

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 3 区分

【発行日】平成25年1月24日 (2013.1.24)

【公表番号】特表2011-506673(P2011-506673A)

【公表日】平成23年3月3日 (2011.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2011-009

【出願番号】特願2010-537989(P2010-537989)

【国際特許分類】

C 0 9 B 23/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 33/533 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

C 0 9 K 11/06 (2006.01)

C 0 9 B 69/10 (2006.01)

C 0 9 B 11/28 (2006.01)

C 0 9 B 57/02 (2006.01)

C 0 9 B 57/00 (2006.01)

【 F I 】

C 0 9 B 23/00 C S P L

G 0 1 N 21/64 F

G 0 1 N 21/64 C

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/574 D

C 0 9 K 11/06

C 0 9 B 69/10 B

C 0 9 B 11/28 E

C 0 9 B 57/02 A

C 0 9 B 57/00 Z

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月9日 (2011.12.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式IIの構造を有する化合物であって、

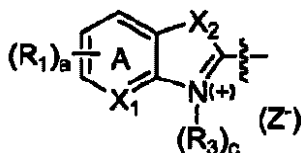
【化 1 8 4】



式II

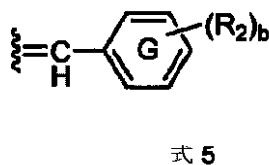
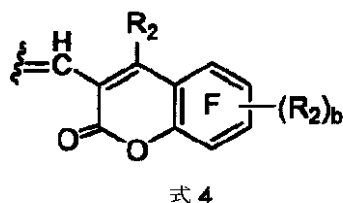
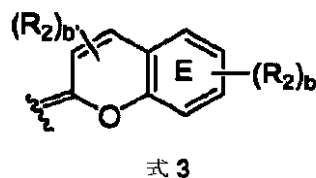
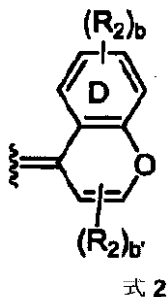
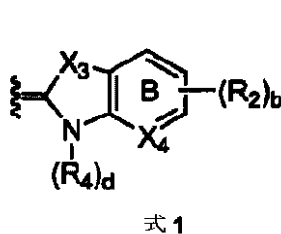
Fは、下記式の構造を有する部位であり、

【化 1 8 5】



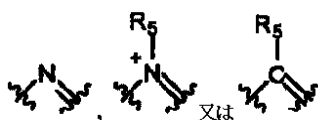
Z⁻は、正電荷又は負電荷の対イオンであり、
Yは、F及び 間で電子消失しうる架橋単位であり、
は、下記構造の1つを有する部位であって、

【化 1 8 6】



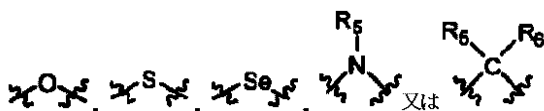
X₁ 及び X₄ は、独立に下記であり、

【化 1 8 7】



X₂ 及び X₃ は、独立に下記であり、

【化 1 8 8】



a 及び b は、独立に 0, 1, 2 又は 3 であり、

b' は、0, 1 又は 2 であり、

が式1であり、前記化合物の最大吸収波長が660nmより小さい場合、R₅ 及び R₆ は、各々独立に (R)_p-(L)_q-で、R₅ 及び R₆ は、置換環を形成するように結合せず、

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ 及び R₆ は、各々独立に (R)_p-(L)_q-であり、

前記化合物の各 (R)_p-(L)_q-の R は、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、ホスホン酸基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

前記化合物の各 (R)_p-(L)_q-の L は、各々独立に 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、約 1 ~ 100 原子を含み、

各 $(R)_p-(L)_q$ -の p は、各々独立に約1～約20の範囲の整数であり、
 R_1 又は R_2 の各 $(R)_p-(L)_q$ -の q は、各々独立に0～約20の範囲の整数であり、
 R_3, R_4, R_5, R_6 又は R_7 の各 $(R)_p-(L)_q$ -の q は、各々独立に1～約20の範囲の整数であり、

c は0又は1であり、

d は0又は1であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -の R の少なくとも1つは、反応性部位であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -の R の少なくとも1つは、水溶性高分子であり、前記水溶性高分子は、約800～約3000の範囲の分子量を有するポリアルキレンオキシドである、化合物。

【請求項2】

前記化合物は、約660nm以上、好ましくは、約660～約1250nm（端部を含む）の最大吸収を有する、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項3】

R の少なくとも1つは、スルホン酸基である、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項4】

Y は、少なくとも5つの炭素を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項5】

前記水溶性高分子が、ポリエチレングリコールを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項6】

前記少なくとも2つの水溶性高分子基、好ましくは、2つのポリエチレングリコール基、が存在する、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

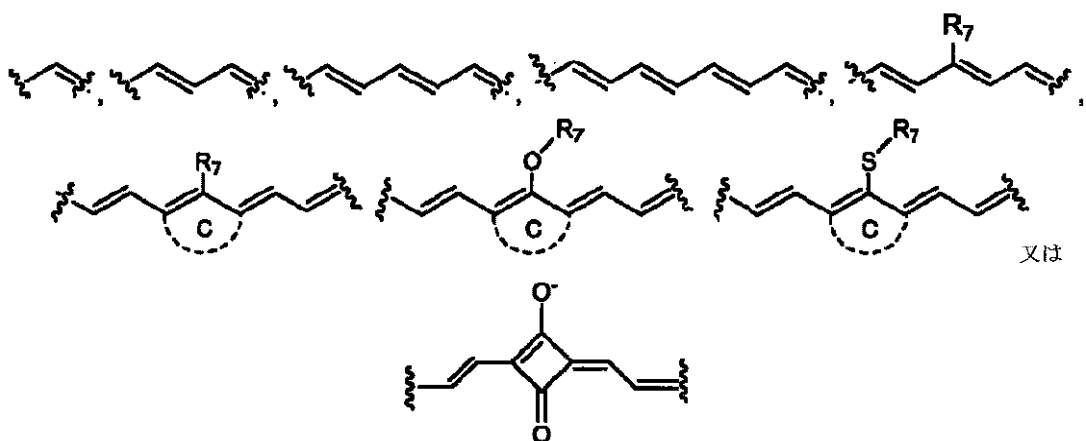
【請求項7】

少なくとも二つの隣接する R_1 及び／又は二つの隣接する R_2 が存在する場合、前記二つの隣接する R_1 及び／又は二つの隣接する R_2 は、1以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された六員環を形成するように結合し、好ましくは前記環が芳香族である、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項8】

