

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6522339号
(P6522339)

(45) 発行日 令和1年5月29日 (2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日 (2019.5.10)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 491/147 (2006.01)

C O 7 D 491/147

A 6 1 K 49/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/00

C O 7 D 223/16 (2006.01)

C O 7 D 223/16 C S P A

C O 7 D 471/04 (2006.01)

C O 7 D 471/04 1 1 2 Z

C O 7 D 491/16 (2006.01)

C O 7 D 471/04 1 2 1

請求項の数 15 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-543546 (P2014-543546)
(86) (22) 出願日 平成24年11月20日 (2012.11.20)
(65) 公表番号 特表2014-534261 (P2014-534261A)
(43) 公表日 平成26年12月18日 (2014.12.18)
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/066139
(87) 国際公開番号 W02013/078244
(87) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013.5.30)
審査請求日 平成27年11月20日 (2015.11.20)
審判番号 不服2017-14134 (P2017-14134/J1)
審判請求日 平成29年9月25日 (2017.9.25)
(31) 優先権主張番号 61/562, 021
(32) 優先日 平成23年11月21日 (2011.11.21)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 593089149
プロメガ コーポレーション
Promega Corporation
アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
11-5399 マディソン ウッズ ホ
ロー ロード 2800番地
(74) 代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎
(74) 代理人 100088694
弁理士 弟子丸 健
(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

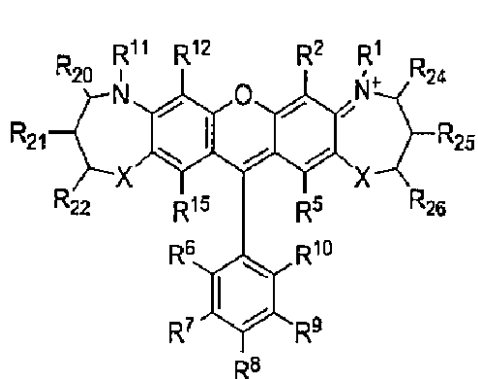
(54) 【発明の名称】 カルボキシXローダミン類似体

(57) 【特許請求の範囲】

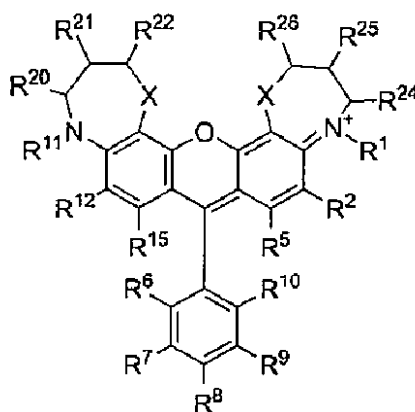
【請求項 1】

式 (I a) または式 (I b) :

【化 1】



(I a)



(I b)

で表される化合物であって、

式中、

R^1 および R^2 は、互いに結合してトリメチレン基を形成しており、

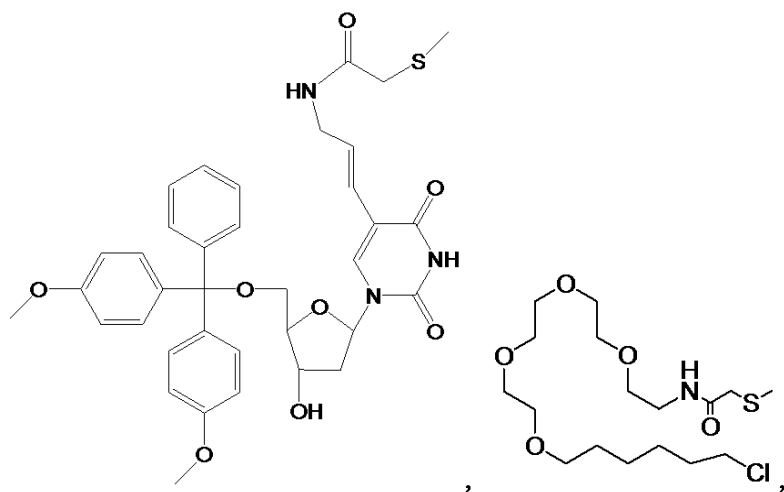
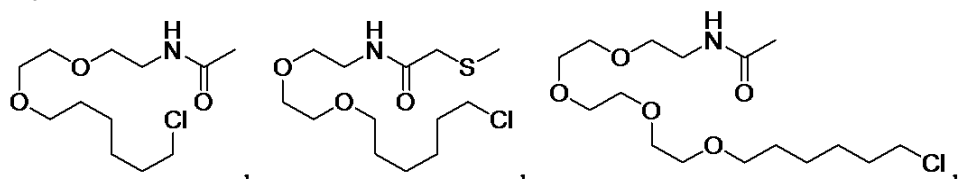
R^{11} および R^{12} は、互いに結合してトリメチレン基を形成しており、

R^5 および R^{15} はHであり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} はHであり、

R^6 および R^{10} のうちの一方は、 COO^- 、 $COOH$ 又はHであり、

R^6 および R^{10} のうちの他方、ならびに R^{7-9} は、独立して、H、Cl、F、 $COOH$ 、 SO_3H 、 SCH_2COOH 、



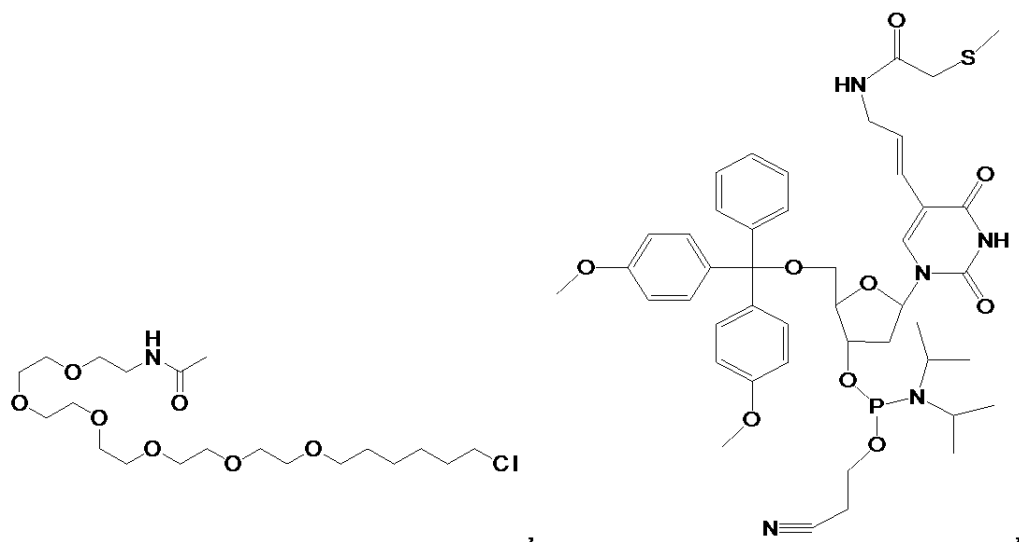
10

20

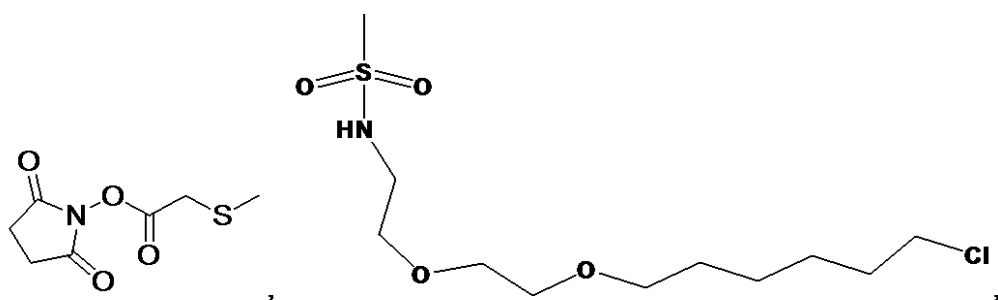
30

40

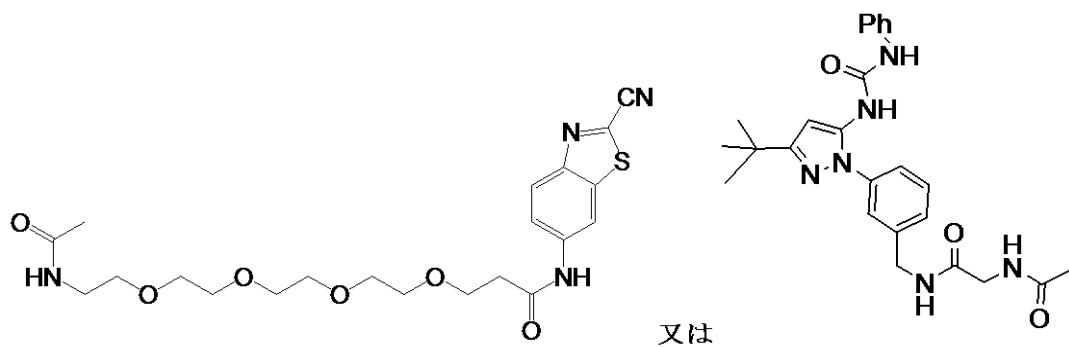
50



10



20



30

であり、および

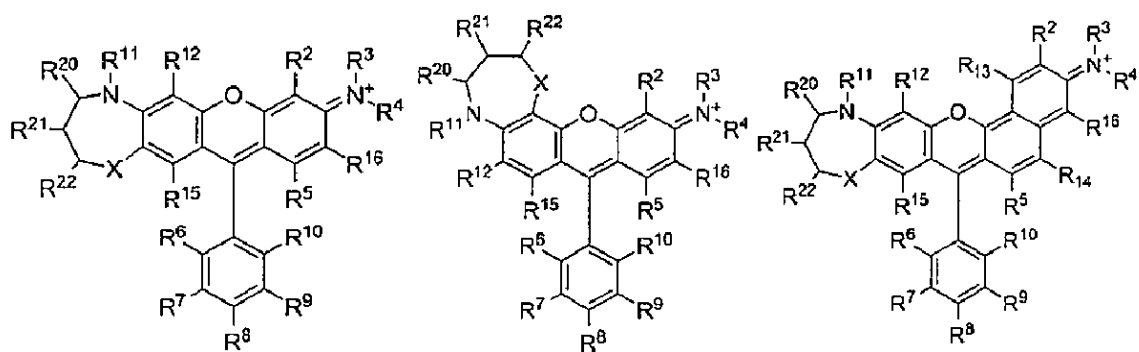
40

各 X は、独立して、 CH_2 又は $\text{CH}(\text{CH}_3)$ である、化合物。

【請求項 2】

式 (III a)、式 (III b) または式 (III c) :

【化 2】



(III a)

(III b)

(III c)

10

で表される化合物であって、

式中、

R^{11} および R^{12} は、互いに結合してトリメチレン基を形成しており、

R^2 および R^{16} はHであることができ、

R^3 および R^4 は、独立して、メチル又はエチルであることができ、

20

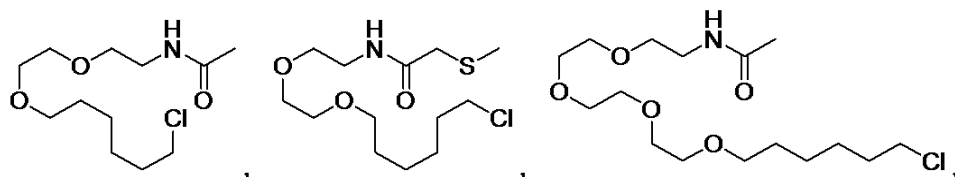
あるいは、 R^2 および R^3 は、互いに結合してトリメチレン基を形成し、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、互いに結合してトリメチレン基又は $-C(CH_3)_2-C=C(CH_3)-$ を形成し、

R^5 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} はHであり、

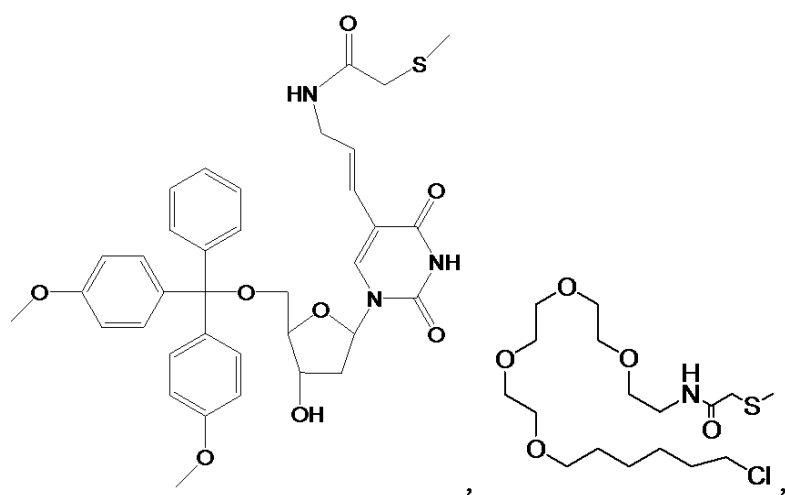
R^{20} 、 R^{21} および R^{22} はHであり、

R^6 および R^{10} のうちの一方は、 COO^- 、 $COOH$ 又はHであり、

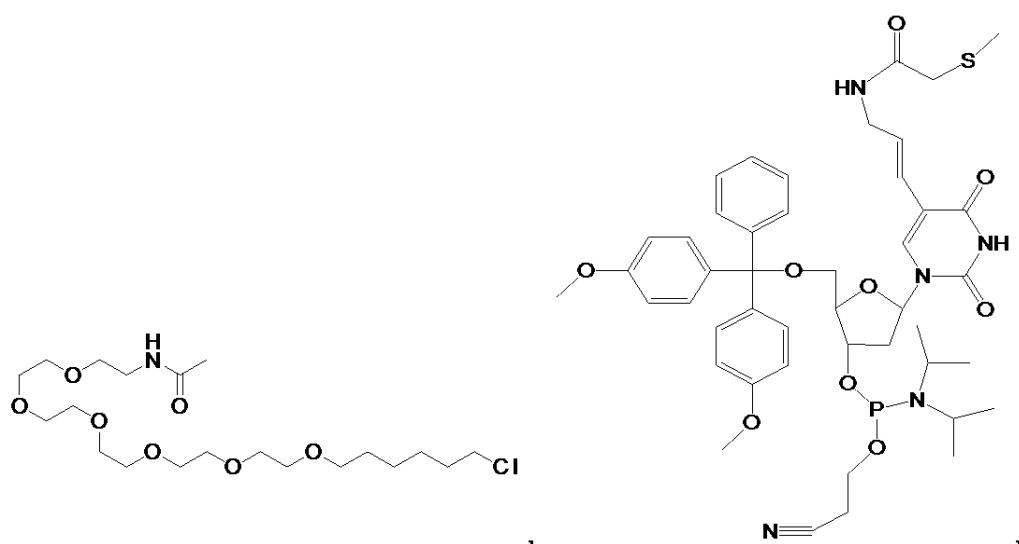
R^6 および R^{10} のうちの他方、ならびに R^{7-9} は、独立して、H、Cl、F、 $COOH$ 、 SO_3H 、 SCH_2COOH 、



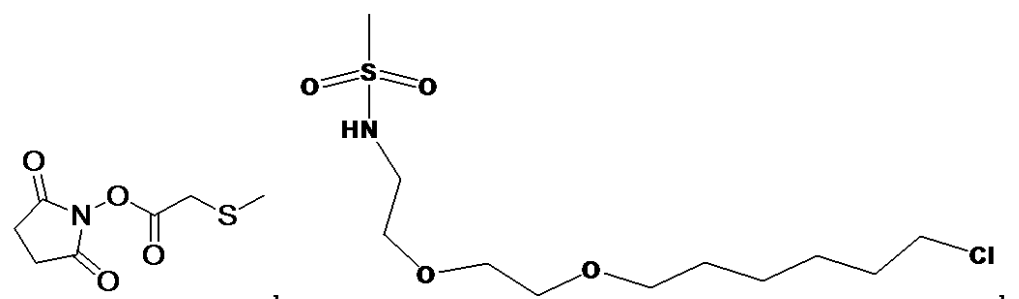
30



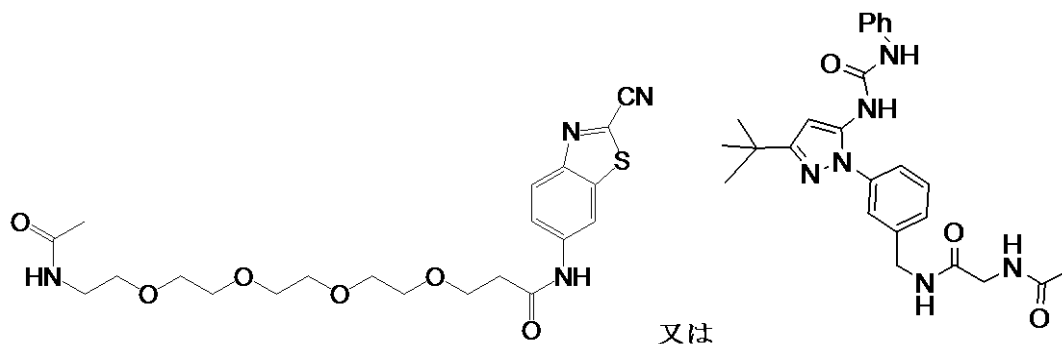
10



20



40



10

であり、および

X は、 CH_2 又は $\text{CH}(\text{CH}_3)$ である、化合物。

【請求項 3】

X が、 CH_2 である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

R^3 および / または R^4 が、メチルまたはエチルである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 5】

R^6 および / または R^9 が、H、Cl または F である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

20

【請求項 6】

R^{10} が、H、F、Cl、 CO_2H または SO_3H である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7】

試料中の核酸ポリマーの存在を検出する方法であって、

- a) 核酸ポリマーを含有すると思われる試料を、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物とオリゴヌクレオチドとを含む複合体を含有する組成物と接触させること、
 - b) 前記試料中の前記化合物の存在または量を検出すること、
- を含む、方法。

【請求項 8】

1 回の反応で、2 つ以上の核酸ポリマーを検出する、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

- a) 選択生体分子を含有すると思われる試料と、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物を含有する組成物を接触させ、混合物を得ること、および、
 - b) 前記混合物中の前記標識生体分子の存在または量を検出すること、
- を含む、生体分子を標識する方法。

【請求項 10】

前記化合物が、シアノベンゾチアゾールを含有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記生体分子が、タンパク質または固形支持体である、請求項 9 に記載の方法。

40

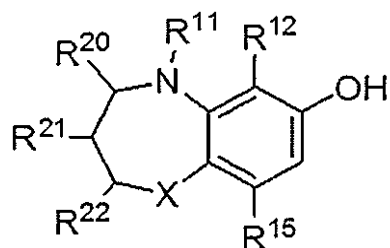
【請求項 12】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物、および使用説明書を含む、キット。

【請求項 13】

式 (VII Ia) :

【化3】



(VIII a)

10

で表される化合物であって、

式中、

R^{15} はHであり、

R^{20} 、 R^{21} および R^{22} はHであり、

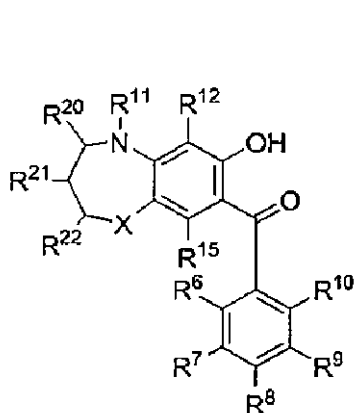
R^{11} および R^{12} は、互いに結合してトリメチレン基を形成しており、および
 X は、 CH_2 又は $CH(CH_3)$ である、化合物。

【請求項14】

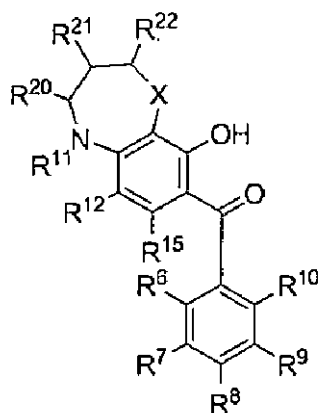
式(I X a)または式(I X b)：

【化4】

20



(IX a)



(IX b)

30

で表される化合物であって、

式中、

R^{15} はHであり、

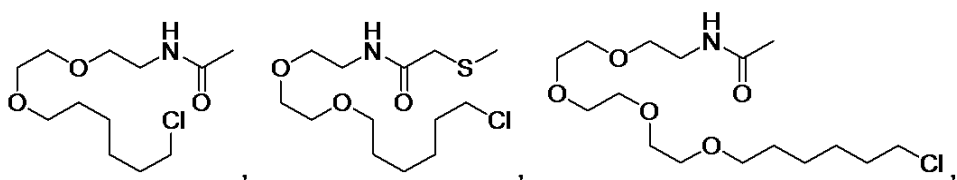
R^{20} 、 R^{21} および R^{22} はHであり、

R^{11} および R^{12} は、互いに結合してトリメチレン基を形成しており、

R^6 および R^{10} のうちの一方は、 COO^- 、 $COOH$ 又はHであり、

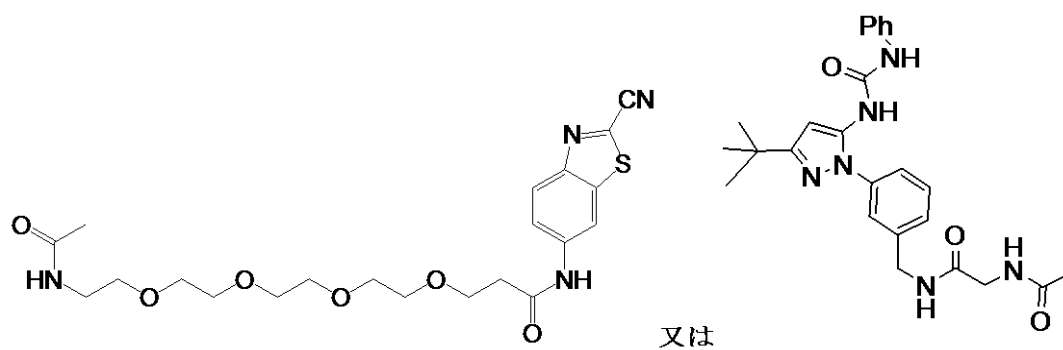
R^6 および R^{10} のうちの他方、ならびに R^{7-9} は、独立して、H、Cl、F、 $COOH$ 、 SO_3H 、 SCH_2COOH 、

