

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-506673

(P2011-506673A)

(43) 公表日 平成23年3月3日(2011.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO9B 23/00 (2006.01)</b>	CO9B 23/00 CSPL	2GO43
<b>GO1N 21/64 (2006.01)</b>	GO1N 21/64 F	4HO56
<b>GO1N 33/533 (2006.01)</b>	GO1N 21/64 C	
<b>GO1N 33/574 (2006.01)</b>	GO1N 33/533	
<b>CO9K 11/06 (2006.01)</b>	GO1N 33/574 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 147 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-537989 (P2010-537989)  
 (86) (22) 出願日 平成20年12月12日 (2008.12.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年7月23日 (2010.7.23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/013698  
 (87) 国際公開番号 W02009/078970  
 (87) 国際公開日 平成21年6月25日 (2009.6.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/013, 956  
 (32) 優先日 平成19年12月14日 (2007.12.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507310363  
 バイオティウム, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 945  
 45, ハイワード, インベストメント  
 ブールバード 3423, スイート  
 8  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光性化合物

## (57) 【要約】

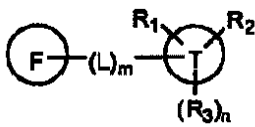
本発明は、蛍光性色素全般に関する。本発明は、広範な蛍光性色素及び同物を含むキットを提供し、多様な生体分子、細胞及び微生物を標識するのに適用しうる。また、本発明は、研究開発、法医学的同定、環境研究、疾病状態の診断、予後及び/又は治療において、上記蛍光性色素を使用する多様な方法も提供する。1つの実施形態において、本発明の蛍光性化合物を使用して調製した標識生体分子は、ダイマー形成を有意に低減することを示す。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 I の化合物であって、

## 【化 1 7 4】



Fは、フルオロフォアであり、

10

Tは、1以上の化学結合で形成された結合部位であり、3以上の別個の部位と結合しており、前記結合部位が約1～100原子を含み、

m及びnは、独立に0～20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であって、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1～100原子を含み、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のpは、各々1～20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のqは、各々0～20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のRは、各々独立に、

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

20

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -Hであって、少なくともR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のR一つが反応基であり、少なくともR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のR他の一つが水溶性高分子基である、式 I の化合物。

## 【請求項 2】

前記フルオロフォアが、キサントゲン色素、クマリン色素、ピレン色素又はシアニン色素である請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

前記フルオロフォアが、クマリン色素である請求項 1 に記載の化合物。

30

## 【請求項 4】

前記フルオロフォアが、ピレン色素である請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

前記フルオロフォアが、ローダミン色素である請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

前記水溶性高分子が、ポリアルキレンオキシドである請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキシドである請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

前記水溶性高分子が、炭化水素である請求項 1 に記載の化合物。

40

## 【請求項 9】

前記水溶性高分子が、ポリペプチドである請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 10】

前記水溶性高分子が、約300Daより大きい分子量を有する請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 11】

前記水溶性高分子が、約800Daより大きい分子量を有する請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 12】

前記水溶性高分子が、約800Da～約3000Daの範囲の分子量を有する請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 13】

50

前記反応基が、アミノ、スルフヒドリル又はヒドロキシ求核剤と共有結合を形成する請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

前記反応基が、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、ハロゲン置換ピリジン、ハロゲン置換ジアジン、ホスホラミダイト、マレイミド、アジリジン、スルホニルハライド、酸ハロゲン化物、ヒドロキスクシンイミジルエステル、ヒドロキシルホスクシンイミジルエステル、テトラフルオロフェノールエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、アルキン、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド、グリオキサール又はアルデヒドである請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 1 5】

前記化合物の最大蛍光励起波長が、約350～約1200nmの範囲である請求項 1 に記載の化合物。

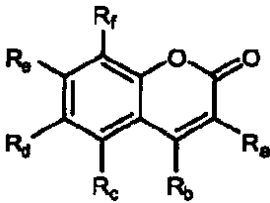
【請求項 1 6】

前記化合物の最大蛍光発光波長が、約360～約1250nmの範囲である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

前記フルオロフォアが、下記式のクマリンであって、

【化 1 7 5】



20

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  が、フルオロフォアと-(L)<sub>m</sub>-部位又は下記式の部位に結合している結合であって、

【化 1 7 6】



30

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  の残った部位が、各々独立に式  $(R)_p$ -(L)<sub>q</sub>- であって、

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  の R が、各々独立に、

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン

酸基、ホスホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -H であり、

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  の L が各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり

、約 1 ~ 100 原子を含み、

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  の p が各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数であり、

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$ ,  $R_e$  及び  $R_f$  の q が各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数である、

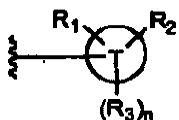
40

請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 8】

下記式が、

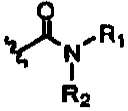
【化 1 7 7】



下記式を有する請求項 1 7 に記載の化合物。

50

【化 1 7 8】



【請求項 1 9】

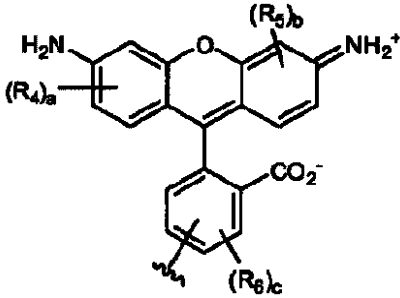
前記フルオロフォアが，1以上のスルホン酸基で置換されている請求項 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

前記フルオロフォアが下記式の化合物であって，

10

【化 1 7 9】



下記式がフルオロフォアと

20

【化 1 8 0】



-(L)<sub>m</sub>- 部位又は下記式の部位に結合し，

【化 1 8 1】



R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>が，各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であって，

R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のRが，各々独立に，

30

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基，

ii) 水溶性高分子基，

iii) アルキル基，トリフルオロアルキル基，ハロゲン基，スルホニル基，スルホン酸基，ホスホン酸基又はスルホンアミド基，若しくは，

iv) -Hであり，

R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のLが，各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり，約 1 ~ 1 0 0 原子を含み，

R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のpが，各々独立に 1 ~ 2 0 の範囲の整数であり，

R<sub>4</sub>，R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のqが，各々独立に 0 ~ 2 0 の範囲の整数であり，

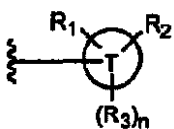
a，b，及びcが，各々独立に 0，1，2 又は 3 である，請求項 1 に記載の化合物。

40

【請求項 2 1】

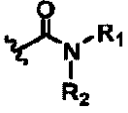
m が 0 であり，下記式が，

【化 1 8 2】



下記式を有する請求項 2 0 に記載の化合物。

【化 1 8 3】



【請求項 2 2】

R<sub>1</sub>が、水溶性高分子基を含み、R<sub>2</sub>が、反応基を含む請求項 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

R<sub>1</sub>が、ポリエチレングリコールを含む請求項 2 2 に記載の化合物。

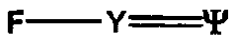
【請求項 2 4】

R<sub>2</sub>が、N-ヒドロキシこはく酸イミド基を含む請求項 2 2 に記載の化合物。

【請求項 2 5】

最大蛍光励起波長を有する化合物であって、前記化合物が、式IIの構造を有し、

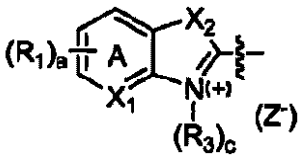
【化 1 8 4】



式II

Fは、下記式の構造を有する部位であり、

【化 1 8 5】

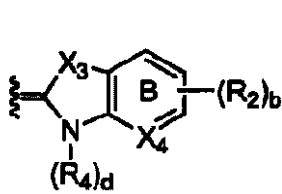


Z<sup>-</sup>は、対イオンであり、

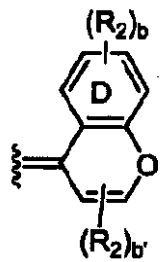
Yは、F及び 間で電子消失しうる架橋単位であり、

は、下記構造の1つを有する部位であって、

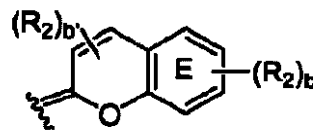
【化 1 8 6】



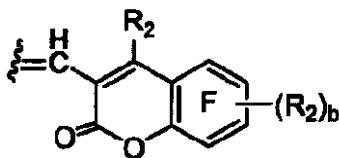
式 1



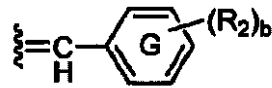
式 2



式 3



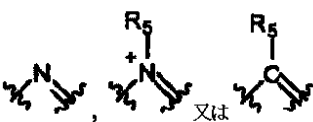
式 4



式 5

X<sub>1</sub>及びX<sub>4</sub>は、独立に下記であり、

【化 1 8 7】



X<sub>2</sub>及びX<sub>3</sub>は、独立に下記であり、

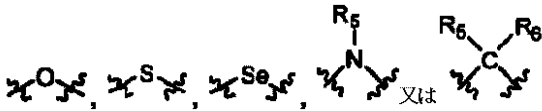
10

20

30

40

## 【化 1 8 8】



a及びbは、独立に0, 1, 2又は3であり、

b'は、0, 1又は2であり、

が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nmより小さい場合、 $R_5$ 及び $R_6$ は、各々独立に $(R)_p-(L)_q-$ で、 $R_5$ 及び $R_6$ は、置換環を形成するように結合せず、

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$ 及び $R_6$ は、各々独立に $(R)_p-(L)_q-$ であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q-$ のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q-$ のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1~100原子を含み、

各 $(R)_p-(L)_q-$ のpは、各々独立に約1~約20の範囲の整数であり、

$R_1$ 又は $R_2$ の各 $(R)_p-(L)_q-$ のqは、各々独立に0~約20の範囲の整数であり、

$R_3, R_4, R_5, R_6$ 又は $R_7$ の各 $(R)_p-(L)_q-$ のqは、各々独立に1~約20の範囲の整数であり、

cは0又は1であり、

dは0又は1であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q-$ のRの少なくとも1つは、反応性部位であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q-$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である、化合物。

## 【請求項 2 6】

少なくとも二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ が存在する場合、前記二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ は、1以上の $(R)_p-(L)_q-$ により置換されない又は置換された六員環を形成するように結合している請求項 2 5 に記載の化合物。

## 【請求項 2 7】

前記二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ は、六員環を形成するように結合している場合、形成された環が芳香族である請求項 2 6 に記載の化合物。

## 【請求項 2 8】

が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nm以上である、又は が式1以外である場合、 $R_5$ 及び $R_6$ は、各々独立に $(R)_p-(L)_q-$ 、又は $R_5$ 及び $R_6$ は、1以上の $(R)_p-(L)_q-$ により置換されない又は置換された環状部位を形成するように結合している請求項 2 5 に記載の化合物。

## 【請求項 2 9】

Yが下記であって、

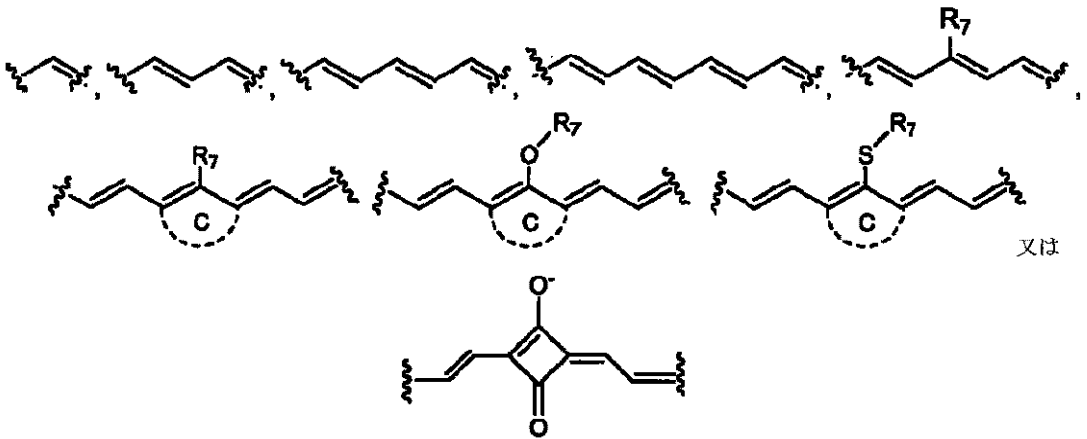
10

20

30

40

## 【化 1 8 9】



10

Cが存在する場合，Cは，五員環基又は六員環基であり，

R<sub>7</sub>は，(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であり，

各(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-のRは，各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基，

ii) 水溶性高分子基，

iii) アルキル基，アリール基，アルキルアミノ基，ジアルキルアミノ基，アルコキシ基，トリフルオロアルキル基，ハロゲン基，スルホニル基，スルホン酸基又はスルホンアミド基，

20

iv) -H，

前記化合物の各(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-のLは，各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり，約1～100原子を含み，

pは，各々独立に約1～約20の範囲の整数であり，

qは，各々独立に1～約20の範囲の整数である，請求項25に記載の化合物。

## 【請求項30】

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>のRの少なくとも1つは，荷電部位である請求項25に記載の化合物。

## 【請求項31】

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>のRの少なくとも1つが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む請求項25に記載の化合物。

30

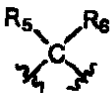
## 【請求項32】

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の各Rが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む請求項25に記載の化合物。

## 【請求項33】

X<sub>2</sub>及びX<sub>3</sub>が，独立に下記である請求項25に記載の化合物。

## 【化 1 9 0】

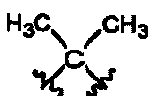


40

## 【請求項34】

X<sub>2</sub>及びX<sub>3</sub>が，独立に下記である請求項25に記載の化合物。

## 【化 1 9 1】



## 【請求項35】

前記水溶性高分子が，ポリアルキレンオキシドである請求項25に記載の化合物。

## 【請求項36】

50

前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキシドである請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 3 7】

前記水溶性高分子が、約300より大きい分子量を有する請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 3 8】

前記水溶性高分子が、約800より大きい分子量を有する請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 3 9】

前記水溶性高分子が、約800～約3000の範囲の分子量を有する請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 4 0】

二つの隣接する  $(R_1)_a$  及び結合している環A中の原子が、炭素環を形成するように結合している請求項 2 6 に記載の化合物。 10

【請求項 4 1】

前記炭素環が、芳香族である請求項 4 0 に記載の化合物。

【請求項 4 2】

二つの隣接する  $(R_2)_b$  及び結合している環B中の原子が、炭素環を形成するように結合している請求項 2 6 に記載の化合物。

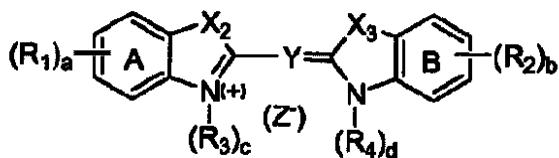
【請求項 4 3】

前記炭素環が、芳香族である請求項 4 2 に記載の化合物。

【請求項 4 4】

前記化合物が、下記式を有する請求項 2 5 に記載の化合物。 20

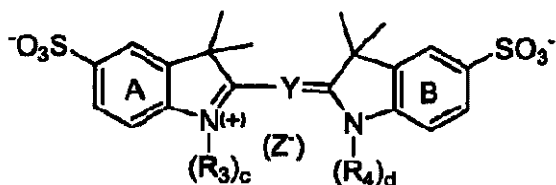
【化 1 9 2】



【請求項 4 5】

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 3】



Cが1であり、dが1であり、

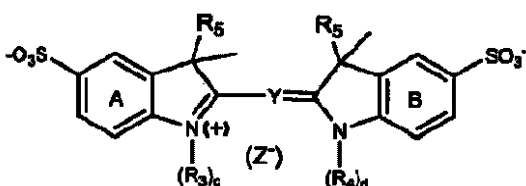
$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である、請求項 2 5 に記載の化合物。 40

【請求項 4 6】

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 4】



Cが1であり、dが1であり、

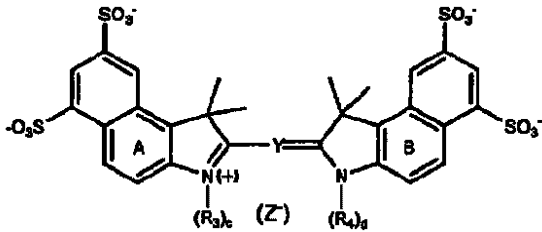
$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,

$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 水溶性高分子である, 請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 47】

前記化合物が, 下記式を有する化合物であって,

【化 195】



10

$C$  が 1 であり,  $d$  が 1 であり,

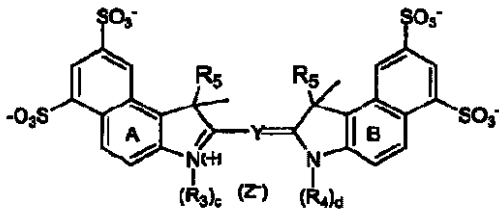
$R_3$  及び  $R_4$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,

$R_3$  及び  $R_4$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 水溶性高分子基である, 請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 48】

前記化合物が, 下記式を有する化合物であって,

【化 196】



20

$C$  が 1 であり,  $d$  が 1 であり,

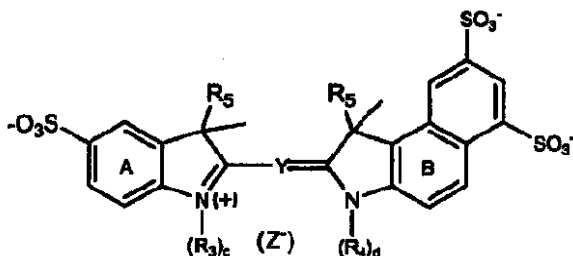
$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,

$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 水溶性高分子である, 請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 49】

前記化合物が, 下記式を有する化合物であって,

【化 197】



40

$C$  が 1 であり,  $d$  が 1 であり,

$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,

$R_3$ ,  $R_4$  及び  $R_5$  の  $R$  の少なくとも 1 つは, 水溶性高分子である, 請求項 25 に記載の化合物。

50

【請求項 5 0】

前記化合物の最大蛍光励起波長が、約350～約1200nmの範囲である請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 1】

前記化合物の最大蛍光発光波長が、約360～約1250nmの範囲である請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 2】

前記水溶性高分子が、ポリアルキレンオキシドである請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 3】

前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキシドである請求項 2 5 に記載の化合物。

10

【請求項 5 4】

前記水溶性高分子が、炭化水素である請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 5】

前記水溶性高分子が、ポリペプチドである請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 6】

前記水溶性高分子が、約300より大きい分子量を有する請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 7】

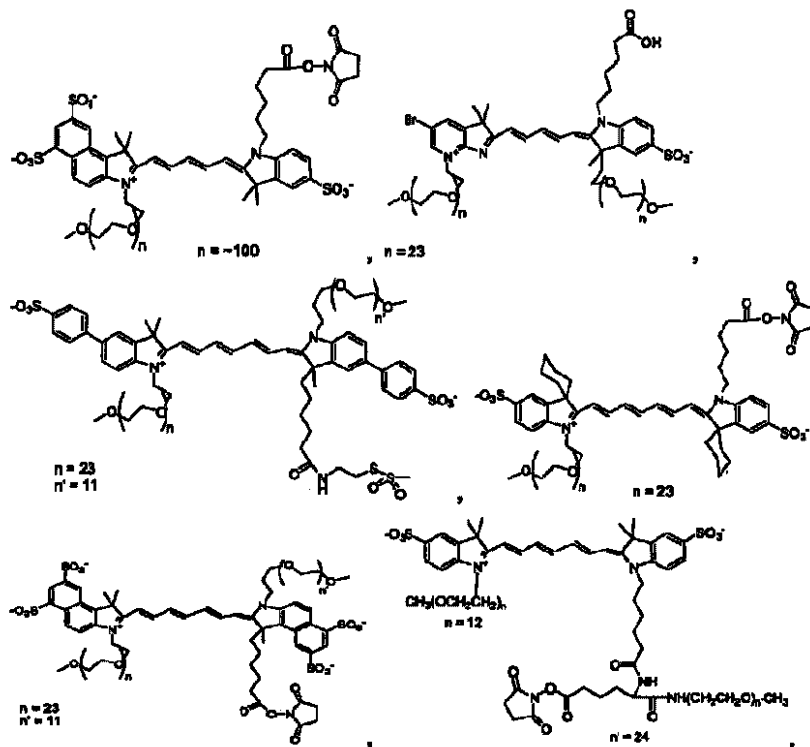
前記水溶性高分子が、約800より大きい分子量を有する請求項 2 5 に記載の化合物。

【請求項 5 8】

前記化合物が、下記である請求項 2 5 に記載の化合物。

20

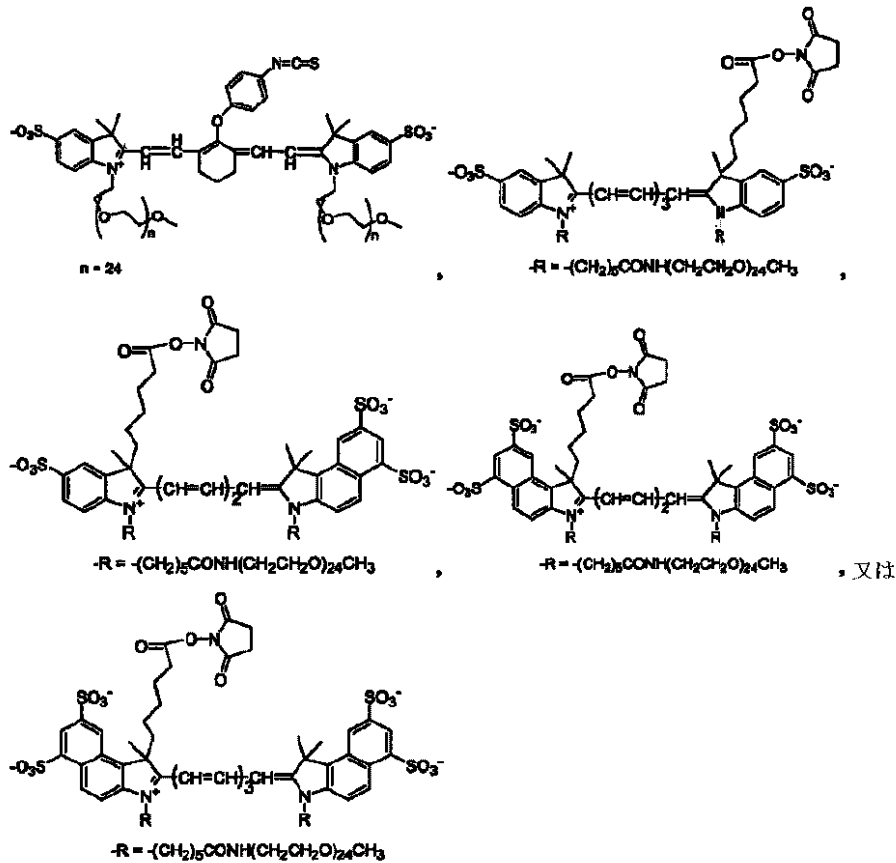
【化 1 9 8】



30

40

【化 1 9 9】



10

20

【請求項 5 9】

シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である，反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。

【請求項 6 0】

シアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である，反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。

30

【請求項 6 1】

前記色素が，非スピロ部位によって置換されている請求項 5 9 又は 6 0 に記載の置換シアニン色素。

【請求項 6 2】

結合剤が標的ポリペプチドに選択的に結合して錯体を形成し，該錯体の形成によって蛍光の信号雑音比が少なくとも100となる請求項 5 9 又は 6 0 の置換シアニン色素で標識された結合剤。

【請求項 6 3】

前記置換シアニン色素が，非スピロ置換基によって置換されている請求項 6 2 に記載の結合剤。

40

【請求項 6 4】

前記結合剤が，ポリペプチドである請求項 6 2 に記載の結合剤。

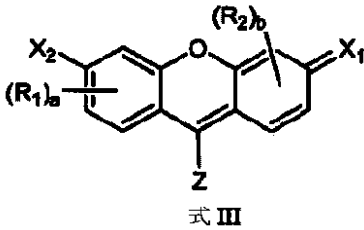
【請求項 6 5】

前記ポリペプチドが，抗体である請求項 6 3 に記載の結合剤。

【請求項 6 6】

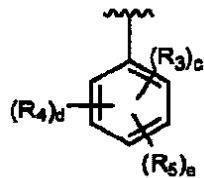
式 III の化合物であって，

【化 2 0 0】



Zが、-H、アルキル、-CF<sub>3</sub>、-CN又は下記式のラジカルであり、

【化 2 0 1】



X<sub>1</sub>が、=O、=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>又は=NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub><sup>+</sup>であり、

X<sub>2</sub>が、-OH、-NH<sub>2</sub>又は-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1~100原子を含み、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のpは、各々独立に1~20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のqは、各々独立に0~20の範囲の整数であり、

a、b、c、d及びeは、各々独立に0、1、2、3又は4であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のRの少なくとも1つは、反応性部位であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である、化合物。

【請求項 6 7】

R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>の少なくとも1つが、1以上の(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-により置換されない又は置換された5員環又は6員環を形成するように、隣接するR<sub>1</sub>又はR<sub>2</sub>及び隣接するR<sub>1</sub>又はR<sub>2</sub>が結合しているいずれかの環中の介在原子と結合可能である請求項 6 6 に記載の化合物。

【請求項 6 8】

前記R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>の少なくとも1つ及び隣接するR<sub>1</sub>又はR<sub>2</sub>が、5員環又は6員環を形成するように、結合可能である場合、前記環が不飽和である請求項 6 7 に記載の化合物。

【請求項 6 9】

前記R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>の少なくとも1つ及び隣接するR<sub>1</sub>又はR<sub>2</sub>が、5員環又は6員環を形成するように、結合可能である場合、前記環が飽和である請求項 6 7 に記載の化合物。

【請求項 7 0】

X<sub>1</sub>が、=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>である請求項 6 6 に記載の化合物。

【請求項 7 1】

X<sub>1</sub>が、=Oである請求項 6 6 に記載の化合物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 2】

$X_2$ が、-OHである請求項 6 6 に記載の化合物。

## 【請求項 7 3】

$X_2$ が、-NH<sub>2</sub>である請求項 6 6 に記載の化合物。

## 【請求項 7 4】

前記化合物の最大蛍光励起波長が、約450～約750nmの範囲である請求項 6 6 に記載の化合物。

## 【請求項 7 5】

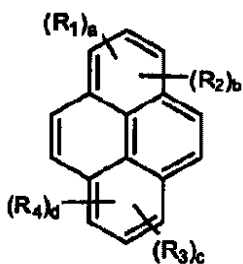
前記化合物の最大蛍光発光波長が、約470～約800nmの範囲である請求項 6 6 に記載の化合物。

10

## 【請求項 7 6】

式Vの化合物であって、

## 【化 2 0 2】



式 V

20

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ は、各々独立に $(R)_p-(L)_q-$ であり、

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、ホスホン酸基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1～100原子を含み、

30

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のpは、各々独立に1～20の範囲の整数であり、

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のqは、各々独立に0～20の範囲の整数であり、

a, b, c及びdは、各々独立に0, 1, 2又は3であり、

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、反応性部位であり、

$R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である、化合物。

## 【請求項 7 7】

i) 請求項 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載の化合物、ii) 緩衝剤、iii) 接合生成物を精製する材料又は装置、iv) 前記化合物の使用を説明する使用説明書、を含むキット。

40

## 【請求項 7 8】

請求項 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載した式の構造を有する標識を含む生体分子であって、前記式の前記少なくとも1つの反応性部位が、前記標識を前記生体分子に結合する反応を起こした生体分子。

## 【請求項 7 9】

前記生体分子が、ポリヌクレオチドを含む請求項 7 8 に記載した標識を含む生体分子。

## 【請求項 8 0】

前記生体分子が、ポリペプチドを含む請求項 7 8 に記載した標識を含む生体分子。

## 【請求項 8 1】

前記ポリペプチドが、更に抗原結合部位を含む請求項 8 0 に記載の生体分子。

50

- 【請求項 8 2】  
前記ポリペプチドが、完全免疫グロブリンである請求項 8 0 に記載の生体分子。
- 【請求項 8 3】  
前記ポリペプチドが、Fabフラグメントである請求項 8 0 に記載の生体分子。
- 【請求項 8 4】  
請求項 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載した式の構造を有する標識を含む免疫グロビンであって、前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が、前記標識を前記免疫グロビンに結合する反応を起こし、前記免疫グロビンが、がん細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である免疫グロビン。
- 【請求項 8 5】 10  
前記抗体が、erb2と結合する請求項 8 4 に記載の免疫グロビン。
- 【請求項 8 6】  
請求項 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載の化合物と基質生体分子とを、前記化合物と前記基質生体分子間を架橋するのに十分な条件で、反応させる工程を備える標識生体分子の調製方法。
- 【請求項 8 7】  
前記基質生体分子が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭化水素、脂質又はこれらの組合せである請求項 8 6 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】 20  
前記基質生体分子が、ポリヌクレオチドである請求項 8 7 に記載の方法。
- 【請求項 8 9】  
集団内で隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する、集団内の細胞を標識する方法であって、前記方法は、前記生体分子が細胞を表示する結合相手と結合する標的部位を含み、前記部位によって集団内の隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する、細胞を請求項 7 8 に記載の生体分子と接触させる工程を備える方法。
- 【請求項 9 0】 30  
さらに細胞をイメージングする工程を備える方法であって、  
前記イメージング工程が、  
i) 細胞へ励起波長を当てる工程と、  
ii) 細胞から発光された蛍光を検出する工程と、  
を備える請求項 8 9 に記載の方法。
- 【請求項 9 1】  
インビトロで標識が起こる請求項 8 9 に記載の方法。
- 【請求項 9 2】  
インビボで標識が起こる請求項 8 9 に記載の方法。
- 【請求項 9 3】  
ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が685nm以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリン。
- 【請求項 9 4】 40  
ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が750nm以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリン。
- 【請求項 9 5】  
前記免疫グロビンが、前記蛍光性化合物との接合における標的への結合特異性を保持する請求項 9 3 又は 9 4 に記載の免疫グロビン。
- 【請求項 9 6】  
前記免疫グロビンが、がん細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である請求項 9 5 に記載の免疫グロビン。
- 【請求項 9 7】  
前記抗体が、erb2と結合する請求項 9 6 に記載の免疫グロビン。
- 【請求項 9 8】 50

前記蛍光性化合物が、請求項1, 25, 59, 60又は66に記載の化合物である請求項93又は94に記載の免疫グロビン。

【請求項99】

蛍光性化合物によって標識されたポリペプチドであって、請求項1, 25, 59, 60, 66又76に記載の化合物である蛍光性化合物を欠く対応するポリペプチドの半減期よりも短くない血清半減期を示すポリペプチド。

【請求項100】

前記ポリペプチド及び結合剤を含む錯体の形成工程を備えるポリペプチドの標識方法であって、前記結合剤が、請求項1, 25, 59, 60, 66又は76に記載した式の構造を有する蛍光標識を含み、前記式の前記少なくとも1つの反応性部位が、前記標識を前記結合剤に結合する反応を起こしたポリペプチドの標識方法。

10

【請求項101】

前記結合剤が抗体である請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記錯体が、(a) 前記ポリペプチドと結合する一次抗体、及び、(b)二次抗体に対する結合能力を示して二次抗体として機能する結合剤を含む請求項101に記載の方法。

【請求項103】

標識が、固体基質上で起こる請求項102に記載の方法。

【請求項104】

ポリペプチドを細胞内で標識する請求項102に記載の方法。

20

【請求項105】

前記錯体が、約100より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される請求項102に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

【請求項106】

前記錯体が、約250より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される請求項102に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

30

【請求項107】

前記錯体が、約270より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される請求項102に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

【請求項108】

前記錯体が、標識度がDyLight 680(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する請求項102に記載の方法。

【請求項109】

前記錯体が、標識度がCy5.5(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する請求項102に記載の方法。

40

【請求項110】

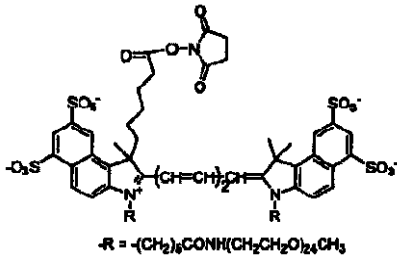
前記錯体が、標識度がAlexa Fluor 680(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する請求項102に記載の方法。

【請求項111】

請求項25に記載した式の構造を有する前記標識が、下記構造を有する化合物である請求項108, 109, 110のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【化 2 0 3】



## 【請求項 1 1 2】

各錯体が、635nm又は633nmで励起される請求項 1 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 3】

各錯体が、同一タンパク質濃度で存在する請求項 1 1 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本出願は、2007年12月14日に出版された米国仮特許出願第61/013,956号の優先権を主張し、参照することによって全体をここに組み込む。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

蛍光性色素は、生物学的研究及び医学的診断において広く使用されている。蛍光性色素は、従来の放射性物質より優れており、なぜなら、蛍光性色素は、典型的には検出するのに十分な感度があり、高価でなく、より低毒性だからである。特に、識別可能な色範囲を持つフルオロフォアの多様性により、多重生体標的を並行して検出することが可能な多重アッセイを実施でき、より実践的である。多重標的を並行して視覚化する能力が、インビトロ及びインビボでの異なった生体標的間の空間的及び時間的な関係の描写においてしばしば要求される。加えて、広範囲の蛍光性色素の生成は、高処理、自動化アッセイの実施に新たな道を開き、それゆえ、アッセイの単価を劇的に引き下げる。更に、蛍光性色素の低毒性は、インビトロでの取り扱いを容易にし、また、インビボでの生命活動のイメージングをより安全にする。

## 【0 0 0 3】

蛍光性色素は多様な利点があるにも関わらず、従来の色素には深刻な制限がある。例えば、従来の蛍光性色素は、典型的には有効な色素の輝度を現象させる現象として知られる色素間消光をする傾向がある。標識目標、例えば、タンパク質又はDNAのような生体分子の輝度を最大化するため、多重色素分子と与えられた標的を結合することは通常の実践である。従来の蛍光性色素の多くでは、標識目標の蛍光強度は、しばしば結合色素分子数と直接比例せず、例えば、標的に結合した多重色素間の消光によって、予測強度よりかなり低い。かかる消光の効果は、部分的には、非蛍光性色素ダイマーの形に結びつく、結合色素分子間の物理的な相互作用に起因する。ダイマー形成は疎水性相互作用によって推進される。なぜなら、多くの旧来の蛍光性色素、様々なローダミン色素及びシアニン色素などは高度に疎水性の芳香族化合物であり、これら常用の色素はとりわけ標識生体分子上にダイマーを形成する傾向がある。スルホン酸基を色素に付加すると、ダイマー形成の低減が見られる。例えば、特許文献1、特許文献2及び特許文献3並びに非特許文献1を参照。しかしながら、スルホン化はダイマー形成を低減するが、また、生体分子内に負電荷を導入し、標的分子の生命活動を乱すリスクを増大させる。その上、インビボで被験者に使用する場合、スルホン酸のみで置換した色素はより短い血清での半減期を示すであろう。

## 【0 0 0 4】

従来の蛍光性色素におけるもう1つの制限要因は、個々の蛍光性基に内因する低蛍光輝度である。かかる特性は、一般に蛍光性基の蛍光量子収率によって決まる。低い蛍光量子

10

20

30

40

50

収率は、通常、電子エネルギーが光の代わりに熱に変換する励起電子状態から分子の振動及び回転状態へのエネルギー移動による。蛍光性基の蛍光量子収率を改善する一手法は、色素構造を剛直化して、色素の振動及び回転モードを制限することである。例えば、二個のベンズアゾリウム窒素原子窒素原子を連結する二本の炭素鎖によって剛直化したモノメチンシアニン色素に関して記載がある特許文献4及び特許文献5参照。同様に、特許文献6では、三つの融合環システムへの架橋部位の組込みによって、トリメチンシアニン色素が剛直化された。剛直化シアニン色素は、すべて、非剛直化の対照色素と比較して、量子収率が有意に改善した。しかしながら、他の望ましい特性が犠牲になって量子収率は改善した。例えば、相対的に複雑な構造のために、かかる剛直化色素は、典型的には通常のシアニン色素より数段多い合成段数を取り、しばしば低収率である。高度に剛直化した色素は、タンパク質上に凝集するより高度に傾向するも見られうる。例えば、剛直化シアニン色素は、非剛直化シアニンよりもずっと低い標識度で使用した場合であってもタンパク質上でダイマーを形成することが示された(非特許文献2)。更に、剛直化トリメチンシアニン色素は、通常非剛直化トリメチンシアニン色素と比べて、光安定性が有意に低下することが示された(例えば、特許文献6参照)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,268,486号明細書

【特許文献2】米国特許第6,977,305号明細書

20

【特許文献3】米国特許第6,130,101号明細書

【特許文献4】米国特許第5,981,747号明細書

【特許文献5】米国特許第5,986,093号明細書

【特許文献6】米国特許第6,133,445号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Panchuk-Voloshinaら J Histochem. Cytochem. 47(9), 1179 (1999)

【非特許文献2】Cooperら Journal of Fluorescence 14, 145(2004)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、多様な用途において広範囲の分子へ簡易で効果的な標識しうる改善された組成物及び方法に対する相当の要望が存続している。本発明は、かかる課題に取り組み、さらなる利点を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

従って、本発明は、以下の特性のいずれか又は全てを有する蛍光性化合物を提供する。1つの実施形態において、本発明の蛍光性化合物を使用して調製した標識生体分子は、ダイマー形成を有意に低減することを示す。他の実施形態において、本発明の化合物及び標識生体分子は、高い水溶性、改善した蛍光量子収率、改善した光安定性、比較的簡単な合成、標識結合剤の改善した特異性、及び/又は、改善したインビボでの半減期等の他の望ましい特性を示す。

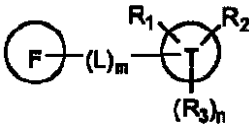
40

【0009】

本発明は、式Iの化合物を提供する。

【0010】

## 【化1】



Fは、フルオロフォアであり、

Tは、1以上の化学結合で形成された結合部位であり、3以上の別個の部位と結合しており、前記結合部位が約1~100原子を含み、

m及びnは、独立に0~20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であって、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、安定な部位であるような基から選択された約1~100原子を含み、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のpは、各々1~20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のqは、各々0~20の範囲の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のRは、各々独立に、

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -Hであって、少なくともR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のR一つが反応基であり、少なくともR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>のR他の一つが水溶性高分子基である。

## 【0011】

いくつかの実施形態において、前記フルオロフォアが、キサンテン色素、クマリン色素、ピレン色素又はシアニン色素である。前記水溶性高分子が、例えば、ポリエチレンオキシドのようなポリアルキレンオキシドであってもよい。あるいは、前記水溶性高分子基が、炭化水素又はポリペプチドであってもよい。前記水溶性高分子基が、約300Daより大きい分子量、あるいは、約800Daより大きい分子量又は約800Da~約3000Daの範囲の分子量を有してもよい。前記反応基が、アミノ、スルフヒドリル又はヒドロキシ求核剤と共有結合を形成してもよい。例えば、前記反応基が、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、ハロゲン置換ピリジン、ハロゲン置換ジアジン、ホスホラミダイト、マレイミド、アジリジン、スルホニルハライド、酸ハロゲン化物、ヒドロキシスクシンイミジルエステル、ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル、テトラフルオロフェノールエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、アルキン、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド、グリオキサール又はアルデヒドであってもよい。

## 【0012】

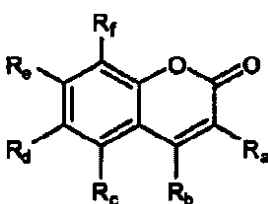
本発明の化合物の蛍光励起波長が、約350~約1200nmの範囲であってもよく、一方、前記化合物の蛍光発光波長が、約360~約1250nmの範囲であってもよい。

## 【0013】

一つの実施形態において、式1の化合物が、下記式のクマリンであるフルオロフォアを含み、

## 【0014】

## 【化2】



R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>e</sub>及びR<sub>f</sub>が、フルオロフォアと-(L)<sub>m</sub>-部位又は下記式の部位に結合

している結合であって、

【0015】

【化3】

Ⓣ

$R_a, R_b, R_c, R_d, R_e$  及び  $R_f$  の残った部位が、各々独立に式  $(R)_p-(L)_q$  - であって、

$R_a, R_b, R_c, R_d, R_e$  及び  $R_f$  の  $R$  が、各々独立に、

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子のラジカル、

10

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -H であり、

$R_a, R_b, R_c, R_d, R_e$  及び  $R_f$  の  $L$  が各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、安定な部位であるような基から選択された約 1 ~ 100 の原子を含み、

$R_a, R_b, R_c, R_d, R_e$  及び  $R_f$  の  $p$  が各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数であり、

$R_a, R_b, R_c, R_d, R_e$  及び  $R_f$  の  $q$  が各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数である。

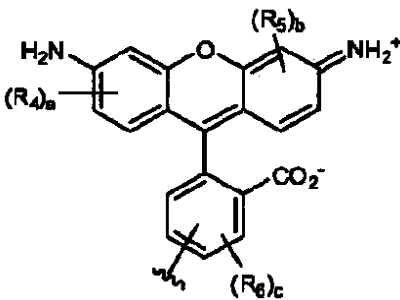
【0016】

他の実施形態において、式 I の化合物が、下記式のローダミンであるフルオロフォアを含み、

20

【0017】

【化4】



30

下記式が前記フルオロフォアと

【0018】

【化5】



前記  $-(L)_m$  - 部位又は下記式の部位に結合し、

【0019】

【化6】

40

Ⓣ

$R_4, R_5$  及び  $R_6$  が、各々独立に  $(R)_p-(L)_q$  - であって、

$R_4, R_5$  及び  $R_6$  の  $R$  が、各々独立に、

i) 反応性対と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -H であり、

$R_4, R_5$  及び  $R_6$  の  $L$  が、各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、約 1 ~ 10

50

0 原子を含み、

$R_4, R_5$  及び  $R_6$  の  $p$  が、各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数であり、

$R_4, R_5$  及び  $R_6$  の  $q$  が、各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数であり、

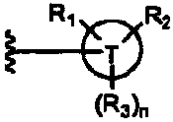
$a, b,$  及び  $c$  が、各々独立に 0, 1, 2 又は 3 である。

【0020】

関連する実施形態において、下記は、

【0021】

【化7】

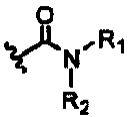


10

下記式を有する。

【0022】

【化8】



一部の実施形態において、 $R_1$  が、水溶性高分子基を含み、 $R_2$  が、反応基を含む。例えば、 $R_1$  は、ポリエチレングリコールを含む。他の実施形態において、 $R_2$  が、N-ヒドロキシこはく酸イミド基を含む。

20

【0023】

また、他の実施形態において、前記フルオロフォアが、1以上のスルホン酸基で置換されている。

【0024】

他の実施形態において、本発明は、最大蛍光励起波長を有する化合物であって、前記化合物が、式IIの構造を有する化合物を提供する。

【0025】

【化9】



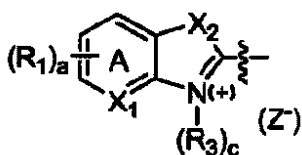
式II

30

Fは、下記式の構造を有する部位である。

【0026】

【化10】



40

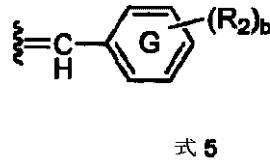
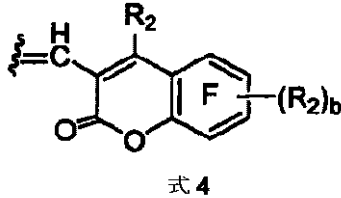
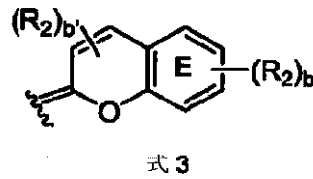
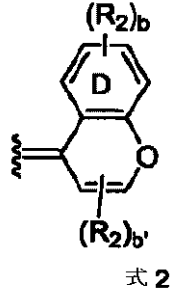
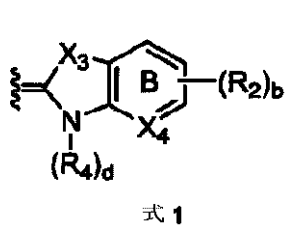
Zは、対イオンであり、Yは、F及び 間で電子消失しうる架橋単位である。

【0027】

は、下記構造の1つを有する部位である。

【0028】

## 【化 1 1】

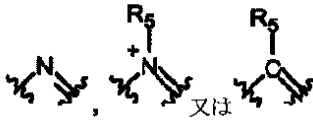


10

$X_1$  及び  $X_4$  は、独立に下記である。

【 0 0 2 9 】

【化 1 2】

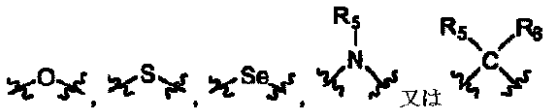


20

$X_2$  及び  $X_3$  は、独立に下記である。

【 0 0 3 0 】

【化 1 3】



30

$a$  及び  $b$  は、独立に 0, 1, 2 又は 3 である。

【 0 0 3 1 】

$b'$  は、0, 1 又は 2 である。

【 0 0 3 2 】

が式 I であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が 660nm より小さい場合、 $R_5$  及び  $R_6$  は、各々独立に  $(R)_p-(L)_q$ - で、 $R_5$  及び  $R_6$  は、置換環を形成するように結合しない。

【 0 0 3 3 】

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  及び  $R_6$  は、各々独立に  $(R)_p-(L)_q$ - である。

【 0 0 3 4 】

前記化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ - の R は、各々独立に

40

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、である。

【 0 0 3 5 】

前記化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ - の L は、各々独立に 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、約 1 ~ 100 原子を含む。

【 0 0 3 6 】

各  $(R)_p-(L)_q$ - の p は、各々独立に約 1 ~ 約 20 の範囲の整数である。

50

## 【0037】

$R_1$ 又は $R_2$ の各 $(R)_p-(L)_q$ -の $q$ は、各々独立に0～約20の範囲の整数である。

## 【0038】

$R_3, R_4, R_5, R_6$ 又は $R_7$ の各 $(R)_p-(L)_q$ -の $q$ は、各々独立に1～約20の範囲の整数である。

## 【0039】

$c$ は0又は1であり、 $d$ は0又は1である。

## 【0040】

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -の $R$ の少なくとも1つは、反応性部位である。

## 【0041】

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -の $R$ の少なくとも1つは、水溶性高分子である。

## 【0042】

一部の実施形態において、本発明は、少なくとも二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ が存在する場合、前記二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ は、1以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された六員環を形成するように結合している式IIの化合物を提供する。一部の実施形態において、本発明は、前記二つの隣接する $R_1$ 及び/又は二つの隣接する $R_2$ は、六員環を形成するように結合している場合、形成された環が芳香族である式IIの化合物を提供する。

## 【0043】

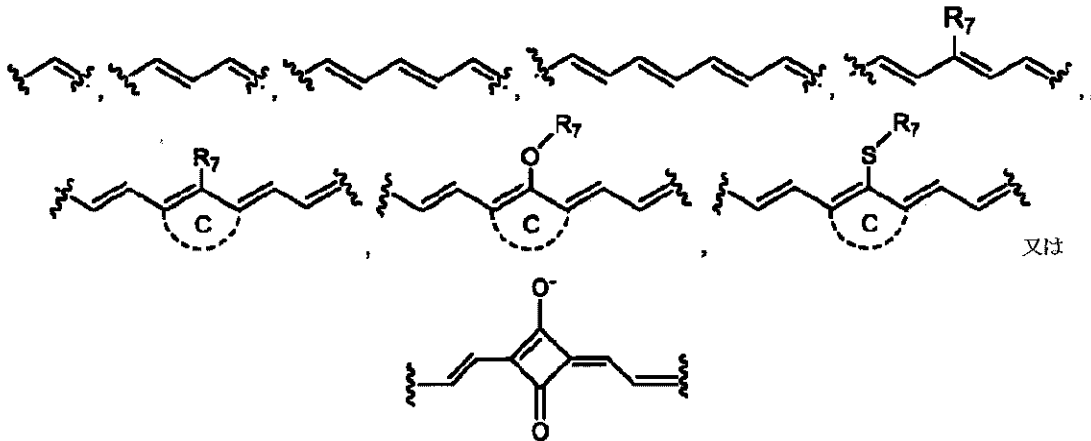
一部の実施形態における式IIの化合物において、 $\lambda$ が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nm以上である、又は $\lambda$ が式1以外である場合、 $R_5$ 及び $R_6$ は、各々独立に $(R)_p-(L)_q$ -、又は $R_5$ 及び $R_6$ は、1以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された環状部位を形成するように結合している。

## 【0044】

一部の実施形態における式IIの化合物において、 $Y$ が下記であって、

## 【0045】

## 【化14】



$C$ が存在する場合、 $C$ は、五員環基又は六員環基であり、

$R_7$ は、 $(R)_p-(L)_q$ -であり、

各 $(R)_p-(L)_q$ -の $R$ は、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -の $L$ は、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部

