

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 531946**

(P2003 - 531946A)

(43)公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 9 B 19/00		C 0 9 B 19/00	2 G 0 4 5
C 0 7 D265/38		C 0 7 D265/38	2 G 0 5 4
C 0 7 H 21/00		C 0 7 H 21/00	4 B 0 2 4
C 0 9 K 11/06		C 0 9 K 11/06	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 5 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 89数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 580235(P2001 - 580235)

(86)(22)出願日 平成13年5月1日(2001.5.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(86)国際出願番号 PCT/US01/14110

(87)国際公開番号 W001/083621

(87)国際公開日 平成13年11月8日(2001.11.8)

(31)優先権主張番号 09/564,417

(32)優先日 平成12年5月2日(2000.5.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アブレラ コーポレイション  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404  
フォスター シティ, リンカーン セン  
ター ドライブ 850

(72)発明者 ヤン, ションウェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94568,  
ダブリン, オデュッセイ ウェイ 757  
5

(72)発明者 ユアン, パウ ミャウ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129,  
サン ノゼ, ジョンソン アベニュー  
1249

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 スルホン化 [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素およびそれらの標識結合体の使用

(57)【要約】

蛍光スルホン化 3 , 7 - ジアミノ - [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素が提供され、これらは、生体高分子および他の基質を標識するのに、特に有用である。この色素標識結合体は、無傷の生体細胞を使用する細胞表面アッセイを含めた種々の状況で、また、核酸検出方法で、使用できる。これらの新しい色素は、水溶性であり、種々の物質 (例えば、ポリヌクレオチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、抗体、炭水化物、リガンド、粒子および表面) に共役できる。

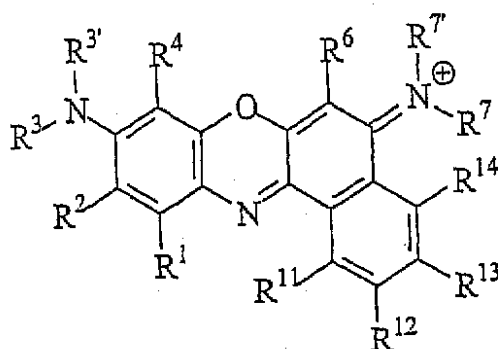
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン構造を含む色素化合物であって、ここで、該化合物は、少なくとも1個のスルホネート置換基を含有する、

化合物。

【請求項2】 任意の会合した対イオンを含む、次式：

【化1】



により規定される、請求項1に記載の色素化合物であって、ここで：

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ が、単独である場合、別々に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アミノアルキル、 $C_5 \sim C_{14}$ アリアル、1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリアル、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ または反応性連結基であり；

$R^1$ が、 $R^2$ と一緒にする場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノであり；

$R^3$ 、 $R^{3'}$ 、 $R^7$ および $R^{7'}$ が、単独である場合、別々に、水素、反応性連結基、脂肪族カチオン鎖、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは $C_5 \sim C_{14}$ アリアルであり；

$R^3$ が、 $R^{3'}$ と一緒にする場合、 $C_2 \sim C_8$ アルキルジイルであり；

$R^7$ が、 $R^{7'}$ と一緒になる場合、 $C_2 \sim C_8$ アルキルジイルであり；

$R^{11}$ および $R^{12}$ が、一緒になる場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノであり；

$R^{12}$ および $R^{13}$ が、一緒になる場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノであり；

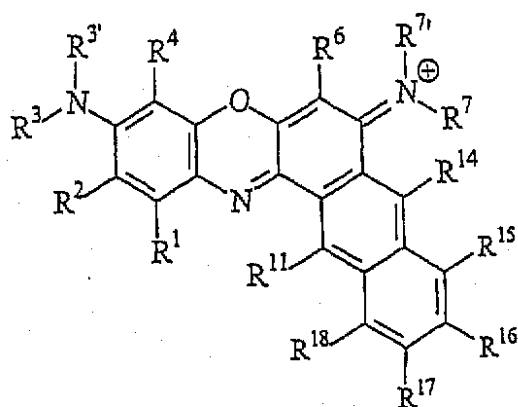
$R^{13}$ および $R^{14}$ が、一緒になる場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノであり；

各Wが、別個に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ または $-C(O)R^A$ であり；そして

各 $R^A$ および各 $R^B$ が、別個に、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルであるが、但し、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ の少なくとも1個が、スルホネートであるか、または $R^{12}$ および $R^{13}$ が、一緒になって、ベンゾ環に結合した少なくとも1個のスルホネートを含むベンゾであるか、または $R^3$ 、 $R^{3'}$ 、 $R^7$ および $R^{7'}$ の少なくとも1個が、 $C_1 \sim C_6$ アルキルスルホネートまたは $C_4 \sim C_{10}$ アリールスルホネートである、色素化合物。

【請求項3】 次式：

【化2】



により規定される、請求項2に記載の色素化合物であって、ここで：

R<sup>15</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>17</sup>およびR<sup>18</sup>が、別々に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>5</sub>~C<sub>14</sub>アリール、1個もしくはそれ以上の同一もしくは異なるW基で置換されたC<sub>5</sub>~C<sub>14</sub>アリール、-OR<sup>A</sup>、-SR<sup>A</sup>、-NR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>A</sup>または反応性連結基である、色素化合物。

【請求項4】 請求項2に記載の化合物であって、ここで：

R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>が、C2-環原子、C3-環原子および3-窒素原子と一緒にあって、5員~7員環を形成し、この環原子が、炭素、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択されるか、または

R<sup>3'</sup>およびR<sup>4</sup>が、3-窒素原子、C3-環原子およびC4-環原子と一緒にあって、5員~7員環を形成し、この環原子が、炭素、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択されるか、または

R<sup>6</sup>およびR<sup>7'</sup>が、C6-環原子、C7-環原子および7-窒素原子と一緒にあって、5員~7員環を形成し、この環原子が、炭素、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択されるか、または

R<sup>7</sup>およびR<sup>14</sup>が、7-窒素原子、C7-環原子およびC8-環原子およびC14-環原子と一緒にあって、5員~7員環を形成し、この環原子が、炭素、窒素、酸素および硫黄からなる群から選択される、色素化合物。

【請求項5】 前記5員~7員環が、gem-二置換炭素原子を含有する、請求項4に記載の色素化合物。

【請求項6】 前記gem-二置換炭素原子が、同一または異なり得る2個のC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基で置換されている、請求項5に記載の色素化合物。

【請求項7】 前記C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル基が、メチルである、請求項6に記載の色素化合物。

【請求項8】 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>およびR<sup>6</sup>が、それぞれ、水素である、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項9】 R<sup>3</sup>およびR<sup>3'</sup>が、それぞれ別個に、C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>アルキルである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項10】 R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が、一緒になって、[1,2]ベンゼノ、[1,2]ナフタレノまたは[2,3]ナフタレノである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項11】 R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>が、それぞれ、水素である、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項12】 R<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>が、一緒になって、[1,2]ベンゼノである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項13】 R<sup>12</sup>およびR<sup>13</sup>が、一緒になって、[1,2]ベンゼノである、請求項2に記載の色素化合物。

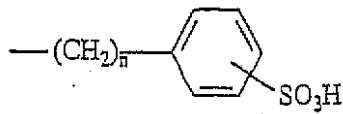
【請求項14】 R<sup>13</sup>およびR<sup>14</sup>が、一緒になって、[1,2]ベンゼノである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項15】 前記脂肪族カチオン鎖が、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-<sup>+</sup>NR<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-<sup>+</sup>NR<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>2</sub>または-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-<sup>+</sup>NR<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-<sup>+</sup>NR<sub>3</sub>であり、各nが、別個に、2~3の整数であり、そしてRの各存在が、別個に、水素およびC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルから選択される、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項16】 前記アルキルスルホネートが、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>Hであり、そしてnが、1~6の整数である、請求項2に記載の色素組成物。

【請求項17】 前記アリールスルホネートが、以下：

【化3】

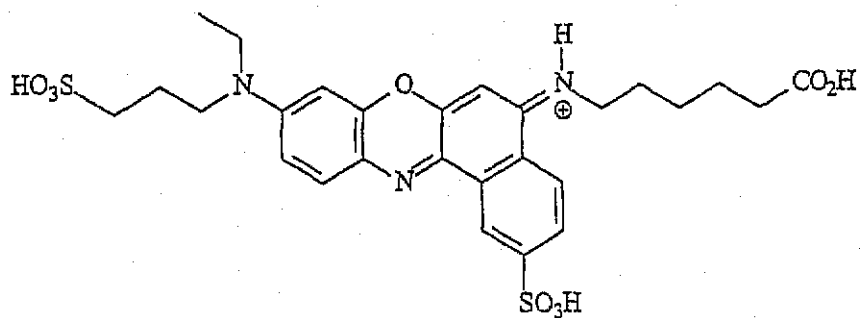
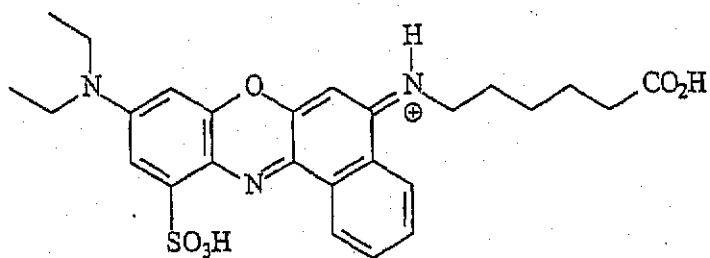
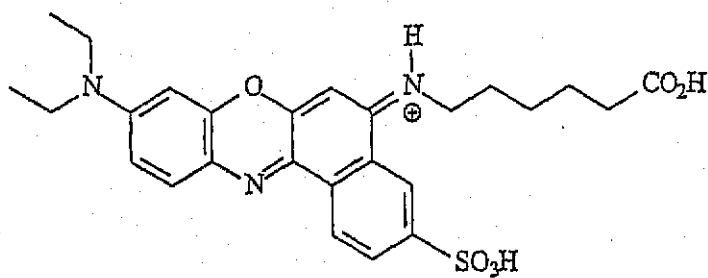
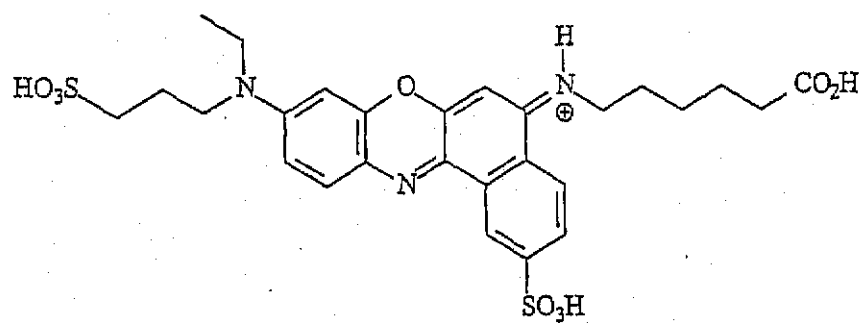


であり、そしてnが、0または1である、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項18】 前記反応性連結基が、スクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、塩化スルホンル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、ホスホラミダイト、マレイミド、ハロアセチルまたはヨードアセトアミドである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項19】 次式：

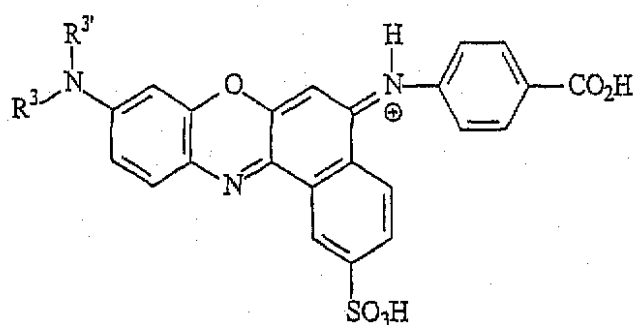
【化4】



により規定される、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項20】 次式：

【化5】



のうち1つにより規定され、ここで、 $R^3$ および $R^{3'}$ が、別個に、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルである、請求項2に記載の色素化合物。

【請求項21】 請求項2に記載の色素化合物で基質を標識する方法であって、基質 - 色素結合体を形成するのに有効な条件下にて、該色素化合物の反応性連結基を基質と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項22】 前記反応性連結基が、N - ヒドロキシスクシンイミドである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記反応性連結基が、ホスホラミダイトである、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記基質が、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリペプチド、炭水化物、リガンド、粒子または表面である、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 前記粒子が、ナノ粒子、微小球体、ビーズまたはリポソームである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記表面が、ガラス表面である、請求項24に記載の方法。

【請求項27】 リンカーによりアクセプター化合物に連結されたドナー化合物を含有する、エネルギー移動色素化合物であって、ここで、

該ドナー化合物は、第一波長で、光の吸収に応答して、励起エネルギーを放射でき、そして

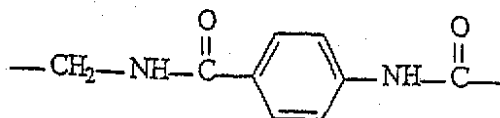
該アクセプター化合物は、該ドナー化合物により放射された該励起エネルギーを吸収すると、第二波長で、蛍光を発することができ、

ここで、該ドナー化合物および該アクセプター化合物の少なくとも1種は、請求項1に記載の化合物である、

エネルギー移動色素化合物。

【請求項28】 前記リンカーが、以下の構造：

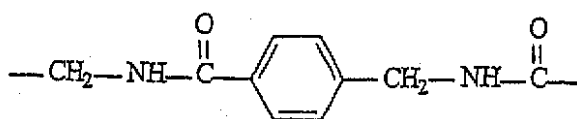
【化6】



を有する、請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物。

【請求項29】 前記リンカーが、以下の構造：

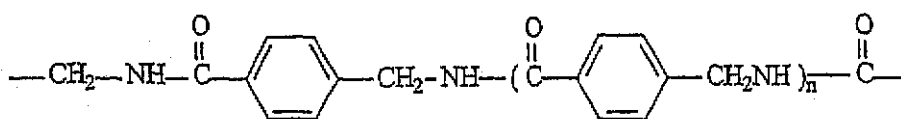
【化7】



を有する、請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物。

【請求項30】 前記リンカーが、以下の構造：

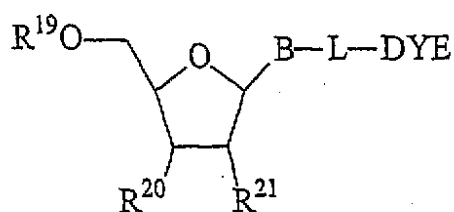
【化8】



を有し、そしてnが、1または2である、請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物。

【請求項31】 次式：

【化9】



により規定される、化合物であって、ここで：

DYEは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物であり；

Lは、リンカーであり；

Bは、核酸塩基であり；

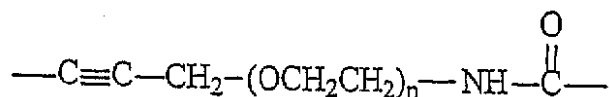
R<sup>19</sup>は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、またはそれらのホスフェートアナログであり；そして

R<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>は、単独である場合、それぞれ別個に、H、HO、F、ホスホラミダイト基、もしくはポリメラーゼ媒介重合を阻害する部分であるか、または一緒になる場合、2'-3'-ジデヒドロリボースを形成する、化合物。

【請求項32】 Bが、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7-デアザアデニン、グアニン、7-デアザグアノシン、7-デアザ-8-アザグアニンまたは7-デアザ-8-アザアデニンである、請求項31に記載の化合物。

【請求項33】 Lが、以下：

【化10】



であり、そしてnが、0、1または2である、請求項31に記載の化合物。

【請求項34】 酵素的に取り込み可能である、請求項31に記載の化合物

。

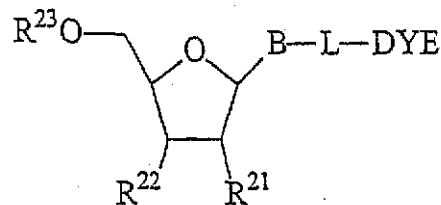
【請求項35】 ターミネーターである、請求項31に記載の化合物。

【請求項36】  $R^{19}$ が、トリホスフェート、 -チオトリホスフェートまたはトリホスフェートエステルアナログであり、そして $R^{20}$ および $R^{21}$ が、単独である場合、それぞれ別個に、H、F、またはポリメラーゼ媒介重合を阻害する部分であるか、または一緒になる場合、2' - 3' -ジデヒドロリボースを形成する、請求項35に記載の化合物。

【請求項37】 酵素的に伸長可能である、請求項31に記載の標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド。

【請求項38】 次式：

【化11】



により規定される、ポリヌクレオチドであって、ここで：

該ポリヌクレオチドは、2個またはそれ以上のヌクレオチドを含有し；

DYEは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物であり；

Lは、リンカーであり；

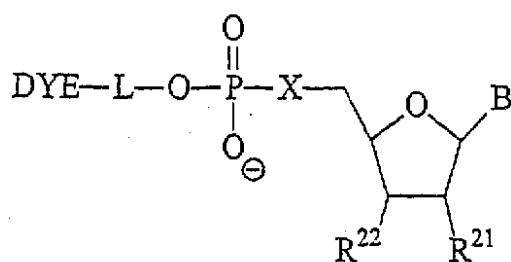
Bは、核酸塩基であり；

$R^{21}$ は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、 $C_1 \sim C_6$ アミノアルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アリル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $-OCH_3$ または $-OCH_2CH=CH_2$ であり；そして

$R^{22}$ および $R^{23}$ は、別個に、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログである、ポリヌクレオチド。

【請求項39】 次式：

【化12】



により規定される、化合物であって、ここで：

該化合物は、2個またはそれ以上のヌクレオチドを含有し；

DYEは、請求項1または請求項27に記載の化合物であり；

Lは、リンカーであり；

Xは、O、NHまたはSであり；

Bは、核酸塩基であり；

R<sup>21</sup>は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、-OCH<sub>3</sub>または-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>であり；そして

R<sup>22</sup>は、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログである、

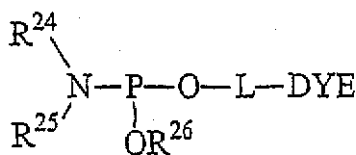
化合物。

【請求項40】 Lが、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルジイルである、請求項39に記載の化合物。

【請求項41】 Lが、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-を含み、そしてnが、1~100である、請求項39に記載の化合物。

【請求項42】 次式：

【化13】



により規定される、ホスホラミダイト化合物であって、ここで：

DYEは、請求項1に記載の化合物であり；

Lは、リンカーであり；

$R^{24}$ および $R^{25}$ は、別々に、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_4 \sim C_{10}$ アリアル、または10個までの炭素原子を含有するシクロアルキルであるか；または $R^{24}$ および $R^{25}$ は、該ホスホラミダイト窒素原子と一緒に、飽和窒素複素環を形成し；そして

$R^{26}$ は、ホスファイトエステル保護基である、ホスホラミダイト化合物。

【請求項43】  $R^{26}$ が、メチル、2-シアノエチルまたは2-(4-ニトロフェニル)エチルである、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物。

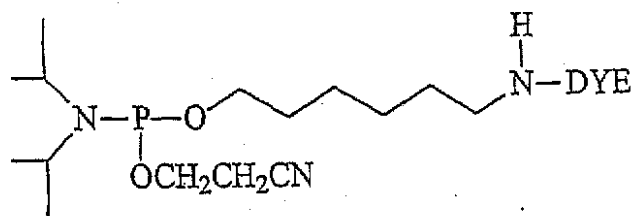
【請求項44】  $R^{24}$ および $R^{25}$ が、それぞれ、イソプロピルである、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項45】 Lが、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルジイルである、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項46】 Lが、前記3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン構造の3-窒素原子または7-窒素原子に結合される、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項47】 次式：

【化14】



により規定される、ホスホラミダイト化合物であって、ここで：

DYEは、請求項1に記載の化合物である、ホスホラミダイト化合物。

【請求項48】 式P-L-DYEにより規定される標識結合体であって、  
ここで：

Pは、ポリペプチドであり；

Lは、リンカーであり；そして

DYEは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物である、  
標識結合体。

【請求項49】 Lが、アミド結合である、請求項48に記載の結合体。

【請求項50】 Lが、カルボキシル末端、アミノ末端、リジン側鎖、アスパラギン酸側鎖またはグルタミン酸側鎖を介して、Pに結合される、請求項48に記載の結合体。

【請求項51】 Pが、ストレプトアビジン、カスパーゼ切断基質または抗体である、請求項48に記載の結合体。

【請求項52】 細胞表面レセプターを検出する方法であって、請求項48に記載の結合体を細胞の表面レセプターに結合する工程および結合した結合体からの蛍光信号を検出する工程を包含する、  
方法。