40



50



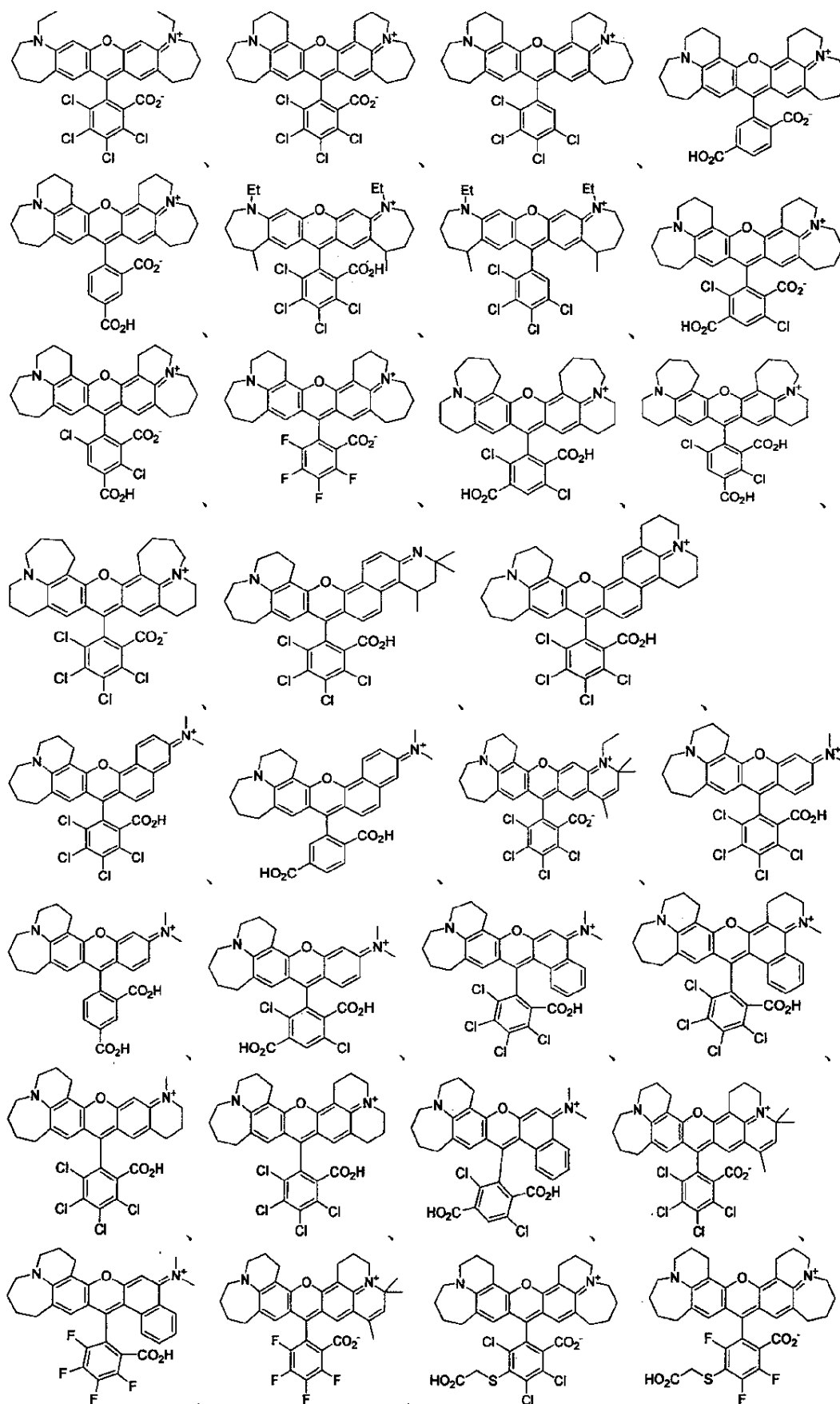


であり、および

Xは、 CH_2 又は $CH(CH_3)$ である、化合物。

【請求項15】

【化 5】



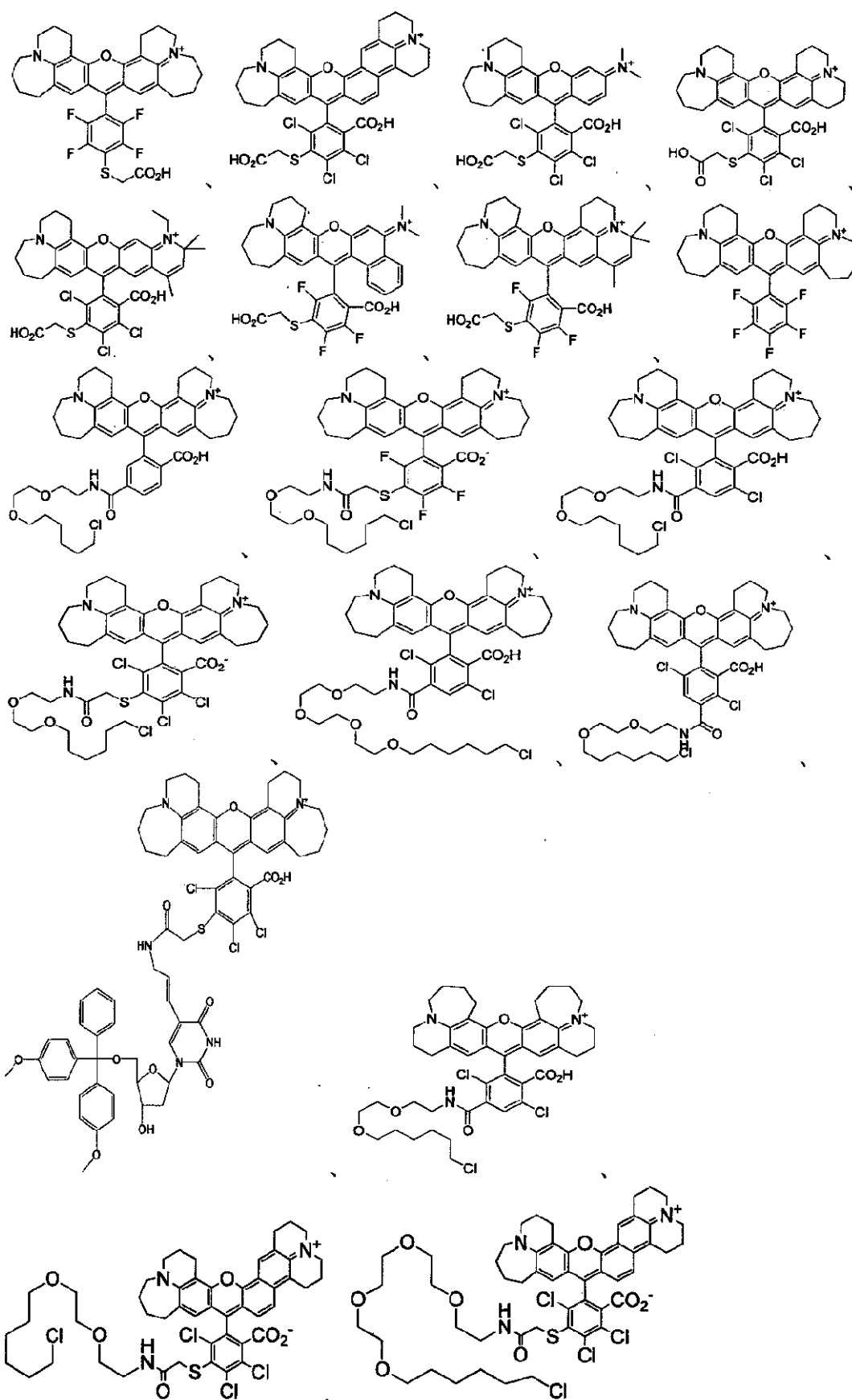
10

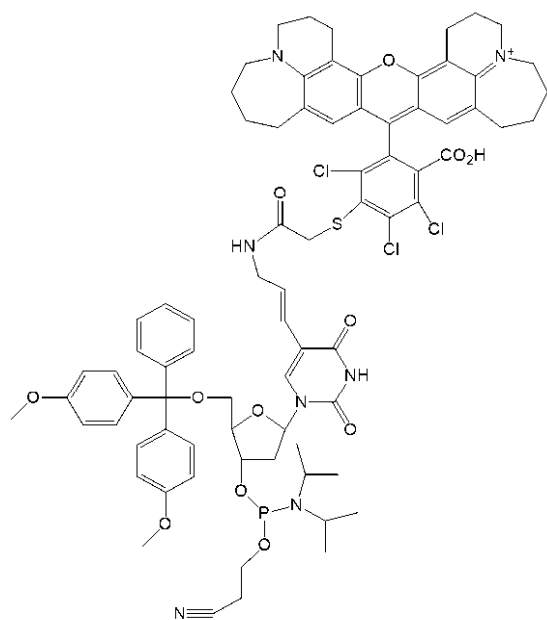
20

30

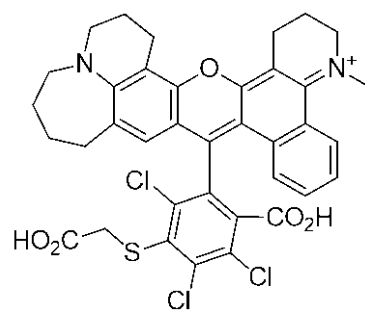
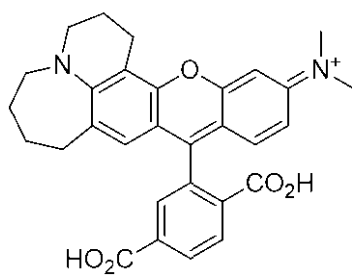
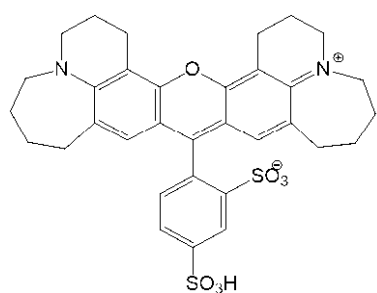
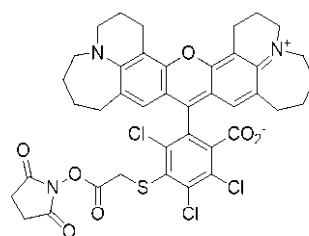
40

50

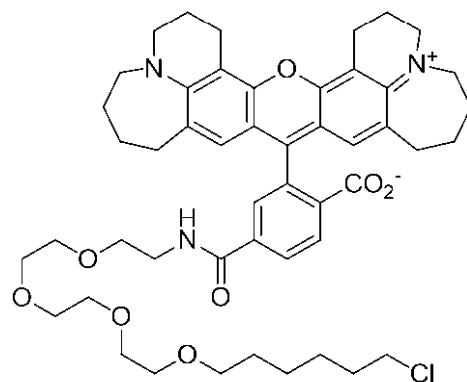
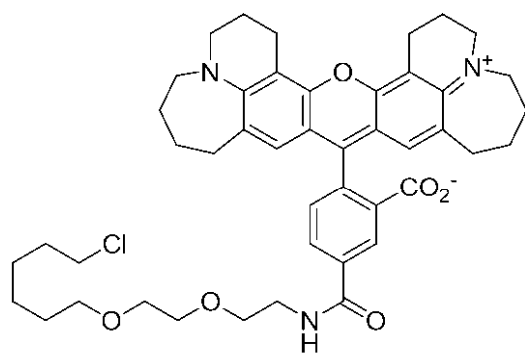




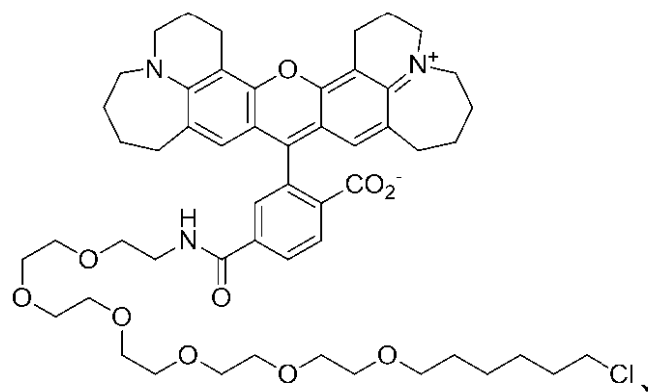
10



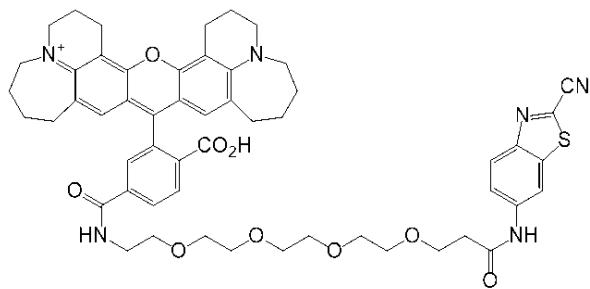
20



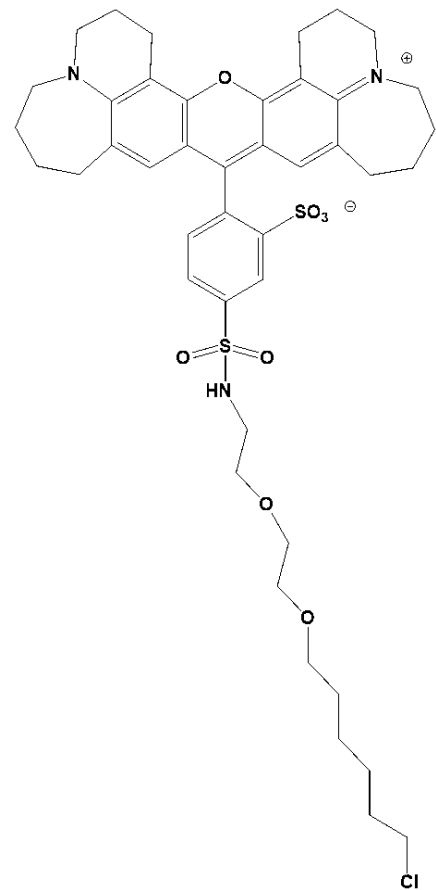
30



40



、および



からなる群から選択される、1の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光色素およびそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

蛍光色素は、生物学的研究および医療診断技術に広く用いられている。蛍光色素は、安価で、毒性も少なく、通常は十分な感度で検出できることから、従来技術よりも優れている傾向にある。識別可能な範囲の色を有する蛍光色素は多様であり、それによって、複数の生物学的な標的を同時に検出することができるマルチプレックスな分析をより実用的なものとしている。

【0003】

新たな機器および生物学的用途の需要増加に対応するため、色素の特性をさらに改善することが求められている。特に、最大シグナル検出のための色素の波長の微調整を可能にし、追加の色を提供するための、さらなる戦略が求められている。

【発明の概要】

【0004】

一つの態様において、本発明は以下の式(Ia)または式(Ib)：

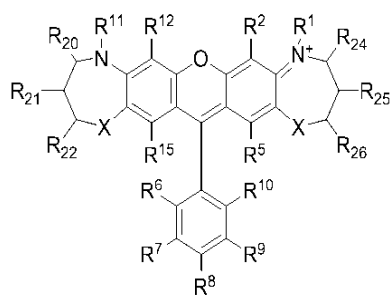
10

20

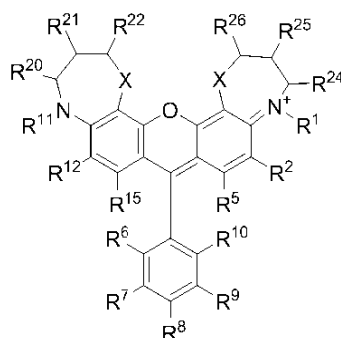
30

40

【化 1】



(I a)



(I b)

10

に記載の化合物を提供し、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_5$ であり、

Lは、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_5 は、結合物質であり、

R^2 、 R^5 、 R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_5$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^1 および R^2 、ならびに/または、 R^{11} および R^{12} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、ハロ、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_5$ であり、

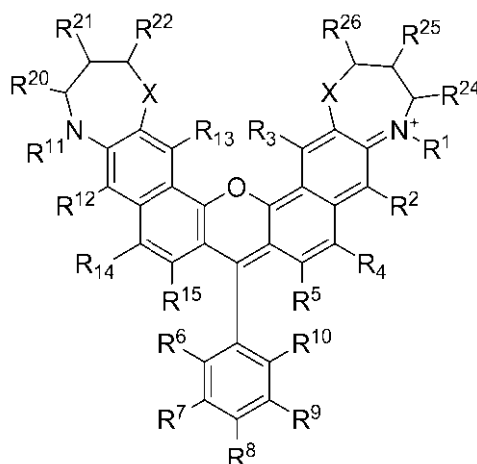
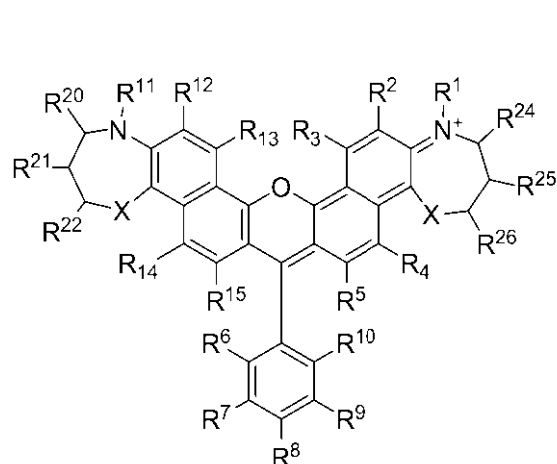
各Xは、独立して、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである。

【0005】

別の態様において、本発明は、式(II a)または式(II b)：

【化 2】



40

50

(I I a)

(I I b)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_5$ であり、

Lは、1 ~ 16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_5 は、結合物質であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_5$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^1 および R^2 、ならびに/または、 R^{11} および R^{12} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_5$ であり、

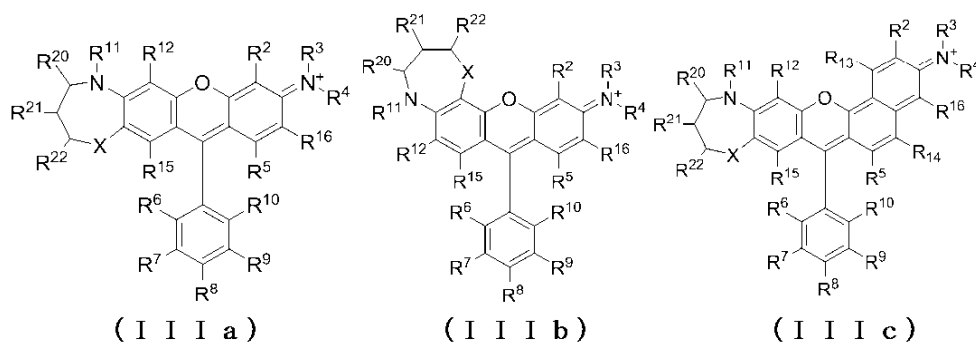
各Xは、独立して、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは、 $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである。

【0006】

さらなる態様において、本発明は、式(III a)、式(III b)または式(III c)：

【化3】



に記載の化合物を提供し、式中、

R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_5$ であり、

Lは、1 ~ 16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_5 は、結合物質であり、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_5$ であり、

R^3 および R^4 は、H、アルキル、L-R、 $L-C_5$ 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ であるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R^5 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_5$ であり、
 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^{11} および R^{12} は炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_5$ であり、

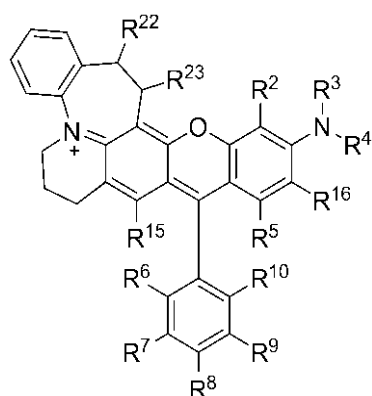
Xは、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは、 $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである。

【0007】

さらに別の態様において、本発明は、式(IV)：

【化4】



(IV)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_5$ であってもよく、

Lは、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_5 は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、Hまたはアルキルであるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_5$ であり、

R^{22} および R^{23} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_5$ である。

【0008】

さらなる態様において、本発明は、式(V)：

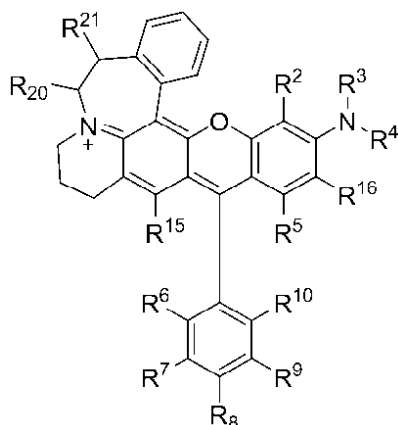
10

20

30

40

【化 5】



(V)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であってもよく、

L は、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、H またはアルキルであるか、または、炭素環、複素環、アリール環もしくはヘテロアリール環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

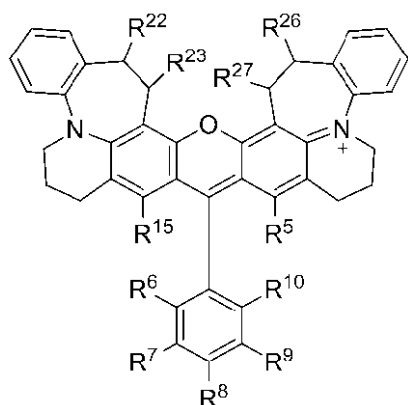
R^{20} および R^{21} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である。

【0009】

別の態様において、本発明は、式 (VI) :

【化 6】



(VI)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 S

10

20

30

40

50

O_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ であり、

L は、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_S は、結合物質であり、

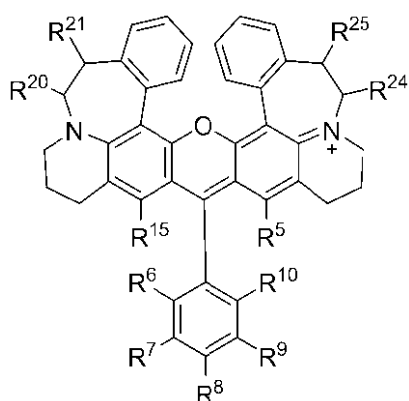
R^{22} 、 R^{23} 、 R^{26} および R^{27} は、独立して、 H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{22} および R^{23} および R^{26} および R^{27} のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ である。