位であり，約1～100原子を含み，

pは，各々独立に約1～約20の範囲の整数であり，

qは，各々独立に1～約20の範囲の整数である。

【0046】

一部の実施形態における式IIの化合物において， $R_1$ 及び $R_2$ のRの少なくとも1つは，荷電部位である。他の実施形態において， $R_1$ 及び $R_2$ のRの少なくとも1つが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む。更に他の実施形態において， $R_1$ 及び $R_2$ の各Rが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む。

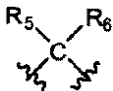
【0047】

一部の実施形態における式IIの化合物において， $X_2$ 及び $X_3$ が，独立に下記である。

10

【0048】

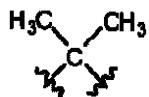
【化15】



一部の実施形態における式IIの化合物において， $X_2$ 及び $X_3$ が，独立に下記である。

【0049】

【化16】



20

一部の実施形態における式IIの化合物において，前記水溶性高分子が，ポリアルキレンオキシドである。他の実施形態において，前記水溶性高分子が，ポリエチレンオキシドである。一部の実施形態において，前記水溶性高分子が，約300より大きい分子量を有する。他の実施形態において，前記水溶性高分子が，約800より大きい分子量を有する。他の実施形態において，前記水溶性高分子が，約800～約3000の範囲の分子量を有する。

【0050】

一部の実施形態における式IIの化合物において，二つの隣接する $(R_1)_a$ 及び結合している環A中の原子が，炭素環を形成するように結合している。一部の実施形態において，前記炭素環が，芳香族である。他の実施形態において，二つの隣接する $(R_2)_b$ 及び結合している環B中の原子が，炭素環を形成するように結合している。一部の実施形態において，前記炭素環が，芳香族である。

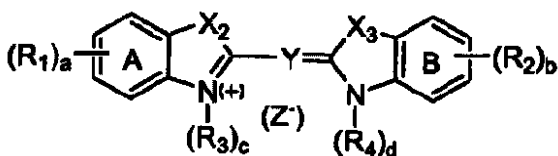
30

【0051】

一部の実施形態における式IIの化合物において，前記化合物が，下記式を有する。

【0052】

【化17】

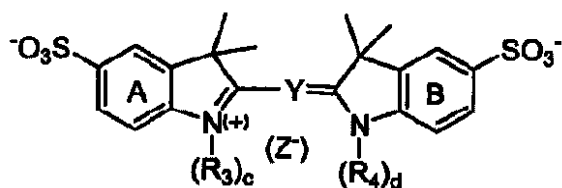


40

一部の実施形態における式IIの化合物において，前記化合物が，下記式を有する化合物であって，

【0053】

【化18】



Cが1であり、dが1であり、

$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

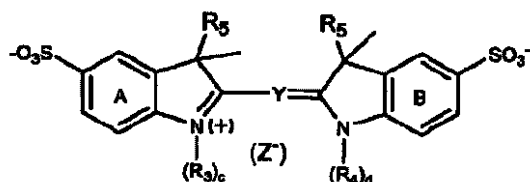
$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である。

【0054】

一部の実施形態における式IIの化合物において、前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【0055】

【化19】



Cが1であり、dが1であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

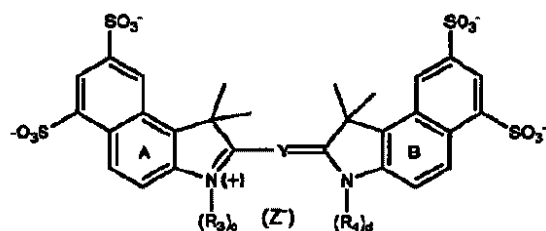
$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である。

【0056】

一部の実施形態における式IIの化合物において、前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【0057】

【化20】



Cが1であり、dが1であり、

$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

$R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である。

【0058】

一部の実施形態における式IIの化合物において、前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【0059】

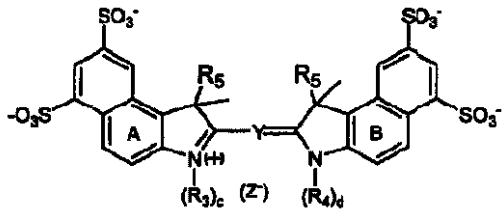
10

20

30

40

## 【化 2 1】



Cが1であり、dが1であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である。

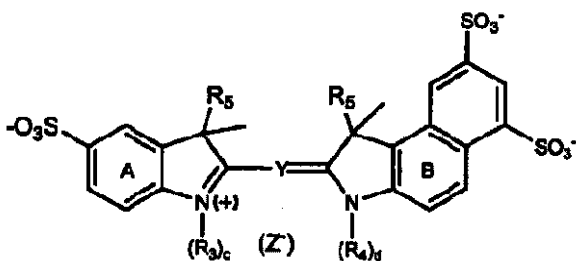
10

## 【0060】

一部の実施形態における式IIの化合物において、前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

## 【0061】

## 【化 2 2】



20

Cが1であり、dが1であり、

$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

$R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である。

## 【0062】

一部の実施形態において、前記化合物の最大蛍光励起波長が、約350～約1200nmの範囲である。他の実施形態において、前記化合物の最大蛍光発光波長が、約360～約1250nmの範囲である。

30

## 【0063】

一部の実施形態において、前記水溶性高分子が、ポリアルキレンオキシドである。他の実施形態において、前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキシドである。更に他の実施形態において、前記水溶性高分子が、炭化水素である。他の実施形態において、前記水溶性高分子が、ポリペプチドである。一部の実施形態において、前記水溶性高分子が、約300より大きい分子量を有する。他の実施形態において、前記水溶性高分子が、約800より大きい分子量を有する。

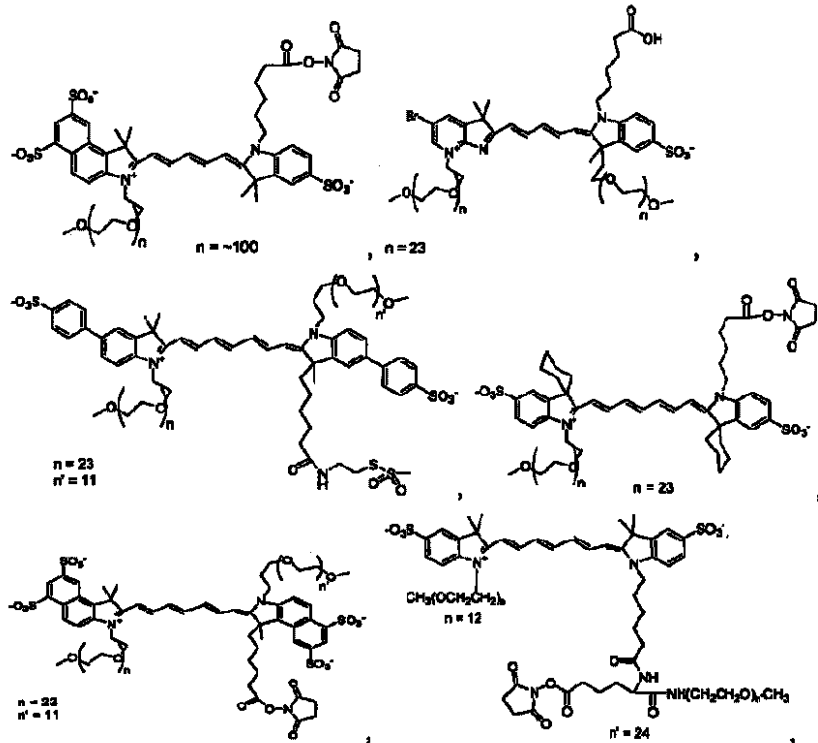
## 【0064】

一部の実施形態における式IIの化合物において、前記化合物が、下記である。

40

## 【0065】

【化23】

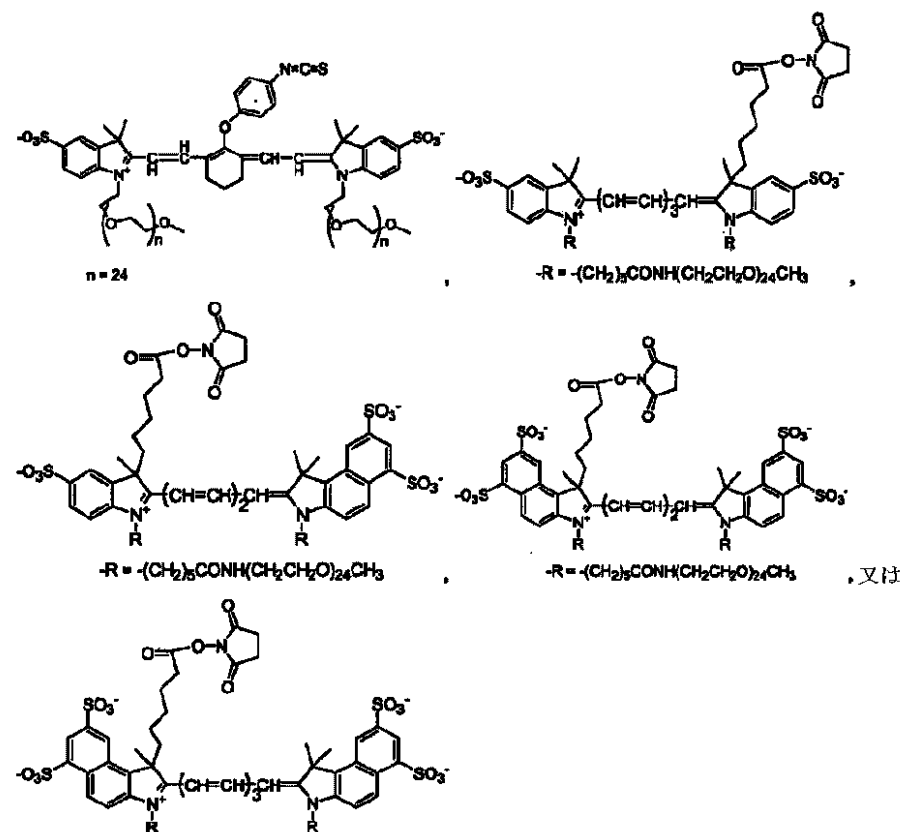


10

20

【0066】

【化24】



30

40

他の実施形態において、シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。一部の実施形態において、請求項の置換シアニン色素、すなわち、前記色素は、非スピロ部位によって置換されている。

【0067】

50

更なる実施形態において、シアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。一部の実施形態において、請求項の置換シアニン色素、すなわち前記色素が、非スピロ部位によって置換されている。

【0068】

更に他の実施形態において、本発明は、結合剤が標的ポリペプチドに選択的に結合して錯体を形成し、該錯体の形成によって蛍光の信号雑音比が少なくとも100となる本発明の置換シアニン色素で標識された結合剤を提供する。一部の実施形態において、前記置換シアニン色素が、非スピロ置換基によって置換されている。一部の実施形態において、前記結合剤が、ポリペプチドである。他の実施形態において、前記ポリペプチドが、抗体である。

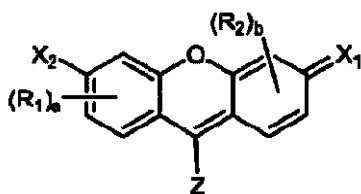
10

【0069】

他の実施形態において、本発明は式IIIの化合物を提供する。

【0070】

【化25】



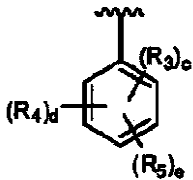
式III

20

Zが、-H、アルキル、-CF<sub>3</sub>、-CN又は下記式のラジカルである。

【0071】

【化26】



30

X<sub>1</sub>が、=O、=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>又は=NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub><sup>+</sup>である。

【0072】

X<sub>2</sub>が、-OH、-NH<sub>2</sub>又は-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>である。

【0073】

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-である。

【0074】

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

40

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -Hである。

【0075】

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1~100原子を含む。

【0076】

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のpは、各々独立に1~20の範囲の整数であり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>のqは、各々独立に0~20の範囲の整数である。

50

## 【 0 0 7 7 】

a, b, c, d及びeは, 各々独立に 0, 1, 2, 3 又は 4 である。

## 【 0 0 7 8 】

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$  及び  $R_9$  の R の少なくとも 1 つは, 反応性部位である。

## 【 0 0 7 9 】

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$  及び  $R_9$  の R の少なくとも 1 つは, 水溶性高分子基である。

## 【 0 0 8 0 】

式 III の化合物の一部の実施形態において,  $R_6, R_7, R_8$  及び  $R_9$  の少なくとも 1 つが, 1 以上の  $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された 5 員環又は 6 員環を形成するように, 隣接する  $R_1$  又は  $R_2$  及び隣接する  $R_1$  又は  $R_2$  が結合しているいずれかの環中の介在原子と結合可能である。一部の実施形態において, 前記  $R_6, R_7, R_8$  及び  $R_9$  の少なくとも 1 つ及び隣接する  $R_1$  又は  $R_2$  が, 5 員環又は 6 員環を形成するように, 結合可能である場合, 前記環が不飽和である。他の実施形態において, 前記  $R_6, R_7, R_8$  及び  $R_9$  の少なくとも 1 つ及び隣接する  $R_1$  又は  $R_2$  が, 5 員環又は 6 員環を形成するように, 結合可能である場合, 前記環が飽和である。

10

## 【 0 0 8 1 】

式 III の化合物の一部の実施形態において,  $X_1$  が,  $=NH_2^+$  である。他の実施形態において,  $X_1$  が,  $=O$  である。更に他の実施形態において,  $X_2$  が,  $-OH$  である。一部の実施形態において,  $X_2$  が,  $-NH_2$  である。

20

## 【 0 0 8 2 】

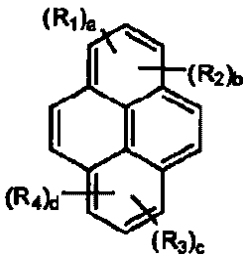
一部の実施形態において, 前記化合物の最大蛍光励起波長が, 約 450 ~ 約 750 nm の範囲である。他の実施形態において, 前記化合物の最大蛍光発光波長が, 約 470 ~ 約 800 nm の範囲である。

## 【 0 0 8 3 】

他の実施形態において, 本発明は, 式 V の化合物を提供する。

## 【 0 0 8 4 】

## 【 化 2 7 】



式 V

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  は, 各々独立に  $(R)_p-(L)_q$ - である。

## 【 0 0 8 5 】

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の R は, 各々独立に

- i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,
- ii) 水溶性高分子基,
- iii) アルキル基, トリフルオロアルキル基, ハロゲン基, ホスホン酸基, スルホン酸基又はスルホンアミド基,
- iv) -H である。

40

## 【 0 0 8 6 】

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の L は, 各々独立に 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり, 約 1 ~ 100 原子を含む。

## 【 0 0 8 7 】

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の p は, 各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数である。

## 【 0 0 8 8 】

50

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の  $q$  は、各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数である。

【0089】

$a, b, c$  及び  $d$  は、各々独立に 0, 1, 2 又は 3 である。

【0090】

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の  $R$  の少なくとも 1 つは、反応性部位である。

【0091】

$R_1, R_2, R_3$  及び  $R_4$  の  $R$  の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である。

【0092】

更なる実施形態において、本発明は、i) 請求項 1, 25, 59, 60, 66 又は 76 に記載の化合物、ii) 緩衝剤、iii) 接合生成物を精製する材料又は装置、iv) 前記化合物の使用を説明する使用説明書、を含むキットを提供する。

10

【0093】

他の実施形態において、本発明は、式 I, II, III, IV, V に記載した式の構造を有する標識を含む生体分子、シアニン色素の最大蛍光励起波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素、又はシアニン色素の最大吸収波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素であって、前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が、前記標識を前記生体分子に結合する反応を起こした生体分子を提供する。一部の実施形態において、前記生体分子が、ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、前記生体分子が、ポリペプチドを含む。一部の実施形態において、前記ポリペプチドが、更に抗原結合部位を含む。一部の実施形態において、前記ポリペプチドが、完全免疫グロブリンである。一部の実施形態において、前記ポリペプチドが、Fab フラグメントである。

20

【0094】

他の実施形態において、本発明は、式 I, II, III, IV, V に記載した式の構造を有する標識を含む免疫グロブリン、シアニン色素の最大蛍光励起波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素、又はシアニン色素の最大吸収波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素であって、前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が、前記標識を前記免疫グロブリンに結合する反応を起こし、前記免疫グロブリンが、ガン細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である免疫グロブリンを提供する。一部の実施形態において、前記抗体が、erb2 と結合する。

30

【0095】

他の実施形態において、本発明は、式 I, II, III, IV, V に記載の化合物、シアニン色素の最大蛍光励起波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素、又はシアニン色素の最大吸収波長が 660nm 以上である、反応基及び 1 以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素であって、基質生体分子とを、前記化合物と前記基質生体分子間を架橋するのに十分な条件で、反応させる工程を備える標識生体分子の調製方法を提供する。一部の実施形態において、前記基質生体分子が、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭化水素、脂質又はこれらの組合せである。他の実施形態において、前記基質生体分子が、ポリヌクレオチドである。

40

【0096】

更に他の実施形態において、本発明は、集団内で隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する、集団内の細胞を標識する方法であって、前記方法は、前記生体分子が細胞を表示する結合相手と結合する標的部位を含み、前記部位によって集団内の隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する、細胞を本発明に係る方法で標識した生体分子と接触させる工程を備える方法を提供する。一部の実施形態において、さらに細胞をイメージングする工程を備える方法であって、前記イメージング工程が、i) 細胞へ励起波長を当てる工程と、ii) 細胞から発光された蛍光を検出する工程と、を備える。一部の実施形態において、インビトロで標識が起こる。他の実施形態において、インビボで標識が起こる。

【0097】

他の実施形態において、本発明は、ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が 685nm

50

以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリンを提供する。一部の実施形態において、前記免疫グロブリンが、前記蛍光性化合物との接合における標的への結合特異性を保持する。一部の実施形態において、前記免疫グロブリンが、ガン細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である。一部の実施形態において、前記抗体が、*er b2*と結合する。一部の実施形態において、前記蛍光性化合物が、本発明は、式I, II, IIIに記載の化合物、シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素又はシアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素である。

【0098】

他の実施形態において、本発明は、ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が750nm以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリンを提供する。一部の実施形態において、前記免疫グロブリンが、前記蛍光性化合物との接合における標的への結合特異性を保持する。一部の実施形態において、前記免疫グロブリンが、ガン細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である。一部の実施形態において、前記抗体が、*er b2*と結合する。一部の実施形態において、前記蛍光性化合物が、本発明は、式I, II, III, Vに記載の化合物、シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素又はシアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素である。

10

【0099】

更なる実施形態において、本発明は、蛍光性化合物によって標識されたポリペプチドであって、式I, II, III, Vに記載の化合物である蛍光性化合物を欠く対応するポリペプチドの半減期よりも短くない血清半減期を示すポリペプチド、シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素又はシアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素を提供する。

20

【0100】

他の実施形態において、本発明は、前記ポリペプチド及び結合剤を含む錯体の形成工程を備えるポリペプチドの標識方法であって、前記結合剤が、式I, II, III, Vに記載した式の構造を有する蛍光標識、シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素又はシアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である、反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素を含み、前記式の前記少なくとも1つの反応性部位が、前記標識を前記結合剤に結合する反応を起こしたポリペプチドの標識方法を提供する。一部の実施形態において、前記結合剤が抗体である。一部の実施形態において、前記錯体が、(a) 前記ポリペプチドと結合する一次抗体、及び、(b) 二次抗体に対する結合能力を示して二次抗体として機能する結合剤を含む。一部の実施形態において、標識が、固体基質上で起こる。一部の実施形態において、ポリペプチドを細胞内で標識する。一部の実施形態において、前記錯体が、約100より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)。他の実施形態において、前記錯体が、約250より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)。更に他の実施形態において、前記錯体が、約270より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)。

30

40

【0101】

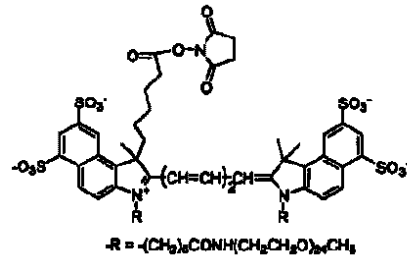
一部の実施形態において、前記錯体が、標識度がDyLight 680(登録商標)色素に匹敵す

50

る，同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する。他の実施形態において，前記錯体が，標識度がCy5.5(登録商標)色素に匹敵する，同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する。更に他の実施形態において，前記錯体が，標識度がAlexa Fluor 680(登録商標)色素に匹敵する，同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する。一部の実施形態において，式IIの構造を有する前記標識が，下記構造を有する化合物である。

【0102】

【化28】



一部の実施形態において，各錯体が，635nm又は633nmで励起される。一部の実施形態において，各錯体が，同一のタンパク質濃度で存在する。

(参照による組み込み)

本明細書中で記載したすべての刊行物及び特許出願は，個々の刊行物及び特許出願それぞれを特に個別に指摘して参照することによって本明細書に組み込むのと同じ範囲まで参照することによって本明細書に組み込む。

【図面の簡単な説明】

【0103】

本発明の新規な特徴は，特に添付の請求項中に規定した。本発明の原理を用いた，図解の実施形態を記載する以下の添付した詳細な図面を参照することで，本発明の特徴及び利点をよりよく理解できる。

【図1】各々，緩衝剤水溶液中，同様の標識度(すなわち，~4)で，ヤギ抗マウスIgGに接合したCy5(登録商標)色素及び化合物No.41(例41)の吸収スペクトルを示す代表図である。Cy5(登録商標)色素のスペクトルは，色素凝集に特徴的な二重ピークを示し，一方，化合物No.41のスペクトルは，主に単一ピークを示し，色素凝集が実質的にないことを表わしている。

【図2】同様の標識度(すなわち，~5)及び等価タンパク質濃度で，ヤギ抗マウスIgGに接合したCy5(登録商標)色素及び化合物No.41(例41)の630nmで励起した蛍光発光スペクトルを示す代表図である。本発明の蛍光性基が，Cy5(登録商標)色素よりも有意義に蛍光がより多いことをデータは示している。

【図3】化合物No.41(例41)及びCy5(登録商標)色素が，緩衝剤水溶液中，同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗ウサギIgGにおける630nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。本発明の蛍光性基が，Cy5(登録商標)色素よりも蛍光消光がより少ないことをデータは示している(例97参照)。

【図4】化合物No.5(例5)，Cy3(登録商標)色素及びAlexa Fluor 555(登録商標)色素を緩衝剤水溶液中，同一タンパク質濃度で接合したストレプトアビジンの530nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。本発明の蛍光性基のより高い勾配は，本発明の蛍光性基が内因的にCy3(登録商標)色素又はAlexa Fluor 555(登録商標)色素のいずれよりも蛍光性が高いことを示す(例97参照)。

【図5】化合物No.5(例5)，Cy3(登録商標)色素及びAlexa Fluor 555(登録商標)色素を緩衝剤水溶液中，同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスの530nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。三種類の蛍光性基はすべて同様の吸収及び発光極大

10

20

30

40

50

点を有するが、Cy3(登録商標)色素及びAlexa Fluor 555(登録商標)色素は水溶性高分子基を有しない。本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてAlexa Fluor 555(登録商標)色素と同程度の輝度であるが、Cy3(登録商標)色素の蛍光は、高標識度において実質的に消光していることをデータは示している(例97参照)。

【図6】化合物No.67(例67)、及び分光的に類似の蛍光性基を持ち水溶性高分子基を有さないAlexa Fluor 660(登録商標)色素を緩衝剤水溶液中、同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスIgGの640nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。Alexa Fluor 660(登録商標)色素と比べて、本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であり、高標識度の抗体に関して蛍光消光がより少ないことをデータは示している(例97参照)。

10

【図7】化合物No.92(例92)、及び分光的に類似の蛍光性基を持ち水溶性高分子基を有さないAMCAを緩衝剤水溶液中、同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスIgGの350nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。AMCAと比べて、本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であり、高標識度の抗体に関して蛍光消光がより少ないことをデータは示している(例97参照)。

【図8】化合物No.96(例96)、及び分光的に類似の蛍光性基を持ち水溶性高分子基を有さない5(6)-カルボキシローダミン110(CR110)を緩衝剤水溶液中、同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスIgGの488nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。CR110と比べて、本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であり、高標識度の抗体に関して蛍光消光がより少ないことをデータは示している(例97参照)。

20

【図9】流動細胞計測により計測した多様な蛍光標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、標識度2.7、3.9及び5.8の化合物No.41で各々標識したヤギ抗マウスIgG又はCy5(登録商標)色素で標識した市販のヤギ抗マウスIgGで染色した(暗色コラム)。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞を一次抗体なしに蛍光二次抗体で各々直接的に染色した(無色コラム)。本発明の接合抗体で染色した細胞は、市販の接合抗体で染色した細胞より25-60% 高輝度であり優れた信号雑音比であることを結果は示している(例104参照)。

【図10】蛍光強度の関数としての免疫蛍光染色された細胞の頻度分布を示す流動細胞計測のヒストグラム図である。ジャーカット細胞を固定し、透過処理し、マウス抗ヒトCD3抗体と共に培養した。CD3抗体は引き続きAlexa Fluor 647(登録商標)色素(DOL 3.1)で(灰色線ピーク)又は化合物No.41(DOL 3.9)で(暗色線ピーク)標識したヤギ抗マウスIgGと共に培養した。Alexa Fluor 647(登録商標)色素で標識した抗体は、本発明の蛍光性基で標識した抗体よりも細胞の染色度がより低く、蛍光染色がより散乱していることを図は示している(例105参照)。

30

【図11】本発明の蛍光性基の経時的安定性をフルオレセイン及びAlexa Fluor 488(登録商標)色素と比較した比較図である。アクチン線維を化合物No.96、Alexa Fluor 488(登録商標)色素又はフルオレセインで標識したファロイジンで染色し、各試料の相対蛍光を時間に対してプロットした。化合物96を用いて標識した生体分子の光安定性は、フルオレセインだけでなくAlexa Fluor 488(登録商標)色素に対しても優れていることを図11は示す(例107参照)。

40

【図12A】図12A、B、及びCは、異なる標識度(DOL)での三種類の近赤外色素で調製して接合したヤギ抗マウスIgGの吸収スペクトルを示す代表図である。図12Aは、4種の異なるDOL(抗体当たり1.2~3.4色素分子)でのCy7(登録商標)色素で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。

【図12B】四種の異なるDOL(抗体当たり2.2~5.9色素分子)でのAlexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。

【図12C】六種の異なるDOL(抗体当たり1.1~7.4色素分子)での色素No.29(表3)で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。全スペクトルはPBS7.

50

4緩衝剤中室温で測定した。Cy7(登録商標)色素及びAF750(登録商標)色素で標識した接合物(A及びB)のスペクトルは共に色素凝集に特徴的な二重ピークを示し、一方、化合物No.29で標識した接合物(C)のスペクトルは、主に単一ピークを示し、色素凝集が実質的にないことを表わしている。

【図13】近赤外色素である本発明の色素No.29(表3)、及び分光的に類似の近赤外蛍光性基を持ち水溶性高分子基を有さないAlexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素及びCy7(登録商標)色素をPBS緩衝剤pH7.4中で、同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスIgGの735nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)の代表図である。AF750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素と比べて、色素29の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であり、高標識度の抗体に関して蛍光消光がより少ないことをデータは示している。

10

【図14】流動細胞計測により計測した近赤外色素、本発明の色素No.29(表3)、Alexa Fluor 750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素の各々で蛍光標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、すべて同様の標識度で標識された三種類の二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞をアイソタイプ対照一次抗体及び各蛍光二次抗体でも染色した(暗色コラム)。本発明の接合抗体で染色した細胞は、市販の接合抗体で染色した細胞より高輝度であり優れた信号雑音比であることを結果は示している。

【図15】表3の化合物No.29、Alexa Fluor750(登録商標)(AF750(登録商標))色素及びCy7(登録商標)色素の三種類の近赤外色素の光安定性と比較した比較図である。5 $\mu$ M色素濃度での三種類の色素の溶液を1/2時間、太陽光に曝露した。溶液の吸収スペクトルを光分解の前後で記録した。本発明の近赤外色素は、AF750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素の両者よりも有意義に安定であることを結果は示す。

20

【図16A】図16A及びBは、Alexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素又は色素29(表3)で標識した抗体で細胞内にて標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。図16Aは、流動細胞計測により計測した、表示量の化合物No.29(DOL=3.5)で標識したヤギ抗マウスIgG又はAPC-AF750(登録商標)直列色素で標識した市販のヤギ抗マウスIgG(invitrogen社製)のいずれかで染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、すべて同様の標識度で標識された二種類の二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞をアイソタイプ対照一次抗体及び各蛍光二次抗体でも染色した(暗色コラム)。

30

【図16B】図16Aからの染色の信号雑音比を示す代表図である。流動細胞計測実験は、633nmレーザー及び780/60nm PMT検出器を備えたBD LSR II上で実施した。色素No.29は極僅かな背景を有する高い蛍光信号を発生し、一方、APC-AF750(登録商標)直列色素は有意に非特異的な染色であることを結果は示した。色素No.29は633nmでの吸収が極僅かであり、一方、直列色素はドナー色素であるAPCによって該レーザー波長において最大吸収に近いことを結果は示した。本明細書中で開示した色素No.29などの近赤外色素は波長633nm以下の励起光源を用いる流動細胞計測分析に特に有利である。

40

【図17】色素No.31(表3)、Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)800色素及びLi-Cor Biosciences社からのIRDye 800(登録商標)CW色素という三種類の近赤外色素を接合したヤギ抗マウスIgGの同様な波長での全蛍光対標識度(DOL)の代表図である。色素No.31は、他の二種類の色素より広範囲のDOLにわたって有意に高輝度であることをデータは示す。

【図18】流動細胞計測により計測した色素No.31(表3)、Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)800色素及びLi-Cor Biosciences社からのIRDye 800(登録商標)CW色素の各々で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。三種類の近赤外色素の蛍光消光を評価するため、表示された異なる標識度(DOL)で各色素によって抗体を標識した。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、

50

その後、標識された二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞をアイソタイプ対照一次抗体及び各蛍光二次抗体でも染色した(アイソタイプ、暗色コラム)。色素No.31は、Dylight(登録商標)800色素及びIRDye 800(登録商標)CW色素の両方より広範囲のDOLにわたって有意に高輝度であり、色素No.31は他の二種類の色素よりもはるかに良好な信号雑音比であることを結果は示す。

【図19】近赤外色素である本発明の色素No.32(表3)、及び三種類の分光的に類似の近赤外蛍光性基を持つGE Healthcare社からのCy5.5(登録商標)色素、invitrogen社からのAlexa Fluor 680(登録商標)(AF680)色素及びThermo Fisher社からのDylight(登録商標)680色素の各々で接合したヤギ抗マウスIgGの全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。蛍光測定はPBS7.4緩衝剤中室温で660nm励起を用いて実施した。Cy5.5(登録商標)、Alexa Fluor 680(登録商標)及びDylight(登録商標)680と比べて、本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であることをデータは示している。

【図20A】図20A及びBは、個々の四種類の異なる近赤外色素で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルに関するデータの代表図である。図20Aは、流動細胞計測により計測した色素No.32(表3)、GE Healthcare社からのCy5.5(登録商標)色素、Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)680色素又はinvitrogen社からのAlexa Fluor 680(登録商標)(AF680)色素で標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。四種類の近赤外色素の蛍光消光を評価するため、1色素当たり表示された異なる1種又は2種の標識度(DOL)で各分量のヤギ抗マウスIgG、抗体を標識し、八系統の抗体を形成した。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、標識された二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞をアイソタイプ対照一次抗体及び各蛍光二次抗体でも染色した(アイソタイプ、暗色コラム)。

【図20B】図20Aでの染色の信号雑音比(S/N)に関するプロット図である。色素No.32は、他の三種類の市販近赤外色素から調製した接合物よりもはるかに高輝度であり、該接合物よりも染色においてより特異的であることをデータは示す。

【発明を実施するための形態】

【0104】

本発明の好適な実施形態が示され本明細書中に記載されているが、かかる実施形態は単なる例示として提供したに過ぎないことは当業者に明らかである。当業者にとって、本発明から離れることなく多数の変形、変更、及び置換を実施することが可能である。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する多数の代替を本発明の実施において採用しうることが理解できる。下記の請求項が本発明の範囲を定義し、これら請求項の範囲内の方法及び構造並びにその均等物が本発明の範囲に及ぶ意図である。

【0105】

本発明は、少なくとも一つの反応基及び少なくとも一つの水溶性高分子を含む蛍光性化合物を開示する。かかる化合物は、制限された分子内移動度、増大した蛍光量子収率、低減した凝集、増大した溶解性、低減した消光及び増大したインビボ及びインビトロでの安定性などの望ましい特性を備えてもよい。化合物をポリペプチド及びポリヌクレオチドなどの分子及び生体分子の標識に使用してもよく、診断及びイメージングシステムを含む幅広い用途において好適である。

【0106】

本発明の蛍光性化合物及び標識分子は、蛍光消光に寄与する主要因としてしばしば参照される低減した色素凝集を示してもよい。本発明での凝集抑制は、過剰な和の負電荷スルホン酸基を用いることなく達成しうる。このことは、今度は、タンパク質などの生体分子の標識において助けになりうる。なぜなら、標識タンパク質は、基質タンパク質の等電点に匹敵する等電点を有しうるため、その生物学的特異性をよりよく保持しうるからである。本発明の水溶性高分子の使用は、水溶性高分子が連結するフルオロフォアの偽装又は遮蔽において助けになりうる。例えば、かかる水溶性高分子は、ポリエチレングリコールなどの相対的に大きな基であってもよい。フルオロフォアがポリペプチドなどの生体分子に

連結している場合、特に望ましい。従って、他の蛍光標識タンパク質と比較して、本発明の化合物で標識したタンパク質は、プロテアーゼ触媒作用による分解に対してより抵抗性がありうる。従って、本発明の標識抗体などの標識タンパク質は、哺乳動物の身体などの動物の身体に適応する場合、環境においてより長い半減期を示しうり、それゆえ、インビボでのイメージングに好適であってもよい。また、標識生体分子は、インビトロシステム、例えば、血清又は他の生物学的抽出物を用いたアッセイにおいて、より長い半減期を示しうる。

#### 【0107】

水溶性高分子は、水溶性高分子が結合するフルオロフォアの振動及び回転などの分子内移動度を抑制又は低減しうる。このため、蛍光性基の蛍光量子収率が増大しうる。蛍光増進効果は、比較的柔軟なコア構造を有する蛍光性基に対して特に効果的でありうる。加えて、本発明の標識分子は、対応する基質生体分子よりもインビボにおいてより低い免疫原性及びより低い抗原性であってもよい。更に、本発明の化合物及び標識分子は、よりよい光安定性及び蛍光性基の曝露抵抗を示してもよい。

10

#### 【0108】

##### (定義)

本発明の化合物は、不斉中心、キラル軸及びキラル面(E L ElieI及びS H Wilen, 「炭素化合物の立体化学」John Wiley & Sons, New York, 1994,1119 1190頁中に記載のように)を有してもよく、ラセミ体、ラセミ混合物及び個々のジアステレオマーとして生成してもよく、光学異性体を含むすべての可能な異性体及びその混合物は、本発明に含まれる。加えて、本明細書で開示した化合物は、互変異性体として存在してもよく、一互変異性体構造のみが描述されていたとしても、両互変異性体形態はともに本発明の範囲に含まれる意図である。

20

#### 【0109】

いかなる変異(例えば、R, L, (R<sub>1</sub>)<sub>a</sub>, (L)<sub>q</sub>)がいかなる置換において一回以上発生した場合、各発生での定義は他の発生のすべてで独立している。置換及び変異の組合せは、かかる組合せが安定な化合物になった場合のみ許容される。置換基から環システム中に描いた線は、いずれか好適な環の炭素原子と結合しうることを示す。環システムが多環式であった場合、近位の環上のいずれか好適な炭素原子のみと結合することを意図する。置換基による環の置換は、一般に、置換基が環に融合する環状構造であることを許容する。

30

#### 【0110】

本発明の化合物における置換基及び置換パターンは、化学的に安定で、直ちに入手可能な出発物質から下記に記載したかかる方法でも、当業者に既知の技術でも直ちに合成可能である化合物を提供する周知技術の一つから選択できることが理解される。置換基自体が1以上の基と置換されるならば、安定構造が得られる限り、かかる多重の基は、同じ炭素上又は異なる炭素上であってもよいことが理解される。「一以上の置換基で任意に置換された」との表現は「少なくとも一つの置換基任意に置換された」との表現と等価であり、かかる場合、好適な実施形態は0から3置換基である。

#### 【0111】

本明細書中において、「アルキル」は分岐、直鎖及び環状脂肪族飽和炭化水素基を共に含む意図である。アルキル基として特にメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等、また、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、テトラヒドロナフタレン、メチレンシクロヘキシル等のようなシクロアルキルなども挙げられる。「アルコキシ」とは酸素の架橋を介して結合するアルキル基を言う。

40

#### 【0112】

「アルケニル」の用語は直鎖、分岐又は環状の、少なくとも一つの炭素炭素二重結合を含んでいる非芳香族炭化水素基を言う。アルケニル基としては、限定されないが、エテニル、プロベニル、ブテニル及びシクロヘキセニルが挙げられる。アルケニル基の直鎖、分

50

岐又は環状部分は，二重結合を含んでよく，置換アルケニル基が示された場合，置換されてもよい。

【0113】

「アルキニル」の用語は直鎖，分岐又は環状の，少なくとも一つの炭素炭素三重結合を含んでいる非芳香族炭化水素基を言う。アルキニル基としては，限定されないが，エチニル，プロピニル及びブチニルが挙げられる。アルキニル基の直鎖，分岐又は環状部分は，三重結合を含んでよく，置換アルキニル基が示された場合，置換されてもよい。

【0114】

本明細書中において，「アリール」は，いかなる安定な各環あたり7原子までの単環又は少なくとも一つの環が芳香族である多環炭素環を意味する意図である。かかるアリール要素の例示としては，フェニル，ナフチル，テトラヒドロナフチル，インダニル，ピフェニル，フェナントリル，アントリル又はアセナフチルが挙げられる。アリール置換基が二環式で一環が非芳香族である場合，結合が芳香族環を介していることが理解される。

10

【0115】

「複素アリール」の用語は，本明細書中において，少なくとも一つの環が芳香族であり，O，N及びSからなる群から選択された1～4個のヘテロ原子を含む安定な各環あたり7原子までの単環又は二環を表わす。本定義の範囲内の複素アリール基は，限定されないが，アクリジニル，シンノリニル，キノキサリニル，ピラゾニル，インドリニル，ベンゾトリアゾリル，フラニル，チエニル，ベンゾチエニル，ベンゾフラニル，キノリニル，イソキノリニル，オキサゾリル，イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル，ピリジニル，ピリミジル，ピロリル，テトラヒドロキノリン，キサンチニル及びクマニルが挙げられる。複素アリール置換基が二環式で一環が非芳香族又はヘテロ原子を含まない場合，結合がそれぞれ芳香族環又はヘテロ原子含有環を介していることが理解される。

20

【0116】

「複素環」又は「複素環の」の用語は，本明細書中において，少なくとも一つのヘテロ原子がO，N及びSである5～10員の芳香族又は非芳香族複素環を意味する意図である。本定義は，二環基を含む。そこで，「複素環」は，上記複素アリールとそのジヒドロ及びテトラヒドロ類縁体をも含む。更に「複素環」の例示としては，限定されないが，以下の，ベンゾイミダゾリル，ベンゾフラニル，ベンゾフラザニル，ベンゾピラゾリル，ベンゾトリアゾリル，ベンゾチオフェニル，ベンゾオキサゾリル，カルバゾリル，カルボリニル，シンノリニル，フラニル，イミダゾリル，インドリニル，インドリル，インドラジニル，インザゾリル，イソベンゾフラニル，イソインドリル，イソキノリル，イソチアゾリル，イソオキサゾリル，ナフトピリジニル，オキサジザゾリル，オキサゾリル，オキサゾリン，イソオキサゾリン，オキセタニル，ピラニル，ピラジニル，ピラゾリル，ピリダジニル，ピリドピリジニル，ピリダジニル，ピリジル，ピリミジル，ピロリル，キナゾリニル，キノリル，キノキサリニル，テトラヒドロピラニル，テトラゾリル，テトラゾロピリジル，チアジザゾリル，チアゾリル，チエニル，トリアゾリル，アゼチジニル，アジリジニル，1,4-ジオキサニル，ヘキサヒドロアゼピニル，ペラジニル，ペリリジニル，ピロリジニル，モルフォリニル，チオモルフォリニル，ジヒドロベンゾイミダゾリル，ジヒドロベンゾフラニル，ジヒドロベンゾチオフェニル，ジヒドロベンゾオキサゾリル，ジヒドロフラニル，ジヒドロイミダゾリル，ジヒドロインドリニル，ジヒドロイソオキサゾリル，ジヒドロイソチアゾリル，ジヒドロオキサジザゾリル，ジヒドロオキサゾリル，ジヒドロピラジニル，ジヒドロピラゾリル，ジヒドロピリジニル，ジヒドロピリミジニル，ジヒドロピロリル，ジヒドロキノリニル，ジヒドロテトラゾリル，ジヒドロチアジザゾリル，ジヒドロチアゾリル，ジヒドロチエニル，ジヒドロトリアゾリル，ジヒドロアゼチジニル，メチレンジオキシベンゾイル，テトラヒドロフラニル及びテトラヒドロチエニルが挙げられる。

30

40

【0117】

アルキル，アルケニル，アルキニル，シクロアルキル，アリール，複素アリール及び複素環置換基は，特に定義がない場合，置換されてもよく，置換されなくてもよい。例えば

50

、アルキル基は、モルフォリニル又はピペリジニルなどのOH、オキソ、ハロ、アルコキシ、ジアルキルアミノ又は複素環から選択された一以上の置換基で置換されてもよい。

【0118】

「ハロ」又は「ハロゲン」の用語は、クロロ、フルオロ、プロモ、及びイオド基を含む意図である。

【0119】

「芳香族」の用語は、常識的感覚で用いられ、環の周囲など、複数の結合にわたって基本的に非局在化している不飽和物を含む。

【0120】

「置換基」の用語は、置換される化学基、ラジカル、分子、部位又は化合物中の水素を置き換える原子、ラジカル又は化学基を言う。

10

【0121】

本明細書中において、「スピロ」は、環状部位の環原子の一つが、該他の基であるような他の基と結合している環状部位を言う。非スピロ置換基は、非スピロ部位の元素と該他の基の間で、結合関係を介して該他の基と直接結合している環状又は非環状の部位である。スピロ部位の例示としては、例えば、シクロヘキサノン環A上の置換基環Bである。

【0122】

【化29】



20

記載がなければ、「ラジカル」の用語は、いかなる分子又は化合物に適応される時、「フリーラジカル」よりも、部分、断片又は分子又は化合物の基を言うのに用いられる。ラジカルは、共有結合を介して他の部位と連結してもよい。

【0123】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」、「プローブ」及び「オリゴヌクレオチド」の用語は互換的に使用される。いかなる長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド若しくはその類縁物のいずれかの重合体形態を言う。ポリヌクレオチドは、いかなる三次元構造を取りうり、既知又は未知のいかなる機能を発揮しうる。以下は、制限されないポリヌクレオチドの例示である。遺伝子又は遺伝子断片の翻訳又は非翻訳領域、連鎖解析から規定された単数又は複数の遺伝子座、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボゾームRNA、リボザイム、cDNA、組換え型のポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いかなる配列での単離DNA、いかなる配列での単離RNA、核酸プローブ及びプライマーが挙げられる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類縁体などの修飾ヌクレオチドを含む。修飾をするならば、ヌクレオチド構造への修飾を重合体の構築の前又は後で付与してもよいヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断していてもよい。ポリヌクレオチドは、標識成分との接合によるなどで、重合後、更に修飾されてもよい。「ポリヌクレオチド」は、ペプチド核酸(PNA)、固定核酸(LNA)、トレオフラノシル核酸(TNA)及び他の非天然核酸又は核酸類縁体を言うのにも使用しうる。例えば、De Mesmaekerら(1997) Pure & Appl Chem, 69, 3, pp437-440参照の当業者に既知の他のベース及び骨格修飾は本定義の範囲に入る。

30

40

【0124】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」の用語は、本明細書中であらゆる長さのアミノ酸重合体を言い、互換的に使用される。重合体は、直鎖、環状又は分岐であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断してもよい。また、

50

該用語は、例えば、via スルホン化，糖鎖修飾，脂質付加，アセチル化，リン酸化，ヨウ素化，メチル化，酸化，たんぱく質分解処理，リン酸エステル化，プレニル化，ラセミ化，セレノイル化，アルギニル化，ユビキチン化又は，標識成分での接合などの，他のいかなる操作などの，トランスファー-RNAを媒介とするタンパク質へのアミノ酸付加を介して修飾されたアミノ酸重合体にも及ぶ。本明細書中において，「アミノ酸」の用語は，グリシン及びD又はL光学異性体の両方，並びにアミノ酸類縁体及びペプチド類縁体を含む天然及び/又は非天然若しくは合成アミノ酸のいずれかを言う。

【0125】

「抗体」の用語は本明細書中において，免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子，すなわち，抗原と特異的に結合する(「免疫反応する」)抗原結合位置を含む分子の免疫学的に活性な部分を言う。構造的には，最も単純な自然発生抗体(例えば，IgG)は，二本の重鎖(H鎖)及び二本の軽鎖(L鎖)がジスルフィド結合で結びついた四つのポリペプチド鎖を備える。免疫グロブリンは，IgD，IgG，IgA，IgM及びIgEなどの，数形式の分子を含む，多数の系統の分子を表わす。「免疫グロブリン分子」の用語は，例えば，複合抗体又は改変抗体及びそれらの断片を含む。抗体の抗原結合機能は，自然発生抗体の断片によって行われることが示された。これらの断片を総称して「抗原結合単位」と呼ぶ。抗原結合単位は、その分子構造に基づき，「単鎖」(「Sc」)及び「非単鎖」(「Nsc」)型に広く分離できる。

10

【0126】

また，「抗体」の用語の中には，無脊椎動物及び脊椎動物を含む種起源の多様な免疫グロブリン分子にも及ぶ。「ヒト」の用語は，抗体又は抗原結合単位に適応する場合，ヒト遺伝子またはその断片によって発現した免疫グロブリン分子を言う。

20

「ヒト化」の用語は，非ヒト(例えば，げっ歯類又は霊長類)に適用する場合，抗体は，非ヒト免疫グロブリンから由来する最小限の配列を含む複合免疫グロブリン，免疫グロブリン鎖又はその断片である。

大部分，ヒト化抗体は，レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が，所望する特異性，親和性及び容量を有するマウス，ラット，ウサギ又は霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。一部の例では，ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基によって置換される。更に，ヒト化抗体は，レシピエント抗体と導入されたCDR又はフレームワーク配列のいずれも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾により，さらに洗練された最適の抗体性能を作り，人体に導入する場合，免疫原性を最小化する。一般的に，ヒト化抗体は，全て又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンに一致し，全て又は実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列である，実質的に全ての少なくとも一つの，典型的には二つの可変ドメインを含んでもよい。また，ヒト化抗体は，少なくとも免疫グロブリン固定領域(Fc)の一部分，典型的にはヒト免疫グロブリンの固定領域の一部分を含んでもよい。

30

【0127】

「安定性」の用語は，目的の用途での使用に有用な純度で反応混合物から分離するように残存して，十分な化学的安定性を有する組成物及び化合物を言う。

40

【0128】

「蛍光性基」，「フルオロフォア」，「色素」又は「蛍光性基」の用語は互換的に蛍光性の分子，基又はラジカルを言う。

「蛍光性」の用語は，化合物の分子に適応する場合、エネルギー吸収(紫外線、可視光線又は赤外線輻射)及び再発光，少なくとも経時的な光としてのエネルギーの画分についての化合物の特性を言うのに用いる。蛍光性基，化合物又はフルオロフォアは，限定されないが，個々の化合物，分子，タンパク質及び高分子錯体を含む。また，フルオロフォアは，有機配位子増感剤とのランタニドイオン及びランタニド錯体のような長寿命の蛍光減衰を示す化合物を含む。

【0129】

50

「被験者」は、本明細書中において、発現した遺伝的物質を含む生物学的独立体を言う。生物学的独立体は多様な実施態様であり、脊椎動物である。一部の実施形態において、生物学的独立体は哺乳動物である。他の実施形態において、被験者はヒトを含む生物学的独立体である。

【0130】

「対照」は、比較目的で実験において用いる代替的被験者又は試料である。対照は「ポジティブ」又は「ネガティブ」であってもよい。例えば、実験目的が、対象とする疾病が細胞又は組織内に引き起こす特異的に発現した転写物又はポリペプチドを検出することにある場合、ポジティブ対照(かかる疾病に特徴的な特異的発現及び症状を呈するような被験者又は被験者からの試料)、及びネガティブ対照(かかる疾病の特異的発現及び臨床的症状を欠く被験者又は被験者からの試料)を用いることが一般に好適である。

10

【0131】

「FRET」の用語は、フェルスター共鳴エネルギー移動を言う。本発明では、FRETは、少なくとも二つの蛍光性化合物間、蛍光性化合物及び非蛍光性化合物間又は蛍光性成分と非蛍光性成分間で発生するエネルギー移動過程を言う。