Y が下記であって、

【化189】



C が存在する場合、 C は、五員環基又は六員環基であり、

R_7 は、 $(R)_p-(L)_q$ -であり、

各 $(R)_p-(L)_q$ -の R は、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基，アリール基，アルキルアミノ基，ジアルキルアミノ基，アルコキシ基，トリフルオロアルキル基，ハロゲン基，スルホニル基，スルホン酸基又はスルホンアミド基，

iv) -H，

前記化合物の各(R)_p-(L)_q-のLは，各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり，約1～100原子を含み，

pは，各々独立に約1～約20の範囲の整数であり，

qは，各々独立に1～約20の範囲の整数である，前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項9】

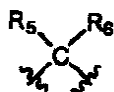
(i) R₁及びR₂のRの少なくとも1つは，荷電部位である；あるいは

(ii) R₁及びR₂のRの少なくとも1つが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む；あるいは

(iii) R₁及びR₂の各Rが，スルホン酸基又はホスホン酸基を含む；あるいは

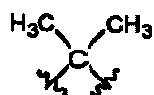
(iv) X₂及びX₃が，独立に下記

【化190】



又は

【化191】



である，

前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

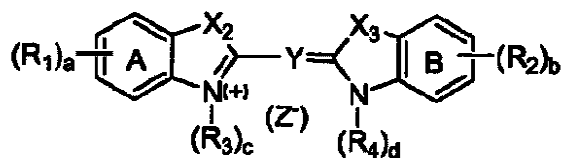
【請求項10】

二つの隣接する(R₁)_a及び結合している環A又は環B中の原子が，炭素環，好ましくは芳香族環を形成するように結合している，前記請求項のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項11】

前記化合物が，下記式を有する化合物である；

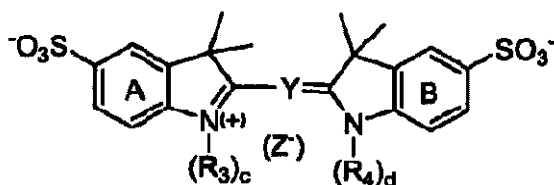
【化192】



あるいは，

前記化合物が，下記式を有する化合物であって，

【化193】

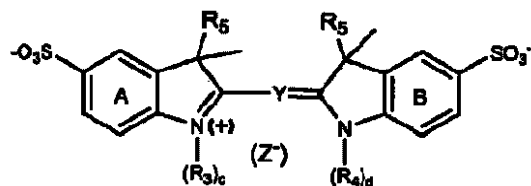


Cが1であり，dが1であり，

R₃及びR₄のRの少なくとも1つは，反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

R_3 及び R_4 の R の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である；
あるいは、

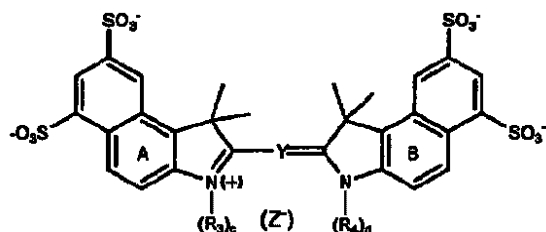
前記化合物が、下記式を有する化合物であって、
【化 1 9 4】



C が 1 であり、 d が 1 であり、
 R_3 、 R_4 及び R_5 の R の少なくとも 1 つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反
応基、

R_3 、 R_4 及び R_5 の R の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である；
あるいは、

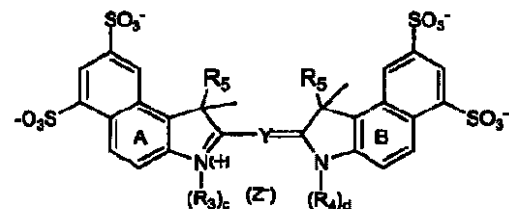
前記化合物が、下記式を有する化合物であって、
【化 1 9 5】



C が 1 であり、 d が 1 であり、
 R_3 及び R_4 の R の少なくとも 1 つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

、
 R_3 及び R_4 の R の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である；
あるいは、

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、
【化 1 9 6】



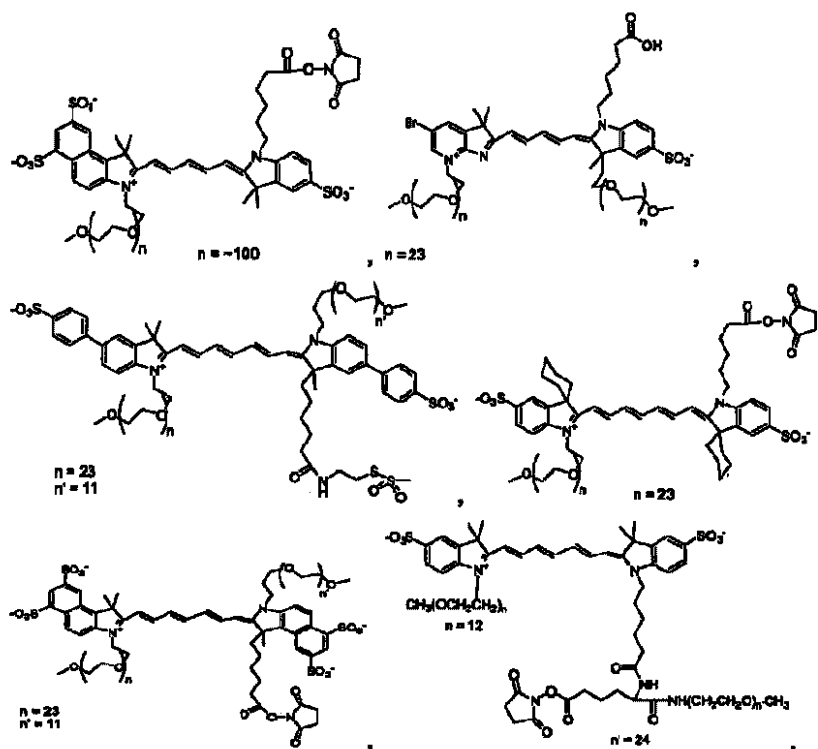
C が 1 であり、 d が 1 であり、
 R_3 、 R_4 及び R_5 の R の少なくとも 1 つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反
応基、

R_3 、 R_4 及び R_5 の R の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である；
あるいは、

