(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年12月22日(22.12.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/265043 A1

(51) 国際特許分類:
C09K 11/06 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)
C09B 23/01 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
C09B 23/14 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/023976

(22) 国際出願日： 2022年6月15日(15.06.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

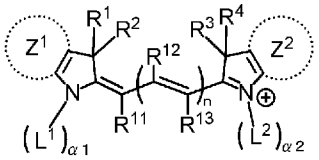
(30) 優先権データ：
特願 2021-101305 2021年6月18日(18.06.2021) JP
特願 2022-044427 2022年3月18日(18.03.2022) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 金澤 吉憲 (**KANAZAWA, Yoshinori**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 渡辺 康介 (**WATANABE, Kousuke**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 田中 宏明 (**TANAKA, Hiroaki**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 中田 飛翼 (**NAKATA, Hiyoku**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). ▲濱▼田 直佳 (**HAMADA, Naoka**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 込山 和興 (**KOMIYAMA, Kazuoki**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社

(54) **Title:** COMPOUND AND LABELED BIOMATERIAL USING SAME

(54) 発明の名称： 化合物及びこれを用いた標識生体物質



AA
一般式(1)

AA General formula (1)

(57) **Abstract:** A compound of formula (1) and a labeled biomaterial comprising said compound. The ring Z^1 and the ring Z^2 represent six-membered rings formed of ring-forming atoms selected from carbon atoms and nitrogen atoms. R^1–R^4, R^{11}–R^{13}, L^1, and L^2 represent specific groups, and n, α1, and α2 represent specific numbers. At least one of R^{11}– R^{13} includes a substituent capable of binding to a biomaterial, or a carboxy group. The compound represented in formula (1) has at least one structure represented by $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$. R^{21} represents a specific group, and m represents a specific number. The compound represented in formula (1) is a neutral compound.

(57) 要約：下記式（１）の化合物、これを有する標識生体物質。 環Ｚ^{1}及び環Ｚ^{2}は、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環を示す。 Ｒ^1～Ｒ^4、Ｒ^{11}～Ｒ^{13}、Ｌ^1、Ｌ^{2}は特定の基を示し、ｎ、α１、α２は特定の数を示す。 Ｒ^{11}～Ｒ^{13}の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。 式（１）で表される化合物は、少なくとも１つの－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ^{21}で表される構造を有する。Ｒ^{21}は特定の基を示し、ｍは特定の数を示す。 式（１）で表される化合物は中性の化合物である。

WO 2022/265043 A1

［続葉有］

内 Kanagawa (JP). 川井 一輝(**KAWAI, Kazuki**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人イイダアンドパートナーズ，外(**IIDA & PARTNERS** et al.); 〒1050004 東京都港区新橋３丁目１番１０号 石井ビル３階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 化合物及びこれを用いた標識生体物質

技術分野

[0001] 本発明は、化合物及びこれを用いた標識生体物質に関する。

背景技術

[0002] 様々な刺激（病気、環境変化など）に対する生体内の変化を観察するために、目的の検出対象物質に対して結合性の生体分子（抗体等）を蛍光性化合物（色素）で標識した蛍光標識生体物質が多用されている。

例えば、タンパク質混合物から特定のタンパク質を検出するウエスタンブロッティング（以下、ＷＢとも略す。）でも、上記特定のタンパク質の有無ないし存在量を、このタンパク質に対して結合性の蛍光標識抗体を用いて検出する蛍光法が利用されている。

また、生体中の生体分子、細胞及び組織等の動態及び機能等を解析するバイオイメージング技術においては、蛍光標識により可視化した生体の特定の部位を観察する生体蛍光イメージングが、生体観察の技術の一つとして利用されている。

[0003] 上記蛍光標識に用いられる蛍光色素として、例えば、特許文献１に記載されるようにシアニン色素が知られている。しかし、シアニン色素を蛍光標識に用いた場合、標識後の色素間における自己会合等の相互作用が生じやすく、蛍光量子収率が低下する傾向にある。

この問題に対処した技術として、例えば、特許文献２には、水溶性のＰＥＧ（ポリエチレングリコール）基を導入したシアニン色素が記載されている。上記特許文献２によれば、各特許文献記載のシアニン色素は、色素が有するＰＥＧ基によって標識後の色素間における自己会合が抑制され、従来のシアニン色素に比べて高い蛍光強度を示すとされる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許出願公開第２０２１／００９３７３７号明細書

特許文献2：国際公開第２００９／０７８９７０号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、本発明者らの検討により、上記特許文献１に記載のシアニン色素を用いた蛍光標識で得られる蛍光強度は低く、十分な蛍光強度が得られないことがわかってきた。また上記特許文献２に記載のシアニン色素を用いた蛍光標識では、抗体等の生体分子に対するシアニン色素の結合性がそもそも低く、蛍光強度自体も低く、十分な蛍光強度が得られないことがわかってきた。

本発明は、得られた標識生体物質が優れた蛍光強度を示す化合物を提供することを課題とする。また本発明は、この化合物と生体物質とを結合してなる標識生体物質を提供することを課題とする。

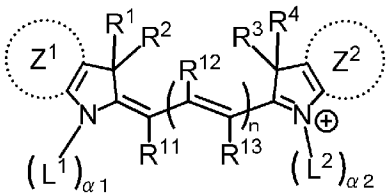
課題を解決するための手段

[0006] すなわち、本発明の上記課題は、下記の手段によって解決された。

〔１〕

下記一般式（１）で表される化合物。

[化1]



一般式(1)

上記式中、Ｒ^{1}～Ｒ^{4}は、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又は－（ＣＨ$_{2}$－ＣＨ$_{2}$－Ｏ）$_{m}$－Ｒ^{21}を示す。ｍは１～１０であって、Ｒ^{21}はアルキル基を示す。

Ｒ^{11}～Ｒ^{13}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して

５又は６員環を形成していてもよい。ただし、R^{11}～R^{13}の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。

ｎは１～３の整数である。

L^1及びL^2はアルキル基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示す。R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。L^1とL^2は、互いに結合し、環を形成していてもよい。

α１及びα２は０または１である。

環Z^1及び環Z^2は、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環を示し、置換基を有していてもよく、縮合環を形成していてもよい。環Z^1及び環Z^2が環構成窒素原子を有する６員環を形成する場合、この環構成窒素原子は置換基で置換されていてもよい。

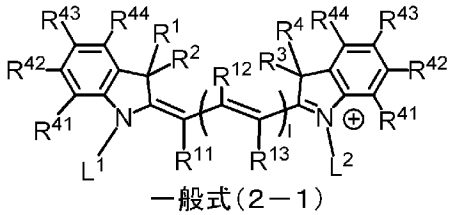
式（１）で表される化合物は、少なくとも１つの－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}で表される構造を有する。R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。

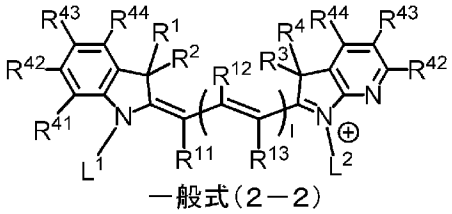
ただし、式（１）で表される化合物は中性の化合物である。

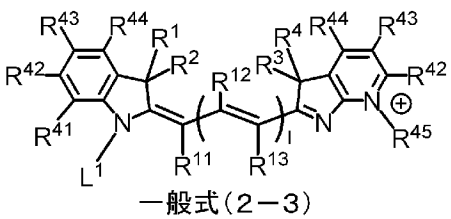
〔２〕

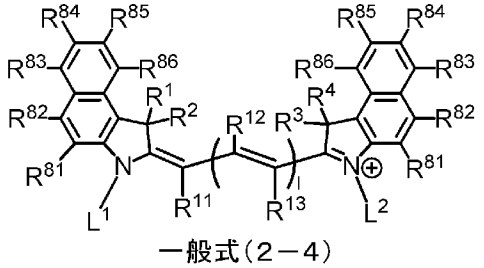
下記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される、〔１〕に記載の化合物。

[化2]


一般式（２－１）


一般式（２－２）


一般式（２－３）


一般式（２－４）

上記式中、R^{45}は、アルキル基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示

す。

R^{41}～R^{44}及びR^{81}～R^{86}は、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して縮合環を形成していてもよい。

R^{1}～R^{4}、R^{11}～R^{13}、L^{1}、L^{2}及びｍは、それぞれ上記のR^{1}～R^{4}、R^{11}～R^{13}、L^{1}、L^{2}及びｍと同義である。

R^{1}～R^{4}、L^{1}、L^{2}又はR^{45}の少なくとも１つは、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}である。R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。

Ｉは２又は３の整数を示す。

ただし、式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物は中性の化合物である。

〔３〕

上記のR^{1}及びR^{2}の少なくとも１つと上記のR^{3}及びR^{4}の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表され、ｍが１～１０である構造を含む、〔１〕又は〔２〕に記載の化合物。

〔４〕

化合物中に、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表され、ｍが１～１０である構造を４つ含む、〔３〕に記載の化合物。

〔５〕

上記のL^{1}及びL^{2}の少なくとも１つが、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である、〔１〕～〔４〕のいずれか１つに記載の化合物。

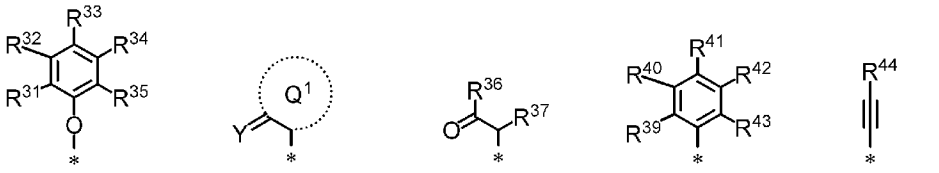
〔６〕

上記のL^{1}及びL^{2}が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である、〔５〕に記載の化合物。

〔７〕

上記のＲ[11]～Ｒ[13]のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、下記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基である、〔１〕～〔６〕のいずれか１つに記載の化合物。

[化3]



上記式中、Ｙは酸素原子又は＝ＮＲ[38]を示し、環Ｑ[1]は５員又は６員の、複素環又は炭化水素環を示す。

Ｒ[31]～Ｒ[44]は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

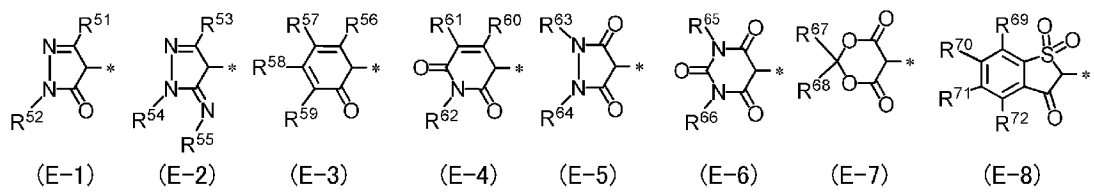
ただし、一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

〔８〕

上記一般式（ＩＩ）で表される置換基が、下記式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基である、〔７〕に記載の化合物。

[化4]



上記式中、Ｒ[51]～Ｒ[72]は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキ

シ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

ただし、一般式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

〔９〕

上記のＲ^{11}～Ｒ^{13}のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、上記一般式（ＩＶ）で表される置換基である、〔７〕に記載の化合物。

〔１０〕

上記のＲ^{39}～Ｒ^{43}のうち少なくとも１つが、カルボキシ基、カルボキシ基を有するアルキルオキシ基、カルボキシ基を有するアルキルカルバモイル基、又はカルボキシ基を有するポリ（オキシアルキレン）カルバモイル基である、〔９〕に記載の化合物。

〔１１〕

〔１〕～〔１０〕のいずれか１つに記載の化合物と生体物質とが結合してなる標識生体物質。

〔１２〕

上記生体物質がタンパク質、アミノ酸、核酸、糖鎖及びリン脂質のいずれかである〔１１〕に記載の標識生体物質。

発明の効果

[0007] 本発明の化合物は、優れた蛍光強度を示す標識生体物質を得ることができる。また、本発明の標識生体物質は優れた蛍光強度を示す。

発明を実施するための形態

[0008] 本発明において、特定の符号又は式で表示された置換基もしくは連結基等（以下、置換基等という）が複数あるとき、又は、複数の置換基等を同時に規定するときには、特段の断りがない限り、それぞれの置換基等は互いに同一でも異なっていてもよい（「それぞれ独立に」の表現の有無にかかわらず、それぞれの置換基等は互いに同一でも異なっていてもよい）。このことは

、置換基等の数の規定についても同様である。また、複数の置換基等が近接するとき（特に、隣接するとき）には、特段の断りがない限り、それらが互いに連結して環を形成していてもよく、形成される環は不飽和結合を有していてよく、有していなくてもよい。また、特段の断りがない限り、環、例えば脂環、芳香族環及びヘテロ環は、さらに縮環して縮合環を形成していてもよい。

本明細書において、特段の断りがない限り、二重結合については、分子内にＥ型及びＺ型が存在する場合、そのいずれであっても、またこれらの混合物であってもよい。また、特段の断りがない限り、化合物としてジアステレオマー及びエナンチオマーが存在する場合には、そのいずれであっても、またこれらの混合物であってもよい。

[0009] 本発明において、化合物及び置換基の表示については、化合物そのもの及び置換基そのもののほか、その塩、そのイオンを含む意味に用いる。例えば、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基（－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）$_2$）等は、水素原子が解離してイオン構造を取っていてもよく、塩構造を取っていてもよい。すなわち、本発明において、「カルボキシ基」はカルボン酸イオン又はその塩を、「スルホ基」はスルホン酸イオン又はその塩を、「ホスホノ基」はホスホン酸イオン又はその塩を、それぞれ含む意味で使用する。上記塩構造を構成する際の１価若しくは多価のカチオンとしては、特に制限されず、無機カチオン、有機カチオン等が挙げられ、具体的には、Ｎａ$^+$、Ｌｉ$^+$及びＫ$^+$等のアルカリ金属のカチオン、Ｍｇ$^{2+}$、Ｃａ$^{2+}$及びＢａ$^{2+}$等のアルカリ土類金属のカチオン、並びに、トリアルキルアンモニウムカチオン、テトラアルキルアンモニウムカチオン等の有機アンモニウムカチオンが挙げられる。

塩構造の場合、その塩の種類は１種類でもよく、２種類以上混在していてもよく、化合物中で塩型と遊離酸構造の基が混在していてもよく、また、塩構造の化合物と遊離酸構造化合物が混在していてもよい。

本発明の化合物は、いずれも中性の化合物である。本発明において、化合

物が中性であるとは、電気的に中性であることを意味する。具体的には、化合物内の電荷を有する基又は対イオンによって、化合物全体として電荷が０となるように調整されている。例えば、一般式（１）で表される化合物において、Ｌ^{2}が結合する窒素原子の形式電荷は、α２＝０である場合を除き＋１である。この形式電荷と対となるようにして、化合物中のスルホ基等の解離性基がスルホン酸イオン等のイオン構造を有することによって、本発明の化合物は、化合物全体として電荷０の化合物となる。α２＝０である場合、Ｌ^{2}が結合する窒素原子の形式電荷は０である。

なお、一般式（１）で表される化合物において、Ｌ^{1}が結合する窒素原子の形式電荷は、α１＝１である場合０である。α１＝０である場合は、Ｌ^{1}が結合する窒素原子の形式電荷が０となるよう、一般式（１）におけるＬ^{1}が結合する窒素原子を含有する５員環と環Ｚ^{1}との縮合部分の二重結合に代えて、Ｌ^{1}が結合する窒素原子と環Ｚ^{1}との結合部分が二重結合となる共役構造を取る。

本発明で規定する各一般式においては、化合物が有する正電荷を、特定の窒素原子が有する構造として便宜上特定して示している。ただし、本発明の化合物は共役系を有するため、実際には、上記窒素原子以外の他の原子が正電荷を採りうることもあり、化学構造の１つとして各一般式で表される構造を取りうる化合物であれば、各一般式で表される化合物に包含される。このことは負電荷についても同様である。

また、本発明の効果を損なわない範囲で、構造の一部を変化させたものを含む意味である。更に、置換又は無置換を明記していない化合物については、本発明の効果を損なわない範囲で、任意の置換基を有していてもよい意味である。このことは、置換基（例えば、「アルキル基」、「メチル基」、「メチル」などのように表現される基）、連結基（例えば、「アルキレン基」、「メチレン基」、「メチレン」などのように表現される基）及び環（例えば、「複素環」、「炭化水素環」などのように表現される環）についても同様である。このような任意の置換基のうち、本発明において好ましい置換基

は、後述の置換基群Ｔから選択される置換基である。

本発明において、ある基の炭素数を規定する場合、この炭素数は、本発明ないし本明細書において特段の断りのない限りは、基全体の炭素数を意味する。つまり、この基がさらに置換基を有する形態である場合、この置換基を含めた全体の炭素数を意味する。

[0010] また、本発明において「～」を用いて表される数値範囲は、「～」前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む範囲を意味する。

[0011] 本発明の化合物は、下記一般式（１）で表される。本発明の化合物が、優れた蛍光強度を示す標識生体物質を得ることができる理由の詳細については定かではないが、次のように考えられる。

本発明の化合物は、一般式（１）で示されるように、環構成原子として窒素原子を含み、環Z^1若しくは環Z^2が縮環した複素環を両末端に有するポリメチン鎖（本発明において、ポリメチン鎖とは、鎖内に複数の二重結合を有する炭化水素鎖であって、全体が共役している鎖を意味し、炭化水素鎖は置換基R^{11}～R^{13}を有している。なお、この炭化水素鎖を構成する炭素原子数は２ｎ＋３であり、（　）$_n$で括る炭化水素鎖を構成する炭素原子と、R^{11}で置換された炭素原子と、これらの両側に位置する複素環を構成する環構成炭素原子とからなる。以下、同様である。）を有し、更に、環Z^1が縮環した複素環の窒素原子が三級アミン構造を有し、環Z^2が縮環した複素環の窒素原子が四級アンモニウム構造を有することにより、ポリメチン骨格を介した電荷移動による吸収が生じる。このように、本発明の化合物は、ポリメチン色素（広義にはシアニン色素）と称される化合物に分類される。

本発明の化合物は、上記構造を有した上で、更に、繰り返し数２ｎ＋３のメチン鎖上の置換基R^{11}～R^{13}の少なくとも１つは、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含み、かつ、化合物中に、－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}で表され、ｍが１～１０であるＰＥＧ（ポリエチレングリコール）基を含む構造を少なくとも１つ有する。このように、化合物中のR^{11}～R^{13}の少なくともいずれかの位置にカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換

基を有することによって、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}で表されるＰＥＧ基による排除体積効果をより発現しやすい化学構造を有する化合物とすることができ、化合物同士の相互作用が効果的に抑制された結果、化合物の自己会合による蛍光強度の低下を抑制することができると考えられる。加えて、ＰＥＧ基における繰り返し数ｍを１０以下とすることにより、ｍが１０を越えるＰＥＧ基の場合に生じてしまう大きな排除体積効果による生体物質への結合性の低下が抑えられ、実用上問題ないレベルの生体物質への結合性を示すことができる。

[0012] 本発明の化合物は、繰り返し数２ｎ＋３のメチン鎖の長さに依存して、ｎ＝１の場合に５２０～６００ｎｍの波長領域（５８５ｎｍ付近）に、ｎ＝２の場合に６２０～７００ｎｍの波長領域（６８５ｎｍ付近）に、ｎ＝３の場合に７４０～８３０ｎｍの波長領域（７８５ｎｍ付近）に、それぞれ励起吸収波長を有する。そのため、これらの一般式（１）で表される化合物は、それぞれ、励起光源として化合物の吸収励起波長に対応したおよそ５００～８００ｎｍの波長領域の任意の波長（例えば、６００ｎｍ、７００ｎｍ、８００ｎｍ付近）のものを使用する蛍光標識において、優れた蛍光強度を示す標識生体物質を得られる化合物として使用できる。

[0013] 多色ＷＢでは、可視領域から近赤外領域までの範囲内において、複数の発光色を検出する。そのため、色素を励起発光させた際に互いに干渉してクロストークが起こらないように、複数の色素の吸収発光波形が適切な波長関係となるように選択する必要がある。ある励起光では１つの色素だけが光り、他の色素が光らないように調整されるのが理想的である。この観点で、例えば、多色ＷＢの近赤外領域の発光には、７００ｎｍ付近と８００ｎｍ付近という、ある程度波長の離れた２種類の励起光源が用いられている。

近赤外光励起による蛍光検出は、可視光励起による検出に比べてメンブレンの自家蛍光、すなわちバックグラウンド蛍光を抑制できるため、シグナルノイズ比（Ｓ／Ｎ比）を高めやすく、目的のタンパク質を高感度に検出することが可能となる。そのため、近年、微量タンパク質の解析研究において、

近赤外領域の発光を利用した蛍光検出ＷＢの必要性が増してきている。

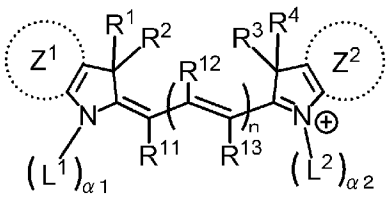
しかし、近赤外領域では、一般的に蛍光色素の蛍光量子収率が低く、高いシグナル量を得ることが難しい。本発明の化合物のうちｎ＝２又は３である化合物は、上記の７００ｎｍ付近と８００ｎｍ付近の２種類のものを有する多色ＷＢにおいても、優れた蛍光強度を示す標識生体物質を得られる化合物として使用でき、特に、タンパク質をより高感度に観察、検出するという要望に対しても、上記特許文献１及び２記載のシアニン色素を含む従来のシアニン色素を用いた蛍光標識と比較して、優れた蛍光強度とを示すことができる。

[0014] 以下、本発明の一般式（１）で表される化合物について詳述する。

[0015] ＜一般式（１）で表される化合物＞

本発明の一般式（１）で表される化合物は、下記の通りである。

[0016] [化5]



一般式(1)

[0017] 式中、R^1～R^4は、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示す。ｍは１～１０であって、R^{21}はアルキル基を示す。

R^{11}～R^{13}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して５又は６員環を形成していてもよい。ただし、R^{11}～R^{13}の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。

ｎは１～３の整数である。

L^1及びL^2はアルキル基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示す。R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。L^1とL^2は、互いに結

合し、環を形成していてもよい。

α１及びα２は０または１である。

環Ｚ[1]及び環Ｚ[2]は、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環を示し、置換基を有していてもよく、縮合環を形成していてもよい。環Ｚ[1]及び環Ｚ[2]が環構成窒素原子を有する６員環を形成する場合、この環構成窒素原子は置換基で置換されていてもよい。

式（１）で表される化合物は、少なくとも１つの－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]で表される構造を有する。Ｒ[21]及びｍは、それぞれ上記のＲ[21]及びｍと同義である。

ただし、式（１）で表される化合物は中性の化合物である。

[0018] 以下、一般式（１）における置換基等について詳述する。

[0019] （１）Ｒ[1]～Ｒ[4]

Ｒ[1]～Ｒ[4]は、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又は－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]を示す。Ｒ[1]とＲ[2]は互いに連結して環を形成していてもよく、Ｒ[3]とＲ[4]は互いに連結して環を形成していてもよい。

Ｒ[1]～Ｒ[4]として採りうるアルキル基、アリール基及びヘテロアリール基は、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基、アリール基及びヘテロアリール基と同義である。

[0020] 無置換のアルキル基の炭素数は、１～６が好ましく、１～４がより好ましく、１～２がさらに好ましい。

置換基を有するアルキル基のアルキル基部分の炭素数としては、１～１０が好ましく、１～８がより好ましく、２～６がさらに好ましく、３～５がさらに好ましい。また、置換基を有するアルキル基の最長鎖を構成する原子数としては、３～３５が好ましく、３～３０がより好ましく、３～２５がさらに好ましい。

本発明において、「置換基を有するアルキル基のアルキル基部分の炭素数」とは、アルキル基が有する置換基部分を除く炭素数を意味する。

本発明において、「置換基を有するアルキル基の最長鎖を構成する原子数

」とは、置換基部分を含む原子数（すなわち、全原子数から、最長鎖を構成しない分子鎖の原子数を引いた原子数）を意味する。なお、スルホ基、カルボキシ基等の解離性の水素原子を有する置換基が最長鎖を構成する場合、解離の有無にかかわらず、水素原子を含めて計算する。また、後述する生体物質に結合可能な置換基部分における原子数は含めない。

[0021] R^1～R^4として採りうるアルキル基が有していてもよい置換基としては、アルコキシ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、カルバモイル基、アシルアミノ基、スルホ基、ホスホノ基、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}及び－（C_3H_6－O）$_m$－R^{21}、並びにこれらの置換基の組み合わせからなる基が挙げられる。また、後述する生体物質に結合可能な置換基を挙げることができる。なお、上記のアルコキシ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、カルバモイル基、アシルアミノ基、スルホ基及びホスホノ基並びにこれらの置換基の組み合わせからなる基におけるアルキル基部分が、後述する生体物質に結合可能な置換基を有していてもよい。

R^1～R^4として採りうる置換基を有するアルキル基としては、上記置換基を有するアルキル基であれば特に制限はないが、分子間相互作用の抑制の観点からは、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を置換基として有するアルキル基が好ましい。この場合、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}がアルキル基に直接置換していてもよく、カルバモイル基と－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}との組み合わせからなる基として置換していてもよい。

[0022] （－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}）

R^1～R^4として採りうる－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}において、mは１～１０であり、R^{21}はアルキル基を示す。

mは平均繰り返し数（単に、繰り返し数とも称す。）を意味し、４～１０が好ましく、４～８がより好ましい。

上記平均繰り返し数は、化合物について^{1}Ｈ－ＮＭＲ測定を行い、平均積分値より算出することができる。本発明において規定する平均繰り返し数は、

上記方法により算出される平均繰り返し数の小数第一位を四捨五入して得られる数を意味する。

R^{21}におけるアルキル基は、上記R^1～R^4として採りうる、アルキル基の記載を適用することができる。

R^1～R^4として採りうる－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}及びR^1～R^4に含まれる－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}としては、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－無置換のアルキル基が好ましい。

[0023] （－（C_3H_6－O）$_m$－R^{21}）

R^1～R^4として採りうる－（C_3H_6－O）$_m$－R^{21}におけるm及びR^{21}は、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}におけるm及びR^{21}と同義である。

R^1～R^4として採りうる－（C_3H_6－O）$_m$－R^{21}における－C_3H_6－は、－CH_2－CH_2－CH_2－、－CH_2－CH（CH_3）－及び－CH（CH_3）－CH_2－のいずれの構造であってもよい。

[0024] R^1～R^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含むことが好ましく、蛍光強度をより向上させる観点から、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含むことがより好ましく、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、かつ、化合物中に－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を合計４つ含むことがさらに好ましい。なかでも、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つとL^1とL^2が、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含むことが特に好ましい。上記－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造は、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}として、上記メチン鎖に直接結合する複素環の環構成原子に直接結合していることが好ましい。

上記－（CH_2－CH_2－O）$_m$－におけるmは、上記－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}におけるmと同義である。

R^1～R^4の置換基は、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を少なくとも１つ有するR^{11}～R^{13}から離れた位置に存在し、しかもシアニン色

素骨格（平面）に対し垂直方向へ張り出すため、この置換基として－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含むことにより、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造による排除体積効果がより効果的に発現され、縮環部分がπ－π相互作用しにくくなり（会合抑制効果が強まり）、会合による蛍光強度の低下をより抑制できると推定している。

[0025] （２）R^{11}～R^{13}

R^{11}～R^{13}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基又はハロゲン原子を示す。隣接する基同士が互いに結合して５又は６員環を形成していてもよい。ただし、R^{11}～R^{13}の少なくとも１つは、後述するように、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

R^{11}～R^{13}として採りうるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子は、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子と同義であり、好ましい範囲も同じである。

また、R^{11}～R^{13}として採りうるアミド基としては、後述する置換基群Ｔにおけるアミド基のほかに、カルボン酸アミドに由来する１価の置換基であるアシルアミノ基もしくはカルバモイル基、又は、スルホン酸アミドに由来する１価の置換基であるスルホニルアミノ基もしくはスルファモイル基が挙げられる。これらの基は、後述する置換基群Ｔにおけるアシルアミノ基、カルバモイル基、スルホニルアミノ基及びスルファモイル基とそれぞれ同義であり、好ましい範囲も同じである。R^{11}～R^{13}として採りうるアミド基としては、これらのなかでもアシルアミノ基が好ましい。

R^{11}～R^{13}として採りうるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミ

ノ基及びアミド基は、無置換であってもよく、置換基を有していてもよい。

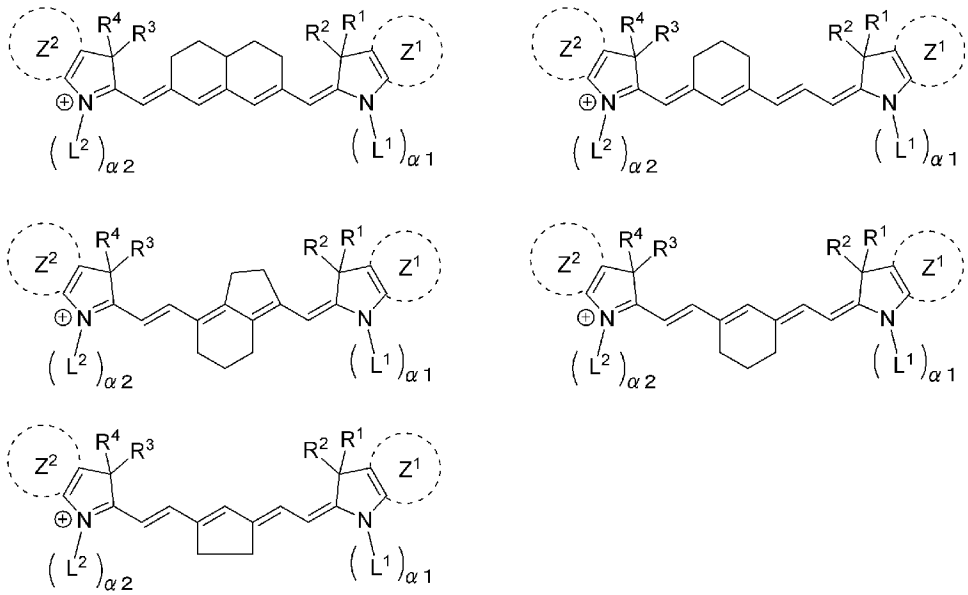
R^{11}～R^{13}におけるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びアミド基が有していてもよい置換基としては、後述する置換基群Ｔにおける置換基が挙げられ、例えば、アルキル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アリール基、ヘテロアリール基、アシル基、アルコキシカルボニル基、アルキルスルホニル基、アミノ基、アミド基、ニトロ基、シアノ基、スルホ基又はハロゲン原子が好ましい。また、オキソ基（＝Ｏ）又はイミノ基（＝ＮＨ、水素原子は置換基に置き換えられていてもよい。）も挙げられる。また、カルボキシ基又は後述する生体物質に結合可能な置換基も好ましく挙げられ、R^{11}～R^{13}におけるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基又はアミド基が有していてもよい置換基は、上記で挙げた基を２種以上組合わせてなる基であってもよい。

[0026] R^{11}～R^{13}のうち、隣接する基同士が互いに結合して５又は６員環を形成する場合、形成される５又は６員環は、芳香族性又は脂肪族性のいずれであってもよく、脂肪族性であることが好ましい。化合物中における上記の５又は６員環の数は特に制限されないが、１又は２個が好ましく、１個がより好ましい。

例えば、ｎ＝３の場合を例にすると、R^{11}～R^{13}のうち隣接する基同士が結合して形成される環を有する構造としては、下記構造が好ましく挙げられる。なお、下記例においては、環構造を形成していないR^{11}～R^{13}は水素原子であり、環構造は置換基を有しない構造として記載しているが、上述の通り、R^{11}～R^{13}の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものであり、その他のR^{11}～R^{13}についても下記の構造に限定されるものではない。