【請求項53】 ビーズベース免疫捕捉法であって、請求項48に記載の結合体を抗体被覆ビーズに結合する工程および結合した結合体からの蛍光信号を検出する工程を包含する、  
方法。

【請求項54】 標識ポリヌクレオチドを合成する方法であって、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物を、固体支持体に結合したポリヌクレオチドにカップリングする工程を包含する、  
方法。

【請求項55】 標識ポリヌクレオチドを合成する方法であって、ヌクレオシドホスホラミダイトを、請求項1に記載の固体支持体結合色素化合物または請求項27に記載の固体支持体結合エネルギー移動化合物にカップリングする工程を包含する、

方法。

【請求項56】 標識ポリヌクレオチドを合成する方法であって、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物を、ポリペプチドにカップリングする工程を包含する、

方法。

【請求項57】 標識プラスマー伸長産物を産生する方法であって、(i)連続プライマー伸長部を支持できる酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物および(ii)ターミネーターの存在下にて、プライマー-標的ハイブリッドを酵素的に伸長する工程を包含し、ここで、該プライマーまたは該ターミネーターは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物で標識されている、

方法。

【請求項58】 以下の工程を包含する、連結方法：

2本のポリヌクレオチドプローブを標的ヌクレオチド配列にアニールする工程、および

該プローブの一方の5'末端と他方のプローブの3'末端との間で、ホスホジエステル結合を形成する工程であって、

ここで、一方または両方のプローブは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物を含有する、

方法。

【請求項59】 フラグメント分析方法であって、該方法は、以下：

ポリヌクレオチドフラグメントをサイズ依存分離プロセスにかける工程であって、ここで、該フラグメントは、請求項1に記載の色素化合物または請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物を含有する、工程；および

該分離プロセスを開始した後、標識したポリヌクレオチドフラグメントを検出する、工程、

を包含する、方法。

【請求項60】 前記フラグメントが、移動度調節標識で標識される、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 前記分離プロセスの前に、前記フラグメントが、連結により形成される、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 前記分離プロセスが、電気泳動であり、そして前記標識ポリヌクレオチドフラグメントが、蛍光により検出される、請求項59に記載の方法。

【請求項63】 増幅方法であって、該方法は、以下：

2本またはそれ以上のプライマーを標的DNA配列にアニールする、工程；および

該プライマーを、ポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチド混合物により伸長する、工程、を包含し、

ここで、プライマーまたはヌクレオチドは、請求項1に記載の色素で標識される、

方法。

【請求項64】 増幅方法であって、該方法は、以下：

2本またはそれ以上のプライマーおよび蛍光色素クエンチャープローブを標的DNA配列にアニールする、工程；および

該プライマーを、ポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチド混合物により伸長する、工程、を包含し、

ここで、該プローブは、請求項1に記載の色素で標識される、

方法。

【請求項65】 ポリヌクレオチドを標識するキットであって、請求項1に記載の反応性連結基を含む色素化合物およびポリヌクレオチドを含有する、

キット。

【請求項66】 ポリヌクレオチドを標識するキットであって、請求項42に記載のホスホラミダイト化合物およびポリヌクレオチドを含む、

キット。

【請求項67】 標識プライマー伸長産物を産生するキットであって、連続プライマー伸長部を支持できる酵素的に伸長可能なヌクレオチド、ターミネーターおよびプライマーを含み、ここで、該プライマーまたは該ターミネーターは、

請求項1に記載の色素化合物で標識される、  
キット。

【請求項68】 標識プライマー伸長産物を産生するキットであって、連続プライマー伸長部を支持できる酵素的に伸長可能なヌクレオチド、ターミネーターおよびプライマーを含み、ここで、該プライマーまたは該ターミネーターは、請求項27に記載のエネルギー移動色素化合物で標識される、  
キット。

【請求項69】 標識プライマー伸長産物を産生するキットであって、連続プライマー伸長部を支持できる酵素的に伸長可能なヌクレオチド、ターミネーターおよびプライマーを含み、ここで、該プライマーまたは該ターミネーターは、請求項19に記載の色素化合物で標識される、  
キット。

【請求項70】 前記ターミネーターが、4種の異なる移動度調節ターミネーターのセットであり、その1種が、標的Aで終止し、その1種が、標的Gで終止し、その1種が、標的Cで終止し、その1種が、標的TまたはUで終止する、請求項69に記載のキット。

【請求項71】 前記4種の異なるターミネーターのセットが、移動度合致ターミネーターである、請求項70に記載のキット。

【請求項72】 ポリペプチドを標識するキットであって、請求項1に記載の反応性連結基を含む色素化合物およびポリペプチドを含有する、  
キット。

【請求項73】 前記反応性連結基が、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルである、請求項72に記載のキット。

【請求項74】 ビーズベース免疫捕捉アッセイ用キットであって、請求項48に記載の結合体および抗体被覆ビーズを含有する、  
キット。

【請求項75】 細胞表面レセプター検出用キットであって、請求項48に記載の結合体、および該結合体を細胞の表面レセプターに結合する試薬を含有する、

キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(I. 発明の分野)**

本発明は、スルホン化3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素化合物およびそれらの使用に関する。

**【0002】****(II. 発明の背景)**

蛍光試薬により、多くの分野(生物学的用途、生物医学用途、遺伝子用途、発酵用途、水産養殖用途、農業用途、法医学用途および環境用途を含む)において、生命科学研究が可能になっている。蛍光プローブおよび蛍光染色は、生体高分子を同定し、細胞内外の特定の生体成分を検出する。一般的な例は、細胞表面のレセプターを検出するために蛍光標識抗体を使用することである。別の例は、核酸を特性付けるためにゲル電気泳動を広く使用することであるが、その1つの限界は、核酸バンドを検出するのに使用される方法の感度である。

**【0003】**

蛍光標識を利用する生物学的分析物の検出は、放射性標識の必要性を排除し、それにより、安全性が高まり、環境に対する悪影響および放射性廃棄物処理に付随した費用が少なくなる。蛍光検出法を使用する方法の例には、自動DNA配列決定、オリゴヌクレオチドプローブ法、ポリメラーゼ鎖反応産物の検出、免疫アッセイなどが挙げられる。生命科学および医学において、研究者および技術者は、しばしば、細胞表面にあるタンパク質、抗原、および他のリガンドを検出する必要がある。レセプターベースのアッセイは、発現したタンパク質および他のリガンドを検出するために、標識された分子(例えば、蛍光標識したペプチド、タンパク質および抗体)を使用する。

**【0004】**

広範囲の用途にわたって生体高分子を染色または標識するのに一般に適用できる色素は、好ましくは、以下の特性を有する:(i)無細胞アッセイおよび細胞ベースアッセイの両方において少量の生体高分子が感度良く検出できるように、その色素-生体高分子の結合体または複合体は、低いバックグラウンドで、非常

に高い信号を生じるべきである；および ( i i ) その蛍光信号が有意な光退色なしで観察され、モニターされ、そして記録され得るように、この結合体または複合体は、光安定性であるべきである。色素 - ペプチドまたは色素 - 抗体結合体の膜または細胞（特に、生きた細胞）表面への細胞表面結合に關与する用途について、これらの色素は、好ましくは、( i i i ) 有効な結合体濃度および検出感度を達成するために、良好な水溶性を有し、そして ( i v ) その細胞の正常な代謝プロセスを乱したり早すぎる細胞死を引き起こさないように、生きた細胞に非毒性である。

#### 【0005】

核酸染色として多くの色素化合物が使用できることが見出されているものの、利用できる殆どの色素は、可視スペクトルの緑色領域で蛍光を発する。緑色レーザーは、赤色レーザーよりも高価であり、そして生体細胞アッセイでは、細胞成分およびアッセイ設備の自己蛍光が原因で、バックグラウンド信号が高い。これらの高いバックグラウンド信号により、このアッセイの感度が低下する。さらに、多くの細胞成分は、緑色光を吸収し、そのアッセイの感度がさらに低下する。それゆえ、光安定性で、可視スペクトルの赤色領域で励起および発光極大を有し、そして水溶性である感受性色素が非常に望まれている。

#### 【0006】

( I I I . 発明の要旨 )

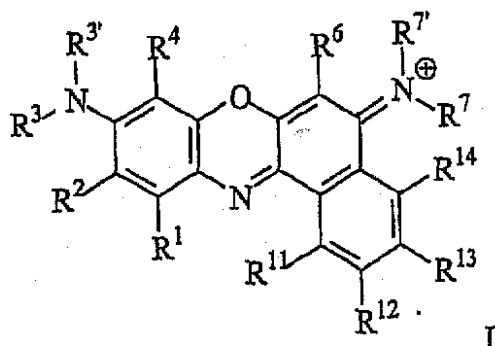
本発明は、特に、蛍光検出のための基質を標識するのに有用な新しい種類のスルホン化 3 , 7 - ジアミノ - [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素に関する。1局面では、本発明の化合物は、光スペクトルの赤色領域で光を放射し、典型的には、600 nm 以上の励起極大を有する。これらの化合物は、水溶液中での優れた溶解性を有し、それらが結合した分子の水溶性を増大し得る。

#### 【0007】

一般に、本発明は、少なくとも1個のスルホネート置換基を含有する 3 , 7 - ジアミノ - [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン構造を含む色素化合物を提供する。1実施形態では、本発明は、任意の会合した対イオンを含む、次式 ( I ) により規定される色素化合物を含む：

【0008】

【化15】



ここで、

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ は、単独の場合、別々に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アミノアルキル、 $C_5 \sim C_{14}$ アリアル、1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリアル、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ または反応性連結基である；

$R^1$ は、 $R^2$ と一緒にする場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノである；

$R^3$ 、 $R^{3'}$ 、 $R^7$ および $R^{7'}$ は、単独の場合、別々に、水素、反応性連結基、脂肪族カチオン鎖、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは $C_5 \sim C_{14}$ アリアルである；

$R^3$ は、 $R^{3'}$ と一緒にする場合、 $C_2 \sim C_8$ アルキルジイルである；

$R^7$ は、 $R^{7'}$ と一緒にする場合、 $C_2 \sim C_8$ アルキルジイルである；

$R^{11}$ および $R^{12}$ は、一緒にする場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノである；

$R^{12}$ および $R^{13}$ は、一緒にする場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノである；

$R^{13}$ および $R^{14}$ は、一緒にする場合、 $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノ、または1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリーレノである；

各Wは、別個に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-NR^A R^B$

$^B$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ または $-C(O)R^A$ である；そして

各 $R^A$ および各 $R^B$ は、別個に、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルである；

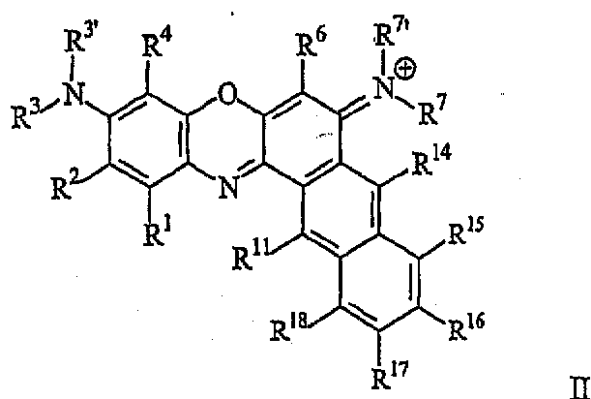
但し、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ の少なくとも1個は、スルホネートであるか、または $R^{12}$ および $R^{13}$ は、一緒になって、ベンゾ環に結合した少なくとも1個のスルホネートを含むベンゾであるか、または $R^3$ 、 $R^3'$ 、 $R^7$ および $R^{7'}$ の少なくとも1個は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルスルホネートまたは $C_4 \sim C_{10}$ アリールスルホネートである。

【0009】

本発明はまた、次式(II)により規定される色素化合物を含む：

【0010】

【化16】



ここで、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ および $R^{18}$ は、別々に、水素、スルホネート、カルボキシレート、ホスホネート、ホスフェート、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_5 \sim C_{14}$ アリール、1個以上の同一または異なるW基で置換された $C_5 \sim C_{14}$ アリール、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ または反応性連結基であり、ここで、 $R^A$ および $R^B$ は、上で定義したとおりである。

【0011】

式Iまたは式IIの1実施形態では、その環原子が炭素、窒素、酸素およびイ

オウからなる群から選択される5員～7員環は、 $R^2$ および $R^3$ を、C2-環原子、C3-環原子および3-窒素原子と一緒にすることにより；または $R^3'$ および $R^4$ を、3-窒素原子、C3-環原子およびC4-環原子と一緒にすることにより；または $R^6$ および $R^{7'}$ を、C6-環原子、C7-環原子および7-窒素原子と一緒にすることにより；または $R^7$ および $R^{14}$ を、7-窒素原子、C7-環原子およびC8-環原子およびC14-環原子と一緒にすることにより、形成される。この5員～7員環は、必要に応じて、gem-二置換炭素原子を含有し得る。例えば、このgem-二置換炭素原子は、同一または異なり得る2個の $C_1 \sim C_6$ アルキル基（例えば、メチル）で置換され得る。

#### 【0012】

上記式IおよびIIに関連したさらなるの実施形態では、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ および $R^6$ は、それぞれ、水素である；または $R^3$ および $R^{3'}$ は、それぞれ別個に、 $C_1 \sim C_3$ アルキルである；または $R^1$ および $R^2$ は、一緒になって、[1, 2]ベンゼノ、[1, 2]ナフタレノもしくは[2, 3]ナフタレノである；または $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ は、それぞれ、水素である；または式Iにおいて、 $R^{11}$ および $R^{12}$ は一緒になって、もしくは $R^{12}$ および $R^{13}$ は一緒になって、もしくは $R^{13}$ および $R^{14}$ は一緒になって、[1, 2]ベンゼノである。

#### 【0013】

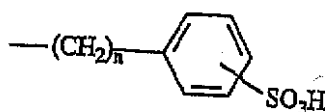
別の実施形態では、この脂肪族カチオン鎖は、 $-(CH_2)_n-NR_2$ 、 $-(CH_2)_n-^+NR_3$ 、 $-(CH_2)_n-^+NR_2-(CH_2)_n-NR_2$ または $-(CH_2)_n-^+NR_2-(CH_2)_n-^+NR_3$ であり、各nは、別個に2～3の整数であり、そしてRの各例は、別個に、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される。

#### 【0014】

特定の好ましい実施形態では、このアルキルスルホネートは、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ であり、そしてnは、1～6の整数である；またはアリアルルスルホネートは、以下である：

#### 【0015】

## 【化17】



ここで、 $n$ は、0または1である。

## 【0016】

前記反応性連結基は、存在するとき、好ましくは、スクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、ホスホラミダイト、マレイミド、ハロアセチルまたはヨードアセトアミドであるが、他の連結基もまた、使用され得る。さらに特定の実施形態では、この反応性連結基は、N-ヒドロキシスクシンイミド（これは、ポリペプチドとの結合体化に特に有用である）またはホスホラミダイト（ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとの結合体化に好ましい基）である。

## 【0017】

本発明の化合物は、種々の基質部分（例えば、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリペプチド、炭水化物、リガンド、粒子または表面）と結合体化できる。1実施形態では、この基質は、粒子（例えば、ナノ粒子、微小球体、ビードまたはリポソーム）である。別の実施形態では、この基質は、表面（例えば、ガラス表面）である。従って、本発明は、このような結合体およびそれらを調製する方法を含む。

## 【0018】

本発明は、さらに、以下を含有するエネルギー移動色素化合物を含む：ドナー化合物であって、ドナー化合物は、リンカーによりアクセプター化合物に連結され、ここで、ドナー化合物は、第一波長で、光の吸収に応答して、励起エネルギーを放射し得、そしてこのアクセプター化合物は、ドナー化合物により放射された励起エネルギーを吸収すると、第二波長で、蛍光を発し得、ここで、このドナ

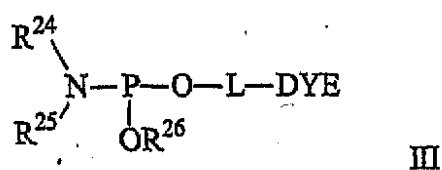
一化合物およびアクセプター化合物の少なくとも1種は、本発明に従う化合物である、ドナー化合物。

【0019】

本発明はまた、次式(III)により規定されるホスホラミダイト化合物を含む：

【0020】

【化18】



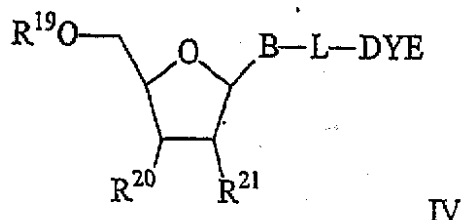
ここで、DYEは、上記種類の色素化合物またはエネルギー移動色素化合物である；Lは、リンカーである； $R^{24}$ および $R^{25}$ は、別々に、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_4 \sim C_{10}$ アリール、または10個までの炭素原子を含有するシクロアルキルである；または $R^{24}$ および $R^{25}$ は、このホスホラミダイト窒素原子と一緒にあって、飽和窒素複素環を形成する；そして $R^{26}$ は、ホスファイトエステル保護基である。1つの実施形態では、 $R^{26}$ は、メチル、2-シアノエチルまたは2-(4-ニトロフェニル)エチルである。別の実施形態では、 $R^{24}$ および $R^{25}$ は、それぞれ、イソプロピルである。別の実施形態では、 $R^{24}$ および $R^{25}$ は、一緒にあって、モルホリノである。別の実施形態では、Lは、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルジイルである。別の実施形態では、Lは、3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン構造の3-窒素原子または7-窒素原子に結合される。代表的な1実施形態では、 $R^{24}$ および $R^{25}$ は、それぞれ、イソプロピルであり、 $R^{26}$ は、シアノエチルであり、そしてL-DYEは、式-( $CH_2$ )<sub>6</sub>-NH-DYEにより規定される。

【0021】

本発明はまた、式(IV)により規定されるヌクレオシドまたはヌクレオチド化合物を提供する：

【0022】

【化19】



ここで、DYEは、上述の種類の色素化合物またはエネルギー移動色素化合物である；Lは、リンカーである；Bは、核酸塩基である；R<sup>19</sup>は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、またはそれらのホスフェート類似物である；そしてR<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>は、単独の場合、それぞれ別個に、H、HO、F、ホスホラミダイト基、またはポリメラーゼ媒介重合を阻害する部分であるか、または一緒になる場合、2' - 3' - ジデヒドロリボースを形成する。1組の実施形態では、Bは、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、7 - デアザグアノシン、7 - デアザ - 8 - アザグアニンまたは7 - デアザ - 8 - アザアデニンである。別の実施形態では、この化合物は、酵素的に取り込み可能である。別の実施形態では、この化合物は、ターミネーターである。1ターミネーター実施形態では、R<sup>19</sup>は、トリホスフェート、

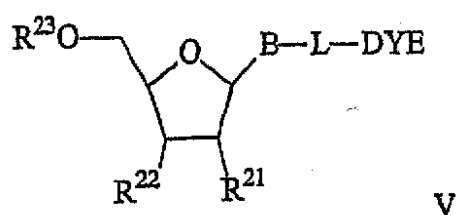
- チオトリホスフェートまたはトリホスフェートエステル類似物であり、そしてR<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>は、単独の場合、それぞれ別個に、H、F、またはポリメラーゼ媒介重合を阻害する部分であるか、または一緒になる場合、2' - 3' - ジデヒドロリボースを形成する。別の実施形態では、このヌクレオシドまたはヌクレオチドは、酵素的に伸長可能である。

【0023】

別の局面では、本発明は、式(V)のポリヌクレオチドを含む：

【0024】

【化20】



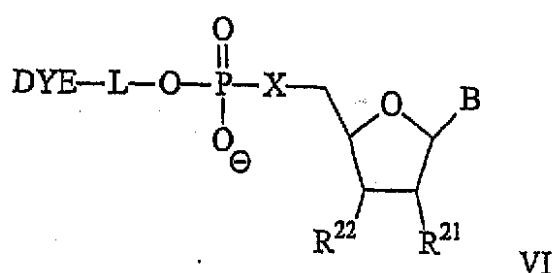
ここで、このポリヌクレオチドは、2個以上のヌクレオチドを含有する；DYEは、上記種類の色素化合物またはエネルギー移動色素化合物である；Lは、リンカーである；Bは、核酸塩基である；R<sup>21</sup>は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、-OCH<sub>3</sub>または-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>である；そしてR<sup>22</sup>およびR<sup>23</sup>は、別個に、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間類似物である。

