

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4471711号  
(P4471711)

(45) 発行日 平成22年6月2日(2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日(2010.3.12)

(51) Int.Cl.	F 1
C09B 23/00	C09B 23/00
C07D 417/06	C07D 417/06
G01N 21/78	G01N 21/78
G01N 33/58	G01N 33/58

請求項の数 2 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2004-114829 (P2004-114829)
(22) 出願日	平成16年4月8日(2004.4.8)
(62) 分割の表示	特願2000-528627 (P2000-528627) の分割
原出願日	平成11年1月19日(1999.1.19)
(65) 公開番号	特開2004-323839 (P2004-323839A)
(43) 公開日	平成16年11月18日(2004.11.18)
審査請求日	平成18年1月16日(2006.1.16)
(31) 優先権主張番号	09/012,525
(32) 優先日	平成10年1月23日(1998.1.23)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509130413 アプライドバイオシステムズ、エルエルシー
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92008, カールスバッド, バンアレンウェイ 5791
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下夏樹

最終頁に続く

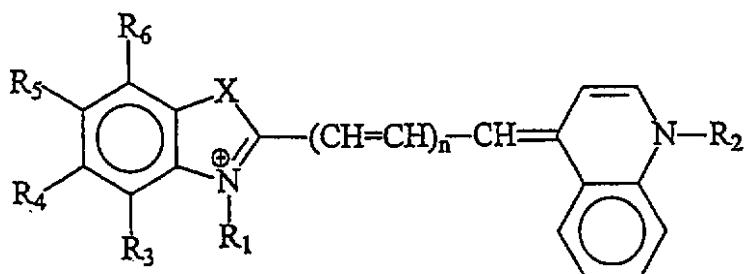
(54) 【発明の名称】非対称シアニン色素クエンチャー

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の構造を有し、そして任意の付随する対イオンを含む非対称シアニン色素化合物であつて：

## 【化 1】



10

ここで：

nは、0～2の範囲内であり；

Xは、O、SまたはSeであり；

R<sub>1</sub>は、メチル、連結基、およびメチン架橋の隣接炭素と一緒になる場合に該色素化合物のチアゾール環と縮合したテトラヒドロピリジン部分を形成する部分からなる群から選択され、該連結基は、スクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジルエス

20

テル、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、4, 6-ジクロロトリアジニル、カルボキシレート、低級アルキルアミン、低級アルキルカルボキシ部分、マレイミド、ハロアセチル、およびヨードアセトアミドからなる群より選択され；

R<sub>2</sub>は、スクシンイミジルエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、4, 6-ジクロロトリアジニル、カルボキシレート、低級アルキルアミン、低級アルキルカルボキシ部分、マレイミド、ハロアセチル、およびヨードアセトアミドからなる群より選択される連結基であり；

R<sub>3</sub>は、水素、ならびにR<sub>4</sub>と、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が置換しているベンゼン環と一緒にになる場合に1個またはそれ以上のニトロ基で置換されるナフタレン架橋を形成する部分からなる群より選択され；

R<sub>4</sub>は、水素、ならびにR<sub>3</sub>もしくはR<sub>5</sub>のどちらかと、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>が置換しているベンゼン環と一緒にになる場合に1個またはそれ以上のニトロ基で置換されるナフタレン架橋を形成する部分からなる群より選択され；

R<sub>5</sub>は、ニトロ基、ならびにR<sub>4</sub>もしくはR<sub>6</sub>のどちらかと、R<sub>5</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>6</sub>が置換しているベンゼン環と一緒にになる場合に1個またはそれ以上のニトロ基で置換されるナフタレン架橋を形成する部分からなる群より選択され；

R<sub>6</sub>は、水素、ならびにR<sub>5</sub>と、R<sub>6</sub>およびR<sub>5</sub>が置換しているベンゼン環と一緒にになる場合に1個またはそれ以上のニトロ基で置換されるナフタレン架橋を形成する部分からなる群より選択される、化合物。

#### 【請求項2】

nが1または2である、請求項1に記載の化合物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

###### (発明の分野)

本発明は、レポーター-クエンチャーエネルギー-移動色素対でクエンチャーとして有用な色素化合物に関する。より詳細には、本発明は、シアニンクエンチャー化合物、このような化合物を取込む試薬、このような化合物および/または試薬を利用する方法に関する。

##### 【背景技術】

##### 【0002】

###### (背景)

核酸ハイブリダイゼーションアッセイは、現代生物学において重要な分類の技術に含まれる。このようなアッセイは、多様な適用を有し、遺伝病の診断、ヒトの同定、微生物の同定、親子鑑定、ウイルス学、およびDNA塩基配列決定（すなわちハイブリダイゼーションによる塩基配列決定）が挙げられる。

##### 【0003】

核酸ハイブリダイゼーションアッセイの重要な局面は、ハイブリダイゼーションの検出を容易するために使用される方法である。核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用される特に重要な分類の方法は、「レポーター」色素および「クエンチャー」色素を含むレポーター-クエンチャーエネルギー-移動色素対を利用する。これらの色素は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)過程を通じて相互作用する。これらの方法において、レポーターは、発光化合物であって、これは、化学反応(化学ルミネセンスを生ずる)によるか、または光の吸収(蛍光を生ずる)によるかどちらかで励起され得る。このクエンチャーは、レポーターと相互作用することにより光の放射を変え、その結果、通常、レポーターの発光効率を減少し得る。この現象を、クエンチングと呼ぶ。このクエンチング効率は、レポーター分子とクエンチャー分子との間の距離の強い関数である。従って、核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、ハイブリダイゼーションの検出は、エネルギー移動系を設計することによって達成され、この移動系においてレポーターとクエンチャーとの間の間隔が、ハイブリダイゼーションの結果として調節される。

10

20

30

40

50

## 【0004】

現在、FRETベースの核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用されるクエンチャーは、それ自体が、蛍光性である。すなわちレポーターの蛍光をクエンチングすることに加えて、このクエンチャーは、蛍光発光を生じる。このことは、複数のスペクトル分析レポーターを使用するアッセイにおいて特に問題である。クエンチャーの蛍光が、1種またはそれ以上のレポーターによって生じられる蛍光シグナルと相互作用し得るからである。

## 【0005】

従って、実質的にそれ自体、非蛍光性であるクエンチャーカラムが引き続き必要である。

## 【発明の開示】

10

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

## (要旨)

本発明は、レポーター - クエンチャーエネルギー - 移動色素対のコンテクストにおいて有用である非蛍光性シアニンクエンチャーカラムの1分類における本発明者らの発見に関する。これらのクエンチャーカラムは、検出方法として蛍光エネルギー移動を利用する核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて特定の適用を見出す。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

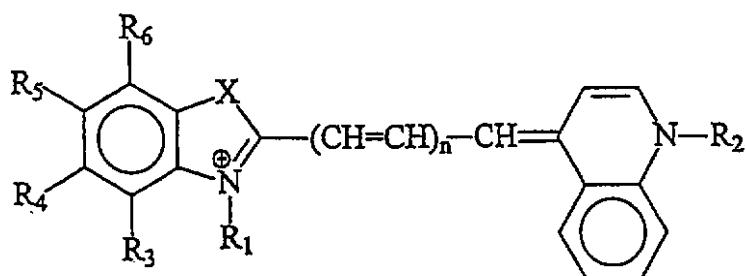
本発明は、以下を提供する：

20

項目(1) 次の構造を有し、そして任意の付随する対イオンを含む非対称シアニン色素化合物であって：

## 【0008】

## 【化2】



30

ここで：

nは、0～2の範囲内であり；

Xは、O、SまたはSeであり；

R<sub>1</sub>は、メチルおよび連結基からなる群から選択されるか、またはメチン架橋の隣接炭素と一緒にになる場合、5～7員を有する環構造を形成し；

R<sub>2</sub>は、連結基であり；

R<sub>3</sub>は、水素であるか、またはR<sub>4</sub>と一緒にになる場合、1個またはそれ以上のニトロ基で置換される縮合芳香族架橋を形成し；

40

R<sub>4</sub>は、水素であるか、またはR<sub>3</sub>もしくはR<sub>5</sub>のどちらかと一緒にになる場合、1個またはそれ以上のニトロ基で置換される縮合芳香族架橋を形成し；

R<sub>5</sub>は、ニトロであるか、またはR<sub>4</sub>もしくはR<sub>6</sub>のどちらかと一緒にになる場合、1個またはそれ以上のニトロ基で置換される縮合芳香族架橋を形成し；

R<sub>6</sub>は、水素であるか、またはR<sub>5</sub>と一緒にになる場合、1個またはそれ以上のニトロ基で置換される縮合芳香族架橋を形成する、化合物。

## 【0009】

項目(2) 項目1に記載の化合物であって、R<sub>5</sub>がニトロであり、そしてR<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>6</sub>が、それぞれ水素である、化合物。

## 【0010】

50

項目(3) 項目1に記載の化合物であって、前記連結基が、低級アルキルアミンまたは低級アルキルカルボキシである、化合物。

## 【0011】

項目(4) 項目1に記載の化合物であって、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の一方が-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>であり、ここでqは、2~12の範囲であり、そしてもう一方は、連結基である、化合物。

## 【0012】

項目(5) 項目3に記載の化合物であって、ここで、前記低級アルキルカルボキシが-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-CO<sub>2</sub>Hであり、ここでqは、2~12の範囲である、化合物。

10

## 【0013】

項目(6) 項目1に記載の化合物であって、ここでXが、硫黄である、化合物。

## 【0014】

項目(7) 項目1に記載の化合物であって、ここでnが、0または1である、化合物。

## 【0015】

項目(8) 項目1に記載の化合物であって、ここでR<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>がそれぞれ水素であり、そしてR<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>が一緒になって、1個またはそれ以上のニトロ基で置換される縮合芳香族環となる、化合物。

