(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-552934
(P2023-552934A)
(43)公表日　令和5年12月20日(2023.12.20)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07D 491/052 (2006.01)		C07D	491/052	CSP	4B063
C12Q 1/6874(2018.01)		C12Q	1/6874	Z	4C050
C12Q 1/6876(2018.01)		C12Q	1/6876	Z	4C057
C07D 491/147 (2006.01)		C07D	491/147		
C07D 491/22 (2006.01)		C07D	491/22		

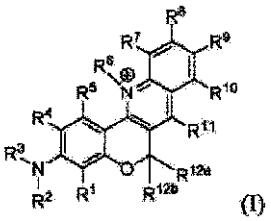
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全76頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-580795(P2022-580795)
(86)(22)出願日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月2日(2023.2.2)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/086344
(87)国際公開番号　WO2022/129437
(87)国際公開日　令和4年6月23日(2022.6.23)
(31)優先権主張番号　63/127,061
(32)優先日　令和2年12月17日(2020.12.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　502279294
イルミナ ケンブリッジ リミテッド
英国シービー２１・６ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９番
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100132263
弁理士　江間 晴彦
(74)代理人　100221501
弁理士　式見 真行
(72)発明者　クレッシナ，エレナ
英国シービー２１・６ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９、
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　長いストークスシフトのクロメノキノリン色素及び配列決定用途における使用

(57)【要約】
本出願は、長いストークスシフトのクロメノキノリン色素及び蛍光標識としてのそれらの使用に関する。例えば、これらの色素は、核酸配列決定用途のためのヌクレオチドを標識するために使用され得る。クロメノキノリン色素は、式（Ｉ）を有する。



(I)

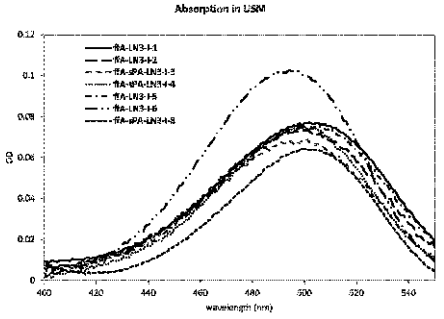
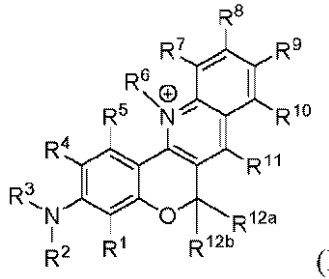


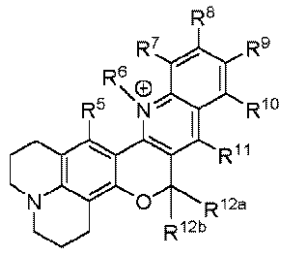
FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）の化合物、その塩又はメソメリー形態であって、
【化１】



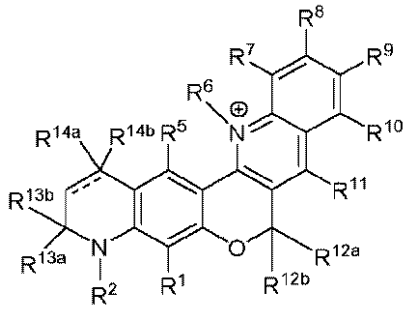
(I)

式中、Ｒ^{1}、Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}、Ｒ^{10}、Ｒ^{11}、Ｒ^{12a}及びＲ^{12b}の各々が、独立して、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシ、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルケニル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルキニル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシ）Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、
Ｒ^{2}及びＲ^{3}の各々が、独立して、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、又は置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、
Ｒ^{6}が、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル又は置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、
代替的に、Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール又は任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、
代替的に、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール又は任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、
代替的に、Ｒ^{8}及びＲ^{9}は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換されたＣ$_{6}$－Ｃ$_{10}$アリール、任意に置換された３～１０員カルボシクリル、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール又は任意に置換された３～１０員ヘテロシクリルを形成し、
但し、Ｒ^{2}及びＲ^{3}の各々が、エチルである場合、Ｒ^{1}、Ｒ^{4}、Ｒ^{5}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{10}、Ｒ^{11}、Ｒ^{12a}及びＲ^{12b}の各々が、Ｈであり、Ｒ^{6}が、メチルであり、Ｒ^{9}が、カルボキシルを含む置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであることを条件とし、
但し、前記化合物が構造
【化２】



を有するように、Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニルを形成し、かつ、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニルを形成する場合、Ｒ^{5}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{10}、Ｒ^{11}、Ｒ^{12a}及びＲ^{12b}の各々が、Ｈであり、Ｒ^{6}が、メチルであり、Ｒ^{9}が、カルボキシルを含む置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであることを条件とする、化合物、その塩又はメソメリー形態。
【請求項２】
Ｒ^{2}が、Ｈであり、Ｒ^{3}が、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル又は置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルで

ある、請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
Ｒ^{2}及びＲ^{3}の各々が、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルである、請求項１に記載の化合物。
【請求項４】
前記式（Ｉ）の化合物が、式（Ｉａ）、その塩又はメソメリー形態によって表され、
【化３】



(Ia)

式中、Ｒ^{13a}、Ｒ^{13b}、Ｒ^{14a}及びＲ^{14b}の各々が、独立して、Ｈ、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシ、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルケニル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルキニル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシ）Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、
実線及び破線
【化４】

によって表される結合は、単結合及び二重結合からなる群から選択され、但し、
【化５】

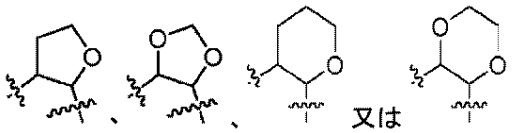
が二重結合の場合、Ｒ^{14b}は、存在しないことを条件とする、請求項１に記載の化合物。
【請求項５】
実線及び破線
【化６】

によって表される前記結合が、二重結合である、請求項４に記載の化合物。
【請求項６】
Ｒ^{14a}が、Ｈ又はＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルである、請求項５に記載の化合物。
【請求項７】
Ｒ^{14a}が、メチルである、請求項６に記載の化合物。
【請求項８】
実線及び破線
【化７】

によって表される前記結合が、単結合である、請求項４に記載の化合物。

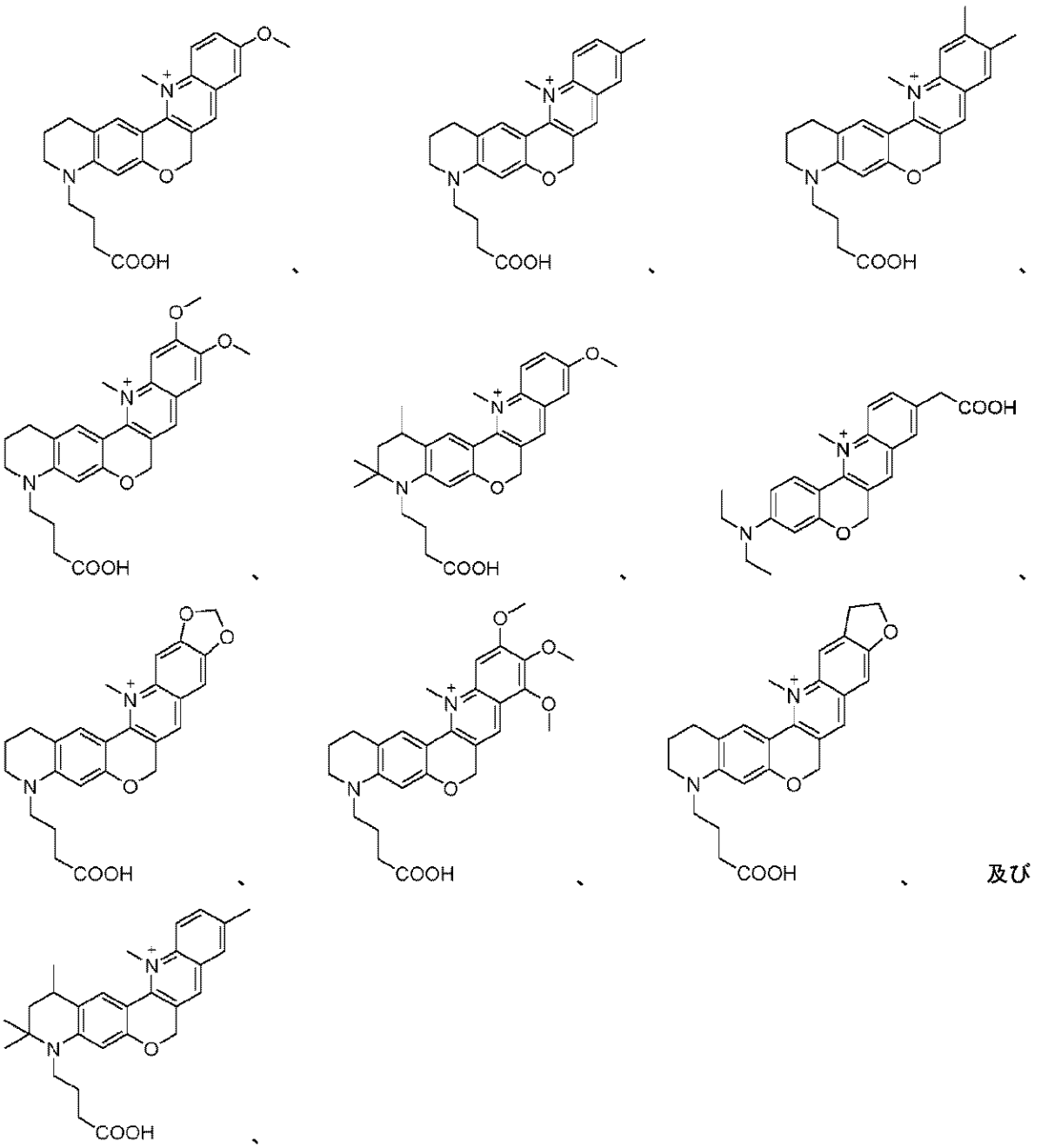
【請求項９】
R^{14a}が、Ｈであり、R^{14b}が、C_1-C_6アルキルである、請求項８に記載の化合物。
【請求項１０】
R^{14a}及びR^{14b}の各々が、Ｈである、請求項８に記載の化合物。
【請求項１１】
R^{13a}及びR^{13b}の各々が、Ｈである、請求項４～１０のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１２】
R^{13a}及びR^{13b}の各々が、C_1-C_6アルキルである、請求項４～１０のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１３】
R^{13a}及びR^{13b}の各々が、メチルである、請求項１２に記載の化合物。
【請求項１４】
R^2が、C_1-C_6アルキル又は置換されたC_1-C_6　アルキルである、請求項４～１３のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１５】
R^2が、カルボキシル（－Ｃ（Ｏ）ＯＨ）、カルボキシレート（－Ｃ（Ｏ）Ｏ－）、スルホ（$-SO_3H$）、スルホネート（$-SO_3-$）、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}、及び－Ｃ（Ｏ）$NR^{16}R^{17}$からなる群から選択される１つ以上の置換基で置換されたC_1-C_6アルキルであり、R^{15}が、任意に置換されたC_1-C_6アルキル、任意に置換されたC_6-C_{10}アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたC_3-C_7シクロアルキルであり、R^{16}及びR^{17}の各々が、独立して、Ｈ、任意に置換されたC_1-C_6アルキル、任意に置換されたC_6-C_{10}アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたC_3-C_7シクロアルキルである、請求項１４に記載の化合物。
【請求項１６】
R^2が、カルボキシル又は－Ｃ（Ｏ）$NR^{16}R^{17}$で置換されたC_1-C_6アルキルであり、各R^{16}及びR^{17}が、独立して、カルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}、スルホ又はスルホネートで置換されたC_1-C_6アルキルである、請求項１５に記載の化合物。
【請求項１７】
R^1が、Ｈである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１８】
R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に結合して、任意に置換された６員ヘテロシクリルを形成する、請求項１及び４～１３のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項１９】
前記６員ヘテロシクリルが、１つ以上のC_1-C_6アルキルで置換されている、請求項１８に記載の化合物。
【請求項２０】
各R^5及びR^{11}が、Ｈである、請求項１～１９のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２１】
R^6が、C_1-C_6アルキルである、請求項１～２０のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２２】
R^6が、カルボキシル又は－Ｃ（Ｏ）$NR^{16}R^{17}$で置換されたC_1-C_6アルキルであり、各R^{16}及びR^{17}が、独立して、カルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}、スルホ又はスルホネートで置換されたC_1-C_6アルキルである、請求項１～２０のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２３】
R^7、R^8、R^9及びR^{10}のうちの少なくとも１つが、独立して、C_1-C_6アルキ

ル又はＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシである、請求項１～２２のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２４】
Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}のうちの少なくとも１つが、カルボキシル、カルボキシレート、スルホ、スルホネート、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{15}又は－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{16}Ｒ^{17}で置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、各Ｒ^{16}及びＲ^{17}が、独立して、Ｈ、又はカルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{15}、スルホ若しくはスルホネートで置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルである、請求項１～２２のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２５】
Ｒ^{8}及びＲ^{9}は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５又は６員ヘテロシクリルを形成する、請求項１～２２のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２６】
前記任意に置換された５又は６員ヘテロシクリルが、
【化８】



である、請求項２５に記載の化合物。
【請求項２７】
Ｒ^{12a}及びＲ^{12b}の各々が、Ｈである、請求項１～２６のいずれか一項に記載の化合物。
【請求項２８】

【化９】



それらの塩及びメソメリー形態からなる群から選択される、請求項１に記載の化合物。

【請求項２９】

請求項１～２８のいずれか一項に記載の化合物で標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。

【請求項３０】

前記化合物が、式（Ｉ）のＲ^{2}又はＲ^{6}のカルボキシル基を介して前記ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに結合している、請求項２９に記載の標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。

【請求項３１】

前記化合物が、式（Ｉ）のＲ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}のうちの１つのカルボキシル基を介して前記ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに結合している、請求項２９に記載の標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。

【請求項３２】

前記化合物が、ピリミジン塩基のＣ５位置、又は７－デアザプリン塩基のＣ７位置にリ

ンカー部分を介して結合している、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。
【請求項３３】
前記ヌクレオチドのリボース糖又はデオキシリボース糖に共有結合した３’ＯＨブロッキング基を更に含む、請求項２９～３２のいずれか一項に記載の標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。
【請求項３４】
前記ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドである、請求項２９～３３のいずれか一項に記載のヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド。
【請求項３５】
前記標的ポリヌクレオチドが、固体支持体に固定化されている、請求項３４に記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項３６】
前記固体支持体が、複数の固定化された標的ポリヌクレオチドのアレイを含む、請求項３５に記載のオリゴヌクレオチド。
【請求項３７】
請求項２９～３３のいずれか一項に記載の第１の化合物で標識された第１のヌクレオチドを含む、キット。
【請求項３８】
第２のヌクレオチドを更に含み、前記第２のヌクレオチドが、前記第１の標識されたヌクレオチドの前記第１の化合物とは異なる第２の化合物で標識されている、請求項３７に記載のキット。
【請求項３９】
前記第１の標識されたヌクレオチド及び第２の標識されたヌクレオチドが、第１の光源波長を使用して励起可能である、請求項３８に記載のキット。
【請求項４０】
第３のヌクレオチドを更に含み、前記第３のヌクレオチドが、前記第１及び前記第２の化合物とは異なる第３の化合物で標識されており、前記第１及び第３の標識されたヌクレオチドが、第２の光源波長を使用して励起可能である、請求項３８又は３９に記載のキット。
【請求項４１】
第４のヌクレオチドを更に含み、前記第４のヌクレオチドが、標識されていない（暗色）、請求項４０に記載のキット。
【請求項４２】
前記第１の標識されたヌクレオチド、前記第２の標識されたヌクレオチド、及び前記第３の標識されたヌクレオチドの各々が、単一の検出チャネルで検出可能である発光スペクトルを有する、請求項３７～４１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４３】
ＤＮＡポリメラーゼ及び１つ以上の緩衝組成物を更に含む、請求項３７～４２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４４】
標的ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、
（ａ）プライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体を１つ以上の標識されたヌクレオチドと接触させることであって、前記標識されたヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、請求項２９～３３のいずれか一項に記載のヌクレオチドであり、前記プライマーポリヌクレオチドが、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、
（ｂ）標識されたヌクレオチドを前記プライマーポリヌクレオチドに組み込んで、伸長されたプライマーポリヌクレオチドを生成することと、

（ｃ）前記伸長されたプライマーポリヌクレオチドの１つ以上の蛍光測定を実施して、前記組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定することと、を含む、方法。
【請求項４５】
前記プライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体が、前記標的ポリヌクレオチドを前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的なプライマーポリヌクレオチドと接触させることによって形成される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
（ｄ）前記プライマーポリヌクレオチドに組み込まれた前記ヌクレオチドから標識及び３’ブロッキング基を除去することを更に含む、請求項４４又は４５に記載の方法。
【請求項４７】
（ｅ）前記除去された標識及び前記３’ブロッキング基を前記プライマーポリヌクレオチドから洗い落とすことを更に含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
鋳型ポリヌクレオチド鎖の少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程（ａ）～（ｅ）を繰り返すことを更に含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記工程（ａ）～（ｅ）が、少なくとも５０回繰り返される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記プライマーポリヌクレオチドに組み込まれた前記ヌクレオチドからの前記標識及び前記３’ブロッキング基が、単一の化学反応において除去される、請求項４４～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記方法が、自動配列決定機器で実施され、前記自動配列決定機器が、異なる波長で作動する２つの光源を含む、請求項４４～５０のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、クロメノキノリン色素及び蛍光標識としてのそれらの使用に関する。具体的には、化合物は、核酸配列決定用途のためのヌクレオチド標識として使用され得る。
【背景技術】
【０００２】
蛍光標識を有する核酸の非放射性検出は、分子生物学における重要な技術である。組換えＤＮＡ技術で用いられる多くの手順は、以前、例えば、^{32}Ｐで放射性標識されたヌクレオチド又はポリヌクレオチドの使用に依存した。放射性化合物は、核酸及び他の目的の分子の高感度な検出を可能にする。しかしながら、放射性同位体の使用には、それらの費用、制限された貯蔵寿命、不十分な感度、及びより重要なことに、安全性の考慮事項などの重大な制限がある。放射性標識の必要性を排除すると、安全上のリスク、並びに環境への影響及び例えば、試薬廃棄に関連するコストの両方が低減される。非放射性蛍光検出に適した方法としては、非限定的な例として、自動化されたＤＮＡ配列決定、ハイブリダイゼーション方法、ポリメラーゼ鎖反応生成物のリアルタイム検出、及び免疫アッセイが挙げられる。
【０００３】
多くの用途について、複数の空間的に重複する分析物の独立した検出を達成するために、複数の分光的に区別可能な蛍光標識を用いることが望ましい。そのような多重方法では、反応容器の数を低減して、実験プロトコルを簡素化し、用途特異的試薬キットの生成を容易にすることができる。例えば、多色の自動化されたＤＮＡ配列決定システムでは、多重蛍光検出は、単一の電気泳動レーンにおける複数のヌクレオチド塩基の分析を可能にし、それによって、単色の方法と比較してスループットを増加させ、レーン間電気泳動移動度の変動に関連する不確実性を低減する。

【０００４】
しかしながら、多重蛍光検出は、問題となる可能性があり、適切な蛍光標識の選択を制約するいくつかの重要な要因が存在する。第１に、所与の用途において、実質的に分解された吸収及び発光スペクトルで色素化合物を見つけることは困難である場合がある。加えて、いくつかの蛍光色素が一緒に使用される場合、色素の吸収バンドが通常広く分離されているため、同時励起によって区別可能なスペクトル領域で蛍光シグナルを生成することは複雑である場合があり、そのため２つの色素に対してでも同等の蛍光励起効率を達成することは、困難である。多くの励起方法は、レーザのような高電力光源を使用するため、色素は、そのような励起に耐えるのに十分な光安定性を有する必要がある。分子生物学方法にとって特に重要な最終的な考慮事項は、蛍光色素が、例えば、ＤＮＡ合成溶媒及び試薬、緩衝液、ポリメラーゼ酵素、並びにリガーゼ酵素などの試薬化学物質と適合性である必要があることの程度である。

【０００５】
配列決定技術の進歩につれて、全ての上記の制約を満たし、かつ特に固相配列決定などの高スループット分子方法に適した更なる蛍光色素化合物、それらの核酸コンジュゲート、及び複数の色素セットの必要性が生じている。

【０００６】
蛍光バンドの好適な蛍光強度、形状、及び波長最大値のような蛍光特性を改善した蛍光色素分子は、核酸配列決定の速度及び精度を改善することができる。強い蛍光シグナルは、測定が、水性の生物学的緩衝液中及び高温で行われる場合には、大部分の有機色素の蛍光強度がそのような条件下では著しく低いため、特に重要である。更に、色素が結合している塩基の性質はまた、蛍光最大値、蛍光強度、及び色素の他のスペクトル特性に影響を及ぼす。核酸塩基と蛍光色素との間の、配列特異的相互作用は、蛍光色素の具体的な設計によって調整することができる。蛍光色素の構造を最適化することにより、ヌクレオチドの組み込み効率を改善し、配列決定エラーのレベルを低減させ、核酸配列決定における試薬の使用量を減少させ、その結果、核酸配列決定のコストを低減させることができる。

【０００７】
いくつかの光学的及び技術的開発は、既に、画質を大幅に向上させてきたが、最終的には、不十分な光学解像度によって制限された。一般に、光学顕微鏡の光学解像度は、使用される光の波長のおよそ半分の距離で離間した物体どうしを見分けるレベルに限定される。実際には、互いに非常に遠く離れた（少なくとも２００～３５０ｎｍ）物体どうしのみが、光学顕微鏡法によって見分けることができる。画像解像度を改善し、単位表面積当たりで分解可能なオブジェクトの数を増加させる１つの方式は、より短い波長の励起光を使用することである。例えば、同じ光学系を用いて、波長がΔλ約１００ｎｍだけ短縮されると、解像度がより良好になり（約Δ５０ｎｍ／（約１５％））、歪みの少ない画像が記録され、認識可能なエリア上の物体の密度が約３５％増加する。

【０００８】
特定の核酸配列決定法は、色素で標識されたヌクレオチドを励起及び検出するためにレーザ光を用いる。これらの機器は、６６０ｎｍで励起可能な適切な色素と共に、赤色レーザなどのより長い波長の光を使用する。有用な解像度を維持しながら、より密集した核酸配列決定クラスターを検出するためには、より短波長の青色光源（４５０～４６０ｎｍ）を使用することができる。この場合、光学解像度は、長波長赤色蛍光色素の発光波長によってではなく、むしろ、次に長い波長の光源、例えば、５３２ｎｍの「緑色レーザ」によって励起可能な色素の発光によって制限される。したがって、配列決定用途の蛍光検出における使用のための青色色素標識が必要とされている。

【０００９】
クロメノキノリン色素は、蛍光プローブ又はミトコンドリア標識としての使用について文献で報告されている。Ｇｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｎｓｏｒｓ＆Ａｃｔｕａｔｏｒｓ：Ｂ．Ｃｈｅｍｉｃａｌ ２７３（２０１８）１６７０－１６７５及びＬｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ２０１８，５４（１２）：１

５０９－１５１２を参照されたい。それにもかかわらず、これらのクロメノキノリン色素のほとんどは赤色の発光を有し、核酸配列決定のための水性条件でのそれらの安定性は未確認のままである。したがって、テーラーメイドの吸着（adsorption）波長及び良好な安定性を有する蛍光ストークスシフトを有するクロメノキノリン色素を設計することは、色素開発における重要な課題のままである。

【発明の概要】

【００１０】

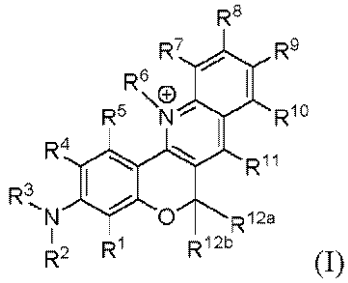
本明細書には、長いストークスシフト、並びにヌクレオチド標識化及び配列決定用途に好適な改善された蛍光強度及び化学的安定性を有するクロメノキノリン色素が記載されている。これらのクロメノキノリン色素は、青色光及び緑色光の両方の励起下で強い蛍光を有する（例えば、これらのクロメノキノリン色素は、約４５０ｎｍ～約５３０ｎｍ、約４６０ｎｍ～約５２０ｎｍ、約４７５ｎｍ～約５１０ｎｍ、又は約４９０ｎｍ～約５００ｎｍの吸収波長を有し得る）。更に、これらのクロメノキノリン色素は、合成による配列決定に使用される市販の色素と比較して、高ｐＨ緩衝液においてより高い安定性を有する。

【００１１】

本開示のいくつかの態様は、式（Ｉ）の化合物、又はその塩、若しくはメソメリー形態に関し、

【００１２】

【化１】



(I)

式中、R^1、R^4、R^5、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12a}及びR^{12b}の各々が、独立して、Ｈ、C_1－C_6アルキル、置換されたC_1－C_6アルキル、C_1－C_6アルコキシ、C_2－C_6アルケニル、C_2－C_6アルキニル、C_1－C_6ハロアルキル、C_1－C_6ハロアルコキシ、（C_1－C_6アルコキシ）C_1－C_6アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（C_1－C_6アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（C_1－C_6アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、

R^2及びR^3の各々が、独立して、Ｈ、C_1－C_6アルキル、又は置換されたC_1－C_6アルキルであり、

R^6が、C_1－C_6アルキル又は置換されたC_1－C_6アルキルであり、

代替的に、R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール若しくは任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、かつ／又は

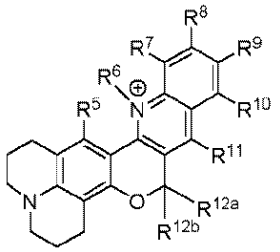
代替的に、R^3及びR^4は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール若しくは任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、かつ／又は

代替的に、R^8及びR^9は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換されたC_6－C_{10}アリール、任意に置換された３～１０員カルボシクリル、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール又は任意に置換された３～１０員ヘテロシクリルを形成する。いくつかの実施形態では、R^2及びR^3の各々は、エチルであり、R^1、R^4、R^5、R^7、R^8、R^{10}、R^{11}、R^{12a}及びR^{12b}の各々が、Ｈであり、R^6が、メチルであり、したがって、R^9が、カルボキシルを含む置換されたC_1－C_6アルキルである。い

くつかの実施形態では、化合物が構造

【００１３】

【化２】



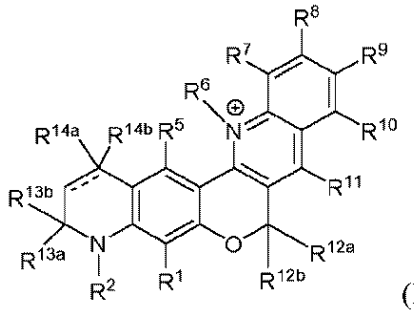
を有するように、Ｒ１及びＲ２は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニル及びＲを形成し、Ｒ３及びＲ４は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニルを形成し、Ｒ５、Ｒ７、Ｒ８、Ｒ１０、Ｒ１１、Ｒ１２ａ及びＲ１２ｂの各々が、Ｈであり、Ｒ６が、メチルであり、したがって、Ｒ９が、カルボキシルを含む置換されたＣ１－Ｃ６アルキルである。

【００１４】

いくつかの実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、式（Ｉａ）又はその塩若しくはメソメリー形態によっても表され、

【００１５】

【化３】



(Ia)

式中、Ｒ１３ａ、Ｒ１３ｂ、Ｒ１４ａ及びＲ１４ｂの各々が、独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、置換されたＣ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルコキシ、Ｃ２－Ｃ６アルケニル、Ｃ２－Ｃ６アルキニル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルキル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルコキシ、（Ｃ１－Ｃ６アルコキシ）Ｃ１－Ｃ６アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（Ｃ１－Ｃ６アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（Ｃ１－Ｃ６アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、実線及び破線

【００１６】

【化４】

によって表される結合は、単結合及び二重結合からなる群から選択され、但し、

【００１７】

【化５】

が二重結合の場合、Ｒ１４ｂは、存在しないことを条件とする。

【００１８】

式（Ｉ）又は（Ｉａ）の化合物のいくつかの実施形態では、Ｒ６、Ｒ７、Ｒ８、Ｒ９、Ｒ１０及びＲ１１のうちの１つは、カルボキシル基（－Ｃ（Ｏ）ＯＨ）を含む。他の実施

形態では、R^2又はR^3カルボキシル基を含む。

【００１９】

いくつかの態様では、本開示の化合物は、例えば、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、リガンド、粒子、細胞、半固体表面（例えば、ゲル）、又は固体表面などの基質部分で標識されるか、又はコンジュゲートされる。標識化又はコンジュゲーションは、カルボキシル基を介して実施され得、それは、当該技術分野で既知の方法を使用して、それに結合した部分（ヌクレオチドなど）又はリンカー上のアミノ又はヒドロキシル基と反応し、アミド又はエステルを形成し得る。

【００２０】

本開示のいくつかの他の態様は、例えば、基材部分への共有結合を可能にするためのリンカー基を含む色素化合物に関する。連結は、R基のうちのいずれかを含む、色素の任意の位置で実施され得る。いくつかの実施形態では、連結は、式（Ｉ）のR^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}及びR^{11}のうちの１つを介して、又はR^2又はR^3を介して実施され得る。いくつかの更なる実施形態では、連結は、式（Ｉａ）のR^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}及びR^{11}のうちの１つを介して、又はR^2を介して実施され得る。

【００２１】

本開示のいくつかの更なる態様は、以下の式によって定義される標識されたヌクレオシド又はヌクレオチド化合物を提供し、

Ｎ－Ｌ－色素

式中、Ｎは、ヌクレオシド又はヌクレオチドであり、

Ｌは、任意のリンカー部分であり、

色素は、本開示による式（Ｉ）又は（Ｉａ）の蛍光化合物の部分であり、式（Ｉ）又は（Ｉａ）の化合物の官能基（例えば、カルボキシル基）は、リンカー部分又はヌクレオシド／ヌクレオチドのアミノ又はヒドロキシル基と反応して共有結合を形成する。

【００２２】

本開示のいくつかの追加の態様は、式（Ｉ）又は（Ｉａ）の化合物で標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに関する。

【００２３】

本開示のいくつかの追加の態様は、様々な免疫学的アッセイ、オリゴヌクレオチド若しくは核酸標識化において、又は合成によるＤＮＡ配列決定のために使用され得る色素化合物（遊離又は標識された形態）を含むキットに関する。更に別の態様では、本開示は、自動機器プラットホーム上の合成による配列決定のサイクルに特に適した色素「セット」を含むキットを提供する。いくつかの態様では、少なくとも１つのヌクレオチドが本明細書に記載の標識されたヌクレオチドである、１つ以上のヌクレオチドを含有するキットである。

【００２４】

本開示の更なる態様は、標的ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、

（ａ）プライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体を１つ以上の標識されたヌクレオチド（例えば、Ａ、Ｇ、Ｃ及びＴ、又はｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＣＴＰ及びｄＴＴＰ）と接触させることであって、当該標識されたヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、式（Ｉ）又は（Ｉａ）のクロメノキノリン色素で標識された本明細書に記載のヌクレオチドであり、プライマーポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

（ｂ）標識されたヌクレオチドをプライマーポリヌクレオチドに組み込んで、伸長されたプライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体を生成することと、

