

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4117248号
(P4117248)

(45) 発行日 平成20年7月16日(2008.7.16)

(24) 登録日 平成20年4月25日(2008.4.25)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 C 49/80	(2006.01)	C O 7 C 49/80	
C O 7 C 49/813	(2006.01)	C O 7 C 49/813	
C O 7 C 49/84	(2006.01)	C O 7 C 49/84	B
C O 7 C 225/22	(2006.01)	C O 7 C 49/84	G
C O 7 C 233/61	(2006.01)	C O 7 C 225/22	

請求項の数 7 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-536189(P2003-536189)
 (86) (22) 出願日 平成14年10月10日(2002.10.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2002/010511
 (87) 国際公開番号 W02003/033447
 (87) 国際公開日 平成15年4月24日(2003.4.24)
 審査請求日 平成16年6月1日(2004.6.1)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-312562(P2001-312562)
 (32) 優先日 平成13年10月10日(2001.10.10)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 501387839
 株式会社日立ハイテクノロジーズ
 東京都港区西新橋一丁目24番14号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (72) 発明者 斎藤 充弘
 茨城県ひたちなか市市毛882番地 株式
 会社 日立ハイテクノロジーズ 設計・製
 造統括本部 那珂事業所内
 (72) 発明者 プレチ エルノ
 スイス連邦 チューリヒ HC1 E31
 3、エーテーハー ヘンガーベルク スイ
 ス連邦工科大学有機化学講座内

審査官 前田 憲彦

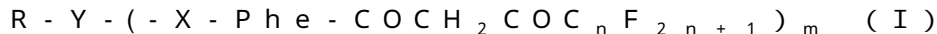
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発光性化合物及びそれを用いた標識試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式(I)：



(式中、Rは水素、フェニル基、又はタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基であり、当該タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基は

イムノアッセイあるいは核酸検出法は、可視的及び放射活性計測を含む数多くの手法によってその計測がなされている。蛍光体あるいは蛍光色素で標識したものの蛍光強度測定はその簡易さのため多く用いられている。この手法の有用性は、励起光波長とは異なる波長域にある蛍光あるいは発光が発生し、これを的確に検出することにあるが、蛍光あるいは発光が比較的短時間で消失することにより、励起光の発生と蛍光あるいは発光の測定がほぼ同時になされ、励起光に由来するノイズが計測され、バックグラウンドが高くなることがある問題がある。

蛍光あるいは発光波長のピークは励起光波長ピークに比較して長い波長域にあることが多く、これを波長選択フィルター等を使用し蛍光あるいは発光を励起光から分離して計測する。励起光波長と発光あるいは蛍光波長との波長差を一般的にストークスシフトと呼ぶが、

10

蛍光計測においてはストークスシフトが小さく、励起光と蛍光発光とを波長差を持って明確に分離することが難しいことがある。ローダミンあるいはフルオレセイン等の蛍光色素においては、蛍光の波長分布域が広く、ブロードな蛍光波形が得られる。複数の蛍光体あるいは蛍光色素を用いて複数物質の同時計測を行おうとする場合、蛍光波長域がオーバーラップし個々の物質の計測が難しいが、個々の物質の量を知るために換算式を適用しアルゴリズム解析する必要が生ずる。

発光に励起光が干渉しない方法として、電気化学発光法、酵素化学発光法を含む化学発光法の手法が用いられることがある。これにおいては標識体あるいは標識色素への励起光の照射はなく、したがって発光のみを計測すればよい。イソルミノールあるいはアクリジウムエステルを標識して対象物質の計測をする方法や、標識物質は酵素であるが基質に発光反応を起こすものを用いるペルオキシダーゼとルミノールとの反応、あるいは *Adamantyl 1,2-dioxetane aryl phosphate* (AMPDP) とアルカリホスファターゼとの反応を利用した高感度計測系が構築されている。

20

近年、ユーロピウムあるいはサマリウム等の希土類元素とそれらのリガンドとのコンプレックスの蛍光あるいは燐光消光時間が長いことを利用した、時間分解蛍光あるいは燐光測定法が優れた手法として開発されている。蛍光あるいは燐光の消光時間が長いこと、ストークスシフトが大きいこと、蛍光あるいは燐光ピーク波形がシャープであることにより、励起光によるノイズを含むことなく蛍光あるいは燐光のシグナルが検出され、高感度の分析手法を提供するとされる。キセノンフラッシュランプあるいはレーザー等により励起光をパルスで照射し、励起光による装置あるいは他の物質の蛍光が消失する時間が経過してから、目的の蛍光あるいは燐光を計測する手法であり、このリガンドの改良が進展しており、4,7-bis(chlorosulphonyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA) あるいは 4,4'-bis(1",1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-6"-hexanedion-6"-yl)chlorosulfonyl (BHHCT) といった化合物が報告されている。BHHCTは、例えば特開平9-241233号公報に開示されている。これらは優れたキレートであるが、イムノアッセイあるいは核酸検出法に十分な最小検出感度を与えるには至っていない。

30

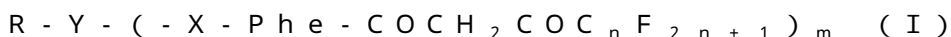
発明の開示

本発明の目的は、核酸検出法、イムノアッセイ法、化学発光分析法において用いられる時間分解蛍光測定法、遅延燐光測定法あるいはエネルギー転スファア蛍光検出法の標識試薬に関し、試料中の目的物質を高感度計測可能で有用な標識試薬、及びその標識試薬に用いられる化合物を提供することにある。

40

本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 一般式 (I) :

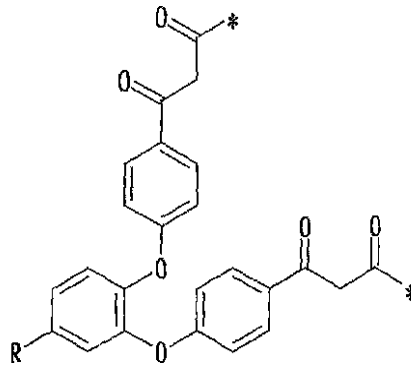


(式中、Rは水素、アルキル基、フェニル基、又はタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基であり、YはCH₂、炭素環又は複素環であり、XはO、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH又はNHCOであり、Pheはフェニレン基であり、nは1から5までの整数であり、mは1、2又は3である。)

50

で表される化合物。

(2) 一般式(1) :

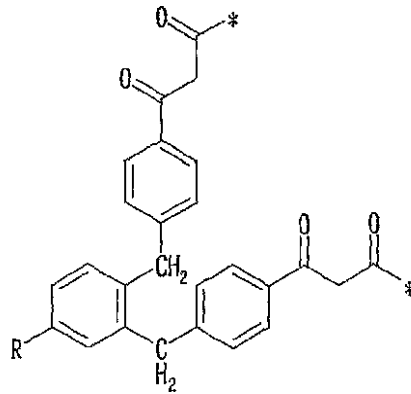


10

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(3) 一般式(2) :

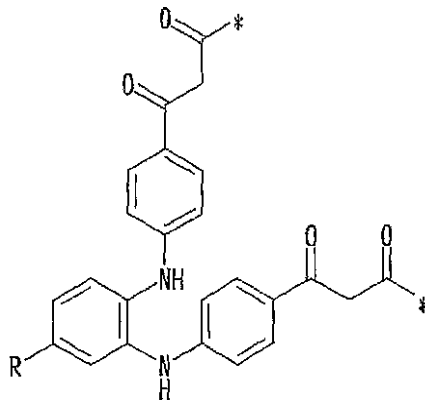


20

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(4) 一般式(3) :



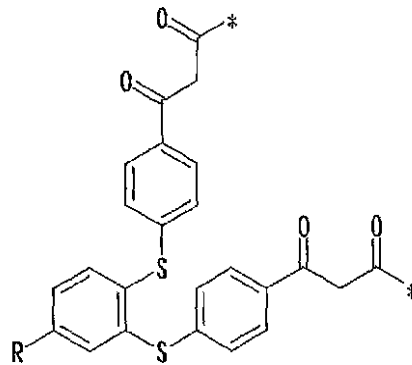
30

40

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(5) 一般式(4) :

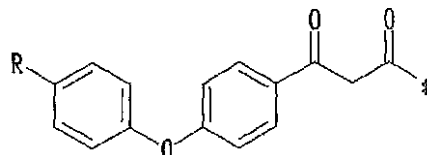


10

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

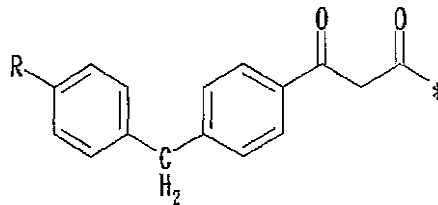
(6)一般式(5) :



(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

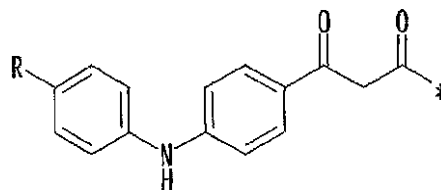
(7)一般式(6) :