【0010】

さらなる態様において、本発明は、式(VII)：

【化7】



(VII)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、 H 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ であり、

L は、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_S は、結合物質であり、

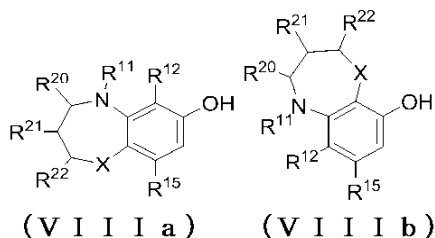
R^{20} 、 R^{21} 、 R^{24} および R^{25} は、独立して、 H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} および R^{24} および R^{25} のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ である。

【0011】

さらなる態様において、本発明は、式(VIIa)または式(VIIb)：

【化 8】



に記載の化合物を提供し、式中、

R^{11} は、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_s$ であり、

Lは、1 ~ 16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、ならびに R^{22} および R^{23} のうち一つ以上が、縮合アリール環を共に形成し、

R^{11} および R^{12} は、任意選択的に置換された環において、共に連結されても良く、 R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

Xは、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである。

【0012】

一部の態様において、本発明は、標識された生体分子を提供する。一部の態様において、標識された生体分子は、小分子（たとえば、薬剤または薬剤化合物）である。他の態様において、標識された生体分子または標識された小分子は、標的（たとえば、薬剤標的）への結合をモニターするための蛍光トレーサーとして作用する。

【0013】

他の態様において、本発明は、試料中の選択分子を検出するための方法を提供し、当該方法には、a) 選択分子を含有すると思われる試料を、本発明の化合物および選択分子に対するリガンドを含有する複合体を含む組成物と接触させ、混合物を得ること、b) 当該混合物中の当該化合物の存在または量を検出すること、が含まれる。

【0014】

一部の態様において、本発明は、試料中の核酸ポリマーの存在を検出する方法を提供し、当該方法には、核酸ポリマーを含有すると思われる試料を、本発明の化合物およびオリゴヌクレオチドを含有する複合体を含有する組成物と接触させること、および、当該試料中の当該化合物の存在または量を検出すること、が含まれる。

【0015】

一部の態様において、本発明は、対象の標的（たとえば、薬剤標的）への結合をモニターする方法を提供し、当該方法には、対象標的を含有する融合タンパク質を含有する試料を、本明細書に記述される色素を結合された小分子と接触させること、および、小分子複合体の対象標的への結合を検出すること、が含まれる。一部の態様において、融合タンパク質は、対象標的に融合されたルシフェラーゼタンパク質を含有する。他の態様において、融合タンパク質は、対象標的に融合された蛍光タンパク質を含有する。一部の態様において、融合タンパク質がルシフェラーゼタンパク質を含有する場合、結合は、生物発光共鳴エネルギー転移（BRET）により検出される。一部の態様において、融合タンパク質

10

20

30

40

50

が蛍光タンパク質を含有する場合、結合は、蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) により検出される。一部の態様において、試料は、融合タンパク質を発現する細胞を含有する。

【 0 0 1 6 】

一部の態様において、本発明は、タンパク質 - タンパク質相互作用をモニターするための方法を提供し、当該方法には、第一融合タンパク質および第二融合タンパク質を含有する試料を、本明細書に記述される色素を結合されたりガンドと接触させること、ならびに、第一および第二融合タンパク質の間の相互作用を検出すること、が含まれる。一部の態様において、第一融合タンパク質は、第一結合パートナーに融合されたルシフェラーゼタンパク質を含有し、第二融合タンパク質は、第二結合パートナーに融合された H a l o T a g (登録商標) タンパク質を含有し、リガンド複合体は、H a l o T a g (登録商標) リガンドを含有する。

10

【 0 0 1 7 】

一部の態様において、本発明は、タンパク質 (複数含む)、ペプチド (複数含む) またはリガンド (複数含む) の標識に用いられ得る反応性色素を提供する。一部の態様において、本発明の反応性色素は、標的タンパク質またはペプチドに、反応性シアノベンゾチアゾールの標識作用を用いて付着させる。

【 0 0 1 8 】

他の態様において、本発明は、本発明の化合物、または本発明による標識生体分子を含有するキットを提供する。一部の態様において、当該キットは、標識生体分子または標識小分子 (たとえば、薬剤または薬剤化合物) を含有する。一部の態様において、当該キットはさらに、対象タンパク質または対象標的を含有する融合タンパク質を発現する細胞を含有する。他の態様において、当該キットはさらに、対象タンパク質または対象標的を含有する融合タンパク質を発現するためのベクターを含有する。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図 1 A】本発明の様々な化合物を示す。

【図 1 B】本発明の様々な化合物を示す。

【図 1 C】本発明の様々な化合物を示す。

【図 1 D】本発明の様々な化合物を示す。

【図 1 E】本発明の様々な化合物を示す。

30

【図 2 A】本発明の様々な化合物を示す。

【図 2 B】本発明の様々な化合物を示す。

【図 2 C】本発明の様々な化合物を示す。

【図 2 D】本発明の様々な化合物を示す。

【図 2 E】本発明の様々な化合物を示す。

【図 3 A】本発明の様々な化合物を示す。

【図 3 B】本発明の様々な化合物を示す。

【図 3 C】本発明の様々な化合物を示す。

【図 3 D】本発明の様々な化合物を示す。

【図 3 E】本発明の様々な化合物を示す。

40

【図 4】F A M、J O E、E T T M R、E T R O X および E T 4 5 1 0 で標識された遺伝子座のピークを示す電気泳動図を示す。男性の D N A (1 . 0 n g) を、2 1 - S T R プライマー対混合物 (表 1) および追加の遺伝子座 D 2 2 S 1 0 4 5、D 2 S 4 4 1 および D Y S 3 9 1 を用いて増幅させた。増幅産物を、A p p l i e d B i o s y s t e m s 3 5 0 0 x L G e n e t i c A n a l y z e r で分析した。パネル A : F A M 標識遺伝子座 (A m e l o g e n i n、D 3 S 1 3 5 8、D 1 S 1 6 5 6、D 6 S 1 0 4 3、D 1 3 S 3 1 7 および P e n t a E) のピークを示す電気泳動図。パネル B : J O E 標識遺伝子座 (P e n t a D、D 1 6 S 5 3 9、D 1 8 S 5 1、D 2 S 1 3 3 8 および C S F 1 P O) のピークを示す電気泳動図。パネル C : E T - T M R 標識遺伝子座 (T H 0 1、v W A、D 2 1 S 1 1、D 7 S 8 2 0、D 5 S 8 1 8、および T P O X) のピ

50

ークを示す電気泳動図。パネルD：ET ROX標識遺伝子座(D8S1179、D12S391、D19S433およびFGA)を示す電気泳動図。パネルE：ET 4510標識遺伝子座(D22S1045、D2S441およびDYS391)を示す電気泳動図。注記：PentaDが、JOE標識遺伝子座セット中で最も大きい遺伝子座であり、ET 4510標識遺伝子座は、最も小さいものから最も大きいものまで示されている。他のセット中の遺伝子座は、最も大きいものから最も小さいものまで示されている。

【図5】4510で標識された(パネルA)、4563で標識された(パネルB)、または4574で標識された(パネルC)、DYS391、D2S441およびD22S1045遺伝子座のピークを示す電気泳動図を示す。男性DNA(1.0ng)を、21-STRプライマー対混合物(表1)および追加の遺伝子座D22S1045、D2S441およびDYS391を用いて増幅させた。増幅産物を、Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzerで分析した。

10

【図6】4510で標識された(パネルA)、4563で標識された(パネルB)、または4574で標識された(パネルC)、DYS391、D2S441およびD22S1045遺伝子座のピークを示す電気泳動図を示す。および、JOEで標識された遺伝子座、PentaD、D16S539、D18S51、D2S1338およびCSF1POのピークを示す電気泳動図を示す。男性DNA(1.0ng)を、21-STRプライマー対混合物(表1)および追加の遺伝子座D22S1045、D2S441およびDYS391を用いて増幅させた。増幅産物を、Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzerで分析した。

20

【図7】4510で標識された(パネルA)、4563で標識された(パネルB)、または4574で標識された(パネルC)、DYS391、D2S441およびD22S1045遺伝子座のピークを示す電気泳動図を示す。男性DNA(0.5ng)を、21-STRプライマー対混合物(表1)および追加の遺伝子座D22S1045、D2S441およびDYS391を用いて増幅させた。増幅産物を、Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzerで分析した。

【図8】4510で標識された(パネルA)、4563で標識された(パネルB)、または4574で標識された(パネルC)、DYS391、D2S441およびD22S1045遺伝子座のピークを示す電気泳動図を示す。および、JOEで標識された遺伝子座、PentaD、D16S539、D18S51、D2S1338およびCSF1POのピークを示す電気泳動図を示す。男性DNA(0.5ng)を、21-STRプライマー対混合物(表1)および追加の遺伝子座D22S1045、D2S441およびDYS391を用いて増幅させた。増幅産物を、Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzerで分析した。

30

【図9】リガンド3780を用いた共焦点像を示す。(a)核局在配列(HT-NLS)を含有するHaloTag(登録商標)を安定発現しているU2OS細胞を、無洗浄プロトコルで、100nM リガンド3780で標識し、3% 633レーザー、PMT715、CA80μm、100xを用いて撮像した。(b)HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1μM リガンド3780で標識し、3% 633レーザー、PMT600、CA200μm、100xを用いて撮像した。(c)融合タンパク質p65-HaloTag(p65-HT)を安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1μM リガンド3780で標識し、8% 633レーザー、PMT775、CA80μm、100xを用いて撮像した。(d)U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1μM リガンド3780で標識し、8% 633レーザー、PMT775、CA200μm、20xを用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

40

【図10】リガンド3781を用いた共焦点像を示す。(a)融合タンパク質p65-HTを安定発現しているU2OS細胞、および、(b)U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1μM リガンド3781で標識した。細胞は、10% 543レーザー、P

50

MT830、CA80 μm 、80 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

【図11】リガンド3782を用いた共焦点像を示す。(a) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、無洗浄プロトコルで、100 nM リガンド3782で標識し、3% 633レーザー、PMT615、CA80 μm 、100 \times を用いて撮像した。(b) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3782で標識し、3% 633レーザー、PMT600、CA200 μm 、100 \times を用いて撮像した。(c) 融合タンパク質p65-HTを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3782で標識し、8% 633レーザー、PMT775、CA80 μm 、100 \times を用いて撮像した。(d) U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3782で標識し、8% 633レーザー、PMT775、CA200 μm 、20 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

10

【図12】リガンド3783を用いた共焦点像を示す。(a) HT-NLSを安定して発現しているU2OS細胞を、無洗浄プロトコルで、100 nM リガンド3783で標識し、3% 633レーザー、PMT615、CA80 μm 、100 \times を用いて撮像した。(b) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3783で標識し、3% 633レーザー、PMT600、CA200 μm 、100 \times を用いて撮像した。(c) 融合タンパク質p65-HTを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3783で標識し、8% 633レーザー、PMT750、CA80 μm 、100 \times を用いて撮像した。(d) U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3783で標識し、8% 633レーザー、PMT775、CA200 μm 、20 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

20

【図13】リガンド3905を用いた共焦点像を示す。(a) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3905で標識し、3% 633レーザー、PMT600、CA200 μm 、20 \times を用いて撮像した。(b) 融合タンパク質p65-HTを安定発現しているU2OS細胞、および、(c) U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3905で標識し、15% 633レーザー、PMT800、CA80 μm 、20 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

30

【図14】リガンド3906を用いた共焦点像を示す。(a) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3906で標識し、3% 633レーザー、PMT600、CA200 μm 、20 \times を用いて撮像した。(b) 融合タンパク質p65-HTを安定発現しているU2OS細胞、および、(c) U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3906で標識し、10% 633レーザー、PMT720、CA80 μm 、20 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

40

【図15】リガンド3954の共焦点像を示す。(a) HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞、および、(b) U2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM リガンド3954で標識し、4% 633レーザー、PMT880、CA80 μm 、20 \times を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルはDICを示し、右側のパネルは2つを重ね合わせたものを示す。

【図16】リガンド4356および4357の共焦点像を示す。HT-NLSを安定発現しているU2OS細胞を、迅速標識プロトコルで、1 μM のリガンド(a) 4356、

50

または (b) 4357 で標識し、10% 633 レーザー、PMT 830、CA 80 μ m、30x を用いて撮像した。各像の左のパネルは、蛍光チャンネルを示し、真ん中のパネルは DIC を示し、右側のパネルは 2 つを重ね合わせたものを示す。

【図 17】HT-NLS を安定発現している U2OS 細胞でのリガンド 3780、3782 および 3783 の標識効率を示す。(a) 直接的なリガンドシグナル (633) および TMR シグナル (532) を示す SDS-PAGE 後の蛍光スキャン。レーン 1 は、5 μ M TMR 迅速標識 (追跡) と共に、洗浄無し標識 (パルス) を用いた 100 nM リガンドを表し、レーン 2 は、5 μ M TMR 迅速標識 (追跡) を伴う 1 μ M 迅速標識 (パルス) を表し、レーン 3 は、5 μ M TMR 迅速標識 (追跡) を伴う 5 μ M 迅速標識 (パルス) を表し、「TMR」は、TMR リガンドのみで標識された細胞を表す。(b) TMR 単独バンドのパーセントとして、TMR ゲルからのバンド (TMR シグナル) の定量化を示すグラフ。

10

【図 18】リガンド 3782 存在下での U2OS 細胞および CHO 細胞の生存能力を示す。グラフは、リガンド 3782 または DMSO 担体 (対照) と 24 時間インキュベーションした後の、Cell Titer - Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assay の結果を示す。各バーは、n = 6 ウェル (\pm SEM) を表す。

【図 19】HaloTag (登録商標) TMR リガンドの代替としての、ゲルベース分析における、リガンド 3782 の性能を示す。

【図 20】不活性 p38 アルファキナーゼに結合する p38 アルファキナーゼ蛍光トレーサー PBI 4838 の略図を示す。

20

【図 21A】BRET を用いてモニターされた、NanoLuc - p38 融合タンパク質発現細胞での、色素トレーサー PBI 4838 の滴定を示す。さらに、図は、トレーサーと NanoLuc - p38 融合物の相互作用を、BIRB 796 で阻害することが出来ることを示す。結合は、溶解細胞中で、BRET を用いてモニターされた。

【図 21B】BRET を用いてモニターされた、NanoLuc - p38 融合タンパク質発現細胞での、色素トレーサー PBI 4838 の滴定を示す。さらに、図は、トレーサーと NanoLuc - p38 融合物の相互作用を、BIRB 796 で阻害することが出来ることを示す。結合は、生細胞中で、BRET を用いてモニターされた。

【図 22A】蛍光色素トレーサー PBI 4838 を用いた、生細胞中の、既知の薬物 (BIRB 796) のキナーゼ標的 p38 への結合のモニタリングを示す。結合は、BRET ならびに、p38 に対して測定された EC50 値を用いてモニターされた。

30

【図 22B】蛍光色素トレーサー PBI 4838 を用いた、生細胞中の、既知の薬物 (BIRB 796) のキナーゼ標的 p38 への結合のモニタリングを示す。結合は、BRET ならびに、PKCa (陰性対照) に対して測定された EC50 値を用いてモニターされた。

【図 23】HaloTag (登録商標) リガンドに結合された色素である、PBI 3781 へ結合された HaloTag - FKBP12 融合物と、NanoLuc - Frb 融合物 (ドナー) の間に発生する BRET の、ラパマイシン依存性の増加を示す (A)。(B) は、NanoLuc ルシフェラーゼおよび PBI 3781 の発光スペクトル、ならびに、PBI 3781 の励起スペクトルを示す。

40

【図 24】色素が結合された HaloTag (登録商標) リガンド (PBI 3781) と、BRET を用いた NanoLuc - Frb 融合物と HaloTag - FKBP12 融合物の間の、ラパマイシン介在相互作用のモニタリングを示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義

本明細書において、以下の用語および表現は、示された意味を有する。ラジカル、置換基、および範囲に対して以下に記載される具体的な値は解説の目的のためのみである。それらは他の定義された値、またはラジカルおよび置換基に対して定義された範囲内の他の

50

値を除外しない。

【 0 0 2 1 】

基または部分を置換することが出来る場合、「置換された」という用語は、もし、指示される原子の標準の原子価を上回らず、置換によって安定した化合物がもたらされるのであれば、「置換された」を用いた表現中で指示されている基の、一つ以上（たとえば、1、2、3、4、5または6；一部の実施形態においては、1、2または3；および他の実施形態においては、1または2）の水素が、列挙され、指定される基の選択物と置換することができる、または当業者に公知の適切な基（たとえば、以下に列挙される基の一つ以上）と置換することができることを示している。置換される基の適切な置換基としては、

アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、ハロ、ハロアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリフルオロメチルチオ、ジフルオロメチル、アセチルアミノ、ニトロ、トリフルオロメチル、トリフルオロメトキシ、カルボキシ、カルボキシアルキル、ケト、チオキソ、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、アリールスルフィニル、アリールスルホニル、ヘテロアリールスルフィニル、ヘテロアリールスルホニル、ヘテロサイクルスルフィニル、ヘテロサイクルスルホニル、リン酸塩、硫酸塩、ヒドロキシルアミン、ヒドロキシル（アルキル）アミン、およびシアノを挙げることができる。さらに、適切な指定される基としては、たとえば、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $NC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NRR-S(=O)_2O-$ 、 $-S(=O)_2OH$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)O_2RR$ 、 $-P(=O)O_2RR$ 、 $-P(=O)(O-)_2$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(S)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(S)OR$ 、 $-C(O)SR$ 、 $-C(S)SR$ 、 $-C(O)NRR$ 、 $-C(S)NRR$ 、 $-C(NR)NRR$ が挙げられ、ここで、各Xは、独立して、ハロゲン（「ハロ」）：F、Cl、BrまたはIであり、各Rは、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、保護基またはプロドラッグ部分である。当業者なら容易に理解できることであるが、置換基がケト（ $=O$ ）またはチオキソ（ $=S$ ）等である場合、置換された原子上の2つの水素原子が置き換えられる。

【 0 0 2 2 】

本明細書において、「アルキル」という用語は、たとえば1～20の炭素原子、多くの場合は1～12、または1～約6炭素原子を有する、分枝している炭化水素、分枝していない炭化水素、または、環状の炭化水素を指す。例としては、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-メチル-1-プロピル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル（t-ブチル）、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチル、3,3-ジメチル-2-ブチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル等が挙げられるが、これらに限定されない。アルキルは、置換されても、置換されなくてもよい。たとえば、置換アルキル基は、以下に記述されるハロアルキル基であっても良い。アルキルはまた、任意選択的に、部分的に、または全体的に不飽和であってもよい。したがって、アルキル基の列記としては、アルケニル基およびアルキニル基の両方が挙げられる。アルキルは、前述および上に挙げた例のように、一価の炭化水素ラジカルであってもよく、または、その用途の状況に従い、二価の炭化水素ラジカル（たとえば、アルキレン）であってもよい。さらに、アルキル基は、中断された（interrupted）という用語について以下に記述するように、任意選択的に中断されてもよい。

【 0 0 2 3 】

「アルケニル」という用語は、分枝している、または分枝していない、部分的に不飽和の一価ラジカル炭化水素鎖を指す（すなわち、炭素 - 炭素、 sp^2 二重結合）。一つの実施形態において、アルケニル基は、2 ~ 10 炭素原子、または 2 ~ 6 炭素原子を有しても良い。別の実施形態において、アルケニル基は、2 ~ 4 炭素原子を有する。例としては、エチレンまたはビニル、アリル、シクロペンテニル、5 - ヘキセニル等が挙げられるが、これらに限定されない。アルケニルは、置換されていても、置換されていなくてもよい。

【 0 0 2 4 】

「アルキニル」という用語は、完全な不飽和の点を有する、分枝している、または分枝していない一価ラジカル炭化水素鎖を指す（すなわち、炭素 - 炭素、 sp 三重結合）。一つの実施形態において、アルキニル基は、2 ~ 10 炭素原子、または 2 ~ 6 炭素原子を有してもよい。別の実施形態において、アルキニル基は、2 ~ 4 炭素原子を有してもよい。この用語の典型的な例としては、たとえば、エチニル、1 - プロビニル、2 - プロビニル、1 - ブチニル、2 - ブチニル、3 - ブチニル、1 - ヘキシニル、2 - ヘキシニル、3 - ヘキシニル、1 - オクチニル等の基がある。アルキニルは、置換されていても、置換されていなくてもよい。

【 0 0 2 5 】

「シクロアルキル」または「カルボシル (carbocycle)」または「炭素環式化合物の」という用語は、単独の環または複数の縮合環を有する 3 ~ 約 10 炭素原子の環式のアルキル基を指す。そのようなシクロアルキル基としては、例えば、単独の環構造としてシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロオクチル等が挙げられ、複数の環構造としては、アダマンタニル等が挙げられる。シクロアルキルは、置換されていても、置換されていなくてもよい。シクロアルキル基は、一価であっても二価であってもよく、アルキル基についての上述のように、任意選択的に置換されていてもよい。シクロアルキル基は、任意選択的に、一つ以上の不飽和の部位を含んでいてもよく、たとえば、シクロアルキル基は、一つ以上の炭素 - 炭素二重結合（たとえば、シクロヘキセン、1, 3 - シクロヘキサジエン、1, 4 - シクロヘキサジエン等）を含んでもよい。シクロアルキル基は、単環として 3 ~ 8 炭素原子を有する、二環として 7 ~ 12 炭素原子を有する、および、多環として約 20 炭素原子までを有する、飽和または部分的に不飽和な環を意味する、炭素環であってもよい。単環炭素環は、通常は、3 ~ 6 環原子を有し、さらにより典型的には、5 ~ 6 環原子を有する。二環炭素環は、7 ~ 12 環原子（たとえば、ビスクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または [6, 6] システムとして配置される）を有し、または、9 ~ 10 環原子（[5, 6] または [6, 6] システムとして配置される）を有する。炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1 - シクロペント - 1 - エニル、1 - シクロペント - 2 - エニル、1 - シクロペント - 3 - エニル、シクロヘキシル、1 - シクロヘックス - 1 - エニル、1 - シクロヘックス - 2 - エニル、または 1 - シクロヘックス - 3 - エニルが挙げられる。炭素環は、アルキル基についての上述のように、任意選択的に置換されていてもよい。

