(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117642413 A
(43)申请公布日 2024.03.01

(21)申请号 202280049194.7
(22)申请日 2022.08.30
(30)优先权数据
2021-141996 2021.08.31 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/032639 2022.08.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/032994 JA 2023.03.09
(71)申请人 富士胶片株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 滨田直佳 白兼研史 吉光佑二
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 张志楠 庞东成
(51)Int.Cl.
C07K 2/00(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)

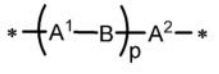
权利要求书2页 说明书55页

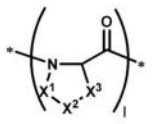
(54)发明名称

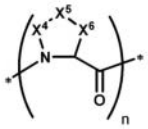
化合物及使用了该化合物的标记生物物质

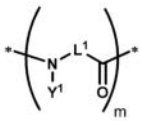
(57)摘要

一种具有荧光体部及由下述通式(I)表示的结构的化合物及标记生物物质。式中,A^1表示由下述通式(a1)表示的结构,A^2表示由下述通式(a2)表示的结构,B表示由下述通式(b)表示的结构。式中,X^1～X^6表示-O-、-S-、>NR^1或>CR^2R^3。R^1～R^3表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基、-NR^9R^{10}、-OR^{11}或阴离子性基团。R^9～R^{11}表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或杂芳基。Y^1表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。L^1表示2价连接基团。l、m、n及p为1以上的整数。*表示键合键。


通式(I)


通式(a1)

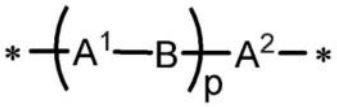

通式(a2)


通式(b)

CN 117642413 A

1.一种化合物,其具有荧光体部及由下述通式(I)表示的结构,

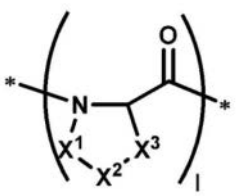
[化学式1]



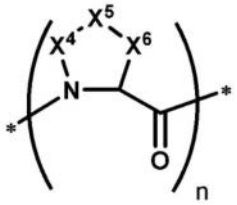
通式 (I)

式中,A^1表示由下述通式(a1)表示的结构,A^2表示由下述通式(a2)表示的结构,B表示由下述通式(b)表示的结构,

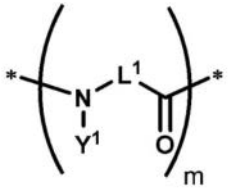
[化学式2]



通式 (a1)



通式 (a2)



通式 (b)

式中,X^1～X^6表示-O-、-S-、>NR^1或>CR^2R^3,

R^1～R^3表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基、-NR^9R^{10}、-OR^{11}或阴离子性基团,

R^9～R^{11}表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或杂芳基,

Y^1表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基,

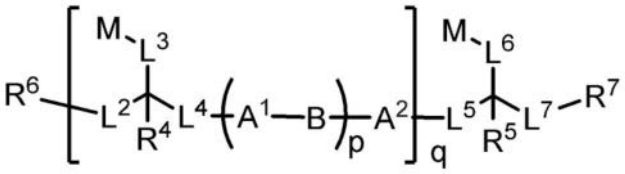
L^1表示2价连接基团,

l、m、n及p为1以上的整数,

*表示键合键。

2.根据权利要求1所述的化合物,其由下述通式(II)表示,

[化学式3]



通式 (II)

式中,R^4及R^5表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基,

R^6及R^7表示氢原子、羟基、硫烷基、烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团、-$(L\text{-}O)_tR^E$或Q,L表示亚烷基,R^E表示氢原子或烷基,t为1～24,Q表示羧基、能够与生物物质键合的取代基或能够与固体支撑体键合的取代基,

L^2～L^7表示单键或2价连接基团,

M表示荧光体部、生理活性物质部、前药部或放射性同位素含有部,

q为1以上的整数,

A^1、A^2、B及p与所述A^1、A^2、B及p含义相同,

其中,M中的至少1个表示荧光体部。

3.根据权利要求1或2所述的化合物,其中,

所述l及n中的至少一者为3以上的整数。

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是所述通式(b)中的连接>NY^1与>C=O的最短原子数为1~4的连接基团。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中,

所述L^1为包含环结构的连接基团。

6.根据权利要求5所述的化合物,其中,

所述环结构为具有聚环氧烷基作为取代基的基团。

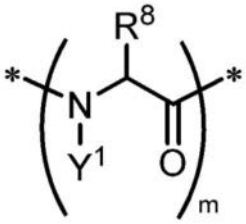
7.根据权利要求1至6中任一项所述的化合物,其中,

由所述通式(b)表示的结构的ClogP值为1.0以下。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的化合物,其中,

所述B为由下述通式(c)表示的结构,

[化学式4]



通式(c)

式中,R^8表示氢原子或烷基,Y^1及m与所述Y^1及m含义相同,

*表示键合键。

9.根据权利要求8所述的化合物,其中,

所述R^8为具有阴离子性基团、阳离子性基团及聚环氧烷基中的任一基团作为取代基的烷基。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中,

所述p为1的整数。

11.根据权利要求9所述的化合物,其中,

所述R^8为具有聚环氧烷基作为取代基的烷基。

12.一种标记生物物质,其由权利要求1至11中任一项所述的化合物与生物物质键合而成。

13.根据权利要求12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、核苷酸、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,多使用利用荧光性化合物(荧光色素)标记了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,即使在从蛋白质混合物检测特定的蛋白质的免疫印迹法(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] 在上述荧光标记中,通常使用有机荧光色素分子,通常通过使用键合了多个荧光色素分子的荧光标记生物物质,提高亮度(荧光强度)。然而,花青色素、若丹明色素等表示荧光性的有机色素的大部分包含具有高平面性的芳香族发色团,因此容易产生标记后的色素之间的相互作用,其结果,容易产生基于色素之间的自缔合等的相互作用的荧光强度的降低。而且,随着每个活体分子1分子的荧光色素的分子数(荧光标记率:DOL)增加,基于自缔合等的荧光强度有进一步下降的倾向。

[0006] 作为用于上述荧光标记的标记物质,已知有具有长链分子与色素分子键合的结构的化合物。而且,在与荧光标记不同的领域中,同样地,利用长链分子,键合色素等,形成标签或探针。

[0007] 例如,非专利文献1公开有利用聚脯氨酸连接体键合近红外荧光色素(NIRF色素)与近红外淬灭剂色素(NIRQ色素)。根据非专利文献1记载的技术,通过上述连接体调整NIRF色素与NIRQ色素的距离,由此通过荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer、FRET)进行荧光消光,能够提高基于光声成像的检测灵敏度。

[0008] 而且,专利文献1公开有在用于诊断和/或治疗用的的生物标记物(在活体内的物质中,成为病状变化等生理学指标)具有特异性目标指向能量的两亲性纳米粒子,其中,包含含有亲水性及疏水性的高分子的嵌段共聚物(A)及通过蛋白水解酶分解的肽及含有疏水性高分子的嵌段共聚物(B)的两亲性纳米粒子。专利文献1公开了能够使用脯氨酸作为构成疏水性高分子的成分,并且纳米粒子可以包含荧光物质。

[0009] 专利文献2公开有用于诊断和/或治疗的适用的化合物,其中,含有能够与纤维蛋白键合的肽,在该肽链中具有源自脯氨酸的结构的化合物。根据专利文献2记载的技术,该化合物也可以包含荧光色素。

[0010] 以往技术文献

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Synthesis of Polyproline Spacers between NIR Dye Pairs for FRET to Enhance Photoacoustic Imaging

[0013] 专利文献

[0014] 专利文献1:日本特表第2017-512763号

[0015] 专利文献2:日本特表第2010-512400号

发明内容

[0016] 发明要解决的技术课题

[0017] 本发明的课题在于提供一种当作为相对于生物物质等的标记物质时,在对溶液的适用及对膜的适用中的任一种使用方式中也显示优异的荧光强度的色素化合物。并且,本发明的课题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。

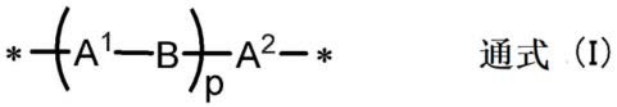
[0018] 用于解决技术课题的手段

[0019] 即,本发明的上述课题通过下述方法得到解决。

[0020] 〔1〕

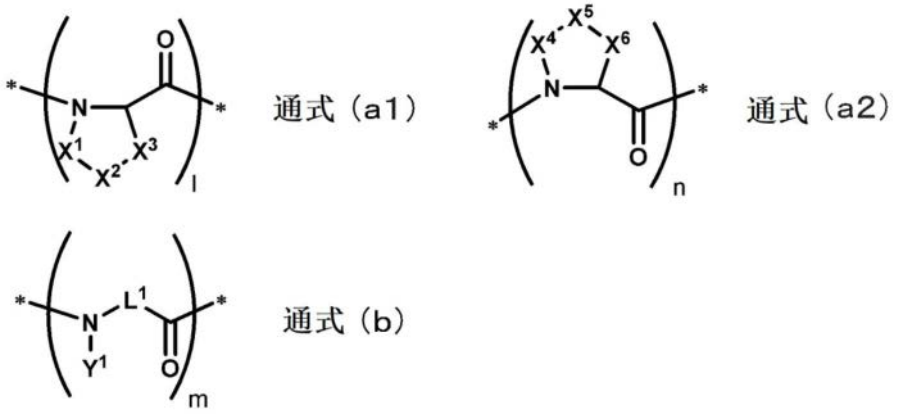
[0021] 一种化合物,其具有荧光体部及由下述通式(I)表示的结构。

[0022] [化学式1]

[0023] 

[0024] 式中,A^1表示由下述通式(a1)表示的结构,A^2表示由下述通式(a2)表示的结构,B表示由下述通式(b)表示的结构。

[0025] [化学式2]

[0026] 

[0027] 式中,X^1~X^6表示-O-、-S-、>NR^1或>CR^2R^3。

[0028] R^1~R^3表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基、-NR^9R^{10}、-OR^{11}或阴离子性基团。

[0029] R^9~R^{11}表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或杂芳基。

[0030] Y^1表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0031] L^1表示2价连接基团。

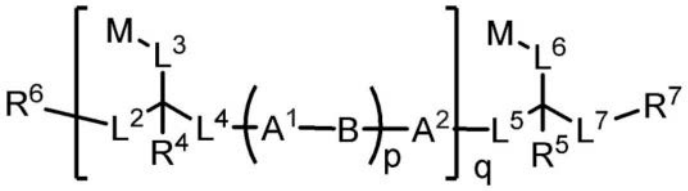
[0032] l、m、n及p为1以上的整数。

[0033] *表示键合键。

[0034] 〔2〕

[0035] 根据〔1〕所述的化合物,其由下述通式(II)表示。

[0036] [化学式3]

[0037] 

通式(II)

[0038] 式中,R^4及R^5表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0039] R^6及R^7表示氢原子、羟基、硫烷基、烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团或Q。Q表示羧基、能够与生物物质键合的取代基或能够与固体支撑体键合的取代基。

[0040] L^2～L^7表示单键或2价连接基团。

[0041] M表示荧光体部、生理活性物质部、前药部或放射性同位素含有部。

[0042] q为1以上的整数。

[0043] A^1、A^2、B及p与上述A^1、A^2、B及p含义相同。

[0044] 其中,M中的至少1个表示荧光体部。

[0045] 〔3〕

[0046] 根据〔1〕或〔2〕所述的化合物,其中,

[0047] 上述l及n中的至少一者为3以上的整数。

[0048] 〔4〕

[0049] 根据〔1〕至〔3〕中任一项所述的化合物,其中,

[0050] 上述L^1为上述通式(b)中的连接>NY^1与>C=O的最短原子数为1～4的连接基团。

[0051] 〔5〕

[0052] 根据〔1〕至〔4〕中任一项所述的化合物,其中,

[0053] 上述L^1为包含环结构的连接基团。

[0054] 〔6〕

[0055] 根据〔5〕所述的化合物,其中,

[0056] 所述环结构为具有聚环氧烷基作为取代基的基团。

[0057] 〔7〕

[0058] 根据〔1〕至〔6〕中任一项所述的化合物,其中,

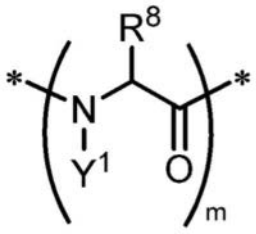
[0059] 由上述通式(b)表示的结构的ClogP值为1.0以下。

[0060] 〔8〕

[0061] 根据〔1〕至〔7〕中任一项所述的化合物,其中,

[0062] 上述B为由下述通式(c)表示的结构。

[0063] [化学式4]

[0064]  通式(c)

[0065] 式中,R^8表示氢原子或烷基。Y^1及m与上述Y^1及m含义相同。

[0066] *表示键合键。

[0067] 〔9〕

[0068] 根据〔8〕所述的化合物,其中,

[0069] 上述R^8为具有阴离子性基团、阳离子性基团及聚环氧烷基中的任一基团作为取代基的烷基。

[0070] 〔10〕

[0071] 根据〔1〕至〔9〕中任一项所述的化合物,其中,

[0072] 上述p为1的整数。

[0073] 〔11〕

[0074] 根据〔9〕所述的化合物,其中,

[0075] 上述R^8为具有聚环氧烷基作为取代基的烷基。

[0076] 〔12〕

[0077] 一种标记生物物质,其由〔1〕至〔11〕中任一项所述的化合物与生物物质键合而成。

[0078] 〔13〕

[0079] 根据〔12〕所述的标记生物物质,其中,

[0080] 上述生物物质为蛋白质、氨基酸、核酸、核苷酸、糖链及磷脂中的任一种。

[0081] 发明效果

[0082] 关于本发明的化合物,当作为相对于生物物质等的标记时,在对溶液的适用及对膜的适用中的任一种使用方式中也能够显示优异的荧光强度。并且,本发明的标记生物物质在对溶液的适用及对膜的适用中的任一种使用方式中,也显示优异的荧光强度。

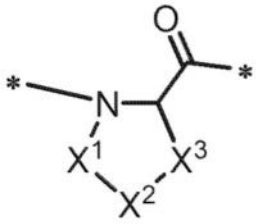
具体实施方式

[0083] 在本发明中,在具有多个由特定的符号或式表示的取代基、连接基团或结构单元等(以下,称为取代基等)时,或者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相同。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,它们可以彼此连接而形成环。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。

[0084] 例如,在本发明中,由后述通式(a1)表示的结构是指,由下述通式(i)表示的结构连接l个(l为1(一)以上的整数)。此时,l个由通式(i)表示的结构可以彼此相同,也可以彼此不同。另外,下述通式(i)中的X^1~X^3与后述通式(a1)中的X^1~X^3含义相同。这对于由()m括起来的结构,由()n括起来的结构,及、由()p括起来的结构,以及、由[]q括起来的结构也相同,存在m个的结构可以彼此相同,也可以彼此不同,存在n个的结构可以彼此相同,也可以彼此不同,存在p个的结构可以彼此相同,也可以彼此不同,存在q个的结构可以彼此相

同也可以彼此不同。而且,在化合物中,在具有多个由通式(I)表示的结构的情况下,多个A^1可以彼此相同,也可以彼此不同,多个A^2可以彼此相同,也可以彼此不同,多个B可以彼此相同也可以彼此不同。

[0085] [化学式5]

[0086] 

通式 (i)

[0087] 在本发明中,只要没有特别说明,则关于双键,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。而且,只要没有特别说明,在化合物中存在不对称碳原子或不对称中心的情况下,组态可以为R,S表述中的R及S中的任一个,而且也可以为它们的混合物。

[0088] 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)$_2$)等解离性阴离子性基团可以通过氢离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基团的含义使用,“磺基”以包含磺酸根离子或其盐的基团的含义使用,“膦酰基”以包含膦酸根离子或其盐的基团的含义使用。作为构成上述盐结构时的1价或多价阳离子,并不受特别限制,可以举出无机阳离子、有机阳离子等,具体而言,可以举出Na^+、Li^+及K^+等碱金属阳离子、Mg^{2+}、Ca^{2+}及Ba^{2+}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。

[0089] 在盐结构的情况下,其盐的种类可以是1种,也可以混合存在2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。

[0090] 本发明的化合物均为中性化合物。在本发明中,化合物为中性是指电中性。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,在作为构成荧光体部的色素的一例举出的由通式(α)表示的花青色素中,R^{42}键合的氮原子的形式电荷为+1,以使与该形式电荷成对,花青色素中或本发明的化合物中的其他结构中的磺基等解离性基团具有磺酸离子等离子结构,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。

[0091] 在与本发明中规定的花青色素有关的各通式中,为方便起见,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,由于本发明中规定的花青色素具有共轭体系,因此实际上,除了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花青色素,则包含在由各通式表示的花青色素中。这对于负电荷也同样适用。

[0092] 并且,在不损害本发明的效果的范围内,是指包含改变结构的一部分。此外,关于未明确记载经取代或未经取代的化合物,是指在不损害本发明的效果的范围内,可以具有任意的取代基。这关于取代基(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)也相同。在这种任意的取代基中,在本发明中优选取代基是选自后述的取代基组T中的取代基。

[0093] 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,则是指基团整体的碳原子数。即,当为该基团进一步具有取代基的方式时,是指包含该取代基的全部碳原子数。

[0094] 并且,在本发明中使用“~”表示的数值范围是指作为下限值及上限值包含记载于“~”前后的数值的范围。

[0095] 本发明的化合物为具有荧光体部及由后述通式(I)表示的结构的化合物。本发明的化合物在溶液、膜及斑点印迹中的任一状态下都能够获得显示出优异的荧光强度的标记生物物质的详细原因尚不确定,但认为如下。

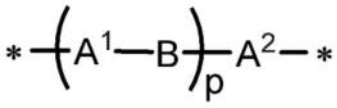
[0096] 本发明的化合物所包含的由后述的通式(I)表示的结构为具有由包含源自脯氨酸的环结构等含氮饱和5元环的重复单元(重复数1以上)构成的结构A^1及A^2,在存在多个这些A^1及A^2,进而存在多个A^1的情况下,通过与由A^1及A^2不同的重复单元(重复数1以上)构成的结构B连接各A^1之间的比较刚直的结构。认为本发明的化合物通过具有由该通式(I)表示的比较刚直的结构和荧光体部的结构,在分子间或具有2以上荧光体部的情况下,能够有效抑制由分子内的荧光体部的缔合引起的消光。因此,使用本发明的化合物而获得的标记生物物质在溶液、膜及斑点印迹的任一使用方式中都能够显示出优异的荧光强度。其中,在使用了本发明的化合物的标记生物物质中,通过具有B的结构,能够抑制由A^1及A^2的疏水性相互作用引起的凝集,因此认为与使用不具有由上述通式(I)表示的结构中的结构B的化合物的情况相比,在斑点印迹的状态中,显示更优异的荧光强度。

[0097] 以下,对本发明的化合物进行详细说明。

[0098] <本发明的化合物>

[0099] 本发明的化合物具有荧光体部及由下述通式(I)表示的结构。

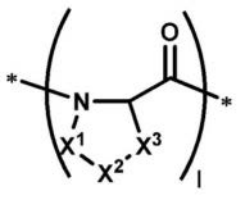
[0100] [化学式6]

[0101] 

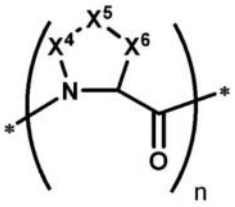
通式(I)

[0102] 式中,A^1表示由下述通式(a1)表示的结构,A^2表示由下述通式(a2)表示的结构,B表示由下述通式(b)表示的结构。

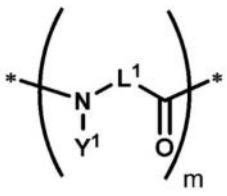
[0103] [化学式7]

[0104] 

通式(a1)



通式(a2)



通式(b)

[0105] 式中,X^1～X^6表示-O-、-S-、>NR^1或>CR^2R^3。

[0106] R^1～R^3表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基、-NR^9R^{10}、-OR^{11}或阴离子性基团。

[0107] R^9～R^{11}表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或杂芳基。

[0108] Y^1表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0109] L^1表示2价连接基团。

[0110] l、m、n及p为1以上的整数。

[0111] *表示键合键。

[0112] 另外,如前所述,由通式(b)表示的结构为与由通式(a1)表示的结构及由通式(a2)表示的结构中的任一种不同的结构。即,通式(b)中的L^1与Y^1可以键合而形成环,但所形成的环既不是将通式(a1)中的氮原子、X^1～X^3及碳原子设为环构成原子的5元环,也不是将通式(a2)中的氮原子、X^4～X^6及碳原子设为环构成原子的5元环。

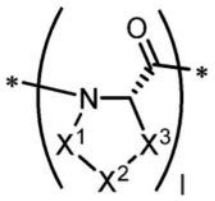
[0113] 上述荧光体部只要以共价键的状态含有于本发明的化合物中即可,在由通式(I)表示的结构中,可以作为任意取代基所具有的基团键合,作为与由通式(I)表示的结构不同的结构,可以直接或介由连接基团与通式(I)中的键合键*键合。作为上述荧光体部直接或介由连接基团与通式(I)中的键合键*键合的方式,例如,可以举出由后述通式(II)表示的化合物。

