

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 49/00 G01N 31/22

G01N 21/76 C07D209/60

C07D403/14 C09B 62/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96192854.9

[45]授权公告日 2002 年 11 月 6 日

[11]授权公告号 CN 1093768C

[22]申请日 1996. 1. 30 [21]申请号 96192854.9

[30]优先权

[32]1995. 1. 30 [33]JP [31]12283/95

[32]1995. 8. 31 [33]JP [31]223613/95

[86]国际申请 PCT/JP96/00169 1996. 1. 30

[87]国际公布 WO96/23525 日 1996. 8. 8

[85]进入国家阶段日期 1997. 9. 26

[73]专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 伊东进 野沢正之 志贺匡宣

佐佐本一美 竹迫和浩 竹内博

[56]参考文献

WO95/02699A 1995. 1. 26 C12Q1/00

审查员 刘菊芳

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

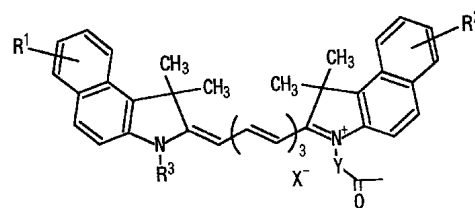
代理人 邵红 杨丽琴

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 3 页

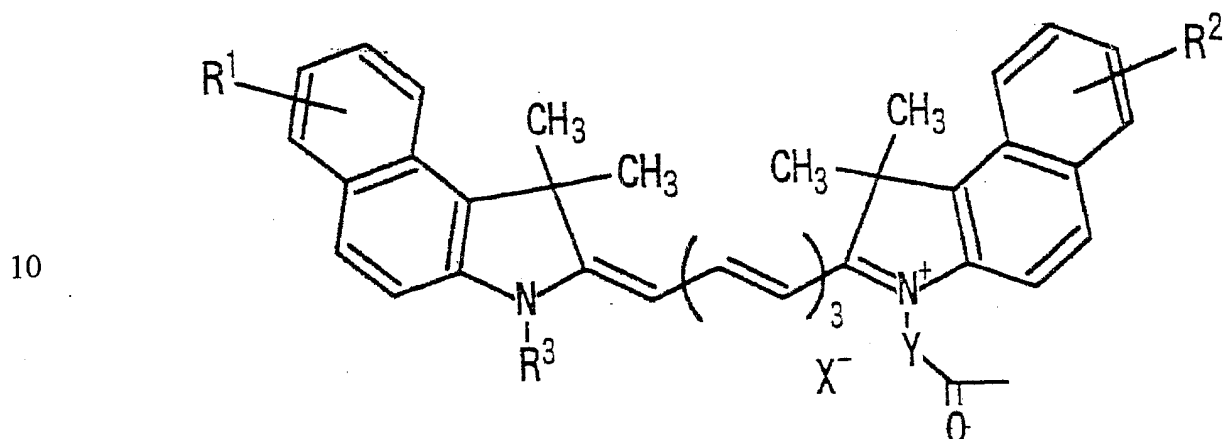
[54]发明名称 诊断用标记物

[57]摘要

含有用(a)例如抗体等的检测系统,及(b)与该检测系统结合的下述式(R¹及 R²分别独立地表示氢原子或烷基等;R³表示烷基或磺酸烷基等;根据需要,X⁻表示阴离子种;Y 表示碳数 1~10 的亚烷基、或含有由氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的,1 个以上原子的碳数 1~10 的亚烷基)表示的荧光性官能基的诊断用标记物。由于通过照射近红外线乃至远红外线,发出 780nm 以上波长的荧光,所以对于红外线内窥镜检查或外科手术时,确定病灶等是有用的。

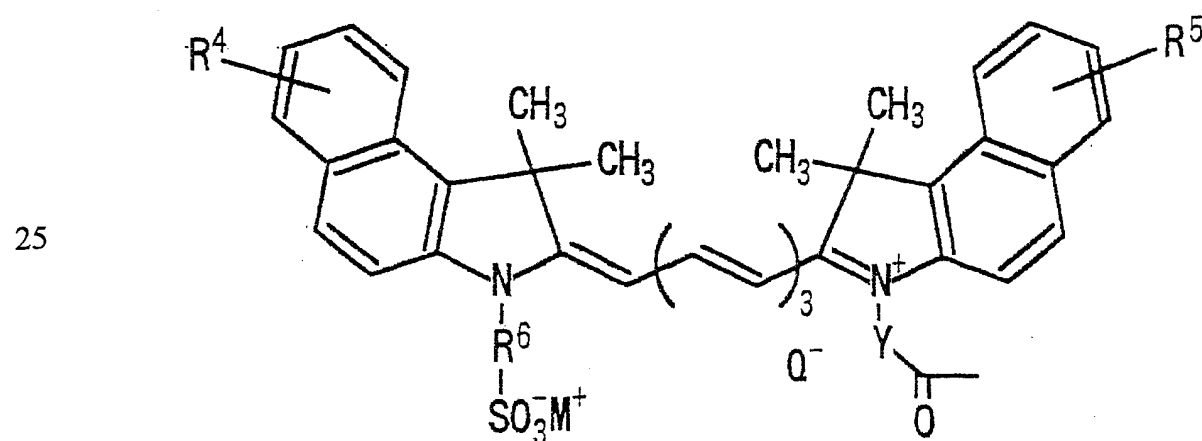


1. 包括 (a) 检测系统, 及 (b) 与该检测系统结合的下式表示的荧光性官能基的诊断用标记物, 并且用近红外线或远红外线激发光照射时荧光官能基团能够发出 780nm 以上波长的荧光, 所述检测系统选自抗体、核酸和生物素-卵白素系统



15 式中, R^1 及 R^2 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、烷氧基或磺酸基;
 R^3 表示烷基、磺酸烷基或氨基取代烷基; X 表示阴离子种; Y 表示碳数 1~10 的亚烷基、或含有从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 个以上原子的碳数 1~10 的亚烷基。

2. 包括 (a) 检测系统, 及 (b) 与该检测系统结合的下式表示的荧光性官能基的诊断用标记物, 并且用近红外线或远红外线激发光照射时
 20 荧光官能基团能够发出 780nm 以上波长的荧光,



30 式中, R^4 及 R^5 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基或磺酸盐基;
 R^6 表示亚烷基; M^+ 表示碱金属离子; Q^- 表示卤离子、高氯酸根离子、或硫氰酸根离子; Y 表示碳数 1~10 的亚烷基、或含有从氧原子、氮原子

及硫原子组成群选出的1个以上原子的碳数1~10的亚烷基。

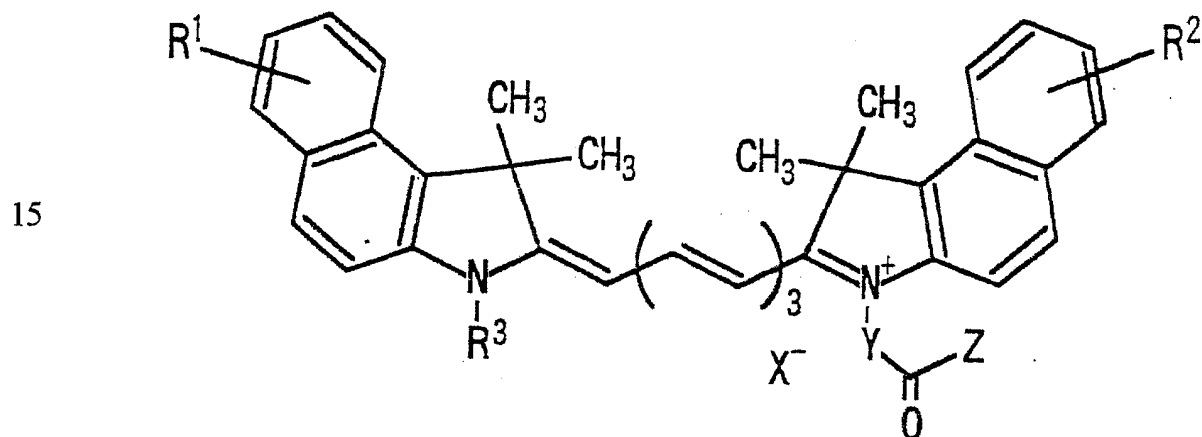
3. 权利要求1或2所述的诊断用标记物, 其中, 荧光性官能基是直接
与检测系统结合的。

4. 权利要求1或2所述的诊断用标记物, 其中, 荧光性官能基是通
5 过接头或蛋白与检测系统结合的。

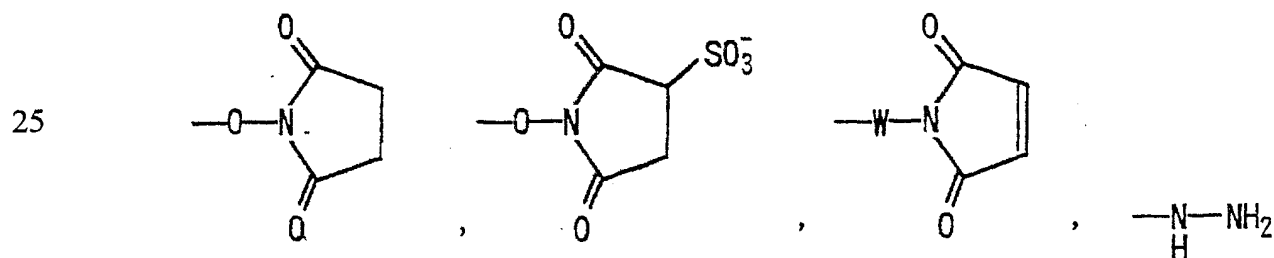
5. 权利要求1所述的诊断用标记物, 其中, 作为抗体, 使用抗癌抗
原抗体, 抗细菌抗体或抗病毒抗体。

6. 诊断药, 含有权利要求1~5中任何一项所述的诊断用标记物作
为有效成分。

10 7. 用下式表示的化合物,



20 式中, R^1 及 R^2 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、烷氧基或磺酸
基; R^3 表示烷基、磺酸烷基或氨基取代烷基; X^- 表示阴离子种; Z 表示
由下式组成群选出的基;



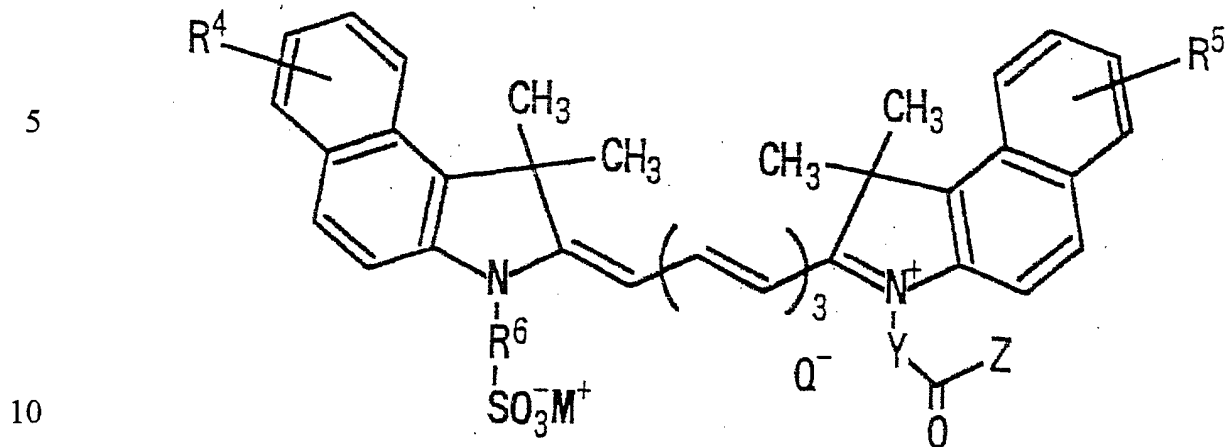
以及 Y 分别独立地表示碳数1~10的亚烷基、或含有由氧原子、氮原子
30 及硫原子组成群选出的1个以上原子的碳数1~10的亚烷基。

