



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397923 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180028519.9

田中宏明

(22) 申请日 2021.04.22

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

(30) 优先权数据

专利代理师 张志楠 褚瑶杨

2020-077176 2020.04.24 JP

2020-129753 2020.07.30 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

C09B 23/01 (2006.01)

2022.10.14

C07D 403/14 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07D 471/04 (2006.01)

PCT/JP2021/016361 2021.04.22

C07D 487/22 (2006.01)

C07D 498/22 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/215514 JA 2021.10.28

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(71) 申请人 富士胶片株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 金泽吉宪 藤原良 白兼研史

渡边康介 荒井雄辉 込山和兴

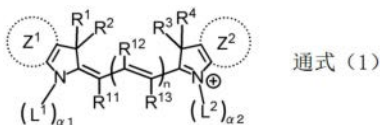
权利要求书3页 说明书53页

(54) 发明名称

化合物及使用了该化合物的标记生物物质

(57) 摘要

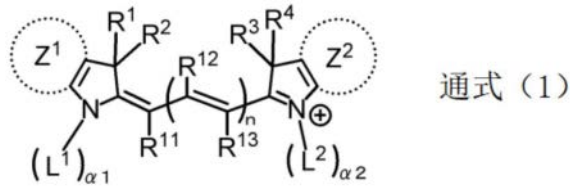
本发明提供一种下述式(1)的化合物、具有该化合物的标记生物物质。Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>表示特定的6元环。其中，Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>的至少一者是相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子在邻位具有特定的取代基的苯环，或位于上述邻位的成环原子为氮原子的特定的含氮6元环。R<sup>1</sup>~R<sup>4</sup>、R<sup>11</sup>~R<sup>13</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、R<sup>21</sup>表示特定的基团，n、α1、α2、m表示特定的数。下述化合物在杂环上具有至少1个由-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>-R<sup>21</sup>表示的结构，在特定的位置具有至少1个羧基或能够与生物物质键合的取代基，在Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>的至少一者是上述特定的含氮6元环的情况下，特定的取代基彼此可以键合而形成环。



通式(1)

1. 一种化合物,其由下述通式(1)表示,

[化学式1]



上述式中, $R^1 \sim R^4$ 表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ , $m$ 为1~10, $R^{21}$ 表示可以具有取代基的烷基,

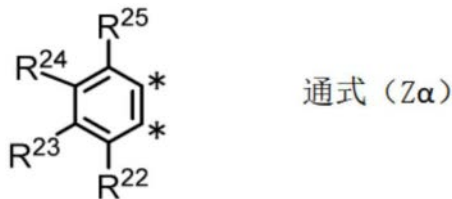
$R^{11} \sim R^{13}$ 表示氢原子、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基或卤原子,相邻的基团彼此可以相互键合而形成5元环或6元环,

$n$ 为1~3的整数,

$L^1$ 及 $L^2$ 表示可以具有取代基的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ , $R^{21}$ 及 $m$ 与上述 $R^{21}$ 及 $m$ 含义相同, $\alpha_1$ 及 $\alpha_2$ 为0或1,

环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 表示由选自碳原子及氮原子中的成环原子形成的6元环,可以具有取代基,也可以形成稠环,其中,环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的至少一者是由下述通式( $Z\alpha$ )表示的苯环,或者是满足下述规定( $Z\beta$ )的含氮6元环,

[化学式2]



上述式中, $R^{22}$ 表示烷基、烷氧基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子,

$R^{23} \sim R^{25}$ 表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子,相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环,

由通式( $Z\alpha$ )表示的结构在\*的位置与通式(1)的含有该氮原子的杂环键合,并使 $R^{22}$ 成为 $L^1$ 或 $L^2$ 所键合的氮原子的邻位,

规定( $Z\beta$ ):相对于 $L^1$ 或 $L^2$ 所键合的氮原子位于邻位的成环原子为氮原子的含氮6元环,位于该邻位的成环氮原子可以具有取代基,

$R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 表示的结构, $R^{21}$ 及 $m$ 与上述 $R^{21}$ 及 $m$ 含义相同,

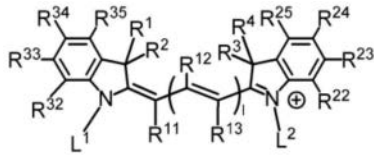
$L^1$ 、 $L^2$ 及所述位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基,

在 $Z^1$ 及 $Z^2$ 的至少一者是满足所述规定( $Z\beta$ )的含氮6元环的情况下, $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^1 \sim R^4$ 及所述位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中的两者可以相互键合而形成包含重复数 $2n+3$ 的次甲基链的环,

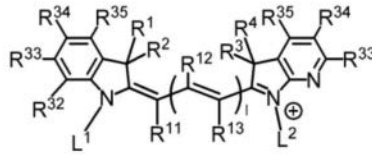
其中,由式(1)表示的化合物是中性化合物。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其由下述通式(2-1)~(2-3)中的任一个表示,

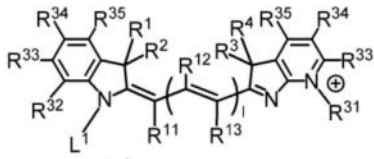
[化学式3]



通式 (2-1)



通式 (2-2)



通式 (2-3)

上述式中,  $R^{31}$  表示可以具有取代基的烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ ,

$R^{32} \sim R^{35}$  表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环,

$R^1 \sim R^4, R^{11} \sim R^{13}, L^1, L^2, R^{21} \sim R^{25}$  及  $m$  与上述  $R^1 \sim R^4, R^{11} \sim R^{13}, L^1, L^2, R^{21} \sim R^{25}$  及  $m$  含义相同,  $1$  表示 2 或 3,

$L^1, L^2$  及  $R^{31}$  的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基,

其中, 由式 (2-1) ~ (2-3) 中的任一个表示的化合物是中性化合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物, 其中,

所述  $R^1$  及  $R^2$  的至少一者和所述  $R^3$  及  $R^4$  的至少一者包含  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m-$  表示的结构。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的化合物, 其中,

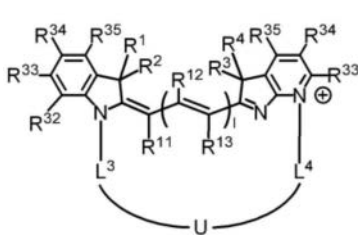
所述  $L^1, L^2$  及规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基及  $R^{31}$  的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基和  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m-$  表示的结构。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的化合物, 其中,

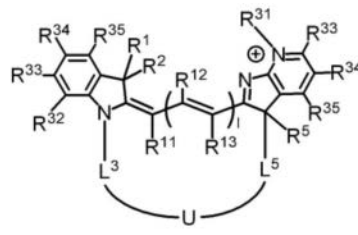
所述  $R^{11} \sim R^{13}$  的至少一者为芳氧基或芳硫基。

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其由下述通式 (5-1) ~ (5-4) 中的任一个表示,

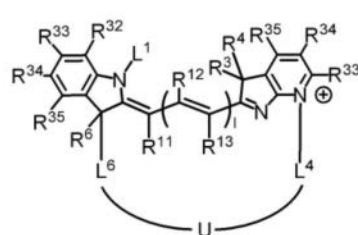
[化学式 4]



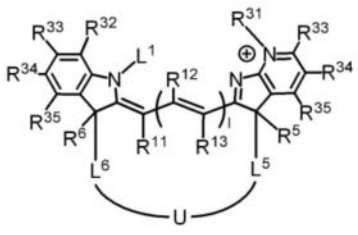
通式 (5-1)



通式 (5-2)



通式 (5-3)



通式 (5-4)

上述式中,  $R^1 \sim R^6$  表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ ,

- $R^{31}$ 表示可以具有取代基的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ ，  
 $R^{32}\sim R^{35}$ 表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子，相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环，  
1表示2或3，  
 $L^3\sim L^6$ 表示亚烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基- $*$ ， $*$ 表示与U的键合位置，  
连接基团U表示总原子数1~100的2价连接基团，  
 $R^{11}\sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$ 及m与上述 $R^{11}\sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$ 及m含义相同，  
 $R^1\sim R^6$ 、 $L^1$ 、 $R^{31}$ 及 $L^3\sim L^6$ 的至少一者包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构，m与上述m含义相同，  
 $L^1$ 、 $R^{31}$ 、 $L^3\sim L^6$ 及连接基团U的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基，  
其中，由式(5-1)~(5-4)表示的化合物是中性化合物。
7. 根据权利要求6所述的化合物，其中，  
所述连接基团U中的与 $L^3\sim L^6$ 的连接部是-O-基、-NR<sup>50</sup>-基、-COO-基、-CONR<sup>50</sup>-基或-SO<sub>2</sub>NR<sup>50</sup>-基，其中，R<sup>50</sup>是氢原子或烷基。
8. 根据权利要求6或7所述的化合物，其中，  
所述R<sup>1</sup>及R<sup>2</sup>的至少一者和所述R<sup>3</sup>及R<sup>4</sup>的至少一者包含m=1~10且由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构。
9. 根据权利要求6至8中任一项所述的化合物，其中，  
所述 $L^3\sim L^6$ 全部包含m=1~10且由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构。
10. 根据权利要求6至9中任一项所述的化合物，其中，  
所述连接基团U是2价连接基团，该2价连接基团具有羧基或能够与生物物质键合的取代基。
11. 一种标记生物物质，其由权利要求1至10中任一项所述的化合物与生物物质键合而成。
12. 根据权利要求11所述的标记生物物质，其中，  
所述生物物质为蛋白质、氨基酸、核酸、糖链及磷脂中的任一种。

## 化合物及使用了该化合物的标记生物物质

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种化合物及使用了该化合物的标记生物物质。

### 背景技术

[0002] 为了观察活体内对各种刺激(疾病、环境变化等)的变化,大多使用利用荧光性化合物(色素)标记对目标检测对象物质具有键合性的活体分子(抗体等)的荧光标记生物物质。

[0003] 例如,在从蛋白质混合物检测特定的蛋白质的蛋白质印迹法(以下,也简称为WB。)中,也利用使用对该蛋白质具有键合性的荧光标记抗体来检测上述特定的蛋白质的有无或存在量的荧光法。

[0004] 并且,在分析活体中的活体分子、细胞及组织等的动态及功能等的生物成像技术中,利用观察通过荧光标记可视化的活体的特定的部位的活体荧光成像作为活体观察的技术之一。

[0005] 作为用于上述荧光标记的荧光色素,已知有花青色素。然而,在将花青色素用于荧光标记的情况下,标记后的色素之间容易发生自缔合等相互作用,存在荧光量子产率下降的倾向。

[0006] 作为应对该问题的技术,例如,在专利文献1及2中记载有导入了水溶性的PEG(聚乙二醇)基的花青色素。根据上述专利文献1及2,各专利文献中记载的花青色素通过色素所具有的PEG基来抑制标记后的色素之间的自缔合,显示出比以往的花青色素高的荧光强度。

[0007] 以往技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2009/078970号

[0010] 专利文献2:国际公开第2013/130761号

### 发明内容

[0011] 发明要解决的技术课题

[0012] 然而,通过本发明人等的研究可知,在使用上述专利文献1及2中记载的花青色素的荧光标记中,花青色素对抗体等活体分子的键合性低。结果发现,使用与以往的花青色素相同当量的色素时获得的荧光强度低,且无法获得充分的荧光强度。

[0013] 本发明的课题在于,提供一种化合物,其与生物物质的键合性良好,且所获得的标记生物物质显示出优异的荧光强度。并且,本发明的课题还在于,提供一种将该化合物与生物物质键合而成的标记生物物质。

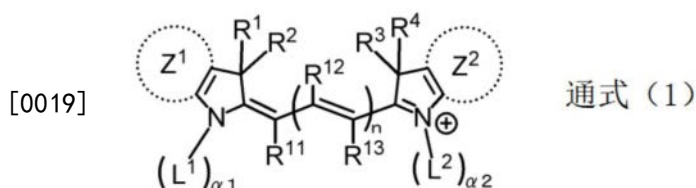
[0014] 用于解决技术课题的手段

[0015] 即,本发明的上述课题通过下述方法得到解决。

[0016] (1)

[0017] 一种化合物,其由下述通式(1)表示,

[0018] [化学式1]



[0020] 上述式中,  $R^1 \sim R^4$  表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $m$  为 1~10,  $R^{21}$  表示可以具有取代基的烷基。

[0021]  $R^{11} \sim R^{13}$  表示氢原子、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成 5 元环或 6 元环。

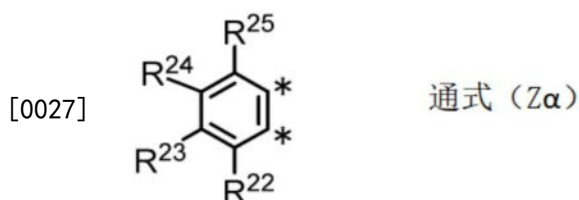
[0022]  $n$  为 1~3 的整数。

[0023]  $L^1$  及  $L^2$  表示可以具有取代基的烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $R^{21}$  及  $m$  与上述  $R^{21}$  及  $m$  含义相同。

[0024]  $\alpha_1$  及  $\alpha_2$  为 0 或 1。

[0025] 环  $Z^1$  及环  $Z^2$  表示由选自碳原子及氮原子中的成环原子形成的 6 元环, 可以具有取代基, 也可以形成稠环。其中, 环  $Z^1$  及环  $Z^2$  的至少一者是由下述通式 (Z $\alpha$ ) 表示的苯环, 或者是满足下述规定 (Z $\beta$ ) 的含氮 6 元环。

[0026] [化学式2]



[0028] 上述式中,  $R^{22}$  表示烷基、烷氧基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子。

[0029]  $R^{23} \sim R^{25}$  表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0030] 由通式 (Z $\alpha$ ) 表示的结构在 \* 的位置与通式 (1) 的含有上述氮原子的杂环键合, 并使  $R^{22}$  成为  $L^1$  或  $L^2$  所键合的氮原子的邻位。

[0031] 规定 (Z $\beta$ ): 相对于  $L^1$  或  $L^2$  所键合的氮原子位于邻位的成环原子为氮原子的含氮 6 元环。位于该邻位的成环氮原子可以具有取代基。

[0032]  $R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$  及  $L^2$  的至少一者包含由  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$  表示的结构。 $R^{21}$  及  $m$  与上述  $R^{21}$  及  $m$  含义相同。

[0033]  $L^1$ 、 $L^2$  及上述位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

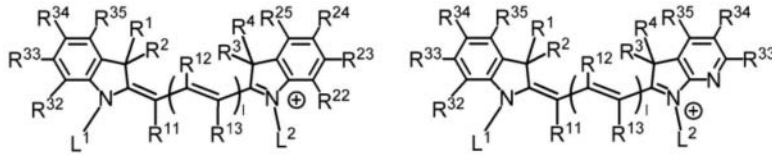
[0034] 在  $Z^1$  及  $Z^2$  的至少一者是满足上述规定 (Z $\beta$ ) 的含氮 6 元环的情况下,  $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^1 \sim R^4$  及上述位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中的两者可以相互键合而形成包含重复数  $2n+3$  的次甲基链的环。

[0035] 其中, 由式 (1) 表示的化合物是中性化合物。

[0036] (2)

[0037] 根据 (1) 所述的化合物, 其由下述通式 (2-1) ~ (2-3) 中的任一个表示。

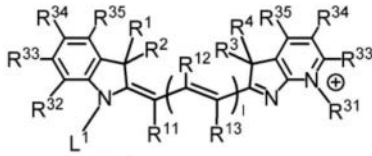
[0038] [化学式3]



通式 (2-1)

通式 (2-2)

[0039]



通式 (2-3)

[0040] 上述式中,  $R^{31}$  表示可以具有取代基的烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0041]  $R^{32} \sim R^{35}$  表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0042]  $R^1 \sim R^4$ 、 $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^{21} \sim R^{25}$  及  $m$  与上述  $R^1 \sim R^4$ 、 $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^{21} \sim R^{25}$  及  $m$  含义相同。

[0043]  $l$  表示 2 或 3。

[0044]  $L^1$ 、 $L^2$  及  $R^{31}$  的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0045] 其中, 由式 (2-1) ~ (2-3) 中的任一个表示的化合物是中性化合物。

[0046] (3)

[0047] 根据(1)或(2)所述的化合物, 其中, 上述  $R^1$  及  $R^2$  的至少一者和上述  $R^3$  及  $R^4$  的至少一者包含  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m-$  表示的结构。

[0048] (4)

[0049] 根据(1)至(3)中任一项所述的化合物, 其中, 上述  $L^1$ 、 $L^2$ 、规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基及  $R^{31}$  的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基和  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m-$  表示的结构。

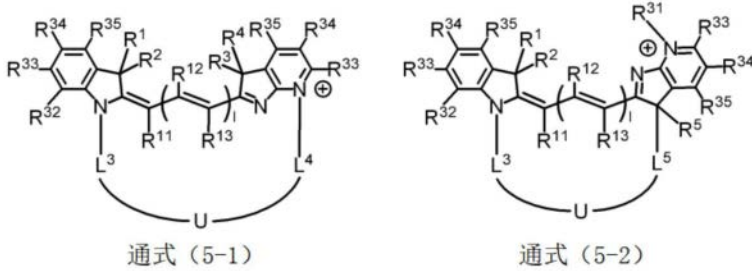
[0050] (5)

[0051] 根据(1)至(4)中任一项所述的化合物, 其中, 上述  $R^{11} \sim R^{13}$  的至少一者为芳氧基或芳硫基。

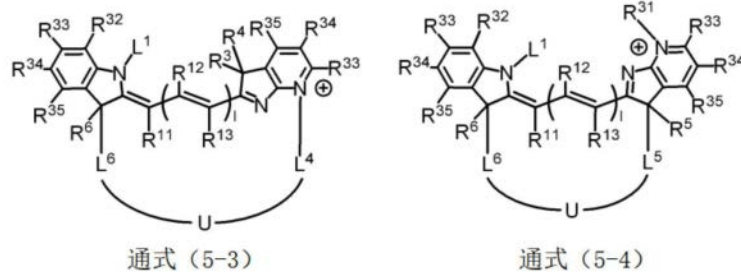
[0052] (6)

[0053] 根据(1)所述的化合物, 其由下述通式 (5-1) ~ (5-4) 中的任一个表示。

[0054] [化学式4]



[0055]



[0056] 上述式中,  $R^1 \sim R^6$  表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0057]  $R^{31}$  表示可以具有取代基的烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0058]  $R^{32} \sim R^{35}$  表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0059]  $l$  表示 2 或 3。

[0060]  $L^3 \sim L^6$  表示亚烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基-\*, \* 表示与 U 的键合位置。

[0061] 连接基团 U 表示总原子数 1~100 的 2 价连接基团。

[0062]  $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$  及  $m$  与上述  $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$  及  $m$  含义相同。

[0063]  $R^1 \sim R^6$ 、 $L^1$ 、 $R^{31}$  及  $L^3 \sim L^6$  的至少一者包含由  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ - 表示的结构。 $m$  与上述  $m$  含义相同。

[0064]  $L^1$ 、 $R^{31}$ 、 $L^3 \sim L^6$  及连接基团 U 的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0065] 其中, 由式 (5-1) ~ (5-4) 表示的化合物是中性化合物。

[0066] (7)

[0067] 根据 (6) 所述的化合物, 其中, 上述连接基团 U 中的与  $L^3 \sim L^6$  的连接部是 -O- 基、-NR<sup>50</sup>- 基、-COO- 基、-CONR<sup>50</sup>- 基或 -SO<sub>2</sub>NR<sup>50</sup>-。其中, R<sup>50</sup> 是氢原子或烷基。

[0068] (8)

[0069] 根据 (6) 或 (7) 所述的化合物, 其中, 上述  $R^1$  及  $R^2$  的至少一者和上述  $R^3$  及  $R^4$  的至少一者包含  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ - 表示的结构。

[0070] (9)

[0071] 根据 (6) 至 (8) 中任一项所述的化合物, 其中, 上述  $L^3 \sim L^6$  全部包含  $m=1 \sim 10$  且由  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ - 表示的结构。

[0072] (10)

[0073] 根据 (6) 至 (9) 中任一项所述的化合物, 其中, 上述连接基团 U 是具有羧基或能够与生物物质键合的取代基的 2 价连接基团。

[0074] (11)

[0075] 一种标记生物物质, 其由 (1) 至 (10) 中任一项所述的化合物与生物物质键合而成。

[0076] (12)

- [0077] 根据(11)所述的标记生物物质,其中,
- [0078] 上述生物物质为蛋白质、氨基酸、核酸、糖链及磷脂中的任一种。
- [0079] 发明效果
- [0080] 本发明的化合物显示出与生物物质的良好的键合性,且所获得的标记生物物质显示出优异的荧光强度。并且,本发明的标记生物物质表示优异的荧光强度。

### 具体实施方式

[0081] 在本发明中,在具有多个由特定的符号或式表示的取代基或连接基团等(以下,称为取代基等)时,或同时规定多个取代基等时,只要没有特别说明,各个取代基等彼此可以相同或不同。这对于取代基等的数量的规定也同样适用。并且,在多个取代基等靠近时(尤其,相邻时),只要没有特别说明,它们可以相互连接而形成环。并且,只要没有特别说明,环、例如脂环、芳香族环及杂环可以进一步稠合而形成稠环。

[0082] 在本说明书中,只要没有特别说明,关于双键,在分子内存在E型及Z型的情况下,可以是其中的任一种,并且也可以是它们的混合物。并且,只要没有特别说明,在作为化合物存在非对映体及对映体的情况下,可以是其中的任一种,并且也可以是它们的混合物。

[0083] 在本发明中,关于化合物及取代基的表示,除了化合物本身及取代基本身以外,还用于包含其盐、其离子的含义。例如,羧基、磺基及膦酰基(-P(=O)(OH)<sub>2</sub>)等可以将氢原子解离而采用离子结构,也可以采用盐结构。即,在本发明中,“羧基”以包含羧酸根离子或其盐的含义使用,“磺基”以包含磺酸根离子或其盐的含义使用,“膦酰基”以包含膦酸根离子或其盐的含义使用。作为构成上述盐结构时的1价或多价阳离子,没有特别限制,可举出无机阳离子、有机阳离子等,具体而言,可举出Na<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>及K<sup>+</sup>等碱金属阳离子、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>及Ba<sup>2+</sup>等碱土类金属阳离子、以及三烷基铵阳离子、四烷基铵阳离子等有机铵阳离子。

[0084] 在盐结构的情况下,其盐的种类可以是一种,也可以混合存在两种以上,也可以在化合物中混合存在盐型和游离酸结构的基团,并且也可以混合存在盐结构的化合物和游离酸结构化合物。

[0085] 本发明的化合物均为中性化合物。在本发明中,化合物为中性表示电中性。具体而言,通过化合物内的具有电荷的基团或抗衡离子,将化合物整体的电荷调整为0。例如,在由通式(1)表示的化合物中,L<sup>2</sup>所键合的氮原子的形式电荷除了 $\alpha_2=0$ 的情况以外为+1。以与该形式电荷成对的方式,化合物中的磺基等解离性基团具有磺酸根离子等离子结构,由此本发明的化合物作为化合物整体成为电荷0的化合物。当 $\alpha_2=0$ 时,L<sup>2</sup>所键合的氮原子的形式电荷为0。

[0086] 另外,在由通式(1)表示的化合物中,L<sup>1</sup>所键合的氮原子的形式电荷在 $\alpha_1=1$ 时为0。当 $\alpha_1=0$ 时,以L<sup>1</sup>所键合的氮原子的形式电荷成为0的方式,代替通式(1)中的含有L<sup>1</sup>所键合的氮原子的5元环与环Z<sup>1</sup>的稠合部分的双键,而具有L<sup>1</sup>所键合的氮原子与环Z<sup>1</sup>的键合部分成为双键的共轭结构。

[0087] 在本发明中规定的各通式中,为了方便,将化合物所具有的正电荷确定为特定的氮原子所具有的结构来表示。其中,由于本发明的化合物具有共轭体系,因此实际上,除上述氮原子以外的其他原子有时也能够带正电荷,只要是作为化学结构之一能够采用由各通式表示的结构的化合物,则包含在由各通式表示的化合物中。这对于负电荷也同样适用。

[0088] 在本发明中,相对于 $L^1$ 所键合的氮原子的邻位是指,在含有 $L^1$ 所键合的氮原子作为成环原子,在环 $Z^1$ 稠合而成的杂环中,将 $L^1$ 所键合的氮原子设为1位,将 $R^1$ 及 $R^2$ 所键合的碳原子设为3位时,环 $Z^1$ 为5元环时表示6位,环 $Z^1$ 为6元环时表示7位。例如,在通式(2-1)~(2-3)中,位于相对于 $L^1$ 所键合的氮原子的邻位的取代基为 $R^{32}$ 。这对于相对于 $L^2$ 所键合的氮原子的邻位也同样适用。

[0089] 并且,表示在不损害本发明的效果的范围内,包含改变了结构的一部分的化合物。而且,关于未明确记载取代或未取代的化合物,表示在不损害本发明的效果的范围内,可以具有任意的取代基。这对于取代基(例如,表述为“烷基”、“甲基(Methyl group)”、“甲基(Methyl)”等的基团)及连接基团(例如,表述为“亚烷基”、“亚甲基(Methylene group)”、“亚甲基(Methylene)”等的基团)也同样适用。在这样的任意的取代基中,在本发明中优选的取代基是选自后述的取代基组T中的取代基。