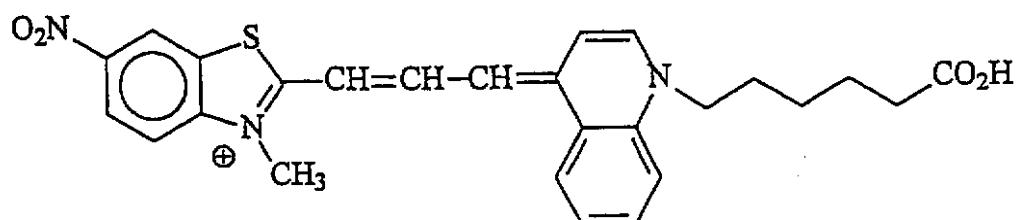
20

## 【0016】

項目(9) 以下の式の化合物

## 【0017】

## 【化3】

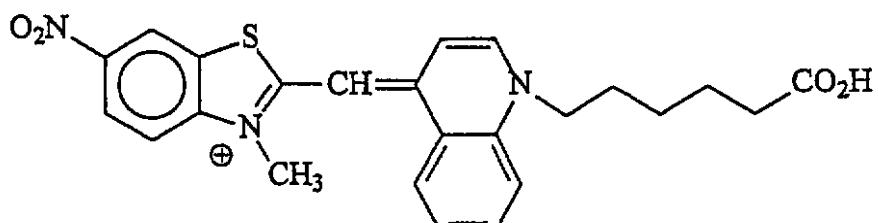


30

項目(10) 以下の式の化合物

## 【0018】

## 【化4】

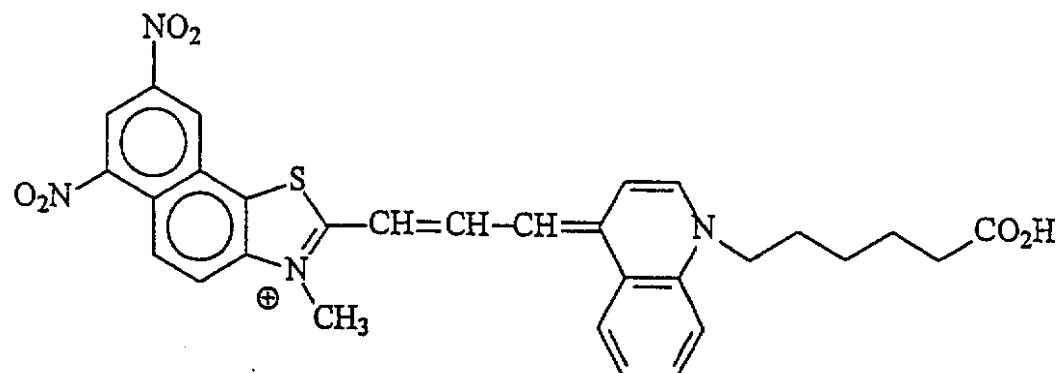


40

項目(11) 以下の式の化合物

## 【0019】

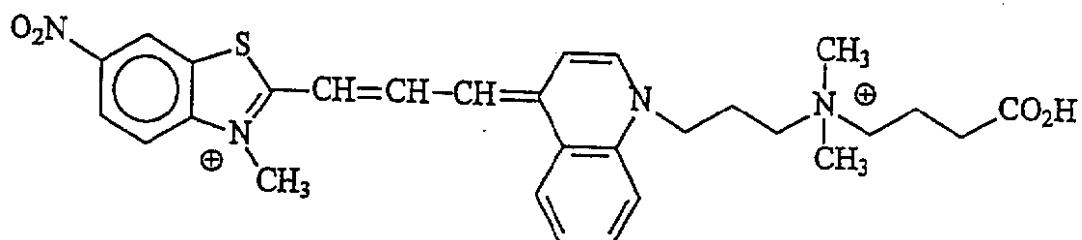
【化5】



項目(12) 以下の式の化合物

【0020】

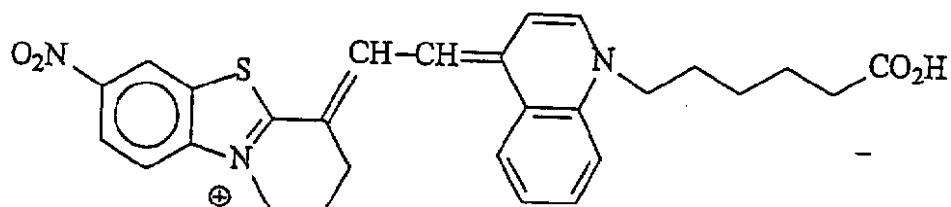
【化6】



項目(13) 以下の式の化合物

【0021】

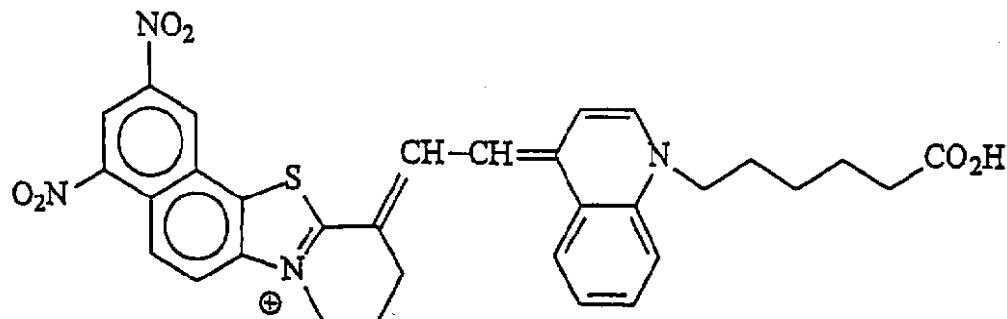
【化7】



項目(14) 以下の式の化合物

【0022】

【化8】



項目(15) レポーター色素およびクエンチャー色素を含むレポーター-クエンチャーエネルギー移動色素対であって、該クエンチャー色素が、項目1に記載の非対称シアニ

50

ン色素化合物である、レポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対。

【0023】

項目(16) 前記レポーター色素が、キサンテン、クマリン、ナフチルアミン、シアニンおよびボディピー(bodipy)色素からなる群から選択される、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対。

【0024】

項目(17) 前記レポーター色素がキサンテン色素である、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対。

【0025】

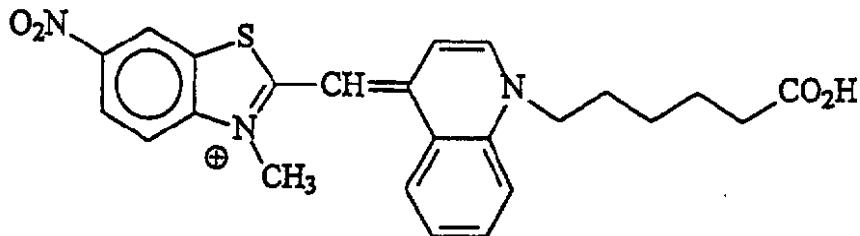
項目(18) 前記キサンテン色素が、フルオレセイン色素またはローダミン色素である、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対。 10

【0026】

項目(19) 前記レポーター色素が、カルボキシ - フルオレセイン(FAM)であり、前記クエンチャーカラムが、以下の式である、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対

【0027】

【化9】

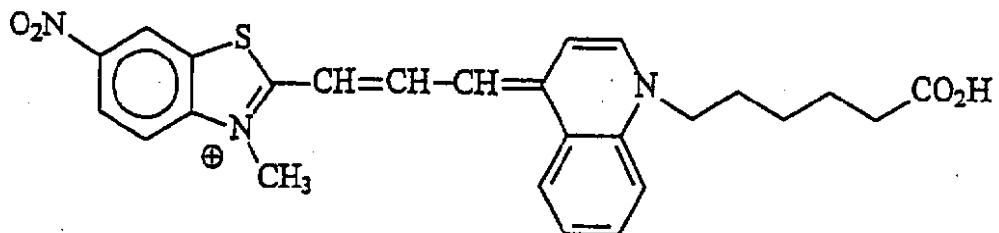


20

項目(20) 前記レポーター色素が、カルボキシ - フルオレセイン(FAM)、2',4',1,4-テトラクロロフルオレセイン(TET)、および2'-クロロ-5'-フルオロ-7',8'-縮合フェニル-1,4-ジクロロ - カルボキシフルオレセイン(NED)からなる群から選択され、そして前記クエンチャーカラムが、以下の式である、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対 30

【0028】

【化10】

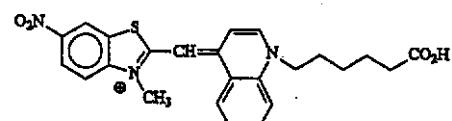
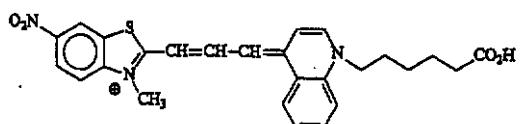


40

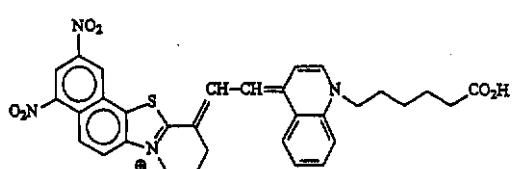
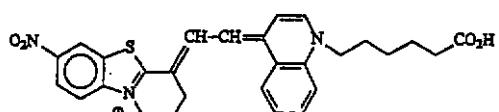
項目(21) 前記クエンチャーカラムが、以下の式である、項目15に記載のレポーター - クエンチャーエネルギー移動色素対