【 0 0 2 6 】

「アルコキシ」という用語は、アルキル - O - 基を指し、ここで、アルキルは、本明細書に定義される。一つの実施形態において、アルコキシ基としては、たとえば、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、*tert* - ブトキシ、*sec* - ブトキシ、*n* - ペントキシ、*n* - ヘキシルオキシ、1, 2 - ジメチルブトキシ等が挙げられる。アルコキシは、置換されていても、置換されていなくてもよい。

【 0 0 2 7 】

「アリール」という用語は、元となる芳香族環系の単独の炭素原子から一つの水素原子を除去することにより得られる芳香族炭化水素基を指す。ラジカルは、元となる環系の、飽和炭素原子または不飽和炭素原子であってもよい。アリール基は、6 ~ 18 炭素原子、6 ~ 14 炭素原子、または 6 ~ 10 炭素原子を有してもよい。アリール基は、単環（たと

10

20

30

40

50

えば、フェニル)または多縮合環(融合)環を有しても良く、ここで、少なくとも一つの環は芳香族(たとえば、ナフチル、ジヒドロフェナントレニル、フルオレニルまたはアンスリル)である。典型的なアリール基としては、ベンゼン、ナフタレン、アンスラセン、ピフェニル等から得られるラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。アリールは、アルキル基についての上述のように、置換されていなくても、任意選択的に置換されていてよい。たとえば、アリール基は、様々な置換アリール(たとえば、ペンタフルオロフェニルまたはパラ-トリフルオロメチルフェニル等)を提供するために、一つ以上の置換基(上述のもの)で置換されていてよい。

【0028】

「ハロ」という用語は、フルオロ、クロロ、プロモ、およびヨード基を指す。同様に、「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素、ヨードを指す。

【0029】

「ヘテロアリール」という用語は、本明細書において、1、2、または3つの芳香族環を含有し、および芳香族環中に少なくとも1つの窒素、酸素または硫黄原子を含有する単環、二環、または三環系として定義され、上記で「置換された」の定義で記述されるように、たとえば1つ以上、特に1~3の置換基で置換されても、置換されなくとも良い。典型的なヘテロアリール基は、1つ以上のヘテロ原子に加えて、2~14の炭素原子を含有する。ヘテロアリール基の例としては、2H-ピロリル、3H-インドリル、4H-キノリジニル、アクリジニル、ベンゾ[b]チエニル、ベンゾチアゾリル、-カルボリニル、カルバゾリル、クロメニル、シノリニル、ジベンゾ[b,d]フラニル、フラザニル、フリル、イミダゾリル、イミジゾリル、インダゾリル、インドリシニル、インドリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ナフチリジニル、オキサゾリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナルサジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチイニル、フェノキサジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリミジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、チアジアゾリル、チアンスレニル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、テトラゾリル、およびキサンテニルが挙げられるが、これらに限定されない。一つの実施形態において、「ヘテロアリール」という用語は、非過酸化酸素、硫黄およびN(Z)(ここで、Zは、無いか、またはH、O、アルキル、アリールもしくは(C₁-C₆)アルキルアリールである)から独立して選択されるヘテロ原子を1、2、3または4つ、ならびに炭素を含有する5~6環原子を含有する単環芳香族環を意味する。別の実施形態においてヘテロアリールは、それらから由来する約8~10環原子のオルト-縮合二環複素環を意味し、特に、ベンズ-誘導体または、それらヘプロピレン、トリメチレンもしくはテトラメチレンジラジカルを融合することにより誘導されるものを意味する。

【0030】

「複素環」という用語は、酸素、窒素および硫黄基から選択されるヘテロ原子を少なくとも1つ含有する、飽和または部分的に不飽和の環系を意味し、環のサイズは、3~約12原子、または合計で約7~約14の環原子を含む二環系であり、および、「置換された」という用語のもと、本明細書に定義される基の一つ以上で任意選択的に置換されている。複素環は、一つ以上のヘテロ原子を含有する単環、二環、または三環系であっても良い。複素環基はまた、環に付着するオキソ基(=O)またはチオキソ(=S)基を含んでも良い。複素環基の非限定的な例示としては、1,3-ジヒドロベンゾフラン、1,3-ジオキサラン、1,4-ジオキサン、1,4-ジチアン、2H-ピラン、2-ピラゾリン、4H-ピラン、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、インドリニル、イソクロマニル、イソインドリニル、モルホリン、ピペラジニル、ピペリジン、ピペリジル、ピラゾリジン、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピロリジン、ピロリン、キヌクリジン、およびチオモルホリンが挙げられる。

【0031】

10

20

30

40

50

「複素環」という用語は、例示を目的とし、非限定的に、Paquette, Leo A.; Principles of Modern Heterocyclic Chemistry (W.A. Benjamin, New York, 1968)の特に1、3、4、6、7および9章、The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A Series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950～現在)の特に13、14、16、19および28号、ならびに、J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 5566に記述される複素環のモノラジカルを挙げることができる。一つの実施形態において、「複素環」は、本明細書に定義される「炭素環」を含み、ここで、1つ以上(たとえば、1、2、3または4)の炭素原子は、ヘテロ原子(たとえば、O、NまたはS)と置換されている。

【0032】

複素環は、例示を目的とし、非限定的に、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(10
ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、ピペリジニル、4-
ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、
テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタ
ヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジニル、
2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソ
ベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソ
チアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインド
リル、3H-インドリル、1H-インダゾリ、ブリニル、4H-キノリジニル、フタラジ
ニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シノリニル、プテリジニル、カル
20
パゾリル、
-カルボリニル、フェナンチリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェ
ナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、
イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピ
ラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホ
リニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリ
ル、ベンゾキサゾリニル、イサチノイルおよびビス-テトラヒドロフラニルを含む。

【0033】

例示を目的とし、非限定的に、炭素結合複素環は、ピリジンの2、3、4、5もしくは
6位で結合されるか、ピリダジンの3、4、5もしくは6位で結合されるか、ピリミジンの
2、4、5もしくは6位で結合されるか、ピラジンの2、3、5もしくは6位で結合され
30
るか、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールもしくはテト
ラヒドロピロールの2、3、4もしくは5位で結合されるか、オキサゾール、イミダゾ
ールもしくはチアゾールの2、4もしくは5位で結合されるか、イソキサゾール、ピラ
ゾールもしくはイソチアゾールの3、4もしくは5位で結合されるか、アジリジンの2も
しくは3位で結合されるか、アゼチジンの2、3もしくは4位で結合されるか、キノリンの2
、3、4、5、6、7もしくは8位で結合されるか、または、イソキノリンの1、3、4
、5、6、7もしくは8位で結合される。炭素結合複素環としては、2-ピリジル、3-
ピリジル、4-ピリジル、5-ピリジル、6-ピリジル、3-ピリダジニル、4-ピリダ
ジニル、5-ピリダジニル、6-ピリダジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、
5-ピリミジニル、6-ピリミジニル、2-ピラジニル、3-ピラジニル、5-ピラジニ
40
ル、6-ピラジニル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル等が挙げられる。
。

【0034】

例示を目的として、非限定的に、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロ
ール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イ
ミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾ
リン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾールの1位に
結合されるか、イソインドールもしくはイソインドリンの2位に結合されるか、モルホ
リンの4位に結合されるか、および、カルパゾールもしくは
-カルボリンの9位に結合さ
50
れてもよい。一つの実施形態において、窒素結合複素環としては、1-アジリジル、1-

アゼテジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリルおよび1 - ピペリジニルが挙げられる。

【0035】

「アミノ」という用語は、 $-NH_2$ を指す。アミノ基は、「置換された」という用語に対して本明細書に定義されるように、任意選択的に置換されても良く、たとえば、アミノ基は、 $-NR_2$ であっても良く、ここで、Rは、置換の定義で列記された基である。たとえば、 $-NR_2$ 基は、「アルキルアミノ」を含むことが出来、ここで、少なくとも1つのRは、アルキルであり、2番目のRは、アルキルもしくは水素であり、および/または、「アシルアミノ」($-N(R)C(=O)R$)を含み、ここで、各Rは、独立して、水素、アルキル、アルカリルまたはアリールである。

10

【0036】

「アルカリル」という用語は、少なくとも1つのアルキル基で置換されたアリール基を指し、それらは、アルキル基またはアリール基のいずれかのラジカルを介して、置換基を共に形成する。アルカリルのアルカリ基は、直鎖または分枝鎖いずれかの約1～8炭素原子を含むことが出来る。典型的なアルカリル基としては、ベンジル、2 - フェニルエチル、3 - フェニルプロピル、4 - フェニルブチ、5 - フェニルペンチル、6 - フェニルヘキシル、7 - フェニルヘプチル、8 - フェニルオクチル、それらの分枝アルキル鎖誘導体、およびそれらのナフタレン版が挙げられる。アルカリルは、アルキル基に対して上述されたように、任意選択的に置換されてもよい。

【0037】

20

「中断された(interrupted)」という用語は、示されている各原子の標準原子価を超えず、中断により、安定した化合物がもたらされる場合、別の基が、「中断された」という用語の表現で言及されている特定の炭素鎖の2つの隣接する炭素原子(およびそれらに付着される水素原子(たとえば、メチル(CH_3)、メチレン(CH_2)、またはメチン(CH)))の間に挿入されることを意味する。炭素鎖を中断することができる適切な基としては、たとえば、一つ以上の非過酸化オキシ($-O-$)、チオ($-S-$)、イミノ($-N(H)-$)、メチレンジオキシ($-OCH_2O-$)、カルボニル($-C(=O)-$)、カルボキシ($-C(=O)O-$)、カルボニルジオキシ($-OC(=O)O-$)、カルボキシラト($-OC(=O)-$)、イミン($C=NH$)、スルフィニル(SO)およびスルホニル(SO_2)が挙げられる。アルキル基は、前述の適切な基の一つ以上(たとえば、1、2、3、4、5または約6)で中断されることができる。中断部位はまた、アルキル基の炭素原子と当該アルキル基に付着される炭素原子の間であっても良い。

30

【0038】

一つ以上の置換基を含有する上述の任意の基に関して、もちろん、そのような基には、立体的に実現不可能な、および/または、合成不可能な任意の置換または置換パターンが含まれないことが理解される。さらに、本発明の化合物は、これらの化合物の置換により発生するすべての立体異性体を含有する。本発明の一部の化合物は、非対称の置換炭素原子を含有しても良く、および、光学的に活性で、またはラセミ体で単離されてもよいことが理解される。当分野において、たとえば、ラセミ体の分割または光学的に活性な開始材料から合成することにより、光学的に活性な形態を調製する方法が公知である。すべてのキラル体、ジアステレオマー体、ラセミ体、およびすべての構造幾何異性体は、本発明の一部である。加えて、本発明の一部の化合物は、回転異性体として存在しても良い。一部の例において、これらの回転異性体は、分離することができる。回転異性体およびそれらの混合物は両方とも、本発明により企図されるものである。

40

【0039】

一つの異性体が、別のと比較して優れた特性または活性を示し得る。必要であれば、キラルカラムを用いたHPLCによって、または、Tucker et al., *J. Med. Chem.*, 37: 24 37 (1994)に記載されるような樟脳塩化物等の分割剤を用いた分割により、ラセミ物質を分離させることができる。キラル化合物はまた、キラル触媒またはキラルリガンド(たとえば、Huffman et al., *J. Org. Chem.*, 60: 1590 (1995))を用いて直接合成しても良い

50

。

【 0 0 4 0 】

「有効量」とは、一般に、所望される効果を得る量を意味し、たとえば、反応をもたらすのに十分な量である。

【 0 0 4 1 】

本明細書において、「接触すること」とは、触れること、接触すること、または接近もしくはごく近傍に近づく振る舞いを指し、分子レベルで、たとえば、化学的反応または物理的变化を、たとえば溶液中、細胞中または他の反応混合物中で、引き起こすことを含む。

【 0 0 4 2 】

10

「反応基」という用語は、カルボン酸の活性化エステル、アミン、アルコール、ハロゲン化スルホニル、メルカプタン、ボロナート、ホスホルアミダイト、イソシアネート、ハロアセタミド、アルデヒド、アジド、アシルニトリル、光活性化基またはハロゲン化アルキルを指す。

【 0 0 4 3 】

「結合物質」という用語は、たとえば、表面（たとえば、ビーズ、固形支持体、樹脂粒子またはアッセイプレート）、生物学的分子（たとえば、タンパク質、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド（DNAおよびRNAを含む）、酵素基質、抗体、ナノボディ、ポリペプチド、ポリペプチドベースの毒素、アミノ酸、脂質、炭水化物、ハプテン、小分子、薬剤、薬剤化合物、イオン錯化剤（たとえば、金属キレート剤）、微粒子、合成ポリマーもしくは天然ポリマー、細胞、ウイルス、他の蛍光分子または表面）、または他の対象の部分（たとえば、クロロアルカンまたはシアノベンゾチアゾール）等の、共有結合性物質を指す。

20

【 0 0 4 4 】

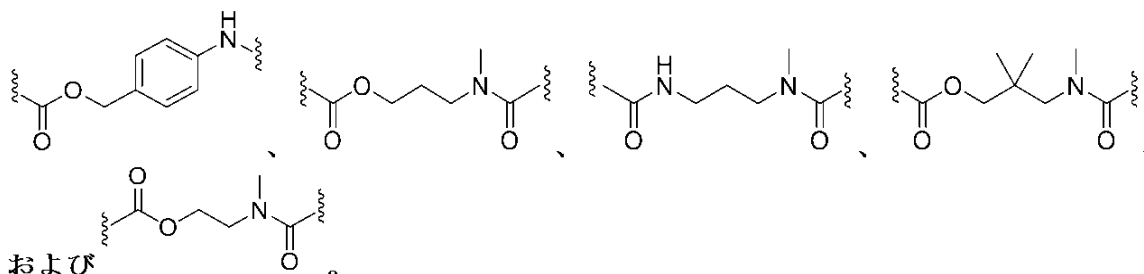
「トレーサー」は、本発明の色素が、上記で定義されるように生物学的分子に、おそらくはリンカーを介して結合されている、結合物質の一種である。

【 0 0 4 5 】

「痕跡の無いリンカー（traceless linker）」または「自己犠牲リンカー（self-immolative linker）」という用語は、リンカーから結合物質が切り離されると、非結合色素を放出するために、色素から当該リンカーが自動的に切り離される、リンカーを指す。痕跡の無いリンカーの例としては、以下が挙げられる：

30

【 化 9 】



40

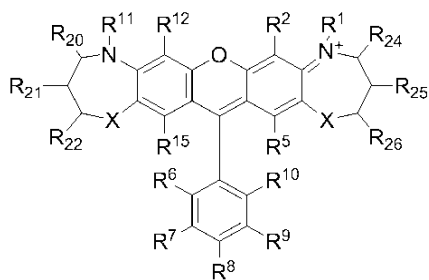
当業者には理解されることだが、リンカーの長さおよび置換のさらなる改変が可能である。

【 0 0 4 6 】

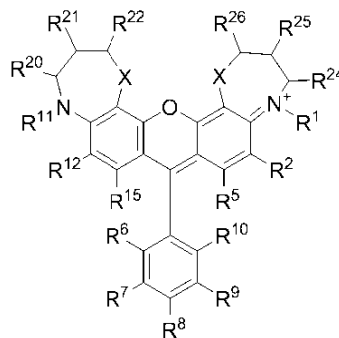
色素

本発明は、以下の式（I a）および式（I b）：

【化 10】



(I a)



(I b)

10

の化合物を提供し、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_s$ であり、

Lは、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^2 、 R^5 、 R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、共にアリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を形成し、

R^1 および R^2 、ならびに/または、 R^{11} および R^{12} は共に炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、ハロ、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

各Xは、独立して、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである。

【0047】

一部の実施形態において、 R^1 および R^2 、または R^{11} および R^{12} により形成された環は、C、N、OおよびSから選択される3 ~ 10の原子であってもよい。他の実施形態において、環は、5 ~ 7原子を有する。ある実施形態において、環原子はすべて炭素である。これらの環は、さらに、不飽和の要素を含有しても良い。ある実施形態において、これらの環は、アリール環またはヘテロアリール環である。

【0048】

式(I b)において、 R^2 および R^5 は、アリール環またはヘテロアリール環を共に形成しても良い。好適には、環は、フェニルまたはチオフェニルである。一部の実施形態において、環は置換されている。

【0049】

好適には、Xは CH_2 である。 R^{11} は、好適には C_{1-4} アルキルである。一部の実施形態において、 R^{11} は、メチルまたはエチルである。他の実施形態において、 R^{11} および R^{12} は、5 ~ 7員炭素環を形成する。好適には、環は非置換の6員環である。好適には、 R^2 および R^{12} は、H、ClまたはOMeである。 R^5 および R^{15} は、Hであっても良い。

【0050】

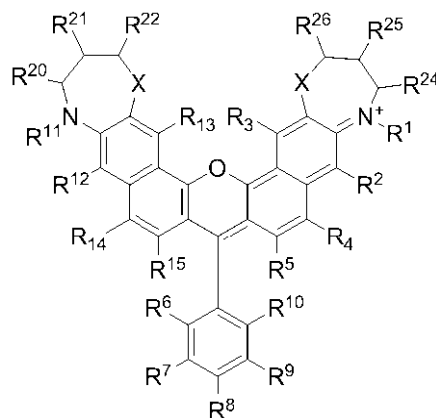
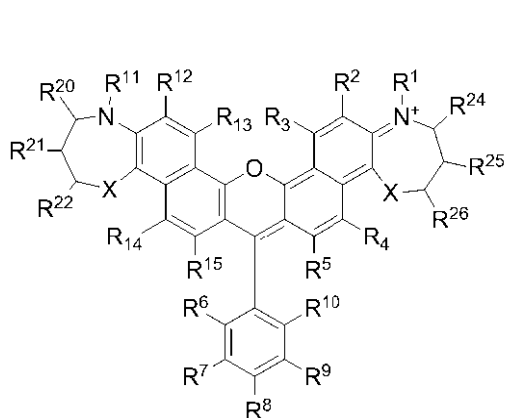
20

30

40

50

本発明はまた、以下の式 (I I a) および式 (I I b) :
【化 1 1 】



(I I a)

(I I b)

の化合物を提供し、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、H または C_{1-4} アルキル、L - R もしくは L - C_s であり、

L は、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - R または L - C_s であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^1 および R^2 、ならびに / または、 R^{11} および R^{12} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - R または L - C_s であり、

各 X は、独立して、CHR²³、O、S または NR³⁰ であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは、-C(O) C_{1-4} アルキルである。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、 R^1 および R^2 または R^{11} および R^{12} により形成される環は、C、N、O および S から選択される 3 ~ 10 原子であっても良い。他の実施形態において、環は 5 ~ 7 原子を有する。ある実施形態において、環原子はすべて炭素である。これらの環は、さらに、不飽和の要素を含有しても良い。ある実施形態において、環は、アリール環またはヘテロアリール環であってもよい。

【 0 0 5 2 】

式 (I I a) において、 R^2 および R^3 、 R^4 および R^5 、 R^{12} および R^{13} 、または R^{14} および R^{15} のうち一つ以上がまた、アリール環またはヘテロアリール環と共に連結されていても良い。式 (I I b) において、 R^4 および R^5 または、 R^{14} および R^{15} のうちの一つまたは両方が、アリール環またはヘテロアリール環を共に形成しても良い。好適には、環は、フェニルまたはチオフェニルである。一部の実施形態において、環

10

20

30

40

50

は置換されている。

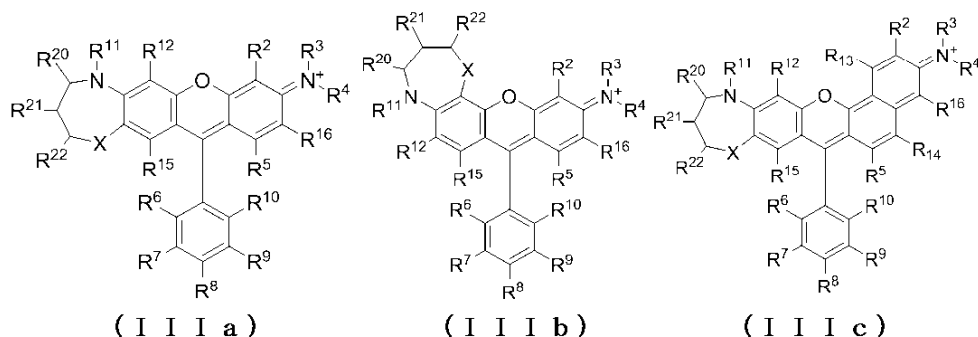
【 0 0 5 3 】

好適には、XはCH₂である。R^{1 1}は、好適にはC_{1 - 4}アルキルである。一部の実施形態において、R^{1 1}は、メチルまたはエチルである。他の実施形態において、R^{1 1}およびR^{1 2}は、共に5～7員炭素環を形成する。好適には、環は非置換の6員環である。好適には、R²、R⁵、R^{1 2}およびR^{1 5}は、Hである。

【 0 0 5 4 】

本発明はまた、以下の式(III a)、(III b)および(III c)：

【 化 1 2 】



の化合物を提供し、式中、

R^{1 1}は、独立して、HまたはC_{1 - 4}アルキル、L - RもしくはL - C_Sであり、

Lは、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

Rは、反応基であり、

C_Sは、結合物質であり、

R²およびR^{1 6}は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - RまたはL - C_Sであり、

R³およびR⁴は、H、アルキル、L - R、L - C_S、L - CO₂H、L - SO₃Hであるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、あるいは、R²およびR³、ならびに、独立して、R⁴およびR^{1 6}は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R⁵、R^{1 2}、R^{1 3}、R^{1 4}およびR^{1 5}は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - RまたはL - C_Sであり、

R^{2 0}、R^{2 1}、R^{2 2}およびR^{2 3}は、独立して、HまたはC_{1 - 6}アルキルであるか、または、R^{2 0}およびR^{2 1}、R^{2 1}およびR^{2 2}、R^{2 2}およびR^{2 3}の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^{1 1}およびR^{1 2}は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6 - 1 0}は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - RまたはL - C_Sであり、

Xは、CHR^{2 3}、O、SまたはNR^{3 0}であり、および、

R^{3 0}は、H、C_{1 - 4}アルキルまたは、-C(O)C_{1 - 4}アルキルである。

【 0 0 5 5 】

式(III a)および(III b)において、R^{1 6}およびR⁵は、炭素環、複素環、アリール環またはヘテロアリール環を共に形成しても良い。式(III c)において、R^{1 4}およびR⁵、ならびに/または、R²およびR^{1 3}は、炭素環、複素環、アリール環またはヘテロアリール環を共に形成しても良い。好適には、環は、フェニルまたはチオフェニルである。一部の実施形態において、環は、置換されている。

