

【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 17 年 9 月 2 日 (2005.9.2)

【公開番号】特開 2004-43819 (P2004-43819A)
 【公開日】平成 16 年 2 月 12 日 (2004.2.12)
 【年通号数】公開・登録公報 2004-006
 【出願番号】特願 2003-288285 (P2003-288285)
 【国際特許分類第 7 版】

C 0 9 B 11/28
 C 0 7 D 405/14
 C 0 7 D 491/16
 C 0 9 K 11/06
 C 0 9 K 11/07
 // C 1 2 Q 1/68

【F I】

C 0 9 B 11/28 N
 C 0 7 D 405/14
 C 0 7 D 491/16
 C 0 9 K 11/06
 C 0 9 K 11/07
 C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】
 【提出日】平成 17 年 5 月 2 日 (2005.5.2)
 【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】

エネルギー転移色素であって、以下：

第 1 の波長で光を吸収して、そしてそれに対する励起エネルギーを放出するキサンテン
 ドナー色素；

該ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収して、それに対する第 2 の波長
 で蛍光を発する、4 , 7 - ジクロロロダミンアクセプター色素；および

該 4 , 7 - ジクロロロダミンアクセプター色素の環における 5 位もしくは環における
 6 位に該ドナー色素の環における 4 ' 位を結合させるリンカー
 を含む、
 エネルギー色素。

【請求項 2】

前記ドナー色素がフルオロセイン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のエネルギー転移色素であって、ここで、前記リンカーが、以下：
 アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 5 員環、少なくとも
 1 つの不飽和結合を有する 6 員環、縮合環構造を含む、エネルギー転移色素。

【請求項 4】

前記エネルギー転移色素を別の基質に結合させるのに適した連結基をさらに含む、請求項
 1 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 5】

前記連結基が、前記ドナー色素の環における 5 位または環における 6 位に結合する、請求項 4 に記載のエネルギー転移色素。

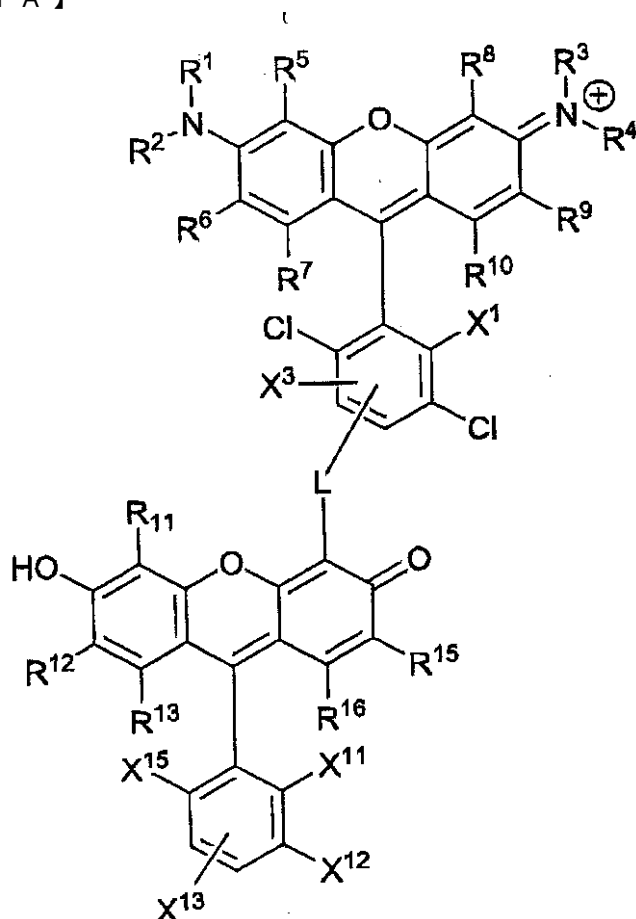
【請求項 6】

前記連結基が、前記 4, 7 - ジクロロローダミンアクセプター色素の 4' 位に結合する、請求項 4 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のエネルギー転移色素であって、以下の構造：

【化 1 A】



を備え、ここで、

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の各々は、互いに独立して、水素およびアルキルから選択されるか、あるいは、 R^1 および R^5 、 R^2 および R^6 、 R^3 および R^8 、ならびに / または R^4 および R^9 は、それらが結合している原子と一緒にあって、5 員環、6 員環または 7 員環を形成し；