【0029】

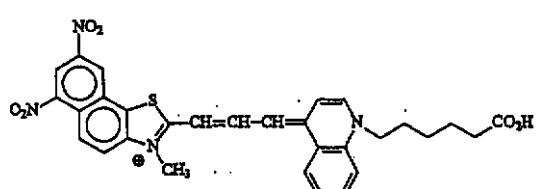
## 【化11】



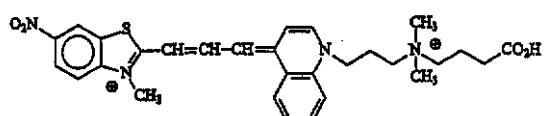
10



20



および



30

項目(22) 標識化オリゴヌクレオチドであって、  
オリゴヌクレオチド；および  
該オリゴヌクレオチドに共有結合的に結合した項目1に記載の非蛍光シアニン色素クエン  
チャーを含む、標識化オリゴヌクレオチド。

## 【0030】

項目(23) 前記オリゴヌクレオチドに共有結合的に結合したレポーター色素をさら  
に含む、項目22に記載の標識化オリゴヌクレオチド。

## 【0031】

項目(24) 項目23に記載の標識化オリゴヌクレオチドであって、ここで、前記レ  
ポーター色素および前記クエンチャー色素の前記位置において、該標識化オリゴヌクレオ  
チドが、標的核酸配列にハイブリダイズされる場合、該レポーター色素が該クエンチャー  
色素によって効果的にクエンチされず、そして該標識化オリゴヌクレオチドが、標的核酸  
配列にハイブリダイズされない場合、該レポーター色素が該クエンチャー色素によって効  
果的にクエンチされるような、標識化オリゴヌクレオチド。

## 【0032】

項目(25) 項目24に記載の標識化オリゴヌクレオチドであって、前記レポーター  
色素が、効果的にクエンチされる場合、この蛍光が、効果的にクエンチされない場合の蛍  
光に比べて、2分の1以下に減少する、標識化オリゴヌクレオチド。

## 【0033】

40

50

項目(26) 項目25に記載の標識化オリゴヌクレオチドであって、前記レポーター色素が、効果的にクエンチされる場合、この蛍光が、効果的にクエンチされない場合の蛍光に比べて、6分の1以下に減少する、標識化オリゴヌクレオチド。

【0034】

項目(27) 項目23に記載の標識化オリゴヌクレオチドであって、前記レポーター色素および前記クエンチャーカラー色素の一方が、前記オリゴヌクレオチドの3'末端で結合し、そしてもう一方が、該オリゴヌクレオチドの5'-末端で結合する、標識化オリゴヌクレオチド。

【0035】

項目(28) 標的核酸配列を検出する方法であって、少なくとも1つの標的核酸配列を含む核酸サンプルを提供する工程；および標識化オリゴヌクレオチドプローブを、該標的核酸配列にハイブリダイズする工程を包含し、該標識化オリゴヌクレオチドプローブは、項目1に記載の非対称シアニン色素化合物で標識化される、方法。 10

【0036】

項目(29) 項目28に記載の方法であって、前記標識化オリゴヌクレオチドは、前記オリゴヌクレオチドに共有結合的に結合したレポーター色素を含む、方法。

【0037】

項目(30) 項目29に記載の方法であって、ここで、前記レポーター色素および前記クエンチャーカラー色素の前記位置において、前記標識化オリゴヌクレオチドが、標的核酸配列にハイブリダイズされる場合、該レポーター色素が、該クエンチャーカラー色素によって効果的にクエンチされず、そして該標識化オリゴヌクレオチドが、標的核酸配列にハイブリダイズされない場合、該レポーター色素が該クエンチャーカラー色素によって効果的にクエンチされるような、方法。 20

【0038】

項目(31) 項目30に記載の方法であって、前記レポーター色素が、効果的にクエンチされる場合、この蛍光が、効果的にクエンチされない場合の蛍光に比べて、2分の1以下に減少する、方法。

【0039】

項目(32) 項目31に記載の方法であって、前記レポーター色素が、効果的にクエンチされる場合、この蛍光が、効果的にクエンチされない場合の蛍光に比べて、6分の1以下に減少する、方法。 30

【0040】

項目(33) 項目29に記載の方法であって、前記レポーター色素および前記クエンチャーカラー色素の一方が、前記オリゴヌクレオチドの3'末端で結合し、そしてもう一方が、該オリゴヌクレオチドの5'-末端で結合する、方法。

【0041】

項目(34) 項目29に記載の方法であって、前記レポーター色素および前記クエンチャーカラー色素の一方または両方が、前記オリゴヌクレオチドプローブから除去されるように該オリゴヌクレオチドプローブを消化する工程をさらに含む、方法。

【0042】

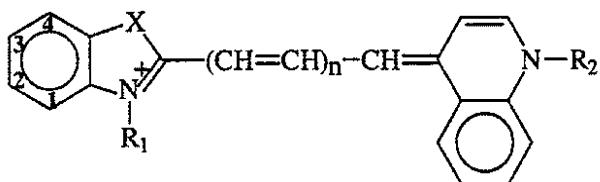
項目(35) 項目34に記載の方法であって、前記オリゴヌクレオチドプローブを消化する工程が、ポリメラーゼ酵素の5' 3'ヌクレアーゼ活性によって行われる、方法。 40

【0043】

項目(36) 次の構造を有する非対称シアニン色素化合物であって：

【0044】

## 【化12】



その置換された形態を含み、ここで：

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>の少なくとも1つは、連結基であり；そして

Xは、O、S、またはSeであり；

ここでnは0～2の範囲である、非対称シアニン色素化合物。

10

## 【0045】

項目(37) C-3置換基がニトロである、項目(36)に記載の化合物。

## 【0046】

項目(38) 項目36に記載の化合物であって、前記連結基が、低級アルキルアミンまたは低級アルキルカルボキシである、化合物。

## 【0047】

項目(39) 項目36に記載の化合物であって、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の一方が-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>であり、ここでqは、2～12の範囲であり、そしてもう一方は連結基である、化合物。

20

## 【0048】

項目(40) 項目38に記載の化合物であって、ここで、前記低級アルキルカルボキシが-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-CO<sub>2</sub>Hであり、ここでqは、2～12の範囲である、化合物。

## 【0049】

項目(41) 項目36に記載の化合物であって、ここでXが、硫黄である、化合物。

## 【0050】

項目(42) 1位および2位；2位および3位；ならびに/または3位および4位で結合した、縮合芳香族置換基または置換芳香族置換基を有する、項目(36)に記載の化合物。

30

## 【0051】

項目(43) 前記置換芳香族が、ニトロ置換基を含む、項目(42)に記載の化合物

。

## 【0052】

項目(44) R<sub>2</sub>およびメチン架橋の最も近い炭素と一緒にになる場合に5員～7員の環構造を形成する架橋基を含む、項目36に記載の化合物。

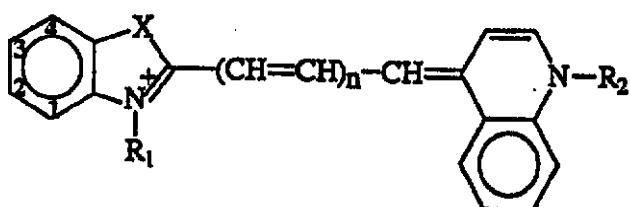
## 【0053】

第1の局面において、本発明は、以下の構造を有する非対称性のシアニン色素化合物(その置換形態を含む)を含み、

## 【0054】

40

## 【化13】



ここで、すくなくとも1個のR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は連結基であり、XはO、S、またはSeで

50

あり、そしてnは0～2の範囲である。

#### 【0055】

第2の局面において、本発明は、レポーター色素およびクエンチャーカラムを含むレポーター・クエンチャーエネルギー移動色素対を含み、ここで、クエンチャーカラムは、第1の局面の非対称シアニン色素化合物である。

#### 【0056】

E P - A - 0 710 668は、非ニトロ置換シアニン色素およびオリゴヌクレオチドの結合体を示す。これらの結合体が、標的にハイブリダイズまたは結合する場合、蛍光強度の検出可能な増加または蛍光偏光の変化が観測される。従って、E P - A - 0 710 668の結合体色素は、蛍光共鳴エネルギー移動によって予想外のクエンチングおよびニトロ置換シアニン色素の非蛍光特性によって本発明と区別される。10

#### 【0057】

第3の局面において、本発明は、第1の局面に従って、そこに共有結合的に結合したシアニン色素クエンチャーカラムを有するオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0058】

第4の局面において、本発明は、標的の核酸配列を検出するための方法を提供し、これは、少なくとも1個の標的核酸配列を含む核酸サンプルを提供し、そして標識化オリゴヌクレオチドプローブを標的の核酸配列にハイブリダイズする工程を含み、この標識化オリゴヌクレオチドプローブが、第1の局面の非対称シアニン色素化合物で標識化される。この第4の局面の特定の好ましい実施態様において、さらなる方法は、レポーター色素およびクエンチャーカラムの1個または両方がオリゴヌクレオチドプローブから取除かれるようなオリゴオリゴヌクレオチドを消化する工程を含む。20

#### 【0059】

上記発明の様々な局面および実施態様は、公知のクエンチャーカラム化合物を越える次の重要な有用性の1またはそれ以上を達成する。本発明の非対称シアニンクエンチャーカラムは、試薬（例えば、ポリヌクレオチド）と容易に共有結合をし得る。さらに、オリゴヌクレオチドプローブは、本発明の非対称シアニンクエンチャーカラムで標識化され、従来の標識化プローブに比べて高いハイブリダイゼーション安定性を示し、これによりハイブリダイゼーションの不一致に対してより敏感である、より短いプローブの使用を可能にする。さらに、本発明の非対称シアニンクエンチャーカラムは、本質的に非蛍光性であり、これにより1個またはそれ以上のさらなるレポーターにより占有され得るさらなるスペクトルを提供する。30

#### 【0060】

本発明のこれらおよび他の目的、特徴、および有用性は、以下の明細書、図面、および特許請求の範囲を参照することでより良く理解される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0061】