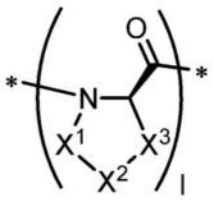
[0114] 荧光体部只要至少1个包含于本发明的化合物中即可。荧光体部优选包含2个以上。

[0115] 关于荧光体部,能够适用后述由通式(II)表示的化合物中的荧光体部的记载及具体例等。

[0116] 在本发明中,若考虑到立体异构体,则由通式(a1)表示的结构优选为由下述通式(IA)或(IB)中的任一式表示的结构。另外,下述通式中的X^1～X^3及l与上述通式(a1)中的X^1～X^3及l含义相同。若考虑到立体异构体,则由通式(a2)表示的结构同样也优选为由下述通式(IA)或(IB)中的任一式表示的结构。此时,通式(IA)及(IB)中的X^1～X^3及l分别与上述通式(a2)中的X^4～X^6及n含义相同。

[0117] [化学式8]

[0118] 

通式(IA)


通式(IB)

[0119] X^1～X^6表示-O-、-S-、>NR^1或>CR^2R^3。R^1～R^3表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基、-NR^9R^{10}、-OR^{11}或阴离子性基团。

[0120] 能够用作R^1～R^3的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基及阴离子性基团与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基、杂芳基及阴离子性基团含义相同,优选的范围也相同。

[0121] 能够用作上述R^1～R^3的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基可以未经取代,也可以具有取代基。

[0122] 作为R^1～R^3中的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为卤原子。

[0123] 能够用作R^1～R^3的-NR^9R^{10}及-OR^{11}中,R^9～R^{11}表示氢原子、烷基、烯基、炔基、酰基、芳基或杂芳基。

[0124] 能够用作R^9～R^{11}的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基含义相同,优选的范围也相同。

[0125] 能够用作上述R^9～R^{11}的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基可以未经取代,也可以具有取代基。

[0126] 作为R^9～R^{11}中的烷基、烯基、炔基、酰基、芳基及杂芳基可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为卤原子。

[0127] 作为R^9～R^{11},优选为氢原子或烷基。

[0128] 作为R^1～R^3,优选为氢原子、烷基、-NR^8R^9、-OR^{10}或阴离子性基团,更优选为氢原子、烷基、-NR^8R^9或-OR^{10},进一步优选为氢原子。

[0129] 作为上述X^1～X^3,优选为至少任意1个为>CR^2R^3,更优选为至少2个为>CR^2R^3,进一步优选均为>CR^2R^3。

[0130] 作为上述X^4～X^6,优选为至少任意1个为>CR^2R^3,更优选为至少2个为>CR^2R^3,进一步优选均为>CR^2R^3。

[0131] 另外,上述X^1～X^6可以具有荧光体部,也可以不具有荧光体部。

[0132] 能够用作Y^1的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基含义相同,优选的范围也相同。

[0133] 作为Y^1中的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为卤原子。

[0134] Y^1优选为氢原子。

[0135] 作为2价连接基团L^1,优选为将亚烷基、亚烯基、亚炔基、2价的环基、-O-、>NR^{a1}、>C=O、>S=O、-$S(=O)_2$-及>P(=O)OR^{a2}的各基团中的1种或2种以上组合而成的连接基团。R^{a1}及R^{a2}表示氢原子或1价的取代基。

[0136] 能够构成L^1的亚烷基与从选自后述的取代基组T的烷基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。亚烷基部分(即,除了亚烷基所具有的取代基部分的部分)的碳原子数优选为1～30,更优选为1～20,进一步优选为1～15。

[0137] 能够构成L^1的亚烯基与从选自后述的取代基组T的烯基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。亚烯基部分的碳原子数(即,除了亚烯基所具有的取代基部分的部分)优选为2～30,更优选为2～20,进一步优选为2～15。

[0138] 能够构成L^1的亚炔基与从选自后述的取代基组T的炔基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。亚炔基部分(即,除了亚炔基所具有的取代基部分的部分)的碳原子数优选为2～30,更优选为2～20,进一步优选为2～15。

[0139] 能够构成L^1的亚烷基、亚烯基及亚炔基分别可以为直链状,也可以为支链状。

[0140] 能够构成L^1的2价的环基与作为从后述的取代基组T中的环基(即,环烷基、环烯基、芳基或含杂原子环基)进一步去除1个氢原子而成基团的亚环烷基、亚环烯基、亚芳基、杂亚芳基或2价的脂肪族含杂原子环基含义相同,优选的基团也相同。

[0141] 作为能够构成L^1的亚芳基,亚芳基部分(即,除了亚芳基所具有的取代基部分的部分)的碳原子数优选为6～22,更优选为6～18,进一步优选为6～14。亚芳基优选为亚苯基或从菲去除2个氢原子而成的基团。

[0142] 作为能够构成L^1的杂亚芳基,杂亚芳基部分(即,除了杂亚芳基所具有的取代基部分的部分)的碳原子数优选为2～16,更优选为2～12,进一步优选为2～8。杂亚芳基优选为作为环构成原子具有>NH的5或6元的杂亚芳基,更优选为从吡咯环、咪唑环或三唑环去除2个氢原子的2价的基团。

[0143] 能够构成L^1的2价的环基优选为亚芳基或杂亚芳基。

[0144] 作为能够用作R^{a1}及R^{a2}的1价的取代基,优选为烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。能够用作R^{a1}及R^{a2}的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基含义相同,优选的范围也相同。这些取代基也可以进一步被选自取代基组T的基团取代。

[0145] 作为R^{a1}及R^{a2},优选为氢原子或烷基,更优选为氢原子。

[0146] 2价连接基团L^1可以未经取代,也可以具有取代基。即,在优选的方式中能够构成L^1的亚烷基、亚烯基、亚炔基、2价的环基、>NR^{a1}及>P(=O)OR^{a2}也可以未经取代,并且可以具有取代基。

[0147] 作为L^1可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为-$NR^{c1}R^{c2}$(R^{c1}及R^{c2}表示氢原子或烷基,优选为氢原子。)、芳基(优选为苯基)、杂芳基(优选为作为环构成原子包含>NH的5或6元的杂芳基,更优选为咪唑-基或吲哚-基。)、卤原子、羟基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、胍基(优选为、-NHC(=NH)NH_2)、烷硫基、酚基、硫烷基、阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基、或者将这些取代基组合2种以上而成的基团。

[0148] 作为L^1可以具有的取代基中组合上述2种以上而成的基团,可以优选举出将芳基、杂芳基、羟基、氨基甲酰基、酰氨基、阴离子性基团、阴离子性基团或聚环氧烷基组合2种以上而成的基团,更优选为被阴离子性基团、阳离子性基团或羟基取代的芳基、被阴离子性基团、阳离子性基团或羟基取代的杂芳基、具有聚环氧烷基作为取代基的氨基甲酰基或具有聚环氧烷基作为取代基的酰氨基。

[0149] 另外,在具有聚环氧烷基作为取代基的氨基甲酰基中,聚环氧烷基可以直接与氨基甲酰基键合,也可以介由从氨基甲酰基或酰氨基去除1个氢原子而获得的连接基团等与氨基甲酰基键合。同样地,在具有聚环氧烷基作为取代基的酰氨基中,聚环氧烷基可以直接与酰氨基键合,也可以介由从氨基甲酰基或酰氨基去除1个氢原子而获得的连接基团等与酰氨基键合。

[0150] 在能够构成L^1的将亚烷基、亚烯基、亚炔基、2价的环基、-O-、>NR^{a1}、>C=O、>S=O、-S(=O)$_2$-及>P(=O)OR^{a2}中的1种或2种以上组合而成的连接基团中,组合基团的种类只要成为妥当的化学结构则并不受特别限制。

[0151] 在能够构成L^1的将亚烷基、亚烯基、亚炔基、2价的环基(亚环烷基、亚环烯基、亚芳基、杂亚芳基或2价的脂肪族含杂原子环基)、-O-、>NR^{a1}、>C=O、>S=O、-S(=O)$_2$-及>P(=O)OR^{a2}中的1种或2种以上组合而成的连接基团中,组合基团的种类并不受特别限制,但例如,优选为1～6种,更优选为1～4种,进一步优选为1～2种。另外,将亚烷基、亚烯基、亚炔

基、亚环烷基、亚环烯基、亚芳基、杂亚芳基、2价的脂肪族含杂原子环基、-O-、>NR^{a1}、>C=O、>S=O、-S(=O)$_2$-及>P(=O)OR^{a2}的各基团分别算为1种,最多为14种类。

[0152] 作为能够构成L^1的将亚烷基、亚烯基、亚炔基、2价的环基、-O-、>NR^{a1}、>C=O、>S=O、-S(=O)$_2$-及>P(=O)OR^{a2}中的2种以上组合而成的连接基团,更优选为亚烷基-亚芳基-亚烷基、亚烷基-杂亚芳基-亚烷基、亚烷基-O-P(=O)OR^{a2}-亚烷基、亚烷基-O-的重复(后述的-(LL-O)$_h$-)或杂亚芳基-C(=O)-NH-亚烷基-C(=O)-NH-杂亚芳基-C(=O)-NH-亚烷基-NH-。

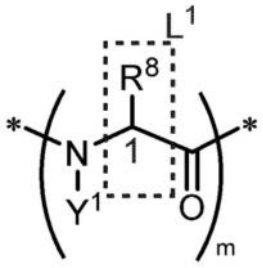
[0153] 作为2价连接基团L^1,优选为亚烷基、亚芳基或杂亚芳基或将这些组合2种以上而成的基团,更优选为亚烷基、亚芳基、杂亚芳基、亚烷基-亚芳基-亚烷基或亚烷基-杂亚芳基-亚烷基,进一步优选为亚烷基、亚芳基或杂亚芳基,尤其优选为亚烷基。2价连接基团L^1还优选设为组合亚烷基、亚烯基、亚炔基及2价的环基中的至少1种和-O-、>NR^{a1}、>C=O及>P(=O)OR^{a2}中的至少1种而成的基团,更优选为亚烷基-O-P(=O)OR^{a2}-亚烷基、亚烷基-O-的重复(后述的-(LL-O)$_h$-)、或、杂亚芳基-C(=O)-NH-亚烷基-C(=O)-NH-杂亚芳基-C(=O)-NH-亚烷基-NH-。

[0154] 另外,从将由通式(b)表示的结构的ClogP值调整至后述的优选范围的观点出发,L^1还优选具有特定的取代基,具体而言,优选具有-NH_2、作为环构成原子包含>NH的5或6元的杂芳基、羟基、-C(=O)NH_2、-NHC(=NH)NH_2、阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基,更优选具有阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基。

[0155] 关于2价连接基团L^1,连接通式(b)中的>NY^1与>C=O的最短原子数优选为1~8的连接基团,更优选为1~6的连接基团,进一步优选为1~4的连接基团。从抑制荧光体部的缔合的观点出发,L^1中的上述最短原子数优选为1或2,更优选为1。

[0156] 关于上述的2价连接基团L^1,“连接通式(b)中的>NY^1与>C=O的最短原子数”是指,构成连接>NY^1与>C=O的最短链的原子数。例如,在由下述通式(c)表示的结构中,构成连接>NY^1与>C=O的最短链的原子数为“1”。关于通式(c)的详细内容,将在后面进行详细叙述。

[0157] [化学式9]

[0158] 

通式(c)

[0159] 上述L^1优选为包含环结构的连接基团。作为L^1为包含环结构的连接基团的方式,可以举出在连接(i)>NY^1与>C=O的最短链中具有环结构的方式及在除了连接(ii)>NY^1与>C=O的最短链以外的部位具有环结构的方式。作为上述(i)的方式中的环结构,可以举出前述能够构成L^1的2价的环基。上述(ii)的方式相当于L^1具有环结构作为取代基的方式,具体而言,可以举出后述通式(c)中的R^8具有环结构的例子。

[0160] 其中,优选为上述(i)的方式。

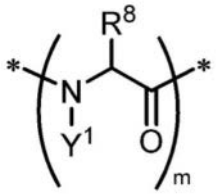
[0161] 由通式(b)表示的结构根据m及p(在后述的通式(II)中m、p及q)能够采用2以上的

结构。在本发明的化合物中的由通式(b)表示的结构中,上述的L^1为包含环结构的基团的结构的个数的比例优选为20%以上,更优选为40%以上。对上限值并没有特别限制,能够设为100%以下。另外,还优选为由通式(b)表示的结构中的所有L^1为包含环结构的基团。

[0162] 环结构优选为具有聚环氧烷基作为取代基的基团,聚环氧烷基可以直接与环结构键合,也可以介由连接基团键合。作为连接基团,可以举出从选自上述L^1可以具有的取代基的基团进一步去除氢原子而成的基团,优选为亚烷基。

[0163] 上述B优选为由下述通式(c)表示的结构。该由通式(c)表示的结构相当于上述通式(b)中的L^1中的最短原子数(通式(b)中的连接>NY^1与>C=O的最短原子数)为1的结构。

[0164] [化学式10]

[0165] 

通式(c)

[0166] 式中,R^8表示氢原子或烷基。Y^1及m与上述通式(b)中的Y^1及m含义相同。

[0167] *表示键合键。

[0168] R^8能够采用的烷基与后述的取代基组T中的烷基含义相同,优选的范围也相同。

[0169] 能够用作R^8的烷基可以是未经取代,也可以具有取代基。

[0170] 作为R^8中的烷基可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,能够适用前述的L^1可以具有的取代基的优选的记载。

[0171] 作为R^8中的烷基可以具有的取代基,优选为芳基(优选为苯基)、杂芳基(优选为咪唑-基或吲哚-基)、羟基、氨基(优选为$-NH_2$)、氨基甲酰基、酰氨基、胍基(优选为-NHC(=NH)NH_2)、烷硫基、酚基、硫烷基、阴离子性基团(优选为磺基、膦酰基或膦酰氧基)、阳离子性基团或聚环氧烷基、或者将这些组合2种以上而成的基团。

[0172] 作为R^8中的烷基可以具有的取代基中组合上述的2种以上而成的基团,能够优选适用前述L^1可以具有的取代基中组合上述的2种以上而成的基团所涉及的记载。

[0173] R^8优选为具有阴离子性基团、阳离子性基团及聚环氧烷基中的任一种作为取代基的烷基,阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基可以直接与烷基键合,也可以介由连接基团键合。作为连接基团,可以举出从选自上述的R^8中的烷基可以具有的取代基的基团进一步去除氢原子而成的基团,优选为氨基甲酰基或酰氨基或将这些组合而成的基团。

[0174] 从将由通式(c)表示的结构的ClogP值调整至后述的优选范围的观点出发,R^8与L^1相同地,优选具有特定取代基,作为具体的基团,与优选前述的L^1具有的特定取代基的记载含义相同。

[0175] 其中,从提高溶液状态下的荧光强度的观点出发,R^8优选为具有阴离子性基团作为取代基的烷基,从提高对溶液的适用及对膜的适用(干燥状态)中的荧光强度的观点出发,R^8优选为具有聚环氧烷基作为取代基的烷基。

[0176] (ClogP值)

[0177] 由通式(b)表示的结构的ClogP值优选为1.0以下,更优选为0.0以下,进一步优选为-1.0以下。

[0178] 其中,“ClogP值”为使用PerkinElmer Informatics公司制造的ChemDraw(注册商

标)Professional(ver.16.0.1.4)计算的值。具体而言,利用ChemDraw描绘由通式(b)表示的结构,在当选择由括号括起来的范围的结构(构成构成重复单元的结构)时计算的ClogP值中,将对小数点第二位四捨五入而获得的值设为由通式(b)表示的结构的ClogP值。

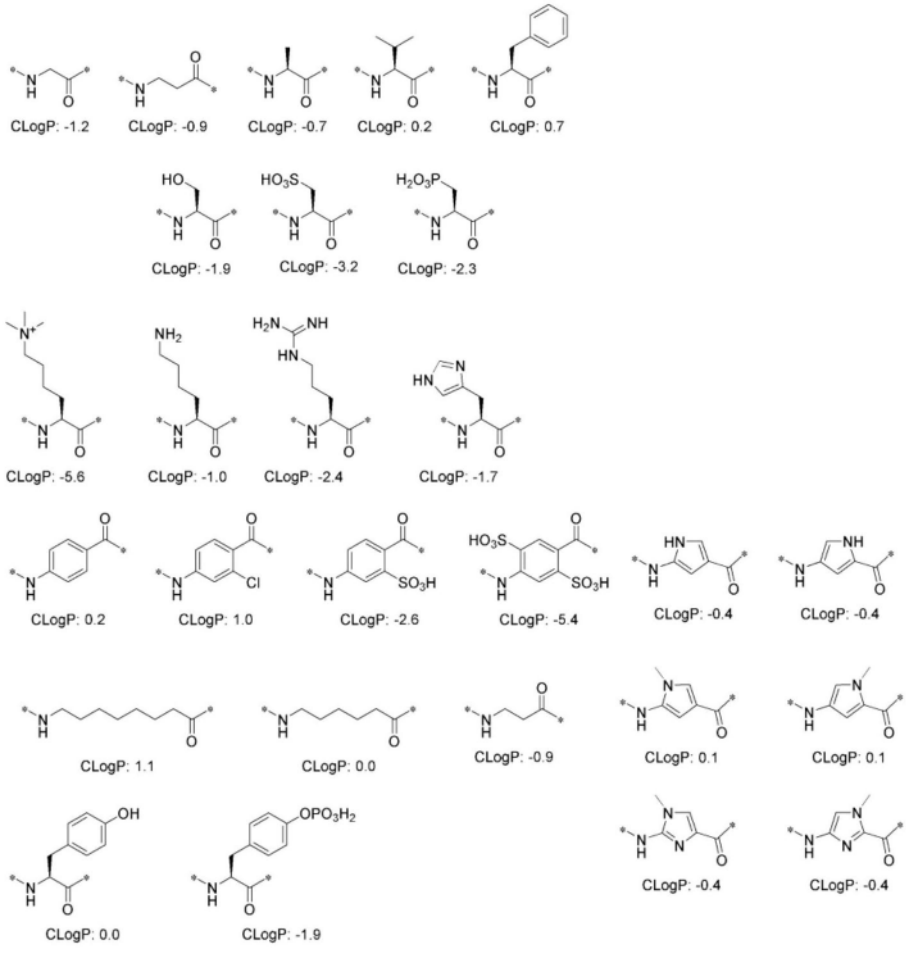
[0179] 由通式(b)表示的结构根据m及p(在后述的通式(II)中m、p及q)能够采用2以上的结构。在本发明的化合物中的由通式(b)表示的结构中,满足上述ClogP值的结构的个数的比例优选为20%以上,更优选为40%以上。对上限值并没有特别限制,能够设为100%以下。另外,还优选为由通式(b)表示的结构的全部满足上述ClogP值的结构。

[0180] 上述由通式(b)表示的结构的ClogP值的优选范围及满足ClogP值的结构的比例所涉及的记载也同样能够适用于前述由通式(c)表示的结构的ClogP值的优选范围及满足ClogP值的结构的比例。

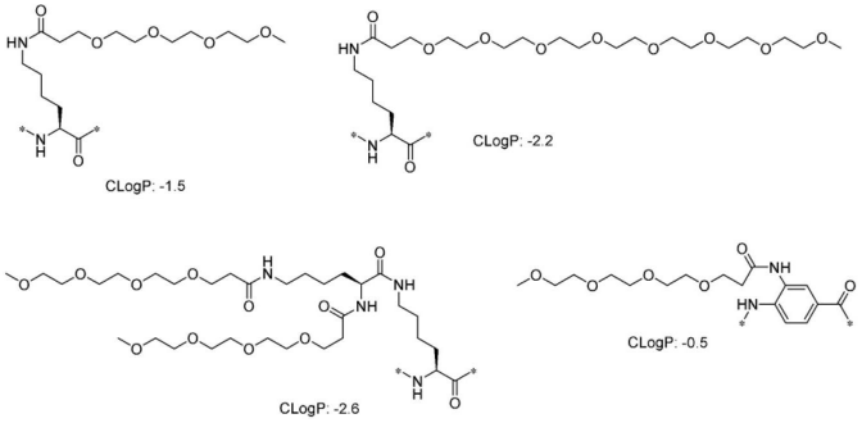
[0181] 将由通式(b)表示的结构的具体例与其ClogP值一起示于以下。其中,在本发明中,并不限定于这些结构。

[0182] 在下述具体例中,*表示键合键。

[0183] [化学式11]

[0184] 

[0185] [化学式12]

[0186] 

[0187] l、m、n及p为1以上的整数。以下记载的l、m、n及p的优选范围中的数均为“整数”。

[0188] l优选为2以上,更优选为5以上。l的上限并不受特别限定,但优选为30以下,更优选为25以下,进一步优选为20以下,尤其优选为15以下、其中优选为10以下。

