

(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2008-535945

(P2008-535945A)

(43) 公表日 平成20年9月4日 (2008. 9. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C09B 11/28 (2006.01)	C09B 11/28 C S P B	4 B O 2 4
C09B 57/02 (2006.01)	C09B 57/02 Z N A H	4 B O 6 3
C09B 29/085 (2006.01)	C09B 29/085 Z	4 H O 5 6
C09B 23/00 (2006.01)	C09B 23/00 L	
C09B 57/10 (2006.01)	C09B 29/085 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-500917 (P2008-500917)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月9日 (2006. 3. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月24日 (2007. 10. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/008425
 (87) 国際公開番号 W02006/099050
 (87) 国際公開日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)
 (31) 優先権主張番号 60/661, 222
 (32) 優先日 平成17年3月9日 (2005. 3. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

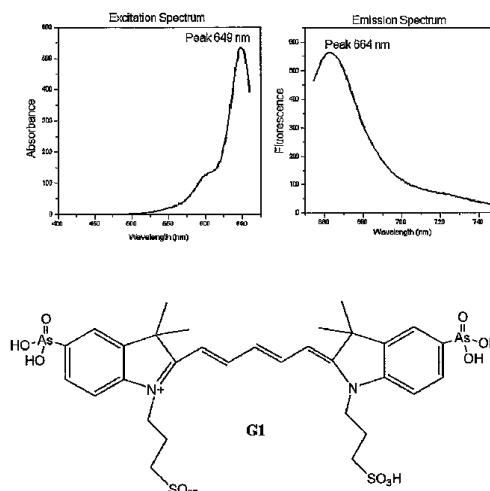
(71) 出願人 504019928
 セファイド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニ
 ーベイル カリビアン ドライブ 904
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ゴール, アレキサンダー エー.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98072
 , ウッジンビル, 170ティーエイチ
 アベニュー ノースイースト 2005
 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 極性色素

(57) 【要約】

本発明は、新規な極性蛍光色素および消化物質色素、ならびに強化された極性を有するマイナーグループバインダに関する。さらに、本発明は、自動化合成の条件下、極性アルソナート色素でラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを製造する方法、およびそのようなプローブを使用する方法に関する。したがって、一実施形態で、本発明は、1種以上のアルソナート基で置換された蛍光化合物を含む極性蛍光色素であって、該蛍光化合物は、340 nmと1100 nmとの間で励起と、440 nmと1150 nmとの間に最高蛍光発光とを有する蛍光色素を提供する。



Excitation and emission spectra of anionic acid carbocyanine dye G1, 1.25mM in pH 8.0 10mM Tris buffer.

【特許請求の範囲】

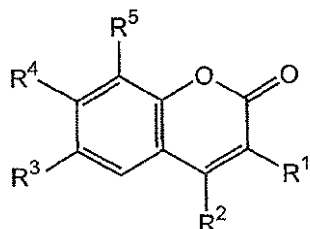
【請求項 1】

1 種以上のアルソナート基で置換された蛍光化合物を含む極性蛍光色素であって、該蛍光化合物は、340nmと1100nmとの間に励起を、440nmと1150nmとの間に最高蛍光発光を有する蛍光色素。

【請求項 2】

式 (I) :

【化 1】



(I)

(式中、

R¹ は、水素、アルキル、-CHO、-NO₂、-CH₂R¹¹、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ または -L-R_x であり；

R² は、水素、-CN、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは -CH₂R¹¹ であり；

R³ は、水素、アルキル、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

R⁴ は、-NR¹²R¹³ であり、ここで、R¹² および R¹³ は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニルであり、または R¹² および R¹³ は一緒になって複素環を形成し；

R⁵ は、水素、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

R⁶ および R⁷ は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶ および R⁷ は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶ および R⁷ が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、-R⁶-R⁷- は、-[C(R⁸)₂]_w- (w は 2 または 3) であり、各 R⁸ は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、-OC(O)-アルキル、-OC(O)-アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、-CH₂CN、-CH₂SO₂Me、-CH₂SO₂Ph であり、または隣接する炭素の 2 個の R⁸ は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R⁸ はオキソを形成し；

R¹¹ は、-COOH、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、R¹、R³、R⁵ および R¹¹ の少なくとも 1 つは、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ である)

の化合物。

【請求項 3】

式 (II) :

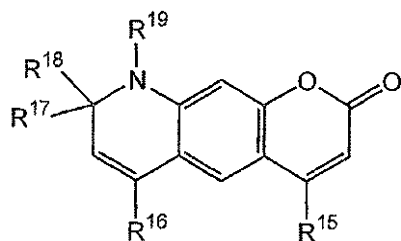
10

20

30

40

【化 2】



(II)

(式中、

R¹⁵ は、水素、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは -CN であり；

10

R¹⁶ は、-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；R⁶ および R⁷ は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリアルまたはヘテロアリアルであり；あるいは

R⁶ および R⁷ は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶ および R⁷ が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、-R⁶-R⁷- は、-[C(R⁸)₂]_w- (w は 2 または 3) であり、各 R⁸ は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、-OC(O)-アルキル、-OC(O)-アリアル、アルキル、アリアル、アルキルカルボニル、アリアルカルボニル、-CH₂CN、-CH₂SO₂Me、-CH₂SO₂Ph であり、または隣接する炭素の 2 個の R⁸ は、それらが結合する炭素と一緒に、アリアルまたはヘテロアリアルを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R⁸ はオキソを形成し；

20

R¹⁷ および R¹⁸ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはハロアルキルであり；

R¹⁹ は、水素、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、-COOH または -SO₂OH で置換されているアルキル、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、-COOH または -SO₂OH で置換されているアリアル、または -L-R_x であり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

30

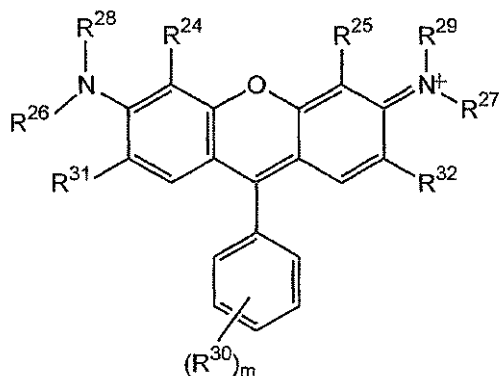
R_x は、反応基である)

の化合物。

【請求項 4】

式 (III)：

【化 3】



(III)

(式中、

m は、1、2、3、4 または 5 であり；

40

R²⁴ および R²⁵ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、-A

50

$s(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；
 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} および R^{29} は、同じまたは異なり、独立して、水素、場合によ
 っては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で
 置換されているアルキルまたはアリールであり；

R^{31} および R^{32} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{30} は、独立して、水素、 $-C(O)R^{33}$ 、ハロゲン、アルキル、アラルキル、ア
 リール、アルキルチオ、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-SO_2R^{33}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $-L-R_x$
 であり；

R^{33} は、ヒドロキシ、 $-NH(CH_2)_jSO_3R^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jAs(=O)(OR^{34})_2$ 、 $-NH(CH_2)_jCOOR^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jOR^{34}$ ま
 たは $-NH(CH_2)_jN(R^{34})_2$ (j は 2～6 の間の整数) であり；

各 R^{34} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリールまたはヘテロアリ
 ールであり；

R^{24} および R^{28} は、場合によっては、5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{25} および R^{29} は、場合によっては、5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{26} および R^{28} は、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されてもよい 5～9 員環の複素環を形成してもよく
 ；

R^{27} および R^{29} は、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で場合によっては置換されてもよい 5～9 員環の複素環を
 形成してもよく；

R^{26} および R^{31} は、場合によっては、水素、アルキル、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で場合によっては置換され
 てもよい 5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{27} および R^{32} は、場合によっては、水素、アルキル、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で場合によっては置換され
 てもよい 5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロ
 アリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原
 子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、
 ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、ア
 リール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$
 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭
 素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の
 R^8 はオキソを形成し；および

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非
 水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭
 素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構
 成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} お
 よび R^{33} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む)

の化合物。

【請求項 5】

10

20

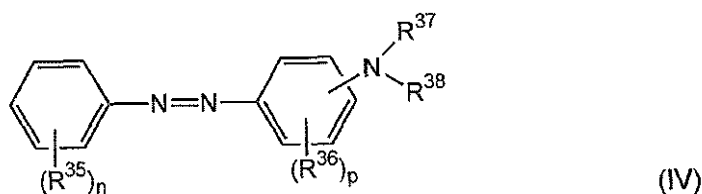
30

40

50

式 (IV) :

【化 4】



(式中、

各 R^{35} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；
 n は、1、2 または 3 であり；

p は、1 または 2 であり；

各 R^{36} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；
 R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ は、 $-\text{[C}(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アルキル}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アリール}$ 、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

R^{37} および R^{38} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アラルキル、アリールまたは $-\text{L}-\text{R}_x$ であり；

R^{39} は、場合によっては、1 個以上の $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ で置換されるアリールまたはヘテロアリールであり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

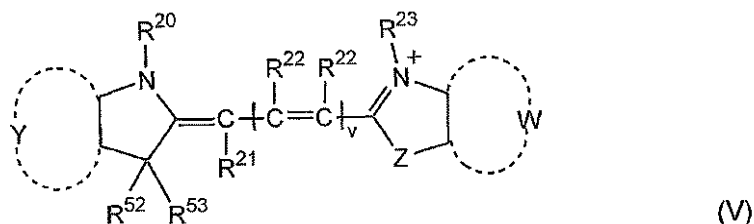
ただし、 R^{35} および R^{36} の少なくとも 1 個は、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である)

の化合物。

【請求項 6】

式 (V) :

【化 5】



(式中、

10

20

30

40

50

v は、0、1、2、3、4、5 または 6 であり；

Y は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=C R^{4\ 6}-$ 、 $=N^+ R^{4\ 7}-$ または $=N-$ であり；

W は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=C R^{4\ 6}-$ 、 $=N^+ R^{4\ 7}-$ または $=N-$ であり；

Z は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-C(R^{4\ 8})_2-$ または $-NR^{4\ 9}-$ であり；

$R^{2\ 0}$ および $R^{2\ 3}$ は、同じまたは異なり、独立して、アルキル、アラルキルまたはヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはトリアルキルアンモニウムで置換されている置換アルキル、または $L-R_x$ であり；

$R^{5\ 2}$ および $R^{5\ 3}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アルキル置換ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

$R^{2\ 1}$ および各 $R^{2\ 2}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、メルカプト、アリアルオキシ、複素環、イミニウムイオン、 $L-R_x$ であり、または 2 個の隣り合う $R^{2\ 1}$ および $R^{2\ 2}$ あるいは任意の 2 個の隣り合う $R^{2\ 2}$ は、場合によっては、アルキル、ハロゲンまたはオキソで置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；あるいは 1 個の炭素をはさんだ 2 個の $R^{2\ 2}$ は、それらが結合する炭素と一緒にあって、場合によっては、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリアルチオ、アルコキシ、アリアルオキシ、オキソ ($=O$)、 $=S$ または $=C(R^{5\ 0})_2$ で置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；

各 $R^{4\ 6}$ および $R^{4\ 7}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリアル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

各 $R^{4\ 8}$ および $R^{4\ 9}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素または場合によっては、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されるアルキルであり；

各 $R^{5\ 0}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、シアノ、 $-C(O)NHR^{4\ 8}$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリアルまたはヘテロアリアルであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒にあって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリアル、アルキル、アリアル、アルキルカルボニル、アリアルカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒にあって、アリアルまたはヘテロアリアルを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

10

20

30

40

50

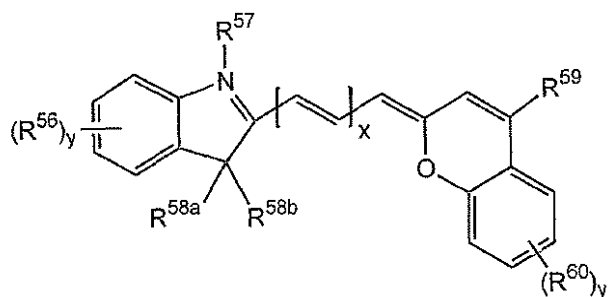
ただし、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{46} 、 R^{47} 、 R^{48} 、 R^{49} 、 R^{52} および R^{53} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である)

の化合物。

【請求項7】

式(VI)：

【化6】



(VI)

10

(式中、

y は、1、2 または 3 であり；

x は、0、1、2 または 3 であり；

各 R^{56} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は2または3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

R^{57} は、アルキル、アラルキルまたはヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノもしくはトリアルキルアンモニウムで置換されているアルキル、または $L-R_x$ であり；

R^{58a} および R^{58b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、またはヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ もしくは $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

R^{59} は、水素、アルキルまたはアラルキルであり；

各 R^{60} は、同じまたは異なり、独立して、水素、 $-NR^{61a}R^{61b}$ 、アルキル、アリール、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{61a} および R^{61b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、またはヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ もしくは $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

L は、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構

20

30

40

50

成され；および

R_x は、反応基であり、

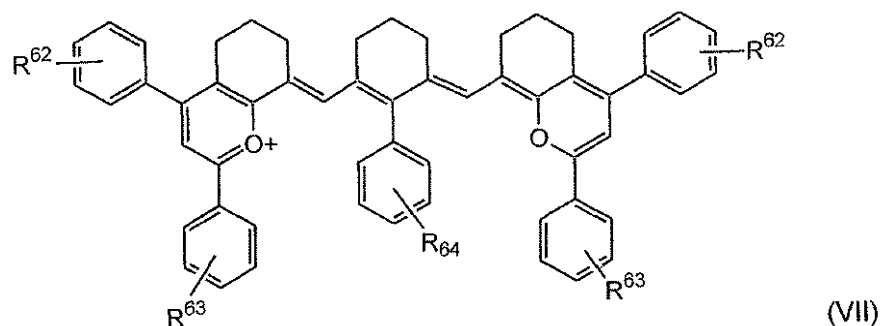
ただし、 R^{56} 、 R^{58a} 、 R^{58b} 、 R^{60} および R^{61a} および R^{61b} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む

の化合物。

【請求項8】

式(VII)：

【化7】



(式中、

各 R^{62} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、アルキル、またはヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ もしくは $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)]_w-$ (w は2または3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

各 R^{63} および R^{64} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、アルキル、またはヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ もしくは $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

L は、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{62} 、 R^{63} および R^{64} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む

の化合物。

【請求項9】

10

20

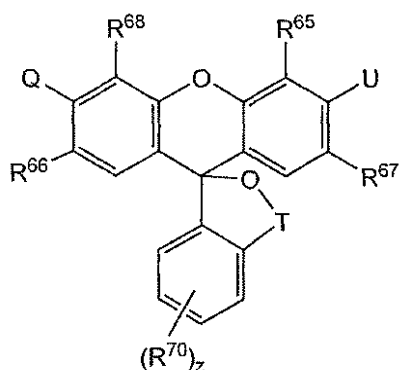
30

40

50

式 (VIII) :

【化 8】



(VIII)

10

(式中、

z は、1、2 または 3 であり；

T は、 $>C=O$ または $>S(=O)_2$ であり；Q は、 $-OR^{71}$ または $-NR^{72}R^{73}$ であり；U は、 $-OR^{74}$ または $-NR^{75}R^{76}$ であり；

各 R^{68} および R^{65} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキル、アリールまたは $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{66} および R^{67} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキルまたは $L-R_x$ であり；

各 R^{70} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素上の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

各 R^{71} および R^{74} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルカルボニルまたはアリールカルボニルであり；

各 R^{72} 、 R^{73} 、 R^{75} および R^{76} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはアリールであり；あるいは

R^{71} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{74} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{72} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{73} および R^{66} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{75} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{76} および R^{67} は、これらが結合する炭素と一緒に、5 または 6 員環の複素環

20

30

40

50

を形成し；

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

R_xは、反応基であり、

ただし、R^{6 5}、R^{6 6}、R^{6 7}、R^{6 8}およびR^{7 1}の少なくとも1つは、－As(＝O)(OR⁶)(OR⁷)または－As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり、あるいは－As(＝O)(OR⁶)(OR⁷)または－As(OR⁶)₂(OR⁷)₂を含む

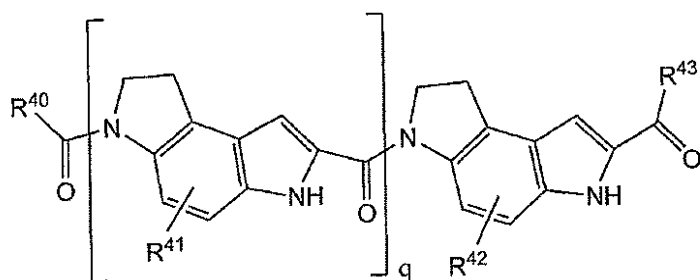
の化合物。

10

【請求項10】

式(IX)：

【化9】



(IX)

20

(式中、

R^{4 0}およびR^{4 3}は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アリール、アルコキシまたは－L－R_xであり、ただし、R^{4 0}およびR^{4 3}の少なくとも1つは－L－R_xであり；

各R^{4 1}は、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、スルホニル、ホスホニル、－As(＝O)(OR⁶)(OR⁷)または－As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

R⁶およびR⁷は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶およびR⁷は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶およびR⁷が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、－R⁶－R⁷－は、－[C(R⁸)₂]_w－(wは2または3)であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、－OC(O)－アルキル、－OC(O)－アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、－CH₂CN、－CH₂SO₂Me、－CH₂SO₂Phであり、または隣接する炭素の2個のR⁸は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素上の2個のR⁸はオキソを形成し；

30

qは、0、1または2であり；

R^{4 2}は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、－As(＝O)(OR⁶)(OR⁷)または－As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

40

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

R_xは、反応基であり、

ただし、R^{4 1}およびR^{4 2}の少なくとも1つは、－As(＝O)(OR⁶)(OR⁷)または－As(OR⁶)₂(OR⁷)₂である)

の化合物。

【請求項12】

アルソナートエステル基を有する色素で置換されているオリゴヌクレオチドを含むオリゴ

50

ヌクレオチド結合体。

【請求項 13】

前記色素が、340nmと1100nmとの間に励起を、440nmと1150nmとの間に最高蛍光発光を有する蛍光色素である請求項12記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

前記色素が、前記オリゴヌクレオチドが標的に結合する前に、報告蛍光団から発せられた蛍光を吸収するように構成された非蛍光性消光物質である請求項12記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

前記色素が、請求項2～10のいずれかに記載の化合物である請求項12記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 16】

さらに、MGB基を含む請求項12～15のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

前記MGB基が極性アルソナート基で置換されている請求項16記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドが、分子標識、Scorpion（登録商標）プローブ、サンライズプローブ、立体配置的に補助されたプローブおよびTaqManTMプローブから選択されたプローブである請求項12～17のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド結合体

20

【請求項 19】

標的核酸を直接的に検出する方法であって、

式(I-I I I)および(V-V I I I)の1種以上の色素化合物に結合体化するオリゴヌクレオチドを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、該オリゴヌクレオチドは、さらに、1以上の極性アルソナート基で場合によっては置換されているMGBを含むステップと；

色素標識オリゴヌクレオチドプローブを生物学的サンプルに添加するステップであって、該プローブは、該標的核酸に対して相補的または実質的に相補的であるステップと；

該プローブを、適切な条件下で十分な時間、該標的核酸とハイブリッド形成させるステップと；

30

該色素から放射された蛍光を検出するステップと；

を含む方法。

【請求項 20】

式(I)～(V I I I)（式中、R_xはホスホルアミダイト基である）でのいずれかの色素試薬を使用して、自動化合成でオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、ホスホルアミダイト方法を使用して、オリゴヌクレオチドの自動化合成を実施して、色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと；

該色素標識オリゴヌクレオチドの-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂を脱保護し、-AsO₃²⁻または-AsO₃H⁻から選択される負電荷極性基を有する色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと；

40

該色素標識オリゴヌクレオチドを反応媒体から単離するステップと；

を含む方法。

【請求項 21】

さらに、前記オリゴヌクレオチド中のMGBを結合体化するステップを含む請求項20記載の方法。

【請求項 22】

前記MGBが、アルソナート基で置換されている請求項21記載の方法。

【請求項 23】

TaqManアッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法で

50

あって、

式（I V）の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式（I－I I I）および（V－V I I I）のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、該プローブは、該蛍光色素が該消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；該色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；該標的が存在する場合、該プローブを該標的とハイブリッド形成させ、該標的をTaqポリメラーゼによって切断するPCR温度サイクルを実行するステップと；該蛍光シグナルを、該切断された色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法。

10

【請求項24】

分子標識アッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、

式（I V）の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式（I－I I I）および（V－V I I I）のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、該プローブは、該蛍光色素が該消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；該色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；該標的が存在する場合、該プローブを該標的とハイブリッド形成させ、それによって該蛍光色素と該消光物質色素とを離すPCR温度サイクルを実行するステップと；該蛍光シグナルを、該消光していない蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法。

20

【請求項25】

Scorpionプローブアッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、

プライマーと、式（I V）の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式（I－I I I）および（V－V I I I）のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、該プローブは、該蛍光色素が該消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと

30

該色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；該プライマーを標的DNAとハイブリッド形成させ、それによって、標的DNA上の該プローブを延長するPCR温度サイクルを実行するステップと；該延長されたプローブを熱変性し、該消光物質色素を切り離すステップと；該延長されたプローブを冷却し、内部再配列を可能にし、標的特異的方法で該蛍光色素に蛍光発光させるステップと；該蛍光シグナルを該蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

（発明の背景）

（発明の分野）

本発明は、結合体化されたアルソン酸から誘導された、強化された極性を有する、新規な蛍光色素、消光物質色素およびマイナーグループバインダに関する。さらに、本発明は、細胞を染色する方法、タンパク質をラベルする方法および自動化合成条件下で極性アルソナート色素を結合体化したオリゴヌクレオチドプローブを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

（関連技術の説明）

50

色素でラベルされた合成オリゴヌクレオチドは、相補的DNAおよびRNA標的用の配列特異的プローブとして、何年も使用されてきている。これらの方法は、特異的核酸標的の識別および定量を可能にするため、法医学的分子生物学および医学的診断において広い用途を有している。DNAプローブの初期の用途は、放射性ラベル（代表的には、 ^{32}P ）を依存していたが、最近の方法は、化学発光および蛍光基を含むレポーター分子を使用する。改良された機器設備によって、これらの分光光度法の感度は、放射性ラベル化の方法に迫るあるいは越えることを可能にしている。高量子収率を持つ蛍光色素は、特に、高感度検出試薬が望まれる、生物学的用途に適している。

【0003】

近年開発された検出方法は、プローブハイブリダイゼーションの検出のために、蛍光強度の直接検出ではなく、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）方法を採用する。このタイプのアッセイでは、消光物質分子の吸収スペクトルがドナー蛍光団の放射スペクトルと重なり、2つの分子が接近した場合、FRETがドナー蛍光団（レポーター）とアクセプター分子（消光物質）との間で起こる。ドナー蛍光団の励起状態のエネルギーは、共鳴双極子誘起双極子相互作用によって隣のアクセプターに移動し、ドナー蛍光の消光に帰する。ドナー分子とアクセプター分子との間のエネルギー移動の効率は、分子間の距離に非常に依存する。蛍光消光の他のメカニズムも知られ、たとえば、衝突または電荷移動消光がある。

【0004】

通常、FRETに基礎を置く検出方法は、ドナー蛍光の消光が効率的であるようにドナー蛍光団およびアクセプター分子が接近するように設計されている。アッセイの間、ドナー分子とアクセプター分子は、蛍光が起こるように離れている。FRET系検出アッセイは、核酸ハイブリダイゼーションおよび酵素化学の分野で発展してきた。FRETハイブリダイゼーションアッセイの数種のフォームが見直されている（非特許文献1）。消光は、また、非FRETメカニズム、たとえば、衝突消光（非特許文献2参照）によっても起こる。

【0005】

レポーター蛍光団と消光物質とを含むオリゴヌクレオチドプローブは、通常、非蛍光性である。しかし、そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、検出可能な蛍光を放出することにより、ハイブリダイゼーションが起こった後、標的配列の存在をレポートすることが可能である。ハイブリダイゼーションまたはPCR方法は、オリゴヌクレオチドプローブの配置を変え、あるいはプローブからの色素を酵素的に切断するので、レポーター蛍光団および消光物質は、物理的に離れはじめ、蛍光はそれによって回復する。DNA増幅が「リアルタイム」PCRで起こる時、蛍光性となるオリゴヌクレオチドプローブを使用するアッセイフォーマットは、詳細が、非特許文献3および非特許文献4）に記載されている。さらに、リアルタイムPCRにおいてDNAプローブとして有用な蛍光団-オリゴヌクレオチド-消光物質結合体は、詳細が、特許文献1、特許文献2および特許文献3に記載されている。

【0006】

しかし、蛍光色素および消光物質は、それらの一般的な疎水性特性により、核酸プローブの物理的特性が実質的に変化するかもしれない。プローブが複数の色素を結合体化している場合、またはプローブが、マイナーグループバイндаまたはインターカレータのように、プリンの多い配列または他の疎水性残基を含む場合、これは、特に難しい問題である。

【0007】

この問題は、数種の極性基、通常、スルホン酸基含有色素をプローブに導入することによって部分的に解決されている。スルホン酸基は、色素分子に負の電荷をもたらし、該電荷は、スルホニル部分によって与えられる増加した極性によって、凝集体を形成する分子の固有の傾向を減らす〔非特許文献5〕。また、環スルホン化も、Cy3、Cy5〔非特許文献6〕、カスケードブルー〔非特許文献7〕の様な多くの色素の明るさを水性媒体中

10

20

30

40

50

で増加し、ローダミン色素の光安定性を大きく増す〔非特許文献8〕。これらの色素のいくつかは、Molecular Probes社から市販されており、商標Alexa Fluor（登録商標）色素として知られている。これらの水溶性色素は、活性化スクシニミジルエステルとして販売され、タンパク質および核酸用の普及したラベルである。極性スルホニル蛍光色素は、特許文献5、特許文献6および特許文献7に記載されている。

【0008】

高い量子効率および親水性を保持するように、向上した特性を有する、生物学的染色のための極性色素、オリゴヌクレオチドプローブおよび極性色素に結合体化するタンパク質を提供すること、および自動化合成により、そのような色素標識プローブを提供することの必要性が業界には残っている。

【特許文献1】米国特許第6,727,356号明細書

【特許文献2】米国特許第6,653,473号明細書

【特許文献3】米国特許第6,323,337号明細書

【特許文献4】米国特許第6,130,101号明細書

【特許文献5】米国特許第5,268,486号明細書

【特許文献6】米国特許第6,399,392号明細書

【非特許文献1】Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press Inc., San Diego, 1992年, p. 311-352

【非特許文献2】Weira, Anal. Chem., 1994年, 第66巻, p. 1500-1506

【非特許文献3】Tyagiら, Nat. Biotech., 1998年, 第16巻, p. 49-53

【非特許文献4】Leeら, Nucl. Acid Res., 1993年, 第21巻, p. 3761-3766

【非特許文献5】Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C.J., Waggoner A. S., 「Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimide esters.」, Bioconj. Chem., 1993年, 第4巻, p. 105-111

【非特許文献6】Wessendorf M. W., Brelje T. C., 「Which fluorophore is brightest? A comparison of staining obtained using fluorocein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red and Cyanine 3.18.」, Histochemistry, 1992年, 第98巻, p. 81-85

【非特許文献7】Whitaker J. E., Haugland R. P., Moore P. L., Hewitt P. C., Resse M., Haugland R. P., 「Cascade Blue derivatives: water soluble, reactive, blue emission dyes evaluated as fluorescent labels and tracers.」, Anal. Biochem., 1991年, 第198巻, p. 119-130

【非特許文献8】Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M. K., Millard P. J., Mao F., Leung W.-Y., Haugland R. P., 「Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates.」, J Histochem Cytochem, 1999年, 第47巻, 第9号, p. 1179-1188

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の簡単な要旨)

本発明は、少なくとも1つのアルソナート基を含む新規な色素、およびそれに結合体化するオリゴヌクレオチドプローブおよびタンパク質を提供する。さらに、本発明は、自動化合成によって、アルソナート含有色素でラベルされたオリゴヌクレオチドを製造する方法、およびアルソナート色素標識オリゴヌクレオチドを使用する方法を提供する。

【0010】

したがって、一実施形態で、本発明は、1種以上のアルソナート基で置換された蛍光化合物を含む極性蛍光色素であって、該蛍光化合物は、340nmと1100nmとの間で励起と、440nmと1150nmとの間に最高蛍光発光とを有する蛍光色素を提供する。

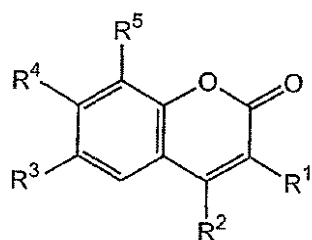
10

【0011】

他の実施形態で、本発明は、式(I)：

【0012】

【化10】



20

(I)

(式中、

R¹ は、水素、アルキル、-CHO、-NO₂、-CH₂R¹¹、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ または -L-R_x であり；

R² は、水素、-CN、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは -CH₂R¹¹ であり；

30

R³ は、水素、アルキル、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

R⁴ は、-NR¹²R¹³ であり、ここで、R¹² および R¹³ は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニルであり、または R¹² および R¹³ は一緒になって複素環を形成し；

R⁵ は、水素、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

R⁶ および R⁷ は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶ および R⁷ は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶ および R⁷ が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、-R⁶-R⁷-は、-[C(R⁸)₂]_w- (wは2または3) であり、各R⁸ は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、-OC(O)-アルキル、-OC(O)-アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、-CH₂CN、-CH₂SO₂Me、-CH₂SO₂Phであり、または隣接する炭素の2個のR⁸ は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個のR⁸ はオキソを形成し；

40

R¹¹ は、-COOH、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷) または -As(OR⁶)₂(OR⁷)₂ であり；

L は、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1~30個の非

50

水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^1 、 R^3 、 R^5 および R^{11} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である）で表される化合物を提供する。

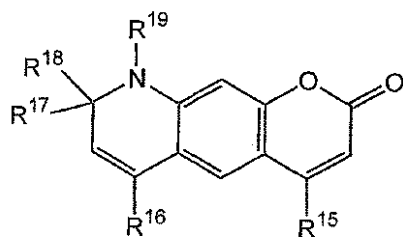
【0013】

他の実施形態で、本発明は、式 (II)：

【0014】

10

【化11】



(II)

(式中、

20

R^{15} は、水素、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは $-CN$ であり；

R^{16} は、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は2または3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

30

R^{17} および R^{18} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはハロアルキルであり；

R^{19} は、水素、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、 $-COOH$ または $-SO_2OH$ で置換されているアルキル、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、 $-COOH$ または $-SO_2OH$ で置換されているアリール、または $-L-R_x$ であり；

L は、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

40

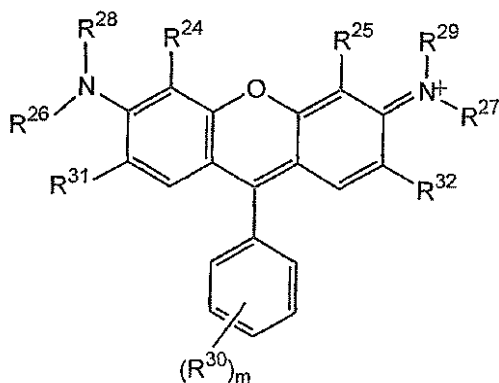
R_x は、反応基である）で表される化合物を提供する。

【0015】

他の実施形態で、本発明は、式 (III)：

【0016】

【化 1 2】



(III)

(式中、

mは、1、2、3、4または5であり；

R²⁴およびR²⁵は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

R²⁶、R²⁷、R²⁸およびR²⁹は、同じまたは異なり、独立して、水素、場合によっては、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂で置換されているアルキルまたはアリールであり；

R³¹およびR³²は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

各R³⁰は、独立して、水素、-C(O)R³³、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アリール、アルキルチオ、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、-SO₂R³³、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)、-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂または-L-R_xであり；

R³³は、ヒドロキシ、-NH(CH₂)_jSO₃R³⁴、-NH(CH₂)_jAs(=O)(OR³⁴)₂、-NH(CH₂)_jCOOR³⁴、-NH(CH₂)_jOR³⁴または-NH(CH₂)_jN(R³⁴)₂(jは2~6の間の整数)であり；

各R³⁴は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

R²⁴およびR²⁸は、場合によっては、5または6員環の複素環を形成してもよく；

R²⁵およびR²⁹は、場合によっては、5または6員環の複素環を形成してもよく；

R²⁶およびR²⁸は、場合によっては、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂で置換されてもよい5~9員環の複素環を形成してもよく；

R²⁷およびR²⁹は、場合によっては、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂で置換されてもよい5~9員環の複素環を形成してもよく；

R²⁶およびR³¹は、場合によっては、水素、アルキル、-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂で置換されてもよい5または6員環の複素環を形成してもよく；

R²⁷およびR³²は、場合によっては、水素、アルキル、-CH₂As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-CH₂As(OR⁶)₂(OR⁷)₂で置換されてもよい5または6員環の複素環を形成してもよく；

R⁶およびR⁷は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶およびR⁷は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶およびR⁷が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、-R⁶-R⁷-は、-[C(R⁸)₂]_w- (wは2または3)であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、-OC(O)-アルキル、-OC(O)-アリール、アルキル、ア

10

20

30

40

50

リール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒にあって、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；および

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} および R^{33} の少なくとも1つは、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり、あるいは $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ を含む)で表される化合物を提供する。