【0025】

本発明はまた、式(VI)のポリヌクレオチドを含む：

【0026】

【化21】



この化合物は、2個以上のヌクレオチドを含有する；ここで、DYEは、上記種類の色素化合物またはエネルギー移動色素化合物である；Lは、リンカーである；Xは、O、NH、またはSである；Bは、核酸塩基である；R<sup>21</sup>は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、-OCH<sub>3</sub>または-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>である；そしてR<sup>22</sup>は、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド

間類似物である。1実施形態において、Lは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルジイルである。別の実施形態において、Lは $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含み、そしてnは1~100である。

#### 【0027】

本発明はまた、式P-L-DYEにより規定される結合体を含む：ここで、Pは、ポリペプチドである；Lは、リンカーである；そしてDYEは、上記種類の色素化合物またはエネルギー移動色素化合物である。1実施形態では、Lは、アミド結合である。別の実施形態では、Lは、カルボキシル末端、アミノ末端、リジン側鎖、アスパラギン酸側鎖またはグルタミン酸側鎖を介して、Pに結合される。さらなる実施形態では、Pは、ストレプトアビジン、カスパーゼ開裂基質または抗体である。

#### 【0028】

別の局面では、本発明は、細胞表面レセプターを検出する方法を含み、この方法は、P-L-DYE結合体（例えば、上記のもの）を細胞の表面レセプターに結合する工程、および結合した結合体からの蛍光信号を検出する工程を包含する。

#### 【0029】

別の局面では、本発明は、ビーズベース免疫捕捉法を含み、この方法は、P-L-DYE結合体（例えば、上記のもの）を、抗体被覆ビーズに結合する工程、および結合した結合体からの蛍光信号を検出する工程を包含する。

#### 【0030】

別の局面では、本発明は、標識されたポリヌクレオチドを合成する方法を含み、この方法は、ホスホラミダイト化合物（例えば、上記のもの）を、固体支持体に結合したポリヌクレオチドにカップリングする工程を包含する。1実施形態では、このような方法は、ヌクレオシドホスホラミダイトを、固体支持体結合色素化合物または固体支持体結合エネルギー移動化合物（例えば、上記のもの）にカップリングして、標識ポリヌクレオチドを形成する工程を包含し得る。

#### 【0031】

別の局面では、本発明は、標識プライマー伸長産物を産生する方法を含み、こ

の方法は、(i)連続プライマー伸長部を支持できる酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物および(ii)ターミネーターの存在下にて、プライマー-標的ハイブリッドを酵素的に伸長する工程を包含し、ここで、このプライマーまたはこのターミネーターは、色素化合物またはエネルギー移動色素化合物(例えば、上記のもの)で標識されている。

#### 【0032】

別の局面では、本発明は、連結方法を含み、この方法は、以下の工程を包含する：2つのポリヌクレオチドプローブを標的ポリヌクレオチド配列にアニールする工程、およびこのプローブの一方の5'末端と他方のプローブの3'末端との間で、ホスホジエステル結合を形成する工程であって、ここで、一方または両方のプローブは、色素化合物またはエネルギー移動色素化合物(例えば、上記のもの)を含有する。

#### 【0033】

別の局面では、本発明は、フラグメント分析方法を含み、この方法は、以下の工程を包含する：複数のポリヌクレオチドフラグメントをサイズ依存分離プロセスにかける工程であって、ここで、このフラグメントは、色素化合物またはエネルギー移動色素化合物(例えば、上記のもの)を含有する、工程；およびこの分離プロセスを開始した後、標識したポリヌクレオチドフラグメントを検出する工程。

#### 【0034】

別の局面では、本発明は、増幅方法を含み、この方法は、以下の工程を包含する：2個以上のプライマーを標的DNA配列にアニールする工程；およびこのプライマーを、1つ以上の酵素的に伸長可能なヌクレオチドの存在下で、ポリメラーゼ媒介伸長により伸長する工程。このヌクレオチドは、本発明の色素で標識され得る。この増幅方法は、さらに、蛍光色素クエンチャープローブを標的DNA配列にアニールする工程を包含し得、ここで、このプローブは、本発明の化合物を含有する。

#### 【0035】

本発明はまた、本発明の色素化合物(遊離形状または結合体形状で)および1

種以上の他の化合物（これは、基質を標識し、試験を行うなどに使用され得る）を含むキットを提供する。例えば、このようなキットは、オリゴヌクレオチドを標識し、標識プライマー伸長産物を産生し、免疫捕捉に、および細胞レセプターアッセイに有用であり得る。

【0036】

(V. 詳細な説明)

今ここで、本発明の実施形態を詳細に参照するが、それらの例は、添付の図面で図示されている。本発明は、好ましい実施形態に関連して記述されているものの、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定するように意図されないことが理解される。逆に、本発明は、全ての代替物、改良物および等価物を含むように意図され、これらは、本発明の範囲内であり得る。

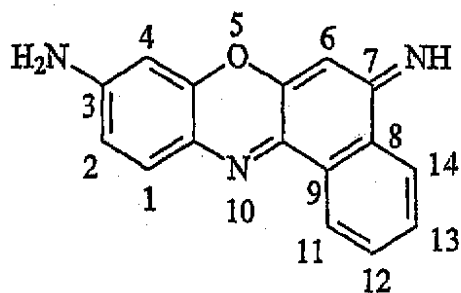
【0037】

(V. 1 定義)

本明細書の目的上、本発明の化合物の[8, 9]ベンゾフェノキサジン環系の位置は、以下のようにして番号を付けられる：

【0038】

【化22】



本明細書中で使用する場合、以下の用語は、以下の意味を有すると意図される

:

「アルキル」とは、飽和または不飽和の、直鎖、分枝または環状の炭化水素基であって、親アルカン、アルケンまたはアルキンの単一炭素原子から1個の水素原子を除去することにより誘導されたものを意味する。典型的なアルキル基には、メチル、エチル、プロピル、ブチルなどが挙げられるが、これらに限定されな

い。典型的なアルキル基には、メチル(-CH<sub>3</sub>)；エチル(例えば、エタニル(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、エテニル(-CH=CH<sub>2</sub>)、エチニル(-C≡CH))；プロピル(例えば、プロパン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、プロパン-2-イル、シクロプロパン-1-イル、プロパ-1-エン-1-イル(-CH=CH-CH<sub>2</sub>)、プロパ-1-エン-2-イル、プロパ-2-エン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、プロパ-2-エン-2-イル、シクロプロパ-1-エン-1-イル、シクロプロパ-2-エン-1-イル、プロパ-1-イン-1-イル(-C≡C-CH<sub>3</sub>)、プロパ-2-イン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-C≡C-CH)など)；ブチル(例えば、ブタン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、ブタン-2-イル、シクロブタン-1-イル、ブタ-1-エン-1-イル(-CH=CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、ブタ-1-エン-2-イル、ブタ-2-エン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、ブタ-2-エン-2-イル、ブタ-1,3-ジエン-1-イル(-CH=CH-CH=CH<sub>2</sub>)、ブタ-1,3-ジエン-2-イル、シクロブタ-1-エン-1-イル、シクロブタ-1-エン-3-イル、シクロブタ-1,3-ジエン-1-イル、ブタ-1-イン-1-イル(-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、ブタ-1-イン-3-イル、ブタ-3-イン-1-イル(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡C-CH)など)などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、このアルキル基は、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキルであり、(C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>)アルキルが特に好ましい。

【0039】

「アルコキシ」とは、-ORを意味し、ここで、Rは、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキルである。

【0040】

「アミノアルキル」とは、-RNH<sub>2</sub>を意味し、ここで、Rは、(C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキルである。

【0041】

「アルキルジイル」とは、1個~12個の炭素原子を有する飽和または不飽和の分枝、直鎖または環状炭化水素基であって、親アルカン、アルケンまたはアルキンの2個の異なる炭素原子の各々から1個の水素原子を除去することにより、

または親アルカン、アルケンまたはアルキンの単一炭素原子から2個の水素原子を除去することにより誘導された2つの一価基中心を意味する。典型的なアルキルジイル基には、メタノ(-CH<sub>2</sub>-)；1,2-エチルジイル；1,3-プロピルジイル；1,4-ブチルジイルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0042】

「アリール」とは、6個～20個の炭素原子を有する一価芳香族炭化水素基であって、親芳香環系の単一炭素原子から1個の水素原子を除去することにより誘導されたものを意味する。典型的なアリール基には、ベンゼン、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから誘導された基が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0043】

「アリールジイル」とは、6個～20個の炭素原子を有する不飽和の環式または多環式の二価芳香族炭化水素基であって、共役共鳴電子系を有し、親アリール化合物の2個の異なる炭素原子から2個の水素原子を除去することにより誘導された少なくとも2個の一価ラジカル中心を有するものを意味する。

#### 【0044】

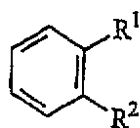
「アリーレノ」とは、2個の隣接一価ラジカル中心を有する二価架橋基であって、親芳香環系の2個の隣接炭素原子の各々から1個の水素原子を除去することにより誘導されたものを意味する。親芳香環系(例えば、ベンゼン)にアリーレノ架橋基(例えば、ベンゼノ)を結合することにより、縮合芳香環系(例えば、ナフタレン)が得られる。この架橋は、得られた二重結合環系へのその結合に一致した非累積二重結合の最大数を有すると考えられる。アリーレノ置換基が、代替置換基を含む構造上で2個の隣接置換基を一緒にすることにより形成されるとき、炭素原子を2回カウントすることを回避するために、このアリーレノ架橋の炭素原子は、この構造の架橋炭素原子を置換する。

#### 【0045】

一例として、以下の構造が考えられる：

#### 【0046】

## 【化23】



R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が、それぞれ、水素であるとき、得られる化合物は、ベンゼンである。R<sup>1</sup>が、R<sup>2</sup>と一緒にあって、C<sub>6</sub>アリーレノ(ベンゼノ)であるとき、得られる化合物は、ナフタレンである。R<sup>1</sup>が、R<sup>2</sup>と一緒にあって、C<sub>10</sub>アリーレノ(ナフタレノ)のとき、得られる化合物は、アントラセンまたはフェナントレンである。特異的な結合性が意図されているとき、(このアリーレノ基の)関与している架橋炭素原子は、括弧で表示される(例えば、[1,2]ベンゼノ([1,2]ベンゾ)、[1,2]ナフタレノ、[2,3]ナフタレノなど)。

## 【0047】

「核酸塩基」とは、相補核酸塩基または核酸塩基類似物(例えば、プリン、7-デアザプリンまたはピリミジン)との対形成でワトソン-クリック水素結合を形成できる窒素含有複素環部分を意味する。典型的な核酸塩基には、天然に生じる核酸塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、および天然に生じる核酸塩基の類似物(例えば、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、7-デアザ-8-アザアデニン、イノシン、ネブラリン、ニトロピロール、ニトロインドール、2-アミノ-プリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、プソイドシチジン、プソイドイソシチジン、5-プロピニルシチジン、イソシチジン、イソグアニン、7-デアザ-グアニン、2-チオ-ピリミジン、6-チオ-グアニン、4-チオ-チミン、4-チオ-ウラシル、O<sup>6</sup>-メチルグアニン、N<sup>6</sup>-メチル-アデニン、O<sup>4</sup>-メチル-チミン、5,6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、4-メチル-インドールおよびエテノアデニン)がある(Fasman(1989年)、Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biologyの385~394ページ)。

ージ (CRC Press, Boca Raton, FL) )。

【0048】

「ヌクレオシド」とは、リボース糖のC - 1'炭素に結合された核酸塩基からなる化合物を意味する。このリボースは、置換または非置換であり得る。置換リボース糖には、それらの1個またはそれ以上の炭素原子(好ましくは、その3' - 炭素原子)が、1個またはそれ以上の同一または異なる - R基、 - OR基、 - NRR基またはハロゲン基で置換されたリボースが挙げられるが、これらに限定されず、ここで、各Rは、別個に、水素、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>)アルキルまたは(C<sub>5</sub> ~ C<sub>14</sub>)アリールである。特に好ましいリボース類には、リボース、2' - デオキシリボース、2', 3' - ジデヒドロリボース、3' - ハオリボース、3' - フルオオリボース、3' - クロロリボースおよび3' - アルキルリボースがある。その核酸塩基が、AまたはGであるとき、このリボース糖は、この核酸塩基のN<sup>9</sup> - 位置に結合される。その核酸塩基が、C、TまたはUであるとき、このペントース糖は、この核酸塩基のN<sup>1</sup> - 位置に結合される(Kornberg and Baker, (1992年) DNA Replication, 第2版、Freeman, San Francisco, CA)。

【0049】

「ヌクレオチド」とは、モノマー単位としてまたは核酸内でのヌクレオシドのリン酸エステルを意味する。ヌクレオチドは、時には、そのリボース糖の構造的な特徴を特に指摘するために、「NTP」または「dNTP」および「ddNTP」として表示される。「ヌクレオチド5' - トリホスフェート」とは、その5' - 位置でトリホスフェートエステル基を有するヌクレオチドを意味する。このトリホスフェートエステル基は、種々の酸素についてのイオウ置換基を含み得る(例えば、 - チオ - ヌクレオチド5' - トリホスフェート)。

【0050】

本明細書中で使用する「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、2個またはそれ以上の連続するヌクレオシド、ヌクレオチドまたはそれらの類似物から構成される任意の重合体配列を包含する。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、交換可能に使用され、2' - デオキシリボヌクレ

オチド (DNA) およびリボヌクレオチド (RNA) を含めて、ヌクレオチドモノマーの一本鎖および二本鎖重合体を意味する。ポリヌクレオチドは、完全にデオキシリボヌクレオチドから構成されるか、完全にリボヌクレオチドから構成されるか、またはそれらのキメラ混合物から構成され得、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合連鎖、またはヌクレオチド間類似物、および会合した対イオン (例えば、 $H^+$ 、 $NH_4^+$ 、トリアルキルアンモニウム、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^+$  など) により連結され得る。ポリヌクレオチドは、核酸塩基および糖類似物から構成され得る。ポリヌクレオチドは、典型的には、数個 (例えば、5 個 ~ 40 個) (このとき、しばしば、オリゴヌクレオチドと呼ばれる) のモノマー単位から数千個のモノマーヌクレオチド単位の範囲のサイズである。他に述べられていなければ、ポリヌクレオチド配列が示されているときはいつでも、それらのヌクレオチドは、左から右に 5' から 3' への順序であること、および「A」は、デオキシアデノシンを意味し、「C」は、デオキシシチジンを意味し、「G」は、デオキシグアノシンを意味し、そして「T」は、チミンを意味する。

【0051】

「ポリペプチド」とは、ペプチドまたはタンパク質 (例えば、抗体または酵素) を意味する。

【0052】

「結合部位」とは、リンカーに共有結合する部分 (例えば、色素、ペプチドまたはオリゴヌクレオチド) 上の部位を意味する。

【0053】

「リンカー」とは、共有結合または原子鎖 (これは、色素を基質 (例えば、ポリヌクレオチド) に結合するか、または一方の色素を他の色素に結合する) を含有する化学部分を意味する。

【0054】

「反応性連結基」とは、他の分子と反応して共有結合を形成できる化学的に反応性の置換基または部分 (例えば、求核試薬または求電子試薬) を意味する。

【0055】

「複素環」とは、1 個またはそれ以上の環原子が (炭素ではなく) ヘテロ原子

(例えば、窒素、酸素およびイオウ)である環系を有する分子を意味する。

【0056】

「酵素的に伸長可能な」とは、(i)ポリメラーゼ酵素の作用によって、ポリヌクレオチド鎖の末端上に酵素的に取り込むことができ、そして(ii)連続プライマー伸長を支持できるヌクレオチドを意味する。

【0057】

「酵素的に取り込み可能な」とは、ポリメラーゼ酵素の作用によって、ポリヌクレオチド鎖の末端上に酵素的に取り込むことができるヌクレオチドを意味する。

。

【0058】

「ターミネーター」とは、酵素的に取り込み可能なヌクレオチドであって、得られるポリヌクレオチド鎖へのヌクレオチドの引き続いた取り込みを阻害し、それにより、ポリメラーゼ伸長を停止するものを意味する。典型的なターミネーターは、3'-ヒドロキシル置換基がなく、2',3'-ジデオキシリボース、2',3'-ジデヒドロリボース、および2',3'-ジデオキシ、3'-ハロ(例えば、3'-フルオロ)リボースを含む。あるいは、リボフラノース類似物(例えば、アラビノース)が使用され得る。代表的なヌクレオチドターミネーターには、2',3'-ジデオキシ-D-リボフラノシル、D-アラビノフラノシル、3'-デオキシ-D-アラビノフラノシル、3'-アミノ-2',3'-ジデオキシ-D-リボフラノシルおよび2',3'-ジデオキシ-3'-フルオロ-D-リボフラノシルが挙げられる(Chidgeavadze.(1984年) Nucleic Acids Res., 12:1671~1686;およびChidgeavadze.(1985年) FEB. Lett., 183:275~278)。ヌクレオチドターミネーターには、また、可逆性ヌクレオチドターミネーターが挙げられる(Metzker (1994年) Nucleic Acids Res., 22(20):4259)。

【0059】

「基質」とは、本発明の色素化合物が結合できる物質である。基質には、(i)ポリヌクレオチド、(ii)ヌクレオシドおよびヌクレオチド、(iii)ペ

プチドおよびタンパク質、(iv)炭水化物、(v)配位子、および(vi)前出の(i)~(v)の任意の類似物が挙げられる。

#### 【0060】

「ヌクレオチド間類似物」とは、リン酸エステル類似物、例えば、ホスホン酸アルキル(例えば、ホスホン酸 $C_1 \sim C_4$ アルキル(例えば、ホスホン酸メチル)、ホスホラミダイド)、アルキルホスホトリエステル(例えば、 $C_1 \sim C_4$ アルキルホスホトリエステル(例えば、メチルホスホトリエステル))、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートを意味する。ヌクレオチド間類似物には、また、非ホスフェート類似物が挙げられ、ここで、この糖/ホスフェートサブユニットは、アミド結合(例えば、2-アミノエチルグリシン単位(例えば、PNA; Nielsen, 「Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymidine-substituted polyamide」、Science 254:1497~1500(1991年)を参照))で置き換えられる。

#### 【0061】

「標的配列」とは、相補的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの対象であるポリヌクレオチド配列を意味する。この配列は、DNA、RNA、それらの類似物(それらの組合せを含めて)から構成できる。

#### 【0062】

「スペクトル分解可能な」とは、蛍光色素のセットに関連して、各色素の蛍光発光バンドが、十分に識別可能である(すなわち、十分に非オーバーラップしている)こと、これらの色素が、単独でまたは他の化合物(標識した)と結合したときのいずれかにおいて、一連の帯域通過フィルターおよび光電子増倍管、電荷結合素子(CCD)、スペクトログラフなどを使用して、標準的な光検出システム(例えば、光検出器)を使って、それらの蛍光信号に基づいて、互いに識別可能であることを意味する(Wheellessら、(1985)Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysisの21~76ページ(Academic Press, New Yor

k) )。好ましくは、スペクトル分解可能な色素セットを含む全ての色素は、単一光源により、励起可能である。

#### 【0063】

「移動度合致」とは、等しい長さの標識ポリヌクレオチドを使用したとき、標識が異なるが実質的に類似した電気泳動移動度を有するポリヌクレオチドを生じる蛍光色素のセットを意味する。典型的には、1セットの移動度合致色素で標識したポリヌクレオチドの相対的電気泳動移動度は、約半分未満のヌクレオチドだけ変わる。好ましくは、これらの移動度合致色素は、先に定義したように、スペクトル分解可能である。

#### 【0064】

##### (V.2 色素化合物および合成)

本発明の化合物は、当該技術分野で利用できる任意の適当な方法により、調製できる。本発明の種々の異なるスルホン化色素化合物を調製する代表的な方法は、以下の実施例の項で見られ、また、以下でさらに詳細に述べる。

