博士学位論文

光音響イメージング剤としてのシアニン色素の構造活性相関とがん細胞イメージングへの応用

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻・生命医薬科学コース
生体分析化学研究室

土屋　光輝

2024 年 3 月

目次

略語

ADC	antibody-drug conjugate
ATP	adenosine triphosphate
Abs	absorbance
Abs_{max}	absorption maximum wavelength
AcONa	sodium acetate
BCA	bicinchoninic acid
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Boc	*tert*-butoxycarbonyl
Bu	butyl
CMOS	complementary metal oxide semiconductor
CT	Computed Tomography
Charge (N)	charge of N
Cy	Cyanine
D	L-aspartic acid
DAR	dye to antibody ratio
DCM	dichloromethane
DFT	density functional theory
DIEA	diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	*N,N*-dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
E	glutamic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESI	electrospray ionization
EWG	electron withdrawing group
Em_{max}	fluorescence emission maximum wavelength
Et	ethyl
FBS	fetal bovine serum
FET	field-effect transistor

Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
G	L-glycine
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HER2	human epidermal growth fgactor type 2
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometer
ICG	Indocyanine Green
K	L-lysine
LAP	leucine aminopeptidase
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
LRMS	low-resolution mass spectrometer
M	molar concentration
MRI	Magnetic Resonance Imaging
Me	methyl
NA	numerical aperture
ND	neutral density
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide
NPA	natural population analysis
ODS	octadecylsilyl
OPO	optical parametric oscillator
PA	photoacoustic
PAS	photoacoustic spectroscopy
PAW	photoacoustic wave
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffered saline
PC-SM	penicillin streptomycin
PI	propidium iodide
PeT	photoinduced electron transfer

Pr	propyl
R	L-arginine
R (C–N)	C–N bond length
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
SOMO	singly occupied molecular orbital
Su	succinimide
TBR	target to background ratio
TEAA	triethylammonium acetate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography
TSTU	*N,N,N′,N′*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate
UV-Vis	ultraviolet-visible
YAG	Yttrium Aluminum Garnet
a.u.	arbitrary unit
c	cyclic
calcd	calculated
dba	dibenzylideneacetone
eq.	equivalent
f	D-phenylalanine
h	hours(s)
i-	*iso*-
m	milli
min	minute(s)
mmu	milli mass unit
n	nano
o-	*ortho*-
p-	*para*-
pH	potential of hydrogen
p*K*a	acid-base dissociation constant
rt	room temperature

sec	second(s)
t-	*tert-*
y	yield
μ	micro
Δλ	stokes shift
ϕ_f	fluorescent quantum yield

序論

光イメージングは、光、特に可視光や近赤外光を使用して物体や生体組織の画像を取得する技術である。光イメージングの中でも、特に蛍光イメージングは、その簡便さや感度の高さを生かして、細胞機能の観察などの基礎研究から、病理学的評価などの臨床検査まで広く利用されている。[1,2] 蛍光イメージングでは特定の波長の光を吸収し、異なる波長の光 (蛍光) を放出する色素を用いる。蛍光とは光を吸収して基底一重項状態から励起一重項状態に励起された分子が、再びエネルギーを放出して基底一重項状態に戻る際に発生する光であり、その波長や強度は、励起される分子の共役系の長さや構造の剛直性など様々な特性に応じて変化する (**Figure 1**)。代表的な蛍光色素である Rhodamine や BODIPY は、蛍光の発生効率を示す蛍光量子収率 (ϕ_f) が高く、吸収した光エネルギーを効率よく蛍光として放出する (**Figure 2a–b**)。[3–5] この特徴から、これらの色素は広範な生物学的プロセスを理解するための重要なツールとして開発されてきた。例えば、カルシウムイオンとキレート錯体を形成して蛍光強度が変化する色素を用いることで、神経細胞の活性化を観察でき、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) と反応して蛍光強度が変化する色素を用いることで、細胞の酸化ストレスを可視化できる。[6–8] また、抗体と蛍光色素を結合したイメージング剤は、*in vivo* における新規薬剤の評価などに利用されている。[9–11] さらに、蛍光色素を利用した光イメージングは、その特異性や簡便さから、疾患の診断や術中の病変部位の観察においても広く利用されている。例えば、fluorescein は血中滞留性に優れるため、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、網膜静脈閉塞症などの眼疾患の診断のための血管造影剤として使用されている。また、がんなどの病変部位に選択的に集積する蛍光色素は、術中に健康な組織を保護しつつ、病変部位を正確に除去するためのガイドとして使用されている。[12–14]

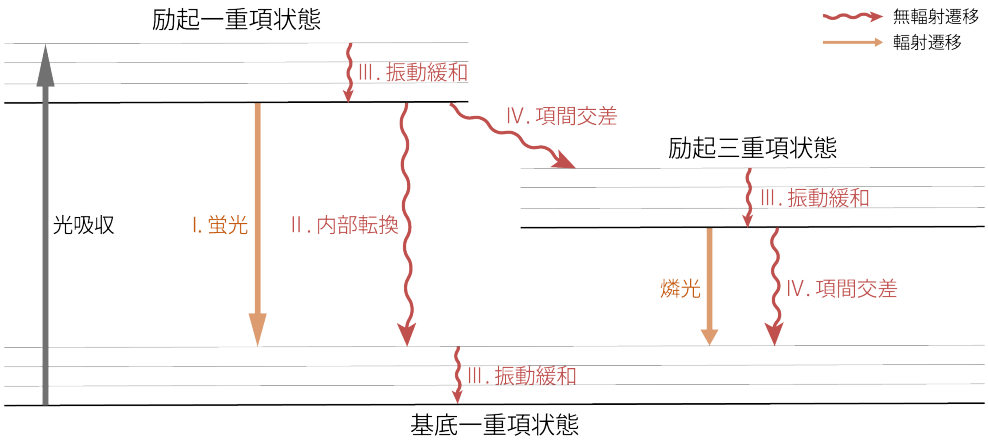


Figure 1. ヤブロンスキー図 [15]

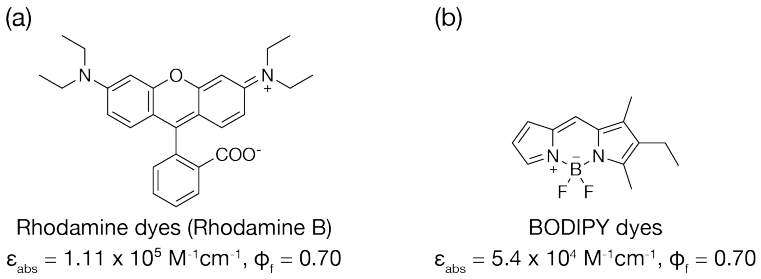


Figure 2. 代表的な色素の化学構造 [3,4]　光学特性はいずれも EtOH 中のものを示す。

一方で、光イメージングにおける最大の課題は、光が生体組織を通過する際に散乱されやすく、また、吸収されやすいため、検出器に到達する前にシグナル強度が大きく減衰することである（**Figure 3a–b**）。[16,17] この現象は、特に深部組織や脳などの厚い組織の観察を困難にする。例えば、可視光の 500 nm の光は、1 mm の皮膚組織を通過するだけで、散乱により強度が約 5%まで低下する。また、ヘモグロビンなどによる光吸収の影響も大きく、ヘモグロビンに吸収されにくい近赤外光の 800 nm の光であっても、1 mm の皮膚組織を通過すると、強度が約 40%まで低下する。自家蛍光もまた、蛍光イメージングにおける重要な課題である。多くの生体分子、特にフラビン類やリポフスチンは、人工の蛍光色素と同様に光を吸収して蛍光を発するため、蛍光イメージングではこれらの分子が発する蛍光がバックグラウンドシグナルとなり、標的部位の蛍光シグナルの検出が困難になる（**Figure 3c**）。このため、生体の外から光を照射する通常の蛍光イメージングでは生体深部に位置する病変の観察には困難であり、これを克服するための新たな技術が求められている。

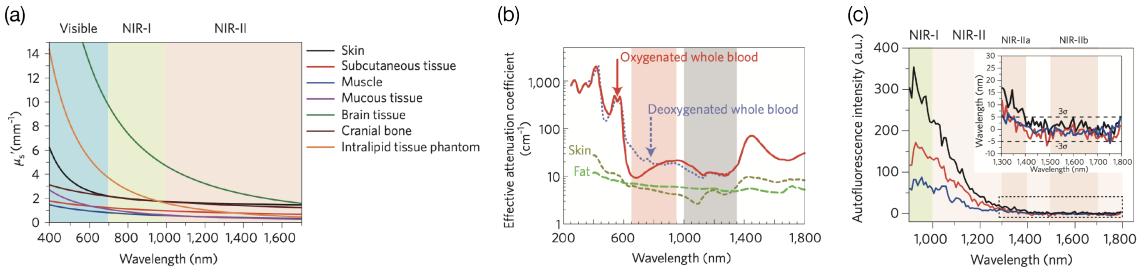


Figure 3. 生体組織における光の減衰 [16,17]　生体組織ごとの(a) 散乱係数のスペクトル, (b) 吸光係数のスペクトル, (c) 808 nm での励起におけるマウス肝臓（黒）、脾臓（赤）および心臓組織（青）の自家蛍光スペクトル。

このような背景から、深部組織を画像化する手法として、光音響（PA; photoacoustic）イメージングが注目されている。[18,19]PA イメージングは、分子が光を吸収するときに起こる光音響効果という現象を利用したイメージング法である。光音響効果とは、光エネルギーを

吸収した分子が熱を放出し、その熱によって周辺の媒体（組織など）の瞬間的な熱膨張が起き、音響波が発生する現象である。音響波は波長が長いため、散乱係数が光と比較して 2 桁から 3 桁以上低く、また、内因性の色素による吸収の影響を受けない。このため、音響波を PA シグナルとして検出し解析することで、生体深部に存在する特定の分子を可視化でき、生体組織の 5–7 cm の深さにおける PA イメージングが報告されている。[20,21]

光音響効果は 19 世紀後半に発見されたが、当初は生体の診断技術としては注目されておらず、主に大気中成分の分析などに用いられていた。[22,23]21 世紀に入り、レーザー技術や超音波検出技術が進歩すると、生体組織などの不均一な媒体で発生した光音響波を解析できるようになり、ヘモグロビンやメラニンといった生体内のタンパク質を高い感度でイメージングできるようになった。[24,25] 特にヘモグロビンは、その酸素化状態に応じて異なる吸収スペクトルを示すため、組織の血液酸素濃度のマッピングに有効であり、血流の観察や腫瘍の血管新生の評価などに用いられてきた（**Figure 4**）。[26,27] また、蛍光イメージングと同様に、がん細胞に特異的に集積する抗体などの分子と、光音響効果を示す人工色素を結合したイメージング剤を用いれば、病変部位や組織を選択的に可視化することができる。[28,29]

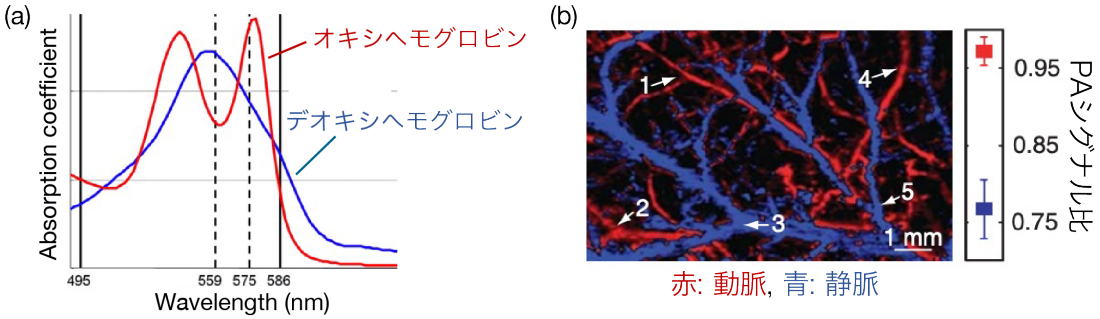


Figure 4. ヘモグロビンの PA イメージング [26,27]

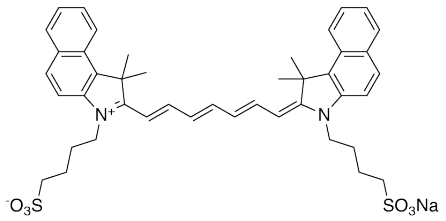
人工色素を用いる PA イメージングでは、用いる色素の光音響波の発生効率で検出感度が変わり、測定可能深度などに大きく影響する。以下は色素から生じる音響波の発生効率を示す式である（**Equation 1**）。[25]

$$\text{PA wave} = \varepsilon_g C_g \frac{\alpha {V_s}^2}{C_p} \varphi \emptyset_{nr}$$

ε_g：基底状態の分子のモル吸光係数
C_g：基底状態の分子の濃度
α：周辺組織の体積膨張率
V_s：組織中での音速（1540 m/s）
C_p：周辺組織の定圧比熱
φ：レーザ光源の光量
（単位時間当たりの光エネルギー）
$\emptyset_{nr}$：分子の無輻射過程の量子収率

Equation 1. 光音響波の発生式

生体で PA イメージングを行う場合、式に含まれる周辺組織の体積膨張率や低圧比熱、組織中での音速といったパラメータはほぼ一定の値をとる。一方で、色素が光を吸収する効率を示すモル吸光係数や、熱をエネルギーとして放出する無輻射過程の量子収率は、用いる色素によって変化し、PA シグナルの発生効率に影響を与える。無輻射過程は **Figure 1** に示す内部転換 (Ⅱ)、振動緩和 (Ⅲ)、項間交差 (Ⅳ) に相当する遷移過程であり、この過程ではエネルギーを光ではなく、熱として放出する。この熱が周辺組織の熱膨張を起こし、音響波を生じるため、無輻射過程の量子収率が高い色素は強い PA シグナルを示す。蛍光イメージングに用いられる Rhodamine や BODIPY などの色素は光を吸収する効率が高い (λ_{abs} of rhodamine B = $5.0 \times 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$)[3] ものが多いが、蛍光を放出する輻射過程の割合が大きく ($\phi_f = 0.70$)[3]、無輻射過程の割合が小さいことから、PA イメージングには不適である。[3,4] これらの蛍光色素と同様に、血管やリンパ管を可視化するための蛍光色素として用いられてきたインドシアニングリーン (ICG)[30,31] も高いモル吸光係数を示す (**Figure 5**)。一方で、ICG は BODIPY や Rhodamine と比べて蛍光量子収率が低いため (ϕ_f = 0.14)[5]、無輻射過程の量子収率が高く、BODIPY や Rhodamine と比べて強い PA シグナルを示す。また、ICG の吸収極大波長は生体内での光透過性が高い近赤外光領域にあるため、**Figure 2** に示すように、励起光の散乱や吸収の影響を軽減でき、深部組織のイメージングに適する。これらの利点から、ICG を利用した PA イメージングは多数報告されており、血管やリンパ管の可視化に応用されている。[24,32]



Cyanine dyes, (Indocyanine Green (ICG))

ε_{abs} = 2.23 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$, ϕ_f = 0.14

Figure 5. Indocyanine Green (ICG) の化学構造　光学特性は EtOH 中のものを示す。

しかし、ICG は PA イメージングのための色素として優れた特性を示すが、いくつかの課題がある。まず、ICG は光安定性が低く、光励起した分子からのエネルギー移動によって生じた一重項酸素によって酸化されやすく、イメージングの際に光退色しやすい。[33–35] また、ICG を用いた PA イメージング剤では、通常、病変部位と正常部位の集積量の差を利用して観察するため、血中に滞留した ICG や非特異的に正常組織に分布した ICG からのシグナル

により、病変部位の Target to background ratio (TBR) が低下し、高コントラストなイメージングが困難となる (**Figure 6a**)。

そこで近年では、病変部位の環境や生体分子に部位特異的に応答して PA スペクトルが変化する色素の開発が盛んに行われている (**Figure 6b**)。このような色素を用いれば、病変部位に集積した色素の PA シグナルと非特異的な分布によるバックグラウンドシグナルを識別することができ、病変部位を選択的かつ高コントラストに観察できる。これまでに報告されている生体分子に応答して PA スペクトルが変化する色素は BODIPY の骨格を持つものが多く、Cu^{2+}や NO を検出できる色素が開発されている。[36,37] また、ICG の骨格を用いた色素も数例報告されているが、これらの色素は疎水性が高く病変部位に直接投与しなければ PA シグナルが観察できないことや、光安定性の低さが課題となっている。[38,39]

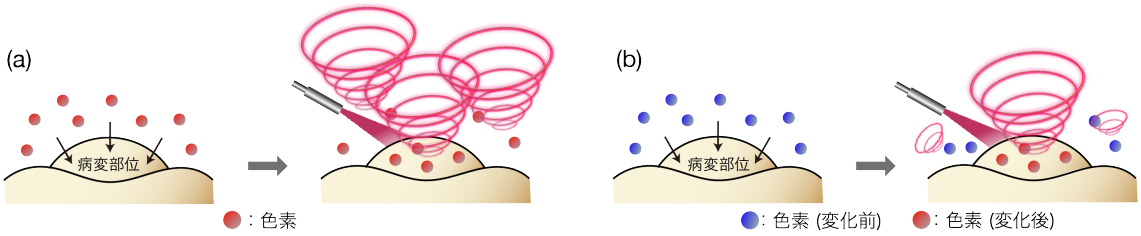


Figure 6. PA 色素が病変部位に集積した際のシグナル変化の模式図 (a) 病変部位でシグナルが変化しない色素、(b) 病変部位でシグナルが変化する色素の集積時のシグナル変化の模式図

本研究では、PA シグナルの発生効率が高い ICG の骨格をもとに、様々な生体内反応に応答して疾患部位を高コントラストに観察できる PA 色素の開発を目指した (**Figure 7**)。第 1 章では、ICG の構造を基に、図中に示す R^1 に共役系に影響を与える種々の官能基を導入した化合物を設計・合成し、光学・PA 特性を検討した (**Figure 7 I**)。また、合成した ICG 誘導体が pH などの外部環境や生体分子に対して PA 特性が変化する可能性を調べ、高コントラストな PA イメージングに向けた検討を行った。ICG はポリメチン鎖に環状構造を導入することで光安定性が向上することが報告されているため、本研究で開発する ICG 誘導体にも環状構造を導入し、光安定性に対する検討も行った (**Figure 7 II**)。

第 2 章では、様々な生体分子に応答して PA シグナルが変化する PA 色素の論理的設計を可能にするために、合成した ICG 誘導体の吸収スペクトル変化と電子密度変化を解析し、環境応答性 PA 色素の開発のための設計指針を示した。

第 3 章では、開発した ICG 誘導体を用いて、がんの PA イメージングの検討を行った。担がんマウスにおける検討では、色素の凝集に由来する抗体-色素複合体のシグナル強度の低下を抑制するため、芳香環部位に水溶性のスルホ基を導入した色素を設計し、生体イメージングへの応用を検討した（**Figure 7Ⅲ**）。

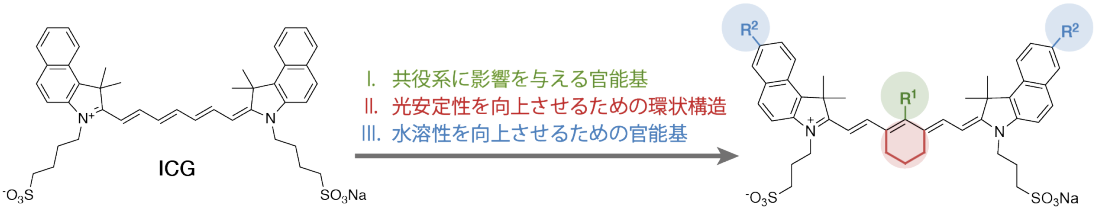


Figure 7. ICG を改変した環境応答性色素の設計

第１章　光音響 (PA; photoacoustic) イメージングのための pH 応答性色素の構造活性相関の検討

PA イメージングは、光を吸収した分子から発生する PA シグナルを検出することで簡便な深部疾患の診断に有用であると考えられている。しかし、従来の PA イメージング剤は、血中に分布した色素からのバックグラウンドシグナルによる影響で、病変部位の特定のために必要なコントラストが低いため、小さな病変などでは正確に観察することが難しく、これが診断の精度を下げる可能性がある。[40]

病変部位、特にがんや炎症部位は健康な組織と比較して pH が異なることが知られている。[41] 例えば、腫瘍の微小環境では、異常な代謝活動、特に解糖系の亢進により、周囲の正常な組織よりも pH が低下しており、腫瘍の浸潤、転移、および治療抵抗性との関連が報告されている。[42] また、炎症部位は活性化された免疫細胞からの代謝産物により pH が低下している。[43,44]pH の変化は、神経系疾患や心血管疾患においても重要な役割を果たしており、脳卒中や神経変性疾患では、細胞内外の pH の不均衡が神経細胞の損傷や死に直接的に関連している。[45] 心血管系においても、心筋梗塞時には局所的な酸素不足が pH の低下を引き起こし、心筋細胞の損傷に寄与する。[46,47]

そこで第 1 章では、生体深部の病変部位を高コントラストに観察することを目指し、pH に応じて PA スペクトルが変化する色素の開発を行なった。このような色素があれば、病変の pH に応じて PA シグナルが変化するため、病変部位と正常部位を識別することができ、高コントラストなイメージングが可能になると考えられる。色素の PA シグナルの大きさは **Equation 1** に示したように、光を吸収する効率や、熱が発生する効率に応じて変化する。よって、pH の変化に応じてこれらの効率、すなわち吸光係数や蛍光量子収率が変化する色素を開発できれば、がんや炎症部位などの疾患部位の pH に応答して PA シグナルが変化する色素として利用できると考えられる。

ピペラジニル基を持つ色素はプロトン化によって色素の吸光特性が変化するため、細胞内 pH の検出などに蛍光イメージングで利用されてきた。[48,49] そこで、ICG の骨格に、ピペラジニル基を中心とした種々のアミノ基を導入した誘導体を設計・合成し (**Figure 8**)、これらの pH 応答性や光学特性を調べ、病変部位の高コントラストな観察に有用な PA 色素の開発を目指した。

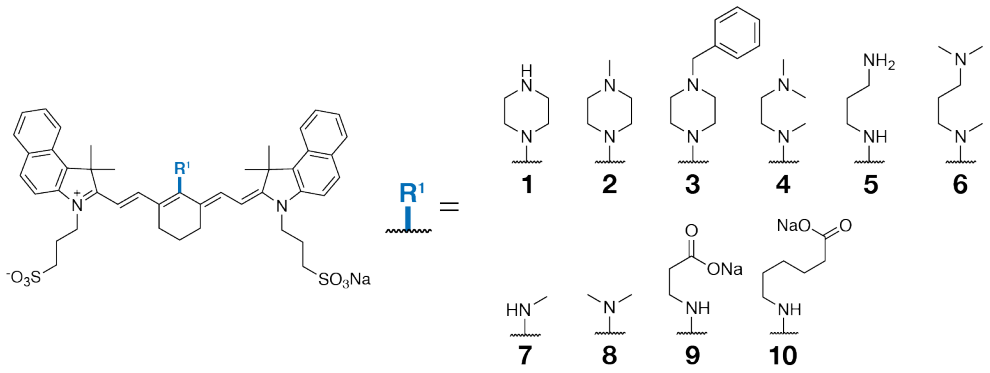
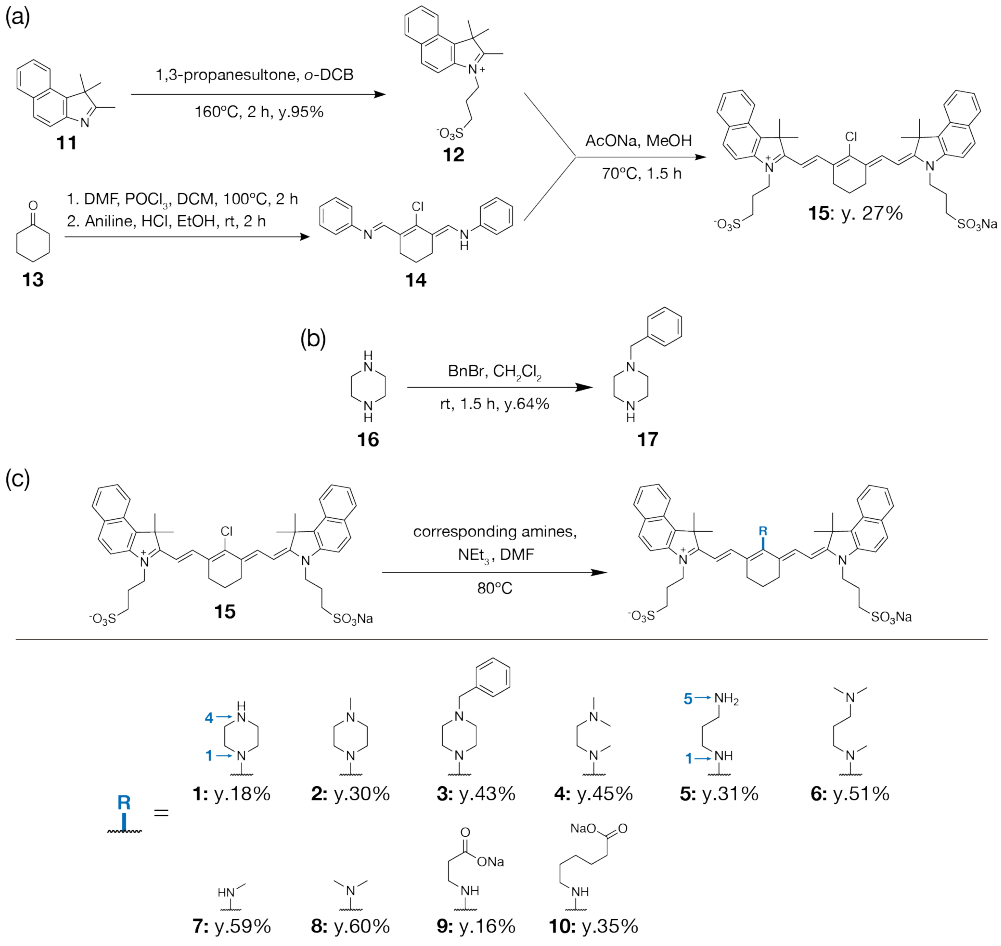


Figure 8. アミノ基を置換した色素の設計

第 1 節　pH 応答性 PA 色素を開発するためのアミノ基を置換したシアニン色素の光学特性の検討

アミノ基を置換した色素の合成

アミノ基を置換した色素 **1–10** は以下のスキームによって合成した (**Scheme 1**)。先行文献を基に、1*H*-benz[e]indolium 誘導体 **12** と imine 誘導体 **14** を合成した (**Scheme 1a**)。[48,49] 化合物 **12**, **14** を sodium acetate (AcONa) 存在下、methanol (MeOH) 中で反応させて **15** を合成した。化合物 **3** の前駆体である **17** はピペラジンを、dichloromethane (CH_2Cl_2) を溶媒として用い、benzyl bromide に求核反応させることで合成した (**Scheme 1b**)。この **15** に、triethylamine (NEt_3) 存在下、*N*,*N*-dimethylformamide (DMF) 中で各アミンを反応させてシアニン色素 **1–10** を得た (**Scheme 1c**)。



Scheme 1. 1–10 の合成スキーム　(a) 前駆体 **15** の合成, (b) **3** の前駆体 **17** の合成, (c) **1–10** の合成

アミノ基を置換した色素の吸収スペクトル測定

アミノ基を置換した **1–10** の吸収スペクトルが pH に応じて変化をするか検討するため、各色素を終濃度 1 μM となるよう溶媒に溶解し、酸性から塩基性条件における吸収スペクトルを測定した (**Figure 9**)。水溶液中での光学特性を検討するために、溶媒には phosphate buffer (PB)に dimethyl sulfoxide (DMSO) が 30%になるよう混和させたもの（PB with 30% DMSO）を用いた。シアニン色素は水溶液中で疎水性相互作用やπ-π相互作用により H-aggregate や J-aggregate と呼ばれる凝集体を形成し、この凝集体が吸収スペクトル変化を起こすことがある。[50–52] そこで、色素の単量体の光学特性を検討するために、凝集体を形成しないと考えられる DMSO のみを溶媒とした条件でも光学特性を検討した。この場合は酸として trifluoroacetic acid (TFA) を、塩基として NEt_3 を用いて、pH に対する吸収スペクトル変化を調べた (**Figure 10**)。

1,4-ジアザアルキル基を持つ **1–4** の吸収スペクトルは、いずれも pH の低下に応じて吸収極大が 700 nm から 800 nm 付近にシフトし、吸光度が増大した (**Figure 9a–d**)。このスペクトルの変化は 1,4-ジアザアルキル基が非環状である **4** でも観察されたため、ジアザアルキル基の立体構造は吸収スペクトル変化に影響しないと考えられる (**Figure 9d**)。1,5-ジアザアルキル基を持つ **5**, **6** は pH の減少により徐々に吸収スペクトルが長波長側にシフトしたが、このスペクトル変化の大きさは 1,4-ジアザアルキル基を持つ **1–4** よりも小さく、二つのアミノ基の距離もスペクトル変化の大きさに影響を与えることが示唆された (**Figure 9e–f**)。一方で、ジアザアルキル基を持たない **7–10** の吸収スペクトルは、アミノ基の構造によらず、いずれの色素でも pH に応じたスペクトル変化が見られなかった (**Figure 9g–j**)。色素 **9–10** では、 pH によってわずかに吸光度の大きさが異なったが、pH の増減に伴う段階的な吸収スペクトル変化は観察されず、また、吸収極大波長の変化も観察されなかったため、このスペクトルの違いはプロトン化/脱プロトン化によるものではなく、測定誤差であると考えられる。ジアザアルキル基を持つ **1–6** では、DMSO を溶媒として用いた場合でも、酸の添加 (pH の低下) によって長波長側に吸収極大がシフトした (**Figure 10**)。ジアザアルキル基を持つ **1–6** は PB with 30% DMSO もしくは DMSO を溶媒として使用した場合でも観測されたスペクトル変化が一致していたため、水溶液中でのスペクトル変化は凝集体の形成ではなく、pH の変化によるものであることが示唆された。

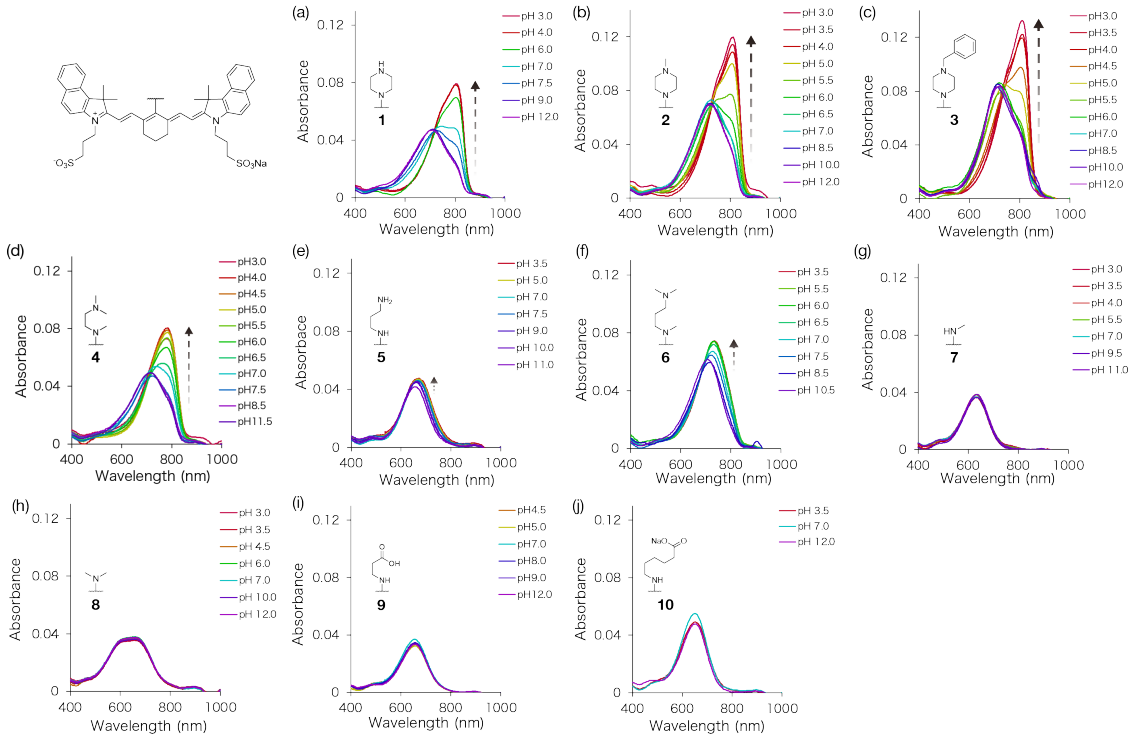


Figure 9. 1–10 を PB with 30% DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル　(a) **1**, (b) **2**, (c) **3**, (d) **4**, (e) **5**, (f) **6**, (g) **7**, (h) **8**, (i) **9**, (j) **10** の pH 3–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM になるよう溶液を調製し、吸収スペクトルを測定した。

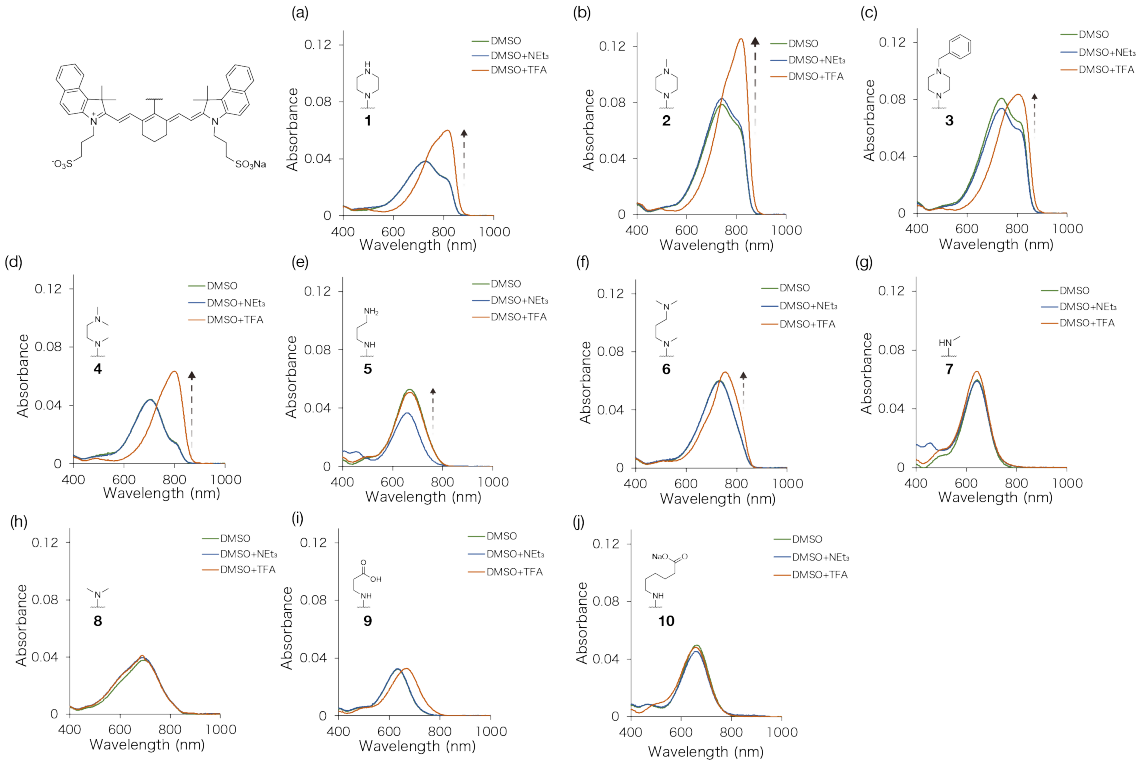


Figure 10. 1–10 を DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル　(a) **1**, (b) **2**, (c) **3**, (d) **4**, (e) **5**, (f) **6**, (g) **7**, (h) **8**, (i) **9**, (j) **10** の酸性から塩基性条件における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM、TFA の終濃度は 130 mM、NEt_3 の終濃度は 370 mM になるよう溶液を調製し、吸収スペクトルを測定した。

アミノ基を置換した色素の蛍光スペクトル測定

励起された色素は、内部エネルギーを熱として放出しながら励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化 (振動緩和) し、その後、励起状態の安定構造から基底状態に遷移する過程で蛍光や熱 (内部転換) を放出する (**Figure 1**)。色素の PA 特性は熱の発生効率 (無輻射過程の量子収率) に影響するため (**Equation 1**)、振動緩和や内部転換が起こりやすい色素ほど PA シグナルの発生効率が高くなると考えられる。振動緩和で放出する熱は、吸収した光のエネルギーと、蛍光として放出する光のエネルギー差に相当するため、吸収極大波長と蛍光極大波長の差を示すストークスシフトが大きい場合、振動緩和によって放出する熱の割合が大きくなる。 また、蛍光と競合する過程である内部転換 (無輻射過程) の割合は蛍光量子収率が低いほど高くなる。アミノ基を置換した **1–10** の PA 色素としての特性を検討するため、PB with 30% DMSO または DMSO に各色素を終濃度 1 μM となるよう溶解し、酸性から中性条件における蛍光スペクトルを測定した (**Figure 11–12**)。DMSO を溶媒として用いた場合には、酸として trifluoroacetic acid (TFA) を用いて pH に対する

蛍光スペクトル変化を調べた。また、得られた吸収・蛍光スペクトルの結果から吸収極大波長 (Abs_{max})，蛍光極大波長 (Em_{max})，ストークスシフト ($\Delta\lambda$)，モル吸光係数 (ε)，蛍光量子収率 (ϕ_f) を算出し、表にまとめた (**Table 1**)。

1,4-ジアザアルキル基を持つ **1–4** の蛍光スペクトルの極大値は、吸収スペクトルと同様に pH に応じて変化した (**Figure 11a–d**)。しかし、吸収スペクトルは、酸性と中性で最小でも 57 nm の吸収極大波長のシフトが見られたのに対して、蛍光スペクトルでは、酸性と中性で最大でも 11 nm の蛍光極大波長のシフトしか観察されなかった。1,4-ジアザアルキル基を持つ **1–4** は中性条件で大きなストークスシフトを示したため、PA シグナルの発生効率が高いことが示唆された。モノアミノ基を持つ **7–10** は吸収極大波長が短いものの、蛍光極大波長は **1–6** と同等であり、大きなストークスシフトを示した。ジアザアルキル基を持つ **1–6** の DMSO 中での蛍光量子収率 (7–13%) は、ICG の DMSO 中での蛍光量子収率 (13%) と同等またはそれ以下であり、**1–6** は PA シグナルの発生効率が優れることが示唆された。

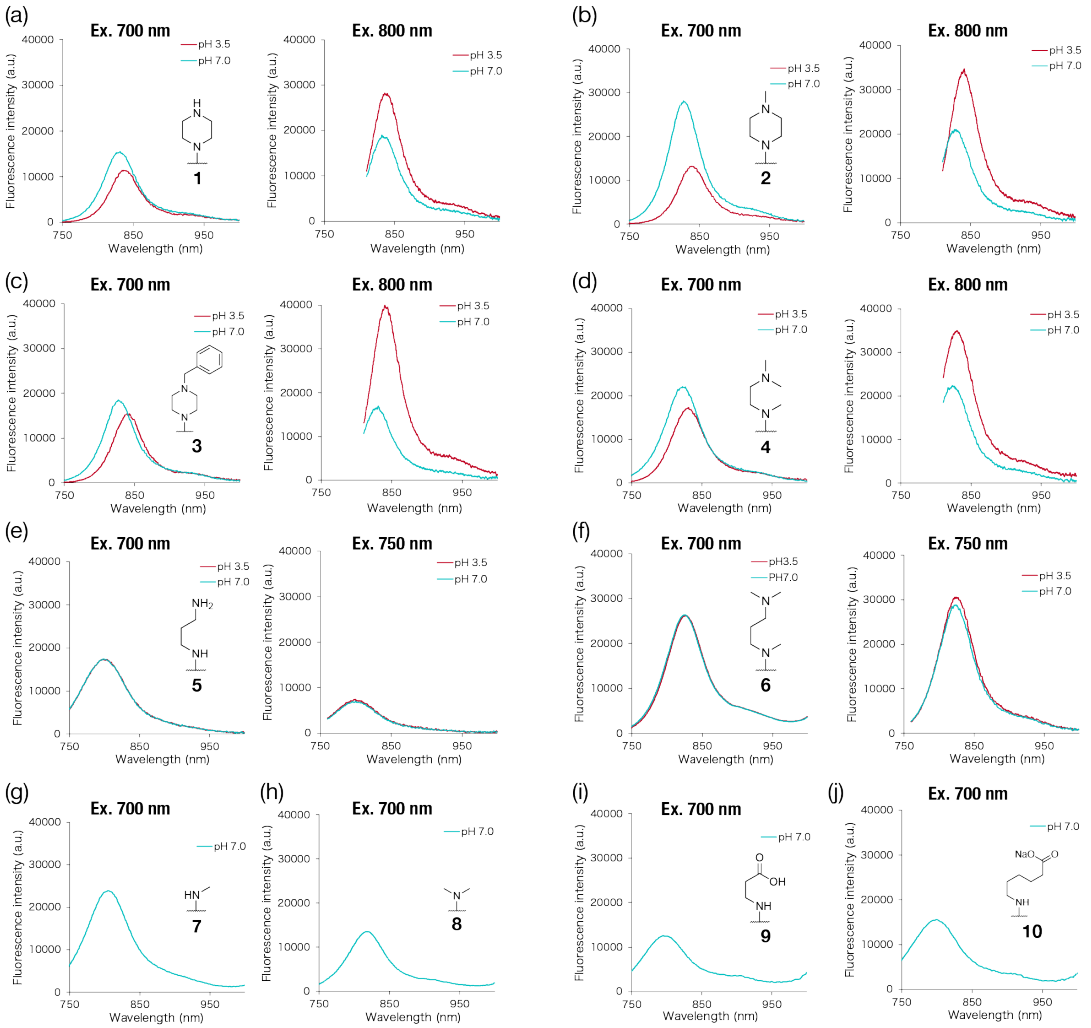


Figure 11. 1–10 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル (a) **1**, (b) **2**, (c) **3**, (d) **4**, (e) **5**, (f) **6**, (g) **7**, (h) **8**, (i) **9**, (j) **10** の pH 3.5 または 7.0 における蛍光スペクトル。スペクトルは 700、750 または 800 nm の励起光を用いて測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

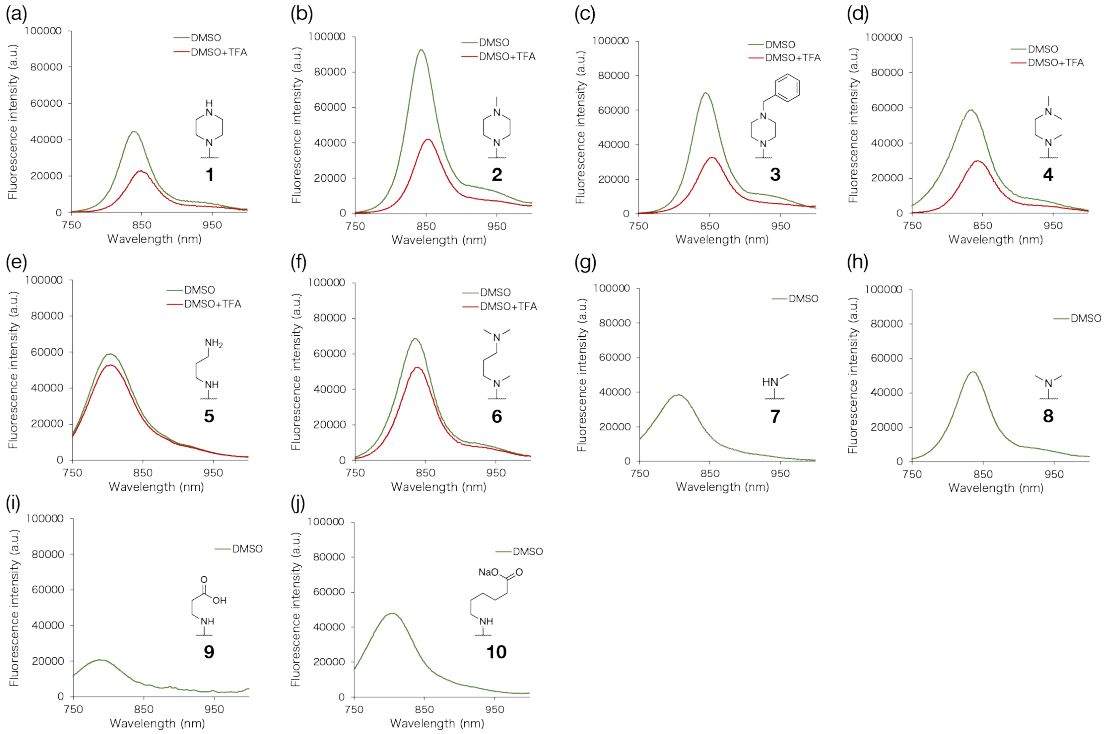


Figure 12. 1–10 の DMSO を溶媒とした場合の蛍光スペクトル　(a) **1**, (b) **2**, (c) **3**, (d) **4**, (e) **5**, (f) **6**, (g) **7**, (h) **8**, (i) **9**, (j) **10** の酸性または中性条件における蛍光スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光を用いて測定した。色素の終濃度は 1 μM、TFA の終濃度は 130 mM、NEt_3 の終濃度は 370 mM になるよう溶液を調製し、吸収スペクトルを測定した。

Table 1. 1 –10 の酸性・中性 pH における光学特性

Compound	Abs_{max} (nm)[a]	Em_{max} (nm)[a]	Δλ (nm)[a]	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)[a]	φ_f[b]	p*K*a[a]
1 (neutral)	745	831	86	5.0×10^4	0.09	-
1 (acidic)	802	838	36	7.9×10^4	0.07	6.9
2 (neutral)	741	845	104	8.2×10^4	0.12	-
2 (acidic)	818	852	34	1.3×10^5	0.07	5.5
3 (neutral)	737	845	108	7.8×10^4	0.08	-
3 (acidic)	801	854	53	8.4×10^4	0.07	4.7
4 (neutral)	702	833	131	4.4×10^4	0.18	-
4 (acidic)	797	844	47	6.4×10^4	0.13	6.6
5 (neutral)	664	804	140	5.1×10^4	0.16	-
5 (acidic)	670	805	135	5.1×10^4	0.15	7.2
6 (neutral)	730	837	107	6.0×10^4	0.12	-
6 (acidic)	753	840	87	6.7×10^4	0.10	7.3
7 (neutral)	642	806	164	5.7×10^4	0.22	-
8 (neutral)	694	836	142	4.1×10^4	0.13	-
9 (neutral)	629	787	158	3.2×10^4	0.32	-
10 (neutral)	661	805	144	3.6×10^4	0.18	-

吸収･蛍光スペクトルの結果から吸収極大波長 (Abs_{max}), 蛍光極大波長 (Em_{max}), ストークスシフト (Δλ), モル吸光係数 (ε), 蛍光量子収率 (ϕ_f) を算出した。溶媒として a) PB with 30% DMSO、b) DMSO and DMSO with 1% TFA を用いた。色素の終濃度は 1 μM、TFA の終濃度は 130 mM になるよう溶液を調製し、吸収スペクトルを測定した。

アミノ基を置換した色素の吸収スペクトルの可逆性の検討

アミノ基を置換した色素の pH 変化に応じたスペクトル変化が不可逆的である場合、病変部位での pH 応答後に他組織へ移行した色素からのシグナルは、偽陽性のシグナルとして観察される。アミノ基を置換した色素のスペクトル変化が可逆的であり、外部の pH をリアルタイムに反映できるか検討するため、DMSO 中の酸性から塩基性条件の吸収スペクトル変化を、酸として TFA、塩基として NEt_3 を用いて検討した。

ジアザアルキル基をもつ **4**, **6** の DMSO 溶液の吸収スペクトルを測定した後、TFA (30 μL, 終濃度 130 mM) を添加して吸収スペクトルを測定したところ、吸収極大が長波長側にシフトした (**Figure 13**)。さらに、この溶液に過剰量の NEt_3 (30 μL, 終濃度 370 mM) を添加して再び吸収スペクトルを測定すると、吸収極大が短波長側にシフトして TFA 添加前の吸収スペクトルと一致した。よって、ジアザアルキル基の pH に応じた吸収スペクトル変化は可逆的であり、外部の pH をリアルタイムに反映することが示唆された。

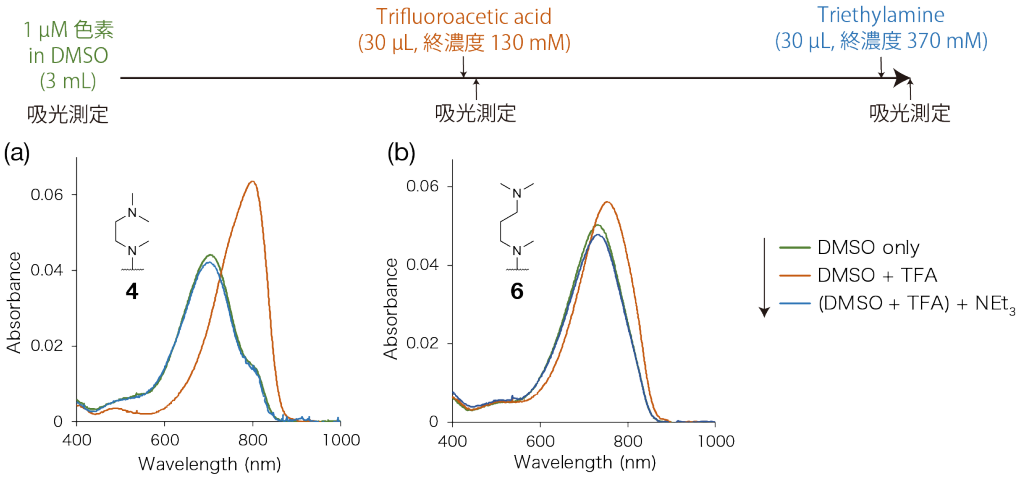


Figure 13. ジアザアルキル基を持つ色素の吸収スペクトル変化の可逆性の検討 4 または 6 を終濃度 1 μM になるように DMSO に溶かし TFA と NEt_3 を順次添加して吸収スペクトルを測定した。

アミノ基を置換した色素の p*K*a の比較

pH に応答した吸収スペクトル変化が見られた 1–6 の吸収極大における吸光度の変化から p*K*a を算出したところ、1,4-ジアザアルキル基を持つ 1 は 6.9、2 は 5.5、3 は 4.7、4 は 6.6 であり、いずれの色素も中性から酸性の pH 変化に応じて吸収スペクトルが変化することが示された（**Figure 14a–d**）。4 位に電子吸引性基であるベンジル基が置換した 3 は 1, 2, 4 と比較して特に低い p*K*a を示したが、これはベンジル基によって 4 位のアミノ基の電子密度が低下し、プロトン化が起こりにくくなったためであると考えられる。また、この結果から、pH の低下による吸収スペクトル変化が 4 位のアミノ基の電子状態に依存することが示唆された（**Figure 14c**）。1,5-ジアザアルキル基を持つ 5 の p*K*a は 7.2、6 の p*K*a は 7.3 であり、1,4-ジアザアルキル基を持つ色素よりも高い p*K*a を示したが、これは 1,4-ジアザアルキル基の 4 位のアミノ基と比べて、1,5-ジアザアルキル基の 5 位のアミノ基のほうが立体障害が少なく、プロトン化された状態が安定化しやすいためだと考えられる（**Figure 14e–f**）。

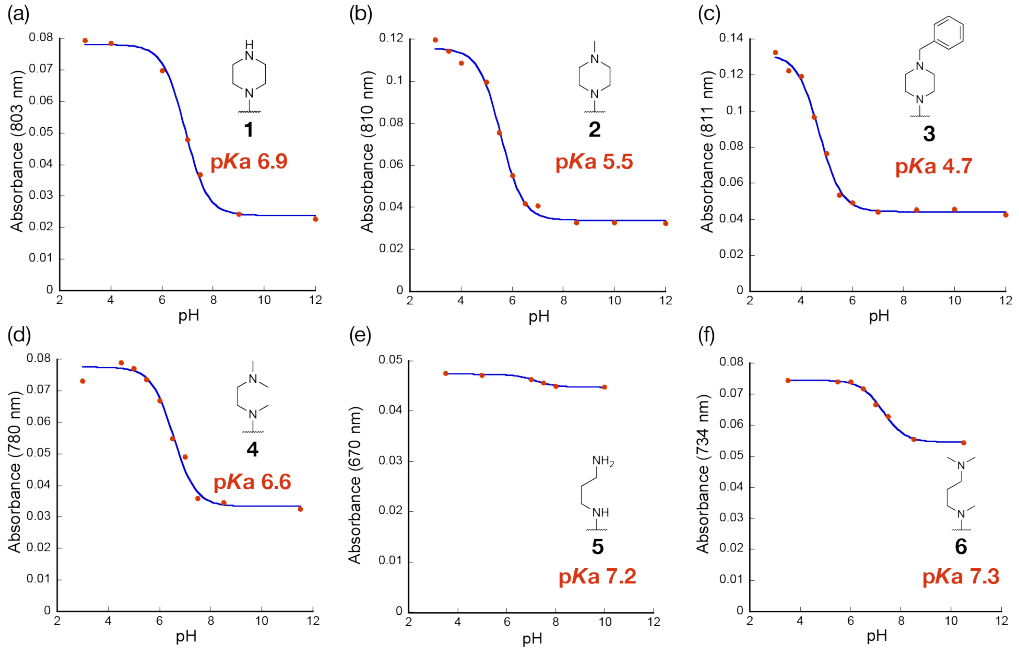


Figure 14. ジアザアルキル基を有する色素の p*K*a の比較　酸性 pH での吸収極大の吸光度を pH の値に対してプロットし、Kaleida Graph (Synergy) を用いて算出した。