8. 权利要求7所述的化合物作为荧光标记剂的用途。

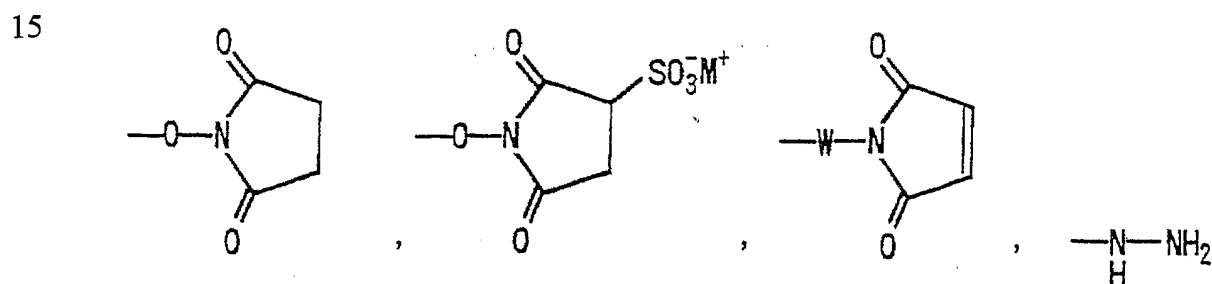
9. 权利要求1所述的诊断用标记物的制造方法, 其是包括使权利要

求 7 所述的化合物与检测系统反应的工序。

10. 用下式表示的化合物,



式中, R^4 及 R^5 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基或磺酸盐基;
 R^6 表示亚烷基; M^+ 表示碱金属离子; Q^- 表示卤离子、高氯酸根离子、或
 硫氰酸根离子; Z 表示用下式组成群选出的基;



W 及 Y 分别独立地表示碳数 1~10 的亚烷基、或含有由氧原子、氮原子
 及硫原子组成群选出的 1 个以上原子的碳数 1~10 的亚烷基。

11. 权利要求 10 所述的化合物作为荧光标记剂的用途。

12. 权利要求 2 所述的诊断用标记物的制造方法, 其包括使权利要
 25 求 10 所述的化合物, 与检测系统反应的工序。

诊断用标记物

技术领域

- 5 本发明涉及诊断用标记物。进一步详细地说，本发明涉及使特异识别癌细胞的抗体等与用对组织障碍性小的经近红外线或远红外线照射激发后发出荧光的特定标记用化合物结合的，可适用于生物体的诊断用标记物。

背景技术

- 10 近年，由于电子内窥镜的普及，使内窥镜诊断变得容易，在癌症早期，可确切地发现胃癌和大肠癌等。进而，对于微小癌的诊断，电子内窥镜和使用通常的内窥镜时的诊断能力几乎相同，这就意味着还未确立活用电子内窥镜功能的新的诊断方法。对于用通常的内窥镜不能识别的微小病变，只要用在电子内窥镜下可检测的标记抗体，标记微小病变，
15 就可用计算机处理，进行图像解析，可容易地进行检测，但这种方法还未实用化。

- 为了确立使用电子内窥镜的上述诊断方法，需要用免疫组织化学的染色法直接对生物体组织染色。固定化标本的染色法是已经确立的技术。可是，非固定化标本的染色法对于本专业人员还不是可利用的技术。
20 例如，对于非固定化标本的免疫染色法虽然有报告（*四国医学杂志*，29，180，1987）但对于使用近红外线的本领域的切除新鲜标本和生物体组织本身的免疫染色法，还没有报告。

- 另一方面，对于上述的诊断方法，也需要在电子内窥镜下可检测的诊断用标记物（标记化的抗体等）。已知将用紫外线激发，发出紫外·可见光的荧光的标记用化合物与抗体结合的诊断用标记物，广泛用于检测
25 存在于摘出生物体外的组织的癌细胞和癌组织。可是，使用由紫外线激发的荧光性诊断用标记物的方法，由于紫外线能损伤生物体组织和DNA，所以不适用于生物体。目前，还没有可直接适用于生物体的诊断用标记物。

- 30 已知吲哚花青绿（ICG），在红外线内窥镜下，显示特异的吸收，发出荧光。已知用红外线内窥镜，使用吲哚花青绿的例子（*Gastroenterological Endoscopy*, 34, pp. 2287 - 2296, 1992；及

Gastrointestinal Endoscopy, 40, pp. 621 - 2; 628, 1994), 但任何一个例子都是在血管内投入 ICG。另外, 一般由于以吲哚花青绿为主的荧光性色素疏水性高, 以单体给于肠道内时可快速吸收, 所以试图通过在母环或侧链部分导入亲水性的磺酰基等, 提高水溶性, 提高测定效率, 避免吸收后的毒性问题。可是, 还未发现与吲哚花青绿发出相同荧光的水溶性标记用化合物。

本发明的目的在于提供对于通过免疫组织化学的染色法直接使生物体组织染色的有用的诊断用标记物。本发明另一目的在于提供通过对组织障碍性小的近红外线乃至远红外线照射, 发生荧光, 可直接用于生物体的诊断用标记物。即, 本发明的课题在于提供不必担心由于紫外线激发所引起生物体组织和 DNA 损伤的、也适用于生物体的诊断用标记物。提供具有这样特征的, 且水溶性优良的诊断用标记物也是本发明的目的之一。

另外, 本发明的目的在于提供对于使用红外线内窥镜等的准体内的食道癌、胃癌、大肠癌等上皮性组织的恶性新生物及感染症等早期诊断和外科手术时病灶的确定或诊断上有用的, 适用于生物体的诊断标记物。另外, 本发明另一目的在于提供使用这种诊断用标记物, 通过免疫组织化学的染色法, 将生物体组织直接染色的方法。

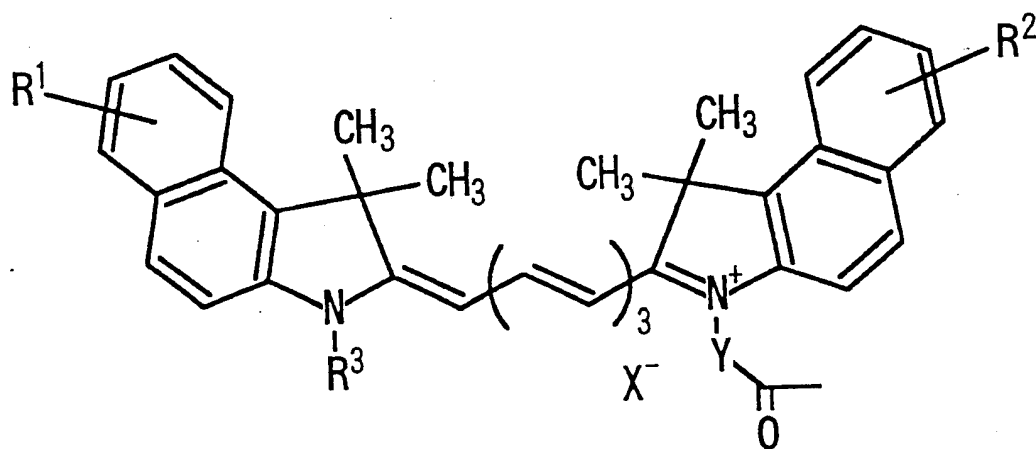
发明的公开

本发明者们, 通过潜心研究上述课题, 合成各种吲哚花青绿的衍生物, 成功地制造了通过近红外线乃至远红外线激发, 发出荧光的吲哚花青绿衍生物。另外, 本发明者们发现使用上述的吲哚花青绿衍生物作为标记用化合物, 与抗癌抗原等反应, 可制造对生物体直接适用的诊断用标记物, 以及这种诊断用标记物, 对于通过免疫组织化学的染色法直接染色生物体组织是有用的。

进而, 本发明者们对于提供水溶性优良的诊断用标记物进行潜心研究结果发现, 在上述的吲哚花青绿衍生物中, 对于可形成分子内抗衡离子(两性离子)的化合物, 由于形成抗衡离子, 分子的离子性降低, 有损坏水溶性的场合, 但是若碘化钠等与该衍生物作用, 在分子内不形成抗衡离子, 保持了整个分子的离子性, 显著地增大了水溶性。本发明就是基于这些见解而完成的。

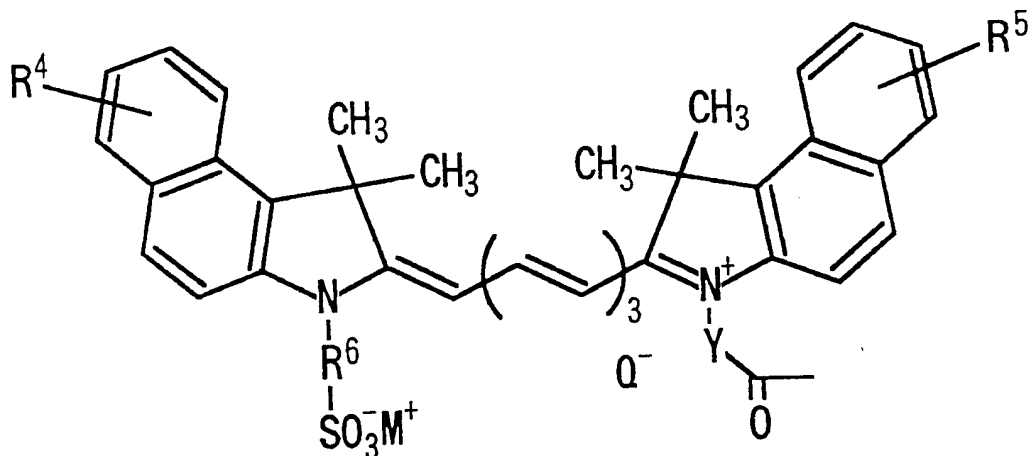
即, 本发明提供了包括(a)检测系统, 及(b)结合在该检测系

统上的用下述式 (I) 表示的荧光性官能基的诊断用标记物,



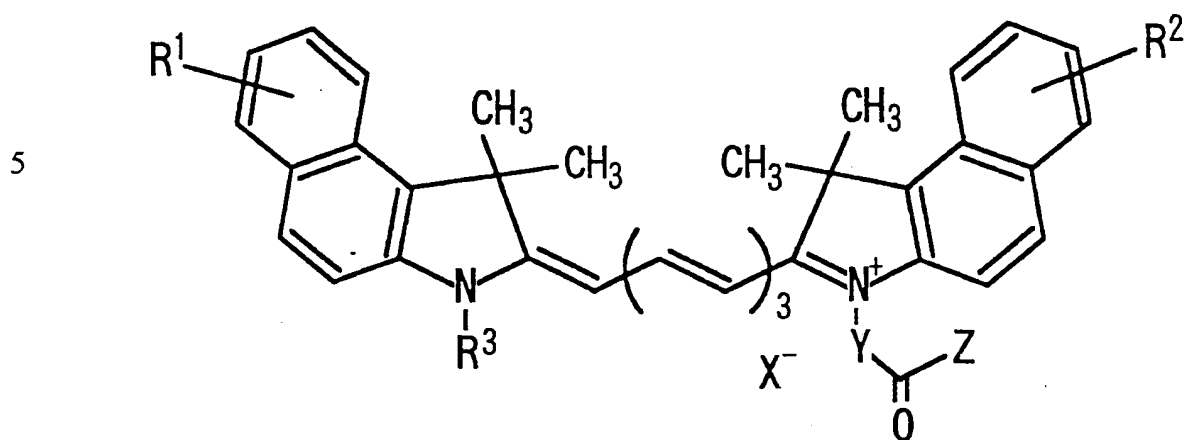
(式中, R^1 及 R^2 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、烷氧基或磺酸基; R^3 表示烷基、磺酸烷基或氨基取代烷基; X^- , 根据需要, 表示阴离子种; Y 表示碳数 1 ~ 10 的亚烷基、或含有从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 个以上原子的碳数 1 ~ 10 的亚烷基)。

另外, 按照本发明的另一个方案, 提供包括 (a) 检测系统, 及 (b) 结合在该检测系统上的用下式 (II) 表示的荧光性官能基的诊断用标记物,

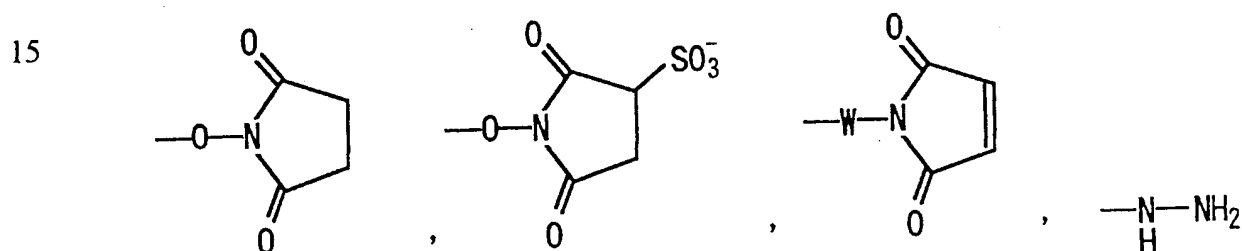


(式中, R^4 及 R^5 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基、或磺酸盐基; R^6 表示亚烷基; M^+ 表示碱金属离子; Q^- 表示卤离子、高氯酸根离子、或硫氰酸根离子; Y 表示碳数 1 ~ 10 的亚烷基、或含有从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 个以上原子的碳数 1 ~ 10 的亚烷基)。

