

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/151072

発行日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(43) 国際公開日 平成30年8月23日(2018.8.23)

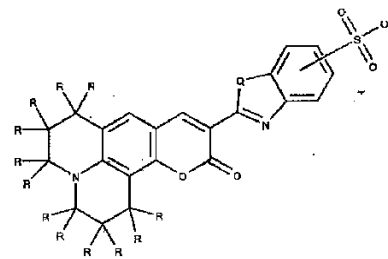
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C09B 57/02 (2006.01)</b>	C09B 57/02 C S P H	4 C O 5 O
<b>C09B 67/08 (2006.01)</b>	C09B 67/08 B	
<b>C09K 11/06 (2006.01)</b>	C09K 11/06	
<b>C07D 491/16 (2006.01)</b>	C07D 491/16	
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 Y	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2018-568516 (P2018-568516)	(71) 出願人 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/004803	
(22) 国際出願日 平成30年2月13日(2018.2.13)	
(31) 優先権主張番号 PCT/JP2017/005284	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(32) 優先日 平成29年2月14日(2017.2.14)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72) 発明者 高梨 健作 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
(31) 優先権主張番号 特願2017-24875 (P2017-24875)	(72) 発明者 中山 慎 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
(32) 優先日 平成29年2月14日(2017.2.14)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(72) 発明者 西川 賢司 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ ニカミノルタ株式会社内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノクマリン化合物およびアミノクマリン化合物内包樹脂粒子

## (57) 【要約】

本発明は、下記式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物および該アミノクマリン化合物と該アミノクマリン化合物を内包する樹脂粒子とを有するアミノクマリン化合物内包樹脂粒子である。式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R<sup>1</sup>を表わし、R<sup>1</sup>は水素原子またはメチル基を表わす。本発明のアミノクマリン化合物は、従来知られているスルホン化クマリン系化合物と比べ、励起波長がより長波長であり、475 nm以上の波長、特に500 nm近辺の波長に対して有効に励起する蛍光色素である。本発明のアミノクマリン化合物は、この波長特性を利用して、たとえば475~510 nmの波長で励起し、510~540 nmの緑色発光領域において観察することが可能な蛍光色素であり、免疫染色等において好適に活用することが期待できる。



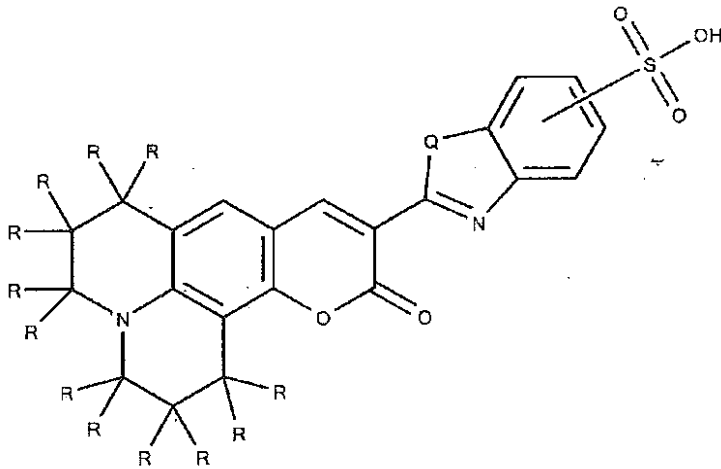
(1)

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物。

## 【化 1】



(1)

(式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R<sup>1</sup>を表わし、R<sup>1</sup>は水素原子またはメチル基を表わす。)

## 【請求項 2】

前記式(1)中のQがイオウ原子である請求項1に記載のアミノクマリン化合物。

## 【請求項 3】

前記式(1)中のQが酸素原子である請求項1に記載のアミノクマリン化合物。

## 【請求項 4】

前記式(1)中のQがN-R<sup>1</sup>である請求項1に記載のアミノクマリン化合物。

## 【請求項 5】

請求項1に記載のアミノクマリン化合物と該アミノクマリン化合物を内包する樹脂粒子とを有するアミノクマリン化合物内包樹脂粒子。

## 【請求項 6】

前記樹脂粒子がアミノ樹脂粒子である請求項5に記載のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子。

## 【請求項 7】

励起スペクトル極大波長が475~510nmであり、蛍光スペクトル極大波長が510~540nmである請求項5または6に記載のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規な色素であるアミノクマリン化合物およびこのアミノクマリン化合物を樹脂に内包してなるアミノクマリン化合物内包樹脂粒子に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

現在の医療環境においては、被験者が対象疾患に罹患しているか否かを判断するためのデータを提供するために、あるいは被験者へ投薬すべきかどうかの指標を提供するために、さまざまな臨床用検査薬や研究用検査薬が開発され、治療の大きな助けとなっている。

## 【0003】

被験者から血液や組織切片等の検体を採取し、多くの場合には免疫反応を利用して特定のターゲット(低分子・タンパク・遺伝子・細胞など)を検出し、同定し、定量することで、さまざまな検査が開発されてきた。例えば、前記罹患の有無によって発現量が増減する生体内の分子(抗原)に、蛍光標識した抗体を特異的に結合させることにより抗原を蛍光標識し、蛍光シグナルの量から疾患に関連する抗原の量を定量することが行われる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 4 】

また、成人T細胞白血病 (ATL)へ投薬すべきかどうかの指標を提供するために開発された最近の臨床用検査薬の例として、抗 CCR4 抗体モガムリズマブ分子標的薬の投与前にターゲットであるCCR4の検出を行う検査が義務づけられた。CCR4の検出は、採取した血液検体に免疫反応を施すFACS法と、採取した組織検体に免疫反応を施すIHC法とが開発されており、前者は蛍光検出によりCCR4を定量(スコア化)し、後者は発色検出によりCCR4を定量(スコア化)している。

## 【 0 0 0 5 】

ところで、採取した組織検体に免疫反応を施す免疫組織化学的手法の中にも、蛍光標識した抗体を抗原に結合させる技術も知られており、蛍光色素を粒子に内包させたナノ粒子に抗体を直接的または間接的に結合させ、これを抗原に結合させる技術が高感度達成に有用と考えられている。

10

## 【 0 0 0 6 】

免疫組織化学的手法に限らず、一度に多くの情報を得たいというニーズは医療関係者に強くあり、複数の蛍光色素で同時に別のターゲットを検出する方法の開発も多く進められている。たとえば、緑色領域、赤色領域、オレンジ色領域および遠赤外線領域の各領域において蛍光発光を呈する色素を用意して、4種類のターゲットを検出することは上記の免疫反応を利用するFACS法の他にもELISA法、FISH法などで原理的には可能であり、商品化もされている。

## 【 0 0 0 7 】

緑色領域で発光する色素としては、スルホン化されたクマリン系色素が知られている。このスルホン化クマリン色素としては、たとえば特許文献1に記載されたスルホン化クマリン色素が挙げられる。スルホン化クマリン色素は、水への溶解性が優れるので、さまざまな免疫反応による蛍光検出ツールに対する適応性がある。しかしその一方、以下の通り検体に由来する蛍光ノイズが、蛍光検出および定量を不正確にする大きな要因になっていた。

20

## 【 0 0 0 8 】

たとえば緑の蛍光発光を示す色素の場合、スルホン化クマリン色素については、そのほとんどは470nm以下の波長領域に励起スペクトルの極大波長を有し、475nm以上の波長では励起光吸収が大幅に低減する。このため、従来のスルホン化クマリン色素は、多重染色を行う上で別の蛍光色素の波長領域から影響を受けてしまうなどの制約が大きい。

30

## 【 0 0 0 9 】

また、475nmより短波長領域では、当該蛍光色素以外の物質(夾雑物)に起因する蛍光、いわゆる自家蛍光が大きくなる傾向がある。このため、従来のスルホン化クマリン色素を用いた免疫蛍光検出においては、蛍光色素に基づく蛍光強度に対して、バックグラウンドの蛍光強度が相対的に高くなり、シグナル/バックグラウンド比(S/B)が低くなるという問題があった。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

40

## 【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 特開平 6 - 2 7 1 5 9 9 号 公 報

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、上記のような従来技術に伴う問題を解決しようとするものであって、475nm以上の波長領域、たとえば475~510nmの波長領域に励起スペクトルの極大波長を有するスルホン化クマリン系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 】

## 【 0 0 1 2 】

50

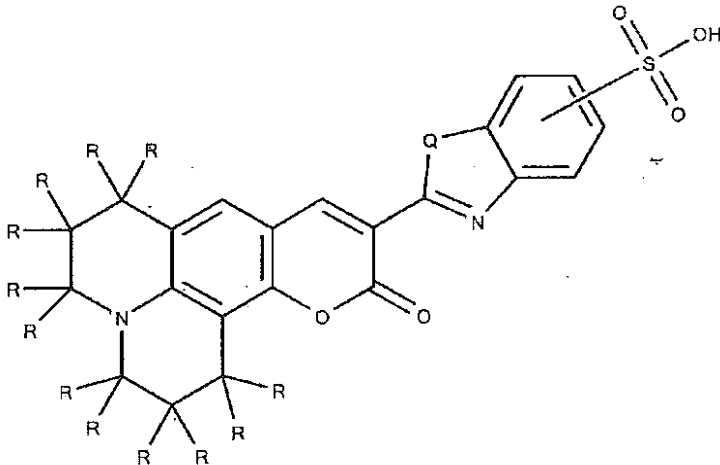
本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意研究した結果、特定構造を有するアミノクマリン化合物が上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明のアミノクマリン化合物は、下記式(1)で示される構造を有する。

【0014】

【化1】



10

(1)

20

(式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R<sup>1</sup>を表わし、R<sup>1</sup>は水素原子またはメチル基を表わす。)

前記アミノクマリン化合物は、前記式(1)中のQがイオウ原子であるアミノクマリン化合物、酸素原子であるアミノクマリン化合物、またはN-R<sup>1</sup>であるアミノクマリン化合物である。

【0015】

本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、前記アミノクマリン化合物と該アミノクマリン化合物を内包する樹脂粒子とを有する。

【0016】

前記アミノクマリン化合物内包樹脂粒子において、前記樹脂粒子がアミノ樹脂粒子であることが好ましい。

30

【0017】

前記アミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、励起スペクトル極大波長が475~510nmであり、蛍光スペクトル極大波長が510~540nmであることが好ましい。

【発明の効果】

【0018】

本発明のアミノクマリン化合物は、従来知られている特許文献1に記載のスルホン化クマリン系化合物等と比べ、励起波長がより長波長であり、475以上の波長、特に500nm近辺の波長に対して有効に励起する蛍光色素である。本発明のアミノクマリン化合物は、この波長特性を利用して、たとえば475~510nmの波長で励起をし、510~540nmの緑色発光領域において観察することが可能な蛍光色素であり、免疫染色等において好適に活用することが期待できる。

40

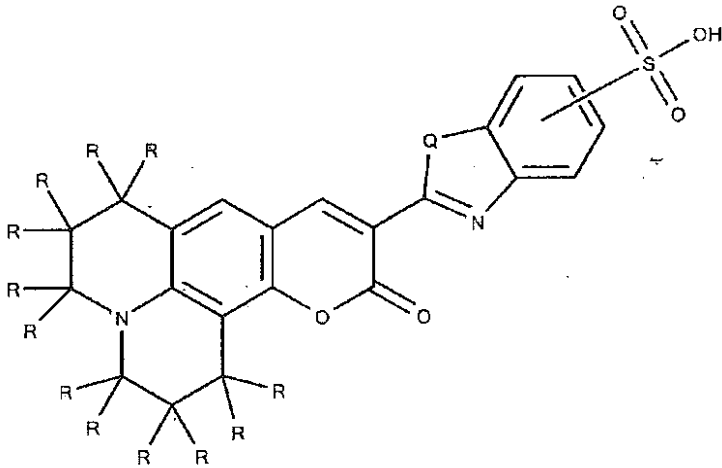
【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明のアミノクマリン化合物は、下記式(1)で示される構造を有する。

【0020】

## 【化 2】



10

式(1)中、12個のRは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。

## 【0021】

式(1)中、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R<sup>1</sup>を表わす。前記R<sup>1</sup>は水素原子またはメチル基を表わす。本発明のアミノクマリン化合物は、式(1)のQがイオウ原子である場合、ベンゾチアゾール構造を有し、酸素原子である場合、ベンゾオキサゾール構造を有し、N-R<sup>1</sup>である場合、ベンゾイミダゾール構造を有することになる。

