

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6562942号  
(P6562942)

(45) 発行日 令和1年8月28日(2019.8.28)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C07F 5/02 (2006.01)</b>	C07F 5/02 C SPD
<b>A61K 31/69 (2006.01)</b>	A61K 31/69
<b>A61K 49/00 (2006.01)</b>	A61K 49/00
<b>G01N 21/64 (2006.01)</b>	G01N 21/64 F
<b>G01N 21/78 (2006.01)</b>	G01N 21/78 C

請求項の数 32 (全 124 頁)

(21) 出願番号 特願2016-558730 (P2016-558730)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)  
 (65) 公表番号 特表2017-518261 (P2017-518261A)  
 (43) 公表日 平成29年7月6日 (2017. 7. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/022977  
 (87) 国際公開番号 W02015/148915  
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)  
 審査請求日 平成30年1月24日 (2018. 1. 24)  
 (31) 優先権主張番号 61/971, 313  
 (32) 優先日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 596118493  
 アカデミア シニカ  
 ACADEMIA SINICA  
 台湾, タイペイ 11529, ナンカン,  
 アカデミア ロード 128, セクション  
 2  
 128 Sec 2, Academia  
 Road, Nankang, Taipei  
 11529 TW  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

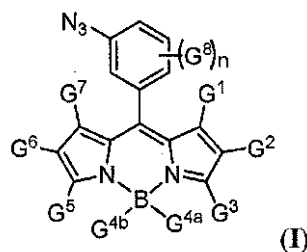
(54) 【発明の名称】 反応性標識化合物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)の化合物:

【化108】



またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物

[式中、

G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>、G<sup>5</sup>、G<sup>6</sup>、G<sup>7</sup>およびG<sup>8</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルケニル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、-OR<sup>A</sup>、-CH<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN

、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、および $-\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{\text{B}}$ であり、

各 $\text{R}^{\text{A}}$ は、水素、任意選択で置換されている $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各 $\text{R}^{\text{B}}$ は、水素、任意選択で置換されている $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2個の $\text{R}^{\text{B}}$ は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

$\text{G}^{4\text{a}}$ および $\text{G}^{4\text{b}}$ はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリール基およびアリールオキシのアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかでもよく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の炭素原子を有し、各アルキル、アリール、アルコキシ、およびアリールオキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、

ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、

$n$ は、0、1、2、3、または4である]。

【請求項2】

$\text{G}^1$ および $\text{G}^3$ が、メチルである、請求項1に記載の化合物。

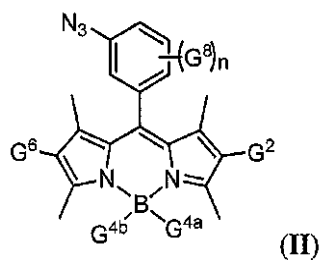
【請求項3】

$\text{G}^5$ および $\text{G}^7$ が、メチルである、請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

式(II)のもの、

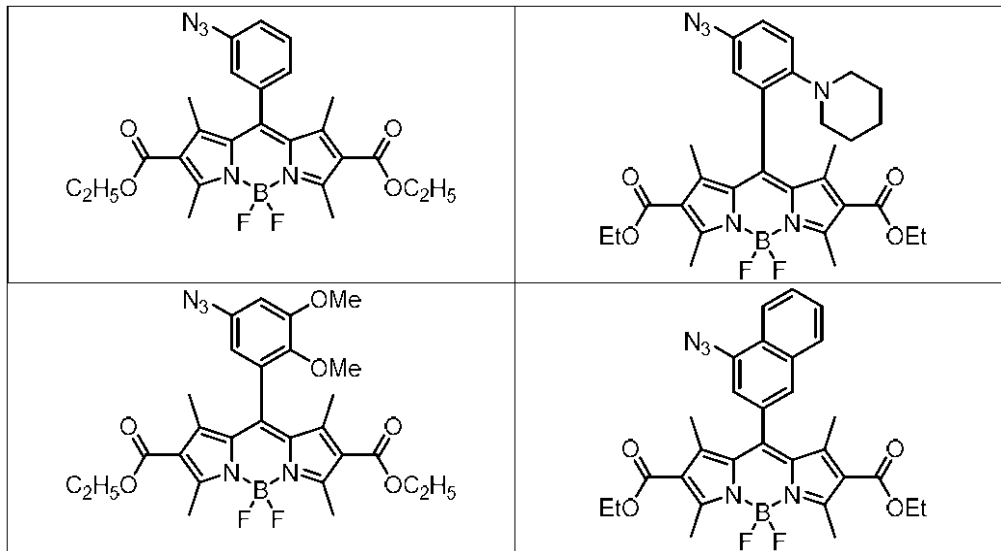
【化109】



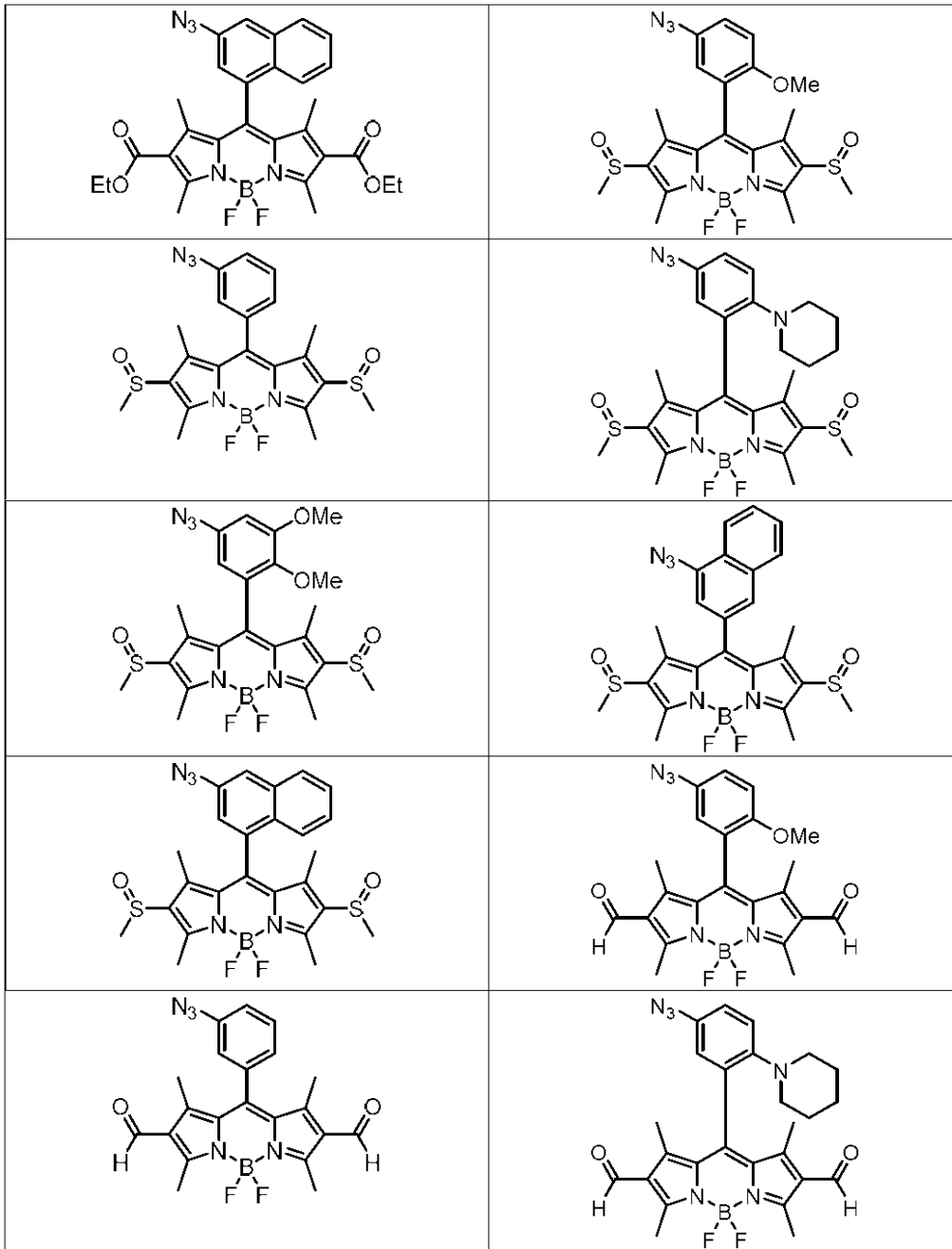
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、請求項1から3のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項5】

## 【化 1 1 8】



【化 1 1 9】

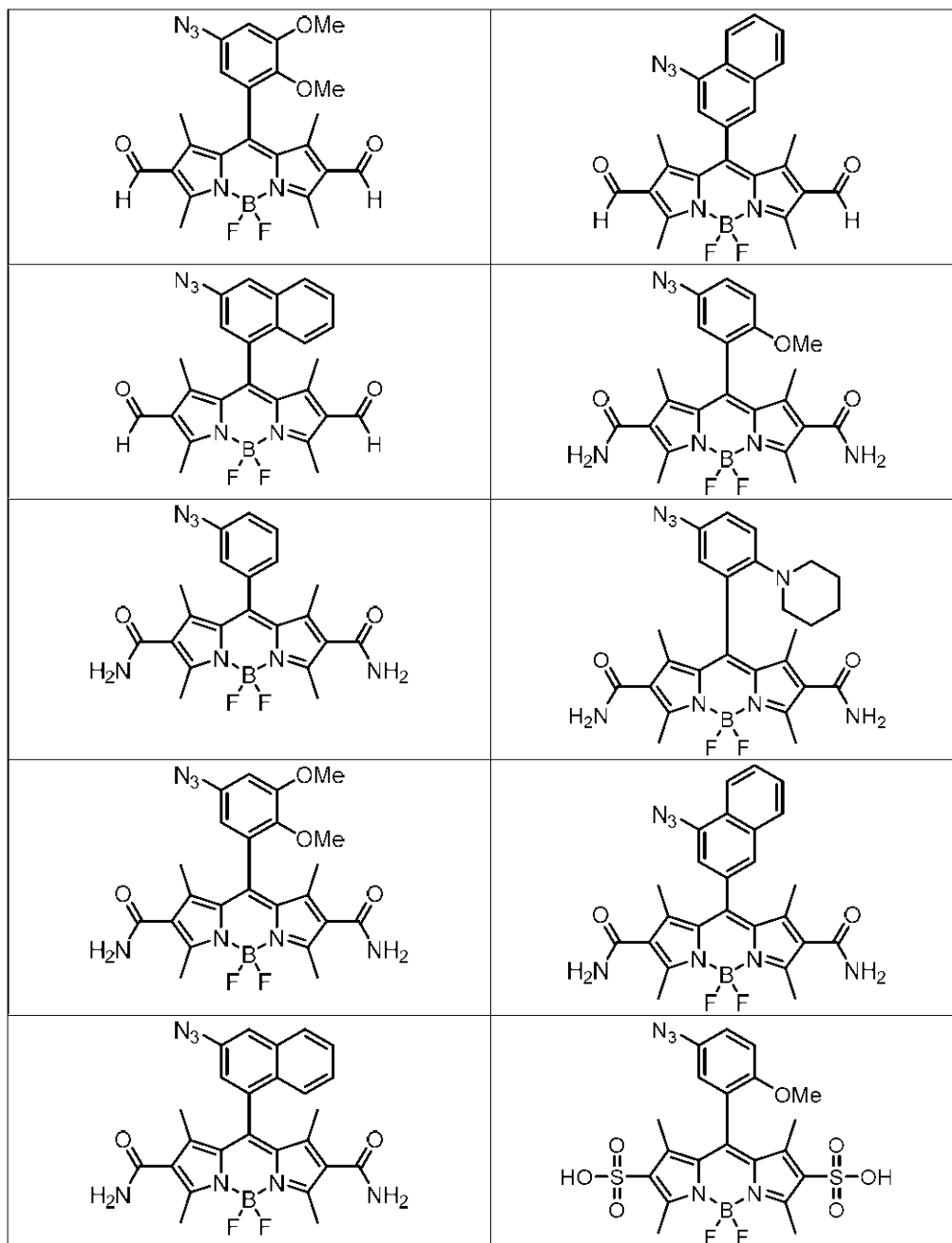


10

20

30

## 【化 1 2 0】

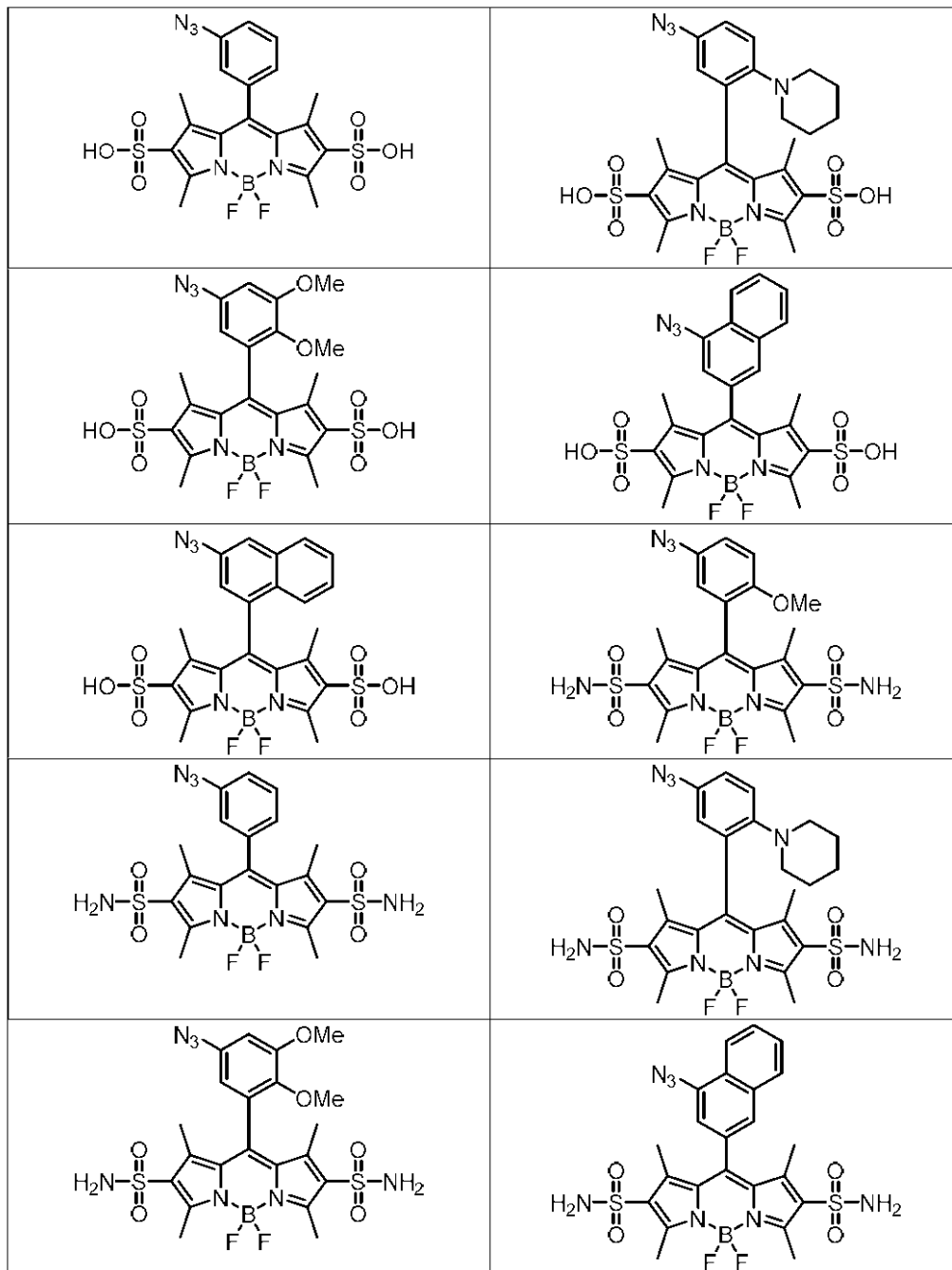


10

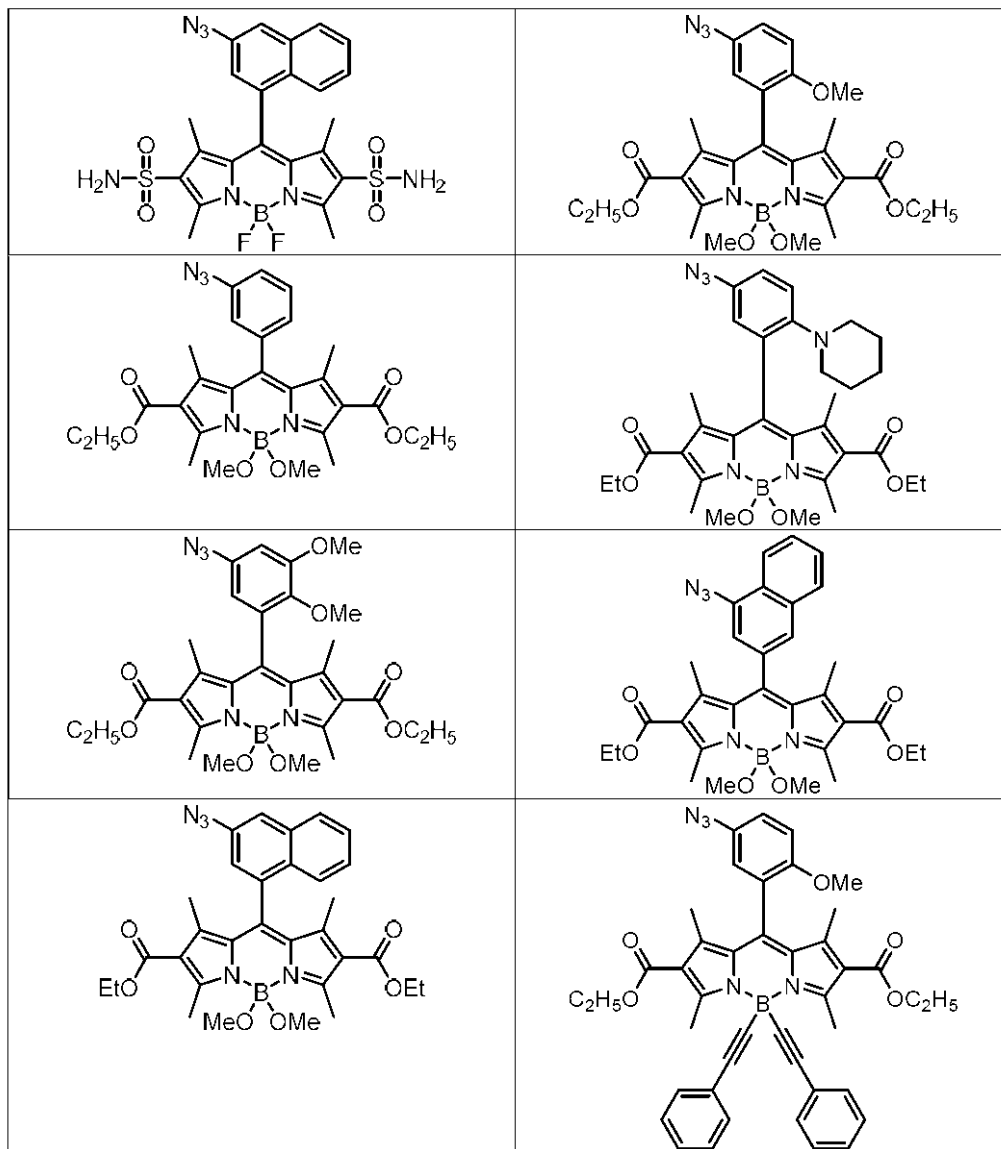
20

30

## 【化 1 2 1】



## 【化 1 2 2】

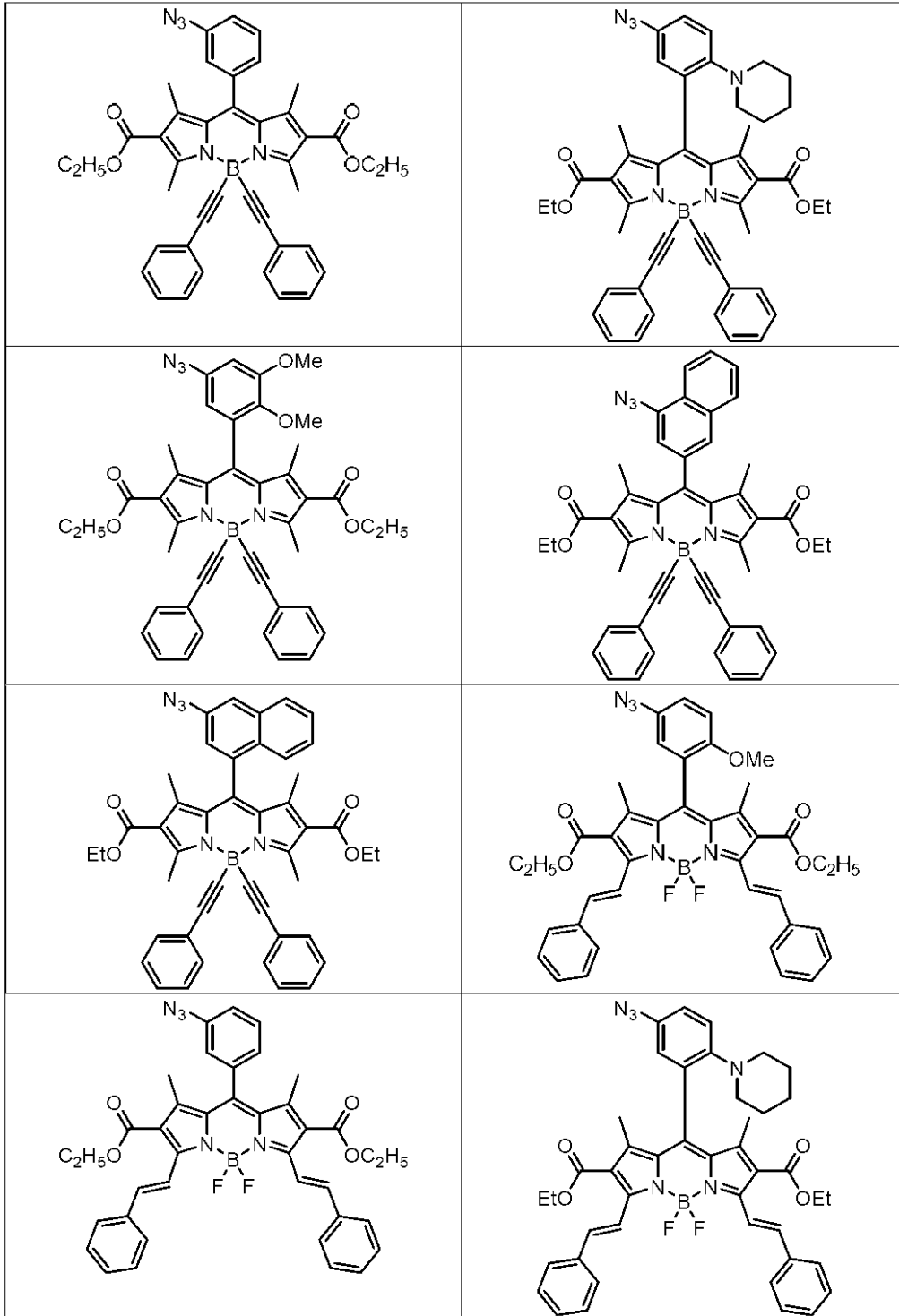


10

20

30

【化 1 2 3】



10

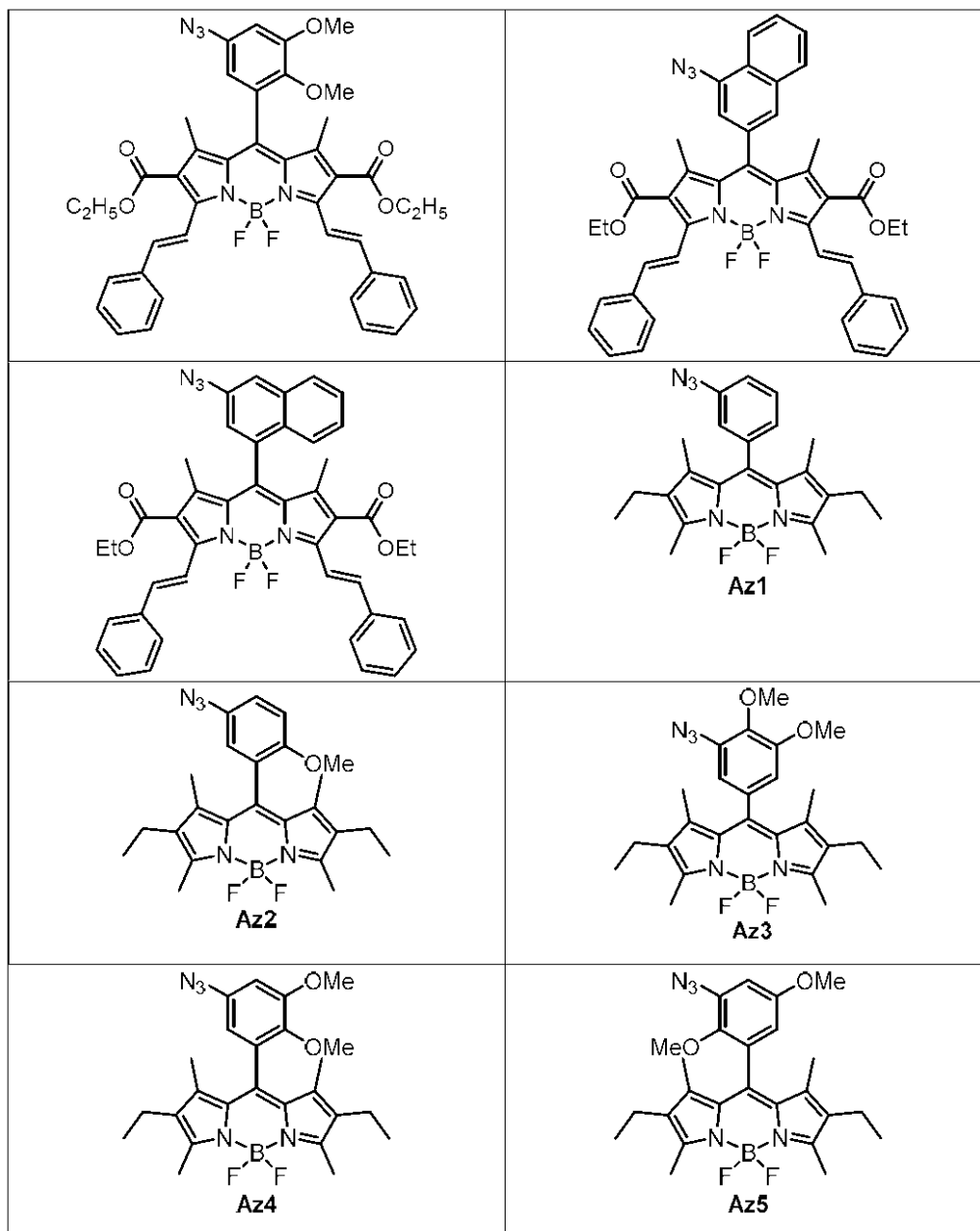
20

30

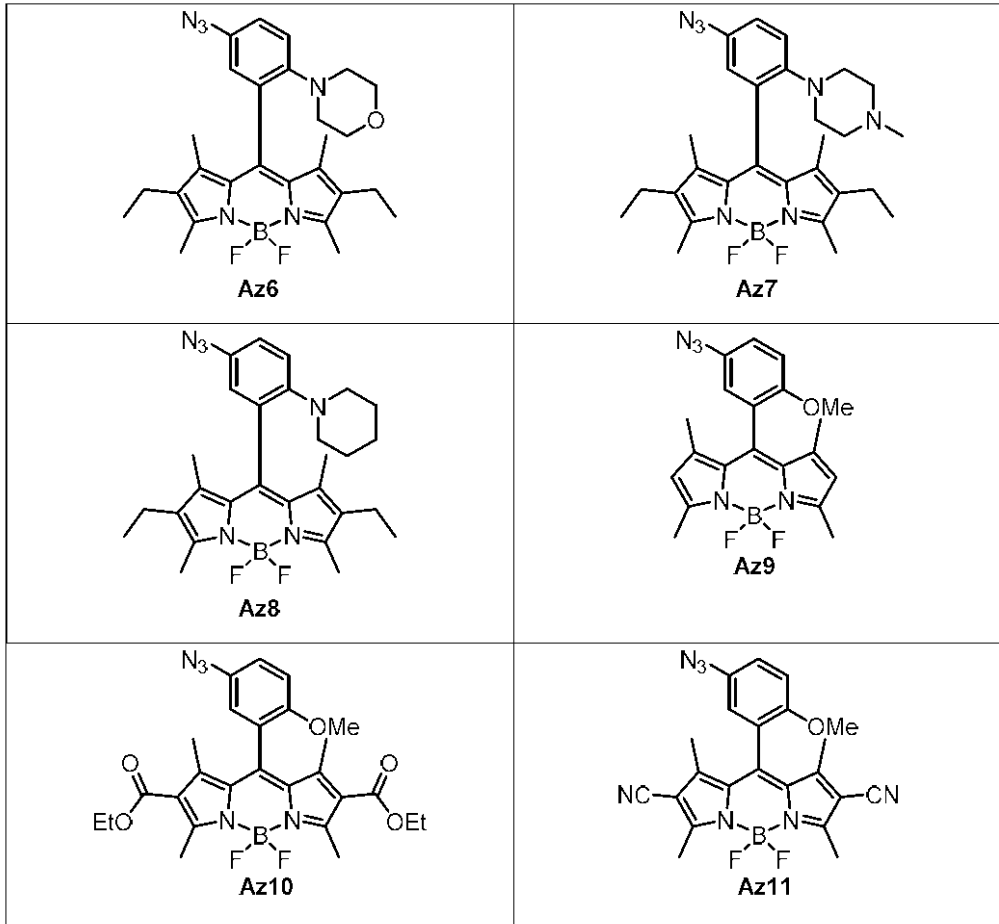
40



## 【化 1 2 4】



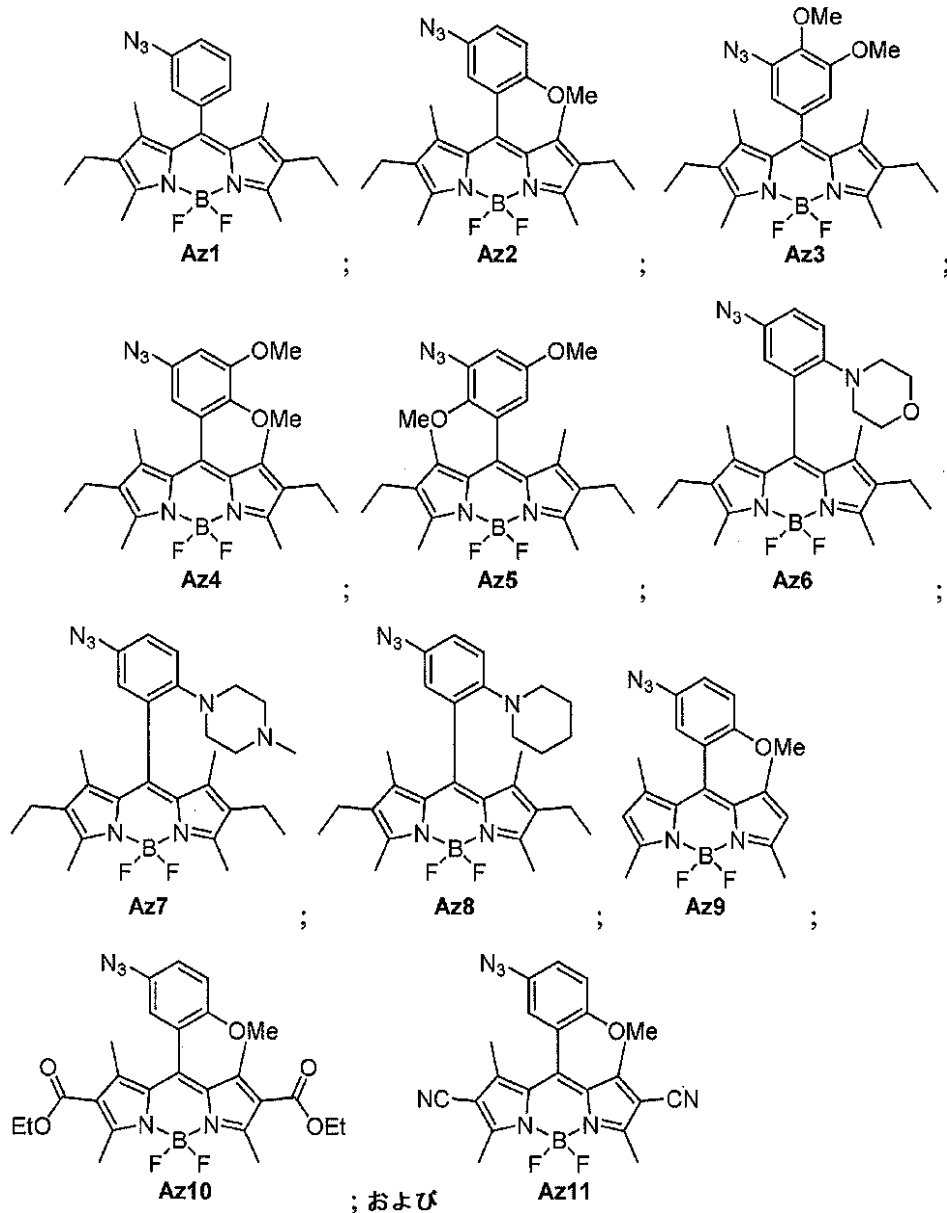
## 【化 1 2 5】



からなる群から選択される化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物。

【請求項 6】

## 【化 1 1 0】



10

20

30

からなる群から選択される、請求項 4 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

アルキン含有分子をイメージングする方法であって、

(a) 前記分子のアルキン基への請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物のライゲーションのための条件下で、前記化合物と、前記アルキン含有分子を含有する試料とを接触させ、トリアゾール生成物を形成させるステップと、

40

(b) 前記トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含む、方法。

## 【請求項 8】

前記接触ステップが、金属触媒の存在下で行われる、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記金属触媒が、銅 (I) である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記化合物が、前記アルキン基に共有結合的に連結している、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

50

前記試料が、細胞を含有し、前記アルキン含有分子が、細胞表面上または前記細胞内に位置している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記化合物が、請求項 5 に規定される化合物から選択される式によって記載される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記化合物が、請求項 6 に記載の化合物から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記アルキン含有分子が、生体分子である、請求項 7 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記生体分子が、DNA、RNA、タンパク質またはグリカンである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記生体分子が、細胞の表面上または近くに位置している、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記生体分子が、細胞内生体分子である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

試料中のアルキン含有分子を検出する方法であって、

( a ) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物と、アルキン含有分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、

20

( b ) 試料混合物から放出される蛍光シグナルのレベルを測定するステップと、

( c ) 前記試料中の前記アルキン含有分子の存在を決定するステップと

を含み、前記分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、前記アルキン含有分子の存在を示す、方法。

【請求項 1 9】

前記接触ステップが、金属触媒の存在下で行われる、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記金属触媒が、銅 ( I ) である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記試料が、細胞を含有し、前記アルキン含有分子が、細胞の表面上もしくは近く、または細胞内に位置している、請求項 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記化合物が、請求項 5 に規定の化合物から選択される式によって記載される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記化合物が、請求項 6 に記載の化合物から選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記アルキン含有分子が、生体分子である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記生体分子が、DNA、RNA、タンパク質またはグリカンである、請求項 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

前記生体分子が、細胞の表面上または近くに位置している、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記生体分子が、細胞内生体分子である、請求項 2 4 に記載の方法。

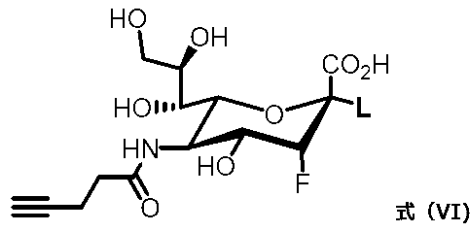
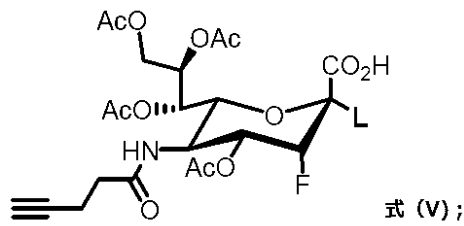
【請求項 2 8】

細胞におけるデュアル蛍光イメージングのための前記化合物の使用を含む、請求項 7 または 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 9】

50

シアリダーゼ酵素の活性部位をイメージングする方法であって、  
 (a) 前記シアリダーゼ酵素の前記活性部位への化合物のライゲーシヨンのための条件下で、前記化合物と、前記シアリダーゼ酵素を含むことが疑われる試料とを接触させ、共有結合生成物を形成させるステップであって、前記化合物が、式(V)または(VI)：  
 【化126】



[式中、

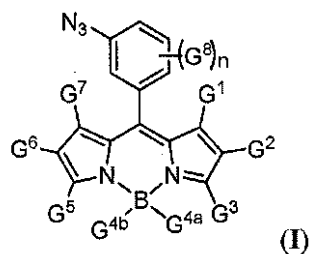
Lは、Cl、Br、I、ウンベリフェリル、クマリンオキシド、トリフレート、メシレート、トシレート、ハロゲン、アルコキシ、フェノキシ、ベンゾエート、ペンタフルオロフェノキシ、または4-ニトロフェノキシからなる群から選択される]の化合物であるステップと、

(b) 前記共有結合生成物と、式(I)のアジド含有蛍光発生プローブとを接触させて、蛍光発生トリアゾール生成物を形成させるステップと、

(c) 前記トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含み、

前記式(I)のアジド含有蛍光発生プローブは、以下の式：

【化117】



[式中、

G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>、G<sup>5</sup>、G<sup>6</sup>、G<sup>7</sup>およびG<sup>8</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルケニル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、-OR<sup>A</sup>、-CH<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)OR<sup>A</sup>、-S(O)R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>、-SO<sub>3</sub>R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、および-NHSO<sub>2</sub>R<sup>B</sup>であり、

各R<sup>A</sup>は、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

10

20

30

40

50

各 R<sup>B</sup> は、水素、任意選択で置換されている C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは 2 個の R<sup>B</sup> は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

G<sup>4a</sup> および G<sup>4b</sup> はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1 ~ 4 個の炭素原子を有し、アリール基およびアリールオキシのアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で 6 ~ 20 個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で 5 ~ 20 個の炭素原子を有し、各アルキル、アリール、アルコキシ、およびアリールオキシは、独立に、非置換であるか、または 1 個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、  
n は、0、1、2、3、または 4 である ]

を有する、方法。

【請求項 30】

L が、Cl、Br、または I である、請求項 29 に記載の方法。

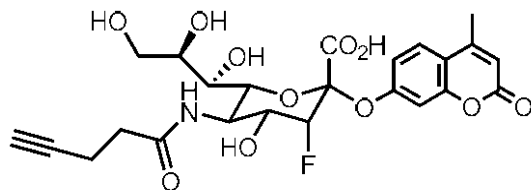
【請求項 31】

L が、ウンベリフェリルである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記式 (VI) の化合物が、化合物 601

【化 127】



CoumFSA (601)

である、請求項 31 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本開示は、2014年3月27日に出願された米国特許仮出願第61/971,313号の優先権の利益を主張する。その内容は、本明細書において参考として援用される。

【0002】

分野

本開示は、シクロオクチンが縮合した蛍光発生プローブのトリアゾール形成、アジド-BODIPY化合物、ならびにアルキン含有またはアジド含有生体分子の診断およびイメージングのための蛍光で切断されるプローブの分野に関する。本開示は、アジド-アルキン環化付加(AAC)による蛍光増強戦略に関する。

【背景技術】

【0003】

銅によって触媒されるアジド-アルキン1,3-双極子環化付加(CuAAC)は、複雑な混合物における生体分子の標識化、ならびに固定細胞および組織のイメージングなどの用途のために化学生物学において広範囲に使用されてきた。(Kolbら、Angew. Chem.

10

20

30

40

50

Int. Ed., 2001年、40巻、2004頁; Rostovtsevら、Angew. Chem. Int. Ed., 2002年、41巻、2596頁; WuおよびFokin、Aldrichimica Acta、2007年、40巻、7頁。)これらの天然の細胞環境内のタンパク質、DNA、RNA、脂質およびグリカン中への蛍光プローブの組込みは、イメージング、および *in vivo* でのこれらの役割の理解のための機会を実現する。(Best、Biochemistry、2009年、48巻、6571頁。)

#### 【0004】

例えば、タンパク質中のグリカンは、細胞表面上に表示され、これは多数の生理学的および病理学的プロセスにおいて意味を持っている。異常細胞の表面上の異常なグリコシル化は、病的状態、例えば、炎症およびがん転移において観察されることが多い。特に、発現の場所、ならびにシアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼのレベルの変化からもたらされると考えられる変化した末端シアリル化およびフコシル化は、悪性腫瘍と関連している。タンパク質または脂質のいずれかに付着している、がんのバイオマーカーとしてのグリカンの生物学的情報内容を探索する能力は、グライコミクス研究の主要な過程となってきた。(Hsuら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 2007年、104巻、2614頁; Sawaら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 2006年、103巻、12371頁。)

#### 【0005】

生物系におけるグリコシル化パターンの変化の分析が今や可能である。(PrescherおよびBertozzi、Nat. Chem. Bio., 2005年、1巻、13頁。)細胞生合成機構への、生体直交型化学レポーターとして作用する特有な官能基を含有する非天然炭水化物の代謝的組込みによってプロセスが開始する。次いで、修飾されたグリカンは加工され、細胞表面上で構築される。相補的生体直交型官能基を備えた検出可能な蛍光プローブとのそれに続く反応によって、組み込まれた非天然グリカンの検出が可能となる。(SlettenおよびBertozzi、Angew. Chem. Int. Ed., 2009年、48巻、2頁。)

#### 【0006】

生体直交型化学レポーターの概念は、タンパク質におけるグリコシル化、および生物系における細胞表面の化学的リモデリングのプロテオミクス解析に適用されてきた。生体直交型化学反応はまた、他の用途、例えば、タンパク質標識化、活性をベースとするタンパク質フォールディング、タンパク質の標的の同定、翻訳後修飾、および細胞増殖モニタリングのために使用されてきた。生体直交型化学レポーター戦略による生細胞上の特定の官能基の標識化は、細胞生物学においてますます有力となってきた。過去数年において、生物系において生体適合性および選択性を特に示す、生体直交型化学において著しい進歩がなされてきた。これらのアプローチは、これらの固有の選択性および調整可能な電子工学によって、理想的な生体直交型反応としての環化付加に基づくことが多い。しかし、特に、細胞および生命体への用途の観点から、この分野が直面する多くの課題がまだ存在する。例えば、大部分の生体直交型レポーター戦略は、フルオロフォア (fluorophore) 標識された反応体パートナーを使用する多段階の手順が伴い、これは細胞内環境または組織から除去することが困難である高いバックグラウンド蛍光ノイズをもたらすことが多い。さらに、これらの方法は、検出可能なシグナルを達成するために高濃度の試薬および触媒を必要とする。

#### 【0007】

いくつかの最近の試みは、ライゲーションして高度に蛍光性のトリアゾール錯体を得ることができる非蛍光性アルキンまたはアジドとのCuAAC反応による、非蛍光または弱蛍光プローブの設計に焦点を当ててきた(図2)。(ZhouおよびFahrni、J. Am. Chem. Soc., 2004年、126巻、8862頁; Sivakumarら、Org. Lett., 2004年、24巻、4603頁; Sawaら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 2006年、103巻、12371頁; Xieら、Tetrahedron, 2008年、64巻、2906頁; Liら、Org. Lett., 2009年、11巻、3008頁; Le Droumaguetら、Chem. Soc. Rev., 2010年、39巻、1223頁; Qiら、Bioconjugate Chem., 2011年、22巻

10

20

30

40

50

、1758頁；Chaoら、*Sci. China Chemistry*、2012年、55巻、125頁；Hernerら、*Org. Biomol. Chem.*、2013年、11巻、3297頁。) 高効率で起こるこのタイプのCuAAC反応は、出発材料のバックグラウンド蛍光ノイズを伴わないトリアゾールの形成における明確な蛍光特性によって、細胞生物学および機能的プロテオミクスの台頭しつつある分野において広範な用途を有する。しかし、これらのアジドおよびアルキニル官能化されたプローブは通常、UV領域における励起を必要とし、水溶液中で乏しい量子収率を伴って青色の光を発光する。このような光学特性は、生物学的用途のために理想的ではない。

#### 【0008】

高度に効率的なCuAAC反応によって誘発される明確な蛍光増強は、細胞生物学および機能的プロテオミクスの台頭しつつある分野において広範な用途を有する(Le Droumaquet, C.; Wang, C.; Wang, Q., *Chem. Soc. Rev.*、2010年、39巻、1233~1239頁; Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*、2006年、103巻、12371~12376頁、Shie, J.-J.; Liu, Y.-C.; Lee, Y.-M.; Lim, C.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*、2014年、136巻、9953~9961頁; Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*、2007年、104巻、2614~2619頁、Tsai, C.-S.; Liu, P.-Y.; Yen, H.-Y.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H., *Chem. Commun.*、2010年、46巻、5575~5577頁)。しかし、Cu(I)の毒性は、生物系におけるCuAACの使用を妨げてきた。

#### 【0009】

金属触媒と関連する細胞毒性の問題を回避するために、環ひずみによって促進されるアジド-アルキン環化付加(SPAAc)が、代替の戦略として開発されてきた(Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., *Chem. Soc. Rev.*、2010年、39巻、1272~1279頁、Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res.*、2011年、44巻、805~815頁)。シクロオクチン部分は、基部構造としてSPAAc試薬、例えば、二フッ化シクロオクチン(DIFO)および誘導体中に組み込まれることが多い(Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*、2004年、126巻、15046~15047頁、Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*、2008年、130巻、11486~11493頁)。環ひずみを増加させるために、シクロオクチン部分は、他の環と縮合して、より高い反応性を有するSPAAc試薬、例えば、ジベンジルシクロオクチン(DIBO)(Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.*、2008年、47巻、2253~2255頁、Poloukhine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.*、2009年、131巻、15769~15777頁、Stockmann, H.; Nieves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.*、2011年、2巻、932~936頁、Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Flanagan-Steet, H. R.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.*、2012年、134巻、5381~5389頁)、ジアリールアザシクロオクチノン(BARAC)(Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*、2010年、132巻、3688~3690頁)およびピシクロノニン(BCN)(Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Leferber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.*、2010年、49巻、9422~9425頁)を得ることができる。縮小7員環を担持するテトラメチルチアシクロヘプチン(TMTH)はまた、アジドとの環化付加反応において反応性を示す(de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K.