以上より、ジアザアルキル基をもつ **1**–**6** の吸収スペクトルは pH に応じて変化し、ジアザアルキル基を持たない **7**–**10** の吸収スペクトルは pH に応じて変化しないことが示された。これらの結果から、pH に応じた吸収スペクトル変化には 4 位または 5 位のアミノ基が影響することが示唆された。また、凝集体を形成しない DMSO 中でも同様の吸収スペクトル変化が見られたことから、この吸収スペクトル変化は凝集体の形成によるものではなく、4 位または 5 位のアミノ基のプロトン化によるものであることが示唆された。吸収スペクトルの変化は、4 位のアミノ基の自由度がより大きい非環状のジアザアルキル基を持つ **4**–**6** でも観察されたため、4 位のアミノ基が固定されている必要がなく、2,3 位の炭素原子を経由した、結合を介した相互作用であると考えられる。一方で、非環状のジアザアルキル基を持つ色素であっても、4 位のアミノ基がポリメチン鎖に近接するコンフォメーションをとる色素であれば、共役系と空間的に相互作用することでスペクトル変化を起こす可能性もある。スペクトル変化が結合を介した相互作用であり、ジアザアルキル基が環状である必要がないならば、4 位に第 1 級アミンを持つ色素など、より様々な色素の設計が可能であるため、今後は非環状なジアザアルキル基を持つ色素の安定なコンフォメーションの計算や、NCI（Non-Covalent Interactions）plot[53] による相互作用の解析を行う。1,4-ジアザアルキル基を持つ **1**–**4** の pH に応じた吸収スペクトル変化は、1,5-ジアザアルキル基を持つ **5**, **6** の吸収スペクトル変化よりも大きく、スペクトル変化の大きさは 4 位または 5 位のアミノ基

の位置が影響することが示唆された。1,4-ジアザアルキル基をもつ **1–4** の中性条件や、モノアミノ基をもつ **7–10** は、無輻射過程である振動緩和に寄与するストークスシフトが大きかった。また、**1–6** は低い蛍光量子収率を示したため、PA シグナルの発生効率が高い可能性が示された。

第２節　アミノ基を置換したシアニン色素の PA 特性の検討

アミノ基を置換した色素の PA スペクトルの測定

アミノ基を置換した色素は大きなストークスシフトや低い蛍光量子収率を示し、PA シグナルの発生効率が高い可能性が示された。これらの色素の PA 特性を調べるために、PB with 50% DMSO に **4**, **6**, **7** を終濃度 10 μM となるよう溶解して PA スペクトルを測定した。以下に、PA スペクトル測定の概要を示す (**Figure 15**)。[54] まず、色素の溶液をスライドガラスに滴下し、音響波が減衰しないように水槽下部を溶液に接触させた状態で、溶液にナノ秒パルス光を照射した。発生した PA シグナルを上部の超音波センサによって検出し、パワーメーターによって測定した励起光のエネルギーで規格化した。波長ごとに 50 回ずつ PA シグナルを測定し、加算平均値を取ることでシグナル強度を得た。

色素 **4**, **6**, **7** の酸性・中性 pH における PA スペクトルを測定したところ、いずれの色素も吸収スペクトルに応じた PA スペクトルを示した (**Figure 16**)。特に、ジアザアルキル基を持つ **4** の PA スペクトルは、吸収スペクトルと同様に pH に応じて極大値が長波長側に大きくシフトし、吸光度が増大したため、pH 応答性の PA 色素として利用できることが示唆された(**Figure 16a**)。

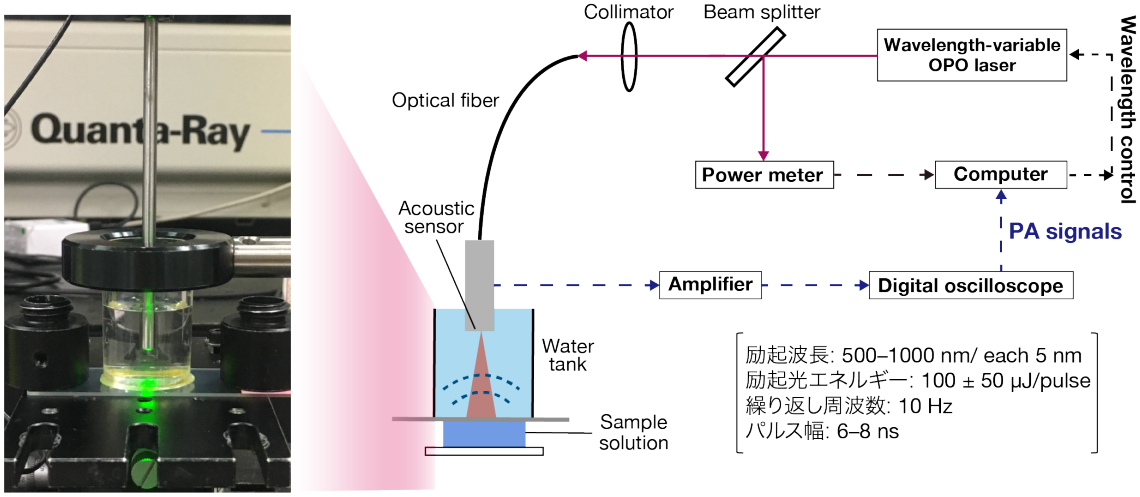


Figure 15. PA スペクトル測定装置の setup

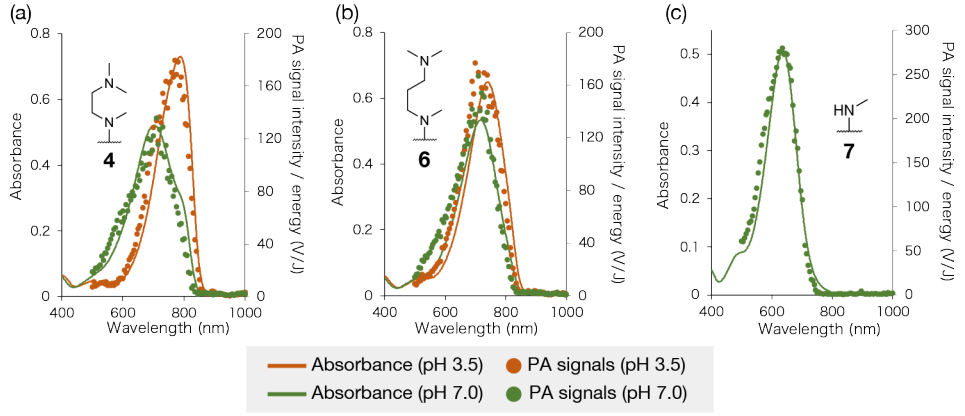


Figure 16. 4, 6, 7 の PB with 50% DMSO を溶媒とした場合の酸性・中性での PA スペクトルと吸収スペクトルの比較　(a) **4**, (b) **6**, (c) **7** の pH 3.5 および 7.0 における PA スペクトルと吸収スペクトル。色素の終濃度 は 10 μM で測定した。

アミノ基を置換した色素の PA 特性と吸収・蛍光特性の比較

得られた PA シグナルと色素の光学特性の関係を検討するため、PA シグナルを吸光度に対してプロットし、近似曲線から相関係数を算出した (**Figure 17a**)。PA シグナルと吸光度は、いずれの色素の相関係数も 0.96 以上であり、**Equation 1** が示すように PA シグナルは吸光度に正に相関することが示された。一方で、モノアミノ基を持つ **7** は高い PA シグナルの発生効率を示したが、ジアザアルキル基をもつ **4**, **6** は pH によらず、それぞれ同等の PA シグナルの発生効率を示した。**Equation 1** から色素ごとの PA シグナルの発生効率の違いは無輻射過程の量子収率が影響していると考えられる。得られた PA シグナルの極大値を各色素の蛍光量子収率に対してプロットしたところ、モノアミノ基を持つ **7** を除く、ジアザアルキル基を持つ **4**, **6** の相関係数は–0.97 であり、PA シグナルは蛍光量子収率に対して負に相関した (**Figure 17b**)。一方で、モノアミノ基を持つ **7** は高い蛍光量子収率を持つものの、高い PA シグナルの発生効率を示し、PA シグナルは蛍光量子収率に相関しなかった。次に、得られた PA シグナルの極大値を各色素のストークスシフトに対してプロットしたところ、PA シグナルの極大値とストークスシフトの間に相関は見られなかった。無輻射過程は振動緩和や内部転換、項間交差など、光を吸収した分子が基底状態に戻る際の様々な過程に存在するため、**4**, **6**, **7** の PA シグナルは蛍光量子収率やストークスシフトに対して一貫した相関が見られなかったと考えられる。pH 7.0 における **4** はストークスシフトが大きいものの蛍光量子収率が高いため、PA シグナルの発生効率は他の色素と比較して高くなかったと考えられる。

励起光の波長と PA シグナルの発生効率の関係を調べるために、吸光度と PA シグナルをプロットしたところ、いずれの色素でも、吸光度が同じ場合は短波長側の波長の光で励起したほうが、より高い PA シグナルの発生効率を示した (**Figure 18a–e**)。励起された色素は、内部エネルギーを熱として放出しながら励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化 (振動緩和) し、その後、励起状態の安定構造から基底状態に遷移する過程で蛍光や熱 (内部転換) を放出する (**Figure 1**)。短波長で励起した場合のほうが、より高いエネルギー状態から、振動緩和による熱を放出して励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化するため、この熱が PA シグナルの増大に寄与したと考えられる (**Figure 18f**)。

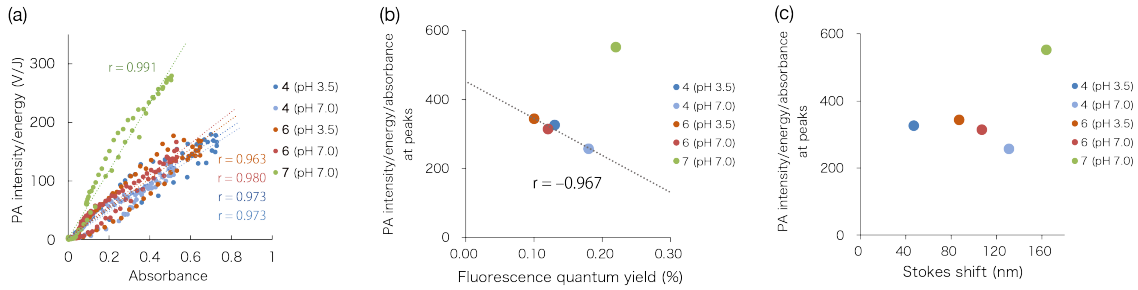


Figure 17. 4, 6, 7 を PB with 50% DMSO に溶かした溶液の PA シグナル発生効率と光学特性の比較　(a) **4**, **6**, **7** の PA シグナルの強度と吸光度のプロット。(b) **4**, **6**, **7** の PA シグナルの極大値と蛍光量子収率のプロット。色素の終濃度は 10 μM で測定した。

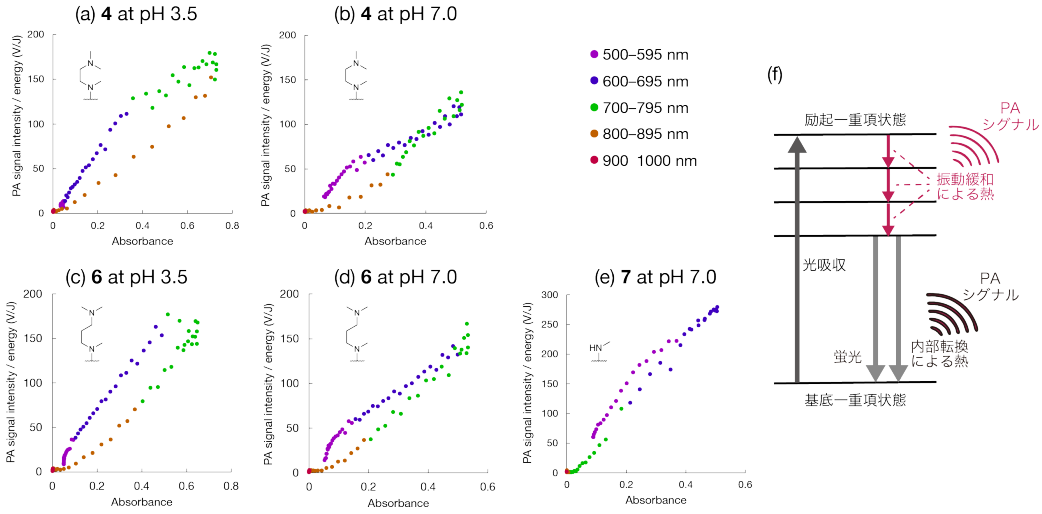


Figure 18. 4, 6, 7 を PB with 50% DMSO に溶かした溶液の各励起波長と PA シグナル強度の比較　(a, b) **4**, (c, d) **6**, (e) **7** の pH3.5 または 7.0 における各吸光度における励起波長と PA シグナル発生強度のプロット。(f) 振動緩和による PA シグナルの発生のダイアグラム。色素の終濃度は 10 μM で測定した。

第２節の結果から、Equation 1 が示すように、アミノ基を置換した色素の吸収スペクトルと PA スペクトルは相関した。一方で、モノアミノ基を持つ **7** は蛍光量子収率が高いものの、ストークスシフトが大きいためか PA シグナルの発生効率が高かった。一般的には、蛍光量子収率が低い色素のほうが PA シグナルの発生効率が高いことが報告されているが [55]、蛍光量子修理やストークスシフトとの相関が見られない色素も報告されており、励起状態から更なる高励起状態へ遷移した色素からの熱の発生が指摘されている。[56] 色素の PA 特性を解析した知見はまだ不十分であるが、PA シグナルの発生にはさまざまな無輻射過程が複合的に影響すると考えられ、より理論的に色素の PA シグナルの発生効率を予測する方法は未知であり、高次の励起状態の解析や項間交差などの他の無輻射過程の影響も解析する必要があると考えられる。

1,4-ジアザアルキル基を持つ **4** は pH 変化に応じて、PA スペクトルが大きく変化したため、PA イメージングに用いる色素として有用である可能性が示された。

まとめ

pH に応答して PA スペクトルが変化する色素の開発を目指し、1,4-ジアザアルキル基、1,5-ジアザアルキル基、モノアミノ基をシアニン色素に置換した誘導体 **1–10** を合成した。合成した色素の中で、ジアザアルキル基をもつ色素 (**1–6**) の吸収スペクトルは pH に応じて変化した。1,4-ジアザアルキル基を持つ **1–4** の吸収スペクトルの pH に応じた変化は、1,5-ジアザアルキル基を持つ **5**, **6** の吸収スペクトル変化よりも大きく、スペクトル変化の大きさは 4 位または 5 位のアミノ基の位置が影響することが示唆された。色素 **4**, **6**, **7** の PA シグナルの発生効率は **Equation 1** に示すように吸光度や蛍光量子収率に相関する傾向が見られ、また、振動緩和による熱の発生が多いと考えられる短波長側の光で励起したほうが強い PA シグナルを生じることが示された。一方、一般的な PA 色素とは異なり、**7** のように高い蛍光量子収率を持つものの、PA シグナルの発生効率が高い色素もあり、PA シグナルの発生にはストークスシフトが影響する振動緩和など他の無輻射過程にも依存することが示唆された。より詳細な PA シグナルの発生効率の解明には、項間交差や高次の励起状態における振動緩和など、様々な無輻射過程の解析が必要と考えられる。ジアザアルキル基を持つ色素の PA スペクトルは、吸収スペクトルと同様、pH に応じて大きく変化したため、これらの色素は病変部位の pH に応答して PA スペクトルが変化する色素として利用できる可能性が示された。

第２章　病変部位の様々な環境因子に応答して PA シグナルが変化するイメージング剤の開発に向けた検討

PA イメージングは、非侵襲的に深部を観察するイメージング技術として、臨床応用の可能性が注目されており、低 pH や低酸素など、病変部位の環境に応答して PA シグナルが変化する色素を用いることで、病変部位を高コントラストに観察することが可能になる。[57–59] 第 1 章で開発した pH 応答性色素は、低 pH に応じて吸収および PA スペクトルが変化するため、酸性環境であるがんなどの可視化に有用であると考えられる。一方、pH 以外の環境因子や生体分子との反応性を利用した病変部位の観察は、より広範な病変部位の観察や治療方針の決定につながる可能性がある。例えば、肝障害や肝がんなどでは leucine aminopeptidase (LAP) などの特定の酵素活性が上昇する。[60] このような酵素に応答して PA スペクトルが変化する色素は、病変部位を高感度に検出できるだけでなく、病変部位の酵素の活性に着目した病態の評価ができる可能性がある。また、酸化還元反応に関与する活性酸素種（ROS）は、生体内での免疫応答や炎症プロセスにおいて重要な役割を果たしており、免疫細胞などの細胞活動が活発な領域で生成されやすい。[61–63]ROS に応答して PA スペクトルが変化する色素は、炎症部位やがんなどを特定できるだけでなく、病変部位での免疫細胞の活性を観察することもできると考えられ、生体病変のさらなる理解や免疫療法などの治療方針の決定ができる可能性もある。このような背景から、アミノ基を置換した色素の pH 変化に応じた吸収スペクトル変化のメカニズムを応用して、より多様な病変部位の観察や生体における病態の理解に利用可能なイメージング剤の開発を目指した。

第１節　pH 応答性色素の吸収スペクトル変化のメカニズムの解明

異なる原子や置換基を 1,4-ジアザアルキル部位に持つ色素の設計と合成

開発した 1,4-ジアザアルキル基を持つ **1**–**4** の吸収スペクトルは pH に応じて大きく変化した一方で、モノアミノ基を持つ **7**–**10** の吸収スペクトルは pH に応じて変化しなかった (**Figure 19a**)。この結果から、pH に応じたスペクトル変化は 1,4-ジアザアルキル基の 4 位のアミノ基のプロトン化が影響して起きると考えられた。アミノ基がプロトン化してアンモニウム基になると、電子吸引性が増加するため、この電子吸引性の増加が吸収スペクトル変化に影響している可能性があると考えられた。そこで、この 4 位のアミノ基を様々な原子や置換基に変更した色素を設計・合成し、各色素の分光学的特性と電子密度を解析することで、吸収スペクトル変化のメカニズムを検討した (**Figure 19b**)。窒素原子を 4 位に持つ **2** と比較するため、電子吸引性 (電気陰性度 [64,65]) が異なる原子である炭素原子、酸素原子を持つ **18**, **19** を設計した。また、電子吸引性基であるアミドやアンモニウムを持つ **20**–**22** を設計した。[66]

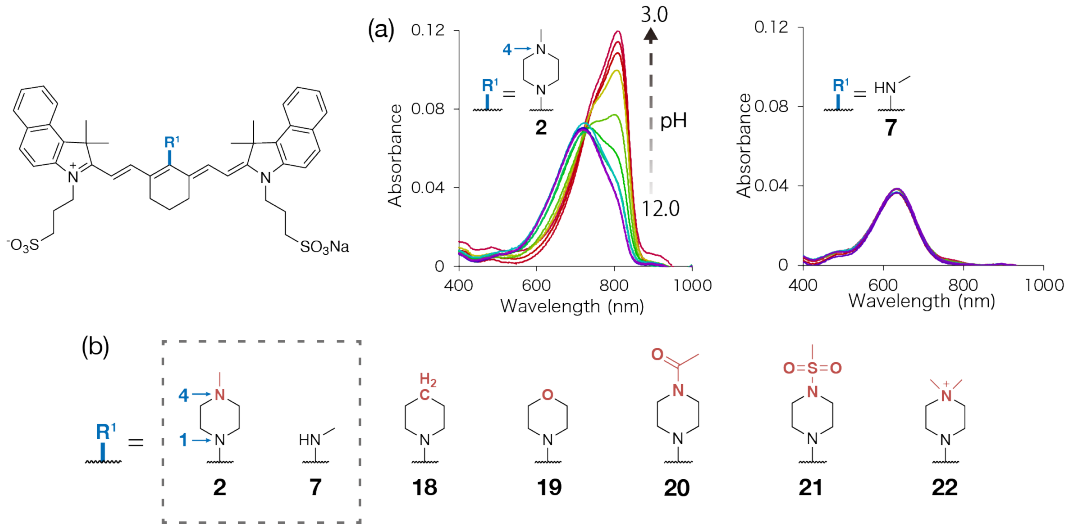
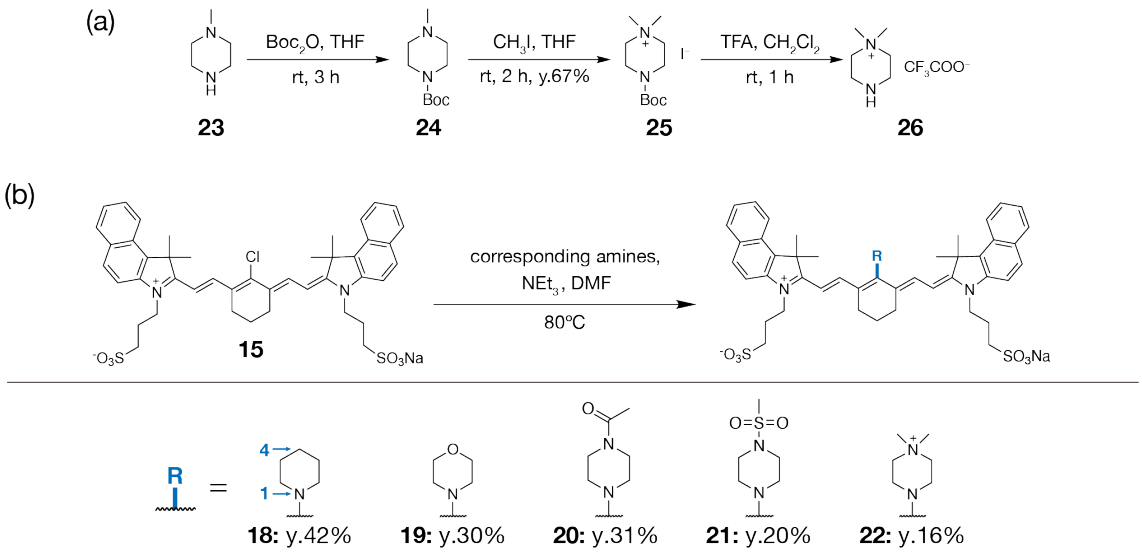


Figure 19. 異なる原子や置換基を 4 位に持つ誘導体の設計　(a) ジアザアルキル基を持つ **2** とジアザアルキル基を持たない **7** の各 pH における吸収スペクトル, (b) **2**, **7** と異なる原子や置換基を 4 位に持つ **18**–**22** の化学構造

異なる原子や置換基を 4 位に持つ色素は以下のスキームによって合成した (**Scheme 2**)。**22** の前駆体である **26** は、*N*-methylpiperazine を *t*-butoxycarbonyl (Boc) 基で保護した後にメチル化して第 4 級アンモニウム塩 **25** にした。**25** の Boc 基を TFA で脱保護して **26** を得た (**Scheme 2a**)。クロロ基が置換した **15** に、NEt_3 存在下、DMF を溶媒として用い、各アミンを反応させて **18**–**22** を得た (**Scheme 2b**)。



Scheme 2. 18–22 の合成スキーム　(a) **22** の前駆体 **26** の合成, (b) 前駆体 **15** からの **18**–**22** の合成スキーム

異なる原子や置換基を 4 位に持つ色素の吸収スペクトル測定

4 位に様々な原子や置換基を導入した **18**–**22** の光学特性を調べるため、**18**–**22** を終濃度が 1 μM となるよう PB with 30% DMSO または DMSO に溶解し、各 pH における吸収および蛍光スペクトルを測定した (**Figure 20**–**22**)。溶媒には、水溶液中での光学特性を検討するために PB with 30% DMSO を用いた。また、シアニン色素は水溶液中で疎水性相互作用やπ-π相互作用により H-aggregate や J-aggregate と呼ばれる凝集体を形成し、この凝集体が吸収スペクトル変化を起こすことがある。[50–52] そこで、凝集体を形成しないと考えられる DMSO のみを溶媒とした条件でも光学特性を検討した。この場合は、酸として TFA、塩基として NEt_3 を用いて、pH に対する吸収スペクトル変化を調べた。

4 位に炭素原子を持つ **18** の吸収極大は 720 nm 付近に見られたが、**20**–**22** の吸収極大は 815 nm 付近に見られた (**Figure 20**)。4 位にアミノ基を持つ **2** と異なり、**18**–**22** はいずれも pH に応じた吸収スペクトル変化を示さなかった。色素 **22** の吸光度は **18**–**21** と比較して

小さく、測定時に時間経過によって減少した。これは強力な電子求引性基である第 4 級アンモニウム塩の構造を持つ **22** によって色素の共役系が電子不足となり、溶液中に存在する水酸化物イオンなどが求核攻撃することで、色素が分解した可能性が考えられる（**Figure 20e**）。色素 **18–22** は pH に応じた吸収スペクトル変化を示さず、**2** の吸収スペクトル変化には、1,4-ジアザアルキル基の 4 位のアミノ基が重要であることが示唆された（**Figure 22**）。色素 **19** の DMSO 溶液に TFA を添加した場合は吸光度の減少が見られたが、酸として TFA の代わりに HCl を添加した場合は、HCl を加えない場合の吸収スペクトルと一致したため、TFA を添加した場合のスペクトル変化は酸性 pH に対する応答ではなく、TFA と反応することで色素が分解したためと考えられる（**Figure 21b**）。色素 **18**, **20–22** は DMSO を溶媒として用いた場合でも同様の吸収スペクトルを示したため、水溶液中の吸収スペクトルは凝集体のものではないと考えられる。一方、**19** は、溶媒として PB with 30% DMSO を用いた場合と DMSO を用いた場合で異なる吸収スペクトルを示した（**Figure 20b**, **21b**）。

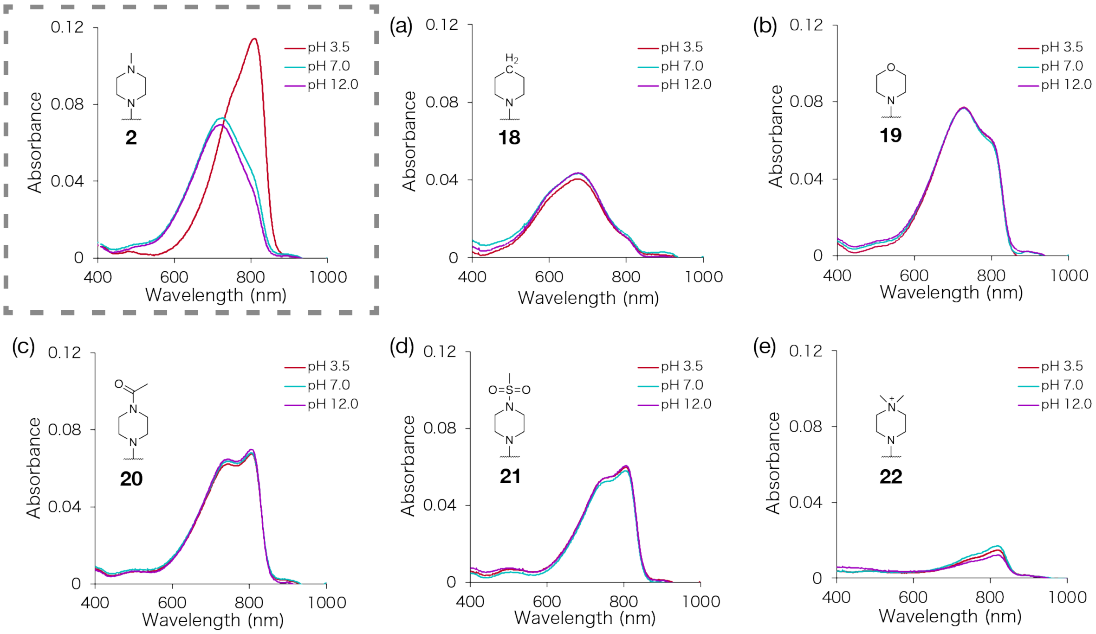


Figure 20. 18–22 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **18**, (b) **19**, (c) **20**, (d) **21**, (e) **22** の pH 3–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

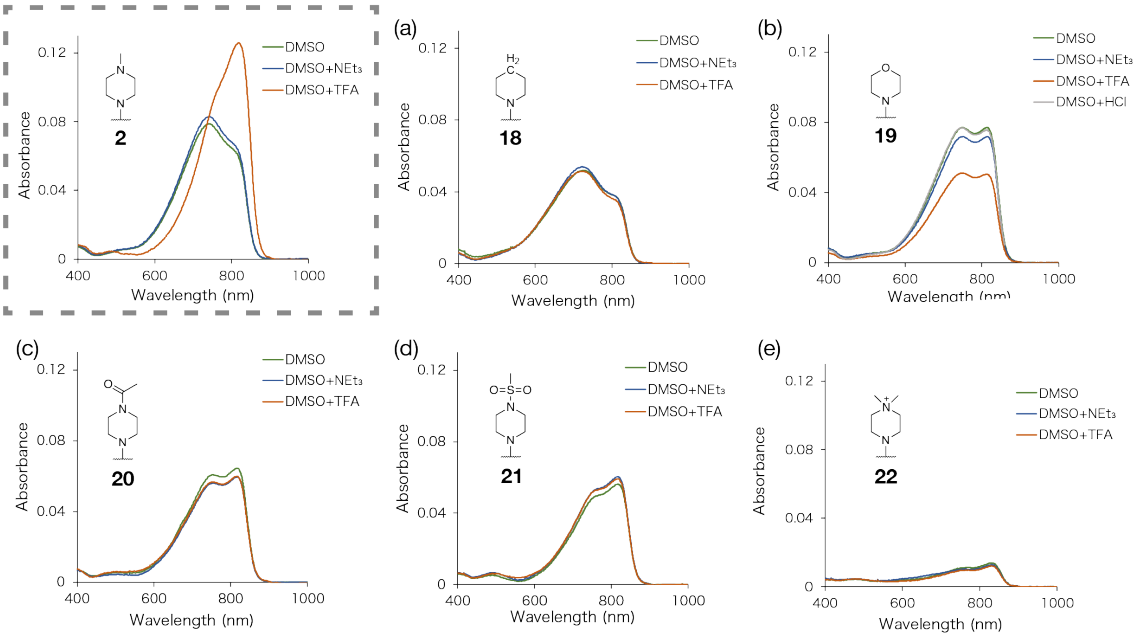


Figure 21. 18–22 の DMSO を溶媒として用いた場合の酸性もしくは塩基性条件での吸収スペクトル　(a) **18**, (b) **19**, (c) **20**, (d) **21**, (e) **22** の酸性から塩基性条件における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

異なる原子や置換基を 4 位に持つ色素の蛍光スペクトル測定

異なる原子や置換基を 4 位に持つ **18–22** の光学特性をより詳細に検討するため、PB with 30% DMSO または DMSO に各色素を終濃度 1 μM となるよう溶解し、酸性から中性条件における蛍光スペクトルを測定した（**Figure 22–23**）。また、得られた吸収・蛍光スペクトルの結果から吸収極大波長（Abs_{max}），蛍光極大波長（Em_{max}），ストークスシフト（Δλ），モル吸光係数（ε），蛍光量子収率（ϕ_f）を算出し、表にまとめた（**Table 2**）。

色素 **18–22** は異なる吸収極大波長を示したが、蛍光極大波長はいずれの色素も 840 nm 付近に見られた（**Figure 22**）。これらは **2** の吸収極大波長および蛍光極大波長と類似しており、励起時や蛍光を放出する際の電子状態は似ていると考えられる。**18–22** は PB with 30% DMSO または DMSO を溶媒として用いた場合のいずれでも強い蛍光が観察された。特に、**19** は PB with 30% DMSO または DMSO を溶媒として用いた場合でそれぞれ異なる吸収スペクトルを示したが、いずれの場合でも同様の蛍光スペクトルを示した（**Figure 22b**, **23b**）。シアニン色素は水溶液中で H-aggregate と呼ばれる凝集体を形成することがあるが、H-aggregate では一般的に蛍光の消失が見られる。[50–52] 一方、色素の吸光特性は溶媒の誘電率にも影響を受け、溶媒によって全く異なる吸収スペクトルを示す色素も存在する。[67,68]**19** はいずれの溶媒でも強い蛍光が観察されたため、**19** の溶媒による吸収スペクトルの変化は、

蛍光の消失が特徴的な H-aggregate によるものではなく、DMSO と水（PB）の誘電率の差によるものと推察される。

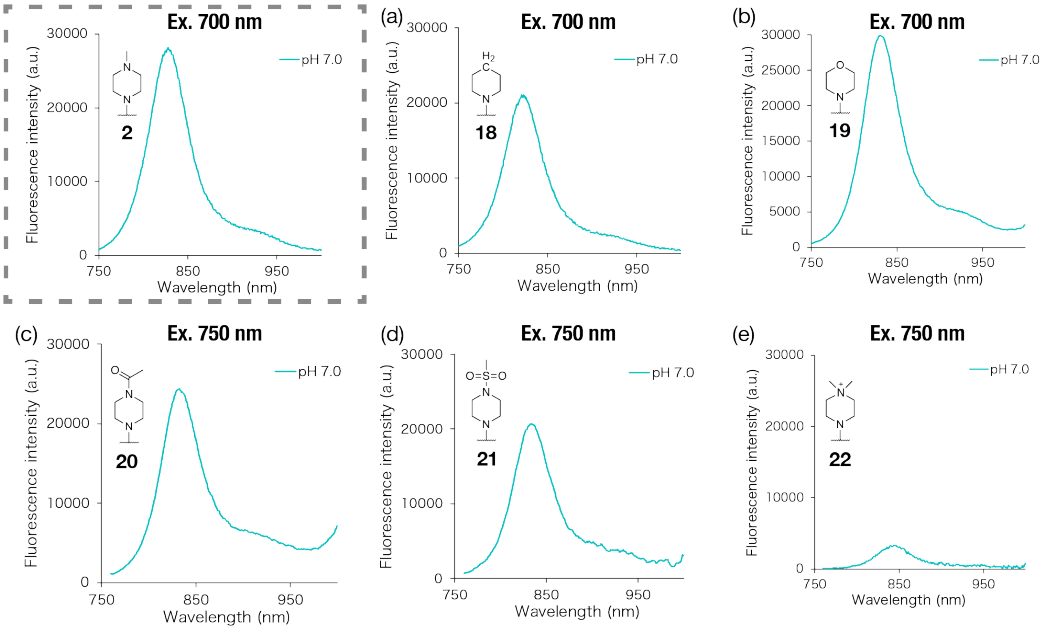


Figure 22. 18–22 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合（pH 7.0）の蛍光スペクトル　(a) **18**, (b) **19**, (c) **20**, (d) **21**, (e) **22** の pH 7.0 における吸収スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光を用いて測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

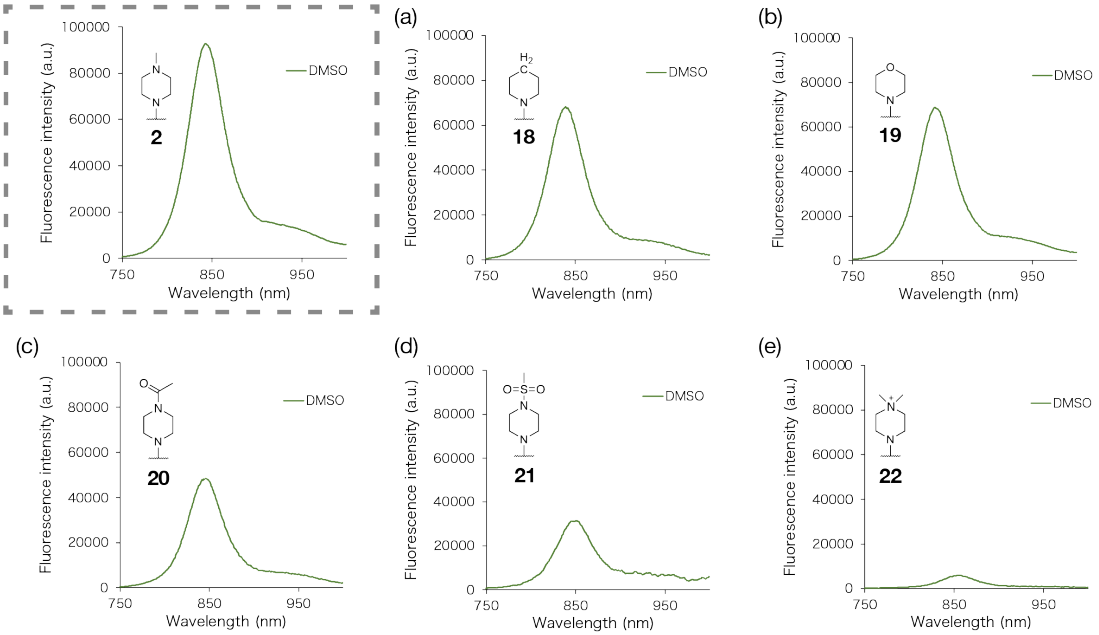


Figure 23. 18–22 の DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル　(a) **18**, (b) **19**, (c) **20**, (d) **21**, (e) **22** の蛍光スペクトル。750 nm の励起光を用いて測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

Table 2. 18–22 の光学特性

Compound	Abs_{max} (nm)[a]	Em_{max} (nm)[a]	Δλ (nm)[a]	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)[a]	ϕ_f[b]
18	722	839	117	4.8×10^4	0.11
19	770	841	71	7.8×10^4	0.09
20	817	844	27	6.5×10^4	0.09
21	815	849	34	5.9×10^4	0.10
22	817	843	26	1.8×10^4	0.07

溶媒として a) PB with 50% DMSO、b) DMSO and DMSO with 1% TFA を用いた。

異なる原子や置換基を 4 位に持つ色素の吸収スペクトルの比較

次に、**2**, **18–22** の溶液の吸収スペクトルを、吸光係数の違いを考慮して比較するため、短波長側の吸収極大が見られる 700 nm 付近の吸光度で規格化し、815 nm の相対吸光度を比較した（**Figure 24**）。**2** は pH に応じて吸収スペクトルが変化するが、**2** が脱プロトン化していると考えられる溶媒（pH 7.0 の PB with 30% DMSO もしくは DMSO のみ）において比較した。

アミドや第 4 級アンモニウムのような電子吸引性基を 4 位に持つ **20–22** は pH 7.0 の PB with 30% DMSO を用いた場合でも、DMSO を用いた場合でも、815 nm に大きい吸収極大を示した。一方、強い電子吸引性基を持たない **2**, **18**, **19** では 815 nm の相対吸光度が小さく、短波長側に吸収極大が見られ、815 nm の相対吸光度は 4 位に強い電子吸引性基を持つ色素ほど大きいことが示唆された。**2**, **18**, **19** の 815 nm の相対吸光度の大きさは電気陰性度の大きい原子を 4 位にもつ色素ほど大きかった (**19** (O)>**2** (N)>**18** (C))。

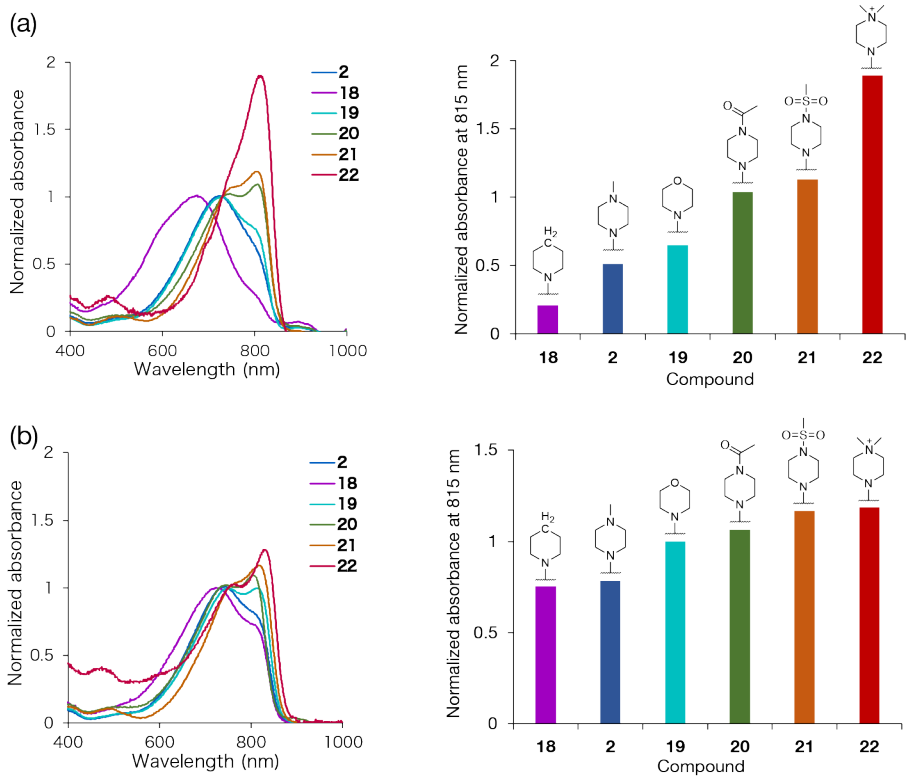


Figure 24. 18–22 の吸収スペクトルの比較　(a) それぞれの色素を PB with 30% DMSO に、(b) DMSO に溶かした溶液の吸収スペクトルの比較。吸収スペクトルは短波長の 700 nm 付近の吸収極大で規格化して比較した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

ジアザアルキル基に種々の官能基に変換した色素の最安定構造と自然電子密度の解析

4-メチルピペラジニル基を持つ **2** の 4 位のアミノ基を様々な原子や置換基に変換した **18–22** の吸収スペクトルの違いを検討するため、各色素の最安定構造を density functional theory (DFT) 計算で調べ、分子内の自然電荷を算出した (**Figure 25–26**)。分子サイズが大きいため、汎関数には長距離の相互作用を考慮できる LC-ωPBE を用いた。[69] また、側鎖

のスルホプロピル基はメチル基やプロピル基に変更しても吸光・蛍光特性に影響しないことが報告されているため、計算時間の短縮のためにメチル基として計算した。[70]**Figure 25–26** における **2’, 18’–22’**はそれぞれ **2, 18–22** の側鎖のスルホプロピル基をメチル基に変換したものを示す。**22’**の分子全体の電子密度は小さく算出されたが、これは sp^3 アンモニウムカチオンの強い電子求引性によって分子全体が電子不足になったためと考えられる(**Figure 26**)。計算結果を解析し、ピペリジニル構造の 1 位の N の負電荷 (Charge (N)) と、ピペリジニル基とポリメチン鎖をつなぐ C–N 結合の結合長 (R (C–N)) を比較したところ、Charge (N)の大きさと R (C–N)には負の相関が見られ、1 位の窒素原子の電子対が C–N 結合間の二重結合の形成に寄与する可能性が示された (**Figure 27a–b**)。Charge (N)の大きさと R (C–N)は各色素の 815 nm における相対吸光度とも相関が見られ、815 nm の相対吸光度が大きい色素ほど、Charge (N)が大きく、R (C–N)が長かった (**Figure 27c–d**)。特に C–N 結合長の長い **21’**や **22’**の bond order は 1.0 であり、これらの色素は C–N 結合間の単結合性が強いことが示された (**Figure 27a**)。

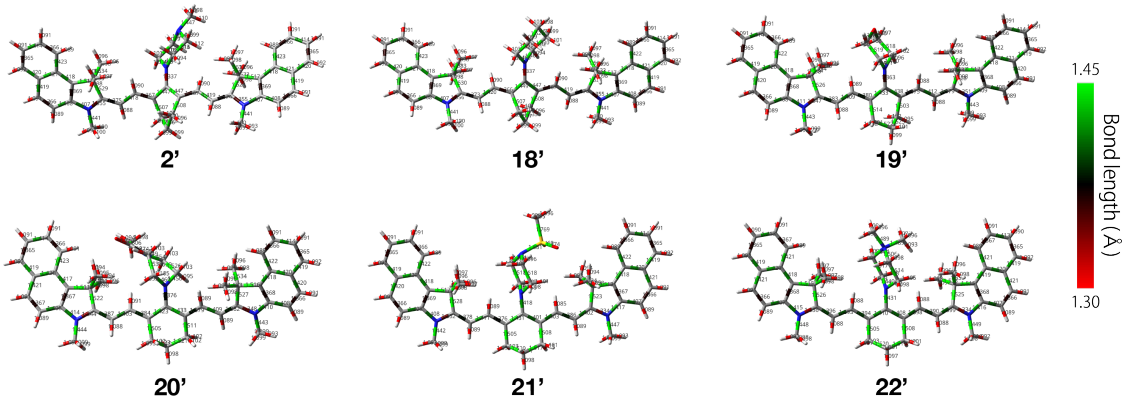


Figure 25. DFT 計算によって求めた 2’, 18’–22’の最安定構造

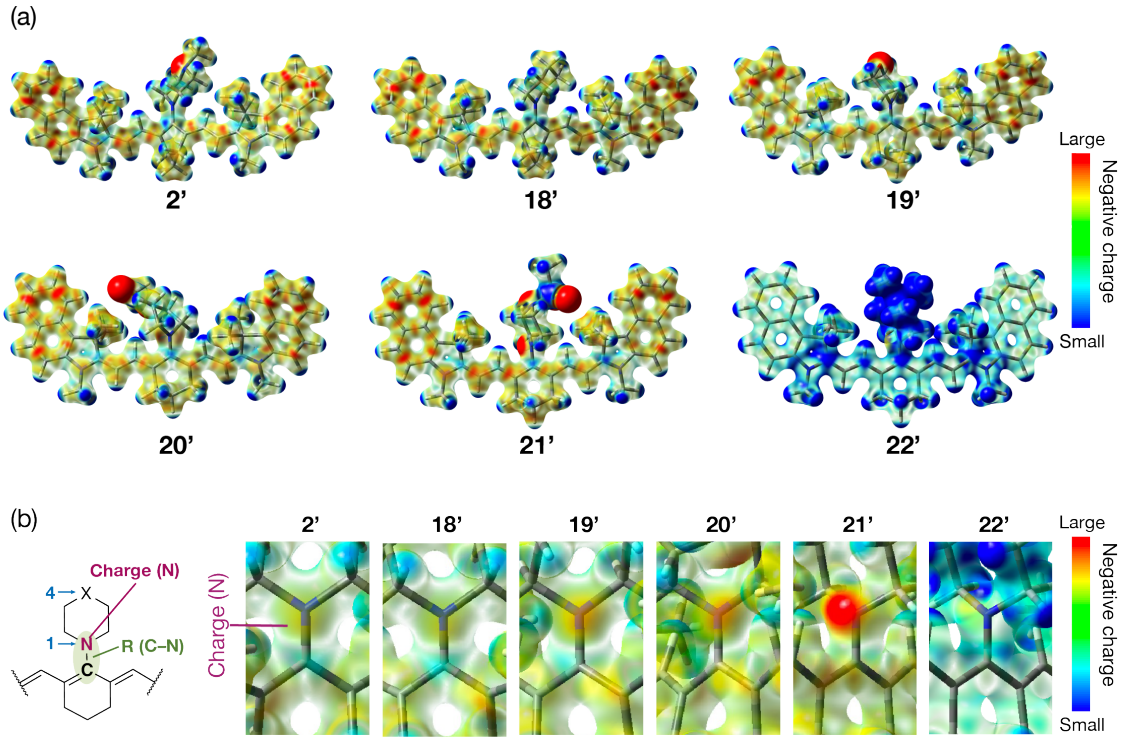
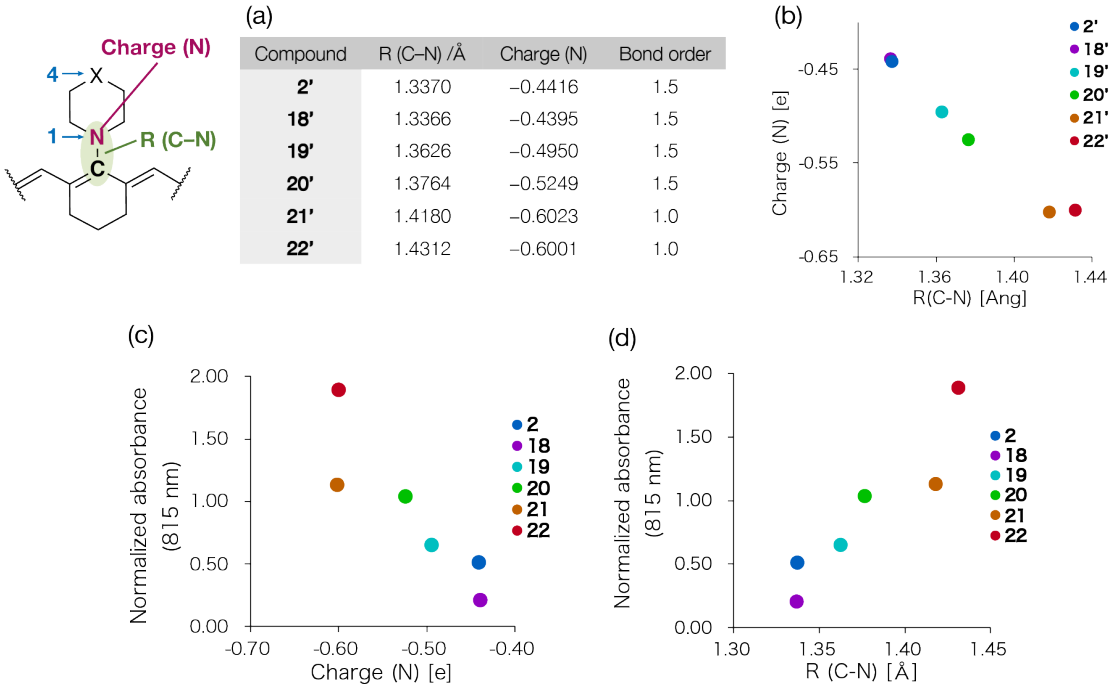


Figure 26. DFT 計算によって求めた 2’, 18’–22’の静電ポテンシャルマップ　(a) 色素の構造全体、(b) C–N 結合部位の静電ポテンシャルマップ



Compound	R (C–N) /Å	Charge (N)	Bond order
2'	1.3370	−0.4416	1.5
18'	1.3366	−0.4395	1.5
19'	1.3626	−0.4950	1.5
20'	1.3764	−0.5249	1.5
21'	1.4180	−0.6023	1.0
22'	1.4312	−0.6001	1.0

Figure 27. 2, 18–22 の 815 nm の相対吸光度と、DFT 計算で求めた 2', 18'–22'の Charge (N)、R (C-N)のプロット　(a) 2', 18'–22'の C–N 結合長、1 位の N の負電荷及び結合次数。(b) 1 位の N の負電荷と C–N 結合長, (c) 815 nm の相対吸光度と 1 位の N の負電荷, (d) 815 nm の相対吸光度と C–N 結合長の比較。

pH 応答性色素の吸収スペクトル変化の考察

吸収スペクトルと DFT 計算の結果から、ジアザアルキル基の pH に応じた吸収スペクトル変化を考察した。4 位に電子吸引性基を持たない **18** などの色素では Charge (N)が小さく、R (C–N)が短いことから、1 位の N の電子対が C–N 結合間に二重結合を形成することで交差共役が生じ、短波長の 700 nm 付近に吸収極大を示したと推察される（**Figure 28a**)。一方で、**21** などの 4 位に強い電子吸引性基を持つ色素では、Charge (N)が大きく、R (C–N)が長いため、1 位の窒素原子の電子対による交差共役が抑制されて長波長の 800 nm 付近に吸収極大を示したと考えられる（**Figure 28b**)。

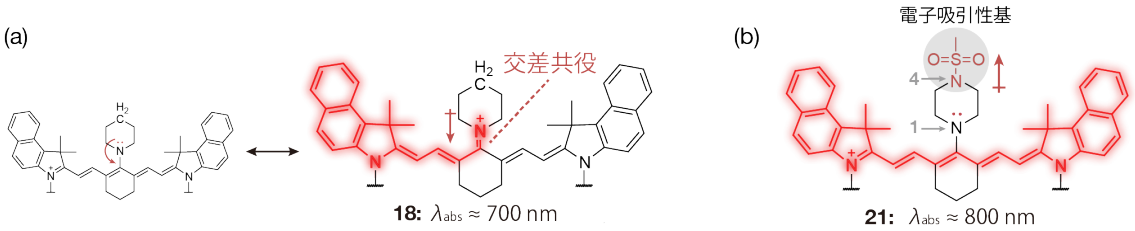


Figure 28. 4 位の官能基の電子吸引性に応じた吸収スペクトル変化の考察　(a) 電子吸引性基を持たない色素と (b) 強い電子吸引性基を持つ色素の吸収スペクトルの考察

また、4 位にアミノ基を持つ **2** は中性と酸性で異なる吸収スペクトルを示し、pH の低下に応じて吸収極大が 700 nm から 800 nm 付近にシフトした（**Figure 9**）。吸収スペクトルの変化が 4 位の置換基の電子吸引性の変化によるものとすると、**2** は中性 pH で 4 位のアミノ基が脱プロトン化していると考えられ、1 位の窒素原子の電子対による交差共役を起こし、700 nm 付近に吸収極大を示したと考えられる（**Figure 29a**）。一方、酸性では 4 位のアミノ基がプロトン化することで電子吸引性が増大し、1 位の窒素原子の電子対による交差共役を抑制して、800 nm 付近に吸収極大を示したと考えられる（**Figure 29b**）。以上より、ジアザアルキル基を持つ色素の pH 変化に応じた吸収スペクトル変化は、4 位のアミノ基のプロトン化の有無で交差共役が変化するためであることが示唆された。

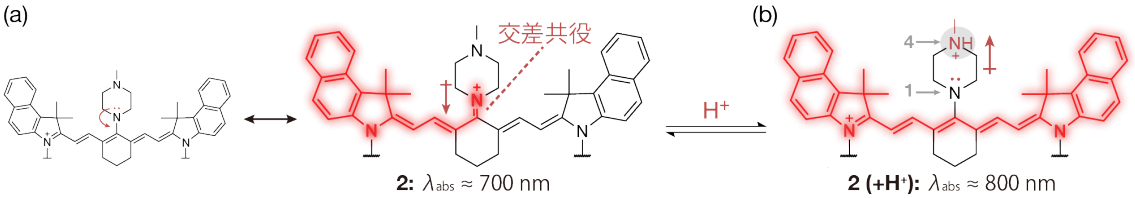


Figure 29. ジアザアルキル基を持つ色素の吸収スペクトル変化のメカニズムの考察　ジアザアルキル基を持つ色素の (a) 中性 pH と (b) 酸性 pH における吸収スペクトルの違いの考察

第 1 節の結果から、**2**, **18**–**22** の吸収スペクトルは 4 位の原子・置換基によって異なり、アミド基やアンモニウム基のような強い電子吸引性基を持つ **20**–**22** は 815 nm に大きな相対吸光度を示した。815 nm の相対吸光度はポリメチン鎖に隣接する N の負電荷（Charge (N)）やピペリジニル基とポリメチン鎖をつなぐ C–N 結合の結合長（R (C–N)）と相関し、815 nm の相対吸光度が大きい色素ほど、Charge (N) が大きく、R (C–N) が長いことが示された。これらの結果から、吸収極大波長の変化はポリメチン鎖に隣接する N の電子対が C–N 結合間に二重結合の形成に寄与し、共役系が分断されることで起こると考えられ、1-

