

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-231093

(P2008-231093A)

(43) 公開日 平成20年10月2日(2008.10.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7D 311/82 (2006.01)	CO7D 311/82 CSP	2G045
CO7D 405/12 (2006.01)	CO7D 405/12	4C062
GO1N 33/58 (2006.01)	GO1N 33/58 Z	4C063
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/533	

審査請求 有 請求項の数 14 OL 外国語出願 (全 67 頁)

(21) 出願番号 特願2008-10915 (P2008-10915)
 (22) 出願日 平成20年1月21日 (2008.1.21)
 (31) 優先権主張番号 11/625, 379
 (32) 優先日 平成19年1月22日 (2007.1.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508020074
 ビアス・バイオテクノロジー・インコーポ
 レーテッド
 アメリカ合衆国・イリノイ・61105・
 ロックフォード・ノース・メリディアン・
 ロード・3747

(74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武

(74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆

(74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

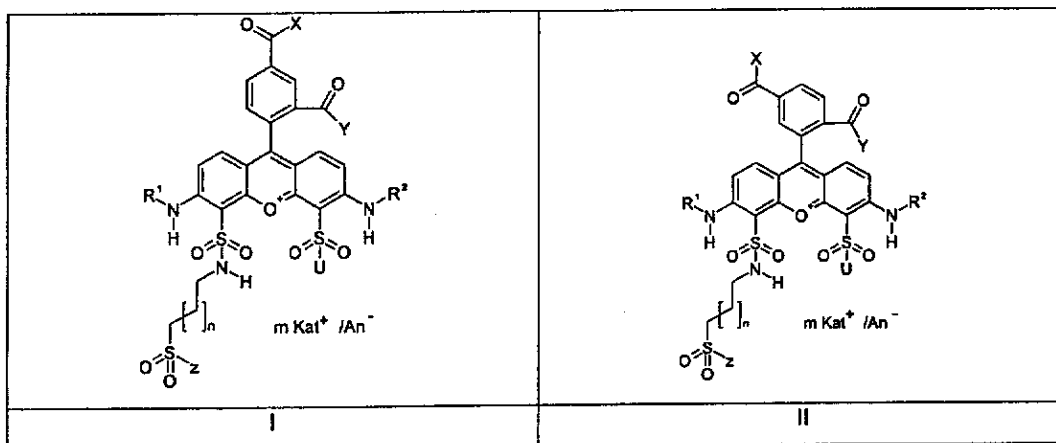
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キサンテン化合物のスルホンアミド誘導体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 キサンテン化合物のスルホンアミド誘導体の提供および該誘導体を使用する方法

【解決手段】 下記一般式Iおよび/または一般式IIの化合物、該化合物を含有する組成物

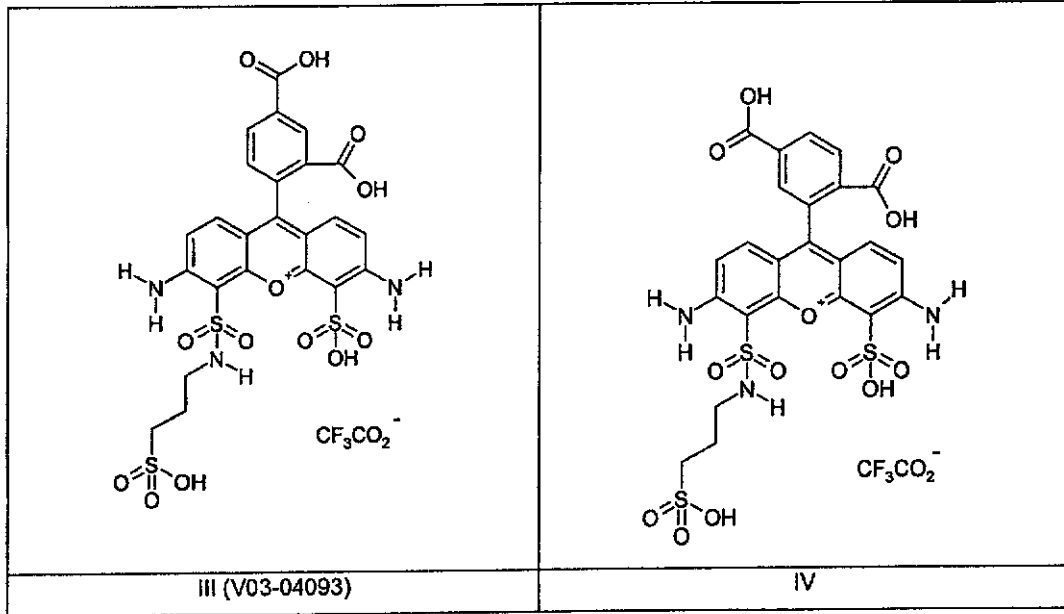


10

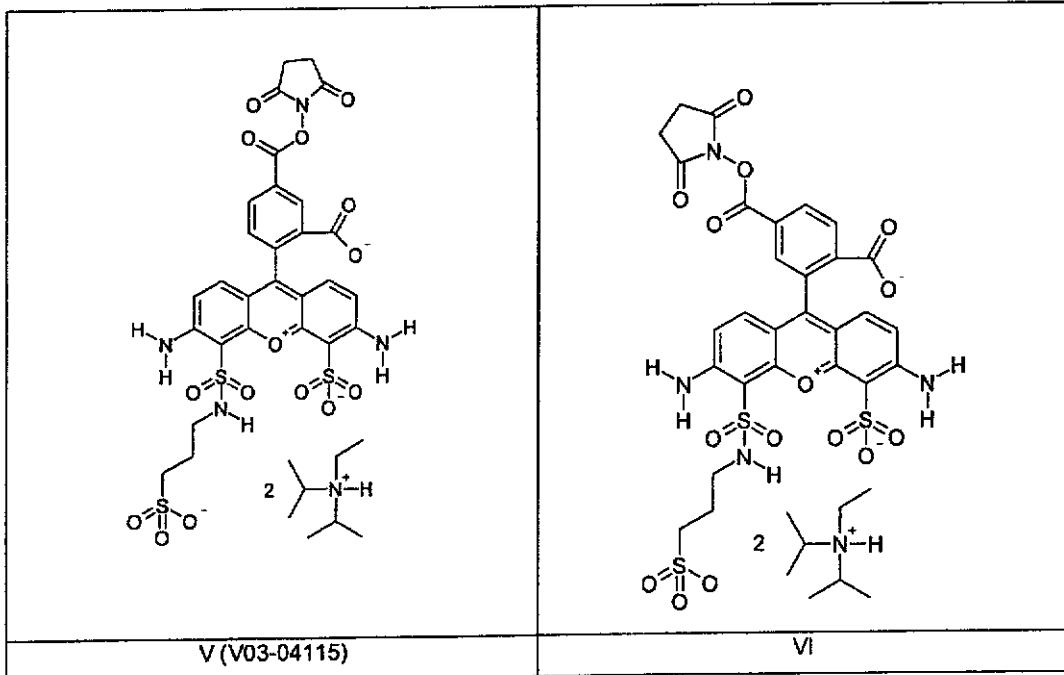
【選択図】 なし

20

【化 2 A】



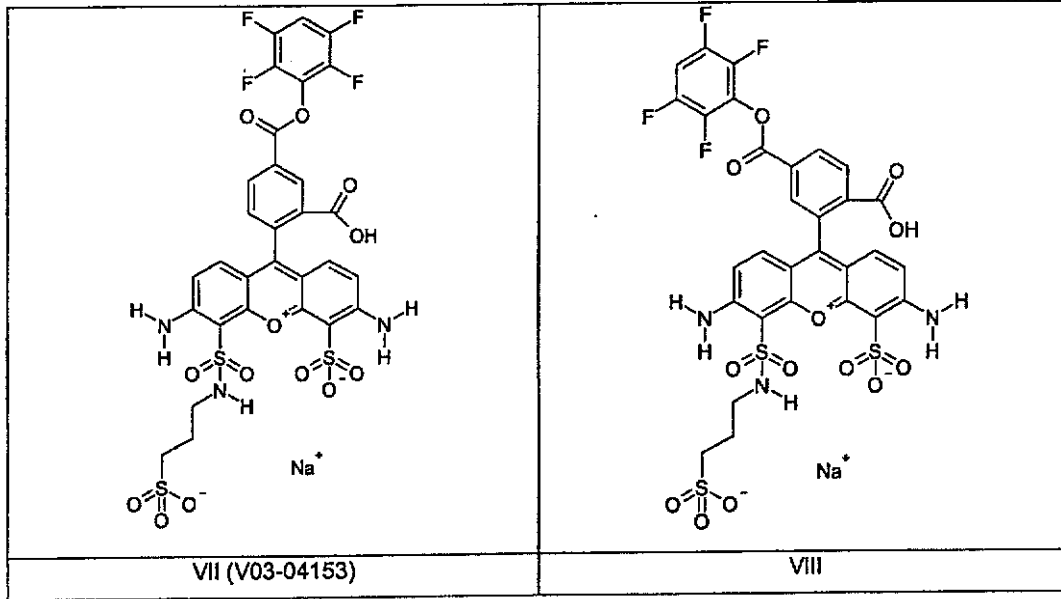
10



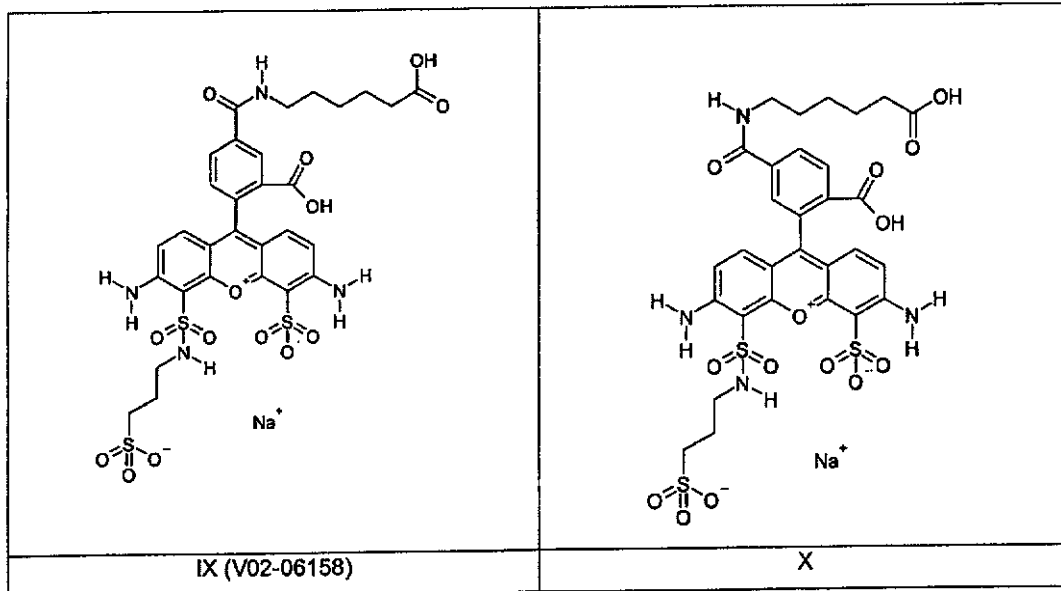
20

30

【化 2 B】



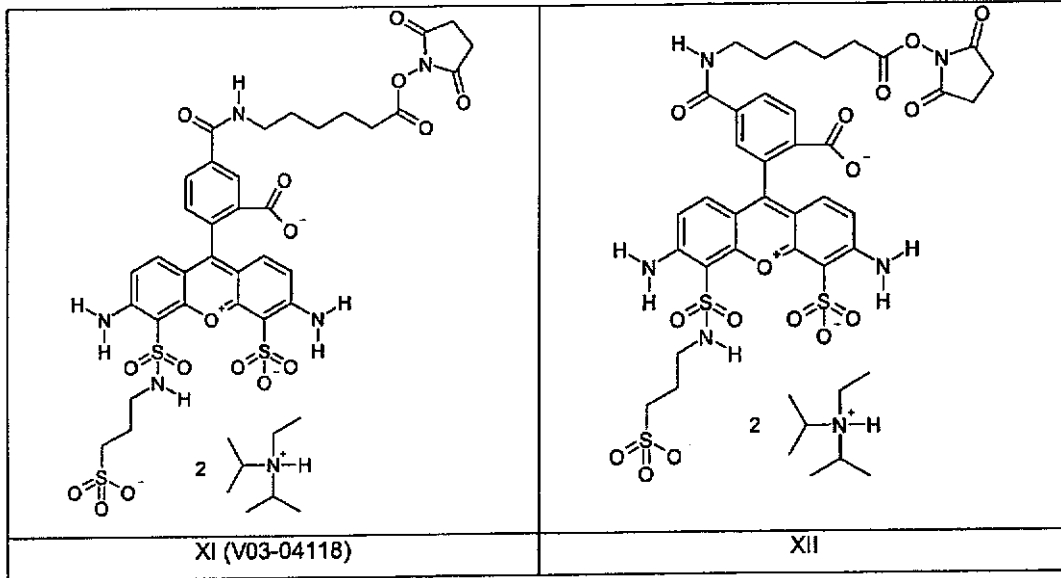
10



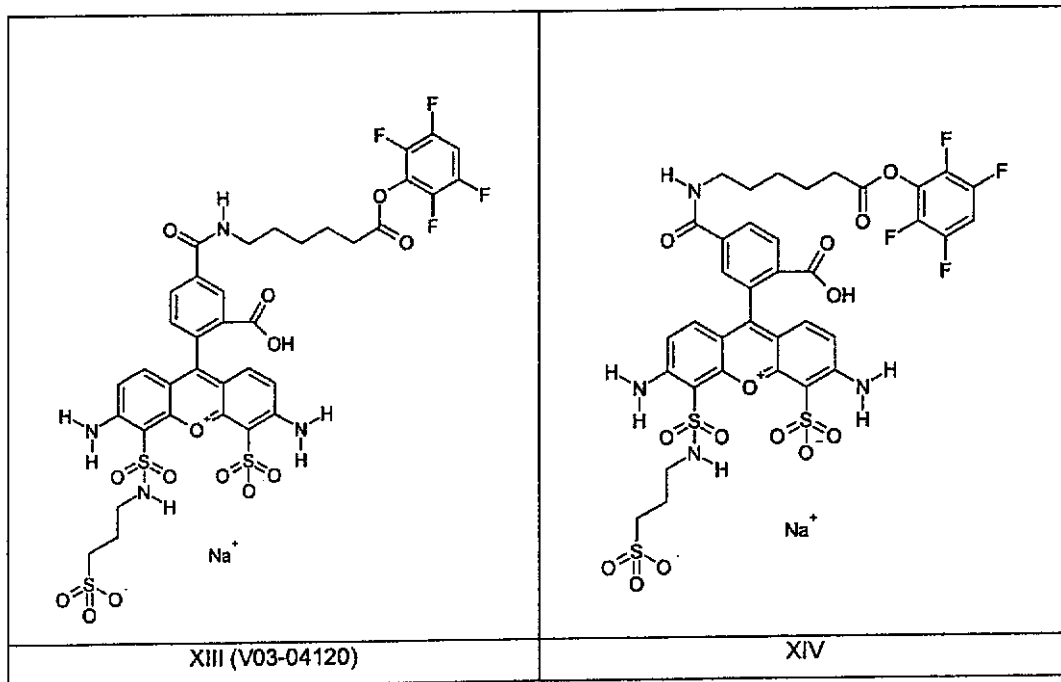
20

30

【化 2 C】



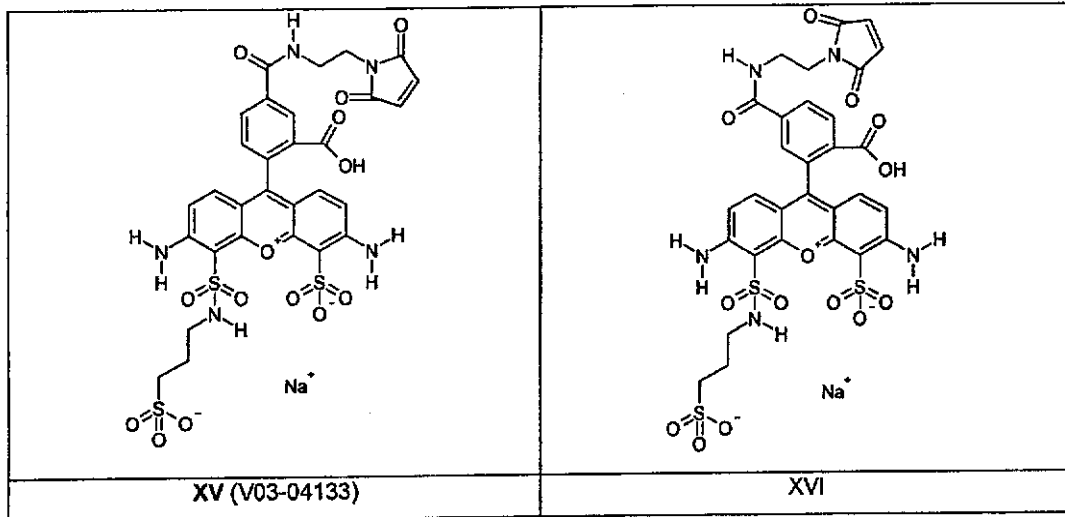
10



20

30

【化 2 D】



10

の少なくとも 1 種から選択される化合物。

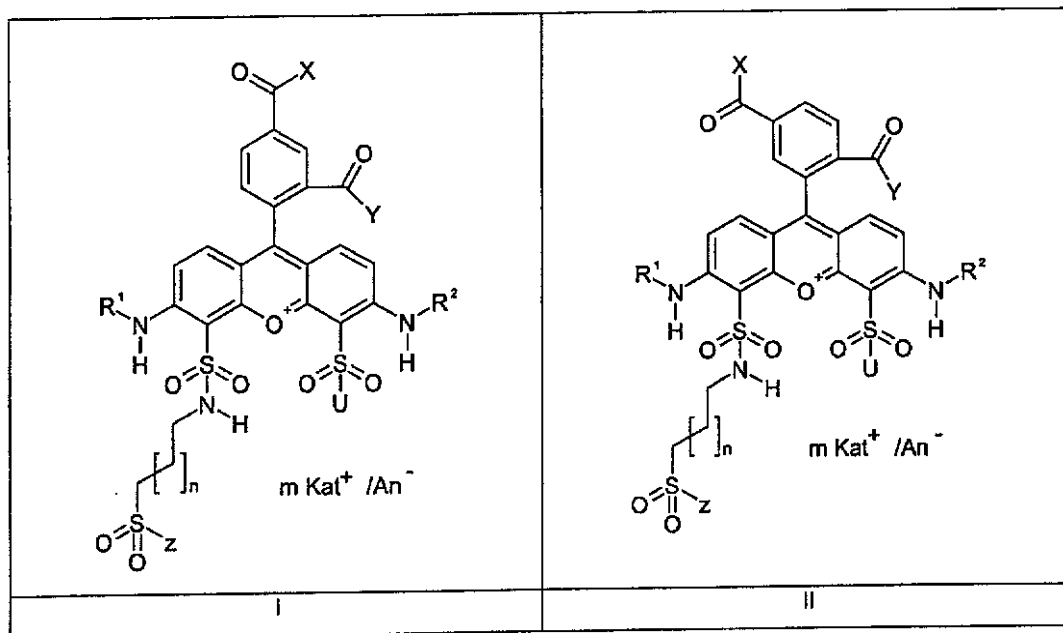
【請求項 3】

少なくとも 1 種の賦形剤と、

式 I または式 II :

20

【化 3】



30

[式中、

R^1 および R^2 は、同じかまたは異なり、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{18}$ アルキル、およびスルホアルキルからなる群から選択され；

X および Y は、同じかまたは異なり、独立して、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH-NH_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-Su$ (スクシニミジル/スルホスクシニミジル)、 $-O-STP$ (4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、 $-O-TFP$ (2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、 $-O$ -ベンゾトリアゾール、 $-O$ -ベンゾトリアゾール、 $-NR-CO-CH_2-I$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR$ -生体分子、 $-NR-L-COO^-$ 、 $-NR-L-COOH$ 、 $-NR-L-COO-Su$ 、 $-NR-L-COO-STP$ 、 $-NR-L-COO-TFP$ 、 $-NR-L-CONR_2$ 、 $-NR-L-CO$ -生体分子、 $-NR-L-CO-NH-NH_2$ 、 $-NR-L-OH$ 、 $-NR-L-O$ -ホスホルアミダイト、 $-NR-L-CHO$ 、 $-NR-L$ -マレイミド、および $-NR-L-NH-CO-CH_2-I$ 〔ここで、 R は、 R^1 または R^2 と同じであり、 L は、酸素、置換された窒素、および/または硫黄からなる群から選択される少なくとも 1

40

50

種の原子で置換されていてもよい、直鎖状 ($-(\text{CH}_2)_o-$ 、 $o = 1 \sim 15$) の、交差の、または環状の二価のアルカン基からなる群から選択され、前記生体分子は、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、またはハプテンである) からなる群から選択され;

Z は、 $-\text{O}^-$ または $-\text{OH}$ であり;

U は、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{OH}$ 、または $-\text{NH}-\text{L}-\text{SO}_2\text{Z}$ であり;

K a t は、Li、Na、K、(モノ-、ジ-、またはトリアルキル) アンモニウム、または他の陽イオンであり;

A n は、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{BF}_4$ 、 $-\text{ClO}_4$ 、 $-\text{CH}_3\text{CO}_2$ 、 $-\text{CF}_3\text{CO}_2$ 、または他の陰イオンであり;

m は、式 I または式 II の色素部分の正または負の電荷を補うのに必要な 1 ~ 6 の整数であり;

n は、0 ~ 12 の整数である]

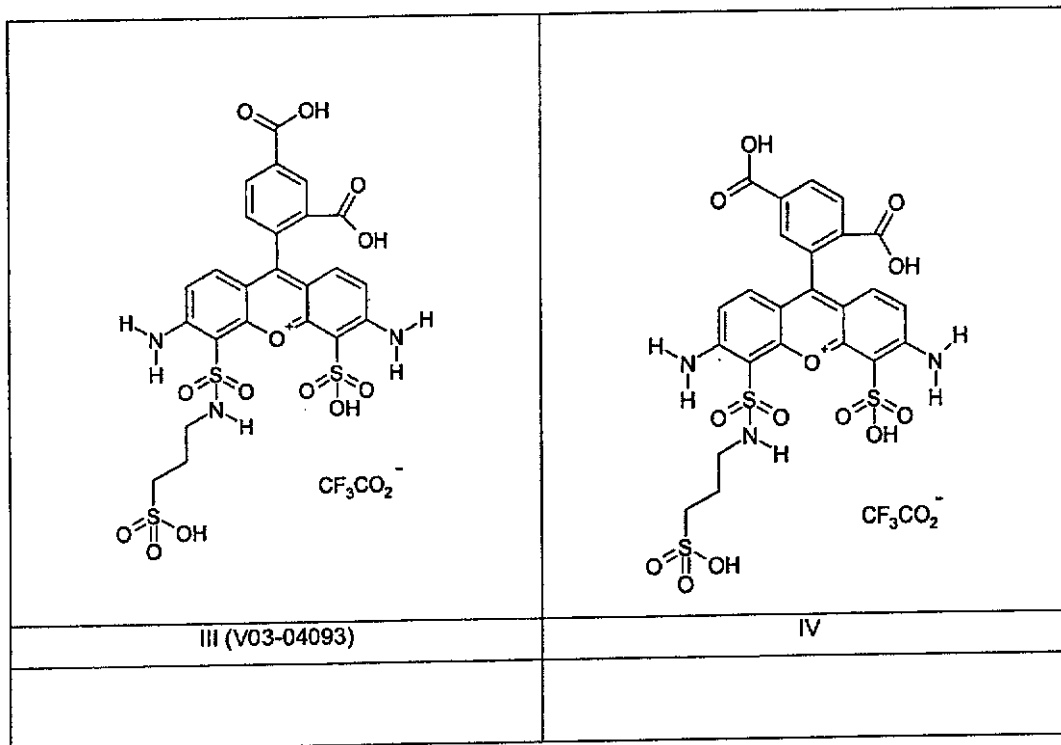
の少なくとも 1 種から選択される生体適合性色素組成物をもたらす化合物とを含む、生体適合性色素組成物。

【請求項 4】

少なくとも 1 種の賦形剤と、

式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII、式 VIII、式 IX、式 X、式 XI、式 XII、式 XIII、式 XIV、式 XV、および式 XVI:

【化 4 A】



10

20

30

40

【化 4 B】

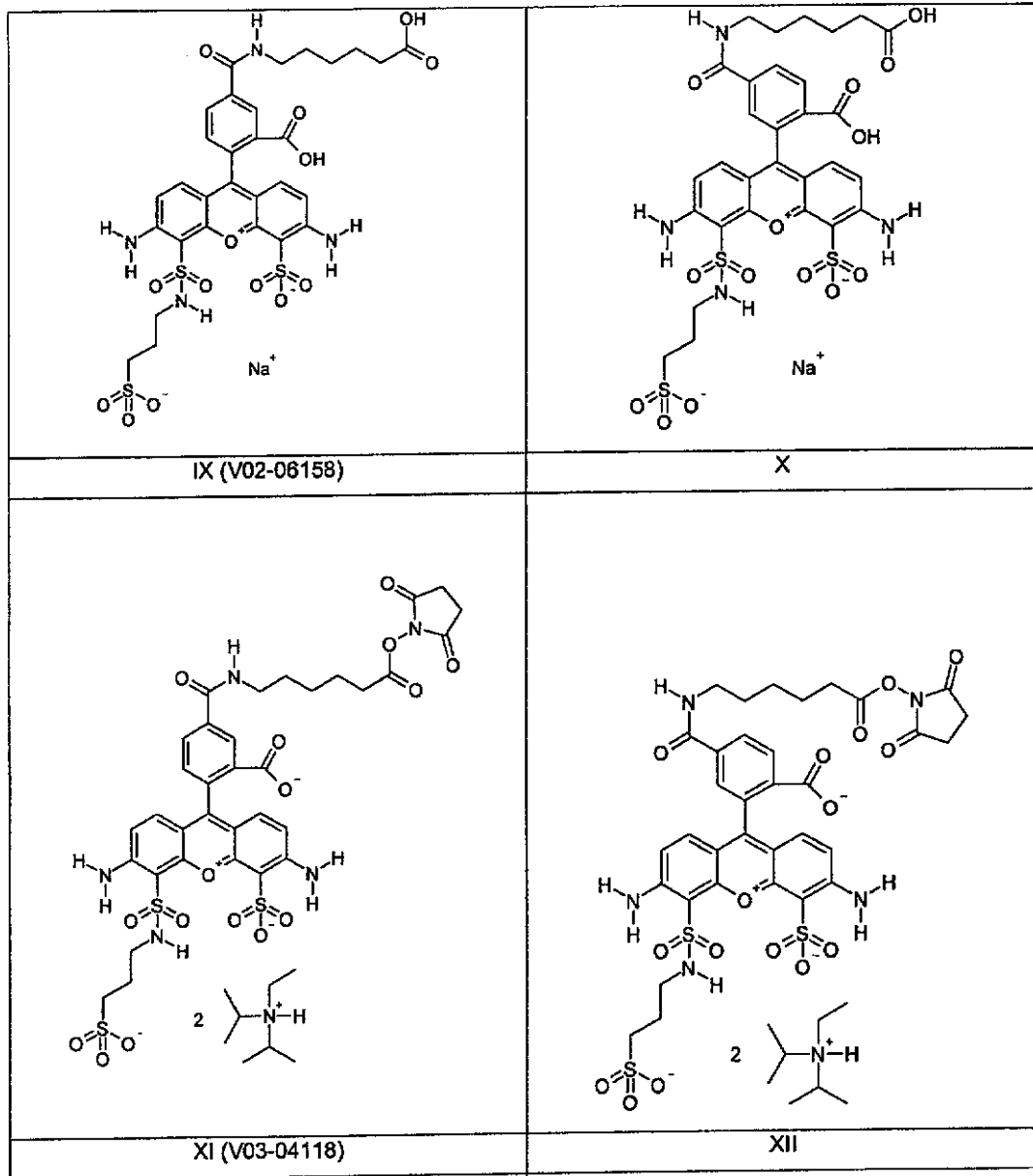
<p>Chemical structure V (V03-04115) is a complex molecule. It features a central benzimidazole ring system. The benzimidazole has two amino groups (-NH₂) at the 2 and 6 positions. At the 5-position, there is a propyl chain ending in a sulfonate group (-SO₃⁻). At the 7-position, there is a sulfonate group (-SO₃⁻). At the 4-position, there is a para-substituted phenyl ring. This phenyl ring has a carboxylate group (-COO⁻) at the 1-position and a 2-oxo-1,3-dioxolane-5-yl group at the 4-position. The 2-oxo-1,3-dioxolane ring is a five-membered cyclic acetal with a carbonyl group (=O) at the 2-position. A counterion, 2,2,4,4-tetramethylpiperidinium, is shown with a coefficient of 2.</p>	<p>Chemical structure VI is similar to structure V, but the 2-oxo-1,3-dioxolane group is replaced by a 2-oxo-1,3-dioxane group, which is a six-membered cyclic acetal with a carbonyl group (=O) at the 2-position. The counterion is the same 2,2,4,4-tetramethylpiperidinium cation with a coefficient of 2.</p>
<p>V (V03-04115)</p>	<p>VI</p>
<p>Chemical structure VII (V03-04153) is similar to structure V, but the 2-oxo-1,3-dioxolane group is replaced by a 2-hydroxy-1,3-dioxolane group, which is a five-membered cyclic acetal with a hydroxyl group (-OH) at the 2-position. The counterion is a sodium ion (Na⁺).</p>	<p>Chemical structure VIII is similar to structure VII, but the 2-hydroxy-1,3-dioxolane group is replaced by a 2-hydroxy-1,3-dioxane group, which is a six-membered cyclic acetal with a hydroxyl group (-OH) at the 2-position. The counterion is a sodium ion (Na⁺).</p>
<p>VII (V03-04153)</p>	<p>VIII</p>

