

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 533446

(P2003 - 533446A)

(43)公表日 平成15年11月11日(2003.11.11)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 D493/04	106	C 0 7 D493/04	106 Z 4 B 0 6 3
C 0 9 K 11/06		C 0 9 K 11/06	4 B 0 6 4
C 1 2 P 17/18		C 1 2 P 17/18	D 4 C 0 7 1
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 34数)

(21)出願番号 特願2001 - 578440(P2001 - 578440)

(86) (22)出願日 平成13年4月26日(2001.4.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月28日(2002.10.28)

(86)国際出願番号 PCT/AU01/00472

(87)国際公開番号 W001/081351

(87)国際公開日 平成13年11月1日(2001.11.1)

(31)優先権主張番号 PQ 7117

(32)優先日 平成12年4月26日(2000.4.26)

(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71)出願人 フルオロテクニックス ピーティーワイ
リミテッド
オーストラリア, ニューサウスウェールズ
州 2109, ノース ライド, マッカリー
ユニヴァーシティ, アール257 ビル
ディング イー8シー

(72)発明者 ベル, フィリップ, ジョン, リヴィ
ングストーン
オーストラリア, ニューサウスウェールズ
州 2074, タラムラ, アップス アヴェ
ニュー 18

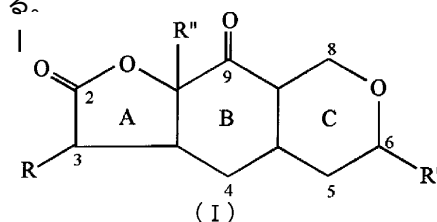
(74)代理人 弁理士 山田 行一 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光化合物

(57)【要約】

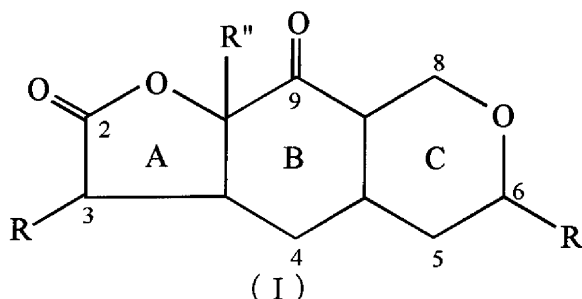
下記式 (I) の蛍光色素化合物が記載されている。該化合物は、特定波長の光での励起により蛍光の発光が起こるように、有機化合物と相互作用することから有用である。有機化合物が蛍光色素化合物に結合した場合、蛍光を検出またはモニターすることが、有機化合物の検出または定量化の手段となる。下記式 (I) においては、R、R' 及びR''の各々は、水素原子、ハロゲン原子または一つ以上のハロゲン基、ヒドロキシ基及び/またはオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(I)に従う化合物。

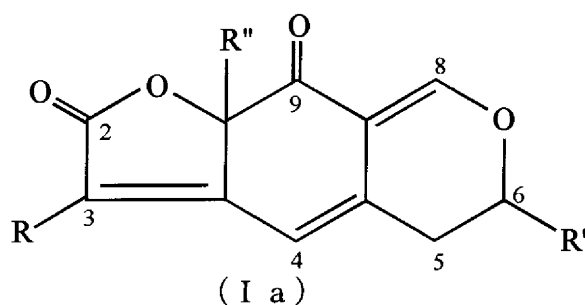
【化1】



(式中、R、R'及びR''の各々は、水素原子、ハロゲン原子、または一つ以上のハロゲン基、ヒドロキシ基及び/またはオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、環A、B及びCは、一つ以上の二重結合を随意に含み、環B及びCは、一つ以上のハロゲン原子で随意に置換されており、式(I)の互変異性体が含まれる。及び、該化合物は有機化合物と相互作用することができ、有機化合物と相互作用すると、該化合物は広い範囲の波長で励起された後に蛍光を発するものである。)

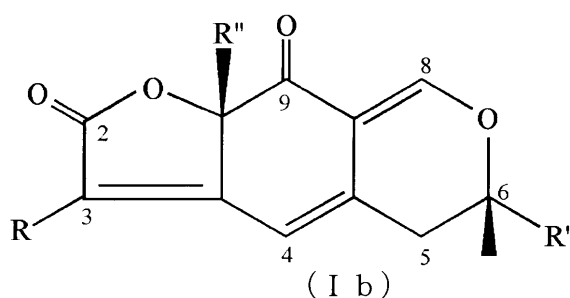
【請求項2】 下記式(Ia)に従い、その互変異性体を含む、請求項1に記載の化合物。

【化2】



【請求項3】 下記式(Ib)で表示される立体化学を有し、その互変異性体を含む、請求項2に記載の化合物。

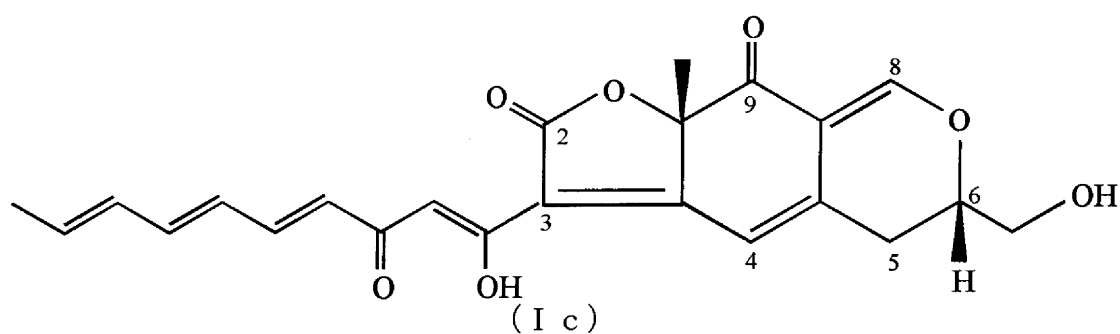
【化3】



【請求項4】 Rがヒドロキシ基及びオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀結合アルケニル基であり、R'がヒドロキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基であり、R''が直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基であり、その互変異性体を含む、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の化合物。

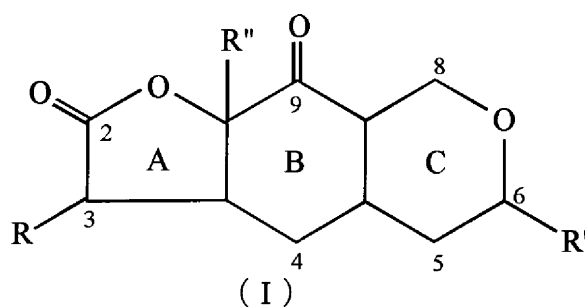
【請求項5】 Rが-C(OH)CHC(O)(CH)₆CH₃、R'が-CH₂OH、及びR''がMeであり、化合物が式(I c)に従う5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンであり、その互変異性体を含む、請求項3に記載の化合物。

【化4】



【請求項6】 式(I)に従う化合物。

【化5】



(式中、R、R'及びR''の各々は、水素原子、ハロゲン原子、または一つ以上のハロゲン基、ヒドロキシ基及び/またはオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基であり、環A、B及びCは、一つ以上のハロゲン原子で随意に置換されており、及び環A、B及びCは、一つ以上の二重結合を随意に含むものであり、前記の互変異性体が含まれる。但し、

(i) R'=-CH₂OH、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aの間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(ii) R'= Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aの間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(iii) R'= Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(iv) R'=-n-プロピル、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(v) R'=-n-プロピル、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₆Me、

(vi) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、

R -C(O)(CH)₅Me、

(vii) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには

、R -C(O)(CH)₆Me、

(viii) R'=-Ac、R''=Me、C4=C1、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときは