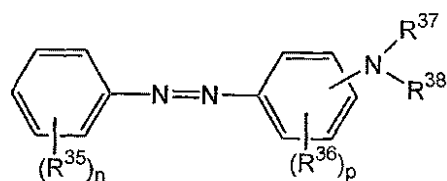
10

【0017】

他の実施形態で、本発明は、式(IV)：

【0018】

【化13】



(IV)

20

(式中、

各 R^{35} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-\text{N}=\text{N}-\text{R}^{39}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；
nは、1、2または3であり；

pは、1または2であり；

30

各 R^{36} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-\text{N}=\text{N}-\text{R}^{39}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；
 R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒にあって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ は、 $-\text{[C}(\text{R}^8)_2]_w-$ (wは2または3)であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アルキル}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アリール}$ 、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒にあって、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

40

R^{37} および R^{38} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリールまたは $-\text{L}-\text{R}_x$ であり；

R^{39} は、場合によっては、1個以上の $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ で置換されるアリールまたはヘテロアリールであり；

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構

50

成され；および

R_x は、反応基であり、

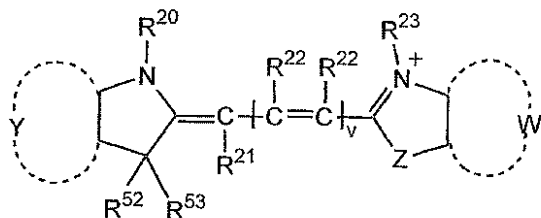
ただし、 R^{35} および R^{36} の少なくとも 1 個は、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である）で表される化合物を提供する。

【0019】

他の実施形態で、本発明は、式 (V)：

【0020】

【化 14】



(V)

(式中、

v は、0、1、2、3、4、5 または 6 であり；

Y は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=CR^{46}-$ 、 $=N^+R^{47}-$ または $=N-$ であり；

W は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=CR^{46}-$ 、 $=N^+R^{47}-$ または $=N-$ であり；

Z は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-C(R^{48})_2-$ または $-NR^{49}-$ であり；

R^{20} および R^{23} は、同じまたは異なり、独立して、アルキル、アラルキルまたはヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはトリアルキルアンモニウムで置換されているアルキル、または $L-R_x$ であり；

R^{52} および R^{53} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アルキル置換ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^{21} および各 R^{22} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、メルカプト、アリアルオキシ、複素環、イミニウムイオン、 $L-R_x$ 、または 2 個の隣り合う R^{21} および R^{22} あるいは任意の 2 個の隣り合う R^{22} は、場合によっては、アルキル、ハロゲンまたはオキソで置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；あるいは 1 個の炭素をはさんだ 2 個の R^{22} は、それらが結合する炭素と一緒にあって、場合によっては、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリアルチオ、アルコキシ、アリアルオキシ、オキソ ($=O$)、 $=S$ または $=C(R^{50})_2$ で置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；

R^{46} および R^{47} はそれぞれ同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリアル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^{48} および R^{49} はそれぞれ同じまたは異なり、独立して、水素または場合によっては、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されるアルキルであり；

各 R^{50} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、シアノ、 $-C(O)NHR$

10

20

30

40

50

^{4 8}であり；

R⁶およびR⁷は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶およびR⁷は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶およびR⁷が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ （wは2または3）であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個のR⁸は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個のR⁸はオキソを形成し；

10

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_xは、反応基であり、

ただし、R²⁰、R²³、R⁴⁶、R⁴⁷、R⁴⁸、R⁴⁹、R⁵²およびR⁵³の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である）で表される化合物を提供する。

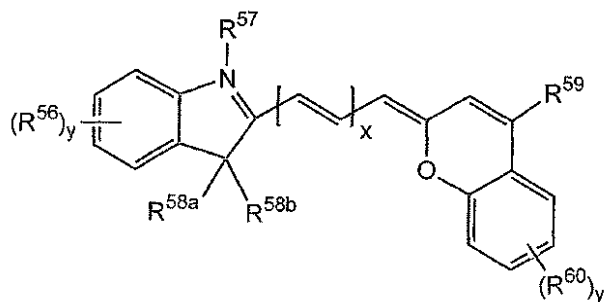
20

【0021】

他の実施形態で、本発明は、式(VI)：

【0022】

【化15】



30

(VI)

(式中、

yは、1、2または3であり；

xは、0、1、2または3であり；

各R⁵⁶は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

R⁶およびR⁷は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶およびR⁷は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶およびR⁷が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ （wは2または3）であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個のR⁸は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個のR⁸はオキソを形成し；

40

R⁵⁷は、アルキル、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはトリアルキルアンモニウムで

50

置換されているアラルキルまたはアルキル、または $L-R_x$ であり；

R^{58a} および R^{58b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

R^{59} は、水素、アルキルまたはアラルキルであり；

各 R^{60} は、同じまたは異なり、独立して、水素、 $-NR^{61a}R^{61b}$ 、アルキル、アリール、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{61a} および R^{61b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

L は、一重共有結合または C 、 N 、 O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

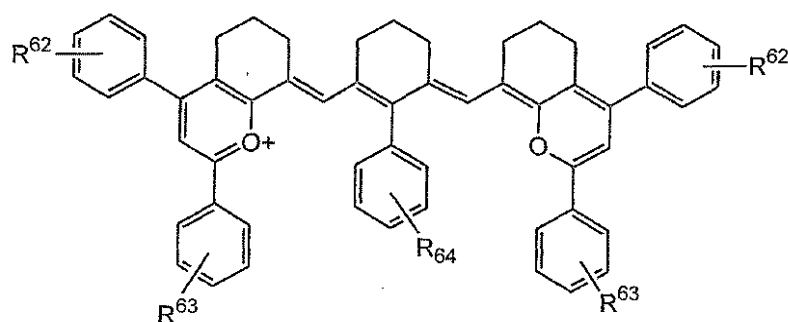
ただし、 R^{56} 、 R^{58a} 、 R^{58b} 、 R^{60} および R^{61a} および R^{61b} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む) で表される化合物を提供する。

【0023】

他の実施形態で、本発明は、式 (VII)：

【0024】

【化16】



(VII)

(式中、

各 R^{62} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、 H 、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭

素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

各 R^{63} および R^{64} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

L は、一重共有結合または C 、 N 、 O および S からなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

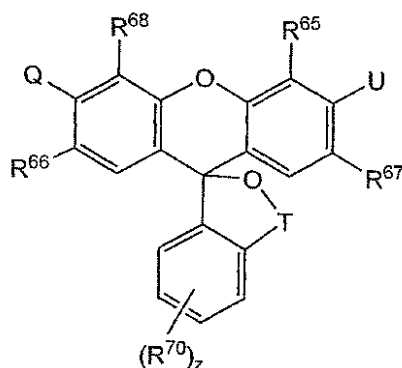
ただし、 R^{62} 、 R^{63} および R^{64} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む)で表される化合物を提供する。

【0025】

他の実施形態で、本発明は、式(VIII)：

【0026】

【化17】



(VIII)

(式中、

z は、1、2または3であり；

T は、 $>C=O$ または $>S(=O)_2$ であり；

Q は、 $-OR^{71}$ または $-NR^{72}R^{73}$ であり；

U は、 $-OR^{74}$ または $-NR^{75}R^{76}$ であり；

各 R^{68} および R^{65} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキル、アリールまたは $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{66} および R^{67} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキルまたは $L-R_x$ であり；

各 R^{70} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、 H 、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は2または3)であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$

、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒にあって、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

各 R^{71} および R^{74} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルカルボニルまたはアリールカルボニルであり；

各 R^{72} 、 R^{73} 、 R^{75} および R^{76} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはアリールであり；あるいは

R^{71} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；あるいは

R^{74} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；あるいは

R^{72} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；あるいは

R^{73} および R^{66} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；あるいは

R^{75} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；あるいは

R^{76} および R^{67} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5または6員環の複素環を形成し；

L は、一重共有結合または C 、 N 、 O および S からなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

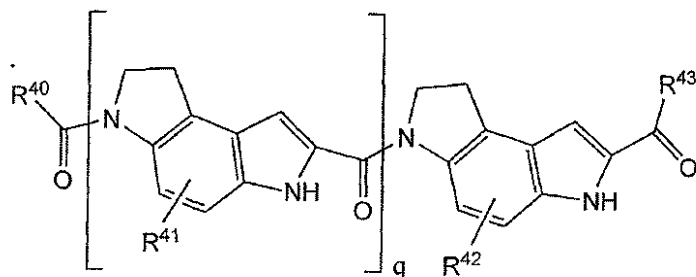
ただし、 R^{65} 、 R^{66} 、 R^{67} 、 R^{68} および R^{71} の少なくとも1つは、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり、あるいは $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ を含むで表される化合物を提供する。

【0027】

他の実施形態で、本発明は、式(IX)：

【0028】

【化18】



(IX)

(式中、

R^{40} および R^{43} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アリール、アルコキシまたは $-\text{L}-\text{R}_x$ であり、ただし、 R^{40} および R^{43} の少なくとも1つは $-\text{L}-\text{R}_x$ であり；

各 R^{41} は、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、スルホニル、ホスホニル、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、 H 、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒にあって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ は、 $-\text{C}(\text{R}^8)$

)₂]_w—(wは2または3)であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、—OC(O)—アルキル、—OC(O)—アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、—CH₂CN、—CH₂SO₂Me、—CH₂SO₂Phであり、または隣接する炭素の2個のR⁸は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個のR⁸はオキソを形成し；

qは、0、1または2であり；

R^{4 2}は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、—As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または—As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素—炭素結合、炭素—窒素結合、窒素—窒素結合、炭素—酸素結合および炭素—硫黄結合から構成され；および

R_xは、反応基であり、

ただし、R^{4 1}およびR^{4 2}の少なくとも1つは、—As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または—As(OR⁶)₂(OR⁷)₂である)で表される化合物を提供する。

【0029】

一つの態様で、本発明は、アルソナートエステル基を有する色素で置換されているオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド結合体を提供する。

【0030】

特に、該色素は、340nmと1100nmとの間に励起を、440と1150nmとの間に最高蛍光発光を有する蛍光色素、あるいはオリゴヌクレオチドが標的に結合する前に、報告蛍光団から発せられた蛍光を吸収するように構成された非蛍光性消光物質である。通常、色素は、式(I～VII)のいずれかによって示される。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、さらに、MGB基を含んでもよい。通常MGB基は、極性アルソナート基で置換されている。

【0031】

さらなる実施形態において、本発明は、オリゴヌクレオチドが、分子標識、Scorpion(登録商標)プローブ、サンライズプローブ、立体配置的に補助されたプローブおよびTaqManTMプローブから選択されたプローブであるオリゴヌクレオチド結合体を提供する。

【0032】

他の態様では、本発明は、標的核酸を直接的に検出する方法であって、式(I—I I I)および(V—V I I I)で表される1種以上の色素化合物に結合体化するオリゴヌクレオチドを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得、該オリゴヌクレオチドは、さらに、1以上の極性アルソナート基で場合によっては置換されているMGBを含み；色素標識オリゴヌクレオチドプローブを生物学的サンプルに添加し、該プローブは、標的核酸に対して相補的または実質的に相補的であり；プローブを、適切な条件下で十分な時間、標的核酸とハイブリッド形成し；色素から放射された蛍光を検出する方法を提供する。

【0033】

他の態様では、本発明は、式(I)～(V I I I)(式中、R_xはホスホルアミダイト基である)でのいずれかの色素試薬を使用して、自動化合成でオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、ホスホルアミダイト方法を使用して、オリゴヌクレオチドの自動化合成を実施して、色素標識オリゴヌクレオチドを得；色素標識オリゴヌクレオチドの—As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または—As(OR⁶)₂(OR⁷)₂を脱保護し、—AsO₃²⁻または—AsO₃H⁻から選択される負電荷極性基を有する色素標識オリゴヌクレオチドを得；色素標識オリゴヌクレオチドを反応媒体から単離する方法を提供する。

【0034】

さらなる態様では、本発明は、TaqManアッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、式(IV)の消光物質色素に結合体化するオリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドと、式 (I-I I I) および (V-V I I I) のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得、各色素は、1 個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあり；色素標識オリゴヌクレオチドプローブを P C R 反応媒体に添加し；標的が存在する場合、プローブを標的とハイブリッド形成させ、標的を T a q ポリメラーゼによって切断する P C R 温度サイクルを実行し；蛍光シグナルを、切断色素からリアルタイムに読み取る方法を提供する。

【0035】

さらに別の態様では、本発明は、分子標識アッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、式 (I V) の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式 (I-I I I) および (V-V I I I) のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得、各色素は、1 個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあり；色素標識オリゴヌクレオチドプローブを P C R 反応媒体に添加し；標的が存在する場合、プローブを標的とハイブリッド形成させ、それによって蛍光色素と消光物質色素とを離す P C R 温度サイクルを実行し；蛍光シグナルを、消光していない蛍光色素からリアルタイムに読み取る方法を提供する。

【0036】

さらに別の態様では、本発明は、S c o r p i o n プローブアッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、プライマーと、式 (I V) の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式 (I-I I I) および (V-V I I I) のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得、各色素は、1 個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあり；色素標識オリゴヌクレオチドプローブを P C R 反応媒体に添加し；プライマーを標的 D N A とハイブリッド形成させ、それによって、標的 D N A 上のプローブを延長する P C R 温度サイクルを実行し；延長された熱変成プローブを熱変性し、消光物質色素を切り離し；延長されたプローブを冷却し、内部再配列を可能にし、標的特異的方法で蛍光色素に蛍光発光させ；蛍光シグナルを蛍光色素からリアルタイムに読み取る方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

先に記載したように、本発明は、新規な蛍光色素、消光物質および強化された極性を持つマイナーグループバインダに関する。さらに、本発明は、極性アルソナート色素でラベルされたオリゴヌクレオチドプローブを、自動化合成の条件下で製造する方法に関する。

1. 定義

本明細書で使用される以下の用語は、以下の意味を持つ。

【0038】

「アルキル」は、1 ~ 10 個の炭素原子を有する、直鎖または分岐状、非環状または環状、不飽和または飽和脂肪族炭化水素を意味し、一方用語「低級アルキル」は、アルキルと同じ意味を持つが、1 ~ 6 個の炭素原子を含む。代表的な飽和直鎖アルキルとして、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどが挙げられ、一方、飽和分岐状アルキルとして、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチルなどが挙げられる。代表的な飽和環状アルキルとして、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、-C H₂-シクロヘキシルなどが挙げられ、一方、不飽和環状アルキルとして、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、-C H₂-シクロヘキセニルなどが挙げられる。また、環状アルキルは、本明細書では、「シクロアルキル」とも言う。不飽和アルキルは、隣り合う炭素原子の間に少なくとも1 個の二重または三重結合を含む（それぞれ、「アルケニル」または「アルキニル」と言う）。代表的な直鎖および分岐状アルケニルとして、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メ

チル-1-ブテンニル、2-メチル-2-ブテンニル、2,3-ジメチル-2-ブテンニルなどが挙げられ、一方代表的な直鎖および分岐状アルキニルとして、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどが挙げられる。他に規定されない限り、本発明のアルキルは、場合によっては、1個以上の任意の本明細書で規定するような「置換基」によって、置換されうる。

【0039】

「アラルキル」は、アリール基によって置換されたアルキルを言う。該アルキルおよびアリール基は本明細書に規定した通りである。他に規定されない限り、本発明のアラルキルは、場合によっては、1個以上の任意の本明細書で規定するような「置換基」によって置換されうる。

10

【0040】

「アルコキシ」は、式： —O—アルキル のラジカルを言う。例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、シクロプロピルオキシ、シクロヘキシルオキシなどが挙げられる。低級アルコキシは、1～5個の炭素を含む基を言う。

【0041】

「アシル」は、式： —C(=O)—R （式中、Rは、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、複素環またはヘテロアリールであり、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、複素環およびヘテロアリールは本明細書で規定する通りである）で表されるラジカルを言う。代表的なアシル基として、アセチル、ベンゾイル、プロピオニル、イソブチリル、 α -ブトキシカルボニルなどが挙げられる。

20

【0042】

「アリール」は、場合によっては置換されているフェニルまたはナフチルを言う。アリールの規範的な置換基として、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルスルホニル、メルカプト、アルキルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル（ここで、アルコキシ部分は1～15個の炭素を含む）、アリールオキシカルボニル（ここで、アリールオキシ部分は6～20個の炭素を含む）またはヘテロアリールカルボニル（ここで、ヘテロアリール部分は3～15個の炭素原子を含む）の1種以上が挙げられる。他に規定されない限り、本発明のアリールは、場合によっては、1個以上の任意の本明細書で規定するような「置換基」によって置換されうる。

30

【0043】

「アリールオキシ」は、式： —O—アリール で表されるラジカルを言う。アリールオキシの一例は、フェノキシである。

【0044】

「アルキルカルボニル」は、式： —C(O)—アルキル で表されるラジカルを言う。例として、メチルカルボニル、エチルカルボニルなどが挙げられる。

【0045】

「アリールカルボニル」は、式： —C(O)—アリール で表されるラジカルを言う。例として、フェニルカルボニルおよびナフチルカルボニルが挙げられる。

【0046】

「アミノアルキル」は、1個以上の水素が、アミノ基で置き換えられたアルキルのサブセットを言う。アミノ基の水素は、さらに、1個以上のアルキル、アリール、シクロアルキル、複素環またはヘテロアリールによって置換されうる。

40

【0047】

「モノアルキルアミノ」および「ジアルキルアミノ」は、1または2個の水素がそれぞれアルキル基で置き換えられたアミノ基を言う。

【0048】

「トリアルキルアンモニウム」は、式： $\text{—N}^+(\text{アルキル})_3$ で表されるカチオンを言う。

【0049】

50

「アルキルチオ」は、式： $-S-$ アルキルで表されるラジカルを言う。アルキルは本明細書で規定する通りである。

【0050】

「アリールチオ」は、式： $-S-$ アリールで表されるラジカルを言う。アリールは本明細書で規定する通りである。

【0051】

「2-シアノアルキル」は、1個以上の水素がシアノ基で置き換えられたアルキルのサブセットを言う。2-シアノアルキルの一例は、シアノエチルである。

【0052】

「炭素環」は、飽和、部分的に飽和（不飽和）あるいは芳香族である、炭素環原子のみを有する、3～7員環単環、または7または14員環2環または3環状環を意味する。炭素環は、さらに、1～5個の本明細書で規定するような置換基で置換されてもよい。芳香族炭素環は、本明細書では、「アリール」とも言う。炭素環の例として、炭素環状ラジカルがあり、シクロヘキサン、シクロヘキセン、ノルボルナン、ニルボルネン、ビスクロ[2.2.2]オクタン、フェニル、ナフタレニル、インダニル、インデニル、アズレニル、フルオレニル、アントラセニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。他に規定されない限り、本発明の炭素環は、場合によっては、1個以上の任意の本明細書で規定するような「置換基」によって置換されうる。

10

【0053】

「電子吸引基」は、電子が不足するあるいは正に帯電した部分を言う。例として、 CN 、 NO_2 、 $-S(O)_2-$ アルキルおよび $-N^+(アルキル)_3$ が挙げられる。

20

【0054】

「ハロアルキル」は、1個以上の水素がハロゲンで置き換えられたアルキルのサブセットを言う。ハロアルキルの一例は、トリフルオロメチルである。

【0055】

「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を言う。

【0056】

「複素環」は、飽和、不飽和または芳香族の、窒素、酸素、硫黄およびヒ素から独立して選択される1～4個の複素原子を含む、5～7員環単環または7～10員環2環、複素環状環であって、窒素および硫黄複素原子は、場合によっては酸化されてもよく、窒素複素原子は、場合によっては、四級化されてもよい環であり、前記任意の複素環が縮合されベンゼン環を形成する2環状環を含む。複素環は、場合によっては、1～5個の置換基で置換されてもよい。複素環は、任意の複素原子または炭素原子を介して結合してもよい。芳香族複素環は、「ヘテロアリール」とも言う。代表的なヘテロアリールは、フリル、ベンゾフラニル、チオフエニル、ベンゾチオフエニル、ピロリル、インドリル、イソインドリル、アザインドリル、ピリジル、キノリニル、イソキノリニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ベンゾキサゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ベンゾイミダゾリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、シンノリニル、フタラジニル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル、ベンゾキサジアゾリル、チアジアゾリル、インダゾリルおよびキナゾリニルである。上に列挙したヘテロアリールに加えて、複素環は、モルホリニル、ピロリジノリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニルなども含む。他に規定されない限り、本発明の複素環は、場合によっては、1個以上の任意の本明細書で規定するような「置換基」によって置換されうる。

30

40

【0057】

「オキソ」は $=O$ を言う。

【0058】

50

「スルホニル」は、式： $-SO_3R$ （式中、Rは、水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたは生物学的適合性カチオンである）で表されるラジカルを言う。

【0059】

「アルキルスルホニル」は、式： $-SO_3-$ アルキルで表されるラジカルを言い、アルキルは本明細書で規定する通りである。

【0060】

「ホスホニル」は、式： $-P(=O)(OR')(OR'')$ （式中、R'およびR''はそれぞれ同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリール、ヘテロアリールまたは生物学的適合性カチオンである）で表されるラジカルを言う。

【0061】

用語本明細書で使用する「置換された」は、前記基の任意のもの（たとえば、アルキル、アルコキシ、アリール、ヘテロアリールおよび複素環）であって、少なくとも1個の水素原子が置換基で置き換えられたものを意味する。関連する用語「置換基」は、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、アシル、アルキルスルホニル、メルカプト、シアノ、ニトロ、 $-COOH$ 、アルキルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、ヘテロアリール、複素環、 $-NR_aR_b$ 、 $-NR_aC(=O)R_b$ 、 $-NR_cC(=O)NR_aR_b$ 、 $-NR_aC(=O)OR_b$ 、 $-NR_aSO_2R_b$ 、 $-C(=O)NR_aR_b$ 、 $-OC(=O)R_a$ 、 $-OC(=O)OR_a$ 、 $-OC(=O)NR_aR_b$ 、 $-NR_aSO_2R_b$ または式： $-J-G-R_a$ 〔式中、Jは、アルカンジイル、置換アルカンジイルまたは直接結合であり、アルカンジイルは、同じまたは異なる炭素原子から取った2個の水素原子を有する2価のアルキルを言い；Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-N(R_b)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-N(R_b)C(=O)-$ 、 $-C(=O)N(R_b)-$ または直接結合（ここで、 R_a 、 R_b および R_c は、同じまたは異なり、独立して、水素、アミノ、アルキル、置換アルキル（ハロゲン化アルキルを含む）、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、複素環または置換複素環であり、あるいは R_a および R_b は、これらが結合する窒素原子と一緒に、複素環または置換複素環を形成する）である〕を言う。

【0062】

「蛍光団」は、400と1150nmとの間の蛍光放射極大を持つ化合物を言う。通常、蛍光団は、電子が非局在化している延長共役システムを有する化合物である。これらの化合物として（括弧内はnmで示した放射極大である）、Cy2TM（506）、GFP（Red Shifted）（507）、YO-PROTM-1（509）、YOYTM-1（509）、カルセイン（517）、FITC（518）、FluorXTM（519）、AlexaTM（520）、ローダミン110（520）、5-FAM（522）、Oregon GreenTM500（522）、Oregon GreenTM488（524）、RiboGreenTM（525）、Rhodamine GreenTM（527）、ローダミン123（529）、Magnesium GreenTM（531）、Calcium GreenTM（533）、TO-PROTM-1（533）、TOTO（登録商標）-1（533）、JOE（548）、BODIPY（登録商標）530/550（550）、Dil（565）、BODIPY（登録商標）（568）、BODIPY（登録商標）558/568（568）、BODIPY（登録商標）564/570（570）、Cy3TM（570）、AlexaTM546（570）、TRITC（572）、Magnesium OrangeTM（575）、フィコエリトリンR&B（575）、ローダミンファロイジン（575）、Calcium OrangeTM（576）、ピロニンY（580）、ローダミンB（580）、TAMRA（582）、Rhodamine RedTM（590）、Cy3.5TM（596）、ROX（608）、Calcium CrimsonTM（615）、AlexaTM594（615）、Texas Red（登録商標）（615）、ナイルレッド（628）、YO-PROTM-3（631）、YOYOTM-3（631）、R-フィコシアニン（642

10

20

30

40

50

）、C-フィコシアニン（648）、TO-PROTM-3（660）、TOTO（登録商標）-3（660）、DiD DiLC（5）（665）、Cy5TM（670）、チアジカルボシアニン（671）、Cy5.5（694）が挙げられる。本発明の目的のために、蛍光団は、アルソナート基のような負電荷極性基1個以上で修飾することができる。先に検討したように、これらの修飾蛍光団の極性の増加によって、オリゴヌクレオチドのような生物物質に結合体化した後でさえそれらの量子収率を高く保持する傾向がある。

【0063】

「オリゴヌクレオチド」は、約3～100個のヌクレオチド単位のオリゴマーを言う。ヌクレオチド単位は、核酸中に自然に見られる主要な複素環塩基（ウラシル、シトシン、チミン、アデニンおよびグアニン）全て、および天然起源のおよび合成された変種、なら
10
びにこれらの塩基の類縁体、たとえば、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-N⁴エテノシトシン、4-アミノピラゾロ[3, 4-d]ピリミジンおよび6-アミノ-4-ヒドロキシ[3, 4, d]ピリミジンを含む。オリゴヌクレオチドの「糖」あるいはグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、2-フルオロリボース、2-Oアルキルまたはアルケニルリボース（ここで、アルキル基は1～6個の炭素を有してもよく、アルケニル基は2～6個の炭素を有してもよい）を含んでもよい。天然起源のヌクレオチドにおいて、および本明細書に記載された変種および類縁体において、デオキシリボースまたはリボース部分は、フラノース環を形成し、グリコシル結合は、β構造であり、プリン塩基は9-位で、ピリミジンは1-位で、ピラゾロピリミジンは1-位で糖部分に結合する。今のところ、本発明によれば、オリゴデオキシリボ
20
ヌクレオチド（ODN）が好ましく、したがって、好ましい糖は、2-デオキシリボースである。ODNのヌクレオチド単位は、業界でよく知られているように、「リン酸塩」骨格によって相互接続している。「オリゴヌクレオチド結合体」は、一般的に、他の有機部分、たとえば色素化合物に共有結合で結合するオリゴヌクレオチドを言う。

【0064】

本明細書で使用される用語「色素」は、通常、オリゴヌクレオチドまたはマイナーグループバインダのような生物物質に結合体化する、検出可能な色素化合物を広く言う。本明細書では、色素複合生物物質を「色素標識」生物物質とも言う。本発明の目的のために、色素は、蛍光色素、消光物質色素またはIR色素が可能である。

【0065】

蛍光色素は、その高い検出感度を蛍光団成分に負い、蛍光団成分は、消光物質も生物物質中に存在する場合、レポーター蛍光団も含む。用語「蛍光団」は、先に規定した通りである。通常は、蛍光色素は、340nmと1100nmとの間に励起を、440と1150nmとの間に最高蛍光発光を有する。

【0066】

消光物質色素あるいは「消光物質」は、レポーター蛍光団が放射しないように、エネルギーポテンシャルを励起したレポーター蛍光団から引き離すように構成されている非蛍光発色団を言う。本発明では、消光物質は、通常は、マイナーグループバインダ（MGB）を有するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドとカップリングされている。

【0067】

本発明のIR色素は、UV視覚領域内で吸収し、IR領域（780～1150nm）近傍で放射する。色素は、IR領域近傍で目に見えない状態で「輝き」、可視光域では非常に熱い金属に似ているので、通常、IR照射線を「熱線」と呼ぶ。したがって、生物学的標識の基本的な光学色素と同様に、IR色素標識は、可視光域内で放射し、現代の光学電子機器によって検出することができる。

【0068】

「リンカー」は、蛍光団を物質に接触させ、結合体化する共有結合の多様な群である。共有結合は、安定な化学的結合の組合せが可能で、場合によっては、単、二重、三重または芳香族炭素-炭素結合、さらに炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合、炭素-硫黄結合、リン-酸素結合およびリン-窒素結合を含む。リンカーは、通常、少なく
40
50

とも2官能性である。すなわち、2個の官能基を含み、そのうちの1個は蛍光団に結合するものであり、他は反応基に結合するものである。結合は、通常、カルボキシレートエステル、アミド、エーテル、チオエーテル、スルホンアミド、尿素、ウレタン、またはホスホルアミダイト部分を形成することになる。たとえば、多くの蛍光団は、カルボキシレートエステル、カルボキシアミド、またはスルホンアミド部分の形成によって、リンカーに容易にカップリングすることができるようにするカルボン酸またはスルホン酸基を有する。同様に、リンカーは、反応基にカップリングすることができ、これによって、興味のある物質に結合体化することになる。

【0069】

通常、リンカーは、C、N、O、PおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を有し、エーテル、チオエーテル、アミン、エステル、カルボキサミド、スルホンアミド、ヒドラジン結合および芳香族またはヘテロ芳香族結合の任意の結合で構成されている。共有結合は、直鎖または環状、あるいはこれらの組合せであってもよい。直鎖結合の例として、ポリメチレン、ポリエチレングリコール、アルキルスルホニル、アルキルチオ、アミノアルコールおよびジオールが挙げられる。「アミノアルコール」は、式： —NH—Y—O— （式中、Yは、アルカンジイルまたは置換アルカンジイルである）で表されるジラジカルを言い、アルカンジイルは、異なる炭素原子から取った2個の水素原子を有する2価のアルキルを言う。「ジオール」は、式： —O—Y—O— （式中、Yは先に規定した通り）で表されるジラジカルを言う。環状基を有するリンカーは、通常、ヌクレオシドまたは修飾されたヌクレオシドを含む。これらのリンカーは、ホスホルアミダイト反応基と結合し、これは次いで、オリゴヌクレオチドの伸長骨格に簡単にカップリングすることができるので、オリゴヌクレオチドの自動化合成において特に有用である。リンカー中のヌクレオシドのリボース基の5'-末端ヒドロキシ基は、反応シーケンス中で次の塩基とカップリングすることによって、オリゴヌクレオチド鎖の伸長を継続することができる。リンカー中の5'-末端ヒドロキシ基は、通常、4, 4'-ジメトキシトリチル（DMTr）基によって保護されている。さらに、ヌクレオシドリンカーの塩基上の他の基は、自動化合成の間保護が求められるかもしれない。保護すべき部位および使用すべき保護剤の認定は、当業者の知識の範囲内である。保護基は、通常、所定のリンカー内の1～30個の非水素原子は除外され数えられない。

【0070】

「反応基」または「 R_x 」は、色素を興味のある物質に反応結合体化しうる官能基を言う。通常、該物質は、色素の共有結合に関して適切な官能基を有する「生物物質」または「生体分子」である。とりわけ、本発明の色素を結合体化するのに特に有用な適切な「生物物質」または「生体分子」として、抗原、ステロイド、ビタミン、薬物、ハプテン、代謝物、毒物、環境汚染物質、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、核酸高分子、炭水化物、脂質、イオン錯形成部分および非生物学的な高分子が挙げられる。あるいは、生物物質として、細胞、細胞系、細胞フラグメントまたは非細胞粒子が挙げられる。これらの中で、例として、ウィルス粒子、細菌粒子、ウィルス成分、生体細胞（たとえば、動物細胞、植物細胞、細菌、酵母、または原生生物）、あるいは細胞成分が挙げられる。好ましい生物物質は、オリゴヌクレオチド、アミノ酸、ペプチド、たんぱく質、チラミン、ポリサッカライド、イオン錯形成部分、ヌクレオチド、核酸高分子、ハプテン、薬物、ホルモン、脂質、脂質集合体、高分子、高分子微粒子、生物細胞またはウィルスが挙げられる。一実施形態では、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸高分子のような生体高分子の結合体も、本発明の追加の色素を含む、第2蛍光色素または消光物質色素でラベルされ、エネルギー移行ペアを形成する。

【0071】

さらに典型的には、生物物質は、自動化合成における、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの成長鎖である。物質は、CPGまたはポリスチレンのような、通常オリゴヌクレオチドの自動化合成において使用される固形支持体も含みうる。結合体化されるべき物質に色素を結合するために使用される反応基の選択は、通常、複合すべき物質の反

10

20

30

40

50

応部位および所望の共有リンカーのタイプまたは長さに依存する。先に記載した物質に関して存在する官能基のタイプは、通常、アミン類、チオール類、アルコール類、フェノール類、アルデヒド類、ケトン類、ホスフェート類、イミダゾール類、2置換アミン類、アルソナートエステル類、プリン類、ピリミジン類、カルボン酸類、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチドは、同じまたは異なってもよい複数の色素と結合体化してもよい。たとえば、消光物質色素とレポーター蛍光団とを同じオリゴヌクレオチドに結合体化してもよい。反応条件の注意深いコントロールによりある選択性を得ることができるが、標識の選択性は、適正な反応基を持つ色素の選択によって得るのが最も良い。

【0072】

10

通常、 R_x は、アミン、チオール、アルコール、アルデヒドまたはケトンと反応するであろう。一実施形態では、 R_x は、アクリルアミド、カルボン酸の活性化エステル、アシルアジド、アシルニトリル、アルデヒド、アルキルハライド、アミン、無水物、アニリン、アリールハライド、アジリジン、ボロネート、カルボン酸、ジアゾアルカン、ハロアセタミド、ハロトリアジン、ヒドラジン（ヒドラジン類を含む）、イミドエステル、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ホスホルアミダイト、スルホニルハライドまたはチオール基である。好ましくは、 R_x は、カルボン酸、サクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ホスホルアミダイト、アミン、ハロアセタミド、ヒドラジン、イソチオシアネート、マレイミド基、またはアジドパーフルオロベンザミド基である。