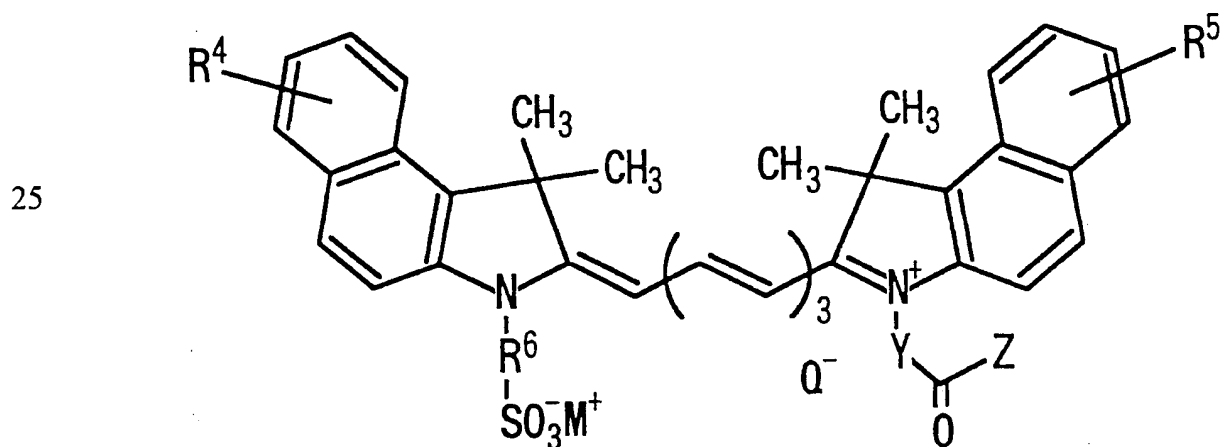
进而, 按照本发明的另一方案, 提供制造上述诊断用标记物有用的化合物, 用下述式 (III) 和用下述式 (V) 表示的化合物。



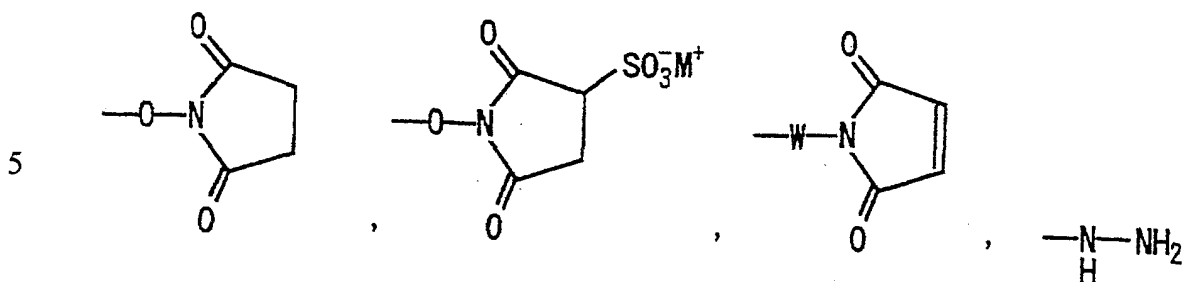
(式中, R^1 及 R^2 分别独立地表示氢原子、烷基、芳基、烷氧基或磺酸基; R^3 表示烷基、磺酸烷基或氨基取代烷基; X^- , 根据需要, 表示阴离子种; Z 表示由下述式组成群选出的基;



W 及 Y 分别独立地表示碳数 1 ~ 10 的亚烷基、或含有氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 以上原子的碳数 1 ~ 10 的亚烷基)。



(式中, R^4 及 R^5 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基、或磺酸盐基; R^6 表示亚烷基; M^+ 表示碱金属离子; Q^- 表示卤离子、高氯酸根离子、或硫氰酸根离子; Z 表示由下式组成群选出的基,



W 及 Y 分别独立地表示碳数 1~10 的亚烷基、或含有从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 个以上原子的碳数 1~10 的亚烷基的化合物)。

15 本发明也提供了包括使这些化合物和检测系统结合的工序的上述诊断用标记物的制造方法。

另外, 提供了包括 (a) 检测系统; 及 (b) 结合在该检测系统上的荧光官能基的诊断用标记物, 当用波长 600~800nm 的激发光照射时,

20 所述官能基发出 780nm 以上波长的荧光。此外, 按照上述各诊断用标记物优选的方案, 可提供荧光性官能基与检测系统直接结合的上述各诊断用标记物; 荧光性官能基, 通过接头或者蛋白, 与检测系统结合的上述各诊断用标记物; 检测系统从抗体、核酸及扩增系物质组成群中选出的上述各诊断用标记物; 作为抗体, 使用抗癌抗原体、抗细菌抗体或抗病毒抗体的上述各诊断用标记物; 用于红外线内窥镜检查或外科手术时, 确定病灶的上述各诊断用标记物; 及通过免疫组织化学的染色法, 直接用于染色生物体组织上述各诊断用标记物。另外, 提供了含有上述各诊断用标记物作为有效成分的诊断药。

图的简单说明

25 图 1 是表示标记用化合物(化合物 18)的红外线吸收光谱的图。(A)是通过添加碘化钠, 形成盐的化合物 18 的红外线吸收光谱, (B)是作为原料使用的吲哚花青绿-N-己酸磺基琥珀酰亚胺酯(化合物 17)的红外线吸收光谱。

图 2 是表示用标记用化合物 6 和抗 EMA 抗体结合, 得到的本发明

30 诊断用标记物(74 μ g/ml)的紫外·可见光吸收光谱。

图 3 是表示使标记用化合物 18 和人体 IgG 结合的本发明诊断用标记物的荧光光谱。图中, 实线表示发光光谱、虚线表示激发光谱。

实施发明的最佳方案

上述用通式 (I) 及 (II) 表示的荧光性官能基, 通过结合在母核的 $-Y-CO-$ 基的羰基, 与检测系统结合。上述通式 (I) 中, R^1 及 R^2 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基或磺酸基 ($-SO_3H$)。 R^1 及 R^2 分别可在苯基上的任意位置上取代。作为烷基, 可使用碳数 1 ~ 6 左右的直链或支链的低级烷基, 优选的是碳数 1 ~ 4 的直链或支链的低级烷基。例如, 适宜的是甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基等。

作为 R^1 及 R^2 表示的芳基, 可使用取代的或未取代的苯基、萘基、吡啶基等。作为烷氧基, 可使用碳数 1 ~ 6 左右, 优选的是碳数 1 ~ 4 的直链或支链的低级烷氧基, 更具体地, 可使用甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基等。作为磺酸基, 除了游离态的 $-SO_3H$ 基之外, 可使用磺酸基的碱性加成盐 (磺酸盐基), 例如钠盐、钾盐等。在这些之中, 优选的, R^1 及 R^2 分别独立地是氢原子、烷基、烷氧基或磺酸盐基。

R^3 表示烷基、磺酸烷基或氨基取代烷基。在这些基中, 作为烷基, 例如可使用上述的烷基。磺酸烷基的磺酸基或氨基取代烷基的氨基, 也可分别取代在烷基上的任何位置上, 例如可使用取代在烷基的末端上的。

磺酸基及氨基也可分别形成碱性加成盐及酸加成盐。例如, 优选的是磺酸形成钠盐和钾盐的、氨基形成卤化铵等盐的、氨基季胺化的等。另外, 作为氨基, 可使用取代或未取代的氨基。作为磺酸烷基或氨基取代烷基的例子, 例如可举出磺酸甲基 ($-CH_2SO_3H$)、磺酸乙基、氨基甲基、氨基乙基、甲基氨基乙基、及它们的盐等。

在用式 (I) 表示的荧光性官能基中, 根据需要, X^- 表示卤离子、醋酸根离子、高氯酸根离子、碳酸根离子等的阴离子种。用 X^- 表示的这些阴离子, 起到消除 $Y-CO-$ 基取代的母核内氮原子上的正电荷, 将整个用式 (I) 表示的荧光性官能基维持中性的作用。因此, 例如, 在用式 (I) 表示的荧光性官能基中的 R^1 、 R^2 及 R^3 中的一个基是阴离子性的基时, 由于其基的负电荷消除母核内的季氮原子上的正电荷, 形成分子内两性离子, 所以有时不需要 X^- 。另一方面, R^1 或 R^2 中的任何一个磺酸基、 R^3 是氨基取代烷基时, 由于在这些基之间, 电荷平衡, 所

以有时需要 X^- 。

在用上述通式 (II) 表示的荧光性官能基中, R^4 及 R^5 分别独立地表示氢原子、烷基、烷氧基或磺酸盐基。 R^4 及 R^5 可分别取代在苯基上的任意位置上。作为烷基及烷氧基, 可使用上述的, 作为磺酸盐基

- 5 ($-SO_3^-M^+$: M^+ 表示碱金属离子, 可与 Q^- 的抗衡离子的 M^+ 相同或不同), 例如可使用钠磺酸盐基或钾磺酸盐基等。

- R^6 表示直链或支链的亚烷基, 例如, 可使用碳数 1 ~ 6 左右, 优选的是碳数 2 ~ 5 的直链或支链的低级亚烷基, 最优选的是亚丙基、正丁基、或亚戊基。在 R^6 上取代的 $-SO_3^-$ 基, 可取代在该亚烷基的任意位置
10 上, 但例如, 优选的使用取代在亚烷基的末端上的。更具体地, 作为 $R^6 - SO_3^-$, 例如, 优选的是用 $-(CH_2)_k - SO_3^-$ (k 表示 2 ~ 4 的整数) 表示的基等。

- M^+ 表示碱金属离子。作为碱金属离子, 优选的可使用钠离子或钾离子。 Q^- 表示卤离子、高氯酸离子、或硫氰酸离子, 优选的是使用氯离子、
15 溴离子或碘离子等。这些之中, 特别优选的是碘离子。不拘泥任何特定的理论, 但上述荧光性官能基具有 $Y - CO -$ 基取代的氮原子上的正电荷 (用上述式中 N^+ 表示) 和来自 $R^3 - SO_3^-$ 的负电荷, 但若用 M^+Q^- 表示的碱金属盐共存时, 则在氮原子上的正电荷 (用上述式中 N^+ 表示) 和 Q^- 之间, 以及 $R^3 - SO_3^-$ 和 M^+ 之间, 分别形成离子键。其结果, 阻止分子
20 内形成抗衡离子, 维持整个分子的离子性, 显著增大水溶性。

- 在上述通式 (I) 及 (II) 中, Y 表示碳数 1 ~ 10 的直链或支链的烷基, 优选的是碳数 3 ~ 5 的直链或支链的亚烷基, 最优选的是亚丙基、亚丁基或亚戊基。另外, Y 表示含有从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的, 1 个以上的原子的碳数 1 ~ 10 的直链或支链的烷基。作为用
25 $-Y - CO -$ 表示的基, 例如可利用 $-CH_2 - CO -$; $-(CH_2)_2 - CO -$;
 $-(CH_2)_3 - CO -$; $-(CH_2)_4 - CO -$; $-(CH_2)_5 - CO -$;
 $-CH_2 - CO - NH - (CH_2)_5 - CO -$;
 $-(CH_2)_2 - CO - NH - (CH_2)_5 - CO -$;
 $-(CH_2)_3 - CO - NH - (CH_2)_5 - CO -$;
30 $-(CH_2)_4 - CO - NH - (CH_2)_5 - CO -$;
 $-CH_2 - CO - NH - (CH_2)_5 - CO - NH - (CH_2)_2 - CO -$;

$-(\text{CH}_2)_4 - \text{CO} - (\text{N}, \text{N}' - \text{哌嗪基} (\text{piperadiny} \text{l})) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO}$ 、
 $(\text{N}, \text{N}' - \text{哌嗪基})$ 表示在哌嗪的 1 的位置上取代 $-(\text{CH}_2)_4 - \text{CO}$ -、在 4
 的位置上取代 $-(\text{CH}_2)_2 - \text{Z}$ 基, 以下相同); 另外, $-\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5$
 $-\text{CO} - (\text{N}, \text{N}' - \text{哌嗪基}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO}$ - 等。