(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

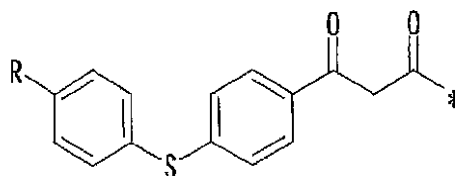
(8)一般式(7) :



(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(9)一般式(8) :



(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

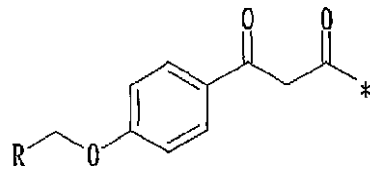
(10)一般式(9) :

20

30

40

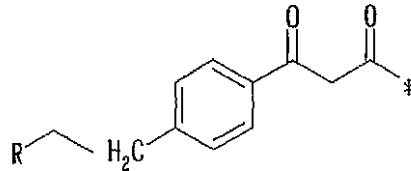
50



(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(11)一般式(10) :

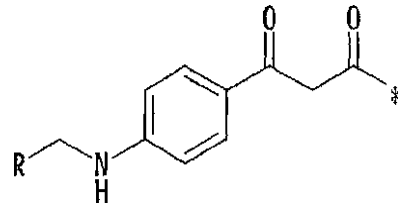


10

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(12)一般式(11) :

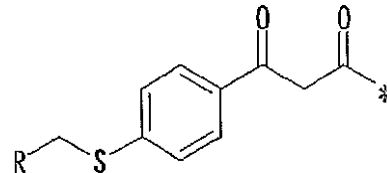


20

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(13)一般式(12) :

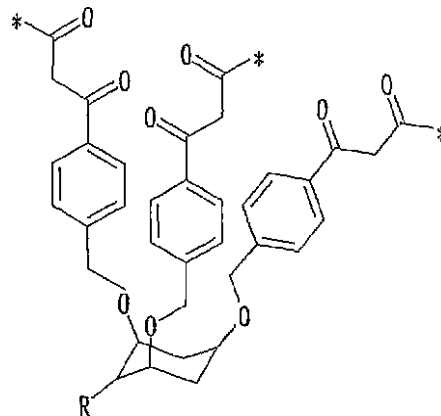


30

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

(14)一般式(13) :



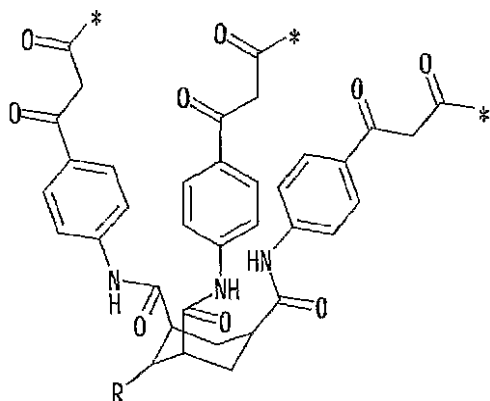
40

(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

50

で表される前記(1)記載の化合物。

(15)一般式(14)：



10

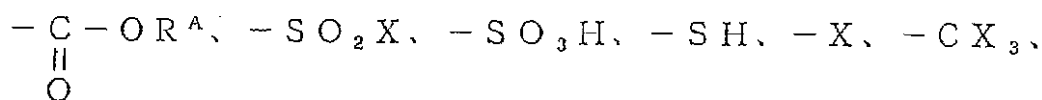
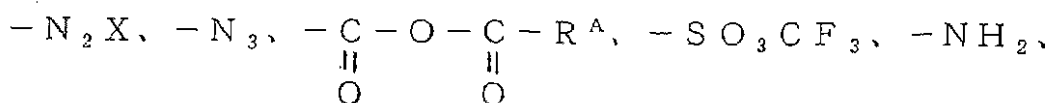
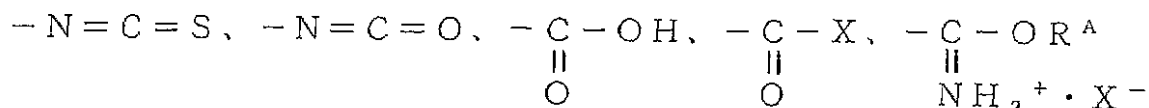
(式中、*は $C_n F_{2n+1}$ (ここで、 n は1から5までの整数である。)であり、 R は前記(1)と同義である。)

で表される前記(1)に記載の化合物。

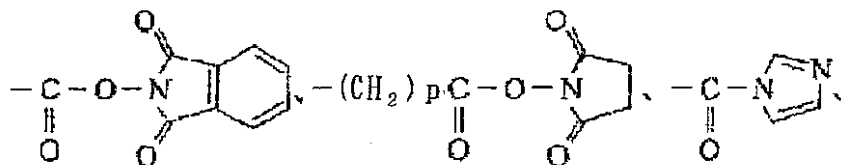
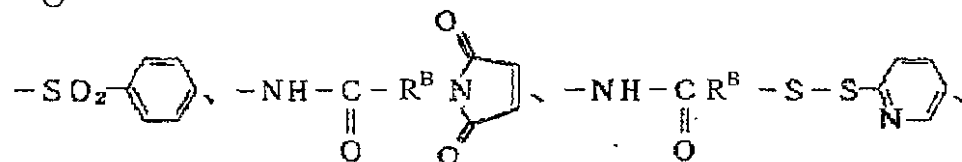
(16) R が、酸素、窒素及びイオウから選ばれる少なくとも1つのヘテロ原子を鎖員原子に含んでいてもよい炭素鎖からなるスペーサーの末端にタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸又は塩基に結合可能な官能基が結合した基である前記(1)~(15)のいずれかに記載の化合物。

20

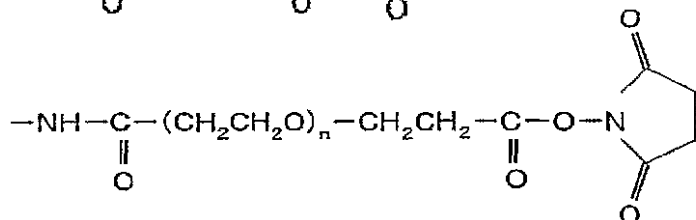
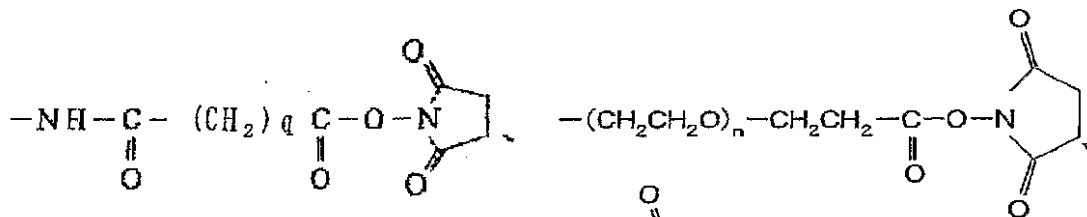
(17) R が、下式：



30




40



50

(ただし、Xはハライド原子、 $-\text{OSO}_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_4\text{F}_9$ 、

$-\text{OSO}_2$  $-\text{CH}_3$ から選択され、 R^{A} はアルキル基、アルケニル基、アリー

基、アラルキル基から選択され、 R^{B} はアルキレン基、アリーレン基、アラルキレン基から選択され、 p は0~5、 q は2~10である。

n は1から20である。)