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 および R^{10} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、また、あるいは、 R^6 および R^7 ならびに / または R^9 および R^{10} は、それらが結合している原子と一緒にあって、ベンゾ基を形成し得；

R^8 は、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、置換フェニルおよび連結基から選択され、

X^1 および X^3 の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カル

ボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され、

L は、該ドナー色素と該アクセプター色素を連結するリンカーであり；

$R^{1\ 1}$ 、 $R^{1\ 2}$ 、 $R^{1\ 3}$ 、 $R^{1\ 5}$ 、および $R^{1\ 6}$ の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択されるか、また、あるいは、 $R^{1\ 2}$ および $R^{1\ 3}$ ならびに / または $R^{1\ 5}$ および $R^{1\ 6}$ は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

$X^{1\ 1}$ 、 $X^{1\ 2}$ 、および $X^{1\ 5}$ の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され得；

$X^{1\ 3}$ は、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、および連結基から選択される、エネルギー転移色素。

【請求項 8】

前記 4，7 - ジクロロロダミンアクセプター色素が、DR110 - 2、DR6G - 2、DTMR および DROX から選択される、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 9】

試薬およびエネルギー転移色素を含む蛍光標識試薬であって、該エネルギー転移色素が、以下：

第1の波長で光を吸収して、そしてそれに対する励起エネルギーを放出し得るキサントドナー色素；

該ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収して、それに対する第2の波長で蛍光を発する、4，7 - ジクロロロダミンアクセプター色素；および

該4，7 - ジクロロロダミンアクセプター色素の環における5位または環における6位に該ドナー色素の環における4'位を結合させるリンカーを含む、蛍光標識試薬。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の蛍光標識試薬であって、ここで、前記試薬が、タンパク質、ポリペプチド、ポリサッカリド、ヌクレオシドまたはヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、脂質、固体支持体ならびに有機ポリマーおよび無機ポリマーからなる群より選択される、蛍光標識色素。

【請求項 11】

前記試薬が、ヌクレオシドまたはヌクレオチドである、請求項 10 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチドであって、ここで、前記エネルギー転移試薬が、前記ドナー色素の環における5位もしくは環における6位でヌクレオシドまたはヌクレオチドの核酸塩基に結合するか、または前記4，7 - ジクロロロダミンアクセプター色素の4'位に共有結合する、蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチドであって、ここで、前記エネルギー転移色素が、アセチレンアミド結合またはアルケンアミド結合によって、該ヌクレオシドまたはヌクレオチドの核酸塩基に共有結合する、蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチドであって、ここで

、アセチレンアミド結合またはアルケンアミド結合が、 $-C \equiv C-CH_2-NH-C(O)-$ 、 $3-アミノ-1-プロピン-1-イル$ 、 $-C \equiv C-CH_2-NH-C(O)-(CH_2)_5-C(O)-$ 、 $-C \equiv CH-C(O)-NH-(CH_2)_5-NH-C(O)-$ および $-C \equiv C-CH_2-O-CH_2-CH_2-NR-$ 、ここで、Rは水素、保護基、またはアルキルである、蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 15】

前記ドナー色素がフルオロセインである、請求項 11 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 16】

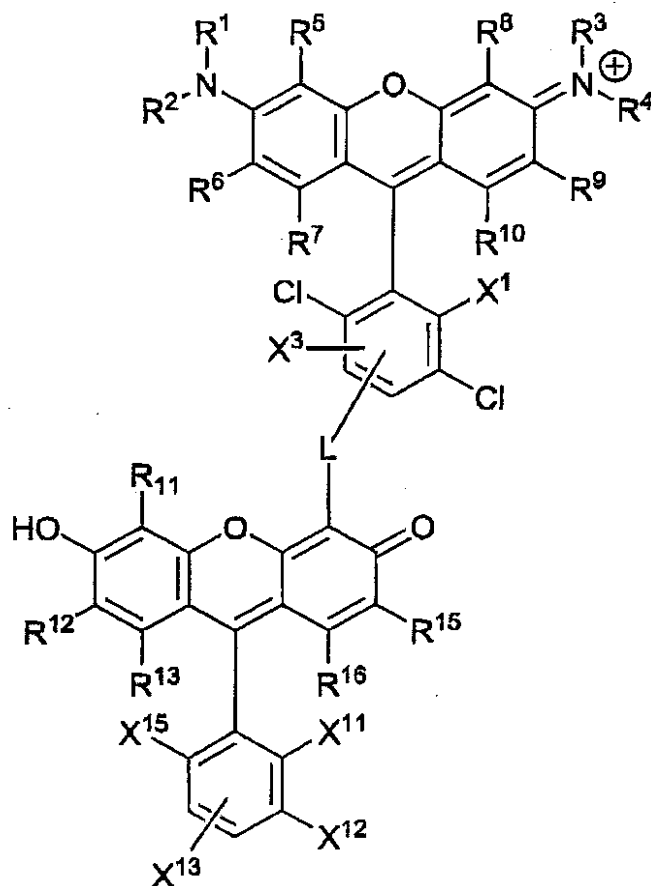
請求項 11 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチドであって、ここで、前記リンカーが、以下：

アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 5 員環、および少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 6 員環、縮合環構造を含む、
 蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチドであって、前記エネルギー転移色素は、以下の構造：

【化 1 B】



を備え、ここで、

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の各々は、互いに独立して、水素およびアルキルから選択されるか、あるいは、 R^1 および R^5 、 R^2 および R^6 、 R^3 および R^8 、ならびに / または R^4 および R^9 は、それらが結合している原子と一緒にあって、5 員環、6 員環または 7 員環を形成し；

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 および R^{10} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、また、あるいは、 R^6 および R^7 ならびに / または R^9 および R^{10} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

R^8 は、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、

X^1 および X^3 の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され、

L は、該ドナー色素と該アクセプター色素を連結するリンカーであり；

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 、および R^{16} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択されるか、また、あるいは、 R^{12} および R^{13} ならびに / または R^{15} および R^{16} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

X^{11} 、 X^{12} 、 X^{13} および X^{15} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され得；

R^8 または X^{13} は、該ヌクレオシドまたはヌクレオチドへの結合を含む、
蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 18】

前記ヌクレオシド / またはヌクレオチドが、2' - デオキシリボヌクレオシドである、請求項 11 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 19】

前記ヌクレオシド / またはヌクレオチドが、2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 11 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 20】

前記 2' - デオキシリボヌクレオチドが、2' - デオキシリボヌクレオシド - 5' - トリホスフェートである、請求項 19 に記載の蛍光標識ヌクレオシドまたは蛍光標識ヌクレオチド。

【請求項 21】

前記ヌクレオシド / ヌクレオチドが、終止ヌクレオチドである、請求項 11 ~ 17 に記載の蛍光標識ヌクレオシド。

【請求項 22】

前記終止ヌクレオチドが、2' , 3' - ジデオキシヌクレオシド - 5' - トリホスフェートである、請求項 21 に記載のヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 23】

前記試薬が、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログである、請求項 9 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 24】

前記エネルギー転移色素が、前記 5' 末端に結合している、請求項 23 に記載の蛍光標識オリゴヌクレオチドまたは蛍光標識オリゴヌクレオチドアナログ。

【請求項 25】

前記エネルギー転移色素が、前記 3' 末端に結合している、請求項 23 に記載の蛍光標識オリゴヌクレオチドまたは蛍光標識オリゴヌクレオチドアナログ。

【請求項 26】

前記エネルギー転移色素が、前記核酸塩基に結合している、請求項 23 に記載の蛍光標識オリゴヌクレオチドまたは蛍光標識オリゴヌクレオチドアナログ。

【請求項 27】

核酸を分析するためのキットであって、

4つの異なる終止ヌクレオチドのセットを備え、そして、該終止ヌクレオチドの各々は、異なるテンプレートヌクレオチドでテンプレート依存性プライマー伸長反応を終止させ、そして、該キットは、検出可能である空間的に分解可能な蛍光シグナルを生じ得る蛍光標識を備え、該蛍光標識のうちの少なくとも1つは、エネルギー転移色素であり

該エネルギー転移色素は、以下：

以下：

第1の波長で光を吸収して、そしてそれに対する励起エネルギーを放出するキサンテンドナー色素；

該ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収して、それに対する第2の波長で蛍光を発する、4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素；および

該4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素の環における5位または環における6位に該ドナー色素の環における4'位を結合させるリンカー

を含み、

ここで、前記エネルギー転移色素が、該4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素の環における4'位または該ドナー色素の環における5位または環における6位で終止ヌクレオチドに結合する、

キット。

【請求項 28】

前記ドナー色素が、フルオロセイン色素である、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

請求項 27 に記載のキットであって、ここで、前記ドナー色素とアクセプター色素とを連結させるリンカーが、以下：アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも1つの不飽和結合を有する5員環、少なくとも1つの不飽和結合を有する6員環および縮合環構造