には、R -(CH)₂C(Me)CHC(Me)(Et)、

(ix) R'=-Ac、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -(

CH)₂C(Me)CHC(Me)(Et)、

(x) R'=-Ac、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -

(CH)₂C(Me)CH-i-Pr、

(xi) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8a及びC5とC6の間に二重結合を含むときには

、R -C(O)(CH)₄Me、

(xii) R'=-n-Pr、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(xiii) R'=-n-Pr、R''=Me、環A、B及びCが二重結合を含まないときには、R -C(O)(CH)₄Me、

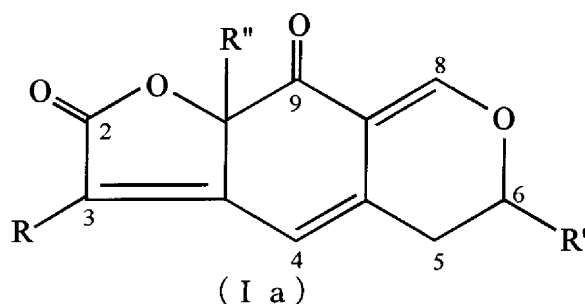
(xiv) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₆Me、

(xv) R'=-C(CH₂)(Me)、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(xvi) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me)

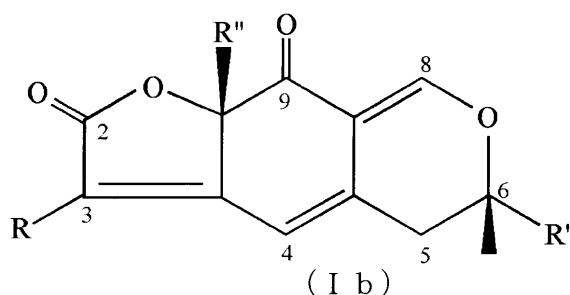
【請求項7】 下記式(Ia)に従う、請求項6に記載の化合物。

【化6】



【請求項 8】 下記式 (I b) で表示される立体化学を有する、請求項 7 に記載の化合物。

【化 7】



【請求項 9】 前記化合物が、有機化合物と相互作用するときは、青色波長で励起された後に蛍光を発する、請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】 前記化合物が、300 - 560 nm の範囲の光によって励起されるときに蛍光を発する、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】 前記有機化合物がタンパク質であり、且つ、前記化合物が前記タンパク質と相互作用するときに 307 nm での励起後に蛍光を発する、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】 前記化合物が、約 400 nm、488 nm 及び 514 nm の光によって励起されるときに蛍光を発する、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 13】 前記化合物が、488 nm で励起された後に 600 nm で蛍光を発する、請求項 12 に記載の化合物。

【請求項 14】 請求項 1 乃至 13 のいずれか一項に記載の化合物、分析学的に許容可能なキャリアー、及び随意のフルオロクロム、を含む組成物。

【請求項15】 請求項1乃至13のいずれか一項に記載の化合物を調製する方法であって、菌類種が前記化合物を生産する条件下で前記菌類種を培養すること、及び培養物から前記化合物を分離することを含む、前記方法。

【請求項16】 蛍光色素またはマーカールとしての、請求項1乃至13のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項17】 有機分子の染色、標識付け及び/または検出する手法における、請求項16に記載の使用。

【請求項18】 有機化合物を蛍光標識する方法であって、請求項1乃至13のいずれか一項に記載の化合物を、有機化合物が前記化合物で蛍光標識されるように、前記有機化合物に結合させることを含む、前記方法。

【請求項19】 前記有機化合物が、タンパク質、ペプチド、糖、核酸、細胞表面分子または界面活性剤であるか、抗体または細胞に含まれる、請求項1乃至14及び16乃至18のいずれか一項に記載の化合物、方法、組成物または使用。

【請求項20】 前記化合物が、前記有機化合物に結鎖分子を介して結合される、請求項19に記載の化合物、方法または使用。

【請求項21】 有機化合物を含むサンプル中の前記有機化合物を検出する方法であって、請求項18の方法に従って前記有機化合物を標識すること、及びその蛍光をモニターまたは検出することによって前記サンプル中の前記有機化合物を検出すること、を含む前記方法。

【請求項22】 前記標識された有機化合物が、広い範囲の波長、好ましくは300 - 560 nmの範囲の波長、より好ましくは青色波長の光に前記サンプルが晒されるときに検出される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記標識された有機化合物の蛍光モニタリングまたは検出が、透視法、分光法、顕微鏡法または血球計算法による、請求項21または22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、一般に、新規な蛍光化合物及び蛍光色素として機能することができる化合物、微生物からこのような化合物を単離する方法並びに科学的アプリケーションにおけるこのような化合物の使用に関する。

【0002】**(従来技術)**

蛍光を発する化合物は、多くの用途を有しており、細胞全体、細胞構成要素及び細胞機能の検出のために蛍光が必要とされる生物学的アプリケーションに特に適していると知られる。たとえば、多くの診断法及び分析法では、サンプルが検出可能なようにサンプルに蛍光標識が付けられることが要求される。これは、様々な物質(たとえば、細胞、組織、タンパク質、抗体、酵素、薬、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、核酸、炭水化物、または、蛍光性結合体を作る天然若しくは合成ポリマー)と相互作用する蛍光色素またはプローブを使用することによって達成される。

【0003】

合成蛍光プローブと一緒に、観察される生化学反応に対して特異性を与えるためにリガンドが多用される。そして、蛍光色素により、相互作用の検出または定量化の手段が提供される。これらの(たとえば、ゲルまたは水溶液中での)アプリケーションの中には、タンパク質の検出、細胞トラッキング、蛍光標識抗体を介してのタンパク質の検出、酵素活性のアセスメント、核酸染色が含まれる。

【0004】

通常、長波長の吸光度は、細胞自動蛍光からの干渉を減らして、光との協働によるフルオロホアの細胞毒性を減らすので、蛍光プローブの有用性を向上させる。レーザは、蛍光を励起する集中光源として特に有効であるが、現在、レーザの出力は、特定波長の光に制限されている。したがって、励起スペクトルがレーザ出力と一致する化合物の有用性は非常に高い。アルゴンレーザーは、蛍光の励起に最も一般的な光源であって、488nm及び514nmの光に主な出力を持つ。したがっ

て、これらの波長のどちらかによって励起される蛍光化合物には、特定の有用性がある。あるいは、蛍光の励起は、発光ダイオード等の固体光源を使って達成され得る。これらの代替源から発する光によって励起される蛍光化合物にも特定の有用性がある。

【0005】

赤色蛍光化合物は、生物学研究の多くの分野で広範に使用されている。テキサスレッド、テトラメチルローダミン-イソチオシアネートまたは赤色発光BODIPY色素を含む、これら赤色蛍光化合物の多くは、542nm等の緑色波長での励起を必要とする。このため、多くのアプリケーション（特に、アルゴンイオンレーザが励起に使用される場合）での使用が制限される。臭化エチジウム等の化合物は、アルゴンイオンレーザ（520nm帯）からの光で励起されるが、一般には、核酸以外の有機分子を標識するのに適切でない。フィコエリトリン等の他の化合物はアルゴンイオンレーザ（488nm）を使用して励起され、オレンジ色/赤色の波長で発光する。しかし、フィコエリトリンは、安定性が悪く分子量が大きいため、細胞トラッキング、核酸標識またはタンパク質染色等の多くのアプリケーションにとって不適である。

【0006】

タンパク質染色に関しては、利用可能な方法が多くある。これらの方法では、非蛍光化合物または蛍光化合物を利用することができる。最も一般に使われている方法は、非蛍光性のクーマシーブルーを利用し、大量の有機溶媒の使用を必要とし、時間がかかる。蛍光に基づく他のタンパク質検出法が利用可能であり、非蛍光法よりも潜在的には高感度である。しかし、これらの方法は、一般に、非蛍光法に比べて非常に費用のかかるものであり、広範囲にわたる使用は制限される。したがって、比較的高い感度と有効なスペクトル特性を兼ねた化合物には、特定の有用性がある。