で表される少なくとも1つの官能基を有する基が挙げられる。

で表される少なくとも1つの官能基を有する前記(1)~(16)のいずれかに記載の化合物。

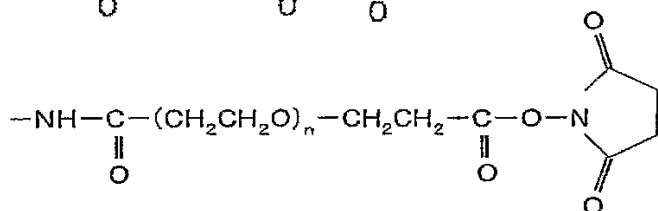
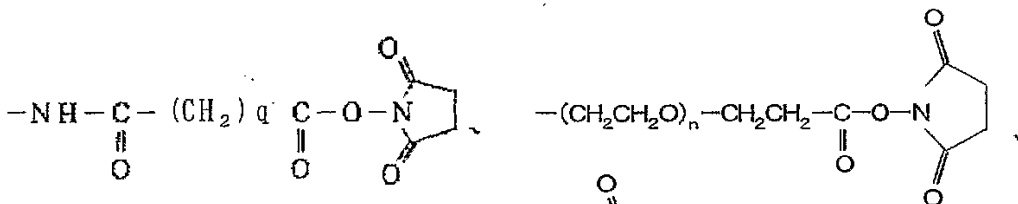
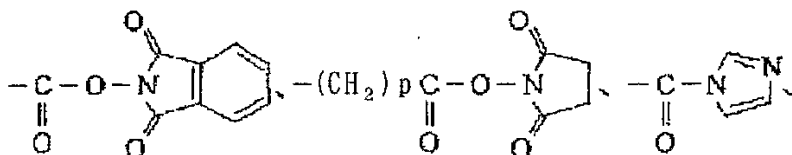
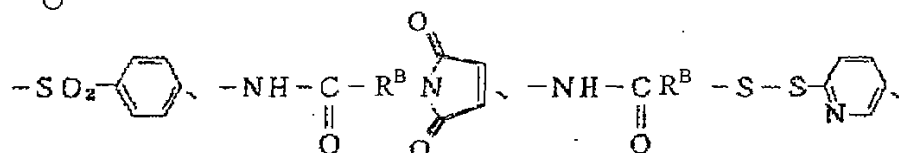
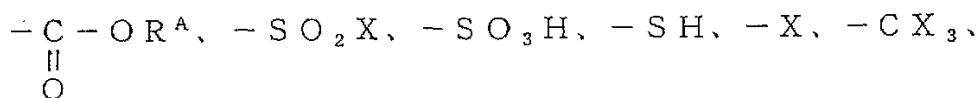
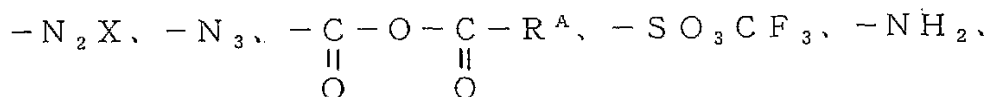
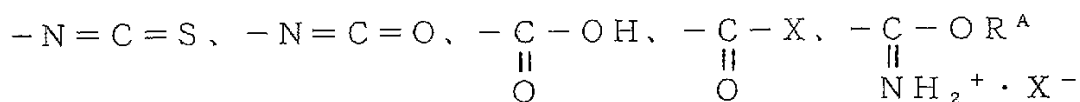
(18)前記(1)~(17)のいずれかに記載の化合物と希土類イオンからなる蛍光性錯体。

(19)前記(1)~(17)のいずれかに記載の化合物又は前記(18)に記載の蛍光性錯体からなる標識試薬。

(20)免疫測定又は核酸検出に用いるための前記(19)に記載の標識試薬。

(21)前記(19)又は(20)に記載の標識試薬を用いるタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸又は塩基の標識方法。

前記式(I)において、Rは水素、アルキル基、フェニル基、又はタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基である。ここで、「タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基」とは、対象となるタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に存在するアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、水酸基のいずれかに結合可能な基であれば特に制限はないが、例えば、下式：



10


20

30

40

50

(ただし、Xはハライド原子、 $-\text{OSO}_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_4\text{F}_9$ 、

$-\text{OSO}_2$  $-\text{CH}_3$ から選択され、 R^{A} はアルキル基、アルケニル基、アリー

ル基、アラルキル基から選択され、 R^{B} はアルキレン基、アリーレン基、アラルキレン基から選択され、 p は0~5、 q は2~10である。

n は1から20である。)

で表される少なくとも1つの官能基を有する基が挙げられる。

前記式において、Xで表されるハライド原子(ハロゲン原子)としては、フルオリド(フッ素)、クロリド(塩素)、ブロミド(臭素)、ヨージド(ヨウ素)が挙げられる。 R^{A} で表されるアルキル基としては、例えば炭素数1~6のアルキル基(例えばメチル基、エチル基)が挙げられ、アルケニル基としては、例えば炭素数2~6のアルケニル基(例えばビニル基、プロペニル基)が挙げられ、アリール基としては、例えばフェニル基、ナフチル基が挙げられ、アラルキル基としては、例えばベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基が挙げられる。 R^{B} で表されるアルキレン基としては、例えば炭素数1~6のアルキレン基(例えば $-(\text{CH}_2)_n-$ 、ここで n は1~6の整数)が挙げられ、アリーレン基としては、例えばフェニレン基、ナフチレン基が挙げられ、アラルキレン基としては、例えば $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_n-$ (ここでArはフェニレン基、ナフチレン基、 n は1~6の整数)が挙げられる。

Rが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基に結合可能な基である場合、Rの結合相手となるタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸もしくは塩基としては、特に制限はないが、例えば抗体類、標識抗体類、抗原類、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ウシ血清アルブミン、ハプテン、ホルモン、ポリペプチド、ポリヌクレオチドが挙げられる。

Yで表される炭素環としては、例えば、置換されていてもよい芳香族単環炭化水素環(例えば、ベンゼン環)、置換されていてもよい飽和単環炭化水素からなる3~8員環(例えば、シクロヘキサン環)、置換されていてもよい不飽和単環炭化水素からなる4~8員環(例えば、シクロヘキセン環、シクロペンタジエン環)、置換されていてもよい縮合多環炭化水素環(例えば、ナフタレン環、フェナントレン環、フルオレン環)、炭化水素環集合(例えば、ビフェニル、テルフェニル、フェナントレン環、フルオレン環)が挙げられる。

Yで表される複素環としては、例えば、置換されていてもよい芳香族複素単環(例えば、チオフェン環)、置換されていてもよい3~8員の飽和複素単環(例えば、テトラヒドロフラン環)、置換されていてもよい不飽和複素単環(例えば、ピロリン環)、置換されていてもよい縮合複素環(例えば、ベンゾチオフェン環、ジベンゾチオフェン環、ベンゾフラン環、ジベンゾフラン環)が挙げられる。

Phで表されるフェニレン基としては、1,4-フェニレンが好ましい。

本発明に用いる希土類イオンとしては、好ましくはランタノイドイオン、例えば、ユウロピウム(Eu)、サマリウム(Sm)、テルビウム(Tb)、ジスプロシウム(Dy)等のイオンが挙げられる。

金属元素を含むキレート分子のサイズは比較的小さいものであるが、ペプチド、アミノ酸、特に、タンパク質あるいは塩基鎖の標識においては、C(炭素)を主とした鎖(スペーサー)を介して標識した方が有利であることがある。タンパク質あるいは塩基鎖には複雑な3次構造をとることが多く、標識体の有する官能基に対する結合サイトが構造の内部にあることがある。これらに標識させようとする場合、スペーサーの使用は有効である。

前記スペーサーとしては、例えば酸素、窒素及びイオウから選ばれる少なくとも1つのヘテロ原子を鎖員原子に含んでいてもよい炭素鎖からなるスペーサーが用いられる。

前記スペーサーを有するRの具体例としては、

$-(\text{CH}_2)_a-\text{FG}$ 、又は

$-\text{R}[(\text{CH}_2)_b-\text{A}]_c-(\text{CH}_2)_d-\text{FG}$

10

20

30

40

50

(式中、aは1から40までの整数であり、bは1から20までの整数であり、cは1から10までの整数であり、dは0から20までの整数であり、Aは酸素(O)、窒素(NH)又はイオウ(S)であり、FGは官能基である。)

で表されるものが挙げられる。

蛍光は第一励起状態から基底状態への遷移に際して起こる発光であり、スピン多重度の異なる状態間の遷移により燐光が発せられる。従来、重金属イオンと配位する錯体試薬は、

-ジケトン構造を有する標識試薬、芳香族基を有する標識試薬があった。フェノールフタレインは蛍光も燐光も観測されないのに、-O-(酸素)の橋渡しをつけたフルオレセインは強い蛍光や燐光を示す。またピリジンは蛍光も燐光も観測されないが、ベンゼン環を1つつけたキノリンになると蛍光や燐光も見られるようになる。

蛍光あるいは燐光の強度を強くしようとする場合、芳香族基とO(酸素)の両者を有し、かつ、安定であり更には合成収率の高いものが有利である。

イムノアッセイあるいは核酸検出手法においては、固相をその反応プラットフォームとし、固相上で、抗原抗体反応物、あるいはDNAあるいはRNAハイブリダイゼーション反応産物を形成させ、これを計測する。標識体あるいは標識色素はあらかじめ抗原、抗体、DNAあるいはRNAに結合され反応生成物が構成されるか、あるいは、例えばアビジンとビオチンとの反応を利用して、最後に反応物に結合させ、計測が開始される。

本発明の化合物及び標識試薬は、-ジケトン構造と芳香族基の両方を有し、かつ、Pheで表されるフェニレン基と、Yで表されるCH₂、炭素環又は複素環との間に、Xで表されるO、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH又はNHCOが存在し、これによりユーロピウムを例とする希土類元素を橋渡しする-ジケトン部位での可動域が大きくなり、より効果的に希土類イオンを保持することができる。これにより、希土類イオンはより確実に-ジケトン部位に配位し、結果として、適切な励起光が照射された場合、確実に蛍光あるいは燐光を発することができる。

また、本発明の化合物及び標識試薬は、前記のように、Pheで表されるフェニレン基と、Yで表される炭素環又は複素環との間に、Xで表されるO、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH又はNHCOを置くことにより芳香族基(フェニレン基)と炭素環又は複素環とが連続しないので、親水性を大きく阻害せずに有効なキレートを得ることができる。