からなる群より選択される官能基を含む、

キット。

【請求項 30】

前記終止ヌクレオチドが、前記4,7-ジクロロローダミンアクセプター色素の4'位に結合する、請求項 27 に記載のキット。

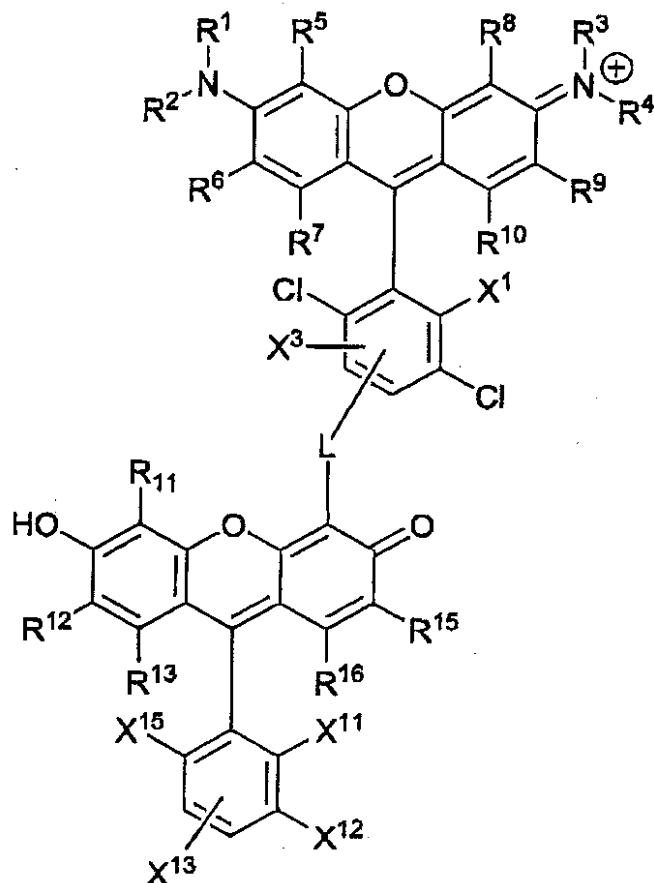
【請求項 31】

前記終止ヌクレオチドが、前記ドナー色素の5位または6位に結合している、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 32】

請求項 27 に記載のキットであって、ここで、前記エネルギー転移色素が、以下の構造：

【化 1 C】



を備え、ここで、

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の各々は、互いに独立して、水素およびアルキルから選択されるか、あるいは、 R^1 および R^5 、 R^2 および R^6 、 R^3 および R^8 、ならびに / または R^4 および R^9 は、それらが結合している原子と一緒に、5員環、6員環または7員環を形成し；

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 および R^{10} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、また、あるいは、 R^6 および R^7 ならびに / または R^9 および R^{10} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

R^8 は、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、

X^1 および X^3 の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され、

L は、該ドナー色素と該アクセプター色素を連結するリンカーであり；

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 、および R^{16} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択されるか、また、あるいは、 R^{12} および R^{13} ならびに / または R^{15} および R^{16} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

X^{11} 、 X^{12} 、 X^{13} および X^{15} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素

、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され得；

R^8 または X^{1-3} は、該ヌクレオシドまたはヌクレオチドへの結合を含む、キット。

【請求項 33】

前記終止ヌクレオチド標識は、単一光源によって励起可能である、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 34】

請求項 27 に記載のキットであって、ここで、前記 4 つの異なる終止ヌクレオチドの各々において、前記蛍光標識は、エネルギー転移色素であって、以下：

第1の波長で光を吸収して、そしてそれに対する励起エネルギーを放出するキサントンドナー色素；

該ドナー色素によって放出された励起エネルギーを吸収して、4, 7 - ジクロロローダミンアクセプター色素；および

該 4, 7 - ジクロロローダミンアクセプター色素の環における 5 位または環における 6 位に該ドナー色素の環における 4' 位を結合させるリンカーを含む、

ここで、各エネルギー転移色素は、前記 4, 7 - ジクロロローダミンアクセプター色素の 4' 位、または該ドナーの 5 位もしくは 6 位でそのそれぞれの終止ヌクレオチドに結合する、キット。