【0007】

溶液中でのタンパク質の定量化については、いくつかの方法がある。これらの方法は、ある範囲の手法に基づいており、これには、色素が可溶タンパク質に結合する方法が含まれる。これらの色素は、非蛍光化合物でも蛍光化合物でもあり

得る。蛍光色素ベースの方法は、非蛍光色素のものよりしばしば感度が高いので、広範囲の濃度にわたってタンパク質濃度を決定することができる。タンパク質結合機能と有効なスペクトル特性を兼ねた化合物には、特定の有用性がある。

【0008】

酵素研究においては、特定の酵素活性検出のために、蛍光化合物の広範囲にわたる使用がある。たとえば、フルオレセインジ-β-D-ガラクトピラノシド (FDG) は、非蛍光化合物であり、フルオレセインガラクトシドをまず生じ、蛍光性の非常に高いフルオレセインを次に生じるよう、酵素 β-ガラクトシダーゼによって順番に加水分解される。FDG化合物の切断は、溶液での蛍光の増加によってモニターされ、このようにして酵素活性を感度良く定量化することが許容される。現在、限られた数のフルオロホアだけがこのプロシージャにふさわしい。したがって、新規な蛍光化合物で様々な基質に結合され得るものが有用である。

【0009】

二重染色に関しては、低分子量フルオロホアの選択が非常に限られている。優勢な緑色フルオロホアはフルオレセインであり、アルゴンイオンレーザの488nm帯からの光を強く吸収し、518nmで再発光する (re-emits)。現在、低分子量であって、アルゴンイオンレーザの488nmまたは514nm帯で励起される赤色またはオレンジ色のフルオロホアはほとんどない。したがって、アルゴンイオンレーザによって励起され、600nmよりも長い波長で発光する、低分子量の化合物が有用であり、特に、フルオレセインとスペクトルの重なりが最小である場合に有用である。

【0010】

本発明者は、ある範囲の有機分子に容易に結合して蛍光性複合体を作ることができる、菌に由来する新規化合物を単離した。

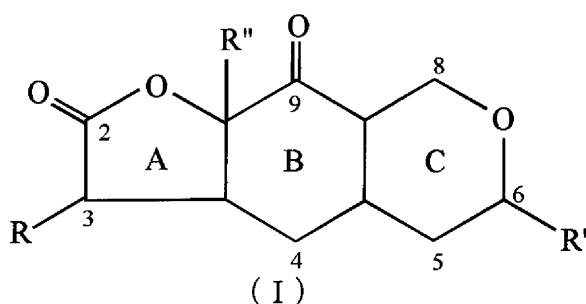
【0011】

(発明の開示)

発明の第一の態様では、式(I)に従う化合物が提供される。

【0012】

【化1】



【0013】

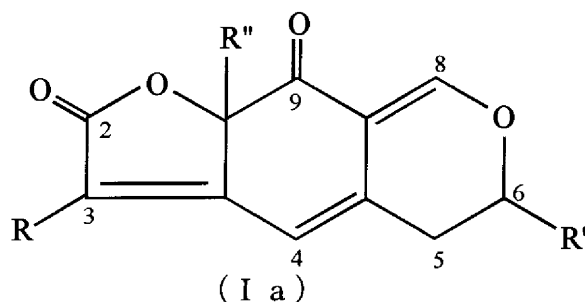
ここで、R、R' 及びR''の各々は、水素原子、ハロゲン原子、または一つ以上のハロゲン基、ヒドロキシ基及び/またはオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基である；環A、B及びCは、一つ以上の二重結合を随意に含む；環B及びCは、一つ以上のハロゲン原子で随意に置換される；及び、該化合物は有機化合物と相互作用することができ、有機化合物と相互作用すると、該化合物は広い範囲の波長で励起された後に蛍光を発する。好ましくは、該化合物は、300-560nmの範囲の波長、より好ましくは380-530nmの範囲の波長、更により好ましくはUV波長及び/または青色波長で励起される。好ましくは、該化合物は、460~700 nmの波長で発光する。より好ましくは、発光ピークは、ドデシル硫酸ナトリウム等の有機化合物と相互作用するときは、およそ530nmが中心であり、タンパク質または細胞等の生体分子と相互作用するときは、605nmが中心である。

【0014】

好ましくは、本発明の第一の態様では、式(Ia)に従う化合物が提供される。

【0015】

【化2】

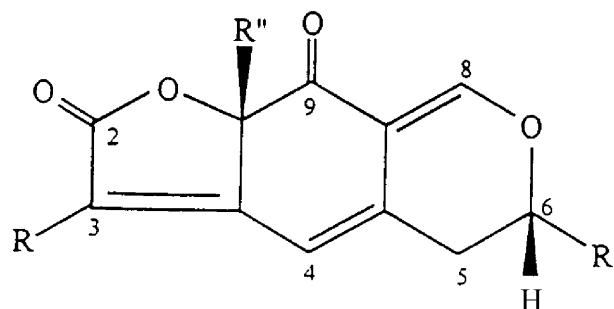


【0016】

好ましくは、式(1a)に従う化合物は、式(1b)で表されるような立体化学性を持つ。

【0017】

【化3】



(1b)

【0018】

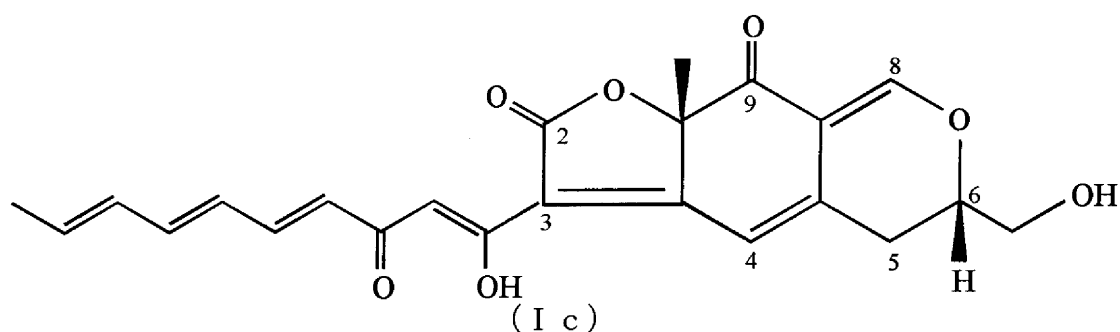
好ましくは、Rは、ヒドロキシ基及びオキシ基で随意に置換された、直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀結合アルケニル基であり; R' は、ヒドロキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基であり、R'' は、直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基である。

【0019】

より好ましくは、第一及び第二の態様に従う本発明が、式(1c)に従う化合物5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオン(5,6-dihydro-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-hydroxy-3-oxo-1,4,6,8-decatetraenyl]-6-hydroxymethyl-9a-methyl-2H-furo[3,2-g][2]benzopyran-2-9(9aH)-dione)にあるように、R=-C(OH)CHC(O)(CH)₆CH₃、R'=-CH₂OH、及び R''=Meである。

【0020】

【化4】



第二の態様では、本発明は、式(I)に従う化合物であって、R、R'及びR''の各々が、水素原子、ハロゲン原子、または一つ以上のハロゲン基、ヒドロキシ基及び/またはオキシ基で随意に置換された直鎖または分岐鎖C₁₋₂₀アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基である；環A、B及びCは、一つ以上のハロゲン原子で随意に置換されている；及び、環A、B及びCは、一つ以上の二重結合を随意に含むものである。但し、