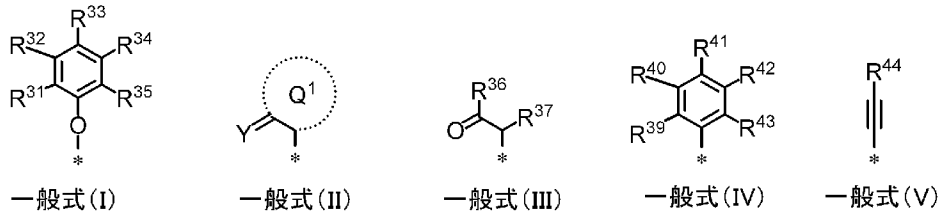
[0027]

[化6]



[0028] Ｒ１１～Ｒ１３のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものは、下記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基であることが好ましく、下記一般式（IV）で表される置換基であることがより好ましい。

[0029] [化7]



[0030] 上記式中、Ｙは酸素原子又は＝ＮＲ３８を示し、環Ｑ１は５員又は６員の、複素環又は炭素水素環を示す。

Ｒ３１～Ｒ４４は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

なお、Ｒ３６とＲ３７が互いに結合して５又は６員環を形成することはなく、一般式（II）で表される置換基と一般式（III）で表される置換基とは異なる

。

ただし、一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

[0031] Ｒ^{31}～Ｒ^{35}における隣り合う基は互いに連結して環を形成していてもよく、Ｒ^{39}～Ｒ^{43}における隣り合う基は互いに連結して環を形成していてもよい。

[0032] Ｒ^{31}～Ｒ^{44}として採り得るアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子は、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子と同義であり、好ましい範囲も同じである。

Ｒ^{31}～Ｒ^{44}として採り得るアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子は、置換基を有していてもよく、例えば、スルホ基又はハロゲン原子（好ましくはフッ素原子）が好ましく挙げられる。

Ｒ^{31}～Ｒ^{44}として採り得るアミド基は、上記Ｒ^{11}～Ｒ^{13}として採り得るアミド基の記載を適用することができる。Ｒ^{31}～Ｒ^{44}として採り得るアミド基としては、これらのなかでも、カルバモイル基及びスルファモイル基が好ましく挙げられる。

Ｒ^{31}～Ｒ^{44}として採り得る生体物質に結合可能な置換基は、後述する生体物質に結合可能な置換基と同義であり、好ましい範囲も同じである。

[0033] 上記一般式（Ｉ）で表される置換基において、Ｒ^{31}～Ｒ^{35}としては、上記で挙げた基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、

カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましい。

上記一般式（Ｉ）で表される置換基としては、Ｒ^{32}～Ｒ^{34}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが好ましく、Ｒ^{32}～Ｒ^{34}のうちの少なくとも１つ（好ましくはいずれか１つ）が、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することがより好ましい。Ｒ^{31}～Ｒ^{35}のいずれかの置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する形態としては、Ｒ^{31}～Ｒ^{35}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基であってもよく、Ｒ^{31}～Ｒ^{35}として採り得る置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基で置換されている形態であってもよい。

[0034] 上記一般式（II）で表される置換基において、Ｙは酸素原子が好ましい。

環Ｑ^{1}は、５員又は６員の、複素環又は炭化水素環を示す。

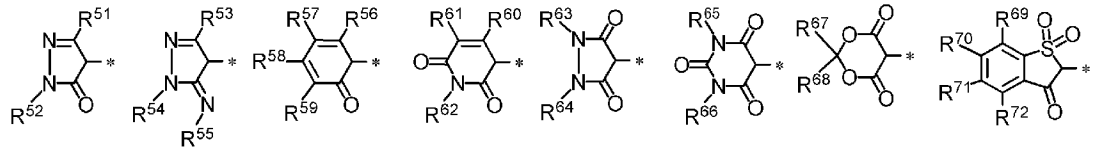
環Ｑ^{1}は、芳香族環であっても脂肪族環であってもよいが、脂肪族環であることが好ましい。

また、環Ｑ^{1}を構成する環構成原子のうち、Ｙが結合する炭素原子と結合手＊を有する炭素原子以外の原子としては、炭素原子、窒素原子、酸素原子又は硫黄原子が挙げられ、環構成原子の種類は１種であってもよく２種以上であってもよいが、１種又は２種であることが好ましい。

環Ｑ^{1}は置換基を有していてもよく、縮合環を形成していてもよい。

[0035] 上記一般式（II）で表される置換基は、下記式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基であることが好ましい。

[0036] [化8]



(E-1) (E-2) (E-3) (E-4) (E-5) (E-6) (E-7) (E-8)

[0037] 上記式中、Ｒ^{51}～Ｒ^{72}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキ

シ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

ただし、一般式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

[0038] Ｒ^{51}～Ｒ^{72}として採り得るアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子は、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基及びハロゲン原子と同義であり、好ましい範囲も同じである。

Ｒ^{51}～Ｒ^{72}として採り得る生体物質に結合可能な置換基は、後述する生体物質に結合可能な置換基と同義であり、好ましい範囲も同じである。

Ｒ^{51}～Ｒ^{72}としては、上記で挙げた基のなかでも、水素原子、アルキル基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましい。

上記一般式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基としては、各置換基中のＲ^{51}～Ｒ^{72}のうちの少なくとも１つがカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有していればよく、なかでも、一般式（Ｅ－１）においてはＲ^{52}が、一般式（Ｅ－２）においてはＲ^{54}が、一般式（Ｅ－３）においてはＲ^{57}～Ｒ^{59}のうちの少なくとも１つが、一般式（Ｅ－４）においてはＲ^{61}及びＲ^{62}のうちの少なくとも１つが、一般式（Ｅ－５）においてはＲ^{63}及びＲ^{64}のうちの少なくとも１つが、一般式（Ｅ－６）においてはＲ^{65}及びＲ^{66}のうちの少なくとも１つが、一般式（Ｅ－７）においてはＲ^{67}及びＲ^{68}のうちの少なくとも１つが、一般式（Ｅ－８）においてはＲ^{69}～Ｒ^{72}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが好ましい。Ｒ^{51}～Ｒ^{72}のいずれかの置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する形態としては、Ｒ^{51}～Ｒ^{72}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基であってもよく、Ｒ^{51}～Ｒ^{72}として採り得る置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基で置換されて

いる形態であってもよい。

[0039] 上記一般式（III）で表される置換基において、R^{36}又はR^{37}としては、上記で挙げた基のなかでも、水素原子、アルキル基、アミノ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましい。

上記一般式（III）で表される置換基としては、R^{36}又はR^{37}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有すればよく、R^{36}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することがより好ましい。R^{36}又はR^{37}のいずれかの置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する形態としては、R^{36}又はR^{37}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基であってもよく、R^{36}又はR^{37}として採り得る置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する形態であってもよい。

[0040] 本発明においては、R^{11}、及び、環Z^{2}が縮環した複素環に結合する炭素原子が有するR^{13}以外のR^{12}又はR^{13}の少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが好ましく、環Z^{1}が縮環した複素環と環Z^{2}が縮環した複素環とを結ぶ結合の中心部分にカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することがより好ましい。

[0041] R^{11}、及び、環Z^{2}が縮環した複素環に結合する炭素原子が有するR^{13}は、水素原子が好ましい。

R^{12}及び上記以外のR^{13}のうち、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有しない基としては、水素原子、アルキル基、アリールオキシ基又はアリールチオ基が好ましく、水素原子又はアルキル基がより好ましく、水素原子がさらに好ましい。

また、R^{11}～R^{13}のうち、R^{11}、及び、環Z^{2}が縮環した複素環に結合する炭素原子が有するR^{13}以外のR^{12}～R^{13}における隣接する基同士が、互いに結合して５又は６員環を形成していることが好ましく、６員環を形成していることがより好ましい。また、環Z^{1}が縮環した複素環と環Z^{2}が縮環した複素環とを結ぶ結合の中心部分に上記５又は６員環を形成していることが好

ましい。環Z^1が縮環した複素環と環Z^2が縮環した複素環とを結ぶ結合の中心部分に形成される環とは、２つの複素環からの結合原子数が等しくなる炭素原子を環構成原子として含む環を意味する。

なお、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基は、上記のR^{11}～R^{13}における隣接する基同士が互いに結合して５又は６員環を形成する場合、この環以外の箇所に有することが好ましい。

[0042] 上記一般式（IV）で表される置換基において、R^{39}～R^{43}としては、上記で挙げた基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がさらに好ましい。

上記一般式（IV）で表される置換基としては、R^{39}およびR^{43}がアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子であることが蛍光強度をより向上させる観点、また、優れた耐光性が得られる観点から好ましい。また、R^{40}～R^{42}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基、カルボキシ基を有するアルキルオキシ基、カルボキシ基を有するアルキルカルバモイル基、もしくは、カルボキシ基を有するポリ（オキシアルキレン）カルバモイル基であるか、又は生体物質に結合可能な置換基を有することが好ましく、R^{40}～R^{42}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基、カルボキシ基を有するアルキルオキシ基、カルボキシ基を有するアルキルカルバモイル基、又はカルボキシ基を有するポリ（オキシアルキレン）カルバモイル基であることがより好ましく、R^{41}が、カルボキシ基、カルボキシ基を有するアルキルオキシ基、カルボキシ基を有するアルキルカルバモイル基、又はカルボキシ基を有するポリ（オキシアルキレン）カルバモイル基であることがさらに好ましく、R^{41}がカルボキ

シ基であることが特に好ましい。

R^{39}～R^{43}のいずれかの置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する形態としては、R^{39}～R^{43}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基であってもよく、R^{39}～R^{43}として採り得る置換基がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基で置換されている形態であってもよい。

[0043] 上記一般式（Ｖ）で表される置換基において、R^{44}としては、上記で挙げた基のなかでも、置換基としてカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する、アリール基が好ましい。このアリール基は、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基以外の置換基を有していてもよく、例えば、アルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子が好ましく挙げられる。

[0044] （３）L^1及びL^2

L^1及びL^2は、アルキル基又は－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}を示す。R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。L^1とL^2は、互いに結合し、環を形成していてもよい。

L^1及びL^2におけるアルキル基が有していてもよい置換基としては、アルコキシ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、カルバモイル基、アシルアミノ基、スルホ基及びホスホノ基並びにこれらの置換基の組み合わせからなる基が挙げられる。また、－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}（R^{21}及びｍは、それぞれ上記のR^{21}及びｍと同義である。）及び後述する生体物質に結合可能な置換基を挙げることができる。なお、上記のアルコキシ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、カルバモイル基、アシルアミノ基、スルホ基及びホスホノ基並びにこれらの置換基の組み合わせからなる基におけるアルキル基部分が、－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}又は後述する生体物質に結合可能な置換基を有していてもよい。

[0045] L^1及びL^2として採りうるアルキル基は、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基と同義である。

無置換のアルキル基の炭素数は、１～６が好ましく、１～４がより好まし

く、１～３がさらに好ましい。

置換基を有するアルキル基のアルキル基部分の炭素数は、１～１０が好ましく、１～８がより好ましく、１～７がさらに好ましく、１～６がさらに好ましく、１～５がさらに好ましい。また、置換基を有するアルキル基の最長鎖を構成する原子数は、３～１４が好ましく、３～１２がより好ましく、３～１０がさらに好ましい。

[0046] L^1及びL^2として採り得る置換基を有するアルキル基としては、水溶性をより向上させる観点からは、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基が好ましく、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基がより好ましく、カルボキシ基及びスルホ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基がさらに好ましい。なお、上記の好ましい置換基（アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基）と、これらの置換基以外の基との組合わせからなる置換基を有するアルキル基であってもよい。

また、上記R^1～R^4が採り得る、置換基を有するアルキル基の形態も好ましく適用できる。

[0047] L^1及びL^2として採りうる－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}は、上記R^1～R^4における－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}の記載を好ましく適用することができる。

L^1及びL^2として採りうる－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}としては、R^{21}が末端にカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有しないアルキル基であることが好ましく、無置換のアルキル基であることがより好ましい。

[0048] L^1及びL^2は、化合物中の高脂溶性を示す構造による色素間の会合抑制の観点から、少なくとも一方が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であることが好ましく、L^1及びL^2の両方が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であること

がより好ましい。

R^1～R^4と、L^1及びL^2の組み合わせとしては、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、L^1及びL^2の少なくとも１つが、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である組み合わせが好ましく挙げられ、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、L^1及びL^2が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である組み合わせがより好ましく、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、L^1及びL^2が、スルホ基を置換基として有するアルキル基であることがさらに好ましい。

なお、上記のL^1及びL^2として採り得るアルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基は、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であることが好ましく、カルボキシ基及びスルホ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であることがより好ましく、スルホ基を置換基として有するアルキル基であることがさらに好ましい。

[0049] （４）環Z^1及び環Z^2

環Z^1及び環Z^2は、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環を示し、置換基を有していてもよく、縮合環を形成していてもよい。

環Z^1及び環Z^2が、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環の縮合環を形成している場合、この縮合環全体を、環Z^1及び環Z^2として理解する。

環Z^1及び環Z^2が環構成窒素原子を有する６員環を形成する場合、この環構成窒素原子は置換基で置換されていてもよい。蛍光強度をより向上させる観点からは、環Z^1及び環Z^2は単環であることが好ましい。

[0050] 環Z^1及び環Z^2として採りうる炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環としては、脂肪族環であっても芳香族環であってもよいが、芳香族環が好ましい。

上記６員環としては、例えば、炭化水素環又は含窒素複素環が挙げられる。含窒素複素環としては、L^1もしくはL^2が結合する窒素原子に対してオルト位に位置する環構成原子が窒素原子である含窒素複素環が好ましく、L^1もしくはL^2が結合する窒素原子に対してオルト位に位置する環構成原子が窒素原子であるピリジン環がより好ましい。

上記６員環としては、ベンゼン環、ピリジン環、ピリミジン環、ピリダジン環、ピラジン環及び１，２，３若しくは１，２，４－トリアジン環が挙げられ、ベンゼン環又はピリジン環が好ましい。また、共役構造の記載の方法によって、これらの芳香族環と環構成原子の種類及び位置を同じとする脂肪族環も挙げられる。

[0051] 上記６員環又は上記６員環の縮合環が有していてもよい置換基としては、後述する置換基群Ｔにおける置換基が挙げられ、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、カルボキシ基、スルホ基、ホスホノ基、スルホンアミド基、ニトロ基又はハロゲン原子がより好ましく、アルキル基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基又はハロゲン原子がより好ましい。

水溶性の向上および会合抑制の観点から、環Z^1及び環Z^2は、各々独立に、１つ以上の親水性基を有することが好ましく、環Z^1又は環Z^2を構成する環の数１つに付き少なくとも１つの親水性基を有することがより好ましい。例えば、環Z^1及び環Z^2が共にナフタレン環である場合、環Z^1及び環Z^2を構成する環の数はいずれも２となり、環Z^1及び環Z^2がいずれも、少なくとも２つの親水性基を有することがより好ましいことを意味する。上限値は、構造として可能な限り特に制限されず、後述する化合物全体としての親水性基の数にあわせて、適宜調整することができる。

親水性基としては、特に制限されないが、例えば、置換基を有するアルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基が挙げられ、スルホ基が好

ましい。これらの親水性基は、環Z^1又は環Z^2に直接結合していてもよく、連結基を介して結合していてもよく、直接結合していることが好ましい。

[0052] （５）ｎ、$\alpha 1$及び$\alpha 2$

ｎは、１～３の整数であって、２又は３の整数が好ましい。

$\alpha 1$及び$\alpha 2$は０または１である。$\alpha 1$が０であるとはL^1を有しないことを意味し、$\alpha 1$が１であるとはL^1を有することを意味する。同様に、$\alpha 2$が０であるとはL^2をしないことを意味し、$\alpha 2$が１であるとはL^2を有することを意味する。

環Z^1が、L^1もしくはL^2が結合する窒素原子に対してオルト位に位置する環構成原子が窒素原子である含窒素複素環である場合に、$\alpha 1$は０を取りうる。また、環Z^2が、L^1もしくはL^2が結合する窒素原子に対してオルト位に位置する環構成原子が窒素原子である含窒素複素環である場合に、$\alpha 2$は０を取りうる。

[0053] R^{11}～R^{13}の少なくとも１つは、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。

上記一般式（１）で表される化合物は、上記のカルボキシ基または生体物質に結合可能な置換基により、生体物質と結合し、目的とする標識生体物質を得ることができる。なお、カルボキシ基は、生体物質に結合可能な置換基を常法により容易に誘導することができる。

本発明において、「生体物質に結合可能な置換基」は、カルボキシ基から誘導される生体物質に結合可能な置換基を含む。

このように、上記一般式（１）で表される化合物は、シアニン骨格構造中において特定の位置に有する置換基（具体的には、繰り返し数ｎ＋１のポリメチン鎖上の置換基であるR^{11}～R^{13}のうちの少なくとも１つ）により生体物質と結合するため、得られる標識生体物質は、上述の通り、優れた蛍光強度を示すと考えられる。

R^{11}～R^{13}のうちカルボキシ基または生体物質に結合可能な置換基を有する基の数は、合計で、少なくとも１つ以上であればよく、検出対象物質の定

量の観点から、１～３つが好ましく、１つ又は２つがより好ましく、１つがさらに好ましい。

[0054] また、上記一般式（１）で表される化合物は、化合物として十分な親水性を付与する観点から、化合物全体として親水性基を、２個以上有することが好ましく、２～８個有することがより好ましく、２～６個有することがさらに好ましく、３～６個有することが特に好ましい。

親水性基としては、前述の環Z^1及び環Z^2が採りうる親水性基の記載を適用することができる。

親水性基の位置は特に制限されないが、上記親水性基を有する基としては、例えば、R^{11}～R^{13}、環Z^1、環Z^2、L^1及びL^2が好ましく挙げられる。

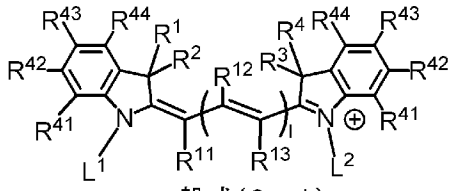
なお、上記一般式（１）で表される化合物が、上記のカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基として上記親水性基を有する場合、上記のカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基の他に、親水性基を１個以上有することが実際的であり、好ましい。具体例としては、例えばカルボキシ基、スルホ基等が挙げられ、アルキル基、アルコキシ基等がカルボキシ基、スルホ基等を置換基として有する基であってもよく、例えば、スルホアルキル基、スルホアルコキシ基等が挙げられる。

[0055] ＜一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物＞

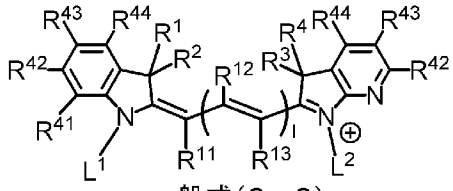
本発明の一般式（１）で表される化合物は下記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表されることが好ましい。

[0056]

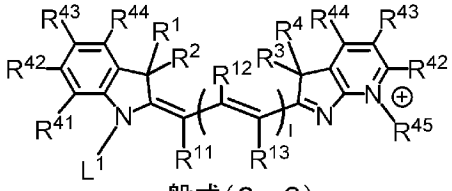
[化9]



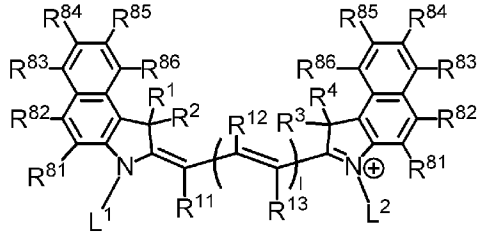
一般式（２－１）



一般式（２－２）



一般式（２－３）



一般式（２－４）

[0057] 式中、R^{45}は、アルキル基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示す。

R^{41}～R^{44}及びR^{81}～R^{86}は、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して縮合環を形成していてもよい。

なお、一般式（２－１）及び（２－４）のいずれでも表される化合物については、優先的に一般式（２－４）で表される化合物に分類する。すなわち、一般式（２－１）におけるR^{43}とR^{44}が結合してベンゼン環を形成することはない。

R^1～R^4、R^{11}～R^{13}、L^1、L^2及びｍは、それぞれ上記一般式（１）におけるR^1～R^4、R^{11}～R^{13}、L^1、L^2及びｍと同義であり、好ましい範囲も同じである。

R^1～R^4、L^1、L^2又はR^{45}の少なくとも１つは、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}である。すなわち、一般式（２－１）、（２－２）及び（２－４）においては、R^1～R^4、L^1及びL^2のうちの少なくとも１つは－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}であり、一般式（２－３）においては、R^1～R^4、L^1及びR^{45}のうちの少なくとも１つは－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}であることを意味する。R^{21}及びｍは、それぞれ上記一般式（１）におけるR^{21}及びｍと同義である。

Ｉは２又は３の整数を示す。

上記一般式（１）で表される化合物と同様に、上記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物は、Ｒ^{11}～Ｒ^{13}の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。

ただし、式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物は中性の化合物である。

[0058] Ｒ^{45}として採りうるアルキル基及び－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ^{21}は、Ｌ^{1}又はＬ^{2}として採りうるアルキル基及び－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ^{21}と同義である。

[0059] Ｒ^{41}～Ｒ^{44}及びＲ^{81}～Ｒ^{86}として採り得るアルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基及びハロゲン原子は、それぞれ、後述する置換基群Ｔにおけるアルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基及びハロゲン原子と同義である。

Ｒ^{41}～Ｒ^{44}及びＲ^{81}～Ｒ^{86}として採り得るアミド基は、上記一般式（１）におけるＲ^{11}～Ｒ^{13}として採り得るアミド基の記載を適用することができる。

[0060] Ｒ^{41}～Ｒ^{44}としては、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、スルホ基又はカルボキシ基が好ましい。

Ｒ^{41}～Ｒ^{44}における隣り合う基は互いに連結して環を形成していてもよい。形成される環は単環であってもよく縮合環であってもよい。構成する環としては、環員数は５又は６が好ましく、脂肪族環であっても芳香族環であってもよい。６員環である場合には芳香族環であることが好ましい。

縮合環である場合、Ｒ^{41}～Ｒ^{44}が結合するベンゼン環を含めて、２～５個の環からなる縮合環であることが好ましく、２～４個の環からなる縮合環であることがより好ましく、２又は３個の環からなる縮合環であることがさらに好ましい。

環を形成している形態としては、Ｒ^{41}～Ｒ^{44}における隣り合う基が互いに

連結して少なくともベンゼン環を形成していること、すなわち、R^{41}～R^{44}が結合するベンゼン環とあわせて、少なくともナフタレン環構造を形成していることが好ましい。

なかでも、一般式（２－１）～（２－３）のいずれかで表される化合物のうち、一般式（２－１）で表される化合物において、R^{41}とR^{42}が環を形成しているか、R^{42}とR^{43}が環を形成しているか、又は、R^{43}とR^{44}が環を形成していることが好ましく、R^{41}とR^{42}が環を形成しているか、又は、R^{42}とR^{43}が環を形成していることがより好ましい。

R^{41}～R^{44}が結合するベンゼン環と、R^{41}～R^{44}における隣り合う基が互いに連結して形成される環とにより構成される環は、置換基を有していてもよく、有していてもよい置換基としては、上述のR^{41}～R^{44}として採り得るアルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基及びハロゲン原子が挙げられ、アルキル基、アルコキシ基、スルホ基又はカルボキシ基が好ましい。

[0061] 一般式（２－１）～（２－３）のいずれかで表される化合物において、水溶性の向上および会合抑制の観点から、上述の一般式（１）で表される化合物における環Z^1及び環Z^2に対応する環が、各々独立に、１つ以上の親水性基を有することが好ましく、環Z^1又は環Z^2に対応する環を構成する環の数１つに付き少なくとも１つの親水性基を有することがより好ましい。上限値は、構造として可能な限り特に制限されず、後述する化合物全体としての親水性基の数にあわせて、適宜調整することができる。

親水性基としては、特に制限されないが、例えば、置換基を有するアルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基が挙げられ、スルホ基が好ましい。これらの親水性基は、環Z^1又は環Z^2に対応する環に直接結合していてもよく、連結基を介して結合していてもよく、直接結合していることが好ましい。

環Z^1又は環Z^2に対応する環における親水性基を有する位置は、特に制限されず、例えば、少なくともR^{43}として親水性基を有することが好ましく、

R^{43}として親水性基を有することがより好ましい。

[0062] R^{81}～R^{86}としては、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基又はカルボキシ基が好ましい。

R^{81}～R^{86}として採り得るアルキル基、アルコキシ基及びアリール基は、置換基を有していてもよく、有していてもよい置換基としては、例えば、アルキル基、アルコキシ基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基及びハロゲン原子が挙げられ、アルキル基、アルコキシ基、スルホ基又はカルボキシ基が好ましい。

一般式（２－４）で表される化合物において、水溶性の向上および会合抑制の観点から、上述の一般式（１）で表される化合物における環Z^1及び環Z^2に対応する環が、各々独立に、１つ以上の親水性基を有することが好ましく、環Z^1又は環Z^2に対応する環を構成する環の数１つに付き少なくとも１つの親水性基を有することがより好ましい。上限値は、構造として可能な限り特に制限されず、後述する化合物全体としての親水性基の数にあわせて、適宜調整することができる。

親水性基としては、特に制限されないが、例えば、置換基を有するアルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基が挙げられ、スルホ基が好ましい。これらの親水性基は、環Z^1又は環Z^2に対応する環に直接結合していてもよく、連結基を介して結合していてもよく、直接結合していることが好ましい。

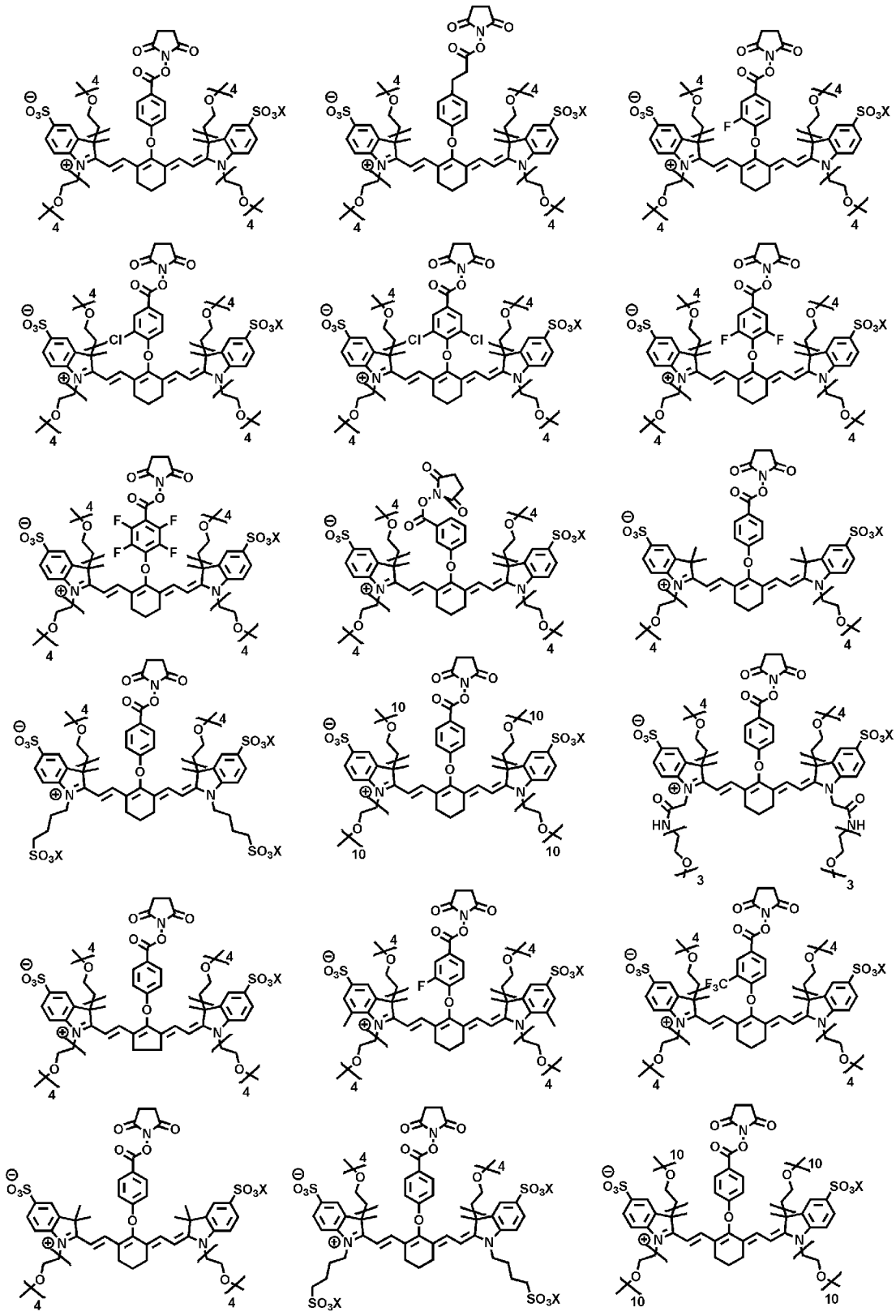
環Z^1又は環Z^2に対応する環における親水性基を有する位置は、特に制限されず、例えば、少なくともR^{83}～R^{85}のいずれか１つに親水性基を有することが好ましく、少なくともR^{83}及びR^{85}として親水性基を有するか、又は、少なくともR^{84}として親水性基を有することがより好ましく、R^{83}及びR^{85}として親水性基を有するか、又は、R^{84}として親水性基を有することがさらに好ましく、R^{83}及びR^{85}として親水性基を有することが特に好ましい。

[0063] 以下に、本発明の一般式（１）で表される化合物の具体例を示すが、本発明はこれらの化合物に限定されない。下記具体例において、－SO_3Xにおけ

るX$^+$は水素イオン（H$^+$）、ナトリウムイオン、カリウムイオン、アンモニウム（NH$_4^+$）又はトリエチルアンモニウム（NH（CH$_2$CH$_3$）$_3^+$）を示す。