[0090] 在本发明中,在规定某个基团的碳原子数的情况下,该碳原子数只要在本发明或本说明书中没有特别说明,则表示基团整体的碳原子数。即,在该基团是进一步具有取代基的方式的情况下,表示包含该取代基的全部碳原子数。

[0091] 并且,在本发明中使用“~”表示的数值范围表示作为下限值及上限值包含记载于“~”前后的数值的范围。

[0092] 本发明的化合物由下述通式(1)表示。对于本发明的化合物显示出与生物物质的良好的键合性,且所获得的标记生物物质显示出优异的荧光强度的详细原因尚不清楚,但认为如下。

[0093] 如通式(1)所示,本发明的化合物具有聚次甲基链(在本发明中,表示通过共轭双键连接的次甲基链,且构成次甲基链的碳原子数为 $2n+3$ ,也称为重复数 $2n+3$ 的次甲基链。以下相同。),该聚次甲基链含有氮原子作为成环原子,且在两末端具有环 $Z^1$ 或环 $Z^2$ 稠合而成的杂环,而且,环 $Z^1$ 稠合而成的杂环的氮原子具有叔胺结构,环 $Z^2$ 稠合而成的杂环的氮原子具有季铵结构,由此通过经由聚次甲基骨架的电荷移动而产生吸收。如此,本发明的化合物被分类为称为聚次甲基色素(广义上为花青色素)的化合物。

[0094] 本发明的化合物在具有上述结构的基础上,还具有如下结构:上述2个杂环中的与3位的环构成碳原子键合的 $R^1$ ~ $R^4$ 以及取代成成环氮原子的 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者包含 $m=1$ ~10且由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 表示的PEG(聚乙二醇)基,并且 $L^1$ 、 $L^2$ 及环 $Z^1$ 或环 $Z^2$ 能够具有的后述规定(Z $\beta$ )的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少1个具有能够与生物物质键合的取代基。由此,在具有 $m$ 超过10的PEG基的化合物中,能够抑制由于大的排除体积效果而产生的与生物物质的键合性下降,能够显示出与生物物质的良好的键合性。

[0095] 此外,本发明的化合物作为上述环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的至少一者,具有由后述通式(Z $\alpha$ )表示的在相对于氮原子的邻位具有取代基的苯环,或满足后述规定(Z $\beta$ )的相对于氮原子的邻位为氮原子的含氮6元环。由此认为,通过邻位的取代基对与聚次甲基链的末端键合的杂环的成环氮原子的立体效果和由位于邻位的氮原子获得的亲水化效果,抑制了化合物彼此的相互作用,结果,能够抑制由化合物的自缔合引起的荧光强度的下降。

[0096] 本发明的化合物依赖于重复数 $2n+3$ 的次甲基链的长度,当 $n=1$ 时在585nm附近具有激励吸收波长,当 $n=2$ 时在685nm附近具有激励吸收波长,当 $n=3$ 时在785nm附近具有激励吸收波长。因此,由这些通式(1)表示的化合物分别在使用600nm、700nm、800nm附近的激

励光源的荧光标记中,能够作为显示出与生物物质的良好的键合性和优异的荧光强度的化合物使用。

[0097] 在多色WB中,在从可见区域到近红外区域的范围内,检测多个发光色。因此,需要以多个色素的吸收发光波形成适当的波长关系的方式进行选择,以免在使色素激励发光时相互干涉而产生串扰。理想的是,调整成在某个激励光中仅有1个色素发光,其他色素不发光。从该观点出发,例如,在多色WB的近红外区域的发光中,使用700nm附近和800nm附近这样的波长某种程度分离的2种激励光源。

[0098] 利用近红外光激励的荧光检测与利用可见光激励的检测相比,能够抑制膜的自家荧光,即背景荧光,因此容易提高信噪比(S/N比),能够高灵敏度地检测目标蛋白质。因此,近年来,在微量蛋白质的分析研究中,利用近红外区域的发光的荧光检测WB的必要性增加。

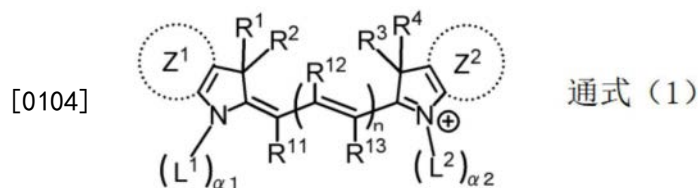
[0099] 然而,在近红外区域,通常荧光色素的荧光量子产率低,不易获得高的信号量。即使在具有上述700nm附近和800nm附近的2种化合物的多色WB中,本发明的化合物中n=2或3的化合物也能够作为显示出与生物物质的良好的键合性和优异的荧光强度的化合物使用,尤其,对于更高灵敏度地观察、检测蛋白质的要求,与使用了含有上述专利文献1及2中记载的花青色素的以往的花青色素的荧光标记相比,也能够显示出与生物物质的良好的键合性和优异的荧光强度。

[0100] 以下,对本发明的由通式(1)表示的化合物进行详细说明。

[0101] <由通式(1)表示的化合物>

[0102] 本发明的由通式(1)表示的化合物如下所述。

[0103] [化学式5]



[0105] 式中, $R^1 \sim R^4$ 表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $m$ 为1~10, $R^{21}$ 表示可以具有取代基的烷基。

[0106]  $R^{11} \sim R^{13}$ 表示氢原子、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基或卤原子,相邻的基团彼此可以相互键合而形成5元环或6元环。

[0107]  $n$ 为1~3的整数。

[0108]  $L^1$ 及 $L^2$ 表示可以具有取代基的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $R^{21}$ 及 $m$ 与上述 $R^{21}$ 及 $m$ 含义相同。

[0109]  $\alpha_1$ 及 $\alpha_2$ 为0或1。

[0110] 环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 表示由选自碳原子及氮原子中的成环原子形成的6元环,可以具有取代基,也可以形成稠环。其中,环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的至少一者是由后述通式(Za)表示的苯环,或满足后述规定(Zb)的含氮6元环。

[0111]  $R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 表示的结构。 $R^{21}$ 及 $m$ 与上述 $R^{21}$ 及 $m$ 含义相同。其中,如后所述,在 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^1 \sim R^4$ 及后述的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中的两者相互键合的情况下,包含形成该键的基团的 $R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者只要包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ 表示的结构即可。

[0112]  $L^1$ 、 $L^2$ 及后述规定(ZB)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0113] 在 $Z^1$ 及 $Z^2$ 的至少一者是满足后述的规定(ZB)的含氮6元环的情况下, $L^1$ 、 $L^2$ 及后述规定(ZB)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中的两者可以相互键合而形成包含重复数 $2n+3$ 的次甲基链的环。

[0114] 其中,由式(1)表示的化合物是中性化合物。

[0115] 以下,对通式(1)中的取代基等进行详细说明。

[0116] (1)  $R^1 \sim R^4$

[0117]  $R^1 \sim R^4$ 分别独立地表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $R^1$ 与 $R^2$ 可以相互连接而形成环, $R^3$ 与 $R^4$ 也可以相互连接而形成环。

[0118] 能够用作 $R^1 \sim R^4$ 的烷基、芳基及杂芳基与后述的取代基组T中的烷基、芳基及杂芳基含义相同。

[0119] 未取代的烷基的碳原子数优选为1~6,更优选为1~4,进一步优选为1~2。

[0120] 作为具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数,优选为1~10,更优选为1~8,进一步优选为2~6,进一步优选为3~5。并且,作为构成具有取代基的烷基的最长链的原子数,优选为3~35,更优选为3~30,进一步优选为3~25。其中,如后所述,在 $L^1$ 、 $L^2$ 及后述规定(ZB)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中的两者相互键合的情况下,在由 $L^3 \sim L^6$ 及U构成的基团中,构成与具有上述取代基的烷基的最长链对应的部分的原子数也优选为5~50,更优选为5~40,进一步优选为5~30。

[0121] 在本发明中,“具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数”表示除了烷基所具有的取代基部分以外的碳原子数。

[0122] 在本发明中,“构成具有取代基的烷基的最长链的原子数”表示包含取代基部分的原子数(即,总原子数减去不构成最长链的分子链的原子数的原子数)。另外,在磺基、羧基等具有解离性的氢原子的取代基构成最长链的情况下,无论有无解离,都包含氢原子进行计算。并且,不包含后述的能够与生物物质键合的取代基部分中的原子数。

[0123] 作为能够用作 $R^1 \sim R^4$ 的烷基可以具有的取代基,可举出烷氧基、羧基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺基、膦酰基及 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 、以及由这些取代基的组合构成的基团。并且,能够举出后述的能够与生物物质键合的取代基。另外,上述烷氧基、羧基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺基及膦酰基以及由这些取代基的组合构成的基团中的烷基部分可以具有后述的能够与生物物质键合的取代基。

[0124] 作为能够用作 $R^1 \sim R^4$ 的具有取代基的烷基,只要是具有上述取代基的烷基则没有特别限制,从抑制分子间相互作用的观点出发,优选具有 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 作为取代基的烷基。在该情况下, $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 可以直接取代烷基,也可以作为由氨基甲酰基和 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 的组合构成的基团取代。

[0125]  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$

[0126] 在能够用作 $R^1 \sim R^4$ 的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 中, $m$ 为1~10, $R^{21}$ 表示可以具有取代基的烷基。

[0127]  $m$ 表示平均重复数(也简称为重复数),优选为4~10,更优选为4~8。

[0128] 关于上述平均重复数,能够对化合物进行 $^1H$ -NMR测定,由平均积分值计算。在本发

明中规定的平均重复数表示将通过上述方法计算出的平均重复数的小数第一位四舍五入而获得的数。

[0129]  $R^1$ 中的可以具有取代基的烷基能够适用能够用作上述 $R^1 \sim R^4$ 的可以具有取代基的烷基的记载。

[0130] 作为能够用作 $R^1 \sim R^4$ 的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 及 $R^1 \sim R^4$ 所包含的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ ,优选为 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -未取代的烷基。

[0131]  $R^1 \sim R^4$ 的至少一者优选包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构,从进一步提高荧光强度的观点出发, $R^1$ 及 $R^2$ 的至少一者和 $R^3$ 及 $R^4$ 的至少一者更优选包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构。上述由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构优选作为 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 直接键合到与上述次甲基链直接键合的杂环上。

[0132] 上述 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -中的 $m$ 与上述 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 中的 $m$ 含义相同。

[0133]  $R^1 \sim R^4$ 的取代基相对于花青素骨架(平面)向垂直方向突出,因此推测通过包含由 $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -表示的结构作为该取代基,稠环部分不易发生 $\pi-\pi$ 相互作用(缔合抑制效果增强),能够抑制由缔合引起的荧光强度的下降。

[0134] (2)  $R^{11} \sim R^{13}$

[0135]  $R^{11} \sim R^{13}$ 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基或卤原子。相邻的基团彼此可以相互键合而形成5元环或6元环。

[0136] 能够用作 $R^{11} \sim R^{13}$ 的烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基及卤原子与后述的取代基组T中的烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基及卤原子含义相同,优选的范围也相同。

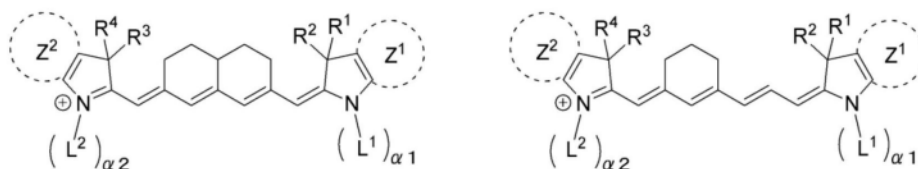
[0137] 能够用作 $R^{11} \sim R^{13}$ 的烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基及氨基可以分别独立地未取代,也可以具有取代基。

[0138] 作为 $R^{11} \sim R^{13}$ 中的烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基及氨基可以具有的取代基,可举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为烷氧基或磺基。

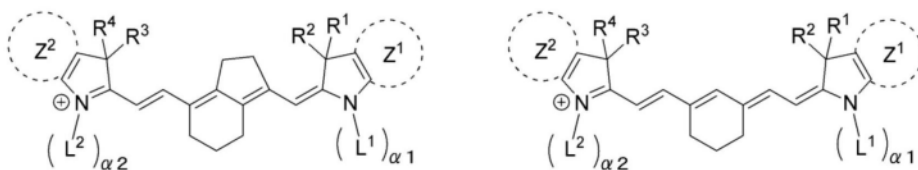
[0139]  $R^{11} \sim R^{13}$ 中,相邻的基团彼此相互键合而形成的5元环或6元环可以具有芳香族性或脂肪族性中的任一种,优选为脂肪族性。并且,优选形成6元环。化合物中的上述5元环或6元环的数量没有特别限制,优选为1或2个,更优选为1个。

[0140] 例如,以 $n=3$ 的情况为例,作为具有 $R^{11} \sim R^{13}$ 中相邻的基团彼此键合而形成的环的结构,可优选举出下述结构。另外,在下述例中,记载了未形成环结构的 $R^{11} \sim R^{13}$ 为氢原子,环结构不具有取代基的结构,但并不限于这些。

[0141] [化学式6]



[0142]



[0143]  $R^{11}$ 及与环 $Z^2$ 稠合而成的杂环键合的碳原子所具有的 $R^{13}$ 优选为氢原子。

[0144]  $R^{12}$ 及上述以外的 $R^{13}$ 优选为氢原子、烷基、芳氧基或芳硫基,更优选为氢原子、烷基或芳氧基。

[0145]  $R^{11} \sim R^{13}$ 的至少一者优选为芳氧基或芳硫基, $R^{12}$ 及上述与假吡啶环键合的碳原子所具有的 $R^{13}$ 以外的 $R^{13}$ 中的至少一者更优选为芳氧基或芳硫基。

[0146]  $R^{11} \sim R^{13}$ 中, $R^{11}$ 及与环 $Z^2$ 稠合而成的杂环键合的碳原子所具有的 $R^{13}$ 以外的 $R^{12} \sim R^{13}$ 中的相邻的基团彼此优选相互键合而形成5元环或6元环,更优选形成6元环。并且,优选在连接环 $Z^1$ 稠合而成的杂环与环 $Z^2$ 稠合而成的杂环的键的中心部分形成上述5元环或6元环。在连接环 $Z^1$ 稠合而成的杂环与环 $Z^2$ 稠合而成的杂环的键的中心部分形成的环表示包含来自2个杂环的键原子数相等的碳原子作为成环原子的环。

[0147] (3)  $L^1$ 、 $L^2$

[0148]  $L^1$ 及 $L^2$ 分别独立地表示可以具有取代基的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。 $R^{21}$ 及 $m$ 与上述 $R^{21}$ 及 $m$ 含义相同。

[0149] 作为 $L^1$ 及 $L^2$ 中的烷基可以具有的取代基,可举出烷氧基、羧基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺基及膦酰基以及由这些取代基的组合构成的基团。并且,能够举出后述的能够与生物物质键合的取代基。另外,上述烷氧基、羧基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺基及膦酰基以及由这些取代基的组合构成的基团中的烷基部分可以具有后述的能够与生物物质键合的取代基。

[0150] 能够用作 $L^1$ 及 $L^2$ 的烷基与后述的取代基组T中的烷基含义相同。

[0151] 未取代的烷基的碳原子数优选为1~6,更优选为1~4,进一步优选为1~3。

[0152] 具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数优选为1~10,更优选为1~8,进一步优选为1~7,进一步优选为1~6,进一步优选为1~5。并且,构成具有取代基的烷基的最长链的原子数优选为3~14,更优选为3~12,进一步优选为3~10。

[0153] 作为能够用作 $L^1$ 及 $L^2$ 的具有取代基的烷基,从进一步提高水溶性的观点出发,优选具有烷氧基、羧基、磺基及膦酰基的至少1个作为取代基的烷基,更优选具有羧基及磺基的至少1个作为取代基的烷基。另外,也可以是具有由上述优选的取代基(烷氧基、羧基、磺基及膦酰基)和这些取代基以外的基团的组合构成的取代基的烷基。

[0154] 并且,也能够优选适用上述 $R^1 \sim R^4$ 能够采用的具有取代基的烷基的形态。

[0155] 能够用作 $L^1$ 及 $L^2$ 的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 能够优选适用上述 $R^1 \sim R^4$ 中的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 的记载。

[0156] 作为能够用作 $L^1$ 及 $L^2$ 的 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ , $R^{21}$ 优选为在末端具有羧基或能够与生物物质键合的取代基的烷基。在该情况下,羧基或能够与生物物质键合的取代基可以直接取代烷基,也可以作为由烷氧基羰基和羧基或能够与生物物质键合的取代基的组合构成的基团取代。

[0157] (4) 环 $Z^1$ 及环 $Z^2$

[0158] 环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 表示由选自碳原子及氮原子中的成环原子形成的6元环,可以具有取代基,也可以形成稠环。从进一步提高荧光强度的观点出发,环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 优选为单环。

[0159] 其中,环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的至少一者是由后述通式(Z $\alpha$ )表示的苯环,或满足后述规定(Z $\beta$ )的含氮6元环。

[0160] 作为能够用作环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的由选自碳原子及氮原子中的成环原子形成的6元环,可以是脂肪族环,也可以是芳香族环,但优选为芳香族环。

[0161] 作为上述6元环,例如,可举出烃环或含氮杂环,具体而言,可举出苯环、吡啶环、嘧啶环、哒嗪环、吡嗪环及1,2,3或1,2,4-三嗪(triazine)环,优选为苯环或吡啶环。并且,还可举出通过共轭结构的记载的方法使这些芳香族环与成环原子的种类及位置相同的脂肪族环。

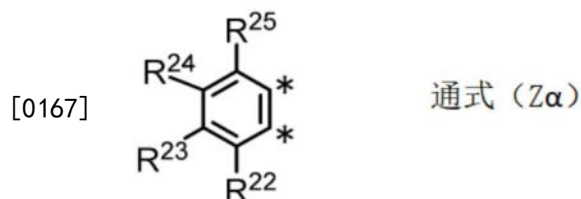
[0162] 作为上述6元环可以具有的取代基,可举出后述的取代基组T中的取代基,优选烷基、烷氧基、芳基、羧基、磺基、膦酰基、磺酰胺基、硝基或卤原子,更优选烷基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子。

[0163] 从提高水溶性及抑制缔合的观点出发,环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 优选分别独立地具有1个以上的亲水性基团,更优选在构成环 $Z^1$ 或环 $Z^2$ 的环的每1个具有至少1个亲水性基团。例如,表示更优选在环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 均为萘环的情况下,构成环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 的环的数量均为2,且环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 均具有至少2个亲水性基团。只要是可能的结构,则上限值没有特别限制,能够配合后述的作为化合物整体的亲水性基团的数量适当调整。

[0164] 作为亲水性基团,没有特别限制,例如,可举出具有取代基的烷氧基、羧基、磺基及膦酰基,优选为磺基。

[0165] (由通式(Z $\alpha$ )表示的苯环)

[0166] [化学式7]



[0168] 上述式中,R<sup>22</sup>表示烷基、烷氧基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子。

[0169] R<sup>23</sup>~R<sup>25</sup>表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子,相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0170] 由通式(Z $\alpha$ )表示的结构在\*的位置与通式(1)的含有上述氮原子的杂环键合,并使R<sup>22</sup>成为L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子的邻位。

[0171] R<sup>22</sup>中的烷基、烷氧基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子分别与后述的取代基组T中的烷基、烷氧基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子含义相同。

[0172] 能够用作R<sup>23</sup>~R<sup>25</sup>的烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子分别与后述的取代基组T中的烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子含义相同。

[0173] 作为R<sup>23</sup>~R<sup>25</sup>中相邻的基团彼此相互键合而形成的稠环,没有特别限制,可优选举出苯环,作为环 $Z^1$ 或环 $Z^2$ ,可优选举出萘环。

[0174] R<sup>22</sup>优选为烷基或磺基。

[0175] R<sup>23</sup>~R<sup>25</sup>优选为氢原子、磺基、硝基或卤原子,更优选为氢原子、磺基或卤原子。

[0176] (规定(Z $\beta$ ))

[0177] 规定(Z $\beta$ ):相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子位于邻位的成环原子为氮原子的含氮6元环。

[0178] 作为满足上述规定 (ZB) 的含氮6元环,例如,可举出吡啶环、嘧啶环、哒嗪环、吡嗪环及1,2,3或1,2,4-三嗪环,优选为吡啶环。

[0179] 优选为环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 不会同时满足规定 (ZB)。

[0180] 满足规定 (ZB) 的含氮6元环含有相对于 $L^1$ 或 $L^2$ 所键合的氮原子位于邻位的成环氮原子,可以在作为成环原子的氮原子上具有取代基,作为可以具有的取代基,具体而言,能够举出能够用作上述 $R^{23} \sim R^{25}$ 或 $L^1$ 或 $L^2$ 的取代基。

[0181] 满足规定 (ZB) 的含氮6元环可以在除氮原子以外的成环原子上具有取代基,具体而言,能够举出能够用作上述 $R^{23} \sim R^{25}$ 或 $L^1$ 或 $L^2$ 的取代基。

[0182] (5)  $n$ 、 $\alpha_1$ 及 $\alpha_2$

[0183]  $n$ 为1~3的整数,优选为2或3。

[0184]  $\alpha_1$ 及 $\alpha_2$ 为0或1。 $\alpha_1$ 为0表示不具有 $L^1$ , $\alpha_1$ 为1表示具有 $L^1$ 。同样地, $\alpha_2$ 为0表示不具有 $L^2$ , $\alpha_2$ 为1表示具有 $L^2$ 。

[0185] 在环 $Z^1$ 满足上述规定 (ZB) 的情况下, $\alpha_1$ 可以取0。并且,在环 $Z^2$ 满足上述规定 (ZB) 的情况下, $\alpha_2$ 可以取0。

[0186]  $L^1$ 、 $L^2$ 及上述规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0187] 由上述通式 (1) 表示的化合物通过上述羧基或能够与生物物质键合的取代基与生物物质键合,能够获得目标标记生物物质。另外,羧基能够通过常规方法容易地衍生能够与生物物质键合的取代基。

[0188] 在本发明中,“能够与生物物质键合的取代基”包括能够与由羧基衍生的生物物质键合的取代基。

[0189] 如此,由上述通式 (1) 表示的化合物通过在花青骨架结构中的特定的位置具有的取代基(具体而言, $L^1$ 、 $L^2$ 或上述规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基)与生物物质键合,因此认为所获得的标记生物物质如上所述显示出优异的荧光强度。

[0190]  $L^1$ 、 $L^2$ 及上述规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基中,具有羧基或能够与生物物质键合的取代基的基团的数量只要合计为至少1个以上即可,从检测对象物质的定量的观点出发,优选为1~3个,更优选为1个或2个,进一步优选为1个。

[0191] 从进一步提高荧光强度的观点出发, $L^1$ 、 $L^2$ 及上述规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少1个优选包含羧基或能够与生物物质键合的取代基和 $m=1 \sim 10$ 且由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-$ 表示的结构。认为这是因为具有适度的亲水性和适度的排除体积效果。

[0192] 并且,从作为化合物赋予充分的亲水性的观点出发,由上述通式 (1) 表示的化合物优选作为化合物整体具有2个以上的亲水性基团,更优选具有2~8个,进一步优选具有2~6个,尤其优选具有3~6个。

[0193] 作为亲水性基团,能够适用前述环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 能够采用的亲水性基团的记载。

[0194] 亲水性基团的位置没有特别限制,作为具有上述亲水性基团的基团,例如,可优选举出 $R^{11} \sim R^{13}$ 、环 $Z^1$ 、环 $Z^2$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 。

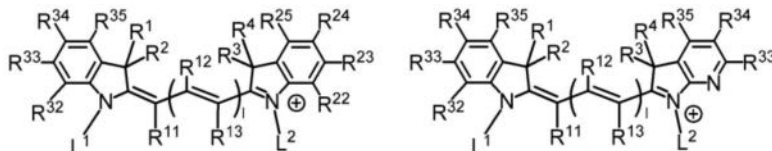
[0195] 并且,在 $Z^1$ 及 $Z^2$ 的至少一者是满足上述规定 (ZB) 的含氮6元环的情况下, $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^1 \sim R^4$ 及上述规定 (ZB) 中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基(例如,后述的通式 (2-3) 的 $R^{31}$ ) 中的两者可以相互键合而形成包含重复数 $2n+3$ (在后述的通式 (2-1) ~ (2-3) 中为重复

数 $2n+3$ 的次甲基链的环。作为如此形成的环,例如,可举出由后述通式(5-1)~(5-4)中的任一个表示的结构。在形成这样的环的情况下,认为通过抑制旋转(环 $Z^1$ 耦合而成的杂环及环 $Z^2$ 耦合而成的杂环的旋转),能够进一步提高荧光强度。

[0196] <由通式(2-1)~(2-3)中的任一个表示的化合物>

[0197] 本发明的由通式(1)表示的化合物优选由下述通式(2-1)~(2-3)中的任一个表示。

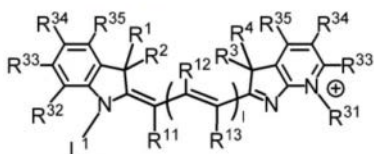
[0198] [化学式8]