10

20

30

40

50



K.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012年、51巻、2443 ~ 2447頁、King, M., Baati, R.; Wagner, A. *Chem. Commun.*, 2012年、48巻、9308 ~ 9309頁)。2種のシクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブである *CoumBARAC* (Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.*, 2011年、13巻、5937 ~ 5939頁) および *Fl-DIBO* (Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012年、134巻、18809 ~ 18815頁) は、それぞれ Bertozzi および Boons のグループによって記載されてきた。

#### 【0010】

4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン (BODIPY としてまた公知である) 色素は、多くの生物学的用途のための一般的なフルオロフォアの1タイプである。BODIPY色素は、良好な化学的および光物理的安定性、相対的に高いモル吸光係数および蛍光量子収率 ( $f_1$ )、可視スペクトル領域 (500nm超) における励起波長/発光波長、ならびに高いピーク強度を伴う狭い発光バンド幅を含めた多数の利点を有する。(Loudet および Burgess, *Chem. Rev.*, 2007年、107巻、4891頁; Ulrichら, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008年、47巻、1184頁; Boensら, *Chem. Soc. Rev.*, 2012年、41巻、1130頁; Kamkaewら, *Chem. Soc. Rev.*, 2013年、42巻、77頁。)

いくつかのアジド-BODIPY誘導体が、CuAAC反応による蛍光標識化のために開発されてきた。(Liら, *J. Org. Chem.*, 2008年、73巻、1963頁。) 具体的には、低蛍光3-アジド-BODIPY誘導体は、CuAAC反応を受けて、増強された蛍光を有する対応するトリアゾールを得ることが示されてきた。トリアゾール生成物は、アジド-BODIPYと比較して300倍増加した蛍光を実現し、低い蛍光量子収率 ( $f_1 < 0.03$ ) を示したが、未反応のアジド-BODIPY化合物は不安定であり、生理学的条件下でアルキニル生体分子と反応することができず、多くの生物学的用途と不適合性なものとしている。(Wangら, *Sci. China Chemistry*, 2012年、55巻、125頁; Chauhanら, *Tetrahedron Lett.*, 2014年、55巻、244頁。)

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

【非特許文献1】Kolbら, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001年、40巻、2004頁

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

したがって、細胞標識化、細胞における生体分子の局在化を検出および/または可視化するための、細胞環境に適している分子プローブの新規な設計が必要とされている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

したがって、本開示は、細胞環境に適している緑色を発光するBODIPYスカフォールドを含有する新規な一連のアジド-BODIPY化合物に関する。BODIPYスカフォールドは、その魅力的な合成および蛍光性フィーチャのために出発モジュールとして使用される。例示的なBODIPYは、8位において容易に修飾される。この位置におけるアリール化は、アリール部分およびBODIPYコアがねじれており、コンジュゲーションが脱カップリングしているため、吸収および発光波長に対して実質的な影響を有さない。

#### 【0014】

これらの例示的な化合物は、洗浄プロセスを伴わないアルキン官能化されたタンパク質による標識化のために有用であり、かつ共焦点顕微鏡観察による細胞中のアルキントグ付きグリコシルコンジュゲートの局在化を可視化するのに適している。さらに、アルキニル-糖類修飾された細胞は、溶解して、富化を伴わないプローブ標識された糖タンパク質の

10

20

30

40

50

直接の検出のための A z B O C E t 標識化を使用することによって S D S - P A G E で分析することができる。

【 0 0 1 5 】

本開示はまた、アルキン官能化された部分に反応することができる、シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブに関する。いくつかの態様では、シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブは、細胞中に存在することができる。いくつかの態様では、シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブを使用して、細胞中のアジド - 複合糖質を検出することができる。

【 0 0 1 6 】

本開示はまた、試料と、式 ( I ) のアジド - B O D I P Y 化合物および / または式 ( I V ) のシクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブとをデュアルイメージングモードで接触させることによる、アジド官能化された複合糖質およびアルキニル官能化された複合糖質 ( glyconjugates ) の両方のデュアルイメージングに関する。

【 0 0 1 7 】

本開示はまた、酵素の活性部位と共有結合を形成するように設計したプローブを使用して酵素の活性を測定することに関し、前記プローブは、アジド含有蛍光発生プローブによるさらなる検出のためのアルキン部分を含む。酵素は、シアリダーゼでよい。蛍光発生シアリダーゼプローブは、機序に基づく阻害剤として 3 - フルオロシアリルフルオリドをベースとすることができる。

【 0 0 1 8 】

したがって、本開示は、アジド - アルキン環化付加 ( A A C ) を受ける例示的な新規な式 ( I ) のアジド - B O D I P Y 化合物に関する。アジド - アルキン環化付加 ( A A C ) は、ひずみまたは触媒 ( 金属もしくは有機物 ) により促進されるものであり得る。いくつかの実施形態では、触媒は、金属触媒である。ある特定の実施形態では、金属触媒は、銅 ( I ) である。

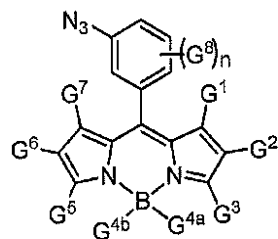
【 0 0 1 9 】

本明細書に記載されている例示的なアジド - B O D I P Y 化合物は、アルキン化合物と反応して、検出を促進する増強された蛍光を有する安定的なトリアゾール生成物を得ることができる。提供される例示的な化合物は、洗浄プロセスを伴わない細胞 - イメージングにおいてかなりの進歩を表し、S D S - P A G E 後に細胞ライセートからのアルキントグ付き糖タンパク質の直接のゲル内検出に適用可能である。

【 0 0 2 0 】

本開示の一態様は、式 ( I ) のアジド - B O D I P Y 化合物 :

【 化 1 】



( I )

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物 [ 式中、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>、G<sup>4 a</sup>、G<sup>4 b</sup>、G<sup>5</sup>、G<sup>6</sup>、G<sup>7</sup> および G<sup>8</sup> および n は、本明細書に記載の通りである ] に関する。

【 0 0 2 1 】

別の態様において、本開示は、アジド - B O D I P Y 化合物の調製のための合成法を提供する。本開示はまた、本明細書に記載されているアジド - B O D I P Y 化合物が、有機アルキンと反応して、増強された蛍光を有するトリアゾール生成物を形成することができ

10

20

30

40

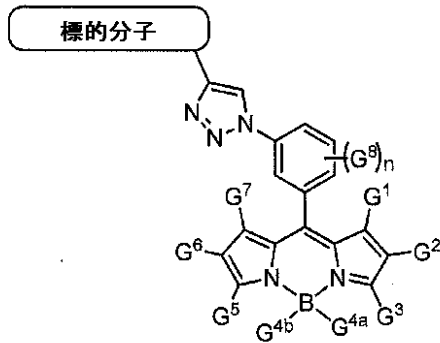
50

ることを示す。

【0022】

別の態様において、本開示は、式(III)のトリアゾリル-BODIPY化合物：

【化2】



10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物[式中、 $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^{4a}$ 、 $G^{4b}$ 、 $G^5$ 、 $G^6$ 、 $G^7$ 、 $G^8$ および $n$ は、本明細書に記載の通りである。標的分子は、これらに限定されないが、生体分子、例えば、DNA、RNA、タンパク質およびグリカンを含む]を提供する。

【0023】

アジド-アルキン環化付加(AAC)は、ひずみまたは触媒(金属もしくは有機物)により促進されるものであり得る。いくつかの実施形態では、触媒は、金属触媒である。ある特定の実施形態では、金属触媒は、銅(I)である。

20

【0024】

さらに別の態様において、本開示は、生体分子を検出および/またはイメージングする方法に関する。

【0025】

ある特定の実施形態では、本開示は、アルキン含有分子をイメージングする方法であって、

(a) 分子のアルキン基への本明細書に記載のような化合物のライゲーションを可能とする条件下で、化合物を、アルキン含有分子を含有する試料と共にインキュベートして、トリアゾール生成物を形成させるステップと、

30

(b) トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを検出するステップとを含む、方法を提供する。

【0026】

ある特定の実施形態では、本開示は、試料中のアルキン含有分子を検出する方法であって、

(a) 本明細書に記載のような化合物と、アルキン含有分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、

(b) 試料から放出される蛍光シグナルのレベルを検出するステップと、

(c) 試料中のアルキン含有分子の存在を決定するステップと

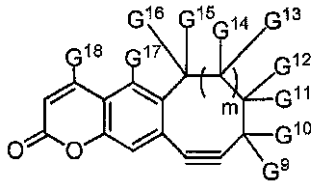
40

を含み、

分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、アルキン含有分子の存在を示す、方法を提供する。

別の態様において、本開示は、式(IV)のシクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブ：

## 【化3】



(IV)

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物 [ 式中、

$G^9$ 、 $G^{10}$ 、 $G^{11}$ 、 $G^{12}$ 、 $G^{13}$ 、 $G^{14}$ 、 $G^{15}$ 、 $G^{16}$ 、 $G^{17}$  および  $G^{18}$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルケニル、任意選択でハロゲン、任意選択でニトロソ、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  であり、

$R$  はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  から独立に選択され、

各  $R^A$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各  $R^B$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

$G^9$  および  $G^{10}$  はそれぞれの場合、水素、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、ニトロソ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリールオキシのアリール基およびアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、

$m$  は、1であり、

$n$  は、0、1、2、3、または4である

]を提供する。

## 【0027】

ある特定の実施形態では、本開示は、アジド含有分子をイメージングする方法であって

10

20

30

40

50

- 、
- ( a ) 分子のアジド基への式 ( I V ) の化合物のライゲーションを可能とする条件下で、化合物を、アジド含有分子を含有する試料と共にインキュベートして、トリアゾール生成物を形成させるステップと、
- ( b ) トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを検出するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 0 2 8 】

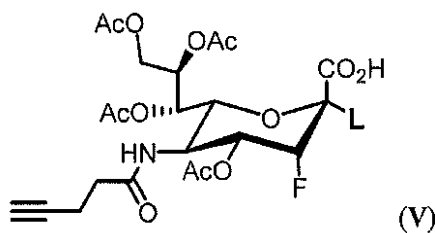
ある特定の実施形態では、本開示は、試料中のアジド含有分子を検出する方法であって、

- ( a ) 式 ( I V ) の化合物と、アジド含有分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、
- ( b ) 試料から放出される蛍光シグナルのレベルを検出するステップと、
- ( c ) 試料中のアジド含有分子の存在を決定するステップとを含む、
- 分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、アジド含有分子の存在を示す、方法を提供する。

## 【 0 0 2 9 】

別の態様において、本開示は、式 ( V ) の化合物：

## 【 化 4 】



- ( 式中、L は、ハロゲン、アルコキシ、フェノキシ、ペンタフルオロフェノキシ、4 - ニトロフェノキシ、ウンベリフェリル、アルカノエート、ベンゾエート、トリフレート、メシレート、またはトシレートからなる群から選択される ) に関する。

## 【 0 0 3 0 】

ある特定の実施形態では、本開示は、シアリダーゼ酵素の活性部位をイメージングする方法であって、

- ( a ) シアリダーゼ酵素の活性部位への請求項 4 1 に記載の化合物のライゲーシンのための条件下で、化合物と、シアリダーゼ酵素を含むことが疑われる試料とを接触させ、共有結合生成物を形成させるステップと、
- ( b ) 共有結合生成物と、本明細書に記載のようなアジド含有蛍光発生プローブとを接触させて、蛍光発生トリアゾール生成物を形成させるステップと、
- ( c ) トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 0 3 1 】

ある特定の実施形態では、本開示は、

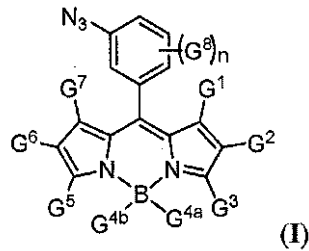
- ( a ) 請求項 4 4 に記載の化合物と、シアリダーゼ酵素分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、
- ( b ) 試料混合物中のクマジンから放出される蛍光シグナルのレベルを測定するステップと、
- ( c ) 試料中のシアリダーゼ酵素分子の存在を決定するステップとを含む、試料中のシアリダーゼ酵素の活性部位を検出する方法であって、分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、アジド含有分子の存在を示す、方法を提供する。

本発明の実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

## (項目1)

式(I)の化合物:

【化108】



10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物

[式中、

$G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^5$ 、 $G^6$ 、 $G^7$  および  $G^8$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  であり、

20

$R$  はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  から独立に選択され、

各  $R^A$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

30

各  $R^B$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

$G^{4a}$  および  $G^{4b}$  はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリール基およびアリールオキシのアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、

40

$n$  は、0、1、2、3、または4である]。

(項目2)

50

G<sup>1</sup> および G<sup>3</sup> が、メチルである、項目 1 に記載の化合物。

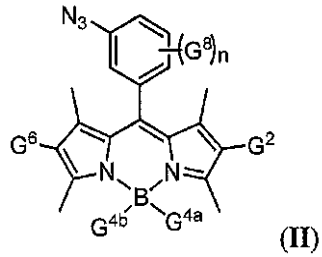
(項目 3)

G<sup>5</sup> および G<sup>7</sup> が、メチルである、項目 1 に記載の化合物。

(項目 4)

式 (II) のもの、

【化 109】



10

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

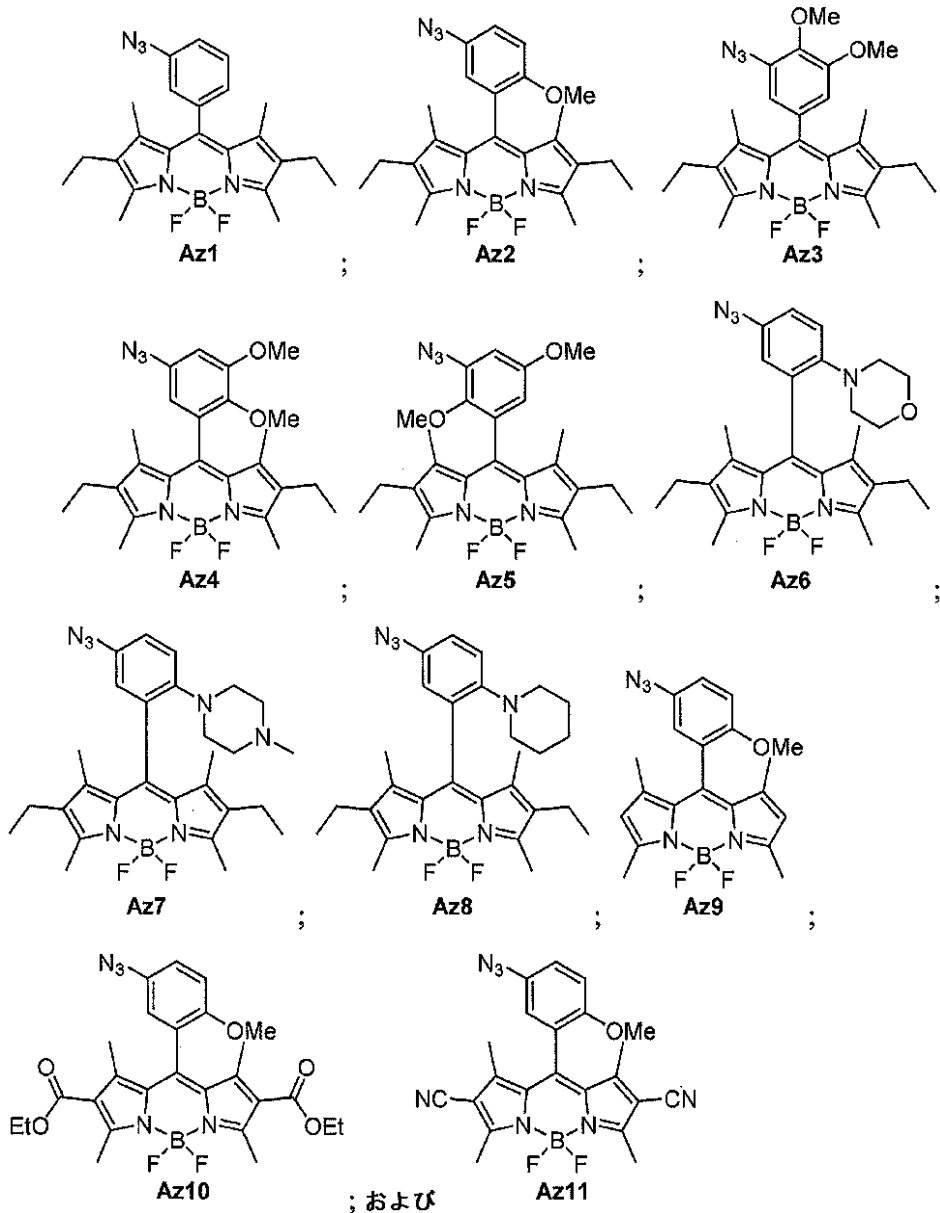
(項目 5)

表 1 から選択される式によって記載される、項目 4 に記載の化合物。

(項目 6)

20

## 【化 1 1 0】



10

20

30

からなる群から選択される、項目 4 に記載の化合物。

(項目 7)

アルキン含有分子をイメージングする方法であって、

(a) 前記分子のアルキン基への項目 1 に記載の化合物のライゲーションのための条件下で、前記化合物と、前記アルキン含有分子を含有する試料とを接触させ、トリアゾール生成物を形成させるステップと、

40

(b) 前記トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含む、方法。

(項目 8)

前記接触ステップが、金属触媒の存在下で行われる、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記金属触媒が、銅 (I) である、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記化合物が、前記アルキン基に共有結合的に連結している、項目 7 に記載の方法。

(項目 11)

前記試料が、細胞を含有し、前記アルキン含有分子が、細胞表面上または前記細胞内に

50



位置している、項目 7 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記化合物が、表 1 から選択される式によって記載される、項目 7 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記化合物が、項目 6 に記載の化合物から選択される、項目 7 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記アルキン含有分子が、生体分子である、項目 7 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記生体分子が、DNA、RNA、タンパク質またはグリカンである、項目 1 4 に記載の方法。

10

(項目 1 6)

前記生体分子が、細胞の表面上または近くに位置している、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記生体分子が、細胞内生体分子である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 8)

試料中のアルキン含有分子を検出する方法であって、

(a) 項目 1 に記載の化合物と、アルキン含有分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、

(b) 試料混合物から放出される蛍光シグナルのレベルを測定するステップと、

20

(c) 前記試料中の前記アルキン含有分子の存在を決定するステップと  
を含み、前記分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、前記アルキン含有分子の存在を示す、方法。

(項目 1 9)

前記接触ステップが、金属触媒の存在下で行われる、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記金属触媒が、銅 (I) である、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記試料が、細胞を含有し、前記アルキン含有分子が、細胞の表面上もしくは近く、または細胞内に位置している、項目 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 2 2)

前記化合物が、表 1 から選択される式によって記載される、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記化合物が、項目 6 に記載の化合物から選択される、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記アルキン含有分子が、生体分子である、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記生体分子が、DNA、RNA、タンパク質またはグリカンである、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

40

前記生体分子が、細胞の表面上または近くに位置している、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記生体分子が、細胞内生体分子である、項目 2 4 に記載の方法。

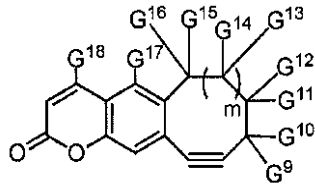
(項目 2 8)

細胞におけるデュアル蛍光イメージングのための前記化合物の使用を含む、項目 7 または 1 8 に記載の方法。

(項目 2 9)

式 (IV) の化合物：

## 【化 1 1 1】



(IV)

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物

10

[ 式中、

$G^9$ 、 $G^{10}$ 、 $G^{11}$ 、 $G^{12}$ 、 $G^{13}$ 、 $G^{14}$ 、 $G^{15}$ 、 $G^{16}$ 、 $G^{17}$  および  $G^{18}$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルケニル、任意選択でハロゲン、任意選択でニトロソ、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  であり、

$R$  はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  から独立に選択され、

20

各  $R^A$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各  $R^B$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

30

$G^9$  および  $G^{10}$  はそれぞれの場合、水素、フルオロ、クロロ、プロモ、ヨード、ニトロソ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリールオキシのアリール基およびアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、

40

$m$  は、1である]。

(項目30)

$G^9$  および  $G^{10}$  が、水素である、項目29に記載の化合物。

(項目31)

50

G<sup>9</sup> および G<sup>10</sup> が、ハロゲンである、項目 29 に記載の化合物。

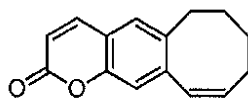
(項目 32)

G<sup>9</sup> および G<sup>10</sup> が、フッ素である、項目 31 に記載の化合物。

(項目 33)

化合物 101

【化 112】



101

10

である、項目 29 に記載の化合物。

(項目 34)

アジド含有分子をイメージングする方法であって、

(a) 前記分子のアジド基への項目 29 に記載の化合物のライゲーションのための条件下で、前記化合物と、前記アジド含有分子を含有する試料とを接触させ、トリアゾール生成物を形成させるステップと、

(b) 前記トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含む、方法。

20

(項目 35)

試料中のアジド含有分子を検出する方法であって、

(a) 項目 29 に記載の化合物と、アジド含有分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、

(b) 試料混合物から放出される蛍光シグナルのレベルを測定するステップと、

(c) 前記試料中の前記アジド含有分子の存在を決定するステップと

を含み、前記分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、前記アジド含有分子の存在を示す、方法。

(項目 36)

(a) 1 - ベンゾスペロンの 8 位における位置選択的ニトロ化；

30

(b) 1 - ベンゾスペロンの 8 位におけるニトロ基の還元；

(c) 還元されたニトロ基の酸条件下でのジアゾ化およびヒドロキシル化による、アルコールの形成；

(d) ベンジルエーテルとしての前記アルコール上のヒドロキシル基の保護；

(e) BF<sub>3</sub> · OEt<sub>2</sub> の存在下での TMS - ジアゾメタンによる処理による環状ケトン上の環の拡張；

(f) NaBH<sub>4</sub> によるシクロオクタノン上のカルボニル基の還元；

(g) 前記還元されたカルボニル基のシリル化による、シリルエーテルの形成；

(h) 水素化による前記アルコール上のベンジル保護基の除去による、フェノールの形成；

40

(i) Et<sub>3</sub>N および MgCl<sub>2</sub> の存在下での過剰なパラホルムアルデヒドによる前記フェノールの処理による、サリチルアルデヒドの形成；

(j) 新たに調製したケテニリドントリフェニルホスホランによる前記サリチルアルデヒドの処理；

(k) 前記ケテニリドントリフェニルホスホラン処理したサリチルアルデヒドの脱シリル化および酸化による、ケトンの形成、

(l) エノールトリフレートへの前記ケトン中の前記カルボニル基の変換；

(m) 強塩基 NaHMDS による前記エノールトリフレートの処理による脱離反応、それによる最終生成物 101 の生成

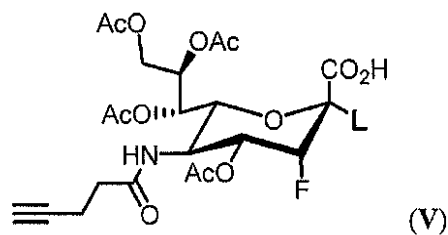
を含む、項目 33 に記載の化合物を生成する方法。

50

(項目 37)

式 (V) の化合物 :

【化 113】



(V)

10

(式中、Lは、ハロゲン、クマリンオキシド、トリフレート、メシレート、トシレート、ハロゲン、アルコキシ、フェノキシ、ペンタフルオロフェノキシ、または4-ニトロフェノキシからなる群から選択される)。

(項目 38)

Lが、ハロゲンである、項目 37 に記載の化合物。

(項目 39)

Lが、フッ素である、項目 38 に記載の化合物。

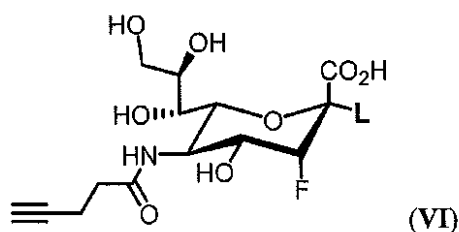
(項目 40)

クマリンである、項目 37 に記載の化合物。

(項目 41)

式 (VI) の化合物 :

【化 114】



(VI)

20

(式中、Lは、ハロゲン、アルコキシ、フェノキシ、ペンタフルオロフェノキシ、4-ニトロフェノキシ、ウンベリフェリル、アルカノエート、ベンゾエート、トリフレート、メシレート、またはトシレートからなる群から選択される)。

30

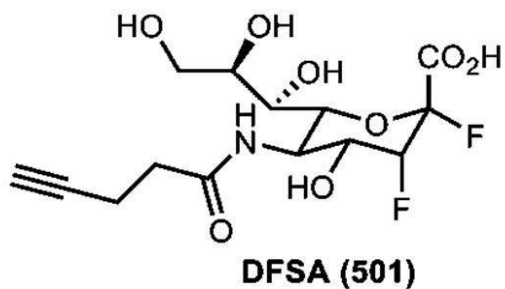
(項目 42)

Lが、ハロゲンである、項目 41 に記載の化合物。

(項目 43)

Lが、化合物 501 である、項目 41 に記載の化合物。

【化 115】



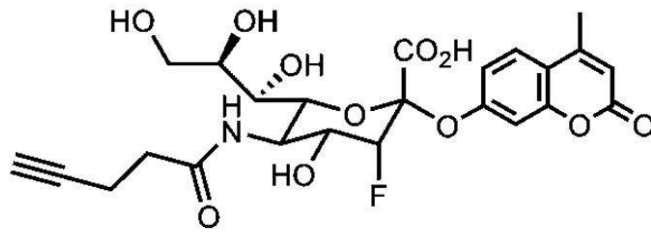
DFSA (501)

40

(項目 44)

化合物 601 である、項目 41 に記載の化合物。

## 【化 1 1 6】



CoumFSA (601)

10

## (項目 4 5)

シアリダーゼ酵素の活性部位をイメージングする方法であって、

( a ) 前記シアリダーゼ酵素の前記活性部位への項目 4 1 に記載の化合物のライゲーシヨンのための条件下で、前記化合物と、前記シアリダーゼ酵素を含むことが疑われる試料とを接触させ、共有結合生成物を形成させるステップと、

( b ) 前記共有結合生成物と、本明細書に記載のようなアジド含有蛍光発生プローブとを接触させて、蛍光発生トリアゾール生成物を形成させるステップと、

( c ) 前記トリアゾール生成物から放出される蛍光シグナルを測定するステップとを含む、方法。

## (項目 4 6)

20

試料中のシアリダーゼ酵素の活性部位を検出する方法であって、

( a ) 項目 4 1 に記載の化合物と、シアリダーゼ酵素分子を有することが疑われる試料とを接触させるステップと、

( b ) 試料混合物中のクマジンから放出される蛍光シグナルのレベルを測定するステップと、

( c ) 前記試料中の前記シアリダーゼ酵素分子の存在を決定するステップとを含む、

前記分子の非存在下での蛍光シグナルのレベルと比較した増強された蛍光シグナルは、アジド含有分子の存在を示す、方法。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 3 2】

【図 1】図 1 は、CuAAC 反応による蛍光スクリーニングにおいて使用されるアジド - 置換 BODIPY 誘導体 Az 1 ~ Az 8 の構造を示す。

## 【 0 0 3 3】

【図 2】図 2 は、UV ランプ励起 (  $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$  ) を伴うマイクロタイタープレートにおける、対応するトリアゾール誘導体 T 1 ~ T 8 を生じさせる Az 1 ~ Az 8 の CuAAC 反応の蛍光スクリーニングを示す。化合物 Az 1 ~ Az 8 および T 1 ~ T 8 を、アリール部分の電子密度の増加する順序で分別する。

## 【 0 0 3 4】

40

【図 3】図 3 は、4 - ペンチン - 1 - オールによる CuAAC 反応によって得た、アミノ - BODIPY Am 1 0、アジド - BODIPY Az 2、Az 9 ~ Az 1 1 および対応するトリアゾリル - BODIPY T 2、T 9 ~ T 1 1 の構造を示す。

## 【 0 0 3 5】

【図 4】図 4 は、25 でのエタノール溶液 (  $12 \mu\text{M}$  ) 中のトリアゾリル - BODIPY T 1 0、アジド - BODIPY Az 1 0 およびアミノ - BODIPY Am 1 0 の吸収および標準化した発光スペクトルを示す。挿入物：エタノール溶液 (  $120 \mu\text{M}$  ) 中の T 1 0、Az 1 0 および Am 1 0 の画像。緑色の T 1 0 溶液への、黄色の Az 1 0 溶液の変化は明らかであった。

## 【 0 0 3 6】

50

【図5】図5は、AzBOCEt (Az10)によるアルキン官能化されたBSA標識化を示す。ゲルは蛍光イメージングによって分析した ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$ )。総タンパク質含量は、クマシーブルー染色によって明らかにされた。

【0037】

【図6A】図6は、AzBOCEt (Az10)による細胞蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。(A)  $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ およびAz10を使用した細胞標識化実験の例示。CL1-5細胞を、 $100 \mu\text{M}$ の $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ または対照糖 ( $\text{Ac}_4\text{ManNAc}$ および $\text{Ac}_4\text{GalNAc}$ )と共に3日間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で $0.1 \mu\text{M}$ のAz10で1時間処理した。(B) 蛍光、明視野および重ね合わせ画像。スケールバー： $75 \mu\text{m}$ 。(C) CL1-5細胞中の発現されたグリコシルコンジュゲートの局在化。これらのグリコシルコンジュゲートを、蛍光発生プローブAz10 (緑色)、抗GRASP65 (ゴルジマーカー)、それに続いてCy3コンジュゲートされた抗ウサギ (赤色)、およびヘキスト (青色、細胞核マーカー)で標識した。スケールバー： $10 \mu\text{m}$ 。

10

【図6B】図6は、AzBOCEt (Az10)による細胞蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。(A)  $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ およびAz10を使用した細胞標識化実験の例示。CL1-5細胞を、 $100 \mu\text{M}$ の $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ または対照糖 ( $\text{Ac}_4\text{ManNAc}$ および $\text{Ac}_4\text{GalNAc}$ )と共に3日間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で $0.1 \mu\text{M}$ のAz10で1時間処理した。(B) 蛍光、明視野および重ね合わせ画像。スケールバー： $75 \mu\text{m}$ 。(C) CL1-5細胞中の発現されたグリコシルコンジュゲートの局在化。これらのグリコシルコンジュゲートを、蛍光発生プローブAz10 (緑色)、抗GRASP65 (ゴルジマーカー)、それに続いてCy3コンジュゲートされた抗ウサギ (赤色)、およびヘキスト (青色、細胞核マーカー)で標識した。スケールバー： $10 \mu\text{m}$ 。

20

【図6C】図6は、AzBOCEt (Az10)による細胞蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。(A)  $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ およびAz10を使用した細胞標識化実験の例示。CL1-5細胞を、 $100 \mu\text{M}$ の $\text{Ac}_4\text{ManNA1}$ 、 $\text{Ac}_4\text{GalNA1}$ または対照糖 ( $\text{Ac}_4\text{ManNAc}$ および $\text{Ac}_4\text{GalNAc}$ )と共に3日間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で $0.1 \mu\text{M}$ のAz10で1時間処理した。(B) 蛍光、明視野および重ね合わせ画像。スケールバー： $75 \mu\text{m}$ 。(C) CL1-5細胞中の発現されたグリコシルコンジュゲートの局在化。これらのグリコシルコンジュゲートを、蛍光発生プローブAz10 (緑色)、抗GRASP65 (ゴルジマーカー)、それに続いてCy3コンジュゲートされた抗ウサギ (赤色)、およびヘキスト (青色、細胞核マーカー)で標識した。スケールバー： $10 \mu\text{m}$ 。

30

【0038】

【図7】図7は、細胞ライセートからのAzBOCEt (Az10)によるCuAACを使用した、アルキントグ付き糖タンパク質の直接のゲル内蛍光検出を示す。ゲルを蛍光イメージング ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$ ) およびクマシーブルー染色によって分析し、総タンパク質含量が明らかとなった。

【0039】

【図8A】図8は、AzBOCEt (Az10)による細胞蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。CL1-5細胞を、 $\text{Ac}_4\text{GlcNA1}$ または $\text{Ac}_4\text{GlcNAc}$ と共に3日間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で $0.1 \mu\text{M}$ のAz10で1時間処理した。(A) 蛍光、明視野および重ね合わせ画像。スケールバー： $75 \mu\text{m}$ 。(B) CL1-5肺細胞における発現しているグリコシルコンジュゲートの局在化。これらのグリコシルコンジュゲートを、蛍光発生プローブAz10 (緑色)、抗GRASP65 (ゴルジマーカー)、それに続いてCy3コンジュゲートされた抗ウサギ (赤色)、およびヘキスト (青色、細胞核マーカー)で標識した。スケールバー： $10 \mu\text{m}$ 。

40

【図8B】図8は、AzBOCEt (Az10)による細胞蛍光標識化、および共焦点顕

50

微鏡観察によるイメージングを示す。CL1-5細胞を、Ac<sub>4</sub>GlcNA1またはAc<sub>4</sub>GlcNAcと共に3日間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で0.1 μMのAz10で1時間処理した。(A)蛍光、明視野および重ね合わせ画像。スケールバー：75 μm。(B)CL1-5肺細胞における発現しているグルコシルコンジュゲートの局在化。これらのグルコシルコンジュゲートを、蛍光発生プローブAz10(緑色)、抗GRASP65(ゴルジマーカー)、それに続いてCy3コンジュゲートされた抗ウサギ(赤色)、およびヘキスト(青色、細胞核マーカー)で標識した。スケールバー：10 μm。

【0040】

【図9】図9は、細胞中のCuAACのAzBOCetを使用したグリカン輸送の蛍光イメージングを示す。CL1-5細胞を、500 μMのAc<sub>4</sub>ManNA1と共に1時間インキュベートし、それに続いてPBS緩衝液で洗浄し、過剰なAc<sub>4</sub>ManNA1を除去した。糖処理した細胞を、それぞれ、培養培地中で1時間、7時間、14時間および21時間インキュベートし、次いで、CuAAC条件下で0.1 μMのAz10で1時間標識した。

10

【0041】

【図10】図10は、SPAACをベースとする蛍光形成プローブ、比較上のプローブ、および比較上のプローブのトリアゾール生成物を示す。

【0042】

【図11】図11は、シアリダーゼプローブの構造を示す。

20

【0043】

【図12】図12は、活性をベースとするプローブの一般構造を示す。

【0044】

【図13】図13は、シアリダーゼ酵素の機序および遷移状態を示す。

【0045】

【図14】図14は、シアリダーゼ活性部位のX線結晶構造を示す。

【0046】

【図15】図15は、シアリダーゼの同定のための蛍光発生反応を示す。

【0047】

【図16】図16A、16Bは、蛍光発生プローブの反応の間の吸光度および発光スペクトルおよび時間経過を示す。

30

【0048】

【図17】図17は、101およびモデルアジド分子の反応時間の関数としての蛍光発生プローブ濃度の逆数のプロットを示す。

【0049】

【図18】図18は、101およびモデルアジド含有グリカンの反応時間の関数としての蛍光発生プローブ濃度の逆数のプロットを示す。<sup>1</sup>H-NMRによってモニターするような、CD<sub>3</sub>OD-D<sub>2</sub>Oの溶液(5:1、v/v)中の化合物101およびN-アジドアセチルマンノサミンの反応についての時間に対する1/[101]のプロット。

【0050】

40

【図19】図19は、200 μMのAc<sub>4</sub>ManNAzと共にインキュベートし、かつ洗浄なしおよび固定なし条件下で100 μMのプローブ101で標識したCL1-5生細胞のタイムラプス蛍光および重ね合わせ画像を示す。

【0051】

【図20】図20は、共焦点顕微鏡観察によって可視化された、CL1-5細胞におけるプローブ標識したシアリル複合糖質の局在化を示す。

【0052】

【図21】図21は、細胞中のSPAACのcoumOCT(101)を使用した複合糖質輸送の高コントラスト蛍光イメージングを示す。

【0053】

50

【図22】図22は、200  $\mu$ MのAc<sub>4</sub>ManNAzと共にインキュベートし、かつ100  $\mu$ Mのプロープ101で標識したCL1-5生細胞のタイムラプス蛍光および重ね合わせ画像を示す。

【0054】

【図23】図23は、細胞中のSPAACのcoumOCT(101)を使用した複合糖質輸送の蛍光イメージングを示す。

【0055】

【図24A】図24A、24Bは、coumOCT(1)、AzBOCEtによる細胞中のデュアル蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。coumOCT(1)、AzBOCEtによる細胞中のデュアル蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージング。(A)Ac<sub>4</sub>ManNA1、Ac<sub>4</sub>GlcNAz、101およびAzBOCEtを使用した細胞標識化実験の例示。CL1-5細胞を、100  $\mu$ MのAc<sub>4</sub>ManNA1およびAc<sub>4</sub>GlcNAzまたは対照糖(Ac<sub>4</sub>ManNAcおよびAc<sub>4</sub>GlcNAc)と共に3日間インキュベートし、これをSPAAC条件下で100  $\mu$ Mのプロープ101で0.5時間処理し、次いで、CuAAC条件下で0.1  $\mu$ MのAzBOCEtと共に1時間インキュベートした。(B)CL1-5細胞におけるデュアル蛍光イメージング。これらの複合糖質は、アジド含有複合糖質についてプロープ101(シアン)で、およびアルキン含有複合糖質についてAzBOCEt(緑色)で標識した。(スケールバー:10  $\mu$ m)

10

【図24B】図24A、24Bは、coumOCT(1)、AzBOCEtによる細胞中のデュアル蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。coumOCT(1)、AzBOCEtによる細胞中のデュアル蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージング。(A)Ac<sub>4</sub>ManNA1、Ac<sub>4</sub>GlcNAz、101およびAzBOCEtを使用した細胞標識化実験の例示。CL1-5細胞を、100  $\mu$ MのAc<sub>4</sub>ManNA1およびAc<sub>4</sub>GlcNAzまたは対照糖(Ac<sub>4</sub>ManNAcおよびAc<sub>4</sub>GlcNAc)と共に3日間インキュベートし、これをSPAAC条件下で100  $\mu$ Mのプロープ101で0.5時間処理し、次いで、CuAAC条件下で0.1  $\mu$ MのAzBOCEtと共に1時間インキュベートした。(B)CL1-5細胞におけるデュアル蛍光イメージング。これらの複合糖質は、アジド含有複合糖質についてプロープ101(シアン)で、およびアルキン含有複合糖質についてAzBOCEt(緑色)で標識した。(スケールバー:10  $\mu$ m)

20

30

【0056】

【図25】図25は、化合物101および3-メルカプトプロピオン酸のCDCl<sub>3</sub>中の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

【0057】

【図26】図26は、化合物111および3-メルカプトプロピオン酸のCDCl<sub>3</sub>中の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0058】

特定の官能基および化学用語の定義を、下記でより詳細に記載する。化学元素は、元素周期表、CASバージョン、Handbook of Chemistry and Physics、第75版、内表紙によって同定し、特定の官能基は一般に、その中に記載されている通りに定義する。さらに、有機化学の一般的原理、ならびに特定の官能性部分および反応性は、Organic Chemistry、Thomas Sorrell, University Science Books、Sausalito、1999年;SmithおよびMarch、March's Advanced Organic Chemistry、第5版、John Wiley & Sons、Inc.、New York、2001年;Larock、Comprehensive Organic Transformations、VCH Publishers、Inc.、New York、1989年;およびCarruthers、Some Modern Methods of Organic Synthesis、第3版、Cambridge University Press、Cambridge、1987年に記載されている。

40

【0059】

50



本明細書に記載されている化合物は、1つまたは複数の不斉中心を含むことができ、このように、様々な立体異性体の形態、例えば、エナンチオマーおよび/またはジアステレオマーで存在することができる。例えば、本明細書に記載されている化合物は、個々のエナンチオマー、ジアステレオマーまたは幾何異性体の形態でよく、あるいはラセミ混合物、および1つまたは複数の立体異性体が富化された混合物を含めた立体異性体の混合物の形態でよい。異性体は、キラル高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、キラル塩の形成および結晶化を含めた方法を使用して混合物から単離することができ、または好ましい異性体は、不斉合成によって調製することができる。例えば、Jacquesら、Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981年); Wilenら、Tetrahedron, 33巻: 2725頁(1977年); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962年); および Wilen, S.H., Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions, 268頁 (E.L. Eliel編, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, 1972年)を参照されたい。本開示は、他の異性体を実質的に含有しない個々の異性体として、および代わりに、様々な異性体の混合物としての化合物をさらに包含する。

#### 【0060】

値の範囲が列挙される時、その範囲内の各値および部分範囲を包含することを意図する。例えば、「 $C_{1-6}$ アルキル」は、 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 、 $C_6$ 、 $C_{1-6}$ 、 $C_{1-5}$ 、 $C_{1-4}$ 、 $C_{1-3}$ 、 $C_{1-2}$ 、 $C_{2-6}$ 、 $C_{2-5}$ 、 $C_{2-4}$ 、 $C_{2-3}$ 、 $C_{3-6}$ 、 $C_{3-5}$ 、 $C_{3-4}$ 、 $C_{4-6}$ 、 $C_{4-5}$ 、および $C_{5-6}$ アルキルを包含することを意図する。

#### 【0061】

本明細書において使用する場合、「アルキル」は、1~10個の炭素原子を有する直鎖状または分岐状の飽和炭化水素基のラジカルを指す（「 $C_{1-10}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~9個の炭素原子を有する（「 $C_{1-9}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~8個の炭素原子を有する（「 $C_{1-8}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~7個の炭素原子を有する（「 $C_{1-7}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~6個の炭素原子を有する（「 $C_{1-6}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~5個の炭素原子を有する（「 $C_{1-5}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~4個の炭素原子を有する（「 $C_{1-4}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~3個の炭素原子を有する（「 $C_{1-3}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1~2個の炭素原子を有する（「 $C_{1-2}$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、1個の炭素原子を有する（「 $C_1$ アルキル」）。いくつかの実施形態では、アルキル基は、2~6個の炭素原子を有する（「 $C_{2-6}$ アルキル」）。 $C_{1-6}$ アルキル基の例には、メチル（ $C_1$ ）、エチル（ $C_2$ ）、*n*-プロピル（ $C_3$ ）、イソプロピル（ $C_3$ ）、*n*-ブチル（ $C_4$ ）、*tert*-ブチル（ $C_4$ ）、*sec*-ブチル（ $C_4$ ）、イソ-ブチル（ $C_4$ ）、*n*-ペンチル（ $C_5$ ）、3-ペンタニル（ $C_5$ ）、アミル（ $C_5$ ）、ネオペンチル（ $C_5$ ）、3-メチル-2-ブタニル（ $C_5$ ）、第三級アミル（ $C_5$ ）、および*n*-ヘキシル（ $C_6$ ）が含まれる。アルキル基のさらなる例には、*n*-ヘプチル（ $C_7$ ）、*n*-オクチル（ $C_8$ ）などが含まれる。他に特定しない限り、アルキル基はそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換アルキル」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換アルキル」）。ある特定の实施形態では、アルキル基は、非置換 $C_{1-10}$ アルキル（例えば、 $-CH_3$ ）である。ある特定の实施形態では、アルキル基は、置換 $C_{1-10}$ アルキルである。

#### 【0062】

本明細書において使用する場合、「アルケニル」は、2~10個の炭素原子および1個または複数の炭素-炭素二重結合（例えば、1個、2個、3個、または4個の二重結合）を有する直鎖状または分岐状炭化水素基のラジカルを指す。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2~9個の炭素原子を有する（「 $C_{2-9}$ アルケニル」）。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、アルケニル基は、2～8個の炭素原子を有する（「C<sub>2-8</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2～7個の炭素原子を有する（「C<sub>2-7</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2～6個の炭素原子を有する（「C<sub>2-6</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2～5個の炭素原子を有する（「C<sub>2-5</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2～4個の炭素原子を有する（「C<sub>2-4</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2～3個の炭素原子を有する（「C<sub>2-3</sub>アルケニル」）。いくつかの実施形態では、アルケニル基は、2個の炭素原子を有する（「C<sub>2</sub>アルケニル」）。1個または複数の炭素-炭素二重結合は、内部（例えば、2-ブテニルにおける）または末端（例えば、1-ブテニルにおける）でよい。C<sub>2-4</sub>アルケニル基の例には、エテニル（C<sub>2</sub>）、1-プロペニル（C<sub>3</sub>）、2-プロペニル（C<sub>3</sub>）、1-ブテニル（C<sub>4</sub>）、2-ブテニル（C<sub>4</sub>）、ブタジエニル（C<sub>4</sub>）などが含まれる。C<sub>2-6</sub>アルケニル基の例には、上記のC<sub>2-4</sub>アルケニル基、およびペンテニル（C<sub>5</sub>）、ペンタジエニル（C<sub>5</sub>）、ヘキセニル（C<sub>6</sub>）などが含まれる。アルケニルのさらなる例には、ヘプテニル（C<sub>7</sub>）、オクテニル（C<sub>8</sub>）、オクタトリエニル（C<sub>8</sub>）などが含まれる。他に特定しない限り、アルケニル基はそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換アルケニル」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換アルケニル」）。ある特定の実施形態では、アルケニル基は、非置換C<sub>2-10</sub>アルケニルである。ある特定の実施形態では、アルケニル基は、置換C<sub>2-10</sub>アルケニルである。