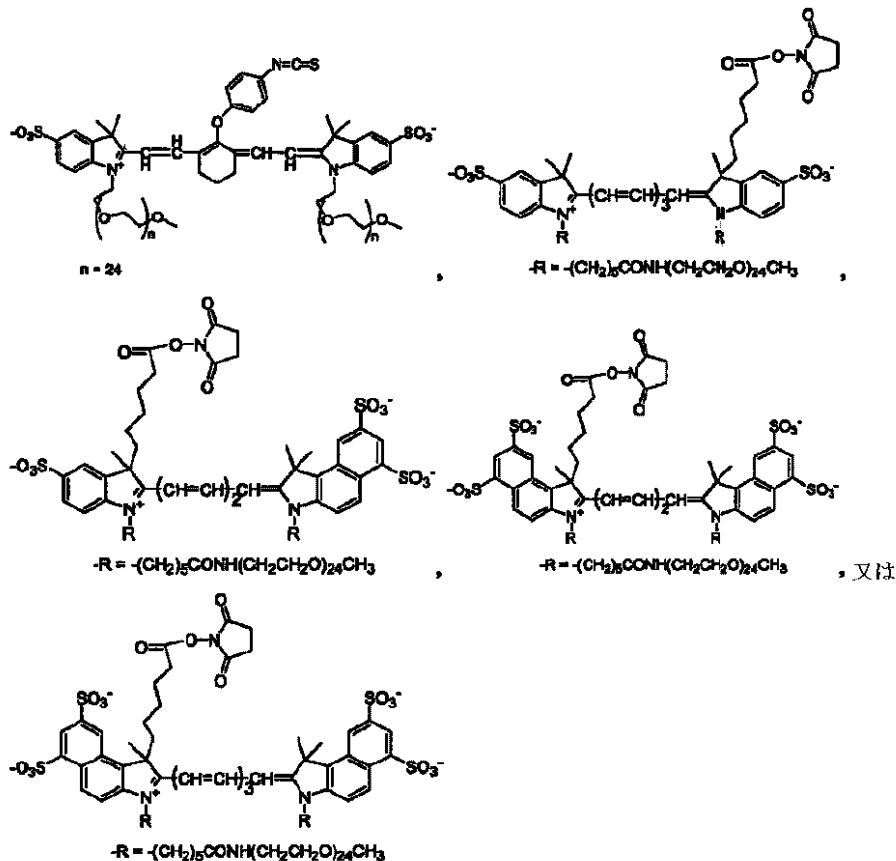
前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

R₃, R₄ 及び R₅ の R の少なくとも 1 つは, 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,

【化 1 9 8】



【化 1 9 9】



【請求項 1 3】

- i) 前記請求項のいずれか一項に記載の化合物,
 - ii) 緩衝剤,
 - iii) 接合生成物を精製する材料又は装置,
 - iv) 前記化合物の使用を説明する使用説明書,
- を含むキット。

【請求項 1 4】

前記請求項のいずれか一項に記載した式の構造を有する標識を含む生体分子, 好ましくは, ポリヌクレオチド又はポリペプチドであって, 前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が, 前記標識を前記生体分子に結合する反応を起こした生体分子。

【請求項 1 5】

前記請求項のいずれか一項に記載した式の構造を有する標識を含む免疫グロビンであって, 前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が, 前記標識を前記免疫グロビンに結合する反応を起こし, 前記免疫グロビンが, がん細胞上の抗原, 好ましくはerb2と特異的に結合する抗体である免疫グロビン。

【請求項 1 6】

前記請求項のいずれか一項に記載の化合物と基質生体分子とを, 前記化合物と前記基質生体分子間を架橋するのに十分な条件で, 反応させる工程を備える標識生体分子, 好ましくは, ポリペプチド, ポリヌクレオチド, 炭化水素, 脂質又はこれらの組合せ (前記ポリペプチドが抗体である場合を含む), の調製方法。

【請求項 1 7】

集団内で隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する, 集団内の細胞を標識する方法であって, 前記方法は, 前記生体分子が細胞を表示する結合相手と結合する標的部位を含み, 前記部位によって集団内の隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する, 細胞を前記請求項のいずれか一項に記載の生体分子と接触させる工程を備え、任意に細胞をイメージ

グする工程をさらに供え、前記イメージング工程が、i)前記細胞へ励起波長を当てる工程と、ii)前記細胞から発光された蛍光を検出する工程と、を備える、方法。

【請求項 18】

蛍光性化合物によって標識されたポリペプチドであって、前記請求項のいずれか一項に記載の化合物である蛍光性化合物を欠く対応するポリペプチドの半減期よりも短くない血清半減期を示すポリペプチド。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

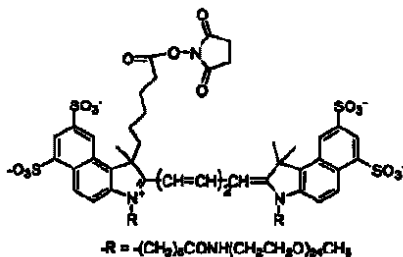
【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

【化 28】



一部の実施形態において、各錯体が、635nm又は633nmで励起される。一部の実施形態において、各錯体が、同一のタンパク質濃度で存在する。

(参照による組み込み)

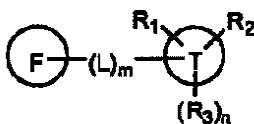
本明細書中で記載したすべての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物及び特許出願それぞれを特に個別に指摘して参照することによって本明細書に組み込むのと同じ範囲まで参照することによって本明細書に組み込む。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

式 I の化合物であって、

【化 174】



式 I

Fは、フルオロフォアであり、

Tは、1以上の化学結合で形成された結合部位であり、3以上の別個の部位と結合しており、前記結合部位が約1～100原子を含み、

m及びnは、独立に0～20の範囲の整数であり、

R₁、R₂及びR₃は、各々独立に(R)_p-(L)_q-であって、

R₁、R₂及びR₃のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1～100原子を含み、

R₁、R₂及びR₃のpは、各々1～20の範囲の整数であり、

R₁、R₂及びR₃のqは、各々0～20の範囲の整数であり、

R₁、R₂及びR₃のRは、各々独立に、

i)反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii)水溶性高分子基、

iii)アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン

酸基，ホスホン酸基又はスルホンアミド基，若しくは，

iv)-Hであって，少なくとも R_1 ， R_2 及び R_3 のR一つが反応基であり，少なくとも R_1 ， R_2 及び R_3 のR他の一つが水溶性高分子基である，式Iの化合物。

(項目2)

前記フルオロフォアが，キサントゲン色素，クマリン色素，ピレン色素又はシアニン色素である項目1に記載の化合物。

(項目3)

前記フルオロフォアが，クマリン色素である項目1に記載の化合物。

(項目4)

前記フルオロフォアが，ピレン色素である項目1に記載の化合物。

(項目5)

前記フルオロフォアが，ローダミン色素である項目1に記載の化合物。

(項目6)

前記水溶性高分子が，ポリアルキレンオキシドである項目1に記載の化合物。

(項目7)

前記水溶性高分子が，ポリエチレンオキシドである項目1に記載の化合物。

(項目8)

前記水溶性高分子が，炭化水素である項目1に記載の化合物。

(項目9)

前記水溶性高分子が，ポリペプチドである項目1に記載の化合物。

(項目10)