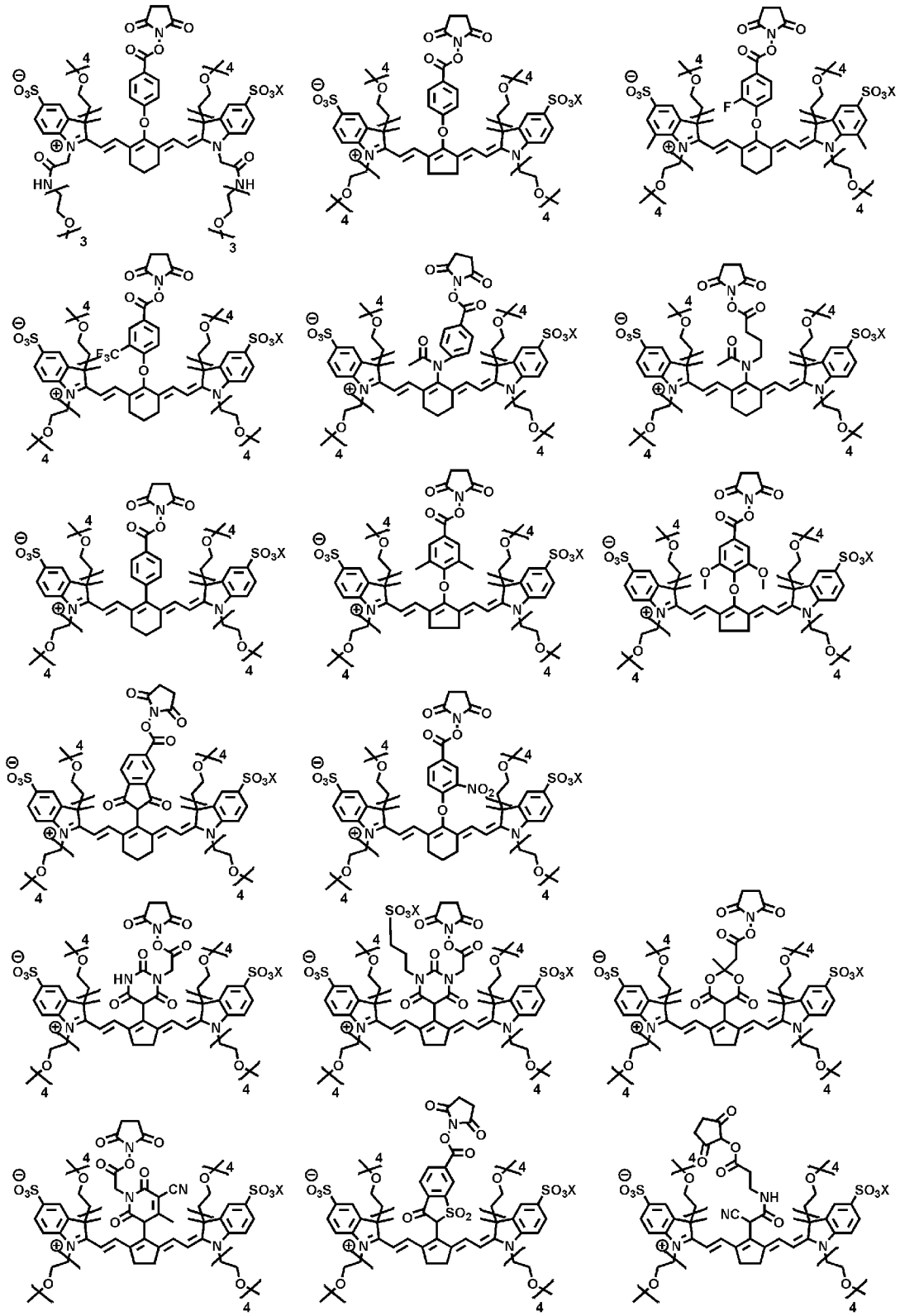
[0064]

[化10]



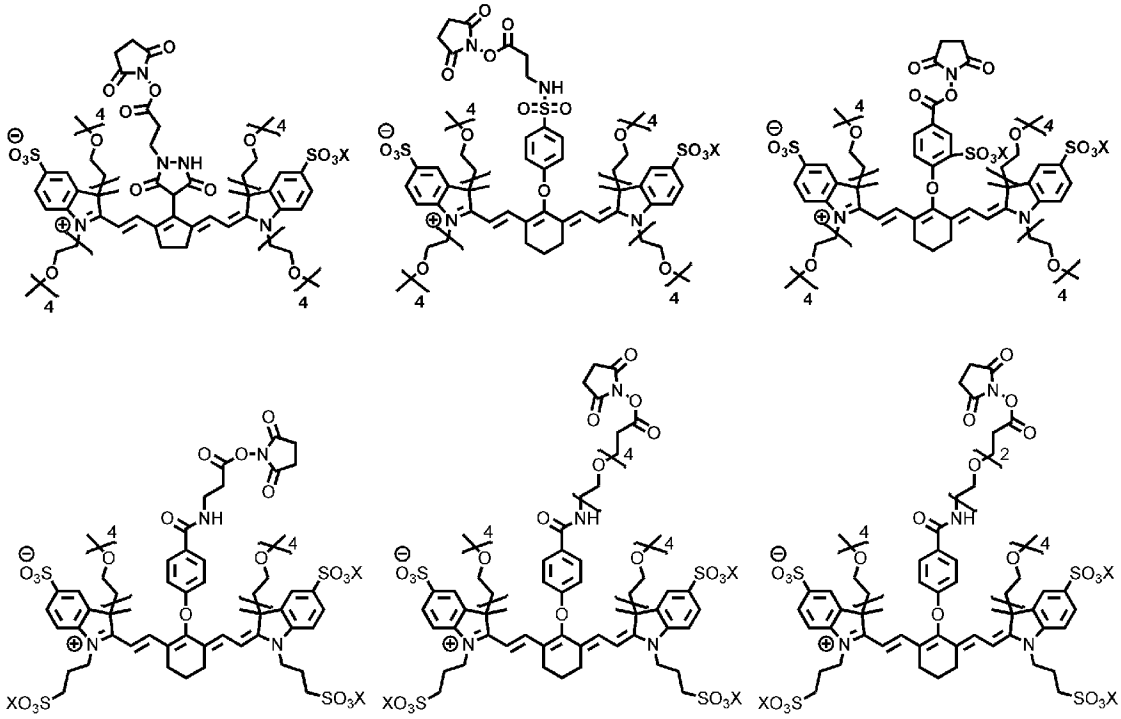
[0065]

[化11]



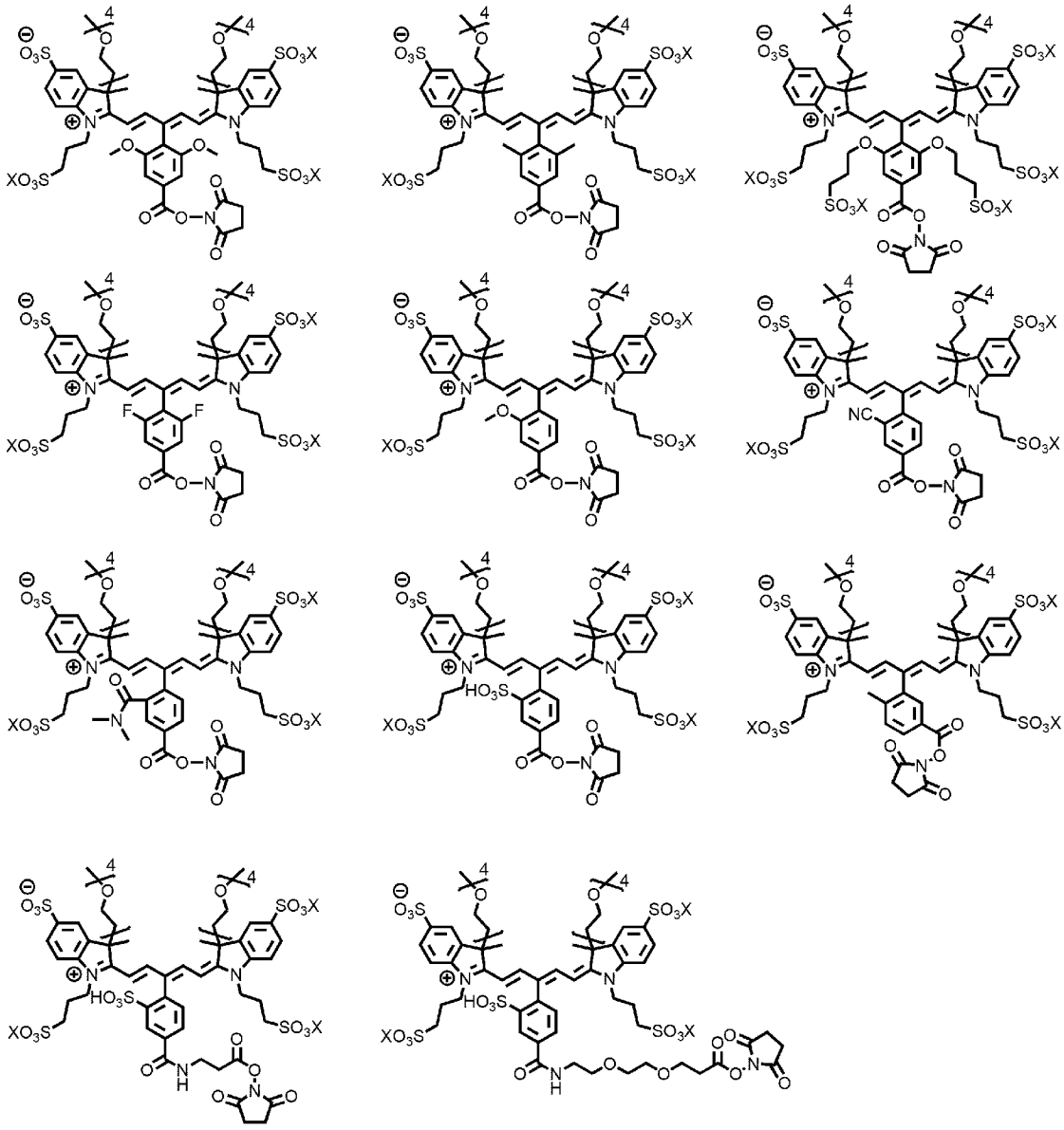
[0066]

[化12]



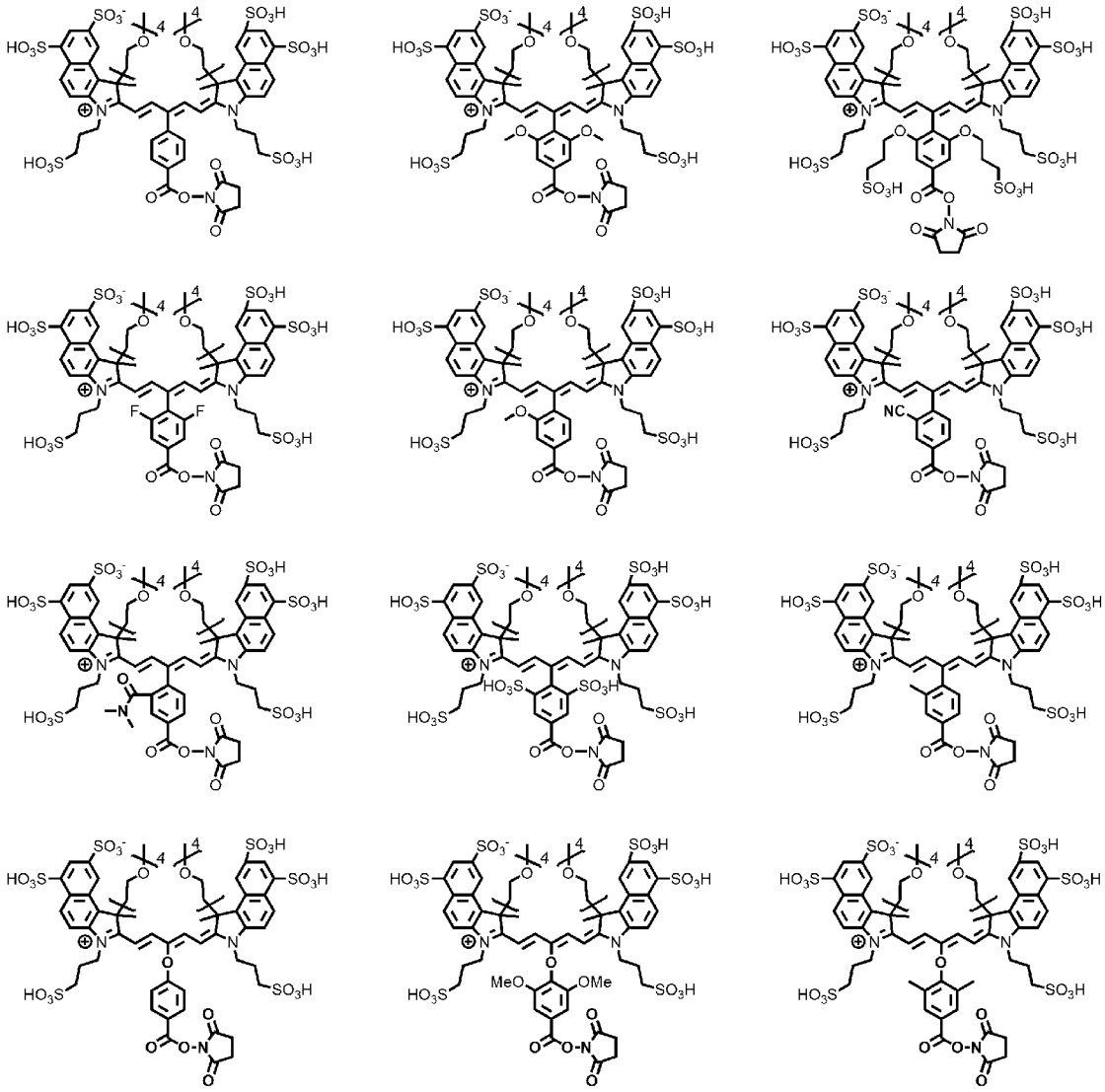
[0067]

[化13]



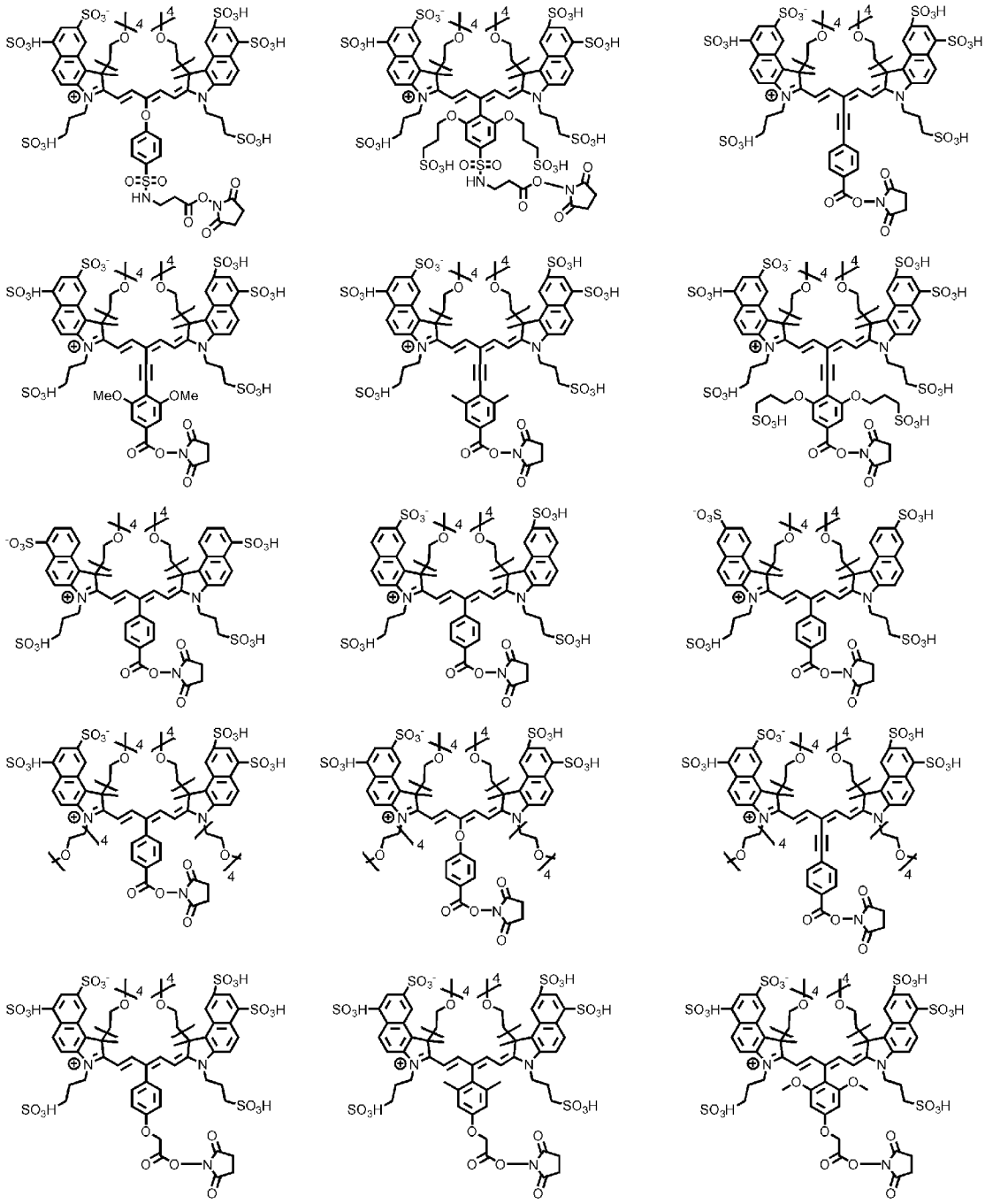
[0068]

[化14]



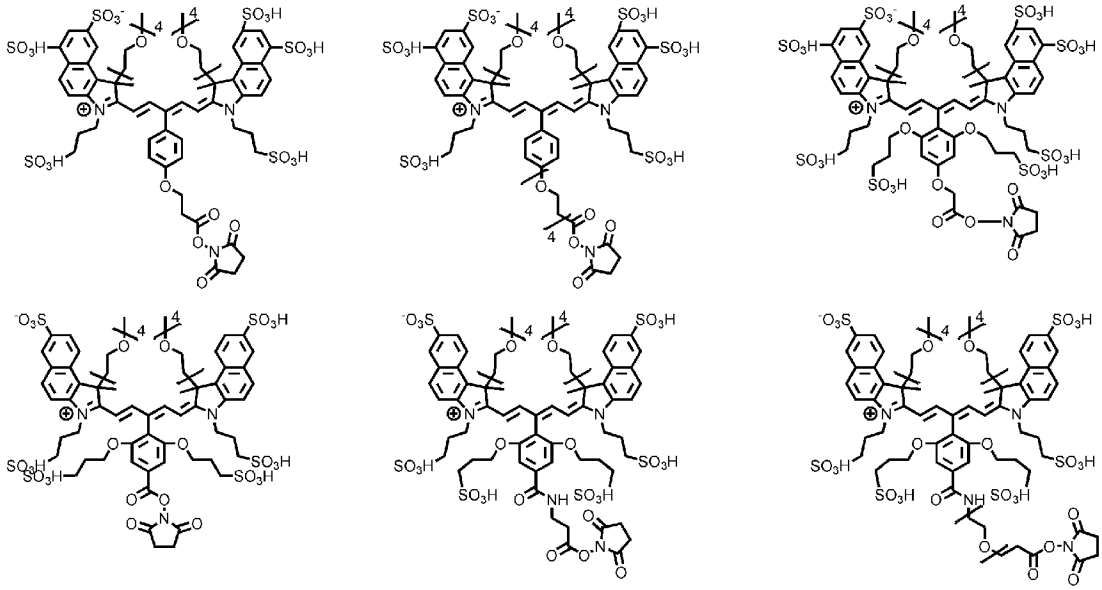
[0069]

[化15]



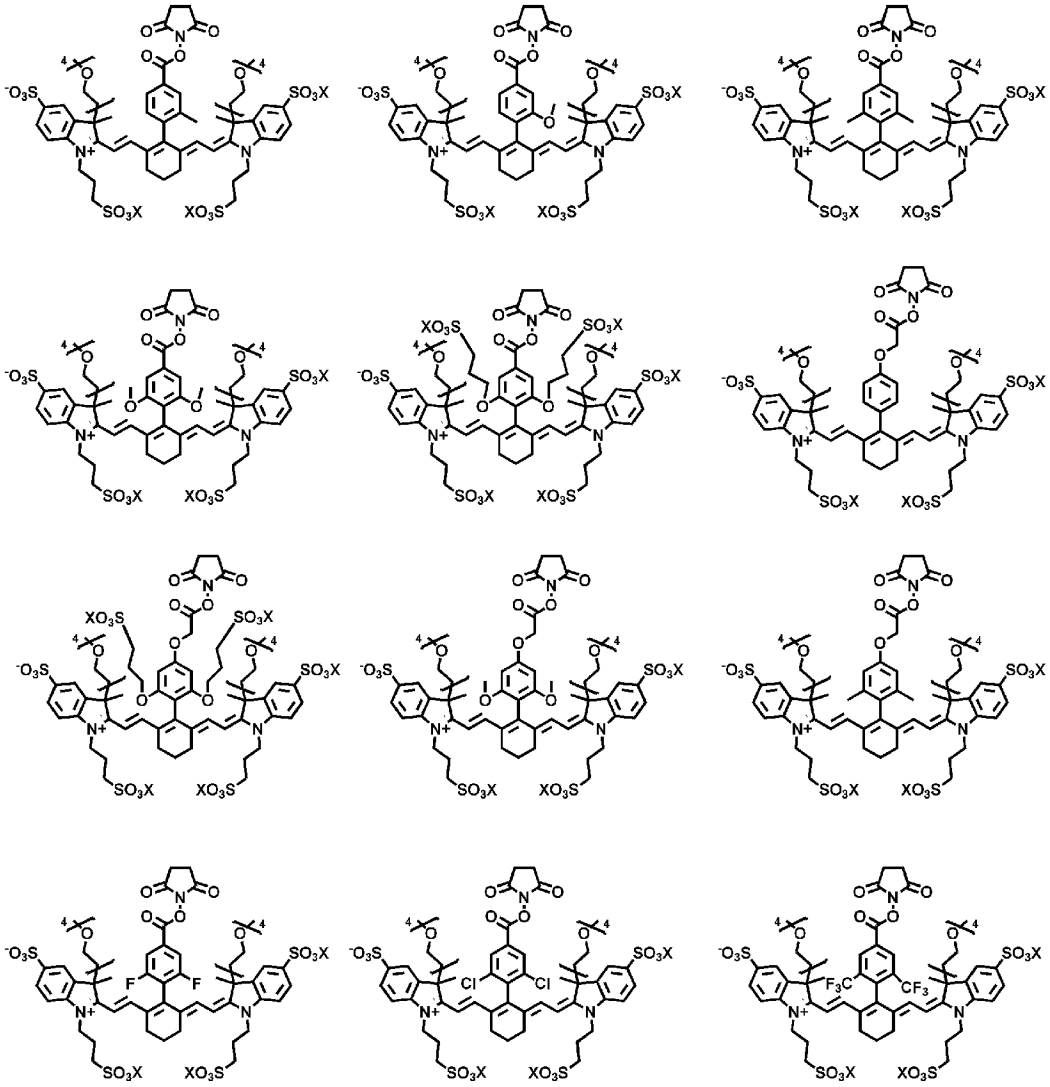
[0070]

[化16]



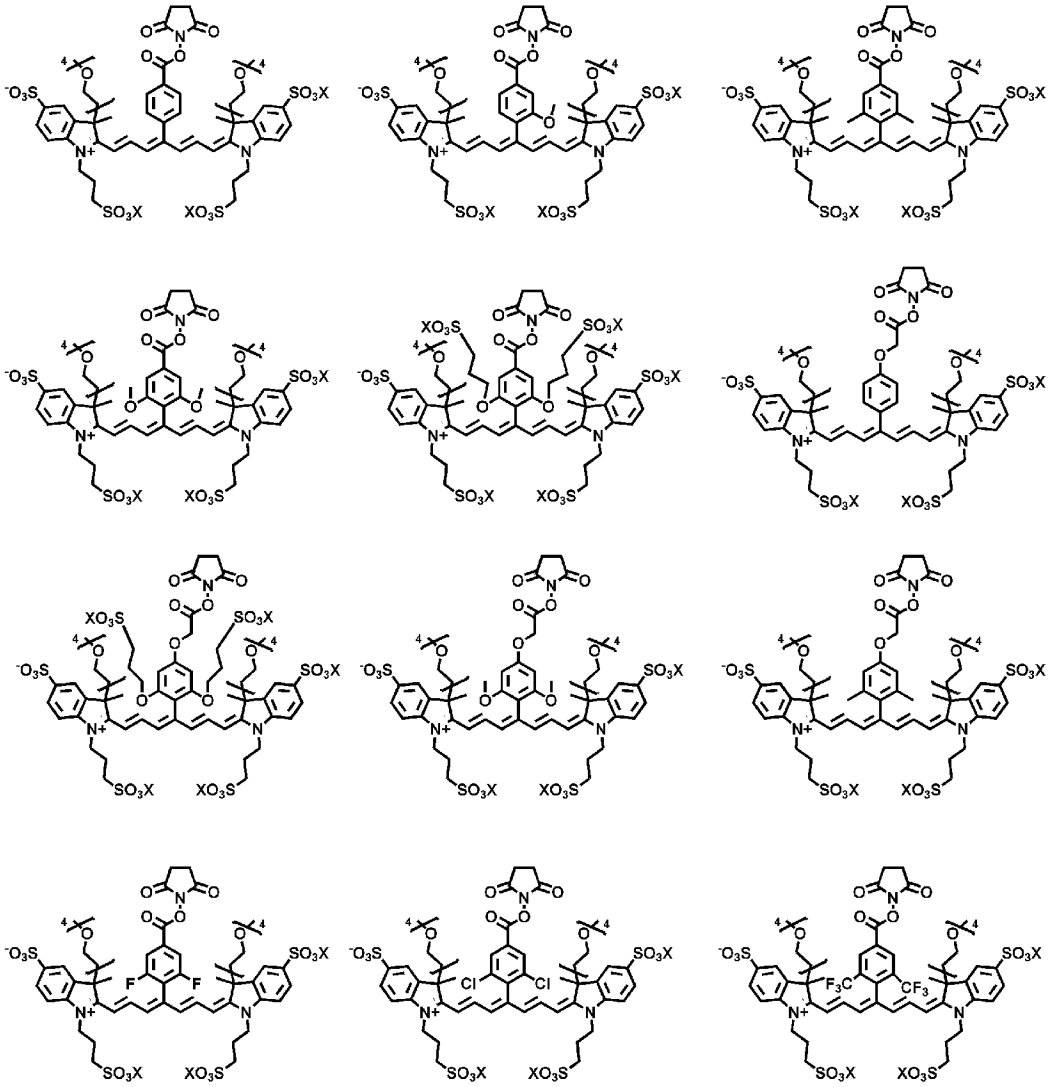
[0071]

[化17]



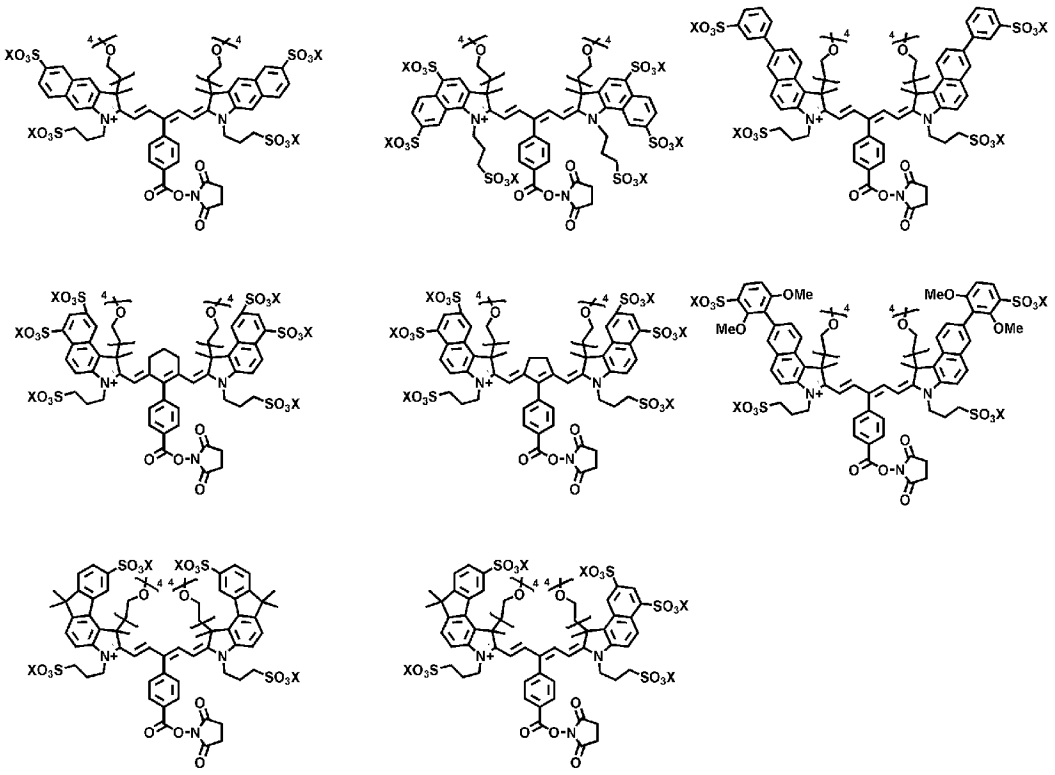
[0072]

[化18]



[0073]

[化19]



[0074] 本発明の第一の好ましい形態としては、上記一般式（１）で表される化合物のうち７４０～８３０ｎｍに励起吸収波長を有するものが挙げられる。上記のＲ[11]～Ｒ[13]のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、上記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基であり、好ましくは上記一般式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＶ）のいずれかで表される置換基であり、より好ましくは上記一般式（Ｉ）または（ＩＶ）で表される置換基が挙げられる。

本発明の第一の好ましい形態における化合物としては、例えば、上記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物（ただし、Ｉ＝３の整数である。）のうち、上記一般式（２－１）で表される化合物が挙げられ、一般式（２－１）における各置換基が以下の形態Ｉ又はIIのいずれかを満たす化合物がより好ましく挙げられる。

（形態Ｉ）

上記のＲ[11]～Ｒ[13]のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結

合可能な置換基を有するものが、上記一般式（Ｉ）又は（ＩＩ）で表される置換基であり、Ｌ[1]及びＬ[2]が、上述の－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]であるか、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であり、Ｒ[1]及びＲ[2]の少なくとも１つとＲ[3]及びＲ[4]の少なくとも１つが、上述の－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－で表される構造を含み、Ｒ[41]～Ｒ[44]の少なくとも１つ（好ましくはＲ[43]）がスルホ基である形態。

この形態において、上記一般式（Ｉ）における置換基Ｒ[31]～Ｒ[35]としては、上述の基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましい。上記一般式（Ｉ）で表される置換基の中でも、Ｒ[31]およびＲ[35]がアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子であることが蛍光強度をより向上させる観点、また、優れた耐光性が得られる観点から好ましい。また、Ｒ[32]～Ｒ[34]のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが特に好ましい。

この形態において、上記一般式（ＩＩ）で表される置換基としては、上述の式（Ｅ－４）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基が好ましく、上述の式（Ｅ－６）で表される置換基がより好ましい。式（Ｅ－４）～（Ｅ－８）における置換基については、上述の記載を適用することができる。

（形態II）

上記のＲ[11]～Ｒ[13]のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、上記一般式（ＩＶ）で表される置換基であり、Ｌ[1]及びＬ[2]が、上述の－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]であるか、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であり、Ｒ[1]及びＲ[2]の少なくとも１つとＲ[3]及びＲ

^{4}の少なくとも１つが、上述の－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、R^{41}～R^{44}の少なくとも１つ（好ましくはR^{43}）がスルホ基である形態。

この形態において、上記一般式（ＩＶ）における置換基R^{39}～R^{43}としては、上述の基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましい。上記一般式（ＩＶ）で表される置換基の中でも、R^{39}およびR^{43}がアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子であることが蛍光強度をより向上させる観点、また、優れた耐光性が得られる観点から好ましい。また、R^{40}～R^{42}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが特に好ましい。

[0075] 本発明の第二の好ましい形態としては、６２０～７００ｎｍに励起吸収波長を有するものであり、上記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物（ただし、ｌ＝２の整数である。）のうち、好ましくは上記一般式（２－１）で表される化合物が挙げられる。上記のR^{11}～R^{13}のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、上記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基であり、好ましくは上記一般式（Ｉ）、（ＩＶ）及び（Ｖ）のいずれかで表される置換基であり、より好ましくは上記一般式（ＩＶ）で表される置換基が挙げられる。

上記一般式（ＩＶ）における置換基R^{39}～R^{43}としては、上述の基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましい。上記一般式（ＩＶ）で表され

る置換基の中でも、R^{39}およびR^{43}がアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子であることが蛍光強度をより向上させる観点、また、優れた耐光性が得られる観点から好ましい。また、R^{40}～R^{42}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが特に好ましい。