また、本発明の化合物及び標識試薬は、Pheで表されるフェニレン基と、Yで表される炭素環又は複素環との間に、Xで表されるO、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH又はNHCOを置くことにより、C_nF_{2n+1}(ここで、nは1から5までの整数である。)及び-ジケトン部と対峙する位置においてそれらの電子吸引効果に影響され難くなり、リアクティブグループの導入がなされやすくなる。結果として、より効率的にアミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸との結合体を得られることになる。

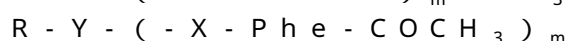
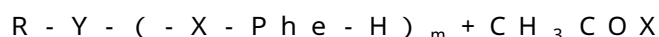
同様に、本発明の化合物及び標識試薬は、Pheで表されるフェニレン基と、Yで表される炭素環又は複素環との間に、Xで表されるO、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH又はNHCOを置くことにより、リアクティブグループを介したアミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸あるいはプラスチック粒子等の固相担体との結合を行う場合、それらの影響を-ジケトン部においては受け難くなり、効果的に希土類イオンを保持することができる。これにより、希土類イオンはより確実に-ジケトン部位に配位し、結果として、適切な励起光が照射された場合、確実に蛍光あるいは燐光を発することができる。

更には、本発明の化合物及び標識試薬は、R中にスペーサーを用いると、Rの官能基がよりタンパク質あるいは塩基鎖等に結合しやすくなり、結果として被標識体1分子あたりの標識体ラベル数を増やすことができる。

本発明の化合物は、例えば、次のようにして製造することができる。

(製造法1)

第1工程



(式中、Xはハロゲン原子、例えば塩素であり、R、Y、X及びPheは前記式(I)と

10

20

30

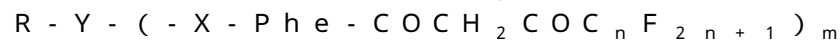
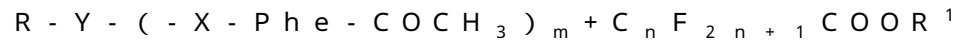
40

50

同義である。)

この反応は、いわゆるフリーデル-クラフツアシル化 (Friedel-Crafts acylation) であり、常法により行うことができる。溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム等が用いられ、塩化アルミニウム等のルイス酸の存在下に反応を行う。

第2工程



(式中、 R^1 は低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基であり、R、Y、X、Phe、n 及び m は前記式 (I) と同義である。)

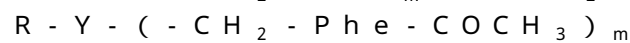
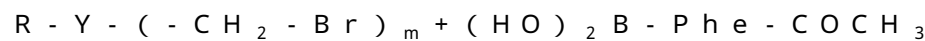
10

この反応は、ケトン化合物とエステル化合物との縮合反応であり、常法により行うことができる。溶媒としては、シクロヘキサン、n-ヘキサン、ジエチルエーテル等が用いられ、水素化ナトリウム、金属アルコキシド等の存在下に反応を行う。

(製造法2)

この製造法は、XがCH₂である場合の製造法である。

第1工程

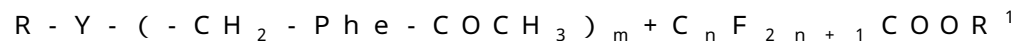


(式中、R、Y、Phe 及び m は前記式 (I) と同義である。)

この反応は、テトラヒドロフラン-水混合溶媒等の溶媒中、PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (dppf = 1, 1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene) の存在下に反応を行う。

20

第2工程



(式中、 R^1 は低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基であり、R、Y、Phe、n 及び m は前記式 (I) と同義である。)

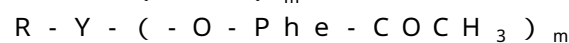
この反応は、製造法1の第2工程と同様に行うことができる。

(製造法3)

この製造法は、XがOである場合の製造法である。

30

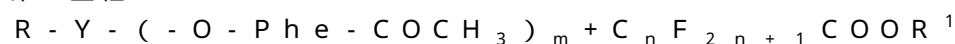
第1工程



(式中、R、Y、Phe 及び m は前記式 (I) と同義である。)

この反応は、溶媒にK₂CO₃、NaOH又はNaH等を加え行う。

第2工程



(式中、 R^1 は低級アルキル基、例えばメチル基、エチル基であり、R、Y、Phe、n 及び m は前記式 (I) と同義である。)

40

この反応は、製造法1の第2工程と同様に行うことができる。

以上のようにして得られる化合物は、標識試薬としてタンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸又は塩基の標識に用いたり、あるいはプラスチック粒子等の担体表面に固相化、更にはリポソーム等の中空を有する封入体に内封し用いることができる。

本発明の化合物を用いた標識反応は、当該化合物中の官能基とタンパク質、核酸中の官能基の関係に応じて適当な反応を選択することにより行うことができる。例えば、本発明の化合物中のクロロスルホニル基、カルボキシ基と、タンパク質中のアミノ基とのアミド形成反応によって標識反応を行うことができる。このアミド形成反応は、室温で炭酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液 (pH 9.0 ~ 9.5) 中で反応が容易に進行する。

本発明の標識試薬を用いる免疫測定法としては、例えば、時間分解蛍光免疫測定法や抗原

50

抗体反応を利用した特異的結合アッセイが挙げられる。ここで、時間分解蛍光免疫測定法とは、長寿命の蛍光標識体（Eu-キレート等）を用い、短い寿命のバックグラウンドの蛍光が消失した後に、標識体の蛍光シグナルのみを時間分解蛍光測定する高感度な蛍光免疫測定法をいう。特異的結合アッセイとは、抗原抗体反応を利用した免疫測定、レセプター・アクセプターの結合反応を利用したアッセイ、核酸のハイブリダイゼーションを利用したアッセイ等をいう。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2001-312562の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

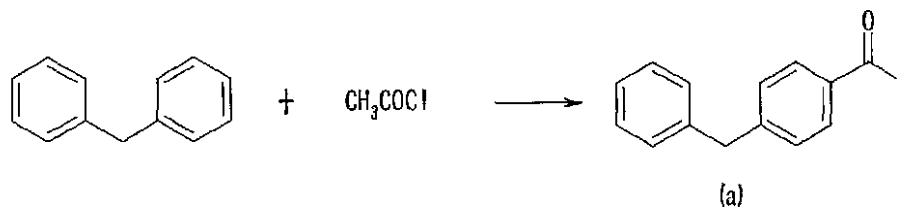
以下に本発明を、実施例を用いて説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を何ら制限するものではない。

（実施例1）

以下、一般式（6）で表される化合物の合成法の1例である。

第1工程

以下を第1工程とする。



10

20

材料

（1）無水塩化アルミニウム：2.18g

（2）無水ジクロロメタン：35mL

（3）塩化アセチル：1.29g

（4）ジフェニルメタン：2.5g

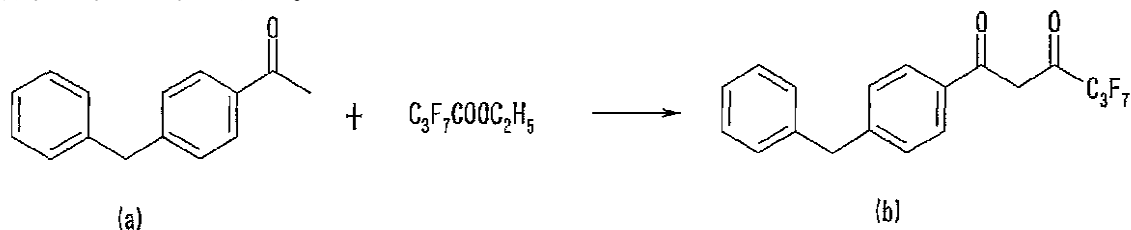
合成方法

フラスコに材料（1）及び（2）を加え、0℃に冷却した。更に材料（3）を加え、冷却下材料（4）のジクロロメタン溶液15mLをゆっくり滴下し、室温にて2時間攪拌した。混合物に15g程度の水を加え、更に1規定塩酸溶液20mLを加え、析出する酸化アルミニウムを溶解させ、有機層を分取した。水層をジクロロメタン20mLで3回抽出した。有機層を混合し、水洗し、無水硫酸マグネシウムを加え、減圧下にて溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル = 3：2）にて精製し化合物（a）を得た。（収率96%）

30

第2工程

以下を第2工程とする。



40

材料

（1）水素化ナトリウム（60% in oil）：60mg

（2）無水シクロヘキサン：5mL

（3） $\text{C}_3\text{F}_7\text{COOC}_2\text{H}_5$ ：460mg

（4）化合物（a）：200mg

合成方法

フラスコに材料（1）及び（2）を加え、加熱攪拌しながら材料（3）及び（4）のシクロヘキサン溶液3mLを加え、更に室温で30分攪拌した。混合物に15%酢酸水溶液を

50

加え、氷水 10 mL に注ぎ入れた。分液ロートにて有機層を分取し、水層をジエチルエーテル 20 mL で 3 回抽出した。有機層を混合し、更に水洗し、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥し、減圧下で溶媒を留去させ、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶媒 n - ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 2）にて精製し淡黄色の化合物（b）を得た。（収率 99%）