前記水溶性高分子が，約300Daより大きい分子量を有する項目1に記載の化合物。

(項目11)

前記水溶性高分子が，約800Daより大きい分子量を有する項目1に記載の化合物。

(項目12)

前記水溶性高分子が，約800Da～約3000Daの範囲の分子量を有する項目1に記載の化合物。

(項目13)

前記反応基が，アミノ，スルフヒドリル又はヒドロキシ求核剤と共有結合を形成する項目1に記載の化合物。

(項目14)

前記反応基が，イソチオシアネート，イソシアネート，モノクロロトリアジン，ジクロロトリアジン，ハロゲン置換ピリジン，ハロゲン置換ジアジン，ホスホラミダイト，マレイミド，アジリジン，スルホニルハライド，酸ハロゲン化物，ヒドロキシスクシンイミジルエステル，ヒドロキシスルホスクシンイミジルエステル，テトラフルオロフェノールエステル，イミドエステル，ヒドラジン，アジドニトロフェニル，アジド，アルキン，3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド，グリオキサール又はアルデヒドである項目1に記載の化合物。

(項目15)

前記化合物の最大蛍光励起波長が，約350～約1200nmの範囲である項目1に記載の化合物。

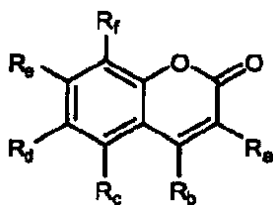
(項目16)

前記化合物の最大蛍光発光波長が，約360～約1250nmの範囲である項目1に記載の化合物。

(項目17)

前記フルオロフォアが，下記式のクマリンであって，

【化 1 7 5】



R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f が、フルオロフォアと $-(L)_m$ - 部位又は下記式の部位に結合している結合であって、

【化 1 7 6】



R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f の残った部位が、各々独立に式 $(R)_p-(L)_q$ - であって、

R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f の R が、各々独立に、

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基、ホスホン酸基又はスルホンアミド基、若しくは、

iv) -H であり、

R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f の L が各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、約 1 ~ 100 原子を含み、

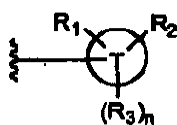
R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f の p が各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数であり、

R_a, R_b, R_c, R_d, R_e 及び R_f の q が各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数である、
項目 1 に記載の化合物。

(項目 1 8)

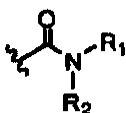
下記式が、

【化 1 7 7】



下記式を有する項目 1 7 に記載の化合物。

【化 1 7 8】



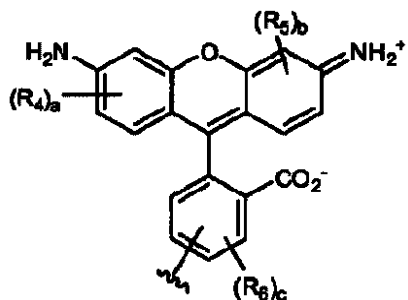
(項目 1 9)

前記フルオロフォアが、1 以上のスルホン酸基で置換されている項目 1 7 に記載の化合物。

(項目 2 0)

前記フルオロフォアが下記式の化合物であって、

【化 1 7 9】



下記式がフルオロフォアと

【化 1 8 0】

-(L)_m- 部位又は下記式の部位に結合し、

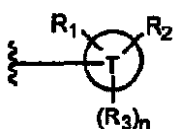
【化 1 8 1】

R₄, R₅ 及び R₆ が, 各々独立に (R)_p-(L)_q-であって,R₄, R₅ 及び R₆ の R が, 各々独立に,i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基,ii) 水溶性高分子基,iii) アルキル基, トリフルオロアルキル基, ハロゲン基, スルホニル基, スルホン酸基, ホスホン酸基又はスルホンアミド基, 若しくは,iv) -H であり,R₄, R₅ 及び R₆ の L が, 各々 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり, 約 1 ~ 100 原子を含み,R₄, R₅ 及び R₆ の p が, 各々独立に 1 ~ 20 の範囲の整数であり,R₄, R₅ 及び R₆ の q が, 各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数であり,a, b, 及び c が, 各々独立に 0, 1, 2 又は 3 である, 項目 1 に記載の化合物。

(項目 2 1)

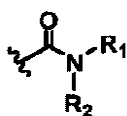
m が 0 であり, 下記式が,

【化 1 8 2】



下記式を有する項目 2 0 に記載の化合物。

【化 1 8 3】



(項目 2 2)

R₁ が, 水溶性高分子基を含み, R₂ が, 反応基を含む項目 2 1 に記載の化合物。

(項目 2 3)

R₁が、ポリエチレングリコールを含む項目 2 2 に記載の化合物。

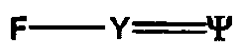
(項目 2 4)

R₂が、N-ヒドロキシこはく酸イミド基を含む項目 2 2 に記載の化合物。

(項目 2 5)

最大蛍光励起波長を有する化合物であって、前記化合物が、式IIの構造を有し、

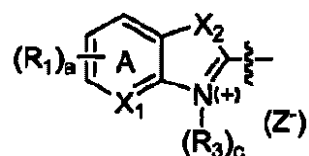
【化 1 8 4】



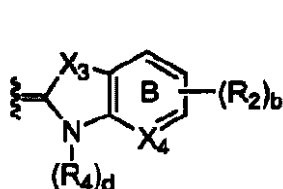
式II

Fは、下記式の構造を有する部位であり、

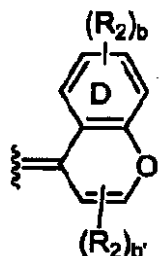
【化 1 8 5】

Z⁻は、対イオンであり、Yは、F及び 間で電子消失しうる架橋単位であり、は、下記構造の 1 つを有する部位であって、

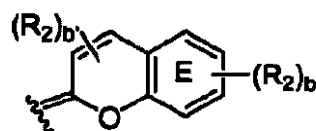
【化 1 8 6】



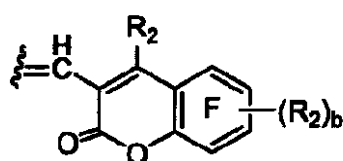
式 1



式 2



式 3



式 4



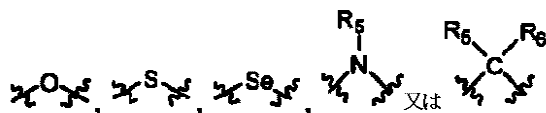
式 5

X₁及びX₄は、独立に下記であり、

【化 1 8 7】

X₂及びX₃は、独立に下記であり、

【化 1 8 8】



a及びbは、独立に 0, 1, 2 又は 3 であり、

b' は、0, 1 又は 2 であり、

が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nmより小さい場合、 R_5 及び R_6 は、各々独立に $(R)_p-(L)_q$ -で、 R_5 及び R_6 は、置換環を形成するように結合せず、