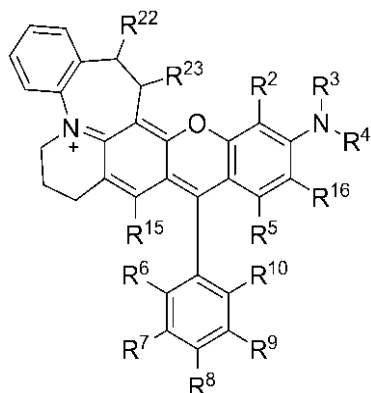
【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、 R^{11} および R^{12} で形成される環は、C、N、O および S から選択される 3 ~ 10 原子であっても良い。他の実施形態において、環は、5 ~ 7 原子を有する。ある実施形態において、環原子はすべて炭素である。これらの環は、さらに、不飽和の要素を含有しても良い。ある実施形態において、環は、アリールまたはヘテロアリールである。

【0057】

本発明はまた、以下の式 (IV) :

【化13】



(IV)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であってもよく、

L は、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、H またはアルキルであるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

R^{22} および R^{23} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である。

【0058】

本発明はさらに、以下の式 (V) :

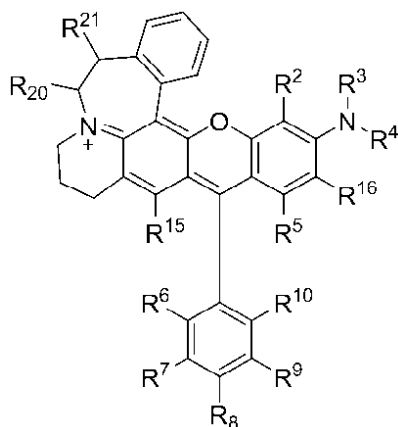
10

20

30

40

【化 1 4】



10

(V)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であってもよく、

L は、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

20

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、H またはアルキルであるか、または、炭素環、複素環、アリール環もしくはヘテロアリール環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

R^{20} および R^{21} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

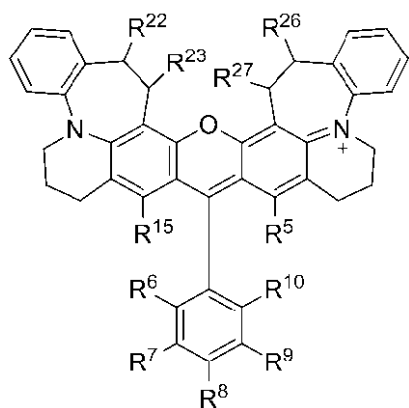
30

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である。

【0059】

本発明はさらに、以下の式 (VI) :

【化 1 5】



40

(VI)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 S

50

O_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ であり、

L は、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_S は、結合物質であり、

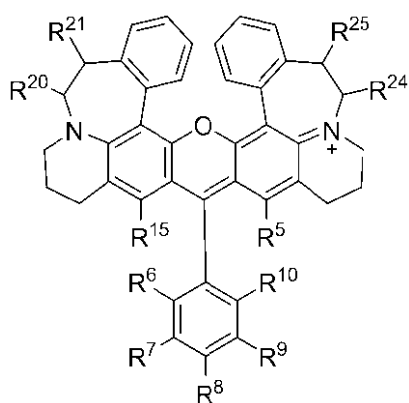
R^{22} 、 R^{23} 、 R^{26} および R^{27} は、独立して、 H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{22} および R^{23} および R^{26} および R^{27} のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ である。

【0060】

本発明はさらに、以下の式(VII)：

【化16】



(VII)

に記載の化合物を提供し、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、 H 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ であり、

L は、1～16の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C_S は、結合物質であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{24} および R^{25} は、独立して、 H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} および R^{24} および R^{25} のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OH 、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_S$ である。

【0061】

以下の記載は、適切な場合には、式(I)～(VII)に適用される。好適には、 R^2 、 R^5 および R^{15} は、 H である。 R^3 および R^4 は、好適には C_{1-4} アルキルである。一部の実施形態において、 R^3 および R^4 は、メチルまたはエチルである。 R^3 および R^4 は、たとえばピペラジン等の複素環を共に形成しても良い。他の実施形態において、 R^2 および R^3 、ならびに/または、 R^4 および R^{16} は、5～7員炭素環を共に形成する。環は、好適には非置換の6員環である。

【0062】

R^{10} は、好適には H 、 F 、 Cl 、 CO_2H または SO_3H である。ある実施形態にお

いて、 R^{10} は、Hである。 R^6 および R^9 は、好適にはHまたはハロゲンである。ある実施形態において、 R^6 および R^9 は、ClまたはFのいずれかであっても良い。

【0063】

好適には、 R^7 および R^8 のうちの一つは、 $-L-R$ 、 $-L-CO_2H$ 、または $-L-C_5$ であり、他は、H、ClまたはFである。

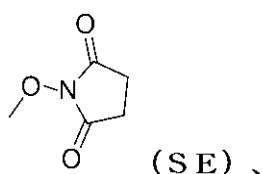
【0064】

Lは、好適には、 $-CO-$ 、 $-SCH_2CO-$ 、または $-SO_2-$ である。Lはまた、PEG部分を含んでも良い。他の実施形態において、Lは、「痕跡の無い」または「自己犠牲」リンカーである。

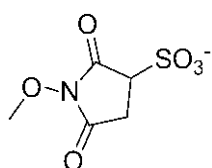
【0065】

好適には、Rは、

【化17】



【化18】

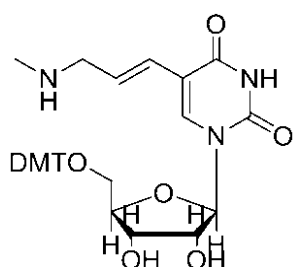


または $-Cl$ であり、SEが最も好ましい。

【0066】

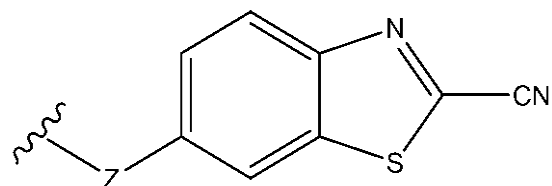
C_5 は、好適には、式 $NHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n(CH_2)_6Cl$ のクロロアルカン(n は、2~6)、ヌクレオシド(たとえば、

【化19】



(アリアルミノdU))、アリアルミノdUを介して好適に付着したオリゴヌクレオチド、またはシアノベンゾチアゾールである。好適には、シアノベンゾチアゾールは、

【化20】



であり、式中、Zは、OまたはNHである。

【0067】

好適な化合物としては、図1~3に示されるものが挙げられる。当業者であれば、列1および行1の間にある任意の組み合わせが実現可能であることを理解するであろう。化合物番号を示してあるものは合成されている。

【0068】

他の固有な特性の中で、7員環を含有する本発明の化合物は、既存の本分野の化合物と

10

20

30

40

50

比較して、色素の励起と発光において明らかな赤方偏移を示す。ある実施形態において、本発明の化合物は、最大で約 600 nm ~ 約 730 nm の発光を有する。ある実施形態において、本発明の化合物は、最大で約 575 nm ~ 約 675 nm の励起を有する。

【0069】

文献中には本明細書に記述されている様式で縮合 7 員環を蛍光色素に組み込む記述は無いが、2つの公表文献 (Zachariasse, et al., J. Photochem. Photobiol. A, 1997, 105, 373-383; Saha and Samanta, J. Phys. Chem. A 2002, 106, 4763-4771) において、6 員炭素環および 7 員炭素環で色素蛍光に関連する窒素を含有することの比較が記述されている。これらの文献報告中に記載される色素では、環サイズが増加するにつれ、溶媒極性が増加しつつ量子収量が劇的に低下するが、本発明の色素についてはそのようなことは発生しない。

10

【0070】

また、ローザミン (rosamine) 誘導体において非縮合環サイズの影響に関する議論がある (Lu and Burgess, J. Org. Chem., 2008, 73, 8711-8718)。発光波長の偏移は、5 員環から 6 員環へと環サイズが変化しても確認されなかった。極性溶媒中での高い量子収量を維持しながら、縮合 7 員環を含有する色素の、6 員環のそれと比較した、発光の赤方偏移はまったく予期しないものであった。

【0071】

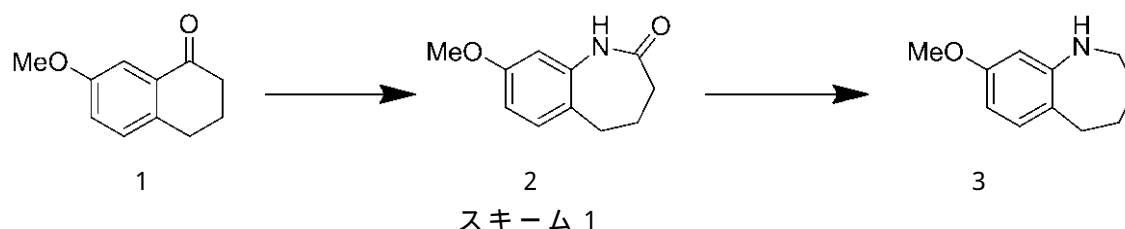
色素の合成

本明細書に記述される化合物は、様々な方法を用いて合成および結合されることが出来る。たとえば、Beija, et al., Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 2410-2433を参照のこと。例示的な合成を以下に要約する。

20

色素前駆体の合成

【化21】

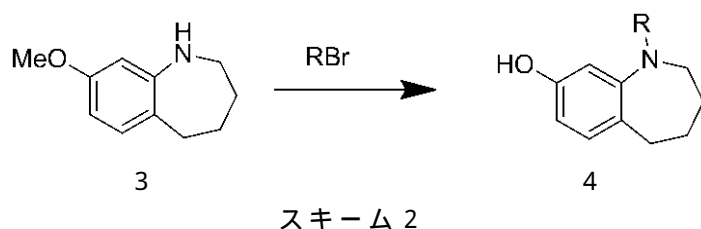


30

【0072】

中間体 3 の合成は、テトラロン 1 のオキシムの形成、次いで Beckmann 転位により化合物 2 を得ることができる。次いで、Lactam 還元により化合物 3 を得る。

【化22】

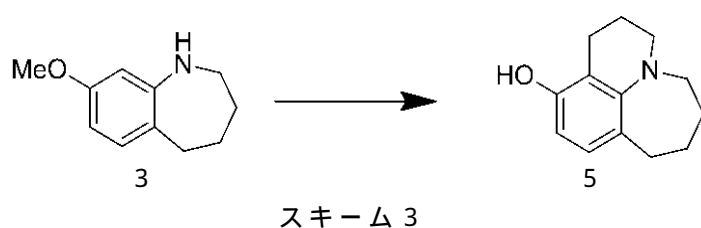


40

【0073】

この環状アミン 3 のアルキル化、次いで脱メチル化により化合物 4 を得る。

【化23】



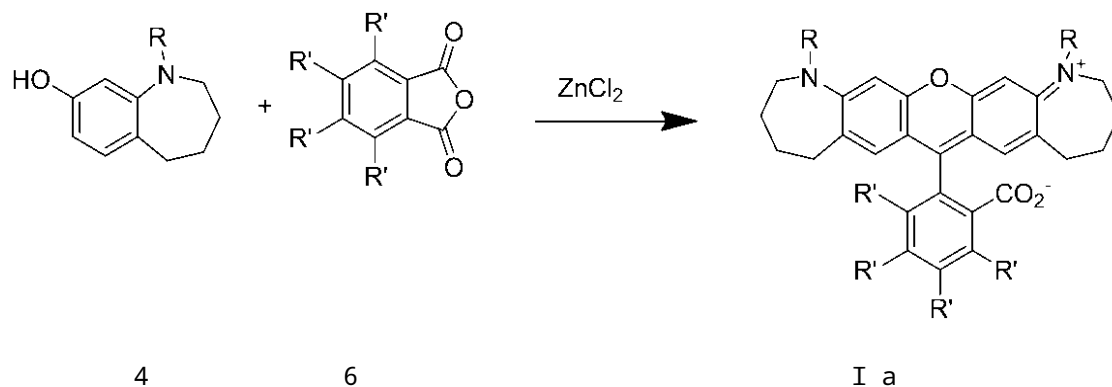
【0074】

50

ブロモクロロプロパンとの窒素のアルキル化、次いで熱誘導性環化により、三環アミンを得る。このアミンの脱メチル化により、化合物 5 を得る。5 - メトキシテトラロンの使用により、異性体アミノフェノールを得る。

対称性色素 (Symmetrical Dye) の合成

【化 2 4】



10

スキーム 4

【0075】

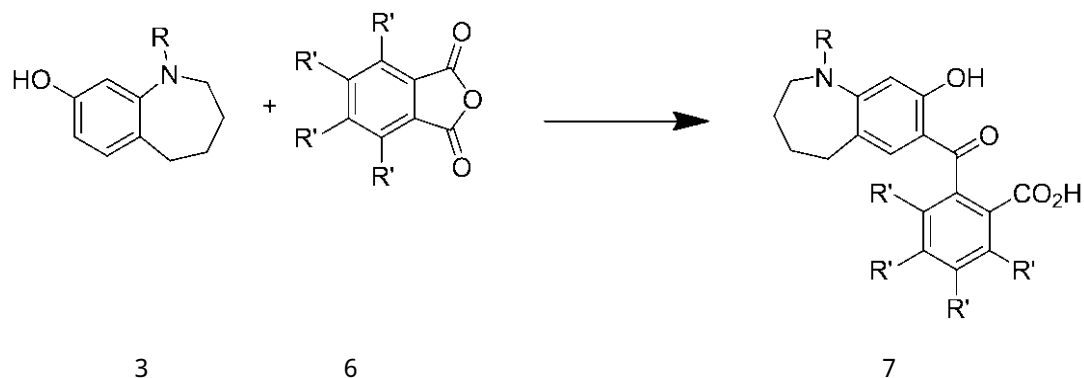
対称性ローダミンの合成は、化合物 3、無水物 6 および $ZnCl_2$ を高熱で共に融合させる溶融処理により得られる。無水物 6 が不斉である場合、精製により両方の異性体色素が得られ、通常、それらは等量である。多くの場合、脱カルボキシル化ローザミンの一部

20

はまた、化合物 I a の熱誘導性脱カルボキシル化から単離される。

非対称色素の合成

【化 2 5】



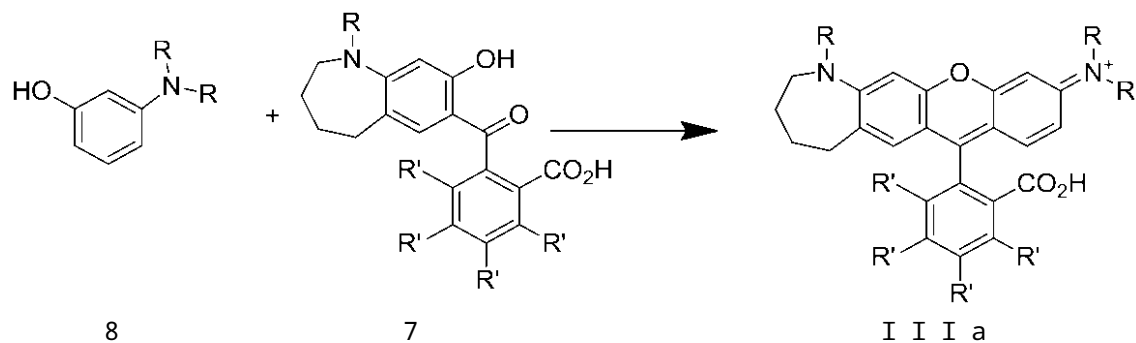
30

スキーム 5

【0076】

非対称ローダミン色素の合成は、2つの処理ステップで行うことができる。最初のステップでは、アミノフェノール 3 を、酸性触媒の非存在下で無水物 6 と反応させ、ケトン付加物 7 を得る。上述のように、もし 6 が比対称性である場合、7 の 2 つの異性体は、この段階で分離することができる。

【化 2 6】



40

スキーム 6

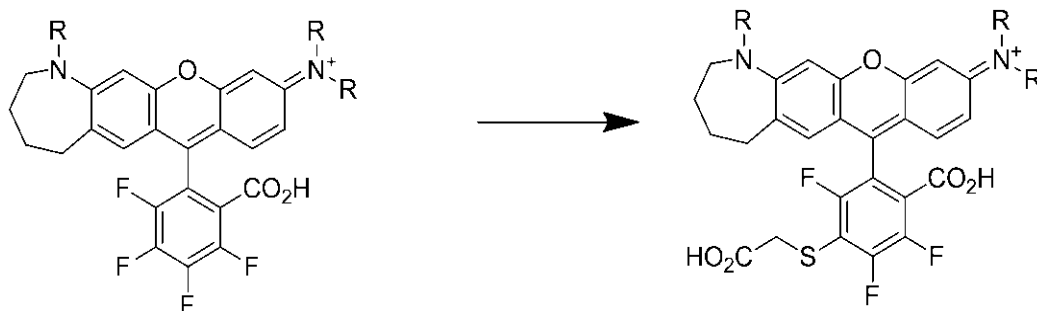
50

【 0 0 7 7 】

次いで、化合物 7 を別のアミノフェノール（またはアミノナフトール）と反応させ、式 I I I a の色素を得る。この反応の典型的なやり方は、触媒トリメチルシリルポリホスフェートと、80 で、DMFで行われる。

ハロゲン化色素の結合

【 化 2 7 】



10

スキーム 7

【 0 0 7 8 】

テトラハロゲン化ローダミン（フルオロまたはクロロのいずれか）を、DMF中で、メルカプト酢酸で処理することにより官能基化した。このカルボン酸を、次いで、スクジミジルエステル（succidimidy l ester）（SE）として活性化し、生体分子に結合させる。低級環上のカルボン酸を伴うローダミンを、SEとして直接活性化し、生体分子に結合させた。

20

【 0 0 7 9 】

当業者には理解できることだが、本明細書の化学式の化合物を合成する代替法が、当業者には明らかである。さらに、様々な合成ステップが、代替的な順序で実施されてもよく、または所望の化合物を得るために実施されてもよい。本明細書に記述される化合物の合成に有用な保護基の方法論（保護および脱保護）および合成化学変化が当分野に公知であり、たとえば、R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); および、L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)、ならびにそれらの続版に記述されるものが挙げられる。

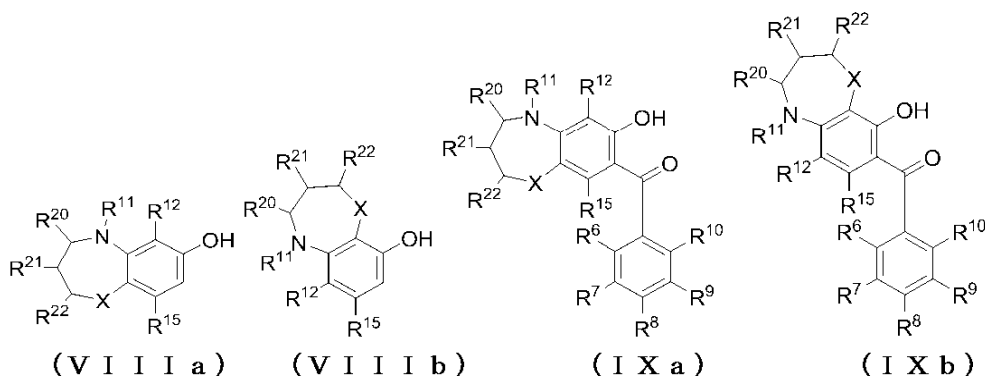
30

【 0 0 8 0 】

中間体

本発明はさらに、式 (V I I I) および (I X) :

【 化 2 8 】



40

の化合物を提供し、式中、

R¹¹ は、H または C₁₋₄ アルキル、L - R もしくは L - C_s であり、

L は、1 ~ 16 の非水素原子を有する、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の

50

飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基のうちの組み合わせを含有するものであるか、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合であり、

R は、反応基であり、

C₅ は、結合物質であり、

R¹² および R¹⁵ は、独立して、H、アルキル、アリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - R または L - C₅ であり、

R²⁰、R²¹、R²² および R²³ は、独立して、H または C₁₋₆ アルキルであるか、または、R²⁰ および R²¹、R²¹ および R²²、ならびに R²² および R²³ のうち一つ以上が、縮合アリール環を共に形成し、

R¹¹ および R¹² は、任意選択的に置換された環において、共に連結されても良く、R⁶⁻¹⁰ は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - R または L - C₅ であり、

X は、CHR²³、O、S または NR³⁰ であり、および、

R³⁰ は、H、C₁₋₄ アルキルまたは - C(O)C₁₋₄ アルキルである。

【0081】

一部の実施形態において、R¹¹ および R¹² により形成される環は、C、N、O および S から選択される 3 ~ 10 原子であっても良い。これらの環は、さらに、不飽和の要素を含有しても良い。

【0082】

これらの化合物は、式 (I) ~ (VII) の化合物の合成に有用である。

【0083】

標識化生体分子

簡潔に述べると、本発明の色素は、物質組成の検出を可能にさせる標識剤として用いられても良い。本発明の色素は、限定されないが、生体分子（たとえば、ポリペプチド、ポリペプチドベースの毒素、アミノ酸、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド（DNA および RNA を含む）、脂質、炭水化物および酵素基質）を含む広範囲の分子の標識に用いることができる。さらに、当該化合物は、ハプテン、小分子、薬剤、薬剤化合物、イオン錯化剤（たとえば金属キレート物質）、微粒子、合成ポリマーまたは天然ポリマー、細胞、ウイルス、他の蛍光物質または表面を標識するために用いられても良い。得られた標識分子は、複合体またはトレーサーと呼称されてもよい。

【0084】

一部の態様において、色素を、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと結合することができる。本発明の色素は、たとえばホスホルアミダイト（phosphoramidite）、活性化エステルまたは反応性プラチナ錯体を介する等の当業者公知の任意の方法でヌクレオシド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと結合されてもよい。

【0085】

他の態様において、本発明の色素は、アミノ酸、アミノ酸類似体、またはポリペプチドと結合するために用いられることができる。他の態様において、本発明の色素は、小分子（たとえば、薬剤または薬剤化合物）と結合するために用いられることができる。一部の態様において、結合小分子は、蛍光トレーサーとして用いることができる。