20

【0073】

ある実施形態では、カルボン酸のサクシンイミジルエステルまたはペンタフルオロフェニルエステルである R_x が、色素-オリゴヌクレオチド結合体を製造するために特に有用である。カルボキシル性官能基のこれらの活性化形態は、その上にあるアミン基のような反応部位を介してオリゴヌクレオチドまたは固形支持体に結合体化する。

【0074】

他の実施形態では、ホスホルアミダイトである R_x が、オリゴヌクレオチドの自動化合成において特に有用である。ホスホルアミダイトは、弱酸性条件下でヒドロキシ基に対して反応性があり、自動化オリゴヌクレオチド合成において、オリゴヌクレオチドの成長鎖の 5'-末端ヒドロキシ基と容易にカップリングするであろう。代表的なホスホルアミダイトは、シアノエチルホスホルアミダイトである。

30

【0075】

「色素試薬」は、リンカーを介して反応基とカップリングする色素を言う。色素試薬は、オリゴヌクレオチド配列中の可変性位置に導入することができる構成ブロックである。具体的な必要性に依るが、色素試薬は、固形支持体の反応性部位に直接的に反応することができ、塩基付加の合成シーケンスを開始することができる。色素試薬は、オリゴヌクレオチドの成長鎖と反応することができ、該試薬の異なる部分上の保護ヒドロキシ基を介して、配列の伸長を継続することができる。最終的に、色素試薬は、5'-末端で、オリゴヌクレオチドの伸長を止めるために使用することもできる。先に検討したように、色素がホスホルアミダイト基にカップリングしている「ホスホルアミダイト試薬」は、自動化オリゴヌクレオチド合成にとって、特に有用である。

40

【0076】

「極性基」は、より大きな電気陰性度と電子をひきつける傾向を持つ原子群全体を言い、近くの原子または原子群と分け合っている。極性基は、必ずというわけではないが、通常、負電荷である。極性基の例として、スルホン酸 ($-SO_3H$)、ホスホン酸 ($-P(=O)(OH)_2$)、アルソン酸 ($-As(=O)(OH)_2$) およびこれらのエステル類および塩類が挙げられる。

【0077】

用語「アルソナート」は、一般的に、遊離アルソン酸 ($-As(=O)(OH)_2$) で置換された有機部分および／またはアルソナートエステルを言う。用語「アルソナートエ

50

ステル」は、遊離のアルソン酸の 2 個の保護形態のどちらか 1 つを言う。特に、アルソナートエステルは、式： $-As(=O)(OR)_2$ で表されるアルソナートジエステルまたは式： $-As(OR)_4$ で表されるアルソナートオルソエステルでありうる。アルソナートジエステルは、類似の変換反応でケタール形態とし、式： $-As(OR)_4$ で表されるアルソナートオルソエステルを得るのが有利である。

【0078】

各 R は、同じまたは異なり、独立して、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり、通常、アルキル-OH、アリール-OH およびヘテロアリール-OH の反応残基である。さらに典型的には、アルソナートエステルの 2 個の任意の R 基は互いに結合し、キレート形態をとってもよい。換言すれば、色素化合物のアルソン酸置換基は、2 個または 3 個の炭素原子によって離された 2 個の酸素原子を有するキレート化剤と反応させることによって、キレート化エステル形態に変換することができる。そのようなキレート化剤として、エチレングリコール、グリコールアルデヒド、グリオキザール、グリコール酸、グリオキシル酸、プロピレングリコール、ピナコール (2, 3-ジメチル-2, 3-ブタンジオール)、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオン酸、マロンアルデヒドおよびピロカテコールが挙げられる。

10

【0079】

アルソナートジエステルおよびアルソナートオルソエステル中の R 基の存在によって、アルソン酸の電荷が中和され、それによって、自動化オリゴヌクレオチド合成におけるラベルされた色素試薬の親和性が強化される。本明細書の後で検討するように、R 基は、容易に除去され、負電荷アルソン酸極性基を得る。

20

【0080】

「アルキルアルソナート」は、1 個以上のアルソナート基で置換されたアルキルを言う。「アリールアルソナート」は、1 個以上のアルソナート基で置換されたアリール基を言う。「ヘテロアリールアルソナート」は、1 個以上のアルソナート基で置換されたヘテロアリールを言う。

【0081】

「固形支持体」は、オリゴヌクレオチド合成に沿う要請のある任意の支持体を言い、たとえば、ガラス、制御孔ガラス (CPG)、高分子材料、ポリスチレン、被覆ガラスなどが挙げられる。「固形支持体」は、上で列挙した材料で作られたビーズ、ハチ巣、アレイまたはチップの形で使用することができる。

30

【0082】

「生物学的適合性カチオン」は、生物学的適合性のある、正に帯電したイオンであって、生体分子に悪影響を与えないものを言う。なかでも、適切なカチオンとして、 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} および Mg^{2+} 、アンモニウム、アルキルアンモニウムまたはアルコキシアンモニウム塩、あるいはピリジニウム塩が挙げられる。

【0083】

「マイナーグロブバインダ」(MGB) は、分子量が約 150 ~ 約 2000 ドルトンの分子のラジカルを言い、これは、非挿入方法で、会合定数が約 $10^3 M^{-1}$ を超える、2 本鎖 DNA、RNA またはそのハイブリッドのマイナーグロブ中に結合する。そのような化合物は、大きく変化する化学構造を有するので、公知のマイナーグロブ結合化合物の全ての一般化学式は示せないが、DNA のマイナーグロブ中に結合しうる化合物は、一般的に言えば、半月形の 3 次元構造を有する。通常、MGB は、ペプチド結合を介して互いにカップリングした縮合複素環の数種の単位 of 化学構造を有する。

40

【0084】

従来技術の殆どのマイナーグロブ結合化合物は、2 本鎖 DNA の B 型の領域が多い、A-T (アデニンおよびチミン) が強く好まれる。米国特許第 5,801,155 号明細書は、共役的に結合するマイナーグロブバインダ (MGB) を有するオリゴヌクレオチドは、相補的標的に関して、修飾されたオリゴヌクレオチドより配列特異的であると開示する。さらに、MGB-オリゴヌクレオチド結合体は、より短いオリゴヌクレオチドとハ

50

イブリゼーションをされた非修飾オリゴヌクレオチドと比較した場合、相補的DNA標的鎖とのハイブリッド安定性を実質的に増加する。

2. 新規な色素および色素試薬

先に記載したように、強化された極性を持つ色素は、主にその高い水溶性および生物学的親和性のために、数多くの有用な適応を提供する。スルホン酸極性基を有する色素は、核酸およびタンパク質をラベルするために、さらに生体物質を染色するために、広く使用されている。市販の色素のいくつかの例を図1および2に示す。

【0085】

アルソン酸 $\text{HAs}(\text{=O})(\text{OH})_2$ の有機誘導体は、19世紀から公知であり、アゾ色素に水溶性を与える。多くのこれらの化合物が、新しい色素および薬物の研究において Paul Ehrlich のような有名な科学者によって合成された。毒性が殆どないスルホネート類は、高極性が必要不可欠な色素特性である場合、殆どの適用のために次の世紀でより普及し始めた。今日、比較的少数のアルソン色素が、殆ど分析化学および生物医学研究における適用のために、使用されている。Th、U、Zrの検出用 [Anal. Chim. Acta 71, 375, 1974]、およびCd、Zn検出 [Anal. Chim. Acta 1974, 68, 73] 用の、よく知られ、広く使用されている試薬 Arsenazo III (2, 7-ビス[(2-アルソノフェニル)アゾ]-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸) は、Savvin S. B. によって1959年合成された [見本用に Basargin, N. N., Ivanov, V. M., Kuznetsov V. V. および Mikhailova A. V. “40 Years since the Discovery of the Arsenazo III Reagent” J. Anal. Chem. 55, No. 3, 2000 参照のこと]。アルソン酸色素は、タンパク質に関し特異的親和性を持つことが実証され、したがって、生体物質の選択的染色またはラベル付けに使用することができる。アルソノフェニルジアゾニウム塩とタンパク質との反応の結果得られるアルソノフェニルアゾタンパク質、アゾ色素は、凝結防止特性および抗リンパ腫特性を持つことが報告されている [Broome J. D. および Kidd J. G. “The Anticoagulant and Antilymphoma Properties of Arsenic Azoproteins: I. Anticoagulant Effects of Arsenic Azoproteins in Vivo and in Vitro: Comparison of Arsenicals as Anticoagulants and as Antilymphoma Agents: Molecular Structure in Relation to Anticoagulant and Antilymphoma Properties” J. Exp. Med., 120: 449-466, 1964]。アゾフェニルアルソン色素は、サブチリシンと結合体を形成することが示されている [Glazer A. N. “The Time-Dependent Specific Interaction of 4-(4'-Aminophenylazo)phenylarsonic Acid with Subtilisins” Proc. Nat. Acad. Sci., Biochemistry, 59, 996-1002, 1968]。

【0086】

前記アルソン酸色素は蛍光性ではない。したがって、蛍光性アルソン酸色素は、その極性および高い検出可能蛍光シグナルのため、タンパク質および核酸の細胞染色およびラベル付けのような技術において、新しい利点を提供する。その高い感受性蛍光シグナルのため、これらの蛍光色素は、一般的に、非常に低い濃度で使用され、環境に悪影響を及ぼすことなく、あるいは非常に小さな影響しか及ぼさない。

【0087】

3価のヒ素、またはAs(III)系蛍光色素は、そのチオールに対する高い親和性のため、生物学的ラベルとして使用される(たとえば、米国特許第6, 933, 384号、6, 686, 458号、6, 451, 569号、6, 054, 271号、6, 008, 3

10

20

30

40

50

78号および5, 932, 474号明細書参照)。しかし、ヒ素(III)化合物の毒性に関する懸念によってその適用が非常に制限されている。

【0088】

As(V)としても知られている5価のヒ素化合物は、As(III)よりも毒性がずっと少ない。したがって、本発明は、1個以上のアルソン酸基またはアルソナートエステル基で置換された新規な蛍光色素および消光物質色素を提供する。色素中に存在する各エステル基は、脱保護された時、負電荷を提供することができ、それによって、そのような色素でラベルされたオリゴヌクレオチドプローブの特性を改善することができる。

【0089】

アルソン酸基は、数多くの公知の色素相溶性がある。アルソン酸基は、アルソン酸基が色素のスペクトル性質、たとえば、励起波長および放射波長、量子収率、蛍光性の寿命において、測定可能な変化を引き起こさない場合、所定の色素と併用可能である。アルソン酸基で修飾されうる色素の例として、以下の発色団およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。ローダミン、キサンチン、カルボシアニン、フタロシアニン、ポルフィリン、トリフェニルメタン、スクアライン、チオスクアライン、クロコニウム色素、テトラゾリウム色素、インジゴ、アゾ色素、キノン、フェナジンおよびサフラニン、フェノチアジン、クマリン、フェナンチリジン、アクリジンおよびアクリドン、フルオレンおよびフルオレノン、4-ボラー3a, 4a-ジアザ-s-インダセン、1, 8-ナフタルイミド。他の置換基として、極性の増強のための、スルホネートおよびホスホネートを挙げることができる。アルソン酸基を有するフッ化色素は、強化された光安定性およびより高い蛍光量子収率とともに、増強された極性および輝度を発揮しうる。フッ素原子は、複素環状環およびカルボシアニン架橋部に導入されうる。

【0090】

さらに、本発明は、本発明の色素、リンカーおよび反応基を含む色素試薬を提供する。色素試薬は、オリゴヌクレオチド、マイナーグループバイндаまたは固形支持体に反応して結合体化しうる。さらに具体的には、本発明は、極性アルソン酸置換基がそのエステル形態でマスクされている、修飾された極性蛍光および消光物質色素試薬を提供する。アルソナートエステルを含む色素は、オリゴヌクレオチドの合成のホスホルアミダイト方法に適合する有機溶剤に可溶である。色素の負の電荷を除去することによって、色素を自動化オリゴヌクレオチド合成に組み込むことができる。負の電荷は、合成後復元され、1個以上の極性基を持つ色素でラベルされたオリゴヌクレオチドを与える。したがって、これらのホスホルアミダイト試薬は、5'-ホスホルアミダイト試薬を使用する逆合成において、アルソナート色素を、合成オリゴヌクレオチドの5'末端、内部位置、または3'末端に導入するために使用することができる。オリゴヌクレオチド合成の完了時、アルソナートエステル類は、脱プロトン化することができ、負の電荷は復元される。

【0091】

したがって、一実施形態で本発明は、アルソナート極性基を有する蛍光色素、およびそのような蛍光色素を含む色素試薬を提供する。該蛍光色素は、340nmと1100nmとの間に励起を、440と1150nmとの間に最高蛍光発光を有する。

【0092】

具体的には、一実施形態では、本発明の化合物は、1個以上のアルソナート基によって置換された7-アミノコラミン誘導体である。本発明の7-アミノコラミン色素は、以下の一般式(I)で示される。

【0093】

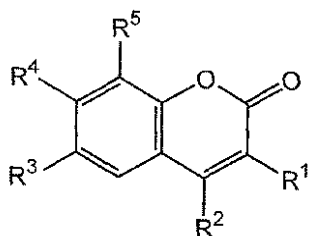
10

20

30

40

【化 19】



(I)

(式中、

R^1 は、水素、アルキル、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{R}^{11}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ または $-\text{L}-\text{R}_x$ であり； 10

R^2 は、水素、 $-\text{CN}$ 、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは $-\text{CH}_2\text{R}^{11}$ であり；

R^3 は、水素、アルキル、ハロゲン、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；

R^4 は、 $-\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ であり、ここで、 R^{12} および R^{13} は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニルであり、または R^{12} および R^{13} は一緒になって複素環を形成し；

R^5 は、水素、ハロゲン、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり； 20

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ は、 $-\text{[C}(\text{R}^8)_2\text{]}_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アルキル}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アリール}$ 、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し； 30

R^{11} は、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

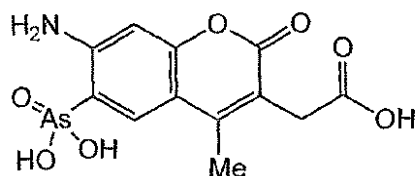
R_x は、反応基であり、

ただし、 R^1 、 R^3 、 R^5 および R^{11} の少なくとも 1 つは、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である。) 40

R^1 および R^2 の少なくとも 1 個が $-\text{L}-\text{R}_x$ を含む場合、式 (I) は、オリゴヌクレオチド、MGB または固形支持体に結合しうるアルソナート色素試薬を示す。通常、 R^{11} が、 $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分にカップリングすべき反応部位を提供する。たとえば、 R^{11} が $-\text{COOH}$ の場合、色素は、 $-\text{NH}_2$ 基を有する $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分に容易にカップリングすることができ、アルソナート色素試薬を得る。そのようなアルソン酸色素のカルボン酸誘導体を以下に図示する。

【0094】

【化 20】



リンカーは、必ずしもそうではないが、通常、アルキレン鎖のような原子の直鎖基である。 $-\text{NH}_2$ 基を有しているに加えて、リンカーは、通常、反応基 R_x とさらにカップリングするために、他の反応性部位を有する。

10

【0095】

市販の固形支持体のほとんどが、CPGのように、アミン基を持つので、固形支持体に結合するために、 R_x はアミン反応基である可能性がある。アミン反応基の例として、サクシンイミジルまたはペンタフルオロフェニルカルボキレートエステルのようなカルボン酸および活性化カルボン酸が挙げられる。特に自動化合成の間、オリゴヌクレオチドに結合するためには、 R_x はホスホルアミダイト基である。さらに、自動化オリゴヌクレオチド合成の目的のためには、そのような色素試薬中の極性アルソン酸基は、通常、それらのエステル形態、特にそれらのアルソナートオルソエステル形態にマスクされる。

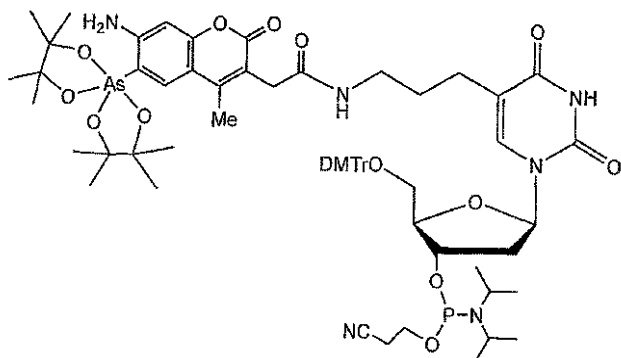
【0096】

式 (I) の色素試薬の具体的な例では、以下の構造を持つ。

20

【0097】

【化 21】



30

この例では、7-アミノコラミンがアルソナートオルソエステルで置換されている。さらに、リンカー部分は、5-ヒドロキシ保護ヌクレオシド（たとえば、2-デオキシウリジン）を含む。反応基はホスホルアミダイトであり、これは、自動化合成中、容易にオリゴヌクレオチドとカップリングすることができる。脱保護後、DMTr保護5-ヒドロキシは、塩基付加の鎖を延ばすことができ、色素標識オリゴヌクレオチドの合成を完成する。負電荷アルソン酸基とは異なり、アルソナートエステル基は、自動化合成の反応条件と適合性がある。

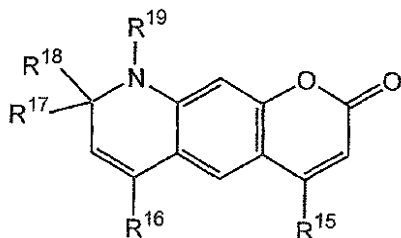
【0098】

40

他の実施形態では、本発明の化合物は、一般式 (II) で示される。

【0099】

【化 2 2】



(II)

(式中、

10

R^{15} は、水素、アルキル、アラルキル、ハロアルキルまたは $-CN$ であり；

R^{16} は、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

20

R^{17} および R^{18} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはハロアルキルであり；

R^{19} は、水素、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、 $-COOH$ または $-SO_2OH$ で置換されているアルキル、場合によってはヒドロキシ、ハロゲン、 $-COOH$ または $-SO_2OH$ で置換されているアリール、または $-L-R_x$ であり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

30

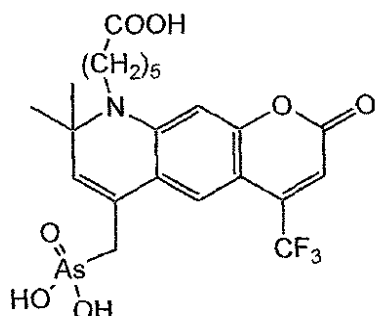
R_x は、反応基である。）

通常、 R^{19} が、 $-L-R_x$ 部分にカップリングすべき反応部位を提供する。たとえば、 R^{19} が $-COOH$ 基を含む場合、色素は、 $-NH_2$ 基を有する $-L-R_x$ 部分に容易にカップリングすることができ、アルソナート色素試薬を得る。あるいは、 R^{19} は $-OH$ 基を含んでもよく、これは、ホスホルアミダイト基に直接カップリングすることができる。色素試薬に容易に変換することができる色素として以下の例が示される。

【0100】

【化 2 3】

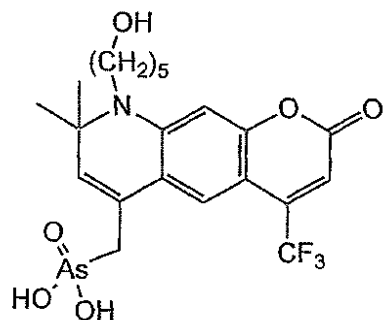
40



【0101】

50

【化 2 4】

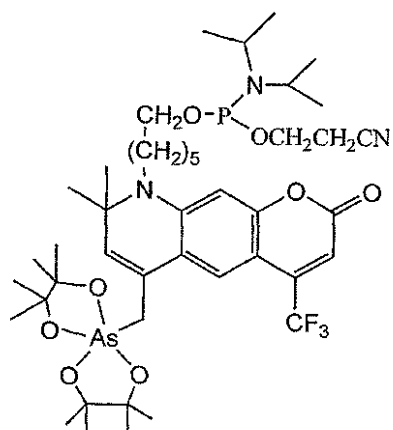


10

式 (I I) の色素試薬の例は、以下の構造によって図示される。

【 0 1 0 2】

【化 2 5】



20

この例では、リンカーはアルキレン鎖であり、反応基はホスホルアミダイト基である。アルソン酸極性基は、オルソエステル形態でマスクされる。自動化オリゴヌクレオチド合成では、オリゴヌクレオチドプローブの所定の配列において、最後の構成ブロックとして使用することができる。

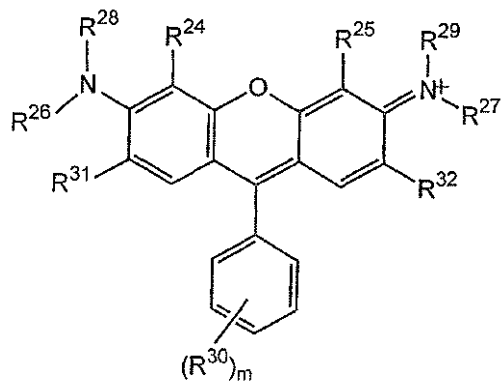
30

【 0 1 0 3】

他の実施形態で、本発明の化合物は、1 個以上のアルソナートエステル基で置換されたローダミンである。これらの化合物は、以下の一般式 (I I I) で示される。

【 0 1 0 4】

【化 2 6】



40

(III)

(式中、

m は、1、2、3、4 または 5 であり；

R²⁴ および R²⁵ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、-As (=O) (OR⁶) (OR⁷) または -As (OR⁶)₂ (OR⁷)₂ であり；

50

R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} および R^{29} は、同じまたは異なり、独立して、水素、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されているアルキルまたはアリールであり；

R^{31} および R^{32} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ハロゲン、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{30} は、独立して、水素、 $-C(OR^3)$ 、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アリール、アルキルチオ、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-SO_2R^{33}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $-L-R_x$ であり；

R^{33} は、ヒドロキシ、 $-NH(CH_2)_jSO_3R^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jAs(=O)(OR^{34})_2$ 、 $-NH(CH_2)_jCOOR^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jOR^{34}$ または $-NH(CH_2)_jN(R^{34})_2$ (j は 2～6 の間の整数) であり；

各 R^{34} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

R^{24} および R^{28} は、場合によっては、5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{25} および R^{29} は、場合によっては、5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{26} および R^{28} は、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されてもよい 5～9 員環の複素環を形成してもよく；

R^{27} および R^{29} は、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されてもよい 5～9 員環の複素環を形成してもよく；

R^{26} および R^{31} は、場合によっては、水素、アルキル、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されてもよい 5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^{27} および R^{32} は、場合によっては、水素、アルキル、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されてもよい 5 または 6 員環の複素環を形成してもよく；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し；および

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} および R^{33} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む。)

一実施形態では、 R^{26} 、 R^{27} 、 R^{28} および R^{29} は、それぞれ、水素である。 R^{24} および R^{25} は、それぞれ、アルソン酸である。したがって、式 (III) の色素は、以下の構造を有する。

10

20

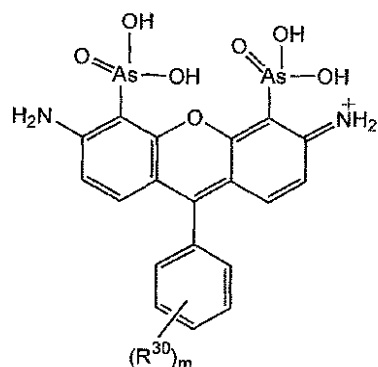
30

40

50

【0105】

【化27】

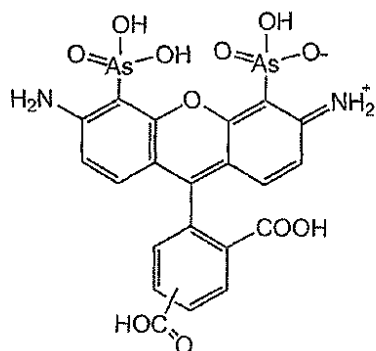


10

通常、 R^{30} が $-L-R_x$ 部分にカップリングすべき反応部位を提供する。たとえば、 R^{30} が $-COOH$ の場合、色素は、 $-NH_2$ 基を有する $-L-R_x$ 部分に容易にカップリングし、アルソナート色素試薬を得ることができる。アルソン酸色素のそのようなカルボン酸誘導体の例を以下に図示する。

【0106】

【化28】



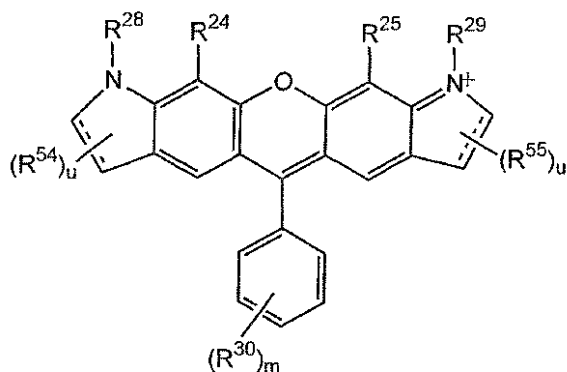
20

他の実施形態では、 R^{26} および R^{31} は、場合によっては、5 または 6 員複素環を形成してもよく、 R^{27} および R^{32} は、場合によっては、5 または 6 員複素環を形成してもよい。規範的な化合物は、式 (III A) および (III B) による、以下の分子フレームワークを有し、ここで、各 5 または 6 員環は、場合によっては、それぞれ、 R^{54} および R^{55} で置換されている。各 R^{54} および R^{55} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である。点線の結合は、N 含有複素環において、異なる不飽和の度合いがある可能性があることを示す。

30

【0107】

【化29】



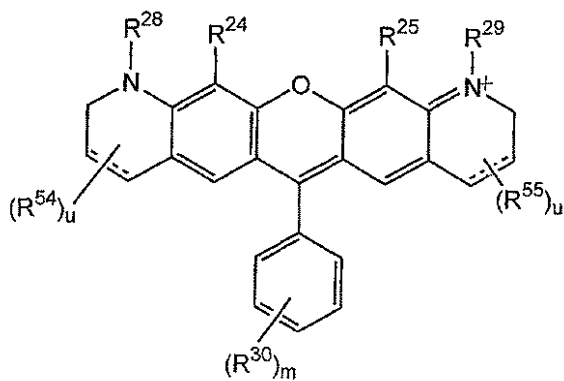
40

(III A)

【0108】

50

【化 3 0】



(III B)

10

通常、式 (I I I A) および (I I I B) の N 含有複素環は、さらに、1 個以上の置換基、 R^{54} および R^{55} で置換されている。 R^{54} および R^{55} は、それぞれ、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたは極性アルソン酸基で置換されているアルキルである。たとえば、 R^{54} および R^{55} は、それぞれ、 $-\text{CH}_2\text{As}(=\text{O})(\text{OH})_2$ である。

【0109】

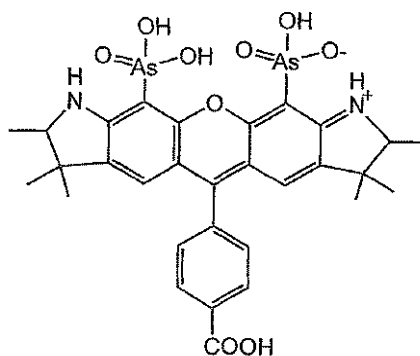
さらに、フェニル基は 1 個以上の R^{30} 基で置換されている。通常、 R^{30} が対応色素試薬の $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分を提供する。たとえば、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{SO}_3\text{R}^{34}$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^{34})_2$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{COOR}^{34}$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{OR}^{34}$ または $-\text{NH}(\text{CH}_2)_j\text{N}(\text{R}^{34})_2$ (j は、2~6 の間の整数) のような $-\text{L}-\text{R}_x$ 部分は、フェニル基の $-\text{SO}_3\text{H}$ または $-\text{COOH}$ 置換基にカップリングすることができる。 R^{34} は、通常、反応基 (R_x) であり、アルキル、アリール、ヘテロアリールである可能性がある。たとえば、 R^{34} は、ペンタフルオロフェニルまたはマレイミドである。式 (I I I A) および (I I I B) の色素のカルボン酸誘導体の例を以下に図示する。対応する色素試薬のいくつかを表 1 に示す。

20

【0110】

【化 3 1】

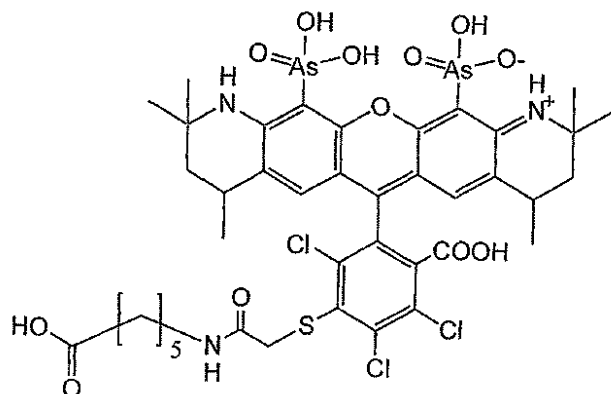
30



40

【0111】

【化 3 2】

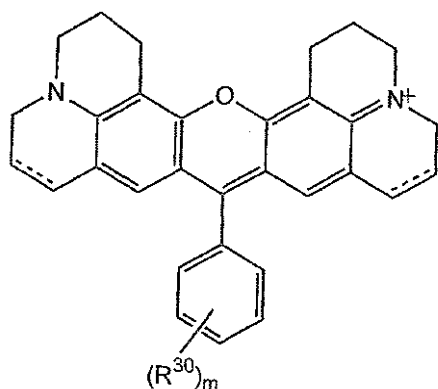


10

さらなる実施形態では、式 (I I I B) の R^{24} および R^{28} は、場合によっては、5 または 6 員複素環を形成してもよく、 R^{25} および R^{29} は、場合によっては、5 または 6 員複素環を形成してもよい。規範的な化合物は、式 (I I I C) による、以下の分子フレームワークを有する。

【0 1 1 2】

【化 3 3】



20

(III C)

点線の結合は、N 含有複素環において、異なる不飽和の度合いある可能性があることを示す。各 N 含有複素環は、場合によっては、 $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ で置換されうる。

30

【0 1 1 3】

通常、 R^{30} が、追加の極性基を提供する。たとえば、 R^{30} は、 $-SO_2OH$ 、 $-SO_2NH(CH_2)_jSO_3H$ 、 $-SO_2NH(CH_2)_jAs(=O)(OH)_2$ 、 $-SO_2NH(CH_2)_jCOOH$ または $-SO_2NH(CH_2)_jOH$ (j は 2~6 の間の整数) である。

【0 1 1 4】

あるいは、 R^{30} が、対応色素試薬の $-L-R_x$ 部分を提供する。たとえば、 $-NH(CH_2)_jSO_3R^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jAs(=O)(OR^{34})_2$ 、 $-NH(CH_2)_jCOOR^{34}$ 、 $-NH(CH_2)_jOR^{34}$ または $-NH(CH_2)_jN(R^{34})_2$ (j は 2~6 の間の整数) のような $-L-R_x$ 部分は、フェニル基の $-SO_3H$ または $-COOH$ 置換基にカップリングすることができる。 R^{34} は、通常、反応基 (R_x) であり、アルキル、アリール、ヘテロアリールである可能性がある。たとえば、 R^{34} はペンタフルオロフェニルまたはマレイミドである。式 (I I I C) のそのような色素試薬の例を表 I に示す。

40

【0 1 1 5】

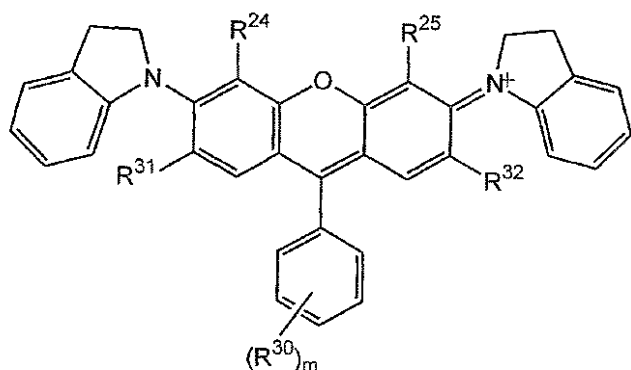
さらなる実施形態では、 R^{27} および R^{29} は、場合によっては、5~9 員複素環を形成してもよく、 R^{26} および R^{28} は、場合によっては、5~9 員複素環を形成してもよく、各複素環は、場合によっては、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As($

50

OR⁶)₂ (OR⁷)₂ で置換されてもよい。一実施形態では、各N含有複素環は5または6員環である。他の実施形態で、各N含有複素環は、9員環2環状環である。規範的な分子フレームワーク、式(IIID)を以下に示す。

【0116】

【化34】



(IIID)

10

式(III)の化合物の全てが蛍光性ではないことが認められる。窒素が自由に回転する場合、換言すれば、ベンゼン環で縮合環内に閉じ込められていない場合、該化合物は、光のエネルギーを熱として発散することができる。そのような化合物は、本明細書で規定するような消光物質として使用することができる。たとえば、式(IIIA)～(IIIC)で示される化合物は、蛍光化合物であり、式(IIID)で示される化合物は消光物質である。

20

【0117】

先に検討したように、R³⁰基の1つが-L-R_xの場合、式(III)の化合物は、色素試薬である。特に、自動化オリゴヌクレオチド合成の目的のために、色素試薬中の極性基は、通常、それらのアルソナートエステル形態でマスクされる。式(III)の蛍光性ローダミン色素試薬およびローダミン消光物質色素試薬の具体的な例を表1に示す。それらの活性化エステル形態の追加のローダミン消光物質色素を図7に図示する。