【0132】

「結合剤」は、結合する結合対又は標的分子に対して選択的な結合を示す分子である。結合剤は、ポリペプチド、抗体又はタンパク質、ポリペプチドベースの毒素、アミノ酸ベースの毒素、ヌクレオチド、DNA及びRNAを含むポリヌクレオチド、脂質及び炭化水素若しくはそれらの組み合わせなどの生体分子であってもよい。また、結合剤は、金属キレート、微粒子、合成又は天然重合体、細胞、細菌又は本発明に係る色素分子を含む他の蛍光性分子などのハプテン、薬剤、イオン性錯化剤であってもよい。

20

【0133】

「標的部位」は、結合対と結合する結合剤の部分である。標的部位は、限定されないが、他のポリヌクレオチド又はポリペプチドに選択的に結合するポリヌクレオチド内のヌクレオチド配列であってもよい。標的部位の他の限定されない例は、ポリヌクレオチド配列又は第二ポリペプチド配列に選択的に結合する巨大ポリペプチド配列内のポリペプチド配列であってもよい。標的部位は、限定されないが、たんぱく質受容体、他の小分子モチーフ又は錯化剤に結合する小分子又は構造的モチーフであってもよい。選択的結合は特定の結合現象であってもよい。

30

【0134】

「結合対」は、標的部位において結合する分子又は粒子である。細胞、細菌、細胞断片、抗体、抗体断片、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、抗原、小さい分子又はその組合せであってもよい。結合剤によって選択的又は特異的に結合してもよい。

【0135】

蛍光の「信号雑音比」の用語は、本明細書中、ポリペプチド-抗体錯体の文脈である場合、(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)の比率である。

【0136】

「標識度」又は「DOL」は、本明細書中において、標的分子当たりの結合色素分子数(限定されない、ポリペプチド及びポリヌクレオチドを含む)を言う。例えば、抗体などのポリペプチド当たり一つの色素分子であれば1.0標識度(DOL)を表わす。もし平均して1以上の色素分子が抗体などのポリペプチドと反応し架橋すると、標識度は1より大きくなり、更に整数以外の数値となってもよい。DOLの数値が大きいほど、標識の度合いが大きくなる。

40

【0137】

「細胞内」は、本明細書中において細胞内に所与の分子が存在することを言う。細胞内分子は、細胞質内に、細胞膜に結合して、細胞小器官の表面上に又は細胞の細胞小器官内に存在しうる。

50

## 【0138】

「基質」又は「固体基質」は、反応性表面の文脈では、特定の相互作用を検定する物質を言う。例えば、本文脈では、基質はアレイの表面又はマイクロウェルの表面であってもよい。また、特定の形状を形成しないが、表面上に結合点を有する重合体などの固体であってもよい。

## 【0139】

「最大励起波長」及び「最大蛍光励起波長」の用語は、本明細書中で互換的に使用される。これらの用語は、色素が最大蛍光で発光する光エネルギーを蛍光性化合物が吸収する最大波長を言う。「最大吸収波長」の用語は、色素に適応する場合、色素が最も効率的に蛍光の励起エネルギーを吸収する光エネルギーの波長を言う。蛍光性色素は、「最大蛍光発光波長」を有し、色素が最も強く蛍光する波長である。単一の波長がいずれの色素についても言及される場合、用語の文脈に従って、励起、吸収又は発光の最大波長を言い、例えば、吸収波長は、色素が最大吸収する波長を言い、発光波長は、色素が最も強く蛍光する波長を言う。

10

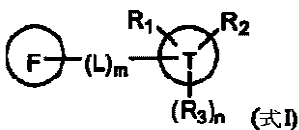
## 【0140】

本発明の化合物

本発明は式1の化合物を提供する。

## 【0141】

## 【化30】



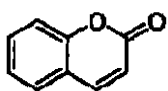
20

ここで、Fは、フルオロフォア又は蛍光性基を表わす。一般的に、本発明の化合物に好適なフルオロフォア(式1中「f」)は、 $-(L)_m-$ 又はT基へ結合しうる置換位置を有する蛍光性化合物から誘導される。サブカテゴリーも含めて多数の蛍光性基の核となる構造は、フルオロフォアに適していてもよい。フルオロフォアは、一般に蛍光性基の一分類に属する蛍光性基を形成するのに必要な最小限の原子数を含む構造を含んでもよい。例として、クマリン蛍光性基は、下記式Aに示した核となる構造を含む。

## 【0142】

30

## 【化31】

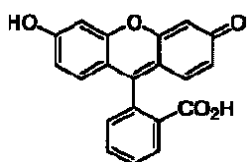


式A

他の例として、フルオレセイン蛍光性基は、下記式Bに示した核となる構造を含む。

## 【0143】

## 【化32】



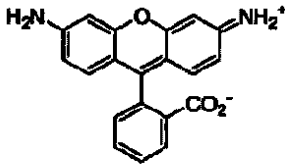
式B

40

更に他の例として、ローダミン蛍光性基は、下記式Cに示した核となる構造を含む。

## 【0144】

【化33】



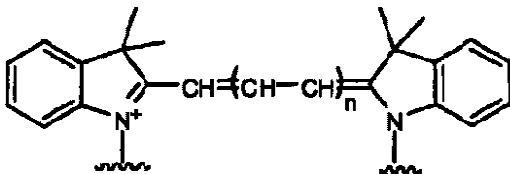
式C

更なる他の例として、シアニン蛍光性基は、下記式Dに示した核となる構造を含む。

【0145】

【化34】

10



式D

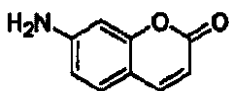
蛍光性基の分類の核となる構造は、上記原理を用いて当業での通常の技術の一つにより直ちに決定できる。蛍光性基の分類が任意であってもよいため、蛍光性基の核となる構造を決定する技術の一つがいくらか任意であってもよい。

蛍光性基の分類は、例えば、蛍光性基の下位分類が、特定の蛍光性基の下位分類に特有の一つ以上の置換基を含む異なる下位分類に分類してもよい。それゆえ、各蛍光性基の下位分類の核となる構造があってもよい。例えば、下記式Eとして示した7-アミノクマリンは、それ自体が、より一般的なクマリン蛍光性基に属する式Aの核となる構造を有する蛍光性基の下位分類であり、すべての7-アミノクマリン誘導体に対して核となる構造である。

20

【0146】

【化35】



式E

30

以下の表は、多数のフルオロフォア及び核となる構造の共通する分類に対する典型的励起波長及び発光波長を示す。

【0147】

【表1】

40

蛍光性基	典型的励起波長	典型的発光波長
クマリン	300-500 nm	350-550 nm
フルオレセイン	470-520 nm	500-540 nm
ローダミン	480-640 nm	510-660 nm
シアニン	350-1200 nm	360-1250 nm
ピレン	350-490 nm	400-510 nm

いくつかの実施形態において、Fは、シアニン蛍光性基、Cy蛍光性基、キサンテン蛍光性基、Alexa Fluor蛍光性基、クマリン蛍光性基、ピレン蛍光性基、Bodipy蛍光性基、ATTO蛍光性基又はDY蛍光性基から誘導されてもよい。当業者には周知のように、シアニン蛍光性基は、多様なシアニン蛍光性基の下位分類を含んでもよく、限定されないが、インドカルボシアニン蛍光性基、オキサカルボシアニン蛍光性基、チアカルボシアニン蛍光性基、アザカルボシアニン蛍光性基(アザシアニン蛍光性基)、スチリルシアニン基及びメロシアニン蛍光性基を単なる例示として挙げられる。同様に、例えば、キサンテン蛍光性基は、限定されないが、フルオレセイン及びその誘導体並びに多様なローダミン蛍光性基を含

50

む。

【0148】

フルオロフォアとして用いる本発明の蛍光性化合物の他の限定されない例示としては、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、Alexa Fluor 蛍光性基、ATTO 蛍光性基、Bodipy 蛍光性基、オーラミン0、ベンズアントロン、9,10-ビス(フェニルエチニル)アントラセン、5,12-ビス(フェニルエチニル)ナフタセン、カルボキシフルオレセインジアセテート、カルセイン、カルボキシフルオレセイン、1-クロロ-9,10-ビス(フェニルエチニル)アントラセン、2-クロロ-9,10-ビス(フェニルエチニル)アントラセン、クマリン、シアニン、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、DyLight Fluor 蛍光性基、フルオレセイン、2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン、Hilyte Fluor 蛍光性基、LDS 751、オレゴングリーン、ペリレン、フィコピリン、フィコエリトリン、フィコエリトロピリン、ピレン、ローダミン及びルテニウム(II)トリス(バソフェナントロリンジスルホン酸)が挙げられる。かかる化合物及び誘導体又はかかる化合物のラジカルを本発明のフルオロフォアとして用いてもよい。

10

【0149】

本発明で用いる他の蛍光性基の例示としては、限定されないが、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'ジスルホン酸、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネートなどのアクリジン及び誘導体、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、4-アミノ-N-[3-ビニルスルホニル]フェニル]ナフタルイミド-3,5ジスルホネート(ルシファーイエローVS)、N-(4-アミノ-1-ナフチル)マレイミド、アントラニルアミド、BODEPY(登録商標)その誘導体及び類縁体、プリリアントイエロー、Cy3及びCy5及び他の誘導体などのシアニン蛍光性基、クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC、クマリン120)、7-アミノ-4-トリフルオロメチルコルアリン(クマラン151)などのクマリン及び誘導体、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、5-[ジメチルアミノ]ナフタレン-1-スルホニルクロライド(DNS、ダンシルクロライド)、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、5-(4,6-ジクロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン(DTAF)などのフルオレセイン及び誘導体、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)及びQFITC(XRITC)、フルオレサミン、4-メチルウンベリフェロン、ナイルブルー及び他の類縁体などのオキサジン蛍光性基、ピレン、ピレンブチラート、サクシニミジル1-ピレンブチラートなどのピレン及び誘導体、ローザミン蛍光性基、テトラメチルローザミン及び他の類縁体、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リサミンローダミンBスルホニルクロライド、ローダミン(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101及びスルホローダミン101(テキサスレッド)のスルホニルクロライド誘導体、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、テトラメチルローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(トリTC)などのローダミン及び誘導体及びメチレンブルー及びその類縁体などのチアジン蛍光性基が挙げられる。本特許で用いる更なるフルオロフォアは、米国特許出願第2003/0165942、2003/0045717及び2004/0260093号及び米国特許第5,866,366号及び国際特許公開パンフレット第WO 01/16375号に開示されており、その両者を参照しここに組み込む。更なる例示は、米国特許第6,399,335号、米国特許出願第2003/0124576号公報及びハンドブック「蛍光プローブ及び標識技術の手引き、第10版」(2005)(Invitrogen社/分子プローブから入手)に開示されており、その全てを参照しここに組み込む。

20

30

40

【0150】

また、本発明の蛍光性基は、蛍光性タンパク質を含んでもよい。かかる当業者に既知の蛍光性タンパク質は、例えば、米国特許第5,625,048、5,777,079、6,066,475、6,319,669、6,046,925、6,124,128及び6,077,707号中に記載されたGFT及びその多様な誘導体を含む。更なる蛍光性タンパク質は、Y66F、Y66H、EBFP、GFPuv、ECFP、AmCyan1、Y66W、S65A、S65C、S65L、S65T、EGFP、ZsGreen1、EYFP、ZsYellow1、DsRed、DsRed2、AsRed2、mRFP1及びHcRed1である。

50

## 【 0 1 5 1 】

かかる蛍光性基の多くは、市販され、本発明の化合物の合成において使用してもよい。反応性蛍光性基の市販元は、invitrogen(Molecular Probes)、AnaSpec、Amersham (AP Biotech)、Atto-Tec、Dyomics、Clontech及びSigma-Aldrich社が挙げられる。

## 【 0 1 5 2 】

フルオロフォアは、連結部位-(L)<sub>m</sub>-を介して結合部位Tに結合してもよい。一般的に、連結部位(一般的に「L」で表す)は、フルオロフォア、水溶性高分子及び反応基など、二つの部位を互いに又は本発明の化合物を含む他の基とつなぐあらゆる基である。合成容易性及び簡便性が一般に各連結部位の性質に影響する。いくつかの実施形態において、連結部位は、約1-100原子を含む基であり、安定な部位であるような基から選択された一以上の化学結合で形成される。他の実施形態において、連結部位は、一以上の炭素-水素、炭素-窒素、炭素-酸素、炭素-硫黄、炭素-リン、窒素-水素、硫黄-水素、リン-水素、硫黄-酸素、硫黄-窒素、硫黄-リン、リン-酸素、リン-窒素及び酸素-窒素結合で形成され、かかる結合は、連結部位が安定であるよう選択された、単、二重、三重、芳香族及び複素環式芳香族結合であってもよい。連結部位は、例えば、二価アルキルラジカルであってもよい。あるいは、連結部位は、付加的なエーテル、アミン、アミド、エステル、スルホニル、チオエーテル、カルボキシアミド、スルホンアミド、ヒドラジド又はモルフォリノ、アリール及び複素アリール基を含むアルキル基であってもよい。

10

## 【 0 1 5 3 】

連結部位は、一般に、約1-100原子で形成される。いくつかの実施形態において、連結部位は、付加的な水素原子ならびに1-50原子で形成される。かかる原子は、例えば、C、N、O、P又はSであってもよい。他の実施形態において、二基をつなぐ連結部位は、基の間の1-50の連続した結合を含む。一部の連結する部位は、1-40、1-30、1-20、1-10、1-5、5-25又は5-20のかかる連続した結合を有してもよい。

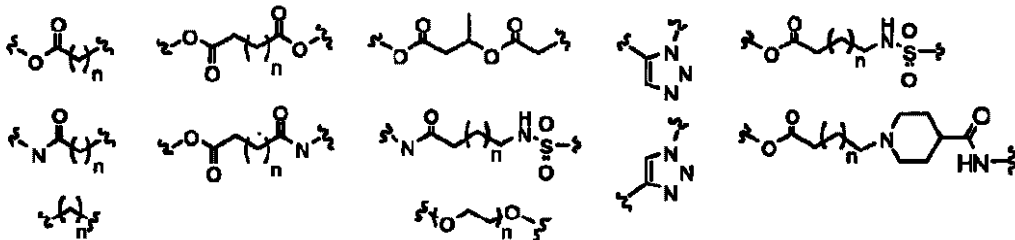
20

## 【 0 1 5 4 】

限定されない連結部位の例示を以下に示す。

## 【 0 1 5 5 】

## 【 化 3 6 】



30

上記画像中、nは望ましい連結長を提供するためなどにより変わりうる、繰返しメチレン単位数を表わす。典型的には、nは1-約50の範囲である。一部の連結体は1-40、1-30、1-20、1-10、1-5、5-30、5-20又は5-15のnを取る。

## 【 0 1 5 6 】

同様に、結合部位(一般に「T」で表わす)は、フルオロフォア、水溶性高分子及び反応基などの三以上の個々の部位を互いに又は連結部位などの本発明の化合物を含む他の基と結合するあらゆる基である。合成容易性及び簡便性が一般に各連結部位の性質に影響する。いくつかの実施形態において、連結部位は、約1-100原子を含む基であり、安定な部位であるような基から選択された一以上の化学結合で形成される。結合は安定な部位であるような基から選択されてもよい。他の実施形態において、結合部位は、一以上の炭素-水素、炭素-窒素、炭素-酸素、炭素-硫黄、炭素-リン、窒素-水素、硫黄-水素、リン-水素、硫黄-酸素、硫黄-窒素、硫黄-リン、リン-酸素、リン-窒素及び酸素-窒素結合で形成され、かかる結合は、安定な部位であるような基から選択された、単、二重、三重、芳香族及び複素環式芳香族結合であってもよい。いくつかの実施形態において、Tは、1-50原子あるいは、1-40、1-30、1-20又は1-10の原子を含む。TはN又はCなどの単一原子であ

40

50

ってもよい。また、Tは、炭素環、複素環又は芳香族基などの小環状基である。限定されない例として、置換フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、ピフェニル、フェナントリル、アントリル、アセナフチル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、フラニル、イミダゾリル、インドリニル、インドリニル、インドラジニル、インザゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリニル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ナフトピリジニル、オキサジザゾリル、オキサゾリル、オキサゾリン、イソオキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、テトラヒドロピラニル、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、チアジザゾリル、チアゾリル、チエニル、チアゾリル、アゼチジニル、アジリジニル、1,4-ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ペペラジニル、ペペリジニル、ピロリジニル、モルフォリニル、チオモルフォリニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフェニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリニル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジザゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジザゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル及びテトラヒドロチエニルが挙げられる。結合部位は、例えば、三価、四価、五価又は六価であってもよい。結合部位の例示を下記に示した。

10

20

【0157】

【化37】



式Iの記号m及びnは、存在する連結する部位水を示し、独立に0～20の範囲の整数である。mが0の場合、連結する部位が存在しないと理解され、二つの部位がかかる連結する部位と結合していると示された場合、結合を介してつながると理解される。nが0の場合、「n」で表される置換基が存在しないと理解される。

30

【0158】

式Iの $R_1$ 、 $R_2$ 及び $R_3$ で表示された基は、式 $(R)_p-(L)_q$ -の基である。

複数の $(R)_p-(L)_q$ -基が化合物中にある場合、各R、L、p又はqは、同一化合物中に存在する他のR、L、p又はq基のいずれとも独立である。一般に、pは、各々1～20の範囲の整数である。いくつかの実施形態において、pは1である。他の実施形態において、pは、1～2、3、4、5、10又は15の範囲を取りうる。一般に、qは、各々0～20の範囲の整数であり、pが0の実施形態において、Lは存在せず、Lに結合するよう示されたあらゆるR基は結合を介して直接つながると理解される。あるいはpが1であってもよい。他の態様において、qは、1～2、3、4、5、10又は15の範囲を取りうる。

40

【0159】

「R」は、本発明の化合物に所望の機能的特性を付与してもよい。より特によりR基の実施形態を以下に詳述する。

【0160】

本発明の化合物は、反応基である少なくとも一つのRを含む。反応基は、基質又は基質分子上の反応対と共有結合を形成するよう反応可能な化学的な部位である。本発明の化合物は、好適な反応対を備える又は好適な反応対を備えるように誘導化される広範な分子又は基質を標識するのに使用できる。「反応基」及び「反応対」は、本発明の化合物上の基又は標識する分子上の基を言う。本明細書では、簡便のため、限定されないが、化合物上の化合物上の結合形成基は一般に反応基と言ひ、基質分子上の結合形成基は一般に反応

50

対と言う。本明細書において「反応性基質」，「基質」及び「反応対」は互換的に使用される。

【0161】

反応基及びその反応対は，各々，結合剤又は触媒で又はなしで共有結合を形成可能な求電子剤及び求核剤であってもよい。

一実施形態によると，反応基は，紫外線光活性化又は光分解により，炭化水素分子と反応可能な光活性化されうる基である。他の実施形態によると，反応基は，ディールズ・アルダー反応を介して共役ジエンと反応可能な求ジエン体である。更に他の実施形態によると，反応基は，求ジエン体と反応可能な1,3-ジエンである。更に他の実施形態によると，反応基は，1,2,3-トリアゾール連結を形成するアジド官能基と反応可能なアルキンである。更に他の実施形態によると，反応基は，いわゆるシュタウディングー反応を介してアミド連結を形成するアジド官能基と反応可能な2-(ジフェニルホスフィノ)安息香酸メチルエステルである。単なる例示として，本発明に係る有用な反応基，官能基及び対応する連結を，Table 1中に一覧した。

10

【0162】

【表2】

Table1:反応基、官能基及び共有結合連結の例示

反応基	反応対/基質	得られる共有結合連結
活性化エステル*	アミン/アニリン	カルボキサミド
アクリルアミド	チオール	チオエーテル
アクリルアジド**	アミン/アニリン	カルボキサミド
ハロゲン化アクリル	アミン/アニリン	カルボキサミド
ハロゲン化アクリル	アルコール/フェノール	エステル
アクリロニトリル	アルコール/フェノール	エステル

20

【0163】

【表 3】

Table1:反応基、官能基及び共有結合連結の例示

反応基	反応対/基質	得られる共有結合連結
アクリロニトリル	アミン/アニリン	カルボキサミド
アルデヒド	アミン/アニリン	イミン
アルデヒド又はケトン	ヒドラジン	ヒドラゾン
アルデヒド又はケトン	ヒドロキシルアミン	オキシム
ハロゲン化アルキル	アミン/アニリン	アルキルアミン
ハロゲン化アルキル	チオール	チオエーテル
ハロゲン化アルキル	アルコール/フェノール	エステル
アルキルスルホン酸	チオール	チオエーテル
アルキルスルホン酸	カルボン酸	エステル
アルキルスルホン酸	アルコール/フェノール	エステル
無水物	アルコール/フェノール	エステル
無水物	アミン/アニリン	カルボキサミド
ハロゲン化アリール	チオール	チオフェノール
ハロゲン化アリール	アミン	アリールアミン
アジリジン	チオール	チオエーテル
ボロン酸	グリコール	ボロン酸エステル
エポキシサイド	チオール	チオエーテル
ハロゲン化アセトアミ	チオール	チオエーテル
ハロゲン化トリアジン	アミン/アニリン	アミノトリアジン
ハロゲン化トリアジン	アルコール/フェノール	トリアジンエーテル
イミドエステル	アミン/アニリン	アミジン
イソシアナート	アミン/アニリン	尿素
イソシアナート	アルコール/フェノール	ウレタン
チオイソシアナート	アミン/アニリン	チオ尿素
マレイミド	チオール	チオエーテル
ホスホラミダイト	アルコール	亜リン酸エステル
ハロゲン化シリル	アルコール	シリルエーテル
スルホン化エステル	アミン/アニリン	アルキルアミン
スルホン化エステル	チオール	チオエーテル
スルホン化エステル	アルコール	エーテル
ハロゲン化スルホニル	アミン/アニリン	スルホンアミド
ハロゲン化スルホニル	フェノール/アルコール	スルホン化アミド
アジド	アルキン	トリアゾール
Cis-白金	グアノシン	白金-グアノシン錯体

\* : 活性化エステルは、一般に、式CO を有すると、当業者において理解されている。式中、 は、敏感に離脱する基であり、例えば、サクシニミジルオキシ(-OC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)、スルホサクシニミジルオキシ(-OC<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub>H)、又は、-1-オキシベンゾトリアゾリル(-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>)、又は、ニトロ、フルオロ、クロロ、シアノ、トリフルオロメチル又はそれらの組合せなどのアリールオキシ基、又は、例えば、電子吸引性置換基(s)で一回以上置換したアリールオキシ基、又は無水物又は混合無水物を形成するため用いた、カルボジイミドで活性化した活性化アリールエステル又はカルボン酸-OCOR<sup>a</sup>又は- NR<sup>a</sup>NHR<sup>b</sup>、ここでR<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>は、同一でも異なってもよく、独立にC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>ペルフロロアルキル又はC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシである、又はシクロヘキシル、3-ジメチルアミノプロピル、又は、N-モルフォリノエチルなどである

\*\* : また、アクリルアジドは、イソシアネートに再配列しうる。

## 【0164】

反応基は、アミン、チオール、ヒドロキシル又はアルデヒドと反応する一基であってもよい。反応基は、例えばスクシンイミドエステル(SE)などのアミン-反応基又は、例えばマレイミド、ハロアセトアミド又はチオスルホン化メタン(MTS)などのチオール-反応基、又は、例えばアミン、アミノオキシ又はヒドラジドなどのアルデヒド-反応基であってもよい。

## 【0165】

また、本発明の化合物は、少なくとも一つの水溶性高分子基であるRを含む。本発明に係る水溶性高分子基は、蛍光性基の核となる構造の分子内移動度を有意に低減しうり、それゆえ蛍光性基の蛍光量子収率を改善しうる。また、かかる基は、結合する化合物に、蛍光性基の光安定性向上、生体分子標識での蛍光性基凝集の低減、標識生体分子(抗体など)の染色特異性の増大並びにインビボでの標識生体分子(抗体など)の免疫原性及び抗原性の

10

20

30

40

50

低減などの他の特性を付与してもよい。

【0166】

各水溶性高分子基は、一般に実質的に非反応性であり、水溶性部位が、化合物の蛍光特性を向上するのに十分な大きさである。本文脈で用いる「重合体」の用語は、厳密な繰返し単位を要しない。繰返し単位を有しない十分な分子サイズ及び溶解性の分子が本発明の目的の「水溶性高分子基」と想定する。

【0167】

水溶性高分子基としては、限定されないが、ポリペプチド及び炭化水素有機重合体及び生体分子を含む。水溶性高分子としては、エーテル基、ヒドロキシル基、三級アミン基、四級アミン基、及び/又は、グアニジン基を含む。各水溶性高分子は、直鎖、分岐、環状若しくはそれらの組合せであってもよい。本発明の水溶性高分子は、単鎖又は一、二、三、四又はそれより多い連鎖を含んでもよい。一、二、三、四又はそれより多い分岐の水溶性高分子を使用してもよい。本発明の化合物は、多数の水溶性高分子基のいずれを含んでもよい。一般に、本発明の化合物は、少なくとも1水溶性高分子基から約8水溶性高分子基を含む。一つの実施形態において、化合物は、少なくとも2水溶性高分子基から約8水溶性高分子基を含む。他の実施形態において、化合物は、少なくとも3水溶性高分子基から約8水溶性基を含む。一化合物の各水溶性高分子基又は全水溶性高分子基の好適な分子量は、約100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 10000, 15000, 20000Da又はそれ以上であってもよい。一つの実施形態において、本発明の水溶性高分子基は、450~5000Daの分子量を有する。他の実施形態において、本発明の水溶性高分子基は、約800~約3000Daの分子量を有する。更に他の実施形態において、一化合物の全水溶性高分子基の総分子量は、約450~約5000Daである。更なる他の実施形態において、一化合物の全水溶性高分子基の総分子量は、約1,000~約3,000Daである。

10

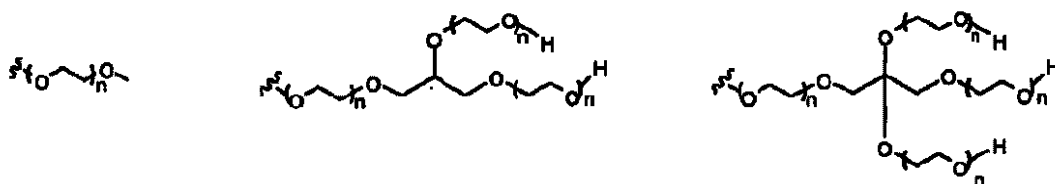
20

30

【0168】

一つの実施形態において、本発明の水溶性高分子はポリアルキレンオキシドである。好適なポリアルキレンオキシドとしては、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール(PEG-PPG)共重合体及びN-置換メタクリルアミド含有重合体及び共重合体が挙げられる。本発明に適する多様なポリアルキレンオキシドとその製法及び使用は、以下を参照、米国特許第5,637,749; 5,650,388; 5,298,643; 5,605,976; 5,567,422; 5,681,567; 5,321,095; 5,349,001; 5,405,877; 5,234,903; 5,478,805; 5,324,844; 5,612,460; 5,756,593; 5,686,110; 5,880,131; 6,824,782; 5,808,096; 6,013,283; 6,251,382号中に記載されている。ポリアルキレンオキシド試薬の市販元としては、Sigma-Aldrich, Nanocs, Creative Biochem, Pierce, Enzon, Nektar及び日本油脂社が挙げられる。ポリアルキレンオキシド基の例として下記を示す。

40



ポリアルキレンオキシドは、重合体に他の望ましい特性を付与するのに必要な置換基を追加的に置換してもよい。かかる修飾は、例えば、重合体の半減期の化学的又は生物学的安定性の調整をしよう重合体の化学的安定性を増大又は低減する化学的連結を含んでもよい。一部の場合、ポリアルキレンオキシド分子は、多様な基で末端処理または「末端処理」されてもよい。かかる基の例示として、ヒドロキシ、アルキルエーテル(例えば、メチル、エチル、プロピルエーテル)、カルボキシメチルエーテル、カルボキシエチルエーテ

50

ル，ベンジルエーテル，ジベンジルメチレンエーテル又はジメチルアミンが挙げられる。ポリアルキレンオキシドは，多数の用いうる末端の一を有してもよく，限定されないが，ヒドロキシル，メチルエーテル，エチルエーテル，カルボキシメチルエーテル及びカルボキシエチルエーテルが挙げられる。一実施形態において，メチルエーテル末端のポリアルキレンオキシドはポリエチレングリコールポリマーである。かかる基はmPEGと呼んでもよい。mPEG一般に式 $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ であって，ここで，nはエチレングリコール単位数であり，該mPEGの大きさによって決まる。

#### 【0170】

他の好適な重合体は，ポリ(2-ヒドロキシエチル methacrylate)，ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド，ポリ(スチレンスルホン酸)，ポリ(ビニルアルコール)又はポリ(2-ビニルN-メチルピリジウムヨーダイド)の誘導体及び接合体

他の実施形態において，本発明の水溶性高分子は炭化水素である。かかる炭化水素は，単糖類又は多糖類を含み，例えば，可溶性スターチ，グリコーゲン，デキストラン，ペクチン，マンナン，ガラクトン，ヒドロキシメチルセルロース，ヒドロキシエチルセルロース他のセルロース誘導体が挙げられる。水溶性高分子が炭化水素である場合，炭化水素中に存在するヒドロキシル基の少なくとも30%が，メチルエーテル，スルホナートアルキルエーテル及び/又はアセテートエステルでマスクされてもよい。

#### 【0171】

更に他の実施形態において，本発明の水溶性高分子はポリペプチドである。好適なポリペプチドは，例えば，セリン，アルギニン，イプシロンアミノ基で修飾したポリリジン又はシステイン酸を含む。かかるポリペプチドの他の例示は，例えば，国際特許出願パンフレット第WO 2006/081249号中に開示されている。かかるポリペプチドは本発明の水溶性高分子として使用してもよいと予期しうる。

#### 【0172】

また，本発明の水溶性高分子は，上記異なる分類の組合せも含む。例えば，かかる水溶性高分子は，ポリアルキレンオキシド部位に連結したポリペプチドである。

#### 【0173】

水溶性高分子は，一般に本発明の化合物中に含まれる単数又は複数の基反応基の化学性において互換性のない単数又は複数の基を含まない。例えば，水溶性高分子は，反応基が求電子剤である場合，強求核剤を含まない。より特定した例では，水溶性高分子は，反応基がN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルの場合，一級又は二級アミンを含まない。他の特定の例では，反応基がマレイミドの場合，水溶性高分子はチオールを含まない。同様に，水溶性高分子は一般に反応基が求核剤である場合，強求電子剤を含まない。しかしながら，水溶性物は，反応基の化学性が有意に影響しない又は本発明の化合物の安定性が貯蔵及び取り扱い中に影響されないなどの最小限数の弱求核剤又は最小限数の弱求電子剤を含みうる。弱求核剤の例としては，炭化水素分子中に通常存在するヒドロキシル基がある。そこで，いくつかの実施形態において，水溶性高分子が炭化水素である場合，好適には炭化水素中に存在するヒドロキシル基の少なくとも30%が，メチルエーテルなどのエーテル及び/又はアセテートエステルなどのエステルとしてマスクされてもよい。他の実施形態において，全ヒドロキシル基がエーテル及び/又はエステルとしてマスクされてもよい。

#### 【0174】

一般に，本発明の化合物の付加的置換基(「R」)は，一部の場合，スルホン酸 $(-SO_3^-)$ ，ホスホン酸 $(-PO_3^{2-})$ 及びアンモニウム基などの基であってもよい。本明細書において，アンモニウムの用語は， $NH_4^+$ ，トリアルキルアンモニウム又はテトラアルキルアンモニウムを意味する。当業者ならば，電荷均衡のためイオン性基には対イオンが必要だと理解できる。例えば，負電荷の $-SO_3^-$ 又は $-PO_3^{2-}$ は，各々負電荷を均衡化するため一又は二のカチオンを必要としてもよい。同様に，正電荷のアンモニウムは，中性を維持するためアニオンを必要としてもよい。一般に，対イオンが該蛍光性基の安定性を低下させない限り，対イオンの性質は重要な意味を持たない。いくつかの実施形態において，置換基が $-SO_3^-$ 又

10

20

30

40

50

は-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>である場合、対イオンは、H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>及びアンモニウムである。他の実施形態において、置換基がアンモニウムである場合、対イオンは、塩化物、フッ化物、臭化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸等が好適である。一部の蛍光性基は、内因的に正電荷又は負電荷を有してもよい。かかる場合、内因的電荷は、中性を維持するため、対イオンとして挙動するか、対イオンを必要としてもよい。内因的電荷に対する対イオンの選択規則は上述した。本発明のいくつかの実施形態において、少なくとも一つのスルホン酸基(-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)が存在し、いずれかの必要な対イオンがH<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>及びアンモニウムから選択される。簡潔にするという理由のため、明細書中に記載した大部分の蛍光性基構造のいかなる解離可能な単数又は複数の対イオンを示さなかった。

【0175】

かかる置換基は、化合物の水溶性及び/又はその蛍光量子収率を増大させてもよい。しかしながら、比較的多数の荷電基は一般に望ましくない。なぜなら、高度に荷電したフルオロフォアを得ることとなり、タンパク質と接合する上で、例えば、タンパク質の等電点を有意に荷電し、それゆえ、標識タンパク質の生物学的特性におそらく影響しするからである。例えば、高度に荷電したフルオロフォア分子で標識した抗体は、染色で大きなバックグラウンドを示す。いくつかの実施形態において、かかる荷電水溶性R基の数は、0~4又は0~3である。本発明の蛍光性基が少なくとも一つの水溶性高分子基を有するため、また、蛍光性基の水溶性及び/又はその蛍光量子収率を増大させることが可能であるため、スルホン酸基などの荷電R基の数は、最小限に維持でき、このため、標識タンパク質の生物学的特異性の消失を最小限にとどめた。

【0176】

各置換基Rは、同一でも異なってもよく、ハロゲン、-OH、-NH<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>及び1~15個の炭素原子及び任意に一つのヘテロ原子を含むいずれかの炭素含有置換基から選択されてもよい。存在する場合、少なくとも一つのヘテロ原子は、ハロゲン、N、O、S、P及びSiからなる基から選択されるのが好適である。

一部の場合、Rは、例えば、ジエチルアミン又はジメチルアミンなどのジアルキルアミン置換基であってもよい。Rが炭素含有置換基である場合、例えば、アルキル、シクロアルキル、アルケニル又はアルキニルを含むいかなる構造又は立体配置を想定してもよい。

【0177】

本発明の化合物は多様な立体配置を取りうる。特定の立体配置の立体配置の例示を下記table 2中に示した。

【0178】

【表4】

Table2:式Iの化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
クマリン不飽和	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン-反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCl等の 三価の原子 又は基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG,		アミン-					

【0179】

10

20

30

40

【表 5】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
		MW 800- 2000		反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
クマリン1付加 的置換基(アル キル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ, 又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
クマリン2付加 的置換基(アル キル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ, 又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					

10

20

30

40

【 0 1 8 0 】

【表 6】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>n</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
クマリン3付加 的置換基(アル キル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ, 又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
クマリン, 融合環 付加的置換基 (アルキル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ 又はスルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
				チオール 反応性					
				アルコール 反応性					

10

20

30

40

【 0 1 8 1 】

【表 7】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
					反応性				
		PEG, MW 2000- 5000			アミン- 反応性				
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				
インドカルボン アニン蛍光性基, 非置換	アルキレン, m = 0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q = 0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q = 0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				
		PEG, MW 800- 2000			アミン- 反応性				
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				
		PEG, MW 2000- 5000			アミン- 反応性				
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				
インドカルボン アニン蛍光性基, 付加的置換基 (アルキル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ 又はスルホニル)	アルキレン, m = 0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q = 0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q = 0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				
		PEG, MW 800- 2000			アミン- 反応性				
					チオール- 反応性				
					アルコール- 反応性				

10

20

30

40

【 0 1 8 2 】

【表 8】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
ローダミン蛍光 性基, 非置換	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	0 q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
ローダミン蛍光 性基, 付加的置換 基, (アルキル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ, 又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW		アミン- 反応性					

10

20

30

40

【 0 1 8 3 】

【表 9】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
		2000-5000							
				チオール-反応性					
				アルコール-反応性					
フルオロセイン 蛍光性基, 非置換	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300-800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800-2000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 2000-5000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
フルオロセイン 蛍光性基, 付加的 置換基(アルキル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ, 又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300-800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 800-2000		アミン- 反応性					
				チオール- 反応性					
				アルコール- 反応性					
		PEG, MW 2000-5000		アミン- 反応性					

10

20

30

40

【 0 1 8 4 】

【表 10】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>r</sub> RG	(L) <sub>s</sub>	(R) <sub>t</sub>	(L) <sub>u</sub>		
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
ビレン	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
ビレン, 付加的 置換基, (アルキル, ハロ, アミノ, ヒドロキシ又は スルホニル)	アルキレン, m=0又は 1	PEG, MW 300- 800	アルキレン, q=0又は 1	アミン- 反応性	アルキレン, q=0又は 1			0	N又はCH等 の三価の 原子又は 基
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
		PEG, MW 800- 2000		アミン- 反応性					
					チオール 反応性				
					アルコール 反応性				
		PEG, MW 2000- 5000		アミン- 反応性					
					チオール 反応性				
					アルコール				

10

20

30

40

【 0 1 8 5 】

【表 1 1】

Table2:式 I の化合物の立体配置の例示

F	(L) <sub>m</sub>	R <sub>1</sub>		R <sub>2</sub>		R <sub>3</sub>		n	T
		(R) <sub>p</sub> WSP	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub> RG	(L) <sub>q</sub>	(R) <sub>p</sub>	(L) <sub>q</sub>		
				反応性					

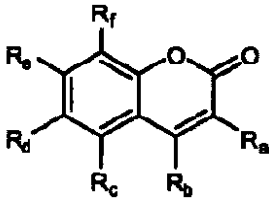
上記表中、「WSP」は水溶性高分子基を示し、一方、「RG」は反応基を表す

一つの実施形態において、式 I の化合物が、下記式のキサンテン蛍光性基、クマリン蛍光性基、ピレン蛍光性基又はシアニン蛍光性基であるフルオロフォアを含む。かかるフルオロフォアは下記式を有してもよい。

10

【0186】

【化39】



式 I 中に示されたように、R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>e</sub>及びR<sub>f</sub>が、フルオロフォアと-(L)<sub>m</sub>-部位又は下記式の部位に結合している結合である。

20

【0187】

【化40】



R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>e</sub>及びR<sub>f</sub>の残った部位が、式(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であって、R、L、p及びqが上記定義のようである。例えば、R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>、R<sub>c</sub>、R<sub>d</sub>、R<sub>e</sub>及びR<sub>f</sub>のいかなる隣接対が、結合して、付加的なR置換基だけでなく、環中に付加的なヘテロ原子を任意に含む飽和又は不飽和の5員環又は6員環を形成してもよい。一部の実施形態において、かかるR置換基は、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、スルホンアミド、ハロ、ヒドロキシ、アミノ又はアルキル基である。

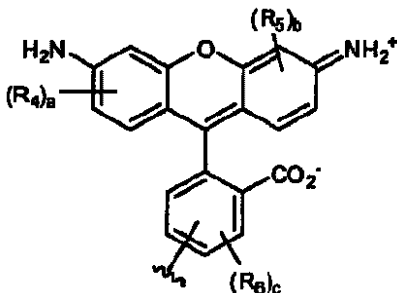
30

【0188】

他の実施形態において、フルオロフォアが、下記式である。

【0189】

【化41】

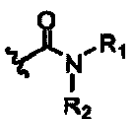


40

下記式が上記フルオロフォアと

【0190】

【化42】



上記-(L)<sub>m</sub>-部位又は下記式の部位に結合し、

【0191】

50

## 【化 4 3】

(T)

$R_4$ ,  $R_5$  及び  $R_6$  が, 各々独立に  $(R)_p-(L)_q$ -であって,

$R_4$ ,  $R_5$  及び  $R_6$  の  $R$  が, 各々独立に,

i) 反応性対と反応し共有結合を形成可能な反応基,

ii) 水溶性高分子基,

iii) アルキル基, トリフルオロアルキル基, ハロゲン基, スルホン酸基又はスルホンアミド基, 若しくは,

iv) -Hであり,

$R_4$ ,  $R_5$  及び  $R_6$  の  $L$  が, 各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり, 約 1 ~ 1 0 0 原子を含み,

$R_4$ ,  $R_5$  及び  $R_6$  の  $p$  が, 各々独立に 1 ~ 2 0 の範囲の整数であり,

$R_4$ ,  $R_5$  及び  $R_6$  の  $q$  が, 各々独立に 0 ~ 2 0 の範囲の整数であり,

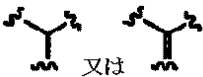
$a$ ,  $b$ , 及び  $c$  が, 各々独立に 0, 1, 2 又は 3 である。

## 【 0 1 9 2】

一つの実施形態において,  $T$  は下記式のような一つの炭素原子を含む三価の部位であり

## 【 0 1 9 3】

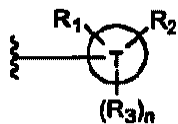
## 【化 4 4】



あるいは,  $T$  は三価の窒素原子であってもよい。例えば, 下記式 I 中,

## 【 0 1 9 4】

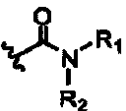
## 【化 4 5】



下記式を有してもよい。

## 【 0 1 9 5】

## 【化 4 6】



$R_1$  が水溶性高分子である場合, 上記水溶性高分子は, 約 300Da より大きい分子であってもよい。あるいは, 約 800Da より大きい分子量又は約 300Da より大きい分子量, あるいは, 約 800Da ~ 約 3000Da の範囲の分子量を有してもよい。 $R_1$  は, 例えば, ポリエチレングリコール基などの水溶性基を含んでもよい。いくつかの実施形態において, ポリエチレングリコール基の分子量は, 450 ~ 5000Da である。

## 【 0 1 9 6】

$R_2$  が反応基である場合, 反応基は, 例えば, アミノ, スルフヒドリル又はヒドロキシ求核剤と共有結合を形成してもよい。いくつかの実施例において, 反応基は, イソチオシアネート, イソシアネート, モノクロロトリアジン, ジクロロトリアジン, ハロゲン置換ピリジン, ハロゲン置換ジアジン, ホスホラミダイト, マレイミド, アジリジン, スルホンルハライド, 酸ハロゲン化物, ヒドロキシスクシンイミジルエステル, ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル, テトラフルオロフェノールエステル, イミドエステル, ヒドラジン, アジドニトロフェニル, アジド, アルキン, 3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン

10

20

30

40

50

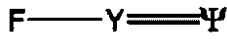
アミド，グリオキサール又はアルデヒドである。いくつかの実施例において，反応基は，N-ヒドロキシこはく酸イミドエステルである。

【0197】

本発明の他の実施形態において，最大蛍光励起波長を有する，式IIの構造を有する化合物が提供される。

【0198】

【化47】

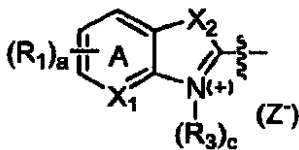


式II

Fは，下記式の構造を有する部位である。

【0199】

【化48】



Z<sup>-</sup>は，対イオンである。

【0200】

Yは，F及び 間で電子消失しうる架橋単位である。シアニン蛍光性基の文脈において，好適な部位は当業者に周知である。一般に，Y基は，上記二つの構造環で電子消失しうる

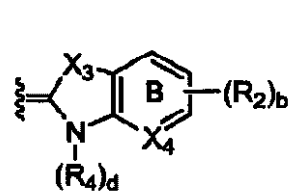
。例えば，Yは，メチン単位であってもよく，あるいは，任意に一つ以上の4員環，5員環又は6員環を組み込んでいるポリメチン単位(トリ-，ペンタ-又はヘプタメチン)であってもよい。また，本発明のR基への付加的置換も想定される。例えば，Yは，上記に定義した水溶性高分子，反応基又は付加的な置換基であるR基を含んでもよい。例えば，アルキル，SO<sub>3</sub><sup>-</sup>及びハロゲンがみな，Y基の一部として存在するありうる置換基である。

【0201】

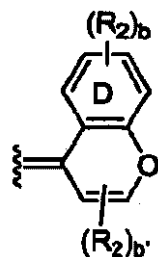
一部の実施形態において， は，下記構造の1つを有する部位である。

【0202】

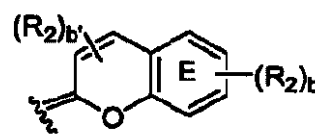
【化49】



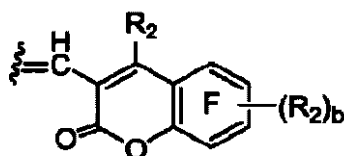
式1



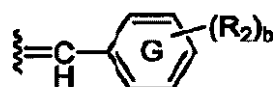
式2



式3



式4



式5

X<sub>1</sub>及びX<sub>4</sub>は，独立に下記である。

【0203】

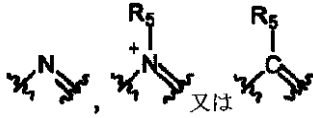
10

20

30

40

【化50】



X<sub>1</sub>及びX<sub>4</sub>は、付加的に置換されてもよく、また置換されなくてもよい。

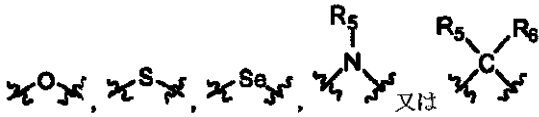
【0204】

X<sub>2</sub>及びX<sub>3</sub>は、独立に下記である。

【0205】

【化51】

10






要素a及びbは、独立に0, 1, 2又は3である。

【0206】




要素b'は、0, 1又は2である。

【0207】

いくつかの実施形態において、が式1であり、化合物の最大蛍光励起波長が660nmより小さい場合、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-で、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、置換環を形成するように結合しない。本発明の他の実施形態において、が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nm以上である、又はが式1以外である場合、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、各々独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-、又はR<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、1以上の(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-により置換されない又は置換された環状部位を形成するように結合している。形成された環状部位は、炭素環又は複素環を有する5員環、6員環又は7員環であり、いくつかの実施形態において、一つ以上の反応基及び/又は一つ以上の水溶性高分子により置換される。

20

【0208】

更に他の実施態様において、が式1であり、化合物の最大蛍光励起波長が655nmより小さい場合、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-で、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、置換環を形成するように結合しない。本発明の他の実施形態において、が式1であり、化合物の最大蛍光励起波長が655nm以上である、又はが式1以外である場合、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、独立に(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-、又はR<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、1以上の(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-により置換されない又は置換された環状部位を形成するように結合している。

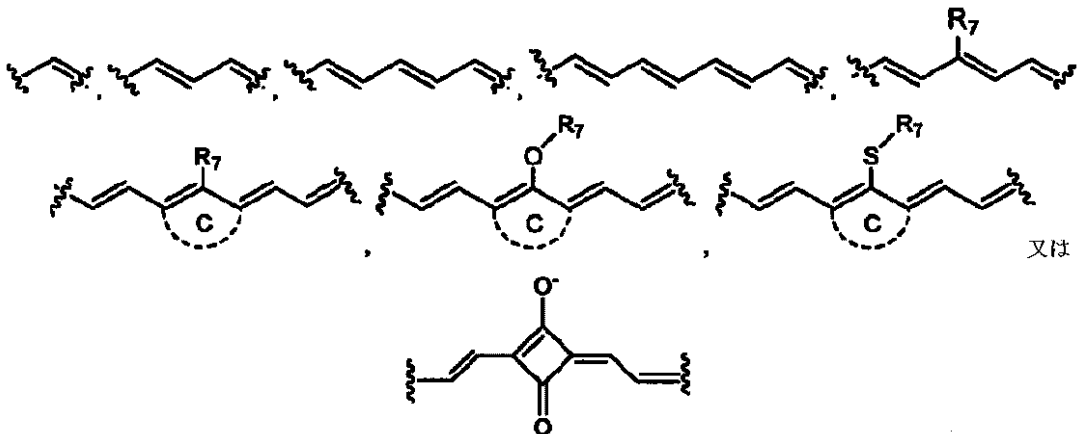
30

【0209】

多様な実施形態において、Yは下記である。

【0210】

【化52】



40

Cが存在する場合、Cは、五員環基又は六員環基である。

50

## 【0211】

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$  及び  $R_7$  は、各々独立に  $(R)_p-(L)_q$ -である。

## 【0212】

化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ -のRは、各々独立に

- i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、
- ii) 水溶性高分子基、
- iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、
- iv) -Hである。

10

## 【0213】

化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ -のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1~100原子を含む。

## 【0214】

$(R)_p-(L)_q$ -のpは、各々独立に約1~約20の範囲の整数であり、

$(R)_p-(L)_q$ -のqは、各々独立に0~約20の範囲の整数である。

## 【0215】

$R_3, R_4, R_5, R_6$  及び  $R_7$  の各  $(R)_p-(L)_q$ -のqは、各々独立に1~約20の範囲の整数である。

## 【0216】

要素cは0又は1である。

20

## 【0217】

要素dは0又は1である。

## 【0218】

化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ -のRの少なくとも1つは、反応性部位であり、化合物の各  $(R)_p-(L)_q$ -のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である。