10

20

30

【化 4 C】

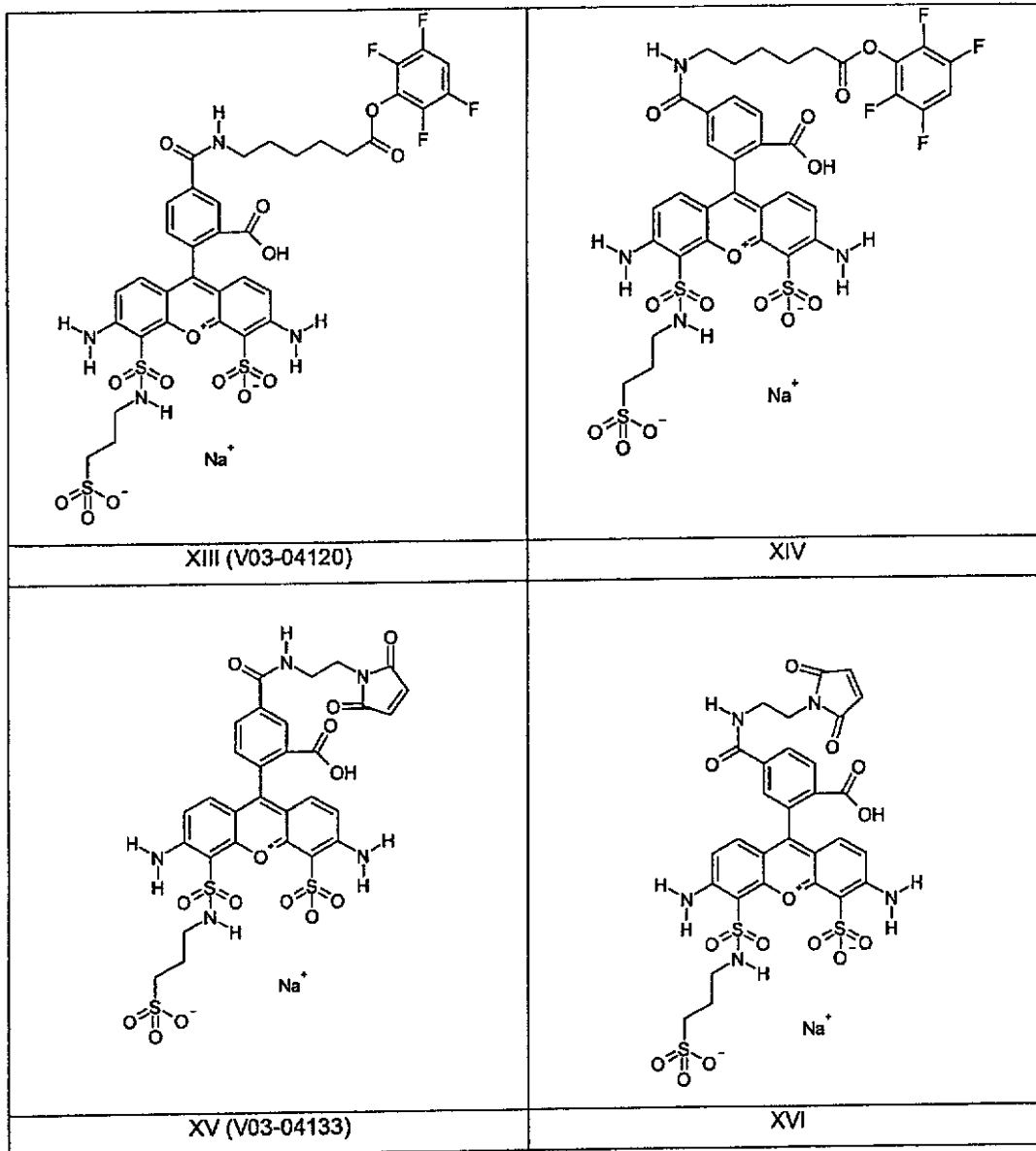


10

20

30

【化 4 D】



、ならびにこれらの組合せから選択される生体適合性色素組成物をもたらす化合物とを含む、生体適合性色素組成物。

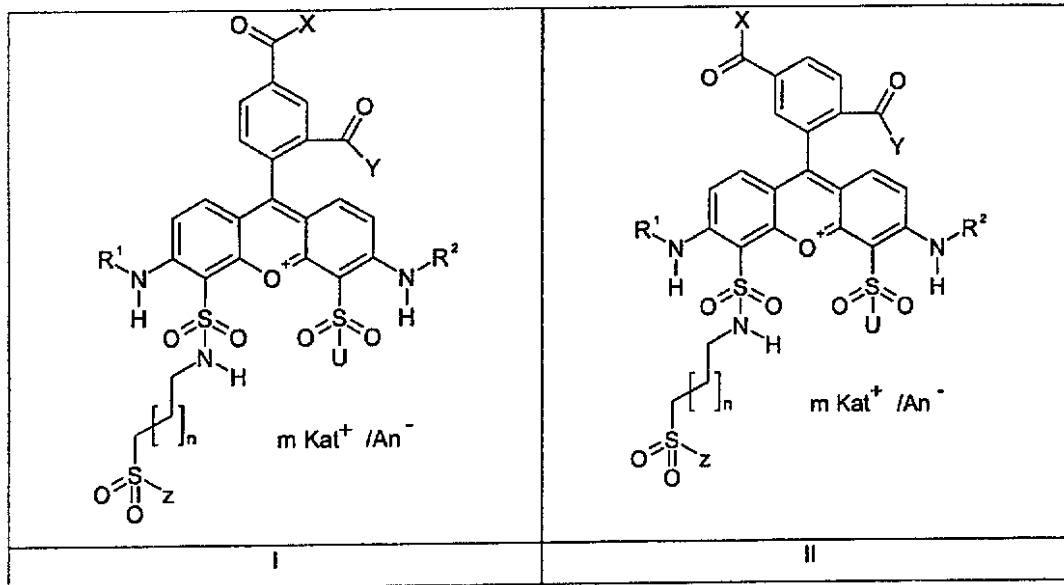
【請求項 5】

少なくとも 1 種の生体分子をラベリングする方法であって、

少なくとも 1 種の賦形剤と、

式 I または 式 II :

【化5】



10

[式中、

R¹ および R² は、同じかまたは異なり、独立して、-H、-C₁~C₁₈アルキル、および-

20

-スルホアルキルからなる群から選択され；

X および Y は、同じかまたは異なり、独立して、-O⁻、-OH、-SH、-NH-NH₂、-F、-Cl、-Br、-I、-O-Su(スクシニイミジル/スルホスクシニイミジル)、-O-STP(4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、-O-TFP(2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、-O-ベンゾトリアゾール、-ベンゾトリアゾール、-NR-CO-CH₂-I、-NR₂、-NR-生体分子、-NR-L-COO⁻、-NR-L-COOH、NR-L-COO-Su、-NR-L-COO-STP、-NR-L-COO-TFP、-NR-L-CONR₂、-NR-L-CO-生体分子、-NR-L-CO-NH-NH₂、-NR-L-OH、-NR-L-O-ホスホルアミダイト、-NR-L-CHO、-NR-L-マレイミド、および-NR-L-NH-CO-CH₂-I〔ここで、R は、R¹ または R² と同じであり、L は、酸素、置換された窒素、および/または硫黄からなる群から選択される少なくとも1種の原子で置換されているもよい、直鎖状(-(CH₂)_o-、o = 1~15)の、交差の、または環状の二価のアルカン基からなる群から選択され、前記生体分子は、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、またはハプテンである〕からなる群から選択され；

30

Z は、-O⁻ または -OH であり；

U は、-O⁻、-OH、または -NH-L-SO₂Z であり；

K a t は、Li、Na、K、(モノ-、ジ-、またはトリアルキル)アンモニウム、または他の陽イオンであり；

A n は、-F、-Cl、-Br、-I、-BF₄、-ClO₄、-CH₃CO₂、-CF₃CO₂、または他の陰イオンであり；

m は、式Iまたは式IIの色素部分の正または負の電荷を補うのに必要な1~6の整数であり；かつ

40

n は、0~12の整数である]

の少なくとも1種の化合物と

を含む組成物を、前記化合物が生体分子に結合するのに足りる条件下、有効な濃度で前記生体分子に供給する工程；および

前記生体分子に結合した結合体を検出する工程を含む方法。

【請求項6】

少なくとも1種の生体分子をラベリングする方法であって、

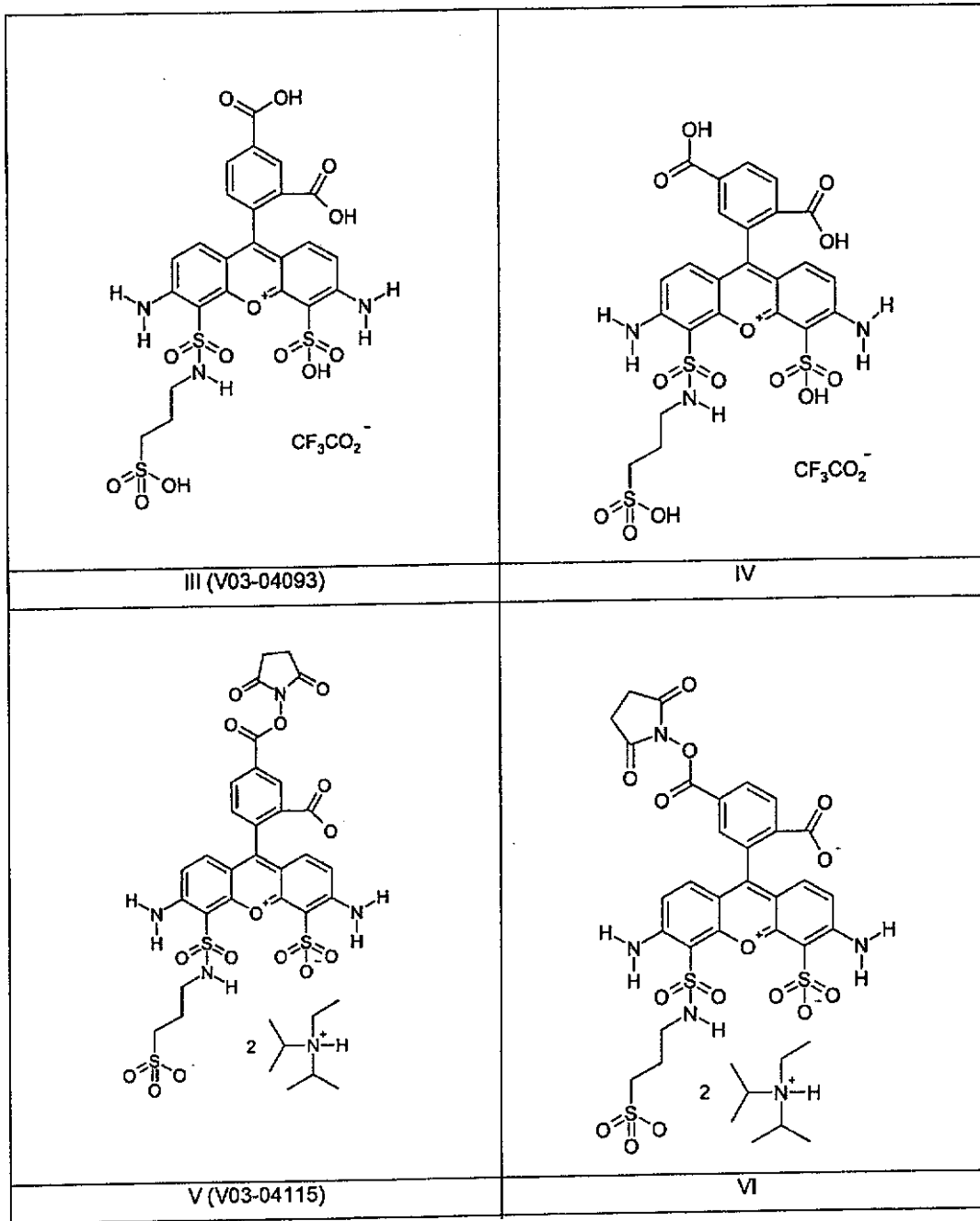
少なくとも1種の賦形剤と、

式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII、式IX、式X、式XI、式XII、式XIII、式XIV、式

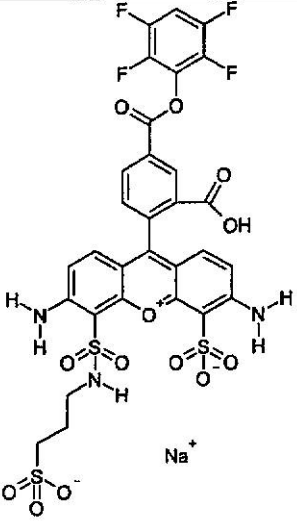
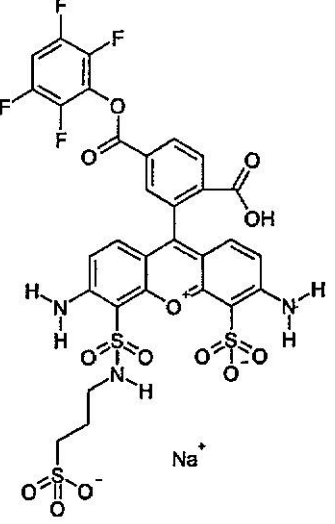
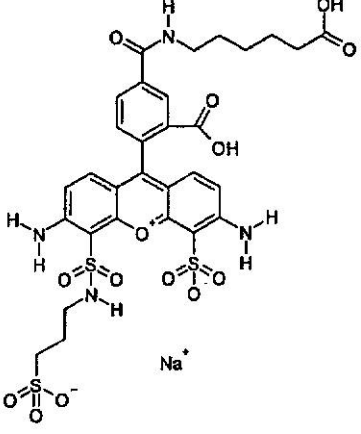
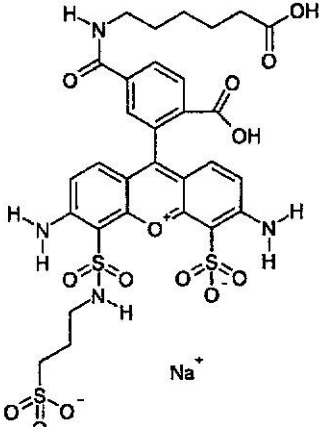
50

XV、および式XVI：

【化6A】



【化 6 B】

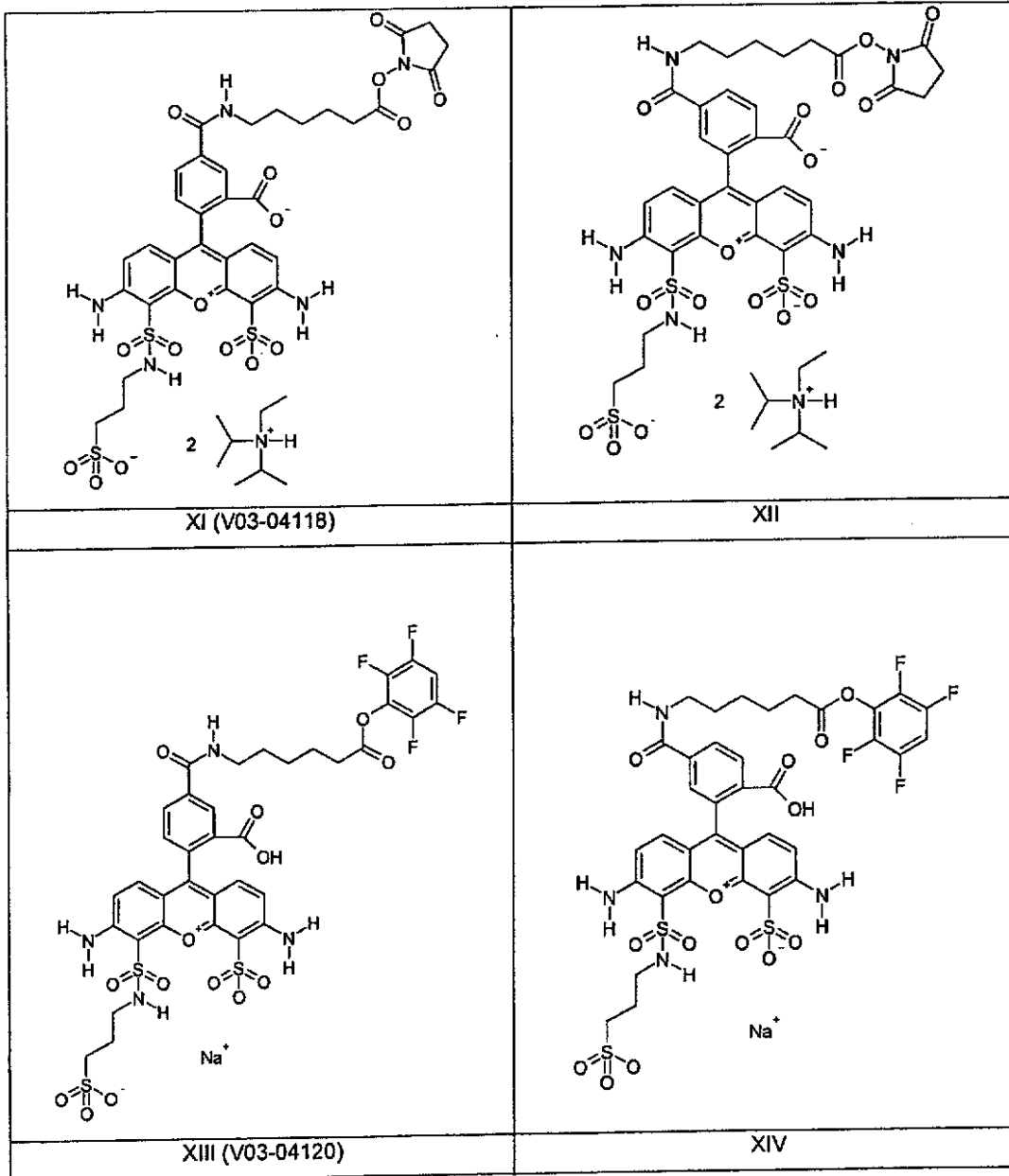
 <p>VII (V03-04153)</p>	 <p>VIII</p>
 <p>IX (V02-06158)</p>	 <p>X</p>

10

20

30

【化 6 C】

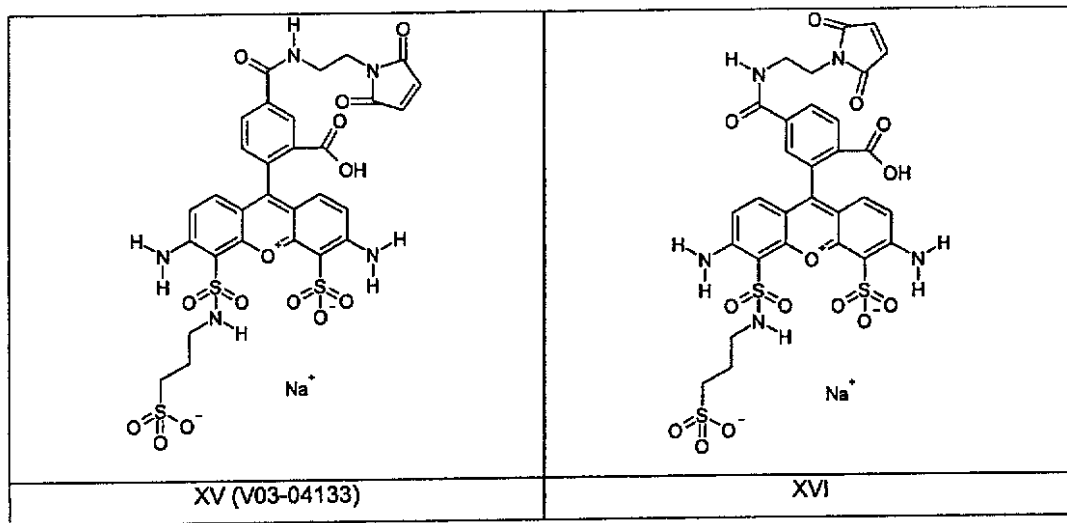


10

20

30

【化 6 D】



10

、ならびにこれらの組合せの少なくとも 1 種の化合物と
 を含む組成物を、化合物が前記生体分子に結合するのに足りる条件下、有効な濃度で前記
 生体分子に供給する工程；および
 前記生体分子に結合した結合体を検出する工程を含む方法。

20

【請求項 7】

タンパク質アッセイ、免疫蛍光アッセイ、シングルプレックスアプリケーション、または
 マルチプレックスアプリケーションの少なくとも 1 種において使用される、請求項 5 また
 は 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

他の蛍光色素または結合体と組み合わせてマルチプレックスアプリケーションにおいて
 使用される、請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

結合前に前記化合物に反応性を付与する、請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

前記化合物が、さらに L-Rt (L は、前記化合物に共有結合した連結基であり、R t は、
 前記生体分子に共有結合的に連結可能な反応性基である) を有する、請求項 5 または 6 の
 いずれかに記載の方法。

【請求項 11】

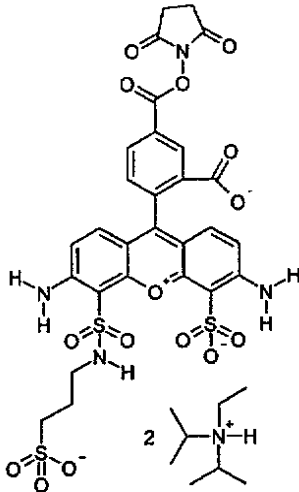
前記生体分子が、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、
 またはハプテンの少なくとも 1 種から選択される、請求項 5 または 6 のいずれかに記載の
 方法。

【請求項 12】

式 V :

40

【化 7】



10

で示される、生物学的アッセイにおいて蛍光色素として使用可能な化合物 (V03-04115)

【請求項 1 3】

生体分子結合体として検出された、請求項 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

タンパク質アッセイにおける使用指示書を備えるキットに含まれる請求項 1 2 に記載の化合物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光性キサンテン化合物のスルホンアミド誘導体、これらを用いる組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

有機蛍光化合物 (色素とも呼ばれる) は、生物学的アッセイにおいて高感度検出試薬として用いられる。キサンテン型色素は、研究用試薬として多くの製造会社から商業的に入手可能である。

30

これらの化合物のうちフルオレセイン誘導体は、3H-キサンテン-6-オール-3-オンのコア構造をベースにし、中心環のC9に2-カルボキシフェニル基を有する。ローダミン色素は、典型的には、6-アミノ-3H-キサンテン-3-オン構造を有し、C9に同じ2-カルボキシフェニル基を有する。

【0003】

蛍光色素に負荷電のスルホネート基を加えると、これらの水溶性を高め、生物学的アプリケーションにおける使用を容易にし、かつ、電荷の反発などに起因する色素-色素相互作用を低減する。スルホン化は、シアニン色素の修飾 (米国特許第5,268,486号、同第5,486,616号、同第5,569,587号、および同第5,569,766号) およびキサンテン型色素の修飾 (米国特許第6,130,101号) にも用いられてきた。

40

【特許文献 1】米国特許第6,130,101号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

さらなる化合物、組成物、および方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

キサンテン環構造を有する化合物のスルホンアミド誘導体、特にアリアルスルホンアミ

50

ド誘導体を開示する。これらは、蛍光キサンテン化合物または色素と呼ばれ、フルオレセイン、ロードル色素、ローダミン類、およびこれらの反応性の誘導体および結合体がある。1種以上のアリアルスルホンアミド誘導体および親水性構成部分をこのスルホンアミドの窒素に加えると、置換されていない化合物の誘導体より水溶性および他の特性が高められる。1つの実施態様では、本化合物は、場合により、生体分子に共有結合的にカップリングさせるために用いることができる反応性基を有していてもよい。

これらの化合物は、増強された蛍光、水溶性、および生体適合性を有し、生物学的アッセイおよび他のタイプのアッセイにおける蛍光プローブとして組成物および方法において使用されうる。

【発明を実施するための最良の形態】

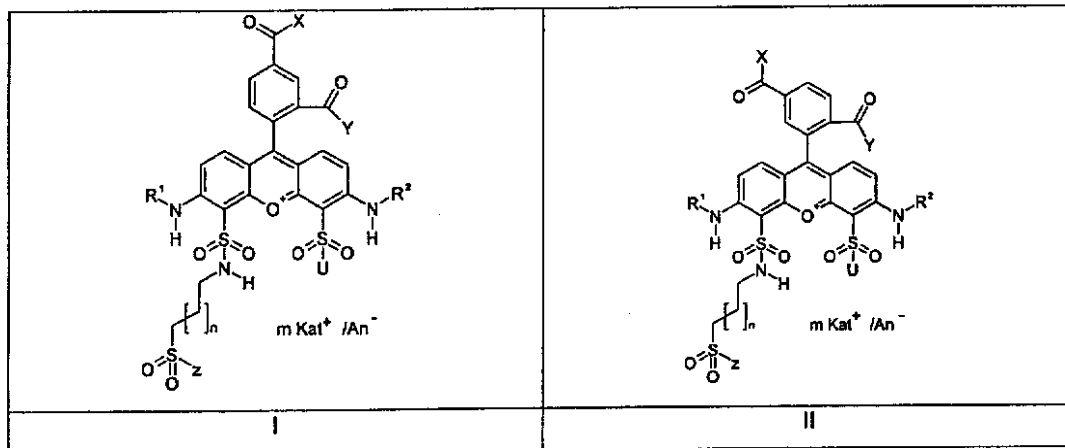
【0006】

1つの実施態様として、スルホンアミド誘導体に加えて、少なくとも1個の反応性のL-Rt基(Lは、色素に共有結合した連結基であり、Rtは、別の分子に共有結合的に連結可能な反応性基である)を有するキサンテン色素誘導体が挙げられる。