（ｃ）組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定するために伸長されたプライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体の１つ以上の蛍光測定を実施することと、を含む、方法である。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】ユニバーサルスキャン混合物（Universal Scan Mix、ＵＳＭ）中の２μＭの溶液としてのクロメノキノリン色素Ｉ－１～Ｉ－６及びＩ－８とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの吸収スペクトルを示す。
【図２Ａ】それぞれ励起波長として５２０ｎｍ又は４５０ｎｍのいずれかを使用してＵＳＭ中で獲得されたクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－５及びＩ－６とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光発光スペクトルを示す。
【図２Ｂ】それぞれ励起波長として５２０ｎｍ又は４５０ｎｍのいずれかを使用してＵＳＭ中で獲得されたクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－５及びＩ－６とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光発光スペクトルを示す。
【図２Ｃ】それぞれ励起波長として５２０ｎｍ又は４５０ｎｍのいずれかを使用してＵＳＭ中で獲得されたクロメノキノリン色素Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－８とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光発光スペクトルを示す。
【図２Ｄ】それぞれ励起波長として５２０ｎｍ又は４５０ｎｍのいずれかを使用してＵＳＭ中で獲得されたクロメノキノリン色素Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－８とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光発光スペクトルを示す。
【図３Ａ】同じ条件でのクマリン参照色素ＡとコンジュゲートしたｆｆＣのものと比較した、エタノールアミン緩衝液中の４５℃でのクロメノキノリン色素Ｉ－３及びＩ－４とコンジュゲートした２つのｆｆＡの残存する蛍光パーセントを示す。
【図３Ｂ】同じ条件でのクマリン参照色素ＡとコンジュゲートしたｆｆＣのものと比較した、グリシン緩衝液中の４５℃でのクロメノキノリン色素Ｉ－３及びＩ－４とコンジュゲートした２つのｆｆＡの残存する蛍光パーセントを示す。
【図３Ｃ】同じ条件でのクマリン参照色素ＡとコンジュゲートしたｆｆＣのものと比較した、ＴＲＩＳ緩衝液中の４０℃でのクロメノキノリン色素Ｉ－３及びＩ－４とコンジュゲートした２つのｆｆＡの残存する蛍光パーセントを示す。
【図３Ｄ】同じ条件でのクマリン参照色素ＡとコンジュゲートしたｆｆＣのものと比較した、ＭＯＰＳ緩衝液中の４０℃でのクロメノキノリン色素Ｉ－３及びＩ－４とコンジュゲートした２つのｆｆＡの残存する蛍光パーセントを示す。
【図４Ａ】それぞれクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で得られた散乱プロットを示す。
【図４Ｂ】それぞれクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で得られた散乱プロットを示す。
【図４Ｃ】それぞれクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で得られた散乱プロットを示す。
【図４Ｄ】それぞれクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で得られた散乱プロットを示す。
【図４Ｅ】それぞれクロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で得られた散乱プロットを示す。
【図４Ｆ】クロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドでの組み込み混合物を使用して、１×３００サイクルでのフェージング及びプレフェージング計量を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
本開示の実施形態は、特に高ｐＨ水性環境において、増強された蛍光強度、長いストークスシフト、及び改善された化学的安定性を有するクロメノキノリン色素に関する。これらのクロメノキノリン色素はまた、広い励起波長を有し、青色及び緑色の光源の両方によ

って励起され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロメノキノリン色素は、２つのチャネルＣＭＯＳ検出（緑色光励起及び青色光励起）を備えるＩｌｌｕｍｉｎａのｉＳｅｑ（商標）プラットホームで使用され得る。

【００２７】

定義

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成目的のみのためであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【００２８】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、明示的かつ明確に１つの指示対象に限定されていない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本教示の趣旨又は範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の様々な実施形態に対して様々な修正及び変更を行うことができることは、当業者には明らかであろう。したがって、本明細書に記載の様々な実施形態は、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物の範囲内の他の修正及び変形を包含することが意図される。

【００２９】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。用語「含む（including）」、並びに他の形態、例えば、「含む（include）」、「含む（includes）」、及び「含まれる（included）」の使用は、限定的ではない。更に、用語「有するｈａｖｉｎｇ）」、並びに他の形態、例えば、「有する（have）」、「有する（has）」、及び「有した（had）」の使用は、限定的ではない。本明細書で使用されるとき、移行句又は請求項の本文において、用語「含む（comprise）」及び「含む（comprising）」は、オープンエンドの意味を有するものとして解釈されるべきである。すなわち、上記の用語は、語句「少なくとも有する」又は「少なくとも含む」と同義であると解釈されるべきである。例えば、プロセスの文脈において使用される場合、「含む（comprising）」という用語は、プロセスが少なくとも列挙された工程を含むが、追加の工程を含み得ることを意味する。化合物、組成物、又はデバイスの文脈で使用される場合、用語「含む（comprising）」は、化合物、組成物、又はデバイスが少なくとも列挙された特徴又は構成要素を含むが、追加の特徴又は構成要素も含み得ることを意味する。

【００３０】

本明細書で使用される場合、一般的な有機略語は、以下のように定義される。

【００３１】

【表１】

℃	摂氏温度
ｄＡＴＰ	デオキシアデノシン三リン酸
ｄＣＴＰ	デオキシシチジン三リン酸
ｄＧＴＰ	デオキシグアノシン三リン酸
ｄＴＴＰ	デオキシチミジン三リン酸
ｄｄＮＴＰ	ジデオキシヌクレオチド三リン酸
ｆｆＡ	完全に官能化されたＡヌクレオチド
ｆｆＣ	完全に官能化されたＣヌクレオチド
ｆｆＧ	完全に官能化されたＧヌクレオチド
ｆｆＮ	完全に官能化されたヌクレオチド
ｆｆＴ	完全に官能化されたＴヌクレオチド
ｈ	時間
ＲＴ	室温
ＳＢＳ	合成による配列決定

【００３２】

本明細書で使用される場合、「アレイ」という用語は、異なるプローブ分子が相対的な位置に従って互いに区別することができるように、１つ以上の基材に結合した異なるプローブ分子の集団を指す。アレイは、基材上の異なるアドレス可能な位置に各々位置する異なるプローブ分子を含み得る。代替的に、又は追加的に、アレイは、各々が異なるプローブ分子を有する別個の基材を含むことができ、異なるプローブ分子は、基材が結合される表面上の基材の位置に従って、又は液体中の基材の位置に従って特定され得る。別個の基材が表面上に位置する例示的なアレイとしては、例えば、米国特許第６，３５５，４３１（Ｂ１）号、米国特許出願公開第２００２／０１０２５７８号、及びＰＣＴ国際公開第００／６３４３７号に記載されているように、ウェル中のビーズを含むものが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、蛍光活性化細胞選別機（fluorescent activated cell sorte、ＦＡＣＳ）などのマイクロ流体デバイスを使用して、ビーズを液体アレイ内で区別するために本発明において使用され得る例示的な形式は、例えば、米国特許第６，５２４，７９３号に記載されている。本発明において使用され得るアレイの更なる例としては、米国特許第５，４２９，８０７号、同第５，４３６，３２７号、同第５，５６１，０７１号、同第５，５８３，２１１号、同第５，６５８，７３４号、同第５，８３７，８５８号、同第５，８７４，２１９号、同第５，９１９，５２３号、同第６，１３６，２６９号、同第６，２８７，７６８号、同第６，２８７，７７６号、同第６，２８８，２２０号、同第６，２９７，００６号、同第６，２９１，１９３号、同第６，３４６，４１３号、同第６，４１６，９４９号、同第６，４８２，５９１号、同第６、５１４、７５１号及び同第６，６１０，４８２号、並びに国際公開第９３／１７１２６号、国際公開第９５／１１９９５号、国際公開第９５／３５５０５号、欧州特許第７４２２８７号、及び欧州特許第７９９８９７号に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３３】

本明細書で使用するとき、用語「共有結合した（「ｃｏｖａｌｅｎｔｌｙ　ａｔｔａｃｈｅｄ」又は「ｃｏｖａｌｅｎｔｌｙ　ｂｏｎｄｅｄ」）」は、原子間の電子対の共有によって特徴付けられる化学結合の形成を指す。例えば、共有結合したポリマーコーティン

グとは、他の手段、例えば、接着又は静電相互作用による表面への結合と比較して、基材の官能化表面と化学結合を形成するポリマーコーティングを指す。表面に共有結合したポリマーは、共有結合に加えて、手段によって結合され得ることが理解されるであろう。

【００３４】

本明細書で使用するとき、用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、元素周期表の７族の、例えばフッ素、塩素、臭素、又はヨウ素のいずれか１つを意味し、フッ素及び塩素が好ましい。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「ａ」及び「ｂ」が整数である、「Ｃ$_{ａ}$～Ｃ$_{ｂ}$」は、アルキル、アルケニル、若しくはアルキニル基の炭素原子の数、又はシクロアルキル若しくはアリール基の環原子の数を指す。すなわち、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルの環、及びアリールの環は、「ａ」～「ｂ」、両端の炭素原子を含有し得る。例えば、「Ｃ$_{１}$～Ｃ$_{４}$アルキル」基は、１～４個の炭素を有する全てのアルキル基、すなわち、ＣＨ$_{３}$－、ＣＨ$_{３}$ＣＨ$_{２}$－、ＣＨ$_{３}$ＣＨ$_{２}$ＣＨ$_{２}$－、（ＣＨ$_{３}$）$_{２}$ＣＨ－、ＣＨ$_{３}$ＣＨ$_{２}$ＣＨ$_{２}$ＣＨ$_{２}$－、ＣＨ$_{３}$ＣＨ$_{２}$ＣＨ（ＣＨ$_{３}$）－、及び（ＣＨ$_{３}$）$_{３}$Ｃ－を指し、Ｃ$_{３}$～Ｃ$_{４}$シクロアルキル基は、３～４個の炭素原子を有する全てのシクロアルキル基、すなわち、シクロプロピル及びシクロブチルを指す。同様に、「４～６員ヘテロシクリル」基は、４～６個の全環原子を有する全てのヘテロシクリル基、例えば、アゼチジン、オキセタン、オキサゾリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリンなどを指す。「ａ」及び「ｂ」がアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、又はアリール基に関して指定されていない場合、これらの定義に記載される最も広い範囲が想定されるべきである。本明細書で使用される場合、「Ｃ$_{１}$－Ｃ$_{６}$」という用語は、Ｃ$_{１}$、Ｃ$_{２}$、Ｃ$_{３}$、Ｃ$_{４}$、Ｃ$_{５}$、及びＣ$_{６}$、並びに２つの数字のうちのいずれかによって定義される範囲を含む。例えば、Ｃ$_{１}$－Ｃ$_{６}$アルキルは、Ｃ$_{１}$、Ｃ$_{２}$、Ｃ$_{３}$、Ｃ$_{４}$、Ｃ$_{５}$、及びＣ$_{６}$アルキル、Ｃ$_{２}$－Ｃ$_{６}$アルキル、Ｃ$_{１}$－Ｃ$_{３}$アルキルなどを含む。同様に、Ｃ$_{２}$－Ｃ$_{６}$アルケニルは、Ｃ$_{２}$、Ｃ$_{３}$、Ｃ$_{４}$、Ｃ$_{５}$、及びＣ$_{６}$アルケニル、Ｃ$_{２}$－Ｃ$_{５}$アルケニル、Ｃ$_{３}$－Ｃ$_{４}$アルケニルなどが含まれ、Ｃ$_{２}$－Ｃ$_{６}$アルキニルは、Ｃ$_{２}$、Ｃ$_{３}$、Ｃ$_{４}$、Ｃ$_{５}$、及びＣ$_{６}$アルキニル、Ｃ$_{２}$－Ｃ$_{５}$アルキニル、Ｃ$_{３}$－Ｃ$_{４}$アルキニルなどを含む。Ｃ$_{３}$－Ｃ$_{８}$シクロアルキルは各々、３、４、５、６、７、及び８個の炭素原子を含有する炭化水素環、又はＣ$_{３}$－Ｃ$_{７}$シクロアルキル又はＣ$_{５}$－Ｃ$_{６}$シクロアルキルなどの２つの数字のうちのいずれかによって定義される範囲を含む。

【００３６】

本明細書に使用されるとき、「アルキル」は、完全に飽和している（すなわち、二重結合又は三重結合を含有しない）直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルキル基は、１～２０個の炭素原子を有してもよい（本明細書に示されるときはいつでも、「１～２０」などの数値範囲は、所与の範囲内の各整数を指す。例えば、「１～２０個の炭素原子」は、アルキル基が、１個の炭素原子、２個の炭素原子、３個の炭素原子など、最大で２０個の炭素原子からなり得るが、本定義はまた、用語「アルキル」（数値範囲が指定されていない）の発生もカバーすることを意味する。アルキル基はまた、１～９個の炭素原子を有する中規模のアルキルであってもよい。アルキル基は、１～６個の炭素原子を有する低級アルキルであってもよい。一例にすぎないが、「Ｃ$_{１－６}$　アルキル」又は「Ｃ$_{１}$－Ｃ$_{６}$アルキル」は、アルキル鎖中に１～６個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、アルキル鎖は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、及びｔ－ブチルからなる群から選択される。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「アルコキシ」は、Ｒが上に定義されるアルキルである、「「Ｃ$_{１}$－$_{９}$アルコキシ」又は「Ｃ$_{１}$－Ｃ$_{９}$　アルコキシ」などの式－ＯＲを指し、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、１－メチルエトキシ（イソプロポキシ）、ｎ－ブトキ

シ、イソブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、及びｔｅｒｔ－ブトキシなどが含まれるが、これらに限定されない。

【００３８】

本明細書に使用されるとき、「アルケニル」は、１つ以上の二重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルケニル基は、２～２０個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「アルケニル」の発生もカバーする。アルケニル基はまた、２～９個の炭素原子を有する中規模のアルケニルであってもよい。アルケニル基は、２～６個の炭素原子を有する低級アルケニルであってもよい。一例にすぎないが、「C_{2-6}アルケニル」又は「C_{2-6}アルケニル」とは、アルケニル鎖中に２～６個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、アルケニル鎖は、エテニル、プロペン－１－イル、プロペン－２－イル、プロペン－３－イル、ブテン－１－イル、ブテン－２－イル、ブテン－３－イル、ブテン－４－イル、１－メチル－プロペン－１－イル、２－メチル－プロペン－１－イル、１－エチル－エテン－１－イル、２－メチル－プロペン－３－イル、ブタ－１，３－ジエニル、ブタ－１，２－ジエニル、及びブタ－１，２－ジエン－４－イルからなる群から選択される。典型的なアルケニル基としては、エテニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、及びヘキセニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００３９】

本明細書で使用するとき、「アルキニル」は、１つ以上の三重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルキニル基は、２～２０個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「アルキニル」の発生もカバーする。アルキニル基はまた、２～９個の炭素原子を有する中規模のアルキニルであってもよい。アルキニル基は、２～６個の炭素原子を有する低級アルキニルであってもよい。例にすぎないが、「C_{2-6}アルキニル」又は「C_{2-6}アルキニル」は、アルキニル鎖中に２～６個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、そのアルキニル鎖は、エチニル、プロピン－１－イル、プロピン－２－イル、ブチン－１－イル、ブチン－３－イル、ブチン－４－イル、及び２－ブチニルからなる群から選択される。典型的なアルキニル基としては、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、及びヘキシニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４０】

用語「芳香族」は、共役π電子系を有し、炭素環芳香族（例えば、フェニル）及び複素環式芳香族基（例えば、ピリジン）の両方を含む環又は環系を指す。この用語は、環系全体が芳香族である限り、単環式又は縮合多環式（すなわち、隣接する原子対を共有する環）基を含む。

【００４１】

本明細書で使用するとき、「アリール」は、環骨格中に炭素のみを含有する芳香環又は環系（すなわち、２個の隣接する炭素原子を共有する２つ以上の縮合環）を指す。アリールが環系である場合、系内の全ての環は芳香環である。アリール基は６～１８個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「アリール」の発生もカバーする。いくつかの実施形態では、アリール基は、６～１０個の炭素原子を有する。アリール基は、「C_{6-10}アリール」、「C_6又はC_{10}アリール」、又は類似の表記で指定され得る。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、アズレニル、及びアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４２】

「アラルキル」又は「アリールアルキル」は、「C_{7-14}アラルキル」などの、アルキレン基を介して置換基として結合されたアリール基であり、ベンジル、２－フェニルエチル、３－フェニルプロピル、及びナフチルアルキルを含むがこれらに限定されない。いくつかの場合において、アルキレン基は、より低級アルキレン基（すなわち、C_{1-6}アルキレン基）である。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」は、環骨格中に窒素、酸素、及び硫黄を含むがこれらに限定されない、１個以上のヘテロ原子、すなわち炭素以外の元素を含有する芳香環又は環系（すなわち、２個の隣接する原子を共有する２つ以上の縮合環）を指す。ヘテロアリールが環系である場合、系内の全ての環は芳香環である。ヘテロアリール基は、５～１８個の環員（すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含む、環骨格を構成する原子の数）を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「ヘテロアリール」の発生もカバーする。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、５～１０個の環員又は５～７つの環員を有する。ヘテロアリール基は、「５～７員ヘテロアリール」、「５～１０員ヘテロアリール」、又は類似の表記で指定され得る。ヘテロアリール環の例としては、フリル、チエニル、フタラジニル、ピロリル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、インドリル、イソインドリル、及びベンゾチエニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４４】

「ヘテロアラルキル」又は「ヘテロアリールアルキル」は、アルキレン基を介して置換基として結合されたヘテロアリール基である。例としては、２－チエニルメチル、３－チエニルメチル、フリルメチル、チエニルエチル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソオキサゾリリルアルキル、及びイミダゾリルアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、アルキレン基は、より低級アルキレン基（すなわち、C_{1-6}アルキレン基）である。

【００４５】

本明細書で使用するとき、「カルボシクリル」は、環系骨格中に炭素原子のみを含有する非芳香族環又は環系を意味する。カルボシクリルが環系である場合、２つ以上の環が、縮合、架橋、又はスピロ結合方式で一体に結合され得る。カルボシクリルは、環系中の少なくとも１つの環が芳香族ではないことを条件として、任意の飽和度を有してもよい。したがって、カルボシクリルとしては、シクロアルキル、シクロアルケニル、及びシクロアルキニルが挙げられる。カルボシクリル基は、３～２０個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「カルボシクリル」の発生もカバーする。カルボシクリル基はまた、３～１０個の炭素原子を有する中規模のカルボシクリルであってもよい。カルボシクリル基はまた、３～６個の炭素原子を有するカルボシクリルであってもよい。カルボシクリル基は、「C_{3-6}カルボシクリル」、「C_{3-C_6}カルボシクリル」、又は類似の表記で指定され得る。カルボシクリル環の例としては、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、シクロヘキセニル、２，３－ジヒドロ－インデン、ビシクル［２．２．２］オクタニル、アダマンチル、及びスピロ［４．４］ノナニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４６】

本明細書で使用するとき、「シクロアルキル」は、完全飽和カルボシクリル環又は環系を意味する。例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシルが挙げられる。

【００４７】

本明細書で使用するとき、「ヘテロシクリル」は、環骨格中に少なくとも１個のヘテロ原子を含有する非芳香族環又は環系を意味する。ヘテロシクリルどうしは、縮合、架橋、又はスピロ結合式に、一体に接合されてもよい。ヘテロシクリルは、環系中の少なくとも１つの環が芳香族ではないことを条件として、任意の飽和度を有してもよい。ヘテロ原子は、環系中の非芳香環又は芳香環のいずれかに存在してもよい。ヘテロシクリル基は、３～２０個の環員（すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含む、環骨格を構成する原子の数）を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「ヘテロシクリル」の発生もカバーする。ヘテロシクリル基はまた、３～１０個の環員を有する中規模のヘテロ

シクリルであってもよい。ヘテロシクリル基は、３～６つの環員を有するヘテロシクリルであってもよい。ヘテロシクリル基は、「３～６員ヘテロシクリル」又は類似の表記で指定されてもよい。好ましい６員単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、Ｏ、Ｎ又はＳのうちの１つ～３つまで選択される。好ましい５員の単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、Ｏ、Ｎ、又はＳから選択される１個又は２個のヘテロ原子から選択される。ヘテロシクリル環の例としては、アゼピニル、アクリジニル、カルバゾリル、シノリニル、ジオキソラニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、モルホリニル、オキシラニル、オキセパニル、チアパニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ジオキサピペラジニル、ピロリジニル、ピロリドニル、ピロリジオニル、４－ピペリドニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、１，３－ジオキシニル、１，３－ジオキサニル、１，４－ジオキシニル、１，４－ジオキサニル、１，３－オキサチニル、１，４－オキサチニル、１，４－オキサチアニル、２Ｈ－１，２－オキサジニル、トリオキサニル、ヘキサヒドロ－１，３，５－トリアジニル、１，３－ジオキソリル、１，３－ジオキソラニル、１，３－ジチオリル、１，３－ジチオラニル、イソオキサゾリニル、イソオキサゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキサゾリジノニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、１，３－オキサチオラニル、インドリニル、イソインドリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロ－１，４－チアジニル、チアモルフォリニル、ジヒドロベンゾフラニル、ベンズイミダゾリジニル、及びテトラヒドロキノリンが挙げられるが、それらに限定されない。

【００４８】

本明細書で使用される場合、「アルコキシアルキル」又は「（アルコキシ）アルキル」は、C_{2-8}アルコキシアルキル、又は（C_{1}－C_{6}アルコキシ）C_{1}－C_{6}アルキル、例えば、－（CH_{2}）$_{1-3}$－OCH_{3}などのアルキレン基を介して接続されたアルコキシ基を指す。

【００４９】

「Ｏ－カルボキシ」基は、「－ＯＣ（＝Ｏ）Ｒ」基を指し、式中、Ｒは、本明細書で定義するように、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００５０】

「Ｃ－カルボキシ」基は、「－Ｃ（＝Ｏ）ＯＲ」基を指し、式中、Ｒは、本明細書で定義するように、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニルと、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルとからなる群から選択される。非限定的な例としては、カルボキシル（すなわち、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ）が挙げられる。

【００５１】

「スルホニル」基は、「－SO_{2}Ｒ」基を指し、式中、Ｒは、本明細書で定義するように、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００５２】

「スルフィノ」基は、「－Ｓ（＝Ｏ）ＯＨ」基を指す。

【００５３】

「スルフィノ」基は、「－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$ＯＨ」又は「－SO_{3}Ｈ」基を指す。

【００５４】

「スルホネート」基は、「－SO_{3}－」基を指す。

【００５５】

「スルフェート」基は、「－SO_{4}－」基を指す。

【００５６】

「Ｓ－スルホンアミド」基は、「－$SO_{2}NR_{A}R_{B}$」基を指し、式中、R_{A}及びR_{B}

は、本明細書で定義するように、各々独立して、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００５７】

「Ｎ－スルホンアミド」基は、「－Ｎ（R_A）SO_2R_B」基を指し、式中、R_A及びR_bは、本明細書に定義されるように、各々独立して、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００５８】

「Ｃ－アミド」基は、－Ｃ（＝Ｏ）NR_AR_B」基を指し、式中、R_A及びR_Bは、本明細書に定義されるように、各々独立して、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００５９】

「Ｎ－アミド」基は、－Ｎ（R_A）Ｃ（＝Ｏ）R_B」基を指し、式中、R_A及びR_Bは、本明細書に定義されるように、各々独立して、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。

【００６０】

「アミノ」基は、「－NR_AR_B」基を指し、式中、R_A及びR_Bは、本明細書に定義されるように、各々独立して、水素、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}カルボシクリル、C_{6-10}アリール、５～１０員ヘテロアリール、及び３～１０員ヘテロシクリルから選択される。非限定的な例としては、遊離アミノ（すなわち、$-NH_2$）が挙げられる。

【００６１】

「アミノアルキル」基は、アルキレン基を介して連結されたアミノ基を指す。

【００６２】

「アルコキシアルキル」基は、「C_{2-C_8}アルコキシアルキル」などのアルキレン基を介して接続したアルコキシ基を指す。

【００６３】

基が「任意に置換された」として記載される場合、それは非置換であるか、又は置換されているかのいずれかであり得る。同様に、基が「置換された」として記載される場合、置換基は、示された置換基のうちの１つ以上から選択され得る。本明細書で使用するとき、置換基は、１個以上の水素原子が別の原子又は基に対して交換されている非置換親基から誘導される。別途記載のない限り、基が「置換されている」とみなされる場合、それは、基が、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルケニル、C_1-C_6アルキニル、C_3-C_7カルボシクリル（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、C_3-C_7－カルボシクリル－C_1-C_6－アルキル（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、３～１０員ヘテロシクリル（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、３～１０員ヘテロシクリル－C_1-C_6－アルキル（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、アリール（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、アリール（C_1-C_6）アルキル（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、５～１０員ヘテロアリール（任意に、ハロ、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6アルコキシ、C_1-C_6ハロアルキル、及びC_1-C_6ハロアルコキシで置換されている）、５～１０員ヘテロア

リール（Ｃ１－Ｃ６）アルキル（任意に、ハロ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルコキシ、Ｃ１－Ｃ６ハロアルキル、及びＣ１－Ｃ６ハロアルコキシで置換されている）、ハロ、－ＣＮ、ヒドロキシ、Ｃ１－Ｃ６アルコキシ、Ｃ１－Ｃ６アルコキシ（Ｃ１－Ｃ６）アルキル（すなわち、エーテル）、アリールオキシ、スルフヒドリル（メルカプト）、ハロ（Ｃ１－Ｃ６）アルキル（例えば、－ＣＦ３）、ハロ（Ｃ１－Ｃ６）アルコキシ（例えば、－ＯＣＦ３）、Ｃ１－Ｃ６アルキルチオ、アリールチオ、アミノ、アミノ（Ｃ１－Ｃ６）アルキル、ニトロ、Ｏ－カルバミル、Ｎ－カルバミル、Ｏ－チオカルバミル、Ｎ－チオカルバミル、Ｃ－アミド、Ｎ－アミド、Ｓ－スルホンアミド、Ｎ－スルホンアミド、Ｃ－カルボキシ、Ｏ－カルボキシ、アシル、シアネート、イソシアネート、チオシアネート、イソチオシアネート、スルフィニル、スルホニル、－ＳＯ３Ｈ、スルホネート、スルフェート、スルフィノ、－ＯＳＯ２Ｃ１－Ｃ４アルキル、及びオキソ（＝Ｏ）から独立して選択される１つ以上の置換基で置換されていることを意味する。ある基が「任意に置換された」と記載されている場合は常に、その基は、上記置換基で置換され得る。いくつかの実施形態では、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、カルボシクリル又はヘテロシクリル基が置換されている場合、各々は独立して、ハロ、－ＣＮ、－ＳＯ３－、－ＯＳＯ３－、－ＳＯ３Ｈ、－ＳＲＡ、－ＯＲＡ、－ＮＲＢＲＣ、オキソ、－ＣＯＮＲＢＲＣ、－ＳＯ２ＮＲＢＲＣ、－ＣＯＯＨ、及び－ＣＯＯＲＢからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換され、式中、ＲＡ、ＲＢ、及びＲＣは、各々独立して、Ｈ、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、アリール、又は置換されたアリールから選択される。

【００６４】

当業者には理解されるように、本明細書に記載の化合物は、イオン化形態、例えば、－ＣＯ２－、－ＳＯ３－又は－Ｏ－ＳＯ３－で存在し得る。化合物が、正又は負に帯電した置換基、例えば、－ＳＯ３－を含有する場合、化合物が全体として中性であるように、負又は正に帯電した対イオンを含有してもよい。他の態様では、化合物は塩形態で存在してもよく、対イオンは、共役酸又は塩基によって提供される。

【００６５】

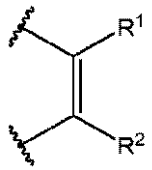
ある特定のラジカル命名法は、文脈に応じてモノラジカル又はジラジカルのいずれかを含むことができることを理解されたい。例えば、置換基が分子の残りの部分への２つの結合点を必要とする場合、置換基はジラジカルであることが理解される。例えば、２つの結合点を必要とするアルキルとして特定される置換基としては、－ＣＨ２－、－ＣＨ２ＣＨ２－、－ＣＨ２ＣＨ（ＣＨ３）ＣＨ２－などのジラジカルが挙げられる。他のラジカル命名法は、ラジカルが「アルキレン」又は「アルケニレン」などのジラジカルであることを明確に示す。

【００６６】

２つの「隣接する」Ｒ基は、「それらが結合している原子と共に」環を形成すると言われる場合、原子の集合単位、介在する結合、及び２つのＲ基が列挙された環であることを意味する。例えば、以下のサブ構造が存在する場合、

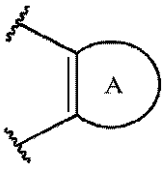
【００６７】

【化６】

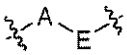


Ｒ１及びＲ２は、水素及びアルキルからなる群から選択されるものとして定義されるか、又はＲ１及びＲ２は、それらが結合している原子と共にアリール若しくはカルボシクリルを形成するし、これは、Ｒ１及びＲ２が、水素若しくはアルキルから選択することができるか、又は代替的に、サブ構造が、以下の構造を有することを意味し、

【００６８】
【化７】



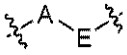
式中、Ａは、アリール環又は示された二重結合を含有するカルボシクリルである。
【００６９】
置換基がジラジカルとして示される場合（すなわち、分子の残りの部分への２つの結合点を有する）は、特に指示がない限り、置換基が任意の方向性構成で結合することができることを理解されたい。したがって、例えば、－ＡＥ－又は
【００７０】
【化８】



として示される置換基は、Ａが、分子の最も左の結合点で結合されるように、方向付けられている置換基、並びにＡが、分子の最も右の結合点で結合される場合を示す。加えて、基又は置換基が、
【００７１】
【化９】



として示され、Ｌが、任意に存在するリンカー部分と定義され、Ｌが存在しない（又は不在である）場合、そのような基又は置換基は、
【００７２】
【化１０】



と等価物である。
【００７３】
本明細書に記載される化合物の単一のメソメリー形態が示されている各事例においては、代替的なメソメリー形態も同様に企図される。
【００７４】
本明細書に使用されるとき、「ヌクレオチド」は、窒素含有複素環式塩基、糖、及び１つ以上のリン酸基を含む。それらは、核酸配列のモノマー単位である。ＲＮＡ中では、糖は、リボースであり、ＤＮＡ中では、デオキシリボース、すなわち、リボース中に存在するヒドロキシル基を欠く糖である。窒素含有複素環式塩基は、プリン、デアザプリン、又はピリミジン塩基であり得る。プリン塩基には、アデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ）、並びに７－デアザアデニン又は７－デアザグアニンなどのそれらの修飾された誘導体又は類似体が含まれる。ピリミジン塩基としては、シトシン（Ｃ）、チミン（Ｔ）、及びウラシル（Ｕ）、並びにそれらの修飾された誘導体又は類似体が挙げられる。デオキシリボースのＣ－１原子は、ピリミジンのＮ－１又はプリンのＮ－９に結合される。
【００７５】
本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」は、ヌクレオチドと構造的に類似しているが、リン酸部分を欠いている。ヌクレオシド類似体の例は、標識が塩基に連結され、糖

分子に結合したリン酸基が存在しないものである。用語「ヌクレオシド」は、当業者によって理解される通常の意味で、本明細書で使用される。例としては、リボース部分を含むリボヌクレオシド、及びデオキシリボース部分を含むデオキシリボヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。修飾されたペントース部分は、酸素原子が炭素で置き換えられている、かつ／又は炭素が硫黄又は酸素原子で置き換えられている、ペントース部分である。「ヌクレオシド」は、置換塩基及び／又は糖部分を有し得るモノマーである。更に、ヌクレオシドは、より大きなＤＮＡ及び／又はＲＮＡポリマー及びオリゴマーに組み込まれ得る。