本発明の第二の好ましい形態における上記一般式（２－１）で表される化合物（ただし、ｌ＝２の整数である。）のうち、上述の置換基以外の置換基としては、L^1及びL^2が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であり、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、上述の－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表される構造を含み、R^{41}～R^{44}の少なくとも１つ（好ましくはR^{43}）がスルホ基である形態が好ましく挙げられる。

[0076] 本発明の第三の好ましい形態としては、６２０～７２０ｎｍに励起吸収波長を有するものであり、上記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物（ただし、ｌ＝２の整数である。）のうち、好ましくは上記一般式（２－４）で表される化合物が挙げられる。上記のR^{11}～R^{13}のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、上記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基であり、好ましくは上記一般式（Ｉ）、（ＩＶ）及び（Ｖ）のいずれかで表される置換基であり、より好ましくは上記一般式（ＩＶ）で表される置換基が挙げられる。

上記一般式（ＩＶ）における置換基R^{39}～R^{43}としては、上述の基のなかでも、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アルキルチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基が好ましく、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基がより好ましい。上記一般式（ＩＶ）で表される置換基の中でも、蛍光強度をより向上させる観点、また、優れた耐光性が得られる観点から、R^{39}またはR^{43}の少なくとも一方がアルキル基、アルコ

キシ基又はハロゲン原子であることが好ましく、R^{39}及びR^{43}がアルキル基、アルコキシ基又はハロゲン原子であることがより好ましい。また、R^{40}～R^{42}のうちの少なくとも１つが、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが好ましく、R^{41}がカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有することが特に好ましい。

本発明の第三の好ましい形態における上記一般式（２－４）で表される化合物（ただし、ｌ＝２の整数である。）のうち、上述の置換基以外の置換基としては、L^1及びL^2が、上述の－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}であるか、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基であり、R^1及びR^2の少なくとも１つとR^3及びR^4の少なくとも１つが、上述の－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－で表される構造を含み、R^{83}～R^{85}の少なくとも１つ（好ましくは、R^{83}及びR^{85}、又は、R^{84}、より好ましくは、R^{83}及びR^{85}）がスルホ基である形態が好ましく挙げられる。

[0077] 本発明の一般式（１）で表される化合物は、R^{11}～R^{13}の少なくとも１つが有する生体物質に結合可能な置換基によって、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、糖鎖及び脂質などの生体物質に結合させることができ、標識生体物質として用いることができる。

生体物質に結合可能な置換基としては、生体物質に作用（付着を含む）もしくは結合するための基であれば、特に制限することなく用いることができ、国際公開第２００２／０２６８９１号等に記載の置換基を挙げることができる。なかでも、ＮＨＳエステル構造（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）、スクシンイミド構造、マレイミド構造、アジド基、アセチレン基、ペプチド構造（ポリアミノ酸構造）、長鎖アルキル基（好ましくは、炭素数１２～３０）、４級アンモニウム基が好ましく挙げられる。

[0078] 本発明の一般式（１）で表される化合物のうち、R^{11}～R^{13}の少なくともいずれか１つに生体物質に結合可能な置換基を少なくとも有する化合物の具体例としては、例えば、上述の本発明の一般式（１）で表される化合物に加

え、後記標識生体物質における例示化合物が挙げられる。また、上記本発明の一般式（１）で表される化合物における例示化合物において、生体物質に結合可能な置換基を後記標識生体物質における例示化合物として示すようにして有する形態も、具体例として挙げられる。なお、本発明はこれらの化合物に限定されない。例えば、これらの具体例において、カルボキシ基及びスルホ基等の解離性の水素原子を有する基については、水素原子が解離して塩構造を採っていてもよい。

[0079] 本発明の一般式（１）で表される化合物は、化合物構造を一般式（１）で規定する構造とすること以外は、公知の方法で合成できる。例えば、特許文献１、特許文献２等に記載の方法が挙げられる。

生体物質に結合可能な置換基を有する化合物は、化合物構造を一般式（１）で規定する構造とすること以外は、公知の方法で合成できる。例えば、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｇｒｅｇ Ｔ． Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ著）を参照することができる。

[0080] ＜＜標識生体物質＞＞

本発明の標識生体物質は、本発明の一般式（１）で表される化合物と生体物質とが結合した物質である。本発明の一般式（１）で表される化合物は蛍光性を有し、近赤外領域の発色用として適した吸収波長ピークと優れた蛍光強度を示すため、標識生体物質に好ましく用いることができる。一般式（１）で表される化合物と生体物質との結合は、一般式（１）で表される化合物と生体物質とが直接結合した形態でもよいし、連結基を介して連結した形態でもよい。

[0081] 上記生体物質としては、タンパク質（ペプチドを含む。）、アミノ酸、核酸、糖鎖及び脂質が好ましく挙げられる。タンパク質としては抗体が好ましく挙げられ、脂質としてはリン脂質、脂肪酸及びステロールが好ましく挙げられ、リン脂質がより好ましい。

上記生体物質のうち、臨床病理的に有用な物質としては、特に制限されるものではないが、例えば、Ｉｇ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）Ｇ、Ｉｇ

Ｍ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ等の免疫グロブリン、補体、Ｃ反応性蛋白（ＣＲＰ）、フェリチン、α_1マイクログロブリン、β_2マイクログロブリン等の血漿タンパク及びそれらの抗体、α－フェトプロテイン、癌胎児抗原（ＣＥＡ）、前立線性酸性フォスファターゼ（ＰＡＰ）、ＣＡ（ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ）１９－９、ＣＡ－１２５等の腫瘍マーカー及びそれらの抗体、黄体化ホルモン（ＬＨ）、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、ヒト繊毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）、エストロゲン、インスリン等のホルモン類及びそれらの抗体、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）関連抗原（ＨＢｓ、ＨＢｅ、ＨＢｃ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、成人Ｔ細胞白血病（ＡＴＬ）等のウイルス感染関連物質及びそれらの抗体、等が挙げられる。

さらに、ジフテリア菌、ボツリヌス菌、マイコプラズマ、梅毒トレポネーマ等のバクテリア及びそれらの抗体、トキソプラズマ、トリコモナス、リーシュマニア、トリパノゾーマ、マラリア原虫等の原虫類及びそれらの抗体、ＥＬＭ３、ＨＭ１、ＫＨ２、ｖ６．５、ｖ１７．２、ｖ２６．２（由来マウス１２９、１２９／ＳＶ、Ｃ５７ＢＬ／６、ＢＡＬＢ／ｃ）等のＥＳ細胞（Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ）及びそれらの抗体、フェニトイン、フェノバルビタール等の抗てんかん薬、キニジン、ジゴキニシン等の心血管薬、テオフィリン等の抗喘息薬、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン等の抗生物質等の薬物類及びそれらの抗体、その他の酵素、菌体外毒素（スチレリジンＯ等）及びそれらの抗体等も挙げられる。また、Ｆａｂ’２、Ｆａｂ、Ｆｖ等の抗体断片も用いる事ができる。

[0082] 本発明の一般式（１）で表される化合物（以下、化合物（１）とも略す。）と生体物質が相互作用して結合した具体的な形態としては、例えば、下記に記載する形態が挙げられる。

ｉ）化合物（１）中のペプチドと生体物質中のペプチドとの非共有結合（例えば、水素結合、キレート形成を含むイオン結合）又は共有結合、

ｉｉ）化合物（１）中の長鎖アルキル基と生体物質中の脂質二重膜及び脂質などとのファンデルワールス力、

ｉｉｉ）化合物（１）中のＮＨＳエステル（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）と生体物質中のアミノ基との反応によるアミド結合、

ｉｖ）化合物（１）中のマレイミド基と生体物質中のスルファニル基（－ＳＨ）との反応によるチオエーテル結合、

ｖ）化合物（１）中のアジド基と生体物質中のアセチレン基とのＣｌｉｃｋ反応又は化合物（１）中のアセチレン基と生体物質中のアジド基とのＣｌｉｃｋ反応によるトリアゾール環の形成、

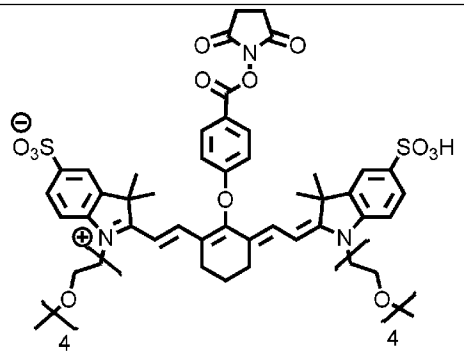
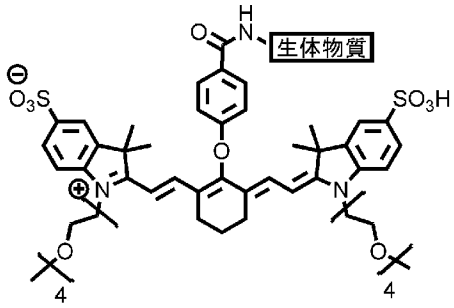
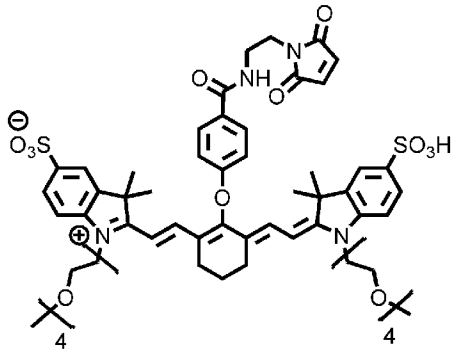
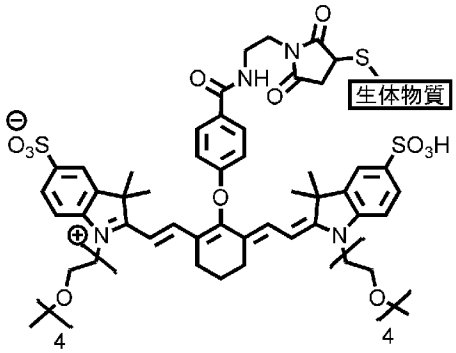
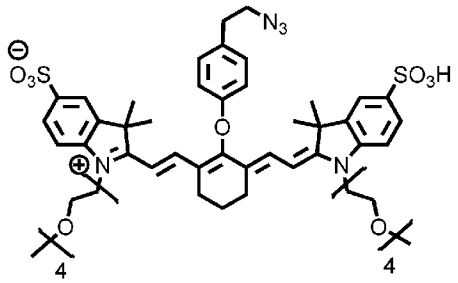
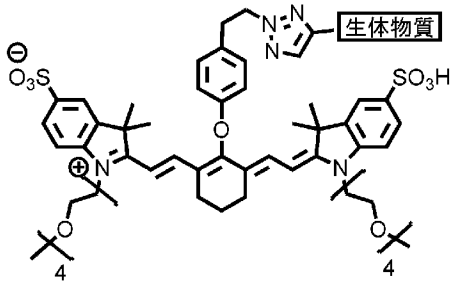
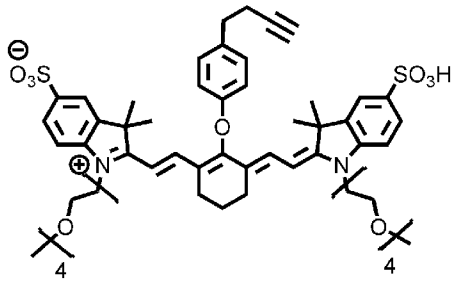
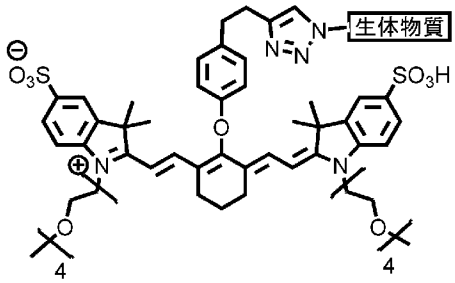
が挙げられる。

上記ｉ）～ｖ）の形態以外にも、例えば、Lucas C. D. de Rezende and Flavio da Silva Emery,. A Review of the Synthetic Strategies for the Development of BODIPY Dyes for Conjugation with Proteins, Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, 2013, Vol 5, No. 1, p.62-83に記載の形態により結合することができる。また、本発明の標識生体物質の作製においても、同文献に記載の方法等を適宜参照することができる。

[0083] 以下に、本発明の一般式（１）で表される化合物のうち、R^{11}～R^{13}の少なくともいずれか１つに生体物質に結合可能な置換基を少なくとも有する化合物と、これと相互作用により結合する生体物質とから得られる本発明の標識生体物質の具体例を示すが、本発明はこれらの化合物等に限定されない。下記具体例において、スルホ基等の解離性の水素原子を有する基については、水素原子が解離して塩構造を採っていてもよい。

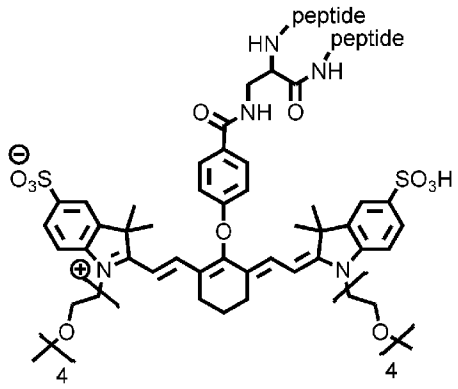
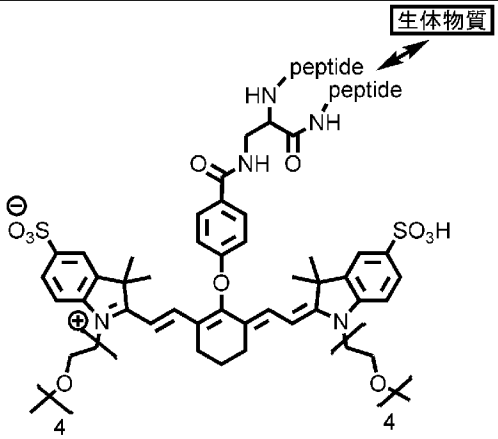
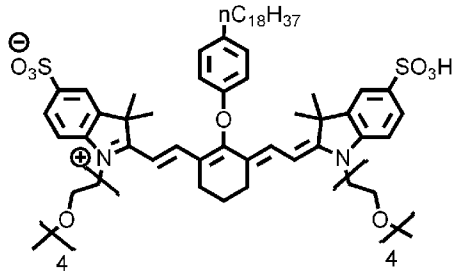
[0084]

[化20]

化合物例	生成物(結合様式)
 ＮＨＳエステル構造	 生体物質のアミノ基を介した結合
 マレイミド構造	 生体物質のスルファニル基を介した結合
 アジド構造	 生体物質のアセチレン基を介したClick反応
 アセチレン構造	 生体物質のアジド基を介したClick反応

[0085]

[化21]

化合物例	生成物（結合様式）
 ペプチド構造（ポリアミノ酸構造）	 生体物質のペプチドを介した結合
 長鎖アルキル基	生体物質の脂質二重膜又はリン脂質などを介したファンデルワールス力

[0086] ＜標識生体物質を含む試薬＞

本発明の標識生体物質を含む試薬において、本発明の標識生体物質は、例えば、生理食塩水及びリン酸緩衝液等の水系媒体に溶解した溶液形態、並びに、微粒子状粉末及び凍結乾燥粉末等の固形形態等、特に制限されることなく、使用目的等に応じてその形態を適宜選択することができる。

例えば、蛍光標識試薬として本発明の標識生体物質を用いる場合に、上記いずれかの形態の標識生体物質を含む試薬として使用することもできる。

[0087] ＜標識生体物質の用途＞

本発明の一般式（１）で表される化合物から得られる本発明の標識生体物質は、優れた蛍光強度を示すことができ、光照射により励起された標識生体物質から放出される蛍光を安定的に検出することができる。このため、本発明の標識生体物質は、蛍光標識を用いた種々の技術に適用することができ、例えば、多色ＷＢにおける蛍光標識試薬又は生体蛍光イメージング試薬とし

て好適に用いることができる。

[0088] 本発明の標識生体物質を用いて行う蛍光検出は、通常、以下（ｉ）～（ｉｉ）または（ｉｖ）～（ｖｉｉ）の工程を含む。（ｉ）～（ｉｉｉ）の工程を含む蛍光検出は、本発明の化合物で蛍光標識した一次抗体を用いる直接法に該当し、（ｉｖ）～（ｖｉｉ）の工程を含む蛍光検出は、本発明の化合物で蛍光標識した二次抗体を用いる間接法に該当する。

（ｉ）下記（ａ）及び（ｂ）をそれぞれ用意する工程

（ａ）標的とする生体物質（以下、「標的生体物質」とも称す。）を含む試料

（ｂ）上記（ａ）における標的生体物質と結合可能な生体物質（以下、「一次生体物質」とも称す。）と、本発明の化合物と、が結合した本発明の標識生体物質（以下、「本発明の標識生体物質Ａ」とも称す。）

（ｉｉ）上記（ａ）における標的生体物質と、上記（ｂ）の本発明の標識生体物質Ａにおける一次生体物質と、が結合した結合体（以下、「蛍光標識された結合体Ａ」とも称す。）を用意する工程

（ｉｉｉ）上記の蛍光標識された結合体Ａに、本発明の標識生体物質Ａが吸収する波長域の光を照射し、本発明の標識生体物質Ａが発する蛍光を検出する工程

（ｉｖ）下記（ｃ）～（ｅ）をそれぞれ用意する工程

（ｃ）標的生体物質を含む試料

（ｄ）上記（ｃ）における標的生体物質と結合可能な生体物質（以下、「一次生体物質」とも称す。）

（ｅ）上記（ｄ）の一次生体物質と結合可能な生体物質（以下、「二次生体物質」とも称す。）と、本発明の化合物と、が結合した本発明の標識生体物質（以下、「本発明の標識生体物質Ｂ」とも称す。）

（ｖ）上記（ｃ）における標的生体物質と、上記（ｄ）の一次生体物質と、が結合した結合体（以下、「結合体ｂ」とも称す。）を用意する工程

（ｖｉ）上記結合体ｂにおける一次生体物質と、本発明の標識生体物質Ｂにおける二次生体物質と、が結合した結合体（以下、「蛍光標識された結合体Ｂ２」とも称す。）を用意する工程

（ｖｉｉ）上記の蛍光標識された結合体Ｂ２に、本発明の標識生体物質Ｂが吸収する波長域の光を照射し、本発明の標識生体物質Ｂが発する蛍光を検出する工程

[0089] 上記の標的生体物質と結合可能な生体物質（一次生体物質）、及び、一次生体物質と結合可能な生体物質（二次生体物質）としては、上記本発明の標識生体物質における生体物質が挙げられる。標的生体物質（被検体中の生体物質）又は一次生体物質にあわせて適宜選択することができ、被検体中の生体物質又は一次生体物質に対して特異的に結合可能な生体物質を選択することができる。

[0090] 上記標的生体物質のうち、タンパク質としては、いわゆる疾患マーカーが挙げられる。疾患マーカーとしては、特に制限はされるものではないが、例えば、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、ＰＩＶＫＡ－ＩＩ（ｐｒｏｔｅｉｎ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ｖｉｔａｍｉｎ Ｋ ａｂｓｅｎｃｅ ｏｒ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ＩＩ）、ＢＣＡ２２５（ｂｒｅａｓｔ ｃａｒｃｉｎｏｍａ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ）、塩基性フェトプロテイン（ＢＦＰ）、ＣＡ（ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ）１５－３、ＣＡ１９－９、ＣＡ７２－４、ＣＡ１２５、ＣＡ１３０、ＣＡ６０２、ＣＡ５４／６１（ＣＡ５４６）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＤＵＰＡＮ－２、エラスターゼ１、免疫抑制酸性タンパク（ＩＡＰ）、ＮＣＣ－ＳＴ－４３９、γ－セミノプロテイン（γ－Ｓｍ）、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、前立腺酸性フォスファターゼ（ＰＡＰ）、神経特異エノラーゼ（ＮＳＥ）、Ｉｂａ１、アミロイドβ、タウ、フロチリン、扁平上皮癌関連抗原（ＳＣＣ抗原）、シアリルＬｅＸ－ｉ抗原（ＳＬＸ）、ＳＰａｎ－１、組織ポリペプタイド抗原（ＴＰＡ）、シリアルＴｎ抗原（ＳＴＮ）、シフラ（ｃｙｔｏｋｅｒａｔｉｎ：ＣＹＦＲＡ）ペプシノゲン（ＰＧ）、Ｃ－反応性タンパク（Ｃ

ＲＰ）、血清アミロイドＡタンパク（ＳＡＡ）、ミオグロビン、クレアチンキナーゼ（ＣＫ）、トロポニンＴ、心室筋ミオシン軽鎖Ｉ等が挙げられる。

[0091] 上記標的生体物質は細菌でもよく、この細菌としては、細胞微生物学的検査の対象とされる細菌が挙げられ、特に制限されるものではないが、例えば、大腸菌、サルモネラ菌、レジオネラ菌、公衆衛生に問題を生じる菌等が挙げられる。

[0092] 上記標的生体物質はウイルスでもよく、このウイルスとしては、特に制限されるものではないが、例えば、Ｃ型、Ｂ型肝炎ウイルスの抗原等の肝炎ウイルス抗原、ＨＩＶウイルスのｐ２４タンパク抗原、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）のｐｐ６５タンパク抗原、ＨＰＶ（ヒトパピローマウイルス）のＥ６及びＥ７タンパク等が挙げられる。

[0093] 上記標的生体物質は細胞でもよく、この細胞としては、生細胞に制限されるものではなく死細胞であってもよい。

[0094] 上記（ｉ）または（ｉｖ）において、標的生体物質を含む試料は、特に制限されることなく、常法に従って調製することができる。

また、本発明の標識生体物質も、特に制限されることなく、標的生体物質と結合可能な生体物質と本発明の化合物とを常法に従って結合させて調製することができる。結合の形態及び結合を形成する反応は、上記本発明の標識生体物質で説明した通りである。

[0095] 上記（ｖ）において、標的生体物質と一次生体物質とは、直接結合させても、標的生体物質及び一次生体物質とは異なるその他の生体物質を介して結合させてもよい。また、上記（ｖｉ）において、結合体ｂにおける一次生体物質と、本発明の標識生体物質Ｂにおける二次生体物質とは、直接結合させても、一次生体物質及び二次生体物質とは異なるその他の生体物質を介して結合させてもよい。

本発明の標識生体物質は、直接法及び間接法のいずれにおける蛍光標識抗体としても用いることができるが、間接法における蛍光標識抗体として用いることが好ましい。

上記（ｉｉ）または（ｖ）及び（ｖｉ）において、本発明の標識生体物質等と標的生体物質との結合は、特に制限されることなく、常法に従って行うことができる。

[0096] 上記（ｉｉｉ）または（ｖｉｉ）において、本発明の標識生体物質を励起するための波長は、本発明の標識生体物質を励起可能な発光波長（波長光）であれば特に限定されない。

本発明の化合物（１）のうち、ｎが１である化合物を用いた標識生体物質は、５８５ｎｍ付近（具体的には、５６０～６００ｎｍの波長領域）に吸収極大波長を有するため、照射する光の波長域は５３０～６５０ｎｍが好ましく、５５０～６３０ｎｍがより好ましい。この化合物を用いた標識生体物質は、可視領域における６００ｎｍ付近の励起光源に対して、優れた蛍光強度を示す標識生体物質として、好適に用いることができる。

本発明の化合物（１）のうち、ｎが２である化合物を用いた標識生体物質は、６８５ｎｍ付近（具体的には、６２０～７００ｎｍの波長領域）に吸収極大波長を有するため、照射する光の波長域は６３０～７５０ｎｍが好ましく、６５０～７３０ｎｍがより好ましい。この化合物を用いた標識生体物質は、多色ＷＢ等の近赤外領域における７００ｎｍ付近の励起光源に対して、優れた蛍光強度を示す標識生体物質として、好適に用いることができる。

本発明の化合物（１）のうち、ｎが３である化合物を用いた標識生体物質は、７８５ｎｍ付近（具体的には、７４０～８３０ｎｍの波長領域）に吸収極大波長を有するため、照射する光の波長域は７００～８５０ｎｍが好ましく、７３０～８３０ｎｍがより好ましい。この化合物を用いた標識生体物質は、多色ＷＢ等の近赤外領域における８００ｎｍ付近の励起光源に対して、優れた蛍光強度を示す標識生体物質として、好適に用いることができる。

[0097] 本発明に用いられる蛍光励起光源としては、本発明の標識生体物質を励起可能な発光波長（波長光）を発光するものであれば特に限定されず、例えば、各種レーザー光源を用いることができる。また、各種光学フィルターを用いて、好ましい励起波長を得たり、蛍光のみを検出したりする事ができる。

[0098] 上記（ｉ）～（ｖｉｉ）におけるその他の事項については、特に制限されることなく、蛍光標識を用いる蛍光検出において通常用いられる手法、試薬、装置等の条件を適宜選択することができる。

また、上記（ｉ）～（ｖｉｉ）以外の工程についても、蛍光標識を用いる種々の手法にあわせて、通常用いられる手法、試薬、装置等の条件を適宜選択することができる。

[0099] 例えば、本発明の標識生体物質を用いた多色ＷＢは、標的生体物質として通常用いられる手法（電気泳動によるタンパク質の分離、メンブレンへのブロッティング、メンブレンのブロッキング）によりブロットメンブレンを作製し、本発明の標識生体物質を標識抗体（好ましくは、二次抗体）として用いることにより、優れた蛍光強度で標的生体物質を検出することができる。

[0100] －　置換基群Ｔ　－

本発明において、好ましい置換基としては、下記置換基群Ｔから選ばれる置換基が挙げられる。

また、本発明において、単に置換基としてしか記載されていない場合は、この置換基群Ｔを参照するものであり、各々の基、例えば、アルキル基、が記載されているのみの場合は、この置換基群Ｔの対応する基が好ましく適用される。

さらに、本明細書において、アルキル基を環状（シクロ）アルキル基と区別して記載している場合、アルキル基は、直鎖アルキル基及び分岐アルキル基を包含する意味で用いる。一方、アルキル基を環状アルキル基と区別して記載していない場合、及び、特段の断りがない場合、アルキル基は、直鎖アルキル基、分岐アルキル基及びシクロアルキル基を包含する意味で用いる。このことは、環状構造を採りうる基（アルキル基、アルケニル基、アルキニル基等）を含む基（アルコキシ基、アルキルチオ基、アルケニルオキシ基等）、環状構造を採りうる基を含む化合物についても同様である。基が環状骨格を形成しうる場合、環状骨格を形成する基の原子数の下限は、この構造を採りうる基について下記に具体的に記載した原子数の下限にかかわらず、３

以上であり、５以上が好ましい。

下記置換基群Ｔの説明においては、例えば、アルキル基とシクロアルキル基のように、直鎖又は分岐構造の基と環状構造の基とを明確にするため、これらを分けて記載していることもある。

[0101] 置換基群Ｔに含まれる基としては、下記の基を含む。

アルキル基（好ましくは炭素数１～３０、より好ましくは炭素数１～２０、さらに好ましくは炭素数１～１２、さらに好ましくは炭素数１～８、さらに好ましくは炭素数１～６、特に好ましくは炭素数１～３）、アルケニル基（好ましくは炭素数２～３０、より好ましくは炭素数２～２０、さらに好ましくは炭素数２～１２、さらに好ましくは炭素数２～６、さらに好ましくは炭素数２～４）、アルキニル基（好ましくは炭素数２～３０、より好ましくは炭素数２～２０、さらに好ましくは炭素数２～１２、さらに好ましくは炭素数２～６、さらに好ましくは炭素数２～４）、シクロアルキル基（好ましくは炭素数３～２０）、シクロアルケニル基（好ましくは炭素数５～２０）、アリール基（単環の基であってもよく、縮環の基（好ましくは２～６環の縮環の基）であってもよい。縮環の基である場合、５～７員環等からなる。アリール基は好ましくは炭素数６～４０、より好ましくは炭素数６～３０、さらに好ましくは炭素数６～２６、特に好ましくは炭素数６～１０）、ヘテロ環基（環構成原子として少なくとも１つの窒素原子、酸素原子、硫黄原子、リン原子、ケイ素原子又はセレン原子を有し、単環の基であってもよく、縮環の基（好ましくは２～６環の縮環の基）であってもよい。単環の基である場合、その環員数は５～７員が好ましく、５員又は６員がより好ましい。ヘテロ環基の炭素数は好ましくは２～４０、より好ましくは２～２０である。ヘテロ環基は芳香族ヘテロ環基（ヘテロアリール基）及び脂肪族ヘテロ環基（脂肪族複素環基）が包含される。）、アルコキシ基（好ましくは炭素数１～２０、より好ましくは炭素数１～１２）、アルケニルオキシ基（好ましくは炭素数２～２０、より好ましくは炭素数２～１２）、アルキニルオキシ基（好ましくは炭素数２～２０、より好ましくは炭素数２～１２）、シクロ

アルキルオキシ基（好ましくは炭素数３～２０）、アリールオキシ基（好ましくは炭素数６～４０、より好ましくは炭素数６～２６、さらに好ましくは炭素数６～１４）、ヘテロ環オキシ基（好ましくは炭素数２～２０）、ポリアルキレンオキシ基（好ましくは炭素数２～４０、より好ましくは炭素数２～２０）、

[0102] アルコキシカルボニル基（好ましくは炭素数２～２０）、シクロアルコキシカルボニル基（好ましくは炭素数４～２０）、アリールオキシカルボニル基（好ましくは炭素数６～２０）、アミノ基（好ましくは炭素数０～２０で、無置換アミノ基（－NH_2）、（モノ－又はジ－）アルキルアミノ基、（モノ－又はジ－）アルケニルアミノ基、（モノ－又はジ－）アルキニルアミノ基、（モノ－又はジ－）シクロアルキルアミノ基、（モノ－又はジ－）シクロアルケニルアミノ基、（モノ－又はジ－）アリールアミノ基、（モノ－又はジ－）ヘテロ環アミノ基を含む。無置換アミノ基を置換する上記各基は置換基群Ｔの対応する基と同義である。）、スルファモイル基（好ましくは炭素数０～２０で、アルキル、シクロアルキルもしくはアリールのスルファモイル基が好ましい。）、アシル基（好ましくは炭素数１～２０、より好ましくは炭素数２～１５）、アシルオキシ基（好ましくは炭素数１～２０）、カルバモイル基（好ましくは炭素数１～２０で、アルキル、シクロアルキルもしくはアリールのカルバモイル基が好ましい。）、

[0103] アシルアミノ基（好ましくは炭素数１～２０、例えば、アセチルアミノ、シクロヘキシルカルボニルアミノ、ベンゾイルアミノ等）、アミド基（アミノカルボニル基）、スルホンアミド基（スルホニルアミノ基又はスルファモイル基のいずれでもよい。好ましくは炭素数０～２０で、アルキル、シクロアルキルもしくはアリールのスルホンアミド基が好ましい。）、アルキルチオ基（好ましくは炭素数１～２０、より好ましくは炭素数１～１２）、シクロアルキルチオ基（好ましくは炭素数３～２０）、アリールチオ基（好ましくは炭素数６～４０、より好ましくは炭素数６～２６、さらに好ましくは炭素数６～１４）、ヘテロ環チオ基（好ましくは炭素数２～２０）、アルキル、

シクロアルキルもしくはアリールスルホニル基（好ましくは炭素数１～２０）、

[0104] シリル基（好ましくは炭素数１～３０、より好ましくは炭素数１～２０で、アルキル、アリール、アルコキシもしくはアリールオキシが置換したシリル基が好ましい。）、シリルオキシ基（好ましくは炭素数１～２０で、アルキル、アリール、アルコキシもしくはアリールオキシが置換したシリルオキシ基が好ましい。）、ヒドロキシ基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン原子（例えばフッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子）、酸素原子（具体的には、環を構成する＞CH_2を＞C＝Oに置き換える）、カルボキシ基（－CO_2H）、ホスホノ基〔－PO（OH）$_2$〕、ホスホリル基〔－O－PO（OH）$_2$〕、スルホ基（－SO_3H）、ホウ酸基〔－B（OH）$_2$〕、オニオ基（環状アンモニオを含むアンモニオ基、スルホニオ基、ホスホニオ基を含み、好ましくは炭素数０～３０、より好ましくは１～２０）、スルファニル基（－SH）、アミノ酸残基、又は、ポリアミノ酸残基が挙げられる。