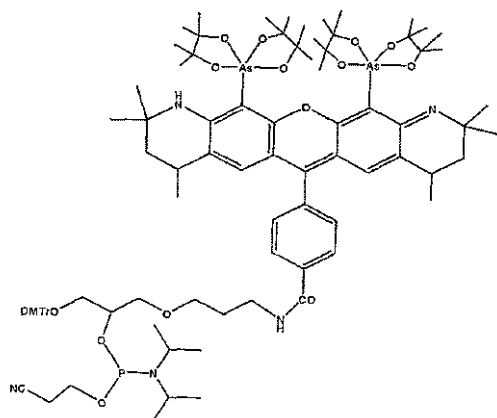
表 I

【0118】

30

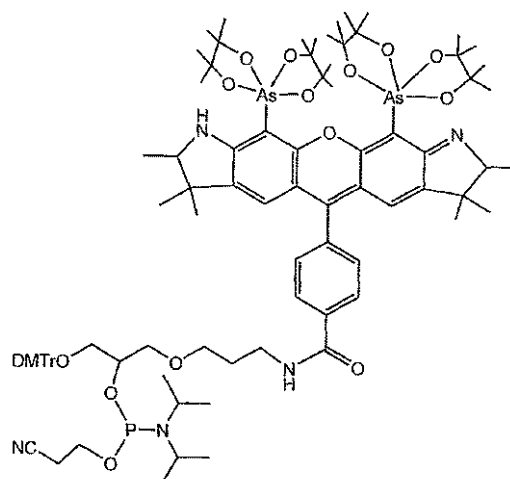
【表 1】

IIIa

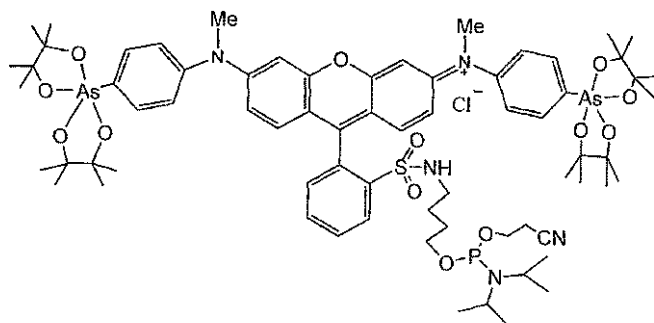


10

IIIb



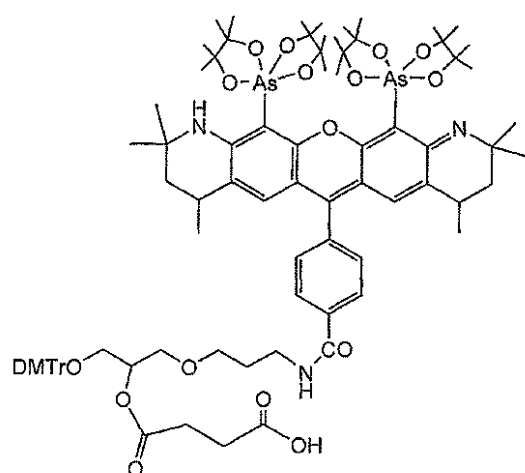
20

IIIc^a

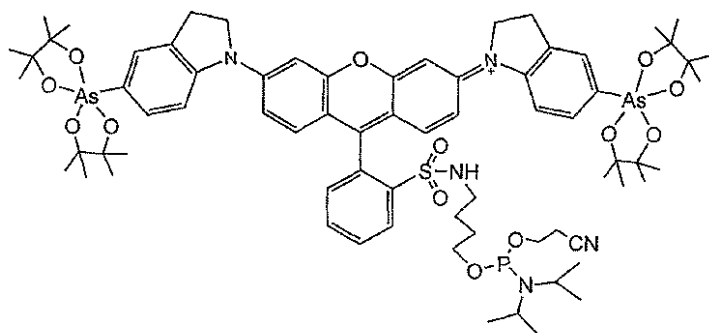
40

【 0 1 1 9 】

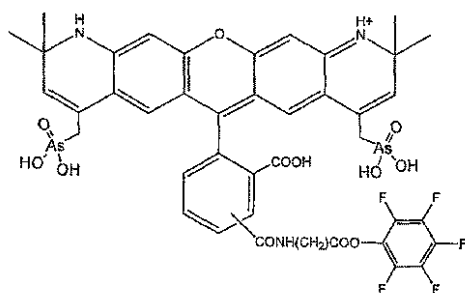
【表 2】

III^d^b

10

III^e^a

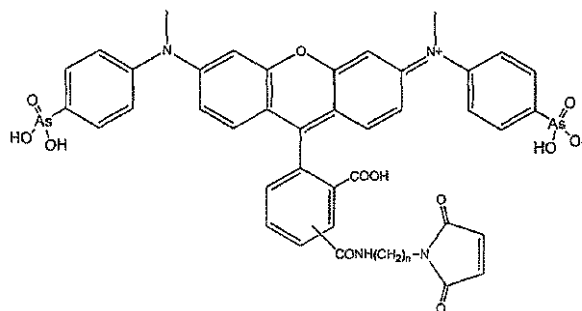
20

III^f

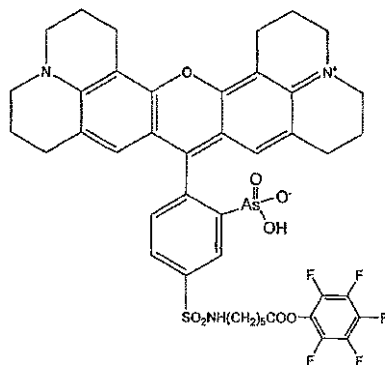
30

【 0 1 2 0 】

【表 3】

IIIg^a

IIIh



10

20

a. 消光物質色素

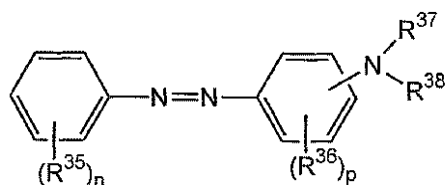
b. 反応性カルボキシル基は、CPG支持体の-NH₂基とカップリングする。

【0121】

他の実施形態で、本発明は、強化された極性を有する蛍光消光物質色素および自動化合成用のその対応色素試薬を提供する。消光物質色素およびその試薬は、以下の一般式（I V）で表すことができる。

【0122】

【化35】



(IV)

30

40

50

(式中、

各R³⁵は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、-NO₂、-CN、-SO₃⁻、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、-N=N-R³⁹、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；
nは、1、2または3であり；

pは、1または2であり；

各R³⁶は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、-NO₂、-CN、-SO₃⁻、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、-N=N-R³⁹、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；
R⁶およびR⁷は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R⁶およびR⁷は結合し一緒になって、ヒ素と、R⁶およびR⁷が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、-R⁶-R⁷-は、-[C(R⁸)₂]_w-（wは2または3）であり、各R⁸は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、-OC(O)-アルキル、-OC(O)-アリール、アルキル、ア

リール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

$\text{R}^{3,7}$ および $\text{R}^{3,8}$ は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アラルキル、アリールまたは $-\text{L}-\text{R}_x$ であり；

$\text{R}^{3,9}$ は、場合によっては、1個以上の $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ で置換されるアリールまたはヘテロアリールであり；

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

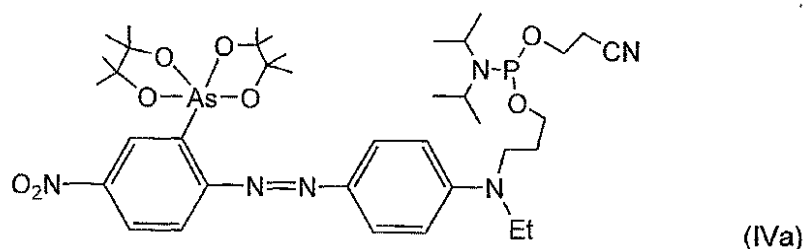
R_x は、反応基であり、

ただし、 $\text{R}^{3,5}$ および $\text{R}^{3,6}$ の少なくとも1個は、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である。）

$\text{R}^{3,7}$ および $\text{R}^{3,8}$ の少なくとも1つが $-\text{L}-\text{R}_x$ の場合、本発明は、自動化オリゴヌクレオチド合成に適切な色素試薬を提供する。アルソナート基を持つ蛍光消光物質色素試薬の例を以下に示す。

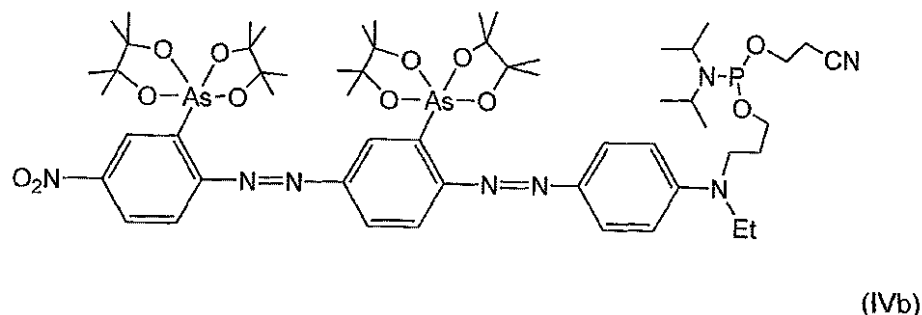
【0123】

【化36】



【0124】

【化37】



他の代表的なリンカーおよび反応基は、米国特許第6,653,473号および第6,727,356号明細書に記載されているものである。極性消光物質色素試薬の追加の例示を図10に図示する。

【0125】

他の実施形態で、本発明は、蛍光性カルボシアニン色素誘導体および以下の一般式(V)で表される色素試薬を提供する。

【0126】

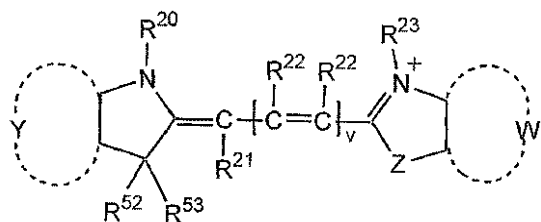
10

20

30

40

【化 3 8】



(V)

(式中、

v は、0、1、2、3、4、5 または 6 であり；

10

Y は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=C R^{46}-$ 、 $=N^+ R^{47}-$ または $=N-$ であり；

W は、各環において 6 個の原子を有する 1 または 2 個の縮合芳香族環を形成するために必要な原子を示し、各環原子は、同じまたは異なり、独立して、 $=C R^{46}-$ 、 $=N^+ R^{47}-$ または $=N-$ であり；

Z は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-C(R^{48})_2-$ または $-N R^{49}-$ であり；

R^{20} および R^{23} は、同じまたは異なり、独立して、アルキル、アラルキルまたはヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはトリアルキルアンモニウムで置換されているアルキル、または $L-R_x$ であり；

20

R^{52} および R^{53} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アルキル置換ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^{21} および各 R^{22} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシ、メルカプト、アリアルオキシ、複素環、イミニウムイオン、 $L-R_x$ 、または 2 個の隣り合う R^{21} および R^{22} あるいは任意の 2 個の隣り合う R^{22} は、場合によっては、アルキル、ハロゲンまたはオキソで置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；あるいは 1 個の炭素をはさんだ 2 個の R^{22} は、それらが結合する炭素と一緒にあって、場合によっては、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリアルチオ、アルコキシ、アリアルオキシ、オキソ ($=O$)、 $=S$ または $=C(R^{50})_2$ で置換されている 4、5 または 6 員環の炭素環を形成し；

30

R^{46} および R^{47} はそれぞれ同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、アリアル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^{48} および R^{49} はそれぞれ同じまたは異なり、独立して、水素または場合によっては、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されるアルキルであり；

40

各 R^{50} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、シアノ、 $-C(O)NHR^{48}$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリアルまたはヘテロアリアルであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリアル、アルキル、ア

50

リール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

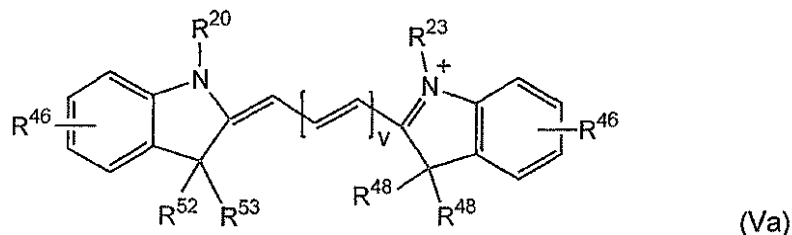
R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{46} 、 R^{47} 、 R^{48} 、 R^{49} 、 R^{52} および R^{53} の少なくとも1つは、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である。）

具体的には、一実施形態において、式(V)は、式(Va)で表される、Cy5シアニン色素誘導体である。

【0127】

【化39】



(Va)

(式中、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{48} 、 R^{46} 、 R^{52} および R^{53} は、先に規定した通りである)

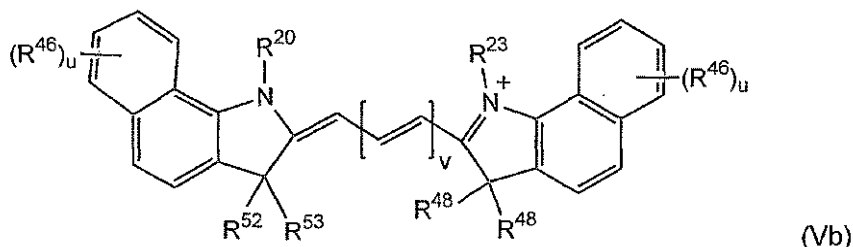
より具体的な実施形態では、各 R^{48} 、 R^{52} および R^{53} はメチルであり、各 R^{20} および R^{23} は、同じまたは異なり、独立して、 $-(\text{CH}_2)_t\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{AsO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{COOH}$ または $-(\text{CH}_2)_t\text{OH}$ (t は1～6の間の整数)であり、各 R^{46} は $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である。

【0128】

さらなる実施形態では、式(V)は、式(Vb)で表される別のタイプのCy5シアニン色素誘導体である。

【0129】

【化40】



(Vb)

(式中、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{48} 、 R^{46} 、 R^{52} および R^{53} は、先に規定した通りであり、 u は1または2である。)

さらに具体的な実施形態では、各 R^{52} 、 R^{53} および R^{48} はメチルであり、各 R^{20} および R^{23} は同じまたは異なり、独立して、 $-(\text{CH}_2)_t\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{AsO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_t\text{COOH}$ または $-(\text{CH}_2)_t\text{OH}$ (t は1～6の間の整数)であり、各 R^{46} は、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ である。

【0130】

10

20

30

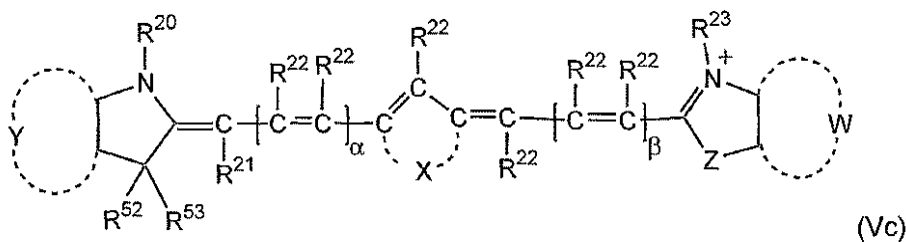
40

50

他の実施形態では、1個の炭素をはさんだ2個の R^{22} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、4、5または6員炭素環を形成する。これらの化合物は、以下の式(Vc)でさらに具体的に表すことができる。

【0131】

【化41】



10

(式中、

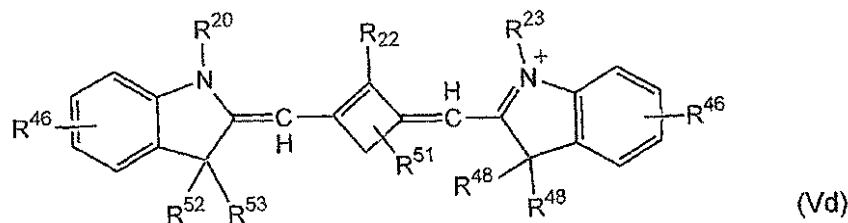
Xは、1個の4-、5-または6-員炭素環状環を形成するために必要な原子を表し、該炭素環状環は、場合によっては、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリールチオ、アルコキシ、アリールオキシ、オキソ(=O)、=Sまたは=C(R^{50})₂で置換され、 $\alpha + \beta = v - 2$ であり、他のR基、YおよびWは全て先に規定した通りである。)

具体的には、一実施形態では、炭素環はシクロブテンであり、 α および β は、それぞれ0であり、YおよびWはそれぞれ、縮合ベンゼンである。これらの色素は、一般的に、スクアラインおよびチオスクアライン色素と言い、以下の式(Vd)で表すことができる。

20

【0132】

【化42】



(式中、 R^{51} は、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリールチオ、アルコキシ、アリールオキシ、オキソ(=O)、=Sまたは=C(R^{50})₂であり、他のR基は全て先に規定した通りである。)

30

より具体的には、各 R^{48} 、 R^{52} および R^{53} はメチルであり、各 R^{20} および R^{23} は同じまたは異なり、独立して、 $-(CH_2)_tSO_3H$ 、 $-(CH_2)_tAsO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_tCOOH$ または $-(CH_2)_tOH$ (t は1~6の間の整数)であり、各 R^{46} は $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、 R^{22} はヒドロキシ、メルカプトまたは置換アルキルである。)

アルソン酸基を持つスクアラインおよびチオスクアライン色素は、高い水溶性とこのクラスの色素の固有のスペクトル特性との実用的に有用な組合せを与える。これらの色素は、スペクトル特性が非常に環境に依存するため、生物学的結合体化と染色用に実的に有用である[米国特許出願公開第2003/0235846号明細書]。スクアライン系生物学的ラベルは、高ストークスシフト、水溶液中の遊離の色素のように、より低い量子収率($\phi = 0.15$)、および生体分子に結合したとき非常に高い量子収率($\phi = 0.6 \sim 0.7$)を発現する[Oswald B., Patsenker L., Duschl J., Szmajnski H., Wolfbeis O. S., Terpetschnig E. 「Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels」Bioconjug Chem. Nov-Dec, 10(6), p925-31, 1999]。

40

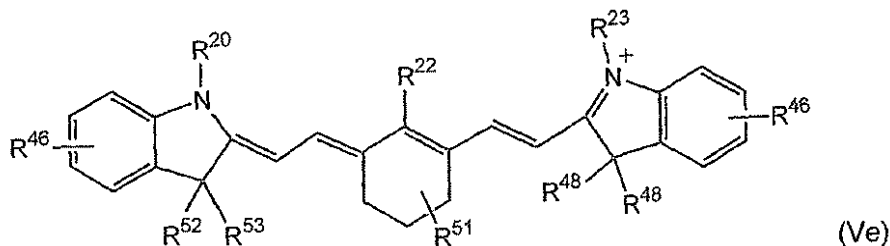
50

【0133】

他の具体的な実施形態では、炭素環状は、シクロヘキセンであり、 α および β は、それぞれ1であり、YおよびWは、それぞれ、縮合ベンゼンであり、式(V)の化合物は、蛍光性IR色素である。それらは、以下の式(Ve)で表すことができる。

【0134】

【化43】



10

(式中、 R^{51} は、アルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリールチオ、アルコキシ、アリールオキシ、オキソ(=O)、=Sまたは=C(R^{50})₂であり、他のR基は全て先に規定した通りである。)

より具体的には、各 R^{48} 、 R^{52} および R^{53} はメチルであり、各 R^{20} および R^{23} は、同じまたは異なり、独立して、 $-(CH_2)_tSO_3H$ 、 $-(CH_2)_tAsO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_tCOOH$ または $-(CH_2)_tOH$ (t は1~6の間の整数)であり、各 R^{46} は、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、 R^{22} はヒドロキシ、メルカプトまたは置換アルキルである。

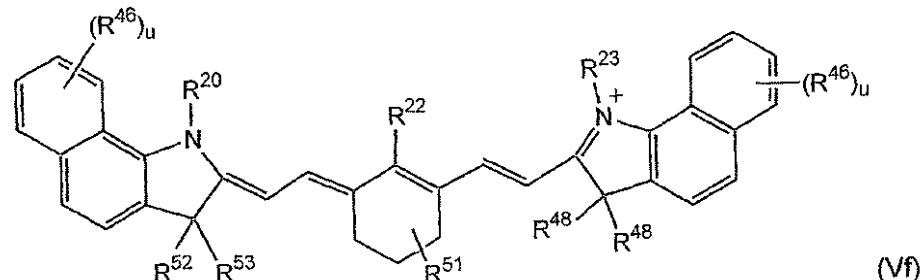
20

【0135】

他の具体的な実施形態では、炭素環状はシクロヘキセンであり、 α および β はそれぞれ1であり、YおよびWはそれぞれ縮合ナフタレンであり、式(V)の化合物は蛍光性IR色素である。これらは、以下の式(Vf)にしたがって表すことができる。

【0136】

【化44】



30

(式中、 R^{51} はアルキル、ハロゲン、アルキルチオ、アリールチオ、アルコキシ、アリールオキシ、オキソ(=O)、=Sまたは=C(R^{50})₂であり、 u は1または2であり、他のR基は全て先に規定した通りである。)

より具体的には、各 R^{48} 、 R^{52} および R^{53} はメチルであり、各 R^{20} および R^{23} は同じまたは異なり、独立して、 $-(CH_2)_tSO_3H$ 、 $-(CH_2)_tAsO_3H_2$ 、 $-(CH_2)_tCOOH$ または $-(CH_2)_tOH$ (t は1~6の間の整数)であり、各 R^{46} は $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、 R^{22} はヒドロキシ、メルカプトまたは置換アルキルである。

40

【0137】

R^{20} 、 R^{23} 、 R^{46} 、 R^{47} 、 R^{48} 、 R^{49} 、 R^{52} および R^{53} の少なくとも1つが $-L-R_x$ の場合、本発明は、自動化オリゴヌクレオチド合成に適切な色素試薬を提供する。

【0138】

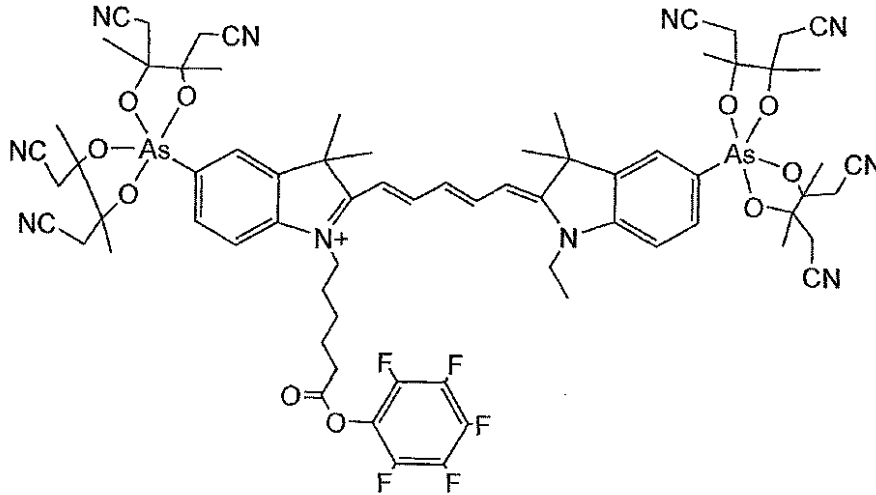
一実施形態では、 R_x は、そのペンタフルオロフェニルエステル形態の活性化カルボン酸である。該基は特にアミン反応性であり、アミン官能基を有するMGB、固形支持体、

50

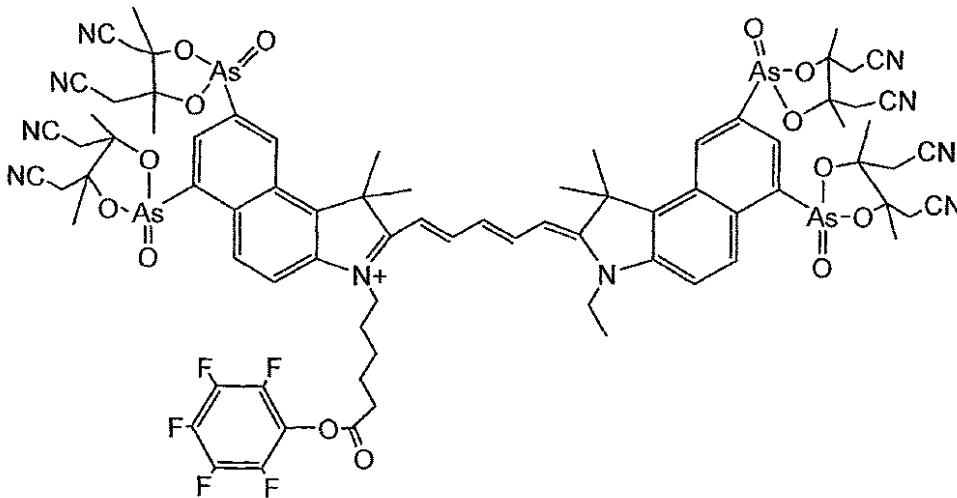
色素、またはオリゴヌクレオチドに結合することができる。具体的な例を以下に示す。

【0139】

【化45】



10



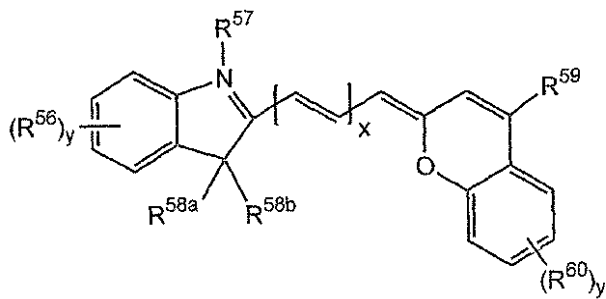
20

30

さらなる実施形態では、本発明は、以下の一般式(VI)で表される、強化された極性および安定性を持つ修飾蛍光性IR色素を提供する。

【0140】

【化46】



(VI)

40

(式中、

yは、1、2または3であり；

xは、0、1、2または3であり；

各R⁵⁶は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、-As(=O)(OR⁶)(OR⁷)または-As(OR⁶)₂(OR⁷)₂であり；

50

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

R^{57} は、アルキル、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ 、 $-COOH$ 、アルコキシ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノまたはトリアルキルアンモニウムで置換されているラルキルまたはアルキル、または $L-R_x$ であり；

R^{58a} および R^{58b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

R^{59} は、水素、アルキルまたはラルキルであり；

各 R^{60} は、同じまたは異なり、独立して、水素、 $-NR^{61a}R^{61b}$ 、アルキル、アリール、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

各 R^{61a} および R^{61b} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシ、 $-COOH$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ で置換されているアルキルであり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{56} 、 R^{58a} 、 R^{58b} 、 R^{60} および R^{61a} および R^{61b} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む。))

式 (VI) の化合物の代表的な例として、さらに、式 (VIa) (ここで、 R^{60} はアルソン酸基であり、 R^{57} は、 $-SO_3H$ 、 $-AsO_3H_2$ 、 $-COOH$ および $-OH$ のような極性基で終了したアルキルまたはアルキレン鎖であり、 R^{59} は t -ブチル基であり、 R^{60} はジアルキルアミノ基である) で表されるものもある。

【0141】

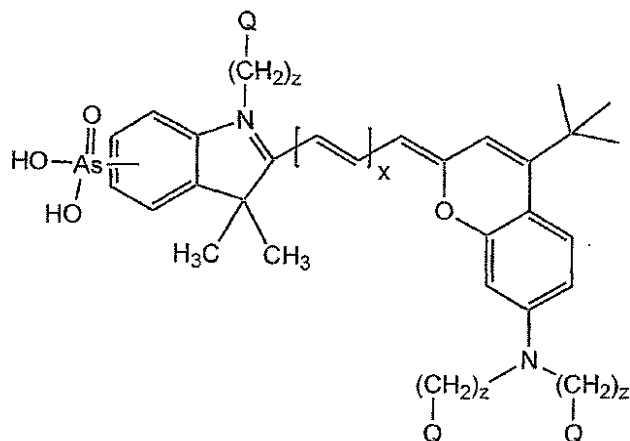
10

20

30

40

【化 4 7】



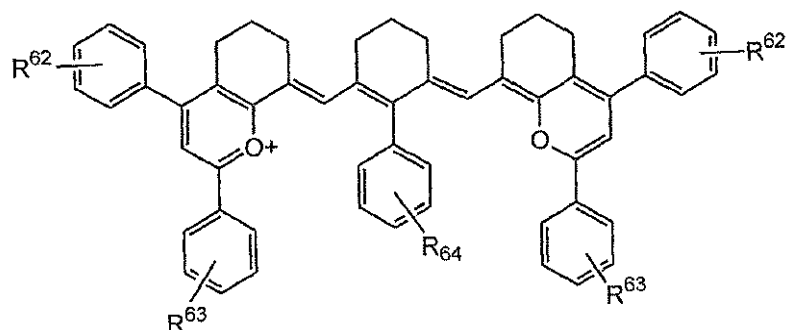
10

(各Qは、独立して、H、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{AsO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{COOH}$ または $-\text{OH}$ であり、 z は1～6である) (VIa)

さらなる実施形態では、本発明は、以下の一般式(VII)で表される、強化された極性および安定性を持つ、他の修飾蛍光性IR色素を提供する。

【0142】

【化 4 8】



(VII)

20

(式中、

30

各 R^{62} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 、アルキル、ヒドロキシ、 $-\text{COOH}$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 、 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ または $\text{L}-\text{R}_x$ で置換されているアルキルであり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-\text{R}^6-\text{R}^7-$ は、 $-\text{[C}(\text{R}^8)_2\text{]}_w-$ (w は2または3)であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アルキル}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-\text{アリール}$ 、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成し；

40

各 R^{63} および R^{64} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ 、アルキル、ヒドロキシ、 $-\text{COOH}$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミン、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、スルホニル、ホスホニル、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ 、 $\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ または $\text{L}-\text{R}_x$ で置換されているアルキルであり；

50

Lは、一重共有結合またはC、N、OおよびSからなる群から選択される1～30個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

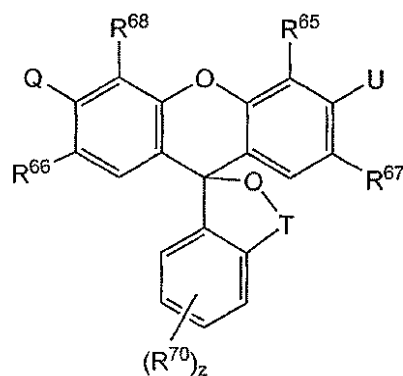
ただし、 R^{62} 、 R^{63} および R^{64} の少なくとも1つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む。)

さらなる実施形態では、本発明は、1個以上のアルソナートエステル基で置換された蛍光性キサンチン誘導体を提供する。これらの化合物は、以下の一般式(VIII)で表すことができる。

10

【0143】

【化49】



20

(VIII)

(式中、

z は、1、2または3であり；

T は、 $>C=O$ または $>S(=O)_2$ であり；

Q は、 $-OR^{71}$ または $-NR^{72}R^{73}$ であり；

U は、 $-OR^{74}$ または $-NR^{75}R^{76}$ であり；

各 R^{68} および R^{65} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキル、アリールまたは $-CH_2As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-CH_2As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

30

各 R^{66} および R^{67} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルキルまたは $L-R_x$ であり；

各 R^{70} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ 、 $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ または $L-R_x$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は2または3)であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素上の2個の R^8 はオキソを形成し；

40

各 R^{71} および R^{74} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルカルボニルまたはアリールカルボニルであり；

各 R^{72} 、 R^{73} 、 R^{75} および R^{76} は、同じまたは異なり、独立して、水素、アルキルまたはアリールであり；あるいは

50

R^{71} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{74} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{72} および R^{68} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{73} および R^{66} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{75} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；あるいは

R^{76} および R^{67} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員環の複素環を形成し；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1 ～ 30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素－炭素結合、炭素－窒素結合、窒素－窒素結合、炭素－酸素結合および炭素－硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{65} 、 R^{66} 、 R^{67} 、 R^{68} および R^{71} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり、あるいは $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を含む。) 20

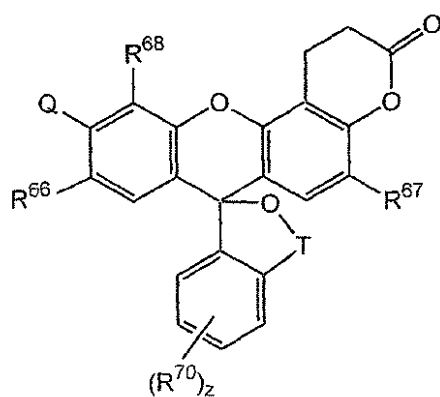
通常、 R^{71} および R^{74} は、それぞれ、アルキルカルボニルであり、さらに典型的には、 t -ブチルカルボニルである。

【0144】

R^{74} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員複素環を形成し、式 (VIII) の化合物は、より具体的には、以下の式 (VIIIa) で表すことができる。

【0145】

【化50】

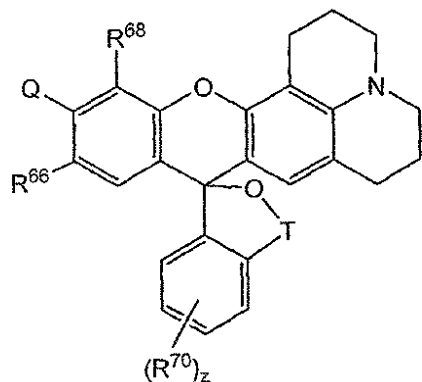


(VIIIa)