#### 【0065】

本発明のスルホン化3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素は、好都合には、図1で図示しているように、前駆体から合成できる。代表的な合成経路は、酸性条件下(例えば、0.1~0.5M塩酸)にて、2-ニトロソ,5-アミノフェノール化合物19および当量の1-アミノナフタレン化合物20(各々は、エタノール中にて、0.5mM~5mMの最終濃度である)を環化することにより、開始する。この混合物は、2~50時間還流される。冷却後、それらの溶媒は、蒸発され、環化された生成物21は、結晶化および濾過により、または逆相HPLCにより、精製され得る。反応物19および20のいずれかまたは両方は、記述のように、置換基X(例えば、スルホネート)でアリアル置換できる。あるいは、このスルホネート基は、その環化の後のスルホン化により、導入できる。5-アミノフェノール19のアミノ基は、式Iで示すように、アルキル基(例えば、アルキルスルホネート、アリアルスルホネート)または他の基を有し得る。あるいは、この3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン環構造は、Ottawa, 「Process for the manuf

acture of basic oxazine dyestuffs」(米国特許第3,655,601号)の方法に従って合成でき、この場合、そのニトロソ官能基が、インサイチュで形成される。また、その3-アミノ基および7-アミノ基は、VanAllan, (1969年)「The reaction of 12H-benzo[a]phenothiazine and 12H-benzo[b]phenoxazine with certain heterocyclic azides」、Jour. Org. Chem. 34: 1691~94に従って、光または熱の下でアリールアジド試薬と反応させることにより、この[8,9]ベンゾフェノキサジン環構造上で形成できる。

#### 【0066】

これらのC3およびC7第一級または第二級アミノ基は、典型的な条件下にて、アルキル化されて、種々の置換基が得られる。図1は、Briggs (1997年)「Synthesis of functionalised fluorescent dyes and their coupling to amines and amino acids」J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1051-58の方法に従って、21のC7アミノ基をアルキル化剤(例えば、ブロモアルキル、ハロ-ベンジル)または他の求電子試薬でアルキル化するとC7アミノアルキル化生成物22が得られることを示している。典型的には、このアルキル化反応は、溶媒(例えば、トルエン、ジメチルホルムアミド、アセトニトリルまたはテトラヒドロフラン)中にて、比較的の不溶性塩基(例えば、炭酸カリウムまたは炭酸ナトリウム)を使って、不均一条件下にて、行われる。この反応物は、完全な反応を起こすために、還流温度まで加熱され得る。これらのアルキル化剤は、反応性連結基に転化できる官能基を含み得る。このアルキル化剤が塩基感受性官能基(例えば、エステル)を含有する場合、この塩基は、非求核性であり得る(例えば、実施例9)。

#### 【0067】

この縮合[8,9]ベンゾ環は、塩化メチレンまたは他の適当な溶媒中でのクロロスルホン酸および硫酸ナトリウムでスルホン化され得る。あるいは、このスルホン化は、純粋なクロロスルホン酸中で行われ得る。得られるアリールスルホ

ニルクロライドは、水で、そのアリールスルホネート生成物まで加水分解される。このフェノールまたはナフタレン中間体、または環化生成物のアリールスルホン化はまた、発煙硫酸 $\text{SO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 中で実行され得る(Stewart, 「Aminonaphthalimide dyes for intracellular labelling」、米国特許第4,473,693号)。スルホン化は、数個のアリール位置の1個またはそれ以上で起こり得、スルホン化[8,9]ベンゾフェノキサジン色素23が得られる(図1)。その特定の異性体は、通常の実験技術(例えば、NMR)により決定され得、そして逆相HPLCにより、他の異性体から精製され得る。得られるスルホネート基の数は、質量分析法により、決定され得る。

#### 【0068】

その合成経路は、ナフチルアミン化合物のスルホン化に続いてアルキル化(例えば、図5の9)を伴い得る。ニトロソアミノフェノール化合物で環を環化すると、本発明の色素(例えば、12)が得られる。あるいは、第一級アミノスルホネートナフチル化合物を環化すると、例えば、10(図6)が得られる。そのC7アミノ基は、保護ペプチドでアシル化され得、ペプチド-色素結合体(例えば、11)が得られる。

#### 【0069】

このスルホン化の過程において、それらのC3およびC7アミノ置換基上の連結基のエステルは、加水分解され得る(例えば、2をクロロスルホン化すると、3が得られる)(図2)。得られるカルボン酸基は、好都合には、活性化されて、基質と反応する反応性連結基が形成する。図2は、そのカップリング試薬であるTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート)を使って3を対応する活性エステルであるN-ヒドロキシスクシンイミドに転化することを示している(実施例4)。あるいは、このエステルまたはカルボン酸基は、ヒドロキシルに還元されホスフィチル化され得、非常に反応性のホスホラミダイト化合物IIIが得られる。

#### 【0070】

構造IおよびIIによる好ましい化合物の1群には、C3およびC7アミノ基

を脂肪族カチオン鎖で置換した化合物がある。この脂肪族カチオン鎖は、典型的には、全体で4個～20個の非水素原子を含み、1個～4個のヘテロ原子（例えば、窒素）を有し、これは、その色素を使用する条件下にて、正電荷に寄与している。例えば、 $R^3$ または $R^7$ は、 $-(CH_2)_n-NR_2$ 、 $-(CH_2)_n-^+NR_3$ 、 $-(CH_2)_n-^+NR_2-(CH_2)_n-^+NR_3$ および $-(CH_2)_n-^+NR_2-(CH_2)_n-^+NR_3$ であり得り、ここで、各 $n$ は、2または3であり、そして各 $R$ は、独立して、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群から選択される。親[8,9]ベンゾフェノキサジン環のC7イミニウム窒素が寄与している正電荷を含まず、このカチオン鎖は、この色素を使用する条件下にて、少なくとも1価の正電荷、典型的には、4価以下の正電荷を有する。これらの正電荷は、典型的には、アミノ基またはイミノ基に基づいているが、正電荷を支持できる他の元素（例えば、イオウ、リンおよびヨウ素）もまた、これらのカチオンが使用条件下にて安定である範囲まで、使用され得る。

#### 【0071】

アリール環置換基である $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ および $R^{14}$ は、基質とカップリングするかエネルギー移動色素化合物を形成する反応性連結基を有し得る。これらの反応性連結基は、求核性官能基（例えば、アミノ、チオールまたはヒドロキシル）または求電子性官能基（例えば、活性エステル、ジスルフィド、ハライドまたはエポキシド）であり得る。例えば、アリール環置換基は、アミノメチル基であり得、これは、アミノ求核試薬として反応し得るか、または求電子反応性連結基にさらに転化され得る。アリール環のアミノメチル化、クロロメチル化およびヒドロキシメチル化は、当該技術分野で周知の反応である。

#### 【0072】

上記合成方法に続いて、広範囲の色素化合物が調製され得る（図8および9）。

#### 【0073】

当業者は、上で具体的に記述した化合物種だけでなく構造Iに含まれる化合物の多くが、互変異性、配座異性、幾何異性および/または立体異性の現象を示し

得ることを認識している。本明細書および特許請求の範囲の式が、可能な互変異性体形態、配座異性体形態、鏡像異性体形態または幾何異性体形態の1つだけに相当できるので、本発明は、本明細書中で記述した用途の1つまたはそれ以上を有する化合物の任意の互変異性体形態、配座異性体形態、鏡像異性体形態および/または幾何異性体形態を包含することが理解されるべきである。

#### 【0074】

特定の例として、本明細書全体を通じて、C3アミノおよびC7アミノ置換基が言及されている。この命名法は、図示した構造式（これらは、これらの化合物の数種の可能な互変異性体形態（または共鳴構造）の1つだけを表している）に対応しているので、これらの言及は便宜上にすぎず、このようないずれの言及も、本明細書中で記述した化合物の範囲を限定するものとは解釈されないことが分かる。

#### 【0075】

それに加えて、当業者はまた、本発明の化合物が、特に、それらの環境のpHに依存して、多くの異なるプロトン化状態で存在し得ることを認識している。本明細書中で提供された構造式は、数種の可能なプロトン化状態の1つだけで、この化合物を描写しているものの、これらの構造は、例証的なものにすぎず、本発明は、任意の特定のプロトン化状態には限定されない（これらの化合物の任意の全てのプロトン化形態が、本発明の範囲内に入ると解釈される）ことが分かる。

#### 【0076】

本発明の化合物は、複数の正電荷または負電荷を有し得る。典型的には、本発明の色素の正味電荷は、負である。これらの色素に会合した対イオンは、典型的には、それらの化合物が得られる合成方法および/または単離方法に支配される。典型的な対イオンには、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、リチウム、ハライド、アセテート、トリフルオロアセテート等およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。任意の会合した対イオンは、本発明の重要な特徴ではなく、本発明は、任意の種類対イオンと会合した色素を包含することが分かる。さらに、これらの化合物は、種々の異なる形態で存在できるので、本発明は、対イオンと会合した色素の形態（例えば、乾燥塩）だけでなく、対イオン

と会合していない形態（例えば、水溶液または有機溶液）も包含すると解釈される。

【0077】

(V.3 エネルギー移動色素化合物)

他の局面では、本発明は、上記構造 I または II により規定されるような色素化合物を含有するエネルギー移動色素化合物を包含する。一般に、本発明のエネルギー移動色素には、第一波長で光を吸収しそれに応答して励起エネルギーを放射するドナー色素、ドナー色素が放射した励起エネルギーを吸収しそれに応答して第二波長で蛍光を発することができるアクセプター色素が挙げられる。このドナー色素は、リンカーを介して、このアクセプター色素に結合され得、このリンカーは、このドナー色素とアクセプター色素との間で効率的なエネルギー移動を促進するのに効果的である (Lee, 「Energy transfer dyes with enhanced fluorescence」、1998年9月1日に登録された米国特許第5,800,996号; Lee, 「Energy transfer dyes with enhanced fluorescence」、1999年8月31日に登録された米国特許第5,945,526号; Mathies, 「Fluorescent labels and their use in separations」、1997年8月5日に登録された米国特許第5,654,419号)。あるいは、このドナー色素およびアクセプター色素は、その基質上の異なる結合点で、標識され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、その5'末端にて、ドナー色素で標識され得、そしてその3'末端にて、アクセプター色素で標識され得る。ペプチドは、そのカルボキシル末端で、ドナー色素で標識され得、また、内部システインまたはリシン側鎖で、アクセプター色素で標識され得る (Komoriya, 「Compositions for the detection of proteases in biological samples and methods of use thereof」、米国特許第5,605,809号)。本発明のエネルギー移動色素では、基質を標識するドナー色素またはアクセプター色素の少なくとも1種は、スルホン化3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン

色素である。このエネルギー移動色素を含む他の色素は、フルオレセイン色素、ローダミン色素およびシアニン色素を含めて、スルホン化 [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素でのエネルギー移動プロセスを受ける任意の蛍光部分であり得る。

#### 【0078】

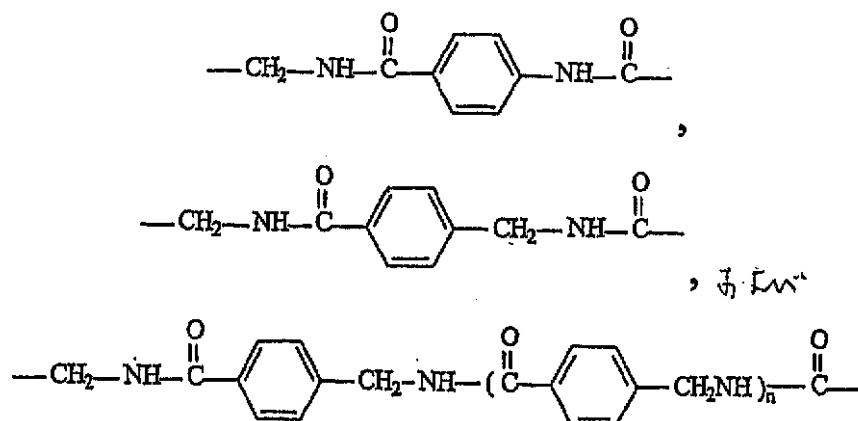
エネルギー移動色素は、混合物中の複数の標識基質の同時検出（例えば、DNA塩基配列決定）で使用するのが有利である。単一のドナー色素は、各色素が共通の波長で強力な吸収を有するように、1セットのエネルギー移動色素で使用できる。次いで、このエネルギー移動セットにあるアクセプター色素を変えることにより、このアクセプター色素は、それらの各個の発光極大により、スペクトル分解できる。エネルギー移動色素はまた、非エネルギー移動色素よりも大きい有効 Stokes シフトを提供する。この Stokes シフトは、その励起極大（このドナー色素が光を極大吸収する波長）と、発光極大（このアクセプターが光を最大発光する波長）との間での差である。

#### 【0079】

好ましい実施形態では、このドナー色素とアクセプター色素との間のリンカーは、そのリンカーにある程度の構造的剛直性を与える官能基（例えば、アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも1個の不飽和結合または縮合環構造を有する5員環および6員環）を含有する。このエネルギー移動色素のドナー色素およびアクセプター色素は、以下の代表的な構造を有するリンカーにより、結合され得る：

#### 【0080】

【化24】



ここで、nは、1または2である。

#### 【0081】

エネルギー移動色素のドナー色素とアクセプター色素との間のリンカーの結合部位は、このドナー色素およびアクセプター色素の一方または両方が本発明の色素である任意の位置であり得る。好ましい結合部位は、C3およびC7アミノを含有する。

#### 【0082】

このエネルギー移動色素化合物は、リンカーを介して、基質に共有結合される。このリンカーは、結合、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルジイル、C<sub>6</sub>~C<sub>20</sub>アリールジイルおよびベアリング (bearing) 官能基 (アミド、カーバメート、尿素、チオ尿素、ホスフェート、ホスホロチオエートなどを含めて) であり得る。好ましいリンカーには、1,2-エチルジイルおよび1,6-ヘキシルジイルが挙げられる。このエネルギー移動色素と基質との間のリンカーの結合部位は、そのエネルギー移動色素上の任意の位置であり得、この場合、このドナー色素およびアクセプター色素の一方または両方は、本発明の色素である。この基質がヌクレオシドまたはヌクレオチドである場合、その基質上の好ましい結合部位は、その核酸塩基上である。この基質がオリゴヌクレオチドである場合、好ましい結合部位には、その3'末端および5'末端が挙げられる。この基質がペプチドまたはタンパク質である場合、好ましい結合部位には、そのアミノ末端およびカルボキシル末端、ならびにリシン残基アミノ置換基が挙げられる。

## 【0083】

## (V.4 色素の標識試薬)

本発明は、標識試薬を含み、ここで、スルホン化3,7-ジアミノ[8,9]ベンゾフェノキサジン蛍光色素は、基質と反応する反応性形態である。別の局面では、本発明は、標識した(すなわち、式Iの本発明の色素と結合した)基質を含む。基質は、実質的に、本発明の色素が結合できる任意の色素または基質であり得、これらには、例として、タンパク質、ポリペプチド、多糖類、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、脂質、固体支持体、有機および無機重合体、ならびにそれらの組合せおよび集合体(例えば、染色体、核、生きた細胞(例えば、細菌または他の微生物、哺乳動物の細胞、組織など))などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの色素は、疎水性引力、イオン引力および共有結合を含む、種々の手段により、任意のリンカーを介して、この基質と結合される。好ましくは、これらの色素は、共有結合を介して、この基質と結合される。

## 【0084】

標識化は、典型的には、当該技術分野で周知の方法を使用して、適切な反応性色素と結合する基質とを両方が溶解する溶媒中にて混合し(Hermanson, Bioconjugate Techniques, (1996年) Academic Press, San Diego, CA. 40~55頁、643-71ページ)、続いて、その結合体を任意の未結合出発物質または不要な副生成物から分離することにより、生じる。この色素結合体は、後の使用のために、乾燥状態でまたは溶液中で保存できる。

## 【0085】

これらの色素は、その置換基位置の1つまたは色素の他の分子との共有結合において、反応性連結基を含有し得る。反応性連結基は、共有結合を形成できる部分、典型的には、求核分子と反応できる求電子官能基(例えば、アルコール、アルコキシド、アミン、ヒドロキシルアミンおよびチオール)である。反応性連結基の例には、スクシンイミドエステル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホン酸エステル、ハロゲン化シリル、2,6-ジクロロトリアジニル、ペン

タフルオロフェニルエステル、ホスホラミダイト、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アリル、アルデヒド、ケトン、アシルアジド、無水物およびγ-アセトアミドが挙げられる。

#### 【0086】

好ましい反応性連結基は、スルホン化 [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素のカルボキシル置換基のN - ヒドロキシスクシンイミジルエステル ( NHS ) である ( 図 2、4、5 )。この色素の NHS エステル形態は、好ましい標識試薬である。この色素の NHS エステルは、予備形成され、単離され、精製され、そして / または特徴付けられ得るか、あるいはインサイチュで形成されて、基質の求核基 ( 例えば、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ペプチドなど ) と反応され得る。典型的には、この色素のカルボキシル形態は、カルボジイミド試薬 ( 例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド ) またはウロニウム試薬 ( 例えば、TSTU ( O - ( N - スクシンイミジル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート、HBTU ( O - ベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート ) または HATU ( O - ( 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート ) )、活性剤 ( 例えば、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール ( HOBt ) および N - ヒドロキシスクシンイミド ) のある種の組合せと反応して色素の NHS エステルを得ることにより、活性化される。本発明のスルホネート [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素上の NHS エステルに好ましい置換基位置は、R<sup>3</sup>およびR<sup>7</sup>である。NHS エステルの代表的な例は、図 2、4、5 において、それぞれ、構造 4、8、13 である。

#### 【0087】

ある場合には、この色素および基質は、その色素をインサイチュで活性化し基質と反応させて 1 工程で色素 - 基質結合体を形成することにより、カップリングされ得る。例えば、実施例 11 では、色素 10 の C 7 アミノ基は、活性剤 BOP ( ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ - トリス ( ジメチルアミノ ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート ) を用いて、テトラマーペプチドと直接カップリ

ングされて、アミド連結ペプチド - 色素結合体 11 が得られる。

【0088】

他の活性化試薬およびカップリング試薬には、TBTU (2 - (1H - ベンゾトリアゾ - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、TFFH (N, N', N'', N''' - テトラメチルウロニウム 2 - フルオロ - ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP (ベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、EEDQ (2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン)、DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド); DIPCDI (ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT (1 - (メシチレン - 2 - スルホニル) - 3 - ニトロ - 1H - 1, 2, 4 - トリアゾール) およびハロゲン化アリールスルホニル (例えば、塩化トリイソプロピルベンゼンスルホニル) が挙げられる。

【0089】

他の好ましい反応性連結基は、本発明の色素のホスホラミダイト形態である。ホスホラミダイト色素試薬は、本発明の色素で標識したオリゴヌクレオチドの自動化合成に特に有用である。オリゴヌクレオチドは、通例、ホスホラミダイト法により、固体支持体上で合成される (Caruthers, M. および Beaucage, S. 「Phosphoramidite compounds and processes」、1983年11月15日に発行された米国特許第4,415,732号; Caruthers, M. および Matteucci, M. 「Process for preparing polynucleotides」、1984年7月3日に発行された米国特許第4,458,066号; Beaucage, S. および Iyer, R. (1992年) 「Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach」、Tetrahedron 48:2223~2311)。

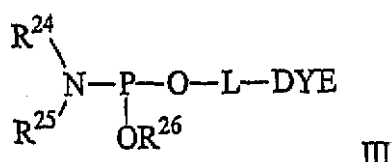
【0090】

これらのホスホラミダイト試薬は、ヌクレオシド性または非ヌクレオシド性で

あり得る。非ヌクレオシド形態のホスホラミダイト色素試薬は、一般式 I I I を有する：

【0091】

【化25】



ここで、DYEは、エネルギー移動色素を含む、保護または非保護形態の色素Iである。Lは、リンカーである。R<sup>24</sup>およびR<sup>25</sup>は、別々に、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキル、C<sub>4</sub>~C<sub>10</sub>アリール、および10個までの炭素原子を含有するシクロアルキルであるか、またはR<sup>24</sup>およびR<sup>25</sup>は、そのホスホラミダイト窒素原子と一緒にあって、飽和窒素複素環を形成する。R<sup>26</sup>は、ホスファイトエステル保護基であり、これは、このオリゴヌクレオチドの不要な伸長を防止する。一般に、R<sup>26</sup>は、オリゴヌクレオチド合成条件に対して安定であるが、このオリゴヌクレオチドまたは色素の完全性に悪影響を与えない試薬で、合成オリゴヌクレオチド生成物から除去できる。好ましくは、R<sup>26</sup>は、以下である：(i)メチル、(ii)2-シアノエチル；-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN、または(iii)2-(4-ニトロフェニル)エチル；-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(p-NO<sub>2</sub>Ph)である。ホスホラミダイト試薬の好ましい実施形態は、以下の場合である：(i)R<sup>24</sup>およびR<sup>25</sup>は、それぞれ、イソプロピルであり、(ii)R<sup>24</sup>およびR<sup>25</sup>は、一緒にあって、モルホリノであり、(iii)Lは、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルであり、(iv)R<sup>26</sup>は、2-シアノエチルであり、そして(v)DYEは、リンカーによって、R<sup>3</sup>またはR<sup>7</sup>で結合される。ホスホラミダイト色素試薬I I Iは、基質を本発明の単一蛍光色素で標識化する。この基質がオリゴヌクレオチドである場合、この色素は、3'方向から5'方向の合成の結果として、このオリゴヌクレオチドの5'末端で結合される。他のホスホラミダイト色素試薬(ヌクレオシド性および非ヌクレオシド性)により、オリゴヌクレオチドの他の部