##### （好ましい実施態様の詳細な説明）

参考は、本発明の好ましい実施態様、添付する図面で説明される例に詳細に示される。本発明は、好ましい実施態様を組合せて記載されるが、これらの実施態様によって本発明を限定しようと意図するものではないことを理解されるべきである。逆に、本発明は、代替の、改変のおよび等価のものを含むことを意図するものであり、これらは、添付される特許請求の範囲によって定義される発明の範囲内に含まれ得る。40

#### 【0062】

##### （I. 定義）

他に記述しなければ、次の本明細書において使用する用語および語法は、次の意味を有することを意図する。

#### 【0063】

「エネルギー移動」および「蛍光クエンチング」とは、エネルギーが、電子的に励起したルミネセンス「レポーター」分子から、「クエンチャーカラム」分子によって取除かれ、これによりレポーター分子からの光発光なしで、レポーター分子がその基底状態に戻るプロセス50

スをいう。このレポーター分子は、光吸収および化学反応を含む多数のプロセスの任意により、より高いエネルギーレベルの1つに励起され得る。

#### 【0064】

一連の色素に関して「スペクトル分解能」とは、色素の蛍光発光バンドが十分に明瞭（すなわち、十分に重複しないこと）であることを意味し、各色素が結合する試薬（例えば、ポリヌクレオチド）が、各色素により発生する蛍光シグナルに基づいて、標準光検出系（例えば、通過帯域フィルター、光電子増倍管、電荷結合素子、および分光器などの系を使用すること）を使用して識別され得、米国特許第4,230,558号、同第4,811,218号、またはWheeler et al. (1985) "Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis" (Academic Press, New York, 1985) に記載される系に例示される。10

#### 【0065】

「連結基」とは、試薬に付属した「補相的官能基」と反応し得る部分を意味し、これらの反応により、試薬に色素を結合する「連結」を形成する。この補相的官能基がアミンである場合、好ましい連結基は、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、4,6-ジクロロトリアジニル、カルボキシレートスクシンイミジルエステル、または他の活性なカルボキシレートである。あるいは、連結基は、アミンであり得る。この補相的官能基がスルフヒドリルである場合、好ましくは、この連結基は、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。R. Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular probes, Inc. (1992) を参照のこと。特定の好ましい実施態様において、この連結基は、N-ヒドロキシスクシンイミジル (NHS) エステルであり、そして補相的官能基がアミンである。ここで、NHSエステルを形成するために、カルボキシレート連結基を含む本発明の色素を、ジシクロヘキシリカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させる。20

#### 【0066】

「低級アルキル」とは、1~8個の炭素原子を含む直鎖および分岐炭化水素の部分（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、tert-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、など）を意味する。30

#### 【0067】

「ヌクレオシド」とは、ペントースの1'位に連結したプリン、デアザプリン、またはピリミジンヌクレオシドベース（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、デアザアデニン、デアザグアノシン、など）からなる化合物をいう。ヌクレオシドベースがプリンまたは7-デアザプリンである場合、この糖部分がプリンまたはデアザプリンの9位に結合され、そしてヌクレオシドベースがピリミジンである場合、糖部分がピリミジンの1位に結合される（例えば、Kornerup and Baker, DNA Replication, 第2版 (Freeman, San Francisco, 1992)）。本明細書中で使用される用語「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドのリン酸エステル（例えば、三リン酸エステル）のことをいう。ここで、最も一般的なエステル化部位は、ペントースのC-5位に結合される水酸基である。本明細書中で使用される用語「ヌクレオシド/ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの両方を含む一連の化合物をいう。ヌクレオシド/ヌクレオチドに関する「アナログ」は、改变されたベース部分、改变された糖部分および/または改变されたホスフェート部分を有する合成アナログを含む（例えば、ScheitによるNucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980) に一般的に記載される）。ホスフェートアナログは、リン原子が、<sup>+</sup>5酸化状態であり、そして1個またはそれ以上の酸素原子が、非酸素部分で置換されるホスフェートアナログを含む。典型的なホスフェートアナログは、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホアミデート、ホウ40  
ナロゲン、ホスホジセレノエート、ホスホセレノロチオエート、ホスホジセレノロチオエート、ホスホセレノロアニロチオエート、ホスホセレノロアニリデート、ホスホセレノアミデート、ホスホセレノロアミデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリデート、ホスホセレノロアミリ.DateField="2010-06-02" Date-Time="10:00:00" />

素ホスフェート（付随する対イオン（例えば、 $H^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Na^+$ ）を、このような対イオンが存在する場合に含む）が挙げられるが、これらにより限定されるものではない。典型的なベースアナログは、2', 6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、偽ウリジン、C-5-プロピン、イソシトシン、イソグアニン、2-チオピリミジンおよび他の同様なアナログが挙げられるが、これらに限定されない。典型的な糖アナログは、2' - または3' 位が水素、ヒドロキシ、アルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、アリルオキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、およびフェノキシ）、アミノ、またはアルキルアミノ、フルオロ、クロロ、およびブロモである2' - または3' - 改変体が挙げられるが、これらにより限定されるものではない。用語「標識化ヌクレオシド / 標識化ヌクレオチド」は、標識に共有結合するヌクレオシド / ヌクレオチドのことをいう。

10

## 【0068】

「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」とは、天然のヌクレオチドモノマーまたはそのアナログ（二本鎖または一本鎖のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、その $\beta$ -アノマー形状、などを含む）のポリマーのことを意味する。通常、このヌクレオシドモノマーは、ホスホジエステル連結によって結合されるが、本明細書において使用される場合、用語「ホスホジエステル連結」は、ホスホジエステル結合またはそのホスフェートアナログを含む結合（付随する対イオン（例えば、 $H^+$ 、 $NH_4^+$ 、 $Na^+$ ）を、このような対イオンが存在する場合に含む）のことをいう。典型的に、ポリヌクレオチドは、少しのモノマー単位（例えば5 ~ 40）から幾千のモノマー単位のサイズの範囲である。ポリヌクレオチドが文字の配列によって表される場合（例えば、ATGCCCTG）は、ヌクレオチドは、左から右へ5'から3'の順序であり、そして他に記述がなければ、「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、デオキシチミジンを意味することが理解される。

20

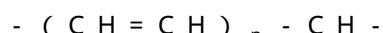
## 【0069】

本明細書中で使用される「置換」とは、1またはそれ以上の水素原子が、1またはそれ以上の非水素原子、官能基または官能部分で置換される分子のことをいう。例えば、非置換窒素は、-NH<sub>2</sub>であり、一方置換窒素は、-NHCH<sub>3</sub>である。典型的な置換基は、ハロ（フッ素および塩素）、低級アルキル、低級アルケン、低級アルキン、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、芳香族、フェニル、多環式芳香族、電子リッチな複素環、および連結基が挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0070】

「メチン架橋」または「ポリメチン架橋」とは、2個のベース部分を接続するシアニン色素化合物の部分、すなわち次の構造を有する架橋のことをいい、



ここで、nは、典型的に0 ~ 2の範囲にある。

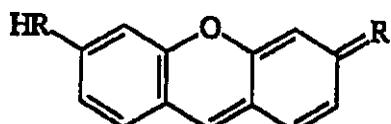
## 【0071】

「キサンテン系色素」とは、次の縮合3環構造を含む色素であり、

## 【0072】

## 【化14】

40

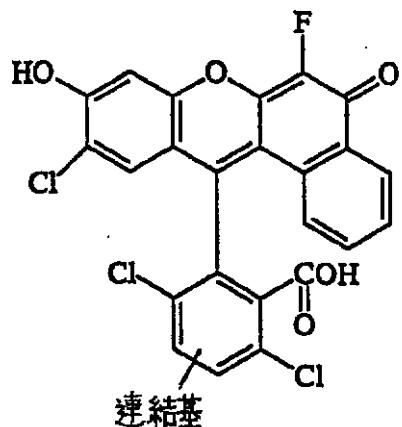


ここで、Rは、酸素（フルオレセイン）または-NH（ローダミン）（その置換形状を含む）である。典型的な置換フルオレセイン化合物は、次の構造を有する「NED」色素、

## 【0073】

50

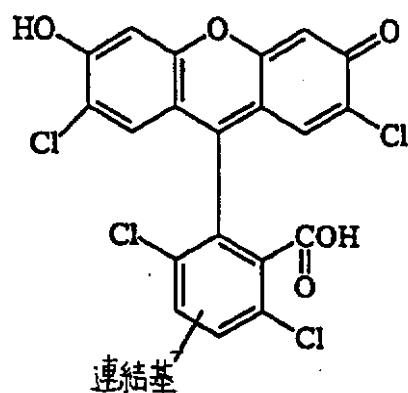
【化15】



次の構造を有する「TET」色素、

【0074】

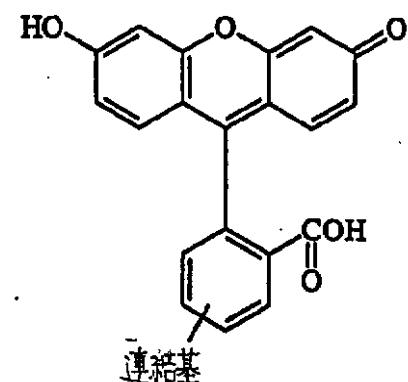
【化16】



および、次の構造を有する「FAM」色素、

【0075】

【化17】

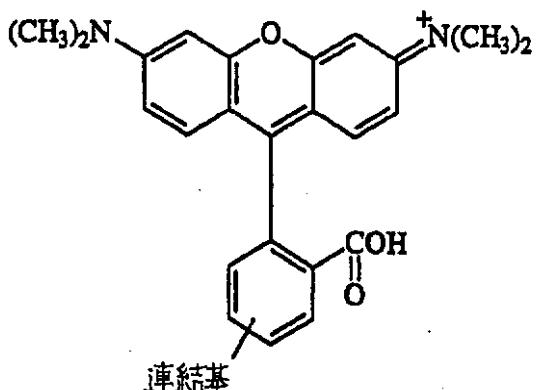


を含む。典型的なローダミン色素は、以下の構造を有する「TAMRA」または「TMR」色素である。

【0076】

40

【化18】

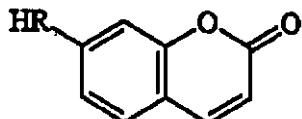


10

「クマリン色素」は、次の縮合2環構造を含む色素であり、

【0077】

【化19】



20

ここで、Rは、酸素(ヒドロキシクマリン)または-NH(アミノクマリン)(それらの置換形状を含む)である。

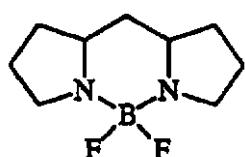
【0078】

「BODIPY<sup>TM</sup>色素」は、次の縮合環構造を含む色素(その置換形状を含む)である。

【0079】

【化20】

30



the Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth Addition, Haugland, Molecular Probes, Inc. (1996)を参照のこと。