また、カルボキシ基、ホスホノ基、スルホ基、オニオ基、アミノ酸残基、ポリアミノ酸残基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－アルキル基（mはR^1～R^6におけるmと同義である。）を置換基として有する上記のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アリール基、ヘテロ環基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、シクロアルキルオキシ基、アリールオキシ基、ヘテロ環オキシ基、アルコキシカルボニル基、シクロアルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アミノ基、スルファモイル基、アシル基、アシルオキシ基、カルバモイル基、アシルアミノ基、スルホンアミド基、アルキルチオ基、シクロアルキルチオ基、アリールチオ基、ヘテロ環チオ基、アルキル、シクロアルキルもしくはアリールスルホニル基が挙げられる。

[0105] 置換基群Ｔから選ばれる置換基は、より好ましくは、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アルコキシ基、シクロアルコキシ基、アリールオキシ基、アルコキシカルボニル基、シクロアル

コキシカルボニル基、アミノ基、アシルアミノ基、シアノ基又はハロゲン原子であり、特に好ましくは、アルキル基、アルケニル基、アリール基、ヘテロ環基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アミノ基、アシルアミノ基又はシアノ基である。

[0106] 置換基群Ｔから選ばれる置換基は、特段の断りがない限り、上記の基を複数組み合わせてなる基をも含む。例えば、化合物又は置換基等がアルキル基、アルケニル基等を含むとき、これらは置換されていても置換されていなくてもよい。また、アリール基、ヘテロ環基等を含むとき、それらは単環でも縮環でもよく、置換されていても置換されていなくてもよい。

実施例

[0107] 以下に実施例に基づき、本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。なお、室温とは２５℃を意味する。

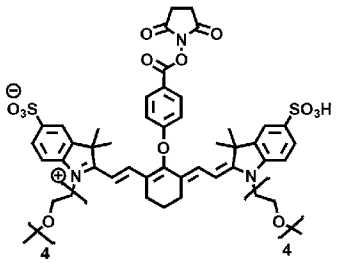
[0108] 上記一般式（１）で表される化合物（１）～（２０）、比較化合物（１）～（５）及びＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７を、以下に示す。

化合物（１）～（４）及び（１７）～（２０）が、７４０～８３０ｎｍに励起吸収波長を有する本発明の第一の好ましい形態の化合物であり、化合物（５）～（７）が、６２０～７００ｎｍに励起吸収波長を有する本発明の第二の好ましい形態の化合物であり、化合物（８）～（１６）が、６２０～７００ｎｍに励起吸収波長を有する本発明の第三の好ましい形態の化合物である。

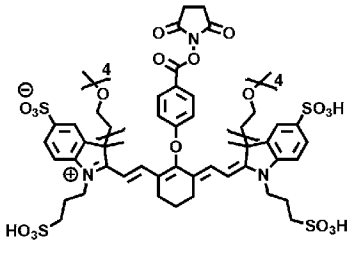
なお、実施例化合物及び比較化合物において、－SO_3Hで表されるスルホ基は、精製工程等において、一部、塩構造（例えば、カリウム塩、ナトリウム塩、ＴＥＡ（トリエチルアミン）塩あるいはＤＩＰＥＡ（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン）塩）を含む構造を採っていてもよい。また、実施例及び比較化合物において、エチレンオキシ構造を括る括弧に添える数字は、平均繰り返し数を意味する。いずれの化合物も、平均繰り返し数の小数第一位が０である化合物を原料として用いて合成した。

[0109]

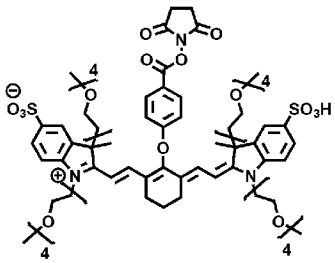
[化22]



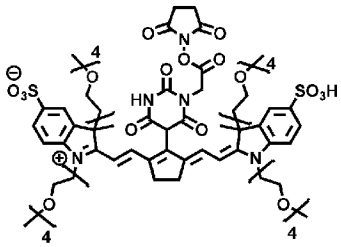
化合物(1)



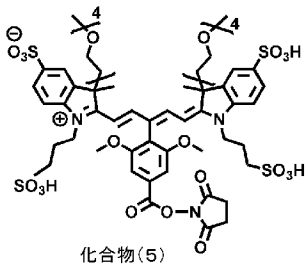
化合物(2)



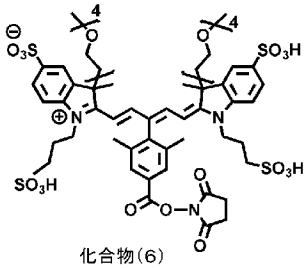
化合物(3)



化合物(4)



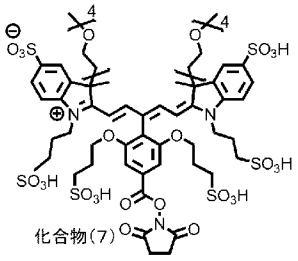
化合物(5)

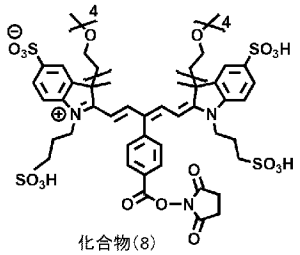


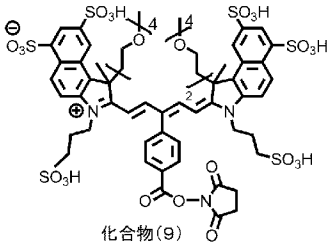
化合物(6)

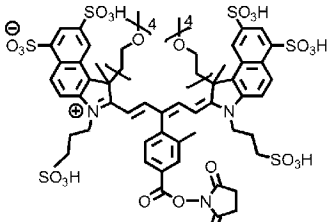
[0110]

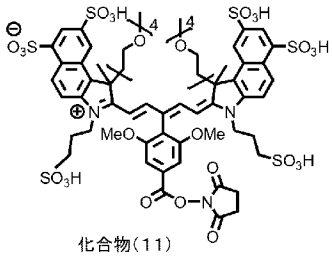
[化23]

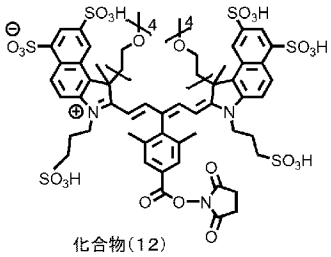

化合物(7)

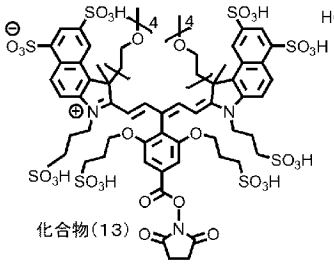

化合物(8)

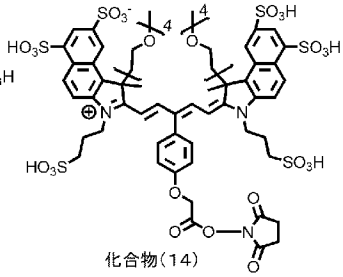

化合物(9)

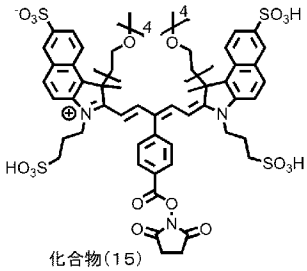

化合物(10)

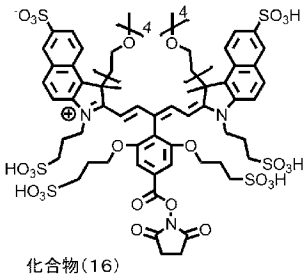

化合物(11)


化合物(12)


化合物(13)

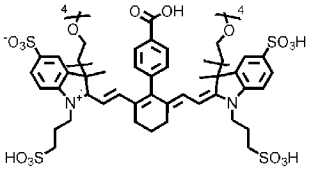

化合物(14)

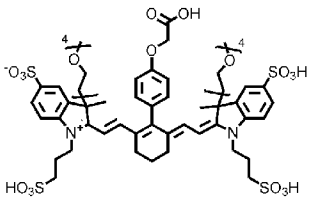

化合物(15)

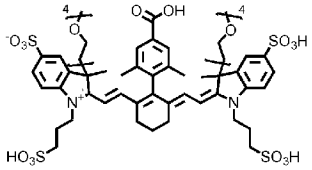

化合物(16)

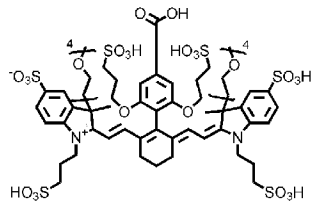
[0111]

[化24]

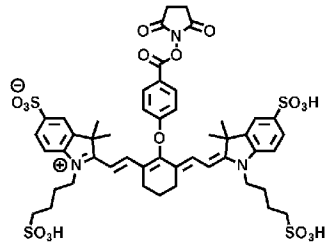

化合物(17)

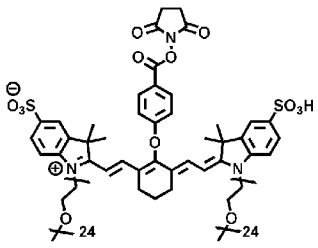

化合物(18)

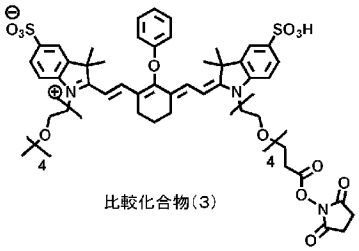

化合物(19)

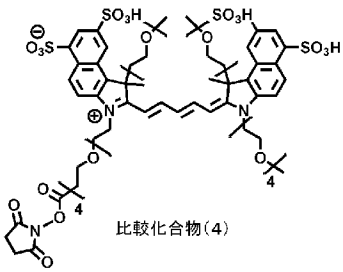

化合物(20)

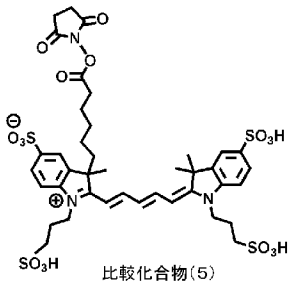
[0112] [化25]

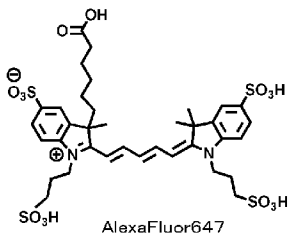

比較化合物(1)


比較化合物(2)


比較化合物(3)


比較化合物(4)


比較化合物(5)


AlexaFluor647

[0113] 比較化合物（１）は、米国特許出願公開第２０２１／００９３７３７号明細書記載の化合物である。

比較化合物（２）は、国際公開第２００９／０７８９７０号記載の化合物のＮＨＳエステル誘導体である。

比較化合物（５）は、上記化学構造を有すると推定されるＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７（商品名、製品番号Ａ３３０８４、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）のＮＨＳエステル誘導体である。

[0114] 以下に、各実施例で用いる化合物（１）～（１６）及び比較化合物（１）

～（４）の合成方法を詳しく説明するが、出発物質、色素中間体及び合成ルートはこれらに限定されるものではない。

以下の合成ルートにおいて、室温とは２５℃を意味する。

[0115] 特に記載のない場合、逆相カラムクロマトグラフィーにおける担体は、ＳＮＡＰ Ｕｌｔｒａ Ｃ１８（商品名、Ｂｉｏｔａｇｅ社製）またはＳｆａｒ Ｃ１８（商品名、Ｂｉｏｔａｇｅ社製）を使用し、順相カラムクロマトグラフィーにおける担体は、Ｈｉ－Ｆｌａｓｈ Ｃｏｌｕｍｎ（商品名、山善社製）を使用した。

逆相カラムクロマトグラフィー又は順相カラムクロマトグラフィーにおいて使用する溶離液における混合比は、容量比である。例えば、「アセトニトリル：水＝０：１００→２０：８０」は、「アセトニトリル：水＝０：１００」の溶離液を「アセトニトリル：水＝２０：８０」の溶離液へ変化させたことを意味する。

分取ＨＰＬＣ（Ｈｉｇｈ Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ Ｌｉｑｕｉｄ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）は、２７６７（商品名、ｗａｔｅｒｓ社製）を使用した。

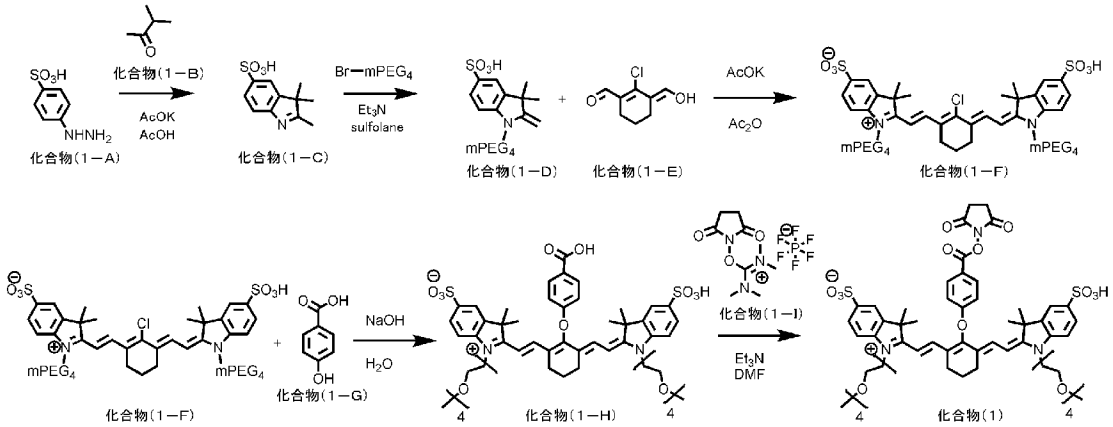
[0116] ＭＳスペクトルは、ＡＣＱＵＩＴＹ ＳＱＤ ＬＣ／ＭＳ Ｓｙｓｔｅｍ〔商品名、Ｗａｔｅｒｓ社製、イオン化法：ＥＳＩ（ＥｌｅｃｔｒｏＳｐｒａｙ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、エレクトロスプレーイオン化）〕又はＬＣＭＳ－２０１０ＥＶ〔商品名、島津製作所社製、イオン化法：ＥＳＩ及びＡＰＣＩ（Ａｔｏｍｏｓｐｈｅｒｉｃ Ｐｒｅｓｓｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ、大気圧化学イオン化）を同時に行うイオン化法〕を用いて測定した。

[0117] ＜化合物（１）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）を合成した。

[0118]

[化26]



[0119] １）化合物（１－Ｃ）の合成

２００ｍｌ容のナスフラスコに化合物（１－Ａ）１．９ｇ、酢酸（ＡｃＯＨ）２０ｍｌ、化合物（１－Ｂ）１．３ｇ及び酢酸カリウム（ＡｃＯＫ）０．９８ｇを入れ、窒素雰囲気下１４０℃にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→３５／６５）で精製し、化合物（１－Ｃ）０．９９ｇを得た。

[0120] ２）化合物（１－Ｄ）の合成

化合物（１－Ｃ）４７８ｍｇ、ｍＰＥＧ$_4$－Ｂｒを１．０８ｇ、スルホラン２ｍＬ、及びトリエチルアミン（Ｅｔ$_3$Ｎ）０．１３２ｍｌを５０ｍｌ容のナスフラスコに入れ、１２０℃にて６時間加熱撹拌した。反応液へ、酢酸エチル/ヘキサン（１/１）２０ｍＬを加え、沈殿を生じさせた。沈殿物を逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→２０／１００）にて精製し、化合物（１－Ｄ）３６９ｍｇを得た。

[0121] ３）化合物（１－Ｆ）の合成

試験管に化合物（１－Ｄ）２１４ｍｇ、化合物（１－Ｅ）４３ｍｇ、酢酸カリウム（ＡｃＯＫ）２５ｍｇ及び無水酢酸（Ａｃ$_2$Ｏ）１ｍＬを加え、窒素雰囲気下、６０℃で２時間攪拌した。反応収束後、蒸留水を加え、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→２５／７５）にて精製し、化合物（１－Ｆ）１７０ｍｇを得た。

[0122] ４）化合物（１－Ｈ）の合成

試験管に化合物（１－Ｆ）１０ｍｇ及び蒸留水３００μＬを加え、９５℃で攪拌した。この溶液へ、化合物（１－Ｇ）３ｍｇと水酸化ナトリウム５ｍｇを蒸留水２００μＬに混合した溶液を滴下して、９５℃で３０分撹拌した。反応液を室温に冷却し、分取ＨＰＬＣにて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（１－Ｈ）６．０ｍｇを得た。化合物（１－Ｈ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１０９７、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１０９５

[0123] ５）化合物（１）の合成

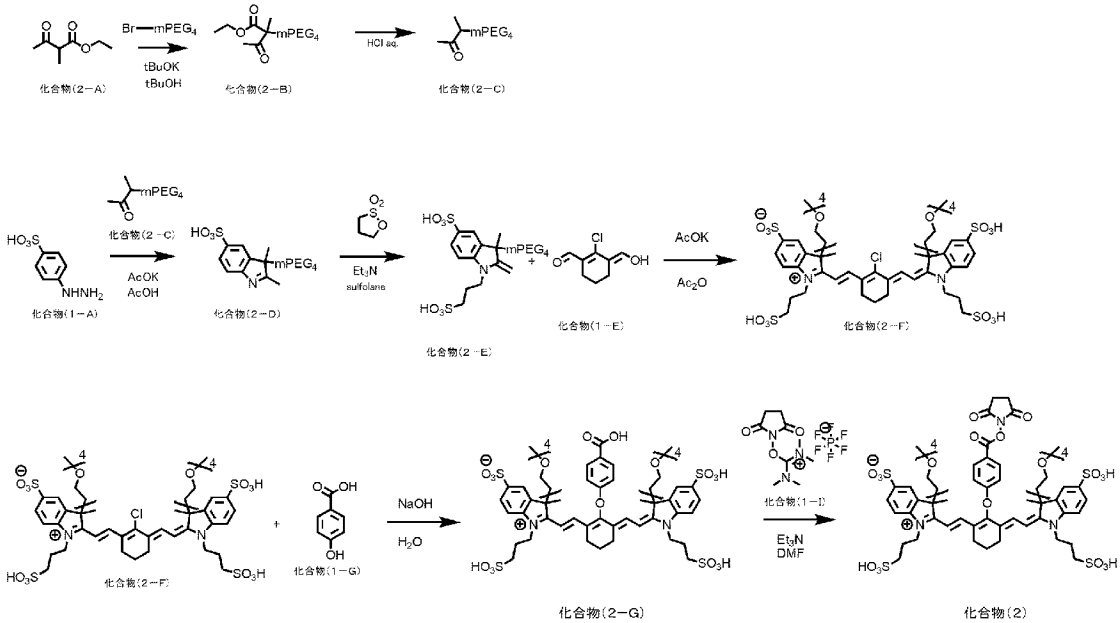
化合物（１－Ｈ）３．０ｍｇに、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）０．３０ｍｌ、化合物（１－Ｉ）１ｍｇを溶解したのち、１時間攪拌させた。その後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチル１．５mLを加えて上澄みを除去、真空乾燥を施すことで化合物（１）を得た。

[0124] ＜化合物（２）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に化合物（２）を合成した。化合物（２－Ｇ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１３１３

[0125] [化27]



[0126] なお、化合物（２－Ｃ）は下記の通りに合成した。

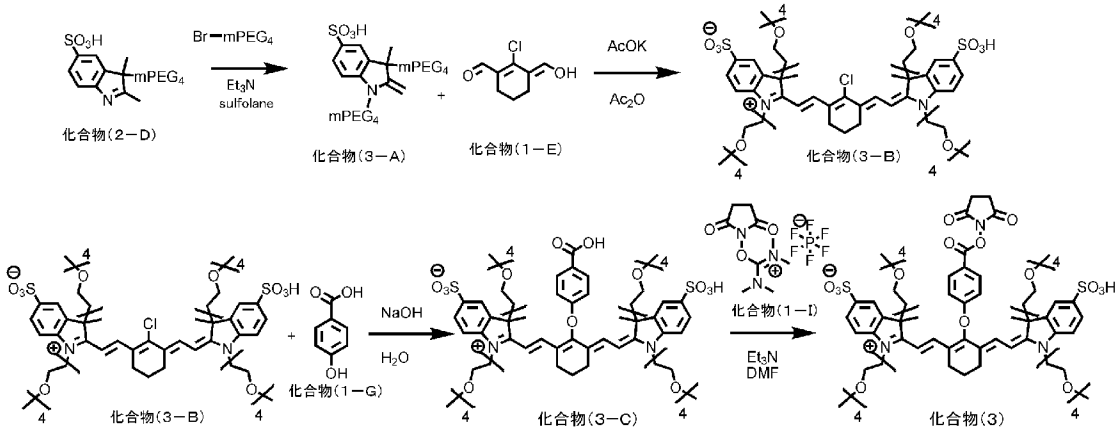
窒素置換した５００ｍｌ容の三ツ口フラスコに、ｔｅｒｔ－ブタノール（ｔＢｕＯＨ）２００ｍｌ及びカリウムｔｅｒｔ－ブトキシド（ｔＢｕＯＫ）１２ｇを入れ、攪拌しているところに化合物（２－Ａ）１４．４ｇを滴下し、しばらく攪拌した。次に、トリエチレングリコール２－ブロモエチルメチルエーテル（Ｂｒ－ｍＰＥＧ$_4$）３２．５ｇを滴下し、加熱攪拌した。８０℃にて１時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチル及び蒸留水で分液操作を施し、蒸留水により粗生成物を抽出した。得られた粗生成物に３０％塩酸水溶液３０ｍｌを加え、１００℃にて３時間撹拌した。その後、溶媒を減圧留去し、順相カラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン／酢酸エチル＝５０／５０→３０／７０）で精製することで、化合物（２－Ｃ）１１．０ｇを得た。

[0127] ＜化合物（３）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に化合物（３）を合成した。化合物（３－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^+$）$^+$＝１４５０、（Ｍ－Ｈ$^+$）$^-$＝１４４８

[0128] [化28]

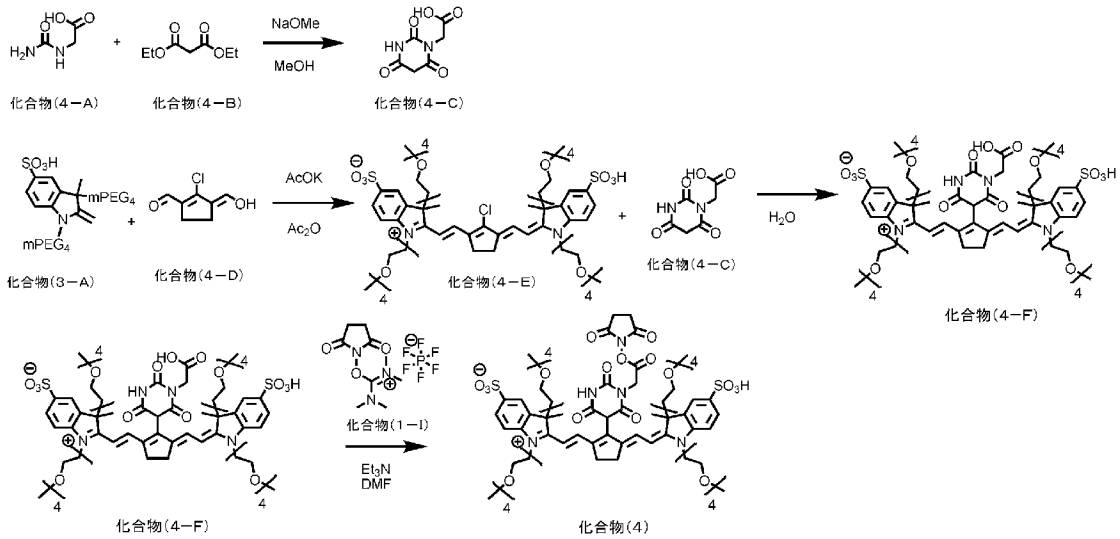


[0129] ＜化合物（４）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に化合物（４）を合成した。化合物（４－Ｆ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^+$）$^+$＝１４８４、（Ｍ－Ｈ$^+$）$^-$＝１４８２

[0130] [化29]



[0131] なお、化合物（４－Ｃ）は下記の通りに合成した。

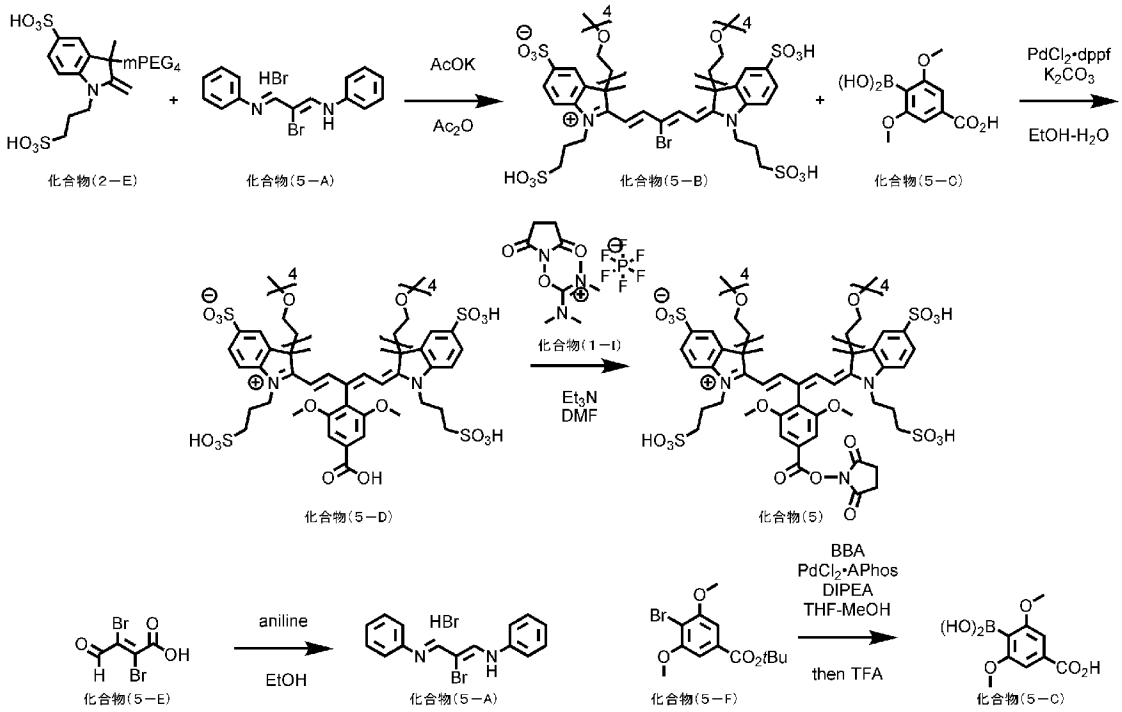
窒素置換した５０ｍｌ容のフラスコに、化合物（４－Ａ）５００ｍｇ、化合物（４－Ｂ）１．２８ｍＬ、ナトリウムメトキシド０．８ｇ、及びメタノール１０ｍＬを入れ、３時間加熱還流した。室温まで冷却後、濾過にて化合物（４－Ｃ）０．５２ｇを得た。

[0132] ＜化合物（５）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（５）を合成した。

[0133]

[化30]



[0134] １）化合物（５－Ｂ）の合成

５ｍｌ容のナスフラスコに化合物（２－Ｅ）９４ｍｇ、化合物（５－Ａ）３４ｍｇ、酢酸カリウム（ＡｃＯＫ）８０ｍｇ及び無水酢酸（Ac_2O）４．５ｍＬを加え、窒素雰囲気下、６０℃で２．５時間攪拌した。反応液を酢酸エチルへ加え、沈殿を生じさせた。沈殿物を逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→１０／９０）にて精製し、化合物（５－Ｂ）４６ｍｇを得た。化合物（５－Ｂ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：$(M+H^+)^+$＝１１９０、１１９２

[0135] ２）化合物（５－Ｄ）の合成

試験管に化合物（５－Ｂ）３０ｍｇ、化合物（５－Ｃ）２８ｍｇ、［１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン］パラジウム（ＩＩ）ジクロリド　ジクロロメタン付加物２１ｍｇ、炭酸カリウム３５ｍｇ、エタノール１．２６ｍｌ及び蒸留水０．１２６ｍｌを加え、窒素雰囲気下、５５℃にて３０分加熱撹拌した。溶媒を減圧留去し、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→２０／１００）及び分取ＨＰ

ＬＣにて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（５－Ｄ）２．６ｍｇを得た。化合物（５－Ｄ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１２９１

[0136] ３）化合物（５）の合成

化合物（５－Ｄ）０．９ｍｇに、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）０．１０ｍｌ、トリエチルアミン０．００１ｍｌ、化合物（１－ｌ）１ｍｇを溶解したのち、１時間攪拌させた。その後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチル／ヘキサン（１／１）１ｍＬを加えて上澄みを除去、真空乾燥を施すことで化合物（５）を得た。

[0137] なお、化合物（５－Ａ）は下記の通りに合成した。

１００ｍｌ容の三口ナスフラスコに化合物（５－Ｅ）２．８９ｇ、エタノール１５ｍｌを加えた。氷冷下、アニリン２．０５ｍｌとエタノール１５ｍｌの混合物を滴下した後、６０℃で４時間加熱攪拌した。反応収束後、溶媒を半量になるまで減圧留去した後、氷食塩水浴に移し攪拌した。生じた固体を濾過、乾燥することで化合物（５－Ａ）２．５５ｇを得た。化合物（５－Ａ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝３０１、３０３

なお、化合物（５－Ｃ）は下記の通りに合成した。

５０ｍｌ容の三口ナスフラスコに化合物（５－Ｆ）３１６ｍｇ、テトラヒドロキシジボラン１４１ｍｇ、ジクロロビス［ジ－ｔ－ブチル（ｐ－ジメチルアミノフェニル）ホスフィノ］パラジウム（II）１．５ｍｇ、テトラヒドロフラン３．２ｍｌ、メタノール１．６ｍｌ、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン０．３４８ｍｌを加えた。５５℃で２時間加熱攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣にトリフルオロ酢酸３．２ｍｌを加え室温にて１５分攪拌した。反応収束後、溶媒を減圧留去した後、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→１０／９０）にて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（５－Ｃ）９３ｍｇを得た。化合物（５－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