通式(2-1)

通式(2-2)

[0199]



通式(2-3)

[0200] 式中, $R^{31}$ 表示可以具有取代基的烷基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0201]  $R^{32} \sim R^{35}$ 表示氢原子、烷基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子,相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0202]  $R^1 \sim R^4$ 、 $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 及 $R^{22} \sim R^{25}$ 与上述通式(1)中的 $R^1 \sim R^4$ 、 $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 及 $R^{22} \sim R^{25}$ 含义相同,优选的范围也相同。

[0203] 1表示2或3。另外,1为整数。

[0204] 与由上述通式(1)表示的化合物同样地,由上述通式(2-1)~(2-3)中的任一个表示的化合物中, $L^1$ 、 $L^2$ 及 $R^{31}$ 的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0205] 其中, $L^1$ 、 $L^2$ 、 $R^1 \sim R^4$ 及 $R^{31}$ 中的两者不会相互键合而形成包含重复数 $2n+3$ 的次甲基链的环。

[0206] 其中,由式(2-1)~(2-3)中的任一个表示的化合物是中性化合物。

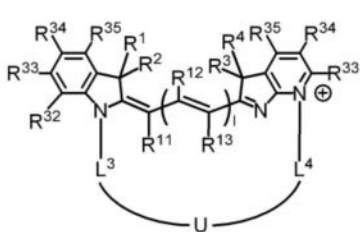
[0207] 能够用作 $R^{31}$ 的可以具有取代基的烷基及 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 与能够用作 $L^1$ 或 $L^2$ 的可以具有取代基的烷基及 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 含义相同。

[0208] 能够用作 $R^{32} \sim R^{35}$ 的烷基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子与上述通式(Za)中的能够用作 $R^{23} \sim R^{25}$ 的烷基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基及卤原子含义相同。

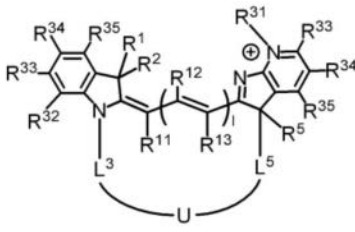
[0209] <由通式(5-1)~(5-4)中的任一个表示的化合物>

[0210] 本发明的由通式(1)表示的化合物优选由下述通式(5-1)~(5-4)中的任一个表示。

[0211] [化学式9]

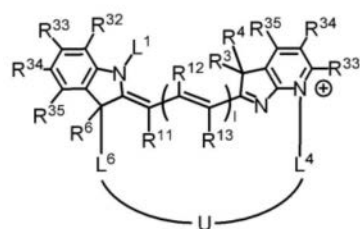


通式 (5-1)

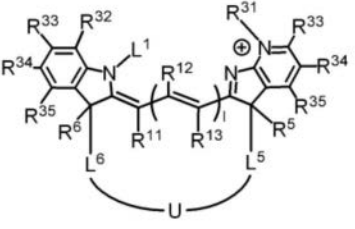


通式 (5-2)

[0212]



通式 (5-3)



通式 (5-4)

[0213] 式中,  $R^1 \sim R^6$  表示可以具有取代基的烷基、芳基、杂芳基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0214]  $R^{31}$  与上述通式 (2-1) ~ (2-3) 中的  $R^{31}$  含义相同, 优选的范围也相同。即,  $R^{31}$  表示可以具有取代基的烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 。

[0215]  $R^{32} \sim R^{35}$  与上述通式 (2-1) ~ (2-3) 中的  $R^{32} \sim R^{35}$  含义相同, 优选的范围也相同。即,  $R^{32} \sim R^{35}$  表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、磺酰胺基、硝基或卤原子, 相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0216] 1 表示 2 或 3。另外, 1 为整数。

[0217]  $L^3 \sim L^6$  表示亚烷基或  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基-\*。\* 表示与 U 的键合位置。

[0218] 连接基团 U 表示原子数 1 ~ 100 的 2 价连接基团。

[0219]  $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$  及 m 与上述通式 (1) 中的  $R^{11} \sim R^{13}$ 、 $R^{21}$ 、 $L^1$  及 m 含义相同, 只要没有特别说明, 优选的范围也相同。

[0220]  $R^1 \sim R^6$ 、 $L^1$ 、 $R^{31}$  及  $L^3 \sim L^6$  的至少一者包含由  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ - 表示的结构。m 与上述 m 含义相同。

[0221]  $L^1$ 、 $R^{31}$ 、 $L^3 \sim L^6$  及连接基团 U 的至少一者包含羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0222] 其中, 由式 (5-1) ~ (5-4) 中的任一个表示的化合物是中性化合物。

[0223] 能够用作  $L^3$  的亚烷基相当于从能够用作  $L^1$  及  $L^2$  的具有取代基的烷基中去除 1 个氢原子或取代基而获得的亚烷基。能够用作  $L^4$  的亚烷基相当于从满足规定 (ZB) 的含氮 6 元环的成环氮原子上可以具有的取代基即烷基中去除 1 个氢原子或取代基而获得的亚烷基。能够用作  $L^5$  及  $L^6$  的亚烷基相当于从能够用作  $R^1 \sim R^4$  的具有取代基的烷基中去除 1 个氢原子或取代基而获得的亚烷基。

[0224] 能够用作  $L^3 \sim L^6$  的亚烷基的亚烷基部分的碳原子数能够优选适用  $L^1$  及  $L^2$  中的具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数的记载。

[0225] 能够用作  $L^3$  的  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基-\* 相当于从能够用作  $L^1$  及  $L^2$  的  $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$  ( $R^{21}$  表示具有取代基的烷基。) 中作为  $R^{21}$  的烷基中去除 1 个氢原子或取代基而获得的  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基。

[0226] 能够用作  $L^4$  的  $-(CH_2-CH_2-O)_m$ -亚烷基-\* 相当于从满足规定 (ZB) 的含氮 6 元环的成

环氮原子上可以具有的取代基即  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-\text{R}^{21}$  ( $\text{R}^{21}$  表示具有取代基的烷基。) 中去除 1 个氢原子或取代基而获得的  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  亚烷基。

[0227] 能够用作  $\text{L}^5$  及  $\text{L}^6$  的  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  亚烷基-\* 相当于从能够用作  $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  的  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-\text{R}^{21}$  ( $\text{R}^{21}$  表示具有取代基的烷基。) 中去除 1 个氢原子或取代基而获得的  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  亚烷基。

[0228] 在能够用作  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  的  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  亚烷基-\* 中,  $m$  优选为 1~10, 更优选为 1~8, 亚烷基部分的碳原子数能够优选适用  $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  中的具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数的记载。

[0229] 从进一步提高荧光强度的观点出发, 化合物中所包含的全部  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  (即, 化合物中所包含的  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  各自) 优选包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构。对各通式具体而言, 优选在通式 (5-2) 中  $\text{L}^3$  及  $\text{L}^5$  包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构, 在通式 (5-3) 中  $\text{L}^4$  及  $\text{L}^6$  包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构, 在通式 (5-4) 中  $\text{L}^5$  及  $\text{L}^6$  包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构。

[0230] 并且, 在上述通式 (5-1) ~ (5-3) 中, 优选  $\text{R}^1$  及  $\text{R}^2$  的至少一者和  $\text{R}^3$  及  $\text{R}^4$  的至少一者包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构。对各通式具体而言, 优选在通式 (5-1) 中  $\text{R}^1$  及  $\text{R}^2$  的至少一者和  $\text{R}^3$  及  $\text{R}^4$  的至少一者包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构, 在通式 (5-2) 中  $\text{R}^1$  及  $\text{R}^2$  的至少一者包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构, 在通式 (5-3) 中  $\text{R}^3$  及  $\text{R}^4$  的至少一者包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构。 $m$  与上述通式 (1) 中的  $m$  含义相同。

[0231] 即, 这表示优选位于通式 (5-1) ~ (5-3) 中的聚次甲基链的两端的 2 个杂环均满足下述条件 I。

[0232] (条件 I)

[0233] 作为杂环的成环原子的  $\text{sp}^3$  碳原子中的不具有与连接基团 U 键合的取代基的  $\text{sp}^3$  碳原子中, 该  $\text{sp}^3$  碳原子上的至少 1 个取代基包含由  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_m-$  表示的结构。

[0234] 构成连接基团 U 的总原子数为 1~100, 优选为 10~90, 更优选为 20~90, 进一步优选为 30~80。

[0235] 连接基团 U 优选为选自亚烷基、-O-、- $\text{NR}^{50}$ -、-COO-、-CONR<sup>50</sup>- 及 - $\text{SO}_2\text{NR}^{50}$ - 中的 3 个以上键合而形成的 2 价连接基团。 $\text{R}^{50}$  表示氢原子或烷基。

[0236] 能够用作连接基团 U 的亚烷基的亚烷基部分的碳原子数优选为 1~10, 更优选为 1~8, 进一步优选为 1~7, 尤其优选为 1~6, 最优选为 1~5。

[0237] 能够用作  $\text{R}^{50}$  的烷基能够优选适用上述  $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$  中的烷基的记载。

[0238] 作为  $\text{R}^{50}$ , 优选为氢原子。

[0239] 构成连接基团 U 的上述亚烷基、-O-、- $\text{NR}^{50}$ -、-COO-、-CONR<sup>50</sup>- 及 - $\text{SO}_2\text{NR}^{50}$ - 的数量优选为 3~11, 更优选为 3~7, 进一步优选为 3~5, 尤其优选为 3。

[0240] 连接基团 U 中, 与  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  的连接部优选为 -O-、- $\text{NR}^{50}$ -、-COO-、-CONR<sup>50</sup>- 或 - $\text{SO}_2\text{NR}^{50}$ -。即, 优选连接基团 U 经由构成连接基团 U 的 -O-、- $\text{NR}^{50}$ -、-COO-、-CONR<sup>50</sup>- 或 - $\text{SO}_2\text{NR}^{50}$ - 与  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  的亚烷基键合。连接基团 U 更优选为 2 价连接基团, 其中, 与  $\text{L}^3 \sim \text{L}^6$  的连接部是 -O-、- $\text{NR}^{50}$ -、-COO-、-CONR<sup>50</sup>- 或 - $\text{SO}_2\text{NR}^{50}$ -, 并且上述连接部彼此通过亚烷基连接。

[0241] 连接基团 U 优选为具有羧基或能够与生物物质键合的取代基的 2 价连接基团。在连接基团 U 中, 作为具有羧基或能够与生物物质键合的取代基的位置, 可举出亚烷基或作为  $\text{R}^{50}$  的烷基, 优选为亚烷基。

[0242] 在连接基团U中,羧基或能够与生物物质键合的取代基可以与亚烷基或作为R<sup>50</sup>的烷基直接键合,也可以经由连接基团ZZZ键合。

[0243] 作为上述连接基团ZZZ,可举出亚烷基、-NR<sup>60</sup>-、-COO-、-CONR<sup>60</sup>-及-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>m</sub>-、以及由这些取代基的组合构成的基团。组合的数量例如优选为2~7,更优选为2~5。

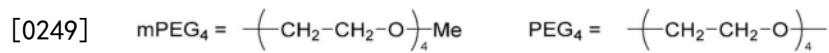
[0244] R<sup>60</sup>为氢原子或烷基,优选为氢原子。作为能够用作R<sup>60</sup>的烷基,能够优选适用上述R<sup>50</sup>中的烷基的记载,但能够用作R<sup>60</sup>的烷基不会具有羧基或能够与生物物质键合的取代基。

[0245] m表示重复数,优选为1~10,更优选为1~8,进一步优选为1~4。

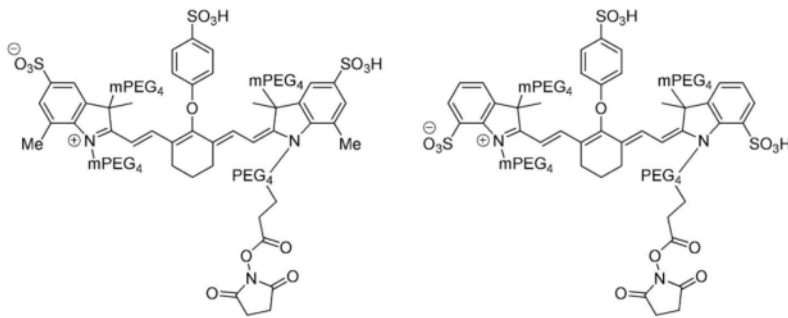
[0246] R<sup>12</sup>及与环Z<sup>2</sup>稠合而成的杂环键合的碳原子所具有的R<sup>13</sup>以外的R<sup>13</sup>优选为氢原子、烷基、芳氧基或芳硫基,更优选为氢原子、烷基或芳氧基,进一步优选为氢原子。

[0247] 以下,示出本发明的由通式(1)表示的化合物的具体例,但本发明并不限于这些化合物。在下述具体例中,磺基可以将氢原子解离而采用盐结构。在下述具体例中,mPEG<sub>4</sub>及PEG<sub>4</sub>分别表示以下结构,X表示氢原子、氯原子或溴原子,Me表示甲基。其中,PEG<sub>4</sub>在碳原子侧与氮原子、或环Z<sup>1</sup>或环Z<sup>2</sup>稠合而成的杂环的成环原子键合。

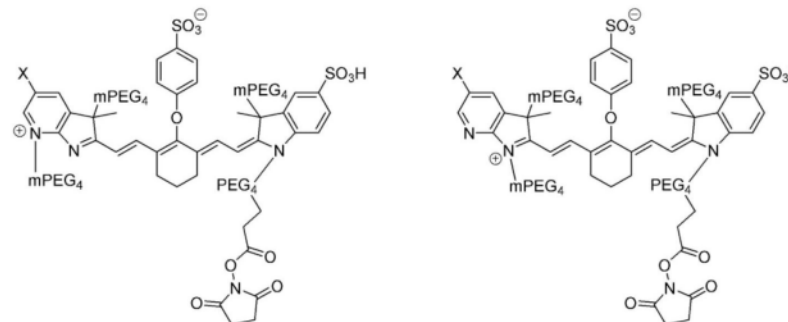
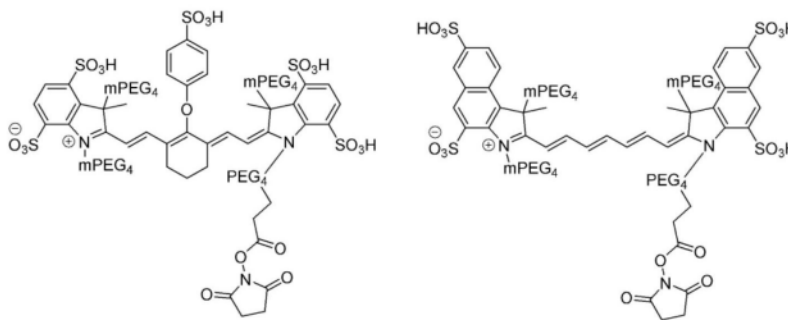
[0248] [化学式10]



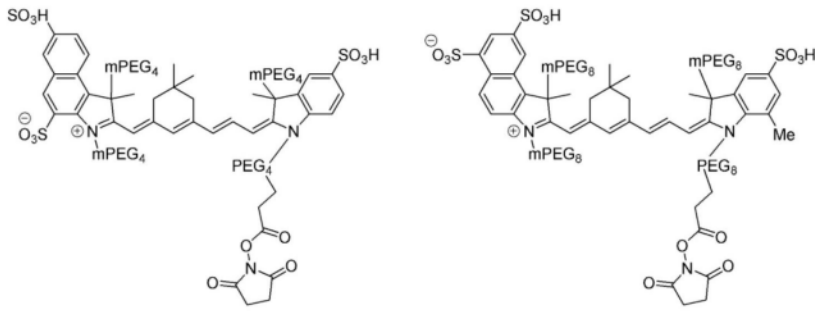
[0250] [化学式11]



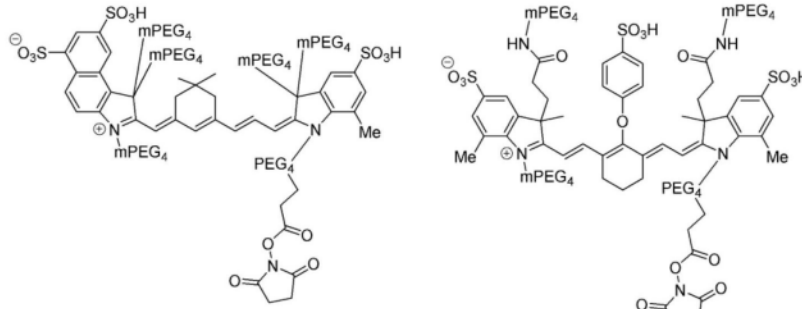
[0251]



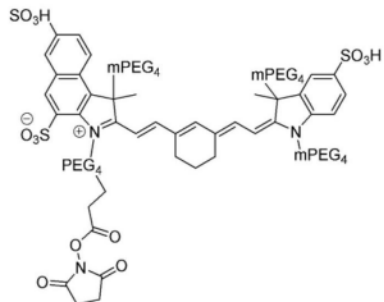
[0252] [化学式12]

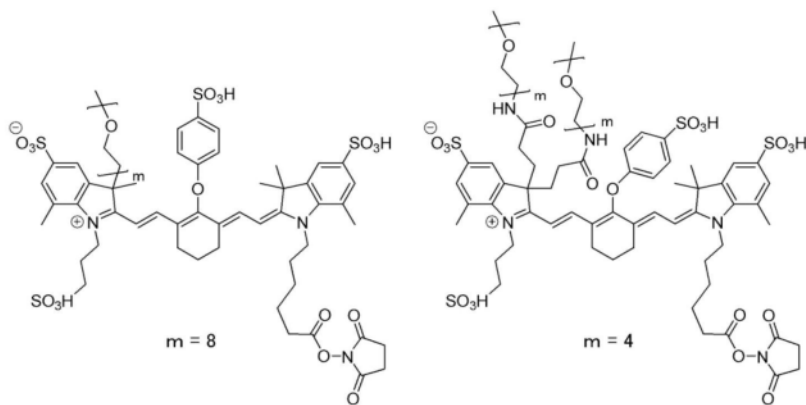


[0253]

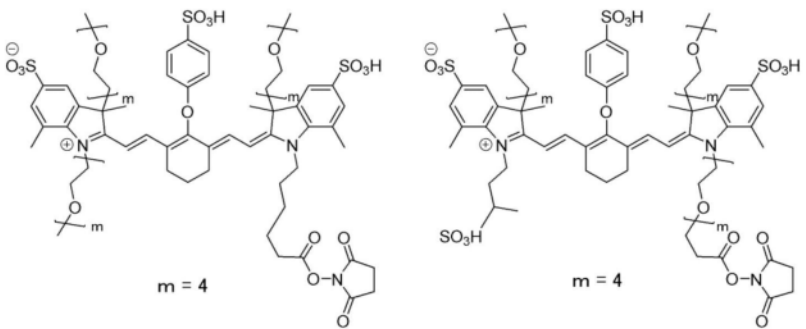
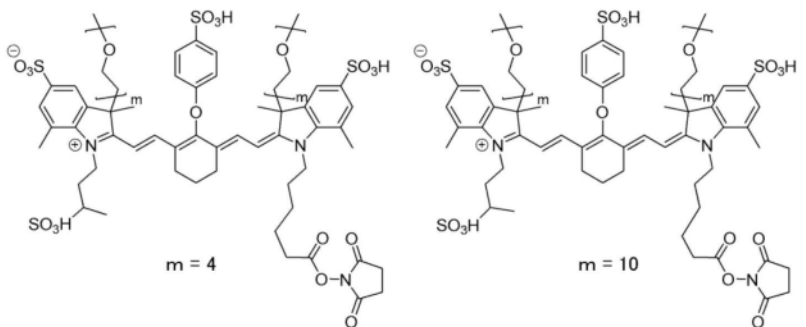


[0254] [化学式13]



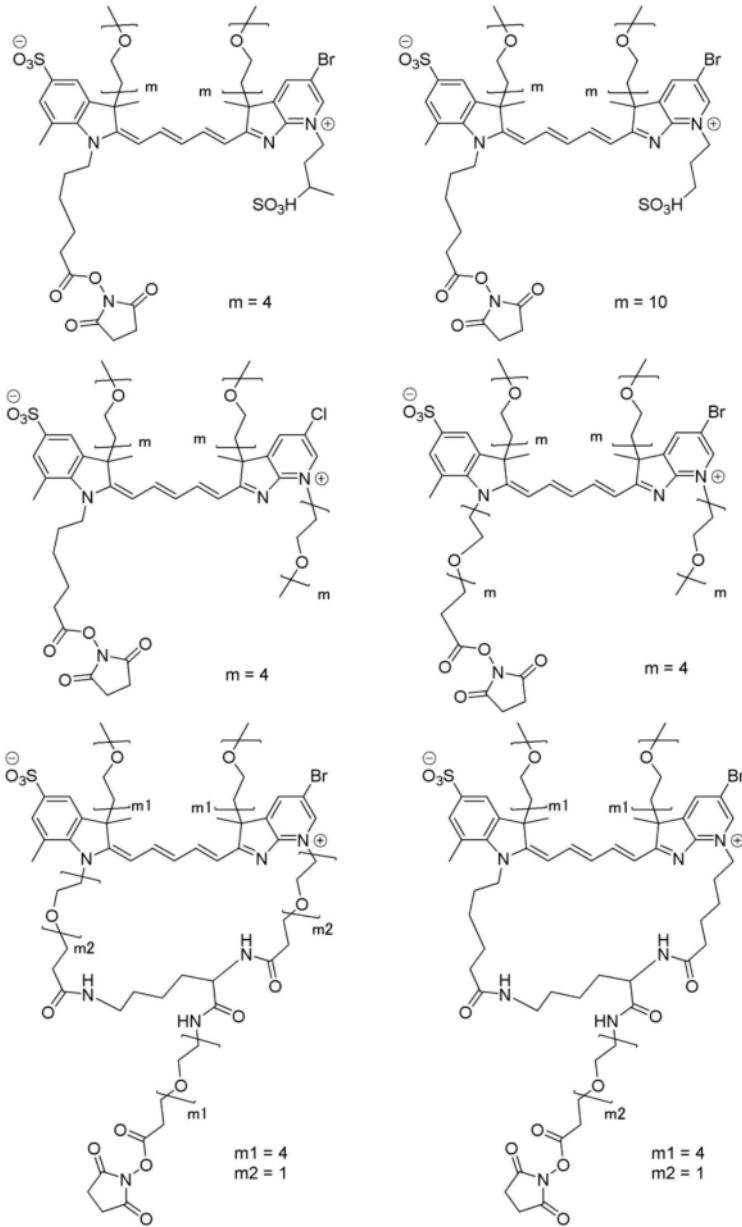


[0255]

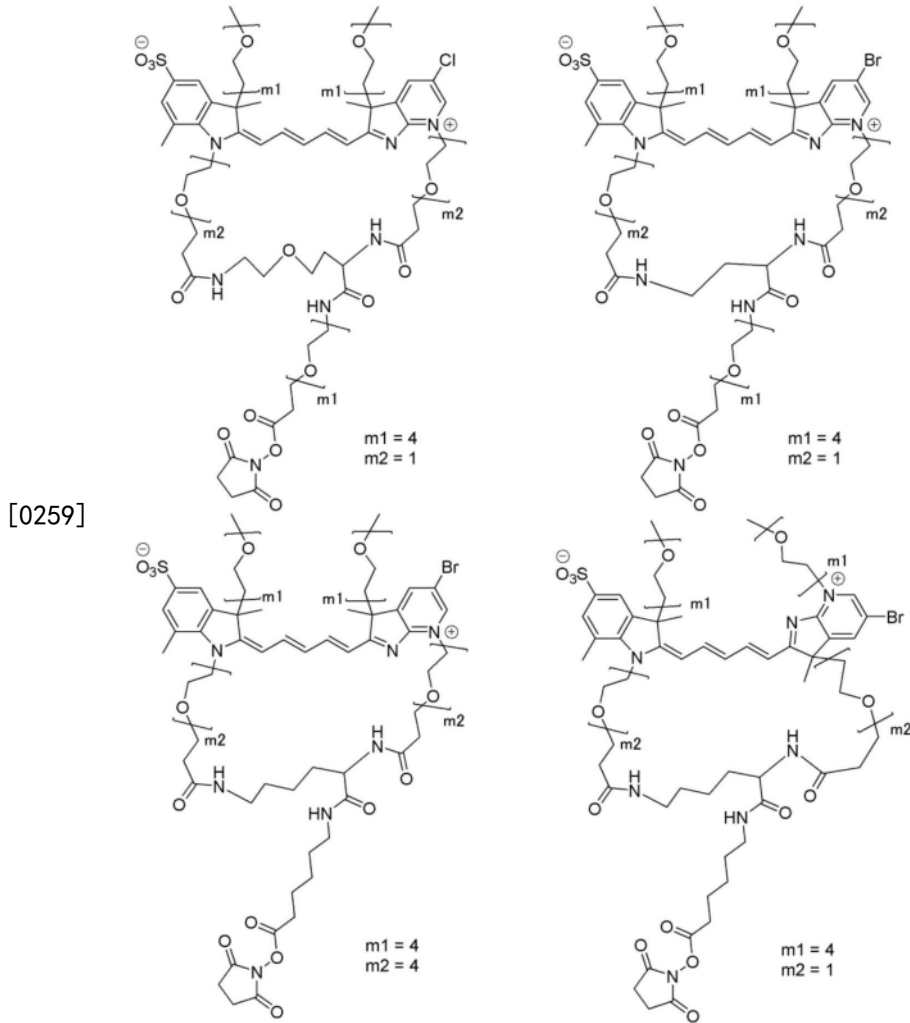


[0256] [化学式14]