#### 【0063】

本明細書において使用する場合、「アルキニル」は、2～10個の炭素原子および1個または複数の炭素-炭素三重結合（例えば、1個、2個、3個、または4個の三重結合）を有する直鎖状または分岐状炭化水素基のラジカルを指す（「C<sub>2-10</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～9個の炭素原子を有する（「C<sub>2-9</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～8個の炭素原子を有する（「C<sub>2-8</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～7個の炭素原子を有する（「C<sub>2-7</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～6個の炭素原子を有する（「C<sub>2-6</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～5個の炭素原子を有する（「C<sub>2-5</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～4個の炭素原子を有する（「C<sub>2-4</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2～3個の炭素原子を有する（「C<sub>2-3</sub>アルキニル」）。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、2個の炭素原子を有する（「C<sub>2</sub>アルキニル」）。1個または複数の炭素-炭素三重結合は、内部（例えば、2-ブチニルにおける）または末端（例えば、1-ブチニルにおける）でよい。C<sub>2-4</sub>アルキニル基の例には、これらに限定されないが、エチニル（C<sub>2</sub>）、1-プロピニル（C<sub>3</sub>）、2-プロピニル（C<sub>3</sub>）、1-ブチニル（C<sub>4</sub>）、2-ブチニル（C<sub>4</sub>）などが含まれる。C<sub>2-6</sub>アルケニル基の例には、上記のC<sub>2-4</sub>アルキニル基、およびペンチニル（C<sub>5</sub>）、ヘキシニル（C<sub>6</sub>）などが含まれる。アルキニルのさらなる例には、ヘプチニル（C<sub>7</sub>）、オクチニル（C<sub>8</sub>）などが含まれる。他に特定しない限り、アルキニル基はそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換アルキニル」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換アルキニル」）。ある特定の実施形態では、アルキニル基は、非置換C<sub>2-10</sub>アルキニルである。ある特定の実施形態では、アルキニル基は、置換C<sub>2-10</sub>アルキニルである。

#### 【0064】

本明細書において使用する場合、「カルボシクリル」または「炭素環式」は、非芳香族環系において3～10個の環炭素原子（「C<sub>3-10</sub>カルボシクリル」）および0個のヘテロ原子を有する非芳香族環状炭化水素基のラジカルを指す。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、3～8個の環炭素原子を有する（「C<sub>3-8</sub>カルボシクリル」）。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、3～7個の環炭素原子を有する（「C<sub>3-7</sub>カルボシクリル」）。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、3～6個の環

10

20

30

40

50

炭素原子を有する（「 $C_{3-6}$ カルボシクリル」）。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、4～6個の環炭素原子を有する（「 $C_{4-6}$ カルボシクリル」）。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、5～6個の環炭素原子を有する（「 $C_{5-6}$ カルボシクリル」）。いくつかの実施形態では、カルボシクリル基は、5～10個の環炭素原子を有する（「 $C_{5-10}$ カルボシクリル」）。例示的な $C_{3-6}$ カルボシクリル基には、これらに限定されないが、シクロプロピル（ $C_3$ ）、シクロプロペニル（ $C_3$ ）、シクロブチル（ $C_4$ ）、シクロブテニル（ $C_4$ ）、シクロペンチル（ $C_5$ ）、シクロペンテニル（ $C_5$ ）、シクロヘキシル（ $C_6$ ）、シクロヘキセニル（ $C_6$ ）、シクロヘキサジエニル（ $C_6$ ）などが含まれる。例示的な $C_{3-8}$ カルボシクリル基には、これらに限定されないが、上記の $C_{3-6}$ カルボシクリル基、およびシクロヘプチル（ $C_7$ ）、シクロヘプテニル（ $C_7$ ）、シクロヘプタジエニル（ $C_7$ ）、シクロヘプタトリエニル（ $C_7$ ）、シクロオクチル（ $C_8$ ）、シクロオクテニル（ $C_8$ ）、ビスクロ[2.2.1]ヘプタニル（ $C_7$ ）、ビスクロ[2.2.2]オクタニル（ $C_8$ ）などが含まれる。例示的な $C_{3-10}$ カルボシクリル基には、これらに限定されないが、上記の $C_{3-8}$ カルボシクリル基、およびシクロノニル（ $C_9$ ）、シクロノネニル（ $C_9$ ）、シクロデシル（ $C_{10}$ ）、シクロデセニル（ $C_{10}$ ）、オクタヒドロ-1H-インデニル（ $C_9$ ）、デカヒドロナフタレニル（ $C_{10}$ ）、スピロ[4.5]デカニル（ $C_{10}$ ）などが含まれる。上記の例が例示するように、ある特定の实施形態では、カルボシクリル基は、単環式（「単環式カルボシクリル」）または多環式（例えば、縮合環、架橋環もしくはスピロ環系、例えば、二環式系（「二環式カルボシクリル」）または三環式系（「三環式カルボシクリル」）を含有する）のいずれかであり、飽和していてもよいか、または1個もしくは複数の炭素-炭素二重結合もしくは三重結合を含有することができる。「カルボシクリル」はまた、上記に定義されているようなカルボシクリル環が、1個または複数のアリアルまたはヘテロアリアル基と縮合しており、付着点がカルボシクリル環上にある、環系を含み、このような場合には、炭素の数は、炭素環式環系における炭素の数を示し続ける。他に特定しない限り、カルボシクリル基はそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換カルボシクリル」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換カルボシクリル」）。ある特定の实施形態では、カルボシクリル基は、非置換 $C_{3-10}$ カルボシクリルである。ある特定の实施形態では、カルボシクリル基は、置換 $C_{3-10}$ カルボシクリルである。

#### 【0065】

本明細書において使用する場合、「ヘテロシクリル」または「複素環」は、環炭素原子および1～4個の環ヘテロ原子を有する3～14員の非芳香族環系のラジカルを指し、各ヘテロ原子は、窒素、酸素、および硫黄から独立に選択される（「3～14員のヘテロシクリル」）。1個または複数の窒素原子を含有するヘテロシクリル基において、付着点は、原子価が許容するような、炭素または窒素原子でよい。ヘテロシクリル基は、単環式（「単環式ヘテロシクリル」）または多環式（例えば、縮合環、架橋環もしくはスピロ環系、例えば、二環式系（「二環式ヘテロシクリル」）または三環式系（「三環式ヘテロシクリル」））のいずれかであり、飽和していてもよいか、または1個もしくは複数の炭素-炭素二重結合もしくは三重結合を含有することができる。ヘテロシクリル多環式環系は、1つまたは両方の環において1個または複数のヘテロ原子を含むことができる。「ヘテロシクリル」はまた、上記に定義されているようなヘテロシクリル環が、1個または複数のカルボシクリル基と縮合しており、付着点がカルボシクリル環上またはヘテロシクリル環上のいずれかにある環系、あるいは上記に定義されているようなヘテロシクリル環が、1個または複数のアリアルまたはヘテロアリアル基と縮合しており、付着点がヘテロシクリル環上にある、環系を含み、このような場合には、環員の数が、ヘテロシクリル環系における環員の数を示し続ける。他に特定しない限り、ヘテロシクリルはそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換ヘテロシクリル」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換ヘテロシクリル」）。ある特定の实施形態では、ヘテロシクリル基は、非置換3～14員のヘテロシクリルである。ある特定の实施形態では、ヘテロシク

リル基は、置換3～14員のヘテロシクリルである。

【0066】

本明細書において使用する場合、「アリール」は、芳香族環系において提供される6～14個の環炭素原子および0個のヘテロ原子を有する、単環式または多環式（例えば、二環式もしくは三環式）の $4n+2$ 芳香族環系（例えば、環状配置において共有されている6個、10個、もしくは14個の電子を有する）のラジカルを指す（「 $C_{6-14}$ アリール」）。いくつかの実施形態では、アリール基は、6個の環炭素原子を有する（「 $C_6$ アリール」；例えば、フェニル）。いくつかの実施形態では、アリール基は、10個の環炭素原子を有する（「 $C_{10}$ アリール」；例えば、ナフチル、例えば、1-ナフチルおよび2-ナフチル）。いくつかの実施形態では、アリール基は、14個の環炭素原子を有する（「 $C_{14}$ アリール」；例えば、アントラシル）。「アリール」はまた、上記に定義されているようなアリール環が、1個または複数のカルボシクリルまたはヘテロシクリル基と縮合しており、ラジカルまたは付着点のアリール環上にある、環系を含み、このような場合には、炭素原子の数は、アリール環系における炭素原子の数を示し続ける。他に特定しない限り、アリール基はそれぞれの場合、独立に、非置換（「非置換アリール」）であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されている（「置換アリール」）。ある特定の实施形態では、アリール基は、非置換 $C_{6-14}$ アリールである。ある特定の实施形態では、アリール基は、置換 $C_{6-14}$ アリールである。

10

【0067】

本明細書において使用する場合、「ヘテロアリール」は、芳香族環系において提供される環炭素原子および1～4個の環ヘテロ原子を有する、5～14員の単環式または多環式（例えば、二環式、三環式）の $4n+2$ 芳香族環系（例えば、環状配置において共有されている6個、10個、もしくは14個の電子を有する）のラジカルを指し、各ヘテロ原子は、窒素、酸素および硫黄から独立に選択される（「5～14員のヘテロアリール」）。1個または複数の窒素原子を含有するヘテロアリール基において、付着点は、原子価が許容するような、炭素原子または窒素原子でよい。ヘテロアリール多環式環系は、1つまたは両方の環において1個または複数のヘテロ原子を含むことができる。「ヘテロアリール」は、上記に定義されているようなヘテロアリール環が、1個または複数のカルボシクリルまたはヘテロシクリル基と縮合しており、付着点ヘテロアリール環上にある、環系を含み、このような場合には、環員の数は、ヘテロアリール環系における環員の数を示し続ける。「ヘテロアリール」はまた、上記に定義されているようなヘテロアリール環が、1個または複数のアリール基と縮合しており、付着点のアリール環上またはヘテロアリール環上のいずれかにある、環系を含み、このような場合には、環員の数は、縮合多環式（アリール/ヘテロアリール）環系における環員の数を示す。1個の環がヘテロ原子を含有しない多環式ヘテロアリール基（例えば、インドリル、キノリニル、カルバゾリルなど）において、付着点は、いずれかの環、すなわち、ヘテロ原子を担持するいずれかの環（例えば、2-インドリル）またはヘテロ原子を含有しない環（例えば、5-インドリル）上でよい。

20

30

【0068】

上記から理解されるように、本明細書に定義されているようなアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリール基は、ある特定の实施形態では、任意選択で置換されている。任意選択で置換されているとは、置換されているか、または非置換であり得る基を指す（例えば、「置換」もしくは「非置換」アルキル、「置換」もしくは「非置換」アルケニル、「置換」もしくは「非置換」アルキニル、「置換」もしくは「非置換」ヘテロアルキル、「置換」もしくは「非置換」ヘテロアルケニル、「置換」もしくは「非置換」ヘテロアルキニル、「置換」もしくは「非置換」カルボシクリル、「置換」もしくは「非置換」ヘテロシクリル、「置換」もしくは「非置換」アリール、または「置換」もしくは「非置換」ヘテロアリール基）。一般に、用語「置換されている」は、基上に存在する少なくとも1個の水素が、許容できる置換基、例えば、置換によって、安定

40

50

的な化合物、例えば、転位、環化、脱離、または他の反応による転換を自発的に受けない化合物をもたらす置換基で置き換えられていることを意味する。他に示さない限り、「置換されている」基は、基の1個または複数の置換可能な位置において置換基を有し、任意の所与の構造における複数の位置が置換されているとき、置換基は、各位置において同じまたは異なる。用語「置換されている」は、有機化合物の全ての許容できる置換基による置換を含むことを企図し、本明細書に記載されている置換基のいずれかは、安定的な化合物の形成をもたらす。本開示は、安定的な化合物に到達するために、ありとあらゆるこのような組合せを企図する。本開示の目的のために、ヘテロ原子、例えば、窒素は、水素置換基および/またはヘテロ原子の原子価を満たし、かつ安定的な部分の形成をもたらす本明細書に記載のような任意の適切な置換基を有し得る。

10

## 【0069】

例示的な炭素原子置換基には、これらに限定されないが、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SO_2H$ 、 $-SO_3H$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{aa}$ 、 $-ON(R^{bb})_2$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-N(R^{bb})_3^+X^-$ 、 $-N(OR^{cc})R^{bb}$ 、 $-SH$ 、 $-SR^{aa}$ 、 $-SSR^{cc}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CHO$ 、 $-C(OR^{cc})_2$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-OC(=O)R^{aa}$ 、 $-OCO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-OC(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-OC(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-OC(=R^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$ 、 $-SO_2N(R^{bb})_2$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-SO_2OR^{aa}$ 、 $-OSO_2R^{aa}$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-OS(=O)R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-OSi(R^{aa})_3$ 、 $-C(=S)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=S)SR^{aa}$ 、 $-SC(=S)SR^{aa}$ 、 $-SC(=O)SR^{aa}$ 、 $-OC(=O)SR^{aa}$ 、 $-SC(=O)OR^{aa}$ 、 $-SC(=O)R^{aa}$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-OP(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-OP(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-OP(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 、 $-OP(=O)_2N(R^{bb})_2$ 、 $-P(=O)(NR^{bb})_2$ 、 $-OP(=O)(NR^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-OP(R^{cc})_2$ 、 $-OP(R^{cc})_3$ 、 $-B(R^{aa})_2$ 、 $-B(OR^{cc})_2$ 、 $-BR^{aa}(OR^{cc})$ 、 $C_{1-10}$ アルキル、 $C_{1-10}$ ペルハロアルキル、 $C_{2-10}$ アルケニル、 $C_{2-10}$ アルキニル、 $C_{1-10}$ ヘテロアルキル、 $C_{2-10}$ ヘテロアルケニル、 $C_{2-10}$ ヘテロアルキニル、 $C_{3-14}$ カルボシクリル、 $3-14$ 員のヘテロシクリル、 $C_6-14$ アリール、および $5-14$ 員のヘテロアリールが含まれ、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個の $R^{dd}$ 基で独立に置換されており、

20

30

あるいは炭素原子上の2個のジェミナルな水素は、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NN(R^{bb})_2$ 、 $=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$ 、 $=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$ 、 $=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$ 、 $=NR^{bb}$ 、または $=NOR^{cc}$ で置き換えられており、 $R^{aa}$ はそれぞれの場合、独立に、 $C_{1-10}$ アルキル、 $C_{1-10}$ ペルハロアルキル、 $C_{2-10}$ アルケニル、 $C_{2-10}$ アルキニル、 $C_{1-10}$ ヘテロアルキル、 $C_{2-10}$ ヘテロアルケニル、 $C_{2-10}$ ヘテロアルキニル、 $C_{3-14}$ カルボシクリル、 $3-14$ 員のヘテロシクリル、 $C_6-14$ アリール、および $5-14$ 員のヘテロアリールから選択され、あるいは2個の $R^{aa}$ 基は接合して、 $3-14$ 員のヘテロシクリルまたは $5-14$ 員のヘテロアリール環を形成し、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個の $R^{dd}$ 基で独立に置換されており、

40

50

R<sup>b b</sup> はそれぞれの場合、独立に、水素、 - OH、 - OR<sup>a a</sup>、 - N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - CN、 - C(=O)R<sup>a a</sup>、 - C(=O)N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - CO<sub>2</sub>R<sup>a a</sup>、 - SO<sub>2</sub>R<sup>a a</sup>、 - C(=NR<sup>c c</sup>)OR<sup>a a</sup>、 - C(=NR<sup>c c</sup>)N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - SO<sub>2</sub>N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - SO<sub>2</sub>R<sup>c c</sup>、 - SO<sub>2</sub>OR<sup>c c</sup>、 - SOR<sup>a a</sup>、 - C(=S)N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - C(=O)SR<sup>c c</sup>、 - C(=S)SR<sup>c c</sup>、 - P(=O)<sub>2</sub>R<sup>a a</sup>、 - P(=O)(R<sup>a a</sup>)<sub>2</sub>、 - P(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 - P(=O)(NR<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、 C<sub>1-10</sub>アルキル、 C<sub>1-10</sub>ペルハロアルキル、 C<sub>2-10</sub>アルケニル、 C<sub>2-10</sub>アルキニル、 C<sub>1-10</sub>ヘテロアルキル、 C<sub>2-10</sub>ヘテロアルケニル、 C<sub>2-10</sub>ヘテロアルキニル、 C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、 3~14員のヘテロシクリル、 C<sub>6-14</sub>アリール、 および5~14員のヘテロアリールから選択され、あるいは2個のR<sup>b b</sup>基は接合して、3~14員のヘテロシクリルまたは5~14員のヘテロアリール環を形成し、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個のR<sup>d d</sup>基で独立に置換されており、

10

R<sup>c c</sup> はそれぞれの場合、独立に、水素、 C<sub>1-10</sub>アルキル、 C<sub>1-10</sub>ペルハロアルキル、 C<sub>2-10</sub>アルケニル、 C<sub>2-10</sub>アルキニル、 C<sub>1-10</sub>ヘテロアルキル、 C<sub>2-10</sub>ヘテロアルケニル、 C<sub>2-10</sub>ヘテロアルキニル、 C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、 3~14員のヘテロシクリル、 C<sub>6-14</sub>アリール、 および5~14員のヘテロアリールから選択され、あるいは2個のR<sup>c c</sup>基は接合して、3~14員のヘテロシクリルまたは5~14員のヘテロアリール環を形成し、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個のR<sup>d d</sup>基で独立に置換されており、

20

R<sup>d d</sup> はそれぞれの場合、独立に、ハロゲン、 - CN、 - NO<sub>2</sub>、 - N<sub>3</sub>、 - SO<sub>2</sub>H、 - SO<sub>3</sub>H、 - OH、 - OR<sup>e e</sup>、 - ON(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - N(R<sup>f f</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、 - N(OR<sup>e e</sup>)R<sup>f f</sup>、 - SH、 - SR<sup>e e</sup>、 - SSR<sup>e e</sup>、 - C(=O)R<sup>e e</sup>、 - CO<sub>2</sub>H、 - CO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - OC(=O)R<sup>e e</sup>、 - OCO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - C(=O)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - OC(=O)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - NR<sup>f f</sup>C(=O)R<sup>e e</sup>、 - NR<sup>f f</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - NR<sup>f f</sup>C(=O)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - C(=R<sup>f f</sup>)OR<sup>e e</sup>、 - OC(=NR<sup>f f</sup>)R<sup>e e</sup>、 - OC(=NR<sup>f f</sup>)OR<sup>e e</sup>、 - C(=NR<sup>f f</sup>)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - OC(=NR<sup>f f</sup>)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - NR<sup>f f</sup>C(=NR<sup>f f</sup>)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - NR<sup>f f</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - SO<sub>2</sub>N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - SO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - SO<sub>2</sub>OR<sup>e e</sup>、 - OSO<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - S(=O)R<sup>e e</sup>、 - Si(R<sup>e e</sup>)<sub>3</sub>、 - OSi(R<sup>e e</sup>)<sub>3</sub>、 - C(=S)N(R<sup>f f</sup>)<sub>2</sub>、 - C(=O)SR<sup>e e</sup>、 - C(=S)SR<sup>e e</sup>、 - SC(=S)SR<sup>e e</sup>、 - P(=O)<sub>2</sub>R<sup>e e</sup>、 - P(=O)(R<sup>e e</sup>)<sub>2</sub>、 - OP(=O)(R<sup>e e</sup>)<sub>2</sub>、 - OP(=O)(OR<sup>e e</sup>)<sub>2</sub>、 C<sub>1-6</sub>アルキル、 C<sub>1-6</sub>ペルハロアルキル、 C<sub>2-6</sub>アルケニル、 C<sub>2-6</sub>アルキニル、 C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、 C<sub>2-6</sub>ヘテロアルケニル、 C<sub>2-6</sub>ヘテロアルキニル、 C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、 3~10員のヘテロシクリル、 C<sub>6-10</sub>アリール、 5~10員のヘテロアリールから選択され、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個のR<sup>g g</sup>基で独立に置換されており、あるいは2個のジェミナルなR<sup>d d</sup>置換基は接合して、=Oまたは=Sを形成することができる、

30

40

R<sup>e e</sup> はそれぞれの場合、独立に、 C<sub>1-6</sub>アルキル、 C<sub>1-6</sub>ペルハロアルキル、 C<sub>2-6</sub>アルケニル、 C<sub>2-6</sub>アルキニル、 C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、 C<sub>2-6</sub>ヘテロアルケニル、 C<sub>2-6</sub>ヘテロアルキニル、 C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、 C<sub>6-10</sub>アリール、 3~10員のヘテロシクリル、 および3~10員のヘテロアリールから選択され、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2

50

個、3個、4個、または5個のR<sup>g g</sup>基で独立に置換されており、

R<sup>f f</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>ペルハロアルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>2-6</sub>アルキニル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>2-6</sub>ヘテロアルケニル、C<sub>2-6</sub>ヘテロアルキニル、C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、3~10員のヘテロシクリル、C<sub>6-10</sub>アリールおよび5~10員のヘテロアリールから選択され、あるいは2個のR<sup>f f</sup>基は接合して、3~14員のヘテロシクリルまたは5~14員のヘテロアリール環を形成し、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個のR<sup>g g</sup>基で独立に置換されており、

R<sup>g g</sup>はそれぞれの場合、独立に、ハロゲン、-CN、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>H、-SO<sub>3</sub>H、-OH、-OC<sub>1-6</sub>アルキル、-ON(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、-NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、-NH<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sup>+</sup>X<sup>-</sup>、-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>、-N(OC<sub>1-6</sub>アルキル)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-N(OH)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-NH(OH)、-SH、-SC<sub>1-6</sub>アルキル、-SS(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-C(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-OC(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-OCO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-OC(=O)NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-NHC(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-N(C<sub>1-6</sub>アルキル)C(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-NHCO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-NHC(=O)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-NHC(=O)NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-NHC(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=NH)O(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-OC(=NH)(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-OC(=NH)OC<sub>1-6</sub>アルキル、-C(=NH)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-C(=NH)NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-C(=NH)NH<sub>2</sub>、-OC(=NH)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-OC(NH)NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-OC(NH)NH<sub>2</sub>、-NHC(NH)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-SO<sub>2</sub>N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、-SO<sub>2</sub>OC<sub>1-6</sub>アルキル、-OSO<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、-SOC<sub>1-6</sub>アルキル、-Si(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>3</sub>、-OSi(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>3</sub>、-C(=S)N(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、C(=S)NH(C<sub>1-6</sub>アルキル)、C(=S)NH<sub>2</sub>、-C(=O)S(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-C(=S)SC<sub>1-6</sub>アルキル、-SC(=S)SC<sub>1-6</sub>アルキル、-P(=O)<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>アルキル)、-P(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-OP(=O)(C<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、-OP(=O)(OC<sub>1-6</sub>アルキル)<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>ペルハロアルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>2-6</sub>アルキニル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>2-6</sub>ヘテロアルケニル、C<sub>2-6</sub>ヘテロアルキニル、C<sub>3-10</sub>カルボシクリル、C<sub>6-10</sub>アリール、3~10員のヘテロシクリル、5~10員のヘテロアリールであり、あるいは2個のジェミナルなR<sup>g g</sup>置換基は接合して、=Oまたは=Sを形成することができ、式中、X<sup>-</sup>は、対イオンである。

#### 【0070】

本明細書において使用する場合、用語「ハロ」または「ハロゲン」は、フッ素(フルオロ、-F)、塩素(クロロ、-Cl)、臭素(ブロモ、-Br)、またはヨウ素(ヨード、-I)を指す。

#### 【0071】

ある特定の実施形態では、窒素原子上に存在する置換基は、窒素保護基である(また、本明細書において、「アミノ保護基」と称される)。窒素保護基には、これらに限定されないが、-OH、-OR<sup>a a</sup>、-N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、-C(=O)R<sup>a a</sup>、-C(=O)N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、-CO<sub>2</sub>R<sup>a a</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>a a</sup>、-C(=NR<sup>c c</sup>)R<sup>a a</sup>、-C(=NR<sup>c c</sup>)OR<sup>a a</sup>、-C(=NR<sup>c c</sup>)N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>c c</sup>)<sub>2</sub>、-

10

20

30

40

50

$\text{SO}_2\text{R}^{\text{c c}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{c c}}$ 、 $-\text{SOR}^{\text{a a}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{c c}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{c c}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{c c}}$ 、 $\text{C}_{1-10}$  アルキル (例えば、アラルキル、ヘテロアラルキル)、 $\text{C}_{2-10}$  アルケニル、 $\text{C}_{2-10}$  アルキニル、 $\text{C}_{1-10}$  ヘテロアルキル、 $\text{C}_{2-10}$  ヘテロアルケニル、 $\text{C}_{2-10}$  ヘテロアルキニル、 $\text{C}_{3-10}$  カルボシクリル、3~14員のヘテロシクリル、 $\text{C}_{6-14}$  アリール、および5~14員のヘテロアリール基が含まれ、各アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アラルキル、アリール、およびヘテロアリールは、0個、1個、2個、3個、4個、または5個の $\text{R}^{\text{d d}}$ 基で独立に置換されており、式中、 $\text{R}^{\text{a a}}$ 、 $\text{R}^{\text{b b}}$ 、 $\text{R}^{\text{c c}}$ および $\text{R}^{\text{d d}}$ は、本明細書に定義されている通りである。窒素保護基は、参照により本明細書中に組み込まれているProtecting Groups in Organic Synthesis, T. W. GreeneおよびP. G. M. Wuts、第3版、John Wiley & Sons、1999年に詳細に記載されているものを含む。

10

## 【0072】

例えば、窒素保護基、例えば、アミド基 (例えば、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{a a}}$ ) には、これらに限定されないが、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3-フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3-ピリジルカルボキサミド、N-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p-フェニルベンズアミド、o-ニトロフェニルアセトアミド (nitrophenylacetamide)、o-ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、(N'-ジチオベンジルオキシアシルアミノ)アセトアミド、3-(p-ヒドロキシフェニル)プロパンアミド、3-(o-ニトロフェニル)プロパンアミド、2-メチル-2-(o-ニトロフェノキシ)プロパンアミド、2-メチル-2-(o-フェニルアゾフェノキシ)プロパンアミド、4-クロロブタンアミド、3-メチル-3-ニトロブタンアミド、o-ニトロシナムイド (nitrocinnamide)、N-アセチルメチオニン誘導体、o-ニトロベンズアミドおよびo-(ベンゾイルオキシメチル)ベンズアミドが含まれる。

20

## 【0073】

窒素保護基、例えば、カルバメート基 (例えば、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{a a}}$ ) には、これらに限定されないが、メチルカルバメート、エチルカルバメート (carbamate)、9-フルオレニルメチルカルバメート (Fmoc)、9-(2-スルホ)フルオレニルメチルカルバメート、9-(2,7-ジブromo)フルオロエニルメチルカルバメート、2,7-ジ-t-ブチル-[9-(10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサントール)]メチルカルバメート (DBD-Tmoc)、4-メトキシフェナシルカルバメート (Phenoc)、2,2,2-トリクロロエチルカルバメート (Troc)、2-トリメチルシリルエチルカルバメート (Teoc)、2-フェニルエチルカルバメート (hZ)、1-(1-アダマンチル)-1-メチルエチルカルバメート (Adpoc)、1,1-ジメチル-2-ハロエチルカルバメート、1,1-ジメチル-2,2-ジブromoエチルカルバメート (DB-t-BOC)、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルバメート (TCBOC)、1-メチル-1-(4-ピフェニル)エチルカルバメート (Bpoc)、1-(3,5-ジ-t-ブチルフェニル)-1-メチルエチルカルバメート (t-Bumeoc)、2-(2'-および4'-ピリジル)エチルカルバメート (Pyoc)、2-(N,N-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバメート、t-ブチルカルバメート (BOC)、1-アダマンチルカルバメート (Adoc)、ビニルカルバメート (Voc)、アリルカルバメート (Alloc)、1-イソプロピルアリルカルバメート (Ipaoc)、シナミルカルバメート (Coc)、4-ニトロシナミルカルバメート (Noc)、8-キノリルカルバメート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート (Cbz)、p-メトキシベンジルカルバメート (Moz)、p-ニトロベンジル (nitrobenzyl)カルバメート、p-ブromoベンジルカルバメート、p-クロロベンジルカルバメート、2,4-ジクロロベンジルカルバメート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバメート (MsZ)、9-アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、2-メ

30

40

50



チルチオエチルカルバメート、2 - メチルスルホニルエチルカルバメート、2 - ( p - トルエンスルホニル ) エチルカルバメート、[ 2 - ( 1 , 3 - ジチアニル ) ] メチルカルバメート ( D m o c )、4 - メチルチオフェニルカルバメート ( M t p c )、2 , 4 - ジメチルチオフェニルカルバメート ( B m p c )、2 - ホスホニオエチルカルバメート ( P e o c )、2 - トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート ( P p o c )、1 , 1 - ジメチル - 2 - シアノエチルカルバメート、m - クロロ - p - アシルオキシベンジルカルバメート、p - ( ジヒドロキシボリル ) ベンジルカルバメート、5 - ベンゾイソキサゾリルメチルカルバメート、2 - ( トリフルオロメチル ) - 6 - クロモニルメチルカルバメート ( T c r o c )、m - ニトロフェニルカルバメート、3 , 5 - ジメトキシベンジルカルバメート、o - ニトロベンジルカルバメート、3 , 4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジルカルバメート、フェニル ( o - ニトロフェニル ) メチルカルバメート、t - アミルカルバメート、S - ベンジルチオカルバメート、p - シアノベンジルカルバメート、シクロブチルカルバメート、シクロヘキシルカルバメート、シクロペンチルカルバメート、シクロプロピルメチルカルバメート、p - デシルオキシベンジルカルバメート、2 , 2 - ジメトキシアシルビニルカルバメート、o - ( N , N - ジメチルカルボキサミド ) ベンジルカルバメート、1 , 1 - ジメチル - 3 - ( N , N - ジメチルカルボキサミド ) プロピルカルバメート、1 , 1 - ジメチルプロピニルカルバメート、ジ ( 2 - ピリジル ) メチルカルバメート、2 - フラニルメチルカルバメート、2 - ヨードエチルカルバメート、イソボルニル ( isoborynl ) カルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチニルカルバメート、p - ( p ' - メトキシフェニルアゾ ) ベンジルカルバメート、1 - メチルシクロブチルカルバメート、1 - メチルシクロヘキシルカルバメート、1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチルカルバメート、1 - メチル - 1 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチルカルバメート、1 - メチル - 1 - ( p - フェニルアゾフェニル ) エチルカルバメート、1 - メチル - 1 - フェニルエチルカルバメート、1 - メチル - 1 - ( 4 - ピリジル ) エチルカルバメート、フェニルカルバメート、p - ( フェニルアゾ ) ベンジルカルバメート、2 , 4 , 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバメート、4 - ( トリメチルアンモニウム ) ベンジルカルバメート、および 2 , 4 , 6 - トリメチルベンジルカルバメートが含まれる。

#### 【 0 0 7 4 】

窒素保護基、例えば、スルホンアミド基 ( 例えば、 $-S(=O)_2R^{a,a}$  ) には、これらに限定されないが、p - トルエンスルホンアミド ( T s )、ベンゼンスルホンアミド、2 , 3 , 6 , - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M t r )、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼンスルホンアミド ( M t b )、2 , 6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( P m e )、2 , 3 , 5 , 6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M t e )、4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M b s )、2 , 4 , 6 - トリメチルベンゼンスルホンアミド ( M t s )、2 , 6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド ( i M d s )、2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホンアミド ( P m c )、メタンスルホンアミド ( M s )、- トリメチルシリルエタンスルホンアミド ( S E S )、9 - アントラセンスルホンアミド、4 - ( 4 ' , 8 ' - ジメトキシナフチルメチル ) ベンゼンスルホンアミド ( D N M B S )、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド、およびフェナシルスルホンアミドが含まれる。

#### 【 0 0 7 5 】

他の窒素保護基には、これらに限定されないが、フェノチアジニル - ( 1 0 ) - アシル誘導体、N ' - p - トルエンスルホニルアミノアシル誘導体、N ' - フェニルアミノチオアシル誘導体、N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、N - アセチルメチオニン誘導体、4 , 5 - ジフェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン、N - フタルイミド、N - ジチアスクシンイミド ( D t s )、N - 2 , 3 - ジフェニルマレイミド、N - 2 , 5 - ジメチルピロール、N - 1 , 1 , 4 , 4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加体 ( S T A B A S E )、5 - 置換 1 , 3 - ジメチル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、5 - 置換 1 , 3 - ジベンジル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、1

10

20

30

40

50

- 置換 3, 5 - ジニトロ - 4 - ピリドン、N - メチルアミン、N - アリルアミン、N - [ 2 - (トリメチルシリル)エトキシ]メチルアミン (SEM)、N - 3 - アセトキシプロピルアミン、N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン (pyrrolin) - 3 - イル)アミン、第四級アンモニウム塩、N - ベンジルアミン、N - ジ(4 - メトキシフェニル)メチルアミン、N - 5 - ジベンゾスベリルアミン、N - トリフェニルメチルアミン (Tr)、N - [(4 - メトキシフェニル)ジフェニルメチル]アミン (MMTr)、N - 9 - フェニルフルオレニルアミン (PhF)、N - 2, 7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレンアミン、N - フェロセニルメチルアミノ (Fcm)、N - 2 - ピコリルアミノ N' - オキシド、N - 1, 1 - ジメチルチオメチレンアミン、N - ベンジリデンアミン、N - p - メトキシベンジリデンアミン、N - ジフェニルメチレンアミン、N - [(2 - ピリジル)メチル]メチレンアミン、N - (N', N' - ジメチルアミノメチレン)アミン、N, N' - イソプロピリデンジアミン、N - p - ニトロベンジリデンアミン、N - サリチリデンアミン、N - 5 - クロロサリチリデンアミン、N - (5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル)フェニルメチレンアミン、N - シクロヘキシリデンアミン、N - (5, 5 - ジメチル - 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル)アミン、N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン酸誘導体、N - [フェニル(ペンタアシルクロムまたはタングステン)アシル]アミン、N - 銅キレート、N - 亜鉛キレート、N - ニトロアミン、N - ニトロソアミン、アミン N - オキシド、ジフェニルホスフィンアミド (Dpp)、ジメチルチオホスフィンアミド (Mpt)、ジフェニルチオホスフィンアミド (Ppt)、ジアルキルホスホロアミデート、ジベンジルホスホロアミデート、ジフェニルホスホロアミデート、ベンゼンスルフェンアミド、o - ニトロベンゼンスルフェンアミド (Nps)、2, 4 - ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、および 3 - ニトロピリジンスルフェンアミド (Npys) が含まれる。

#### 【0076】

ある特定の実施形態では、酸素原子上に存在する置換基は、酸素保護基である(また、本明細書において「ヒドロキシル保護基」と称される)。酸素保護基には、これらに限定されないが、 $-R^{a a}$ 、 $-N(R^{b b})_2$ 、 $-C(=O)SR^{a a}$ 、 $-C(=O)R^{a a}$ 、 $-CO_2R^{a a}$ 、 $-C(=O)N(R^{b b})_2$ 、 $-C(=NR^{b b})R^{a a}$ 、 $-C(=NR^{b b})OR^{a a}$ 、 $-C(=NR^{b b})N(R^{b b})_2$ 、 $-S(=O)R^{a a}$ 、 $-SO_2R^{a a}$ 、 $-Si(R^{a a})_3$ 、 $-P(R^{c c})_2$ 、 $-P(R^{c c})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{a a}$ 、 $-P(=O)(R^{a a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{c c})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{b b})_2$ 、および  $-P(=O)(NR^{b b})_2$  が含まれ、式中、 $R^{a a}$ 、 $R^{b b}$ 、および  $R^{c c}$  は、本明細書に定義されている通りである。酸素保護基は、参照により本明細書中に組み込まれている Protecting Groups in Organic Synthesis、T. W. Greene および P. G. M. Wuts、第 3 版、John Wiley & Sons、1999 年に詳細に記載されているものを含む。

#### 【0077】

例示的な酸素保護基には、これらに限定されないが、メチル、メトキシメチル (MOM)、メチルチオメチル (MTM)、t - ブチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル (SMOM)、ベンジルオキシメチル (BOM)、p - メトキシベンジルオキシメチル (PMBM)、(4 - メトキシフェノキシ)メチル (p - AOM)、グアヤコールメチル (GUM)、t - ブトキシメチル、4 - ペンテニルオキシメチル (POM)、シロキシメチル、2 - メトキシエトキシメチル (MEM)、2, 2, 2 - トリクロロエトキシメチル、ビス(2 - クロロエトキシ)メチル、2 - (トリメチルシリル)エトキシメチル (SEMOR)、テトラヒドロピラニル (THP)、3 - プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1 - メトキシシクロヘキシル、4 - メトキシテトラヒドロピラニル (MTHP)、4 - メトキシテトラヒドロチオピラニル、4 - メトキシテトラヒドロチオピラニル S、S - ジオキシド、1 - [(2 - クロロ - 4 - メチル)フェニル] - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル (CTMP)、1, 4 - ジオキサソ - 2 - イル

、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a - オクタヒドロ - 7, 8, 8 - トリメチル - 4, 7 - メタノベンゾフラン - 2 - イル、1 - エトキシエチル、1 - (2 - クロロエトキシ) エチル、1 - メチル - 1 - メトキシエチル、1 - メチル - 1 - ベンジルオキシエチル、1 - メチル - 1 - ベンジルオキシ - 2 - フルオロエチル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、2 - トリメチルシリルエチル、2 - (フェニルセレニル) エチル、t - ブチル、アリル、p - クロロフェニル、p - メトキシフェニル、2, 4 - ジニトロフェニル、ベンジル (Bn)、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、o - ニトロベンジル、p - ニトロベンジル、p - ハロベンジル、2, 6 - ジクロロベンジル、p - シアノベンジル、p - フェニルベンジル、2 - ピコリル、4 - ピコリル、3 - メチル - 2 - ピコリル N - オキシド、ジフェニルメチル、p, p' - ジニトロベンズヒドリル、5 - ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、 - ナフチルジフェニルメチル、p - メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ (p - メトキシフェニル) フェニルメチル、トリ (p - メトキシフェニル) メチル、4 - (4' - ブロモフェナシルオキシフェニル) ジフェニルメチル、4, 4', 4'' - トリス (4, 5 - ジクロロフタルイミドフェニル) メチル、4, 4', 4'' - トリス (レプリノイルオキシフェニル) メチル、4, 4', 4'' - トリス (ベンゾイルオキシフェニル) メチル、3 - (イミダゾール - 1 - イル) ビス (4', 4'' - ジメトキシフェニル) メチル、1, 1 - ビス (4 - メトキシフェニル) - 1' - ピレニルメチル、9 - アントリル、9 - (9 - フェニル) キサンテニル、9 - (9 - フェニル - 10 - オキソ) アントリル、1, 3 - ベンゾジチオラン - 2 - イル、ベンゾイソチアゾリル S, S - ジオキシド、トリメチルシリル (TMS)、トリエチルシリル (TES)、トリスプロピルシリル (TIPS)、ジメチルイソプロピルシリル (IPDMS)、ジエチルイソプロピルシリル (DEIPS)、ジメチルテキシルシリル、t - ブチルジメチルシリル (TBDMS)、t - ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリベンジルシリル、トリ - p - キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル (DPMS)、t - ブチルメトキシフェニルシリル (TBMPMS)、ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、p - クロロフェノキシアセテート、3 - フェニルプロピオネート、4 - オキソペンタノエート (レプリネート)、4, 4 - (エチレンジチオ) ペンタノエート (レプリノイルジチオアセタール)、ピバレート (pivaloate)、アダマントエート (adamantoate)、クロトネート、4 - メトキシクロトネート、ベンゾエート、p - フェニルベンゾエート、2, 4, 6 - トリメチルベンゾエート (メシトエート (mesitoate))、メチルカーボネート、9 - フルオレニルメチルカーボネート (Fmoc)、エチルカーボネート、2, 2, 2 - トリクロロエチルカーボネート (Troc)、2 - (トリメチルシリル) エチルカーボネート (TMSEC)、2 - (フェニルスルホニル) エチルカーボネート (Psec)、2 - (トリフェニルホスホニオ) エチルカーボネート (Peoc)、イソブチルカーボネート、ピニルカーボネート、アリルカーボネート、t - ブチルカーボネート (BOC)、p - ニトロフェニルカーボネート、ベンジルカーボネート、p - メトキシベンジルカーボネート、3, 4 - ジメトキシベンジルカーボネート、o - ニトロベンジルカーボネート、p - ニトロベンジルカーボネート、S - ベンジルチオカーボネート、4 - エトキシ - 1 - ナフチル (naphthyl) カーボネート、メチルジチオカーボネート、2 - ヨードベンゾエート、4 - アジドブチレート、4 - ニトロ - 4 - メチルペンタノエート、o - (ジブロモメチル) ベンゾエート、2 - ホルミルベンゼンスルホネート、2 - (メチルチオメトキシ) エチル、4 - (メチルチオメトキシ) ブチレート、2 - (メチルチオメトキシメチル) ベンゾエート、2, 6 - ジクロロ - 4 - メチルフェノキシアセテート、2, 6 - ジクロロ - 4 - (1, 1, 3, 3 - テトラメチルブチル) フェノキシアセテート、2, 4 - ビス (1, 1 - ジメチルプロピル) フェノキシアセテート、クロロジフェニルアセテート、イソブチレート、モノスクシネート (monosuccinoate)、(E) - 2 - メチル - 2 - プテノエート、o - (メトキシアシル) ベンゾエート、 - ナフトエート、ニトレート、アルキル N, N, N', N' - テト

10

20

30

40

50

ラメチルホスホロジアミデート、アルキルN - フェニルカルバメート、ボレート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル2, 4 - ジニトロフェニルスルフェネート、スルフェート、メタンスルホネート(メシレート)、ベンジルスルホネート、およびトシレート(Ts)が含まれる。

【0078】

ある特定の実施形態では、硫黄原子上に存在する置換基は、硫黄保護基である(また、「チオール保護基」と称される)。硫黄保護基には、これらに限定されないが、 $-R^{a a}$ 、 $-N(R^{b b})_2$ 、 $-C(=O)SR^{a a}$ 、 $-C(=O)R^{a a}$ 、 $-CO_2R^{a a}$ 、 $-C(=O)N(R^{b b})_2$ 、 $-C(=NR^{b b})R^{a a}$ 、 $-C(=NR^{b b})OR^{a a}$ 、 $-C(=NR^{b b})N(R^{b b})_2$ 、 $-S(=O)R^{a a}$ 、 $-SO_2R^{a a}$ 、 $-Si(R^{a a})_3$ 、 $-P(R^{c c})_2$ 、 $-P(R^{c c})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{a a}$ 、 $-P(=O)(R^{a a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{c c})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{b b})_2$ 、および $-P(=O)(NR^{b b})_2$ が含まれ、式中、 $R^{a a}$ 、 $R^{b b}$ 、および $R^{e e}$ は、本明細書に定義されている通りである。硫黄保護基は、参照により本明細書中に組み込まれているProtecting Groups in Organic Synthesis、T. W. GreeneおよびP. G. M. Wuts、第3版、John Wiley & Sons、1999年に詳細に記載されているものを含む。

【0079】

本明細書において使用する場合、2つの実体が互いに「コンジュゲート」または「ライゲーション」されているとき、これらは直接または間接の共有結合的または非共有結合的相互作用によって連結されている。ある特定の実施形態では、会合は、共有結合である。他の実施形態では、会合は、非共有結合である。非共有結合的相互作用は、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水的相互作用、磁性相互作用、静電相互作用などを含む。ある特定の実施形態では、2つの実体は、任意選択でリンカー基を介して共有結合的に接続している。

【0080】

本明細書において使用する場合、用語「塩」は、正しい医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などを伴わずにヒトおよび下等動物の組織と接触する使用に適したこれらの塩を指し、かつ合理的な利益/リスク比と釣り合っている、薬学的に許容される塩を含めたありとあらゆる塩を指す(以下を参照されたい。Bergeらは、薬学的に許容される塩について詳細にJ. Pharmaceutical Sciences(1977年)66巻:1~19頁において記載している)。薬学的に許容される無毒性の酸性塩の例は、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸および過塩素酸と共に、または有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、またはマロン酸と共に、あるいは当技術分野で使用される他の方法、例えば、イオン交換を使用することによって形成される、アミノ基の塩である。他の薬学的に許容される塩には、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが含まれる。適当な塩基に由来する薬学的に許容される塩は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩および $N^+(C_{1-4} \text{アルキル})_4$ 塩を含む。代表的なアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらなる薬学的に許容される塩には、適切な場合、対イオン、例えば、ハロゲン化物イオン、水酸化物

イオン、カルボン酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、硝酸イオン、低級アルキルスルホネートイオン、およびアリアルルスルホネートイオンを使用して形成される、無毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンが含まれる。

【0081】

投与を企図する「対象」には、これらに限定されないが、ヒト（すなわち、任意の年齢群の男性または女性、例えば、小児対象（例えば、乳児、児童、青年期）または成人対象（例えば、若年成人、中年成人、または高齢成人））ならびに/あるいは他の非ヒト動物、例えば、哺乳動物（例えば、霊長類（例えば、カニクイザル、アカゲザル）；商業的に関連性のある哺乳動物、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、および/またはイヌ）ならびに鳥（例えば、商業的に関連性のある鳥、例えば、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、および/またはシチメンチョウ）が含まれる。ある特定の実施形態では、動物は、哺乳動物である。動物は、雄性または雌性であり、任意の発達段階のものでよい。非ヒト動物は、トランスジェニック動物であり得る。

10

【0082】

本明細書において使用する場合、用語「状態」、「疾患」および「障害」は、互換的に使用される。

【0083】

本明細書において使用する場合、「阻害」、「阻害すること」、「阻害する」および「阻害剤」などは、特定の生物学的プロセスの活性を低減させるか、遅延させるか、停止させるか、または防止する化合物の能力を指す。

20

【0084】

本明細書において使用する場合、用語「細胞」は、任意の属または種の真核細胞および原核細胞を包含することを意味し、哺乳動物細胞が特に目的である。「細胞」はまた、正常細胞および異常細胞の両方、例えば、がん性細胞を包含することを意味する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞は、生細胞である。