[0189] m优选为1～4,更优选为1～2,进一步优选为1。

[0190] n优选为2以上,更优选为5以上。n的上限并不受特别限定,但优选为30以下,更优选为25以下,进一步优选为20以下,尤其优选为15以下、其中优选为10以下。

[0191] p优选为1～4,更优选为1～2,从提高所获得的标记生物物质的活性的观点出发,进一步优选为1。另外,p读取为在化合物中能够读取的最大数。

[0192] 抑制荧光体部的分子内和/或分子间的缔合,从进一步提高荧光强度的观点出发,优选为l及n中的至少一者为3以上的整数,更优选为l及n这两者为3以上的整数。

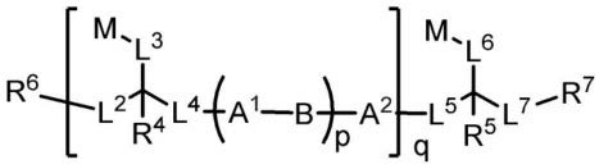
[0193] 在化合物中A^1存在2以上的情况中,本发明的化合物中的A^1中,l为3以上的整数的A^1的个数的比例只要可以获得上述效果则并不受特别限定,优选为40％以上,更优选为60％以上,进一步优选为80％以上。对上限值并没有特别限制,能够设为100％以下。另外,还优选为本发明的化合物中的A^1全部为l为3以上的整数的A^1。

[0194] 这在化合物中A^2存在2以上的情况下也相同,关于在上述化合物中A^1存在2以上的情况中的记载,将A^1改读为A^2,将l改称为n而适用。

[0195] 在本发明的化合物中,即使m为2以上,在通过通式(I)中的A^1及A^2的结构保持通式(I)的结构整体的刚直性的情况(虽不受特别限定,但例如优选为B的结构为α-氨基酸的情况、包含芳香族环的情况等)下,可以认为抑制荧光体部的缔合,显示高荧光性能。

[0196] 本发明的化合物优选为由下述通式(II)表示的化合物。

[0197] [化学式13]

[0198] 

通式 (II)

[0199] R^4及R^5表示氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基。

[0200] 能够用作R^4及R^5的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、芳基及杂芳基含义相同,优选的范围也相同。

[0201] 能够用作R^4及R^5的取代基可以具有取代基,作为这种取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基,例如,优选为卤原子。

[0202] R^4及R^5优选为氢原子。

[0203] 在使用氨基酸作为原料的情况下,R^4及R^5大多成为氢原子,但是R^4及R^5中的取代基对于本发明的化合物显示优异的荧光强度没有大的贡献,因此R^4及R^5可以为除了氢原子以外的其他取代基(烷基、烯基、炔基、芳基或杂芳基)。

[0204] R^6及R^7表示氢原子、羟基、硫烷基、烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团、-(L-O)$_t$$R^E$或Q。

[0205] 能够用作R^6或R^7的烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团及-(L-O)$_t$$R^E$与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团及-(L-O)$_t$$R^E$含义相同,优选的范围也相同。

[0206] 能够用作R^6或R^7的烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基及杂芳基可以未经取代,也可以具有取代基。

[0207] 作为R^6或R^7中的烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、氨基、酰基及杂芳基可以具有的取代基,可以举出将后述的取代基组T中的取代基组合1种或2种以上而成的基团,优选为烷基、酰基、烷氧基、氨基、氨基甲酰基、酰氨基、卤原子、-(L-O)$_t$$R^E$、阴离子性基团、阳离子性基团或Q或将这些取代基组合2种以上而成的取代基,更优选为酰基、氨基、氨基甲酰基、酰氨基、卤原子、-(L-O)$_t$$R^E$、膦酰基、膦酰氧基、或Q或将这些取代基组合2种以上而成的取代基。

[0208] 能够用作R^6或R^7的Q表示羧基、能够与生物物质键合的取代基或能够与固体支撑体键合的取代基。

[0209] 作为能够与生物物质键合的取代基,能够适用能够与后述的生物物质键合的取代基的记载,作为能够与固体支撑体键合的取代基,能够适用能够与后述的固体支撑体键合的取代基的记载。

[0210] 作为R^6,优选为酰基或-C(=O)(L-O)$_t$$R^E$,更优选为酰基。另外,$R^6$能够设为组合烷基与膦酰基和/或膦酰氧基而成的基团。

[0211] 作为R^7,优选为具有由*-NH-亚烷基-C(=O)-表示的结构的基团或具有由*-NH-(LL-O)$_h$-表示的结构的基团。*是指与L^7的键合部位。-(LL-O)$_h$-除了确定与L^7键合的侧以外与后述的-(LL-O)$_h$-含义相同。

[0212] (具有由*-NH-亚烷基-C(=O)-表示的结构的基团)

[0213] 作为由*-NH-亚烷基-C(=O)-表示的结构中的亚烷基,优选为上述的通式(c)中的>CHR^8。其中,R^8优选为氢原子。而且,由-NH-亚烷基-C(=O)-表示的结构可以重复,作为重复数(在以后中,将重复数也表述为w。),优选为1~15,更优选为1~10,进一步优选为1~5。

[0214] R^7为由*-[NHCH$_2$C(=O)]$_w$-**(w为1~5)表示的结构,优选为**所示侧的末端为羟基的方式。

[0215] 在**所示侧的末端为Q的情况下,R^7还优选为*-[NHCH$_2$C(=O)]$_w$-**与Q被连接基团连接的方式。此时,连接基团并不受特别限制,但例如,可以举出>C=O、>NR^{b1}(R^{b1}如后所述,优选为氢原子或烷基。)或亚烷基、或者将这些组合2种以上而成的基团,可以优选举出-NR^{b1}-亚烷基。作为这种R^7,例如为由*-[NHCH$_2$C(=O)]$_w$-NHCH$_2$-**(w为1~5)表示的结构,可以设为**所示侧的末端为Q的方式。

[0216] (具有由*-NH-(LL-O)$_h$-表示的结构的基团)

[0217] 在R^7为末端为Q的取代基的情况下,还优选为*-NH-(LL-O)$_h$-与Q被连接基团连接的

方式。此时,连接基团并不受特别限制,但例如,可以举出>C=O、>NR^{b1}(R^{b1}如后所述,优选为氢原子或烷基。)或亚烷基、或者将这些组合2种以上而成的基团,可以优选举出亚烷基。作为这种R^7,例如可以设为*-NH-$(LL\text{-}O)_h$-C_2H_4-Q的方式。

[0218] R^6及R^7中的至少一者优选具有Q。R^6具有Q的方式包含在R^6为Q的情况,及Q与连接基团键合的方式(介由连接基团具有Q的方式),R^7具有Q的方式包含在R^7为Q的情况,及Q与连接基团键合的方式(介由连接基团具有Q的方式)。

[0219] 在R^6及R^7中的至少一者具有Q的情况下,具有Q的R^6及具有Q的R^7优选具有肽结构,更优选为肽结构与NHS酯结构的组合。在R^6及R^7中的至少一者具有Q的情况下,具有Q的R^6及具有Q的R^7能够设为具有后述的-$(LL\text{-}O)_h$-的方式,也可以设为-$(LL\text{-}O)_h$-与NHS酯结构的组合。关于更具体的结构,如上所述。

[0220] L^2~L^7表示单键或2价连接基团,优选为单键或将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>NR^{b1}、>C=O、>S=O、-$S(=O)_2$-及>$P(=O)OR^{b2}$的各基中的1种或2种以上组合而成的连接基团。R^{b1}及R^{b2}表示氢原子或1价的取代基。

[0221] 能够构成L^2~L^7的亚烷基与从选自后述的取代基组T的烷基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。

[0222] 能够构成L^2~L^7的亚烯基与从选自后述的取代基组T的烯基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。

[0223] 能够构成L^2~L^7的亚炔基与从选自后述的取代基组T的炔基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。

[0224] 能够构成L^2~L^7的亚芳基与从选自后述的取代基组T的芳基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。

[0225] 能够构成L^2~L^7的杂亚芳基与从选自后述的取代基组T的杂芳基进一步去除1个氢原子而得的基团含义相同,优选的基团也相同。

[0226] 能够构成L^2~L^7的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基可以是未经取代的基团,也可以是具有取代基的基团。

[0227] 作为能够构成L^2~L^7的上述亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基可以具有的取代基,并不受特别的限定,可以举出选自后述的取代基组T的基团,优选为烷基、烯基、炔基、芳基、烷氧基、杂芳基、阴离子性基团、阳离子性基团、氨基、酰基、氨基甲酰基、酰氨基、-$(L\text{-}O)_t$$R^E$或卤原子。

[0228] 并且,能够构成L^2~L^7的上述亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基可以具有的取代基的数量只要能够用作结构,则没有特别限制,能够设为至少1个以上,作为上限值,没有特别限制,例如,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基中的所有氢原子可以被取代基取代。

[0229] 作为能够构成L^2~L^7的>NR^{b1}中的R^{b1}及>$P(=O)OR^{b2}$中的能够用作R^{b2}的1价的取代基,优选为烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或-$(L\text{-}O)_g$$R^E$,与后述的取代基组T中的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基及-$(L\text{-}O)_g$$R^E$含义相同,优选的范围也相同。

[0230] 作为R^{b1}及R^{b2},优选为氢原子或烷基,更优选为氢原子。

[0231] 在能够构成L^3~L^6的将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>NR^{b1}、>C=O、>S=O、-$S(=O)_2$-及>$P(=O)OR^{b2}$中的2种以上组合而成的连接基团中,组合

基团的种类只要成为妥当的化学结构,则并不受特别限制,但例如,优选为2～6种,更优选为2～4种。另外,亚烷基、亚烯基、亚炔基、-O-、-S-、>NR^{b1}、>C=O、>S=O、-$S(=O)_2$-及>P(=O)OR^{b2}分别算为1种,最多为12种类。

[0232] 在能够构成L^3～L^6的将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>NR^{b1}、>C=O、>S=O、-$S(=O)_2$-及>P(=O)OR^{b2}中的2种以上组合而成的连接基团中,组合基团的数量并不受特别限制,但例如,优选为以下的组合基团的数量。

[0233] 在L^2中,组合基团的数量并不受特别限制,但可以优选举出1～10个,更优选为1～7个,进一步优选为1～3个。另外,还优选为1个。

[0234] 在L^3及L^6中,组合基团的数量并并不受特别限制制,但可以优选举出1～10个,更优选为1～7个,进一步优选为1～5个。

[0235] 在L^4中,组合基团的数量并并不受特别限制制,但可以优选举出1～10个,更优选为1～7个,进一步优选为1～5个。

[0236] 在L^5中,组合基团的数量并不受特别限制,但可以优选举出1～10个,更优选为1～7个,进一步优选为1～5个。

[0237] 在L^7中,组合基团的数量并不受特别限制,但可以优选举出1～20个,更优选为1～18个,进一步优选为1～10个。另外,还优选为1个。

[0238] 例如,在实施例1的化合物(1)-NHS中,L^4为将2个>C=O、1个>NR^{a1}(R^{a1}为氢原子)、1个亚烷基(-C_2H_4-)组合而成的基团,“组合基团的种类”为3种类、“组合基团的数量”为4个。

[0239] (i)L^2、L^7

[0240] 上述能够构成L^2～L^7的2价连接基团中,L^2更优选为组合数量为1,进一步优选为>NR^{b1}、>C=O、亚芳基、亚烷基、-O-或-S-,尤其优选为>NR^{b1}、>C=O、亚芳基或烷基、其中优选为>NH或>C=O。

[0241] 在上述能够构成L^2～L^7的2价连接基团中,L^7更优选为组合数量为1,进一步优选为>C=O、>NR^{b1}或亚芳基,尤其优选为>C=O或>NR^{b1}。

[0242] (ii)L^3、L^6

[0243] L^3及L^6更优选为将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>C=O及>NR^{b1}中的1种或2种以上组合而成的基团,进一步优选为由*-L^x-L^y-**表示的基团。

[0244] L^x为单键或将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基中的1种或2种以上组合而成的基团,L^y为单键、-O-、-S-、>C=O或>NR^{b1}。*表示向L^2及L^4键合的碳原子或L^5及L^7键合的碳原子的键合键,**表示与M的键合键。其中,在L^y为单键的情况下,L^x为杂亚芳基或者包含位于*侧的将亚烷基、亚烯基、亚炔基及亚芳基中的1种或2种以上组合而成的基团及位于**侧的杂亚芳基的基团。

[0245] 在上述的由*-L^x-L^y-**表示的基团中,L^3及L^6优选为L^y为单键、-S-、>C=O或>NR^{b1}的基团,更优选为L^y为>C=O或>NR^{b1}的基团,进一步优选为L^x为亚烷基且L^y为>C=O或>NR^{b1}的基团。

[0246] (iii)L^4、L^5

[0247] L^4更优选为单键、>C=O、>NR^{b1}、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基或杂亚芳基,或者亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基中的至少1种与>NR^{b1}及>C=O的组合,进一步优选为通过亚烷基、亚烯基及亚炔基中的至少1种连接-C(=O)-NR^{b1}-与>C=O的基团或

>C=O,尤其优选为通过亚烷基连接-C(=O)-NR^{b1}-与>C=O的基团或>C=O,其中优选为>C=O。

[0248] L^5更优选为单键、>C=O、>NR^{b1}、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基或杂亚芳基,或者亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基中的至少1种与>NR^{b1}及>C=O的组合,进一步优选为通过亚烷基、亚烯基及亚炔基中的至少1种连接-NR^{b1}-C(=O)-与>NR^{b1}的基团或>NR^{b1},尤其优选为通过亚烷基连接-NR^{b1}-C(=O)-与>NR^{b1}的基团或>NR^{b1},其中优选为>NR^{b1}。

[0249] 另外,关于上述的L^4所涉及的记载中的"-C(=O)-NR^{b1}-"及上述的L^5所涉及记载中的"-NR^{b1}-C(=O)-"中的左右与通式(II)中的纸面上的左右相同。

[0250] 另外,在由上述通式(II)表示的化合物中,将M与L^2及L^4键合的碳原子或L^5及L^7键合的碳原子连接的连接链中的最短原子数例如为1~60即可,优选为1~40。在M为荧光体部的情况下,上述最短原子数是指,在荧光体部M中,将用于显示荧光的共轭结构部分与L^2及L^4键合的碳原子或L^5及L^7键合的碳原子连接的连接链中的最短原子数。

[0251] 另外,在由上述通式(II)表示的化合物中,还优选在M的共轭结构部分-后述的连接基团由ZZZ-L^3-表示的结构中由"-连接基团ZZZ-L^3-"表示的连接链中的任一部分、及M的共轭结构部分-后述的由连接基团ZZZ-L^6-表示的结构中由-连接基团ZZZ-L^6-"表示的连接链中的任一部分具有后述由-$(CH_2-CH_2-O)_b$-表示的结构(b也如后所述。)。

[0252] 在由通式(II)表示的化合物中,相邻的基团彼此可以相互键合而形成环。作为可以相互键合而形成环的相邻的基团的组合,例如,可以举出L^2与L^3的组合、L^2与L^4的组合、L^3与R^4的组合、L^5与L^6的组合、L^5与L^7的组合或L^6与R^5的组合。

[0253] 上述相邻的基团彼此可以相互键合而形成的环可以为芳香族环及脂肪族环中的任一种,也可以为烃环及杂环中的任一种,优选为5或6元环。

[0254] 作为上述脂肪族环,优选举出环戊烷环、环己烷环或以上述由通式(a1)表示的结构中记载的碳原子、氮原子及X^1~X^3为环构成原子的5元环,更优选为以上述由通式(a1)表示的结构中记载的碳原子、氮原子及X^1~X^3为环构成原子的5元环。

[0255] 作为上述芳香族环,优选为苯环或含氮芳香族杂环,更优选为苯环或环构成原子由碳原子及氮原子构成的含氮芳香族杂环,进一步优选为苯环或吡啶环。

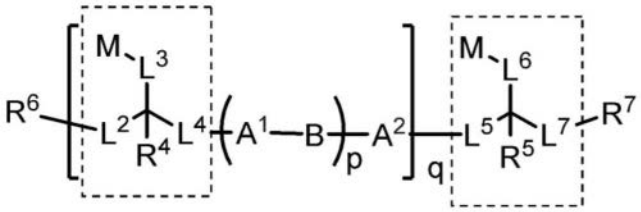
[0256] 这些环可以具有取代基,作为可以具有的取代基,没有特别限制,选自取代基组T。

[0257] 作为通过L^3与R^4的组合或L^6与R^5的组合形成的环,可以为上述脂肪族环及芳香族环中的任一种,优选为上述的脂肪族环。

[0258] 作为通过L^2与L^3的组合、L^2与L^4的组合、L^5与L^6的组合或L^5与L^7的组合形成的环,上述脂肪族环及芳香族环中的任一种,优选为以上述由通式(a1)表示的结构中记载的碳原子、氮原子及X^1~X^3为环构成原子的5元环或苯环。

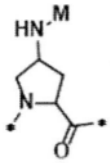
[0259] 例如,能够将由通式(II)的虚线包围的下述结构设为,

[0260] [化学式14]

[0261]  通式 (II)

[0262] 包含具有环结构的以下结构的结构。在以下结构中,*表示连接部。

[0263] [化学式15]

[0264] 

[0265] q为1以上的整数。对上限值没有特别限制,例如,能够设为30以下的整数,优选为20以下的整数,更优选为10以下的整数,进一步优选为8以下的整数。

[0266] A^1、A^2、B及p与前述的通式(I)中的A^1、A^2、B及p含义相同。

[0267] M表示荧光体部、生理活性物质部、前药部或放射性同位素含有部。

[0268] 其中,M中的至少1个表示荧光体部。在存在多个M的情况下,M中的至少2个优选为光吸收特性彼此等效的荧光体部。

[0269] 在本发明的化合物中,对上述荧光体部M的数量的上限值没有特别限制,例如,能够设为20个以下,优选为18个以下,更优选为16个以下。

[0270] 作为M能够采用的荧光体部(以下,也称为荧光体部M),只要是包括显示荧光的有机化合物的结构部,则没有特别的限制而能够使用。而且,荧光体部M可以为由显示荧光的有机化合物构成的结构部进一步具有连接基团的结构部。作为这种连接基团,并不受特别限制,例如能够举出后述的连接基团ZZZ。例如,在由通式(II)表示的化合物中,优选举出荧光体部M通过该连接基团ZZZ与L^3或L^6键合的化合物。

[0271] 作为荧光体部M,例如,可以优选地举出由呫吨色素、若丹明色素、香豆素色素、花青色素、芘色素、噁嗪色素、方酸菁色素、吡啶基噁唑色素及吡咯亚甲色素中的至少1种色素构成的结构部。

[0272] 作为上述的呫吨色素、若丹明色素、香豆素色素、花青色素、芘色素、噁嗪色素、方酸菁色素、吡啶基噁唑色素及吡咯亚甲色素,没有特别限制,能够使用作为这些色素通常已知的色素。

[0273] 在本发明的化合物具有2个以上荧光体部的情况下,从设为没有产生FRET的结构的观点出发,各荧光体部优选为光吸收特性彼此等效的荧光体部。上述“光吸收特性彼此等效的荧光体部”是指,满足各荧光体部的吸收光谱中的最大吸收波长之差为15nm以内的关系。

[0274] 在本发明中,化合物所具有的所有荧光体部更优选为在各荧光体部的吸收光谱中的最大吸收波长中满足最靠低波长侧的最大吸收波长与最靠高波长侧的最大吸收波长之差为15nm以内的关系的化合物。

[0275] 作为化合物中具有2个荧光体部的化合物,如上所述,已知有产生FRET现象的化合物。该化合物中的被激励光激励的荧光体部I(能量供给体)和从荧光体部I接受能量的其他

荧光体部II(能量受容体)满足荧光体部之间的距离等特定要件,除此之外,各吸收光谱中的最大吸收波长之差通常设计为超过15nm。在这种化合物中,虽然从荧光体部I发出荧光但是能量被荧光体部II接收,因此导致作为化合物的荧光强度变低。

[0276] 作为上述的光吸收特性彼此等效的荧光体部的化学结构,只要满足上述的最大吸收波长之差则没有特别限制,优选为荧光体部的主骨架的结构相同。其中,取代基的组态及链长等可以不同,而且在具有阴离子性基团或阳离子性基团的情况下,抗衡离子也可以彼此不同。上述最大吸收波长之差优选为10nm以内,更优选为5nm以内。

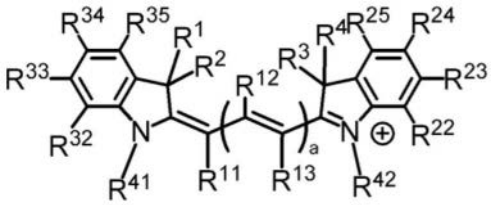
[0277] 另外,荧光体部的吸收光谱是指,使用分光光度计测定利用PBS缓冲液稀释的构成荧光体部的荧光体单体的光谱。