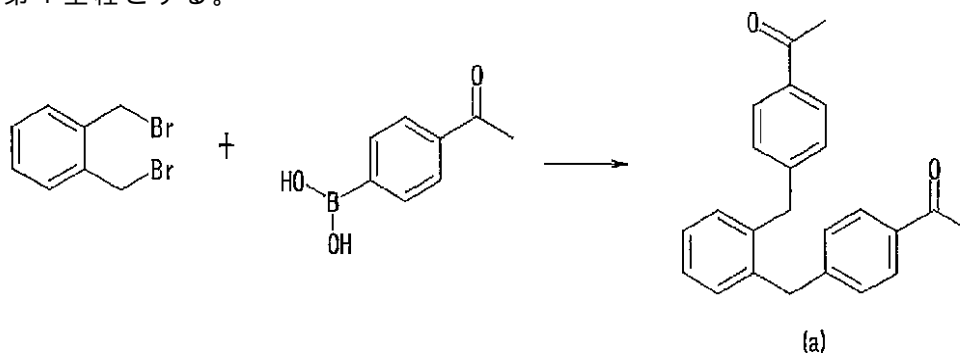
化合物（b）のゲルクロマトグラフィー分析データを図 1 に示す。また、TOF / MS スペクトルによる分析で m/z 406 を確認した。

（実施例 2）

以下、一般式（2）で表される化合物の合成法の 1 例である。

第 1 工程

以下を第 1 工程とする。



材料

(1) 1,2-Bis(bromomethyl)benzene : 5.0 g

(2) 4-Acetylphenylboronic acid : 13.6 g

(3) Tetrahydrofuran (THF) 50 mL と蒸留水 5 mL との混合液

(4) 炭酸セシウム : 18.5 g

(5) PdCl₂(dppf) · CH₂Cl₂ : 1.5 g

dppf = 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene

反応温度 : 70 (還流)

反応時間 : 1 日

合成方法

反応容器に材料（1）、（2）、（3）及び（4）を混合し、70 で加熱攪拌した。30 分後、材料（5）を添加した。24 時間後、加熱を停止し、反応溶液を蒸留水 60 mL に投入して、クロロホルム 80 mL で抽出した。有機層を 5% 塩酸水溶液 40 mL、蒸留水 40 mL で順次洗浄し、硫酸マグネシウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去して粗生成物 6 g を得た。シリカゲルクロマトグラフィーにて分離精製した後、ゲルクロマトグラフィーにて分取精製を行った。1.0 g の化合物（a）を得た。（HPLC 純度 99%、収率 15%）

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 2.56 (6H, s), 3.96 (4H, s), 7.10 - 7.15 (6H, m), 7.23 - 7.27 (2H, m), 7.81 - 7.84 (4H, m)

MS (MALDI TOF) m/z 344 (M + H⁺)

第 2 工程

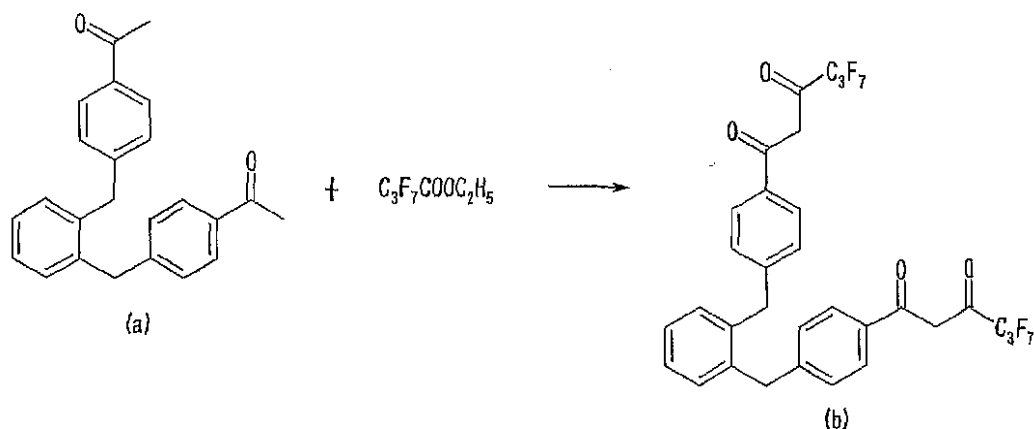
以下を第 2 工程とする。

10

20

30

40



10

材料

- (1) 化合物 (a) : 300 mg
 (2) $C_3F_7COOC_2H_5$: 440 mg
 (3) 脱水ジエチルエーテル : 12 mL
 (4) ナトリウムメトキシド : 99 mg

反応時間 : 室温

反応温度 : 1 日

合成方法

反応容器に材料 (1)、(2)、(3) 及び (4) を混合した。24 時間後、10% 硫酸水溶液 12 mL を加えた。15 分間の攪拌の後、有機層を減圧留去して析出した結晶をろ過した。よく水洗した後、結晶をエタノール 10 mL へ投入し、加熱攪拌した。エタノールを 5 mL 程度まで減圧留去し、石油エーテル 20 mL を加えて加熱攪拌した。不溶分をろ過し、溶媒を留去し化合物 (b) 300 mg を得た。ゲルクロマトグラフィーにて分取精製し、化合物 (b) 100 mg を得た。

20

MS (MALDI TOF) m/z 735 ($M + H^+$)

化合物 (b) の HPLC 分析データを図 2 に、化合物 (b) の NMR 分析データを図 3 に、化合物 (b) の TOF / MS スペクトル分析データを図 4 に示す。

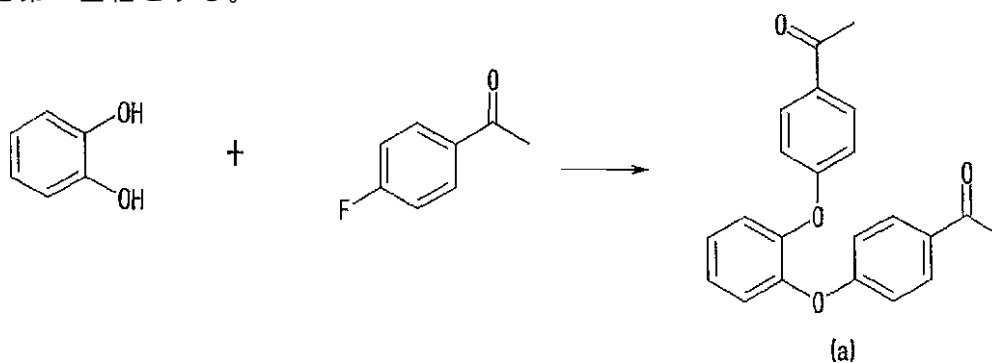
(実施例 3)

以下、一般式 (1) で表される化合物の合成法の 1 例である。

30

第 1 工程

以下を第 1 工程とする。



40

材料

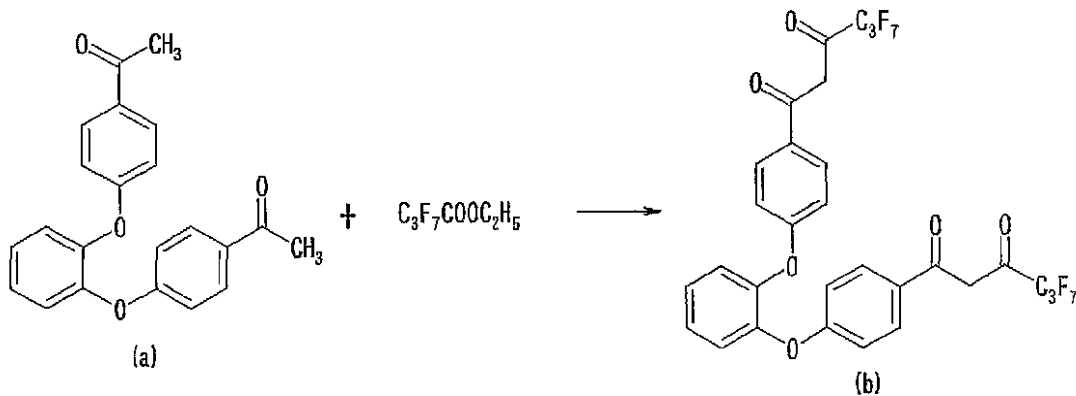
- (1) 1,2-Dihydroxybenzene
 (2) 4'-Fluoroacetophenone