【0085】

本明細書において使用する場合、用語「試料」は、任意の化学的試料または生体試料を含む。化学的試料は、任意の化学的混合物または化合物を指す。生体試料は、これらに限定されないが、細胞培養物またはその抽出物；動物（例えば、哺乳動物）から得た生検材料、またはその抽出物；および血液、唾液、尿、糞便、精液、涙、もしくは他の体液、またはそれらの抽出物を含む。例えば、用語「生体試料」は、単細胞微生物（例えば、細菌および酵母）ならびに多細胞生物を含めた任意の生きている生物（例えば、植物および動物、例えば、脊椎動物または哺乳動物、特に、健康なもしくは明らかに健康なヒト対象、または診断もしくは研究される状態もしくは疾患に冒されているヒト患者）から得られるか、これらによって排泄されるか、またはこれらによって分泌される、任意の固体または液体試料を指す。生体試料は、固体材料、例えば、組織、細胞、細胞ペレット、細胞抽出物、細胞ホモジネート、もしくは細胞画分；または生検材料、または体液を含めた任意の形態でよい。体液は、任意の部位（例えば、血液、唾液（もしくは口腔内頬側細胞を含有する口内洗浄液）、涙、血漿、血清、尿、胆汁、脳脊髄液、羊水、腹水、および胸水、またはそこからの細胞、眼房水もしくは硝子体液、または任意の分泌液）、漏出液、浸出液（例えば、膿瘍、または感染もしくは炎症の任意の他の部位から得た液体）、あるいは関節（例えば、正常な関節、または疾患、例えば、関節リウマチ、骨関節炎、痛風もしくは敗血症性関節炎に冒された関節）から得た液体から得ることができ、生体試料は、任意の器官もしくは組織（生検もしくは剖検材料を含めた）から得ることができ、あるいは細胞（初代細胞もしくは培養細胞）または任意の細胞、組織もしくは器官によって条件調整される媒体を含み得る。生体試料はまた、組織のセクション、例えば、組織学的目的のために採取された凍結したセクションを含み得る。生体試料はまた、細胞または組織ホモジネートの部分的または完全な分画によって生じたタンパク質、脂質、炭水化物および核酸を含めた生物学的分子の混合物を含む。試料は好ましくはヒト対象から採取されるが、生体試料は、任意の動物、植物、細菌、ウイルス、酵母などからでよい。動物という用語は、

30

40

50

本明細書において使用する場合、例えば、哺乳動物、鳥、爬虫類、両生類、魚、虫および単細胞を含めた、任意の発達段階のヒトならびに非ヒト動物を指す。細胞培養物および生組織試料は、複数の動物であると考えられる。特定の例示的な実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、またはブタ）である。動物は、トランスジェニック動物またはヒトクローンであり得る。必要に応じて、生体試料は、予備的分離技術を含めた予備的加工に供し得る。

【0086】

用語「生理学的条件」は、生細胞と適合性のこれらの条件、例えば、主に、生細胞と適合性である温度、pH、塩分などの水性条件を包含することを意味する。

10

【0087】

本開示は、新規な一連の反応性標識化合物の設計および化学合成に基づいている。化合物は、細胞環境に適している緑色を発光するBODIPYスカフォールドを含有するアジド-BODIPY化合物でよい。BODIPYスカフォールドは、その魅力的な合成および蛍光性フィーチャのために出発モジュールとして使用される。BODIPYは8位において容易に修飾される。この位置におけるアリアル化は、アリアル部分およびBODIPYコアがねじれており、コンジュゲーションが脱カップリングしているため吸収および発光波長に対して実質的な影響を有さない。

【0088】

本明細書に記載されているのは、触媒の存在下でアルキン含有分子とアジド-アルキン環化付加(AAC)を受け、分子の検出を促進する増強された蛍光を示すトリアゾリル生成物を形成する、アジド-BODIPY化合物である。アジド-BODIPY化合物は、洗浄プロセスを伴わない細胞イメージングにおける進歩を表し、SDS-PAGE後に細胞ライセートからのアルキントグ付き糖タンパク質の直接のゲル内検出に適用可能である。

20

【0089】

反応性標識化合物はまた、シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブでよい。シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブは、クマリン部分に連結したシクロオクチンをさらに含むことができる。また、本明細書に記載されているのは、触媒の存在下でアジド含有分子と共にアジド-アルキン環化付加(AAC)を受け、分子の検出を促進する増強された蛍光を示すトリアゾリル生成物を形成させる、シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブ化合物である。

30

【0090】

本明細書に記載されているのは、生細胞中のアジド含有複合糖質およびアルキニル含有複合糖質をイメージングするためのアジド-BODIPYおよびシクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブの両方を使用する方法である。

【0091】

本明細書に記載されているのは、酵素の活性部位へのコンジュゲーションのための化合物、および前記化合物を使用する方法である。いくつかの実施形態では、酵素は、シアリダーゼ酵素である。いくつかの実施形態では、化合物は、アルキニル含有化合物である。いくつかの実施形態では、化合物は、シアリダーゼ酵素の活性部位と共有結合を形成する。

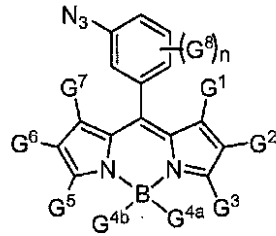
40

アジド-BODIPY化合物

【0092】

アジド-BODIPY化合物は、式(I)：

## 【化5】



(I)

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物であり、式中、  
 $G^1$ 、 $G^2$ 、 $G^3$ 、 $G^5$ 、 $G^6$ 、 $G^7$  および  $G^8$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意  
 選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルケニル  
 、任意選択で置換されている  $C_{1-6}$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、  
 任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、  
 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  であり、

$R$  はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で  
 置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換され  
 ているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されてい  
 るアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、  
 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  から独立に選択され、

各  $R^A$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されて  
 いるアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテ  
 ロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各  $R^B$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されて  
 いるアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテ  
 ロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2  
 個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

$G^{4a}$  および  $G^{4b}$  はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリールオキ  
 シ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリー  
 ルオキシのアリール基およびアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールの  
 いずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の  
 炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の  
 炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキ  
 ル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリー  
 ルオキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個も  
 しくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、  
 アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アル  
 キル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはク  
 ロロであり、

$n$  は、0、1、2、3、または4である。

## 【0093】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^1$  は、水素、ハロゲン、任意選択で  
 置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で  
 置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換  
 されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2O$

10

20

30

40

50

$R^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

#### 【0094】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^2$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒にあって



、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^2$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^2$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^2$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

【0095】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^3$  は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH_2SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $H$  である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $-OH$  である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $-OCH_3$  または  $-OC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $-N(R^B)_2$  であり、式中、 $R^B$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒に、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^3$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

【0096】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^5$  は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH_2SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^5$  は、 $H$  である。ある特定の実施形態では、 $G^5$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^5$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^5$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^5$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシク

10

20

30

40

50

リル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^5$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

10

## 【0097】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^6$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $H$ である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、メチル、エチル、または $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^6$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

20

30

40

## 【0098】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^7$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2O$

50

$R^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒に、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^7$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

#### 【0099】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^8$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^8$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒に、複素環を形成する。

、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

【0100】

ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている炭素環または複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている5員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている6員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されているフェニルを形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、非置換フェニルを形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、またはOの1個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5員の複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、およびOの群からそれぞれ独立に選択される2個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5員の複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、またはOの1個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている6員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、およびOからなる群から各々独立に選択される2個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている6員の炭素環を形成する。

10

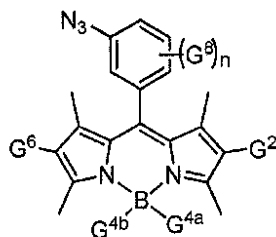
20

【0101】

いくつかの実施形態では、 $G^1$ 、 $G^3$ 、 $G^5$  および  $G^7$  の少なくとも2つは、 $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ 、 $G^3$ 、 $G^5$  および  $G^7$  の少なくとも2つは、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。いくつかの実施形態では、 $G^1$ 、 $G^3$ 、 $G^5$  および  $G^7$  のそれぞれは、 $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ 、 $G^3$ 、 $G^5$  および  $G^7$  のそれぞれは、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ 、 $G^3$ 、 $G^5$  および  $G^7$  のそれぞれは、メチルである。ある特定の実施形態では、本開示は、式 (II) の化合物：

30

【化6】



40

(II)

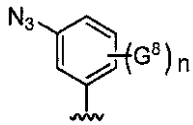
またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物を対象とし、式中、 $G^2$ 、 $G^{4a}$ 、 $G^{4b}$ 、 $G^6$ 、 $G^8$  および  $n$  は、本明細書に記載の通りである。

【0102】

ある特定の実施形態では、

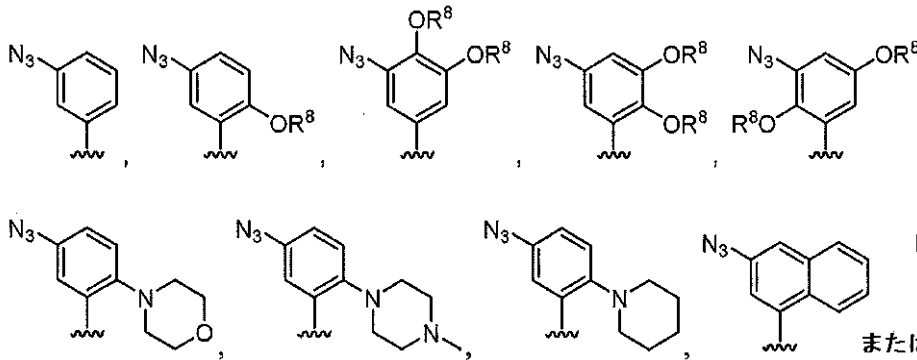
50

【化7】



は、式：

【化8】



10

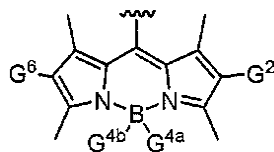
のものである。本明細書において使用する場合、R<sup>8</sup> はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、または酸素保護基である。ある特定の実施形態では、R<sup>8</sup> は、水素である。ある特定の実施形態では、R<sup>8</sup> は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。ある特定の実施形態では、R<sup>8</sup> は、メチルまたはエチルである。ある特定の実施形態では、R<sup>8</sup> は、酸素保護基である。

20

【0103】

ある特定の実施形態では、

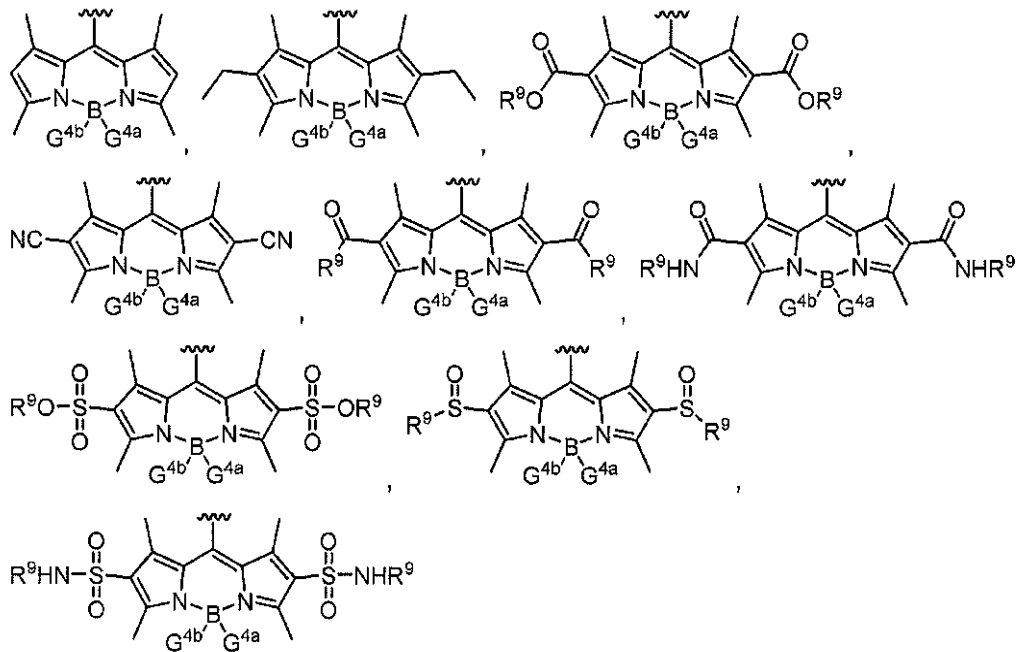
【化9】



30

は、式：

## 【化10】



10

のものである。本明細書において使用する場合、 $R^9$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $R^9$  は、水素である。ある特定の実施形態では、 $R^9$  は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $R^9$  は、メチルまたはエチルである。ある特定の実施形態では、 $R^9$  は、酸素保護基である。 $G^{4a}$  および  $G^{4b}$  はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリールオキシ、またはアルキニルである。

20

## 【0104】

ある特定の実施形態では、置換基は、化合物の光学異性および/または立体異性をもたらし得る。化合物の塩、溶媒和物、水和物、およびプロドラッグ形態はまた目的のものである。全てのこのような形態は、本開示によって包含される。このように、本明細書に記載されている化合物は、その薬学的に許容される塩、溶媒和物、水和物、プロドラッグ、および異性体を含めた、その塩、溶媒和物、水和物、プロドラッグ、および異性体形態を含む。ある特定の実施形態では、化合物は、薬学的活性誘導体へと代謝し得る。

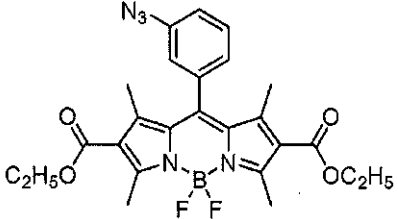
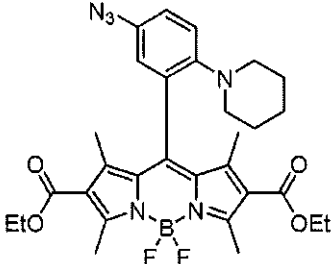
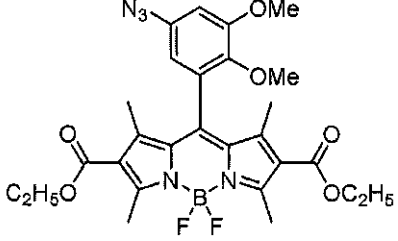
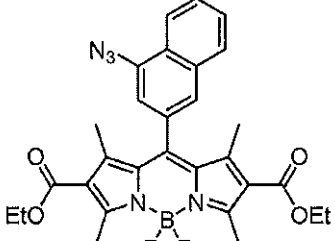
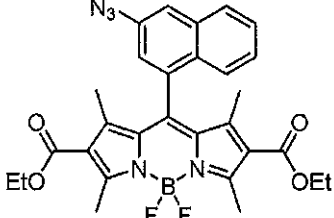
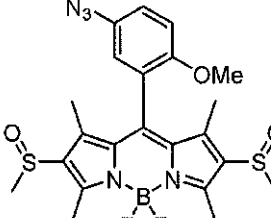
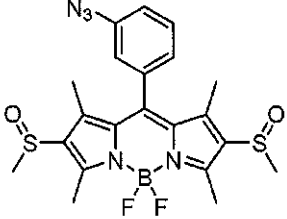
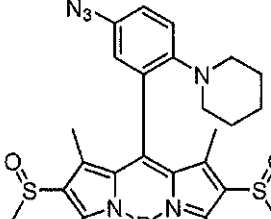
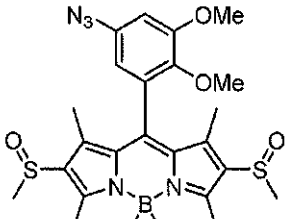
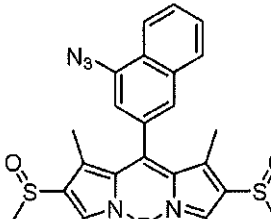
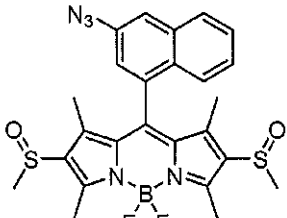
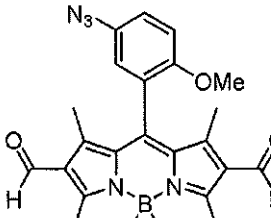
30

## 【0105】

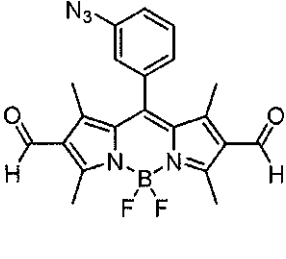
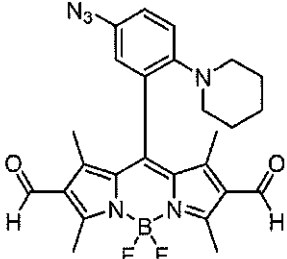
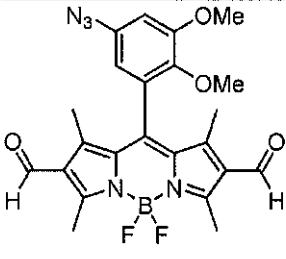
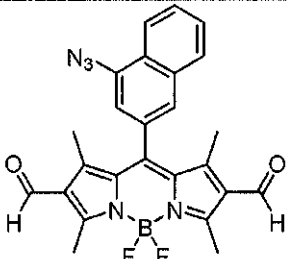
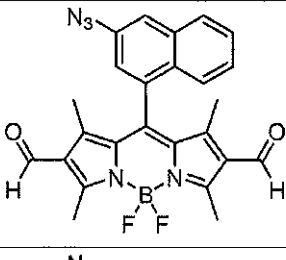
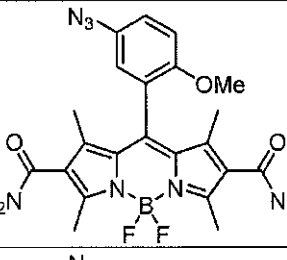
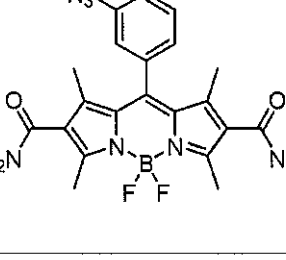
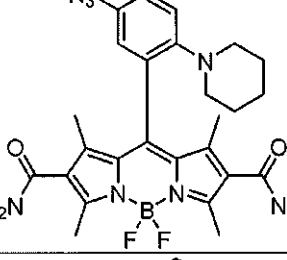
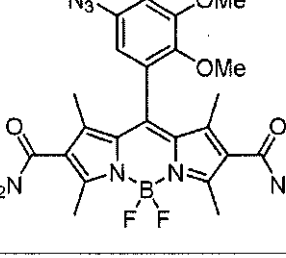
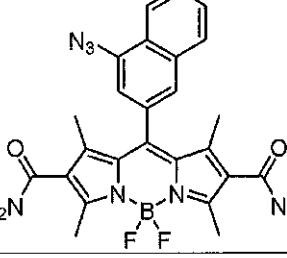
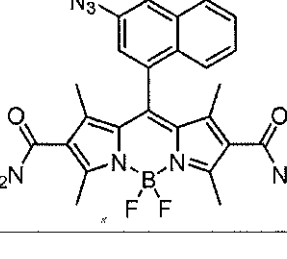
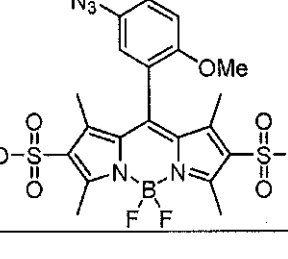
式(I)および(II)の例示的な化合物を、表1において示す。

【表 1 - 1】

表1. 式(I)および(II)の例示的な化合物。

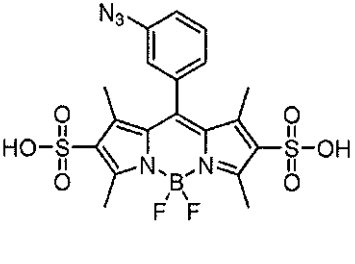
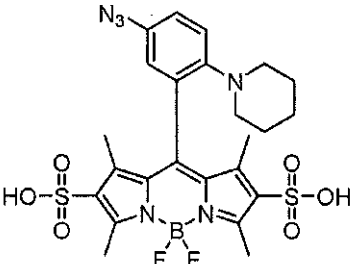
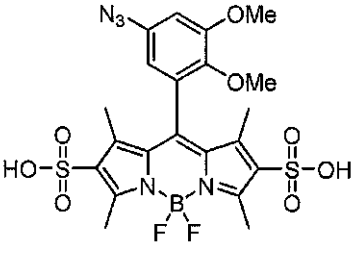
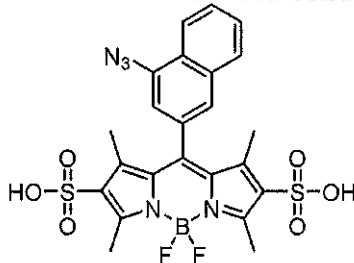
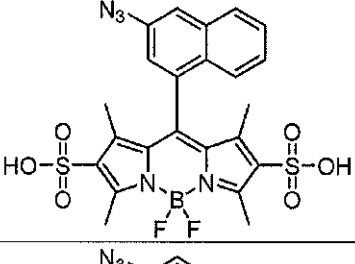
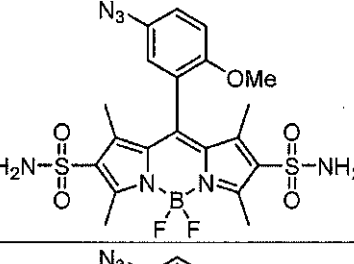
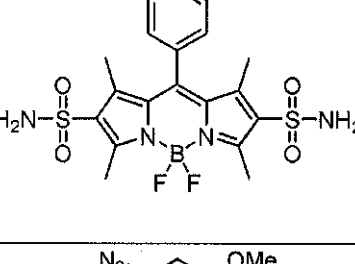
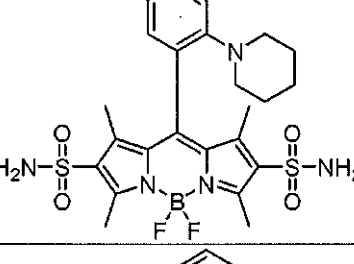
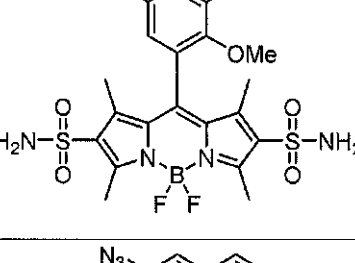
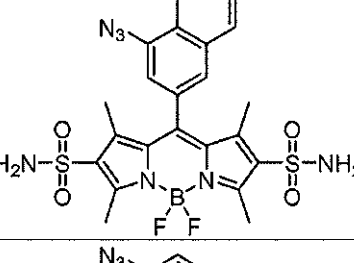
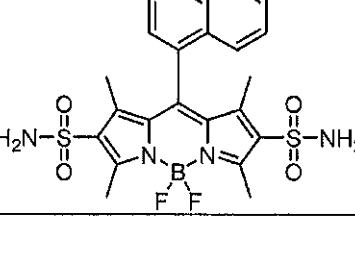
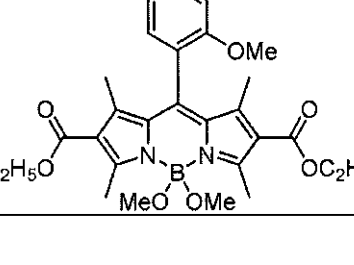
		10
		20
		30
		40
		
		

【表 1 - 2】

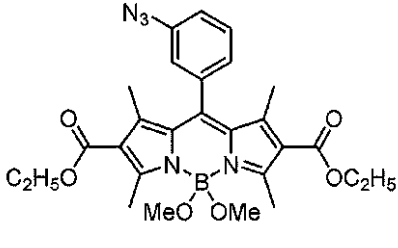
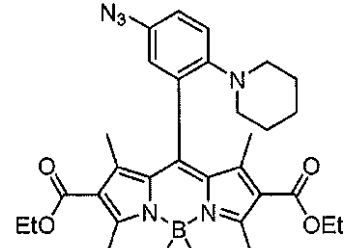
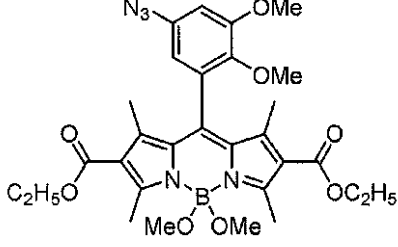
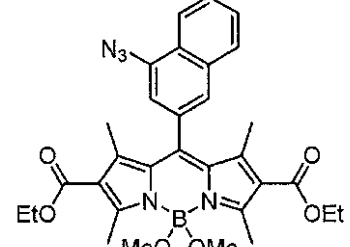
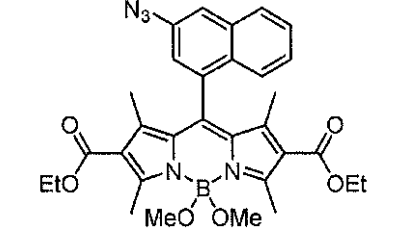
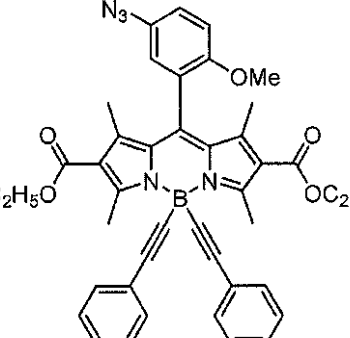
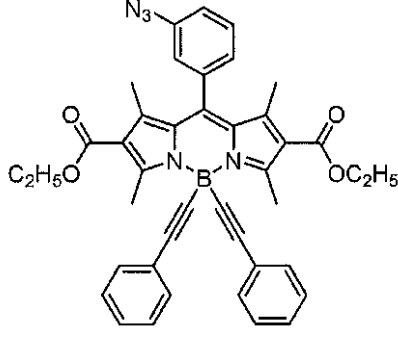
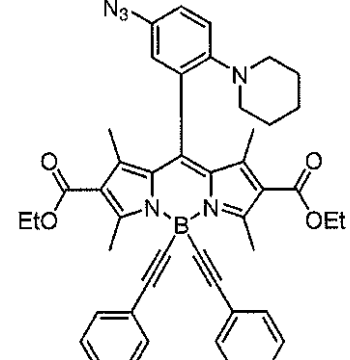
		
		10
		20
		
		30
		40



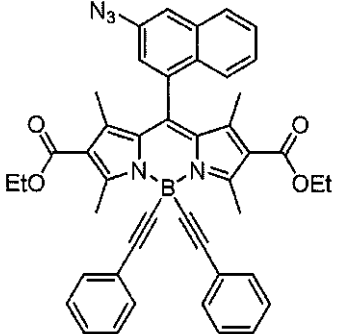
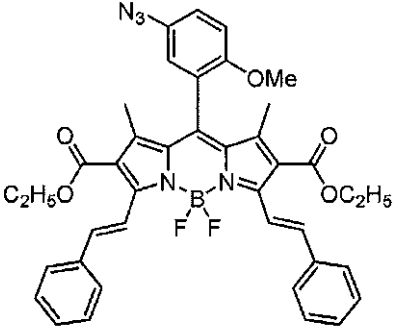
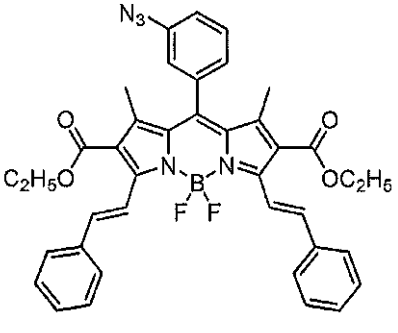
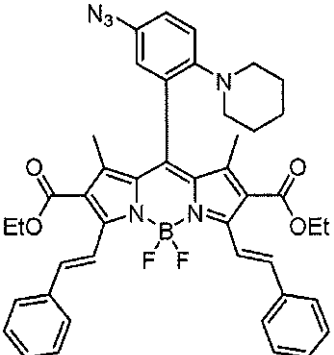
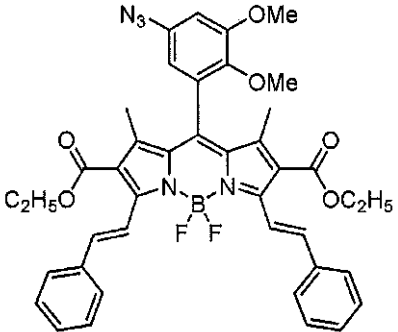
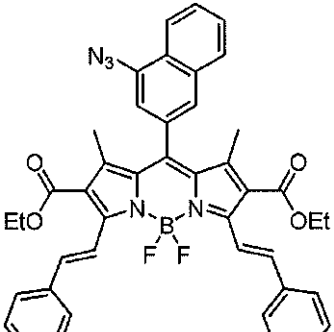
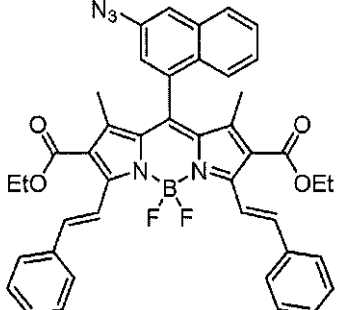
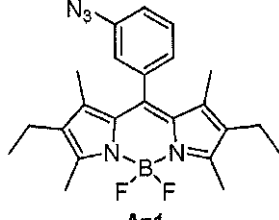
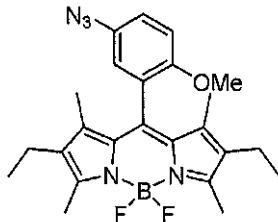
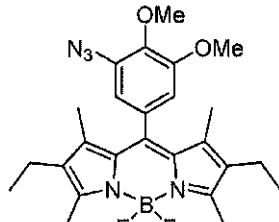
【表 1 - 3】

		
		10
		20
		
		30
		40

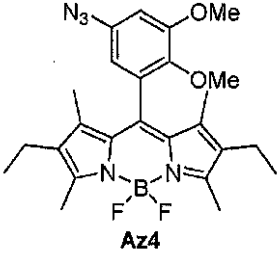
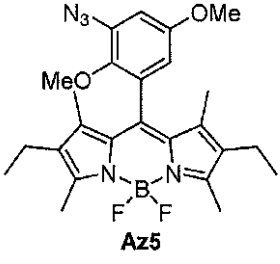
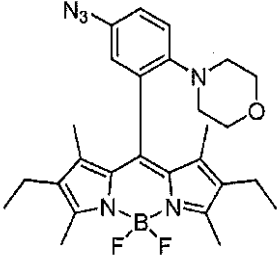
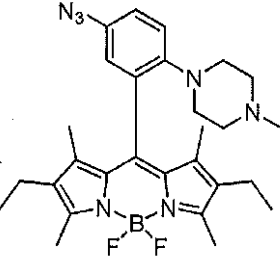
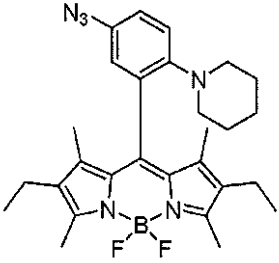
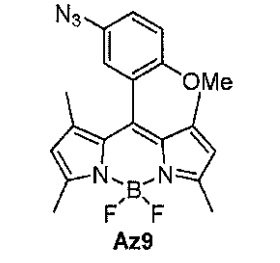
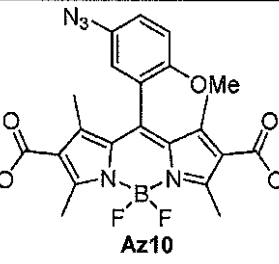
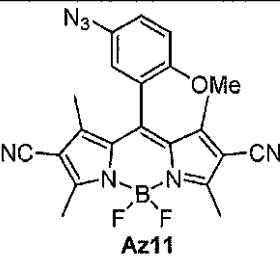
【表 1 - 4】

		10
		20
		30
		40

【表 1 - 5】

		10
		20
		30
	 <p style="text-align: center;"><b>Az1</b></p>	30
 <p style="text-align: center;"><b>Az2</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Az3</b></p>	40

【表 1 - 6】

 <p style="text-align: center;"><b>Az4</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Az5</b></p>	
 <p style="text-align: center;"><b>Az6</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Az7</b></p>	10
 <p style="text-align: center;"><b>Az8</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Az9</b></p>	20
 <p style="text-align: center;"><b>Az10</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Az11</b></p>	30

## 【0106】

例示的なアジド - BODIPY化合物を使用して、アルキニル付属生体分子を含めたアルキン化合物を検出した。アルキン化合物とのAAC反応の後、トリアゾール環の形成によって蛍光消光を放出し、蛍光増強現象がもたらされる。化合物T2およびT9～T11は、アジドとのAACを受け、蛍光性トリアゾール生成物を生じさせるこのようなタイプのプローブの例である。

アルキン含有分子

## 【0107】

本開示に記載されているアルキン含有分子は、式

## 【化11】

標的分子



のものである。

## 【0108】

例示的なアルキン含有標的分子には、これらに限定されないが、少なくとも1個のアルキンを含有するか、または含有するように修飾されている、アミノ酸およびアミノ酸残基、ポリペプチド(ペプチドおよびタンパク質を含めた)、糖または糖残基などが含まれる

10

20

30

40

50

## 【0109】

例示的な標的分子には、これらに限定されないが、生体分子、例えば、DNA、RNA、タンパク質またはグリカンが含まれ、これは天然に存在し得るか、または合成的にもしくは組換え技術によって産生されてもよく、単離されるか、実質的に精製されるか、またはアルキン含有標的分子がベースとしている無修飾分子の天然環境（例えば、宿主動物、例えば、哺乳動物、例えば、マウス宿主（例えば、ラット、マウス）、ハムスター、イヌ、ネコ、ウシ、ブタなど内を含めた、細胞表面上または細胞内）内に存在し得る。いくつかの実施形態では、標的分子は、*in vitro*で無細胞反応において存在する。他の実施形態では、標的分子は、細胞中に存在し、かつ/または細胞の表面上に表示される。10  
目的の多くの実施形態では、標的分子は、生細胞中；生細胞の表面上；生きている生物、例えば、生きている多細胞生物中にある。適切な生細胞は、生きている多細胞生物の部分である細胞；多細胞生物から単離された細胞；不死化細胞系などを含む。

## 【0110】

標的分子がポリペプチドである場合、ポリペプチドは、D-アミノ酸、L-アミノ酸、または両方からなってもよく、天然に、合成的に、または組換え技術のいずれかによってさらに修飾されて、他の部分を含み得る。例えば、標的ポリペプチドは、リポタンパク質、糖タンパク質、または他のこのような修飾されたタンパク質であり得る。

## 【0111】

一般に、有用な標的分子は、本開示による修飾されたアジド-BODIPYとの反応のための少なくとも1個のアルキンを含むが、2個またはそれ超、3個またはそれ超、5個またはそれ超、10個またはそれ超のアルキンを含み得る。反応の最終生成物の意図する用途、標的分子自体の性質、および本明細書に開示されている本開示の実施において当業者には容易に明らかである他の理由によって、適切な標的分子中に存在し得るアルキンの数は変化する。20

## 【0112】

本開示のこの実施形態は、*in vivo*での標的分子の修飾において特に有用である。この実施形態では、標的基質は修飾されて、修飾されたアジド-BODIPYへの連結が望ましいポイントにおいてアルキニル基を含む。例えば、標的基質がポリペプチドである場合、ポリペプチドは修飾されて、N-末端アルキンを含有する。標的基質が糖タンパク質である場合、糖タンパク質の糖残基は、修飾されて、アルキンを含有することができる。アルキンで修飾されていないが、アルキンでこれから修飾される標的分子は、本明細書において「標的基質」と称される。アルキンで修飾された標的分子は、本明細書において「アルキン修飾された標的分子」または「アルキン含有標的分子」と称される。30

## 【0113】

標的基質は、*in vitro*で生じ、次いで、細胞中に導入されることができ（例えば、マイクロインジェクション、リポソームまたはリポフェクチンが媒介する送達、電気穿孔などによる）、修飾のために標的とされる基質の性質によってこの方法は変化し、当業者が容易および適切に選択することができる。最終標的基質はまた、宿主細胞の天然の生合成機構を活用することによって*in vivo*で生じさせることができる。例えば、細胞は所望の標的分子の合成のための基質の生体適合性アルキン誘導体と共に提供することができ、基質は、細胞によって加工され、所望の最終標的基質のアルキン誘導体が得られる。例えば、標的基質が細胞表面糖タンパク質である場合、細胞は、糖タンパク質内に見出される糖残基のアルキン誘導体と共に提供することができ、これはそれに続いて天然の生合成プロセスを通して細胞によって加工され、アクセス可能なアルキン基を含む少なくとも1つの修飾された糖部分を有する修飾された糖タンパク質が生じる。40

## 【0114】

標的基質はまた、方法を使用して*in vivo*で産生させることができる。例えば、アルキンを有する非天然アミノ酸は、E.coliにおいて発現している組換えポリペプチド中に組み込むことができる（例えば、Kiickら（2000年）Tetrahedron、56巻：50

9487頁を参照されたい)。このような組換え技術によって産生されたポリペプチドは、本開示による修飾されたアジド-BODIPYと選択的に反応することができる。

【0115】

一例では、アルキン基は、所望の生体ポリマー標的基質のための合成構造ブロックを有する細胞（例えば、生体ポリマー、例えば、タンパク質をグリコシル化する真核細胞）を提供することによって標的分子中に組み込まれる。例えば、細胞は、糖タンパク質中のアルキン基の組み込みを実現するアルキン基を含む糖分子と共に提供することができる。いくつかの実施形態では、糖タンパク質は、細胞表面上に発現している。代わりに、アルキン基は、アミノ酸中に組み込むことができ、これはそれに続いて細胞によって合成されるペプチドまたはポリペプチド中に組み込まれる。生体ポリマー中に非天然構造ブロックを組み込むためにいくつかの方法が利用可能である。標的分子として細胞表面オリゴ糖類に制限する必要はない。例えば、vanHestら（1998年）FEBS Lett. 428巻：68頁；およびNowakら（1995年）Science、268巻：439頁を参照されたい。

10

【0116】

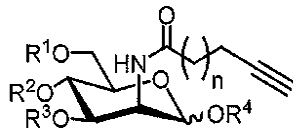
一実施形態では、標的分子は、炭水化物含有分子（例えば、糖タンパク質；多糖類など）であり、アルキン基は、合成基質を使用して標的分子中に導入される。いくつかの実施形態では、合成基質は、グリコシル化分子の産生において利用される糖のアルキン誘導体である。いくつかの実施形態では、合成基質は、例えば、糖タンパク質生合成経路において細胞表面分子の産生において利用される糖のアルキン誘導体である。例えば、宿主細胞は、合成シアル酸アルキニル誘導体と共に提供することができ、これはシアル酸生合成のための経路中に組み込まれ、最終的に糖タンパク質における合成糖残基の組み込みがもたらされる。いくつかの実施形態では、糖タンパク質は、細胞表面上に表示されている。

20

【0117】

一例では、合成基質は、一般式

【化12】



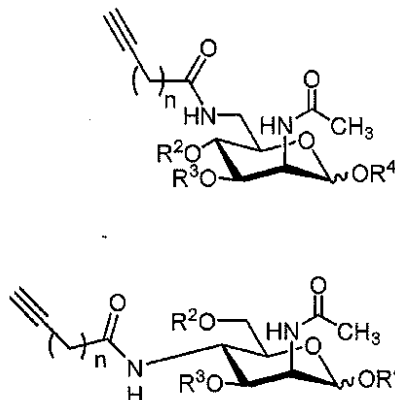
のマンノサミンのアルキニル誘導体であり、式中、 $n$ は、0～7、一般に1～4、より通常には1～2であり、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $R^4$ は、独立に、水素またはアセチルである。いくつかの実施形態では、基質は、N-3-ブチノイルマンノサミン（ $n=0$ ）もしくはそのアセチル化誘導体、またはN-4-ペンチノイルマンノサミン（ $n=1$ ）もしくはそのアセチル化形態である。

30

【0118】

別の実施形態では、合成基質は、例えば、

【化13】



40

の一般式のアルキニル糖誘導体であり、これらのいずれかは、シアル酸生合成経路中に組み込むことができ、式中、 $n$ は、1～6、一般に1～4、より通常には1～2であり、 $R$

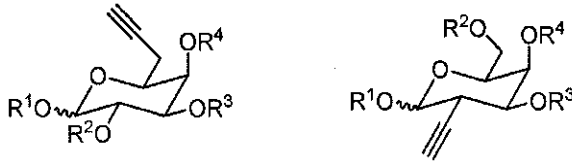
50

<sup>2</sup>、 $R^3$ 、および $R^4$ は、独立に、水素またはアセチルである。

【0119】

別の実施形態では、合成基質は、例えば、

【化14】



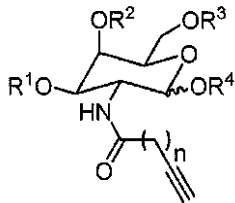
の一般式のアルキニル糖誘導体であり、式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $R^4$ は、独立に、水素またはアセチルであり、合成基質は、フコースを伴う生合成経路中に組み込まれている。

10

【0120】

別の実施形態では、合成基質は、例えば、

【化15】



20

の一般式のアルキニル糖誘導体であり、式中、 $n$ は、1～6、一般に1～4、より通常には1～2であり、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、および $R^4$ は、独立に、水素またはアセチルであり、これはガラクトースを伴う生合成経路中に組み込まれている。

【0121】

いくつかの実施形態では、対象の方法を使用して、細胞の表面を修飾する。このように、一態様において、本開示は、細胞の表面を *in vitro* または *in vivo* で修飾する方法をフィーチャする。この方法は一般に、アルキニル基を含む標的分子中のアルキン基と、修飾されたアジド-BODIPYとを反応させ、細胞表面における化学選択的ライゲーションを実現することを伴う。多くの実施形態では、方法は、細胞表面上の標的分子をアルキニル基で修飾するステップと、標的分子中のアルキニル基と修飾されたアジド-BODIPYとを反応させるステップとを含む。例えば、上記のように、アルキニル糖は生細胞に提供され、このアルキニル糖は、細胞表面上に表示されている糖タンパク質中に組み込まれる。

30

【0122】

対象の修飾されたアジド-BODIPY化合物、および対象の修飾方法は、研究用途および診断用途を含めた種々の用途において有用である。

【0123】

いくつかの実施形態では、対象の修飾されたアジド-BODIPY化合物、および対象の修飾方法は、研究用途において有用である。目的の用途は、研究用途、例えば、受容体の機能的および物理的特性を探索すること；プロテオミクス；メタボロミクスなどを含み、研究用途はまた、創薬または他のスクリーニング用途を含む。

40

【0124】

プロテオミクスは、タンパク質を検出、同定、および定量化して、生物学的に関連性のある情報を得ることを目的とする。メタボロミクスは、代謝物および他の小分子、例えば、脂質および炭水化物の検出、同定、および定量化である。Fiehn (2001年) Comparative and Functional Genomics、2巻：155～168頁；および米国特許第6,873,914号。

【0125】

50

創薬用途には、これらに限定されないが、がん細胞生存率および/または成長を阻害する薬剤を同定することが含まれる。このように、いくつかの実施形態では、本開示は、がん細胞生存率および/または成長を阻害する薬剤を同定する方法を提供する。この方法は一般に、細胞の成分を修飾して、アルキンを含む第1の反応性パートナーを含むことと、試験薬剤の存在下で細胞と、修飾されたアジド - B O D I P Yを含む第2の反応性パートナーとを接触させることであり、接触は生理学的条件下であり、接触によって、第1の反応性パートナーのアルキニル基、および第2の反応性パートナーのアジド - B O D I P Y化合物の間の反応がもたらされ、それによって細胞成分を合成的におよび共有結合的に修飾することと、存在する場合、第2の反応性パートナーによる細胞の修飾のレベルに対する試験薬剤の効果を決定することとを伴う。

10

## 【0126】

がん細胞が同じ細胞型の正常（非がん）細胞より多い量の炭水化物を生成するものである場合、方法は、がん性細胞の成長および/または生存能を低減させる薬剤を同定することを実現する。

## 【0127】

目的の用途はまた、診断用途、例えば、がんの検出などのためを含み、検出可能な標識を含む対象の修飾されたシクロアルキンを使用して、がん細胞上に存在するアルキンを修飾された標的分子、例えば、アルキンを標識された標的分子を標識する。目的の用途はまた、治療用途を含み、薬物または他の治療剤は、共有結合的に連結された薬物または他の治療剤を含む対象の修飾されたアジド - B O D I P Y化合物を使用して、アルキンを修飾された標的分子に送達される。

20

## 【0128】

本開示の特定の実施形態は、例えば、生物、例えば、個体における細胞の代謝または他の状況を決定する *in vivo* でのイメージングのために使用される。非限定的な一例として、対象の方法は、個体（例えば、げっ歯類、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、非ヒト霊長類、およびヒトを含めた哺乳動物）におけるがん細胞の *in vivo* でのイメージングに適用することができる。

## 【0129】

対象のアジド - アルキニル環化付加の1つの例示的な非限定的用途は、細胞がそれらの表現型を変化させるにつれ起こる細胞における代謝的变化の検出にある。一例として、変化したグリコシル化パターンは、天然に存在するグリカンの過小発現および過剰発現の両方、ならびに胚発生の間の発現に通常制限されているグリカンの表示からなる、腫瘍表現型の顕著な特徴である。形質転換細胞と関連する一般の抗原の例は、シアリル *Lewis a*、シアリル *Lewis x*、シアリル T、シアリル Tn、およびポリシアル酸 (PSA) である。Jorgensenら (1995年) *Cancer Res.* 55巻、1817~1819頁; Sel I (1990年) *Hum. Pathology*、21巻、1003~1019頁; Takiら (1988年) *J. Biochem.*、103巻、998~1003頁; Gabius (1988年) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*、27巻、1267~1276頁; Feizi (1991年) *Trends Biochem. Sci.*、16巻、84~86頁; Taylor-Papadimitriouおよび Epenetos (1994年) *Trends Biotech.*、12巻、227~233頁; Hakomoriおよび Zhang (1997年) *Chem. Biol.*、4巻、97~104頁; Dohiら (1994年) *Cancer*、73巻、1552頁。これらの抗原は、これらがそれぞれ末端シアル酸を含有するという重要なフィーチャを共有する。PSAは、長さが50単位までのシアル酸残基のホモポリマーである。上昇したレベルのシアル酸は、胃 (Dohiら (1994年) *Cancer*、73巻、1552頁; および Yamashitaら (1995年) *J. Natl. Cancer Inst.*、87巻、441~446頁)、結腸 (Yamashitaら (1995年) *J. Natl. Cancer Inst.*、87巻、441~446頁; Hanskiら、(1995年) *Cancer Res.*、55巻、928~933頁; Hanskiら (1993年) *Cancer Res.*、53巻、4082~4088頁; Yangら (1994年) *Glycobiology*、4巻、873~884頁; Saitohら (1992年) *J. Biol. Chem.*、267巻、5700~5711頁)、膵臓 (Sawadaら (1994年) *Int. J. Cancer*、57