ピペラジニル基の 4 位に導入した置換基の電子吸引性に応じて、N の電子対による交差共役の寄与が変化することが示唆された。また、第 1 章で合成したジアザアルキル基を持つ色素も同様に、低 pH で 1,4-ジアザアルキル基の 4 位のアミノ基がプロトン化/脱プロトン化することで交差共役が制御されていることが示唆された。

第２節　アリール基を置換したシアニン色素の光学特性の検討

これまでの結果から、ピペリジニル基を持つ色素の、4 位の置換基の電子吸引性に応じて、吸収スペクトルが変化することが示された（**Figure 30a**）。そこで、この吸収スペクトル変化のメカニズムを、pH 変化以外のより広範な生体反応に応用するために検討した。酵素の中には基質と反応することで、基質の置換基の電子吸引性が変化するものが存在し、ペプチダーゼは弱い電子供与性基であるアミド基を加水分解して、強い電子供与性基であるアミノ基にする（**Figure 30b**）。[71,72] ペプチダーゼの中には、ベンゼンに置換したアミド基に反応するものも多く存在する。[73,74] また、チロシナーゼは電子豊富なカテコール誘導体を酸化して、電子不足なオルトキノン誘導体にする（**Figure 30c**）。[75] このような酵素によるアリール基の置換基の変化に応答して、吸収スペクトルが変化することを目指し、1-ピペラジニル基の 4 位に様々なアリール基を持つ **27–31** を設計した。

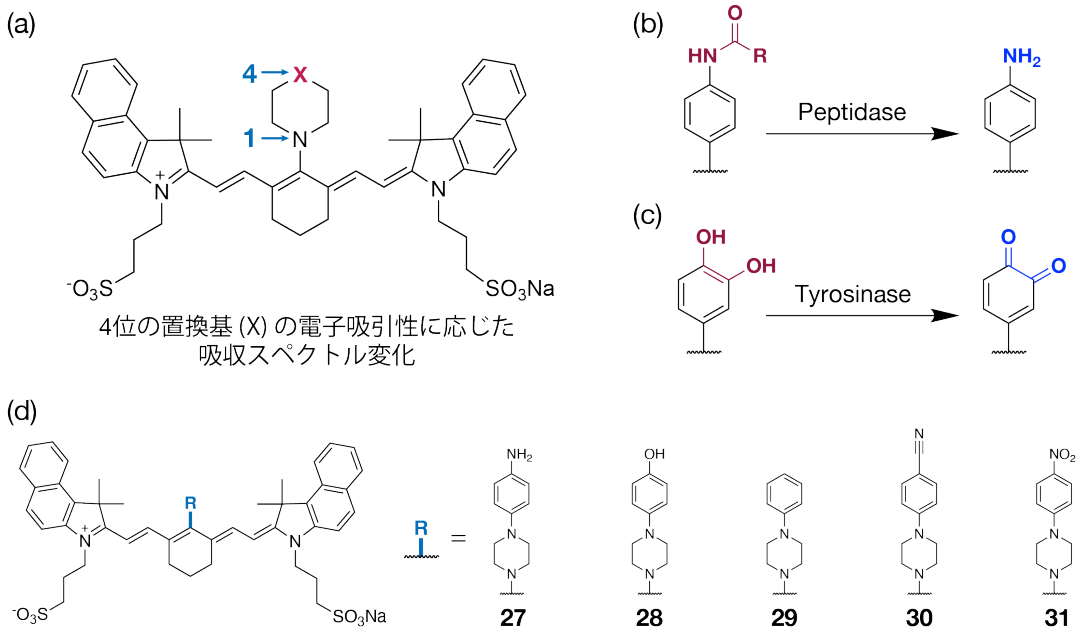
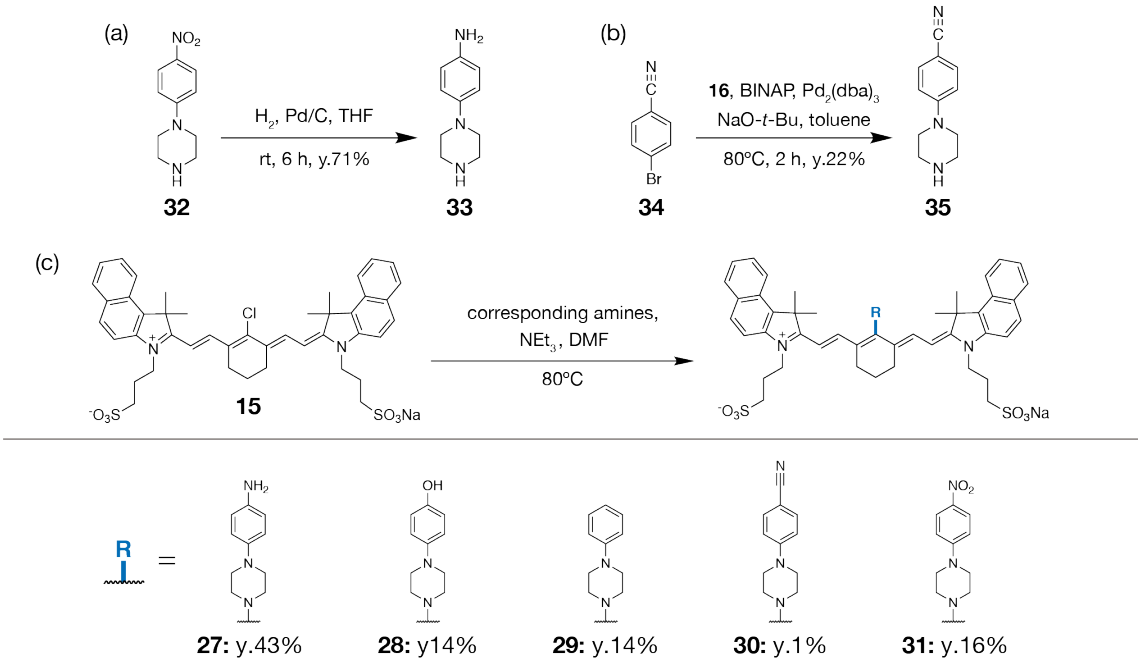


Figure 30. アリール基を置換した色素の設計　(a) 4 位の置換基に応じた吸収スペクトル変化 (b) peptidase によるアミドからアミンへの変換, (c) tyrosinase によるカテコール誘導体からオルトキノン誘導体への変換 (d) 様々なアリール基を 1-ピペラジニル基の 4 位に導入した色素の化学構造

アリール基を置換した色素の合成

アリール基を置換した **27–31** は以下のスキームによって合成した (**Scheme 3**)。化合物 **27** と **30** の前駆体である *N*-(4-aminophenyl)piperazine (**33**) と *N*-(4-cyanophenyl)piperazine (**35**) はそれぞれ接触還元と Buchwald-Hartwig クロスカップリングで合成した (**Scheme 3a–b**)。クロロ基を持つ **15** に、NEt_3 存在下、DMF を溶媒として用い、各アミンを反応させて **27–31** を合成した (**Scheme 3c**)。



Scheme 3. 27–31 の合成スキーム　(a) **27** の前駆体 **33**, (b) **30** の前駆体 **35**, (c) **27–31** の構造と合成

アリール基を置換した色素の吸収スペクトル測定

1-ピペラジニル基の 4 位に様々なアリール基を導入した **27–31** を終濃度が 1 μM となるよう溶媒に溶かし、その溶液の各 pH における吸収スペクトルを測定した (**Figure 31–32**)。水溶液中での光学特性を検討するために、溶媒には phosphate buffer (PB)に dimethyl sulfoxide (DMSO) が 50%になるよう混和させたもの（PB with 50% DMSO）を用いた。シアニン色素は水溶液中で疎水性相互作用やπ-π相互作用により H-aggregate や J-aggregate と呼ばれる凝集体を形成し、この凝集体が吸収スペクトル変化を起こすことがある。そこで、凝集体を形成しないと考えられる DMSO のみを溶媒とした条件でも光学特性を検討した。[50–52] この場合は、酸として TFA、塩基として NEt_3 を用いて pH に対する吸収スペクトル変化を調べた。

色素 **27–29** の吸収極大は 730 nm 付近に見られたが、**30**, **31** の吸収極大は 815 nm 付近に見られた（**Figure 31**）。色素 **27**, **29–31** は PB with 50%DMSO 中においても、DMSO 中においても酸性や塩基性に応じた吸収スペクトル変化を示さず、プロトン化や脱プロトン化を起こさないことが示唆された（**Figure 31a**, **31c–e**, **32a**, **32c–e**）。色素 **28** は DMSO を溶媒として用いた場合は pH に応じた吸収スペクトル変化を示さなかったが、PB with 50% DMSO を溶媒として用いた場合、pH 12.0 で 800 nm 付近の吸光度が低下した（**Figure 31b**）。これは、フェノール性水酸基が脱プロトン化してフェノラートイオンになり、4 位のアミノ基の電子供与性の増大によって交差共役が促進されたためと考えられる。色素 **27**, **30**, **31** は、PB with 50% DMSO もしくは DMSO を溶媒として用いた場合で、同様の吸収スペクトルを示したため、水の割合を増やしても、凝集の影響がほとんどないことが示唆された。一方、**28**, **29** は DMSO 中と PB with 50% DMSO で異なる吸収スペクトルを示した。

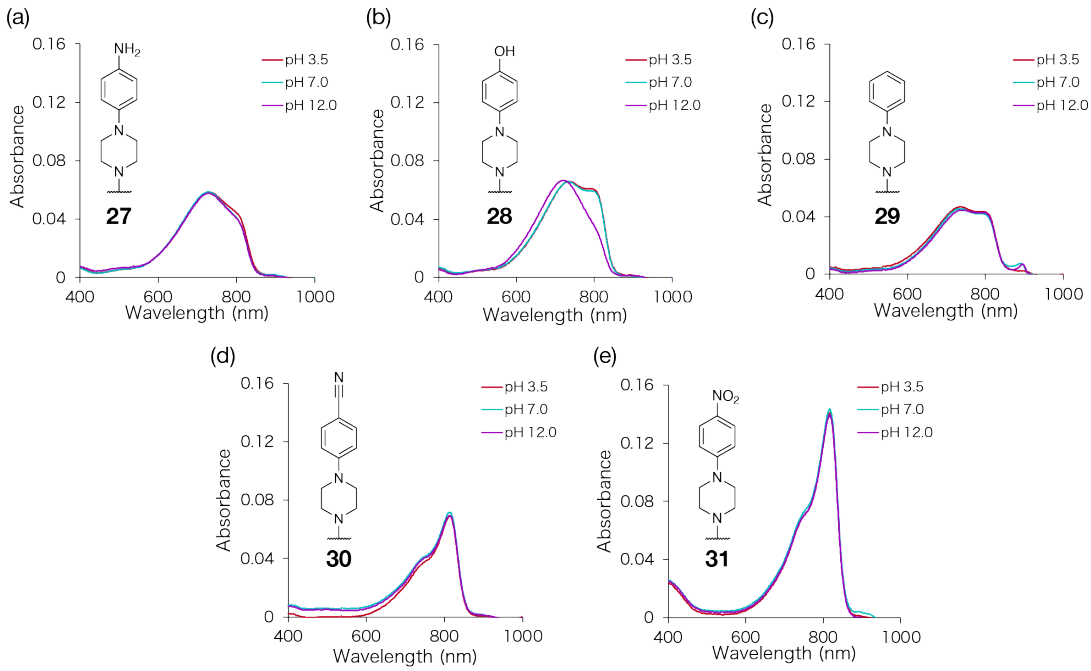


Figure 31. 27–31 を PB with 50% DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル

(a) **27**, (b) **28**, (c) **29**, (d) **30**, (e) **31** の pH 3.5–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

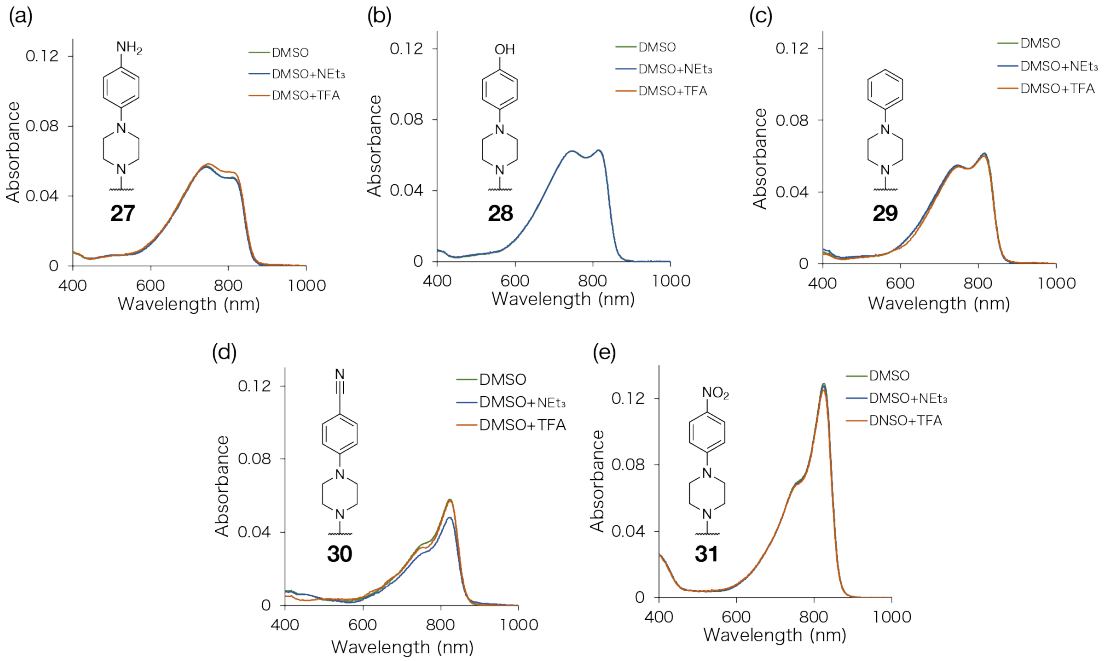


Figure 32. 27–31 を DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル　(a) **27**, (b) **28**, (c) **29**, (d) **30**, (e) **31** の酸性から塩基性条件における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

アリール基を置換した色素の蛍光スペクトル測定

アリール基を置換した **27–31** の光学特性をより詳細に検討するため、PB with 50% DMSO または DMSO に各色素を終濃度 1 μM となるよう溶解し、酸性から中性条件における蛍光スペクトルを測定した（**Figure 33–34**）。また、得られた吸収・蛍光スペクトルの結果から Abs_{max}, Em_{max}, Δλ, ε, ϕ_f を算出し、表にまとめた（**Table 3**）。

色素 **27–31** はそれぞれ異なる吸収極大波長を示したが、蛍光極大波長はいずれの色素も 830–840 nm 付近に見られた（**Figure 33–34**）。色素 **29–31** は、PB with 50% DMSO および DMSO を溶媒として用いたいずれの場合でも、強い蛍光が観察された。色素 **27**, **28** の ϕ_f は DMSO を溶媒として用いた場合はそれぞれ 0.01, 0.02 と、他の化合物と比べて低い値だった。色素 **27**, **28** のアリール基は電子供与性基によって Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) のエネルギーが上昇していると考えられる。このため、**27**, **28** はシアニンが励起された後に形成される二つの Singly Occupied Molecular Orbital（SOMO）のうち、低エネルギー側の SOMO にアリール基から Photoinduced Electron Transfer (PeT) が起き、消光したと考えられる。[76,77] 色素 **28**, **29** は、PB with 50% DMSO もしくは DMSO を溶媒として用いた場合で、それぞれ異なる吸収スペクトルを示したが、いずれの溶媒でも同様の蛍光スペクトルを示した（**Figure 33b–c**, **34b–c**）。色素 **28** の ϕ_f は他の色素と比べ

て小さい値を示したが、他のアリール基を持つ色素では凝集体に由来するような吸収・蛍光特性が観察されていないことから、吸収スペクトル変化は DMSO と水（PB）の誘電率の差によるものと考えられる。[67,68]

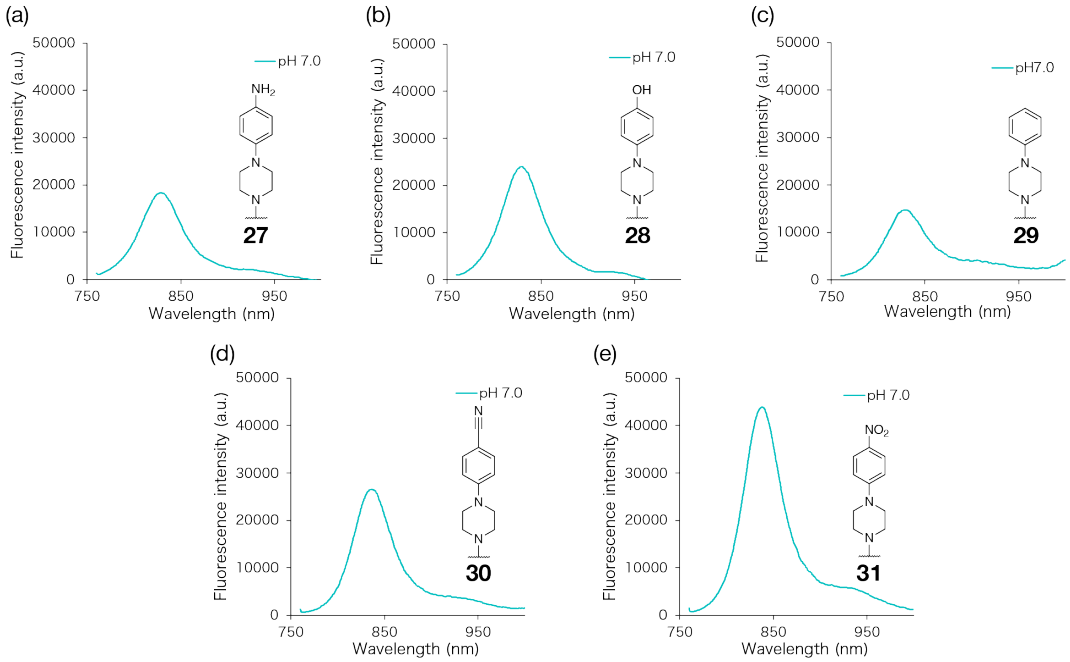


Figure 33. 27–31 を PB with 50% DMSO に溶かした溶液の蛍光スペクトル　(a) **27**, (b) **28**, (c) **29**, (d) **30**, (e) **31** の pH 7.0 における蛍光スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光で測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

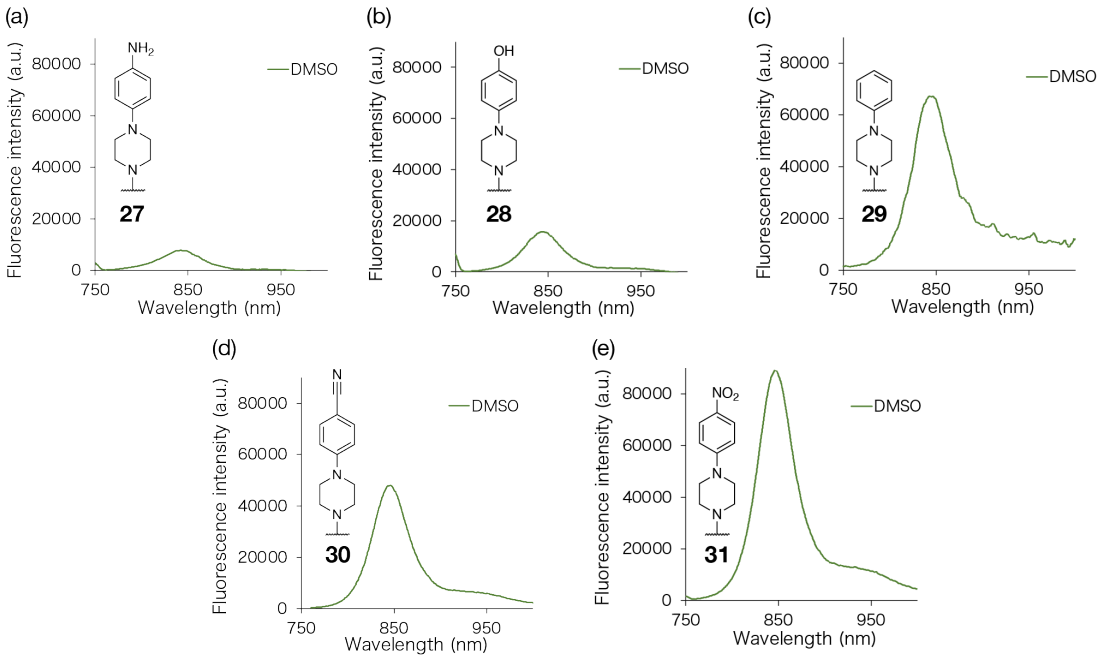


Figure 34. 27–31 を DMSO に溶かした溶液の蛍光スペクトル　(a) **27**, (b) **28**, (c) **29**, (d) **30**, (e) **31** を DMSO に溶かした溶液の蛍光スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光で測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

Table 3. 27–31 の光学特性

Compound	Abs_{max} (nm)[a]	Em_{max} (nm)[a]	Δλ (nm)[a]	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)[a]	ϕ_f[b]
27	727	828	101	5.9×10^4	0.01
28	732	830	98	6.6×10^4	0.02
29	736	831	95	6.0×10^4	0.12
30	813	837	24	7.2×10^4	0.11
31	816	837	21	1.4×10^5	0.10

溶媒として a) PB with 50% DMSO、b) DMSO and DMSO with 1% TFA を用いた。

アリール基を置換した色素の吸収スペクトルの比較

次に、**27–31** の吸収スペクトルを、吸光係数の違いを考慮して比較するため、短波長側の吸収極大が見られる 700 nm 付近の吸光度で規格化し、815 nm の相対吸光度を比較した (**Figure 35**)。色素 **28** は pH に応じて吸収スペクトルが変化するが、**28** のヒドロキシ基がプロトン化していると考えられる溶媒 (pH 7.0 の PB with 50% DMSO もしくは DMSO のみ) を用いた場合のスペクトルを比較した。

アリール基に電子供与性基であるアミノ基もしくはヒドロキシ基が置換した **27**, **28** は、PB with 50% DMSO (pH 7.0)もしくは DMSO を溶媒として用いたいずれの場合でも、815 nm の相対吸光度が小さかった。一方、アリール基に電子求引性基であるニトリル基もしくはニトロ基が置換した **30**, **31** は、いずれの溶媒を用いた場合でも、815 nm の相対吸光度が小さく、アリール基の電子吸引性の変化が吸収スペクトルに影響を与えることが示唆された。

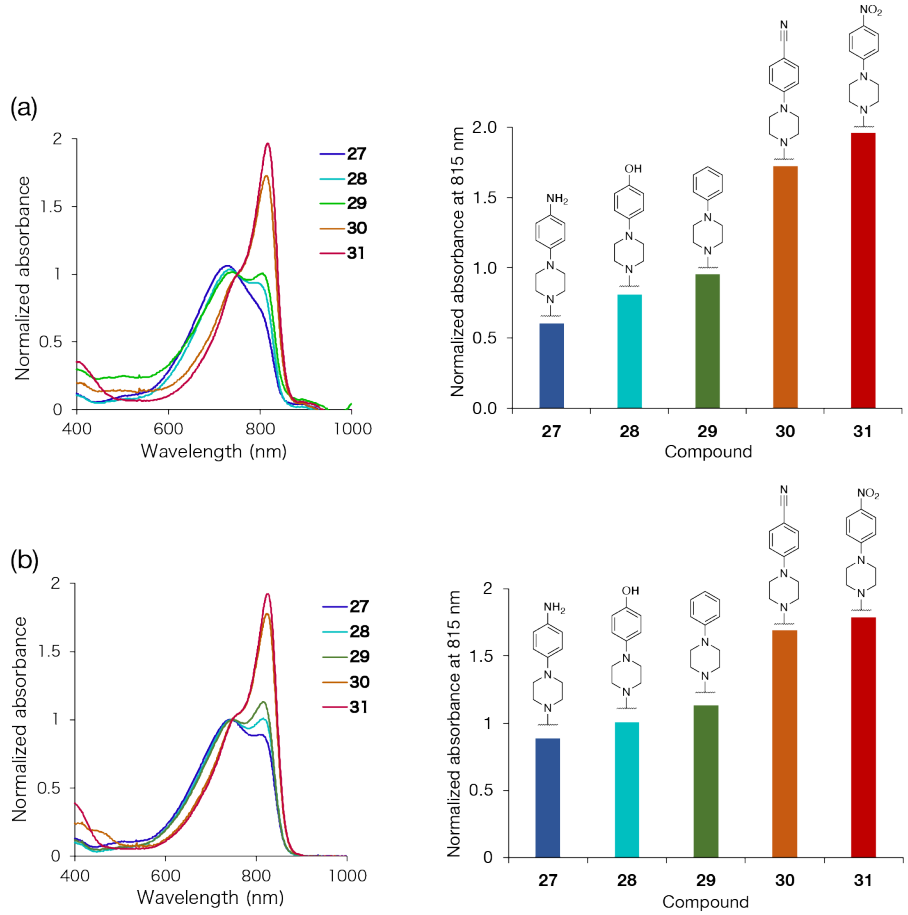


Figure 35. 27–31 の吸収スペクトルの比較　(a) PB with 50% DMSO を溶媒として用いた場合、(b) DMSO を溶媒として用いた場合の **27–31** の吸収スペクトルの比較

アリール基を置換した色素の最安定構造と自然電子密度の解析

色素 **27–31** の吸収スペクトルが異なる原因を調べるため、各色素の最安定構造を DFT 計算で調べ、分子の自然電荷を算出した (**Figure 36–37**)。分子サイズが大きいため、汎関数には長距離の相互作用を考慮できる LC-ωPBE を用いた。[69] また、側鎖のスルホプロピル基はメチル基やプロピル基に変更しても吸光・蛍光特性に影響しないため、計算時間の短縮の

ためにメチル基として計算した。[70]**Figure 36–37** における **27'–31'**はそれぞれ **27–31** の側鎖のスルホプロピル基をメチル基に変換したものを示す。計算結果から、1-ピペラジニル基の 1 位の N の負電荷（Charge (N)）と、1-ピペラジニル基とポリメチン鎖をつなぐ C–N 結合の結合長（R (C–N)）をプロットしたところ、Charge (N)と R (C–N)には負の相関が見られ、**Figure 27** の場合と同様に、C–N 結合の二重結合の形成が関与する可能性が示唆された（**Figure 38a–b**)。815 nm における相対吸光度が大きい**30, 31** の誘導体**30', 31'**は Charge (N)が大きく、R (C–N)が長いことから（**Figure 38c–d**)、815 nm における相対吸光度の増大は、**Figure 28** に示したように、電子求引性の高いアリール基が結合したことによって交差共役が抑制されたためであると考えられる。一方で、Charge (N)が-0.53 より大きく、R (C–N)が 1.375 より長い色素で急激に 815 nm の相対吸光度が増加しており、**Figure 27** の場合とは異なる傾向を示した。C–N 結合長の長い **31** の bond order は 1.0 であり、C–N 結合間の単結合性が強かった（**Figure 38a**)。以上より、Charge (N)や R (C–N)に対する吸光度の変化の仕方は異なるものの、1-ピペラジニル基の 4 位に導入したアリール基の電子吸引性を変えることでも、吸収スペクトル変化を制御できることが示唆された。

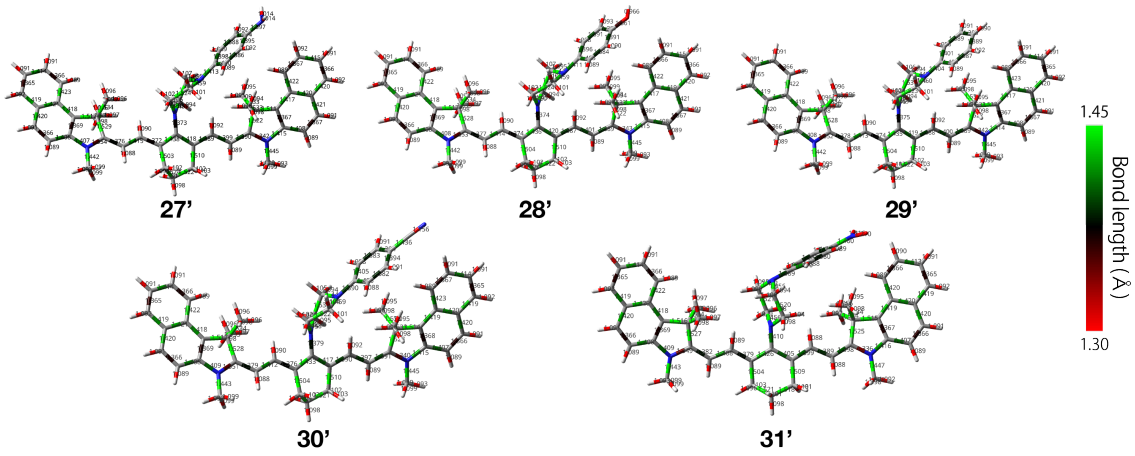


Figure 36. DFT 計算により算出した 27'–31'の最安定構造

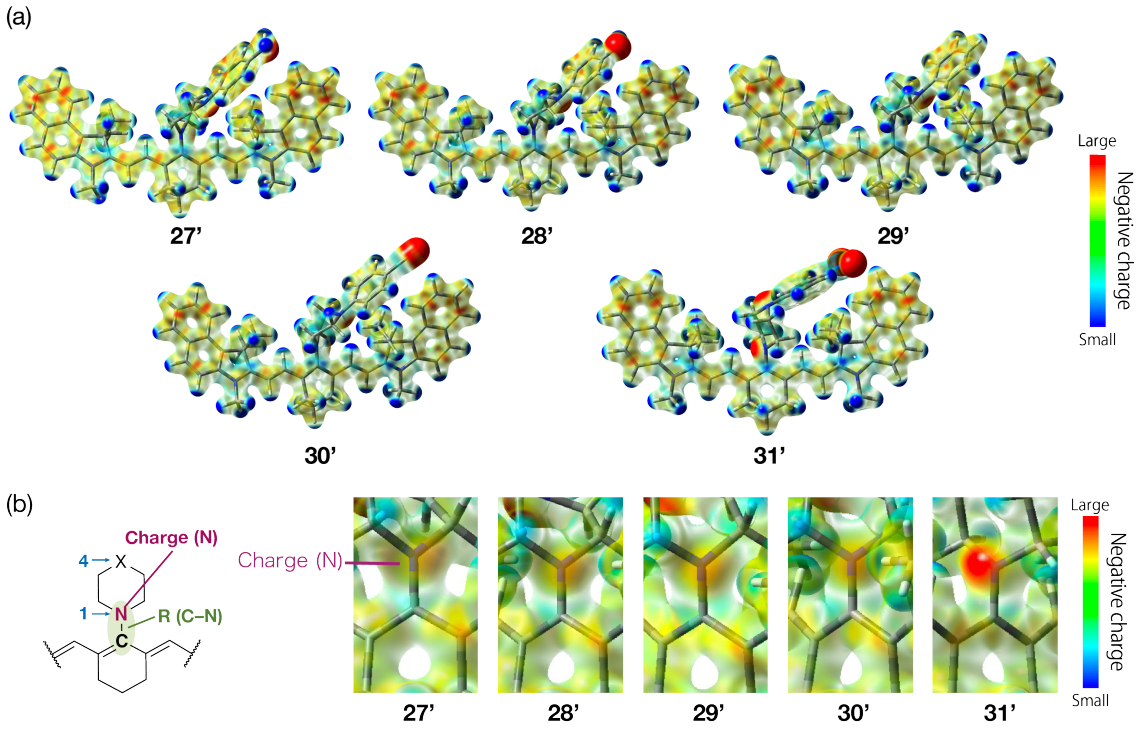
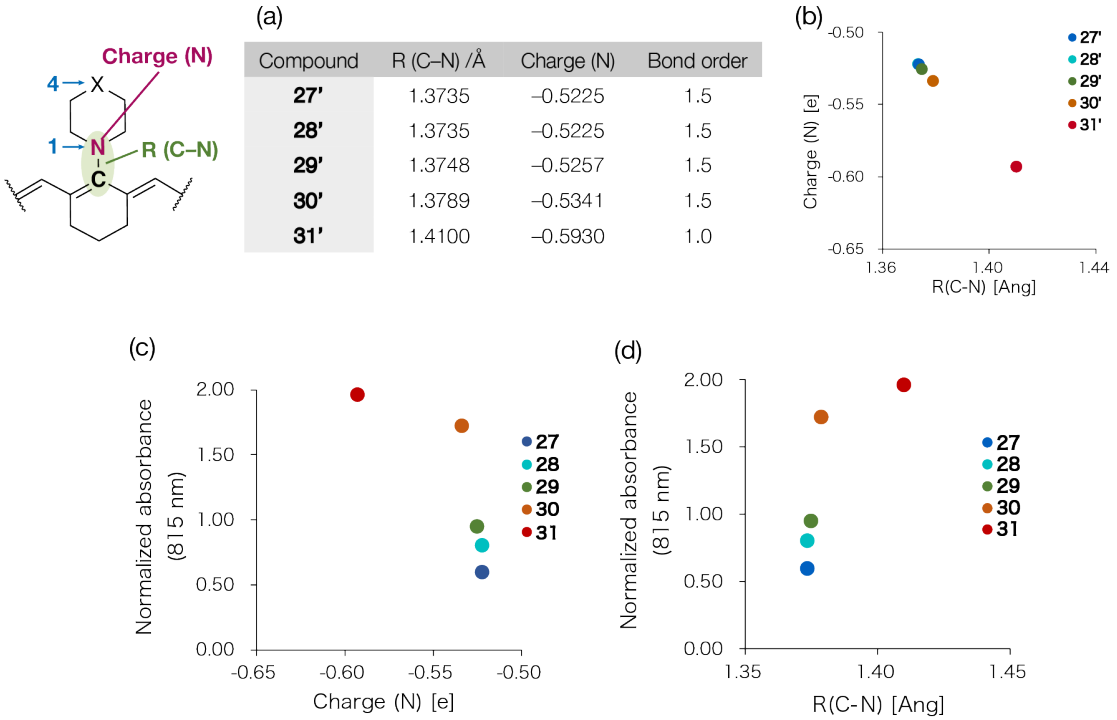


Figure 37. DFT 計算により算出した 27’–31’の静電ポテンシャルマップ (a) 色素の構造全体、(b) C–N 結合部位の静電ポテンシャルマップ



Compound	R (C–N) /Å	Charge (N)	Bond order
27'	1.3735	–0.5225	1.5
28'	1.3735	–0.5225	1.5
29'	1.3748	–0.5257	1.5
30'	1.3789	–0.5341	1.5
31'	1.4100	–0.5930	1.0

Figure 38. 27–31 の 815 nm の相対吸光度と DFT 計算で求めた 27'–31'の Charge (N)、R (C–N)のプロット　(a) **27'–31'**の C–N 結合長、1 位の N の負電荷及び結合次数。(b) 1 位の N の負電荷と C–N 結合長, (c) 815 nm の相対吸光度と 1 位の N の負電荷, (d) 815 nm の相対吸光度と C–N 結合長の比較。

第 2 節の結果から、ピペラジニル基の 4 位にアリール基を置換した **27–31** の吸収スペクトルは、アリール基の置換基に応じて変化した。アリール基に強い電子吸引性基が置換した色素ほど、815 nm の相対吸光度が大きく、Charge (N) が大きく、R (C–N) が長かった。このことから、**2**, **18–22** と同様に、電子吸引性基が N の電子対による交差共役を制御することが示唆された。一方で、Charge (N) が–0.53 より大きく、R (C–N)が 1.375 より長い色素で急激に 815 nm の相対吸光度が増加した。色素 **27–31** の安定構造は芳香族環が相互作用することで、benzindolium 部位に傾いており（**Figure 36**)、この相互作用によってアリール基の電子密度が変化し、Charge (N) や R (C–N)に影響した可能性が考えられる。以上より、**2**, **18–22** と Charge (N) 、R (C–N)の変化の仕方は異なるが、1-ピペラジニル基の 4 位にアリール基を導入した色素でも、置換基を変えることで吸収スペクトルを制御できることが示された。

第３節　アリール基を置換した色素の応用に向けた検討

色素 **27–31** の結果から、1-ピペラジニル基の 4 位にアリール基を導入した色素は、アリール基の 4 位の置換基の電子吸引性の変化によって、吸収スペクトルが変化することを示した (**Figure 35–36**)。この吸収スペクトル変化のメカニズムを用いて、がん細胞で活性が上昇している酵素の反応によって PA スペクトルが変化する色素の開発を目指し、肝細胞がんや膵臓がんなど、特定のがんに高発現している leucine aminopeptidase (LAP) に着目した。LAP はがん細胞の増殖、浸潤、転移に関連する酵素であり、LAP の活性が高いがん細胞は、浸潤、転移しやすいことが報告されている [78]LAP はペプチドの N 末端のロイシン残基を認識し、ロイシンが形成するアミド結合を加水分解する。LAP はアニリンのアミノ基に縮合したロイシンも認識し、加水分解することが報告されており、LAP の活性を検出する PA 色素として **36** を設計した。[73,74] 色素 **36** はロイシンが縮合したアニリド構造を有しており、LAP による加水分解を受けて、アミド基がアミノ基に加水分解されることでベンゼン環の電子密度が上昇し、吸収スペクトルが変化すると考えられる (**Figure 39**)。また、**36** と比較するために、単純なアミド構造を持つ **37** も設計した。

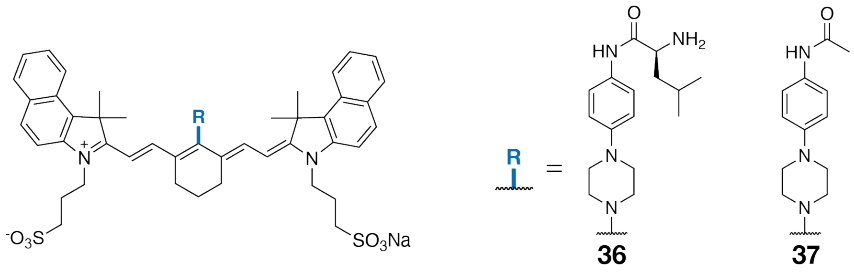
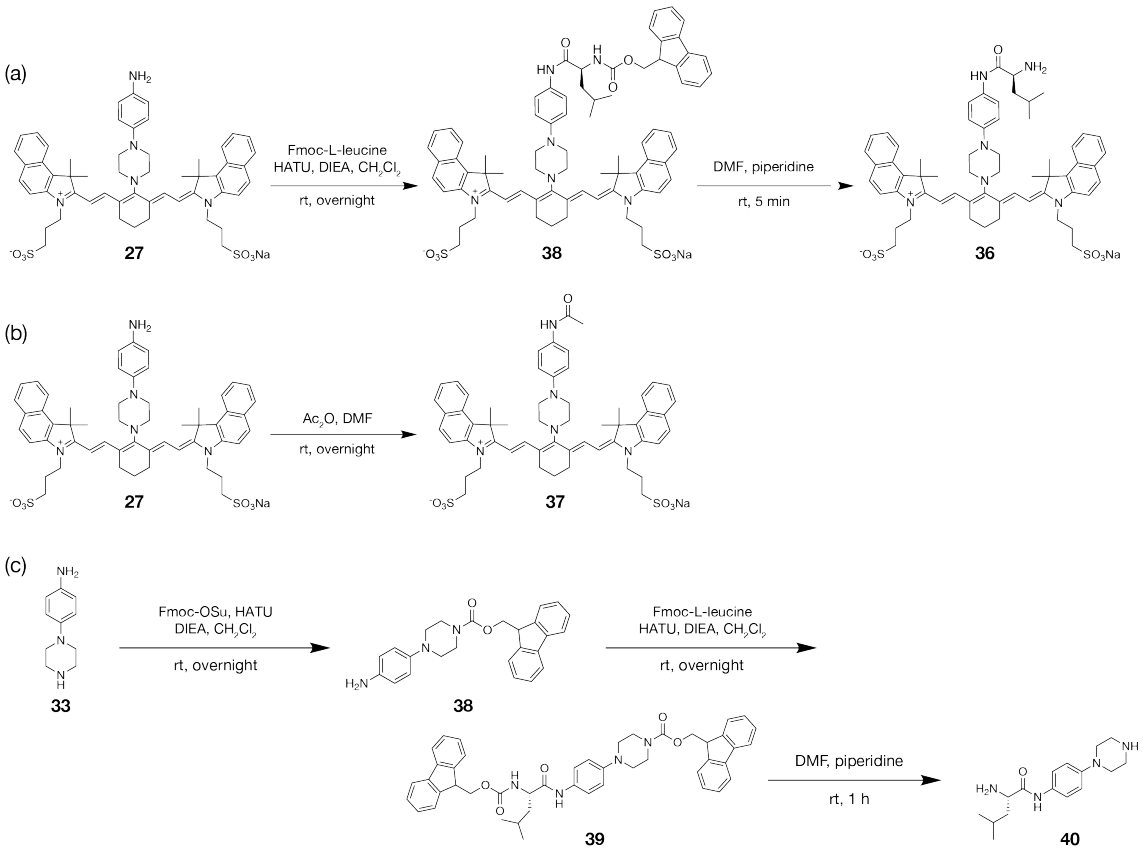


Figure 39. アリール基のパラ位にアミドを持つ色素の設計

アミド基をアリール基のパラ位に置換した色素の合成

色素 **36** は、**27** に CH_2Cl_2 中で Fmoc-L-leucine を縮合し、piperidine 存在下、DMF 中で Fmoc を脱保護して得た (**Scheme 4a**)。色素 **37** は **27** を DMF 中で Ac_2O を縮合することで得た (**Scheme 4b**)。また、**36** の部分構造の酵素反応性を検討するため、**40** を **33** から Fmoc 保護、Fmoc-L-leucine の縮合、Fmoc 脱保護の反応を経て合成した (**Scheme 4c**)。



Scheme 4. 36, 37, 40 の合成スキーム　(a) **36**, (b) **37**, (c) **40** の合成スキーム

Leucine を縮合した部分構造の酵素との反応性の検討

まず、Leucine が縮合した構造を有する **40** が酵素と反応するか調べた。化合物 **40** を終濃度 1 μM になるよう PBS に溶かし、その後 LAP を終濃度 1 μg/mL になるよう加え、吸収スペクトルを経時的に測定した。化合物 **40** は LAP 添加前、260 nm に吸収極大を示したが、LAP を添加すると吸収スペクトルが変化し、60 min 後には 245 nm に吸収極大がシフトした (**Figure 40a**)。一般に 4-nitroaniline のように電子供与性基と電子吸引性基が同じ共役系に置換した化合物は吸収極大が長波長側にシフトする。[79–81] 化合物 **40** は LAP によって加水分解されると 1-ピペリジニル基とアミノ基の二つの強い電子供与性基が置換した構造になり、4-nitroaniline の場合とは逆の現象によって、吸収極大が短波長側にシフトしたと考えられる。LAP 添加後 60 min における吸収スペクトルを **33** の吸収スペクトルと比較したところ、吸収極大波長が一致したことから、**40** は LAP によって加水分解され、**33** になったことが示唆された (**Figure 40b**)。

アミド基やアミノ基をアリール基パラ位にもつ色素の吸収スペクトルの比較

次に 4-アミノフェニル基を持つ **27** の吸収スペクトルを、*N*-アシル-4-アミノフェニル基を持つ **36, 37** の吸収スペクトルと比較した。溶媒として、水溶液中での吸収スペクトルを検討するために PB with 30% DMSO を、凝集が影響していないことを調べるために DMSO を用いた。

色素 **36, 37** は **27** と異なり、800 nm に吸収極大を示した (**Figure 41**)。これは *N*-アシル-4-アミノフェニル基のアシル基の電子吸引性によって交差共役が抑制されたためと考えられる。また、**36, 37** は PB with 30% DMSO もしくは DMSO を溶媒として用いたいずれの場合でも、同様の吸収スペクトルを示し、800 nm に吸収極大を示したことから、吸収スペクトルの違いは色素の凝集によるものではないことが示唆された (**Figure 42**)。色素 **37** に LAP を添加した検討は **37** の疎水性のために行うことができなかったが、パラ位にアミド基を持つ色素はパラ位にアミノ基を持つ色素と異なる吸収スペクトルを示したため、ペプチダーゼなどのアミド基に応答してスペクトルを変化させる色素として利用できる可能性が示された。

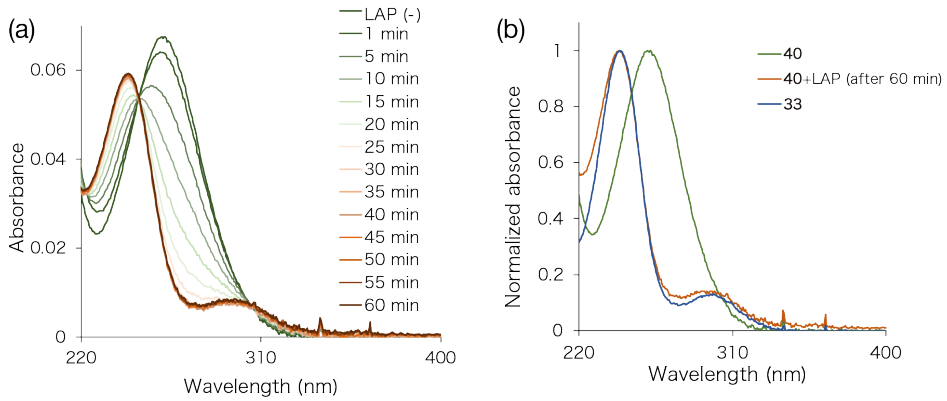


Figure 40. 33, 40 を PBS に溶かした溶液の LAP 存在下/非存在下における吸収スペクトル (a) LAP 添加前および添加後における **40** の吸収スペクトル, (b) **33, 40** と LAP 添加後 60 min における **40** の吸収スペクトル。**33, 40** の終濃度は 1–5 μM で、LAP の終濃度は約 1 μg/mL で測定し、(b) はそれぞれの吸収極大で規格化した。

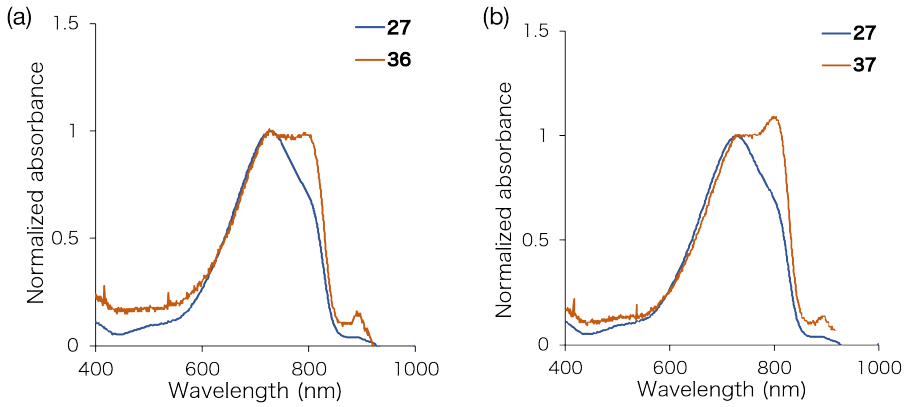


Figure 41. 27 と 36, 37 を PB with 30% DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル (a) **27** と **36**, (b) **27** と **37** の pH 7.0 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定し、700 nm 付近の吸収極大で規格化した。

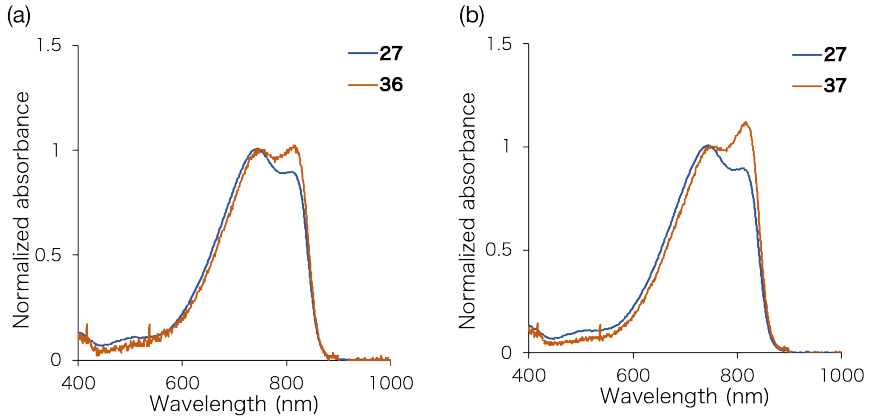


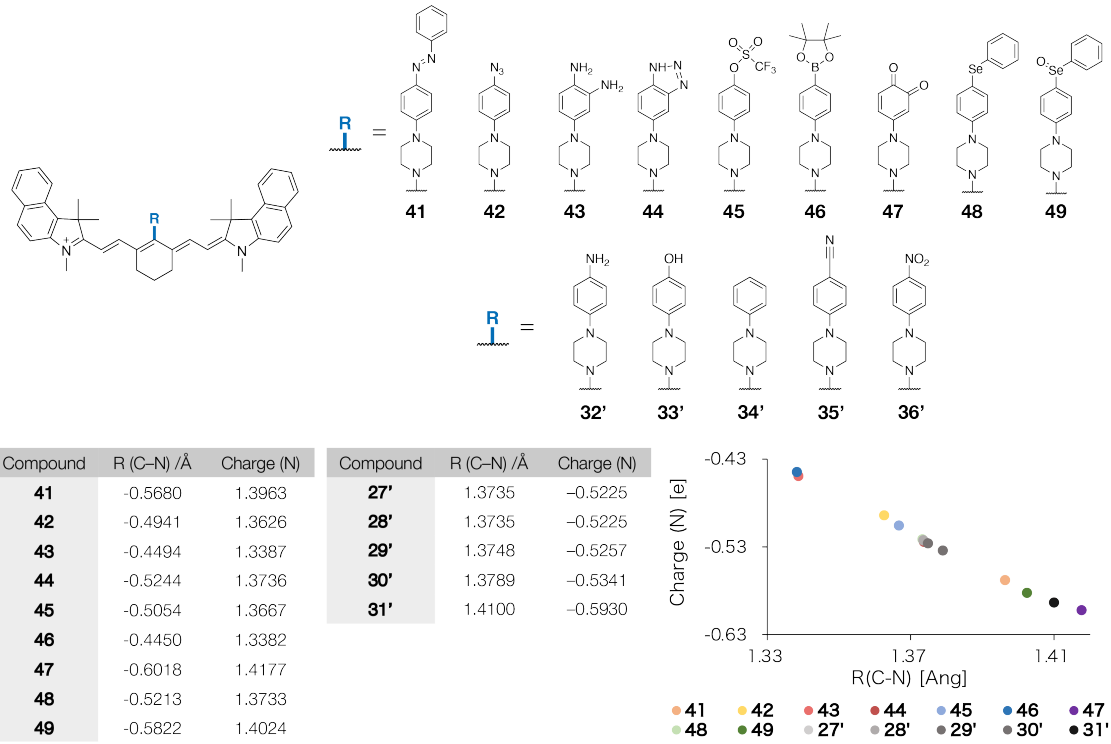
Figure 42. 27 と 36, 37 を DMSO に溶かした溶液の各 pH での吸収スペクトル (a) **27** と **36**, (b) **27** と **37** の DMSO 中での吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定し、700 nm 付近の吸収極大で規格化した。

DFT 計算によるアリール基を持つ色素の吸光特性の予測

Figure 38c–d の結果から、様々なアリール基を持つ色素の Charge (N)と、R (C–N)を計算すれば、色素の吸収スペクトルの予測が可能であると考えた。そこで、生体分子や酵素と反応することが報告されているアリール基をもつ **41–49** を設計し、DFT 計算によって Charge (N)や R (C–N)を調べた。また、**Figure 43** における **32'–36'**はそれぞれ **32–36** の側鎖のスルホプロピル基をメチル基に変換したものを示す。4-(フェニルアゾ)フェニル基を持つ **41** は azoreductase と反応して 4-アミノフェニル基を持つ **32'**になると考えられ、**47** のオルトキノン構造は、カテコールと tyrosinase の反応生成物であり、いずれの酵素もがん

細胞に高発現していることが報告されている。[82–85] また、硫化水素（H_2S）と一酸化窒素（NO）は生体内でシグナル分子として機能することが知られているが、4-アジドフェニル基を持つ **42** は H_2S と反応して 4-アミノフェニル基を持つ **32** になり、3,4-ジアミノフェニル基を持つ **43** は NO と反応して 5-ベンゾトリアゾリル基を持つ **44** になると考えられる。[86–89] 生体内で発生する ROS である O_2^-, H_2O_2, HClO と特異的に反応する官能基も報告されている。[90–92] トリフルオロメタンスルホキシ基を持つ **45** は O_2^-と反応して、ピナコラートボリル基を持つ **46** は H_2O_2 と反応して **33'**になると考えられ、4-(フェニルセレノ)フェニル基を持つ **48** は HClO と反応して 4-(フェニルセレニニル)フェニル基を持つ **49'**になると考えられる。DFT 計算により、これらの色素の最安定構造を調べ、1 位の N の負電荷（Charge (N)）と C-N 結合長（R (C–N)）を計算し、**41–49** がどのような吸収スペクトルを示すか予測した。

色素 **41–49** はアリール基の構造によって様々な Charge (N)と R (C–N)を示した（**Figure 43**)。中でもオルトキノン誘導体である **47** は、815 nm に大きな吸収極大を持つ **36** よりも Charge (N)が大きく、R (C-N)が長いため、**47** は 800 nm 付近に大きな吸収極大を持つことが予想される。また、HClO と反応することが報告されている 4-(フェニルセレノ)フェニル基を持つ **48**、azoreductase が認識する 4-(フェニルアゾ)フェニル基をもつ **41** は、それぞれ反応後の推定生成物である **49**, **27'**と比較して Charge (N)、R (C–N)の変化が大きく、ROS や酵素との反応で吸収・PA スペクトルが大きく変化する色素として利用できる可能性が示された。



Compound	R (C–N) /Å	Charge (N)
41	-0.5680	1.3963
42	-0.4941	1.3626
43	-0.4494	1.3387
44	-0.5244	1.3736
45	-0.5054	1.3667
46	-0.4450	1.3382
47	-0.6018	1.4177
48	-0.5213	1.3733
49	-0.5822	1.4024