R^{75} および R^{65} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員複素環を形成し；および R^{76} および R^{67} は、これらが結合する炭素と一緒にあって、5 または 6 員複素環を形成し、式 (VIII) の化合物は、より具体的には、以下の式 (VIIIb) で表すことができる。

【0146】

【化 5 1】



10

R^{66} 、 R^{67} および R^{70} の少なくとも 1 つが $-L-R_x$ の場合、本発明は、自動化オリゴヌクレオチド合成に適切なキサンチン色素試薬を提供する。

【0147】

一実施形態では、 R_x は、自動化オリゴヌクレオチド合成用のホスホルアミダイト基である。他の実施形態で、 R_x は、そのペンタフルオロフェニルエステル形態において、カルボン酸、イソチオシアネートまたはマレイミド基、活性化カルボン酸である。具体的なキサンチン色素試薬を図 8 および 9 に図示する。

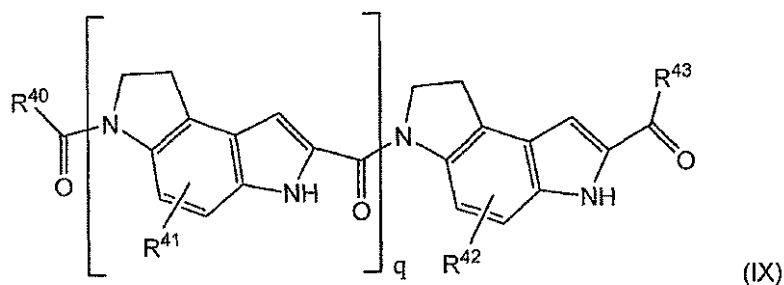
20

【0148】

さらなる実施形態では、本発明は、以下の一般式 (IX) で表される、強化された極性および疎水性を持つ、修飾 MGB を提供する。

【0149】

【化 5 2】



30

(式中、

R^{40} および R^{43} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アリール、アルコキシまたは $-L-R_x$ であり、ただし、 R^{40} および R^{43} の少なくとも 1 つは $-L-R_x$ であり；

各 R^{41} は、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、スルホニル、ホスホニル、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

40

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の 2 個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素上の 2 個の R^8 はオキソを形成し；

q は、0、1 または 2 であり；

50

R^{42} は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

L は、一重共有結合または C、N、O および S からなる群から選択される 1～30 個の非水素原子を含む共有結合であり、一重、二重、三重の任意の結合、または芳香族炭素-炭素結合、炭素-窒素結合、窒素-窒素結合、炭素-酸素結合および炭素-硫黄結合から構成され；および

R_x は、反応基であり、

ただし、 R^{41} および R^{42} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である。）

一実施形態では、本発明は、式 (IX) (式中、 R^{41} および R^{42} の少なくとも 1 つは、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である) の MGB を提供する。

10

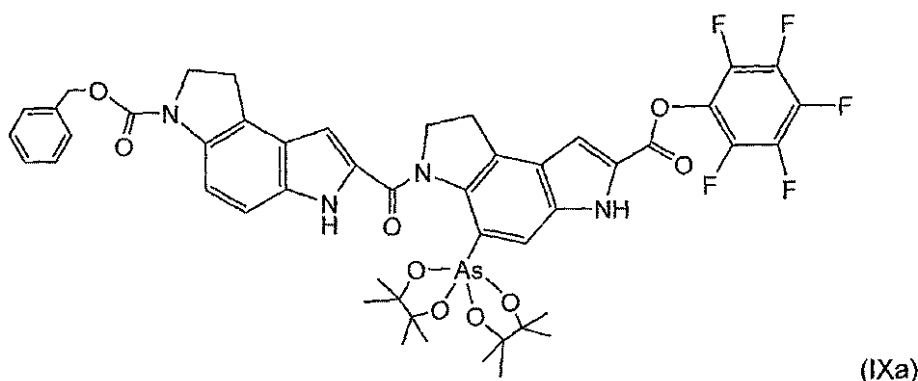
【0150】

本発明の MGB は、オリゴヌクレオチド、色素および固形支持体に、反応基を介して、反応によって結合する。しかも、自動化オリゴヌクレオチド合成の目的のために、色素試薬中の極性基は、通常、アルソナートエステル形態でマスクされている。以下は、極性基を有する MGB の 2 つの具体的な例示である。

【0151】

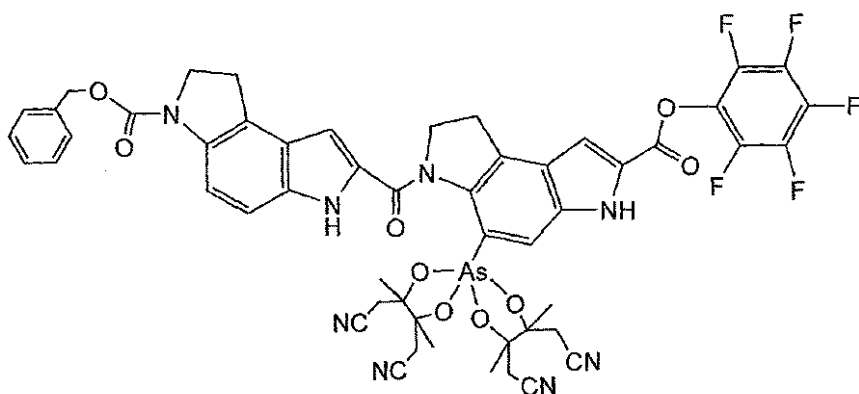
【化 53】

20



(IXa)

30



(IXb)

40

これらの例示において、反応基は、そのペンタフルオロフェニルエステル形態の活性化カルボン酸である。該基は、特にアミン反応性であり、アミン官能基を有する MGB、固形支持体、色素またはオリゴヌクレオチドに結合することができる。

3. 極性色素を使用する適用および方法

一つの態様で、本発明は、1 個以上のアルソナート基： $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を有する式 (I)～(VIII) の色素化合物を、生物学的サンプルと、所望の条件下で、測定可能な光学応答を得るのに十分な濃度で組み合わせることによる、生物学的サンプルの染色における、1 個以上の極性アルソン基を有する色素化合物の使用を提供する。

【0152】

50

本発明の一態様では、本発明の色素化合物を、サンプルを認識あるいは定量することができるように、直接にサンプルを染色またはラベルするために使用する。たとえば、そのような色素を、生物学的標的測定対象物用のアッセイの一部として、生物学的または非生物学的流体中の検出可能なトレーサー元素として；染色されたサンプルは照射され、腫瘍細胞または組織を選択的に破壊する、腫瘍の光力学的治療としての目的のために；あるいは普通、一重項酸素の光増感生成によって、動脈内プラークまたは細胞を光で切除するために、加えてもよい。好ましい一実施形態では、色素結合体を、結合体化された物質は特定の結合ペアの相補的メンバーであるリガンドを含むサンプルを染色するために使用する。

【0153】

通常、サンプルを、液体源から直接、あるいは固体物質（有機または無機）からの洗浄液として、細胞が培養されるために導入された成長培地として、または細胞が評価のために置かれた緩衝溶液として得る。サンプルが細胞を含む場合、該細胞は、場合によっては、微生物を含む単一の細胞であり、あるいは多細胞生物、胚、組織、組織生検体、線維、バイオフィームなどを含む2または3次元の層において他の細胞と関連する複数細胞である。

【0154】

あるいはサンプルは固体で、場合によっては、液体または蒸気からろ過によって除去されたスミア、スクラップまたは濃縮水である。本発明の一つの態様では、サンプルを、生物液体、たとえば、分離されたまたは未ろ過の生物液体、たとえば、尿、髄液、血液、リンパ液、組織均質化物、細胞間隙液、細胞抽出物、粘液、唾液、痰、便、生理的分泌物または他の類似の液体から得る。あるいは、サンプルを、環境源、たとえば、土、水、または空気から得；または工業的源、たとえば、廃液流れ、水資源、供給ライン、あるいは製造ロットから取る。

【0155】

さらに他の実施形態では、サンプルを、固体または半固体マトリックス上または中に置く。本発明の一つの態様では、マトリックスは膜である。他の態様では、マトリックスは、核酸またはタンパク質を分離し特徴付けるために使用されるような電気泳動ゲル、または電気泳動ゲルから膜への移動によって製造されるプロットである。他の態様では、マトリックスは、シリコンチップまたはガラススライドであり、関心のある測定対象物がアレイ中のチップまたはスライド上に固定されている（たとえば、サンプルはマイクロアレイ中にタンパク質または核酸高分子を含む）。さらに他の態様では、マトリックスは、マイクロウェルプレートまたは微小流体チップであり、サンプルは、自動化方法、通常、ハイスループットスクリーニングアッセイ、たとえば薬剤スクリーニングの種々の方法により分析される。

【0156】

本発明の色素化合物は、一般的に、先に記載した本発明の色素化合物と関心のあるサンプルとを、検出可能な光学応答を得るように選択された条件下で組み合わせることによって利用される。本明細書で使用される用語「色素化合物」は、請求項の色素の全ての態様のものを言い、反応性色素および生物物質または生体分子に結合体化する色素の両方を含む。色素化合物は、通常、共有結合またはサンプルの元素と結合または結合体化する非共有結合を形成し、あるいは単に、サンプルまたはサンプルの部分の境界内に存在する。次にサンプルは、光学応答を誘発するように選択された波長で照射される。通常、サンプルの染色は、光学応答を標準または予想される応答とさらに比較することによって、サンプルの特定の特性を測定するために使用される。

【0157】

検出可能な光学応答は、観察によってあるいは機器を使用して検出可能な光学シグナルの変化あるいはその発生を意味する。通常、検出可能な応答は、蛍光における変化、たとえば、蛍光、蛍光寿命、蛍光極性化の輝度、励起または放射波長分布、あるいはこれらの組合せにおける変化である。標準または予想される応答と比べた染色の度合いおよび／ま

10

20

30

40

50

たは位置は、サンプルが所定の特性を持つかどうかあるいはどの程度持つかを示す。本発明のいくつか色素は、蛍光発光を殆ど見せないかもしれないが、しかしそれでも発色色素として有用である。そのような発色団は、FRET適用においてエネルギー受容体として、あるいは単に所望の色をサンプルまたはサンプルの一部に付与するために有用である。

【0158】

生物学的適用に関して、本発明の色素化合物は、通常、水性で、殆ど、業界で一般的に知られている方法に従って製造された水溶液または水性混和性溶液中で使用される。色素化合物の正確な濃度は、実験条件および所望の結果に依るが、通常、約1ナノモル〜1ミリモル、あるいはこれ以上の範囲である。最適濃度は、最小バックグラウンド蛍光を伴う満足な結果が得られるまで、系統変動によって決定される。

10

【0159】

色素化合物を生物学的成分でサンプルを染色するために使用するのが最も有利である。サンプルは、成分（完全細胞、細胞抽出物、細菌、ウィルス、細胞小器官およびこれらの混合物を含む）、あるいは単一成分または複数の成分の均質群（たとえば、天然または合成アミノ酸、核酸または炭水化物高分子、あるいは脂質膜結合体を含む）の不均質混合物を含んでもよい。これらの色素は、一般的に、使用の濃度内で、生きている細胞および他の生物学的成分に無毒である。

【0160】

色素化合物は、色素化合物と関心のあるサンプル成分との間の接触を促進する任意の方法でサンプルと組み合わせる。通常、色素化合物または色素化合物を含有する溶液を、サンプルに単に加える。本発明のある色素、特に1つ以上のスルホン酸またはアルソン酸部分によって置換されている色素は、生物学的細胞の膜に不浸透である傾向があり、ひとたび生細胞が中に入ると通常、よく保持される。形質膜を透過する処理、たとえば、電気穿孔法、ショック処理、または高細胞外ATPを使用して、選択された色素化合物を細胞に導入することができる。あるいは、選択された色素化合物を、たとえば、圧力マイクロインジェクション、スクラップローディング、パッチクランプ法または食菌作用によって、細胞に物理的に挿入することができる。

20

【0161】

その天然のエステル形態のアルソナート色素は、生物学的膜に付着あるいは貫通してもよい。場合によっては、該エステル形態は、微細環境において加水分解し、膜の片面に、あるいは細胞の内側に色素の極性形態を与え、その結果研究または診断ツールを提供する。

30

【0162】

脂肪族アミンまたはヒドラジン残基を導入する色素を細胞に微量注入することができ、それらは、適当な位置で、ホルムアルデヒドまたはグルタルデヒドのようなアルデヒド固定液によって固定されうる。この固定によって、そのような色素は、神経細胞トレースのような細胞内適用に有用な色素となる。

【0163】

リン脂質のような親油性置換基を持つ色素化合物は、たとえば、膜構造用のプローブとしての用途のために、リポソーム、リポタンパク質、フィルム、プラスティック、親油性微粒子球または類似の物質中に導入するために、あるいはトレースのために、脂質集合体に非共有結合で導入される。親油性色素は、膜構造の蛍光性プローブとして有用である。

40

【0164】

化学反応性色素化合物は、多種多様な物質上の対応する官能基に共有結合し、先に記載した色素結合体を形成する。細胞の表面上の、細胞膜内の、細胞内器官のような細胞内区画内の、あるいは細胞の細胞質内のラベル反応性部位に色素化合物を使用することによって、サンプルにおける、それらの存在または量、接近可能性、あるいはそれらの空間的および時間的分布の測定を可能にする。光反応性色素は、生物細胞の外膜の光ラベル成分と同様に、あるいは細胞用の光定着型極性トレーサーとして使用することができる。

【0165】

50

本発明の方法に使用できる好ましい化合物として、 R_x が、カルボン酸、カルボン酸の活性化エステル、アミン、アジド、ヒドラジン、ハロアセタミド、アルキルハライド、イソチオシアネートまたはマレイミド基である化合物；生物物質が、抗体、ペプチド、レクチン、ポリサッカライド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、核酸高分子、イオン錯形成部分、脂質、または1個以上の同じまたは異なる追加の蛍光団に結合してもよい、非生物学的有機高分子または高分子微粒子である化合物が挙げられる。

【0166】

場合によっては、サンプルを、染色後洗浄し、残留する、過剰のあるいは結合していない色素化合物を除去する。サンプルは、場合によっては、染色途中に、洗浄溶液、透過処理および／または固定化溶液、および追加の検査試薬を含む溶液を始めとする、他の溶液の1種以上と組み合わせる。追加の検査試薬は、通常、業界で一般的に公知の方法に従って、特異的細胞成分、細胞内物質の存在、または細胞状態に基づいて検出可能な応答を引き起こす。追加の検査試薬が、対象色素化合物のスペクトル特性と異なる特性を持つ生成物を持つまたは生成する場合は、多色適用が可能である。これは、追加の検査試薬が、染色色素の特性とは検出において異なるスペクトル特性を持つ本発明の色素または色素結合体である場合、特に有用である。

【0167】

色素結合体である本発明の化合物は、業界で広く知られている方法に従って使用され、たとえば、顕微鏡検査法および免疫蛍光測定法におけるにおける抗体結合体の用途；および核酸ハイブリダイゼーションアッセイおよび核酸シーケンス用のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド結合体（たとえば、米国特許第5,332,666号明細書、Prober et al. (1994)；米国特許第5,171,534号明細書、Smith et al. (1992)；米国特許第4,997,928号明細書、Hobbs (1991)；および国際公開第94/05688号パンフレット、Menchén et al.；これら全ては参照によって組み込まれる）が挙げられる。本発明の複数の独立した色素の色素結合体は、多色適用の有用性を有する。

【0168】

染色後または染色途中のいつでも、サンプルを選択された光の波長で照射し、検出可能な光学応答を得、光学応答を検出するための方法で観察する。本発明の色素化合物を照射するために有用な装置として、携帯型紫外線ランプ、水銀アークランプ、キセノンランプ、レーザーおよびレーザーダイオードが挙げられるが、これらに限定されない。これらの照射源は、場合によっては、レーザースキャナ、蛍光マイクロプレートリーダー、標準のまたはミニ蛍光光度計、あるいはクロマト検出器に組み込まれている。本発明の好ましい実施形態は、以下に記す領域が比較的安価な励起ソースの出力に非常に適合しているので、633～636 nm、647 nm、660 nm、680 nmまたは近傍の、および700 nmを超える波長で、励起可能な色素である。

【0169】

光学応答を、場合によっては、可視的検査によって、以下の装置、すなわち、CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザースキャナ、蛍光光度計、フォトダイオード、量子カウンター、エビ蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメータ、蛍光マイクロプレートリーダーの任意のものを使用することによって、光電子増倍管のような、シグナルを増幅する手段によって、検出する。サンプルを、フローサイトメータを使用して検査する場合、サンプルの検査は、場合によっては、それらの蛍光応答に従い、サンプルの特性の仕分けを含む。

【0170】

他の態様では、本発明は、式(I)－(VII)（式中、 R_x は、ホスホルアミダイト基である）で表される色素試薬を、自動化オリゴヌクレオチド合成において使用する方法であって、ホスホルアミダイト方法を使用して、オリゴヌクレオチドの自動化合成を行い、色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップであって、色素試薬は、オリゴヌクレオチドの固形支

持体または伸長鎖に結合体化するステップと；

反応媒体から色素標識オリゴヌクレオチドを単離するステップと；

色素標識オリゴヌクレオチドの極性基を脱保護し、負電荷極性基を有する色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと

を含む方法を提供する。

【0171】

亜リン酸トリエステル、ホスホトリエステルおよびH-ホスホニル化学によるオリゴヌクレオチドの固相合成に関する手法の詳しい説明は、広く出回っている。たとえば、Itakura, 米国特許第4,401,796号明細書；Caruthers et al., 米国特許第4,458,066号および4,500,707号明細書；Beaucage et al., Tetrahedron Lett., 22:1859-1862 (1981)；Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191 (1981)；Caruthers et al., Genetic Engineering, 4:1-17 (1982)；Oligonucleotide Synthesis, Jones, 第2章, Atkinson et al., 第3章, およびSproat et al., 第4章：A Practical Approach, Gait (編集), IRL Press, Washington D. C. (1984)；Froehler et al., Tetrahedron Lett., 27:469-472 (1986)；Froehler et al., Nucleic Acids Res., 14:5399-5407 (1986)；Sinha et al., Tetrahedron Lett., 24:5843-5846 (1983)；およびSinha et al., Nucl. Acids Res., 12:4539-4557 (1984)を参照のこと。これらは参照によってその全体を本明細書に組み入れる。

【0172】

一般的に、カップリングサイクルにおいて利用されるモノマーヌクレオチドの供給のタイミングおよび濃度は、市販のDNA合成装置において使用される市販のホスホルアミダイトに典型的なプロトコルと相違しない。これらの場合、モノマーを含有する溶液を、市販の合成装置上の過剰のホスホルアミダイトのために備えられたポート上の受け口に単に加えればよい（たとえば、モデル380B, Applied Biosystems, Foster City, Calif., U. S. A.）。しかし、特定のモノマーのカップリング効率が他のホスホルアミダイトより実質的に低い場合、合成を最適化するために、試薬の供給のタイミングまたは濃度を変える必要があるかもしれない。低カップリング効率を訂正するためのオリゴヌクレオチド合成プロトコルの最適化方法は、当業者にはよく知られている。一般的には、供給する試薬の濃度または試薬の量を増加して、より高いカップリング効率を達成する。カップリング効率を測定する方法もよく知られている。たとえば、5'-ヒドロキシル保護基がジメトキシトリチル(DMT)である場合、カップリング効率は、DMT基から酸性が除かれる間、DMTカチオン濃度を測定することによって決定してもよい。DMTカチオン濃度は、普通、酸洗浄液をスペクトル-測光的にモニターすることによって測定する。酸/DMT溶液は、明るいオレンジ色である。あるいは、カップリングによって、カップリングしなくなったオリゴヌクレオチドはさらなる延長を阻止されるので、カップリング効率を、たとえば、キャピラリー電気泳動法またはHPLCを利用して、オリゴヌクレオチドの完全長に対する欠失長さの比を比較することによって算出してもよい。

【0173】

固相オリゴヌクレオチド合成は、数多くの固形支持体を使用して行ってもよい。適切な支持体は、保護されたモノマーの結合のための官能基を提供するもので、これは合成されたオリゴヌクレオチド中で3'末端塩基となる。支持体は、特定の合成化学において利用される試薬に対して不活性でなければならない。適切な支持体は当業者によく知られている。固形支持体材料として、ポリアクリロイルモルホリド、シリカ、制御細孔ガラス(C

P G)、ポリスチレン、ポリスチレン／ラテックスおよびカルボキシル官能化 T e f l o n (登録商標)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい支持体は、アミノ官能化制御細孔ガラスおよびポリスチレンである。

【0174】

固相オリゴヌクレオチド合成は、出発点として、固形支持体にカップリングした、完全に保護されたモノマー（たとえば、保護ヌクレオシド）を必要とする。このカップリングは、通常、3'-ヒドロキシルを介する。通常、リンカー基は、1端が、共有結合で3'-ヒドロキシルに、もう1端が供給結合で固形支持体に結合する。次いで、第1合成サイクルで、縮合反応によって、ヌクレオチドモノマーをその3'-リン酸塩を介して結合ヌクレオシドの5'-ヒドロキシルにカップリングし、3'-5'ホスホジエステル架橋を形成する。続く合成サイクルで、P₁-修飾モノマーを含むヌクレオチドモノマーを最後に結合したヌクレオチドの5'-ヒドロキシルに付加する。この方法において、オリゴヌクレオチドは、固形支持体に結合する3'末端を有する「成長」オリゴヌクレオチドを生成する、3'から5'方向で合成される。

10

【0175】

ヌクレオシドモノマーを固形支持体に結合させる方法は、当業者には数多く知られている。通常、スクシネートまたはヘミスクシネートを介して制御細孔ガラスに共有結合されたモノマーが一般的に使用される。ヘミスクシネートを介して制御細孔ガラスにカップリンされた、従来の保護されたヌクレオシドは、数多くの供給元（たとえば、Glen Research, Sterling, Vermont, U. S. A. ; Applied Biosystems, Foster City, Calif., U. S. A. ; および Pharmacia LKB, Piscataway, N. J., U. S. A.）から市販されている。

20

【0176】

一度完全長のオリゴヌクレオチドが合成されれば、オリゴヌクレオチドを脱保護し、使用する前に、固形支持体から切り離す。切り離しおよび脱保護は、同時に、または任意の順番で順番に行ってもよい。2つの手順は、ある保護基が、固形支持体から切り離される前に、オリゴヌクレオチドから除去され、他の基が溶液中の切り離されたオリゴヌクレオチドから脱保護されるように、ばらばらに行ってもよい。手順の順序は、存在する特定のブロック部分、固形支持体への特定の結合、および合成を行う個々の優先性に依存する。脱保護が切り離しに先行する場合は、保護基をオリゴヌクレオチドから洗い流してもよく、これには固形支持体上の結合が残っている。逆に、脱保護が切り離しの後に続く場合は、除去された保護基は、オリゴヌクレオチドが存在する溶液中に残る。オリゴヌクレオチドは、使用の前に、これらの保護基からの単離を要求されることがしばしばある。

30

【0177】

好ましい実施形態および殆どの商業的DNA合成では、5'-ヒドロキシル上の保護基は、合成の最終段階で除去される。次いで、オリゴヌクレオチドが固形支持体から切り離され、残った脱保護は溶液中で行われる。5'-ヒドロキシル保護基の除去は、通常、次のヌクレオチドモノマーのカップリングの前に、末端5'-ヒドロキシル保護基を除去するために、合成で利用したのと同じ試薬での処理を必要とする。5'-ヒドロキシル保護基がジメトキシトリチル基である場合、脱保護は、酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸またはトリフルオロ酢酸での処理により達成することができる。

40

【0178】

オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、2'-ヒドロキシル基がtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)部分でブロックされている場合は、後の基は合成の最後に、テトラヒドロフラン中で、テトラブチルアンモニウムフルオリドを使用して除去してもよい。Wu et al., J. Org. Chem. 55: 4717-4724 (1990) 参照。フェノキシアセチル保護基は、アルコール中、無水アンモニアで除去することができる(TBDMS基が安定で、オリゴヌクレオチドが切り離されない条件下で)。シチジンのベンゾイル保護基は、アルコール中、無水アンモニアでも除去する。

50

【0179】

切り離され、完全に脱保護されたオリゴヌクレオチドを、直接的使用してもよいし（脱保護試薬を取り除くために、凍結乾燥または蒸発された後）または使用の前に精製してもよい。合成オリゴヌクレオチドの精製は、一般的に、完全長のオリゴヌクレオチドを、脱保護ステップで除去された保護基から、さらに重要なこととして、次のヌクレオチドモノマーとカップリングしなかったオリゴヌクレオチドを合成中にキャップする時生成した、欠失型オリゴヌクレオチドから単離するために、望ましい。

【0180】

オリゴヌクレオチド精製技術は、当業者によく知られている。方法として、シリカプレートにおける薄層クロマトグラフィー（TLC）、ゲル電気泳動、サイズ分画（たとえば、ショーデックスカラムを使用して）、逆相高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）およびアニオン交換クロマトグラフィー（たとえば、mono-Qカラムを使用して、Pharmacia-LKB, Piscataway, N. J., U. S. A.）が挙げられるが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチド精製の検討に関しては、Oligonucleotide Synthesis, McLaughlin et al., 第5章およびWu et al., 第6章：A Practical Approach, Gait（編集）, IRL Press, Washington, D. C., (1984)を参照のこと。

4. 色素標識オリゴヌクレオチドプローブ

本発明は、さらに、相補的DNAまたはRNA標的の検出において有用な、色素標識オリゴヌクレオチドプローブ、または色素-オリゴヌクレオチド結合体を提供する。

【0181】

本発明のオリゴヌクレオチドは、式（I）～（VII）の色素標識の少なくとも1つを導入する、一本鎖の天然または合成DNAまたはRNA、PNA（ペプチド核酸）およびLNA（ロック核酸）である。色素標識は、共有結合を介してオリゴヌクレオチドの配列中に導入される。そうすると、反応基を持つ色素試薬は、固形支持体またはオリゴヌクレオチドにカップリングされ、所定の位置でオリゴヌクレオチドの配列に導入される。

【0182】

先に検討したように、本発明の色素試薬は、ホスホルアミダイト方法を使用するオリゴヌクレオチドの自動化合成に特に適切であるが、これに限定されない。そのような色素試薬の反応基は、ホスホルアミダイト類、たとえば、シアノエチル保護ホスホルアミダイトである。色素試薬中の極性基は、該色素試薬がいかなる負の電荷も持たないように、それらのエステル形態にマスクされる。したがって、マスクされた色素試薬は、自動化合成において要求される無水および弱酸性条件に適合性がある。オリゴヌクレオチド合成の完了した時、エステル保護基は除去され、 $-AsO_3^{2-}$ または $-AsO_3H^-$ のような負電荷極性基は再生される。

【0183】

したがって、他の実施形態では、本発明は、1個以上の $-As(=O)(OR^6)_2$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ （式中、 R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ （wは2または3）であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成する）を有する蛍光性および／または消光物質色素でラベルされたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0184】

さらなる実施形態では、色素標識オリゴヌクレオチドは、結合効率およびハイブリッド化安定性を改良するため、さらに1以上の小溝結合剤(MGB)を含む。MGBそれ自身は、場合によっては、ハイブリッド化条件により適用するために、強化された極性および親水性の極性基を1個以上含むように修飾されうる。より具体的には、本発明のオリゴヌクレオチドは、場合によっては、式(V1)のMGBに結合体化する。

【0185】

一実施形態では、色素標識オリゴヌクレオチドを、ポスト合成結合体化中に、色素を、固形支持体上または溶液中のオリゴヌクレオチドに導入することによって製造する。

【0186】

他の実施形態で、本発明のオリゴヌクレオチドを、以下のステップを含む自動化合成によって製造する。

色素の全負電荷極性基を、色素はこれ以上負の電荷を持たないように、エステル化によって保護するステップであって、該色素はさらにオリゴヌクレオチドに結合体化しうる反応基を持つステップと；

オリゴヌクレオチドの自動化合成を、ホスホルアミダイト方法を行い、色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと；

色素標識オリゴヌクレオチドを反応媒体から単離するステップと；

色素標識オリゴヌクレオチドの極性基を脱保護し、負電荷極性基を得るステップ。

【0187】

より具体的には、本発明のオリゴヌクレオチドを、以下のステップを含む自動化合成によって製造する。

1種以上の $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ (式中、

R^6 および R^7 は、同じまたは異なり、独立して、H、アルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；あるいは

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する2個の酸素原子とを含む5または6員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)]_w-$ (w は2または3)であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2Me$ 、 $-CH_2SO_2Ph$ であり、または隣接する炭素の2個の R^8 は、それらが結合する炭素と一緒に、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは同じ炭素の2個の R^8 はオキソを形成する)を有する、式(I)～(VII)の色素試薬を準備するステップと；

ホスホルアミダイト方法を使用して、オリゴヌクレオチドの自動化合成を行い、色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと；

色素標識オリゴヌクレオチドの $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ を脱保護し、 $-AsO_3^{2-}$ または $-AsO_3H^-$ から選択される負電荷極性基を有する色素標識オリゴヌクレオチドを得るステップと；

反応媒体から色素標識オリゴヌクレオチドを単離するステップ。

【0188】

本発明の色素標識オリゴヌクレオチドは、多種多様のDNA増幅/定量化方法における生物学的サンプル中の核酸の相補的鎖の検出、たとえば、5'-ヌクレアーゼアッセイ、鎖置換増幅法(SDA)、核酸塩基配列増幅法(NASBA)、ローリングサークル増幅法(RCA)のための、および液相または固相(たとえばアレイ)アッセイにおける、標的の直接検出のためのプローブとして有用である。

【0189】

さらに、本発明の色素標識オリゴヌクレオチドは、実質的にいかなるフォーマットのプローブ、たとえば、TaqManTMプローブ、分子標識、Scorpion(登録商標

10

20

30

40

50

）プローブ／プライマー、Sunrise プローブTM、立体配置的に補助されたプローブ、ライトアッププローブおよび侵入物検出プローブとして使用することができる。国際公開第01/86001号パンフレットは、核酸増幅、検出および定量における暗い消光物質を有する核酸プローブを記載し、この出願はその全体を本明細書に組み入れる。

【0190】

したがって、本発明は、式（I-111）および（V-VIII）の色素化合物の1以上に結合体化するオリゴヌクレオチドを使用し、オリゴヌクレオチドに対する相補的配列を有する標的を直接検出する方法であって、該オリゴヌクレオチドは、場合によっては、さらに1以上のアルソン極性基で置換されているかもしれないMGBを含み、

以下のステップ：

色素標識オリゴヌクレオチドプローブを生物学的サンプルに加えるステップであって、プローブは標的核酸に対して相補的あるいは実質的に相補的であるステップと；

適切な条件下、十分な時間、プローブと標的核酸とでハイブリッド形成させるステップと；

色素から放射される蛍光を検出するステップと

を含む方法を提供する。

【0191】

消光物質色素および蛍光性レポーター色素（該色素の1または両方ともが少なくとも1個の極性アルソン酸基を有する）の両方を持つオリゴヌクレオチドは、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）におけるプローブとして特に有用である。PCR技術は、特異的なDNA配列を増幅し、DNAプローブアッセイを一重DNA標的から実行することを可能にする。PCR技術の「リアルタイム」変更形態は、スペクトルフルオロメトリック温度サイクラを使用して、流れに任せて、PCRの進展の検出を可能にする。3つの極性アッセイフォーマットは、PCRが進むにつれて蛍光性となるDNAプローブを使用し、TaqManTM、分子標識およびScorpion（登録商標）プライマーが挙げられ、その全てが定量のために蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に依存するプローブのハイブリッド化である。

【0192】

TaqManTM プローブは、蛍光色素を通常5'塩基上に、および消光色素を通常3'塩基上に含むオリゴヌクレオチドである。照射された時、励起された蛍光色素は、蛍光するのではなく、エネルギーを近くの消光色素分子に伝達し、非蛍光性物質となる。TaqManTM プローブは、PCR生成物の内部領域にハイブリッド形成するように設計される。PCRの間、ポリメラーゼは、TaqManTM プローブが結合されているテンプレート複製し、ポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性は、プローブを切り離す。これにより蛍光性色素と消光色素が離され、これ以上FRETは起こらない。蛍光は、各サイクルで増加し、プローブ切断の速度に比例する。

【0193】

また、分子標識は、蛍光性色素および消光色素も含むが、消光色素が蛍光色素に直接隣接する場合、FRETだけが起こる。分子標識は、溶液中で遊離し、蛍光色素および消光物質を非常に近くで橋かけしながら、ヘアピン構造を導入するように設計される。分子標識が標的に対してハイブリッド形成する場合、蛍光色素および消光物質は離され、FRETは起こらず、照射で蛍光色素は、光を放つ。TaqManTM プローブと違い、分子標識は、増幅反応の間、原型を保つように設計され、シグナル測定のため、各サイクルで標的に対して再結合しなければならない。

【0194】

Scorpion（登録商標）プローブおよびプライマーは、DxS社の独占技術である。Scorpion（登録商標）プライマーは、プライマーが共有結合でプローブに結合する2官能性分子である。該分子は、蛍光団（レポーター）および消光物質も含む。標的の非存在下で、消光物質は、蛍光団によって放射された蛍光をほぼ吸収する。PCR反応の間、標的の存在下で、蛍光団および消光物質は、互いに離れ、これにより、放射され