【0007】

1つの実施態様は、一般式Iまたは一般式II:

【化1】



[式中、

R^1 および R^2 は、同じかまたは異なり、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{18}$ アルキル、および-スルホアルキルからなる群から選択され;

X および Y は、同じかまたは異なり、独立して、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH-NH_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-Su$ (スクシンイミジル/スルホスクシンイミジル)、 $-O-STP$ (4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、 $-O-TFP$ (2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、 $-O$ -ベンゾトリアゾール、 $-O$ -ベンゾトリアゾール、 $-NR-CO-CH_2-I$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR$ -生体分子、 $-NR-L-COO^-$ 、 $-NR-L-COOH$ 、 $-NR-L-COO-Su$ 、 $-NR-L-COO-STP$ 、 $-NR-L-COO-TFP$ 、 $-NR-L-CONR_2$ 、 $-NR-L-CO$ -生体分子、 $-NR-L-CO-NH-NH_2$ 、 $-NR-L-OH$ 、 $-NR-L-O$ -ホスホルアミダイト、 $-NR-L-CHO$ 、 $-NR-L$ -マレイミド、および $-NR-L-NH-CO-CH_2-I$ [ここで、 R は、 R^1 または R^2 と同じであり、 L は、酸素、置換された窒素、および/または硫黄からなる群から選択される少なくとも1種の原子で置換されていてもよい、直鎖状($-(CH_2)_o-$ 、 $o = 1 \sim 15$)の、交差の、または環状の二価のアルカン基からなる群から選択され、前記生体分子は、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、またはハプテンである]からなる群から選択され;

Z は、 $-O^-$ または $-OH$ であり;

U は、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、または $-NH-L-SO_2Z$ であり;

Kat は、 Li 、 Na 、 K 、(モノ-、ジ-、またはトリアルキル)アンモニウム、または他の陽イオンであり;

An は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-BF_4$ 、 $-ClO_4$ 、 $-CH_3CO_2$ 、 $-CF_3CO_2$ 、または他の陰イオンで

10

20

30

40

50

あり；

mは、式Iまたは式IIの色素部分の正または負の電荷を補うのに必要な1～6の整数であり；かつ

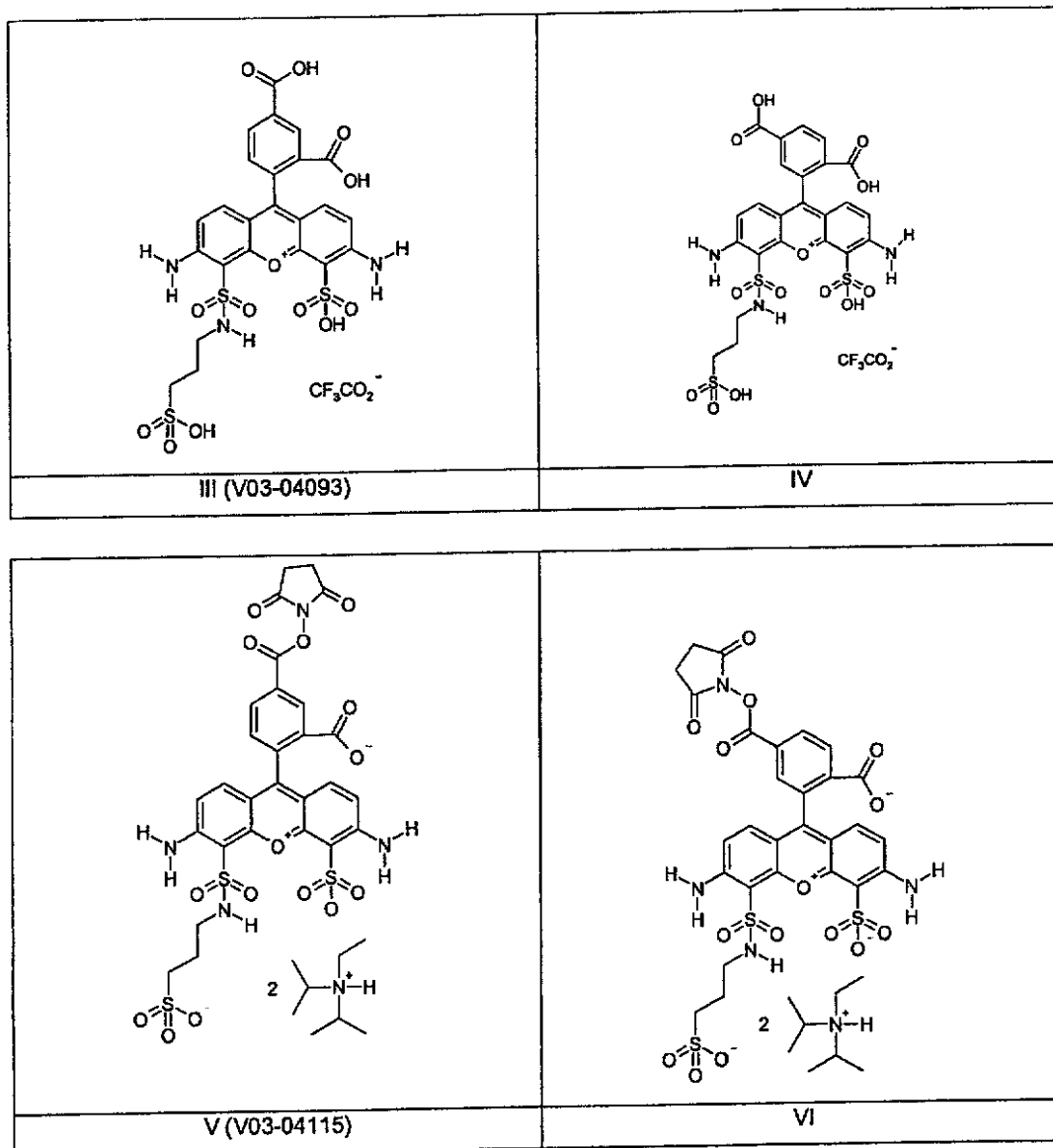
nは、0～12の整数である]

の少なくとも1種の化合物である。

【0008】

実施態様において、一般式Iおよび/または式IIの化合物として、下記式III (V03-04093)、式IV、式V (V03-04115)、式VI、式VII (V03-04153)、式VIII、式IX (V02-06158)、式X、式XI (V03-04118)、式XII、式XIII (V03-04120)、式XIV、式XV (V03-04133)、および/または式XVI：

【化2A】



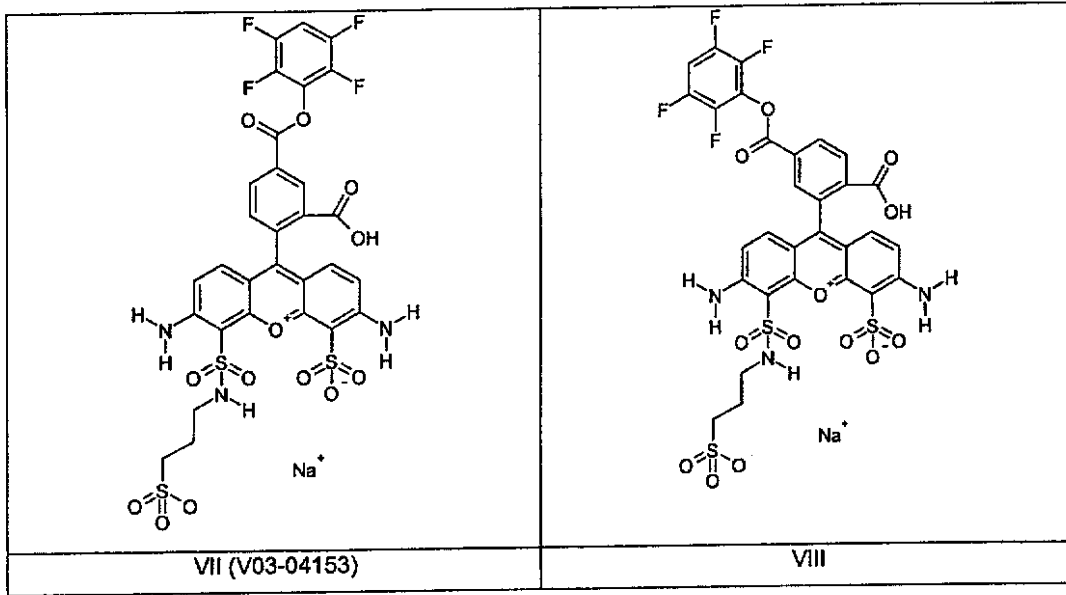
10

20

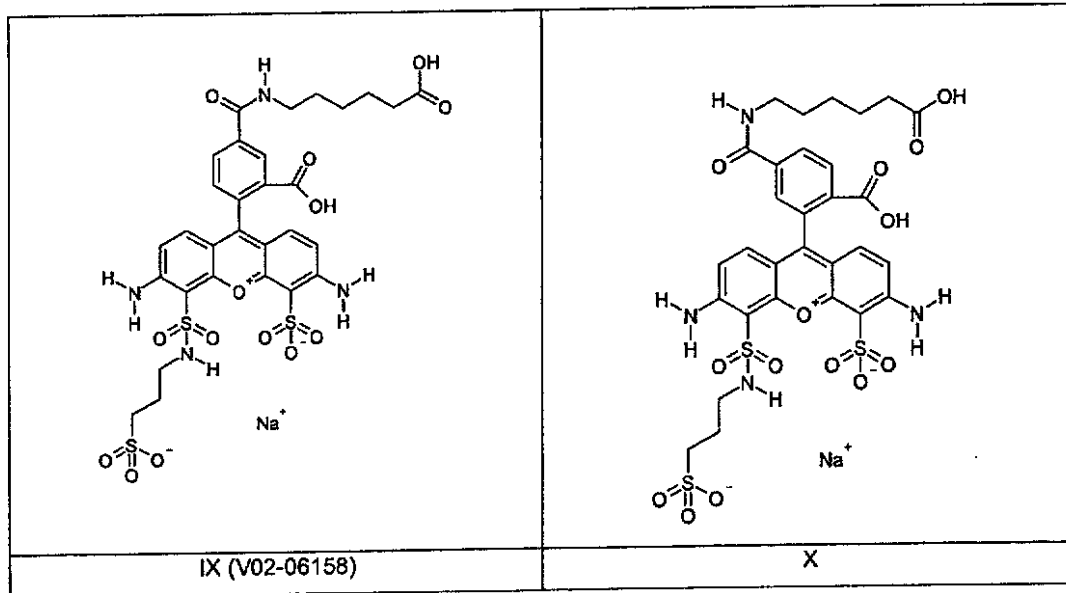
30

40

【化 2 B】



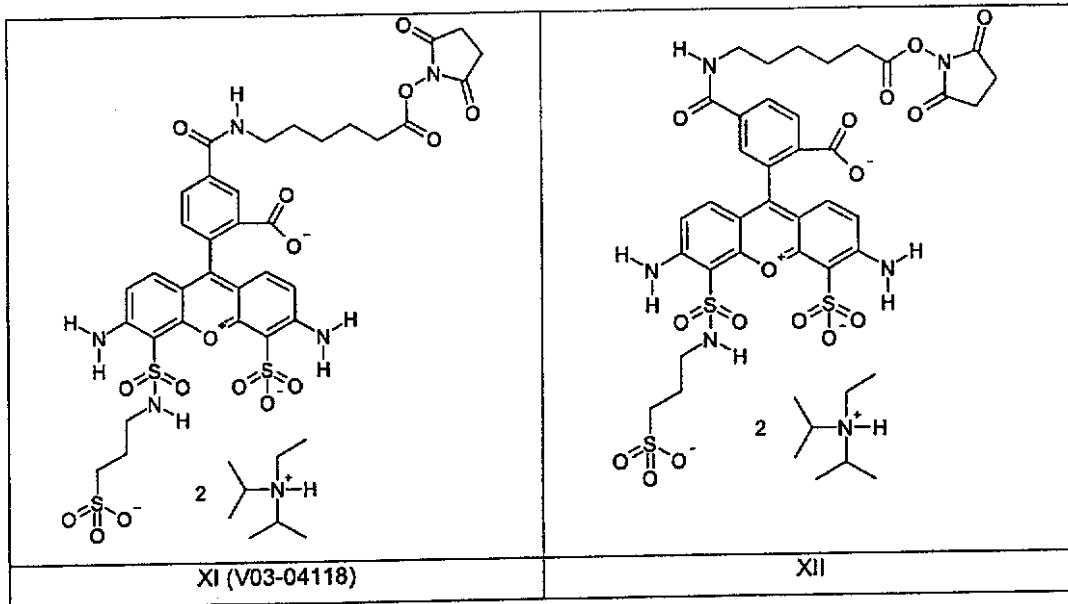
10



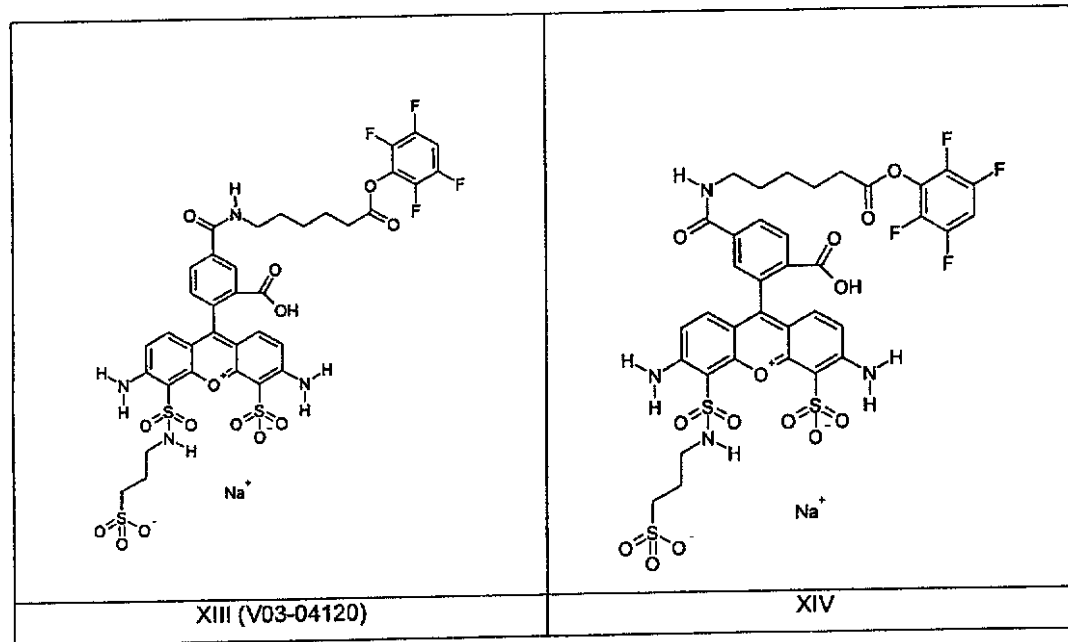
20

30

【化 2 C】



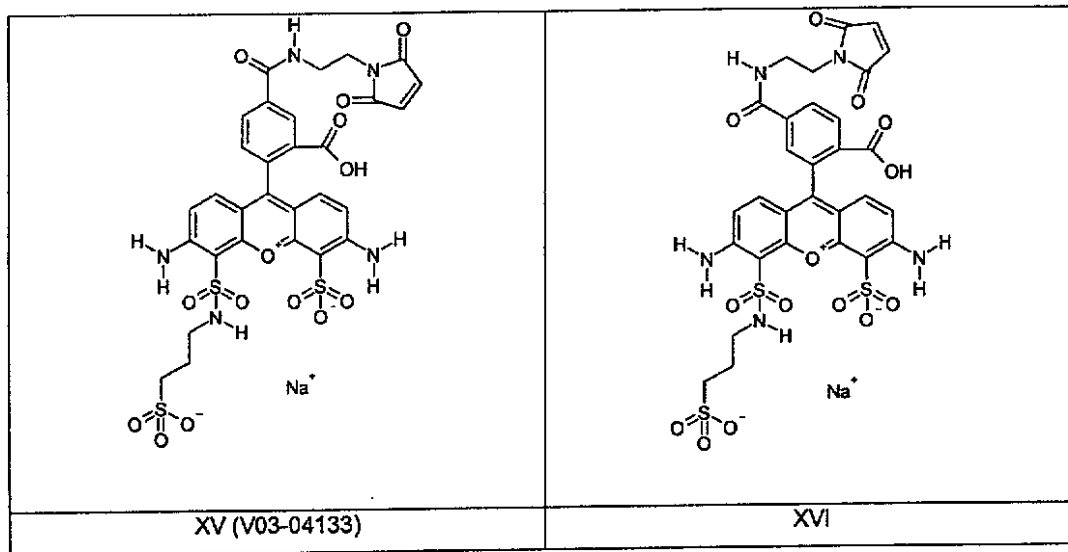
10



20

30

【化2D】



10

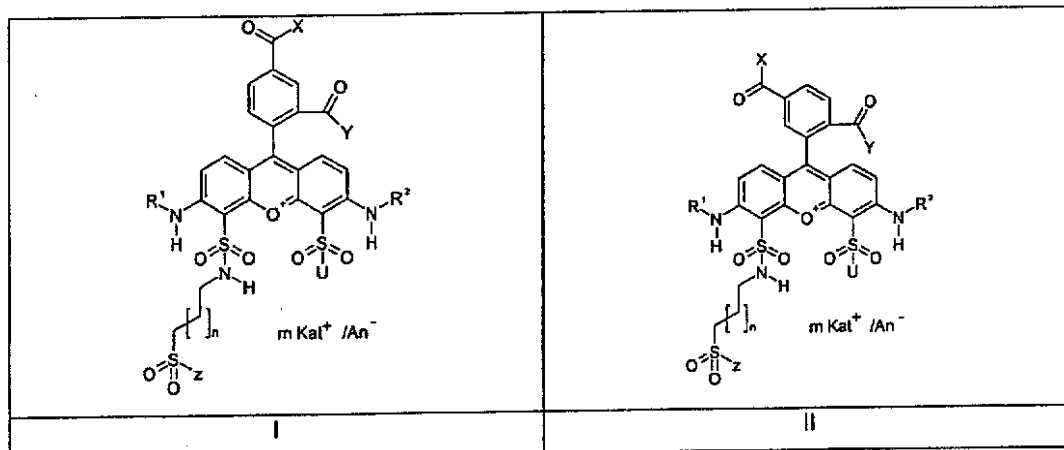
の実施態様が挙げられる。

【0009】

別の実施態様は、少なくとも1種の賦形剤と、
一般式Iまたは一般式II：

20

【化3】



30

[式中、

R¹およびR²は、同じかまたは異なり、独立して、-H、-C₁~C₁₈アルキル、および-スルホアルキルからなる群から選択され；

XおよびYは、同じかまたは異なり、独立して、-O⁻、-OH、-SH、-NH-NH₂、-F、-Cl、-Br、-I、-O-Su(スクシニミジル/スルホスクシニミジル)、-O-STP(4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、-O-TFP(2,3,5,6-テトラフルオロフェニル)、-O-ベンゾトリアゾール、-ベンゾトリアゾール、-NR-CO-CH₂-I、-NR₂、-NR-生体分子、-NR-L-COO⁻、-NR-L-COOH、NR-L-COO-Su、-NR-L-COO-STP、-NR-L-COO-TFP、-NR-L-CONR₂、-NR-L-CO-生体分子、-NR-L-CO-NH-NH₂、-NR-L-OH、-NR-L-O-ホスホルアミダイト、-NR-L-CHO、-NR-L-マレイミド、および-NR-L-NH-CO-CH₂-I〔ここで、Rは、R¹またはR²と同じであり、Lは、酸素、置換された窒素、および/または硫黄からなる群から選択される少なくとも1種の原子で置換されていてもよい、直鎖状(-(CH₂)_o-、o=1~15)の、交差の、または環状の二価のアルカン基からなる群から選択され、前記生体分子は、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、またはハプテンである〕からなる群から選択され；

40

50

Z は、 $-O^-$ または $-OH$ であり；

U は、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、または $-NH-L-SO_2Z$ であり；

K a t は、Li、Na、K、（モノ-、ジ-、またはトリアルキル）アンモニウム、または他の陽イオンであり；

A n は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-BF_4$ 、 $-ClO_4$ 、 $-CH_3CO_2$ 、 $-CF_3CO_2$ 、または他の陰イオンであり；

m は、式 I または式 II の色素部分の正または負の電荷を補うのに必要な 1~6 の整数であり；かつ

n は、0~12 の整数である]

の少なくとも 1 種の化合物と

を含む、生体適合性色素組成物である。

10

【0010】

別の実施態様は、少なくとも 1 種の賦形剤と、式 III、式 IV、式 V、式 VI、式 VII、式 VIII、式 IX、式 X、式 XI、式 XII、式 XIII、式 XIV、式 XV、および式 XVI、およびこれらの組合せから選択される化合物とを含む生体適合性色素組成物である（ここで、式 III~XVI は上述したとおりである）。

【0011】

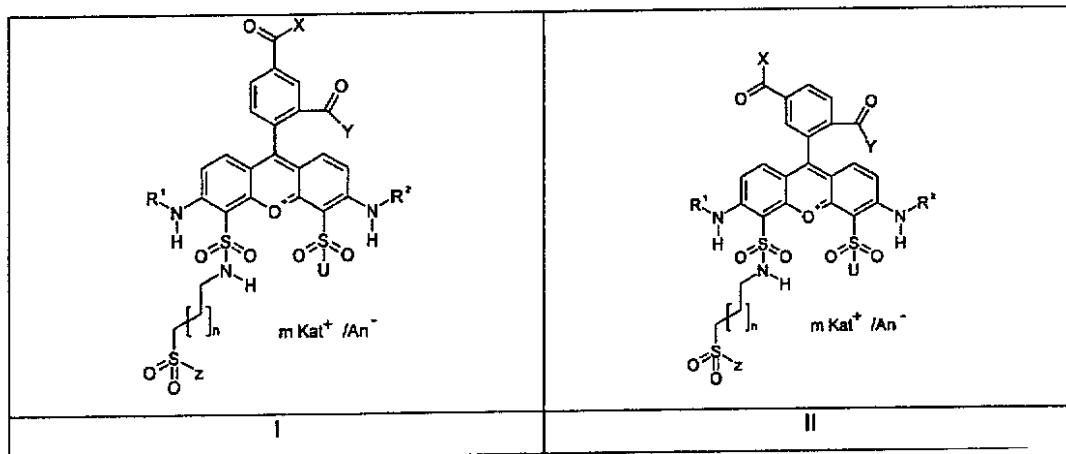
別の実施態様は、少なくとも 1 種の生体分子をラベリングする方法であって、

少なくとも 1 種の賦形剤と、

一般式 I または一般式 II：

20

【化 4】



30

[式中、

R¹ および R² は、同じかまたは異なり、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{18}$ アルキル、および $-$ スルホアルキルからなる群から選択され；

X および Y は、同じかまたは異なり、独立して、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH-NH_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-O-Su$ （スクシニミジル / スルホスクシニミジル）、 $-O-STP$ （4-スルホ-2,3,5,6-テトラフルオロフェニル）、 $-O-TFP$ （2,3,5,6-テトラフルオロフェニル）、 $-O$ -ベンゾトリアゾール、 $-NR-CO-CH_2-I$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR$ -生体分子、 $-NR-L-COO^-$ 、 $-NR-L-COOH$ 、 $-NR-L-COO-Su$ 、 $-NR-L-COO-STP$ 、 $-NR-L-COO-TFP$ 、 $-NR-L-CONR_2$ 、 $-NR-L-CO$ -生体分子、 $-NR-L-CO-NH-NH_2$ 、 $-NR-L-OH$ 、 $-NR-L-O$ -ホスホルアミダイト、 $-NR-L-CHO$ 、 $-NR-L$ -マレイミド、および $-NR-L-NH-CO-CH_2-I$ [ここで、R は、R¹ または R² と同じであり、L は、酸素、置換された窒素、および / または硫黄からなる群から選択される少なくとも 1 種の原子で置換されていてもよい、直鎖状 ($-(CH_2)_o-$ 、 $o = 1 \sim 15$) の、交差の、または環状の二価のアルカン基からなる群から選択され、前記生体分子は、タンパク質、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ビオチン、またはハプテンである] からなる群から選択され；

40

Z は、 $-O^-$ または $-OH$ であり；

50

U は、 $-O^-$ 、 $-OH$ 、または $-NH-L-SO_2Z$ であり；

K a t は、Li、Na、K、（モノ-、ジ-、またはトリアルキル）アンモニウム、または他の陽イオンであり；

A n は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-BF_4$ 、 $-ClO_4$ 、 $-CH_3CO_2$ 、 $-CF_3CO_2$ 、または他の陰イオンであり；

m は、式Iまたは式IIの色素部分の正または負の電荷を補うのに必要な1~6の整数であり；かつ

n は、0~12の整数である]

の少なくとも1種の化合物と

を含む組成物を、前記化合物が生体分子に結合するのに足りる条件の下、有効な濃度で前記生体分子に供給する工程；および

前記生体分子に結合した結合体を検出する工程を含む方法である。

【0012】

別の実施態様は、少なくとも1種の生体分子をラベリングする方法であって、

少なくとも1種の賦形剤と、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII、式IX、式X、式XI、式XII、式XIII、式XIV、式XV、および式XVI、およびこれらの組合せの少なくとも1種の化合物とを含む組成物を、前記化合物が生体分子に結合するのに足りる条件下、有効な濃度で前記生体分子に供給する工程；および

前記生体分子に結合した結合体を検出する工程

を含む方法である（ここで、式III~XVIは上述したとおりである）。

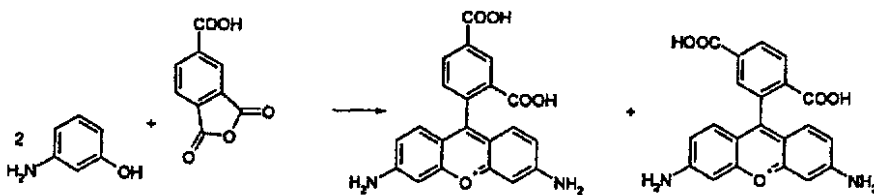
【0013】

実施態様において、一般式Iおよび/または式IIの化合物として、下記式III（V03-04093）、式IV、式V（V03-04115）、式VI、式VII（V03-04153）、式VIII、式IX（V02-06158）、式X、式XI（V03-04118）、式XII、式XIII（V03-04120）、式XIV、式XV（V03-04133）、および式XVIの実施態様が挙げられる。

【0014】

1つの実施態様において、下記式：

【化5】



5-カルボキシ-ローダミン110 6-カルボキシ-ローダミン110

のとおり、出発物質としてm-アミノフェノールおよびトリメリット酸無水物を用いて、5-カルボキシ-ローダミン110が、6-カルボキシ-ローダミン110との異性体混合物として形成される。この5/6カルボキシ-ローダミン異性体混合物の収率は約16%であった。