Compound	R (C–N) /Å	Charge (N)
27'	1.3735	–0.5225
28'	1.3735	–0.5225
29'	1.3748	–0.5257
30'	1.3789	–0.5341
31'	1.4100	–0.5930

Figure 43. 様々なアリール基を 1-ピペラジニル基に導入した色素の計算による吸収スペクトル変化の予測

第 3 節では、吸収スペクトル変化のメカニズムを、1-ピペラジニル基の 4 位にアリール基を置換した色素に応用することを目指し、LAP に応答して PA シグナルが変化するアリール基の開発に向けた検討と、DFT 計算によるアリール基を持つ色素の吸収スペクトル変化の予測を行った。Leucine が縮合した **40** は LAP の添加によって、吸収スペクトルが経時的に変化し、60 min 後には **33** の吸収極大波長が一致したことから、**40** は LAP によって加水分解され、**33** になったことが示唆された。また、この **40** と同様に *N*-アシル-4-アミノフェニル基を持つ **36** や **37** の 815 nm の相対吸光度は、4-アミノフェニル基を持つ **27** と比較して大きかったため、アシル基の有無を制御することで、PA スペクトルが変化する色素を開発できる可能性が示された。また、DFT 計算の結果から、アリール基の置換基によって、Charge (N) や R (C–N) が変化することが示唆された。HClO と反応することが報告されている 4-(フェニルセレノ)フェニル基を持つ **48** や、azoreducatase が認識する 4-(フェニルアゾ)フェニル基をもつ **41** は、それぞれ反応の推定生成物である **49**, **27'**と比較して Charge (N)、R (C–N)の変化が大きかったため、ROS や酵素との反応で吸収・PA スペクトルが大きく変化する色素として利用できる可能性が示された。

まとめ

ジアザアルキル基を持つ色素の pH に応じた吸収スペクトル変化のメカニズムを明らかにするため、1,4-ジアザアルキル基の 4 位に様々な置換基を持つシアニン色素を設計し、分光学的特性や電子密度を検討した。4 位に様々な置換基を持つ **2**, **18**–**22** の吸収スペクトルを測定したところ、各色素の 815 nm の相対吸光度はそれぞれ異なり、4 位に電子吸引性基であるアミドや第 4 級アンモニウムを導入した **20**–**22** では 815 nm に大きな吸収極大が見られた。また、各色素の Charge (N)と、ピペリジニル基とポリメチン鎖をつなぐ C–N 結合の結合長（R (C–N)）を DFT 計算により求め、比較したところ、4 位に電子吸引性基を持つ、815 nm の相対吸光度が大きい色素ほど Charge (N)が大きく、R (C-N)が長かった。これらの結果から、吸収スペクトルは 4 位の置換基の電子吸引性に応じて変化し、4 位に強い電子吸引性基を持たない **18** などの色素は 1 位の窒素原子の電子対が C-N 結合間の二重結合の形成に寄与し、交差共役を起こすことで、短波長の 700 nm 付近に吸収極大を示すと考えられる。一方で、4 位に強い電子吸引性基を持つ **21** などの色素では、1 位の窒素原子の電子対による交差共役が抑制されて 800 nm に吸収極大を示したと考えられる。同様に、1,4-ジアザアルキル基を持つ **2** などの色素では pH 変化に応じた 4 位のプロトン化の変化で電子吸引性が変化し、吸収スペクトルが変化したと考えられる。また、4 位にアリール基が置換した 1-ピペラジニル基を持つ色素においては、アリール基の電子求引性の変化によって吸収スペクトルが変化することが示された。このスペクトル変化はアミド基を持つ色素でも見られたため、ペプチダーゼなどアミドをアミンに変換する酵素に反応して PA スペクトルが変化する色素が開発できる可能性が示された。

第 3 章　pH 応答性シアニン色素のがん PA イメージングへの応用

第 1 章で開発した pH 応答性色素は、pH に応じて吸収および PA スペクトルが変化する。一方で、色素自体は疾患部位への選択的な集積性を持たないため、病変部位に直接投与しなければ、疾患の状態を観察することは困難であり、例えば、がんの特定が難しい微小がんや転移がんの早期発見には利用できない。そこで第 3 章では、pH 応答性色素を用いて、静脈に投与することでもがんの観察が可能な PA イメージング剤の開発を目指した。

IgG 抗体などの特定の抗体は細胞膜のタンパク質を認識し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、弱酸性環境のリソソームに取り込まれる。[93] このため、pH に応じて吸収・PA スペクトルが変化する色素を、がん細胞のタンパク質を標的とする抗体に結合した抗体-色素複合体は、がん細胞の細胞膜のタンパク質に結合後、弱酸性環境のリソソームに取り込まれる (**Figure 44**)。そして、弱酸性に応答して変化した PA シグナルを検出すれば、がん細胞の選択的かつ高コントラストなイメージングが可能になると考えた。特に、開発した pH 応答性色素は低 pH に応じて 700 nm 付近での励起における PA シグナルが減少し、800 nm 付近での励起における PA シグナルが増加する色素であり、中性と酸性での極大値の比を算出すれば、色素の集積濃度に依存せず、腫瘍部位の pH を観察可能になると考えられる。[94,95]

ジアザアルキル基を持つ **2**, **3** に、抗体に結合させるためのカルボキシ基を導入した **50**, **51** を設計した (**Figure 45a**)。また、ジアザアルキル基を持たず pH 応答性がないと考えられる **52** も設計し、**50**, **51** と比較した(**Figure 45b**)。

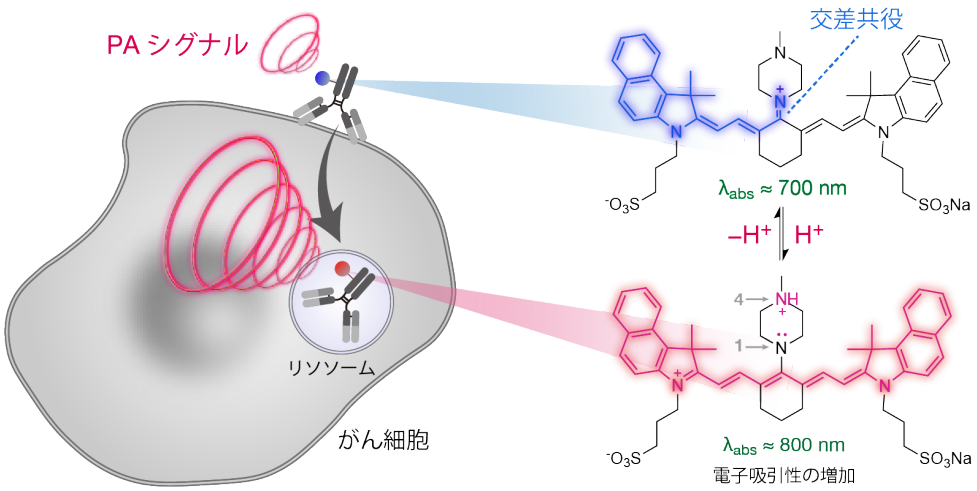


Figure 44. pH に応答して PA スペクトルが変化する色素を抗体に結合させた抗体-色素複合体によるがん細胞イメージングのコンセプト

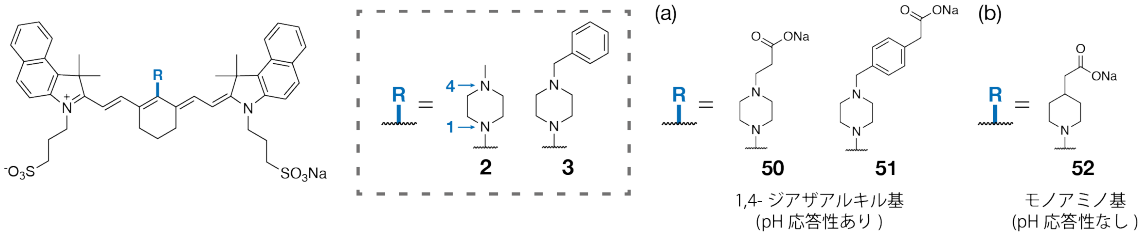
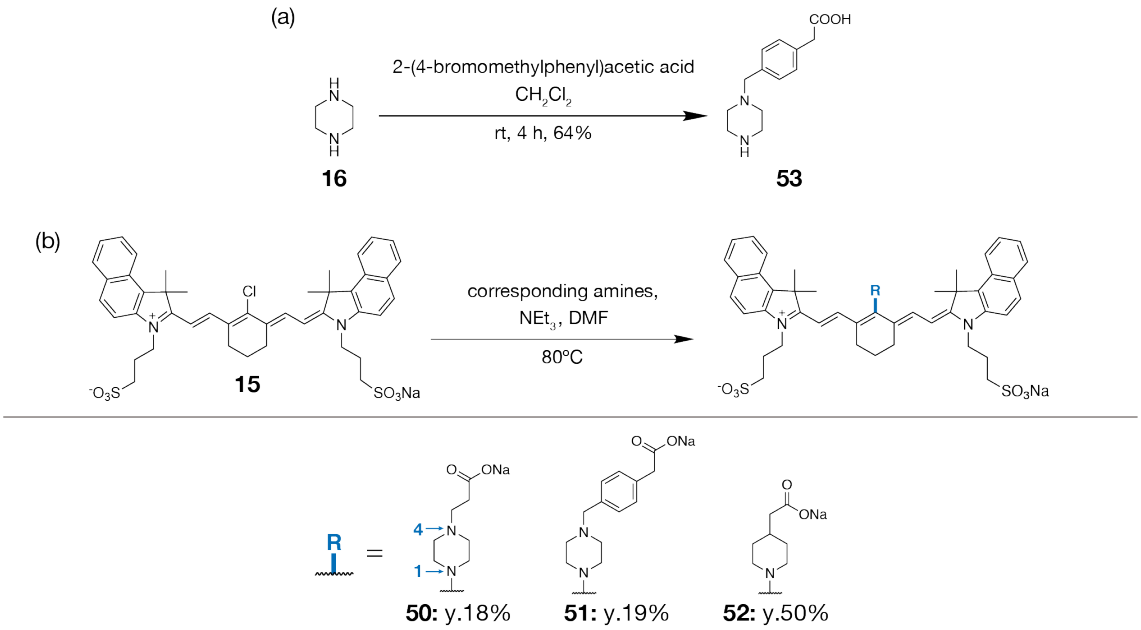


Figure 45. カルボキシ基を導入した色素の設計 (a) pH 応答性があると考えられる **50**, **51**、(b) pH 応答性がないと考えられる **52** の構造

第１節　抗体-pH 応答性色素複合体によるがん細胞 PA イメージング

カルボキシ基を導入した色素の合成

カルボキシ基を導入した **50–52** は以下のスキームに従って合成した (**Scheme 5**)。色素 **51** の前駆体である **53** は CH_2Cl_2 を溶媒として用い、piperazine (**16**) を 2-(4-bromomethylphenyl)acetic acid に求核反応させて得た (**Scheme 5a**)。クロロ基を持つ **15** に NEt_3 存在下、DMF を溶媒として用い、各アミンを反応させて **50–52** を合成した (**Scheme 5b**)。



Scheme 5. 50–52 の合成スキーム　(a) **51** の前駆体 **53**、(b) カルボキシ基を導入した **50–52** の合成スキーム

カルボキシ基を導入した色素の吸収スペクトル測定

カルボキシ基を導入した **50–52** の吸収スペクトルが pH に応じて変化をするかを検討するため、各色素を終濃度 1 μM となるよう溶媒に溶解し、pH 3–12 における吸収スペクトルを測定した (**Figure 46–47**)。溶媒には、水溶液中での光学特性を検討するために PB with 30% DMSO を、凝集が影響していないことを調べるために DMSO を用いた。DMSO のみを溶媒として用いる場合は、酸として TFA、塩基として NEt_3 を用いた。

1,4-ジアザアルキル基を持つ **50**, **51** の吸収スペクトルは、いずれも pH の低下に応じて吸収極大が 700 nm から 800 nm 付近にシフトし、吸光度が増大した（**Figure 46a–b**）。一方で、1,4-ジアザアルキル基を持たない **52** の吸収スペクトルは pH 変化に応答した吸収スペクトル変化を示さなかった（**Figure 46c**）。**50**, **51** は、DMSO を溶媒として用いた場合でも、pH の低下によって長波長側に吸収極大がシフトしたため、水溶液中でのスペクトル変化は凝集体の形成ではなく、色素のプロトン化状態の変化によるものであることが示唆された（**Figure 47**）。

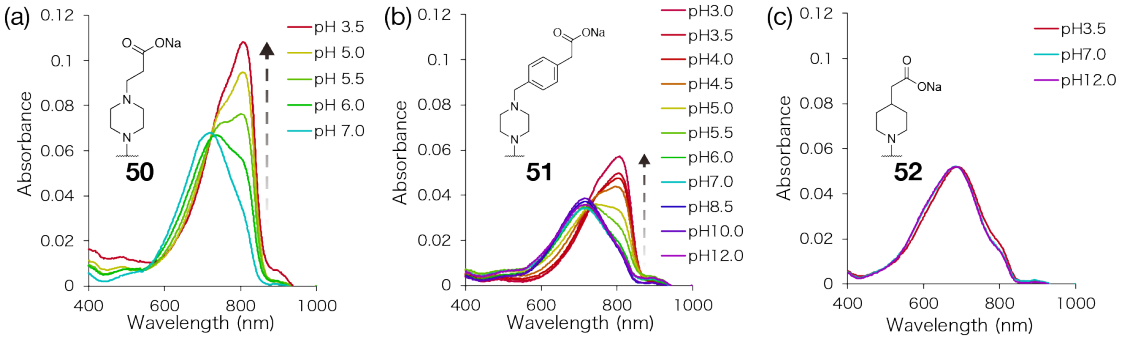


Figure 46. 50–52 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の pH 3–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

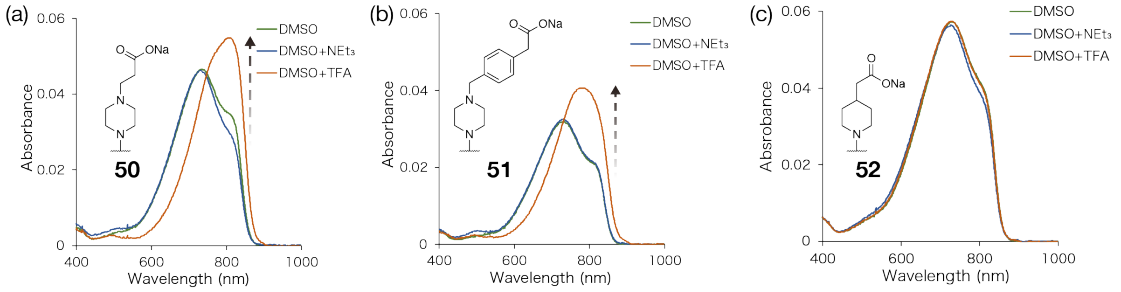


Figure 47. 50–52 の DMSO を溶媒とした用いた各 pH での吸収スペクトル　(a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の酸性または塩基性条件における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

カルボキシ基を導入した色素の蛍光スペクトル測定

色素の PA 特性は、蛍光と競合する過程である内部転換 (無輻射過程) の割合や吸収極大波長と蛍光極大波長の差を示すストークスシフトに影響する。そこで、**50–52** のストークスシフトやΦ_fを測定し、ICG と比較した。PB with 30% DMSO または DMSO に **50–52** を終濃度 1 μM となるよう溶解し、酸性から中性条件における蛍光スペクトルを測定した (**Figure 48–49**)。DMSO を溶媒として用いた場合には、酸として TFA を用いて pH に対する蛍光スペクトル変化を調べた。また、得られた吸収・蛍光スペクトルの結果から Abs_{max}、Em_{max}、Δλ、ε、ϕ_f を算出し、p*K*a とともに表にまとめた (**Table 4**)。

カルボキシ基を置換した **50**, **51** の蛍光スペクトルの極大値は、吸収スペクトルと同様に pH に応じて変化した (**Figure 48**)。しかし、**50**, **51** の吸収スペクトルは、酸性と中性で最小でも 84 nm の吸収極大波長のシフトが見られたのに対して、蛍光スペクトルでは、酸性と中性で最大でも 13 nm の蛍光極大波長のシフトしか観察されなかった。色素 **50–52** は中性条件で、酸性条件よりも大きなストークスシフトを示した。また、**50–52** の DMSO 中での蛍光量子収率 (8–13%) は、ICG の DMSO 中での蛍光量子収率 (13%)[96] と同等またはそれ以下であり、PA シグナルの発生効率が優れることが示唆された。

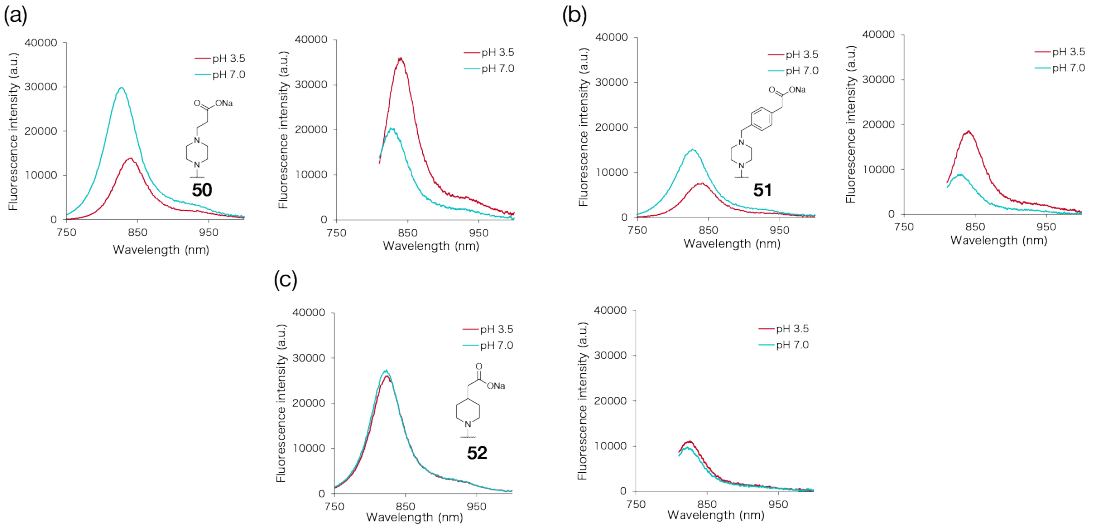


Figure 48. 50–52 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル (a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の pH 3.5 または 7.0 における蛍光スペクトル。励起光は 750 または 800 nm、色素の終濃度は 1 μM で測定した。

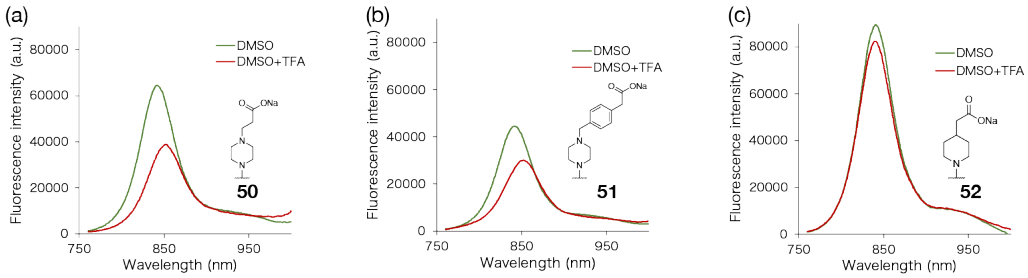


Figure 49. 50–52 の DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル　(a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の蛍光スペクトル。励起光は 700 nm、色素の終濃度は 1 μM で測定した。

Table 4. 50–52 の酸性・中性における光学特性

Compound	Abs_{max} (nm)[a]	Em_{max} (nm)[a]	Δλ (nm)[a]	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)[a]	ϕ_f[b]	p*K*a[a]
50 (neutral)	720	828	108	6.8×10^4	0.12	-
50 (acidic)	806	841	35	1.1×10^5	0.08	5.7
51 (neutral)	718	830	112	3.4×10^4	0.12	-
51 (acidic)	802	841	39	5.0×10^4	0.08	4.9
52 (neutral)	683	749	112	5.2×10^4	0.13	-

溶媒として a) PB with 50% DMSO、b) DMSO and DMSO with 1% TFA を用いた。

カルボキシ基を導入した色素の p*K*a の比較

色素 **50**, **51** の 800 nm 付近の吸光度の変化から p*K*a を算出したところ、**50** は 5.7, **51** は 4.9 であり、それぞれ **2**, **3** と同等の p*K*a を示した (**Figure 50**)。リソソームの pH は 4.5–4.8 であるので、**50**, **51** は生体の一般的な細胞外 pH 7.4 とリソソームの pH の間で吸収スペクトルが変化すると考えられる。[97]

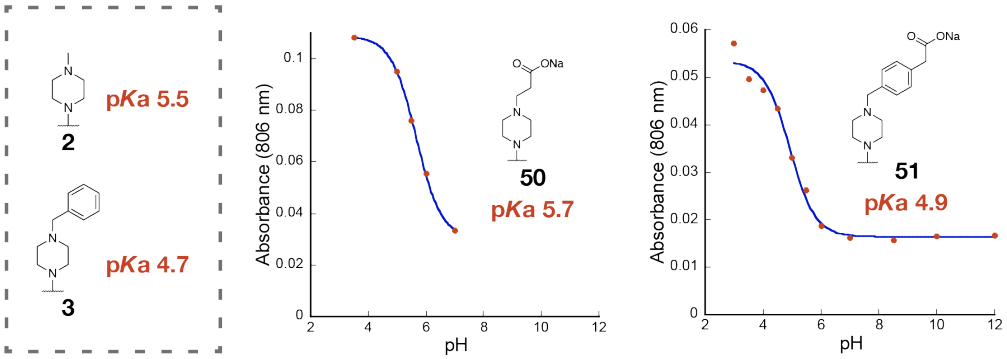
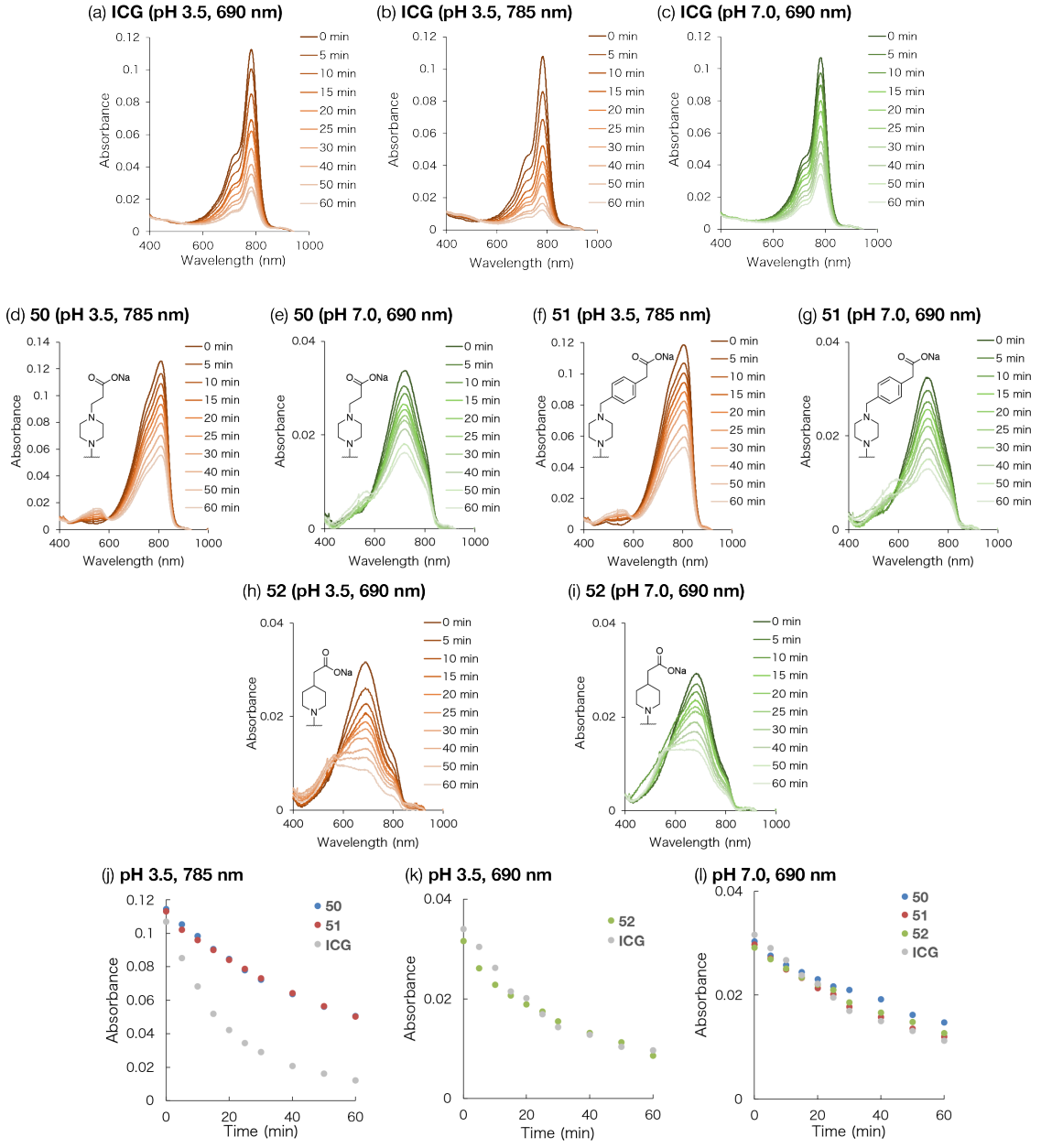


Figure 50. 50, 51 の p*K*a の比較　PB with 30% DMSO を溶媒とした場合の 806 nm の吸光度を pH の値に対してプロットし、Kaleida Graph (Synergy) で算出した。

カルボキシ基を導入した色素の安定性の検討

PA イメージングでは、PA 色素が溶媒分子や溶存酸素などと反応して分解し、シグナル強度が低下することが問題となる。また、光励起した色素から生じる ROS によっても色素が分解し、シグナル強度が低下する。[98] そこで、カルボキシ基を導入した **50–52** の光照射時、非照射時の安定性を検討した (**Figure 51–52**)。まず、PB with 30% DMSO に ICG を終濃度 1 μM となるよう溶解し、690 または 785 nm のレーザー光を照射して、pH 3.5 及び 7.0 における吸収スペクトルの変化を経時的に観察した (**Figure 51a–c**)。また、ICG の 690 または 785 nm の吸光度と同じになるよう、**50–52** を PB with 30% DMSO に溶解し、レーザー光を照射して、pH 3.5 及び 7.0 における吸収スペクトルの変化を経時的に観察した (**Figure 51d–i**)。色素 **52** は ICG の 785 nm との吸光度の差が大きいため、濃度差が小さくなるよう pH 3.5 でも 690 nm のレーザー光で検討した。得られた結果から近似曲線を引き、吸光度が半減するまでの時間（半減時間）を算出したところ、**50–52** はいずれの色素も ICG と同等、またはより長い半減時間を示した (**Figure 51m**)。特に **50, 51** の pH 3.5 における半減時間は ICG の 3–3.5 倍であり、ICG よりも高い光安定性を持つことが示された。これは、**50, 51** のピペラジン部位がプロトン化され、誘起効果によってポリメチン鎖の電子密度が低下し、ROS との反応性が低下したためだと考えられる。

次に、PB with 30% DMSO に ICG と **50–52** を終濃度 1 μM となるよう溶解し、暗所下で吸収スペクトルの変化を経時的に観察した (**Figure 52**)。pH に応答しない **52** は pH 3.5 において ICG よりも吸光度の減少が大きかったが、その他の条件では **50–52** は ICG と吸光度の減少幅が同等またはより小さく、ICG よりも安定性が高いことが示唆された。



(m)

Compound	pH 3.5 (785 nm)	pH 3.5 (690 nm)	pH 7.0 (690 nm)
50	48.7 min	-	60.4 min
51	51.2 min	-	44.1 min
52	-	29.9 min	50.5 min
ICG	14.7 min	24.5 min	36.5 min

吸光度が半減するまでの時間

Figure 51. 50–52, ICG の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の光安定性の検討　光照射 (10 mW/cm^2) による (a–c) ICG, (d–e) **50**, (f–g) **51**, (h–i) **52** の吸収スペクトル変化、 (j–l) 色素間での経時的な吸光度変化の比較、(m) 各色素の吸光度の半減時間

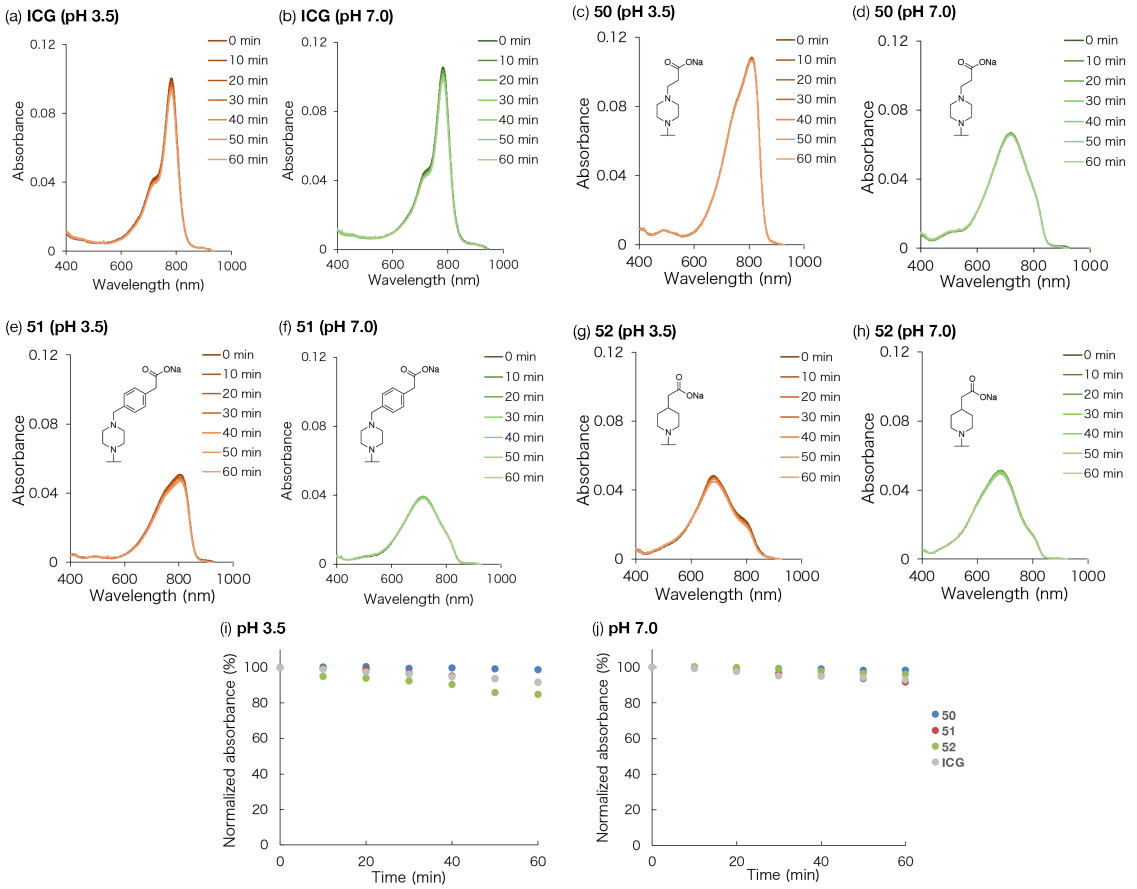


Figure 52. 50–52, ICG の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の暗所下安定性の検討　(a, b) ICG, (c, d) **50**, (e, f) **51**, (g, h) **52** の経時的な吸収スペクトル変化、 (I, j) 色素間での経時的な吸光度変化の比較

カルボキシ基を導入した色素の PA スペクトル測定

カルボキシ基を導入した **50**, **51** の PA スペクトルが pH に応じて変化するか検討するために、**Figure 15** の setup を用い、PB with 50% DMSO を溶媒として用いて、pH 3.5 及び 7.0 の PA スペクトルを測定した (**Figure 53**)。色素 **50**, **51** の PA スペクトルは吸収スペクトルと同様に pH に応じて変化した (**Figure 53a–b**)。ジアザアルキル基を持たない **52** の PA スペクトルは pH に応じて変化しなかった (**Figure 53c**)。

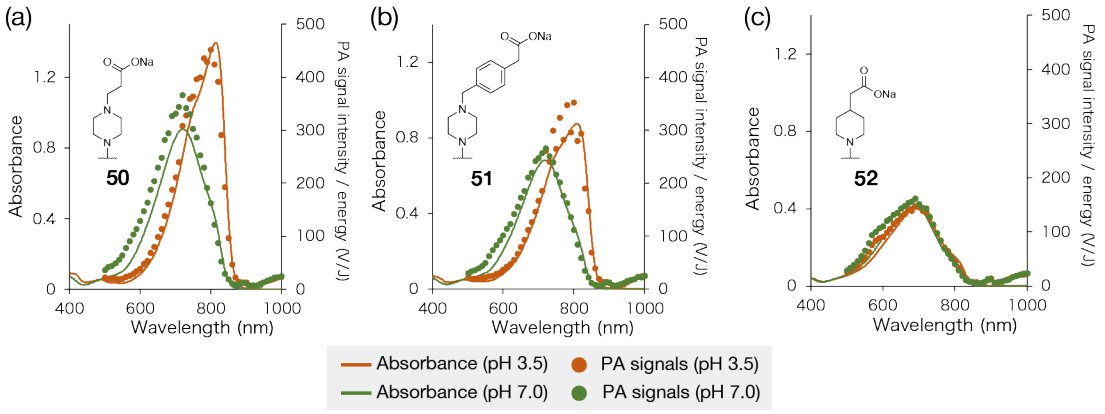


Figure 53. 50–52 の酸性・中性 pH における PA スペクトルと吸収スペクトル　色素の終濃度が 10 μM になるよう PB with 50% DMSO に溶かした pH 3.5 および 7.0 の溶液を測定した。(a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の PA スペクトルと吸収スペクトル。

カルボキシ基を導入した色素の PA シグナル強度と光学特性の比較

得られた PA シグナルと色素の光学特性の関係を検討するため、PA シグナル強度を吸光度に対してプロットし、近似曲線から相関係数を算出したところ、いずれの色素の相関係数も 0.98 以上であり、PA シグナル強度は吸光度に正に相関した (**Figure 54a**)。次に、得られた PA スペクトルの極大値を各色素の蛍光量子収率に対してプロットしたところ、ジアザアルキル基を持つ **4**, **6** とは異なり、PA スペクトルの極大値は蛍光量子収率に対して負に相関しなかった (**Figure 54b**)。次に、得られた PA スペクトルの極大値を各色素のストークスシフトに対してプロットしたところ、PA スペクトルの極大値はストークスシフトに対して正の相関が見られており、振動緩和による熱の発生への寄与が大きいことが示唆された (**Figure 54c**)。PA シグナル強度と吸光度のプロットにおいて、励起光の波長と PA シグナル強度を比較したところ、いずれの色素も短波長で励起した場合に大きい PA シグナル強度を示した (**Figure 55**)。励起された色素は、内部エネルギーを熱として放出しながら励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化 (振動緩和) し、その後、励起状態の安定構造から基底状態に遷移する過程で蛍光や熱 (内部転換) を放出する (**Figure 1**)。短波長で励起した場合のほうが、より高いエネルギー状態から、振動緩和による熱を放出して励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化するため、この熱が PA シグナルの増大に寄与したと考えられる (**Figure 55e**)。

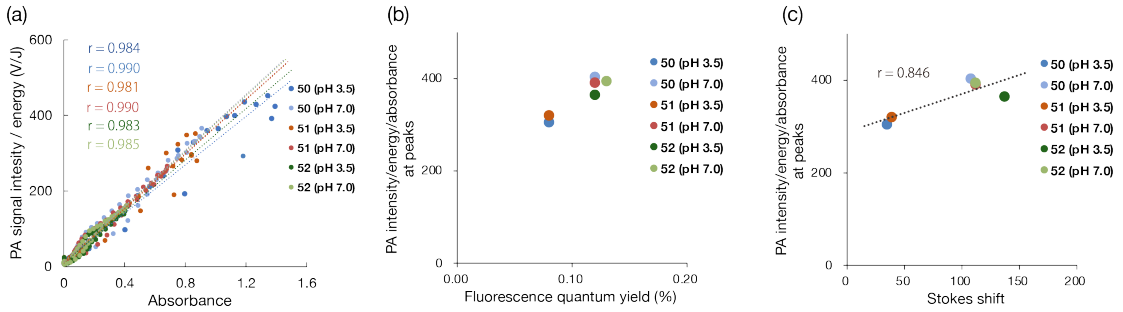


Figure 54. 50–52 の PA シグナル強度と光学特性の比較　(a) 色素の終濃度が 10 μM になるよう PB with 50% DMSO に溶かした溶液の PA シグナル強度と吸光度のプロット。(b)色素の終濃度が 10 μM になるよう PB with 50% DMSO に溶かした溶液の PA シグナルの極大値と蛍光量子収率のプロット。

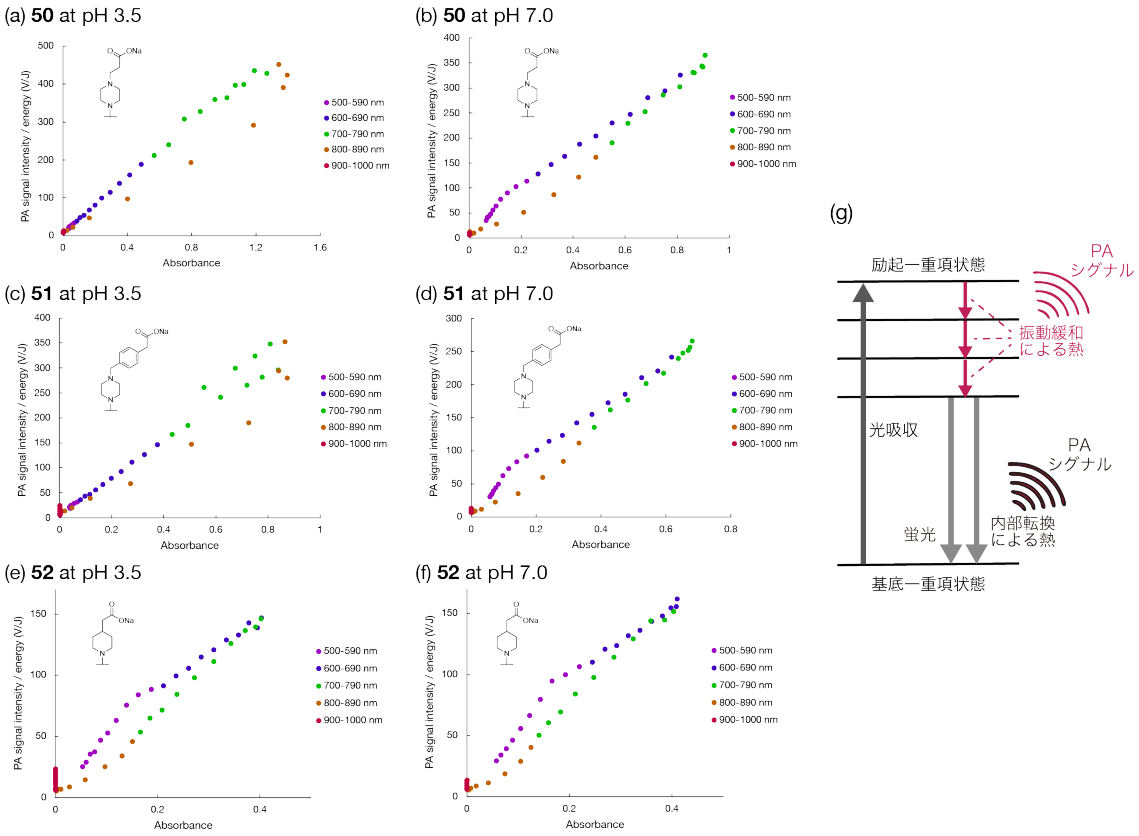


Figure 55. 50–52 の励起光の波長と PA シグナル強度のプロット　(a, b) **50**, (c, d) **51**, (e, f) **52** の pH3.5 または 7.0 の各吸光度と PA シグナル強度のプロット。(g) 振動緩和による PA シグナルの発生のダイアグラム。色素の終濃度は 10 μM で測定した。

カルボキシ基を導入した色素の細胞毒性の検討

次に、**50–52** の細胞毒性を、propidium iodide (PI) 染色で調べ、ICG と比較した。色素 **50–52** もしくは ICG を、胆管がん細胞である HuCCT-1 にそれぞれ終濃度 1 または 10 μM で添加し、24 時間インキュベート後に PI 染色で細胞毒性を比較した。終濃度 1 μM で **50–52** を添加した細胞の PI で染色された割合は、色素を添加していない細胞と比較して同程度であり、ICG を添加した細胞と比較すると低かった (**Figure 56**)。終濃度 10 μM で **50–52** を添加した細胞の PI で染色される割合は、色素を添加しなかった細胞や ICG を添加した細胞とほとんど変わらず 10–30%であり、**50–52** と ICG の細胞毒性は同程度であることが示唆された。

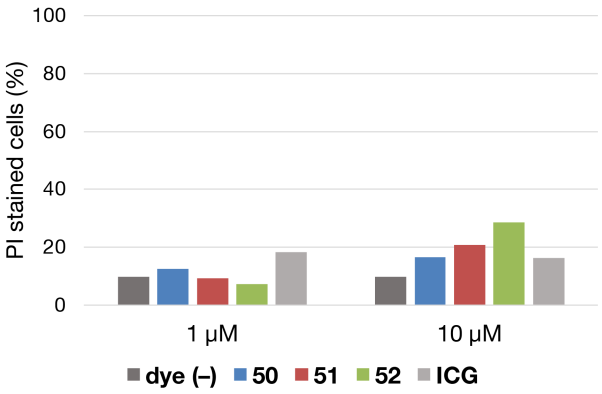
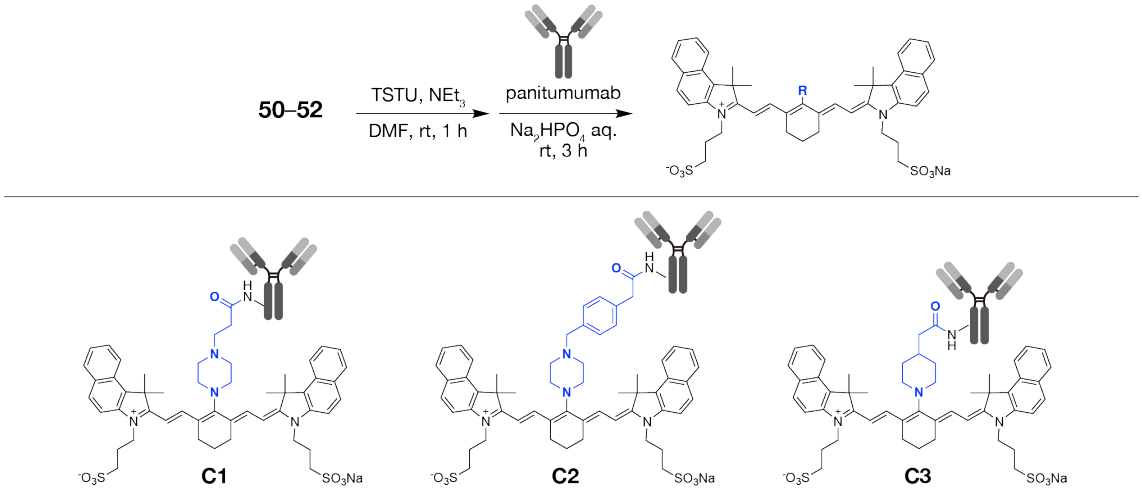


Figure 56. PI 染色による 50–52 と ICG の細胞毒性の比較

抗体-pH 応答性色素の作製

がん細胞の PA イメージングを行うために、**50–52** を非小細胞肺がんや頭頸部がんなどで高発現している epidermal growth factor receptor (EGFR) に結合する抗体 panitumumab に結合した、抗体-色素複合体 **C1–C3** を作製した (**Scheme 6**)。色素 **50–52** のカルボキシ基を NEt_3 存在下、DMF を溶媒として用い、*N,N,N′,N′*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate (TSTU) を加えることで反応性の高い succinimidyl ester にした。濃縮後、Na_2HPO_4 存在下、水を溶媒として panitumumab と反応させ、限外濾過によって精製し、**C1–C3** を得た。反応時間を長くすれば、より多くの色素を抗体に結合できるが、抗体の動態やタンパク質認識部位への結合による EGFR 認識能の低下が考えられるため、抗体一つに対して結合している色素の数を示す dye to antibody ratio (DAR) は 10 以下となるよう作製した。[99,100] 吸光測定と BCA assay で DAR を算出したところ、約 **C1**=3、**C2**=8、**C3**=5 であった。



Scheme 6. C1–C3 の作製スキーム

蛍光顕微鏡による抗体-pH 応答性色素の細胞内集積性の検討

抗体-色素複合体 C1–C3 が、がん細胞に取り込まれるか検討するため、C1–C3 を終濃度 5 μg/mL になるよう EGFR 高発現細胞の HuCCT-1 または EGFR 非発現細胞の NIH-3T3 に添加し、24 時間インキュベート後に蛍光顕微鏡で観察した (Figure 57)。抗体-色素複合体 C1–C3 を EGFR 高発現細胞の HuCCT-1 に添加した場合では、いずれの抗体-色素複合体を添加した細胞からも蛍光が観察され、抗体-色素複合体を添加していない細胞と比較して、細胞内の蛍光強度が有意に高かった (Figure 57a)。抗体-色素複合体 C1 は C2, C3 と比較すると細胞内の蛍光強度が低かったが、これは C1 の DAR が C2, C3 よりも低いためと考えられる。EGFR 非発現細胞の NIH-3T3 に添加した細胞では、いずれの抗体-色素複合体を添加した場合でも蛍光がほとんど観察されず、細胞内の蛍光強度は抗体-色素複合体を添加していない細胞と比較して同程度であった (Figure 57b)。よって、C1–C3 はいずれの色素も EGFR 選択的に細胞に内在化し、取り込まれることが示唆された。

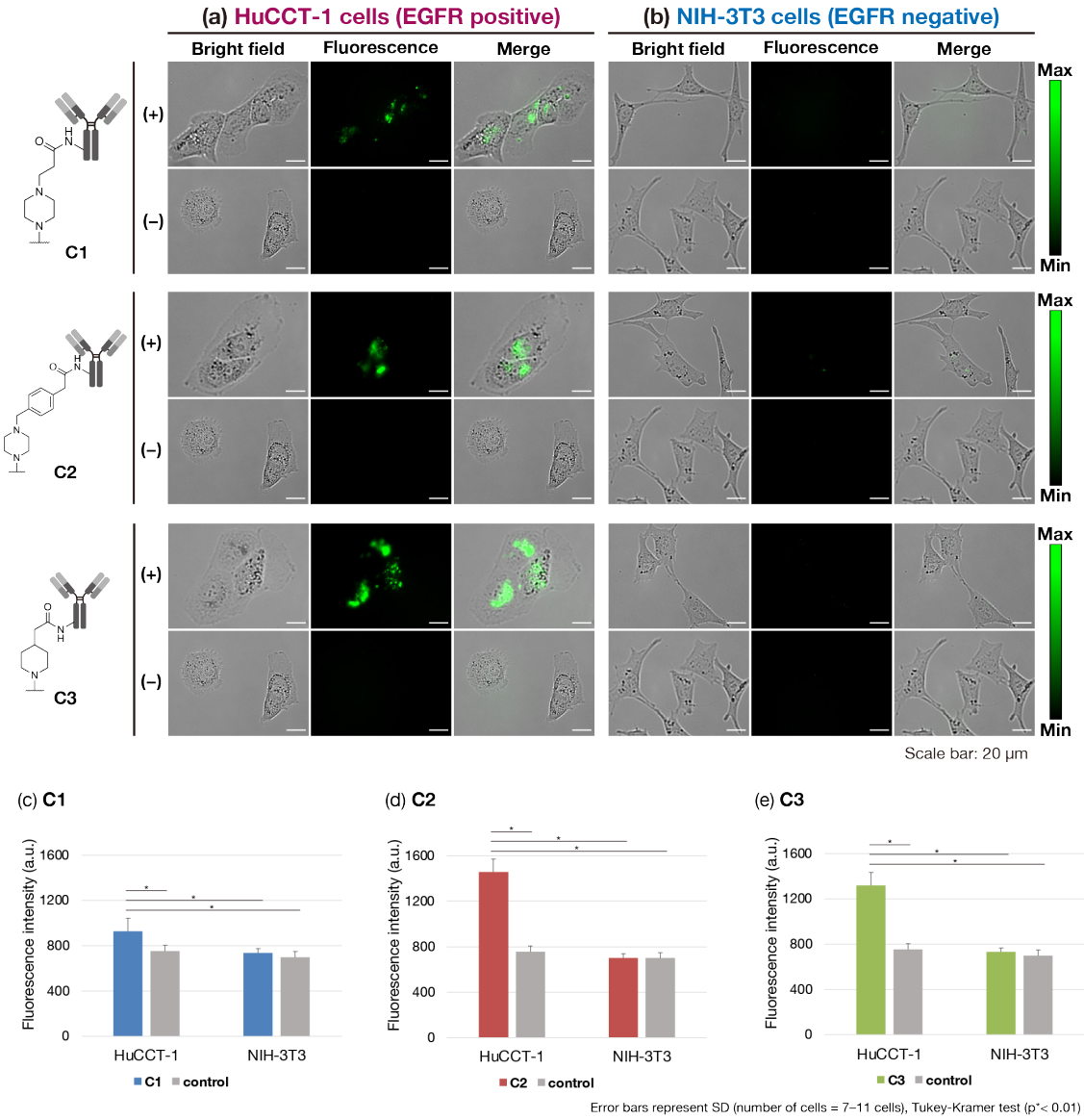


Figure 57. 蛍光顕微鏡による C1–C3 の細胞内集積性の検討　C1–C3 添加 24 時間後の (a) EGFR 高発現細胞の HuCCT-1, (b) EGFR 非発現細胞の NIH-3T3 の蛍光顕微鏡画像。(c) **C1**, (d) **C2**, (e) **C3** 添加後の HuCCT-1 及び NIH-3T3 における細胞内の蛍光強度の比較。Error bars represent SD (n = 7–11 cells), Tukey-Kramer test (p* < 0.01)。

抗体-pH 応答性色素によるがん細胞の PA イメージング

次に、抗体-色素複合体 **C1–C3** を培養がん細胞に添加し、光音響顕微鏡を用いて PA イメージングを行った。以下に、PA イメージングの概要を示す (**Figure 58**)。抗体-色素複合体を添加した培養がん細胞を、光音響波が減衰しないようにディッシュ下部が水に触れるよう設置した。**C1–C3** を添加した培養がん細胞にナノ秒パルス光を照射して、発生した PA シ

グナルを水槽内の超音波センサによって検出した。得られた PA シグナルを増幅後、デジタルオシロスコープで検出してコンピュータによって解析した。また、明視野画像は、ディッシュ上部の Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS) カメラによって撮影した。

抗体-色素複合体 **C1**–**C3** を終濃度 5 μg/mL で HuCCT-1 に添加し、24 時間インキュベート後に PA シグナルを観察した。細胞内での pH に応答した PA スペクトル変化を観察するため、675 と 800 nm の 2 つの励起波長で PA イメージングを行った。同一視野で 800 nm と 675 nm での励起における PA シグナルを測定し、その比を算出すれば細胞内の pH を測定できると考えられる。しかし、励起光による細胞への障害や、色素の退色の影響により同一視野での 2 つの励起波長による連続した PA シグナル測定が困難であったため、それぞれの波長における別視野での PA シグナル強度のみを観察した。

PA イメージングの結果、いずれの抗体-色素複合体においても、両励起波長で細胞内から PA シグナルが観察された (**Figure 59**)。pH 応答性色素を結合させた **C1**, **C2** では 800 nm で励起した場合のほうが 675 nm で励起した場合よりも、より強い PA シグナルが観察された。一方で、pH 非応答性色素を結合させた **C3** では、**C1**, **C2** とは異なり 675 nm で励起した場合のほうが 800 nm で励起した場合よりも、より強い PA シグナルが観察された。次に、HuCCT-1 以外の EGFR 高発現細胞として MDA-MB-231 に **C1**–**C3** を終濃度 5 μg/mL で添加して PA イメージングを行ったところ、HuCCT-1 の結果と同様に、**C1**, **C2** を添加した細胞では 800 nm で励起した場合のほうが強い PA シグナルが観察されたが、**C3** を添加した細胞では 675 nm で励起した場合のほうが強い PA シグナルが観察された (**Figure 60**)。抗体-色素複合体 **C1**, **C2** に結合している色素 **50**, **51** は酸性において 800 nm 付近に吸収・PA スペクトルの極大値がシフトする (**Figure 48**)。よって、**C1**, **C2** はがん細胞に内在化後、弱酸性環境のリソソームに取り込まれ、PA スペクトルが変化した可能性が示された。