30

40

50



巻、901～907頁)、肝臓(Sawadaら(1994年)J. Biol. Chem.、269巻、1425～1431頁)、肺(Weibelら(1988年)Cancer Res.、48巻、4318～4323頁)、前立腺(Jorgensenら(1995年)Cancer Res.、55巻、1817～1819頁)、腎臓(Rothら(1988年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻、2999～3000頁)、および乳がん(Choら(1994年)Cancer Res.、54巻、6302～6305頁)、ならびにいくつかのタイプの白血病(Joshiら(1987年)Cancer Res.、47巻、3551～3557頁; Altevogtら(1983年)Cancer Res.、43巻、5138～5144頁; Okadaら(1994年)Cancer、73巻、1811～1816頁)を含めた多くのがんにおける形質転換された表現型と高度に相関している。細胞表面シアル酸のレベルおよび転移能の間の強い相関関係がまた、いくつかの異なる腫瘍タイプにおいて観察されてきた(Kakejiら(1995年)Brit. J. Cancer、71巻、191～195頁; Takanoら(1994年)Glycobiology、4巻、665～674頁)。単一のがん細胞上の複数のシアル酸付加抗原の集団的表示は、抗原の同一の補体を必ずしも発現することなく多くの異なる腫瘍タイプが高度なシアル酸表現型を共有するという事実を説明することができる(Rothら(1988年)、上述)。結果的に、シアル酸レベルに基づいて細胞を標的とする診断または治療方針は、多くのがんへの広範な適用性を有する。

10

## 【0130】

生きている動物への非天然アルキニル糖(MannNA1、GalNA1)の導入および組込みは、代謝の状況における変化の検出を実現する。適当なエピトープタグの付着によって、修飾されたアジド-BODIPY化合物は、生きている生物におけるこれらの細胞を標識し、結果的に代謝の状況における変化を検出する。腫瘍化細胞の早期の検出およびそれに続くインターベンションは、がん患者についての重症度を低減させ、生存率を増加させる。

20

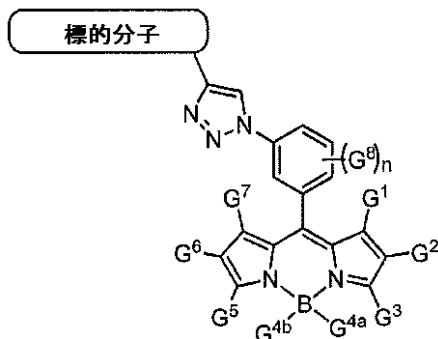
トリアゾリル-BODIPY化合物

## 【0131】

トリアゾリル-BODIPY化合物は、アジド-BODIPY化合物とアルキン含有分子とをアジド-アルキン環化付加(AAC)によって反応させることによって形成される。トリアゾリル-BODIPY化合物は、対応するアジド-BODIPY化合物と比較して増強された蛍光を示す。本開示において記載するトリアゾリル-BODIPY化合物は、式(III)のもの：

30

## 【化16】



40

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物であり、式中、

G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>、G<sup>5</sup>、G<sup>6</sup>、G<sup>7</sup>およびG<sup>8</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルケニル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、-OR<sup>A</sup>、-CH<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>A</sup>、-C(O)OR<sup>A</sup>、-S(O)R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>、-SO

50

$_3 R^A$ 、 $-SO_2 N(R^B)_2$ 、および $-NH SO_2 R^B$ であり、  
 $R$ はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2 OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2 R^A$ 、 $-SO_3 R^A$ 、 $-SO_2 N(R^B)_2$ 、および $-NH SO_2 R^B$ から独立に選択され、

各 $R^A$ は、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各 $R^B$ は、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、

$G^{4a}$ および $G^{4b}$ はそれぞれの場合、フルオロ、アルキル、アルコキシ、アリーロキシ、またはアルキニルであり、

アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1~4個の炭素原子を有し、アリーロキシのアリール基およびアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかによく、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6~20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5~20個の炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリーロキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、

$n$ は、0、1、2、3、または4である。

#### 【0132】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^1$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2 OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2 R^A$ 、 $-SO_2 N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH SO_2 R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $H$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、メチル、エチル、または $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒に、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^1$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

### 【0133】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^2$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $H$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、メチル、エチル、または $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OH$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OCH_3$ または $-OC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-OR^A$ であり、式中、 $R^A$ は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $-N(R^B)_2$ であり、式中、 $R^B$ はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の $R^B$ は、介在する窒素と一緒に、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $NH_2$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $NHCH_3$ または $NHC_2H_5$ である。ある特定の実施形態では、 $G^2$ は、 $NHR^B$ であり、式中、 $R^B$ は、窒素保護基である。

### 【0134】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^3$ は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および $-NH_2SO_2R^A$ から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^3$ は、 $H$ である。ある特定の実施形態では、 $G^3$ は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^3$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim$

10

20

30

40

50

C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、G<sup>7</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、-OHである。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、-OCH<sub>3</sub>または-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>であり、式中、R<sup>B</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個のR<sup>B</sup>は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、NH<sub>2</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、NHR<sup>B</sup>であり、式中、R<sup>B</sup>は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、NHCH<sub>3</sub>またはNHCH<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>3</sup>は、NHR<sup>B</sup>であり、式中、R<sup>B</sup>は、窒素保護基である。

10

## 【0135】

20

本明細書において一般に定義されているように、G<sup>5</sup>は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、-OR<sup>A</sup>、-CH<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>、-OC(O)R<sup>C</sup>、-SR<sup>A</sup>、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-N(R<sup>A</sup>)C(O)R<sup>C</sup>、-C(O)N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>C</sup>、-C(O)OR<sup>A</sup>、-S(O)R<sup>C</sup>、-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、=O、=NOH、=N-OR<sup>A</sup>、=N-NH<sub>2</sub>、=N-NHR<sup>A</sup>、=N-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>、および-NHSO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>から独立に選択される。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、Hである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、メチル、エチル、またはn-プロピルである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-OHである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-OCH<sub>3</sub>または-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-OR<sup>A</sup>であり、式中、R<sup>A</sup>は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、-N(R<sup>B</sup>)<sub>2</sub>であり、式中、R<sup>B</sup>はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個のR<sup>B</sup>は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、NH<sub>2</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、NHR<sup>B</sup>であり、式中、R<sup>B</sup>は、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、NHCH<sub>3</sub>またはNHCH<sub>2</sub>H<sub>5</sub>である。ある特定の実施形態では、G<sup>5</sup>は、NHR<sup>B</sup>であり、式中、R<sup>B</sup>は、窒素保護基である。

30

40

## 【0136】

50

本明細書において一般に定義されているように、 $G^6$  は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH_2SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-OH$  である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-OCH_3$  または  $-OC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $-N(R^B)_2$  であり、式中、 $R^B$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^6$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

### 【0137】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^7$  は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH_2SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OH$  である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OCH_3$  または  $-OC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $-N(R^B)_2$

2 であり、式中、 $R^B$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^7$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

#### 【0138】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^8$  は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH_2SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $H$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-OH$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-OCH_3$  または  $-OC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、酸素保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $-N(R^B)_2$  であり、式中、 $R^B$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成する。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NH_2$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHCH_3$  または  $NHC_2H_5$  である。ある特定の実施形態では、 $G^8$  は、 $NHR^B$  であり、式中、 $R^B$  は、窒素保護基である。

#### 【0139】

ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている炭素環または複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている5員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている6員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されているフェニルを形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の2つは、これらの介在する原子と一緒にあって

10

20

30

40

50

、非置換フェニルを形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の 2 つは、これらの介在する原子と一緒にあって、任意選択で置換されている複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の 2 つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、または O の 1 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている 5 員の複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の 2 つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、および O の群からそれぞれ独立に選択される 2 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている 5 員の複素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の 2 つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、または O の 1 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている 6 員の炭素環を形成する。ある特定の実施形態では、互いに隣接している  $G^8$  基の 2 つは、これらの介在する原子と一緒にあって、S、N、および O からなる群から各々独立に選択される 2 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている 6 員の炭素環を形成する。

10

## 【0140】

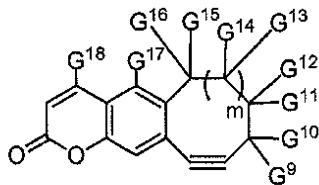
本開示の 1 つまたは複数の実施形態の有効性を、下記の記載において記載する。本開示の他のフィーチャまたは利点は、下記の図面およびいくつかの実施形態の詳細な記載から、ならびにまた添付の特許請求の範囲から明らかである。

シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブ

シクロオクチンをベースとする蛍光発生プローブは、式 (IV) :

## 【化 17】

20



(IV)

またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、もしくは水和物であり、式中、

$G^9$ 、 $G^{10}$ 、 $G^{11}$ 、 $G^{12}$ 、 $G^{13}$ 、 $G^{14}$ 、 $G^{15}$ 、 $G^{16}$ 、 $G^{17}$  および  $G^{18}$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 6$  アルケニル、任意選択でハロゲン、任意選択でニトロソ、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 6$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  であり、

30

R はそれぞれの場合、水素、ハロゲン、任意選択で置換されているアルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているアシル、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^B$  から独立に選択され、

40

各  $R^A$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、

各  $R^B$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリールから独立に選択され、あるいは 2

50

個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を形成し、  
 $G^9$  および  $G^{10}$  はそれぞれの場合、水素、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ニトロソ、アルキル、アルコキシ、アリーロキシ、またはアルキニルであり、  
 アルキルおよびアルコキシ基は、非分岐飽和であり、1～4個の炭素原子を有し、アリーロキシのアリール基およびアリール基は、炭素環式アリールまたは複素環式アリールのいずれかであり、炭素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で6～20個の炭素原子を有し、複素環式アリール基は、置換基の炭素原子を含めて全部で5～20個の炭素原子を有し、カルボアルコキシ基は、カルボン酸のアルキルエステルであり、アルキル基は、上記に定義されている通りであり、各アルキル、アリール、アルコキシ、アリーロキシ、ベンゾ、およびカルボアルコキシは、独立に、非置換であるか、または1個もしくは複数の置換基で置換されていてもよく、アルキル置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、またはアリールであり、アリール置換基は、ハロ、ヒドロキシル、アミノ、アルキル、アリール、ニトロ、またはカルボキシルであり、ハロ置換基は、フルオロまたはクロロであり、  
 $m$  は、1である。

【0141】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^9$  は、水素、ハロゲン、ニトロソ、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、  
 $-OR^A$ 、  
 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^A$  から独立に選択される。ある特定の実施形態では、 $G^9$  は、Hである。ある特定の実施形態では、 $G^9$  は、ハロゲンである。ある特定の実施形態では、 $G^9$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルである。ある特定の実施形態では、 $G^{10}$  は、メチル、エチル、または  $n$ -プロピルである。ある特定の実施形態では、 $G^9$  は、 $-OR^A$  であり、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基である。ある特定の実施形態では、 $G^9$  は、フルオロである。

【0142】

本明細書において一般に定義されているように、 $G^{10}$  は、水素、ハロゲン、ニトロソ、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、任意選択で置換されているヘテロアリール、  
 $-OR^A$ 、  
 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 、および  $-NH SO_2R^A$  から独立に選択され、式中、 $R^A$  は、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、任意選択で置換されているアリール、または酸素に付着しているとき、酸素保護基、または硫黄に付着しているとき、硫黄保護基であり、 $R^B$  はそれぞれの場合、独立に、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されているアルケニル、任意選択で置換されているアルキニル、任意選択で置換されているヘテロシクリル、および任意選択で置換されているアリール、または窒素保護基であり、あるいは2個の  $R^B$  は、介在する窒素と一緒にあって、複素環を

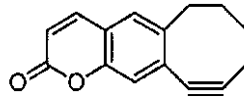


形成する。ある特定の実施形態では、G<sup>10</sup>は、フルオロである。

【0143】

ある特定の実施形態では、本開示は、101の化合物を対象とする。

【化18】



101

【0144】

シクロオクチンとクマリンフルオロフォアとを縮合させることによって設計される新規な蛍光形成プローブ101は、洗浄なしおよび固定なし条件、ならびに触媒非含有条件下での生細胞中のアジド含有複合糖質のリアルタイムイメージングのために本明細書に記載されている。このプローブは、低い細胞毒性を伴って細胞透過性であり、トリアゾール形成後に蛍光を生じさせ、したがって、良好な蛍光シグナルを伴う糖タンパク質局在化および輸送の細胞内イメージングを可能とする。さらに、101および本明細書に記載されているアジド-BODIPYプローブの組合せは、それぞれ、二重標識化実験における生細胞中のトリアゾール形成によって、2種の異なる代謝的に組み込まれたアジドおよびアルキン含有複合糖質の検出を可能とする。

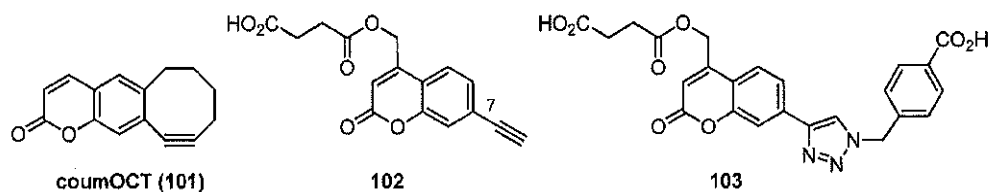
10

【0145】

低蛍光7-アルキニルクマリン102は、CuAAC反応を受けて、トリアゾール環の電子供与性特性によって増強された蛍光を有するトリアゾール103が得られることが示されてきた。<sup>6c</sup>このように、クマリン部分101へのシクロオクチンの組込みは、蛍光を減少し得るが、アジドとの101のSPAAC反応によって、高感度検出のための高度に蛍光性のトリアゾール生成物を得ることができる。本開示において、本発明者らは、SPAACをベースとする蛍光形成プローブ101(図10)、すなわち、洗浄なしおよび固定なし条件下での生細胞中のアジドタグ付きグリカンの時間経過イメージングのために使用することができるcoumOCTについて報告する。

20

【化19】



coumOCT (101)

102

103

30

【0146】

図10. 生細胞中のアジド含有複合糖質のイメージングのためのトリアゾール形成による高い蛍光を示す、SPAACをベースとする蛍光形成プローブ101の設計。比較のために、7-アルキニルクマリン102は、アジドとCuAAC反応を受けて、高度に蛍光性のトリアゾール103を形成する弱蛍光プローブである。

40

活性をベースとする酵素プローブ

【0147】

本開示は、機序に基づく阻害剤として3-フルオロシアリルフルオリドから、およびレポーターライゲーションのためにアルキン基を組み込むことによって調製される、一連の活性をベースとするシアリダーゼプローブであるDFSA(501)、およびCoumFSA(601)について記載する。DFSA(501)は、全ての試験したシアリダーゼの活性部位失活剤である。この報告において、本発明者らは、活性をベースとするシアリダーゼプローブであるCoumFSA(601)、およびDFSA(501)の化学合成を記載してきた。

## 【化20-1】

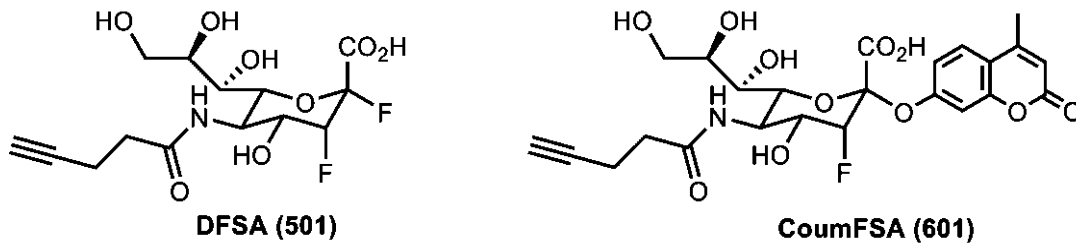
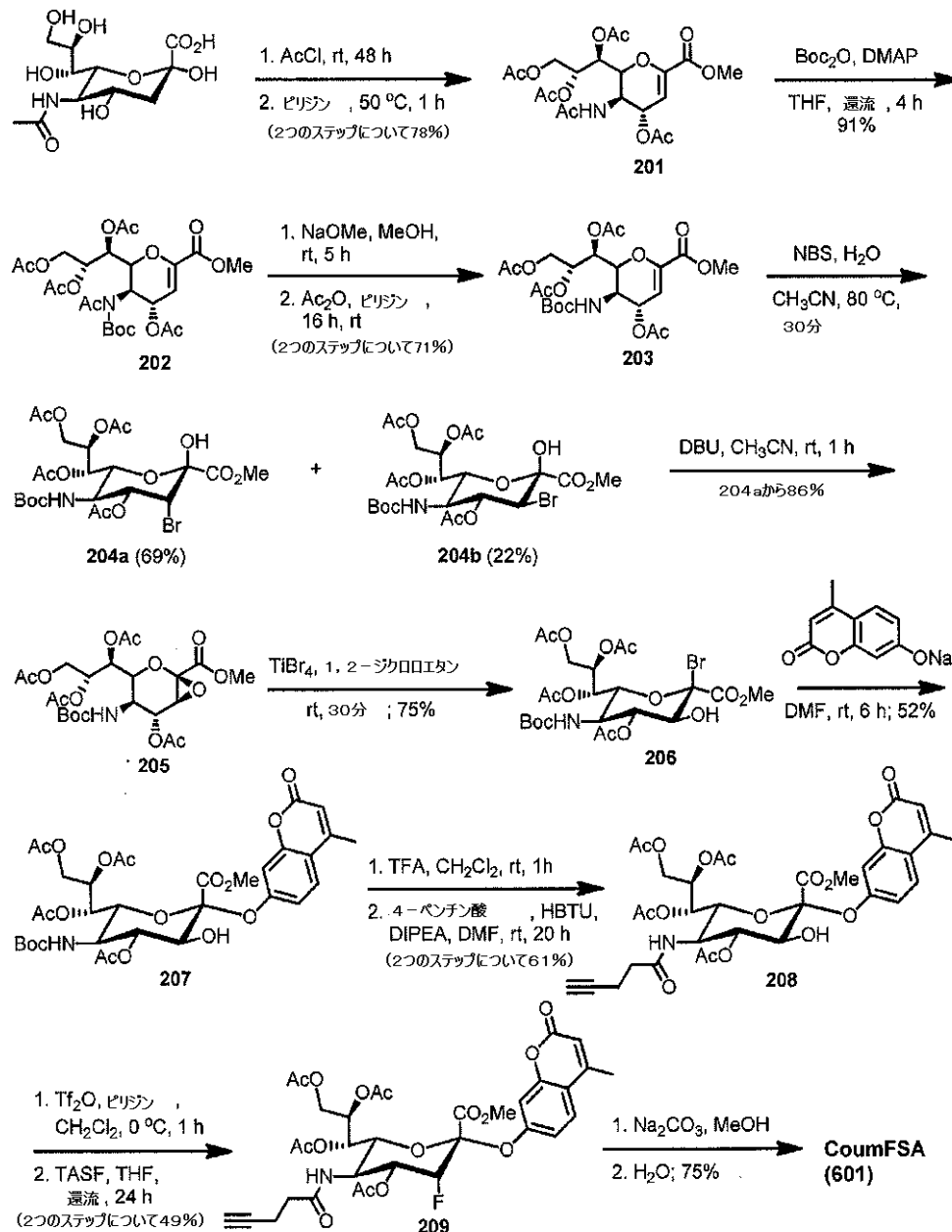


図11. シアリダーゼプローブDFSA501およびCoumFSA601の構造。

10

## 【化20-2】



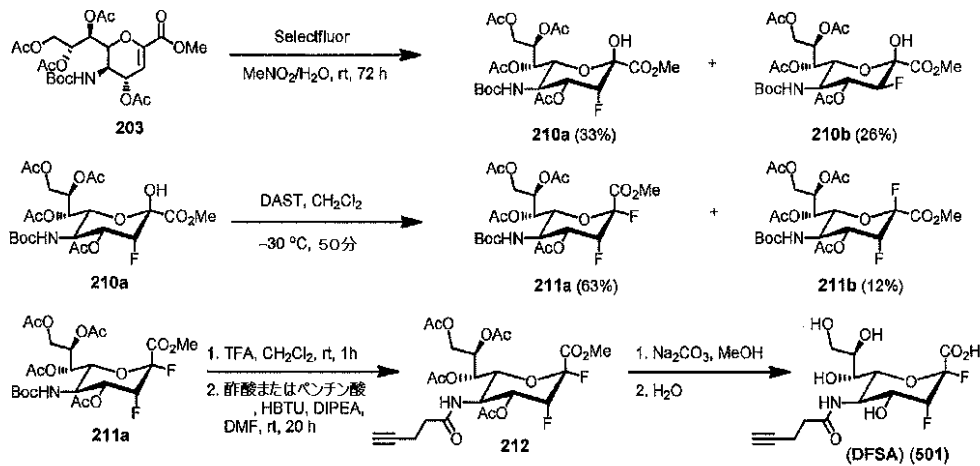
20

30

40

スキーム500. CoumFSAの化学合成。

## 【化 2 1】



10

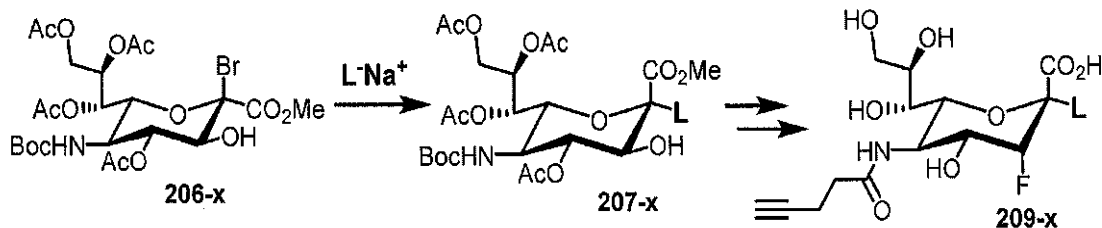
スキーム 600 . DFSA (501) の化学合成。

## 【 0 1 4 8】

いくつかの実施形態では、一連の活性をベースとする酵素プローブは、化合物 206 に加える脱離基 L を変化させることによって合成することができる。スキーム 700 において示すように、弱酸の塩の任意の選択物（ナトリウム塩は示す通りであるが、任意のカチオン対イオンを使用することができる）を、許容される脱離基として使用することができる。例えば、L は、アルコキシ、フェノキシ、ペンタフルオロフェノキシ、4 - ニトロフェノキシ、クマリン、アルカノエート、ベンゾエート、トリフレート、メシレート、またはトシレートでよい。

20

## 【化 2 2】



30

スキーム 700 . 脱離基塩  $L^- Na^+$  の選択による化合物 209 のバリエーションの化学合成。

## 【 0 1 4 9】

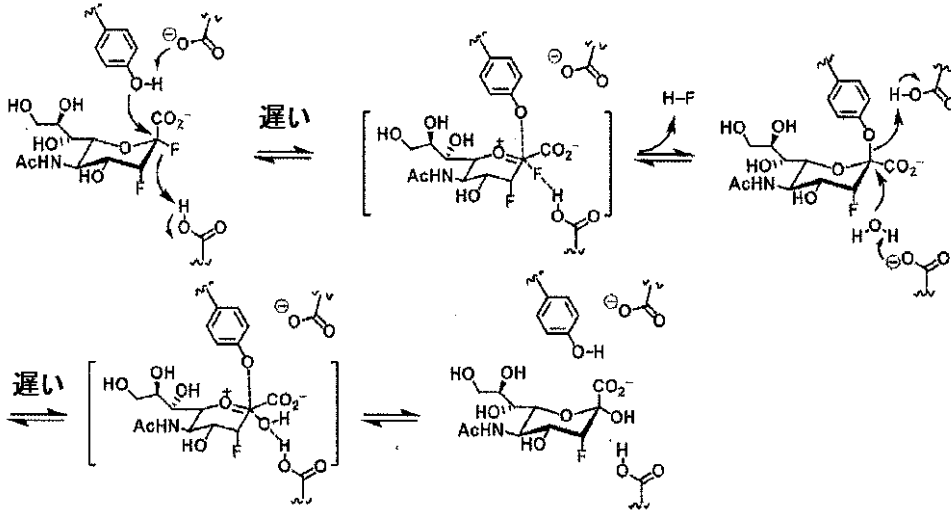
図 12 は、活性をベースとする酵素プローブ (ABP) の一般構造を示す。ABP は、反応性基、スペーサーまたは結合基、およびレポータータグを含有する。反応性基は、酵素標的の触媒の機序に基づいて設計され、これは酵素活性部位における求核性残基と反応して、共有結合付加体を形成することができる求電子試薬を含有することができる。フルオロフォアおよびビオチン、ならびに「クリッカブル」ハンドル、例えば、アジドおよびアセチレンを含めた種々のレポータータグを、酵素の可視化および富化のために使用することができる。

40

## 【 0 1 5 0】

本開示は、特にシアリダーゼのための活性をベースとする酵素プローブの設計を記載する。3 - フルオロシアリルフルオリドは、動力学的モデルによって、野性型 *trans*-シアリダーゼを時間依存的様式で不活性化する。強い電子吸引基によって、フッ素は、正に帯電しているオキソ - カルベニウムイオン様遷移状態を不安定化し (図 801)、それによって共有結合中間体の形成および加水分解の両方を遅延させることができる。

## 【化 2 3】



10

## 【 0 1 5 1】

図 1 3 . 基質上に作用するシアリダーゼ酵素の機序および遷移状態。

## 【 0 1 5 2】

シアリダーゼ酵素の結晶構造が、3 - フルオロシアリルフルオリドとのノイラミニダーゼ - 共有結合性複合体を支持し、これはさらに修飾されて、新規な化学官能基を活性部位中に組み込むことができることを本発明者らは認識してきた。図 8 0 2 に示すように、ノイラミニダーゼ (neuraminidase) (シアリダーゼ) 活性部位における T y r 4 0 6 は、3 - フルオロシアリルフルオリド基質上の C - 2 に対して求核攻撃を行う (Nat Commun, 2 0 1 3 年、4 巻、1 4 9 1 頁)。したがって、脱離基による C - 2 の修飾は、T y r 4 0 6 および 3 - フルオロシアリルフルオリド基質の間の共有結合を生じさせる。アルキル官能基を含める 3 - フルオロシアリルフルオリド基質のさらなる修飾は、共有結合された基質が、アジド含有蛍光発生プローブ、例えば、本明細書に記載されているこれらの化合物によって検出されることを可能とする。図 1 4 . 3 - フルオロシアリルフルオリド基質とのノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) 活性部位の結晶構造。

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている活性をベースとするプローブ (A B P) を使用して、シアリダーゼ酵素を検出および同定することができる。図 2 6 において示すように、A B P は、シアリダーゼの活性部位と反応して、共有結合を形成することができる。細胞を任意選択で溶解することができる。A B P は、アジド含有レポーター分子 (例えば、本明細書に記載されているアジド含有蛍光発生プローブ) とさらに反応して、トリアゾール錯体を形成することができる。次いで、トリアゾール錯体を、検出することができる (例えば、質量分析法、蛍光、ルミネセンス、吸収分光法による)。図 1 5 . シアリダーゼの同定のための蛍光発生反応。

30

## 【実施例】

## 【 0 1 5 3】

(実施例 1)

アジド - B O D I P Y 化合物の合成

材料

他に示さない限り、全ての試薬は市販であり、それ以上精製することなく使用した。他に示さない限り、全ての溶媒は無水グレードであった。特に断りのない限り、全ての非水性反応は、アルゴンの僅かな陽圧下でオープン乾燥させたガラス器具中で行った。反応を磁氣的に攪拌し、シリカゲル上の薄層クロマトグラフィーによってモニターした。カラムクロマトグラフィーは、4 0 ~ 6 3 μ m 粒径のシリカゲル上で行った。収率は分光学的に純粋な化合物について報告する。

機器

## 【 0 1 5 4】

40

50

融点をElectrothermal MEL-TEMP (登録商標) 1101D融点装置で記録し、補正しなかった。NMRスペクトルはBruker AVANCE 600分光計(600MHz)で記録した。化学シフトは、テトラメチルシラン(TMS)に対する値で示す。結合定数JはHzで示す。内部標準は、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルについて $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}} = 7.24$ )、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルについて $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}} = 77.0$ )であった。分裂パターンは、s(一重線)、d(二重線)、t(三重線)、q(四重線)、m(多重項)、br(幅広い)およびdd(二重線の二重線)として報告する。高分解能ESI質量スペクトルは、Bruker Daltonics分光計で記録した。吸光度スペクトルは、Perkin Elmer Lambda 35紫外可視分光光度計で記録した。蛍光スペクトルは、AMINCO-Bowmanシリーズ2ルミネセンス分光計で記録した。全ての写真は、Leica TCS-SP5共焦点レーザー走査顕微鏡で収集した。

10

## 【0155】

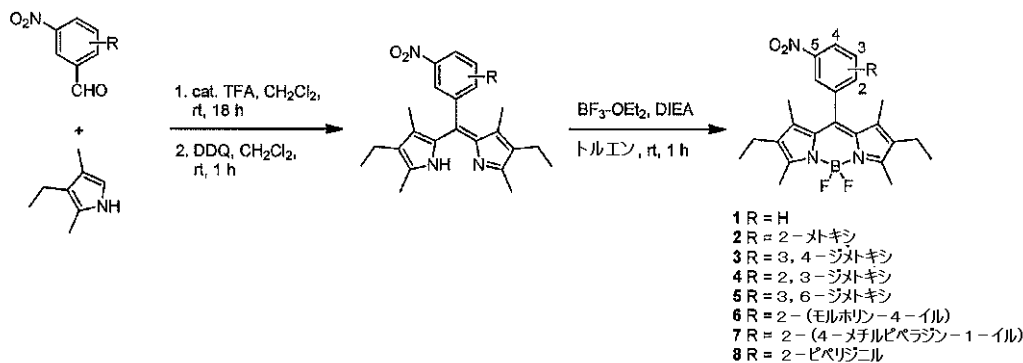
アジド-BODIPY化合物Az1、Az2、Az3、Az4、Az5、Az6、Az7およびAz8の合成のための好都合な経路を、本明細書において開示する。調製は、重要なニトロ中間体1、2、3、4、5、6、7および8を使用し、これら是对応するアジド-BODIPY化合物に効果的に変換された。アジド-BODIPY化合物Az1、Az2、Az3、Az4、Az5、Az6、Az7およびAz8の構造を図1に示す。合成経路における試薬およびステップは下記の通りである。

## 【0156】

20

ステップ1. 置換ニトロベンズアルデヒドとの2,4-ジメチル-3-エチルピロールの酸によって触媒される縮合、それに続く穏やかな条件中でのDDQによる酸化によって、ジピロメテン中間体を得て、これを $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ で処理し、対応するニトロ-BODIPY 1~8を得た。

## 【化24】

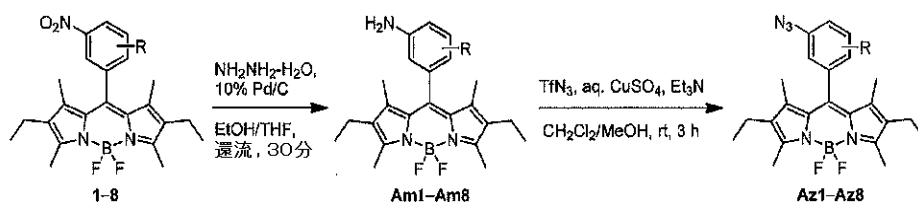


30

ステップ2. 従前に報告された方法によって、アミノ-BODIPY Am1~Am8を、10% Pd/Cの存在下でヒドラジンによるニトロ-BODIPYの還元によって妥当な収率で得た。穏やかな条件におけるトリフルルアジド( $\text{TfN}_3$ )による処理によって、アミノ-BODIPYを、標的アジド-BODIPY Az1~Az8に変換した。(Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. J. Org. Chem., 2008年、73巻、1963~1970頁。)

40

## 【化25】



## 【0157】

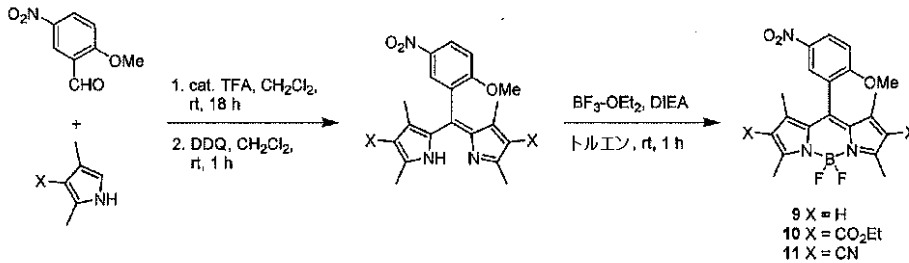
50

アジド - BODIPY 化合物 Az 9、Az 10 および Az 11 の合成のための好都合な経路を、本明細書において開示する。調製は、重要なニトロ中間体 9、10 および 11 を使用し、これらに対応するアジド - BODIPY 化合物に効果的に変換された。アジド - BODIPY 化合物 Az 9、Az 10 および Az 11 の構造を図 3 に示す。合成経路における試薬およびステップは、下記の通りである。

【0158】

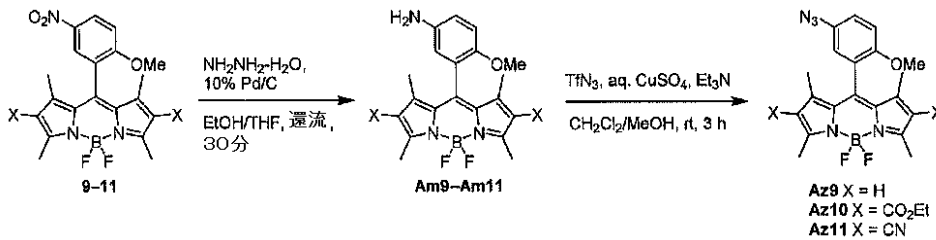
ステップ 1 . 2 - メトキシ - 5 - ニトロベンズアルデヒドとの 2 , 4 - ジメチル - 3 - 置換ピロールの酸によって触媒される縮合、それに続く穏やかな条件中での DDQ による酸化によって、ジピロメテン中間体を得て、これを  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  で処理し、対応するニトロ - BODIPY 9 ~ 11 を得た。

【化 26】



ステップ 2 . 従前に報告された方法によって、アミノ - BODIPY Am 9 ~ Am 11 を、10% Pd/C の存在下でのヒドラジンによるニトロ - BODIPY の還元によって妥当な収率で得た。穏やかな条件におけるトリフルルアジド ( $\text{TfN}_3$ ) による処理によって、アミノ - BODIPY を、標的アジド - BODIPY Az 9 ~ Az 11 に変換した。(Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K., J Org. Chem., 2008年、73巻、1963 ~ 1970頁。)

【化 27】



(実施例 2)

トリアゾリル - BODIPY 化合物の合成

【0159】

トリアゾリル - BODIPY 化合物 T 2、T 9、T 10 および T 11 の合成のための好都合な経路を、本明細書において開示する。トリアゾリル - BODIPY 化合物 T 2、T 9、T 10 および T 11 の構造を図 3 に示す。合成経路における試薬およびステップは、下記の通りである。

【0160】

トリアゾリル - BODIPY 化合物 T 2、T 9、T 10 および T 11 を、トリプロパルギルアミンおよびエチルアジドアセテートから調製した  $\text{CuSO}_4$ 、アスコルビン酸ナトリウム、トリス - トリアゾールリガンドを含有する  $\text{CuAAC}$  条件において、4 - ペンチン - 1 - オールによるアジド - BODIPY 化合物 Az 2、Az 9、Az 10 および Az 11 の 1,3 - 双極子環化付加によって妥当な収率で得た。(Zhou, Z.; Fahrni, C.J., J. Am. Chem. Soc., 2004年、126巻、8862 ~ 8863頁)。

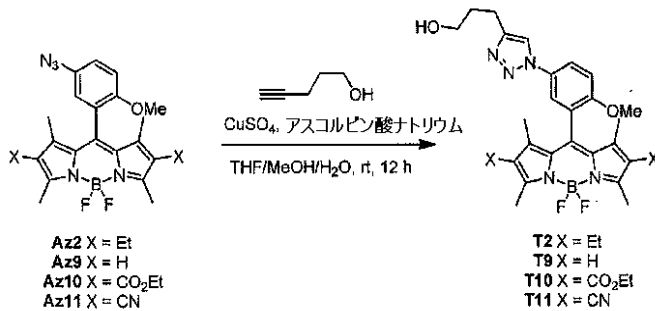
10

20

30

40

## 【化28】



10

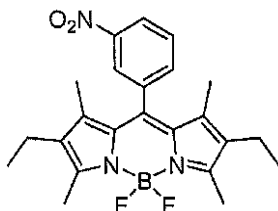
ニトロ - BODIPY の一般合成手順および生成物特性決定。

## 【0161】

置換ニトロベンズアルデヒド (3 mmol) および 3 - 置換 2, 4 - ジメチルピロール (6 mmol) を、Ar 雰囲気下で無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL) に溶解した。TFA (1 滴) を加え、このように得られた溶液を室温にて一晩撹拌した。TLC 分析によって示されるように 12 ~ 18 時間の反応体の完全な消費の後、2, 3 - ジクロロ - 5, 6 - ジシアノ - 1, 4 - ベンゾキノン (DDQ, 3 mmol) を一度に加えた。反応混合物を室温にて 1 時間撹拌し、次いで、ブライン (400 mL) で洗浄し、有機画分を MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗化合物を短いアルミナオキシドカラム (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 上で精製し、ジピロメテンの茶色の固体を得た。粗ジピロメテン生成物および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (40 mmol) を無水トルエン (150 mL) に溶解し、室温にて 10 分間撹拌した。BF<sub>3</sub> · OEt<sub>2</sub> (55 mmol) をゆっくりと加え、撹拌を 1 時間続けた。反応混合物を水 (3 × 50 mL) およびブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / ヘキサンまたは EtOAc / ヘキサンによる溶出によるシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによって精製し、対応するニトロ - BODIPY 生成物 1 ~ 11 を得た。2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - (3 - ニトロフェニル) - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (1)。

20

## 【化29】



30

## 【0162】

化合物 1 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 3 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 15 % 収率で調製した。C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>、暗赤色の固体、mp 246 ~ 248 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) R<sub>f</sub> = 0.38 ;

40

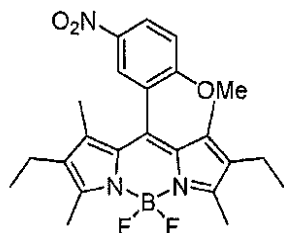
## 【化30】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.36–8.34 (1 H, m), 8.20 (1 H, t, J = 1.7 Hz), 7.70–7.64 (2 H, m), 2.52 (6 H, s), 2.28 (4 H, q, J = 7.6 Hz), 1.23 (6 H, s), 0.96 (6 H, t, J = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.0, 148.6, 137.6, 136.3, 134.8, 133.5, 130.4, 130.2, 123.89, 123.85, 17.0, 14.5, 12.6, 12.1; HRMS、C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 426.2164、実測値 : m/z 426.2167 [M + H]<sup>+</sup>。

50

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - ( 2 - メトキシ - 5 - ニトロフェニル ) - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン ( 2 )

【化 3 1】



10

【 0 1 6 3 】

化合物 2 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 2 - メトキシ - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 5.1 % 収率で調製した。C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>、暗赤色の固体、mp 210 ~ 212 ; TLC ( EtOAc / ヘキサン、1 : 4 ) R<sub>f</sub> = 0.33 ;

【化 3 2 - 1】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.42 (1 H, dd, J = 9.1, 2.5 Hz), 8.15 (1 H, d, J = 2.5 Hz), 7.11 (1 H, d, J = 9.1 Hz), 3.93 (3 H, s), 2.56 (6 H, s), 2.32 (4 H, q, J = 7.6 Hz), 1.36 (6 H, s), 1.02 (6 H, t, J = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.0,

20

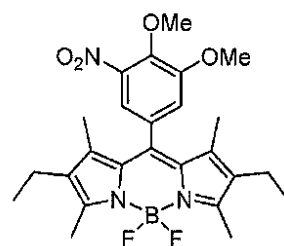
【化 3 2 - 2】

154.4, 141.8, 137.1, 133.5, 133.0, 130.4, 126.8, 126.1, 125.6, 110.9, 56.6, 17.0, 14.6, 12.6, 11.5;

HRMS、C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> : 計算値 456.2270、実測値 : m/z 456.2267 [M + H]<sup>+</sup>。

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - ( 3, 4 - ジメトキシ - 5 - ニトロフェニル ) - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン ( 3 )。

【化 3 3】



30

【 0 1 6 4 】

化合物 3 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 3, 4 - ジメトキシ - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 4.5 % 収率で調製した。C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、暗赤色の固体、mp 190 ~ 192 ; TLC ( EtOAc / ヘキサン、1 : 3 ) R<sub>f</sub> = 0.5 ;

40

【化 3 4】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.28 (1 H, s), 7.02 (1 H, s), 4.04 (3 H, s), 3.89 (3 H, s), 2.51 (6 H, s), 2.30 (4 H, q, J = 7.5 Hz), 1.38 (6 H, s), 0.98 (6 H, t, J = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.9, 145.3, 143.2, 137.7, 136.4, 133.4, 131.4, 130.4, 116.16, 116.12, 62.5, 56.8, 17.0, 14.5, 12.6, 12.0;

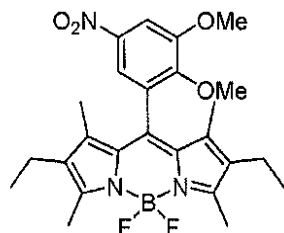
50



HRMS、 $C_{25}H_{31}BF_2N_3O_4$ ：計算値 486.2376、実測値： $m/z$  486.2377  $[M+H]^+$ 。

2,6-ジエチル-4,4-ジフルオロ-8-(2,3-ジメトキシ-5-ニトロフェニル)-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(4)。

【化35】



10

【0165】

化合物4は、2,4-ジメチル-3-エチルピロールおよび2,3-ジメトキシ-5-ニトロベンズアルデヒドから3つのステップについて41%収率で調製した。 $C_{25}H_{30}BF_2N_3O_4$ 、暗赤色の固体、mp 185~187；TLC (EtOAc/ヘキサン、1:4)  $R_f = 0.35$ ；

【化36】

$^1H$ NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.88 (1 H, d,  $J=2.3$

20

Hz), 7.76 (1 H, d,  $J=2.3$  Hz), 4.00 (3 H, s), 3.83 (3 H, s), 2.51 (6 H, s), 2.29 (4 H, q,  $J=7.6$

Hz), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t,  $J=7.6$  Hz);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  154.5, 152.8, 151.8,

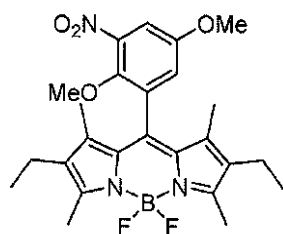
143.8, 137.1, 133.4, 133.2, 130.3, 129.5, 117.8, 108.1, 60.8, 56.4, 17.0, 14.6, 12.6, 11.6;

HRMS、 $C_{25}H_{31}BF_2N_3O_4$ ：計算値 486.2376、実測値： $m/z$  486.2378  $[M+H]^+$ 。

2,6-ジエチル-4,4-ジフルオロ-8-(2,5-ジメトキシ-3-ニトロフェニル)-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(5)。

30

【化37】



【0166】

40

化合物5は、2,4-ジメチル-3-エチルピロールおよび2,5-ジメトキシ-3-ニトロベンズアルデヒドから3つのステップについて36%収率で調製した。 $C_{25}H_{30}BF_2N_3O_4$ 、暗赤色の固体、mp 181~183；TLC ( $CH_2Cl_2$ /ヘキサン、3:7)  $R_f = 0.5$ ；

## 【化 3 8】

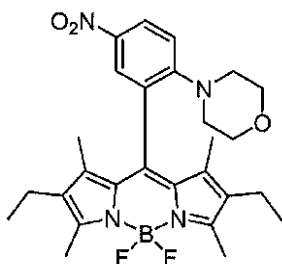
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.41 (1 H, d,  $J=3.1$  Hz),  
6.98 (1 H, d,  $J=3.1$  Hz), 3.83 (3 H, s), 3.71 (3 H, s), 2.52 (6 H, s), 2.30 (4 H, q,  $J=7.6$  Hz),  
1.44 (6 H, s), 0.98 (6 H, t,  $J=7.6$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.6, 154.8, 145.0,  
144.3, 137.3, 133.4, 133.2, 132.9, 130.3, 120.7, 110.4, 62.2, 56.2, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7;

HRMS、 $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$  : 計算値 486.2376、実測値 :  $m/z$  486.2378  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - (2 - モルホリノ - 5 - ニトロフェニル) - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - イндаセン (6)。

10

## 【化 3 9】



20

化合物 6 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 2 - モルホリノ - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 3.8% 収率で調製した。 $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_3$ 、暗赤色の固体、mp 179 ~ 181 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7)  $R_f = 0.25$  ;

## 【化 4 0】

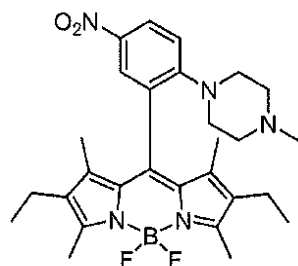
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.24 (1 H, dd,  $J=9.1$ ,  
2.6 Hz), 8.02 (1 H, d,  $J=2.6$  Hz), 6.96 (1 H, d,  $J=9.1$  Hz), 3.84 (4 H, t,  $J=4.3$  Hz), 3.24 (4 H,  
t,  $J=4.3$  Hz), 2.52 (6 H, s), 2.31 (4 H, q,  $J=7.6$  Hz), 1.42 (6 H, s), 0.99 (6 H, t,  $J=7.6$  Hz);  $^{13}\text{C}$   
NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.1, 154.9, 141.1, 137.1, 136.0, 133.5, 129.8, 127.4, 126.2, 126.1,  
117.4, 66.6, 50.4, 17.1, 14.6, 12.6, 12.1;

30

HRMS、 $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_3$  : 計算値 511.2692、実測値 :  $m/z$  511.2695  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - [2 - (4 - メチルピペラジノ) - 5 - ニトロフェニル] - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - イндаセン (7)。

## 【化 4 1】



40

## 【0167】

化合物 7 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 2 - (4 - メチルピペラジノ) - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 4.8% 収率で調製した。

50

$C_{28}H_{36}BF_2N_5O_2$ 、暗赤色の固体、mp 175 ~ 177 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7)  $R_f = 0.25$  ;