【0015】

5-カルボキシ-ローダミンから出発して、この反応は下記のとおりスルホクロル化反応によって進行する：

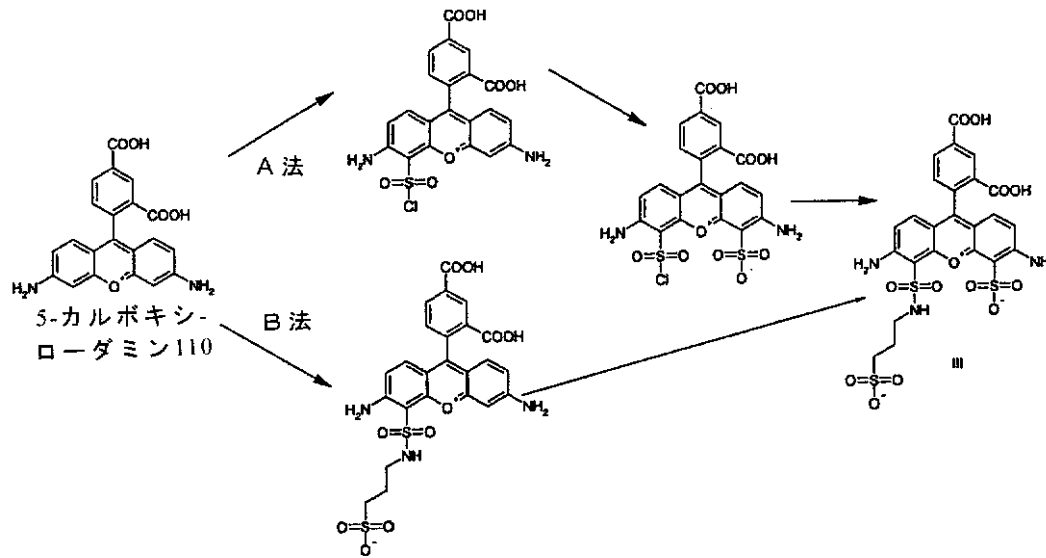
10

20

30

40

【化6】



10

【0016】

1つの実施態様は、スルホンアミドキサンテン色素誘導体を蛍光染料として用いる。この実施態様では、色素誘導体を、さまざまなアプリケーション（例えば、ゲルまたはプロット上、細胞内、組織切片内などの電気泳動法によって分離されるアプリケーション）において生体分子（例えば、タンパク質など）を染色するために用いる。この実施態様では、反応性スルホンアミドキサンテン色素誘導体は、生体分子に共有結合的に連結していてもよく、かつ/あるいは色素誘導体の生体分子への非共有結合性相互作用（例えば、吸収）を増大させるために構成要素を色素誘導体に加えてもよい。このような非共有結合性相互作用は、極性基または荷電した基に欠ける疎水性構成要素（例えば、アルキル鎖、芳香環など）を加えることによって容易にすることができる。1つの実施態様では、疎水性構成要素と荷電したまたは極性の親水性構成要素とを色素化合物の別の部分で組み合わせると、生体分子（例えば、タンパク質など）の吸収性の染色が増強された。

20

【0017】

本化合物は、光に安定な緑色の蛍光物質であり、レーザー光を増強し、これによってアルゴンイオンレーザーを用いる試料中の化合物の検出を容易にするのに良好な中間波長に吸収極大を有する。本化合物は、試料中の唯一の色素として用いることができる。あるいは、本化合物は、マルチプレックスアッセイに使用することができる。1つの実施態様は、マルチプレックスアッセイにおいて、本化合物を赤色色素と共に用いる。1つの実施態様は、本化合物を免疫蛍光顕微鏡法において用いる。1つの実施態様は、本化合物をハイコンテント分析（HGA）アッセイおよび化合物スクリーニング（例えば、核内移行、タンパク質誘導など）に対するタンパク質性細胞質を定量するためのさまざまな刺激物質を用いるものにおいて用いる。1つの実施態様は、本化合物を、（直接または間接の）免疫蛍光法において用いる（例えば、細胞内標的の局在を検出および定量するためのもの）。1つの実施態様は、本結合体化合物をスタンドアロンの一次抗体として用いる。1つの実施態様は、本化合物をHCAアッセイのためのターンキー試薬キットに組み込む。

30

40

本発明は、以下の実施例によってさらに理解されるであろう。

【実施例】

【0018】

[実施例1]：化合物III（V03-04093）のA法による合成

821 mg（2 mmol）の5-(6)-カルボキシローダミン110塩酸塩（純粋な異性体または混合物）の10 mlクロロスルホン酸溶液を、80 にて1時間加熱した。室温に冷却した後、10 mlの20%発煙硫酸を添加し、この溶液を室温にて90分間保った。次いで、この溶液を400 gの破碎した氷に注意深く注加し、得られた沈殿物を濾取した。氷水で洗浄した後、この沈

50

殿物を、238 mg (2 mmol) の3-アミノプロパンスルホン酸のアセトニトリルと水との混合液 (10 ml ; V/V = 1:1) 中の溶液 (1 ml のトリエチルアミンを含有する) に溶解させた。溶媒を除去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー (RP-18シリカゲル ; 1% トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル / 水2/8) によって精製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 491 \text{ nm}$

MS (ESI⁺) [m/z] : 656.4 [M]⁺

【0019】

[実施例2] : 化合物V (V03-04115) の合成

V03-04093 (154 mg ; 0.2 mmol) を、DMFと水との混合液 (10 ml ; V/V = 3:1) に溶解し、0 に冷却した。この溶液に、O-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 (120 mg ; 0.4 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (52 mg ; 0.4 mmol) を添加した。0 にて20分の後、溶媒を高い真空度で蒸留により除いた。残渣をカラムクロマトグラフィー (RP-18シリカゲル ; アセトニトリル / 水2/8) によって精製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 494 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 751.1 [M+H]⁻

【0020】

[実施例3] : 化合物VII (V03-04153) の合成

V03-04093 (154 mg ; 0.2 mmol) を、DMFと水との混合液 (10 ml ; V/V = 3:1) に溶解した。この溶液に、テトラフルオロフェノール (33 mg ; 0.2 mmol) 、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (82 mg ; 0.4 mmol) 、およびジイソプロピルエチルアミン (52 mg ; 0.4 mmol) を添加した。室温にて24時間の後、溶媒を高い真空度で蒸留により除いた。残渣を塩化ナトリウム (584 mg ; 10 mmol) を含有する10 mlの水に溶解させ、カラムクロマトグラフィー (RP-18シリカゲル ; アセトニトリル / 水2/8) によって精製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 495 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 802.1 [M]⁻

【0021】

[実施例4] : 化合物IX (V02-06158) の合成

化合物V (V03-04115) (実施例2に従って調製したもの) (101 mg ; 0.1 mmol) を、DMFと水との混合液 (5 ml ; V/V = 3:1) に溶解した。この溶液に、アミノカプロン酸 (26 mg ; 0.2 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (52 mg ; 0.4 mmol) を添加した。室温にて2時間の後、溶媒を高い真空度で蒸留により除いた。残渣を塩化ナトリウム (584 mg ; 10 mmol) を含有する10 mlの水に溶解させ、カラムクロマトグラフィー (RP-18シリカゲル ; アセトニトリル / 水3/7) によって精製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 492 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 767.1 [M]⁻

【0022】

[実施例5] : 化合物XI (V03-04118) の合成

化合物XI (V03-04118) を、化合物IX (V02-06158) (79 mg ; 0.1 mmol) を出発物質として用いて、実施例2の化合物V (V03-04115) と同じように調製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 492 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 864.1 [M+H]⁻

【0023】

[実施例6] : 化合物XIII (V03-04120) の合成

化合物XIII (V03-04120) を、化合物IX (79 mg ; 0.1 mmol) を出発物質として用いて、実施例3の化合物VII (V03-04153) と同じように調製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 493 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 915.2 [M]⁻

【0024】

[実施例7] : 化合物XV (V03-04133) の合成

10

20

30

40

50

化合物V (V03-04115) (実施例2に従って調製したもの) (101 mg ; 0.1 mmol) を、DMFと水との混合液 (5 ml ; V/V = 3:1) に溶解した。この溶液に、2-マレイミドエチルアミノトリフルオロアセテート (38 mg ; 0.15 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (52 mg ; 0.4 mmol) を添加した。室温にて2時間の後、溶媒を高い真空度で蒸留により除いた。残渣を塩化ナトリウム (584 mg ; 10 mmol) を含有する水に溶解させ、カラムクロマトグラフィー (RP-18シリカゲル ; アセトニトリル / 水3/7) によって精製した。

UV-Vis (pH7緩衝) : $\lambda_{abs} = 493 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z] : 776.1 [M]⁻

【0025】

[実施例8] : タンパク質への結合

10

化合物に、それらが他の分子に共有結合的に連結することを可能にする基を加えることによって、反応性を付与した。反応性の基を、例えばタンパク質などの巨大分子 (例えば、抗体、ストレプトタビジン) に結合させ、免疫蛍光アッセイ (例えば、ウエスタンプロット、ELISA、フローサイトメトリー、細胞内アッセイなど) において用いた。

【0026】

10 mg/mlのヤギ抗ウサギIgG(H+L)(GAR) 3 x 10 mgおよび10 mg/mlのヤギ抗マウスIgG(H+L)(GAM) 3 x 10 mgを、pH8.4の50 mM ホウ酸塩緩衝液5リットルに対して一晩透析した。透析した各抗体を、0.1 mlのDMF中で再構成された式V、XI、およびXIIIの各化合物10モル過剰でラベルした。反応を室温 (約20 ~ 約22) にて2時間行った。試料を、0.15 M NaCl、pH7.2 (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) の0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液3 x 5

20

【0027】

10 mg/mlのストレプトタビジン (SA) 3 x 10 mgを、pH8.4の50 mM ホウ酸塩緩衝液中で再構成した。このストレプトタビジンを、0.1 mlのDMF中で再構成された式V、XI、およびXIIIの各化合物5モル過剰でラベルした。反応を室温にて2時間行った。試料を、0.15 M NaCl、pH7.2 (PBS) の0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液3 x 5リットルに対して一晩透析することによって、過剰の未反応の化合物を除去した。PBSを3回交換して用いた。ラベルしたタンパク質の1:100希釈液を作成し、試料の吸収スキャンを実施した直後に、式V、XI、およびXIIIの各化合物で作られた結合体について、色素のモル数とタンパク質のモル数との比が2~4の間 (2および4を含む) であることを定量した。

30

【0028】

10 mg/mlのニュートラビジン (登録商標) ビオチン結合タンパク (NA) (Pierce Biotechnology社) 1 x 10 mgを、pH8.4の50 mM ホウ酸塩緩衝液中で再構成した。ニュートラビジン (登録商標) ビオチン結合タンパクを、DMF中で再構成された式Vの化合物5モル過剰でラベルした。反応を室温にて2時間行った。過剰の未反応の化合物を、試料を、0.15 M NaCl、pH7.2 (PBS) の0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液3 x 5リットルに対して一晩透析することによって除去した。PBSを3回交換して用いた。ラベルしたタンパク質の1:100希釈液を作成し、試料の吸収スキャンを実施した直後に、式Vの化合物で作られた結合体について、色素のモル数とタンパク質のモル数との比が2~3の間 (2および3を含む) であることを定量した。

40

【0029】

[実施例9] : ヤギ抗ウサギ結合体のプレートアッセイ

式Vの化合物-ヤギ抗ウサギ(GAR) 結合体を用いた機能アッセイのデータを図1に示す。このアッセイは、室温 (約20 ~ 約22) にて段階的に希釈した96ウェルの白色半透明のウサギIgG-コーティングプレート (10 μg/ml ~ 0 μg/ml) で行った。このプレートを、PBS-0.05% Tween 3 x 200 μl、およびPBS緩衝液1 x 200 μlで洗浄した。式V-ヤギ抗ウサ

50

ギ(GAR)結合体を、PBS緩衝液中、0.004 mg/mlに希釈した。この希釈した結合体をプレートのウェルに注ぎ(100 µl/ウェル)、このプレートを1時間インキュベートした後、上述の通りに洗浄した。PBS緩衝液をプレートに加え(100 µl/ウェル)、TECAN Safire(登録商標)をグリーンレーザー設定にて励起波長495 nmおよび発光波長519 nmで使用して蛍光強度を得た。商業的に入手可能なAlexa Fluor(登録商標)488-GAR(Molecular Probes社、Eugene オレゴン州)を、同じ濃度に希釈し、式V-GAR結合体について前述した通りに評価した。

【0030】

図1に示したように、ウサギIgGが、2 ng/ウェルの濃度で、式V-GAR結合体を用いて検出された。式III-GAR結合体をアッセイした場合、Alexa Fluor(登録商標)488-GAR結合体より10%高いシグナル強度が得られた(データは図示せず)。

【0031】

[実施例10]: ストレプトタビジン結合体およびニュートラビジン(登録商標)結合体を用いるプレートアッセイ

ストレプトタビジンおよびニュートラビジン(登録商標)がそれぞれ結合した式Vの化合物を用いた機能アッセイのデータを、それぞれ図2および図3に示す。このアッセイは、段階的に希釈した96ウェルの白色半透明のビオチン化-BSA-コーティングプレート(2 µg/ml ~ 0 µg/ml)で行った。プレートを、PBS-0.05% Tween 3 x 200 µl、およびPBS緩衝液1 x 200 µlで洗浄した。式V-ストレプトタビジン(SA)結合体および式V-ニュートラビジン(登録商標)(NA)結合体を、PBS緩衝液中、0.004 mg/mlに希釈した。希釈した結合体をプレートのウェルに注ぎ(100 µl/ウェル)、このプレートを覆い、光を遮断し、1時間インキュベートした後、上述の通りに洗浄した。PBS緩衝液をプレートに加え(100 µl/ウェル)、TECAN Safire(登録商標)をグリーンレーザー設定にて使用して蛍光強度を得た。商業的に入手可能なAlexa Fluor(登録商標)488-SA(Molecular Probes社)を、同じ濃度に希釈し、式Vが結合したSAについて前述した通りに評価した。

【0032】

SAに対して図2に、NAに対して図3に示したように、このアッセイで、ビオチン化されたBSAが、2 ng/ウェルの濃度で、式Vが結合したストレプトタビジンを用いても式Vが結合したニュートラビジン(登録商標)を用いても検出された。

【0033】

[実施例11]: マルチプレックスウエスタンブロット

組換えマウスTNF とHeLa細胞ライセートとの組合せを、4~20%のトリス-グリシンゲル上の電気泳動法によって分離した。タンパク質は、Hybond-LFPメンブレン(Amersham社)に移動し、1 x BSA/PBS-0.05% Tween中で一晩ブロックされた。このブロットを、PBS-0.05% Tween-20で希釈したマウス抗-チューブリンMAb一次抗体(1 µl/ml)およびウシ抗-TNF 一次抗体(1 µg/ml)と共に1時間コインキュベートした。インキュベーションの後、ブロットをPBS-0.05% Tween-20で3 x 10分間洗浄した。PBS-0.05% Tween-20で希釈した二次抗体-式V-ヤギ抗ウサギ(GAR)結合体(0.067 µg/ml)および二次抗体-DyLight(登録商標)649-ヤギ抗マウス(GAM)結合体(0.067 µg/ml)を、タンパク質の検出のためにインキュベートした。このインキュベーションの後、ブロットをPBS-0.05% Tween-20で6 x 5分間洗浄した。画像は、グリーンレーザーおよびレッドレーザー設定にてTyphoon 9410 Variable Model Imagerで撮影した。

【0034】

結果を図4に示す。各レーン1~7は、以下の量の組換えマウスTNF : 0.20 ng、0.39 ng、0.78 ng、6.25 ng、12.5 ng、25 ng、および50 ngをそれぞれ含有し、HeLa細胞ライセートの以下の希釈液: HeLa細胞ライセートの1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、および1:64希釈液をそれぞれ含有する。赤色に染色されたバンドは、TNF である(純粋)。緑色に染色されたバンドは、細胞ライセート中のチューブリンである。TNF は、式V-GAR結合体を用いて0.2 ngに至るまで検出された。これらの結果は、開示したローダミン結合体がマルチプレックスアプリケーションにおいて用いられ得ることを実証する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

[実施例 1 2] : 免疫蛍光アッセイ

組織学的に調製されたヒト小腸正常細胞を含有するスライドを、インキュベーター内で45℃にて50分間加熱することによって脱パラフィン化した。このスライドを、EZ-脱ワックス溶液中の5分間のインキュベーション2回によって再水和した後、超純粋で1回およびPBS-0.05% Tween-20 (PBST) で1回洗浄した。スライドを、標的取り出し溶液中、95℃～99℃にて40分間インキュベートした後、20分間室温に冷却し、PBS-0.05% Tween-20で1回洗浄することによって、標的を取り出した。このスライドを、PBS-0.05% Tween-20で2 x 3分間洗浄した。

【 0 0 3 6 】

このスライドをもとのインキュベーション容器に戻し、PBS-0.05% Tween-20中の3%の正常ヤギ血清15 mlを添加し、このスライドを4℃にて一晩インキュベートした。このスライドを遠心分離で乾燥させた。DyLight (登録商標) 680に結合したコムギ胚芽凝集素 (WGA) を10 µg/mlに希釈し、ウサギ抗-S-100一次抗体を(もとの濃度から) 1:400に希釈した。両試薬は、同じ1 ml のPBS-0.05% Tween-20中で希釈した。200 µlのこの処理液をスライドに注いだ。スライド上に収容された組織を、インキュベーションチャンバーで覆って、抗体溶液の蒸発を防いだ。このスライドを、一次抗体で1時間インキュベートした。このスライドを、PBS-0.05% Tween-20で3回洗浄した。

【 0 0 3 7 】

式V-ヤギ抗ウサギ(GAR)結合体を、10 µg/mlに希釈し、200 µlをスライドに注いだ。このスライド上に収容された組織を、インキュベーションチャンバーで覆って、抗体溶液の蒸発を防いだ。このスライドを、二次抗体で1時間インキュベートした後、PBS-0.05% Tween-20で3回洗浄した。このスライドをPBS中にディップした後、遠心分離により乾燥させた。一滴の蛍光封入媒体をスライドに添加した後、カバーガラスを施した。このスライドをZeissの共焦点顕微鏡を使用して視覚化するまで4℃で貯蔵した。

【 0 0 3 8 】

結果を図5に示す。赤色の染色領域は、DyLight (登録商標) 680-WGA結合体を示す。緑色の染色領域は、式V-GAR結合体を示す。これらの結果は、開示したローダミン結合体が免疫蛍光アプリケーションにおいて用いられ得ることを実証する。

【 0 0 3 9 】

[実施例 1 3] : 蛍光In-Situハイブリダイゼーション (FISH)

間期および中期を囲む視認可能な細胞質を有する細胞に対して、細胞を0.005%のペプシンを含む0.01 M HCl中37℃にて10分間インキュベートすることによって、スライドを調製した。次いで、このスライドをPBS中で2 x 1分間洗浄し、PBS中の1%のホルムアルデヒド中で10分間インキュベートした。このスライドをPBS中で2 x 1分間インキュベートし、70%エタノール中で1分間脱水させた後、98%エタノール中で1分間脱水させ、100%エタノール中で1分間脱水させた後、空気乾燥させた。

【 0 0 4 0 】

標的に対して式Vの化合物でラベルしたプローブ10 µlを、0.5 mlの微小遠心管に分配した後、水浴中で96℃にて5分間インキュベートした。この管を簡単に遠心分離した後、標的に10 µlのプローブ混合物を注ぎ、カバーガラスで覆った。このスライドおよびプローブを、温度制御されたホットプレート上で80℃にて2分間の間変性させる。その後、加湿された環境中、37℃にて12~18時間インキュベートした。

【 0 0 4 1 】

カバーガラスを、37℃にて2 x SSC/0.1% Tween-20中に浸漬させることによって取り除いた。次いで、このスライドを、0.5 x SSC/0.1% SDS中60℃～65℃にて4 x 5分間洗浄した後、蒸留水で簡単にリンスし、直射光を遮断して空気乾燥させた。DAPI抗退色溶液(20 µl)を標的に注ぎ、カバーガラス(24 mm x 50 mm)で覆った。その後、適切なフィルターセットまたはレーザーを備えた蛍光顕微鏡上で観察した。蛍光発光が、ハイブリダイゼーション後に検出された。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

[実施例 1 4] : フローサイトメトリー

フローサイトメトリーを使用し、ヤギ抗マウス(GAM)二次抗体でラベルされた式Vの化合物を用いて、Jurkat細胞上のCD3レセプターを評価する。Jurkat細胞を、5分間4000 rpmで遠心分離し、1 x 3 mlのdPBSで洗浄し、5 mlのdPBSに再懸濁させる。細胞の濃度は 28×10^6 細胞/mlに調節する。細胞を、マウス抗-CD3抗体(0.625 μ g/ml)中で45分間インキュベートし、5分間遠心分離にかけ、2 x 1 mlのPBSで洗浄する。細胞を、dPBSで希釈された式V-ヤギ抗マウス結合体(2.7 μ g/ml)中で45分間インキュベートする。その後、細胞を上述の通りに遠心分離し、2 x 1 mlのdPBSで洗浄し、300 μ lのdPBSに再懸濁させる。データをBecton Dickinson FACSCalibur(登録商標)または同等のフローサイトメトリーに収集する。個々の細胞上の抗体が、高精度、高速、かつ正確に、定量的に検出される。

10

【 0 0 4 3 】

[実施例 1 5] : ハイコンテンツスクリーニング(HCS)および/またはハイコンテンツ分析(HCA)アッセイのための試薬キット

上述した化合物のいずれかを、抗体に結合させ、特定の生物学のためのHCSおよび/またはHCAのためのキットとして調製することができる。このキットは、有効なプロトコールにおける使用指示書を備える。

【 0 0 4 4 】

[実施例 1 6] : ハイコンテンツスクリーニング(HCS)

上述した化合物のいずれかを、抗体に結合させ、p53誘導のHCS測定に用いる。A549細胞を、異なる濃度のカンプトセシンでこれらの細胞を処理する1日前に、96ウェルマイクロプレート上に5000細胞/ウェル播種する。薬剤の存在下、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、加湿されたインキュベーター内で18~20時間個々の細胞をインキュベートした。その後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定化し、0.1%Triton X-100で透過処理した後、ウサギp53一次抗体および上述した化合物の1つのヤギ抗ウサギ結合体でラベル化した。細胞核を、Hoechst 33342でラベル化した。試料を撮影し、ArrayScan(登録商標)でHCS Reader(Cellomics社、Pittsburgh、ペンシルベニア州)上で定量的に分析する。蛍光画像は、5 μ Mのカンプトセシンで核内のp53誘導を示した。未処理の細胞には、p53のシグナルが存在しなかった。カンプトセシン処理した細胞は、核内での鮮やかなp53ラベリングを示した。

20

【 図面の簡単な説明 】

30

【 0 0 4 5 】

実施態様の他の変形も、上記の記述および実施例から当業者に明らかである。したがって、前述した実施態様は、特許請求の範囲を限定するものと解されるべきではない。

【 0 0 4 6 】

本出願は、色を用いて作製された少なくとも1種の図を含む。米国特許法施行規則1.84条に基づき、着色図の受理請求書を同封して同日に提出する。着色図を有する本出願または特許出願公報のコピーは、請求および必要な料金の支払いにより米国特許庁により提供される。

【 図 1 】 図 1 は、特定の化合物(式V)の1つの、タンパク質アッセイにおけるヤギ抗ウサギ結合体としての使用を示す(式V-GAR結合体)。

40

【 図 2 】 図 2 は、ストレプトタビジン結合体としての式Vの使用を示す。

【 図 3 】 図 3 は、ニュートラビジン(登録商標)結合体としての式Vの使用を示す。

【 図 4 】 図 4 は、マルチプレックスウエスタンブロットによるタンパク質の検出のための式Vの使用を示す。

【 図 5 】 図 5 は、免疫蛍光染色における式Vの使用を示す。

【 図 1 】

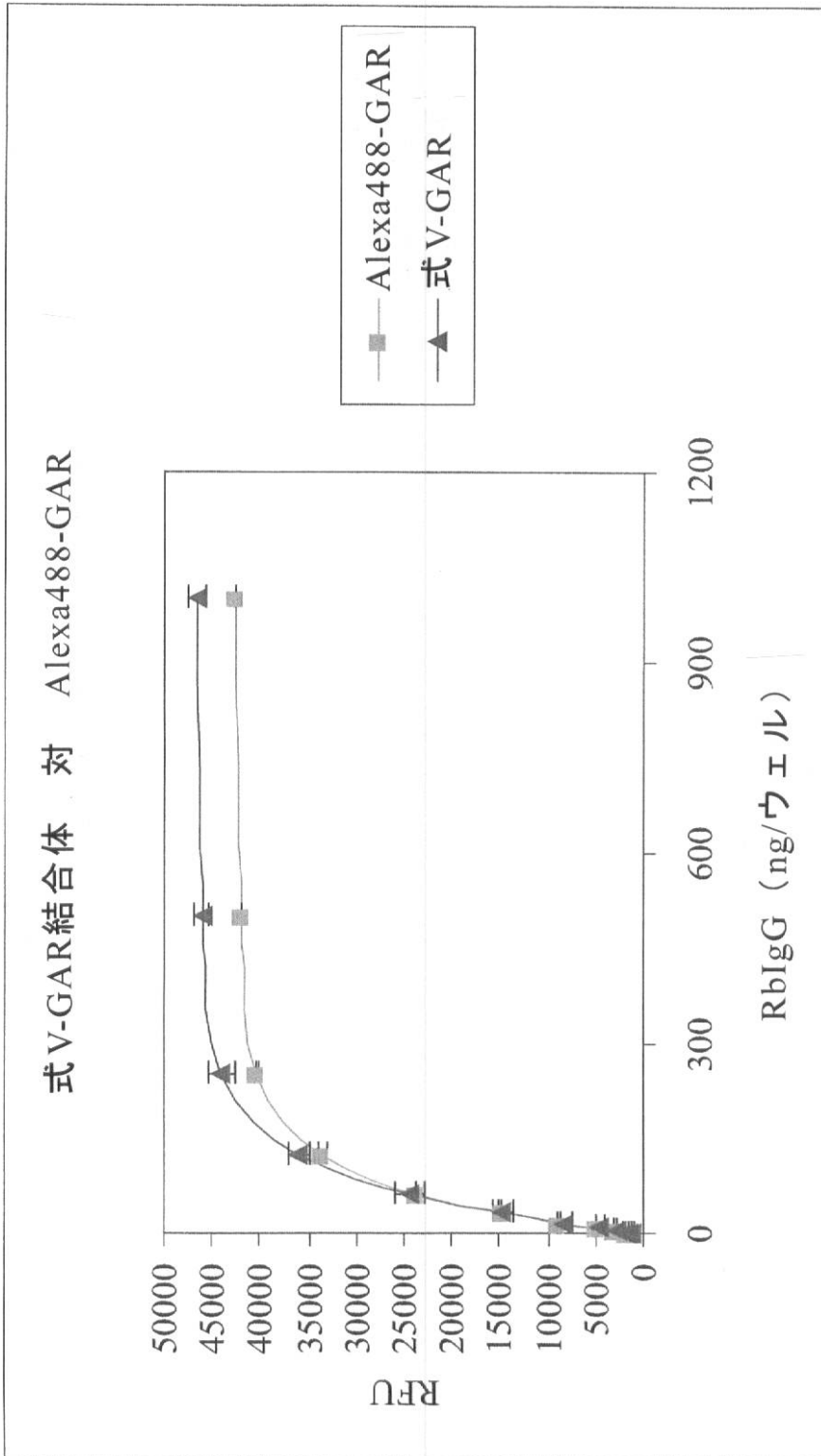
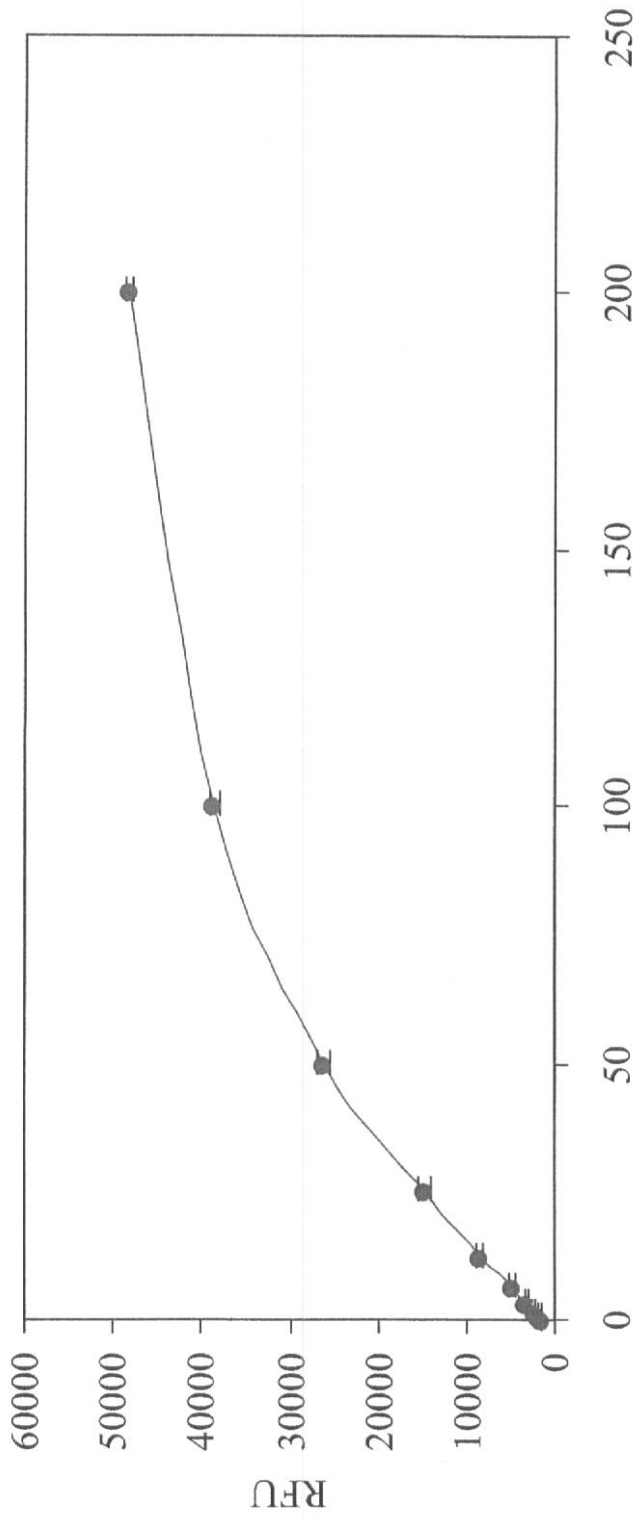