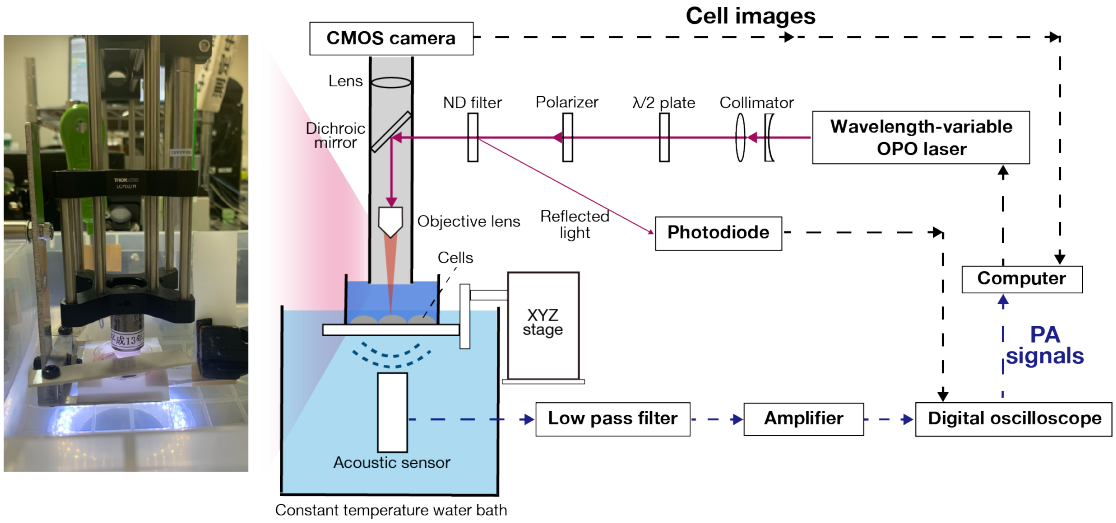


Figure 58. PA イメージングのための setup

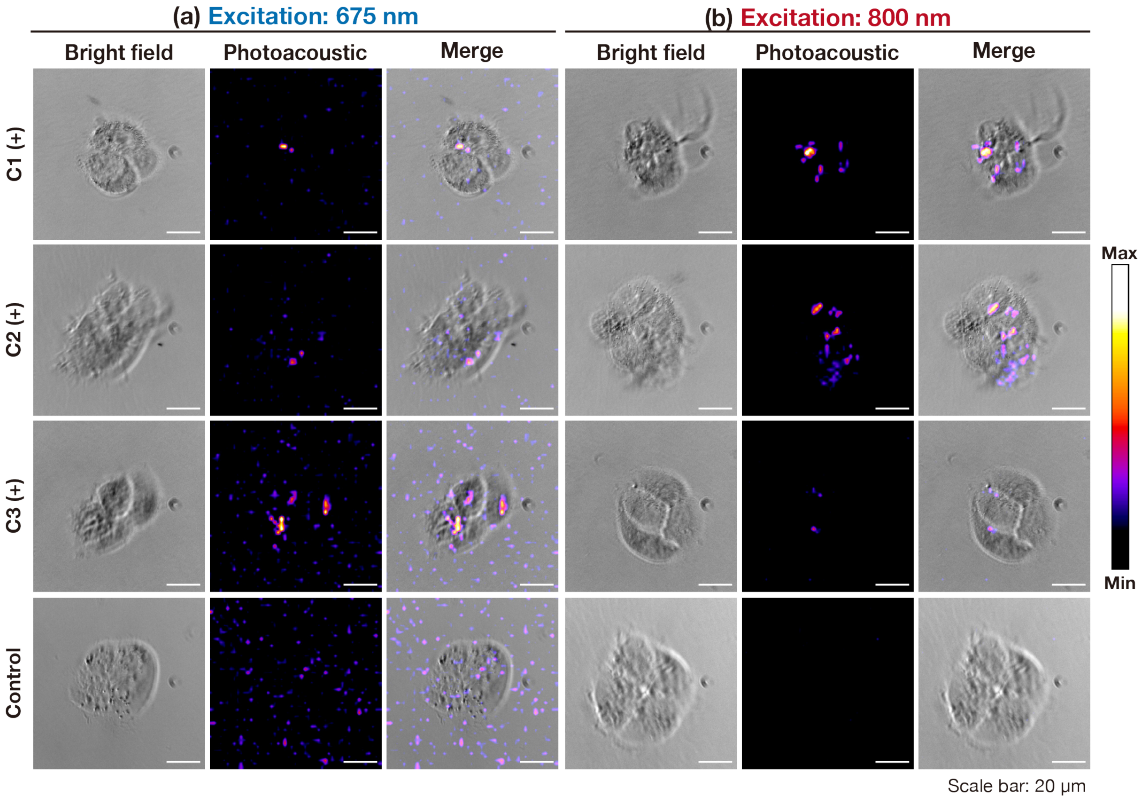


Figure 59. C1–C3 を添加した HuCCT-1 細胞の PA イメージング (a) 675 nm, (b) 800 nm の励起光による C1–C3 添加 24 時間後および C1–C3 非添加の HuCCT-1 の PA イメージング

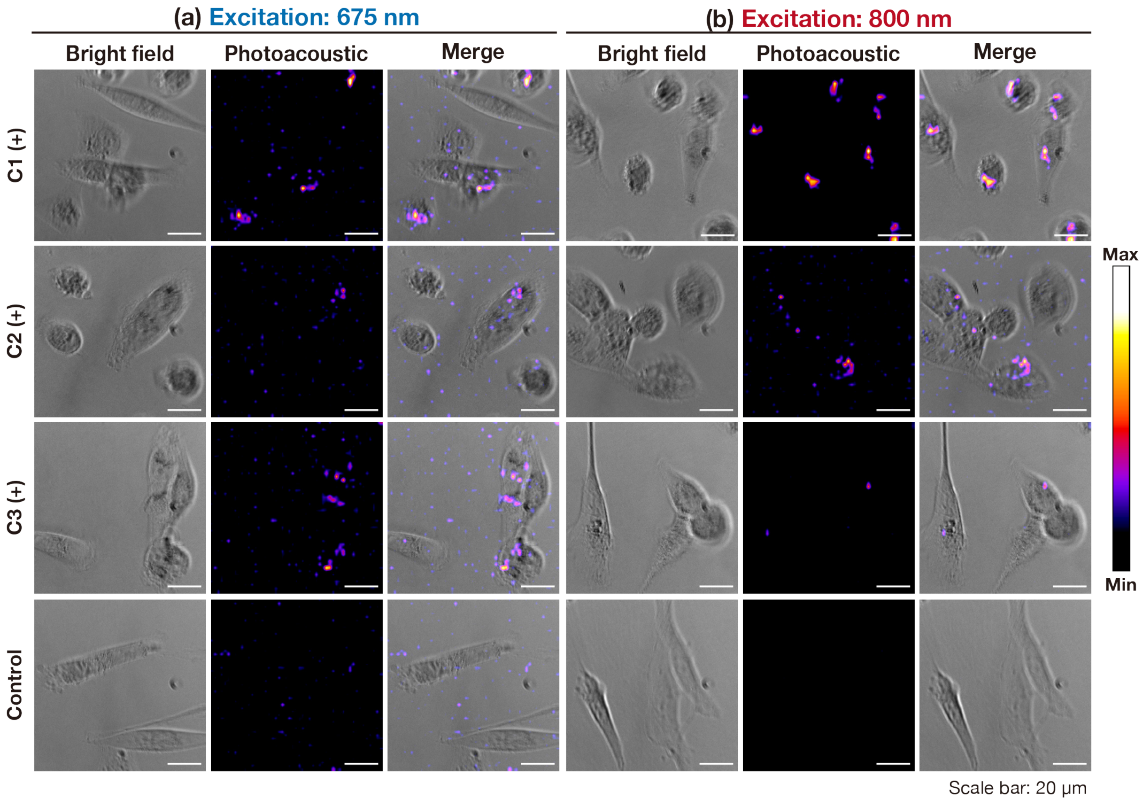


Figure 60. C1–C3 を添加した MDA-MB-231 細胞の PA イメージング (a) 675 nm, (b) 800 nm の励起光による **C1–C3** 添加 24 時間後および **C1–C3** 非添加の MDA-MB-231 の PA 画像。

第 1 節の結果から、がんの PA イメージングを行うために、カルボキシ基をもつ pH 応答性の **50**, **51** を開発した。色素 **50**, **51** は第 1 章で開発した **1–4** と同様の吸光及び蛍光、P A 特性を示し、また、**50**, **51** の光照射時、光非照射時における安定性は ICG と比較して優れていた。がん細胞のイメージングを行うために **50**, **51** を抗体と結合した抗体-色素複合体 **C1–C3** はがん細胞の EGFR 選択的に取り込まれることが示された。**C1–C3** による培養がん細胞での PA イメージングを行ったところ、同一視野での PA シグナル比は算出できなかったたが、**C1–C3** を添加した EGFR 高発現の HuCCT-1, A431 は 800 nm で励起した場合のほうが、675 nm で励起した場合よりも強い PA シグナルが観察された。よって、**C1–C3** はリソソームに取り込まれ、弱酸性の pH に応答し PA スペクトルが変化した可能性が示された。

第２節　生体における PA イメージングのための小分子ペプチド-pH 応答性色素複合体の検討

抗体-色素複合体 **C1–C2** は培養がん細胞のリソソームに取り込まれ、リソソームの弱酸性 pH に応答して PA スペクトルが変化することが示唆された。そこで、**C1** と **C2** を用いて腫瘍が観察できるか検討するため、**C1** または **C2** 100 μg を、HuCCT-1 を皮下移植した担がんマウスに静脈投与して 24 時間後に蛍光イメージングを行った。抗体-色素複合体 **C1–C2** を投与したマウスからの蛍光を観察したところ、腫瘍から色素由来の蛍光は観察されず、主に肝臓や腸付近から色素由来の蛍光が観察された（**Figure 61**）。**C1**, **C2** を投与しても腫瘍から蛍光が観察されなかった要因として、**50**, **51** が水溶液中で panitumumab とアミド結合をうまく形成せず、疎水性相互作用による非共有結合を介して抗体に付加していた可能性が考えられた。この場合、マウスに投与しても、色素が血中で遊離するため、腫瘍に集積しない。この原因として、**50–52** の水溶液中での高い凝集性が挙げられる。色素 **50–52** は DMSO 濃度が 30%未満の水溶液中では凝集体に由来すると考えられる吸収スペクトルを示したことから、水溶液中で疎水性相互作用を起こしやすい化合物であると考えられる（**Figure 62**）。抗体と色素を結合させる時に、色素の疎水性相互作用を抑制するために有機溶媒の濃度を上げれば、単量体の色素と抗体を反応させることができると考えられるが、高濃度の有機溶媒は抗体のコンフォメーション変化を起こし、抗体の活性に影響すると考えられる。[101,102] そこで第 2 節では、抗体の代わりに、有機溶媒に溶解しても活性が変化しないと考えられる小分子ペプチドと、色素を結合させた小分子-色素複合体を作製し、検討を行った（**Figure 63a**）。

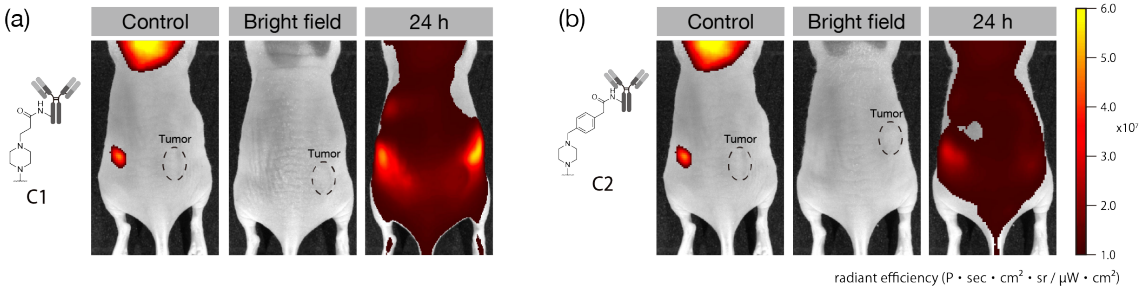


Figure 61. C1, C2 を投与した担がんマウスの蛍光イメージング　(a) **C1**, (b) **C2** を尾静脈投与して 24 時間後にマウスの蛍光画像。脇腹から観察されている蛍光は肝臓や胆汁が排泄された腸に由来すると考えられる。

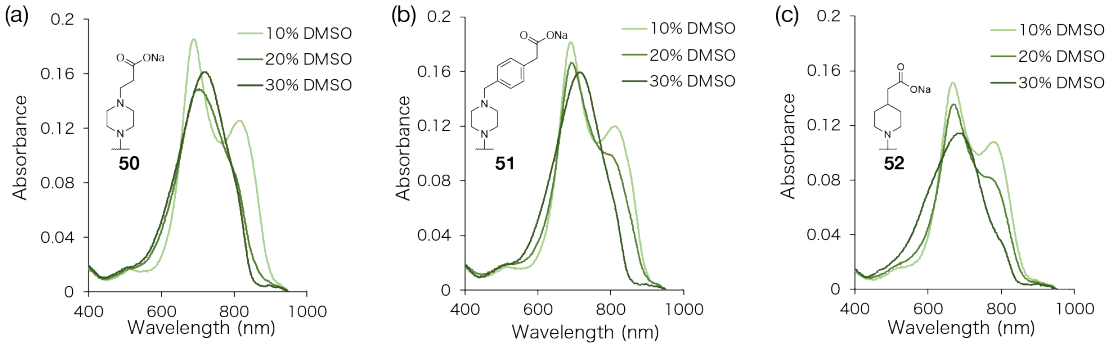


Figure 62. 50–52 の PB with 10–30% DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **50**, (b) **51**, (c) **52** の pH 7.0 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 10 μM で測定した。

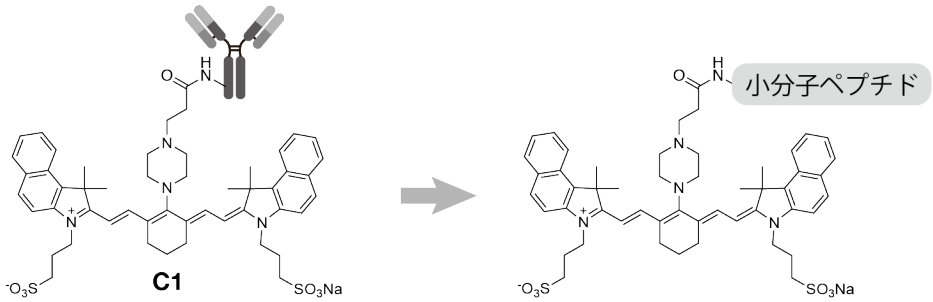
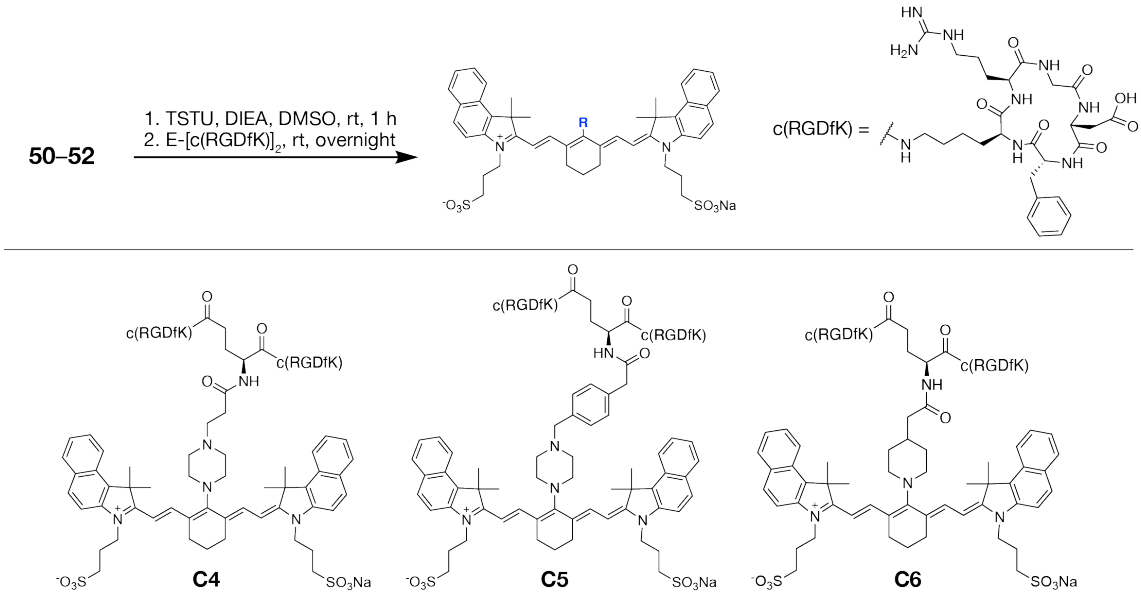


Figure 63. *In vivo* での PA イメージングのための小分子-色素複合体の設計

RGD-pH 応答性色素複合体の作製

小分子ペプチドとして RGD ペプチドを用いた。RGD ペプチドは arginine、glycine、aspartic acid で構成されるアミノ酸配列を持つペプチドであり、細胞の遊走に関与し、特定のがん細胞で高発現する integrin αvβ3 と結合することが知られている。[103]RGD ペプチドの立体構造が固定された環状の RGD ペプチドは通常の RGD ペプチドよりも integrin αvβ3 との結合性が高く、がん細胞に集積する抗がん剤や、腫瘍を観察するための PET イメージング剤に利用されている。[104,105] また、多価の環状 RGD ペプチドは 1 価の環状ペプチドよりも integrin αvβ3 との親和性が向上することが報告されているため [106]、**50–52** に 2 価の RGD ペプチドを結合させた RGD-色素複合体 **C4–C6** を作製し、PA イメージングを行った (**Scheme 7**)。

RGD-色素複合体 **C4–C6** はカルボキシ基を NEt_3 存在下、DMSO を溶媒として TSTU を反応させて活性化し、その後 DMSO 中でアスパラギン酸に 2 価の環状 RGD ペプチドが結合した E-[c(RGDfK)]$_2$ と反応させて合成した。



Scheme 7. C4–C6 の作製スキーム

RGD-pH 応答性色素複合体の吸収スペクトル測定

RGD-色素複合体 **C4–C6** の吸収スペクトルが pH に応じて変化をするか検討するため、各色素を終濃度 1 μM となるよう PB with 30% DMSO に溶解し、pH 3.5 と 7.0 における吸収スペクトルを測定した (**Figure 9**)。

RGD-色素複合体 **C4**, **C5** は **50**, **51** と同様に低 pH に応じて 800 nm 付近に吸収極大がシフトし、吸光度が増加した (**Figure 64a–b**)。一方、**C6** は **52** と同様に pH に応じた吸収スペクトル変化は観察されなかった (**Figure 64c**)。このことから、**50**, **51** のカルボキシ基にペプチドを結合させても、pH に応じた吸収スペクトルの変化は維持されることが示唆された。

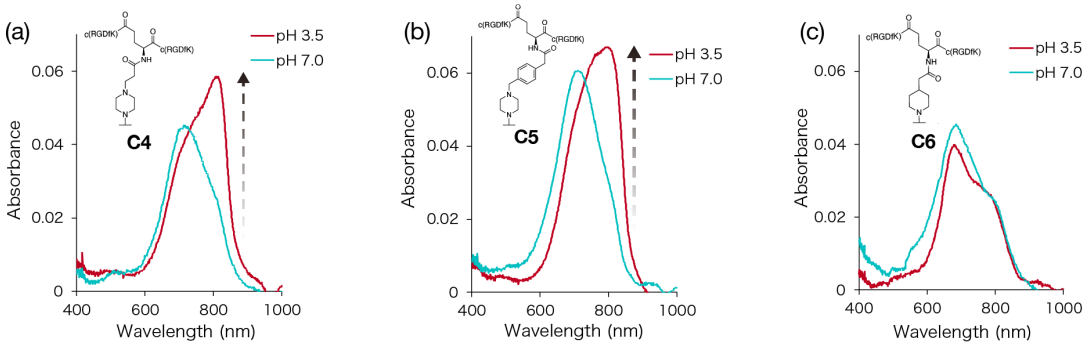


Figure 64. C4–C6 を PB with 30% DMSO に溶かした溶液の吸収スペクトル　(a) **C4**, (b) **C5**, (c) **C6** の pH3.5 及び 7.0 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

蛍光顕微鏡による RGD-pH 応答性色素複合体の細胞集積性の検討

次に、作製した **C4–C6** ががん細胞に取り込まれるか検討するため、終濃度 5 μg/mL で integrin αvβ3 高発現細胞の U87MG に添加し、24 時間インキュベート後、蛍光顕微鏡で観察した。**C4–C6** を添加したいずれの細胞からも色素由来の蛍光が観察された。また、抗体-色素複合体を添加していない細胞と比較して、細胞内の蛍光強度が高かったため、**C4–C6** ががん細胞に取り込まれることが示唆された（**Figure 65**）。

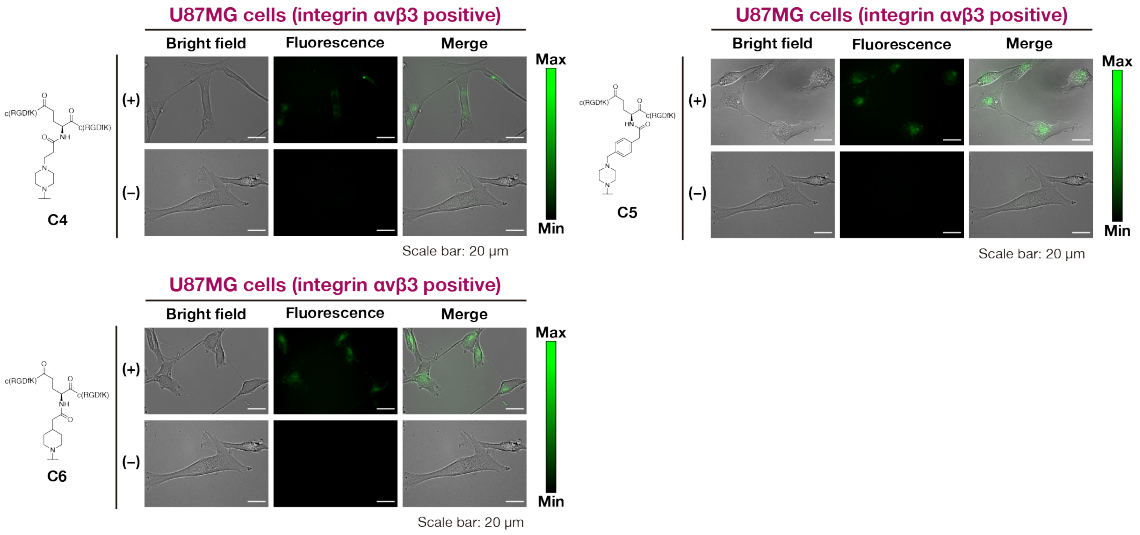


Figure 65. 蛍光顕微鏡による C4–C6 の U87MG への集積性の検討　**C4–C6** を添加して 24 時間後および **C4–C6** 非添加の U87MG の蛍光画像

RGD-pH 応答性色素複合体による U87MG の PA イメージング

Figure 58 に示した setup を用いて、**C4–C6** 添加後の培養がん細胞の PA イメージングを行った。pH 応答性色素が結合した **C4**, **C5** は細胞内のリソソームに取り込まれた場合、リソソームの酸性環境で極大波長が 700 nm から 800 nm にシフトすると考えられる (**Figure 46**)。細胞内での pH に応答した PA シグナル変化を観察するため、675 nm と 800 nm の 2 つの励起波長により別視野での PA イメージングを行ったところ、両励起波長において細胞内から PA シグナルが観測された (**Figure 66**)。**C4**, **C5** はリソソームの pH に応答して 800 nm での励起により強い PA シグナルを発すると考えられたが、**C4, C5** を添加した細胞は、非 pH 応答性色素が結合した **C6** を添加した細胞と同様に、いずれも 800 nm での励起による PA シグナルは弱く、675 nm での励起により強い PA シグナルが観測されたため、**C4**, **C5** はリソソームへの取り込みが十分でないことが示唆された。RGD ペプチドに別の蛍光色素を結合させた検討では、RGD-色素複合体が integrin αvβ3 に結合してリソソームに取り込まれた後、リソソームを脱出し、細胞質へ色素が分布することが報告されている。[107,108] この検討は蛍光顕微鏡による観察のみであり、RGD-色素複合体の詳細な細胞内分布は解明されていないが、**C4**, **C5** を添加した細胞が、675 nm の励起により強い PA シグナルが観察されたことから、**C4**, **C5** は細胞質に分布した可能性がある。以上より、リソソームの低 pH を利用したがん細胞の PA イメージングには、RGD-色素複合体よりも抗体-色素複合体のほうが適することが示唆された。

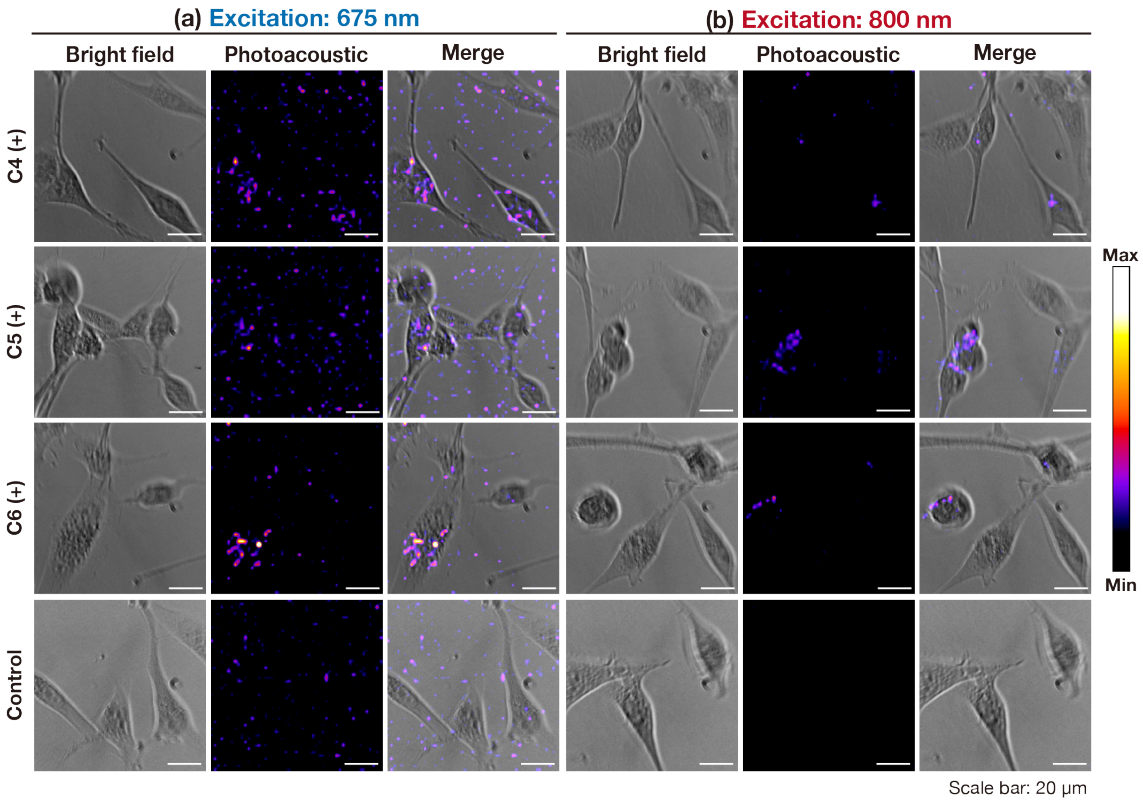


Figure 66.　C4–C6 を添加した U87MG の PA イメージング　(a) 675 nm, (b) 800 nm の励起光による **C4–C6** 添加 24 時間後および **C4–C6** 非添加の U87MG の PA イメージング

第 2 節では、腫瘍の PA イメージングを目指し、有機溶媒中で色素と結合できる RGD ペプチドを用いた RGD-色素複合体 **C4–C6** を開発した。**50–52** を結合した **C4**, **C5** は **50**, **51** と同様に pH に応じて吸収および PA スペクトルが変化し、RGD ペプチドを結合しても pH 応答性が維持されることが示された。また、**C4–C6** は integrin αvβ3 を発現するがん細胞に取り込まれ、細胞内から PA シグナルが観察された。しかし、**50**, **51** を結合した **C4**, **C5** は細胞内のリソソームに取り込まれた場合、リソソームの酸性環境に応答して極大波長が 800 nm にシフトすると考えられたが、**C4**, **C5** を添加したがん細胞では、675 nm のほうが 800 nm で励起した場合よりも強い PA シグナルが観察されたため、**C4**, **C5** の一部はリソソーム以外の場所に分布したことが示唆された。これらの結果から、RGD-色素複合体はリソソームの低 pH を利用したがん細胞の PA イメージングには適さないことが示唆された。

第３節　生体における PA イメージングのための抗体-高水溶性色素複合体の検討

RGD-色素複合体 **C4–C6** は培養がん細胞に取り込まれたが、リソソームだけではなく、細胞質に分布するため、pH 応答性 PA イメージング剤には適さないことが示唆された。そこで次に、色素の芳香環部位に水溶性官能基を導入した、水溶液中でも抗体と反応することが可能な色素を設計し、この抗体-高水溶性色素複合体を用いた腫瘍の PA イメージングを目指した (**Figure 67**)。

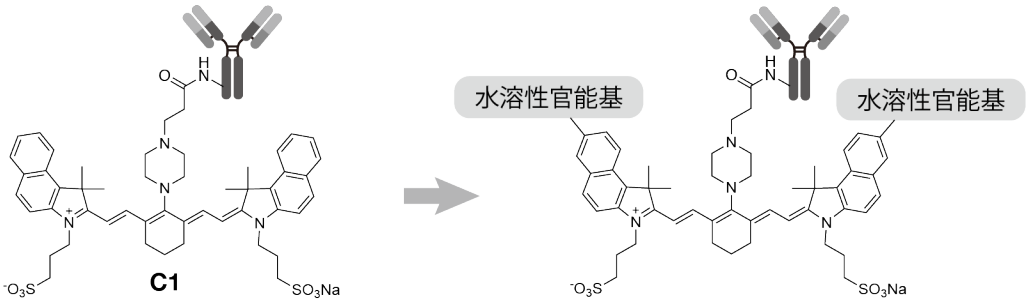


Figure 67. ***In vivo*** **での PA イメージングのための水溶性の向上を狙った色素を用いた抗体-色素複合体の設計**

高水溶性 pH 応答性色素の設計と合成

シアニン色素の芳香環部位へのスルホ基の導入は、色素の単量体の光学特性にほとんど影響を与えず[109,110]、水溶液中での凝集性を低下させることが知られている。[111,112] そこで本研究では、水溶性の向上を狙った色素によって生体の PA イメージングが可能であるか検討するため、**50–52** の 1*H*-benz[e]indole 部位に水溶性官能基であるスルホ基を導入した **54–56** を設計した (**Figure 68**)。**54–56** の 1*H*-benz[e]indole 誘導体 **58** は、**11** を濃硫酸でスルホン化し、カリウム塩にした後、acetonitrile (MeCN) 中で 1,3-propanesultone と反応させて合成した (**Scheme 8a**)。その後、**58** を **14** と MeOH を溶媒として反応させて、クロロ基をもつ **59** を合成した (**Scheme 8b**)。**59** に NEt_3 存在下、DMF を溶媒として各アミンを反応させ、**54–56** を得た (**Scheme 8c**)。

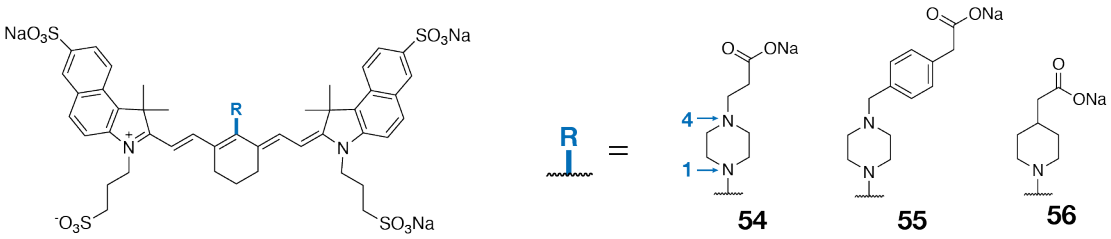
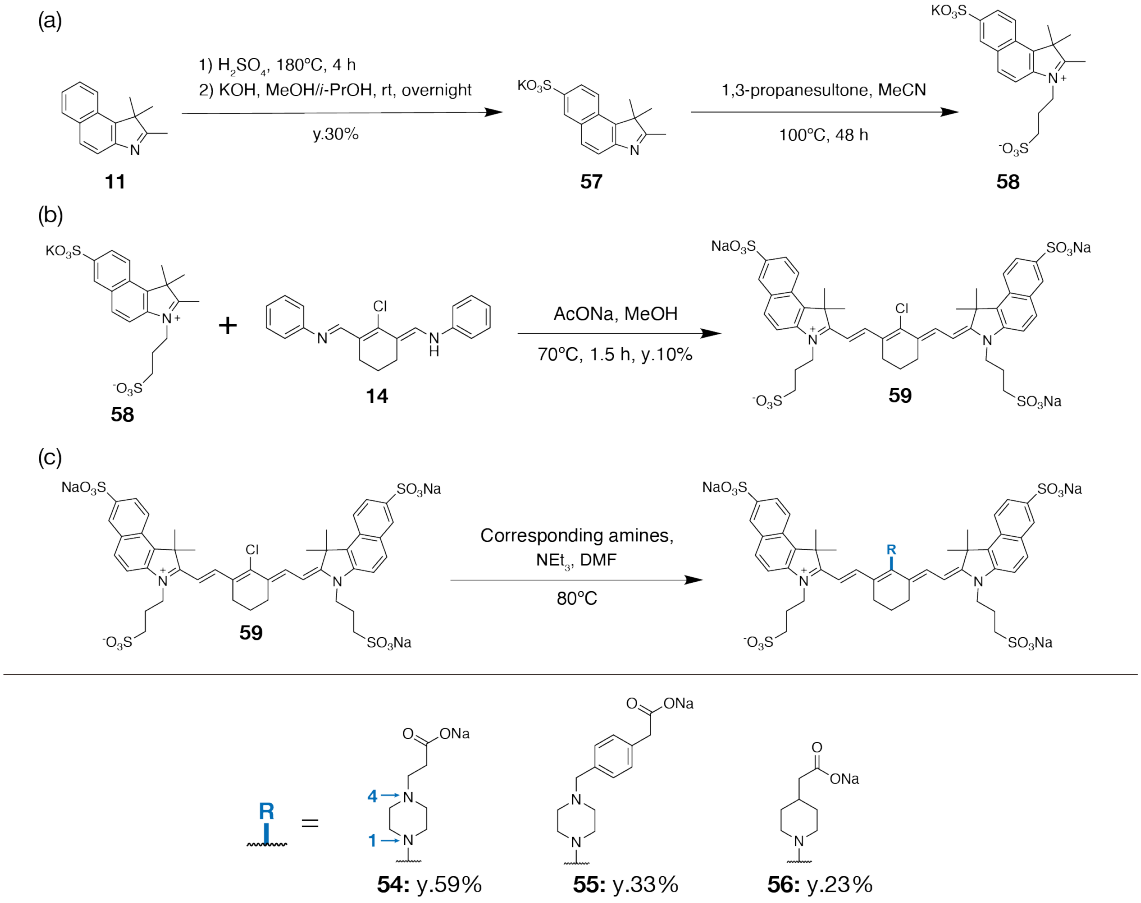


Figure 68. 水溶性の向上を狙った色素の設計



Scheme 8. 54–56 の合成スキーム (a) スルホン酸を持つ 1*H*-benz[e]indolium 構造 58, (b) クロロ基を持つ 59, (c)アミノ基を置換基に持つ 54–56 の合成スキーム

高水溶性 pH 応答性色素の吸収スペクトル測定

水溶性の向上を狙った **54–56** の吸収スペクトルが pH に応じて変化するかを検討するため、各色素が終濃度 1 μM になるよう溶解し、pH 3–12 における吸収スペクトルを測定した（**Figure 69–71**）。溶媒には、水溶液中での光学特性を検討するために PB with 30% DMSO、PB with 1% DMSO、また、凝集が影響していないことを調べるために DMSO を用いた。溶媒として DMSO を用いた検討では、酸として TFA、塩基として NEt_3 を用いた。

1,4-ジアザアルキル基を持つ **54**, **55** の吸収スペクトルは、いずれも pH の低下に応じて吸収極大が 700 nm から 800 nm 付近にシフトし、吸光度が増大した（**Figure 69a–b**）。一方で、ジアザアルキル基を持たない **56** の吸収スペクトルは pH に応答した吸収スペクトル変化を示さなかった（**Figure 69c**）。**54**, **55** の pH に応じた吸収スペクトル変化は DMSO 濃度が低い PB with 1% DMSO を溶媒として用いた場合でも見られた（**Figure 70**）。シアニン色素を有機溶媒/水の混合溶媒に溶かす場合、有機溶媒の割合が小さくなると凝集しやすくなると考えられるが、DMSO の割合を減らした溶媒を用いた場合でも、DMSO を溶媒として用いた場合と同様の吸収スペクトル変化が見られたことから、**54**, **55** が高い水溶性を持ち、有機溶媒の割合が小さい溶媒中でも凝集しないことが示唆された。**54**, **55** は、DMSO を溶媒として用いた場合でも、pH の低下によって長波長側に吸収極大がシフトしたため、水溶液中でのスペクトル変化は凝集体の形成ではなく、pH の変化によるものであることが示唆された（**Figure 71**）。

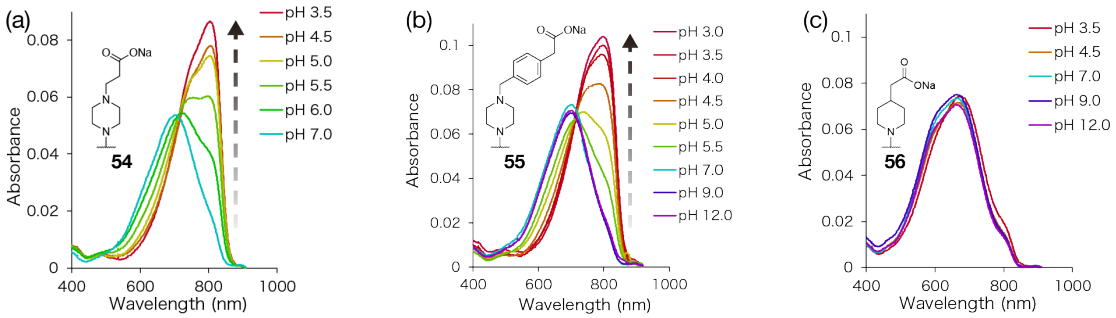


Figure 69. 54–56 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の pH 3–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

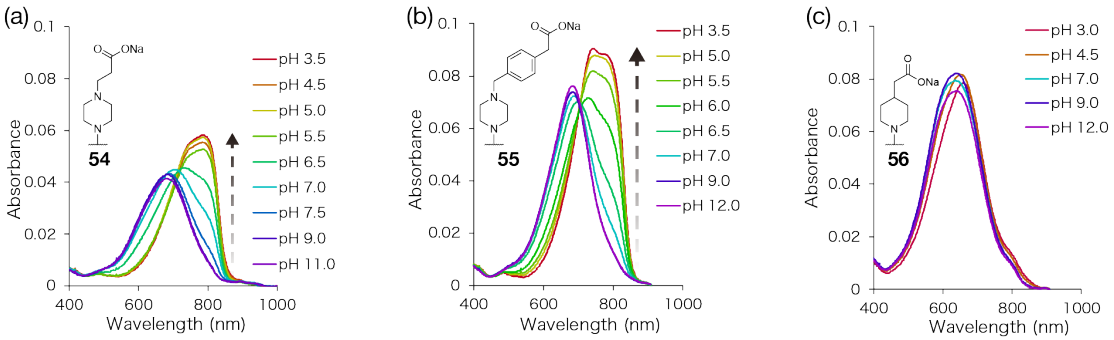


Figure 70. 54–56 の PB with 1% DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の pH 3–12 における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

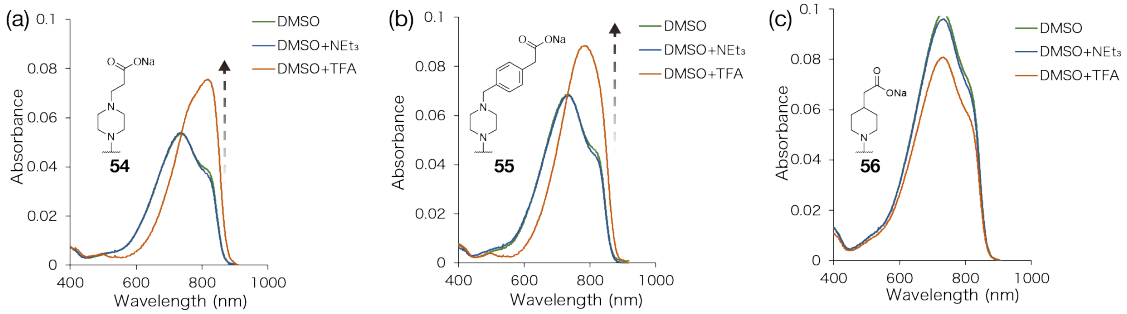


Figure 71. 54–56 の DMSO を溶媒として用いた場合の各 pH での吸収スペクトル　(a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の酸性から塩基性条件における吸収スペクトル。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

高水溶性 pH 応答性色素の蛍光スペクトル測定

色素の PA 特性は、蛍光と競合する過程である内部転換 (無輻射過程) の割合や吸収極大波長と蛍光極大波長の差を示すストークスシフトに影響するため、**54–56** を PB with 30% DMSO または DMSO に各色素を終濃度 1 μM となるよう溶解し、酸性から中性条件における蛍光スペクトルを測定した (**Figure 72–73**)。DMSO を溶媒として用いた場合には、酸として TFA を用いて pH に対する蛍光スペクトル変化を調べた。また、得られた吸収・蛍光スペクトルの結果から Abs_{max}、Em_{max}、Δλ、ε、ϕ_f を算出し、p*K*a とともに表にまとめた (**Table 5**)。

54–56 の吸収スペクトルは、酸性と中性で約 100 nm の吸収極大波長のシフトが見られたのに対して、蛍光スペクトルでは、酸性と中性で最大でも 15 nm の蛍光極大波長のシフトしか観察されなかった。**54–56** は中性条件で大きなストークスシフトを示したため、PA シグナルの発生効率が高いことが示唆された。**54–56** の DMSO 中での蛍光量子収率 (8–13%) は、ICG の DMSO 中での蛍光量子収率 (13%) と同等またはそれ以下であり、**54–56** は PA シグナルの発生効率が優れることが示唆された。

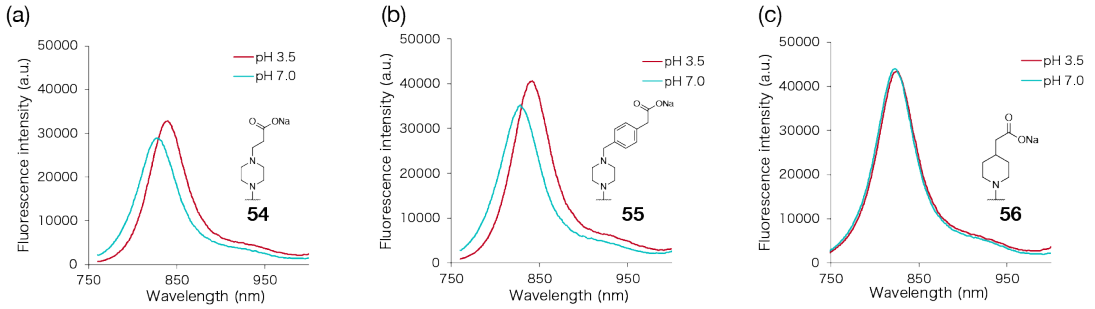


Figure 72. 54–56 の PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル (a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の pH 3.5 及び 7.0 における蛍光スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光で測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

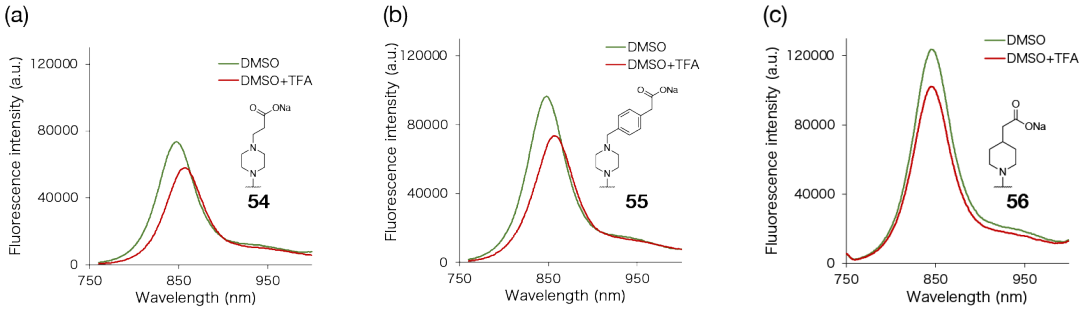


Figure 73. 54–56 の DMSO を溶媒として用いた場合の蛍光スペクトル (a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の酸性から中性条件における蛍光スペクトル。スペクトルは 750 nm の励起光で測定した。色素の終濃度は 1 μM で測定した。

Table 5. 54–56 の酸性・中性条件下における光学特性

Compound	Abs$_{max}$ (nm)[a]	Em$_{max}$ (nm)[a]	Δλ (nm)[a]	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)[a]	ϕ_f[b]	p*K*a[a]
54 (neutral)	702	828	126	5.4×10^4	0.12	-
54 (acidic)	804	838	34	8.7×10^4	0.08	5.7
55 (neutral)	701	827	126	7.3×10^4	0.13	-
55 (acidic)	797	842	45	1.0×10^5	0.08	5.0
56 (neutral)	665	822	157	7.4×10^4	0.11	-

a) 溶媒として PB with 30% DMSO を用いた, b) 溶媒として DMSO and DMSO with 1% TFA を用いた。

高水溶性 pH 応答性色素の p*K*a の比較

各 pH における 800 nm 付近の吸光度から **54**, **55** の p*K*a を算出したところ、**54** は 5.7, **55** は 5.0 であった (**Figure 74**)。スルホ基を持たない **50** と **51** の p*K*a はそれぞれ 5.7 と 4.9 だったことから、スルホ基の導入による p*K*a への影響はほとんど見られなかった。

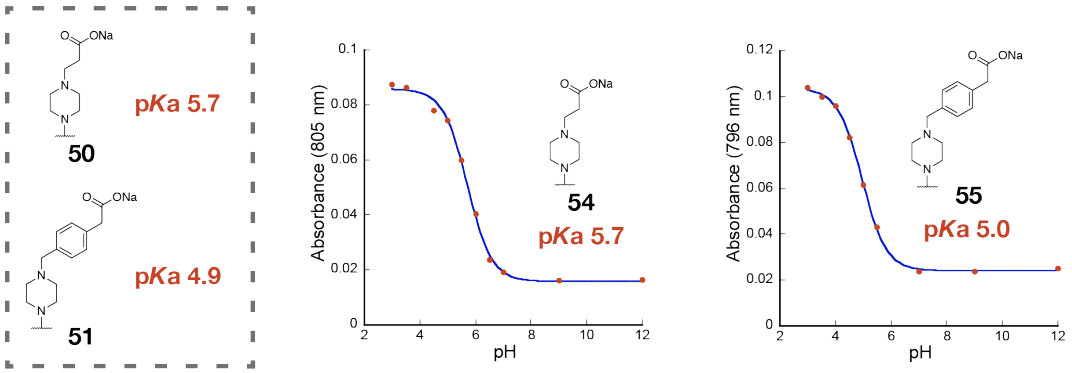


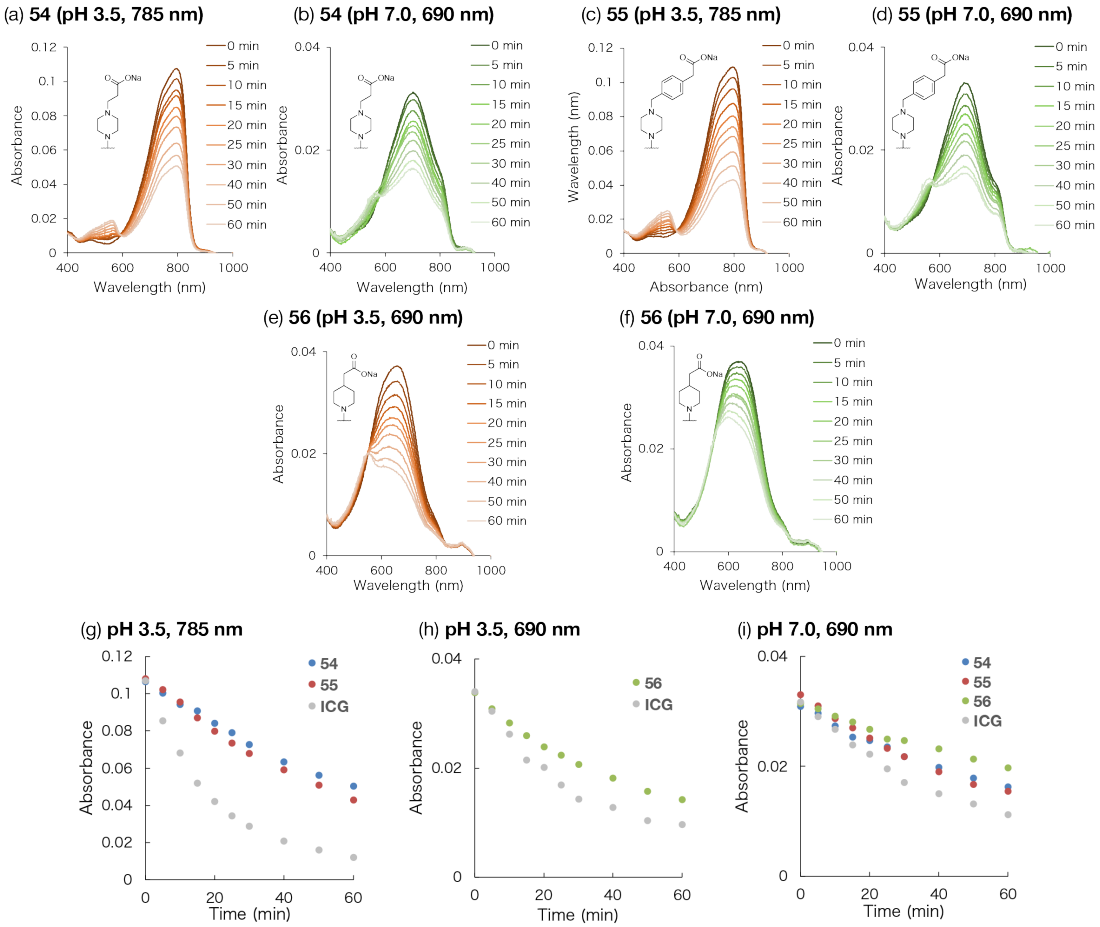
Figure 74. 54, 55 の p*K*a の比較　p*K*a は PB with 30% DMSO を溶媒として用いた場合の 800 nm 付近の吸光度を pH の値に対してプロットし、Kaleida Graph (Synergy) で算出した。

高水溶性 pH 応答性色素の安定性の検討

色素 **54–56** の、光照射時、光非照射時の色素の安定性を検討した (**Figure 75–76**)。PB with 30%DMSO 中に 1 μM ICG の 690 または 785 nm の吸光度と同じになるよう、**54–56** を溶解し、レーザー光を照射して、pH 3.5 及び 7.0 における吸収スペクトルの変化を経時的に観察した (**Figure 75a–f**)。**56** の 785 nm の吸光度は ICG のそれと差が大きいため、濃度差が小さくなるよう pH 3.5 でも 690 nm のレーザーを用いた。得られた結果から近似曲線を引き、吸光度が半減するまでの時間 (半減時間) を算出したところ、**54–56** の pH 3.5

及び 7.0 における半減時間は ICG の 1.4–4.0 倍であり、ICG よりも高い光安定性を持つことが示唆された（**Figure 75j**）。また、**54–56** の半減時間は **50–52** と比較しても 7–68 min 長くなっており、電子吸引性基であるスルホン酸の導入によって共役系の電子密度が低下し、ROS などによる酸化反応が抑制されたと考えられる。

次に、PB with 30% DMSO に **54–56** を終濃度 1 μM となるよう溶解し、暗所下での吸収スペクトルの変化を経時的に観察した（**Figure 76a–f**）。**54–56** は 60 分経過後でも吸光度が変化せず、ICG よりも高い安定性を示した（**Figure 76i–j**）。



(j)

Compound	pH 3.5 (785 nm)	pH 3.5 (690 nm)	pH 7.0 (690 nm)
吸光度が半減するまでの時間			
54	55.9 min	-	65.9 min
55	44.7 min	-	52.3 min
56	-	45.0 min	119 min
ICG	14.7 min	24.5 min	36.5 min

Figure 75. 54–56 を PB with 30% DMSO に溶かした場合の光安定性の検討　光照射（10 mW/cm^2）による（a, b）**54**, (c, d) **55**, (e, f) **56** の吸収スペクトル変化、（g–i）色素間での経時的な吸光度変化の比較、(j) 各色素の吸光度の半減時間

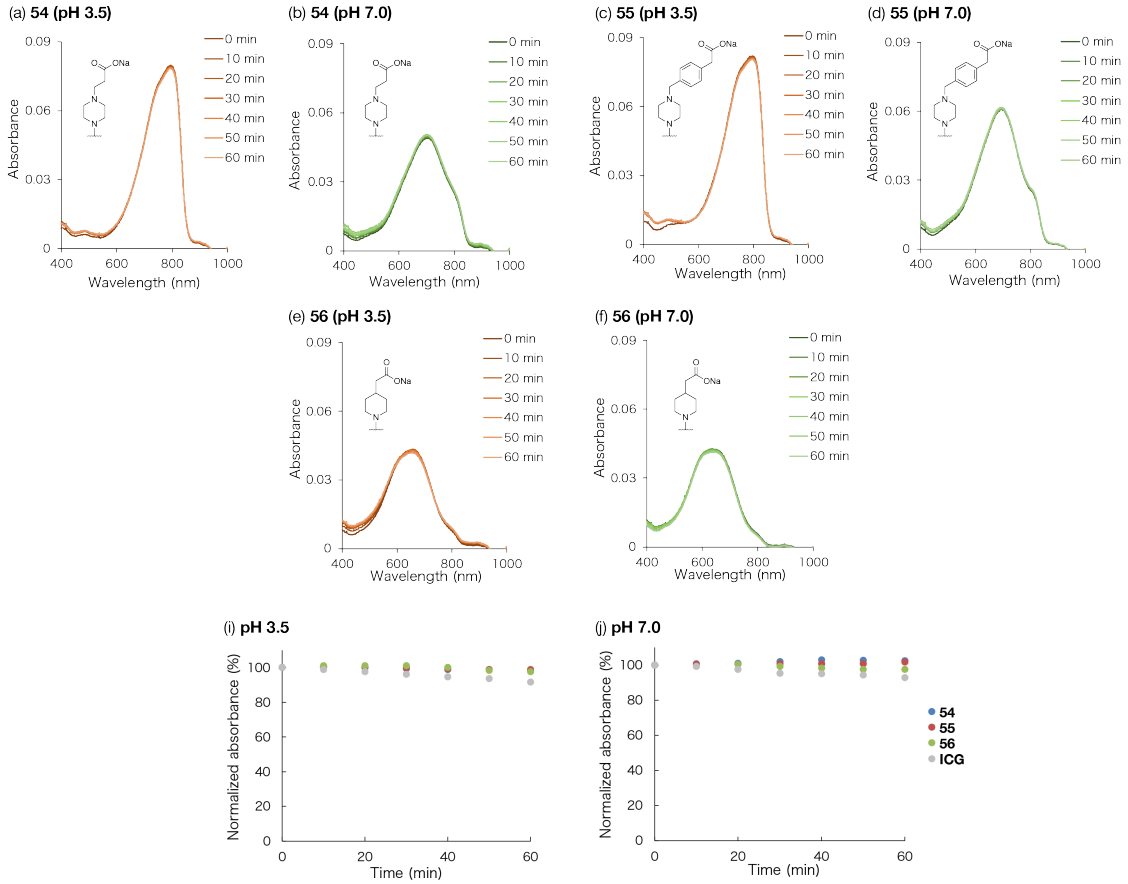


Figure 76. 54–56 を PB with 30% DMSO に溶かした場合の安定性の検討　蛍光スペクトルは 700 nm の励起光を色素の終濃度 1 μM の溶液に照射することで測定した。