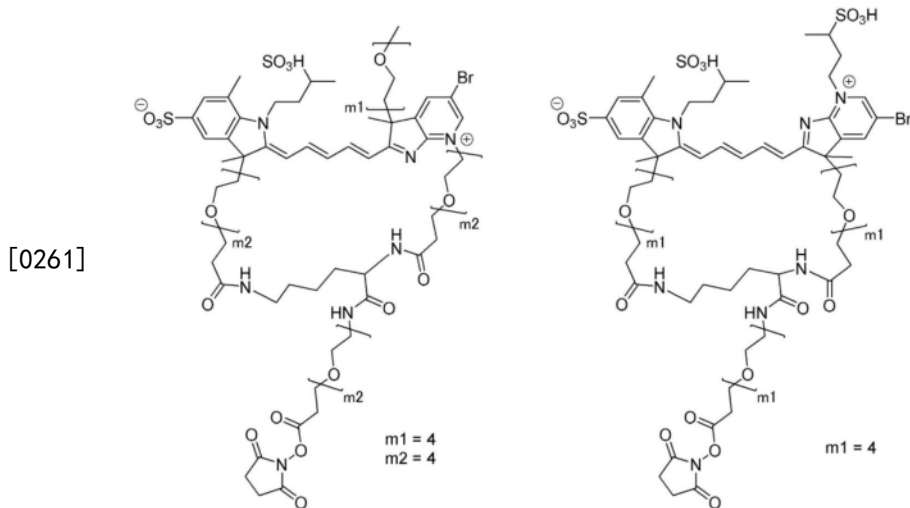
[0257]



[0258] [化学式15]



[0260] [化学式16]



[0262] 本发明的由通式(1)表示的化合物能够通过 $L^1$ 、 $L^2$ 及上述规定(ZB)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少1个所具有的能够与生物物质键合的取代基,与蛋白质、肽、氨基酸、核酸、糖链及脂质等生物物质键合,能够用作标记生物物质。

[0263] 作为能够与生物物质键合的取代基,只要是用于与生物物质作用(包括附着)或键合的基团,则能够没有特别限制地使用,能够举出国际公开第2002/026891号等中记载的取

代基。其中,可优选举出NHS酯结构(N-羟基琥珀酰亚胺酯)、琥珀酰亚胺结构、马来酰亚胺结构、叠氮基、乙炔基、肽结构(聚氨基酸结构)、长链烷基(优选为碳原子数12~30)、季铵基。

[0264] 本发明的由通式(1)表示的化合物中,作为在 $L^1$ 、 $L^2$ 及上述规定(ZB)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少任一个上至少具有能够与生物物质键合的取代基的化合物的具体例,例如,可举出后述标记生物物质中的例示化合物。并且,在上述本发明的由通式(1)表示的化合物中的例示化合物中,如作为后述标记生物物质中的例示化合物所示那样具有能够与生物物质键合的取代基的形态也可以作为具体例举出。另外,本发明并不限于这些化合物。例如,在这些具体例中,关于羧基及磺基等具有解离性的氢原子的基团,可以将氢原子解离而采用盐结构。

[0265] 关于本发明的由通式(1)表示的化合物,将化合物结构设为通式(1)中规定的结构,除此以外,能够用公知的方法合成。例如,可举出专利文献1、专利文献2等中记载的方法。

[0266] 关于具有能够与生物物质键合的取代基的化合物,将化合物结构设为通式(1)中规定的结构,除此以外,能够用公知的方法合成。例如,能够参考Bioconjugate Techniques (Third Edition、Greg T.Hermanson著)。

[0267] <<标记生物物质>>

[0268] 本发明的标记生物物质是本发明的由通式(1)表示的化合物与生物物质键合而成的物质。本发明的由通式(1)表示的化合物具有荧光性,显示出适合用于近红外区域的显色的吸收波长峰和优异的荧光强度,因此能够优选用于标记生物物质。由通式(1)表示的化合物与生物物质之间的键合可以是由通式(1)表示的化合物与生物物质直接键合的方式,也可以是经由连接基团连接的方式。

[0269] 作为上述生物物质,可优选举出蛋白质、肽、氨基酸、核酸、糖链及脂质。作为蛋白质,可优选举出抗体,作为脂质,可优选举出磷脂、脂肪酸及甾醇,更优选磷脂。

[0270] 上述生物物质中,作为临床病理上有用的物质没有特别限制,例如可举出Ig (Immunoglobulin:免疫球蛋白)G、IgM、IgE、IgA、IgD等免疫球蛋白、补体、C反应蛋白(CRP)、铁蛋白、 $\alpha_1$ 微球蛋白、 $\beta_2$ 微球蛋白等血浆蛋白及它们的抗体、 $\alpha$ -甲胎蛋白、癌胚抗原(CEA)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、CA(carbohydrate antigen:碳水化合物抗原(糖链抗原))19-9、CA-125等肿瘤标记及它们的抗体、黄体化激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、雌激素、胰岛素等激素类及它们的抗体、乙型肝炎病毒(HBV)相关抗原(HBs、HBe、HBc)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、成人T细胞白血病(ATL)等病毒感染相关物质及它们的抗体等。

[0271] 而且,也可举出白喉病菌、肉毒杆菌、支原体、苍白密螺旋体等细菌及它们的抗体、弓形浆虫、滴虫、利什曼虫、锥虫、疟原虫等原虫类及它们的抗体、ELM3、HM1、KH2、v6.5、v17.2、v26.2(源自小鼠129、129/SV、C57BL/6、BALB/c)等ES细胞(Embryonic Stem Cell:胚胎干细胞)及它们的抗体、苯妥英、苯巴比妥等抗癫痫药、奎尼丁、地高辛等心血管药、茶碱等抗哮喘药、氯霉素、庆大霉素等抗生素等药物类及它们的抗体、其他酶、外毒素(苯乙烯吡啶(styrelidine 0)等)及它们的抗体等。并且,也能够使用Fab' 2、Fab、Fv等抗体片段。

[0272] 作为本发明的由通式(1)表示的化合物(以下,也简称为化合物(1))与生物物质相互作用而键合的具体方式,例如可举出下述记载的方式。

[0273] 可举出：

[0274] i) 化合物(1)中的肽与生物物质中的肽的非共价键(例如,氢键、包含螯合形成的离子键)或共价键；

[0275] ii) 化合物(1)中的长链烷基与生物物质中的脂质双层膜及脂质等的范德瓦尔斯力；

[0276] iii) 基于化合物(1)中的NHS酯(N-羟基琥珀酰亚胺酯)与生物物质中的氨基的反应的酰胺键；

[0277] iv) 基于化合物(1)中的马来酰亚胺基团与生物物质中的巯烷基(-SH)的反应的硫醚键；及

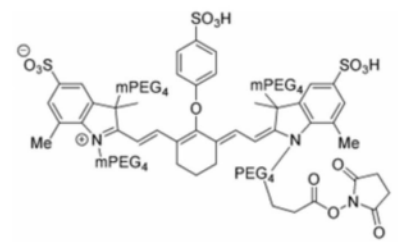

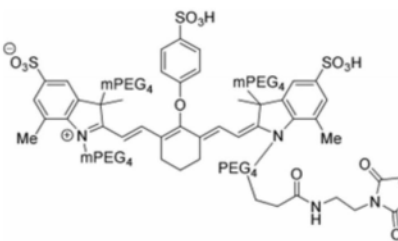
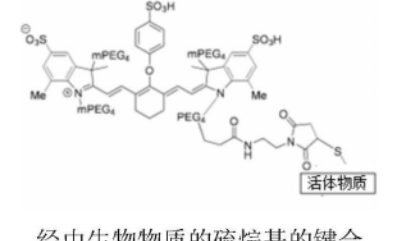
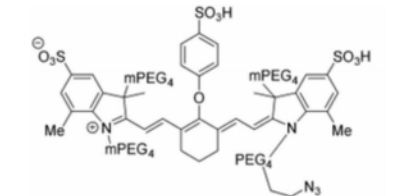
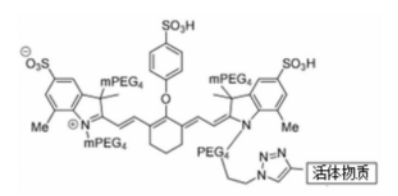
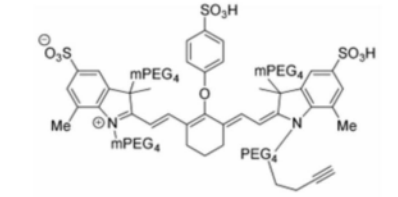
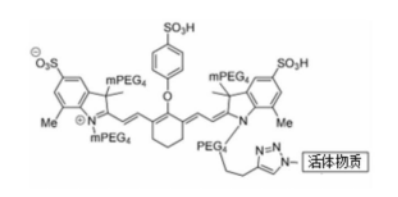
[0278] v) 基于化合物(1)中的叠氮基与生物物质中的乙炔基的点击反应或基于化合物(1)中的乙炔基与生物物质中的叠氮基的点击反应的三唑环的形成。

[0279] 除了上述i)~v)的方式以外,例如也能够通过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中记载的方式键合。并且,在本发明的标记生物物质的制作中,也能够适当参考该文献中记载的方法等。

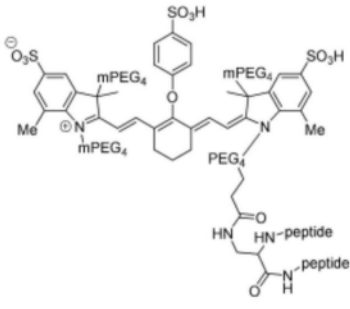
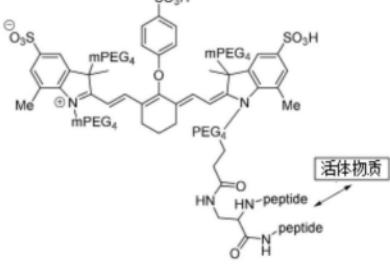
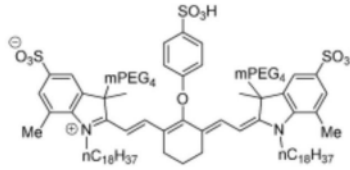
[0280] 以下示出由本发明的由通式(1)表示的化合物中的,在L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>及上述规定(Zβ)中的位于邻位的成环氮原子所具有的取代基的至少任一个上至少具有能够与生物物质键合的取代基的化合物和通过与其相互作用而键合的生物物质获得的本发明的标记生物物质的具体例,但本发明并不限于这些化合物等。在下述具体例中,关于磺基等具有解离性的氢原子的基团,可以将氢原子解离而采用盐结构。关于mPEG<sub>4</sub>及PEG<sub>4</sub>,与由前述通式(1)表示的化合物的具体例中的mPEG<sub>4</sub>及PEG<sub>4</sub>含义相同。

[0281] [化学式17]

[0282]

化合物例	产物(键合方式)
<p style="text-align: center;">NHS 酯结构</p> 	<p style="text-align: center;">经由生物物质的氨基的键合</p> 
<p style="text-align: center;">马来酰亚胺结构</p> 	<p style="text-align: center;">经由生物物质的硫烷基的键合</p> 
<p style="text-align: center;">叠氮结构</p> 	<p style="text-align: center;">经由生物物质的乙炔基的点击反应</p> 
<p style="text-align: center;">乙炔基结构</p> 	<p style="text-align: center;">经由生物物质的叠氮基的点击反应</p> 

[0283] [化学式18]

化合物例	产物(键合方式)
<p>[0284]</p>  <p>肽结构(聚氨基酸结构)</p>	 <p>经由生物物质的肽的键合</p>
 <p>长链烷基</p>	<p>经由生物物质的脂质双层膜或磷脂等的范德瓦尔斯力</p>

[0285] <含有标记生物物质的试剂>

[0286] 在含有本发明的标记生物物质的试剂中,本发明的标记生物物质没有特别限制,能够根据使用目的等适当选择其形态,例如溶解于生理盐水及磷酸缓冲液等水系介质中的溶液形态以及微粒子状粉末及冻结干燥粉末等固体形态等。

[0287] 例如,在使用本发明的标记生物物质作为荧光标记试剂的情况下,也能够用作含有上述任一种形态的标记生物物质的试剂。

[0288] <标记生物物质的用途>

[0289] 由本发明的由通式(1)表示的化合物获得的本发明的标记生物物质能够显示出优异的荧光强度,能够稳定地检测从通过光照射激励的标记生物物质释放的荧光。因此,本发明的标记生物物质能够适用于使用荧光标记的各种技术,例如,能够适合用作多色WB中的荧光标记试剂或活体荧光成像试剂。

[0290] 使用本发明的标记生物物质进行的荧光检测通常包括以下(i)~(iii)或(iv)~(vii)的工序。包括(i)~(iii)的工序的荧光检测与使用利用本发明的化合物进行荧光标记的一次抗体的直接法对应,包括(iv)~(vii)的工序的荧光检测与使用利用本发明的化合物进行荧光标记的二次抗体的间接法对应。

[0291] (i) 分别准备下述(a)及(b)的工序

[0292] (a) 含有作为目标的生物物质(以下,也称为“目标生物物质”)的试样

[0293] (b) 能够与上述(a)中的目标生物物质键合的生物物质(以下,也称为“一次生物物质”)与本发明的化合物键合而成的本发明的标记生物物质(以下,也称为“本发明的标记生物物质A”)

[0294] (ii) 准备上述(a)中的目标生物物质与上述(b)的本发明的标记生物物质A中的一次生物物质键合而成的键合体(以下,也称为“荧光标记的键合体A”)的工序

[0295] (iii) 向上述荧光标记的键合体A照射本发明的标记生物物质A吸收的波长区域的

光,检测本发明的标记生物物质A发出的荧光的工序

[0296] (iv) 分别准备下述(c)~(e)的工序

[0297] (c) 含有目标生物物质的试样

[0298] (d) 能够与上述(c)中的目标生物物质键合的生物物质(以下,也称为“一次生物物质”。)

[0299] (e) 能够与上述(d)的一次生物物质键合的生物物质(以下,也称为“二次生物物质”。)与本发明的化合物键合而成的本发明的标记生物物质(以下,也称为“本发明的标记生物物质B”。)

[0300] (v) 准备上述(c)中的目标生物物质与上述(d)的一次生物物质键合而成的键合体(以下,也称为“键合体b”。)的工序

[0301] (vi) 准备上述键合体b中的一次生物物质与本发明的标记生物物质B中的二次生物物质键合而成的键合体(以下,也称为“荧光标记的键合体B2”。)的工序

[0302] (vii) 向上述荧光标记的键合体B2照射本发明的标记生物物质B吸收的波长区域的光,检测本发明的标记生物物质B发出的荧光的工序

[0303] 作为能够与上述目标生物物质键合的生物物质(一次生物物质)及能够与一次生物物质键合的生物物质(二次生物物质),可举出上述本发明的标记生物物质中的生物物质。能够配合目标生物物质(受检体中的生物物质)或一次生物物质适当选择,能够选择能够与受检体中的生物物质或一次生物物质特异键合的生物物质。

[0304] 作为上述目标生物物质中的蛋白质,可举出所谓的疾病标记。作为疾病标记,没有特别限制,例如可举出 $\alpha$ -甲胎蛋白(AFP)、PIVKA-II(protein induced by vitamin K absence or antagonist II:抗原蛋白K缺失或抗原II反转的蛋白)、BCA225(breast carcinoma-associated antigen:乳腺癌胚胎相关)、碱性甲胎蛋白(BFP)、CA(carbohydrate antigen:癌胚抗原)15-3、CA19-9、CA72-4、CA125、CA130、CA602、CA54/61(CA546)、癌胚抗原(CEA)、DUPAN-2、弹性蛋白酶1、免疫抑制酸性蛋白(IAP)、NCC-ST-439、 $\gamma$ -精蛋白( $\gamma$ -Sm)、前列腺特异抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、神经特异烯醇酶(NSE)、Iba1、淀粉样蛋白 $\beta$ 、Tau、flotillin、鳞状细胞癌相关抗原(SCC抗原)、唾液酸LeX-i抗原(SLX)、SPan-1、组织多肽抗原(TPA)、唾液酸Tn抗原(STN)、CYFRA(cytokeratin:细胞角蛋白)胃蛋白酶原(PG)、C-反应性蛋白(CRP)、血清淀粉样蛋白A蛋白(SAA)、肌红蛋白、肌酸激酶(CK)、肌钙蛋白T、心室肌肌球蛋白轻链I等。

[0305] 上述目标生物物质可以是细菌,作为该细菌,可举出作为细胞微生物学性检查对象的细菌,虽没有特别限制,但例如可举出大肠杆菌、沙门氏菌、呼吸道病菌、对公众卫生产生问题的菌等。

[0306] 上述目标生物物质可以是病毒,作为该病毒的抗原,没有特别限制,例如可举出丙型、乙型肝炎病毒的抗原等肝炎病毒抗原、HIV病毒的p24蛋白抗原、CMV(巨细胞病毒)的pp65蛋白抗原、HPV(人乳头瘤病毒)的E6及E7蛋白等。

[0307] 在上述(i)或(iv)中,含有目标生物物质的试样没有特别限制,能够按照常规方法制备。

[0308] 并且,本发明的标记生物物质也没有特别限制,能够使能够与目标生物物质键合的生物物质与本发明的化合物按照常规方法键合而制备。键的形态及形成键的反应如上述

本发明的标记生物物质中所说明。

[0309] 在上述(v)中,目标生物物质与一次生物物质可以直接键合,也可以经由与目标生物物质及一次生物物质不同的其他生物物质键合。并且,在上述(vi)中,键合体b中的一次生物物质与本发明的标记生物物质B中的二次生物物质可以直接键合,也可以经由与一次生物物质及二次生物物质不同的其他生物物质键合。

[0310] 本发明的标记生物物质也能够用作直接法及间接法的任一者中的荧光标记抗体,优选用作间接法中的荧光标记抗体。

[0311] 在上述(ii)或(v)及(vi)中,本发明的标记生物物质等与目标生物物质的键合没有特别限制,能够按照常规方法进行。

[0312] 在上述(iii)或(vii)中,关于用于激励本发明的标记生物物质的波长,只要是能够激励本发明的标记生物物质的发光波长(激励波长),则没有特别限定。

[0313] 本发明的化合物(1)中,使用n为1的化合物的标记生物物质在585nm附近(560~620nm)具有吸收极大波长,因此照射的光的波长区域优选为530~650nm,更优选为550~630nm。使用该化合物的标记生物物质能够适合用作对可见区域中的600nm附近的激励光源显示出优异的荧光强度的标记生物物质。

[0314] 本发明的化合物(1)中,使用n为2的化合物的标记生物物质在685nm附近(660~720nm)具有吸收极大波长,因此照射的光的波长区域优选为630~750nm,更优选为650~730nm。使用该化合物的标记生物物质能够适合用作对多色WB等近红外区域中的700nm附近的激励光源显示出优异的荧光强度的标记生物物质。

[0315] 本发明的化合物(1)中,使用n为3的化合物的标记生物物质在785nm附近(760~820nm)具有吸收极大波长,因此照射的光的波长区域优选为730~850nm,更优选为750~830nm。使用该化合物的标记生物物质能够适合用作对多色WB等近红外区域中的800nm附近的激励光源显示出优异的荧光强度的标记生物物质。

[0316] 作为在本发明中使用的荧光激励光源,只要是发射能够激励本发明的标记生物物质的发光波长(激励波长)的光源,则没有特别限定,例如,能够使用各种激光光源。并且,能够使用各种滤光器,获得优选的激励波长或仅检测荧光。

[0317] 关于上述(i)~(vii)中的其他事项,没有特别限制,能够适当选择在使用荧光标记的荧光检测中通常使用的方法、试剂、装置等条件。

[0318] 并且,关于上述(i)~(vii)以外的工序,也能够配合使用荧光标记的各种方法适当选择通常使用的方法、试剂、装置等条件。

[0319] 例如,使用本发明的标记生物物质的多色WB通过作为目标生物物质通常使用的方法(利用电泳的蛋白质的分离、向膜的印迹、膜的结块)制作印迹膜,通过将本发明的标记生物物质用作标记抗体(优选为二次抗体),能够以优异的荧光强度检测目标生物物质。

[0320] -取代基组T-

[0321] 在本发明中,作为优选的取代基,可举出选自下述取代基组T中的取代基。

[0322] 并且,在本发明中,在仅记载为取代基的情况下,参考该取代基组T,在仅记载有各个基团例如烷基的情况下,优选适用该取代基组T的对应的基团。

[0323] 而且,在本说明书中,在将烷基与环状(环)烷基区分记载的情况下,烷基以包含直链烷基及支链烷基的含义使用。另一方面,在未将烷基与环状烷基区分记载的情况及没有

特别说明的情况下,烷基以包含直链烷基、支链烷基及环烷基的含义使用。这对于含有能够采用环状结构的基团(烷基、烯基、炔基等)的基团(烷氧基、烷硫基、烯氧基等)、含有能够采用环状结构的基团的化合物也同样适用。在基团能够形成环状骨架的情况下,形成环状骨架的基团的原子数的下限与关于能够采用该结构的基团在下述中具体地记载的原子数的下限无关,为3以上,优选为5以上。

[0324] 在下述取代基组T的说明中,例如,如烷基和环烷基那样,为了明确直链或支链结构的基团和环状结构的基团,有时将它们分开记载。

[0325] 作为取代基组T所包含的基团,包括下述基团。

[0326] 可举出烷基(优选为碳原子数1~30,更优选为碳原子数1~20,进一步优选为碳原子数1~12,进一步优选为碳原子数1~8,进一步优选为碳原子数1~6,尤其优选为碳原子数1~3)、烯基(优选为碳原子数2~30,更优选为碳原子数2~20,进一步优选为碳原子数2~12,进一步优选为碳原子数2~6,进一步优选为碳原子数2~4)、炔基(优选为碳原子数2~30,更优选为碳原子数2~20,进一步优选为碳原子数2~12,进一步优选为碳原子数2~6,进一步优选为碳原子数2~4)、环烷基(优选为碳原子数3~20)、环烯基(优选为碳原子数5~20)及芳基(可以是单环的基团,也可以是稠环的基团(优选为2~6环的稠环的基团)。在其为稠环的基团的情况下,由5~7元环等构成。芳基优选为碳原子数6~40,更优选为碳原子数6~30,进一步优选为碳原子数6~26,尤其优选为碳原子数6~10)、杂环基(作为成环原子具有至少1个氮原子、氧原子、硫原子、磷原子、硅原子或硒原子,可以是单环的基团,也可以是稠环的基团(优选为2~6环的稠环的基团)。在其为单环的基团的情况下,该环元数优选为5~7元,更优选为5元或6元。杂环基的碳原子数优选为2~40,更优选为2~20。杂环基包含芳香族杂环基(杂芳基)及脂肪族杂环基(脂肪族杂环基)。)、烷氧基(优选为碳原子数1~20,更优选为碳原子数1~12)、烯氧基(优选为碳原子数2~20,更优选为碳原子数2~12)、炔氧基(优选为碳原子数2~20,更优选为碳原子数2~12)、环烷氧基(优选为碳原子数3~20)、芳氧基(优选为碳原子数6~40,更优选为碳原子数6~26,进一步优选为碳原子数6~14)、杂环氧基(优选为碳原子数2~20)、聚亚烷基氧基(优选为炭素数2~40,更优选为炭素数2~20)、

[0327] 烷氧基羰基(优选为碳原子数2~20)、环烷氧基羰基(优选为碳原子数4~20)、芳氧基羰基(优选为碳原子数6~20)、氨基(优选为碳原子数0~20,包含未取代氨基(-NH<sub>2</sub>)、(单-或二-)烷基氨基、(单-或二-)烯基氨基、(单-或二-)炔基氨基、(单-或二-)环烷基氨基、(单-或二-)环烯基氨基、(单-或二-)芳基氨基、(单-或二-)杂环氨基。取代未取代氨基的上述各基团与取代基组T的对应的基团含义相同。)、氨磺酰基(优选为碳原子数0~20,优选为烷基、环烷基或芳基的氨磺酰基。)、酰基(优选为碳原子数1~20,更优选为碳原子数2~15)、酰氧基(优选为碳原子数1~20)、氨基甲酰基(优选为碳原子数1~20,优选为烷基、环烷基或芳基的氨基甲酰基。)、

[0328] 酰氨基(优选为碳原子数1~20)、磺酰胺基(优选为碳原子数0~20,优选为烷基、环烷基或芳基的磺酰胺基。)、烷硫基(优选为碳原子数1~20,更优选为碳原子数1~12)、环烷硫基(优选为碳原子数3~20)、芳硫基(优选为碳原子数6~40,更优选为碳原子数6~26,进一步优选为碳原子数6~14)、杂环硫基(优选为碳原子数2~20)、烷基、环烷基或芳基磺酰基(优选为碳原子数1~20)、