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 及び R_6 は、各々独立に $(R)_p-(L)_q$ -であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -のLは、各々独立に 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり、約 1 ~ 100 原子を含み、

各 $(R)_p-(L)_q$ -のpは、各々独立に約 1 ~ 約 20 の範囲の整数であり、

R_1 又は R_2 の各 $(R)_p-(L)_q$ -のqは、各々独立に 0 ~ 約 20 の範囲の整数であり、

R_3, R_4, R_5, R_6 又は R_7 の各 $(R)_p-(L)_q$ -のqは、各々独立に 1 ~ 約 20 の範囲の整数であり、

cは 0 又は 1 であり、

dは 0 又は 1 であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -のRの少なくとも 1 つは、反応性部位であり、

前記化合物の各 $(R)_p-(L)_q$ -のRの少なくとも 1 つは、水溶性高分子である、化合物。

(項目 2 6)

少なくとも二つの隣接する R_1 及び / 又は二つの隣接する R_2 が存在する場合、前記二つの隣接する R_1 及び / 又は二つの隣接する R_2 は、1 以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された六員環を形成するように結合している項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 2 7)

前記二つの隣接する R_1 及び / 又は二つの隣接する R_2 は、六員環を形成するように結合している場合、形成された環が芳香族である項目 2 6 に記載の化合物。

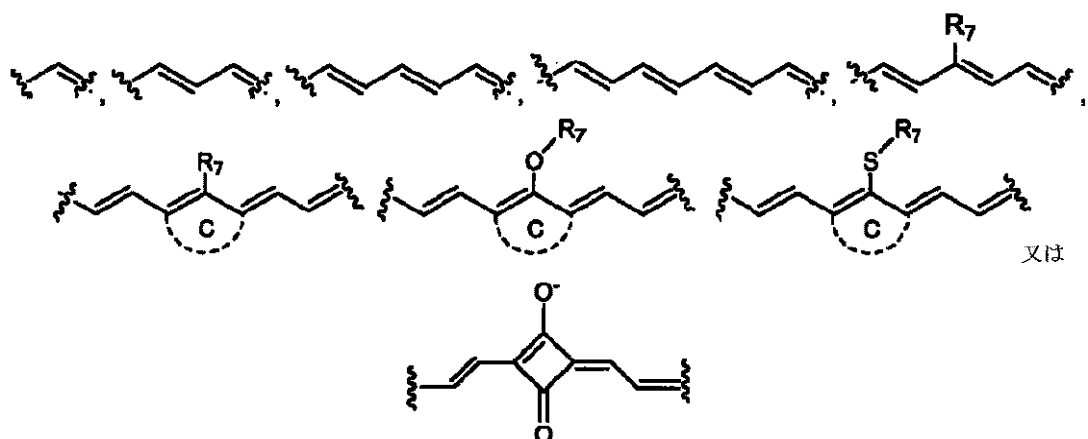
(項目 2 8)

が式1であり、前記化合物の最大蛍光励起波長が660nm以上である、又は が式1以外である場合、 R_5 及び R_6 は、各々独立に $(R)_p-(L)_q$ -、又は R_5 及び R_6 は、1 以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された環状部位を形成するように結合している項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 2 9)

Yが下記であって、

【化 1 8 9】



Cが存在する場合、Cは、五員環基又は六員環基であり、

R₇は、(R)_p-(L)_q-であり、

各(R)_p-(L)_q-のRは、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、アリール基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルコキシ基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、スルホニル基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv) -H、

前記化合物の各(R)_p-(L)_q-のLは、各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり、約1～100原子を含み、

pは、各々独立に約1～約20の範囲の整数であり、

qは、各々独立に1～約20の範囲の整数である、項目25に記載の化合物。

(項目30)

R₁及びR₂のRの少なくとも1つは、荷電部位である項目25に記載の化合物。

(項目31)

R₁及びR₂のRの少なくとも1つが、スルホン酸基又はホスホン酸基を含む項目25に記載の化合物。

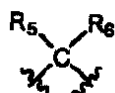
(項目32)

R₁及びR₂の各Rが、スルホン酸基又はホスホン酸基を含む項目25に記載の化合物。

(項目33)

X₂及びX₃が、独立に下記である項目25に記載の化合物。

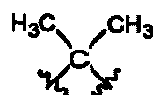
【化 1 9 0】



(項目34)

X₂及びX₃が、独立に下記である項目25に記載の化合物。

【化 1 9 1】



(項目 3 5)

前記水溶性高分子が、ポリアルキレンオキシドである項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 3 6)

前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキシドである項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 3 7)

前記水溶性高分子が、約300より大きい分子量を有する項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 3 8)

前記水溶性高分子が、約800より大きい分子量を有する項目 2 5 に記載の化合物。

(項目 3 9)

前記水溶性高分子が、約800～約3000の範囲の分子量を有する項目 2 5 に記載の化合物

。

(項目 4 0)

二つの隣接する $(R_1)_a$ 及び結合している環A中の原子が、炭素環を形成するように結合している項目 2 6 に記載の化合物。

(項目 4 1)

前記炭素環が、芳香族である項目 4 0 に記載の化合物。

(項目 4 2)

二つの隣接する $(R_2)_b$ 及び結合している環B中の原子が、炭素環を形成するように結合している項目 2 6 に記載の化合物。

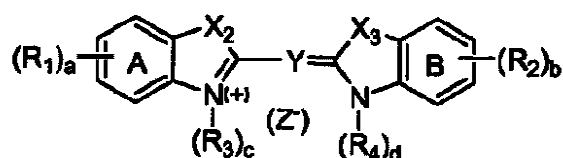
(項目 4 3)

前記炭素環が、芳香族である項目 4 2 に記載の化合物。

(項目 4 4)

前記化合物が、下記式を有する項目 2 5 に記載の化合物。

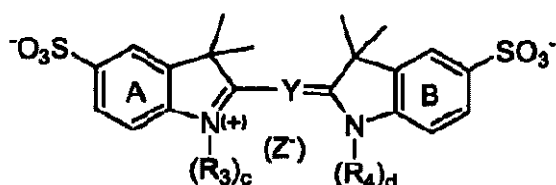
【化 1 9 2】



(項目 4 5)

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 3】



Cが1であり、dが1であり、

R_3 及び R_4 のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

。

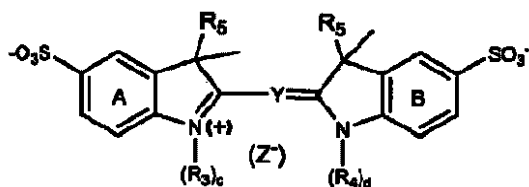
R_3 及び R_4 のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である、項目 2 5 に記載の化合物