[0278] 能够用作上述M的荧光体部作为一方式,还优选为由吡咯亚甲色素构成的结构部。作为吡咯亚甲色素,能够举出二吡咯亚甲基硼络合物。作为二吡咯亚甲基硼络合物,能够使用国际公开第2019/230963号中记载的由通式(1)或(4)表示的荧光性化合物(二吡咯亚甲基硼络合物)、国际公开第2021/100814号中记载的由通式(1)表示的化合物(二吡咯亚甲基硼络合物),将这些记载引用并入本说明书中。

[0279] 另外,关于构成上述荧光体部M的色素,以不具有能够与生物物质键合的取代基的方式并入。

[0280] 能够用作上述M的荧光体部作为另一方式,优选为由花青色素构成的结构部,更优选为由下述通式(α)所表示的花青色素构成的结构部。

[0281] [化学式16]

[0282] 

通式(α)

[0283] 式中,R^1~R^4表示烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$。b为1~50,R^{21}表示烷基。

[0284] R^{11}~R^{13}表示氢原子、烷基、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。

[0285] R^{22}~R^{25}及R^{32}~R^{35}表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、氨磺酰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、硝基或卤原子。

[0286] R^{41}及R^{42}表示烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$。R^{21}及b与上述的R^{21}及b含义相同。R^{41}及R^{42}可以彼此键合而形成环。

[0287] a为1~3的整数。

[0288] 通过从上述的R^1~R^4、R^{11}~R^{13}、R^{22}~R^{25}、R^{32}~R^{35}、R^{41}或R^{42}中的任一个去除1个氢原子,成为1价的结构部。

[0289] 其中,由式(α)表示的花青色素为中性。

[0290] 由上述通式(α)表示的花青色素依赖于通过共轭双键连接的重复数为2a+3的次甲基链的长度,当a=1时,在520~600nm的波长区域(585nm附近),具有激励吸收波长,当a=2时,在620~700nm的波长区域(685nm附近),具有激励吸收波长,当a=3时,在740~830nm的波长区域(785nm附近),具有激励吸收波长。因此,具有由通式(α)所表示的花青色素构成的

结构部作为荧光体部M的本发明的化合物分别在使用与化合物的吸收激励波长对应的大致500～800nm的波长区域的任意波长(例如,600nm、700nm、800nm附近)的光源作为激励光源的荧光标记中,能够用作显示优异的荧光强度的化合物。

[0291] 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为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。

[0292] 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。

[0293] 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,具有由通式(α)所表示的花青色素构成的结构部作为荧光体部M的本发明的化合物中a＝2或3的化合物也能够用作显示出优异的荧光强度的化合物,尤其,对于更高灵敏度地观察、检测蛋白质的要求,与使用了以往的花青色素的荧光标记相比,也能够显示出优异的荧光强度。

[0294] (i)R^1～R^4

[0295] R^1～R^4表示烷基或$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$。

[0296] 能够用作R^1～R^4的烷基与后述的取代基组T中的烷基含义相同。

[0297] 未经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。

[0298] 在烷基具有取代基的情况下,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,尤其优选为2～5。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3～25,进一步优选为3～15,尤其优选为3～11。

[0299] 在本发明中,“具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数”是指除了烷基所具有的取代基部分以外的碳原子数。

[0300] 在本发明中,“构成具有取代基的烷基的最长链的原子数”是指包含取代基部分的原子数(即,从总原子数中减去不构成最长链的分子链的原子数而得的原子数)。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。

[0301] 作为能够用作R^1～R^4的烷基可以具有的取代基,可以举出烷氧基、羧基、烷氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、磺基、膦酰基及$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$、以及由这些取代基的组合构成的基团。

[0302] 作为能够用作R^1～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。

[0303] 作为能够用作R^1～R^4的烷基,优选为未经取代的烷基。

[0304] $(-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21})$

[0305] 能够用作R^1～R^4的$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$中,b为1～50,R^{21}表示烷基。

[0306] b是指平均重复数(也简称为重复数。),优选为1～24,更优选为1～12,进一步优选

为1～10,尤其优选为4～10,最优选为4～8。

[0307] 关于上述平均重复数,能够对化合物进行^{1}H-NMR测定,由平均积分值计算。在本发明中规定的平均重复数是指,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。

[0308] R^{21}中的烷基能够适用能够用作上述R^1～R^4的烷基的记载。

[0309] 作为能够用作R^1～R^4的$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$及作为R^1～R^4的烷基能够作为取代基具有的$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$,优选为$-(CH_2-CH_2-O)_b-$未经取代的烷基。

[0310] 从提高荧光色素本身的荧光强度的观点出发,优选为R^1～R^4中的至少1个包含由$-(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构,更优选为R^1及R^2中的至少1个和R^3及R^4中的至少1个包含由$-(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构。

[0311] 本发明的化合物中的所有荧光体部M为由通式(α)所表示的花青色素构成的结构部,进一步优选为R^1及R^2中的至少1个与R^3及R^4中的至少1个包含由$-(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构。

[0312] 由上述$-(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构优选通过采用$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$作为R^1～R^4导入。

[0313] 上述$-(CH_2-CH_2-O)_b-$中的b与上述$-(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$中的b含义相同。

[0314] R^1～R^4的取代基相对于花青色素骨架(平面)向垂直方向突出,因此推测通过包含由$-(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构作为该取代基,稠环部分不易发生π-π相互作用(抑制缔合的效果增强),能够抑制由缔合引起的荧光强度的下降。

[0315] (ii)R^{11}～R^{13}

[0316] R^{11}～R^{13}分别独立地表示氢原子、烷基、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。

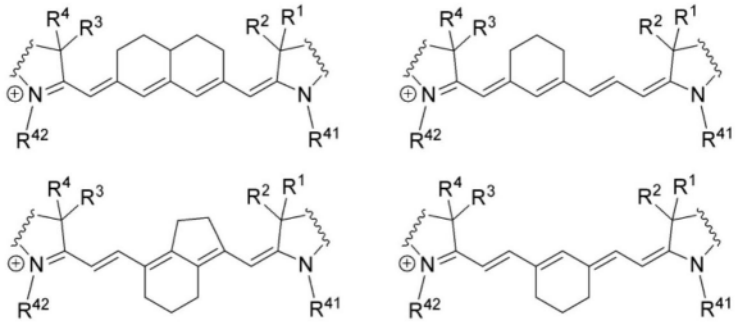
[0317] 能够用作R^{11}～R^{13}的烷基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基及卤原子与后述的取代基组T中的烷基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基及卤原子含义相同,优选范围也相同。

[0318] 作为R^{11}～R^{13}中的烷基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基及氨基可以具有的取代基,可以举出后述的取代基组T中的取代基。

[0319] 在R^{11}～R^{13}中,相邻的基团彼此相互键合而形成的5元环或6元环可以为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。

[0320] 例如,以a＝3的情况为例,作为具有R^{11}～R^{13}中相邻的基团彼此键合而形成的环的结构,可以优选举出下述结构。另外,在下述例中,记载了未形成环结构的R^{11}～R^{13}为氢原子,环结构不具有取代基的结构,但并不限定于这些。并且,在下述中,省略记载波浪线末端的结构。

[0321] [化学式17]

[0322] 

[0323] R^{11}及与假吲哚环键合的碳原子所具有的R^{13}优选为氢原子。

[0324] R^{12}及除了上述以外的R^{13}优选为氢原子或烷基。

[0325] 在R^{11}～R^{13}中,除了R^{11}及与假吲哚环键合的碳原子所具有的R^{13}以外的R^{12}～R^{13}中的相邻的基团彼此(即,除了与假吲哚环键合的碳原子所具有的R^{13}以外的R^{13}和R^{12}中的相邻的基团彼此)优选相互键合而形成5或6元环,更优选形成6元环。而且,优选在连接吲哚啉环及假吲哚环的键合的中心部分形成上述5或6元环。在连接吲哚啉环及假吲哚环的键的中心部分形成的环是指含有来自吲哚啉环及假吲哚环的键合原子数相等的碳原子作为环构成原子的环。

[0326] 上述荧光体部M通过从上述的R^{1}～R^{4}、R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}、R^{32}～R^{35}、R^{41}或R^{42}中的任一个中去除1个氢原子,成为1价的结构部。

[0327] 具体而言,通过从能够用作R^{1}～R^{4}、R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}、R^{32}～R^{35}、R^{41}或R^{42}的取代基中去除1个氢原子成为1价的结构部,或者能够用作R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}或R^{32}～R^{35}的氢原子被去除,而成为在键合有R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}或R^{32}～R^{35}的碳原子上具有键合键的1价的结构部。

[0328] 其中,上述荧光体部M优选通过从上述R^{41}及R^{42}键合而形成的环上去除1个氢原子而成为1价的结构部。

[0329] (iii)R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}

[0330] R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}表示氢原子、烷基、烷氧基、芳基、磺基、氨磺酰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、硝基或卤原子。关于这些R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35},相邻的基团彼此可以相互键合而形成稠环。

[0331] 能够用作R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}的烷基、烷氧基、芳基、磺基、氨磺酰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、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、氨磺酰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、酰氧基、氨基甲酰基、酰氨基、硝基及卤原子含义相同。

[0332] 作为R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}中相邻的基团彼此相互键合而形成的稠环没有特别限制,例如,可以举出萘环。另外,从抑制缔合的观点出发,优选R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}中相邻的基团彼此不相互键合,不形成稠环。

[0333] 从提高水溶性及抑制缔合的观点出发,优选为R^{22}～R^{25}中的至少1个和R^{32}～R^{35}中的至少1个具有亲水性基团,更优选为R^{22}～R^{25}所键合的环及R^{32}～R^{35}所键合的环的每一个具有至少1个亲水性基团。例如,R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}中相邻的基团彼此相互键合而分别形成萘环作为稠环的情况下,是指R^{22}～R^{25}所键合的环的数量为2个,R^{32}～R^{35}所键合的环的数量为2个,更优选为R^{22}～R^{25}中的至少2个及R^{32}～R^{35}中的至少2个具有亲水性基团。只要是可能的结构,则上限值没有特别限制,能够根据后述的作为化合物整体的亲水性基团的数量适当调

整。

[0334] 作为亲水性基团,没有特别限制,例如,可以举出具有取代基的烷氧基、羧基、磺基及膦酰基,优选为磺基。

[0335] R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}优选为氢原子、烷基、磺基、硝基或卤原子,更优选为氢原子、烷基、磺基或卤原子,进一步优选为氢原子、烷基或磺基。

[0336] (iv)R^{41}及R^{42}

[0337] R^{41}及R^{42}表示烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$。R^{21}及b与上述的R^{21}及b含义相同。

[0338] 作为R^{41}及R^{42}中的烷基可以具有的取代基,可以举出烷氧基、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。

[0339] 能够用作R^{41}及R^{42}的烷基与后述的取代基组T中的烷基含义相同。

[0340] 未经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。

[0341] 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。

[0342] 作为能够用作R^{41}及R^{42}的具有取代基的烷基,从进一步提高水溶性的观点出发,优选为具有烷氧基、羧基、磺基及膦酰基中的至少1个作为取代基的烷基,更优选为具有羧基及磺基中的至少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)和除了这些取代基以外的基团的组合构成的取代基的烷基。

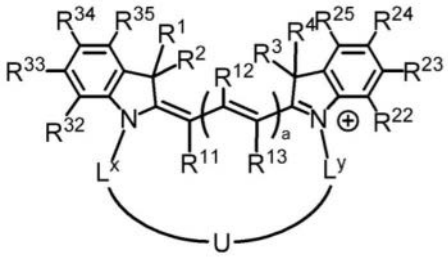
[0343] 并且,也能够优选适用能够用作上述R^1～R^4的具有取代基的烷基的方式。

[0344] 能够用作R^{41}及R^{42}的-$(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$能够优选适用上述R^1～R^4中的-$(CH_2-CH_2-O)_b-R^{21}$的记载。

[0345] R^{41}及R^{42}可以彼此键合而形成环。

[0346] 由上述通式(α)表示的花青色素中,作为R^{41}及R^{42}相互键合而形成环的结构,优选举出由下述通式(β)表示的花青色素。

[0347] [化学式18]

[0348] 

通式(β)

[0349] 式中,L^x及L^y表示亚烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_b-$亚烷基-*。*表示与U的键合位置。

[0350] 连接基团U表示原子数1～100的2价连接基团。

[0351] R^1～R^4、R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}、R^{32}～R^{35}、b及a与上述通式(α)中的R^1～R^4、R^{11}～R^{13}、R^{22}～R^{25}、R^{32}～R^{35}、b及a含义相同,除非另有说明,优选的范围也相同。

[0352] R^1～R^4、L^x、L^y及U中的至少1个包含由-$(CH_2-CH_2-O)_b-$表示的结构。b与上述b含义相同。

[0353] 其中,由式(β)表示的花青色素为中性。

[0354] 能够用作L^x及L^y的亚烷基相当于从能够用作R^{41}及R^{42}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。

[0355] 能够用作L^x及L^y的亚烷基的亚烷基部分的碳原子数能够优选适用R^{41}及R^{42}中的具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数的记载。

[0356] 能够用作L^x及L^y的-$(CH_2-CH_2-O)_b$-亚烷基-*相当于从能够用作R^{41}及R^{42}的-$(CH_2-CH_2-O)_b$-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-$(CH_2-CH_2-O)_b$-亚烷基。

[0357] 在能够用作L^x及L^y的-$(CH_2-CH_2-O)_b$-亚烷基-*中,b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R^{41}及R^{42}中的具有取代基的烷基的烷基部分的碳原子数的记载。

[0358] 从进一步提高荧光强度的观点出发,L^x及L^y优选均包含由-$(CH_2-CH_2-O)_b$-表示的结构。

[0359] 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。

[0360] 连接基团U优选为选自亚烷基、-O-、-NR^{50}-、-COO-、-$CONR^{50}$-及-SO_2NR^{50}-的3个以上键合而形成的2价连接基团。R^{50}表示氢原子或烷基。

[0361] 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。

[0362] 在本发明中,“亚烷基的亚烷基部分的碳原子数”是指,除了亚烷基所具有的取代基部分以外的碳原子数。

[0363] 能够用作R^{50}的烷基能够优选适用上述R^1～R^4中的烷基的记载。

[0364] 作为R^{50},优选为氢原子。

[0365] 构成连接基团U的上述亚烷基、-O-、-NR^{50}-、-COO-、-$CONR^{50}$-及-SO_2NR^{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。

[0366] 在连接基团U中,与L^x及L^y的连接部优选为-O-、-NR^{50}-、-COO-、-$CONR^{50}$-或-SO_2NR^{50}-。即,连接基团U优选介由构成连接基团U的-O-、-NR^{50}-、-COO-、-$CONR^{50}$-或-SO_2NR^{50}-与L^x及L^y的亚烷基键合。连接基团U更优选为2价连接基团,其中,与L^x及L^y的连接部是-O-、-NR^{50}-、-COO-、-$CONR^{50}$-或-SO_2NR^{50}-,并且上述连接部彼此通过亚烷基连接。

[0367] 连接基团U优选通过去除1个氢原子成为1价的结构部即荧光体部M。在连接基团U中,作为去除1个氢原子的部位,可以举出亚烷基或作为R^{50}的烷基,优选为亚烷基。

[0368] 在连接基团U中,在亚烷基或作为R^{50}的烷基中去除1个氢原子时,可以从亚烷基或作为R^{50}的烷基直接去除1个氢原子,连接基团ZZZ与亚烷基或作为R^{50}的烷基键合,该连接基团ZZZ可以成为键合键。

[0369] 作为上述连接基团ZZZ,可以举出亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>C=O、-NR^{60}-、>S=O、-$S(=O)_2$-、>P(=O)OR^{70}、-COO-、-$CONR^{60}$-及-$(CH_2-CH_2-O)_p$-、以及由这些取代基的组合构成的基团。组合的数量没有特别限制,例如,能够设为2～20,优选为2～7,更优选为2～5。

[0370] R^{60}及R^{70}为氢原子或烷基,优选为氢原子。作为能够用作R^{60}及R^{70}的烷基,能够优选适用上述R^{50}中的烷基的记载。

[0371] p表示重复数,优选为1～10,更优选为1～8,进一步优选为1～4。

[0372] (v)a

[0373] a为1～3的整数,优选为2或3的整数。

[0374] 在由上述通式(α)表示的花青色素中,R^1～R^4、R^{41}及R^{42}中的至少1个优选包含由-$(CH_2-CH_2-O)_b$-表示的结构。b与上述b含义相同。由此,认为具有由通式(α)所表示的花青色素构成的结构部的本发明的化合物能够具有适度的亲水性和适度的排除体积效果,所获得的标记生物物质能够显示出优异的荧光强度。

[0375] 而且,关于由上述通式(α)表示的花青色素,从作为本发明的化合物赋予充分的亲水性的观点出发,由通式(α)表示的花青色素的每一分子的亲水性基团的数量优选为2个以上,更优选为2～8个,进一步优选为2～6个,尤其优选为3～6个。

[0376] 作为亲水性基团,能够适用前述R^{22}～R^{25}及R^{32}～R^{35}能够采用的亲水性基团的记载。

[0377] 只要没有特别说明,亲水性基团的位置并不受特别限制,作为具有上述亲水性基团的基团,例如可以优选举出R^{22}～R^{25}、R^{32}～R^{35}、R^{41}或R^{42}。

[0378] 另外,在由上述通式(α)或(β)表示的结构中,可以从任意取代基去除1个氢原子成为1价的结构部(荧光体部M),但例如优选为从连接基团U去除1个氢原子1个成为1价的结构部。

[0379] 作为能够用作M的生理活性物质部,只要是由生理活性物质构成的结构部,则没有特别限制而能够使用。作为生理活性物质,例如,可以举出维生素、辅酶、荷尔蒙、抗生素、神经递质、细胞因子等,更具体而言,日本特开2021-020956的[0095]段中记载的卡利奇霉素、阿霉素、道诺霉素、丝裂霉素C、博来霉素、环胞苷、长春新碱、长春花碱、甲氨蝶呤、顺氯氨铂或其衍生物、澳瑞他汀或其衍生物、美坦生或其衍生物、紫杉醇或其衍生物、喜树碱或其衍生物等,能够适用日本特开2021－020956的[0095]～[0099]段的记载。

[0380] 作为能够用作M的前药部,只要是由在活体内被代谢而变化为生理活性物质的化合物构成的结构部,则没有特别限制而能够使用。作为前药,例如,能够适用日本特开2020-105187的[0003]段的记载(2-吡咯啉阿霉素的前药方式)。

[0381] 作为能够用作M的放射性同位素含有部,只要是包含能够啊医疗领域利用的放射性同位素的结构部,则没有特别限制而能够使用。作为放射性同位素,例如,可以举出碘131、铟111、钇90及镥177、铜64,但不限于这些。能够适用日本特开2021-11483的[0225]段的记载。作为包含放射性同位素的结构部,可以举出上述放射性同位素键合或配位于氨基或叔胺的氮原子、硫烷基、芳基或杂芳基等的结构部。作为叔胺的氮原子配位于上述放射性同位素的结构部,可以举出DOTA(1,4,7,10-四氮环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)等配位于上述放射性同位素而形成络合物的结构部,作为硫烷基配位于上述放射性同位素的结构部,可以举出由二乙酰基双(N(4)-甲基氨基硫脲)铜(II)等络合物构成的结构部。

[0382] 在利用肽合成法获得本发明的化合物中由通式(II)中的任一式表示的化合物的情况下,通常,纸面上右侧为C末端结构,纸面上左侧为N末端结构。

[0383] 本发明的化合物优选至少包含1个由上述Q表示的取代基、即羧基、能够与生物物质键合的取代基或能够与固体支撑体键合的取代基。

[0384] 本发明的化合物通过羧基或能够与后述的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。

[0385] 而且,本发明的化合物通过羧基或后述能够与固体支撑体键合的取代基,能够与微粒等固体支撑体键合,而获得目标标记微粒等。作为微粒,并不受特别限定,能够举出包含了玻璃制珠、磁珠等非聚合物制珠、聚合物制珠等的对向本发明的化合物的键合有用的小型粒子。在某种实施方式中,微粒包含聚苯乙烯制珠。小型粒子只要是在荧光标记中常用的尺寸则并不受特别限制,但通常,平均粒子径为10nm～10μm。另外,羧基能够通过常规方法容易地衍生能够与固体支撑体键合的取代基。

[0386] 在本发明中,为方便起见,在能够与生物物质键合的取代基及能够与固体支撑体键合的取代基中未包含羧基,“生物物质能够与键合的取代基”包含能够与由羧基衍生的生物物质键合的取代基,“固体支撑体能够与键合的取代基”包含能够与由羧基衍生的固体支撑体键合的取代基。其中,如上所述,通过羧基能够与生物物质或固体支撑体键合。

[0387] 在本发明的化合物中,对具有由上述Q表示的取代基的位置没有特别限制,但优选在由通式(I)表示的结构及除了荧光体部以外的结构中具有,在由通式(II)表示的化合物中,优选在R^6及R^7中的至少一者中具有。