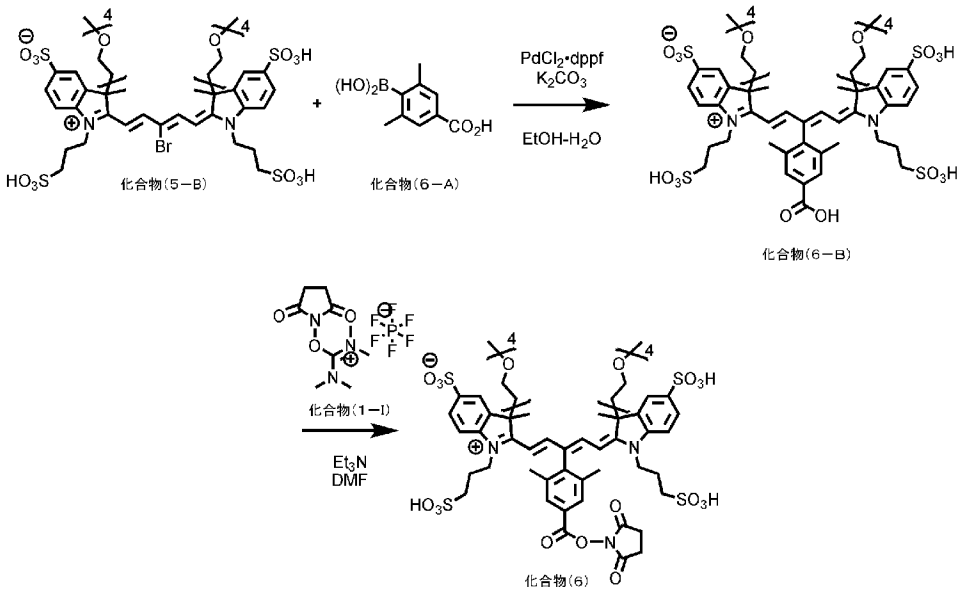
ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝２２７、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝２２５

[0138] ＜化合物（６）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（５）と同様に化合物（６）を合成した。化合物（６－Ｂ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１２５９

[0139] [化31]

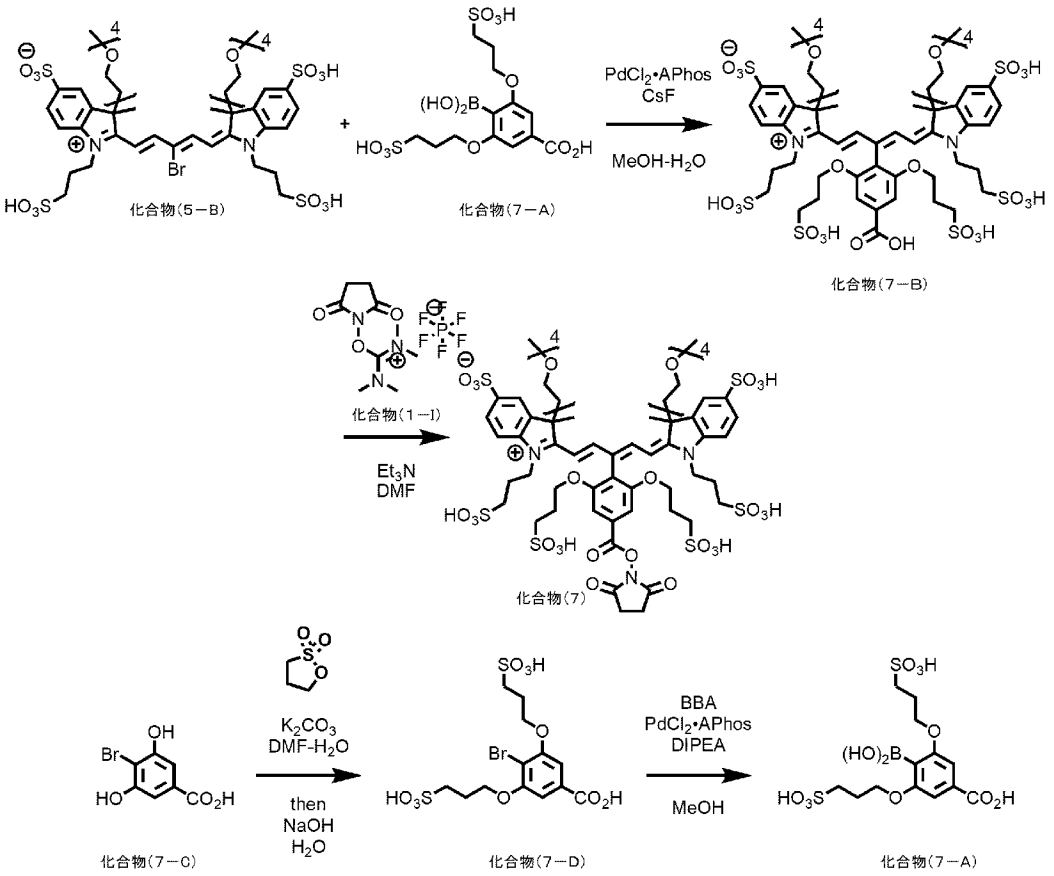


[0140] ＜化合物（７）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（５）と同様に化合物（７）を合成した。

[0141]

[化32]



[0142] なお、化合物（７－Ｄ）は下記の通りに合成した。

２００ｍｌ容のナスフラスコに化合物（７－Ｃ）５００ｍｇ、炭酸カリウム（K_2CO_3）１．２０ｇ、１，３－プロパンスルトン０．９５ｍｌ、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）２０ｍｌ、蒸留水１０ｍｌを加えた。８０℃で１時間加熱攪拌した後、１，３－プロパンスルトン０．５７ｍｌを加えた。８０℃で１時間加熱攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣に酢酸エチル３０ｍｌを加え６０℃で１５分加熱攪拌した後、０℃に空冷した。固体をろ過し、減圧乾燥を施すことで白色固体を得た。得られた固体を蒸留水５ｍｌに溶解させ水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）４００ｍｇを加えた。８０℃で１時間加熱攪拌した後、室温まで冷却し３０％塩化水素水溶液１．２ｍｌを加えた。反応液を逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→１０／９０）にて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（７－Ｄ）３３３ｍｇを得た。化合物（７－Ｄ）のＭＳ測定の結果は以下

の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝４７５、４７７

なお、化合物（７－Ａ）は下記の通りに合成した。

化合物（５－Ｃ）の合成法において、化合物（５－Ｆ）に代えて化合物（７－Ｄ）を用いた以外は同様にして無色固体の化合物（７－Ａ）（１１８ｍｇ、収率３０％）を得た。

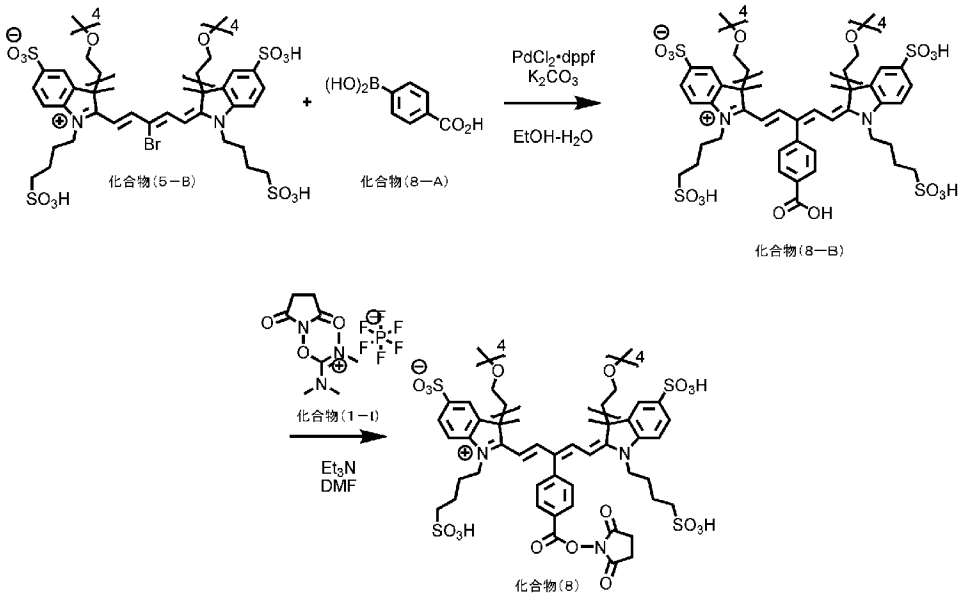
［Ｍ＋Ｈ$^{+}$］$^{+}$：４４３

[0143] ＜化合物（８）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（５）と同様に化合物（８）を合成した。化合物（８－Ｂ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１２３１

[0144] [化33]

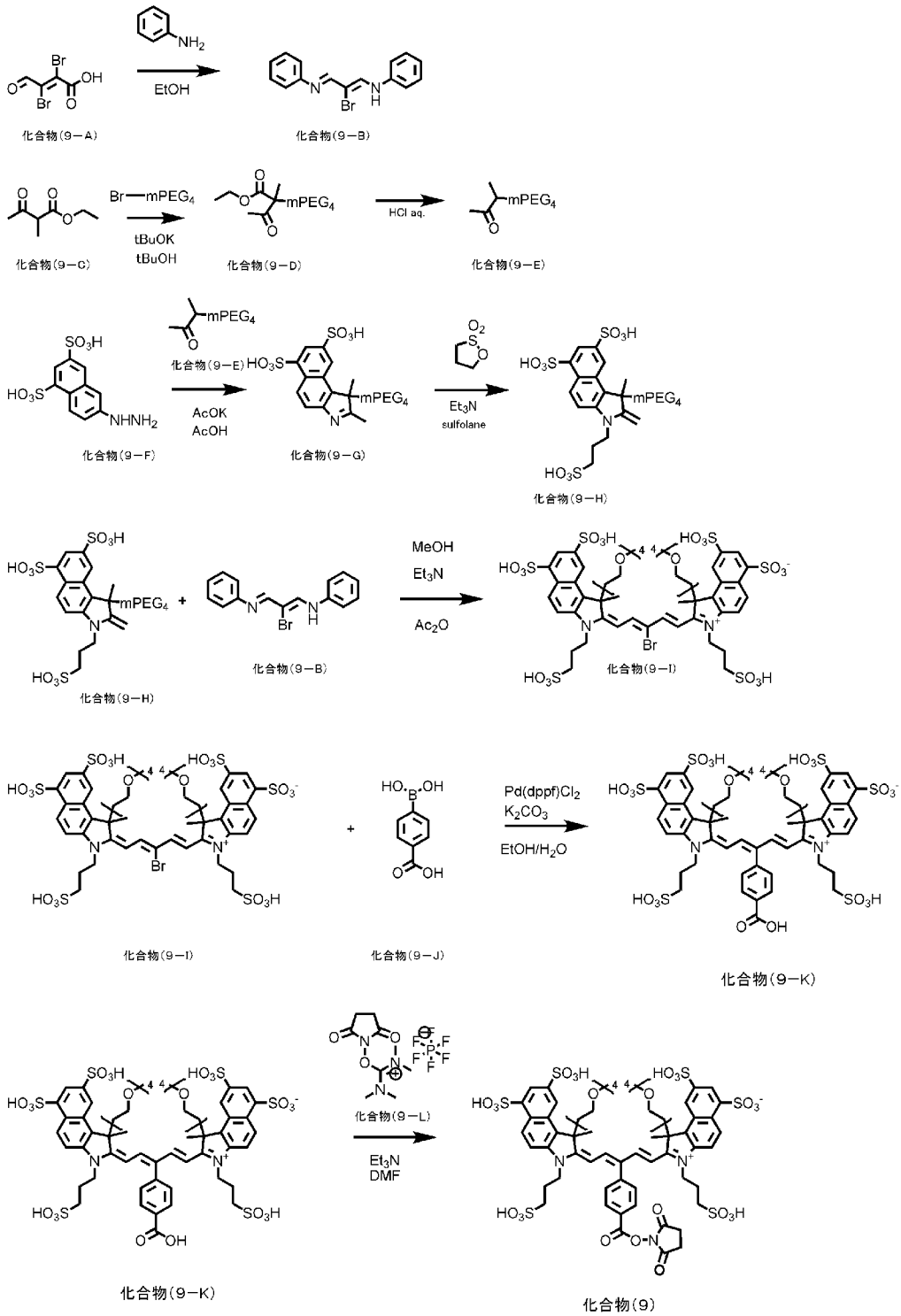


[0145] ＜化合物（９）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（９）を合成した。

[0146]

[化34]



[0147] 化合物（９－Ｂ）の合成

１００ｍｌ容のナスフラスコに化合物（９－Ａ）２．９ｇ、エタノール１５ｍｌを入れ、アニリン２．１ｍＬを溶解させたエタノール１５ｍＬを０℃

にて滴下した後、窒素雰囲気下６０℃にて４時間撹拌した。溶媒を減圧留去して溶媒量を１５ｍＬとし、０℃に空冷した。析出した黄色結晶をろ過し化合物（９－Ｂ）２．６ｇを得た。

[0148] 化合物（９－Ｅ）の合成

窒素置換した５００ｍｌ容の三ツ口フラスコに、ｔｅｒｔ－ブタノール（ｔＢｕＯＨ）２００ｍｌ及びカリウムｔｅｒｔ－ブトキシド（ｔＢｕＯＫ）１２ｇを入れ、攪拌しているところに化合物（９－Ｃ）１４．４ｇを滴下し、しばらく攪拌した。次に、トリエチレングリコール２－ブロモエチルメチルエーテル（Ｂｒ－ｍＰＥＧ４）３２．５ｇを滴下し、加熱攪拌した。８０℃にて１時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチル及び蒸留水で分液操作を施し、蒸留水により粗生成物を抽出した。得られた粗生成物に３０％塩酸水溶液３０ｍｌを加え、１００℃にて３時間撹拌した。その後、溶媒を減圧留去し、順相カラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン／酢酸エチル＝５０／５０→３０／７０）で精製することで、化合物（９－Ｅ）１１．０ｇを得た。

[0149] 化合物（９－Ｇ）の合成

１００ｍｌ容の三ツ口ナスフラスコに化合物（９－Ｆ）１００ｍｇ、酢酸（ＡｃＯＨ）０．３ｍＬ、化合物（９－Ｅ）１２４ｍｇ及び酢酸カリウム（ＡｃＯＫ）３１ｍｇを入れ、窒素雰囲気下１３０℃にて１時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→２０／８０）で精製し、化合物（９－Ｇ）５８ｍｇを得た。

[0150] 化合物（９－Ｈ）の合成

化合物（９－Ｇ）４７０ｍｇ、１，３－プロパンスルトンを０．１５ｍＬ、スルホラン２ｍＬ、酢酸カリウム（ＡｃＯＫ）２５４ｍｇを５０ｍｌ容のナスフラスコに入れ、１１０℃にて１時間加熱撹拌した。反応液へ、酢酸エチル２０ｍＬを加え、沈殿を生じさせた。沈殿物を逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→３０／７０）にて精製

し、化合物（９－Ｈ）４７５ｍｇを得た。

[0151] 化合物（９－Ｉ）の合成

試験管に化合物（９－Ｈ）１７１ｍｇ、化合物（９－Ｂ）４８ｍｇ、トリエチルアミン（Et_3N）７１μＬ、メタノール（ＭｅＯＨ）５μＬ及び無水酢酸（Ac_2O）０．４８ｍＬを加え、窒素雰囲気下、５０℃で２時間攪拌した。反応収束後、蒸留水を加え、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→２５／７５）にて精製し、化合物（９－Ｉ）１５０ｍｇを得た。

[0152] 化合物（９－Ｋ）の合成

試験管に化合物（９－Ｉ）１０ｍｇ、炭酸カリウム（K_2CO_3）１０ｍｇ、エタノール（ＥｔＯＨ）３００μＬ及び蒸留水１００μＬを加え、５０℃で攪拌した。この溶液へ、化合物（９－Ｊ）６ｍｇと［１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン］パラジウム（ＩＩ）ジクロリド（Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2）を蒸留水２００μＬに混合した溶液を滴下して、５０℃で３０分撹拌した。反応液を室温に冷却し、分取ＨＰＬＣにて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（９－Ｋ）３．６ｍｇを得た。化合物（９－Ｋ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：$(M+H^+)^+$＝１４９１、$(M-H^+)^-$＝１４８９

[0153] 化合物（９）の合成

化合物（９－Ｋ）３．６ｍｇに、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）０．３０ｍｌ、化合物（９－Ｌ）１ｍｇを溶解したのち、１時間攪拌させた。その後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチル１．５ｍＬを加えて上澄みを除去、真空乾燥を施すことで化合物（９）を得た。

[0154] ＜化合物（１０）の合成＞

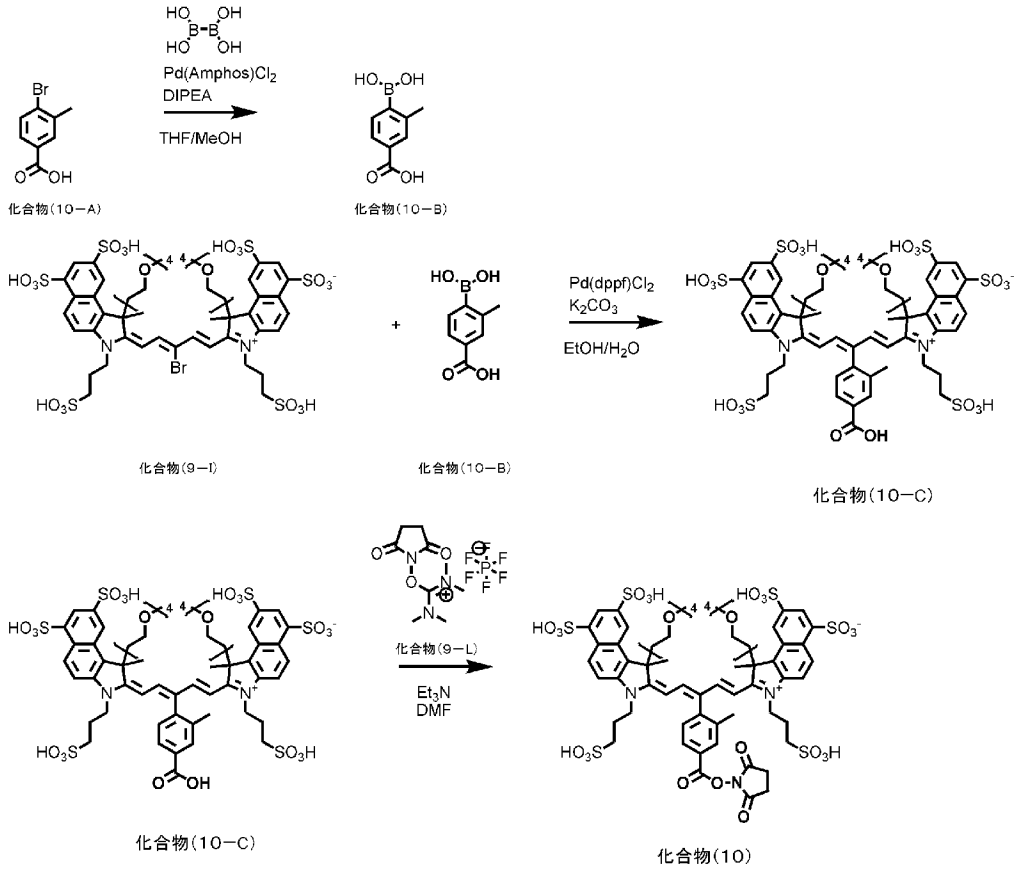
下記のスキームに基づき、化合物（９）と同様に化合物（１０）を合成した。化合物（１０－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：$(M+H^+)^+$＝１５０５、$(M-H^+)^-$＝１５０

3

[0155] なお、化合物（１０－Ｂ）は次のようにして合成した。１００ｍｌ容の三ツ口ナスフラスコに化合物（１０－Ａ）５００ｍｇ、テトラヒドロキシジボロン３０９ｍｇ、ビス（ジ－ｔｅｒｔ－ブチル（４－ジメチルアミノフェニル）ホスフィン）ジクロロパラジウム（II）３ｍｇ、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＰＥＡ）７６０μＬ、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）５ｍＬおよびメタノール（ＭｅＯＨ）２．５ｍＬを入れ、窒素雰囲気化５５℃にて３時間攪拌した。溶媒を減圧蒸留し、逆相カラムクロマトグラフィー（溶離液：アセトニトリル／水＝０／１００→３０／７０）で精製し、化合物（１０－Ｂ）２２０ｍｇを得た。

[0156] [化35]

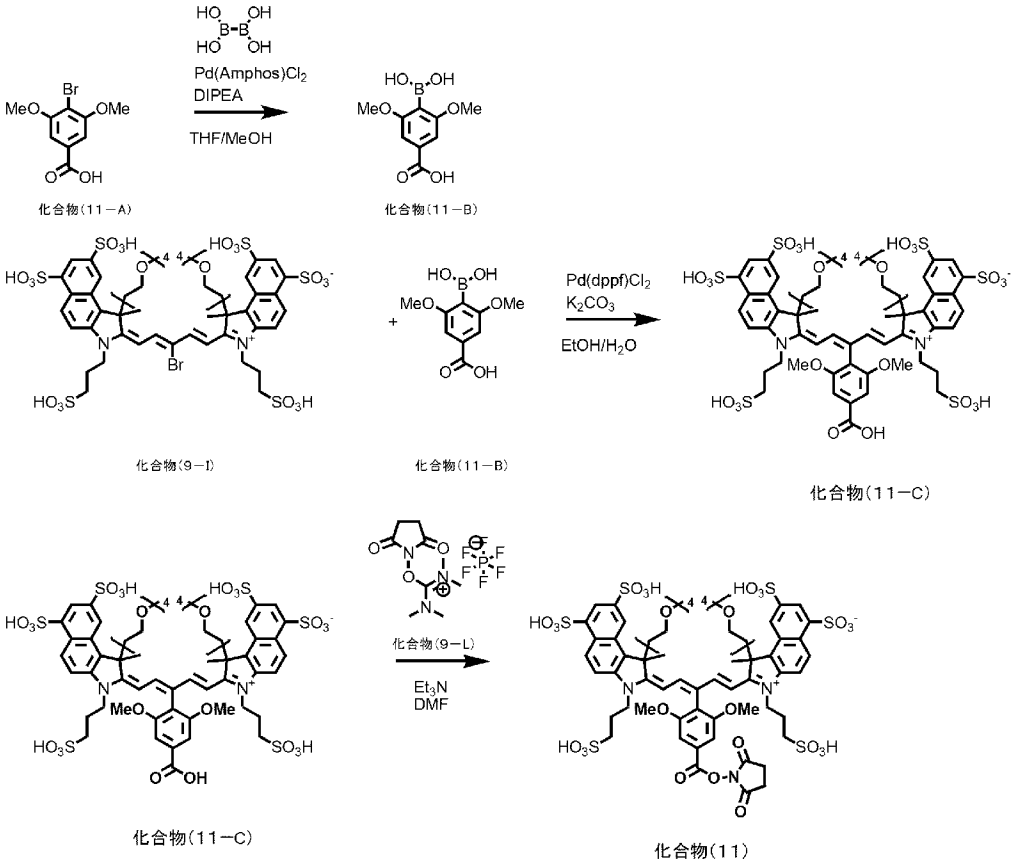


[0157] ＜化合物（１１）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１０）と同様に化合物（１１）を合成した。化合物（１１－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^+$）$^+$＝１５５１、（Ｍ－Ｈ$^+$）$^-$＝１５４９

[0158] [化36]



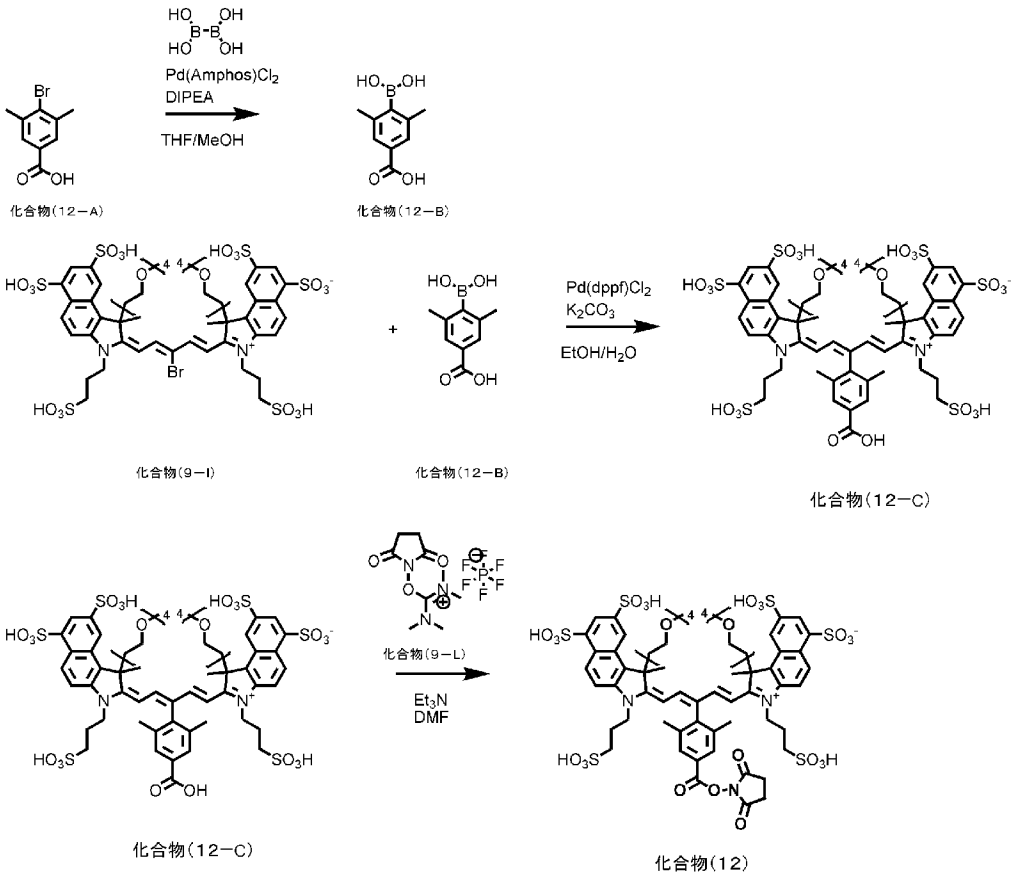
[0159] ＜化合物（１２）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１０）と同様に化合物（１２）を合成した。化合物（１２－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^+$）$^+$＝１５１９、（Ｍ－Ｈ$^+$）$^-$＝１５１７

[0160]

[化37]



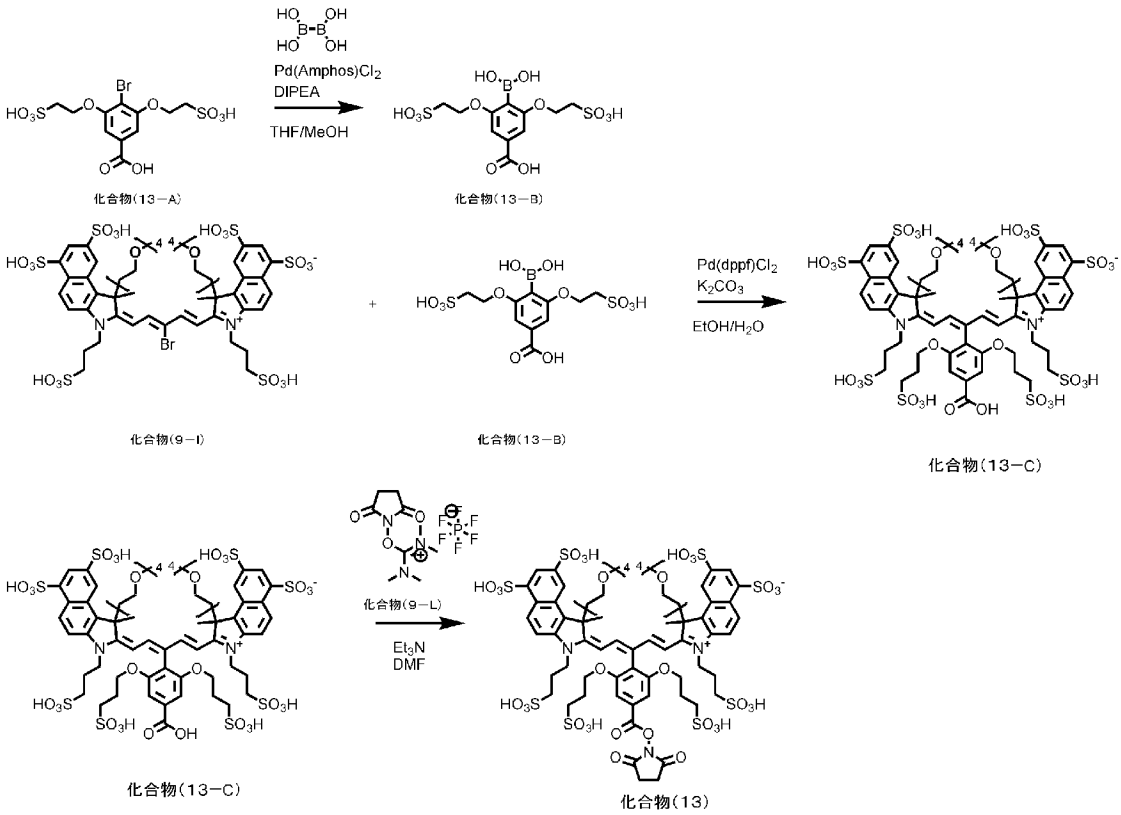
[0161] ＜化合物（１３）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１０）と同様に化合物（１３）を合成した。化合物（１３－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１７６７、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１７６５

[0162]

[化38]



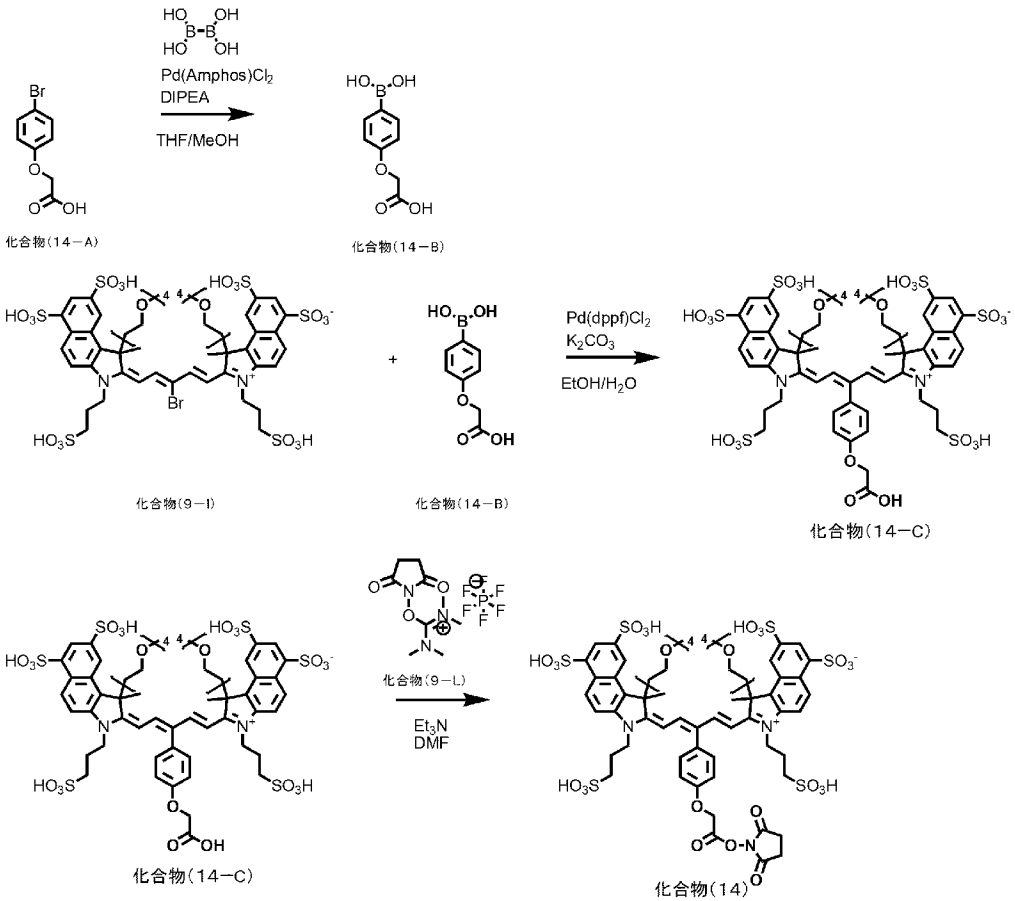
[0163] ＜化合物（１４）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１０）と同様に化合物（１４）を合成した。化合物（１４－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１５２１、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１５１９