高水溶性 pH 応答性色素の PA スペクトル測定

色素 **54**, **55** の PA スペクトルが pH に応じて変化するか検討するために、**Figure 15** の setup を用いて PA スペクトルを測定した。**54**, **55** の PA スペクトルは吸収スペクトルと同様に pH に応じて変化し、1,4-ジアザアルキル基を持たない **56** の PA スペクトルは pH に応じて変化しなかったため、水溶性を向上させた色素である **54–56** でも吸収スペクトルに応じた PA スペクトルを持つことが示された（**Figure 77**）。

得られた PA シグナル強度を吸光度に対してプロットし、近似曲線から相関係数を算出したところ、いずれの色素の相関係数も 0.98 以上であり、PA シグナル強度は吸光度に正に相関することが示された（**Figure 78a**）。次に、得られた PA スペクトルの極大値を各色素の蛍光量子収率に対してプロットしたところ、PA スペクトルの極大値は蛍光量子収率に対して負に相関せず、ストークスシフトに対しては正に相関し、**50–52** と同様の結果を示した（**Figure 78b–c**）。測定した PA シグナル強度と吸光度のプロットにおいて、励起光の波長と

PA シグナル強度を比較したところ、いずれの色素も短波長で励起した場合に大きい PA シグナル強度を示した。励起された色素は、内部エネルギーを熱として放出しながら励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化（振動緩和）し、その後、励起状態の安定構造から基底状態に遷移する過程で蛍光や熱（内部転換）を放出する（**Figure 1**）。短波長で励起した場合のほうが、より高いエネルギー状態から、振動緩和による熱を放出して励起状態の安定なコンフォメーションを持つ構造に変化するため、この熱が PA シグナルの増大に寄与したと考えられる（**Figure 79e**）。

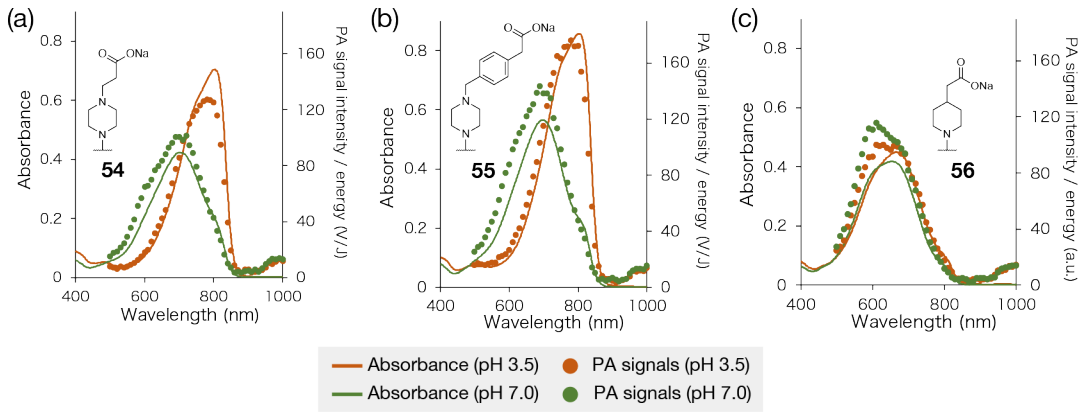


Figure 77. 54–56 の酸性・中性 pH における PA スペクトルと吸収スペクトル　色素の終濃度 10 μM となるよう PB with 20% DMSO に溶かした (a) **54**, (b) **55**, (c) **56** の PA スペクトルと吸収スペクトル。

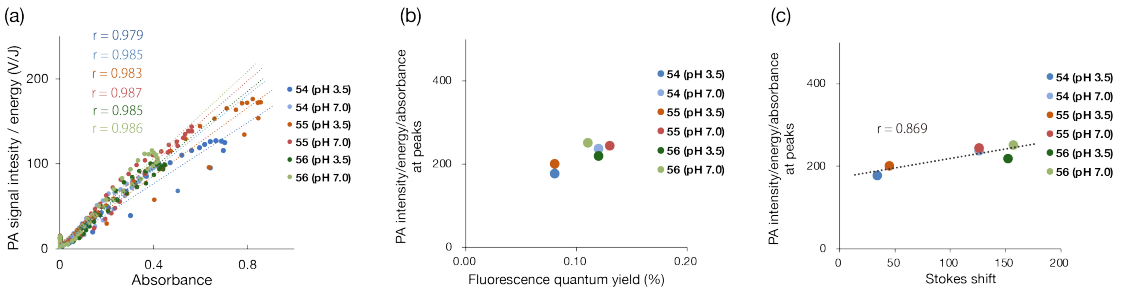


Figure 78. 54–56 の PA シグナル発生効率と光学特性の比較　(a) 終濃度 10 μM となるよう PB with 20% DMSO に各色素を溶かした溶液の(a) PA シグナル強度と吸光度の比較。(b) PA スペクトルの極大値と蛍光量子収率の比較。(c) PA スペクトルの極大値とストークスシフトの比較。

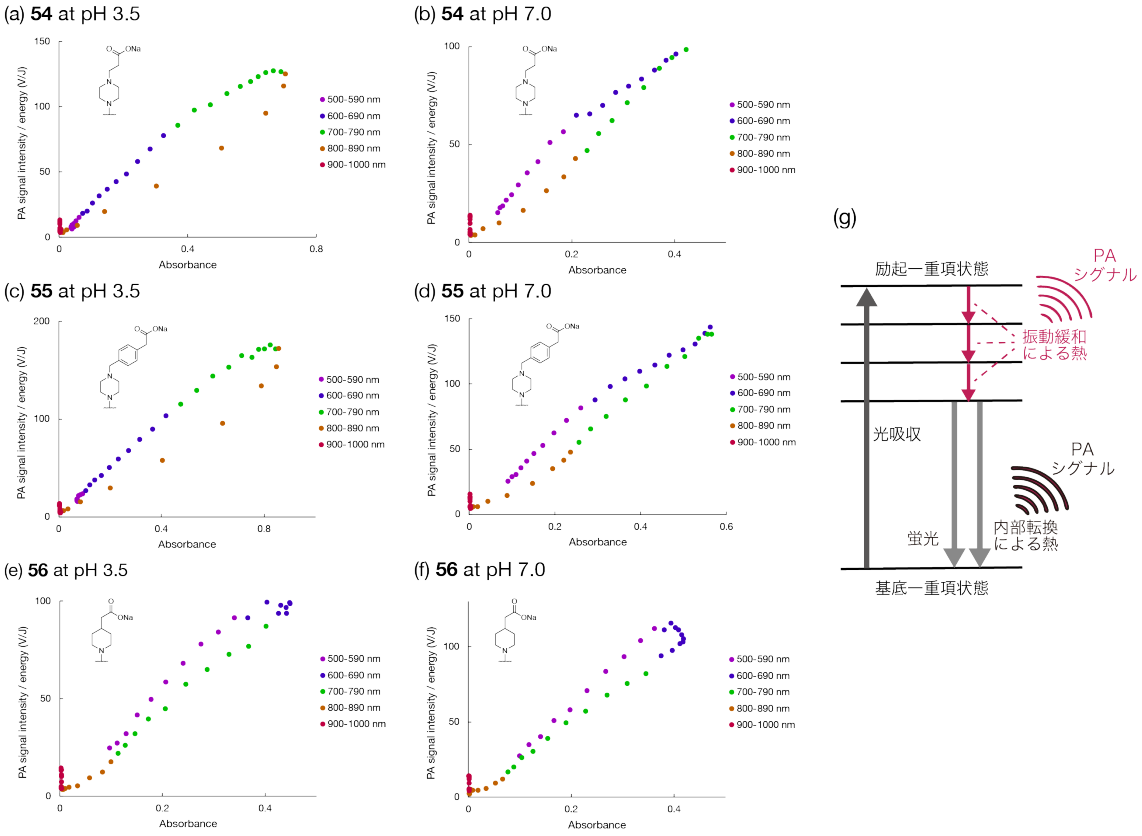
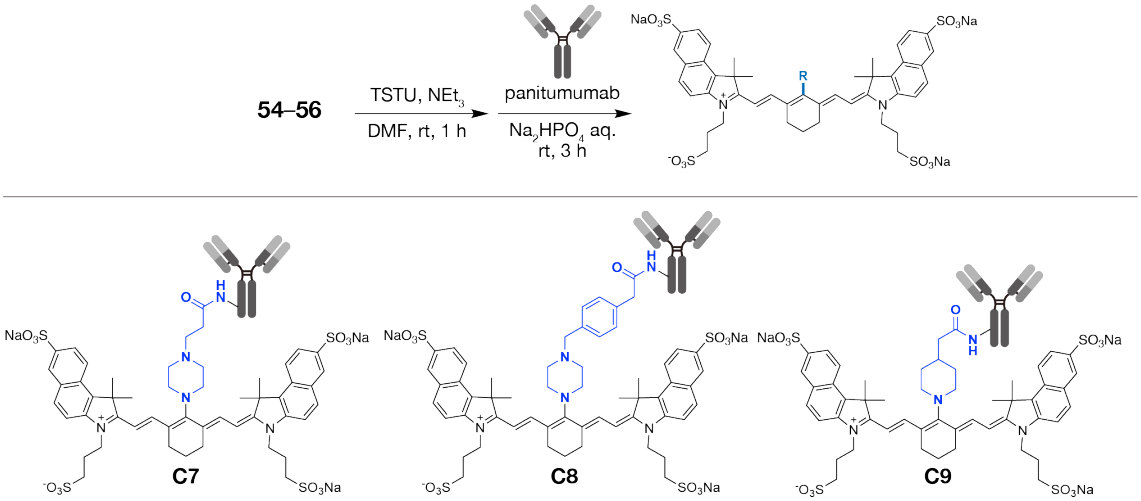


Figure 79. 励起光の波長と PA シグナル強度のプロット　(a, b) **54**, (c, d) **55**, (e, f) **56** の pH3.5 または 7.0 の各吸光度と PA シグナル強度のプロット。(g) 振動緩和による PA シグナルの発生のダイアグラム。色素の終濃度は 10 μM で測定した。

高水溶性 pH 応答色素を用いた抗体-色素複合体の作製

水溶性を向上させた色素である **54**–**56** を用いて腫瘍の PA イメージングを行うために、**54**–**56** を EGFR に結合する抗体である panitumumab に結合した、抗体-色素複合体 **C7**–**C9** を作製した (**Scheme 9**)。**C7**–**C9** はカルボキシ基を NEt_3 存在下、DMF 溶媒として用い、TSTU を加えることで反応性の高い succinimidyl ester にした。濃縮後、Na_2HPO_4 存在下、水を溶媒として用い、panitumumab と反応させて、限外濾過によって精製して **C7**–**C9** を得た。反応時間を長くすれば、より多くの色素を抗体に結合できるが、抗体の動態や Fab 領域への結合による EGFR 認識能の低下が考えられるため、DAR は 10 以下となるよう作製した。[99,100]DAR を吸光測定と BCA assay を用いて測定したところ、約 **C7**=1, **C8**=3, **C9**=2 であった。



Scheme 9. C7–C9 の作製スキーム

蛍光観察による高水溶性 pH 応答色素を用いた抗体-色素複合体の細胞集積性の検討

抗体-色素複合体 C7–C9 が、がん細胞に取り込まれるかを蛍光顕微鏡で検討した。まず、抗体-色素複合体 C7–C9 を終濃度 5 μg/mL になるよう EGFR 高発現細胞の HuCCT-1 及び EGFR 非発現細胞の NIH-3T3 に添加し、24 時間インキュベート後に蛍光顕微鏡で観察した。C7–C9 を添加した EGFR 高発現細胞では、いずれの抗体-色素複合体を添加した場合でも色素由来の蛍光が観察され、抗体-色素複合体を添加していない細胞と比較して、細胞内の蛍光強度が高かった (**Figure 80a**)。C7–C9 を添加した EGFR 非発現細胞の NIH-3T3 では、いずれの抗体-色素複合体を添加した場合でも蛍光がほとんど観察されず、細胞内の蛍光強度は抗体-色素複合体を添加していない細胞と比較して同程度であった (**Figure 80b**)。別の EGFR 高発現細胞としてヒト類表皮癌細胞である A431 を用いた場合でも、抗体-色素複合体 C7–C9 を終濃度 5 μg/mL となるよう添加して検討を行ったところ、24 時間インキュベート後に、NIH-3T3 の場合より強い蛍光が細胞内から観察された (**Figure 81**)。以上の結果から、C7–C9 はいずれの抗体-色素複合体も EGFR 選択的に内在化し、がん細胞内に取り込まれることが示唆された。

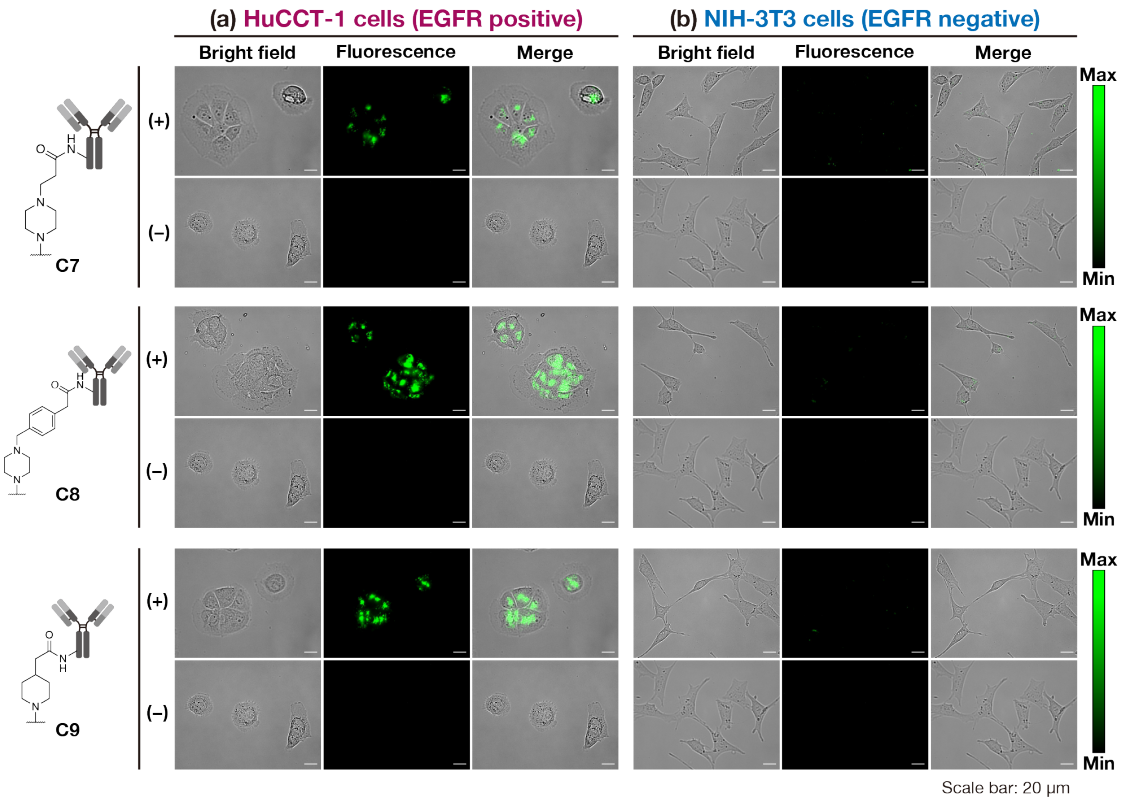


Figure 80. 蛍光顕微鏡による C7–C9 の HuCCT-1 と NIH-3T3 への集積性の比較 C7–C9 添加 24 時間後および C7–C9 非添加の (a) EGFR 高発現を高発現する HuCCT-1, (b) EGFR を発現しない NIH-3T3 の蛍光顕微鏡画像。

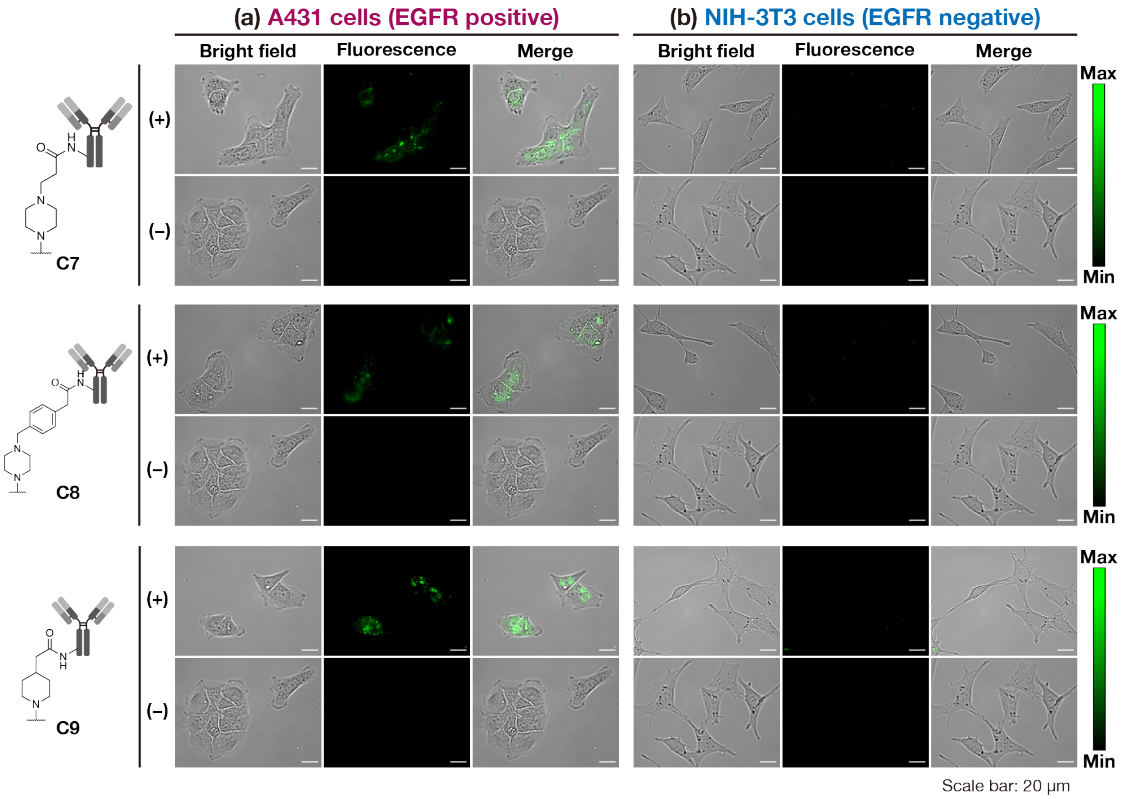


Figure 81. 蛍光顕微鏡による C7–C9 の A431 と NIH-3T3 への集積性の比較 C7–C9 添加 24 時間後および C7–C9 非添加の (a) EGFR 高発現を高発現する A431, (b) EGFR を発現しない NIH-3T3 の蛍光顕微鏡画像。

高水溶性 pH 応答色素を用いた抗体-色素複合体による HuCCT-1 移植マウスの蛍光イメージング

抗体-色素複合体 C7–C9 が腫瘍に集積するか検討するため、C7–C9 100 μg を EGFR 高発現細胞の HuCCT-1 を皮下移植した担がんマウスに静脈投与し、680、700、720、740、760、780 nm の光をそれぞれ励起光として、経時的に蛍光を観察した。抗体-色素複合体 C7–C9 を EGFR 高発現細胞の HuCCT-1 を移植した担がんマウスに投与した結果、時間経過により腫瘍からの蛍光強度が増大し、24 時間後には腫瘍から強い蛍光が観察された (**Figure 82**)。24 時間経過後、励起波長ごとの腫瘍 (右背) とバックグラウンド (左背) の蛍光強度をプロットしたところ、pH 応答性色素を結合させた C7, C8 では長波長側の励起光でより強い蛍光が腫瘍から観察された (**Figure 83a–b**)。C7, C8 を投与したマウスでは、バックグラウンドにおいても長波長側でより強い蛍光が観察されたが、780 nm での励起における蛍光強度と 700 nm での励起における腫瘍の蛍光強度の比（F780/F700）は、バックグラウン

ド（**C7**: 2.0、**C8**: 2.2）よりも腫瘍（**C7**: 2.3、**C8**: 2.5）のほうが高かった（**Figure 83e**)。pH 非応答性色素を結合した **C6** を投与したマウスでも、腫瘍から強い蛍光が観察されたが、F780/F700 はバックグラウンド（1.0)、腫瘍（1.0）で共に同じ値であった。これらのことから、**C7**, **C8** は腫瘍に集積した後、リソソームの弱酸性環境に応答して 800 nm 付近の吸光度および蛍光が増加することが示された。また、pH 応答性の **C7**, **C8** を投与した担がんマウスは pH 非応答性の **C6** を投与した担がんマウスよりも腫瘍とバックグラウンドにおける強度比が大きく、腫瘍を高コントラストに検出できることが示唆された。

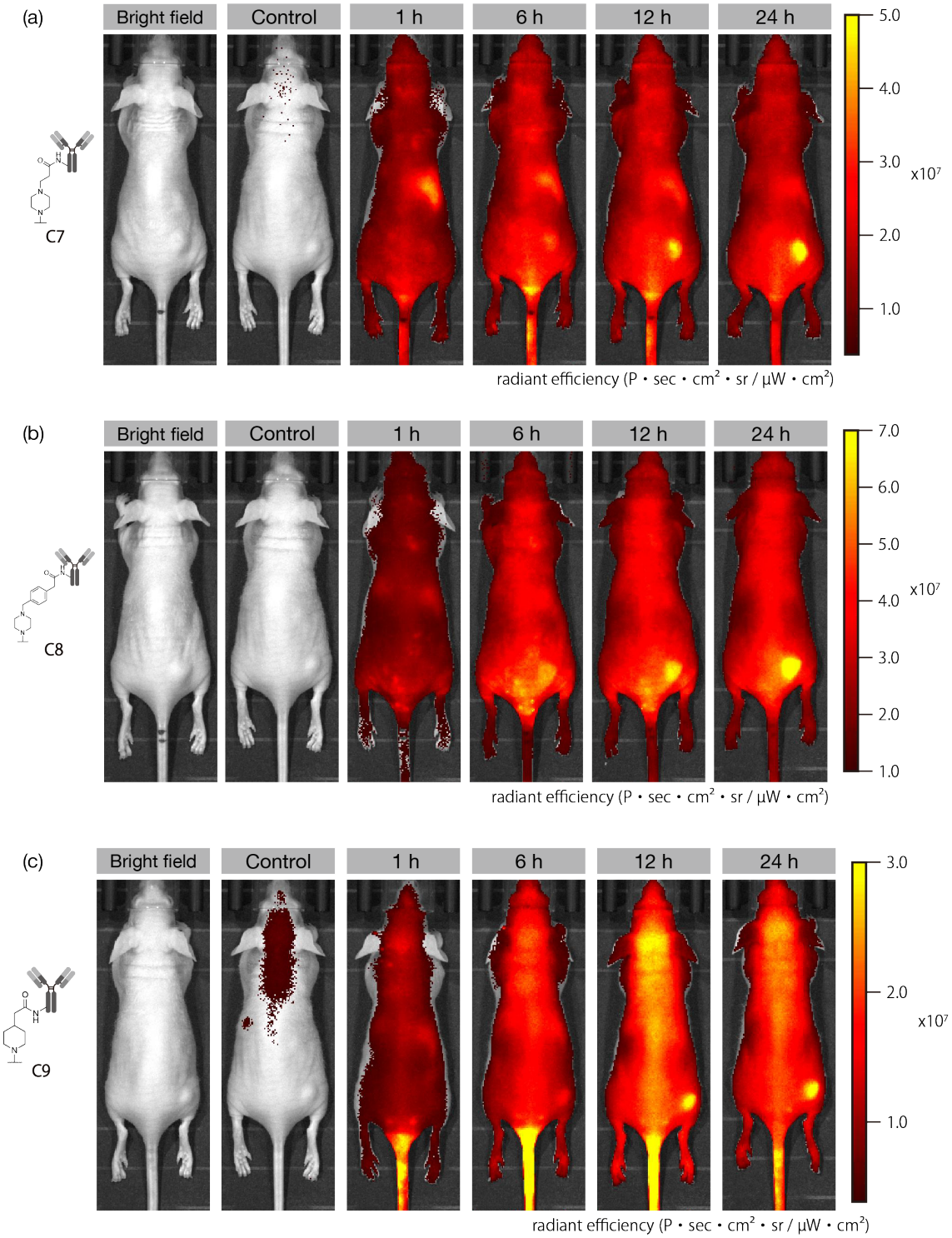


Figure 82. C7–C9 を投与した HuCCT-1 移植マウスにおける蛍光イメージング　測定可能な吸収極大波長の励起光 （**C7**, **C8**: 780 nm、**C9**: 680 nm）により検出された (a) **C7**, (b) **C8**, (c) **C9** を静脈投与して 24 時間後の HuCCT-1 移植マウスの蛍光画像。

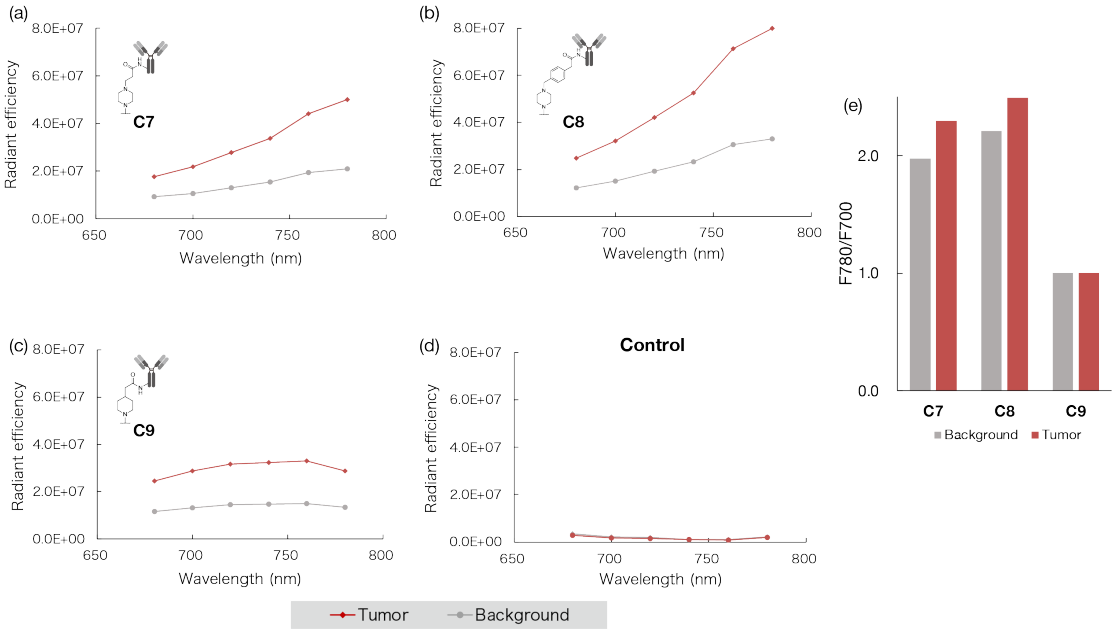


Figure 83. C7–C9 を投与した HuCCT-1 移植マウスの蛍光強度の比較　励起光 （680、700、720、740、760、780 nm）により検出された (a) **C7**, (b) **C8**, (c) **C9** を静脈投与して 24 時間後のマウス、(d) 抗体-色素複合体を投与していないマウスの腫瘍（右背）とバックグラウンド（左背）における蛍光強度。(e) 腫瘍の 780 nm での励起における蛍光強度と 700 nm での励起における蛍光強度の比（F780/F700）。

高水溶性 pH 応答性色素を用いた抗体-色素複合体による A431 移植マウスの蛍光イメージング

抗体-色素複合体 **C7–C9** が EGFR 高発現のヒト胆管がん細胞である HuCCT-1 以外で利用できるか検討するため、同じく EGFR 高発現細胞であり、ヒト類上皮がん細胞である A431 を皮下移植した担がんマウスに **C7–C9** を静脈投与し、680、700、720、740、760、780 nm の光をそれぞれ励起光として、経時的に蛍光を観察した。その結果、時間経過により腫瘍からの蛍光強度が増大し、24 時間後には腫瘍から強い蛍光が観察された (**Figure 84**)。24 時間経過後、励起波長ごとの腫瘍 (右背) とバックグラウンド (左背) の蛍光強度をプロットしたところ、pH 応答性色素を結合させた **C7**, **C8** では長波長側の励起光でより強い蛍光が腫瘍から観察された (**Figure 85a–b**)。**C7**, **C8** を投与したマウスでは、バックグラウンドにおいても長波長側でより強い蛍光が観察されたが、780 nm での励起における蛍光強度と 700 nm での励起における腫瘍の蛍光強度の比（F780/F700）は、バックグラウンド（**C7**: 1.5、**C8**: 1.4）よりも腫瘍（**C7**: 1.8、**C8**: 1.9）のほうが高かった（**Figure 85e**)。pH 非応答性色素を結合した **C6** を投与したマウスでも、腫瘍から強い蛍光が観察されたが、F780/F700

はバックグラウンド（1.0）と腫瘍（1.1）でほぼ同じ値であった。次に **C7–C9** を投与して 24 時間後に蛍光を観察した後、各臓器を切除して *ex vivo* における蛍光を観察した。**C7–C9** を投与したマウスは、いずれの色素においても腫瘍と肝臓でのみ強い蛍光が観察され、他の臓器からはほとんど蛍光が観察されなかった (**Figure 86**)。よって、**C7–C9** は腫瘍に選択的に集積し、また、肝臓で主に代謝されることが示唆された。**C7–C9** は EGFR 高発現のヒト胆管がん細胞である HuCCT-1、EGFR 高発現のヒト類上皮がん細胞である A431 を移植したいずれの担がんマウスの腫瘍にも集積したため、EGFR を発現する様々ながん種の腫瘍をイメージングできることが示唆された。

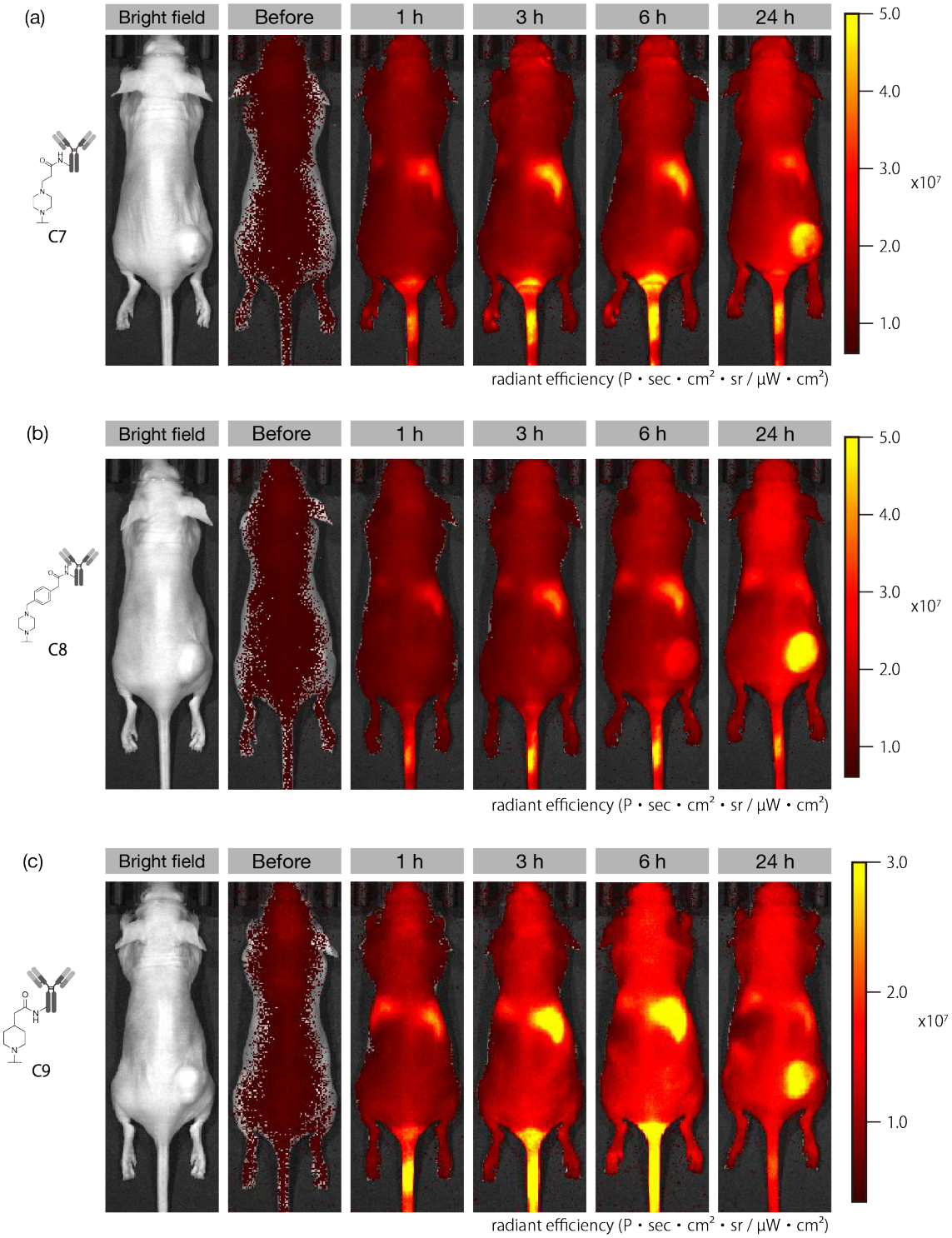


Figure 84. C7–C9 を投与した A431 移植マウスにおける蛍光イメージング　測定可能な吸収極大波長の励起光（**C7**, **C8**: 780 nm、**C9**: 680 nm）により検出された (a) **C7**, (b) **C8**, (c) **C9** を尾静脈投与して 24 時間後の A431 移植マウスの蛍光画像。

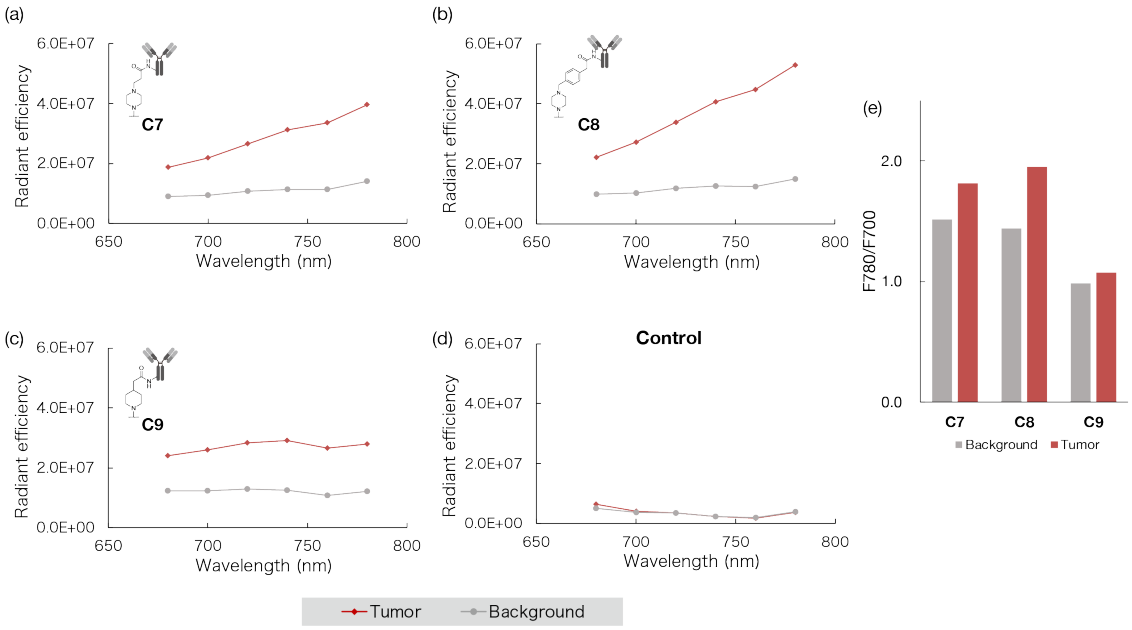


Figure 85.　C7–C9 を投与した A431 移植マウスの蛍光強度の比較　励起光（680、700、720、740、760、780 nm）により検出された (a) **C7**, (b) **C8**, (c) **C9** を静脈投与して 24 時間後のマウス、(d) 抗体-色素複合体を投与していないマウスの腫瘍（右背）とバックグラウンド（左背）における蛍光強度。(e) 腫瘍の 780 nm での励起における蛍光強度と 700 nm での励起における蛍光強度の比（F780/F700）。

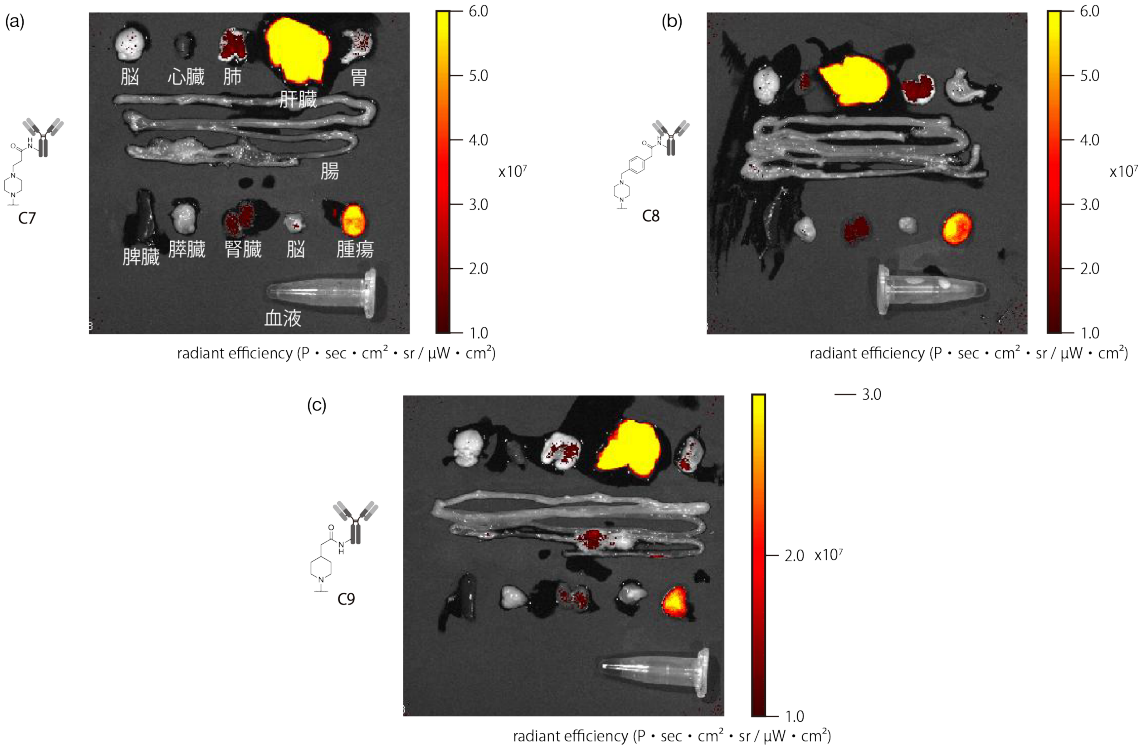


Figure 86. C7–C9 を投与した A431 移植マウスの *ex vivo* における蛍光強度の比較　測定可能な吸収極大波長の励起光（**C7**, **C8**: 780 nm、**C9**: 680 nm）により検出された (a) **C7**, (b) **C8**, (c) **C9** を静脈投与して 24 時間後における *ex vivo* の蛍光強度。

第 3 節では、腫瘍の PA イメージングを目指し、水溶性を向上させた色素である **54**–**56** を開発した。**54**–**56** は **50**–**52** と同様に pH に応じて吸収および PA スペクトルが変化し、また、弱酸性環境に応答する p*K*a を持つことが示された。**54**–**56** を抗体に結合した抗体-色素複合体 **C7**–**C9** は EGFR 選択的にがん細胞に取り込まれた。**C7**–**C9** を静脈投与した EGFR 高発現の HuCCT-1 及び A431 を皮下移植した担がんマウスはいずれも、長波長の 780 nm で腫瘍から強い蛍光が観察されたため、**C7**–**C9** が腫瘍へ集積し、リソソームの低 pH に応答することが示唆された。また、この結果から、**C7**–**C9** は EGFR を発現する様々ながん種の腫瘍をイメージングできることが示唆された。

まとめ

pH に応答して PA スペクトルが変化する色素を用いて PA イメージングを行うために、新たな pH 応答性色素群を開発した。これらの色素を抗体や RGD ペプチドに結合した抗体-色素複合体及び RGD-色素複合体を作製し、細胞や動物でのイメージングを検討した。pH に応答して PA スペクトルが変化する色素を panitumumab に結合した **C1**, **C2** は培養細胞の EGFR 選択的に内在化し、800 nm の励起光で PA シグナルが検出されたため、EGFR 発現細胞選択的な PA イメージング剤として機能することが示唆された。RGD ペプチドを結合した **C4**, **C5** でも同様に培養がん細胞で PA シグナルが検出されたが、低 pH に応答して PA シグナル変化は見られなかったため、リソソーム以外の細胞質などにも分布したと推察される。

抗体-色素複合体 **C1**–**C3** を担がんマウスに投与して蛍光イメージングを行ったところ腫瘍から蛍光は観察されなかったが、スルホ基をさらに導入しして水溶性を高めた色素を結合した **C7**–**C9** を担がんマウスに投与して蛍光イメージングを行ったところ、投与 24 時間後に腫瘍から強い蛍光が観察された。また、pH 応答性色素を結合した **C8**, **C9** では 800 nm の励起光で最も強い蛍光が腫瘍から観察され、腫瘍へ集積し、低 pH に応答してシグナルが変化する可能性が示された。今後は **C1**–**C3** を投与した担がんマウスなどでの PA イメージングを行い、PA イメージング剤として利用できるか検討する。

総括と展望

第 1 章では pH に応答してスペクトルが変化する PA イメージングを目指し、シアニン色素にアミノ基を導入した色素群を合成した。合成した色素の中で、1,4-ジアザアルキル基を持つ色素の吸収および PA スペクトルは pH に応じて大きく変化したため、これらの色素は炎症やがんなどで見られる病変部位の pH に応答して PA スペクトルが変わる色素として利用できる可能性が示された。

第 2 章では、見出した色素の吸収スペクトルが pH に応じて変化するメカニズムを検討するため、1-ピペリジニル基の 4 位に様々な置換基を導入した色素を設計し、光学特性や電子状態を比較した。検討の結果、吸収スペクトル変化は 4 位の置換基の電子吸引性によって起きることが示唆された。すなわち、4 位の置換基の電子吸引性が弱い色素では 1-ピペリジニル基の 1 位の N の電子対がシアニン色素の共役系を分断することで、吸収極大が短波長側にシフトし、4 位の置換基の電子吸引性が強い色素では、1 位の N の電子対による交差共役が抑制され、吸収極大が長波長側にシフトしたと考えられる。このことから、第 1 章で合成した 1,4-ジアザアルキル基を持つ色素では、pH の変化に応答して 4 位のアミノ基がプロトン化し、4 位の電子吸引性が変化することで吸収スペクトルが変化したと考えられる。また、1-ピペラジニル基の 4 位にアリール基を導入した色素においても、交差共役を制御できることを示し、ペプチダーゼや ROS による生体内反応で PA スペクトルが変化する色素の開発につながる知見を見出した。

第 3 章では、pH 応答性シアニン色素を抗体に結合した抗体-色素複合体を作製し、がん細胞の PA イメージングを行った。作製した抗体-色素複合体はがん細胞選択的に内在化し、酸性環境であるリソソームに取り込まれて PA シグナルが変化することが示唆された。また、生体での PA イメージングを目指して高い水溶性を示す抗体-色素複合体を作製し、担がんマウスで蛍光イメージングを行ったところ、静脈投与後 24 時間で腫瘍から強い蛍光が観察された。また、pH に応じて 800 nm の吸収極大が増大する抗体-色素複合体を投与したマウスでは、800 nm 付近において腫瘍から強い蛍光が観察されたことから、作製した抗体-色素複合体が腫瘍のイメージングに有用である可能性が示された。腫瘍に集積して pH に応答することが示唆されたため、今後は **C1**–**C3** を投与した担がんマウスなどでの PA イメージングを行い、PA イメージング剤として利用できるか検討する。

PA イメージングは、深部病変を簡便に観察することができるため、光イメージング法の限界を克服する新しい手法であり、ヘモグロビンなどの内因性造影剤を用いた甲状腺[113,114]や乳房イメージング[115–117]などですでに臨床応用されている。さらに、病変部位の酵素や pH

に応答して PA スペクトルが変化するイメージング剤を使用することで、PA イメージングで病変を高コントラストに描出できる可能性がある。本研究では、このような病変部位の環境に応答して PA スペクトルが変化する色素の開発を目指し、さまざまな置換基を導入した ICG 誘導体を開発した。開発した pH に応答して PA スペクトルが変化する色素は、腫瘍の PA イメージングに有望であり、簡便かつ高感度な腫瘍の観察を実現できる可能性がある。また、開発した pH 応答性色素を結合した抗体-色素複合体は、HER2 を標的とするトラスツズマブや CD30 を標的とするブレンツキシマブなど、他の種類の抗体を用いることで、さまざまなサブタイプの腫瘍にも応用できる可能性がある。[118] 一方、pH 応答性色素のメカニズムを検討した結果、シアニンに結合したアミノ基からの交差共役を制御することでスペクトル変化を制御できることを示し、環境に応答して PA スペクトルが変わる色素を設計するための知見を見出した。このメカニズムは、pH のみならず、ペプチダーゼや ROS などの生体分子に応答する PA 色素の開発に繋がると考えられ、PA イメージングの発展に貢献しうる。

実験の部

General information

Reagents

Reagents and solvents were purchased from Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., (Tokyo, Japan), FUJIFILM Wako Pure Chemicals Corporation (Osaka, Japan), Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA), Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan), or Combi-Blocks Inc. (California, USA), and were used without further purification. Reaction solvents were dried on 3Å molecular sieves as needed.

MS analysis

Mass spectra (MS) were recorded on a JMS-T100LP (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) or a Q Exactive MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI).

NMR analysis

^{1}H NMR spectra were recorded on a JNM-ECX400P, JNM-ECS400, or JNM-ECZ400 (JEOL Ltd.) spectrometer operating at 400 MHz. All δ values are reported in ppm relative to tetramethylsilane or deuterated solvent signals.

HPLC analysis

HPLC analysis was performed using a reverse-phase column (Inertsil ODS-3 column 4.6 mm × 250 mm) (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan), fitted on an LC-20AD pump (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), and an RF-20A or SPD-M20A detector (Shimadzu Co.).

Semi-preparative HPLC purification

Semi-preparative HPLC was performed with a reverse-phase column (Inertsil ODS-3 column 10 mm × 250 mm or InertSustain C18 column 10 mm × 250 mm, GL Sciences Inc.), fitted on an LC-20AD pump (Shimadzu Co.), and an SPD-10A or SPD-20AV detector (Shimadzu Co.). For purification, 0.1 M triethylamine acetate (TEAA) buffer,

20 mM triethylamine (NEt_3) in water, or 0.1% trifluoracetic acid (TFA) in water were used as eluent A, while MeCN/1% H_2O was used as eluent B.

Medium pressure LC purification

Medium pressure LC was performed with a Universal ODS Premium column (30 μm, 5.0 × 19.0 mm, Yamazen Co., Osaka, Japan) and ODS packed Inject Column (Yamazen Co., Osaka, Japan), fitted on an EPLCAI-580 system (Yamazen Co.). 0.1 M TEAA buffer was used as mobile phase A, while MeCN was used as mobile phase B.

Optical analysis

UV-Vis spectra were obtained with a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu Co.). Fluorescence spectra were obtained with a spectrofluorometer (FP-8600, JASCO Co., Tokyo, Japan).

Cell cultures

HuCCT-1 cells were provided by Dr. Maenaka (Graduate school of pharmaceutical sciences, Hokkaido University, Hokkaido, Japan), NIH-3T3 cells by Dr. Kobayashi (National Institutes of Health, Maryland, USA), MDA-MB-231 cells by Dr. Kuge (Central Institute of Isotope Science in Hokkaido University, Hokkaido, Japan), and U87MG by American Type Culture Collection (ATCC). HuCCT-1 and NIH-3T3 cells were cultured in the Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 medium (Merck KGaA), while MDA-MB-231 and U87MG cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Merck KGaA) at 37°C in a humified incubator with 5% CO_2. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific K.K.) and 1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan).

Experimental procedure

PA measurements [54]

PA signals in phosphate buffer with DMSO were detected using a home-build set up, as shown in **Figure 15**.[119] An excitation pulse light (6–8 nsec) was generated using a wavelength-tunable optical parametric oscillator (OPO) laser system (Versascan MBI-FE, Spectra Physics or PrimoScan BMU-SE, Spectra Physics) excited by a Nd:YAG laser (Quanta-Ray Pro-190-THDA-FE, Spectra Physics) with a repetition frequency of 10 Hz. The excitation pulse light was shaped to have a 3 mm diameter beam, focused using an 18.24 mm focal length lens, and introduced into a multimode optical fiber (M40L02, Thorlabs, Newton, NJ, USA) with a core diameter of 400 μm and an NA of 0.48. To correct potential output energy fluctuations, the pulse light was split using a beam sampler, and the energy of the split light was measured using an energy meter (PE10-C, Ophir Optics, Jerusalem, Israel). The output end of the multimode optical fiber was fixed at the center of an ultrasonic sensor with a ring-shaped detection element (inner diameter 1.4 mm, outer diameter 3.0 mm). The detection surface of the ultrasonic sensor was submerged in a small water tank filled with degassed water.

The bottom surface of the small water tank was made of a glass cover that transmitted both light and ultrasonic waves, and the distance between the detection surface of the ultrasonic sensor and the glass cover was set to 10 mm. The excitation pulse light from the multimode optical fiber was irradiated into the liquid column, and the resulting ultrasound was observed using the ultrasonic sensor. The signal was then amplified using an FET amplifier (SA220F5, NF Circuit Design Block, Kanagawa) and recorded using a digital oscilloscope (M9210A, Agilent technology, Santa Clara, CA).

Dyes were dissolved in a 50% phosphate buffer/50% DMSO solution at pH 3.5 or 7.0 and at a final concentration of 10 μM. The solution was then dropped onto a glass slide, and the glass cover on the bottom surface of the small water tank was brought into contact with the liquid surface of the solution, adjusting the gap between the glass cover and the glass slide to 1 mm. Then, PA measurements were performed at 5 nm intervals in the 500–1000 nm range for **4**, **6**, **7**, and at 10 nm intervals in the 500–1000 nm range for **50**–**52** and **54**–**56**. To investigate sample changes due to photobleaching or aggregation, measurements were performed at 10 nm intervals in

the 500-1000 nm range, followed by 10 nm intervals in the 505-995 nm range for **4**, **6**, **7**, and at 20 nm intervals in the 500-1000 nm range, followed by 20 nm intervals in the 505-995 nm range for **50–52** and **54–56**. At each excitation wavelength, 50 PA signal measurements were conducted, and the intensity peak values of the averaged signals were measured. These values were then normalized by the energy of the irradiated excitation pulse light to determine the photoacoustic signal intensity at each excitation wavelength.

Fluorescence imaging with cyanine dye-antibody conjugates in cultured cancer cells

Fluorescence imaging in cultured cells was performed using a BX41 upright fluorescence microscope (Olympus) equipped with a UPlanSApo 40x objective lens (Olympus). Images were captured with an Exi Aqua monochrome camera (Q imaging) and an acquisition software (Q Capture Pro, Q imaging). The microscope used a U-DM-Cy7-3 filter (Olympus, Excitation: 673–748 nm, Emission: 765-855 nm) and U-RFL-T excitation light source (Olympus).

HuCCT-1 cells were seeded in a 35 mm dish containing a glass cover and incubated at 37 °C with 5% CO_2. After one day, antibody-dye conjugates were added to the dish at a final concentration of 5 μg/mL and incubated for 24 h. The glass cover was removed from the dish, washed with phenol red-free medium, and placed on a slide with the cell side facing down. Subsequently, the slide was set up in a fluorescence microscope, and the fluorescence was determined. Image processing and analysis were performed using an Image J software version 1.52.

PA imaging with cyanine dye-antibody conjugates in cultured cancer cells

PA imaging in cultured cells was performed using a home-build set up, as shown in **Figure 58**. A wavelength-tunable nanosecond pulsed laser (NT342A-10-AW, EKSPLA, pulse duration, 5 nsec; repetition rate, 10 Hz) was employed as the laser source. The excitation pulse light was collimated to form a 1 cm diameter beam and then adjusted for pulse energy using a wave plate (1/2λ plate), polarizing plate, and ND filter. The light was focused onto the dish using a LUMPLFLM 40x water-immersion objective

lens (Olympus). The photoacoustic waves from the sample were detected by an acoustic transducer (10K6.4I PF15, Japan Probe, focal length, 15 mm; center frequency, 10 MHz) in the water bath. The PA signal was amplified through a low-pass filter (BLP-21.4+, Mini-Circuits, bandwidth; DC-22MHz) and an amplifier (AU-1647, MITEQ, bandwidth; 0.1 K–400 MHz, gain; 57 dB), and then recorded using a digital oscilloscope (DS-5654A, IWATSU). To correct for potential variations in output energy, pulse light energy was measured by placing a pyroelectric energy sensor (919E-0.1-12-25K, Newport) at the position where the dish was placed. The acquired photoacoustic signal was normalized by the measured excitation light pulse energy. A laser diode was positioned where the reflected light from the ND filter passes, and the photoacoustic signal was measured only when the pulse light intensity was sufficient. Photoacoustic images were generated as two-dimensional images by scanning the sample in a zigzag pattern using a stepping motor stage (TAMM100-50C and HSC-103, OptoSigma) and projecting the peak envelope intensity values of each acquired photoacoustic signals. Bright field images were observed using a CMOS camera (DCC1645C, Thorlabs).

