

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-529219

(P2005-529219A)

(43) 公表日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C09B 69/10</b>	C09B 69/10	Z 2G054
<b>C09B 11/28</b>	C09B 11/28	D 4B063
<b>C09B 23/00</b>	C09B 11/28	E
<b>C09B 57/00</b>	C09B 11/28	K
<b>C12Q 1/00</b>	C09B 23/00	L

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-511721 (P2004-511721)	(71) 出願人	501358080 シ ビオ アンテルナショナル フランス国, エフー91400 サクレ, エールエヌ 306
(86) (22) 出願日	平成15年6月6日(2003.6.6)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月2日(2005.2.2)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/006459	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02003/104685	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成15年12月18日(2003.12.18)	(74) 代理人	100108903 弁理士 中村 和広
(31) 優先権主張番号	02/06948		
(32) 優先日	平成14年6月6日(2002.6.6)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少なくとも1のオリゴヌクレオチドに共有結合するフルオロフォアを含みかつ少なくとも1の官能基を含む蛍光物質、並びにその使用

## (57) 【要約】

本発明は、1以上のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログに共有結合するフルオロフォアであって、希土類金属クリプテートを除くものを含み、かつフルオロフォア上に、又はオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログのうちの1に導入されるか又は作られ、単体分子と結合することを許容する少なくとも1の官能基を含む蛍光物質に関する。本発明は、担体分子に共有結合する蛍光物質からなる蛍光抱合体に関し、並びに蛍光トレーサーの使用に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

1 以上のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログに共有結合するフルオロフォアを含む蛍光物質であって、該蛍光物質がフルオロフォア上又はオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログのうちの 1 上に導入されるか又は作成される少なくとも 1 の官能基を含むことを特徴とする前記物質。但し、上記フルオロフォアは、希土類金属クリプテートではない。

**【請求項 2】**

前記オリゴヌクレオチド又は前記オリゴヌクレオチド・アナログが、2 ~ 60 個のヌクレオチド・ユニットを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の物質。

10

**【請求項 3】**

前記官能基が、スペーサー腕を介して前記物質に結合しうることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の物質。

**【請求項 4】**

前記フルオロフォアが、1 以上の芳香環を含み、そして 20000 より大きい、好ましくは 50000 より大きい、高い分子吸光係数を有することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の物質。

**【請求項 5】**

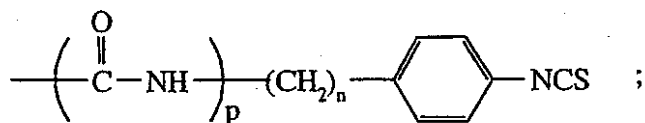
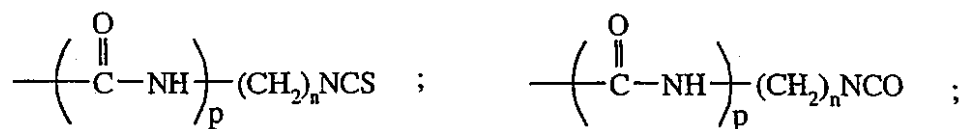
前記フルオロフォアが、ローダミン、サイアニン、スクアライン、ボディピー、フルオロセイン、及びそれらの誘導体から選ばれることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の物質。

20

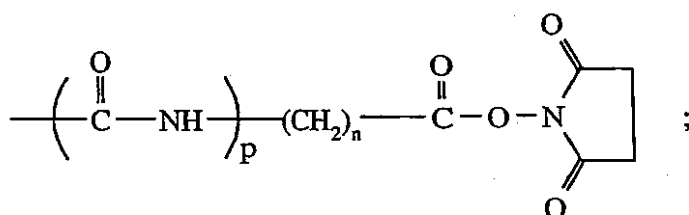
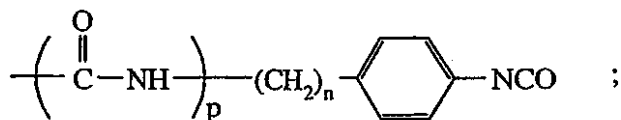
**【請求項 6】**

前記官能基が以下の群：マレイミド、カルボン酸、ハロアセトアミド、アルキル・ハライド、アジド、ヒドラジド、アルデヒド、ケトン、アミノ、スルフヒドリル、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アジリジン、スルホニル・ハライド、酸ハライド、ヒドロキシスクシンイミド・エステル、ヒドロキシルホスクシンイミド・エステル、イミド・エステル、ヒドラジド、アジドニトロフェニル、アジドフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)プロプリオンアミド、及びグリオキサール、及びより特異的に以下の式：

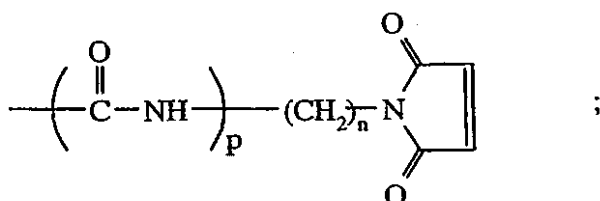
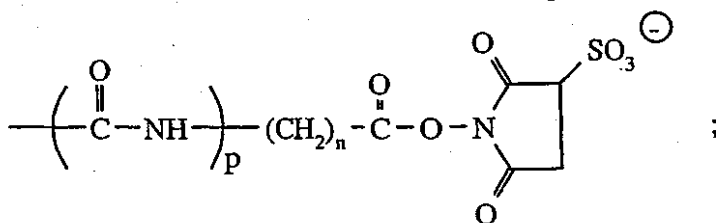
【化 1】



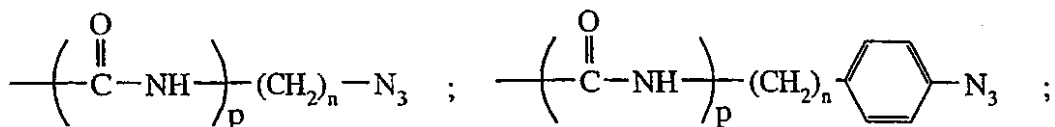
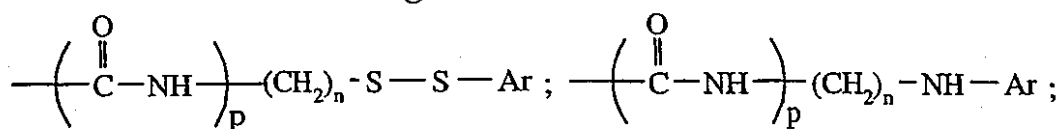
10



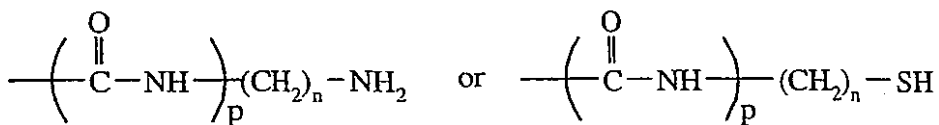
20



30



40



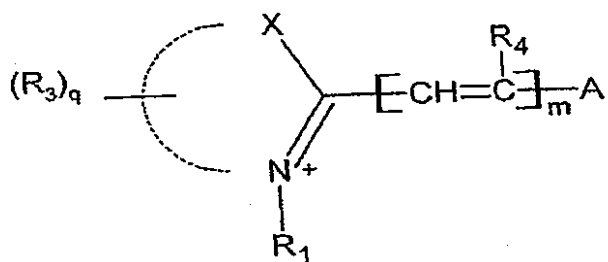
{ 式中、nは0～8範囲であり、かつpは0又は1と等しく、そしてArは1～3個のヘテロ原子を含む5-又は6-員の複素環であって、場合によりハロゲン原子で置換される複素環である。 }

で表される基から選ばれることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の物質 50

【請求項 7】

以下の式 (I) :

【化 2】



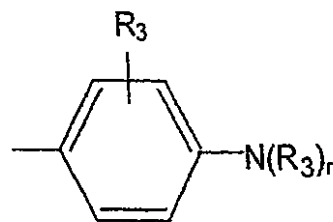
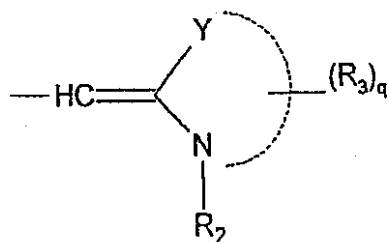
(I)

10

[式中、

- A は、以下の基 :

【化 3】



$r = 2$  又は  $3$

30



$r = 2$  又は  $3$

40

{基中、

- 点線は、各々 1 ~ 3 個の融合環を形成するために必要とされる炭素原子を表し、  
 $R_3$  基は、該環に結合し ;

- X 及び Y は、各々 N、C=O、O、S、又は  $C(CH_3)_2$  を表し、

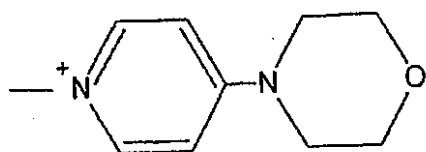
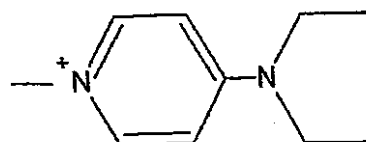
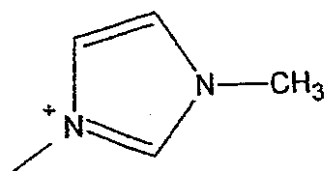
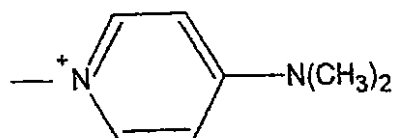
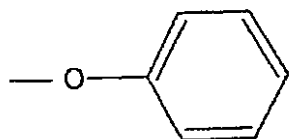
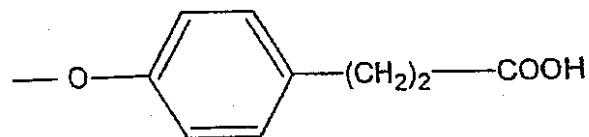
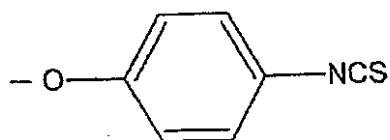
- m は、1、2、3、又は 4 の値を有し ;

- q は、1、2、又は 3 の値を有し ;

50

- $(R_3)_q$  は、 $q$  個の  $R_3$  基を表し、該  $R_3$  は同一であるか又は異なりうる；
- $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  基は、同一であるか又は異なり、そして水素； $-(CH_2)_s-Z$  基 (基中、 $s$  は 0 ~ 4 の範囲であり、かつ  $Z$  は、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $OH$ 、又は  $N^+R_1R_2R_3$  を表し、ここで  $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  は、上で定義される通りである)、請求項 6 において定義される官能基；並びに場合により請求項 6 において定義される官能基を含むオリゴヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる } から選ばれる基を表し；
- $R_4$  は、 $H$ ； $OH$ ； $CH_3$ ； $Cl$ ；及び以下の式：

【化 4】



10

20

30

40

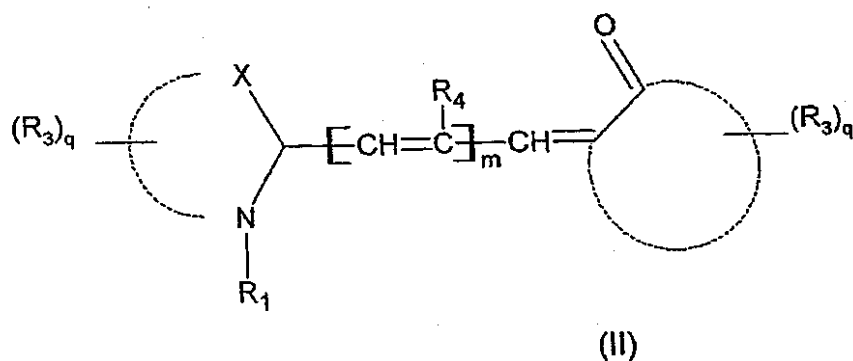
で表される基から選ばれ、アリル位における置換基  $R_4$  は、ポリエチレン鎖と共に、4 ~ 14 個の原子を含む 1 ~ 3 の融合環を形成し、該環は、飽和されるか又は不飽和であり、該環は 1 以上の O、N、及び S 原子を含むことがあり、そして場合によりオキシ基で置換されうる]

で表される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質。

【請求項 8】

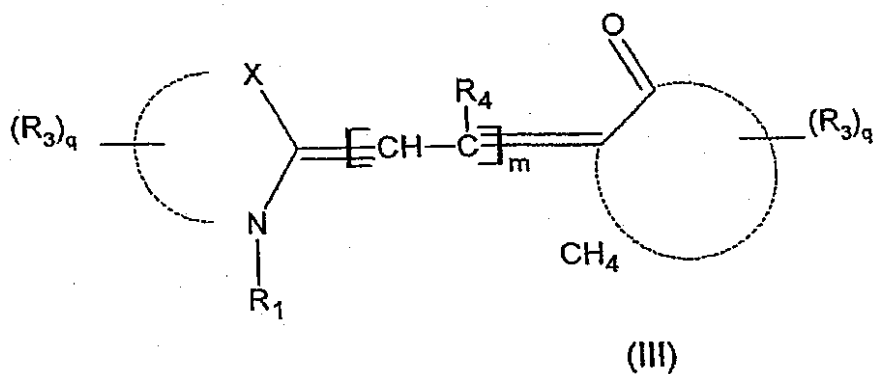
以下の式 (I I) 又は式 (I I I)：

## 【化5】



10

又は



20

{式中、

- 点線は、1～3個の融合環を形成するために必要とされる炭素原子を表し、R<sub>3</sub>基は、該環に結合する；

30

- Xは、N、C=O、O、S、又はC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>を表し、

- mは、1、2、3、又は4の値を有し；

- qは、1、2、又は3の値を有し；

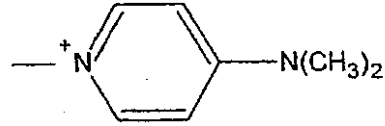
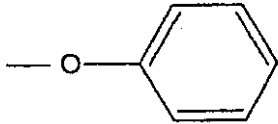
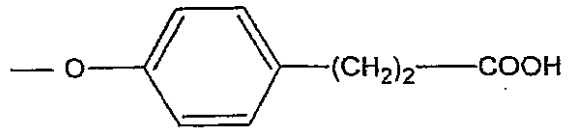
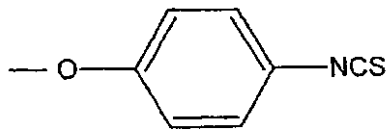
- (R<sub>3</sub>)<sub>2</sub>は、q個のR<sub>3</sub>基を表し、該R<sub>3</sub>は同一であるか又は異なりうる；