- 5 另外, $-\text{Y} - \text{CO}$ - 基的羧基, 也可含有碳数 1 ~ 10 的直链或支链
 的亚烷基, 从氧原子、氮原子及硫原子组成群选出的 1 个原子的碳数 1 ~
 10 的直链或支链的亚烷基; 或通过 $-\text{NH} - \text{NH}$ - 基等与检测系统结合。

在本发明的诊断用标记物中, 在制造具有用式 (I) 表示的荧光性
 官能基的诊断用标记物时, 优选的, 作为标记用化合物, 使用上述式
 10 (III) 的化合物。另外, 在制造具有用式 (II) 表示的荧光性官能基的
 本发明诊断用标记物时, 优选的是使用下述式 (V) 的标记用化合物。

在上述通式 (III) 及 (V) 的化合物中, 作为用 $\text{Y} - \text{CO} - \text{Z}$ 表
 示的基, 例如可使用 $-\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{Z}$; $-(\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - \text{Z}$;

- $-(\text{CH}_2)_3 - \text{CO} - \text{Z}$; $-(\text{CH}_2)_4 - \text{CO} - \text{Z}$; $-(\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{Z}$;
 15 $-\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{Z}$;
 $-(\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{Z}$;
 $-(\text{CH}_2)_3 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{Z}$;
 $-(\text{CH}_2)_4 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{Z}$;
 $-\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - \text{Z}$;
 20 $-(\text{CH}_2)_4 - \text{CO} - (\text{N}, \text{N}' - \text{哌嗪基}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{Z}$; 。 另外,
 $-\text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{CO} - (\text{N}, \text{N}' - \text{哌嗪基}) - (\text{CH}_2)_2 - \text{Z}$ 等。

在用 Z 表示的基中, 作为 W, 可适当使用相当于上述 $\text{Y} - \text{CO} - \text{Z}$
 例中的 Y 的基。另外, N - 磺基丁二酰亚氨氧基的磺酸基的抗衡离子的
 M^+ 和式 (V) 的标记用化合物中的 Q⁻的抗衡离子的 M^+ , 可相同, 也可不
 25 同, 但优选的, 两者都是钠离子。上述的标记用化合物中的式 (V) 表
 示的化合物, 例如可通过制造在用式 (V) 表示的化合物中, 不存在用
 M^+X^- 表示的碱金属盐的抗衡离子型的化合物后, 将该化合物, 以高浓度
 溶解在二甲基亚砷或二甲基甲酰胺等的溶剂中, 在该溶液中, 添加碱金
 属盐, 而容易地制造。

- 30 另外, 在实施例, 具体地说明适宜使用制造本发明诊断用标记物
 的本发明化合物的制造例, 但对于本专业人员, 通过参照该实施例, 可
 理解到适当改变初始原料、药剂、反应条件等, 容易地制造本发明的化

合物。

在作为 Z，使用 N - 丁二酰亚氨基及 N - 磺基丁二酰亚氨基时，由于这些基，与 Z 结合的羰基同时形成反应性的活性酯，所以含在检测系统的氨基 ($\text{H}_2\text{N} - \text{R}$)，与该活性酯中的 Z 置换，形成 - Y - CO - NH - R。另外，作为 Z，使用 2 - (N - 马来酰亚氨基) - 烷基时，含在检测系统的硫醇基 ($\text{HS} - \text{R}$) 进行反应，形成 - Y - CO - 烷基 - S - R。进而，Z 是 - NH - NH_2 时，含在检测系统的还原糖末端的醛基 ($\text{OHC} - \text{R}$) 进行反应，形成 - Y - CO - NH - NH - CO - R。

因此，通过使标记用化合物与检测系统反应，相当于连接在用式 (III) 或 (V) 表示的标记用化合物的母环及结合在母环的连接部分的 - Y - CO - 部，作为荧光性的官能基，保存在本发明的诊断用标记物中。进而，对于用上述方法制造具有这种化学结构的本发明诊断用标记物，没有限制，当然用任何方法制造的，也包括在本发明范围内。

另外，在用上述式 (I) 及 (II) 表示的荧光性官能基，用式 (III) 及 (V) 表示的化合物，以及实施例流程图所述的化合物中，是将氮原子上的正电荷 (用上述式中 N^+ 表示)，固定在母环中的一个氮原子上的，但通过共轭双键，可将正电荷移到另一个氮原子上，这是本专业人员容易理解的。因此，这样的共轭，互变异构体，当然是完全包括在本发明范围内的。

作为应与上述荧光性官能基结合的检测系统，可使用识别对于癌特异性高的抗体等各种抗原的抗体、作为探针可使用的核酸、或可用于生物素 - 卵白素等用于扩增系的扩增系物质等。作为抗体，例如可使用与癌细胞和癌组织，优选的是特异地结合在初期癌细胞和初期癌组织的抗癌抗原抗体。例如除了对于 CEA、AFP、CA19 - 9、NSE、DU - PAN - 2、CA50、span - 1、CA72 - 4、CA125、HCG、p53、STN (シアリル Tn 抗原)、C - erb B - 2 蛋白特异反应的胃的抗肿瘤抗体之外，可利用对于食道癌、大肠癌、直肠癌、皮肤癌、子宫癌等肿瘤抗原特异反应的抗肿瘤抗体等。另外，也可使用抗病原体蛋白抗体。作为核酸，可使用可作为对于特定的基因乃至病原体基因探针使用的核酸。

作为检测系统，使用上述抗体和核酸时，由于本发明诊断用标记物

所含的上述检测系统，与癌抗原和癌基因等特异地结合，所以用本发明的诊断用标记物可将癌细胞和癌组织等病灶免疫地染色。然后，使用红外线激光等，照射近红外线乃至远红外线，可确认发出荧光的病灶。

5 本发明诊断用标记物的另一个形式，是将荧光性官能基导入到作为检测系统的卵白素或生物素等扩增系物质中。例如，通过将以往通用的生物素标记化抗癌抗原抗体等用于生物体，可使抗癌抗原抗体和生物素标记化抗体结合，进行标记。进行这样标记后，通过将作为检测系统，含有卵白素的本发明诊断用标记物，与生物素标记化抗体结合，可用本
10 发明的诊断标记物，使由卵白素标记化抗体的标记扩增，通过红外线激光等，可检测出初期癌。作为扩增系物质，只要可扩增上述标记的，可使用任何一种。

进而，作为本发明诊断用标记物的检测系统，也可使用将上述扩增系物质，与上述抗体或核酸结合的产物。例如，作为本发明诊断用标记物的检测系统。可使用将卵白素与抗癌抗原抗体结合的抗体。或者，作
15 为本发明的诊断用标记物的检测系统，也可使用二次抗体。上述说明的检测系统，就是例子，可用于本发明诊断用标记物的检测系统，不限于上面所述的。只要是对于用于检查、诊断目的的标的细胞或标的组织具有实质特异地结合性质的，任意的检测系统都可使用。

20 本发明诊断用标记物，与上述荧光性官能基和检测系统不限于直接或通过接头而结合，例如也可通过将荧光性官能基和检测系统导入到白蛋白等蛋白中，通过白蛋白等蛋白，将荧光性官能基与检测系统结合。在白蛋白等蛋白中，可将上述荧光性官能基导入 1 个或 2 个以上，优选的可导入约 10 个以上，由于容易导入抗体等检测系统，所以使用这种蛋白的诊断用标记物是本发明优良的方案。

25 进而，本发明另一方案的诊断用标记物，是由通过照射 600 ~ 800nm 波长的激发光，发出 780nm 以上，优选的是发出 780 ~ 840nm 以上波长荧光的荧光性官能基结合的检测系统组成。作为这种荧光性官能基，除了来自上述式 (I) 及式 (II) 的之外，只要通过照射 600 ~ 800nm 波长的激发光，发出 780nm 以上波长的荧光的，都可使用。根据诊断用标
30 记物使用目的和使用的激发光种类，可由本专业人员适当选择为导入这种荧光性官能基的化合物。

为将这样的荧光性官能基与检测系统结合，例如可使用花青苷类、

酞青类、二硫醇镍络合类、萘醌·蒽醌类、靛酚系、偶氮类等的近红外线吸收性化合物。将这些的化合物，直接或通过接头与检测系统结合时，由于化合物的吸收波长往往移动到长波长侧，所以用于导入荧光性官能基的化合物的激发光波长下降到600nm也无妨。另外，为将荧光性官能基导入到检测系统，使用的上述化合物，最好在上述通式(III)或(V)中，具有用乙表示的基。在这样的基不存在时，本专业人员，可通过可利用的接头，使荧光性官能基与检测系统结合。

由本发明提供的诊断药，其特征是含有上述诊断用标记物作为有效成分。本发明的诊断药可通过近红外线乃至远红外线进行激发，由于在诊断时，不引起生物体组织和DNA的损伤，所以是有用的。另外，本发明的诊断药具有水溶性极其优良的特点。在本发明的诊断药中，特别优选的是含有在照射780nm的激发光时，发出比820nm左右更长波长的荧光的诊断用标记物的诊断药。另外，本发明的诊断药，也可含有1种或1种以上的诊断用标记物。

本发明的诊断药在于将上述诊断用标记物，作成溶解在各种缓冲液等的水溶性介质，优选的是溶解在生理食盐水和磷酸缓冲液等的缓冲液中的溶液剂的形态，或在诊断、检查用时，添加生理食盐水和磷酸缓冲液等的缓冲液，作成可溶解的微粒子状粉末和冷冻干燥粉末形态的固形剂等形式提供，但诊断药的形态不受上述的限制，本专业人员可根据目的等，进行适当选择。

为制造本发明的诊断药，可使用作为药理学、制药学上容许的添加剂，例如赋形剂、崩解剂、乃至崩解辅助剂、粘合剂、润滑剂、被覆剂、色素、稀释剂、基剂、溶解剂乃至溶解辅助剂、等渗透压剂、pH调节剂、稳定剂、喷射剂及粘合剂等。例如也可添加葡萄糖、乳糖、D-甘露醇、淀粉或结晶纤维素等赋形剂；羧甲基纤维素、淀粉、或羧甲基纤维素钙等的崩解剂或崩解辅助剂；凡士林、液体石蜡、聚乙二醇、明胶、高岭土、甘油、蒸馏水或硬脂性等基剂；葡萄糖、氯化钠、D-甘露醇、甘油等等渗透压剂；无机酸、有机酸、无机碱或有机碱等的pH调节剂；维生素A、维生素E、可给予辅酶Q等稳定化的药剂等的制剂用添加物。

对于含有本发明诊断用标记物的诊断药的使用方法，例如若对于使用红外线内窥镜的检查方法加以说明，将怀疑存在病灶的组织，在内窥镜下，喷雾或涂敷上述诊断药（浓度为0.1~1,000mg/ml左右的），染

色病变部，进行适当洗涤，从组织中除去多余诊断药后，通过照射近红外线乃至远红外线，更具体地，例如照射 600 ~ 800nm，优选的是 780nm 左右波长的激发光，可检测发出荧光的病灶部。本发明诊断用标记物，具有可直接适用于生物体的特点，但本发明诊断用标记物的使用状态不
5 限于适用生物体，当然对于石蜡固定化标本等的固定化标本也适用。

荧光检测时，例如可使用红外线内窥镜或红外线显微镜等手段，例如可使用 1 个或 2 个以上组合的，具有透过特性的过滤器，具体地，是具有遮断激发光特性的过滤器和荧光检测用过滤器。在将本发明诊断用标记物用于生物体进行内窥镜检查时，作为内窥镜，可使用倍率是 10 ~
10 1,000 左右的，例如优选的是使用具有显微镜水平倍率的红外线内窥镜等。另外，对于内窥镜，优选的是设置有本发明诊断药的喷雾或涂敷手段和洗涤手段的。

在将本发明诊断用标记物用于摘出到生物体外的组织和标本等时，荧光检测时，可使用红外线显微镜。另外，在通常光下，观察标本，确
15 认染色部位后，在暗室内，红外线光源下，用红外线胶片进行摄影，或收录在录像片上，用计算机进行图像解析。