HuCCT-1, MDA-MB-231, or U87MG cells were seeded in 35 mm dishes and incubated at 37 °C with 5% CO_2. After one day, antibody-dye conjugates were added to the dish at a final concentration of 5 μg/mL and incubated for 24 h. Subsequently, the bottom surface of the cell dish was put in contact with a water bath set to 37 °C, and PA imaging was performed at 675 and 800 nm. Image processing and analysis were performed using an Image J software version 1.52.

Measurement and calculation of optical properties of the cyanine dyes

Absorption and fluorescence spectra of 1 or 10 μM (final) compounds were measured in DMSO or 0.1 M phosphate buffer (pH 3.0–12.0). In DMSO, trifluoroacetic acid (TFA) and triethylamine (NEt_3) were used for adjusting the pH. The fluorescence quantum yield (ϕ_f) was calculated according to the following formula.

$$\varphi_x = \frac{A_{st}}{A_x}\frac{{n_x}^2}{{n_{st}}^2}\frac{D_x}{D_{st}}\varphi_{st}$$

Where, x = sample, st = standard material, A = absorbance at an excitation wavelength, n = refractive index, D = Area under the fluorescence spectra. ICG was used as a standard material (ϕ = 0.13 in DMSO). p*K*a values were calculated with a

Kaleida Graph software (Synergy software) using the absorption peaks of the dyes at acidic pH.

Investigation of reversibility of the absorption spectra at several pH values

After the absorbance measurement of 1 μM cyanine dyes in DMSO, TFA (0.4 mmol) was added to the DMSO solution, and the absorption spectra were measured again. Then, NEt_3 (1.1 mmol) was added to the DMSO solution containing TFA and the absorption spectra were measured again.

Stability investigation of dyes

Stability of **50–52** and **54–56** in the dark or under light exposure was investigated in 0.1 M phosphate buffer at pH 3.5 or 7.0 with 30% DMSO. For investigating stability in the dark, each dye was dissolved to phosphate buffer with 30% DMSO at the final concentration of 1 μM in a 3 mL cuvette. The solution was incubated in the dark and the absorbance was measured at each 10 min. For investigating stability under light exposure, each dye was dissolved into phosphate buffer with 30% DMSO as the absorbance of each dye at 690 or 785 nm was same value each other. A cuvette containing each solution was irradiated by a 690 or 785 nm laser (10 mW cm^{-2}) (MLL-III-690–800 mW or MLL-III-785–1 W; Changchun New Industries Optoelectronics Tech, Co., Ltd.) and the absorbance was measured at each 5 min until 30 min, and then, measured at each 10 min until 60 min.

Calculation of the most stable structures and electron density

Using the CONFLEX8 program in combination with the Gaussian16 program for B3LYP/3-21G* calculations, conformational searches were performed for each cyanine dye. Among the obtained conformations, those with energies within 3 kcal/mol of the lowest energy were subjected to structural optimization calculations using the Gaussian16 program with LC-ωPBE/cc-pVDZ. The most stable conformational structure was identified through these calculations. Using such structure, the charges of the N atoms adjacent to the polymethine chain were

calculated employing natural population analysis.

Cytotoxicity test

To quantitatively evaluate the cytotoxicity of **50**–**52** and Indocyanine Green (ICG), percentage of dead cells was assessed using Propidium Iodide (PI) staining. For PI staining, HuCCT-1 cells were seeded in 35 mm dishes at a density of 2.0 x 10^5 cells per well. After 24 h incubation at 37°C, 5% CO_2, each dye was added to the culture medium at the final concentration of 0, 1, or 10 μM, and incubated for 24 h at 37°C, 5% CO_2. After supernatant containing floating cells was collected in a 5 mL Eppendorf tube, cells were detached with 250 μL of 0.05% trypsin solution and collected by additional PBS 200 μL × 2. The cell suspension was centrifuged, the supernatant was removed, and the cells were resuspended in 1 mL of PBS. The cell suspension was centrifuged, the supernatant was removed, and the cells were resuspended in 100 μL of Binding buffer containing 40 μg/mL PI. The cell solution was stained in the dark for 15 min at room temperature. The cells were then increased in volume by adding 400 μL of Binding buffer, passed through a 10 μm filter to single cells, and measured using a Gallios Flow Cytometer (Beckman-Coulter). Fluorescence of PI was measured using 500-550 nm fluorescence filters. The acquired data were analyzed using Kaluza Analysis 2.1 software (Beckman-Coulter).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using JMP Pro 17.0.0 software (SAS Institute). For multiple group tests, one way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey-Kramer test was performed, and a P value of 0.05 or less was defined as a statistically significant difference (n=3).

Preparation of tumor-bearing mice

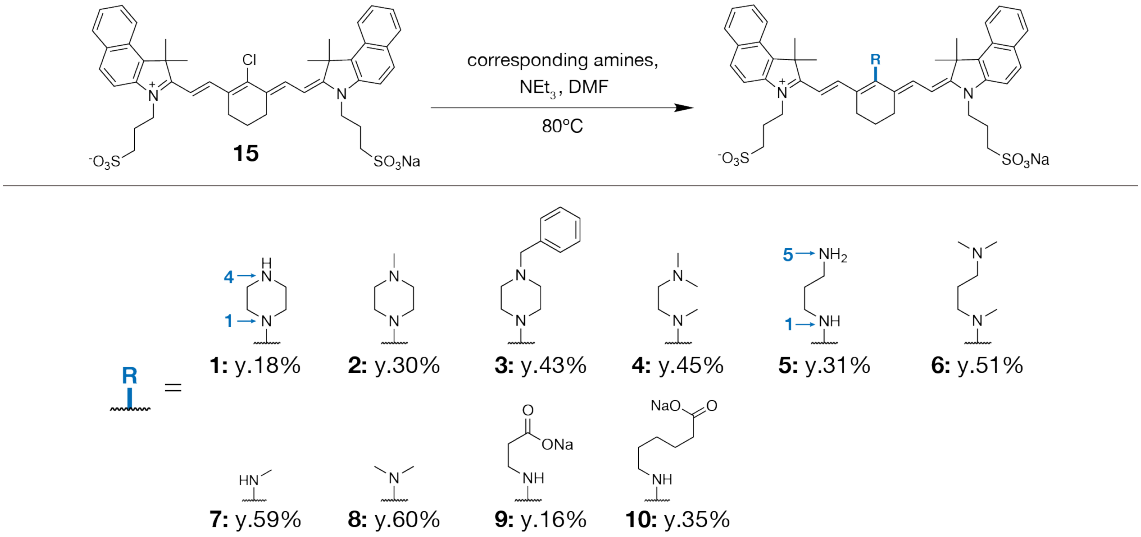
Animal experiments were conducted in accordance with the regulations for animal experimentation at Hokkaido University, a national university corporation. All procedures were performed under anesthesia with isoflurane. U87MG or HuCCT-1 cells (2.0–5.0x10^6 cells/tumor) were transplanted subcutaneously into the right side

of the back of Balb/c Slc-nu/nu mice (6–8 weeks old, female, Japan SLC) to create tumor-bearing mice.

In vivo Fluorescence Imaging

In vivo fluorescence imaging of **C1**–**C9** was performed under anesthesia with isoflurane, using an IVIS Imaging System (Revvity) equipped with a filter set (excitation filter: 680–780 nm, fluorescence filter: 845 nm). Image processing was carried out using Living Image software.

Synthetic procedure



General synthetic procedure of cyanine dyes with various amino groups

15 (1 eq.), corresponding amine (3–14 eq.), and NEt_3 (0–123 eq.) were dissolved in anhydrous DMF (0.03–0.20 mL/μmol). The mixture was stirred at 80°C under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC, DMF was removed under vacuum and the precipitate was purified by semi-preparative HPLC (A/B = 20 mM NEt_3 in water/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding cyanine dyes.

Preparation of 1

15 (50.7 mg, 61.7 μmol), piperazine (22.9 mg, 266 μmol), and NEt_3 (50.0 μL, 359 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **1** (9.50 mg, 18%) as an orange solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.19 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.98 (d, 4H, J = 9.0 Hz), 7.77 (d, 2H, J = 12.0 Hz), 7.69 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.57 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 7.40 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 6.11 (d, 2H, J = 12.0 Hz), 4.29 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 3.75–3.67 (m, 4H), 3.51–3.46 (m, 4H), 3.08–3.02 (m, 4H) , 2.05–1.97 (m, 4H) , 1.92 (s, 12H), 1.90–1.83 (m, 4H), 1.80–1.73 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{48}H_{55}N_4O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 847.3569, found: 847.3582 (+1.3

mmu).

Preparation of 2

15 (60.2 mg, 73.3 μmol), 1-methylpiperazine (100 mg, 1.00 mmol) were dissolved in anhydrous DMF. Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **2** (19.8 mg, 30%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.24 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.02–7.97 (m, 4H), 7.82 (d, 2H, J = 14.0 Hz), 7.72 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.58 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 7.42 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 6.16 (d, 2H, J = 14.0 Hz), 4.32 (t, 4H, J = 7.2 Hz), 3.74-3.68 (m, 4H), 3.32–3.28 (m, 4H), 2.57 (t, 8H, J = 6.7 Hz), 2.41 (s, 3H), 2.05–1.97 (m, 4H), 1.93 (s, 12H), 1.79–1.72 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{49}H_{57}N_4O_6S_2$ [M−Na]$^-$ 861.3725, found: 861.3742 (+1.7 mmu).

Preparation of 3

15 (60.3 mg, 73.4 μmol), **17** (80.0 μL, 454 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **3** (25.0 mg, 43%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.19 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.95 (d, 4H, J = 9.0 Hz), 7.88 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 7.66–7.57 (m, 4H), 7.50–7.40 (m, 7H), 6.15 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 4.33 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 3.92 (s, 2H), 3.83-3.78 (m, 4H), 2.98 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 2.90–2.85 (m, 4H) , 2.59 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 2.31–2.21 (m, 4H) , 1.92 (s, 12H), 1.88–1.81 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{55}H_{61}N_4O_6S_2$ [M−Na]$^-$ 937.4038, found: 937.4057 (+1.9 mmu).

Preparation of 4

15 (52.8 mg, 64.3 μmol), *N,N,N'*-trimethylethylenediamine (23.4 μL, 180 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **4** (25.4 mg, 45%) as a purple solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.17 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.96–7.91 (m, 4H), 7.86 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 7.59–7.53 (m, 4H), 7.39 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 6.12 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 4.32 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 3.95 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.51 (s, 3H), 2.99 (t, 4H, J = 7.2 Hz), 2.81–2.76 (m, 2H) , 2.60 (t, 4H, J = 10.0 Hz) , 2.33–2.22 (m, 10H), 1.97 (s, 12H), 1.90–1.84 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{49}H_{59}N_4O_6S_2$ [M−Na]$^-$ 863.3882, found:

863.3893 (+1.1 mmu).

Preparation of 5

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), propanediamine (30.0 μL, 356 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **5** (16.3 mg, 31%) as a blue solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.15 (d, 2H, *J* = 9.9 Hz), 7.93–7.86 (m, 6H), 7.55–7.49 (m, 4H,), 7.35 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.00–5.92 (br m, 2H), 4.31–4.24 (br m, 4H), 3.91 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.98 (t, 4H, *J* = 8.1 Hz), 2.90 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.63 (t, 4H, *J* = 6.3 Hz), 2.30–2.23 (m, 4H), 2.03–1.91 (m, 14H), 1.89–1.83 (m, 2H). HRMS (ESI^+): calcd. for $C_{47}H_{56}N_4NaO_6S_2$ $[M+Na]^+$ 859.3534, found: 859.3543 (+0.9 mmu).

Preparation of 6

15 (51.6 mg, 61.2 μmol), *N,N,N'*-trimethylpropanediamine (26.4 μL, 180 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford 6 (28.2 mg, 51%) as a purple solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.19 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.98–7.91 (m, 4H), 7.78 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 7.63–7.54 (m, 4H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.16 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.34 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz), 3.84 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.50 (s, 3H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.62 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz) , 2.39 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 2.33–2.23 (m, 10H) , 2.09–1.96 (m, 14H), 1.91–1.84 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{50}H_{61}N_4O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 877.4049, found: 877.4038 (−1.1 mmu).

Preparation of 7

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), methylamine (10.3 μL, 232 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **7** (29.3 mg, 59%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.13 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.89 (d, 4H, *J* = 8.5 Hz), 7.79 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 7.55–7.45 (m, 4H), 7.34 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 5.92 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.29–4.20 (m, 4H), 3.51 (s, 3H), 3.02–2.93 (m, 4H), 2.69–2.61 (m, 4H), 2.31–2.21 (m, 4H), 2.03–1.82 (m, 14H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{45}H_{50}N_3O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 792.3147, found: 792.3171 (+2.4

mmu).

Preparation of 8

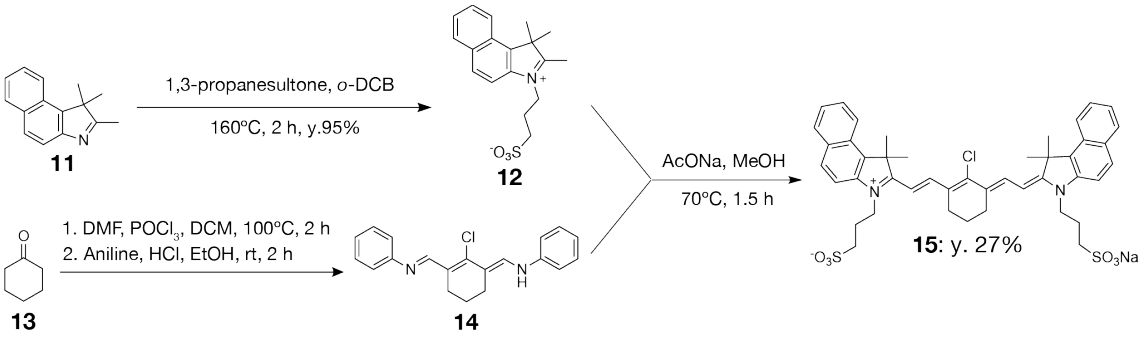
15 (53.8 mg, 65.5 µmol), dimethylamine (20.0 µL, 297 µmol), and NEt_3 (60.0 µL, 431 µmol) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **8** (32.4 mg, 60%). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.16 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.91 (d, 4H, *J* = 7.6 Hz), 7.65 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 7.57–7.50 (m, 4H), 7.37 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.04 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.32–4.24 (m, 4H), 3.59 (s, 6H), 2.98 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.60 (t, 4H, *J* = 5.6 Hz), 2.31–2.21 (m, 4H), 1.99–1.82 (m, 14H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{46}H_{52}N_3O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 806.3303, found: 806.3315 (+1.2 mmu).

Preparation of 9

15 (50.0 mg, 60.9 µmol), β-alanine (16.0 mg, 180 µmol), and NEt_3 (40.0 µL, 287 µmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **9** (8.50 mg, 16%) as a purple solid. 1H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.21 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.95–7.87 (m, 6H), 7.56–7.49 (m, 4H), 7.35 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 5.99 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.26 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz), 3.98 (t, 2H, *J* = 5.4 Hz), 2.98 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.65–2.57 (m, 6H), 2.30–2.22 (m, 4H), 1.99 (s, 12H), 1.91–1.84 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{47}H_{51}N_3O_8S_2$ $[M-H-Na]^-$ 424.6564, found: 424.6569 (+0.5 mmu).

Preparation of 10

15 (50.0 mg, 60.9 µmol), 6-aminohexanoic acid (23.8 mg, 181 µmol), and NEt3 (40.0 µL, 287.0 µmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **10** (19.5 mg, 35%) as a dark red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.17 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.93–7.84 (m, 6H), 7.58–7.50 (m, 4H), 7.35 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 5.99 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.26 (t, 4H, *J* = 10.0 Hz), 3.82 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 2.98 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.62 (t, 4H, *J* = 6.3 Hz) , 2.30–2.20 (m, 6H), 1.97 (s, 12H) , 1.91–1.84 (m, 4H), 1.77–1.70 (m, 2H), 1.56–1.49 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{50}H_{58}N_3O_8S_2$ $[M-Na]^-$ 892.3671, found: 892.3688 (+1.7 mmu).



Preparation of 12

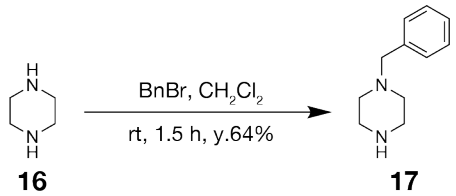
11 was synthesized according to a reported procedure.[49] 1,1,2-Trimethyl-1H-benzo[e]indole (2.00 g, 9.56 mmol) and 1,3-propanesultone (1.30 g, 10.6 mmol) were dissolved in anhydrous o-dichlorobenzene (5 mL). The mixture was stirred at 160°C for 2 h under an argon atmosphere. Upon reaction completion, the precipitate was filtered, washed with cold n-hexane, and dried in vacuo to afford **12** (3.00 g, 95%) as a gray solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 8.35 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.28 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 8.24–8.18 (m, 2H), 7.77 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.71 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 4.76 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz), 2.92 (s, 3H), 2.65 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.25–2.16 (m, 2H), 1.74 (s, 6H). LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{18}H_{21}NO_3S$ $[M+H]^+$ 332, found: 332.

Preparation of 14

13 was synthesized according to a reported procedure.[48] Phosphoryl chloride (2.50 mL, 26.8 mmol) was added dropwise to anhydrous DMF (3.00 mL, 38.7 mmol) on an ice bath. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, a 1:1 mixture of cyclohexanone and dichloromethane (1.50 mL of each, cyclohexanone 14.5 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred at 100°C for 2 h. After cooling to room temperature, EtOH was added to the mixture, followed by the dropwise addition of a mixture of aniline:EtOH (5 mL of each, aniline 54.9 mmol) on an ice bath. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Upon reaction completion, the dark red solution was poured into 1.5 M HCl aq. (200 mL). After 30 min, the precipitate was collected by filtration, washed with cold *n*-hexane, and dried in vacuo to yield **14** (5.08 g) as a dark red solid, which was used in the next step without further purification. LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{20}H_{20}ClN_2$ $[M+H]^+$ 323, found: 323.

Preparation of 15

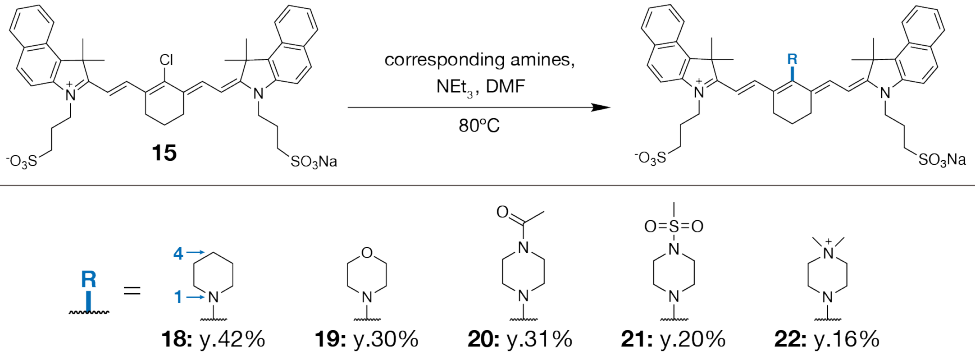
12 (663 mg, 2.00 mmol), **14** (323 mg, 1.00 mmol), and AcONa (246 mg, 3.00 mmol) were dissolved in anhydrous MeOH (12 mL). The mixture was stirred and refluxed for 1.5 h under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O), the mixture was evaporated, and the precipitate was purified by medium pressure LC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a Sep-Pak C18 cartridge for removing TEAA and a cation exchange resin. The solution was freeze-dried to afford **15** (223 mg, 27%) as a glossy orange solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.56 (d, 2H, *J* = 14.4 Hz), 8.27 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 8.05–7.96 (m, 4H), 7.73 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.64 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.48 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.50 (d, 2H, *J* = 14.4 Hz), 4.51 (t, 4H, *J* = 7.9 Hz), 3.01 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz), 2.82 (t, 4H, *J* = 5.8 Hz), 2.37–2.27 (m, 4H), 2.04 (s, 12H), 2.01–1.94 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{44}H_{46}ClN_2O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 797.2491, found: 797.2514 (+2.3 mmu).



16 **17**

Preparation of 17

16 (2.20 g, 25.5 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (15 mL). Benzyl bromide (1.18 mL, 9.90 mmol) was added dropwise to the mixture on an ice bath. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Upon reaction completion, the mixture was evaporated and purified by silica gel chromatography (CH_2Cl_2/MeOH, 90/10 to 0/100). After removal of all the volatiles from the collected fractions, the residue was dried in vacuo to afford **17** (1.11 g, 64%). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.27–7.14 (m, 5H), 3.42 (s, 2H), 2.81 (t, 4H, *J* = 4.9 Hz), 2.38–2.30 (br m, 4H). LRMS (ESI^+): calcd. for $C_{11}H_{16}N_2$ $[M+H]^+$ 177, found: 177.



General synthetic procedure of cyanine dyes with various amino groups

15 (1 eq.), corresponding amine (3–14 eq.), and NEt_3 (0–123 eq.) were dissolved in anhydrous DMF (0.03–0.20 mL/μmol). The mixture was stirred at 80°C under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC, DMF was removed under vacuum and the precipitate was purified by semi-preparative HPLC (A/B = 20 mM NEt_3 in water/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding cyanine dyes.

Preparation of 18

15 (62.0 mg, 60.9 μmol), piperidine (18.7 μL, 189 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford 18 (22.2 mg, 42%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.18 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.95–7.89 (m, 4H), 7.81 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 7.59–7.52 (m, 4H), 7.38 (t, 2H, J = 7.4 Hz), 6.09 (d, 2H, J = 13.5 Hz) , 4.34–4.26 (m, 4H) , 3.92–3.83 (m, 4H), 2.98 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 2.61 (t, 4H, J = 6.7 Hz), 2.31–2.21 (m, 4H), 2.03–1.94 (m, 18H), 1.91–1.83 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{49}H_{56}N_3O_6S_2$ $[M-Na]^-$ 846.3616, found: 846.3640 (+2.4 mmu).

Preparation of 19

15 (62.3 mg, 71.1 μmol) and morpholine (60.0 mg, 689 μmol) were dissolved in anhydrous DMF. Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **19** (18.4 mg, 30%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 8.02–7.91 (m, 6H), 7.64–7.55 (m, 4H), 7.41 (t, 2H, J = 7.6 Hz),

6.20 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.36 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz), 4.07–4.01 (m, 4H), 3.81–3.76 (m, 4H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.63 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.33–2.23 (m, 4H), 2.02 (s, 12H), 1.91–1.84 (m, 2H). HRMS (ESI⁻): calcd. for $C_{48}H_{54}N_3O_7S_2$ [M−Na]⁻ 848.3409, found: 848.3418 (+0.9 mmu).

Preparation of 20

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 1-acetylpiperazine (21.5 μL, 180 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **20** (17.3 mg, 31%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 8.02 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz) , 7.99–7.92 (m, 4H), 7.64–7.56 (m, 4H), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 6.25 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz) , 4.39 (t, 4H, *J* = 7.9 Hz), 3.98–3.88 (m, 4H), 3.74–3.65 (m, 4H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz) , 2.65 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.33–2.24 (m, 7H), 2.01 (s, 12H), 1.92–1.85 (m, 2H). HRMS (ESI⁻): calcd. for $C_{50}H_{57}N_4O_7S_2$ [M−Na]⁻ 889.3674, found: 889.3706 (+3.2 mmu).

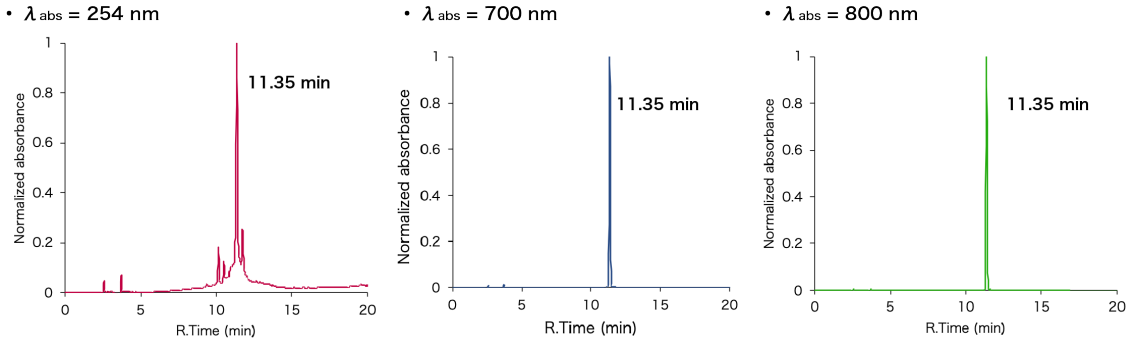
Preparation of 21

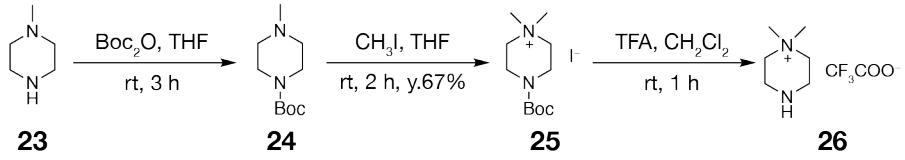
15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 1-methylsulfonylpiperazine (29.6 mg, 200 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **21** (11.6 mg, 20%) as a blue solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.24 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 8.08 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz) , 8.00–7.93 (m, 4H), 7.65 (d, 2H, 8.5 Hz), 7.60 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.43 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz), 6.29 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.41 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 3.76–3.70 (m, 4H), 3.61–3.56 (m, 4H), 3.12 (s, 3H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.66 (t, 4H, *J* = 6.3 Hz), 2.34–2.24 (m, 4H), 2.04 (s, 12H), 1.92–1.85 (m, 2H). HRMS (ESI⁻): calcd. for $C_{49}H_{57}N_4O_8S_3$ [M−Na]⁻ 925.3344, found: 925.3366 (+2.2 mmu).

Preparation of 22

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), **26** (43.6 mg, 180 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). The mixture was stirred at 80°C for 1.5 h under an argon atmosphere. Then, further NEt_3 (1.00 mL, 7.20 mmol) was added to the mixture. The mixture was reacted and purified according to the general procedure to

afford **22** (8.40 mg, 16%) as a gray solid. Since **22** underwent decomposition during the NMR measurements, it was analyzed by LC-MS and its purity was confirmed by HPLC. HRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{50}H_{60}N_4NaO_6S_2$ $[M+Na]^+$ 899.3847, found: 899.3875 (+0.1 mmu).





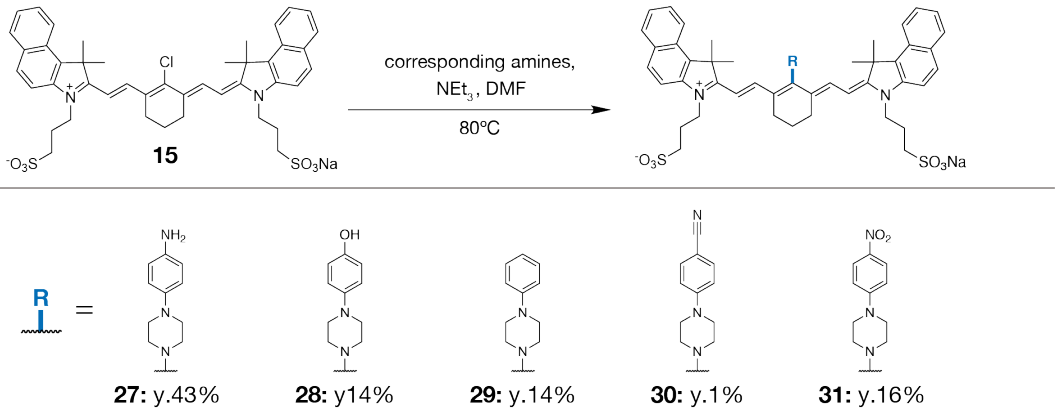
Preparation of 25

1-Methylpiperazine (0.40 mL, 3.60 mmol) and Boc_2O (0.96 g, 4.40 mmol) were dissolved in tetrahydrofuran (THF) (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The formation of **24** was monitored by ESI-MS (m/z 201). Then, iodomethane (0.20 mL, 3.20 mmol) was added to the reaction mixture. The mixture was stirred at room temperature for further 3 h. Upon reaction completion, the mixture was filtered, the solid was washed with cold Et_2O and then dried in vacuo to afford **25** (857 mg, 67%) as a white solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.83 (t, 4H, J = 4.7 Hz), 3.78–3.72 (m, 4H), 3.66 (s, 6H), 1.47 (s, 9H). HRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{11}H_{23}N_2O_2$ $[M-I]^+$ 215.1754, found: 215.1754 (+0.0 mmu).

Preparation of 26

25 (61.6 mg, 180 μmol) was dissolved in TFA/CH_2Cl_2 (1:1, 3.5 mL each). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. Upon reaction completion, the mixture was evaporated and then dried in vacuo to afford **26** as a brown liquid, which was used in the next step without further purification. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 3.74–3.78 (m,

4H), 3.65–3.70 (m, 4H), 3.34 (s, 9H).



General synthetic procedure of cyanine dyes bearing aryl groups

15 (1 eq.), corresponding amine (3.0–3.1 eq.), and NEt_3 (4.7–7.1 eq.) were dissolved in anhydrous DMF (0.11–0.16 mL/μmol). The mixture was stirred at 80°C under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC, DMF was removed under vacuum and the precipitate was purified by semi-preparative HPLC (A/B = 20 mM NEt_3 in water/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding cyanine dyes.

Preparation of 27

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), **33** (31.9 mg, 180 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **27** (25.0 mg, 43%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.15 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 8.00 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 7.97–7.90 (m, 4H), 7.62–7.53 (m, 4H), 7.40 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 7.01 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 6.83 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.20 (d, 2H, J = 13.5 Hz), 4.36 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 3.92 (s, 4H), 3.41 (s. 4H), 2.99 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 2.64 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 2.32-2.23 (m, 4H), 1.99 (s, 12H), 1.92-1.85 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{54}H_{60}N_5O_6S_2$ $[M\text{-}Na]^-$ 938.3991, found: 939.4012. (+2.1 mmu)

Preparation of 28

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 1-(4-hydroxyphenyl)piperazine (32.0 mg, 180.0 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **28** (8.30 mg, 14%). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.16 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.02 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 7.97-7.91 (m, 4H), 7.62-7.54 (m, 4H), 7.40 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz), 7.04 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.84 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.21 (d, 2H, *J* = 13.9 Hz), 4.36 (t, 4H, *J* = 10.0 Hz), 3.93-3.88 (m, 4H), 3.47-3.42 (m, 4H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.65 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.31-2.25 (m, 4H), 1.99 (s, 12H), 1.91-1.86 (m, 3H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{54}H_{59}N_4O_7S_2$ [M-Na]$^-$ 939.3831, found: 939.3854. (+2.3 mmu).

Preparation of 29

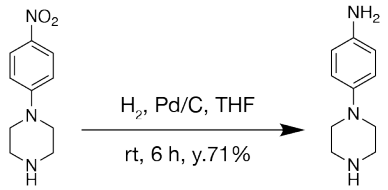
15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 1-phenylpiperazine (28.4 μL, 180 μmol), and NEt_3 (40.0 μL, 287 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (10 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **29** (8.00 mg, 14%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.14 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.05 (d, 2H, *J* = 13.9 Hz), 7.97-7.90 (m, 4H), 7.60 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.55 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz), 7.43-7.34 (m, 4H), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 6.98 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.22 (d, 2H, *J* = 13.9 Hz), 4.37 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 3.92-3.86 (m, 4H), 3.64-3.58 (m, 4H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.65 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.32-2.24 (m, 4H), 1.97 (s, 12H), 1.93-1.86 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{54}H_{59}N_4O_6S_2$ [M-Na]$^-$ 923.3882, found: 923.3891. (+0.9 mmu)

Preparation of 30

15 (62.0 mg, 60.9 μmol), **35** (18.7 μL, 189 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **30** (0.50 mg, 1%). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.15-8.08 (m, 4H), 7.98-7.92 (m, 4H), 7.71 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.65-7.59 (m, 4H), 7.42 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.24 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.27 (d, 2H, *J* = 13.9 Hz), 4.39 (t, 4H, *J* = 7.9 Hz), 3.90-3.85 (m, 4H), 3.79-3.74 (m, 4H), 2.98 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz), 2.67 (t, 4H, *J* = 6.3 Hz), 2.32-2.24 (m, 4H), 1.92 (s, 12H), 1.30-1.27 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{55}H_{58}N_5O_6S_2$ [M-Na]$^-$ 948.3834, found: 948.3861. (+2.7 mmu)

Preparation of 31

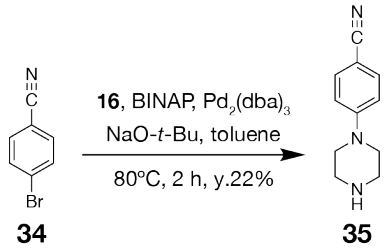
15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 1-(4-nitrophenyl)piperazine (37.3 mg, 180 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **31** (16.2 mg, 16%) as a green solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.31 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.15 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 8.02 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.98-7.91 (m, 4H), 7.63 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.56 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 7.23 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.28 (d, 2H, *J* = 13.9 Hz), 4.40 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 4.03-3.97 (m, 4H), 3.77-3.71 (m, 4H), 2.98 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz), 2.67 (t, 4H, *J* = 5.2 Hz), 2.32-2.24 (m, 4H), 1.94-1.87 (m, 14H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{54}H_{58}N_5O_8S_2$ $[M-Na]^-$ 968.3732, found: 968.3735 (+0.3 mmu).



32 **33**

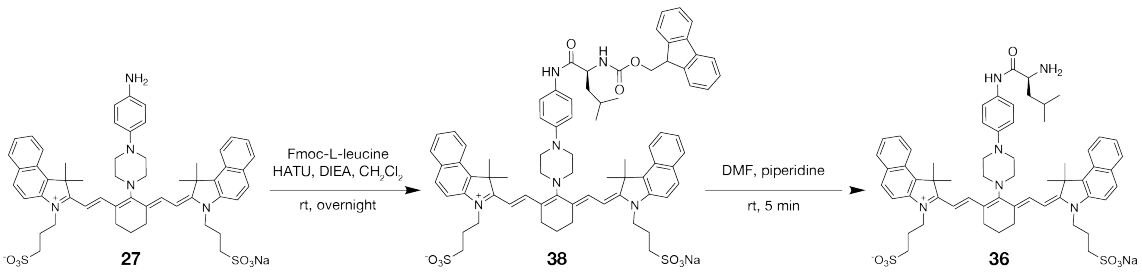
Preparation of 33

32 (170 mg, 0.82 mmol) was dissolved in anhydrous THF (8 mL). Pd/C (50.0 mg, 0.12 mmol) was then added, followed by the filling of the flask with hydrogen gas. The mixture was stirred at room temperature for 6 h. After the reaction, the solution was filtered under reduced pressure using THF, and the filtrate was checked by HPLC (ODS silica column, H_2O, 0.1% TFA/99% MeCN, 1% H_2O, gradient from 80/20 to 100/0 MeCN). The solvent was removed under reduced pressure without further purification to obtain **33** as a solid (103 mg, 71%). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 6.73 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 6.61 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 2.86 (s, 8H) LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{10}H_{16}N_3$ $[M+H]^+$ 178, found: 178.



Preparation of 35

piperazine (**16**) (1.15 g, 13.4 mmol), 4-bromobenzonitrile (**34**) (0.80 g, 4.40 mmol) and NaO-*t*-Bu (0.60 g, 6.20 mmol) was added in anhydrous toluene (20 mL). Then, (dibenzylideneacetone)dipalladium (9.15 mg, 0.01 mmol) and *rac*-BINAP (18.7 mg, 0.03 mmol) were added, and the mixture was replaced with argon. The mixture was stirred at 80 °C for 2 h. After the reaction, the solution was left to cool to room temperature, filtered under reduced pressure, and washed with Et_2O. The solvent of the filtrate was removed under reduced pressure. The obtained product was purified using semi-preparative HPLC (ODS silica column, H_2O, 0.1% TFA/99% MeCN, 1% H_2O). The fraction containing the desired product was evaporated and freeze-dried to obtain **35** (180 mg, 22%). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ7.58 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.09 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 3.57 (t, 4H, J = 5.4 Hz), 3.34–3.28 (m, 5H). LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{11}H_{14}N_3$ $[M+H]^+$ 188, found: 188.

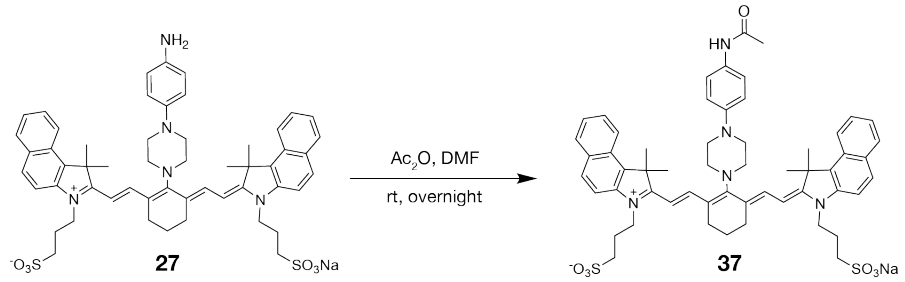


Preparation of 36

27 (2.5 mg, 2.60 μmol), Fmoc-L-leucine (0.88 mg, 2.50 μmol), HATU (0.99 mg, 2.60 μmol), and diisopropylethylamine (DIEA) (0.87 μL, 5.00 μmol) were added to DMF (2 mL) under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction progress was monitored by HPLC (ODS silica column, 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). Upon completion, the solvent was removed under

reduced pressure to obtain **38**. HRMS (ESI⁻): calcd. for $C_{75}H_{81}N_6O_9S_2$ [M–Na]⁻ 1273.5520, found: 1273.5512 (–0.8 mmu).

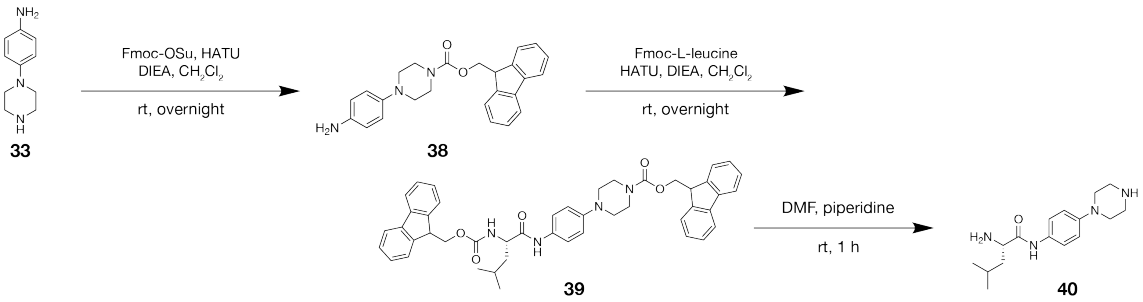
To the obtained precipitate, piperidine/DMF (1/1, each 1 mL) were added, and the solution was stirred at room temperature for 5 min. The solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified with HPLC (ODS silica column, 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). The collected fraction was then evaporated until only water remained, and the aqueous solution was passed through a Sep-Pak cartridge using water and MeOH. The obtained solution was evaporated until only water remained. After the solution was passed through a sodium ion exchange resin, the product was freeze-dried to obtain **36** (0.30 mg, 11%) as a blue solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.15 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz), 8.03 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 7.94 (t, 4H, *J* = 8.3 Hz), 7.63-7.53 (m, 6H), 7.43–7.36 (m, 2H), 7.14 (d, 2H, *J* = 10.3 Hz), 6.21 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.62–4.60 (m, 1H), 4.40–4.34 (m, 4H), 3.95–3.90 (m, 4H), 3.59–3.54 (m. 4H), 3.01–2.97 (m, 4H), 2.68–2.64 (m, 4H), 2.31-2.25 (m, 4H), 2.03–1.88 (m, 14H), 1.61–1.54 (m, 2H), 1.05–0.90 (m, 7H). HRMS (ESI⁻): calcd. for $C_{60}H_{71}N_6O_7S_2$ [M–Na]⁻ 1051.4831, found: 1051.4848 (+1.7 mmu).



Preparation of 37

27 (2.50 mg, 2.60 μmol) and Ac_2O (0.51 mg, 5.00 μmol) were added in DMF 2 mL under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction progress was monitored by HPLC (ODS silica column, 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). Upon completion, the solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified with HPLC (ODS silica column, 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). The collected fraction was then evaporated until only water remained, and the aqueous solution was passed through a Sep-Pak cartridge using water and MeOH. The obtained solution was evaporated until only water remained. After the solution was passed through a sodium ion exchange resin, the product was freeze-dried to

obtain **37** (0.50 mg, 19%) as a blue-green solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.14 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.04 (d, 2H, *J* = 14.5 Hz), 7.94 (t, 4H, *J* = 8.0 Hz), 7.63-7.53 (m, 6H), 7.40 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.12 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.22 (d, 2H, *J* = 14.5 Hz), 4.37 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 3.92–3.87 (m, 4H), 3.60–3.56 (m. 4H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.65 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.32-2.25 (m, 4H), 2.14 (s, 3H), 1.98 (s, 12H), 1.92-1.90 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{56}H_{62}N_5O_7S_2$ $[M–Na]^-$ 980.4096, found: 980.4123 (+2.7 mmu).



Preparation of 38

33 (300 mg, 1.69 mmol), Fmoc-OSu (570 mg, 1.69 mmol) was dissolved in THF 10 mL and then DIEA (522 µL, 3.00 mmol) was added to the solution. The mixture was stirred for 1 h at 0°C. The reaction progress was confirmed with HPLC. Upon completion, THF was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (10 mL) and wash with water (40 mL), 2% aq. $NaHSO_4$ (2x20 mL), water (2x20 mL), brine (20 mL). The organic phase was dried by Na_2SO_4 and the solvent was evaporated to obtain **38** (253 mg, 37%) as an ocher solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ7.77 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.32 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 6.81 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz), 6.67 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz), 4.46 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 4.27 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz), 3.65–3.57 (br m, 4H), 3.00–2.92 (br m, 4H). LRMS (ESI^+): calcd. for $C_{25}H_{26}N_3O_2$ $[M+H]^+$ 400, found: 400.

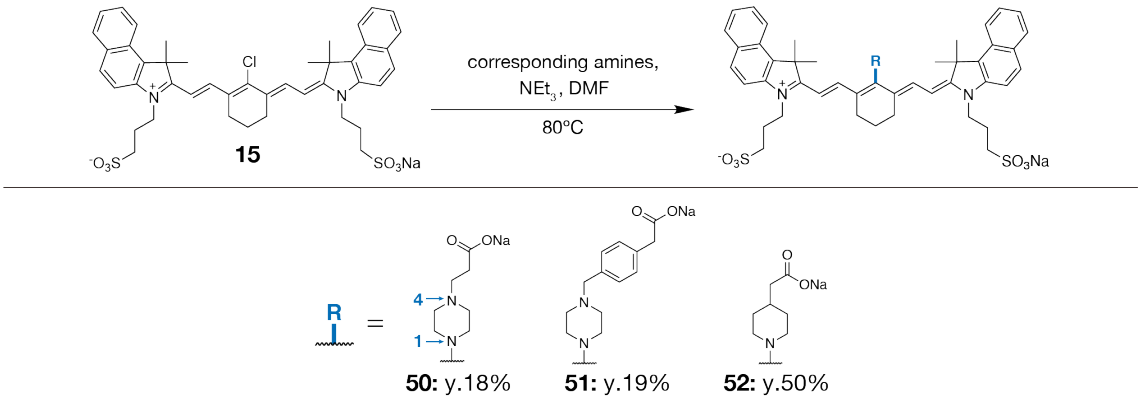
Preparation of 39

38 (100 mg, 250 µmol), Fmoc-L-leucine (88.4 mg, 250 µmol), HATU (95.1 mg, 250 µmol), and DIEA (87.1 µL, 500 µmol) were added in CH_2Cl_2 (3 mL). The mixture was stirred rt overnight. After reaction progress was confirmed by TLC, the residue was washed with CH_2Cl_2 and H_2O. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and then concentrated.

The residue was purified with column chromatography (silica 2.5 g, CH_2Cl_2/ AcOEt = 4:1). The obtained fraction was concentrated to afford **39** (154 mg, 84%) as a white solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ7.77 (dd, 4H, *J* = 7.5, 3.0 Hz), 7.58 (dd, 4H, *J* = 7.5, 3.0 Hz), 7.44–7.38 (m, 6H), 7.32 (td, 4H, *J* = 7.5, 3.0 Hz), 6.88 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 4.48 (d, 4H, *J* = 6.4 Hz), 3.65–3.56 (br m, 4H), 3.09–3.01 (br m, 4H), 1.80–1.66 (m, 2H). LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{46}H_{46}N_4O_5$ $[M+H]^+$ 735, found: 735.

Preparation of 40

39 (150 mg, 0.204 mmol) was added to DMF/piperidine (1/1, 2 mL). The solution was stirred at room temperature overnight for 1 h. The reaction progress was monitored by HPLC. Upon completion, the solvent was evaporated and the preicipitate was purified with HPLC. The collected fraction was concentrated to obtain **40** (55.2 mg, 95%) as a yellow liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ7.52 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 7.02 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz), 3.97 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz), 3.38–3.35 (m, 8H), 1.71–1.68 (m, 3H), 1.05–1.01 (m, 6H). LRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{16}H_{25}N_4O$ $[M+H]^+$ 291, found: 291.



General synthetic procedure of cyanine dyes bearing diazaalkyl and carboxy groups

15 (1 eq.), corresponding amines (3–14 eq.), and NEt_3 (0–123 eq.) were dissolved in anhydrous DMF (0.03–0.20 mL/μmol). The mixture was stirred at 80°C under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC, DMF was removed under vacuum and the precipitate was purified by semi-preparative HPLC (A/B = 20 mM NEt_3 in water/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected

fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding cyanine dyes.

Preparation of 50

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 3-(piperazin-1-yl)propanoic acid (28.9 mg, 182 μmol), and NEt_3 (50.7 μL, 364 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **50** (10.5 mg, 18%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.97–7.89 (m, 6H), 7.62–7.56 (m, 4H), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 6.16 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.34 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz), 3.84 (t, 4H, *J* = 3.8 Hz), 3.02–2.88 (m, 10H), 2.62 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.54 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz) , 2.32–2.23 (m, 4H) , 2.02 (s, 12H), 1.90–1.84 (m, 2H). HRMS (ESI+): calcd. for $C_{51}H_{58}N_4Na_3O_8S_2$ $[M+Na]^+$ 987.3384, found: 987.3367 (−1.7 mmu).

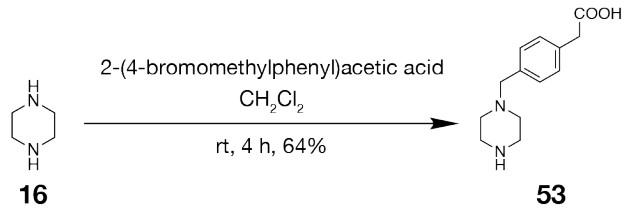
Preparation of 51

15 (54.2 mg, 66.0 μmol), **53** (49.2 mg, 210 μmol), and NEt_3 (50.0 μL, 359 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **37** (12.5 mg, 19%) as a red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.21 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.97–7.92 (m, 4H), 7.88 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 7.64 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.44–7.38 (m, 6H), 6.15 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 4.33 (t, 4H, *J* = 7.6 Hz), 3.86–3.80 (m, 6H), 3.50 (s, 2H), 2.99 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 2.90–2.83 (m, 4H), 2.60 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.31–2.22 (m, 4H), 1.97 (s, 12H), 1.90–1.82 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{57}H_{63}N_4O_8S_2$ $[M-Na]^-$ 995.4093, found: 995.4109 (+1.6 mmu).

Preparation of 52

15 (50.0 mg, 60.9 μmol), 4-piperidineacetic acid (25.8 mg, 180 μmol), and NEt_3 (60.0 μL, 431 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (7 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **52** (28.4 mg, 50%) as a purplish blue solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.95–7.89 (m, 4H), 7.84 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 7.60–7.54 (m, 4H), 7.38 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 6.11 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.31 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 4.07–3.99 (m, 2H), 3.71 (t, 2H, *J* = 10.0 Hz),

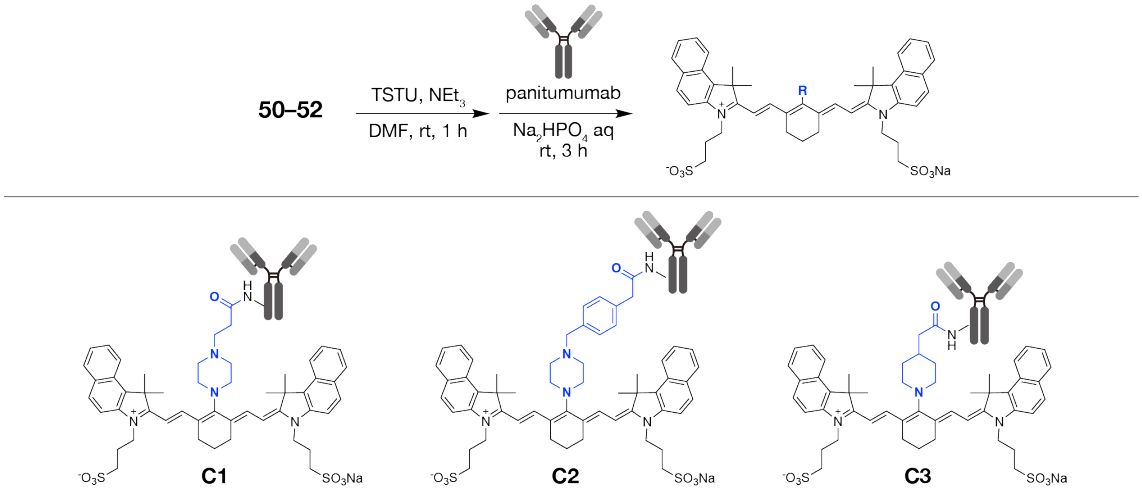
2.99 (t, 4H, J = 7.0 Hz), 2.61 (t, 4H, J = 6.5 Hz) , 2.38–2.21 (m, 6H) , 2.14–2.07 (m, 2H), 2.00 (s, 12H), 1.91–1.82 (m, 2H), 1.73–1.60 (m, 2H). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{51}H_{58}N_3O_8S_2$ [M−Na]$^-$ 904.3671, found: 904.3681 (+1.0 mmu).



16 **53**

Preparation of 53

16 (1.80 g, 21.0 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (15 mL). 4-(Bromomethyl)-benzeneacetic acid (1.60 g, 7.00 mmol) was added dropwise to the mixture on an ice bath. The mixture was stirred for 4 h at room temperature. Upon reaction completion, the mixture was adjusted to neutral pH by addition of TFA to allow an easy dissolution of the product in aqueous solvents. Then, the mixture was purified by semi-preparative HPLC (A/B = H_2O, 0.1% TFA/MeCN, 99% MeCN, 1% H_2O). After removal of all the volatiles from the collected fractions, the product was dried in vacuo to afford **53** (171 mg, 10%) as a white solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.46–7.33 (m, 4H), 4.12 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.42 (t, 4H, J = 5.2 Hz), 3.25–3.15 (m, 4H). HRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{13}H_{19}N_2O_2$ [M+H]$^+$ 235.1441, found: 235.1440 (+0.1 mmu).



General procedure for the preparation of cyanine dye-antibody conjugates

Each cyanine dye (1 eq), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate (TSTU) (2.0–2.1 eq), and NEt_3 (3.0–4.5 eq) were dissolved in anhydrous DMF (1.0–1.4 mL/μmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction progress was monitored by HPLC (A/B = 0.1 M triethylamine acetate (TEAA) buffer/99% MeCN, 1% H_2O). Subsequently, TFA was added to the mixture to neutralize the pH. Then, DMF was removed under vacuum and the precipitate was dried under vacuum. The crude product was used in the next step without further purification.

The crude product was dissolved in DMSO (30 μL) to prepare a 5.8–10.5 mM DMSO solution. The DMSO solution (purity: 67%, 2.63 μL, 10.15 nmol) and 32.7 mg/mL panitumumab in PBS (9.17 μL, 2.03 nmol) were added to 0.1 M Na_2HPO_4 aq. containing 5% DMSO toa total volume of 300 μL. The mixture was left at room temperature for 3 h. Upon reaction completion, the mixture was purified by using an Amicon Ultra-4 30 kDa (Merck KGaA) filter. The protein concentration of the product was measured with a microplate reader (infinite M200, TECAN) using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) and dye concentration was calculated by absorbance measurements using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimazu Co.). The ratios of antibody to dye were found to be 1:3–8, which included dyes binding to antibodies or dyes connected via non-covalent binding due to their hydrophobicity.