【００７６】

用語「プリン塩基」は、当業者によって理解される通常の意味で、本明細書で使用され、その互変異性体を含む。同様に、用語「ピリミジン塩基」は、当業者によって理解される通常の意味で、本明細書で使用され、その互変異性体を含む。任意に置換されたプリン塩基の非限定的なリストとしては、プリン、アデニン、グアニン、デアザプリン、７－デアザアデニン、７－デアザグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、アロキサンチン、７－アルキルグアニン（例えば、７－メチルグアニン）、テオブロミン、カフェイン、尿酸、及びイソグアニンが挙げられる。ピリミジン塩基の例としては、シトシン、チミン、ウラシル、５，６－ジヒドロウラシル、及び５－アルキルシトシン（例えば、５－メチルシトシン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００７７】

本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドを「含む」として記載される場合、それは、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと共有結合を形成することを意味する。同様に、ヌクレオシド又はヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに「組み込まれた」など、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの一部として記載される場合、それは、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと共有結合を形成することを意味する。いくつかのそのような実施形態では、共有結合は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの３’ヒドロキシ基と、本明細書に記載のヌクレオチドの５’リン酸基との間で、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの３’炭素原子とヌクレオチドの５’炭素原子との間のリン酸ジエステル連結として形成される。

【００７８】

本明細書で使用される場合、「開裂可能なリンカー」という用語は、リンカー全体を除去する必要があることを意味するものではない。開裂部位は、リンカーの一部が、開裂後に検出可能な色素及び／又はヌクレオシド若しくはヌクレオチド部分に結合したままであることを確実にするリンカー上の位置に配置され得る。

【００７９】

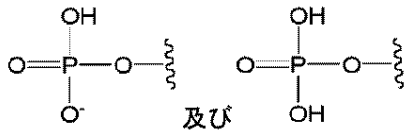
本明細書で使用される場合、「誘導体」又は「類似体」は、修飾された塩基部分及び／又は修飾された糖部分を有する合成ヌクレオチド又はヌクレオシド誘導体を意味する。そのような誘導体及び類似体は、例えば、Ｓｃｈｅｉｔ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ａｎａｌｏｇｓ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎ，１９８０）及びＵｈｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ９０：５４３－５８４，１９９０に考察されている。ヌクレオチド類似体はまた、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキル－ホスホネート、ホスホラニリデート（phosphoranilidate）、及びホスホラミデート連結を含む修飾されたリン酸ジエステル連結を含むことができる。本明細書で使用される「誘導体」、「類似体」、及び「修飾された」は、互換的に使用され得、本明細書で定義される用語「ヌクレオチド」及び「ヌクレオシド」に包含される。

【００８０】

本明細書で使用される場合、用語「リン酸塩／ホスフェート」は、当業者によって理解される通常の意味で使用され、そのプロトン化形態

【００８１】

【化１１】



（例えば、　　及び　　）

を含む。本明細書で使用される場合、用語「一リン酸」、「二リン酸」、及び「三リン酸」は、当業者によって理解される通常の意味で使用され、プロトン化形態を含む。

【００８２】

本明細書で使用される場合、「フェージング」という用語は、３’ターミネーター及びフルオロフォアの不完全な除去、及び／又は所与の配列決定サイクルでのポリメラーゼによるクラスター内のＤＮＡ鎖の一部分の組み込みを完了不良によって引き起こされる、ＳＢＳにおける現象を指す。プレフェージングは、効果的な３’ターミネーターなしでヌクレオチドを組み込むことによって引き起こされ、取り込みイベントは、停止不良により１サイクル前に進む。フェージング及びプレフェージングは、特定のサイクルに対する測定されたシグナル強度を、現在のサイクルからのシグナル、並びに前及び次のサイクルからのノイズからなるようにする。サイクル数が増加するにつれて、フェージング及びプレフェージングによって影響を受けたクラスター当たりの配列の割合は増加し、正しい塩基の特定を妨げる。プレフェージングは、合成による配列決定（sequencing by synthesis、ＳＢＳ）中の微量の保護されていない、又はブロックされていない３’－ＯＨヌクレオチドの存在によって引き起こされ得る。保護されていない３’－ＯＨヌクレオチドは、製造プロセス中、又は場合によっては、貯蔵及び試薬処理プロセス中に生成され得る。したがって、プレフェージングの発生率を減少させるヌクレオチド類似体の発見は驚くべきことであり、ＳＢＳ用途において既存のヌクレオチド類似体に対して大きな利点を提供する。例えば、提供されるヌクレオチド類似体は、より速いＳＢＳサイクル時間、低いフェージング及びプレフェージング値、並びにより長い配列決定リード長をもたらし得る。

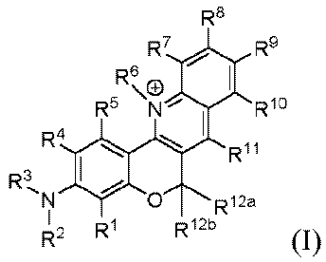
【００８３】

式（Ｉ）のクロメノキノリン色素

本開示のいくつかの態様は、式（Ｉ）のクロメノキノリン色素、並びにその塩及びメソメリー形態に関し、

【００８４】

【化１２】



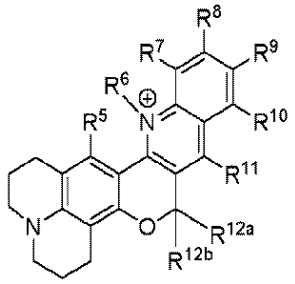
(I)

式中、R^1、R^4、R^5、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12a}及びR^{12b}の各々が、独立して、Ｈ、C_1－C_6アルキル、置換されたC_1－C_6アルキル、C_1－C_6アルコキシ、C_2－C_6アルケニル、C_2－C_6アルキニル、C_1－C_6ハロアルキル、C_1－C_6ハロアルコキシ、（C_1－C_6アルコキシ）C_1－C_6アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（C_1－C_6アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（C_1－C_6アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、

R^2及びR^3の各々が、独立して、Ｈ、C_1－C_6アルキル、又は置換されたC_1－C_6アルキルであり、

R^6が、C_1－C_6アルキル又は置換されたC_1－C_6アルキルであり、

代替的に、R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール若しくは任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、かつ／又は
代替的に、R^3及びR^4は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール若しくは任意に置換された５～１０員ヘテロシクリルを形成し、かつ／又は
代替的に、R^8及びR^9は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換されたC_6-C_{10}アリール、任意に置換された３～１０員カルボシクリル、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール又は任意に置換された３～１０員ヘテロシクリルを形成し、
但し、R^2及びR^3の各々が、エチルである場合、R^1、R^4、R^5、R^7、R^8、R^{10}、R^{11}、R^{12a}及びR^{12b}の各々が、Ｈであり、R^6が、メチルであり、R^9が、カルボキシルを含む置換されたC_1-C_6アルキルであることを条件とし、
但し、化合物が構造
【００８５】
【化１３】



を有するように、R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニルを形成し、かつ、R^3及びR^4は、それらが結合している原子と一緒に、ピペリジニルを形成する場合、R^5、R^7、R^8、R^{10}、R^{11}、R^{12a}及びR^{12b}の各々が、Ｈであり、R^6が、メチルであり、R^9が、カルボキシルを含む置換されたC_1-C_6アルキルであることを条件とする。
【００８６】
式（Ｉ）の化合物の任意の実施形態では、基が置換されたC_1-C_6アルキルとして定義される場合、それは、カルボキシル、カルボキシレート、スルホ、スルホネート、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}又は－Ｃ（Ｏ）$NR^{16}R^{17}$で置換されたC_1、C_2、C_3、C_4、C_5又はC_6アルキルであり得、式中、各R^{16}及びR^{17}が、独立して、Ｈ、又はカルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}、スルホ若しくはスルホネートで置換されたC_1-C_6アルキルである。
【００８７】
式（Ｉ）の化合物のいくつかの実施形態では、R^2及びR^3のうちの少なくとも１つは、Ｈである。いくつかの更なる実施形態では、R^2及びR^3の両方は、Ｈである。他の実施形態では、R^2は、Ｈであり、R^3は、C_1-C_6アルキル又は置換されたC_1-C_6アルキルである。他の実施形態では、R^2及びR^3の各々は、独立して、C_1-C_6アルキル又は置換されたC_1-C_6アルキルである。置換されたC_1-C_6アルキルには、カルボキシル、カルボキシレート　（－Ｃ（Ｏ）$^-$）、スルホ（$-SO_3H$）、スルホネート（$-SO_3^-$）、スルフェート（$-O-SO_3-$）、任意に置換されたアミノ（Ｂｏｃ保護されたアミノ基など）、－Ｃ（Ｏ）OR^{15}又は－Ｃ（Ｏ）$NR^{16}R^{17}$などの１つ以上の置換基で置換されたメチル、エチル、イソプロピル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、２－ブチル、ｎ－ペンチル、２－ペンチル、ｎ－ヘキシルなどが含まれるが、これらに限定されず、式中、R^{15}が、任意に置換されたC_1-C_6アルキル、任意に置換されたC_6-C_{10}アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたC_3-C_7シクロアルキルであり、R^{16}及びR^{17}の各々が、独立して、Ｈ、任意

に置換されたＣ１－Ｃ６アルキル、任意に置換されたＣ６－Ｃ１０アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたＣ３－Ｃ７シクロアルキルである。一実施形態では、Ｒ２及びＲ３の各々は、エチルである。他の実施形態では、Ｒ２は、Ｈであり、Ｒ３は、カルボキシルで置換されたｎ－プロピルである。

【００８８】

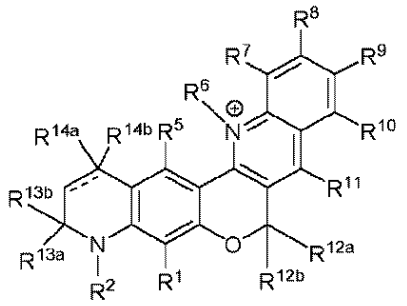
式（Ｉ）の化合物の任意の実施形態では、基が置換されたＣ１－Ｃ６アルキルとして定義される場合、それは、カルボキシル、カルボキシレート、スルホ、スルホネート、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ１５又は－Ｃ（Ｏ）ＮＲ１６Ｒ１７で置換されたＣ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５又はＣ６アルキルであり得、式中、各Ｒ１６及びＲ１７が、独立して、Ｈ、又はカルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ１５、スルホ若しくはスルホネートで置換されたＣ１－Ｃ６アルキルである。

【００８９】

式（Ｉ）の化合物のいくつかの実施形態はまた、式（Ｉａ）によって表され、式（Ｉ）のＲ３及びＲ４は、それらが結合している原子と一緒に、以下の構造の任意に置換された６員ヘテロシクリルを形成する。

【００９０】

【化１４】



(Ia)、

塩又はそのメソメリー形態：

式中、Ｒ１３ａ、Ｒ１３ｂ、Ｒ１４ａ及びＲ１４ｂの各々が、独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキル、置換されたＣ１－Ｃ６アルキル、Ｃ１－Ｃ６アルコキシ、Ｃ２－Ｃ６アルケニル、Ｃ２－Ｃ６アルキニル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルキル、Ｃ１－Ｃ６ハロアルコキシ、（Ｃ１－Ｃ６アルコキシ）Ｃ１－Ｃ６アルキル、任意に置換されたアミノ、アミノ（Ｃ１－Ｃ６アルキル）、ハロ、シアノ、ヒドロキシ、ヒドロキシ（Ｃ１－Ｃ６アルキル）、ニトロ、スルホニル、スルホ、スルフィノ、スルホネート、Ｓ－スルホンアミド、又はＮ－スルホンアミドであり、

実線及び破線

【００９１】

【化１５】

によって表される結合は、単結合及び二重結合からなる群から選択され、但し、

【００９２】

【化１６】

が二重結合の場合、Ｒ１４ｂは、存在しないことを条件とする。

【００９３】

式（Ｉａ）の化合物のいくつかの実施形態では、実践及び破線

【００９４】

【化１７】

によって表される結合は、二重結合である。いくつかのそのような実施形態では、R^{14a}は、H又はC_1－C_6アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、n－プロピル、n－ブチル、2－ブチル、n－ペンチル、2－ペンチル、又はn－ヘキシルなど）である。一実施形態では、R^{14a}は、メチルである。式（Ia）の化合物の他の実施形態では、実践及び破線

【００９５】

【化１８】

によって表される結合は、単結合である。いくつかのそのような実施形態では、各R^{14a}は、Hであり、R^{14b}は、C_1－C_6アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、n－プロピル、n－ブチル、2－ブチル、n－ペンチル、2－ペンチル、又はn－ヘキシルなど）である。いくつかのそのような実施形態では、R^{14a}及びR^{14b}の各々は、Hである。いくつかの実施形態では、R^{13a}及びR^{13b}の各々は、Hである。他の実施形態では、R^{13a}及びR^{13b}の各々は、C_1－C_6アルキルである。一実施形態では、R^{13a}及びR^{13b}メチルの各々。

【００９６】

式（Ia）の化合物のいくつかの実施形態では、R^2は、Hである。他の実施形態では、R^2は、C_1－C_6アルキル又は置換されたC_1－C_6アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、n－プロピル、n－ブチル、2－ブチル、n－ペンチル、2－ペンチル、又はn－ヘキシルなど）である。いくつかの更なる実施形態では、R^2は、カルボキシル（－C（O）OH）、カルボキシレート（－C（O）O－）、スルホ（$-SO_3H$）、スルホネート（$-SO_3-$）、－C（O）OR^{15}、及び－C（O）$NR^{16}R^{17}$からなる群から選択される１つ以上の置換基で置換されたC_1－C_6アルキルであり、R^{15}が、任意に置換されたC_1－C_6アルキル、任意に置換されたC_6－C_{10}アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたC_3－C_7シクロアルキルであり、R^{16}及びR^{17}の各々が、独立して、H、任意に置換されたC_1－C_6アルキル、任意に置換されたC_6－C_{10}アリール、任意に置換された５～１０員ヘテロアリール、又は任意に置換されたC_3－C_7シクロアルキルである。いくつかの更なる実施形態では、R^2が、カルボキシル又は－C（O）$NR^{16}R^{17}$で置換されたC_1－C_6アルキルであり、各R^{16}及びR^{17}が、独立して、カルボキシル、カルボキシレート、－C（O）OR^{15}、スルホ又はスルホネートで置換されたC_1－C_6アルキルである。いくつかの実施形態では、置換は、直鎖C_2、C_3、C_5、C_6、又はC_6アルキルの末端にある。一実施形態では、R^3は、カルボキシルで置換されたn－プロピルである。

【００９７】

式（I）又は（Ia）の化合物のいくつかの実施形態では、R^1は、Hである。他の実施形態では、R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に結合して、任意に置換された５、６、又は７員ヘテロシクリルを形成する。いくつかのそのような実施形態では、R^1及びR^2は、それらが結合している原子と一緒に結合して、１つ以上のC_1－C_6アルキルで置換された６員ヘテロシクリルを形成する。

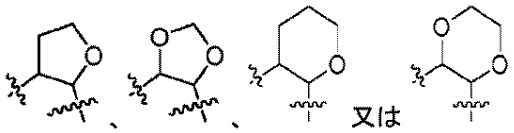
【００９８】

式（I）又は（Ia）の化合物のいくつかの実施形態では、R^6は、C_1－C_6アルキルである。一実施形態では、R^6は、メチルである。他の実施形態では、R^6が、カルボキシル又は－C（O）$NR^{16}R^{17}$で置換されたC_1－C_6アルキルであり、各R^{16}及びR^{17}が、独立して、カルボキシル、カルボキシレート、－C（O）OR^{15}、スルホ又はスルホネートで置換されたC_1－C_6アルキルである。

【００９９】

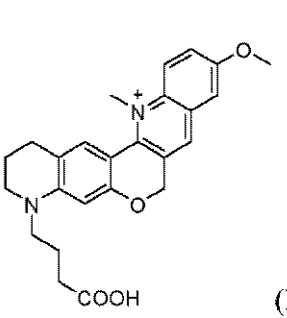
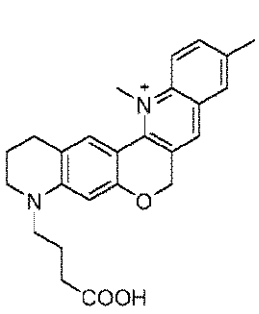
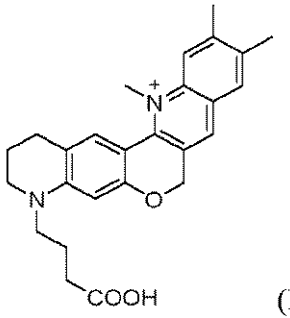
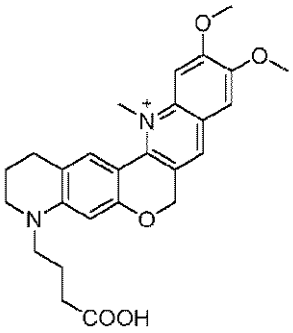
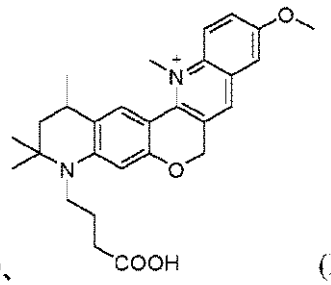
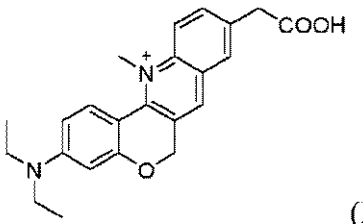
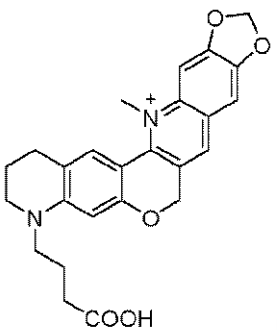
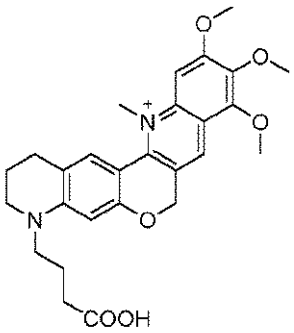
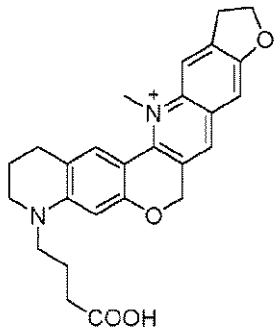
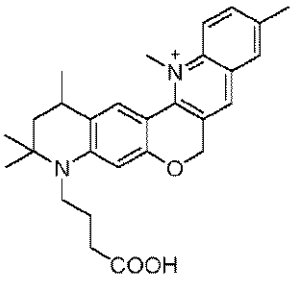
式（I）又は（Ia）の化合物のいくつかの実施形態では、R^5は、Hである。いくつかの更なる実施形態では、R^{11}は、Hである。いくつかの更なる実施形態では、R^{12a}及びR^{12b}の各々は、Hである。

【０１００】
式（Ｉ）又は（Ｉａ）の化合物のいくつかの実施形態では、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}のうちの少なくとも１つは、Ｈである。そのような一実施形態では、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}の各々は、Ｈである。別のそのような実施形態では、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、及びＲ^{10}の各々は、Ｈである。別のそのような実施形態では、Ｒ^{7}及びＲ^{10}の各々は、Ｈである。他の実施形態では、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}のうちの少なくとも１つは、独立して、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、２－ブチル、ｎ－ペンチル、２－ペンチル、又はｎ－ヘキシルなど）又はＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、イソプロポキシ、ｎ－ブトキシ、２－ブトキシ、ｎ－ペントキシ、２－ペントキシ、ｎ－ヘキソキシなど）である。そのような一実施形態では、Ｒ^{9}は、メチル又はメトキシである。別のそのような実施形態では、Ｒ^{8}及びＲ^{9}の各々は、メチル又はメトキシである。更に別の実施形態では、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}の各々は、メチル又はメトキシである。他の実施形態では、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}及びＲ^{10}のうちの少なくとも１つは、カルボキシル、カルボキシレート、スルホ、スルホネート－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{15}又は－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{16}Ｒ^{17}で置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルであり、各Ｒ^{16}及びＲ^{17}が、独立して、Ｈ、又はカルボキシル、カルボキシレート、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{15}、スルホ若しくはスルホネートで置換されたＣ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキルである。他の実施形態では、Ｒ^{8}及びＲ^{9}は、結合している原子と一緒に、任意に置換された５員又は６員のヘテロシクリル、例えば、
【０１０１】
【化１９】



などの構造を有するものを形成する。
【０１０２】
式（Ｉ）又は（Ｉａ）の化合物の追加の実施形態は、以下を含む。
【０１０３】

【化２０】


(I-1)、

(I-2)、

(I-3)、

(I-4)、

(I-5)、

(I-6)、

(I-7)、

(I-8)、

(I-9)、及び

(I-10)、

並びにそれらの塩及びメソメリー形態。非限定的な例の対応するＣ１－Ｃ６アルキルカルボン酸エステル（化合物のカルボン酸基から形成されたメチルエステル、エチルエステルイソプロピルエステル、及びｔ－ブチルエステルなど）。

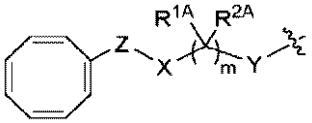
【０１０４】

シクロオクタテトレエン（cyclooctatetraene、ＣＯＴ）光保護部分

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の蛍光化合物（式（Ｉ）又は（Ｉａ））は、それに共有結合した光保護部分を導入するように更に修飾され得、例えば、シクロオクタテトラエン部分は、構造

【０１０５】

【化２１】



を含み、式中、

R^{1A}及びR^{2A}の各々が、各々独立して、H、ヒドロキシル、ハロゲン、アジド、チオール、ニトロ、シアノ、任意に置換されたアミノ、カルボキシル、－C（O）OR^{5A}、－C（O）$NR^{6A}R^{7A}$、任意に置換されたC_{1-6}アルキル、任意に置換されたC_{1-6}アルコキシ、任意に置換されたC_{1-6}ハロアルキル、任意に置換されたC_{1-6}ハロアルコキシ、任意に置換されたC_{2-6}アルケニル、任意に置換されたC_{2-6}アルキニル、任意に置換されたC_{6-10}アリール、任意に置換されたC_{7-14}アラルキル、任意に置換されたC_{3-7}カルボシクリル、任意に置換された5～10員ヘテロアリール、又は任意に置換された3～10員ヘテロシクリルであり、

X^1及びY^1が、各々独立して、結合、－O－、－S－、$-NR^{3A}-$、－C（＝O）－、－C（＝O）－O－、

－C（＝O）$-NR^{4A}-$、$-S(O)_2-$、$-NR^{3A}-C(=O)-NR^{4A}$、$-NR^{3A}-C(=S)-NR^{4A}-$、任意に置換されたC_{1-6}アルキレン、又は少なくとも1個の炭素原子が、O、S、若しくはNで置き換えられた任意に置換されたヘテロアルキレンであり、

Zが、存在しないか、任意に置換されたC_{2-6}アルケニレン、又は任意に置換されたC_{2-6}アルキニレンであり、

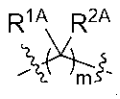
R^{3A}及びR^{4A}の各々が、独立して、H、任意に置換されたC_{1-6}アルキル、又は任意に置換されたC_{6-10}アリールであり、

R^{5A}が、任意に置換されたC_{1-6}アルキル、任意に置換されたC_{6-10}アリール、任意に置換されたC_{7-14}アラルキル、任意に置換されたC_{3-7}カルボシクリル、任意に置換された5～10員ヘテロアリール、又は任意に置換された3～10員ヘテロシクリルであり、

R^{6A}及びR^{7A}の各々が、独立して、H、任意に置換されたC_{1-6}アルキル、任意に置換されたC_{6-10}アリール、任意に置換されたC_{7-14}アラルキル、任意に置換されたC_{3-7}カルボシクリル、任意に置換された5～10員ヘテロアリール、又は任意に置換された3～10員ヘテロシクリルであり、

【0106】

【化22】



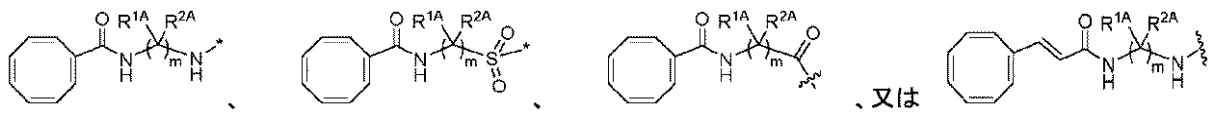
におけるR^{1A}及びR^{2A}が結合している炭素原子が、O、S、又はNで任意に置き換えられ、但し、炭素原子がO又はSで置き換えられる場合、R^{1A}及びR^{2A}は、両方とも存在しないことを条件とし、当該炭素原子が、Nで置き換えられる場合、R^{2A}は、存在しないことを条件とし、mは、0～10の整数である。いくつかの実施形態では、X及びYは、両方とも結合ではない。

【0107】

いくつかの更なる実施形態では、シクロオクタテトラエン部分は、構造

【0108】

【化23】



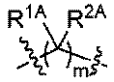
、又は

を含む。いくつかのそのような実施形態では、R^{1A}及びR^{2A}のうちの少なくとも1つは、水素である。いくつかの更なる実施形態では、R^{1A}及びR^{2A}の両方が、水素である。いくつかの他の実施形態では、R^{1A}は、Hであり、R^2は、任意に置換されたアミノ、カルボキシル、又は－C（O）$NR^{6A}R^{7A}$である。いくつかの実施形態では、

mは、１、２、３、４、５、又は６であり、R^{1A}及びR^{2A}の各々は、独立して、水素、任意に置換されたアミノ、カルボキシル、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{6A}Ｒ^{7A}、又はそれらの組み合わせである。いくつかの更なる実施形態では、mが、２、３、４、５、又は６である場合、１つのR^{1A}は、アミノ、カルボキシル、又は－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{6A}Ｒ^{7A}であり、残りのR^{1A}及びR^{2A}は、水素である。いくつかの実施形態では、

【０１０９】

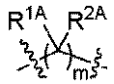
【化２４】



におけるR^{1A}及びR^{2A}が結合している少なくとも１つの炭素原子は、Ｏ、Ｓ、又はＮで置き換えられている。いくつかのそのような実施形態では、

【０１１０】

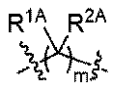
【化２５】



における１つの炭素原子は、酸素原子によって置き換えられ、当該置き換えられた炭素原子に結合しているR^{1A}及びR^{2A}の両方は存在しない。いくつかの他の実施形態では、

【０１１１】

【化２６】



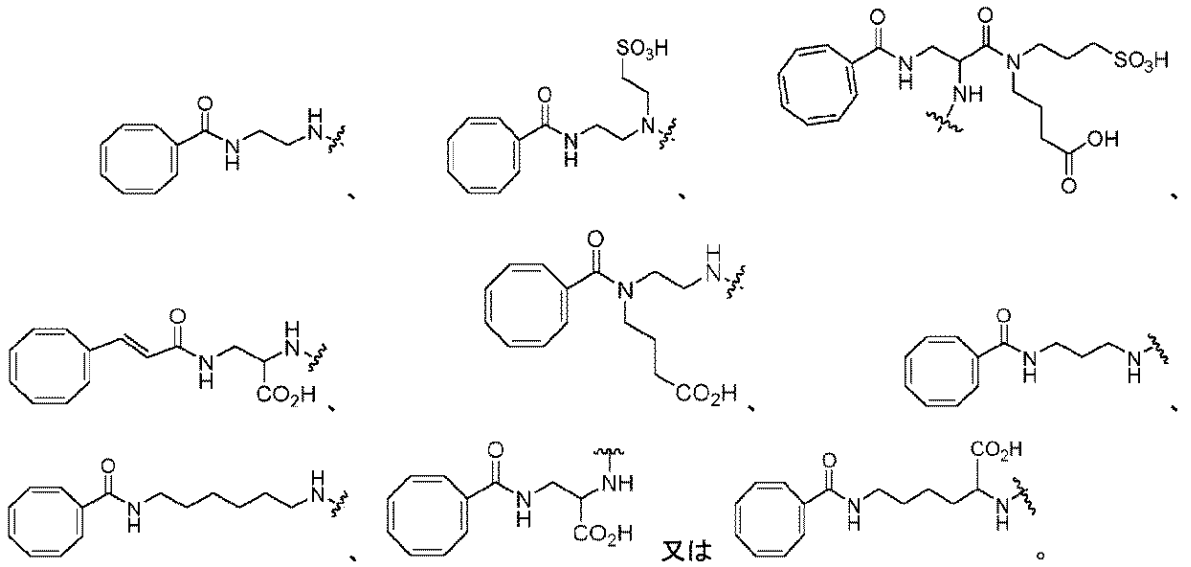
における１つの炭素原子が窒素原子で置き換えられる場合、当該置き換えられた炭素原子に結合しているR^{2}は、存在せず、当該置き換えられた炭素原子に結合しているR^{1}は、水素又はC_{1-6}アルキルである。R^{1A}及びR^{2A}の任意の実施形態では、R^{1A}又はR^{2A}は、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{6A}Ｒ^{7A}であり、R^{6A}及びR^{7A}は、独立して、Ｈ、C_{1-6}アルキル又は置換されたC_{1-6}アルキル（例えば、－CO_2H、－NH_2、－SO_3H、又は－SO_3－で置換されたC_{1-6}アルキル）であり得る。

【０１１２】

いくつかの更なる実施形態では、本明細書に記載の蛍光色素は、以下の構造のシクロオクタテトラエン部分を含む。

【０１１３】

【化２７】



本明細書に記載のＣＯＴ部分は、アミド結合を形成する（アミド結合のカルボニル基が示されていない）ための本明細書に記載の蛍光色素の官能基（例えば、カルボキシル基）とＣＯＴ誘導体のアミノ基との間の反応により得られる。

【０１１４】

標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド

本開示の一態様によれば、本明細書に記載の色素化合物は、基材部分への結合に好適であり、特に基材部分への結合を可能にするリンカー基を含む。基材部分は、本開示の色素をコンジュゲートさせることができる実質上任意の分子又は物質であってもよく、非限定的な例として、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、リガンド、粒子、固体表面、有機及び無機ポリマー、染色体、核、生細胞、並びにこれらの組み合わせ又は集合体が挙げられる。色素は、疎水性誘引、イオン誘引、及び共有結合を含む様々な手段によって、任意のリンカーによってコンジュゲートさせることができる。いくつかの態様では、色素は、共有結合によって基材にコンジュゲートされる。より具体的には、共有結合は、リンカー基によるものである。場合によっては、このような標識されたヌクレオチドは、「修飾されたヌクレオチド」とも称される。

【０１１５】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の式（Ｉ）若しくは（Ｉａ）の色素、若しくはそれらのメソメリー形態の塩又は本明細書に記載の光保護部分ＣＯＴを含有するその誘導体で標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに関する。標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、カルボキシル基（－ＣＯ$_2$Ｈ）又はアルキル－カルボキシル基を介して本明細書に開示される色素化合物に結合し、アミド又はアルキル－アミドを形成し得る。いくつかの更なる実施形態では、カルボキシル基は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドのアミノ又はヒドロキシル基への結合に使用され得る、カルボキシル基の活性化形態、例えば、アミド又はエステルの形態であり得る。本明細書で使用するとき、用語「活性化エステル」は、例えばアミノ基を含有する化合物と、穏和な条件下で反応することができるカルボキシル基誘導体を指す。活性化エステルの非限定的な例としては、ｐ－ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル、及びスクシンイミドエステルが挙げられるが、これらに限定されない。