(i) R'=-CH₂OH、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4aの間に二重結合を含み；環CはC8とC8aの間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(ii) R'= Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4aの間に二重結合を含み；環CはC8とC8aの間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(iii) R'= Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4aの間に二重結合を含み；環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(OH)CHC(O)(CH)₆C(Et)(Me)、

(iv) R'=-n-プロピル、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4aの間に二重結合を含み；環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(v) R'=-n-プロピル、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4aの間に二重結合を含み；環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₆Me、

(vi) R'=-C(CH₃)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み；環BはC4とC4

aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、

R -C(O)(CH)₅Me、

(vii) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには

、R -C(O)(CH)₆Me、

(viii) R'=-Ac、R''=Me、C4=C1、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むとき

には、R -(CH)₂C(Me)CHC(Me)(Et)、

(ix) R'=-Ac、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -(

CH)₂C(Me)CHC(Me)(Et)、

(x) R'=-Ac、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -

(CH)₂C(Me)CH-i-Pr、

(xi) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環AはC3とC3aの間に二重結合を含み;環BはC4とC4aの間に二重結合を含み;環CはC8とC8a及びC5とC6の間に二重結合を含むときには

、R -C(O)(CH)₄Me、

(xii) R'=-n Pr、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(xiii) R'=-n Pr、R''=Me、環A、B及びCが二重結合を含まないときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(xiv) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₆Me、

(xv) R'=-C(CH₂)(Me)、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、

(xvi) R'=- (CH)₂Me、R''=Me、環Aは二重結合を含まず;環B及びCはC8aとC4aとC5とC6の間に二重結合を含むときには、R -C(O)(CH)₄Me、である。

【0021】

好ましくは、発明の第二の態様に従う化合物は、式(1a)に従うものであり、

より好ましくは、式(1b)で表されるように立体化学性を持つ。

【0022】

より好ましくは、第二の態様に従う本発明の化合物は、式(1c)に従う化合物5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンにあるように、 $R=-C(OH)CHC(O)(CH)_6CH_3$ 、 $R'=-CH_2OH$ 及び $R''=Me$ である。

【0023】

式(1)-(1c)に従う化合物が、対応する互変異性体構造(tautomeric structures)の全体を含むことは認識されよう。

【0024】

化学的に、5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオン等の式(1)-(1c)の化合物はアザフィロン(azaphilone)化合物のメンバーである。アザフィロン化合物はいろいろな菌類(fungus)によって生産される。その抗生物質的機能、酵素機能抑制能、及びモナスカス種(Monascus sp.)によって生産される食品添加物着色剤の役割について研究がされてきた。

【0025】

また、アザフィロン核(azaphilone nucleus)は、モナスカス種によって生産される色素(pigment)でも見つけられた。一般のアザフィロンコアを含む色素には、ジヒドロモナシン(dihydro-monascin)及びモナスコルビン(monascorubin)が含まれる。生体分子または有機化合物を染色する蛍光色素としての有用性については記録されていない。

【0026】

出願人に知られている従来技術のどれも、式(1)-(1c)に記載された構造の化合物が蛍光性であることを教示または示唆していないし、それが生体分子または有機化合物の蛍光染色に適切であることも示唆していない。従って、この化合物と関連する予想外で有利な特性がある。これには、ゲル中でのタンパク質の高

感度検出、細胞トラッキング及び二重染色が含まれる。

【0027】

本発明者は、式(1)-(1c)に従う化合物が水溶液中では蛍光性でないが、有機化合物と相互作用して強い蛍光染色を生じることを見出した。好ましい実施形態では、本発明の式(1)-(1c)に従う化合物は、有機分子の検出及び標識付けに使用される。

【0028】

好ましくは、式(1)-(1c)に従う化合物は、有機分子に結合すると、青色波長での励起の後に蛍光を発する。より好ましくは、式(1)-(1c)に従う化合物は、300-560nmの範囲の吸収光によって励起される。

【0029】

好ましい実施形態では、式(1)-(1c)に従う化合物は、タンパク質と相互作用して、標準のUVトランスイルミネータ(307nm)によって発生する光で励起され得る蛍光性複合体を作る。励起されると、蛍光性複合体は、広範囲にわたる波長で発光するので、タンパク複合体の検出が許容される。タンパク質/色素(dye)複合体の励起波長には、DNA(最大吸収518nm、最大発光605nm)と複合化された臭化エチジウムの励起波長が含まれる。このことは、ゲル中のタンパク質及びDNAを共に検出するために同一の装置を使用することができるので、特定の有用性である。広い範囲に励起波長があるために、化合物は、アルゴンイオンレーザの488nmと514nmの帯域によって強く励起されると同様に、ダイオード光源(例えば、400nm辺りで発光するもの)から発される光を吸収することもできる。

【0030】

もう一つの好ましい実施形態では、式(1)-(1c)に従う化合物の蛍光性型は、アルゴンイオンレーザの488nm出力からの光を強く吸収し、600nmよりも長波長で再発光することができる。

【0031】

もう一つの好ましい実施形態では、式(1)に従う化合物は、分析的に許容可能なキャリアーと共に組成物に含まれ、二重染色アプリケーションにおいてフル

オレセインのようなフルオロクロムとの組み合わせで使用され得る。このようなフルオロクロムは、組成物に含まれてもよいし、別に使用されてもよい。

【0032】

式(I) - (Ic) に従う化合物は、菌類種によって生産され得る。好ましくは、菌類種は、1998年1月15日にオーストラリア政府分析研究所 (AGAL) に寄託された、受託番号 NM98/00507によって同定される菌株である。

【0033】

新規なフルオロホアである5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオン及び関連化合物の構造、並びにそれらの精製及び単離方法については、これまで記載がなかった。

【0034】

式(I) - (Ic) に従う化合物の有機分子への結合は、直接的な化学結合または物理結合を含み、または本技術分野で既知の「結鎖分子」を使用することによって達成されてもよい。有機分子蛍光色素として使用されるときに本発明の化合物が結合することのできる有機分子には、たとえば、タンパク質、ペプチド、糖、核酸、抗体、細胞表面生体分子、界面活性剤 (detergents) 及び細胞が含まれる。化合物が蛍光性であって有機化合物と結合するという特性のために、有機化合物に付いた蛍光色素の検出が必要とされるいかなるアプリケーションにおいても、該化合物が用途を持つことはいうまでもない。

【0035】

第三の態様では、本発明は、発明の第一及び第二の態様に従う化合物を生産する方法にあり、該方法は、菌類種が化合物を生産する条件下で該菌類種を培養すること、及び培養物から化合物を分離することを含む。

【0036】

式(I) - (Ic) に従う化合物は、粗培養抽出物であるとき、または抽出及び分離技術によって精製されるときに、蛍光色素として使用され得る。

【0037】

AGAL 受託番号 NM98/00507によって同定される菌株を、増殖培地上に接種し、

その上でインキュベーションした後に、蛍光色素として適した化合物が菌類によって生産されることが本発明者によって見つけられた。適切な菌類培養物の上澄液から以外にも、別の技術を使用することによって本発明の第一及び第二の態様の式(I) - (Ic) に従う化合物を生産することが可能であることはいうまでもない。たとえば、菌類が「前駆体」を生産するならば、化学的、物理的または酵素的手段によって、その前駆体を蛍光性型に修飾することが可能である。このような化合物を微生物から取得できるという知識は、有効な特性を備えた全く異なる化合物または同一ファミリーに属する蛍光色素としての用途に適した他の化合物の発見及び生産を許容するに違いない。また、式Iに従う化合物は、直接的な化学合成によって合成的に生産されてもよいし、菌類によって使用される生合成経路での中間生成物を修飾することによって合成的に生産されてもよい。