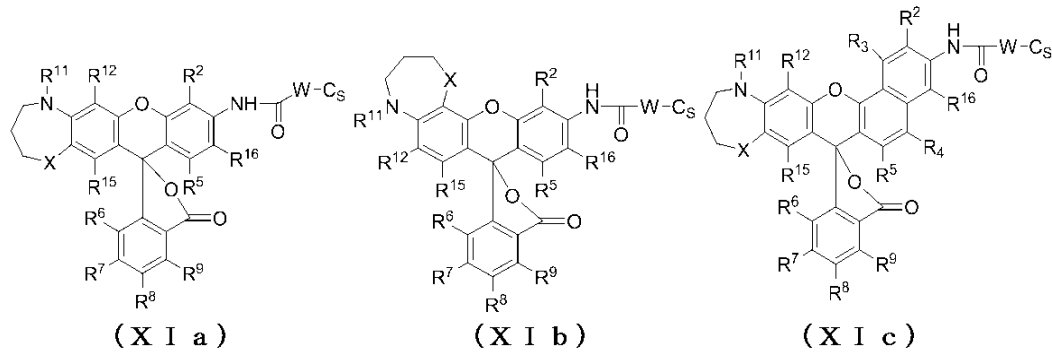
【0086】

一部の実施形態において、標識生体分子は、プロ蛍光性化合物（profluorescent compounds）であってもよい。プロ蛍光性化合物は、関連色素と比較して減少された蛍光を有し、対象の酵素に対する基質を含有するものである。対象の酵素に作用されると、プロ蛍光性化合物由来の蛍光色素が放出され、それにより蛍光が発せられる。「痕跡の無い」または「自己犠牲」リンカーをまた、色素と酵素基質の間に含めることができる。

【0087】

例示的な標識生体分子として、式 (XIa)、式 (XIb) および (XIc) :

【化 29】



10

の化合物が挙げられ、式中、

R^{11} は、H または C_{1-6} アルキルであり、

W は、痕跡の無いリンカーまたは直接結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、酵素基質であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L-R、L- C_s 、L- CO_2H 、または L- SO_3H であり、

20

R^{11} および R^{12} は、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環に共に連結されても良く、

$R^6 - R^9$ は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L- CO_2H 、または L- SO_3H であり、および、

X は、 CH_2 、O、S または NH である。

【0088】

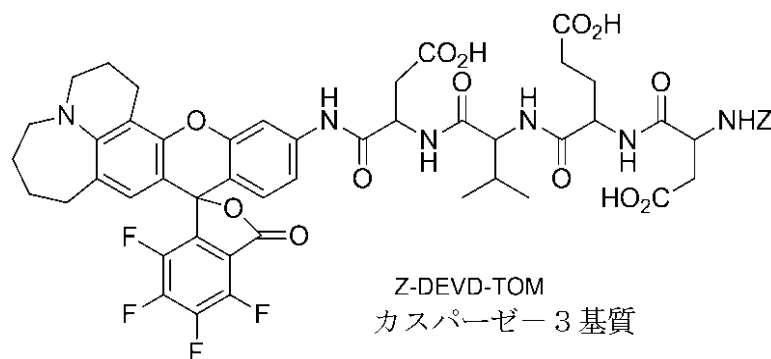
一部の実施形態において、酵素基質は、Z-DEVD である。別の実施形態において、酵素基質は Z-AAF-ベンジルである。

【0089】

式 (X I a) によるプロ蛍光化合物としては、以下：

30

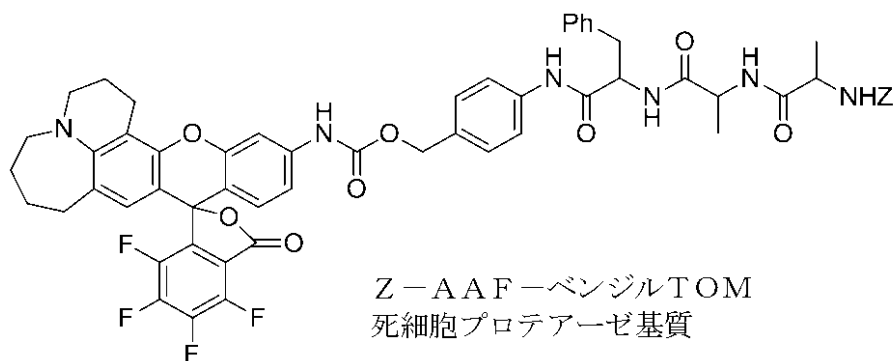
【化 30】



40

および、

【化 3 1】



10

が挙げられる。

【0090】

他の実施形態において、本発明は、他のプロ蛍光性生体分子を提供する。一部の実施形態において、本発明の色素は、生体分子を介してクエンチャーに付着される。色素の発光スペクトルで吸収する任意のクエンチャーを用いることができる。当業者であれば、そのようなクエンチャーを特定することができるであろう。適切なクエンチャーとしては、Black Hole Quenchers (商標) および QXL (商標) クエンチャー (Life Technologies より入手可能) が挙げられる。

【0091】

20

クエンチャーを含有する例示的なプロ蛍光性化合物としては、以下が挙げられる：MM P-3 基質として、クエンチャー-GABA-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab (色素)-Ala-Lys-NH₂ (アミノ酸鎖の切断により、クエンチャーが色素から分離され、蛍光が発せられる)。一つの実施形態において、色素は、低級環のカルボン酸を介してアミノ酸鎖に結合されることができる。色素はまた、他の位置でアミノ酸鎖に付着されることもできる。

【0092】

使用法

本発明の色素は、広範囲のアプリケーションを目的とする共有結合標識生体分子に有用なツールを提供する。標識により、たとえばタンパク質、糖タンパク質、核酸および脂質等の生体分子ならびに小分子 (たとえば、薬剤もしくは薬剤物質、無機化学薬品またはそれらの任意の組み合わせ等) に関する相互作用の研究が可能となる。相互作用は、セルなしの生物系、細胞系、または *in vivo* で研究されてもよい。様々な相互作用の分析は多くの場合、科学研究および開発、薬物デザイン、スクリーニングおよび最適化、系統発生分類、個人、親および法鑑定の変異子型決定、環境研究、疾患状態の診断、予後診断および/または治療の重要な部分を担う。

30

【0093】

本発明の一部の態様において、本発明の複合体は、試料を標識し、当該試料を同定または定量できるようにするために用いられる。たとえば、そのような複合体は、標的生物検体に対するアッセイの一部として添加されてもよく、または、生物学的液体もしくは非生物学的液体中の検出可能なトレーサー要素として添加されてもよい。

40

【0094】

試料は、生物学的材料 (たとえば、固形材料 (有機または無機) からの洗浄液、細胞培養が為された培地、細胞溶解物、評価のために細胞が播種された緩衝液、または生理学的源 (たとえば、血液、血漿、血清、尿等)) から直接採取されてもよい。試料が細胞を含有する場合、当該細胞は、任意選択的に、単一細胞 (微生物を含む)、または2次元もしくは3次元で他の細胞に関連した多細胞 (多細胞生物、胚、組織、生検、線維、バイオフィルム等を含む) である。試料が細胞を含有する場合、当該細胞は、溶解されていてもよく (たとえば、細胞溶解物)、または細胞全体であってもよい。

【0095】

50

あるいは、試料は固形であり、任意選択的に、スメア、またはスクレープ、またはろ過により液体または蒸気から除去された残余物である。本発明の一つの態様において、試料は、生理学的液体（たとえば尿、脳脊髄液、血液、リンパ液、組織ホモジネート、間質液、細胞抽出物、粘液、唾液、痰、糞便、生理学的な分泌物または他の同様の液体等）の分離物または未濾過物を含む、生物学的液体から得られる。あるいは、試料は、たとえば土壌、水、または空気等の環境的源から、またはたとえば廃棄物流、水源、供給ラインもしくは製造ロットから取り出された等の工業的源から得られる。

【0096】

他の実施形態において、試料は、固形状もしくは半固形状基質の上または内に存在する。本発明の一つの態様において、基質は膜である。他の態様において、基質は、たとえば核酸またはタンパク質を分離および特徴付けるために用いられる電気泳動ゲル、または電気泳動ゲルから膜へとトランスファーすることにより調製されるプロットである。他の態様において、基質はシリコンチップまたはガラススライドであり、対象の検体はアレイ中で、そのチップ上またはスライド上に固定されている（たとえば、試料は、マイクロアレイ中でタンパク質または核酸ポリマーを含有している）。さらに他の態様において、基質はマイクロウェルプレートまたはマイクロ流体チップであり、試料は、自動化された方法、典型的には、たとえば薬剤スクリーニング等のハイスループットスクリーニングの様々な方法により、分析される。

【0097】

色素複合体は通常、検出可能な光学的反応を生じさせるために選択された条件下で、上述の複合体と対象の試料とを結合させることによって利用される。次いで、試料は、光学的反応を引き起こすために選択された波長で照らされる。典型的には、試料の具体的な特性は、光学的反応と、標準反応または予期される反応との比較により測定される。

【0098】

検出可能な光学的反応とは、観察または機器を使用してのいずれかで検出することができる光学的なシグナルの発生または変化を意味する。通常、検出可能な反応は、蛍光の強度、励起波長もしくは発光波長分布、蛍光の存続期間、蛍光偏光またはそれらの組み合わせの変化等の、蛍光の変化である。標準または予測される反応と比較した標識の程度および/または位置は、試料が所与の特性を有しているかどうか、およびそれがどの程度であるかを示唆している。本発明の一部の色素は、ほとんど蛍光発光を示さないが、発色団色素としてまだ有用である。そのような発色団は、FRET応用においてエネルギーアクセプターとして有用であり、または単純に、試料もしくは試料の一部に所望の色を与えるのに有用である。

【0099】

生物学的応用を目的として、色素複合体は通常、当分野に良く知られている方法に従い調製される水性溶液、ほぼ水性の溶液、または水性混和性の溶液において用いられる。色素化合物の正確な濃度は、実験条件および所望される結果に依存するが、典型的には、約1ナノモル～1ミリモルかそれ以上の範囲である。最適濃度は、最小のバックグラウンドの蛍光で、満足な結果が得られるまで、体系的に変化させることにより決定されてもよい。

【0100】

色素複合体は、生物学的成分を含有する試料を標識するために用いられても良い。試料は、成分（生細胞、細胞抽出物、細胞溶解物、細菌、ウイルス、細胞小器官およびそれらの混合物を含む）の異種混合物、または単一成分または同種成分集団（たとえば、天然アミノ酸もしくは合成アミノ酸、核酸もしくは炭水化物ポリマー、または脂質膜複合物）を含有しても良い。色素は多くの場合、使用濃度範囲内で、生細胞および他の生物学的成分に対して非毒性である。

【0101】

色素複合体は、色素複合体と対象の試料成分の間の接触を促進するように、試料と混合されてもよい。典型的には、色素複合体または色素複合体を含有する溶液は、単純に、試

10

20

30

40

50

料に添加される。本発明のある色素（たとえば、1つ以上のスルホン酸部分で置換されているもの）は、生物細胞の膜にあまり浸透しないが、いったん生細胞の中に入ると、多くの場合、その中に良く留まることが出来る。細胞膜の透過性処置（たとえば、エレクトロポレーション、ショック処置または高濃度細胞外ATP）を用いて、選択された色素複合体を細胞内に導入してもよい。あるいは、選択された色素複合体を、たとえば加圧マイクロインジェクション、スクレープローディング（scrape loading）、パッチクランプ法、またはファゴサイトーシス等により、物理的に細胞内に挿入することもできる。

【0102】

脂肪族アミンまたはヒドラジン残基を包含する色素は、細胞内にマイクロインジェクションされてもよく、たとえばホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド等のアルデヒド固定剤により細胞内でそれらの位置を固定することができる。この性質により、たとえばニューロントレース等の細胞内用途にそれら色素を活用することができる。

【0103】

脂溶性の置換基（たとえば、リン脂質）を有する色素は、たとえば、膜構造に対するプローブとしての利用のために、またはリポソーム、リポタンパク質、フィルム、プラスチック、脂溶性ミクロスフィアまたは類似の材料への組み込みのために、またはトレースのために、非共有結合的に脂質アセンブリへと組み込まれても良い。脂溶性色素は、膜構造の蛍光プローブとして有用である。

【0104】

化学反応性色素化合物は、上述の色素複合体を形成するために、様々な材料上対応する官能基に、共有結合的に付着してもよい。細胞表面上、細胞膜内、たとえば細胞小器官等の細胞内分画、または細胞質内の反応部位を標識するために色素化合物を用いて、それらの存在、量、近接性、活性または試料内のそれらの空間的および時間的分布を測定することができる。同様に光反応性の色素を用いて、生物細胞の外膜の成分を光標識しても良く、または細胞に対する光固定性極性トレーサーとして用いても良い

【0105】

一部の実施形態において、クロロアルカン標識色素を、HaloTag（登録商標）と共に用いて、対象のタンパク質とHaloTag（登録商標）タンパク質の間に融合タンパク質を生成させることにより、対象タンパク質を検出してもよい。一般的に、これらの融合タンパク質は、HaloTag（登録商標）融合構築物から細胞により発現され、融合タンパク質は、クロロアルカン標識色素を用いることにより検出される。このことにより、タンパク質発現を検出でき、またはタンパク質発現の経時的変化、タンパク質の局在と移動を測定することができる。さらに、蛍光ラベルを用いて、これらのタンパク質をゲル中で検出することができる。当該色素はまた、たとえばクチナーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素/トリメトプリムSNAPタグ、ClipTag、アルキルシトシントランスフェラーゼ（米国特許出願第2012/0237961号（本明細書に参照により援用される）を参照のこと）、およびアシル担体タンパク質（米国特許出願第2010/0173384号（本明細書に参照により援用される）を参照のこと）等の他のオルトゴナルな標識系で用いても良い。さらに、HaloTagはまた、たとえばHsuingen環化（クリック化学）、ヒドラゾンおよびオキシム形成ならびにシュタウディンガーライゲーション等の他の標識作用に対してオルトゴナルである。

【0106】

任意選択的に、試料は、残余分、過剰分もしくは結合しなかった分の色素化合物または色素複合体を除去するために、標識の後に洗浄される。試料は任意選択的に、標識の過程で一つ以上の他の溶液（洗浄溶液、透過および/または固定溶液、ならびに追加の検出試薬を含有する溶液を含む）と混合される。追加の検出試薬とは、一般的に、特定の細胞成分、細胞内基質または細胞状態の存在によって、当分野に一般に知られている方法に従い、検出可能な反応を生み出すものである。追加の検出試薬が、本発明の色素化合物のスペクトル特性とは異なる産物を有する、またはそのような産物を生成するものであった場合

10

20

30

40

50

、マルチカラーの応用が可能となる。このことは、追加の検出試薬が、標識色素スペクトル特性と検出可能な程度にはっきりと異なるスペクトル特性を有する色素または色素複合体である場合に、とりわけ有益である。

【0107】

色素複合体は、たとえば、顕微鏡検査法および免疫蛍光アッセイにおける抗体複合体の使用、または核酸ハイブリダイゼーションアッセイのためのヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド複合体の使用、核酸増幅反応、および核酸配列解析（たとえば、米国特許第5,332,666号、第5,171,534号および第4,997,928号ならびに国際公開第94/05688号を参照のこと）等の当分野に公知の方法に従い用いられる。本発明の複合的な独立系色素の色素複合体は、マルチカラー用途の実用性を備えている。

10

【0108】

標識の後、または標識している間の任意のときに、検出可能な光学的反応を生み出すために選択された光の波長で試料を照射し、光学的反応を検出する方法を用いて観察する。本発明の色素化合物の照射に有用な機器としては、限定されないが、携帯紫外線ランプ、水銀アークランプ、キセノンランプ、レーザーおよびレーザーダイオードが挙げられる。これらの照射源は、任意選択的にレーザースキャナー、蛍光マイクロプレートリーダー、標準もしくはミニ蛍光光度計、またはクロマトグラフィー検出器に統合される。

【0109】

光学的反応は、任意選択的に、目視検査または以下の任意のデバイスを用いて検出される：CCDカメラ、ビデオカメラ、写真用フィルム、レーザースキャニングデバイス、蛍光光度計、フォトダイオード、量子カウンター、落斜蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、またはたとえば光電子増倍管等のシグナル増幅装置。試料がフローサイトメーターを用いて検査される場合、試料の検査には、蛍光反応に従い、任意選択的に試料の一部をソーティングすることが含まれる。

20

【0110】

使用法の例示

i. 核酸ポリマーの検出

一つの実施形態において、本発明の色素オリゴヌクレオチド複合体は、核酸ポリマーを含有する、または含有すると考えられる試料と混合され、色素オリゴヌクレオチド複合体（たとえば、プローブまたはプライマー）と試料の混合物を、複合体中のオリゴヌクレオチドと試料中の核酸ポリマーとが十分に混合される時間、インキュベートし、核酸ハイブリッド（複合物）（すなわち、プローブ）を形成させ、または核酸合成（すなわち、プライマー）を開始させ、それを検出することが出来る。標識分子の特徴（存在、位置、強度、励起スペクトルおよび発光スペクトル、蛍光極性、蛍光発光期間、ならびに他の蛍光シグナルの物理的特性）を用いて、試料の性状または部分の検出、識別、ソート、定量、配列解析および/または分析を行うことができる。本発明の色素複合体は、任意選択的に、異なるスペクトル特性を有する同一クラスの色素を含む、一つ以上の追加の試薬（たとえば、検出可能な程度に異なる蛍光試薬）と併せて用いられる。

30

【0111】

一般に、色素複合体は、試料および使用目的と合う水溶液または水性混和溶液中での色素複合体の溶解により、使用の調製がなされる。生物学的試料に対しては、細胞形態または細胞生理機能を乱すことは最小限にすることが望ましく、溶液はそれに基づいて選択される。

40

【0112】

標識溶液は、色素複合体を水性溶媒（たとえば、水、緩衝液（たとえば、緩衝生理食塩水。好ましくは一部の生存識別用途のために、リン酸塩が含まれていないもの）、トリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン（TRIS）緩衝液（好ましくはEDTAを含有する）、または水混和性有機溶媒（たとえばジメチルスルホキシド（DMSO）等）、ジメチルホルムアミド（DMF）、または低級アルコール（たとえば、メタノールまたはエタ

50

ノール))に直接、溶解することにより作製される。色素複合体は、通常、標識溶液に用いられるものよりも約100倍高い濃度で、前もって有機溶媒(たとえば、100%DM SO)に溶解されており、次いで、色素複合体が有効量で存在するように、水または緩衝液等の水性溶液で、1倍以上に希釈される。

【0113】

細胞性試料のための標識溶液は一般的に、0.1 nM超、50 μM未満の色素濃度であり、より典型的には、1 nM超、10 μM未満(たとえば、0.5 ~ 5 μM等)である。電気泳動ゲルに対する標識溶液は、一般的に、0.1 μM超、10 μM未満の色素濃度であり、より典型的には約0.5 ~ 2 μMである。同様のことが、核酸と混合される前のゲルへの色素添加にも当てはまる。溶液中の遊離核酸の検出および定量に対する標識溶液は、一般的に、0.1 μM ~ 2 μMの濃度を有している。標識溶液の最適濃度および組成は、試料の性状(物理的、生物学的、生化学的および生理学的特性を含む)、色素-試料相互作用の性状(核酸部位への色素の移転率を含む)、および実施される分析の性状によって決定され、ならびに、標準法に従い、決定することができる。

【0114】

試料中の核酸は、DNAもしくはRNA、またはそれらの混合物もしくはハイブリッドであっても良い。いずれのDNAも任意選択的に一重、二重、三重または四重らせんDNAであり、いずれのRNAも任意選択的に一重(ss)または二重(ds)らせんである。核酸は、天然ポリマー(起源が生物学的なもの)または合成ポリマー(人工的に改変または調製されたもの)であっても良い。核酸ポリマー(たとえば、少なくとも8塩基または塩基対を含有するもの)は、核酸断片、オリゴヌクレオチドまたは、2次元もしくは3次元構造を伴うより大きな核酸ポリマーとして存在しても良い。核酸は、任意選択的に、たとえば染色体等のように、凝縮された状態で存在する。核酸ポリマーは、任意選択的に一つ以上の改変塩基を含有し、または非共有結合的にもしくは共有結合的に付着されている標識に結合し、または非共有結合的にもしくは共有結合的に付着されている標識を含有する。たとえば、改変塩基は、自然発生の改変塩基(たとえば、tRNAの(プソイドウリジン)、5-メチルシトシン、6-メチルアミノプリン、6-ジメチルアミノプリン、1-メチルグアニン、2-メチルアミノ-6-ヒドロキシプリン、2-ジメチルアミノ-6-ヒドロキシプリン、5-アミノ-DU、イソC、イソG、または他の公知の微量塩基(たとえば、Davidson, The Biochemistry Of The Nucleic Acids (1976)を参照のこと)であってもよく、またはたとえばモルホリン誘導体化リン酸塩(AntiVirals, Inc., Corvallis, Oregon)等の独特のリンカー、またはたとえばN-(2-アミノエチル)グリシン単位(Wittung et al., Nature, 368:561 (1994))等のペプチド核酸を含有するために合成的に改変されているか、または、脂肪族アミン、カルボン酸、アルコール、チオールまたはヒドラジンである単一反応性官能基(10炭素未満)を含有するために合成的に改変されているか、または、蛍光標識もしくは他のハプテン(たとえば、イノシン、プロモデオキシウリジン、ヨードデオキシウリジン、ピオチン、ジゴキシゲニン、2,4-ジニトロフェニル等(当該標識は元々ヌクレオチドに付着されている(たとえば、CHROMATIDE(商標)標識ヌクレオチド、Molecular Probes, Eugene, Oregon)か、核酸に非共有結合的に付着しているリガンド、または核酸ポリマーの3'末端もしくは5'末端に位置している)を含有するために合成的に改変されている。主に改変塩基および結合を含有している核酸ポリマーに対する色素の感度は、結合状態との干渉により減少し得る。一部の実施形態において、色素は、ある色素:塩基対比で、非特異的ヌクレアーゼ活性を阻害するが、制限エンドヌクレアーゼ活性は阻害しない可能性がある。

【0115】

核酸を含有する試料は、任意選択的に、生物学的構造(すなわち、生物体または生物体の個別の単位)、または溶液(生物学的構造を含有する溶液を含む)、または固形もしくは半固形物質である。結果的として、核酸は任意選択的に、溶液中に遊離し、固形もしくは半固形物質中または固形もしくは半固形物質上で固定され、生物学的構造から抽出され