【0080】

「シアニン色素」は、メチン、またはポリメチン、架橋によって結合される2個の窒素複素環式環を含む色素である。このような色素の網羅的な総説は、Ficken(Ficken, The Chemistry of Synthetic Dyes、第IV巻、Venkataraman(1971))によって提供される。

【0081】

(I. 非対称シアニン色素化合物)

(A. 構造)

第一の局面において、本発明は、非蛍光クエンチャーとして有用な新規な分類のシアニン色素化合物を含む。これらの化合物は、すぐ下の式1に示される一般式(その置換形状を含む)を有し、ここでR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>の少なくとも1個は、連結基であり、Xは、O、S、またはSeであり、そしてnは、0~2の範囲である。(本明細書において提供され

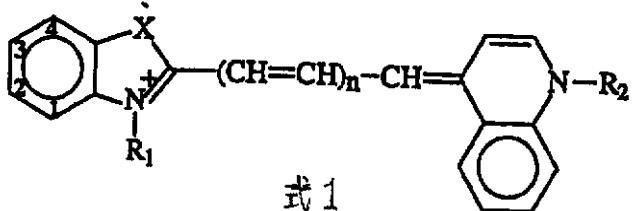
40

50

る全分子構造は、示される正確な電子構造だけではなく、全ての共鳴構造、プロトン化状態、およびそれらに付随する対イオンをも含むことを意図していることに注意すべきである。)

## 【0082】

## 【化21】



10

好ましくは、この化合物が、非蛍光クエンチャーとして使用される場合、この化合物は、ニトロC-3置換を含む。例えば、化合物5、9、20、21および23。

## 【0083】

代わりの好ましい実施態様において、式1の化合物の連結基は、低級アルキルアミン、または低級アルキルカルボキシ部分であり、ここで、特に好ましい低級アルキルカルボキシは、 $-(\text{CH}_2)_q\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_q\text{CO}_2\text{H}$ （ここで、qは2~12の範囲である）である。例えば、化合物23。

20

## 【0084】

別の好ましい実施態様において、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>のうちの1つは、 $-(\text{CH}_2)_q\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ であり、ここでqは、2~12の範囲であり、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>のもう一方は、連結基である。

## 【0085】

さらに別の好ましい実施態様において、本発明のシアニン化合物のX基は、硫黄である。例えば、化合物5、9、20、21、22および23。

## 【0086】

別の好ましい実施態様において、式1の化合物は、縮合芳香族、または置換芳香族、1位および2位、2位および3位；ならびに/または3位および4位で結合した置換基が挙げられる。さらに好ましくは、この置換芳香族は、1個またはそれ以上のニトロ置換基を含む。例えば、化合物21および22。

30

## 【0087】

本発明のさらに好ましい実施態様において、式1の化合物は、R<sub>1</sub>およびメチン架橋の隣接炭素が一緒にになって、5~7員（より好ましくは6員）を有する環構造を形成する、架橋基を含む。例えば、化合物20および21。

## 【0088】

## (B. 合成)

一般に、非蛍光シアニン色素クエンチャーは、以下のように調製され得る。図2Aおよび2Bを参照のこと。四級化ベンザゾール誘導体（例えば、ベンゾチアゾリウム塩10または13）をレピジニウム塩、11と混合し、そして塩基性条件下で（メタノール中のジイソプロピルエチルアミン、またはピリジン）還流した。溶媒をエバポレートし、そして粗製固体を希塩酸（例えば、水中5%）で洗浄し、そして乾燥した。

40

## 【0089】

この色素は、カルボン酸基をスクシンイミジルエステルに変換することによってアミノ反応性が与えられ得る。例えば、色素12または14を、スクシンイミジルテトラメチルウロニウム塩およびDIPPEAと共に、DMF中に溶解させる。この生成物を、希塩酸を添加することで沈殿させ、洗浄し、そして乾燥する。

## 【0090】

## (I.I. 非蛍光シアニン色素を含有する色素対)

50

レポーター - クエンチャーチ色素対は、任意の分子対から構成され得、これらの分子は、エネルギー転移プロセスに関与し得る。典型的なレポーターは、キサンテン色素（フルオレセイン、およびローダミン色素を含む）から選択され得る。これらの化合物の多くの適切な形態は市販されており、様々な置換基をそれぞれのキサンテン環に有し、これらの置換基が、オリゴヌクレオチドに対する結合部位として、または、付着のための結合官能性として使用され得る。蛍光化合物の別のグループは、ナフチルアミン類であり、これらは、位または位にアミノ基を有する。このようなナフチルアミノ化合物には、1 - ジメチルアミノナフチル - 5 - スルホネート、1 - アニリノ - 8 - ナフタレンスルホネートおよび2 - p - トルイジニル - 6 - ナフタレンスルホネートが挙げられる。他の色素には、以下のものが挙げられるが、それらに限定されない：3 - フェニル - 7 - イソシアナートクマリン、アクリジン（例えば、9 - イソチオシアナートアクリジンおよびアクリジンオレンジ）、N - (p - (2 - ベンゾオキサゾリル)フェニル)マレイミド、ベンゾオキサジアゾール、スチルベン、ピレンなど。

## 【0091】

好ましくは、レポーター分子は、フルオレセイン色素およびローダミン色素から選択される。オリゴヌクレオチドに対する付着に関する、これらの色素および適切な連結方法論は、ほかの場合にも記載されている（Khannaら（上記）；Marshall Hiss tochemical J., 7: 299 - 303 (1975)；Mechnenら、米国特許第5,188,934号；Menchienら、欧州特許出願第87310256.0号；およびBergotら、国際出願PCT/US90/05565）。特に好ましいレポーター分子には、フルオレセイン色素、NED、TETおよびFAMが挙げられる：

典型的なレポーター - クエンチャーチ色素対には、以下のものが挙げられる。

## 【0092】

## 【表1】

レポーター	クエンチャー
FAM	ニトロチアゾール オレンジ (化合物9)
FAM	ニトロチアゾール ブルー (化合物5)
TET	ニトロチアゾール ブルー (化合物5)
TET	ニトロチアゾール ブルー (化合物5)
NED	ニトロチアゾール ブルー (化合物5)

## (III. 色素標識されたポリヌクレオチド)

別の局面において、本発明は、本発明の非蛍光シアニン色素を用いて標識されたポリヌクレオチドを包含する。このような標識されたポリヌクレオチドは、多数の重要なコンテクストにおいて有用であり、これらのコンテクストは、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブとして、およびオリゴヌクレオチドライゲーションプローブとして含む。

## 【0093】

一重に、または二重に標識されたポリヌクレオチドは、任意の多数の周知の方法を使用して調製され得る。3'末端でオリゴヌクレオチドを適切に標識する方法は、以下の方法が挙げられるが、これらに限定されない：(1) 3'末端のリボヌクレオチドの過ヨウ素酸酸化、続く、アミン含有標識との反応（HellerおよびMorrison、Rapid Detection and Identification of Infe

10

20

30

40

50

tious Agents (D. T. Kingsbury および S. Falkow、編)、頁245-256、Academic Press (1985)に記載) ; (2) デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いる、3'-脂肪族アミン含有ヌクレオチドの酵素的付加、続く、アミン反応性標識との反応 (Morrison、欧州特許出願第232967号) ; および(3) 3'-リボヌクレオチドの過ヨウ素酸酸化、続く、1,6-ヘキサンジアミンとの反応による、3'末端脂肪族アミンの提供、続く、アミン反応性標識との反応 (Cardulloら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8790-8794 (1998))。

## 【0094】

オリゴヌクレオチドの5'末端の標識化方法には、以下のものが挙げられる：(1) 5'～5'カップリングリボヌクレオチドの過ヨウ素酸酸化、続く、アミン反応性標識との反応 (Heller および Morrison、1985) ; (2) エチレンジアミンと5'ホスホリル化ポリヌクレオチドとの縮合、続く、アミン反応性標識との反応 (Morrison、1987) ; および(3) 固相DNA合成において、アミノヘキシリホスファイト剤を用いる脂肪族アミン置換基の導入、続く、アミン反応性標識との反応 (Cardullo、1988)。

## 【0095】

これらの末端標識化方法に加え、標識は、アミン含有ヌクレオチドホスホルアミダイト剤 (phosphoramidite reagent) (例えば、5' - ジメトキシリチル - 5' - [N - (トリフルオロアセチルアミノヘキシ) - 3 - アクリルイミド] - 2 - デオキシウリジン)、3' - [(2 - シアノエチル) - (N, N - デイソプロピル) ] - ホスホルアミダイト (phosphoramidite) (例えば、アミノモディファイヤー C6 dT ホスホルアミダイト (Linker Arm Nucleotide, Glen Research, Inc.)) を使用して、合成ポリヌクレオチドの特定の位置に配置され得る (Mathiesら、米国特許第5,688,648号)。

## 【0096】

オリゴヌクレオチドの標識化手順の全体的な総説に関しては、以下を参照のこと：R. Haugland の、Excited States of Biopolymers、Steiner 編、Plenum Press (1983)、Fluorogenic Probe Design and Synthesis: A Technical Guide、PE Applied Biosystems (1996)、および G.T. Herman、Bioconjugate Techniques、Academic Press (1996) における記載。