20

## 【0022】

式(1)に含まれるスルホン酸基SO<sub>3</sub>Hは、前記ベンゾチアゾール構造、ベンゾオキサゾール構造またはベンゾイミダゾール構造に含まれるベンゼン環が有する結合可能な4つの炭素原子のうちどの炭素原子に結合していてもよい。

## 【0023】

本発明のアミノクマリン化合物は、クマリン構造に結合する窒素原子が、クマリン構造に含まれるベンゼン環の4つの炭素原子とともに、2つの6員環を形成している点、すなわちアミノクマリンのアミノ基がジュロリジン構造となっている点で、特許文献1などに記載された公知のスルホン化クマリン系化合物と構造が相違する。

## 【0024】

このような構造を有する本発明のアミノクマリン化合物は、公知のスルホン化クマリン系化合物よりも、励起波長が長波長であり、励起スペクトル極大波長が475nm以上であり、たとえば475~510nmである。また、本発明のアミノクマリン化合物は、発光波長も公知のスルホン化クマリン系化合物より長波長であり、蛍光スペクトル極大波長が510nm以上であり、たとえば510~540nmである。ここで、「励起スペクトル極大波長」とは、励起スペクトルにおいて極大を示す波長を意味する。「蛍光スペクトル極大波長」とは、蛍光スペクトルにおいて極大を示す波長を意味する。

30

## 【0025】

式(1)で表わされる本発明のアミノクマリン化合物は、該アミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物に比較して、発光強度が強いという特徴を有する。

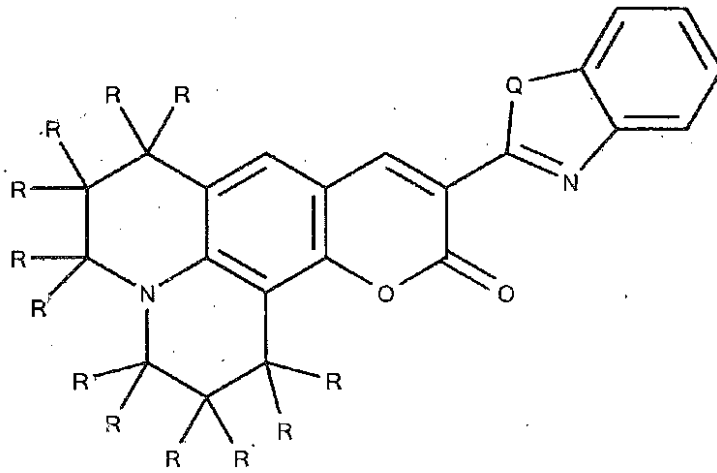
40

## 【0026】

本発明のアミノクマリン化合物は、たとえば、下記式(2)で示される構造を有するクマリン化合物をスルホン化する方法により製造することができる。具体的には、式(2)で示されるクマリン化合物0.1gに対して発煙硫酸を1ml加えて、0~140℃で、1~8時間反応させることにより本発明のアミノクマリン化合物を製造することができる。

## 【0027】

## 【化3】



10

(2)

(式(2)中のRおよびQは、それぞれ式(1)中のRおよびQと同義である。)

本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、前記アミノクマリン化合物と該アミノクマリン化合物を内包する樹脂粒子とを有する。本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、免疫染色等に好適に使用することができる。

## 【0028】

樹脂粒子に内包されるアミノクマリン化合物については前述のとおりである。

20

## 【0029】

アミノクマリン化合物を内包する樹脂粒子は、アミノクマリン化合物を内包できる限り特に制限はないが、熱硬化性樹脂であることが好ましい。熱硬化性樹脂は三次元的な網目構造を有するので、これに包み込まれた色素は樹脂粒子から離脱しにくく、免疫染色等において好適である。熱硬化性樹脂としては、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂およびフラン樹脂等を挙げることができる。これらの中でも、メラミン樹脂、尿素樹脂等のアミノ樹脂は、色素の樹脂粒子からの離脱をより効果的に抑止できる点で、特に好ましい。

## 【0030】

樹脂粒子に内包されるアミノクマリン化合物の量は、特に制限はなく、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を免疫染色に用いる場合には、検出可能な輝度を確保できる量であればよい。

30

## 【0031】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子の平均粒径は、特に制限はないが、免疫染色に用いる場合には、通常40~500nm、好ましくは50~200nmである。アミノクマリン化合物内包樹脂粒子の平均粒径が500nmを超えると染色性に問題が生じる場合があり、40nm未満であると、視認性に問題が生じる場合がある。

## 【0032】

上記平均粒径は、SEM観察でアミノクマリン化合物内包粒子の1000個について粒径を測定し、その平均値として算出される。

40

## 【0033】

本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、公知の色素内包樹脂粒子の製造方法に準じて製造することができる。

## 【0034】

たとえば、本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、樹脂合成用のモノマー原料をアミノクマリン化合物の存在下で重合させることにより製造することができる。具体的には、アミノクマリン化合物および界面活性剤を含有する水溶液に樹脂合成用のモノマー原料を添加し、通常55~75℃、好ましくは68~72℃で、10分間程度、好ましくは10~15分間激しく攪拌する。その後、重合開始剤を添加して、55~75℃、好ましくは68~72℃で、4~24時間、好ましくは4~5時間激しく攪拌して、乳化重合

50

させる。さらに、液温を80～90、好ましくは80～82に上げ、30～60分間、好ましくは30～40分間激しく攪拌する。反応液は、通常、凝集塊と上清である粒子分散液とに分かれる。反応液から粒子分散液を回収する。この粒子分散液を遠心分離し、上清である分散媒を除いた後、沈殿に超純水を加え、超音波分散する。遠心分離、沈殿への超純水添加および超音波分散の工程をさらに数回繰り返す。これにより、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子の水分散液が得られる。

【0035】

前記樹脂合成用のモノマー原料とは、重合することにより、前記樹脂粒子を形成し得る原料である。

【0036】

アミノクマリン化合物の添加量は、樹脂合成用のモノマー原料1gに対し、通常1～50mgである。

【0037】

前記界面活性剤には特に制限はなく、通常の乳化重合反応に使用される界面活性剤を用いることができる。前記界面活性剤としては、アニオン系、ノニオン系およびカチオン系の全ての界面活性剤を用いることができる。アニオン系の界面活性剤としては、例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等が挙げられる。ノニオン系の界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等が挙げられる。カチオン系の界面活性剤としては、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド等が挙げられる。界面活性剤は、1種類単独で使用しても、2種類以上を併用してもよい。

【0038】

市販の界面活性剤としては、例えば、「エマルゲン」（登録商標、花王（株）製）や「ネオベレックス」（登録商標、花王（株）製）を好適に用いることができる。エマルゲンの有効成分はポリオキシエチレンアルキルエーテルであり、ネオベレックスの有効成分はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムである。

【0039】

界面活性剤の添加量は、樹脂合成用のモノマー原料1gに対し、通常1～3mgである。

【0040】

前記重合開始剤としては、熱によりラジカルを発生するアゾ化合物および過酸化物などの熱重合開始剤が挙げられ、アゾ化合物として好ましくはV-50(2,2'-Azobisis(2-methylpropionamide)dihydrochloride)が挙げられ、過酸化物として好ましくは過硫酸アンモニウムが挙げられる。重合開始剤はレドックス重合開始剤であってもよい。

【0041】

重合開始剤の添加量は、樹脂合成用のモノマー原料1gに対し、通常0.1～1.5mg、好ましくは0.3～0.45mgである。

【0042】

前記アミノクマリン化合物内包樹脂粒子において、前記樹脂粒子がアミノ樹脂粒子であることが好ましい。

【0043】

前記アミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、励起スペクトル極大波長が475～510nmであり、蛍光スペクトル極大波長が510～540nmであることが好ましい。

【0044】

式(1)で表わされるアミノクマリン化合物を樹脂に内包させて製造された本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、そのアミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物を樹脂に内包させて製造されたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子と比較して、発光強度が強い傾向がある。これは、式(1)で表わされるアミノクマリン化合物は、該アミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物よりも、樹脂に内包されやすい性質があり、樹脂に

10

20

30

40

50

より多く取り込まれるからであると推測される。

【0045】

本発明のアミノクマリン化合物およびアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、上記の特性を有することから、免疫染色等において好適に活用することができる。

【0046】

具体的には、本発明のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子を用いた蛍光標識法により蛍光標識を行うと、緑色の輝点が明瞭であり、多重標識の場合、他の色領域、たとえば赤色領域への漏れ込みが小さく、緑色の輝点と赤色の輝点との良好なバランスが得られる。

【0047】

以下、前記アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を用いた蛍光標識法を説明する。

10

【0048】

前記蛍光標識法としては、免疫染色法およびFISH等を挙げることができる。免疫染色法およびFISHの具体的な操作方法是特に限定されず、公知の方法を用いることができる。色素粒子にて標識を行う従来の免疫染色法またはFISHにおいて、前記色素粒子として前記アミノクマリン化合物内包粒子を使用すればよい。

【0049】

免疫染色法の場合、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて、HER2およびKi67の他、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48およびCD59などの染色対象タンパク質に対しても染色することができる。

【0050】

前記蛍光標識法は、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いた標識を含む多重標識であってもよい。すなわち、2つ以上の標識対象に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重標識を行い、その染色対象の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識することができる。たとえば、複数の標識対象について、そのうちの一部の標識対象に対して前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行い、他の標識対象に対して緑色以外の発光を示す色素を含む粒子を用いて標識を行って、複数の標識対象を緑色と緑色以外の色とで別々に標識化することができる。

20

【0051】

たとえば、免疫染色法においては、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48およびCD59から選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色することができる。そうすれば、たとえば、PDL1をアミノクマリン化合物内包粒子によって緑色に染色し、CTLA4を赤色で染色して、PDL1とCTLA4とを異なる色で標識化するということが可能になる。

30

【0052】

この多重染色においては、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48、CD59、IDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGIT、INF- $\gamma$ 、INF- $\alpha$ 、INF- $\beta$ 、INF- $\delta$ 、INF- $\epsilon$ 、INF- $\kappa$ 、INF- $\lambda$ 、CSF、EPO、EGF、FGF、PDGF、HGF、TGF、CD3、CD4、CD25、CD28、CD80、CD86、CD160、CD57、OX40(別名CD134)、OX40L(別名CD252)、ICOS(別名CD278)、ICOSL(別名CD275)、CD155、CD226、CD112、CD27、CD70、4-1BB(別名CD137)、4-1BBL(別名CD137L)、GITR(別名CD357)、GITRL、BTLA(別名CD272)、HVEM(別名CD270)、TIM-3、Galectin-9、LAG-3(別名CD223)、B7-H3(別名CD276)、B7-H4、B7-H5、CD40、CD40L、PD-1、PD-L2、2B4(別名CD244)、KLRG-1、E-Cadherin、N-Cadherin、R-Cadherin、CD68、CD163およびCSF1-Rから選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色することができる。

40

50

## 【 0 0 5 3 】

前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行うと、明瞭な緑色の輝点を確認でき、赤色領域などの他の色領域への漏れ込みが小さい。このため、特定の標識対象に対して前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて緑色の標識を行い、他の染色対象に対して赤色素を含む色素粒子を用いて赤色の標識を行うと、得られる緑色の輝点は赤色領域への漏れ込みが小さく、緑色の輝点と赤色の輝点との良好なバランスが得られる。

## 【 0 0 5 4 】

前記アミノクマリン化合物は、前記アミノクマリン化合物以外のクマリン化合物に比較して、赤色領域に近い発光領域を有するが、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行うと、前記アミノクマリン化合物以外のクマリン化合物を含む色素粒子よりも、赤色領域への漏れ込みがむしろ小さいという効果が得られる。

10

## 【 実施例 】

## 【 0 0 5 5 】

## [ 実施例 1 ]

20 mL バイアル管瓶に下記式 ( 3 ) で表わされる化合物 ( 3 ) 600 mg を入れ、発煙硫酸 6 mL を加えて、25 ℃ にて 4 時間攪拌し、反応を行った。反応の進行は TLC にて確認した。具体的には、反応液の一部を NaOH 水溶液にて中和した後、反応液にエタノールを加え、CHCl<sub>3</sub> を 2、MeOH を 3 の割合で混合した溶液を用いて TLC を行った。原料の Rf 値 0.88 に対し、目的物の Rf 値 0.73 であり、この TLC のデータより、反応の収束および目的物の生成を確認した。