図 1

【 図 2 】

式V-ストレプトタビジン結合体



ビオチン化BSA (ng/ウェル)

図 2

【 図 3 】

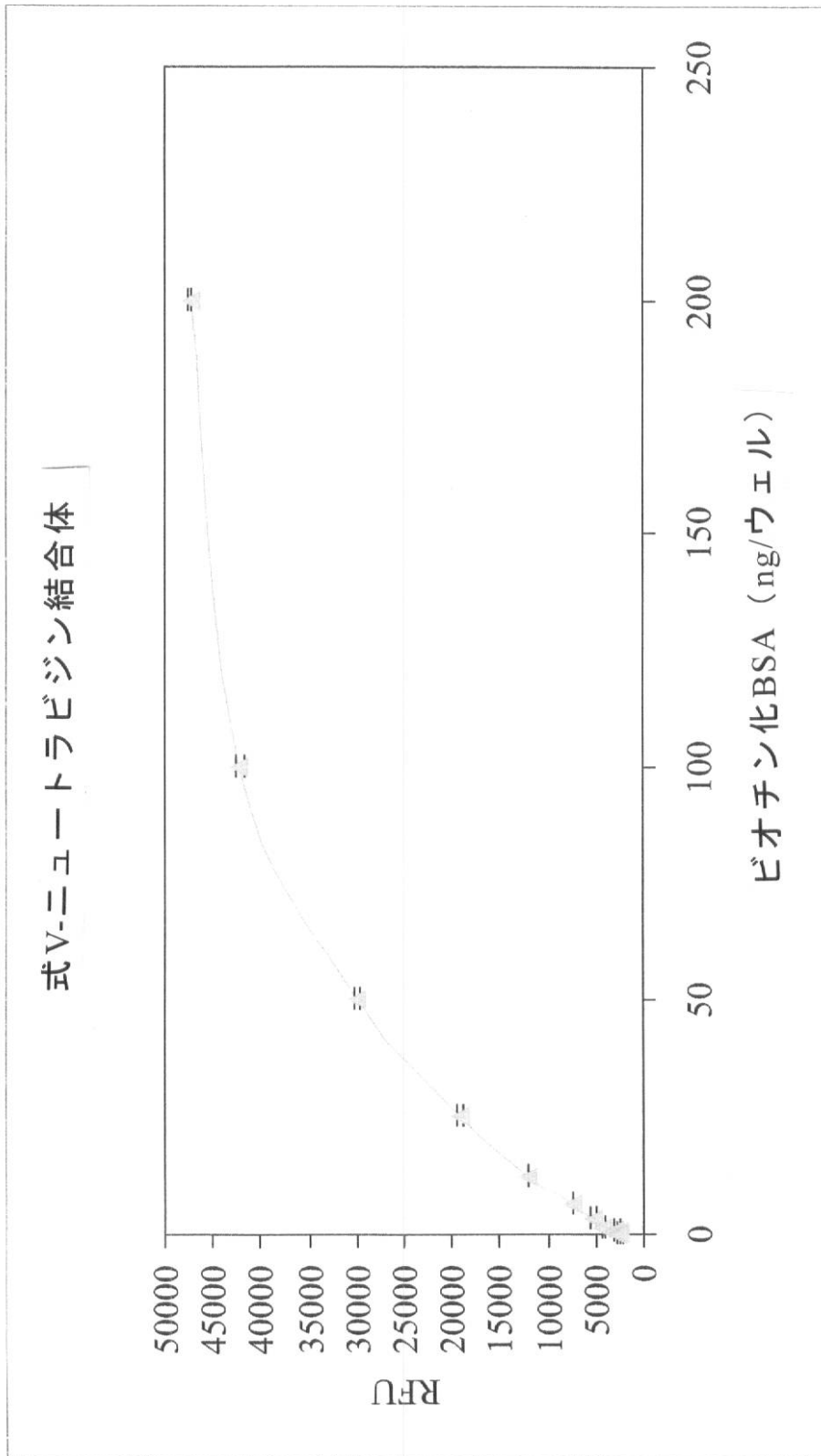


図 3

【 図 4 】

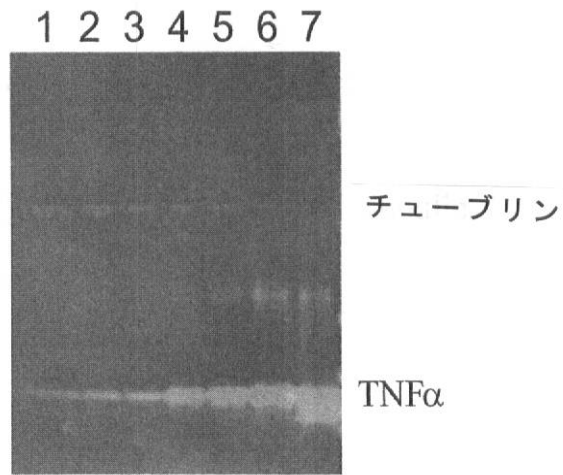


図 4

【 図 5 】

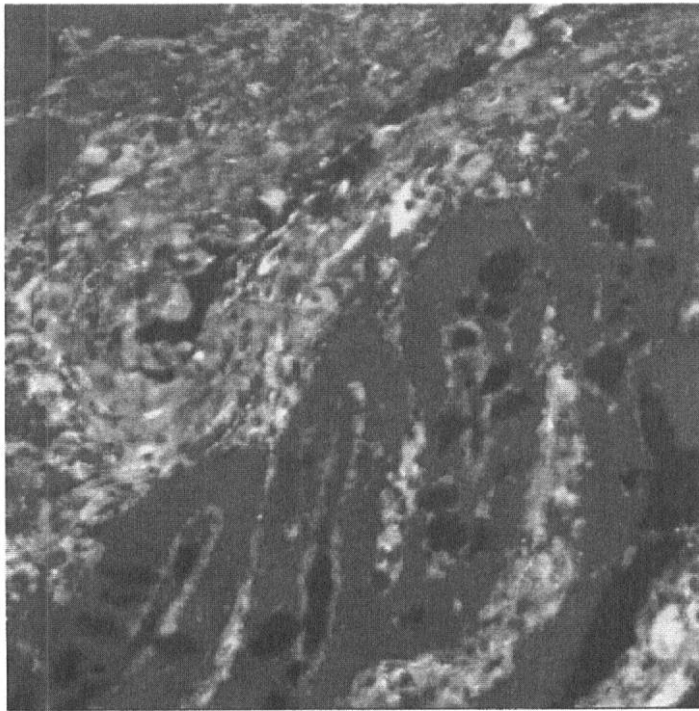


図 5

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴィルヘルム・ゲー・フランク
ドイツ・D - 0 7 7 4 3・イエーナ・グリートガッセ・6
- (72)発明者 マティアス・エス・ヴェンツェル
ドイツ・D - 0 7 7 4 9・イエーナ・ブレントシュトレームシュトラッセ・4
- (72)発明者 ペーター・テー・ツェルネイ
ドイツ・D - 9 9 4 2 5・ヴァイマル・ボーデルシュヴィンクシュトラッセ・1 3 7
- (72)発明者 スルピヒ・デサイ
アメリカ合衆国・イリノイ・6 1 1 1 4・ロックフォード・クロス・ハイヴン・クロース・3 2 1
5
- (72)発明者 グレッグ・ハーマンソン
アメリカ合衆国・イリノイ・6 1 1 1 1・ラヴズ・パーク・スカイ・ドライヴ・1 2 6 0 1
- Fターム(参考) 2G045 DA36 FB03 FB12
4C062 HH16
4C063 AA01 BB07 BB08 BB09 CC79 DD04 EE01

【 外国語明細書 】

SULFONAMIDE DERIVATIVES OF XANTHENE COMPOUNDS**TECHNICAL FIELD**

Compounds, compositions, and methods using sulfonamide derivatives of fluorescent xanthene compounds.

BACKGROUND

Organic fluorescent compounds, also referred to as dyes, are used as sensitive detection reagents in biological assays. Xanthene-type dyes are commercially available as research reagents from a number of manufacturers.

Fluorescein derivatives of these compounds are based on the 3H-xanthene-6-ol-3-one core structure, with a 2-carboxyphenyl group at C9 of the central ring. Rhodamine dyes typically have a 6-amino-3H-xanthene-3-imine core structure with the same 2-carboxyphenyl group at C9. Rhodol based dyes have a central 6-amino-3H-xanthene-3-one structure with the same 2-carboxyphenyl group at C9.

Adding negatively charged sulfonate groups to fluorescent dyes increases their water solubility, facilitating use in biological applications and reducing dye-dye interactions due to like charge repulsion. Sulfonation has been used to modify cyanine dyes (U.S. Patent Nos. 5,268,486; 5,486,616; 5,569,587; and 5,569,766) and xanthene-type dyes (U.S. Patent No. 6,130,101).

Additional compounds, compositions, and methods are desirable.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

This application contains at least one drawing executed in color. A Petition under 37 C.F.R. §1.84 requesting acceptance of the color drawings is filed separately on even date herewith. Copies of this patent or patent application publication with color drawing(s) will be provided by the Office upon request and payment of the necessary fee.

FIG. 1 illustrates use of one specific compound (formula V) as a Goat-Anti-Rabbit conjugate used in a protein assay (formula V-GAR conjugate).

FIG. 2 illustrates use formula V as a Streptavidin conjugate.

FIG. 3 illustrates use of formula V as a NeutrAvidin® conjugate.

FIG. 4 shows use of formula V for protein detection by multiplex Western blotting.

FIG. 5 shows use of formula V in immunofluorescence staining.

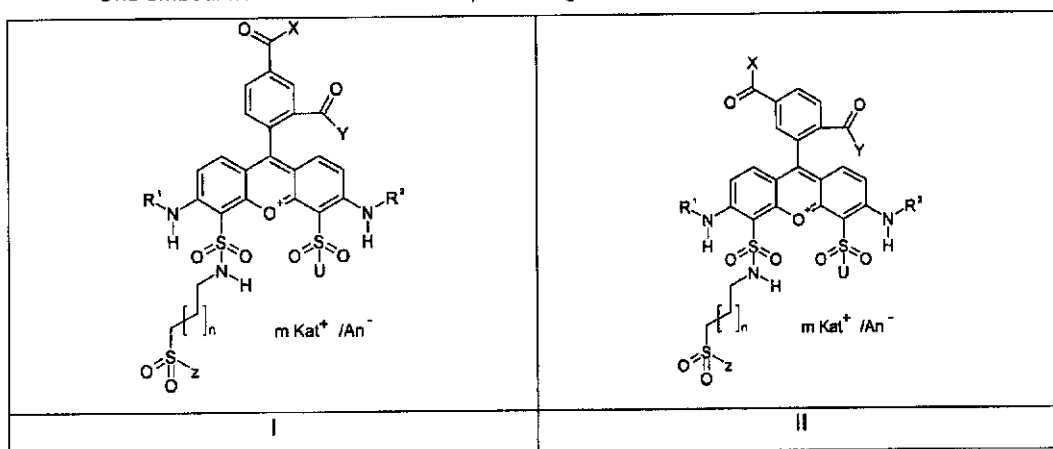
DETAILED DESCRIPTION

Sulfonamide derivatives, particularly aryl sulfonamide derivatives, of compounds containing a xanthene ring structure, are disclosed. These are referred to as fluorescent xanthene compounds or dyes, and include fluoresceins, rhodol dyes, rhodamines, and their reactive derivatives and conjugates. Addition of one or more aryl sulfonamide derivatives and hydrophilic constituents to the sulfonamide nitrogen results in enhanced hydrophilicity and other properties over those of unsubstituted compounds. In one embodiment, the compounds optionally contain a reactive group that may be used for covalent coupling to biomolecules.

These compounds have enhanced fluorescence, water solubility, and biocompatibility, and may be used in compositions and methods as fluorescent probes in biological and other types of assays. Their properties compare favorably with negatively charged sulfonate derivatives.

One embodiment includes xanthene dye derivatives that contain, in addition to the sulfonamide derivative, at least one reactive group L-Rt where L is a linker group covalently attached to the dye and Rt is a reactive group that is capable of covalently linking to another molecule.

One embodiment is at least one compound of general formula I or general formula II



wherein R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, -C₁-C₁₈-alkyl or - ω -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of -O⁻, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $-(CH_2)_o-$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is -O⁻ or OH;

U is -O⁻, -OH, or NH-L-SO₂Z;

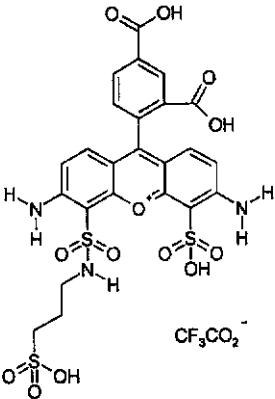
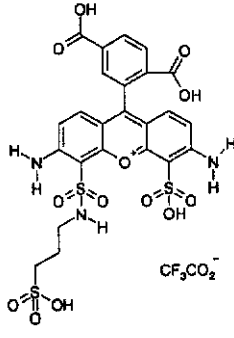
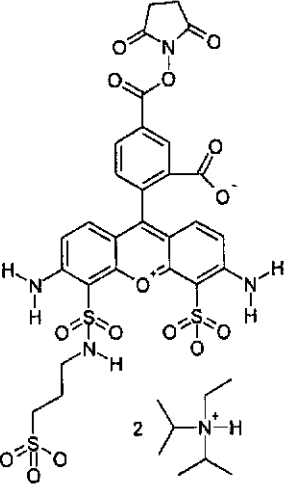
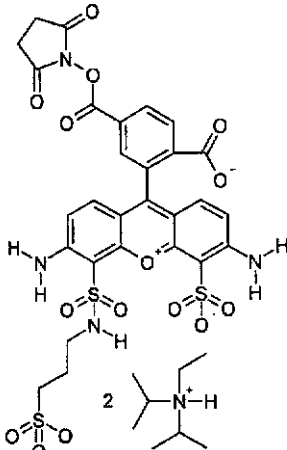
Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

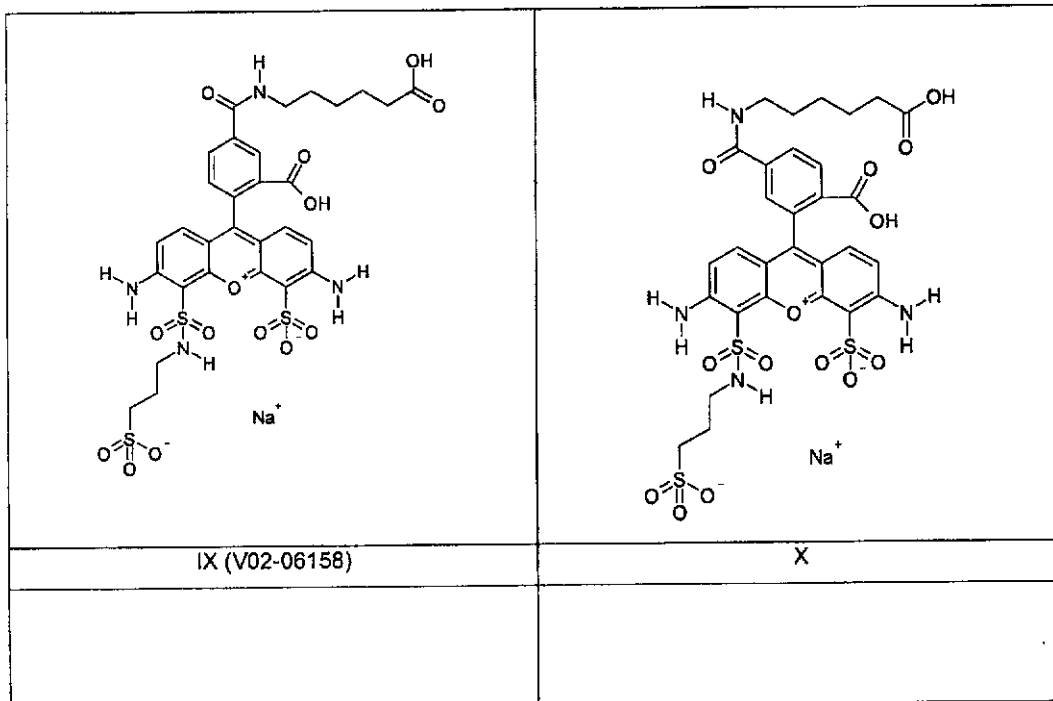
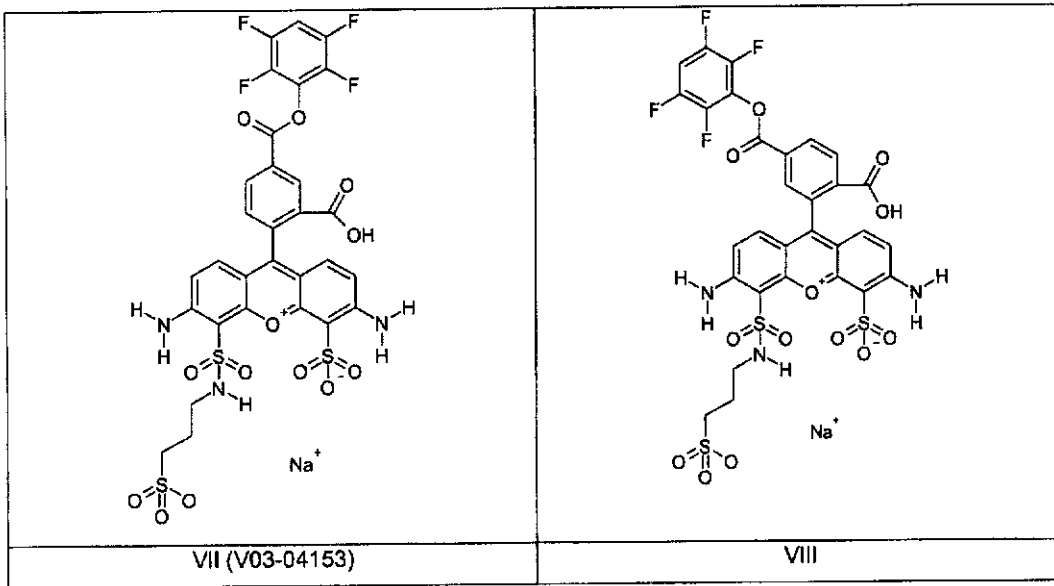
An is F, Cl, Br, I, BF₄⁻, ClO₄⁻, CH₃CO₂⁻, CF₃CO₂⁻ or another anion;

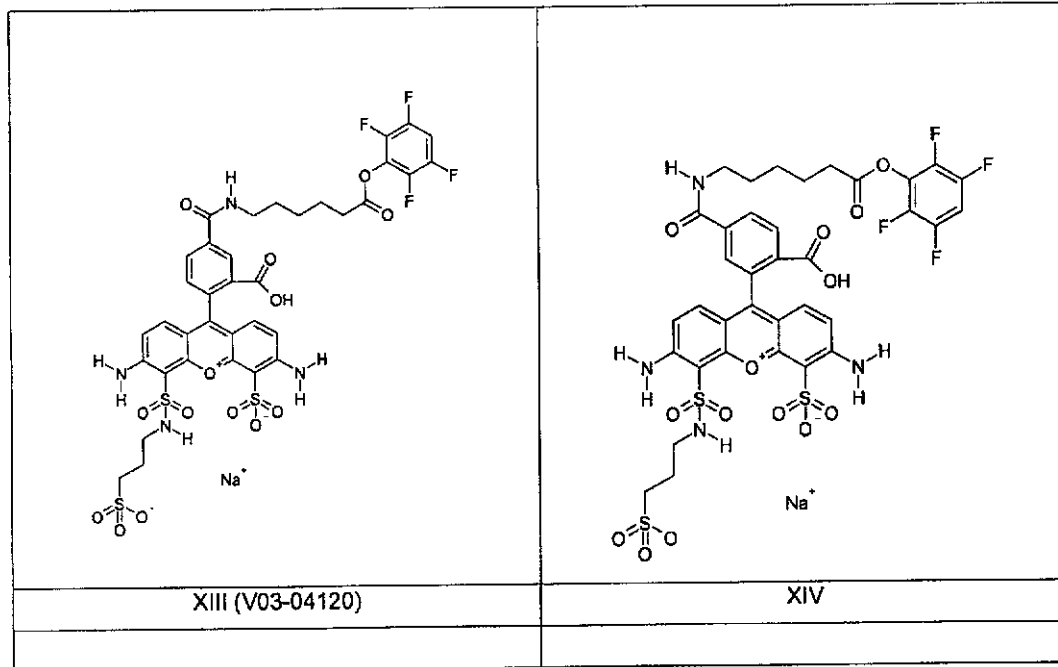
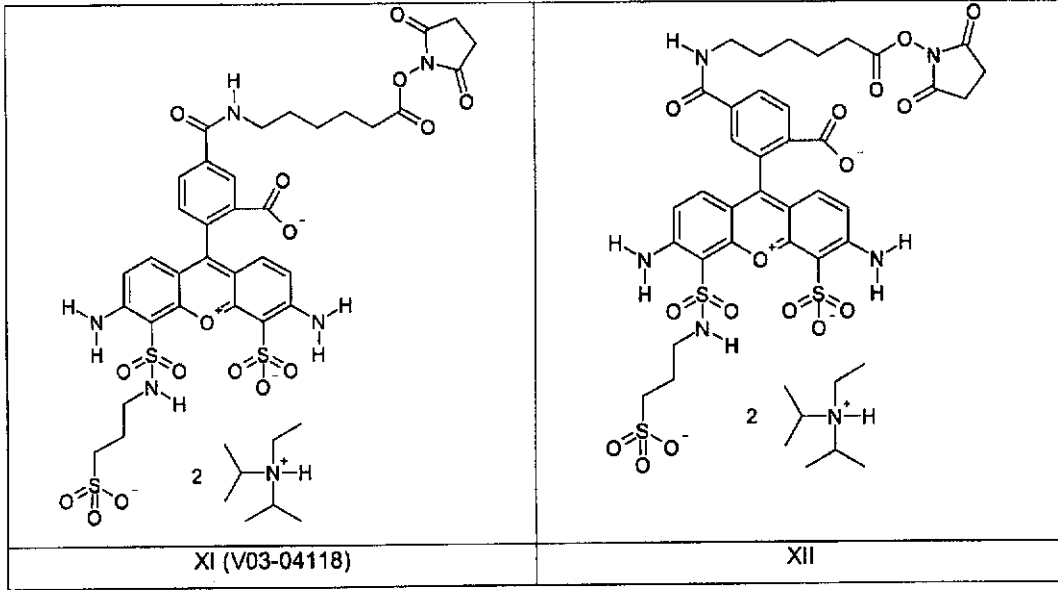
m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

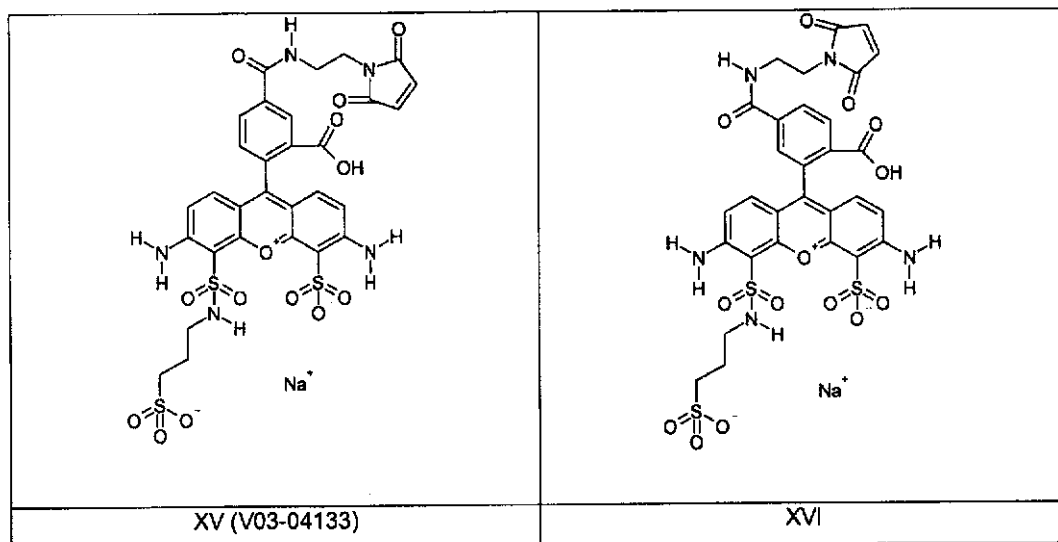
n is an integer from 0 - 12.