。

(項目 4 6)

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 4】



Cが1であり、dが1であり、

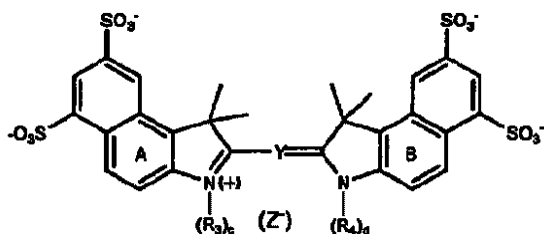
R_3 、 R_4 及び R_5 のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

R_3 、 R_4 及び R_5 のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である、項目25に記載の化合物。

(項目47)

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 5】



Cが1であり、dが1であり、

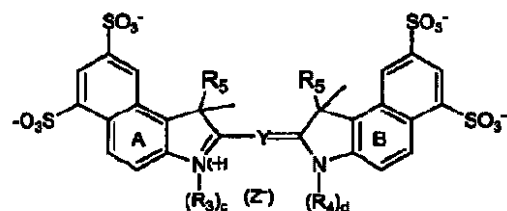
R_3 及び R_4 のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基

R_3 及び R_4 のRの少なくとも1つは、水溶性高分子基である、項目25に記載の化合物

(項目48)

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 6】



Cが1であり、dが1であり、

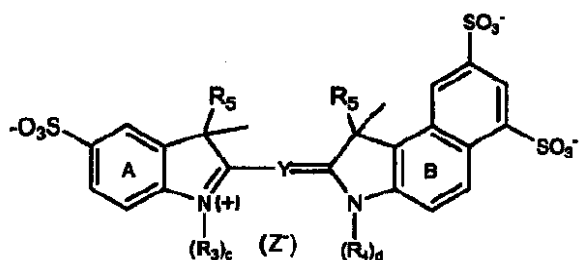
R_3 、 R_4 及び R_5 のRの少なくとも1つは、反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

R_3 、 R_4 及び R_5 のRの少なくとも1つは、水溶性高分子である、項目25に記載の化合物。

(項目49)

前記化合物が、下記式を有する化合物であって、

【化 1 9 7】



Cが1であり，dが1であり，

R₃，R₄及びR₅のRの少なくとも1つは，反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基，

R₃，R₄及びR₅のRの少なくとも1つは，水溶性高分子である，項目25に記載の化合物。

(項目50)

前記化合物の最大蛍光励起波長が，約350～約1200nmの範囲である項目25に記載の化合物。

(項目51)

前記化合物の最大蛍光発光波長が，約360～約1250nmの範囲である項目25に記載の化合物。

(項目52)

前記水溶性高分子が，ポリアルキレンオキシドである項目25に記載の化合物。

(項目53)

前記水溶性高分子が，ポリエチレンオキシドである項目25に記載の化合物。

(項目54)

前記水溶性高分子が，炭化水素である項目25に記載の化合物。

(項目55)

前記水溶性高分子が，ポリペプチドである項目25に記載の化合物。

(項目56)

前記水溶性高分子が，約300より大きい分子量を有する項目25に記載の化合物。

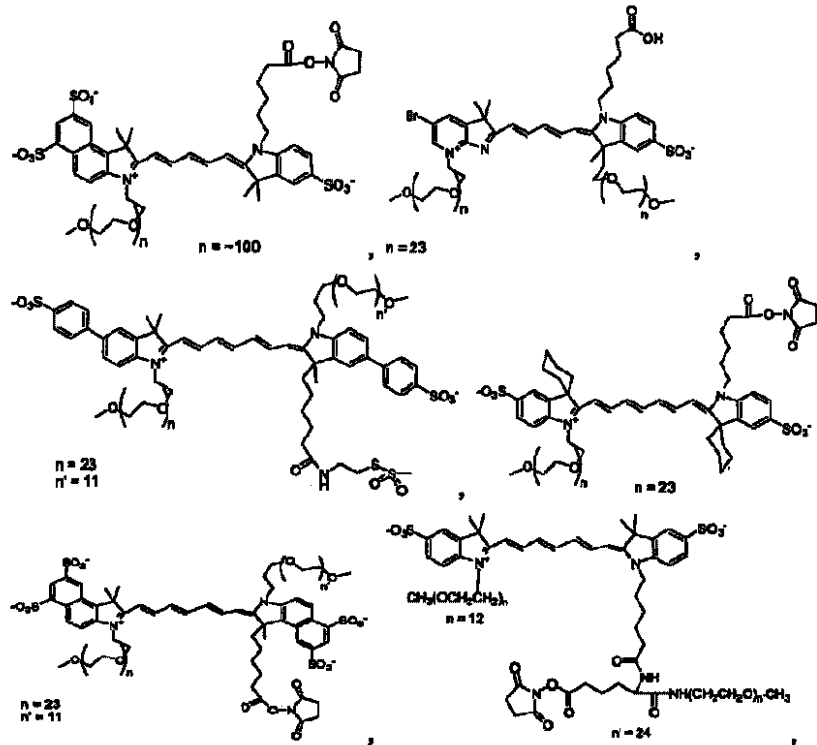
(項目57)

前記水溶性高分子が，約800より大きい分子量を有する項目25に記載の化合物。

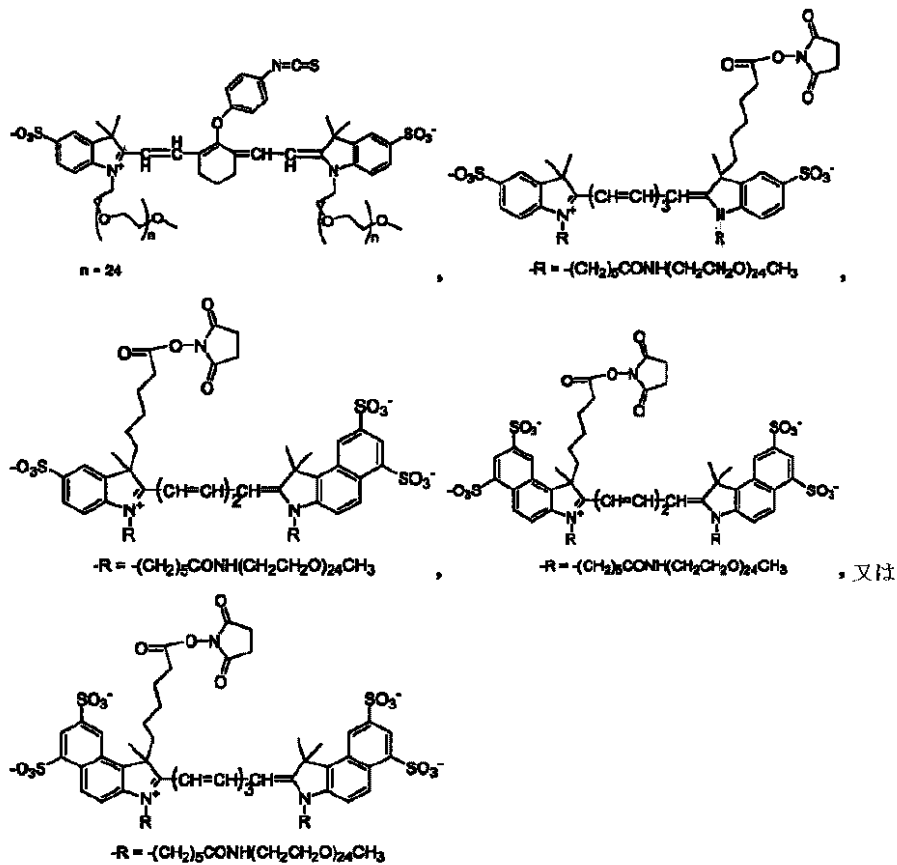
(項目58)