【0038】

また、本発明の式(I) - (Ic) に従う化合物は、化学的手段によって合成的に生産されてもよい。新規な蛍光化合物が菌類によって生産されるという知識は、必要条件下で菌類を培養することとは別に、化合物を生産する他の手段を導くであろう。

【0039】

本発明の式(I) - (Ic) に従う化合物は、細胞及び他の有機分子に蛍光性型で結合するので、細胞または他の有機分子が化合物で標識されるとき、それらを追跡する手段として使用され得る点で明確な利点を持つ。

【0040】

第四の態様では、本発明は、本発明の第一及び第二の態様に従う化合物の蛍光色素またはマーカーとしての使用にあり、好ましくは、有機分子を染色、標識化及び/または検出するための科学的な手法にある。

【0041】

本発明の第一の及び第二の態様に従う化合物の使用の実施例としては、顕微鏡法のための細胞追跡用色素、膜流動性色素、抗体との結合、核酸への結合、細胞表面リガンドイメージング色素、糖への結合、血球計算 (cytometric) 分析、及び共焦顕微鏡法が含まれるが、これらに限定されない。しかし、赤色波長での蛍

光が必要とされるいかなる使用にでも該化合物が適切であることが認識され、これには、488nmで励起する場合が含まれる。

【0042】

第五の態様では、本発明は、有機化合物を蛍光標識する方法にあり、該方法は、本発明の第一または第二の態様に従う化合物を、有機化合物が該化合物で蛍光標識されるように該有機化合物に結合させることを含む。

【0043】

好ましくは、広範囲にわたる波長（好ましくは300-560 nmの範囲での波長）に晒されるとき、蛍光標識された有機化合物が検出される。

【0044】

有機化合物には、タンパク質、ペプチド、糖、核酸、抗体、細胞表面生体分子、界面活性剤及び細胞が含まれるが、これらに限定されない。化合物は、化学的または物理的会合で有機化合物に直接に結合されてもよいし、結鎖分子を介して有機化合物に結合されてもよい。化合物が有機化合物（たとえば抗体またはレクチン）に特異的なリガンドに付けられる場合には、そのリガンドが有機化合物へ結合することにより、有機化合物が蛍光標識されるようになる。

【0045】

第六の態様では、本発明は、有機化合物を含むサンプル中の有機化合物を検出する方法にあり、該方法は、本発明の第五態様の方法に従い有機化合物を標識すること、その蛍光をモニターまたは検出することによってサンプル中の有機化合物を検出すること、を含む。好ましくは、標識された有機化合物は、サンプルが広範囲にわたる波長、好ましくは300-560 nmの範囲の波長、より好ましくは青色波長の光に晒されるときに検出される。

【0046】

標識された有機化合物の蛍光をモニターまたは検出することは本技術分野に既知であるいかなる手段によってもよい。このような手段には、透視法、分光学、顕微鏡法及び血球計算法が含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

この明細書を通して、用語「含む」または「含む（三人称）」若しくは「含む

(現在進行形)」等の変形は、明示されたエレメント、完全体若しくはステップ、またはエレメント、完全体若しくはステップのグループを含むが、他のいかなるエレメント、完全体若しくはステップ、またはエレメント、完全体若しくはステップのグループを排除するものではないとして理解されよう。

【0048】

文書、作用、材料、装置、記事等についての、本明細書に含まれるあらゆる議論は、本発明の内容を提供する目的だけのものである。これらの事項のいくつかまたは全部が、先行技術ベースの一部を形成すると考えられるべきではないし、本出願の各請求項の優先日前にオーストラリアに存在した本発明に関連する分野の一般的知識であるとの容認として考えられるべきではない。

【0049】

本発明がより明らかに理解され得るよう、次の実施例と添付図面を参照して好ましい実施の形態を記載する。

【0050】

(発明を実行するための態様)

(実施例1)

抽出物Aの生産

AGAL受諾番号NM 98/00507によって同定された菌株を識別する全ての特性を有する生物学的に純粋な微生物の培養物を取得した。

【0051】

菌類 (AGAL 受託番号NM 98/00507) の増殖培地は、ショ糖 (CSR) 40g、酵母エキス (Difco) 5g、ペプトン (Difco) 10g及び寒天 (Difco) 10gを1Lの水に加えることによって調製した。媒地を殺菌し且つ寒天を溶かすために、115°Cで15分間、混合物をオートクレーブで処理した。液体をペトリ皿へ注ぎ室温にセットさせた。冷却後、媒地表面上へ菌類培養物を接種して、25°Cで3日間インキュベーションした。培養物を冷凍庫へ移して、色素生産が高まり培養物が強い赤色に変化するまで (通常は3日から5日)、4°Cでインキュベーションした。

【0052】

収穫のために十分な色素が培養物に生産されたら、菌類のバイオマスを含む培

地を、エタノール2容量に対して培地1容量の比で、エタノール中へ移した。4°Cでインキュベーションし且つ16時間シェイキングすることによってエタノール相に色素を抽出させた。その液相を残留培養培地から別の容器に移し、4°Cで10分間、3000rpmで遠心分離した。

【0053】

浄化された抽出物(抽出物A)は、使用のために保存されるか、又は実施例2及び3の下で記載されるプロシージャのうちの1つによって更に精製された。

【0054】

(実施例2)

抽出物Bを生産するための抽出物Aの精製

実施例1に記載の方法によって生産される粗エタノール抽出物である抽出物Aの容量を、高真空下で減らして、溶媒としてメタノールを使用して、セルロース粉末上で色素分析し、セファデックスLH-20カラムにかけ、また、メタノールで溶出した。48時間にわたってフラクションを収集し、端の近くに溶出している紫バンドを収集した。このフラクションを凍結乾燥させて、(0.1%の酢酸)メタノールの最小容量で再懸濁させて保存した。

【0055】

(実施例3)

5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンの精製

実施例2に記載の方法によって生産される抽出物Bを、HPLC精製(Supelco C16-アミド・カラム、75%メタノール/水、0.05%酢酸、そして50%アセトニトリル/水、0.05%酢酸に溶解されている)にかけた。水を除去するために、最終フラクションを凍結させ(-20°C)、窒素流下で残留アセトニトリルを蒸発させた。

【0056】

このプロシージャにより、分析的に純粋な5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンが生産され、それはオ

レンジ色の固体であった。

【0057】

(実施例4)

5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンの構造決定

実施例3に従って生産された化合物を、5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンについて構造決定をするために、NMR分光法と高分解能質量分析法の組み合わせを使用して分析した。

【0058】

(核磁気共鳴スペクトル法)

実施例3から得られたHPLC精製化合物(～5mg)をCDCl₃(0.5mL;99.96atom%、Aldrich)中に溶解し、NMRチューブ(PP527、Wilmald)内へフィルターすることによって、NMRサンプルを調製した。サンプルを脱気して窒素雰囲気下で平衡化した。

【0059】

Bruker DRX600(600MHz)核磁気共鳴分光計を使い127°CでNMRデータを取得し、xwinNMR(バージョン2.6;Bruker社)を使用して処理した。¹Hスペクトル幅6009Hz及びリサイクルディレイ2sを持つ直角位相検出(quadrature detection)を使って、全ての2D NMR実験を操作した。化学シフトは、残存CHCl₃(dH 7.26ppm; dC 77.01ppm)と参照した。高出力¹Hp/2パルスは9.5ミリ秒に、(MLEVスピンのための)低出力パルスは25.15ミリ秒にあると決定された。GARPデカップリングについて、¹³C高出力p/2パルスは10.5ミリ秒であり、65ミリ秒の低出力パルスを使用した。グラジエントパルスは、100ステップ・サイン・プログラムを使用してz軸に沿って加えた。