位（例えば、3'末端、核酸塩基、ヌクレオチド間結合、糖）における標識化が可能になる。核酸塩基、ヌクレオチド間連鎖、および糖部位での標識化により、蛍光色素での内部標識化および複数標識化が可能となる。

#### 【0092】

これらの色素は、非ヌクレオシド性ホスホラミダイト色素標識試薬（例えば、図7で示したもの）に変換され得る。この色素がカルボキシル基を含有する場合、そのカルボキシルは、例えば、NHSに活性化され得、そして6-アミノ、1-ヘキサノールでアミド化され得る。得られるヒドロキシルは、ビス（ジ-イソプロピルアミノ）シアノエチルホスファイトまたはクロロジイソプロピルアミノシアノエチルホスフィンでホスフィチル化（phosphitylate）され得、そのホスホラミダイト色素標識試薬が得られる（Theisen（1992年）「Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides」、Nucleic Acid Symposium Series No.27, Oxford University Press, Oxford, 99~100頁）。あるいは、この色素のカルボキシル基は、ヒドロキシルに還元され、ホスフィチル化され得る。2種の代表的なホスホラミダイト-色素試薬は、図7で示されている。

#### 【0093】

ホスホラミダイト色素試薬IIIは、穏やかな酸活性化下にて、ヒドロキシル基（例えば、固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドの5'末端OH）と反応して、ヌクレオチド間ホスファイト基を形成し、これは、次いで、ヌクレオチド間ホスフェート基に酸化される。ある場合には、この色素は、構造Iにおいて、官能基（例えば、C3およびC7アミン）を含有し得、これらは、このホスホラミダイト試薬の合成中またはそれをオリゴヌクレオチドのような分子を標識するのに使用している間のいずれかにて、保護が必要である。使用する保護基は、これらの官能基の性質に依存しており、当業者に明らかである（Greene, T. およびWuts, P. Protective Groups in Organic Synthesis, 2版, John Wiley & Sons, N

ew York, 1991年)。一般に、使用する保護基は、オリゴヌクレオチド合成において5'-ヒドロキシル保護基(例えば、ジメトキシトリチル)を除去するのに通例使用される酸性条件(例えば、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸)下にて安定であり、また、固体支持体から合成オリゴヌクレオチドを脱保護および/または開裂するのに使用される塩基性条件(水酸化アンモニウム、水性メチルアミン)下にて不安定であるべきである。

#### 【0094】

通常の手順を使用して、このオリゴヌクレオチドのアデニンおよびシトシンの環外アミンは、ベンゾイル(bz)で保護でき、また、グアニンの環外アミンは、ジメチルホルムアミド(dmf)またはイソブチリル(ibutyl)で保護できる。好ましくは、この核酸塩基は、穏やかな塩基性条件下で容易に除去される基で保護される。例えば、dA<sup>bz</sup>、dC<sup>bz</sup>、dG<sup>dmf</sup>およびTホスホラミダイトで合成されるオリゴヌクレオチド(およびそれらの対応する3'ヌクレオシド固体支持体)は、65℃で、濃水酸化アンモニウム中にて、60分で開裂および脱保護できる。

#### 【0095】

##### (V.4A ペプチド/タンパク質標識化)

アミノ酸およびアミノ酸アナログから構成されるペプチド、タンパク質、抗体、および他の生体高分子は、本発明のスルホン化[8,9]ベンゾフェノキサジン色素と結合することにより、共有結合的に標識され得る。典型的には、この色素は、求電子形態(例えば、NHS反応性連結基)であり、これは、このペプチドの求核基(例えば、リシンのようなアミノ酸のアミノ末端またはアミノ側鎖)と反応する。あるいは、この色素は、求核形態(例えば、アミノまたはチオール反応性連結基)であり得、これは、このペプチドの求電子基(例えば、アミノ酸のカルボキシル末端またはカルボキシル側鎖のNHS)と反応し得る。標識したペプチド、タンパク質および抗体は、細胞表面および細胞内の成分と相互作用して、それらの特異的結合特性および認識特性を保持し得る。この色素は、その結合または認識事象を局在化し、視覚化し、そして定量化する検出要素を提供する。ペプチドはまた、2個の部分、蛍光レポーターおよびクエンチャーで標識でき

、これらは、一緒になって、蛍光共鳴エネルギー移動 ( FRET ) を受ける。この蛍光レポーターは、インタクトなペプチド中のクエンチャー部分によって部分的または著しくクエンチされ得る。このペプチドがペプチダーゼまたはプロテアーゼで開裂すると、蛍光の検出可能な上昇が測定され得る ( Knight , C . ( 1995年 ) 「 Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes 」、Methods in Enzymology , Academic Press , 248 : 18 ~ 34 ) 。

#### 【0096】

これらの色素をNHSエステル形態でペプチドに結合する一般的なプロトコルは、NHSエステルを水性アクリロニトリル ( アクリロニトリルの割合は、溶解性を達成する色素の疎水性により、決定される ) に溶解し、ペプチドを水中 ( またはペプチドが疎水性であるなら、アクリロニトリル水溶液中 ) に溶解することを伴う。この溶液には、渦流化または振とうしつつ、0.1 M 緩衝液濃度を達成するために、この溶液に、水性重炭酸ナトリウム緩衝液 ( 1 M ) が添加される。この混合物は、室温で、10分間 ~ 30分間振とうされる。この反応混合物中の粗ペプチド - 色素結合体は、直接、逆相HPLCで精製できる。実施例11は、このような1結合体を説明している ( 図6 ) 。

#### 【0097】

( V . 4 B ヌクレオチド標識化 )

好ましい種類の標識化基質には、本発明の色素で標識化したヌクレオシドおよびヌクレオチドの結合体が挙げられる。このような標識化ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、酵素合成により形成されたポリヌクレオチド ( 例えば、PCR増幅、サンガー型ポリヌクレオチド塩基配列決定およびニック翻訳反応に関連して使用される標識ヌクレオチド5' - トリホスフェート ) を標識するのに特に有用である。

#### 【0098】

ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、その糖または核酸塩基部分上の部位で、標識できる。好ましい核酸塩基標識化部位には、プリン核酸塩基の8 - C、7 - デアザプリン核酸塩基の7 - Cまたは8 - C、およびピリミジン核酸塩基の5 -

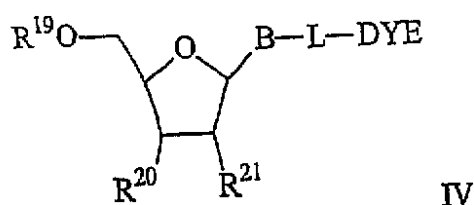
位置が挙げられる。ヌクレオシドまたはヌクレオチドと色素との間では、任意の位置で、色素に、リンカーが結合され得る。

【0099】

この標識ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、酵素的に取り込み可能であり、また、酵素的に伸長可能であり得る。本発明の色素で標識したヌクレオシドまたはヌクレオチドは、式(IV)を有し得る：

【0100】

【化26】



ここで、DYEは、エネルギー移動色素を含む、色素Iの保護形態または非保護形態である。Bは、核酸塩基(例えば、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7-デアザアデニン、グアニンおよび8-デアザグアノシン)である。R<sup>19</sup>は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、チオホスフェート、またはホスフェートエステルアナログである。R<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>は、単独で、それぞれ独立して、H、HO、Fおよびホスホラミダイトである。R<sup>20</sup>またはR<sup>21</sup>がホスホラミダイトである場合、R<sup>19</sup>は、酸開裂可能なヒドロキシル保護基(例えば、ジメトキシトリチル)であり、これにより、自動化合成条件下にて、引き続いたモノマーカップリングが可能となる(Caruthers, 「Phosphoramidite compounds and processes」、1983年11月15日に発行された米国特許第4,415,732号; Caruthers, 「Process for preparing polynucleotides」、1984年7月3日に発行された米国特許第4,458,066号; Beaucage, S. および Iyer, R. (1992年) 「Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidi

te approach」、Tetrahedron 48:2223~2311)。

【0101】

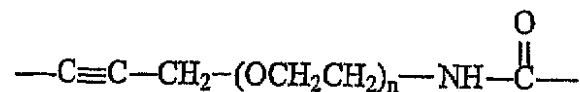
標識ヌクレオシドまたはヌクレオチドがターミネーターである場合、 $R^{20}$ および $R^{21}$ は、ポリメラーゼ媒介テンプレート指向性重合を阻止するように選択される。ターミネーターヌクレオチドでは、 $R^{20}$ および $R^{21}$ は、単独で、それぞれ独立して、H、F、およびポリメラーゼ媒介テンプレート指向性重合を阻止する部分であるか、または一緒になって、2'-3'-ジデヒドロリボースを形成する。

【0102】

リンカーLは、以下であり得る：

【0103】

【化27】



ここで、nは、0、1または2である。

【0104】

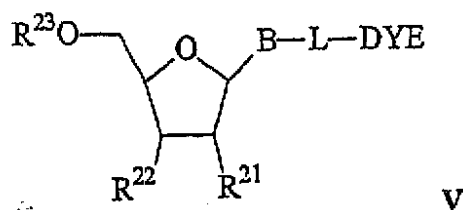
(V.4C オリゴヌクレオチドの標識化)

他の好ましい種類の標識基質には、オリゴヌクレオチドと本発明の色素との結合体が挙げられる。このような結合体は、DNA塩基配列決定プライマー、PCRプライマー、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ、オリゴヌクレオチドライゲーショントラップ、二重標識5'-エキソヌクレアーゼ(TaqMan™)プローブとしての有用性を見出し得る(Fung「Aminoderivatized phosphite and phosphate linking agents, phosphoramidite precursors, and useful conjugates thereof」、1988年7月12日に発行された米国特許第4,757,141号; Andr

us, 1995年; Hermanson, Bioconjugate Techniques, (1996年) Academic Press, San Diego, CA. 40~55頁、643-71頁; Mullah (1998年) 「Efficient synthesis of double dye-labelled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay」、Nucl. Acids Res. 26:1026~1031)。標識オリゴヌクレオチドは、式(V)を有し得る：

【0105】

【化28】

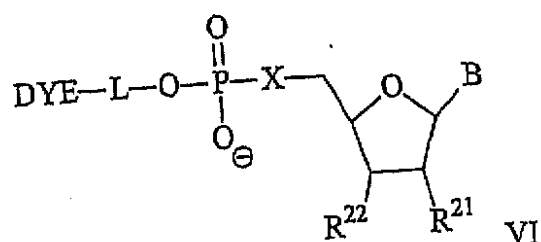


ここで、このオリゴヌクレオチドは、2個~100個のヌクレオチドを含有する。DYEは、エネルギー移動色素を含む、蛍光色素Iである。Bは、核酸塩基（例えば、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7-デアザアデニン、グアニンおよび8-デアザグアノシン）である。Lは、リンカーである。R<sup>21</sup>は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、OCH<sub>3</sub>またはOCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>である。R<sup>22</sup>は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログである。R<sup>23</sup>は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログである。この実施形態（構造V）では、この核酸塩基標識オリゴヌクレオチドは、それらの核酸塩基を介して結合された本発明の複数の色素を有し得る。核酸塩基標識オリゴヌクレオチドVは、以下により形成され得る：(i) DNAポリメラーゼまたはリガーゼによる酵素的に取り込み可能なヌクレオチド試薬IV（ここで、R<sup>19</sup>は、トリホスフェートである）の酵素的な取り込み、および(ii) 自動化合成によるヌクレオン

ドホスホラミダイト試薬のカップリング。核酸塩基標識オリゴヌクレオチドVは、1個より多い取り込み可能ヌクレオチドIVの取り込みにより複数標識され得るのに対して、色素標識試薬（例えば、III）で標識することにより、式VIに従う単一の5'標識オリゴヌクレオチドが得られる：

【0106】

【化29】



ここで、Xは、O、NHまたはSであり；R<sup>21</sup>は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アリル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルコキシ、OCH<sub>3</sub>またはOCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>であり；R<sup>22</sup>は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログであり；そしてR<sup>23</sup>は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログである。Lは、アルキル、アリールまたはポリエチレンオキシである。好ましくは、Lは、n-ヘキシルジルである。

【0107】

合成オリゴヌクレオチドを標識する第一方法では、求核官能基（例えば、第一級脂肪族アミン）は、標識結合位置で、オリゴヌクレオチド（例えば、5'末端）上に導入される。自動化した後、固体支持体合成は、完結され、そのオリゴヌクレオチドは、この支持体から開裂され、そして全ての保護基は、除去される。この求核試薬-オリゴヌクレオチドは、均一溶液条件下にて、求電子部分（例えば、イソチオシアネートまたは活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）））を含有する過剰な標識試薬と反応される（Herman son, Bioconjugate Techniques, (1996) Academic Press, San Diego, CA. 40~55頁, 643

- 71頁; Andrus, A. 「Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers」(1995) PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, 39~54頁)。

【0108】

第二の直接標識化方法では、合成前または合成中にて、このオリゴヌクレオチドに、標識が直接取り込まれる(Mullah, 「Solid support reagents for the direct synthesis of 3'-labelled polynucleotides」、1998年4月7日に発行された米国特許第5,736,626号; Nelson, 「Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis」、1992年8月25日に発行された米国特許第5,141,813号)。この直接標識化方法は、(i)合成後反応工程を必要とせず、それにより、標識ポリヌクレオチドの合成を簡単にし、そして(ii)この2段階溶液標識化方法で典型的に遭遇する低反応収率(<60%)に付随した問題、すなわち、(a)過剰な標識からの標識オリゴヌクレオチドの精製;(b)未標識オリゴヌクレオチドからの標識オリゴヌクレオチドの精製;(c)低い生成収率に起因する高いコストおよび手間のかかる分析手順および精製手順;および(d)合成中の求核官能基の非可逆的キャップ化が回避されるので、好ましい。特定の蛍光色素および他の標識は、5'標識化用のホスホラミダイト試薬として、官能化される(Theisen(1992)「Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides」、Nucleic Acid Symposium Series No.27, Oxford University Press, Oxford, 99~100頁)。

【0109】

標識オリゴヌクレオチドVIは、ホスホラミダイト試薬IIIを使った自動化

合成により、形成され得る。あるいは、標識オリゴヌクレオチドVIは、色素（例えば、4）の反応性連結基形態（例えば、NHS）と5'-アミノアルキルオリゴヌクレオチドとを反応させることにより、形成され得る。

#### 【0110】

一般に、この標識オリゴヌクレオチドが、酵素合成により作製される場合、以下の手順が使用され得る。標識DNAは、変性され、そしてオリゴヌクレオチドプライマーは、そのテンプレートDNAにアニールされる。その刺激された標的（例えば、dGTP、dATP、dCTPおよびdTTPまたはdUTPを含有する混合物）の連続テンプレート指向性酵素伸長を支持し得る酵素的に取り込み可能なヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの混合物は、刺激された標的に添加される。これらのヌクレオチドの少なくとも断片は、標識ターミネーターIVとして、色素Iで標識される。次に、そのポリメラーゼ酵素が活性である条件にて、この混合物に、ポリメラーゼ酵素が添加される。標識オリゴヌクレオチドは、ポリメラーゼ媒介ストランド合成中にて、標識ヌクレオチドまたはターミネーターの取り込みにより、形成される。代替の酵素的合成方法では、1種のプライマーの代わりに、2種のプライマーが使用される：一方は、この標的の（+）鎖に相補的であり、そして他方は、この標的の（-）鎖に相補的であり、そのポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼであり、その反応温度は、変性温度と伸長温度との間で循環され、それにより、PCRにより、その標的配列に対する標識相補体を指数関数的に合成する（Innis（1990年）PCR Protocols編、Academic Press）。

#### 【0111】

好ましい1合成後化学標識方法では、オリゴヌクレオチドは、以下のようにして標識される。構造Iに従う色素のNHS形態は、DMSOに溶解または懸濁され、そして約pH9で、0.25M重炭酸/炭酸緩衝液中にて、5'-アミノヘキシルオリゴヌクレオチドに過剰に（10～20倍）添加され、そして6時間反応される（例えば、米国特許第4,757,141号）。色素標識オリゴヌクレオチドVIIは、緩衝液（例えば、0.1モル濃度のトリエチルアミン酢酸塩（TEAA））で溶出するサイズ排除クロマトグラフィーカラムに通すことにより

、未反応色素から分離できる。粗標識オリゴヌクレオチドVIIを含有する画分は、勾配溶離液を使用する逆相HPLCにより、さらに精製される。

#### 【0112】

(V.5A 細胞表面およびビーズベースのアッセイ方法)

本発明のスルホン化3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素および試薬は、細胞表面レセプターアッセイによく適している。これらの色素はまた、広範囲の状況(例えば、溶液中、ビーズ上、全細胞アッセイにおいて、フローサイトメトリーにおいて、電気泳動ゲルマトリックスにおいて、プロットにおいてなどを含めて)において、細胞表面成分の引き続いた検出のために、基質(例えば、ペプチド、タンパク質およびポリヌクレオチド)を標識するのに使用できる。

#### 【0113】

細胞蛍光強度の直接定量化および蛍光標識事象(例えば、ペプチド-色素結合体の細胞表面結合)の列挙は、生体細胞またはビーズでミックスアンドリード(mix-and-read)非放射活性アッセイを自動化するシステム(FMAT<sup>TM</sup>8100 HTS System PE Biosystems, Foster City, CA)上で行われ得る(Miraglia, 「Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology」、(1999年)J. of Biomolecular Screening 4:193~204)。本発明の色素は、赤色スペクトル領域で検出され、プレート細胞またはスクリーニング化合物から生じる青緑レーザーシステムを使用して伝統的に遭遇する高い背景蛍光を最小にする。この技術は、細胞上またはその内部に存在しているレセプターへの蛍光標識基質(例えば、本発明の色素で標識したペプチドおよびタンパク質)の結合を測定するのに使用される。本発明の色素を使用する用途には、また、細胞表面レセプター結合アッセイ、免疫捕捉アッセイ、蛍光連結免疫吸着アッセイ(FLISA)、カスパーゼ開裂(Zheng, 「Caspase-3 controls both cytopla

smic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo」、(1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23)、アポトーシス(Vermes, 「A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V」(1995年) J. Immunol. Methods 184:39~51)、および細胞障害性アッセイが挙げられる。蛍光定量微小容量(microvolume)アッセイ技術は、その細胞表面に標的化した分子による上方制御または下方制御を確認するために使用され得る(Swartzman, 「A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology」、(1999年) Anal. Biochem. 271:143-51)。

#### 【0114】

本発明の色素はまた、非細胞ベースアッセイ、例えば、酵素アッセイ、タンパク質または他の標的への化合物の結合を検出するための薬剤スクリーニングアッセイ、および臨床試料中のタンパク質、ペプチドまたは核酸のアッセイで使用され得る。例えば、これらの色素は、捕捉タンパク質(capture protein)(例えば、ストレプトアビジン)を標識するのに使用され得る。得られる色素-共役物は、基質のペプチドまたはタンパク質に結合されるビオチン標識抗体で結合できる。免疫捕捉アッセイでは、第二抗体は、固体担体(例えば、ビードまたは粒子)に固定化または被覆される。第二抗体がまた、この基質のペプチドまたはタンパク質を結合するとき、このビードに由来の蛍光は、測定できる。未結合色素-共役物からの未結合蛍光は、その画像分析検出アルゴリズムにより無視され、分離工程および洗浄工程が除かれる。

#### 【0115】

## (V.5B 核酸検出法)

非同位体的に標識したオリゴヌクレオチドは、多くの重要な分子生物学的用途（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、DNA塩基配列決定、遺伝子発現のアンチセンス転写および翻訳制御、遺伝分析およびDNAプローブベースの診断試験）における必須成分である（Kricka, L. (1992年) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, San Diego, 3~28ページ）。蛍光色素標識オリゴヌクレオチドの蛍光検出は、核酸配列検出アッセイ、例えば、5'エキソヌクレアーゼアッセイ（Livak, 「Self-quenching fluorescence probe」、1998年3月3日に発行された米国特許第5,723,591号）、FRETハイブリダイゼーション（Tyagi, S. and Kramer, F. (1996年) 「Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridization」、*Nature Biotechnology*, 14:303-08）、遺伝連鎖マッピング（Dib (1996年) 「A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites」、*Nature* 380:152-54）およびオリゴヌクレオチド-連結アッセイ（Grossman (1994年) 「High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation」、*Nucl. Acids Res.* 22:4527-34）の基準である。