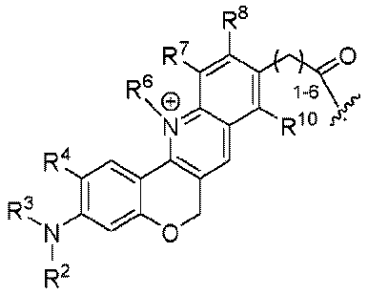
【０１１６】

例えば、式（Ｉ）の色素化合物は、式（Ｉ）のＲ^6、Ｒ^7、Ｒ^8、Ｒ^9、Ｒ^{10}及びＲ^{11}のうちの１つ、又はＲ^2／Ｒ^{3}のうちの１つを介してヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに結合し得る。いくつかのそのような実施形態では、式（Ｉ）のＲ^{9}は、－ＣＯ$_2$Ｈ又は－（ＣＨ$_2$）$_{1-6}$－ＣＯ$_2$Ｈを含み、結合は、Ｒ^{9}のカルボキシル官能基とヌク

レオチド又はヌクレオチドリンカーのアミノ官能基と間にアミド部分を形成する。一例として、標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、以下の構造の色素部分：

【０１１７】

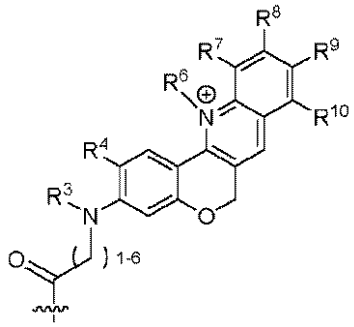
【化２８】



を含み得る。他の実施形態では、式（Ｉ）のＲ^{2}又はＲ^{3}は、－ＣＯ$_{2}$Ｈ又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{1-6}$－ＣＯ$_{2}$Ｈを含み、結合は、－ＣＯ$_{2}$Ｈ基を使用してアミドを形成する。例えば、標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、以下の色素部分：

【０１１８】

【化２９】



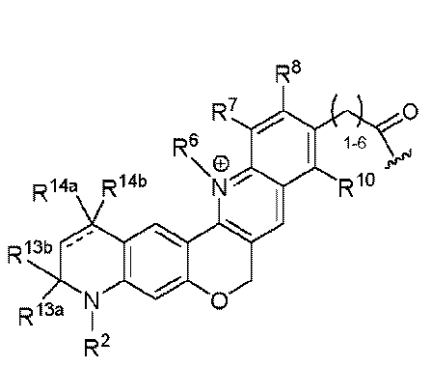
を含み得る。

【０１１９】

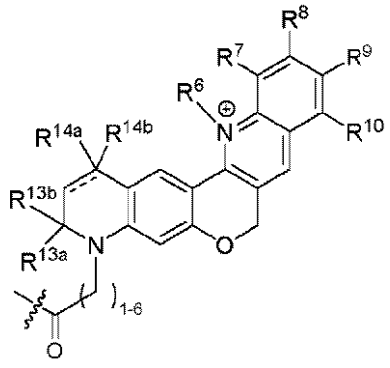
同様に、式（Ｉａ）の色素化合物は、式（Ｉａ）のＲ^{6}、Ｒ^{7}、Ｒ^{8}、Ｒ^{9}、Ｒ^{10}及びＲ^{11}のうちの１つ（例えば、Ｒ^{9}）、又はＲ^{2}を介して、化合物のカルボキシル官能基とヌクレオチド又はヌクレオチドリンカーのアミノ官能基との間にアミド部分を形成することによって、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに結合し得る。例えば、標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、以下の色素部分：

【０１２０】

【化３０】



又は



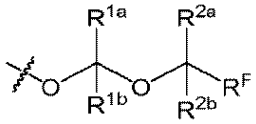
を含み得る。他の実施形態では、式（Ｉ）又は（Ｉａ）のＲ^{6}は、－ＣＯ$_{2}$Ｈ又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{1-6}$－ＣＯ$_{2}$Ｈを含み、結合は、－ＣＯ$_{2}$Ｈ基を使用してアミドを形成する。

【０１２１】
いくつかの実施形態では、色素化合物は、ヌクレオチド塩基を介してオリゴヌクレオチド又はヌクレオチドに共有結合し得る。いくつかのそのような実施形態では、標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、任意にリンカー部分を介して、ピリミジン塩基のＣ５位置、又は７－デアザプリン塩基のＣ７位置に結合した色素を有し得る。例えば、核酸塩基は、７－デアザアデニンであり得、色素は、Ｃ７位置で、任意にリンカーを介して７－デアザアデニンに結合している。核酸塩基は、７－デアザグアニンであり得、色素は、Ｃ７位置で、任意にリンカーを介して７－デアザグアニンに結合している。核酸塩基は、シトシンであり得、色素は、Ｃ５位置で、任意にリンカーを介してシトシンに結合している。別の例として、核酸塩基は、チミン又はウラシルであり得、色素は、Ｃ５位置で、任意にリンカーを介してチミン又はウラシルに結合している。

【０１２２】
３’ヒドロキシルブロッキング基
標識されたヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドはまた、ヌクレオチドのリボース糖又はデオキシリボース糖に共有結合したブロッキング基を有してもよい。ブロッキング基は、リボース糖又はデオキシリボース糖上の任意の位置に結合されてもよい。特定の実施形態では、ブロッキング基は、ヌクレオチドのリボース糖又はデオキシリボース糖の３’ＯＨ位置にある。様々な３’ＯＨブロッキング基は、国際公開第２００４／０１８４９７号及び国際公開第２０１４／１３９５９６号において開示されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。例えば、ブロッキング基は、アジドメチル（－ＣＨ$_2$Ｎ$_3$）若しくは置換されたアジドメチル（例えば、－ＣＨ（ＣＨＦ$_2$）Ｎ$_3$又はＣＨ（ＣＨ$_2$Ｆ）Ｎ$_3$）、又はリボース若しくはデオキシリボース部分の３’酸素原子に接続しているアリルであり得る。いくつかの実施形態では、３’ブロッキング基は、アジドメチルであり、リボース又はデオキシリボースの３’炭素を用いて３’－ＯＣ$_2$HN$_3$を形成する。

【０１２３】
いくつかの他の実施形態では、３’ブロッキング基及び３’酸素原子は、リボース又はデオキシリボースの３’炭素に共有結合した構造

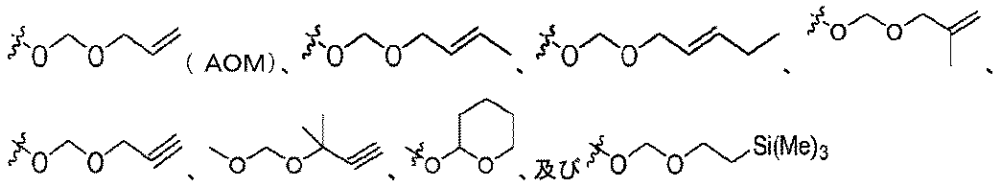
【０１２４】
【化３１】



のアセタール基を形成し、式中、
各Ｒ^{1a}及びＲ^{1b}は、独立して、Ｈ、Ｃ$_1$～Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ハロアルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルコキシ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ハロアルコキシ、シアノ、ハロゲン、任意に置換されたフェニル、又は任意に置換されたアラルキルであり、
各Ｒ^{2a}及びＲ^{2b}は、独立して、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$ハロアルキル、シアノ、又はハロゲンであり、
代替的に、Ｒ^{1a}及びＲ^{2a}は、それらが結合している原子と一緒に、任意に置換された５～８員ヘテロシクリル基を形成し、
Ｒ^{F}は、Ｈ、任意に置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、任意に置換されたＣ$_3$－Ｃ$_7$シクロアルケニル、任意に置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルキニル、又は任意に置換された（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキレン）Ｓｉ（Ｒ^{3a}）$_3$であり、
各Ｒ^{3a}は、独立して、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、又は任意に置換されたＣ$_6$－Ｃ$_{10}$アリールである。

【０１２５】
追加の３’－ＯＨブロッキング基は、米国特許出願公開第２０２０／０２１６８９１（Ａ１）号において開示され、これは、その全体が参照により組み込まれる。アセタールブロッキング基

【０１２６】
【化３２】

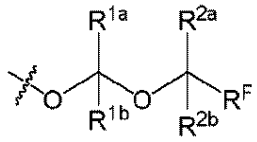


の非限定的な例であり、各々、リボース又はデオキシリボースの３’炭素に共有結合している。

【０１２７】
３’ヒドロキシルブロッキング基の脱保護

いくつかの実施形態では、アジドメチル３’ヒドロキシル保護基は、水溶性ホスフィン試薬を使用することによって除去又は脱保護され得る。非限定的な例としては、トリス（ヒドロキシメチル）ホスフィン（ＴＨＭＰ）、トリス（ヒドロキシエチル）ホスフィン（ＴＨＥＰ）、又はトリス（ヒドロキシルプロピル）ホスフィン（ＴＨＰ又はＴＨＰＰ）が挙げられる。本明細書に記載の３’－アセタールブロッキング基は、様々な化学条件下で除去又は開裂され得る。ビニル又はアルケニル部分を含有するアセタールブロッキング基

【０１２８】
【化３３】



の場合、非限定的な開裂条件は、ホスフィン配位子、例えばトリス（ヒドロキシメチル）ホスフィン（ＴＨＭＰ）、又はトリス（ヒドロキシルプロピル）ホスフィン（ＴＨＰ又はＴＨＰＰ）の存在下での、Ｐｄ（ＯＡｃ）$_2$又はアリルＰｄ（ＩＩ）クロリド二量体などのＰｄ（ＩＩ）錯体を含む。アルキニル基（例えば、エチニル）を含有するこれらのブロッキング基の場合、それらはまた、ホスフィン配位子（例えば、ＴＨＰ又はＴＨＭＰ）の存在下でのＰｄ（ＩＩ）錯体（例えば、Ｐｄ（ＯＡｃ）$_2$又はアリルＰｄ（ＩＩ）クロリド二量体）によって除去され得る。

【０１２９】
パラジウム開裂試薬

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の３’ヒドロキシルブロッキング基は、パラジウム触媒によって開裂され得る。いくつかのそのような実施形態では、Ｐｄ触媒は、水溶性である。いくつかのそのような実施形態では、は、Ｐｄ（０）錯体である（例えば、トリス（３，３’，３’’－ホスフィニジントリス（ベンゼンスルホナト）パラジウム（０））塩ノナナトリウム（nonasodium）九水和物）である。場合によっては、Ｐｄ（０）は、アルケン、アルコール、アミン、ホスフィン、又は金属水素化物などの試薬によるＰｄ（ＩＩ）錯体の還元からその場で生成され得る。好適なパラジウム源としては、Na_2PdCl_4、$Pd(CH_3CN)_2Cl_2$，$(PdCl(C_3H_5))_2$、$[Pd(C_3H_5)(THP)]Cl$、$[Pd(C_3H_5)(THP)_2]Cl$、$Pd(OAc)_2$、$Pd(Ph_3)_4$、$Pd(dba)_2$、$Pd(Acac)_2$、$PdCl_2(COD)$、及び$Pd(TFA)_2$が挙げられる。そのような一実施形態では、Ｐｄ（０）錯体は、Na_2PdCl_4からその場で生成される。別の実施形態では、パラジウム源は、アリルパラジウム（ＩＩ）クロリド二量体［$(PdCl(C_3H_5))_2$］である。いくつかの実施形態では、Ｐｄ（０）錯体は、Ｐｄ（ＩＩ）錯体をホスフィンと混合することによって水溶液中で生成される。好適なホスフィンとしては、トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰ）、トリス（ヒドロキシメチル）ホスフィン（ＴＨＭＰ）、１，３，５－ト

リアザ－７－ホスファアダマンタン（ＰＴＡ）、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物カリウム塩、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、及びトリフェニルホスフィン－３，３’，３’’－トリスルホン酸三ナトリウム塩などの水溶性ホスフィンが挙げられる。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、Ｐｄ（０）は、Ｐｄ（ＩＩ）錯体［（ＰｄＣｌ（C_3H_5））$_2$］をＴＨＰとその場で混合することによって調製される。Ｐｄ（ＩＩ）錯体とＴＨＰとのモル比は、約１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、又は１：１０であり得る。いくつかの更なる実施形態では、アスコルビン酸又はその塩（例えば、アスコルビン酸ナトリウム）などの１つ以上の還元剤を添加してもよい。いくつかの実施形態では、開裂混合物は、一級アミン、二級アミン、三級アミン、炭酸塩、リン酸塩、若しくはホウ酸塩、又はそれらの組み合わせなどの追加の緩衝試薬を含有し得る。いくつかの更なる実施形態では、緩衝剤試薬は、エタノールアミン（ethanolamine、ＥＡ）、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス）、グリシン、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、２－ジメチルエタノールアミン（dimethylethanolamine、ＤＭＥＡ）、２－ジエチルエタノールアミン（diethylethanolamine、ＤＥＥＡ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルエチレンジアミン（tetramethylethylenediamine、ＴＥＭＥＤ）、若しくはＮ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラエチルエチレンジアミン（tetraethylethylenediamine、ＴＥＥＤＡ）、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、緩衝剤試薬は、ＤＥＥＡである。別の実施形態では、緩衝剤試薬は、炭酸塩、リン酸塩、若しくはホウ酸塩、又はそれらの組み合わせなどの１つ以上の無機塩を含有する。一実施形態では、無機塩は、ナトリウム塩である。

【０１３１】

リンカー

本明細書に開示される色素化合物は、基材又は別の分子へ化合物が共有結合するための置換位置の１つに、反応性リンカー基を含んでもよい。反応性連結基は、結合（例えば、共有結合又は非共有結合）、特に共有結合を形成することができる部分である。特定の実施形態では、リンカーは、開裂可能なリンカーであってもよい。用語「開裂可能なリンカー」の使用は、リンカー全体を除去する必要があることを意味するものではない。開裂部位は、リンカーの一部が、開裂後に色素及び／又は基材部分に結合したままであることを確実にするリンカー上の位置に配置され得る。開裂可能なリンカーは、非限定的な例として、求電子的に開裂可能なリンカー、求核的に開裂可能なリンカー、光開裂可能リンカー、還元条件下で開裂可能なリンカー（例えば、ジスルフィド又はアジド含有リンカー）、酸化的条件で開裂可能なリンカー、安全装置リンカーの使用によって開裂可能なリンカー、除去機構によって開裂可能であるリンカーであり得る。色素化合物を基材部分に結合させるために開裂可能なリンカーを使用することにより、必要に応じて、検出後に標識を除去することができ、下流の工程においていかなる干渉シグナルも回避することができる。

【０１３２】

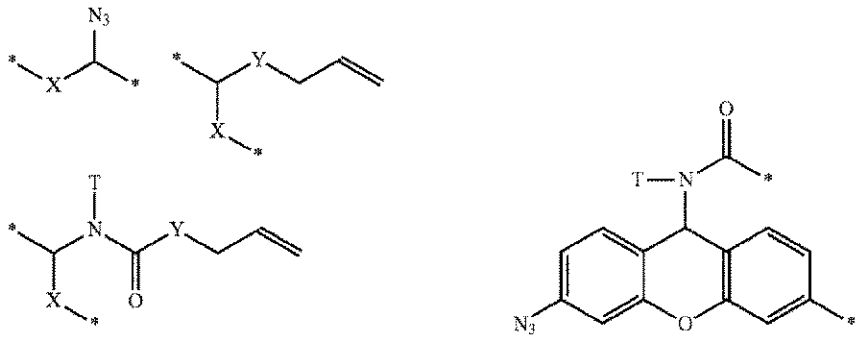
有用なリンカー基は、ＰＣＴ国際公開第２００４／０１８４９３号（参照により本明細書に組み込まれる）に見ることができ、その例としては、水溶性ホスフィン、又は遷移金属から形成された水溶性遷移金属触媒及び少なくとも部分的に水溶性の配位子を使用して開裂され得るリンカーが挙げられる。水溶液中で、後者は、少なくとも部分的に水溶性の遷移金属錯体を形成する。このような開裂可能なリンカーは、ヌクレオチドの塩基を、本明細書に記載される色素などの標識に接続するために使用することができる。

【０１３３】

特定のリンカーとしては、下の式の部分を含むものなど、ＰＣＴ国際公開第２００４／０１８４９３号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものが挙げられ、

【０１３４】

【化３４】



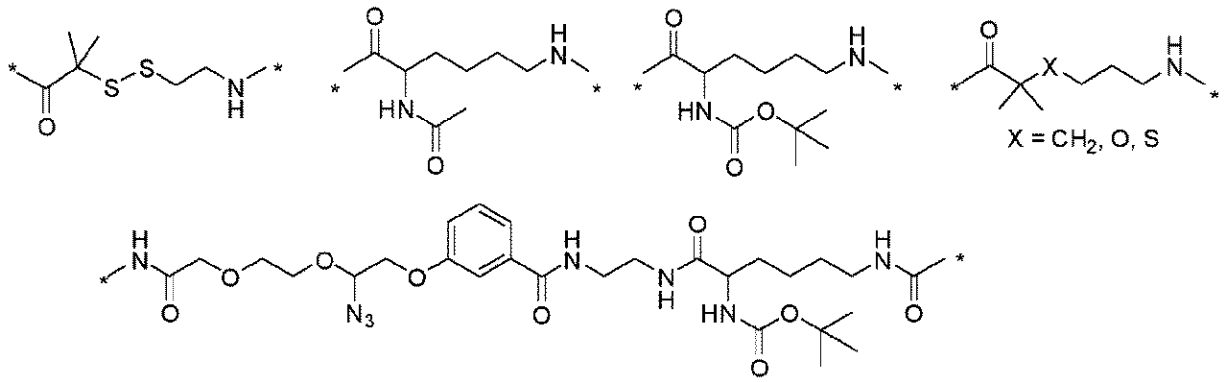
式中、Ｘは、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、及びＮＱを含む基から選択され、Ｑは、Ｃ１－１０の置換又は非置換アルキル基であり、Ｙは、Ｏ、Ｓ、ＮＨ、及びＮ（アリル）を含む基から選択され、Ｔは、水素又はＣ$_{1}$－Ｃ$_{10}$置換又は非置換アルキル基であり、＊は、その部分がヌクレオチド又はヌクレオシドの残りの部分に接続される場所を示す。いくつかの態様では、リンカーは、ヌクレオチドの塩基を、例えば、本明細書に記載の色素化合物などの標識に接続する。

【０１３５】

リンカーの追加の例としては、以下の式の部分を含むものなど、米国特許出願公開第２０１６／００４０２２５号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものが挙げられる

【０１３６】

【化３５】



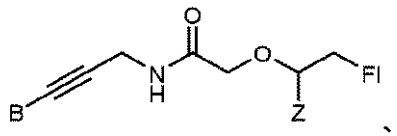
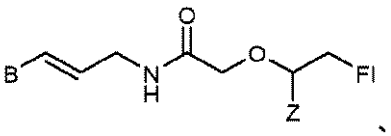
（式中、＊は、その部分がヌクレオチド又はヌクレオシドの残りの部分に接続される場所を示す）。本明細書に示されるリンカー部分は、ヌクレオチド／ヌクレオチドと標識との間の全体又は部分的リンカー構造を含んでもよい。本明細書に示されるリンカー部分は、ヌクレオチド／ヌクレオチドと標識との間の全体又は部分的リンカー構造を含んでもよい。

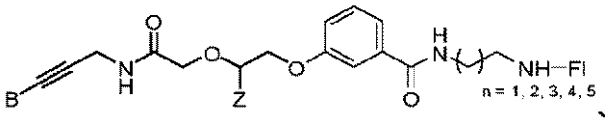
【０１３７】

リンカーの追加の例としては、以下の式の部分が挙げられ、

【０１３８】

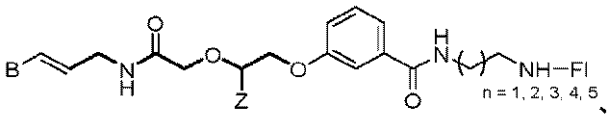
【化３６】

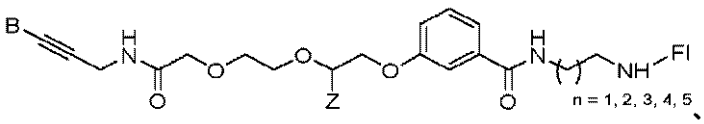

、

、


、

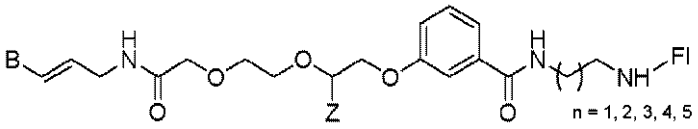
【０１３９】

【化３７】


、


、

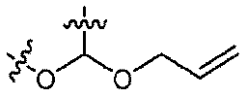
又は



式中、Ｂは、核酸塩基であり、Ｚは、－Ｎ$_3$（アジド）、－Ｏ－Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、－Ｏ－Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、又は－Ｏ－Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキニルであり、Ｆｌは、追加のリンカー構造を含有し得る色素部分を含む。当業者は、本明細書に記載の色素化合物が、色素化合物の官能基（例えば、カルボキシル）をリンカーの官能基（例えば、アミノ）と反応させることによってリンカーに共有結合していることを理解する。一実施形態では、開裂可能なリンカーは、

【０１４０】

【化３８】



（「ＡＯＬ」リンカー部分）を含み、式中、Ｚは、－Ｏ－アリルである。

【０１４１】

特定の実施形態では、蛍光色素（フルオロフォア）とグアニン塩基との間のリンカーの長さは、例えば、ポリエチレングリコールスペーサー基を導入することによって変更することができ、それにより、当該技術分野において既知の他の連結を介してグアニン塩基に結合した同じフルオロフォアと比較して、蛍光強度を増加させることができる。例示的なリンカー及びそれらの特性は、ＰＣＴ国際公開第２００７／０２０４５７号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。リンカーのこのような設計、特にそれらの長さが増加したことは、ＤＮＡなどのポリヌクレオチドに組み込まれたとき、グアノシンヌクレオチドのグアニン塩基に結合したフルオロフォアの輝度の改善を可能にすることができる。したがって、色素が、グアニン含有ヌクレオチドに結合した蛍光色素標識の検出を必要とする任意の分析方法における使用のためである場合、リンカーが、国際公開第２００７／０２０４５７号に記載される、式－（（ＣＨ$_2$）$_2$Ｏ）$_n$－（式中、ｎは、２～５０の整数である）のスペーサー基を含む場合、有利である。

【０１４２】

ヌクレオシド及びヌクレオチドは、糖又は核塩基上の部位で標識されてもよい。当該技

術分野において既知のように、「ヌクレオチド」は、窒素塩基、糖、及び１つ以上のリン酸基からなる。ＲＮＡにおいて、糖は、リボースであり、ＤＮＡにおいて、糖は、デオキシリボース、すなわち、リボース中に存在するヒドロキシル基を欠く糖である。窒素塩基は、プリン又はピリミジンの誘導体である。プリンはアデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ）であり、ピリミジンはシトシン（Ｃ）及びチミン（Ｔ）であるか、又はＲＮＡの文脈では、ウラシル（Ｕ）である。デオキシリボースのＣ－１原子は、ピリミジンのＮ－１又はプリンのＮ－９に結合される。ヌクレオチドはまた、ヌクレオシドのリン酸エステルであり、糖のＣ－３又はＣ－５に結合したヒドロキシル基にエステル化が生じる。ヌクレオシドは、通常、一リン酸、二リン酸、又は三リン酸である。

【０１４３】

「ヌクレオシド」は、ヌクレオチドと構造的に類似しているが、リン酸部分を欠いている。ヌクレオチド類似体の例は、標識が塩基に連結され、糖分子に結合したリン酸基が存在しないものである。

【０１４４】

塩基は通常、プリン又はピリミジンと称されるが、当業者は、ヌクレオチド又はヌクレオシドの能力を変化させてワトソン・クリック塩基対合を起こすことのない誘導体及び類似体が利用可能であることを理解するであろう。「誘導体」又は「類似体」は、コア構造が親化合物と同じであるか、又は密接に類似しているが、例えば、異なる又は追加の側基（誘導体ヌクレオチド又はヌクレオシドが他の分子と連結されるのを可能にする）などの化学的又は物理的変更が加えられた化合物又は分子を意味する。例えば、塩基は、デアザプリンであってもよい。特定の実施形態では、誘導体は、ワトソン・クリック対合を受けることができるべきである。「誘導体」及び「類似体」はまた、例えば、修飾された塩基部分及び／又は修飾された糖部分を有する合成ヌクレオチド又はヌクレオシド誘導体を含む。そのような誘導体及び類似体は、例えば、Ｓｃｈｅｉｔ，Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ａｎａｌｏｇｓ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎ，１９８０）及びＵｈｌｍａｎ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ９０：５４３－５８４，１９９０に考察されている。ヌクレオチド類似体はまた、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキル－ホスホネート、ホスホラニリデート（phosphoranilidate）、ホスホラミデート連結などを含む修飾されたリン酸ジエステル連結を含み得る。

【０１４５】

色素は、例えばリンカーを介してヌクレオチド塩基上の任意の位置に結合されてもよい。特定の実施形態では、ワトソン－クリック塩基対合が、得られた類似体に対して依然として実施され得る。特定の核塩基標識化部位としては、ピリミジン塩基のＣ５位置、又は７－デアザプリン塩基のＣ７位置が挙げられる。上記のように、リンカー基を使用して、ヌクレオシド又はヌクレオチドに色素を共有結合させることができる。

【０１４６】

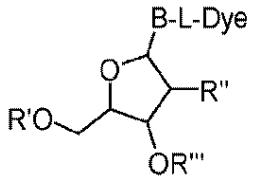
特定の実施形態では、標識されたヌクレオシド又はヌクレオチドは、酵素的に組み込み可能であり得、かつ酵素的に伸長可能であり得る。したがって、リンカー部分は、ヌクレオチドを化合物に接続するのに十分な長さであってもよく、その結果、化合物は、核酸複製酵素によるヌクレオチドの全体的な結合及び認知と有意なほどには干渉しない。したがって、リンカーはスペーサー単位も含み得る。スペーサーは、例えば、開裂部位又は標識からヌクレオチド塩基を遠ざける。

【０１４７】

本明細書に記載の色素で標識されたヌクレオシド又はヌクレオチドは、以下の式を有し得、

【０１４８】

【化３９】

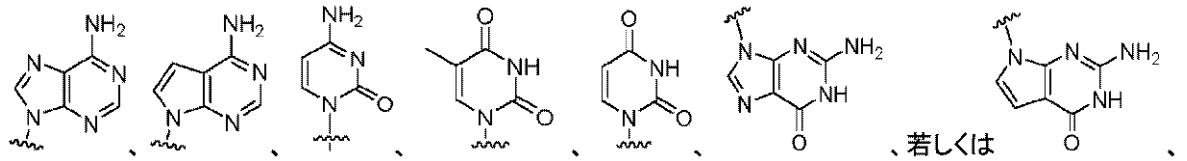


【０１４９】

式中、色素は、（色素の官能基とリンカー「Ｌ」の官能基との間の共有結合後）本明細書に記載のクロメノキノリン色素化合物（標識）部分であり、Ｂは、例えば、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、７－デアザアデニン、グアニン、７－デアザグアニンなどの核酸塩基であり、Ｌは、存在しても存在しなくてもよい任意のリンカーであり、Ｒ’は、Ｈであり得、又は－ＯＲ’は、一リン酸、二リン酸、三リン酸、チオリン酸、リン酸エステル類似体、反応性リン含有基に結合した－Ｏ－、又はブロッキング基によって保護された－Ｏ－であり、Ｒ’‘は、Ｈ又はＯＨであり、Ｒ’’’は、Ｈであり、本明細書に記載の３’ＯＨブロッキング基、又は－ＯＲ’’’は、ホスホルアミダイトを形成する。－ＯＲ’’’がホスホルアミダイトである場合、Ｒ’は、自動合成条件下で続くモノマーカップリングを可能にする酸開裂可能なヒドロキシル保護基である。いくつかの更なる実施形態では、Ｂは、

【０１５０】

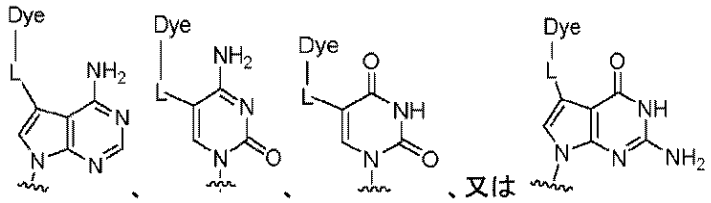
【化４０】



又はそれらの任意に置換された誘導体及びそれらの類似体を含む。いくつかの更なる実施形態では、標識された核酸塩基は、構造

【０１５１】

【化４１】



を含む。

【０１５２】

特定の実施形態では、ブロッキング基は、色素化合物とは別個に独立しており、すなわち、色素化合物には結合していない。代替的に、色素は、３’－ＯＨブロッキング基の全て又は一部を含んでもよい。したがって、Ｒ’’’は、色素化合物を含んでも含まなくてもよい３’－ＯＨブロッキング基であり得る。

【０１５３】

更に別の代替的実施形態では、ペントース糖の３’炭素上にブロッキング基は、存在せず、例えば、塩基に結合した色素（又は色素及びリンカー構造物）が、更なるヌクレオチドの組み込みに対するブロックとして作用するのに十分なサイズ又は構造であり得る。したがって、色素が糖の３’位置に結合されているかどうかにかかわらず、ブロックは立体的妨害物に起因し得るか、又は、サイズ、電荷、及び構造の組み合わせに起因し得る。

【０１５４】

更に別の代替的実施形態では、ブロッキング基は、ペントース糖の２’又は４’炭素上に

存在し、更なるヌクレオチドの組み込みのブロックとして作用するのに十分なサイズ又は構造であり得る。

【０１５５】

ブロッキング基の使用により、例えば、標識されたヌクレオチドが組み込まれるときに伸長を停止することなどによって、重合を制御することができる。ブロッキング効果が可逆的である場合、例えば、化学的条件を変更することによって、又は化学ブロックを除去することによって可逆的である場合（但し、例はこれらの場合に限られない）、特定の点で伸長を一旦停止してから、継続を可能とすることができる。

【０１５６】

特定の実施形態では、リンカー（色素とヌクレオチドとの間）及びブロッキング基が両方とも存在し、互いに別個の部分である。特定の実施形態では、リンカー及びブロッキング基は、両方とも同じ条件、又は実質的に同様の条件下で開裂可能である。したがって、脱保護及び脱ブロッキングプロセスは、色素化合物及びブロッキング基の両方を除去するために単一の処理のみが必要となるため、より効率的であり得る。しかしながら、いくつかの実施形態では、リンカー及びブロッキング基は、異なる条件下で個別に開裂可能である代わりに、同様の条件下で開裂可能である必要はない。