【0060】

32Kリアルポイントを使用して1D実験のデータを取得し、ゼロを64Kに充てんし、分解能を向上させるためにガウス型掛け合わせをした(Gaussian mul

tiplied)。エコー/アンチエコーTPPIグラジエント(80:20.1)選択を使用し、感度が強化されたダブルINEPTトランスファーを介して、炭素-水素コリレーション(HSQC)を達成した(Palmer, A. G., III, Cavanagh, J., and Wright, P. (1991) J. Magn. Reson. 93, 151-70; Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., and Schmidt, P. (1994) J. Biomol. NMR 4, 301-6; Kay, L. E., Keifer, P., and Saarinen, T. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114(26), 10663-5)。取得の間は、デカップリングで、1.3sリサイクルディレイで、 t_2 (増加量につき128走査)において2Kデータポイントを収集した。 t_1 では、512増加量を使用し(10-170 ppm)、INEPTシーケンスを、145HzのX-H結合のために最適化した。エコー/アンチエコーTPPIフェーズ感度を選択するために、80:20.1の勾配率を用いた。

【0061】

関心のプロトン上での選択ガウス型パルスを使用して、一次元ROESYスペクトルを測定した(Kessler, H., H. Oschkinat, C. Griesinger & W. Bermel, (1986) J. Magn. Reson. 70, 106; Stonehouse, J., P. Adell, J. Keeler & A.J. Shaka, (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 6037; Stott, K., J. Stonehouse, J. Keeler, T.L. Hwang & A.J. Shaka, (1995) J. Am. Chem. Soc. 117, 4199-4200)。 $p/2$ パルスを達成するために、1000ステップガウス型プログラム(60ミリ秒、64.6デシベル)を用いた。コンティヌオ波スピン・ロックのために100ミリ秒(13デシベル)混合時間を使用した。 z 軸に沿って15%のグラジエントでグラジエント選択を達成した。6009Hz以上で、10Kトランジエントを集積させた。照射されたピークのパーセントとしてROE強化を測定した。キャリアー周波数からはオフセットをコンペンセーションしなかった。

【0062】

二次元ホモヌクレア(homonuclear)ハートマン-ハートトランスファースペクトル(TOCSY)は、2ms低出力トリムパルスでフランクされたMLEV17(Bax, A., & Davis, D. G. (1985) J. Magn. Reson. 63(1), 207-13)パルスシーケンスを使用して測定した。サインベルシフトした(90°)アポダイゼーションを、両方の次元の処理で使用した。

【0063】

1-結合相関性(Bax, A., & M.F. Summers, (1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 2093 - 2094)を抑制するために、ローパスJ-フィルター(145Hz)でロングレンジカップリング(HMBC)のために最適化されたダブル量子コヒーレンス及びヘテロ核ゼロを介した $2D^1H-^{13}C$ 相関を、収集の間デカップリングなしで、選択のためのグラジエントパルス(50:30:40.1)を用いて取得した。別個の実験で、ロングレンジカップリング発生についてのディレイは、20、10、5及び2Hzのカップリングについて最適化した。F1においては、210ppmのスペクトル幅を使用し、フェーズ情報を廃すために最終的スペクトル強度を計算した。

【0064】

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) 1.75, s, C9a-Me; 1.84, dd, J 6.7, 1.1 Hz, C9'-Me; 2.80, dd, J 17.2, 3.6 Hz, H5 ; 2.89, ddd, J 17.1, 11.5, 1.9 Hz, H5 ; 3.85, dd, J 12.2, 5.5 Hz, C6CH₂OH; 3.97, dd, J 12.2, 3.4 Hz, C6CH₂OH; 4.39, m, H6; 5.97, m, H9'; 6.10, d, J 15.1 Hz, H4', 6.19, ddd, J 15.1, 10.6, 1.6 Hz, H8'; 6.25, dd, J 14.6, 11.2 Hz, H6'; 6.58, dd, J 14.5, 10.5 Hz, H7'; 6.79, s, H2'; 7.16, bs, H4, 7.32, dd, J 15.2, 11.2 Hz, H5'; 7.85, s, H8。

【0065】

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) 18.8, C9'-Me; 28.0, C9a-Me; 29.3, C5; 63.4, C6-CH₂OH; 79.0, C6; 86.2, C9a; 101.0, C2'; 112.2, C8a; 113.4, C4; 115.3, C3; 126.5, C4'; 128.6, C6'; 131.7, C8'; 136.0, C9'; 140.9, C4a; 142.0, C7'; 142.6, C5'; 159.0, C8; 168.2, C2/C3a; 177.7, C1'; 185.0, C3'; 190.0, C9。

【0066】

全てのプロトンがプロトン化された炭素に相関及び割り当てのために、ヘテロ核シングル量子干渉(HSQC)を用いた。それに加えて、8ミリ秒、20ミリ秒、100ミリ秒の混合時間で、一連の全相関分光法(TOCSY)実験を実行することにより、各々のスピン・システムを特徴付けた。最も短い混合時間は、直接的に結合したプロトンだけに相関を与えたのに対して、最も長い混合時間は、全体のスピン

・システムを同定して、(明らかに)結合していない多くのプロトンの位置を割り当てるために有用な非常に小さいロングレンジカップリングについての情報を与えた。隙間結合性の詳細は、一連の次元選択回転フレーム相関分光法 (ROESY) 実験によって達成した。ROEフリーなTOCSYトランスファーのみを観察するために、グラジエントセクションを用いて、低出力ガウシアン90度パルスによって、選択的励起を達成した。100ミリ秒の混合時間が最適であるとわかった。プロトン化されていない全ての炭素を割り当てるには、25、50、100及び250ミリ秒の混合時間を持つ、長いレンジのヘテロ核マルチプル量子干渉 (HMBC) スペクトルが決定的であるとわかった。この後であっても、C2はプロトンとは相関しないとわかり、それは168.2ppmでC3aと一致した。

【0067】

スペクトルデータから、幾つかの三環系スケルトンが理論的に可能だったが、1つ(5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオン)が有効データに正確に適合した。

【0068】

(質量分析)

化合物の分子式が $C_{23}H_{22}O_7$ であると決定するために、実施例3によって生産された化合物を高分解能質量分析にかけた。

【0069】

質量スペクトル (ESI、陽イオン) m/e 411 ($M+H^+$, 55%), 317 (5), 249 (12), 163 (10), 121 (100), 93 (4)。陰イオンESI-FTICR 検出: $M - H^+$, 409.1304, $C_{23}H_{21}O_7$ は409.1293を要求する; 検出: 247.0617、 $C_{13}H_{12}O_5$ は247.0685を要求する。

【0070】

max及び max

max (MeOH) 432, 555nm, 10000, 4000。 max (アルカリMeOH) 432nm, 16000。 max (酸性MeOH) 390, 560nm, 6000, 10000。

【0071】

max (ニート) 3400 (br) , 2925, 2854, 1744, 1712, 1589, 1259, 1010cm⁻¹。

【0072】

(実施例5)

抽出物Aを用いたタンパク質ゲル染色

多くの標準プロトコールのうちの一つによって、タンパク質ゲルを調製した。たとえば、Laemmliのプロトコール(U.K. 1970、Nature、227:680-685)によってSDSページゲルを調製した。電気泳動が完了したあと、電気泳動装置からゲルを取り除いた。水90mL、グリセリン10mL及び抽出物A5mLから成る染色溶液100mLを含む容器の中でゲルを固定した。ゲルと染色溶液を、90分間、穏やかにシェイキングしてインキュベーションした。90分間の染色プロシージャの後、溶液を取り除いて、ゲルを水で3時間を簡単に洗った。こうした簡単な洗浄の後、10%のグリセリン水溶液100mL中にゲルを置いて、更に30分間シェイキングしてインキュベーションした。