【化 4 2】

$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.21

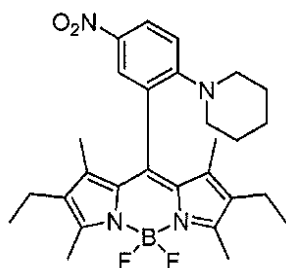
(1 H, dd,  $J = 9.2, 2.8$  Hz), 8.00 (1 H, d,  $J = 2.8$  Hz), 6.93 (1 H, d,  $J = 9.2$  Hz), 3.29 (4 H, t,  $J = 4.7$  Hz), 2.52 (6 H, s), 2.32 (4 H, q,  $J = 7.6$  Hz), 2.19 (4 H, t,  $J = 4.7$  Hz), 2.15 (3 H, s), 1.42 (6 H, s), 0.99 (6 H, t,  $J = 7.6$  Hz);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155.1, 154.6, 140.6, 137.2, 136.4, 133.4, 129.9, 127.4, 126.1, 125.5, 117.5, 54.7, 49.8, 45.9, 17.1, 14.7, 12.6, 12.1;

10

HRMS、 $C_{28}H_{37}BF_2N_5O_2$  : 計算値 524.3008、実測値 :  $m/z$  524.3010  $[M+H]^+$ 。

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - (2 - ピペリジノ - 5 - ニトロフェニル - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン (8))。

【化 4 3】



20

化合物 8 は、2, 4 - ジメチル - 3 - エチルピロールおよび 2 - ピペリジノ - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 40 % 収率で調製した。 $C_{28}H_{35}BF_2N_4O_2$ 、暗赤色の固体、mp 201 ~ 203 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9)  $R_f = 0.38$  ;

【化 4 4】

$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.19 (1 H, dd,  $J = 9.2,$

30

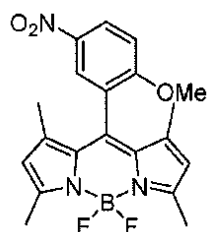
2.8 Hz), 7.97 (1 H, d,  $J = 2.8$  Hz), 6.91 (1 H, d,  $J = 9.2$  Hz), 3.23 (4 H, t,  $J = 5.3$  Hz), 2.52 (6 H, s), 2.30 (4 H, q,  $J = 7.6$  Hz), 1.48-1.44 (2 H, m), 1.43 (6 H, s), 1.37-1.34 (4 H, m), 0.98 (6 H, t,  $J = 7.6$  Hz);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  156.0, 154.3, 139.9, 137.2, 137.0, 133.2, 130.0, 127.5, 126.1, 125.1, 117.3, 51.3, 25.8, 23.9, 17.1, 14.6, 12.6, 12.1;

HRMS、 $C_{28}H_{36}BF_2N_4O_2$  : 計算値 509.2899、実測値 :  $m/z$  509.2901  $[M+H]^+$ 。

4, 4 - ジフルオロ - 8 - (2 - メトキシ - 5 - ニトロフェニル) - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン (9)。

40

【化 4 5】



化合物 9 は、2, 4 - ジメチルピロールおよび 2 - メトキシ - 5 - ニトロベンズアルデヒドから 3 つのステップについて 39 % 収率で調製した。 $C_{20}H_{20}BF_2N_3O_3$ 、

50

暗赤色の固体、mp 178 ~ 180 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 4)  $R_f = 0.31$  ;

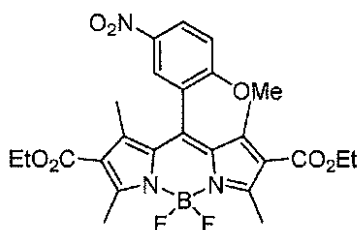
【化46】

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.42 (1 H, dd,  $J=9.1, 2.7$  Hz), 8.17 (1 H, d,  $J=2.7$  Hz), 7.12 (1 H, d,  $J=9.1$  Hz), 6.02 (2 H, s), 3.93 (3 H, s), 2.59 (6 H, s), 1.46 (6 H, s);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.7, 156.1, 141.9, 135.0, 131.1, 126.9, 126.0, 124.8, 121.5, 118.9, 111.0, 56.7, 14.6, 14.2;

HRMS、 $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_3$  : 計算値 400.1644、実測値 :  $m/z$  400.1640 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ 。 10

2,6-ジエトキシカルボニル-4,4-ジフルオロ-8-(2-メトキシ-5-ニトロフェニル)-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(10)。

【化47】



20

化合物10は、2,4-ジメチル(dimethyl)-4-エトキシカルボニルピロールおよび2-メトキシ-5-ニトロベンズアルデヒドから3つのステップについて60%収率で調製した。 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_7$ 、橙赤色の固体、mp 181 ~ 183 ; TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / ヘキサン、7 : 3)  $R_f = 0.18$  ;

【化48】

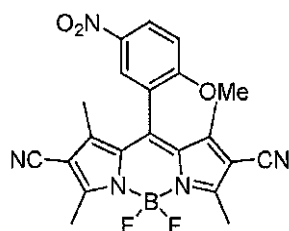
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.43 (1 H, dd,  $J=9.2, 2.8$  Hz), 8.09 (1 H, d,  $J=2.8$  Hz), 7.11 (1 H, d,  $J=9.2$  Hz), 4.26 (4 H, q,  $J=7.1$  Hz), 3.89 (3 H, s), 2.82 (6 H, s), 1.71 (6 H, s), 1.31 (6 H, t,  $J=7.1$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.0, 161.4, 160.0, 146.4, 142.2, 139.2, 131.1, 127.6, 125.5, 124.3, 122.7, 111.3, 60.3, 56.8, 15.1, 14.2, 13.2;

30

HRMS、 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_7$  : 計算値 544.2067、実測値 :  $m/z$  544.2061 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ 。

2,6-ジシアノ-4,4-ジフルオロ-8-(2-メトキシ-5-ニトロフェニル)-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(11)。

【化49】



40

【0168】

化合物11は、3-シアノ-2,4-ジメチルピロール<sup>57</sup>および2-メトキシ-5-ニトロベンズアルデヒドから3つのステップについて13%収率で調製した。 $\text{C}_{22}\text{H}_{11}$  50

$C_{22}H_{19}BF_2N_5O_3$ 、赤色の固体、mp 278 ~ 280 ; TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / ヘキサン、7 : 3) R<sub>f</sub> = 0.18 ;

【化50】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.49 (1 H, dd, J=9.1, 2.6 Hz), 8.10 (1 H, d, J=2.6 Hz), 7.19 (1 H, d, J=9.1 Hz), 3.93 (3 H, s), 2.72 (6 H, s), 1.63 (6 H, s); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.9, 160.2, 148.2, 142.2, 140.6, 131.2, 128.3, 125.1, 122.2, 113.2, 111.8, 106.8, 57.1, 13.9, 13.7;

HRMS、 $C_{22}H_{19}BF_2N_5O_3$  : 計算値 450.1549、実測値 : m/z 450.1546 [M+H]<sup>+</sup>。 10

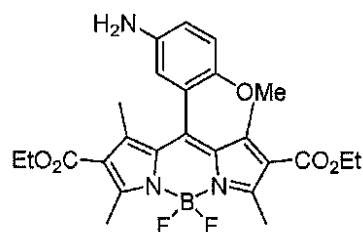
アジド - BODIPY (Az1 ~ Az11) の一般合成手順および生成物特性決定。

【0169】

EtOH (20 mL) および THF (20 mL) の混合溶媒中のニトロ - BODIPY 1 ~ 11 (0.5 mmol) の溶液を、Ar で 10 分間パージした。ヒドラジン - 水和物 (0.3 mL) および 10% Pd/C (60 mg、0.1 当量) を加えた。反応混合物を 30 分間加熱還流し、次いで、Pd/C を真空濾過によって除去した。溶媒の蒸発後、残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによって精製し、アミノ - BODIPY の赤色の固体を得た。アミノ - BODIPY Am1 ~ Am11 の粗生成物を、50 mL の丸底フラスコ中で CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) に溶解した。トリエチルアミン (Et<sub>3</sub>N、1.5 mmol) および CuSO<sub>4</sub> の溶液 (0.1 mL の水中 25 μmol) を、フラスコに加えた。新たに調製したトリフリルアジド (TfN<sub>3</sub>) の溶液 (3 mL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 1.5 mmol) を次いで加え、メタノール (0.5 mL) を加えることによって混合物を均質なものとした。室温にて 3 時間攪拌した後、混合物を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (10 mL) 中に注ぎ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物を、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / ヘキサン、EtOAc / ヘキサンまたは MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> による溶出によるシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによって精製し、対応するアジド - BODIPY 生成物 Az1 ~ Az11 を得た。 20

8 - (5 - アミノ - 2 - メトキシフェニル) - 2, 6 - ジエトキシカルボニル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Am10)。 30

【化51】



【0170】

化合物 Am10 は、化合物 10 から 83% 収率で調製した。 $C_{26}H_{30}BF_2N_3O_5$ 、暗赤色の固体、mp 188 ~ 190 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7) R<sub>f</sub> = 0.23 ; 40

## 【化52】

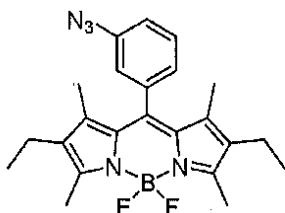
 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.82–6.77 (2 H, m), 6.45 (1 H, d,  $J=2.5$  Hz), 4.25 (4 H, q,  $J=7.1$  Hz), 3.66 (3 H, s), 3.52 (2 H, br s), 2.79 (6 H, s), 1.82 (6 H, s), 1.30 (6 H, t,  $J=7.1$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.4, 158.9, 148.8, 147.3, 143.4, 141.4, 131.5, 123.7, 122.0, 117.4, 115.6, 112.8, 60.1, 56.0, 14.9, 14.3, 12.9;

HRMS、 $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_5$  : 計算値 514.2325、実測値 :  $m/z$  514.2327  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

8 - (3 - アジドフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az1)。

## 【化53】



## 【0171】

化合物 Az1 は、化合物 1 から 2 つのステップについて 47% 収率で調製した。 $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_5$ 、暗赤色の固体、mp 151 ~ 153 (摂氏温度); TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9)  $R_f = 0.38$ ;

## 【化54】

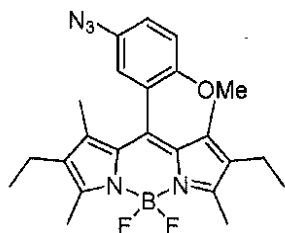
 $^1\text{H}$ 

NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.01 (1 H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.85 (1 H, s), 7.75 (1 H, t,  $J=7.7$  Hz), 7.65 (1 H, d,  $J=7.1$  Hz), 2.52 (6 H, s), 2.27 (4 H, q,  $J=7.4$  Hz), 1.22 (6 H, s), 0.95 (6 H, t,  $J=7.4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.0, 154.7, 137.7, 137.4, 137.1, 135.3, 133.3, 130.5, 130.2, 121.2, 121.0, 17.0, 14.5, 12.6, 12.1;

HRMS、 $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_5$  : 計算値 422.2328、実測値 :  $m/z$  422.2330  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

8 - (5 - アジド - 2 - メトキシフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az2)。

## 【化55】



## 【0172】

化合物 Az2 は、化合物 2 から 2 つのステップについて 59% 収率で調製した。 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$ 、暗赤色の固体、mp 163 ~ 165 (摂氏温度); TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 4)  $R_f = 0.52$ ;

## 【化56】

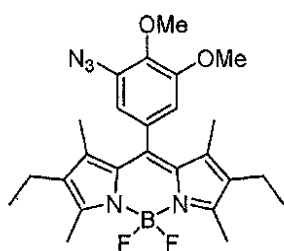
<sup>1</sup>H

NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.08 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.95 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (1 H, s),  
3.74 (3 H, s), 2.50 (6 H, s), 2.28 (4 H, q, *J* = 7.4 Hz), 1.36 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, *J* = 7.4 Hz); <sup>13</sup>C  
NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.1, 153.7, 137.6, 135.5, 133.4, 132.6, 130.6, 126.2, 120.5, 112.4,  
56.0, 17.1, 14.6, 12.5, 11.2;

HRMS、C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O : 計算値 452.2433、実測値 : m/z 452  
.2429 [M+H]<sup>+</sup>。

8 - (3 - アジド - 4,5 - ジメトキシフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフル  
オロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン  
(Az3)。

## 【化57】



## 【0173】

化合物 Az3 は、化合物 3 から 2 つのステップについて 51% 収率で調製した。C<sub>25</sub>  
H<sub>30</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>、橙赤色の固体、mp 156 ~ 158 (摂氏温度) ; TLC (E  
tOAc / ヘキサン、1 : 4) R<sub>f</sub> = 0.41 ;

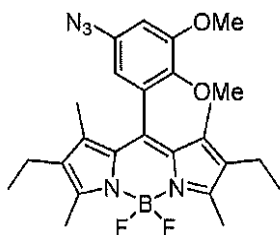
## 【化58】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.09 (1 H, d, *J* = 1.4 Hz), 5.85 (1 H, d, *J* = 1.4 Hz), 4.64 (3 H, s),  
3.95 (3 H, s), 2.49 (6 H, s), 2.26 (4 H, q, *J* = 7.5 Hz), 1.26 (6 H, s), 0.94 (6 H, t, *J* = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C  
NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.4, 155.2, 154.56, 154.53, 137.6, 137.3, 133.1, 130.4, 128.4,  
118.2, 100.6, 65.6, 56.9, 17.0, 14.5, 12.5, 12.0;

HRMS、C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 482.2539、実測値 : m/z 48  
2.2542 [M+H]<sup>+</sup>。

8 - (5 - アジド - 2,3 - ジメトキシフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフル  
オロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン  
(Az4)。

## 【化59】



## 【0174】

化合物 Az4 は、化合物 4 から 2 つのステップについて 54% 収率で調製した。C<sub>25</sub>  
H<sub>30</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>、暗赤色の固体、mp 158 ~ 160 (摂氏温度) ; TLC (E  
tOAc / ヘキサン、1 : 4) R<sub>f</sub> = 0.48 ;

## 【化60】

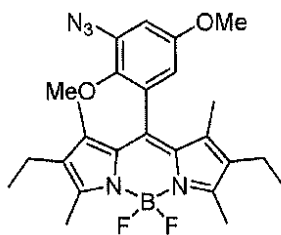
<sup>1</sup>H

NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (1 H, s), 6.82 (1 H, s), 3.94 (3 H, s), 3.88 (3 H, s), 2.54 (6 H, s), 2.29 (4 H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.43 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, *J* = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.1, 154.4, 153.1, 152.9, 137.3, 134.1, 133.2, 130.6, 129.3, 125.1, 97.6, 60.8, 56.1, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7;

HRMS、C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 482.2539、実測値 : m/z 482.2541 [M+H]<sup>+</sup>。

8 - (3 - アジド - 2, 5 - ジメトキシフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az5)。

## 【化61】



## 【0175】

化合物 Az5 は、化合物 5 から 2 つのステップについて 54% 収率で調製した。C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>、暗赤色の固体、mp 150 ~ 152 (摂氏温度); TLC (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>/ヘキサン、1:4) R<sub>f</sub> = 0.45;

## 【化62】

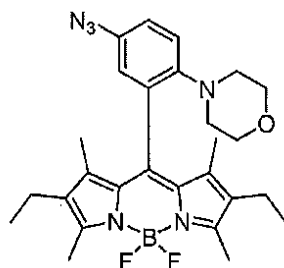
<sup>1</sup>H

NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.16 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 5.81 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz), 4.42 (3 H, s), 3.72 (3 H, s), 2.55 (6 H, s), 2.32 (4 H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.52 (6 H, s), 0.99 (6 H, t, *J* = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.0, 156.7, 154.7, 154.4, 137.3, 134.1, 133.1, 133.0, 130.6, 126.0, 90.7, 66.1, 55.8, 17.1, 14.6, 12.6, 11.8;

HRMS、C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 482.2539、実測値 : m/z 482.2543 [M+H]<sup>+</sup>。

8 - (5 - アジド - 2 - モルホリノフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az6)。

## 【化63-1】



## 【0176】

化合物 Az6 は、化合物 6 から 2 つのステップについて 62% 収率で調製した。C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O、暗赤色の油; TLC (EtOAc/ヘキサン、1:4) R<sub>f</sub> = 0.



4 ;

【化 6 3 - 2】

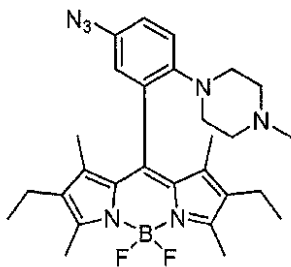
 $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 

7.06 (1 H, dd,  $J=8.7, 2.7$  Hz), 7.01 (1 H, d,  $J=8.7$  Hz), 6.81 (1 H, d,  $J=2.7$  Hz), 3.48 (4 H, t,  $J=4.4$  Hz), 2.94 (4 H, t,  $J=4.4$  Hz), 2.51 (6 H, s), 2.30 (4 H, q,  $J=7.6$  Hz), 1.39 (6 H, s), 0.97 (6 H, t,  $J=7.6$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.8, 147.3, 137.4, 134.9, 132.9, 131.0, 130.2, 121.1, 120.6, 120.5, 67.1, 51.6, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7;

HRMS、 $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}$  : 計算値 507.2855、実測値 :  $m/z$  507.2858 [M+H] $^+$ 。

8 - [5 - アジド - 2 - (4 - メチルピペラジノ) フェニル] - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az7)。

【化 6 4】



20

【0177】

化合物 Az7 は、化合物 7 から 2 つのステップについて 72% 収率で調製した。 $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_7$ 、暗赤色の泡 ; TLC (MeOH /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、1 : 19)  $R_f = 0.33$  ;

【化 6 5】

 $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.06–7.01 (2 H, m), 6.80 (1 H, s), 2.99 (4 H, br s), 2.51 (6 H, s), 2.32–2.26 (8 H, m), 2.18 (3 H, s), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t,  $J=7.4$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.8, 146.8, 137.4, 135.3, 133.0, 131.2, 130.2, 121.4, 121.0, 120.5, 54.7, 50.1, 45.0, 17.1, 14.7, 12.6, 11.7;

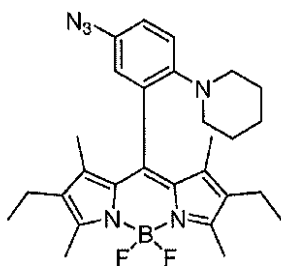
30

HRMS、 $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_7$  : 計算値 520.3172、実測値 :  $m/z$  520.3177 [M+H] $^+$ 。

8 - (5 - アジド - 2 - ピペリジノフェニル) - 2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az8)。

40

【化 6 6】



【0178】

50

化合物 A z 8 は、化合物 8 から 2 つのステップについて 6 9 % 収率で調製した。C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>、暗赤色の油；TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) R<sub>f</sub> = 0.67；

【化 6 7】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ

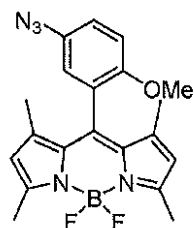
7.07 (1 H, dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz), 7.03 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.82 (1 H, d, *J* = 2.6 Hz), 2.94 (4 H, t, *J* = 5.2 Hz), 2.56 (6 H, s), 2.34 (4 H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.44 (6 H, s), 1.43–1.38 (6 H, m), 1.02 (6 H, t, *J* = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.3, 148.9, 138.2, 137.5, 133.8, 132.6, 130.7, 130.4, 121.0, 120.8, 120.3, 52.6, 26.2, 24.1, 17.1, 14.6, 12.5, 11.7;

10

HRMS、C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>：計算値 505.3063、実測値：m/z 505.3066 [M + H]<sup>+</sup>。

8 - (5 - アジド - 2 - メトキシフェニル) - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (A z 9)。

【化 6 8】



20

【0179】

化合物 A z 9 は、化合物 9 から 2 つのステップについて 7 1 % 収率で調製した。C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O、暗赤色の固体、mp 152 ~ 154 (摂氏温度)；TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) R<sub>f</sub> = 0.51；

【化 6 9】

<sup>1</sup>H

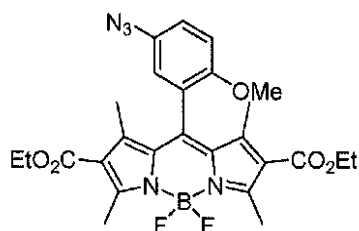
NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.08 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.96 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (1 H, s), 5.95 (2 H, s), 3.74 (3 H, s), 2.53 (6 H, s), 1.46 (6 H, s); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.4, 153.8, 142.3, 137.1, 133.5, 131.2, 125.3, 121.1, 120.7, 120.3, 112.5, 56.0, 14.6, 13.9;

30

HRMS、C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O：計算値 396.1807、実測値：m/z 396.1805 [M + H]<sup>+</sup>。

8 - (5 - アジド - 2 - メトキシフェニル) - 2, 6 - ジエトキシカルボニル - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (A z 10)。

【化 7 0】



40

【0180】

化合物 A z 10 は、化合物 A m 10 から 5 8 % 収率で調製した。C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>、赤色の固体、mp 86 ~ 88；TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7) R<sub>f</sub>

50

= 0 . 4 1 ;

【化 7 1】

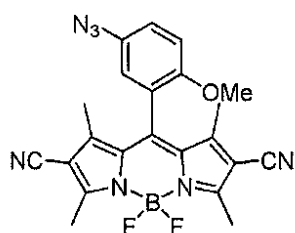
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

7.14 (1 H, dd,  $J=8.8, 2.8$  Hz), 6.99 (1 H, d,  $J=8.8$  Hz), 6.79 (1 H, d,  $J=2.8$  Hz), 4.26 (4 H, q,  $J=7.1$  Hz), 3.75 (3 H, s), 2.80 (6 H, s), 1.76 (6 H, s), 1.31 (6 H, t,  $J=7.1$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.3, 159.4, 153.5, 146.9, 141.4, 134.2, 131.3, 124.7, 122.3, 121.4, 119.8, 112.7, 60.2, 56.1, 15.0, 14.3, 13.0;

HRMS、 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5$  : 計算値 540.2230、実測値 :  $m/z$  540.2227 [M+H]<sup>+</sup>。 10

8 - (5 - アジド - 2 - メトキシフェニル) - 2, 6 - ジシアノ - 4, 4 - ジフルオロ - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (Az 11)。

【化 7 2】



20

【0181】

化合物 Az 11 は、化合物 11 から 2 つのステップについて 61% 収率で調製した。  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}$ 、赤色の固体、mp 141 ~ 143 (摂氏温度); TLC (  $\text{C}_6\text{H}_6$  / ヘキサン、7 : 3 )  $R_f = 0.31$  ;

【化 7 3】

$^1\text{H}$

NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.21 (1 H, dd,  $J=8.9, 2.3$  Hz), 7.06 (1 H, d,  $J=8.9$  Hz), 6.77 (1 H, d,  $J=2.3$  Hz), 3.77 (3 H, s), 2.70 (6 H, s), 1.67 (6 H, s);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.6, 151.9, 147.7, 141.8, 133.6, 130.4, 121.6, 121.2, 118.2, 112.5, 112.1, 105.4, 55.3, 12.9, 12.4; 30

HRMS、 $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BF}_2\text{N}_7\text{O}$  : 計算値 446.1712、実測値 :  $m/z$  446.1714 [M+H]<sup>+</sup>。

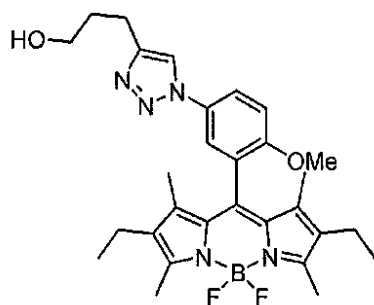
4 - ペンチン - 1 - オールとのアジド - BODIPY の銅 (I) によって触媒されるアジド - アルキン環化付加反応のための手順。

【0182】

アジド - BODIPY (Az 2 または Az 9 ~ Az 11、0.1 mmol) および 4 - ペンチン - 1 - オール (0.1 mmol) を、THF (5 mL) に溶解した。アスコルビン酸ナトリウムの新たに調製した 1 M 溶液 (0.2 mL の水中 0.2 mmol) を加え、それに続いて銅 (II) 五水和物 (0.1 mL の水中 0.005 mmol) を加えた。メタノール (0.5 mL) を加えることによって混合物を均質なものとし、次いで、室温にて 12 時間攪拌した。TLC モニタリングは、12 時間で反応体の完全な消費を示した。溶媒の蒸発の後、残渣を、EtOAc / ヘキサンによる溶出によるシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーによって精製し、対応するトリアゾール生成物 T2 および T9 ~ T11 を得た。 40

2, 6 - ジエチル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - { 3 - [ 4 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 1 - イル ] - 2 - メトキシフェニル } - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン (T2)。 50

## 【化74】



## 【0183】

10

化合物T2は、化合物Az2から71%収率で調製した。 $C_{29}H_{36}BF_2N_5O_2$ 、赤色の固体、mp 180~182 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 1)  $R_f = 0.15$  ;

## 【化75-1】

$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.89

(1 H, dd,  $J = 8.9, 2.7$  Hz), 7.66 (1 H, s), 7.46 (1 H, d,  $J = 2.7$  Hz), 7.10 (1 H,  $J = 8.9$  Hz), 3.83 (3 H, s), 3.73 (2 H, t,  $J = 6.1$  Hz), 2.88 (2 H, t,  $J = 7.3$  Hz), 2.51 (6 H, s), 2.28 (4 H, q,  $J = 7.5$  Hz),

## 【化75-2】

20

1.98–1.96 (2 H, m), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t,  $J = 7.5$  Hz);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$

156.8, 154.0, 148.3, 137.5, 134.7, 132.8, 131.3, 130.5, 125.9, 122.6, 121.9, 119.1, 112.0, 61.8,

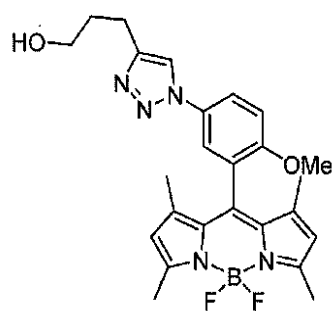
56.1, 31.8, 22.0, 17.0, 14.6, 12.5, 11.4;

HRMS、 $C_{29}H_{37}BF_2N_5O_2$  : 計算値 536.3008、実測値 :  $m/z$  536.3005 [M+H]<sup>+</sup>。

4,4-ジフルオロ-8-{3-[4-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-1,2,3-トリアゾール-1-イル]-2-メトキシフェニル}-1,3,5,7-テトラメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン(T9)。

## 【化76】

30



## 【0184】

40

化合物T9は、化合物Az9から79%収率で調製した。 $C_{25}H_{28}BF_2N_5O_2$ 、赤色の固体、mp 165~167 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、7 : 3)  $R_f = 0.23$  ;

## 【化 7 7】

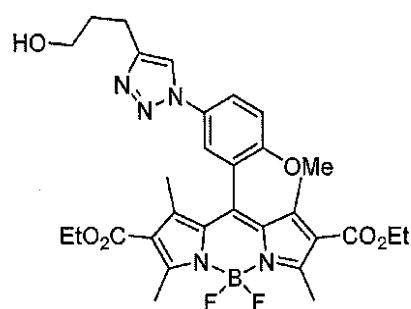
 $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.88

(1 H, d,  $J=8.8$  Hz), 7.66 (1 H, s), 7.49 (1 H, s), 7.11 (1 H, d,  $J=8.8$  Hz), 5.97 (2 H, s), 3.83 (3 H, s), 3.73 (2 H, q,  $J=5.3$  Hz), 2.88 (2 H, t,  $J=7.3$  Hz), 2.54 (6 H, s), 1.99–1.95 (2 H, m), 1.47 (6 H, s);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.5, 155.7, 148.4, 142.2, 136.3, 131.3, 131.2, 125.0, 122.7, 121.7, 121.2, 119.0, 112.1, 61.7, 56.1, 31.8, 22.0, 14.6, 14.1;

HRMS、 $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$  : 計算値 480.2382、実測値 :  $m/z$  480.2379  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2, 6 - ジエトキシカルボニル - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - { 3 - [ 4 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 1 - イル ] - 2 - メトキシフェニル } - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン ( T 1 0 ) 。

## 【化 7 8】



## 【 0 1 8 5 】

化合物 T 1 0 は、化合物 A z 1 0 から 9 0 % 収率で調製した。  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 、赤色の固体、mp 157 ~ 159 ; TLC ( EtOAc / ヘキサン、4 : 1 )  $R_f = 0.32$  ;

## 【化 7 9 - 1】

 $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 

7.91 (1 H, dd,  $J=8.9, 2.6$  Hz), 7.67 (1 H, s), 7.49 (1 H, d,  $J=2.6$  Hz), 7.14 (1 H, d,  $J=8.9$  Hz), 4.26 (4 H, q,  $J=7.1$  Hz), 3.84 (3 H, s), 3.73 (2 H, q,  $J=5.8$  Hz), 2.88 (2 H, t,  $J=7.3$  Hz), 2.81 (6 H, s), 1.99–1.94 (2 H, m), 1.79 (6 H, s), 1.31 (6 H, t,  $J=7.1$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.2, 159.6, 156.3, 148.5, 146.7, 140.6, 131.7, 131.3, 124.5, 123.3, 122.5, 121.4,

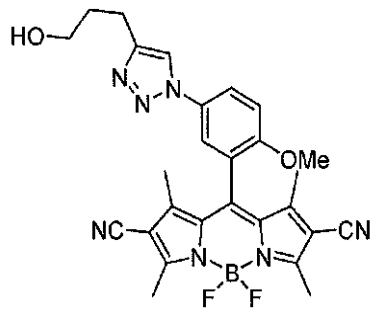
## 【化 7 9 - 2】

119.0, 112.3, 61.6, 60.3, 56.3, 31.8, 21.9, 15.0, 14.2, 13.1;

HRMS、 $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_6$  : 計算値 624.2805、実測値 :  $m/z$  624.2801  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2, 6 - ジシアノ - 4, 4 - ジフルオロ - 8 - { 3 - [ 4 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 1 - イル ] - 1, 3, 5, 7 - テトラメチル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン ( T 1 1 ) 。

## 【化80】



## 【0186】

化合物T11は、化合物Az11から78%収率で調製した。C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>、赤色の固体、mp 175~177 (摂氏温度); TLC (EtOAc) R<sub>f</sub> = 0.42;

## 【化81】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.90

(1 H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.71 (1 H, s), 7.58 (1 H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.20 (1 H, d, *J* = 9.0 Hz), 3.86 (3 H, s), 3.73 (2 H, t, *J* = 6.1 Hz), 2.89 (2 H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.71 (6 H, s), 1.99–1.95 (2 H, m), 1.69 (6 H, s); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.9, 155.7, 148.7, 148.6, 142.0, 131.9, 131.4, 123.7, 122.5, 121.0, 118.9, 113.4, 112.6, 106.5, 61.7, 56.5, 31.8, 22.0, 13.9, 13.6;

HRMS、C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 530.2287、実測値 : m/z 530.2289 [M+H]<sup>+</sup>。

(実施例3)

生体分子の検出およびイメージング  
分光学的測定

## 【0187】

アミノ-BODIPY Am10、アジド-BODIPY Az2およびAz9~Az11、ならびに対応するトリアゾリル-BODIPY T2およびT9~T11の全ての分光学的測定は、1 cmのパス長を有するキュベットを使用して25 ± 0.1にてエタノール中に行った。測定前に、全ての溶液をアルゴン下で数分間脱気した。各実験のために、スリット幅は、励起および発光の両方について2.0 nmであった。0.07~0.7の吸光度範囲内で吸光度スペクトルを測定した (l = 1.0 cm)。蛍光量子収率測定を、蛍光光度計およびUV-Vis機器で行った。相対的量子効率を、補正した発光スペクトル下面積を比較することによって得た。報告した量子収率は、下記の等式によって4つのポイントの平均として計算した。

試料 = 標準 (A<sub>標準</sub> / A<sub>試料</sub>) (F<sub>試料</sub> / F<sub>標準</sub>) (n<sub>試料</sub> / n<sub>標準</sub>)<sup>2</sup>  
式中、「 $\phi$ 」は、量子収率であり、「A」は、励起頻度における吸光度であり、「F」は、発光曲線下面積であり、「n」は、使用した溶媒の屈折率である。0.1 MのNaOH水溶液中のフルオレセイン ( $\phi_f = 0.85$ )、およびエタノール中のローダミン6G ( $\phi_f = 0.95$ ) は、蛍光標準である。(Parker, C. A.; Rees, W. T. *Analyst*, 1960年、85巻、587~600頁; Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. J. *Luminescence*, 1982年、27巻、455~462頁。)

マイクロタイタープレートにおけるCuAAC反応の蛍光スクリーニングの手順。

## 【0188】

96ウェルブラックボトムマイクロタイタープレートを実験のために使用し、Molecular Devices Spectramax M5分光計を使用して蛍光測定を行った。上の列において、各ウェルは、EtOH/水(1:1)中の200 μLのアジド-BODIPY (Az1~Az8) (15 μM) を含有した。下の列において、各ウェル

10

20

30

40

50

における全体的な容量は、アジド - BODIPY (Az1 ~ Az8) (15  $\mu$ M)、4 - ペンチン - 1 - オール (75  $\mu$ M)、CuSO<sub>4</sub> (150  $\mu$ M)、アスコルビン酸ナトリウム (300  $\mu$ M) およびトリス - トリアゾールリガンド (150  $\mu$ M) の EtOH / 水 (1 : 1) 溶液を含有して 200  $\mu$ L であった。TLC または MS 分析によってモニターするように、プレート を室温にて 6 時間インキュベートし、次いで、蛍光測定 ( $\lambda_{ex}$  = 488 nm) を *in situ* で行った。蛍光性または非蛍光性トリアゾール化合物の形成は、UV ランプによる 365 nm での照射によって識別することができた (図 2)。

AzBOCET (Az10) によるタンパク質標識化

#### 【0189】

タンパク質標識化実験のために、90 : 10 の pH 7.4 PBS / DMSO 中の、60  $\mu$ g / mL のアルキニル官能化された BSA および無修飾の BSA を、100  $\mu$ M のトリス - トリアゾールリガンド、1 mM の CuSO<sub>4</sub>、2 mM の新たに調製したアスコルビン酸ナトリウム、および 0 ~ 100  $\mu$ M の Az10 と共に室温にて暗黒 1 時間インキュベートした。各混合物 (30  $\mu$ L) を、5% - メルカプトエタノールを含有する 10  $\mu$ L (4x) の SDS 添加色素と混合し、40  $\mu$ L のそれぞれを、4 ~ 12% の Bis - Tris ゲル上に徐々に添加した。ゲルを、100 V にて 2.5 時間流した。ゲルを Typhoon 9400 Variable Mode Imager (Amersham Bioscience) ( $\lambda_{ex}$  = 488 nm;  $\lambda_{em}$  = 526 nm) を使用して画像化し、クマシーブルーで染色した (図 5)。

細胞中の蛍光標識化の顕微鏡分析

#### 【0190】

CL1 - 5 細胞をチャンバースライド上に播種し (ウェル毎に  $1 \times 10^4$  個の細胞 / 1 mL)、培養培地 (10% FBS、100 U / mL のペニシリン、100  $\mu$ g / mL のストレプトマイシン、1 mM の L - グルタミンおよび 1 mM のピルビン酸ナトリウムを補充した RPMI - 1640) 中で 100  $\mu$ M のそれぞれのアルキニル - 糖または対照と共に 3 日間インキュベートした。アルキニル - 糖は、過アセチル化アルキニル - N - アセチルマンノサミン (Ac<sub>4</sub>ManNA1)、過アセチル化アルキニル - N - アセチルガラクトサミン (Ac<sub>4</sub>GalNA1) および過アセチル化アルキニル - N - アセチルグルコサミン (Ac<sub>4</sub>GlcNA1) を含む。対照糖は、過アセチル化 N - アセチルマンノサミン (Ac<sub>4</sub>ManNAc)、過アセチル化 N - アセチルガラクトサミン (Ac<sub>4</sub>GalNAc) および過アセチル化 N - アセチルグルコサミン (Ac<sub>4</sub>GlcNAc) を含む。

#### 【0191】

糖類似体処理した細胞への AzBOCET (Az10) の標識化を検出するために、糖処理した細胞を PBS で洗浄し、PBS 中の 3% パラホルムアルデヒドで室温にて 20 分間固定した、PBS 中の 0.2% Triton X - 100 で室温にて 20 分間透過性とし、PBS 中の 3% ウシ血清アルブミンで室温にて 30 分間ブロックした。細胞中の蛍光標識されたアルキニル付グリコシルコンジュゲートを観察するために、細胞を、50% エタノールを有する PBS 緩衝液中の 0.1  $\mu$ M の AzBOCET (Az10)、100  $\mu$ M のトリス - トリアゾールリガンド、1 mM の CuSO<sub>4</sub>、および 2 mM のアスコルビン酸ナトリウムと共に室温にて 1 時間インキュベートした。細胞の蛍光画像は、共焦点レーザー走査顕微鏡を使用することによって 496 nm の励起にて取得した。アルキニル - グリカンの場所を同定するために、プローブ標識した細胞を、抗 GRASP 65、それに続いてゴルジのための Cy3 コンジュゲートした抗ウサギ、および細胞核のためのヘキストでさらに染色した (図 6)。

細胞抽出物中のアルキニル付シリアル糖タンパク質の検出および同定

#### 【0192】

100  $\mu$ M の Ac<sub>4</sub>ManNAc または Ac<sub>4</sub>ManNA1 で 3 日間処理した CL1 - 5 細胞から収集した細胞抽出物 (20  $\mu$ g) を、示した濃度の Az10、100  $\mu$ M のトリス - トリアゾールリガンド、<sup>53</sup> 1 mM の CuSO<sub>4</sub>、および 2 mM のアスコルビン酸ナトリウムと共に室温にて 1 時間インキュベートし、CuAAC 反応が進行した。反応し

10

20

30

40

50

た抽出物を SDS - PAGE によってさらに分離し、蛍光シグナルを Typhoon 9400 Variable Mode Imager (Amersham BioScience) ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$ ) によって検出した。クマシーブルーで染色されたタンパク質バンドは、添加対照を表した (図 7)。

【0193】

蛍光シグナルで標識されたタンパク質を含有する示した 12 バンドを切除し、小さな断片に切断した。ゲル断片を 50 mM の 1 : 1 (v/v) の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3 / \text{CH}_3\text{CN}$  で脱染し、次いで、56 にて 25 mM の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  中の 10 mM のジチオトレイトール (DTT) で 45 分間再水和した。過剰な DTT を除去し、アルキル化のために 25 mM の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  中の 55 mM のヨードアセトアミド (IAA) を室温にて暗中 30 分間加えた。過剰な IAA を除去し、ゲルを 50 mM の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3 / \text{CH}_3\text{CN}$ 、1 : 1 (v/v) で 2 回洗浄し、真空遠心分離を使用して乾燥した後に  $\text{CH}_3\text{CN}$  で乾燥させた。新たに調製したトリプシン溶液 (25 mM の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  中 5 ng /  $\mu\text{L}$ 、40  $\mu\text{L}$ ) を各ゲル断片に加え、ゲル断片を 37 に 18 時間温めた。消化されたペプチドを、50%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50  $\mu\text{L}$ ) を含有する 1% トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid) (TFA) の水溶液で超音波処理下にて 10 分間 2 回抽出した。合わせた抽出物および洗浄剤を、3 時間の真空遠心分離を使用して濃縮し、揮発性物質を除去した。消化されたペプチドを分析し、表 2 において示すようにハイブリッドリニアイオントラップ四重極フーリエ変換 (LTQ - FT) 質量分析計で同定した。

【表 2 - 1】

表 2. 細胞抽出物中の質量分析法によって同定されるシリアル糖タンパク質。タンパク質はアクセッション番号によって表に表し、そのタンパク質について見出されたペプチドの数 (Pep. 数) を列挙する。

バンド	番号	遺伝子名	タンパク質名	アクセッション番号	Pep. 数
1	1-1	IGF2R	カチオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体	IPI00289819	13
4	4-1	COLGALT 1	プロコラーゲンガラクトシルトランスフェラーゼ 1	IPI00168262	16



【表 2 - 2】

	4-2	PRKCSH	グルコシダーゼ2サブユニットベータ	IPI00026154 IPI00792916	19
	4-3	FKBP10	ペプチジル-プロリルシストランスイソメラーゼFKBP10	IPI00303300	22
	4-4	SLC1A1	中性アミノ酸輸送体B(0)	IPI00019472 IPI00922487 IPI00922776	6
	4-5	RPN1	リボホリン-1	IPI00025874	1
5	5-1	P4HA1	プロリル4-ヒドロキシラーゼサブユニットアルファ-1	IPI00009923 IPI00218682 IPI00916535	14
	5-2	OIT3	腫瘍性タンパク質誘発転写物3タンパク質	IPI00328215 IPI00855752	4
6	6-1	NCLN	ニカリン(Nicalin)	IPI00470649 IPI00607732	4
7	7-1	ERO1L	ERO1-様タンパク質アルファ	IPI00386755	4
8	8-1	NCEH1	中性コレステロールエステルヒドロラーゼ1	IPI00002230 IPI00790972 IPI00924788	4
	8-2	SERPINH1	セルピンH1	IPI00032140	3
	8-3	SIGLEC7	シアル酸-結合Ig-様レクチン7	IPI00004288 IPI00220858 IPI00220860 IPI00220862	2
9	9-1	ERLIN1	エルリン(Erlin)-1	IPI00007940	18
	9-2	DNAJB11	DnaJホモログサブファミリーBメンバー11	IPI00074870	9
	9-3	AHSG	アルファ-2-HS-糖タンパク質	IPI00953689	6
	9-4	RCN1	レチコカルビン-1	IPI00015842	1
	9-5	IMPAD1	イノシトールモノホスファターゼ3	IPI00787853	2
	9-6	IKBIP	核因子カッパ-Bキナーゼ-相互作用タンパク質の阻害剤	IPI00043598 IPI00401792 IPI00797136 IPI00896464	4
10	10-1	CTSL	カテプシンL1	IPI00012887	7
	10-2	TOR1B	トーション-1B	IPI00023137	1
11	11-1	SUMF2	スルファターゼ修飾因子2	IPI00334513 IPI00334514 IPI00334516 IPI00783919 IPI00939930	5
	11-2	CNPY3	タンパク質キャノピー(canopy)ホモログ3	IPI00398366 IPI00551062	4
	11-3	PPT1	パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ1	IPI00002412	2
	11-4	SSR1	トランスロコン関連タンパク質サブユニットアルファ	IPI00301021 IPI00449669	2
12	12-1	PSMA1	プロテアソームサブユニットアルファタイプ-1	IPI00016832 IPI00472442	30
	12-2	CTXZ	カテプシンZ	IPI00002745	3

10

20

30

## 細胞におけるデュアル蛍光標識化の顕微鏡分析

【0194】

CL1-5細胞をチャンパースライド上に播種し(ウェル毎に $2.5 \times 10^4$ 個の細胞/0.5mL)、培養培地(10% FBS、100U/mLのペニシリン、100 $\mu$ g/mLのストレプトマイシン、1mMのL-グルタミンおよび1mMのピルビン酸ナトリウムを補充したRPMI-1640)中で3日間、100 $\mu$ Mのアルキニル-糖(過アセチル化アルキニル-N-アセチルマンノサミン、Ac<sub>4</sub>ManNA1)もしくはアジド-糖(過アセチル化アジド-N-アセチルグルコサミン、Ac<sub>4</sub>GlcNAz)のいずれか、もしくは両方と共に、または陰性対照として糖を伴わずにインキュベートした。細胞をPBSで3回洗浄し、次いで、10%DMSOを有するPBS中の100 $\mu$ MのcoumOCTと共に37にて30分間インキュベートした。10%DMSOを有するPBSによる3回の洗浄、それに続くPBS中の3%パラホルムアルデヒドによる室温にて20分間

40

50

の固定の後、細胞を、50%エタノールを有するPBS中の0.1 μMのAzBOCet (Az10)、100 μMのリガンド、1 mMのCuSO<sub>4</sub>、および2 mMのアスコルビン酸ナトリウムと共に室温にて1時間インキュベートし、共焦点顕微鏡(TCS-SP5-MP-SMD、Leica)を使用して細胞の蛍光画像を得た(図9)。

(実施例4)

シクロオクチン官能化された蛍光プローブ101の合成：

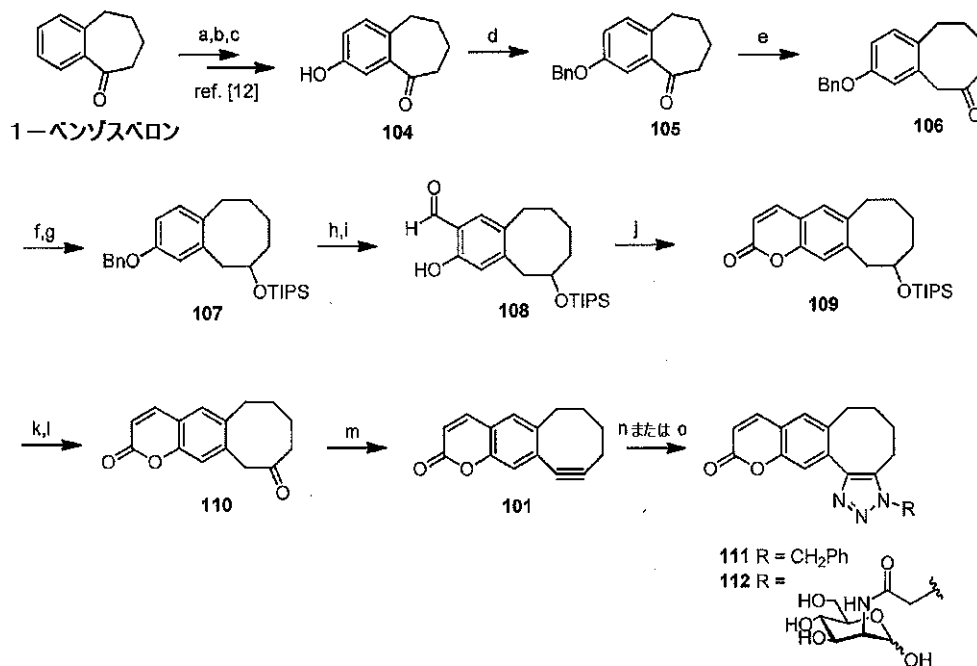
【0195】

スキーム100は、出発材料として1-ベンゾスベロンを使用した化合物101の合成を示す。従前に報告された手順に従って、1<sup>2</sup>1-ベンゾスベロンを、8位において位置選択的ニトロ化に供した。次いで、ニトロ基を還元し、それに続いて酸条件下でのジアゾ化およびヒドロキシル化を行い、アルコール104を得た。ベンジルエーテルとしてヒドロキシル基の保護の後、環状ケトン105は、BF<sub>3</sub>・OEt<sub>2</sub>の存在下でTMS-ジアゾメタンによる処理によって環拡大を受け、シクロオクタノン生成物106を73%収率で得た。NaBH<sub>4</sub>によるカルボニル基の還元、それに続くシリル化によって、シリルエーテル107を96%収率で得た。107におけるベンジル基を水素化によって除去し、フェノール中間体をEt<sub>3</sub>NおよびMgCl<sub>2</sub>の存在下で過剰なパラホルムアルデヒドで処理し、サリチルアルデヒド108が形成された。新たに調製したケテニリデントリフェニルホスホラン(ketenylidetriphenylphosphorane)による108の処理によって、109におけるクマリンスカフォールドを構築した。脱シリル化および酸化の後、ケトン110を、78%収率で得た。化合物110におけるカルボニル基を、エノールトリフレートに変換し、これをそれに続いて強塩基NaHMDSで処理し、脱離反応を生じさせ、coumOCTプローブ101を得た。