20

## 【 0 0 5 6 】

50 mL バイアル管瓶に氷を 8 分目 ( 30 mL ) まで入れ、この中に反応液を少しずつ加えた。生成した色素が懸濁した懸濁液が得られた。この懸濁液を遠心分離し、上澄み液を除去して色素を沈殿として回収した。沈殿を純水 10 mL で分散し、この分散液を遠心分離して、上澄み液を除去して、沈殿を回収し、再度、純水 10 mL で分散し、この分散液を遠心分離して上澄み液を除去して、沈殿を回収した。回収した沈殿をエタノールで分散し、この分散液を遠心分離し、上澄み液を除去して、沈殿として下記式 ( I ) で表わされるアミノクマリン化合物 I を得た。アミノクマリン化合物 I の収率は 80 % であった。

## 【 0 0 5 7 】

得られた沈殿物を乾燥後、得られた粉末を純水に加えた後、NaOH 水溶液で中和し、沈殿を溶解し、溶液の pH を 7 ~ 8 とした。この溶液を凍結乾燥機にて乾燥する事により、アミノクマリン化合物 I の Na 塩を得た。アミノクマリン化合物 I は、スルホン酸体では水への溶解性が悪いのに対し、Na 塩とする事で、水に速やかに溶解することを確認した。

30

## 【 0 0 5 8 】

アミノクマリン化合物 I を、再蒸留水 ( DDW ) を 10、エタノールを 1 の割合で混合して得られた溶媒に溶解して、10 nM 溶液を作製した。この溶液に対して、分光蛍光度計 F-7000 ( 日立製作所 ( 株 ) 製 ) を用いて、励起スペクトル極大波長、蛍光スペクトル極大波長、および励起波長 490 nm での蛍光強度を測定した。結果を表 1 に示す。励起スペクトルは検出する蛍光波長を固定して励起光の波長を走査して蛍光強度を測定した。蛍光スペクトルは励起光の波長を固定して蛍光強度を測定した。

40

## 【 0 0 5 9 】

また、スルホン化前の原料および本化合物の <sup>1</sup>H - NMR 測定を行ない、目的のスルホン化物が得られている事を確認した。

スルホン化前の <sup>1</sup>H - NMR ( 400MHz, CDCl<sub>3</sub> ) ( 化合物 ( 3 ) ) : δ = 1.31(s, 6H), 1.59(s, 6H), 1.77(t, 2H), 1.83(t, 2H), 3.29(t, 2H), 3.38(t, 2H), 7.30(s, 1H), 7.36(t, 1H), 7.47(t, 1H), 7.94(d, 1H), 8.00(d, 1H), 8.83(s, 1H)

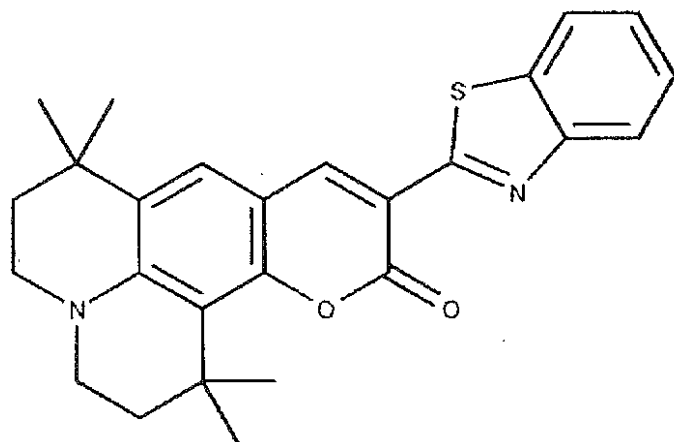
スルホン化後の <sup>1</sup>H - NMR ( 400MHz, CD<sub>3</sub>OD ) ( アミノクマリン化合物 I ) : δ = 1.37(s, 6H), 1.59(s, 6H), 1.83(s broad, 2H), 1.89(s broad, 2H), 3.52(s broad, 2H), 3.61(s broad, 2H), 7.46(s, 1H), 7.95(d, 1H), 8.11(d, 1H), 8.53(s, 1H), 8.69(s, 1

50

H)

【 0 0 6 0 】

【 化 4 】

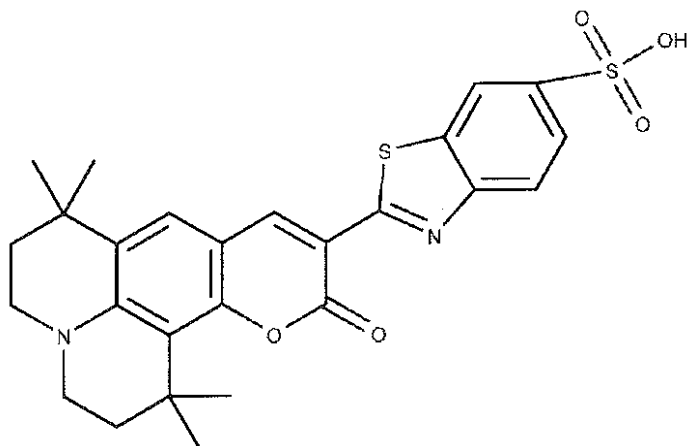


10

(3)

【 0 0 6 1 】

【 化 5 】



20

(I)

30

[ 実施例 2 ]

式 ( 3 ) で表わされる化合物の代わりに下記式 ( 4 ) で表わされる化合物 ( 4 ) を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、下記式 ( I I ) で表わされるアミノクマリン化合物 I I を得た。アミノクマリン化合物 I I の収率は 8 2 % であった。

【 0 0 6 2 】

アミノクマリン化合物 I I を用いて、実施例 1 と同様に励起スペクトル極大波長、蛍光スペクトル極大波長、および蛍光強度を測定した。結果を表 1 に示す。

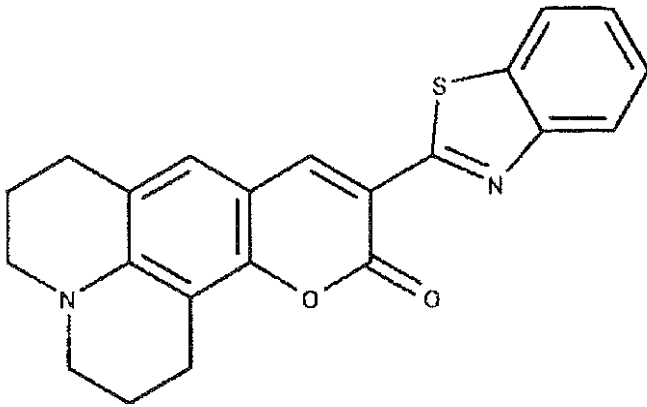
スルホン化前の <sup>1</sup>H - NMR ( 400MHz, CDCl<sub>3</sub> ) ( 化合物 ( 4 ) ) :        = 1.99(m, 4H), 2.79(t, 2H), 2.94(t, 2H), 3.33(s broad, 4H), 7.05(s, 1H), 7.34(t, 1H), 7.46(t, 1H), 7.92(d, 1H), 8.00(d, 1H), 8.80(s, 1H)

40

スルホン化後の <sup>1</sup>H - NMR ( 400MHz, CD<sub>3</sub>OD ) ( アミノクマリン化合物 I I ) :        = 1.95(m, 4H), 2.78(t, 2H), 2.84(t, 2H), 3.36(m, 4H), 7.20(s, 1H), 7.89(d, 1H), 7.94(d, 1H), 8.38(s, 1H), 8.80(s, 1H)

【 0 0 6 3 】

【化 6】

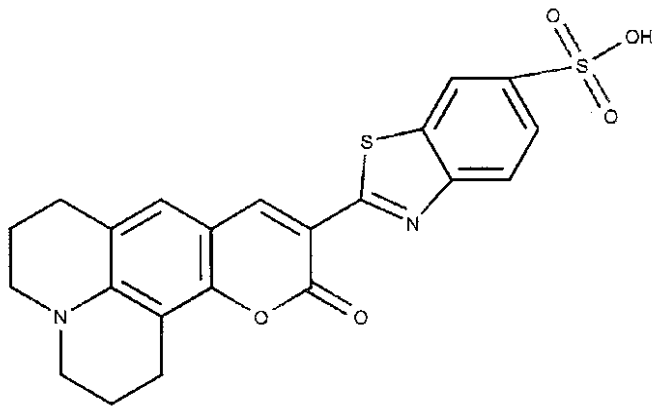


(4)

10

【 0 0 6 4】

【化 7】



(II)

20

[ 実施例 3 ]

式 (3) で表わされる化合物の代わりに下記式 (5) で表わされる化合物 (5) を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、下記式 (III) で表わされるアミノクマリン化合物 III を得た。アミノクマリン化合物 III の収率は 80% であった。

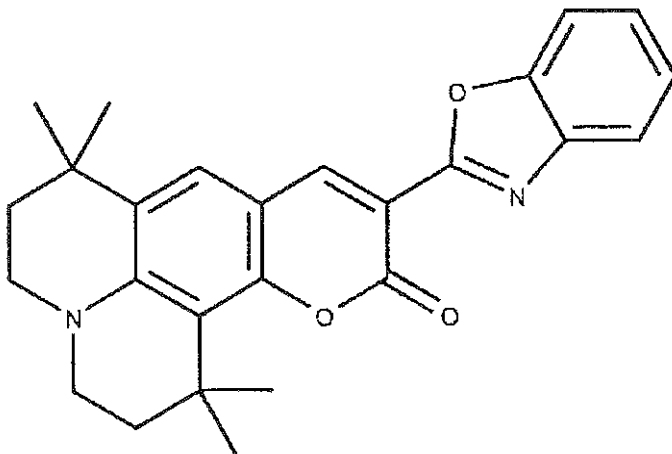
30

【 0 0 6 5】

アミノクマリン化合物 III を用いて、実施例 1 と同様に励起スペクトル極大波長および蛍光スペクトル極大波長を測定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 6 6】

【化 8】



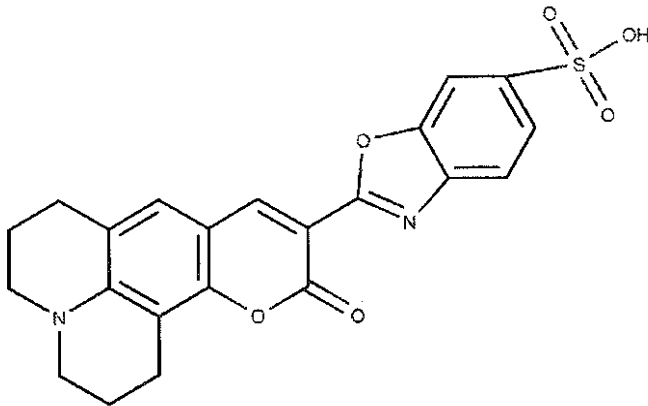
(5)

40

50



## 【化 1 1】



10

(IV)

## 【実施例 5】

式(3)で表わされる化合物の代わりに下記式(7)で表わされる化合物(7)を用いたこと以外は実施例1と同様の方法により、下記式(V)で表わされるアミノクマリン化合物Vを得た。アミノクマリン化合物Vの収率は70%であった。

## 【0071】

アミノクマリン化合物Vを用いて、実施例1と同様に励起スペクトル極大波長および蛍光スペクトル極大波長を測定した。結果を表1に示す。

20

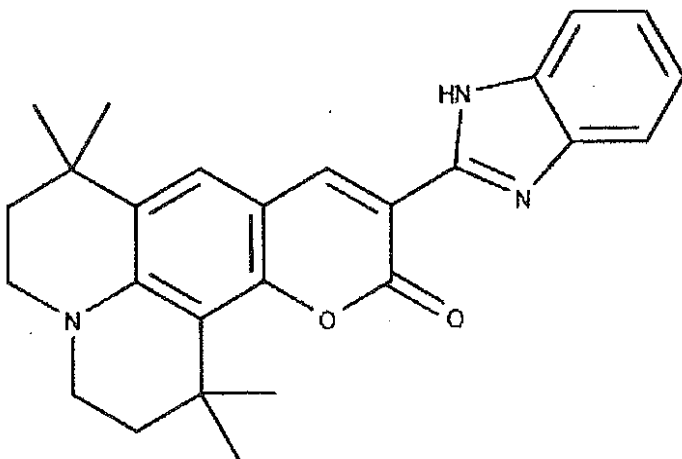
スルホン化前の<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)(化合物(7)) : = 1.98(m, 4H), 2.78(t, 2H), 2.93(t, 2H), 3.33(m, 4H), 6.98(s, 1H), 7.30(d, 1H), 7.31(d, 1H), 7.57(t, 1H), 7.78(t, 1H), 8.50(s, 1H)

