルに加えることによって、アッセイを開始した。30分後、Edinburgh Instruments Nanotaurus Fluorescence Lifetime Plate Reader(Ex405 nmおよび473 nm切断発光フィルター)を使用してプレートを分析した。GraphPad Prismを使用して、ログ阻害剤濃度に対するパーセンテージ阻害のプロットを可変の勾配非直線回帰モデルにフィットさせることによって、スタウロスポリンに対する25.9 nMのIC<sub>50</sub>値を得た(図9を参照されたい)。

30

## 【0104】

(例15)

Lckチロシンキナーゼアッセイ-ATP Kmの判定

緩衝液A: 1 mg/ml BSAを含有する50 mM TRIS、pH7.2

緩衝液B: 80  $\mu$  ATP、20 mM MgCl<sub>2</sub>および1 mg/ml BSA ATP: 200  $\mu$  ~ 98 nM、12段階希釈を含有する、50 mM TRIS、pH7.2基質: LLD-EPEGIYGVLV(1  $\mu$ )

酵素: Lck(p56lck)(EnzoLifeSciences、18 U/ml)、3.6 mU/ウェル

40

ATP溶液(緩衝液A中600  $\mu$ 、3 $\times$ 濃縮)を、2倍に段階希釈することによって、14の連続する濃度範囲を作った。各溶液10  $\mu$ lを、384ウェルプレートに3回重複して加えた。次いで、酵素(5  $\mu$ l緩衝液A中3.6 mU)を各ウェルに加えた。LLD-EPEGIYGVLV(15  $\mu$ l、緩衝液B中2  $\mu$ 、2 $\times$ 濃縮)を各ウェルに加えることによってアッセイを開始した。Edinburgh Instruments N

50

anotaurus Fluorescence Lifetime Plate Reader (Ex 405 nmおよび473 nm切断発光フィルター)を使用して、時間間隔をおいて、リアルタイムでプレート进行分析した。検量線から平均寿命値をpmolのホスホペプチドに変換し、ATP濃度に依存する反応の最初の速度のプロットを使用することによって、GraphPad Prismを使用して非直線回帰フィッティングによりATP Km値を求めた(図10を参照されたい)。LLD-EPEGIYGVLFを使用して、Lckキナーゼに対して求めたATP Kmは36.41 μであった。

【0105】

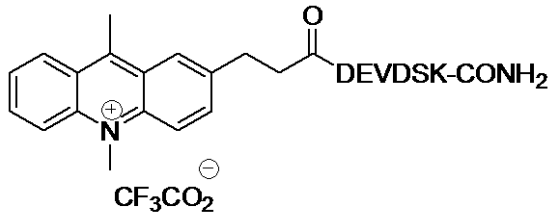
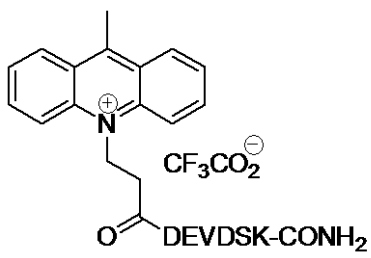
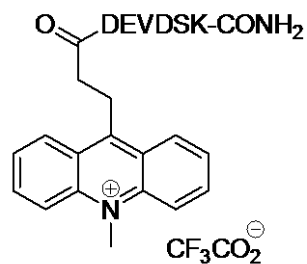
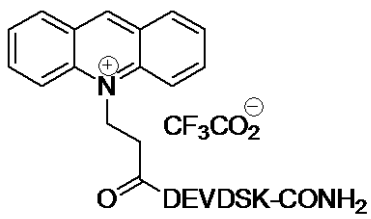
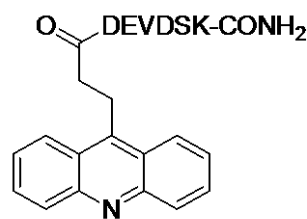
(例16)

蛍光寿命分析のための、色素誘導体III、IV、V、VIおよびVIIのペプチドへの  
10  
付着

例7に記載の一般のプロトコルを使用し、各誘導体の蛍光寿命値の測定および比較を可能にするための色素誘導体のそれぞれ(III~VII)を用いて、ペプチド基質、DEVDSKをN-末端を介して標識した。色素標識したペプチドの蛍光寿命を、水および50 mM TRIS、pH7.4中、1 μの濃度で測定した(表5)。