合成方法

材料 (1)、材料 (2) を溶媒 N,N -Dimethylacetamide に溶解した炭酸カリウム存在下に反応させて、化合物 (a) を得た。

第 2 工程

以下を第 2 工程とする。



10

材料

- (1) 化合物 (a) : 1.75 g
- (2) 無水ジエチルエーテル : 40 mL
- (3) ナトリウムメトキシド : 1.36 g
- (4) $C_3F_7COOC_2H_5$: 3.67 g

合成方法

材料 (1) 及び (2) を混合冷却し、材料 (3) を加えた。更に材料 (4) のジエチルエーテル溶液 10 mL を滴下した。冷却し 1 時間攪拌後、ジエチルエーテルを加え希塩酸で pH 4 とし、水、飽和食塩水で順次洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を除去して赤褐色ペースト 3.87 g を得た。これをウェットカラム精製し (溶媒、ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1)、赤褐色ペースト 2.69 g を得た。

20

(実施例 4)

本発明による化合物を含む発光性化合物を用意した。なお、TTA (4,4,4-Trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione) 及び BFA (4,4,4-Trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione) は (株) 同人化学研究所より購入し、BHHT (4,4'-bis(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanedion-6''-yl)-o-terphenyl) の合成は特開平 9-241233 及び Yuan & Matsumoto (Analytical Chemistry, 1998, 70, 596-601) を参照した。

30

これらの化学構造式を図 5 に示す。

(実施例 5)

本発明による化合物を含む図 5 の化合物をアセトニトリル (和光純薬製) に 10^{-4} モル/mL あるいは 10^{-5} モル/mL に溶解し、更に 10^{-10} モル/mL まで 10 倍段階希釈した。この 10^{-7} モル/mL の溶液を用い、分光光度計 U-3300 (日立ハイテックノロジーズ製) にて吸収スペクトル分析を行った。更に、化合物の 10^{-10} モル/mL 液と 0.2 mM 塩化ユーロピウム 6 水和物 ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、和光純薬製)、0.2 mM TOPO (Tri-n-octylphosphine oxide, 同人化学研究所製)、1% Triton X-100 (シグマ製) を含む水溶液を 1 : 9 に混合し、42 時間インキュベーションした。その 0.1 mL を 96 穴平底マイクロタイ

40

プレート (Nunc 製) のウェルに分注し、時間分解測定装置 (日立ハイテックノロジーズ製) にて 340 nm 付近の励起光を照射、励起光照射より 0.2 ミリ秒後から 0.8 ミリ秒までの 615 nm 付近の波長を有する蛍光を計測した。更に、同様の液を用い、蛍光分光計 F-4010 (日立ハイテックノロジーズ製) 励起スペクトル分析を行った。これらの結果を図 6 に示す。化合物 4 においては、時間分解測定装置において最も高いシグナル強度を示し、蛍光スペクトル分析及び吸収スペクトル分析においてピーク強度が最も大きく蛍光体として有用な化合物であることが確認された。化合物 6 においてはフェニレン基と、Y で表される炭素環との間に、X で表される CH_2 を置くことにより炭素環 3 個をまたぐ共役系が形成され難くなり、結果として化合物 1 の構造の個数に応じたシグナルが観察されているものと思われた。

50

(実施例6)

実施例5の 10^{-11} モル/mL化合物溶液の0.1mLをマイクロタイタープレートのウェルに分注し、時間分解測定装置にて340nm付近の励起光を照射、励起光照射より0.1、0.2、0.3...0.8、0.9、及び1.0ミリ秒後に計測を開始し、その後、0.1ミリ秒間に観察された発光シグナルをそれぞれ図に点を記入し、線で結んだ。

その結果を図7に示す。本発明の化合物は十分に長い蛍光の持続があることが確認された。特に化合物4において、最も長い半減時間を示した。

(実施例7)

フェトプロテイン(AFP)の測定

Yuan & Matsumoto (Analytical Chemistry, 1998, 70, 596-601)を参照した。

(1) AFP抗体のビオチン標識(Pierce社、Sulfo-NHS-LC-Biotin取扱説明書に従う)

抗ヒトAFP抗体(DACO Immunoglobulins製)1mgをリン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.4)1mLで溶解した。Sulfo-NHS-LC-Biotin 0.062mgを混合、氷浴中に2時間静置した。その後、PD-10カラム(ファルマシア製)を用い、PBSにて抗体画分を溶出採取、未結合のSulfo-NHS-LC-Biotinを除いた。ビオチン標識抗体液は0.1%にアジ化ナトリウムを加え、4℃に保存した。

(2) 実施例4の化合物のクロロスルホニル基の導入

図5の化合物0.1ミリモルあたり0.2mLのクロロ硫酸(和光純薬製)を加え、室温にて7時間攪拌した後、攪拌下の純水(氷浴中)4mLに反応溶液を滴下した。生成する沈殿を遠心分離し、純水にて3回洗浄した。その後、沈殿を45時間真空乾燥した。

(3) 化合物のストレプトアビジン標識

ストレプトアビジン(SA, Chemicon International製) 10^{-5} ミリモルを0.1M炭酸緩衝液(pH9.1)4mLに溶解した。前記(2)の化合物 10^{-3} ミリモルをエタノール40μLに溶解し、SA液中に滴下した。混合液を室温にて1時間攪拌した後、0.05%アジ化ナトリウム加0.1M NaHCO₃水溶液で十分に透析した。透析後、1M HClにてpHを6.8に調整し全量を6mLとし、0.1%にBSAを加えた。これを 10^{-7} M EuCl₃·6H₂O、1%BSA、0.1%アジ化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液(pH7.8)にて300倍に希釈し、56℃2時間加温の後、反応に使用した。

(4) 抗AFP抗体によるマイクロタイタープレートコーティング

0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で5μg/mLに希釈した抗ヒトAFP抗体(日本バイオテスト研究所製)をマイクロタイタープレートに100μL分注し、4℃一夜静置コーティングを行った。その後、0.05%Tween20加生理食塩水で洗浄した後、1%BSA、2%シュクロース加炭酸緩衝液(pH9.1)100μLを加え、37℃にて静置した。1時間後、0.05%Tween20(シグマ製)加生理食塩水で洗浄し、4℃で保管した。

(5) イムノアッセイの実施

1%BSA加PBSにて、ヒトAFP標準品(DACO Immunoglobulins製)を10倍段階希釈し、その50μLをマイクロタイタープレート各穴に加えた。37℃、1時間振盪後、0.05%Tween20加生理食塩水で洗浄した。その後、前記(1)で得られたビオチン標識抗AFP抗体を1%BSA加生理食塩水にて1μg/mLに希釈し、その50μLを各穴に分注した。37℃、1時間振盪後、0.05%Tween20加生理食塩水で洗浄した。その後、前記(3)のストレプトアビジン標識化合物の50μLを各穴に分注した。

室温にて30分静置後、0.05%Tween20加生理食塩水で洗浄した。マイクロタイタープレートを時間分解測定装置にて発光量を計測した。

10

20

30

40

50

結果を図8に示す。本発明の化合物は、性能良くイムノアッセイにて使用できることがわかる。特に化合物4においては、良好な検量線が描け、これによる最小検出感度は同時に検討した他の化合物に比較して最も良かった。化合物6においても比較的良好的な検量線と最小検出感度が得られた。これは、実施例6においては、大きなシグナルを示さなかったものの、クロロスルホニル基であったリアクティブグループの結合の良好さ、及び、 β -ジケトン部のユーロピウムイオンの捕捉とその安定性が高く、抗原抗体反応において相対的に良好な結果が得られたものと思われる。

炭素環あるいは複素環1個を有する化合物1、TTA、BFAの場合、クロロスルホニル基であったリアクティブグループが結合しないか、 β -ジケトン部にあるユーロピウムイオンが安定的に保持されず、結果として抗原抗体反応を示すシグナルは得られなかった。

(実施例8)

本発明の化合物の1例である図5の化合物4をとり、考察を試みる。

フェニレン基と、Yで表される炭素環との間に、Xで表されるOを置くことにより、 C_3F_7 及び β -ジケトン部とRの部位間の距離が大きくなり、 C_3F_7 及び β -ジケトン部の電子吸引効果に影響され難くリアクティブグループの導入がなされやすくなる。結果として、より効率的にアミノ酸、ペプチド、タンパク質、あるいは核酸との結合体を得られることになる。

同様に、Xで表されるOを置くことにより、リアクティブグループを介したアミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸あるいはプラスチック粒子等の固相担体との結合を行う場合、それらの影響を β -ジケトン部においては受け難くなり、効果的かつより安定に希土類イオンを保持することができる。これにより、希土類イオンはより確実に β -ジケトン部位に配位し、結果として、適切な励起光が照射された場合、確実に蛍光あるいは燐光を発することができる。

更に、Xで表されるOを置くことにより、 C_3F_7 、 β -ジケトン部及びそれに続く炭素環はよりフレキシブルに配位子を配置し希土類イオンとともにより安定した錯体を形成しているものと思われる。

(実施例9)