## 【0116】

本明細書中で「断片分析」法または「遺伝分析」法と呼ばれる方法の好ましい範疇では、スルホネート3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素で標識したポリヌクレオチド断片は、例えば、連結またはポリメラーゼ方向プライマー伸長により、標識したプライマーまたはヌクレオチドを使用して、テンプレート方向酵素合成により、生成される；この断片は、サイズ依存分離プロ

セス(例えば、電気泳動またはクロマトグラフィー)にかけられる;そして、分離した断片は、その分離に続いて、例えば、レーザーで誘発した蛍光により、検出される(Hunkapiller, 「Real time scanning electrophoresis apparatus for DNA sequencing」、1989年3月7日に発行された米国特許第4,811,218号)。特に好ましい実施形態では、複数の種類のポリヌクレオチドが同時に分離され、それらの異なる種類は、本発明の色素を含めて、スペクトル分解可能な標識により、識別される。

#### 【0117】

好ましくは、DNA塩基配列決定(すなわち、ジデオキシDNA塩基配列決定またはサンガー型塩基配列決定)のチェーンターミネーター法が使用される(Sanger(1977)「DNA sequencing with chain-terminating inhibitors」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467)。代表的な鎖終結ヌクレオチド類似物には、2',3'-ジデオキシヌクレオシド5'トリホスフェート(ddNTP)が挙げられ、これらは、3' 5' DNA鎖伸長に必要な3'-OH基を欠いている。プライマーまたはddNTPは、本発明の色素で標識されて、高解像度電気泳動でそれらの断片を分離した後、蛍光により検出され得る。色素は、このプライマーの5'末端上の官能基、例えば、プライマーの核酸塩基上(Fung, 「Amino-derivatized phosphite and phosphate linking agents, phosphoramidite precursors, and useful conjugates thereof」、1998年7月12日に発行された米国特許第4,757,141号)、または、例えば、アルキニルアミノ連結基を介して、ジデオキシヌクレオチドの核酸塩基上(Khan, 「Substituted propargylethoxyamido nucleosides, oligonucleotides and methods for using same」、1998年6月23日に発行された米国特許第5,770,716号および1998年10月13日に発行された米国特許第5,821,356号

; Hobbs, F. and Trainor, G. 「Alkynyl amino-nucleotides」、1992年9月29日に発行された米国特許第5,151,507号)のアミノ基に結合できる。

【0118】

これらのターミネーターの各々は、異なる蛍光色素を有し、また、集合的に、この実験のターミネーターは、本発明の色素に由来のものの1種またはそれ以上を含めて、1セットの色素を有する。好ましい断片分析法では、色素で標識した断片は、相対的なサイズ(すなわち、配列長さ)で同定される。断片サイズと配列との間の対応は、4個の可能な終止塩基(「ターミネーター」と1セットのスペクトル分解可能な色素のメンバーとを取り込むことにより、確立される(Bergot, 「Spectrally resolvable rhodamine dyes for nucleic acid sequence determination」、1994年11月22日に発行された米国特許第5,366,860号)。

【0119】

リガーゼ酵素による核酸プローブの共有結合による接合は、分子生物学に利用できる最も有用な手段の1つである。2個のプローブをテンプレート核酸にアニールするとき(この場合、これらの2個のプローブは、隣接しており、介在するギャップがない)、一方のプローブの5'末端と他方のプローブの3'末端との間では、リガーゼ酵素により、ホスホジエステル結合が形成できる(Whitley, 「Detection of specific sequences in nucleic acids」、1989年に発行された米国特許第4,883,750号; Landegren, (1988) 「A ligase mediated gene detection technique」、Science 241:1077-80; Nickerson, 「Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide assay」(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-27)。オリゴヌクレオチド連結アッセイは、標的DNA試料における特異的配列の存在を検出

する。一方または両方のプローブを色素で標識する場合、その連結産物は、蛍光で検出され得る。

#### 【0120】

本発明の色素で標識したポリヌクレオチドは、さらに、電気泳動移動速度に影響を与える部分（すなわち、移動度調節標識）で標識され得る。移動度調節標識には、ポリエチレンオキシ単位、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ が挙げられ、ここで、 $n$ は、1~100であり得る（Grossman, 1997年4月29日に発行された米国特許第5,624,800号）。好ましくは、 $n$ は、2~20である。これらのポリエチレンオキシ単位には、ホスフェート基が点在され得る。具体的には、個々の公知のサイズを有するポリエチレンオキシの追加標識でスルホネート3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素標識ポリヌクレオチドを標識することで、このポリヌクレオチドにあるヌクレオチドの数とは実質的に無関係に、電気泳動による分離が可能となる。すなわち、同じ長さのポリヌクレオチドは、分光的に分解可能な色素標識および移動調節標識に基づいて、識別され得る。色素標識および移動度調節標識の両方を有するポリヌクレオチドは、単一標識ポリヌクレオチドまたはヌクレオチド成分の連結またはポリメラーゼ伸長により、酵素的に形成され得る。

#### 【0121】

電気泳動分離に引き続いて、これらの色素-ポリヌクレオチド共役物は、この色素標識ポリヌクレオチドからの蛍光放射を測定することにより、検出される。このような検出を実行するために、これらの標識ポリヌクレオチドは、標準手段（例えば、高強度水銀灯、レーザーなど）により、照射される。好ましくは、この照射手段は、約600nmより長い波長で照射ビームを有するレーザーである。さらに好ましくは、これらの色素-ポリヌクレオチドは、He-Neガスまたは固体状態ダイオードレーザーにより発生するレーザー光により、照射される。この蛍光は、次いで、レーザー感受性検出器（例えば、光電子増倍管、電荷結合素子など）により、検出される。代表的な電気泳動検出システムは、他の文献で記述されている（Hoff, 'Real-time scanning fluorescence electrophoresis apparatus

for the analysis of polynucleotide fragments」、1996年8月6日に発行された米国特許第5,543,026号; Mathies, 「Capillary array confocal fluorescence scanner and method」、1993年12月28日に発行された米国特許第5,274,240号; Hun kapiller, 「Real time scanning electrophoresis apparatus for DNA sequencing」、1989年3月7日に発行された米国特許第4,811,218号)。

#### 【0122】

(VI.6 キット)

本発明は、本発明のスルホネート3,7-ジアミノ-[8,9]ベンゾフェノキサジン色素および/またはそれらの標識共役物を含むキットを包含する。1実施形態では、これらのキットは、本発明の色素を他の分子(すなわち、基質)に結合するのに有用である。このようなキットは、一般に、本発明の色素を含み、これは、この色素を他の分子または物質に結合するのに適切な任意の連結部分および試薬、酵素、緩衝液、溶媒などを含有する。

#### 【0123】

1実施形態では、これらのキットは、酵素的に合成したオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを本発明の色素で標識するのに有用である。このようなキットは、一般に、本発明の標識した酵素的に取り込み可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似物、連続プライマー伸長を支持できる酵素的に取り込み可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似物の混合物およびポリメラーゼ酵素を含有する。好ましくは、この標識した酵素的に取り込み可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似物は、構造IVによる化合物、最も好ましくは、標識ターミネーターである。好ましいポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼ(例えば、AMPLITAQ(登録商標)DNAポリメラーゼFA(PE Biosystems, Foster City, CA))である。

#### 【0124】

他の実施形態では、これらのキットは、合成ポリヌクレオチドを本発明のホス

ホラミダイト色素で標識するのに有用である。このようなキットは、一般に、ホスホラミダイト色素試薬、他の合成試薬および/または固体支持体（これは、必要に応じて、オリゴヌクレオチド合成を実行するためにある）を含有する（Andrus, 「Automated system for polynucleotide synthesis and purification」1993年11月16日に発行された米国特許第5,262,530号）。

#### 【0125】

他のキット実施形態では、本発明の色素および抗体被覆ビーズで標識したペプチドまたはタンパク質を含むキットは、ビードベース免疫捕捉アッセイに有用である。本発明の色素で標識したペプチドまたはタンパク質と共役物を細胞の表面レセプターに結合する試薬とを含むキットは、細胞表面レセプター検出に有用である。

#### 【0126】

##### （V.7 実施例）

本発明が記述されているが、以下の実施例は、限定ではなく例示の目的で、提供されている。

#### 【0127】

##### （実施例1 1の合成）

Nile Blue Chloride (Aldrich, 約90%、1.18g、3mmol)を、水100ml中にて、65 で、30分間懸濁した。0.5M NaOH水(100ml)を添加した。この塩基性色素を、塩化メチレンで3回(100mlごと)抽出した。それらの有機層を合わせ、そして無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。蒸発させた後、遊離塩基1を、オイルポンプで、一晚乾燥した(図2)。

#### 【0128】

##### （実施例2 2の合成）

遊離塩基1(200mg、0.63mmol)を、無水トルエン20mlに溶解した。炭酸カリウムK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Aldrich、260mg、1.89mmol)および6-プロモヘキサン酸エチル(Aldrich、336μl、1.

89 mmol) を添加した。この混合物を、アルゴン下にて、18時間還流した。冷却後、この混合物を、フラッシュシリカゲルカラム ( 溶離液として90%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  ) で精製した。290 mg の化合物Bを得た ( 収率71% ) 。M+1の計算値460.3、実測値460.5 ( 図2 ) 。

#### 【0129】

##### ( 実施例3 3の合成 )

化合物2 ( HCl塩、10 mg、20  $\mu\text{mol}$  ) および無水硫酸ナトリウム ( Aldrich、300 mg ) を、塩化メチレン ( 2 ml ) およびクロロスルホン酸 ( Aldrich、2 ml ) に添加した。この混合物を、70 で、4時間攪拌した。次いで、さらに多くのクロロスルホン酸 ( 20 ml ) および無水硫酸ナトリウム ( 600 mg ) を追加した。この混合物を、70 で、さらに18時間攪拌した。冷却した後、この反応混合物を氷 ( 約100 g ) に滴下した。その溶液を水 ( 50倍 ) で希釈し、そして逆相HPLCカラムに直接装填した。

#### 【0130】

一般に、逆相HPLCは、以下の条件下にて、行った：流速：4 ml / 分。移動相：緩衝液A：水中の0.1% TFA；緩衝液B：アセトニトリル中の0.085% TFA。勾配：緩衝液Bは、15分で、0% ( 100%の緩衝液A ) から70% ( 30%の緩衝液A ) まで直線的に増加させ、次いで、緩衝液Bを2分で、100%まで直線的に増加させた。緩衝液Bを2分間流した後、緩衝液Bを、2分で、0%まで直線的に減少させた。検出器：630 nm ( または、もし、化合物が赤色蛍光色素でなかったなら、280 nm ) 。

#### 【0131】

蒸発させ乾燥した後、10 mg の化合物Cを得た ( 収率89.6% ) 。M+1の計算値512.2、実測値512.3 ( 図2 ) 。

#### 【0132】

##### ( 実施例4 4の合成 )

化合物3 ( トリフルオロ酢酸塩、10 mg、16  $\mu\text{mol}$  ) を、DMF ( 2 ml ) に溶解した。O - ( N - スクシンイミジル ) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート ( TSTU ) ( Fluka、60 mg

、200  $\mu\text{mol}$  ) およびトリエチルアミン ( Aldrich、2.0  $\mu\text{l}$ 、14  $\mu\text{mol}$  ) を添加した。この混合物を、室温で、30分間攪拌した。この混合物を、逆相HPLCで精製した。そのHPLC結果によれば、3の全ては、4に転化された。化合物4の励起最大波長は、643 nmであり、また、発光最大波長は、680 nmであった。M+1の計算値609.2、実測値609.3 ( 図2 )。

#### 【0133】

( 実施例5 5の合成 )

2-ニトロソ-5-ジメチルアミノフェノール塩酸塩 ( TCI America、203 mg、1 mmol )、1-アミノアントラセン ( Aldrich、193 mg、1 mmol ) および塩酸 ( Aldrich、37重量%、2 ml、24 mmol ) を、エタノール ( 100 ml ) に溶解した。この混合物を、18時間還流した。冷却後、それらの溶媒を、圧力下にて、除去した。その残留物を、フラッシュシリカゲルカラム ( 溶離液として、10%メタノール/90%塩化メチレン/0.1%酢酸 ) で精製して、5を得た。M+1の計算値340.1、実測値340.3 ( 図3 )。

#### 【0134】

( 実施例6 6の合成 )

メタノール ( 2 ml ) 中の化合物5 ( 酢酸塩、30 mg、75  $\mu\text{mol}$  ) を、0.5 mM水酸化ナトリウム水溶液30 mlに添加した。5の塩基形状は、クロロホルム抽出、蒸発および乾燥で得た。この塩基性色素に、炭酸カリウム ( Aldrich、138 mg、1 mmol )、6-ブロモヘキサン酸エチル ( Aldrich、178  $\mu\text{l}$ 、1 mmol ) および無水トルエン ( 50 ml ) を添加した。この混合物を、18時間還流した。冷却後、圧力下にて、揮発性試薬を除去した。その残留物を、フラッシュシリカゲルカラム ( 溶離液として、10%メタノール/90%塩化メチレン/0.1%酢酸 ) で精製して、6を得た。M+1の計算値482.2、実測値482.3 ( 図3 )。

#### 【0135】

( 実施例7 7の合成 )

化合物6 (酢酸塩、10 mg、18  $\mu\text{mol}$ )、無水硫酸ナトリウム (500 mg) を、クロロスルホン酸 (Aldrich、4 ml) に添加した。この混合物を、70 °C で、14時間攪拌した。冷却後、この混合物を、濡れた氷 (150 g) に滴下した。その溶液を、次いで、60 °C で、3時間攪拌した。水 (50倍) で希釈した後、この溶液を、逆相HPLCカラムに直接装填し、純粋な7を得た。7の励起最大波長は、650 nmであり、また、発光最大波長は、698 nmである。M + 1の計算値614.1、実測値614.3 (図4)。

**【0136】**

(実施例8 8の合成)

化合物7 (TFA塩、1 mg、1.4  $\mu\text{mol}$ ) を、DMF (2 ml) に溶解した。TSTU (60 mg、200  $\mu\text{mol}$ ) および重炭酸ナトリウム (Aldrich、8.0 mg) を添加した。この混合物を、2時間にわたって、アルゴンで絶えずパージした。この反応混合物を、逆相HPLCで精製して、8を得た。M - 1の計算値709.1、実測値709.3 (図4)。

**【0137】**

(実施例9 9の合成)

8 - アミノ - 2 - ナフタレンスルホン酸 (Aldrich、1.115 g、5 mmol)、6 - ブロモヘキサン酸エチル (1.067 ml、6 mmol) および1,8 - ビス (ジメチルアミノ) ナフタレン (「プロトンスポンジ」 Aldrich、2.14 g、10 mmol) を、無水アセトニトリル (150 ml) に溶解した。この混合物を、アルゴン下にて、18時間還流した。その溶媒を蒸発させ、その残留物を逆相HPLCで精製して、9を得た。化合物IのMS、M - 1の計算値364.1、実測値364.0 (図5)。

**【0138】**

(実施例10 10の合成)

3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - ニトロソ - N - プロピルアニリノ) プロパン - スルホン酸 (Fluka、302 mg、1 mmol) および8 - アミノ - 2 - ナフタレンスルホン酸 (Aldrich、223 mg、1 mmol) を、エタノール (200 ml) および塩酸 (37重量%、4 ml) に溶解した。この混合物を、

18時間還流した。その溶媒を蒸発させた後、その残留物を、逆相HPLCで精製して、10を得た(図6)

(実施例11 11の合成)

Model 433 Peptide Synthesizer (PE Biosystems, Foster City, CA)およびFmoc/HBTU化学反応(Fields, G. and Noble, R. (1990年)「Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids」、Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161~214)を使って、典型的な固相ペプチド合成により、クロロトリチルポリスチレン樹脂上で、DEVDPепチド: Acetyl-Asp(But)Glu(But)ValAsp(But)-COOHを調製した。樹脂上の粗製保護ペプチドを、10分間、塩化メチレン中の1%TFAで切断した。濾液のpHを、4-ジメチルアミノピリジンを用いて8にすぐに上げた。揮発性の試薬を蒸発させた後、粗製保護ペプチド(Acetyl-Asp(But)Glu(But)ValAsp(But)-COOH)を得、直接使用してスルホネート[8, 9]ベンゾフェノキサジン色素に結合させた。

【0139】

粗製保護ペプチドDEVDPепチド: Acetyl-Asp(But)Glu(But)ValAsp(But)-COOH(SEQ. ID NO. 1)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス(ジメチル-アミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)(Advanced ChemTech、22mg、50μmol)および色素10(TFA塩、1mg、1.6μmol)を、DMF(200μl)に溶解した。この混合物を、室温で、72時間振盪した。その溶媒を完全に除去し、その残留物を、塩化メチレン中の30%TFAで、30分間脱保護した。蒸発後、この混合物を逆相HPLCで精製して、11を得た。質量分光分析: M+1の計算値1006.5、実測値1006.3(図6)。

【0140】

(実施例12、12の合成)

化合物9 (4.3 mg、12  $\mu\text{mol}$ ) および3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - ニトロソ - N - プロピルアニリノ) プロパン - スルホン酸 (Fluka、7.2 mg、24  $\mu\text{mol}$ ) を、エタノール (50 ml) および塩酸 (37 重量%、4 ml) に溶解した。この混合物を、18時間還流した。この反応混合物を逆相HPLCで精製して、12を得た。質量分光分析：M+1の計算値620.2, 実測値620.3 (図5)。

**【0141】**

(実施例13 13の合成)

化合物12 (1 mg、1.6  $\mu\text{mol}$ )、TSTU (100 mg、0.33 mmol) およびトリエチルアミン (2.23  $\mu\text{l}$ 、16  $\mu\text{mol}$ ) を、DMF (5 ml) に溶解した。この混合物を、1時間、アルゴンで絶えずパージした。この混合物を、逆相HPLCで精製して、13を得た。質量分光分析：M+1の計算値717.2, 実測値717.3 (図5)。

**【0142】**

(実施例14 Substance Pペプチドの色素共役物14、15、16、17の合成)

Substance Pペプチド：

$\text{H}_2\text{N} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Lys}^3 - \text{Pro} - \text{Gln} - \text{Gln} - \text{Phe} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Leu} - \text{Met} - \text{CONH}_2$  (SEQ. ID NO. 2) を、実施例11の方法で調製した。スルホネート [8, 9] ベンゾフェノキサジン色素のNHS形態 (例えば、4、8、13) を調製し、そして室温で10分間~1時間振盪して、 $\text{NaHCO}_3$  を含有する水性アクリロニトリル中にて、Substance Pペプチドのリシン<sup>3</sup>の側鎖アミノ基にカップリングした。逆相HPLCにより、共役色素 - ペプチド (図11Aおよび図11B) を精製した。

**【0143】**

(実施例15 4およびNeuropeptide Yに由来の色素共役物18の合成)

Neuropeptide Y：

$\text{H}_2\text{N} - \text{Tyr} - \text{Pro} - \text{Ser} - \text{Lys}^4 - \text{Pro} - \text{Asp} - \text{Asn} - \text{Pr}$

o - G l y - G l u - A s p - A l a - P r o - A l a - G l u - A s p - M e t - A l a - A r g - T y r - T y r - S e r - A l a - L e u - A r g - H i s - T y r - I l e - A s n - L e u - I l e - T h r - A r g - G l n - A r g - T y r - C O N H <sub>2</sub> ( S E Q . I D N O . 3 ) を、実施例11の方法により、調製した。スルホネート [ 8 , 9 ] ベンゾフェノキサジン色素4のNHS形態を、室温で10分間振盪して、NaHCO<sub>3</sub>を含有する水性アセトニトリル中にて、Neuropeptide Yのリシン<sup>4</sup>の側鎖アミノ基にカップリングした。逆相HPLCにより、共役色素 - ペプチド18 ( 図11B ) を精製した。

#### 【0144】

本発明は、今ここで、詳細に記述したが、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、それに多くの変更および改変を行うことができることは、当業者に明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、本発明に従う化合物19～23を調製するための一般的な合成経路を示す。