【０１５７】

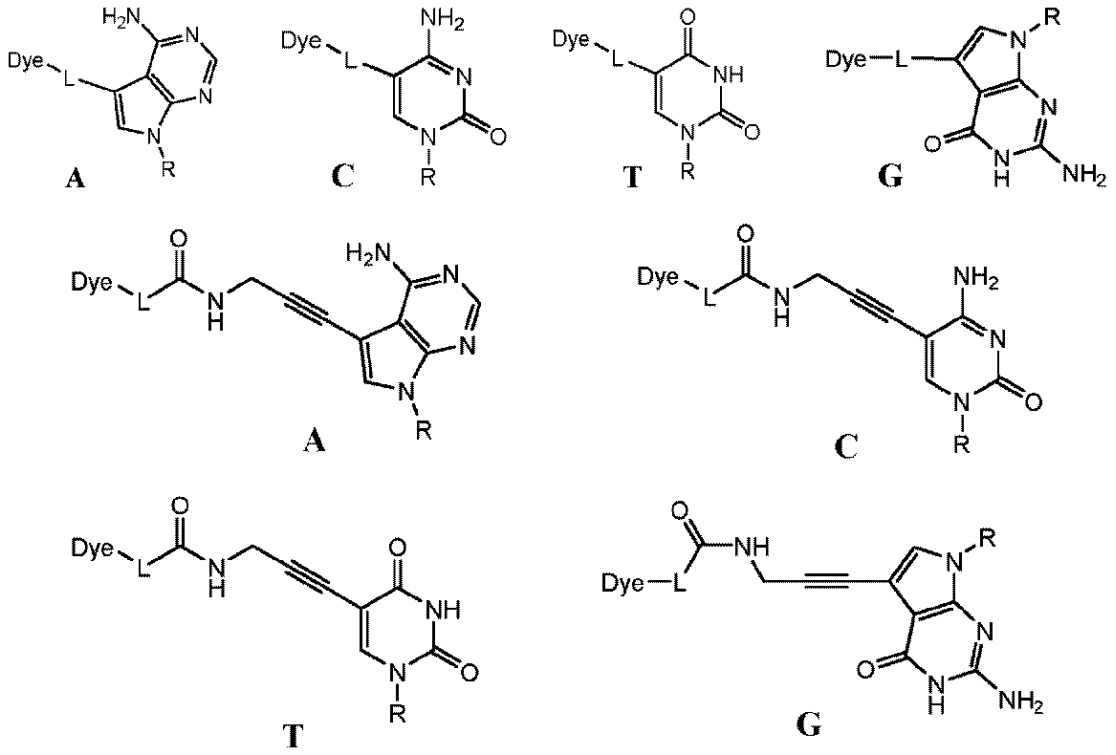
本開示はまた、色素化合物を組み込むポリヌクレオチドも包含する。このようなポリヌクレオチドは、リン酸ジエステル連結で接合されたデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからそれぞれなるＤＮＡ又はＲＮＡであってもよい。ポリヌクレオチドは、自然由来のヌクレオチド、本明細書に記載される標識されたヌクレオチド以外の非自然由来（又は修飾された）ヌクレオチド、又はこれらの任意の組み合わせを、本明細書に記載されるような少なくとも１つの修飾されたヌクレオチド（例えば、色素化合物で標識されたもの）と組み合わせて含むことができる。本開示によるポリヌクレオチドは、非自然由来の骨格連結及び／又は非ヌクレオチド化学修飾も含み得る。少なくとも１つの標識されたヌクレオチドを含むリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの混合物からなるキメラ構造も想到される。

【０１５８】

本明細書に記載の非限定的な例示的な標識されたヌクレオチドとしては、以下のものが挙げられ、

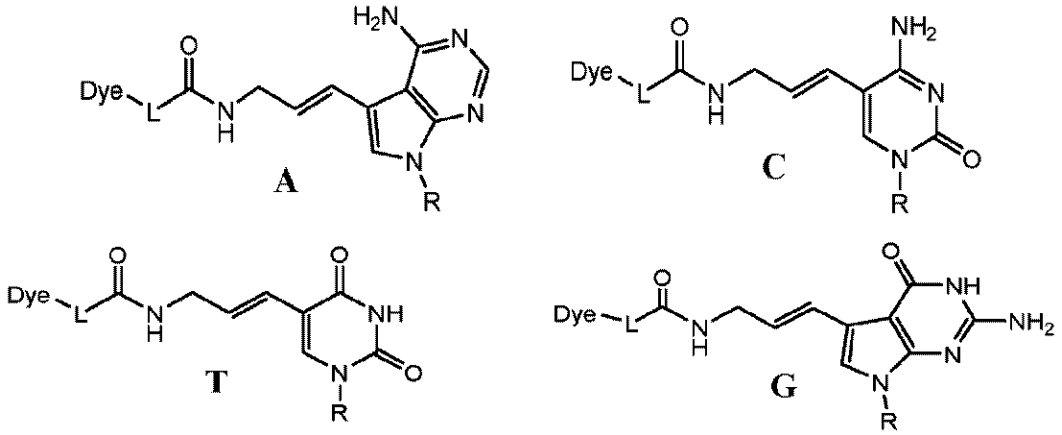
【０１５９】

【化４２】



【０１６０】

【化４３】



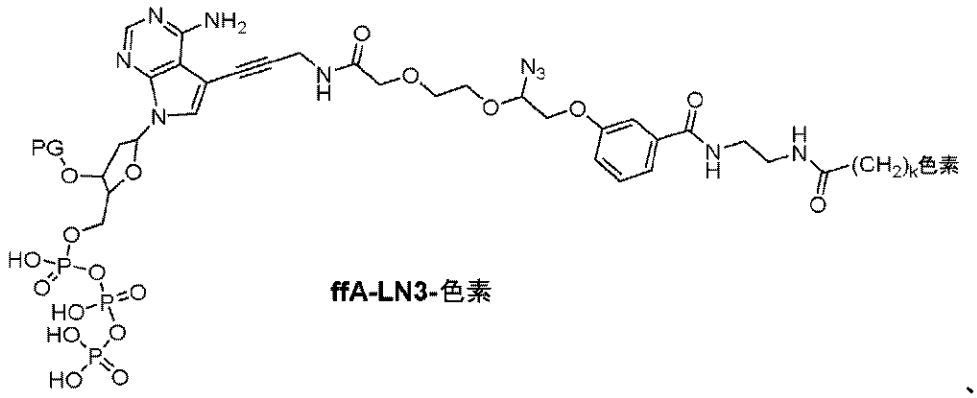
式中、Ｌは、リンカーを表し、Ｒは、上記のリボース若しくはデオキシリボース部分、又は５’位置が一リン酸、二リン酸、若しくは三リン酸で置換されたリボース若しくはデオキシリボース部分を表す。

【０１６１】

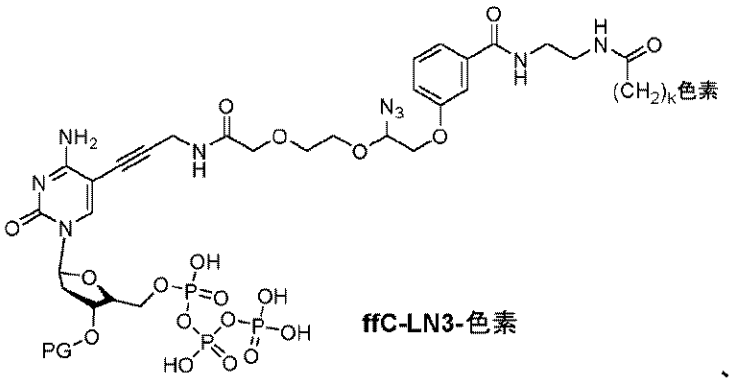
いくつかの実施形態では、非限定的な例示的な蛍光色素コンジュゲートは、以下に示され、

【０１６２】

【化４４】



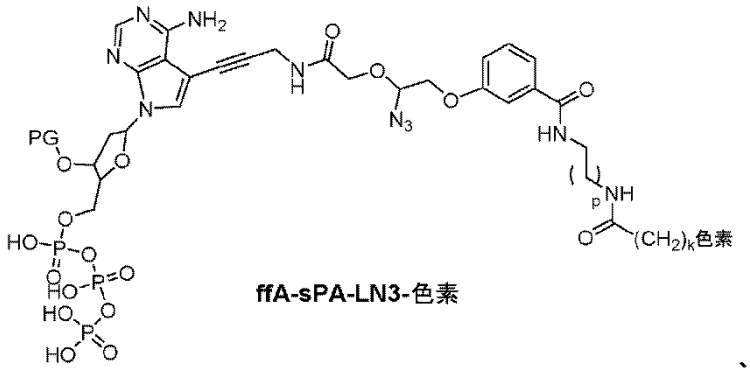
ffA-LN3-色素



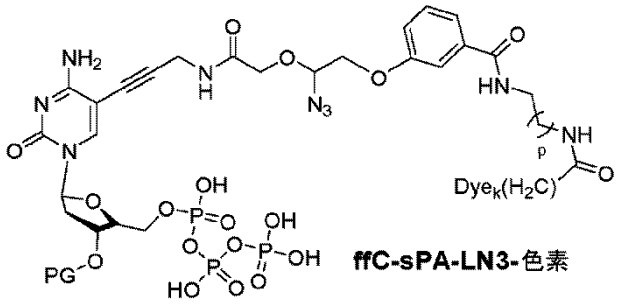
ffC-LN3-色素

【０１６３】

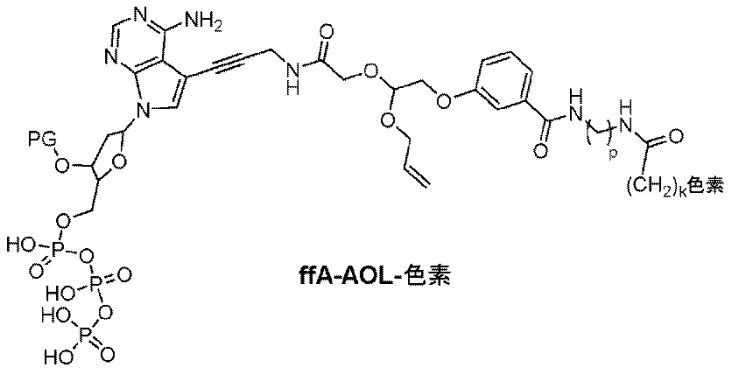
【化４５】



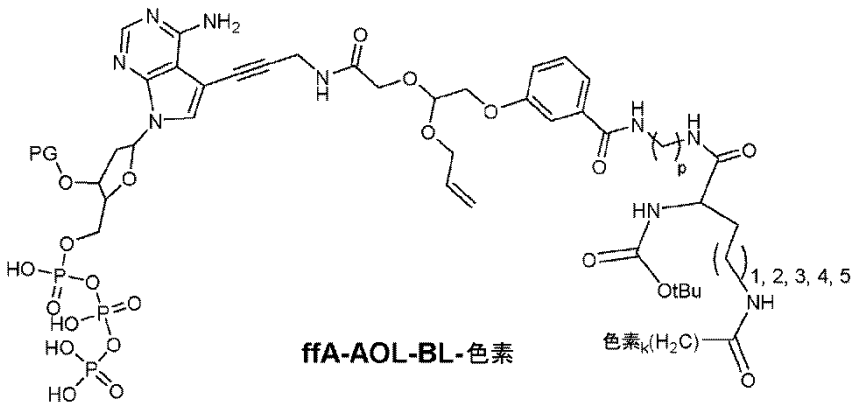
ffA-sPA-LN3-色素



ffC-sPA-LN3-色素



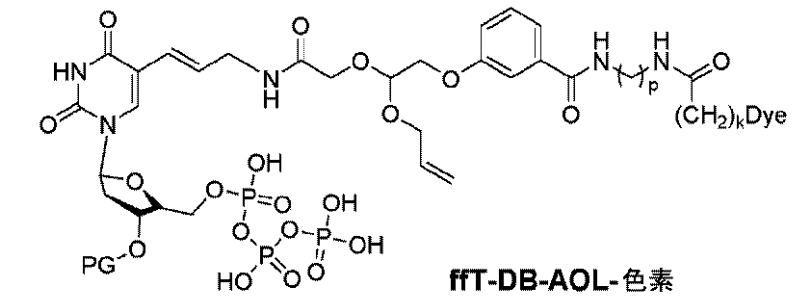
ffA-AOL-色素

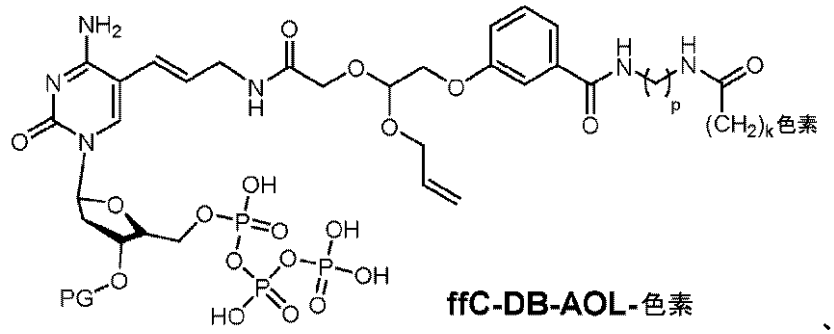


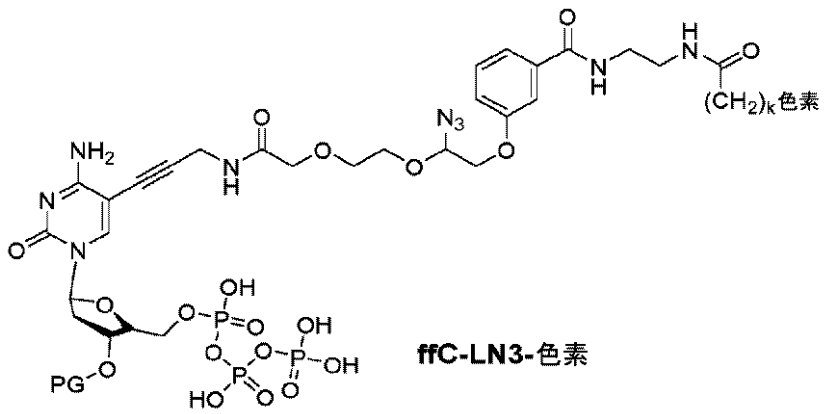
ffA-AOL-BL-色素

【０１６４】

【化４６】



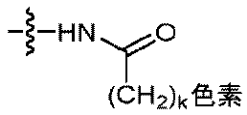




式中、ＰＧは、本明細書に記載の３’ＯＨブロッキング基を表し、ｐは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０の整数であり、ｋは、０、１、２、３、４、又は５である。一実施形態では、－Ｏ－ＰＧは、ＡＯＭである。別の実施形態では、－Ｏ－ＰＧは、－Ｏ－アジドメチルである。一実施形態では、ｋは、５である。いくつかの更なる実施形態では、ｐは、１、２、又は３であり、ｋは、５である。

【０１６５】

【化４７】



は、リンカー部分のアミノ基と色素のカルボキシル基との間の反応の結果としての、開裂可能なリンカーを有する色素の接続点を指す。本明細書に記載の標識されたヌクレオチドの任意の実施形態では、ヌクレオチドは、ヌクレオチド三リン酸である。

【０１６６】

本開示の追加の態様は、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分にハイブリダイズされる。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、固体支持体上に固定化される。いくつかの更なる実施形態では、固体支持体は、複数の固定化された標的ポリヌクレオチドのアレイを含む。更なる実施形態では、固

体支持体は、パターン化されたフローセルを備える。更なる実施形態では、パターン化されたフローセルは、ＣＭＯＳチップ上に製造される。更なる実施形態では、パターン化されたフローセルは、複数のナノウェルを備える。更に別の実施形態では、複数のナノウェルは、各ＣＭＯＳフォトダイオード（ピクセル）上に直接整列される。

【０１６７】

キット

本明細書では、本開示のクロメノキノリン化合物で標識された（すなわち、第１の標識）第１のヌクレオチドを含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、キットはまた、第１の標識されたヌクレオチド中のクロメノキノリン化合物とは異なる第２の化合物で標識された（すなわち、第２の標識）第２の標識されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、第１及び第２の標識されたヌクレオチドは、単一の励起源を使用して励起可能であり、それは、第１の励起波長を有する第１の光源であり得る。例えば、第１及び第２の標識の励起帯は、スペクトルの重複領域における励起が両方の標識を蛍光発光させるように少なくとも部分的に重なっていてもよい。いくつかの更なる実施形態では、キットは、第３のヌクレオチドを含み得、第３のヌクレオチドは、第１及び第２の標識とは異なる第３の化合物で標識されている（すなわち、第３の標識）。いくつかのそのような実施形態では、第１及び第３の標識されたヌクレオチドは、第２の励起源を使用して励起可能であり、それは、第１の励起波長とは異なる第２の励起波長を有する第２の光源であり得る。例えば、第１及び第３の標識の励起帯は、スペクトルの重複領域における励起が両方の標識を蛍光発光させるように少なくとも部分的に重なっていてもよい。いくつかの更なる実施形態では、キットは、第４のヌクレオチドを更に含み得る。いくつかのそのような実施形態では、第４のヌクレオチドは、標識されていない（暗色）。他の実施形態では、第４のヌクレオチドは、第１、第２、及び第３のヌクレオチドとは異なる化合物で標識されており、各標識は、他の標識と区別可能である明確な吸光度最大値を有する。更に他の実施形態では、第４のヌクレオチドは、標識されていない。いくつかの実施形態では、第１の励起光源は、約５００ｎｍ～約５５０ｎｍ、約５１０～約５４０ｎｍ、又は約５２０～約５３０ｎｍ（例えば、５２０ｎｍ）の波長を有する。第２の光源は、約４００ｎｍ～約４８０ｎｍ、約４２０ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は４５０ｎｍ～約４６０ｎｍ（例えば、４５０ｎｍ）の励起波長を有する。代替的な実施形態では、第１の光源は、約４００ｎｍ～約４８０ｎｍ、約４２０ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は４５０ｎｍ～約４６０ｎｍ（例えば、４５０ｎｍ）の励起波長を有する。第２の励起光源は、約５００ｎｍ～約５５０ｎｍ、約５１０～約５４０ｎｍ、又は約５２０～約５３０ｎｍ（例えば、５２０ｎｍ）の波長を有する。第２の光源は、約４００ｎｍ～約４８０ｎｍ、約４２０ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は４５０ｎｍ～約４６０ｎｍ（例えば、４５０ｎｍ）の励起波長を有する。更なる実施形態では、第１の標識、第２の標識、及び第３の標識の各々は、単一の発光収集フィルタ又はチャネルに収集され得る発光スペクトルを有する。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、キットは、４つの標識されたヌクレオチド（Ａ、Ｃ、Ｇ及びＴ又はＵ））を含み得、４つのヌクレオチドのうちの第１のヌクレオチドは、本明細書に開示される化合物で標識される。このようなキットでは、４つのヌクレオチドの各々は、他の３つのヌクレオチド上の標識と同じであるか又は異なる化合物で標識され得る。代替的に、４つのヌクレオチドのうちの第１のヌクレオチドは、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドであり、４つのヌクレオチドのうちの第２のヌクレオチドは、第２の標識を有し、第３のヌクレオチドは、第３の標識を有し、第４のヌクレオチドは、標識されていない（暗色）。別の例として、４つのヌクレオチドのうちの第１のヌクレオチドは、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドであり、４つのヌクレオチドのうちの第２のヌクレオチドは、第２の標識を有し、第３のヌクレオチドは、２つの標識の混合物を担持し、第４のヌクレオチドは、標識されていない（暗色）。したがって、標識化合物のうちの１つ以上は、その化合物が他の化合物と区別可能であるように、異なる吸光度最大値及び／又は発光最大値を有し得る。例えば、各化合物は、各化合物が他の３つの化合物（又は４番

目のヌクレオチドが標識されていない場合は２つの化合物）と分光的に区別可能であるように、異なる吸光度最大値及び／又は発光最大値を有し得る。最大値以外の吸光度スペクトル及び／又は発光スペクトルの部分は異なる場合があり、これらの差異は、化合物を区別するために利用され得ることが理解されるであろう。キットは、２つ以上の化合物が異なる吸光度最大値を有するようなものであってもよい。本明細書に開示されるクロメノキノリン色素は、典型的には、５００ｎｍ未満の領域の光を吸収する。例えば、これらのクロメノキノリン色素は、約４５０ｎｍ～約５３０ｎｍ、約４６０ｎｍ～約５２０ｎｍ、約４７５ｎｍ～約５１０ｎｍ、又は約４９０ｎｍ～約５００ｎｍの吸収波長を有し得る。

【０１６９】

本明細書に記載される化合物、ヌクレオチド、又はキットは、生物学系（例えば、プロセス又はその構成要素を含む）を検出、測定、又は同定するために使用されてもよい。化合物、ヌクレオチド又はキットを用いることができる例示的な技術としては、配列決定、発現分析、ハイブリダイゼーション分析、遺伝子分析、ＲＮＡ分析、細胞アッセイ（例えば、細胞結合又は細胞機能分析）、又はタンパク質アッセイ（例えば、タンパク質結合アッセイ又はタンパク質活性アッセイ）が挙げられる。その使用は、自動配列決定機器などの特定の技術を実行するための自動化機器であってもよい。配列決定機器は、異なる波長で作動する２つの光源を含み得る。

【０１７０】

特定の実施形態では、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドは、標識されていない、若しくは天然のヌクレオチド、又はそれらの任意の組み合わせと組み合わせて供給され得る。ヌクレオチドの組み合わせは、別個の個々の構成要素（例えば、容器又はチューブ当たり１つのヌクレオチド型）として、又はヌクレオチド混合物（例えば、同じ容器又はチューブ内で混合された２つ以上のヌクレオチド）として提供され得る。

【０１７１】

キットが、複数の、特に２つ、又は３つ、又はより具体的には４つのヌクレオチドを含む場合、異なるヌクレオチドは、異なる色素化合物で標識され得るか、又は色素化合物を含まない、暗色であり得る。異なるヌクレオチドが異なる色素化合物で標識されている場合、色素化合物が分光的に区別可能な蛍光色素であるというのが本キットの特徴である。本明細書で使用するとき、用語「分光的に区別可能な蛍光色素」とは、２つ以上の色素が１つの試料に存在する場合、蛍光検出装置（例えば、市販の毛管ベースのＤＮＡ配列決定プラットホーム）によって区別され得る波長で、蛍光エネルギーを放射する蛍光色素を指す。蛍光色素化合物で標識された２つのヌクレオチドがキット形態で供給される場合、分光的に区別可能な蛍光色素は、例えば、同じ光源など、同じ波長で励起され得ることが、いくつかの実施形態の特徴である。蛍光色素化合物で標識された４つのヌクレオチドがキット形態で供給される場合、分光的に区別可能な蛍光色素のうちの２つが１つの波長で励起され得、他の２つの分光的に区別可能な色素は両方とも別の波長で励起され得ることがいくつかの実施形態の特徴である。色素の特定の励起波長は、４５０～４６０ｎｍ、４９０～５００ｎｍ、又は５２０ｎｍ以上（例えば、５３２ｎｍ）である。

【０１７２】

いくつか実施形態では、キットは、本開示のクロメノキノリン色素で標識された第１のヌクレオチド、及び第２の色素で標識された第２のヌクレオチドを含み、色素は、少なくとも１０ｎｍ、特に２０ｎｍ～５０ｎｍ又は３０ｎｍ～４０ｎｍの吸光度最大値の差を有する。より具体的には、第１の標識は、５０ｎｍ超６０ｎｍ超、７０ｎｍ超、又は８０ｎｍ超のストークスシフトを有し得る。第２の標識は、約８０ｎｍ超、９０ｎｍ超、又は１００ｎｍ超のストークスシフトを有し得る（「ストークスシフト」は、ピーク吸収波長とピーク発光波長との間の距離である）。更に、第１の標識は、約４６０ｎｍ～約５２０ｎｍ、約４７５ｎｍ～約５１０ｎｍ、又は約４９０ｎｍ～約５００ｎｍの吸収最大値を有し得る。第２の標識は、約４００ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は約４５０ｎｍ～約４６０ｎｍの吸収最大値を有し得る。更なる実施形態では、キットは、第３の標識されたヌクレオチドを更に含み得、第３の標識は、５２０ｎｍ超の吸収最大値を有する。第３の標識は、２０

ｎｍ超、３０ｎｍ超、又は４０ｎｍ超のストークスシフト、又は２０～４０ｎｍのストークスシフトを有し得る。キットは、標識されていない第４のヌクレオチドを更に含み得る。更なる実施形態では、第１の標識、第２の標識、及び第３の標識の各々は、５４０ｎｍ超、５５０ｎｍ超、５６０ｎｍ超、５７０ｎｍ超、５８０ｎｍ超、５９０ｎｍ超、又は６００ｎｍ超の発光最大値を有する。いくつかの実施形態では、第１の標識、第２の標識、及び第３の標識の発光スペクトルは、単一の発光収集チャネル又はフィルタ（例えば、約５８０～約７００ｎｍの収集領域）で検出又は収集され得る。

【０１７３】

代替的な実施形態では、本開示のキットは、同じ塩基が２つの異なる化合物で標識されているヌクレオチドを含有し得る。第１のヌクレオチドは、本開示の化合物で標識されてもよい。第２のヌクレオチドは、分光的に異なる化合物、例えば、６００ｎｍ未満で吸収される「緑色」色素で標識されてもよい。第３のヌクレオチドは、本開示の化合物と、分光的に異なる化合物との混合物として標識されてもよく、第４のヌクレオチドは「暗色」であり得、かつ標識を含有しなくてもよい。したがって、簡便に言えば、ヌクレオチド１～４は、「青色」、「緑色」、「青色／緑色」、及び暗色と標識され得る。機器を更に単純化するために、４つのヌクレオチドは、単一の光源で励起される２つの色素で標識されることができ、したがって、ヌクレオチド１～４の標識は、「青色１」、「青色２」、「青色１／青色２」、及び暗色であり得る。

【０１７４】

異なる色素化合物で標識された異なるヌクレオチドを有する構成に関して、キットが本明細書に例示されるが、キットは、同じ色素化合物を有する２、３、４個以上の異なるヌクレオチドを含み得ることが理解されるであろう。

【０１７５】

標識されたヌクレオチドに加えて、キットは、少なくとも１つの追加の構成要素を一緒に含み得る。更なる構成要素は、本明細書に記載される方法又は以下の実施例のセクションで特定される構成要素のうちの１つ以上であってもよい。本開示のキットに組み合わせることができる構成要素のいくつかの非限定的な例を以下に記載する。いくつかの実施形態では、キットは、ＤＮＡポリメラーゼ（変異体ＤＮＡポリメラーゼなど）及び１つ以上の緩衝組成物を更に含む。１つの緩衝組成物は、アスコルビン酸又はアスコルビン酸ナトリウムなどの酸化防止剤を含み得、それは検出中に色素化合物を光損傷から保護するために使用され得る。追加の緩衝組成物は、３’ブロッキング基及び／又は開裂可能なリンカーを開裂するために使用され得る試薬を含み得る。例えば、パラジウム錯体など遷移金属及び少なくとも部分的に水溶性の配位子から水溶性ホスフィン又は水溶性遷移金属触媒が形成した。キットの様々な構成要素は、使用前に希釈される濃縮形態で提供され得る。そのような実施形態では、好適な希釈緩衝液も含まれ得る。ここでも、本明細書に記載される方法で特定された構成要素のうちの１つ以上を、本開示のキットに含めることができる。本明細書に記載のヌクレオチド又は標識されたヌクレオチドの任意の実施形態では、ヌクレオチドは、３’ヒドロキシルブロッキング基を含有する。

【０１７６】

<u>配列決定の方法</u>

本開示による色素化合物を含むヌクレオチドは、そのようなヌクレオチドに結合した蛍光標識の検出を含む方法などの任意の分析方法において、それ自体であるか、又はより大きな分子構造若しくはコンジュゲートに組み込まれるか、又はそれらと関連するかにかかわらず、使用され得る。この文脈において、「ポリヌクレオチドに組み込まれる」という用語は、それ自体がより長いポリヌクレオチド鎖の一部を形成し得る、第２のヌクレオチドの３’ヒドロキシル基に、５’リン酸がリン酸ジエステル連結で結合されることを意味し得る。本明細書に記載のヌクレオチドの３’末端は、更なるヌクレオチドの５’リン酸に、リン酸ジエステル連結で結合されてもよく、又はされなくてもよい。したがって、非限定的な一実施形態では、本開示は、ポリヌクレオチドに組み込まれた標識されたヌクレオチドを検出する方法であって、（ａ）本開示の少なくとも１つの標識されたヌクレオチドを

ポリヌクレオチドに組み込むことと、（ｂ）当該ヌクレオチドに結合させた色素化合物からの蛍光シグナルを検出することによって、ポリヌクレオチドに組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定することと、を含む、方法を提供する。

【０１７７】

本方法は、（ａ）本開示による１つ以上の標識されたヌクレオチドがポリヌクレオチドに組み込まれる合成工程と、（ｂ）ポリヌクレオチドに組み込まれた１つ以上の標識されたヌクレオチドが、それらの蛍光を検出又は定量的に測定することによって検出される検出工程と、を含み得る。

【０１７８】

本出願のいくつかの実施形態は、標的ポリヌクレオチド（例えば、一本鎖標的ポリヌクレオチド）の配列を決定する方法であって、（ａ）プライマーポリヌクレオチドを１つ以上の標識されたヌクレオチド（ヌクレオシド三リン酸Ａ、Ｇ、Ｃ、及びＴ）と接触させることであって、当該標識されたヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドであり、プライマーポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、（ｂ）標識されたヌクレオチドをプライマーポリヌクレオチドに組み込むことと、（ｃ）１つ以上の蛍光測定を実施し、組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定することと、を含む。いくつかのそのような実施形態では、プライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体は、標的ポリヌクレオチドを標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的なプライマーポリヌクレオチドと接触させることによって形成される。いくつかの実施形態では、本方法は、（ｄ）プライマーポリヌクレオチドに組み込まれたヌクレオチドから標識部分及び３’ヒドロキシブロッキング基を除去することを更に含む。いくつかの更なる実施形態では、本方法はまた、（ｅ）除去された標識部分及び３’ブロッキング基をプライマーポリヌクレオチド鎖から洗い落とすことを含み得る。いくつかの実施形態では、工程（ａ）～（ｄ）又は工程（ａ）～（ｅ）は、標的ポリヌクレオチド鎖の少なくとも一部分の配列が決定されるまで、繰り返される。場合によっては、工程（ａ）～（ｄ）又は工程（ａ）～（ｅ）は、少なくとも少なくとも３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２５０、又は３００サイクル繰り返される。いくつかの実施形態では、プライマーポリヌクレオチド鎖に組み込まれたヌクレオチドからの標識部分及び３’ブロッキング基は、単一の化学反応で除去される。いくつかの更なる実施形態では、本方法は、自動配列決定機器で実施され、自動配列決定機器は、異なる波長で作動する２つの光源を含む。いくつかの実施形態では、配列決定は、本明細書に記載の配列決定工程の繰り返しのサイクルの完了後に行われる。

【０１７９】

本開示のいくつかの実施形態は、標的ポリヌクレオチド（例えば、一本鎖標的ポリヌクレオチド）の配列を決定するための方法に関し、（ａ）プライマーポリヌクレオチドを、４つの異なる種類のヌクレオチドコンジュゲートのうちの１つ以上を含む組み込み混合物と接触させることであって、第１の種類のヌクレオチドコンジュゲートが、第１の標識を含み、第２の種類のヌクレオチドコンジュゲートが、第２の標識を含み、第３の種類のヌクレオチドコンジュゲートが、第３の標識を含み、第１の標識、第２の標識、及び第３の標識の各々が、互いに分光的に異なり、プライマーヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、（ｂ）混合物からプライマーポリヌクレオチドに１つのヌクレオチドコンジュゲートを組み込んで、伸長されたプライマーポリヌクレオチドを生成することと、（ｃ）第１の励起光源を使用して第１の撮像イベントを実施し、伸長されたポリヌクレオチドから第１の発光シグナルを検出することと、（ｄ）第２の励起光源を使用して第２の撮像イベントを実施し、伸長されたポリヌクレオチドから第２の発光シグナルを検出することと、を含み、第１の励起光源及び第２の励起光源が、異なる波長を有し、第１の発光シグナル及び第２の発光シグナルが、単一の発光検出チャネルで検出又は収集される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のクロ