10

20

30

40

50

(たとえば、溶解細胞、組織もしくは細胞小器官から)、または、生物学的構造内に内包されたままである。核酸を色素に結合させるためには、たとえ核酸が生物学的構造内に内包されていなくとも、核酸を水溶性環境におき、色素に接触させる必要性がある。

【0116】

核酸を含有する生物学的構造は、任意選択的に、たとえば、原核微生物もしくは真核微生物、またはウイルス、ウイロイド、染色体もしくは細胞小器官のように、核酸が細胞内または間質腔に存在する、細胞または組織である。あるいは、生物学的構造は、組織または細胞内に包含されていなくともよく、ウイルスまたは微生物もしくは他の細胞として存在しており、またはその元の細胞から除去された細胞内構成要素(たとえば、プラスミドもしくは染色体、またはミトコンドリアもしくは核もしくは他の細胞内小器官)として存在している。典型的には、生物学的構造は、任意選択的に真核細胞内に含有される細胞内小器官、染色体または細胞である。真核細胞の内側に存在する細胞は、一般に、寄生生物または、たとえばウイルス、細菌、原虫、マイコプラズマもしくはマイコバクテリウム等の他の感染性病原体である。核酸が、生物学的構造(細胞である)の中に含まれている場合、その細胞は生きた細胞または死んだ細胞またはそれらの混合物である。すなわち、細胞膜の完全性は、任意選択的に、保たれているか、または自然に破壊(自己溶解)、機械的もしくは化学的手段で破壊、またはたとえば温度や圧力の変化等の環境的手段により破壊されている。あるいは、細胞は、ブレブを形成しているか、またはアポトーシスを起こしているか、または増殖サイクルにあるか、または細胞分裂の状態にある。

【0117】

核酸が溶液中に存在する場合、試料溶液は、精製核酸または合成核酸(たとえばオリゴヌクレオチド等)からそのままの混合物(たとえば細胞抽出物もしくはホモジネートもしくは他の生物学的液体等)まで、または生物学的、工業的もしくは環境的原料由来の希釈溶液のうちの一つを含むように、様々であり得る。一部の例においては、色素と混合する前に、溶液中の生体分子または液体の混合物から核酸を分離することが望ましい。一般的に、他のタンパク質または他の生物学的分子を有する粗混合物から核酸を分離および精製するための技術は非常に多く存在する。様々な支持体または溶液を用いた、または流体中での、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術等が挙げられる。あるいは、核酸ポリマーがヌクレアーゼの存在下で分解されないように、核酸混合物は、RNAseまたはDNAseで処理し、本発明の色素を用いて、分解産物から識別することができる。

【0118】

本発明の色素は生命体に対する毒性が比較的低いため、多くの場合、生きている試料中の核酸を、色素それ自身により引き起こされるダメージを極力少なく、または無し、検証することができる。一部の細胞は、他の細胞に対しては非透過性であると示されている色素を、細胞膜を超えての受動核酸とは異なる手段(たとえば、ファゴサイトーシスまたは他の摂取手段)により容易に取り込むことができるが、損なわれていない細胞またはゲル中の試料に用いるために、より浸透性のある色素を用いてもよい。これらの色素は、標準的なゲルベースのアプリケーションに用いることができる。色素の光安定性、毒性、結合アフィニティ、量子収量、および蛍光増強は、当分野に公知の標準的な方法に従い、測定される。

【0119】

一つの実施形態において、色素オリゴヌクレオチド複合体(たとえば、プローブまたはプライマー)は、生理学的試料中の対立遺伝子の同定のための方法およびキット中で用いられる。一つの実施形態において、遺伝子座、プライマーおよび増幅プロトコルの適切なセットが、複合的な共増幅遺伝子座から増幅対立遺伝子を生成するために選択され、一つの実施形態においては、当該複合的な共増幅遺伝子座は、サイズが重複しない、または、サイズが重複する異なる遺伝子座を対立遺伝子間で識別することができるような方法で標識される。さらに、この方法より、単一増幅プロトコルの使用に適した短いタンデムリピート(STR)遺伝子座の選別も予期させる。上手くいく組み合わせは、遺伝子座の組み合わせのトライアンドエラー、プライマー対配列の選択、およびすべての含有遺伝子

座が増幅されうる平衡を特定するためのプライマー濃度の調整により創り出すことができる。マルチプレックスな増幅反応ステップで増幅されうる遺伝子座の数は、その反応が特定することができる増幅対立遺伝子を生み出す限り、2～50、または2～50の間の任意の整数値（たとえば、16、17、18、21、23または26）であってもよい。一つの実施形態において、増幅された断片は、500bp未満の長さである。

【0120】

本発明の方法で用いられるプライマーの合成は、当業者公知の任意の標準的なオリゴヌクレオチド合成法を用いて実施することができる。各遺伝子座に対するプライマーの少なくとも1つに、異なる色素標識が共有結合的に付着する。

【0121】

本発明の方法に用いるためのゲノムDNA試料の調製は、DNA増幅と相性の良い任意のDNA調製法を用いて行うことができる。多くのそのような方法が当業者に公知である。分析されるDNA試料の少なくとも1つがヒトゲノムDNAである場合、そのDNAは、組織、血液、精液、腔細胞、毛髪、唾液、尿、骨、口腔試料、胎盤細胞または胎児細胞を含有する羊膜液、絨毛膜絨毛、および上述の試料の任意の混合物からなる群から選択される試料から調製されても良い。

【0122】

ゲノムDNA試料が調製された時点で、標的遺伝子座を、マルチプレックス増幅ステップで共増幅することができる。多くの異なる増幅法（限定されないが、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）、転写ベース増幅、およびストランド置換増幅（SDA）を含む）の任意の一つを用いて、遺伝子座を増幅することができる。一つの実施形態において、DNA試料は、セット中の各遺伝子座に特異的なプライマー対を用いたPCR増幅に供される。

【0123】

各遺伝子座に対するプライマーの少なくとも1つは、色素標識に共有結合的に付着することができる。そのうちの1つは本発明の色素を含有する。プライマーおよびそれらに付着した色素は、ある色で標識された各遺伝子座に対するプライマーを用いて増幅された対立遺伝子が、同じ色で標識されたプライマーを用いてそれらで共増幅されたセット中の他の遺伝子座の対立遺伝子と、対立遺伝子が分離されたとき（たとえば、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動等）に重複しないように、マルチプレックスな増幅反応での使用に対して選択される。本発明での使用のためのプライマーへの付着に適した蛍光標識は、市販されている。たとえば、PE BiosystemsおよびMolecular Probesから販売されている蛍光およびカルボキシ-テトラメチルローダミン標識およびそれらの化学的誘導体を参照のこと。一つの実施形態において、少なくとも3つの異なる標識を用いて、マルチプレックス増幅反応で用いられる異なるプライマーを標識する。サイズマーカーがマルチプレックス反応の評価に含まれる場合、サイズマーカーを調製するために用いられるプライマーは、その反応における対象遺伝子座を増幅するために用いられたプライマーとは異なる標識で標識されてもよい。

【0124】

マルチプレックス増幅ステップから、増幅対立遺伝子のセットが生成された時点で、増幅対立遺伝子が評価される。本方法の評価ステップは、多くの異なる手段のうちの任意の一つを用いて行うことができる。電気泳動（たとえば、キャピラリー電気泳動または変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動）を用いて、マルチプレックス増幅反応の産物を分離してもよい。ゲル分離および電気泳動法、ならびに評価ステップでの使用に適した条件は、当分野で公知である。変性ポリアクリルアミドゲルおよびキャピラリー電気泳動でのDNA断片の分離は、主に断片のサイズに基づき発生する。

【0125】

増幅対立遺伝子が分離された時点で、その対立遺伝子およびゲルまたはキャピラリー中の他の任意のDNA（たとえば、DNAサイズマーカーまたは対立遺伝子ラダー）を、次いで、可視化し、分析することができる。一つの実施形態において、多くの遺伝子座を含有する複合物の検出法は、蛍光であり、マルチプレックス反応における各遺伝子座に対す

10

20

30

40

50

るプライマーは、蛍光検出器を使用した標識産物の検出により観察される。

【0126】

i i . 細胞撮像

蛍光標識生体分子は、培養細胞および全ての動物の両方における遺伝子発現研究のレポーターとして極めて有用であることが証明されている。たとえば、生きている細胞において、蛍光標識タンパク質は、タンパク質、細胞内小器官および他の細胞構成成分の局在および動力学的追跡に、ならびに、細胞内タンパク質輸送のトレーサーとしてもっともよく利用されている。本発明による標識生体分子の定量的撮像は、様々な技術（広視野、共焦点および多光子顕微鏡を含む）を用いて容易に実行され、細胞構造及び機能の複雑さを顕在化させるための固有な手段を提供する。とりわけ、本発明の色素を用いて細胞内のタンパク質転移を画像化し、タンパク質 - タンパク質およびタンパク質 - DNA複合体を検出し、タンパク質発現、転移および活性状態を測定することができる。

10

【0127】

一つの実施形態において、細胞は本発明に従う標識生体分子と接触し、蛍光が検出される。たとえば、タンパク質は本発明の色素で標識することができ、細胞表面受容体への結合に用いることができる。この例において、細胞表面受容体の位置を検出することができる。

【0128】

または、本発明の蛍光色素は、たとえばH a l l o T a g（登録商標）タンパク質（P r o m e g a , M a d i s o n W I）等のモジュール式タンパク質識別システムに用いることができる。このタイプのシステムにおいては、タンパク質のタグは、本発明の蛍光色素に付着したクロロアルカンリンカーを有する合成リガンドに共有結合的に結合するように設計された改変ハロアルカンデハロゲナーゼである。

20

【0129】

i i i . 酵素アッセイ

本発明の色素はまた、酵素基質に結合させることができ、試料中の酵素の存在および/または活性を検出するために用いることができる。ゆえに本発明により、試料中の酵素を検出する方法が提供される。一つの実施形態においては、酵素を含有すると思われる試料を、本発明の色素のプロ蛍光形態である標識生体分子および酵素の基質と接触させ、蛍光を検出する。

30

【0130】

i v . 他の用途

本発明の蛍光色素を、当分野に公知の他の技術に用いることもできる。たとえば、当該色素は、細胞構造（細胞骨格タンパク質、細胞内小器官、脂質、および膜を含み、細胞形態および流体の蛍光トレーサーとして）の精査、および細胞機能（細胞活性、細胞増殖、エンドサイトーシス、受容体、イオンチャンネル、シグナル伝達、ROS、様々な陽イオンおよび膜電位を含む）の精査を目的として、抗体染色、生細胞での有機金属触媒の研究、生物医学撮像、ならびに、小分子、チオール反応性プローブ、ビオチンおよびハプテン誘導体のi n v i v o検出、核酸およびタンパク質分析に用いられても良い。また、当該色素を用いて、F R E TまたはB R E Tを用いた生物学的現象を検出してよい。たとえば、本発明の色素の様々な用途に関する記述として、「The Molecular Probes（登録商標）Handbook」（www.invitrogen.com）を参照のこと。

40

【0131】

また、蛍光共鳴エネルギー転移（F R E T）または生物発光共鳴エネルギー転移（B R E T）を用いた生物学的現象の検出に当該色素を用いても良い。たとえば、本発明の色素の様々な用途に関する記述として、「The Molecular Probes（登録商標）Handbook」（www.invitrogen.com）を参照のこと。一部の実施形態において、本明細書に開示される色素は、B R E Tアクセプターとして使用することができる。本明細書に記述される色素を、ルシフェラーゼのエネルギー転移半径

50

(たとえば、典型的には、10 nm未満)以内に近づかせ、正しい方向に置いた場合、無放射性のエネルギー転移が発生し、色素はその標準的な発光で光を発する。色素をルシフェラーゼに近づけさせるための多くの方法が公知であり、たとえば、小分子または量子ドット(Xia, Z and Rao, J. 2009. Curr. Opin. Biotech 20: 37-44)があり、これらの方法により、対象の生物学システムに関して何かしらを知ることができる。

【0132】

一部の実施形態において、本明細書に開示される色素は、たとえばクロロアルカン(米国特許第7,867,726号を参照のこと)等のタグに結合させてもよい。もし対象タンパク質がHaloTag(登録商標)融合物として発現されていた場合、この結合により、細胞内または細胞溶解物中の別の対象タンパク質により強く色素を結び付けることができる。対象タンパク質とHaloTagタンパク質とのそのような融合物は、色素複合体と共有結合的に標識される。本明細書に開示される色素と特定のタンパク質とを結び付ける多くの他の方法があり、たとえば、色素を特定の抗体に結合させる方法がある。細胞または細胞溶解物中の他の対象タンパク質を、次いで、たとえば蛍光ルシフェラーゼまたはOplophorusルシフェラーゼ(たとえば、Promega社から入手できるNanoLuc(商標)ルシフェラーゼ(米国特許出願第20100281552号および米国特許出願第13/287,986号を参照のこと))等のルシフェラーゼと融合させることができる。もし対象の第一タンパク質および第二タンパク質が規定の距離(たとえば、典型的には10 nm未満)で相互作用した場合、ルシフェリン基質の添加により、BRETが観察される。そのようなシステムにより、様々な条件下(たとえば、生きた細胞の内側)での2つの特定のタンパク質の相互作用を研究することができる。

【0133】

一部の実施形態において、本明細書に開示される色素をFRETまたはBRETで使用するにより、任意の2つの対象物質(たとえば、核酸、脂質、多糖、抗体、小分子(たとえば、薬剤または薬剤化合物等))の生物学的な相互作用を究明することができる。一部の実施形態において、タンパク質と小分子の相互作用は生きた細胞の内側で発生する。一部の実施形態において、本明細書に開示される色素は、小分子(たとえば、分子/タンパク質相互作用がその色素結合により阻害されないような方法で対象タンパク質と結合するトレーサー等)に結合させてもよい。もし対象タンパク質が上述のルシフェラーゼ融合物として発現される場合、生きた細胞の内側の小分子とタンパク質の相互作用を測定することができる。また、そのようなアッセイを用いて、小分子と、たった一つのタンパク質との結合を研究してもよい(たとえばその特定の小分子が多くの他のタンパク質と結合し得るとしても)。

【0134】

一部の実施形態において、本発明の反応性色素を用いて、in situでのタンパク質相互作用を定量化するために、タンパク質(複数含む)またはペプチド(複数含む)を標識してもよい。一部の態様において、色素標識は、反応性シアノベンゾチアゾール(CBT)標識構造(米国特許出願第2009/0263843号(本明細書に参照により採用される)を参照のこと)を用いて標的タンパク質または対象ペプチドに付着されうる。CBT標識構造には、標的タンパク質またはペプチド上に、遊離のN末端システイン残基が必要となるが、たとえば、部位特異的なタンパク質分解性の開裂(たとえばC末端標的タンパク質またはペプチド由来のHaroTag等のN末端レポーターの開裂等)により、in situまたは生化学的な方法で生成することができる。タンパク質分解が発生し、N末端システイン残基が生成された時点で、反応性CBT標識法を用いて、標的タンパク質または対象ペプチド上の単一色素標識を作製することができる。この方法はまた、受容体リガンド(たとえば、サイトカインまたはペプチドリガンド)の部位特異的標識にも用いられうる。色素標識リガンドが適切なエネルギードナー(たとえば、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)のルシフェラーゼ、またはFoster共鳴エネルギー転移(FRET)の短波長蛍光)で標識された細胞表面受容体にごく近接して結合した場合、励起状態のドナーと蛍光色素アクセプターの間にエネルギー転移が発生し、結合色素が

らの発光が増加する。次いで、エネルギー転移を用いて、C B T色素で標識されたタンパク質 / ペプチドと対象のドナー標識された対象の受容体との相互作用を定量化してもよい。この標識法は、たとえば精製タンパク質または精製ペプチド等の精製成分と相性が良く、または全細胞もしくは細胞溶解物を含むより複雑な試料中の精製成分と相性が良い。さらに、この標識法は、B R E Tシグナルを産生するリガンド - 受容体複合体の競争的置換により、対象の受容体に対する未標識タンパク質 / ペプチドのアフィニティの検証にも有用である。

【 0 1 3 5 】

キット

本発明の一つの態様において、上述の本発明の任意の色素を用いた様々なアッセイの実施を促進するキットの形成が提供される。本発明のキットは、通常、色素複合体の調製に有用な化学反応性標識物として、または色素複合体としてのいずれかである、本発明の着色された、または本発明の蛍光色素を含有し、ここで、その結合物質は、特定の結合対メンバーであるか、または、たとえばヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、タンパク質または小分子（薬剤または薬剤化合物）である。当該キットは、任意選択的に、通常は水溶液である、緩衝剤を1つ以上含有する。本発明のキットは任意選択的にさらに、追加の検出試薬、得られた標識物質を精製するための精製媒体、発光標準物質、酵素、酵素阻害剤、有機溶媒、融合タンパク質発現のための構築物（たとえば、ルシフェラーゼを含有する融合タンパク質、またはタンパク質もしくは対象標的に融合されたH a l o T a g（登録商標）タンパク質）、融合タンパク質、または本発明のアッセイ実行のための説明書を含有する。

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態において、本発明のキットは、遺伝子座特異的プライマーを1つ以上、含有する。任意で使用説明書が含まれていても良い。他の任意のキット構成要素としては、特定の遺伝子座のそれぞれに指向する対立遺伝子ラダー、十分量の増幅酵素、増幅を促進する増幅緩衝液、電気泳動のための増幅物質調製のためのローディング溶液、鋳型対照としてのゲノムDNA、分離媒体中で見込まれる物質移動を確認するためのサイズマーカー、およびユーザーを教育し、誤使用を少なくするためのプロトコールおよびマニュアルが挙げられる。また、キット中の様々な試薬の量は、たとえばそのプロセスの最適感度等の多くの要因によって変化させることができる。応用マニュアルでの使用のためのテストキット、または自動検出器もしくは自動分析器との使用のためのテストキットを提供することも、本発明の範囲内にある。

【 0 1 3 7 】

他の実施形態において、当該キットはまた、遺伝子改変された細胞または遺伝子融合（たとえば、タンパク質もしくは対象標的に融合されたルシフェラーゼまたはH a l o T a g（登録商標）タンパク質を含有する融合等）のためのベクターを含む。使用説明書を任意選択的に含んでも良い。

【 0 1 3 8 】

以下の実施例は上述の発明を解説するためのものであり、本発明の範囲を狭めるものとはみなされない。当業者であれば、本発明を実施することができる他の方法を実施例から容易に類推されることが認識できるであろう。本発明の範囲内にありながら、様々な改変および変更が可能であることが、理解されるはずである。

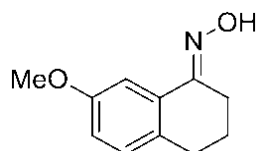
【実施例】

【 0 1 3 9 】

〔実施例1〕

7 - メトキシテトラロンオキシム

【化 3 2】



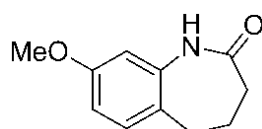
MeOH (175 mL) に溶解した 7 - メトキシテトラロン (15 g) の溶液に、NH₂OH (H₂O に溶解した 50%、15.7 mL) および AcOH (4 mL) を添加した。1 時間攪拌した後、溶液を、固形物が現れ始めるまで濃縮した。反応物を希釈 NaHCO₃ 水溶液 (500 mL) へと注ぎ、得られた固形物をろ過して、標題の化合物 (17.8 g) を得た。1H NMR (DMSO-d₆) 11.08 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.08 (d, 1H), 6.84 (d, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.62-2.49 (m, 4H), 1.77-1.64 (m, 2H)。

【0140】

〔実施例 2〕

8 - メトキシ - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン - 2 (3 H) - オン

【化 3 3】



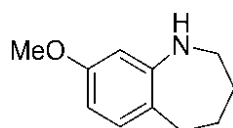
ピリジン (400 mL) に溶解した 7 - メトキシテトラロンオキシム (17.8 g) の溶液に、p - トルエンスルホニル塩化物 (26.6 g) を段階的に添加した。18 時間攪拌した後、反応物を HCl (3 M、1 L) へと注ぎ、得られた固形物をろ過して、粗トシレート (32.4 g) を得た。このオレンジ色の固形物に、EtOH (750 mL) および NaOAc (750 mL の H₂O に溶解した 77.0 g) を添加し、得られた懸濁液を加熱灌流した。16 時間の灌流の後、加熱を停止し、固形物が現れ始めるまで溶液を濃縮した。冷却の後、得られた白色固形物をろ過し、標題の化合物 (11.2 g) を得た：1H NMR (DMSO-d₆) 9.43 (s, 1H); 7.12 (d, 1H), 6.64 (dd, 1H), 6.52 (d, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.56 (t, 2H), 2.12 (t, 2H), 2.07-1.98 (m, 2H)。

【0141】

〔実施例 3〕

8 - メトキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン

【化 3 4】



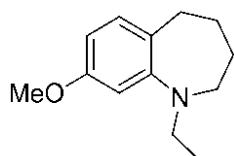
THF (100 mL) に溶解した 8 - メトキシ - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン - 2 (3 H) - オン (2 g) の溶液に、水素化アルミニウムリチウム (0.79 g) を添加し、反応物を加熱灌流した。1 時間の攪拌の後、加熱を停止した。水 (6 mL) を加え、次いで、NaOH (10%、15 mL) を加え、凝集した固形物をろ過で除去し、溶離液を濃縮して、薄茶色の油として標題の化合物 (1.9 g) を得た：1H NMR (DMSO-d₆) 6.88 (d, 1H); 6.37 (d, 1H), 6.22 (dd, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.90-2.85 (m, 2H), 2.57-2.53 (m, 2H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 2H)。

【0142】

〔実施例 4〕

8 - メトキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピン

【化 3 5】



アセトニトリル (25 mL) に溶解した 8 - メトキシ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン (0.5 g) の溶液に、ヨードエタン (0.45 mL) および K_2CO_3 (1.2 g) を添加し、反応物を加熱還流した。18 時間の攪拌の後、過熱を停止し、反応物を濃縮した。得られた残渣を、水 (30 mL) と EtOAc (25 mL) の間で分割し、層を分離させ、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濃縮して、透明な油として標題の化合物 (0.54 g) を得た：¹H NMR (DMSO- d_6)