前記化合物が，下記である項目25に記載の化合物。

【化 1 9 8】



【化 1 9 9】



(項 目 5 9)

シアニン色素の最大蛍光励起波長が660nm以上である，反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。

(項目 6 0)

シアニン色素の最大吸収波長が660nm以上である，反応基及び1以上の水溶性高分子基を含む置換シアニン色素。

(項目 6 1)

前記色素が，非スピロ部位によって置換されている項目 5 9 又は 6 0 に記載の置換シアニン色素。

(項目 6 2)

結合剤が標的ポリペプチドに選択的に結合して錯体を形成し，該錯体の形成によって蛍光の信号雑音比が少なくとも100となる項目 5 9 又は 6 0 の置換シアニン色素で標識された結合剤。

(項目 6 3)

前記置換シアニン色素が，非スピロ置換基によって置換されている項目 6 2 に記載の結合剤。

(項目 6 4)

前記結合剤が，ポリペプチドである項目 6 2 に記載の結合剤。

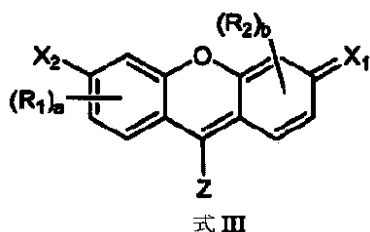
(項目 6 5)

前記ポリペプチドが，抗体である項目 6 3 に記載の結合剤。

(項目 6 6)

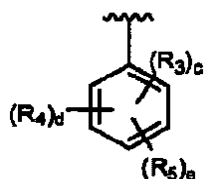
式 III の化合物であって，

【化 2 0 0】



Zが，-H，アルキル，-CF₃，-CN又は下記式のラジカルであり，

【化 2 0 1】



X₁が，=O，=NH₂⁺又は=NR₆R₇⁺であり，

X₂が，-OH，-NH₂又は-NR₈R₉であり，

R₁，R₂，R₃，R₄，R₅，R₆，R₇，R₈及びR₉は，各々独立に(R)_p-(L)_q-であり，

R₁，R₂，R₃，R₄，R₅，R₆，R₇，R₈及びR₉のRは，各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基，

ii) 水溶性高分子基，

iii) アルキル基，トリフルオロアルキル基，ハロゲン基，スルホン酸基又はスルホンアミド基，

iv) -H，

R₁，R₂，R₃，R₄，R₅，R₆，R₇，R₈及びR₉のLは，各々独立に1以上の化学結合で形成された連結部位であり，約1～100原子を含み，

R₁，R₂，R₃，R₄，R₅，R₆，R₇，R₈及びR₉のpは，各々独立に1～20の範囲の整数であり，

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ 及び R_9 の q は、各々独立に 0 ~ 20 の範囲の整数であり、

a, b, c, d 及び e は、各々独立に 0, 1, 2, 3 又は 4 であり、

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ 及び R_9 の R の少なくとも 1 つは、反応性部位であり、

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ 及び R_9 の R の少なくとも 1 つは、水溶性高分子基である、化合物。

(項目 67)

R_6, R_7, R_8 及び R_9 の少なくとも 1 つが、1 以上の $(R)_p-(L)_q$ -により置換されない又は置換された 5 員環又は 6 員環を形成するように、隣接する R_1 又は R_2 及び隣接する R_1 又は R_2 が結合しているいずれかの環中の介在原子と結合可能である項目 66 に記載の化合物。

(項目 68)

前記 R_6, R_7, R_8 及び R_9 の少なくとも 1 つ及び隣接する R_1 又は R_2 が、5 員環又は 6 員環を形成するように、結合可能である場合、前記環が不飽和である項目 67 に記載の化合物。

(項目 69)

前記 R_6, R_7, R_8 及び R_9 の少なくとも 1 つ及び隣接する R_1 又は R_2 が、5 員環又は 6 員環を形成するように、結合可能である場合、前記環が飽和である項目 67 に記載の化合物。

(項目 70)

X_1 が、 $=NH_2^+$ である項目 66 に記載の化合物。

(項目 71)

X_1 が、 $=O$ である項目 66 に記載の化合物。

(項目 72)

X_2 が、 $-OH$ である項目 66 に記載の化合物。

(項目 73)

X_2 が、 $-NH_2$ である項目 66 に記載の化合物。

(項目 74)

前記化合物の最大蛍光励起波長が、約 450 ~ 約 750nm の範囲である項目 66 に記載の化合物。

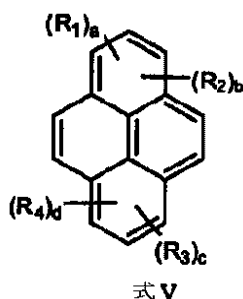
(項目 75)

前記化合物の最大蛍光発光波長が、約 470 ~ 約 800nm の範囲である項目 66 に記載の化合物。

(項目 76)