【0073】

ゲル中でのタンパク質を視覚化するために、UV トランスイルミネータ(307nm)にゲルを移して、ポラロイド(登録商標)667白黒フィルム及び臭化エチジウムゲル(たとえば、モレキュラープローブE-7591)の検出用にデザインされたフィルター・セットを使用して写真を撮った。

【0074】

(実施例6)

孢子形成細胞と休止期細胞の落射蛍光識別

孢子形成を促進する条件下で微生物を培養して、休止期細胞が主な培養物における孢子形成細胞の同定を容易にするために抽出物Bを用いた。たとえば、グルコース10g/L、酵母エキス5g/L及びペプトン10g/Lを含む、水をベースにしたブロスでサッカロミセス・セレビスシア(*Saccharomyces cerevisiae*)を増殖させた。30°Cで16時間インキュベーションした後、遠心分離にかけ、1mLの水に再懸濁させることにより細胞を収穫した。5%の酢酸カリウム、2%の寒天及び水から成る半固体培地の上へ培養物の5mLアリコートスポットした。酵母細胞の孢子形成を

許容するために4日間22°Cで培養物をインキュベーションした。孢子形成された培養物を、1 mL当たり 1×10^9 の細胞密度になるように水に再懸濁させた。この孢子形成された培養物1 mLに抽出物B 5 μ Lを加えた。対比染色として、5(6)-カルボキシフルオレセインジアセタート (CFDA) の10 mM溶液 (DMSO中) 5 mLを、孢子形成された培養物に加えた。5分後、遠心分離によって孢子形成された培養物を収穫して、1 mLの水に再懸濁させた。落射蛍光顕微鏡 (励振488 nm) 下の検査により、孢子形成細胞と休止期細胞との間の区別が迅速になされた。

【0075】

広く記載された本発明の意図または範囲から逸脱することなしに、特定の実施形態に示される本発明に数々の変形及び/または修飾がなされ得ることは当業者に認識されよう。従って、本実施形態は、あらゆる点で、本発明を制限するものではなく例示的であると考慮される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の第一及び第二の態様に従う蛍光化合物である5,6-ジヒドロ-3-[(1Z, 4E, 6E, 8E)-1-ヒドロキシ-3-オキソ-1,4,6,8-デカテトラエニル]-6-ヒドロキシメチル-9a-メチル-2H-フロ[3,2-g][2]ベンゾピラン-2-9(9aH)-ジオンのNMRスペクトルを示す。

【図2】

図1によって同定される化合物がウシ血清アルブミン (BSA) に結合及びヨー化プロピジウムがDNAに結合したときの、蛍光スペクトルの例を示す。過剰なBSAへの結合に用いられた精製化合物のモル数は、過剰なDNAへの結合に用いられたプロピジウムのモル数と等しい。2つの励起帯により、605 nmの発光となっている。図からわかるように、390-400 nmの光による励起により、605 nmで発光の最大値が得られる。

【图1】

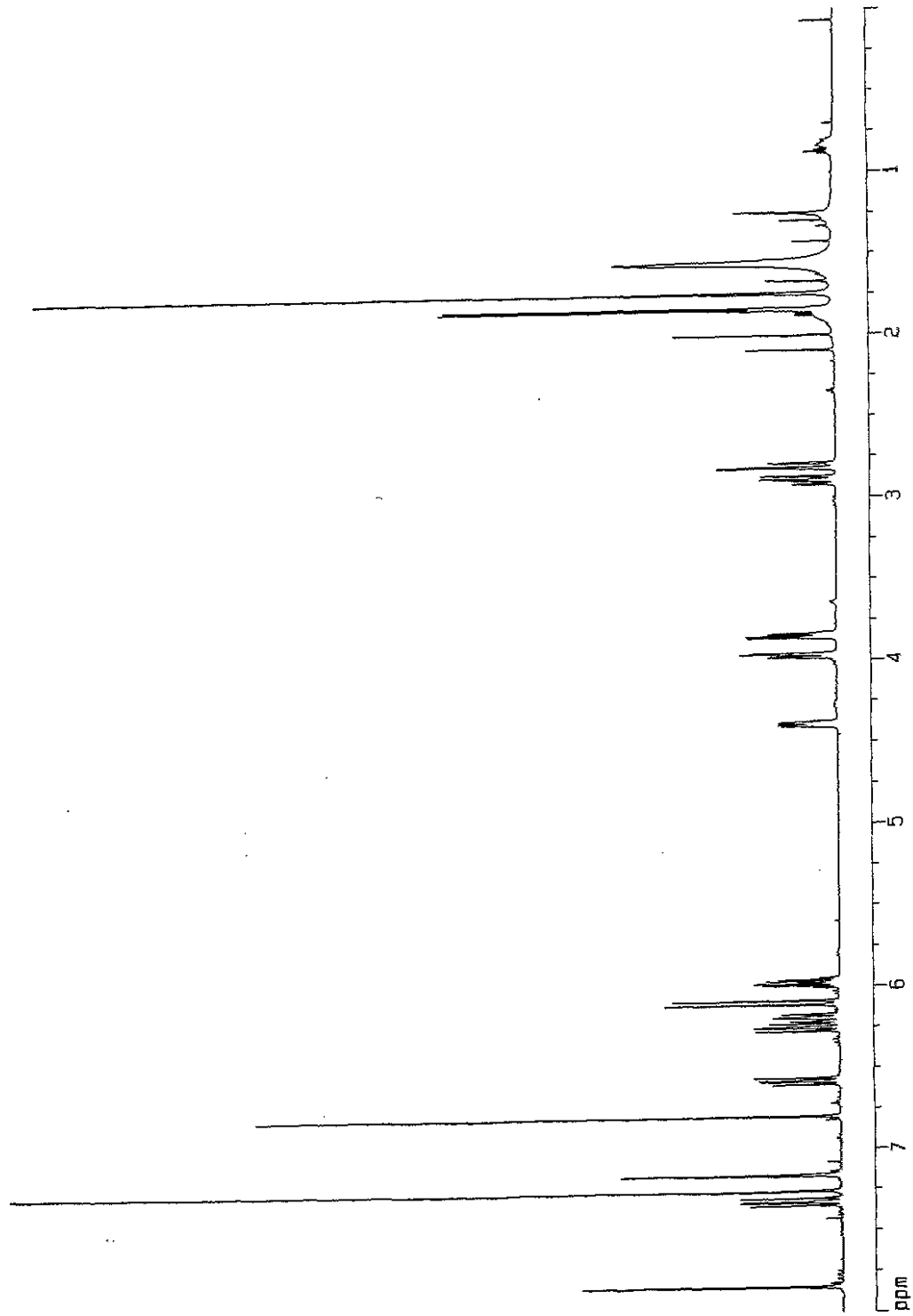
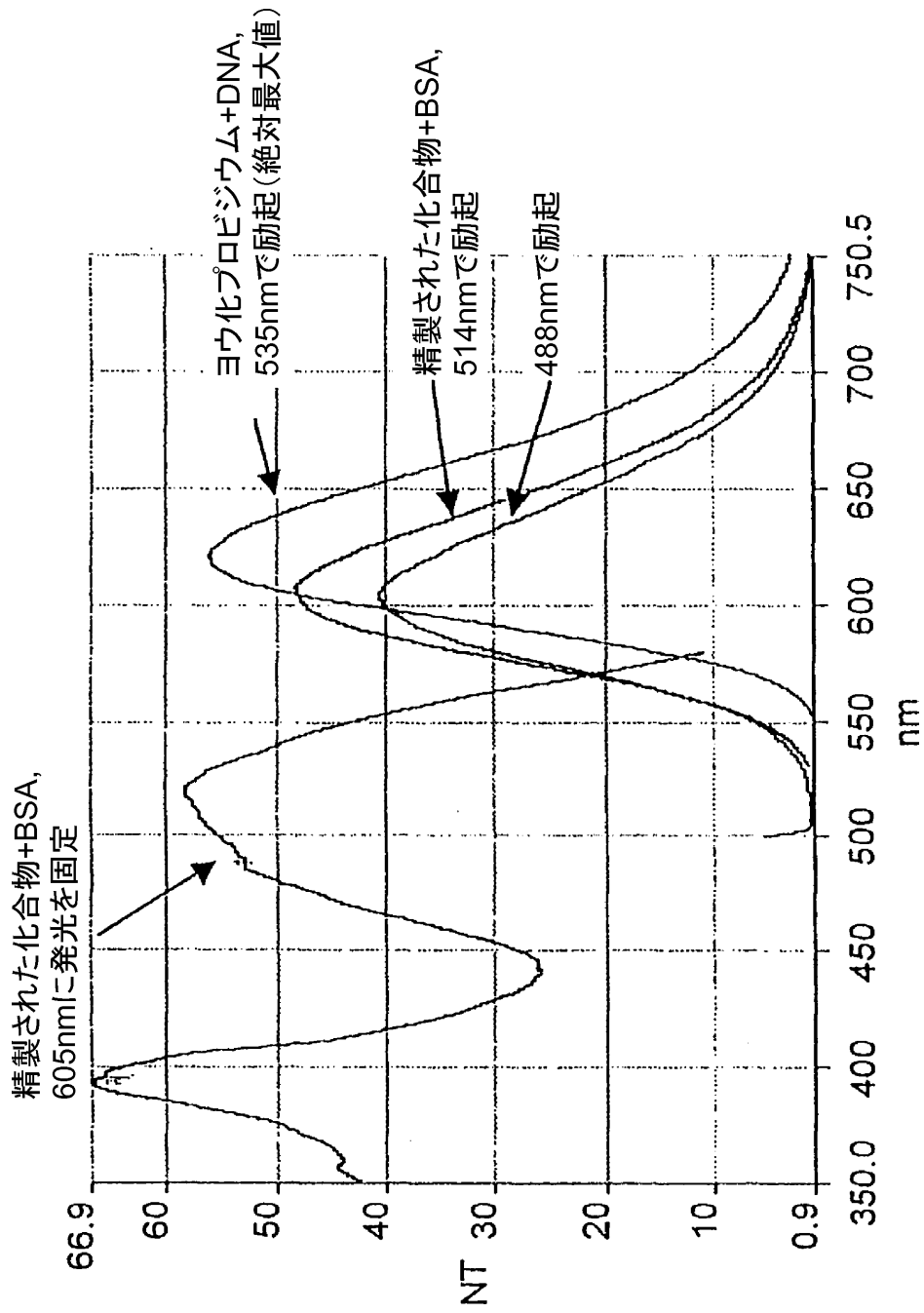