図5の化合物4のBSA標識を行った。実施例7の(2)に従いクロロスルホニル基を導入した。また、標識にあたっては、Yuan & Matsumoto (Analytical Chemistry, 1998, 70, 596-601)を参照した。

クロロスルホニル基を導入した化合物4の1.5mgを含む0.08mL DMF (N,N-Dimethylformamide)液を、BSA 2mgを含む0.1M炭酸緩衝液(pH 9.3) 0.4mLに攪拌しながら加えた。室温にて攪拌の後、PD-10カラムを用い、化合物により標識されたBSA画分を採取する。このとき、0.05M NH_4HCO_3 (pH 8.0)水溶液を溶出液とした。

これを 10^{-7} M $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、1%BSA及び0.1%アジ化ナトリウムを含む0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.8)にて希釈し、56℃、2時間加温した。

ユーロピウム標識BSAを0.05% Tween 20及び0.05%アジ化ナトリウムを含む0.1M トリス塩酸緩衝液(pH 9.1)で10段階階稀釈し、時間分解測定装置にて発光量を計測した。結果を図10に示す。本発明の化合物は、性能がよい標識体として使用できることがわかる。

(実施例10)

以下、本発明の化合物(図5の化合物4)を用いたイムノアッセイを例示する。

(1) 抗ヒトCRP(C反応性タンパク)抗体のビオチン標識

抗ヒトCRP抗体を実施例7の(1)に従い、ビオチン標識を行った。

(2) SA標識体の作製

実施例7の(3)に従い、図5の化合物4のSA標識体を作製し、更に、ユーロピウムを混合した。

(3) 抗ヒトCRP抗体によるマイクロタイタープレートコーティング

10

20

30

40

50

実施例7の(4)に従い、抗ヒトCRP抗体の固相化されたマイクロタイタープレートを用意した。

(4) イムノアッセイの実施

1% BSA加生理食塩水にて、ヒトCRP標準品を10倍段階希釈し、その50 μ Lをマイクロタイタープレート各穴に加えた。37 $^{\circ}$ C、1時間振盪後、0.05% Tween 20加生理食塩水で洗浄した。その後、1 μ g/Lに(1)のビオチン標識抗ヒトCRP抗体を1% BSA加生理食塩水にて希釈し、その50 μ Lを各穴に分注した。37 $^{\circ}$ C、1時間振盪後、0.05% Tween 20加生理食塩水で洗浄した。その後、(2)のユーロピウム標識SAを1% BSA加生理食塩水にて希釈し、その50 μ Lを各穴に分注した。室温にて30分静置後、0.05% Tween 20加生理食塩水で洗浄した。マイクロタイタープレートを時間分解測定装置にて発光量を計測した。

10

結果を図11に示す。図5の化合物4は標識体として、性能よくイムノアッセイにて使用できることがわかる。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、(1)錯体を形成しやすい新規化合物、及び(2)タンパク質等との反応が容易な新規化合物が得られる。更に、イムノアッセイ法あるいは核酸検出法等において有用な標識体の使用が可能となる。

【図面の簡単な説明】

図1は、実施例1の化合物(b)のゲルクロマトグラフィー分析データを示す。

図2は、実施例2の化合物(b)のHPLC分析データを示す。

20

図3は、実施例2の化合物(b)のNMRスペクトル分析データを示す。

図4は、実施例2の化合物(b)のTOF/MSスペクトル分析データを示す。

図5は、実施例5~7に用いられた本発明による化合物及びその他の3-ジケトン(1,3-ジオン)化合物を示す。

図6は、時間分解測定装置での本発明化合物を使用した蛍光シグナル、蛍光分光計励起スペクトルの最大励起波長、及び、分光光度計吸収スペクトルの最大吸収波長を示した一覧表とグラフである。

図7は、本発明による化合物の蛍光減衰曲線を示す。

図8は、本発明による化合物を標識体として用いた、フェトプロテイン(AFP)の検量線を示す。

30

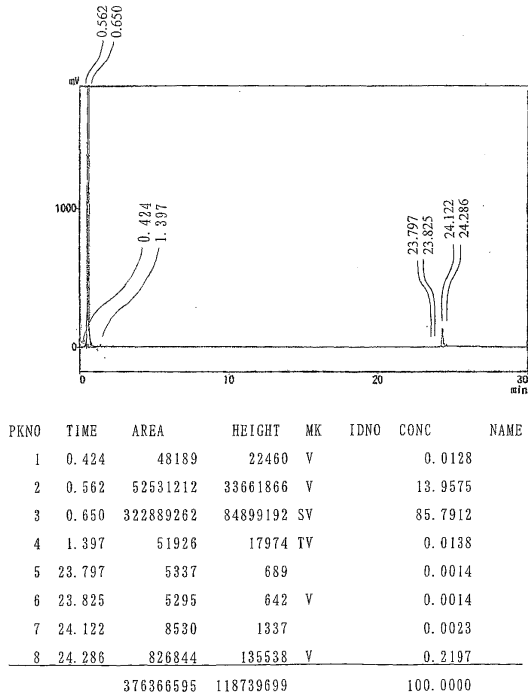
図9は、本発明による化合物の1例を用い、本発明の特徴を示すものである。

図10は、本発明によるユーロピウム標識ウシ血清アルブミン(BSA)の検量線を示す。

図11は、本発明によるヒトC反応性タンパク(CRP)の計測結果を示す。

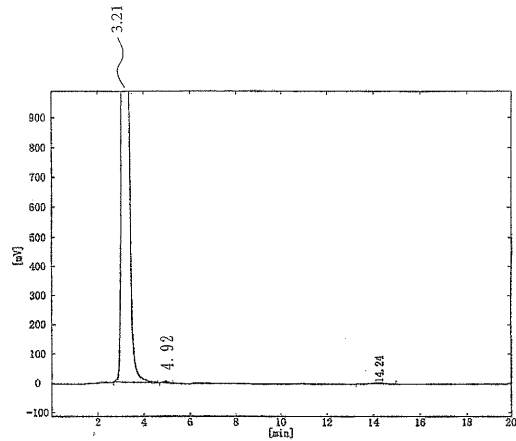
【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2

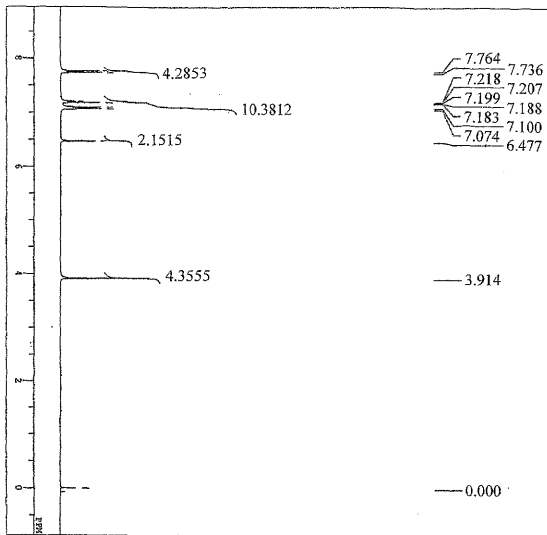


注入料 2ul
 流量 150 ul/min
 カラム CAPCELL PAK C18 UC120 3um 1.5mm*150mm
 検出器 254 nm
 溶離液 CH3CN:H2O=3:1

PKNO	NAME	TIME MARK	CONC	AREA	HEIGHT
1		3.21	99.331	33312302.99	1243512.4
2		4.92	0.217	72919.00	5414.5
3		14.24	0.452	151485.32	4364.7
TOTAL			100.000	33536707.31	1253291.6