In embodiments, compounds of the general formula I and/or formula II include embodiments of formula III (V03-04093), formula IV, formula V (V03-04115), formula VI, formula VII (V03-04153), formula VIII, formula IX (V02-06158), formula X, formula XI (V03-04118), formula XII, formula XIII (V03-04120), formula XIV, formula XV (V03-04133), and/or formula XVI, as follows:

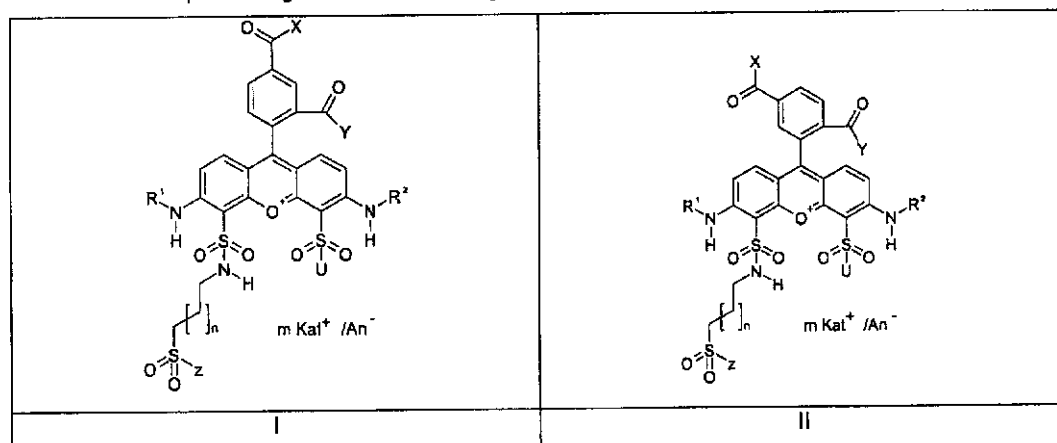
 <p>III (V03-04093)</p>	 <p>IV</p>
 <p>V (V03-04115)</p>	 <p>VI</p>







Another embodiment is a biocompatible dye composition comprising at least one excipient and at least one compound of general formula I or general formula II



wherein

R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, - C_1 - C_{13} -alkyl or - ω -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of -O⁻, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidy/sulfosuccinimidy), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $\{-(CH_2)_o\}$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is $-O^-$ or OH;

U is $-O^-$, -OH or $NH-L-SO_2Z$;

Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

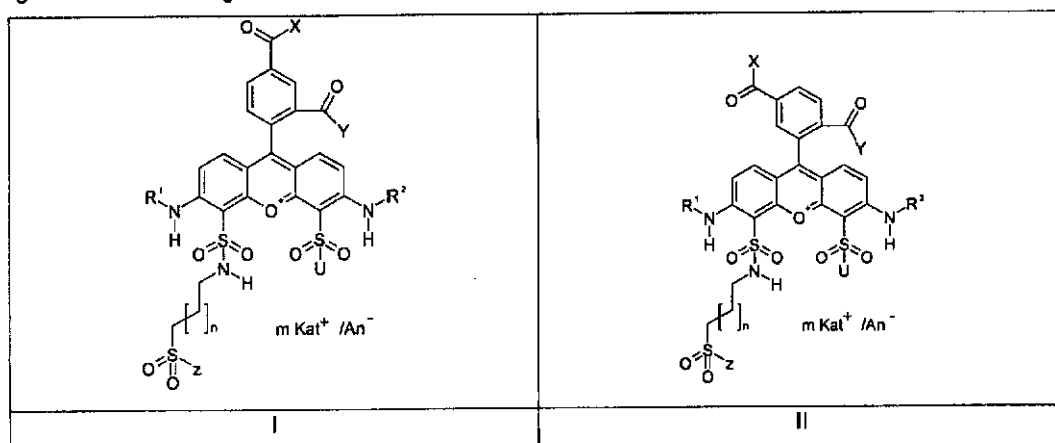
An is F, Cl, Br, I, BF_4^- , ClO_4^- , $CH_3CO_2^-$, $CF_3CO_2^-$ or another anion;

m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

n is an integer from 0 - 12.

Another embodiment is a biocompatible dye composition comprising at least one excipient and a compound selected from the group consisting of formula III, formula IV, formula V, formula VI, formula VII, formula VIII, formula IX, formula X, formula XI, formula XII, formula XIII, formula XIV, formula XV, formula XVI, and combinations thereof, wherein formulas III-XVI are as previously described.

Another embodiment is a method of labelling at least one biomolecule, the method comprising providing a composition comprising at least one excipient and at least one compound of general formula I or general formula II



in an effective concentration to a biomolecule under conditions sufficient for binding the compound to the biomolecule, and

detecting the biomolecule-bound compound,

wherein R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, $-C_1-C_{18}$ -alkyl or $-w$ -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of $-O^-$, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $-(CH_2)_o-$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is $-O^-$ or OH;

U is $-O^-$, -OH or $NH-L-SO_2Z$;

Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

An is F, Cl, Br, I, BF_4^- , ClO_4^- , $CH_3CO_2^-$, $CF_3CO_2^-$ or another anion;

m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

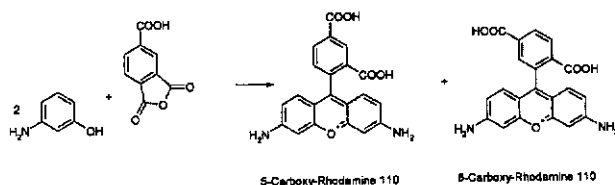
n is an integer from 0 - 12.

Another embodiment is a method of labelling at least one biomolecule, the method comprising providing a composition comprising at least one excipient and a compound of at least one of formula III, formula IV, formula V, formula VI, formula VII, formula VIII, formula IX, formula X, formula XI, formula XII, formula XIII, formula XIV, formula XV, formula XVI, and combinations thereof, in an effective concentration to a biomolecule under conditions sufficient for binding the compound to the biomolecule, and

detecting the biomolecule-bound compound, wherein formulas III-XVI are as previously described.

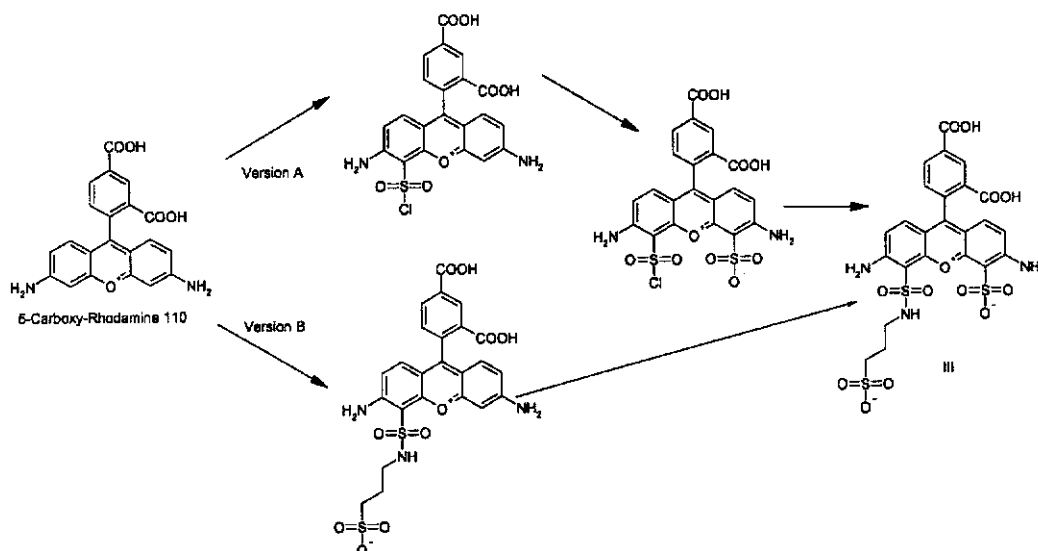
In embodiments, compounds of the general formula I and/or formula II include embodiments of formula III (V03-04093), formula IV, formula V (V03-04115), formula VI, formula VII (V03-04153), formula VIII, formula IX (V02-06158), formula X, formula XI (V03-04118), formula XII, formula XIII (V03-04120), formula XIV, formula XV (V03-04133), and formula XVI.

In one embodiment, 5-carboxy-rhodamine 110 is formed as an isomeric mixture with 6-carboxy-rhodamine 110, using m-aminophenol and trimellitic acid anhydride as starting materials, as follows:



The yield of this 5/6-carboxy-rhodamine isomer mixture was about 16%.

Starting with 5-carboxy-rhodamine, the reaction proceeds via sulfochlorination as follows:



One embodiment uses sulfonamide xanthene dye derivatives as fluorescent stains. In this embodiment, the dye derivatives are used to stain a biomolecule (e.g., protein, etc.) in various applications (e.g., separated by electrophoresis on gels or blots, in cells, in tissue sections, etc.). In this embodiment, a reactive sulfonamide xanthene dye derivative may be covalently linked to the biomolecule, and/or constituents may be added to the dye derivative to promote non-covalent interaction (e.g., adsorption) of the dye derivative to the biomolecule. Such non-covalent interactions may be facilitated by adding hydrophobic constituents (e.g., alkyl chains, aromatic rings, etc.) that lack polar or charged group. In one embodiment, a combination of hydrophobic constituents and charged or polar hydrophilic constituents on another part of the dye compound promote adsorption staining of biomolecules such as proteins.

The compounds are photostable green fluorophores have an absorbance maximum that is a good intermediate wavelength that enhances the laser line and hence facilitates detection of compounds in a sample using an argon ion laser. The compounds may be used as the only dye in a sample. Alternatively, the compounds may be used in multiplexing assays. One embodiment uses the compounds in multiplexing assays in combination with a red dye. One embodiment uses the compounds in immunofluorescence microscopy. One embodiment uses the compounds in High Content Analysis (HCA) assays and compound screening (e.g., using various stimulators to quantify protein cytoplasm to nuclear translocation, protein induction, etc.). One embodiment uses the compounds in immunofluorescence (direct and indirect) (e.g., to detect and quantify localization of intracellular targets). One embodiment uses the conjugated compounds as stand alone primary antibodies. One embodiment incorporates the compounds in a turnkey reagent kit for HCA assays.

The invention will be further appreciated with respect to the following Examples.

EXAMPLE 1

Synthesis of Compound III (V03-04093) via Version A

A solution of 821 mg (2 mmol) 5-(6)-Carboxyrhodamine 110, hydrochloride (either pure isomers or mixture) in 10 ml chlorosulfonic acid was heated to 80°C for one hour. After cooling to room temperature, 10 ml 20% fuming sulphuric acid was added and the solution was kept at room temperature for 90 minutes. The solution was then poured carefully on 400 g crushed ice and the resulting precipitate was filtered off. After washing with ice water, the precipitate was dissolved in a solution of 238 mg (2 mmol) 3-aminopropanesulfonic acid in a mixture of acetonitrile and water (10 ml; V/V = 1:1) containing 1 ml triethylamine. After removing the solvents, the residue was purified by column chromatography (RP-18 silica gel; acetonitrile/water 2/8 containing 1% trifluoroacetic acid).
UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 491 \text{ nm}$
MS (ESI⁺) [m/z]: 656.4 [M]⁺

EXAMPLE 2

Synthesis of Compound V (V03-04115)

V03-04093 (154 mg; 0.2 mmol) was dissolved in a mixture of DMF and water (10 ml; V/V = 3:1) and cooled to 0°C. To this solution O-succinimidyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate (120 mg; 0.4 mmol) and diisopropylethylamine (52 mg; 0.4 mmol) were added. After 20 minutes at 0°C, the solvents were distilled off in high vacuum. The residue was purified by column chromatography (RP-18 silica gel; acetonitrile/water 2/8).
UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 494 \text{ nm}$
MS (ESI⁻) [m/z]: 751.1 [M + H]⁻

EXAMPLE 3

Synthesis of Compound VII (V03-04153)

V03-04093 (154 mg; 0.2 mmol) was dissolved in a mixture of DMF and water (10 ml; V/V = 3:1). To this solution tetrafluorophenol (33 mg; 0.2 mmol), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (82 mg; 0.4 mmol) and diisopropylethylamine (52 mg; 0.4 mmol) were added. After 24 hours at room temperature, the solvents were distilled off in high vacuum. The residue was dissolved in 10 ml water containing sodium chloride (584 mg; 10 mmol) and purified by column chromatography (RP-18 silica gel; acetonitrile/water 2/8).
UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 495 \text{ nm}$
MS (ESI⁻) [m/z]: 802.1 [M]⁻

EXAMPLE 4

Synthesis of Compound IX (V02-06158)

Compound V (V03-04115) (prepared according to Example 2) (101 mg; 0.1 mmol) was dissolved in a mixture of DMF and water (5 ml; V/V = 3:1). To this solution aminocaproic acid (26 mg; 0.2 mmol) and diisopropylethylamine (52 mg; 0.4 mmol) were added. After two hours at room temperature, the solvents were distilled off in high vacuum. The residue was dissolved in 10 ml water containing sodium chloride (584 mg; 10 mmol) and purified by column chromatography (RP-18 silica gel; acetonitrile/water 3/7).
UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 492 \text{ nm}$
MS (ESI⁻) [m/z]: 767.1 [M]⁻

EXAMPLE 5

Synthesis of Compound XI (V03-04118)

Compound XI (V03-04118) was prepared analogously to Compound V (V03-04115) in Example 2 with Compound IX (V02-06158) (79 mg; 0.1 mmol) as the starting material.

UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 492 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z]: 864.1 [M + H]⁻

EXAMPLE 6

Synthesis of Compound XIII (V03-04120)

Compound XIII (V03-04120) was prepared analogously to Compound VII (V03-04153) in Example 3 with Compound IX (79 mg; 0.1 mmol) as the starting material.

UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 493 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z]: 915.2 [M]⁻

EXAMPLE 7

Synthesis of Compound XV (V03-04133)

Compound V (V03-04115) (prepared according to Example 2) (101 mg; 0.1 mmol) was dissolved in a mixture of DMF and water (5 ml; V/V = 3:1). To this solution 2-maleimidoethylamine trifluoroacetate (38 mg; 0.15 mmol) and diisopropylethylamine (52 mg; 0.4 mmol) were added. After two hours at room temperature, the solvents were distilled off in high vacuum. The residue was dissolved in water containing sodium chloride (584 mg; 10 mmol) and purified by column chromatography (RP-18 silica gel; acetonitrile/water 3/7).

UV-Vis (pH 7 buffer): $\lambda_{\text{abs}} = 493 \text{ nm}$

MS (ESI⁻) [m/z]: 776.1 [M]⁻

EXAMPLE 8

Conjugation to Proteins

Compounds were rendered reactive by adding groups enabling them to covalently link to other molecules. Reactive compounds were conjugated to macromolecules such as proteins (e.g., antibodies, Streptavidin) and used in immunofluorescence assays (e.g. Western blot, ELISA, flow cytometry, in-cell assays, etc).

Three x 10 mg goat anti-rabbit IgG (H+L) (GAR) and 3 x 10 mg goat anti-mouse IgG (H+L) (GAM) at 10 mg/ml were dialyzed overnight against five liters of 50 mM borate buffer, pH 8.4. Each of the dialyzed antibodies was labeled with 10 molar excess of each of the compounds of formulas V, XI and XIII that had been reconstituted in 0.1 ml DMF. The reaction was carried out for two hours at room temperature (about 20°C to about 22°C). The excess unreacted compound was removed by dialyzing the samples overnight against 3 x 5 L 0.1 M sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2 (phosphate buffered saline (PBS)). Three changes of PBS were used. Upon making a 1:100 dilution of the labeled proteins and performing absorbance scans of the samples, mole dye to mole protein ratios of between 5 and 6 (inclusive) was determined for conjugates made with compounds of each of formulas V, XI, and XIII.

Three x 10 mg streptavidin (SA) at 10 mg/ml was reconstituted in 50 mM borate buffer, pH 8.4. The streptavidin was labeled with a five molar excess of each of the compounds of formulas V, XI, and

XIII that had been reconstituted in 0.1 ml DMF. The reaction was carried out for two hours at room temperature. The excess unreacted compound was removed by dialyzing the sample overnight against 3 x 5 L of 0.1 M sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2 (PBS). Three changes of PBS were used. Upon making a 1:100 dilution of the labeled proteins and performing absorbance scans of the samples, mole dye to mole protein ratios of between 2 and 4 (inclusive) was determined for conjugates made of compounds of each of formulas V, XI, and XII.

One x 10 mg NeutrAvidin® Biotin Binding Protein (NA) (Pierce Biotechnology, Inc.) at 10 mg/ml was reconstituted in 50 mM borate buffer, pH 8.4. NeutrAvidin® Biotin Binding Protein was labeled with a five molar excess of the compound of formula V had been reconstituted in DMF. The reaction was carried out for two hours at room temperature. The excess unreacted compound was removed by dialyzing the sample overnight against 3 x 5L of 0.1 M sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2 (PBS). Three changes of PBS were used. Upon making a 1:100 dilution of the labeled protein and performing absorbance scans of the samples, a mole dye to mole protein ratio of between 2 and 3 (inclusive) was determined for the conjugate made with the compound.

EXAMPLE 9

Plate Assay of Goat Anti-Rabbit Conjugates

Data for a functional assay using the compound of formula V-Goat anti-Rabbit (GAR) conjugate are shown in FIG. 1. The assay was performed at room temperature (about 20°C to about 22°C) on a serially diluted 96-well white opaque Rabbit IgG-coated plate (10 µg/ml to 0 µg/ml). The plate was washed 3 x 200 µl with PBS-0.05% Tween and 1x 200 µl with PBS buffer. The formula V-GAR conjugate was diluted to 0.004mg/ml in PBS buffer. The diluted conjugate was applied to wells of the plates (100 µl/well), the plate was incubated for one hour, and then washed as described above. PBS buffer was added to the plate (100 µl/well) and the fluorescent intensity was captured using the TECAN Safire® at green laser setting, with an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 519 nm. Commercially available Alexa Fluor® 488-GAR (Molecular Probes, Eugene OR) was diluted to the same concentration and evaluated as previously described with reference to the formula V-GAR conjugate.

As shown in FIG. 1, Rabbit IgG was detected at a level of 2 ng/well with the formula V-GAR conjugate. When a formula III-GAR conjugate was assayed, there was 10% higher signal intensity than the Alexa Fluor® 488-GAR conjugate (data not shown).

EXAMPLE 10

Plate Assay Using Streptavidin and NeutrAvidin® Conjugates

Data for functional assays using the compound of formula V conjugated each of Streptavidin and NeutrAvidin® are shown in FIGS. 2 and 3, respectively. The assays were performed on serially diluted 96-well white opaque Biotinylated-BSA coated plates (2 µg/ml to 0 µg/ml). The plates were washed 3 x 200µl with PBS-0.05% Tween and 1x 200µl with PBS buffer. Formula V-Streptavidin (SA) and Formula V-NeutrAvidin® (NA) conjugates were diluted 0.004 mg/ml in PBS buffer. Diluted conjugates were applied to the wells of the plates (100 µl/well), the plates were covered and protected from light, incubated for one hour, then washed as previously described. PBS buffer was added to the plates (100 µl/well) and the fluorescent intensity was captured using the TECAN Safire® at green laser

setting. Commercially available Alexa Fluor® 488-SA (Molecular Probes) was diluted to the same concentration and evaluated as previously described with reference to the formula V conjugated SA.

As shown in FIG. 2 with reference to SA, and in FIG. 3 with reference to NA, with this assay biotinylated BSA was detected at a level of 2 ng/well with both Formula V conjugated Streptavidin and Formula V conjugated NeutrAvidin.

EXAMPLE 11

Multiplex Western Blotting

A combination of recombinant mouse TNF α and HeLa cell lysate were separated by electrophoresis on a 4-20% Tris-Glycine gel. The proteins were transferred to Hybond-LFP membrane (Amersham) and blocked overnight in 1 x BSA/PBS-0.05%Tween. The blot was co-incubated for one hour with Mouse Anti-Tubulin MAb primary antibody (1 μ g/ml) and Bovine Anti-TNF α primary antibody (1 μ g/ml) diluted in PBS-0.05%Tween-20. Following incubation, the blot was washed 3 x 10 min with PBS-0.05%Tween-20. Secondary antibody-formula V-Goat-Anti-Rabbit (GAR) conjugates (0.067 μ g/ml) and secondary antibody-DyLight™ 649-Goat-Anti-Mouse (GAM)-conjugates (0.067 μ g/ml) diluted in PBS-0.05%Tween-20 were incubated to detect the protein. After this incubation, the blots were washed 6 x 5 min with PBS-0.05%Tween-20. The image was captured on a Typhoon 9410 Variable Mode Imager at green and red laser settings.

Results are shown in FIG. 4. Each of lanes 1-7 contains the following amounts of recombinant mouse TNF α respectively: 0.20 ng, 0.39 ng, 0.78 ng, 6.25 ng, 12.5 ng, 25 ng, and 50 ng, and the following dilutions of HeLa cell lysate respectively: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 and 1:64 dilution of HeLa Cell lysate. Bands stained red were TNF α (pure). Bands stained green were tubulin that was in the cell lysate. TNF α was detected down to 0.2 ng using formula V-GAR conjugates. The results demonstrated that the disclosed rhodamine conjugates may be used in multiplexing applications.

EXAMPLE 12

Immunofluorescence Assay

A histologically prepared slide containing human small intestine normal tissue was deparaffinized by heating at 45°C for 50 min in an incubator. The slide was rehydrated with two five-minute incubations in EZ-dewax solution and then washed once with ultrapure water and once with PBS-0.05%Tween-20 (PBST). The targets were retrieved by incubating the slide in Target Retrieval Solution at 95°C to 99°C for forty minutes, followed by cooling to room temperature for twenty minutes and rinsing once with PBS-0.05%Tween-20. The slide was washed 2 x three minutes with PBS-0.05%Tween-20.

The slide was returned to its original incubation container, 15 ml of 3% Normal Goat Serum in PBS-0.05%Tween-20 was added, and the slide was incubated at 4°C overnight. The slide was dried by centrifugation. Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjugated to DyLight™ 680 was diluted to 10 μ g/ml and rabbit anti-S100 primary antibody was diluted 1:400 (from the original concentration), both reagents were diluted in the same 1 ml of PBS-0.05%Tween-20. Two hundred μ l of this working reagent was applied to the slide. The tissue contained on the slide was covered with an incubation chamber to prevent evaporation of the antibody solution. The slide was incubated for one hour with the primary antibodies. The slide was passively washed three times with PBS-0.05%Tween-20.

The Formula V-Goat Anti-Rabbit (GAR) conjugate was diluted to 10 µg/ml and 200 µl was applied to the slide. The tissue contained on the slide was covered with an incubation chamber to prevent evaporation of the antibody solution. The slide was incubated for one hour with the secondary antibody and then passively washed three times with PBS-0.05% Tween-20. The slide was dipped in PBS and then dried by centrifugation. One drop of fluorescence mounting medium was added to the slide followed by application of a cover slip. The slide was stored at 4°C until visualization using a Zeiss confocal microscope.

Results are shown in FIG. 5. Red staining areas indicate DyLight™ 680-WGA conjugates. Green staining areas indicate formula V-GAR conjugates. The results demonstrated that the disclosed rhodamine conjugates may be used in immunofluorescence applications

EXAMPLE 13

Fluorescence *In-Situ* Hybridization (FISH)

For cells with visible cytoplasm surrounding interphase and metaphase, slides are prepared by incubating the cells in 0.01 M HCl with 0.005% pepsin at 37°C for ten minutes. The slides are then washed 2 x 1 minutes in PBS and incubated for ten minutes in 1% formaldehyde in PBS. The slides are incubated for 2 x 1 minute in PBS and then dehydrated in 70% ethanol for one minute, then at 95% ethanol for one minute, then at 100% ethanol for one minute, before air drying.

Ten µl of compound Formula V labeled probe for a target is dispensed into a 0.5 ml microcentrifuge tube and then incubated at 96°C for five minutes in a water bath. The tubes are briefly centrifuged, then 10 µl of the probe mix is applied to the target and covered with a coverslip. The slides and probes are denatured for two minutes at 80°C on a temperature controlled hot plate and then incubated for 12-18 h in a humidified environment at 37°C.

The coverslips are removed by soaking in 2 x SSC/0.1% Tween-20 at 37°C. The slides are then washed 4 x 5 min in 0.5 x SSC/0.1% SDS at 60°C to 65°C, and then briefly rinsed with distilled water and air dried out of direct light. DAPI anti-fade solution (20 µl) is applied to the target and covered with a coverslip (24 mm x 50 mm) before viewing on a fluorescent microscope equipped with the appropriate filter sets or lasers. Fluorescence is detected upon hybridization.

EXAMPLE 14

Flow Cytometry

Flow cytometry is used to evaluate CD3 receptors on Jurkat cells with a compound of formula V labeled with Goat Anti-Mouse (GAM) secondary antibody. Jurkat cells are centrifuged for five minutes at 4000 rpm, washed with 1 x 3 ml dPBS, and resuspended in 5 ml dPBS. Cell concentration is adjusted to 28×10^6 cells/ml. Cells are incubated for 45 minutes in mouse anti-CD3 antibody (0.625 µg/ml), centrifuged for five minutes and washed with 2 x 1 ml PBS. Cells are incubated for 45 min in formula V- goat anti-mouse conjugate diluted in dPBS (2.7 µg/ml). Cells are then centrifuged as previously described, washed 2 x 1 ml in dPBS, and resuspended in 300 µl dPBS. Data are collected on a Becton Dickinson FACSCalibur® or equivalent flow cytometer. Antigens on individual cells are quantitatively detected with high precision, speed, and accuracy.

EXAMPLE 15

Reagent Kit for High Content Screening (HCS) and/or High Content Analysis (HCA) Assays

Any of the above described compounds are conjugated to antibodies, and are prepared as a kit for HCS and/or HCA for a specific biology. The kit contains instructions for used in a validated protocol.

EXAMPLE 16

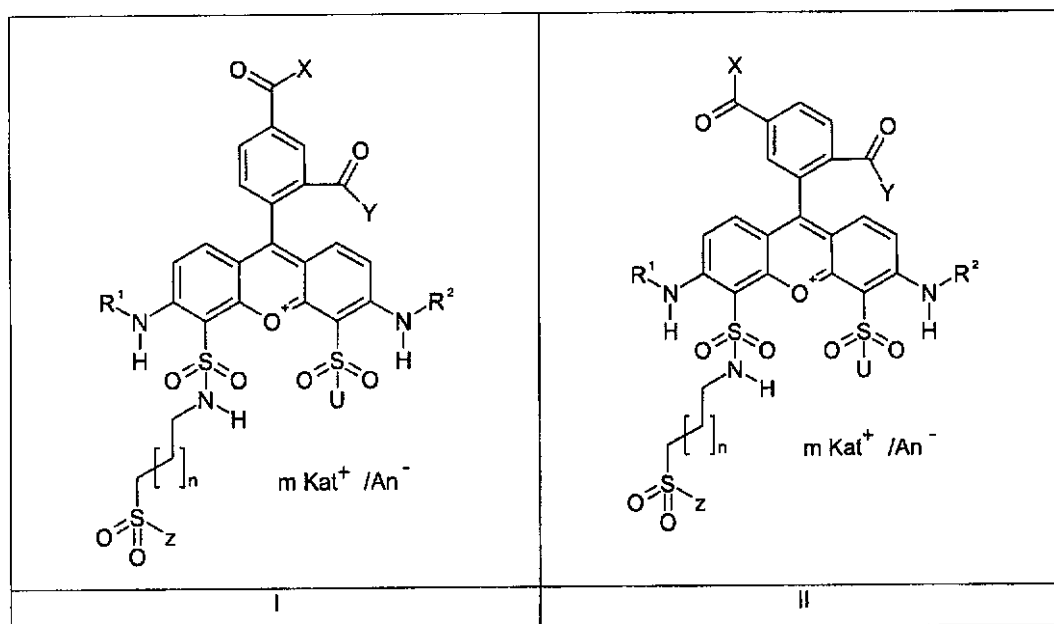
High Content Screening (HCS)

Any of the above described compounds are conjugated to antibodies and used for HCS measurement of p53 induction. A549 cells are seeded at 5,000 cells/well on 96 well microplates one day before treating them with different concentrations of camptothecin. In the presence of the drug, cells are incubated for 18-20 hours at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator. Cells are then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and then labeled with rabbit p53 primary antibody and goat-anti-rabbit-conjugate of one of the above-described compounds. Cell nuclei are labeled with Hoechst 33342. The samples are imaged and quantitatively analyzed on an ArrayScan® HCS Reader (Cellomics, Inc. Pittsburgh PA). Fluorescence images show p53 induction in the nucleus with 5 μM camptothecin. Untreated cells do not have any p53 signal. Camptothecin treated cells show bright p53 labeling in the nuclei.