[0164]

[化39]



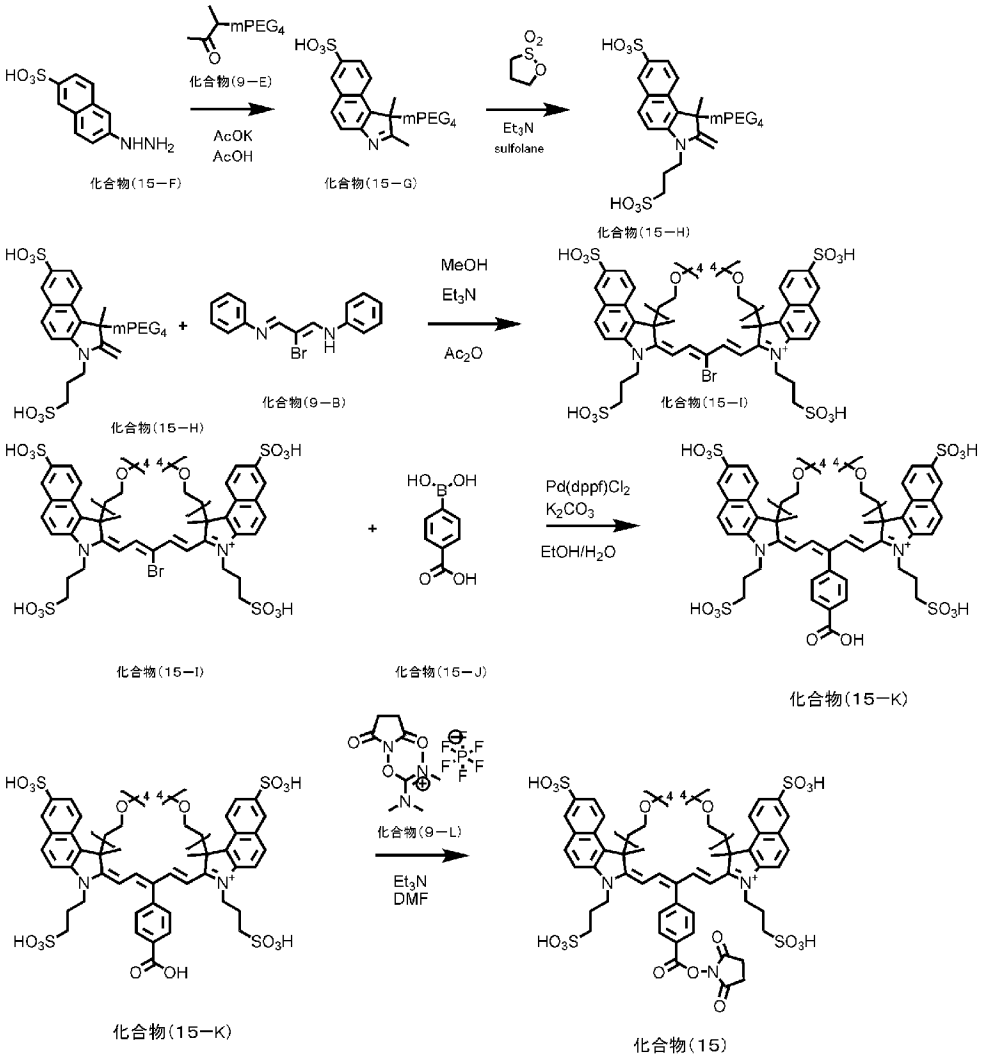
[0165] ＜化合物（１５）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（９）と同様に化合物（１５）を合成した。化合物（１５－Ｋ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１３３１、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１３２９

[0166]

[化40]



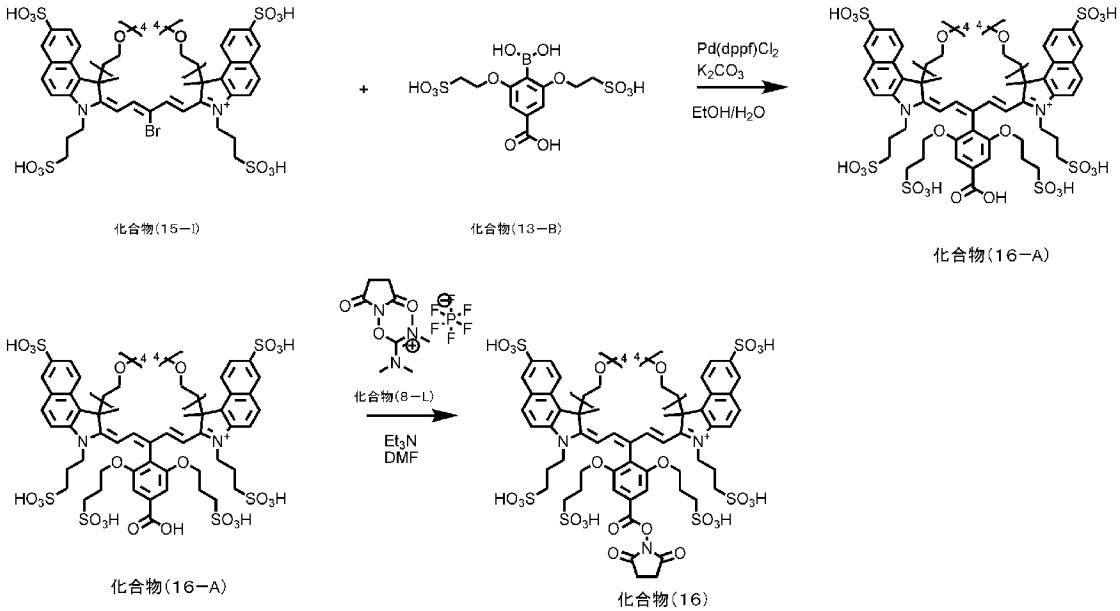
[0167] ＜化合物（１６）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１３）と同様に化合物（１６）を合成した。化合物（１６－Ａ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１６０８、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１６０６

[0168]

[化41]



[0169] ＜化合物（１７）の合成＞

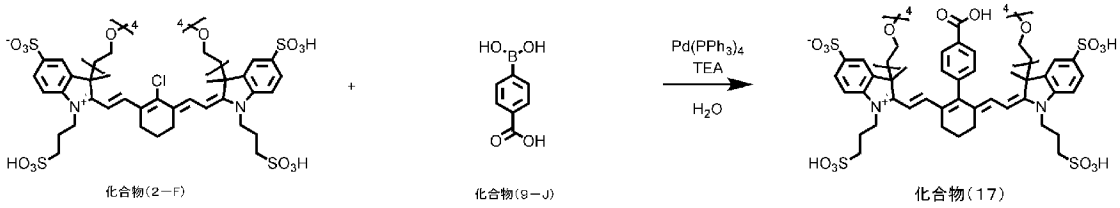
化合物（１７）の合成

試験管に化合物（２－Ｆ）５ｍｇ、トリエチルアミン（ＴＥＡ）８μＬ、蒸留水１００μＬを加え、８０℃で攪拌した。この溶液へ、化合物（９－Ｊ）２ｍｇとテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）（Ｐｄ（ＰＰｈ$_3$）$_4$）を蒸留水１００μＬに混合した溶液を滴下して、８０℃で１時間撹拌した。反応液を室温に冷却し、分取ＨＰＬＣにて精製し、凍結乾燥を施して、化合物（１７）２．８ｍｇを得た。化合物（１７）のＭＳ測定および吸収蛍光測定の結果は以下の通りであった。なお、λ_{ex}は励起波長を意味し、λ_{em}は蛍光波長を意味し、以降においても同義である。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^+$）$^+$＝１２９７、（Ｍ－Ｈ$^+$）$^-$＝１２９５

λ_{ex}＝７６８ｎｍ、λ_{em}＝７８７ｎｍ

[0170] [化42]



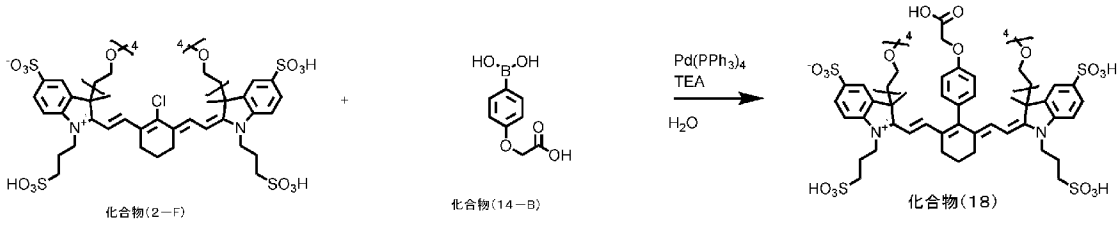
[0171] ＜化合物（１８）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１７）と同様に化合物（１８）を合成した。化合物（１８）のＭＳ測定および吸収蛍光測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１３２７、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１３２５

λ_{ex}＝７６５ｎｍ、λ_{em}＝７８４ｎｍ

[0172] [化43]



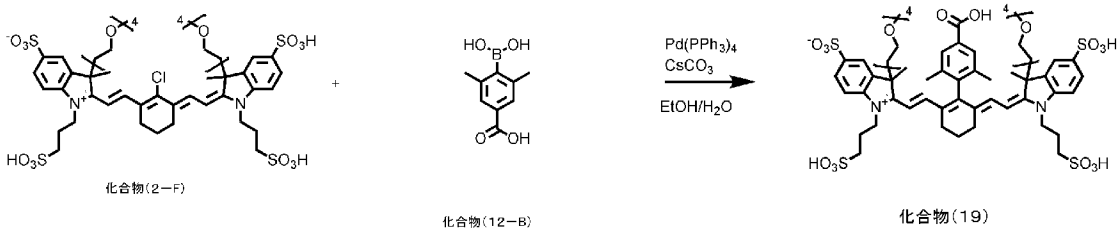
[0173] ＜化合物（１９）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１７）と同様に化合物（１９）を合成した。化合物（１９）のＭＳ測定および吸収蛍光測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１３２５、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１３２３

λ_{ex}＝７７０ｎｍ、λ_{em}＝７８９ｎｍ

[0174] [化44]



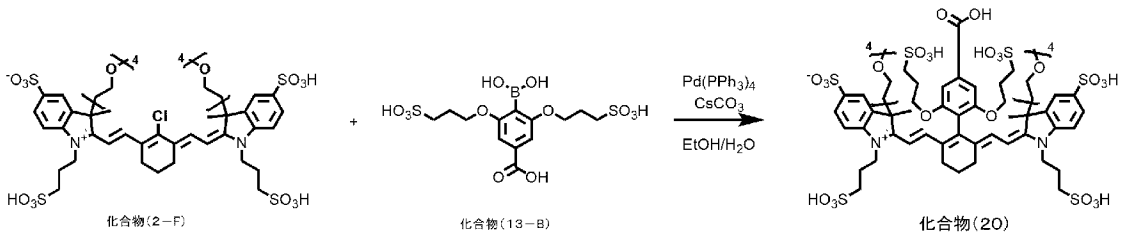
[0175] ＜化合物（２０）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１７）と同様に化合物（２０）を合成した。化合物（２０）のＭＳ測定および吸収蛍光測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１５７３、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１５７１

λ_{ex}＝７７７ｎｍ、λ_{em}＝７９４ｎｍ

[0176] [化45]

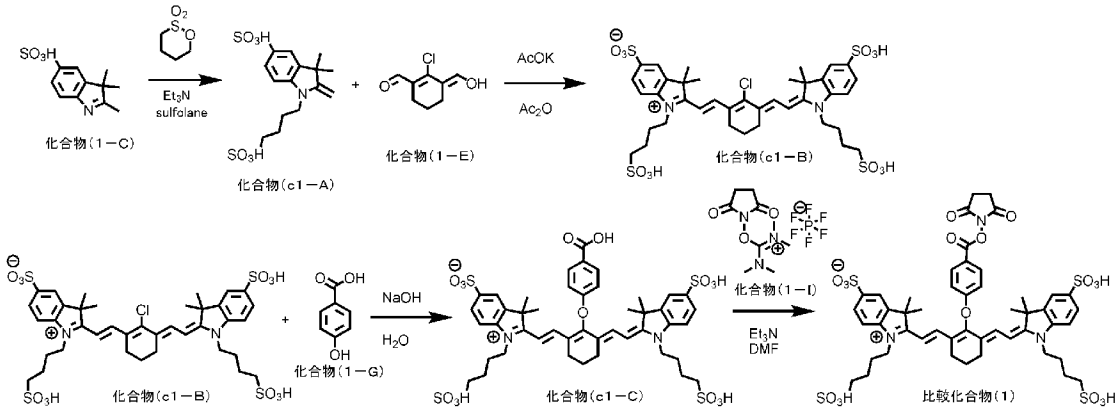


[0177] ＜比較化合物（１）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に比較化合物（１）を合成した。化合物（ｃ１－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝９８９、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝９８７

[0178] [化46]



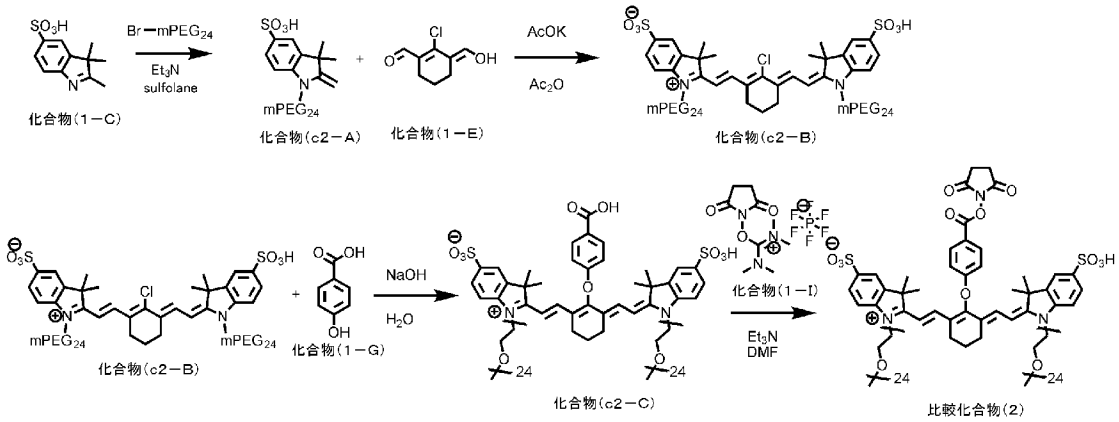
[0179] ＜比較化合物（２）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に比較化合物（２）を合成した。化合物（ｃ２－Ｃ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝２８５８、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝２８５６

[0180]

[化47]

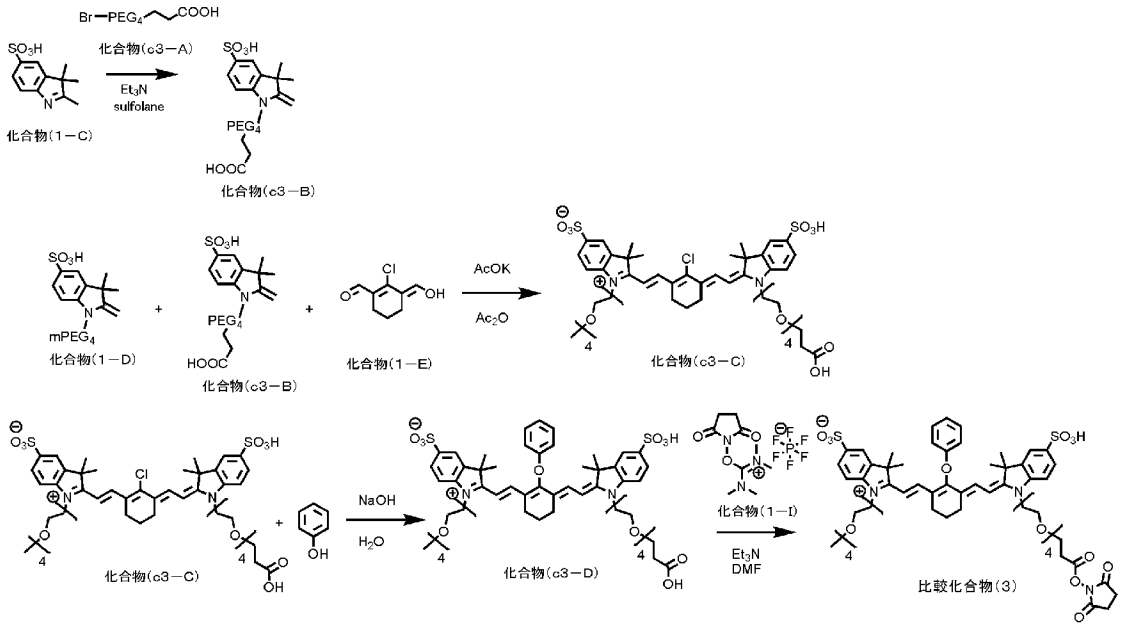


[0181] ＜比較化合物（３）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（１）と同様に比較化合物（３）を合成した。化合物（ｃ３－Ｄ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１１１１、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１１０９

[0182] [化48]



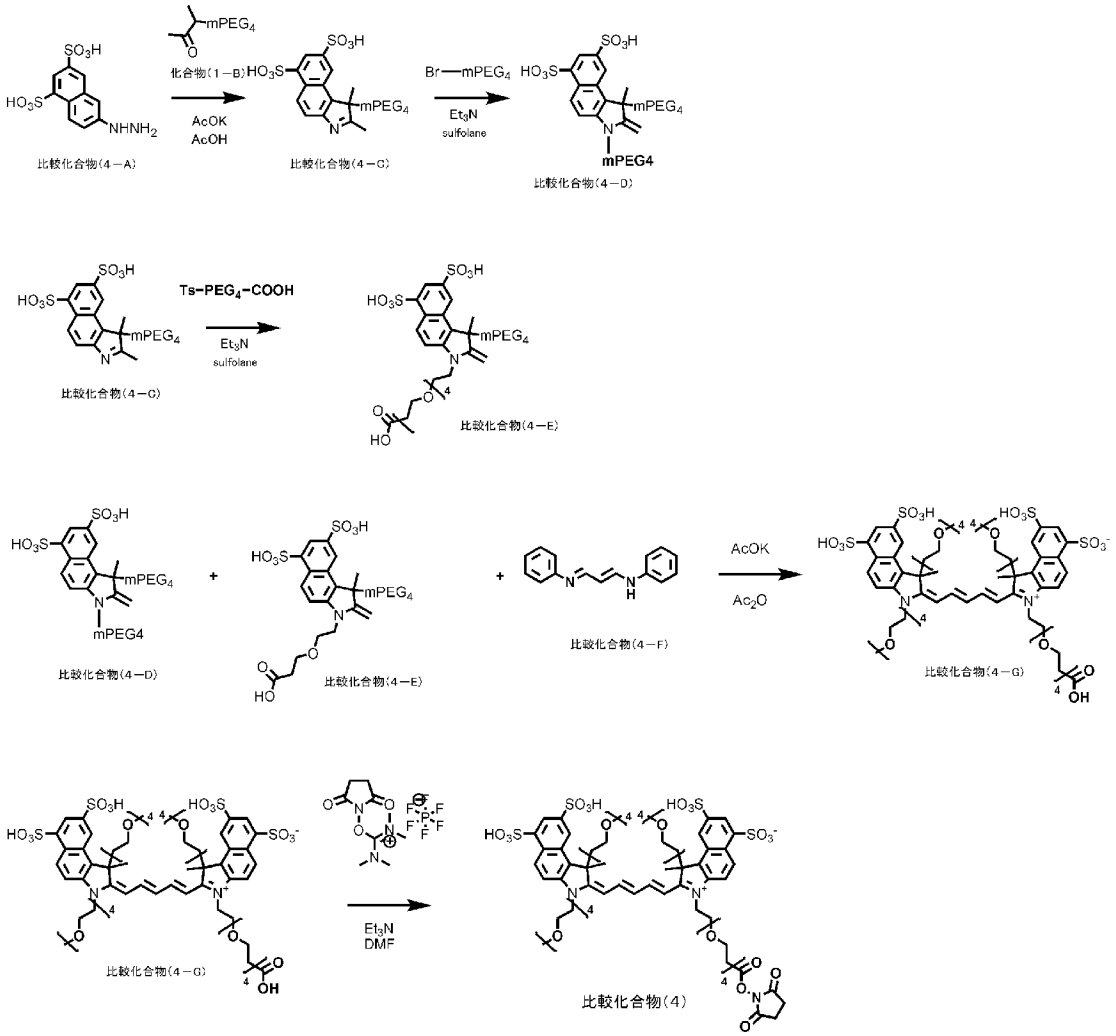
[0183] ＜比較化合物（４）の合成＞

下記のスキームに基づき、化合物（８）と同様に比較化合物（４）を合成した。比較化合物（４－Ｇ）のＭＳ測定の結果は以下の通りであった。

ＭＳ（ＥＳＩ　ｍ／ｚ）：（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）$^{+}$＝１５６５、（Ｍ－Ｈ$^{+}$）$^{-}$＝１５６

3

[0184] [化49]



[0185] ＜実施例１：励起光波長７８５ｎｍでの評価＞

上記の各化合物（１）～（４）及び比較化合物（１）～（３）について、蛍光標識率、溶液蛍光強度及びメンブレン上蛍光強度を評価した。

[0186] ［１］蛍光標識率の評価

マイクロチューブに、抗ウサギＩｇＧ抗体（２．３ｍｇ／ｍｌ）２１７μＬ及び炭酸塩バッファー２１．７μＬを入れ、振とう撹拌を施した後、上記化合物（１）のジメチルスルホキシド溶液を、抗体に対して表１に示すモル当量比になるように加え、さらに振とう撹拌を行った。室温にて１時間静置させ、反応液をゲルろ過カラムクロマトグラフィーＰＤ１０（ＧＥヘルスケ

ア　ライフサイエンス社製）とＰＢＳ溶液（リン酸緩衝食塩水）を用いて精製を施し、上記化合物（１）で標識した標識抗ウサギＩｇＧ抗体を得た。同様にして、各化合物又は比較化合物で標識した標識抗ウサギＩｇＧ抗体を得た。得られた標識抗体について、下記に示す方法により蛍光標識率（ＤＯＬ）を算出した。表１に結果をまとめて示す。

[0187]　蛍光標識率の算出方法は、下記に示すような一般的な手法を用いた。［］の中の記載は単位を示し、［－］は単位がないことを意味する。本試験においては、タンパク質は抗ウサギＩｇＧ抗体を意味する。

蛍光標識率＝蛍光色素の濃度／タンパク質の濃度

蛍光色素の濃度とは、標識されている蛍光色素の総モル濃度［Ｍ］を意味し、タンパク質の濃度とは、蛍光標識したタンパク質のモル濃度［Ｍ］を意味し、それぞれ、下記式により算出される。

蛍光色素の濃度＝$Dye_{max}/\varepsilon_{dye}$

タンパク質の濃度＝$(IgG_{280}-(Dye_{max}\times CF))/\varepsilon_{protein}$

上記式中の各符号は、下記の通りである。

Dye_{max}；蛍光色素の最大吸収波長における吸収［－］

ε_{dye}；蛍光色素のモル吸光係数［$M^{-1}cm^{-1}$］

IgG_{280}；蛍光標識タンパク質の２８０ｎｍにおける吸収［－］

Dye_{280}；蛍光色素の２８０ｎｍにおける吸収［－］

$\varepsilon_{protein}$；タンパク質のモル吸光係数［$M^{-1}cm^{-1}$］

ＣＦ（Ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ）；Dye_{280}/Dye_{max}［－］

[0188] [表1]

表１

No.	標識抗体	3当量	5当量	7当量	10当量
101	化合物(1)-IgG	2．3	3．6	4．5	6．2
102	化合物(2)-IgG	2．2	3．5	4．5	6．1
103	化合物(3)-IgG	2．3	3．7	4．4	6．5
104	化合物(4)-IgG	2．2	3．4	4．3	6．0
c11	比較化合物(1)-IgG	2．2	3．2	4．2	5．9
c12	比較化合物(2)-IgG	1．2	1．8	2．4	3．3
c13	比較化合物(3)-IgG	2．3	3．3	4．2	6．1

[0189] （表の注）

標識抗体の欄において、化合物（Ｚ）－ＩｇＧ又は比較化合物（Ｚ）－ＩｇＧとの表記は、それぞれ、化合物（Ｚ）で標識した標識抗ウサギＩｇＧ抗体又は比較化合物（Ｚ）で標識した標識抗ウサギＩｇＧ抗体を意味する。Ｚは、各化合物の番号を意味する。以降の表においても同義である。

[0190] 上記表１の結果から、以下のことがわかる。

本発明の化合物である化合物（１）～（４）は、抗体１当量に対して３当量、５当量、７当量及び１０当量のいずれのモル当量で添加した場合にも、先行技術文献１に記載の標識化合物である比較化合物（１）を用いた場合と同程度であって、先行技術文献２に記載の標識化合物である比較化合物（２）を用いた場合を越える蛍光標識率を示しており、抗体への結合性としては、実用上問題のない十分なレベルを示していた。このことは、Ｎｏ．ｃ１１又はｃ１２とＮｏ．１０１～１０４との対比から読み取ることができる。

一方、比較化合物（３）は、生体物質に結合可能な置換基を、本発明の一般式（１）におけるL^1が有する点で、本発明で規定する化合物ではない。本発明の化合物である化合物（１）～（４）と比較化合物（３）とは、同程度の蛍光標識率を示しており、蛍光標識率には差がないことがわかる。

[0191] ［２］溶液蛍光強度の評価

上記［１］の蛍光標識率の評価で調製した各標識抗体の溶液を、タンパク質濃度０．００５ｍｇ／ｍＬに調整し、分光蛍光強度計（商品名：ＲＦ－５３００もしくはＲＦ－６０００、島津製作所社製）を用いて、７８５ｎｍの励起光で、露光条件を統一して、蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値を算出した。比較化合物（１）－ＩｇＧのＤＯＬ２．２（色素３当量添加）の蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値を基準値とし、この基準値に対する比（標識抗体の蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値／基準値）を算出し、以下の評価基準に基づき評価した。表２に結果をまとめて示す。

[0192] － 蛍光強度（積分値）の評価基準 －

Ａ：基準値に対する蛍光強度の比が２．０倍以上

Ｂ：基準値に対する蛍光強度の比が１．７倍以上２．０倍未満

Ｃ：基準値に対する蛍光強度の比が１．４倍以上１．７倍未満

Ｄ：基準値に対する蛍光強度の比が１．２倍以上１．４倍未満

Ｅ：基準値に対する蛍光強度の比が１．１倍以上１．２倍未満

Ｆ：基準値に対する蛍光強度の比が０．９倍以上１．１倍未満

Ｇ：基準値に対する蛍光強度の比が０．９倍未満

[0193] [表2]

表２

No.	標識抗体	抗体に対する化合物のモル当量比	DOL	蛍光強度（溶液）
101	化合物（1）-IgG	3当量	2．3	D
		5当量	3．6	D
		7当量	4．5	D
		10当量	6．2	E
102	化合物（2）-IgG	3当量	2．2	C
		5当量	3．5	B
		7当量	4．5	B
		10当量	6．1	B
103	化合物（3）-IgG	3当量	2．3	B
		5当量	3．7	A
		7当量	4．4	A
		10当量	6．5	A
104	化合物（4）-IgG	3当量	2．2	B
		5当量	3．4	A
		7当量	4．3	A
		10当量	6．0	A
c11	比較化合物（1）-IgG	3当量	2．2	1．0（基準値）
		5当量	3．2	F
		7当量	4．2	G
		10当量	5．9	G
c12	比較化合物（2）-IgG	3当量	1．2	G
		5当量	1．8	G
		7当量	2．4	F
		10当量	3．3	E
c13	比較化合物（3）-IgG	3当量	2．3	F
		5当量	3．3	F
		7当量	4．2	G
		10当量	6．1	G

[0194] 上記表２の結果から、以下のことがわかる。

比較化合物（１）は、ＰＥＧ基を含む構造を有しない点で本発明で規定す

る構造ではない。この比較化合物（１）で標識した標識抗体の溶液における蛍光強度はいずれのＤＯＬにおいても低かった（Ｎｏ．ｃ１１）。

比較化合物（２）は、ＰＥＧの繰り返し数（本発明で規定するｍ）が２４である点で、本発明で規定するＰＥＧの繰り返し数よりも長いものである。この比較化合物（２）で標識した標識抗体の溶液における蛍光強度は、ＤＯＬが同等の、化合物（１）～（４）で標識した標識抗体に対して低かった（Ｎｏ．ｃ１２）。

比較化合物（３）は、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を、一般式（１）におけるR^{11}～R^{13}ではなくL^{1}が有する点で、本発明で規定する構造ではない。この比較化合物（３）で標識した標識抗体の溶液における蛍光強度は、いずれのＤＯＬにおいても低かった（Ｎｏ．ｃ１３）。

これに対して、本発明の化合物である化合物（１）～（４）で標識した標識抗体は、いずれも、上記比較化合物（１）で標識した標識抗体の蛍光強度に対して明らかに高い蛍光強度を示した（Ｎｏ．ｃ１１に対するＮｏ．１０１～１０４）。

また、本発明の化合物である化合物（１）～（４）で標識した標識抗体の中でも、ＰＥＧ基を含む構造を有する位置を、R^{1}及びR^{2}の少なくとも１つとR^{3}及びR^{4}の少なくとも１つとする本発明の化合物（２）～（４）で標識した標識抗体はより優れた蛍光強度を示し、化合物中にさらにもう２つＰＥＧ基を含む構造を有する本発明の化合物（３）及び（４）で標識した標識抗体はさらに優れた蛍光強度を示すことがわかる。

[0195] また、表１と表２に示された、ＰＥＧの繰り返し数が４である化合物（１）を用いたＮｏ．１０１と、ＰＥＧの繰り返し数が２４である点でのみ構造の異なる比較化合物（２）を用いたＮｏ．ｃ１２との対比から、ＰＥＧの繰り返し数を本発明の規定内とすることによって、より少ない蛍光性化合物の使用量で抗体を十分に標識することができることがわかる（表１）。また、同程度のＤＯＬを示す標識抗体の溶液同士の比較により、ＰＥＧの繰り返し数を本発明の規定内とすれば、より優れた蛍光強度を実現できることもわか

る（表２）。

[0196] ［３］メンブレン上蛍光強度

ウサギＩｇＧ溶液をタンパク質濃度５．０ｎｇ／ｍＬに調整し、２μＬをニトロセルロースメンブレン上に慎重にスポットした。メンブレンを乾燥後、次いでＴＢＳ－Ｔ（Ｔｒｉｓ Ｂｕｆｆｅｒｅｄ Ｓａｌｉｎｅ ｗｉｔｈ Ｔｗｅｅｎ ２０）中、Ｆｉｓｈ Ｇｅｌａｔｉｎブロッキング緩衝液でブロックした。膜を室温で１時間攪拌しながらインキュベートした。ブロッキング溶液を取り除き、標識抗体（上記［１］で調製した標識抗体の溶液、希釈前の濃度１ｍｇ・ｍＬ）のＰＢＳ溶液をＴＢＳ緩衝液で２００００倍希釈した。メンブレンを希釈した溶液に浸し、１時間攪拌しながらインキュベートした。メンブレンをＴＢＳ－Ｔ緩衝液で１０分間、３回洗浄し、最後にＴＢＳ緩衝液で１０分洗浄した。得られたメンブレンを４０℃のホットプレートで１時間乾燥させ、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｔｙｐｈｏｏｎ ｓｃａｎｎｅｒ（ＧＥＨＣ社製）を用いて画像化し、７８５ｎｍの励起光で、露光条件を統一して、６．４８ｍｍ^{2}の画分の蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲の蛍光強度を測定しシグナル蛍光強度とした。比較化合物（１）－ＩｇＧ ＤＯＬ２．２の蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲のシグナル蛍光強度の積分値を基準値とし、この基準値に対する比（標識抗体の蛍光波長８１０～８４０ｎｍの範囲のシグナル蛍光強度の積分値／基準値）を算出し、以下の評価基準に基づき評価した。表３に結果をまとめて示す。