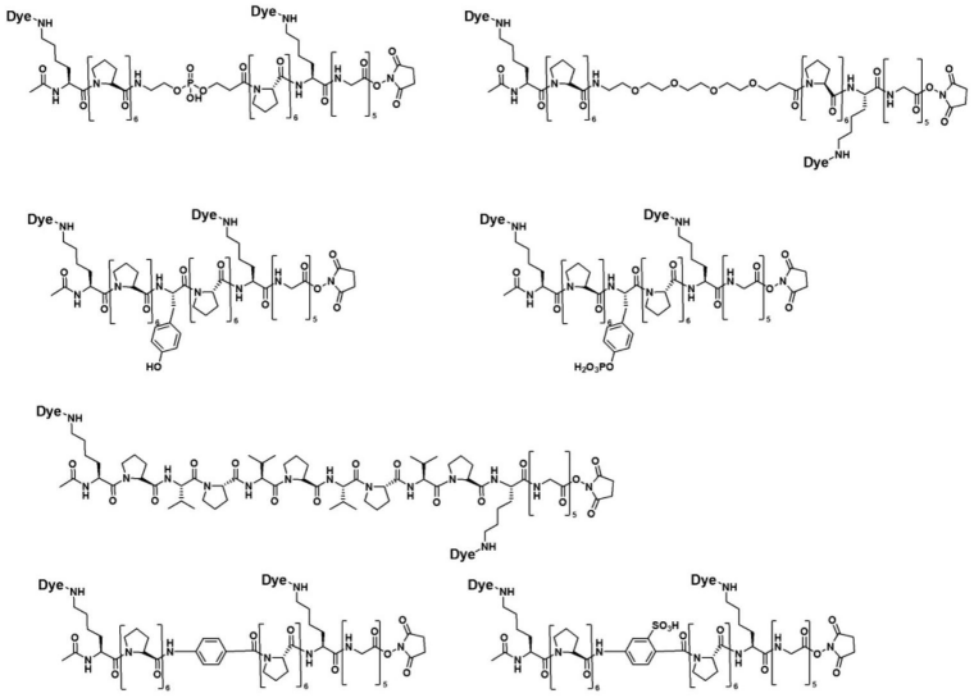
[0388] 本发明的化合物中的由上述Q表示的取代基的数量合计为至少1个以上即可,从检测对象物质的定量的观点出发,优选为1～3个,更优选为1个或2个,进一步优选为1个。

[0389] 而且,从作为化合物赋予充分的亲水性的观点出发,本发明的化合物还优选在除了荧光体部以外的位置具有后述的阴离子性基团,例如优选具有1个以上,更优选具有1～8个,进一步优选具有1～6个。

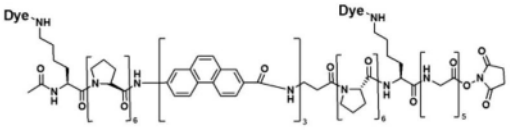
[0390] 只要没有特别说明,阴离子性基团的位置并不受特别限制,作为具上述阴离子性基团的基团,例如,优选举出通式(b)中的L^1。

[0391] 以下,表示本发明的化合物的具体例,但本发明并不限于这些化合物。在下述具体例中,磺基可以将氢离子解离而采用盐结构。Dye表示荧光体部。以下的例示化合物为在末端具有NHS酯结构(N-羟基琥珀酰亚胺酯)作为能够与生物物质键合的取代基的方式。

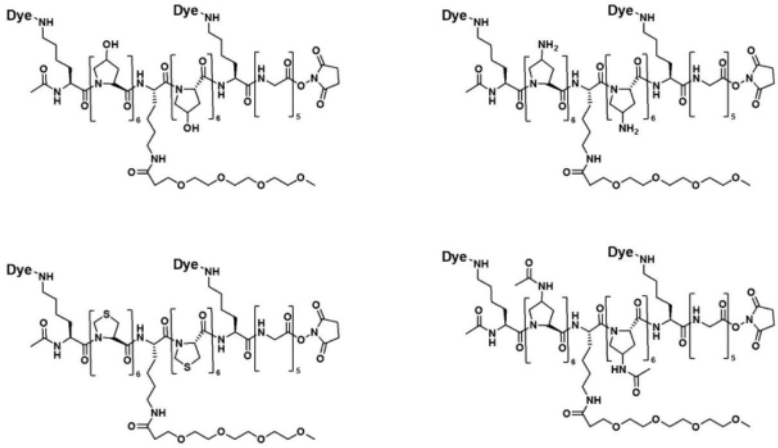
[0392] [化学式19]

[0393] 

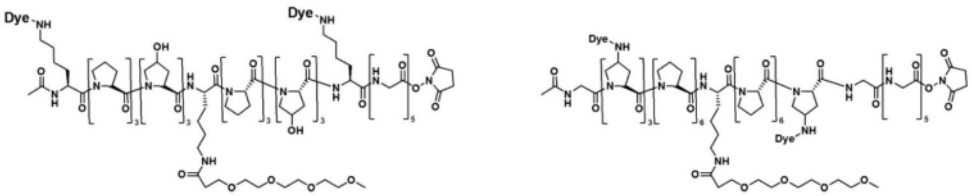
[0394] [化学式20]



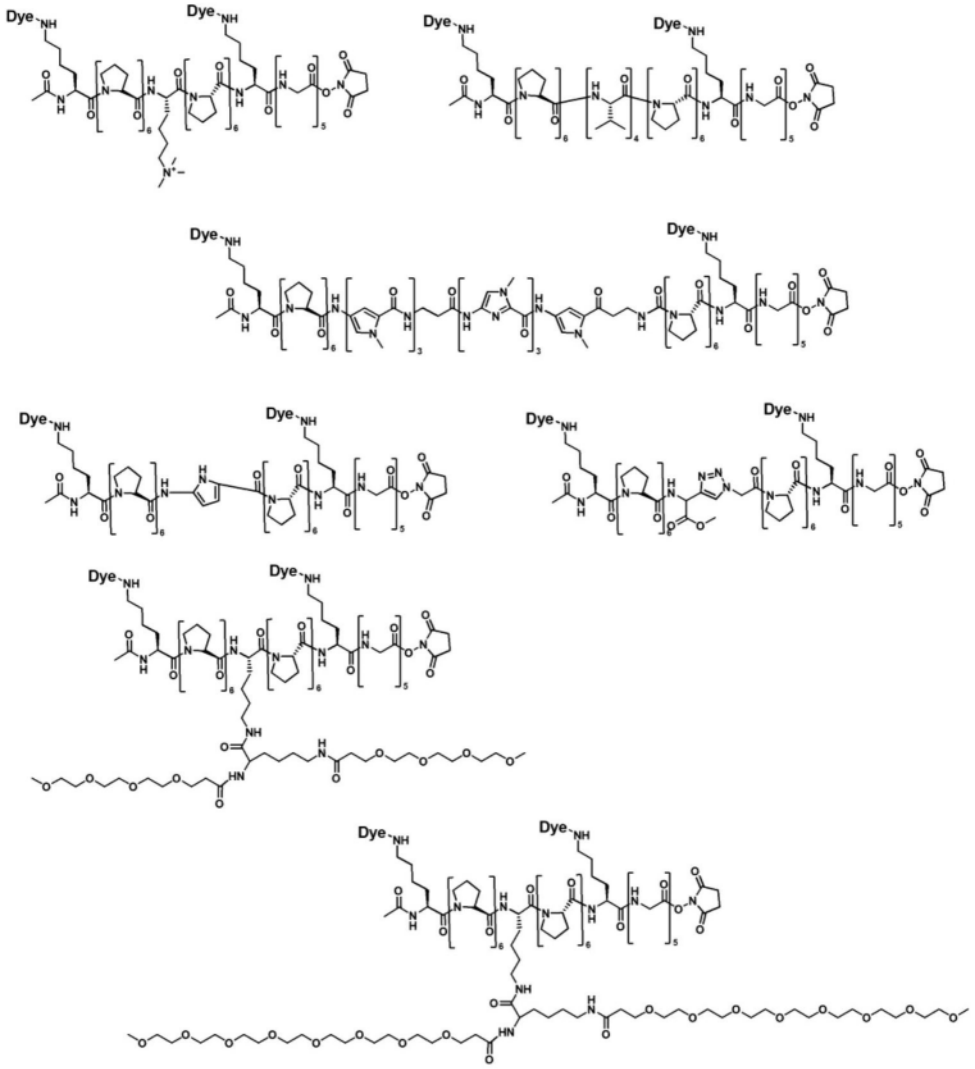
[0395]



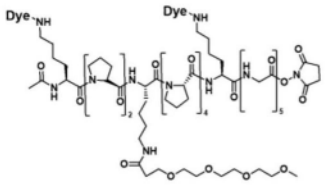
[0396] [化学式21]

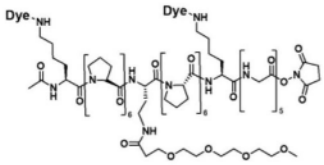


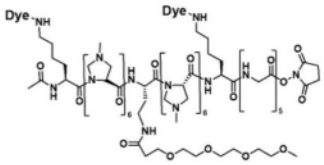
[0397]



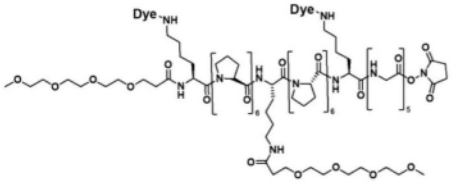
[0398] [化学式22]

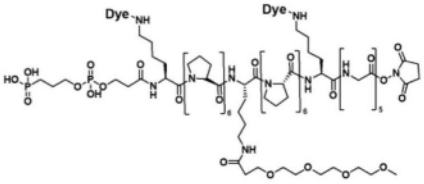


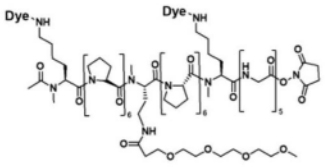


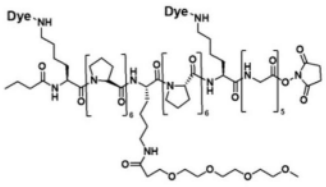


[0399]

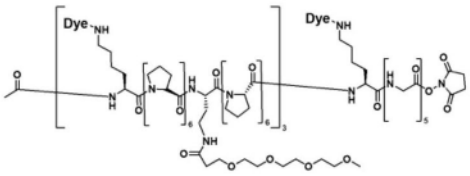


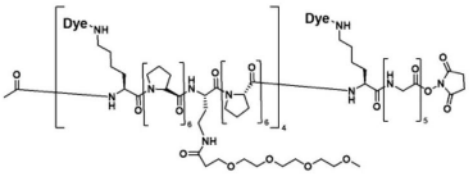




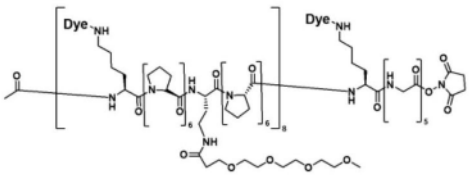


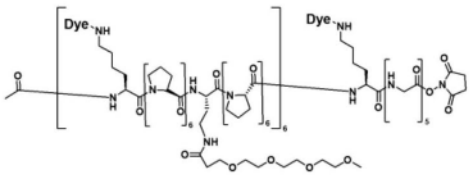
[0400] [化学式23]



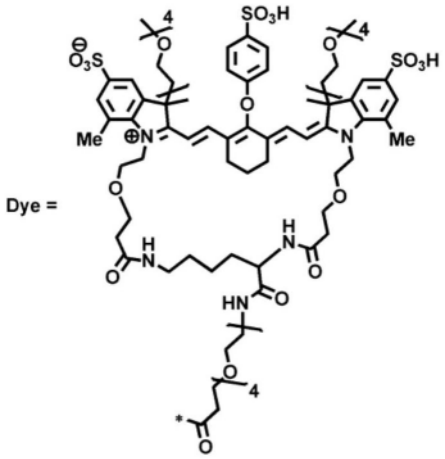


[0401]





[0402] [化学式24]

[0403] 

[0404] 作为本发明的优选的方式,可以举出由上述通式(II)表示的化合物中满足以下方式I的化合物。

[0405] (方式I)

[0406] A^1(由通式(a1)表示的结构):X^1～X^3中的至少任意1个为>CR^2R^3,l为2～30的整数。(R^2及R^3优选为氢原子、烷基、-NR^8R^9、-OR^{10}或阴离子性基团。)

[0407] A^2(由通式(a2)表示的结构):X^4～X^6中的至少任意1个为>CR^2R^3,n为2～30的整数。(R^2及R^3优选为氢原子、烷基、-NR^8R^9、-OR^{10}或阴离子性基团。)

[0408] B(由通式(b)表示的结构):Y^1为氢原子,L^1为连接>NY^1与>C=O的最短原子数为1～4的连接基团,m为1～4的整数。

[0409] R^4及R^5:氢原子

[0410] R^6:酰基或-C(=O)$(L\text{-}O)_tR^E$,或者将烷基与膦酰基和/或膦酰氧基组合而成的基团

[0411] R^7:具有由*-NH-亚烷基-C(=O)-表示的结构的基团或具有由*-NH$(LL\text{-}O)_h$-表示的结构的基团(*是指与L^7的键合部位)

[0412] L^2:>NR^{b1}、>C=O、亚芳基、亚烷基、-O-或-S-

[0413] L^3及L^6:将亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、-O-、-S-、>C=O及>NR^{b1}中的1种或2种以上组合而成的基团

[0414] L^4及L^5:单键、>C=O、>NR^{b1}、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基或杂亚芳基,或者亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基及杂亚芳基中的至少1种与>NR^{b1}及>C=O的组合

[0415] L^7:>C=O、>NR^{b1}或亚芳基

[0416] M中的荧光体部:由呫吨色素、若丹明色素、香豆素色素、花青色素、芘色素、噁嗪色素、方酸菁色素、吡啶基噁唑色素及吡咯亚甲色素中的至少1种色素构成的结构部

[0417] p:1～4的整数

[0418] q:1～20的整数

[0419] 在这些方式中,关于通式(II)中的A^1、A^2、B、R^4～R^7、L^2～L^7、M、p及q,能够适用前述的A^1、A^2、B、R^4～R^7、L^2～L^7、M、p及q所涉及的优选的记载。

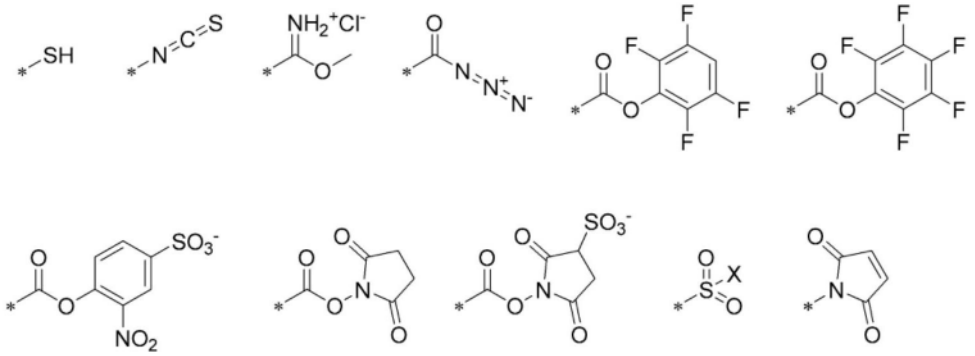
[0420] 本发明的化合物能够通过化合物所具有的至少1个能够与生物物质键合的取代基与蛋白质(包含肽)、氨基酸、核酸、核苷酸、糖链及脂质等生物物质键合,能够用作标记生物物质。

[0421] 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

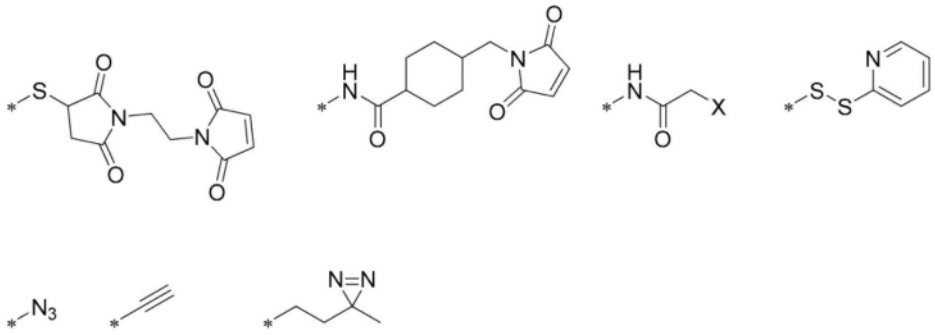
合的基团,则能够没有特别限制地使用,能够举出国际公开第2002/026891号等中记载的取代基。

[0422] 作为“能够与生物物质键合的取代基”,具体而言,能够举出下述结构。

[0423] [化学式25]



[0424]



[0425] X是指碘原子、溴原子等卤原子。*表示键合键。

[0426] 除了上述以外,作为“能够与生物物质键合的取代基”,能够使用肽结构(聚氨基酸结构)、长链烷基等。

[0427] 其中,可以优选举出NHS酯结构(N-羟基琥珀酰亚胺酯结构)、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。

[0428] 在本发明的化合物中,作为至少具有1个能够与生物物质键合的取代基的化合物的具体例,例如,除了上述本发明的例示化合物(具有NHS酯结构的化合物)以外,还可以举出将NHS酯结构适当取代为能够与上述生物物质键合的其他取代基的方式作为具体例。另外,本发明并不限定于这些化合物。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,可以通过氢原子解离而采用盐结构。

[0429] 通过能够与化合物所具有的至少1个固体支撑体键合的取代基,使本发明的化合物能够与上述的微粒等固体支撑体键合,而能够用作固体支撑体试剂。

[0430] 作为能够与固体支撑体键合的取代基,只要是用于作用(包含附着)或键合于固体支撑体的基团,则能够没有特别限制而使用,可以优选举出NHS酯结构(N-羟基琥珀酰亚胺酯结构)、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。其中,可以优选举出NHS酯结构(N-羟基琥珀酰亚胺酯结构)、琥珀酰亚胺结构,马来酰亚胺结构。作为“能够与固体支撑体键合的取代基”的具体的结构,能够使用针对上述的“能够与生物物质键合的取代基”举出的具体的结构。

[0431] 在本发明的化合物中,作为至少具有1个能够与固体支撑体键合的取代基的化合物的具体例,例如,除了上述本发明的例示化合物(具有NHS酯结构的化合物)以外,还可以举出将NHS酯结构适当取代为能够与上述固体支撑体键合的取代基的方式作为具体例。另外,本发明并不限定于这些化合物。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,可以通过氢原子解离而采用盐结构。

[0432] 本发明的化合物能够通过常规方法进行合成。由通式(I)表示的结构例如能够通过通常的肽合成法进行合成,还能够通过肽固相合成进行合成。肽固相合成法还能够优选适用使用了国际公开第2018/174078号中记载的肽自动合成装置的方法。关于荧光体部、生理活性物质部、前药部及放射性同位素含有部,也根据常规方法合成而能够导入到本发明的化合物中。

[0433] 关于具有能够与生物物质键合的取代基的化合物,也能够根据常规方法进行合成。例如,能够参考Bioconjugate Techniques(Third Edition、Greg T.Hermanson著)。

[0434] ＜＜标记生物物质＞＞

[0435] 本发明的标记生物物质为本发明的化合物与生物物质键合而成的物质。本发明的化合物具有荧光性,显示优异的荧光强度,因此能够优选用于标记生物物质。本发明的化合物与生物物质的键合可以是本发明的化合物与生物物质直接键合的方式,也可以介由连接基团连接的方式。

[0436] 作为上述生物物质,可以优选举出蛋白质(包括肽)、氨基酸、核酸、核苷酸、糖链及脂质。作为蛋白质,可以优选举出抗体,作为脂质,可以优选举出磷脂、脂肪酸及固醇,更优选磷脂。

[0437] 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,例如可以举出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、α_1微球蛋白、β_2微球蛋白等血浆蛋白及它们的抗体、α-甲胎蛋白、癌胚抗原(CEA)、前列腺性酸性磷酸酶(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。

[0438] 此外,也可以举出白喉病菌、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,还能够使用Fab'2、Fab、Fv等抗体片段。

[0439] 作为本发明的化合物(以下,也简称为化合物(A)。)与生物物质相互作用而键合的具体的方式,例如可以举出下述记载的方式。

[0440] 可以举出:

[0441] i)化合物(A)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;

[0442] ii)化合物(A)中的长链烷基与生物物质中的脂质二重膜及脂质等的范德瓦尔斯力;

[0443] iii)基于化合物(A)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;

[0444] iv)基于化合物(A)中的马来酰亚胺基团与生物物质中的硫烷基(-SH)的反应的硫醚键;及

[0445] v)基于化合物(A)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(A)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。

[0446] 其中,在上述i)的方式中,本发明的化合物中的肽只要是与生物物质中的肽能够形成非共价键或共价键的肽则并不受特别限制,作为具有这种肽的位置,例如,可以优选举出通式(II)中的R^6或R^7。