スルホン化後の<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>)(アミノクマリン化合物V) : = 1.97(s broad, 4H), 2.80(m, 2H), 2.87(m, 2H), 3.39(m, 4H), 7.19(s, 1H), 7.72(d, 1H), 7.87(d, 1H), 8.05(s, 1H), 8.65(s, 1H)

## 【0072】

## 【化 1 2】

30

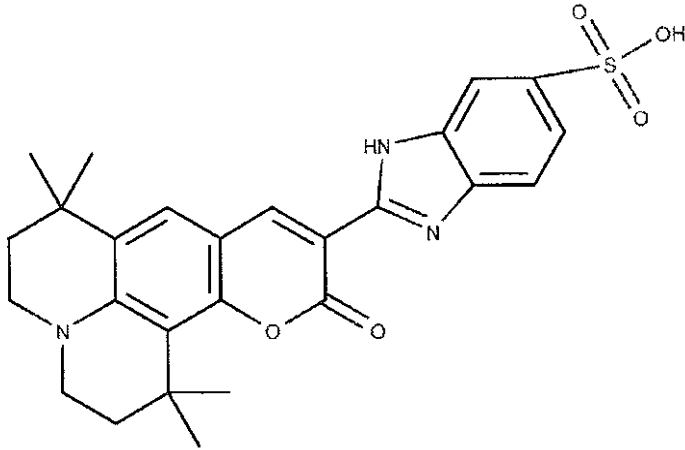


40

(7)

## 【0073】

【化 1 3】



10

(V)

【実施例 6】

式(3)で表わされる化合物の代わりに下記式(8)で表わされる化合物(8)を用いたこと以外は実施例1と同様の方法により、下記式(VI)で表わされるアミノクマリン化合物VIを得た。アミノクマリン化合物VIの収率は75%であった。

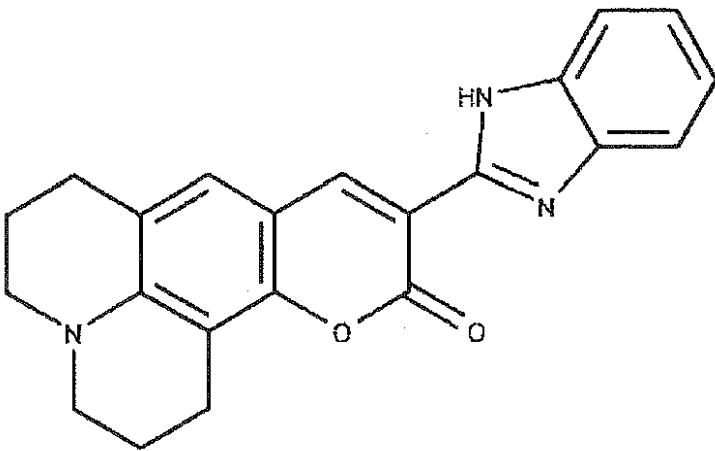
【0074】

アミノクマリン化合物VIを用いて、実施例1と同様に励起スペクトル極大波長および蛍光スペクトル極大波長を測定した。結果を表1に示す。

20

【0075】

【化 1 4】

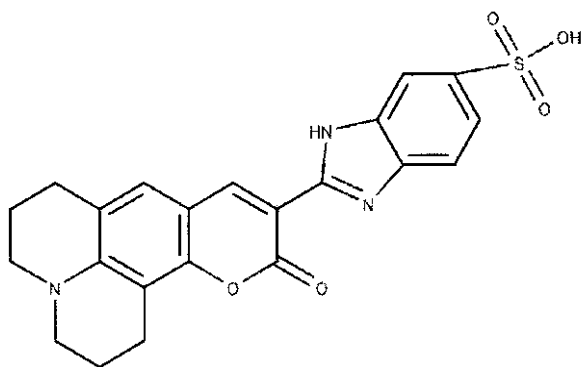


30

(8)

【0076】

【化 1 5】



40

(VI)

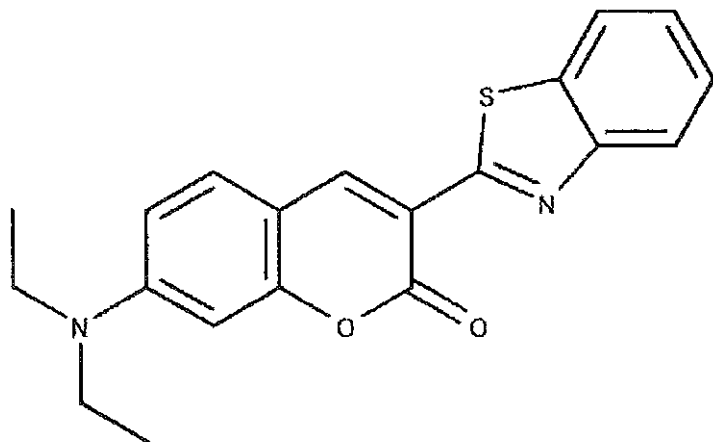
【比較例 1】

50

アミノクマリン化合物 I の代わりに下記式 ( i ) で表わされるアミノクマリン化合物 i を用いたこと以外は実施例 1 と同様に、蛍光強度を測定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 7 7 】

【 化 1 6 】



( i )

10

[ 比較例 2 ]

式 ( 3 ) で表わされる化合物の代わりに上記式 ( i ) で表わされるアミノクマリン化合物 ( i ) を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、下記式 ( i i ) で表わされるアミノクマリン化合物 i i を得た。

20

【 0 0 7 8 】

アミノクマリン化合物 i i を用いて、実施例 1 と同様に励起スペクトル極大波長、蛍光スペクトル極大波長、および蛍光強度を測定した。結果を表 1 に示す。

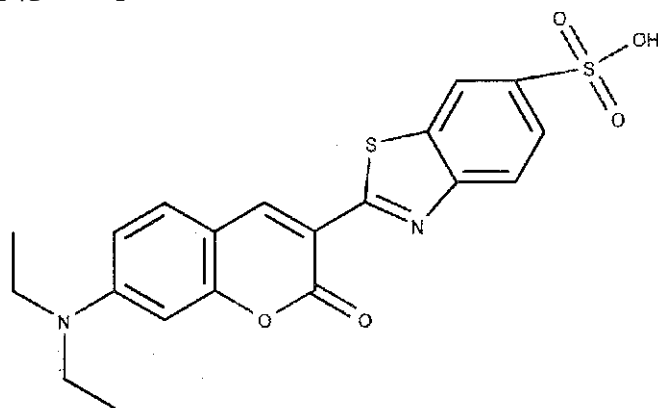
スルホン化前の  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (アミノクマリン化合物 ( i ) ) : = 1.25(t, 6H), 3.46(q, 4H), 6.56(s, 1H), 6.67(d, 1H), 7.36(t, 1H), 7.48(m, 2H), 7.99(d, 1H), 8.01(d, 1H), 8.90(s, 1H)

スルホン化後の  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ ) (アミノクマリン化合物 i i ) : = 1.67(t, 6H), 3.51(m, 4H), 6.68(s, 1H), 6.86(d, 1H), 7.41(d, 1H), 7.78(d, 1H), 7.91(d, 1H), 8.30(s, 1H), 9.03(s, 1H)

30

【 0 0 7 9 】

【 化 1 7 】



( i i )

40

[ 比較例 3 ]

式 ( 3 ) で表わされる化合物の代わりに下記式 ( 9 ) で表わされる化合物 ( 9 ) を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、下記式 ( i i i ) で表わされるアミノクマリン化合物 i i i を得た。

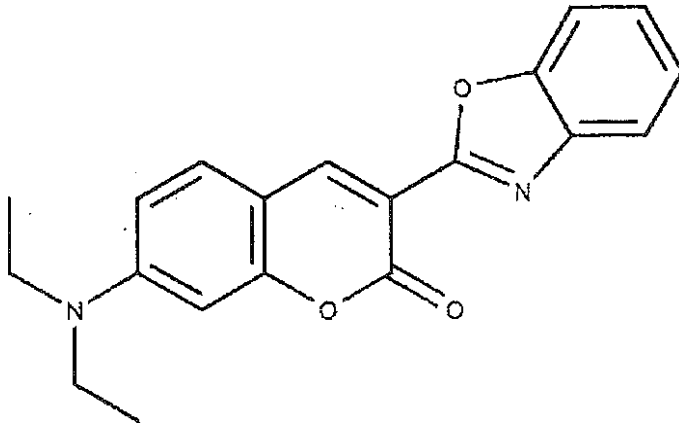
【 0 0 8 0 】

アミノクマリン化合物 i i i を用いて、実施例 1 と同様に励起スペクトル極大波長および蛍光スペクトル極大波長を測定した。結果を表 1 に示す。

50

【 0 0 8 1 】

【 化 1 8 】

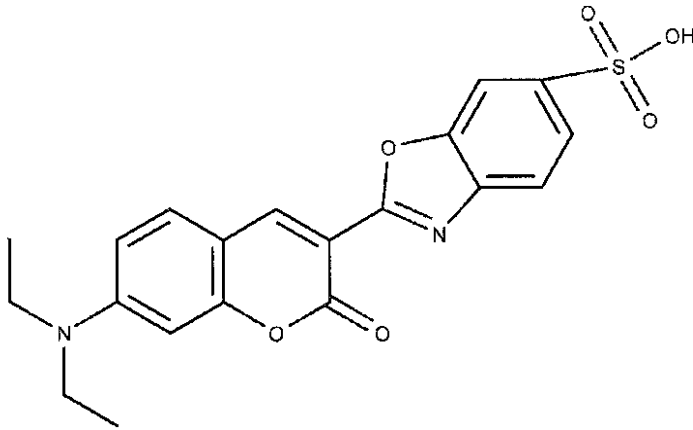


10

(9)

【 0 0 8 2 】

【 化 1 9 】



20

(i i i)

[ 比較例 4 ]

式 ( 3 ) で表わされる化合物の代わりに下記式 ( 1 0 ) で表わされる化合物 ( 1 0 ) を用いたこと以外は実施例 1 と同様の方法により、下記式 ( i v ) で表わされるアミノクマリン化合物 i v を得た。

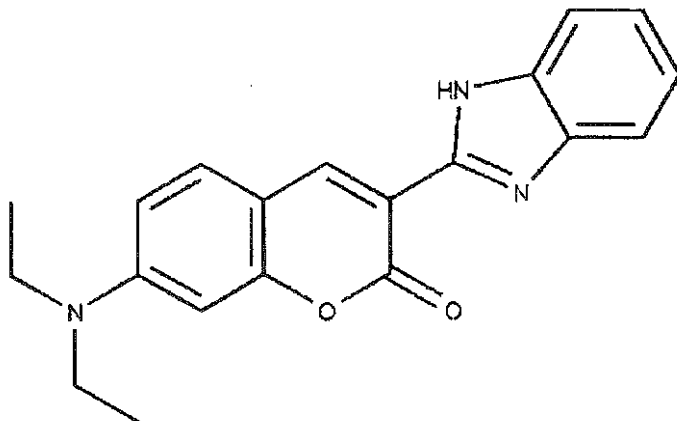
30

【 0 0 8 3 】

アミノクマリン化合物 i v を用いて、実施例 1 と同様に励起スペクトル極大波長および蛍光スペクトル極大波長を測定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 8 4 】

【 化 2 0 】



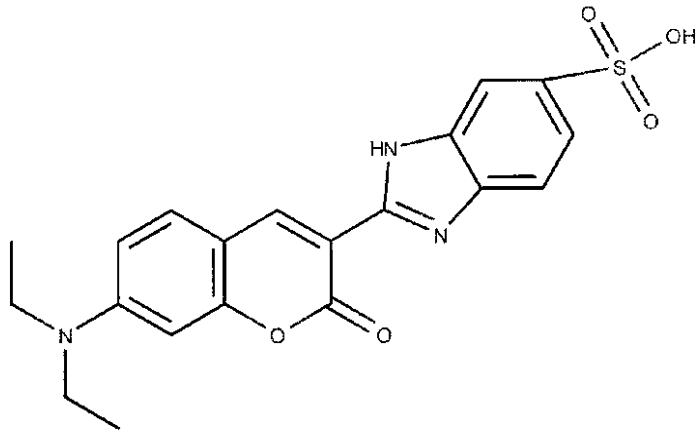
40

(10)