- R<sub>1</sub>及びR<sub>3</sub>基は、同一であるか又は異なり、そして水素；-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-Z基(基中、sは0～4の範囲であり、かつZは、CH<sub>3</sub>、SO<sub>3</sub>H、OH、又はN<sup>+</sup>R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>を表し、ここでR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、及びR<sub>3</sub>は、上で定義される通りである)；請求項6において定義される官能基；並びに場合により請求項6において定義される官能基を含むオリゴヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる}で表される基から選ばれ；

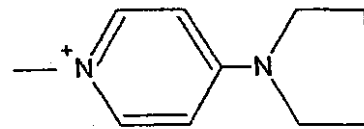
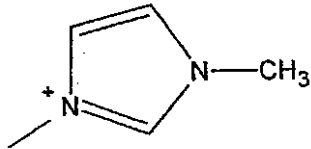
- R<sub>4</sub>は、H；OH；CH<sub>3</sub>；Cl；及び以下の式：

40

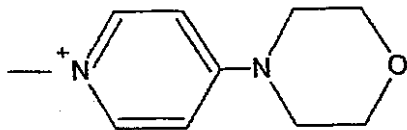
## 【化6】



10



20



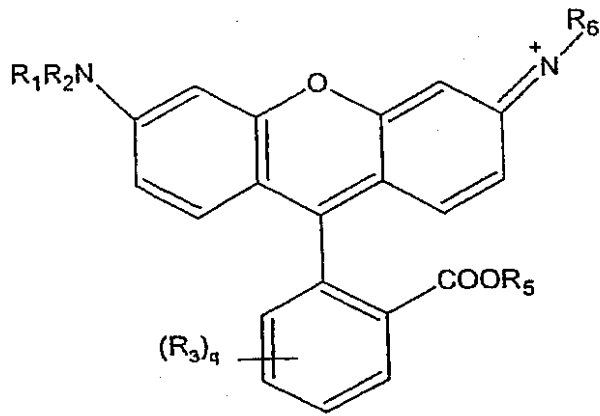
で表される基から選ばれ、アリル位における置換基  $R_4$  は、ポリエチレン鎖と共に、4 ~ 14 個の原子を含む 1 ~ 3 の融合環を形成し、該環は、飽和されるか又は不飽和であり、該環は 1 以上の O、N、及び S 原子を含むことがあり、そして場合によりオキソ基で置換されうる] 30

で表される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質。

## 【請求項 9】

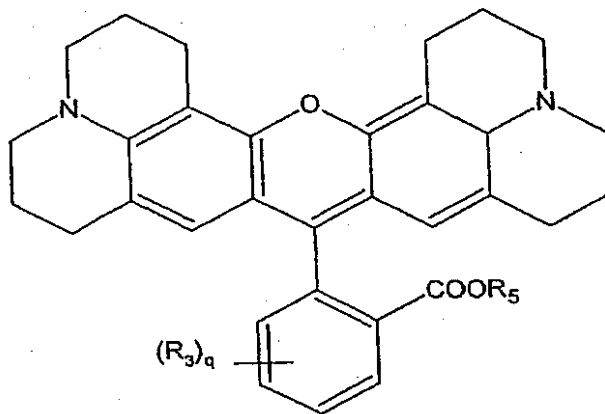
以下の式 (IV)、(V)、(VI)、又は (VII) :

【化 7】



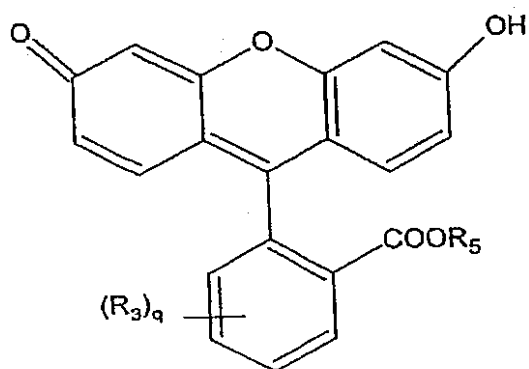
10

(IV)



20

(V)



30

(VI)

40

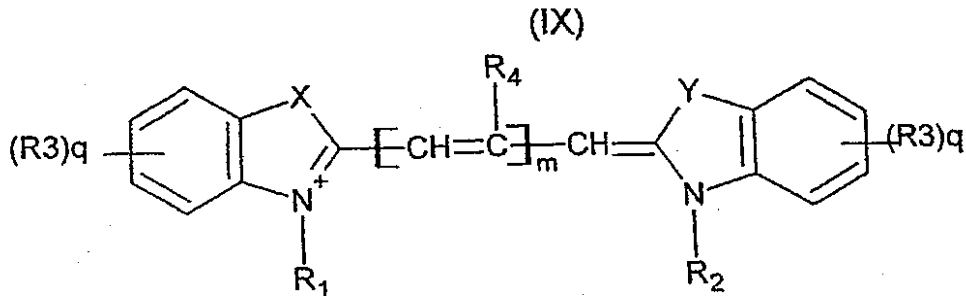


ルアルキル；アシル；スルホ；請求項 6 において定義される官能基；及び請求項 6 において記載される基から選ばれる官能基を場合により含むオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる。} で表される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質。

【請求項 1 1】

以下の式 (IX)：

【化 1 0】



10

{ 式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $X$ 、 $Y$ 、 $m$ 、及び  $q$  は、上で定義された通りである } で表される、請求項 7 に記載の物質。

20

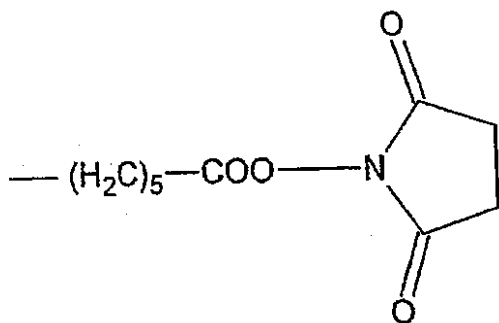
【請求項 1 2】

$X$  及び  $Y$  の各々が、 $C(CH_3)_2$  基を表す、請求項 1 1 に記載の物質。

【請求項 1 3】

-  $R_1$  及び  $R_2$  が、1 ~ 4 個の炭素原子を含むアルキルを表すか、又は以下の式の基を表し、少なくとも 1 の  $R_1$  及び  $R_2$  基は、以下の式：

【化 1 1】



30

で表される基を表し、

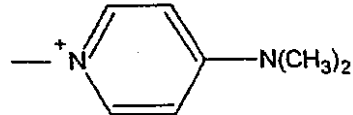
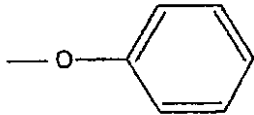
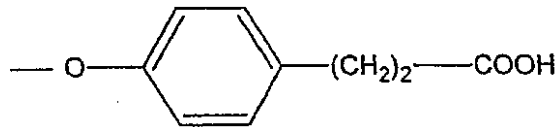
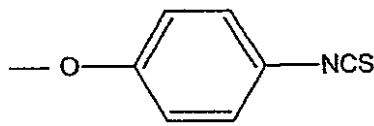
- $R_4$  が水素を表し、
- $q = 1$ 、 $m = 2$  であり、
- $R_3$  が水素； $-(CH_2)_s-Z$  基 (基中、 $s$  は 0 ~ 4 の範囲であり、かつ  $Z$  は、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $OH$ 、又は  $N^+R_1R_2R_3$  基を表し、ここで  $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  は、上で定義される通りである)；請求項 6 で定義される官能基；請求項 6 で定義される官能基を場合により含むオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログを表し；

40

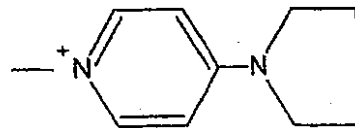
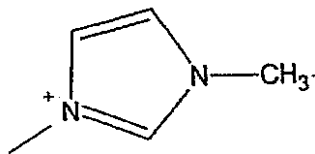
-  $R_4$  が、 $H$ ； $OH$ ； $CH_3$ ； $Cl$ ；及び以下の式：

50

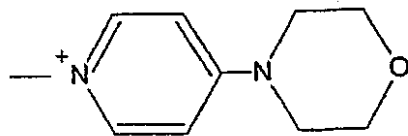
## 【化 1 2】



10



20



で表される基から選ばれ、アリル位における置換基  $R_4$  が、ポリエチレン鎖と共に、4 ~ 14 個の原子を含む 1 ~ 3 の融合環を形成し、該環は、飽和されるか又は不飽和であり、該環は 1 以上の O、N、及び S 原子を含むことがあり、そして場合によりオキシ基で置換されうる、請求項 1 1 に記載の物質。

## 【請求項 1 4】

30

前記フルオロフォアが、オリゴヌクレオチドに直接又はスペーサー腕を介して共有結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の物質。

## 【請求項 1 5】

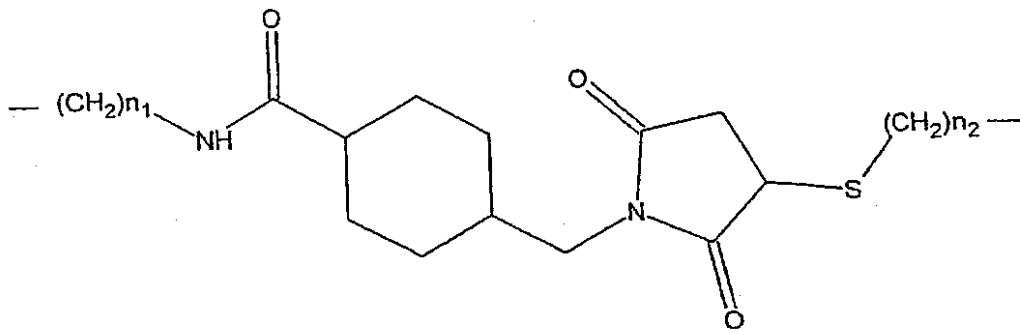
前記フルオロフォアが、場合により 1 以上の二重結合若しくは三重結合を含み、及び/又は場合により 1 以上のヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、リンを含み、或いは 1 以上のカルバモイル若しくはカルボキサミド基を含む直鎖又は分枝鎖  $C_1 \sim C_{20}$  アルキレン基；  $C_5 \sim C_8$  シクロアルキレン基；並びに  $C_6 \sim C_{14}$  アリーレン基から選ばれる二価有機ラジカルからなるスペーサー腕を介してオリゴヌクレオチドに結合し、ここで、上記アルキレン、シクロアルキレン、又はアリーレン基が、場合によりアルキル、アリール、又はスルホネート基で置換されることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の物質。

40

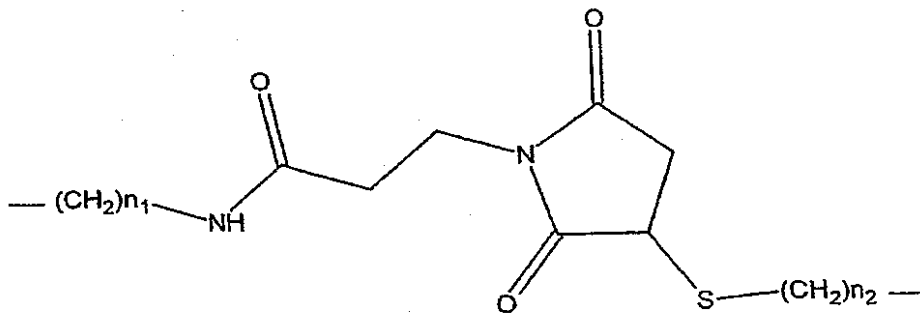
## 【請求項 1 6】

前記スペーサー腕が、以下の基：

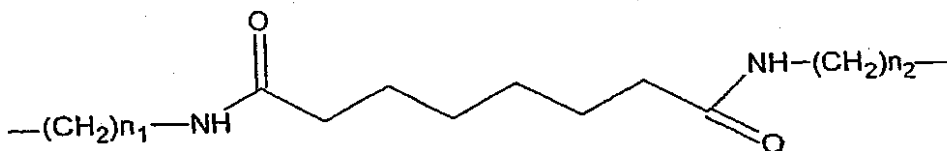
## 【化 1 3】



10



20



30

{ 基中、 $n_1$  及び  $n_2$  が 2 ~ 6 の間である }

で表される基から選ばれることを特徴とする、請求項 15 に記載の物質。

## 【請求項 17】

前記オリゴヌクレオチドが、5 ~ 60、特に 5 ~ 20、好ましくは 5 ~ 15 個のヌクレオチド・ユニットを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の物質

40

## 【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドが、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのユニットであって、ホスホジエステル型の結合を介して互いに結合するユニットの列からなることを特徴とするユニット、請求項 17 に記載の物質。

## 【請求項 19】

前記オリゴヌクレオチドが、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチド・ユニット、又は糖若しくは塩基上で改変されるヌクレオチドアナログ・ユニットの列からなり、これらのユニットは、ホスホジエステル型の天然ヌクレオチド間結合によって、互いに結合され、ここで該ヌクレオチド間結合の幾つかは、場合によりホスホネート、ホスホラミド、又はホスホロチオエート結合で置換されることを特徴とする、請求項 17 に記載

50

の物質。

【請求項 2 0】

前記オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル型の結合により互いに結合するリボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドユニット、並びにアミド結合により互いに結合するヌクレオシドアナログユニットの両者を含む列からなることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の物質。

【請求項 2 1】

前記オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル型の結合により互いに結合するリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチド・ユニット、並びにアミド結合により互いに結合するヌクレオシド・アナログ・ユニットの列からなり、ここで、上記オリゴヌクレオチドが、フルオロフォアに結合することを企図される末端で、少なくとも 5 個のホスホジエステル型のヌクレオチド間結合を含む、請求項 1 7 に記載の物質。

10

【請求項 2 2】

前記官能基が、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログのヌクレオチドユニットのアミン官能基であるか、或いは、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログのヌクレオチド・ユニットの遊離アミン官能基を、エステル、カルボン酸、イソチオシアネート、アルデヒド、カルボニル、スルホニル・ハライド、アルキル・ハライド、アジド、ヒドラジド、ジクロロトリアジン、無水物、ハロアセトアミド、マレイミド、及びスルフヒドリル基から選ばれる基と反応させることから得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の物質。