## 【0219】

一部の実施形態において、本発明は、少なくとも二つの隣接する  $R_1$  及び / 又は二つの隣接する  $R_2$  が存在する場合、二つの隣接する  $R_1$  及び / 又は二つの隣接する  $R_2$  は、1以上の  $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された6員環を形成するように結合する。

30

一部の実施形態において、二つの隣接する  $R_1$  及び / 又は二つの隣接する  $R_2$  は、6員環を形成するように結合している場合、形成された環が芳香族である。一部の実施形態において、二つの隣接する  $(R_2)_b$  及び結合している環B中の原子が、炭素環を形成するように結合し、更に蛍光性基の溶解性を増大させうる基と任意に付加的に置換される。一部の実施形態において、二つの隣接する  $(R_2)_b$  及び結合している環B中の原子が、芳香族である炭素環を形成するように結合し、更に蛍光性基の溶解性を増大させうる基と任意に付加的に置換される。一部の実施形態において、二つの隣接する  $(R_1)_a$  及び結合している環A中の原子が、炭素環を形成するように結合し、更に蛍光性基の溶解性を増大させうる基と任意に付加的に置換される。一部の実施形態において、二つの隣接する  $(R_1)_a$  及び結合している環A中の原子が、芳香族である炭素環を形成するように結合し、更に蛍光性基の溶解性を増大させうる基と任意に付加的に置換される。

40

## 【0220】

要素cは0又は1でもよい。Cが1である場合、 $R_3$  が結合する窒素原子は、正に帯電する。同様に、要素dは0又は1でもよい。

## 【0221】

多様な実施形態における式IIの化合物において、 $R_1$  及び  $R_2$  のRの少なくとも1つは、荷電部位である。一部の実施形態において、 $R_1$  及び  $R_2$  のRの少なくとも1つが、スルホン酸基又はホスホン酸基を含む。更に他の実施形態において、 $R_1$  及び  $R_2$  の各Rが、スルホン酸基又はホスホン酸基を含む。

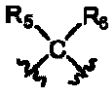
## 【0222】

50

本発明の多様な実施形態において、 $X_2$ 及び $X_3$ が、独立に下記である。

【0223】

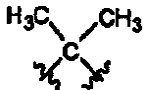
【化53】



関連する実施形態において、 $X_2$ 及び $X_3$ は、メチル又はエチルなどのアルキル基である。一部の実施形態において、 $X_2$ 及び $X_3$ が、独立に下記である。

【0224】

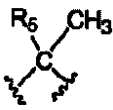
【化54】



一部の実施形態において、 $X_2$ 及び $X_3$ が、独立に下記であり、 $X_5$ が、反応基又は水溶性高分子を含む。

【0225】

【化55】



式IIの化合物は、少なくとも一つの反応基及び水溶性高分子を含む。かかる基は、式II中に示されるいかなる位置で結合してもよい。例えば、反応基又は水溶性高分子は、環A又は環Bに結合してもよい。あるいは、反応基又は水溶性高分子は、式II中に示された窒素原子を置換してもよく、例えば、 $R_3$ が反応基及び $R_4$ が水溶性高分子であって、L連結部位を通じて任意に結合してもよい。また、更に、反応基及び/又は水溶性高分子は、式II中の $X_2$ 及び/又は $X_3$ 位置に結合してもよく、又は連結部構造Yの一部であってもよい。

【0226】

一部の場合、式IIの化合物の溶解性を増大するように、環A上で又は環B、D、E、F及びGの一上で又は環A上で及び環B、D、E、F及びGの一上での荷電部位である、少なくとも一つのR置換基を含むことが望ましくてもよい。かかる部位は、スルホン酸基又は上記他のいずれかの基であってもよい。同様の置換は、例えば、スルホン酸、ホスホン酸又は他の荷電基で置換された連結する部位と結合することで、基 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $X_2$ 及び $X_3$ の一部として起こってもよい。

【0227】

本発明の多様な実施形態において、水溶性高分子はポリアルキレンオキシドである。他の実施形態において、水溶性高分子はポリエチレンオキシドである。更に他の実施形態において、水溶性高分子は炭化水素である。一部の実施形態において、水溶性高分子はポリペプチドである。本発明の多様な実施形態において、水溶性高分子は、約800～約3000の範囲の分子量を有する。いくつかの実施形態において、水溶性高分子は、300より大きい分子量を有する。他の実施形態において、水溶性高分子は、800より大きい分子量を有する。

【0228】

いくつかの実施形態において、式IIの化合物は、少なくとも一つの反応基及び少なくとも二つの水溶性高分子を含む。

【0229】

いくつかの実施形態において、式IIの化合物は下記式である。

【0230】

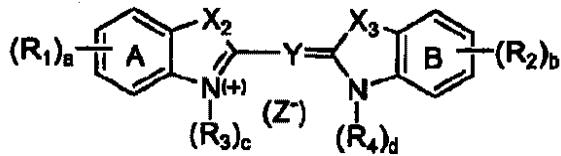
10

20

30

40

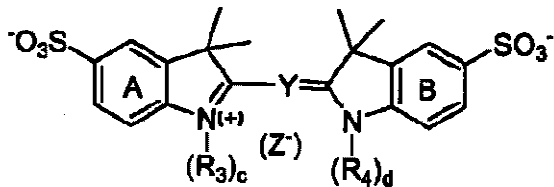
【化56】



いくつかの実施形態において、式IIの化合物は下記式である。

【0231】

【化57】



10

cが1であり、dが1であり、少なくともR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>のRの一つが水溶性高分子基である。

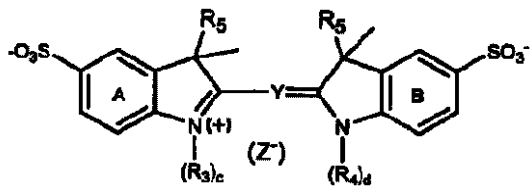
【0232】

他の実施形態において、化合物は下記式である。

20

【0233】

【化58】



cが1であり、dが1であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが水溶性高分子のラジカルである。他の実施形態において、cが1であり、dが1であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの二つが水溶性高分子のラジカルである。一つの実施形態において、最大吸収波長が、約550nm、約650nm又は約750nmであるようにYを選択する。

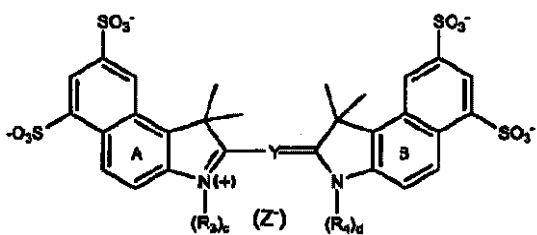
30

【0234】

さらに他の実施形態において、化合物は下記式である。

【0235】

【化59】



40

cが1であり、dが1である。

【0236】

R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基であり、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>のRの一つが水溶性高分子基である。

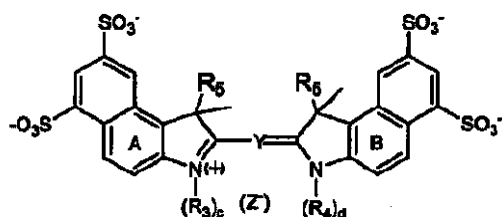
【0237】

50

一部の他の実施形態において、化合物は下記式である。

【0238】

【化60】



cが1であり、dが1である。

10

【0239】

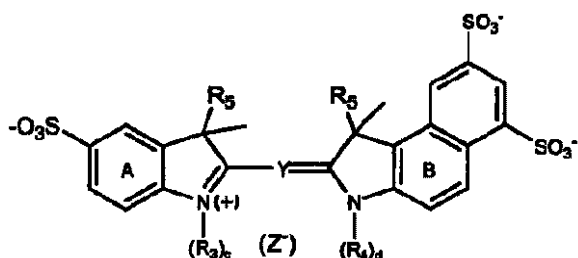
少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの二つが水溶性高分子のラジカルである。

【0240】

他の実施形態において、化合物は下記構造である。

【0241】

【化61】



20

cが1であり、dが1である。

【0242】

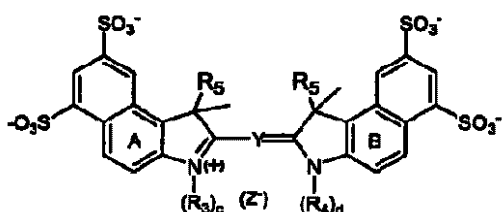
少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの二つが水溶性高分子のラジカルである。他の実施形態において、

30

他の実施形態において、化合物は下記構造である。

【0243】

【化62】



cが1であり、dが1であり、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの一つが反応基であり、少なくともR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>のRの二つが水溶性高分子のラジカルである。一つの実施形態において、最大吸収波長が、約580nm、約680nm又は約790nmであるようにYを選択する。

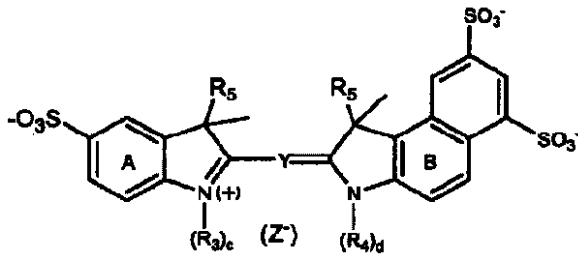
40

【0244】

更に他の実施形態において、化合物は下記構造である。

【0245】

## 【化63】



Cが1であり、dが1であり、 $R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも一つは、反応基であり、 $R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ のRの少なくとも二つは、互いに二つの水溶性高分子のラジカルである。一つの実施形態において、最大吸収波長が、560nm近辺、660nm近辺又は770nm近辺であるようにYを選択する。

10

## 【0246】

式IIの化合物において、式Fの部位の特定の実施形態と組み合わせ、部位Yの特定の実施形態と組み合わせ及び化合物の最大蛍光励起波長が約350～約1200nmの範囲となるように特定の置換基と組み合わせ、架橋単位Yを選択することは当業者に周知である。最大吸収波長及び最大蛍光発光波長を確認するため、色素の吸収及び発光スペクトルを得るのに用いる標準的な分析法は、当業者に周知である。上記基のいずれかの組合せを、約550nm、約560nm、約570nm、約580nm、約590nm、約600nm、約610nm、約620nm、約615nm、約620nm、約625nm、約630nm、約635nm、約640nm、約650nm、約655nm、約660nm、約665nm、約670nm、約675nm、約680nm、約685nm、約690nm、約695nm、約700nm、約705nm、約710nm、約715nm、約720nm、約725nm、約730nm、約735nm、約740nm、約745nm、約750nm、約755nm、約760nm、約765nm、約770nm、約775nm、約780nm、約790nm、約800nm、約810nm、約820nm、約830nm、約840nm、約850nm、約860nm、約870nm、約880nm、約890nm、約900nm、約910nm、約920nm、約930nm、約940nm、約950nm、約960nm、約970nm、約980nm、約990nm、約1000nm、約1020nm、約1040nm、約1060nm、約1080nm、約1100nm、約1120nm、約1140nm、約1160nm、約1180nm又は約1200nmの最大蛍光励起波長を有する本発明の化合物を形成するの用いてもよい。上記部位は、いかなる組合せで用いてもよい。色素の最大蛍光励起波長は、典型的には、色素を励起して発光させる、色素が最大吸収又は最大光学密度を有する波長である。いくつかの実施形態において、式IIの化合物は、>670nmの最大吸収波長を有する。一つの実施形態において、最大吸収波長は、>700nmである。他の実施形態において、最大吸収波長は、>800nmである。

20

30

## 【0247】

また、当業者は、式Fの部位の特定の実施形態と組み合わせ、部位Yの特定の実施形態と組み合わせ及び特定の置換基と組み合わせ、約550nm、約560nm、約570nm、約580nm、約590nm、約600nm、約610nm、約620nm、約615nm、約620nm、約625nm、約630nm、約635nm、約640nm、約650nm、約655nm、約660nm、約665nm、約670nm、約675nm、約680nm、約685nm、約690nm、約695nm、約700nm、約705nm、約710nm、約715nm、約720nm、約725nm、約730nm、約735nm、約740nm、約745nm、約750nm、約755nm、約760nm、約765nm、約770nm、約775nm、約780nm、約790nm、約800nm、約810nm、約820nm、約830nm、約840nm、約850nm、約860nm、約870nm、約880nm、約890nm、約900nm、約910nm、約920nm、約930nm、約940nm、約950nm、約960nm、約970nm、約980nm、約990nm、約1000nm、約1020nm、約1040nm、約1060nm、約1080nm、約1100nm、約1120nm、約1140nm、約1160nm、約1180nm、約1200nm、約1220nm、約1240nm又は約1250nmの最大蛍光発光波長を有する式IIの化合物を得るように、架橋単位Yを選択することができる。上記部位は、いかなる組合せで用いてもよい。

40

## 【0248】

一実施形態によると、式IIの化合物の最大吸収波長は、少なくとも655nmより大きい。

## 【0249】

一実施形態によると、式IIの化合物の最大吸収波長は、少なくとも670nmより大きい。更なる他の実施形態において、式IIの化合物の最大吸収波長は、少なくとも670nmより大

50

きい。更に他の実施形態において、式IIの化合物の最大吸収波長は、少なくとも700nmより大きい。

【0250】

本発明の他の実施形態において、シアニン色素が約660nm以上の最大蛍光励起波長を有する、一つ以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素が提供される。いくつかの実施形態において、置換シアニン色素は、少なくとも一つの反応基を含む。いくつかの実施形態において、置換シアニン色素は、非スピロ部位で置換されている。

【0251】

本発明の更なる実施形態において、シアニン色素が約660nm以上の最大吸収波長を有する、一つ以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素が提供される。いくつかの実施形態において、置換シアニン色素は、少なくとも一つの反応基を含む。いくつかの実施形態において、置換シアニン色素は、非スピロ部位で置換されている。式IIの化合物の構造の例示を下記Table 3中に示した。

10

【0252】

【表 1 2】

Table3: 式IIの化合物の構造の例示

色素 No.	構造	$\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{min}}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
1	<p><math>n = 23</math></p>	457/
2	<p><math>n = 23</math></p>	550/570
3	<p><math>n = 23</math></p>	550/570
4	<p><math>n = 19</math> <math>n' = 19</math></p>	550/570
5	<p><math>n = n' = n'' = 11</math></p>	550/570

10

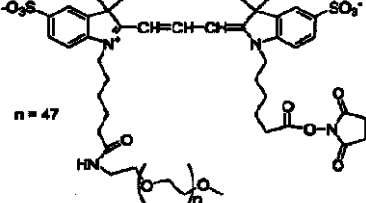
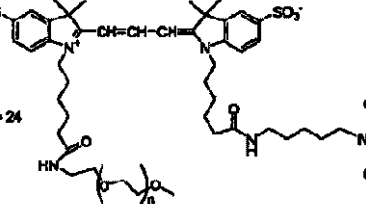
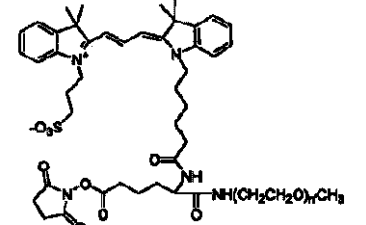
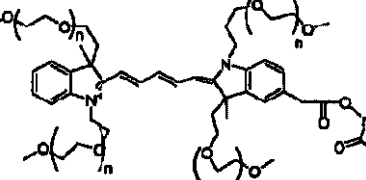
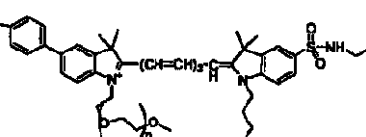
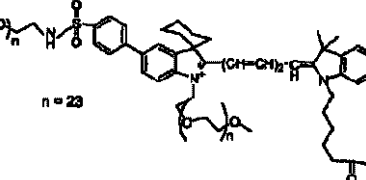
20

30

【 0 2 5 3 】

【表 1 3】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素 No.	構造	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
6		550/570
7		550/570
8		550/570
9		650/665
10		650/665
11		650/665

10

20

30

40

【表 1 4】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素No.	構造	$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
12	<p>n = 23</p>	650/665
13	<p>n = 23 n' = 11</p>	650/665
14	<p>n = 100</p>	660/680
15	<p>n = 23</p>	650/665

10

20

30

【 0 2 5 5 】

【表 15】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素 No.	構造	$\lambda_{max}/\lambda_{min}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
16	<p><math>n = 23</math></p>	663/690
17	<p><math>n = 23</math> <math>n' = 11</math></p>	752/778
18	<p><math>n = 23</math></p>	750/775
19	<p><math>n = 23</math> <math>n' = 11</math></p>	675/694
20	<p><math>CH_2(OCH_2CH_2)_n</math> <math>n = 12</math></p> <p><math>n' = 24</math></p>	750/775

10

20

30

40

【 0 2 5 6 】

【表 16】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素 No.	構造	$\lambda_{ab}/\lambda_{em}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
21	<p>n = 23</p>	
22	<p>n = 24</p>	768/788
23	<p>n = 24</p>	
24	<p>n = 23 n' = 12</p>	635/642
25	<p>n = 24</p>	

10

20

30

40

【 0 2 5 7 】

【表 17】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素No.	構造	$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
26	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	497/513
27	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	555/565
28	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	650/665
29	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	750/770
30	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	660/675

10

20

30

40

【表 18】

Table3:式IIの化合物の構造の例示

色素No.	構造	$\lambda_{12}/\lambda_{max}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
31	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	770/790
32	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	680/700
33	<p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>24</sub>CH<sub>3</sub></p>	790/810

\*簡潔にするため、対イオンは示さなかった

式IIの色素化合物は、優良な溶解性並びに優れた蛍光輝度及び光安定性を有する。特に、典型的には近赤外色素をいう約655nmより大きい最大吸収波長である式IIの化合物は、同様の波長での従来の色素に対し重大な利点を示す。

水溶性高分子の置換基は、本発明の近赤外色素の特性を徹底的に改善させ、先例のない蛍光輝度(図を参照)を得た。水溶性高分子の置換基は、近赤外色素の特性を徹底的に改善させた(図を参照)。

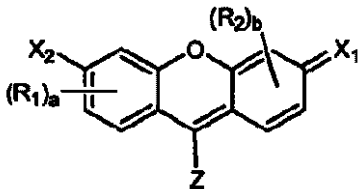
近赤外色素の安定性は問題点であり、貯蔵及び取り扱い上、極度の注意が必要であり、それゆえ、色素の使用に制限があった。

【0259】

また、本発明は、下記式IIIの化合物を提供する。

【0260】

【化64】



式III

Zは、-H、アルキル又は、-CF<sub>3</sub>又は-CNなどの或いは下記の置換基であってもよい。

【0261】

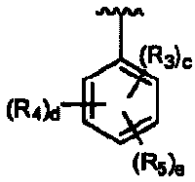
10

20

30

40

## 【化65】



式IIIの化合物は、一般に、キサンテン蛍光性基の分類に属する。 $X_1$ 、 $X_2$ 及びZの選択が、化合物が更にどの分類、つまり、フルオレセイン蛍光性基( $X_1$ が=O、 $X_2$ が-OH、Zが置換フェニルである)又はローダミン蛍光性基( $X_1$ が= $\text{NH}_2^+$ 又は= $\text{NR}_6\text{R}_7^+$ 、 $X_2$ が- $\text{NH}_2$ 又は- $\text{NR}_8\text{R}_9$ 、Zが置換フェニルである)又はrhodol基( $X_1$ が=O、 $X_2$ が= $\text{NH}_2^+$ 又は= $\text{NR}_6\text{R}_7^+$ である)、に属するかを決める。 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 及び $R_9$ は、各々独立に $(R)_p$ - $(L)_q$ -であり、L、p及びqは、一般に本明細書中の他の箇所で前述定義したとおり決定され、加えてまた、Rが、水溶性高分子及び反応基の両者を有する、例えば、結合部位によって結合した部位を含む。変数c、d及びeは、基Z中のフェニル環上の $R_3$ 、 $R_4$ 及び $R_5$ 置換基の数を示し、c、d及びeの合計が5以下であるように0、1、2又は3であってもよい。

10

## 【0262】

式IIIの各化合物は、水溶性高分子だけでなく、反応部位を含む。それゆえに、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 及び $R_7$ のRの少なくとも一つが反応部位であり、一方、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 及び $R_7$ のRの少なくとも一つが水溶性高分子基である。

## 【0263】

いくつかの実施形態において、式IIIの化合物は、フルオレセイン蛍光性基の分類に属し、 $X_1$ 及び $X_2$ がそれぞれ=O及び-OHであり、一方、Zは、式 $(R)_p$ - $(L)_q$ -少なくとも一つの部位で置換されたフェニル基である。関連する実施形態において、Zは、水溶性高分子である少なくとも一つのR及び反応基である少なくとも一つのRを含む。

20

## 【0264】

他の実施形態において、式IIIの化合物がローダミン蛍光性基の分類に属し、 $X_1$ が= $\text{NH}_2^+$ 又は= $\text{NR}_6\text{R}_7^+$ であり、 $X_2$ が- $\text{NH}_2^+$ 又は- $\text{NR}_8\text{R}_9^+$ であり、Zがフェニル部位少なくとも一つの $(R)_p$ - $(L)_q$ -部位(c、d又はeの少なくとも一つは0でない)で置換されている。例示として、 $X_2$ はアミノ基であって任意にアルキルなどの一つ又は二つの基で置換されてもよい。かかる場合、 $X_2$ は、例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルアミノ又はエチルアミノ置換基であってもよい。 $R_1$ 又は $X_2$ のいずれもが水溶性高分子基又は反応基を含まない場合、基Zは、少なくとも一つの反応基及び少なくとも一つの水溶性高分子で置換されてもよい。

30

## 【0265】

他の場合、 $R_1$ 及び $X_2$ を一緒に取って、炭素又は複素環から、式III中の環Aに融合する。関連する実施態様において、 $R_2$ 及び $X_1$ を一緒に取って、炭素又は複素環から、式III中の環Bに融合する。かかる融合環は、付加的なR基、例えば、 $\text{SO}_3^-$ 、アルキル若しくは水溶性高分子基又は反応基で付加的に置換されてもよい。 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 及び $R_9$ の一つと近隣の $R_1$ 及び/又は $R_2$ とを組み合わせ形成された環は、不飽和又は飽和であり、一つ以上の $(R)_p$ - $(L)_q$ -で置換されていなくてもよく、置換されていてもよい。

40

## 【0266】

基Zが-H、-CN又は- $\text{CF}_3$ である場合、 $R_1$ 、 $X_1$ 、 $R_2$ 又は $X_2$ のRの一つが水溶性高分子基を含み、一方、 $R_1$ 、 $X_1$ 、 $R_2$ 又は $X_2$ のRもう一方は反応基を含む。

## 【0267】

いくつかの実施形態において、水溶性基は、連結する部位又は結合する部位を介して、式IIIの核となる構造と結合するポリアルキレンオキシドを含む。 $R_3$ 、 $R_4$ 又は、 $R_5$ のいずれかが、水溶性高分子及び反応基が、共に独立した連結部位を介してつながる結合する部位であることが可能である。

## 【0268】

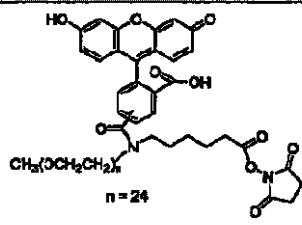
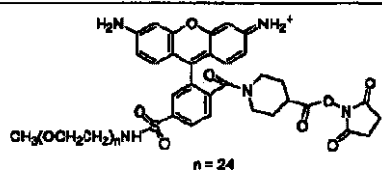
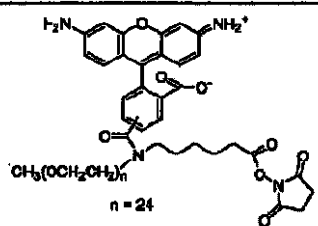
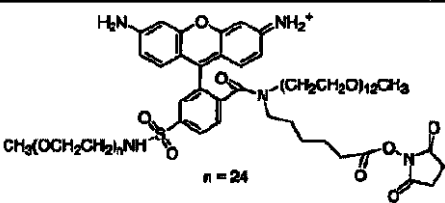
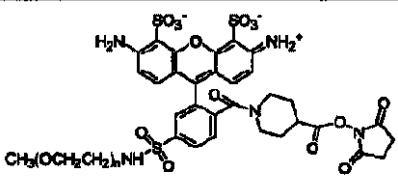
式IIIの化合物の例示をtable 4中に示した。

50

【 0 2 6 9 】

【 表 1 9 】

Table4:キサテン化合物\*の例示

色素No.	構造	$\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{min}}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
34	 <p>式 I</p>	494/520
35	 <p>式 III</p>	
36	 <p>式 I</p>	501/524
37	 <p>式 III</p>	
38	 <p>式 III</p>	

10

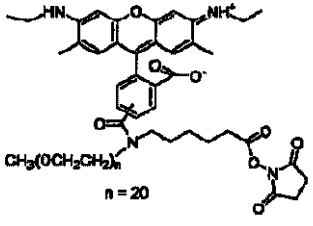
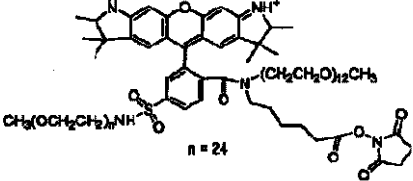
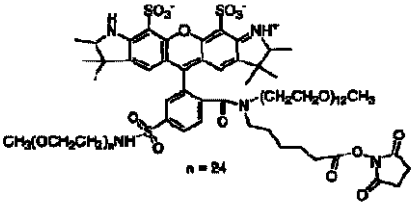
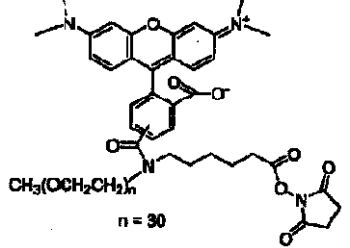
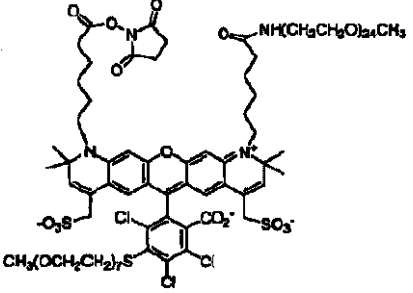
20

30

【 0 2 7 0 】

【表 20】

Table4:キサテン化合物\*の例示

色素No.	構造	$\lambda_{10}/\lambda_{max}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
39	 <p>式 I</p>	520/546
40	 <p>式 III</p>	
41	 <p>式 III</p>	
42	 <p>式 I</p>	540/565
43	 <p>式 III</p>	

10

20

30

40

【 0 2 7 1 】

【表 2 1】

Table4:キサテン化合物\*の例示

色素 No.	構造	$\lambda_{100}/\lambda_{500}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
44	<p>式 III</p>	
45	<p>式 III</p>	
46	<p>式 III</p>	
47	<p>式 III</p>	
48	<p>式 III</p> <p>-R = -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>26</sub>CH<sub>3</sub></p>	488/515

10

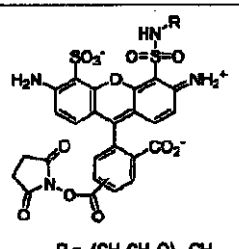
20

30

【 0 2 7 2 】

【表 2 2】

Table4:キサテン化合物\*の例示

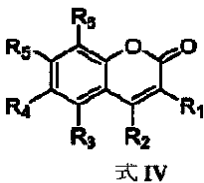
色素 No.	構造	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
49	 <p style="text-align: center;">-R = -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 式 III</p>	494/520

\*簡潔にするため、対イオンは示さなかった

本発明の一つの実施形態において、化合物は、下記式IVを有するクマリン蛍光性基である。

【0273】

【化66】



R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、上記に定義したように、(R)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>-であって、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のRの少なくとも一つが、水溶性高分子を含み、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のRの少なくとも他の一つが反応基を含む。

【0274】

一実施形態によると、R<sub>5</sub>が-OH又は-NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>であり、ここで、R<sub>7</sub>及びR<sub>8</sub>が独立に、H、アルキル基であって、任意に少なくとも一つのヘテロ原子、反応基、水溶性高分子基又はスルホン酸基を含む。あるいは、R<sub>7</sub>がR<sub>8</sub>と君合わさって、任意に少なくとも一つのヘテロ原子を含む置換されない又は置換された5員環又は6員環を形成する。本発明の他の態様において、R<sub>7</sub>がR<sub>4</sub>と組み合わせさって、及び/又は、R<sub>8</sub>がR<sub>4</sub>と組み合わせさって置換されない又は置換された5員環又は6員環を形成する、及び/又は、任意に付加的なR基で置換された他の5員複素環と融合してもよい。

【0275】

他の実施形態によると、R<sub>3</sub>及びR<sub>6</sub>は各々Hであり、R<sub>2</sub>及びR<sub>1</sub>は、独立に上記で定義したR基を含む。R<sub>1</sub>は、アリールであるR基を付加的に含んでもよく、アリールは、ハロゲン、N、P、O、S及びSiから選択した、少なくとも一つのヘテロ原子を任意に含み、一つ以上の付加的R置換基を任意に含む

本発明に従い、選択したクマリン式を、table 5中に一覧する。

【0276】

10

20

30

40

【表 2 3】

Table5:本発明に係る選択されたクマリンベース蛍光性基の一覧

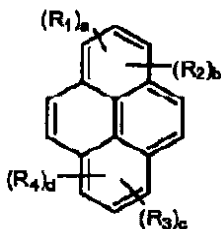
色素 No.	構造	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
50	<p>式 I</p>	353/442
51	<p>式 I</p>	346/442
52	<p>式 I</p>	416/455
53	<p>式 I</p>	430/545
54	<p>式 IV</p> <p>-R = -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub></p>	350/440

\*簡潔にするため、対イオンは示さなかった

また、本発明は、下記式Vの化合物を提供する。

【 0 2 7 7 】

【 化 6 7 】



式Vにおいて、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、互いに独立に $(R)_p-(L)_q$ -であって、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも一つが、水溶性高分子を含み、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ のRの少なくとも他の一つが反応基を含む。変数a、b、c及びdは、独立に0、1、2又は3である。

一般に、a、b、c及びdの合計は、2、3又は4である。一つの実施形態において、a、b、c及びdの合計は、4である。例えば、 $R_1$ 、 $R_2$ 及び $R_3$ は、各々 $(R)_p-(L)_q$ -基が独立に式-SO<sub>2</sub>NH(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>でnが約3～約30又は約7～約24であるものを含むような水溶性高分子基を含んでもよい。本実施態様によれば、 $R_4$ は、活性化カルボン酸のエステルなどの反応基であるRを含む。

10

20

30

40

50

## 【0278】

他の実施形態において、Lは、各スルホンアミドがピレン炭素にS-C結合を介して共有結合的に連結し、各アルキル部分が任意に少なくとも一つのOを含むように、反応基又は水溶性高分子基のいずれかが式Vのピレン部位と連結する、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> N-アルキルスルホンアミド又はC2-C10 N,N-ジアルキルスルホンアミド基を含んでもよい。

## 【0279】

他の実施形態において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は、スルホン酸基などの置換基を含み、R<sub>4</sub>は、水溶性高分子及び反応基の両者が独立した連結部位を介してつながる結合する部位である。

## 【0280】

式Vの化合物の例示をtable 6中に一覧する。

## 【0281】

## 【表24】

Table6: ピレン化合物\*の例示

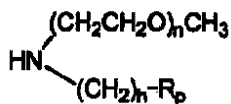
色素No.	構造	$\lambda_{292}/\lambda_{325}$ (nm) (H <sub>2</sub> O)
44	<p>式V</p>	
45	<p>式V</p>	
46	<p>式I</p>	400/424

\*簡潔にするため、対イオンは示さなかった

本発明は、本発明の化合物の調製方法を提供し、該方法は、1)アミン-反応基と下記の構造式を有するアミノ化合物とを連結したフルオロフォアを含む化合物を反応させる工程と、

## 【0282】

## 【化68】



ここで、nは、約3～約30から選択された整数であってもよく、hは、約1～約5から選択された整数であってもよく、R<sub>p</sub>は、保護剤又は保護反応基であり、2)得られた化合物中の保護剤又は保護反応基R<sub>p</sub>を反応基へ転換する。

## 【0283】

上記アミノ化合物は、例えば、mPEGトシレート又は塩化mPEGなどの適切なアルキル化mPEG化合物を、適切なR<sub>p</sub>基を含む適切なアミノアルキル化合物と反応させることで、直ちに調製できる。適切なR<sub>p</sub>基としては、カルボン酸基、カルボン酸基のメチルエステル、カル

10

20

30

40

50

ボン酸基のt-ブチルエステル基，t-BOC-保護アミン基及びベンジルオキシカルボニル-保護基が，単なる例示として，挙げられる。R<sub>p</sub>基が，遊離カルボン酸基などの潜在的反応基であれば，当業者に周知の方法を用いて，直接的に反応基に転換してもよい。R<sub>p</sub>基が，保護基であれば，脱保護を施し，その後，既知の方法を用いて，反応基に転換してもよい。

【0284】

#### (1)対象化合物の使用

目的化合物には多様な異なる用途での使用が見出せる。関心のある一つの用途は，目的化合物の特定の対象化合物に対し蛍光特性を付与することが可能な標識剤としての使用である。本発明の化合物は、限定されないが，ポリペプチド，ポリペプチドベース毒素，アミノ酸，ヌクレオチド，DNA及びRNAを含むポリヌクレオチド，脂質及び炭化水素並びにそれらいずれかの組合せなどの生体分子を含む広範囲の分子のいずれかと反応するのに使用できる。加えて，本発明の化合物は，ハプテン，医薬，金属キレートなどのイオン錯化剤，微粒子，合成又は天然重合体，細胞，ビールス，本発明にかかる色素分子を含む他の蛍光性分子又は表面と反応するのに使用できる。基質分子は，典型的には，目的化合物の反応基と反応して，共有結合又は非共有結合の連結を形成する一つ以上の官能基を含む。一つの形態において，本発明の化合物の反応基は，エステル(スクシンイミドエステル又はSEなど)，マレイミド，ヒドラジド又はアミノオキシ基である。従って，一部の実施形態において，基質分子(又は反応基質)からの官能基はアミン，チオール，アルデヒド又はケトンである。得られた蛍光標識された基質分子は，接合体又は標識された基質分子と言ってもよい。当業者の実践するいかなる蛍光性基-基質接合体の調製方法(例えば，Brinkley, Bioconjugate Chem. 3, 2(1992)を参照しここに組み込む。)も，本発明の実施に適応しうる。

10

20

【0285】

生体分子及び本発明の化合物の接合体は，通常，高い蛍光収率を有し，一方，典型的には，溶解性，受容体又は核酸への選択的結合，特定の酵素の活性化又は抑制，或いは生物膜内に組み込まれる能力などの非標識生体分子のクリティカルパラメータを保つ。しかしながら，最高度の標識度を有する接合体は，まだ沈降や非特異的に結合しうる。必要な場合，機能や結合特異性を保存するために，最大よりも低い標識度が容認されてもよい。本発明の接合体の調製は，特性の最適化実験を伴ってもよい。接合に引き続き，非接合標識剤を、ゲルろ過，透析，接合体沈殿及び再溶解，HPLC又はこれらの技術の組合せによるなどの当業者に既知の技術で除去してもよい。遊離色素の存在は、特に化学的反応性が残存する場合，生体接合での引き続きの実験を理解しがたいものにしうる。

30

【0286】

#### 核酸

他の実施形態において，目的化合物は，ヌクレオシド，ヌクレオチド又はポリヌクレオチドと接合するのに使用でき，かかる分子のいずれも天然又は合成，修飾又は非修飾であってもよい。標識に用いる本発明の化合物は，ホスホラミダイト，活性化エステル(スクシンイミドエステル)，アルキル化基又は反応性白金錯体である反応基を含んでもよい。かかる分子は，本発明の化合物上の反応基に対する一つ以上の反応対を含むか含むように誘導されてもよい。本発明の化合物の反応基は，共有結合の連結を形成するよう該分子上の適切な反応対と反応してもよい。例えば，ホスホラミダイト基は，脱保護後にヒドロキシル基と反応して，リン酸連結を形成してもよく，スクシンイミドエステルなどは，アミン基と反応してアミド連結を形成してもよく，反応性白金錯体は，グアノシン塩基と反応して白金錯体連結を形成してもよい。

40

一つの実施形態において，活性化エステルを含む本発明の反応性化合物は，アミノアルキニル基，アミノアリル基又はアミノアルキル基を含む塩基を含んでいるヌクレオチド三リン酸と，蛍光標識されたヌクレオチド三リン酸を形成するため反応する。

かかる標識ヌクレオチド三リン酸は，しばしば酵素的取込みを介して，蛍光標識された核酸重合体の調製に使用される。

【0287】

50

いくつかの実施形態において、本発明の蛍光性化合物は、アンダイン又はシチジン残基のC-5位へ結合する基又はリンカーと反応する。かかる位置は、ワトソン・クリック塩基対形成に関与せず、相補的配列へのハイブリッド形成にほとんど干渉しない。

アミノアルキニル連結部は、酵素又は標的結合位置とのフルオロフォア相互作用を低減するため、蛍光部位とヌクレオチド間に導入されてもよい。かかる四原子の架橋に加えて、7~10原子のスペーサーを、塩基からフルオロフォアを更に分離するために、導入してもよい。より長いスペーサーの使用により、より高輝度な接合体が得られ、二次検出剤のハプテン容易性を増大してもよい。

#### 【0288】

あるいは、2-アミノエトキシエチル(OBEA)リンカーを用いて、シトシンのN-4位を修飾したデオキシシチジン三リン酸は、調製される。蛍光性フルオロフォアの存在により発生しうる立体的干渉は、付加的スペーサーの使用により低減しうる。

#### 【0289】

蛍光標識DNAは、PCR反応、末端転移酵素-触媒付加又はmck翻訳により、蛍光標識ヌクレオチド三リン酸から調製してもよい。多様なポリメラーゼを、かかる反応中で用いてもよい。かかるポリメラーゼとしては、Taqポリメラーゼ(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイにおいて有用である)、DNAポリメラーゼI(例えば、ニックトランスレーション及びプライマー伸長法アッセイにおいて有用である)、クレノウポリメラーゼ(例えば、ランダム-プライマー標識において有用である)、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(TdT)(例えば、3'-末端標識において有用である)、逆転写酵素(例えばRNAテンプレートからのDNA合成用)又はインビトロでの転写用のSP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ及びT7 RNAポリメラーゼなどの他のポリメラーゼが挙げられる。

#### 【0290】

あるいは、蛍光標識核酸重合体は、最初にアミン-標識ヌクレオチドを核酸重合体へ酵素的に組み込んでアミン-標識核酸重合体を得、続いて上記アミン-標識重合体を本発明の化合物で標識して調製してもよい。蛍光標識ヌクレオチド三リン酸の調製及び使用に関するより詳しい情報は、米国特許第 4,711,955号及び5,047,519号中に見出せる。更にあるいは、DNAなどの核酸重合体は、反応性白金錯体を反応基として含み、米国特許第 5,714,327号中に記載のように白金錯体が、グアノシン塩基の窒素原子と配位結合を形成する本発明の化合物で直接標識してもよい。

#### 【0291】

##### アミノ酸及びポリペプチド

他の実施形態において、目的の化合物は、アミノ酸、アミノ酸類縁体又はポリペプチドと接合するのに使用できる。標識アミノ酸、アミノ酸類縁体及びポリペプチドは、本発明の化合物と、上記化合物上の反応基に対する反応対を含むアミノ酸、アミノ酸類縁体及びポリペプチドとを反応させて、標識される。かかる反応対は、前記ポリペプチド中に存在する天然又は非天然の基であってもよい。例示として、反応対は、天然リシン残基の一部であるアミノ基、天然システイン基の一部であるチオール基などの天然残基であってもよい。

#### 【0292】

可能な限り最大の蛍光を達成するため、標識によりタンパク質の生命活動が最小限しか影響されない程度において、タンパク質を標識可能な限り多数の同一蛍光性基の分子で標識してもよい。他の形態において、複数の蛍光性基分子が、タンパク質上で互いに相互作用することによる蛍光消光を回避することが望ましい。色素-色素相互作用は、色素凝集など物理的、又は、FRETに基づくエネルギー移動など分光学的であってもよく、両者の組合せでもよい。いずれの型の相互作用も、標識度の増大につれて、標識タンパク質の総蛍光が緩やかに立ち上がりその後急激に低下することに特徴づけられる蛍光消光に導かれる。図1-9は、本発明の蛍光性基が、水溶性高分子基を有さない同一の蛍光性基の従来技術品よりも、抗体又はストレプトアビジン上での蛍光消光がより起こりづらい又は実質的に起こりづらいことを示す。タンパク質上の蛍光性基標識の蛍光消光の主要な理由は

、色素ダイマーなどの色素凝集の形成によるものと信じられている。色素ダイマー形成が発生した場合、蛍光性基-タンパク質接合体の吸収スペクトルは、典型的には、二重ピークを示す。図1に示したように、本発明の蛍光性基は、従来技術の同一の蛍光性基よりもダイマー形成をずっと受けにくい。その結果、本発明の蛍光性基は、タンパク質上でより高輝度である(図2)。本発明の蛍光性基がタンパク質上で、比較的凝集する傾向が低いいため、多数回タンパク質を標識でき(すなわち標識度(DOL)がより高い)、より大きな蛍光強度(図3-8)が得られた。その結果、本発明の蛍光性基で標識した抗体は、従来技術の蛍光性基で標識した抗体よりも、標的を検出する感度に優れている(図9)。本発明の蛍光性基で標識した抗体の他の利点は、蛍光標識抗体に関する改善した染色特異性であり(図10)、本発明の蛍光性基で標識した抗体は、従来の蛍光性色素で同一の標識度で標識した同一の抗体よりも、抗原との結合での特異性をより高く維持する。本発明の蛍光性基の更なる利点は、凝集低下及び結合特異性増大の結果であり、結合対と結合した本発明の標識生体分子は、本発明の化合物ではない従来の蛍光性基で標識した同一結合対及び同一生体分子で形成した錯体よりも、より高い信号雑音比を有する蛍光信号を提供する。

10

20

30

40

50

#### 【0293】

いくつかの実施形態において、本発明の方法の錯体は、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約255、約260、約265、約270、約275、約280、約285、約290、約295、約300、約305、約310、約315、約320、約330、約340、約350、約360、約370、約380、約390又は約400以上の信号雑音比を有する。本発明の方法の錯体いくつかの実施形態において、信号雑音比は、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約255、約260、約265、約270、約275、約280、約285、約290、約295、約300、約305、約310、約315、約320、約330、約340、約350、約360、約370、約380、約390又は約400以上である。

#### 【0294】

いくつかの実施形態において、結合対と結合して本発明の標識を含む標識生体分子の錯体は、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約80%、約90%、約100%、約125%、約150%、約175%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%又は約1000%という同一標識度で標識した従来の蛍光性基で同一結合対及び同一生体分子で形成された錯体よりもより大きな蛍光信号を提供する。

#### 【0295】

蛍光性基の更に他の利点は、その高い光安定性であり、特に蛍光顕微鏡での研究において重要である(図11)。加えて、本発明の蛍光性化合物で標識したポリペプチドは、蛍光標識を有さない対応ポリペプチドよりも、短くない血清半減期を有しうる。

#### 【0296】

##### (2)本発明の標識生体分子の使用

目的の化合物は、広範で多様な用途での生体分子を標識するための効果的な手段を提供する。標識は、タンパク質、糖タンパク質、核酸及び脂質などの生体分子、無機化学品だけでなく及びそれらの組合せに生じる相互作用を識別できるようにする。相互作用は、核酸分子間、核酸とタンパク質間、タンパク質と小分子間であってもよい。相互作用は、組織又は器官若しくは被験者内である細胞内での活動まで範囲が及ぶ、無細胞の生物学的系内で、細胞系内で(細胞内及び細胞外系を含む)又はインビボ内で、識別されてもよい。多様な相互作用を描写することは、科学研究及び開発、医薬品設計、スクリーニング及び最適化、系統学的分類、個人、親子の遺伝子型解析及び法医学的同定、環境研究、疾病状態の診断、予後及び/又は治療において、しばしば有意義な手段である。

#### 【0297】

本発明の方法に従い標識した生体分子は、上述のように、結合対、生物学的な相互作用の標的を検出する結合剤として用いてもよい。例えば、タンパク質は、本発明の色素で標識でき、細胞表面受容体に結合するよう使用できる。本発明のいくつかの実施形態におい

て、最大蛍光励起波長が660nm以上であり、水溶性高分子基及び色素と結合剤を効果的に架橋する条件下の反応基を有する、置換シアニン色素で、結合剤を標識する。いくつかの実施形態において、置換シアニン色素は、非スピロ置換基によって置換される。標識された結合剤は、結合対と接触し、蛍光標識が検出される。他の実施形態において、結合剤は、式I、II、III、IV又はVの構造の化合物と、化合物と結合剤を効果的に架橋する条件下で反応する。

**【0298】**

本発明の標識分子は、FRET対の一部として、ドナー又はアクセプター分子のいずれかとして、多様な生物学的アッセイ及び方法中で使用されてもよい。当業者は、特定の用途に基づいて、適切なFRET対を選択することを知りうる。かかる用途としては、限定されないが、分子ビーコンを伴うアッセイ、FRETプロテアーゼアッセイ、流動細胞計測法、核酸ハイブリッド形成及び二以上の部位の相対空間局在化がプローブされねばならない他のいかなる用途が挙げられる。FRETは、一般に10~100の規模で有用である。一実施形態において、FRET対のドナー及びアクセプターが、共に本発明の標識分子である。他の実施形態において、FRET対の他方で標識した相補的オリゴヌクレオチドに対してアニーリングによりエネルギー移動効率を増大が導かれるようなアニーリングが可能であるFRET対の一方は、本発明の標識オリゴヌクレオチドである。かかる例において、FRET対の他方は、本発明のフルオロフォアであってもよく、又は異なるフルオロフォアであってもよい。

10

**【0299】**

一部の用途において、本発明の標識分子を消光するのが望ましい。当業者に既知の多様な消光剤を用いてもよい。限定されない例示としては、Black Hole Quencher(登録商標)部位、DABCYL、リアクティブレッド4(チバクロンブリリアントレッド3B-A)、マラカイトグリーン、4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABITC)及び4,4'-ジイソチオシアナイトジヒドロ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸が挙げられる。例示として、分子ビーコンは本発明の化合物とだけでなく、適切な消光剤とも標識してもよい。ビーコンの閉じた立体配置において、フルオロフォアは消光する。認識又は結合現象の結果としてビーコンが開いた場合、フルオロフォアの蛍光は有意に増大する。

20

**【0300】**

更なる他の実施形態において、本発明は、第一ドナー蛍光性基及び第二アクセプター蛍光性基を含むエネルギー移動蛍光性基を提供し、ここで、ドナー蛍光性基及びアクセプター蛍光性基が共有結合的に連結して、FRET対を形成し、ドナー蛍光性基及びアクセプター蛍光性基の少なくとも一つが、本発明の蛍光性基であり、エネルギー移動蛍光性基が任意に反応基を含む。エネルギー移動蛍光性基の調整方法及びその使用については上述した。米国特許第6,479,303号及び国際特許パンフレットWO 00/13026号参照。

30

**【0301】**

一つの実施形態において、本発明の蛍光性基は、いわゆる直列色素を形成して、蛍光性タンパク質を標識するのに使用される。ここで、本発明の蛍光性基及び蛍光性タンパク質のフルオロフォアは、エネルギー移動対(すなわち、FRET対)を形成する。FRET対が、ドナー蛍光性基の最大吸収で又は近傍で励起されることができ、アクセプター蛍光性基の最大発光で又は近傍で蛍光が集光され、大きなストークスシフトが得られるように、本発明の蛍光性基である、かかるFRET対は、ドナー蛍光性基又はアクセプター蛍光性基のいずれかであり、同様に、タンパク質のフルオロフォアは、ドナー蛍光性基又はアクセプター蛍光性基のいずれかである。直列色素の調製に適する蛍光性タンパク質としては、限定されないが、アロフィコシアニンB、アロフィコシアニン(APC)、C-フィコシアニン、R-フィコシアニン、フィコエリトロシアニン、C-フィコエリトリン、b-フィコエリトリン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン(R-PE)等などの多様なフィコピリンタンパク質が挙げられる。フィコピリンタンパク質及びプロステシスの基としてピリンを含むタンパク質は、タンパク質のフルオロフォアでもある。好適には、フィコピリンタンパク質はR-PE又はAPCである。適切なFRET効率を達成するため、ドナー蛍光性基の発光とアクセプター蛍光性基の吸収が十分な分光学的重なりを有するように、適切な波長の蛍光性基を選択するのが