[0329] 甲硅烷基(优选为碳原子数1~30,更优选为碳原子数1~20,优选为烷基、芳基、烷氧基或芳氧基取代的甲硅烷基。)、甲硅烷氧基(优选为碳原子数1~20,优选为由烷基、芳基、烷氧基或芳氧基取代的甲硅烷氧基。)、羟基、氰基、硝基、卤原子(例如氟原子、氯原子、溴原子或碘原子)、氧原子(具体而言,将构成环的 $>CH_2$ 取代为 $>C=O$ )、羧基( $-CO_2H$ )、膦酰基( $-PO(OH)_2$ )、磷酸基( $-O-PO(OH)_2$ )、磺基( $-SO_3H$ )、硼酸基( $-B(OH)_2$ )、镧基(包含含有环状铵基的铵基、铈基、镨基,优选为碳原子数0~30,更优选为1~20)、硫烷基( $-SH$ )、氨基酸残基或聚氨基酸残基。

[0330] 并且,可举出具有羧基、膦酰基、磺基、镧基、氨基酸残基、聚氨基酸残基或 $-(CH_2-CH_2-O)_m-$ 烷基( $m$ 与 $R^1\sim R^6$ 中的 $m$ 含义相同。)作为取代基的上述烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂环基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、环烷氧基、芳氧基、杂环氧基、烷氧基羰基、环烷氧基羰基、芳氧基羰基、氨基、氨磺酰基、酰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺酰胺基、烷硫基、环烷硫基、芳硫基、杂环硫基、烷基、环烷基或芳基磺酰基。

[0331] 选自取代基组T中的取代基更优选为烷基、烯基、环烷基、芳基、杂环基、烷氧基、环烷氧基、芳氧基、烷氧基羰基、环烷氧基羰基、氨基、酰氨基、氰基或卤原子,尤其优选为烷基、烯基、芳基、杂环基、烷氧基、烷氧基羰基、氨基、酰氨基或氰基。

[0332] 关于选自取代基组T中的取代基,只要没有特别说明,也包括组合多个上述基团而得的基团。例如,在化合物或取代基等包含烷基、烯基等时,它们可以被取代或未被取代。并且,在包含芳基、杂环基等时,它们可以是单环或稠环,可以被取代或未被取代。

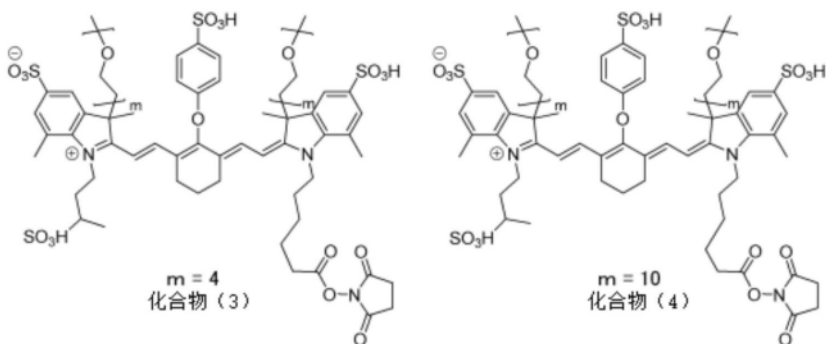
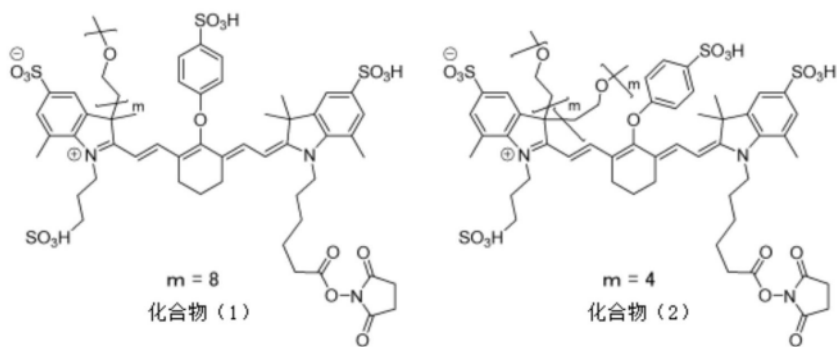
[0333] 实施例

[0334] 以下,根据实施例,对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限于此。另外,室温表示 $25^\circ C$ 。

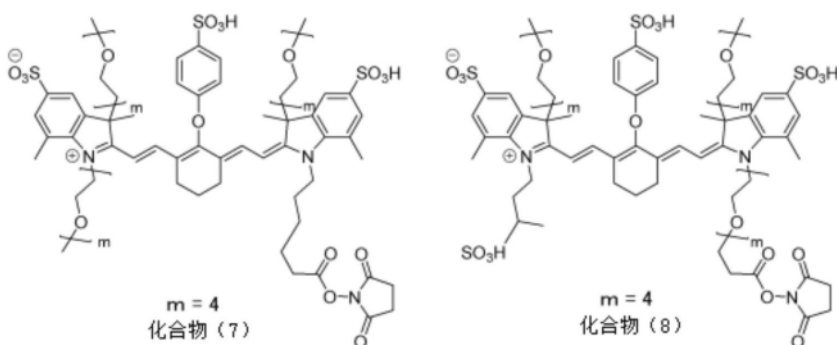
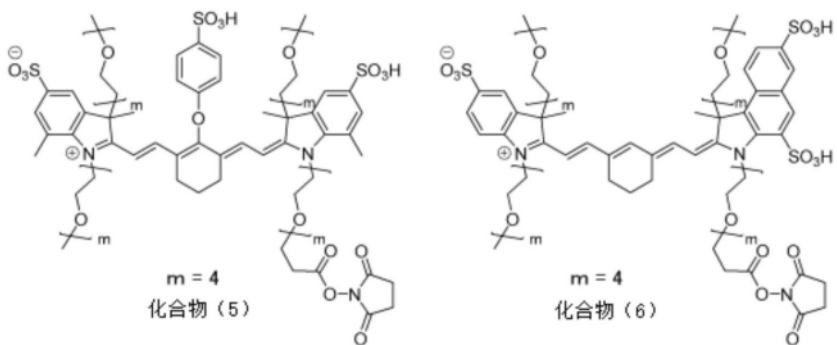
[0335] 将实施例中使用的化合物(1)~(11)、比较化合物(1)~(6)示于以下。

[0336] 另外,在实施例化合物中,即使在没有特别记载的情况下,磺基也可以包含盐结构(例如,钾盐、钠盐、TEA(三乙胺)盐或DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)盐)。 $m$ 表示平均重复数。任一化合物均使用平均重复数的小数第一位为0的化合物作为原料来合成。

[0337] [化学式19]

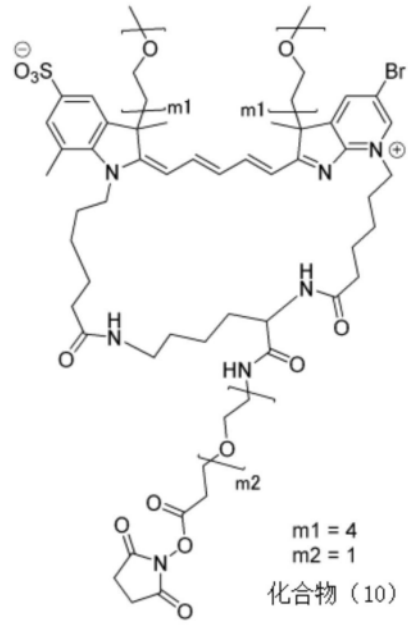
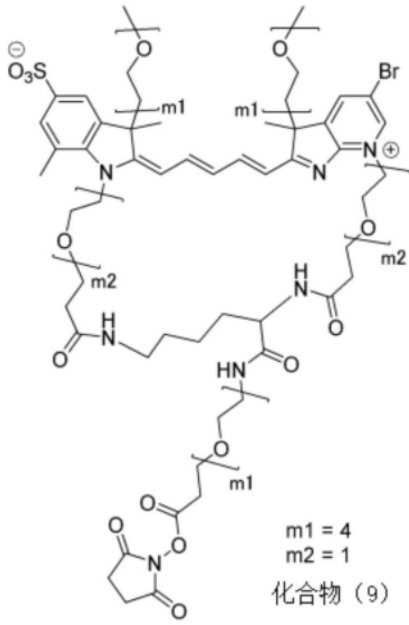


[0338]

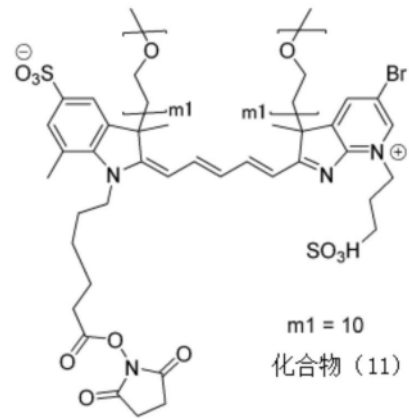


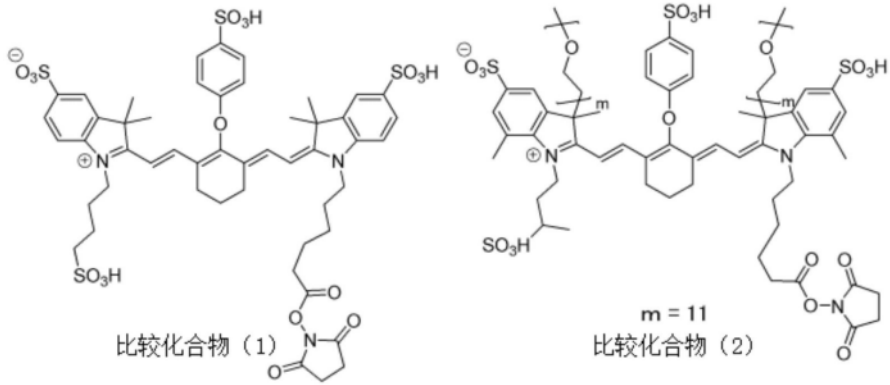
[0339] [化学式20]

[0340]

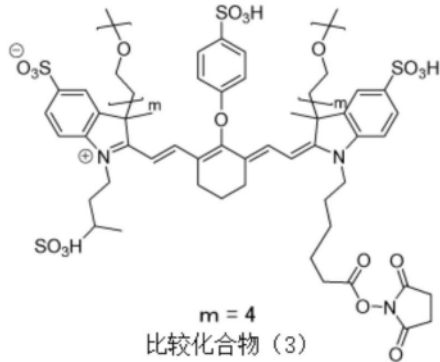


[0341] [化学式21]

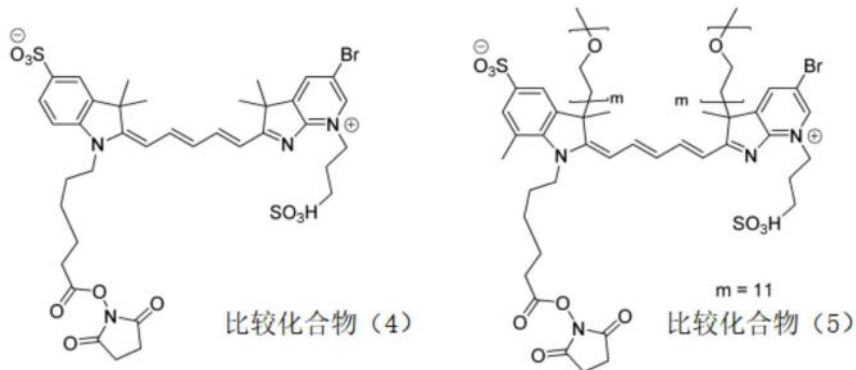




[0342]



[0343] [化学式22]



[0344]



[0345] 比较化合物(1)是LiCor公司制造的IRDye800CW(商品名)。

[0346] 以下,对各实施例中使用的化合物(1)~(8)的合成方法进行详细说明,但起始物质、色素中间体及合成途径并不限于这些。

[0347] 在以下合成途径中,室温表示25℃。

[0348] 在没有特别记载的情况下,反相柱色谱法中的载体使用了SNAP Ultra C18(商品名,Biotage公司制造)或Sfar C18(商品名,Biotage公司制造),正相柱色谱法中的载体使用了Hi-Flash Column(商品名,YAMAZEN CORPORATION制造)。

[0349] 在反相柱色谱法或正相柱色谱法中使用的洗脱液中的混合比是容量比。例如,“乙腈:水=0:100→20:80”表示将“乙腈:水=0:100”的洗脱液改变为“乙腈:水=20:80”的洗脱液。

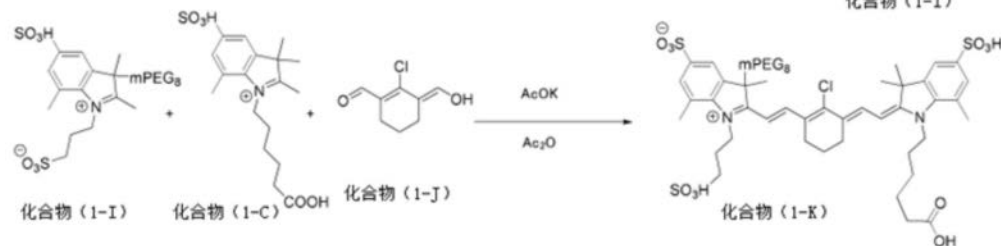
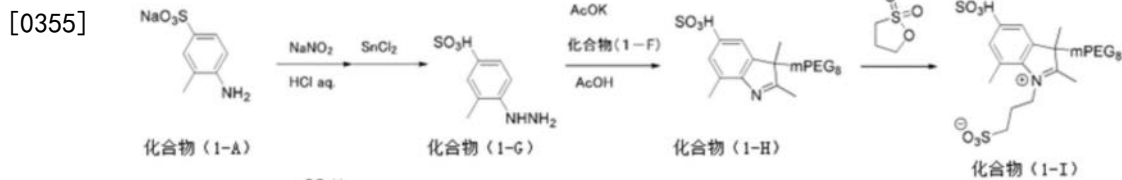
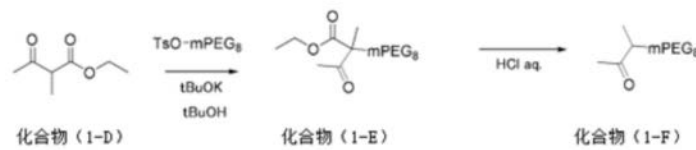
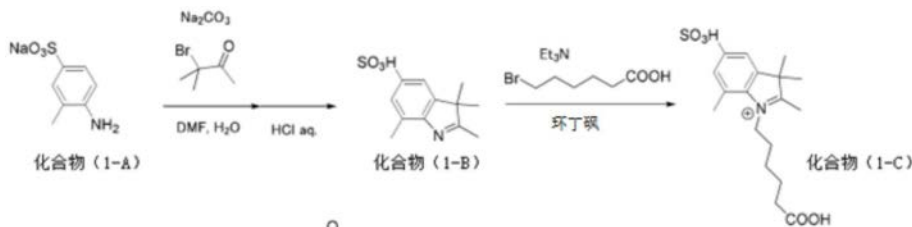
[0350] 分取HPLC(High Performance Liquid Chromatography:高效液相色谱)使用了2767(商品名,Waters Corporation制造)。

[0351] MS谱图使用ACQUITY SQD LC/MS System(商品名,Waters Corporation制造,离子化法:ESI(ElectroSpray Ionization制造,电喷雾离子化))或LCMS-2010EV(商品名,Shimadzu Corporation制造,同时进行离子化法:ESI及APCI(Atmospheric Pressure Chemical Ionization,大气压化学离子化)的离子化法)进行了测定。

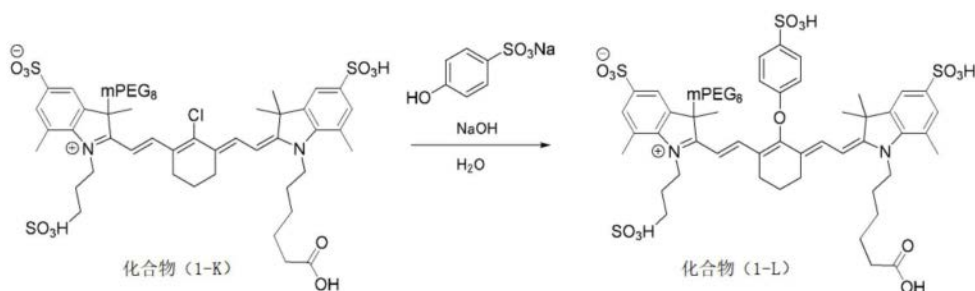
[0352] <化合物(1)的合成>

[0353] 根据下述方案,合成了化合物(1)。

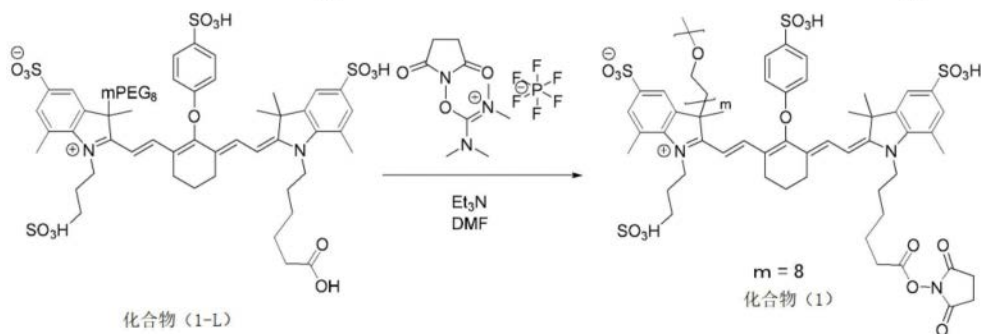
[0354] [化学式23]



[0356] [化学式24]



[0357]



[0358] 1) 化合物 (1-B) 的合成

[0359] 将化合物 (1-A) 10g、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 30mL、蒸馏水 3.3ml、碳酸钠 3.1g 及 3-溴-3-甲基-2-丁酮 16.5g 加入到 200ml 容量的三口烧瓶中,在氮气气氛下,在 90℃ 下加热搅拌了 12 小时。然后,从反应液中减压蒸馏去除溶剂,添加 15ml 的 10% 盐酸水溶液后,在 90℃ 下进一步加热搅拌了 12 小时。然后,减压蒸馏去除溶剂,使其分散在甲醇中,实施了过滤。减压浓缩滤液,添加丙酮使其产生沉淀,通过倾析法去除了上清液。将该粗产物通过反相色谱法 (乙腈/水=0/100→10/90) 提纯,由此获得了化合物 (1-B) 4.1g。

[0360] 2) 化合物 (1-C) 的合成

[0361] 将化合物 (1-B) 400mg、环丁砜 2ml、6-溴己酸 365mg 及三乙胺 ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) 0.169ml 加入到 50ml 容量的茄形烧瓶中,在 120℃ 下加热搅拌了 6 小时。向反应液中添加乙酸乙酯,使其产生沉淀。将沉淀物通过反相色谱法 (洗脱液:乙腈/水=0/100→20/100) 提纯,获得了化合物 (1-C) 95mg。

[0362] 3) 化合物 (1-F) 的合成

[0363] 向氮气置换的 50ml 容量的三口烧瓶中加入叔丁醇 (tBuOH) 200ml 及叔丁醇钾 (tBuOK) 12g,在搅拌时滴加化合物 (1-D) 14.4g,搅拌片刻。接着,滴加聚乙二醇甲基醚甲磺酸酯 (乙二醇单元的平均重复数=8.0、TsO-mPEG<sub>8</sub>) 53.9g,进行加热搅拌。在 80℃ 下搅拌 1 小时后,减压蒸馏去除溶剂,利用乙酸乙酯及蒸馏水实施分液操作,通过蒸馏水提取了粗产物。向所获得的粗产物中添加 30% 盐酸水溶液 30ml,在 100℃ 下搅拌了 3 小时。然后,减压蒸馏去除溶剂,通过正相色谱法 (洗脱液:己烷/乙酸乙酯=50/50→30/70) 提纯,由此获得了化合物 (1-F) 12.1g。

[0364] 4) 化合物 (1-G) 的合成

[0365] 向 1L 容量的三口烧瓶中加入化合物 (1-A) 20g 及蒸馏水 150ml,在搅拌时滴加了 30% 盐酸水溶液 75ml。在盐冰浴中进行冷却,维持 3℃ 以下的同时,缓慢滴加将亚硝酸钠 7g 溶解在蒸馏水 80ml 中的溶液,然后在 0~3℃ 下搅拌了 45 分钟。接着,缓慢滴加将氯化锡 (II) 38g 溶解在蒸馏水 90ml 和 30% HCl 30ml 中的溶液,然后在 7℃ 以下搅拌了 40 分钟。浓缩溶剂,

利用异丙醇清洗残渣,获得了化合物(1-G) 15g。

[0366] 5) 化合物(1-H)的合成

[0367] 向200ml容量的茄形烧瓶中加入化合物(1-G) 2.0g、乙酸(AcOH) 30ml、化合物(1-F) 4.4g及乙酸钾(AcOK) 0.98g,在氮气气氛下,在140℃下搅拌了1小时。减压蒸馏去除溶剂,通过反相色谱法(洗脱液:乙腈/水=0/100→35/65)提纯,获得了化合物(1-H) 3.5g。

[0368] 6) 化合物(1-I)的合成

[0369] 向50ml容量的茄形烧瓶中加入化合物(1-H) 200mg、环丁砜2ml、1,3-丙磺酸内酯80mg及N-乙基二异丙胺129mg,在120℃下搅拌了1.5小时。返回到室温,添加蒸馏水200mg,通过反相色谱法(洗脱液:乙腈/水=0/100→10/90)提纯,获得了化合物(1-I) 61mg。

[0370] 7) 化合物(1-K)的合成

[0371] 向试管中添加化合物(1-I) 72.8mg、化合物(1-C) 36.8mg、化合物(1-J) 17.3mg、乙酸钾(AcOK) 9.8mg及乙酸酐(Ac<sub>2</sub>O) 1mL,在氮气气氛下,在60℃下搅拌了2小时。反应收敛后,添加蒸馏水,通过反相色谱法(洗脱液:乙腈/水=0/100→25/75)提纯,获得了化合物(1-K) 33mg。

[0372] 8) 化合物(1-L)的合成

[0373] 向试管中添加化合物(1-K) 10mg及蒸馏水500μL,在95℃下进行搅拌。向该溶液中滴加将4-羟基苯磺酸钠16.5mg和氢氧化钠5mg混合到蒸馏水500μL中的溶液,在95℃下搅拌了30分钟。将反应液冷却至室温,通过分取HPLC提纯,实施冻结干燥,获得了化合物(1-L) 5.1mg。化合物(1-L)的MS测定的结果如下。

[0374] MS (ESI m/z) : (M+H<sup>+</sup>)<sup>+</sup> = 1369、(M-H<sup>+</sup>)<sup>-</sup> = 1367

[0375] 9) 化合物(1)的合成

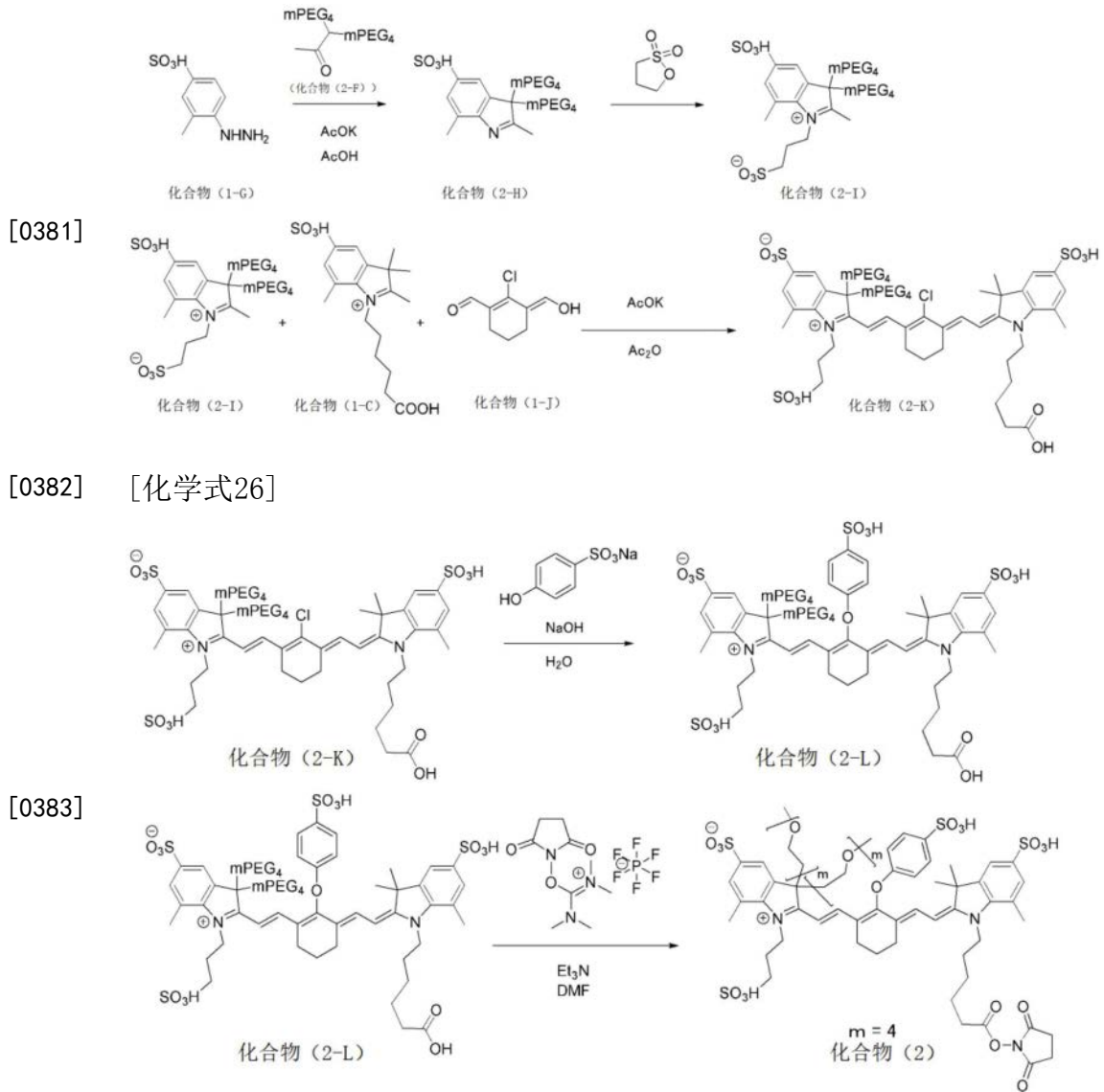
[0376] 向化合物(1-L) 2.6mg中添加N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 0.28ml、溶解了N,N,N',N'-四甲基-0-(N-琥珀酰亚胺基)脲六氟磷酸盐1mg的N,N-二甲基甲酰胺溶液、及三乙胺(Et<sub>3</sub>N) 1.3μL,搅拌了1小时。然后,减压蒸馏去除溶剂,添加乙酸乙酯去除上清液,实施真空干燥,由此获得了化合物(1)。