20

【請求項 2 3】

前記官能基が、オリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログのヌクレオチドユニットの遊離アミン官能基を、N-ヒドロキシスクシンイミジル・エステルと反応させることから得られることを特徴とする、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項において記載される物質。

【請求項 2 4】

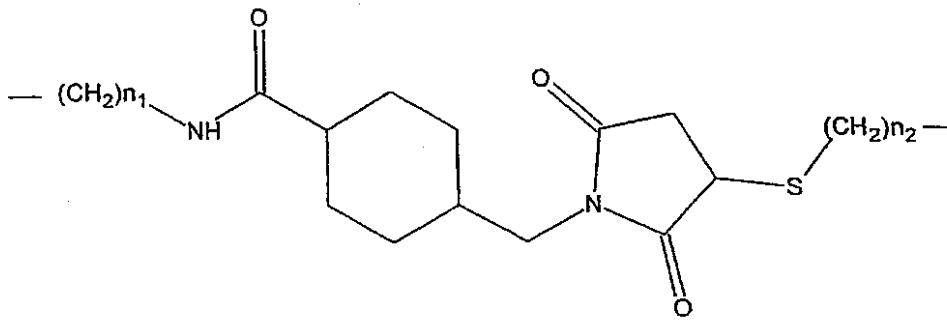
前記官能基が、場合により 1 以上の二重結合若しくは三重結合を含み、及び/又は場合により 1 以上のヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、リンを含み、或いは 1 以上のカルバモイル若しくはカルボキサミド基を含む直鎖又は分枝鎖  $C_1 \sim C_{20}$  アルキレン基； $C_5 \sim C_8$  シクロアルキレン基；並びに  $C_6 \sim C_{14}$  アリーレン基から選ばれる二価有機ラジカルからなるスペーサー腕により、フルオロフォア及び/又はオリゴヌクレオチドに結合し、ここで、上記アルキレン、シクロアルキレン、又はアリーレン基が、場合によりアルキル、アリール、又はスルホネート基で置換されることを特徴とする、請求項 1 ~ 2 3 に記載の物質。

30

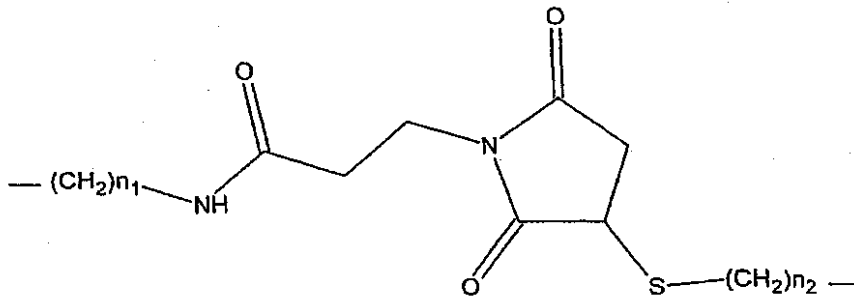
【請求項 2 5】

前記スペーサー腕が、以下の基：

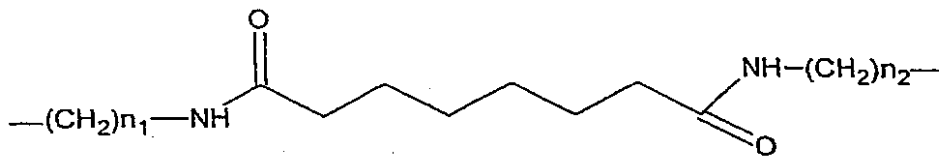
## 【化 1 4】



10



20



{ 式中、 $n_1$  及び  $n_2$  が、2 ~ 6 の間である }

30

で表される基から選ばれることを特徴とする、請求項 2 4 に記載の物質。

## 【請求項 2 6】

担体分子に共有結合する請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の物質からなる、蛍光抱合体。

## 【請求項 2 7】

前記蛍光物質のフルオロフォアが、サイアニン-5 であり、前記物質のオリゴヌクレオチドが、 $A_{15}$  配列を有し、そして前記担体分子が cAMP であることを特徴とする、請求項 2 6 に記載の抱合体。

## 【請求項 2 8】

終モル比が、0 より大きく 1 0 0 未満、好ましくは 0 より大きく 2 0 未満であることを特徴とする、請求項 2 6 及び 2 7 のいずれかに記載の抱合体。

40

## 【請求項 2 9】

前記担体分子が、抗体、抗原、細胞内メッセンジャー、細胞間メッセンジャー、タンパク質、ペプチド、ハプテン、レクチン、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖、核酸、ホルモン、ビタミン、薬用製品、ポリマー、ポリマー製粒子、ガラス、ガラス粒子、又はガラス若しくはポリマーから作られた表面であるということの特徴とする、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の蛍光抱合体。

## 【請求項 3 0】

前記担体分子が、抗体又はストレプトアビジンであるということの特徴とする、請求項 2 9 に記載の蛍光抱合体。

50

## 【請求項 3 1】

蛍光トレーサーとしての、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質又は請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の蛍光抱合体の使用。

## 【請求項 3 2】

分析物を含むと疑われる媒体中で当該分析物を、蛍光により検出及び/又は測定するための、請求項 3 1 に記載の使用。

## 【請求項 3 3】

生体分子間の相互作用を測定し；或いは生理活性、例えば酵素活性、膜結合受容体の活性化、遺伝子転写、膜輸送、又は膜分極の変化を測定するための、請求項 3 2 に記載の使用。

10

## 【請求項 3 4】

薬用製品をスクリーニングする方法における、請求項 3 1 ~ 3 3 に記載の使用。

## 【請求項 3 5】

請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載される蛍光抱合体が、ドナー蛍光化合物の存在下において受容体蛍光化合物として使用される、請求項 3 4 に記載の使用。

## 【請求項 3 6】

請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載される蛍光抱合体が、受容体蛍光化合物の存在下においてドナー蛍光化合物として使用される、請求項 3 5 に記載の使用。

## 【請求項 3 7】

蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光偏向、又は蛍光相関における、請求項 3 5 に記載の使用。

20

## 【請求項 3 8】

*in vivo*における光学イメージングのためのコントラスト剤として、請求項 2 6 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抱合体の使用。

## 【請求項 3 9】

担体分子に結合するフルオロフォアの蛍光強度を高める方法であって、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項において記載される蛍光物質が、フルオロフォアとして使用されることを特徴とする、前記方法。

## 【請求項 4 0】

フルオロフォアへ結合する担体分子の表面における凝集現象を低減する方法であって、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質が、上記フルオロフォアの代わりに使用されることを特徴とする、前記方法。

30

## 【請求項 4 1】

担体分子に結合するフルオロフォアの量子収量を増大させる方法であって、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の蛍光物質を、フルオロフォアとして使用することを特徴とする、前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、1 以上のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログに共有結合するフルオロフォアを含み、かつフルオロフォア上又はオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログの 1 上に導入されるか又は作成される少なくとも 1 の官能基を含む蛍光物質に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

有機分子の多くのファミリーが、多くの適用、特に生体分子を追跡する又は定量することを可能にする診断方法において、生体分子に対する蛍光標識として使用される。

## 【0 0 0 3】

特に、ローダミン、サイアニン、スクアライン(squaraines)、又はボディピー(Bodipy)色素が言及される。多くのこれらの分子は、高い分子吸光係数( $100000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

50

より大きいことも多い)及び通常20%より大きい蛍光量子収量を有する。

【0004】

しかし、これらの蛍光物質がかなりの疎水性の性質を有するため、タンパク質毎に幾つかの蛍光標識を有することが所望されるとき、それらの有機分子は、生体分子、特にタンパク質の表面で凝集を形成する傾向を有する(U. Schobel et al., Bioconjugate chem., 1999,10, 1107-1114)。これらの凝集体は、実質的に非蛍光性であるので、タンパク質の表面に存在する蛍光分子の平均量子収量は、元の分子の量子収量より有意に低い。

【0005】

この問題に打ち勝つために、文献において、特にスルホン酸基を加えることにより、蛍光分子の親水性の性質を増大するある試みが行われた(US 5,268,486)。糖又は炭水化物残渣を、蛍光分子の構造に付加することも言及された(WO 98/49176)。しかしながら、これらのユニットの付加は、それを抑制することなく、凝集現象を制限する。

10

【0006】

タンパク質の標識後、別の試みが、蛍光の量子収量の減少を避けるために使用された。WO 98/26287は、シクロデキストリンを使って、タンパク質の表面に蛍光分子を封入し、そしてその凝集を制限する方法を記載する。しかしながら、該技術は、全ての分子タイプでは、満足に機能しなかった。

【0007】

一つの蛍光分子のみをタンパク質の表面に有するタンパク質を得ることができ、かつ凝集現象を避けることにより高量子収量を維持することができる技術が最近記載された(Winkler et al., Specific labeling of proteins using reactive affinity tag-dye systems, SBS Conference, Vancouver, 2000)。該システムは、制限的である。なぜなら、該システムはタンパク質毎に複数の蛍光分子を持たせることが出来ないからである。

20

【0008】

それゆえ、解決される問題は、生体分子に結合できる標識を提供することであり、これらの複数の標識が同時に生体分子、特にタンパク質に結合したとき、その光物理学的性質は、特に凝集現象によって改変されない。

【発明の開示】

【0009】

本発明に従って、該問題は、フルオロフォアを1以上のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログに結合することにより解決されうる。こうして形成された化合物は、1以上の反応性基を含み、担体分子への結合を許容する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

第一の態様に従って、本発明はそれゆえ、1以上のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログに共有結合するフルオロフォア(但し、希土類金属クリプテートを除く)を含む蛍光物質に関し、該蛍光物質がフルオロフォア又はオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドのうちの1上に導入されるか又は作成される少なくとも1の官能基を含むという点で特徴付けられる。

【0011】

本発明に従った蛍光物質のフルオロフォアは、1以上の芳香環を好ましくは含み、そして、20000以上、好ましくは50000以上の高い分子吸光係数を有する。

40

【0012】

上記フルオロフォアは、好ましくは、ローダミン、サイアニン、スクアライン、ボディピー、フルオレセイン、及びその誘導体から好ましくは選ばれる。

【0013】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、オリゴデオキシリボヌクレオチド(DNA断片)またはオリゴリボヌクレオチド(RNA断片)を等しく意味する。

【0014】

「オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログ」という用語は、本記載にお

50

いて、以下：

- ホスホジエステル型の結合を介して互いに結合されたりボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチド・ユニットの列；

- 又は、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドユニットの列、又は糖若しくは塩基を改変されるヌクレオチドアナログのユニットの列であって、該ユニットがホスホジエステル型の天然のヌクレオチド間の結合により互いに結合され、ここでヌクレオチド間結合のいくつかは、場合によりホスホネート、ホスホールアミド、又はホスホロチオエート結合で場合により置換される列。これらの様々なオリゴヌクレオチド・ファミリーは、Goodchild, Bioconjugate Chemistry, 1 (3), May/June 1990, 77-99において記載される。

10

- 又は、ホスホジエステル型の結合によって互いに結合されるリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチド・ユニット、並びにアミド結合、通常「PNA's」(ペプチド核酸)と呼ばれるアミド結合(M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895-1897によって記載される)によって、互いに結合されるヌクレオチドアナログ・ユニットの両者を含む列、ここでそうした化合物は、例えば、R. Vinayak et al., Nucleoside & Nucleotide, 1997, 16 (7-9), 1653-1656において記載される。

- 又はリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドユニットの列、ここで、ヌクレオチドの幾つか又はヌクレオチド間結合の幾つかは、天然のオリゴリボヌクレオチド又はオリゴデオキシリボヌクレオチドに比較して改変されており、通常のヌクレオチド(アデノシン、デオキシアデノシン、シチジン、デオキシシチジン、グアノシン、デオキシグアノシン、ウリジン又はチミジン)から、ホスフェート架橋、例えばホスホロチオエート・オリゴヌクレオチド(OPT)により形成され、ここでホスフェート架橋の全て又は一部は、チオホスフェート架橋で置換された(P. J. Romaniuk, F. Eckstein (1982) J. Biol. Chem. 257, 7684)。

20

を意味すると企図される。

#### 【0015】

オリゴヌクレオチドのこれらの型の各々1の使用は、本発明の有利な態様を構成する。

#### 【0016】

ヌクレオチド又はヌクレオチド「アナログ」という用語は、糖又は核酸塩基に関する少なくとも1の改変、或いはそれらの改変の組み合わせを含むヌクレオチド/ヌクレオチド

30

を意味すると意図される。例として、以下の改変について言及される。

I. 糖に関する改変(ヌクレオチド又はヌクレオチド・アナログ)：

1°) (遊離又はホスフェート架橋に含まれる)水酸基の立体配置が、天然立体配置(DNA列では -D-エリスロであり、RNA列では -D-リボである)とは異なるという点で、糖要素は改変されうる。アナログにおいては、例えば -D-アラビノ-ペントフラノシド又は -D-キシロ-ペントフラノシドを有する。

2°) ヌクレオチド内結合が、2' - 5'型であるという点で、構造は改変されうる。例えば、-D-リボ-ペントフラノシド-2'-ホスフェート又は3'-デオキシ--D-エリスロ-ペントフラノシド-2'-ホスフェート誘導体である。

構造が、前述の二つの改変を含むようにヌクレオチドは存在する。例えば -D-キシロ-ペントフラノシド-2'-ホスフェートである。

40

3°) 4'炭素が反対の立体配置を有するという点で、構造は天然モデルと異なりうる。つまり、-L-スレオ-ペントフラノシド-3'-ホスフェートの場合である。違いは、1'位(アノマー位)における炭素の立体配置に関してあり、つまり -D-エリスロ-ペントフラノシド-3'-ホスフェートの場合である。ヌクレオチド/ヌクレオチドが、構造が前述の二つの改変を含んで存在する。例えば -L-スレオ-ペントフラノシド-3'-ホスフェートである。

4°) 4'位の酸素が、炭素で置換される(炭素環アナログ)か又は硫黄で置換されるという点で、構造は天然モデルと異なりうる。例えば4'-チオ--D-エリスロ-ペントフラノシド-3'-ホスフェートである。

50

5°) 糖の水酸基の一つがアルキル化されるという点で、構造は天然モデルと異なりうる。例えば、骨格において、2'-O-アルキル-D-リボ-ペンタフラノシド-3'-ホスフェートであり、該アルキル基は、例えばメチル又はアシル基でありうる。