40

50

よい。蛍光性基の選択及び直列色素の調製の詳細な方法は、米国特許第4,520,110号及び5,714,386号中に開示されている。その大きなストークスシフトゆえに、本発明の直列色素は、限定された数の励起光源のみが使用可能な多色検出に有用でありうる。特に、本発明の直列色素は、蛍光標式細胞分取器(FACS)又は流動細胞計測法の研究に有用であってもよい。市販流動細胞計測は、典型的には、1~3の励起光源、通常は1~2励起光源をを備える。例えば、市販流動細胞計測装置の一部は、488nmアルゴンレーザー及び633nm He-Neレーザー又は635nm赤色ダイオードレーザーを備え、大多数の流動細胞計測装置は、488nmアルゴンレーザーのみを有する。それゆえ、複数の標的を検出するためには、各標的は、異なる発光及びすべて通常の励起光源によって効果的に励起される必要がある異なる蛍光性基を有する異なる蛍光性基で染色してもよい。本発明の直列色素がかかる必要を、直ちに調製できる同一の最大励起だが異なる最大発光である異なった直列色素として満たすことができる。例えば、R-PEは、各々、Table 3の色素No.10及びTable 3の化合物No.18で標識してもよく、第一直列色素は488nmで励起して665nmで発光し、第二直列色素は488nmで励起して775nmで発光する二つの直列色素が得られる。

10

20

30

40

50

#### 【0302】

一実施形態において、本発明の化合物を、上記ポリペプチドの共有結合での標識を促進する条件下、複数のポリペプチド及び任意に他の生物学的分子を含む生物学的試料に適応する。いくつかの実施形態において、化合物の反応基は、活性化エステル、マレイミド、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ヒドラジド、アミン又はアミノオキシ基である。生物学的試料は、細胞可溶化液又は組織可溶化液であってもよい。得られた標識ポリペプチド又は細胞成分は、限定されないが、タンパク質マイクロアッセイ、クロマトグラフィー及びゲル電気泳動を含む多様な既知の手段又は技術のいずれかによって、分析し及び/又は精製してもよい。

#### 【0303】

また、本発明は、上述した選択として多様なアッセイ用に、本発明の化合物及び/又は本発明の蛍光性基-基質接合体を含むキットを提供する。本発明のキットは、一つ以上の本発明の化合物及び前記化合物の使用を教える指示書類を含んでもよい。例えば、キットは、基質の標識のための一つ以上の本発明の化合物、標識反応及び製品精製のための一つ以上の緩衝剤、得られた蛍光性基-基質接合体を精製するためのクロマトグラフィーカラム、手順を実施するための手順書、任意に他の付加的試薬及び任意に参照標準を含んでもよい。他の実施形態において、キットは、一つ以上の本発明の蛍光性基-基質接合体、一つ以上の緩衝剤、上記単数又は複数の接合体の使用のための手順書、アッセイのための任意に他の試薬、任意にいかなる単数又は複数の校正標準を含む。キットは、接合体生成物の精製において使用する他の物質や装置を更に含んでもよい。

#### 【0304】

本発明の蛍光性基によって生成した信号は、多様な方法で検出されてもよい。一般に、信号強度の変化は、当業者に既知のいずれの方法によっても検出でき、一般に使用する蛍光性基の選択に基づく。光学系の支援によって実施できる。かかるシステムは、典型的には、少なくとも二つの要素、つまり、励起源及び光検出装置を備える。かかる要素の多数の例を当業者は利用しうる。励起源の例は、変更レーザーなどのレーザーである。レーザー光の選択は、プローブに結合する蛍光性基に基づく。大部分の蛍光性基に関して、要求される励起光は、約300nm~約1200nmの範囲内又はそれ以上、一般的には約350nm~約900nmである。あるいは、本発明の化合物は、単なる例示として、約300~約350nm, 350~400nm, 400~450nm, 450~500nm, 500~550nm, 550~600nm, 600~650nm, 650~700nm, 750nm~800nm又は800nm~850nmの励起波長を用いて励起してもよい。当業者は直ちに通例の実験によって、所与のフルオロフォアを励起する適切な励起波長を確認できる(例えば、ハンドブック「蛍光プローブ及び標識技術の手引き、第10版」(2005)(invitrogen社/分子プローブから入手)前記にて参照して組み込んだ)。所望の場合、他の光学系も採用できる。かかる光学系としては、光学式読み取り装置、高効率光検出系、光電子増倍管、ゲートセンシティブFET、ナノチューブFET、光ダイオード(例えば、アバランシェフォトダイオード(

APD))、カメラ、電荷結合素子(CCD)、電子増倍電荷結合素子(EMCCD)、増強電荷結合素子(ICCD)及び共焦点顕微鏡などの要素が挙げられる。また、これらの光学系としては、光ファイバー、光スイッチ、ミラー、レンズ(マイクロレンズ及びナノレンズを含む)、コリメーターなどの光伝送要素が挙げられる。他の例としては、光減衰器、偏光フィルター(例えば、ダイクロイックフィルター)、光波長フィルター(ローパス、バンドパス、ハイパス)、波長板、遅延ラインなどが挙げられる。いくつかの実施形態において、光伝送要素は、光通信の光閉じ込めアレーでのプレーナ導波路であってもよい。例えば、米国特許第7,292,742、7,181,122、7,013,054、6,917,726、7,267,673及び7,170,050号参照。識別可能な信号の検出に影響する様々な方法で、当業者に既知のこれら及び他の光学コンポーネントを組合せ、組立てることができる。

10

**【0305】**

本発明の蛍光標識ポリヌクレオチドは多様な用途での使用を見出す。かかる用途は、核酸間の相互作用、例えば、DNA及びDNA、DNA及びRNA、RNA及びRNA又はいずれかの他の非天然由来核酸PNA、LNA及び/又はTNA間の相互作用に参与することができる。また、多様な用途は、核酸及びタンパク質、脂質又はそれらの組合せ間の相互作用に参与することができる。特定の核酸アッセイの限定されない例示としては、核酸増幅、定量又はエンドポイント増幅の両方、溶液中又は基質上でのハイブリッド形成(例えば、アレイハイブリッド形成)、ゲルシフト及び核酸シーケンシングが挙げられる。蛍光標識ポリヌクレオチドは液相にて又は基質上に固定して使用できる。

**【0306】**

一実施形態において、標識ポリヌクレオチドをハイブリッド形成プローブとして使用する。ハイブリッド形成プローブの一つの用途は、蛍光その場ハイブリッド形成(FISH)である。本技術において、関心のある配列と相補的な標識ポリヌクレオチドをアニールして、染色体標品を固定し、関心のある配列の存在だけでなく、染色体上の位置も顕微鏡で検出する。FISHは、関心のある核酸を、限定されないが、ガラス、シリコン又は繊維を含む基質上に固定することにより、実行できる。また、FISHは、テロメアなどの反復配列の存在及び長さを検出するのに定量的にも使用してよい(Q-FISH)。これは、顕微鏡で測定された発光した蛍光の強度を定量化することで実行されてもよい。目的の蛍光性化合物を用いるFISHアッセイは、DNA分子又は染色体の特定のセグメントを検出が実行できる。このような特徴を遺伝学カウンセリング(例えば、出生前スクリーニング)、医学及び種同定に持ち

20

30

**【0307】**

いくつかの実施形態において、標識ポリヌクレオチドをPCRなどの増幅反応においてプライマーとして使用できる。更に他の実施形態において、本発明の化合物を、ポリヌクレオチドを標識するのに使用してもよく、その後、ハイブリッド形成プローブ又はリアルタイムPCRプローブであってもよいプローブとして実質的に使用してもよい。かかるプローブは、本発明の一次蛍光性基でFRET対を形成し、二次蛍光性基で標識してもよい。PCRプローブの調製及び使用方法は、当業者に周知である。

**【0308】**

本発明の一実施形態において、以下の工程を備える標的核酸の検出又は定量方法を提供する。a)本発明の標識ポリヌクレオチド(「プローブ」)を提供する工程とb)核酸標的とプローブとのハイブリッド形成を行えるように、上記標識ポリヌクレオチドと核酸標的を接触する工程と、c)核酸標的とハイブリッド形成した核酸プローブにおけるプローブの蛍光の変化を測定することで、核酸標的を検出又は定量する工程である。

40

**【0309】**

本明細書中において、プローブが核酸標的と錯体を形成するときハイブリッド形成は起こる。一般に、錯体は、少なくとも部分的には、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して、安定化する。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対、Hoogsteen結合によつて又はその他の配列特有の方法で生成してもよい。

ハイブリッド形成は、PCR反応の開始やリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的分割

50

などの拡張的な工程を構成してもよい。

【0310】

プローブ及び標的間のハイブリッド形成後、プローブの蛍光強度の変化を測定しうる。かかるハイブリッド形成前後の変化は、検出された信号強度の増大又は減少として得られる。運転中の特定のハイブリッド形成アッセイに基づいて、ハイブリッド形成後の一つ以上の現象が、信号強度の変化生成に寄与してもよい。例えば、レポーター信号の増大は、空間的な拡張又は両者がまだプローブと結合している消光剤基からのレポーター蛍光性基の分離により生じてもよい。加えて、プローブのレポーター又は消光剤のいずれかは、検出されるレポーター信号を生成する、酵素(例えば、5'-3'エキソヌクレアーゼを有するポリメラーゼ)を介した分割の手段によって分離してもよい。上述のように、レポーター及び消光剤の両者は、これらの基が、供出を通じて同一で、相互に関連し、ハイブリッド形成反応中で使用される場合、異なる機能であるように、官能末端で規定される。例えば、プローブに結合する基は、消光剤であり、なぜなら、プローブが標的核酸(典型的には、プローブがランダムな場合を想定している)とハイブリッド形成している場合、光学信号の発光を減少するからである。同様の基は、標的核酸とのハイブリッド形成後の酵素による分割によって、アッセイの間、蛍光性基の信号が検出されるレポーター蛍光性基になりうる。

10

【0311】

前述の信号検出方法を、標的核酸がコピー数で増大する核酸増幅に適応できる。かかる増加は線形的又は指数的に生成してもよい。増幅は、Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、E coli DNAポリメラーゼのクレノウ断片、Tma DNAポリメラーゼ、exo-Tli DNAポリメラーゼ、exo-KOD DNAポリメラーゼ、exo-JDF-3 DNAポリメラーゼ、exo-PGB-D DNAポリメラーゼ、U1Tma(N-切端) Thermatoga martima DNAポリメラーゼ、シークエナーゼなどの天然又は組換え型のDNAポリメラーゼ及び/又はRNAポリメラーゼなどの逆転写酵素によって、もたらされてもよい。

20

【0312】

好適な増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。一般的なPCR手順は、米国特許第4,683,195号(Mullis)及び4,683,202号(Mullisら)中に教示されている。簡潔には、PCRによる核酸の増幅は、繰返しサイクルで行う。DNAの熱変性し、二つのプライマーをアニーリングして増幅される標的核酸セグメントの側面を延伸してシーケンスし、ポリメラーゼでアニールしたプライマーを伸長する。プライマーは、標的核酸の反対側のストランドをハイブリッド形成し、プライマー間でポリメラーゼによる合成が、標的セグメントの量を効果的に倍化させながら、セグメントにおいて進行する。更に、伸長生成物は、プライマーと相補的で結合能があるため、各連続したサイクルは、前回のサイクルで合成された標的核酸の量を実質的に倍化させる。この結果、およそ $2^n$ の比率で、ここでnはサイクル数、特定の標的核酸の指数的な蓄積する。

30

【0313】

典型的な従来のPCR熱サイクリングプロトコールは、(a)90 ~ 95 の範囲で0.5~1分間、変性し、(b)50 ~ 65 の温度範囲で1~2分間アニーリングし、及び(c)68 ~ 75 で少なくとも1分間伸長するの30サイクルを備える。他のプロトコールとしては、限定されないが、ユニバーサルプロトコールだけでなく、急速サイクリングプロトコールも目的のプローブを実施できる。

40

【0314】

従来のPCRの一変形は、「Hot Start PCR」と呼ばれる反応である。Hot Start PCR技術は、反応修復期間でのポリメラーゼ活性の阻害に焦点を当てている。PCRサイクリングに先立ち、ポリメラーゼ活性を制限することで、非特異的な増幅を低減して標的の収量を増大させる。Hot Start PCRの普通の方法としては、ポリメラーゼに対する化学修飾(例えば、米国特許第5,773,258号参照)、ポリメラーゼ-特異抗体によるポリメラーゼの阻害(例えば、米国特許第5,338,671号を参照)及び熱サイクリング実行前に、ポリメラーゼを隔離するため反応場中への物理的バリアー導入(例えば、ワックスバリアー法)が挙げら

50

れる。Hot Start PCRを実行するのに必要な試薬は、キットとして簡便包装され、市販されている(例えばSigma社製JumpStart Kit参照)。

【0315】

目的のプローブで実施可能な、従来のPCRのもう一つの変形は、ネスティッドプライマーを用いる「ネスティッドPCR」である。本方法は、例えば、古文書、法医学の試料を用いる場合、試料中の標的核酸の量が極端に制限されている場合に好適である。ネストPCRを実行する上で、核酸を最初に、標的核酸の大きなセグメントを側部延伸する配列へハイブリッド形成可能な外側セットのプライマーで増幅する。本増幅反応は、大きなセグメント内の標的配列へハイブリッド形成する内側セットのプライマーを用いる増幅サイクルの第二ラウンドに引き継がれる。

10

【0316】

目的のプローブは、逆転写PCR反応(RT-PCR)に採用できる。最初に逆転写酵素が、RNA分子を二重鎖cDNA分子に変換し、二重鎖cDNA分子はその後ポリメラーゼ連鎖反応での次の増幅のテンプレートとして採用される。RT-PCRの実施において、逆転写酵素は、一般に、標的核酸を熱変性した後に、反応試料へ添加される。反応は、その後、増幅が起こる予定サイクル前に、cDNAテンプレートを生成するのに適切な温度(例えば、30 ~ 45 )に十分な時間(例えば、5 ~ 60分間)保持される。かかる反応は、RNA分子中に遺伝情報が蓄積される生物学的実体の検出に特に有用である。生物学的実体の本カテゴリーの限定されない例示としては、HIVなどのRNAウイルス及び肝炎ウイルスが挙げられる。本発明により具体化されたRT-PCRの他の重要な用途は、試験試料中で検出されるmRNAレベルに基づく、生物学的実体の同時定量である。

20

【0317】

また、目的のプローブは、リガーゼ連鎖ポリメラーゼ連鎖反応(LCR-PCR)を実施するのに採用できる。本方法は、標的核酸と、各々標的に特異的な位置及び標的配列に関連しない短アンカー配列を有する一セットのプライマー対との連結を備える。アンカー配列を含む第二セットのプライマーは、その後、第一セットのプライマーに連結した標的配列を増幅するのに使用する。LCR-PCRを実施する天然ゴム中は当業者に周知であり、そこで本明細書中では詳述しなかった(例えば、米国特許第5,494,810号参照)。

【0318】

目的のプローブは、特に均質アッセイ中での使用に適する。かかるアッセイ中、アッセイの結果を記録するアッセイ後処理を要せずに、標的核酸が検出され及び/又は定量される。例えば、均質PCR反応は、密閉試料ホルダー(例えば、チューブ、試料キャピラリー又は加熱チップ)内で実施でき、一旦アッセイが開始すれば、記録のために更に試薬を添加又は除去する必要がない。均質アッセイは、リアルタイムで、アッセイの結果をできる。所望の場合、目的方法の実施において、アッセイの結果は、アッセイの進捗につれ経時的に連続的に記録でき、又は、アッセイ期間中又はアッセイ完了の一つ以上の時点で断続的に記録できる。

30

【0319】

所望の場合、均質アッセイは多重処理でき、すなわち、一以上の標的核酸を一つのアッセイで検出できる。多重アッセイにおいて、共有結合している蛍光性基の性質が異なる二以上の特定の核酸プローブがアッセイされる混合物へ添加される。蛍光性基は、特定の核酸プローブ各々から識別可能な蛍光信号が発せられるように選択される。核酸プローブの異なる蛍光性基の組合せでの信号は、検出及び/又は対応する標的核酸の定量と同時に記録できる。多重処理は、分析コストを大幅に低減し、大容積設定において処理量を格段に増大できる。

40

【0320】

目的のプローブ単一の突然変異を検出するのに使用できる。従って、本発明のプローブを使用して、プローブ配列及び標的配列間のわずかな単一不一致を検出する方法を提供する。PCRによる核酸検出におけるかかる特異性は、診療所での診断及び遺伝子研究において高度に価値がある。例えば、多くの疾病が、ヒト遺伝子内の異なる位置での単一の突然

50

変異に関連している。しかしながら，単一ヌクレオチド遺伝子多型又はSNPとも呼ばれるこの型の遺伝子変異は，理論上，シーケンス処理によって検出しようが，かかるシーケンス処理は，高コストと低効率のため，大規模では実用的とは考えられない。増幅反応によるSNPの検出は，目的のプロープの使用により実行可能である。

#### 【0321】

また，目的のプロープは，核酸増幅反応の監視に特に適する。関連する実施形態において，本発明は，上記標的の増幅中の標的核酸における増加の監視方法を提供する。

該方法は，典型的には，(a)上記標的核酸，標的核酸とハイブリッド形成される少なくとも一のプライマー，増幅中の標的核酸の増加に比例する強度の検出可能な信号を発する本発明の標識オリゴヌクレオチドプロープを含む増幅反応混合物を提供し，(b) 標的核酸を増幅する条件下で，上記混合物を処理し，(c)上記処理工程(b)中，上記混合物により発せられた上記信号の量を測定する工程を備える。所望の場合，信号量は，増幅反応中ずっと連続的に測定され，又は，増幅反応中断続的に測定される。増幅は，プライマー対の使用で指数的又は対の一方のプライマーの使用で線形的でありうる。

#### 【0322】

増幅反応中の信号強度の増加は，標的核酸に対するプロープのハイブリッド形成工程及び増幅反応で使用したポリメラーゼの作用を介した分割工程によってもよい。

#### 【0323】

1つの実施形態において，目的の方法は，PCRとの接合において使用される場合，ポリメラーゼの5'-3'ヌクレアーゼ活性を活用する。目的のプロープは，PCR開始時にプライマーと同時に添加され，プロープの単数又は複数の標識ヌクレオチドの加水分解から生成する信号は，増幅中、標的配列の検出手段を提供する。多数のポリメラーゼが，プライマーを触媒すること及びテンプレート-依存核酸合成に適しており，5'-3'ヌクレアーゼ活性を有する限定されない例示としては，*E. coli* DNAポリメラーゼI，*Thermus thermophilus* (Tth)DNAポリメラーゼ，*Bacillus stearothermophilus* DNAポリメラーゼ，*Thermococcus littoralis* DNAポリメラーゼ及び*Thermus aquaticus* (Taq)DNAポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼが挙げられる。所望の場合，温度安定ポリメラーゼを核酸増幅反応に採用できる。例えば，*Thermus aquaticus*から単離した代表的な熱的に安定な酵素を開示する米国特許第4,889,818号を参照。更なる代表的な温度安定ポリメラーゼとしては，限定されないが，例えば，耐熱性細菌 *Thermus flavus*，*Thermus ruber*，*Thermus thermophilus*，*Bacillus stearothermophilus*(一覽した他よりもいくらか低温が最適である)，*Thermus lacteus*，*Thermus rubens*，*Thermotoga maritima*，*Thermococcus littoralis*及び*Methanothermobacter feravidus*から抽出したポリメラーゼが挙げられる。

#### 【0324】

他の実施形態において，核酸増幅は，ストランド置換活性(ローリングサークル重合としても知られる)を呈するポリメラーゼで実行できる。ストランド置換により，環状DNAテンプレートの直列的複写物の合成が得られ，等温PCR反応において特に有用である。ローリングサークルポリメラーゼの本発明に好適な限定されない例示としては，限定されないが，T5 DNAポリメラーゼ(Chatterjeeら，*Gene* 97:13-19 (1991))及びT4 DNAポリメラーゼホロ酵素(Kaboord及びBenkovic，*Curr. Biol.* 5:149-157 (1995))，ファージM2 DNAポリメラーゼ(Matsumotoら，*Gene* 84:247 (1989))，ファージPRD1 DNAポリメラーゼ(Jungら，*Proc. Natl. Aced. Sci. USA* 84:8287 (1987)，Zhu及びIto，*Biochim. Biophys. Acta.* 1219:267-276 (1994))，DNAポリメラーゼIのクレノウ断片(Jacobsenら，*Eur. J. Biochem.* 45:623-627 (1974))が挙げられる。

#### 【0325】

好適な分類のローリングサークルポリメラーゼは，複製開始の方法として，タンパク質初回刺激を用いる。本分類の規範的なポリメラーゼは，ファージ 29，PRD1，Cp-1，Cp-5，Cp-7，15，1，21，25，BS32 L17，PZE，PZA，Nf，M2Y(又はM2)，PR4，PR5，PR722，B103，SF5，GA-1及びPodoviridea系統の関連する成員から選択又は由来する修飾及び非修飾DNAポリメラーゼである。特定に，野生型バクテリオファージ 29ゲノムは，各5

10

20

30

40

50

'末端に共有結合で連結した頂生タンパク質(TP)を有する, 19,285塩基対の直線状二重鎖DNA(dsDNA)からなる。複製開始するため, ヒストン様ウイルスタンパク質は, おそらくDNA両末端で, 二重らせんの巻戻しに貢献する複製源とヌクレオタンパク質錯体を形成する(Serranoら*The EMBO Journal* 16(9): 2519-2527 (1997))。DNAポリメラーゼは, 当初のdAMPの添加物を, TPにより提供されたからヒドロキシル基へと触媒する。本タンパク質刺激現象は, テンプレートの第三3'ヌクレオチドの反対側で発生し, 開始生成物(TP-dAMP)は, 末端ヌクレオチドを修復するため, DNA内で一位置後方に滑動する。開始後, 同一のDNAポリメラーゼは, DNAストランドの一つを複製し, 一方, 他方を置換する。29 DNAポリメラーゼの高い処理能力及びストランド置換能力によって, 29 TP含有ゲノム(TP-DNA)の複製をヘリカーゼ又はアクセサリ-処理因子なしで完成することができる(Serranoらの概説, *The EMBO Journal* 16(9): 2519-2527 (1997))。

10

## 【0326】

ストランド置換は, 多様なアクセサリ-タンパク質の使用を通じて強化できる。限定されないが, らせん体(Siegelら, *J. Biol. Chem.* 267: 13629-13635 (1992)), 単純ヘルペスウイルスのタンパク質ICP8(Skaliter and Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22): 10665-10669 (1994)), タンパク質と結合している単鎖DNA(Rigler and Romano, *J. Biol. Chem.* 270:8910-8919 (1995)), アデノウイルスDNA結合タンパク質(Zijderveld and van der Vliet, *J. Virology* 68(2):1158-1164 (1994))及びBMRFIポリメラーゼアクセサリ-サブユニット(Tsurumiら*J. Virology* 67(12):7648-7653 (1993))が挙げられる。

20

## 【0327】

目的のプローブは, 等温増幅反応で使用できる。かかる増幅反応は, 熱サイクリングだけに依存しない。手順は, 広範囲な環境温度で適応できる。特に, 二重鎖テンプレート配列の変性は, 二重鎖配列の融点を超える温度の増大を通してだけでは完了しない。むしろ, 変性工程は, ストランドを分離して, プライマーがアニーリング及び伸長できるようにする物理的又は機械的な力が関与する。等温PCRを含む等温増幅反応を実施する多様な機構が米国特許出願第20060019274号公報並びに米国特許第5,824,477及び6,033,850号中に記載されており, 参照しここに組み込む。

## 【0328】

核酸増幅は, 一般に増幅試薬の使用で実行される。増幅試薬としては, 典型的には, 酵素, 緩衝剤水溶液, 塩, プライマー, 標的核酸及びヌクレオシド三リン酸が挙げられる。文脈によっては, 増幅試薬は, 完了又は未完了の増幅反応混合液のいずれかでありうる。

30

## 【0329】

核酸増幅での使用のためのプライマーの選択は, 標的核酸配列に依存する。本発明で使用するプライマーは, 一般に, テンプレート特有の方法で, ポリメラーゼ活性を介して伸長されうるオリゴヌクレオチドであって, 例えば, 10~100又は10~25塩基長である。一般に, 以下の要因がプライマー設計で考慮される。a)対の個々のプライマーそれぞれは, 好適には, 増幅反応において, 自己ハイブリッド形成しない。b)個々の対は, 好適には, 増幅反応において, 横断的ハイブリッド形成しない。c)選定した対は, 増幅する核酸セグメントの側面を延伸する二つの別個の領域へアニールするため, 適当な長さ及び配列の均質性を有さねばならない。しかしながら, プライマーのヌクレオチドのすべてが伸長を起こすために, テンプレートにアニールしなければならない訳ではない。プライマー配列は, 標的核酸の厳密な配列を反映する必要がない。例えば, 非相補的ヌクレオチド断片は, プライマーの5'末端に, 標的と相補的であるプライマー配列の残部で, 結合してもよい。あるいは, 非相補的塩基は, プライマー配列が, アニーリングが起こるのに十分な相補性が標的に対してあり, 相補的核酸ストランドの合成ができるならば, プライマー中に散在できる。

40

## 【0330】

核酸増幅反応は, 標的を増幅するのに用いた酵素と互換性ある緩衝剤中の標的核酸を典型的には備える。緩衝剤としては, 典型的には, テンプレート配列の複製ストランドに組

50

み込まれる能力のあるヌクレオチド又はヌクレオチド類縁体(限定されないが、個々の塩基単位を有するリン酸塩を含むATP, TTP, CTP, GTP又はそれらの類縁体)が挙げられる。

【0331】

所望の場合、増幅反応は、自動化工程として実行する。当業における48, 96又はそれ以上の試料を保持できる多数の熱サイクルが利用できる。好適な光学系は、光源から励起光を反応場へ動かし、各試料からの発光を測定する。例えば、多重光ファイバーにより、熱サイクリングを実行するすべてのPCR管を同時に読み取るようになる。しかしながら、反応場からの蛍光を読むためには、単一の蛍光光度計しか必要ではない。類似の検出スキームが、96穴マイクロタイター方式において好適である。

かかる方式は、例えば、血液銀行でのスクリーニング処理におけるAIDSのスクリーニングなどの遺伝子検査用の大規模試料スクリーニングのために、臨床検査室で頻繁に要望される。

【0332】

従って、本発明は、また、増幅の前中後で、信号を検出、計測及び定量に使用できる、目的のプロープによって生成した信号を検出するための装置を提供する。装置は、目的のプロープを含む増幅反応混合物を保持でき、標的配列の増幅に作用する熱ユニット(例えば熱サイクル装置)及び目的のプロープから生成した信号を検出する検出器を備える。

【0333】

本発明の他の実施形態において、目的のプロープは、核酸標的を検出又は定量する核酸マイクロアッセイ上で行われるアッセイに採用される。かかるアッセイにおいて、蛍光信号は、相補的標的核酸の存在に基づき、核酸マイクロアッセイ上に生成する。

【0334】

遺伝子チップを含む核酸マイクロアッセイは、共有結合的に固体表面に結合するordered arrays of 核酸の規則的配列を含み、例えば、米国特許第5, 871, 928, 6, 040, 193, 6, 262, 776, 6, 403, 320及び6, 576, 424号参照。アッセイ内で発生した蛍光信号を、限定されないが、蛍光イメージング装置、例えば、Hitachi Corp.社、San Bruno, Califにより提供される市販装置又は共焦点レーザー顕微鏡(共焦点蛍光スキャナー)、例えば、General Scanning, Inc.社、Watertown, Massからの市販装置を含む光学検出器で監視及び定量化できる。

【0335】

核酸マイクロアッセイ上で行われるアッセイにおいて、標的核酸は核酸配列の混合物として、好適な生物学的資源から提供されてもよい。体液、固体組織試料、組織培養又はそこから由来する細胞及びその後代、かかる源又は核酸を含む他の試料のいずれかから調製した区分又はスメアから由来してもよい。

【0336】

発現パターンがアッセイされた場合、mRNA配列は、典型的にはユニバーサルプライマーでの逆転写PCRによって、使用前はアッセイ内で標的配列とし、最初に増幅される。

一つの実施形態において、試験試料中に存在する全核酸配列は、分析のため、同時にマイクロアッセイにかけられ、そのため、全標的核酸配列のアレイ上に存在する全核酸との相互作用を行いうる。他の実施形態において、アレイに適用した標的核酸は、マイクロアッセイを用いた精製ハイブリッド形成分析向けのサブセットを得るため予備選択される。例えば、限定された数の標的配列は、例えば、1以上の単一ヌクレオチド遺伝子多型である、1以上の配列の分析されるべき特定のヌクレオチド配列を含むことができる本設定の核酸配列は、マイクロアッセイ上での分析に先立ち、特定のプライマーの支援によりPCRによって増幅されてもよい。

【0337】

被験者の複数の遺伝子の発現に対するアッセイにおいて、標的ポリヌクレオチドは、前述アレイ上で、ハイブリッド形成反応において、プローブと安定な錯体を形成しうる。当業者は、標的核酸としてアンチセンスRNAを用いる場合、アレイ上に固定した配列は、アンチセンス核酸の配列に相補的であるように選択することを理解する。逆に、標的核酸プ

10

20

30

40

50

ールがセンス核酸のプールである場合、アレイ上に固定した配列は、センス核酸の配列に相補的であるように選択する。最後に、標的核酸プールが二重鎖である場合、プローブは、センス及びアンチセンスストランドの両方の標的核酸として、センス及び/又はアンチセンスのいずれかであってもよい。

#### 【0338】

一つの実施形態において、標識プローブは、マイクロアッセイ上の競合的ハイブリッド形成を実行するのに使用する。本アッセイ方式において、試験試料からの標的核酸は、マイクロアッセイ上に固定した既知の配列との結合のために、本発明のプローブと競合する。固定した既知の配列と結合する標識プローブの量は、試験試料中の対応する標的核酸の濃度と反比例する。

10

#### 【0339】

変形ハイブリッド形成アッセイは、レポーターの分割の実行により、プローブの信号を増強する、マイクロアッセイ上でのポリメラーゼの使用を行う。例えば、標的配列の混合物は、最初にアレイ上に固定した既知の配列とハイブリッド形成される。非ハイブリッド形成配列をその後洗い流す。その後、標的配列に対応するプローブは、標的上の異なる領域にハイブリッド形成されうる。過剰な非結合プローブの洗浄において、ハイブリッド形成プローブ上のレポーター蛍光性基は、ポリメラーゼの作用を介して分割され、それによって試験試料中に初めから存在する標的配列の存在及び/又は量を示す検出可能な信号を精製する。

20

#### 【0340】

本発明の標識プローブの使用に対する好適なハイブリッド形成条件は、アレイ上の配列と標的間の認識相互作用が充分特異的で充分安定であることである。上述のとおり、ハイブリッド形成反応は異なる「厳密性」の条件下実施される。関連する条件としては、温度、イオン強度、培養時間、ホルムアミドなどの反応混合物中の付加的溶質の存在及び洗浄手順が挙げられる。高厳密性の条件は、形成する安定なハイブリッド形成錯体に対するハイブリッド形成要素間の最低相補性がより大きいことを要する、高温及び低ナトリウムイオン濃度などである。ハイブリッド形成反応の厳密性を増大する条件は、当業者に周知である。例えば、(Sambrookら(1989)、上述)参照。

30

#### 【0341】

一般に、ハイブリッド形成の特異性(厳密性)と信号強度の間にはトレードオフの関係がある。好適な実施形態において、信号雑音比を向上するために、標的-プローブ錯体の検出前に、ハイブリッド形成アレイの洗浄を実施している。典型的には、ハイブリッド形成アレイは、高度に厳密な溶液で洗浄され、信号は各洗浄の間ごとに読み取られる。そのようになされたデータ系統の分析は、上記洗浄の厳密性、ハイブリッド形成パターンが定説に変更されていないか、関心ある特定のポリヌクレオチドプローブに関して適正な信号を提供しているかを明らかにする。洗浄の厳密性を支配するパラメーターは、一般に、ハイブリッド形成の厳密性のパラメーターと同一である。また、ハイブリッド形成中のブロッキング剤(例えば、血清DNA、洗剤又は他の有機又は無機物界面活性剤)などを含む他の基準でも、非特異的結合を低減できる。

40

#### 【0342】

マイクロアッセイ上の特定ハイブリッド形成現象のイメージングは、典型的には光学システムの支援により実施される。好適なシステムの限定されない例示は、カメラ、荷電結合素子(CCD)、電子増倍電荷結合素子(EMCCD)、増強電荷結合素子(ICCD)及び共焦点顕微鏡が挙げられる。

#### 【0343】

マイクロアッセイは、配列のハイブリッド形成が起こった位置的な局在化を提供する。ハイブリッド形成領域の位置は、特定の配列と、そこで、試験試料中で発現した標的の固有性と相互に関係がある。また、検出方法もyield各ハイブリッド形成領域でのハイブリッド形成度レベルの定量的測定及び 所与の遺伝子転写の発現レベルの直接測定を与える。アレイ上に存在するハイブリッド形成領域及び各々の強度を示すデータの収集は、被験

50

者の遺伝子転写が発現した多数の代表であるハイブリッド形成パターンを構成する。

異なる被験者から由来する標的ポリヌクレオチドのハイブリッド形成により、生成したハイブリッド形成パターン中で検出されたいずれかの不一致は、これら被験者の遺伝子転写の多数の異なる発現を示す。

#### 【0344】

1つの実施形態において、比較すべきハイブリッド形成パターンは、同一のアレイ上に生成しうる。かかる場合、異なったパターンは、個々の型の検出可能な標識によって、区別される。別の形態において、不一致が比較すべき被験者における特定の遺伝子の異なる発現を示す、比較のため採用したハイブリッド形成パターンを異なるアレイ上に生成した。

10

#### 【0345】

比較ハイブリッド形成分析のための試験の核酸は、(a)同一種の異なる器官からの細胞(例えば、異なるヒトから由来する細胞)、(b)同一器官だが、正常又は病気の組織、胎児の又は成人の組織を含む、異なる組織型からの細胞、(c)細胞周期における異なる時点での細胞、(d)外的又は内的刺激のありで又はなしで、処理した細胞、から由来してもよい。そこで、本発明のアレイを用いた比較ハイブリッド形成分析を、広範な文脈での遺伝子発現を監視するために採用できる。かかる分析は、病気及び正常組織間の、異なる型の組織及び細胞間の、異なる細胞周期時点又は異なる発達段階での細胞間の、及び多様な環境の刺激又はリード医薬に関連した細胞間の異なる遺伝子発現を検出するために、拡張してもよい。それゆえ、本発明の発現検出方法は、病気の検出、少なくとも二試料間での特異的

20

#### 【0346】

目的の増幅及び本明細書中に記載した他のいずれかのハイブリッド形成アッセイは、標的を含むであろうと疑念されたあらゆる出所からのあらゆる標的核酸を検出するのに使用できる。試料の出所又は作成された方法に関して、限定する意図はない。一般に、試験試料は、生物学的及び/又は環境的な試料でありうる。生物学的試料は、ヒト又は他の動物、血液、体液、固体組織試料、組織培養又はそこから由来する細胞及びその子孫、前記出所のいずれかから調製した切片又は標本、若しくは核酸を含む他のいずれかの試料から由来してもよい。好適な生物学的試料は、体液であり、限定されないが、尿、血液、脳脊髄液、脊髄液、洞性腔部液、精液、アンモニアク液、脳脊髄液(CSF)及び唾液が挙げられる。他の型の生物学的試料としては、乳製品、野菜、肉、肉の副産物及び廃棄物などの食品及び成分が挙げられる。環境的試料は、限定されない、土壌、水、汚水、化粧品、農業又は工業の試料だけでなく、食品及び乳製品の製造装置、機器、設備、使い捨て及び非使い捨て品から得られた試料などの環境材料から由来する。

30

#### 【0347】

また、本発明に従い標識したポリヌクレオチドは、ゲルシフトアッセイ内で使用してもよい。また、かかるアッセイは、電気泳動移動度シフト解析(EMSA)、ゲル移動シフトアッセイ、バンドシフトアッセイ又はゲル遅延アッセイとしても既知であり、タンパク質-DNA又はタンパク質-RNAの相互作用を研究するのに使用する慣用技術である。本手順は、タンパク質又はタンパク質の混合物が所与のDNA又はRNA配列と結合できる場合、測定することができ、1以上のタンパク質分子が結合錯体中に関与する場合、ときに示することができる。標識オリゴヌクレオチドは、ゲルシフトアッセイ中で使用してもよく、電気泳動の実施及び引き続き蛍光標識の発光を可視化することで、標識オリゴヌクレオチドのゲル中の移動範囲を測定する。ゲルシフトアッセイは、転写開始、DNA複製、DNA修復又はRNAプロセッシング又は突然変異を研究する場合、DNaseフットプリンティング、プライマー伸長及びプライマー-プローブ実験でインビトロにて同時に実行してもよい。

40

ゲルシフトアッセイを実行する方法は既知である。

例えば、Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) 「特定のDNA領域と結合するタンバ

50

ク質のゲルでの定量方法: Escherichia coliのラクトースのオペロン調節システムの成分への適応」Nucleic Res. 9:3047-3060又はFried, M. and Crothers, D.M. (1981) 「ポリアクリルアミドゲルによるEquilibria and kinetics of lac受容体-オペレーター相互作用の平衡及び動態」 Nucleic Res., 9:6505-6525を参照。

【0348】

本発明の蛍光標識ポリペプチドは、幅広いアッセイに有用である。かかるアッセイは、特定のタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-核酸相互作用、対象のタンパク質と阻害剤又は活性剤候補物質間の相互作用を識別できる。阻害剤又は活性剤候補物質としては、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、二重鎖RNAs、リボザイム、リボザイム誘導体、抗体、リボソーム、小分子、無機及び有機化合物が挙げられる。また、目的のアッセイで、例えば、医薬品開発、スクリーニング及び/又は最適化等の酵素学的動態学を研究してもよく、溶液の又は固体基質上に固定した蛍光標識ポリペプチドを用いて実施してもよい。

10

【0349】

特に関心あることは、細胞表面受容体及びその対応する配位子間の特定の相互作用である。細胞表面受容体は、細胞形質膜上にアンカーされ又は細胞形質膜中に挿入された分子である。それらは、タンパク質、糖タンパク質、ポリ糖類及び脂質の大きな系統を構築し、形質膜の構造的構成要素としてだけでなく、多様な生物学的機能を支配する調節要素としても働く。他の形態としては、特定のタンパク質-タンパク質相互作用が、細胞表面受容体及び免疫リボソーム又は免疫毒と関与する。さらなる他の態様において、特定のタンパク質-タンパク質相互作用は、サイトゾルタンパク質、核タンパク質、シャペロンタンパク質又は他の細胞内の膜構造上にアンカーされたタンパク質と関与してもよい。更なる他の形態において、特定のタンパク質-タンパク質相互作用が、標的タンパク質(例えば、抗原)と抗体間にあり、抗体は抗原に対して特異的である。

20

【0350】

標識ポリペプチドと相互作用する実体間の特定の相互作用を、かかる相互作用が起こるであろう条件下、二種類の実体を混合することで、アッセイした。典型的には、相互作用を光学機器の支援で、視覚化した。所望の場合、実体は、光閉込めの中に設置できる(例えば、米国特許第7,267,673号及び第7,170,050号参照)。単一分子を検出する場合、各光閉込めは、調査している一標的のみを含む。これは、光閉込めのアレイ上へのデポジットが、光閉じ込めの主な分配又は主要部分が単一標的分子を有する結果となるように、微量の標的を多量の溶液で希釈することで達成できる。標識ポリペプチド及び相互作用する実体は、従来技術の利用できるいかなる方法によって、光閉じ込めの内部表面に固定できる。かかる方法は、多様な結合部位によって影響を受ける共有結合及び非共有結合の使用に及ぶ。結合部位の選択は、標識ポリペプチド及び/又は相互作用する実体の性質に依存しうる。標識ポリペプチド又はタンパク質のプロープを固定する一手法は、ストレプトアビジン又はアビジン/ビオチン結合対の使用を含む。

30

【0351】

一つの実施形態において、本発明の化合物と反応するポリペプチドは、3~約80アミノ酸をふくむ。かかるポリペプチドの例示としては、限定されないが、ニューロペプチド、サイトカイン、毒素及びペプチダーゼ又はプロテアーゼ基質が挙げられる。蛍光標識-ニューロペプチド、-サイトカイン及び-毒素は、各ペプチドに特異的な受容体の分布を地図化又は可視化するのに使用してもよい。例として、本発明の化合物で環状ペプチド構造を有する毒素であるファロイジンを標識した場合、細胞内のF-アクチン線維を染色するのに使用できる。他の例として、本発明の化合物でペプチドベースの蛇毒である-ブンガロトキシンを標識した場合、アセチルコリン受容体を検出するのに使用できる。本発明の蛍光性基で標識したペプチダーゼ又はプロテアーゼ基質は、ペプチダーゼ又はプロテアーゼの活性度をアッセイ分析するのに使用してもよく、ペプチダーゼ又はプロテアーゼの阻害剤として設計した医薬のスクリーニングに使用してもよい。

40

【0352】

50

例えば、ペプチダーゼにより分割されたペプチド配列を含むペプチドは、ペプチド配列末端で、本発明の蛍光性基から選択した蛍光ドナー蛍光性基である第一蛍光性基によって、また、ペプチド配列の他の末端で、蛍光アクセプター蛍光性基(本発明からの他の蛍光性基又は消光剤等)である第二蛍光性基、ここで、一次色素及び二次色素は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対を形成する、によって、標識してもよい。FRET対のドナー蛍光性基又はアクセプター蛍光性基のいずれかの、上記ペプチダーゼによるペプチド分割の前後での、蛍光の差を検出することで、酵素活性のレベルを評価できる。

#### 【0353】

本発明に従い調整できる他のポリペプチド接合体としては、抗体、レシチン、酵素、リポタンパク質、アルブミン、アビジン、ストレプトアビジン、アネキシン、タンパク質A、タンパク質G、トランスフェリン、アポトランスフェリン、フィコビルタンパク質及び他の蛍光性タンパク質、毒素、成長因子、チュープリン、ホルモン類、多様な受容体及びイオンチャンネルが挙げられる。

#### 【0354】

一つの実施形態において、本発明の化合物は、抗体と反応してもよい。かかる抗体は、所望の用途に基づいて、一次又は二次であってもよい。検出される光源が非常に少量で存在する場合、信号増幅を提供するために、二次抗体を使用してもよい。多様な二次抗体アイソタイプを標識してもよい。限定されない二次抗体アイソタイプの例示としては、抗-マウスIgG、抗-マウスIgM、抗-ウサギIgG、抗-ラットIgG、抗-ラットIgM、抗-モルモットIgG、抗-ニワトリIgG、抗-ハムスターIgG、抗-ヒトIgG、抗-ヒトIgM、抗-ヤギIgG、抗-マウスIgG、抗-ウサギIgG、抗-ラットIgG、抗-ヒツジIgG、抗-ヤギIgG、抗-マウスIgG、抗-ヒトIgG、抗-ラットIgG、抗-マウスIgG、抗-ヒトIgG、抗-ラットIgG、抗-ヤギIgG及び抗-ウサギIgGが挙げられる。

#### 【0355】

あるいは、Fab断片を本発明の化合物で標識してもよい。かかる断片は、完全抗体接合体より優れてもよい。なぜなら、Fc領域を欠くため、非Fc受容体-担持細胞膜での特異的相互作用を低減させ、組織へのベータ侵入を許すためである。

#### 【0356】

本発明の標識二次抗体は、Molecular Probe, Inc.社により市販されているもののよう、信号増幅キット中で使用してもよい。かかるキットは、各々二種類の、マウス抗体などの一次抗体へ特異的に標識した抗体を提供しうる。一つの実施形態において、本発明のウサギ抗-マウスIgG、抗体接合体が最初に用いられ、マウス由来一次抗体に結合する。蛍光は、その後、ヤギ抗ウサギIgG、抗体の二次接合体の添加によって劇的に強化される。

#### 【0357】

更に他の実施形態において、本発明の化合物は、タンパク質A及び/又はタンパク質Gを標識するのに使用してもよい。タンパク質A及びタンパク質Gは細菌のタンパク質であり、ウシ、ネコ、ニワトリ、イヌ、ヤギ、モルモット、ウマ、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、ヒトIgM、IgA、IgE、ヒトIgD、マウスIgG1など、ブタ、ウサギ、ラット又はヒツジなどの多様な種からの多様な分類及び下位分類の免疫グロブリンのFc部と高い親和性で結合し、免疫グロブリンの検出に使用してもよい。あるいは、免疫グロブリンは、式I、II、III、IV又はVの構造を有する本発明の化合物で標識でき、かかる標識後、標的への特異性を維持できる。これら標識免疫グロブリンは、インビトロ又はインビボでの標的抗原の検出に使用できる。いくつかの実施形態において、標識免疫グロブリンは、最大吸収波長が750nm以上のフルオロフォアを含む。他の実施形態において、標識免疫グロブリンは、最大吸収波長が685nm以上のフルオロフォアを含む。本発明の多様な実施態様において、かかる標識免疫グロブリンは、ガン細胞上の抗原と結合する。いくつかの実施形態において、標識免疫グロブリンは、erb2へ結合する。

#### 【0358】

10

20

30

40

50

本発明に従って調製した標識抗体は、多様な用途の一次抗体としてもよい。一方、二次検出方法は、有意な信号増幅を提供でき、直接標識した一次抗体は、しばしば、より低いバックグラウンド蛍光及び非特異的結合性がより低くなる。また、一次抗体を使用することで、直接標識した場合、同じアイソタイプ又は同じ種から由来する複数の一次抗体を同じ試験で使用しうる。

**【0359】**

かかる一次抗体の例示としては、特定のレポーター遺伝子生成物に特異的なポリクローナル抗体が挙げられる。これらは、抗-緑色蛍光剤タンパク質抗体、抗-グルタチオンS-トランスフェラーゼ抗体、抗-ベータ-グルクロニダーゼ抗体、抗-ベータ-ガラクトシダーゼ抗体、特定のエピトープタグに対するモノクローナル抗体、ペンタHis抗体、抗-HA抗体及び抗-c-myc抗体が挙げられる。

10

**【0360】**

また、小胞体、ペルオキシソーム、ミトコンドリア又はチトクロムcなど多様な細胞下の細胞小器官及び構成を標識した、細胞小器官に特異的に標識した抗体を調製してもよい。また、標識抗体は、チトクロムオキシダーゼ(FV錯体)に対する抗体又は錯体I、II、III及びVに対する抗体若しくは抗-ミトコンドリアタンパク質抗体又は抗-ピルビン酸脱水素酵素抗体などの他のミトコンドリアタンパク質に対する抗体などの酸化的リン酸化システムにおけるタンパク質に特異的であってもよい。

**【0361】**

他の実施形態において、標識抗体、特定の増殖マーカー及び細胞周期制御タンパク質を調製してもよい。かかる抗体としては、例えば、TUNELアッセイで用いられる抗-プロモオキシウンジン抗体(抗-BrdU抗体)、抗-ヒトmRNA-結合タンパク質HuR抗体(抗-HuR抗体)、抗-ヒト神経タンパク質HuC/HuD抗体(抗-Hu抗体)、抗-cdc6ペプチド抗体、抗-CD抗体、Dサイクリン/サイクリン-依存キナーゼ阻害剤に対する抗体及び抗-ホスホイノシチダーゼ抗体が挙げられる。

20

**【0362】**

一部の標識抗体は、構造的細胞タンパク質に対して特異的であってもよい。かかる抗体の例示としては、抗-アルファ-チューブリンモノクローナル抗体、抗-グリア原繊維酸性タンパク質(GFAP)抗体、抗-デスミン抗体又は抗-フィブロネクチン抗体がある。本発明で使用するのに適する更なる抗体としては、抗-シナプスI抗体又は抗-NMDA受容体抗体などの神経タンパク質に対して特異的な抗体が挙げられる。本発明に従って標識してもよい他のポリクローナル及びモノクローナル抗体としては、抗-ヒトGolgin-97抗体、抗-ヒトトランスフェリン受容体抗体、マトリックス金属タンパク質分解酵素に対する抗体及び抗-ウシ血清アルブミン抗体が挙げられる。

30

**【0363】**

抗原及び抗体間の特定の相互作用は、目的の蛍光性化合物免疫アッセイを使用する文脈で、調査された。免疫アッセイは、単一分子検出又集団検出ができる。目的の免疫アッセイは、生物学的実体の同定、抗体治療に対するスクリーニング、標的抗原の構造的立体配置の決定において実施できる。例えば、生物学的実体に特異的な抗体又は生物学的実体によって産生された副産物を含む免疫アッセイは、抗体-実体錯体の形成によって、実体を同定するのに日常的に用いられている。また、免疫アッセイは、治療の潜在能力ある標的抗原の生物活性を活性化又は沈静化できる抗体のスクリーニングにも採用する。また、免疫アッセイは、異なる立体配置で折り畳まれている標的タンパク質を差分できる抗イデオタイプ抗体を用いて、構造的な立体配置を計測するのに有用である。

40

**【0364】**

本発明の一実施態様によれば、本発明の蛍光性基で標識したタンパク質などの生体分子は、インビボイメージングに好適であり、限定されないが、細胞内、細胞、組織、器官又は被験者全体に存在する生体分子のイメージングが挙げられる。所望する場合、標識生体分子は、細胞内に存在する所与の分子(例えば、特定細胞のタンパク質)を染色して、イメージングする「In Cell Western」を実施するのに使用することができる。