Other variations or embodiments will also be apparent to one of ordinary skill in the art from the above description and examples. Thus, the forgoing embodiments are not to be construed as limiting the scope of the following claims.

What is claimed is:

1. At least one compound of general formula I or general formula II



wherein

R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, -C₁-C₁₈-alkyl or - ω -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of -O⁻, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $-(CH_2)_o-$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is -O⁻ or OH;

U is -O⁻, -OH or NH-L-SO₂Z;

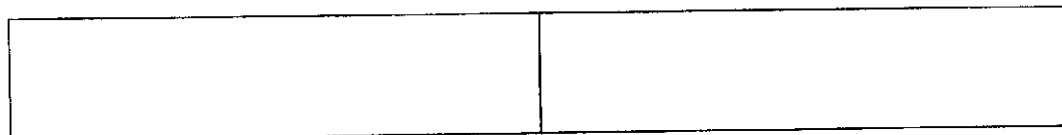
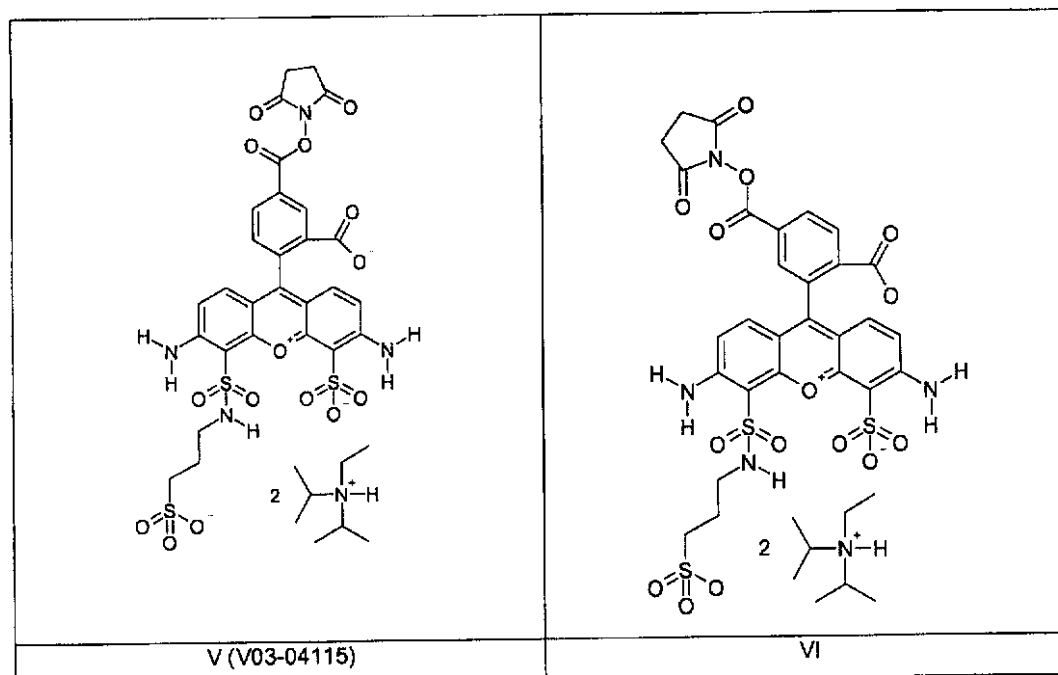
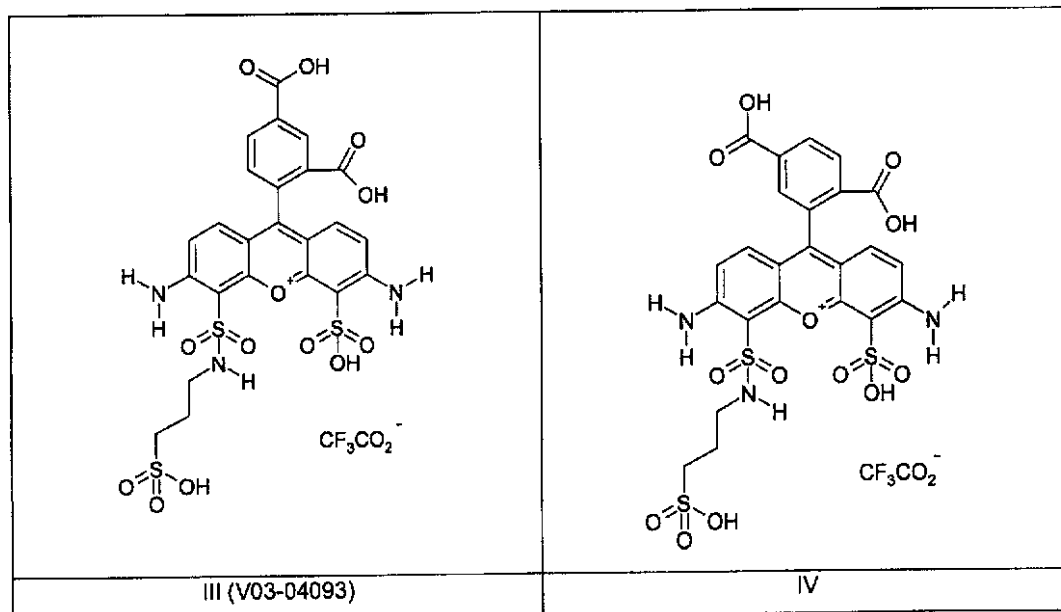
Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

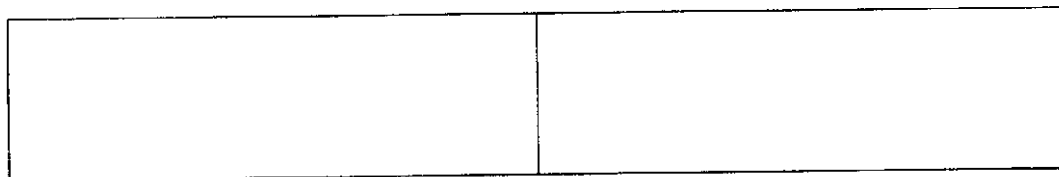
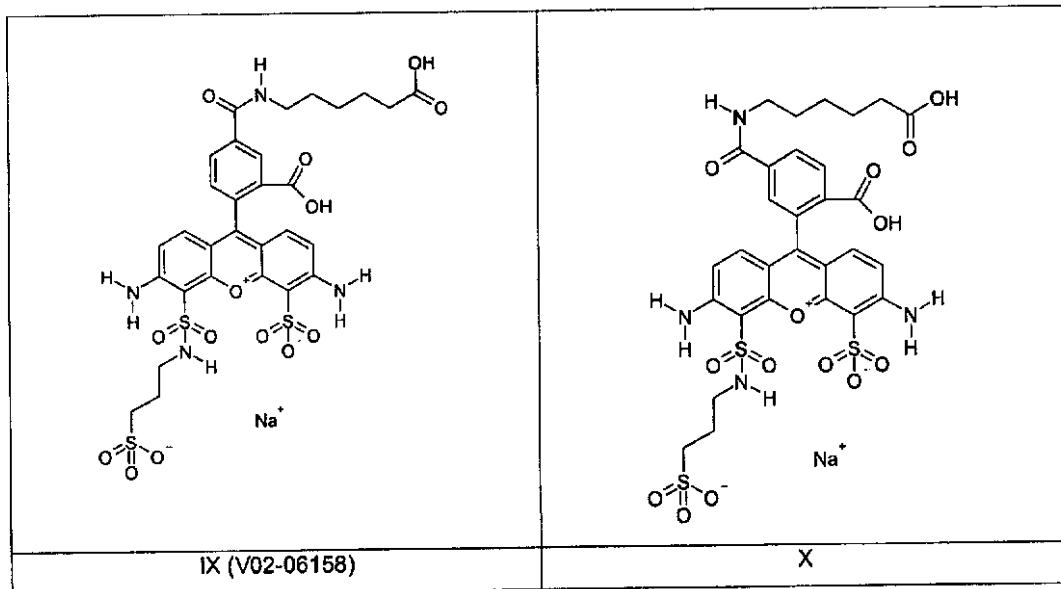
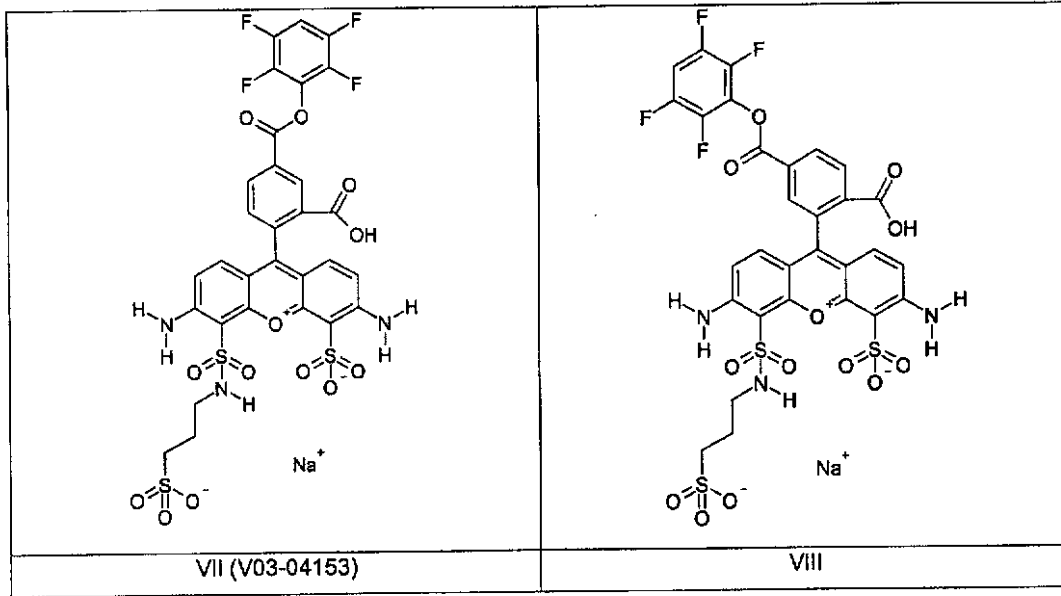
An is F, Cl, Br, I, BF₄⁻, ClO₄⁻, CH₃CO₂⁻, CF₃CO₂⁻ or another anion;

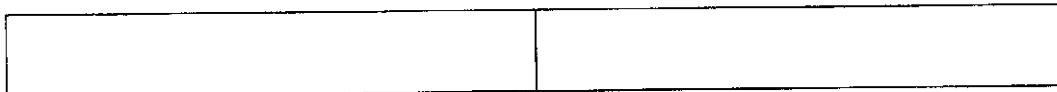
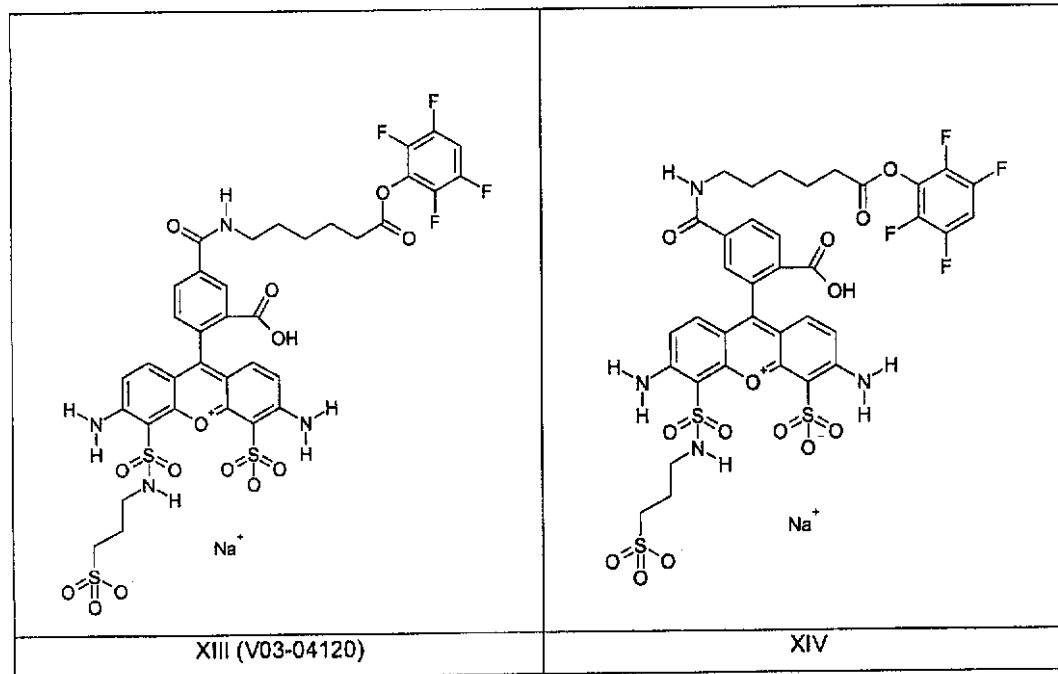
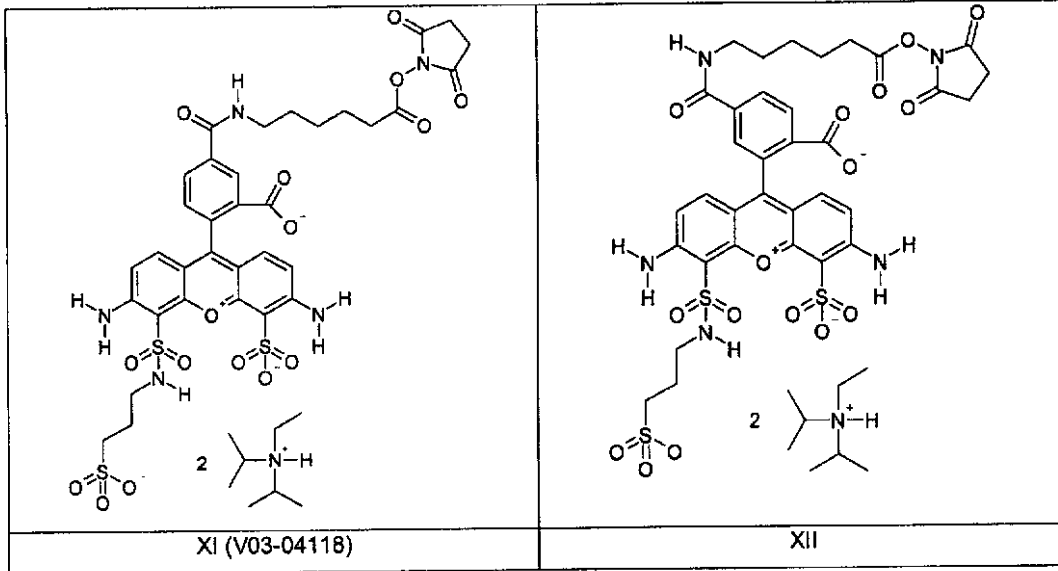
m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

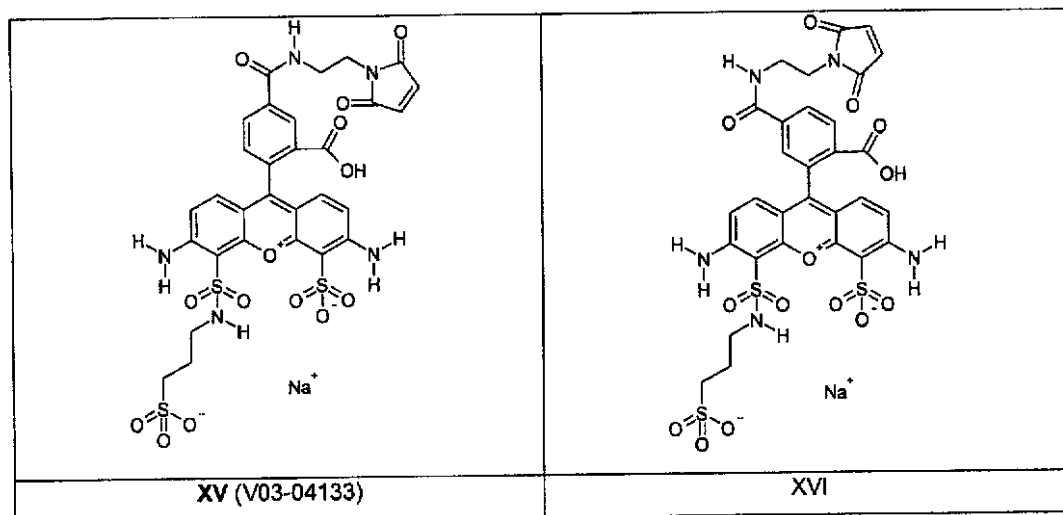
n is an integer from 0 - 12.

2. A compound selected from at least one of formula III, formula IV, formula V, formula VI, formula VII, formula VIII, formula IX, formula X, formula XI, formula XII, formula XIII, formula XIV, formula XV, or formula XVI

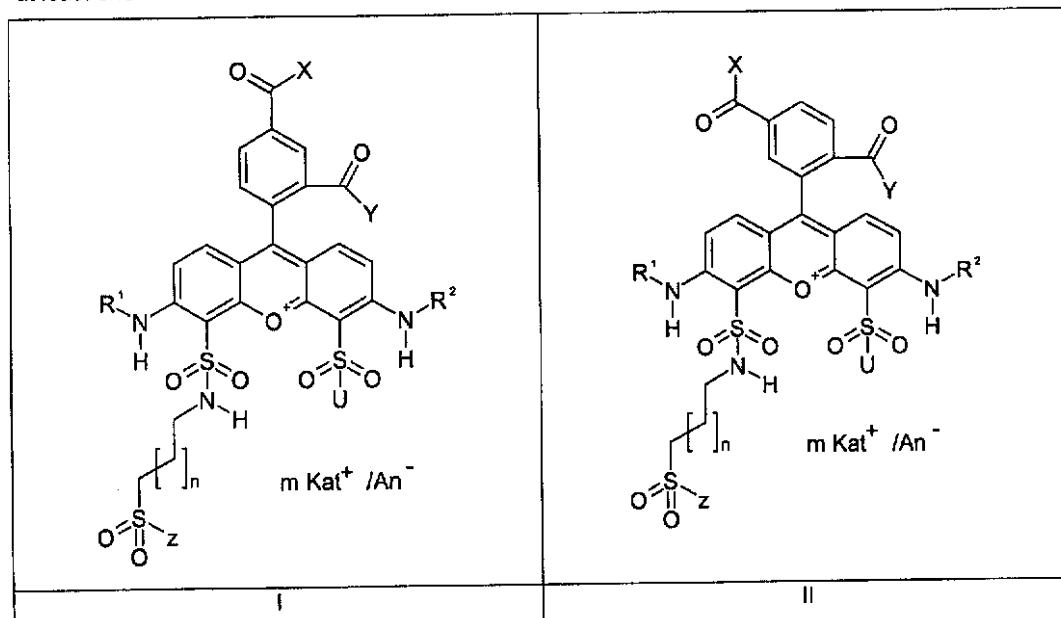








3. A biocompatible dye composition comprising at least one excipient and a compound selected from at least one of formula I or formula II



resulting in a biocompatible dye composition, wherein

R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, -C₁-C₁₈-alkyl or - ω -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of -O⁻, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $-(CH_2)_o-$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic

alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is $-O^-$ or OH;

U is $-O^-$, $-OH$ or $NH-L-SO_2Z$;

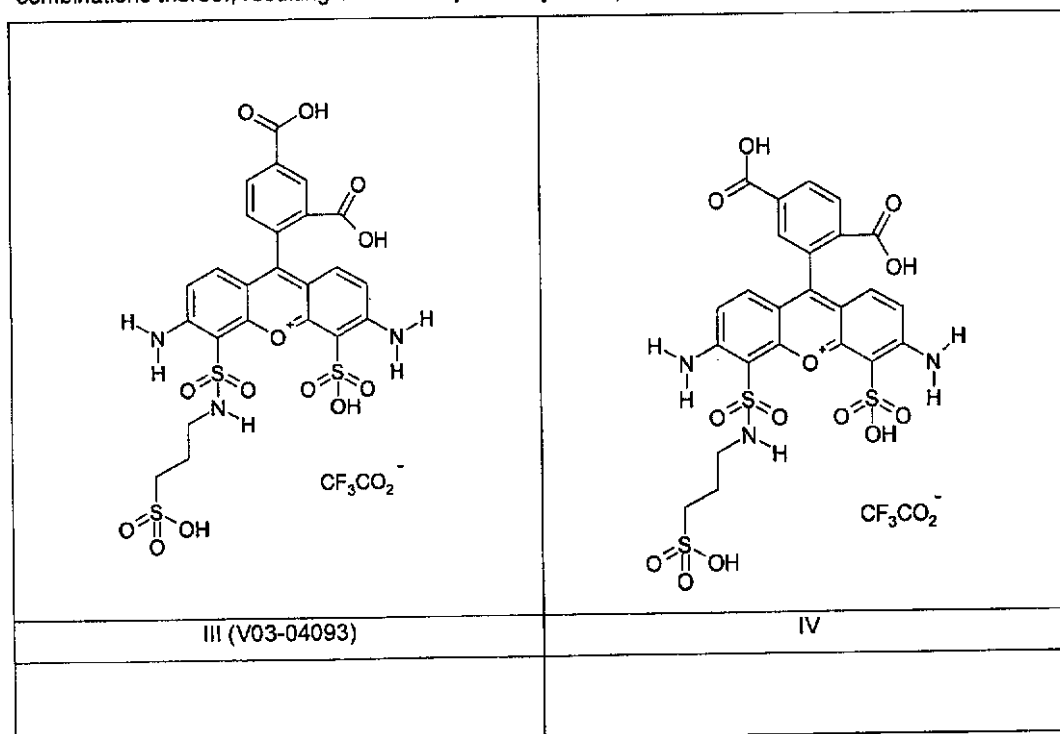
Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

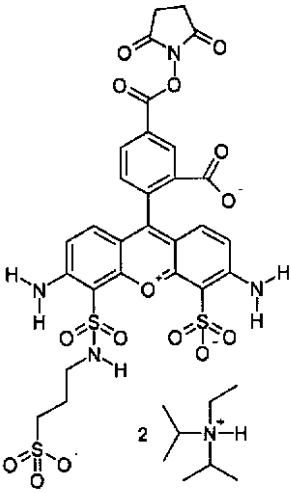
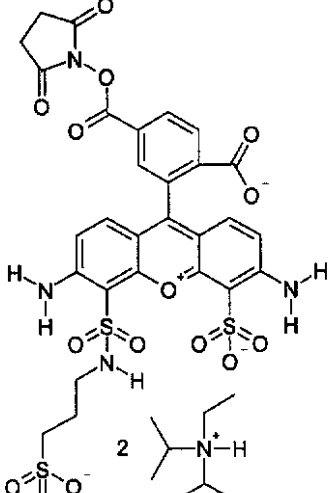
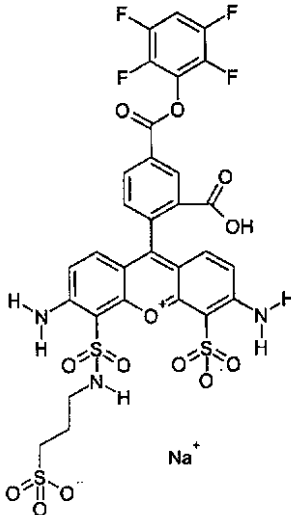
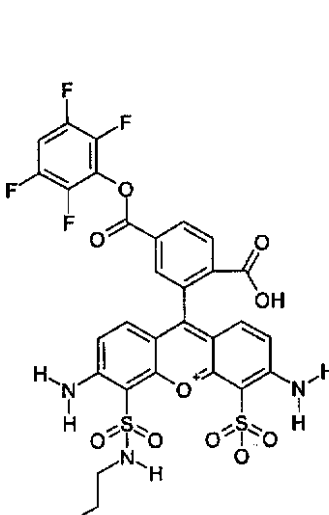
An is F, Cl, Br, I, BF_4^- , ClO_4^- , $CH_3CO_2^-$, $CF_3CO_2^-$ or another anion;

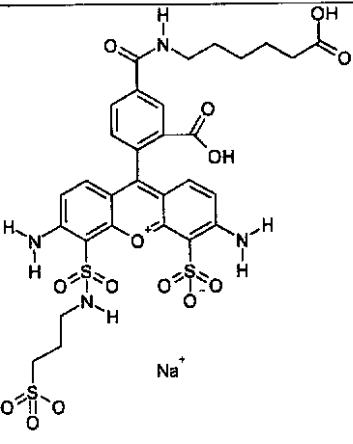
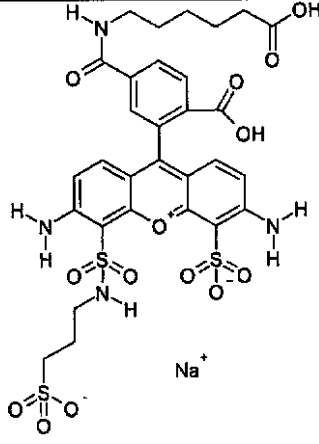
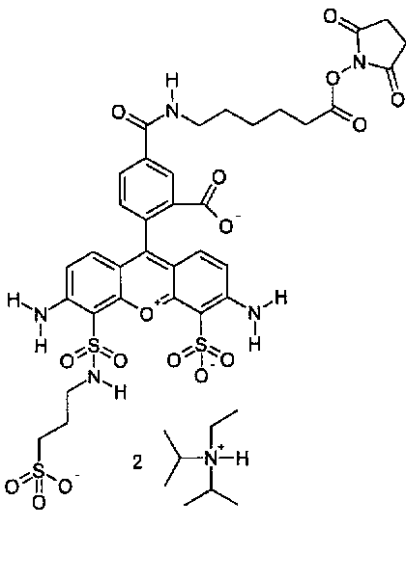
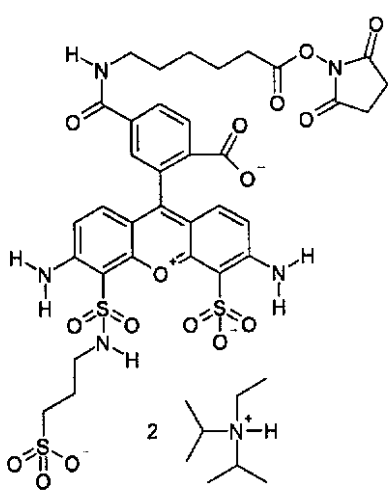
m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

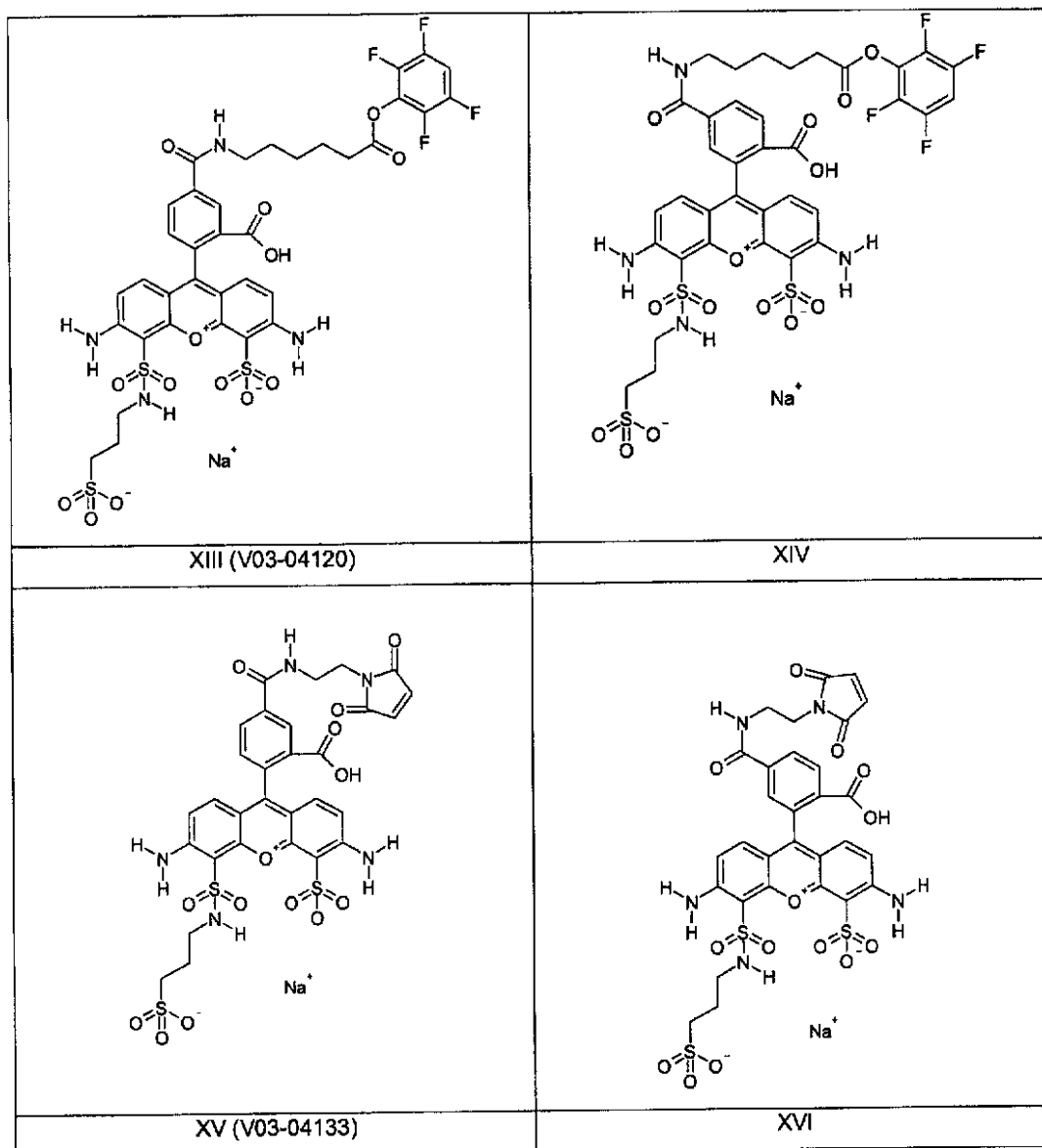
n is an integer from 0 - 12.