6°) 糖要素のみが保存される(例えば、1,2-ジデオキシ-D-エリスロ-ペンタフラノス-3-ホスフェート)という点で、或いは糖がプロパンジオールなどのポリオールで置換されるという点で構造は天然モデルと異なりうる。

【0017】

II. 核酸塩基(ヌクレオチドアナログ)に関する改変:

1°) 核酸塩基の置換基が改変されるという点で核酸塩基は改変されうる。例えば2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、4-チオチミン、4-チオウラシル、又は5-エチニルウラシル。 10

2°) 置換基の位置が、天然の塩基と比較して変えられうる。例えば、イソグアノシン又はイソシトシン。

3°) 核酸塩基の窒素原子が、炭素で置換されうる。例えば、7-デアザグアノシン又は7-デアザアデニン。

【0018】

III. ヌクレオチド間結合に関する修飾

さらに前記のように、糖ユニット間又はそのアナログ間の結合は、例えば、天然ホスホジエステル結合の1以上の酸素を、炭素(ホスホネート系)、窒素(ホスホラミド系)、又は硫黄(ホスホロチオエート)で置き換えることにより、改変されうる。 20

【0019】

ヌクレオチド間結合は、アミド結合で置換されうる。例えば「PNA」型のオリゴヌクレオチド・アナログである。

【0020】

好ましい態様に従って、オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル型の結合により互いに結合されるリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドユニット、並びにアミド結合により互いに結合されるヌクレオチドアナログユニットを含む列からなる。

【0021】

特に、この場合、前記オリゴヌクレオチドは、フルオロフォアに結合することを企図される末端で、ホスホジエステル型の少なくとも5個のヌクレオチド間結合を含みうる。 30

【0022】

好ましくは、前記オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログは、5~60個、特に5~20個、好ましくは5~15個のヌクレオチドユニットを含む。

【0023】

本発明に従った蛍光物質は、担体分子と結合することを許容する少なくとも1の官能基を含むべきである。

【0024】

有利なことに、官能基は、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログのヌクレオチドユニットのアミン官能基であるか、又は同種二機能性又は異種二機能性試薬を使用して、オリゴヌクレオチドの又はオリゴヌクレオチド・アナログのヌクレオチドユニットの遊離アミン官能基を反応させることから得られる。該試薬は、以下の基:カルボン酸の活性化エステル、カルボン酸、イソチオシアネート、アルデヒド、カルボニル、スルホニル・ハライド、アルキルハライド、アジド、ヒドラジド、ジクロロトリアジン、無水物、ハロアセトミド、マレイミド、及びスルフヒドリルから選ばれる官能基を導入することを可能とする。同種二機能性及び異種二機能性試薬並びにその使用は、「Bioconjugation」(chapters 5.3 to 5.6, M. Aslam & A. Dent, Macmillan, London, 1998)において記載される。 40

【0025】

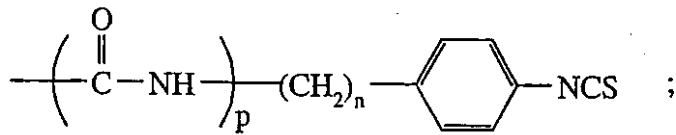
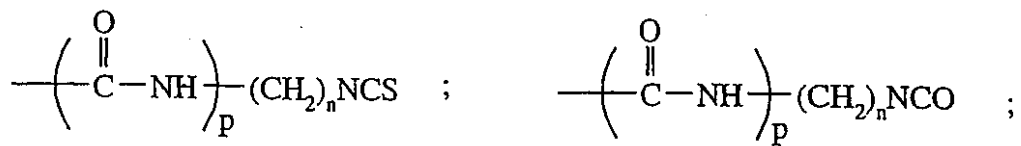
前記官能基は、例えば、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド・アナログのユニットの遊離アミン官能基を、N-ヒドロキシスクシンイミジル・エステルと反応することか 50

ら得られる。

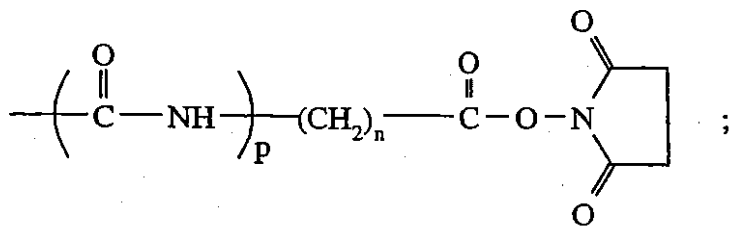
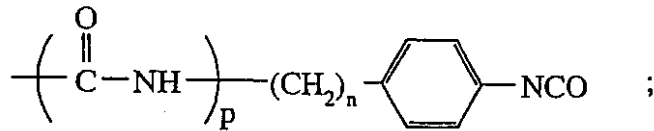
【0026】

好ましい態様に従って、官能基は以下の基：マレイミド、カルボン酸、ハロアセトアミド、アルキル・ハライド、アジド、ヒドラジド、アルデヒド、ケトン、アミノ、スルフヒドリル、イソチオシアネート、イソシアネート、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、アジリジン、スルホニル・ハライド、酸無水物、ヒドロキシスクシンイミド・エステル、ヒドロキシルホスクシンイミド・エステル、イミドエステル、ヒドラジド、アジドニトロフェニル、アジドフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド(propriionamide)、及びグリオキサール、より特異的に以下の式：

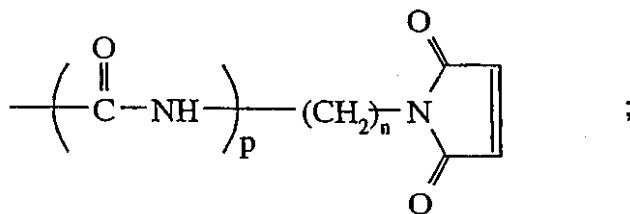
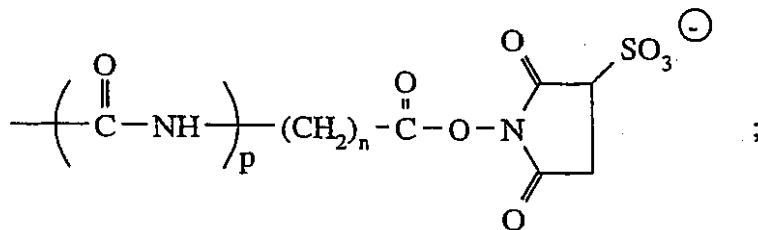
【化1】



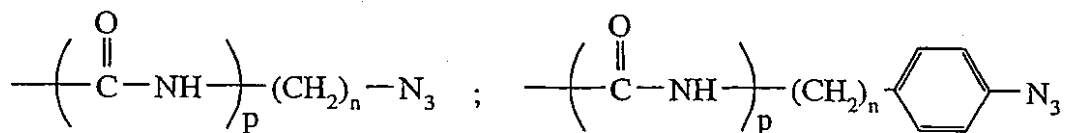
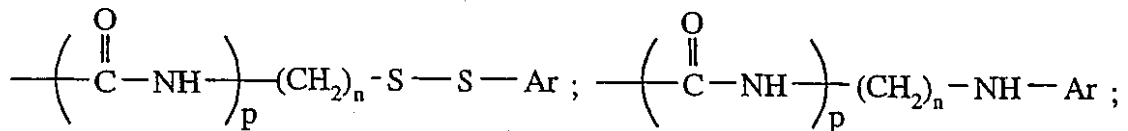
10



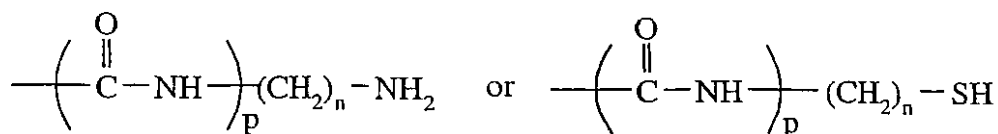
20



30



40



(式中、nは0～8の範囲であり、かつpは、0又は1と等しく、そしてArは、1～3のヘテロ原子を含む5-又は6員環の複素環であり、場合によりハロゲン原子で置換される)

で表される基から選ばれる。

50

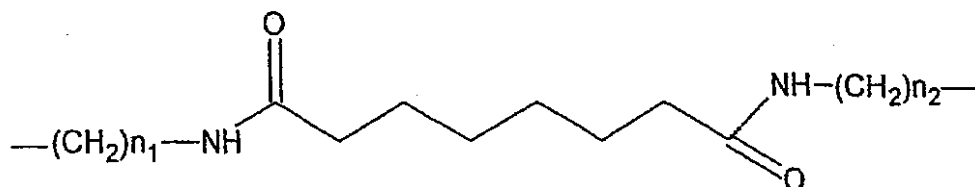
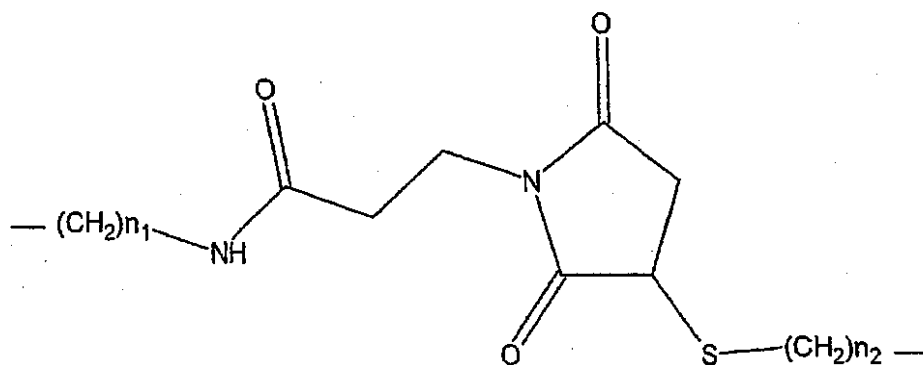
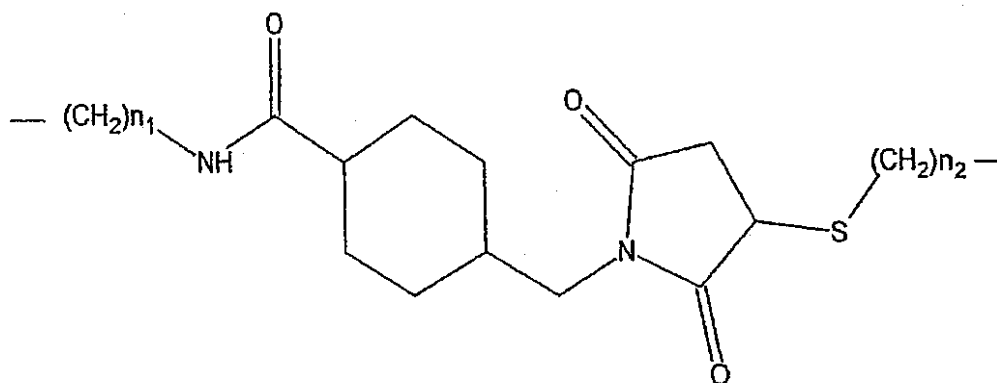
## 【0027】

有利な態様に従って、官能基は、フルオロフォア及び/又はオリゴヌクレオチドに、スペーサー腕により結合される。該スペーサー腕は、場合により、1以上の二重結合若しくは三重結合を含み、及び/又は場合により1以上のヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、硫黄、リンを含み、或いは1以上のカルバモイル若しくはカルボキサミド基を含む直鎖又は分枝鎖  $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン基； $C_5 \sim C_8$ シクロアルキレン基；並びに  $C_6 \sim C_{14}$ アリーレン基から選ばれる二価有機ラジカルからなる。ここで、前記アルキレン、シクロアルキレン、アリーレン基は、場合によりアルキル、アリール、又はスルホネート基で置換される。

## 【0028】

特に、スペーサー腕は、以下の基：

## 【化2】



(基中、 $n_1$ 及び $n_2$ は、2～6の間である。)

で表される。

## 【0029】

好ましい態様に従って、本発明は、以下の式(I)：

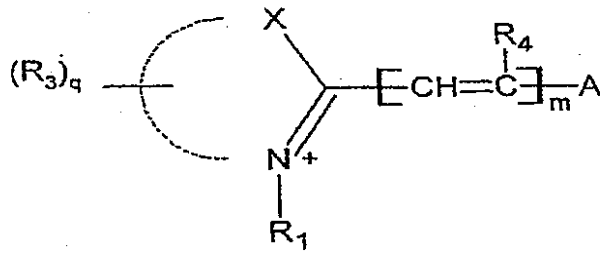
10

20

30

40

【化3】



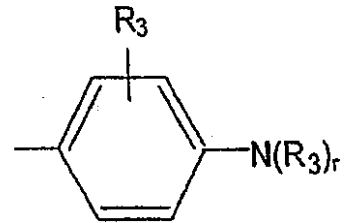
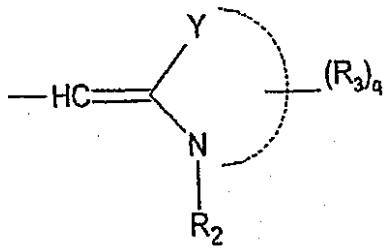
10

(I)

【式中、

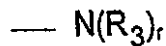
- A は、以下の基：

【化4】

 $r = 2$  又は  $3$ 

20

30

 $r = 2$  又は  $3$ 

{ 式中、

- 点線は、1 ~ 3 個の融合環を形成するために必要とされる炭素原子を表し、 $R_3$  基は、該環に結合し；

- X 及び Y は、各々 N、C=O、O、S、又は  $C(CH_3)_2$  を表し、

- m は、1、2、3、又は 4 の値を有し；

- q は、1、2、又は 3 の値を有し；

-  $(R_3)_q$  は、q 個の  $R_3$  基を表し、該  $R_3$  はそれぞれが同一であるか又は異なりうる

；

-  $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  基は、同一であるか異なり、そして水素； $-(CH_2)_s-Z$  基(基中、-s は 0 ~ 4 の範囲であり、かつ Z が、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $OH$ 、又は  $N^+R_1R_2R_3$  であり、ここで  $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  は、上で定義される通りである)、上で定義される官能基

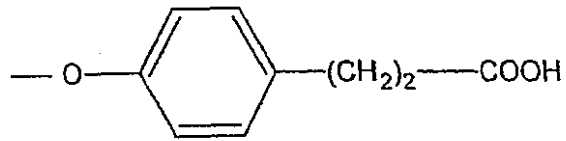
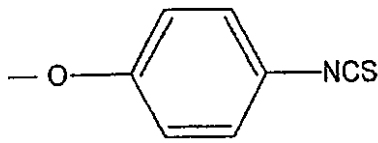
40