50

## 【0365】

本発明の蛍光性基及び/又は本発明の標識生体分子は、選択した投与経路、すなわち、経口又は非経口、を採用する多様な態様で被験者に投与できる。かかる観点において、非経口投与は、限定されないが、以下の経路での投与として、静脈、筋内、皮下、腸管外、眼内、滑液内、経上皮、経皮、経眼、舌下、口腔、特に、経眼、経皮、経眼、直腸及び経鼻での吸入剤及びエアロゲルを介した吸引並びに座薬が上げられる。特に、本発明のタンパク質で標識したmPEGを水溶性高分子基として含む蛍光性基は、有利である。インビボでのイメージングは、様々な疾病の早期検出、スクリーニング、診断、画像誘導外科処置及び治療の手段を提供してもよい。例えば、近赤外蛍光性基-標識毒素(Weisehら *Cancer Res* 67(14), 6882(2007))及び抗体(Kulbershら *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133(5), 511 (2007))は、検出及び腫瘍除去外科手術を誘導するのに使用されている。インビボでのイメージングにおいて、蛍光性基で標識された抗体などの蛍光プローブが最初に動物(哺乳動物など)に投与された。その後、動物に、蛍光性基の吸収に適切な波長で励起光線を当て、蛍光性基の発光に適切な他の波長で蛍光信号を集光することでイメージングを行った。典型的には、励起及び励起光両方の効果的組織侵入、蛍光性基の吸収及び発光波長が470nm超、550nm超、600nm超、640nm超であってもよい。吸収及び発光波長が、1,200nm未満であってもよい。640nm~1,200nmの範囲の波長を有する蛍光性基を近-IR色素又は近赤外色素と称してもよく、組織又はインビボでのイメージに好適である。インビボでのイメージングにとって、蛍光標識抗体の比較的短い半減期を有する抗体を用いることは重要な挑戦である。3以上の蛍光性基分子を備える抗体標識は、代謝される肝臓に移動することで急速に体内から消えることが報告されている(Bioprobe 52, 10-11, March 2007, by Molecular probe, Inc)。標識抗体の半減期を伸ばすため、標的の検出のため経時的に十分な抗体が利用できるために、抗体当たりの蛍光性基分子数(すなわち、標識度又はDOL)を約2まで低減することが必要である。しかしながら、DOLの低減は、個々の標識抗体分子の蛍光輝度が代償となる。それゆえ、インビボでの比較的長い半減期を有する3以上の蛍光性基分子で標識した抗体を持つのが望ましい。PEGは既知の生体適合性材料であり、移植可能な医用デバイスの表面を官能化(Balakrishnan, et al *Bio materials* 26(17), 3495(2005))及び医薬の修飾(Mehvar, et al *Pharm Pharmaceut Sci* 3, 125(2000), Wang, et al *J Biochem Cell Biology* 34, 396(2002))にしばしば用いられる。本発明の実施において、本発明の蛍光性色素分子を、3, 4, 5, 6以上など単数又は複数有する抗体などのタンパク質及び同様な方法で標識した抗体は、体内において比較的長い半減期を有することができる。特に、蛍光性基内の単数又は複数のPEG基は、蛍光性基の複数分子で標識した抗体は、従来の蛍光性色素(Cy5.5, Cy7又はAlexa Fluor 750など)で標識した同一抗体との比較において、免疫原性がより低いというように、蛍光性基をマスクすることができる。一部の実施形態において、蛍光性基上の単数又は複数のPEG基は、プロテアーゼによる加水分解に対する抵抗性がより高い抗体を作って、抗体自体を遮蔽又は保護できる。

## 【0366】

本発明の他の実施形態において、必要な場合、被験者に、式I, II, III, IV又はVの構造を有する標識を含む生体分子を投与する工程を備えるインビボでの被験者のイメージングの方法であって、標識の少なくとも一つの反応性部位が、標識を生体分子に結合する反応を行い、生体分子が、被験者の細胞上の結合対に結合し、細胞を示す標的部位を更に含み、生体分子の標的部位で細胞上の結合対と結合し、それにより隣接細胞と比べて特異的に細胞を標識し、励起波長を細胞に照射し、被験者の細胞から発光した蛍光を検出し、それにより被験者の特異的に標識した細胞を検出する方法を提供する。生体分子は、抗体、抗体の断片、タンパク質、ペプチド、脂質又は炭化水素であってもよい。

## 【0367】

また、本発明の化合物は、免疫組織化学及び免疫細胞化学の実験のための標識生体分子を作製するのに使用してもよい。免疫組織化学(IHC)においては、タンパク質の存在及び位置は、生物学的組織内に存在する抗原と特異的に結合する抗体の原理を活用して、組織

切片内で計測される。かかる実験は、例えば、ガンの診断及び治療に使ってもよい。特定の分子マーカーは、特定のガンの型に関連付けられ、当業者に既知である。また、IHCを、組織の異なる部分内でのバイオマーカーの分布及び局在化の計測をする基礎研究に用いることができる。抗体-抗原相互作用の可視化は、本発明の反応性蛍光性化合物で抗体と反応させ、標識抗体を用いて組織切片を染色することで遂行できる。免疫細胞化学において、標識抗体を培養細胞の集団を染色するのに使用する。本技術は、共焦点レーザー走査顕微鏡と組み合わせることができ、高感度で、複数のタンパク質間の相互作用を可視化するのに使用できる。また、タンパク質の細胞以下の局在化も共焦点顕微鏡を使用して可能である。

#### 【0368】

免疫細胞化学を実施するため、標識ポリペプチドを使用することは特に役立つ。蛍光免疫細胞化学は、蛍光顕微鏡と組み合わせて、細胞内のタンパク質及び核酸のような生体分子の可視化を手依拠する。一つの方法は、所望の標的に対しハイブリッド形成した一次抗体を使用することである。その後、二次抗体を目的の蛍光性色素と接合させ、一次抗体を標的し、錯体を識別するのに用いる。錯体を、色素の励起スペクトルに適合した光の波長で色素を励起することにより、視覚化する。

#### 【0369】

また、免疫細胞化学を用いて細胞内の局在を識別する。所与のタンパク質又は核酸 例 えば、細胞内での生体分子の共存は、各細胞標的に対する異なる系列の抗体を使用して実施する。例えば、一細胞成分はマウスモノクローナル抗体で、他の成分はウサギポリクローナル抗体で標的化する。これらは一次抗体と称される。引き続き、マウス抗体又はウサギ抗体に、様々な発光波長を有する本発明の様々な蛍光性色素を接合した二次抗体を、細胞標的を視覚化するのに使用する。

#### 【0370】

また、本発明の化合物又は本発明の標識生体分子は、多様な用途の細胞粒子の標識に使用できる。従って、本発明は、集合内の隣接細胞に対して異なって標識された細胞によって、細胞集団内の細胞を個別の標識する方法を提供する。本方法は典型的には、本発明の標識生体分子と細胞との接触工程を備え、かかる生体分子は、集団内の隣接細胞に対して異なって標識された細胞によって該細胞を示す、結合対と結合する標的する部位を備える。標的する部位は、検出された細胞上の結合対を認識するいかなる生体分子であってもよい。標的する部位の選択は、標識する細胞によって変わる。例えば、ガン細胞の検出のため、結合対がガン細胞上で特異的に発現するように、標的する部位を選択する。多数のガンマーカーが当業者に既知である。限定されないが、erb2, PDGF受容体, VEGF受容体などの細胞表面受容体, ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ, c-abl, raf, rasなどの細胞内タンパク質の宿主物質並びに転写物因子を含むタンパク質の宿主物質及び分子と結合している他の核酸が挙げられる。他の一部の実施態様において、ガンマーカーは、免疫グロブリンイプシロンFc受容体II, Aik-I, CD20, EGF受容体, FGF受容体, NGF受容体, EpCam, CD3, CD4, CD11a, CD19, CD22, CD30CD33, CD38, CD40CD51, CD55, CD80CD95, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CTLA-4, Mucm1, Mucm 16, Endoglin, Mesothelin受容体, Nogo受容体, 葉酸受容体, CXCR4, インシュリン様成長因子受容体, Ganghosite GD3及びアルファ又はベータインテグリンである。多様な細胞型の異なる標識に対し、特定の細胞を認識する標的部位との結合対を使用できる。例えば、B細胞上又は異なる系列の細胞上で対抗するような、T細胞上で特異的に発現したタンパク質マーカーの宿主物質がある。神経細胞マーカー、筋肉細胞マーカー、さらに外胚葉性、中胚葉性又は内胚葉性由来の細胞を指すマーカーも当業者に既知であり、意図する用途に基づいて、それらの全てを使用できる。標的部位は、標識すべき細胞上の結合対によって認識される抗体、受容体、サイトカインサイトカイン、成長因子及び他のいずれかの部位又はそれらの組合せであってもよい。標識細胞は、細胞内で標識してもよい。

#### 【0371】

異なって標識した細胞は、溶液又は基質に固定した多数のインビトロ様式で、細胞へ異

10

20

30

40

50

なる励起波長で照射し 細胞からの異なる発光波長を検出することで画像化できる。

【0372】

標識細胞及び/又は蛍光の強度は、流動細胞計測法の実施により検出又は定量されてもよい。また、本発明の化合物で標識した又は本発明の標識生体分子で染色した細胞又は粒子は、蛍光活性細胞分別(FACS)を用いた標識の特定の特性に基づいて分離又は単離してもよい。かかる技術は当業者に既知である、簡潔には、本発明の蛍光性色素で細胞を標識し、その後、媒介中に懸濁し、狭い落下ノズルを通過させ、各細胞が典型的には一つの小滴になる。レーザーに基づく検出システムを用いて蛍光を励起し、蛍光に陽性な細胞を有する液滴は電荷を帯びる、荷電した板間を落下させ異なるチューブに収集して、荷電及び非荷電液滴を分離する。装置は、分析手段、集団内の多数の標識細胞の計数又は選択した集団のその後の成長を調べるための細胞分離に用いてもよい。更に、第一と直行する二次レーザーシステムを用いて、第二の蛍光観察又は光散乱に基づく細胞サイズ計測を実施し、システムを洗練してもよい。

10

【0373】

蛍光細胞分別を実施するための更なる案内書としては以下の刊行物が見出せる。Darzynkiewicz, Z, Crissman, H A and Robinson, J P, Eds, 「血球計算第三版 Parts A and B」 (Methods in Cell Biology, Volumes 63 and 64), Academic Press (2001), Davey, H M and Kell, D B, 「流動細胞計測法及び異種性微生物集合の細胞分別 単一細胞分析の重要性」 *biolog. Rev* 60, 641-696 (1996), Givan, A L, 「流動細胞計測法の第一原理第二版」 John Wiley and Sons (2001), Herzenberg, L A, Parks, D, Sahaf, B, Perez, O, Roederer, M and Herzenberg, L A, 「歴史及び展望 蛍光活性化細胞分別装置及び流動細胞計測法 スタンフォードからの概説」 *Chn Chem* 48, 1819-1827 (2002), Jaroszeski, M J and Heller, R, Eds, 「流動細胞計測法プロトコール」 (Methods in Molecular Biology, Volume 91), Humana Press (1997), Ormerod, M G, Ed, 「流動細胞計測法 実践的アプローチ第三版」 Oxford University Press (2000), Robmson, J P, Ed, 「血球計算の最新プロトコール」 John Wiley and Sons (1997), Shapiro, H M, 「血球計算における光学測定 光散乱, 励起, 吸収及び蛍光」 *Meth Cell Biol* 63, 107-129 (2001), Shapiro, H M 「実践流動細胞計測法 第4版」 Wiley-Liss (2003), Weaver, J L, 「流動細胞計測法入門」 *Methods* 21, 199-201 (2000)である。

20

30

【0374】

また、本発明の蛍光性化合物は、蛍光寿命イメージング(FLIM)に使用できる。FLIMは、蛍光性試料の蛍光減衰特性の多様性に基づく画像生成の有用な技術である。共焦点顕微鏡及び他の顕微鏡システムでのイメージング技術として使用できる。FLIMの画像を生成するのに、試料の厚い層での光散乱効果を最小化する利点があるので、その強度よりもフルオロフォア信号の寿命を使用する。FLIMは、従来の蛍光顕微鏡よりも大きな組織深さをプローブでき、生医学組織イメージングに有用でありうる。

【0375】

本発明の化合物は、単一分子用途に用いてもよい。全体的な平均化から逃れて、個々の蛍光性基の分子を観察することで、生物学的及び化学的プロセスの機序の決定をしてもよい。かかるプロセスとしては、キネシン又はミオシンなどのタンパク質モーターの移動、細胞タンパク質錯体の生成、分解及び移動及びDNA又はRNAポリメラーゼの作用機序が挙げられる。かかる実験において、本発明の化合物は、例えば、顕微鏡のスライド又はフローチェンバーなどの表面に結合する生体分子を標識するのに使用してもよい。個々のフルオロフォアは、その後、全反射蛍光顕微鏡を用いて観察してもよい。

40

【0376】

また、本発明の化合物を、脂質の標識に使用してもよい。脂質は、多数の生物学的プロセスに関与し、脂質及び脂質ラフトの標識は、それらの性質の研究においてしばしば重要な方法でありうる。多様な脂質の単層及び二重層を、リボソーム及びミセルなどの生きた

50

細胞内又は人工的系内で標識してもよい。例えば、生きた細胞の集団を、本発明の化合物及びコレラ毒素subunit Bと反応させて調整した、脂質ラフトと特異的に相互作用する蛍光性接合体で標識してもよい。かかる脂質ラフトは、その後、本発明の化合物の一つと標識してもよい抗コレラ毒素抗体の使用により、別個の膜パッチへ架橋してもよい。

**【0377】**

本発明の標識ポリペプチドは、例えば、カルシウムイオン計として、pH計として、リン酸化計として、限定されないが、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、塩素及びハロゲン化合物を含む他のイオン計として、原核生物及び真核生物細胞でのバイオセンサーとしての使用を見出した。例えば、カルシウムイオンの検出において、EFハンドモチーフを含むタンパク質は、カルシウムイオンと結合しながらサイトゾルから膜へ移動することが知られている。かかるタンパク質は、タンパク質の他の領域との疎水性相互作用により、分子内に埋没しているミリストイル基を含む。カルシウムイオンの結合は、立体配置の変化を誘発し、ミリストイル基を露出させ、その後、脂質二重層への挿入が可能となった。かかるEFハンドモチーフを含むタンパク質を、目的の蛍光性色素で標識することで、サイトゾルから形質膜への移動を監視することで、細胞内カルシウムイオンの指示薬にできる。かかる監視は、光学検知器、例えば、共焦点顕微鏡の使用で実施できる。本系で好適に使用できるEFハンドタンパク質としては、限定されないが、リカバリン(1-3)、カルシニューリンB、トロポニンC、ピシニン、ニューロカルシン、カルモジュリン、パルプアルブミン等が挙げられる。

10

**【0378】**

pH計としての使用において、ヒサクトフィリンに基づくシステムを採用してもよい。ヒサクトフィリンは、ミリストイル化ヒスチジンの豊富なタンパク質であり、(細胞性粘菌中に存在することが知られている。アクチン及び酸性脂質への結合は、細胞質のpH変動の範囲内で、鋭くpHに依存する。生きた細胞内では膜結合が、ヒサクトフィリンとアクチン線維との相互作用を打ち消すように見える。およそpH6.5において、これらは典型的には形質膜及び核へ局在化している。これに対し、pH7.5では、細胞質空間全体に分布している。かかる分布の変化は可逆的で、分子表面上でループ状に晒されるヒスチジんクラスターに起因する。細胞質のpH変動の範囲内での細胞内分布の逆転は、ヒスチジン残渣のpK6.5に基づく。細胞分布は、タンパク質のミリストイル化に依存しない。対応する蛍光性色素をヒサクトフィリンへ接合することで、標識ヒサクトフィリンの細胞内分布は、レーザー走査、共焦点顕微鏡又は標準蛍光顕微鏡によって追跡できる。蛍光定量分析は、細胞を通した線走査(レーザー走査共焦点顕微鏡)又は他の電子データ分析(例えば、メタモルフソフトウエア(Universal Imaging Corp社製)の使用及び細胞集団内で収集したデータの平均処理)を実施することで行うことが可能である。

20

30

**【0379】**

また、目的の蛍光性タンパク質は、顕微イメージング及び電子分析を用いて、細胞の配列の自動スクリーニングを含む用途に使用しうることを見出した。スクリーニングは医薬及び機能性遺伝子の発見に使用できる。例えば、内皮細胞による多細胞小管(血管形成)の形成、Fluoroblok Insert System (Becton Dickinson Co.社製)を介した細胞の移動、創傷治療、神経成長という多細胞再構築及び移動における変化を検出するため、例えば、目的のタンパク質を、全細胞のマーカーとして用いる場合や、例えば、信号形質導入、刺激を受けたキナーゼ及びタンパク質キナーゼC、タンパク質キナーゼA、転写因子NFkB及びNFATなどの転写因子の転移、サイクリンA、サイクリンBI及びサイクリンEなどの細胞周期タンパク質、分割された基質、リン脂質の後続する運動で、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、核、核小体、原形質膜、ヒストン、エンドゾーム、リソソーム、微小管、アクチンなどの細胞内構造用マーカーで、プロテアーゼ分割など細胞活性の指標として細胞内位置の変化の検出を行うペプチド(例えば、標的配列)及びタンパク質に融合するタンパク質をマーカーとして使用する場合がある。

40

**【0380】**

また、目的の蛍光性タンパク質は、高スループットスクリーニングアッセイでの使用も

50

見いだせる。目的の蛍光性タンパク質は、典型的には目的の蛍光性色素を欠くタンパク質よりも安定である。一部の実施形態において、蛍光性タンパク質は、1時間、2時間、5時間又は24時間若しくはそれ以上の血清での半減期を示しうる。

【0381】

目的の蛍光性タンパク質を、例えば、目的の蛍光性色素を、例えば、カルシウム結合SH2-、SH3-、PH-、PDZ-ドメインなどの特定の信号発信ドメインと接合することで、二次メッセンジャー検出器として使用できる。

【実施例】

【0382】

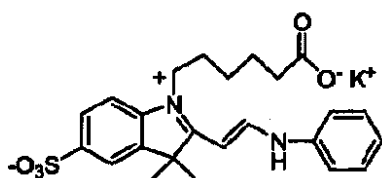
下記例は本発明の実施を説明する目的である。本発明又は請求項の範囲を制限するものとして解釈してはならない。

【0383】

例1: 2-(アニリノビニル)-1-(5-カルボキシペンチル)-3,3-ジメチル-5-スルホインドリウムカリウム塩(化合物No.1)の調製

【0384】

【化69】



化合物 No. 1

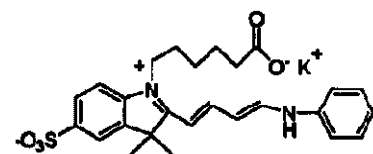
1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸、カリウム塩(Bio接合体 Chem. 4,105 (1993))(5g)、N,N'-ジフェニルホルムアミジン(2.3g)及び無水酢酸(1.1mL)の混合物を120 で30分間加熱した。室温へ冷却後、混合物を真空下濃縮乾固し、残渣をシリカゲル(3.5g)上のカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0385】

例2: 2-(4-アニロブタジエニル)-1-(5-カルボキシペンチル)-3,3-ジメチル-5-スルホインドリウムカリウム塩(化合物No.2)の調製

【0386】

【化70】



化合物 No. 2

1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸、カリウム塩(10g)、マロンアルデヒドジアニル塩酸塩(8g)、Et<sub>3</sub>N(0.356mL)のAcOH溶液(40mL)の混合物を120 で3時間加熱した。室温へ冷却後、混合物を真空下濃縮乾固し、残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで暗褐色粘着性固体(5g)に精製した。

【0387】

例3: 化合物No.3a及び3bの調製

【0388】

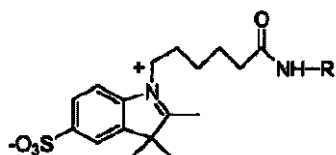
10

20

30

40

## 【化71】



化合物 No. 3a R =  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{24}\text{CH}_3$

化合物 No. 3b R =  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{12}\text{CH}_3$

1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸，カリウム塩 (0.1g) の DMF (1mL) 溶液へ  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.1mL) 及び TSTU (80mg) を添加した。混合物を室温で1時間攪拌し，続いて，by the addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (40  $\mu\text{L}$ ) 及び m-dPEG<sub>24</sub> アミン (0.4g) (QuantaBiodesign社製，Powell，OH) 又は m-dPEG<sub>12</sub> アミン (0.2g) (QuantaBiodesign社製，Powell，OH) を添加した。混合物を室温で一晩攪拌し，その後濃縮乾固した。残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，明褐色固体 (250mg for 化合物No.3a and 102 mg for 化合物No.3b) を得た。

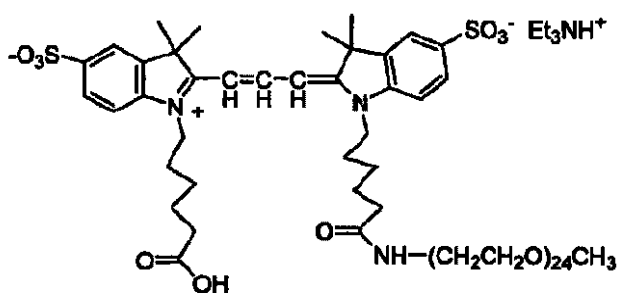
10

## 【0389】

## 例4: 化合物No.4の調製

## 【0390】

## 【化72】



化合物 No. 4

20

化合物No.3a (40mg)，化合物No.1 (30mg)，無水酢酸 (15  $\mu\text{L}$ ) 及び  $\text{Et}_3\text{N}$  (45  $\mu\text{L}$ ) の DMF 溶液 (1 mL) の混合物を室温で一晩攪拌した。暗赤色溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，暗赤色固体 (40mg) を得た。

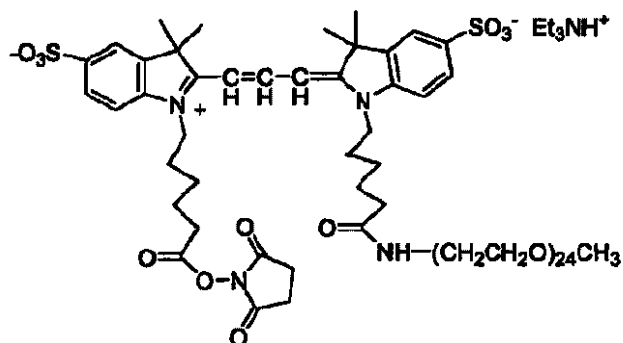
30

## 【0391】

## 例5: 化合物No.5の調製

## 【0392】

## 【化73】



化合物 No. 5

40

化合物No.4 (15mg)， $\text{Et}_3\text{N}$  (3.5  $\mu\text{L}$ ) 及び TSTU (3mg) の DMF 溶液 (0.2mL) の混合物を室温で1時間攪拌した。 $\text{Et}_2\text{O}$  (5mL) を添加し，沈殿 (19mg) を遠心分離で収集した。

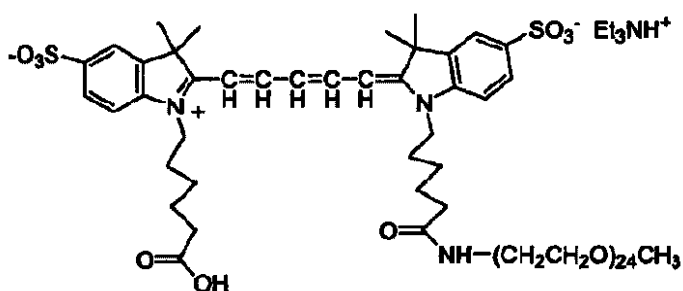
## 【0393】

## 例6: 化合物No.6の調製

50

【 0 3 9 4 】

【 化 7 4 】



化合物 No. 6

10

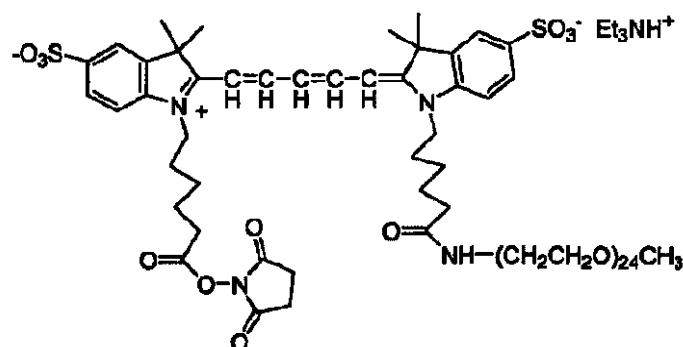
化合物No.3a(30mg), 化合物No.2(20mg), 無水酢酸(10  $\mu$ L)及びEt<sub>3</sub>N(30  $\mu$ L)のDMF溶液(1 mL)の混合物を室温で一晩攪拌した。暗青色溶液を真空下濃縮乾固し, 残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し, 暗青色固体(20mg)を得た。

【 0 3 9 5 】

例7: 化合物No.7の調製

【 0 3 9 6 】

【 化 7 5 】



化合物 No. 7

20

化合物No.6(13mg)のDMF(0.2mL)溶液へEt<sub>3</sub>N(3  $\mu$ L)及びTSTU(2.5mg)を添加し, 混合物を室温で1時間攪拌した。Et<sub>2</sub>O(2mL)を添加し, 沈殿(23mg)を遠心分離で収集した。

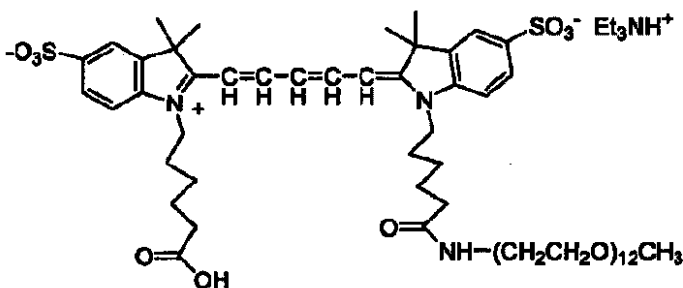
30

【 0 3 9 7 】

例8: 化合物No.8の調製

【 0 3 9 8 】

【 化 7 6 】



化合物 No. 8

40

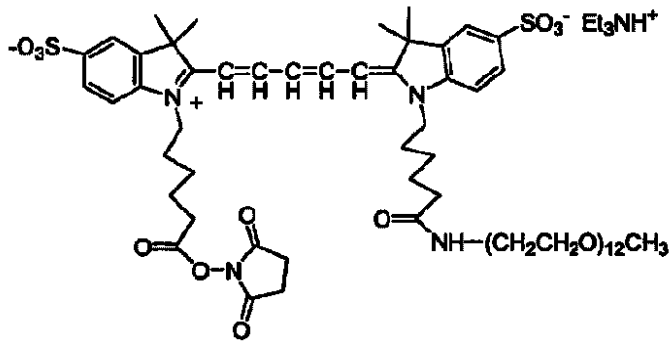
化合物8(60mg)を, 化合物No.6の調製法に従って, 化合物No.2(35mg)及び化合物No.3b(50mg)から合成した。

【 0 3 9 9 】

例9: 化合物No.9の調製

【 0 4 0 0 】

【化77】



化合物 No. 9

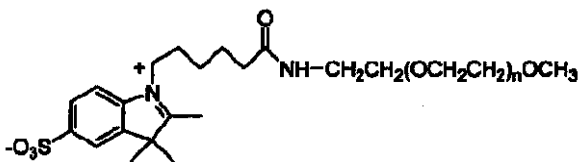
化合物No.9(10mg)を，化合物No.7の調製法に従って，化合物No.8(14mg)から合成した。

【0401】

例10: 化合物No.10の調製

【0402】

【化78】



化合物 No. 10

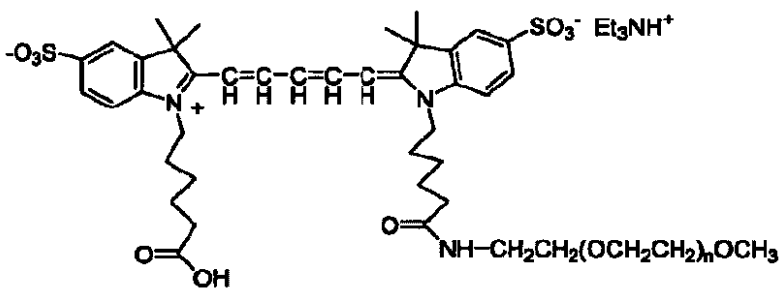
化合物No.10(75mg)を，化合物No.3の合成法に従って，1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸，カリウム及びmPEG-NH<sub>2</sub>(Mwt ~ 2,000) (Laysan Bio.社製 Arab, AL)から調製した。

【0403】

例11: 化合物No.11の調製

【0404】

【化79】



化合物 No. 11

化合物No.11(15mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.10(20mg)及び化合物No.2(6mg)から調製した。

【0405】

例12: 化合物No.12の調製

【0406】

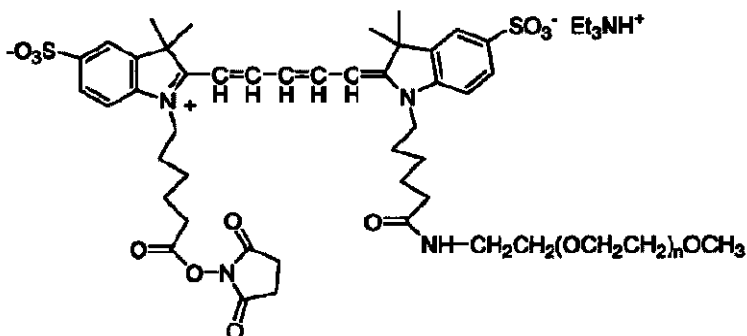
10

20

30

40

【化 8 0】



化合物 No. 12

10

化合物No.12(3mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.11(4mg)から調製した。

【 0 4 0 7】

例13: 化合物No.13の調製

【 0 4 0 8】

【化 8 1】



化合物 No. 13

20

p-ヒドラジノベンゼンスルホン酸(5g)，メチル7-メチル-8-オキソノナノアート(6g)(米国特許出願代2006/0121503号A1)の酢酸溶液(20mL)の混合物を穏やかに3時間還流した。室温へ冷却後，混合物を濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，赤味褐色固体(3g)を得た。固体をNaOAc(1当量)のMeOH溶液(100mL)と混合し，得られた溶液を室温で30分間攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，赤味褐色固体(3g)を得た。

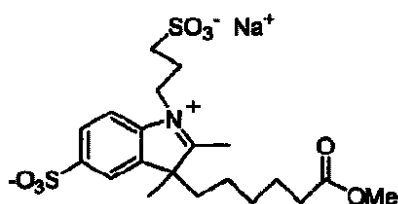
【 0 4 0 9】

例14: 化合物No.14の調製

【 0 4 1 0】

30

【化 8 2】



化合物 No. 14

化合物No.13(0.86g)及び1,3-プロパンスルトン(0.83g)の混合物を120℃で3時間加熱した。EtOAc(50mL)を添加し，懸濁液を穏やかに2時間還流した。室温へ冷却後，沈殿(1g)を吸着過により収集した。

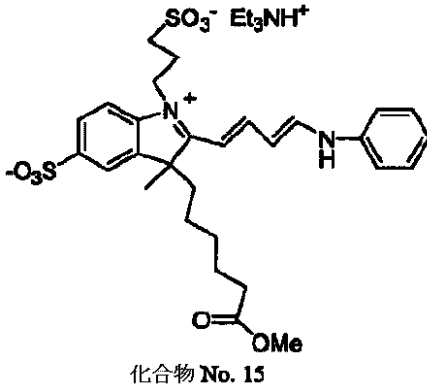
40

【 0 4 1 1】

例15: 化合物No.15の調製

【 0 4 1 2】

【化 8 3】



10

化合物No.14(0.8g) , マロンアルデヒドジアニル塩酸塩(0.52g) ,  $\text{Et}_3\text{N}$ (23  $\mu\text{L}$ ) のAcOH溶液(3mL)の混合物を120 で3時間加熱した。室温へ冷却後, 混合物を真空下濃縮乾固し, 残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し, 暗赤色粘着性固体(0.5g)を得た。

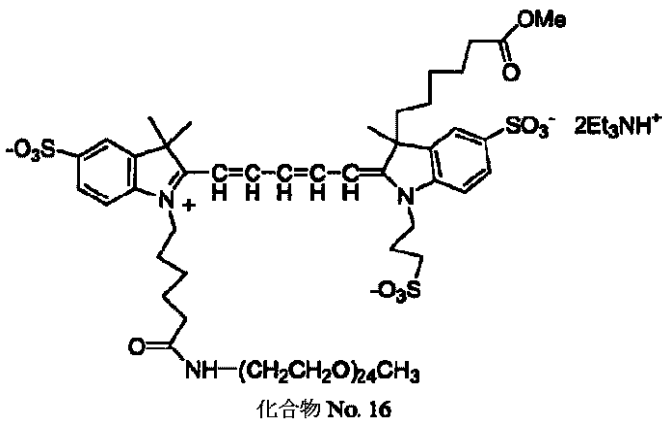
【 0 4 1 3】

例16: 化合物No.16の調製

【 0 4 1 4】

【化 8 4】

20



30

化合物No.16(80mg)を, 化合物No.6の合成法に従って, 化合物No.15 (50mg)及び化合物No.3a(120mg)から調製した。

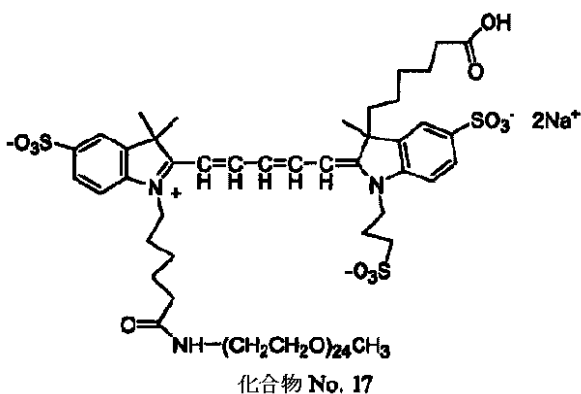
【 0 4 1 5】

例17: 化合物No.17の調製

【 0 4 1 6】

【化 8 5】

40



化合物No.16(50mg)の $\text{H}_2\text{O}$ (2mL)溶液へ1M  $\text{NaOH}$ (120  $\mu\text{L}$ )を添加した。溶液を室温で1時間

50

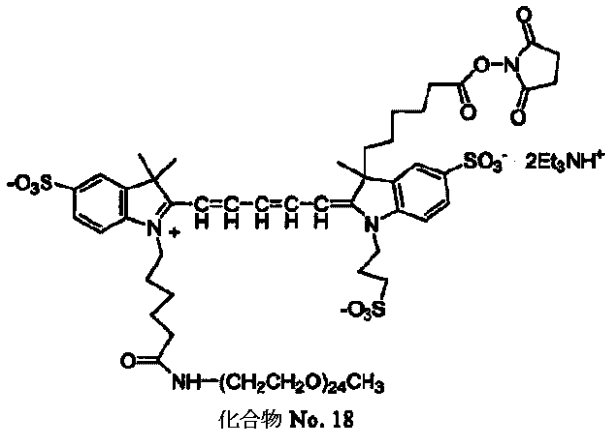
攪拌し，その後，LH-20カラム(35mg)で精製した。

【0417】

例18: 化合物No.18の調製

【0418】

【化86】



10

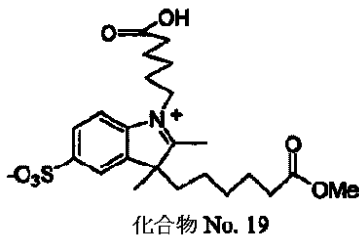
化合物No.18(5mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.17(4mg)から調製した。

例19: 化合物No.19の調製

20

【0419】

【化87】



化合物No.13(0.6g)及び6-プロモヘキサン酸(0.63g)の混合物を140 で1時間加熱した。EtOAc(30mL)を添加し，懸濁液を穏やかに1時間還流し，沈殿(0.45g)を吸引る過により収集した。

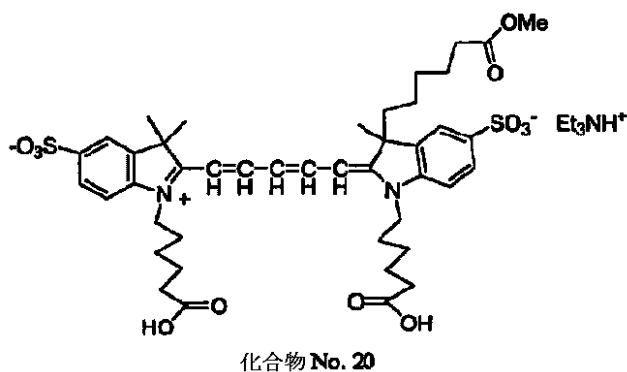
30

【0420】

例20: 化合物No.20の調製

【0421】

【化88】



40

化合物No.19(84mg)，化合物No.2(52mg)，無水酢酸(32 μL)及びEt<sub>3</sub>N(0.1mL)のDMF溶液(2 mL)の混合物を室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，暗青色固体(20mg)を得た。

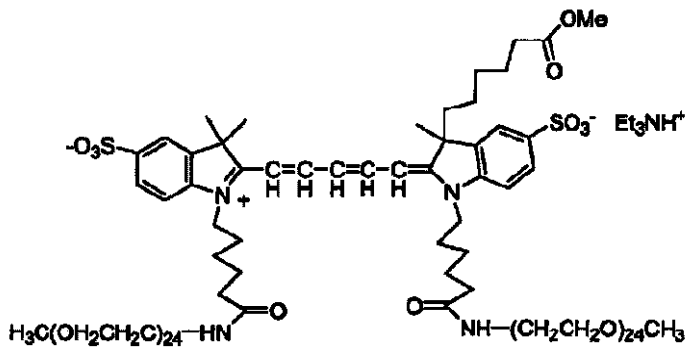
【0422】

50

## 例21: 化合物No.21の調製

【 0 4 2 3 】

【 化 8 9 】



化合物 No. 21

10

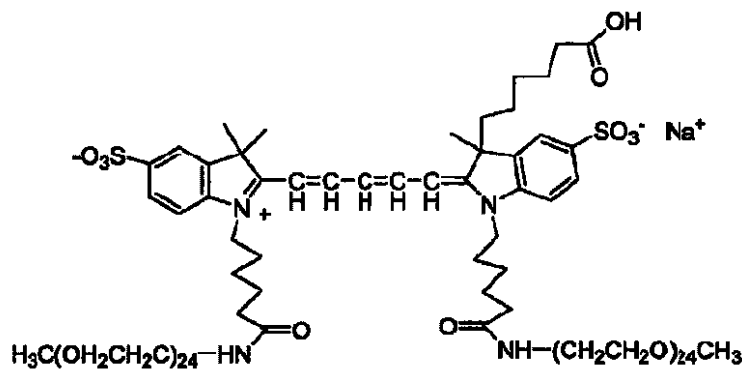
化合物No.21(17mg)を，化合物No.3の合成法に従って，化合物No.20(9mg)及びm-dPEG<sub>24</sub>アミン(27mg)から調製した。

【 0 4 2 4 】

## 例22: 化合物No.22の調製

【 0 4 2 5 】

【 化 9 0 】



化合物 No. 22

20

30

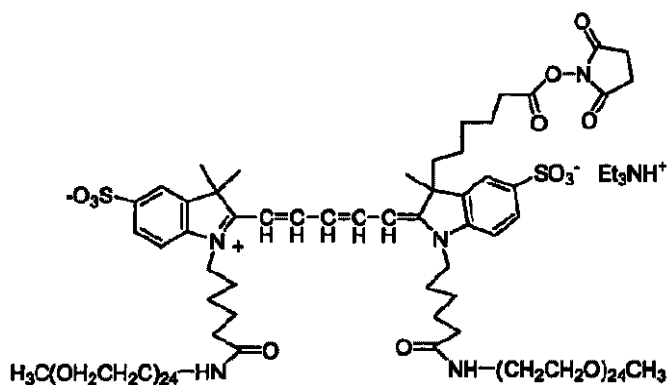
化合物No.21(17mg)のH<sub>2</sub>O(0.5mL)溶液へ1M NaOH(0.1mL)を添加し，溶液を室温で30分間攪拌した。溶液を1N HCl(0.1mL)で酸性化し，LH-20カラムで精製し，凍結乾燥後，暗青色固体(10mg)を得た。

【 0 4 2 6 】

## 例23: 化合物No.23の調製

【 0 4 2 7 】

【 化 9 1 】



化合物 No. 23

40

50

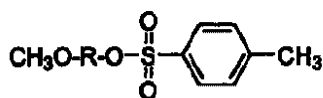
化合物No.23(4mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.22(6mg)から調製した。

【0428】

例24: 化合物No.24a及び24bの調製

【0429】

【化92】



化合物 No. 24a: R=-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

化合物 No. 24b: R=-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>23</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

10

ウンデカエチレングリコールメチルエーテル(1g)(ポリpure AS社製, Oslo, Norway)又はm-dPEG<sub>24</sub>アルコール(1g)(QuantaBiodesign社製, Powell, OH)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液(5mL)及びピリジン(5mL)の溶液に，0 でp-TsCl(1.1当量)を小分けして添加した。混合物を0 で2時間，その後，室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，無色油(化合物No.24a 1.25g及び化合物No.24b 1.10g)を得た。

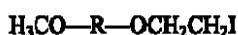
【0430】

例25: 化合物No.25a及び25bの調製

【0431】

【化93】

20



化合物 No. 25a: R=-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

化合物 No. 25b: R=-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>23</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-

化合物No.24a(1.2g)又は化合物No.24b(1.1g)及びNaI(1.1当量)のアセトン溶液(10mL)の混合物を，穏やかに一晩還流した。室温へ冷却後，混合物を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，無色固体(化合物No.25a 1.1g及び化合物No.25b 1g)を得た。

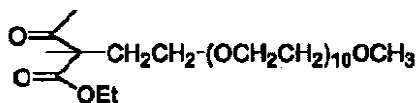
【0432】

例26: 化合物No.26の調製

30

【0433】

【化94】



化合物 No. 26

ナトリウムエトキシド(0.13g)及びエチル2-メチルアセトアセテート(0.28g)の無水EtOH溶液(5mL)の混合物を室温で1時間攪拌し，続いて化合物No.25a(0.8g)を添加した。混合物を穏やかに一晩還流し，溶液を真空下濃縮乾固した。残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，灰白色油(0.75g)を得た。

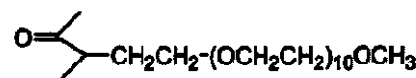
40

【0434】

例27: 化合物No.27の調製

【0435】

【化95】



化合物 No. 27

化合物No.26(0.7g)のMeOH(10mL)溶液へ，NaOH(0.21g)のH<sub>2</sub>O(2mL)溶液を添加した。混合

50

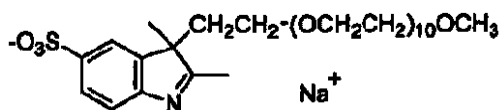
物を60 で一晩加熱した。室温へ冷却後，溶液を6M HCl(1mL)で中性化した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，無色油(0.55g)を得た。

【0436】

例28: 化合物No.28の調製

【0437】

【化96】



化合物 No. 28

10

p-ヒドラジノベンゼンスルホン酸(100mg)及び化合物No.27(300mg)の酢酸溶液(5mL)の混合物を一晩加熱還流した。室温へ冷却後，混合物を濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで淡褐色固体(270mg)へ精製した。固体をNaOAc(1当量)のMeOH溶液(10mL)と混合し，得られた溶液を室温で30分間攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，赤み褐色固体(280mg)を得た。

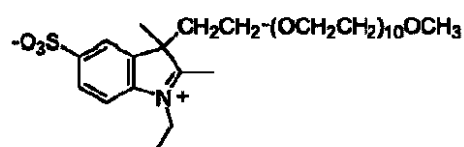
【0438】

例29: 化合物No.29の調製

【0439】

【化97】

20



化合物 No. 29

化合物No.28(200mg)及び大過剰のヨウ化エチル(10mL)の混合物を，一晩沸騰まで加熱した。EtOAc(20mL)を添加し，懸濁液を穏やかに1時間還流した。室温へ冷却後，沈殿(250mg)を吸引ろ過により収集した。

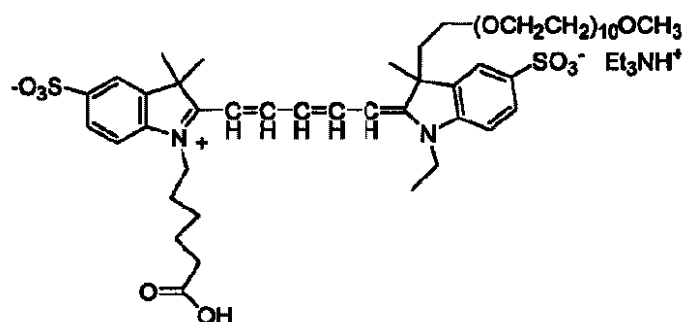
30

【0440】

例30: 化合物No.30の調製

【0441】

【化98】



化合物 No. 30

40

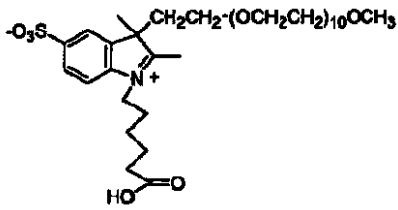
化合物No.30(55mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.29(100mg)及び化合物No.2(65mg)から調製した。

【0442】

例31: 化合物No.31の調製

【0443】

【化99】



化合物 No. 31

化合物No.31(120mg)を，化合物No.19の合成法に従って，化合物No.30(200mg)及び6-ブ  
ロモヘキサン酸(1g)から調製した。

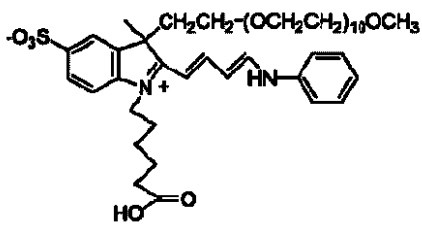
10

【0444】

例32: 化合物No.32の調製

【0445】

【化100】



化合物 No. 32

20

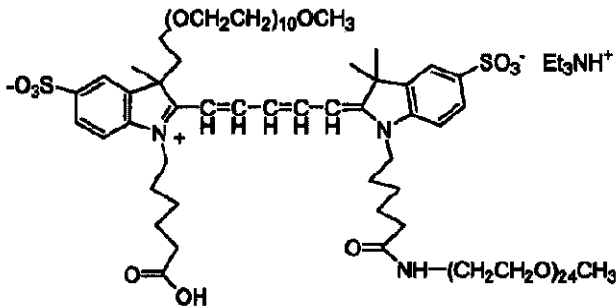
化合物No.32(75mg)を，化合物No.2の合成法に従って，化合物No.31(100mg)から調製し  
た。

【0446】

例33: 化合物No.33の調製

【0447】

【化101】



化合物 No. 33

30

化合物No.33(7mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.32(30mg)及び化合物No.  
3a(45mg)から調製した。

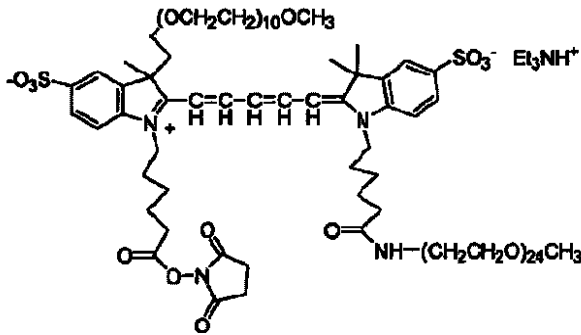
40

【0448】

例34: 化合物No.34の調製

【0449】

【化102】



化合物 No. 34

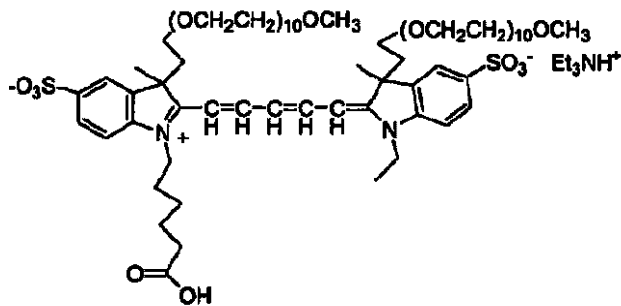
化合物No.34(3mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.33(5mg)から調製した。

【0450】

例35: 化合物No.35の調製

【0451】

【化103】



化合物 No. 35

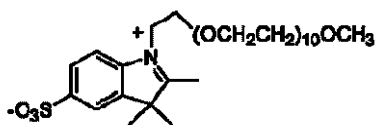
化合物No.35 (7mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.32(30mg)及び化合物No.29(23mg)から調製した。

【0452】

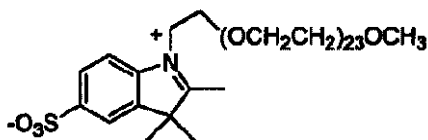
例36: 化合物No.36a及び36bの調製

【0453】

【化104】



化合物 No. 36a



化合物 No. 36b

化合物No.36a(110mg)及び化合物No.36b(100mg)それぞれを，化合物No.19の合成法に従って，2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸，ナトリウム塩(1当量)を，化合物No.25a(600mg)及び化合物No.25b(400mg)で四級化して各々調製した。