10

20

30

40

50

た蛍光が増加する。蛍光を反応チューブ内で検出、測定することができる。

【0195】

Scorpion (登録商標) プライマーは、通常、プローブ元素を 5' 末端に持つ。プローブは、蛍光団を 1 末端に、消光物質をもう 1 つの末端に持つ自己相補的ステム配列である。プライマー配列は、5' 末端が修飾されている。ヘアピンループの始めに PCR ブロッカーを含む (普通、HEG モノマーがブロッキング剤として加えられる)。最初の PCR サイクルでは、プライマーが標的にハイブリッド形成し、ポリメラーゼの作用により延長される。Scorpion (登録商標) プライマーを、複数のプローブを使用することによって、ポイント変異の検査および同定のために使用することができる。各プローブに異なる蛍光団のタグを付け、異なる色を作ることができる。

10

【0196】

Scorpion (登録商標) プライマーでは、プローブは、プライマーに物理的にカップリングしており、シグナル形成に導く反応が単分子反応であることを意味する。これは、TaqManTM または分子標識のような他の技術によって要求される 2 分子衝突とは対照をなしている。

【0197】

PCR 延長の 1 サイクルが完了した後、新しく合成された標的領域を、プローブとして同じ鎖に結合する。変性およびアニーリングの第 2 サイクルの後、プローブおよび標的がハイブリッド形成する。ヘアピンループの変性には、生成した新しい DNA 2 本鎖よりもエネルギーを必要としない。したがって、ヘアピン配列は、新しく生成した PCR 生成物の一部にハイブリッド形成する。これにより、蛍光団を消光物質から離す結果となり、放射を起こす。

20

【0198】

異なる放射スペクトルを持つ蛍光色素は異なるプローブに結合してもよいので、TaqManTM プローブ、分子標識および Scorpion (登録商標) プライマーは、同じサンプル内で複数の DNA 種を測定することが可能である (多重 PCR)。多重 PCR は、内部制御を共増幅させ、シングルチューブ内での対立遺伝子識別し、均質アッセイを可能にする。これらのハイブリッド化プローブは、PCR において真の標的にのみハイブリッド形成し、プライマーダイマーや他の偽の生成物には形成しない。

【0199】

したがって、一つの態様では、本発明のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素が消光物質色素によって消光するように配置された、本発明の蛍光性色素と消光物質色素とを含み、これらの色素の 1 つあるいは両方が、1 以上のアルソン極性基を含む。オリゴヌクレオチドは、リアルタイム PCR において、「分子標識」として有用である。

30

【0200】

一実施形態では、本発明は、TaqManTM アッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、式 (IV) の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式 (I-I I I) および (V-V I I I) のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1 個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；色素標識オリゴヌクレオチドプローブを PCR 反応媒体に添加するステップと；標的が存在する場合、プローブを標的とハイブリッド形成させ、標的を Taq ポリメラーゼによって切断する PCR 温度サイクルを実行するステップと；蛍光シグナルを、切断された色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法を提供する。

40

【0201】

他の実施形態では、本発明は、分子標識アッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、式 (IV) の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式 (I-I I I) およ

50

び（V-V I I I）のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；標的が存在する場合、プローブを標的とハイブリッド形成させ、それによって蛍光色素と消光物質色素とを離すPCR温度サイクルを実行するステップと；蛍光シグナルを、消光していない蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法を提供する。

【0202】

さらなる実施形態では、本発明は、Scorpionプローブアッセイを使用して、実際の使用における標的配列の増幅を検出する方法であって、プライマーと、式（I V）の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式（I-I I I）および（V-V I I I）のいずれかの蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、プローブは、蛍光色素が消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；プライマーを標的DNAとハイブリッド形成させ、それによって、標的DNA上のプローブを延長するPCR温度サイクルを実行するステップと；延長された熱変成プローブを熱変性し、消光物質色素を切り離すステップと；延長されたプローブを冷却し、内部再配列を可能にし、標的特異的方法で蛍光色素に蛍光発光させるステップと；蛍光シグナルを蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；を含む方法を提供する。

5. 合成

a. アルソナート基導入の一般的スキーム

アルソナート色素は、市販のアリールアルソン酸から出発して製造することができ、これは引き続き色素化合物とすることができる。この手法は、スキーム1に従って、アルソン酸カルボシアニン色素の合成によって図示することができる。

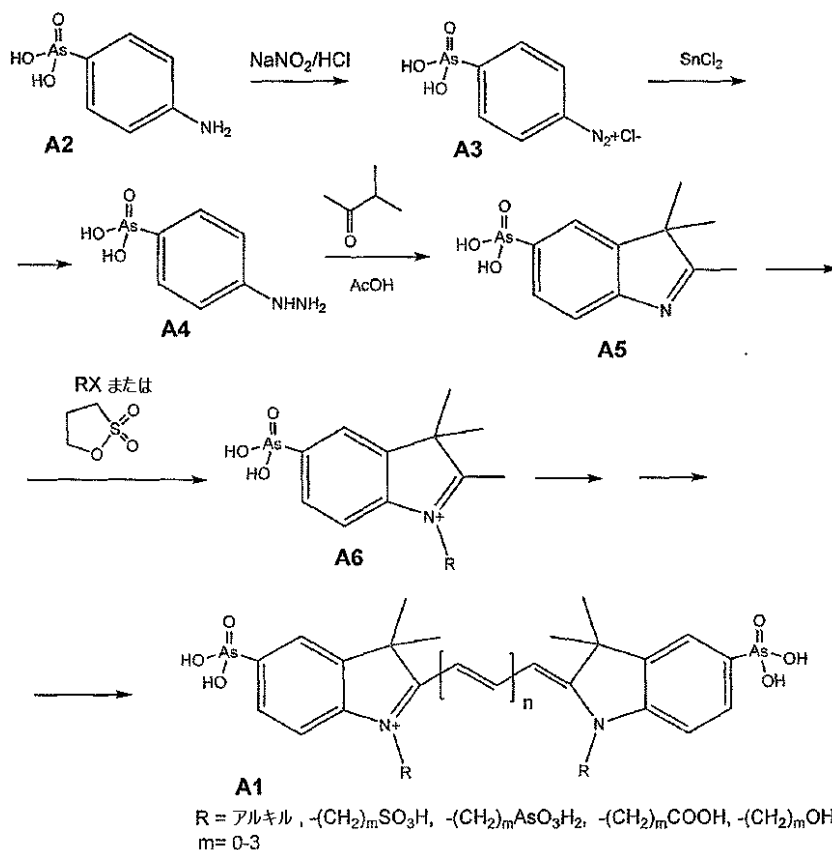
【0203】

特に、アルサニル酸（A2）は、公知の文献方法[Bart Justus Liebig's Ann. Chem. 429, 100, 1922]に従って、塩酸中、硝酸ナトリウムで処理することによって、対応するジアゾニウム塩（A3）に変換することができる。塩化スズ（I I）を使用して、公知の手順[Zhang, Peng; Meng, Jiben; Li, Xiaoliu; Matsuura, Teruo; Wang, Yongmei J. Heterocycl. Chem. 39, 1, p179-184, 2002]に類似の方法によって、ジアゾニウム塩を還元し、対応するヒドラジン（A4）とする。類似のスルホニルインドールを合成するために報告された方法[Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J. および Waggoner A. S. Bioconjugate Chem., 4 (2), p105-111, 1993]に類似して、ヒドラジンA4のFisher環化反応によって、対応するインドール（A5）およびインドリニウム塩（A6）とする。これらの刊行物は、さらに、スルホニルインドールからスルホニルカルボシアニン色素を製造する方法を記載し、該方法は、本発明のアルソナートカルボシアニン色素を組み立てるために使用することができる。同様に、これらの刊行物に記載された、異なるN-置換体を製造する方法は、同じように、多種多様なN-置換基を有するアルソナート色素（A1）の製造にも適用することができる。通常、N-置換基は、色素を核酸、タンパク質および他の生体分子に導入するための、反応基を有するリンカー（-L-R_x 部分）を提供する。

スキーム1

【0204】

【化 5 4】



10

20

あるいは、アリールアルソナート色素は、スキーム 2 に図示した 2 つの手法のいずれかに従って、アルソン基を色素分子に直接導入することによって製造することができる。

【0205】

1 つの手法では、色素を、ヒ素求電子試薬、たとえばヒ素酸 [Ehrlich, Bertheim Chem. Ber., 40, p 3293, 1907; Benda, Kahn Chem. Ber., 41, p 1674-1676, 1908]、あるいは三塩化ヒ素 [Varma, Raman, J. Indian Chem. Soc, 16, p 515-516, 1939] で反応させることによって、アルソナート基を色素分子 (B2) の芳香族成分に求電子置換を介して直接的導入し、亜ヒ酸エステル中間体 B3 を得る。次いで、酸化によって、亜ヒ酸エステル中間体 B3 をアルソナート B1 に変換する [Gough, King J. Chem. Soc, p 669-683, 1930]。アルソナート B1 を、 PCI_3 [Ehrlich, Bertheim, Chem. Ber., 43, p 918, 1910; Chem. Ber., 44, p 1264, 1911] または $\text{SO}_2 - \text{I}_2 - \text{HCl}$ 試薬 [Gavrilov V. I., Khusnutdinova F. M., Gornova N. N. J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.), 57, p 300-303, 1987; Zh. Obshch. Khim., 57, 2, p 350-354, 1987] での処理によって、ジクロロ亜ヒ酸エステル B3 に変換しなおすことができる。

30

40

【0206】

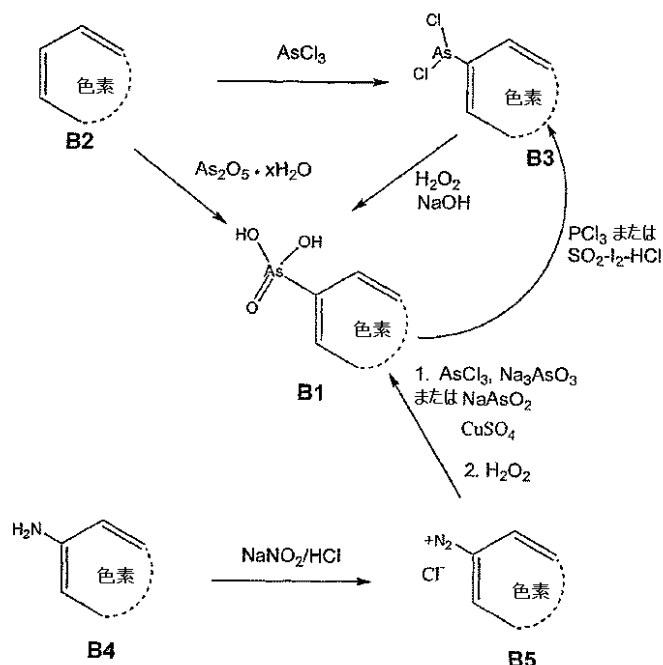
第 2 の手法では、アミノ色素 B4 のアミノ基を置き換えることによって、アルソナート基を色素分子に導入することができる。具体的には、まず、アミノ基をジアゾニウム塩 B5 に変換し、これを亜ヒ酸エステルの銅触媒置換え (Bart 反応) を行い、次いで、酸化によってアルソン置換基とし、B1 [Bardos, T. J. et al., J. Med. Chem., 9, p 221-227, 1966] を得る。

スキーム 2

【0207】

50

【化 5 5】



10

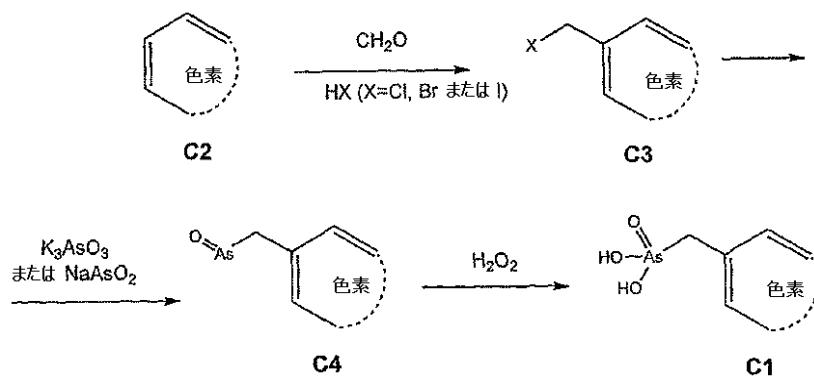
脂肪族アルソナート (C 1) は、スキーム 3 に従って得ることができる。この手法では、
 20
 、先ず、色素 (C 2) の芳香族成分をアルキル化する。アルキル化として、クロロメチル
 化 [Dacka, Stanislaw Pol. J. Chem., 57, 10-12, p 1345-1352, 1983]、プロモメチル化 [Gibson. S. et al.,
 , Tetrahedron, 25, p5047-5057, 1969] またはヨードメチル化 [Sandin, Fieser J. Am. Chem. Soc. 62, p3098-
 3103, 1940] が挙げられるが、これらに限定されない。次いで、アルキル化色素
 (C 3) を、無機亜ヒ酸エステル (C 4) に変換し、酸化ステップによって、C 1 [Qu
 ick; Adams J. Am. Chem. Soc. 44, p811, 1922; Che
 rnokal'skii, B. D. et al., J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.), 36, p1674-1675, 1966; Zh. Obsh
 30
 ch. Khim. 36, 1677-1679, 1966; Dehn, Mc Grath J. Am. Chem. Soc. 28, p352, 1906] を得る。

30

スキーム 3

【0208】

【化 5 6】



40

b. アルソナート色素の保護および脱保護

公知の技術に従って、極性アルソン酸色素、色素-As(=O)(OH)₂ を、便利な
 非極性形態、たとえば、アルソンジエステル、色素-As(=O)(OR)₂ に転換する
 ことができる。先に検討したように、そのような保護形態は、自動化オリゴヌクレオチド
 合成に適合し、高い色素極性が結合体化または染色目的に望ましくない場合の適用におい
 50

50

て使用することができる。

【0209】

アルソンジエステル色素は、 CaC_2 または CuSO_4 の存在下、アルソン酸をアルコールで処理することによって得ることができる [Chernokal'skii B. D. et al., J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.), 36, p1670-1673, 1966; Zh. Obshch. Khim., 36, p1673-1676, 1966]。アルソンジエステルの別の製造方法は、二塩化亜ヒ酸エステルをアルコールで反応させ、次いで酸化して、アルソンジエステルを得る [Werbel et al., J. Org. Chem., 22, p452, 1957] ことに基づく。代表的な保護基は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ および $-\text{CMe}_2-\text{CMe}_2-$ (ピナコール) である。これらの基は、オリゴヌクレオチド合成条件に適合し、スキーム4で図示される脱保護方法を適用することにより、容易に除去することができる。

10

【0210】

シアノエチルエステルは、オリゴヌクレオチドの自動化合成において、リン酸塩を保護するために普通に使用される [Atkinson, T. および Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M. J. (編集者), IRL Press Limited, Oxford, 1984]。この基はアンモニアまたはDBUの存在下で除去することができ、そのメカニズムはβ脱離を含むと考えられる。したがって、一手法では、アルソンシアノエチルエステル(D2)を類似の方法で脱保護し、アルソン酸色素(D1)を得ることができる。

20

【0211】

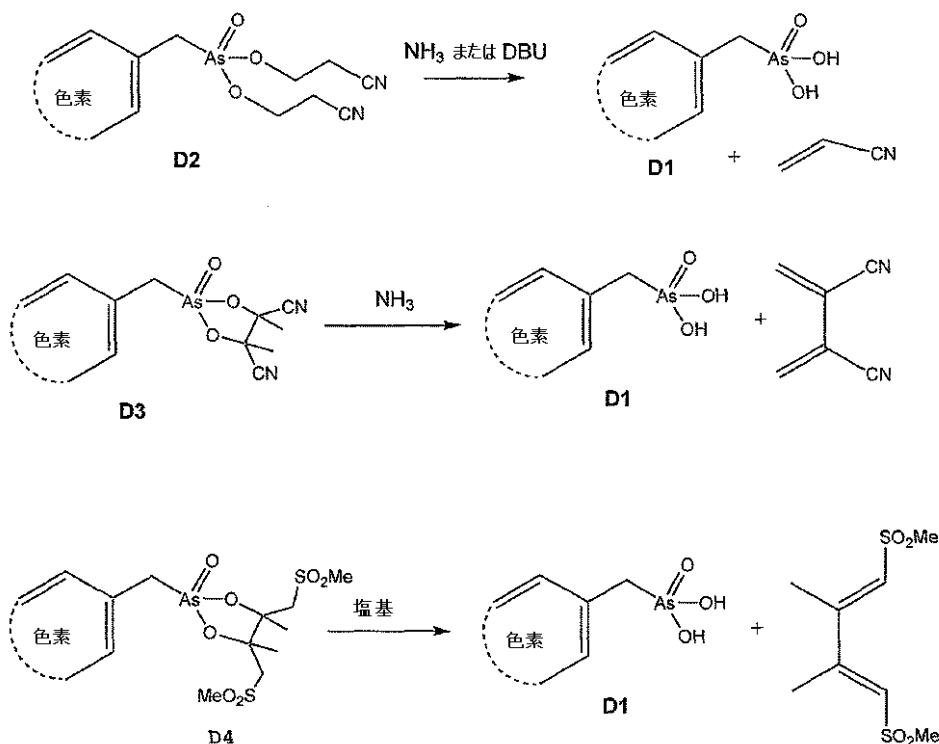
あるいは、アルソン酸を、非環状シアノエチル保護基に類似の通常の方法で、2, 3-ジヒドロキシ-2, 3-ジメチル-サクシンニトリル (Bailey et al., J. Org. Chem., 28, 1963, p828-831) と反応させることによって、最初にオルソエステル(D3)変換することができる。該エステルは、アンモニアの存在下、β脱離を行い、アルソナートジエステルをその遊離酸の形(D1)に戻すことができる。同様に、色素アルソン酸(D4)の保護に関し、2, 3-ジメチル-1, 4-ビス(フェニルスフホジオキソ)ブタン-2, 3-ジオール試薬を、公知の方法で製造することができる [Farkas, F. et al., Helv. Chim. Acta 74 (7), 1991, p1511-1519]。該ジエステルは、酸の存在下、β脱離を行い、アルソナートジエステルをその遊離酸の形(D1)に戻すことができる。

30

スキーム4

【0212】

【化 57】



10

20

30

40

50

保護条件が簡素であること、水性条件下でのキレートによりもたらされる増強された安定性および選択された誘導体に関する脱保護が簡単であることから、アルソン酸はキレート化保護が好ましい。先に記載したように、アルソン酸をアルコールおよびフェノール (ROH) で直接反応させることによって、色素のアルソン酸を、そのオルソエステル形態：色素- $\text{As}(\text{OR})_4$ でマスクすることもできる。オルソエステルのキレート化形態は特に好ましく、ここで、2 個の R 基は一緒に結合し、環状エステル：色素- $\text{As}(\text{O}_2\text{W})_2$ を形成する。通常、キレート化オルソエステルは、ベンゼンによる水の共沸脱離 [Casey J. P., Mislow K. J. Chem. Soc. D, p 1410-1411, 1970] のような脱水条件下、ピロカテコールを始めとするジオールを使用する直接反応により得ることができる。エステル化の程度 (ジエステル対オルソエステル) は、キレート化剤の性質ならびに反応および単離条件に大きく依存する。そのような反応のいくつかの例を図 3 に示す。

【0213】

より具体的には、色素化合物のアルソン酸置換基を、2 個または 3 個の炭素原子によって離されている 2 個の反応性酸素を有するキレート試薬と反応させることによって、そのキレートオルソエステル形態に変換することができる。通常、ジオール系キレート試薬は、一般式 $\text{W}(\text{OH})_2$ (式中、W は $-\text{C}(\text{R}^8)_2-$ W (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-\text{OC}(\text{O})-$ アルキル、 $-\text{OC}(\text{O})-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Ph}$ であり、または隣り合う炭素の 2 個の R^8 が、これらが結合する炭素と一緒にあって、アリールまたはヘテロアリールを形成し、あるいは 2 個の同じ炭素の R^8 がオキソを形成する) で表すことができる。

【0214】

適切なキレート試薬の例として、エチレングリコール、グリコールアルデヒド、グリオキザール、グリコール酸、グリオキシル酸、プロピレングリコール、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオン酸、マロンアルデヒドおよびピロカテコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0215】

これらの試薬を持つアルソン酸のキレート化保護は、[Salmi, Merivuori, Laaksonen Suom. Kemistil. B; 19; 1946; 102, 107]に開示される条件下、無水酢酸のような脱水試薬の存在下で達成することができる。さらに、これらのキレート化(保護)基は、標準アンモニア脱保護条件下で脱離するように設計することができる。この目的のため、保護基は、普通の水性条件、pH 1-8で実質的に安定性を得、アンモニア水条件下で脱離するように最適化されるべきである。アンモニアは、求核剤または塩基、あるいは両方として作用することができる。アンモニア脱保護のそのようなメカニズムは、塩基およびリン酸塩の脱保護に関するオリゴヌクレオチド合成[Atkinson, T. および Smith, 1984]において十分証明されている。

10

【0216】

特に有用な保護試薬は、ピナコール(2, 3-ジメチル-2, 3-ブタンジオール)、2, 4-ジメチル-2, 4-ペンタンジオールおよび2-ヒドロキシイソ酪酸である。実施例11で示すように、ピナコールおよびアルソン酸色素は、室温でアンモニア水によって加水分解することができる、安定なビス-ピナコーラートオルソエステルキレートを形成する。2, 4-ジメチル-2, 4-ペンタンジオールは、アンモニアでも分解する、安定なジエステルキレートを形成する。2-ヒドロキシイソ酪酸は、水性条件下では安定でないが、有機溶液中では安定な(1:1)キレートを形成する。

【0217】

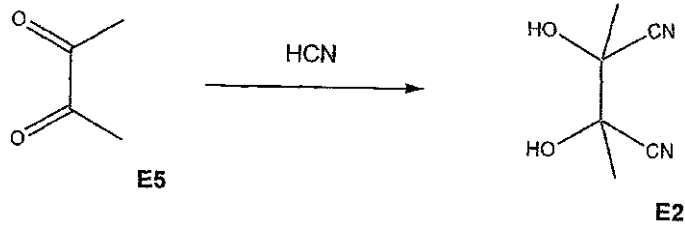
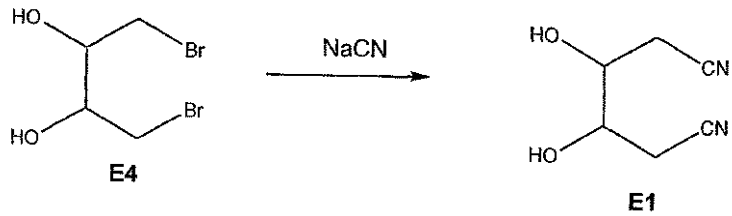
特異的に設計されたジオールは、アルソン酸を同時に保護し、保護基の脱離で促進する化学的部分を提供する対立する目的に役立つかもしれない。そのために、スキーム5では、 $-CH_2CH_2CN$ 、 $-C(Me)CN$ および $-C(Me)CH_2SO_2Ph$ のような付加物を持つジオール(E1, E2およびE3)を図示し、これらは、スキーム4で先に示したメカニズムに従って、 β 脱離を行うことができる。

20

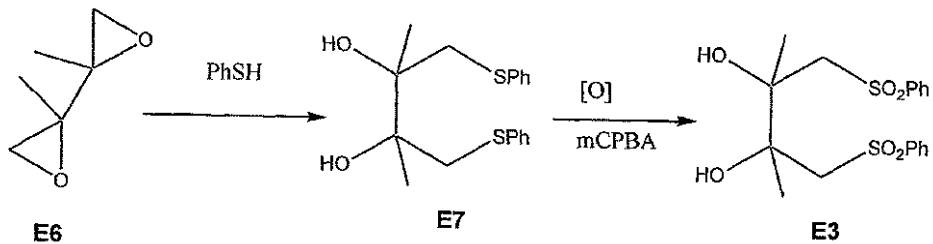
スキーム5

【0218】

【化 5 8】



10



20

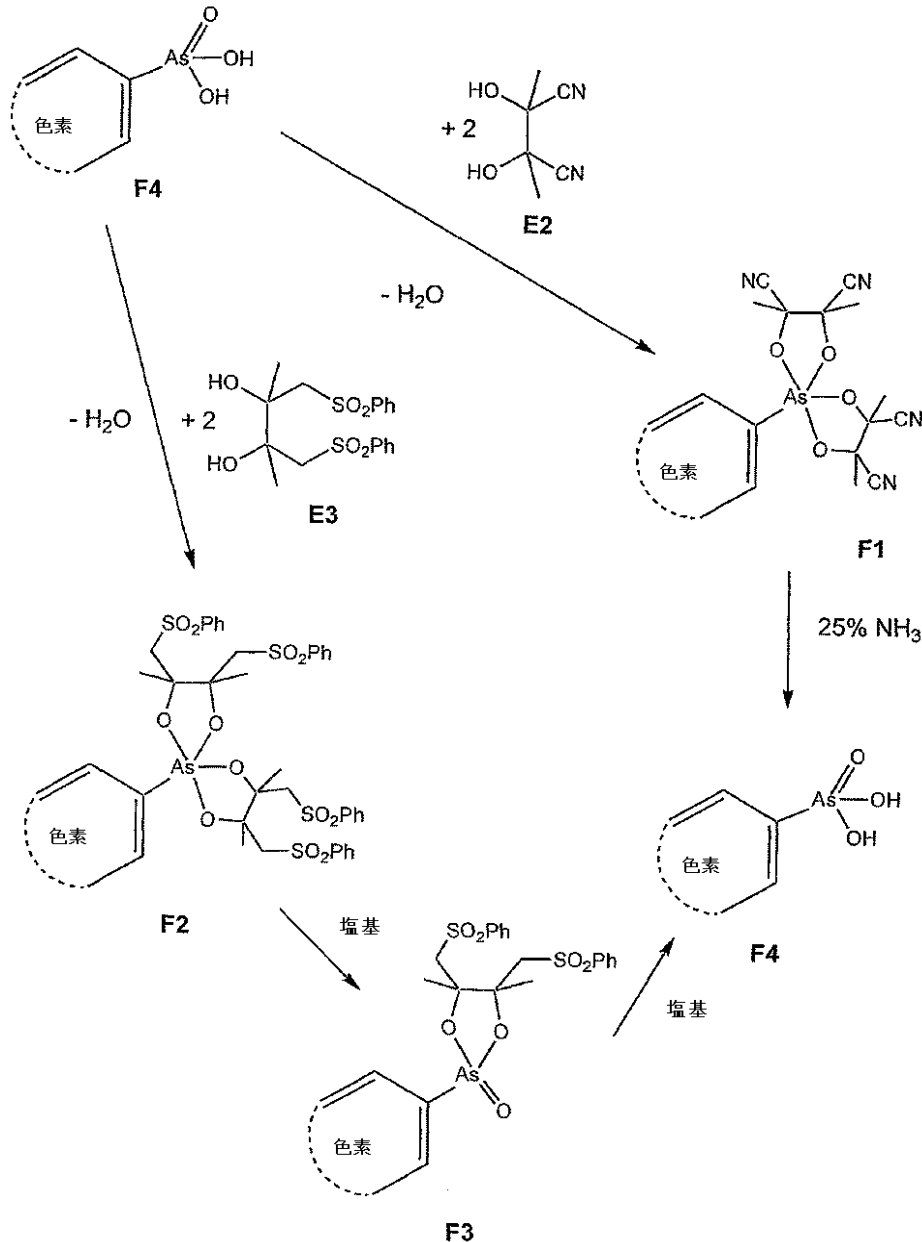
特に、ジオールE1は、公知の手順 [Przybytek Chem. Ber., 17, p1095, 1884] に従って合成された。ジケトンE5を、Bailey et al., 1963に従って、HCN生成ジオールE2と反応させた。以下のFarkas, F. et al. 1991の手順によって、1, 2:3, 4-ジエポキシ-2, 3-ジメチルブタンをチオフェノールと反応させ、ジオールE7を製造し、これをm-クロロ過安息香酸 (mCPBA) で酸化し、保護試薬E3を得た。ジオールE1~E3を、アルソン酸色素と、脱水条件下で反応させることができ [Salmi, Merivuori, Laaksonen, 1946]、対応するアルソンオルソエステルキレート3a (図3)

30

スキーム6

【0219】

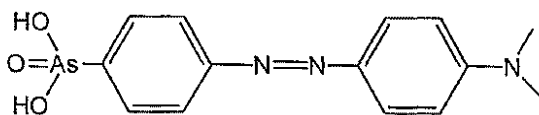
【化 5 9】



キレート 3 a (図 3) および F 1 の脱保護を、3 a は β 脱離によって、または F 1 は γ ー環化で補助されたアンモニア処理によって行った。F 2 の脱保護は、中間体 F 3 を形成するために、DBU のような強塩基を必要とし、これを続いて塩基性条件化でさらに脱保護する。[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸 [Barrowcliff, Pyman, Remfry J. Chem. Soc, 93, p1900, 1908] を、色素中のアルソン酸基の保護および脱保護の条件をどのようにして最適化するかを実証するための、簡単なモデル化合物として使用することができる。

【0220】

【化 6 0】



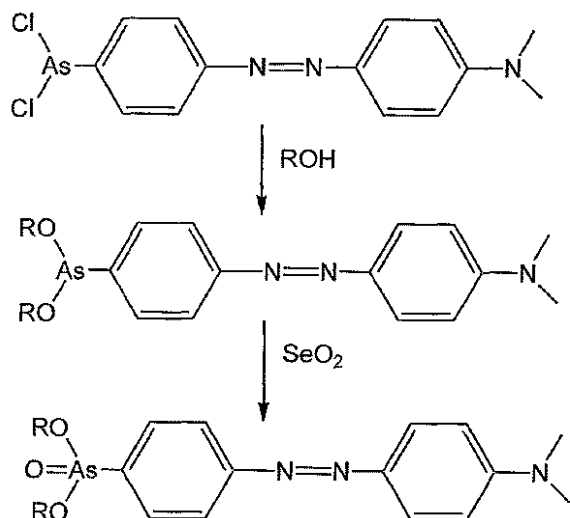
スキーム 7 で図示するように、前記化合物は、PCl₃ [Ehrlich, Bertheim, 1910-1911] による、または SO₂-I₂-HCl 試薬 [Gavrilov V. I., Khusnutdinova F. M., Gornova N. N. 1

987] による処理によって、ジクロロアルシノ誘導体に還元された。ジクロロアルシノ色素誘導体は、アルコールで処理され、次いで酸化され、対応するアルソン酸ジエステル [Werbel et al., 1957] を得る。

スキーム 7

【0221】

【化61】



10

20

6. 実験および例示

一般的説明

試薬および無水溶剤を含む溶剤の全ては、Sigma-Aldrich、TCI、Lancasterまたは他の化学品製造会社から購入した。制御細孔ガラス (CPG) は、CPG社または他の商業的ソースから購入することができる。蒸発は、回転蒸発器およびダイアフラムポンプを使用する、減圧下の溶剤の除去を言う。合成された色素の構造は、FinniganまたはWaters装置上でVarianまたはBrukerのようなNMR装置および質量分光器を使用して証明した。

反応混合物を、Varian, WatersまたはAgilentの装置で、HPLCあるいはLC-MSを使用するクロマトグラフィ、またはEMシリカゲルTLCプレートを使用するTLCによって分析した。UV-VISスペクトルは、Perkin-Elmerのような数多くの市販のスペクトロメーターで取った。自動化オリゴヌクレオチド合成装置は、Applied Biosystemから購入した。

30

【0222】

リアルタイムPCRは、ケフェイド型SmartCycler (登録商標) を使用して行った。

【0223】

スルホニル色素 (たとえば、Alexa532) は、Molecular Probe社から入手可能である。CyTM 色素は、Amersham Biosciences UK社から入手可能である。

40

【0224】

ピロカテコール (カテコール)、グリオキシル酸、グリオキザール、エチレングリコール、1, 4-ジブromo-2, 3-ブタンジオール、p-およびo-アルサニリック酸は、Sigma-Aldrichから購入した。

【0225】

1-アセチル-2, 3-ジヒドロインドール-5-イルアミンは、インドリンから手順 [Prasad G. K. B., Burchat A., Weeratunga G., Watts I., Dmitrienko G. I., Tetrahedron Lett, 32 (38), p5035-5038, 1991] によって得た。

50

【0226】

1-アセチル-2, 3-ジヒドロインドール-5-イルアミン-6-アルソン酸は、等量の1-アセチル-2, 3-ジヒドロインドール-5-イルアミンと H_3AsO_4 とを混合し、乾燥し、得られた塩をデカン中で20時間還流することによって得た。

【0227】

6-アセチル-3, 6, 7, 8-テトラヒドロベンゾ[1, 2-b:4, 3-b']ジピロール-2-エトキシカルボニル-5-アルソン酸、MGB構成ブロックは、1-アセチル-2, 3-ジヒドロインドール-5-イルアミン-6-アルソン酸から、非アルソナン化合物に関する以下のFisher環化反応手順[Samsoniya Sh. A., Kadzhirishvili D. O., Gordееv E. N., Zhigachev V. E., Kurkovskaya L. N., Suvorov N. N. Chem. Heterocycl. Compd. (Engl. Transl.), 18(4), p382-385, 1982; Khim. Geterotsikl. Soedin., 18(4), p504-507, 1982]により得た。