50

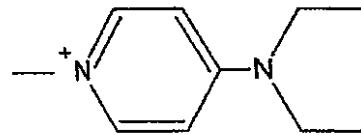
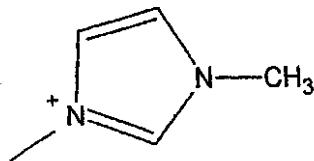
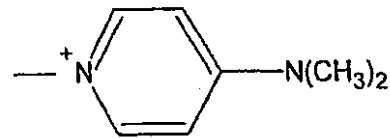
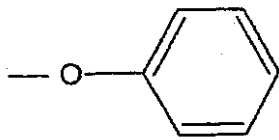
、及び場合により上で定義される官能基を含むオリゴヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる}で表される基から選ばれ；

-R<sub>4</sub>は、H；OH；CH<sub>3</sub>；Cl；及び以下の式：

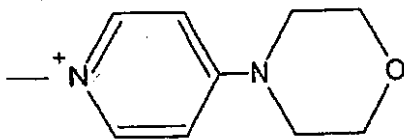
【化5】



10



20



30

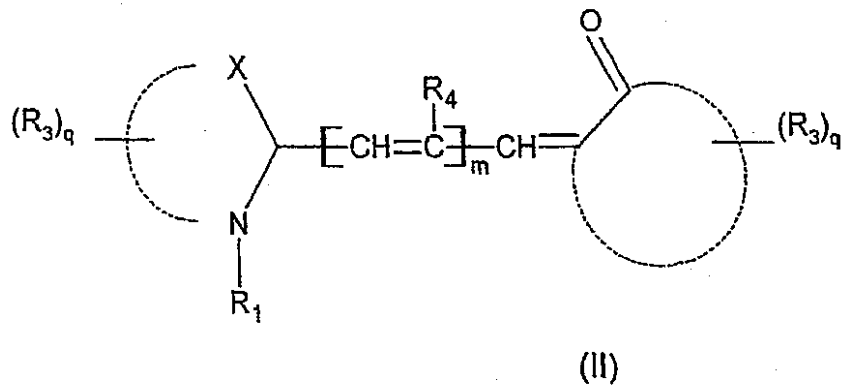
で表される基から選ばれ、アリル位における置換基R<sub>4</sub>は、ポリエチレン鎖と共に、4～14個の原子を含む1～3の融合環を形成し、該環は、飽和されるか又は不飽和であり、該環は1以上のO、N、及びS原子を含むことがあり、そして場合によりオキシ基で置換されうる]

で表される蛍光物質に関する。

【0030】

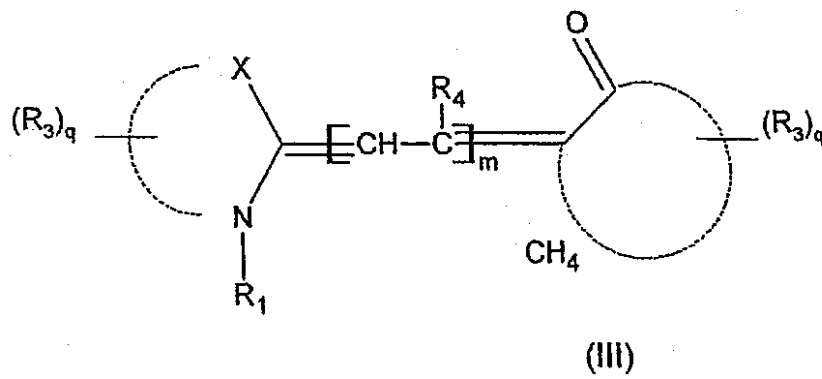
本発明に従った好ましい蛍光物質は、以下の式(I I)及び(I I I)：

【化 6】



10

又は



20

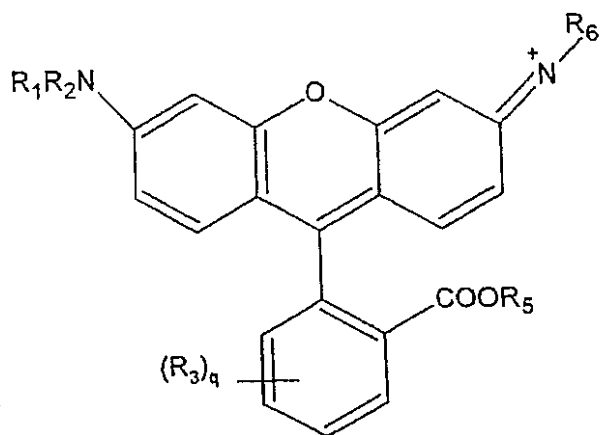
30

(式中、  
点線、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $X$ 、 $m$ 、及び $q$ は、式(I)について上で定義されるとおりである)に一致する。

【0031】

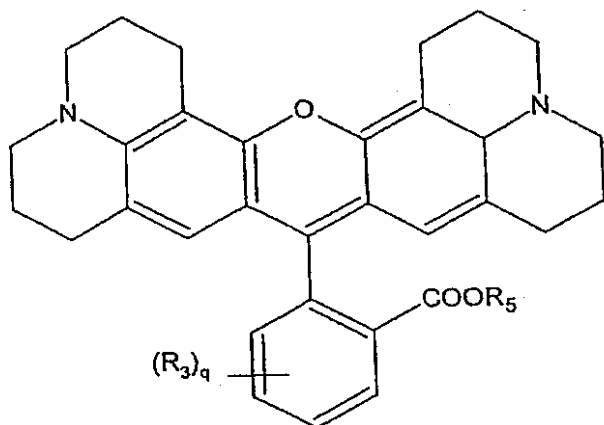
都合の良いことに、本発明は、以下の式(IV)、(V)、(VI)、又は(VII)：

【化7】



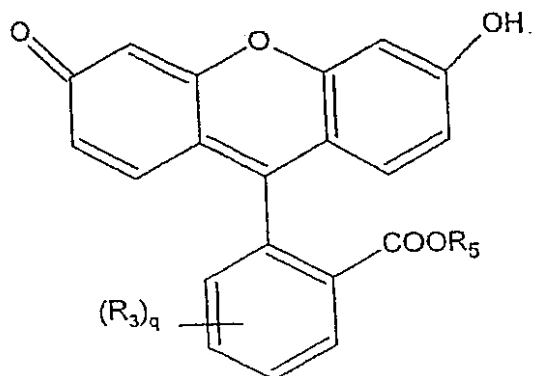
10

(IV)



20

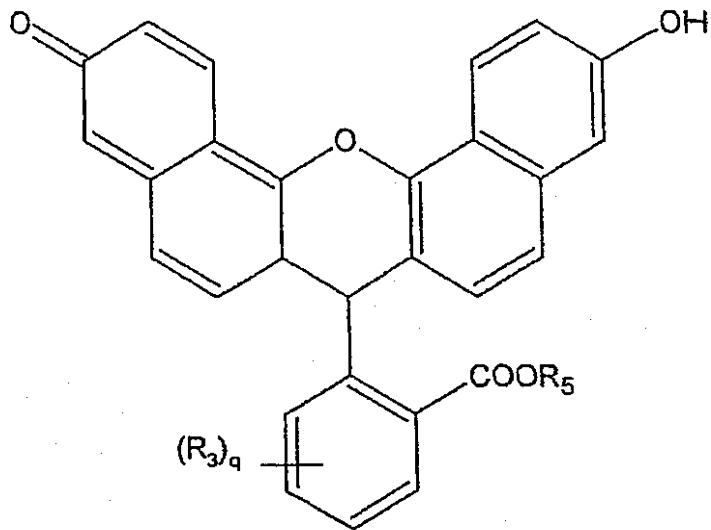
(V)



40

(VI)

【化 8】



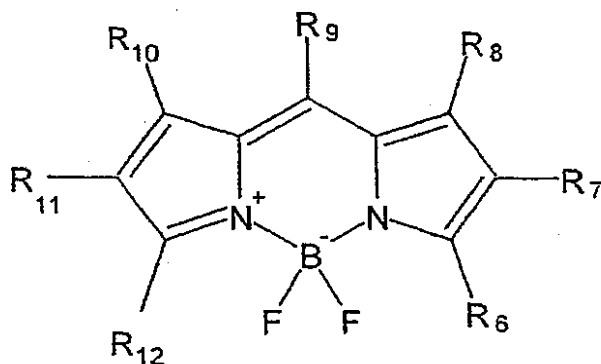
(VII)

{ 式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、及び  $R_5$  は、同一であるか又は異なり、そして、水素； $-(CH_2)_s-Z$  基 (基中、 $-s$  は 0 ~ 4 の範囲であり、かつ  $Z$  が、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $OH$ 、又は  $N^+R_1R_2R_3$  であり、ここで  $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  は、上で定義される通りである)；上で定義される通りの官能基、又はオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる } において表される蛍光物質に関する。

【0032】

別の好ましい態様に従って、本発明は以下の式 (VIII)：

【化 9】



(VIII)

[式中、

置換基  $R_6 \sim R_{12}$  は、以下：水素；ハロゲン；アルキル；シクロアルキル；アリール；アリールアルキル；アシル；スルホ；上で定義される官能基又はオリゴヌクレオチド若しく

10

20

30

40

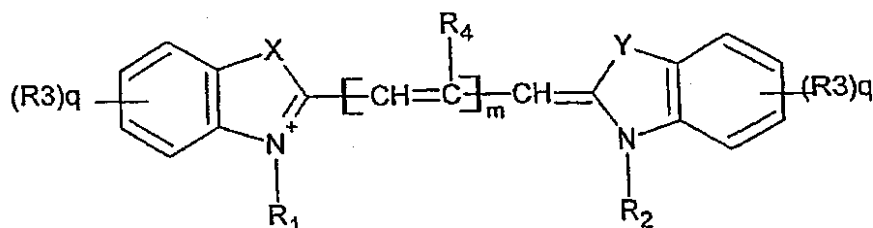
50

はオリゴヌクレオチド・アナログから選ばれる。]で表される蛍光物質に関する。

【0033】

本発明に従った別の蛍光物質は、以下の式(I X)：

【化10】



10

(IX)

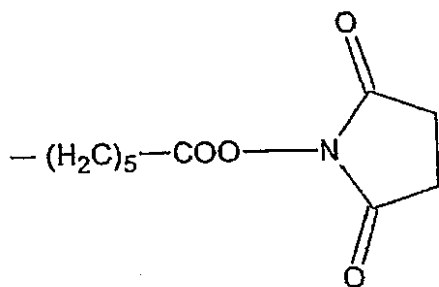
{式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $X$ 、 $Y$ 、 $m$ 、及び $q$ は、上で定義された通りである}に一致する。

20

【0034】

特に好ましい式(I X)の物質は、 $X$ 及び $Y$ が $C(CH_3)_2$ 基を表す物質であり、かつ $-R_1$ 及び $R_2$ が、1~4個の炭素原子を含むアルキル又は以下の式の基を表し、少なくとも1の $R_1$ 及び $R_2$ 基は、以下の式：

【化11】



30

で表される基を表し、

-  $R_4$ が、水素を表し、

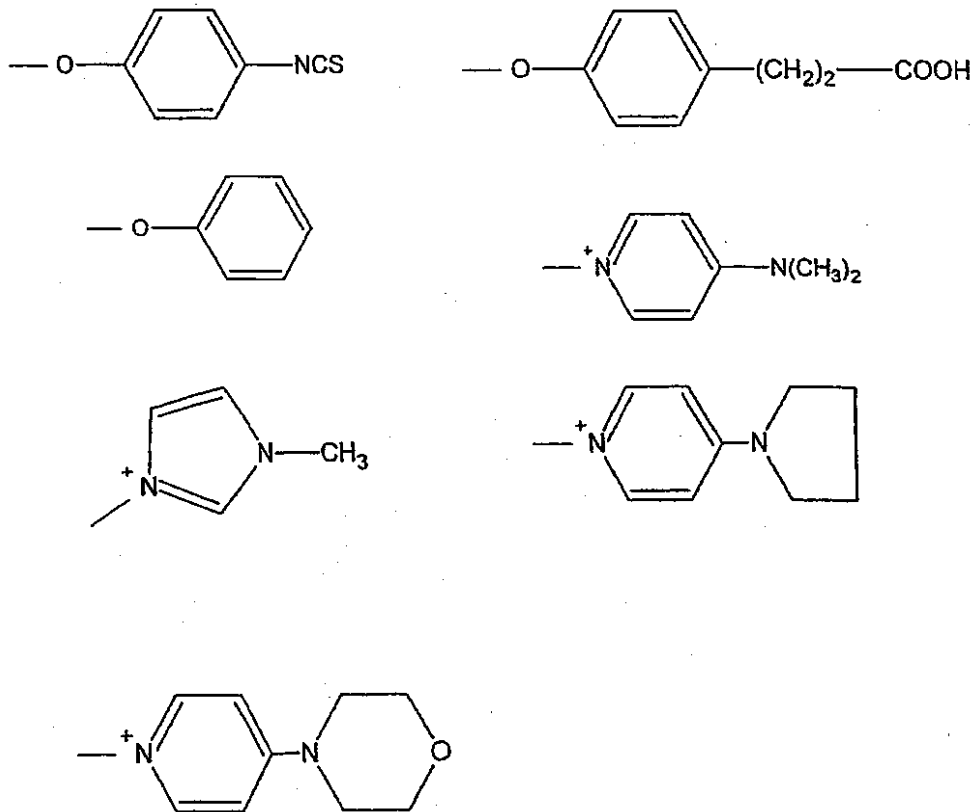
-  $q = 1$ 、 $m = 2$ であり、

40

-  $R_3$ が、水素； $-(CH_2)_s-Z$ 基(基中、 $s$ は0~4の範囲であり、かつ $Z$ が、 $CH_3$ 、 $SO_3H$ 、 $OH$ 、又は $N^+R_1R_2R_3$ を表し、ここで $R_1$ 、 $R_2$ 、及び $R_3$ は、上で定義される通りである)；上で定義される官能基又はオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド・アナログを表し；