实施例

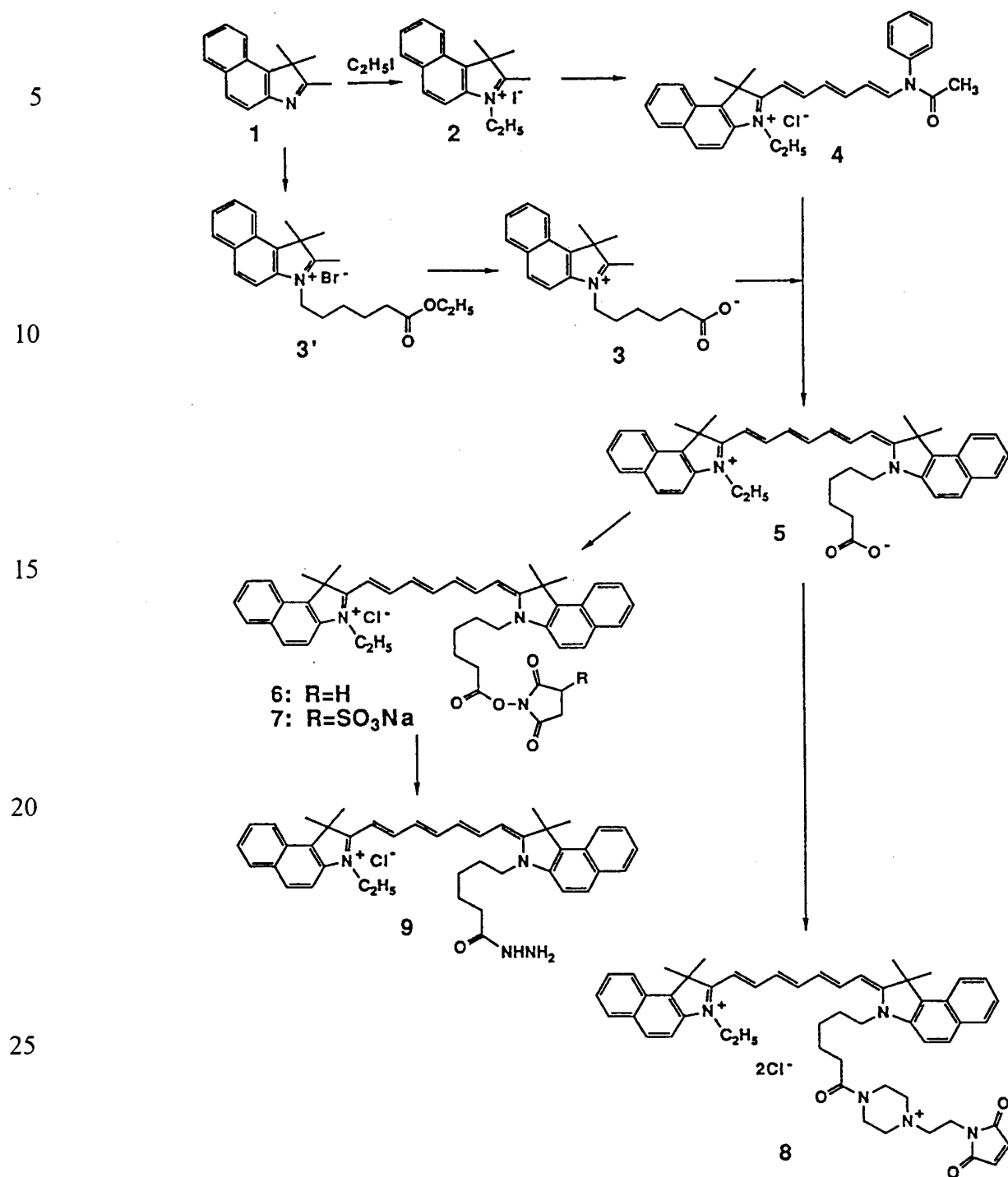
以下，用实施例进一步具体地说明本发明，但本发明的范围不受以下实施例限制。

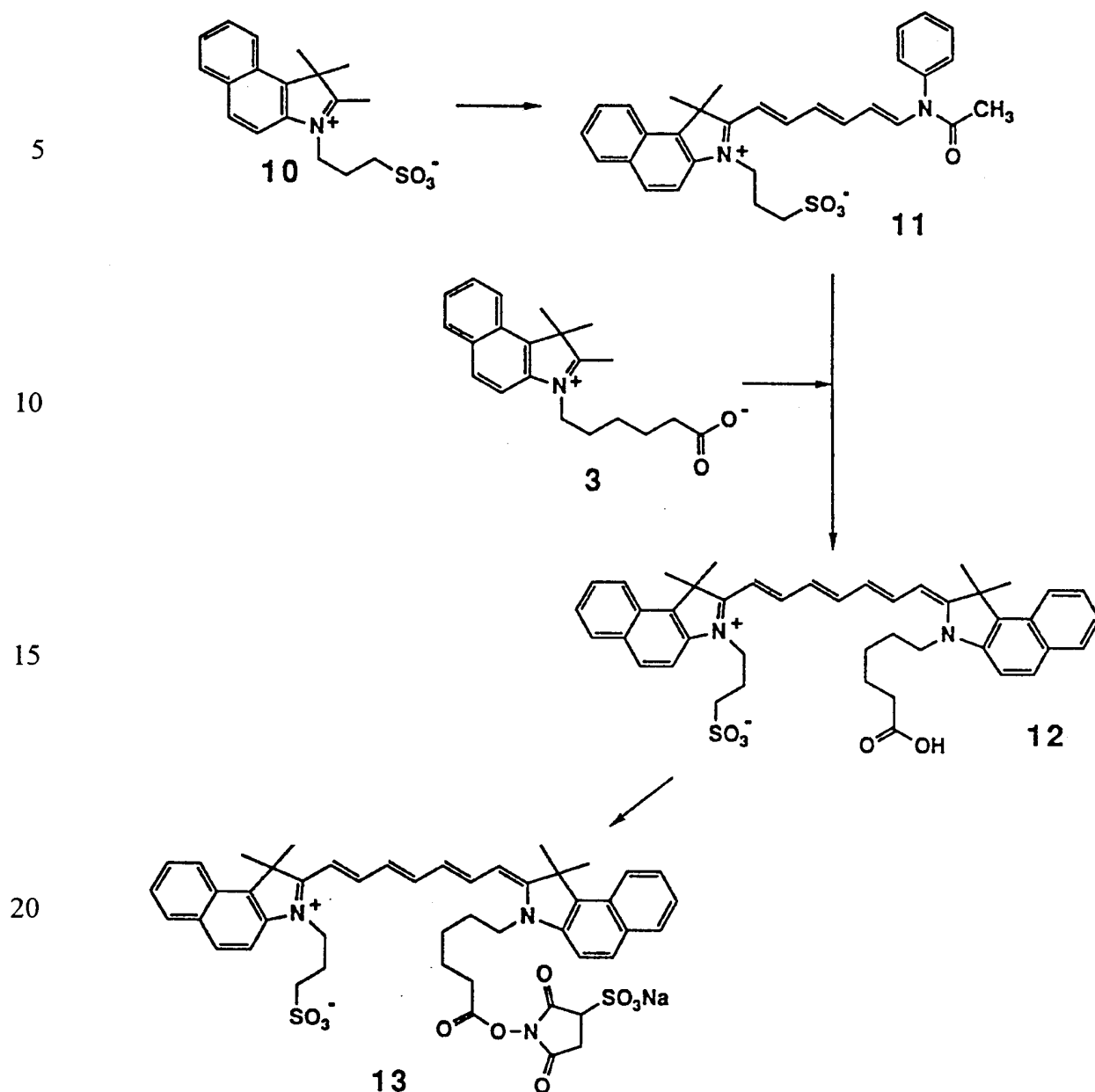
20 例 1：标记用化合物的制造

按照以下的流程图，用于制造本发明诊断用标记物的标记用化合物，制造式 (III) 的化合物。另外，以下制造例的化合物号，对应于流程图中的化合物号。

25

30





25 在化合物 1 (5g, 23.9mmol, 由第一化学药品株式会社得到的) / 乙腈 100ml 中, 加入碘乙烷 (2.84ml, 35.5mmol), 回流 5 小时。在减压下, 浓缩反应液, 在残渣中, 加入乙醚 200ml, 结晶化后, 过滤得到的结晶, 用乙醚洗涤后, 在减压下进行干燥, 得到淡红褐色粉末的化合物 2。收量 6.83g (收率 78.2 %)。

30 在化合物 1 (5g, 23.9mmol) / DMF 100ml 中, 加入 6 - 溴己酸乙酯 (6.32ml, 35.5mmol), 在 80 °C 下, 加热 16 小时。在减压下, 浓缩反应液, 在残渣中, 加入乙醚 200ml, 结晶化后, 过滤得到的结晶,

用乙醚洗涤，在减压下进行干燥。加入 1M 氢氧化钠水溶液/甲醇 = 1/1 混合溶液 30ml，在室温下，搅拌 2 小时。减压蒸出甲醇，用 4M 盐酸水溶液中和水溶液后，用氯仿洗涤 3 次。在减压下浓缩水溶液，得到红色固体的化合物 3。收量 5.75g（收率 74.4 %）。

5 将化合物 2(5g, 13.7mmol)和戊烯二醛二缩苯胺盐酸盐 (3.90g, 13.7mmol)，悬浮在无水醋酸 50ml 中，在 100 °C 下，加热 1.5 小时。将红色溶液注入到 300ml 水中，过滤生成的黑红色固体。用水洗涤后，在减压下，进行干燥，得到黑红色粉末的化合物 4。收量是 6.02g（收率 101 %）。

10 将化合物 4 (220mg, 0.505mmol) 和化合物 3 (164mg, 0.507mmol)，溶解在吡啶 3ml 中，在 50 °C 下，搅拌 1 小时。减压浓缩反应混合物，用硅胶柱（溶剂：1 ~ 20 % 甲醇/氯仿）精制得到的残渣，得到黑绿色固体的化合物 5。收量是 49mg（收率 15.5 %）。

15 在化合物 5 (40mg, 64 μ mol)/DMF 1ml 中，加入 N - 羟基琥珀酸酐 (8.8mg, 76 μ mol) 和 N, N' - 二环己基甲酰亚胺 (DCC, 26.4mg, 0.128mmol)，在 4 °C 下，反应 1 晚后，在反应液中，加入乙醚 10ml，进而，用乙醚洗涤生成的残渣 3 次。将该固体，溶解在氯仿 400 μ l 中，加入 0.1M 盐酸水溶液 200 μ l，搅拌后，分离氯仿相，水洗 3 次。在减压下，浓缩氯仿溶液，得到黑绿色固体的化合物 6 [式 (III) 20 的标记用化合物]。收量 38mg（收率 78.5 %）。MS (FAB) m/e = 720 (M⁺)；荧光光谱: λ_{ex} = 769nm, λ_{em} = 820nm (10 % DMSO/水)。

25 在化合物 5 (20mg, 32 μ mol)/DMF 1ml 中，加入 N - 羟基琥珀酸酐磺酸钠 (8.3mg, 38 μ mol) 和 N, N' - 二环己基甲酰亚胺 (13.2mg, 64 μ mol)，在 4 °C 下，使其反应 1 夜后，过滤。在滤液中，加入乙醚 10ml，进而，用乙醚洗涤生成的残渣 3 次。将该固体溶解在 DMF 400 μ l 中，加入 0.1M 盐酸水溶液 200 μ l，搅拌后，分离氯仿相，水洗 3 次。在减压下，浓缩氯仿溶液，得到黑绿色固体的化合物 7 [式 (III) 的标记用化合物]。收量是 17mg (收率为 66.4 %)。MS (FAB) m/e = 822 (M + Na)；30 荧光光谱: λ_{ex} = 769nm, λ_{em} = 820nm (10 % DMSO/水)。

在化合物 5 (20mg, 32 μ mol)/DMF 0.5ml 中，加入 N - (2 - (N' - 马来酰亚胺) 乙基) 哌嗪二盐酸盐 (PEM, 4.4mg, 38 μ mol)

和三乙胺 (TEA, 20 μ l, 0.146mmol) 及 DCC (10.2mg, 49 μ mol), 在 4 $^{\circ}$ C 下, 反应 1 晚后, 在反应液中, 加入乙醚 10ml, 进而, 用乙醚洗涤生成的残渣 3 次。将该固体, 溶解在氯仿 400 μ l 中, 加入 0.1M 盐酸水溶液 200 μ l, 搅拌后, 分离氯仿相, 水洗 3 次。在减压下, 浓缩氯仿, 得到黑绿色固体的化合物 8 [式 (III) 的标记用化合物]。收量是 20mg (收率是 70.5%)。MS (FAB) $m/e = 814 (M^+)$; 荧光光谱: $\lambda_{ex} = 773\text{nm}$, $\lambda_{em} = 821\text{nm}$ (10% DMSO/水)。