Preparation of C1

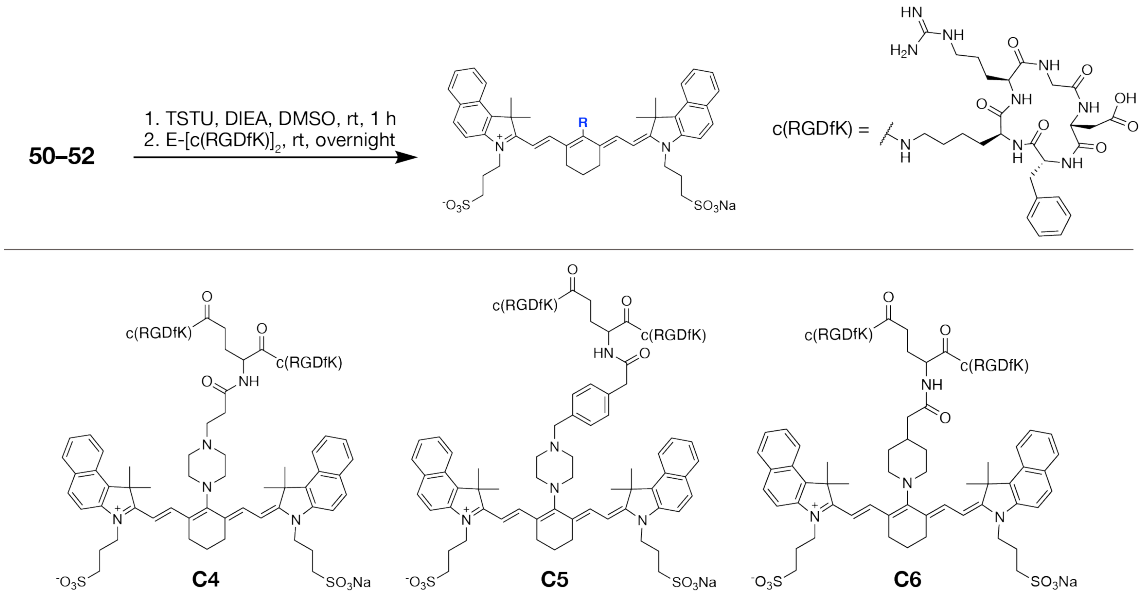
50 (1.93 mg, 2 μmol), TSTU (1.20 mg, 3.99 μmol), and NEt_3 (1.00 μL, 8.90 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. The conjugation reaction was performed using a 5.8 mM DMSO solution (purity: 67%, 2.63 μL, 10.15 nmol). DAR of **C1** was about 3.

Preparation of C2

51 (2.04 mg, 2.00 μmol), TSTU (1.20 mg, 3.99 μmol), and NEt_3 (1.00 μL, 8.90 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. The conjugation reaction was performed using a 10.5 mM DMSO solution (purity: 36%, 2.67 μL, 10.09 nmol). DAR of **C2** was about 8.

Preparation of C3

52 (1.78 mg, 2.15 μmol), TSTU (1.36 mg, 4.52 μmol), and NEt_3 (0.89 μL, 6.39 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (3 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. The conjugation reaction was performed using a 6.4 mM DMSO solution (purity: 60%, 2.64 μL, 10.2 nmol). DAR of **C3** was about 5.



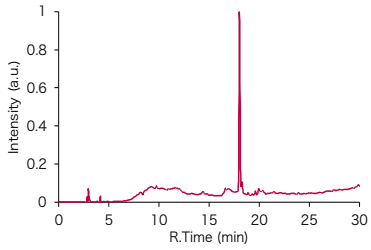
General synthetic procedure of RGD-dye conjugates

50–52 (1 eq) and TSTU (1 eq) were added to anhydrous DMSO (461 µL/µmol). Subsequently, DIEA (2 eq) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction progress was monitored by HPLC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). Upon completion, E-[c(RGDfK)]$_2$ (0.5 eq.) was added to the reaction solution, and the mixture was left to react overnight at room temperature. The reaction mixture was diluted with water/acetonitrile and purified by HPLC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding RGD-dye conjugates. The product was analyzed by HRMS and its purity was confirmed by HPLC.

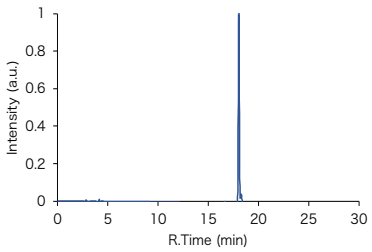
Preparation of C4

50 (0.74 mg, 0.76 μmol) and TSTU (0.23 mg, 0.76 μmol), and DIEA (0.27 μL, 1.52 μmol) were added to anhydrous DMSO (350 μL). Upon completion, E-[c(RGDfK)]$_2$ (0.50 mg, 0.38 μmol) was added to the reaction solution. The mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **C4** as a blue solid (1.00 mg, 58%). HRMS (ESI+): calcd. for $C_{110}H_{144}N_{23}Na_3O_{23}S_2$ $[M+2H]^{2+}$ 1143.9965, found: 1143.9965. (+0.0 mmu).

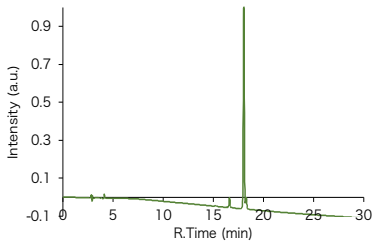
λ_{abs} = 254 nm



λ_{abs} = 700 nm



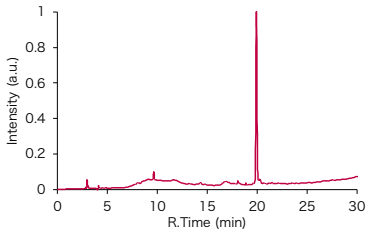
λ_{abs} = 800 nm



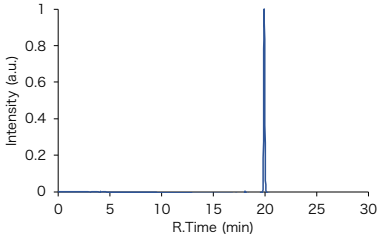
Preparation of C5

51 (0.85 mg, 0.76 μmol) and TSTU (0.23 mg, 0.76 μmol), and DIEA (0.27 μL, 1.52 μmol) were added to anhydrous DMSO (350 μL). Upon completion, E-[c(RGDfK)]$_2$ (0.50 mg, 0.38 μmol) was added to the reaction solution. The mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **C5** as a blue solid (1.20 mg, 67%). HRMS (ESI$^+$): calcd. for $C_{116}H_{148}N_{23}Na_3O_{23}S_2$ $[M+2H]^{2+}$ 1182.0121, found: 1182.0171. (+5.0 mmu).

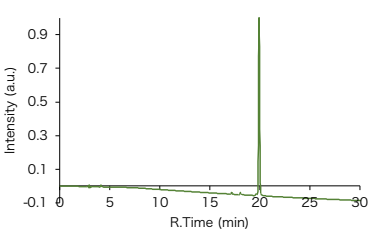
λ_{abs} = 254 nm



λ_{abs} = 700 nm



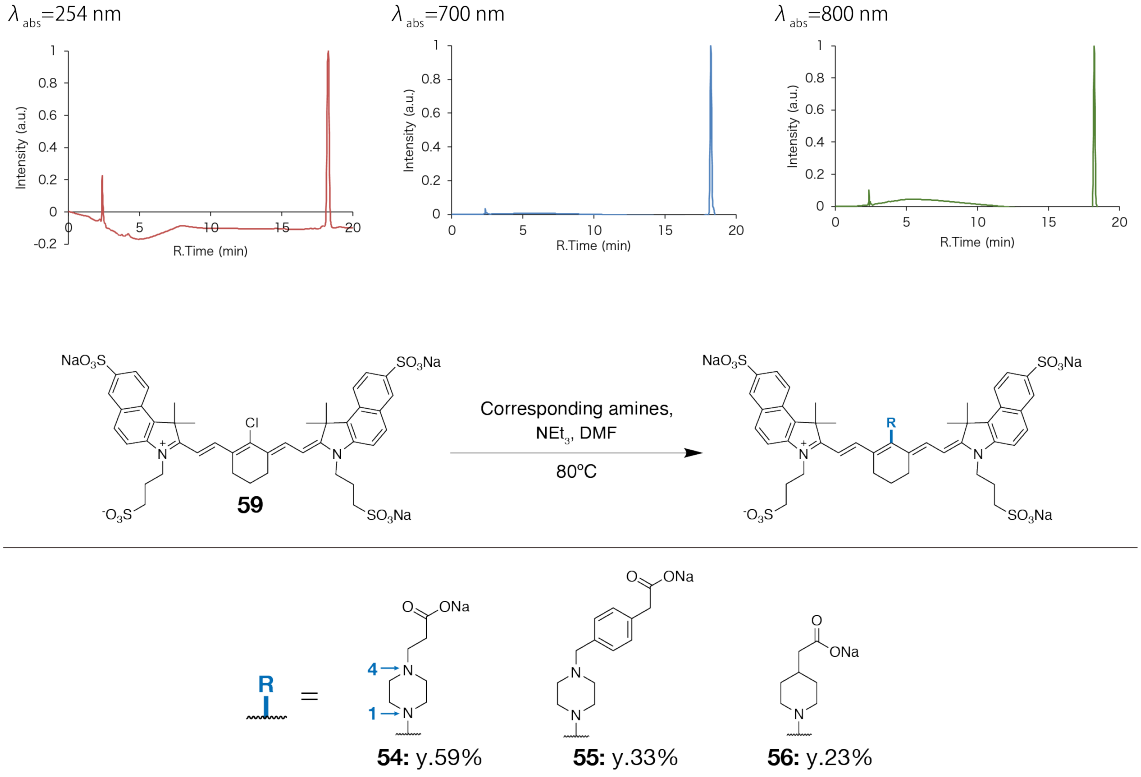
λ_{abs} = 800 nm



Preparation of C6

52 (0.78 mg, 0.76 μmol) and TSTU (0.23 mg, 0.76 μmol), and DIEA (0.27 μL, 1.52 μmol)

were added to anhydrous DMSO (350 μL). Upon completion, E-[c(RGDfK)]$_2$ (0.50 mg, 0.38 μmol) was added to the reaction solution. The mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **C6** as a blue solid (0.51 mg, 60%). HRMS (ESI$^-$): calcd. for $C_{110}H_{141}N_{22}O_{23}S_2$ [M-3Na]$^{3-}$ 733.9999, found: 734.0018. (+1.9 mmu).



General synthetic procedure of cyanine dyes for biological imaging

59 (1 eq.), corresponding amines (3–5 eq.), and NEt_3 (6–10 eq.) were dissolved in anhydrous DMF (0.13–0.47 mL/μmol). The mixture was stirred at 80°C under an argon atmosphere. After checking the reaction progress by HPLC, DMF was removed under vacuum and the precipitate was purified by semi-preparative HPLC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O). After removal of MeCN from the collected fractions, the solution was passed through a cation exchange resin, and then freeze-dried to afford the corresponding cyanine dyes.

Preparation of 54

59 (20.0 mg, 19.5 μmol), 3-(piperazin-1-yl)propanoic acid (9.25 mg, 58.5 μmol), and NEt_3 (16.3 μL, 117 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **54** (13.5 mg,

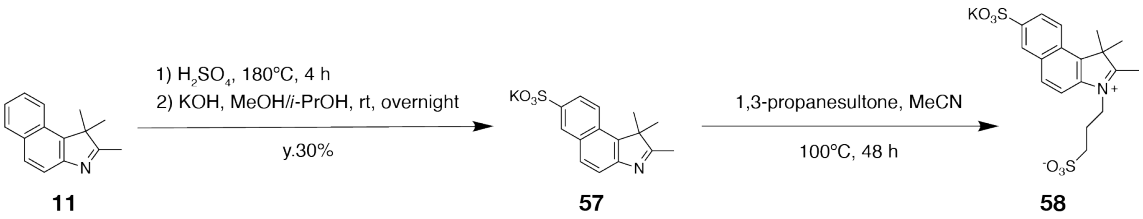
59%) as a blue-green solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.38 (s, 2H), 8.29 (d, 4H, *J* = 9.0 Hz), 8.03 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.98 (dd, 2H, *J* = 9.0, 1.8 Hz), 7.85 (d, 2H, *J* = 13.5 Hz), 7.64 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.16 (d, 2H, *J* = 13.0 Hz), 4.33 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 3.96–3.88 (m, 4H), 3.03–2.86 (m, 10H), 2.62 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 2.53 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 2.32–2.22 (m, 4H), 2.01 (s, 12H), 1.92–1.83 (m, 2H). HRMS (ESI+): calcd. for $C_{51}H_{56}N_4Na_5O_{14}S_4[M+Na]^+$ 1191.2159, found: 1191.2147. (–1.2 mmu).

Preparation of 55

59 (8.69 mg, 8.47 μmol), **39** (4.02 mg, 25.4 μmol), and NEt_3 (7.04 μL, 50.8 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **55** (3.50 mg, 33%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.39 (s, 2H), 8.29 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.06–7.97 (m, 4H), 7.83 (d, 2H, *J* = 13.6 Hz), 7.64 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.41–7.34 (m, 4H), 6.15 (d, 2H, *J* = 13.6 Hz), 4.33 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz), 3.96–3.90 (m, 4H), 3.77 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.00 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 2.90–2.83 (m, 4H), 2.62 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz), 2.30–2.21 (m, 4H), 2.00 (s, 12H), 1.90–1.84 (m, 3H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{57}H_{60}N_4Na_3O_{14}S_4[M–Na]^-$ 1221.2687, found: 1221.2695. (+0.8 mmu).

Preparation of 56

59 (40.0 mg, 39.0 μmol), 3-(piperazin-1-yl)propanoic acid (27.9 mg, 195 μmol), and NEt_3 (54.1 μL, 390 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (5 mL). Then, the mixture was reacted and purified according to the general procedure to afford **56** (2.10 mg, 4.7%) as a purplish red solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.37 (s, 2H), 8.29 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.02 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.95 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 7.78 (d, 2H, *J* = 11.5 Hz), 7.62 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 6.13 (d, 2H, *J* = 11.5 Hz), 4.35–4.26 (br m, 4H), 4.20–4.10 (br m, 2H), 3.80–3.70 (br m, 2H), 2.99 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 2.62 (t, 4H, *J* = 6.3 Hz), 2.50–2.45 (m, 2H), 2.30–2.21 (m, 4H), 2.17–2.09 (m, 2H), 2.04–1.83 (m, 16H), 1.80–1.70 (m, 2H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{51}H_{56}N_3O_{14}S_4[M–3Na]^{3-}$ 1354.0887, found: 354.0894. (+0.7 mmu).

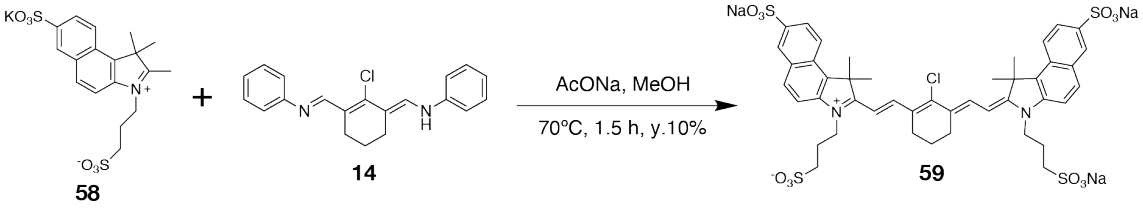


Preparation of 57

11 (4.00 g, 19.1 mmol) was added to concentrated sulfuric acid (16.0 mL, 284 mmol). The solution was stirred at 180°C for 4 h. After the reaction, the solution was cooled to 0°C and an excess of EtOAc was added. The resulting precipitate was filtered, and the obtained solid was dissolved in MeOH/*i*-PrOH (3/2, 80 mL) containing KOH (4.80 g, 85.8 mmol). This solution was stirred at room temperature overnight, and then the solution was removed. The residue was suspended in isopropanol and hexane, filtered, to obtain **57** (3.02 g, 48%) as a black-brown solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.44 (s, 1H), 8.19 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 8.02–7.96 (m, 2H), 7.74 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 2.41 (s, 3H), 1.57 (s, 6H). LRMS (ESI^-): calcd. for $C_{15}H_{14}NO_3S$ $[M-K]^-$ 288, found: 288.

Preparation of 58

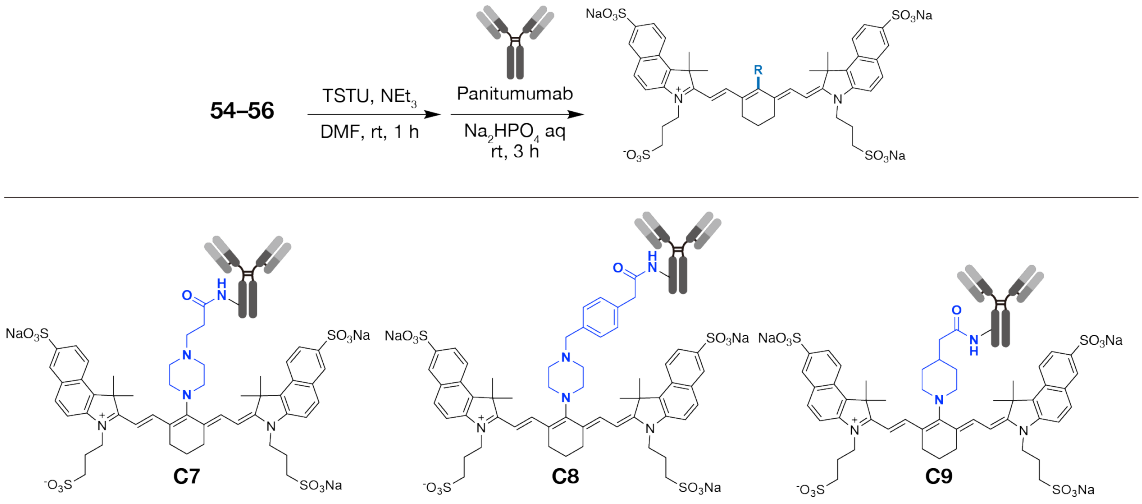
57 (1.80 g, 5.50 mmol) and propane sultone (2.42 mL, 27.5 mmol) were dissolved in MeCN. After purging with argon, the mixture was stirred under reflux for 48 h. The reaction progress was monitored by HPLC (A/B = 0.1 M TEAA buffer/99% MeCN, 1% H_2O), and MeCN was removed under reduced pressure to obtain **58** as a dark brown solid (2.05 g), which was then used for the next step without further purification. LRMS (ESI^-): calcd. for $C_{18}H_{20}NO_6S_2$ $[M-K]^-$ 410, found: 410.



Praparation of 59

58 (1.10 g, 2.44 mmol) was dissolved with **14** (394 mg, 1.22 mmol) and AcONa (328 mg, 4 mmol) in anhydrous MeOH (10 mL). After purging with argon, the mixture was

stirred at 70°C for 1.5 hours. The reaction's progress was monitored by HPLC. After confirming completion, the MeOH was removed under reduced pressure. The precipitated solid was purified by HPLC. Following the removal of acetonitrile from the collected fractions, a desalting step was performed. The solution was then passed through a sodium cation-exchange resin and freeze-dried to yield **59** (8.69 mg, 0.7%) as a green solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD): δ8.58 (d, 2H, J = 14.4 Hz), 8.44 (s, 2H), 8.35 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.12 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.03 (dd, 2H, J = 8.8, 1.6 Hz), 7.79 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 6.54 (d, 2H, J = 13.9 Hz), 4.52 (t, 4H, J = 7.6 Hz), 3.03 (t, 4H, J = 6.7 Hz), 2.82 (t, 4H, J = 5.8 Hz), 2.37–2.27 (m, 4H), 2.09–1.91 (m, 14H). HRMS (ESI^-): calcd. for $C_{44}H_{44}N_2O_{12}ClNaS_4$ $[M-2Na]^{2-}$ 489.0687, found: 489.0702 (+1.5 mmu).



General procedure for the preparation of antibody-water soluble dye conjugates

Each cyanine dye (1 eq), TSTU (2.0–2.1 eq), and NEt_3 (3.0–4.5 eq) were dissolved in anhydrous DMF (1.0–1.4 mL/μmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction progress was monitored by HPLC (A/B = 0.1 M triethylamine acetate (TEAA) buffer/99% MeCN, 1% H_2O). Subsequently, TFA was added to the mixture to neutralize the pH. Then, DMF was removed under vacuum and the precipitate was dried under vacuum. The crude product was used in the next step without further purification.

The crude product was dissolved in DMSO (100 μL). The DMSO solution and 32.7 mg/mL panitumumab in PBS (2 mg, 60.8 μL, 13.5 nmol) were added to 0.1 M

Na_2HPO_4 aq. containing 5% DMSO to a total volume of 2 mL. The mixture was left at room temperature for 3 h. Upon reaction completion, the mixture was purified by using an Amicon Ultra-4 30 kDa (Merck KGaA) filter. The protein concentration of the product was measured with a microplate reader (infinite M200, TECAN) using a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) and dye concentration was calculated by absorbance measurements using a UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimazu Co.).

Preparation of C7

54 (398 μg, 0.34 μmol), TSTU (150 μg, 0.5 μmol), and NEt_3 (0.3 μL, 2 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (0.5 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. DAR of **C7** was about 1.

Preparation of C8

55 (51.0 μg , 40.5 nmol), TSTU (30.1 μg, 100 nmol), and NEt_3 (0.12 μL, 0.85 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (0.2 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. DAR of **C8** was about 3.

Preparation of C9

56 (117 μg, 0.10 μmol), TSTU (61.0 μg, 0.21 μmol), and NEt_3 (0.12 μL, 0.85 μmol) were dissolved in anhydrous DMF (0.2 mL). The mixture was then reacted and purified according to the general procedure. DAR of **C9** was about 2.

参考文献

(1) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent Chemosensors: The Past, Present and Future. Chem. Soc. Rev. 2017, 46 (23), 7105–7123.

(2) Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I. Recent Progress in the Development of Near-Infrared Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. Chem. Soc. Rev. 2013, 43 (1), 16–29.

(3) Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. Synthesis and Applications of Rhodamine Derivatives as Fluorescent Probes. Chem. Soc. Rev. 2009, 38 (8), 2410–2433.

(4) Umezawa, K.; Citterio, D.; Suzuki, K. New Trends in Near-Infrared Fluorophores for Bioimaging. Anal. Sci. 2014, 30 (3), 327–349.

(5) Cosco, E. D.; Lim, I.; Sletten, E. M. Photophysical Properties of Indocyanine Green in the Shortwave Infrared Region. ChemPhotoChem 2021, 5 (8), 727–734.

(6) Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. Design and Synthesis of Fluorescent Probes for Selective Detection of Highly Reactive Oxygen Species in Mitochondria of Living Cells. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (34), 10324–10325.

(7) Nguyen, V.-N.; Ha, J.; Cho, M.; Li, H.; Swamy, K. M. K.; Yoon, J. Recent Developments Of BODIPY-Based Colorimetric and Fluorescent Probes for the Detection of Reactive Oxygen/Nitrogen Species and Cancer Diagnosis. Coord. Chem. Rev. 2021, 439, 213936.

(8) Egawa, T.; Hanaoka, K.; Koide, Y.; Ujita, S.; Takahashi, N.; Ikegaya, Y.; Matsuki, N.; Terai, T.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. Development of a Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe for Calcium Ion and Its Application to Multicolor Neuronal Imaging. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (36), 14157–14159.

(9) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Piao, W.; Kusakabe, M.; Saito, N.; Terai, T.; Okabe, T.; Nagano, T. Development of NIR Fluorescent Dyes Based on Si–Rhodamine for in Vivo Imaging. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134 (11), 5029–5031.

(10) Etrych, T.; Lucas, H.; Janoušková, O.; Chytil, P.; Mueller, T.; Mäder, K. Fluorescence Optical Imaging in Anticancer Drug Delivery. J. Control. Release 2016, 226, 168–181.

(11) He, K.; Zeng, S.; Qian, L. Recent Progress in the Molecular Imaging of Therapeutic Monoclonal Antibodies. J. Pharm. Anal. 2020, 10 (5), 397–413.

(12) Lauwerends, L. J.; Driel, P. B. A. A. van; Jong, R. J. B. de; Hardillo, J. A. U.; Koljenovic, S.; Puppels, G.; Mezzanotte, L.; Löwik, C. W. G. M.; Rosenthal, E. L.; Vahrmeijer, A. L.; Keereweer, S. Real-Time Fluorescence Imaging in Intraoperative Decision Making for Cancer Surgery. Lancet Oncol. 2021, 22 (5), e186–e195.

(13) Gulsuna, B.; Turkmen, T.; Celtikci, A. O. B. & E.; Celtikci, E. Fluorescein-Guided Excision of a Pediatric Intraparenchymal Schwannoma Presenting with Seizure and Neurogenic Pulmonary Edema. Childs Nerv. Syst. 2020, No. 36, 1075–1078.

(14) Vahrmeijer, A. L.; Hutteman, M.; Vorst, J. R. van der; Velde, C. J. H. van de; Frangioni, J. V. Image-Guided Cancer Surgery Using near-Infrared Fluorescence. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2013, 10 (9), 507–518.

(15) Verhoeven, J. W. Glossary of Terms Used in Photochemistry (IUPAC Recommendations 1996). Pure Appl. Chem. 1996, 68 (12), 2223–2286.

(16) Yoon, S.; Kim, M.; Jang, M.; Choi, Y.; Choi, W.; Kang, S.; Choi, W. Deep Optical Imaging within Complex Scattering Media. Nat. Rev. Phys. 2020, 2 (3), 141–158.

(17) Ntziachristos, V. Going Deeper than Microscopy: The Optical Imaging Frontier in Biology. Nat. Methods 2010, 7 (8), 603–614.

(18) Weber, J.; Beard, P. C.; Bohndiek, S. E. Contrast Agents for Molecular Photoacoustic Imaging. Nat. Methods 2016, 13 (8), 639–650.

(19) Fu, Q.; Zhu, R.; Song, J.; Yang, H.; Chen, X. Photoacoustic Imaging: Contrast Agents and Their Biomedical Applications. Adv. Mater. 2019, 31 (6), 1805875.

(20) Kim, C.; Erpelding, T. N.; Jankovic, L.; Pashley, M. D.; Wang, L. V. Deeply Penetrating in Vivo Photoacoustic Imaging Using a Clinical Ultrasound Array System. Biomed. Opt. Express 2010, 1 (1), 278–284.

(21) Kim, C.; Erpelding, T. N.; Jankovic, L.; Wang, L. V. Performance Benchmarks of an Array-Based Hand-Held Photoacoustic Probe Adapted from a Clinical Ultrasound System for Non-Invasive Sentinel Lymph Node Imaging. Philosophical Transactions Royal Soc. Math Phys. Eng. Sci. 2011, 369 (1955), 4644–4650.

(22) Bell, A. G. On the Production and Reproduction of Sound by Light. Am. J. Sci. 1880, s3-20 (118), 305–324.

(23) Pushkarsky, M.; Tsekoun, A.; Dunayevskiy, I. G.; Go, R.; Patel, C. K. N. Sub-Parts-per-Billion Level Detection of NO2 Using Room-Temperature Quantum Cascade Lasers. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006, 103 (29), 10846–10849.

(24) Attia, A. B. E.; Balasundaram, G.; Moothanchery, M.; Dinish, U. S.; Bi, R.; Ntziachristos, V.; Olivo, M. A Review of Clinical Photoacoustic Imaging: Current and Future Trends. Photoacoustics 2019, 16, 100144.

(25) Xia, J.; Yao, J.; Wang, L. H. V. PHOTOACOUSTIC TOMOGRAPHY: PRINCIPLES AND ADVANCES (Invited Review). Prog. Electromagn. Res. 2014, 147, 1–22.

(26) Zhang, H. F.; Maslov, K.; Stoica, G.; Wang, L. V. Functional Photoacoustic Microscopy for High-Resolution and Noninvasive in Vivo Imaging. Nat. Biotechnol. 2006, 24 (7), 848–851.

(27) Saka, M.; Berwick, J.; Jones, M. Linear Superposition of Sensory-Evoked and Ongoing Cortical Hemodynamics. Front. Neuroenergetics 2010, 2, 23.

(28) Li, P.-C.; Shieh, D.-B.; Wang, C.-R.; Wei, C.-W.; Liao, C.-K.; Ding, A.-A.; Wu, Y.-N.; Poe, C.; Jhan, S. In Vivo Photoacoustic Molecular Imaging with Simultaneous

Multiple Selective Targeting Using Antibody-Conjugated Gold Nanorods. Nat. Précéd. 2008, 1–1.

(29) Capozza, M.; Blasi, F.; Valbusa, G.; Oliva, P.; Cabella, C.; Buonsanti, F.; Cordaro, A.; Pizzuto, L.; Maiocchi, A.; Poggi, L. Photoacoustic Imaging of Integrin-Overexpressing Tumors Using a Novel ICG-Based Contrast Agent in Mice. Photoacoustics 2018, 11, 36–45.

(30) Muhanna, N.; Chan, H. H. L.; Douglas, C. M.; Daly, M. J.; Jaidka, A.; Eu, D.; Bernstein, J.; Townson, J. L.; Irish, J. C. Sentinel Lymph Node Mapping Using ICG Fluorescence and Cone Beam CT – a Feasibility Study in a Rabbit Model of Oral Cancer. BMC Méd. Imaging 2020, 20 (1), 106.

(31) Duprée, A.; Rieß, H.; Detter, C.; Debus, E. S.; Wipper, S. H. Utilization of Indocynanine Green Fluorescent Imaging (ICG-FI) for the Assessment of Microperfusion in Vascular Medicine. Innov. Surg. Sci. 2018, 3 (3), 193–201.

(32) Li, L.; Wang, L. V. Recent Advances in Photoacoustic Tomography. Bme Frontiers 2021, 2021, 1–17.

(33) Engel, E.; Schraml, R.; Maisch, T.; Kobuch, K.; Kӧnig, B.; Szeimies, R.-M.; Hillenkamp, J.; Baϋmler, W.; Vasold, R. Light-Induced Decomposition of Indocyanine Green. Invest. Ophth. Vis. Sci. 2008, 49 (5), 1777–1783.

(34) Nani, R. R.; Kelley, J. A.; Ivanic, J.; Schnermann, M. J. Reactive Species Involved in the Regioselective Photooxidation of Heptamethine Cyanines. Chem. Sci. 2015, 6 (11), 6556–6563.

(35) Matikonda, S. S.; Helmerich, D. A.; Meub, M.; Beliu, G.; Kollmannsberger, P.; Greer, A.; Sauer, M.; Schnermann, M. J. Defining the Basis of Cyanine Phototruncation Enables a New Approach to Single-Molecule Localization Microscopy. Acs Central Sci. 2021, 7 (7), 1144–1155.

(36) Lucero, M. Y.; Tang, Y.; Zhang, C. J.; Su, S.; Forzano, J. A.; Garcia, V.; Huang, X.; Moreno, D.; Chan, J. Activity-Based Photoacoustic Probe for Biopsy-Free

Assessment of Copper in Murine Models of Wilson's Disease and Liver Metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. 2021, 118 (36), e2106943118.

(37) Knox, H. J.; Hedhli, J.; Kim, T. W.; Khalili, K.; Dobrucki, L. W.; Chan, J. A Bioreducible N-Oxide-Based Probe for Photoacoustic Imaging of Hypoxia. Nat. Commun. 2017, 8 (1), 1794.

(38) Zeng, L.; Ma, G.; Xu, H.; Mu, J.; Li, F.; Gao, X.; Deng, Z.; Qu, J.; Huang, P.; Lin, J. In Vivo Chemoselective Photoacoustic Imaging of Copper(II) in Plant and Animal Subjects. Small 2019, 15 (6), e1803866.

(39) Mishra, A.; Jiang, Y.; Roberts, S.; Ntziachristos, V.; Westmeyer, G. G. Near-Infrared Photoacoustic Imaging Probe Responsive to Calcium. Anal. Chem. 2016, 88 (22), 10785–10789.

(40) Wang, L. V.; Yao, J. A Practical Guide to Photoacoustic Tomography in the Life Sciences. Nat. Methods 2016, 13 (8), 627–638.

(41) Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orlowski, J. Sensors and Regulators of Intracellular PH. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 2010, 11 (1), 50–61.

(42) Webb, B. A.; Chimenti, M.; Jacobson, M. P.; Barber, D. L. Dysregulated PH: A Perfect Storm for Cancer Progression. Nat. Rev. Cancer 2011, 11 (9), 671–677.

(43) Punnia - Moorthy, A. Evaluation of PH Changes in Inflammation of the Subcutaneous Air Pouch Lining in the Rat, Induced by Carrageenan, Dextran and Staphylococcus Aureus. J. Oral Pathol. Med. 1987, 16 (1), 36–44.

(44) Signore, A.; Mather, S. J.; Piaggio, G.; Malviya, G.; Dierckx, R. A. Molecular Imaging of Inflammation/Infection: Nuclear Medicine and Optical Imaging Agents and Methods. Chem. Rev. 2010, 110 (5), 3112–3145.

(45) Xiong, Z.-G.; Pignataro, G.; Li, M.; Chang, S.; Simon, R. P. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) as Pharmacological Targets for Neurodegenerative Diseases. Curr. Opin. Pharmacol. 2008, 8 (1), 25–32.

(46) Alia, A. M. M. A.; brahim, A.; Younis, A. I. Role of Acid-Base Balance at Admission in Risk Stratification of Patients with Acute Myocardial Infarction. ARC J. Cardiol. 2016, 2 (2).

(47) Hirche, Hj.; Franz, Chr.; Bös, L.; Bissig, R.; Lang, R.; Schramm, M. Myocardial Extracellular K+ and H+ Increase and Noradrenaline Release as Possible Cause of Early Arrhythmias Following Acute Coronary Artery Occlusion in Pigs. J. Mol. Cell. Cardiol. 1980, 12 (6), 579–593.

(48) Patel, N. J.; Manivannan, E.; Joshi, P.; Ohulchanskyy, T. J.; Nani, R. R.; Schnermann, M. J.; Pandey, R. K. Impact of Substituents in Tumor Uptake and Fluorescence Imaging Ability of Near - Infrared Cyanine - like Dyes. Photochem. Photobiol. 2015, 91 (5), 1219–1230.

(49) Bouteiller, C.; Clavé, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Novel Water-Soluble Near-Infrared Cyanine Dyes: Synthesis, Spectral Properties, and Use in the Preparation of Internally Quenched Fluorescent Probes. Bioconjugate Chem. 2007, 18 (4), 1303–1317.

(50) Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. Chem. Rev. 2000, 100 (6), 1973–2012.

(51) Bricks, J. L.; Slominskii, Y. L.; Panas, I. D.; Demchenko, A. P. Fluorescent J-Aggregates of Cyanine Dyes: Basic Research and Applications Review. Methods Appl. Fluoresc. 2017, 6 (1), 012001.

(52) Würthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha - Möller, C. R. J - Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50 (15), 3376–3410.

(53) Contreras-García, J.; Johnson, E. R.; Keinan, S.; Chaudret, R.; Piquemal, J.-P.; Beratan, D. N.; Yang, W. NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. J. Chem. Theory Comput. 2011, 7 (3), 625–632.

(54) Hirasawa, T.; Iwatate, R. J.; Kamiya, M.; Okawa, S.; Urano, Y.; Ishihara, M. Multispectral Photoacoustic Imaging of Tumours in Mice Injected with an Enzyme-Activatable Photoacoustic Probe. J. Opt. 2016, 19 (1), 014002.

(55) Ikeno, T.; Hanaoka, K.; Iwaki, S.; Myochin, T.; Murayama, Y.; Ohde, H.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Design and Synthesis of an Activatable Photoacoustic Probe for Hypochlorous Acid. Anal. Chem. 2019, 91 (14), 9086–9092.

(56) Frenette, M.; Hatamimoslehabadi, M.; Bellinger-Buckley, S.; Laoui, S.; La, J.; Bag, S.; Mallidi, S.; Hasan, T.; Bouma, B.; Yelleswarapu, C.; Rochford, J. Shining Light on the Dark Side of Imaging: Excited State Absorption Enhancement of a Bis-Styryl BODIPY Photoacoustic Contrast Agent. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136 (45), 15853–15856.

(57) Knox, H. J.; Chan, J. Acoustogenic Probes: A New Frontier in Photoacoustic Imaging. Accounts Chem. Res. 2018, 51 (11), 2897–2905.

(58) Miao, Q.; Pu, K. Emerging Designs of Activatable Photoacoustic Probes for Molecular Imaging. Bioconjugate Chem. 2016, 27 (12), 2808–2823.

(59) Zhao, Z.; Swartchick, C. B.; Chan, J. Targeted Contrast Agents and Activatable Probes for Photoacoustic Imaging of Cancer. Chem. Soc. Rev. 2022, 51 (3), 829–868.

(60) He, X.; Li, L.; Fang, Y.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. In Vivo Imaging of Leucine Aminopeptidase Activity in Drug-Induced Liver Injury and Liver Cancer via a near-Infrared Fluorescent Probe. Chem. Sci. 2017, 8 (5), 3479–3483.

(61) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. Development of an Si-Rhodamine-Based Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe Selective for Hypochlorous Acid and Its Applications for Biological Imaging. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (15), 5680–5682.

(62) Murphy, M. P.; Bayir, H.; Belousov, V.; Chang, C. J.; Davies, K. J. A.; Davies, M. J.; Dick, T. P.; Finkel, T.; Forman, H. J.; Janssen-Heininger, Y.; Gems, D.; Kagan, V. E.; Kalyanaraman, B.; Larsson, N.-G.; Milne, G. L.; Nyström, T.; Poulsen, H. E.;

Radi, R.; Remmen, H. V.; Schumacker, P. T.; Thornalley, P. J.; Toyokuni, S.; Winterbourn, C. C.; Yin, H.; Halliwell, B. Guidelines for Measuring Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Cells and in Vivo. Nat. Metab. 2022, 4 (6), 651–662.

(63) Sies, H.; Jones, D. P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020, 21 (7), 363–383.

(64) Mulliken, R. S. A New Electroaffinity Scale; Together with Data on Valence States and on Valence Ionization Potentials and Electron Affinities. J. Chem. Phys. 1934, 2 (11), 782–793.

(65) Allred, A. L. Electronegativity Values from Thermochemical Data. J. Inorg. Nucl. Chem. 1961, 17 (3–4), 215–221.

(66) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. Chem. Rev. 1991, 91 (2), 165–195.

(67) Airinei, A.; Homocianu, M.; Dorohoi, D. O. Changes Induced by Solvent Polarity in Electronic Absorption Spectra of Some Azo Disperse Dyes. J. Mol. Liq. 2010, 157 (1), 13–17.

(68) Marini, A.; Muñoz-Losa, A.; Biancardi, A.; Mennucci, B. What Is Solvatochromism? J. Phys. Chem. B 2010, 114 (51), 17128–17135.

(69) Vydrov, O. A.; Scuseria, G. E. Assessment of a Long-Range Corrected Hybrid Functional. J. Chem. Phys. 2006, 125 (23), 234109.

(70) Chapman, G.; Henary, M.; Patonay, G. The Effect of Varying Short-Chain Alkyl Substitution on the Molar Absorptivity and Quantum Yield of Cyanine Dyes. Anal. Chem. Insights 2011, 6, ACI.S6568.

(71) Gui, R.; Jin, H.; Bu, X.; Fu, Y.; Wang, Z.; Liu, Q. Recent Advances in Dual-Emission Ratiometric Fluorescence Probes for Chemo/Biosensing and Bioimaging of Biomarkers. Coordin. Chem. Rev. 2019, 383, 82–103.

(72) Liu, H.-W.; Chen, L.; Xu, C.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, X.-B.; Tan, W. Recent Progresses in Small-Molecule Enzymatic Fluorescent Probes for Cancer Imaging. Chem. Soc. Rev. 2018, 47 (18), 7140–7180.

(73) Gu, K.; Liu, Y.; Guo, Z.; Lian, C.; Yan, C.; Shi, P.; Tian, H.; Zhu, W.-H. In Situ Ratiometric Quantitative Tracing of Intracellular Leucine Aminopeptidase Activity via an Activatable Near-Infrared Fluorescent Probe. ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 8 (40), 26622–26629.

(74) Zhang, W.; Liu, F.; Zhang, C.; Luo, J.-G.; Luo, J.; Yu, W.; Kong, L. Near-Infrared Fluorescent Probe with Remarkable Large Stokes Shift and Favorable Water Solubility for Real-Time Tracking Leucine Aminopeptidase in Living Cells and In Vivo. Anal. Chem. 2017, 89 (22), 12319–12326.

(75) Kim, T.-I.; Park, J.; Park, S.; Choi, Y.; Kim, Y. Visualization of Tyrosinase Activity in Melanoma Cells by a BODIPY-Based Fluorescent Probe. Chem. Commun. 2011, 47 (47), 12640–12642.

(76) Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (13), 4888–4894.

(77) Miura, T.; Urano, Y.; Tanaka, K.; Nagano, T.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. Rational Design Principle for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein-Based Probes by Photoinduced Electron Transfer. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125 (28), 8666–8671.

(78) Shibata, K.; Kajiyama, H.; Mizokami, Y.; Ino, K.; Nomura, S.; Mizutani, S.; Terauchi, M.; Kikkawa, F. Placental Leucine Aminopeptidase (P-LAP) and Glucose Transporter 4 (GLUT4) Expression in Benign, Borderline, and Malignant Ovarian Epithelia. Gynecol. Oncol. 2005, 98 (1), 11–18.

(79) Qian, G.; Wang, Z. Y. Near - Infrared Organic Compounds and Emerging Applications. Chem. Asian J. 2010, 5 (5), 1006–1029.

(80) Eom, T.; Khan, A. Push-Pull Azobenzene Chromophores with Negative Halochromism. Dye. Pigment. 2021, 188, 109197.

(81) Thorp, P. G.; Thorp, D. The Electronic Absorption Spectra of 2-Substituted-4-NN-Diethylamino4'-Nitroazobenzene Dyes and Their Monoacid Cations : The Applicability of Dewar's Rules to These and Related Dyestuffs. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1979, 1990–2000.

(82) Zhang, P.; Li, S.; Fu, C.; Zhang, Q.; Xiao, Y.; Ding, C. A Colorimetric and near - Infrared Ratiometric Fluorescent Probe for the Determination of Endogenous Tyrosinase Activity Based on Cyanine Aggregation. Analyst 2019, 144 (18), 5472–5478.

(83) Ding, N.; Li, Z.; Tian, X.; Zhang, J.; Guo, K.; Wang, P. Azo-Based near-Infrared Fluorescent Theranostic Probe for Tracking Hypoxia-Activated Cancer Chemotherapy in Vivo. Chem. Commun. 2019, 55 (87), 13172–13175.

(84) Zhou, Y.; Maiti, M.; Sharma, A.; Won, M.; Yu, L.; Miao, L. X.; Shin, J.; Podder, A.; Bobba, K. N.; Han, J.; Bhuniya, S.; Kim, J. S. Azo-Based Small Molecular Hypoxia Responsive Theranostic for Tumor-Specific Imaging and Therapy. J. Control. Release 2018, 288, 14–22.

(85) Kim, T.-I.; Park, J.; Park, S.; Choi, Y.; Kim, Y. Visualization of Tyrosinase Activity in Melanoma Cells by a BODIPY-Based Fluorescent Probe. Chem. Commun. 2011, 47 (47), 12640–12642.

(86) Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126 (10), 3357–3367.

(87) Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. Anal. Chem. 1998, 70 (13), 2446–2453.

(88) Takano, Y.; Echizen, H.; Hanaoka, K. Fluorescent Probes and Selective Inhibitors for Biological Studies of Hydrogen Sulfide- and Polysulfide-Mediated Signaling. Antioxid. Redox Signal. 2017, 27 (10), 669–683.

(89) Lin, V. S.; Chen, W.; Xian, M.; Chang, C. J. Chemical Probes for Molecular Imaging and Detection of Hydrogen Sulfide and Reactive Sulfur Species in Biological Systems. Chem. Soc. Rev. 2014, 44 (14), 4596–4618.

(90) Dickinson, B. C.; Huynh, C.; Chang, C. J. A Palette of Fluorescent Probes with Varying Emission Colors for Imaging Hydrogen Peroxide Signaling in Living Cells. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132 (16), 5906–5915.

(91) Liu, S.-R.; Wu, S.-P. Hypochlorous Acid Turn-on Fluorescent Probe Based on Oxidation of Diphenyl Selenide. Org. Lett. 2013, 15 (4), 878–881.

(92) Xiao, H.; Zhang, W.; Li, P.; Zhang, W.; Wang, X.; Tang, B. Versatile Fluorescent Probes for Imaging the Superoxide Anion in Living Cells and In Vivo. Angew. Chem. Int. Ed. 2020, 59 (11), 4216–4230.

(93) Kalim, M.; Chen, J.; Wang, S.; Lin, C.; Ullah, S.; Liang, K.; Ding, Q.; Chen, S.; Zhan, J. Intracellular Trafficking of New Anticancer Therapeutics: Antibody–Drug Conjugates. Drug Des., Dev. Ther. 2017, 11, 2265–2276.

(94) Grillo-Hill, B. K.; Webb, B. A.; Barber, D. L. Chapter 23 Ratiometric Imaging of PH Probes. Methods Cell Biol. 2014, 123, 429–448.

(95) Park, S.-H.; Kwon, N.; Lee, J.-H.; Yoon, J.; Shin, I. Synthetic Ratiometric Fluorescent Probes for Detection of Ions. Chem. Soc. Rev. 2019, 49 (1), 143–179.

(96) Li, C.; Greenwood, T. R.; Bhujwalla, Z. M.; Glunde, K. Synthesis and Characterization of Glucosamine-Bound Near-Infrared Probes for Optical Imaging. Org. Lett. 2006, 8 (17), 3623–3626.

(97) Ohkuma, S.; Poole, B. Fluorescence Probe Measurement of the Intralysosomal PH in Living Cells and the Perturbation of PH by Various Agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75 (7), 3327–3331.

(98) Zheng, Q.; Jockusch, S.; Zhou, Z.; Blanchard, S. C. The Contribution of Reactive Oxygen Species to the Photobleaching of Organic Fluorophores. Photochem. Photobiol. 2014, 90 (2), 448–454.

(99) Shrestha, D.; Bagosi, A.; Szöllősi, J.; Jenei, A. Comparative Study of the Three Different Fluorophore Antibody Conjugation Strategies. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 404 (5), 1449–1463.

(100) Szabó, Á.; Szendi-Szatmári, T.; Ujlaky-Nagy, L.; Rádi, I.; Vereb, G.; Szöllősi, J.; Nagy, P. The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes. Biophys. J. 2018, 114 (3), 688–700.

(101) Lu, B.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R. Effects of Acetonitrile on Horseradish Peroxidase (HRP)-Anti HRP Antibody Interaction. Biosens. Bioelectron. 1997, 12 (7), 619–625.

(102) Melnikova, Y. I.; Odintsov, S. G.; Kravchuk, Z. I.; Martsev, S. P. Antigen-Binding Activity of Monoclonal Antibodies after Incubation with Organic Solvents. Biochem. Biokhimiia 2000, 65 (11), 1256–1265.

(103) Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. Ligand Binding to Integrins. J. Biol. Chem. 2000, 275 (29), 21785–21788.

(104) Chen, X.; Park, R.; Tohme, M.; Shahinian, A. H.; Bading, J. R.; Conti, P. S. MicroPET and Autoradiographic Imaging of Breast Cancer Av-Integrin Expression Using 18F- and 64Cu-Labeled RGD Peptide. Bioconjugate Chem. 2004, 15 (1), 41–49.

(105) Danhier, F.; Breton, A. L.; Préat, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. Mol. Pharm. 2012, 9 (11), 2961–2973.

(106) Dijkgraaf, I.; Kruijtzer, J. A. W.; Liu, S.; Soede, A. C.; Oyen, W. J. G.; Corstens, F. H. M.; Liskamp, R. M. J.; Boerman, O. C. Improved Targeting of the Avβ3 Integrin by Multimerisation of RGD Peptides. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2007, 34 (2), 267–273.

(107) Hu, Z.; Arrowsmith, R. L.; Tyson, J. A.; Mirabello, V.; Ge, H.; Eggleston, I. M.; Botchway, S. W.; Pantos, G. D.; Pascu, S. I. A Fluorescent Arg–Gly–Asp (RGD) Peptide–Naphthalenediimide (NDI) Conjugate for Imaging Integrin α v β 3 in Vitro. Chem. Commun. 2015, 51 (32), 6901–6904.

(108) Morales, A. R.; Schafer-Hales, K. J.; Marcus, A. I.; Belfield, K. D. Amine-Reactive Fluorene Probes: Synthesis, Optical Characterization, Bioconjugation, and Two-Photon Fluorescence Imaging. Bioconjugate Chem. 2008, 19 (12), 2559–2567.

(109) 大平　貴之. インドシアニングリーンをリード化合物とした新規蛍光及び光音響イメージング剤の開発. 北海道大学大学院生命科学院　修士論文 (未公刊) 2019.

(110) 前田　裕貴. インドシアニングリーン誘導体の物性が体内動体に与える影響の検討. 北海道大学大学院生命科学院　修士論文 (未公刊) 2022.

(111) Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. Cyanine-Labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters. Bioconjugate Chem. 1996, 7 (3), 356–362.

(112) Luciano, M. P.; Crooke, S. N.; Nourian, S.; Dingle, I.; Nani, R. R.; Kline, G.; Patel, N. L.; Robinson, C. M.; Difilippantonio, S.; Kalen, J. D.; Finn, M. G.; Schnermann, M. J. A Nonaggregating Heptamethine Cyanine for Building Brighter Labeled Biomolecules. ACS Chem. Biol. 2019, 14 (5), 934–940.

(113) Yang, M.; Zhao, L.; He, X.; Su, N.; Zhao, C.; Tang, H.; Hong, T.; Li, W.; Yang, F.; Lin, L.; Zhang, B.; Zhang, R.; Jiang, Y.; Li, C. Photoacoustic/Ultrasound Dual Imaging of Human Thyroid Cancers: An Initial Clinical Study. Biomed. Opt. express 2017, 8 (7), 3449–3457.

(114) Dima, A.; Ntziachristos, V. In-Vivo Handheld Optoacoustic Tomography of the Human Thyroid. Photoacoustics 2016, 4 (2), 65–69.

(115) Neuschler, E. I.; Butler, R.; Young, C. A.; Barke, L. D.; Bertrand, M. L.; Böhm-Vélez, M.; Destounis, S.; Donlan, P.; Grobmyer, S. R.; Katzen, J.; Kist, K. A.; Lavin, P. T.; Makariou, E. V.; Parris, T. M.; Schilling, K. J.; Tucker, F. L.; Dogan, B. E. A

Pivotal Study of Optoacoustic Imaging to Diagnose Benign and Malignant Breast Masses: A New Evaluation Tool for Radiologists. Radiology 2018, 287 (2), 398–412.

(116) Diot, G.; Metz, S.; Noske, A.; Liapis, E.; Schroeder, B.; Ovsepian, S. V.; Meier, R.; Rummeny, E.; Ntziachristos, V. Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) of Human Breast Cancer. Clin. Cancer Res. 2017, 23 (22), 6912–6922.

(117) Toi, M.; Asao, Y.; Matsumoto, Y.; Sekiguchi, H.; Yoshikawa, A.; Takada, M.; Kataoka, M.; Endo, T.; Kawaguchi-Sakita, N.; Kawashima, M.; Fakhrejahani, E.; Kanao, S.; Yamaga, I.; Nakayama, Y.; Tokiwa, M.; Torii, M.; Yagi, T.; Sakurai, T.; Togashi, K.; Shiina, T. Visualization of Tumor-Related Blood Vessels in Human Breast by Photoacoustic Imaging System with a Hemispherical Detector Array. Sci. Rep-uk 2017, 7 (1), 41970.

(118) Ogawa, M.; Regino, C. A. S.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. In Vivo Target-Specific Activatable near-Infrared Optical Labeling of Humanized Monoclonal Antibodies. Mol. Cancer Ther. 2009, 8 (1), 232–239.

(119) Hirasawa, T.; Iwatate, R. J.; Kamiya, M.; Okawa, S.; Urano, Y.; Ishihara, M. Multispectral Photoacoustic Imaging of Tumours in Mice Injected with an Enzyme-Activatable Photoacoustic Probe. J. Opt. 2016, 19 (1), 014002.

謝辞

研究室への配属から 6 年半の間、終始ご指導ご鞭撻を賜わり、また、右も左も分からない中で、研究の道標を示してくださった北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 小川美香子教授に心より深く感謝申し上げます。

洞察力に富んだアドバイスと的確なフィードバックを頂き、研究生活から普段の生活まで献身的に支えて頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室 家田直弥准教授に心より感謝致します。

当初は研究室の先輩でありながら、私生活における関わりから生物系に関する研究に関する議論まで助教の枠を超えて支えて頂きました同　中島孝平助教に深く感謝致します。

研究に関する様々なご助言・ご指導を頂きました北海道大学化学反応創成研究拠点 (ICReDD) 向峯あかり助教に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、配属当初から研究に係る活発な議論を交わし、また、研究手技や知識の習得に多大な貢献を頂きました関西医科大学附属光免疫医学研究所 統括部門 高倉栄男准教授に深く感謝致します。

生物系の実験指導を初めとして多くのご助言を頂きました関西医科大学附属光免疫医学研究所 基盤開発部門　鈴木基史助教に深く感謝致します。

学士の頃の研究生活を支えて頂いた神戸薬科大学 薬剤学研究室　河野裕允講師に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、溶液中での光音響スペクトルの測定にご尽力頂きました 防衛省防衛医科大学校 医用工学講座 石原美弥教授、平沢壮助教、浜松医科大学光尖端医学教育研究センター フォトニクス医学研究部　大川晋平教授に心より深く感謝致します。

細胞での光音響イメージング測定にご協力頂きました、公立小松大学 保健医療学臨床工学科 山岡禎久教授、佐賀大学大学院理工学研究科　能塚雄介修士、金子昂司修士に心より深く感謝致します。

用いた化合物の計算化学による解析にご尽力して頂きました、北海道大学大学院理学研究院 武次徹也教授、小林正人准教授に心より深く感謝致します。

本論文の審査をご快諾頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学教育センター 有機合成医薬学部門　市川聡教授、薬師寺文華准教授に心より深く感謝致します。

本研究の遂行にあたって経済的にご援助頂きました、北海道大学博士人材 DX フェローシップに深く感謝致します。

博士課程の生活において、共に切磋琢磨し、私生活での支えとなりました北海道大学薬学研究院　生化学研究室　城島啓佑修士、天然物合成化学研究室　冨田永希修士、創薬科学教育センター有機合成医薬学部門　大川凌太朗学士に心より深く感謝致します。

日々の研究生活を共にし、また、研究室外でも様々なイベントに付き合って頂きました北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室の学生の皆様、卒業生の皆様に心より深く感謝致します。特に、日々の研究生活における苦楽を共にし、切磋琢磨した大平貴之修士、前田裕貴修士、長尾凛氏、宍戸仁氏に深く感謝致します。

また、同期として辛くも楽しい研究生活において常に励まし合い、研究生活の多くの面で支えて頂いた、久野嵩史修士、松廣志乃修士、原田芽生修士、松田拓真学士、伏見佳奈学士に深く感謝致します。

博士課程を修了するまでに支えてくださった友人などすべての方々に深く感謝致します。最後に、本当に長いこれまでの学生生活をご支援くださいました父光一、母武子に心より深く感謝致します。

2024 年 3 月　土屋光輝