4. A biocompatible dye composition comprising at least one excipient and a compound selected from the group consisting of formula III, formula IV, formula V, formula VI, formula VII, formula VIII, formula IX, formula X, formula XI, formula XII, formula XIII, formula XIV, formula XV, formula XVI, and combinations thereof, resulting in a biocompatible dye composition, wherein



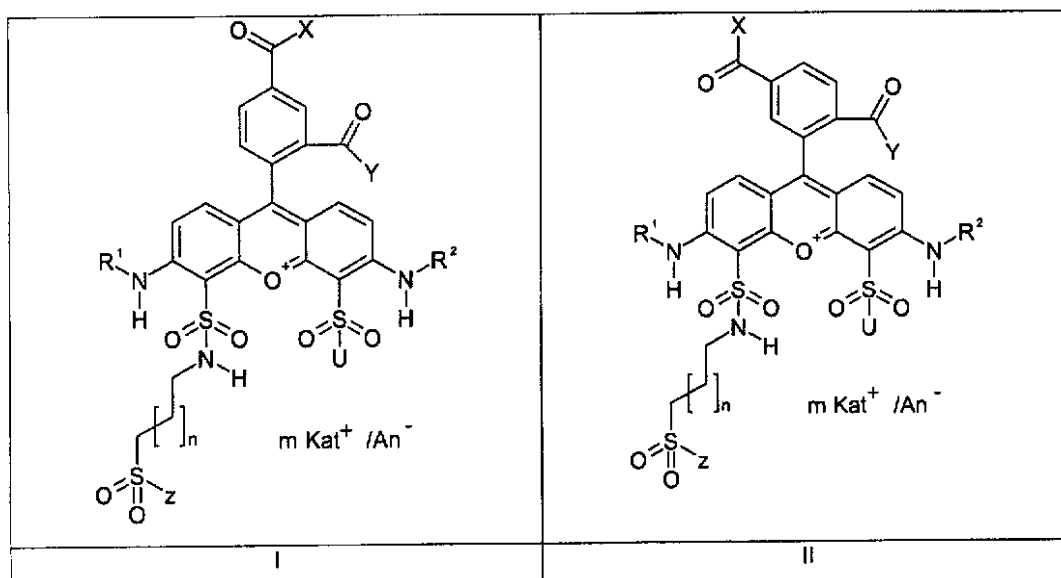
	
V (V03-04115)	VI
	
VII (V03-04153)	VIII

 <p>IX (V02-06158)</p>	 <p>X</p>
 <p>XI (V03-04118)</p>	 <p>XII</p>



5. A method of labelling at least one biomolecule, the method comprising
 providing a composition comprising at least one excipient and a compound of at least one of
 formula I or formula II

--	--



in an effective concentration to a biomolecule under conditions sufficient for conjugating the compound to the biomolecule, and

detecting the biomolecule-bound conjugate, wherein

R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, - C_1 - C_{18} -alkyl or - ω -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of -O⁻, -OH, -SH, -NH-NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -O-Su (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), -O-STP (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-TFP (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), -O-benzotriazole, -benzotriazole, -NR-CO-CH₂-I, -NR₂, -NR-biomolecule, -NR-L-COO⁻, -NR-L-COOH, -NR-L-COO-Su, -NR-L-COO-STP, -NR-L-COO-TFP, -NR-L-CONR₂, -NR-L-CO-biomolecule, -NR-L-CO-NH-NH₂, -NR-L-OH, -NR-L-O-phosphoramidite, -NR-L-CHO, -NR-L-maleimid, or -NR-L-NH-CO-CH₂-I; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear ($-(CH_2)_o-$, o = 1 to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is -O⁻ or OH;

U is -O⁻, -OH or NH-L-SO₂Z;

Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

An is F, Cl, Br, I, BF₄⁻, ClO₄⁻, CH₃CO₂⁻, CF₃CO₂⁻ or another anion;

m is an integer from 1 - 8 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

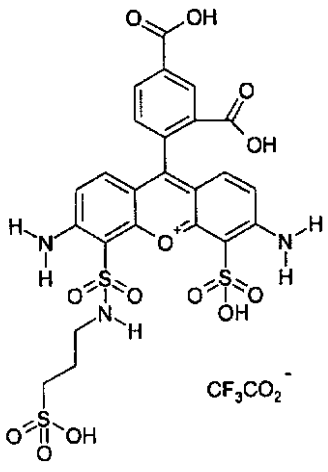
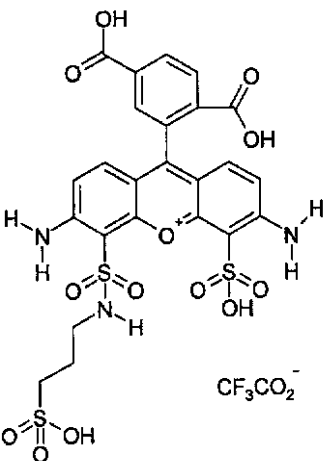
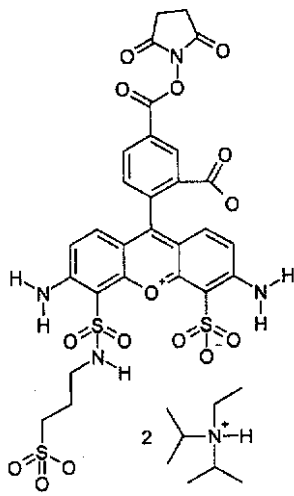
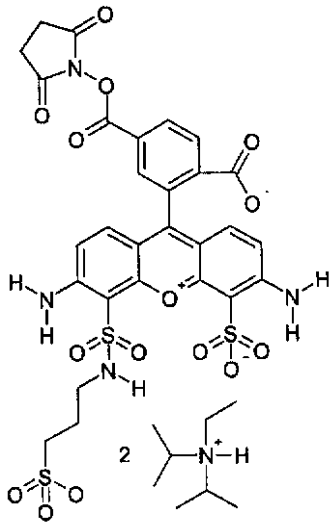
n is an integer from 0 - 12

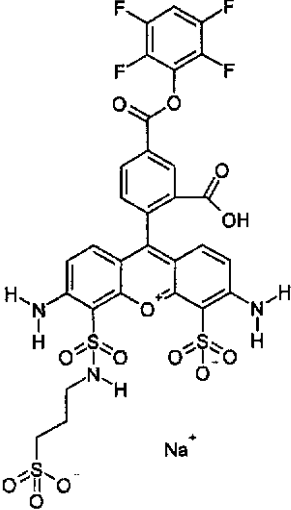
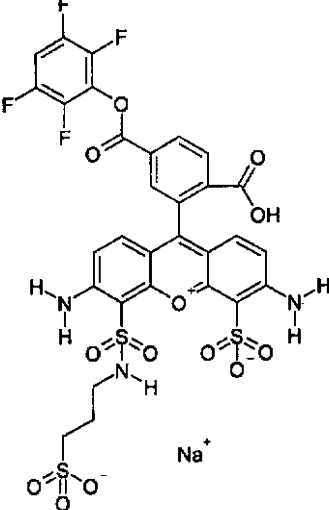
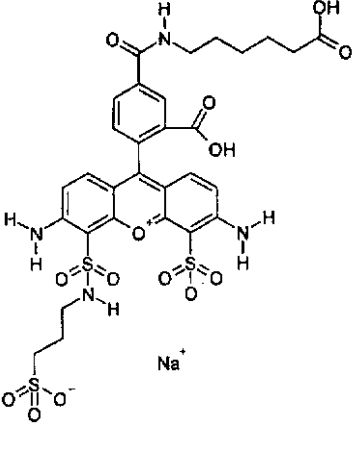
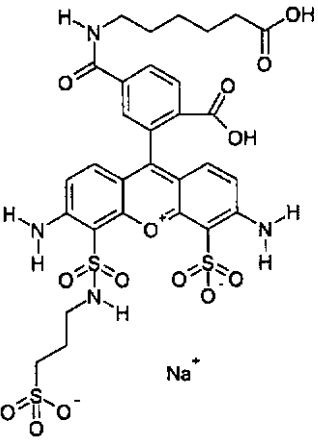
6. A method of labelling at least one biomolecule, the method comprising

providing a composition comprising at least one excipient and a compound of at least one of formula III, formula IV, formula V, formula VI, formula VII, formula VIII, formula IX, formula X, formula

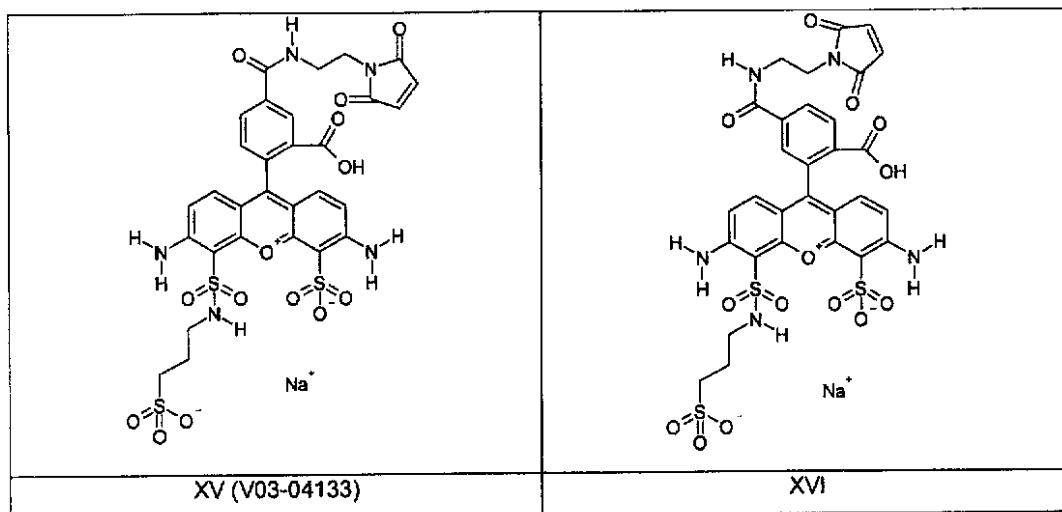
XI, formula XII, formula XIII, formula XIV, formula XV, formula XVI, and combinations thereof, in an effective concentration to a biomolecule under conditions sufficient for conjugating the compound to the biomolecule, and

detecting the biomolecule-bound conjugate, wherein

 <p>III (V03-04093)</p>	 <p>IV</p>
 <p>V (V03-04115)</p>	 <p>VI</p>

 <p>VII (V03-04153)</p>	 <p>VIII</p>
 <p>IX (V02-06158)</p>	 <p>X</p>

<p>Chemical structure XI (V03-04118) features a central xanthine core with two sulfonamide groups at the 2 and 6 positions. The 4-position is substituted with a 4-(2-((2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisoindol-5-ylideneamino)ethyl)amino)phenyl group. The 8-position is substituted with a 3-(3-sulfamoylpropyl)amino group. A sodium counterion is present.</p>	<p>Chemical structure XII features a central xanthine core with two sulfonamide groups at the 2 and 6 positions. The 4-position is substituted with a 4-(2-((2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisoindol-5-ylideneamino)ethyl)amino)phenyl group. The 8-position is substituted with a 3-(3-sulfamoylpropyl)amino group. A sodium counterion is present.</p>
<p>XI (V03-04118)</p>	<p>XII</p>
<p>Chemical structure XIII (V03-04120) features a central xanthine core with two sulfonamide groups at the 2 and 6 positions. The 4-position is substituted with a 4-(2-((2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisoindol-5-ylideneamino)ethyl)amino)phenyl group. The 8-position is substituted with a 3-(3-sulfamoylpropyl)amino group. A sodium counterion is present.</p>	<p>Chemical structure XIV features a central xanthine core with two sulfonamide groups at the 2 and 6 positions. The 4-position is substituted with a 4-(2-((2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisoindol-5-ylideneamino)ethyl)amino)phenyl group. The 8-position is substituted with a 3-(3-sulfamoylpropyl)amino group. A sodium counterion is present.</p>
<p>XIII (V03-04120)</p>	<p>XIV</p>



7. The method of either claim 5 or claim 6 used in at least one of a protein assay, immunofluorescence assay, singleplex application, or multiplex application.

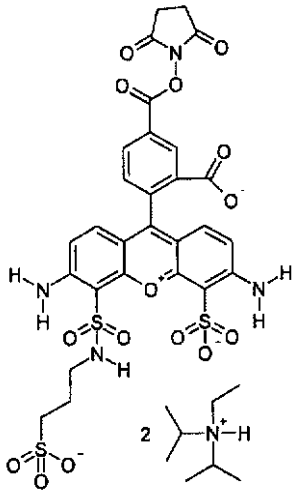
8. The method of either claim 5 or claim 6 used in a multiplex application in combination with other fluorescent dyes or conjugates.

9. The method of either claim 5 or claim 6 wherein the compound is rendered reactive prior to conjugation.

10. The method of either claim 5 or claim 6 wherein the compound further comprises L-Rt where L is a linker group covalently attached to the compound and Rt is a reactive group that is capable of covalently linking to the biomolecule.

11. The method of either claim 5 or claim 6 wherein the biomolecule is selected from at least one of a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten.

12. The compound of formula V (V03-04115)



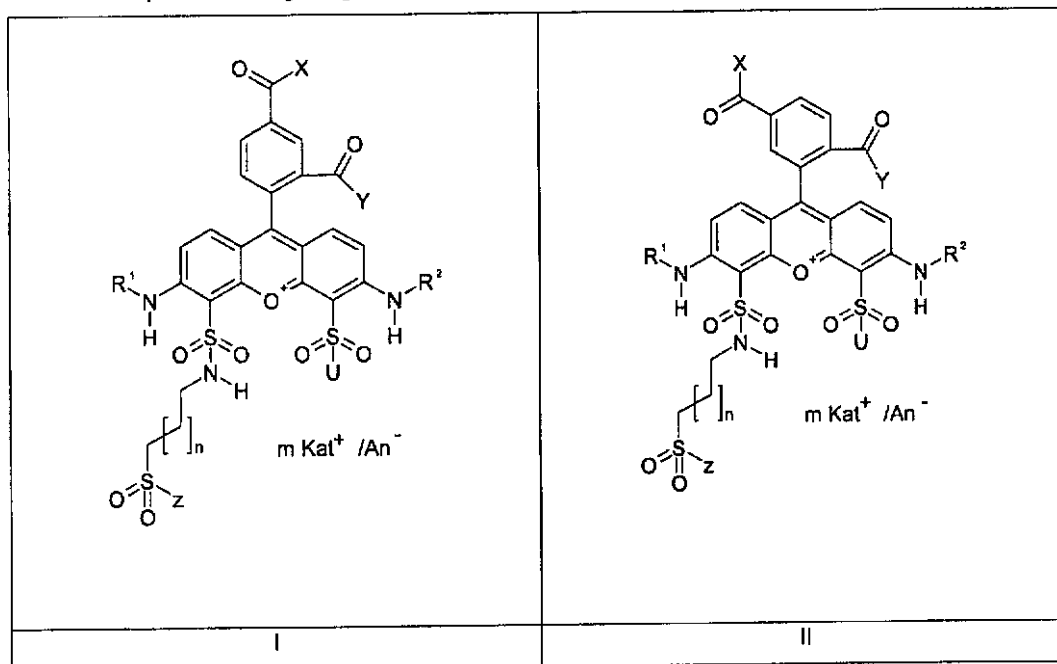
in a composition capable of use as a fluorescent dye in a biological assay.

13. The compound of claim 12 detected as a biomolecule conjugate.

14. The compound of claim 12 in a kit with instructions for use in a protein assay.

1 Abstract

Compounds having the general of formula I and/or formula II



wherein R^1 and R^2 are the same or different and are independently selected from the group consisting of -H, $-C_1-C_{18}$ -alkyl or $-\omega$ -sulfoalkyl;

X and Y are the same or different and are independently selected from the group consisting of $-O^-$, $-OH$, $-SH$, $-NH-NH_2$, $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-O-Su$ (succinimidyl/sulfosuccinimidyl), $-O-STP$ (4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorophenyl), $-O-TFP$ (2,3,5,6-tetrafluorophenyl), $-O$ -benzotriazole, $-benzotriazole$, $-NR-CO-CH_2-I$, $-NR_2$, $-NR$ -biomolecule, $-NR-L-COO^-$, $-NR-L-COOH$, $-NR-L-COO-Su$, $-NR-L-COO-STP$, $-NR-L-COO-TFP$, $-NR-L-CONR_2$, $-NR-L-CO$ -biomolecule, $-NR-L-CO-NH-NH_2$, $-NR-L-OH$, $-NR-L-O$ -phosphoramidite, $-NR-L-CHO$, $-NR-L$ -maleimid, or $-NR-L-NH-CO-CH_2-I$; where R is equal to R^1 and R^2 and L is selected from the group consisting of a divalent linear $-(CH_2)_o-$, $o = 1$ to 15), crossed, or cyclic alkane group that can be substituted by at least one atom selected from the group consisting of oxygen, substituted nitrogen, and/or sulfur, and the biomolecule is a protein, antibody, nucleotide, oligonucleotide, biotin, or hapten;

Z is $-O^-$ or OH;

U is $-O^-$, $-OH$, or $NH-L-SO_2Z$;

Kat is Li, Na, K, ammonium (mono-, di- or trialkyl) or another cation;

An is F, Cl, Br, I, BF_4^- , ClO_4^- , $CH_3CO_2^-$, $CF_3CO_2^-$ or another anion;

m is an integer from 1 - 6 necessary to compensate the negative or positive charge from the dye moiety in formula I or formula II; and

n is an integer from 0 - 12;

compositions containing these compounds, and methods using these compounds, are disclosed.

2 Representative Drawing

None

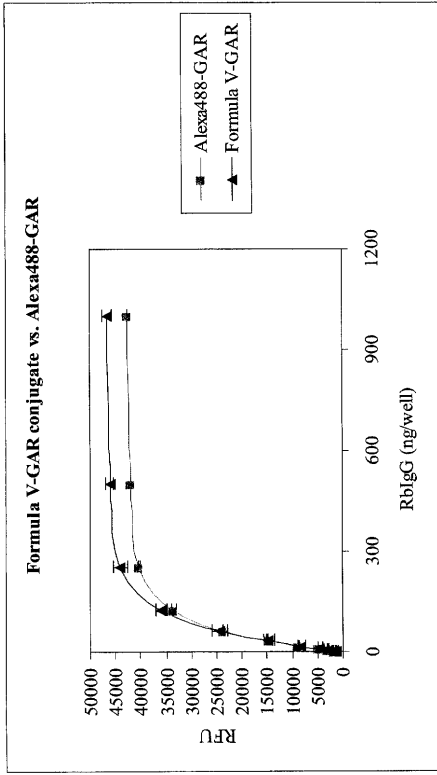


FIG. 1

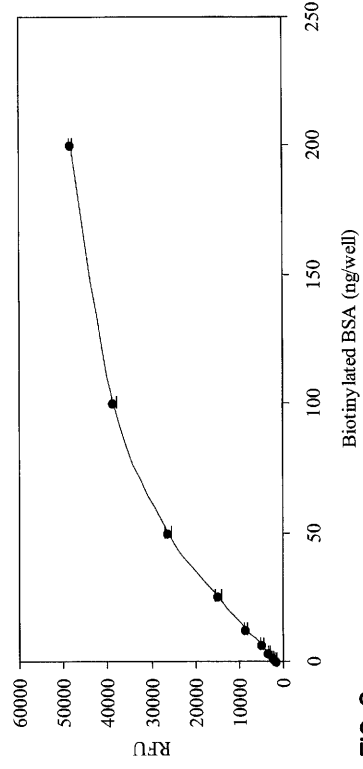


FIG. 2

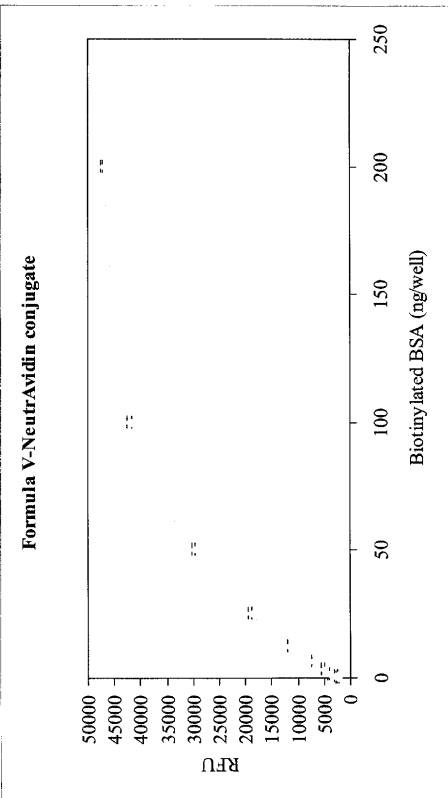


FIG. 3

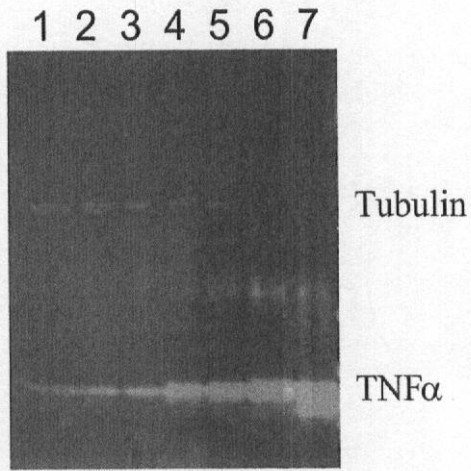


FIG. 4

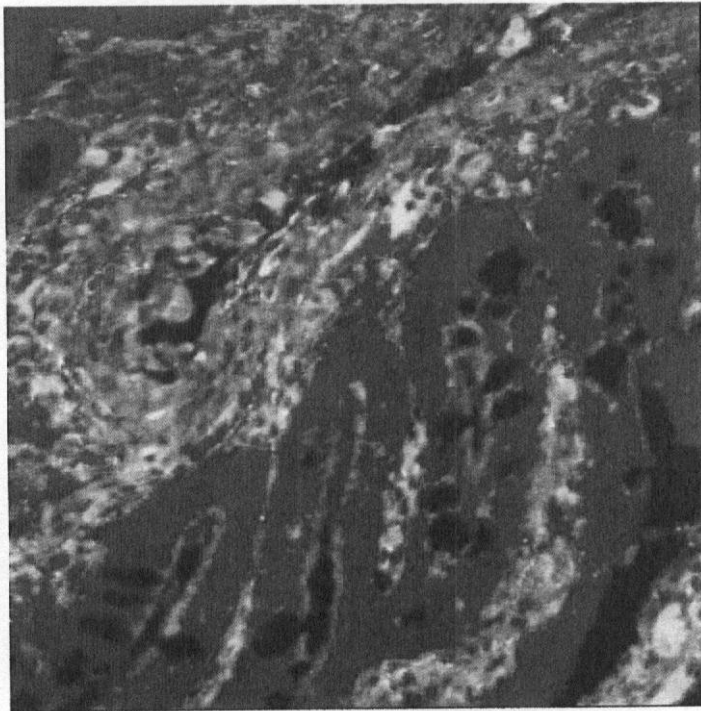


FIG. 5

专利名称(译)	x吨化合物的磺酰胺衍生物		
公开(公告)号	JP2008231093A	公开(公告)日	2008-10-02
申请号	JP2008010915	申请日	2008-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	皮尔斯生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	皮尔斯生物技术公司		
[标]发明人	ヴィルヘルムゲーフランク マティアスエスヴェンツェル ペーターテーツェルネイ スルプヒデサイ グレッグハーマンソン		
发明人	ヴィルヘルム・ゲー・フランク マティアス・エス・ヴェンツェル ペーター・テーツェルネイ スルプヒ・デサイ グレッグ・ハーマンソン		
IPC分类号	C07D311/82 C07D405/12 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	C07D311/82 G01N33/582 Y10S436/80		
FI分类号	C07D311/82.CSP C07D405/12 G01N33/58.Z G01N33/533		
F-TERM分类号	2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB12 4C062/HH16 4C063/AA01 4C063/BB07 4C063/BB08 4C063/BB09 4C063/CC79 4C063/DD04 4C063/EE01		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	11/625379 2007-01-22 US		
其他公开文献	JP5166051B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供a吨化合物的磺酰胺衍生物和使用该衍生物的方法。
 以下通式I和/或通式II的化合物，以及包含该化合物的组合物。 [选择图]
 无