##### 【図2】

図2は、化合物1～4でNHSエステル4の合成経路を示す。

##### 【図3】

図3は、5を形成する環化反応および中間体6を形成するアルキル化を示す。

##### 【図4】

図4は、7を形成するスルホン化反応およびNHSエステル8を形成する活性化を示す。

##### 【図5】

図5は、9を形成するアルキル化、12を形成する環化およびNHSエステル13を形成する活性化を示す。

##### 【図6】

図6は、例示的な保護DEVDPепチド結合体11の形成を示す。

##### 【図7】

図7は、本発明の例示的なホスホラミダイト化合物を示す。

【図8】

図8は、本発明の特定の例示的な化合物の質量分析結果を示す。

【図9】

図9は、特定の間体化合物の質量分析結果を示す。

【図10】

図10は、本発明の特定の例示的な化合物を示す。

【図11A】

図11Aは、本発明に従う5種の例示的なポリペプチド - 色素結合体14 ~ 18を示す。

【図11B】

図11Bは、本発明に従う5種の例示的なポリペプチド - 色素結合体14 ~ 18を示す。

【図1】

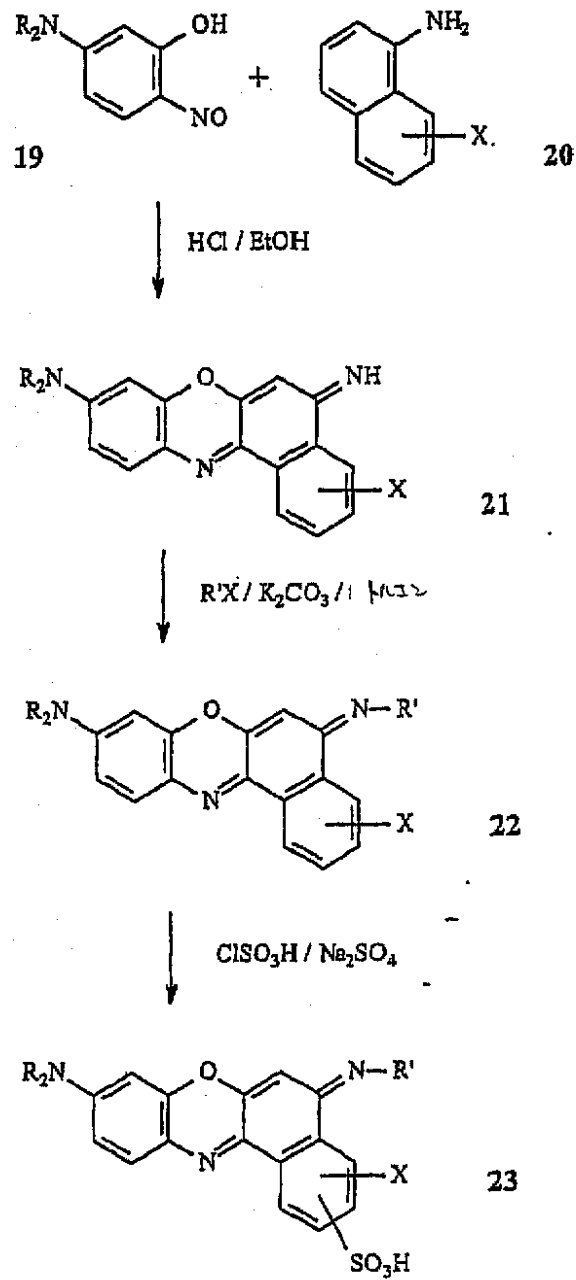


Figure 1

【図2】

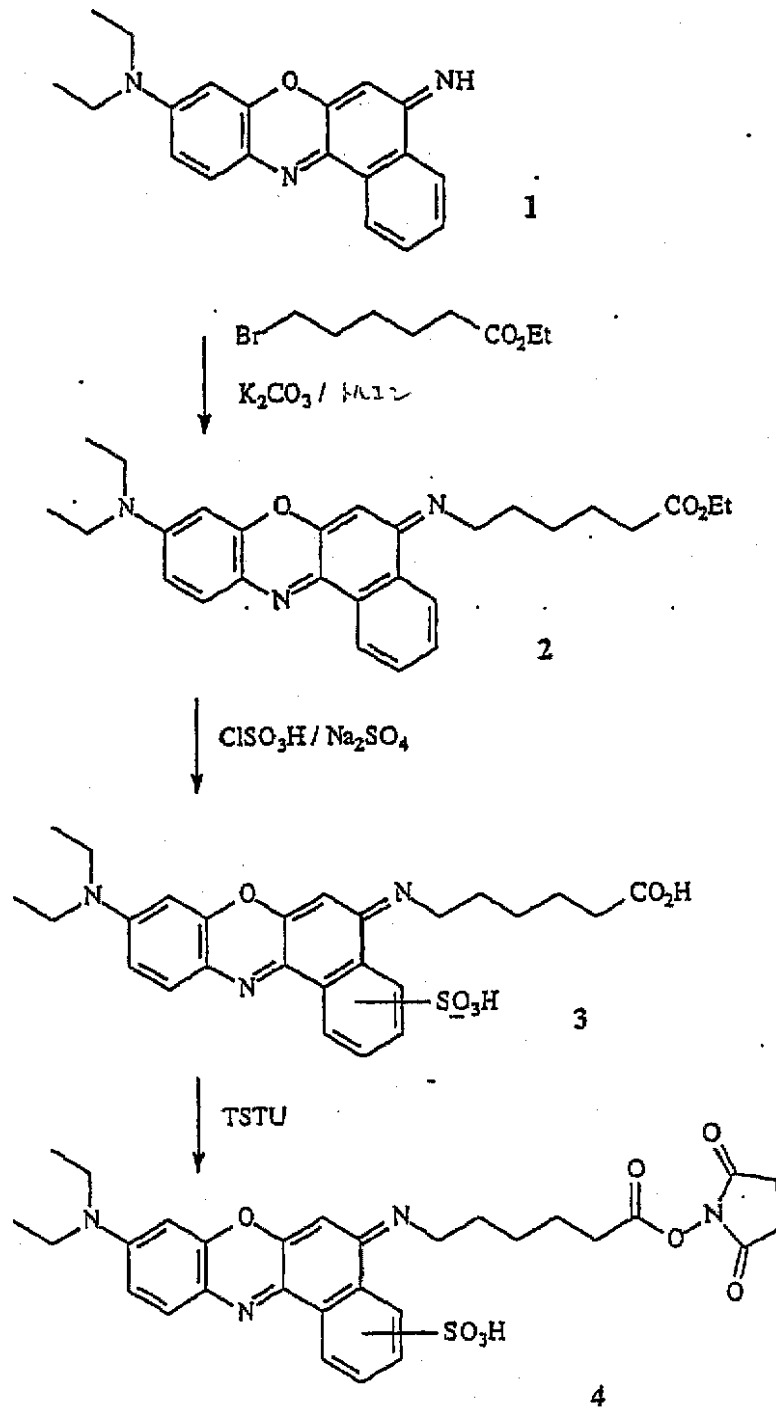


Figure 2

【図3】

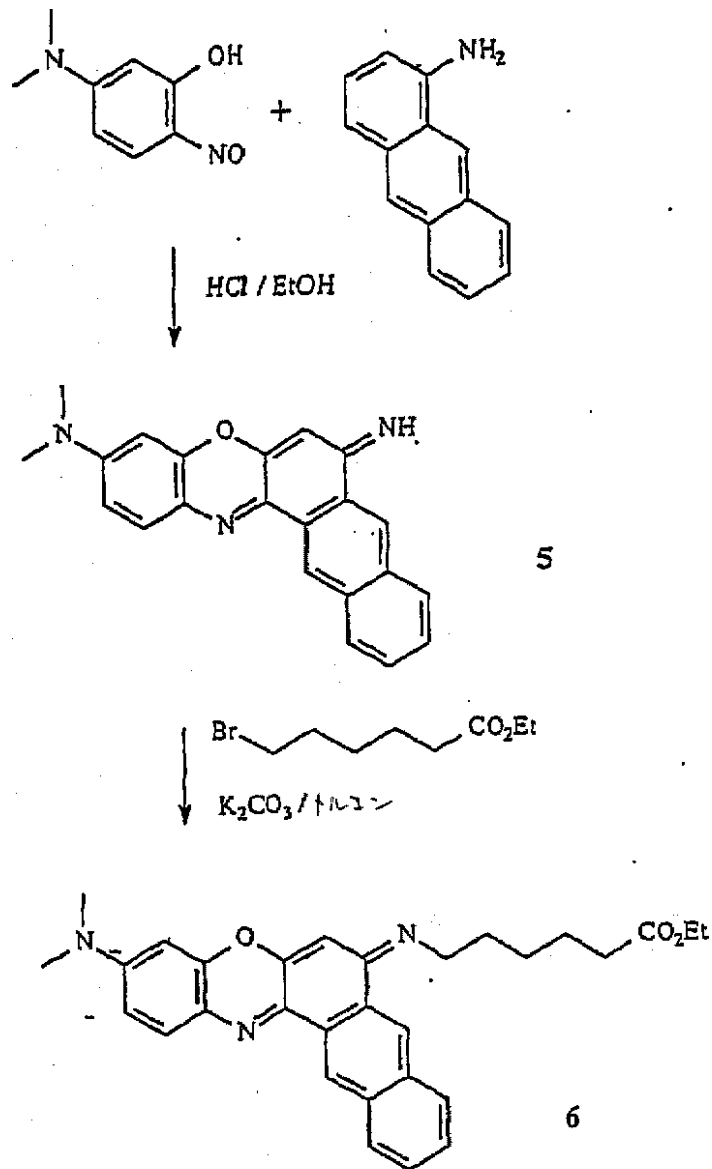


Figure 3

【圖4】

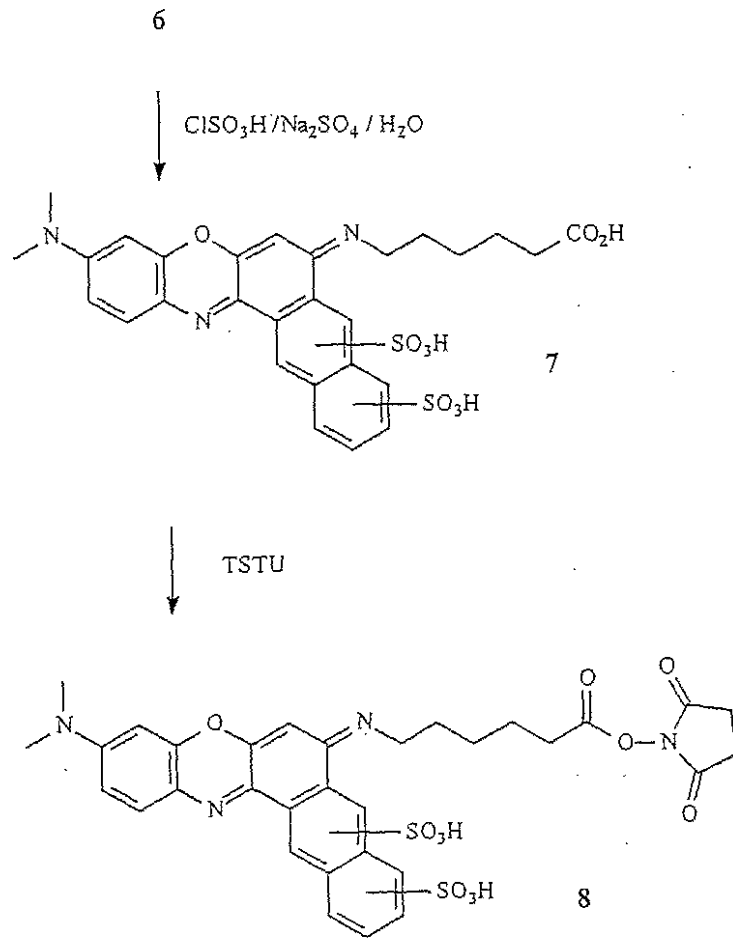


Figure 4

【図5】

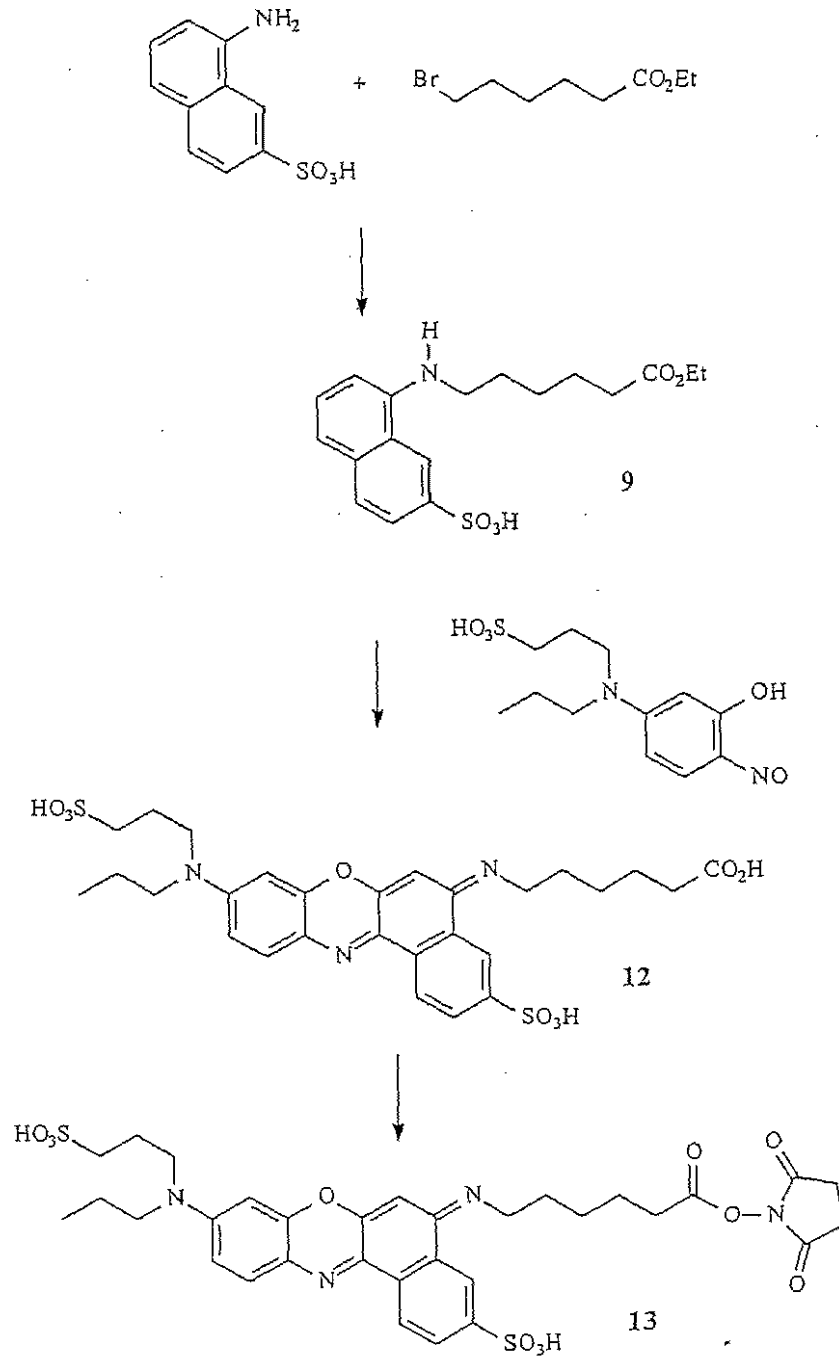


Figure 5

【図6】

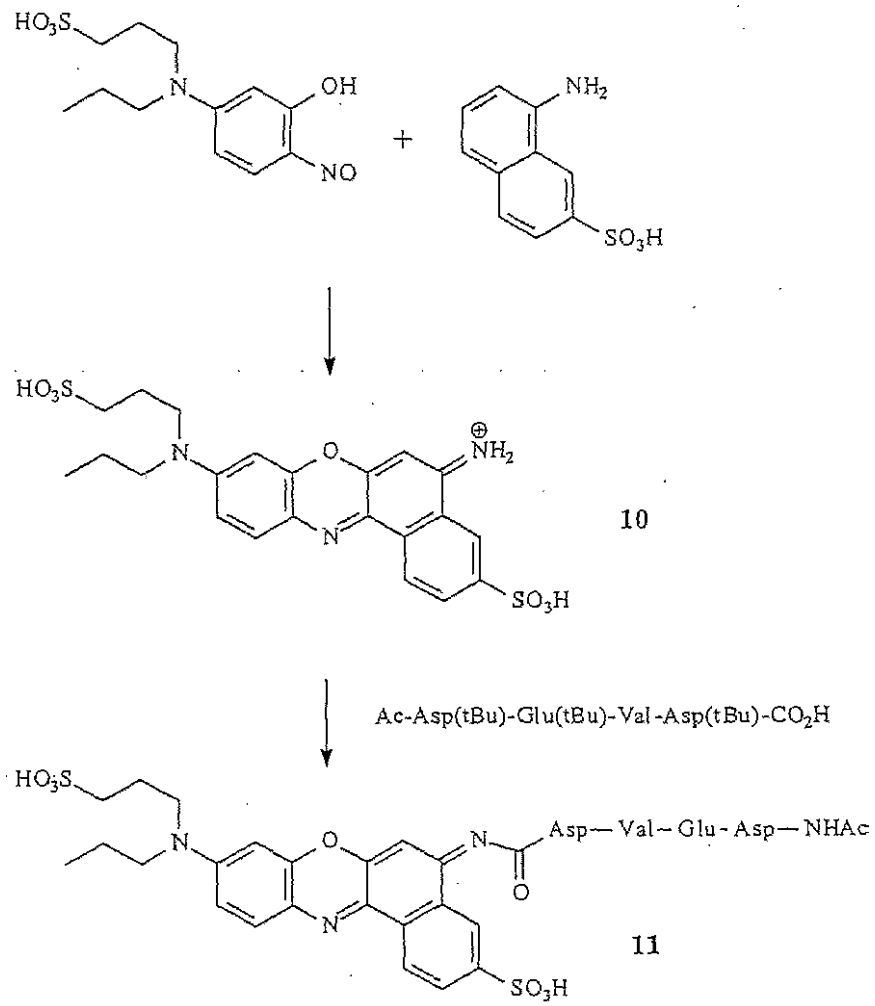


Figure 6

【図7】

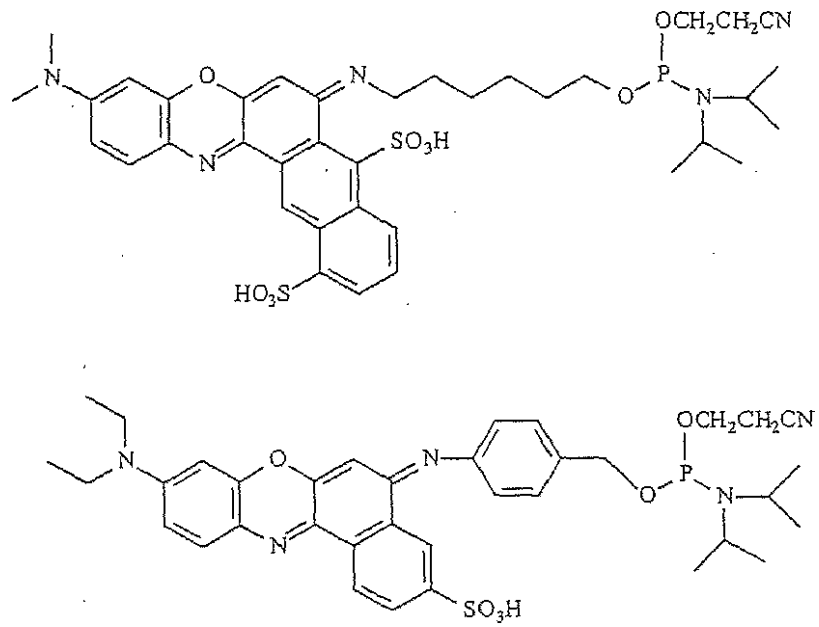


Figure 7

【圖8】

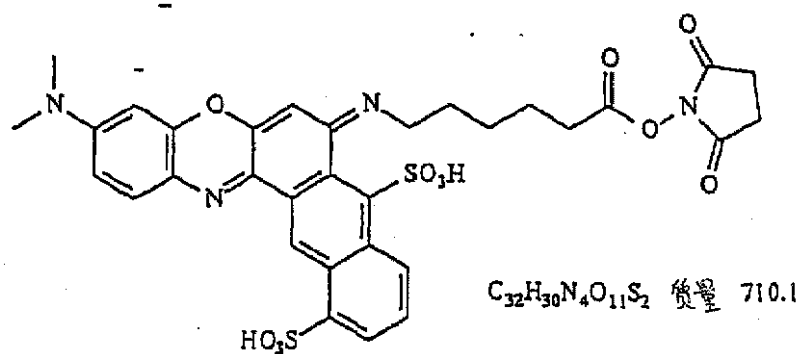
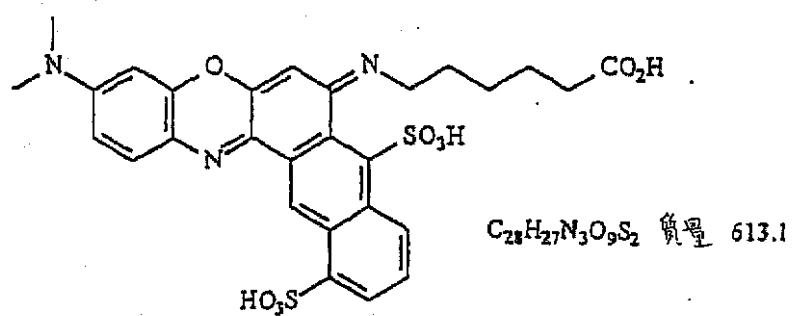
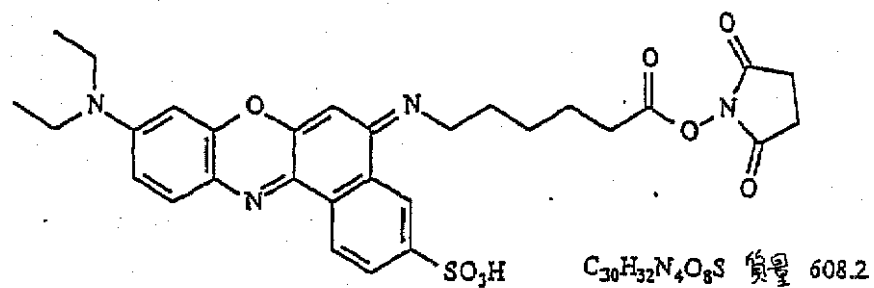
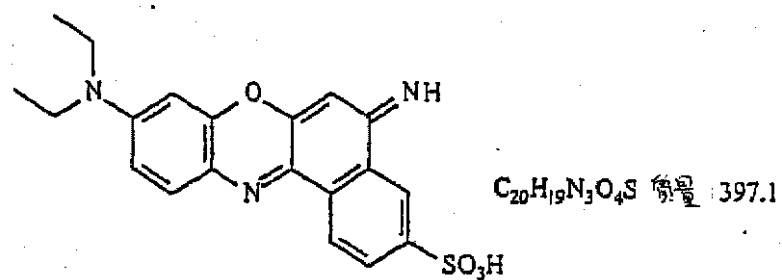