例 2: 标记用化合物的制造

在化合物 6 (2mg, 26.4 μ mol) /DMF 0.5ml 中, 加入胍-盐酸盐 (9.0mg, 0.131mmol), 在室温下, 反应 1 晚。过滤反应液, 减压浓缩滤液后, 将残渣溶解在氯仿 0.5ml 中, 水洗氯仿溶液 3 次。在减压下, 浓缩氯仿相, 得到黑绿色固体的化合物 9。收量是 16mg (收率是 90.0%)。MS (FAB) $m/e = 637 (M^+)$; 荧光光谱: $\lambda_{ex} = 771\text{nm}$, $\lambda_{em} = 820\text{nm}$ (10% DMSO/水)。

将化合物 10 (5.0g, 15.1mmol) 和戊烯二醛二缩苯胺盐酸盐 (4.40g, 15.1mmol), 悬浮在醋酸酐 20ml 和醋酸 300ml 的混合溶液中, 在回流温度下, 加热 5 小时。减压浓缩红色溶液, 在得到的残渣中, 加入醋酸乙酯和水的混合溶液 200ml, 使其悬浮, 过滤得到黑红色固体。用水洗涤后, 在减压下进行干燥, 得到黑红色粉末的化合物 11。收量是 5.33g (收率是 65.2%)。

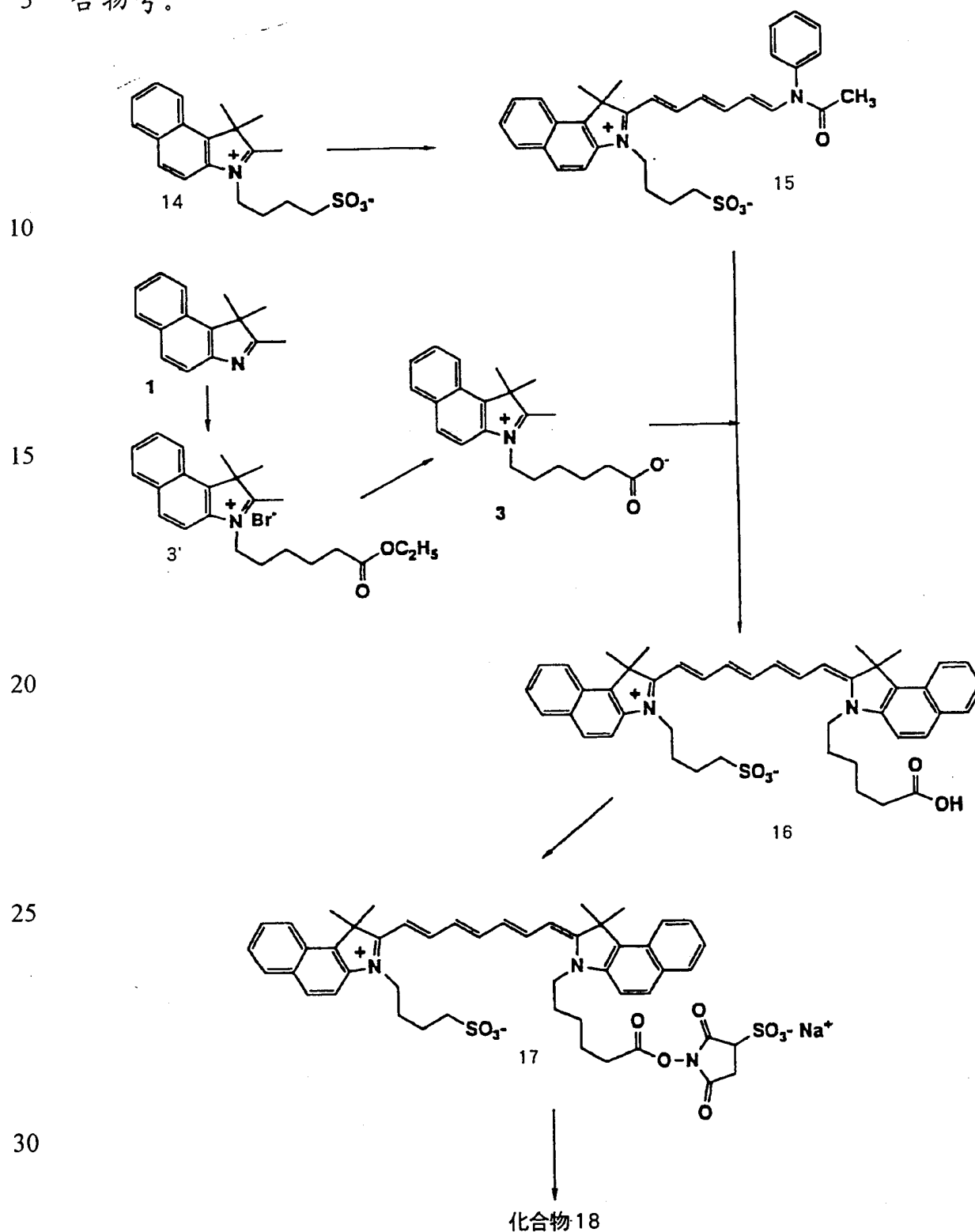
将化合物 11 (167mg, 0.308mmol) 和化合物 3 (100mg, 0.309mmol), 溶解在吡啶 3ml 中, 在 50 $^{\circ}$ C 下, 搅拌 1 小时。在减压下, 浓缩反应混合物, 将得到的残渣, 溶解在 10ml 水中, 使溶液的 pH 达到 3 后, 用交联葡聚糖 LH20 柱 (溶剂: 水) 精制, 得到黑绿色固体的化合物 12。收量是 51mg (收率是 23.1%)。

在 1ml 化合物 12 (30mg, 41.8 μ mol) /50 v/v % THF 水溶液中, 加入 N-羧基琥珀酸酐磺酸钠 (16.8mg, 77.4 μ mol) 和 N,N'-二环己基甲酰亚胺 (25.8mg, 0.125mmol), 在 4 $^{\circ}$ C 下, 使其反应 1 晚后, 过滤, 在 20 $^{\circ}$ C 以下, 减压下浓缩滤液。在残渣中, 加入醋酸乙酯 10ml, 进而, 用乙醚洗涤生成的结晶 3 次。将该结晶溶解在水 200 μ l 中, 用交联葡聚糖 LH20 柱 (溶剂: 水) 精制, 得到黑绿色固体的化合物 13 [式 (III) 的标记用化合物]。收量是 34mg (收率是 88.8%)。MS (FAB) m/e

= 892 (M^{-}); 荧光光谱: $\lambda_{ex} = 771nm$, $\lambda_{em} = 822nm$ (水)。

例 3: 标记用化合物的制造

按照以下流程图, 制造用于制造本发明诊断用标记物的式 (V) 的标记用化合物。另外, 以下的制造例的化合物号, 对应于流程图中的化合物号。



将化合物 14 (5.0g , 14.5mmol) 和戊烯二醛二缩苯胺盐酸盐 (4.23g , 14.5mmol) , 悬浮在醋酸酐 20ml 和醋酸 300ml 的混合溶液中, 在回流温度下, 加热 5 小时。减压浓缩红色溶液, 在得到的残渣中, 加入醋酸乙酯和水的混合溶液 200ml, 使其悬浮, 过滤得到黑红色固体。
5 用水洗涤后, 减压下干燥, 得到黑红色粉末的化合物 15。收量是 5.20g (收率是 66.1 %)。

将化合物 15 (300mg , 0.553mmol) 和化合物 3 (179mg , 0.553mmol) , 溶解在 5ml 的吡啶中, 在 50 °C 下, 搅拌 1 小时。在减压下, 浓缩反应混合物, 将得到的残渣, 溶解在 10ml 水中, 使溶液的 pH
10 达到 3 后, 用交联葡聚糖 LH20 柱 (溶剂: 甲醇) 进行精制, 得到黑绿色固体的化合物 16。收量是 105mg (收率是 25.9 %)。

在化合物 16 (106mg , 0.145mmol) / 50 v/v % THF 水溶液 3ml 中, 加入 N - 羟基琥珀酸酐磺酸钠 (65.2mg , 0.287mmol) 和 N, N' - 二环己基甲酰亚胺 (129mg , 0.596mmol) , 在 4 °C 下, 使其反应 1 夜后,
15 进行过滤, 在 20 °C 以下, 减压浓缩滤液。在残渣中, 加入醋酸乙酯 10ml, 进而, 用乙醚, 洗涤生成的结晶 3 次, 得到黑绿色固体的化合物 17。收量是 110mg (收率 80.7 %)。MS (FAB) m/e = 906 (M⁺); 荧光光谱: $\lambda_{\text{ex}} = 768\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 807\text{nm}$ (水)。

将上述化合物 17 (100mg , 0.11mmol) , 溶解在 2ml 的甲醇中,
20 加入碘化钠 1g (6.7mmol) 的甲醇 5ml 溶液。将甲醇减压浓缩到 1/2, 在 4 °C 下, 使其冷却 1 夜后, 滤得析出结晶。用减压干燥器干燥得到的绿色结晶, 得到化合物 18 [式 (V) 的标记用化合物] (85mg, 收率 72 %)。测定碘化钠的盐形成前 (抗衡离子型) 及盐形成后的水溶性数据及红外线吸收光谱数据 (IR)。另外, 用 Schöniger 法求出碘含量。

25 对于引入碘化钠成盐的化合物 18 和作为原料用的抗衡离子型的吡啶花青绿 N - 己酸磺基琥珀酸亚胺酯 (化合物 17) , 进行红外吸收光谱变化, 在抗衡离子型化合物 17 中, 观察的 2360 及 1740cm^{-1} 的吸收, 对于化合物 18 则消失了 (参照图 1: (a) 表示化合物 18、(b) 表示化合物 17, 即表示盐形成前的)。从这些结果表明, 对于形成分子内抗衡离子时和形成碘化钠的复盐时, 结晶结构是变化的。
30

例 4: 标记用化合物的制造

按照例 3 的方法, 制造吡啶花青绿 N - 丁酸磺基琥珀酰亚胺酯 (化

合物 19)。将该化合物 19 (150mg, 0.17mmol) 溶解在甲醇 3ml 中, 加入碘化钠 1.5g (10mmol) 的甲醇 8ml 溶液。将甲醇减压浓缩到 1/2, 在 4℃ 下冷却 1 夜后, 滤取析出结晶。用减压干燥器干燥得到的绿色结晶, 得到化合物 20 [式 (V) 的标记用化合物] (117mg, 收率 66%)。