【0454】

例37: 化合物No.37の調製

【0455】

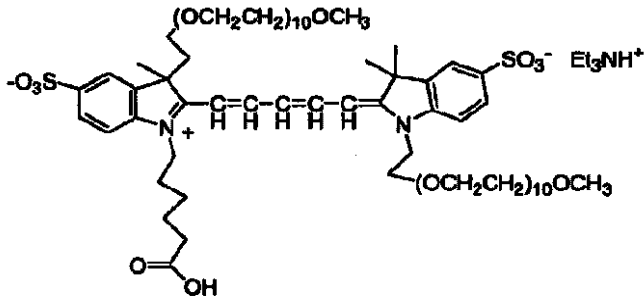
10

20

30

40

【化105】



化合物 No. 37

10

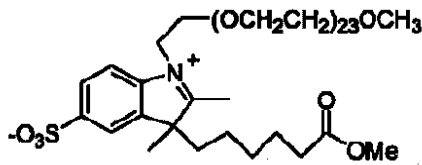
化合物No.37(11mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.36a(25mg)及び化合物No.32(40mg)から調製した。

【0456】

例38: 化合物No.38の調製

【0457】

【化106】



化合物 No. 38

20

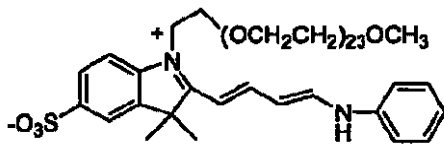
化合物No.38(36mg)を，化合物No.19の調製法に従って，化合物No.13(15mg)及び化合物No.25b(50mg)から合成した。

【0458】

例39: 化合物No.39の調製

【0459】

【化107】



化合物 No. 39

30

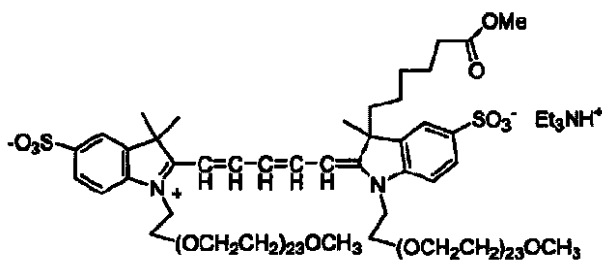
化合物No.39(70mg)を，化合物No.2の調製法に従って，化合物No.36b(100mg)から合成した。

【0460】

例40: 化合物No.40の調製

【0461】

【化108】



化合物 No. 40

50

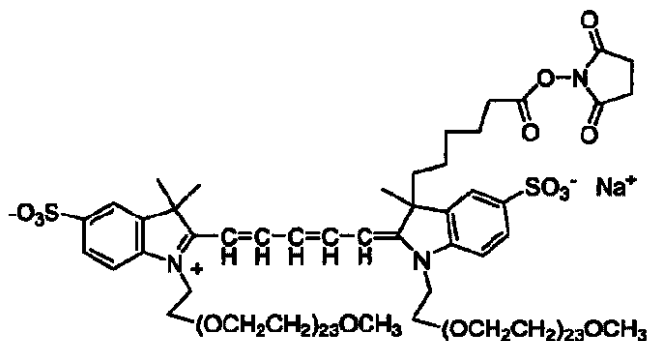
化合物No.40(38 mg)を，化合物No.6の調製法に従って，化合物No.38(30mg)及び化合物No.39(32mg)から合成した。

【 0 4 6 2 】

例41: 化合物No.41の調製

【 0 4 6 3 】

【 化 1 0 9 】



化合物 No. 41

10

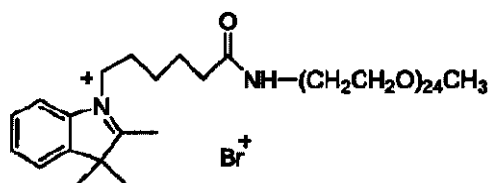
化合物No.40(20mg)を化合物No.22の合成法に従って，加水分解し，遊離酸形態(14mg)を得た。その後，遊離酸形態の色素を，化合物No.23の調製法に従って，化合物No.41(10mg)に転換した。

【 0 4 6 4 】

例42: 化合物No.42の調製

【 0 4 6 5 】

【 化 1 1 0 】



化合物 No. 42

20

30

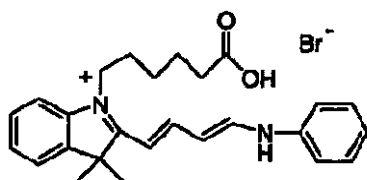
化合物No.42(0.19mg)を，化合物No.3b.の調製法に従って，1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウムプロミド(0.1g)及びm-dPEG<sub>24</sub>アミン(0.3g)から合成した。

【 0 4 6 6 】

例43: 化合物No.43の調製

【 0 4 6 7 】

【 化 1 1 1 】



化合物 No. 43

40

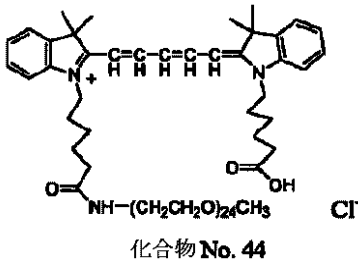
化合物No.43(0.5g)を，化合物No.2の調製法に従って，1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウムプロミド(1g) and マロンアルデヒドジアニル塩酸塩(0.85g)から合成した。

【 0 4 6 8 】

例44: 化合物No.44の調製

【 0 4 6 9 】

## 【化 1 1 2】



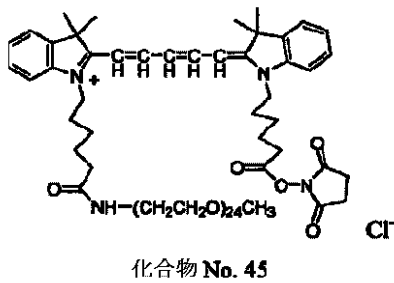
化合物No.44(25mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.42(40mg)及び化合物No.43(15mg)から調製した。

## 【 0 4 7 0 】

例45: 化合物No.45の調製

## 【 0 4 7 1 】

## 【化 1 1 3】



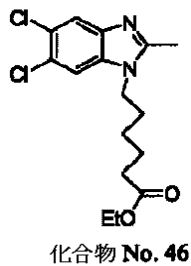
化合物No.45(20mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.44(25mg)から調製した。

## 【 0 4 7 2 】

例46: 化合物No.46の調製

## 【 0 4 7 3 】

## 【化 1 1 4】



水素化ナトリウム(300mg)のDMF溶液へ5,6-ジクロロ-2-メチルベンゾイミダゾール(500mg)を小分けして0 で添加した。混合物を0 で15分間攪拌し，続いて，6-プロモヘキサン酸エチル(0.66mL)を添加した。混合物を0 で更に15分間その後，室温で1時間攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，淡褐色固体(0.75g)を得た。

## 【 0 4 7 4 】

例47: 化合物No.47の調製

## 【 0 4 7 5 】

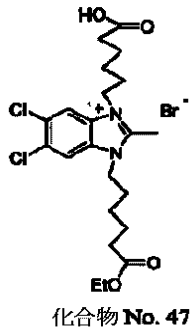
10

20

30

40

【化 1 1 5】



10

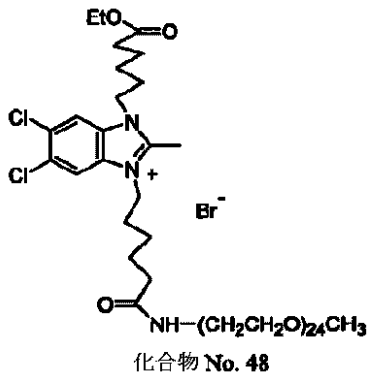
化合物No.46(170mg)及び6-プロモヘキサン酸(200mg)の混合物を140℃で1時間加熱した。EtOAc(20mL)を添加し、懸濁液を穏やかに30分間還流した。室温へ冷却後、沈殿(260mg)を吸引る過により収集した。

【 0 4 7 6】

例48: 化合物No.48の調製

【 0 4 7 7】

【化 1 1 6】



20

化合物No.48(55mg)を、化合物No.3aの調製法に従って、化合物No.47(0.1g)及びm-dPEG<sub>24</sub>アミン(200mg)から合成した。

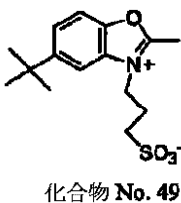
30

【 0 4 7 8】

例49: 化合物No.49の調製

【 0 4 7 9】

【化 1 1 7】



40

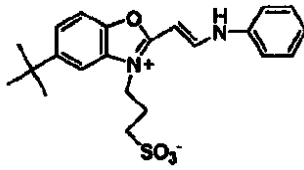
化合物No.49(700mg)を、化合物No.14の合成法に従って、2-メチル-6-t-ブチルベンゾオキサゾール(540mg)及び1,3-プロパンスルトン(450mg)から調製した。

【 0 4 8 0】

例50: 化合物No.50の調製

【 0 4 8 1】

【化 1 1 8】



化合物 No. 50

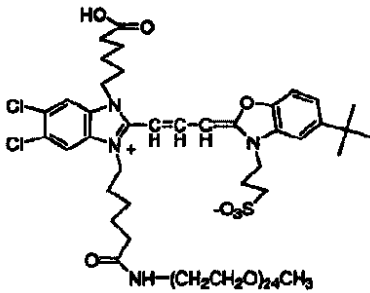
化合物No.50(270mg)を、化合物No.1の合成法に従って、化合物No.49(460mg)及びN,N'-ジフェニルホルムアミジン(340mg)から調製した。

【0 4 8 2】

例51: 化合物No.51の調製

【0 4 8 3】

【化 1 1 9】



化合物 No. 51

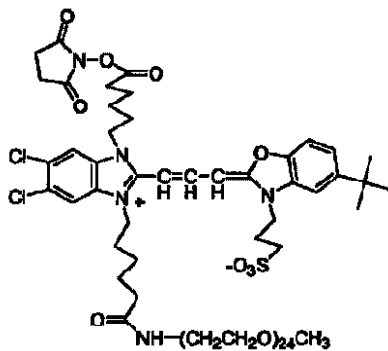
化合物No.48(30mg)及び化合物No.50(10mg)を、化合物No.4の合成法に従って、結合させシアニン色素エチルエステル中間体(16mg)を得た。得られた中間体を、化合物No.22の合成法に従って、1M NaOHを用いて加水分解し、遊離酸色素化合物No.51(10mg)を得た。

【0 4 8 4】

例52: 化合物No.52の調製

【0 4 8 5】

【化 1 2 0】



化合物 No. 52

化合物No.52(7mg)を、化合物No.5の合成法に従って、化合物No.51(8mg)から調製した。

【0 4 8 6】

例53: 化合物No.53の調製

【0 4 8 7】

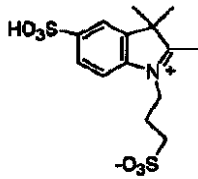
10

20

30

40

【化 1 2 1】



化合物 No. 53

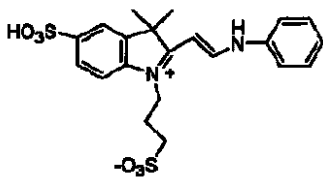
化合物No.53(18g)を，化合物No.49の合成法に従って，2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸ナトリウム塩(1.1g)(Bio接合体 Chem. 4, 105(1993))から調製した。

【 0 4 8 8 】

例54: 化合物No.54の調製

【 0 4 8 9 】

【化 1 2 2】



化合物 No. 54

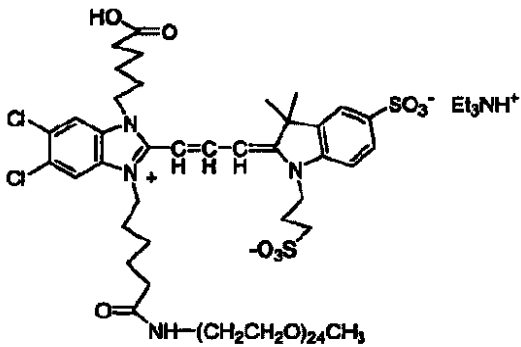
化合物No.54(2.4g)を，化合物No.1の合成法に従って，化合物No.53(5.7g)から調製した。

【 0 4 9 0 】

例55: 化合物No.55の調製

【 0 4 9 1 】

【化 1 2 3】



化合物 No. 55

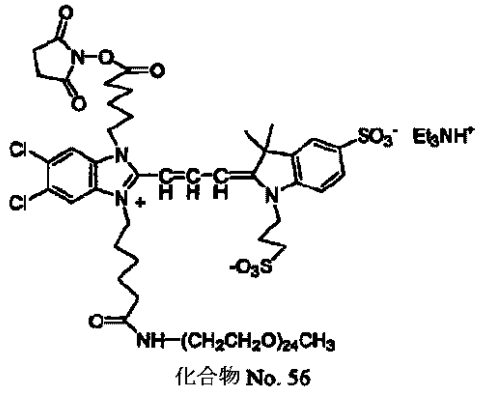
化合物No.54(19mg)及び化合物No.48(33mg)を，化合物No.4の合成法に従って，結合させ，シアニン色素エチルエステル中間体(25mg)を得た。化合物No.22の合成法に従って，1M NaOHを用いて中間体を加水分解し，化合物No.55(17mg)を得た。

【 0 4 9 2 】

例56: 化合物No.56の調製

【 0 4 9 3 】

【化124】



10

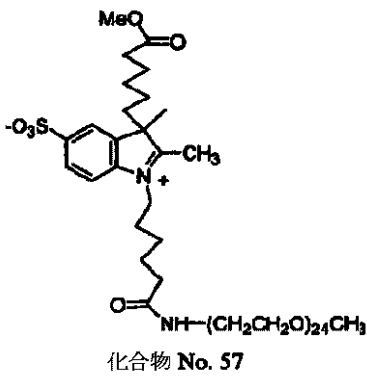
化合物No.56(6mg)を，化合物No.5の合成法に従って，化合物No.55(10mg)から調製した。

【0494】

例57:化合物No.57の調製

【0495】

【化125】



20

化合物No.57(55mg)を，化合物No.3aの調製法に従って，化合物No.19(80mg)及びm-dPEG<sub>24</sub>アミン(100mg)から合成した。

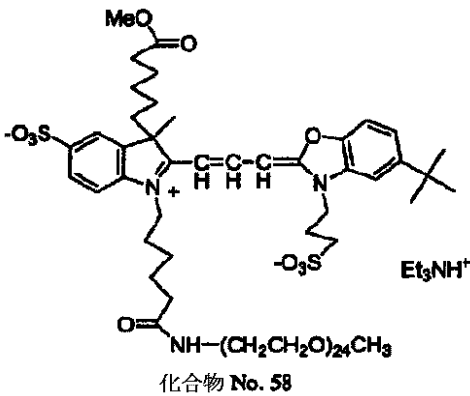
30

【0496】

例58:化合物No.58の調製

【0497】

【化126】



40

化合物No.58(8mg)を，化合物No.4の合成法に従って，化合物No.57(20mg)及び化合物No.50(10mg)から調製した。

【0498】

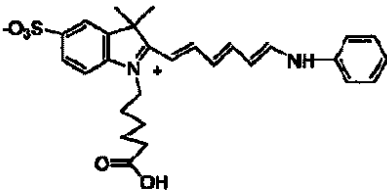
例59: 2(6-アニリノヘキサトリエニル-1-(5-カルボキシペンチル))-3,3-ジメチル-5-ス

50

## ルホインドリウム，分子内塩(化合物No.59)の調製

【 0 4 9 9 】

【 化 1 2 7 】



化合物 No. 59

10

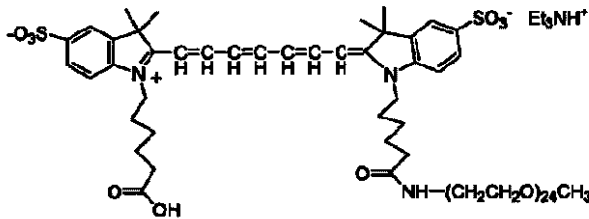
化合物No.59(4g)を，化合物No.2の合成法に従って，1-(5-カルボキシペンチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホン酸分子内塩(12g)及びグルトコンアルデヒドジアニル塩酸塩(18g)から調製した。

【 0 5 0 0 】

例60：化合物No.60の調製

【 0 5 0 1 】

【 化 1 2 8 】



化合物 No. 60

20

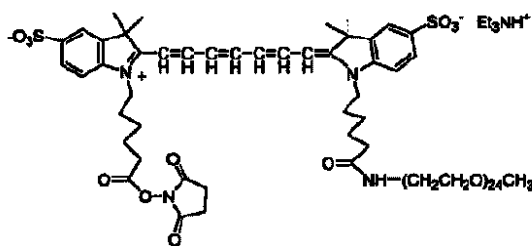
化合物No.60(15mg)を，化合物No.6の合成法に従って，化合物No.59(50mg)及び化合物No.3a(50mg)から調製した。

【 0 5 0 2 】

例61：化合物No.61の調製

【 0 5 0 3 】

【 化 1 2 9 】



化合物 No. 61

30

化合物No.61(6mg)を，化合物No.7の合成法に従って，化合物No.60(10mg)から調製した

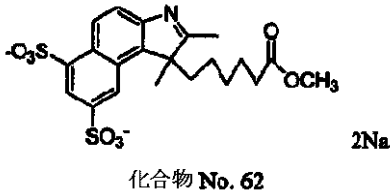
40

【 0 5 0 4 】

例62：化合物No.62の調製

【 0 5 0 5 】

【化 1 3 0】



化合物No.62(5.37g)を、化合物No.13の合成法に従って、6-ヒドラジノナフタレン1,3-ジスルホン酸(5.3g)(Bio接合体 Chem. 7, 356(1996))及びメチル7-メチル-8-オキシノナノアート(3.8g)から調製した。

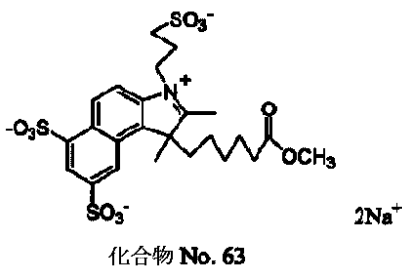
10

【0 5 0 6】

例63：化合物No.63の調製

【0 5 0 7】

【化 1 3 1】



20

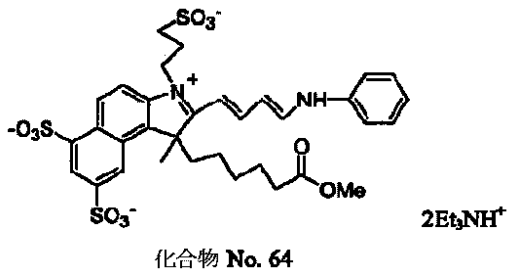
化合物No.14の合成法に従って、化合物No.62(5.37g)、1,3-プロパンスルトン(6g)から化合物No.63(15g)を調製した。

【0 5 0 8】

例64 化合物No.64の調製

【0 5 0 9】

【化 1 3 2】



30

化合物No.2の合成法に従って、化合物No.63(7mg)から化合物No.64(1.5mg)を調製した。

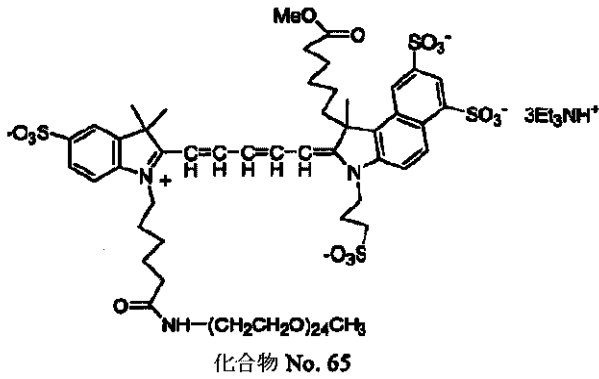
【0 5 1 0】

例65 化合物No.65の調製

【0 5 1 1】

40

【化 1 3 3】



10

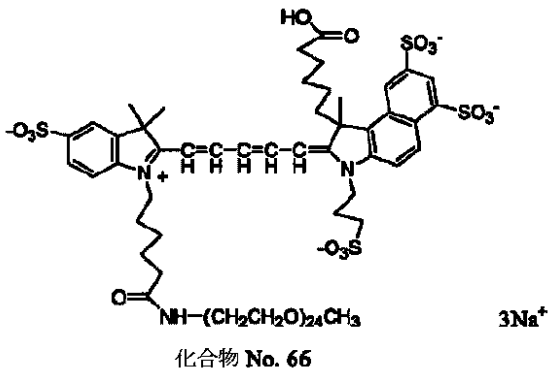
化合物No.6の合成法に従って，化合物No.64(60mg)及び化合物No.3a(100mg)から化合物No.65(17mg)を調製した。

【 0 5 1 2】

例66 化合物No.66の調製

【 0 5 1 3】

【化 1 3 4】



20

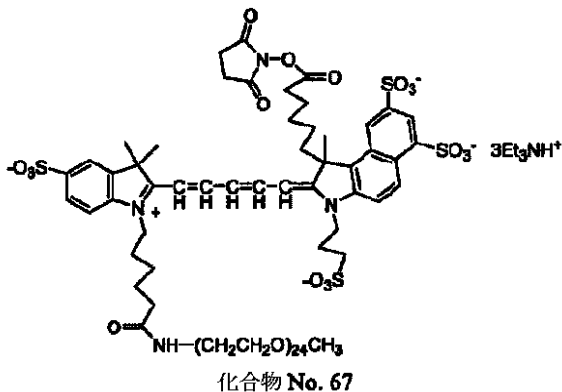
化合物No.17の合成法に従って，化合物No.72(15mg)から化合物No.66(6mg)を調製した。

【 0 5 1 4】

例67 化合物No.67の調製

【 0 5 1 5】

【化 1 3 5】



40

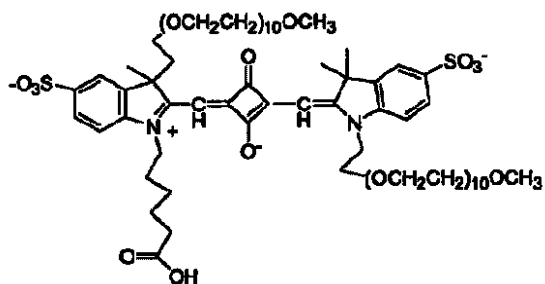
化合物No.7の合成法に従って，化合物No.66(5mg)から化合物No.67(3mg)を調製した。

【 0 5 1 6】

例68 化合物No.68の調製

【 0 5 1 7】

【化 1 3 6】



化合物 No. 68

10

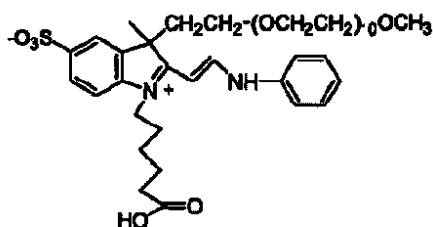
化合物No.31(86mg), 化合物No.36a(76mg)及びスクアリン酸(12mg) の1-ブタノール:トルエン溶液(10mL, 1:1)の混合物を, 4 分子篩を充填したディーン・スターク・トラップを用いて, 一晚加熱還流した。室温へ冷却後, 溶液を真空下濃縮乾固し, 残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し, 暗青色固体(8mg)を得た。

【0 5 1 8】

例69 化合物No.69の調製

【0 5 1 9】

【化 1 3 7】



化合物 No. 69

20

化合物No.1の合成法に従って, 化合物No.31(100mg)から化合物No.69(60mg)を調製した。

【0 5 2 0】

例70 化合物No.70の調製

【0 5 2 1】

【化 1 3 8】



化合物 No. 70

化合物No.1の合成法に従って, 化合物No.36a(100mg)から化合物No.70(50mg)を調製した。

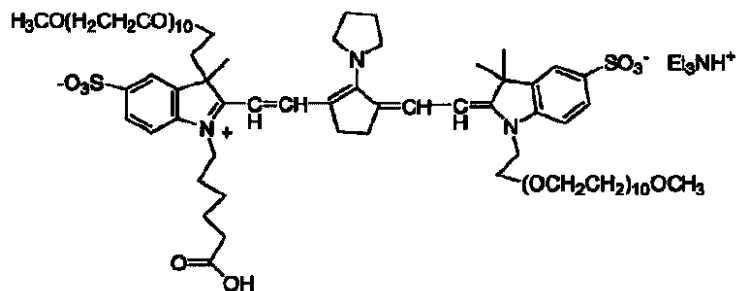
【0 5 2 2】

例71 化合物No.71の調製

【0 5 2 3】

40

【化139】



化合物 No. 71

10

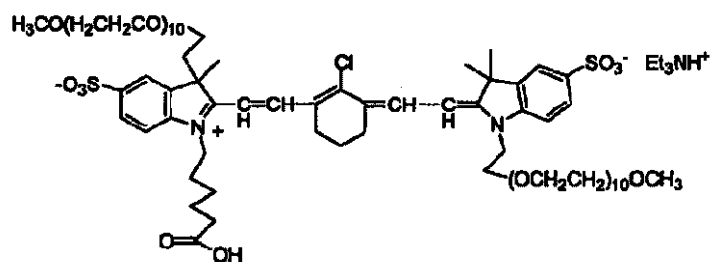
化合物No.69(40mg)，化合物No.70(36mg)，3-ピロリジノ-1-シクロペンテン(6mg)，無水酢酸(12 $\mu$ L)及びEt<sub>3</sub>N(30 $\mu$ L)のDMF溶液(1mL)の混合物を室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，緑色固体(10mg)を得た。

【0524】

例72：化合物No.72の調製

【0525】

【化140】



化合物 No. 72

20

化合物No.31(45mg)，化合物No.36a(40mg)，2-クロロ-3(アニリノメチレン)-1-(アニリニウムメチル)シクロヘキサ-1-エン(17mg)，無水酢酸(16 $\mu$ L)及びEt<sub>3</sub>N(38 $\mu$ L)のDMF溶液(1mL)の混合物を室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，緑色固体(9mg)を得た。

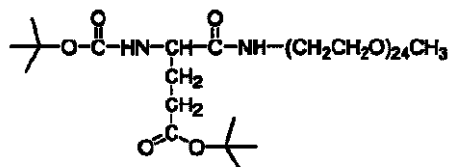
30

【0526】

例73：化合物No.73の調製

【0527】

【化141】



化合物 No. 73

40

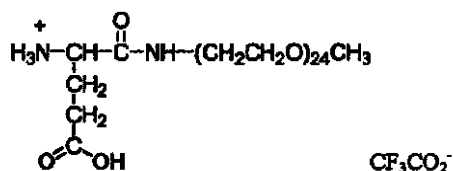
Boc-GIU(OBut)-OH(30mg)(Advanced ChemTech社製，Louisville，KY)のDMF(1mL)溶液にEt<sub>3</sub>N(42 $\mu$ L)及びTSTU(30mg)を添加した。混合物を室温で3時間攪拌し，続いて，m-dPEG<sub>2.4</sub>アミン(100mg)を添加した。混合物を室温で一晩攪拌し続け，その後，真空下濃縮乾固した。残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，化合物No.73を無色油(70mg)として得た。

【0528】

例74 化合物No.74の調製

【0529】

【化 1 4 2】



化合物 No. 74

化合物No.73(68mg)の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1mL)溶液にTFA(1mL)を室温で添加した。混合物を0 で1時間、その後、室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し、無色油(68mg)を得た。

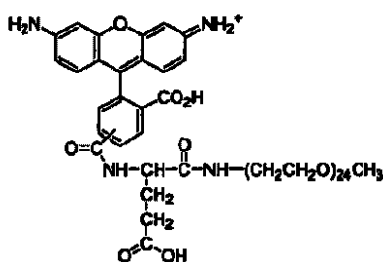
【0 5 3 0】

10

例75 化合物No.75の調製

【0 5 3 1】

【化 1 4 3】



化合物 No. 75

20

5(及び-6)-カルボキシローダミン110、スクシンイミドエステル(14mg)(Biotium社製、Hayward, CA)のDMF溶液(500  $\mu\text{L}$ )の懸濁液に、 $\text{Et}_3\text{N}$ (50  $\mu\text{L}$ )及び化合物No.74(34mg)を室温で添加した。混合物を室温で一晩攪拌し、その後、真空下濃縮乾固した。残渣をLH-20カラム(24mg)で精製した。

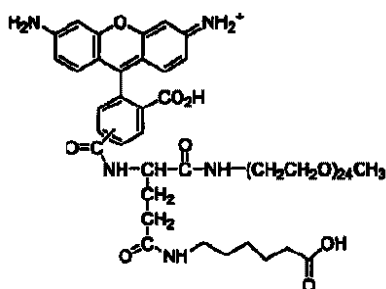
【0 5 3 2】

例76 化合物No.76の調製

【0 5 3 3】

【化 1 4 4】

30



化合物 No. 76

化合物No.75(24mg)のDMF(500  $\mu\text{L}$ )溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$ (10  $\mu\text{L}$ )及びTSTU(4.5mg)を0 で添加した。混合物を0 で1時間攪拌し、続いて、 $\text{Et}_3\text{N}$ (5  $\mu\text{L}$ )及び6-アミノ-1-ヘキサン酸(4mg)の $\text{H}_2\text{O}$ (100  $\mu\text{L}$ )溶液を添加した。混合物を室温で一晩攪拌し、その後、真空下濃縮乾固し、残渣をLH-20カラムで精製し、黄色固体(10mg)を得た。

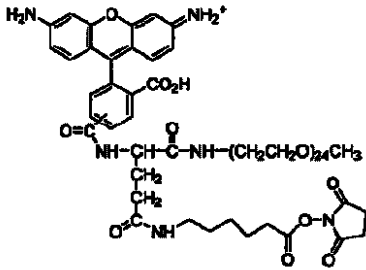
40

【0 5 3 4】

例77 化合物No.77の調製

【0 5 3 5】

【化 1 4 5】



化合物 No. 77

10

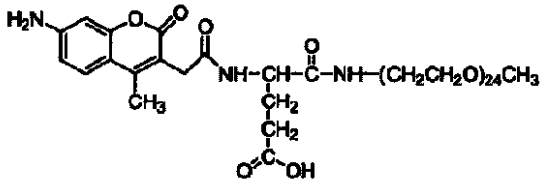
化合物No.76(10mg)のDMF(500 $\mu$ L)溶液に, Et<sub>3</sub>N(3 $\mu$ L)及びTSTU(2mg)を0 で添加した。混合物を0 で1時間攪拌し, Et<sub>2</sub>O(3mL)を添加した。沈殿(5mg)を遠心分離で収集した。

【 0 5 3 6】

例78 化合物No.78の調製

【 0 5 3 7】

【化 1 4 6】



化合物 No. 78

20

7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸, スクシンイミドエステル(20mg, 米国特許第4956480号に従って調製した)のDMF(500 $\mu$ L)溶液に, Et<sub>3</sub>N(50 $\mu$ L)及び化合物No.74(34mg)を添加した。混合物を室温で2時間攪拌し, その後, 真空下濃縮乾固し, 残渣をLH-20カラム(30mg)で精製した。

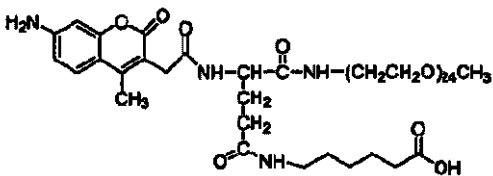
【 0 5 3 8】

例79 化合物No.79の調製

【 0 5 3 9】

30

【化 1 4 7】



化合物 No. 79

化合物No.76の合成法に従って, 化合物No.78(15mg)から化合物No.79(10mg)を調製した

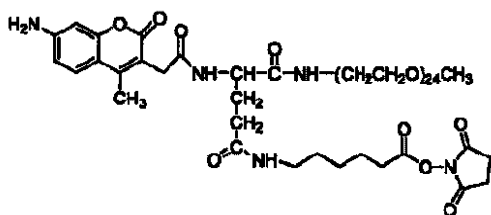
40

【 0 5 4 0】

例80 化合物No.80の調製

【 0 5 4 1】

【化148】



化合物 No. 80

化合物No.77の合成法に従って，化合物No.79(10mg)から化合物No.80(7mg)を調製した。

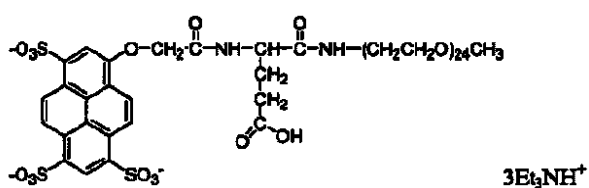
10

【0542】

例81 化合物No.81の調製

【0543】

【化149】



化合物 No. 81

20

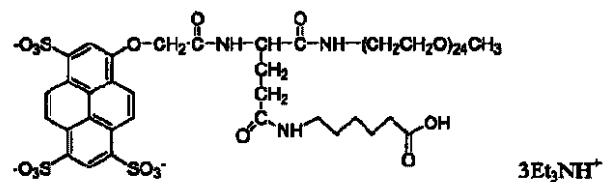
化合物No.81(12mg)を，化合物No.75の合成法に従って，1,3,6-トリスルホ-8-ピレニルオキシアセチルアジド，ナトリウム塩(15mg，米国特許第5132432号)及び化合物No.74(15mg)から調製した。

【0544】

例82 化合物No.82の調製

【0545】

【化150】



化合物 No. 82

30

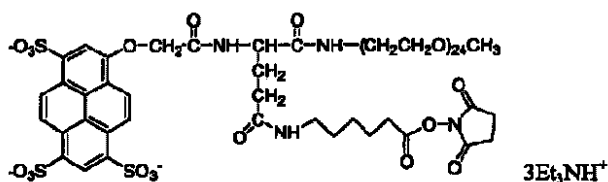
化合物No.76の合成法に従って，化合物No.81(14mg)から化合物No.82(6mg)を調製した。

【0546】

例83 化合物No.83の調製

【0547】

【化151】



化合物 No. 83

40

化合物No.77の合成法に従って，化合物No.82(5mg)から化合物No.83(5mg)を調製した。

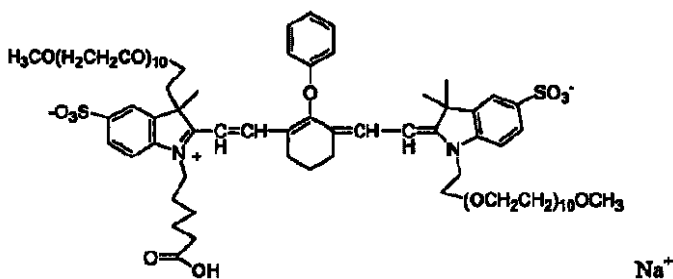
【0548】

例84 化合物No.84の調製

【0549】

50

【化 1 5 2】



10

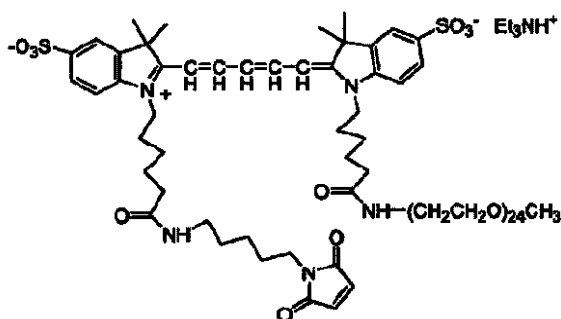
化合物No.72(8mg)及びナトリウムフェノキシド(10mg)の混合物を、70℃で一晩加熱し、その後、真空下濃縮乾固した。残渣をLH-20カラム(3mg)で精製した。

【0 5 5 0】

例85 化合物No.85の調製

【0 5 5 1】

【化 1 5 3】



20

化合物No.7(5mg)のDMF(200 μL)溶液に、Et<sub>3</sub>N(5 μL)及びN-(5-アミノペンチル)マレイミド、トリフルオロ酢酸塩(4mg、Biotium社製)を添加した。混合物を室温で1時間攪拌し、その後、真空下濃縮乾固した。残渣をシリカゲル(2mg)上カラムクロマトグラフィーで精製した。

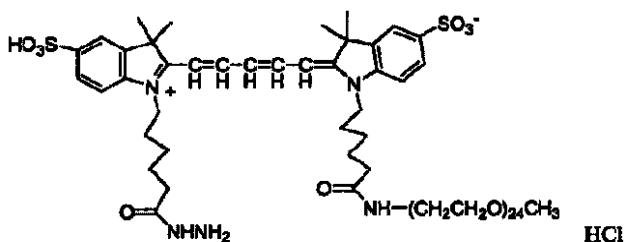
30

【0 5 5 2】

例86 化合物No.86の調製

【0 5 5 3】

【化 1 5 4】



40

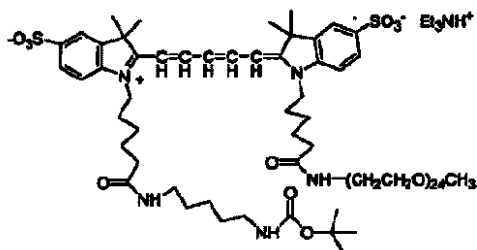
化合物No.7(5mg)のDMF(200 μL)溶液に、無水ヒドラジン(10 μL)を添加した。混合物を室温で2時間攪拌し、その後、1N HClで酸性化した。溶液を真空下濃縮乾固し、残渣をLH-20カラム(3mg)で精製した。

【0 5 5 4】

例87 化合物No.87の調製

【0 5 5 5】

【化 1 5 5】



化合物 No. 87

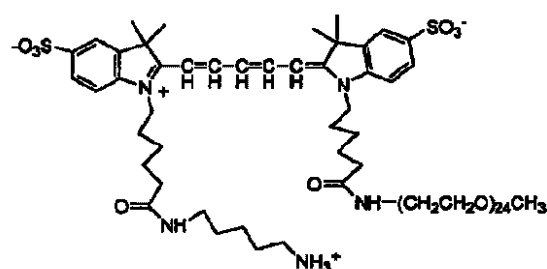
化合物No.87(5mg)を，化合物No.85の合成法に従って，化合物No.7(10mg)及びモノtBOC-カダペリン(2当量)から調製した。

【0 5 5 6】

例88 化合物No.88の調製

【0 5 5 7】

【化 1 5 6】



化合物 No. 88

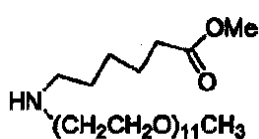
化合物No.87(4mg)の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (500  $\mu\text{L}$ )溶液にTFA(250  $\mu\text{L}$ )を5 で添加した。混合物を50で30分間攪拌し，その後，真空下濃縮乾固した。残渣をLH-20カラムで精製し，暗青色固体(1.5mg)を得た。

【0 5 5 8】

例89 化合物No.89の調製

【0 5 5 9】

【化 1 5 7】



化合物 No. 89

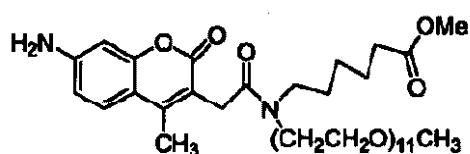
化合物No.24a(1g)，メチル6-アミノヘキサノアート(0.32g)及びジイソプロピルエチルアミン(0.61mL)の $\text{CH}_3\text{CN}$ 溶液(5mL)混合物を穏やかに一晚還流した。室温へ冷却後，溶液を真空下濃縮乾固した。残渣をシリカゲルカラムで精製し，淡黄色油(0.4g)を得た。

【0 5 6 0】

例90 化合物No.90の調製

【0 5 6 1】

【化 1 5 8】



化合物 No. 90

7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸，スクシンイミドエステル(17mg)溶液に， $\text{Et}_3\text{N}$ (50

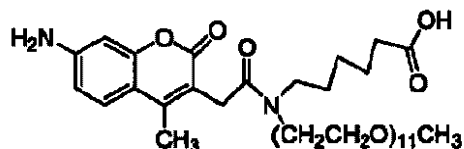
μL)及び化合物No.89(60mg)のDMF溶液(0.5mL)を添加した。混合物を室温で30分間攪拌し、その後、真空下濃縮乾固した。残渣をシリカゲルカラム(46mg)で精製した。

【0562】

例91 化合物No.91の調製

【0563】

【化159】



化合物 No. 91

10

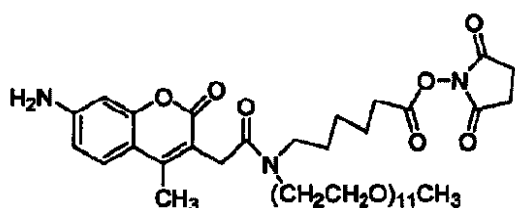
化合物No.90(40mg)のH<sub>2</sub>O(0.5mL)溶液に、1M NaOH溶液(0.15mL)を添加した。混合物を室温で1時間攪拌し、その後、1M HCl(0.15mL)で酸性化した。水溶液をLH-20カラム(35mg)で精製した。

【0564】

例92 化合物No.92の調製

【0565】

【化160】



化合物 No. 92

20

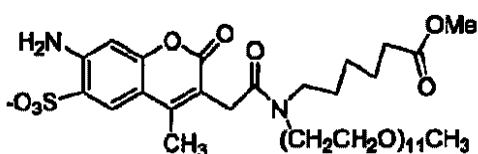
化合物No.92(30mg)を、化合物No.80の合成法に従って、化合物No.91(34mg)から調製した。

【0566】

例93 化合物No.93の調製

【0567】

【化161】



化合物 No. 93

30

化合物No.93(40mg)を、化合物No.90の合成法に従って、7-アミノ-4-メチル-6-スルホクマリン-3-酢酸、スクシンイミドエステル(16mg)(Bioorg.& Med Chem Letters, 9, 229(1999))から調製した。

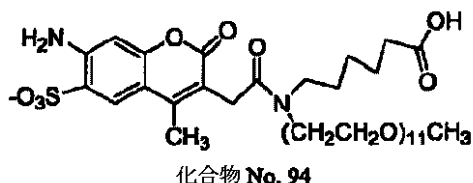
【0568】

例94 化合物No.94の調製

【0569】

40

【化162】



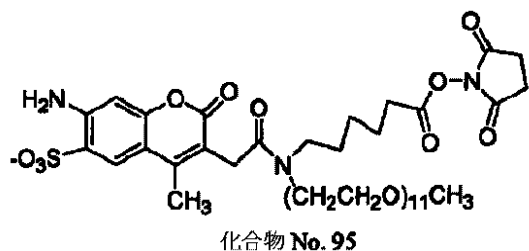
化合物No.94(20mg)を，化合物No.91の合成法に従って，化合物No.93(35mg)から調製した。

【0570】

例95 化合物No.95の調製

【0571】

【化163】



化合物No.95(15mg)を，化合物No.80の合成法に従って，化合物No.94(17mg)から調製した。

【0572】

例96 化合物No.96の調製

【0573】

【化164】



5(及び-6)-カルボキシローダミン110，スクシンイミドエステル(CR110 SE)(60mg)(Biotium社製，Hayward，CA)及びEt<sub>3</sub>N(90μL)のDMF溶液(500μL)の混合物へ，化合物No.89(68mg)を添加した。混合物を室温で2日間攪拌し，その後，真空下濃縮乾固した。残渣をH<sub>2</sub>O(500μL)中に再溶解し，1N NaOH(400μL)を添加した。混合物を室温で一晩攪拌し，その後，LH-20カラムに付した。LH-20カラムを水で溶出し，純粋な遊離酸形態のローダミン色素(45mg)を得た。遊離酸ローダミン色素(30mg)を，化合物No.80の合成法に従って，化合物No.96(22mg)へ転換した。

【0574】

例97 タンパク質色素接合体の調製

ヤギ抗マウスIgG(GAM)，ヤギ抗ウサギIgG(GAR)及びストレプトアビジンの蛍光接合体を，反応性タンパク質及び反応性色素から，刊行された手順(米国特許第6,974,873号，Hauglandら，Meth Mol Biol 45, 205(1995)，Hauglandetal，Meth Mol Biol 45, 223(1995)，Hauglandら，Meth Mol Biol 45, 235(1995)，Hauglandら，Current Protocols in Cell Biology, 1651-16522(2000))に従って，調整した。簡潔には，抗体

10

20

30

40

50

又はストレプトアビジン1mg/mLの0.1mM pH8.5重炭酸ナトリウム緩衝液を，反応性色素の一つと様々な色素分子/タンパク質分子比率で混合した。室温で約一時間保温後，反応混合物を，PBS(pH7.4)で緩衝したSephadex G-25を用いたゲルろ過により分離した。標識反応において多様な色素分子/タンパク質比を用いたことで，色素/タンパク質の対ごとに下記Table 7中に一覧したとおりの，異なる色素標識度(DOL)でタンパク質接合体を生成した。

【0575】

【表25】

Table 7 本発明に従って調整した選択した抗体及びストレプトアビジン接合体一覧

タンパク質	色素	標識度(DOL)
ストレプトアビジン	化合物No. 5	2.8, 3.8, 4.6, 7.8, 9.1, 9.4, 10.6
ヤギ抗マウス IgG	化合物No. 5	1.1, 1.7, 2.9, 3.7, 4.9, 5.8, 7.4, 7.6
ヤギ抗ウサギ IgG	化合物No. 41	1.4, 1.9, 3.0, 5.2, 6.1, 7.1, 9.3
ヤギ抗マウス IgG	化合物No. 41	1.1, 1.7, 2.7, 3.9, 4.8, 5.8, 6.6, 7.3
ヤギ抗マウス IgG	化合物No. 67	1.7, 3.5, 4.9, 6.2, 8.3
ヤギ抗マウス IgG	化合物No. 92	1.7, 4.9, 7.2, 8.6
ヤギ抗マウス IgG	化合物No. 96	1.35, 1.87, 2.69, 3.49, 4.20

10

20

接合体の蛍光を，JACSO社製蛍光分光光度計を使用して測定し，その後，DOLに対してプロットして図4-7を得た。

【0576】

例98 ファロイジン色素接合体の調整

アミノファロイジン(1mg)及び化合物No.5,7及び23(1.5当量)のDMF溶液(200 $\mu$ L)に，N,N-ジイソプロピルエチルアミン(3当量)を添加し，混合物を室温で一晩攪拌した。溶液を真空下濃縮乾固し，残渣をLH-20カラム(1.5mg)でのカラムクロマトグラフィーによって精製した。生成物は，固定細胞の調製において，F-アクチン線維に対する効果的な染色剤である。

30

【0577】

例99 -ブンガロトキシシン色素接合体の調整及び使用

-ブンガロトキシシン(1mg)の0.1M重炭酸ナトリウム(25 $\mu$ L)溶液へ，化合物No.7(1.5当量)を一回で添加し，混合物を室温で2時間攪拌した。生成物をG-25サイズ排除カラムで，その後，逆相HPLCで精製した。アセチルコリン受容体の染色及び得られた蛍光の検出は，長波長において検出されるのだが，Texas Red -ブンガロトキシシン接合体によって得られるものに匹敵する。

【0578】

例100 -アミノデキストラン色素接合体の調整

平均13アミノ基を有する70000MWアミノデキストランの0.1M重炭酸ナトリウム(400 $\mu$ L)溶液へ，色素/デキストランが約12となるように，化合物No.7を添加した。6時間後，接合体をSEPHADEX G-50上で水を溶出剤として精製した。典型的には，4-6モルの色素が，70000MWデキストランと接合した。

40

【0579】

例101 色素-細菌接合体の調整

加熱殺菌した大腸菌をpH8-9緩衝剤(10mg/mL)中に懸濁し，その後，化合物No.7などの0.5-1.0mg/mLのアミノ反応性色素と一緒に培養した。30-60分後，標識細菌を遠心分離及び緩衝剤で数回洗浄して遊離色素を除去した。標識細菌を流動細胞計測により分析した。

【0580】

50

例102 ヌクレオチド-色素接合体の調整

5(3-アミノアリール)-2-デオキシウリジン5'-三リン酸(2mg, Sigma 化学的社製)のH<sub>2</sub>O(100 μL)溶液中へ, 化合物No.7又は化合物No.23のDMF及びトリエチルアミン溶液(5 μL)を添加した。混合物を室温で3時間攪拌し, その後, 真空下濃縮乾固した。残渣を分取型HPLCで精製した。生成物画分を凍結乾燥し, 暗青色ヌクレオチド接合体を得た。

## 【0581】

あるいは, デオキシウリジン5'-三リン酸の蛍光性色素-接合体を, 5(3-アミノ-1-プロピニル)-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸から, 若しくは, チオール化ヌクレオチド又はチオリン酸ヌクレオチドを化合物No.85などの本発明のチオール反応性色素で処理することで調製した。

10

## 【0582】

更に, 2'-(又は3')-2-アミノエチルアミノカルボニルアデノシン5'-三リン酸を若干過剰な化合物No.7と反応させ, 続いてエタノールで沈殿させ, リボース修飾生成物を分取型HPLCで精製した。本発明の色素を有する付加的ヌクレオチド接合体は, Nimmakayalu Mら, Biotechniques, 2000, 28, 518, Muhlegger Kら, Biol. Chem Hoppe Seyler, 1990, 371, 953, Giaid Aら, Histochemistry, 1989, 93, 191などの刊行された手順に従って, 当業者により直ちに調製できる。