【請求項 35】

各ドナー色素が、フルオロセイン色素である、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

請求項 34 に記載のキットであって、ここで、各ドナー色素と各アクセプター色素を連結するリンカーは、以下：

アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 5 員環、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 6 員環および縮合環構造を含む、キット。

【請求項 37】

請求項 34 に記載のキットであって、ここで、各エネルギー転移色素が、前記 4, 7 - ジクロロローダミンアクセプター色素の 4' 位でそのそれぞれの終止ヌクレオチドに結合する、キット。

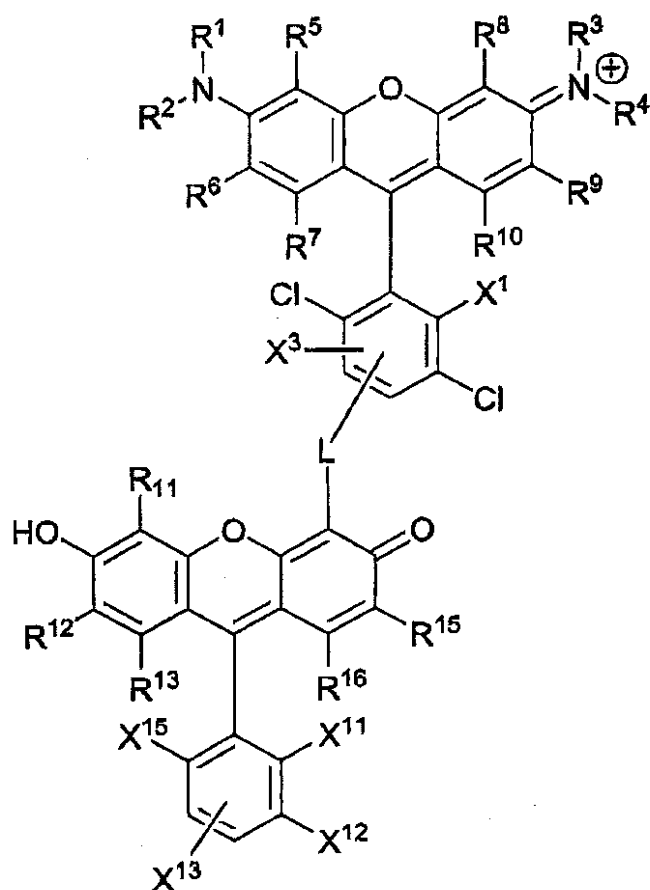
【請求項 38】

請求項 34 に記載のキットであって、ここで、前記ドナー色素の 5 位または 6 位でそのそれぞれの終止ヌクレオチドに結合している、キット。

【請求項 39】

請求項 34 に記載のキットであって、各エネルギー転移色素が、以下の構造：

【化 1 D】



を備え、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の各々は、互いに独立して、水素およびアルキルから選択されるか、あるいは、 R^1 および R^5 、 R^2 および R^6 、 R^3 および R^8 、ならびに / または R^4 および R^9 は、それらが結合している原子と一緒に、5 員環、6 員環または 7 員環を形成し；

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 および R^{10} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、また、あるいは、 R^6 および R^7 ならびに / または R^9 および R^{10} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

R^8 は、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択され、

X^1 および X^3 の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され、

L は、該ドナー色素と該アクセプター色素を連結するリンカーであり；

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{15} 、および R^{16} の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、アルコキシ、フェニル、および置換フェニルから選択されるか、また、あるいは、 R^{12} および R^{13} ならびに / または R^{15} および R^{16} は、それらが結合している原子と一緒に、ベンゾ基を形成し得；

$X^{1\ 1}$ 、 $X^{1\ 2}$ 、 $X^{1\ 3}$ および $X^{1\ 5}$ の各々は、互いに独立して、水素、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、カルボキシル、アルキル、アルケン、アルキン、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリルおよびアルコキシから選択され得；

R^8 または $X^{1\ 3}$ は、それぞれの終止ヌクレオシドまたは終止ヌクレオチドへの結合を含む、キット。

【請求項 40】

各々エネルギー転移色素が、同じドナー色素を含む、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 41】

請求項 27 ~ 40 のいずれか 1 項に記載のキットであって、テンプレート依存性プライマー伸長反応におけるオリゴヌクレオチドプライマーを伸長し得る 4 つのヌクレオシドトリホスフェートのセットを含む、キット。

【請求項 42】

ポリメラーゼをさらに含む、請求項 41 に記載のキット。