## 【0097】

一般に、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブの設計は、本発明の非蛍光シアニン色素クエンチャーを含み、従来技術に従う。従って、標識されたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを設計する場合、以下の一般的なガイドラインに従うべきである：(1) 標的核酸の配列がPCR単位複製配列内に配置される場合、プローブ配列は、プローブが、PCRプライマー間の配列上の位置でハイブリダイゼーションするようにあるべきである；(2) プローブは、約20～30個のヌクレオチド長を有すべきであり、その結果、良好なハイブリダイゼーション動態および結合特異性を保証する；(3) プローブおよび標的の核酸配列における2次構造の阻止；(4) このプローブが1対のPCRプライマーと組み合わせて使用される場合、このプローブは、正方向プライマーおよび逆方向プライマーのいずれともハイブリダイゼーションすべきではない；そして(5) 単一ヌクレオチドの長伸縮(すなわち、4より大きい)を有するプローブを阻止する；および(6) プローブ配列とその相補体との間で選択する場合、GヌクレオチドよりもCヌクレオチドを多く有するストランドを取り出す。

## 【0098】

(IV. 非蛍光シアニン色素を利用するハイブリダイゼーション方法)

ハイブリダイゼーションの検出方法としてエネルギー転移を利用する、幾つかのハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーションアッセイフォーマットが記載されており、これらのうち 5 つを以下に記載し、そして、概略的に図 5 A ~ E に示す。

#### 【 0 0 9 9 】

第 1 アッセイフォーマットにおいて、図 5 A に示されるように、2 つのオリゴヌクレオチドプローブの配列を、それらが標的の核酸 5 の近接した領域とハイブリダイゼーションするように選択される。第 1 プローブ 10 ( 標的核酸の 5' 末端方向へハイブリダイゼーションする ) は、その 5' 末端付近で、レポーター標識で標識され、ここで、第 2 プローブ 15 がその 3' 末端付近で、クエンチャラベルで標識される。従って、3 方向ハイブリッド 20 が、標的核酸 5 および第 1 プローブ 10 および第 2 プローブ 15 との間で形成され、レポーターおよびクエンチャーを、かなり接近させ、そして、エネルギー転移が進行し得る。従って、このフォーマットにおいて、2 つのプローブの標的のハイブリダイゼーションの際、レポーターの発光がクエンチされる ( Heller ら、欧州特許出願第 070685 号 ( 1983 ) ) 。 10

#### 【 0 1 0 0 】

第 2 のアッセイフォーマットにおいて、図 5 B に示されるように、2 つのオリゴヌクレオチドプローブ 25 および 30 は、互いに相補的であり、そして、これらの各々は、レポーター標識またはクエンチャラベルで標識を備え、使用される。プローブが互いにハイブリダイゼーションし、プローブ - プローブハイブリッド 35 を形成する場合、クエンチング相互作用が好まれるようにラベルの位置が選択され、ここでプローブが分離される場合、わずかな量のクエンチングが起こる。標的核酸の検出は、標的核酸 5 およびプローブ 25 および 30 の両方の変性によって達成され、次いで、ストランドの再アニールが可能となる。従って、プローブ - プローブハイブリダイゼーションとプローブ - 標的ハイブリダイゼーションの間に競合が存在する。標的核酸が多く存在すればするほど、より多くのプローブが標的とハイブリダイゼーションし、プローブ - 標的ハイブリッド 40 を形成する。標的 DNA が存在する場合は、レセプター R からの発光の増加によって示され、これは、プローブ - プローブハイブリッド数の減少によって引き起こされる、クエンチャラベルによるクエンチングの減少による ( Morrison 、欧州特許出願第 232967 号 ( 1987 ) ) 。 20

#### 【 0 1 0 1 】

第 3 のアッセイフォーマット ( 図 5 C に記載する ) は、唯一の標識プローブ 45 および二重鎖核酸 50 と優先的に結合する色素を使用する。この色素 50 は、二重鎖種の塩基対間でインターフェースと結合するか、または、ヘリックスの外部と結合し得、そしてクエンチャラベルとして作用する。従って、ハイブリダイゼーションが存在しない場合、クエンチャラベル Q は、一重鎖プローブ 45 と結合せず、そしてレポーター R は、Q による影響を受けない。しかし、標的の核酸 5 が存在する場合、プローブ 45 は標的の核酸とハイブリダイゼーションし、そして Q は、得られた二重鎖領域と結合し、標的 - プローブ - 色素複合体 55 を形成する。この複合体において、Q および R はかなり接近して配置され、そして、エネルギー転移または蛍光のクエンチングが起こり得る。従って、このフォーマットにおいて、レポーターの発光は、プローブが標的とハイブリダイゼーションする際にクエンチされる ( Heller および Morrison 、 Rapid Detection and Identification of Infectious Agents ( D.T. Kingsbury and S.Falkow 、編 ) 、 245 - 256 頁、 Academic Press ( 1985 ) ) 。 30

#### 【 0 1 0 2 】

第 4 のアッセイフォーマット ( 図 5 D に示す ) において、レポーターおよびクエンチャラベルの両方を用いて標識される単一プローブ 60 が使用される。プローブが一本鎖状態である場合、すなわち、標的の核酸とハイブリダイゼーションしていない場合、一本鎖構造のプローブは、レポーター標識およびクエンチャラベルが非常に接近し、それによってエネルギー転移が進行し得るような状態となるように、レポーター標識およびクエンチャラベルの位置が選択される。この一本鎖構造を達成する 1 つの代替方法において、レポーターおよびクエンチャラベルは、プローブ配列を設計することによってかなりの近接化がもたらさ 40

れ、その結果、プローブの末端でヘアピン形状を形成し、それによってレポーターおよびクエンチャーを一緒にねじ伏せる (Bagwell、欧州特許出願第601889号(1994)；TyagiおよびKramer、Nature Biotechnology、14:303-308(1996))。この一本鎖構造を達成する別の代替方法において、クエンチャーおよびレポーターを十分かなり接近してさせるために、一本鎖プローブのランダムコイル形状が役立つように、レポーターおよびクエンチャーがプローブ上で十分に間隔を開けて配置される (Mayrand、米国特許第5,691,146号)。しかし、二重標識されたプローブ60が、標的の核酸5とハイブリダイゼーションし、プローブ-標的ハイブリッド65を形成する場合、レポーターおよびクエンチャーは互いに分離され、そしてクエンチング相互作用が妨げられる。従って、このフォーマットでは、プローブの標的へのハイブリダイゼーションの際、レポーターの発光はクエンチされなくなる。  
10

#### 【0103】

第5アッセイフォーマット、本明細書中では、「Taqlman」アッセイとして言及され、図5Eに示され、レポーター標識およびクエンチャー標識の両方を備える二重標識されたプローブは、標的の核酸とのハイブリダイゼーションの際に消化され、それによって、プローブからの一方または両方の標識を遊離する (Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:7276-7280(1991)；Livak、米国特許第5,538,848号)。この方法において、二重に標識されたプローブ75は、標的の核酸5とハイブリダイゼーションされる。さらに、オリゴヌクレオチドプライマー70は、プローブの上流の位置で標的の核酸とハイブリダイゼーションされる(すなわち、標的の核酸の3'末端と接近する)。次いで、プライマー70は、ポリメラーゼ酵素を用いて伸長され、それによって伸長されたプライマー80を形成する(例えば、DNAポリメラーゼを使用して)。プライマー伸長反応の間、ポリメラーゼの5'-3'スクレアーゼ活性は、プローブ75を切断するのに役立ち、その結果、レポーター標識を備える第1プローブフラグメント85およびクエンチャー標識を備える第2プローブフラグメント90を形成する。従って、レポーター標識およびクエンチャー標識は分離され、それによって、これら2つの間のエネルギー転移を阻止する。従って、このフォーマットにおいて、レポーターの発光は、プローブの標的へのハイブリダイゼーションおよび次のプローブの分解の際に、クエンチされなくなる。  
20  
30

#### 【0104】

上記および図5A～Eの各5つのアッセイフォーマットにおいて、別に説明しない限り、レポーターおよびクエンチャーの位置は任意であることに注目されたい。従って、レポーターが一方のプローブ上に、そしてクエンチャーが他方のプローブ上に示されるが、それらの位置は逆転され得る。

#### 【0105】

上記のアッセイフォーマットは、単一のレポーター標識のみを使用するシステムに関して示されるが、マルチレポーターシステムがまた、実施され得る。このようなマルチレポーターシステムは、単一反応用量における複数のハイブリダイゼーションの分析を必要とする用途に有益である。このようなシステムにおいて、各レポーター分子は発光を生じ、この発光は、任意の他のレポーターからの発光によるスペクトル解析が可能である。各レポーターと共に使用される特定のクエンチャーは、同一であるか、または異なり得、これは、クエンチャーおよびレポーターのスペクトル特性に依存する。  
40

#### 【0106】

上記のアッセイの各々は、核酸增幅工程(例えば、PCR)と組み合わせて実施され得る。従って、ハイブリダイゼーションアッセイを実施する前に、全部または一部の核酸サンプルが増幅され得る。増幅工程と組み合わせて実施する場合、このハイブリダイゼーションアッセイは、エンドポイントモードまたはリアルタイムモードで実施され得る。エンドポイントモードにおいて、ハイブリダイゼーションアッセイは、増幅反応が完了した後(例えば、全部、または実質的に全部のPCR反応の増幅サイクルが完了した後)に実施  
50

される。リアルタイムモードにおいて、ハイブリダイゼーションアッセイは、増幅反応の間の複数の時点（例えば、PCRプロセスの各熱サイクル後）で実施される（Higuchi、欧州特許出願第512334号）。リアルタイムモードが好ましいのは、標的の核酸の初期量の定量測定が必要である場合である（例えば、血液サンプル中に存在する病原核酸の複製数）。