[0447] 除了上述i)~v)的方式以外,例如还能够通过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。

[0448] 本发明的化合物中,关于由具有能够与生物物质键合的取代基的化合物和通过与此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,可以举出在日本特开2019-172826号公报的0038段的化合物例及生成物的记载中将除了能够与生物物质键合的取代基以外的部分取代为本发明的化合物的化合物以及其生成物。其中,本发明并不限于这些标记生物物质等。

[0449] <含有标记生物物质的试剂>

[0450] 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方式,例如溶解于生理盐水及磷酸缓冲液等水系介质中的溶液方式以及微粒子状粉末及冻结干燥粉末等固体方式等。

[0451] 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方式的标记生物物质的试剂。

[0452] <标记生物物质的用途>

[0453] 由本发明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或斑点杂交中的荧光标记试剂或活体荧光成像试剂。

[0454] 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了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。

[0455] (i)分别准备下述(a)及(b)的工序

[0456] (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

[0457] (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”。)

[0458] (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

[0459] (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

[0460] (iv)分别准备下述(c)～(e)的工序

[0461] (c)含有目标生物物质的试样

[0462] (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”。)

[0463] (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”。)

[0464] (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

[0465] (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

[0466] (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

[0467] 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),可以举出上述本发明的标记生物物质中的生物物质。能够根据目标生物物质(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。

[0468] 作为上述目标生物物质中的蛋白质,可以举出所谓的疾病标记。作为疾病标记,没有特别限制,例如可以举出α-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)、BCA(breast carcinoma-associated antigen:乳腺癌胚胎相关)225、碱性甲胎蛋白(BFP)、CA(carbohydrate antigen:糖链抗原)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、γ-精蛋白(γ-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β、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。

[0469] 上述目标生物物质可以是细菌,作为该细菌,可以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,但例如可以举出大肠杆菌、沙门氏菌、呼吸道病菌、产生公众卫生上的问题的菌等。

[0470] 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,例如可以举出丙型、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。

[0471] 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。

[0472] 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。

[0473] 在上述(v)中,目标生物物质与一次生物物质可以直接键合,也可以介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,也可以介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。

[0474] 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。

[0475] 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。

[0476] 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),则不受特别限定。通常,优选为300~1000nm,更优选为400~800nm。

[0477] 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。

[0478] 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。

[0479] 并且,关于除了上述(i)~(vii)以外的工序,也能够根据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。

[0480] 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。对于使用本发明的标记生物物质的斑点杂交,也与多色WB相同,通过作为目标生物物质通常使用的方法制作印迹硝基纤维素膜或印迹PVDF(聚偏氟乙烯)膜等,通过使用本发明的标记生物物质作为标记抗体(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。

[0481] -取代基组T-

[0482] 在本发明中,作为优选取代基,可以举出选自下述取代基组T中的取代基。

[0483] 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。

[0484] 此外,在本发明中,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相同。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。

[0485] 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。

[0486] 作为取代基组T中包含的基团,包括下述基团。

[0487] 可以举出烷基(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)、含杂原子环基(作为环构成原子具有至少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。含杂原子环基的碳原子数优选为2～40,更优选为2～20。含杂原子环基包含芳香族含杂原子环基(杂芳基)及脂肪族含杂原子环基(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)、聚环氧烷基、

[0488] 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(优选以碳原子数0～20,包含未经取代氨基(-NH_2)、(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。取代未经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(优选以碳原子数1～20,更优选以碳原子数2～15包含-C(=O)H、烷基羰基、环烷基羰基、芳基羰基、杂环羰基。)、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。)、

[0489] 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、环烷基或者芳基的磺酰胺基。)、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、环烷基或者芳基磺酰基(优选为碳原子数1～20)、

[0490] 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)$_2$〕、膦酰氧基〔-O-PO(OH)$_2$〕、磺基(-SO_3H)、硼酸基〔-B(OH)$_2$〕、鎓基(也称为阳离子性基团。可以举出含有包含环状铵基的铵基、锍基、磷基,优选为碳原子数0~30、更优选为1~20)、硫烷基(-SH)、胍基(-NHC(=NH)NH_2)、氨基酸残基或聚氨基酸残基。

[0491] (阴离子性基团)

[0492] 在本发明中,阴离子性基团只要是具有阴离子的基团即可。作为这种阴离子性基团,可以举出羧基、膦酰基(膦酸基、-PO(OH)$_2$)、膦酰氧基(磷酸基、-OPO(OH)$_2$)及磺基等,优选为膦酰基、膦酰氧基或磺基,更优选为膦酰氧基或磺基。

[0493] 阴离子性基团可以氢离子解离而采取离子结构,也可以采取盐结构。作为阴离子性基团具有盐结构时的1价或多价的阳离子,能够优选适用前述盐结构的记载中的1价或多价的阳离子的记载。

[0494] (阳离子性基团)

[0495] 在本发明中,阳离子性基团只要是具有阳离子的基团即可。作为这种阳离子性基团,可以举出具有季铵离子的基团及具有季鏻离子的基团等,优选为具有季铵离子的基团。

[0496] 阳离子性基团除了离子结构以外,可以采取盐结构。作为阳离子性基团具有盐结构时的1价或多价的阴离子,例如,可以举出F^-、Cl^-等卤化物离子、BF_4^-、PF_6^-、双(三氟甲基磺酰基)酰亚胺离子等1价或多价的有机阴离子。

[0497] (聚环氧烷基)

[0498] 在本发明中,作为聚环氧烷基,可以举出由-(L-O)$_t$$R^E$表示的1价的基及由-(LL-O)$_h$-表示的2价的基。

[0499] 上述L及LL表示从上述取代基组T中的烷基去1个除氢原子而获得的亚烷基,碳原子数优选为2~4,更优选为2或3,进一步优选为2,亚烷基的键合键即连接2个碳原子的最短链中所包含的碳原子数优选为0~2,更优选为0或1,进一步优选为0。即,上述L及LL最优选为乙烯基。

[0500] 上述t及h是指平均重复数(简称为重复数。),优选为1~24,更优选为1~12,进一步优选为4~12。即使在t及h如为1那样重复数小的情况下,也能够发挥由ClogP值的调整引起的所期望的效果。

[0501] 上述R^E表示氢原子或烷基。能够用作R^E的烷基能够优选适用上述取代基组T中的烷基的记载,其中优选为甲基。作为R^E,优选为甲基。

[0502] 并且,作为多次组合选自取代基组T的取代基而成的基团,例如,可以举出具有阴离子性基团(羧基、膦酰基、磺基)、阳离子性基团(鎓基)、氨基酸残基、聚氨基酸残基或聚环氧烷基作为取代基的上述烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、含杂原子环基、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。

[0503] 选自取代基组T的取代基更优选为烷基、烯基、环烷基、芳基、含杂原子环基、烷氧基、环烷氧基、芳氧基、酰基、烷氧基羰基、环烷氧基羰基、氨基、酰氨基、氨基甲酰基、氰基、卤原子、阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基,尤其优选为烷基、烯基、芳基、含杂原

子环基、烷氧基、酰基、烷氧基羰基、氨基、酰氨基、氨基甲酰基、氰基、阴离子性基团、阳离子性基团或聚环氧烷基。

[0504] 选自取代基组T的取代基除了多次组合上述选自取代基组T的取代基而成的基团以外，只要没有特别说明，还包含多次组合上述的基团而成的基团。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、含杂原子环基等时，它们可以是单环或稠环，可以被取代或未被取代。

[0505] 实施例

[0506] 以下，根据实施例，对本发明进一步详细地进行说明，但本发明并不限定于此。另外，室温是指25℃。

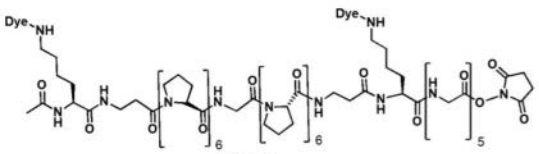
[0507] 将在实施例中使用的化合物(1)-NHS～化合物(8)-NHS、比较化合物(1)-NHS及参考化合物(2)-NHS示于以下。

[0508] 另外，各化合物中的Dye表示由后述结构式表示的结构，*表示键合部位。而且，在各化合物中，即使没有特别说明的情况下，磺基、膦酰氧基也可以包含盐结构(例如，钾盐、钠盐、TEA(三乙胺)盐或者DIPEA(N,N-二异丙基乙胺)盐)。$mPEG_4$是指-$(CH_2CH_2O)_4CH_3$。

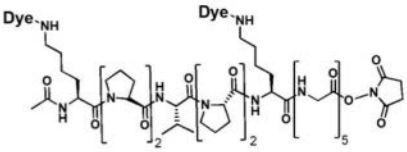
[0509] 以下，方案中的化合物Z的表述是指化合物(Z)。

[0510] [化学式26]

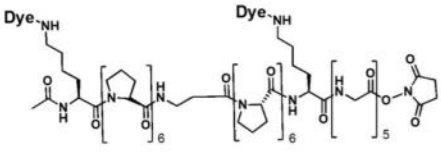
[0511]



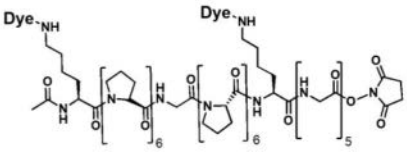
实施例 1
化合物（1）－NHS



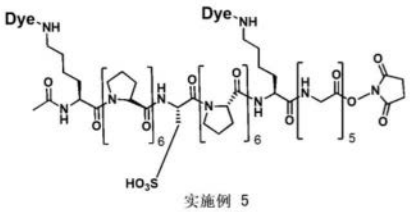
实施例 2
化合物（2）－NHS



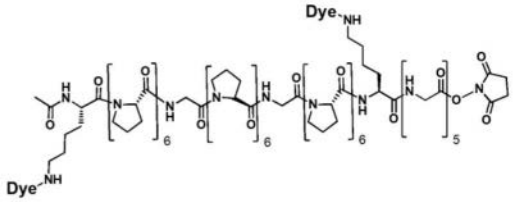
实施例 3
化合物（3）－NHS



实施例 4
化合物（4）－NHS



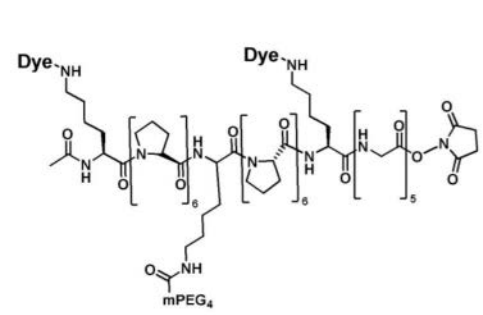
实施例 5
化合物（5）－NHS



实施例 6
化合物（6）－NHS

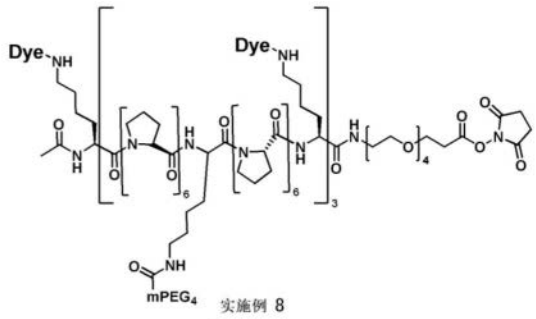
[0512] [化学式27]

[0513]



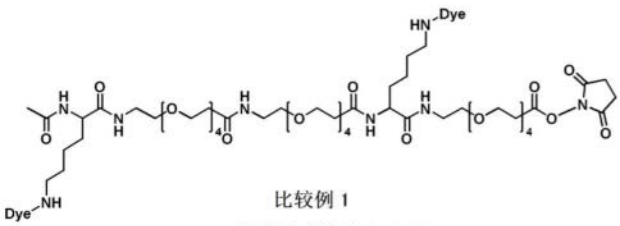
实施例 7

化合物(7)－NHS



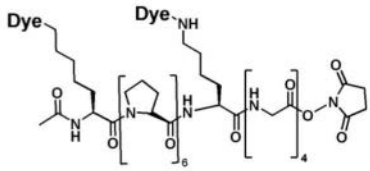
实施例 8

化合物(8)－NHS



比较例 1

比较化合物(1)－NHS

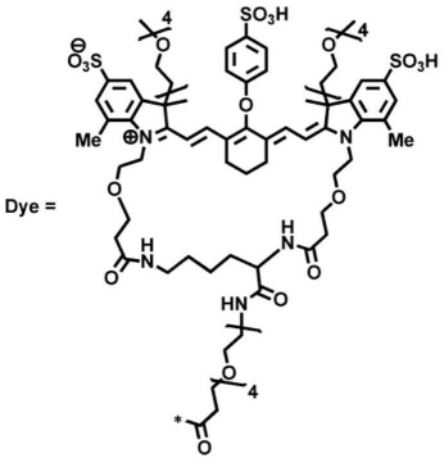


参考例 2

参考化合物(2)－NHS

[0514] [化学式28]

[0515]



[0516] 以下,对各化合物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定于这些。

[0517] 在以下合成途径中,室温是指25℃。

[0518] 另外,各合成中使用的溶剂、化合物、取代基等缩写是指即使在其他部分的记载中,作为溶剂、化合物、取代基等也相同。Resin是指2-氯三苯甲基树脂。而且,%v/v是指容量百分比。

[0519] 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(产品名称,Biotage Japan Ltd.制造)或Sfar C18(产品名称,Biotage Japan Ltd.制造),正相柱色谱法中的载体使用了Hi-Flash Column(产品名称,YAMAZEN CORPORATION制造)。

[0520] 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”是指将“乙腈:水＝0:100”的洗脱液改变为“乙腈:水＝20:80”的洗脱液。

[0521] 分离纯化HPLC(High Performance Liquid Chromatography:高效液相色谱)使用了2767(产品名称,Waters Corporation制造)。

[0522] MS谱图使用ACQUITY SQD LC/MS System〔产品名称,Waters Corporation制造,离子化法:ESI(ElectroSpray Ionization制造,电喷雾离子化)〕或LCMS-2010EV〔产品名称,Shimadzu Corporation制造,同时进行离子化法:ESI及APCI(Atmospheric Pressure ChemicalIonization,大气压化学离子化)的离子化法〕进行了测定。

[0523] 合成例

[0524] 根据国际公开第2018/174078号公报中记载的肽固相法的一般方法进行肽链的合成。

[0525] 〔通过肽自动合成装置进行肽固相合成的一般方法〕

[0526] 使用肽自动合成装置(Biotage Japan Ltd.制造、产品名称:SyroI)进行了肽固相合成。在合成装置中设置Rink Amide-ChemMatrix(注册商标)(Biotage Japan Ltd.制造)、Fmoc氨基酸(0.5mol/L)的N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)溶液、氰基-羟基亚氨基-乙酸乙酯(1.0mol/L)及二异丙基乙胺(0.1mol/L)的NMP溶液、二异丙基碳二亚胺(1.0mol/L)的NMP溶液、哌啶(20%v/v)的NMP溶液及乙酸酐(20%v/v)的NMP溶液,按照指南进行了合成。将Fmoc脱保护(20分)、基于NMP的清洗、Fmoc氨基酸的稠合(1小时)、基于NMP的清洗作为1各循环,将该循环进行重复,由此拉伸肽链。

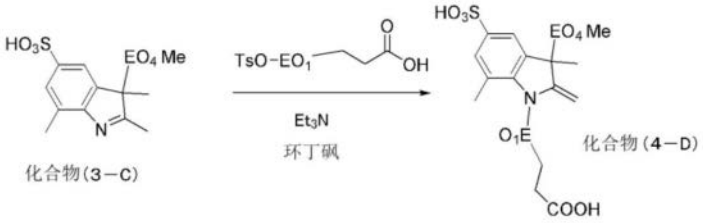
[0527] [化合物(M1-1)的合成]

[0528] 根据下述方案,合成了化合物(M1-1)。化合物(5)的MS测定结果如下。

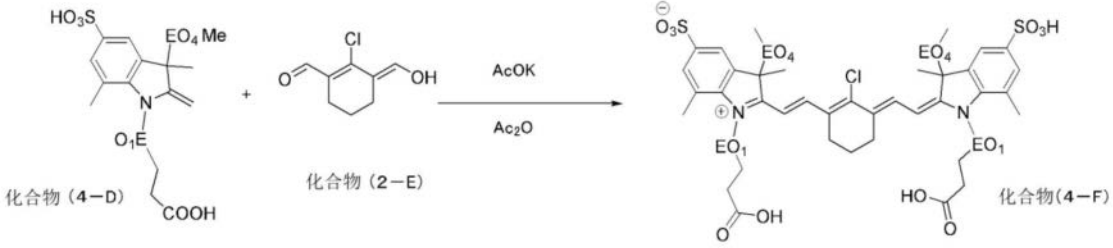
[0529] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=1723、$(M-H^+)^-$=1721

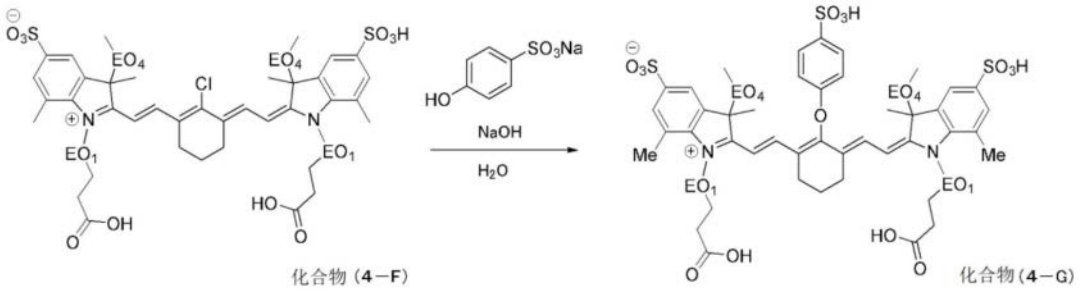
[0530] [化学式29]



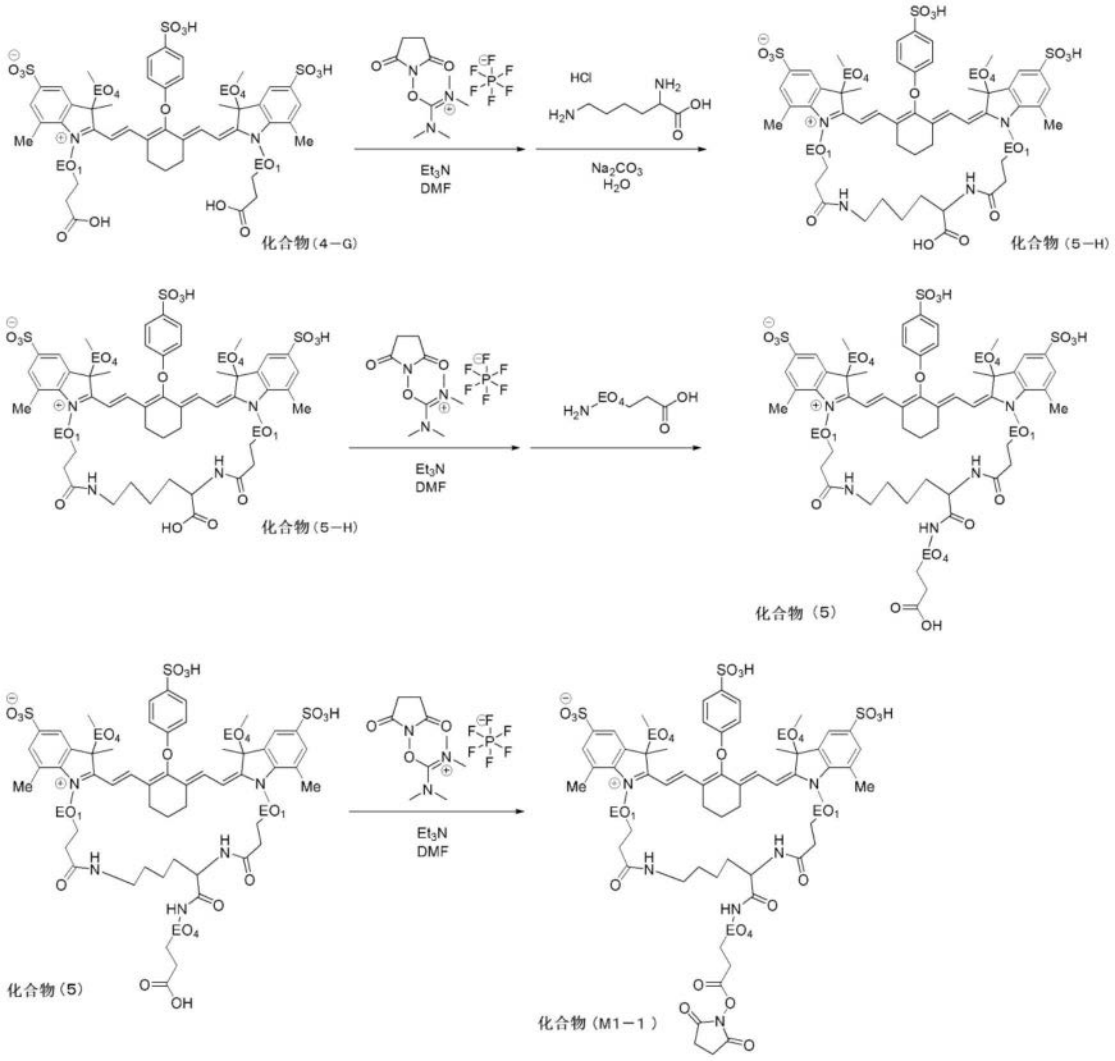


[0531]