- 5 测定碘化钠的盐形成前后的水溶性数据及红外线吸收光谱数据 (IR)。另外, 用 Schöniger 法求得碘含量。

例 5: 标记用化合物的制造

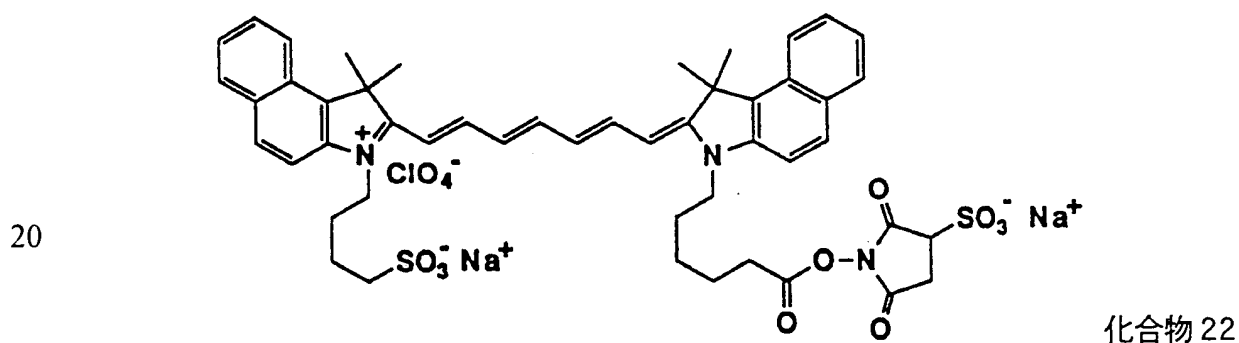
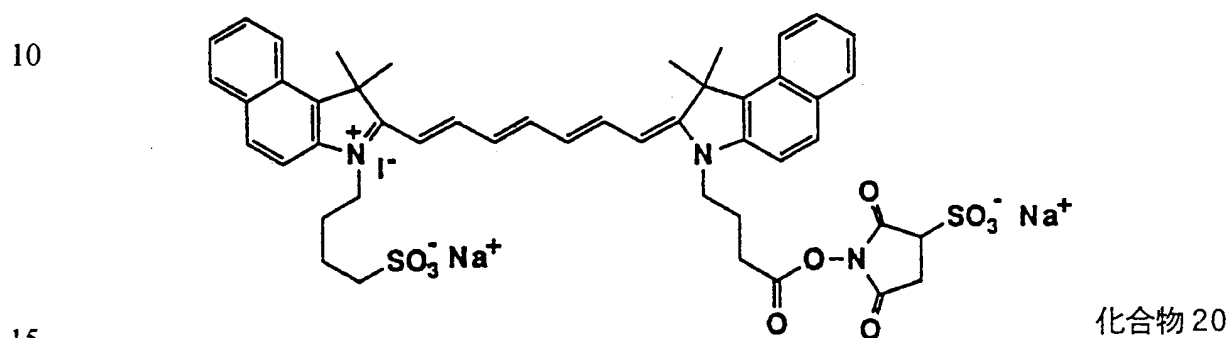
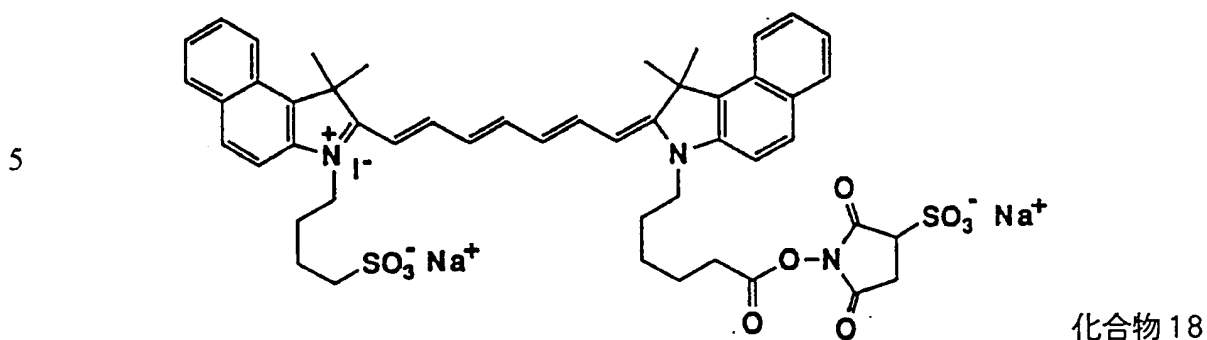
- 按照例 3 的方法, 制造吡啶花青绿 - N - 己酸磺基琥珀酰亚胺酯 (化合物 21)。将该化合物 21 (100mg, 0.11mmol) 溶解在甲醇 2ml 中, 10 加入高氯酸钠 0.3g (2.5mmol) 的甲醇 20ml 溶液。将甲醇减压浓缩到 1/4, 在 4℃ 下, 冷却 1 夜后, 滤得析出结晶。用减压干燥器干燥得到的绿色结晶, 得到化合物 22 [式 (V) 的标记用化合物] 23mg (收率 21%)。测定高氯酸钠形成盐前后的水溶性数据及 IR。

表 1

15

标记用化合物	抗衡离子型	形成复盐型
例 3	化合物 17	化合物 18
水溶性:	1mg/10ml 以上	1mg/0.8ml
20 IR (cm ⁻¹):	2360, 1740	左边吸收消失
碘含量:	-	12.3 %
例 4	化合物 19	化合物 20
水溶性:	1mg/10ml 以上	1mg/0.9ml
25 IR (cm ⁻¹):	2370, 1790	左边吸收消失
碘含量:	-	13.5 %
例 5	化合物 21	化合物 22
水溶性:	1mg/10ml 以上	1mg/5ml
IR (cm ⁻¹):	2370, 1790	左边吸收消失

30



例 6：标记用化合物的制造

按照例 2 的方法，用碘化钠的甲醇溶液处理化合物 13，得到化合物 23。将作为原料所用的化合物 13 的红外线吸收光谱和标记用化合物 23 的红外线吸收光谱进行比较，在化合物 13 中观测的 2360 及 1740cm^{-1} 的吸收，在化合物 23 中，未观察到。

例 7：诊断用标记物的制造

(a) 抗体的精制

30 人含有抗 EMA (Epithelial Membrane Antigen) 抗体的培养上清液 (ダコ社制, M613)，使用 MabTrap GII (弗尔马西亚社制)，如下所述，精制抗 EMA 单克隆抗体。在 4ml 的培养上清液中，加入结合缓

冲液 4ml，加入到预先用结合缓冲液平衡的 MabTrap GII 柱上。用结合缓冲液 5ml 洗涤后，加入洗脱缓冲液 3ml，以每 0.5ml 分取洗脱缓冲液。用分光光度计，收集 280nm 的吸光度是 0.05 以上的级分，作为精制 IgG 级分，使用 PD - 10 柱（弗尔马西亚社制），在 0.1M 磷酸缓冲液（pH 7.5）中，进行缓冲液交换，通过 SDS - PAGE（第一化学药品株式会社制），确认精制度。从培养上清液 4ml，得到精制抗 EMA 单克隆抗体 725 μ g。

（b）抗体和标记用化合物的结合

在含有上述精制抗体 500 μ g 的 100mM 磷酸缓冲液 0.5ml 中，加入 ICG - osu（上述化合物 6）的 DMF 溶液 0.125ml（0.8mg/ml），在 30℃ 下，静置 30 分钟。将该反应混合液，加入到用预先相同的反应缓冲液平衡了的 PD - 10 柱中，分离未反应的 ICG - osu。进而，使用 PD - 10 柱，将蛋白级分的缓冲液，与 0.1M 磷酸缓冲液 - 0.05 % 叠氮化钠（pH 7.4）交换，得到抗 EMA 抗体结合在标记用化合物（化合物 6）的本发明诊断用 74 蛋白 μ g/ml。然后，在保存期间，添加 0.1 % 的 BSA。紫外·可见吸收光谱，如图 2 所示。

上述的光谱测定条件如下。测定仪器：日立 U - 3200 分光光度计；测定溶剂：100mM 磷酸缓冲液（pH 7.4），0.05 % 叠氮化钠；扫描速度：300.0nm/min。然后，在保存时，添加 0.1 % 的 BSA。对于通过 BCA 蛋白鉴定试剂（ピルス社制）得到的抗体浓度和从标记用化合物的 DMSO 中的分子吸光系数求得的标记用化合物的抗体的结合数，约是 12mol 标记用化合物/mol 抗体。

例 8：诊断用标记物的制造

将化合物 18（1mg），溶解在 0.94ml 水中，作成 1mM 溶液。将人体 IgG 1mg，溶解在 pH 8.5 的 50mM 碳酸钠缓冲液 1ml 中，在该溶液中，加入含有化合物 18 的上述溶液 0.2ml，在 30℃ 下，使其反应 1 小时。将反应液加入到交联葡聚糖 G - 25 柱中，分离本发明的诊断用标记物。作为分离用的缓冲液，使用 50mM 磷酸缓冲液（pH 7.4）。未反应的化合物 18，留在交联葡聚糖凝胶的上端，与诊断用标记物的分离是良好的。将得到的诊断用标记物，进行冷冻干燥，在 - 20℃ 下，冷冻保存。取诊断用标记物 1mg，溶解在 100ml 的 50mM 磷酸缓冲液（pH 7.4）中，测定荧光光谱的结果，如图 3 所示。

例 9：诊断用标记物的制造

在含有由例 7 得到的精制抗体 500 μ g 的 100mM 磷酸缓冲液 0.5ml 中，加入化合物 18 的 DMF 溶液 0.125ml (0.8mg/ml)，在 30 $^{\circ}$ C 下，静置 30 分钟。将该反应混合物，加入到用预先相同的反应缓冲液平衡了的 PD - 10 柱中，分离未反应的化合物 18。进而，使用 PD - 10 柱，将蛋白级分的缓冲液，与 0.1M 磷酸缓冲液 - 0.05 % 叠氮化钠 (pH 7.4) 进行交换，得到化合物 18 结合在抗 EMA 抗体的本发明诊断用标记物 74 蛋白 μ g/ml。然后，在保存时，添加 0.1 % 的 BSA。

例 10：标记用化合物和蛋白的结合

10 将 BSA (和光纯药工业制) 10mg (0.151 μ mol) 溶解在 HEPES 缓冲液 3.0ml 中，作成 BSA 溶液。将标记用化合物 (化合物 6) 2.0mg (2.64 μ mol) 溶解在 DMSO 150 μ l 中，与上述 BSA 溶液混合，在冰箱中放置 1 夜。然后，与上述方法相同，使用 PD - 10 柱，进行凝胶过滤，得到在 BSA 中导入来自标记用化合物的荧光性官能基的标记蛋白。另
15 外，在反应終了后的凝胶过滤时，由于来自标记用化合物的绿色溶液不残存在柱中，所以可认为标记化合物全部与 BSA 反应，每 1 分子的 BSA，约导入 17.5 分子的荧光性官能基。

例 11：诊断用标记物的制造

20 (a) 在含有 BSA (10mg) 的 100mM 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 5ml 中，加入化合物 6 的 DMF 溶液 0.5ml (4.6mg/ml)，在 30 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟。将该反应混合液，加入到预先用相同反应缓冲液平衡的交联葡聚糖柱中，从未反应的化合物 6。分离标记用化合物和蛋白的结合体 (标记化 BSA)。使用交联葡聚糖 G25 柱，将含有结合体的级分的缓冲液，与 20mM 磷酸缓冲液 - 0.15M NaCl (pH 7.0) 交换，得到导入荧光性
25 官能基的 BSA 约 8mg。

(b) 在抗 CEA 抗体 1.0mg/ml (0.1M 柠檬酸 / 0.15M NaCl, pH 4.0) 中，加入胃蛋白酶，以使胃蛋白酶浓度达到 0.004mg/ml，37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。将反应液，添加到预先用 20mM 磷酸缓冲液、0.15M NaCl、1mM EDTA 平衡了的 TSKgel G 3000SW 中，从未消化的 IgG 及消化片断，分离
30 F(ab')₂ (约 500 μ g)。在上述的 F(ab')₂ 级分中，添加 2 - 氨基乙硫醇盐酸盐，以使其最终浓度达到 10mM，在 37 $^{\circ}$ C 下，反应 90 分钟。将反应液加到交联葡聚糖 G25 柱中，除去 2 - 氨基乙硫醇，得到含有 Fab' 的溶液。

(c)在标记化 BSA (2mg, 20mM 磷酸缓冲液 - 0.15M NaCl, pH 7.0; PBS)中,一边搅拌,一边滴入 50 μ l 的 sulfo - SMCS 溶液 (sulfo - EMCS, (株)同仁化学研究所, 1mg/ml, PBS), 在室温下, 反应 20 分钟。将该反应液, 加在预先用 PBS 平衡化的交联葡聚糖 G25 柱中, 分离用 sulfo - SMCS 活化了的标记化 BSA。将该溶液添加到上述 (b) 的 Fab' 溶液中, 在搅拌下, 在室温下, 反应 2 小时。反应终了后, 通过使用 TSKgel G3000SW 的凝胶过滤, 分离, 精制反应混合液, 得到导入荧光性官能基和 Fab' 的 BSA。

例 12: 使用诊断用标记物的免疫组织化学的染色

使用上述例 6 的诊断用标记物作为本发明的诊断用标记物, 使诊断用标记物与确认了抗 EMA 抗体的染色性的食道粘膜的石蜡切片(面积约 10 $\times$ 10mm, 厚度为 2.5 μ m) 或食道癌的摘出生切片作用, 用 ABC 法 (卵蛋白·生物素·复合物法) 使其发色, 在显微镜下及通常内窥镜下, 进行观察, 确认染色的程度。另外, 如上所述, 将发色了的标本, 在红外线内窥镜下观察, 鉴定染色部位, 与通过通常内窥镜观察鉴定的染色部位进行比较。进而, 稀释成诊断用标记物倍数浓度, 用通常内窥镜及红外线内窥镜观察, 研究两者的识别能力。