## 【0583】

例103 オリゴヌクレオチド色素接合体の調製

5'-アミノ修飾, 18ベース M13プライマー配列(100 μg)のH<sub>2</sub>O溶液(4 μL)に, 化合物No.7(500 μg)の0.1Mホウ酸ナトリウムpH=8.5緩衝剤(200 μL)溶液を添加した。混合物を室温で一晩攪拌し, 3体積の冷エタノールを添加した。混合物を-20℃へ冷却し, 遠心分離し, 上澄液をデカントし, ペレットをエタノールで濯ぎ, その後, H<sub>2</sub>O(100 μL)中に溶解した。標識オリゴヌクレオチドを分取型HPLCで精製した。目的ピークを収集し, 留去して, 蛍光性オリゴヌクレオチドを得た。

20

## 【0584】

例104 色素-抗体接合体で細胞外にて染色した細胞の流動細胞計測分析

一試料当たり百万個のジャーカット細胞を, 0.25 μgのマウス抗ヒトCD3(BD Biosciences社製)で, 続いて, 図8(例96)に示したDOLでの化合物No.41で標識した1 μgのヤギ抗マウスIgGで染色した。流動細胞計測は, CXPソフトウェアを用いたBeckman Coulter社製 FC-500上で実測した。雑音は, 対照バックグラウンドとして, ヤギ抗マウス化合物No.41接合体のみで染色した細胞からの平均蛍光強度を示す。信号は, CD3及びヤギ抗マウス化合物No.41接合体fで染色した細胞からの平均蛍光強度を示す。

30

## 【0585】

例105 色素-抗体接合体で細胞内にて染色した細胞の流動細胞計測分析

百万個のジャーカット細胞を固定し, 透過処理し, 0.25 μgのマウス抗ヒトCD3抗体(BD Biosciences社製)と一緒に培養した。続いて, CD3抗体を, AlexaFluor647(DOL 3.1)又は化合物No.41(DOL 3.9)(例96)と接合した1 μgのヤギ抗マウスIgGと一緒に培養した。各試料から約10,000個の細胞をBD社製 FACS Calibur流動細胞計測装置上で分析し, 蛍光をFL4チャンネル内で検出した。

40

## 【0586】

例106 チオール反応性色素による β-ガラクトシダーゼの標識

遊離チオール基中タンパク質に富む β-ガラクトシダーゼ溶液を, PBS緩衝剤(200 μL中1 mg)中で調製し, その後, チオール反応性化合物No.85(5mg)のDMF(100 μL)溶液で処理した。未反応色素を, 遠心分離装置を用いて遠心分離して除去した。色素による置換度は例96中に引用した方法を用いて評価した。

## 【0587】

例107 化合物No.96, Alexa Fluor 488及びフルオレセイン間の光安定性の比較

アクチン線維を, 化合物No.96, Alexa Fluor 488及びフルオレセイン(ファロイジン接合体は, 例98に記載した手順を用いた色素のアミノファロイジン及びスクシンイミドエ

50

ステル形態から調製した)で標識したファロイジンにより染色した。洗浄後、各染色試料を連続的に照射し、蛍光強度を5秒ごとに測定することで経過観察した。各試料の相対蛍光対時間をプロットした(図11)。長い間、フルオレセインは、色素の吸収ピークがアルゴンレーザー線の488nmとよく一致するため、緑色蛍光の選ばれた色素であった。しかしながら、フルオレセインは非常に急速に光退色し、顕微鏡研究の使用を限定する。Molecular Probes, Inc.からのAlexa Fluor 488は、その異例の光安定性ゆえに、優れた代替品として開発された。図11は、本発明の化合物No.96は、Alexa Fluor 488よりも光安定性がより優れていることを示す

#### 例108 本発明の標識生体分子の血清での半減期の測定

本発明の標識生体分子のインビボ・血清での半減を、例えば、カテーテル処理したラットへ標識生体分子を注入後、例えば、[Pepinsky, R Bら(2001) J Pharmacol Exp Ther, 297 1059-66]に記載されたように測定してもよい。生体分子の血漿濃度は、その後、抽出した血液試料中で測定される。かかる試料は、研究の時間経過に則った多様な時点で回収されてもよい。標識生体分子の濃度は、蛍光測定及び/又はELISA又はウエスタンプロット等の生化学技術を含む多様な方法を用いて測定してもよい。本発明の蛍光性基の安定化効果は、該色素を有さない対応する生体分子に関して本発明の標識生体分子の安定性を対比することで計測してもよい。

10

【0588】

#### 例109 本発明の色素で標識した抗体及び他の市販色素で標識した同一の抗体の凝集挙動の測定及び比較

20

三種類の近赤外色素の一つでヤギ抗マウスIgGの所定量を標識することで、一系統のヤギ抗マウスIgG接合体を調製した。加えて、色素ごと別々の割合、つまり数個の異なる標識度(DOL)の一つで標識し、標識度の増加に伴い、抗体上の色素分子濃度としての凝集挙動に対する吸収スペクトルが増加することを観測した。使用した色素は、Cy7(登録商標)色素、Alexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素及び本発明の色素である色素No.29(表3)である。図12Aは、4種の異なるDOL(抗体当たり1.2~3.4色素分子)でのCy7(登録商標)色素で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。図12Bは、4種の異なるDOL(抗体当たり2.2~5.9色素分子)でのAlexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。図12Cは、6種の異なるDOL(抗体当たり1.1~7.4色素分子)での色素No.29(表3)で標識したヤギ抗マウスIgGから形成された接合の吸収スペクトルを示す。全スペクトルはPBS7.4緩衝剤中室温で測定した。Cy7(登録商標)色素及びAF750(登録商標)色素で標識した接合物(A及びB)のスペクトルは共に色素凝集に特徴的な二重ピークを示し、一方、化合物No.29で標識した接合物(C)のスペクトルは、実質的に単一ピークを示し、色素凝集が実質的にないことを表わしている。

30

【0589】

#### 例110 本発明の色素で標識した抗体及び水溶性高分子基を有さない他の市販色素で標識した同一の抗体の蛍光信号の測定及び比較

三種類の近赤外色素の一つでヤギ抗マウスIgGの所定量を標識することで、一系統のヤギ抗マウスIgG接合体を調製した。加えて、色素ごと別々の割合、つまり数個の異なる標識度(DOL)の一つで標識し、標識度の増加に伴い、抗体上の色素分子濃度としての蛍光出力が増加することを観測した。使用した色素は、本発明の色素である色素No.29(表3)、Cy7(登録商標)色素及びAlexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素である。Cy7(登録商標)色素及びAlexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素は水溶性高分子基を有さない。図13は、色素No.29(表3)、Alexa Fluor 750(登録商標)(AF750(登録商標))色素及びCy7(登録商標)色素をPBS緩衝剤pH7.4中で、同一タンパク質濃度で接合したヤギ抗マウスIgGの735nmで励起した全蛍光対標識度(DOL)を示す。AF750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素と比べて、色素29の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であり、高標識度の抗体に関して蛍光消光がより少ないことをデータは示している。

40

50

## 【0590】

例111 三種類の近赤外色素で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の細胞内から発する蛍光信号の測定及び比較

色素No.29(表3), Alexa Fluor 750(登録商標)色素又はCy7(登録商標)色素の一つでヤギ抗マウスIgGの所定量を標識することで、一系統のヤギ抗マウスIgG標識接合体を調製した。ジャーカット細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、すべて同様の標識度で標識された三種類の二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞を一次抗体なしに蛍光二次抗体で各々直接的に染色した(暗色コラム)。図14は、流動細胞計測により計測した近赤外色素、本発明の色素No.29(表3), Alexa Fluor 750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素の各々で蛍光標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す。本発明の接合抗体で染色した細胞は、市販の接合抗体で染色した細胞より高輝度であり優れた信号雑音比であることを結果は示している。

10

## 【0591】

例112 三種類の近赤外色素の光安定性の測定及び比較例

図15は、表3の化合物No.29, Alexa Fluor750(登録商標)(AF750(登録商標))色素及びCy7(登録商標)色素の三種類の近赤外色素の光安定性と比較した。5 $\mu$ M色素濃度での三種類の色素の溶液を1/2時間、太陽光に曝露した。溶液の吸収スペクトルを光分解の前後で記録した。本発明の近赤外色素は、AF750(登録商標)色素及びCy7(登録商標)色素の両者よりも有意義に安定であることを結果は示す。

20

## 【0592】

例113 APC-Alexa Fluor 750(登録商標)直列色素又は色素29(表3)で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の細胞内から発する相対蛍光信号の測定及び比較

図16A及びBは、APC-Alexa Fluor 750(登録商標)直列色素又は色素29(表3)で標識した抗体で細胞内にて標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す。図16Aは、流動細胞計測により計測した、表示量の化合物No.29(DOL=3.5)で標識したヤギ抗マウスIgG又はAPC-AF750(登録商標)直列色素で標識した市販のヤギ抗マウスIgG(in vitrogen社製)のいずれかで染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す代表図である。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、すべて同様の標識度で標識された二種類の二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞を一次抗体なしで直接各蛍光二次抗体でも染色した(アイソタイプ、暗色コラム)。図16Bは、図16Aからの染色の信号雑音比を示す流動細胞計測実験は、633nmレーザー及び780/60nm PMT検出器を備えたBD LSR II上で実施した。色素No.29は極僅かな背景を有する良好な蛍光信号を発し、一方、APC-AF750(登録商標)直列色素は有意に非特異的な染色であることを結果は示した。色素No.29は633nmでの吸収が極僅かであり、一方、直列色素はドナー色素であるAPCによって該レーザー波長において最大吸収に近い。APC-AF750(登録商標)色素などの直列色素は相当に製造困難であるため、色素No.29などの単純な色素と比べて製造に費用がかかるため、本発明の近赤外色素は波長633nm以下の励起光源を用いる流動細胞計測分析に特に有利である。

30

40

## 【0593】

例114 同様な波長での三種類の近赤外色素のヤギ抗マウスIgG接合体における標識度の関数としての全蛍光の測定

図17は、本発明の色素、色素No.31(表3), Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)800色素及びLi-Cor Biosciences社からのIRDye 800(登録商標)CW色素という全てが同様の波長を有する色素を接合したヤギ抗マウスIgGの全蛍光対標識度(DOL)を示す。色素No.31は、他の二種類の色素より広範囲のDOLにわたって有意に高輝度であることをデータは示す。

## 【0594】

例115 三種類の近赤外色素のヤギ抗マウスIgG接合体における標識度の関数としての蛍

50

### 光信号の測定及び蛍光消光の比較並びに信号雑音比

図18は、流動細胞計測により計測した色素No.31(表3)、Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)800色素及びLi-Cor Biosciences社からのIRDye 800(登録商標)CW色素の各々で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す。三種類の近赤外色素の蛍光消光を評価するため、表示された異なる数個の標識度(DOL)で各色素によって抗体を標識した。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、標識された二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞を一次抗体なしで直接各蛍光二次抗体でも染色した(アイソタイプ、暗色コラム)。色素No.31は、Dylight(登録商標)800色素及びIRDye 800(登録商標)CW色素の両方より広範囲のDOLにわたって有意に高輝度であり、色素No.31は他の二種類の色素よりもはるかに良好な信号雑音比であることを結果は示す。

【0595】

#### 例116 四種類の分光的に類似の近赤外色素の蛍光量子収率の測定及び比較

図19は、近赤外色素である本発明の色素No.32(表3)、及び三種類の分光的に類似の近赤外蛍光性基を持つGE Healthcare社からのCy5.5(登録商標)色素、invitrogen社からのAlexa Fluor 680(登録商標)(AF680)色素及びThermo Fisher社からのDylight(登録商標)680色素の各々で接合したヤギ抗マウスIgGの全蛍光対標識度(DOL)のプロット図である。蛍光測定はPBS7.4緩衝剤中室温で660nm励起を用いて実施した。Cy5.5(登録商標)、Alexa Fluor 680(登録商標)及びDylight(登録商標)680と比べて、本発明の蛍光性基は、広範囲の標識度においてより高い蛍光量子収率であることをデータは示している。

【0596】

#### 例117 個々の四種類の異なる近赤外色素で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞からの細胞内での相対蛍光信号の測定及び比較

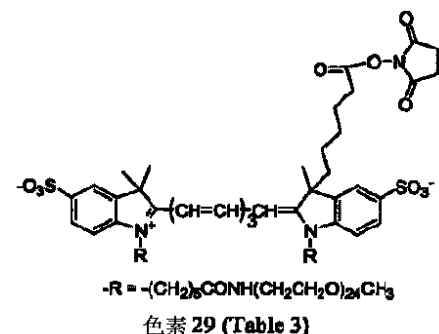
図20A及びBは、個々の四種類の異なる近赤外色素で標識したヤギ抗マウスIgG、抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルに関するデータを示す。図20Aは、流動細胞計測により計測した色素No.32(表3)、GE Healthcare社からのCy5.5(登録商標)色素、Thermo Fisher社からのDylight(登録商標)680色素又はinvitrogen社からのAlexa Fluor 680(登録商標)(AF680)色素で標識した抗体で染色したジャーカット細胞の相対蛍光レベルを示す。四種類の近赤外色素の蛍光消光を評価するため、1色素当たり表示された異なる1種又は2種の標識度(DOL)で各分量のヤギ抗マウスIgG、抗体を標識し、八系統の抗体を形成した。細胞を最初にマウス抗ヒトCD3抗体で標識し、その後、標識された二次抗体の一つで染色した。標識した各二次抗体からの背景蛍光を計測するため、細胞を一次抗体なしで直接各蛍光二次抗体でも染色した(アイソタイプ、暗色コラム)。図20Bは、図20Aでの染色の信号雑音比(S/N)に関するプロット図である。色素No.32は、他の三種類の市販近赤外色素から調製した接合物よりもはるかに高輝度であり、該接合物よりも染色においてより特異的であることをデータは示す。

【0597】

#### 例118 色素29の調製

【0598】

【化165】



色素29を、前記例中で用いた共通の中間体から4工程で調製した。化合物No.19(84mg)、

10

20

30

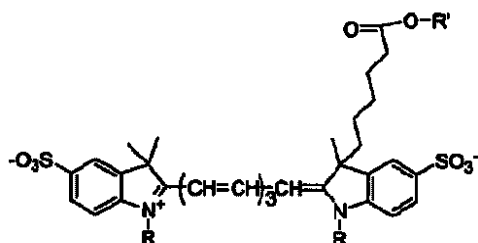
40

50

化合物No.59及び酢酸ナトリウム(4当量)を，酢酸(2mL)及び無水酢酸(1mL)混合物中に混和した。得られた混合物を120 で20分間加熱し，中間化合物No.29aを形成した。

【0599】

【化166】



化合物 No. 29a: R =  $-(CH_2)_5CO_2H$ ; R' =  $-CH_3$ .

化合物 No. 29b: R =  $-(CH_2)_5CONH(CH_2CH_2O)_4CH_3$ ; R' =  $-CH_3$ .

化合物 No. 29c: R =  $-(CH_2)_5CONH(CH_2CH_2O)_4CH_3$ ; R' =  $-H$ .

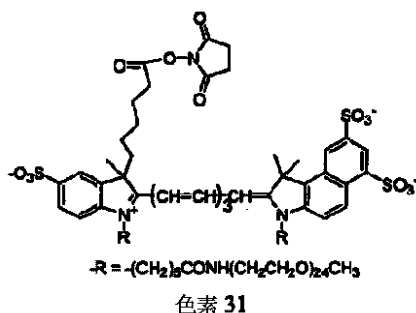
溶液を真空下留去した。生成物を，水を溶出剤として用いるSephadex LH-20によって精製した。化合物No.29a(30mg)を，化合物No.21(例21)を作る手順に従って，ペグ化中間化合物No.29bへ転換した。メチルエステル中間化合物No.21b(18mg)を，化合物No.22(例22)を作る手順に従って，遊離酸化合物No.29cへ加水分解した。化合物No.29c(5mg)を化合物No.23用に例23中に記載したようにTSTU及びトリエチルアミンを用いて，最終製品色素29へ賦活した。

【0600】

#### 例119 色素31の調製

【0601】

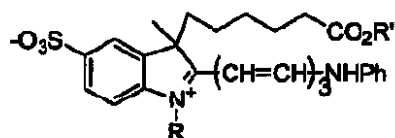
【化167】



色素31を前記例で用いた共通の中間体から，4工程で調製した。最初に化合物No.19(12g)を，グルトコンアルデヒドジアニル塩酸塩(18g)及び $Et_3N$ (0.5mL)のAcOH溶液(40mL)と120 で3時間処理した。室温へ冷却後，混合物を真空下濃縮乾固し，残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで精製し，化合物No.31aを赤褐色粘着性固体(3g)として得た。

【0602】

【化168】



化合物 No. 31a: R =  $-(CH_2)_5CO_2H$ ; R' =  $-CH_3$ .

上記中間体(1g)を，例109で化合物No.29aを作った条件を用いて，N(5-カルボキシペンチル)-1,3,3-トリメチルベンズインドリウム-6,8-ジスルホン酸(1当量)(Bio接合体 Chem. 7, 356(1996))と結合させ，化合物No.31b(80mg)を得た。

【0603】

10

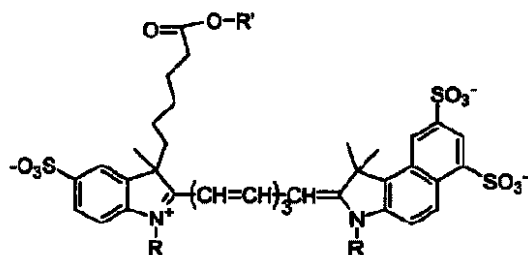
20

30

40

50

【化 1 6 9】

化合物 No. 31b: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$ ; R' =  $-\text{CH}_3$ 化合物 No. 31c: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{24}\text{CH}_3$ ; R' =  $-\text{CH}_3$ 化合物 No. 31d: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{24}\text{CH}_3$ ; R' =  $-\text{H}$ 

10

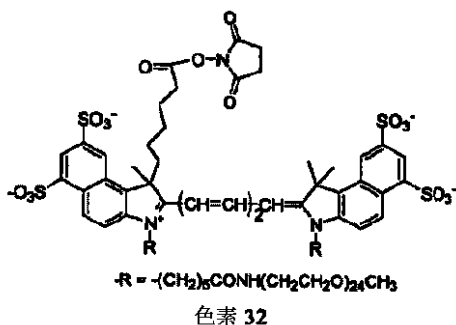
化合物No. 31b(25mg)を化合物No. 31c(60mg)へ変換し、引き続き、例109中に記載した手順を用いて加水分解して遊離酸化合物No. 31dを得た。最後に、TSTU及びトリエチルアミン(例109)を用いて、遊離酸色素化合物No. 31d(10mg)を色素31へ賦活した。

【 0 6 0 4】

例120 色素32の調製

【 0 6 0 5】

【化 1 7 0】

R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{24}\text{CH}_3$ 

色素 32

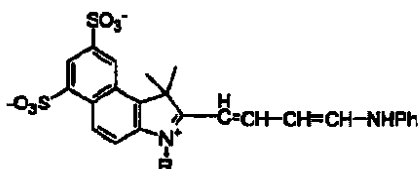
20

色素32をスルホン化ベンズインドリウム中間体及び化合物No. 23(例23)の調製に用いたと同様の手順を用いて調製した。簡潔には、N(5-カルボキシペンチル)-1,3,3-トリメチルベンズインドリウム-6,8-ジスルホン酸(例110)(5g)をマロンアルデヒドジアニル塩酸塩(5g), Et<sub>3</sub>N(0.5mL)のAcOH溶液(50mL)と反応させ、120 で3時間加熱した。室温へ冷却後、混合物を真空下濃縮乾固し、残渣をシリカゲル上カラムクロマトグラフィーで化合物No. 32aへ橙赤色粘着性固体(2.5g)として精製した。

30

【 0 6 0 6】

【化 1 7 1】

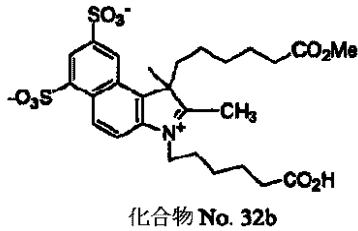
化合物 No. 32a: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$ 

40

化合物No. 62(例62)(5g)を6-プロモヘキサン酸(1.5当量)と完全に混合し、その後、95で24時間加熱してベンズインドリウム中間化合物No. 32bを形成した。

【 0 6 0 7】

## 【化172】

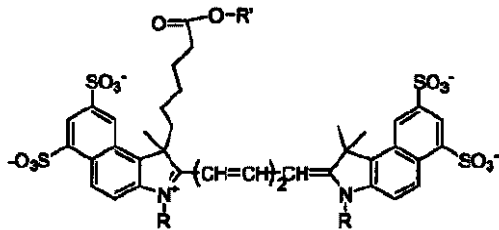


化合物No.32a及び化合物No.32bが結合してシアニンメチルエステル中間化合物No.32cを形成し、引き続き、ペグ化されて化合物No.32dを形成し、続いて加水分解により遊離酸化合物No.32eを形成し、最後に、スクシニミドエステル色素32へ転換した。

10

## 【0608】

## 【化173】



化合物 No. 32d: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_3$ ; R' =  $-\text{CH}_3$

化合物 No. 32a: R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_3$ ; R' =  $-\text{H}$

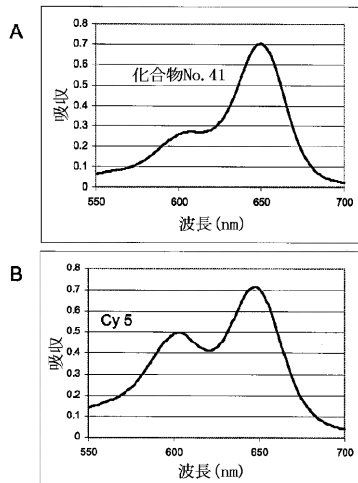
20

化合物No.32cから化合物No.32eを導く工程の手順は、化合物No.23(例23)の調製工程で用いられた手順に類似する。

## 【図1】

【図1】

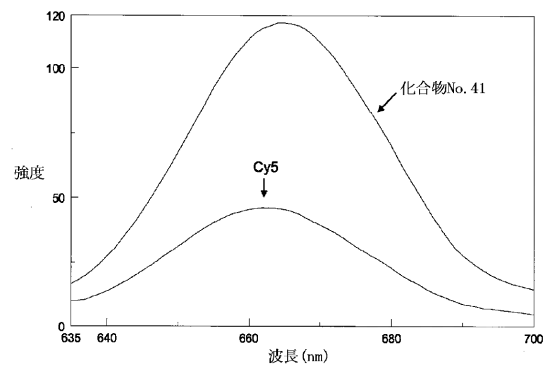
ヤギ抗マウスIgGにおける化合物No.41及びCy(登録商標)の吸収スペクトル



## 【図2】

【図2】

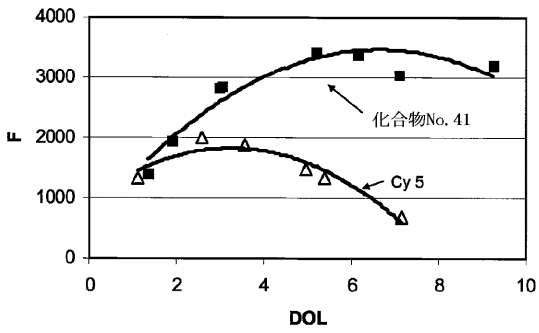
ヤギ抗ウサギIgGにおけるCy5(登録商標)及び化合物No.41の蛍光発光スペクトル



【 図 3 】

【図3】

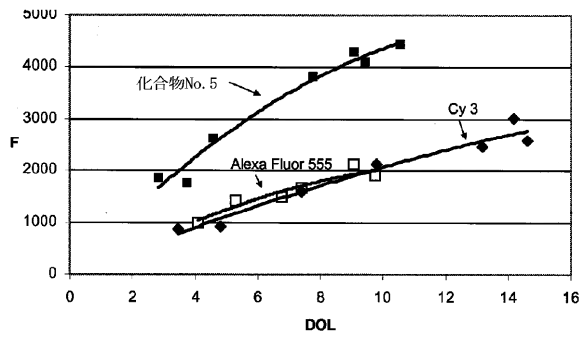
標識度に対する関数としてのヤギ抗ウサギIgGにおける  
Cy5(登録商標)及び化合物No. 41の相対蛍光



【 図 4 】

【図4】

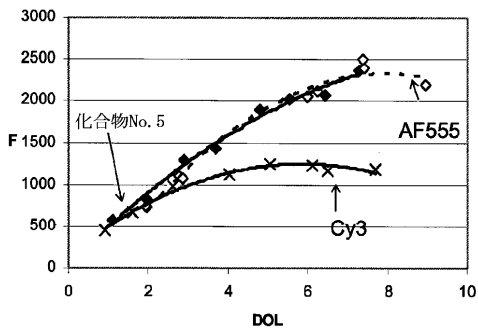
標識度に対する関数としてのストレプトアビジンにおけるCy3(登録商標),  
AlexaFluor555(登録商標)及び化合物No. 5の相対蛍光



【 図 5 】

【図5】

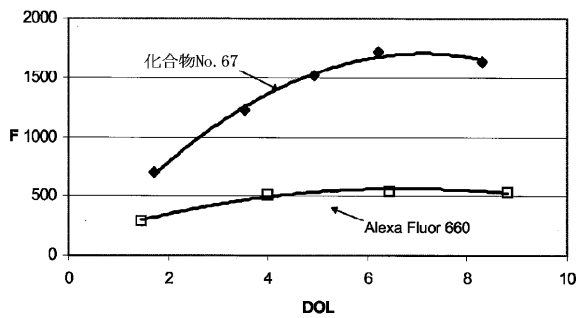
標識度に対する関数としてのヤギ抗ウサギIgGにおけるCy3(登録商標),  
AlexaFluor555(登録商標)及び化合物No. 5の相対蛍光



【 図 6 】

【図6】

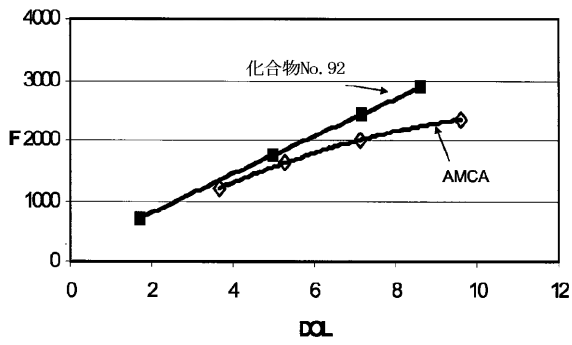
標識度に対する関数としてのヤギ抗マウスIgGにおける  
AlexaFluor660(登録商標)及び化合物No. 67の相対蛍光



【 図 7 】

【図7】

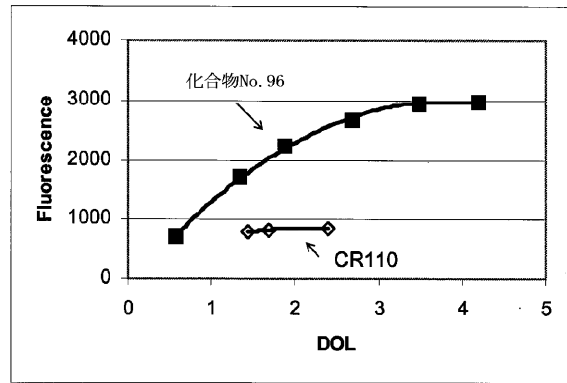
標識度に対する関数としてのヤギ抗マウスIgGにおける AMCA及び化合物No. 92の相対蛍光



【 図 8 】

【図8】

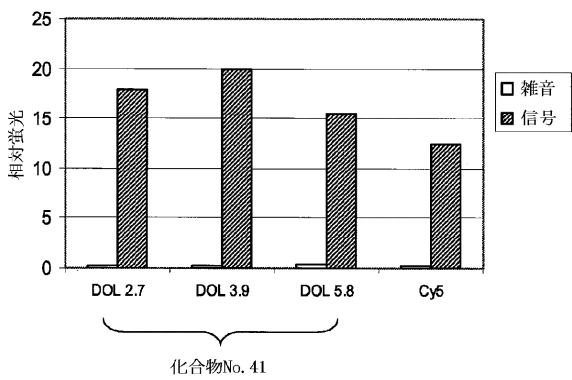
標識度に対する関数としてのヤギ抗マウスIgGにおける CR110及び化合物No. 96の相対蛍光



【 図 9 】

【図9】

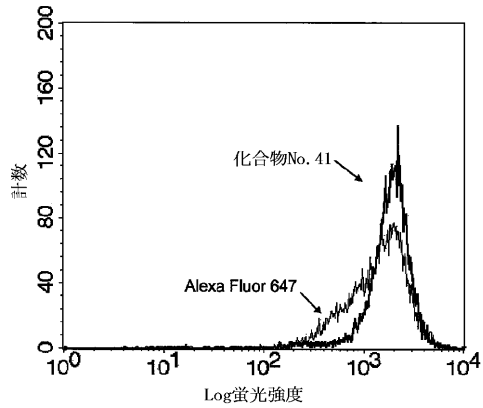
ジャーカット細胞での流動細胞計測



【 図 10 】

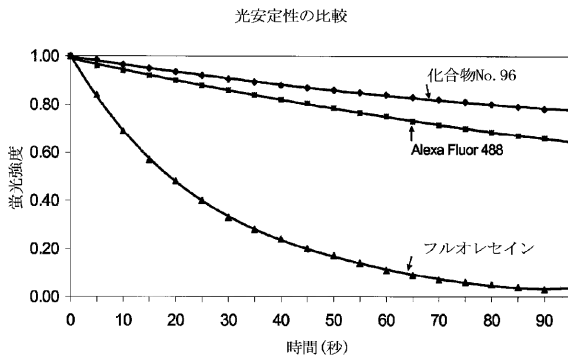
【図10】

ジャーカット細胞での流動細胞計測



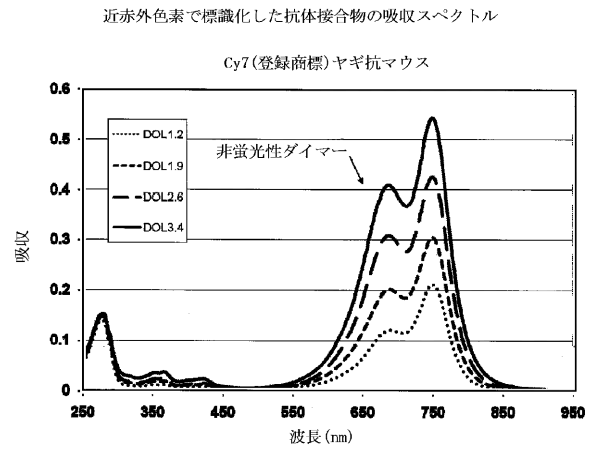
【図11】

【図11】



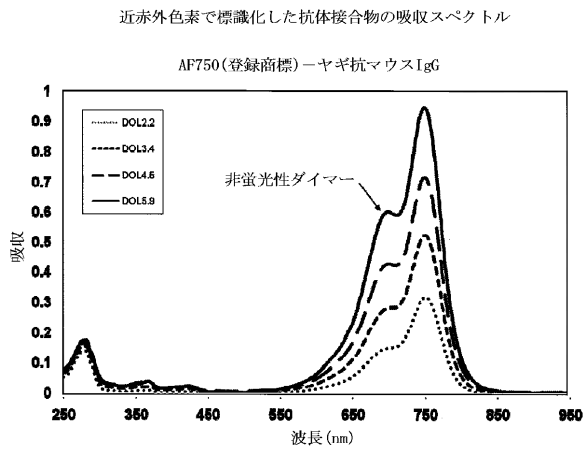
【図12A】

【図12A】



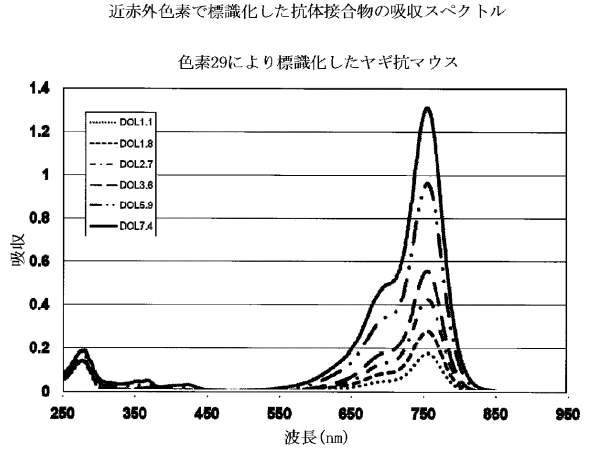
【図12B】

【図12B】



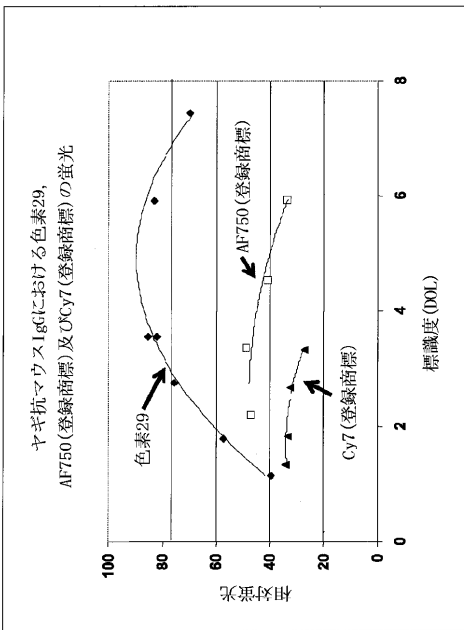
【図12C】

【図12C】



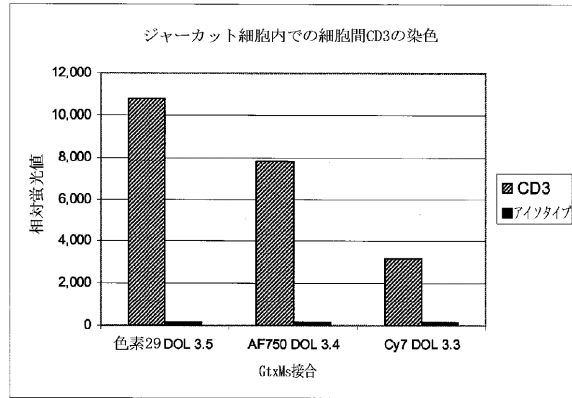
【 図 1 3 】

【図13】



【 図 1 4 】

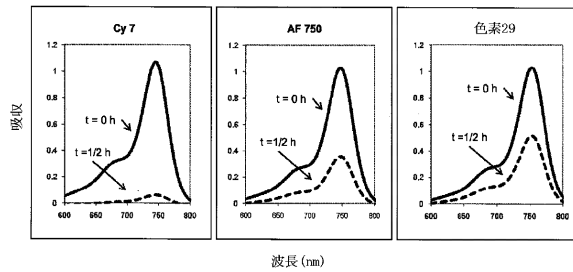
【図14】



【 図 1 5 】

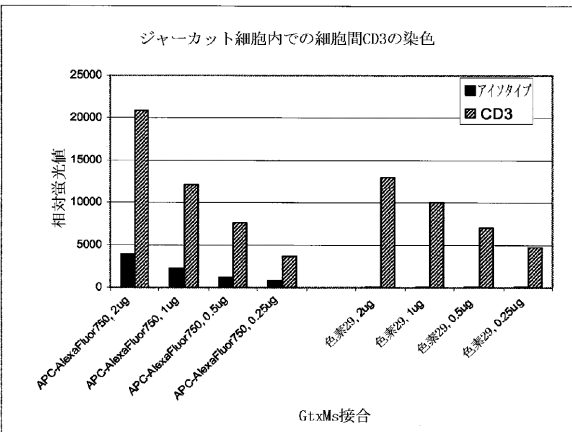
【図15】

近赤外色素の光安定性の比較



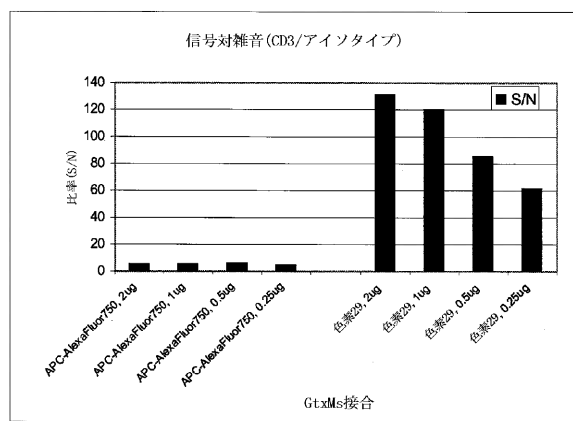
【 図 1 6 A 】

【図16A】



【 図 1 6 B 】

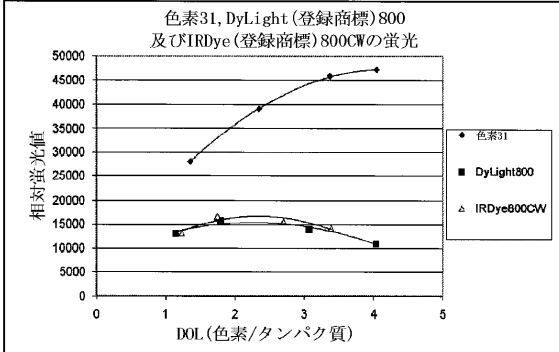
【図16B】



【 図 1 7 】

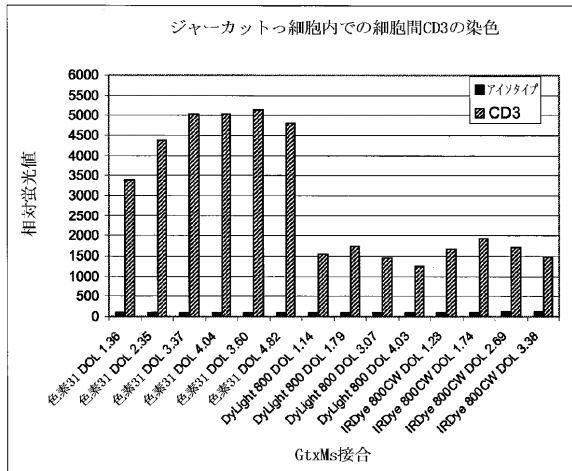
【図17】

色素	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
色素31	770	796
DyLight(登録商標)800	773	793
IRDye(登録商標)800CW	775	796



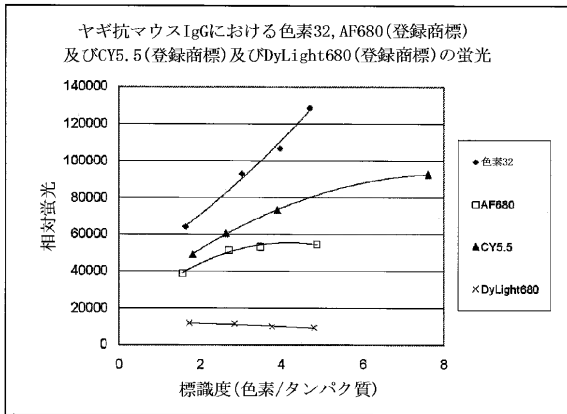
【 図 1 8 】

【図18】



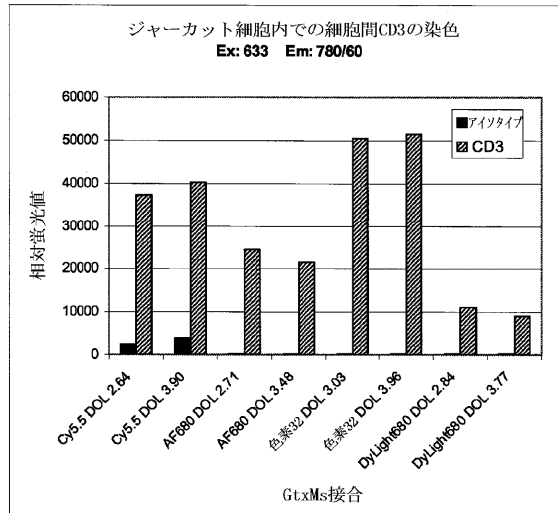
【 図 1 9 】

【図19】



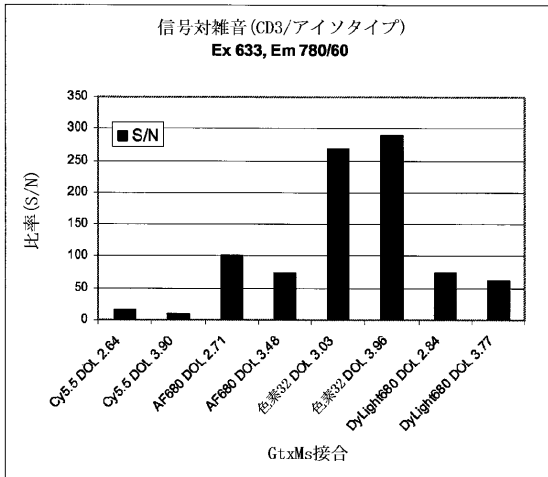
【 図 2 0 A 】

【図20A】




【図20B】

【図20B】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/13698
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 21/64 (2009.01) USPC - 436/172 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 21/64 (2009.01) USPC - 436/172 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 436/600; 424/9.6, 179.1; 8/648; 536/18.7 IPC(8) - G01N 21/64, 21/76, 33/53; A61B 5/00; C07H 5/04 (2009.01) Term search- see search terms below. Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Google Patents; USPTO online search. Search terms: fluoresc\$, dye, label, probe, tag, fluorophore, xanthene, coumarin, pyrene, cyanine, rhodamine, polyalkylene oxide, polyethylene oxide, polyethylene glycol, ethylene glycol, cellulose, polysaccharide, polypeptide, immunoglobulin, immunoassay.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- -Y	US 2003/0044353 A1 (WEISSELEDER, et al.) 06 March 2003 (06.03.2003), entire document, especially, para [0042]-[0047], [0051], [0053], [0055], [0061], [0062], [0068], [0069], [0080], [0100]; FIGS. 1A, 1B	1, 2, 6-12, 15, 16, 25-29, 33-44, 50-57, 59-61, 66, 71, 72, 74, 75, 78-81, 89-94, 98, 100, 101  4, 5, 14, 30-32, 45-49, 58, 62-65, 67-69, 70, 73, 77, 82-85, 95, 96, 97, 99, 102-113
X	US 6,766,183 B2 (WALSH, et al.) 20 July 2004 (20.07.2004), FIG. 15	1, 13
X	US 5,696,157 A (WANG, et al.) 09 December 1997 (09.12.1997), col 31-32, Example 22; col 5-6, Table 1	1, 3, 17-19
X	US 2004/0106806 A1 (BHATT, et al.) 03 June 2004 (03.06.2004), para [0007], [0008]; structure #5	76
X	US 5,082,934 A (SABA, et al.) 21 January 1992 (21.01.1992), title; abstract; col 1, ln 54 to col 2, ln 13; col 3, structure	86-88
Y	US 6,387,672 B1 (ARIMORI, et al.) 14 May 2002 (14.05.2002), abstract; col 6, structure 4; col 7, ln 39-50; col 7, ln 63 to col 8, ln 7; FIG. 1	4
Y	US 6,485,703 B1 (COTE, et al.) 26 November 2002 (26.11.2002), abstract; col 1, ln 9-18; col 7, ln 2-14, ln 34-38; col 8, ln 52-65; col 21, ln 26-35; FIG. 9B	5, 14, 20-24, 70, 73
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 February 2009 (17.02.2009)		Date of mailing of the international search report 02 MAR 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/13698

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,130,101 A (MAO, et al.) 10 October 2000 (10.10.2000), col 33, Example 29, Compound 43	20-24
Y	US 6,662,040 B1 (HENRICH, et al.) 09 December 2003 (09.12.2003), col 15, ln 41-51	30-32, 45, 46, 58
Y	US 5,268,486 A (WAGGONER, et al.) 07 December 1993 (07.12.1993), col 8, ln 27-33; col 7, ln 12-29, 43-47; FIGS. 1, 2	47-49, 112
Y	US 5,968,479 A (ITO, et al.) 19 October 1999 (19.10.1999), col 9, ln 10-37; col 21-22, Compound 18; col 25, Example 8; col 25, 26, Example 11; FIGS. 2, 3	62-65, 82-85, 95-97
Y	US 6,037,137 A (KOMORIYA, et al.) 14 March 2000 (14.03.2000), col 21, structure VII	67-69
Y	US 6,716,979 B2 (DIWU, et al.) 06 April 2004 (06.04.2004), abstract; col 1, ln 42-47; col 24, ln 21-35; col 35, Table 4; col 46, Example 24, Compound 42	77
Y	US 2006/0246477 A1 (HERMANS, et al.) 02 November 2006 (02.11.2006), para [0287]	99
Y	US 2005/0069962 A1 (ARCHER, et al.) 31 March 2005 (31.03.2005), abstract; para [0006], [0012], [0057], [0193], Example 12, para [0198], Example 15; FIG. 3	102-113
Y	US 6,399,392 B1 (HAUGLAND, et al.) 04 June 2002 (04.06.2002), col 3, ln 22-31; col 4, ln 24-30; col 32, Compound 11	22-24
Y	US 5,436,134 A (HAUGLAND, et al.) 25 July 1995 (25.07.1995), abstract; col 2, ln 32-47; col 3, structure; col 4, ln 39-44	49
Y	US 2006/0030638 A1 (VONWILLER, et al.) 09 February 2006 (09.02.2006), para [0111]	58
Y	US 6,512,097 B1 (MARKS, et al.) 28 January 2003 (28.01.2003), abstract; col 1, ln 66 to col 2, ln 4; col 21, ln 60 to col 22, ln 3	85, 97
Y	US 2003/0134790 A1 (LANGENFELD) 17 July 2003 (17.07.2003), para [0117]	103
Y	US 5,585,235 A (BROCCIA) 17 December 1996 (17.12.1996), col 6, ln 32-56	108-113
A	US 2007/0154899 A1 (COULL, et al.) 05 July 2007 (05.07.2007), para [0109], first structure at top of left column on page 10	1, 3, 17, 18
A	US 5,808,044 A (BRUSH, et al.) 15 September 1998 (15.09.1998), FIGS. 6, 10	1, 2, 25-27, 29, 40-44
A	US 4,813,973 A (WINNIK, et al.) 21 March 1989 (21.03.1989), FIG. 1	1, 2

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 9 B 69/10 (2006.01)</b>	C 0 9 K 11/06	
<b>C 0 9 B 11/28 (2006.01)</b>	C 0 9 B 69/10	B
<b>C 0 9 B 57/02 (2006.01)</b>	C 0 9 B 11/28	E
<b>C 0 9 B 57/00 (2006.01)</b>	C 0 9 B 57/02	A
	C 0 9 B 57/00	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 マオ, フェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, ベネディック レーン 3 4 3  
7 9

(72) 発明者 レン, ワイ - イー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 3, サン ラモン, サンディー ウェイ 3 0 8  
3

(72) 発明者 チェン, チン - イン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 3, サン ラモン, サンディー ウェイ 3 0 8  
3

(72) 発明者 フーバー, ハイ ユン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 1, アラメダ, ウィロー ストリート 1 4 2 3

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 CA05 DA02 EA01 FA01 FA02 KA01 KA02  
KA05 KA09 LA02  
4H056 BA02 BB05 BF24F CA01 CA02 CA05 CB01 CC02 CC05 CC08  
CD05 CE02 CE03 DD03 DD06 DD23

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011506673A5</a>	公开(公告)日	2013-01-24
申请号	JP2010537989	申请日	2008-12-12
申请(专利权)人(译)	Baiotiumu公司		
[标]发明人	マオフェイ レンワイイー チェンチンイン フーパーハイユン		
发明人	マオ, フェイ レン, ワイ-イー チェン, チン-イン フーパー, ハイ ユン		
IPC分类号	C09B23/00 G01N21/64 G01N33/533 G01N33/574 C09K11/06 C09B69/10 C09B11/28 C09B57/02 C09B57/00		
CPC分类号	G01N33/582 C09B11/08 C09B11/24 C09B23/0066 C09B23/06 C09B23/083 C09B23/086 C09B57/001 C09B57/02 C09B69/00 G01N21/6428 G01N2021/6439		
FI分类号	C09B23/00.CSP.L G01N21/64.F G01N21/64.C G01N33/533 G01N33/574.D C09K11/06 C09B69/10.B C09B11/28.E C09B57/02.A C09B57/00.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/CA05 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043 /FA02 2G043/KA01 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA02 4H056/BA02 4H056/BB05 4H056/BF24F 4H056/CA01 4H056/CA02 4H056/CA05 4H056/CB01 4H056/CC02 4H056/CC05 4H056 /CC08 4H056/CD05 4H056/CE02 4H056/CE03 4H056/DD03 4H056/DD06 4H056/DD23		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/013956 2007-12-14 US		
其他公开文献	JP2011506673A		

#### 摘要(译)

本发明一般涉及荧光染料。本发明提供了多种荧光染料和含有它们的试剂盒，它们适用于标记各种生物分子，细胞和微生物。本发明还提供了使用荧光染料进行研究和开发，法医鉴定，环境研究，诊断，预后和/或疾病治疗的各种方法。