Figure 1

【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00472
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C07D 493/04, C09B 69/00, C09K 11/06, 11/07, G01N 33/533, 33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN Substructure Search; STN: HCA monascus + isolat?; STN: Medline monascus + isolat?; STN FIL CA; STN FIL CAOLD		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chemical Abstracts 130:25140 I & Food Addit. Contam. (1999) Vol 16 No 1 pages 15-24 See Abstract and the following Registry Nos: RN 50980-32-0 RN 21516-68-7	1, 4, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 125:190174 & Nat. Prod. Lett. (1995) Vol 7 No 1 pages 7-14 See Abstract and the following Registry Nos: RN 180786-02-1 RN 180786-04-3 RN 180786-03-2	1, 2, 3, 4, 9-15, 19-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 4 June 2001		Date of mailing of the international search report 19 June 2001
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2605, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer  CHRISTINE BREMERS Telephone No : (02) 6283 2313

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00472
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chemical Abstracts 98:52085 & Shipin Yu Faxiao Gongye (1982) Vol 5 pages 21-26 See Abstract and RN 3567-98-4	1, 4, 6, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 86:16503 & J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1976) Vol 13 pages 1366-1369 See Abstract and the following Registry Nos: RN 514-67-0 RN 27781-60-8 RN 13283-90-4 RN 28763-05-5	1, 4, 6, 9-15, 19-20
X	US 3993 789 A (MOLL, H R et al) 23 November 1976 See column 1 lines 60-65	1, 4, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 69:86054 & Shitsuryo Bunsaku (1967) Vol 15 No 3-4 pages 188-197 See Abstract and the following Registry Nos: RN 3567-98-4 RN 20648-01-5 RN 13283-90-4 RN 20655-21-4	1, 4, 6, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 67:73536 & J. Chem Soc. C (1967) Vol 8 pages 751-5 See Abstract and RN 13471-84-6	1, 4, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 58:6810e See Abstract and RN 101016-03-9	1, 4, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 56:8677c See Abstract and RN 89212-86-Z and RN 107629-95-8	1, 4, 9-15, 19-20
X	Chemical Abstracts 54:7698g See Abstract and RN 111163-20-3	1, 4, 9-15, 19-20
X	STN File Registry RN 52922-46-0	1, 4, 9-15, 19-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU01/00472

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STN File Registry RN 52922-45-9	1, 4, 6, 9-15, 19-20
X	STN File Registry RN 52922-47-1	1, 4, 9-15, 19-20
X	STN File Registry RN 31187-25-4	1, 4, 9-15, 19-20
X	STN File Registry RN 13283-85-7	1, 4, 6, 9-15, 19-20
X	STN File Registry RN 3733-70-8	1, 4, 6, 9-15, 19-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU01/00472

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	3993789	AU	85812/75	BE	834440	BR	7507315
		CA	1029720	CH	606433	DE	2461642
		ES	442382	FR	2290477	GB	1469893
		IN	141902	IT	1043699	JP	51070226
		NL	7512649	SE	7511794	ZA	7506525
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 カルソ, ピーター

オーストラリア, ニューサウスウェールズ州 2062, キャメレイ, キャメレイロード 1/108

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ42 QS03 QX02
4B064 AE59 CA05 DA13
4C071 AA01 AA08 BB01 BB05 CC12
EE05 FF17 GG03 HH08 HH09
LL04

专利名称(译)	荧光化合物		
公开(公告)号	JP2003533446A	公开(公告)日	2003-11-11
申请号	JP2001578440	申请日	2001-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	FLUOROTECHNICS		
申请(专利权)人(译)	氟工艺私人有限公司		
[标]发明人	ベルフィリップジョンリヴトン カルソピーター		
发明人	ベル, フィリップ, ジョン, リヴィングストン カルソ, ピーター		
IPC分类号	G01N33/533 C07D493/04 C09B57/00 C09B61/00 C09K11/06 C12P17/18 C12Q1/68 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	C07D493/04 C09B57/00 C09B61/00 G01N33/582 G01N33/6839		
FI分类号	C07D493/04.106.Z C09K11/06 C12P17/18.D C12Q1/68.Z G01N33/533		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QS03 4B063/QX02 4B064/AE59 4B064/CA05 4B064/DA13 4C071 /AA01 4C071/AA08 4C071/BB01 4C071/BB05 4C071/CC12 4C071/EE05 4C071/FF17 4C071/GG03 4C071/HH08 4C071/HH09 4C071/LL04		
优先权	2000PQ7117 2000-04-26 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了以下式 (I) 的荧光染料化合物。该化合物是有用的，因为它与有机化合物相互作用，从而在用特定波长的光激发时发生荧光发射。当有机化合物结合到荧光染料上时，检测或监测荧光是检测或定量有机化合物的一种手段。在下式 (I) 中，R，R'和R''中的每一个是氢原子，卤素原子或任选地被一个或多个卤素基团，羟基和/或氧基取代的直链或支链。链C1-20是烷基，烯基或炔基。[化学1]