式 V の化合物であって、

【化 202】



R_1, R_2, R_3 及び R_4 は、各々独立に $(R)_p-(L)_q$ -であり、

R_1, R_2, R_3 及び R_4 の R は、各々独立に

i) 反応性基質と反応し共有結合を形成可能な反応基、

ii) 水溶性高分子基、

iii) アルキル基、トリフルオロアルキル基、ハロゲン基、ホスホン酸基、スルホン酸基又はスルホンアミド基、

iv)-H,

R₁, R₂, R₃及びR₄のLは, 各々独立に 1 以上の化学結合で形成された連結部位であり, 約 1 ~ 1 0 0 原子を含み,

R₁, R₂, R₃及びR₄のpは, 各々独立に 1 ~ 2 0 の範囲の整数であり,

R₁, R₂, R₃及びR₄のqは, 各々独立に 0 ~ 2 0 の範囲の整数であり,

a, b, c及びdは, 各々独立に 0, 1, 2 又は 3 であり,

R₁, R₂, R₃及びR₄のRの少なくとも 1 つは, 反応性部位であり,

R₁, R₂, R₃及びR₄のRの少なくとも 1 つは, 水溶性高分子基である, 化合物。

(項目 7 7)

i) 項目 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載の化合物, ii) 緩衝剤, iii) 接合生成物を精製する材料又は装置, iv) 前記化合物の使用を説明する使用説明書, を含むキット。

(項目 7 8)

項目 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載した式の構造を有する標識を含む生体分子であって, 前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が, 前記標識を前記生体分子に結合する反応を起こした生体分子。

(項目 7 9)

前記生体分子が, ポリヌクレオチドを含む項目 7 8 に記載した標識を含む生体分子。

(項目 8 0)

前記生体分子が, ポリペプチドを含む項目 7 8 に記載した標識を含む生体分子。

(項目 8 1)

前記ポリペプチドが, 更に抗原結合部位を含む項目 8 0 に記載の生体分子。

(項目 8 2)

前記ポリペプチドが, 完全免疫グロブリンである項目 8 0 に記載の生体分子。

(項目 8 3)

前記ポリペプチドが, Fabフラグメントである項目 8 0 に記載の生体分子。

(項目 8 4)

項目 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載した式の構造を有する標識を含む免疫グロビンであって, 前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が, 前記標識を前記免疫グロビンに結合する反応を起こし, 前記免疫グロビンが, がん細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である免疫グロビン。

(項目 8 5)

前記抗体が, erb2と結合する項目 8 4 に記載の免疫グロビン。

(項目 8 6)

項目 1, 2 5, 5 9, 6 0, 6 6 又は 7 6 に記載の化合物と基質生体分子とを, 前記化合物と前記基質生体分子間を架橋するのに十分な条件で, 反応させる工程を備える標識生体分子の調製方法。

(項目 8 7)

前記基質生体分子が, ポリペプチド, ポリヌクレオチド, 炭化水素, 脂質又はこれらの組合せである項目 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記基質生体分子が, ポリヌクレオチドである項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

集団内で隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する, 集団内の細胞を標識する方法であって, 前記方法は, 前記生体分子が細胞を表示する結合相手と結合する標的部位を含み, 前記部位によって集団内の隣接細胞に関連した細胞を特異的に標識する, 細胞を項目 7 8 に記載の生体分子と接触させる工程を備える方法。

(項目 9 0)

さらに細胞をイメージングする工程を供える方法であって,

前記イメージング工程が,

i)細胞へ励起波長を当てる工程と，

ii)細胞から発光された蛍光を検出する工程と，
を備える項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

インビトロで標識が起こる項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 2)

インビボで標識が起こる項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 3)

ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が685nm以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリン。

(項目 9 4)

ポリアルキレンオキシド及び最大吸収波長が750nm以上であるフルオロフォアを含む蛍光性化合物によって標識された免疫グロブリン。

(項目 9 5)

前記免疫グロブリンが，前記蛍光性化合物との接合における標的への結合特異性を保持する項目 9 3 又は 9 4 に記載の免疫グロブリン。

(項目 9 6)

前記免疫グロブリンが，がん細胞上の抗原と特異的に結合する抗体である項目 9 5 に記載の免疫グロブリン。

(項目 9 7)

前記抗体が，erb2と結合する項目 9 6 に記載の免疫グロブリン。

(項目 9 8)

前記蛍光性化合物が，項目 1，2 5，5 9，6 0 又は 6 6 に記載の化合物である項目 9 3 又は 9 4 に記載の免疫グロブリン。

(項目 9 9)

蛍光性化合物によって標識されたポリペプチドであって，項目 1，2 5，5 9，6 0，6 6 又 7 6 に記載の化合物である蛍光性化合物を欠く対応するポリペプチドの半減期よりも短くない血清半減期を示すポリペプチド。

(項目 1 0 0)

前記ポリペプチド及び結合剤を含む錯体の形成工程を備えるポリペプチドの標識方法であって，前記結合剤が，項目 1，2 5，5 9，6 0，6 6 又は 7 6 に記載した式の構造を有する蛍光標識を含み，前記式の前記少なくとも 1 つの反応性部位が，前記標識を前記結合剤に結合する反応を起こしたポリペプチドの標識方法。

(項目 1 0 1)

前記結合剤が抗体である項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記錯体が，(a) 前記ポリペプチドと結合する一次抗体，及び，(b) 二次抗体に対する結合能力を示して二次抗体として機能する結合剤を含む項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

標識が，固体基質上で起こる項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

ポリペプチドを細胞内で標識する項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記錯体が，約100より大きい信号雑音比を生成する方法であって，前記信号雑音比が，下記式によって算出される項目 1 0 2 に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド，アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

(項目 1 0 6)

前記錯体が，約250より大きい信号雑音比を生成する方法であって，前記信号雑音比が，下記式によって算出される項目 1 0 2 に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

(項目107)

前記錯体が、約270より大きい信号雑音比を生成する方法であって、前記信号雑音比が、下記式によって算出される項目102に記載の方法。

(順次結合剤と結合する一次抗体によって結合したポリペプチドを含む錯体からの蛍光信号)/(ポリペプチド、アイソタイプ対照一次抗体及び結合剤の混合物からの蛍光信号)

(項目108)

前記錯体が、標識度がDyLight 680(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する項目102に記載の方法。

(項目109)

前記錯体が、標識度がCy5.5(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する項目102に記載の方法。

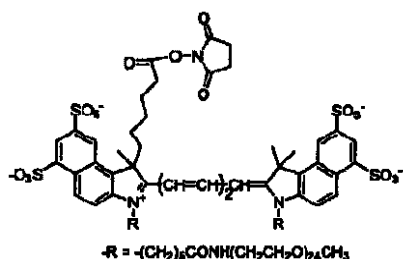
(項目110)

前記錯体が、標識度がAlexa Fluor 680(登録商標)色素に匹敵する、同一の一次抗体及び同一の二次抗体により形成された錯体によって生成した全蛍光信号より少なくとも5%より大きい全蛍光信号を生成する項目102に記載の方法。

(項目111)

項目25に記載した式の構造を有する前記標識が、下記構造を有する化合物である項目108、109、110のいずれか一項に記載の方法。

【化203】



(項目112)

各錯体が、635nm又は633nmで励起される項目111に記載の方法。

(項目113)

各錯体が、同一タンパク質濃度で存在する項目111に記載の方法。