メノキノリン色素は、本方法に記載の第１、第２、又は第３の標識のうちのいずれか１つとして使用され得る。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の撮像イベントの後及び第２の撮像イベントの前に、混合物中の任意のヌクレオチドコンジュゲートの化学修飾を含まない。いくつかの更なる実施形態では、組み込み混合物は、第４の種類のヌクレオチドを更に含み、第４の種類のヌクレオチドは、標識されていない、第１若しくは第２の撮像イベントのいずれからもシグナルを発光しない蛍光部分で標識されている。この配列決定方法では、各組み込まれたヌクレオチドコンジュゲートの同一性は、第１の撮像イベント及び第２の撮像イベントの検出パターンに基づいて決定される。例えば、第１の種類のヌクレオチドコンジュゲートの組み込みは、第１の撮像イベントにおけるシグナル状態及び第２の撮像イベントにおける暗色状態によって決定される。第２の種類のヌクレオチドコンジュゲートの組み込みは、第１の撮像イベントにおける暗色状態及び第２の撮像イベントにおけるシグナル状態によって決定される。第３の種類のヌクレオチドコンジュゲートの組み込みは、第１の撮像イベント及び第２の撮像イベントの両方におけるシグナル状態によって決定される。第４の種類のヌクレオチドコンジュゲートの組み込みは、第１の撮像イベント及び第２の撮像イベントの両方における暗色状態によって決定される。更なる実施形態では、工程（ａ）～（ｄ）は、繰り返しのサイクル（例えば、少なくとも３０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、又は５００回）で実施され、本方法は、各連続的に組み込まれたヌクレオチドコンジュゲートの同一性に基づいて、一本鎖標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分の配列を連続的に決定することを更に含む。いくつかの実施形態では、第１の励起光源は、第２の励起光源よりも短い波長を有する。いくつかのそのような実施形態では、第１の励起光源は、約４００ｎｍ～約４８０ｎｍ、約４２０ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は約４５０ｎｍ～約４６０ｎｍ（すなわち、「青色光」）の波長を有する。一実施形態では、第１の励起光源は、約４５０ｎｍの波長を有する。第２の励起光源は、約５００ｎｍ～約５５０ｎｍ、約５１０ｎｍ～約５４０ｎｍ、又は約５２０ｎｍ～約５３０ｎｍ（すなわち、「緑色光」）の波長を有する。一実施形態では、第２の励起光源は、約５２０ｎｍの波長を有する。他の実施形態では、第１の励起光源は、第２の励起光源よりも長い波長を有する。いくつかのそのような実施形態では、第１の励起光源は、約５００ｎｍ～約５５０ｎｍ、約５１０ｎｍ～約５４０ｎｍ、又は約５２０ｎｍ～約５３０ｎｍ（すなわち、「緑色光」）の波長を有する。一実施形態では、第２の励起光源は、約５２０ｎｍの波長を有する。第２の励起光源は、約４００ｎｍ～約４８０ｎｍ、約４２０ｎｍ～約４７０ｎｍ、又は約４５０ｎｍ～約４６０ｎｍ（すなわち、「青色光」）の波長を有する。一実施形態では、第２の励起光源は、約４５０ｎｍの波長を有する。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのヌクレオチドは、ポリメラーゼ酵素の作用によって合成工程において、ポリヌクレオチド（本明細書に記載の一本鎖プライマーポリヌクレオチドなど）に組み込まれる。しかしながら、例えば、化学的オリゴヌクレオチド合成又は標識されたオリゴヌクレオチドの標識されていないオリゴヌクレオチドへのライゲーションなどのヌクレオチドをポリヌクレオチドに結合する他の方法を使用し得る。したがって、ヌクレオチド及びポリヌクレオチドに関して用語「組み込む」が使用されるときには、化学的方法及び酵素法によるポリヌクレオチド合成を包含することができる。

【０１８１】

特定の実施形態では、合成工程が実施され、かつ任意に、本開示の蛍光標識されたヌクレオチドを含む反応混合物と共に、鋳型又は標的ポリヌクレオチド鎖をインキュベートすることを含んでもよい。ポリメラーゼはまた、鋳型又は標的ポリヌクレオチド鎖にアニーリングされたポリヌクレオチド鎖上の遊離３’ヒドロキシル基と標識されたヌクレオチド上の５’リン酸基との間のリン酸ジエステル連結の形成を可能にする条件下で提供され得る。したがって、合成工程は、ヌクレオチドの鋳型／標的鎖への相補的塩基対合によって指向されるポリヌクレオチド鎖の形成を含み得る。

【０１８２】

本方法の全ての実施形態では、検出工程は、標識されたヌクレオチドが組み込まれるポリヌクレオチド鎖が鋳型／標的鎖にアニーリングされている間、又は２つの鎖が分離される変性工程の後に実施され得る。合成工程と検出工程との間に、例えば化学的又は酵素的反応工程又は精製工程といった更なる工程が含まれてもよい。特に、標識されたヌクレオチドを組み込むポリヌクレオチド鎖は、単離又は精製され得、次いで、更に処理され得るか、又は続く分析に使用され得る。例として、合成工程において本明細書に記載の標識されたヌクレオチドを組み込んだポリヌクレオチドは、続いて、標識されたプローブ又はプライマーとして使用され得る。他の実施形態では、本明細書に記載の合成工程の生成物は、更なる反応工程、所望であれば、精製又は単離されたこれらの続く工程の生成物に供され得る。

【０１８３】

合成工程に好適な条件は、標準的な分子生物学的技術に精通しているものにはよく知られている。一実施形態では、合成工程は、好適なポリメラーゼ酵素の存在下で鋳型／標的鎖に相補的な伸長された標的鎖（プライマーポリヌクレオチド）を形成するために、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドを含むヌクレオチド前駆体を使用する標準的なプライマー伸長反応と類似し得る。他の実施形態では、合成工程は、それ自体が、プライマー及び鋳型のポリヌクレオチド鎖のコピーに由来するアニーリングされた相補鎖からなる、標識された二本鎖増幅生成物を生成する、増幅反応の一部を形成し得る。他の例示的な合成工程としては、ニックトランスレーション、鎖置換重合、ランダムプライミングＤＮＡ標識化などが挙げられる。合成工程に特に有用なポリメラーゼ酵素は、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドの組み込みを触媒することができるものである。様々な天然に生じる又は変異／修飾されたポリメラーゼが使用され得る。例として、熱安定性ポリメラーゼは、熱サイクリング条件を使用して実施される合成反応に使用することができるが、熱安定性ポリメラーゼは、等温プライマー伸長反応には望ましくない場合がある。本開示による標識されたヌクレオチドを組み込むことができる好適な熱安定性ポリメラーゼには、国際公開第２００５／０２４０１０号又は国際公開第０６／１２０４３３号に記載されるものが含まれ、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。３７℃などの低温で実施される合成反応では、ポリメラーゼ酵素は、必ずしも熱安定性ポリメラーゼである必要はなく、したがって、ポリメラーゼの選択は、反応温度、ｐＨ、鎖置換活性などのいくつかの要因に依存する。

【０１８４】

特定の非限定的な実施形態では、本開示は、核酸配列決定、再配列決定、全ゲノム配列決定、一塩基多型スコアリング、ポリヌクレオチドに組み込まれた場合に本明細書に記載の色素で標識された修飾されたヌクレオチド又はヌクレオシドの検出を伴う任意の他の用途の方法を含む。

【０１８５】

本開示の特定の実施形態は、ポリヌクレオチドの合成による配列決定反応における本開示による色素部分を含む標識されたヌクレオチドの使用を提供する。合成による配列決定は、概して、配列決定される鋳型／標的核酸に相補的な伸長されたポリヌクレオチド鎖を形成するために、ポリメラーゼ又はリガーゼを使用して、成長しているポリヌクレオチド鎖に、５’から３’方向に１つ以上のヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを連続的に付加することを含む。付加されたヌクレオチドのうちの１つ以上に存在する塩基の同一性は、検出又は「撮像」工程において決定され得る。付加された塩基の同一性は、各ヌクレオチド組み込み工程後に決定され得る。次いで、鋳型の配列は、従来式のワトソン・クリック塩基対合ルールを使用して推測され得る。一塩基の同一性を決定するための本明細書に記載の色素で標識されたヌクレオチドの使用は、例えば、一塩基多型スコアリングにおいて有用であり得、そのような一塩基伸長反応は、本開示の範囲内である。

【０１８６】

本開示の一実施形態では、鋳型／標的ポリヌクレオチドの配列は、組み込まれたヌクレオチドに結合した蛍光標識の検出を介して配列決定される鋳型ポリヌクレオチドに相補的

な新生鎖への１つ以上のヌクレオチドの組み込みを検出することによって決定される。鋳型ポリヌクレオチドの配列決定は、好適なプライマー（又は、ヘアピンの一部としてプライマーを含有するヘアピン構造体として調製されたプライマー）でプライミングすることができ、新生鎖は、ポリマー触媒反応において、プライマーの３’末端にヌクレオチドを付加することにより、段階的に伸長される。

【０１８７】

特定の実施形態では、異なるヌクレオチド三リン酸（Ａ、Ｔ、Ｇ、及びＣ）の各々は、固有のフルオロフォアで標識されてもよく、また、制御不可能な重合を防止するために、３’位置にブロッキング基を含む。代替的に、４つのヌクレオチドのうちの１つは、標識されていなくてもよい（暗色）。ポリメラーゼ酵素は、鋳型／標的ポリヌクレオチドに相補的な新生鎖にヌクレオチドを組み込み、ブロッキング基は、ヌクレオチドの更なる組み込みを防止する。任意の組み込まれていないヌクレオチドを洗い落とすことができ、各組み込まれたヌクレオチドからの蛍光シグナルは、光源励起及び好適な発光フィルタを使用する電荷結合デバイスなどの好適な手段によって、光学的に「読み取る」ことができる。次いで、３’ブロッキング基及び蛍光色素化合物を除去（脱保護）して（同時に又は連続的に）、更なるヌクレオチドの組み込みのために新生鎖を露出させることができる。典型的には、組み込まれたヌクレオチドの同一性は、各組み込み工程後に決定されるが、これは厳密に必須というわけではない。同様に、米国特許第５，３０２，５０９号（参照により本明細書に組み込まれる）は、固体支持体上に固定化されたポリヌクレオチドを配列決定する方法を開示している。

【０１８８】

上記に例示したようなその方法は、蛍光標識された３’ブロックされたヌクレオチドＡ、Ｇ、Ｃ、及びＴを、ＤＮＡポリメラーゼの存在下で、固定化されたポリヌクレオチドに相補的な成長鎖に組み込む。ポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチドに相補的な塩基を組み込むが、３’－ブロッキング基によって、更なる付加が防止される。次いで、組み込まれたヌクレオチドの標識を判定し、その後、更なる重合を可能にするために、化学的開裂によってブロッキング基が除去され得る。合成による配列決定反応において配列決定される核酸鋳型は、配列決定が所望される任意のポリヌクレオチドであってもよい。配列決定反応用の核酸鋳型は、典型的には、配列決定反応における更なるヌクレオチドの付加のためのプライマー又は開始点として機能する遊離３’ヒドロキシル基を有する二本鎖領域を含む。配列決定される鋳型の領域は、この遊離３’ヒドロキシル基を相補鎖上にオーバーハングする。配列決定される鋳型のオーバーハング領域は、一本鎖であってもよいが、配列決定される鋳型鎖に相補的な鎖上に「切れ目が存在」して、配列決定反応を開始するための遊離３’ＯＨ基を提供する限りにおいて、二本鎖であることも可能である。そのような実施形態では、配列決定は、鎖置換によって進行し得る。特定の実施形態では、遊離３’ヒドロキシル基を有するプライマーが、配列決定される鋳型の一本鎖領域にハイブリダイズする別個の構成要素（例えば、短いオリゴヌクレオチド）として添加され得る。代替的に、配列決定されるプライマー及び鋳型鎖は各々、例えばヘアピンループ構造などの分子内二重鎖を形成することができる部分的に自己相補的な核酸鎖の一部を形成してもよい。ヘアピンポリヌクレオチド及びそれらを固体支持体に結合することができる方法は、ＰＣＴ国際公開第０１５７２４８号及び同第２００５／０４７３０１号において開示されおり、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。ヌクレオチドは、成長するプライマーに連続的に付加され、５’～３’方向にポリヌクレオチド鎖を合成することができる。添加された塩基の性質は、特に各ヌクレオチド付加後に判定されてもよいが、必ずしもそうでなくてもよい。その判定によって、核酸鋳型についての配列情報が提供される。したがって、ヌクレオチドは、ヌクレオチドの５’リン酸基とのリン酸ジエステル連結の形成を介して、核酸鎖の遊離３’ヒドロキシル基にヌクレオチドを結合することにより、核酸鎖（又はポリヌクレオチド）に組み込まれる。

【０１８９】

配列決定される核酸鋳型は、ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又は更にはデオキシヌクレオチド

及びリボヌクレオチドからなるハイブリッド分子であってもよい。核酸鋳型は、配列決定反応における鋳型のコピーを防止しない限り、天然由来のヌクレオチド及び／又は非天然由来のヌクレオチドと、天然由来又は非天然由来の骨格連結を含んでもよい。

【０１９０】

特定の実施形態では、配列決定される核酸鋳型は、当該技術分野で既知の任意の好適な連結方法、例えば、共有結合を介して、固体支持体に結合され得る。特定の実施形態では、鋳型ポリヌクレオチドは、固体支持体（例えば、シリカベースの支持体）に直接結合され得る。しかしながら、本開示の他の実施形態では、固体支持体の表面は、鋳型ポリヌクレオチドの直接的共有結合、又はそれ自体が固体支持体に非共有結合し得るヒドロゲル又は高分子電解質多層を介する鋳型ポリヌクレオチドの固定化のいずれかを可能にするように、何らかの方式で修飾されてもよい。

【０１９１】

ポリヌクレオチドが支持体（例えば、国際公開第２０００／０６７７０号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているものなどのシリカベースの支持体に直接結合しているアレイであって、ポリヌクレオチドが、ガラス上のペンダントエポキシド基と、ポリヌクレオチド上の内部アミノ基との間の反応によって、ガラス支持体上に固定化される、アレイ。加えて、ポリヌクレオチドは、例えば、国際公開第２００５／０４７３０１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、硫黄ベースの求核剤と固体支持体との反応によって固体支持体に結合され得る。固体支持された鋳型ポリヌクレオチドのなお更なる例では、鋳型ポリヌクレオチドが、例えば国際公開第２０００／３１１４８号、国際公開第２００１／０１１４３号、国際公開第２００２／１２５６６号、国際公開第２００３／０１４３９２号、米国特許第６，４６５，１７８号、及び国際公開第２０００／５３８１２号に記載されている、シリカベース又は他の固体支持体に上に支持されたヒドロゲルに結合される場合であり、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９２】

鋳型ポリヌクレオチドが固定化され得る具体的な表面としては、ポリアクリルアミドヒドロゲルが挙げられる。ポリアクリルアミドヒドロゲルは、上記の参考文献及び国際公開第２００５／０６５８１４号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。使用され得る特定のヒドロゲルには、国際公開第２００５／０６５８１４号及び米国特許出願公開第２０１４／００７９９２３号に記載されるものが含まれる。一実施形態では、ヒドロゲルは、ＰＡＺＡＭ（ポリ（Ｎ－（５－アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド－ｃｏ－アクリルアミド））である。

【０１９３】

ＤＮＡ鋳型分子は、例えば、米国特許第６，１７２，２１８号（参照により本明細書に組み込まれ）に記載されているように、ビーズ又は微小粒子に結合され得る。ビーズ又は微小粒子への結合は、配列決定用途に有用であり得る。各ビーズが異なるＤＮＡ配列を含むビーズライブラリを調製することができる。それらの作成のための例示的なライブラリ及び方法は、Ｎａｔｕｒｅ，４３７，３７６－３８０（２００５）、Ｓｃｉｅｎｃｅ，３０９，５７４１，１７２８－１７３２（２００５）に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるヌクレオチドを使用したかかるビーズのアレイの配列決定は、本開示の範囲内である。

【０１９４】

配列決定される鋳型は、固体支持体上に「アレイ」の一部を形成してもよく、この場合、アレイは任意の便利な形態をとることができる。したがって、本開示の方法は、単一分子アレイ、クラスター化アレイ、及びビーズアレイを含む全ての種類の高密度アレイに適用可能である。本開示の色素化合物で標識されたヌクレオチドは、固体支持体上の核酸分子の固定化によって形成されるものが含まれるがこれに限定されない基本的に任意の種類のアレイ上で鋳型を配列決定するために使用され得る。

【０１９５】

しかしながら、本開示の色素化合物で標識されたヌクレオチドは、クラスター化アレイの配列決定の状況において特に有利である。クラスター化アレイでは、アレイ上の別個の領域（多くの場合、部位又は特徴部と称される）は、複数のポリヌクレオチド鋳型分子を含む。一般に、複数のポリヌクレオチド分子は、光学的手段によって個別に分解可能ではなく、代わりに、アンサンブル（集合体）として検出される。アレイがどのように形成されるかに応じて、アレイ上の各部位は、１つの個々のポリヌクレオチド分子の複数のコピー（例えば、部位は、特定の一本鎖若しくは二本鎖核酸種に対して均質である）、又は更には少数の異なるポリヌクレオチド分子の複数のコピー（例えば、２つの異なる核酸種の複数のコピー）を含んでもよい。核酸分子のクラスター化アレイは、当該技術分野において一般的に知られている技術を使用して生成され得る。例として、各々は本明細書に組み込まれる、国際公開第９８／４４１５１号及び国際公開第００／１８９５７号は、核酸の増幅方法を記載しており、鋳型及び増幅産物の両方は、固定化された核酸分子のクラスター又は「コロニー」からなるアレイを形成するために、固体支持体上に固定化されたままである。これらの方法に従って調製されたクラスター化アレイ上に存在する核酸分子は、本開示の色素化合物で標識されたヌクレオチドを使用する配列決定に好適な鋳型である。

【０１９６】

本開示の色素化合物で標識されたヌクレオチドは、単一分子アレイ上の鋳型の配列決定にも有用である。本明細書で使用するとき、用語「単一分子アレイ」又は「ｓｉｎｇｌｅ ｍｏｌｅｃｕｌｅ ａｒｒａｙ、ＳＭＡ」は、固体支持体の上に分布（又は配列）されたポリヌクレオチド分子の集団を指し、いかなる個々のポリヌクレオチドの、集団の全ての他のポリヌクレオチドからの離間距離は、個々のポリヌクレオチド分子を個々に見分けることが可能であるようになっている。したがって、固体支持体の表面上に固定化された標的核酸分子は、いくつかの実施形態では、光学的手段によって分解することができる。これは、１つのポリヌクレオチドを各々表す１つ以上の別個のシグナルが、使用される特定の撮像デバイスが、見分けることができるエリア内で発生することを意味する。

【０１９７】

アレイ上の隣接するポリヌクレオチド分子間の間隔が、少なくとも１００ｎｍ、より具体的には少なくとも２５０ｎｍ、更により具体的には少なくとも３００ｎｍ、更により具体的には少なくとも３５０ｎｍである、単一分子検出が達成され得る。したがって、各分子は個別に分解可能かつ検出可能であり、単一分子蛍光点として検出可能であり、この単一分子蛍光点からの蛍光はまた、単一工程でのフォトブリーチを呈する。

【０１９８】

用語「個々に分解された」及び「個々の解像度」は、可視化されたときに、アレイ上の１つの分子をその隣接する分子と区別することが可能であることを指定するために本明細書で使用される。アレイ上の個々の分子間の分離は、個々の分子を分解するために使用される特定の技術によって、部分的に決定される。単一分子アレイの一般的な特徴は、各々が、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第００／０６７７０号及び国際公開第０１／５７２４８号を参照することによって理解されるであろう。本開示の標識されたヌクレオチドの一使用は、合成による配列決定反応にあるが、そのようなヌクレオチドの有用性は、そのような方法に限定されない。実際に、本明細書に記載の標識されたヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに組み込まれたヌクレオチドに結合した蛍光標識の検出を必要とする任意の配列決定方法において有利に使用され得る。

【０１９９】

特に、本開示の色素化合物で標識された修飾ヌクレオチドは、自動蛍光配列決定プロトコル、特に、サンガー（Ｓａｎｇｅｒ）及び共同研究者の連鎖停止配列決定法に基づく、蛍光色素ターミネーターサイクル配列決定に使用され得る。このような方法は、一般に、酵素及びサイクル配列決定を使用して、プライマー伸長配列決定反応において蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドを組み込む。いわゆるサンガー配列決定法、及び関連するプロトコル（サンガー型）は、標識されたジデオキシヌクレオチドでランダム化された鎖終端を利用する。

【０２００】
したがって、本開示はまた、３’位置及び２’位置の両方においてヒドロキシル基を欠くジデオキシヌクレオチドである色素化合物で標識されたヌクレオチドも包含し、このような修飾されたデオキシヌクレオチドは、サンガー型配列決定法などにおける使用に好適である。
【０２０１】
ジデオキシ塩基を使用することによって達成される効果と同じ効果が、３’－ＯＨブロッキング基を有するヌクレオチドを使用することによって達成され得る（両者とも続くヌクレオチドの組み込みを防止できる）ため、３’ブロッキング基を組み込んだ本開示の色素化合物で標識されたヌクレオチドは、サンガー法及び関連するプロトコルにおいて有用であり得ることが認識されるであろう。本開示によるヌクレオチドであって、３’ブロッキング基を有するヌクレオチドをサンガー型の配列決定方法で使用する場合、本開示の標識されたヌクレオチドが組み込まれる各事例においては、ヌクレオチドが、続いて組み込まれる必要はなく、したがって、標識をヌクレオチドから除去する必要がないため、ヌクレオチドに結合した色素化合物又は検出可能な標識は開裂可能なリンカーを介して接続される必要がないということが理解されるであろう。
【０２０２】
代替的に、本明細書に記載の配列決定方法はまた、標識されていないヌクレオチド及び本明細書に記載の蛍光色素を含有する親和性試薬を使用して実施され得る。例えば、工程（ａ）の組み込み混合物中の４つの異なる種類のヌクレオチドのうちの１つ、２つ、３つ又は各々（例えば、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、及びｄＴＴＰ又はｄＵＴＰ）は、標識されていなくてもよい。４つの種類のヌクレオチド（例えば、ｄＮＴＰ）の各々は、１つの塩基のみがプライマーポリヌクレオチドの３’末端にポリメラーゼによって付加され得ることを確実にするために、３’ヒドロキシルブロッキング基を有する。工程（ｂ）における標識されていないヌクレオチドの組み込み後、残りの組み込まれていないヌクレオチドを洗い落とす。次いで、組み込まれたｄＮＴＰを特異的に認識して、結合し、組み込まれたｄＮＴＰを含む標識された伸長生成物を提供する親和性試薬が導入される。合成による配列決定における標識されていないヌクレオチド及び親和性試薬の使用は、国際公開第２０１８／１２９２１４号及び国際公開第２０２０／０９７６０７号において開示されている。標識されていないヌクレオチドを使用する本開示の修飾された配列決定方法は、以下の工程を含み得る。
（ａ’）プライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体を１つ以上の標識されていないヌクレオチド（例えば、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、及びｄＴＴＰ又はｄＵＴＰ）と接触させることであって、プライマーポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部に相補的である、接触させること、
（ｂ’）ヌクレオチドをプライマーポリヌクレオチドに組み込んで、伸長されたプライマーポリヌクレオチドを生成すること、
（ｃ’）伸長されたプライマーポリヌクレオチドを親和性試薬のセットと接触させることであって、１つの親和性試薬が、組み込まれた標識されていないヌクレオチドに特異的に結合して、標識された伸長されたプライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体を提供する、接触させること、
（ｄ’）標識された伸長されたプライマーポリヌクレオチド／標的ポリヌクレオチド複合体の１つ以上の蛍光測定を実施して、組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定すること。
【０２０３】
本明細書に記載の修飾された配列決定方法のいくつかの実施形態では、組み込み混合物中の標識されていないヌクレオチドの各々は、３’ヒドロキシルブロッキング基を含有する。更なる実施形態では、組み込まれたヌクレオチドの３’ヒドロキシルブロッキング基は、次の組み込みサイクルの前に除去される。なお更なる実施形態では、本方法は、組み込まれたヌクレオチドから親和性試薬を除去することを更に含む。なお更なる実施形態で

は、３’ヒドロキシルブロッキング基及び親和性試薬は同じ反応で除去される。いくつかの実施形態では、親和性試薬のセットは、第１の種類のヌクレオチドに特異的に結合する第１の親和性試薬、第２の種類のヌクレオチドに特異的に結合する第２の親和性試薬、及び第３の種類のヌクレオチドに特異的に結合する第３の親和性試薬を含み得る。いくつかの更なる実施形態では、第１、第２、及び第３の親和性試薬の各々は、分光的に区別可能である検出可能な標識されたを含む。いくつかの実施形態では、親和性試薬は、タンパク質タグ、抗体（抗体の結合断片、単鎖抗体、二重特異性抗体などを含むがこれらに限定されない）、アプタマー、ノッチン、アフィマー、又は組み込まれたヌクレオチドに適切な特異性及び親和性で結合する任意の他の既知の薬剤を含み得る。一実施形態では、少なくとも１つの親和性試薬は、抗体又はタンパク質タグである。別の実施形態では、第１の種類、第２の種類、及び第３の種類の親和性試薬のうちの少なくとも１つは、１つ以上の検出可能な標識（例えば、同じ検出可能な標識の複数のコピー）を含む抗体又はタンパク質タグであり、検出可能な標識は、本明細書に記載のクロメノキノリン色素部分であるか、又はそれを含む。

【実施例】

【０２０４】

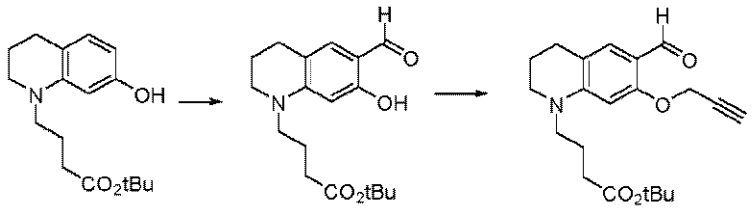
追加的実施形態が、以下の実施例において更に詳細に開示されるが、これらの実施例は、特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。

<u>実施例１．クロメノキノリン色素の合成</u>

<u>クロメノキノリン色素中間体の合成</u>

【０２０５】

【化４８】



【０２０６】

γ－（７－ヒドロキシ－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン－１－イル）酪酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル（１）（３．９４ｇ、１３．５ｍｍｏｌ）を無水Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（dimethylformamide、ＤＭＦ）と共蒸発させた（３×１０ｍＬ）。オキシ塩化リン（１．９ｍＬ、２０ｍｍｏｌ）を０℃で３０ｍＬの無水ＤＭＦに添加した。１５分後、溶液は、淡いピンク色になり、１０ｍＬのＤＭＦ中の１についての溶液を添加した。反応物を室温で３時間撹拌し、次いで、１０ｍＬの飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液でクエンチした。５分後、揮発性物質を減圧下で除去して、深い緑色の油を残した。３００ｍＬの飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液を添加し、溶液を５×２００ｍＬの酢酸エチルで抽出した。プールされた有機相をＭｇＳＯ$_4$で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させ乾固させた。残渣をシリカゲル上でフラッシュクロマトグラフィによって精製して、化合物２を得た。収量：３．６５６ｇ、緑色の油（１１．４ｍｍｏｌ、８４％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ及びＣＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ３２０（Ｍ＋Ｈ$^+$）、（負イオン）ｍ／ｚ３１８（Ｍ－Ｈ$^+$）。

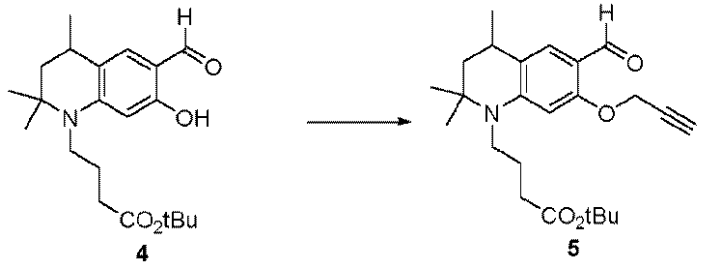
【０２０７】

γ－（６－ホルミル－７－ヒドロキシ－１，２，３，４－テトラヒドロキノリン－１－イル）酪酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル（２）（２．４６ｇ、７．７２ｍｍｏｌ）を無水ＤＭＦに溶解し、次いで、Ｋ$_2$ＣＯ$_3$（２．１３ｇ、１５．４ｍｍｏｌ）、ヨウ化テトラブチルアンモニウム（２５８ｍｇ、０．７０ｍｍｏｌ）及びプロパルギルブロミド（トルエン中８０重量％、１．２８ｍＬ、１１．６ｍｍｏｌ）を添加した。反応物を室温で一晩撹拌し、次いで、１５０ｍＬの水でクエンチし、次いで、２００ｍＬの酢酸エチルで抽出した。水相を分離し、２×１００ｍＬの酢酸エチルで抽出した。次いで、組み合わせた有機

相を２×１００ｍＬの水で再度抽出した。有機相を$MgSO_4$で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させ乾固させた。残渣をシリカゲル上でフラッシュクロマトグラフィによって精製して、化合物３を得た。収量：２．０１ｇ、黄色の固体（５．６５ｍｍｏｌ、７３％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ３５８（$M+H^+$）、３８０（$M+Na^+$）。

【０２０８】

【化４９】

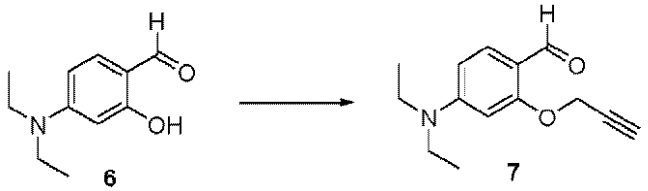


【０２０９】

化合物３について記載された手順に従って、γ－（１－ジメチル－３－メチル－６－ホルミル－７－ヒドロキシ－１，２，３，４－テトラヒドロキノール－１－イル）酪酸ｔｅｒｔ－ブチルエステル（４）から、灰色がかった白色の固体として化合物５を合成した。収量：３５１ｍｇ（０．８６ｍｍｏｌ、８６％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ及びＣＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４００（$M+H^+$）。

【０２１０】

【化５０】

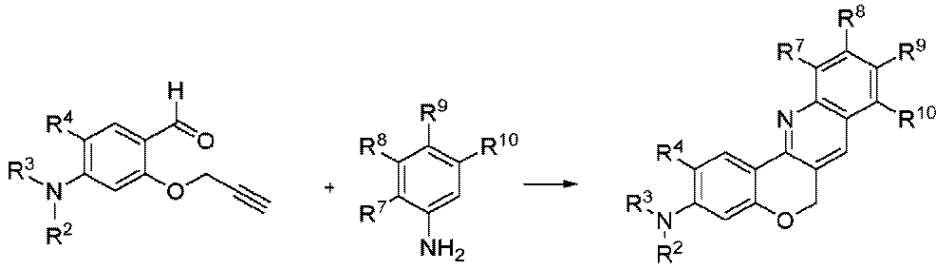


【０２１１】

化合物３について記載された手順に従って、４－（ジエチルアミノ）サリチルアルデヒド（６）から、淡桃色の固体として化合物７を合成した。収量：２．２６３ｍｇ（９．９７ｍｍｏｌ、９５％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ及びＣＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ２３２（$M+H^+$）。

<u>クロメノキノリン色素の一般的な合成</u>

【化５１】



【０２１２】

置換された４－アミノ－２－プロパルギルオキシ－ベンズアルデヒド（０．３３６ｍｍｏｌ）及び置換されたアニリン（０．３７ｍｍｏｌ）をN_2下で無水ＤＭＦに溶解した。次いで、酢酸（１０μＬ、０．１６ｍｍｏｌ）を添加し、溶液を６０Ｃに１時間加熱した。ＴＬＣ（石油エーテル／酢酸エチル１：１）は、黄色の中間体の形成を示した。次いで、ＣｕＩ（１３ｍｇ、０．０６７ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を完了するまで６０～１０