【 0 0 8 5 】

50

## 【化 2 1】



(i v)

## 【 0 0 8 6 】

## 【表 1】

	アミノクマリン化合物	励起スペクトル 極大波長 (nm)	蛍光スペクトル 極大波長 (nm)	蛍光強度
実施例 1	アミノクマリン化合物 I	485	530	430
実施例 2	アミノクマリン化合物 I I	490	531	420
実施例 3	アミノクマリン化合物 I I I	475	517	未測定
実施例 4	アミノクマリン化合物 I V	475	517	未測定
実施例 5	アミノクマリン化合物 V	485	530	未測定
実施例 6	アミノクマリン化合物 V I	485	530	未測定
比較例 1	アミノクマリン化合物 i	未測定	未測定	110
比較例 2	アミノクマリン化合物 i i	470	515	160
比較例 3	アミノクマリン化合物 i i i	460	505	未測定
比較例 4	アミノクマリン化合物 i v	470	515	未測定

## 【実施例 7】

アミノクマリン化合物 I 14.4 mg を水 22 mL に加えて溶解させた。この溶液に乳化重合用乳化剤のエマルジョン（登録商標）430（ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王社製）の 5% 水溶液を 2 mL 加えた。

## 【 0 0 8 7 】

この溶液をホットスターラー上で攪拌しながら 70 °C まで昇温させた後、この溶液にメラミン樹脂原料ニカラック M X - 035（日本カーバイド工業社製）を 0.65 g 加えた。この溶液に反応開始剤としてドデシルベンゼンスルホン酸（関東化学社製）の 10% 水溶液を 1000 μL 加え、70 °C で 50 分間加熱攪拌し、その後、90 °C に昇温して 20 分間加熱攪拌した。以上の操作により、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 I を得た。

## 【 0 0 8 8 】

得られたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子 I の分散液から、純水による洗浄を行い、余剰の樹脂原料やアミノクマリン化合物などの不純物を除いた。具体的には、遠心分離機（クボタ社製マイクロ冷却遠心機 3740）にて 20000 G で 15 分間、遠心分離し、

上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散した。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を5回繰り返した。

【0089】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iの平均粒径をSEM画像の粒子直径より算出した。結果を表2に示す。

【0090】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iを0.0189mg/mLに希釈して100uLを取り、蛍光用マイクロセルに入れて、分光蛍光光度計F-7000(日立製作所(株)製)を用いて、励起波長490nmで蛍光強度を測定した。結果を表2に示す。

【0091】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iを、下記のFACS(Fluorescence Activated Cell Sorting)およびFISH(Fluorescence in situ hybridization)に供した。

(FACS評価)

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iの末端にNH<sub>2</sub>-PEG(polyethylene glycol)-マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗HER2抗体を結合させた。

【0092】

ATCC(American Type Culture Collection)から入手したCOLO201の凍結細胞を37℃の恒温槽で融かし、 $1 \times 10^5$ 個/mL程度の細胞を培地に懸濁して、25cm<sup>2</sup>フラスコで最初の培養を実施した。 $1 \times 10^6$ 個/mL程度に細胞が増えた培養液をトリプシン処理し、フラスコからはがした細胞の一部をCellバンカー液(10%DMSO)で希釈し、凍結乾燥して、保存細胞とした。残りの細胞は継代して目的量 $5 \times 10^7$ 個程度まで培養し、スクレーパーで浮かして回収後、一部をFACS測定に使用した。

【0093】

培養細胞表面に存在するHER2タンパク質を、FACSCalibur(商品名;ベクトン・ディッキンソン社製)で計測した。アミノクマリン化合物内包樹脂粒子IのPBS溶液と上述のように培養したCOLO201との混合液を4℃で、30分間インキュベートし、その100μLを測定用チューブに採り、Assay Diluent(商品名、ベクトン・ディッキンソン社製)で2mLに希釈して、FACSCaliburにインジェクトした。

【0094】

結果を表2に示す。表2中にFACSの結果として示された図は、490nm励起光による530nmの蛍光強度を横軸に、カウント数を縦軸にしたヒストグラムである。この図においては、ヒストグラムが右側にシフトしているほど蛍光強度が強い、つまり明るいことを示す。この図では、実施例7の結果は、下記のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子iを用いた比較例5の結果と比較して示されている。他の実施例および比較例6~8についても同様である。蛍光強度90付近にピークを有するヒストグラムが比較例5のヒストグラムであり、蛍光強度500付近にピークを有するヒストグラムが実施例7のヒストグラムである。実施例7のヒストグラムは、比較例5のヒストグラムからかなり右側にシフトしていることがわかる。この結果から、実施例7のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iは、比較例5のアミノクマリン化合物内包樹脂粒子iより、蛍光強度が強く、明るいことがわかる。

(FISH評価)

{BACプローブの調製}

Cell Biochem Biophys. 2006; 45(1)59の記載の方法に従って、以下のように核酸分子を調製した。GSP社から購入したHER2-DNAクローン(約150kbp)1μg(5μL)に対して、ニックトランスレーション用のキット(製品名「GSP-ニックトランスレーションキット」K-015、GSP社製)のプロトコールに従い、以下のようにニックトランスレーション法により、HER2のDNAクローン(核酸分子)のdTTPをDNP標識dUTPで置換した。

10

20

30

40

50

## 【0095】

〔ニックトランスレーションによる標準的なビオチン標識方法〕

まず、下記の試薬を遠心チューブ内で混合した。

- ・ 10 × Nick Buffer (Tris - HCl [pH 7.2]、MgSO<sub>4</sub>、DTT)
  - ・ ・ ・ 2.5 μL
- ・ BSA (Nuclease-free BSA) ・ ・ ・ 1.5 μL
- ・ dNTP mix (dATP、dCTP、dCTP) ・ ・ ・ 5 μL
- ・ dTTP ・ ・ ・ 0.5 μL、
- ・ DNP-11-dUTP (製品番号NEL551001EA、PerkinElmer社製、250 nmol / 25 μL) ・ ・ ・ 0.15 μL
- ・ 純水 (Nuclease free water) ・ ・ ・ 3 μL
- ・ 上記HER2-DNAクローン約150 kbp 1 μgの水溶液 ・ ・ ・ 5 μL
- ・ DNA Polymerase I (Tris - HCl [pH 7.5]、EDTA、DTT、glycerol) ・ ・ ・ 1 μL
- ・ DNase I ・ ・ ・ 5 μL

次に、15 で4時間反応させ、70 で10分間加熱して反応を停止させた。反応後の遠心チューブに25 μLの蒸留水を添加した。ビオチン標識済みのBACプローブの反応溶液を核酸精製用マイクロスピナラム (GEヘルスケア社製「MicroSpin S-200HR Column」、製品番号「#27-5120-01」)により精製した。

## 【0096】

この溶液に対して、3 M酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2)を約5.56 μL、100 %エタノールを150 μL添加し、-20 で1時間以上静置した。4 で16000 rpm 10分間遠心して沈殿を形成した。さらに、70 %エタノールを500 μL添加して、4 、16000 rpmで1分間遠心し上澄みを除去した。沈殿物に5 ~ 10 μLの蒸留水を添加して完全に溶解させ、最終濃度1 μg / 250 μLのDNP標識されたBACプローブの溶液を得た。

## 【0097】

〔アミノクマリン化合物内包樹脂粒子と上記BACプローブとが結合したDNAプローブの調製〕

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iの表面アミノ基にNHS-PEG (polyethylene glycol) - マレイミド試薬を反応してマレイミドを導入し、これに抗DNP抗体を結合させた。

## 【0098】

上記ニックトランスレーションによりDNP標識したBACプローブを25 μL (濃度1 μg / 250 μL)および抗DNP抗体で表面修飾されたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子を1.0 μL (50 nmol / 50 μL)含む溶液を混合して、室温で30分間結合反応を行い、HER-2検出用のDNAプローブ試薬を得た。

## 【0099】

〔DNAプローブの保存〕

上述のように得られたDNAプローブをハイブリダイゼーション緩衝液 (25 %脱イオン化したホルムアミド、2 × SSC、200 ng / μLサケ精子DNA、5 × デンハルト溶液、50 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.0、1 mM EDTA)に終濃度1 ~ 5 ng / μLとなるように希釈した。必要に応じて、S300サイズのスピナラム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)により遊離のリガンドを除去した。直ぐに使用しない場合、DNAプローブを-20 で冷凍保存した。

## 【0100】

〔HER2遺伝子のコピー数を測定〕

FISHによりHER2遺伝子のコピー数を測定した。FISHは以下に示すように、脱パラフィン処理、検体スライドの前処理、酵素処理、検体の固定処理、プローブの準備

10

20

30

40

50

、検体スライドのDNAの変性処理、ハイブリダイゼーション処理、スライドガラスの洗浄処理、およびDAPI染色処理をこの順で行うことで実施した。

【0101】

〔脱パラフィン処理〕

HER2陽性染色対照標本の検体スライド（パソロジー研究所社製「HER2-FISHコントロールスライド Code PS-09006」）を、以下の（１）～（４）の順で処理することで脱パラフィン処理を行った。（１）ヘモディー（Hemo-De）に常温で10分間浸漬する。（２）検体スライドを新しいHemo-Deに常温10分間浸漬する。同じ操作を3回繰り返す。（３）検体スライドを100%エタノールで常温で5分間浸漬し、2回洗浄し、脱水処理を行う。（４）検体スライドを風乾または45～50のスライドウォーマー上で乾燥させる。

10

【0102】

〔検体スライドの前処理〕

DNAプローブの到達性を向上させるために、上記検体スライドに対し以下の（１）～（６）の順で前処理を行い、細胞膜及び核膜の蛋白質の除去を行った。（１）検体スライドを0.2ml/L HClで室温、20分間処理する。（２）検体スライドを精製水に3分間浸漬する。（３）検体スライドを洗浄緩衝液（2xSSC: standard saline citrate）に3分間浸漬する。（４）検体スライドを80の前処理溶液（1N NaSCN）に30分間浸漬する。（５）検体スライドを精製水に1分間浸漬する。（６）検体スライドを洗浄緩衝液（2xSSC）に5分間浸漬し、この浸漬操作を2回繰り返す。

20

【0103】

〔酵素処理〕

前処理を行った検体スライドに対して、以下の（１）～（４）の処理をこの順で行うことで酵素処理を行った。（１）前処理した検体スライドを取り出し、ペーパータオルにスライドガラスの下端をつけて余分な洗浄緩衝液を取り除く。（２）検体スライドを37に加熱したプロテアーゼ溶液に10～60分間浸漬する。この浸漬処理は、細胞膜及び核膜のタンパク質、特にコラーゲンの分解をするために、25mg プロテアーゼ（2500-3000 Units/mg）[ペプシン]/1M NaCl [pH2.0] 50mLで37、60分間で処理することが望ましい。（３）検体スライドを洗浄緩衝液に5分間浸漬する。この操作を2回繰り返す。（４）検体スライドを風乾または45～50のスライドウォーマー上で2～5分間乾燥させる。

30

【0104】

〔検体の固定〕

検体の固定処理として、前処理を行った検体スライドに対して以下の（１）～（３）の処理を行った。（１）検体スライドを10%中性緩衝ホルマリン（和光純薬社製「4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液」、製品番号163-20145）に常温で10分間浸漬する。（２）検体スライドを洗浄緩衝液に5分間浸漬する。これと同じ操作を2回繰り返す。（３）検体スライドを風乾または45～50のスライドウォーマー上で2～5分間乾燥させる。

40

【0105】

〔プローブの準備〕

冷凍保存しておいたDNAプローブ試薬の溶液を室温に戻し、正確な容量を採液可能なピペティング操作ができる程度まで溶液の粘度を十分にさげて、ボルテックスミキサー等で溶液を混和した。

【0106】

〔検体スライドのDNAの変性〕

検体スライド上のDNAの変性処理として、検体の固定処理を行った検体スライドに対して以下の（１）～（８）の処理を行った。（１）検体スライドの作成前に水で湿らせたペーパータオルを底に敷いた湿潤箱（気密性の容器であり、その側面をペーパータオルで