[0377] <化合物(2)的合成>

[0378] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(2)。化合物(2-L)的MS测定的结果如下。

[0379] MS (ESI m/z) : (M+H<sup>+</sup>)<sup>+</sup> = 1369、(M-H<sup>+</sup>)<sup>-</sup> = 1367

[0380] [化学式25]

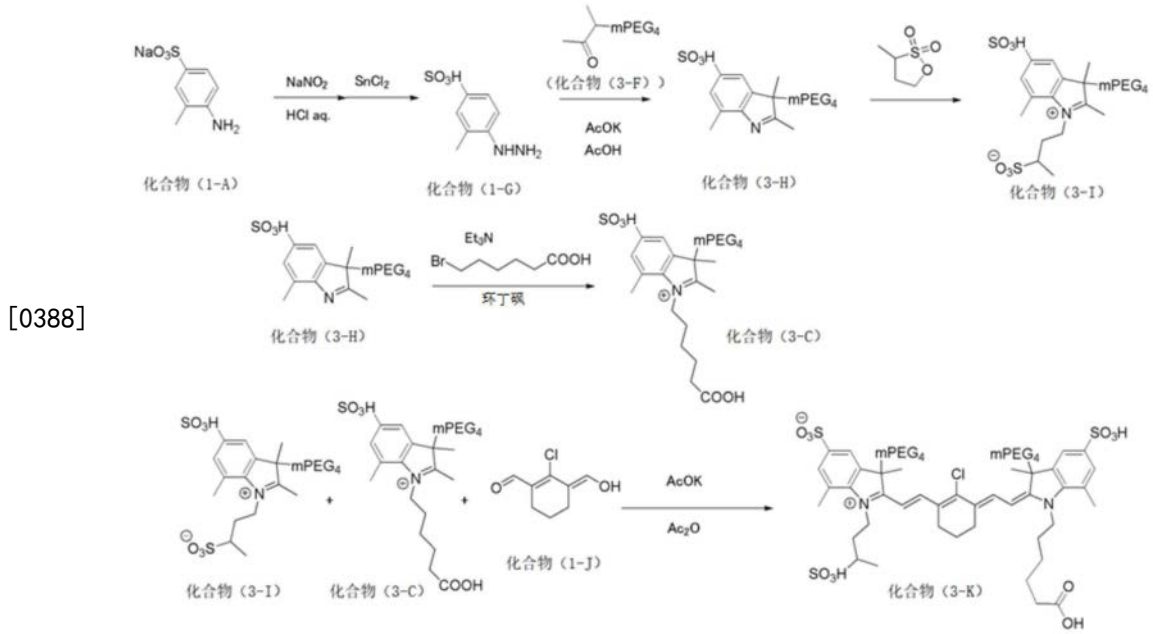


[0384] <化合物(3)的合成>

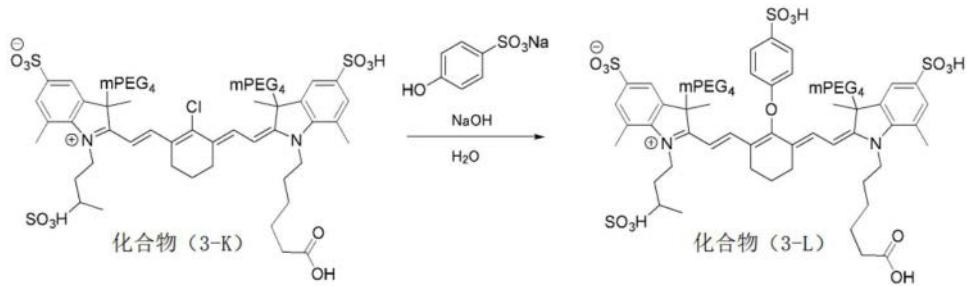
[0385] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(3)。化合物(3-L)的MS测定的结果如下。

[0386] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1383$ 、 $(M-H)^- = 1381$

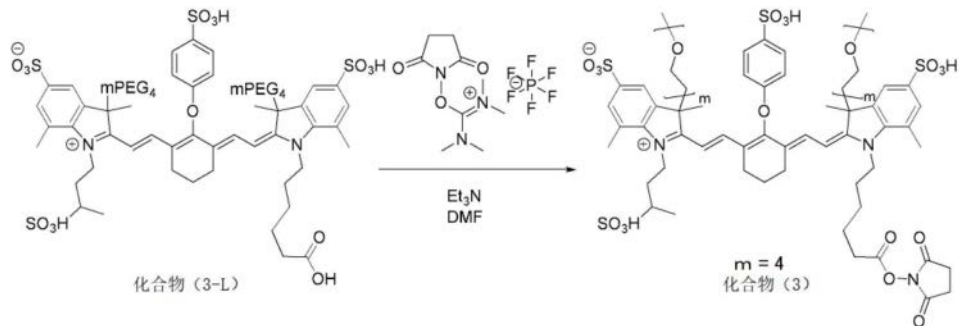
[0387] [化学式27]



[0389] [化学式28]



[0390]

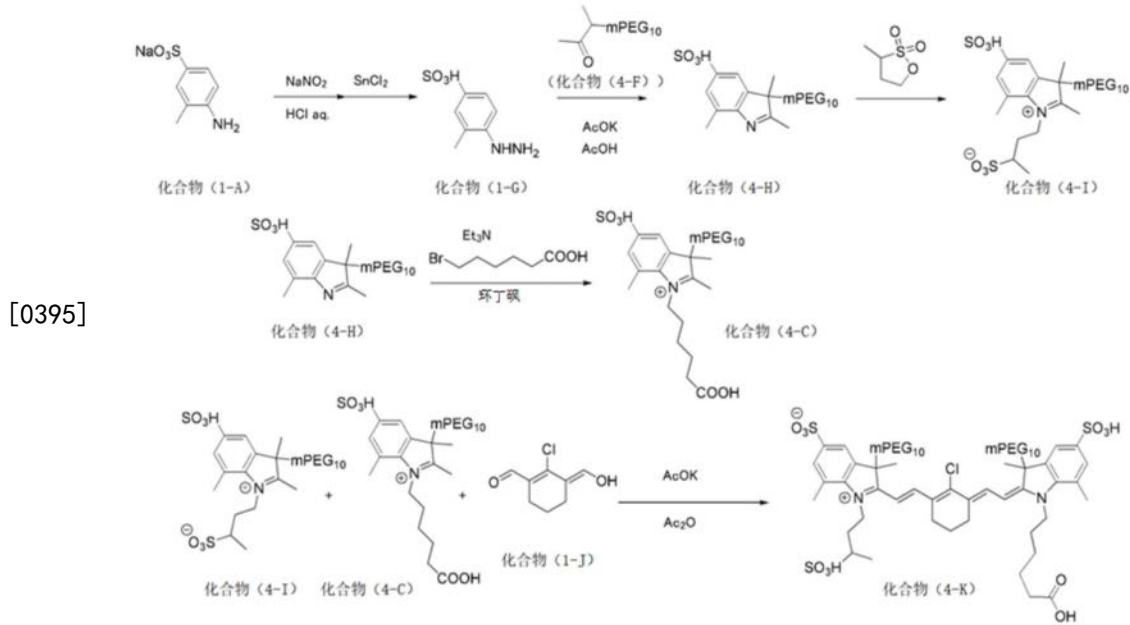


[0391] <化合物(4)的合成>

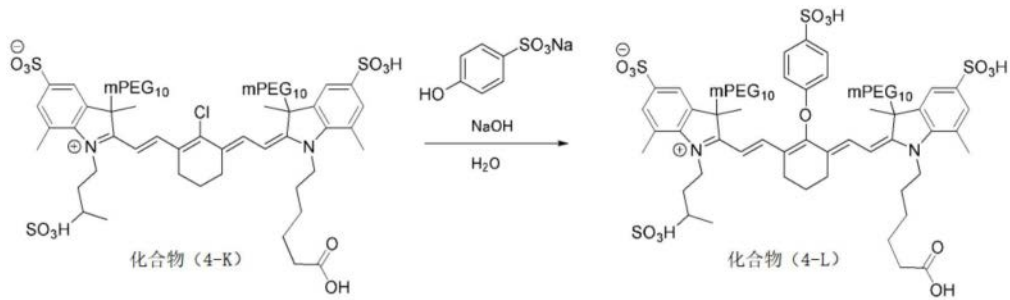
[0392] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(4)。化合物(4-L)的MS测定的结果如下。

[0393] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1912$ 、 $(M-H)^- = 1910$

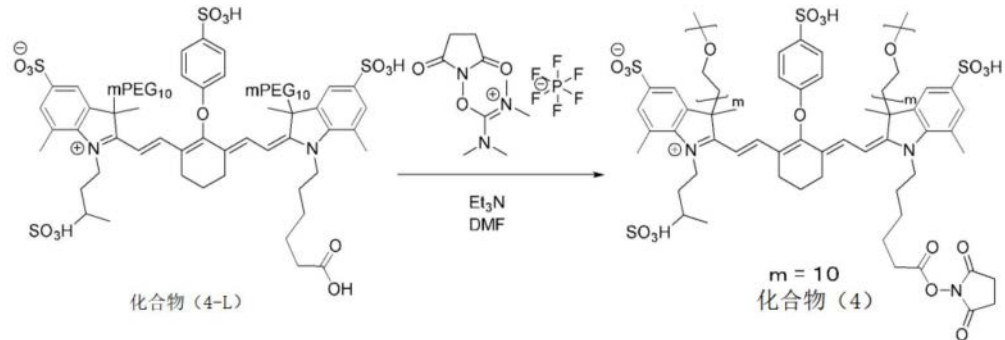
[0394] [化学式29]



[0396] [化学式30]



[0397]

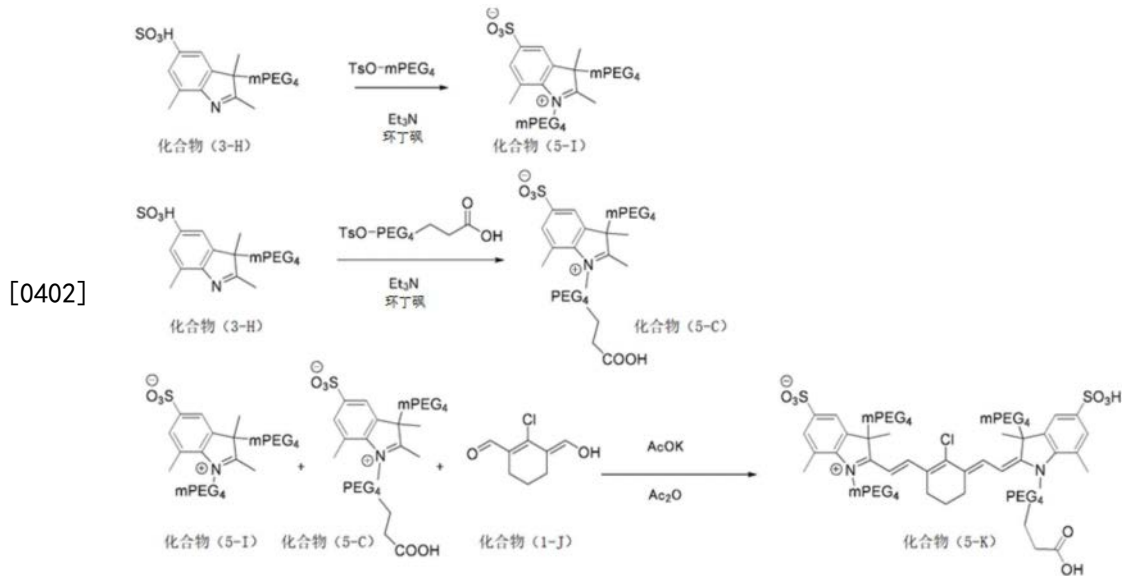


[0398] <化合物(5)的合成>

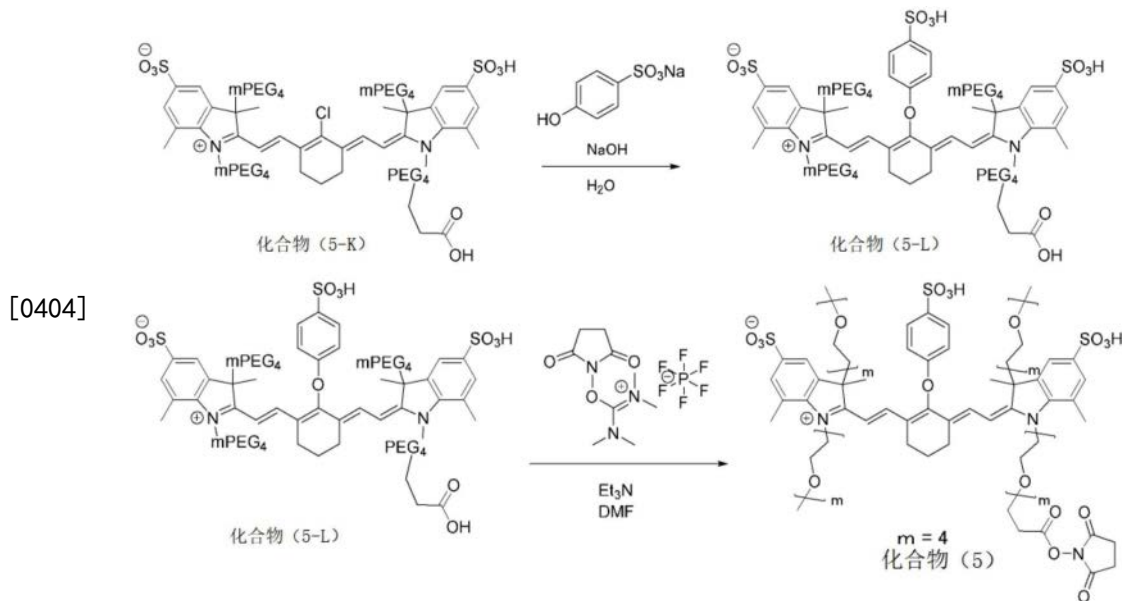
[0399] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(5)。化合物(5-L)的MS测定的结果如下。

[0400] MS (ESI m/z) : (M+H<sup>+</sup>)<sup>+</sup> = 1572、(M-H<sup>+</sup>)<sup>-</sup> = 1570

[0401] [化学式31]



[0403] [化学式32]



[0405] <化合物(6)的合成>

[0406] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(6)。化合物(6-K)的MS测定的结果如下。

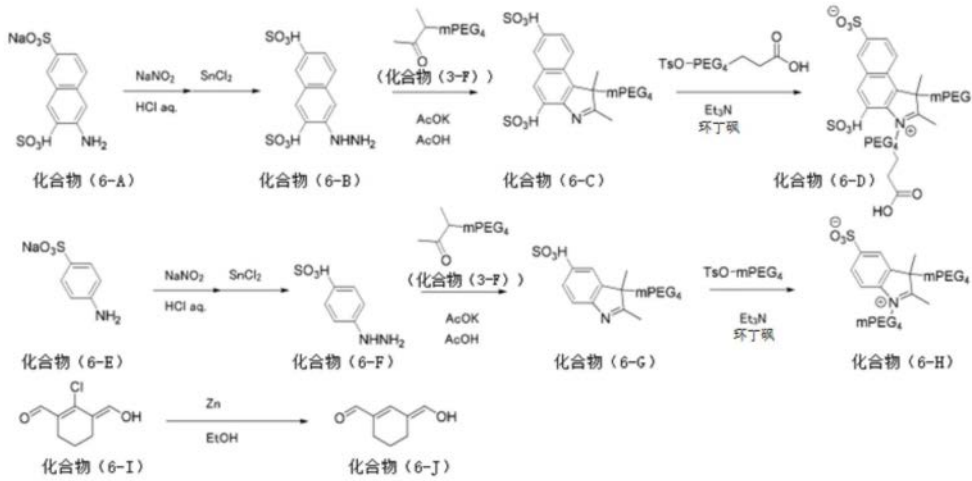
[0407] MS (ESI  $m/z$ ):  $(M+H)^+ = 1502$ 、 $(M-H)^- = 1500$

[0408] 另外,如下合成了化合物(6-J)。

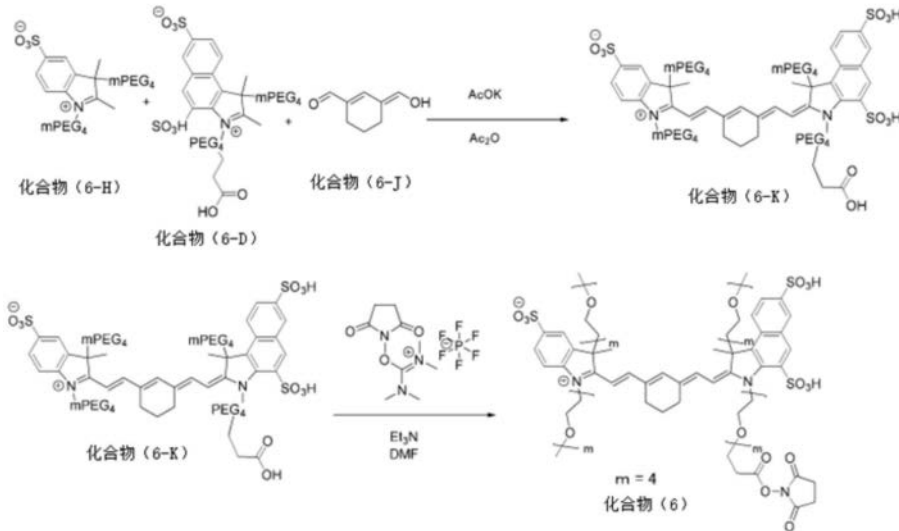
[0409] (化合物(6-J)的合成)

[0410] 向50ml容量的茄形烧瓶中添加化合物(6-I) 0.35g、锌粉末1.3g及乙醇10ml,在回流下使其反应了3小时。通过硅藻土过滤去除锌,通过反相色谱法(洗脱液:乙腈/水=0/100→35/65)提纯,获得了化合物(6-J) 0.1g。

[0411] [化学式33]



[0412]

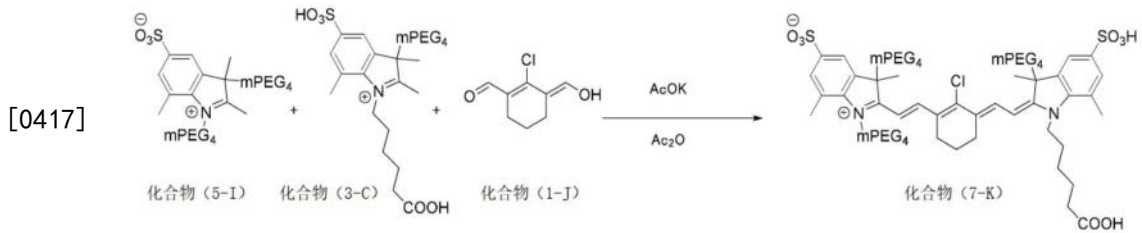


[0413] <化合物(7)的合成>

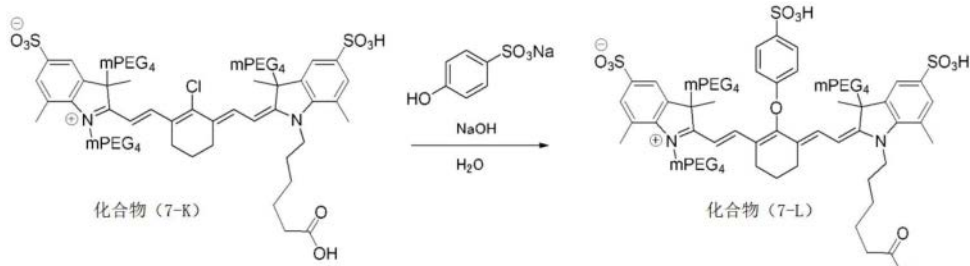
[0414] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(7)。化合物(7-L)的MS测定的结果如下。

[0415] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1438$ 、 $(M-H)^- = 1436$

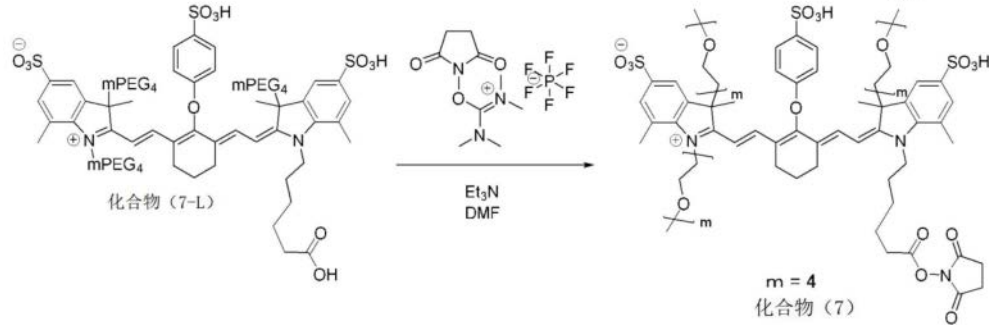
[0416] [化学式34]



[0418] [化学式35]



[0419]

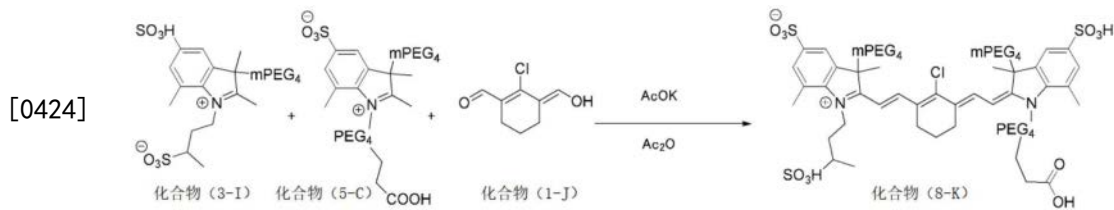


[0420] &lt;化合物(8)的合成&gt;

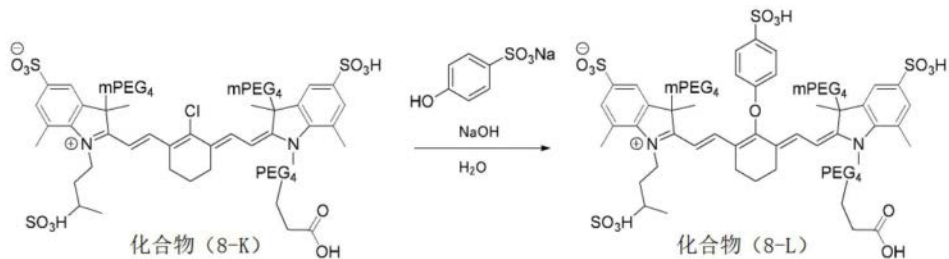
[0421] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(8)。化合物(8-L)的MS测定的结果如下。

[0422] MS (ESI  $m/z$ ):  $(M+H)^+ = 1518$ 、 $(M-H)^- = 1516$ 

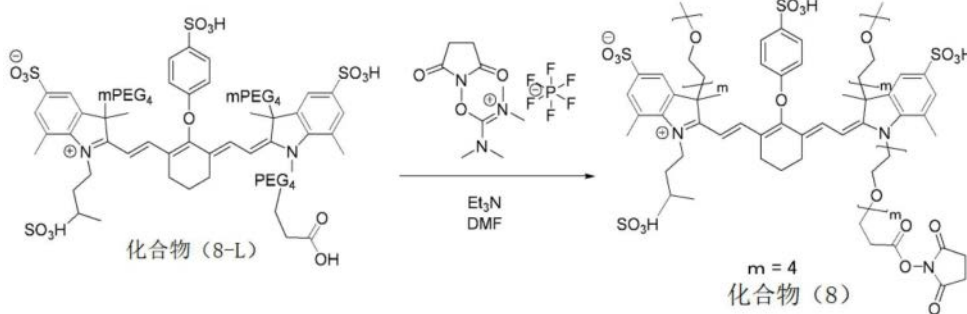
[0423] [化学式36]