【0106】

【表 5】

色素誘導体	ペプチド基質	平均寿命(ns)	
		水	50mM TRIS p H 7.4
(III)		31.1	29.3
(IV)		26.7	25.2
(v)		27.0	25.0
(VI)		24.1	19.1
(VII)		23.6	17.2

10

20

30

40

表5 長い寿命の色素誘導体の比較

【 図 1 】

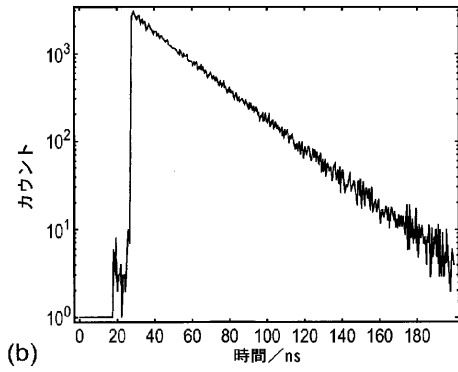
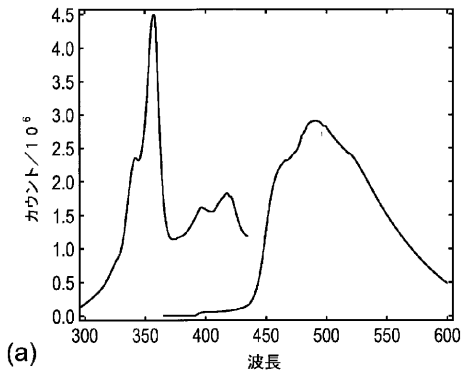