０℃で撹拌した。反応物を３０ｍＬの酢酸エチルで希釈し、シリカゲルのプラグで濾過し、次いで、フラッシュクロマトグラフィにより精製した。

【０２１３】

化合物８ａ：中間体３及びｐ－アニシジンから出発して、化合物８ａを３１％の収率で黄色の固体として得た。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４６１（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１４】

化合物８ｂ：中間体３及び４－メチルアニリンから出発して、化合物８ｂを３５％の収率で黄色の固体として得た（８９ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４４５（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１５】

化合物８ｃ：中間体３及び３、４－ジメチルアニリンから出発して、化合物８ｃを２１％の収率で２つの位置異性体の６：４混合物として、黄色の固体として得た（３２ｍｇ、０．０７ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４５９（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１６】

化合物８ｄ：中間体３及び３、４－ジメトキシアニリンから出発して、化合物８ｄを４８％の収率で黄色の固体として得た（６８ｍｇ、０．１３８ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４９１（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１７】

化合物８ｅ：中間体５及びｐ－アニシジンから出発して、化合物８ｅを４０％収率で黄色の固体として得た（７６ｍｇ、０．１５１ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ５０３（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１８】

化合物８ｆ：中間体７及びメチル－（４－アミノフェニル）－アセテートから出発して、化合物８ｆを３９％の収率で黄色の固体として得た（３２１ｍｇ、０．８５ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ３７７（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２１９】

化合物８ｇ：中間体３及び３、４－（メチレンジオキシ）アニリンから出発して、化合物８ｇを４０％の収率で黄色の固体として得た（６５ｍｇ、０．１３７ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４７５（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２２０】

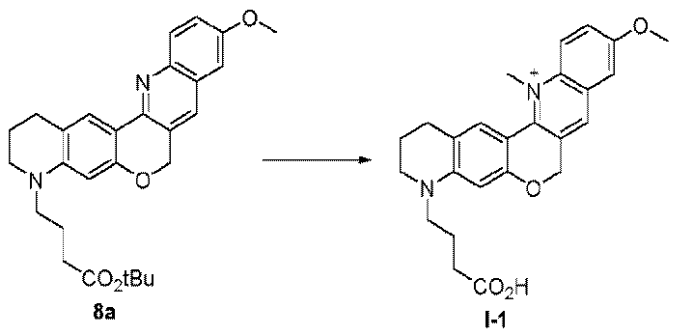
化合物８ｈ：中間体３及び３、４、５－トリメトキシアニリンから出発して、化合物８ｈを３５％の収率で黄色固体として得た（６５ｍｇ、０．１１７ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ５２１（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２２１】

化合物８ｉ：中間体３及び５－アミノ－２、３－ジヒドロベンゾフランから出発して、化合物８ｉを３１％の収率で黄色の固体として得た（５０ｍｇ、０．１１７ｍｍｏｌ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４７３（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２２２】

【化５２】

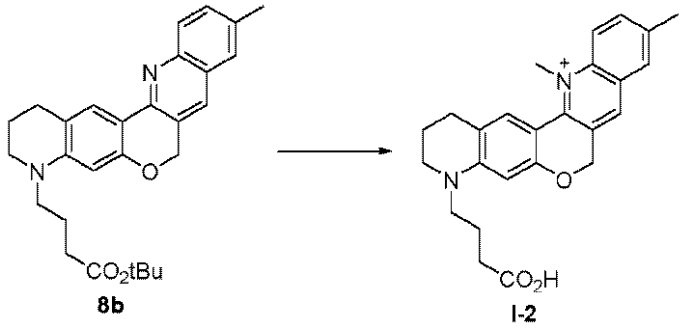


【０２２３】

化合物８ａ（８２ｍｇ、０．１７８ｍｍｏｌ）を圧力管中で乾燥１，４－ジオキサン（２ｍＬ）に溶解した。ヨードメタン（０．５ｍＬ、８ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を１００℃で加熱した。２時間後、それを冷却し、揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。次いで、中間体を乾燥ＤＣＭ（１ｍＬ）に溶解し、０．５ｍＬのトリフルオロ酢酸を添加し、反応物を室温で１．５時間撹拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－１を赤色の固体として得た。収量：２８ｍｇ（０．０６７、３７％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）：δ（ｐｐｍ）８．３８（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．６４（ｄｄ、Ｊ＝９．５、２．９Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５７（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５１（ｄ、Ｊ＝２．９Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５２（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．１８（ｓ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．４６（ｓ、３Ｈ、NCH_3）、３．９９（ｓ、３Ｈ、OCH_3）、３．５５－３．４５（ｍ、４Ｈ、CH_2－Ｎ）、２．８６（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ａｒ）、２．４１（ｔ、Ｊ＝６．９Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０７－１．９０（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４１９（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）。

【０２２４】

【化５３】

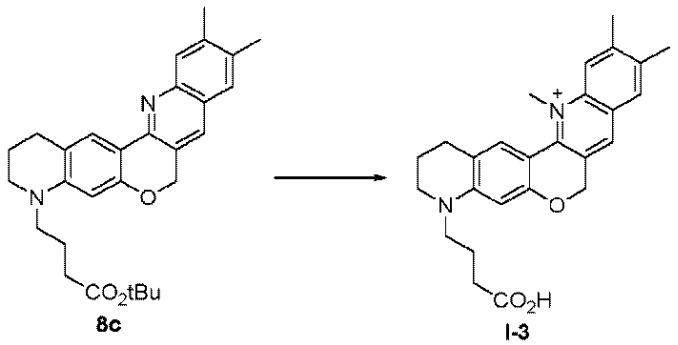


【０２２５】

化合物８ｂ（８９ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）を圧力管中で乾燥１，２－ジクロロエタン（２ｍＬ）に溶解した。トリフルオロメチルメタンスルホン酸メチル（０．４５ｍＬ、４ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（１３８ｍｇ、１ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を１１０℃で加熱した。１８時間後、反応物を冷却し、揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。次いで、中間体をメタノール（１０ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．５ｍＬを添加した。反応物を室温で１８時間撹拌した。次いで、溶液を１ＮのＨＣｌで中和し、揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上で分取スケールＲＰ－ＨＰＬＣによって精製して、化合物Ｉ－２を赤色の固体として得た。収量：３０μｍｏｌ（１５％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）：δ（ｐｐｍ）８．３３（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、８．１０（ｄ、Ｊ＝８．８Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．９２－７．８４（ｍ、２Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５７（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５３（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．１６（ｓ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．４４（ｓ、３Ｈ、NCH_3）、３．５６－３．５２（ｍ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、３．５０－３．４３（ｍ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、２．８５（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ａｒ）、２．５９（ｓ、３Ｈ、CH_3）、２．２５（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０６－１．８９（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４０３（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）。

【０２２６】

【化５４】

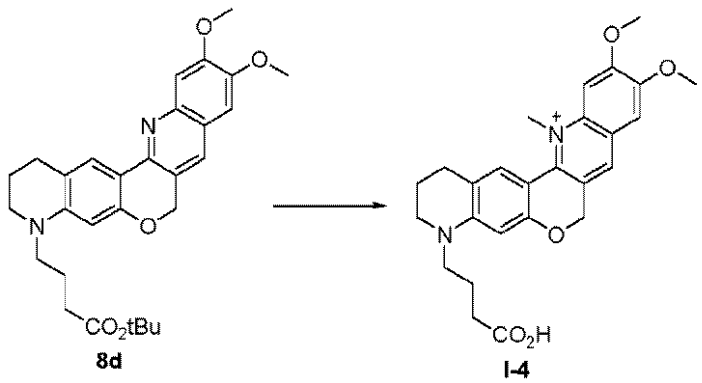


【０２２７】

化合物８ｃ（３０ｍｇ、０．０６５ｍｍｏｌ）を圧力管中で乾燥１，２－ジクロロエタン（１ｍＬ）に溶解した。トリフルオロメタンスルホン酸メチル（１ｍＬ）及びジイソプロピルエチルアミン（０．５ｍＬ）を添加した。室温で１時間後、混合物をＤＣＭ（２０ｍＬ）で希釈し、２０ｍＬの飽和ＮａＨＣＯ$_3$で抽出した。有機相をＭｇＳＯ$_4$で乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸発させ乾固させた。赤色の残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。次いで、中間体をメタノール（１０ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．１５ｍＬを添加した。反応物を室温で１８時間撹拌した。次いで、溶液を１ＮのＨＣｌ（０．６ｍＬ）で中和し、揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－３を２つの位置異性体の６：４の混合物の赤色の固体として得た。収量：１５μｍｏｌ（３５％）。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）：δ（ｐｐｍ）８．７１（ｓ、０．４Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ｂ）、８．３２（ｓ、０．６Ｈ、異性体Ａ）、８．００（ｓ、０．６Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ａ）、７．９６（ｄ、Ｊ＝９．０Ｈｚ、０．４Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ｂ）、７．８５（ｄ、Ｊ＝９．０Ｈｚ、０．４Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ｂ）、７．８２（ｓ、０．６Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ａ）、７．５６（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５４（ｓ、０．４Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ｂ）、６．５３（ｓ、１Ｈ、０．６Ｈ、Ａｒ－ＣＨ、異性体Ａ）、５．２１（ｓ、０．８Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｏ、異性体Ｂ）、５．１５（ｓ、１．２Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｏ、異性体Ａ）、４．４４（ｓ、３Ｈ、ＣＨ$_3$－Ｎ）、３．７１－３．５７（ｍ、ＴＥＡＢ）、３．５７－３．５１（ｍ、２Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｎ）、３．５０－３．４３（ｍ、２Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｎ）、２．８５（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、Ａｒ－ＣＨ$_2$）、２．６９（ｓ、１Ｈ、ＣＨ$_3$異性体Ｂ）、２．６３（ｓ、２Ｈ、ＣＨ$_3$異性体Ａ）、２．５６（ｓ、１Ｈ、ＣＨ$_3$異性体Ｂ）、２．５１（ｓ、２Ｈ、ＣＨ$_3$異性体Ａ）、２．２７（ｔ、Ｊ＝７．２、２Ｈ、ＣＨ$_2$－ＣＯＯ）、２．０６－１．９１（ｍ、４Ｈ、ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｎ）、１．２０（ｔ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、ＴＥＡＢ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４１７（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

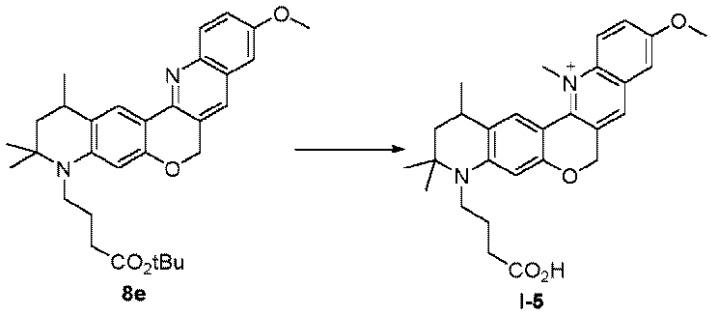
【０２２８】

【化５５】



【０２２９】
化合物８ｄ（６５ｍｇ、０．１３２ｍｍｏｌ）を乾燥ジクロロメタン（１ｍＬ）に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン（１１４μＬ、０．６６ｍｍｏｌ）及びトリフルオロメタンスルホン酸メチル（３００μＬ、２．６５ｍｍｏｌ）を、N_2雰囲気下で添加した。１時間後、揮発性物質を減圧下で除去した。次いで、粗生成物をメタノール（１０ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．５ｍＬを添加した。反応物を室温で１８時間撹拌した。次いで、溶液を酢酸（０．１５ｍＬ）で中和し、揮発性物質を減圧下で除去した。残渣を、最初にフラッシュカラムクロマトグラフィによって、次いで、Ｃ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－４を赤色の固体として得た。収量：９２μｍｏｌ（６９％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ／ＣＤＣｌ$_3$）：δ（ｐｐｍ）８．２６（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．７１（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．４３（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．４２（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．４８（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．１２（ｓ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．４４（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｎ）、４．１５（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、４．０３（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、３．７０－３．５５（ｍ、１Ｈ、ＴＥＡＢ）、３．５０（ｄ、Ｊ＝５．６Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、３．４４（ｄ、Ｊ＝７．７Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、２．８２（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、Ａｒ－CH_2）、２．２５（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０６－１．８５（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）、１．１７（ｔ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、１Ｈ、ＴＥＡＢ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４４９（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２３０】
【化５６】

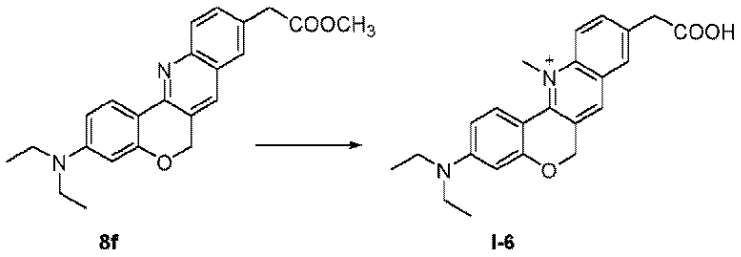


【０２３１】
化合物８ｅ（８０ｍｇ、０．１５９ｍｍｏｌ）を圧力管中で乾燥１，２－ジクロロエタン（２ｍＬ）に溶解した。トリフルオロメタンスルホン酸メチル（３６０μＬ、３．１８ｍｍｏｌ）及びK_2CO_3（１０９ｍｇ、０．７９５ｍｍｏｌ）をN_2雰囲気下で添加し、反応物を１１０℃に２４時間加熱した。揮発性物質を減圧下で除去し、赤色の残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。次いで、中間体をメタノール（５ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．３５ｍＬを添加した。反応物を室温で１８時間撹拌した。次いで、溶液を１ＮのＨＣｌ（０．１５ｍＬ）で中和した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物を最初にフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製し、次いで、Ｃ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して化合物Ｉ－５を赤色の固体として得た。収量：６９μｍｏｌ（４３％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ／ＣＤＣｌ$_3$）：δ（ｐｐｍ）８．３６（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、８．１６（ｄ、Ｊ＝９．５Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．６９－７．６３（ｍ、２Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５１（ｄ、Ｊ＝２．９Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５４（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．１９（ｄ、Ｊ＝１３．７Ｈｚ、１Ｈ、Ｏ－ＣＨＨ）、５．１２（ｄ、Ｊ＝１３．７Ｈｚ、１Ｈ、Ｏ－ＣＨＨ）、４．４７（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｎ）、４．００（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、３．６３（ｑ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、１Ｈ、ＴＥＡＢ）、３．５８－３．４７（ｍ、１Ｈ、ＣＨＨ－Ｎ）、３．３６－３．２９（ｍ、ＣＨＨ－Ｎ　ＭｅＯＨ下）、３．０３－２．８９（ｍ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、２．２７（ｄ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、２Ｈ、Ｃ

Ｈ$_2$－ＣＯＯ）、２．０４－１．８４（ｍ、４Ｈ、ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－Ｎ）、１．４７（ｓ、３Ｈ、ＣＨ$_3$）、１．４６（ｄ、Ｊ＝６．５Ｈｚ、３Ｈ、ＣＨ$_3$）、１．３５（ｓ、３Ｈ、ＣＨ$_3$）、１．２０（ｔ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、２Ｈ、ＴＥＡＢ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４６１（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２３２】

【化５７】

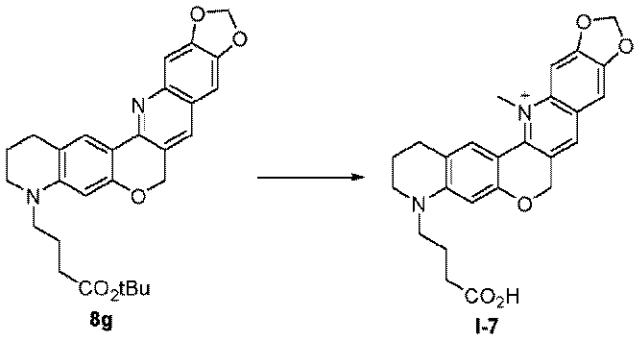


【０２３３】

化合物８ｆ（３１０ｍｇ、０．１８２ｍｍｏｌ）を圧力管中で乾燥１、４－ジオキサン（２ｍＬ）に溶解した。ヨードメタン（０．５ｍＬ、８ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を暗所で、１００℃で加熱した。２日後、揮発性物質を減圧下で除去し、次いで、中間体をメタノール（５ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液１ｍＬを添加した。反応物を室温で１８時間撹拌した。次いで、溶液を１ＮのＨＣｌ（０．１５ｍＬ）で中和した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上で分取スケールＲＰ－ＨＰＬＣによって精製して、化合物Ｉ－６を赤色の固体として得た。収量：２８μｍｏｌ（１５％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）：δ（ｐｐｍ）８．４７（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、８．１５（ｄ、Ｊ＝９．０Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、８．０２（ｄｄ、Ｊ＝９．０、２．０Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．９８（ｄ、Ｊ＝２．０Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．９１（ｄ、Ｊ＝９．４Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．８０（ｄｄ、Ｊ＝９．４、２．６Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５１（ｄ、Ｊ＝２．７Ｈｚ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．２５（ｓ、２Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｏ）、４．４９（ｓ、３Ｈ、ＮＣＨ$_3$）、３．７３（ｓ、３Ｈ、ＯＣＨ$_3$）、３．５９（ｑ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、４Ｈ、ＣＨ$_2$－Ｎ）、２．６５（ｑ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、６Ｈ、ＴＥＡＢ）、１．２９（ｔ、Ｊ＝７．１Ｈｚ、６Ｈ、ＣＨ$_3$　Ｅｔ）、１．１０（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、９Ｈ、ＴＥＡＢ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ３７７（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２３４】

【化５８】



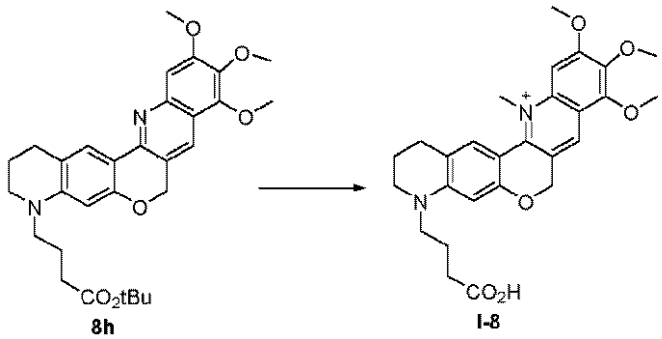
【０２３５】

化合物８ｇ（６５ｍｇ、０．１３７ｍｍｏｌ）を乾燥ジクロロメタン（２ｍＬ）に溶解した。トリフルオロメタンスルホン酸メチル（７７μＬ、０．６８ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（１１８μＬ、０．６８ｍｍｏｌ）をＮ$_2$雰囲気下、０℃で添加し、次いで、反応物を室温で４時間撹拌した。別の部分のトリフルオロメタンスルホン酸メチル（７７μＬ、０．６８ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン

（１１８μＬ、０．６８ｍｍｏｌ）及び２ｍＬの乾燥ＤＣＭを添加した。更に２時間後、揮発性物質を減圧下で除去した。赤色の残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。次いで、中間体をメタノール（１０ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．３７５ｍＬを添加した。反応物を６０℃で２時間撹拌した。次いで、溶液を酢酸（０．０９ｍＬ）で中和した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－７を赤色の固体として得た。収量：９．８μｍｏｌ（７％）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ）：δ（ｐｐｍ）８．２４（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．６２（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．４７（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．３４（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．４８（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．２９（ｓ、２Ｈ、Ｏ－CH_2－Ｏ）、５．０８（ｓ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．３８－４．３１（ｍ、３Ｈ、CH_3－Ｎ）、３．５０（ｔ、Ｊ＝５．４Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、３．４４（ｔ、Ｊ＝７．８Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、２．８１（ｍ、２Ｈ、Ａｒ－CH_2）、２．２５（ｍ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０２－１．８７（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）、１．２０（ｔ、Ｊ＝７．０Ｈｚ、２Ｈ、ＴＥＡＢ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４３３（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）。

【０２３６】

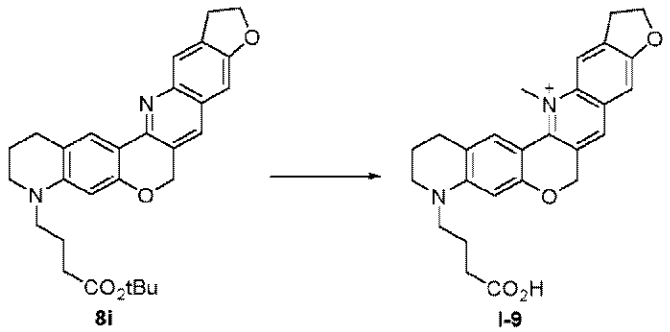
【化５９】



【０２３７】

化合物８ｈ（６５ｍｇ、０．１１７ｍｍｏｌ）を乾燥ジクロロメタン（２ｍＬ）に溶解した。トリフルオロメタンスルホン酸メチル（２７μＬ、０．２３４ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（４１μＬ、０．２３４ｍｍｏｌ）をN_2雰囲気下、０℃で添加し、次いで、反応物を室温で２時間撹拌した。次いで、更にトリフルオロメタンスルホン酸メチル（５４μＬ、０．４６ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（８２μＬ、０．４６ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を室温で２時間撹拌した。次いで、更にトリフルオロメタンスルホン酸メチル（１００μＬ、０．８８ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（８２μＬ、０．４６ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を室温で１時間撹拌し、次いで、揮発性物質を減圧下で除去した。中間体をメタノール（２ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．５ｍＬを添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。次いで、溶液を酢酸（０．２４ｍＬ）で中和した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－８を赤色の固体として得た。収量：７０μｍｏｌ（６０％）。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ／$CDCl_3$）：δ（ｐｐｍ）８．４９（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５１（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．２３（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．４９（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．０９（ｓ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．４０（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｎ）、４．１６（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、４．１５（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、３．９８（ｓ、３Ｈ、CH_3－Ｏ）、３．５４－３．５０（ｍ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、３．４７－３．４１（ｍ、２Ｈ、CH_2－Ｎ）、２．８４（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、Ａｒ－CH_2）、２．２４（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０４－１．８９（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４７９（Ｍ＋Ｈ$^{+}$）。

【０２３８】
【化６０】



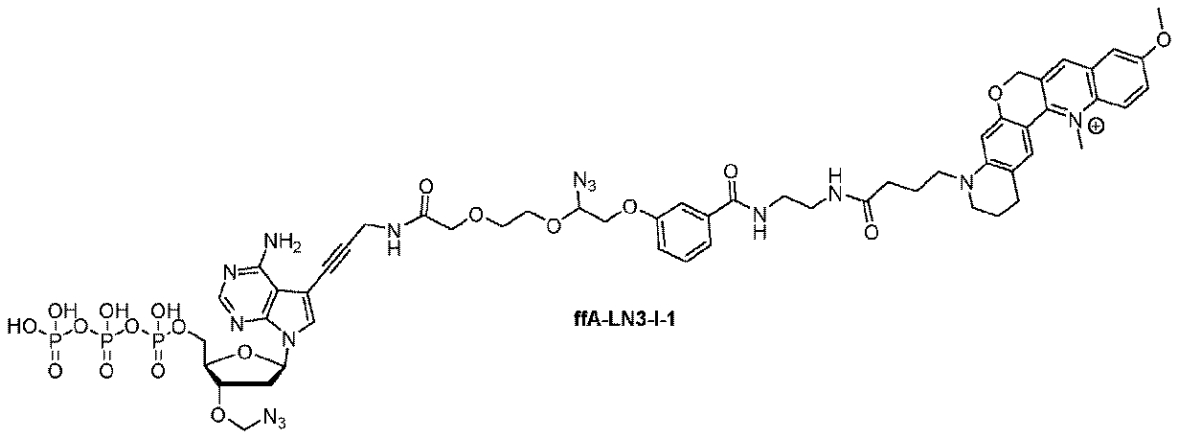
【０２３９】
化合物８ｉ（５０ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）を乾燥ジクロロメタン（１ｍＬ）に溶解した。Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２０８μＬ、１．２ｍｍｏｌ）及びトリフルオロメタンスルホン酸メチル（６００μＬ、５ｍｍｏｌ）をN_2雰囲気下、０℃で添加し、次いで、反応物を室温で２時間撹拌した。次いで、更にトリフルオロメタンスルホン酸メチル（６００μＬ、５ｍｍｏｌ）及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２０８μＬ、１．２ｍｍｏｌ）を添加し、反応物を室温で２時間撹拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で除去した。赤色の残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィによって精製した。中間体をメタノール（５ｍＬ）に溶解し、水中のＮａＯＨの４Ｍの溶液０．２５ｍＬを添加した。反応物を室温で一晩撹拌した。次いで、溶液を酢酸（０．０６ｍＬ）で中和した。揮発性物質を減圧下で除去し、粗生成物をＣ１８カラム上でＲＰクロマトグラフィによって精製して、化合物Ｉ－９を赤色の固体として得た。収量：赤色の固体として、４．１μｍｏｌ（４％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＭｅＯＤ／ＣＤＣｌ$_3$）：δ（ｐｐｍ）８．３０（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、８．１３（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．５４（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、７．２８（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、６．５４（ｓ、１Ｈ、Ａｒ－ＣＨ）、５．１７－５．１４（ｍ、２Ｈ、CH_2－Ｏ）、４．８０（ｔ、Ｊ＝８．４Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－CH_2－Ｏ）、４．４９－４．４０（ｍ、３Ｈ、CH_3－Ｎ）、３．７０－３．４４（ｍ、６Ｈ、CH_2－Ｎ、CH_2－CH_2－Ｏ）、２．８５（ｔ、Ｊ＝６．２Ｈｚ、２Ｈ、Ａｒ－CH_2）、２．２７（ｔ、Ｊ＝７．２Ｈｚ、２Ｈ、CH_2－ＣＯＯ）、２．０４－１．９３（ｍ、４Ｈ、CH_2－CH_2－Ｎ）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳＩ）：（正イオン）ｍ／ｚ４３１（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

【０２４０】
<u>実施例２．クロメノキノリン色素で標識されたヌクレオチドの一般的な合成</u>
式（Ｉ）のクロメノキノリン色素（０．０２０ｍｍｏｌ）を２×２ｍＬの無水Ｎ，Ｎ’－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）と共蒸発させ、次いで、２ｍＬの無水Ｎ，Ｎ’－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）に溶解した。Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２８．４μＬ、０．１６３ｍｍｏｌ）を添加し、続いてＮ、Ｎ、Ｎ’、Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）ウロニウムテトラフルオロボレートを無水ＤＭＡ（ＴＳＴＵ、２３２μＬ、０．０２３ｍｍｏｌ）中の０．１Ｍの溶液として添加した。反応物を窒素下、室温で３０分間撹拌した。この合間、２’－デオキシアデノシン三リン酸リンカー（０．０１ｍｍｏｌ）の水溶液を減圧下で蒸発させて乾固させ、２００μＬの水中の０．１Ｍの重炭酸トリエチルアンモニウム（triethylammonium bicarbonat、ＴＥＡＢ）溶液に再懸濁した。活性化されたクロメノキノリン色素溶液をトリホスフェートに添加し、反応物を室温で１８時間撹拌した。粗生成物を、最初にＤＥＡＥ－Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ａ２５（２５ｇ）上のイオン交換クロマトグラフィによって精製した。トリホスフェートを含有する画分をプールし、溶媒を減圧下で蒸発させて乾固させた。粗物質を、ＹＭＣ－Ｐａｃｋ－Ｐｒｏ　Ｃ１８カラムを使用した分取スケールＲＰ－ＨＰＬＣによって更に精製した。最終化合物は、ＬＣ－ＭＳ、分析ＲＰ－ＨＰＬＣ及びＵＶ－可視分光法によって特

徴付けられた。

【０２４１】

【化６１】

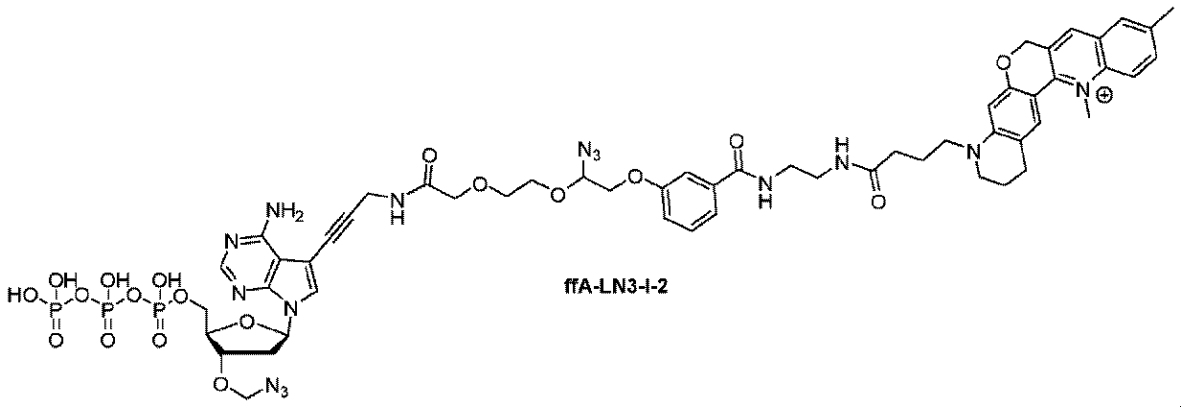


【０２４２】

化合物ｆｆＡ－ＬＮ３－Ｉ－１：収量：２．７μｍｏｌ、（５４％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３４６（Ｍ－Ｈ$^+$）、６７３（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最大}$＝５０３ｎｍ。蛍光発光λ$_{最大}$＝５９０ｎｍ。

【０２４３】

【化６２】

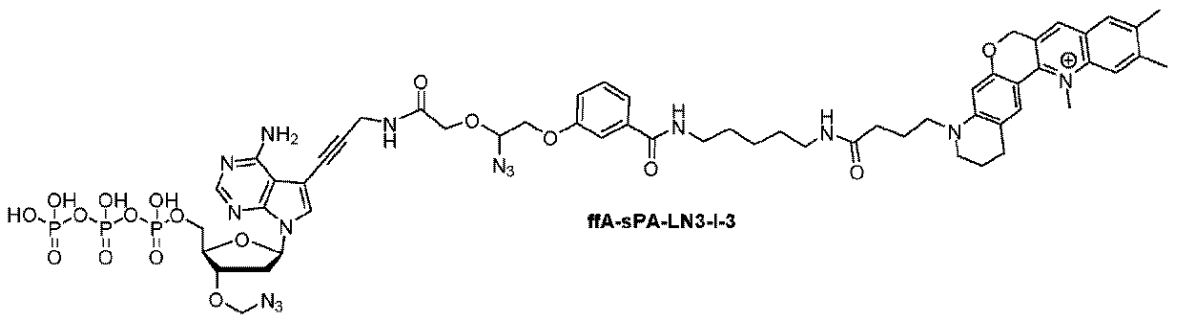


【０２４４】

化合物ｆｆＡ－ＬＮ３－Ｉ－２：収量：６．８μｍｏｌ（６８％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３３０（Ｍ－Ｈ$^+$）、６６５（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最大}$＝５００ｎｍ。蛍光発光λ$_{最大}$＝５８２ｎｍ。