[0425] [化学式37]



[0426]



[0427] &lt;化合物(9)的合成&gt;

[0428] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(9)。化合物(9-H)的MS测定的结

果如下。

[0429] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1470$ 、 $(M-H)^- = 1468$

[0430] 另外,如下合成了化合物(9-H)。

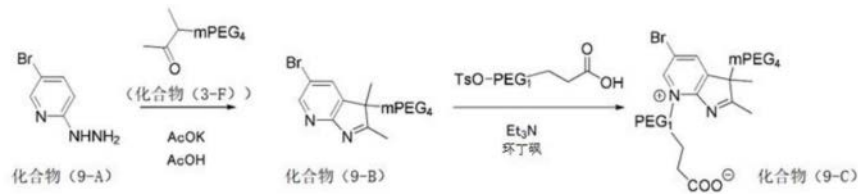
[0431] (化合物(9-G)的合成)

[0432] 向10mL容量的茄形烧瓶中添加化合物(9-F) 20mg、DMF 2mL、N,N,N',N'-四甲基-0-(N-琥珀酰亚胺基)脲六氟磷酸盐(HSTU) 80mg、TEA(三乙胺) 77 $\mu$ L,使其反应了3小时。然后,向将赖氨酸盐酸盐6mg、碳酸钠3mg溶解在水40mL中的溶液滴加反应液,然后使其反应了3小时。浓缩反应液后,通过分取HPLC提纯,实施冻结干燥,获得了化合物(9-G) 7.0mg。

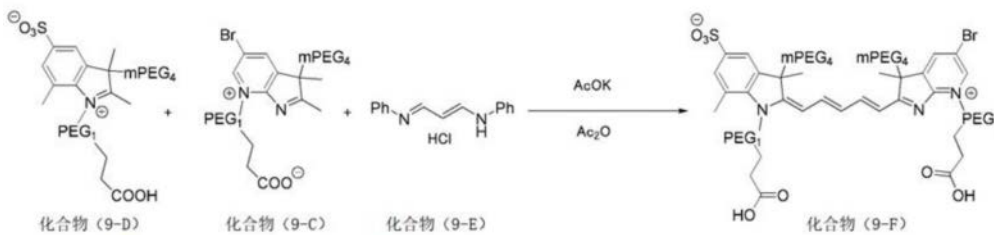
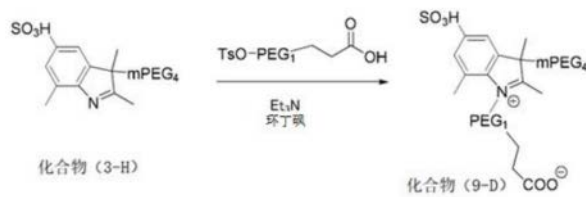
[0433] (化合物(9-H)的合成)

[0434] 向10mL容量的茄形烧瓶中添加化合物(9-G) 7.0mg、DMF 2mL、N,N,N',N'-四甲基-0-(N-琥珀酰亚胺基)脲六氟磷酸盐(HSTU) 2mg、TEA(三乙胺) 5 $\mu$ L,使其反应了3小时。然后,将氨基PEG4acid(商品名,BROAD PHARM公司制造,乙二醇单元的平均重复数=4.0) 1mg的DMF溶液0.5mL添加到反应液中,然后使其反应了3小时。浓缩反应液后,通过分取HPLC提纯,实施冻结干燥,获得了化合物(9-H) 5.3mg。

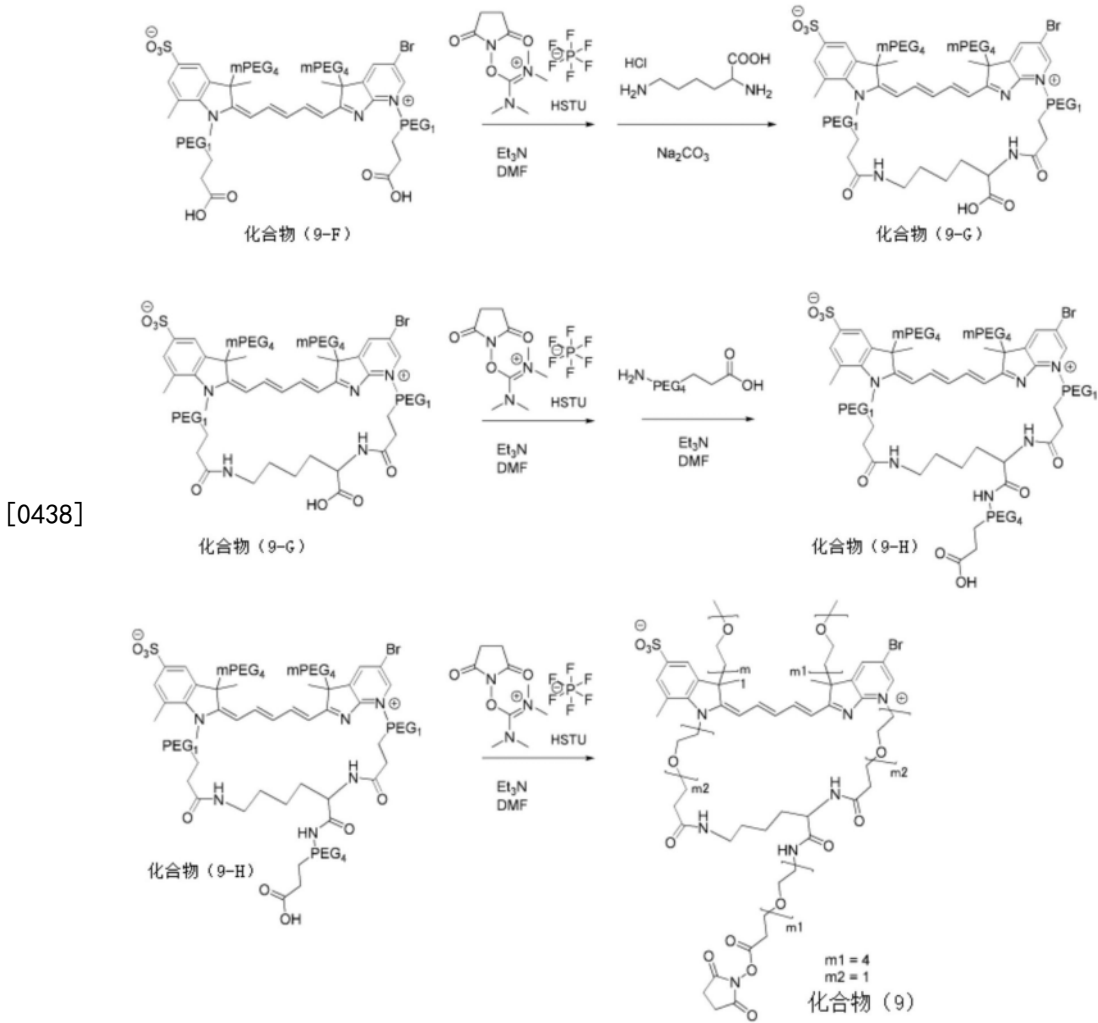
[0435] [化学式38]



[0436]



[0437] [化学式39]

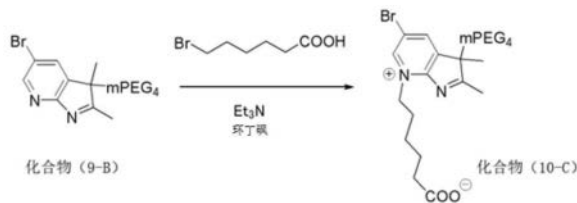


[0439] <化合物(10)的合成>

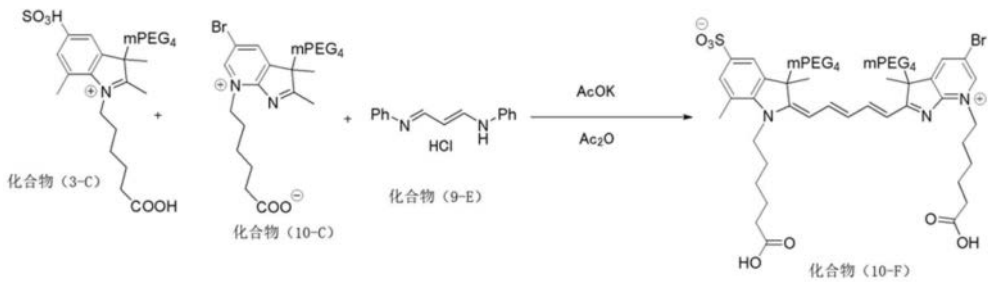
[0440] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(10)。化合物(10-H)的MS测定的结果如下。

[0441] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1334$ 、 $(M-H)^- = 1332$

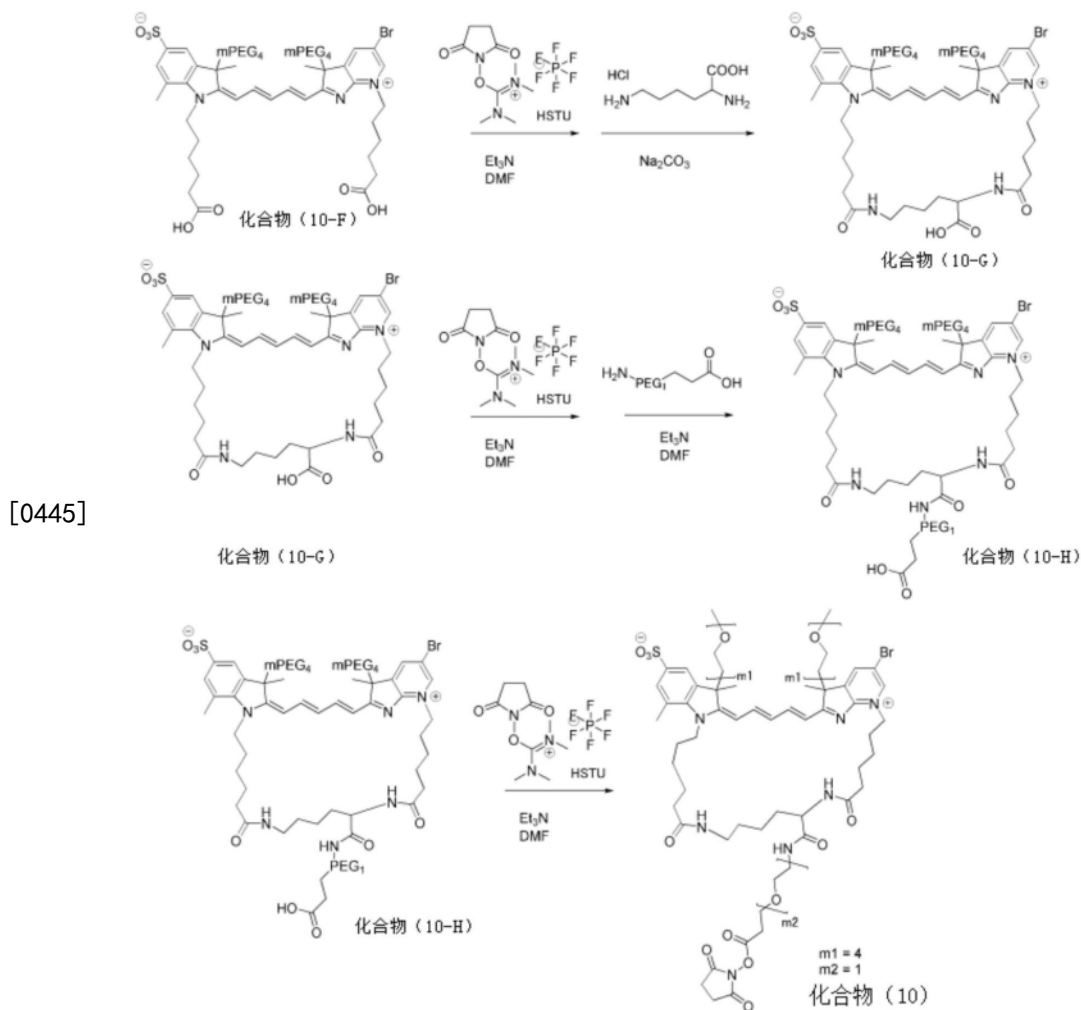
[0442] [化学式40]



[0443]



[0444] [化学式41]

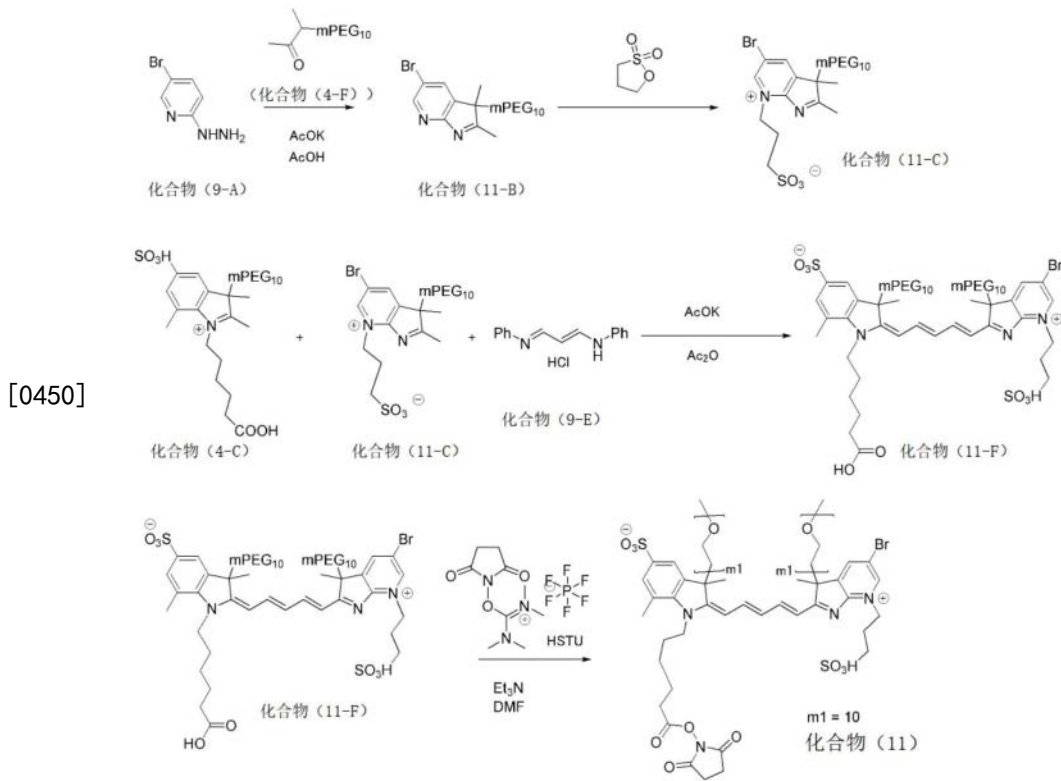


[0446] <化合物(11)的合成>

[0447] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了化合物(11)。化合物(11-F)的MS测定的结果如下。

[0448] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1645$ 、 $(M-H)^- = 1643$

[0449] [化学式42]

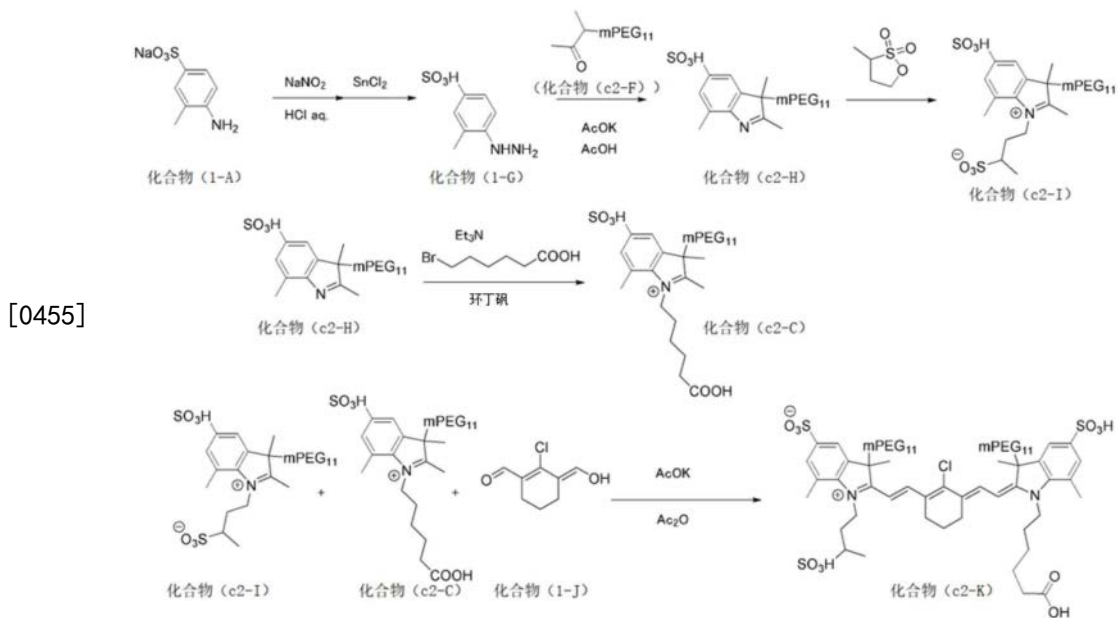


[0451] <比较化合物(2)的合成>

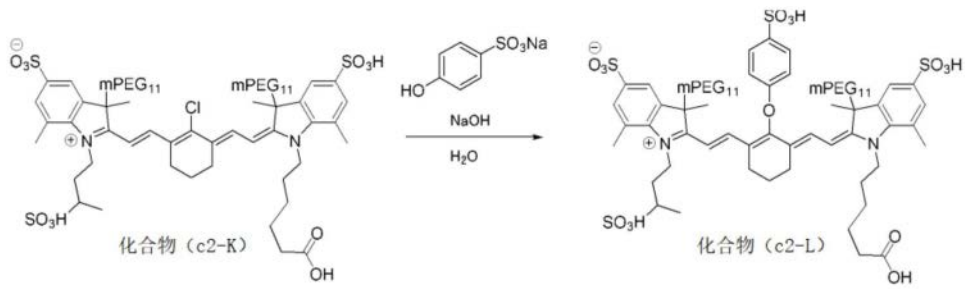
[0452] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了比较化合物(2)。化合物(c2-L)的MS测定的结果如下。

[0453] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 2000$ 、 $(M-H)^- = 1998$

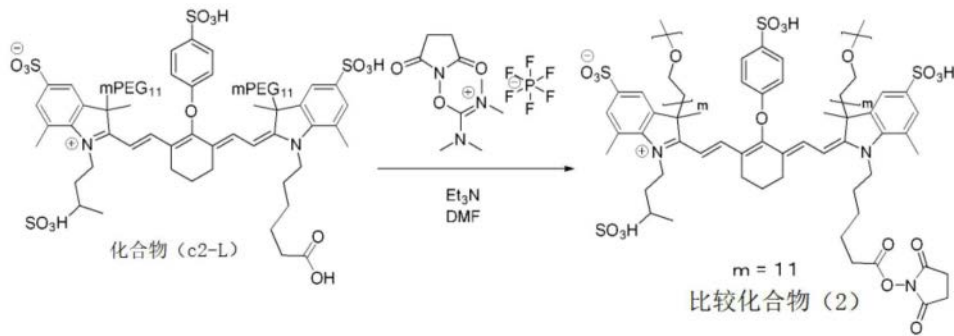
[0454] [化学式43]



[0456] [化学式44]



[0457]

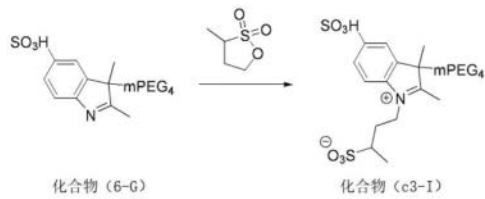


[0458] <比较化合物 (3) 的合成>

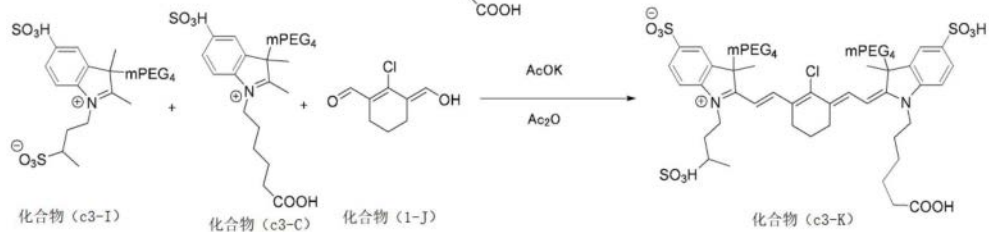
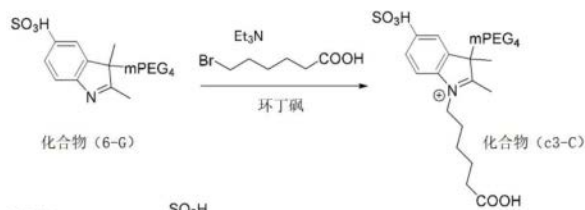
[0459] 根据下述方案,与化合物 (1) 同样地合成了比较化合物 (3)。化合物 (c3-L) 的MS测定的结果如下。

[0460] MS (ESI m/z) : (M+H)<sup>+</sup> = 1355、(M-H)<sup>-</sup> = 1353

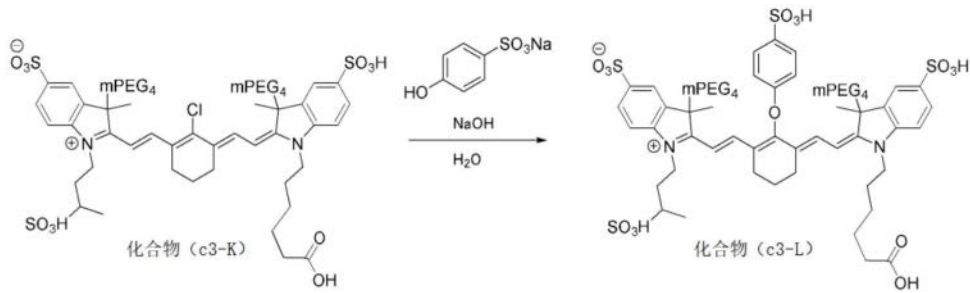
[0461] [化学式45]



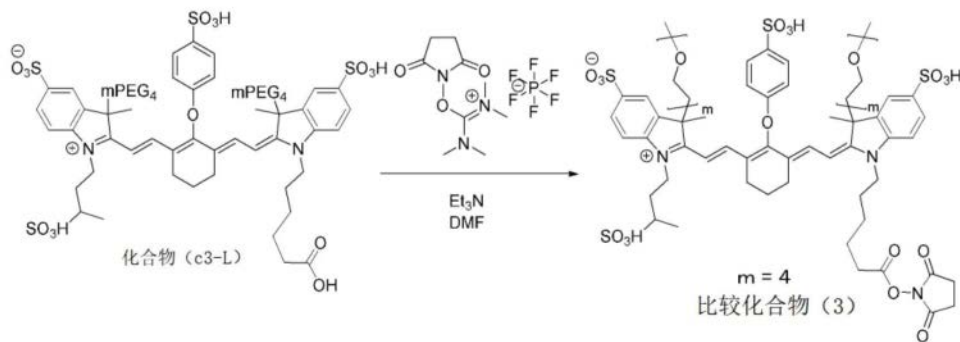
[0462]



[0463] [化学式46]



[0464]

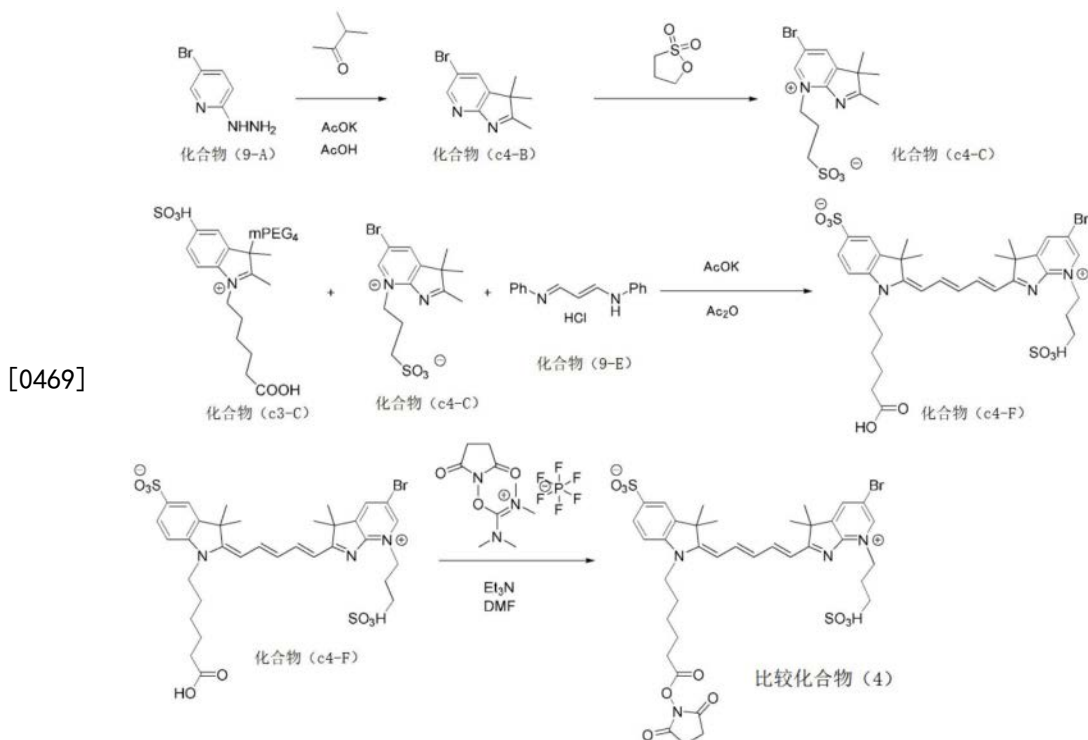


[0465] &lt;比较化合物(4)的合成&gt;