【0196】

スキーム100.SPAACをベースとする蛍光形成プローブ101、ならびに対応するトリアゾール111および112の合成。

【化82】



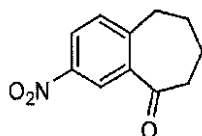
【0197】

試薬および条件：(a) 濃H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KNO<sub>3</sub>、0、1.5時間、72%；(b) Sn、濃HCl、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH、還流、50分、82%；(c) 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液、NaNO<sub>2</sub>、0 から室温、72時間、76%；(d) BnBr、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、DMF、室温、24時間、98%；(e) TMSCHN<sub>2</sub>、BF<sub>3</sub>・OEt<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、0、12時間、73%；(f) NaBH<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>OH、0、1時間；(g) TIP

S O T f、2,6-ルチジン、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、室温、1時間、2つのステップについて96%；(h)  $\text{H}_2$ 、Pd/C、 $\text{CH}_3\text{OH}$ 、EtOAc、1時間；(i) パラホルムアルデヒド、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{Et}_3\text{N}$ 、 $\text{CH}_3\text{CN}$ 、還流、12時間、2つのステップについて87%；(j)  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}=\text{C}=\text{O}$ 、トルエン、90、1.5時間、83%；(k) TBAF、THF、0 から室温、1時間；(l)  $(\text{COCl})_2$ 、DMSO、 $\text{Et}_3\text{N}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、-78 から室温、1時間、2つのステップについて78%；(m) NaHMDS、 $\text{Tf}_2\text{NPh}$ 、-78 から室温、2時間、44%；(n)  $\text{BnN}_3$  (1.5当量)、 $\text{CH}_3\text{CN}$ 、室温、2時間、95%；(o) N-アジドアセチルマンノサミン (1.5当量)、MeOH、 $\text{H}_2\text{O}$ 、室温、2時間、92%。3-ニトロ-6,7,8,9-テトラヒドロベンゾシクロヘプテン-5-オン(A)。

10

## 【化83】



## 【0198】

1-ベンゾスベロン (4.0 g、25 mmol) の濃  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (28 mL) 溶液を0にて冷却し、 $\text{KNO}_3$  (2.8 g、27.7 mmol) の濃  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (7.5 mL) 溶液を30分の期間に亘り滴下で添加した。混合物を0にてさらに1時間攪拌し、次いで、砕いた水中に注いだ。沈殿物を濾過し、水で洗浄し、風乾し、黄色の固体を得た。粗生成物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc/ヘキサン、1:4) によって精製し、純粋なニトロ生成物A (3.69 g、72%) を得た。 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 、白色の針状物、mp 90~92 (文献値、 $^5$  mp 89~90)；TLC (EtOAc/ヘキサン、1:4)  $R_f = 0.31$ ；

20

## 【化84-1】

 $^1\text{H NMR}$  (600

## 【化84-2】

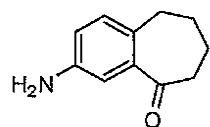
MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.53 (1 H, d,  $J=2.5$  Hz), 8.22 (1 H, dd,  $J=8.3, 2.5$  Hz), 7.37 (1 H, d,  $J=8.3$  Hz), 3.01 (2 H, t,  $J=6.4$  Hz), 2.77 (2 H, t,  $J=6.1$  Hz), 1.94-1.90 (2 H, m), 1.85-1.81 (2 H, m);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203.4, 148.0, 147.0, 139.8, 131.0, 126.2, 123.9, 40.4, 32.4, 24.7, 20.5;

30

HRMS、 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ ：計算値 206.0812、実測値： $m/z$  206.0814  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

3-アミノ-6,7,8,9-テトラヒドロベンゾシクロヘプテン-5-オン(B)。

## 【化85】



40

## 【0199】

濃 HCl (45 mL) およびエタノール (25 mL) 中のニトロ化合物A (2.05 g、10 mmol) および Sn (8.31 g、70 mmol) の混合物を、50分間加熱還流させた。混合物を室温に冷却し、30% NaOH水溶液で塩基性化した。混合物をセライトのパッドを通して濾過し、エタノールで洗浄した。濾液をEtOAc (5 x 50 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物をブライン (100 mL) で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で

50

乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、分析的に純粋なアミノ生成物 B (1.44 g、82%) を得た。C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO、黄色がかった固体、mp 102 ~ 104 (文献値、<sup>5</sup> mp 103 ~ 105) ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7) R<sub>f</sub> = 0.29 ; 【化 8 6】

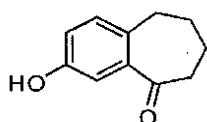
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.02 (1 H, d, J = 2.6 Hz), 6.96 (1 H, d, J = 8.0 Hz), 6.72 (1 H, dd, J = 8.0, 2.6 Hz), 3.65 (2 H, br s, NH), 2.79 (2 H, t, J = 5.5 Hz), 2.67 (2 H, t, J = 6.6 Hz), 1.81–1.74 (4 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 206.2, 144.9, 139.3, 131.6, 130.7, 118.8, 114.5, 40.8, 31.5, 25.4, 20.9;

10

HRMS、C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO : 計算値 176.1070、実測値 : m/z 176.1069 [M + H]<sup>+</sup>。

3 - ヒドロキシ - 6, 7, 8, 9 - テトラヒドロベンゾシクロヘプテン - 5 - オン (104)。

【化 8 7】



【0200】

20

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 mL の 10% 水溶液) 中のアミノ化合物 B (1.45 g、8.3 mmol) の冷たい (0 ) 溶液を、NaNO<sub>2</sub> (687 mg、9.96 mmol) の水 (3 mL) 中水溶液に注意深く加えた。反応混合物を 0 にて 30 分間攪拌し、次いで、スルファミン酸を加えて、過剰な亜硝酸を破壊した。懸濁液を濾過し、濾液を H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mL) およびトルエン (50 mL) の 10% 水溶液中に注いだ。混合物を室温にて 3 日間攪拌した。次いで、層を分離し、水層を EtOAc (5 × 30 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物をブライン (100 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) によって精製し、分析的に純粋なアルコール生成物 104 (1.11 g、76%) を得た。C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>、黄色の固体、mp 98 ~ 100 (文献値、<sup>5</sup> mp 96 ~ 99) ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7) R<sub>f</sub> = 0.37 ;

30

【化 8 8】

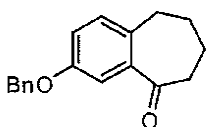
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 (1 H, d, J = 2.8 Hz), 7.07 (1 H, d, J = 8.2 Hz), 6.94 (1 H, dd, J = 8.2, 2.8 Hz), 6.27 (1 H, s, OH), 2.84 (2 H, t, J = 5.7 Hz), 2.72 (2 H, t, J = 6.4 Hz), 1.86–1.76 (4 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 206.7, 154.7, 139.2, 133.9, 131.3, 119.8, 114.9, 40.8, 31.6, 25.3, 20.8;

HRMS、C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 177.0910、実測値 : m/z 177.0911 [M + H]<sup>+</sup>。

40

3 - ベンジルオキシ - 6, 7, 8, 9 - テトラヒドロベンゾシクロヘプテン - 5 - オン (105)。

【化 8 9】



【0201】

アルコール化合物 104 (1.25 g、7.1 mmol) の無水 DMF (10 mL) 溶

50

液を、臭化ベンジル (1 mL、8.4 mmol) および炭酸カリウム (2.1 g、15.2 mmol) で処理した。懸濁液を室温にて24時間激しく攪拌した。混合物を水 (20 mL) 中に注ぎ、Et<sub>2</sub>O (4 × 30 mL) で抽出し、合わせた有機抽出物を水 (3 × 20 mL) およびブライン (100 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) によって精製し、純粋なベンジルオキシ生成物 105 (1.85 g、98%) を得た。C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>、淡黄色の油; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) R<sub>f</sub> = 0.37;

【化90】

<sup>1</sup>H NMR (600

10

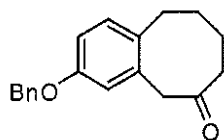
MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41 (2 H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.37–7.35 (3 H, m), 7.31 (1 H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.10 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.02 (1 H, dd, *J* = 8.3, 2.9 Hz), 5.06 (2 H, s), 2.86 (2 H, t, *J* = 5.8 Hz), 2.71 (2 H, t, *J* = 6.2 Hz), 1.84–1.78 (4 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 205.6, 157.4, 139.5, 136.7, 134.2, 131.0, 128.5 (2 ×), 127.9, 127.5 (2 ×), 119.7, 113.2, 70.1, 40.7, 31.6, 25.3, 20.8;

HRMS、C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 267.1380、実測値 : m/z 267.1383 [M + H]<sup>+</sup>。

3 - ベンジルオキシ - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 5 H - ベンゾシクロオクテン - 6 - オン (106)。

20

【化91】



【0202】

攪拌した (トリメチルシリル) ジアゾメタン (5 mL、ヘキサン中約 2 M 溶液、10 mmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) 溶液を、攪拌した化合物 105 (1.6 g、6 mmol) および BF<sub>3</sub> · OEt<sub>2</sub> (820 μL、10 mmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) 溶液に1時間の期間に亘り0にて滴下で添加した。混合物を0にて12時間攪拌し、次いで、砕いた氷中に注いだ。水層を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 20 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物をブライン (50 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮し、オレンジ色の油を得て、これをシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 19) によって精製し、純粋なシクロオクタノン生成物 106 (1.23 g、73%) を得た。C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>、無色の油; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) R<sub>f</sub> = 0.29;

30

【化92】

<sup>1</sup>H

NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.40 (2 H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.37–7.34 (2 H, m), 7.31–7.29 (1 H, m), 7.09 (1 H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.84 (1 H, dd, *J* = 8.4, 2.7 Hz), 6.75 (1 H, d, *J* = 2.7 Hz), 5.01 (2 H, s), 3.72 (2 H, s), 2.74 (2 H, t, *J* = 5.8 Hz), 2.31 (2 H, t, *J* = 5.3 Hz), 1.81–1.77 (2 H, m), 1.72–1.68 (2 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 211.8, 157.4, 136.9, 134.7, 133.4, 131.2, 128.5 (2 ×), 127.9, 127.5 (2 ×), 116.0, 114.4, 70.0, 48.8, 41.0, 32.3, 31.5, 24.7;

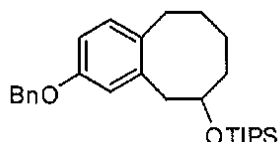
40

HRMS、C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub> : 計算値 281.1536、実測値 : m/z 281.1539 [M + H]<sup>+</sup>。

3 - ベンジルオキシ - 6 - トリイソプロピルシリルオキシ - 5, 6, 7, 8, 9, 10 - ヘキサヒドロベンゾシクロオクテン (107)。

50

## 【化93】



## 【0203】

冷たい(0℃)化合物106(4.8g、17.1mmol)のメタノール(40mL)溶液を、NaBH<sub>4</sub>(970mg、25.7mmol)で処理した。混合物を0℃にて1時間攪拌し、次いで、減圧下濃縮した。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(80mL)に溶解し、1MのHCl水溶液(50mL)およびブライン(50mL)で洗浄した。有機層をMgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、粗アルコール生成物を無色の泡(4.8g)として得て、これをそれ以上精製することなく次のステップで使用した。

10

## 【0204】

上記で調製したアルコール(4.8g、17.0mmol)および2,6-ルチジン(8mL、68.7mmol)を無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50mL)に溶解し、0℃に冷却した。トリイソプロピルシリルトリフルオロメタンスルホネート(9.2mL、34.2mmol)を、混合物に3分の期間に亘り滴下で添加した。混合物を室温にて1時間攪拌し、次いで、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)で希釈した。溶液を飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(50mL)、1MのHCl水溶液(50mL)、およびブライン(50mL)で洗浄した。有機層をMgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン、1:9)によって精製し、純粋なシリルエーテル生成物107(7.2g、2つのステップについて96%)を得た。C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>Si、無色のシロップ; TLC(EtOAc/ヘキサン、1:9)R<sub>f</sub> = 0.51;

20

## 【化94-1】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz,

CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41 (2 H, d, J = 7.4 Hz), 7.37–7.34 (2 H, m), 7.31–7.28 (1 H, m), 6.99 (1 H, dd, J = 6.6, 2.5 Hz), 6.75–6.74 (2 H, m), 5.01 (2 H, s), 3.96–3.93 (1 H, m), 2.91–2.83 (2 H, m), 2.77–2.72 (1 H, m), 2.65–2.61 (1 H, m), 1.76–1.72 (1 H, m), 1.71–1.64 (1 H, m), 1.50–1.41 (3 H, m), 1.18–1.15 (1 H, m), 1.07–1.05 (21 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.8, 138.5, 137.3,

30

## 【化94-2】

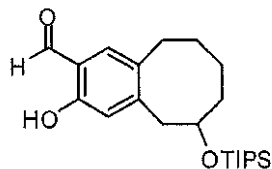
134.1, 130.1, 128.5 (2×), 127.8, 127.5 (2×), 116.7, 112.5, 73.8, 70.0, 40.9, 34.5, 32.3, 32.0, 20.8, 18.2 (6×), 12.4 (3×);

HRMS、C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>O<sub>2</sub>Si: 計算値 439.3032、実測値: m/z 439.3022 [M+H]<sup>+</sup>。

3-ヒドロキシ-6-トリイソプロピルシリルオキシ-5,6,7,8,9,10-ヘキサヒドロベンゾシクロオクテン-2-カルボキサリデヒド(108)。

40

## 【化95】



## 【0205】

化合物107(7.1g、16.2mmol)のメタノール(50mL)およびEtO

50

Ac (20 mL) 溶液を、水素雰囲気下にて Pd/C (100 mg) で処理した。1 時間攪拌した後、混合物をセライトを通して濾過し、EtOAc ですすいだ。濾液を減圧下で濃縮し、薄茶色のシロップ (5.6 g) を得て、これを無水アセトニトリル (150 mL) に溶解し、無水 MgCl<sub>2</sub> (4.64 g、48.6 mmol)、トリエチルアミン (13.5 mL、97.2 mmol) およびパラホルムアルデヒド (4.86 g、162 mmol) で処理した。懸濁液を 12 時間加熱還流させた。混合物を室温に冷却し、濃い黄色の懸濁液を 1 M の HCl 水溶液 (200 mL) で酸性化した。溶液を EtOAc (5 × 150 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物をブライン (200 mL) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 19) によって精製し、純粋なサリチルアルデヒド生成物 108 を得た (5.3 g、2 つのステップについて 87%)。C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>Si、淡黄色のシロップ; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) R<sub>f</sub> = 0.71;

10

【化 96】

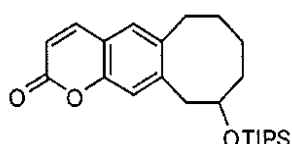
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.77 (1 H, s), 9.79 (1 H, s), 7.24 (1 H, s), 6.76 (1 H, s), 4.03–3.99 (1 H, m), 2.94–2.88 (2 H, m), 2.81–2.76 (1 H, m), 2.71–2.67 (1 H, m), 1.80–1.75 (1 H, m), 1.72–1.66 (1 H, m), 1.52–1.46 (2 H, m), 1.43–1.38 (1 H, m), 1.24–1.16 (1 H, m), 1.07–1.05 (21 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 195.9, 159.5, 148.2, 133.8, 133.7, 119.5, 118.8, 73.2, 41.0, 34.4, 32.2, 32.1, 20.6, 18.1 (6 ×), 12.4 (3 ×);

20

HRMS、C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>3</sub>Si : 計算値 377.2506、実測値 : m/z 377.2511 [M + H]<sup>+</sup>

6, 7, 8, 9, 10, 11 - ヘキサヒドロ - 10 - トリイソプロピルシリルオキシ - シクロオクタ [g] クロメン - 2 (2H) - オン (109)

【化 97】



30

【0206】

ケテニリデントリフェニルホスホランの調製 : 攪拌したカルボエトキシメチレントリフェニルホスホラン (10 g、30 mmol) の無水トルエン (200 mL) 溶液を、ナトリウムヘキサメチルジシラジドの溶液 (17.5 mL、THF 中 2 M 溶液、35 mmol) に 0 °C にて滴下で添加した。添加が完了すると、混合物を 60 °C にて 24 時間加熱した。次いで、反応物を室温に冷却し、濾別した。濾液を減圧下で濃縮し、次いで、エーテル (200 mL) 中に注いだ。沈殿物を濾過し、エーテルで洗浄し、風乾し、ケテニリデントリフェニルホスホラン (5.8 g、64%) を淡黄色の固体として得た。

【0207】

攪拌したサリチルアルデヒド 108 (4.3 g、11.42 mmol) の無水トルエン (100 mL) 溶液を、新たに調製したケテニリデントリフェニルホスホラン (5.2 g、17.2 mmol) に室温にて添加した。混合物を 90 °C にて 1.5 時間加熱し、次いで、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) によって精製し、純粋なクマリン生成物 109 (3.8 g、83%) を得た。C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>Si、無色の固体、mp 103 ~ 105 °C; TLC (EtOAc / ヘキサン、1 : 9) R<sub>f</sub> = 0.25;

40

## 【化98】

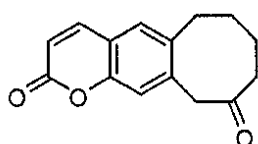
 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,

$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.61 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 7.18 (1 H, s), 7.10 (1 H, s), 6.33 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 4.02 (1 H, dd,  $J=11.9, 5.5$  Hz), 3.00–2.94 (2 H, m), 2.86–2.81 (1 H, m), 2.76–2.72 (1 H, m), 1.80–1.73 (1 H, m), 1.69–1.64 (1 H, m), 1.60–1.55 (1 H, m), 1.47–1.43 (2 H, m), 1.20–1.13 (1 H, m), 1.11–1.03 (21 H, m);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.3, 152.3, 143.3, 142.4, 138.4, 127.8, 118.1, 117.3, 115.7, 73.3, 40.8, 34.5, 32.4, 32.0, 20.6, 18.1 (6  $\times$ ), 12.4 (3  $\times$ );

HRMS、 $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{Si}$  : 計算値 401.2506、実測値 :  $m/z$  401.2511  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。 10

6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 11H - 10 - オキソ - シクロオクタ [g] クロメン - 2 (2H) - オン (110)

## 【化99】



## 【0208】

20

冷たい (0 ) 化合物 109 (3.0 g、7.5 mmol) の THF (20 mL) 溶液を、フッ化テトラブチルアンモニウムの溶液 (10 mL、THF 中 1 M 溶液、10 mmol) で処理した。室温にて 1 時間攪拌した後、混合物を減圧下で濃縮した。残留油をシリカゲルの短いパッド (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) を通して濾過し、濾液を濃縮し、無色の固体 (1.67 g) を得た。

## 【0209】

DMSO (1.5 mL、21.2 mmol) の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 溶液を、攪拌した塩化オキサリル (0.89 mL、10.3 mmol) の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 溶液に -78 にて窒素雰囲気下にて滴下で添加した。混合物を -78 にて 30 分間攪拌し、無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 中の上記で調製したアルコール (1.67 g) を滴下で添加した。混合物を -78 にてさらに 30 分間攪拌し、トリエチルアミン (7.1 mL、50.4 mmol) を加えた。混合物を 30 分間 0 に温め、次いで、水 (40 mL) 中に注いだ。水層を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5  $\times$  50 mL) で抽出した。合わせた有機抽出物を水 (100 mL) およびブライン (100 mL) で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (EtOAc / ヘキサン、1 : 4) によって精製し、所望の生成物 110 を得た (1.45 g、2 つのステップについて 78%)。  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 、無色の固体、mp 127 ~ 129 ; TLC (EtOAc / ヘキサン、3 : 7)  $R_f = 0.32$  ; 30

## 【化100】

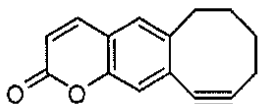
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.63 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 7.29 (1 H, s), 7.09 (1 H, s), 6.34 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 3.82 (2 H, s), 2.84 (2 H, t,  $J=5.7$  Hz), 2.31 (2 H, t,  $J=5.6$  Hz), 1.86–1.84 (2 H, m), 1.73–1.71 (2 H, m);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  209.9, 160.7, 152.6, 142.8, 138.2, 137.7, 129.0, 118.4, 117.7, 116.6, 48.8, 41.1, 32.3, 31.4, 24.5; 40

HRMS、 $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$  : 計算値 243.1016、実測値 :  $m/z$  243.1016  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 10, 11 - ジデヒドロ - シクロオクタ [g] クロメン - 2 (2H) - オン (101)



## 【化101】



## 【0210】

冷たい(-78)化合物110(245mg、1mmol)およびN-フェニルビス(トリフルオロメタンスルホンイミド)(393mg、1.1mmol)の無水THF(10mL)溶液を、ナトリウムヘキサメチルジシラジドの溶液(0.55mL、THF中2M溶液、1.1mmol)にシリンジによって5分の期間に亘り加えた。混合物を-78にて1時間攪拌し、別のバッチのナトリウムヘキサメチルジシラジド(0.55mL、THF中2M溶液、1.1mmol)を加えた。混合物を0に温め、さらに1時間攪拌し、次いで、メタノール(1mL)でクエンチした。混合物を減圧下で濃縮し、黄色のシロップを得て、これをシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン、1:9)によって精製し、標的生成物101(72mg、44%)を得た。C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>、薄黄色の固体、mp 98~100; TLC(EtOAc/ヘキサン、3:7) R<sub>f</sub> = 0.42;

10

## 【化102】

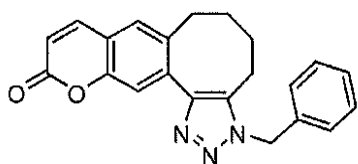
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.60 (1 H, d, J=9.5 Hz), 7.23 (1 H, s), 7.06 (1 H, s), 6.35 (1 H, d, J=9.5 Hz), 2.81 (2 H, br s), 2.61 (2 H, t, J=56.7 Hz), 2.13 (2 H, br s), 1.74 (2 H, br s); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.1, 152.6, 147.4, 143.3, 128.6, 127.1, 117.5, 117.4, 116.1, 113.9, 92.5, 38.3, 33.5, 25.5, 20.5;

20

HRMS、C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>: 計算値 225.0910、実測値: m/z 225.0910 [M+H]<sup>+</sup>。

10-ベンジル-6,7,8,9-テトラヒドロ-シクロオクタトリアゾロ[5,4-g]クロメン-2(2H)-オン(111)

## 【化103】



30

## 【0211】

化合物101(50mg、0.22mmol)のCH<sub>3</sub>CN(5mL)溶液を、ベンジルアジド(44μL、0.33mmol)で処理した。室温にて2時間攪拌した後、混合物を減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(EtOAc/ヘキサン、3:7)によって精製し、所望のトリアゾール生成物111(75mg、95%)を得た。C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>、無色の固体、mp 60~62; TLC(EtOAc/ヘキサン、1:1) R<sub>f</sub> = 0.35;

40

## 【化104】

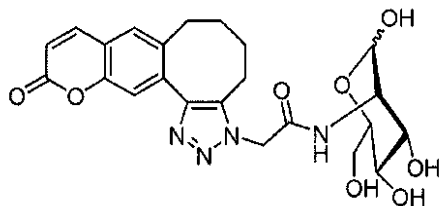
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (1 H, s), 7.65 (1 H, d, J=9.4 Hz), 7.37-7.32 (3 H, m), 7.24 (1 H, s), 7.20-7.19 (2 H, m), 6.39 (1 H, d, J=9.4 Hz), 5.50 (2 H, s), 2.69-2.67 (2 H, m), 2.65-2.63 (2 H, m), 1.79-1.75 (2 H, m), 1.67-1.64 (2 H, m); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.0, 152.4, 143.1, 136.1, 135.3, 135.0, 134.4, 129.0 (2×), 128.7, 128.4, 128.1, 127.1 (2×), 126.9, 116.7, 116.4, 51.9, 30.8, 30.6, 23.9, 20.0;

50

HRMS、 $C_{22}H_{20}N_3O_2$ ：計算値 358.1550、実測値： $m/z$  358.1548  $[M+H]^+$ 。

N-[2-(11-オキソ-4,6,7,11-テトラヒドロクロメノ[7',6':3,4]シクロオクタ[1,2-d][1,2,3]トリアゾール-3(5H)-イル)]アセトアミド-2-デオキシ-, -D-マンノピラノース(112)

【化105】



10

【0212】

化合物101(50mg、0.22mmol)のMeOH(5mL)および水(1mL)溶液を、N-アジドアセチルマンノサミン(142mg、0.33mmol)で処理した。室温にて2時間攪拌した後、混合物を減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、1:9)によって精製し、所望のトリアゾール生成物112(98mg、92%)を得た。 $C_{23}H_{26}N_4O_8$ 、無色の固体、mp 170~172 (摂氏温度)；TLC(MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、1:8)  $R_f$

20

= 0.25；

【化106-1】

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.04 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 7.59 (1 H, s), 7.52 (1 H, s), 6.48 (1 H, d,  $J=9.5$  Hz), 5.15 (1 H, d,  $J=2.9$  Hz), 5.11 (1 H, d,  $J=6.9$  Hz), 4.98–4.85 (1 H, m), 4.89–4.81 (2 H, m), 4.44–4.38 (1 H, m), 3.61–3.59 (3 H, m), 3.53–3.45 (2 H, m), 3.42–3.37 (1 H, m), 3.16–3.14 (2 H, m), 2.86–2.82 (2 H, m), 2.72–2.70 (2 H, m), 1.78 (2 H, br s), 1.61 (2 H, br t,  $J=5.5$  Hz);  $^{13}C$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  165.2, 160.1, 151.9, 143.8, 140.6, 137.0, 135.9, 134.7, 128.8, 118.6, 116.1, 115.2, 92.5, 90.4, 72.9, 72.1, 71.0, 70.5, 68.2, 67.5,

30

【化106-2】

61.5, 61.0, 54.7, 54.2, 50.0, 49.9, 30.6, 29.9, 22.8, 19.6;

HRMS、 $C_{23}H_{27}N_4O_8$ ：計算値 487.1829、実測値： $m/z$  487.1827  $[M+H]^+$ 。

(実施例5)

モデル基質を使用したシクロオクチンが縮合した蛍光発生プローブの反応スコープおよび反応速度の測定

【0213】

SPAACをベースとする蛍光標識化のための試薬としての化合物101の実現可能性を評価するために、ベンジルアジドをモデル基質として使用したその反応スコープおよび反応速度を最初に研究した。アセトニトリル中のベンジルアジドとの101のSPAAC反応は、室温にて2時間で完了し、トリアゾール111を95%収率で得た(スキーム100)。CD<sub>3</sub>CN中の101とベンジルアジド(1:1)との反応性を、 $^1H$ -NMRスペクトルにおける複数の化学シフトの積分によって決定し、25にて0.012M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>の二次速度定数を得た。本発明者らはまた、101およびN-アジドアセチルマンノサミン(MaNNAz)の間の環化付加反応を観察したが、同様に進行して、CD<sub>3</sub>OD-D<sub>2</sub>Oの溶液(5:1、v/v)中で25にて0.010M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>の二次速度定数でトリアゾール112を得た(図17および18)。

40

【0214】

50

表3は、シミュレートされた生理学的条件(10% DMSOを含有するPBS緩衝液、pH7.4)下で記録された、101、111および112の吸収および蛍光データを示す。トリアゾール111および112の形成は、クマリン発光について標準範囲への大きなストークスシフトを伴って蛍光強度の有意な増加が付随した(図16a)。330nmでの励起によって、プローブ101は、低い量子収率( $\phi_f = 0.011$ )を伴う405nmに中心がある弱い発光バンドを生じさせ、一方、トリアゾール111および112の両方は、それぞれ、0.23および0.21の量子収率を伴って435nmにおいて強い蛍光を示した。

#### 【0215】

生体分子標識化のためにより典型的である条件下でSPAAC反応を探るために、本発明者らは、MannNAzとの101の反応についての蛍光応答および時間経過を調査した。実験によって、90%超のMannNAzが40分で消費され、蛍光強度が1時間未満でプラトーに達したことが示された(図16b)。

#### 【表3】

表3. プローブ101およびトリアゾール111、112の分光学的特性

	吸収 ( $\lambda_{max}$ , nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) <sup>[a]</sup>	発光 ( $\lambda_{max}$ , nm)	ストークスシフト ( $cm^{-1}$ )	$\Phi_f$ <sup>[b]</sup>
101	336	7800	405	5070	0.011
111	328	12200	435	7500	0.23
112	330	10800	435	7320	0.21

<sup>a</sup> 消衰係数: 101について340nmにて、ならびに111および112について330nmにて測定。

<sup>b</sup> 蛍光量子収率: 標準として硫酸キナーゼ( $\phi_f = 0.54 \pm 0.03$ )を使用。

#### 【0216】

図16は、(a)101(黒色)、111(青色)および112(赤色)の吸収および蛍光発光スペクトル( $\lambda_{ex} = 330$  nm)(10% DMSOを含有する45  $\mu$ MのPBS緩衝液、pH7.4)、(b)10% DMSOを含有するPBS緩衝液中のN-アジドアセチルマンノサミン(30  $\mu$ M)との101(30  $\mu$ M)のライゲーション反応についての435 nm( $\lambda_{ex} = 330$  nm)での標準化した蛍光強度の時間経過を描写する。

#### 【0217】

パートA: 化合物101およびベンジルアジドを、 $CD_3CN$ に事前溶解し、次いで、20 mMの等モル濃度で混合した。反応を、1時間の期間に亘り $^1H$ -NMR分析によってモニターした。各成分の濃度は、 $^1H$ -NMRスペクトルにおける複数の化学シフトでの積分によって、最初の化合物101の濃度に基づいて決定した。時間(秒)に対する $1/[101]$  ( $M^{-1}$ )をプロットすることによって、 $M^{-1} s^{-1}$ の単位での二次速度定数を、線形回帰分析を使用して決定した。この手順を20 mMの濃度で3回繰り返し、 $0.012 M^{-1} s^{-1}$ の速度定数を25にて得た(図17)。

#### 【0218】

図17は、 $^1H$ -NMRによってモニターするように、 $CD_3CN$ 中の化合物101およびベンジルアジドの反応についての時間に対する $1/[101]$ のプロットを描写する。

#### 【0219】

パートB: 化合物101およびN-アジドアセチルマンノサミンを、 $CD_3OD/D_2O$ (5:1, v/v)に事前溶解し、次いで、20 mMの等モル濃度で混合した。反応を、1時間の期間に亘り $^1H$ -NMR分析によってモニターした。各成分の濃度は、 $^1H$ -NMRスペクトルにおける複数の化学シフトでの積分によって、最初の化合物101の濃度に基づいて決定した。時間(秒)に対する $1/[101]$  ( $M^{-1}$ )をプロットするこ

10

20

30

40

50

とによって、線形回帰分析を使用して、 $M^{-1} s^{-1}$ の単位での二次速度定数を決定した。この手順を20 mMの濃度で3回繰り返して、25 にて $0.010 M^{-1} s^{-1}$ の速度定数を得た(図18)。

#### 【0220】

図18は、 $^1H$ -NMRによってモニターするように、 $CD_3OD-D_2O$ の溶液(5:1、v/v)中の化合物101およびN-アジドアセチルマンノサミンの反応について時間に対する $1/[101]$ のプロットを描写する。

(実施例6)

シクロオクチン縮合した蛍光発生プローブ101を使用した染色された試料の生細胞イメージング:

#### 【0221】

生細胞イメージングにおける101の性能を評価した。この目的のために、高度にシアル酸付加肺がん細胞であるCL1-5を、過アセチル化N-アジドアセチルマンノサミン( $Ac_4ManNAz$ )の存在下で3日間培養して、アジド-シアル酸を発現している細胞を代謝的に産生させた。陰性対照として、CL1-5細胞を過アセチル化N-アセチルマンノサミン( $Ac_4ManNAc$ )の存在下で成長させた。細胞を30分間隔で洗浄なしおよび固定なし条件下に曝露することによって、時間経過実験を行った(図19、図22)。  $Ac_4ManNAz$ で処理された細胞は、蛍光強度の時間依存的増加を示し(上の列:シアン、下の列:青色)、次いで、1.5時間のインキュベーションについて飽和に達した。対照的に、対照細胞は、殆ど蛍光染色を示さなかったが、バックグラウンド標識化が無視できることを支持する。さらに、生細胞中のアジド含有複合糖質の局在化を共焦点顕微鏡観察によって可視化した。プローブ101によって標識した細胞を、それに続いて抗GRASP65、それに続いてゴルジについてFITCコンジュゲートした抗ウサギ、およびヨウ化プロピジウム(PI、細胞核マーカー)で染色した。クマリンプローブ由来する青色の蛍光シグナルが、 $Ac_4ManNAc$ の添加を伴わない  $Ac_4ManNAz$ 処理された細胞において明らかに示された(図20)。標識されたシアル酸付加複合糖質を、coumOCTプローブ(青色蛍光)を使用してサイトゾル中で可視化した。ゴルジ体(緑色の染色)と有意に重複し、細胞核(赤色の染色)においては重複しなかった。

#### 【0222】

図19は、200  $\mu M$ の  $Ac_4ManNAz$ と共にインキュベートし、かつ洗浄なしおよび固定なし条件下で100  $\mu M$ のプローブ101で標識したCL1-5生細胞のタイムラプス蛍光および重ね合わせ画像を描写する。細胞の蛍光画像(上の列)および細胞の明視野重ね合わせ画像(下の列)。対照:  $Ac_4ManNAc$ と共にインキュベートした細胞。(スケールバー:10  $\mu m$ )

#### 【0223】

図20は、共焦点顕微鏡観察によって可視化されるようなCL1-5細胞中のプローブ標識したシアル酸付加複合糖質の局在化を描写する。200  $\mu M$ の  $Ac_4ManNAz$ または  $Ac_4ManNAc$ と共にインキュベートした細胞を、100  $\mu M$ の101(青色)で標識し、抗GRASP65、それに続いてFITCコンジュゲートした抗ウサギ(ゴルジについて、緑色)およびヨウ化プロピジウム(細胞核について、赤色)で染色した。(スケールバー:10  $\mu M$ )

#### 【0224】

驚いたことに、タイムラプス実験において、青色の蛍光が細胞表面上だけでなく、細胞内で観察された。したがって、本発明者らは、coumOCT101が生細胞における直接の細胞内標識化のために利用することができる細胞透過性プローブであり得るかを調査した。このゴールに向かって、CL1-5細胞を  $Ac_4ManNAz$ と共に1時間インキュベートし、それに続いて過剰な  $Ac_4ManNAz$ を除去した。次いで、本発明者らは、シアル酸付加複合糖質の輸送をモニターするためのイメージングを行った。図21に示すように、シアル酸付加複合糖質は、coumOCTを使用することによって容易に画像

10

20

30

40

50

化され、最初の段階においてゴルジ体（赤色）と有意に重複した。しかし、青色の蛍光シグナルの出現は、5時間後に細胞表面上に検出された。蛍光の強度は経時的に増加し、8時間で飽和に達した（図21および図23）。本発明者らの結果は、c o u m O C T が、細胞透過性プローブであるだけでなく、生細胞中の内在性アジド担持複合糖質の直接の標識化のために特異的であることを示す。

#### 【0225】

図21は、細胞中のSPAACのc o u m O C T (1)を使用した複合糖質輸送の蛍光イメージングを描写する。CL1-5細胞を、500 μMのAc<sub>4</sub>ManNAzと共に1時間インキュベートし、それに続いてPBS緩衝液で洗浄し、過剰なAc<sub>4</sub>ManNAzを除去した。糖処理した細胞を、それぞれ、培養培地中で3時間、5時間および8時間インキュベートし、次いで、SPAAC条件下で100 μMのプローブ101で0.5時間標識した。ゴルジを、抗GRASP65、それに続いてCy3コンジュゲートした抗ウサギで標識した。（スケールバー：5 μm）

蛍光分光法による時間経過測定。

#### 【0226】

PBS緩衝液（2.5 mL）中の10% DMSOの混合物中のプローブ101（0.075 μmol）およびN-アジドアセチルマンノサミン（0.075 μmol）の溶液を、37 °Cにてインキュベートした。330 nmでの励起による435 nmでの蛍光発光強度を、5分間隔でモニターした。各ポイントについて、蛍光強度を5秒の期間に亘り測定し、全部で3ポイントに亘り平均化した。対照実験において、N-アセチルマンノサミン（0.075 μmol）を溶液に加えたこと以外は、同じ条件を使用した。

生細胞における蛍光標識化のタイムラプス顕微鏡分析。

#### 【0227】

細胞中の蛍光標識したアジド-複合糖質を観察するために、CL1-5細胞をチャンバースライド上に播種し（ウェル毎に2.5 × 10<sup>4</sup>個の細胞/0.5 mL）、培養培地（10% FBS、100 U/mLのペニシリン、100 μg/mLのストレプトマイシン、1 mMのL-グルタミンおよび1 mMのピルビン酸ナトリウムを補充したRPMI-1640）中で200 μMの対照糖（過アセチル化N-アセチルマンノサミン、Ac<sub>4</sub>ManNAc）またはアジド-糖（過アセチル化N-アジドアセチルマンノサミン、Ac<sub>4</sub>ManNAz）のいずれかと共に3日間インキュベートした。

#### 【0228】

生細胞のタイムラプスイメージングのために、細胞を培養条件に保持するインキュベーターを備えた共焦点顕微鏡（TCS-SP5-MP-SMD、Leica）を使用して実験を行った。事前洗浄した細胞を、10% DMSOを有するPBS中の100 μMのプローブ101と共にインキュベートし、従前の実験からの生細胞を1.5時間に亘り蛍光イメージングを行った。画像は、450 nmの発光にておよび5分間隔で取得した。

#### 【0229】

アジド-複合糖質の局在化を比較するために、プローブ標識した細胞をPBSで洗浄し、PBS中の3%パラホルムアルデヒドで室温にて20分間固定し、PBS中の0.2% Triton X-100で室温にて20分間透過性とし、PBS中の3%ウシ血清アルブミンで室温にて30分間ブロックした。細胞を、抗GRASP65、それに続いてゴルジについてFITCコンジュゲートした抗ウサギ、および細胞核についてヨウ化プロピジウム（PI）で染色した。

#### 【0230】

図22は、洗浄なしおよび固定なし条件下で、200 μMのAc<sub>4</sub>ManNAzと共にインキュベートし、100 μMのプローブ101で標識したCL1-5生細胞のタイムラプス蛍光および重ね合わせ画像を描写する。細胞の蛍光画像（上の列）および細胞の明視野重ね合わせ画像（下の列）。対照：Ac<sub>4</sub>ManNAcと共にインキュベートした細胞。（スケールバー：25 μm）

生細胞における蛍光標識化によるシアリルコンジュゲート輸送の顕微鏡分析。

## 【0231】

異なる時間による細胞における蛍光標識したシアリルコンジュゲートを観察するために、CL1-5細胞をチャンバースライド上に播種し(ウェル毎に $2.5 \times 10^4$ 個の細胞/0.5mL)、培養培地(10% FBS、100U/mLのペニシリン、100 $\mu$ g/mLのストレプトマイシン、1mMのL-グルタミンおよび1mMのピルビン酸ナトリウムを補充したRPMI-1640)中で500 $\mu$ Mのアジド-糖(過アセチル化N-アジドアセチルマンノサミン、Ac<sub>4</sub>ManNAz)と共に1時間インキュベートした。細胞をPBSで3回洗浄し、次いで、培養培地中でインキュベートした。3時間、5時間および8時間後に、細胞を、10%DMSOを有するPBS中の100 $\mu$ MのcoumOCT(101)と共に37にて30分間インキュベートした。生細胞の蛍光イメージングのために、細胞を培養条件中に保持するインキュベーターを備えた共焦点顕微鏡(TCS-SP5-MP-SMD、Leica)を使用して実験を行った。

10

## 【0232】

シアリルコンジュゲートの局在化を比較するために、プローブ標識した細胞をPBSで洗浄し、PBS中の3%パラホルムアルデヒドで室温にて20分間固定し、PBS中の0.2% Triton X-100で室温にて20分間透過性とし、PBS中の3%ウシ血清アルブミンで室温にて30分間ブロックした。細胞を、抗GRASP65、それに続いてゴルジについてCy3コンジュゲートした抗ウサギでさらに染色した。

## 【0233】

図23は、細胞中のSPAACのcoumOCT(101)を使用した、複合糖質輸送の蛍光イメージングを描写する。CL1-5細胞を、500 $\mu$ MのAc<sub>4</sub>ManNAzと共に1時間インキュベートし、それに続いてPBS緩衝液で洗浄し、過剰なAc<sub>4</sub>ManNAzを除去した。糖処理した細胞を、それぞれ、培養培地中で3時間、5時間および8時間インキュベートし、次いで、SPAAC条件下で100 $\mu$ Mのプローブ101で0.5時間標識した。ゴルジを、抗GRASP65、それに続いてCy3コンジュゲートした抗ウサギで標識した。(スケールバー:10 $\mu$ m)

20

実験7:二重標識化実験

## 【0234】

2種の異なる代謝的に組み込まれた複合糖質の併行した蛍光標識化のために、CuAACと組み合わせたSPAACを使用して二重標識化実験を行った。過アセチル化N-アセチルマンノサミン(Ac<sub>4</sub>ManNAc)および過アセチル化N-アセチルグルコサミン(Ac<sub>4</sub>GlcNAc)を、対照糖として用いた。ManNAcは、細胞中の糖タンパク質および糖脂質の末端単糖類として見出されるシアリ酸へと代謝的に変換され、一方、GlcNAzは、小胞体およびゴルジにおいて産生されるN-連結およびO-連結グリカンにおいて豊富である内部単糖類である。CL1-5細胞を、アルキン含有糖(Ac<sub>4</sub>ManNA1)およびアジド含有糖(Ac<sub>4</sub>GlcNAz)の両方の存在下で3日間インキュベートした。細胞を、coumOCTによるSPAAC(アジド糖について)、それに続いてAzBOCEt<sup>6j</sup>によるCuAAC(アルキニル糖について)によって染色し、共焦点顕微鏡観察によって調査した(図24)。

30

## 【0235】

アジド-およびアルキニル-糖の両方で処理した細胞は、両方の蛍光チャンネルにおいて明確なパターン(図24a、24b、24c)を示し、一方、いずれかの糖を省略することは、対応するチャンネルにおける標識化をもたらさなかった(図24d、24e、24fおよび図24g、24h、24i)。興味深いことに、イメージング実験によって、ManNA1およびGlcNAzで標識された種が、同じ局在化において、恐らくゴルジ中で相当に示されたことを明らかにした。さらに、発現されたアルキニル標識されたシアリ酸付加複合糖質は、AzBOCEt標識化によって細胞表面上および部分的にサイトゾル中に明らかに観察され、一方、GlcNAz標識したグリカンは、coumOCTプローブを使用してサイトゾル中でのみ示された。シアリ酸は通常末端グリコシル化によってN-連結およびO-連結グリカンに付着しているが、糖タンパク質への非天然GlcNA

40

50

zの組込みは、さらなるグリコシル化のためのグリコシルトランスフェラーゼの特異性および効率に影響を与え得る。このように、未熟で異常な糖タンパク質は、分解のためにサイトゾルに移送し得る。これらの知見は、c o u m O C TおよびA z B O C E tが、S P A A CおよびC u A A Cトリアゾール形成化学による、単一の細胞内のアジドおよびアルキン標識された代謝的に組み込まれた複合糖質の同時の検出のための蛍光形成プローブとして用いられることができることを確認する。

#### 【0236】

図24A、24Bは、細胞におけるc o u m O C T ( 1 )、A z B O C E tによるデュアル蛍光標識化、および共焦点顕微鏡観察によるイメージングを示す。(A) A c <sub>4</sub> M a n N A l、A c <sub>4</sub> G l c N A z、101およびA z B O C E tを使用した細胞標識化実験の例示。C L 1 - 5細胞を、100 μ MのA c <sub>4</sub> M a n N A lおよびA c <sub>4</sub> G l c N A zまたは対照糖(A c <sub>4</sub> M a n N A cおよびA c <sub>4</sub> G l c N A c)と共に3日間インキュベートし、これをS P A A C条件下で100 μ Mのプローブ101で0.5時間処理し、次いで、C u A A C条件下で0.1 μ MのA z B O C E tと共に1時間インキュベートした。(B) C L 1 - 5細胞におけるデュアル蛍光イメージング。これらの複合糖質を、アジド含有複合糖質についてプローブ101(シアン)で、およびアルキン含有複合糖質についてA z B O C E t(緑色)で標識した。(スケールバー: 10 μ m)