10

【0228】

図5に示すアルソン酸基含有MGB試薬は、6-アセチル-3, 6, 7, 8-テトラヒドロベンゾ[1, 2-b:4, 3-b']ジピロール-2-エトキシカルボニル-5-アルソン酸から、非酸類縁体に関する公表された手順[Boger D. L., Coleman R. S., Invergo B. J., Sakya S. M., Ishizaki T. et al., J. Am. Chem. Soc, 112, 12, p4623-4632, 1990]を使用して製造し、その後以下に記載する方法によってアルソン酸基の保護を行った。

20

【0229】

3, 4-ジヒドロキシアジポニトリル(E1)は、公表された手順[Przybytek Chem. Ber., 17, p1095, 1884]に従って得た。

【0230】

2, 3-ジヒドロキシ-2, 3-ジメチルスクシンニトリルは、Bailey et al., J. Org. Chem., 28, 1963, p828-831によって記載されたようにして得た。

【0231】

2, 3-ジメチル-1, 4-ビス(フェニルチオ)ブタン-2, 3-ジオールは、公知の手順[Farkas, F. et al., Helv. Chim. Acta 74(7), 1991, p1511-1519]によって製造し、これを、m-クロロ過安息香酸を使用して酸化し、2, 3-ジメチル-1, 4-ビス(フェニルチオジオキソ)ブタン-2, 3-ジオールとした。

30

【0232】

4-ヒドラジノフェニルアルソン酸(A4)は、[Zhang, Peng; Meng, Jiben; Li, Xiaoliu; Matsuura, Teruo; Wang, Yongmei J. Heterocycl. Chem. 39, 1, p179-184, 2002]に記載された方法を使用して、4-ヒドラジノ安息香酸に類似した方法で得た。

40

【0233】

[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸は、[Barrowcliff, Pyman, Remfry J. Chem. Soc, 93, p1900, 1908]に記載された方法に従って得た。

方法A

方法Aは、リンカーおよびヌクレオシド中の1級アルコール基のDMTr-保護について、典型的な手順を示す。一般的に言って、1級アルコール(10mmol)を有する化合物を乾燥ピリジン(100mL)に溶解し、アルゴン下、室温で攪拌した。4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド(DMTrCl, 3.5g, 10.3mmol)を一部分加え、5時間攪拌した。混合物を蒸発させ、ジクロロメタン(500mL)に取り、飽和N

50

a H C O₃ および飽和 N a C l 溶液（各 2 0 0 m L）で洗浄し、N a₂ S O₄ で乾燥した。抽出物を蒸発させ、残留物を、酢酸エチル、ジクロロメタンおよびメタノールの混合物を使用して、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィで精製し、DMT r 保護アルコールを製造した。

方法 B

方法 B は、C P G へ固定する一般的方法を示す。（Atkinson, T. および Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M. J.（編集者）, IRL Press 社, Oxford, 1984 も参照）。スキーム 8 は、アルソナート基を有する、式（I I I）のキサンチン色素、リンカー基（ここで 1 級アルコールは、DMT r によって保護されている）を図示する。リンカー基は、無水コハク酸での反応により修飾され、反応基：-C O O H を与え、これは、次に、カップリングし、C P G 上のアミノ基となる。

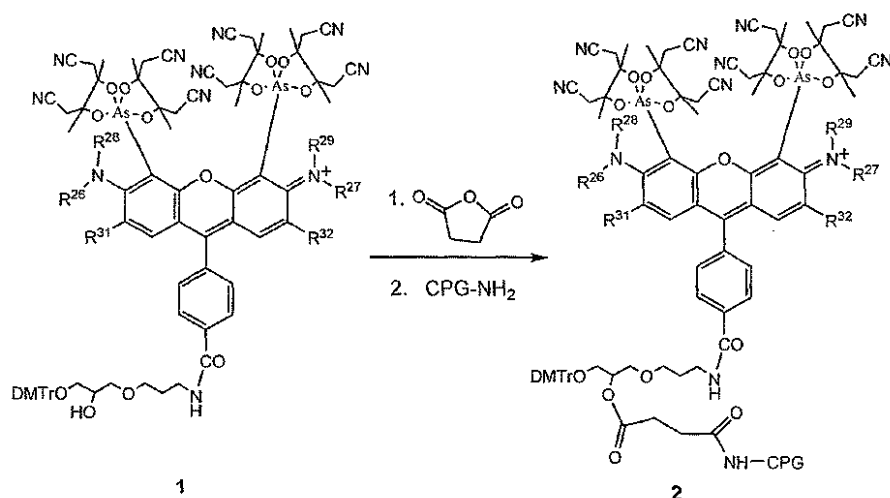
【0234】

一般的に言えば、化合物 1（1.0 mmol）の乾燥 DMF（10 mL）溶液に、無水コハク酸（0.15 g, 1.5 mmol）、トリエチルアミン（0.25 mL）、および触媒として 4-ジメチルアミノピリジン（DMAP, 0.01 g）を加え、反応混合物を室温で一晩攪拌し、1 mL の水により処置を 1 時間行い消光し、未反応無水物を加水分解した。混合物を蒸発し、ジクロロメタン（50 mL）に取り、2 M の飽和 N a H S O₄ 溶液および飽和 N a C l 溶液（各 20 mL）で洗浄し、N a₂ S O₄ で乾燥した。抽出物を蒸発し、酢酸エチル、ジクロロメタンおよびメタノールの混合物を使用するシリカゲルカラムに素早く通した。精製された物質は、コハク酸を含んでいない。スクシネート中間体を、乾燥 DMF（10 mL）に再び溶解し、アミノ-C P G（1 g）およびジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC, 0.31 g, 1.5 mmol）で処理し、アルゴン下で一晩攪拌した。修飾された C P G E をろ過によって集め、エーテルでの洗浄によって精製した。修飾された C P G を酸で脱トリチルし、光学密度によって、放出された DMT r 基を測定することによって負荷を定量した。アルソナート色素をオリゴヌクレオチドプローブの 3' 末端に導入するために、この修飾された C P G 2 を直接使用した。

スキーム 8

【0235】

【化 6 2】



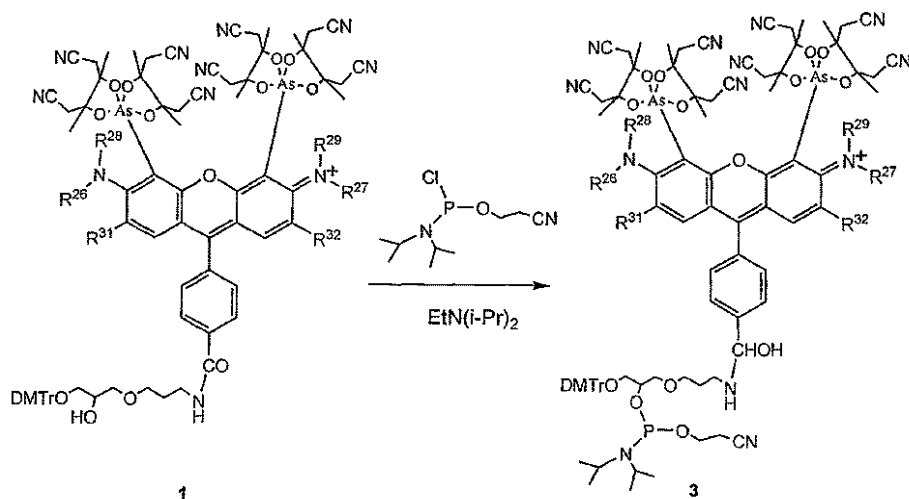
方法 C

方法 C は、ホスホルアミダイトの製造に関する一般的方法を示す。（Atkinson, T., および Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M. J.（編集者）, IRL Press 社, Oxford, 1984 も参照）。以下のスキーム 9 は、式（I I I）1 のキサンチン色素が標準の合成によりホスホルアミダイト化合物 3 とすることを図示する。

スキーム 9

【0236】

【化63】



10

一般的に言えば、化合物 1 (1.0 mmol) の乾燥ジクロロメタン (20 mL) 溶液に、N-エチル-N, N-ジイソプロピルアミン (0.2 g, 1.55 mmol) を加え、アルゴン下、室温で攪拌し、クロロホスファイト (2.5 g, 1.06 mmol) で滴下処理した。反応混合物を 1 時間攪拌し、飽和 NaHCO₃ 溶液および飽和 NaCl 溶液 (各 20 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。抽出物を蒸発させ、最小限の量のエーテルに再度溶解し、攪拌ヘキサンに沈殿させた。固体 3 をろ過により集め、真空乾燥し、アルソナート色素の内部位置、オリゴヌクレオチドプローブの 3'-または 5'-末端への導入のために直接使用した。

20

方法 D

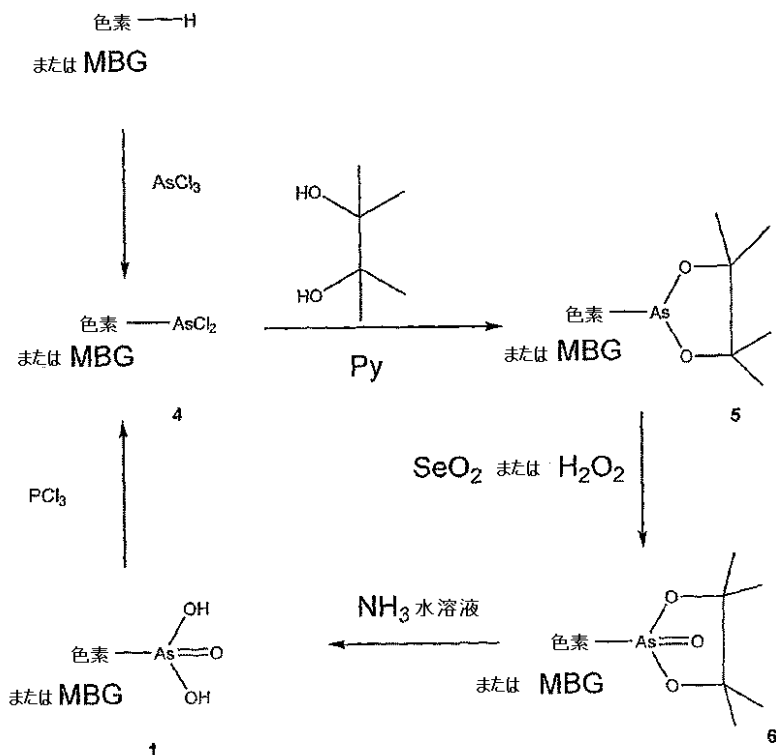
方法 D は、アルソナートジエステルを製造する一般的な方法を示す。アルソナートジエステル色素およびアルソナート基を有する MGB は、亜ヒ酸エステル二塩化物をアルコールで処理し、次いで酸化ステップを行う [Werbel et al., J. Org. Chem., 22, p 452, 1957] ことによって得た。適切なアルコールの例として、HOCH₂CH₂CN、HOCMe₂-CMe₂OH (ピナコール) が挙げられるが、これらに限定されない。スキーム 10 は、亜ヒ酸エステル二塩化物 (-AsCl₂) 基を有する色素または MGB (4) を、ピナコールの存在下、エステル化し、中間体亜ヒ酸エステル 5 を製造するのを図示する。次いで、SeO₂ または H₂O₂ による酸化によって、色素 (または MGB) シアノエチルアルソナートジエステル 6 を製造する。

30

スキーム 10

【0237】

【化 6 4】



10

20

特に、亜ヒ酸エステル二塩化物 4 を有する色素または MGB は、対応するアルソン酸 1 から、 PCl_3 処理 [Ehrlich, Bertheim, 1910-1911] または色素または MGB の AsCl_3 による直接求電子置換 [Varma et al., 1939] によって得られる。

【0238】

一般的に言えば、アルソン酸色素または MGB 1 (1.0 mmol) の三塩化リン (20 ml) 懸濁物を、アルゴン下、60 ° までゆっくり加熱する。混合物を 15 分間攪拌し、ロタバップ (rotavap) により蒸発させ、亜ヒ酸エステル二塩化物 4 を形成した。化合物 4 は湿度に敏感なので、さらに精製することは必要ではない。あるいは、非置換色素または MGB (1.0 mmol) の三塩化ヒ素 (10 ml) 懸濁物をアルゴン下で攪拌しながら、100 ° までゆっくり加熱した。混合物を 30 分間攪拌し、乾燥エーテルまたはヘキサンに注ぎ入れ、亜ヒ酸エステル二塩化物 4 を析出させた。ジクロロ亜ヒ酸エステル 4 をキシレンで蒸発することによって乾燥し、次のステップのエステル化で直接使用した。ジクロロ亜ヒ酸エステル 4 (1.0 mmol) の乾燥ピリジン (10 mL) 溶液に、ピナコール (0.13 g, 1.1 mmol) をアルゴン下に加え、混合物を室温で 3 時間攪拌した。混合物を蒸発させ、残渣を、酢酸エチル、ジクロロメタンおよびメタノールの混合物を使用して、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィによって精製し、化合物 5 を製造した。1, 4-ジオキサン、アセトンまたは DMF の 1 M 溶液中で、60 ° で 3 時間、攪拌しながら、等量の SeO_2 で処理することによって、亜ヒ酸ジエステル 5 を酸化してアルソナートジエステル 6 とし、セライトによって赤色 Se 析出物からろ過し、ロタバップ (rotavap) を使用して蒸発させた。キシレンを用いた共蒸発により微量の DMF を除去し、その後、シリカゲルカラムで沈殿させた。混合物を、酢酸エチル、ジクロロメタンおよびメタノールの混合物を使用して、フラッシュクロマトグラフィによって精製し、アルソナートジエステル 6 を製造した。

30

40

【0239】

保護アルソナート色素または MGB 6 を、先に記載した方法 A ~ C を使用して、CPG 上に固定、またはホスホルアミダイト試薬に変換した。

【0240】

50

記載したホスホルアミダイトおよびCPGを使用したオリゴヌクレオチド合成を、自動化オリゴヌクレオチド合成 [Atkinson, T. および Smith, Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Gait, M. J. (編集者), IRL Press 社, Oxford, 1984] の標準のプロトコルを使用して行った。次いで、アンモニア中で、アルソナートエステルの脱保護を、スキーム10で図示された条件下で行った。

方法 E

方法 E は、アルソン酸色素のキレート化保護の一般的方法を示す。該方法は、ジエステルおよびオルソエステル保護アルソナートの両方を提供することができる。反応の結果は、キレート化剤の性質／構造、反応条件および単離中の処理に大きく依存する。アンモニア不安定性キレート化保護基の選ばれた例を図3に示す。

10

【0241】

酢酸 (5 mL) に、酸形態を単に溶解する、または H_2SO_4 (等量) をアルソナート色素のナトリウム、カリウムまたはトリアルキルアンモニウム塩の対応する量に添加することにより、アルソン酸色素誘導体 (0.1 mmol) の酢酸 (5 mL) 溶液を製造した。得られた溶液を、1.5 倍過剰のキレート化剤、ジオールまたはピロカテコール、各アルソン酸基：1 個のアルソン酸基を持つ色素に関して 0.3 mmol および 2 個のアルソン酸基を持つ色素に関して 0.6 mmol で処理した。グリコールアルデヒド、グリオキザール、グリコール酸、グリオキシル酸、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオン酸、マロンアルデヒドのような他のキレート化剤を、ここで記載した方法と類似の方法で使用した。

20

【0242】

キレート化反応を、無水酢酸 (0.2 mL, 2.1 mmol) の存在下、室温で1時間、または等容積のキシレンを持つ複数の真空蒸発により、水副生物を除去して行った。各蒸留の前に、新しいキシレンおよび酢酸を、同比率で加えた。蒸留は、少なくとも2回繰り返す必要がある。蒸発の実際の回数、反応時間および温度は、保護キレート化剤、使用されるジオールまたはピロカテコールに大きく依存し、反応の進行をモニターするために、TCLを使用して最適化される必要がある。通常、シリカゲル板上でTLCを、2-ブタノン：ギ酸：MeOH：水 (12：1：1：1) の溶液系で行った。生成物 (色素-A_s (O₂W)₂) を、EtOAc：AcOH：MeOH混合物を使用する、シリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィ、またはRP HPLCによって単離した。より具体的には、O₂W (すなわち、-O-W-O-) がジオール (ピロカテコールを含む) 残基であり、Wは本明細書で規定する通りである。

30

方法 F

方法 F は、アルソン酸色素のカルボン酸誘導体の活性化エステルを製造する一般的方法を示す。

【0243】

乾燥カルボン酸結合体の乾燥トリエチルアミン (3.1 mL) およびジクロロメタン (40 mL) 0.56 M 溶液に、アルゴン下でトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル (3.84 mL) を加え、混合物を室温で1時間攪拌する。ヘキサン (40 mL) を加え、色素のアルソン酸トリエチルアンモニウムのペンタフルオロフェニルエステル生成物を析出する。この活性化エステルを、中性または酸性条件下で、RP HPLCのシリカゲルクロマトグラフィによって精製した。該試薬を、もし必要であれば、イオン交換し、ナトリウムまたはカリウム形とし、標準プロトコル [Invitrogen, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 第1章-Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives] を使用して、アミンとのバイオ結合体化に直接使用した。

40

方法 G

アルソナートエステル-保護色素の分解／脱保護速度の測定

50

保護色素（1 mg）およびメチルレッド色素（0.5 mg，内部標準， λ_{max} 482 nm）をMeOH（5 mL）に溶解し、緩衝液または25%アンモニア水溶液（45 mL）と混合した。サンプル（1 mL）を分解の期間に取った。サンプルを迅速に真空下に置き、アンモニアを除去し、MeOHに溶解、あるいは緩衝液中、pH 1.6（0.1%トリフルオロ酢酸）～7.5（0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム）の範囲でHPLC分析のために直接使用した。HPLC分析を、Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110 Aカラム（250×4.6 mm）で、0.1 M酢酸トリエチルアンモニウム（pH 7.5）緩衝液中、MeCNの0～100%勾配を使用して行った。クロマトグラムを、Varian ProStar PDA検出器を使用して、200～600 nmの範囲で検出した。相対濃度の計算を、520 nmでのピーク面積に基づいて行った。内部標準は、8.6分でのピークを得た（ λ_{max} 482 nm）。

10

【0244】

図12は、ビスピナコール保護アゾ色素の塩基誘発脱保護に対応する典型的な速度曲線の例を図示する。

【実施例】

【0245】

実施例

以下の実施例に、本発明の特定の色素試薬およびそれらの製造を説明する。詳細な実験手順は、方法A～Fの任意の適正な組合せに従って得た。

【0246】

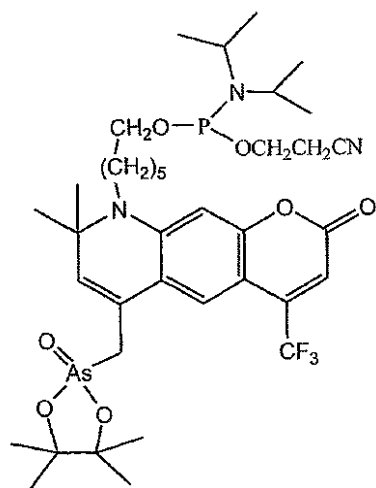
20

実施例1

実施例1は、アルソナートエステルを有する、式（II）のホスホルアミダイト色素試薬である。色素試薬は、ホスホルアミダイト方法を使用する自動化オリゴヌクレオチド合成に適している。

【0247】

【化65】



30

該色素試薬を方法CおよびDに従って製造した。

40

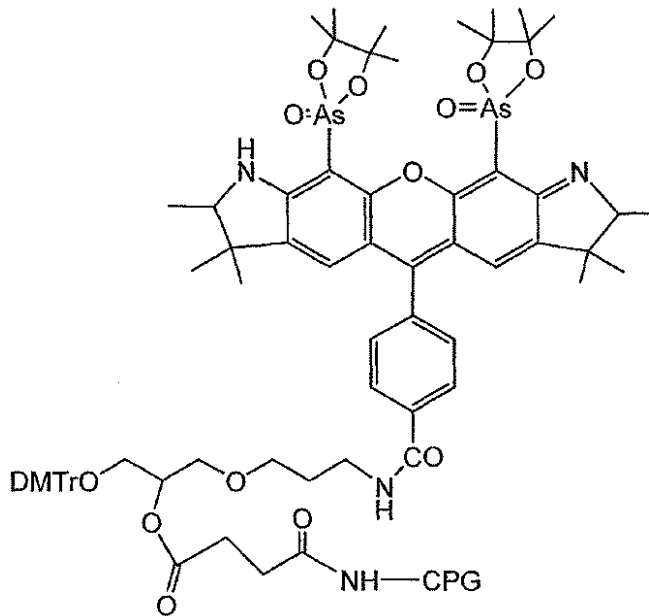
【0248】

実施例2

実施例2は、2個のアルソナートオルソエステルを有する、式（III）のカルボン酸色素試薬を示す。色素試薬は、CPGのような固形支持体に結合し、オリゴヌクレオチド合成を開始するのに適している。

【0249】

【化 6 6】



10

該色素試薬を方法 B および D に従って製造した。

【0250】

20

実施例 3

実施例 3 は、ピナコールを保護キレート化剤として使用する、2 個のアルソナートジエステルを有する、式 (I I I) のホスホルアミダイト色素試薬を示す。色素試薬は、ホスホルアミダイト方法を使用する、自動化オリゴヌクレオチド合成に適切である。

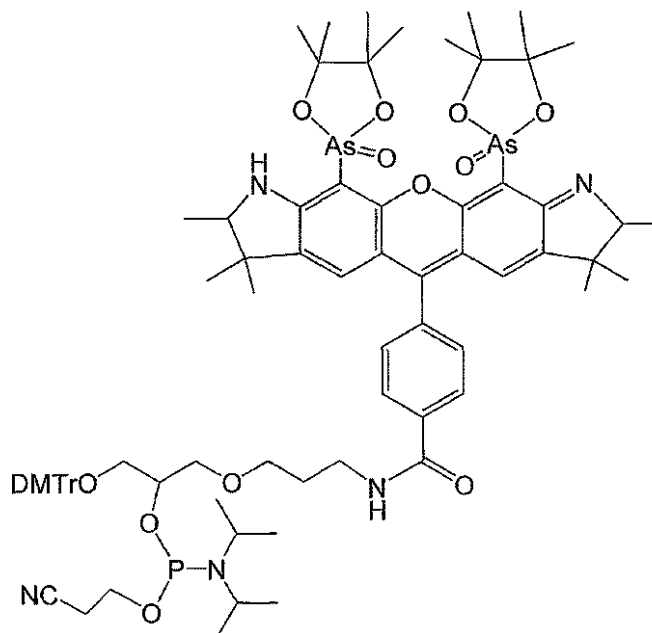
【0251】

色素試薬を、方法 A、C、D および E に従って製造した。さらに詳しい合成経路を、図 4 に図示する。

【0252】

【化 6 7】

30



40

実施例 4

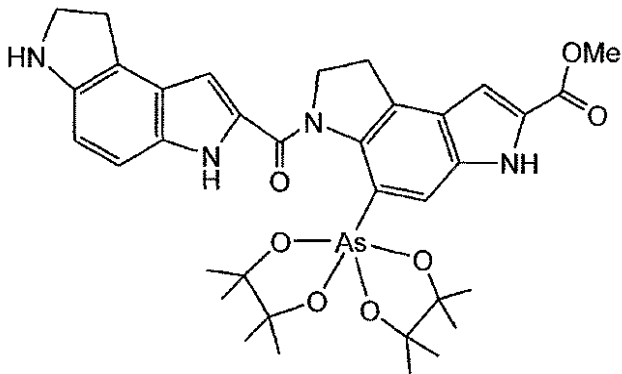
実施例 4 は、キレート化アルソナートエステルを有する、式 (I X) の MGB 中間体を示す。MGB を図 5 に図示されるように製造した。方法 E を使用して、活性化エステルを

50

得た。

【0253】

【化68】



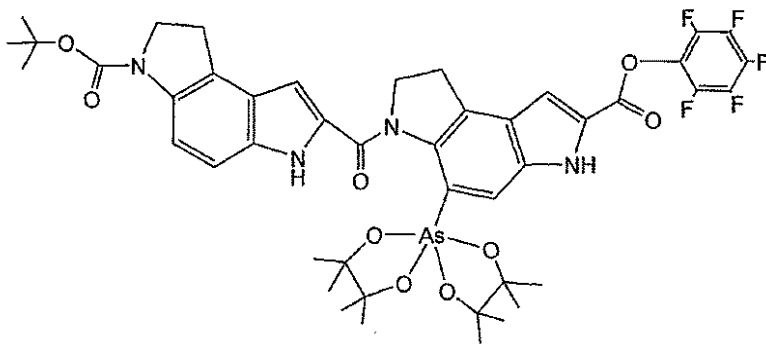
10

実施例 5

実施例 5 は、アルソナートエステルおよび活性化反応基（ $-COOH$ のペンタフルオロフェニルエステル）を有する、式 (VI) の MGB を示す。

【0254】

【化69】



20

キレート化アルソナートエステルを有する MGB を、N 保護ピロロインドールサブユニットを使用し、ピナコールをジオールとして使用する方法 E に従って製造した。2 個のピロロインドールサブユニットの結合を、先に図 5 に図示した、合成経路に従って行った。次の保護、脱保護を、さらに、図 6 に図示する。活性化エステル（ペンタフルオロフェニルエステル）を、方法 F を使用して得た。この活性化エステルを、バイオ結合体化のために、または第 3 MGB サブユニットを試薬に導入するために使用した。

30

【0255】

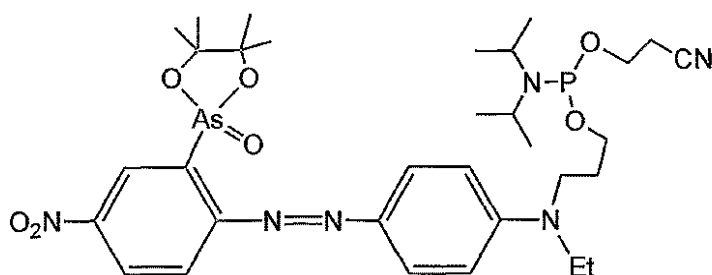
実施例 6

実施例 6 は、アルソナートエステルおよびホスホルアミダイト反応基を有する式 (IV) の蛍光消光物質色素試薬を示す。色素試薬は、ホスホルアミダイト方法を使用する、自動化オリゴヌクレオチド合成に適切である。

40

【0256】

【化70】



50

蛍光消光物質色素試薬を方法Cに従って製造した。

【0257】

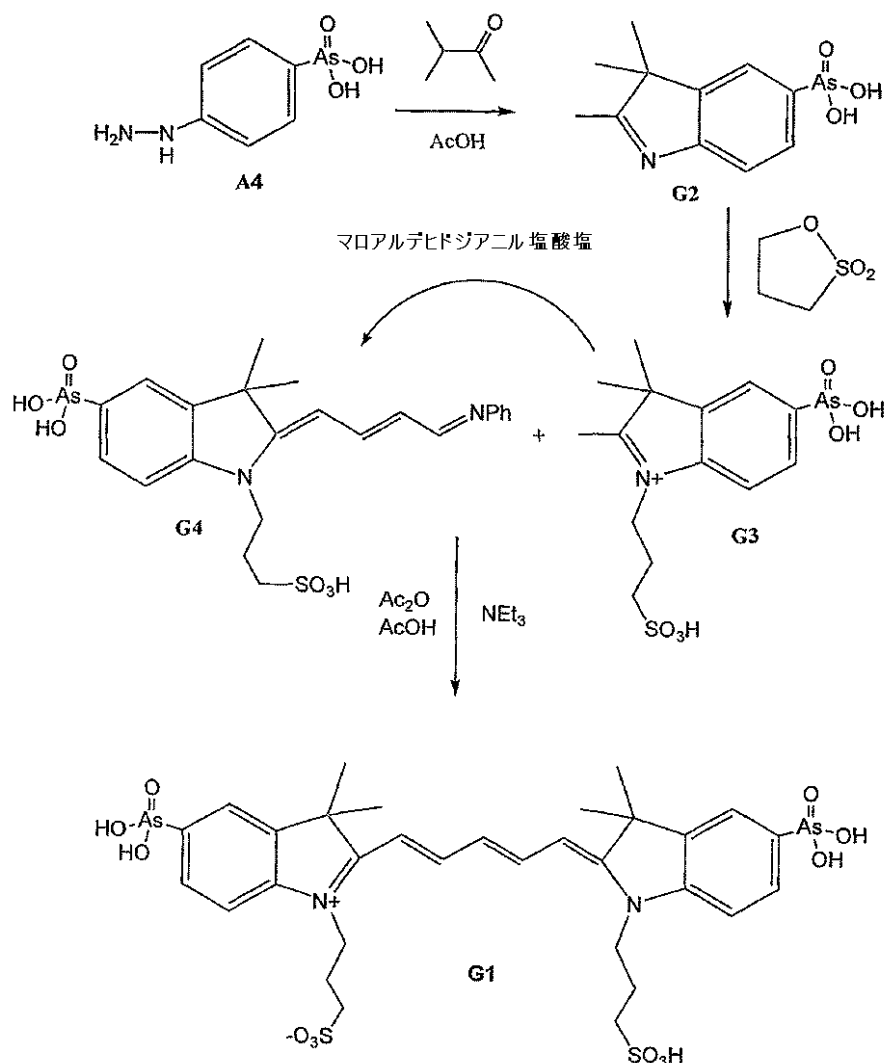
実施例7

式(Va)の極性カルボシアニン色素G1の合成を、スキーム11に図示する。色素化合物G1は、4-ヒドラジノフェニルアルソン酸(A4)から、中間体G2~G4を経て製造される。

スキーム11

【0258】

【化71】



特に、2, 3, 3-トリメチルインドレニニウム-5-スルホニルを得るために、中間体2, 3, 3-トリメチルインドレニニウム-5-アルソン酸(G2)を、スルホフェニルヒドラジンのFisher環化反応類似の方法で得た[Mujumdar R. B., Ernst L. A., Mujumdar S. R., Lewis C. J. およびWaggoner A. S. Bioconjugate Chem., 4(2), p105-111, 1993]

化合物G2を1, 3-プロパンサルトンで処理することによって、以下、Mujumdar R. B. et al., 1993によって記載された一般手順と同じ手順で、1-(γ-スルホナートプロピル)-2, 3, 3-トリメチルインドレニニウム-5-アルソン酸(G3)を得た。

【0259】

中間体G4を、Mujumdar R. B., 1993によって記載された方法の変種によって得た。N置換インドレニンG3(0.14g, 0.31mmol)およびマロン

10

20

30

40

50

アルデヒドジアニル塩酸塩 (0.09 g, 0.35 mmol) の酢酸 (2 ml) およびトリエチルアミン (0.05 ml) 混合溶液を、Ar 下、30 分還流した。反応物に関し、出発インドレニン G 3 の消失と、混合物の UV スペクトルの変化を、HPLC によってモニターした。反応混合物をエーテルで処理した。化合物 G 4 を、不安定な固形析出物として単離し、さらに精製することなく、次のステップの対称または非対称色素の製造のために使用した。

【0260】

色素、2- {5- [3', 3'-ジメチル-1'-(3-スルホプロピル)-1', 3'-ジヒドロインドリデン-5'-アルソナート] -ペンタ-1, 3-ジエニル} -3, 3-ジメチル-1-(3-スルホプロピル)-3H-インドリウム-5-アルソン酸 (G 1) を、スルホシアニン色素の文献 [Briggs, M. S., Burns, D. D., Cooper, M. E., Gregory, S. J. Chem. Commun., 23, 2000, p 2323-2324] に公表された一般的手順を使用して得た。C 1 の励起および放射スペクトルを図 11 に示す。

10

【0261】

実施例 8

IR 色素 H 1 の合成

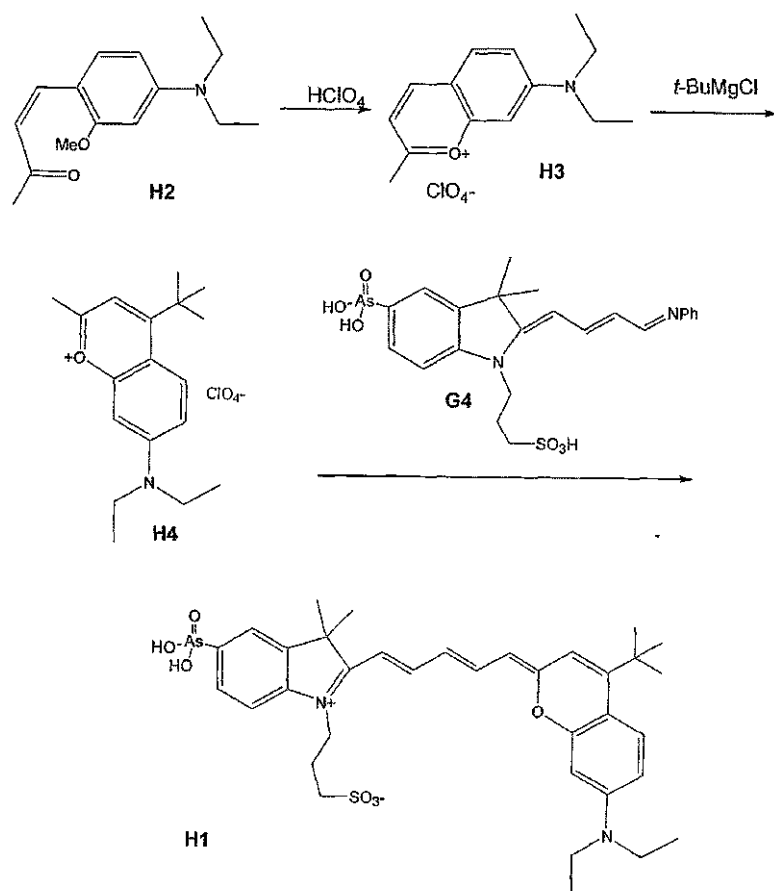
式 (VI a) の代表的な IR 色素 H 1 の合成を、スキーム 12 に示す。この実施例で、x は 2 であり、R^{5 7} は - (CH₂)₅ SO₃ H であり、R^{6 1 a} および R^{6 1 b} は、それぞれ、エチル基であり、R^{5 8 a} および R^{5 8 b} は、それぞれ、メチル基である。