[0197] － 蛍光強度（積分値）の評価基準 －

Ａ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が２．０倍以上

Ｂ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．７倍以上２．０倍未満

Ｃ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．４倍以上１．７倍未満

Ｄ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．２倍以上１．４倍未満

Ｅ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．１倍以上１．２倍未満

Ｆ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が０．９倍以上１．１倍未満

Ｇ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が０．９倍未満

[0198] [表3]

表３

No.	標識抗体	抗体に対する化合物のモル当量比	DOL	シグナル蛍光強度（メンブレン上）
201	化合物（1）-IgG	３当量	２．３	D
		５当量	３．６	D
		７当量	４．５	D
		１０当量	６．２	E
202	化合物（2）-IgG	３当量	２．２	B
		５当量	３．５	B
		７当量	４．５	A
		１０当量	６．１	B
203	化合物（3）-IgG	３当量	２．３	A
		５当量	３．７	A
		７当量	４．４	A
		１０当量	６．５	A
204	化合物（4）-IgG	３当量	２．２	A
		５当量	３．４	A
		７当量	４．３	A
		１０当量	６．０	A
c21	比較化合物（1）-IgG	３当量	２．２	１．０（基準値）
		５当量	３．２	G
		７当量	４．２	G
		１０当量	５．９	G
c22	比較化合物（2）-IgG	３当量	１．２	G
		５当量	１．８	G
		７当量	２．４	F
		１０当量	３．３	E
c23	比較化合物（3）-IgG	３当量	２．３	F
		５当量	３．３	F
		７当量	４．２	G
		１０当量	６．１	G

[0199] 上記表３で示す標識抗体のメンブレン上でのシグナル蛍光強度についても、上記表２で示す標識抗体の溶液での蛍光強度と同様の結果が得られた。

[0200] ＜実施例２：励起光波長６３３ｎｍでの評価＞

上記の各化合物（５）～（８）及び比較化合物（５）について、染色細胞での蛍光強度を評価した。また、化合物及び標識抗体での蛍光量子収率及び耐光性を評価した。

[0201] ［４］標識抗体の染色細胞での蛍光強度評価

上記［１］の蛍光標識率の評価における各標識抗体の溶液の調製において、抗体の標識に使用する化合物及び抗体１当量に対する化合物のモル当量比

を下記表４に示すように変更した以外は同様にして、各標識抗体の溶液を調製した。

上記で合成した標識抗体及び比較標識抗体を用いて、下記の通り細胞染色を行った。調製した染色細胞について、下記特性を評価した。結果を表４にまとめて示す。

[0202] ［染色細胞サンプルの作製］

ＨｅＬａ細胞〔Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ社〕を９６ウェルプレート〔Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社〕に播種し、１０％ウシ胎児血清、１％のＰｅｎｉｃｉｌｌｉｎｅ／Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎと、１％ＭＥＭ非必須アミノ酸を含むＤ－ＭＥＭ培地〔いずれも富士フイルム和光純薬社〕にて２０時間、インキュベータにて培養した。

続いて培地を除き、メタノールを用いて－２０℃で５分間処理を行い固定化したのちＰＢＳ〔Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社〕で洗浄し、ブロッキングおよび膜透過剤として濃度０．２％のＴｒｉｔｏｎＸ－１００（ポリエチレングリコールモノ－ｐ－イソオクチルフェニルエーテル）〔Ａｌｄｒｉｃｈ社〕、濃度２％のＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）〔Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ社〕を含むＰＢＳ溶液およびを加え１時間静置した。ブロッキングおよび膜透過剤を除き、一次抗体として抗α－Ｔｕｂｕｌｉｎ抗体〔ウサギポリクローナル、ＧｅｎｅＴｅｘ社〕希釈液を加え、抗体終濃度１μｇ／ｍＬにて４℃にて１５時間静置した。ＰＢＳＴで洗浄したのち、二次抗体として２μｇ／ｍＬの上記で調製した各標識抗体水溶液を加え、遮光しながら室温にて１時間静置し、再度ＰＢＳＴで洗浄した。さらにＰＢＳで洗浄後、褪色防止剤としてＰｒｏｌｏｎｇ Ｇｏｌｄ〔Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社〕を各ウェルにスポイトで１滴添加することで各染色細胞サンプルを得た。なお、下記蛍光強度評価は、作製直後の染色細胞サンプルを用いた。

[0203] ［染色細胞での蛍光強度評価］

ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ製プレートリーダーＥｎＳｉｇｈｔを用いて、以下の条件で、得られた染色細胞の蛍光強度を測定した。

（測定条件）ウェルスキャンモード、励起波長６３３ｎｍ、蛍光波長６７０－７２０ｎｍ（データ間隔５ｎｍ）、バンド幅８ｎｍ、１００回積算、３×３点、測定高さ３ｍｍ、ポイント距離１ｍｍ）

蛍光波長６７０～７２０ｎｍの範囲の蛍光強度の和（積分値）を試料の蛍光強度とした。比較化合物（５）－ＩｇＧ　ＤＯＬ３．７の蛍光波長６７０～７２０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値を基準値とし、この基準値に対する比（標識抗体の蛍光波長６７０～７２０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値／基準値）を算出し、以下の評価基準に基づき評価した。表４に結果をまとめて示す。

[0204] －　蛍光強度（積分値）の評価基準　－

Ａ：基準値に対する蛍光強度の比が２．５倍以上

Ｂ：基準値に対する蛍光強度の比が２．０倍以上２．５倍未満

Ｃ：基準値に対する蛍光強度の比が１．２倍以上２．０倍未満

Ｄ：基準値に対する蛍光強度の比が１．０倍以上１．２倍未満

Ｅ：基準値に対する蛍光強度の比が１．０倍未満

[0205] [表4]

表４

No.	標識抗体	抗体に対する化合物のモル当量比	DOL	染色細胞での蛍光強度
105	化合物(5)－IgG	20当量	4．7	B
106	化合物(6)－IgG	40当量	6．2	A
107	化合物(7)－IgG	80当量	8．2	A
108	化合物(8)－IgG	20当量	4．8	C
c15	比較化合物(5)－IgG	5当量	5．5	（基準値）

[0206] 上記表４の結果から、以下のことがわかる。

本発明の化合物である化合物（５）～（８）は、蛍光標識率（ＤＯＬ）４．７～８．２を示しており、抗体への結合性としては、実用上問題のない十分なレベルを示していた。

比較化合物（５）は、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を、

一般式（１）におけるR^{11}～R^{13}ではなくR^{3}が有し、－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_m$－R^{21}で表される構造を有しない点で、本発明で規定する構造ではない。

本発明の化合物である化合物（５）～（８）を用いた標識抗体は、いずれも、上記比較化合物（５）を用いた標識抗体の蛍光強度に対して明らかに高い蛍光強度を示した（Ｎｏ．ｃ１５に対するＮｏ．１０５～１０８）。

[0207] ［５］蛍光量子収率の評価

上記の化合物又は標識抗体のＰＢＳ溶液（ｐＨ７．４）を、以下参考資料に記載の手法にて評価した。

“A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields” (HORIBA Scientific社の資料、https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Fluorescence/quantumyieldstrad.pdfより入手可能)

蛍光量子収率については、評価ランクが高いと蛍光量子収率に優れるため非常に好ましい。

[0208] －　蛍光量子収率の評価基準　－

Ａ：０．５以上

Ｂ：０．４以上０．５未満

Ｃ：０．３以上０．４未満

Ｄ：０．２以上０．３未満

Ｅ：０．２未満

［６］耐光性の評価

ＰＢＳ溶液（ｐＨ７．４）に上記で合成した化合物又は標識抗体を、吸収波長ピークの吸光度が０．０９５～０．１０５となるように溶解した。この溶液を、メリーゴーランド光照射機〔ウシオ電機社製のキセノンランプＵＸＬ－５００Ｄ－Ｏ、ＨＡ－５０フィルタ、Ｙ４４フィルタ、露光強度２２ｍＷ／ｃｍ^2（５００ｎｍ換算）〕を用いて露光した状態で、各化合物又は標識抗体の吸収波長ピークの吸光度を分光器（ＨＰ社製、Ａｇｉｌｅｎｔ８４５３）により経時的に測定した。露光前の吸収波長ピークの吸光度を１００％

として、この吸収波長ピークの吸光度が初めて５０％低下（吸収波長ピークの吸光度が５０％に到達）するまでの露光時間を求め、以下の評価基準に基づき評価した。

評価ランクが高いと安定している時間が長くなるため好ましい。

[0209] －　耐光性の評価基準　－

Ａ：４０時間以上

Ｂ：３０時間以上４０時間未満

Ｃ：２０時間以上３０時間未満

Ｄ：１０時間以上２０時間未満

Ｅ：１０時間未満

[0210] [表5]

表５

No.	蛍光性化合物 又は標識抗体	DOL	蛍光量子収率	耐光性
301	化合物（５－Ｄ）	－	Ｂ	Ａ
302	化合物（６－Ｂ）	－	Ａ	Ａ
303	化合物（７－Ｂ）	－	Ｂ	Ａ
304	化合物（８－Ｂ）	－	Ｄ	Ｂ
c31	AlexaFluor647	－	Ｃ	Ｅ
305	化合物（５）－IgG	４．７	Ｂ	Ｂ
306	化合物（６）－IgG	６．２	Ｃ	Ｃ
307	化合物（７）－IgG	８．２	Ｂ	Ａ
308	化合物（８）－IgG	４．８	Ｃ	Ｄ
c32	比較化合物（５）－IgG	５．５	Ｅ	Ｅ

[0211] （表の注）

ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７は前述の通りであり、比較化合物（５）－ＩｇＧは、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７のＮＨＳエステル体を用いて作製した標識抗体を意味する。

[0212] 上記表４及び５の結果から、６２０～７００ｎｍに励起吸収波長を有する本発明の第二の好ましい形態の化合物及びその標識抗体は、得られた標識生体物質が優れた蛍光強度を示すことに加えて、優れた蛍光量子収率を示し、しかも、市販の蛍光性化合物であるＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７及びその標識抗体に比べて、耐光性にも優れることがわかる。

[0213] ＜実施例３：励起光波長６８５ｎｍでの評価＞

上記の各化合物（９）～（１３）及び比較化合物（４）について、溶液蛍光強度及びメンブレン上蛍光強度を評価した。

[0214] ［７］溶液蛍光強度の評価

上記［１］の蛍光標識率の評価における各標識抗体の溶液の調製において、抗体の標識に使用する化合物及び抗体１当量に対する化合物のモル当量比を下記表６に示すように変更した以外は同様にして、各標識抗体の溶液を調製した。得られた各標識抗体の溶液を、タンパク質濃度０．００５ｍｇ／ｍＬに調整し、分光蛍光強度計（商品名：ＲＦ－６０００、島津製作所社製）を用いて、６８５ｎｍの励起光で、露光条件を統一して、蛍光波長７１０～７３０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値を算出した。比較化合物（４）－ＩｇＧのＤＯＬ３．４（色素１０当量添加）の蛍光波長７１０～７３０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値を基準値とし、この基準値に対する比（標識抗体の蛍光波長７１０～７３０ｎｍの範囲の蛍光強度の積分値／基準値）を算出し、以下の評価基準に基づき評価した。表６に結果をまとめて示す。

[0215] －　蛍光強度（積分値）の評価基準　－

Ａ：基準値に対する蛍光強度の比が２．０倍以上

Ｂ：基準値に対する蛍光強度の比が１．７倍以上２．０倍未満

Ｃ：基準値に対する蛍光強度の比が１．４倍以上１．７倍未満

Ｄ：基準値に対する蛍光強度の比が１．２倍以上１．４倍未満

Ｅ：基準値に対する蛍光強度の比が１．１倍以上１．２倍未満

Ｆ：基準値に対する蛍光強度の比が０．９倍以上１．１倍未満

Ｇ：基準値に対する蛍光強度の比が０．９倍未満

[0216]

[表6]

表６

No.	標識抗体	抗体に対する化合物のモル当量比	DOL	蛍光強度（溶液）
109	化合物（９）-IgG	１５当量	４．４	Ｅ
		２５当量	６．４	Ｄ
		４０当量	７．８	Ａ
110	化合物（１０）-IgG	１０当量	３．６	Ｄ
		１５当量	４．９	Ｃ
		２５当量	６．３	Ｂ
111	化合物（１１）-IgG	２５当量	３．９	Ｃ
		４０当量	５．９	Ａ
		６０当量	７．４	Ａ
112	化合物（１２）-IgG	２０当量	３．７	Ｂ
		４０当量	５．２	Ａ
		６０当量	６．７	Ａ
113	化合物（１３）-IgG	１５当量	２．１	Ｅ
		６０当量	３．６	Ｄ
c14	比較化合物（４）-IgG	７当量	２．０	Ｆ
		１０当量	３．４	１．０（基準値）
		１５当量	６．２	Ｆ

[0217] 上記表６の結果から、以下のことがわかる。

本発明の化合物である化合物（９）～（１３）は、蛍光標識率（ＤＯＬ）２．１～７．８を示しており、抗体への結合性としては、実用上問題のない十分なレベルを示していた。

比較化合物（４）は、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を、一般式（１）におけるR^{11}～R^{13}ではなくL^{1}が有する点で、本発明で規定する構造ではない。この比較化合物（４）を用いた標識抗体の溶液における蛍光強度は、いずれのＤＯＬにおいても低かった（Ｎｏ．ｃ１４）。

これに対して、本発明の化合物である化合物（９）～（１３）を用いた標識抗体は、いずれも、上記比較化合物（４）を用いた標識抗体の蛍光強度に対して明らかに高い蛍光強度を示した（Ｎｏ．ｃ１４に対するＮｏ．１０９～１１３）。

また、生体物質に結合可能な置換基を有するR^{13}が一般式（ＩＶ）で表される基である本発明の化合物（９）～（１３）の標識抗体の中でも、一般式（ＩＶ）におけるR^{39}またはR^{43}に置換基を少なくとも１つ有する本発明の

化合物（１０）～（１３）はより優れた蛍光強度を示し、R^{39}およびR^{43}の両方に置換基を有する本発明の化合物（１１）～（１３）はさらに優れた蛍光強度を示すことがわかる。

[0218] ［８］ウエスタンブロッティング蛍光強度評価

トランスフェリン（Ｍｅｒｃｋ社製）をＦｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｓａｍｐｌｅ Ｂｕｆｆｅｒ （４Ｘ, ｎｏｎ－ｒｅｄｕｃｉｎｇ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）で希釈して１ｎｇ／ｕＬ、０．３ｎｇ／ｕＬ、０．１ｎｇ／μＬとし、９５℃で５分加熱処理した。Ｎｏｖｅｘ ４－２０％ Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ Ｍｉｎｉ Ｇｅｌｓ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）に対し、前述のトランスフェリンサンプルとＰａｇｅＲｕｌｅｒＰｒｅｓｔａｉｎｅｄ ＮＩＲ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｌａｄｄｅｒ （ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）をロードした後、定電圧２２５Ｖで４５分電気泳動を実施した。電気泳動後のゲルとニトロセルロースメンブレン（Ｃｙｔｉｖａ社製）を重ね、定電圧２０Ｖで１時間タンパク質転写を実行した後、メンブレンをＷｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｆｉｓｈ Ｇｅｌａｔｉｎ）（ＴＡＫＡＲＡ Ｂｉｏ社製）に浸して４℃にて１２時間静置した。メンブレンをＴＢＳ－Ｔ ｂｕｆｆｅｒで洗浄した後、Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ用１次抗体（Ｄａｋｏ社製）（５０００倍希釈）を入れた液に浸し、１時間振とうし、メンブレンをＴＢＳ－Ｔ ｂｕｆｆｅｒで洗浄した。比較化合物（４）－ＩｇＧ（２５０００倍希釈）の液を調整し、メンブレンを浸して１時間遮光状態で振とうしたのち、ＴＢＳ－Ｔ洗浄した。メンブレンを４０℃恒温槽で１時間遮光して乾燥させた。Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｔｙｐｈｏｏｎ ｓｃａｎｎｅｒ（Ｃｙｔｉｖａ社製）を用いて画像化し、６８５ｎｍの励起光で、測定条件を統一して、３．２４ｍｍ^{2}の画分の蛍光波長７１０～７３０ｎｍの範囲の蛍光強度を測定しシグナル蛍光強度とした。他の化合物の標識抗体についても上記と同様にして蛍光強度を測定した。

比較化合物（４）－ＩｇＧ ＤＯＬ３．４の蛍光波長７１０～７３０ｎｍ

の範囲のシグナル蛍光強度の積分値を基準値とし、この基準値に対する比（標識抗体の蛍光波長７１０～７３０ｎｍの範囲のシグナル蛍光強度の積分値／基準値）を算出し、以下の評価基準に基づき評価した。表７に結果をまとめて示す。

[0219] －　蛍光強度（積分値）の評価基準　－

Ａ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が３．０倍以上

Ｂ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が２．５倍以上３．０倍未満

Ｃ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が２．０倍以上２．５倍未満

Ｄ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．５倍以上２．０倍未満

Ｅ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が１．１倍以上１．５倍未満

Ｆ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が０．９倍以上１．１倍未満

Ｇ：基準値に対するシグナル蛍光強度の比が０．９倍未満

[0220] [表7]

表７

No.	標識抗体	抗体に対する化合物のモル当量比	DOL	ウエスタンブロッティング蛍光強度
209	化合物(9)-IgG	15当量	4．4	C
		25当量	6．4	C
		40当量	7．8	D
210	化合物(11)-IgG	25当量	3．9	B
		40当量	5．9	B
		60当量	7．4	B
211	化合物(12)-IgG	20当量	3．7	B
		40当量	5．2	A
		60当量	6．7	A
212	化合物(13)-IgG	15当量	2．1	D
		60当量	3．6	C
c24	比較化合物(4)-IgG	10当量	3．4	1．0(基準値)

[0221] 上記表７で示す標識抗体のウエスタンブロッティングでの蛍光強度についても、上記表７で示す標識抗体の溶液での蛍光強度と同様の結果が得られた。

[0222] ＜実施例４＞

上記の各化合物（１９）及び（２０）並びに市販品（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ７５０）について、耐光性を評価した。

[0223] ［９］耐光性の評価

ＰＢＳ溶液（ｐＨ７．４）に上記で合成した化合物又は市販品を、吸収波長ピークの吸光度が０．０９５～０．１０５となるように溶解した。この溶液を、メリーゴーランド光照射機〔ウシオ電機社製のキセノンランプＵＸＬ－５００Ｄ－Ｏ、ＨＡ－５０フィルタ、Ｙ４４フィルタ、露光強度２２ｍＷ／ｃｍ^2（５００ｎｍ換算）〕を用いて露光した状態で、各化合物又は市販品の吸収波長ピークの吸光度を分光器（ＨＰ社製、Ａｇｉｌｅｎｔ８４５３）により経時的に測定した。露光前の吸収波長ピークの吸光度を１００％として、この吸収波長ピークの吸光度が初めて５０％低下（吸収波長ピークの吸光度が５０％に到達）するまでの露光時間を求め、以下の評価基準に基づき評価した。

評価ランクが高いと安定している時間が長くなるため好ましい。

[0224] －　耐光性の評価基準　－

Ａ：９時間以上

Ｂ：７時間以上９時間未満

Ｃ：５時間以上７時間未満

Ｄ：３時間以上５時間未満

Ｅ：３時間未満

[0225] [表8]

表８

No.	蛍光性化合物	耐光性
119	化合物（１９）	A
120	化合物（２０）	A
c15	AlexaFluor750	E

[0226] （表の注）

ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ７５０：ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ７５０（商品名、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）。λ_{ex}＝７４９ｎｍ、λ_{em}＝７７５ｎｍの蛍光色素であり、耐光性に優れる色素として知られている。

[0227] 上記表８の結果から、７４０～８３０ｎｍに励起吸収波長を有する本発明

の第一の好ましい形態の化合物は、市販の蛍光性化合物であるＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ７５０に比べて耐光性に優れることがわかる。

[0228] このように、本発明の化合物を用いた標識生体物質は、溶液、メンブレン上、染色細胞及びウエスタンブロッティングの少なくともいずれかの形態において、優れた蛍光強度を有する。

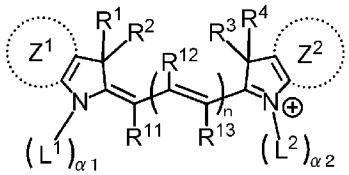
[0229] 本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであると考える。

[0230] 本願は、２０２１年６月１８日に日本国で特許出願された特願２０２１－１０１３０５及び２０２２年３月１８日に日本国で特許出願された特願２０２２－０４４４２７に基づく優先権を主張するものであり、これらはここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で表される化合物。

[化1]



一般式(1)

上記式中、Ｒ[1]～Ｒ[4]は、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又は－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]を示す。ｍは１～１０であって、Ｒ[21]はアルキル基を示す。

Ｒ[11]～Ｒ[13]は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して５又は６員環を形成していてもよい。ただし、Ｒ[11]～Ｒ[13]の少なくとも１つはカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を含む。

ｎは１～３の整数である。

Ｌ[1]及びＬ[2]はアルキル基又は－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]を示す。Ｒ[21]及びｍは、それぞれ前記のＲ[21]及びｍと同義である。Ｌ[1]とＬ[2]は、互いに結合し、環を形成していてもよい。

α１及びα２は０または１である。

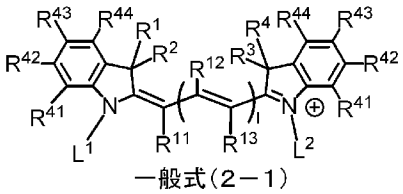
環Ｚ[1]及び環Ｚ[2]は、炭素原子及び窒素原子から選択される環構成原子で形成される６員環を示し、置換基を有していてもよく、縮合環を形成していてもよい。環Ｚ[1]及び環Ｚ[2]が環構成窒素原子を有する６員環を形成する場合、該環構成窒素原子は置換基で置換されていてもよい。

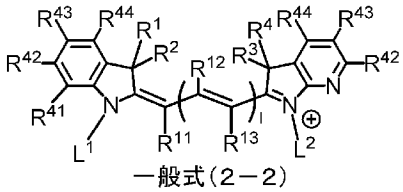
式（１）で表される化合物は、少なくとも１つの－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－Ｒ[21]で表される構造を有する。Ｒ[21]及びｍは、それぞれ前記のＲ[21]及びｍと同義である。

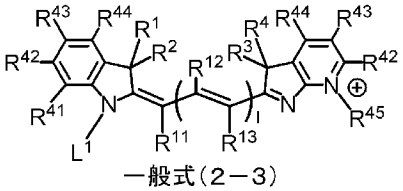
ただし、式（１）で表される化合物は中性の化合物である。

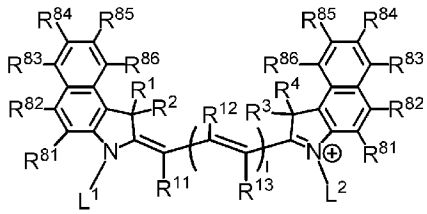
[請求項2] 下記一般式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される、請求項１に記載の化合物。

[化2]


一般式（２－１）


一般式（２－２）


一般式（２－３）


一般式（２－４）

上記式中、R^{45}は、アルキル基又は－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}を示す。

R^{41}～R^{44}及びR^{81}～R^{86}は、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、スルホ基、スルホンアミド基、ニトロ基、カルボキシ基、アミド基又はハロゲン原子を示し、隣接する基同士が互いに結合して縮合環を形成していてもよい。

R^1～R^4、R^{11}～R^{13}、L^1、L^2及びｍは、それぞれ前記のR^1～R^4、R^{11}～R^{13}、L^1、L^2及びｍと同義である。

R^1～R^4、L^1、L^2又はR^{45}の少なくとも１つは、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－R^{21}である。R^{21}及びｍは、それぞれ前記のR^{21}及びｍと同義である。

Ｉは２又は３の整数を示す。

ただし、式（２－１）～（２－４）のいずれかで表される化合物は中性の化合物である。

[請求項3] 前記のR^1及びR^2の少なくとも１つと前記のR^3及びR^4の少なくとも１つが、－（CH_2－CH_2－O）$_m$－で表され、ｍが１～１０である構造を含む、請求項１に記載の化合物。

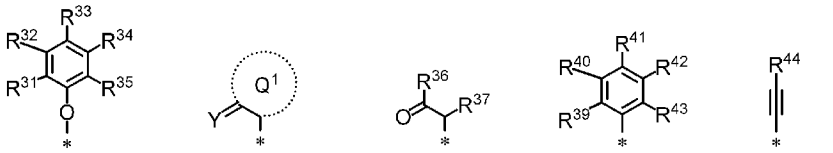
[請求項4] 化合物中に、－（ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｏ）$_m$－で表され、ｍ＝１～１０である構造を４つ含む、請求項３に記載の化合物。

[請求項5] 前記のＬ^{1}及びＬ^{2}の少なくとも１つが、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である、請求項１に記載の化合物。

[請求項6] 前記のＬ^{1}及びＬ^{2}が、アルコキシ基、カルボキシ基、スルホ基及びホスホノ基の少なくとも１つを置換基として有するアルキル基である、請求項５に記載の化合物。

[請求項7] 前記のＲ^{11}～Ｒ^{13}のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、下記一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される置換基である、請求項１に記載の化合物。

[化3]



上記式中、Ｙは酸素原子又は＝ＮＲ^{38}を示し、環Ｑ^{1}は５員又は６員の、複素環又は炭化水素環を示す。

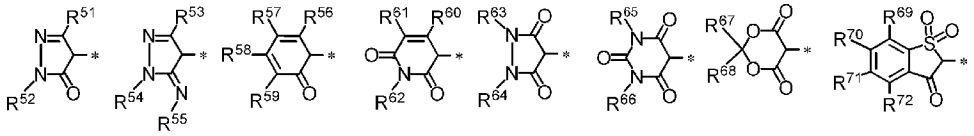
Ｒ^{31}～Ｒ^{44}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、アミド基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

ただし、一般式（Ｉ）～（Ｖ）のいずれかで表される基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

[請求項8] 前記一般式（ＩＩ）で表される置換基が、下記式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基である、請求項７に記載の化合物。

[化4]



(E-1) (E-2) (E-3) (E-4) (E-5) (E-6) (E-7) (E-8)

上記式中、R^{51}～R^{72}は、水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アミノ基、ハロゲン原子、スルホ基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を示す。

ただし、一般式（Ｅ－１）～（Ｅ－８）のいずれかで表される置換基は、少なくとも１つのカルボキシ基又は生体物質に結合可能な置換基を有する。

＊は結合手を示す。

[請求項9] 前記のR^{11}～R^{13}のうち、カルボキシ基を有する置換基又は生体物質に結合可能な置換基を有するものが、前記一般式（ＩＶ）で表される置換基である、請求項７に記載の化合物。

[請求項10] 前記のR^{39}～R^{43}のうち少なくとも１つが、カルボキシ基、カルボキシ基を有するアルキルオキシ基、カルボキシ基を有するアルキルカルバモイル基、又はカルボキシ基を有するポリ（オキシアルキレン）カルバモイル基である、請求項９に記載の化合物。

[請求項11] 請求項１～１０のいずれか１項に記載の化合物と生体物質とが結合してなる標識生体物質。

[請求項12] 前記生体物質がタンパク質、アミノ酸、核酸、糖鎖及びリン脂質のいずれかである請求項１１に記載の標識生体物質。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/023976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09K 11/06(2006.01)i; ***C09B 23/01***(2006.01)i; ***C09B 23/14***(2006.01)i; ***G01N 33/533***(2006.01)i; ***G01N 33/58***(2006.01)i; ***G01N 21/64***(2006.01)i
FI: C09B23/01 CSP; G01N33/58 A; G01N33/58 Z; G01N21/64 F; C09B23/14; C09K11/06; C09K11/06 645; G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09K11/06; C09B23/01; C09B23/14; G01N33/533; G01N33/58; G01N21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0168383 A1 (HERMANSON, Greg) 16 June 2016 (2016-06-16) claims, paragraphs [0512], [0528], [0802]	1-8, 11-12
Y	claims, paragraphs [0512], [0528], [0802]	9-10
X	JP 2021-513968 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 03 June 2021 (2021-06-03) claims, paragraph [0150], etc.	1-2, 11-12
X	JP 2006-513293 A (SCHERING AG.) 20 April 2006 (2006-04-20) claims, claim 20, etc.	1-2, 5-8, 11-12
X	JP 2012-517436 A (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 02 August 2012 (2012-08-02) claims, fig. 1	1-2, 7-8, 11-12
Y	JP 2012-524153 A (LI-COR, INC.) 11 October 2012 (2012-10-11) claims	9-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 August 2022	**06 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/023976

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2016/0168383 A1	16 June 2016	US 2014/0255312 A1	
JP 2021-513968 A	03 June 2021	US 2021/0017132 A1 claims, page 19 WO 2019/161159 A1 EP 3752204 A1 KR 10-2020-0122338 A	
JP 2006-513293 A	20 April 2006	US 2004/0260072 A1 claim 20 WO 2004/065491 A1 EP 1585791 A1 KR 10-2005-0103907 A CN 1742057 A	
JP 2012-517436 A	02 August 2012	US 2012/0028291 A1 fig. 1 WO 2010/091243 A1 EP 2393420 A1	
JP 2012-524153 A	11 October 2012	US 2010/0323389 A1 claims WO 2010/121163 A2 EP 2419478 A1 CN 102459469 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/023976

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C09K 11/06(2006.01)i; C09B 23/01(2006.01)i; C09B 23/14(2006.01)i; G01N 33/533(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i
FI: C09B23/01 CSP; G01N33/58 A; G01N33/58 Z; G01N21/64 F; C09B23/14; C09K11/06; C09K11/06 645; G01N33/533

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C09K11/06; C09B23/01; C09B23/14; G01N33/533; G01N33/58; G01N21/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2016/0168383 A1 (HERMANSON GREG) 16.06.2016 (2016-06-16) claims, [0512], [0528], [0802]	1-8,11-12
Y	claims, [0512], [0528], [0802]	9-10
X	JP 2021-513968 A (ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービシーズ) 03.06.2021 (2021-06-03) 特許請求の範囲、［０１５０］等	1-2,11-12
X	JP 2006-513293 A (シエーリング アクチエンゲゼルシャフト) 20.04.2006 (2006-04-20) 特許請求の範囲、請求項２０等	1-2,5-8,11-12
X	JP 2012-517436 A (ベス・イスラエル・ディーコネス・メディカル・センター, インコーポレイテッド) 02.08.2012 (2012-08-02) 特許請求の範囲、図１	1-2,7-8,11-12

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
19.08.2022	06.09.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
井上　明子 4Z 3230
電話番号 03-3581-1101 内線 3480

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2012-524153 A (ライコア インコーポレイテッド) 11.10.2012 (2012-10-11) 特許請求の範囲	9-10

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/023976

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2016/0168383 A1	16.06.2016	US 2014/0255312 A1	
JP 2021-513968 A	03.06.2021	US 2021/0017132 A1 claims, p.19 WO 2019/161159 A1 EP 3752204 A1 KR 10-2020-0122338 A	
JP 2006-513293 A	20.04.2006	US 2004/0260072 A1 claim20 WO 2004/065491 A1 EP 1585791 A1 KR 10-2005-0103907 A CN 1742057 A	
JP 2012-517436 A	02.08.2012	US 2012/0028291 A1 Fig.1 WO 2010/091243 A1 EP 2393420 A1	
JP 2012-524153 A	11.10.2012	US 2010/0323389 A1 claims WO 2010/121163 A2 EP 2419478 A1 CN 102459469 A	