50

テーピングしたもの)を37℃インキュベータ内に載置して予備加熱する。(2)変性溶液(70%ホルムアミド/SSC[150mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウム])のpHが常温でpH7.0~8.0であることを確かめる。変性溶液をコプリンジャーに入れ、溶液が72±1℃になるまで温浴槽で加温する(72±1℃の温浴槽に少なくとも30分間置く)。(3)ハイブリダイゼーション領域がどの部分かわかるように、検体スライドの裏側に領域を囲むようにダイヤモンドペン等でマークする。(4)検体スライドを72±1℃の変性溶液の入ったコプリンジャー中に浸漬し、検体スライドのDNAを変性する。(5)ピンセットを使って、検体スライドを変性溶液から取り出し、すぐに常温の70%エタノール中に入れる。ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体スライドを1分間浸漬する。(6)検体スライドを70%エタノールから取り出し、85%エタノール中に入れ、ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体を1分間浸漬する。100%エタノールで同じ操作を2回繰り返す。(7)ペーパータオルに検体スライドグラスの下端をつけてエタノールを取り除き、ペーパータオルでスライドグラスの裏側を拭く。(8)検体スライドをドライヤーで風乾または45~50℃のスライドウォーマーで2~5分間乾燥させる。

#### 【0107】

##### 〔ハイブリダイゼーション〕

上記変性処理を行った検体スライドに対して以下の(1)~(3)の処理をこの順で行うことで、検体スライドに対して上述したように調製したDNAプローブ10μL(10~50ng)を用いてハイブリダイゼーション処理を行った。(1)検体スライドのハイブリダイゼーション領域に調製した上記DNAプローブを10μL添加し、すぐに、22mm×22mmのカバーガラスをプローブの上に被せ均一にプローブを広げる。ハイブリダイゼーション領域に気泡が入らないようにする。(2)ペーパーボンドでカバーガラスをシールする。(3)前もって加温した湿潤箱に検体スライドを入れて蓋をして37℃のインキュベータで14~18時間ハイブリダイゼーションを行う。

#### 【0108】

##### 〔スライドグラスの洗浄〕

上記ハイブリダイゼーション処理を行った検体スライドに対して以下の(1)~(6)の処理をこの順で行うことで、検体スライドの洗浄処理を行った。(1)ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液(2×SSC/0.3%NP-40)をコプリンジャーに入れる。ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液が72±1℃になるまで温浴槽で予備加熱をする(72±1℃の温浴槽に少なくとも30分間置く)。(2)ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を入れたコプリンジャーをもうひとつ用意し、常温に維持する。(3)ピンセットでペーパーボンドのシールを取り除く。(4)検体スライドをポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の中に入れる。カバーガラスは自然に溶液中で剥がれるのを待つ。(5)溶液から検体スライドを取り出し、余分な溶液を取り去り、72±1℃に加温したポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液に2分間浸す。ここで、73℃を超える温度や処理時間として2分を超えないようにするのが望ましい。(6)コプリンジャーから検体スライドを取り出し、遮光下(締め切った引出や締め切ったキャビネットの棚等)で風乾する。

#### 【0109】

##### 〔DAPI染色〕

DAPI染色は以下のように行った。まず、10μLのDAPI対比染色液を検体スライドのハイブリダイゼーション領域に添加した。次に、ハイブリダイゼーション処理した後、細胞数をカウントするためにDAPI染色(2μg/mL PBS)を25~10分間行うことで細胞核を染色し、カバーガラスを被せて、シグナルの計測まで検体スライドを遮光して保存した。DAPI(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)はMolecular Probes社(D1306)を使用した。

#### 【0110】

10

20

30

40

50

## 〔観察〕

## &lt; 蛍光顕微鏡観察 &gt;

蛍光顕微鏡観察では、HER2遺伝子染色済み組織切片を、蛍光顕微鏡 Zeiss imager (Camera: MRmモノクロ・冷却機能付、対眼レンズ×10、対物レンズ×60油浸、Zeiss製フィルターセットHE46(励起フィルター500nm±12.5nm、ビームスプリッター515nm、蛍光フィルター535nm±15nm))にセットし、ハイブリダイズしたDNAプローブのアミノクマリン化合物内包樹脂粒子の蛍光発光を、蛍光画像(蛍光静止画像)として取得した。

## 【0111】

得られた蛍光画像から輝点の数を計測した結果を表2に示す。計測された起点数に差があらわれたのは、比較例の場合には緑のバックグランド(ノイズ)の中から緑輝点(シグナル)を見つけ出すのが比較的困難であるのに対して、実施例の場合には高い輝度なのでノイズの影響を受けずに検出できるためである。

## [実施例8~12]

実施例8~12においては、アミノクマリン化合物Iの代わりにアミノクマリン化合物II~VIをそれぞれ用いたこと以外は実施例7と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子II~VIを作製した。

## 【0112】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子II~VIを用いて、実施例7と同様に平均粒径測定、蛍光強度測定、FACSおよびFISHを行った。ただし、実施例10および11においては、FACSは行わなかった。結果を表2に示す。

## [比較例5~8]

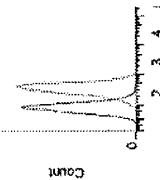
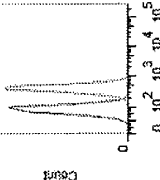
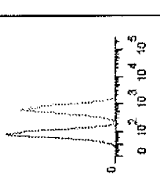
比較例5~8においては、アミノクマリン化合物Iの代わりにアミノクマリン化合物i~ivをそれぞれ用いたこと以外は実施例7と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子i~ivを作製した。

## 【0113】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子i~ivを用いて、実施例7と同様に平均粒径測定、蛍光強度測定、FACSおよびFISHを行った。結果を表3に示す。表3に示したFACSの結果より、比較例6~8では、蛍光色素がスルホン化されているにもかかわらず、ヒストグラムが比較例5のヒストグラムからそれほどシフトしていないことがわかる。

## 【0114】

【表 2】

	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	実施例 11	実施例 12
粒子性能	平均粒径 (nm)	150	133	134	132	133
	内包されている色素	アミノクマリ ン化合物 I	アミノクマリ ン化合物 I I	アミノクマリ ン化合物 V I	アミノクマ リン化合物 V	アミノクマリ ン化合物 V I
	蛍光強度	630	620	400	450	500
評価項目	励起スペクトル 極大波長 (nm)	490	495	480	483	490
	蛍光スペクトル 極大波長 (nm)	535	536	522	523	535
	FACS (ヒストグラム)				未測定	未測定
	FISH (輝点数)	45	45	44	50	44

【0115】

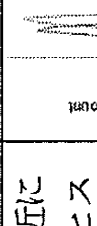
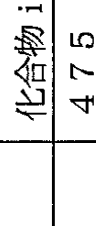
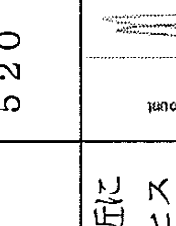
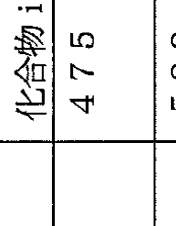
10

20

30

40

【表 3】

	比較例 5	比較例 6	比較例 7	比較例 8
粒子性能	平均粒径 (nm)	128	133	132
	蛍光強度	250	80	200
	内包されている 色素	アミノクマリン化合 物 i	アミノクマリン 化合物 i i i	アミノクマリン 化合物 i v
評価項目	励起スペクトル 極大波長 (nm)	475	465	475
	蛍光スペクトル 極大波長 (nm)	515	520	520
	FACS	蛍光強度90付近に ピークを有するヒス トグラム		
	FISH (輝点数)	11	18	9
				

10

20

30

40

50

## 【実施例 13】

アミノクマリン化合物 I 3.4 mg に塩化チオニル 0.1 mL を加え、65℃ 4 時間、加熱混合した後、真空乾燥を行なって余剰の塩化チオニルを除去した。得られたアミノクマリン化合物と塩化チオニルの反応物と 3 - アミノプロピルトリメトキシシラン (3 - aminopropyltrimetoxysilane、信越シリコン社製、KBM9

03) 3  $\mu$ L を 1.2 mL の N,N - ジメチルホルムアミド (DMF) の中で混合し、オルガノアルコキシシラン化合物を得た。

【0116】

得られたオルガノアルコキシシラン化合物液 0.3 mL を、99% エタノール 24 mL、テトラエトキシシラン (TEOS) 0.3 mL、超純水 0.75 mL、および 28 質量% のアンモニア水 0.75 mL と 25 で 3 時間混合した。

【0117】

上記工程で作製した混合液を 10000 G で 20 分間遠心分離し、上澄みを除去した。この沈殿に対して、エタノールを加えて、沈殿物を分散させ、再度遠心分離をするリンスを行った。さらに同様のリンスを 2 回繰り返し、アミノクマリン化合物内包粒子 V I I を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 60 nm であった。

10

[実施例 14]

超純水 0.85 mL、アンモニア水 0.85 mL としたこと以外は実施例 13 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 V I I I を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 80 nm であった。

[実施例 15]

超純水 1.10 mL、アンモニア水 1.10 mL としたこと以外は実施例 13 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 I X を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 150 nm であった。

20

【0118】

なお、実施例 15 で作製された粒子 I X について、蛍光強度測定、FACS および FISH の評価を行ったところ、表 2 の実施例と同様の結果が得られた。

[実施例 16]

超純水 1.15 mL、アンモニア水 1.15 mL としたこと以外は実施例 13 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 X を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 195 nm であった。

[実施例 17]

超純水 1.20 mL、アンモニア水 1.20 mL としたこと以外は実施例 13 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 X I を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 220 nm であった。

30

[比較例 9]

アミノクマリン化合物 I の代わりに緑色色素である Pyrromethene 556 を用いたこと以外は実施例 15 と同様の方法で、色素内包粒子 v を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 150 nm であった。

[比較例 10]

アミノクマリン化合物 I の代わりに緑色色素である Pyrromethene 556 を用いたこと以外は実施例 7 と同様の方法で、色素内包粒子 v i を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 150 nm であった。

40

[比較例 11]

アミノクマリン化合物 I の代わりに赤色色素であるスルホローダミン 101 を用いたこと以外は実施例 7 と同様の方法で、色素内包粒子 v i i を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 150 nm であった。

[実施例 7A]

実施例 7 で作製したアミノクマリン化合物内包粒子 I を用いて、下記の方法により免疫染色を行った。

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

50

アミノクマリン化合物内包粒子Iを、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2 mM含有するPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3 nMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようにSM(PEG)<sub>12</sub>（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecanethyleneglycol]ester)を混合し、5 で1時間反応させた。

【0119】

この混合液を、10000 Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後に、EDTAを2 mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで末端にマレイミド基がついたアミノクマリン化合物内包粒子Iを得た。

10

【0120】

1 mg/mLに調整したストレプトアビジン（和光純薬工業社製）40 μLを210 μLのボレートバッファーに加えた後、64 mg/mLに調整した2-イミノチオラン塩酸塩（シグマアルドリッチ社製）70 μLを加え、室温で1時間反応させた。これにより、ストレプトアビジンのアミノ基に対してチオール基（-NH-C(=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH）を導入した。

【0121】

このストレプトアビジン溶液をゲルろ過カラム（Zaba Spin Desalting Columns：フナコシ）により脱塩し、上記シリカ系粒子に結合可能なストレプトアビジンを得た。このストレプトアビジン全量（0.04 mg含有）とEDTAを2 mM含有したPBSを用いて上記0.67 nMに調整したシリカ系粒子740 μLとを混合し、室温で1時間反応させた。

20

【0122】

10 mMメルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iを得た。

（ビオチン修飾された2次抗体の作製）

50 mM Tris-HCl溶液（pH 7.5）に抗ウサギIgG抗体50 μgを溶解した。該溶液に、最終濃度3 mMとなるようにDTT（dithiothreitol）溶液を混合した。その後、該溶液を37 で30分間反応させた。その後、脱塩カラムを用いてDTTで還元化した2次抗体を精製した。精製した抗体全量のうち200 μLを50 mM Tris-HCl溶液（pH 7.5）に溶解して抗体溶液を得た。その一方で、スパーサーの長さが30オングストロームであるリンカー試薬「(+)-Biotin-PEG<sub>6</sub>-NH Mal」（Pure PEG社製、製品番号2461006-250）を、DMSOを用いて0.4 mMとなるように調整した。この溶液8.5 μLを前記抗体溶液に添加し、混和して37 で30分間反応させた。