#### 【0107】

##### （V. 実施例）

本発明は、以下の実施例を考慮することによってさらに明らかにされ、これらの実施例は、本発明の単なる例示を意図し、いかなる点においても本発明の範囲を制限することは意図されない。

10

#### 【0108】

##### （実施例1）

ニトロチアゾールブルー5およびニトロチアゾールオレンジ9の合成

ニトロチアゾールブルー5およびニトロチアゾールオレンジ9の合成を、図3および4に概説する。

#### 【0109】

##### （6 - ニトロベンゾチアゾール1の調製）

図3Aを参照のこと。2 - メチルベンゾチアゾールのニトロ化を以下の方法に従って実施した：Mizuno、J. Pharm. Soc. Japan、72、745(1952)。発煙硝酸(1.6mL)および濃硫酸(1.2mL)の混合物を、2 - メチルベンゾチアゾール(2g)の氷冷硫酸(8mL)溶液に添加した。この溶液を1時間室温に加温し、次いで、100mLの氷に注いだ。固体を濾過し、水で洗浄し、そしてエタノール(80mL)から再結晶し、2.5gの黄みを帯びた針状物を得た。

20

#### 【0110】

##### （3 - メチル - 6 - ニトロベンゾチアゾリウム p - トルエンスルホネート2の調製）

図3Aを参照のこと。6 - ニトロベンゾチアゾール(1g)およびメチル-p - トルエンスルホネート(1.2g)の混合物を140°で20分間加熱した。この固体をアセトンで洗浄し、濾過して、青みを帯びた固体を得た(1.1g)。

#### 【0111】

（2 - (2' - アセトアニリドビニル) - 3 - メチルベンゾチアゾリウム p - トルエンスルホネート3の調製）

30

図3Aを参照のこと。3 - メチル - 6 - ニトロベンゾチアゾリウム p - トルエンスルホネート2(200mg、0.52mmol)、ジフェニルホルムアミジン(160mg、0.8mmol)および無水酢酸(2mL)の混合物を20分間還流した。溶液を冷却し、エーテルで粉碎し、茶褐色の固体を得た(200mg)。

#### 【0112】

##### （1 - (5' - カルボキシフェニル) - レビジニウムプロミド4の調製）

図3Bを参照のこと。レビジン(5g)および6 - ブロモヘキサン酸(10g)の混合物を130°で6時間加熱した。この固体をアセトンで洗浄し、濾過し、オフホワイトの固体を得た(10.5g)。

40

#### 【0113】

##### （ニトロチアゾールブルー5の調製）

図3Cを参照のこと。上記のアセトアニリド3(65mg、0.13mmol)および上記のレビジニウムプロミド4(66mg、0.2mmol)およびピリジン(1mL)の混合物を併せ、そして30分間還流した。この青色溶液を乾固するまで濃縮し、そして1mLの5% HClで洗浄した(5×)。残渣を乾燥し、青色固体を得た(67mg)。

#### 【0114】

##### （ニトロチアゾールブルースクシンイミジルエステルの調製）

ジメチルホルムアミド(0.5mL)およびジイソプロピルエチルアミン(0.05m

50

L) 中のニトロチアゾールブルー 5 (31 mg、0.056 mmol) 溶液に、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 (34 mg、0.12 mmol) を添加した。この混合物を10分間、70℃に加温した。反応の進行を、シリカゲルのTLC(溶出液として、600:60:16ジクロロメタン:メタノール:酢酸を使用する)によってモニターした。この均一溶液に5%のHCl (2 mL) を添加した。沈殿物を、さらにHClで洗浄し、そして乾燥させ、暗色の固体を得た (30 mg)。

## 【0115】

(2-(メチルチオ)-6-ニトロベンゾチアゾール7の調製)

図4Aを参照のこと。発煙硝酸 (1.93 g) を、2-(メチルチオ)ベンゾチアゾール (5 g) の冰浴で冷却した濃硫酸 (16.8 g) 溶液に滴下した。5℃で3時間攪拌後、この溶液を氷に注ぎ、そして濾過し、黄色固体を得た (5.7 g、25 mmol、91%)。

## 【0116】

(3-メチル-2-(メチルチオ)-ベンゾチアゾリウム p-トルエンスルホネート8の調製)

6-ニトロ-2-(メチルチオ)ベンゾチアゾール7 (0.5 g、2.2 mmol) およびメチル-p-トルエンスルホネート (3.7 g、20 mmol) の混合物を、1時間にわたって120~145℃に加熱した。この溶液を冷却し、30 mLのエーテルを添加した。得られた非結晶固体をアセトンで粉碎し、淡紫色の固体を得た (0.57 g、1.4 mmol、63%)。

## 【0117】

(ニトロチアゾールオレンジ9の調製)

図4Bを参照のこと。3-メチル-2-(メチルチオ)-ベンゾチアゾリウム p-トルエンスルホネート8 (50 mg、0.12 mmol) および1-(5'-カルボキシペニチル)-レピジニウムプロミド4 (41 mg、0.12 mmol) のメタノール (5 mL) 溶液にジイソプロピルエチルアミン (0.2 mL) を添加した。この溶液を15分間還流した。この溶媒をエバポレートし、そして反応残渣を5%のHCl (2 mL) で粉碎した。この固体を、さらなる5%のHClで洗浄し、そして乾燥させ、オレンジ色の固体 (8 mg)を得た。

## 【0118】

(ニトロチアゾールオレンジスクシンイミジルエステルの調製)

ジメチルホルムアミド (0.1 mL) およびジイソプロピルエチルアミン (0.01 mL) 中のニトロチアゾールオレンジ9 (8 mg) の溶液に、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 (10 mg) を添加した。この混合物を10分間、70℃に加温した。反応の進行をシリカゲルのTLC(溶出液として、600:60:16ジクロロメタン:メタノール:酢酸を使用する)によってモニターした。この均一溶液に5%のHCl (1 mL) を添加した。沈殿物をさらなるHClで洗浄し、そして乾燥させ、オレンジ色の固体を得た (8 mg)。

## 【0119】

(実施例2)

Taqman アッセイのための二重標識プローブの調製

Applied Biosystems Model 394 DNA / RNA 合成機 (The Perkin-Elmer Corporation, PE Applied Biosystems Division (ABD)) を使用し、操作手引きに記載の一般的な手順に従って、オリゴヌクレオチドプローブの自動合成を実施した。色素標識CPG 固体支持体 (Mullah および Andrus, Tetrahedron Letters, 38 (33) : 5751-5754 (1997))、DNA Fast Phosphoramidite (User Bulletin 番号 85, 1994, ABD) ならびに、色素標識ホスホアミダイト、FAM および TET (User Bulletin 50

n番号75、1994、ABD)を使用し、オリゴヌクレオチドを0.2 μmolスケールで合成した。標準的な0.2 μmolの合成サイクルを、FAMアミダイトのカップリング時間をさらに120秒延長することで若干変更した( User Bulletin番号78、1994、ABD)。各プローブは、このプローブの5'末端に付着したレポーター色素および3'末端に配置されたクエンチャーカラムを備える。

#### 【0120】

合成の完了後、MeOH:t-BuNH<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O(1:1:2)(Woolら、米国特許第5,231,191号)の混合物での処理によって、DNA合成機の支持体からオリゴヌクレオチドを自動切斷し、ここで、Applied Biosystems Model 394 DNA/RNA合成機に関する操作手引きに記載される、1時間自動切斷手順(「END CE」手順)を使用した。この混合物を85°で1時間または65°で3時間加熱することで、塩基の保護基を除去した。

#### 【0121】

粗製オリゴヌクレオチドを、純度および完全性に関し、以下の装備および条件を使用する逆相HPLCによって分析した: ABI 783Aプログラム可能検出器を装備したPerkin Elmer シリーズ200溶媒送達システム; Perkin Elmer ISS200オートサンプラー; およびPE Nelson 900シリーズデータシステム; RP-18 逆相クロマトグラフィーカラム(220×4.6mm、ABD); 溶媒A: 0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート; 溶媒B: CH<sub>3</sub>CN; 勾配4~28% B(35分において); 流速: 1mL/分; および検出器: 260nm。

#### 【0122】

(実施例3)

ヒト アクチン遺伝子のためのTaqmanアッセイ

ヒト遺伝子DNAを従来の方法を使用して調製した。アッセイ試薬の組成は以下である(全体の用量、50 μl):

#### 【0123】

【表2】

成 分	濃 度	容 量 (μl)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	10 mM ea	4
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	7
*PCR緩衝液 10X	—	5
UNG	1ユート/ml	0.5
正方向 PCR プライマー	3 μM	5
逆方向 PCR プライマー	3 μM	5
AmpliTaq <sup>TM</sup> Gold DNA ポリメラーゼ	5ユート/ml	0.25
ヒト男半生 DNA	10 ng/ml	2
Taqman プローブ	2 μM	5
水	—	16.3

a. 10mM KCl, 100 mM TRIS-HCl, 0.1 M EDTA, 600 nM 变動内部標準, pH 8.3.