FIG. 1

【 図 2 】

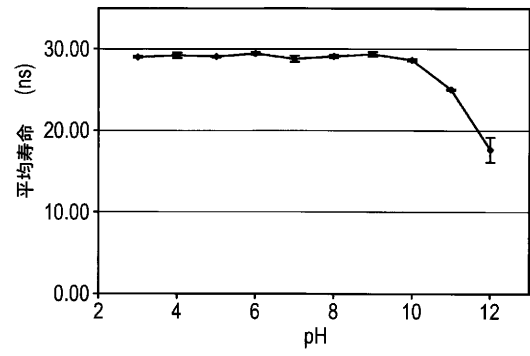


FIG. 2

【 図 3 】

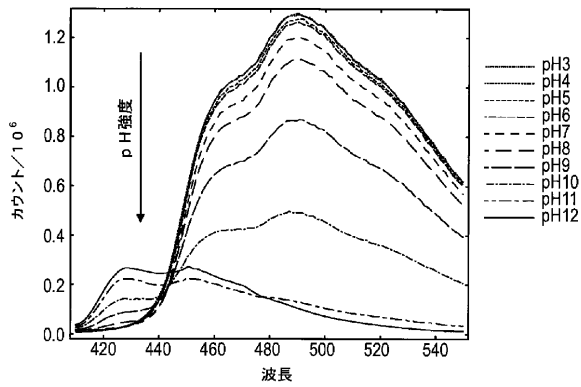


FIG. 3

【 図 4 】

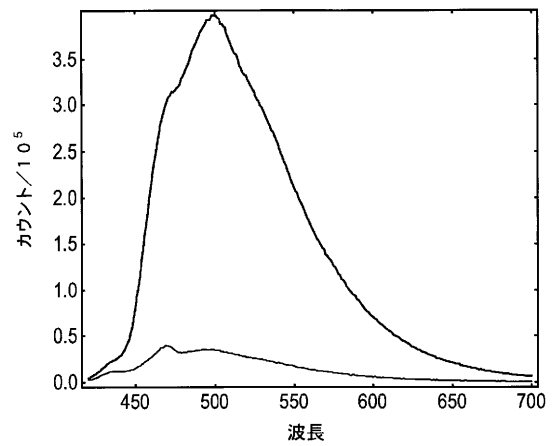


FIG. 4

【 図 5 】

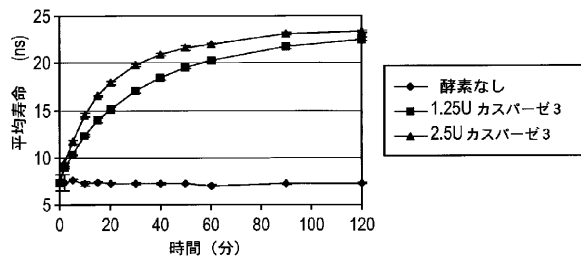


FIG. 5

【 図 7 】

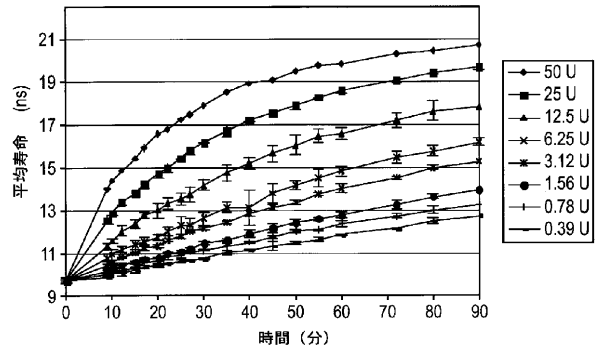


FIG. 7

【 図 6 】

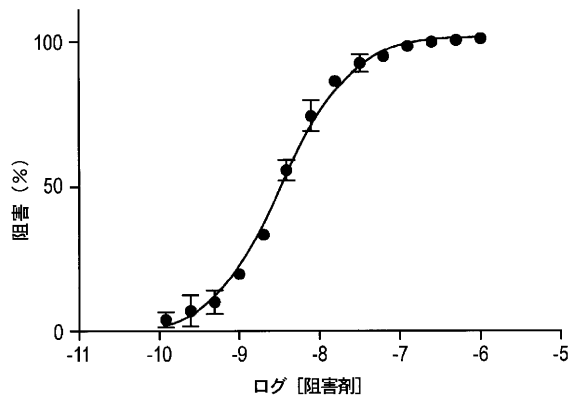


FIG. 6

【 図 8 】

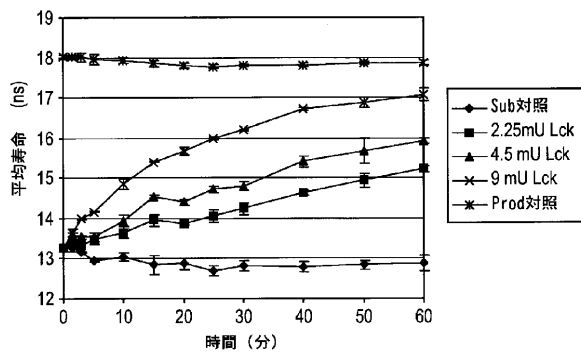


FIG. 8

【 図 9 】

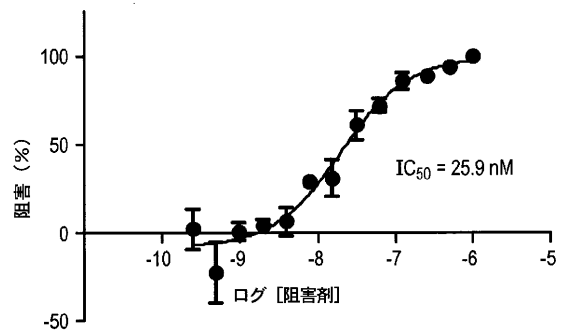


FIG. 9

【 図 1 0 】

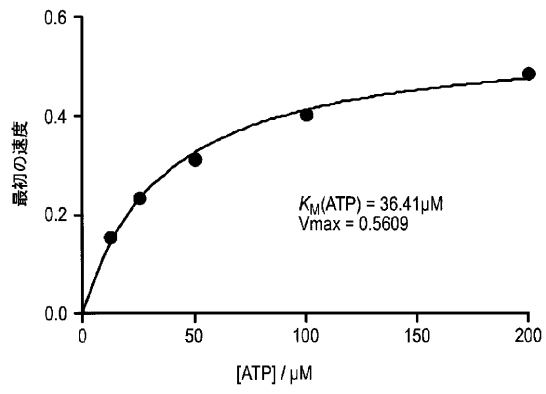


FIG. 10

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/053214

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/52 A61K31/435 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, EMBASE, BIOSIS, FSTA, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/191761 A1 (HEISS AARON M [US] ET AL) 1 September 2005 (2005-09-01) paragraphs [0001], [0041], [0061]; compound 5e	1,5,6,13-15
Y	----- WO 2007/049057 A2 (ITI SCOTLAND LTD [GB]; RAMAGE ROBERT [GB]; MALTMAN BEATRICE [GB]; COTT) 3 May 2007 (2007-05-03) cited in the application claims 1-33,39; tables 1-3 ----- -/--	1-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 February 2013		27/02/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		van der Kooij, M