30

【0123】

この反応溶液を脱塩カラム「Zeba Desalt Spin Columns」（サーモサイエンティフィック社製、Cat.#89882）に供して精製した。脱塩した反応溶液の波長300 nmの吸収を分光高度計（日立製「F-7000」）により計測して反応溶液に含まれるタンパク質の量を算出した。50 mM Tris溶液により反応溶液を250 μg/mLに調整し、該溶液をビオチン化2次抗体の溶液とした。

40

（染色）

（1）標本処理工程

（1-1）脱パラフィン処理工程

染色用の組織切片として、HER2（3+）とHER2（-）の組織アレイスライド（コスモバイオ社製「CB-A712のシリーズ」）を用いた。この組織アレイスライドを脱パラフィン処理した。

【0124】

（1-2）賦活化処理工程

50

脱パラフィン処理した組織アレイスライドを水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織アレイスライドを10 mMクエン酸緩衝液中(pH 6.0)中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織アレイスライドをPBSにより洗浄し、洗浄した組織アレイスライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

【0125】

(2) 免疫染色処理工程

(2-1) 1次反応

BSAを1%含有するPBSを用いて、ペンタナ社製「抗HER2ウサギモノクローナル抗体(4B5)」を0.05 nMに調整し、該1次抗体の溶液を上述のブロッキング処理した組織アレイスライドに対して4で1晩反応させた。

10

【0126】

(2-2) 2次反応

1次反応を行った組織アレイスライドをPBSで洗浄した後、1%BSA含有のPBSで6 µg/mLに希釈した上記ビオチン化2次抗体と室温30分間反応させた。

【0127】

(2-3) 蛍光標識処理

2次反応を行った組織アレイスライドに対して、1%BSA含有のPBSで0.02 nMに希釈したストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iを、中性のpH環境(pH 6.9~7.4)室温の条件下で3時間反応させた。該反応後の組織アレイスライドをPBSで洗浄した。

20

【0128】

(3) 形態観察染色工程

免疫染色後、ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)を行った。免疫染色した切片をマイヤーヘマトキシリン液で5分間染色してヘマトキシリン染色を行った。その後、該組織切片を45の流水で3分間洗浄した。次に、1%エオシン液で5分間染色してエオシン染色を行った。

【0129】

(4) 固定処理工程

免疫染色工程および形態観察染色工程を終えた組織切片に対して、純エタノールに5分間浸漬する操作を4回行い、洗浄・脱水を行った。続いて、キシレンに5分間浸漬する操作を4回行い、透徹を行った。最後に、封入剤(メルク社製「エンテランニュー」)を用いて、組織切片を封入して観察用のサンプルの組織アレイスライドとした。

30

【0130】

(5) 観察・計測工程

固定化処理工程を終えた組織切片に対して所定の励起光を照射して、蛍光を発光させた。その状態の組織切片を蛍光顕微鏡(オリンパス社製「BX-53」)、顕微鏡用デジタルカメラ(オリンパス社製「DP73」)により観察および撮像を行った。上記励起光は、光学フィルターに通すことで575~600 nmに設定した。また、観察する蛍光の波長(nm)の範囲についても、光学フィルターを通すことで612~692 nmに設定した。顕微鏡観察、画像取得時の励起波長の条件は、580 nmの励起では視野中心部付近の照射エネルギーが900 W/cm<sup>2</sup>となるようにした。画像取得時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないように任意に設定(例えば4000 µ秒に設定)して撮像した。HER2(3+)の組織の輝点数は、400倍で撮像した画像をもとにImageJ FindMaxims法により計測した1000細胞の平均値とした。

40

【0131】

視野内の細胞膜上の輝点数Sおよび視野内の細胞外の輝点数Nを測定し、S/Nを算出した。S/Nを表4に示す。

[実施例14A~17A]

実施例14A~17Aでは、それぞれ、実施例14~17で作製したアミノクマリン化

50

合物内包粒子V I I I ~ X Iを用いて、下記の方法により免疫染色を行った。

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにアミノクマリン化合物内包粒子V I I I ~ X Iをそれぞれ使用したこと以外は実施例7 Aと同様の方法でストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子V I I I ~ X Iをそれぞれ得た。

(ビオチン修飾された2次抗体の作製)

実施例7 Aと同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

(染色)

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子V I I I ~ X Iをそれぞれ使用したこと以外は実施例7 Aと同様の方法で、S / Nを算出した。S / Nを表4に示す。

10

[実施例8 A]

実施例8 Aでは、実施例8で作製したアミノクマリン化合物内包粒子I Iを用いて、下記の方法により免疫染色を行った。

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにアミノクマリン化合物内包粒子I Iを使用したこと以外は実施例7 Aと同様の方法でストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子I Iを得た。

(ビオチン修飾された2次抗体の作製)

実施例7 Aと同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

20

(染色)

(1) 標本処理工程

(1-1) 脱パラフィン処理工程

染色用の組織切片としてP D L 1の組織アレイスライドを用いた。この組織アレイスライドを脱パラフィン処理した。

【0132】

(1-2) 賦活化処理工程

脱パラフィン処理した組織アレイスライドを水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織アレイスライドを10 mMクエン酸緩衝液中(pH 6.0)中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織アレイスライドをPBSにより洗浄し、洗浄した組織アレイスライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

30

【0133】

(2) 免疫染色処理工程

(2-1) 1次反応

BSAを1%含有するPBSを用いて、Cell Signaling Technology社製「抗PD-L1ウサギモノクロナール抗体(E1L3N)」を0.05 nMに調整し、該1次抗体の溶液を上述のブロッキング処理した組織アレイスライドに対して4で1晩反応させた。

【0134】

(2-2) 2次反応

1次反応を行った組織アレイスライドをPBSで洗浄した後、1%BSA含有のPBSで6 μg/mLに希釈した上記ビオチン化2次抗体と室温30分間反応させた。

40

【0135】

(2-3) 蛍光標識処理

2次反応を行った組織アレイスライドに対して、1%BSA含有のPBSで0.02 nMに希釈したストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子I Iを、中性のpH環境(pH 6.9~7.4)室温の条件下で3時間反応させた。該反応後の組織アレイスライドをPBSで洗浄した。

【0136】

(3) 形態観察染色工程

50

免疫染色後、ヘマトキシリン・エオシン染色（HE染色）を行った。免疫染色した切片をマイヤーヘマトキシリン液で5分間染色してヘマトキシリン染色を行った。その後、該組織切片を45の流水で3分間洗浄した。次に、1%エオシン液で5分間染色してエオシン染色を行った。

【0137】

（4）固定処理工程

免疫染色工程および形態観察染色工程を終えた組織切片に対して、純エタノールに5分間浸漬する操作を4回行い、洗浄・脱水を行った。続いて、キシレンに5分間浸漬する操作を4回行い、透徹を行った。最後に、封入剤（メルク社製「エンテランニュー」）を用いて、組織切片を封入して観察用のサンプルの組織アレイスライドとした。

10

【0138】

（5）観察・計測工程

実施例7Aと同様の方法で、S/Nを算出した。S/Nを表4に示す。

[比較例9A-1]

（色素内包粒子のストレプトアビジン修飾）

アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりに色素内包粒子vを使用したこと以外は実施例7Aと同様の方法でストレプトアビジン結合色素内包粒子vを得た。

（ビオチン修飾された2次抗体の作製）

実施例7Aと同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

（染色）

20

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにストレプトアビジン結合色素内包粒子vを使用したこと以外は実施例7Aと同様の方法で、S/Nを算出した。S/Nを表4に示す。

[比較例9A-2]

（色素内包粒子のストレプトアビジン修飾）

アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりに色素内包粒子vを使用したこと以外は実施例1と同様の方法でストレプトアビジン結合色素内包粒子vを得た。

（ビオチン修飾された2次抗体の作製）

実施例1と同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

（染色）

30

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子IIの代わりにストレプトアビジン結合色素内包粒子vを使用したこと以外は実施例8Aと同様の方法で、S/Nを算出した。S/Nを表4に示す。

【0139】

【表4】

	染色対象	色素	粒子の種類	粒径(nm)	S/N
実施例7A	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	60	120
実施例14A	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	80	200
実施例15A	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	150	205
実施例16A	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	195	200
実施例17A	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	220	105
実施例8A	PDL1	アミノクマリン化合物I	シリカ	150	120
比較例9A-1	HER2	Pyromethene556	シリカ	150	35
比較例9A-2	PDL1	Pyromethene556	シリカ	150	35

40

50

表4より、式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物Iを内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行うと、式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物以外の色素であるPyrromethene 556を内包した色素内包粒子を用いた場合に比較して、S/Nが向上することが確認された。

[実施例7B]

実施例7で作製したアミノクマリン化合物内包粒子Iを用いて、下記の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。

(色素内包粒子の修飾)

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子Iの末端にNH<sub>2</sub>-PEG(polyethylene glycol)-マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗HER2抗体を結合させ、抗HER2抗体結合アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を作製した。

10

【0140】

上記と同様に、色素内包粒子viiの末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗Ki67抗体を結合させ、抗Ki67抗体結合色素内包粒子を作製した。

(組織標本の免疫染色)

下記工程(1)~(13)によりヒト乳房組織標本の免疫染色(IHC法)を行った。

【0141】

工程(1):キシレンを入れた容器に組織標本を15分浸漬させた。途中2回キシレンを交換した。

【0142】

工程(2):エタノールを入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。途中2回エタノールを交換した。

20

【0143】

工程(3):水を入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。

【0144】

工程(4):10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に組織標本を浸漬させた。

【0145】

工程(5):121で5分間オートクレーブ処理を行った。

【0146】

工程(6):PBSを入れた容器に、オートクレーブ処理後の組織標本を15分浸漬させた。途中3回PBSを交換した。

30

【0147】

工程(7):1%BSA含有PBSを組織標本に載せて、1時間放置した。

【0148】

工程(8):1%BSA含有PBSで0.1nMに調整した抗HER2抗体結合アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を組織標本に載せて一晩放置し、HER2を標識した。

【0149】

工程(9):PBSを入れた容器に標識後の組織標本を15分浸漬させた。

【0150】

工程(10):1%BSA含有PBSで0.1nMに調整した抗Ki67抗体結合色素内包粒子を、組織標本に載せて一晩放置し、Ki67を標識した。

40

【0151】

工程(11):PBSを入れた容器に標識後の組織標本を30分浸漬させた。

【0152】

工程(12):組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

【0153】

工程(13):Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

(顕微鏡観察)

50

蛍光顕微鏡としてCarl Zeiss社製蛍光顕微鏡を、フィルターセットとしてSemrock製フィルターセットを使用した。フィルターセットは免疫染色剤（緑色用および赤色用）に対応する下記２種類を使用した。

【 0 1 5 4 】

【表 5】

フィルターセット	フィルターセットの励起波長／発光波長	
	緑色用	赤色用
励起フィルター	470nm(波長幅30nm)	586nm(波長幅20nm)
ビームスプリッター	495nm	605nm
蛍光フィルター	525nm(波長幅50nm)	628nm(波長幅32nm)

10

免疫染色後の組織標本をステージに設置し、緑色用および赤色用の２種類のフィルターセットを切り替えながら、フィルターセットを切り替えるごとに、組織標本の蛍光像の蛍光輝点数を計測した。結果を表 6 に示す。

【 実施例 8 B 】

実施例 8 B においては、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 V I I の代わりにアミノクマリン化合物内包粒子 I I を使用したこと以外は実施例 7 B と同様の方法により多重免疫染色を行った。結果を表 6 に示す。

20

【 比較例 1 0 B 】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 V I I の代わりに色素内包粒子 v i を使用したこと以外は実施例 7 B と同様の方法により多重免疫染色を行った。結果を表 6 に示す。

【 0 1 5 5 】

【表 6】

	緑色素	緑用フィルター		赤用フィルター	
		緑色輝点数	赤色輝点数	緑色輝点数	赤色輝点数
実施例7B	アミノクマリン化合物I	4100	24	30	1320
実施例8B	アミノクマリン化合物II	4200	36	30	1320
比較例10B	Pyromethene556	1500	156	120	1300

30

表 6 より、HER 2 および Ki 67 の二重染色の結果、式 ( 1 ) で示される構造を有するアミノクマリン化合物 I または I I を内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行うと、式 ( 1 ) で示される構造を有するアミノクマリン化合物以外の色素である Pyromethene 556 を内包した色素内包粒子を用いた場合に比較して、緑色輝点の赤色輝点への漏れ込みが少ないことが確認された。