-  $R_4$ が、 $H$ ； $OH$ ； $CH_3$ ； $Cl$ ；及び以下の式：

## 【化 1 2】



10

20

で表される基から選ばれ、アリル位における置換基  $R_4$  が、ポリエチレン鎖と共に、4 ~ 14 個の原子を含む 1 ~ 3 の融合環を形成し、該環は、飽和されるか又は不飽和であり、該環は 1 以上の O、N、及び S 原子を含むことがあり、そして場合によりオキシ基で置換されうる。 30

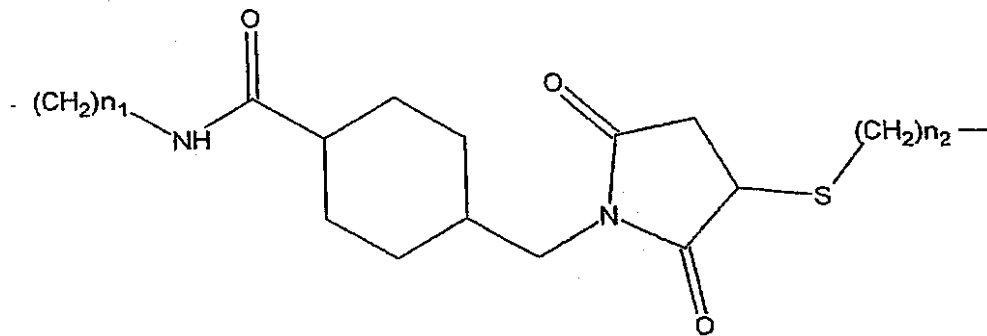
## 【0035】

都合の良いことに、本発明に従った蛍光物質は、オリゴヌクレオチドに直接又はスペーサー腕を介して共有結合するフルオロフォアを含む。

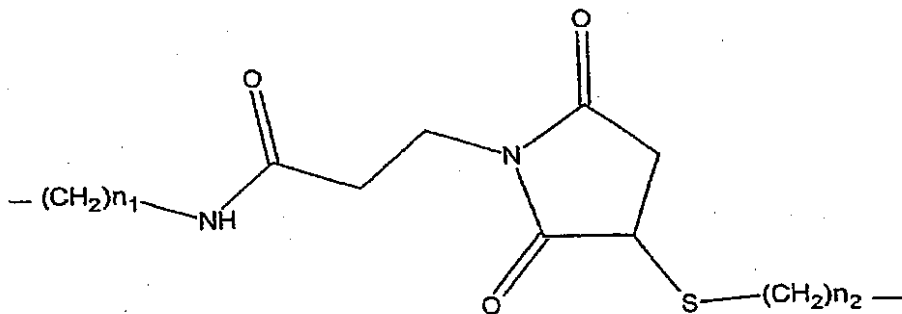
## 【0036】

該スペーサー腕は、1 以上の二重結合又は三重結合及び/又は場合により 1 以上のヘテロ原子、例えば酸素、窒素、硫黄、リン、又は 1 以上カルバモイル若しくはカルボキサミド基を場合により含む直鎖状又は分枝鎖状の  $C_1 \sim C_{20}$  アルキレン基； $C_5 \sim C_8$  シクロアルキレン基；及び  $C_6 \sim C_{14}$  アリーレン基から選ばれる二価有機ラジカルからなり、前記アルキレン、シクロアルキレン又はアリーレン基は、アルキル、アリール、又はスルホネート基で場合により置換されるか、又は以下の基： 40

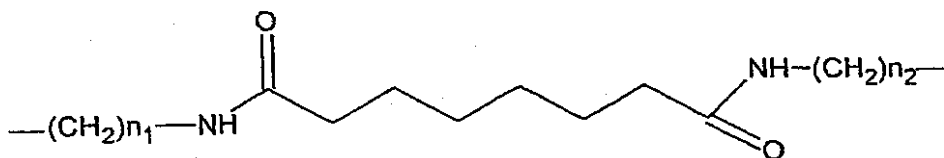
## 【化 1 3】



10



20



30

[基中、 $n_1$ 及び $n_2$ は2～6の間である。]

から選ばれる。

## 【0037】

次の態様に従って、本発明は、担体分子に共有結合される、上で定義される物質からなる蛍光抱合体に関する。

## 【0038】

都合の良い抱合体は、担体分子あたりの蛍光物質のモル数として定義される終モル比は、0より大きく100未満、好ましくは20未満である。

40

## 【0039】

担体分子は、例えば抗体、抗原、細胞内メッセンジャー、細胞間メッセンジャー、タンパク質、ペプチド、ハプテン、レクチン、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、トキシン、炭水化物、オリゴ糖、多糖、核酸、ホルモン、ビタミン、薬用製品、ポリマー、ポリマー製粒子、ガラス、ガラス粒子、又はガラス若しくはポリマーから作られる表面である。

## 【0040】

本発明に従った蛍光物質の使用は、フルオロフォアの凝集体を実質的に示さない抱合体を生産することを可能にする。結果として、フルオロフォアの量子収量は、終モル収量(

50

担体分子あたりの蛍光物質のモル数)が増加するときでさえも、担体分子へ結合した後においてもほぼ完全に保存されうる。

【0041】

このことにより、これらの抱合体は、非照射性エネルギー転移(HTRF型)を使用する蛍光システムにおける使用にとても有利になる。担体分子あたりのフルオロフォアの数、フルオロフォアの量子収量及び分子吸光係数が、これらのシステムの感受性の主要な判定基準である場合、該抱合体は、蛍光による慣用の検出技術よりかなり有利である。

【0042】

本発明はそれゆえ、特に医薬生成物のスクリーニング方法において、蛍光により、分析物を含む媒体中の該分析物を検出及び/又は測定すること、又は生体分子間の相互作用を検出すること；又は生理活性、例えば：酵素活性、膜結合受容体の活性化、遺伝子の転写、膜輸送、若しくは膜分極の変動などを測定することを目的として、上で定義される蛍光物質又は蛍光抱合体を、蛍光トレーサーとして使用することに関する。

10

【0043】

本発明に従った蛍光抱合体は、特に蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光偏向、又は蛍光相関において蛍光化合物のドナーの存在下で蛍光化合物の受容体として使用されるか、蛍光化合物の受容体の存在下で蛍光化合物のドナーとして使用されうる。

【0044】

該抱合体は、in vivoにおける光学イメージングのコントラスト剤として、都合よく使用されうる。

20

【0045】

本発明の対象は、フルオロフォアに結合する担体分子の表面で、凝集現象を低減するための方法であり、上で定義される蛍光物質が、上記フルオロフォアの変わりに使用されるという点で特徴付けられる。

【0046】

最終的に、本発明の対象は、担体分子に結合するフルオロフォアの量子収量を増加する方法であり、上で定義される蛍光物質が、フルオロフォアとして使用されるという点で特徴付けられる。

【0047】

本発明に従った蛍光物質は、以下に記載されるように、「官能性を持たせた」オリゴヌクレオチドを、フルオロフォアとカップリングすることにより調製されうる。

30

【0048】

本記載において、「官能性を持たせたオリゴヌクレオチド」という用語は、少なくとも1の化学的に反応性のある官能基、又は化学基(たとえば蛍光基)を含むオリゴヌクレオチドを意味することを企図され、該オリゴヌクレオチドは、天然オリゴヌクレオチドにおいては存在せず、かつ化学的に反応性の官能基又は化学基を有する改変されたヌクレオチド又は非ヌクレオチド・ユニット取り込むことからもたらされる。該化学的に反応性の官能基は、とりわけ、オリゴヌクレオチド又は改変されたオリゴヌクレオチドの抱合体の合成を行うことを可能にする。「化学的に反応性がある官能基」、「改変されたヌクレオチド」、「非ヌクレオチド・ユニット」、及び「オリゴヌクレオチド抱合体」という用語は、例えばJ. Goodchild による総説[Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: A review of their synthesis and properties. Bioconjugate chemistry, (1990) 1 (3), 77-99]で記載される意味において理解される。「天然オリゴヌクレオチド」という用語は、核酸において存在するヌクレオチドユニットの列によって形成されるポリヌクレオチドを指す[Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains. Eur. J. Biochem. (1983) 131,9-15]。

40

【0049】

以下の例は、本発明を非制限的な様式で例示する。

【実施例】

【0050】

50

以下の略語が使用される：

D T T : ジチオスレート

D S S : N-(ジスクシンイミジル)スベレート

G S T : グルタチオン・S-トランスフェラーゼ

M O P S : 3-[N-モルフォリノ]プロパンスルホン酸

S P D P : N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート

S S M C C : 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の3-スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド・エステル

T E A B : トリエチルアンモニウム・ピカルボネート

T E A A c : 10%アセトニトリルを含むトリエチルアンモニウム・アセテート

10

【0051】

#### I/抱合体の合成

実施例1: CY5-T15-ヘキシルアミン、CY5-T10ヘキシルアミン、及びCY5-T5ヘキシルアミンの合成

該実施例は、5'末端で、非スルホン化CY5などのサイアニン分子で官能性を与えられ、3'末端で、関心の生物分子を標識するために使用されうるアミン基を有する腕で官能性を与えられるT<sub>5</sub>、T<sub>10</sub>、又はT<sub>15</sub>配列のオリゴヌクレオチドの合成を記述する。実施例についてのCY15-T10ヘキシルアミン化合物の一般的な構造は、5'(CY5-TTT TTT TTT T-ヘキシルアミン)<sub>3</sub>により表される。

【0052】

20

「ヘキシルアミン」という用語は、6個の炭素原子から構成され、置換され、かつアミン官能基を有しうる腕を指す。

【0053】

本実施例において、2-ヒドロキシメチル-6-アミノヘキサノール腕は、3'末端に位置するヌクレオチドの3'位における水酸基と、腕の2-ヒドロキシメチルとの間で形成されるリン酸架橋を介して結合される。

【0054】

オリゴヌクレオチドの合成に慣用的に使用されるCPG(制御孔ガラス(Controlled pore glass)の固体支持体)が使用される。そうした支持体は、「官能性をあたえられた」といわれる。なぜなら、オリゴヌクレオチドの最後の脱保護の後で、脂肪性の第一アミン官能基を放出することが出来る保護アミン官能基を有する化学構造が、CPG上に繋がれるからである。

30

【0055】

市販のチミジンのホスホラミダイト誘導体を、T<sub>15</sub>の配列を合成するために使用する。

【0056】

オリゴヌクレオチドの5'位に、サイアニン(CY5)などの蛍光マーカ-を直接導入することができる、市販の非スルホン化サイアニンのホスホラミダイト誘導体を使用する。

【0057】

該合成を、自動DNA合成機(Applied Biosystems type 392)を製品プロトコルに従って使用して行う。2-O-ジメトキシトリチル-6-フルオレニル・メトキシカルボニルアミノヘキサン-1-スクシノイル-長鎖アルキルアミノ-CPG誘導体を繋がれた固体支持体(CPG)(1 μmol)を合成機に設置し、チミジンのホスホラミダイト誘導体を使用して、15サイクルの合成を行い、そして次に非スルホン化サイアニン(CY5)のホスホラミダイト誘導体を使用して1回のカップリングサイクルを行うことにより、T15の配列を合成した。

40

【0058】

該合成の終わりにおいて、製品プロトコルに従って、カラムをアンモニア処理し(約2 mlの28%アンモニア水)、オリゴヌクレオチドとCPG支持体との間の結合を分解することを可能にした。放出されたオリゴヌクレオチドを集めたフラスコを密閉し、50~55 で二時間維持し、そして次に室温に戻した。フラスコの内容物(2 ml)を次に5 m

50

1 ポリプロピレン・チューブ移し、そして次に、スピード-vac (speed-vac) を使用して吸引下で蒸発させて乾燥させた。残渣を次に 500  $\mu$ l の 10 mM・TEAB で溶解した。得られた溶液は、「粗製」オリゴヌクレオチド及び主に所望の<sup>5'</sup>(CY5-(T)<sub>15</sub>-2-オキシメチル-6-アミノヘキサノール)<sub>3</sub>を含む。

【0059】

リクロスファ- (LiChrospher) RP-18e・250-10・(10  $\mu$ ) カラム (Merck) 上で、水性 TEAC 中のアセトニトリル勾配 (緩衝液 A : 25 mM・TEAC 中の 5% アセトニトリル、緩衝液 B : 25 mM・TEAC 中の 50% アセトニトリル ; 流速 5 ml / 分、20 分間における 10% B から 20% B への直線的勾配、及び 10 分間における 20% から 100% の直線的勾配) を使用して、HPLC 精製をした後に、<sup>5'</sup>(CY5-(T)<sub>15</sub>-2-オキシメチル-6-アミノヘキサノール)<sub>3</sub> 化合物を得た。不完全であり、かつ CY5 を含まない配列は、20 分あたりで溶出し、所望の配列<sup>5'</sup>(CY5-(T)<sub>15</sub>-2-オキシメチル-6-アミノヘキサノール)<sub>3</sub> を含む分画は、28 分あたりで収集された (これらの分画は、CY5 基の存在のため青色であった。)

【0060】

所望の配列を含む分画を貯め、そしてスピード-vac を使用して蒸発させて乾燥させた。残渣を純水で溶解した。該溶液の希釈液にあてられた UV / 可視光スペクトル (210 nm ~ 750 nm) は、260 nm での吸光度によってオリゴヌクレオチドの濃度を決定することを可能とし、そしてその 650 nm での吸光度によりサイアニン基 (CY5) の存在を特徴付けることを可能とした。

【0061】

CY5-T10-ヘキシルアミン及び CY5-T5-ヘキシルアミンの化合物は、自動合成機における合成サイクル数を変えることにより、同様に合成される。

【0062】

実施例 2 : SMCC による CY5-T15-ヘキシル-アミン、CY5-T10-ヘキシルアミン、及び CY5-T5-ヘキシルアミン化合物の 3' 位の活性化

実施例 1 から得られた CY5-T15-ヘキシルアミンを、200 mM・PO<sub>4</sub> 緩衝液で溶解し、pH を 8 に調節した。

【0063】

SSMCC の 250 当量を、得られた溶液に添加した。反応混合液を攪拌しながら 30 分間室温でインキュベーションした。

【0064】

以後で CY5-T15-マレイミドと呼ばれる (以後 CY5-T15 (mal) と名付けられる) SSMCC で活性化された CY5-T15-ヘキシルアミン化合物は、2 mM・EDTA、pH 7 を含む 10 mM・PO<sub>4</sub> 緩衝液中の HR10 / 30 G25 (SF) カラムで精製された。精製を 60 ml / h で行った。