[0466] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了比较化合物(4)。化合物(c4-F)的MS测定的结果如下。

[0467] MS (ESI m/z) :  $(\text{M}+\text{H})^+ = 764$ 、 $(\text{M}-\text{H})^- = 762$

[0468] [化学式47]

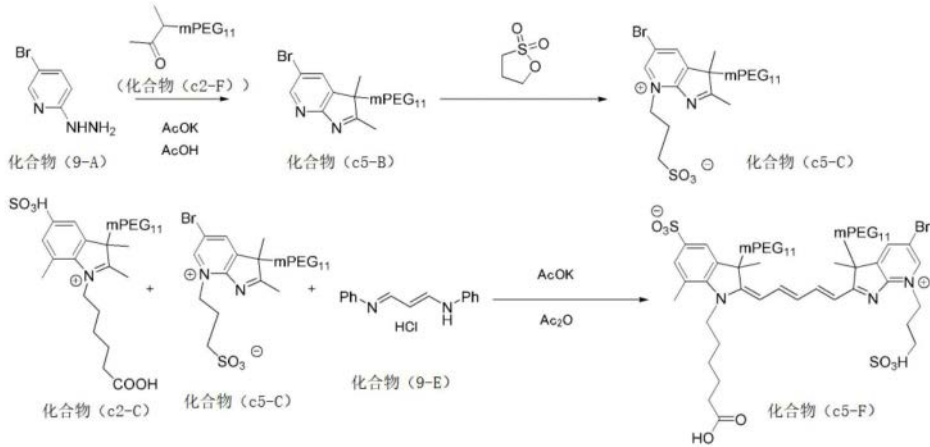


[0470] &lt;比较化合物(5)的合成&gt;

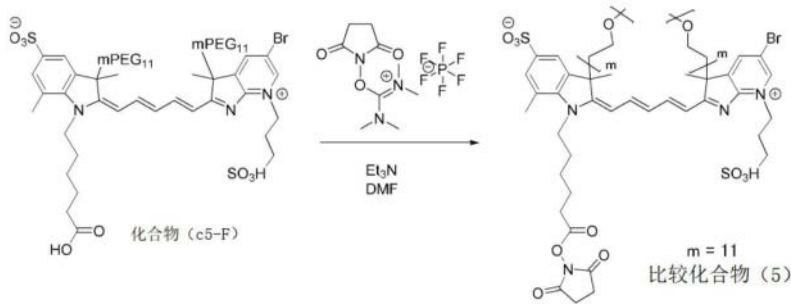
[0471] 根据下述方案,与化合物(1)同样地合成了比较化合物(5)。化合物(c5-F)的MS测定的结果如下。

[0472] MS (ESI m/z) :  $(\text{M}+\text{H})^+ = 1733$ 、 $(\text{M}-\text{H})^- = 1731$

[0473] [化学式48]



[0474]

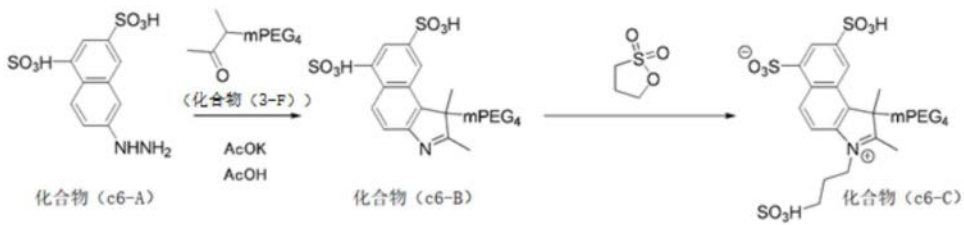


[0475] <比较化合物 (6) 的合成>

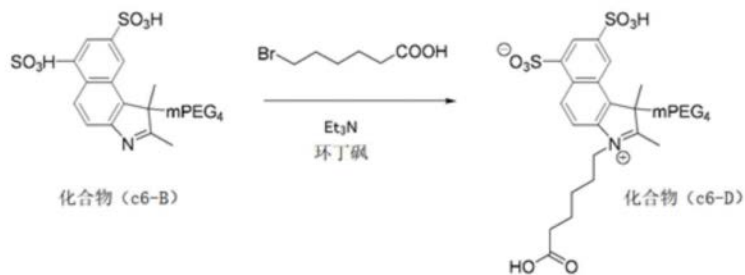
[0476] 根据下述方案,与化合物 (1) 同样地合成了比较化合物 (6)。化合物 (c6-F) 的MS测定的结果如下。

[0477] MS (ESI  $m/z$ ) :  $(M+H)^+ = 1363$ 、 $(M-H)^- = 1361$

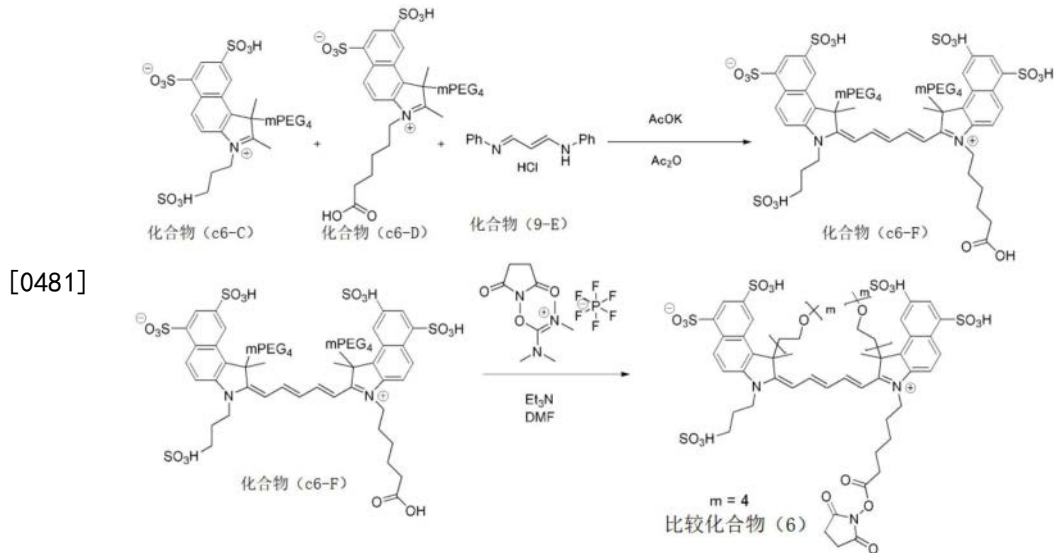
[0478] [化学式49]



[0479]



[0480] [化学式50]



[0482] <实施例1>

[0483] 对于上述各化合物,评价了荧光标记率、溶液荧光强度及膜上荧光强度。

[0484] [1] 荧光标记率的评价

[0485] 向微型管中加入抗兔IgG抗体 (2.3mg/ml) 217 $\mu$ L及碳酸盐缓冲液21.7 $\mu$ L,实施振荡搅拌后,以相对于抗体成为表1所示的摩尔当量比的方式添加化合物(1)的二甲基亚砜溶液,进一步进行了振荡搅拌。在室温下静置1小时,使用凝胶过滤柱色谱PD10 (GE Healthcare Life Sciences制造)和PBS溶液(磷酸缓冲食盐水)对反应液实施提纯,获得了标记抗体(1)。对于所获得的标记抗体,通过下述所示的方法计算出荧光标记率。将结果汇总表示在表1中。

[0486] 荧光标记率的计算方法使用了如下所示的通常的方法。[ ]中的记载表示单位,[-]表示没有单位。在本试验中,蛋白质表示抗兔IgG抗体。

[0487] 荧光标记率=荧光色素的浓度/蛋白质的浓度

[0488] 荧光色素的浓度表示标记的荧光色素的总摩尔浓度[M],蛋白质的浓度表示荧光标记的蛋白质的摩尔浓度[M],分别通过下述式计算。

[0489] 荧光色素的浓度 =  $\text{Dye}_{\text{max}} / \epsilon_{\text{dye}}$

[0490] 蛋白质的浓度 =  $(\text{IgG}_{280} - (\text{Dye}_{\text{max}} \times \text{CF})) / \epsilon_{\text{protein}}$

[0491] 上述式中的各符号如下所述。

[0492]  $\text{Dye}_{\text{max}}$ ; 荧光色素在最大吸收波长下的吸收[-]

[0493]  $\epsilon_{\text{dye}}$ ; 荧光色素的摩尔吸光系数 [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]

[0494]  $\text{IgG}_{280}$ ; 荧光标记蛋白质在280nm下的吸收[-]

[0495]  $\text{Dye}_{280}$ ; 荧光色素在280nm下的吸收[-]

[0496]  $\epsilon_{\text{protein}}$ ; 蛋白质的摩尔吸光系数 [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]

[0497] CF (Correction Factor);  $\text{Dye}_{280} / \text{Dye}_{\text{max}}$  [-]

[0498] [表1]

[0499]

No.	标记抗体	3当量	5当量	7当量	10当量
101	化合物(1) - IgG	2.4	3.7	4.8	6.5
102	化合物(2) - IgG	2.2	3.5	4.6	6.6

103	化合物(3) - IgG	2.3	3.5	4.6	6.7
104	化合物(4) - IgG	2.4	3.6	4.7	6.5
105	化合物(5) - IgG	2.1	3.1	4.2	6.0
106	化合物(6) - IgG	2.3	3.7	4.7	6.6
107	化合物(7) - IgG	2.2	3.5	4.5	6.3
108	化合物(8) - IgG	2.3	3.5	4.6	6.5
109	化合物(9) - IgG	2.4	3.7	4.6	6.8
110	化合物(10) - IgG	2.3	3.5	4.7	6.7
111	化合物(11) - IgG	2.1	3.5	4.4	6.0
c11	比较化合物(1) - IgG	2.3	3.3	4.2	6.3
c12	比较化合物(2) - IgG	1.9	2.8	3.4	4.2
c13	比较化合物(3) - IgG	2.1	3.4	4.3	6.4
c14	比较化合物(4) - IgG	2.2	3.5	4.5	6.4
c15	比较化合物(5) - IgG	1.7	2.5	3.6	4.5
c16	比较化合物(6) - IgG	2.2	3.5	4.5	6.3

[0500] (表注)

[0501] 在标记抗体栏中,化合物(Z) - IgG或比较化合物(Z) - IgG的表述分别表示化合物(Z)的IgG标记抗体或比较化合物(Z)的IgG标记抗体。Z表示各化合物的编号。在以后的表中也含义相同。

[0502] 由上述表1的结果可知以下内容。

[0503] 作为本发明的化合物的化合物(1)~(11)在相对于抗体以3当量、5当量、7当量及10当量的任一摩尔当量添加的情况下,也显示出与使用作为市售的标记化合物的比较化合物(1)时相同程度或其以上的荧光标记率,作为与抗体的键合性,显示出实用上没有问题的充分的水准。这能够从No.c11与No.101~111的对比中读取。

[0504] 另一方面,由于PEG的重复数(本发明中规定的m)为11,因此比较化合物(2)及(5)不是本发明中规定的化合物。由No.c11与c12及c15的对比可知,比较化合物(2)及(5)比作为市售的标记化合物的比较化合物(1)荧光标记率低,随着相对于抗体的摩尔当量变高,荧光标记率进一步下降,与抗体的键合性差。

[0505] 与此相对,作为本发明的化合物的化合物(3)及(4)除了PEG的重复数(本发明中规定的m)分别为4或10这一点不同以外,具有与比较化合物(2)相同的化学结构。可知,这些化合物(3)及(4)均比比化合物(2)荧光标记率高,通过采用PEG的重复数为10以下的结构,能够抑制因导入PEG而引起的与抗体的键合性下降。同样地,作为本发明的化合物的化合物(11)除了PEG的重复数(本发明中规定的m)为10这一点不同以外,具有与比较化合物(5)相同的化学结构。可知,该化合物(11)比比化合物(5)荧光标记率高,通过采用PEG的重复数为10以下的结构,能够抑制因导入PEG而引起的与抗体的键合性下降。

[0506] [2]溶液荧光强度的评价1

[0507] 将在上述荧光标记率下添加色素10当量而制备的各标记抗体的溶液调整为蛋白质浓度0.1mg/mL,使用分光荧光强度计(商品名:RF-5300,Shimadzu Corporation制造),以785nm的激励光统一曝光条件,计算出荧光波长810~840nm的范围的荧光强度的积分值。以

比较化合物(1)-IgG的荧光波长810~840nm的范围的荧光强度的积分值为基准值,计算出与该基准值的比(标记抗体的荧光波长810~840nm的范围的荧光强度的积分值/基准值),根据以下评价基准进行了评价。将结果汇总表示在表2中。

[0508] 在本试验中,对于荧光强度,评价等级“D”以上为合格。

[0509] -荧光强度的评价基准-

[0510] A:荧光强度与基准值之比为2倍以上

[0511] B:荧光强度与基准值之比为1.8倍以上且小于2倍

[0512] C:荧光强度与基准值之比为1.6倍以上且小于1.8倍

[0513] D:荧光强度与基准值之比为1.4倍以上且小于1.6倍

[0514] E:荧光强度与基准值之比为1.2倍以上且小于1.4倍

[0515] F:荧光强度与基准值之比为0.9倍以上且小于1.2倍

[0516] G:荧光强度与基准值之比小于0.9倍

[0517] [表2]

[0518]

No.	标记抗体	荧光强度(溶液)
201	化合物(1)-IgG	D
202	化合物(2)-IgG	C
203	化合物(3)-IgG	B
204	化合物(4)-IgG	C
205	化合物(5)-IgG	A
206	化合物(6)-IgG	B
207	化合物(7)-IgG	B
208	化合物(8)-IgG	A
c21	比较化合物(1)-IgG	1.0(基准值)
c22	比较化合物(2)-IgG	F
c23	比较化合物(3)-IgG	E

[0519] 由上述表2的结果可知以下内容。

[0520] 由于PEG的重复数(本发明中规定的m)为11,因此比较化合物(2)不是本发明中规定的结构。使用该比较化合物(2)的标记抗体在溶液中的荧光强度低(No.c22)。

[0521] 由于环Z<sup>1</sup>及环Z<sup>2</sup>是在相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子的邻位不具有取代基的苯环,因此比较化合物(3)不是本发明中规定的结构。使用该比较化合物(3)的标记抗体在溶液中的荧光强度也低(No.c23)。

[0522] 与此相对,本发明中规定的化合物(1)~(8)的标记抗体均具有相对于上述比较标记抗体(1)的荧光强度为1.4倍以上的荧光强度,显示出优异的荧光强度(相对于No.c21的No.201~208)。

[0523] 尤其,环Z<sup>1</sup>及环Z<sup>2</sup>是在相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子的邻位具有甲基的苯环这一点不同以外具有与比较化合物(3)相同的化学结构的化合物(3)的荧光强度的评价为B,与此相对,在相对于上述氮原子的邻位不具有取代基的比较化合物(3)的荧光强度的评价为E。由此可知,通过采用PEG的重复数为10以下且作为Z<sup>1</sup>及Z<sup>2</sup>在邻位具有取代基的苯环,在溶液状态下显示出优异的荧光强度。

[0524] [3]溶液荧光强度的评价2

[0525] 将在前述荧光标记率的评价中添加色素10当量而制备的各标记抗体的溶液调整为蛋白质浓度0.1mg/mL,使用分光荧光强度计(商品名:RF-5300,Shimadzu Corporation制造),以685nm的激励光统一曝光条件,计算出荧光波长710~730nm的范围的荧光强度的积分值。以比较化合物(4)-IgG的荧光波长710~730nm的范围的荧光强度的积分值为基准值,计算出与该基准值的比(标记抗体的荧光波长710~730nm的范围的荧光强度的积分值/基准值),根据与溶液荧光强度的评价1相同的评价基准进行了评价。将结果汇总表示在表3中。

[0526] 在本试验中,对于荧光强度,评价等级“D”以上为合格。

[0527] [表3]

[0528]

No.	标记抗体	荧光强度(溶液)
301	化合物(9)-IgG	A
302	化合物(10)-IgG	B
303	化合物(11)-IgG	C
c31	比较化合物(4)-IgG	1.0(基准值)
c32	比较化合物(5)-IgG	F
c33	比较化合物(6)-IgG	E

[0529] 由上述表3的结果可知以下内容。

[0530] 由于比较化合物(4)不具有含有重复数m的PEG作为 $R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者的结构(由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 表示的结构),比较化合物(5)的PEG的重复数(本发明中规定的m)为11,比较化合物(6)中环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 是在相对于 $L^1$ 或 $L^2$ 所键合的氮原子的邻位不具有取代基的苯环,因此分别不是本发明中规定的结构。使用这些比较化合物(4)~(6)的标记抗体在溶液中的荧光强度均低(No.c31~c33)。

[0531] 与此相对,本发明中规定的化合物(9)~(11)的标记抗体均具有相对于上述比较标记抗体(4)的荧光强度为1.6倍以上的荧光强度,显示出优异的荧光强度(相对于No.c31的No.301~303)。

[0532] 由表2及3的结果可知,由本发明的化合物获得的标记抗体生物物质在溶液中显示出优异的荧光强度。

[0533] [4]膜上荧光强度评价1

[0534] 将抗兔IgG溶液(在前述荧光标记率的评价中添加色素10当量而制备的各标记抗体的溶液)调整为蛋白质浓度5.0ng/mL,在硝基纤维素膜上慎重地点样2 $\mu$ L。将膜干燥后,接着在TBS-T中利用Fish Gelatin结块缓冲液阻断。将膜在室温下搅拌的同时孵化1小时。去除结块溶液,利用TBS缓冲液将标记抗体的PBS溶液稀释20000倍。将膜浸入稀释的溶液中,搅拌的同时孵化1小时。将膜利用TBS-T缓冲液清洗3次,每次10分钟,最后利用TBS缓冲液清洗10分钟。将所获得的膜在40℃的热板上干燥1小时,使用Amersham Typhoon scanner(GEHC公司制造)进行图像化,以785nm的激励光统一曝光条件,计算出荧光波长810~840nm的范围的荧光强度。以比较化合物(1)-IgG的荧光波长810~840nm的范围的荧光强度的积分值为基准值,计算出与该基准值的比(标记抗体的荧光波长810~840nm的范围的荧光强度的积分值/基准值),根据以下评价基准进行了评价。将结果汇总表示在表4中。

[0535] 在本试验中,对于荧光强度,评价等级“D”以上为合格。

[0536] -荧光强度的评价基准-

[0537] A:荧光强度与基准值之比为4.0倍以上

[0538] B:荧光强度与基准值之比为3.0倍以上且小于4.0倍

[0539] C:荧光强度与基准值之比为2.5倍以上且小于3.0倍

[0540] D:荧光强度与基准值之比为2.0倍以上且小于2.5倍

[0541] E:荧光强度与基准值之比为1.5倍以上且小于2.0倍

[0542] F:荧光强度与基准值之比为0.9倍以上且小于1.5倍

[0543] G:荧光强度与基准值之比小于0.9倍

[0544] [表4]

No.	标记抗体	荧光强度(膜)
401	化合物(1) - IgG	D
402	化合物(2) - IgG	C
403	化合物(3) - IgG	B
404	化合物(4) - IgG	C
405	化合物(5) - IgG	A
406	化合物(6) - IgG	B
407	化合物(7) - IgG	B
408	化合物(8) - IgG	A
c41	比较化合物(1) - IgG	1.0(基准值)
c42	比较化合物(2) - IgG	G
c43	比较化合物(3) - IgG	E

[0546] 由上述表4的结果可知以下内容。

[0547] 由于PEG的重复数(本发明中规定的m)为11,因此比较化合物(2)不是本发明中规定的结构。使用该比较化合物(2)的标记抗体在膜上的荧光强度低(No.c42)。

[0548] 由于环Z<sup>1</sup>及环Z<sup>2</sup>是在相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子的邻位不具有取代基的苯环,因此比较化合物(3)不是本发明中规定的结构。使用该比较化合物(3)的标记抗体在膜上的荧光强度也低(No.c43)。

[0549] 与此相对,本发明中规定的化合物(1)~(8)的标记抗体均具有相对于上述比较标记抗体(1)的荧光强度为2.0倍以上的荧光强度,显示出优异的荧光强度(相对于No.c41的No.401~408)。

[0550] 尤其,环Z<sup>1</sup>及环Z<sup>2</sup>是在相对于L<sup>1</sup>或L<sup>2</sup>所键合的氮原子的邻位具有甲基的苯环这一点不同以外具有与比较化合物(3)相同的化学结构的化合物(3)的荧光强度的评价为B,与此相对,在相对于上述氮原子的邻位不具有取代基的比较化合物(3)的荧光强度的评价为E。由此可知,通过采用PEG的重复数为10以下且作为Z<sup>1</sup>及Z<sup>2</sup>在邻位具有取代基的苯环,在膜上显示出优异的荧光强度。

[0551] [5]膜上荧光强度评价2

[0552] 将抗兔IgG溶液(在前述荧光标记率的评价中添加色素10当量而制备的各标记抗体的溶液)调整为蛋白质浓度5.0ng/mL,在硝基纤维素膜上慎重地点样2μL。将膜干燥后,接

着在TBS-T中利用Fish Gelatin结块缓冲液阻断。将膜在室温下搅拌的同时孵化1小时。去除结块溶液,利用TBS缓冲液将标记抗体的PBS溶液稀释20000倍。将膜浸入稀释的溶液中,搅拌的同时孵化1小时。将膜利用TBS-T缓冲液清洗3次,每次10分钟,最后利用TBS缓冲液清洗10分钟。将所获得的膜在40℃的热板上干燥1小时,使用Amersham Typhoon scanner (GEHC公司制造)进行图像化,以685nm的激励光统一曝光条件,计算出荧光波长710~730nm的范围的荧光强度。以比较化合物(4)-IgG的荧光波长710~730nm的范围的荧光强度的积分值为基准值,计算出与该基准值的比(标记抗体的荧光波长710~730nm的范围的荧光强度的积分值/基准值),根据与膜上荧光强度评价1相同的评价基准进行了评价。将结果汇总表示在表5中。

[0553] 在本试验中,对于荧光强度,评价等级“D”以上为合格。

[0554] [表5]

No.	标记抗体	荧光强度(膜)
501	化合物(9)-IgG	A
502	化合物(10)-IgG	B
503	化合物(11)-IgG	C
c51	比较化合物(4)-IgG	1.0(基准值)
c52	比较化合物(5)-IgG	G
c53	比较化合物(6)-IgG	E

[0556] 由上述表5的结果可知以下内容。

[0557] 由于比较化合物(4)不具有含有重复数m的PEG作为 $R^1 \sim R^4$ 、 $L^1$ 及 $L^2$ 的至少一者的结构(由 $-(CH_2-CH_2-O)_m-R^{21}$ 表示的结构),比较化合物(5)的PEG的重复数(本发明中规定的m)为11,比较化合物(6)中环 $Z^1$ 及环 $Z^2$ 是在相对于 $L^1$ 或 $L^2$ 所键合的氮原子的邻位不具有取代基的苯环,因此分别不是本发明中规定的结构。使用这些比较化合物(4)~(6)的标记抗体在膜上的荧光强度均低(No.c51~c53)。

[0558] 与此相对,本发明中规定的化合物(9)~(11)的标记抗体均具有相对于上述比较标记抗体(4)的荧光强度为2.5倍以上的荧光强度,显示出优异的荧光强度(相对于No.c51的No.501~503)。

[0559] 由表4及5的结果可知,由本发明的化合物获得的标记抗体生物物质在膜上显示出优异的荧光强度。

[0560] 如此,本发明的化合物对抗体具有良好的键合性,而且,使用本发明的化合物的标记生物物质在溶液及膜上的任一形态下都具有优异的荧光强度。

[0561] 对于本发明与其实施方式一同进行了说明,但本发明人认为,只要没有特别指定,在说明的任何细节中也不会对本发明进行限定,在不违反所附的技术方案所示的发明的精神和范围的情况下,应该作广泛的解释。

[0562] 本申请主张基于2020年4月24日在日本申请的日本特愿2020-077176及2020年7月30日在日本申请的日本特愿2020-129753的优先权,在此作为参考将其内容作为本说明书中记载的一部分而引用。