40

【 0 1 5 6 】

さらに、式 ( 1 ) で示される構造を有するアミノクマリン化合物 I または I I を内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行った場合、二重染色の赤輝点数への影響はほとんどないことが表 6 から確認された。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/004803

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int.Cl. C09B57/02(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N33/533(2006.01)i		
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)		
Int.Cl. C09B57/02, C09K11/06, G01N33/533		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan		1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan		1971-2018
Registered utility model specifications of Japan		1996-2018
Published registered utility model applications of Japan		1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAplus/REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2015/041157 A1 (KYUSHU UNIVERSITY) 26 March 2015, paragraph [0060] & US 2016/0248036 A1, paragraph [0088] & EP 3059775 A1	1, 2, 5-7 3, 5
Y	JP 06-009892 A (NIPPON KANKO SHIKISO KENKYUSHO KK.) 18 January 1994, claim 1, examples 1-3 (Family: none)	1-7
Y A	GOOSSENS, Karel et al., "Accurate Diffusion Coefficients of Organosoluble Reference Dyes in Organic Media Measured by Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy", ACS NANO, 2015, 9(7), 7360-7373, in particular, scheme 1	1, 4-7 2, 3
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 March 2018 (01.03.2018)	Date of mailing of the international search report 01 May 2018 (01.05.2018)	
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/JP2018/004803

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JUNG, HyoSung et al., "Rationally Designed Fluorescence Turn-On Sensors: A New Design Strategy Based on Orbital Control", <i>Inorganic Chemistry</i> , 2010, 49, 8552-8557, in particular, fig. 2	1, 2, 5-7 3, 4
Y A	KOMATSU, Kensuke et al., "Development of an Iminocoumarin-Based Zinc Sensor Suitable for Ratiometric Fluorescence Imaging of Neuronal Zinc", <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 2007, 129, 13447-13454, in particular, fig. 1	1, 2, 5-7 3, 4
Y	JP 2006-045314 A (FUJI ELECTRIC HOLDINGS CO., LTD., ASAHI DENKA KOGYO KK.) 16 February 2006, claims 1-15, paragraphs [0050]-[0053] (Family: none)	1-7
Y	JP 06-271599 A (BAYER AG.) 27 September 1994, claim 1, paragraph [0025], examples 1-3 & US 5547860 A, claim 1, column 4, lines 48-59, examples 1-3 & EP 608737 A1	1-7
Y A	JP 2004-309458 A (RIKEN, JAPAN) 04 November 2004, claims 1-5, measurement example 1 & US 2004/0190134 A1, claims 1-5, measurement example 1	5, 7 1-4, 6
Y A	JP 07-508309 A (MOLECULAR PROBES, INC.) 14 September 1995, claims 1-16, example 5 & US 5326692 A, claims 1-15, example 5 & WO 1993/023492 A1	5, 7 1-4, 6
Y A	JP 2015-108572 A (KONICA MINOLTA, INC.) 1 June 2015, claims, examples (Family: none)	5, 7 1-4
A	JP 2014-044419 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 13 March 2014, synthesis examples 10-11 & CN 103576454 A & KR 10-2014-0016833 A & TW 201410673 A	1-7
A	JP 2013-147605 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 01 August 2013, claim 1, examples 4-5 (Family: none)	1-7
A	JP 2013-227552 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 07 November 2013, claim 1, examples 7-8 & KR 10-2013-0111376 A & CN 103360377 A & TW 201348230 A	1-7
A	JP 2013-231165 A (SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.) 14 November 2013, claim 1, synthesis examples 7-8 & KR 10-2013-0112775 A & CN 103365088 A & TW 201343801 A	1-7
A	JP 08-259832 A (TAOKA CHEMICAL CO., LTD., SUMITOMO CHEMICAL INDUSTRY COMPANY LIMITED) 08 October 1996, claim 2, example 1 (Family: none)	1-7
A	JP 46-006225 A (BAUDESSEIER ANILIN UND SOR DA HABRIK AG) 08 December 1971, claims, example 1 (Family: none)	1-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/004803

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 51-000526 A (BAYER AG.) 06 January 1976, claims, compound 55 & US 3985763 A claims, compound 55 & GB 1329042 A & DE 2030507 A	1-7
A	JP 50-069380 A (BAYERAG.) 10 June 1975, claims, compound 55 & US 3985763 A, claims, compound 55 & GB 1329042 A & DE 2030507 A	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 4 8 0 3									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C09B57/02(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N33/533(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C09B57/02, C09K11/06, G01N33/533											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)											
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									
Y	WO 2015/041157 A1 (国立大学法人九州大学) 2015.03.26, 段落 0060	1, 2, 5-7									
A	& US 2016/0248036 A1, 段落 0088 & EP 3059775 A1	3, 4									
Y	JP 06-009892 A (株式会社日本感光色素研究所) 1994.01.18, 請求項 1, 実施例 1-3 (ファミリーなし)	1-7									
☑ 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 01.03.2018		国際調査報告の発送日 01.05.2018									
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) 鈴木 雅雄	4H 3493								
		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 8 / 0 0 4 8 0 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	GOOSSENS, Karel et al., Accurate Diffusion Coefficients of Organosoluble Reference Dyes in Organic Media Measured by Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy, ACS NANO, 2015, 9(7), 7360-7373, 特に、Scheme 1	1, 4-7
A		2, 3
Y	JUNG, Hyo Sung et al., Rationally Designed Fluorescence Turn-On Sensors: A New Design Strategy Based on Orbital Control, Inorganic Chemistry, 2010, 49, 8552-8557, 特に、Figure 2	1, 2, 5-7
A		3, 4
Y	KOMATSU, Kensuke et al., Development of an Iminocoumarin-Based Zinc Sensor Suitable for Ratiometric Fluorescence Imaging of Neuronal Zinc, Journal of the American Chemical Society, 2007, 129, 13447-13454, 特に、Figure 1	1, 2, 5-7
A		3, 4
Y	JP 2006-045314 A (富士電機ホールディングス株式会社, 旭電化工業株式会社) 2006.02.16, 請求項 1-15, 段落 0050-0053 (ファミリーなし)	1-7
Y	JP 06-271599 A (バイエル・アクチエンゲゼルシャフト) 1994.09.27, 請求項 1, 段落 0025, 実施例 1-3 & US 5547860 A, 請求項 1, 第 4 欄第 48-59 行, 実施例 1-3 & EP 608737 A1	1-7
Y	JP 2004-309458 A (独立行政法人理化学研究所) 2004.11.04, 請求項 1-5, 測定例 1	5, 7
A	& US 2004/0190134 A1, 請求項 1-5, 測定例 1	1-4, 6
Y	JP 07-508309 A (モレキュラー・プロウブズ・インコーポレーテッド)	5, 7
A	1995.09.14, 請求項 1-16, 実施例 5 & US 5326692 A, 請求項 1-15, 実施例 5 & WO 1993/023492 A1	1-4, 6
Y	JP 2015-108572 A (コニカミノルタ株式会社) 2015.06.11, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	5-7
A		1-4
A	JP 2014-044419 A (住友化学株式会社) 2014.03.13, 合成例 10-11 & CN 103576454 A & KR 10-2014-0016833 A & TW 201410673 A	1-7
A	JP 2013-147605 A (住友化学株式会社) 2013.08.01, 請求項 1, 実施例 4-5 (ファミリーなし)	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 4 8 0 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-227552 A (住友化学株式会社) 2013.11.07, 請求項 1, 実施例 7-8 & KR 10-2013-0111376 A & CN 103360377 A & TW 201348230 A	1-7
A	JP 2013-231165 A (住友化学株式会社) 2013.11.14, 請求項 1, 合成例 7-8 & KR 10-2013-0112775 A & CN 103365088 A & TW 201343801 A	1-7
A	JP 08-259832 A (田岡化学工業株式会社, 住友化学工業株式会社) 1996.10.08, 請求項 2, 実施例 1 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 46-006225 A (バーデイツシエ・アニリン・ウント・ソーダ・フ アプrik・アクチエンゲゼルシャフト) 1971.12.08, 特許請求の範囲, 実施例 1 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 51-000526 A (バイエル・アクチエンゲゼルシャフト) 1976.01.06, 特許請求の範囲, 化合物 55 & US 3985763 A, 特許請求の範囲, 化合物 55 & GB 1329042 A & DE 2030507 A	1-7
A	JP 50-069380 A (バイエル・アクチエンゲゼルシャフト) 1975.06.10, 特許請求の範囲, 化合物 55 & US 3985763 A, 特許請求の範囲, 化合物 55 & GB 1329042 A & DE 2030507 A	1-7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/53

M

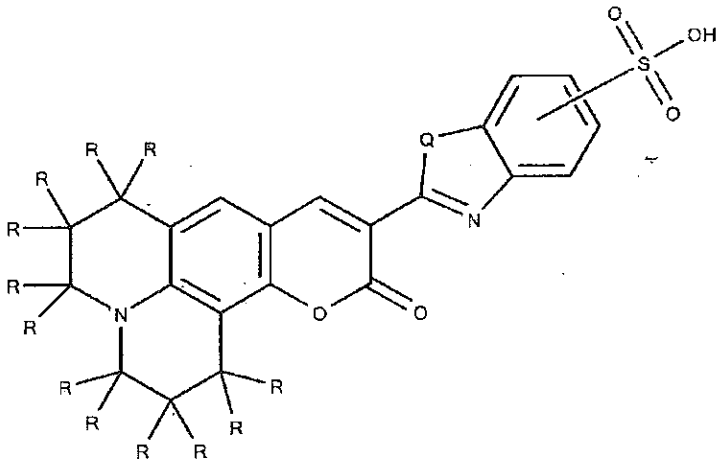
(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(72)発明者 磯田 武寿

東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内

Fターム(参考) 4C050 AA02 AA08 BB07 CC07 DD08 EE01 FF02 GG03 HH04

【要約の続き】

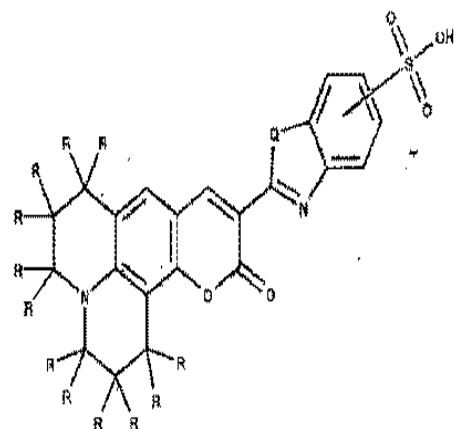


(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	氨基香豆素化合物和含有氨基香豆素化合物的树脂颗粒		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2018151072A1</a>	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2018568516	申请日	2018-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	高梨健作 中山慎 西川賢司 磯田武寿		
发明人	高梨 健作 中山 慎 西川 賢司 磯田 武寿		
IPC分类号	C09B57/02 C09B67/08 C09K11/06 C07D491/16 G01N33/53		
CPC分类号	C09B57/02 C09B67/009 C09B67/0097 C09B69/00 C09B69/109 C09K11/06 G01N33/533		
FI分类号	C09B57/02.CSP.H C09B67/08.B C09K11/06 C07D491/16 G01N33/53.Y G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4C050/AA02 4C050/AA08 4C050/BB07 4C050/CC07 4C050/DD08 4C050/EE01 4C050/FF02 4C050/GG03 4C050/HH04		
优先权	PCT/JP2017/005284 2017-02-14 WO 2017024875 2017-02-14 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明是一种具有氨基香豆素化合物的树脂粒子，该树脂粒子具有下述式(1)所示的结构的氨基香豆素化合物和氨基香豆素化合物，并且该树脂粒子包封该氨基香豆素化合物。在式(1)中，每个R独立地表示氢原子或甲基，Q表示硫原子，氧原子或NR<sub>1</sub>，并且R<sub>1</sub>表示氢原子或甲基。本发明的氨基香豆素化合物具有比常规已知的磺化香豆素化合物更长的激发波长，并且是在475nm或更大的波长，特别是在接近500nm的波长下被有效激发的荧光染料。有。本发明的氨基香豆素化合物是一种荧光染料，通过利用该波长特性，例如在475至510nm的波长处激发，以及在免疫染色等中，可以在510至540nm的绿色发射区域中观察到。可以期望适当地利用它。



(1)