Figure 8

【圖9】

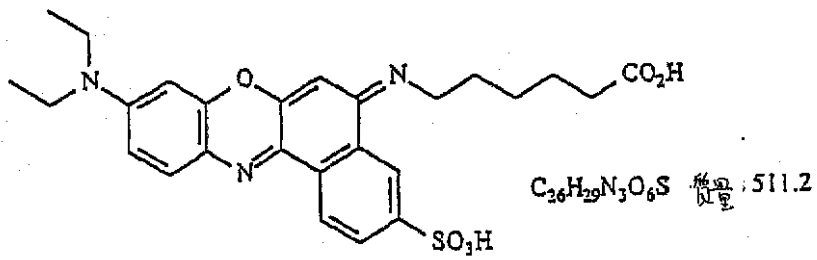
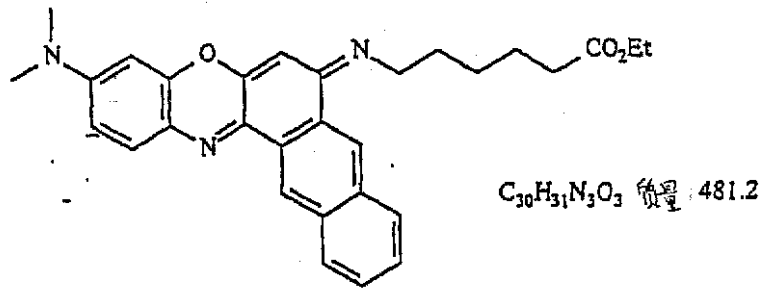
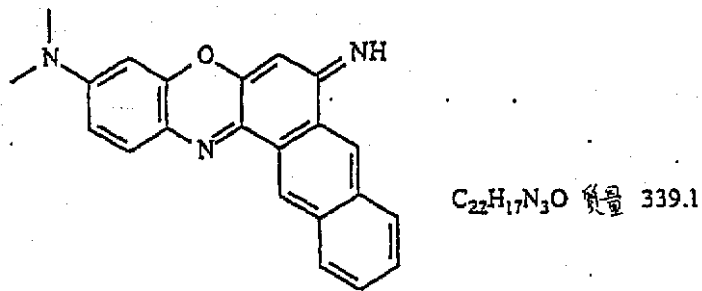
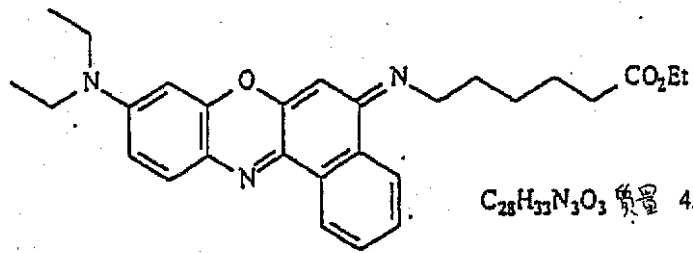


Figure 9

【図10】

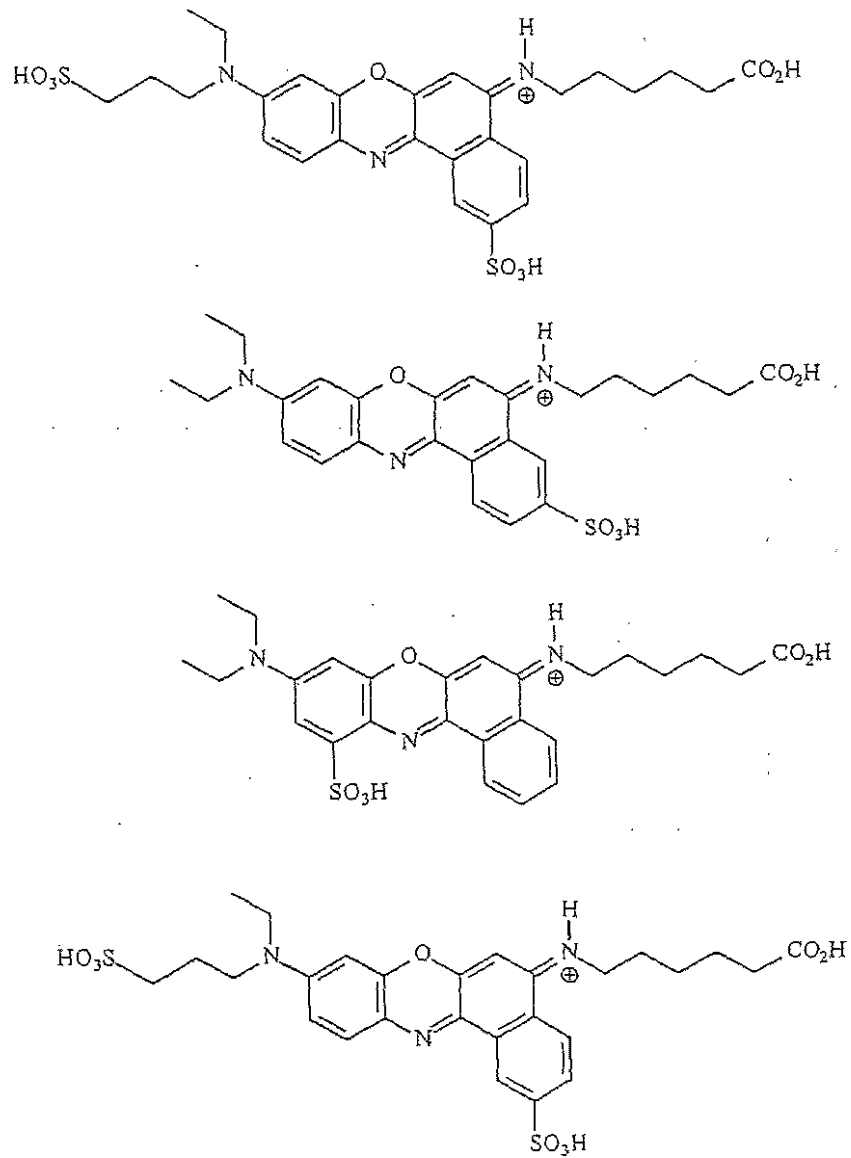


Figure 10

【図11A】

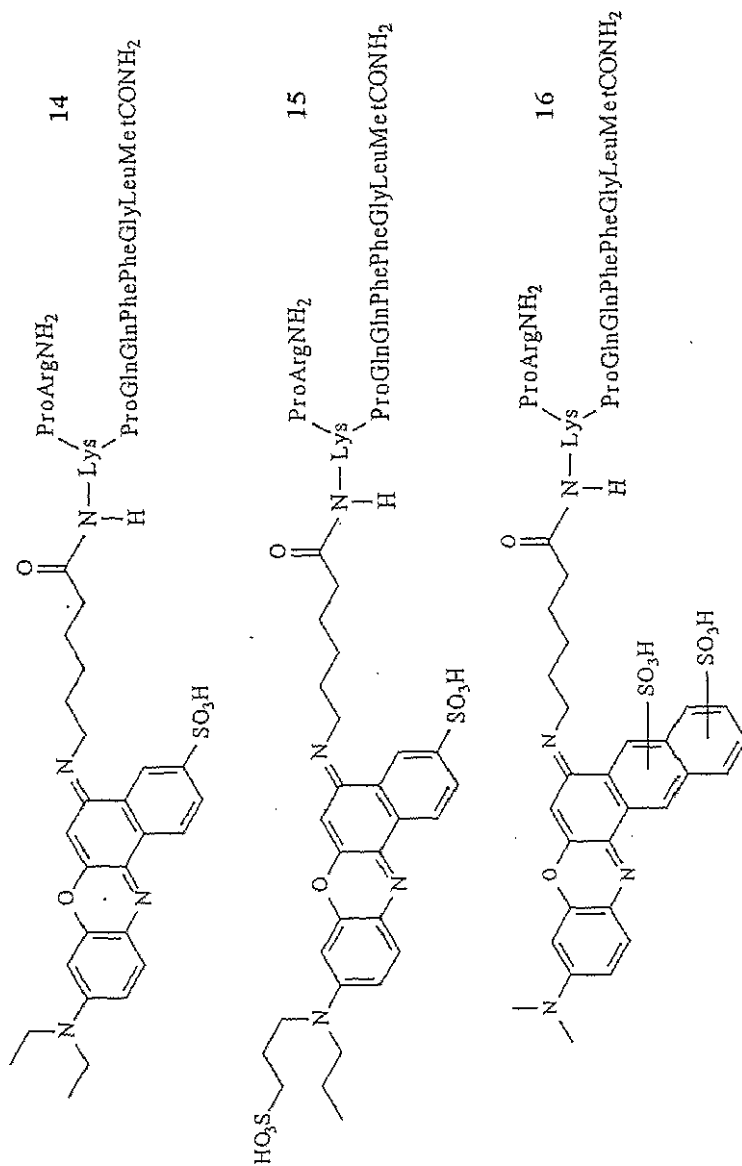


Figure 11A

【图11B】

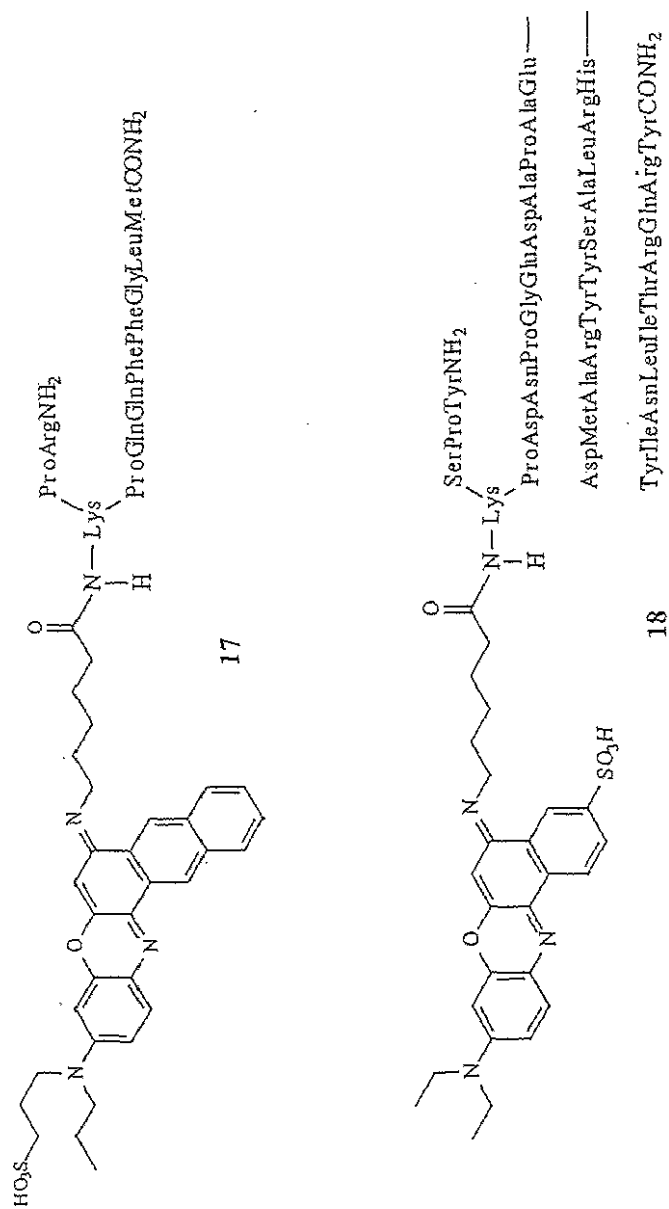


Figure 11B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/14110		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C09B19/00 G01N33/533 C07H21/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C09B G01N C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 019 198 A (HOECHST AG) 26 November 1980 (1980-11-26) page 11, table I, lines 21-28; page 36, table III, lines 30-36 combined with page 37, table III, line 24	1, 2, 8, 9, 11, 17
X	V. STUZKA ET. AL.: "INFRARED SPECTROSCOPY OF BENZO(A)PHENOXAZINES" SPECTROCHIM. ACTA, PART A (1967), vol. 23, no. 7, 1967, pages 2175-2183, XP001051687 NORTHERN IRELAND page 2177, formulas XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX --- -/-	1, 2, 8, 9, 11, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
* 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 document 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 20 December 2001	Date of mailing of the international search report 10/01/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Ketterer, M	

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 01/14110
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. STUZKA ET. AL: "OXAZINES AS ACID-BASE INDICATORS; SOME MELDOLA'S BLUE" CHEMICKE ZVESTI (1968), vol. 22, no. 6, 1968, pages 431-438, XP001051686 see formulas on pages 434, 435, 436	1,2,8,9, 11,17
A	US 5 770 716 A (ROSENBLUM BARNETT B ET AL) 23 June 1998 (1998-06-23) cited in the application  column 8, line 7 -column 9, line 19	1-21,27, 31,38, 39,42, 47,48, 52-59, 63-69, 72,74,75
A	US 5 366 860 A (BERGOT B JOHN ET AL) 22 November 1994 (1994-11-22) cited in the application  formulas column 4, line 40 - line 41; claims	1-21,27, 31,38, 39,42, 47,48, 52-59, 63-69, 72,74,75
A	US 5 936 087 A (LAM JOE Y L ET AL) 10 August 1999 (1999-08-10)  column 3, line 58 -column 6, line 14; claims	1-21,27, 31,38, 39,42, 47,48, 52-59, 63-69, 72,74,75
A	OKAFOR C O: "Synthesis, Properties and Uses of Angular Phenoxazines" DYES AND PIGMENTS, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 7, no. 2, 1986, pages 103-131, XP002122264 ISSN: 0143-7208 page 106, formulas 15,16; page 116, formula 60 page 123, paragraph 2 -page 127, line 2	1,21
A	US 4 714 763 A (THEODOROPULOS SPYROS) 22 December 1987 (1987-12-22) the whole document	1,21,65
A	US 5 792 389 A (FEEMAN JAMES F ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) abstract column 4, formula (IF)	1,2

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/14110

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0019198	A	26-11-1980	DE 2919258 A1	20-11-1980
			BR 8002927 A	23-12-1980
			CA 1146941 A1	24-05-1983
			DD 150618 A5	09-09-1981
			DE 3065660 D1	29-12-1983
			EP 0019198 A1	26-11-1980
			ES 491210 D0	01-12-1980
			ES 8100662 A1	01-02-1981
			JP 55151014 A	25-11-1980
			ZA 8002805 A	24-06-1981
US 5770716	A	23-06-1998	AT 206133 T	15-10-2001
			AU 725288 B2	12-10-2000
			AU 6867298 A	30-10-1998
			CA 2257227 A1	15-10-1998
			DE 69801802 D1	31-10-2001
			EP 0923597 A1	23-06-1999
			JP 2000513016 T	03-10-2000
			WO 9845310 A1	15-10-1998
US 5366860	A	22-11-1994	AT 131210 T	15-12-1995
			DE 69024061 D1	18-01-1996
			DE 69024061 T2	08-08-1996
			EP 0496749 A1	05-08-1992
			JP 2649102 B2	03-09-1997
			JP 5502371 T	28-04-1993
			WO 9105060 A2	18-04-1991
US 5936087	A	10-08-1999	AU 1418299 A	15-06-1999
			EP 1034221 A1	13-09-2000
			WO 9927020 A1	03-06-1999
			US 6051719 A	18-04-2000
			US 6111116 A	29-08-2000
			US 6221606 B1	24-04-2001
			US 2001011139 A1	02-08-2001
US 4714763	A	22-12-1987	EP 0319620 A1	14-06-1989
			US 4873318 A	10-10-1989
US 5792389	A	11-08-1998	NONE	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)		
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/68	A	4 C 0 5 7
	1/68				
G 0 1 N	21/78	G 0 1 N	21/78	C	
	33/53		33/53	M	
	33/542		33/542	A	
	33/566		33/566		
	33/566		33/566	A	
	33/58		33/58	A	
		C 1 2 N	15/00	A	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ユアン, パウ ミャウ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129,  
 サン ノゼ, ジョンソン アベニュー  
 1249

Fターム(参考) 2G045 DA12 DA13 DA14 FB02 FB07  
 FB12  
 2G054 AA06 CA22 CE02 EA03  
 4B024 AA20 CA04 CA05 EA04 HA11  
 HA19  
 4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR55  
 QR62 QS25 QS34 QS36  
 4C056 AA02 AB01 AC03 AD05 AE03  
 EC01 ED07 ED08  
 4C057 MM05

专利名称(译)	磺化[8,9]苯并吩恶嗪染料及其标记的缀合物的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003531946A</a>	公开(公告)日	2003-10-28
申请号	JP2001580235	申请日	2001-05-01
[标]申请(专利权)人(译)	阿普里拉股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Applera公司		
[标]发明人	ヤンシヨンウェイ ユアンパウミャウ		
发明人	ヤン, シヨンウェイ ユアン, パウミャウ		
IPC分类号	G01N33/53 C07D265/38 C07H21/00 C09B19/00 C09K11/06 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C09B19/00 G01N33/533 G01N33/582		
FI分类号	C09B19/00 C07D265/38 C07H21/00 C09K11/06 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/542.A G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/FB12 2G054/AA06 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA20 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/EA04 4B024/HA11 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4C056/AA02 4C056/AB01 4C056/AC03 4C056/AD05 4C056/AE03 4C056/EC01 4C056/ED07 4C056/ED08 4C057/MM05		
优先权	09/564417 2000-05-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了荧光磺化的3,7-二氨基-[8,9]苯甲恶嗪染料，这些染料对于标记生物聚合物和其他底物特别有用。染料标记的偶联物可用于多种情况，包括使用完整活细胞的细胞表面分析以及核酸检测方法。这些新型染料是水溶性的，可以与多种物质偶联，例如多核苷酸，核苷，核苷酸，肽，蛋白质，抗体，碳水化合物，配体，颗粒和表面。