将诊断用标记物的 5 倍稀释液和 10 倍稀释液用于染色, 但在显微镜下发色良好, 即使与作为对照用的抗 EMA 抗体 (稀释 50 倍) 比较, 也可确定相同程度的染色性。对于用通常内窥镜观察标本, 可确认稀释 10 倍的诊断用标记物, 与对照大致相同地, 在食道粘膜上沉淀 DAB (二氨基联苯胺)。

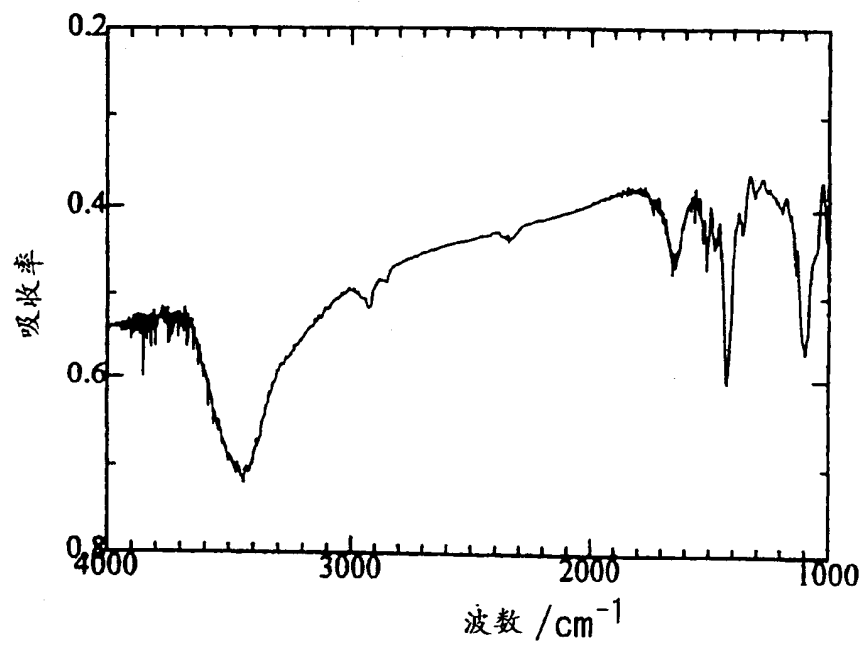
产业上的可利用性

通过使用本发明诊断用标记物, 例如使用红外线内窥镜等, 可简便且正确地进行食道癌、胃癌或大肠癌等上皮性组织的恶性新生物的早期诊断和确定, 诊断外科手术时的病灶。通过本发明诊断用标记物进行的检查和诊断, 由于可不必担心由紫外线激发引起的生物体组织和 DNA 的损伤, 而直接对生物体检查和诊断, 所以作为生物体免疫组织染色法是有用的。

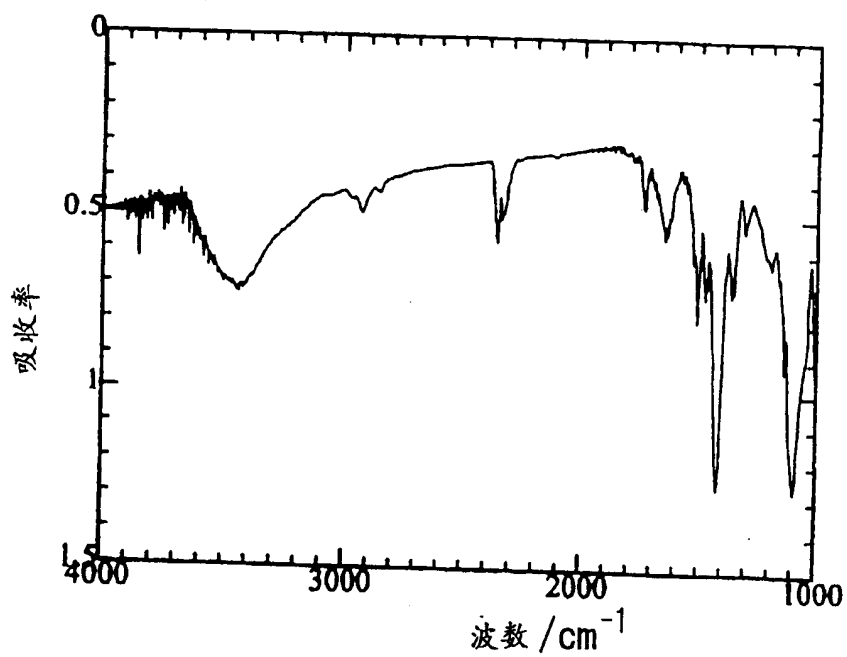
另外, 由于含在本发明诊断用标记物的标记用化合物, 具有极高的水溶性, 所以本发明的诊断用标记物, 不被胃肠道吸收, 可极安全地进行检查和诊断, 所以是有用的。

a)

图 1



b)



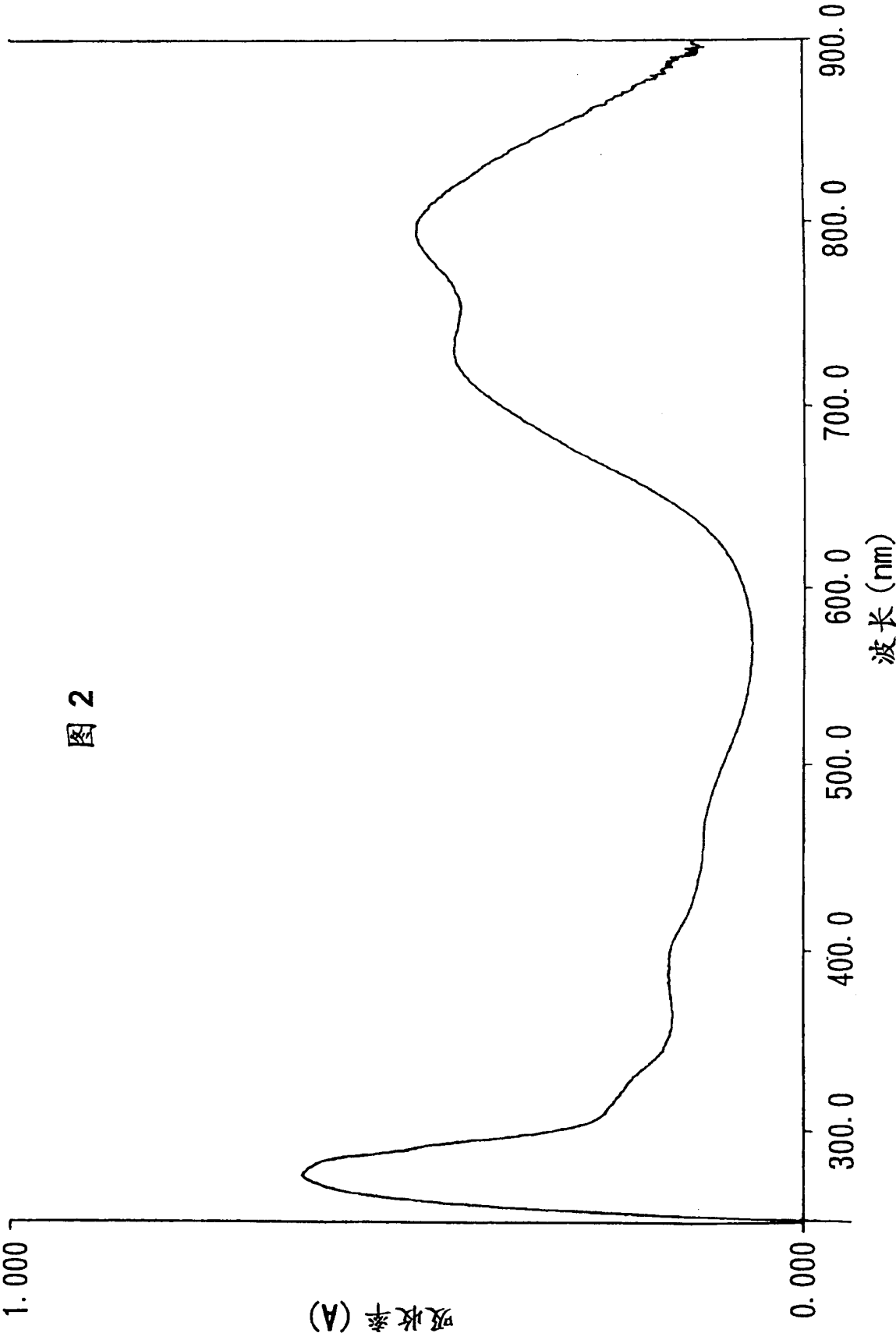


图 2

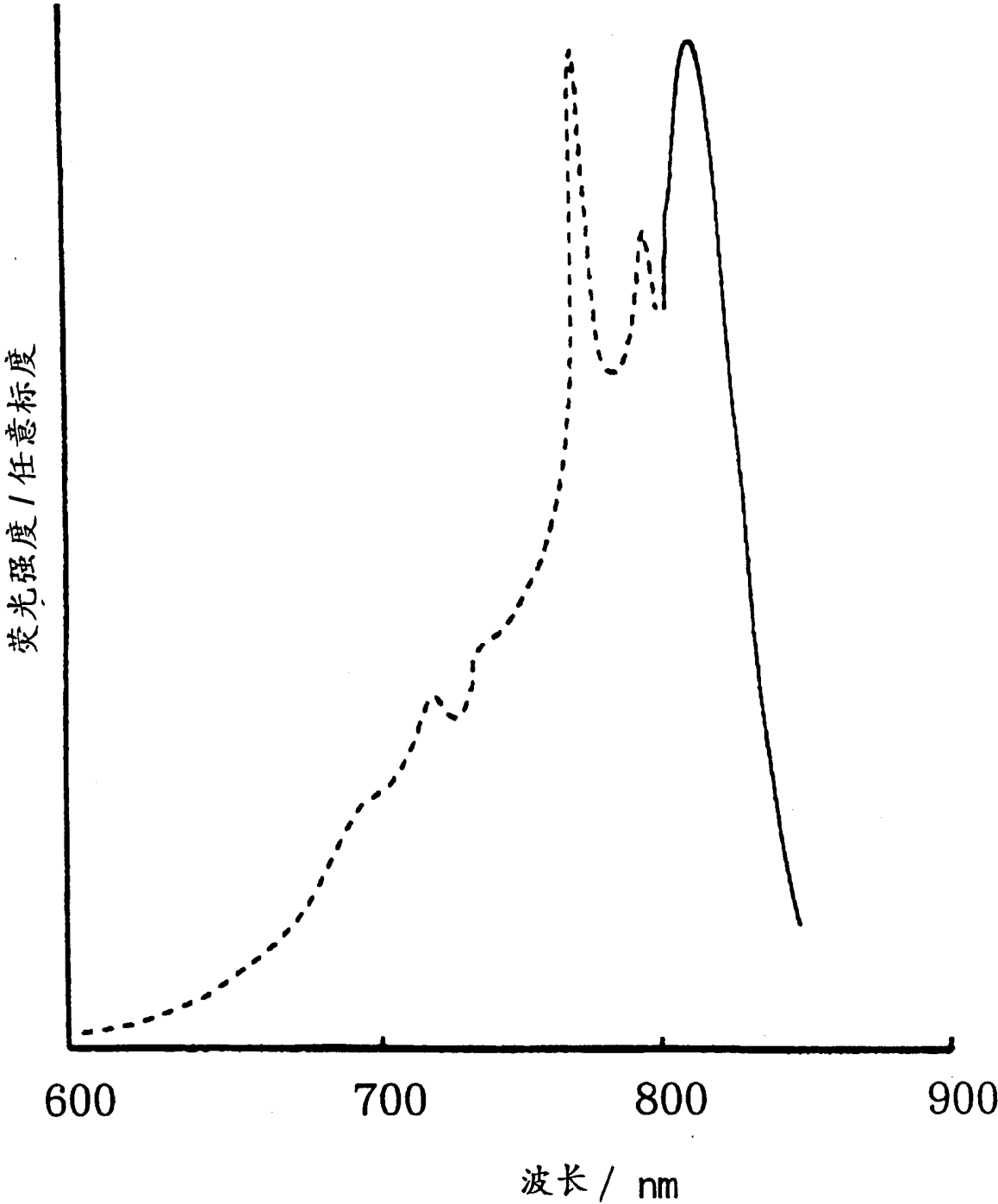


图 3