【0065】

CY5-T15-マレイミド溶液を、スピード-vac で蒸発することにより濃縮した。

【0066】

同じ手順を、CY5-T10-ヘキシルアミンについて行った。

【0067】

CY5-T5-ヘキシルアミン化合物の活性化のために、SSMCC の 150 当量のみを使用した。HR10 / 30 カラムでの更なる精製ステップが必要である。

【0068】

実施例 3 : DSS (N-(ジスクシンイミジル・スベレート) による 3' 位における CY5-T15-ヘキシルアミンの活性化

実施例 1 で得られた CY5-T15-ヘキシルアミン化合物を、10  $\mu$ l の 100 mM・MOPS 緩衝液 (pH 7.6) 及び 5  $\mu$ l のアセトニトリルで溶解した。

【0069】

DSS (DMF 中で 35 mg / ml) の 150 当量を、得られた溶液に加えた。

10

20

30

40

50

## 【0070】

反応混合液を攪拌しながら4 で一晩インキュベーションした。

## 【0071】

以後CY5-T15-NHSと呼ばれる、DSSで活性化されたCY5-T15-ヘキシルアミン化合物を、5mM・MOPS緩衝液pH6.5においてNAP5G25(SF)カラム上で精製した。

## 【0072】

CY5-T15-NHS化合物を、次にブタノールでの数回の精製並びに遠心により濃縮した。ペレットを水で溶解した。

## 【0073】

CY5-T10-ヘキシルアミン及びCY5-T5-ヘキシルアミン化合物を活性化するために同様の手順を行った。

## 【0074】

実施例4：S MCCで活性化されたCY5-(T)<sub>n</sub>-ヘキシルアミン - 抗GST抗体(GSS11)抱合体の調製

GSS11-T15-CY5バッチ(Batch)02B(mal):

0.1M炭酸塩緩衝液、pH9中のGSS11抗体(CIS bio international, France)を、8当量のSPDPを室温で30分間攪拌しながら加え、そして次に終濃度20mMのDTTを攪拌せずに室温で15分間で加えることにより活性化した。

## 【0075】

0.1M・PO<sub>4</sub>緩衝液、pH7中のHR10/10G25(SF)カラムで精製した。

## 【0076】

そうして活性化された抗体を、CY5-T15-マレイミド/抗体GSS11の開始モル比7.6で、実施例2で得たオリゴヌクレオチドCY5-T15-マレイミドと混合した。該インキュベーションは、4 で18~20時間であった。

## 【0077】

カップリングの間における抗体濃度は、0.5mg/mlである。

## 【0078】

GSS11-T15-CY5バッチ03(mal):

GSS11抗体は、5mMの濃度でDTTを添加することによってのみ活性化される。上記バッチ02Bと同様の手順を、CY5-T15-マレイミド/抗体GSS11の開始モル比10.8で行った。

カップリングの間の抗体濃度は、この場合、0.68mg/mlであった。

## 【0079】

GSS11-T5-CY5バッチ01(mal):

CY5-T5-マレイミド/抗体GSS11の開始モル比8で、上記バッチ02Bと同様の手順を行った。

カップリングの間の抗体濃度は、0.9mg/mlである。

## 【0080】

GSS11-T10-CY5バッチ01(mal):

GSS11-T5-CY5バッチ01(mal)と同様の手順を行った。

カップリング生成物を、60ml/hでHR10/30スペルデックス(superdex)200カラム上で生成した。

溶出緩衝液は、0.1Mリン酸緩衝液、pH7であった。

ダイオード・アレイ検出器を使用して精製を行った(様々な波長で行った)。

## 【0081】

実施例5：DSSで活性化されたCY5-(T)<sub>n</sub>-ヘキシルアミン - 抗GST抗体(GSS11)抱合体の調製

GSS11-T15-CY5バッチ01(NHS):

0.1M炭酸塩緩衝液、pH9中のGSS11抗体を、実施例3中で得られたCY5-T

10

20

30

40

50

15-NHS 溶液と混合する。CY5-T15-NHS/抗体の開始モル比は8であった。カップリングの間における抗体濃度は、3.3 mg/ml である。インキュベーションは、室温で攪拌せずに30分間であった。

【0082】

GSS11-T15-CY5 バッチ02 (NHS):

プロトコルは、GSS11-T15-CY5 バッチ01 NHSと同じであり、CY5-T15-NHS/抗体の開始モル比は12であった。インキュベーションは、室温で攪拌しながら2時間30分間であった。

【0083】

カップリング生成物を、HR10/30 スペルデックス200 カラム上で、60 ml/h で精製した。溶出緩衝液は、0.1 Mリン酸緩衝液、pH7 であった。

【0084】

精製をダイオード・アレイ検出器を使用して行った(様々な波長で行った)。

【0085】

実施例6：CY5スルホ-GSS11 抱合体の合成

オリゴヌクレオチドを含まない抱合体は、本発明に従った抱合体の利点を示すために参照化合物として貢献する。

【0086】

スルホン化サイアニンがここで使用される。前述の例において使用される非スルホン化サイアニンは使用されない。なぜなら、後者がオリゴヌクレオチドに結合されない場合、後者の量子収量は、実質的に0であるからである。

【0087】

GSS11-CY5スルホ バッチM5:

スルホン化サイアニン(CY5スルホ)モノNHSを、0.1 M炭酸塩緩衝液、pH9 中のGSS11 抗体に添加した。

【0088】

CY5スルホ/抗体の開始モル比は4であった。

【0089】

インキュベーションは、攪拌しながら室温で1時間であり、カップリングの間における抗体濃度は、5.2 mg/ml であった。

【0090】

精製は、0.1 Mリン酸緩衝液 pH7 において、HR10/10G25(SF)カラム上で行われた。

【0091】

GSS11-CY5スルホバッチM6:

プロトコルは、上記バッチM5と同じであるが、CY5スルホ/抗体の開始モル比が10であった。

【0092】

GSS11-CY5スルホバッチM7:

プロトコルは、上記バッチM5)と同じであるが、CY5スルホ/抗体の開始モル比が20であった。

【0093】

実施例7：CY5-A15-cAMP 抱合体の調製

CY5-A15-ヘキシルアミンは、アデノシンのホスホラミダイト誘導体を、チミジンのホスホラミダイト誘導体の代わりに使用することにより、実施例1においてCY5-T15-ヘキシルアミンに記載される手順と同様の手順に従って獲得される。

【0094】

2'-モノスクシニルアデノシン 3',5'-サイクリック・モノホスフェート(cAMP-succ-NHS)のN-ヒドロキシスクシンイミド・エステルを以下のとおりに行った：

2 mg (3.9  $\mu\text{mol}$ ) の 2'-モノスクシニルアデノシン・3',5'-サイクリック・モノホスフェート(ナトリウム塩、Sigma #M9631)を、エッペンドルフチューブ内で15  $\mu\text{l}$  の N-ヒドロキシスクシンイミド(無水DMSO中で13.3 mg/ml)の溶液中に懸濁した。

【0095】

35  $\mu\text{l}$  の (1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3エチルカルボジイミド・ヒドロクロリド(無水DMSO中に200 mg/ml)溶液を、次に反応体積に加えて、そして室温で振盪機上に設置した。

【0096】

90分間の反応後、反応混合液を、DMSO qs 160  $\mu\text{l}$  で希釈し、その結果 [cAMP-succ-NHS] = 23 nmol/ $\mu\text{l}$  を得、それを抱合体の合成に使用した。

10

【0097】

H<sub>2</sub>O中に溶解したcAMP-succ-NHSを、10 mMのTEAB緩衝液、pH 8.5中のCY5-A15-ヘキシルアミンの溶液と混合した。カップリング反応の間、cAMP-NHS / CY5-A15-ヘキシルアミンのモル比は20であった。カップリング中のcAMPの濃度は、5  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  であった。インキュベーションは、攪拌しながら室温で2時間30分間であった。

【0098】

精製は、0.1 M PO<sub>4</sub> 緩衝液、pH 7中のNap5(G25)上でデサリフィケーション(desalification)を使用して、行われた。

20

【0099】

#### II-光物理学的性質

##### 実施例8：量子収量及びOD<sub>max</sub>/OD<sub>604nm</sub>比の比較

量子収量は、蛍光物質が受けたエネルギーを放出する際の蛍光物質の効率を示す。量子収量が高ければ高いほど、蛍光物質の効率が高くなる。該量子収量が蛍光光度計を使用して計測される。励起は、600 nmで起こり、蛍光は、615 ~ 750 nmで計測された。得られた蛍光スペクトルの領域は、計算され、そして量子収量を決定するために使用された。

【0100】

終モル比(FMR)は、タンパク質に共有結合するフルオロフォアの数を示す。

30

【0101】

蛍光物質の吸収スペクトルは、OD<sub>max</sub>/OD<sub>604nm</sub>比を計算することを可能にした。該比は、標識タンパク質、例えばGSS11抗体又はストレプトアビジンなどの表面上での、フルオロフォア、例えばCY5のおこりうる凝集現象を示す。

【0102】

量子収量及びOD<sub>max</sub>/OD<sub>604nm</sub>比を前記実施例に従って合成された様々な化合物について決定した。

【0103】

8.1 / 以下の表1において与えられる結果は、上記実施例において調製される(オリゴヌクレオチドを含まない)参照抱合体に関する。

40

【0104】

【表 1】

表 1

	終モル比 (FMR)	$OD_{max}/$ $OD_{604nm}$	量子収量
CY5スルホ-モノ NHS	-----	3.16	19%
GSS11-CY5スルホバッチ M5	2.20	2.18	11%
GSS11-CY5スルホバッチ M6	3.80	1.64	4%
GSS11-CY5スルホバッチ M7	6.00	1.24	1%

10

## 【0105】

これらの結果により、スルホン化サイアニン、つまりCY5スルホをGSS11抗体と結合させることは、 $OD_{max}/OD_{604nm}$ 比の減少によって示されるように、特に抗体表面でのCY5の凝集現象を付随する量子収量の低下を導くことを示された。

20

## 【0106】

抗体分子あたりのCY5分子数(FMR)が増加すると、量子収量が低減する。

## 【0107】

8.2 / 以下の表2に与えられる結果は、実施例4及び5において調製された抱合体に関する。参照として使用されるCY5-T10-ヘキシルアミン、及びCY5-T15-ヘキシルアミン化合物は、実施例1において記載されるように調製される。

## 【0108】

【表 2】

表 2

	終モル比 (FMR)	$OD_{max}/$ $OD_{604nm}$	量子収量
CY5-T15-ヘキシルアミン	-----	2.79	25%
GSS11-T15-CY5バッチ 02B (mal)	4.30	2.59	19%
GSS11-T15-CY5バッチ 03 (mal)	1.40	2.59	18%
GSS11-T15-CY5バッチ 01 (NHS)	2.00	2.67	20%
GSS11-T15-CY5バッチ 02 (NHS)	5.10	2.63	20%
CY5-T10-ヘキシルアミン	-----	2.78	26%
GSS11-T10-CY5バッチ 01 (mal)	4.60	2.38	14%

10

20

## 【0109】

本発明に従ってGSS11抗体を、蛍光物質と結合するとき、FMRsの増加に関し、参照抱合体と比較して量子収量及び $OD_{max}/OD_{604nm}$ 比のかなり小さい減少が観測される。このことは明らかに、本発明に従った蛍光物質が、標識タンパク質(ここではGSS11抗体)の表面での凝集を減じるという完全に予期しない性質を示すということを示す。

30

## 【0110】

さらに、得られた結果は、CY5-T15-ヘキシルアミン化合物の活性化方法(DSS又はSSMCC)と無関係である。

## 【0111】

8.3 / 以下の表3において与えられた結果は、実施例7において調製される生成物に関する。参照として使用されるCY5-A15-ヘキシルアミンは、実施例1においてCY5-T15-ヘキシルアミンについて記載される手順に従って調製される。

## 【0112】

【表 3】

表 3

	$OD_{max}/OD_{604}$	量子収量
CY5-A15-NH2	2.7	16%
CY5-A15-cAMP	2.65	19.5%

10

## 【0113】

上の結果は、蛍光物質の蛍光量子収量が、サイクリックAMPに結合後わずかに増加するというを示す。こうして作られた抱合体は、凝集の徴候を示さず、そしてそれゆえ予期しない蛍光性質を有する。

## 【0114】

## 実施例 9：一定抗体濃度での蛍光スペクトル

様々な抱合体で得られた蛍光レベルを比較するために、蛍光放出スペクトル(放出波長の機能として、蛍光強度)を一定の抗体濃度(50 nM)で作りに出した。該スペクトルをLS50B分光蛍光光度計(PerkinElmer)上で、以下の設定で作りに出した：励起波長600 nm、放出波長615~750 nm、スキャン速度480 nm/分。これらのスペクトルに基づき、積分により得られるスペクトルの面積を計算することにより抱合体の蛍光強度を決定することができる。

20

## 【0115】

図1は、抱合体GSS11-CY5スルホ及びGSS11-T15-CY5のFMRと、それらの蛍光強度との間の関係を与える。

以下のシンボルが使用される

30

## 【化14】

- GSS11-CY5スルホ抱合体を示す  
■ GSS11-T15-CY5抱合体を示す

## 【0116】

図1におけるグラフは、抱合体GSS11-CY5スルホの場合、抗体表面におけるCY5の過度の凝集のため、抱合体のFMRの増加が、その全体の蛍光の減少を導くことを示す。他方、抱合体GSS11-T15-CY5の場合、CY5の凝集がないことにより、高い量子収量を維持することができ、結果として抗体毎のCY5の数と実質的に比例する全体の蛍光を得た。

40

## 【0117】

III-FRET (「蛍光共鳴エネルギー転移」)型アッセイにおける本発明に従った蛍光物質の使用。

## 実施例 10：

本発明に従った蛍光物質は、当業者に周知のFRET型システムにおいて使用されうる

50

。

## 【0118】

本実施例において、ビオチン化グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST-ビオチン)は、ドナー化合物(ユーロピウム・クリプテート-ストレプトアビジン(K(EU)-Sa))と本発明に従った蛍光物質(抱合体GSS11-オリゴヌクレオチド-CY5)を含む受容体との間のエネルギー転移からもたらされる、受容体化合物により放出される蛍光を計測することによって、検出される。

## 【0119】

プロトコル・アッセイ:

該アッセイは、蛍光光度計(Discovery, Packard)を用いて行われた。放出波長は、337 nmであった。蛍光を665及び620 nmで計測した。

アッセイ緩衝液: 50 mM Hepes、pH 7、0.1% BSA、400 mM・KF

試薬: GST-ビオチン、20 nM溶液

ドナー: Sa-K(EU)NHS (CIS bio international)