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2012/053214

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ELIZABETH KURUVILLA ET AL: "Selective Interactions of a Few Acridinium Derivatives with Single Strand DNA: Study of Photophysical and DNA Binding Interactions", THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, vol. 111, no. 23, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 6549-6556, XP055053598, ISSN: 1520-6106, DOI: 10.1021/jp071459j abstract scheme 1; page 6550 conclusion; page 6555, column 2 -----</p>	1-33
Y	<p>JOSHY JOSEPH ET AL: "Tuning of Intercalation and Electron-Transfer Processes between DNA and Acridinium Derivatives through Steric Effects", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 15, no. 6, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1230-1235, XP055053644, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc0498222 abstract; figure 1; table 1 -----</p>	1-33
A	<p>PATERSON MICHAEL J ET AL: "A fluorescence lifetime-based assay for serine and threonine kinases that is suitable for high-throughput screening", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 402, no. 1, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 54-64, XP009160374, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2010.03.012 [retrieved on 2010-03-15] Material and methods; abstract -----</p>	1-33

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/053214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005191761	A1	01-09-2005	NONE
-----			
WO 2007049057	A2	03-05-2007	CA 2627628 A1 03-05-2007
			EP 1940965 A2 09-07-2008
			JP 2009513766 A 02-04-2009
			US 2009226940 A1 10-09-2009
			WO 2007049057 A2 03-05-2007
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**C 1 2 Q 1/48 (2006.01) C 1 2 Q 1/48 Z**

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100119013  
 弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777  
 弁理士 市川 さつき

(72)発明者 マルトマン ピアトリス  
 イギリス イーエイチ 3 3 1 イーエイチ イースト ロージアン グレズミュア エルヴィング  
 ストン サイエンس センター アルマック サイエンシーズ (スコットランド) リミテッド  
 内

(72)発明者 ティルナヴィアヌ アディナ - エレナ  
 イギリス イーエイチ 3 3 1 イーエイチ イースト ロージアン グレズミュア エルヴィング  
 ストン サイエンс センター アルマック サイエンシーズ (スコットランド) リミテッド  
 内

(72)発明者 コットン グラハム  
 イギリス イーエイチ 3 3 1 イーエイチ イースト ロージアン グレズミュア エルヴィング  
 ストン サイエンс センター アルマック サイエンシーズ (スコットランド) リミテッド  
 内

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 CB21 DA13 DA14 DA20 DA36 DA54 FB01 FB02  
 FB03 FB12 GC15  
 4B063 QA01 QA18 QQ27 QQ32 QQ33 QQ34 QQ35 QQ36 QQ42 QQ52  
 QR58 QR66 QS26 QX02

专利名称(译)	基于吡啶和吡啶衍生物的荧光染料		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015506462A</a>	公开(公告)日	2015-03-02
申请号	JP2014548193	申请日	2012-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	艾尔玛可科学(苏格兰)有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔纳克科学(苏格兰)有限公司		
[标]发明人	マルトマンピアトリス ティルナヴィアヌアディナエレナ コットングラハム		
发明人	マルトマンピアトリス ティルナヴィアヌアディナ-エレナ コットングラハム		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/53 G01N33/533 C12Q1/68 C12Q1/34 C12Q1/48		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/52 G01N2458/00		
FI分类号	G01N33/58.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/533 C12Q1/68.A C12Q1/34 C12Q1/48.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ27 4B063/QQ32 4B063/QQ33 4B063/QQ34 4B063/QQ35 4B063/QQ36 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR58 4B063/QR66 4B063/QS26 4B063/QX02		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	2011022099 2011-12-22 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及基于吡啶和吡啶鎓衍生物的荧光染料以及这种染料在例如生物化学和/或基于细胞的测定中的用途。