【０２４５】

【化６３】



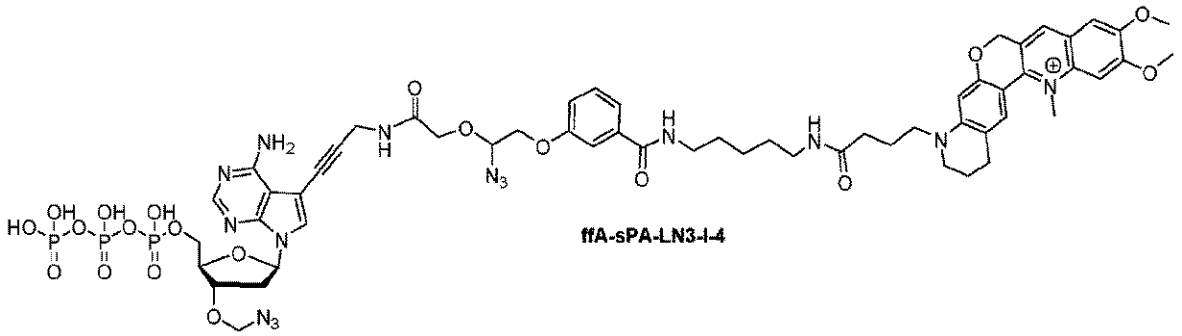
【０２４６】

化合物ｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－３：収量：６．３μｍｏｌ（６３％）。ＬＣ－Ｍ

Ｓ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３４３（Ｍ－Ｈ$^+$）、６７１（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最大}$＝５００ｎｍ。蛍光発光λ$_{最大}$＝５７８ｎｍ。

【０２４７】

【化６４】

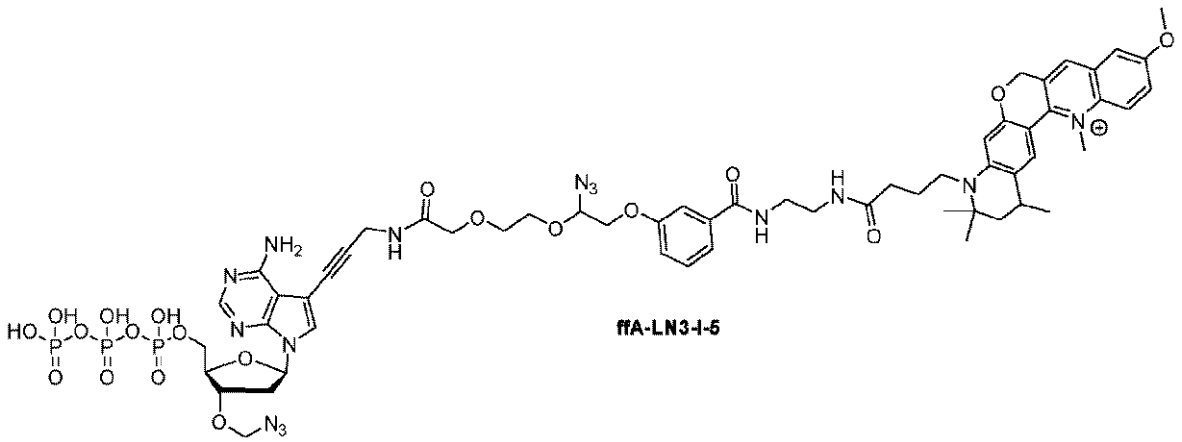


【０２４８】

化合物ｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－４：収量：７．８μｍｏｌ（７８％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３７５（Ｍ－Ｈ$^+$）、６８７（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最大}$＝５００ｎｍ。蛍光発光λ$_{最大}$＝５７８ｎｍ。

【０２４９】

【化６５】

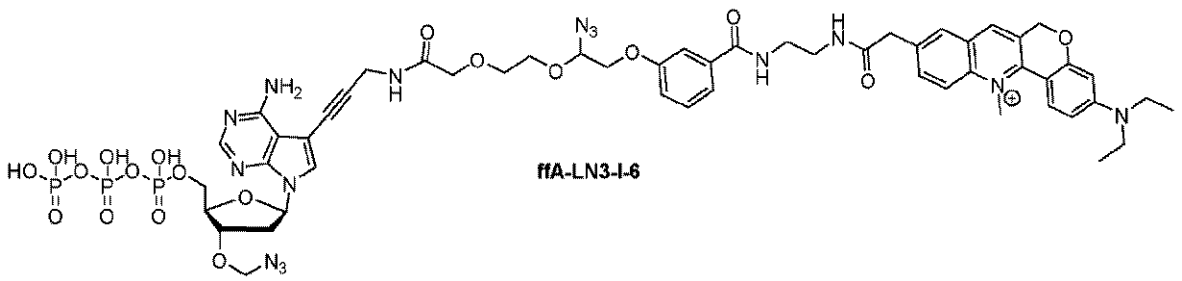


【０２５０】

化合物ｆｆＡ－ＬＮ３－Ｉ－５：収量：７．３μｍｏｌ（７３％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３８８（Ｍ－Ｈ$^+$）、６９４（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最大}$＝５０１ｎｍ。蛍光発光λ$_{最大}$＝５８５ｎｍ。

【０２５１】

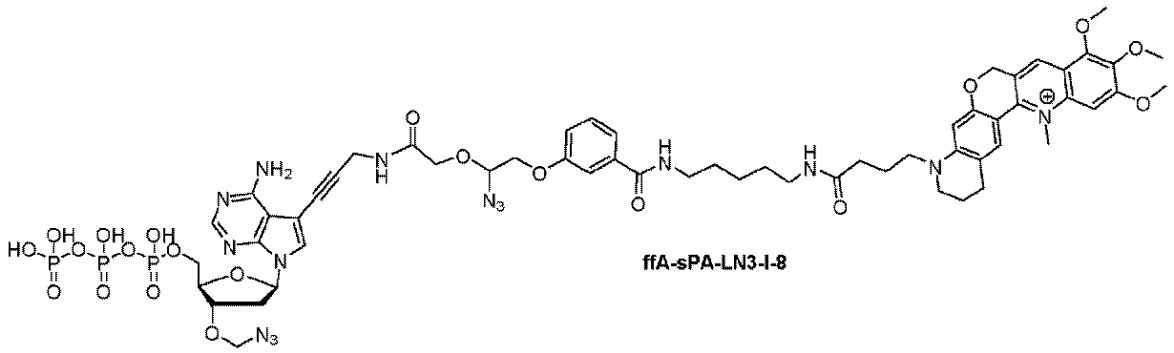
【化６６】



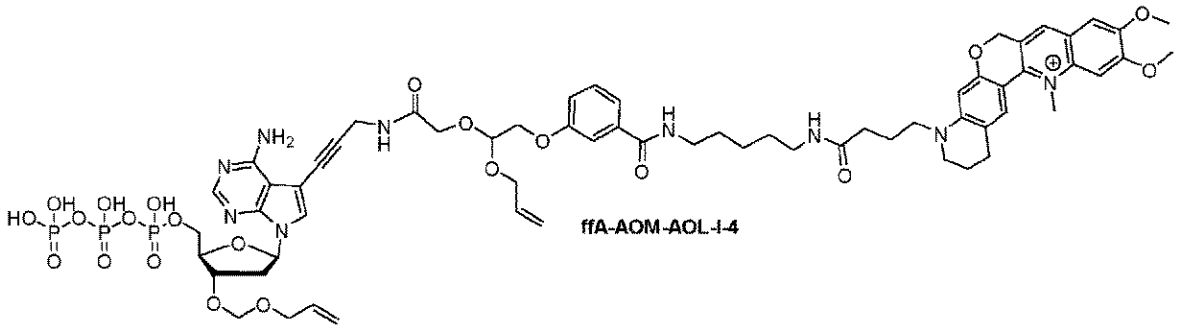
【０２５２】

化合物ｆｆＡ－ＬＮ３－Ｉ－６：収量：３．１μｍｏｌ（３１％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１３０４（Ｍ－Ｈ$^+$）、６５２（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ$_{最}$

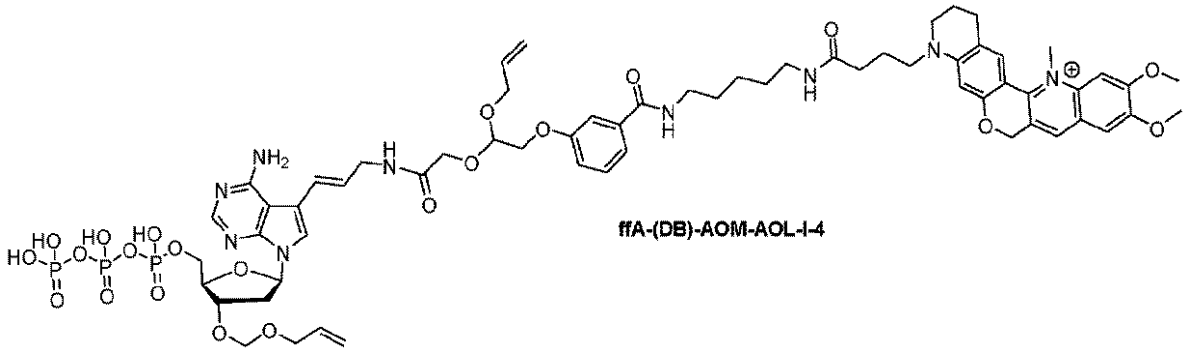
大＝４９５ｎｍ。蛍光発光λ最大＝５７４ｎｍ。
【０２５３】
【化６７】



【０２５４】
化合物ｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－８：収量：６．９μｍｏｌ（６９％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１４０５（Ｍ－Ｈ$^+$）、７０２（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ最大＝５００ｎｍ。蛍光発光λ最大＝５８３ｎｍ。
【０２５５】
【化６８】



【０２５６】
化合物ｆｆＡ－ＡＯＭ－ＡＯＬ－Ｉ－４：収量：１０μｍｏｌ（５０％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１４０５（Ｍ－Ｈ$^+$）、７０２（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ最大＝５００ｎｍ。蛍光発光λ最大＝５７８ｎｍ。
【０２５７】
【化６９】



【０２５８】
化合物ｆｆＡ－（ＤＢ）－ＡＯＭ－ＡＯＬ－Ｉ－４：収量：２．１μｍｏｌ（２１％）。ＬＣ－ＭＳ（ＥＳ）：（負イオン）ｍ／ｚ１４０７（Ｍ－Ｈ$^+$）、７０３（Ｍ－２Ｈ$^+$）。ＵＶ－可視λ最大＝５００ｎｍ。蛍光発光λ最大＝５７８ｎｍ。
【０２５９】

実施例３．クロメノキノリン色素とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドのスペクトル特性

この実施例では、本明細書に記載のクロメノキノリン色素とコンジュゲートしたいくつかの完全に官能化されたＡヌクレオチド（ｆｆＡ）のスペクトル特性を特徴付けた。図１は、ユニバーサルスキャン混合物（ＵＳＭ、１ＭのＴｒｉｓ　ｐＨ７．５、０．０５％のＴｗｅｅｎ、２０ｍＭのアスコルビン酸ナトリウム、１０ｍＭの没食子酸エチル）中の２μＭの溶液としてのクロメノキノリン色素Ｉ－１～Ｉ－６及びＩ－８とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光吸収スペクトルを示す。図２Ａ～図２Ｄは、ＵＳＭ中で励起波長として４５０ｎｍ又は５２０ｎｍのいずれかを使用して獲得されたクロメノキノリン色素Ｉ－１～Ｉ－６及びＩ－８とコンジュゲートしたｆｆＡヌクレオチドの蛍光発光スペクトルを示す。スペクトルは、石英又はプラスチックキュベットを使用して、ＡｇｉｌｅｎｔＣａｒｙ１００ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計及びＣａｒｙＥｃｌｉｐｓｅ蛍光分光光度計で獲得した。本明細書に記載のクロメノキノリン色素は、青色及び緑色の光源の両方で励起され得、また強い蛍光発光を有することが観察された。

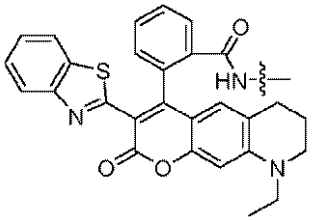
【０２６０】

実施例４．クロメノキノリン色素で標識されたｆｆＡの安定性

化合物ｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－３及びｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－４の高ｐＨの水溶液中での安定性を、１０μＭの所与の化合物の溶液を、１）５０ｍＭのエタノールアミン緩衝液、ｐＨ９．６、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．０２％のＣＨＡＰＳ、４ｍＭの$MgSO_4$、２）５０ｍＭのグリシン緩衝液、ｐＨ９．８、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％のＣＨＡＰＳ、４ｍＭの$MgSO_4$の２つの緩衝液中で、暗所で、４５℃で６日間インキュベートすることによって評価した。設定時点で、溶液のＵＶ－可視吸収及び蛍光発光を、石英キュベットを使用して、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｃａｒｙ　１００　ＵＶ－可視分光光度計及びＣａｒｙ　Ｅｃｌｉｐｓｅ蛍光分光光度計で測定した。加えて、溶液のアリコートを採取し、分析ＨＰＬＣによって分析した。図３Ａ及び図３Ｂは、ｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－３及びｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－４の蛍光発光が経時的に非常にゆっくり減少したことを示し、これは、クロメノキノリン色素Ｉ－３及びＩ－４が、同じ条件下で明るいクマリン参照色素Ａで標識されたｆｆＣと比較して、これらの条件下で安定であることを示している。クマリン参照色素Ａは、米国特許出願公開第２０１８／００９４１４０号に開示されており、ｆｆＣとコンジュゲートした場合、構造部分

【０２６１】

【化７０】



を有する。

【０２６２】

加えて、ヌクレオチド貯蔵に好適な緩衝液における化合物ｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－３及びｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－４の安定性を、１０μＭの溶液を、１）１０ｍＭのＴｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８．０、２）１００ｍＭのＭＯＰＳ緩衝液、ｐＨ７．０の２つの緩衝液中で、４０℃で、暗所で１４日間インキュベートすることによって評価した。設定時点で、溶液のＵＶ－可視吸収及び蛍光発光を、石英キュベットを使用して、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｃａｒｙ　１００　ＵＶ－可視分光光度計及びＣａｒｙ　Ｅｃｌｉｐｓｅ蛍光分光光度計で測定した。加えて、溶液のアリコートを採取し、分析ＨＰＬＣによって分析した。図３Ｃ及び図３Ｄは、同じ条件でクマリン参照色素Ａと比較して、ｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－３及びｆｆＡ－ｓＰＡ－Ｉ－４は、Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０中で１４日後にその蛍光の＞９０％、及びＭＯ

ＰＳ　ｐＨ７．０中で１４日後にその蛍光の＞７５％を保持したことを示す

【０２６３】

実施例５．Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器での配列決定実験

本明細書に記載のクロメノキノリン色素で標識されたｆｆＡは、緑色励起光（約５２０ｎｍ）での第１の画像及び青色励起光（約４５０ｎｍ）での第２の画像を撮影するために設定されたＩｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で試験された。配列決定の方策は、１×３００サイクルの標準的なＳＢＳサイクル（組み込み、続いて撮像、続いて開裂）を実施するために修飾された。これらの実験の各々において使用される組み込み混合物は、以下の４つのｆｆＮ、式（Ｉ）のクロメノキノリン色素で標識されたｆｆＡ、４５０ｎｍの青色光で励起可能なｆｆＣ（例えば、ｆｆＣ－リンカー－クマリン参照色素Ａ）、緑色光で励起可能なｆｆＴ（例えば、ｆｆＴ－リンカー－ＮＲ５５０ｓ０）及び標識されていないｆｆＧ（暗色ｆｆＧ）を、５０ｍＭのエタノールアミン緩衝液、ｐＨ９．６、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％のＣＨＡＰＳ、４ｍＭの$MgSO_4$及びＤＮＡポリメラーゼ中に含有した。図４Ａ～図４Ｅは、クロメノキノリン色素Ｉ－１、Ｉ－２、Ｉ－３、Ｉ－４及びＩ－５で標識されたｆｆＡヌクレオチドとの組み込み混合物について、それぞれ２６サイクルで得られた散乱プロットを示す。図４Ｆは、１×３００サイクルのフェージング及びプレフェージング計量を示す。試験した全てのｆｆＡは、優れた品質の散乱プロット及び配列決定計量を示した。

【０２６４】

表１は、ｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－４を含有する取り込み混合物で実施されたＩｌｌｕｍｉｎａ　ｉＳｅｑ（商標）１００機器で実行された２×３００サイクルのフェージング、プレフェージング、ＰｈｉＸエラー率、及びＱ３０％の計量を示す。機器は、緑色励起光での第１の画像及び青色励起光での第２の画像を撮影するために設定され、その方策は、２×３００サイクルの標準的なＳＢＳサイクル（取り込み、続いて撮像、続いて開裂）を実施するために修正された。これらの実験で使用される組み込み混合物は、５０ｍＭのエタノールアミン緩衝液、ｐＨ９．６、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％ＣＨＡＰＳ、４ｍＭの$MgSO_4$及びＤＮＡポリメラーゼ中に、ヌクレオチドｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－４、４５０ｎｍの青色光で励起可能であるｆｆＣ（例えば、ｆｆＣ－リンカー－クマリン参照色素Ａ）、緑色光で励起可能なｆｆＴ（例えば、ｆｆＴ－リンカー－ＮＲ５５０ｓ０）及び暗色ｆｆＧを含有した。

【０２６５】

【表２】

表１．ｆｆＡ－ｓＰＡ－ＬＮ３－Ｉ－４を使用したｉＳｅｑ（商標）１００配列決定の計量（２×３００サイクル）

	フェージング	プレフェージング	エラー率（％）	Ｑ３０％	Ｑ３０％（最後の１０サイクル）
リード１	０．１１１	０．１２９	０．８１	９１．４９	７２．７５
リード２	０．１１	０．１４１	１．０１	８５．５７	５５．５６

【０２６６】

表２は、ＩｌｌｕｍｉｎａｉＳｅｑ（商標）１００機器での２×１５０サイクル及び２×３００サイクルの実行のフェージング、プレフェージング、ＰｈｉＸエラー率、及びＱ３０％の計量を示し、ｆｆＡ－ＡＯＭ－ＡＯＬ－Ｉ－４を含有する取り込み混合物で実施された。機器は、緑色励起光での第１の画像及び青色励起光での第２の画像を撮影するために設定され、その方策は、２×３００サイクルの標準的なＳＢＳサイクル（取り込み、続いて撮像、続いて開裂）を実施するために修正された。これらの実験で使用される組み

込み混合物は、５０ｍＭのグリシン緩衝液、ｐＨ９．８、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％ＣＨＡＰＳ、４ｍＭの$MgSO_4$及びＤＮＡポリメラーゼ中に、ヌクレオチドｆｆＡ－ＡＯＭ－ａＯＬ－Ｉ－４、４５０ｎｍの青色光で励起可能であり、パラジウム錯体で開裂可能なｆｆＣ、５２０ｎｍの緑色光で励起可能であり、パラジウム錯体で開裂可能なｆｆＴ、及び暗色ｆｆＧを含有した。これらの実験で使用される開裂溶液は、１００ｍＭのジエチルエタノールアミン緩衝液ｐＨ９．５、１００ｍＭのトリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン、１０ｍＭの$[AllylPdCl]_2$、１０ｍＭのアスコルビン酸ナトリウム、１ＭのＮａＣｌ、０．１％のＴｗｅｅｎ２０を含んだ。

【０２６７】

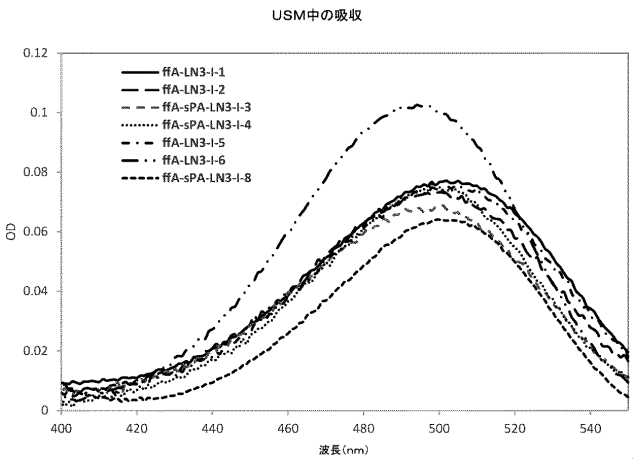
【表３】

表２．ｆｆＡ－ＡＯＭ－ＡＯＬ－Ｉ－４を使用したｉＳｅｑ（商標）１００配列決定の軽量（２×１５０及び２×３００サイクル）

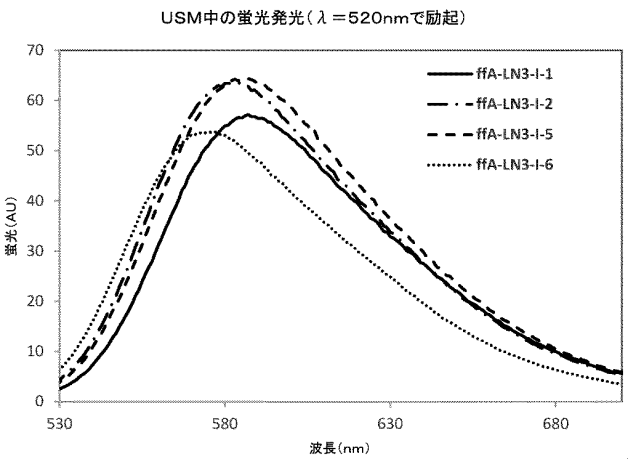
	サイクルのN	フェージング	プレフェージング	エラー率（％）	Ｑ３０％
リード１	１５０	０．１５６	０．０５９	０．５３	９２．８４
リード２	１５０	０．１９７	０．０７	０．５３	９１．１６
リード１	３００	０．１２８	０．０６４	０．７４	９３．０５
リード２	３００	０．１４２	０．０５３	０．６５	９０．９

【図面】

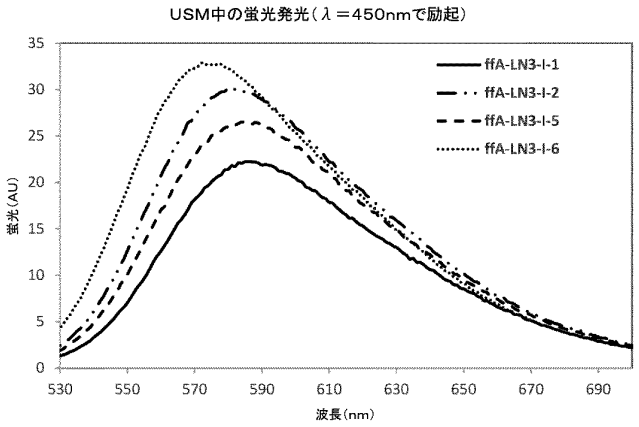
【図１】



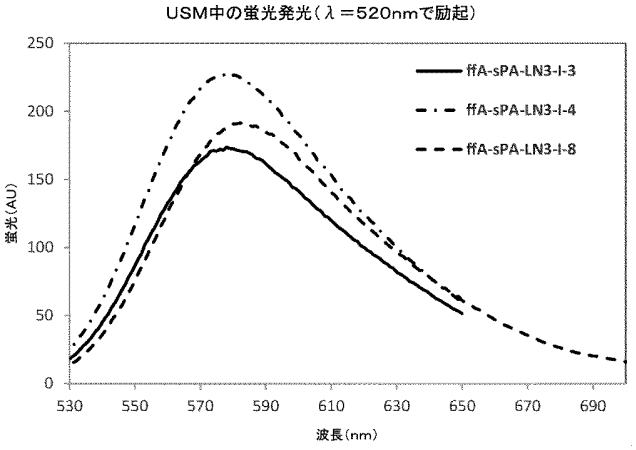
【図２Ａ】



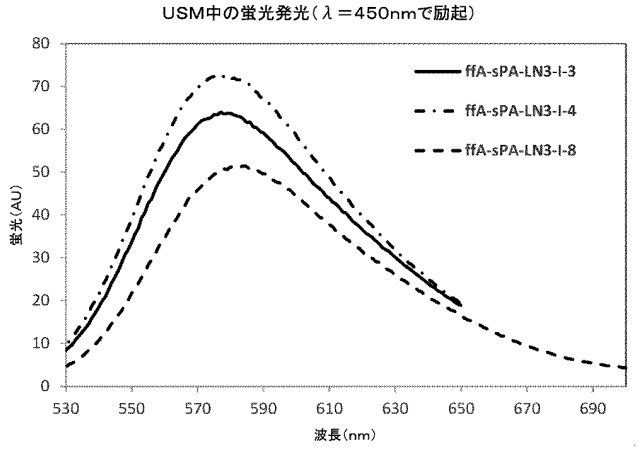
【図２Ｂ】



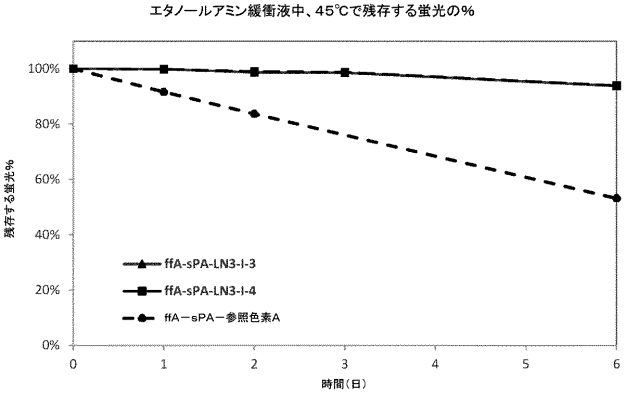
【図２Ｃ】



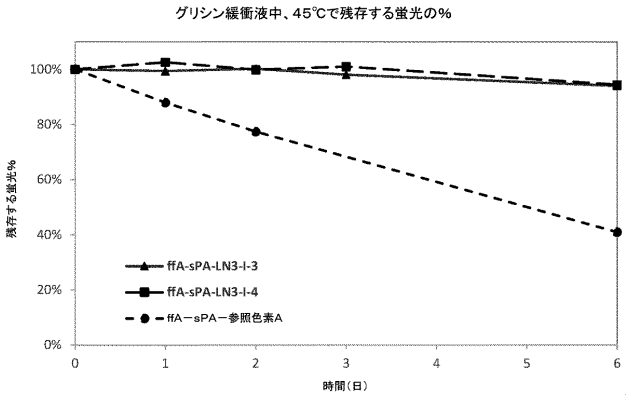
【図２Ｄ】



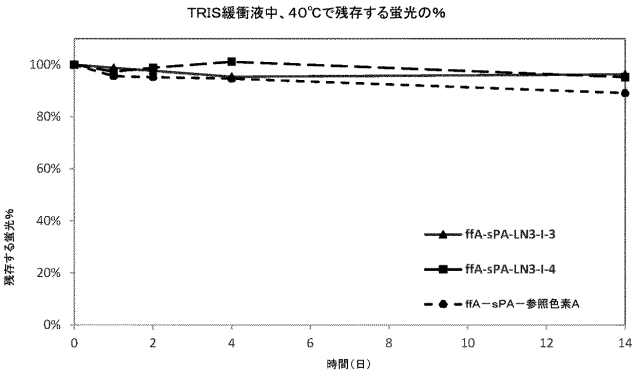
【図３Ａ】



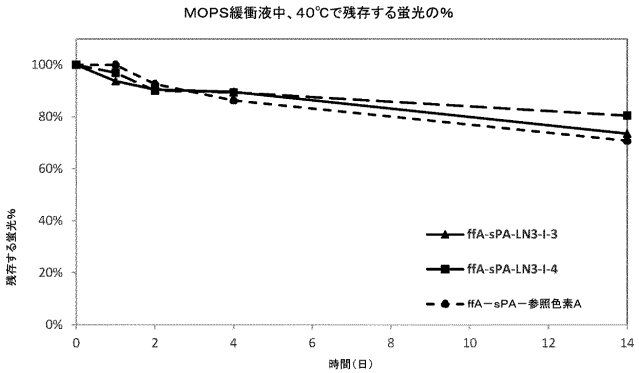
【図３Ｂ】



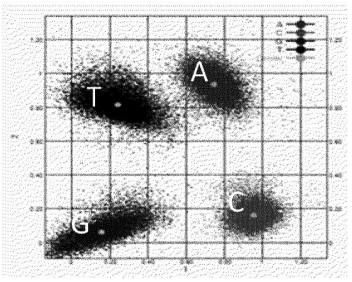
【図３Ｃ】



【図３Ｄ】

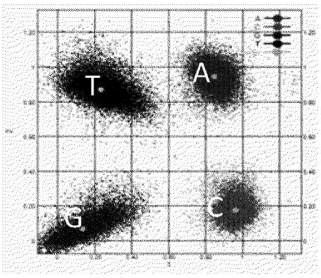


【図４Ａ】



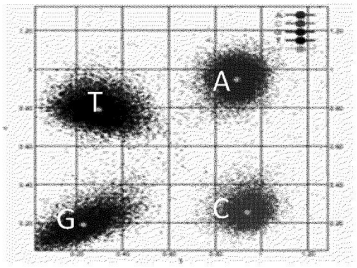
ffA-sPA-LN3-I-1

【図４Ｂ】



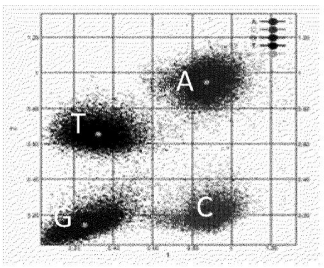
ffA-sPA-LN3-I-2

【図４Ｃ】



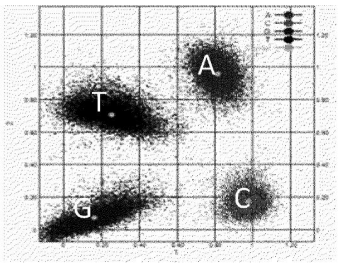
ffA-sPA-LN3-I-3

【図４Ｄ】



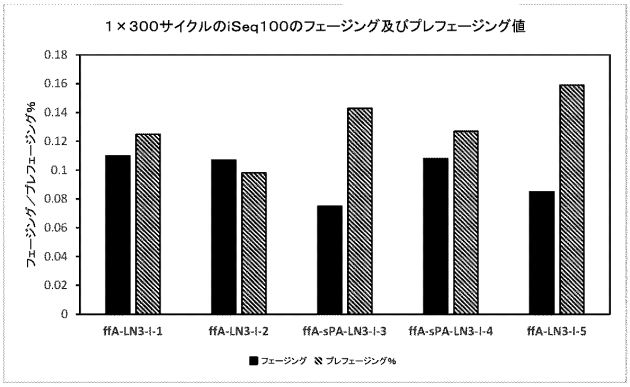
ffA-sPA-LN3-I-4

【図４Ｅ】



ffA-sPA-LN3-I-5

【図４Ｆ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/086344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C09B57/00 C07H21/00 A61K49/00 C07D457/14 G01N33/50
ADD.

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)
C07H C07D G01N A61K 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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105 504 860 B (UNIV CENTRAL SOUTH) 23 April 2019 (2019-04-23)	1-15, 17-27, 29-51
A	claim 1	16,28
A	GENG YANI ET AL: "An aqueous methylated chromenoquinoline-based fluorescent probe for instantaneous sensing of thiophenol with a red emission and a large Stokes shift", SENSORS AND ACTUATORS B: CHEMICAL, vol. 273, 17 July 2018 (2018-07-17), pages 1670-1675, XP055915647, NL ISSN: 0925-4005, DOI: 10.1016/j.snb.2018.07.088 page 1671, scheme 1	1-51

☐ 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
26 April 2022	11/05/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mezzato, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/086344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 105504860 B	23-04-2019	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07H 19/14 (2006.01)		C07H	19/14		
C09B 29/44 (2006.01)		C09B	29/44		
C12Q 1/686(2018.01)		C12Q	1/686	Z	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 フランセ，アントワーヌ

英国シービー２１・６ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 リウ，シャオハイ

英国シービー２１・６ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アビントン、グランタ・パーク１９、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

Ｆターム（参考） 4B063 QA13 QA20 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS34 QX02
4C050 AA01 AA07 AA08 BB07 CC07 CC18 DD07 DD08 DD10 EE01
EE02 FF02 GG03 GG04 HH01
4C057 AA17 BB02 CC03 DD01 LL26 LL42