受容体: GSS11-XL665 (CIS bio international)、参照化合物として使用される。

GSS11-T15-CY5 バッチ 02B mal (実施例4) FMR 4.3

GSS11-T15-CY5 バッチ 03 mal (実施例4) FMR 1.4

GSS11-T15-CY5 バッチ 01 NHS (実施例5) FMR 2 20

GSS11-T15-CY5 バッチ 02 NHS (実施例5) FMR 5.1

GSS11-T10-CY5 バッチ 01 mal (実施例4) FMR 4.6

GSS11-T15-CY5 バッチ 01 mal (実施例4) FMR 8.7

## 【0120】

以下の混合液を、室温で20時間インキュベーションした。

- 終濃度0-0.31-0.62-1.25-2.5、又は5 nMのGST-ビオチン50 µl
- 終濃度2.5 nMの受容体100 µl
- 終濃度1 nMのドナー50 µl

## 【0121】

図2は、GST-ビオチンの濃度(終濃度nMにおけるGST-ビオチン)の変化の関数としての、シグナル(%デルタF)の変化を示す。 30

以下のシンボルを使用する:

## 【化15】

- GSS11-XL-665
- ◆— 抱合体GSS11-T15-CY5バッチ 02 NHSを示す
- — 抱合体GSS11-T15-CY5バッチ 01 NHSを示す 40
- △— 抱合体GSS11-T15-CY5バッチ 02B malを示す
- x— 抱合体GSS11-T15-CY5バッチ 03 malを示す
- — 抱合体GSS11-T10-CY5バッチ 01 malを示す

## 【0122】

図2におけるグラフは、FRET型のアッセイにおける、蛍光標識としての本発明にし 50

たがった蛍光物質の利点を示す。特に、全ての場合において、本発明に従った蛍光物質を使用して観測されるシグナルは、参照受容体化合物(XL)で得られるシグナルより大きいか又は同等である。

【0123】

実施例11：抱合体の寿命及び転移効率

FRET型のアッセイ、例えば前述の実施例のアッセイにおいて得られる寿命及び転移効率は、計算された。試験される抱合体を、実施例4及び5において記載されるように調製し、抱合体GSS11-XL665は、参照化合物として貢献した。

結果は以下の表4において与えられる。

【0124】

【表4】

10

表4

	Sa-K バッチ 14 (NHSの一般商品)		
	ms中のFRETの寿命 ( $\tau_{\text{FRET}}$ )	ms中の遊離Kの寿命 ( $\tau_{\text{游离K}}$ )	転移効率 (%) $1 - (\tau_{\text{FRET}} / \tau_{\text{游离K}})$
GSS11-T10-CY5 バッチ 01mal	0.16	0.969	83%
GSS11-T5-CY5 バッチ 01mal	0.21	1.030	80%
GSS11-T15-CY5 バッチ 03mal	0.21	1.054	79%
GSS11-T5-CY5 バッチ 02mal	0.16	1.001	83%
GSS11-T15-CY5 バッチ 01NHS	0.17	0.997	83%
GSS11-T15-CY5 バッチ 02NHS	0.13	1.038	87%
GSS11-XL665	0.27	1.033	73%

20

30

40

【0125】

該結果により、ドナー化合物と、受容体として使用される本発明に従った抱合体との間におけるエネルギー転移効率が、本発明に従った抱合体において、XL665(コントロール)の効率よりかなり高いということが示される。

【0126】

実施例12：

蛍光物質は、当業者に周知のFRET競合系において使用されうる。

【0127】

本実施例において、試料中のサイクリックAMP(cAMP)の存在は、ドナー化合物(ユーロピウム・クリプテート-抗-cAMPモノクローナル抗体の抱合体)と蛍光物質を含

50

む受容体化合物(CY5-A15-cAMP抱合体)との間におこる蛍光エネルギー転移の阻害を観測することにより検出される。

【0128】

アッセイプロトコル:

該アッセイは、分光光度計(Rubystar, BMG)を使用して行われる。この励起波長は337nmである。該蛍光は、665nm及び620nmで計測される。

【0129】

アッセイ緩衝液: 0.1Mホスフェート、pH7、0.1%BSA、400mM・KF

試薬: cAMP、280nMの溶液

ドナー: ユーロピウム・クリプテート-抗-cAMPモノクローナル抗体(抗-cAMP-K)(Cis bio international) 10

受容体: Cy5-A15-cAMP抱合体(Cis bio international)

cAMP-XL665抱合体、該抱合体は参照化合物として使用される

【0130】

以下の混合液を室温で20時間インキュベーションした。

- 緩衝液 25  $\mu$ l

- 0-0.07-0.27-1.09-4.37-17.5、又は70nMの終濃度でのcAMP 25  $\mu$ l

- cAMP-XL665又はCy5-A15-cAMP 25  $\mu$ l

- 抗-cAMP-K 25  $\mu$ l 20

【0131】

図3は、増加するcAMP量の存在において、2つのインキュベーション時間(1h及び20h)で獲得されるFRETシグナルの阻害(DF/DFmax)を示す。

【0132】

以下のシンボルが使用される

【化16】

--- --- cAMP-XL665 1時間のインキュベーション時間 30

---O--- cAMP-XL665 20時間のインキュベーション時間

— x — Cy5-T15-cAMP 1時間のインキュベーション時間

— ▽ — Cy5-T15-cAMP 20時間のインキュベーション時間

【0133】

図3におけるグラフは、FRET競合型のアッセイにおいて、蛍光標識としての本発明の蛍光物質の利点を示す。該試験の感受性は、実験のインキュベーション時間の限りでは、本発明に従った蛍光物質を使用することにより改良される。さらに、参照受容体(XL665)で観測される1時間と20時間の間における感受性の喪失は、本発明に従った蛍光物質が使用されるとき、なくなる。 40

【図面の簡単な説明】

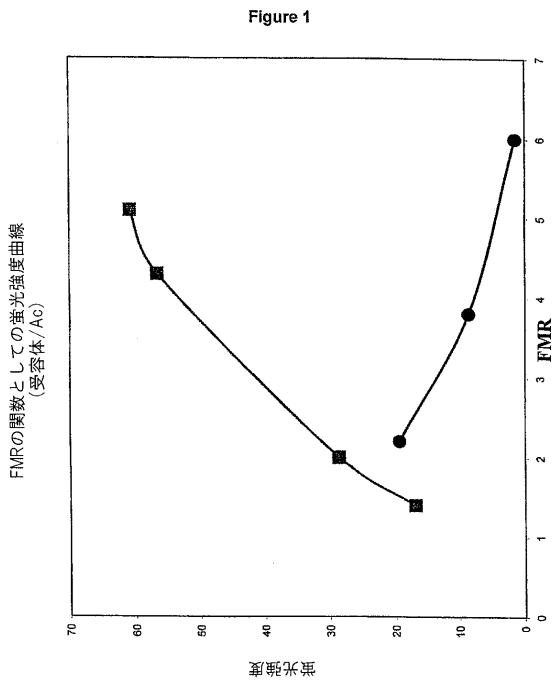
【0134】

【図1】図1は、抱合体GSS11-CY5スルホ及びGSS11-T15-CY5のFMRと、それらの蛍光強度との間の関係を与える。

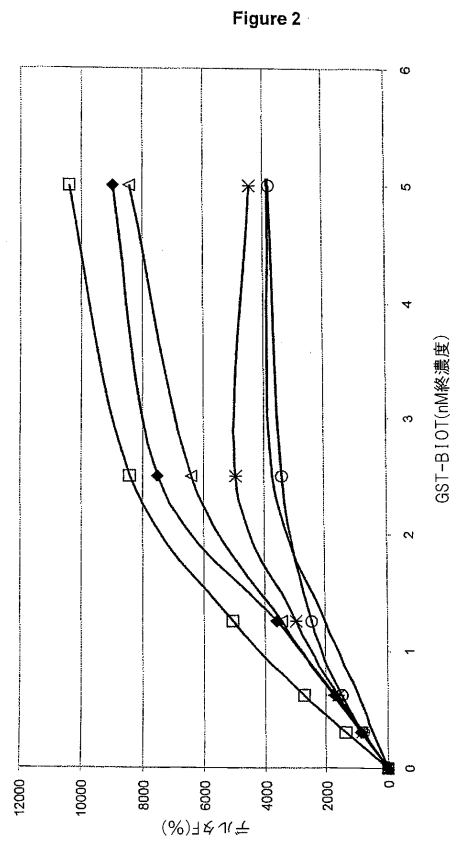
【図2】図2は、GST-ビオチンの濃度(終濃度nMにおけるGST-ビオチン)の変化の関数としての、シグナル(%デルタF)の変化を示す。 50

【図3】 図3は、増加するcAMP量の存在において、2つのインキュベーション時間(1h及び20h)で獲得されるFRETシグナルの阻害(D F / D F m a x )を示す。

【図1】

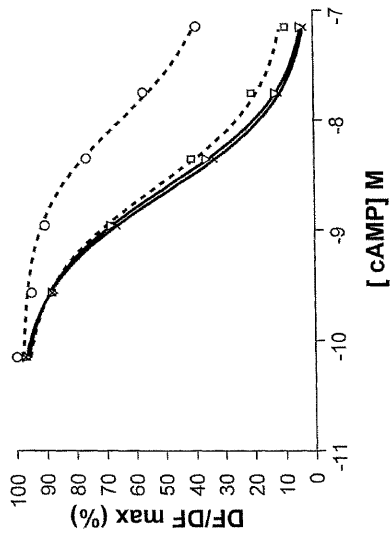


【図2】



【 図 3 】

Figure 3



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 03/06459
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07H21/00  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07H  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 853 992 A (MATHIES RICHARD A ET AL) 29 December 1998 (1998-12-29)  examples fig. 2  ---	1-6, 9, 14, 15, 17-24
X	US 5 994 063 A (METZKER MICHAEL L ET AL) 30 November 1999 (1999-11-30)  examples fig. 2b  ---	1-6, 10, 14, 15, 17-24
X	DE 36 42 939 A (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG) 10 December 1987 (1987-12-10) the whole document  ---	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  3 December 2003		Date of mailing of the international search report  16/12/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patent(aan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  de Nooy, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/06459

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 342 326 B1 (MILTON RAYMOND C) 29 January 2002 (2002-01-29) exemples ---	1
X	US 4 849 513 A (SMITH LLOYD M ET AL) 18 July 1989 (1989-07-18) exemples ---	1
X	US 5 414 077 A (LIN KUEI-YING ET AL) 9 May 1995 (1995-05-09) exemples ---	1
A	GOODCHILD J: "CONJUGATES OF OLIGONUCLEOTIDES AND MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES: A REVIEW OF THEIR SYNTHESIS AND PROPERTIES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 1, no. 3, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 165-187, XP000174627 ISSN: 1043-1802 the whole document ---	1
A	WO 98 26287 A (ASPE DANIEL ;CIS BIO INT (FR)) 18 June 1998 (1998-06-18) the whole document -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/06459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5853992	A	29-12-1998	AU 717018 BZ	16-03-2000
			AU 4742397 A	24-04-1998
			EP 0935670 A1	18-08-1999
			GB 2317951 A ,B	08-04-1998
			JP 2001502000 T	13-02-2001
			WO 9814612 A1	09-04-1998
			US 6150107 A	21-11-2000
US 5994063	A	30-11-1999	US 5614386 A	25-03-1997
			AU 699939 B2	17-12-1998
			AU 6288696 A	22-01-1997
			CA 2225531 A1	09-01-1997
			EP 0833936 A1	08-04-1998
			WO 9700967 A1	09-01-1997
			US 5861287 A	19-01-1999
			US 5728529 A	17-03-1998
DE 3642939	A	10-12-1987	DE 3642939 A1	10-12-1987
			WO 8707611 A1	17-12-1987
US 6342326	B1	29-01-2002	EP 1280861 A2	05-02-2003
			WO 0185850 A2	15-11-2001
US 4849513	A	18-07-1989	CA 1311428 C	15-12-1992
			DE 3750080 D1	21-07-1994
			DE 3750080 T2	22-09-1994
			EP 0270651 A1	15-06-1988
			JP 7300494 A	14-11-1995
			JP 1501149 T	20-04-1989
			WO 8800201 A1	14-01-1988
			CA 1244786 A1	15-11-1988
			DE 3446635 A1	27-06-1985
			FR 2556726 A1	21-06-1985
			GB 2153356 A ,B	21-08-1985
			JP 1951595 C	28-07-1995
			JP 6078353 B	05-10-1994
			JP 6145192 A	24-05-1994
			JP 1250393 A	05-10-1989
			JP 1769567 C	30-06-1993
			JP 4060600 B	28-09-1992
			JP 1057119 B	04-12-1989
			JP 1573676 C	20-08-1990
			JP 60197698 A	07-10-1985
SE 466208 B	13-01-1992			
SE 8406484 A	21-06-1985			
US 5015733 A	14-05-1991			
US 5118802 A	02-06-1992			
US 5118800 A	02-06-1992			
US 5414077	A	09-05-1995	AU 7579991 A	18-09-1991
			WO 9113080 A1	05-09-1991
WO 9826287	A	18-06-1998	FR 2757162 A1	19-06-1998
			AT 228656 T	15-12-2002
			AU 5489498 A	03-07-1998
			DE 69717490 D1	09-01-2003
			DE 69717490 T2	04-09-2003
			EP 0946870 A1	06-10-1999

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 03/06459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9826287	A	ES 2187834 T3	16-06-2003
		WO 9826287 A1	18-06-1998
		JP 2001506002 T	08-05-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78	C 0 9 B 57/00	Z
	C 1 2 Q 1/00	Z
	G 0 1 N 21/78	C

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

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 トランケ, エリック

フランス国, エフ - 3 0 1 3 0 ポン サン エスプリ, シュマン コロンビア

(72) 発明者 モラン, ファブリス

フランス国, エフ - 3 0 2 0 0 サン ナゼール, ラ クローズ

(72) 発明者 バザン, エルベ

フランス国, エフ - 3 0 4 0 0 ビルヌーブ レ アピニョン, アレー ドゥ ラ シェネー 1  
4

(72) 発明者 マティス, ジェラルド

フランス国, エフ - 3 0 2 0 0 バニョル シュール セズ, アンパース カペル デ ラドレス  
1 7

F ターム(参考) 2G054 CA22 CE02 EA03 GA04 GB02

4B063 QA01 QA18 QR32 QR35 QR90 QX02