20

スキーム 12

【0262】

【化 7 2】



30

40

H 2 を [Duck i S., Hadfield J. A., Hepworth L. A., Lawrence N. J., Liu C-Y., McGown A. T. Bioorg. Med. Chem. Lett, 7 (24), p 3091-3094, 1997] に

50

従って得た。

【0263】

中間体H3を、H2の酸触媒環化から得る。t-BuMgClによる置換反応によって、2-メチル-4-tert-ブチル-7-(N,N-ジエチルアミノ)クロメニリウム過塩素酸H4を製造する[Doddi G., Ercolani G. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, p271-276, 1986]。

【0264】

色素、1-(γ-スルホネートプロピル)-3,3-ジメチル-2-[3-(4-tert-ブチルベンゾピラン-2-イリデン)プロペン-1-イル]-3H-インドリウム-5-アルソン酸(H1)を、前記中間体G4と、クロメリニウム過塩素酸H4とを、スルホシアニン色素に関する文献[Briggs, M. S. et al., 2000]で公表された一般的手順によって、縮合することによって得た。

10

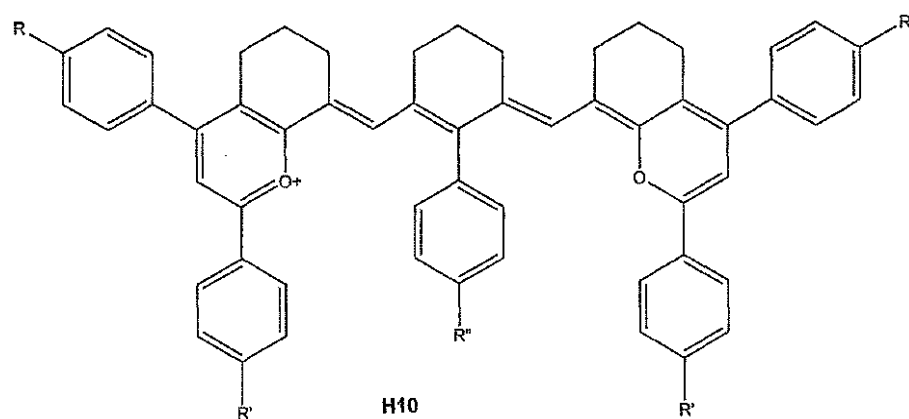
【0265】

実施例9

IR色素H10の合成

【0266】

【化73】



20

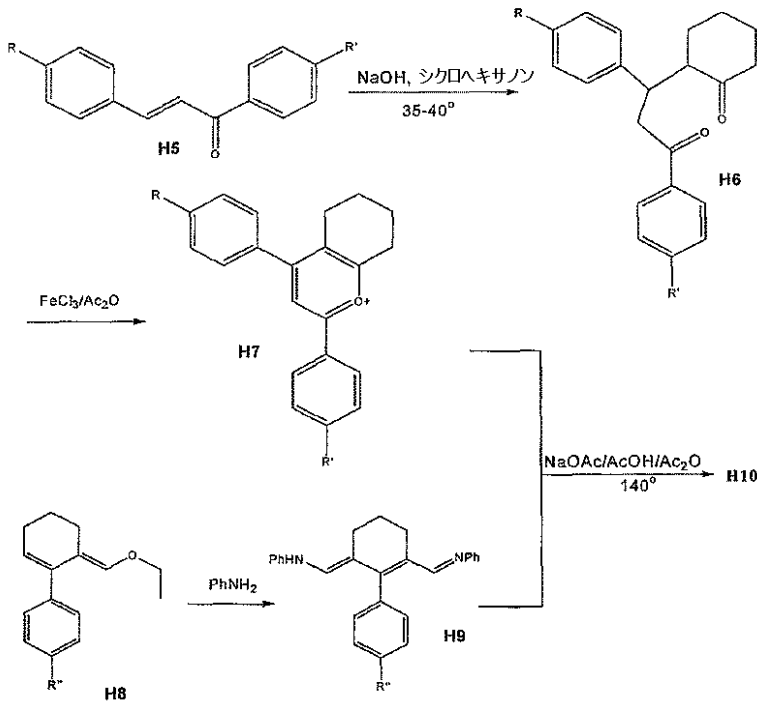
式(VII)のIR色素シリーズH10を、非置換IR色素に関して公表された手順[Ishchenko A. A., Kudinova M. A., Slominski Yu. L., Tolmachev A. I. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), p150-157, 1986; Zh. Org. Khim., 22(1), p170-179, 1986]に従って合成した。色素H10の合成の例を、スキーム13に図示する。

30

スキーム13

【0267】

【化 7 4】



10

20

特に、R、R' - 置換中間体 H7 を、アルソナート置換 H5 を、塩基性条件下でシクロヘキサノンで縮合し、次いで、得られた H6 を、 FeCl_3 の存在下酸化的環化 [Allen, Sallans Can. J. Res., 9, p574-579, 1933] を行うことによって得た。中間体 H9 を、R'' 置換 H8 から得た [Makin S. M., Pomogaev A. I., Boiko T. N., Nikiforova A. P. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), 17 (11), p2033-2036, 1981; Zh. Org. Khim., 17 (11), p2277-2281, 1981; Makin S. M., Pomogaev A. I. J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.), 18 (10), 1982, p1918-1920; Zh. Org. Khim., 18 (10), p2176-2179, 1982]。次いで、H9 を、2 当量の H7 にカップリングし、蛍光性 IR 色素 H10 を得た。

30

【0268】

実施例 10

式 (Vd) の、アルソン酸基を持つスクアラインおよびチオスクアライン色素を、2, 3, 3-トリメチルインドレニウム-5-アルソン酸 (G2) およびその誘導体、たとえば 1-(γ-スルホナートプロピル)-2, 3, 3-トリメチルインドレニウム-5-アルソン酸 (G3) から、米国特許出願公開第 2003/0235846 号明細書に記載するようにして合成した。

40

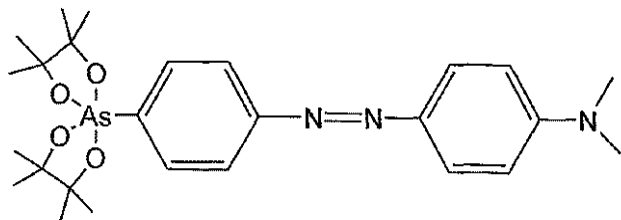
【0269】

実施例 11

[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸ビスーピナコレート

【0270】

【化 7 5】



ジオールキレート試薬としてピナコールを使用し、方法 E において概略を述べた手順に従って、上記の化合物を得た。キシレンでの 2 回の蒸発によって水の除去を達成した。移動層として EtOAc : MeOH (10 : 1) を使用し、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィにより、粗生成物を単離した。生成物を MeOH から結晶化し、オレンジ黄色固体を得た。融点：239～242 °、シリカゲル板上にオレンジ色の単一スポット、 $R_f = 0.5$ (CHCl₃ - MeOH 10 : 1)

【0271】

【数 1】

¹H NMR (DMSO-d₆) δ , ppm: 1.0 (s, 12H, Me), 1.22 (s, 12H, Me), 3.08 (s, 6H, NMe₂), 6.83 (d, 2H, Ar), 7.83 (dd, 4H, Ar), 8.10 (d, 2H, Ar).

化合物は、水性緩衝液中、pH 1.6～7.5 の範囲で安定であるが、25%アンモニア水中で分解し、これによって、オルソエステルが加水分解する。アンモニア中の分解を、方法 G に従って測定した。室温での完全分解速度 ($\tau_{1/2}$) は、約 3 時間である。脱保護の完全反応速度を図 12 に示す。ビスピナコール保護色素 (13.3 分でピーク, λ_{max} : 430 nm) および明らかにモノピナコールで保護された中間体 (9.50 分でピーク, λ_{max} : 440 nm) は、同じ範囲で吸光度を有する。完全に脱保護された色素 (6.0 分でピーク) は、 λ_{max} : 480 nm で極大吸光度を有する。

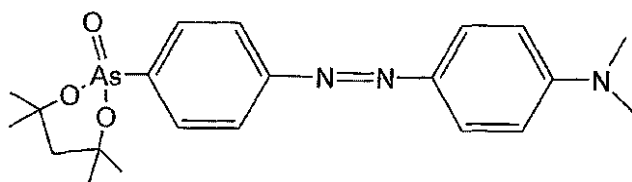
【0272】

実施例 12

[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸 2,4-ジメチル-2,4-ペンタンジオールキレート

【0273】

【化 7 6】



ジオールキレート試薬として 2,4-ジメチル-2,4-ペンタンジオール (Aldrich) を使用して、方法 E で概略を述べた手順に従って、上記の化合物を得た。キシレンでの 2 回の蒸発によって水の除去を達成した。移動層として EtOAc : MeOH (10 : 1) を使用し、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィにより、粗生成物を単離した。生成物を MeOH から結晶化し、オレンジ黄色固体を得た。融点：234～238 °、シリカゲル板上にオレンジ色の単一スポット、 $R_f = 0.5$ (CHCl₃ - MeOH 10 : 1)

【0274】

10

20

30

40

【数 2】

 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ , ppm:1.50 (s, 6H, Me), 1.60 (s, 6H, Me), 2.25 (q, 2H, CH_2), 3.08 (s, 6H, NMe_2), 6.90 (d, 2H, Ar), 7.80-8.05 (m, 6H, Ar).

化合物は、水性緩衝液中、pH 1.6～7.5の範囲で比較的安定であるが、25%アンモニア水中で素早く分解する。アンモニア中の分解を、方法Gに従って測定した。室温での完全分解速度 ($\tau_{1/2}$) は、約15分である。2,4-ジメチル-2,4-ペンタジオール保護色素が、8.9分 (λ_{max} : 449 nm) でピークとして観察された。脱保護色素 (6.0分でピーク) は、 λ_{max} : 480 nmで極大吸光度を有する。実際的に完全な脱保護が4時間後観察された。

10

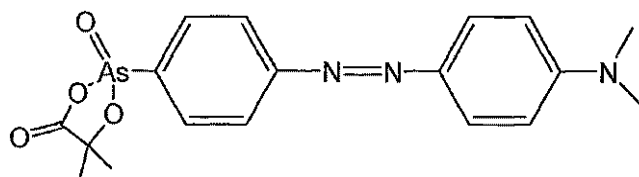
【0275】

実施例 13

[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸、2-ヒドロキシイソラク酸を有するキレート

【0276】

【化77】



20

キレート試薬として2-ヒドロキシイソ酪酸を使用して、方法Eで概略を述べた手順に従って、上記の化合物を得た。キシレンでの2回の蒸発によって水の除去を達成した。移動層としてEtOAcを使用し、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィにより、粗生成物を単離した。生成物をMeOHから結晶化し、オレンジ-黄色固体を得た。融点: 233～235°。

【0277】

【数 3】

 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ , ppm: 1.45 (s, 3H, Me), 1.60 (s, 3H,Me), 3.12 (s, 6H, NMe_2), 6.90 (d, 2H, Ar), 7.70-8.20 (m, 6H, Ar).

30

化合物は、水性緩衝液中、pH 1.6～7.5の範囲で非常に安定である。酸性条件ではすぐに分解し、pH 7.5で数分以内に分解する。緩衝液中の分解を方法Gに従って測定した。室温、pH 7.5での完全分解速度 ($\tau_{1/2}$) は、約10分である。実際的に完全な脱保護が2時間後に観察された。

【0278】

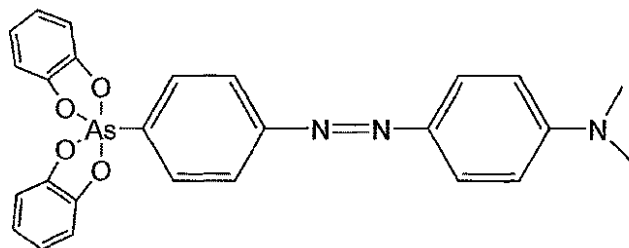
実施例 14

[4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)フェニル]アルソン酸ビス-カテコールキレート

40

【0279】

【化 78】



キレート試薬として1, 2-ジヒドロキシベンゼン（ピロカテコール）を使用して、方法Eで概略を述べた手順に従って、この化合物を得た。キシレンでの2回の蒸発によって得られた水の除去を達成した。化合物を、反応混合物から結晶化し、ろ過で集め、MeOHで洗浄し、茶色の固体を得た。融点：220°（分解）

化合物は、水性緩衝液中、pH1.6～7.5の範囲で非常に安定である。また、室温で25%アンモニア水溶液中でも非常に安定である。化合物は3日間で分解が観察されなかった。HPLCは、8.0分、 λ_{max} ：425nmでピークを示した。

【0280】

実施例15

リアルタイムPCRアッセイ

BHQ-1およびBHQ-2消光物質色素（Biosearch Technologies社からのBlack Hole消光物質）を3'末端に結合し、本発明の蛍光色素を5'末端に結合体化したオリゴヌクレオチドプローブ（Cepheidプローブ）を、以下のリアルタイム（RT）-PCRアッセイで試験した。

【0281】

蛍光性モニターをケフェイドSmartCycler（登録商標）で行った。各反応は、1×PCR緩衝液（Invitrogen、10×PCR緩衝液ストック）、400μM各dNTP、250nM各プライマー、200nMケフェイドプローブ、20単位／25μl SuperAse-Inインヒビター、3単位／25μl白金Taqポリメラーゼ、1単位／25μl Sensiscript RTポリメラーゼ、テンプレートとして1ng／25μl K562RNAを含んでいた。循環プログラムは、15分42℃（1サイクル）、95℃で15秒を45サイクル、次いで60℃で30秒であった。

【0282】

K562RNAにおけるRT-PCR検出を、250nMのフォワードプライマー（5' CAT TCG GGC CGA GAT GTC 3'）および250nMのリバースプライマー（5' CTC CAG GCC AGA AAG AGA GAG TAG 3'）で行った。

【0283】

標的の増幅は、蛍光性シグナルの指数的增加によって検証した。蛍光性シグナルは、平均25サイクルで特定の閾値を越えた。

【0284】

本明細書に記載されたおよび／または出願データシートにリストとして挙げた、前記米国特許、米国特許出願公報、米国特許出願、外国の特許、外国の特許出願、および非特許文献の全ては、その全体を、参照によって本明細書に組み入れる。

【0285】

前記内容から、本発明の特定の実施形態を説明の目的のために、本明細書で記載したが、本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、種々の変形がなされうることが理解されるであろう。したがって、本発明は、添付の請求項以外のものには限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0286】

【図1】数多くの市販のスルホニル含有色素を提示する。

10

20

30

40

50

【図 2】数多くの市販のスルホニル含有色素を提示する。

【図 3】色素、アルソン酸のアルソナートエステル基を含む色素への保護と形成したエステルの脱保護のメカニズムを示す。

【図 4】アルソナート色素をオリゴヌクレオチドに導入するための、式 (I I I) で示されるホスホルアミダイト試薬を、自動化合成法を使用して合成する経路を示す。

【図 5】固形支持体、色素および／またはオリゴヌクレオチドへの結合のための、保護アルソナート基を含む式 (V 1) で表されるマイナーグループバインダ中間体の合成経路を示す。

【図 6】固形支持体、色素および／またはオリゴヌクレオチドへの付着するための、保護アルソナート基を含む式 (V 1) で表される他のマイナーグループバインダ中間体の合成経路を示す。

【図 7】極性蛍光消光アルソン酸ローダミン色素、活性化エステル試薬を示す。

【図 8】自動化合成に適するエステル保護アルソン酸キサンチン色素、ホスホルアミダイトを示す。

【図 9】自動化合成法およびアミン類、チオール類およびジエン類との溶液結合体化によって、オリゴヌクレオチドへ導入するための、エステル保護アルソン酸キサンチン蛍光色素を示す。

【図 10】オリゴヌクレオチド類の自動化合成のための、固形支持体上の極性蛍光消光アルソナートアゾ色素を示す。

【図 11】アルソン酸カルボシアニン色素 G 1 (pH 8.0 の 10 mM トリス緩衝液中に 1.25 mM) の励起および放射スペクトルを示す。

【図 12】25% アンモニア水による 20 °でのモデルビスピナコール保護アゾ色素の脱保護の反応速度を示す。

10

20

【図 1】

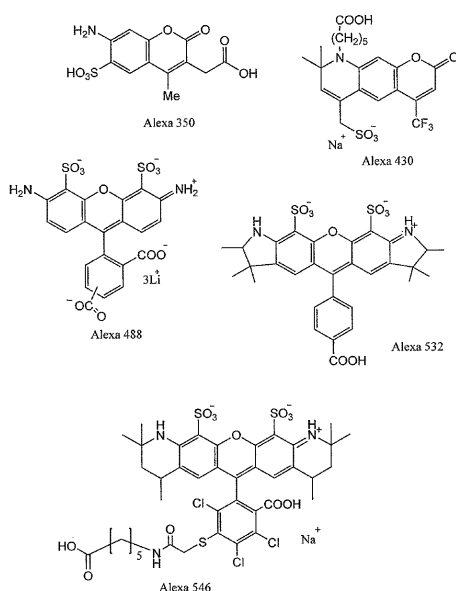


Figure 1. Alexa Fluor® 350, 430, 488, 532 および 546 色素 (従来技術)

【図 2】

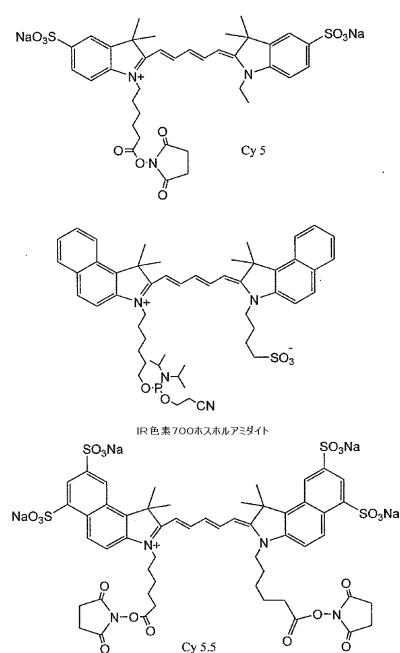


Figure 2. Cy5, IR 色素 700 ホスホルアミダイト および Cy5.5 色素 (従来技術)

【図 3】

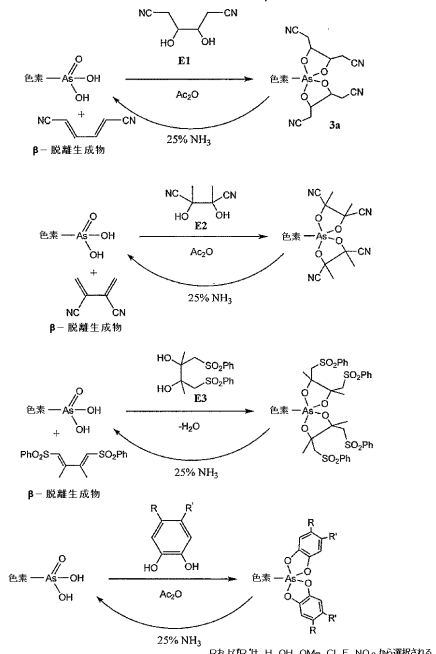


Figure 3. アンモニア不安定性キレート基に依るアルソナート色素の保護

【図 4】

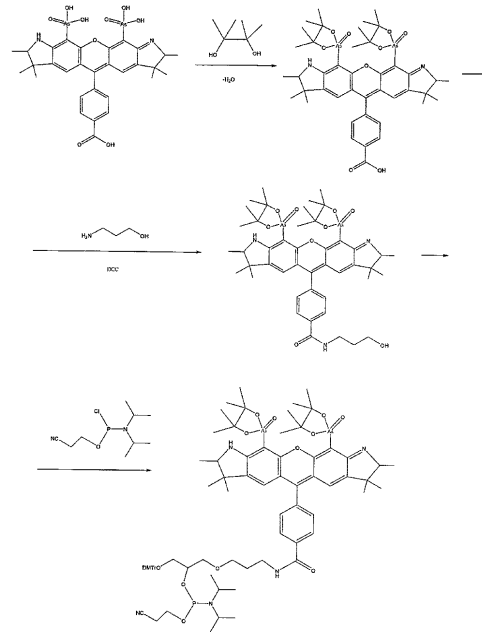


Figure 4. 自動化合成を使用した、アルソナート色素をオリゴマクロレオチドに導入するための、ホスホルアミダイト試薬の合成

【図 5】

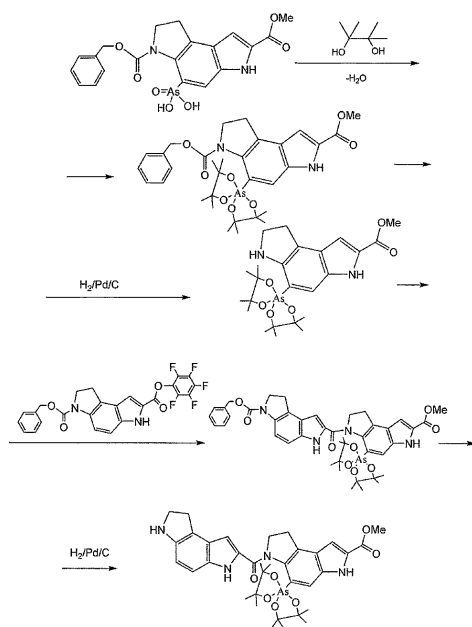


Figure 5. 固形支持体、色素および／またはオリゴマクロレオチドへの付着するための、保護アルソナート基を含むマイナーステップ中間体の合成

【図 6】

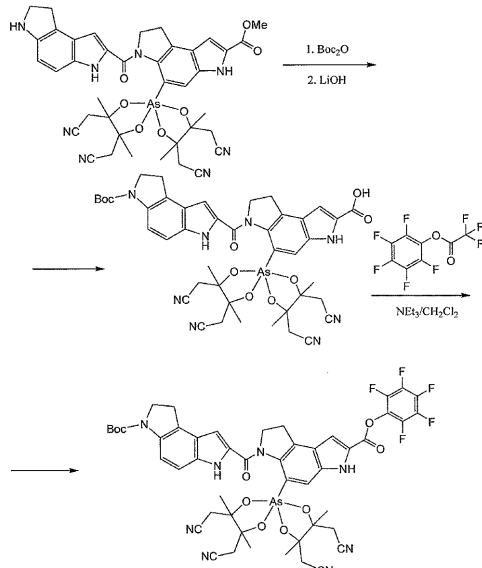


Figure 6. 固形支持体、色素および／またはオリゴマクロレオチドへの付着するための、保護アルソナート基を含むマイナーステップ中間体の合成

【図 7】

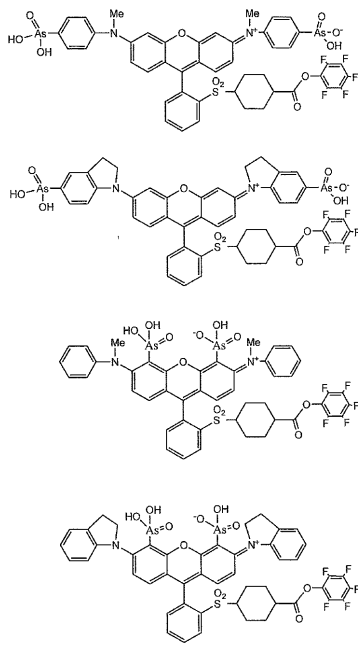


Figure 7. 極性蛍光消光アルソニル酸ローダミン色素、活性化エステル試薬

【図 8】

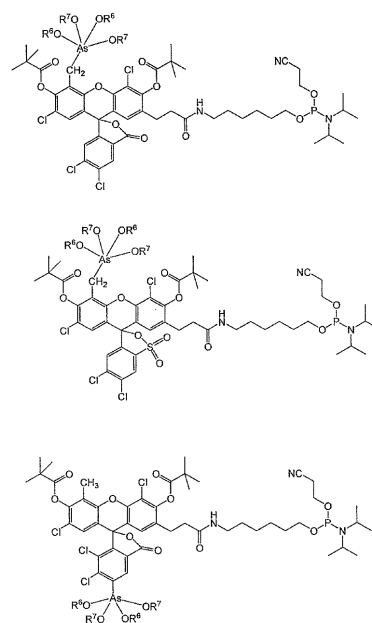


Figure 8. エステル保護アルソニル酸キサンチン色素、ホスホルミダイト

【図 9】

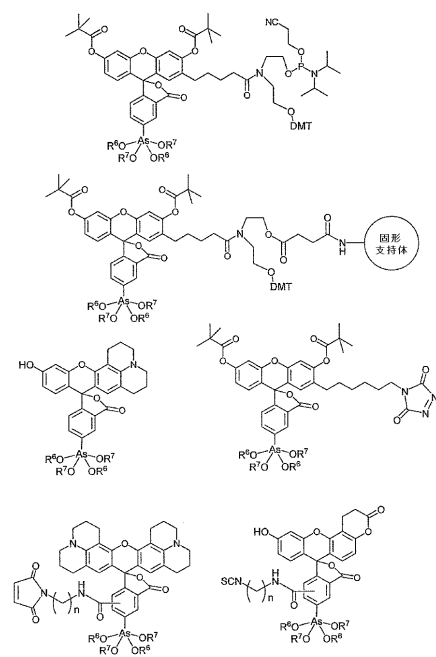


Figure 9. 自動化合成法および溶液結合法によって、オリゴヌクレオチドへ導入するための、エステル保護アルソニル酸キサンチン蛍光色素

【図 10】

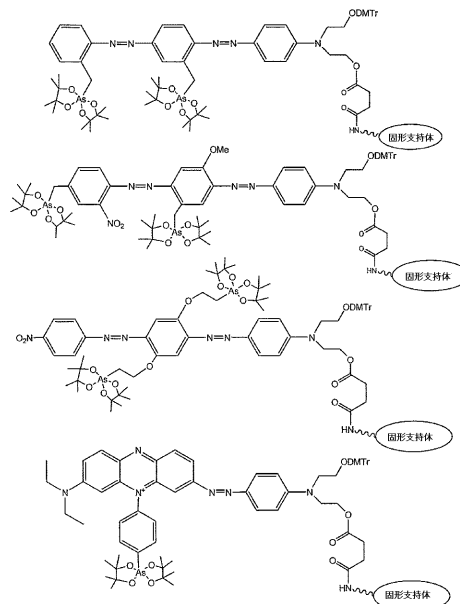


Figure 10. オリゴヌクレオチド 類の自動化合成のための、固形支持体上の極性蛍光消光アルソニルアゾ色素

【図 11】

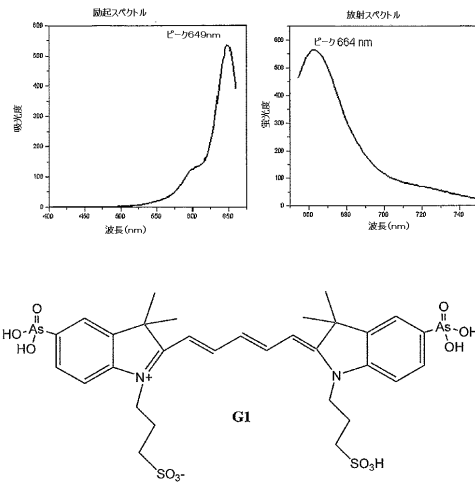


Figure 11. アルソン酸カルボシアニン色素G1の吸収および放射スペクトル
pH8.0、0.01 mM トリス緩衝液中に1.25 mM

【図 12】

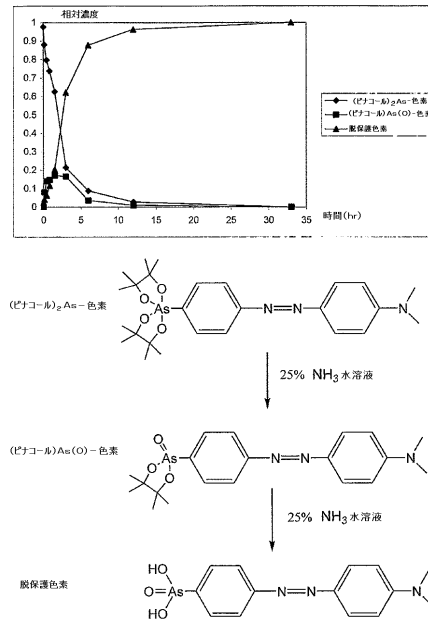


Figure 12. 25%アンモニア水による20°Cでのモデルビスフェノール保護アリ色素の脱保護の反応速度

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/008425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C09K11/06 C09B57/02 C09B56/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09K C09B

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, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERNS S, SINGER S J: "A fluorescence study of specific and non-specific dye-protein interactions" IMMUNOCHEMISTRY, vol. 1, 1964, pages 209-217, XP002388545	1-3,5
Y	the whole document	12-25
X	GLAZER A N: "The time-dependent specific interaction of 4-(4'-aminophenylazo)phenylarsonic acid with subtilisins" BIOCHEMISTRY, 1968, XP002388546	1,5
	the whole document	
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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

5 July 2006

Date of mailing of the international search report

25. 10. 2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vanier, Cécile

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/008425

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THORN K S ET AL: "a novel method of affinity-purifying proteins using bis-arsenical fluorescein" PROTEIN SCIENCE, 2000, pages 213-217, XP002388547 the whole document	1-3,5, 12-25
X	US 6 727 356 B1 (REED MICHAEL W ET AL) 27 April 2004 (2004-04-27) column 4, line 61 - column 5, line 16 compounds 17, 25A, 34A, claims 1,4,5	1-3,5, 12-25
X	US 6 323 337 B1 (SINGER VICTORIA L ET AL) 27 November 2001 (2001-11-27) column 2, lines 31-48	1-3
Y	table 1 column 10, lines 21-37 compounds 1-19 table 3 claims 1,2,8,9,11,20,28,38,53	12-25
A	US 5 512 246 A (RUSSELL ET AL) 30 April 1996 (1996-04-30) claims 1-3 column 2, lines 4-20,33-35,60-63 column 4, lines 28-30 column 7, lines 51,52; example 3	1-25
X	US 2004/241749 A1 (TSIEN ROGER Y ET AL) 2 December 2004 (2004-12-02) paragraph [0083]	1-3,5, 12-25
A	US 6 319 540 B1 (VAN ANTWERP WILLIAM PETER ET AL) 20 November 2001 (2001-11-20) figure 11	1-25
A	EDWARDS J P ET AL: "nonsteroidal androgen receptor agonists based on 4-(trifluoromethyl)-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-one" BIOCHEMISTRY AND MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 9, 1999, pages 1003-1008, XP002388548 the whole document	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.
PCT/US2006/008425

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1(part), 2, 3, 12(part)-25(part)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(part), 2, 3, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 2 and 3 refer to a compound of formula (I), or more specifically of formula (II).
Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.
Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

1.1. claim: 5

Product claim 5 refers to an azo compound of formula IV

2. claims: 1(part), 6, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 6 refer to a compound of formula (V).
Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.
Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

3. claims: 1(part), 7, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 7 refer to a compound of formula (VI).
Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.
Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

4. claims: 1(part), 8, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 8 refer to a compound of formula (VII).
Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.
Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

5. claims: 1(part), 9, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 9 refer to a compound of formula (VIII).
Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.
Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

International Application No. PCT/ US2006/ 008425

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. claims: 1(part), 4, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 4 refer to a compound of formula (III).

Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.

Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

7. claims: 1(part), 10, 12(part)-25(part)

Product claims 1 (part), 10 refer to a compound of formula (IX).

Product claims 12(part)-18(part) refer to an oligonucleotide substituted with said compound.

Process claims 19(part)-25(part) relate to detecting methods using said compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/008425

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6727356	B1	27-04-2004	AU 782204 B2 14-07-2005
			AU 2074801 A 18-06-2001
			CA 2396795 A1 14-06-2001
			EP 1235938 A2 04-09-2002
			JP 2003516163 T 13-05-2003
			WO 0142505 A2 14-06-2001
			US 2002155484 A1 24-10-2002
			US 2002034754 A1 21-03-2002
US 6323337	B1	27-11-2001	CA 2347505 A1 12-11-2001
			GB 2365866 A 27-02-2002
US 5512246	A	30-04-1996	NONE
US 2004241749	A1	02-12-2004	US 2004143122 A1 22-07-2004
			WO 2004065548 A2 05-08-2004
US 6319540	B1	20-11-2001	US 6011984 A 04-01-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 9 B	57/00	(2006.01)	C 0 9 B 11/28	C
C 0 9 K	11/06	(2006.01)	C 0 9 B 11/28	J
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 9 B 23/00	K
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 0 9 B 57/10	
			C 0 9 B 57/00	Z
			C 0 9 K 11/06	
			C 1 2 N 15/00	A
			C 1 2 Q 1/68	A

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

F ターム (参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11 HA08 HA09 HA12
 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42 QR56 QR62
 QR66 QR82 QS03 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02
 4H056 BA02 BB05 BB12 BB14 BC01 BD05 BF08F BF27F BF28F CA01
 CA05 CB03 CC05 CC08 CE03 CE07 DD03 DD16 FA05 FA10