試薬を96-ウェルマイクロタイタートレイ中で混合し、以下のプロトコルを使用して

10

20

30

40

50

熱的に循環させた：50で2分間；95で10分間；95で15秒間、続いて60で1分間を40サイクル。Applied Biosystems Model 7700 Sequence Detection System (ABD) を使用し、増幅プロセス間の蛍光をモニターした。

【0124】

Taqman実験の結果は、2つのパラメータ；Rn値およびCt値を使用して分析され得る。Rn値は、PCR実験の終了時のレポーター色素の蛍光および受動的参照の蛍光との比率である。Ct値、または閾値サイクル数は、蛍光比がバックグラウンドとの識別が可能な時点における、PCRサイクル数である。所定のレポーター色素および固定の標的濃度に対し、Rn値およびCt値の両方は、クエンチャーファイバの効率を反映する。

10

【0125】

NBT5の効率を、レポーターFAMおよびTETをクエンチングする際のTMRの効率と比較した。NTBおよびTMRに対するRn値およびCt値は、両方のレポーター色素に対して識別不可能であった。クエンチャーポリマーをFAMと共に使用し、そしてNTBおよびTMRの両方と等しいことが見出された。NTBをレポーターNEDと対にして他のレポーターと同様の結果を得た。TMRは、レポーター色素NEDと共にクエンチャーファイバとして使用され得なかった。なぜなら、TMRおよびNEDの蛍光発光は、同一の波長であったためである。

【0126】

各個々の出願または特許出願を、特異的、かつ、個々に示し、参考として援用する場合、全ての出願および特許出願は、本明細書中で参考として同程度に援用される。

20

【0127】

極少数の実施態様を以上で詳細に説明したが、これらを含む分子生物学の当業者は、多くの改変が好ましい実施態様において本発明の技術から逸脱することなく可能であることを明らかに理解する。全てのこのようないくつかの改変は、添付の特許請求の範囲内に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1A】図1Aは、本発明の様々な好ましいシアニン色素化合物を示す。

【図1B】図1Bは、本発明の様々な好ましいシアニン色素化合物を示す。

【図2A】図2Aは、本発明のシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための一般的な合成スキームを示す。

30

【図2B】図2Bは、本発明のシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための一般的な合成スキームを示す。

【図3A】図3Aは、本発明の第1番目の好ましいシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための合成スキームを示す。

【図3B】図3Bは、本発明の第1番目の好ましいシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための合成スキームを示す。

【図3C】図3Cは、本発明の第1番目の好ましいシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための合成スキームを示す。

【図4A】図4Aは、本発明の第2番目の好ましいシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための合成スキームを示す。

40

【図4B】図4Bは、本発明の第2番目の好ましいシアニン色素クエンチャーファイバの合成のための合成スキームを示す。

【図5A】図5Aは、本発明に従う様々なハイブリダイゼーション検出方法の概略図を示す。

【図5B】図5Bは、本発明に従う様々なハイブリダイゼーション検出方法の概略図を示す。

【図5C】図5Cは、本発明に従う様々なハイブリダイゼーション検出方法の概略図を示す。

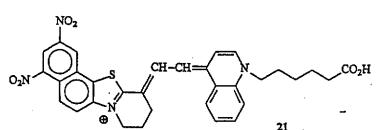
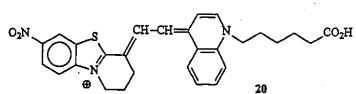
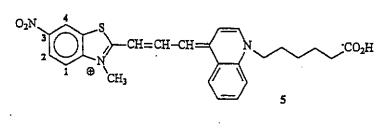
【図5D】図5Dは、本発明に従う様々なハイブリダイゼーション検出方法の概略図を示す。

50

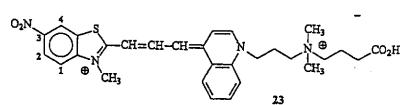
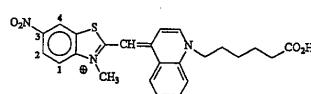
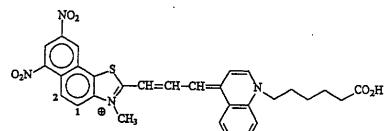
す。

【図5E】図5Eは、本発明に従う様々なハイブリダイゼーション検出方法の概略図を示す。

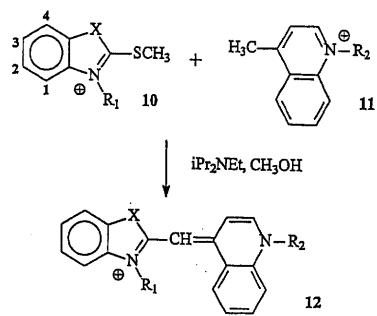
【図1A】



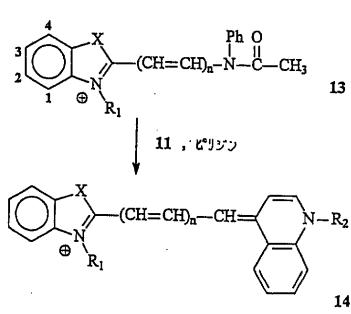
【図1B】



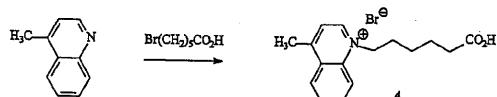
【図2A】



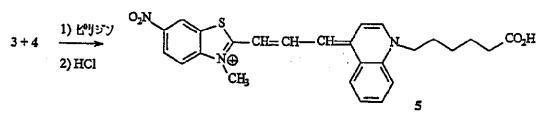
【図2B】



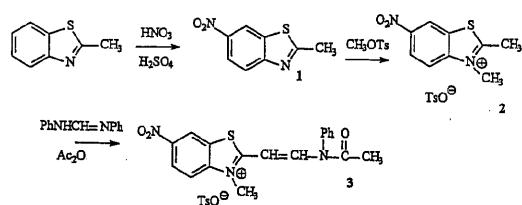
【図3B】



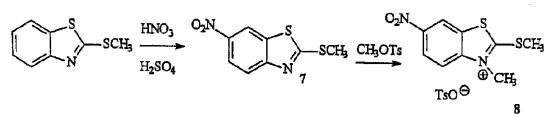
【図3C】



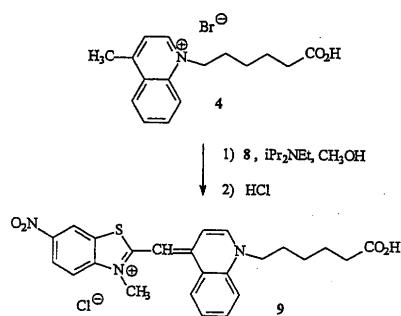
【図3A】



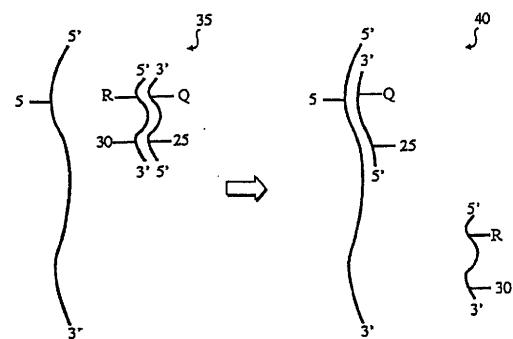
【図4A】



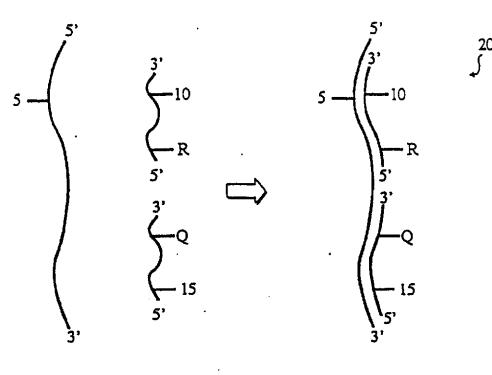
【図4B】



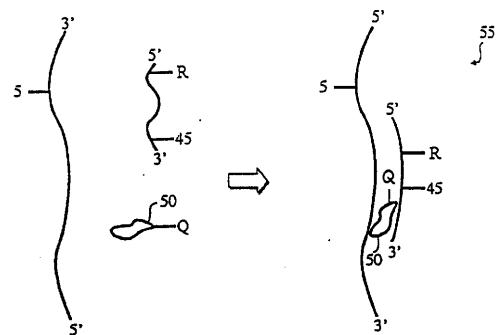
【図5B】



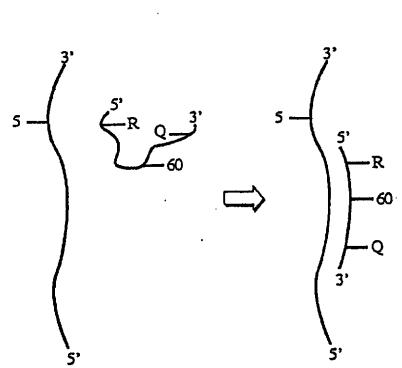
【図5A】



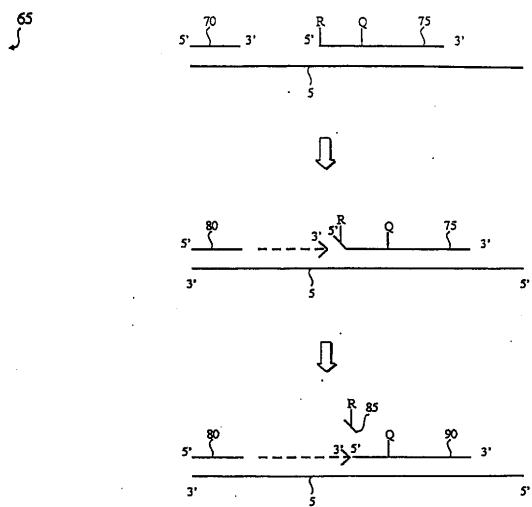
【図5C】



【図 5 D】



【図 5 E】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 リンダ ジー . リー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303 , パロ アルト , ステリング ドライブ 31  
87
- (72)発明者 ロナルド ジェイ . グラハム  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588 , プリーザントン , アンドリューズ ドライブ  
ナンバー 315 3610
- (72)発明者 カイルザーマン ピー . ミュラー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404 , ユニオン シティ , リージェンツ ブールバ  
ード 32804
- (72)発明者 フランシス ティー . ハクゾ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94117 , サン フランシスコ , ページ ストリート  
946

審査官 宮田 和彦

(56)参考文献 特表2000-511057(JP,A)  
米国特許第05321130(US,A)  
Dyes and Pigments, 1995年, Vol. 29, No. 4, p. 315 - 322

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C09B 23/00  
C07D 417/06  
G01N 21/78  
G01N 33/58