細胞におけるデュアル蛍光標識化の顕微鏡分析。

#### 【0237】

C L 1 - 5細胞をチャンバースライド上に播種し(ウェル毎に2.5 × 10<sup>4</sup>個の細胞/0.5 mL)、培養培地(10% F B S、100 U / m Lのペニシリン、100 μ g / m Lのストレプトマイシン、1 m MのL - グルタミンおよび1 m Mのピルビン酸ナトリウムを補充したR P M I - 1640)中で100 μ Mのアルキニル - 糖(過アセチル化アルキニル - N - アセチルマンノサミン、A c <sub>4</sub> M a n N A l)もしくはアジド - 糖(過アセチル化N - アジドアセチルグルコサミン、A c <sub>4</sub> G l c N A z)のいずれか、もしくは両方と共に、または陰性対照として糖を伴わずに3日間インキュベートした。細胞をP B Sで3回洗浄し、次いで、10% D M S Oを有するP B S中の100 μ Mのc o u m O C T ( 101)と共に37 ° Cにて30分間インキュベートした。10% D M S Oを有するP B Sによる3回の洗浄、それに続くP B S中の室温にて3%パラホルムアルデヒドによる20分間の固定の後、細胞を、50%エタノールを有するP B S中の0.1 μ MのA z B O C E t、100 μ Mのリガンド、1 m MのC u S O <sub>4</sub>、および2 m Mのアスコルビン酸ナトリウムと共に室温にて1時間インキュベートし、共焦点顕微鏡(T C S - S P 5 - M P - S M D、L e i c a)を使用して細胞の蛍光画像を得た。

実験8: 3 -メルカプトプロピオン酸の存在下での化合物(101)および化合物(111)の安定性

#### 【0238】

シクロオクチンの潜在的な問題のある副反応は、対応するビニルスルフィドへのタンパク性または内在性チオールの添加である。101および対応するトリアゾール111の潜在的な非特異的染色が、タンパク性または内在性チオールによる三重結合または二重結合へのS H基の添加によって起こり得るかを試験するために、C D C l <sub>3</sub>中の3 -メルカプトプロピオン酸と共の101および111のインキュベーションによって実験を行った(図25および26)。N M Rスペクトル分析は、101および111が、3 -メルカプトプロピオン酸と共のチオール - インまたはチオール - エン添加に対して不活性であることを示唆した。これらの結果は、蛍光形成プローブとしての101の適用が、チオール - イン添加による非特異的染色を伴わない、生細胞中の代謝的に組み込まれた複合糖質の驚くべき検出を可能とすることを示し、形成されたトリアゾールは、蛍光をクエンチするチオール - エン添加を受けない。

#### 【0239】

化合物101および化合物111の溶液(C D C l <sub>3</sub>中25 m M)を、3 -メルカプトプロピオン酸の溶液(C D C l <sub>3</sub>中32 m M)と共に室温(25 ° C)にてインキュベート

10

20

30

40

50

した。反応を、 $^1\text{H}$ -NMR分析によって24時間の期間に亘りモニターした。 $^1\text{H}$ -NMR分析は、 $^1\text{H}$ -NMR分析により3-メルカプトプロピオン酸による化合物101および化合物111に対して置換効果がないことによって、化合物101および化合物111がチオールの存在下で高い安定性を有することを示唆した(図25および図26)。

【0240】

図25は、化合物101および3-メルカプトプロピオン酸単独の $\text{CDCl}_3$ 中の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示し、化合物101の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを、3-メルカプトプロピオン酸で25にて0時間、2時間および24時間処理した。

【0241】

図26は、化合物111および3-メルカプトプロピオン酸単独の $\text{CDCl}_3$ 中の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示し、化合物111の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを、3-メルカプトプロピオン酸で25にて24時間処理した。

【0242】

本開示は、洗浄なしおよび固定なし条件下での生細胞におけるリアルタイムイメージングのための新規なSPAACをベースとする蛍光形成プローブcoumOCT(101)を記載し、ベンジルアジドおよびN-アジドアセチルマンノサミンとの101のSPAAC反応は、それぞれ、 $\text{CD}_3\text{CN}$ 中で $0.012\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ の溶液(5:1, v/v)中で $0.010\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の速度定数で進行した。トリアゾール生成物111および112は、未反応の101と比較して量子収率において20倍の増加を示した( $\phi_f = 0.23$ および $\phi_f = 0.21$ )。さらに、本開示によって、101が、生細胞中のアジド含有複合糖質のイメージングのための蛍光活性化プローブであることが確立される。SPAAC反応は自発的であり、洗浄ステップは必要としない。さらに、プローブ101は無毒性および細胞透過性であり、バックグラウンド標識化の問題を伴わず、これによってCuAAC下でAzBocEtと組み合わせた2種の異なる糖の同時の標識化が可能となる。本開示は、細胞イメージングにおける有意な進歩を表し、in vivoでの生化学的事象のリアルタイム検出に潜在的に適用可能であるべきである。

(実施例9)

CoumFSA(601)の合成。

【0243】

シアル酸(Neu5Ac)を塩化アセチルで処理して、 $^1\text{H}$ -NMR分析によって90%超の収率でクロリド中間体を得た。粗生成物をピリジンに溶解し、50に加熱し、それに続いて濃縮および粉碎し、ピリジン塩酸塩を除去し、シアル酸からグリカール201を78%の全収率で得た。Neu5Boc2en203を、 $\text{Boc}_2\text{O}$ で処理することによって化合物201から合成し、N-アセチル-N-Boc保護された生成物202が生成し、これをZemplen条件下での脱アセチル化、それに続くアセチル化によって、N-Boc保護された化合物203を得た。80でのMeCN中のN-ブロモスクシンイミド(NBS)および水による203のプロモヒドロキシル化によって、プロモヒドリン204aおよび204b(91%; 204a/204b = 3.1:1)を得た。1,8-ジアザピシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU)による204aの処理によって、エポキシド205(86%)を得た。C-3においてヒドロキシル基を有するグリコシルプロミド206は、205から調製した。アルファ-グリコシド207は、無水DMF中のナトリウムメチルウンベリフェロンによって52%収率で得た。水中のトリフルオロ酢酸(TFA)による207のBoc基の除去の後、得られたアミン塩を、DMF中の塩基DIPEAおよびカップリング試薬HBTUの存在下で4-ペンチン酸で処理し、アルキニル生成物208を得た。フルオロ化合物209を、トリプレートへの208の変換によって得て、還流THF中のトリス(ジメチルアミノ)スルホニウムジフルオロトリメチルシリケート(TASF)との反応を可能とした。アルカリ性条件下での209の脱保護によって、逆相カラム上の精製の後、CoumFSA(601)を75%収率で生成した。

(実施例10)

10

20

30

40

50



D F S A ( 5 0 1 ) の合成。

【 0 2 4 4 】

室温での  $\text{MeNO}_2$  水溶液中の *Selectfluor* による化合物 203 のフルオロヒドロキシル化によって、フルオロヒドリン 210 a および 210 b ( 59% ; 210 a / 210 b = 1 . 3 : 1 ) を得た。三フッ化ジエチルアミノ硫黄 ( D A S T ) による 210 a の処理によって、ジフルオロ化合物 211 a および 211 b を得た ( 75% ; 211 a / 211 b = 5 . 3 : 1 ) 。水中のトリフルオロ酢酸 ( T F A ) による 211 a の B o c 基の除去の後、得られたアミン塩を、DMF 中の塩基 D I P E A およびカップリング試薬 H B T U の存在下で 4 - ペンチン酸で処理し、アルキニル生成物 212 を得た。逆相カラム上の精製の後、アルカリ性条件下での 212 の脱保護によって、D F S A ( 5 0 1 ) を 55% 収率で生成した。

10

【 0 2 4 5 】

クレーム項目において、例えば、「a」、「an」および「the」は、それとは反対のことを示さない限り、または文脈からその他の点で明らかでない限り、1つまたは複数を含み得る。群の1つまたは複数のメンバーの間に「または」を含むクレームまたは記載は、それとは反対のことを示さない限り、または文脈からその他の点で明らかでない限り、群メンバーの1つ、複数、または全てが、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する場合、満たされていると考えられる。本開示は、群の正確に1つのメンバーが、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する実施形態を含む。本開示は、群メンバーの複数、または全てが、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する実施形態を含む。

20

【 0 2 4 6 】

さらに、本開示は、全てのバリエーション、組合せ、および順列を包含し、ここでは列挙されたクレームの1つまたは複数からの1つまたは複数の限定、要素、条項、および記述用語は、別のクレームに導入される。例えば、別のクレームに従属する任意のクレームを修飾して、同じ基本クレームに従属する任意の他のクレームにおいて見出される1つまたは複数の限定を含めることができる。要素が例えば、マーカッシュ群フォーマットにおいてリストとして提示される場合、要素の各部分群がまた開示され、任意の要素(複数可)は群から除くことができる。一般に、本開示、または本開示の様態が、特定の要素および/またはフィーチャを含むと言及される場合、本開示の特定の実施形態または本開示の様態は、このような要素および/もしくはフィーチャからなるか、またはこれらから本質的になると理解すべきである。単純化の目的のために、これらの実施形態は、本明細書において特に記載してこなかった。用語「含むこと」および「含有すること」はオープンであることを意図し、さらなる要素またはステップを含むことを許容することがまた留意される。範囲が記載されている場合、エンドポイントが含まれる。さらに、他に示さない限り、または文脈および当業者の理解からその他の点で明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈によって明らかにそれ以外のことの指示がない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本開示の異なる実施形態における記述した範囲内の任意の特定の値または部分範囲を想定することができる。

30

40

【 0 2 4 7 】

本出願は、様々な発行された特許、公開された特許出願、学術論文、および他の公開資料を参照し、これらの全ては参照により本明細書中に組み込まれている。組み込まれた参照文献のいずれかおよび本明細書の中に矛盾が存在する場合、本明細書が優先するものとする。さらに、従来技術の範囲内に入る本開示の任意の特定の実施形態は、クレームの任意の1つまたは複数から明確に除外し得る。このような実施形態は当業者には公知であるとみなされるため、たとえ、除外されることが本明細書において明確に記載されなくても、これらは除外し得る。本開示の任意の特定の実施形態は、従来技術の存在と関連しようとも、関連しなくても、いかなる理由でも任意のクレームから除外することができる。

【 0 2 4 8 】

50

当業者は、単に通例の実験法を使用して、本明細書に記載されている特定の実施形態の多くの同等物を理解するか、確認することができる。本明細書に記載されている本実施形態の範囲は、上記の説明に限定されることを意図しないが、むしろ添付の特許請求の範囲に記載の通りである。下記の特許請求の範囲において定義するように、この記載への様々な変化および修飾は、本開示の精神または範囲を逸脱することなく行い得ることを当業者は認識する。

参照文献

【化 1 0 7 - 1】

Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

Zhou, Z.; Fahrni, C. J. A "Fluorogenic probe for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne ligation reaction: Modulation of the fluorescence emission via  $3(n,\pi^*)-1(\pi,\pi^*)$  Inversion." *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862–8863.

Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. "A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes." *Org. Lett.* **2004**, *24*, 4603–4606.

Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. "Chemistry in living systems." *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.

Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. "Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo." *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 12371–12376.

Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. "Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614–2619.

Loudet, A.; Burgess, K. "BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties." *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932.

Wu, P.; Fokin, V. V. "Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and Applications." *Aldrichim. Acta* **2007**, *40*, 7–17.

Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. "The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201.

Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. "Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives." *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1963–1970.

Xie, F.; Sivakumar, K.; Zeng, Q. B.; Bruckman, M. A.; Hodges, B.; Wang, Q. "A fluorogenic 'click' reaction of azidoanthracene derivatives." *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2906–2914.

10

20

30

40

## 【化 1 0 7 - 2】

Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. "In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish." *Science* **2008**, *320*, 664–667.

Best, M. D. "Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules." *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–6584.

Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. "Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.

Li, J.; Hu, M.; Yao, S. Q. "Rapid synthesis, screening, and identification of xanthone and xanthene-based fluorophores using click chemistry." *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3008–3011.

Le Droumaguet, C.; Wang, C.; Wang, Q. "Fluorogenic click reaction." *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1233–1239.

Qi, J.; Han, M.-S.; Chang, Y.-C.; Tung, C.-H. "Developing visible fluorogenic 'click-on' dyes for cellular imaging." *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1758–1762.

Chao, W.; Fang, X.; Nisaraporn, S.; Jian, S.; Qian, W. "Tuning the optical properties of BODIPY dye through Cu(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction." *Sci. China Chemistry* **2012**, *55*, 125–130.

Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. "Fluorescent indicators based on BODIPY." *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172.

Shieh, P.; Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. "Fluorogenic azidofluoresceins for biological imaging." *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17428–17431.

Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. "BODIPY dyes in photodynamic therapy." *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77–88.

Herner, A.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. "A new family of bioorthogonally applicable fluorogenic labels." *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297–3306.

Chauhan, D. P.; Saha, T.; Lahiri, M.; Talukdar, P. "BODIPY based 'click on' fluorogenic dyes: application in live cell imaging." *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 244–247.

10

20

30

【 図 1 】

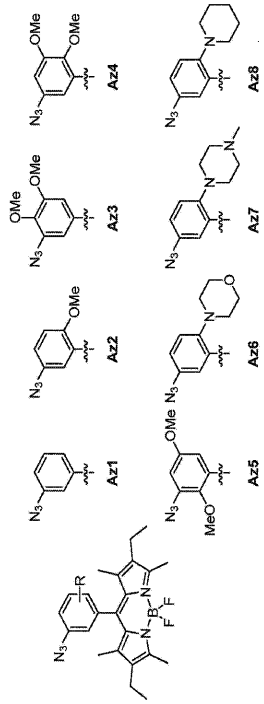


FIG. 1

【 図 2 】

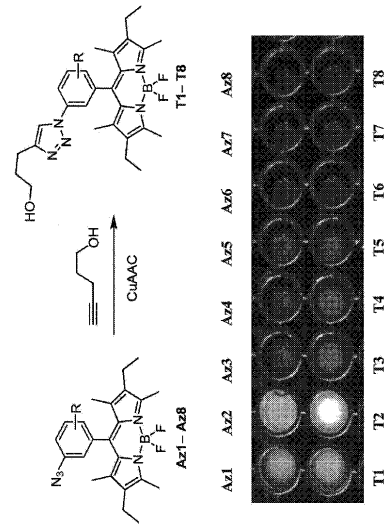


FIG. 2

【 図 3 】

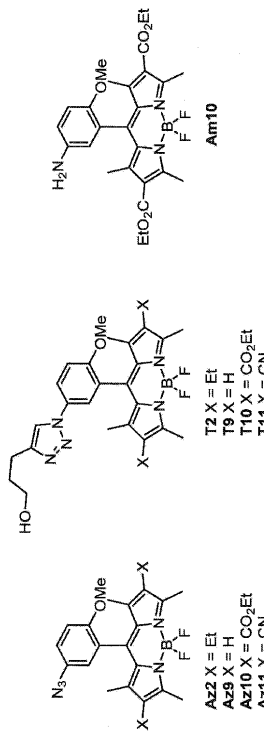


FIG. 3

【 図 4 】

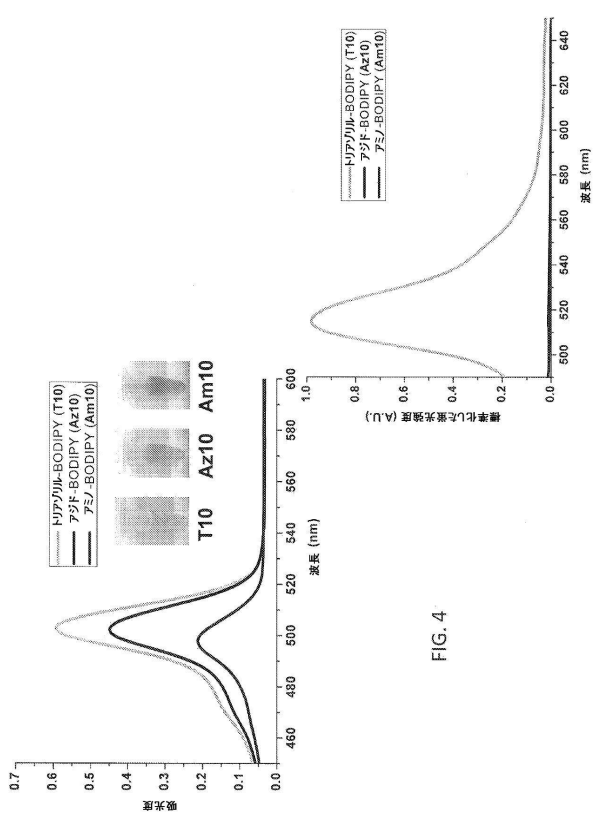


FIG. 4

【 図 5 】

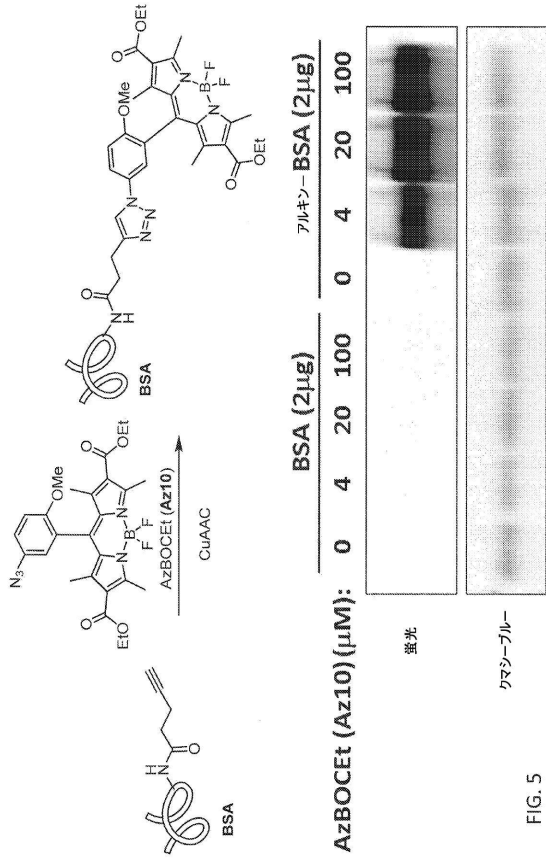


FIG. 5

【 図 6 A 】

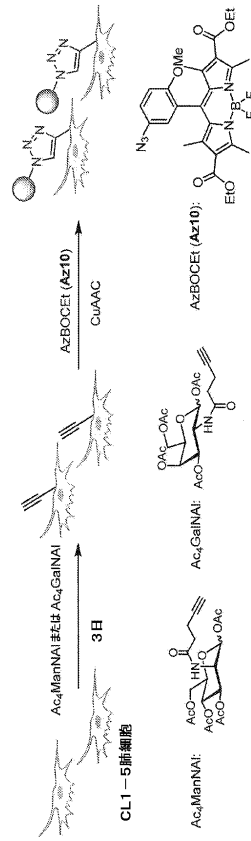


FIG. 6A

【 図 6 B 】

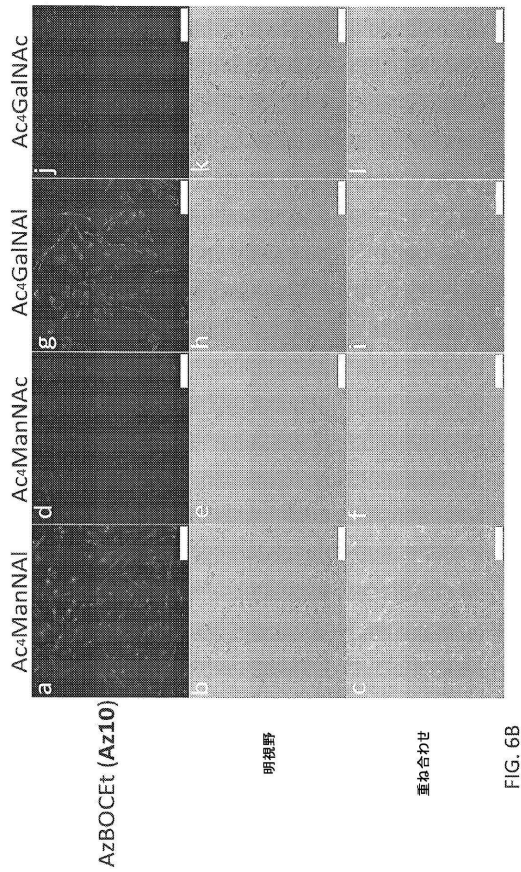


FIG. 6B

【 図 6 C 】

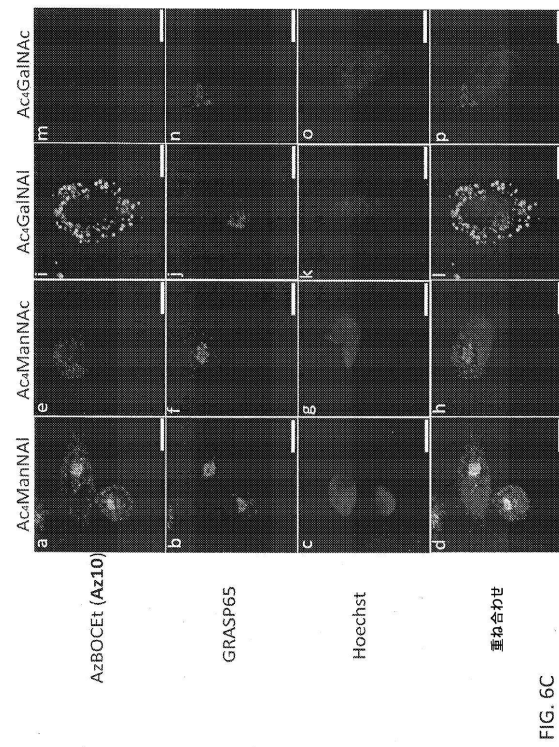


FIG. 6C

【 図 7 】

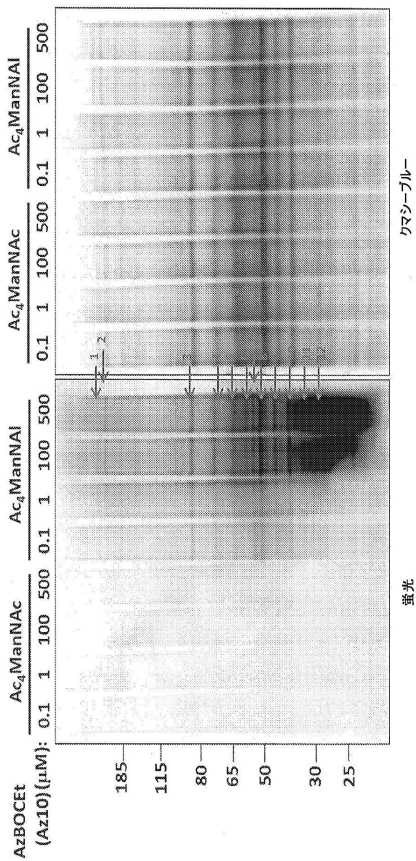


FIG. 7

【 図 8 A 】

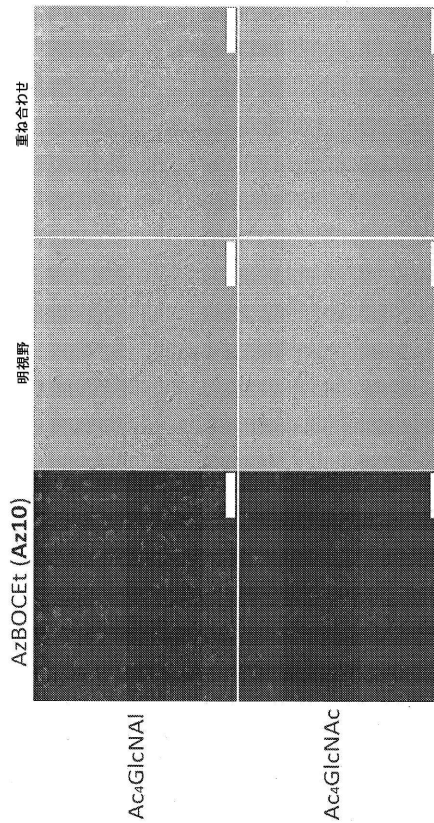


FIG. 8A

【 図 8 B 】

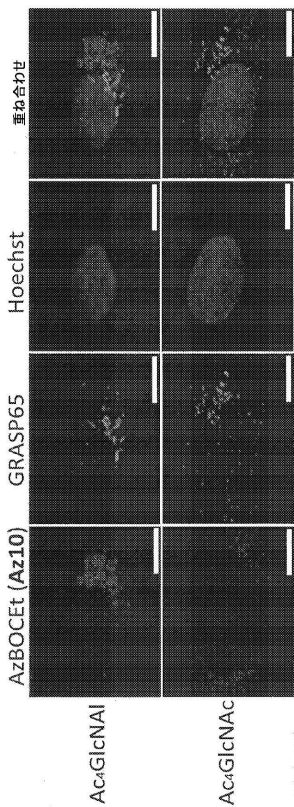
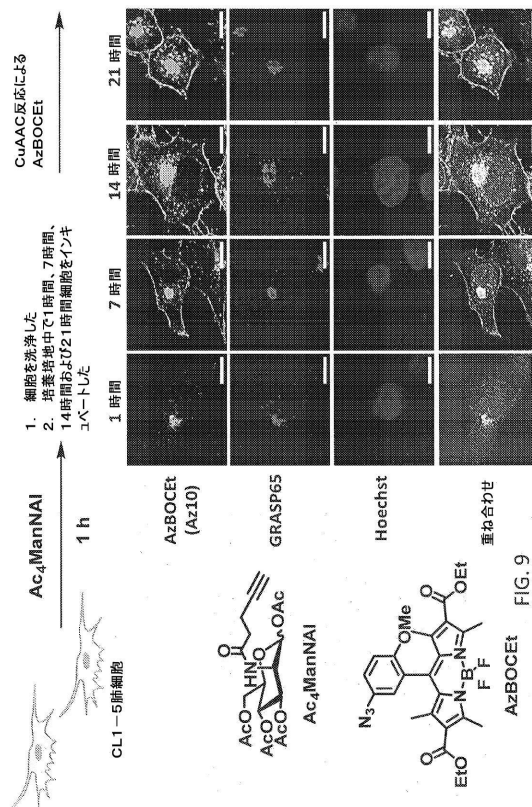


FIG. 8B

【 図 9 】



【 10 】

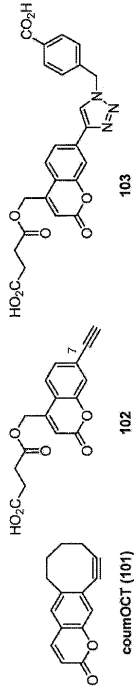


FIG. 10

【 11 】

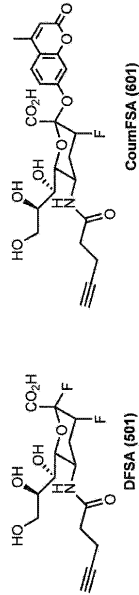


FIG. 11

【 12 】

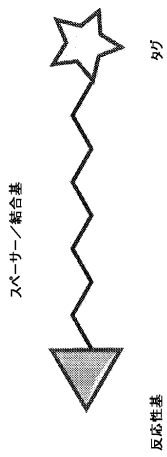


FIG. 12

【 13 】

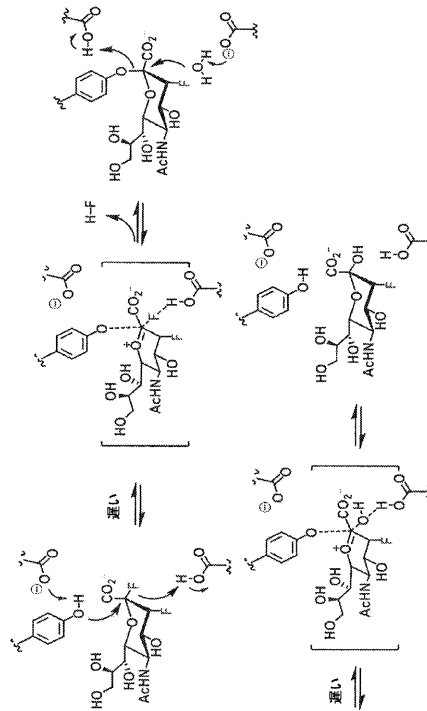


FIG. 13

【 図 14 A 】

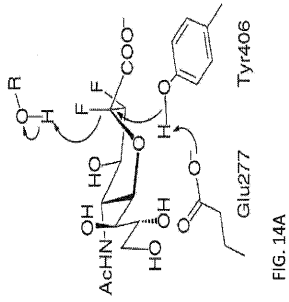


FIG. 14A

【 図 14 B 】

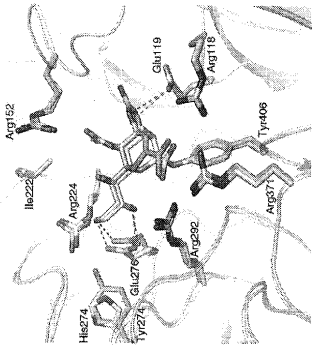


FIG. 14B

【 図 15 】

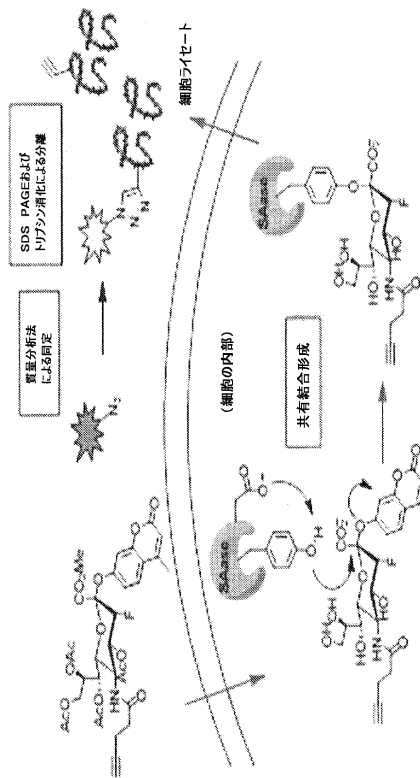


FIG. 15

【 図 16 】

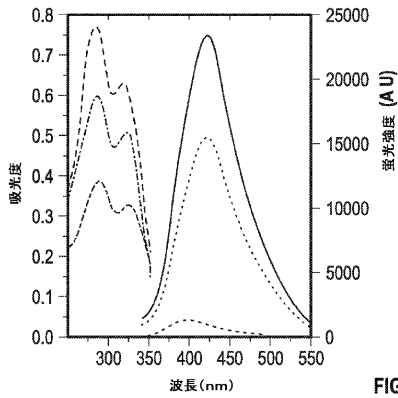


FIG. 16A

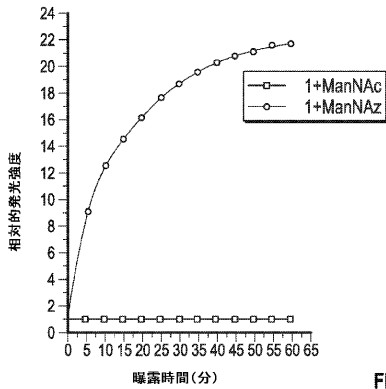


FIG. 16B

【 図 17 】

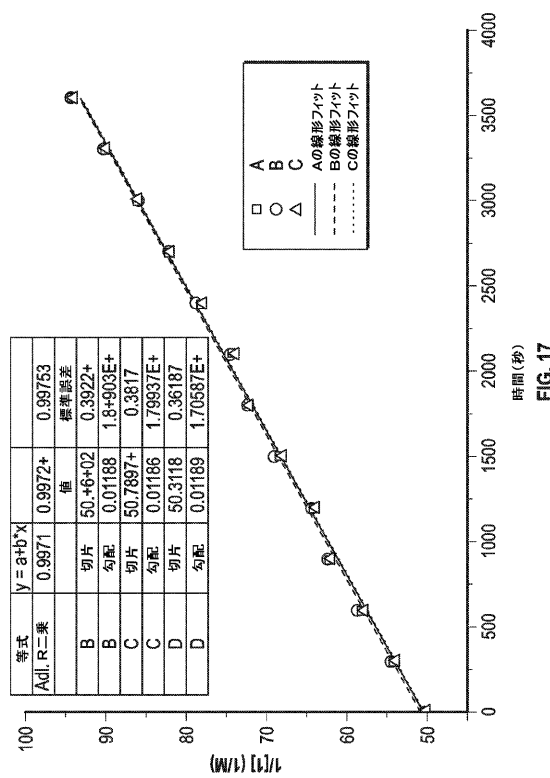


FIG. 17



【 図 18 】

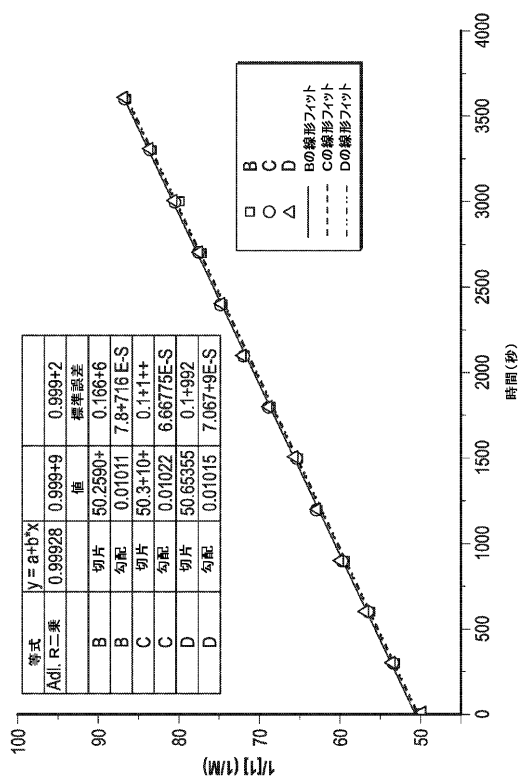


FIG. 18

【 図 19 】

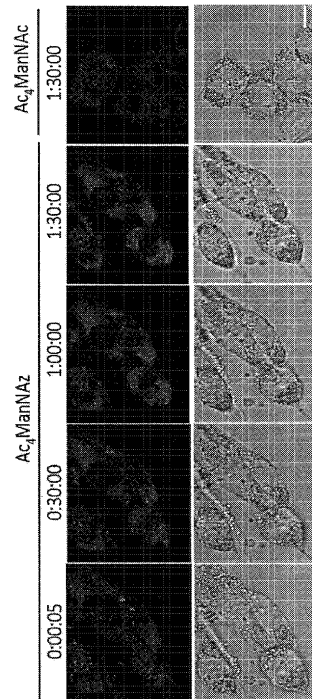


FIG. 19

【 図 20 】

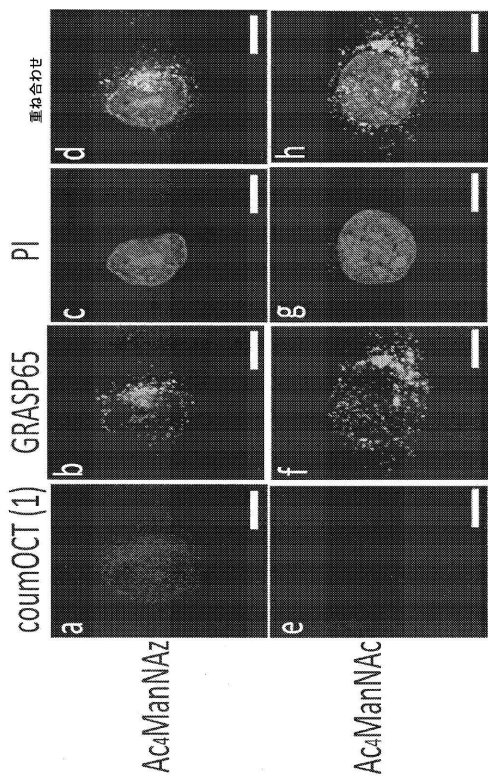


FIG. 20

【 図 21 】

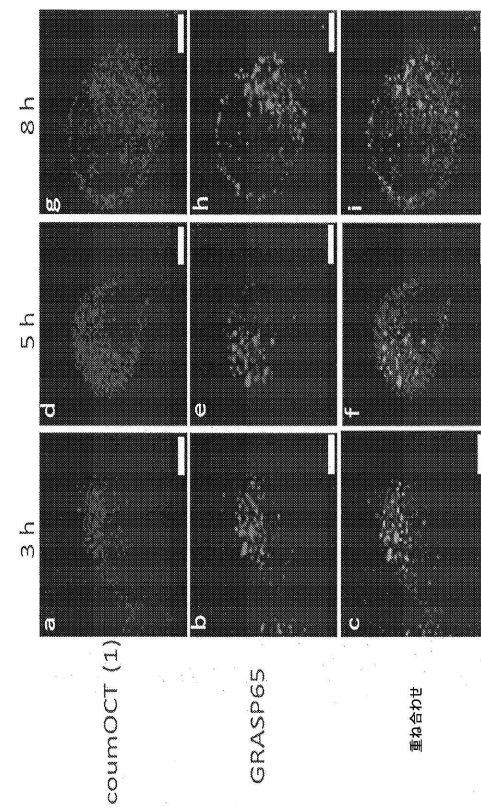


FIG. 21

【 2 2 】

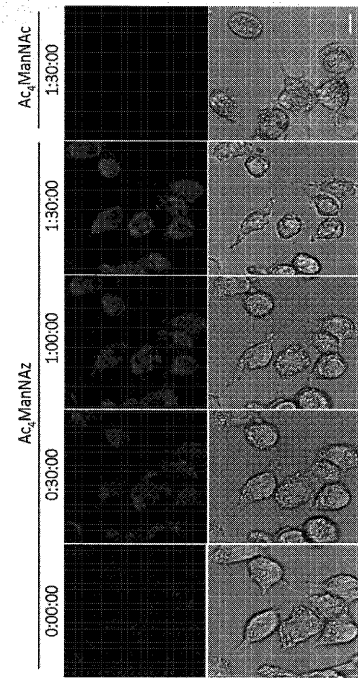


FIG. 22

【 2 3 】

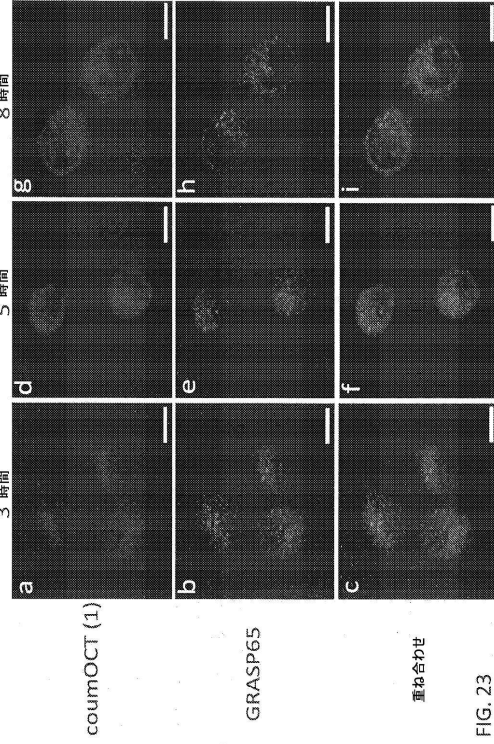


FIG. 23

【 2 4 A 】

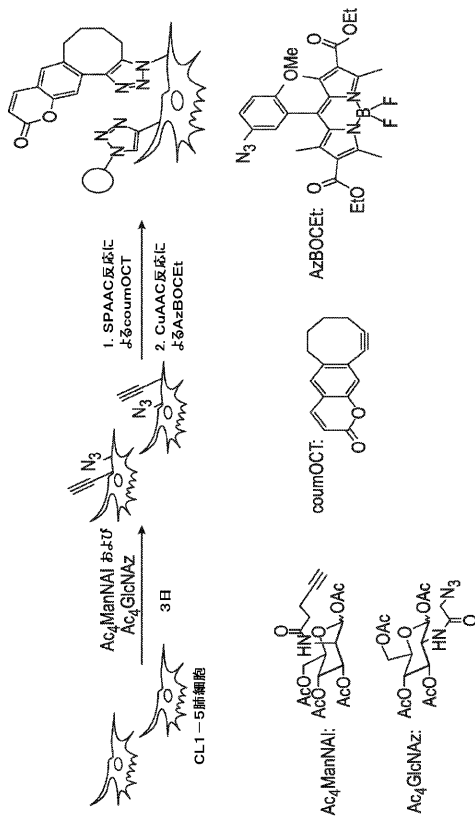


FIG. 24A

【 2 4 B 】

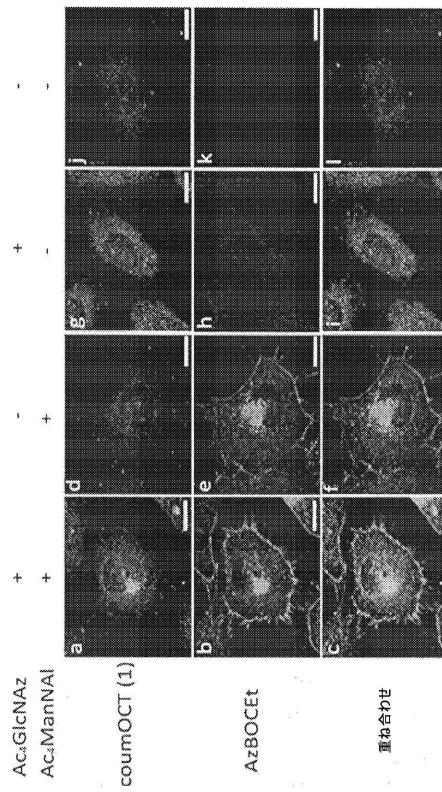


FIG. 24B

【 25 】

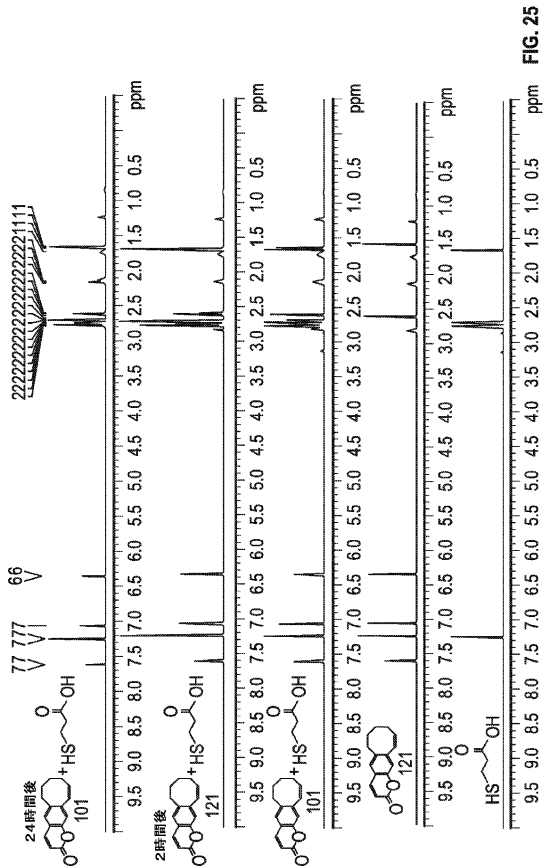


FIG. 25

【 26 】

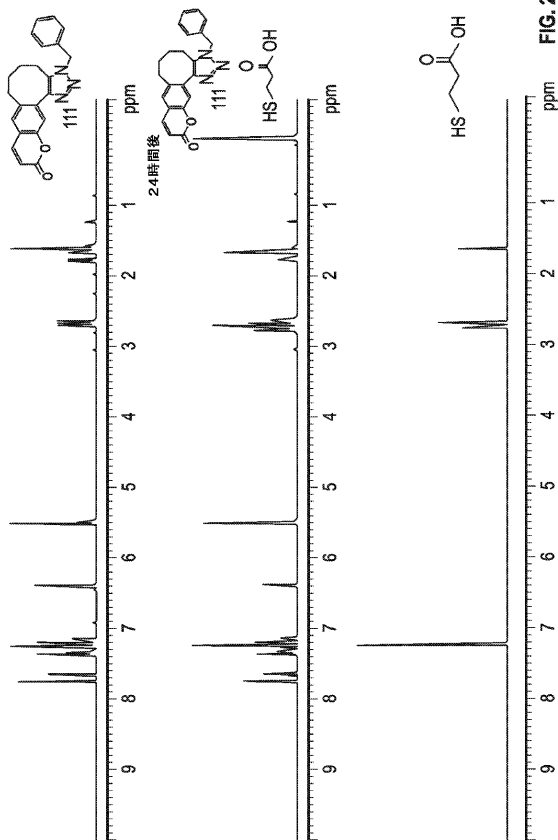


FIG. 26

## フロントページの続き

- (74)代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332  
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ウォン, チ - フェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタ フェ, ピー.オー. ボックス 8154
- (72)発明者 ファン, ジム - ミン  
台湾 115, タイペイ, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2, アカデミア シニカ 気付
- (72)発明者 シエ, ジウン - ジエ  
台湾 115, タイペイ, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2, アカデミア シニカ 気付

審査官 神谷 昌克

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0051109 (US, A1)
- SHIE, J. et al., An Azido-BODIPY Probe for Glycosylation: Initiation of Strong Fluorescence upon Triazole Formation, *Journal of the American Chemical Society*, 2014年, Vol.136, No.28, p.9953-9961
- LEONARDI, M.J. et al., Efficient Foerster Resonance Energy Transfer in 1,2,3-Triazole Linked BODIPY-Zn(II) Meso-tetraphenylporphyrin Donor-Acceptor Arrays, *Inorganic Chemistry*, 2012年, Vol.51, No.24, p.13114-13122
- BAI, D. et al., Exploring Foerster electronic energy transfer in a decoupled anthracene I-based borondipyromethene (bodipy) dyad, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012年, Vol.14, No.13, p.4447-4456
- JOSE, J. et al., Energy transfer dyads based on Nile Red, *Tetrahedron Letters*, 2009年, Vol.50, No.47, p.6442-6445
- WU, L. et al., Fluorescent Cassettes for Monitoring Three-Component Interactions in Vitro and in Living Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 2009年, Vol.131, No.26, p.9156-9157
- HAN, J. et al., 3- and 5-Functionalized BODIPYs via the Liebeskind-Srogl reaction, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009年, Vol.7, No.1, p.34-36
- LI, L. et al., Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives, *Journal of Organic Chemistry*, 2008年, Vol.73, No.5, p.1963-1970
- SHIEH, P. et al., Fluorogenic Azidofluoresceins for Biological Imaging, *Journal of the American Chemical Society*, 2012年, Vol.134, No.42, p.17428-17431
- BRYDEN, F. et al., A mild, facile, one-pot synthesis of zinc azido porphyrins as substrates for use in click chemistry, *Synlett*, 2013年, Vol.24, No.15, p.1978-1982

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07F

A61K

G01N

CAplus/REGISTRY (STN)