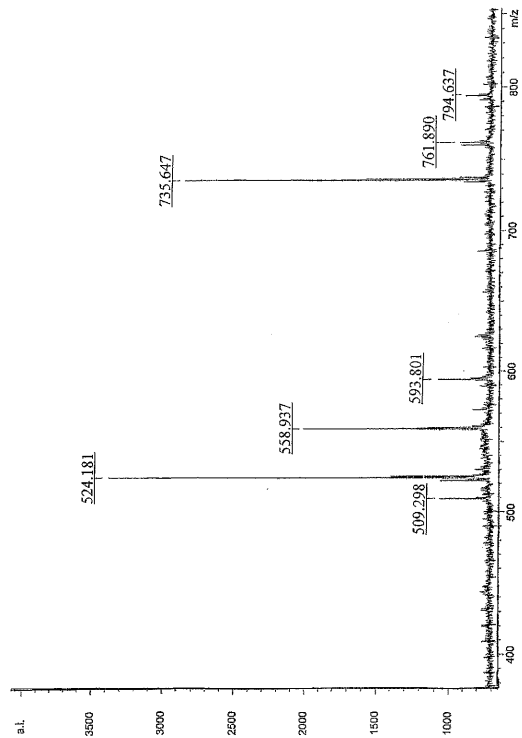
【 図 3 】

FIG. 3



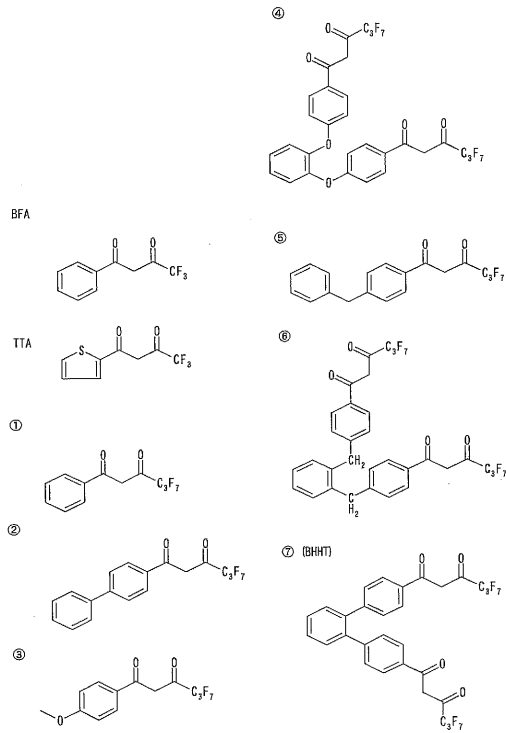
【 図 4 】

FIG. 4



【 図 5 】

FIG. 5



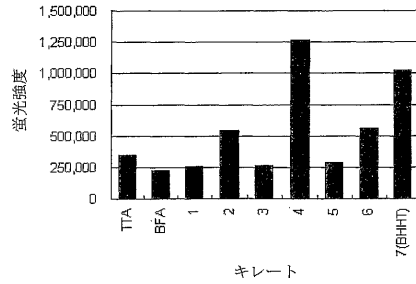
* TTA : 4,4,4-Trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione
 * BFA : 4,4,4-Trifluoro-1-phenyl-1,3-butanedione
 * BHHT : 4,4'-bis(1^a,1^a,2^a,2^a,3^a,3^a-heptafluoro-4^a,6^a-hexanedion-6^a-yl)-o-terphenyl

【 図 6 】

FIG. 6

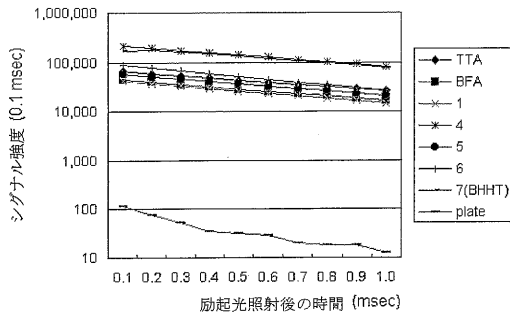
TRF #D1	F-4010		U-3300			
	蛍光強度 10 ⁻¹¹ mol/mL	% vs BHHT	max Ex(nm)	peak intensity	max Abs(nm)	peak intensity
TTA	346,464	34	348.8	1.458	329.0	0.381
BFA	228,316	22	337.6	1.278	323.5	0.254
1	256,477	25	336.0	1.250	333.5	0.235
2	543,166	53	347.2	3.192	nd	nd
3	264,518	26	nd	nd	nd	nd
4	1,268,801	123	336.0	6.009	348.5	1.274
5	291,146	28	337.2	1.822	341.0	0.476
6	557,028	54	329.0	2.108	337.5	1.036
7(BHHT)	1,028,165	100	344.8	5.723	340.0	1.104

nd: not-done



【 図 7 】

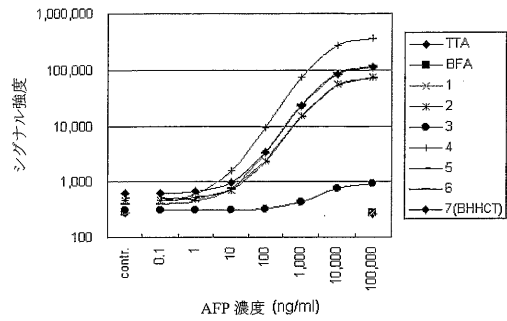
FIG. 7



1/2 life time chelate (msec)	
TTA	0.69
BFA	0.66
1	0.62
4	0.69
5	0.65
6	0.56
7(BHHT)	0.67
Plate	0.33

【 図 8 】

FIG. 8

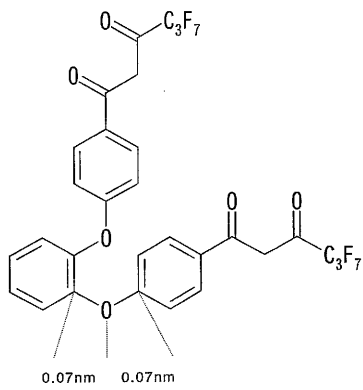


最小検出感度	
LDL (3SD)	pg/mL
TTA	NA
BFA	NA
1	NA
2	3.3
3	490.4
4	0.5
5	3.6
6	1.9
7(BHHT)	2.6

NA: not-available

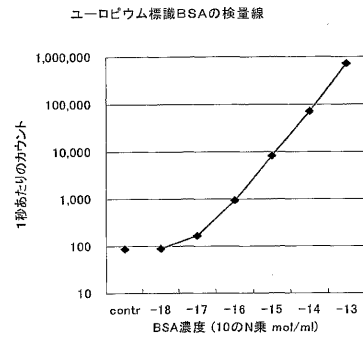
【図9】

FIG. 9



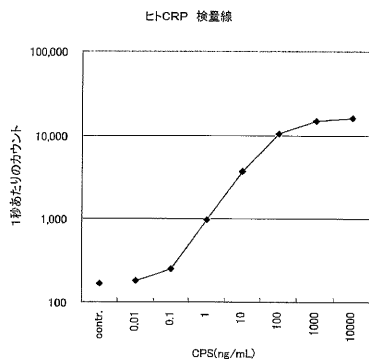
【図10】

FIG. 10



【図11】

FIG. 11



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
<i>C 0 7 C</i>	<i>323/22</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 C</i> 233/61	
<i>C 0 7 K</i>	<i>1/13</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 C</i> 323/22	
<i>C 0 9 K</i>	<i>11/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 1/13	
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/09</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 9 K</i> 11/06	
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/68</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 15/00	A
<i>G 0 1 N</i>	<i>21/78</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i> 1/68	A
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/533</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 21/78	C
<i>C 0 7 F</i>	<i>5/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/533	
			<i>C 0 7 F</i> 5/00	D

- (56) 参考文献 国際公開第 0 1 / 0 2 3 8 9 1 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 1 - 1 9 9 9 9 4 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 1 1 1 4 8 0 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 0 1 9 1 7 1 (J P , A)
 特開平 0 9 - 2 4 1 2 3 3 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 3 4 5 0 3 7 (J P , A)
 特表 2 0 0 0 - 5 1 0 8 1 6 (J P , A)
 特開平 1 1 - 0 0 1 6 2 5 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07C 49/00
 C07C 225/00
 C07C 233/00
 C07C 323/00
 C07K 1/00
 C09K 11/00
 C12N 15/00
 C12Q 1/00
 G01N 21/00
 G01N 33/00
 C07F 5/00
 CAplus(STN)
 REGISTRY(STN)

专利名称(译)	发光化合物和使用其的标记试剂		
公开(公告)号	JP4117248B2	公开(公告)日	2008-07-16
申请号	JP2003536189	申请日	2002-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立高新技术		
申请(专利权)人(译)	日立高新技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	日立高新技术公司		
[标]发明人	斎藤充弘 プレチエルノ		
发明人	斎藤 充弘 プレチ エルノ		
IPC分类号	C07C49/80 C07C49/813 C07C49/84 C07C225/22 C07C233/61 C07C323/22 C07K1/13 C09K11/06 C12N15/09 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/533 C07F5/00 C07C45/45 C07C45/46 C07C45/68 C07C45/71 C07D233/60 C07D333/24		
CPC分类号	C07D333/24 C07C45/455 C07C45/46 C07C45/68 C07C45/71 C07C49/80 C07C49/813 C07C49/84 C07C225/22 C07C323/22 C07C2601/14 G01N2458/40		
FI分类号	C07C49/80 C07C49/813 C07C49/84.B C07C49/84.G C07C225/22 C07C233/61 C07C323/22 C07K1/13 C09K11/06 C12N15/00.A C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/533 C07F5/00.D		
审查员(译)	前田彦		
优先权	2001312562 2001-10-10 JP		
其他公开文献	JPWO2003033447A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通式(1)表示的化合物： $R-Y-(X-Phe-COCH_2COCH_2)_m$ (式中，R是氢，烷基，苯基，或蛋白质，肽，氨基酸，能够结合基团至核酸或碱，Y是CH₂，碳环或杂环，X为O，S，NH，CH₂，OCH₂，CONH或NHCO，Phe是亚苯基，n是1至5的整数，m是1,2或3。包含该化合物和稀土离子的发光复合物;包含该化合物或发光复合物的标记试剂;和使用该标记试剂标记蛋白质，肽，氨基酸，核酸或碱的方法。