[0532] [化学式30]

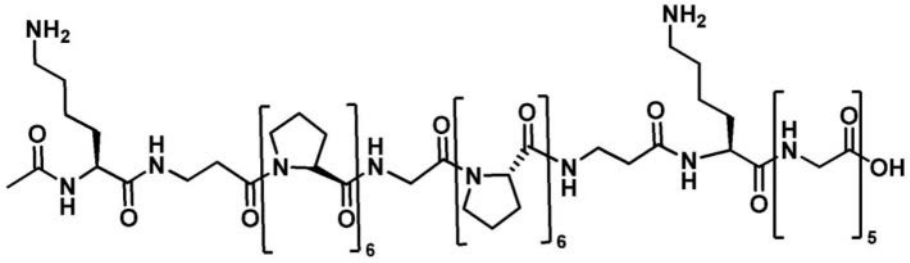
[0533] 

[0534] [化合物(1)的合成]

[0535] 如下所述,合成了化合物(1)。

[0536] 1)化合物(1-1)的合成

[0537] [化学式31]

[0538] 

化合物 1-1

[0539] 将H-Gly-Trt(2-Cl)-Resin(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES,LTD.制造、0.93mmol/g、53.8mg)用作起始原料,进行了肽固相合成。使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)进行的拉伸重复了4个循环。在Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)之后,拉伸N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-β-丙氨酸(Fmoc-β-Ala-OH),接着使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的

拉伸重复了6个循环。在进一步拉伸N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)之后,使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的拉伸重复了6个循环之后,拉伸了N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-β-丙氨酸(Fmoc-β-Ala-OH)。接着在拉伸Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)之后,加入哌啶(20%v/v)的NMP溶液,使其反应20分钟,由此进行Fmoc基团的脱保护,加入乙酸酐(20%v/v)的NMP溶液而反应10分钟,由此将N末端的氨基进行乙酰基化。在结束拉伸后,利用二氯甲烷清洗树脂之后,在减压下,蒸馏去除了溶剂。TFA(三氟乙酸):加入三异丙基硅烷:水=95:2.5:2.5的混合液2.0mL,进行了肽的剪切与脱保护。2小时后,滤出树脂,向滤液中加入甲基叔丁基醚(12mL),产生了固体。在通过离心分离使固体沉淀之后,去除上清液。在利用甲基叔丁基醚清洗固体之后,减压下蒸馏去除溶剂,获得了73.2mg的白色固体的化合物(1-1)。

[0540] 2)化合物(1)的合成

[0541] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入1.2mg的化合物(1-1)、150μL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1μL的三乙基胺(Et_3N)及3.5mg的化合物(M1-1),在室温下搅拌了1小时。之后,浓缩反应液通过分离纯化HPLC进行纯化,并实施冻结干燥,获得了2.2mg化合物(1)。

[0542] 化合物(1)的MS测定结果如下。

[0543] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5373、$(M-H^+)^-$=5271

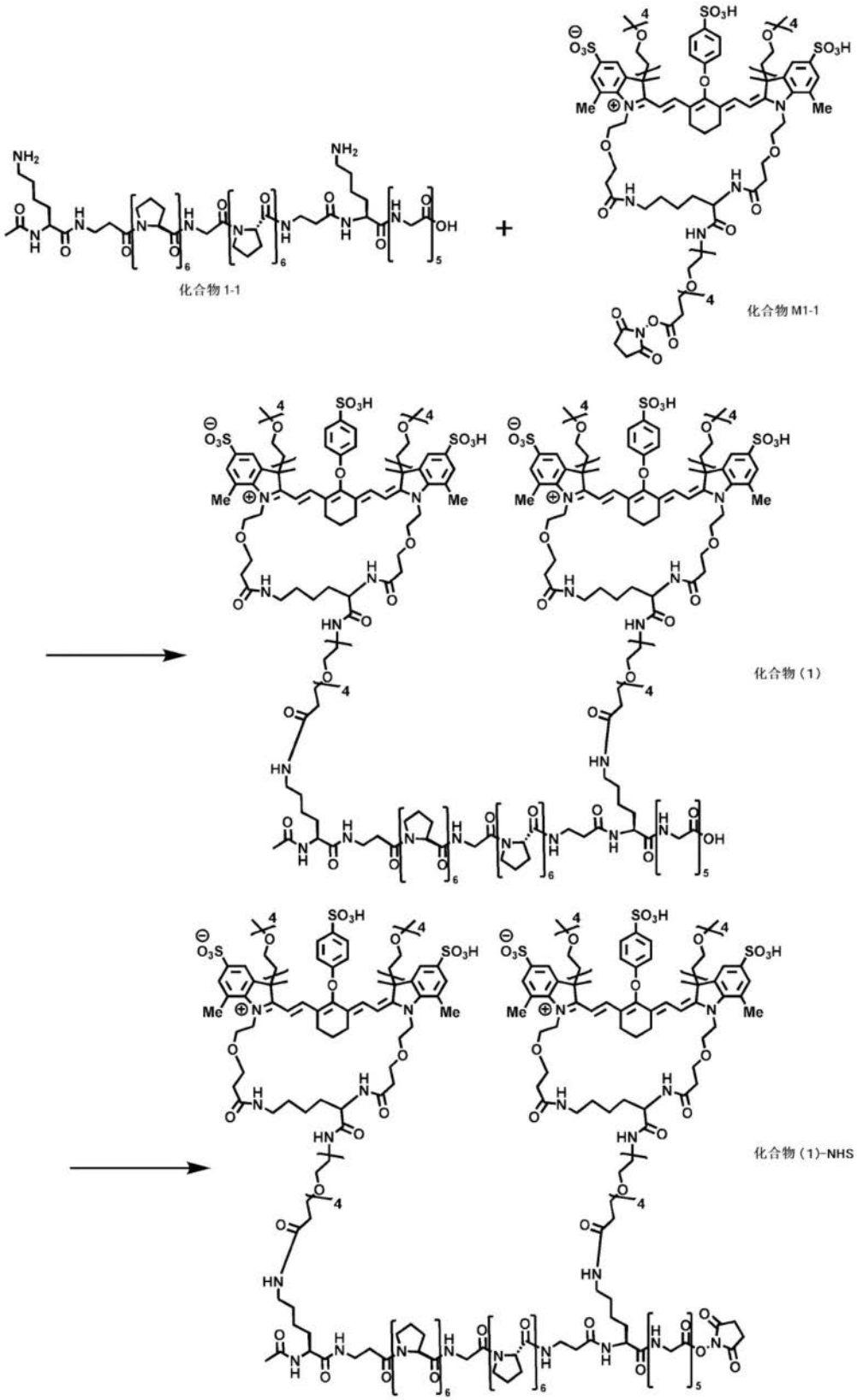
[0544] 3)化合物(1)-NHS的合成

[0545] 向化合物(1)2.2mg中加入N,N-二甲基甲酰胺(DMF)220μL、N,N,N',N'-四甲基-O-(N-琥珀酰亚胺基)脲六氟磷酸盐1mg及三乙胺(Et_3N)1.3μL,搅拌了1小时。然后,减压蒸馏去除溶剂,加入乙酸乙酯去除上清液,实施真空干燥,由此获得了化合物(1)-NHS。

[0546] 将化合物(1-1)与化合物(M1-1)设为起始物质的化合物(1)及化合物(1)-NHS的合成方案如下所述。

[0547] [化学式32]

[0548]



[0549] 在以后中合成的化合物(2)～(7)及参考化合物(2)为分别将上述的化合物(2)-NHS～(7)-NHS及参考化合物(2)-NHS中的NHS酯结构取代为羧基的化合物。即,通过进行与上述化合物(1)-NHS的合成相同的化学反应,化合物(2)～(7)及参考化合物(2)中的羧基转换为对应的NHS酯结构。

[0550] [化合物(2)及化合物(2)-NHS的合成]

[0551] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)、N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)及N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-缬氨酸(Fmoc-L-Val-OH),进行肽链的拉伸,以使成为上述化合物(2)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(2)。

[0552] 化合物(2)的MS测定结果如下。

[0553] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5273、$(M-H^+)^-$=5271

[0554] 除了使用化合物(2)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(2)合成了上述化合物(2)-NHS。

[0555] [化合物(3)及化合物(3)-NHS的合成]

[0556] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)、N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)及N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-β-丙氨酸(Fmoc-β-Ala-OH),进行肽链的拉伸,以使成为上述化合物(3)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(3)。

[0557] 化合物(3)的MS测定结果如下。

[0558] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5245、$(M-H^+)^-$=5243

[0559] 除了使用化合物(3)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(3)合成了化合物(3)-NHS。

[0560] [化合物(4)及化合物(4)-NHS的合成]

[0561] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)及N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH),进行肽链的拉伸,以使成为上述化合物(4)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(4)。

[0562] 化合物(4)的MS测定结果如下。

[0563] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5231、$(M-H^+)^-$=5229

[0564] 除了使用化合物(4)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(4)合成了化合物(4)-NHS。

[0565] [化合物(5)的合成]

[0566] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)、N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)及N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-L-半胱氨酸,进行肽链的拉伸,以使成为上述化合物(5)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(5)。

[0567] 化合物(5)的MS测定结果如下。

[0568] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5325、$(M-H^+)^-$=5323

[0569] 除了使用化合物(5)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(5)合成了化合物(5)-NHS。

[0570] [化合物(6)及化合物(6)-NHS的合成]

[0571] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)及N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH),进行肽链的拉伸,以使成为上述化合物(6)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(6)。

[0572] 化合物(6)的MS测定结果如下。

[0573] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5870、$(M-H^+)^-$=5868

[0574] 除了使用化合物(6)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(6)合成了化合物(6)-NHS。

[0575] [化合物(7)及化合物(7)-NHS的合成]

[0576] 将H-Gly-Trt(2-Cl)-Resin(0.93mmol/g、53.8mg)用作起始原料,进行了肽固相合成。使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)进行的拉伸重复了4个循环。在Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)之后,使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的拉伸重复了6个循环。在进一步拉伸了Nε-(1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己酮-1-亚基)-3-甲基丁基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(ivDde)-OH)后,使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的拉伸重复了6个循环之后,拉伸了Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)。之后,加入哌啶(20%v/v)的NMP溶液,使其反应20分钟,由此进行Fmoc基团的脱保护,并加入乙酸酐(20%v/v)的NMP溶液而反应10分钟,由此对N末端的氨基进行了乙酰基化。在拉伸结束后,通过加入水合肼(5%v/v)的NMP溶液并使其反应1小时来进行ivDde基的脱保护,通过加入4,7,10,13-四氧杂十四烷酸N-琥珀酰亚胺酯(2%v/v)的NMP溶液并使其反应而在Lys侧链导入PEG基。在反应拉伸后,利用二氯甲烷清洗树脂之后,在减压下蒸馏去除了溶剂。TFA:加入三异丙基硅烷:水=95:2.5:2.5的混合液2.0mL,进行了肽的剪切与脱保护。2小时后,滤出树脂,向滤液中加入甲基叔丁基醚(12mL),产生了固体。在通过离心分离使固体沉淀之后,去除上清液。在利用甲基叔丁基醚清洗固体之后,减压下蒸馏去除溶剂,获得了69.5mg的白色固体的化合物(7-1)。之后,使用化合物(7-1)来代替化合物(1-1),除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(7)。

[0577] 化合物(7)的MS测定结果如下。

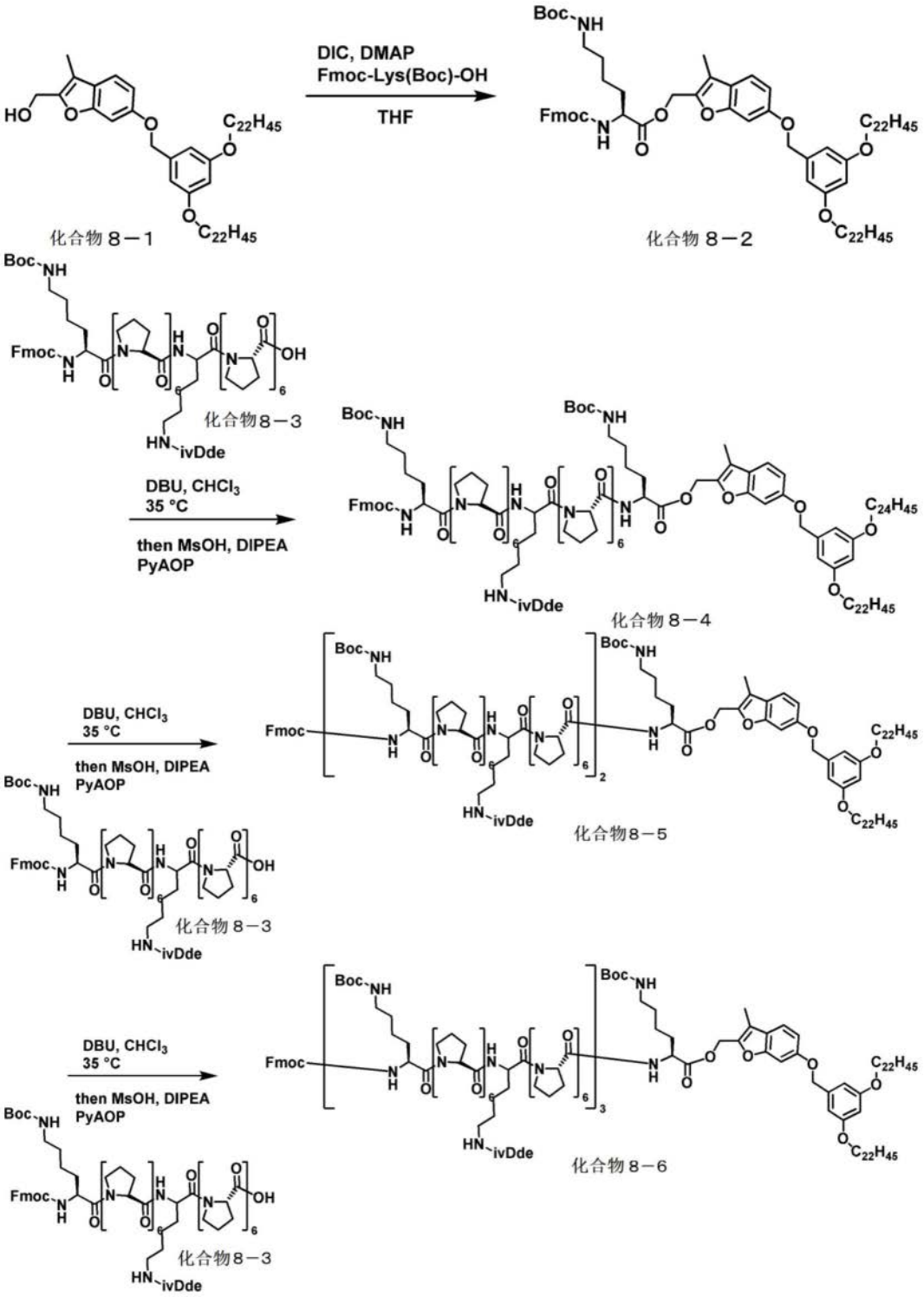
[0578] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=5329、$(M-H^+)^-$=5327

[0579] 除了使用化合物(7)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(7)合成了化合物(7)-NHS。

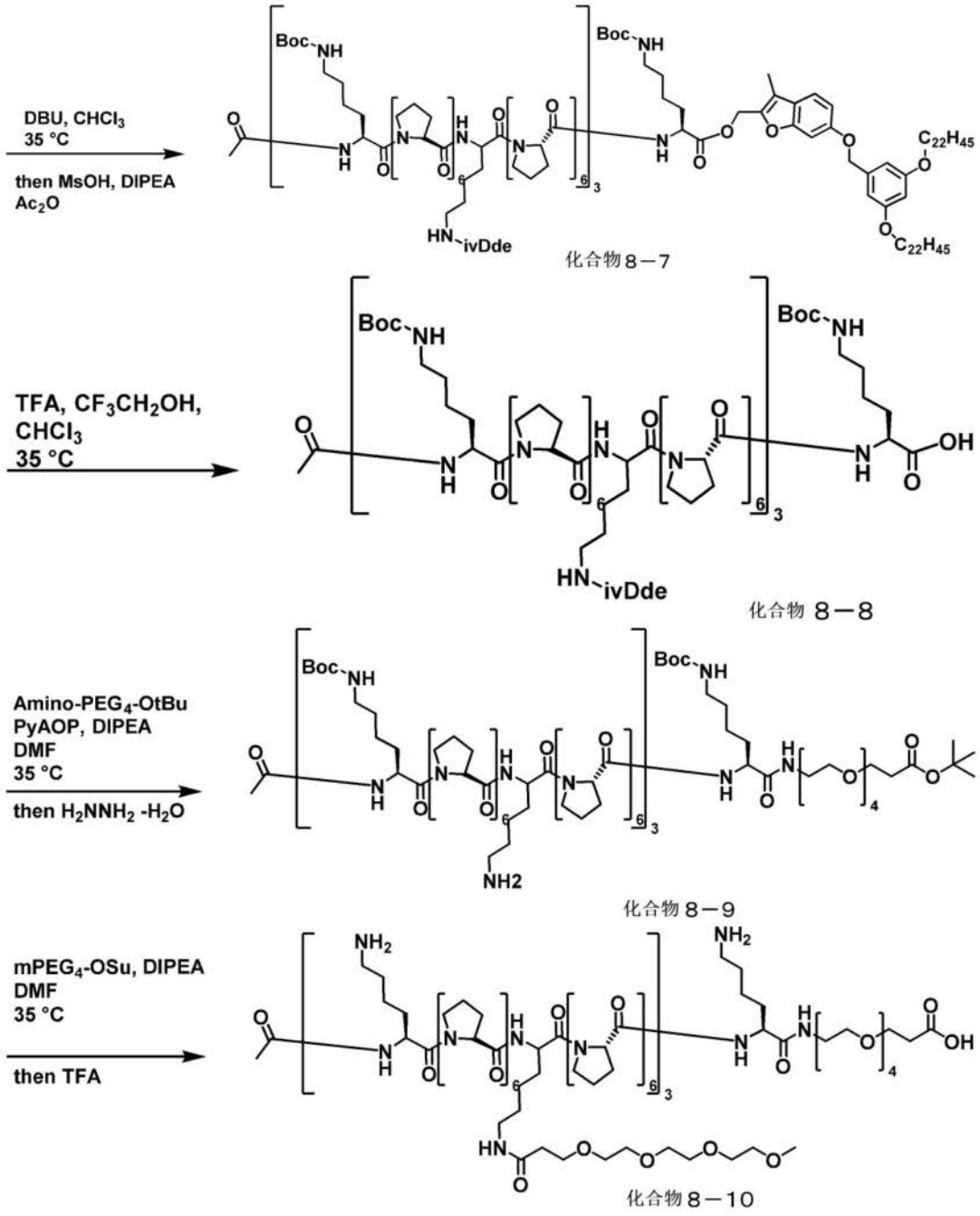
[0580] [化合物(8)的合成法]

[0581] 根据下述方案对化合物(8)进行了合成。

[0582] [化学式33]


DIC, DMAP
Fmoc-Lys(Boc)-OH
THF
化合物 8－1
化合物 8－2
化合物8－3
DBU, CHCl3
35 °C
then MsOH, DIPEA
PyAOP
化合物 8－4
化合物8－5
化合物 8－3
化合物 8－6
化合物8－3

[0583]



[0584]

[0585] 1)化合物(8-2)的合成

[0586] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-1)(国际公开公报第2020/175473号中记载的化合物(4-1))300mg、四氢呋喃(THF)3mL、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)229.8mg、二异丙基碳二亚胺76.8μL及4-二甲氨基吡啶8.0mg,在室温下搅拌了2小时。通过添加乙腈(30mL),对析出的固体进行过滤,并减压干燥,由此获得了350mg的化合物(8-2)。

[0587] 2)化合物(8-3)的合成

[0588] 将H-Pro-Trt(2-Cl)-Resin(0.94mmol/g、53.2mg)用作起始原料,进行了肽固相合成。使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的拉伸重复5个循环,在拉伸Nε-(1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己酮-1-亚基)-3-甲基丁基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰

基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(ivDde)-OH)之后,使用N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH)进行的拉伸进行6个循环之后,拉伸了Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)。在结束拉伸后,利用二氯甲烷清洗树脂之后,在减压下蒸馏去除了溶剂。加入2.0mL的六氟2-丙醇(HFIP):二氯甲烷(CH_2Cl_2)=1:4的混合液,进行了肽的剪切。在30分钟后,滤出树脂对滤液进行浓缩,通过反相柱层析法进行纯化而获得了45.2mg的白色固体的化合物(8-3)。

[0589] 3)化合物(8-4)的合成

[0590] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-2)175mg、氯仿($CHCl_3$)1.5mL及1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU)38.2μL,在35℃下搅拌了1小时。加入甲磺酸(MsOH)16.5μL、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)133μL、化合物(8-3)300mg及(7-氮杂苯并三唑1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyAOP)201mg,在35℃下搅拌了1小时。通过添加乙腈(15mL),对析出的固体进行过滤,并减压干燥,由此获得了322mg的化合物(8-4)。

[0591] 4)化合物(8-5)的合成

[0592] 将原料的化合物(8-2)改为化合物(8-4),除此以外,以与化合物(8-4)的合成相同的方式,合成了化合物(8-5)。

[0593] 5)化合物(8-6)的合成

[0594] 将原料的化合物(8-2)改为化合物(8-5),除此以外,以与化合物(8-4)的合成相同的方式,合成了化合物(8-6)。

[0595] 6)化合物(8-7)的合成

[0596] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-6)542mg、氯仿($CHCl_3$)2.7mL及1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU)25.1μL,在35℃下搅拌了1小时。加入甲磺酸(MsOH)10.9μL、N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)117μL及乙酸酐(Ac_2O)47.7μL,在35℃下搅拌了1小时。通过添加乙腈(15mL),对析出的固体进行过滤,并减压干燥,由此获得了322mg的化合物(8-7)。

[0597] 7)化合物(8-8)的合成

[0598] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-7)48.5mg、氯仿($CHCl_3$)500μL、2,2,2-三氟乙醇(TFE)50μL及三氟乙酸(TFA)5μL,在35℃下搅拌了4小时。之后,对反应液进行过滤,通过向滤液中加入甲基-叔丁基醚(MTBE)6mL,过滤析出的固体,并减压干燥,由此获得了29.1mg的化合物(8-8)。

[0599] 8)化合物(8-9)的合成

[0600] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-8)23mg、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)1.2mL、1-氨基-3、6、9、12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯(Amino-PEG_4-OtBu)2.1mg、(7-氮杂苯并三唑1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyAOP)6.4mg及N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)4.3μL,在35℃下搅拌了2小时。之后,添加24.2μL的水合肼,在室温下搅拌了3小时。在反应结束后,通过反相柱层析法对反应液进行纯化而获得了15.4mg的白色固体的化合物(8-9)。

[0601] 9)化合物(8-10)的合成

[0602] 向10mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(8-9)34mg、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)670μL、4,7,10,13-四氧杂十四烷酸-N-琥珀酰亚胺酯(mPEG_4-OSu)11mg及N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)9.1μL,在35℃下搅拌了2小时。在反应结束后,通过减压蒸留了溶剂之后加入三氟

乙酸(TFA)670μL,在室温下搅拌了2小时。之后,浓缩反应液通过分离纯化HPLC进行纯化,并实施冻结干燥,获得了13.3mg化合物(8-10)。

[0603] 10)化合物(8)的合成

[0604] 使用化合物(8-10)来代替化合物(1-1),除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了化合物(8)。

[0605] 化合物(8)的MS测定结果如下。

[0606] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=11610、$(M-H^+)^-$=11608

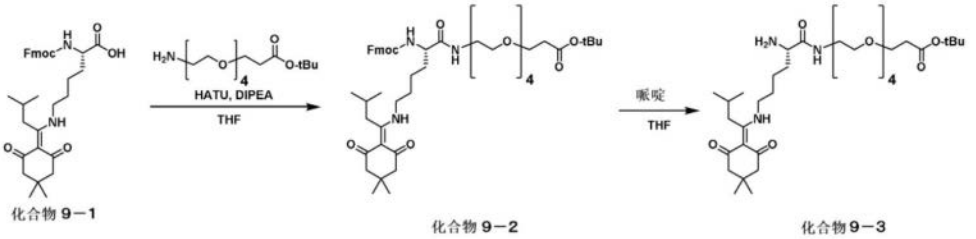
[0607] 11)化合物(8)-NHS的合成

[0608] 此外,除了使用化合物(8)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由化合物(8)合成了化合物(8)-NHS。

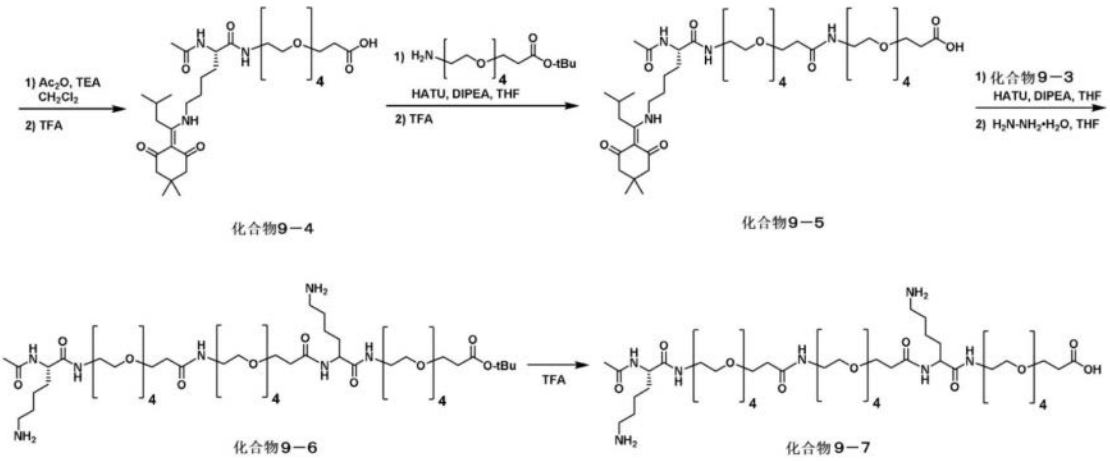
[0609] [比较例化合物(1)的合成法]

[0610] 根据下述方案对比较化合物(1)进行了合成。t-Bu是指叔丁基。

[0611] [化学式34]



[0612]



[0613] 1)化合物(9-3)的合成

[0614] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入Nε-(1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己酮-1-亚基)-3-甲基丁基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(ivDde)-OH)(化合物(9-1))750mg、四氢呋喃(THF)15mL、1-氨基-3、6、9、12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯461mg、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)595mg及N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)273μL,在室温下搅拌了4小时。之后,利用乙酸乙酯及饱和食盐水进行分液后,减压蒸馏去除有机层,从而获得了粗产物形式的化合物(9-2)。

[0615] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(9-2)1.18g、四氢呋喃(THF)7.5mL及哌啶258μL,在室温下搅拌了12小时。之后,利用乙酸乙酯及饱和食盐水进行分液后,减压蒸馏去

除有机层,通过正相柱层析法进行纯化而获得了855mg的化合物(9-3)。

[0616] 2)化合物(9-4)的合成

[0617] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(9-3)855mg、二氯甲烷(CH_2Cl_2)7.7mL、乙酸酐(Ac_2O)83.2μL及三乙基胺(TEA)139μL,在室温下1搅拌了小时。之后,利用氯仿($CHCl_3$)及饱和食盐水进行分液后,减压蒸馏去除有机层而获得了粗产物。

[0618] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入所获得的粗产物和三氟乙酸(TFA)3.5mL,在室温下搅拌了分钟30。之后,浓缩反应液通过反相柱层析法进行纯化,并实施冻结干燥,获得了287mg的化合物(9-4)。

[0619] 3)化合物(9-5)的合成

[0620] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(9-4)287mg、四氢呋喃(THF)5.7mL、1-氨基-3、6、9、12-四氧杂十五烷-15-酸叔丁酯172mg、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)255mg及N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)117μL,在室温下搅拌了4小时。之后,利用乙酸乙酯及饱和食盐水进行分液后,减压蒸馏去除有机层,从而获得了粗产物。

[0621] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入所获得的粗产物和三氟乙酸(TFA)2.5mL,在室温下搅拌了分钟30。之后,浓缩反应液通过反相柱层析法进行纯化,并实施冻结干燥,获得了281mg化合物(9-5)。

[0622] 4)化合物(9-6)的合成

[0623] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(9-5)140mg、四氢呋喃(THF)2.8mL、化合物(9-3)103mg、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)71.9mg及N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)33.0μL,在室温下搅拌了4小时。之后,利用乙酸乙酯及饱和食盐水进行分液后,减压蒸馏去除有机层,从而获得了粗产物。

[0624] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入所获得的粗产物和四氢呋喃(THF)2.8mL及水合肼30.6μL,在室温下搅拌了12小时。之后,浓缩反应液通过反相柱层析法进行纯化,并实施冻结干燥,获得了152mg的化合物(9-6)。

[0625] 5)化合物(9-7)的合成

[0626] 向50mL容量的茄形烧瓶中,加入化合物(9-6)108mg及三氟乙酸(TFA)3mL,在室温下搅拌了1.5小时。之后,浓缩反应液通过反相柱层析法进行纯化,并实施冻结干燥,获得了100mg的化合物(9-7)。

[0627] 6)比较化合物(1)的合成

[0628] 使用化合物(9-7)来代替化合物(1-1),除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了比较化合物(1)。

[0629] 比较化合物(1)的MS测定结果如下。

[0630] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=4466、$(M-H^+)^-$=4464

[0631] 7)比较化合物(1)-NHS的合成

[0632] 除了使用比较化合物(1)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由比较化合物(1)合成了比较化合物(1)-NHS。

[0633] [参考化合物(2)的合成]

[0634] 1)参考化合物(2)的合成

[0635] 作为肽固相合成的原料,使用N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]甘氨酸(Fmoc-Gly-OH)、Nε-(叔丁氧羰基)-Nα-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基)-L-赖氨酸(Fmoc-Lys(Boc)-OH)及N-(9-芴甲氧羰基)-L-脯氨酸(Fmoc-Pro-OH),进行肽链的拉伸,以使成为上述参考化合物(2)-NHS中记载的肽链的结构,除此以外,以与化合物(1)的合成相同的方式,合成了参考化合物(2)。

[0636] 参考化合物(2)的MS测定结果如下。

[0637] MS(ESI m/z):$(M+H^+)^+$=4592、$(M-H^+)^-$=4590

[0638] 2)参考化合物(2)-NHS的合成

[0639] 除了使用参考化合物(2)以外,以与化合物(1)-NHS的合成相同的方式,由参考化合物(2)合成了参考化合物(2)-NHS。

[0640] <实施例1>

[0641] 关于上述的各化合物,作为设为标记物质的基础上的对溶液的适用及对膜的适用的使用方式中的适用性的指标,对荧光标记率、溶液荧光强度、膜上荧光强度及斑点印迹荧光强度进行了评价。

[0642] [0]荧光标记抗体的制作

[0643] 向微型管中加入抗兔IgG抗体(2.3mg/ml)217μL及碳酸盐缓冲液21.7μL,实施振荡搅拌后,以相对于抗体1当量成为15当量的方式加入化合物(1)-NHS的二甲基亚砜溶液,进一步进行了振荡搅拌。在4℃下静放24小时,使用离心式超滤过滤器(产品名称:Amicon Ultra UFC510096、Merck社制造)与PBS溶液(磷酸缓冲食盐水)对反应液实施纯化,获得了化合物(1)-NHS的IgG标记抗体。以相同的方式获得了各化合物、比较化合物及参考化合物的标记抗体。以下,化合物(Z)-IgG、比较化合物(Z)-IgG、参考化合物(Z)-IgG的表述分别是指,化合物(Z)-NHS的IgG标记抗体、比较化合物(Z)-NHS的IgG标记抗体或参考化合物(Z)-NHS的IgG标记抗体。

[0644] 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(DOL)。将结果汇总表示在表A中。

[0645] 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,[-]是指没有单位。在本试验中,蛋白质是指抗兔IgG抗体。

[0646] 荧光标记率=荧光色素的浓度/蛋白质的浓度

[0647] 荧光色素的浓度是指标记的荧光色素的总摩尔浓度[M],蛋白质的浓度是指经荧光标记的蛋白质的摩尔浓度[M],分别通过下述式计算。

[0648] 荧光色素的浓度=$Dye_{max}/\varepsilon_{dye}$

[0649] 蛋白质的浓度=$(IgG_{280}-(Dye_{max}\times CF))/\varepsilon_{protein}$

[0650] 上述式中的各符号如下所述。

[0651] Dye_{max};荧光色素在最大吸收波长下的吸收[-]

[0652] ε_{dye};荧光色素的摩尔吸光系数[$M^{-1}cm^{-1}$]

[0653] IgG_{280};荧光标记蛋白质在280nm下的吸收[-]

[0654] Dye_{280};荧光色素在280nm下的吸收[-]

[0655] $\varepsilon_{protein}$;蛋白质的摩尔吸光系数[$M^{-1}cm^{-1}$]

[0656] CF(Correction Factor);Dye_{280}/Dye_{max}[-]

[0657] [表A]

[0658]

No.	标记抗体	DOL
101	化合物(1)-IgG	4.3
102	化合物(2)-IgG	4.4
103	化合物(3)-IgG	4.4
104	化合物(4)-IgG	4.2
105	化合物(5)-IgG	4.5
106	化合物(6)-IgG	4.6
107	化合物(7)-IgG	4.4
108	化合物(8)-IgG	4.2
c101	比较化合物(1)-IgG	4.6
r102	参考化合物(2)-IgG	4.6

[0659] [1]溶液荧光强度的评价

[0660] 将在上述[0]中制备的标记抗体的溶液制备成蛋白质浓度0.005mg/mL,使用分光荧光强度计(产品名称: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DOL4.6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1中。

[0661] -溶液荧光强度的评价基准-

[0662] A:荧光强度与基准值之比为2.0倍以上

[0663] B:荧光强度与基准值之比为1.5倍以上且小于2.0倍

[0664] C:荧光强度与基准值之比为1.3倍以上且小于1.5倍

[0665] D:荧光强度与基准值之比为1.1倍以上且小于1.3倍

[0666] E:荧光强度与基准值之比小于1.1倍

[0667] [2]膜上荧光强度评价

[0668] 将抗兔IgG溶液制备成蛋白质浓度5.0ng/mL,在硝基纤维素膜上慎重地点样2μL。对膜进行干燥后,接着在TBS-T(Tris Buffered Saline with Tween 20:含吐温20的Tris缓冲盐水)中利用Fish Gelatin封闭缓冲液阻断。一边将膜在室温下进行搅拌一边孵化1小时。去除结块溶液,利用TBS(Tris Buffered Saline:Tris缓冲盐水)将标记抗体的PBS溶液(在上述[0]中制备的标记抗体的溶液、稀释前的浓度1mg/mL)稀释了20000倍。将膜浸入稀释的溶液中,搅拌的同时孵化1小时。利用TBS-T对膜以10分钟清洗3次,最后利用TBS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DOL4.6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1中。

[0669] -膜上荧光强度的评价基准-

[0670] A:荧光强度与基准值之比为2.0倍以上

[0671] B:荧光强度与基准值之比为1.5倍以上且小于2.0倍

[0672] C:荧光强度与基准值之比为1.3倍以上且小于1.5倍

[0673] D:荧光强度与基准值之比为1.1倍以上且小于1.3倍

[0674] E:荧光强度与基准值之比小于1.1倍

[0675] [3]斑点印迹荧光强度评价

[0676] 利用PBS-T(Phosphate Buffered Saline with Tween 20:含吐温20的磷酸盐缓冲盐水)将转铁蛋白(20mg/mL)制备成50ng/mL,在硝基纤维素膜上慎重地点样2μL。在将膜干燥后,接着在TBS-T中利用Fish Gelatin封闭缓冲液阻断。接着,向PBS-T30mL中加入兔抗人转铁蛋白的多克隆抗体6μL,浸渍膜并振荡1小时。然后,取出膜,利用TBS-T清洗4次。之后,向T BS-T30mL中加入将在上述[0]中制备的标记抗体(抗兔IgG)的溶液调整为蛋白质浓度0.1mg/mL的溶液15μL,在其中浸渍膜,在室温下搅拌1小时的同时进行了孵化。利用TBS-T对膜以10分钟/次清洗3次,最后利用TBS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DOL4.6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1中。

[0677] -斑点印迹荧光强度的评价基准-

[0678] A:荧光强度与基准值之比为2.0倍以上

[0679] B:荧光强度与基准值之比为1.5倍以上且小于2.0倍

[0680] C:荧光强度与基准值之比为1.3倍以上且小于1.5倍

[0681] D:荧光强度与基准值之比为1.1倍以上且小于1.3倍

[0682] E:荧光强度与基准值之比小于1.1倍

[0683] [表1]

[0684]

NO.		溶液荧光强度	膜上荧光强度	斑点印迹荧光强度
101	化合物(1)-IgG	D	D	D
102	化合物(2)-IgG	D	D	C
103	化合物(3)-IgG	D	C	C
104	化合物(4)-IgG	C	C	C
105	化合物(5)-IgG	B	C	C
106	化合物(6)-IgG	B	B	C
107	化合物(7)-IgG	B	B	B
108	化合物(8)-IgG	A	A	A
C101	比较化合物(1)-IgG	E (基准)	E (基准)	E (基准)
r102	参考化合物(2)-IgG	D	D	E

[0685] 由上述表1的结果可知以下内容。

[0686] 从比较化合物(1)-NHS不具有由通式(I)表示的结构(-A^1-B-A^2-)的A^1及A^2的方面而言,从参考化合物(2)-NHS不具有由通式(I)表示的结构(-A^1-B-A^2-)的B的方面而言,并不

是本发明中规定的化合物。比较化合物(1)-NHS仅能够获得溶液中的荧光强度、膜上的荧光强度、斑点印迹中的荧光强度均低的标记抗体(No.c101)。参考化合物(2)-NHS仅能够获得斑点印迹状态下的荧光强度相对于比较化合物(1)-NHS的标记抗体的荧光强度小于1.1倍的标记抗体(No.r102)。

[0687] 与此相对,本发明中规定的化合物(1)-NHS～(8)-NHS相对于上述比较化合物(1)-NHS的标记抗体的荧光强度在溶液、膜或斑点印迹中的任意状态下均具有1.1倍以上的荧光强度,能够制作显示优异的荧光强度的标记抗体(相对于No.c101的No.101～108)。尤其,若将化合物(2)-NHS与除了不具有由通式(I)表示的结构(-A^1-B-A^2-)的B的方面以外具有相似的结构的参考化合物(2)-NHS进行比较,则发现关于在斑点印迹状态下的荧光强度,参考化合物(2)-NHS小于1.1倍,相对于此,化合物(2)-NHS为1.3倍以上,通过具有通式(I)中的B的结构,在斑点印迹状态下显示优异的荧光强度(相对于No.r102的No.102)。

[0688] 以下、关注在由通式(I)表示的结构的两侧具有源自赖氨酸的结构的化合物(化合物(2)-NHS～化合物(8)-NHS),进行讨论。

[0689] 通式(I)中的l或n为6的化合物(3)-NHS～化合物(8)-NHS能够制作膜及斑点印迹状态下显示1.3倍以上的荧光强度的标记抗体(相对于No.102的No.103～108)。

[0690] 通式(I)中的l或n为6,通式(b)中的L^1为连接＞NY^1与＞C＝O的最短原子数为1的连接基团的化合物(4)-NHS～化合物(8)-NHS能够制作即使在溶液、膜及斑点印迹中的任意状态下也显示1.3倍以上的荧光强度的标记抗体(相对于No.103的No.104～108)。

[0691] 具有阴离子性基团的化合物(5)-NHS能够制作在溶液状态下显示1.5倍以上的荧光强度的标记抗体(相对于No.104的No.105)。

[0692] 在通式(I)中p为2的化合物(6)-NHS能够制作在溶液及膜状态下显示1.5倍以上的荧光强度的标记抗体(相对于No.104的No.106)。

[0693] 具有聚环氧烷基的化合物(7)-NHS能够制作在溶液、膜及斑点印迹中的任一种中显示1.5倍以上的荧光强度的标记抗体(相对于No.104的No.107)。

[0694] 具有聚环氧烷基且具有4个荧光体部的化合物(8)-NHS相对于具有2个荧光体部的化合物(7)-NHS具有2倍的荧光体部。化合物(8)-NHS相对于化合物(7)-NHS能够制作显示约1.5倍的强度的标记抗体。通常,随着荧光体部的数量(浓度)增加容易产生缔合,难以获得与荧光体部的数量成比例的荧光强度,结果发现在本发明的化合物中,即使在增加化合物中的荧光体部的数量的情况下,也与荧光体部的数量少的情况相同地有效抑制荧光体部的缔合,显示优异的荧光强度。

[0695] 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。

[0696] 本申请主张基于2021年8月31日在日本专利申请的日本专利申请2021-141996的优先权,在此将这些作为参考,并将其内容作为本说明书中记载的一部分编入本说明书中。