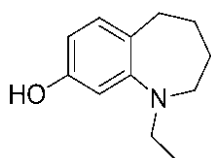
6.93 (d, 1H); 6.39 (d, 1H), 6.33 (dd, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.07 (q, 2H), 2.85-2.82 (m, 2H), 2.62-2.58 (m, 2H), 1.66-1.59 (m, 2H), 1.51-1.43 (m, 2H), 1.10 (t, 3H)。

【 0 1 4 3 】

〔実施例 5〕

8 - ヒドロキシ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピン

【化 3 6】



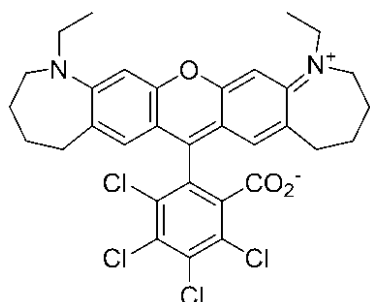
- 78 まで冷却した CH_2Cl_2 (25 mL) に溶解した 8 - メトキシ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピン (0.54 g) の溶液に、 BBR_3 (1.24 mL) を添加し、反応物を徐々に - 20 まで温めた。3 時間の攪拌の後、反応物を MeOH でクエンチし、室温にまで温めさせ、次いで、濃縮した。残渣を HCl (1 M、40 mL) に溶解し、1 時間攪拌した。この溶液を、 K_2CO_3 (飽和、水溶液) で pH 12 まで上げ、EtOAc (40 mL) で抽出した。有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濃縮した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘプタンに溶解した EtOAc の勾配) で精製し、透明な油として標題の化合物 (0.37 g) を得た：¹H NMR (DMSO- d_6) 8.88 (s, 1H), 6.79 (d, 1H); 6.29 (d, 1H), 6.16 (dd, 1H), 3.02 (q, 2H), 2.82-2.79 (m, 2H), 2.57-2.53 (m, 2H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.48-1.42 (m, 2H), 1.09 (t, 3H); MS は 192 ($C_{12}H_{18}NO$ 、 $M+1$) を予期し、実測値は 192。

【 0 1 4 4 】

〔実施例 6〕

ビス (エチルアゼピノ) テトラクロロローダミン (PBI 3737)

【化 3 7】



8 - ヒドロキシ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピン (50 mg)、テトラクロロフタル酸無水物 (52 mg) および $ZnCl_2$ (36 mg) の

混合物を約 250 まで 2 分間加熱した。残渣を $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ (1 / 1、20 mL) に懸濁し、ろ過し、濃縮した。粗色素を、分取 HPLC (H_2O に溶解した 0.1 % TFA 中の ACN の勾配) で精製し、青い固形物として標題の化合物 (1 mg) を得た。MS は 632 ($\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_3^+$ 、 M^+) を予期し、実測値は 632 : $\text{max Abs} = 595 \text{ nm (MeOH)}$ 、 $\text{max Em} = 619 \text{ nm (MeOH)}$ 。

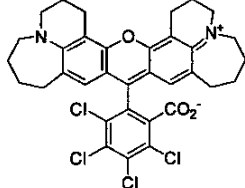
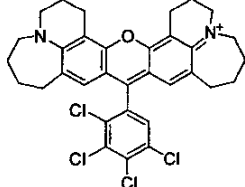
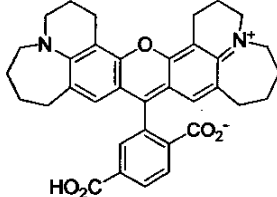
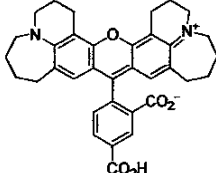
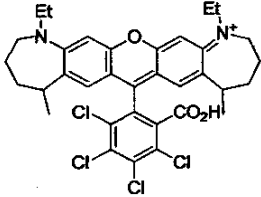
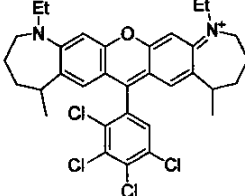
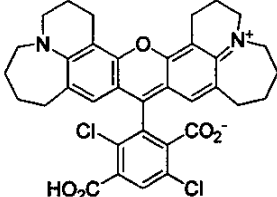
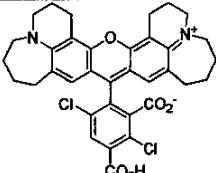
【 0145 】

〔実施例 7〕

追加化合物の合成

適切なフェノールおよび無水フタル酸を使用して、PBI3737 と同様の方法で、以下の化合物を合成した。一部の例において、ローダミンの脱カルボキシル化から得られたローザミンも単離した。

【表 1】

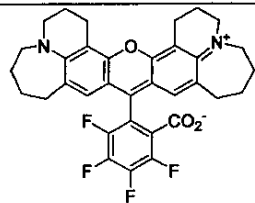
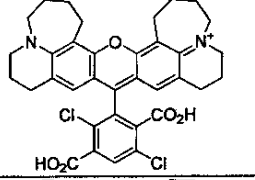
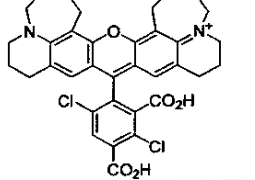
構造	PBI 番号	MS	λ_{\max} Abs	λ_{\max} Em
	3738	656	608	629
	3761	613	610	633
	3739	562	583	604
	3740	562	585	611
	3736	661	594	621
	3760	617	596	626
	3762	631	601	621
	3763	631	602	621

10

20

30

40

	3768	590	607	629
		631		
	3970	631	604	617

10

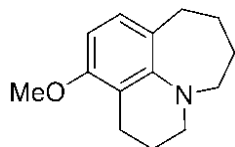
【 0 1 4 6 】

〔 実施例 8 〕

11 - メトキシ - 2 , 3 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピノ [3 , 2 , 1 - i j] キノリン

20

【 化 3 8 】



ブromocyclopropane (2 mL) に溶解した 8 - メトキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン (0 . 2 5 g) の溶液に、 Na_2CO_3 (0 . 6 g) を添加し、反応物を加熱灌流した。18時間の攪拌の後、加熱を停止し、反応物を水 (30 mL) とエーテル (25 mL) の間で分割し、層を分離させ、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濃縮した。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘプタンに溶解した EtOAc の勾配) で精製し、透明な油として標題の化合物 (0 . 27 g) を得た： ^1H NMR (DMSO- d_6) 6.82 (d, 1H); 6.36 (d, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.04-3.00 (m, 2H), 2.89-2.85 (m, 2H), 2.60-2.57 (m, 2H), 2.53-2.49 (m, 2H), 1.70-1.61 (m, 4H), 1.48-1.40 (m, 2H); MS は 218 ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}$, $M+1$) を予期し、実測値は 218。

30

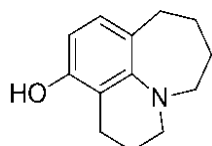
【 0 1 4 7 】

〔 実施例 9 〕

11 - ヒドロキシ - 2 , 3 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピノ [3 , 2 , 1 - i j] キノリン

【 化 3 9 】

40



標題の化合物を、11 - メトキシ - 2 , 3 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピノ [3 , 2 , 1 - i j] キノリンから、8 - ヒドロキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピンと同様の方法で合成した： ^1H NMR (DMSO- d_6) 8.82 (s, 1H), 6.64 (d, 1H); 6.22 (d, 1H), 3.03-2.99 (m, 2H), 2.87-2.83 (m, 2H), 2.55-2.50 (m, 2H), 2.53-2.49 (m, 2H), 1.68-1.61 (m, 4H), 1.45-1.37 (m, 2H); MS は 204 ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$, $M+1$) を予期し、実測値は 204。

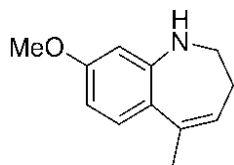
50

【 0 1 4 8 】

〔 実施例 1 0 〕

8 - メトキシ - 5 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン

【 化 4 0 】



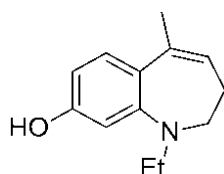
開始材料として 8 - メトキシ - 5 - メチル - 1 H - ベンゾ [b] アゼピン - 2 (3 H)
- オン (Aust. J. Chem. 1978, 31, 2031-2037) を使用した 8 - メトキシ - 2 , 3 , 4
, 5 - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [b] アゼピンの合成に対する方法に従い、標題の化
合物を合成した : $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) 7.28 (d, 1H), 6.46 (dd, 1H); 6.28 (d, 1H), 5
.89 (t, 1H), 5.30 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.40 (t, 2H), 2.41 (q, 2H), 2.14 (d, 3H
); MS は 190 ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$, $\text{M} + 1$) を予期し、実測値は 190。

【 0 1 4 9 】

〔 実施例 1 1 〕

8 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピン

【 化 4 1 】



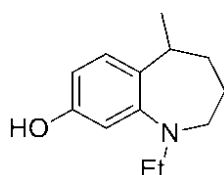
8 - メトキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピンに対
するアルカリ化手順に従い、8 - メトキシ - 5 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベン
ゾ [b] アゼピンから標題の化合物を合成し、8 - ヒドロキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラ
ヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b] アゼピンの合成のために用いられた脱メチル化手順を行
った : $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) 9.15 (s, 1H), 7.05 (d, 1H), 6.31-6.25 (m, 2H), 5.80 (t
, 1H), 5.30 (s, 1H), 3.12-3.03 (m, 4H), 2.17 (q, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.09 (t, 3H)
; MS は 203 ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$, $\text{M} + 1$) を予期し、実測値は 203。

【 0 1 5 0 】

〔 実施例 1 2 〕

8 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ [b]
アゼピン

【 化 4 2 】



MeOH (10 mL) に溶解した 8 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1
- エチルベンゾ [b] アゼピン (0 . 14 g) と Pd/C (10 mg) の懸濁液を、 H_2
でパージし、次いで、1 atm の H_2 下で 3 時間攪拌した。次いで、反応物を Celite
でろ過し、溶離液を濃縮し、粗反応物をシリカゲル (ヘプタンに溶解した EtOAc の
勾配) で精製し、透明な油として標題の化合物 (0 . 09 g) を得た : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3)

7.26 (s, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.46-6.33 (m, 2H), 3.23-3.02 (m, 4H), 2.79-2.67 (m, 2H), 1.81-1.53 (m, 3H), 1.29 (d, 3H), 1.19 (t, 3H); MS は 206 ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$, $\text{M} + 1$) を予期し、実測値は 206。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

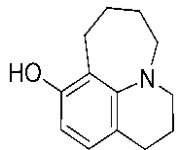
40

50

〔実施例 13〕

9 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノリン

【化 4 3】



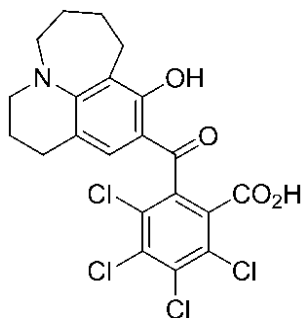
5 - メトキシテトラロンから合成開始する 11 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノリンと同様の方法で、標題の化合物を合成した：¹H NMR (DMSO-d₆) 8.69 (s, 1H), 6.55 (d, 1H); 6.27 (d, 1H), 3.05-3.02 (m, 2H), 2.92-2.89 (m, 2H), 2.68-2.64 (m, 2H), 2.54 (t, 2H), 1.69-1.60 (m, 4H), 1.45-1.37 (m, 2H); MS は 204 (C₁₃H₁₈NO、M + 1) を予期し、実測値は 204。

【0152】

〔実施例 14〕

2, 3, 4, 5 - テトラクロロ - 6 - (9 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノリン - 10 - カルボニル) 安息香酸

【化 4 4】



ジクロロベンゼン (1 mL) に溶解した 9 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノリン (30 mg) の溶液に、テトラクロロフタル酸無水物 (0.13 mL) を添加した。2 時間、還流で攪拌した後、溶媒を除去し、得られた粗生成物を分取 HPLC (H₂O に溶解した 0.1% TFA 中の ACN の勾配) で精製し、緑色の固形物として標題の化合物 (20 mg) を得た：MS は 490 (C₂₁H₁₈Cl₄NO₄⁺、M +) を予期し、実測値は 490。

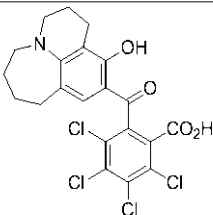
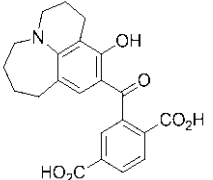
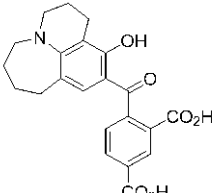
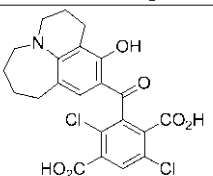
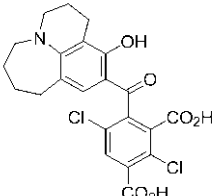
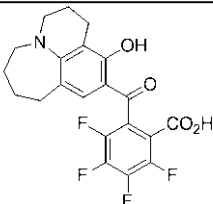
【0153】

〔実施例 15〕

追加の化合物の合成

適切なフェノールおよび無水フタル酸を使用して、2, 3, 4, 5 - テトラクロロ - 6 - (9 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノリン - 10 - カルボニル) 安息香酸と同様の方法で、以下の化合物を合成した。

【表 2】

構造	MS
	489
	396
	396
	464
	464
	424

10

20

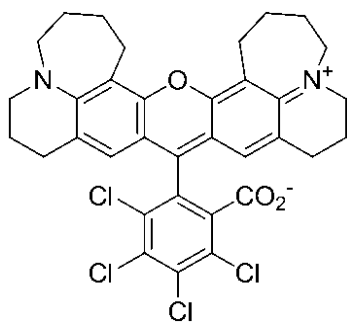
30

【 0 1 5 4 】

〔 实施例 16 〕

ビス(アゼピノピペリジノ)-テトラクロロローダミン(PBI3861)

【化 4 5】



40

DMF (1 m L) に溶解した 2 , 3 , 4 , 5 - テトラクロロ - 6 - (9 - ヒドロキシ - 2 , 3 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピノ [3 , 2 , 1 - i j] キノリン

50

- 10 - カルボニル)安息香酸(20 mg)と9-ヒドロキシ-2,3,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-ij]キノリン(14 mg)の溶液に、トリメチルシリルポリホスフェート(0.25 mL)を添加した。1時間、80 で攪拌した後、水(1 mL)を添加し、得られた溶液を分取HPLC(H₂Oに溶解した0.1% TFA中のACNの勾配)で精製し、青色固形物として標題の化合物(10 mg)を得た：MSは656 (C₃₄H₃₀Cl₄N₂O₃⁺、M⁺)を予期し、実測値は656；
max Abs = 605 nm (MeOH)、max Em = 620 nm (MeOH)。

【0155】

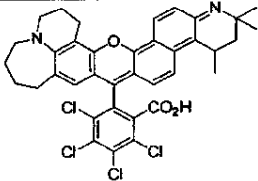
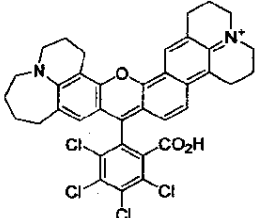
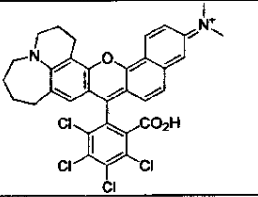
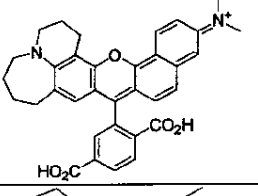
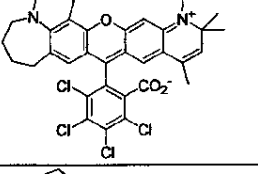
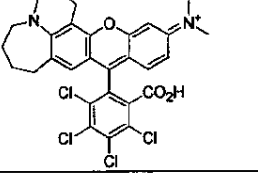
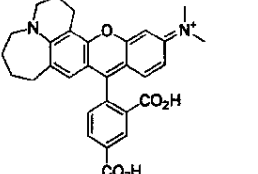
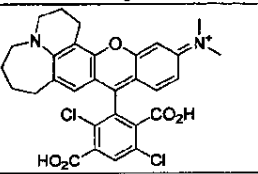
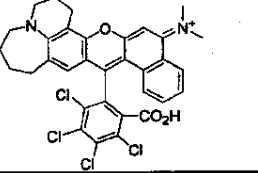
〔実施例17〕

追加の化合物の合成

10

実施例14または15の適切なフェノールおよびケトフェノールを用いて、ビス(アゼピノピペリジノ)-テトラクロロロダミンと同様の方法で以下の化合物を合成した。

【表 3】

構造	PBI 番号	MS	λ_{\max} Abs	λ_{\max} Em
	4273	694	647	713
	4302	693	668	741
	4335	641	632	690
	4351	548	602	662
	4352	670	614	632
	4379	591	590	612
	4382	497	564	596
	4428	566	583	604
	4464	641	611	644

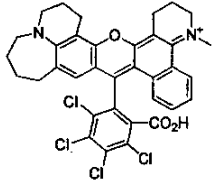
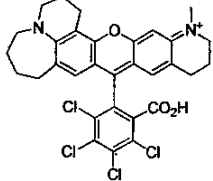
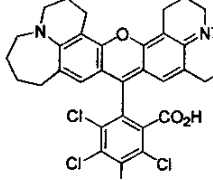
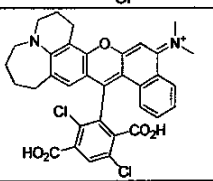
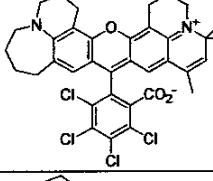
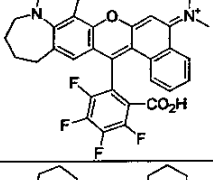
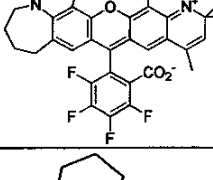
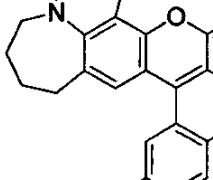
10

20

30

40

50

	4484	667	614	646
	4490	617	592	616
	4496	643	601	621
	4497	616	598	637
	4553	682	619	637
		575	602	642
		617	617	638
	4624	497	571	601

10

20

30

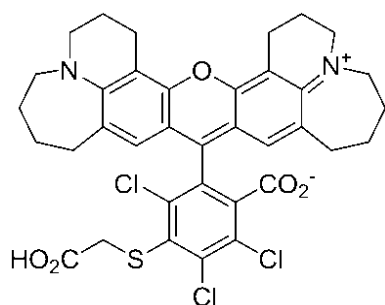
40

【 0 1 5 6 】

〔 実施例 1 8 〕

ビス(ピペリジンアゼピノ) - トリクロロローダミンメルカプト酢酸 (P B I 3 7 6 9)

【化 4 6】



DMF (10 mL) に溶解したビス(ピペリジンアゼピノ)-テトラクロロローダミン (PBI 3738、0.60 g) とジイソプロピルエチルアミン (0.32 mL) の溶液に、メルカプト酢酸 (0.13 mL) を添加した。2 時間攪拌した後、得られた産物を分取 HPLC (H₂O に溶解した 0.1% TFA 中の ACN の勾配) で精製し、青色固形物として標題の化合物 (0.35 g) を得た：MS は 712 (C₃₆H₃₃Cl₃N₂O₅S⁺、M⁺) を予期し、実測値は 712；max Abs = 606 nm (MeOH)、max Em = 627 nm (MeOH)。

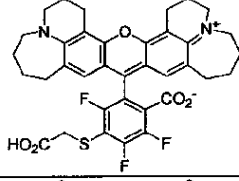
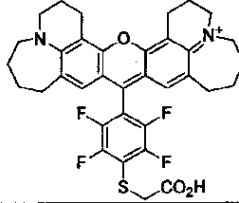
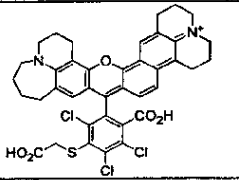
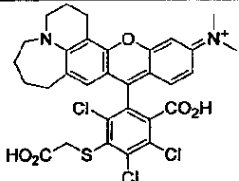
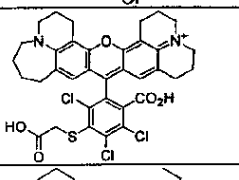
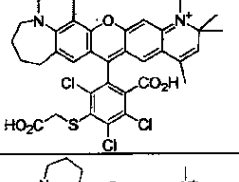
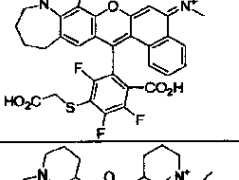
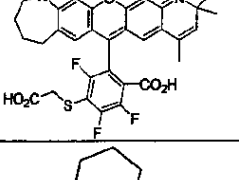
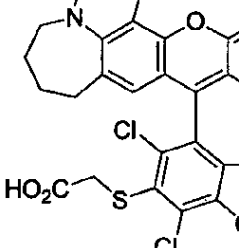
【0157】

〔実施例 19〕

追加の化合物の合成

適切なハロローダミンを用いて、PBI 3769 と同様の方法で以下の化合物を合成した。

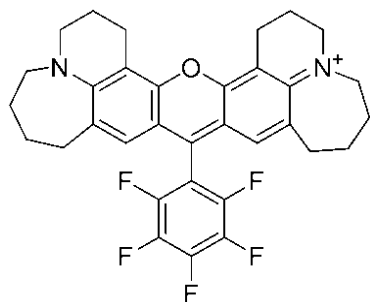
【表 4】

構造	PBI 番号	MS	λ_{\max} Abs	λ_{\max} Em
		662	610	633
	3865	637	617	642
		749		
		647	589	613
	4577	699	600	620
	4555	727	610	629
	4559	647	604	645
	4568	689	613	633
	4681	721	614	652

〔実施例 20〕

ビス(ピペリジノアゼピノ) - ペンタフルオロローザミン (PBI3860)

【化 47】



10

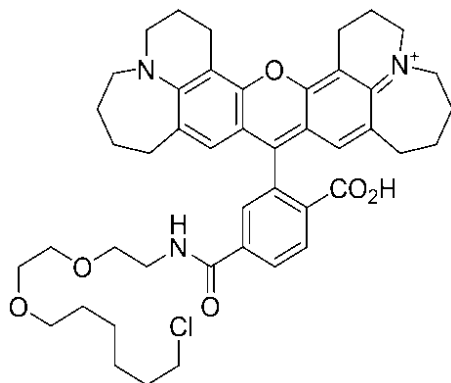
H_2SO_4 (60%水溶液、2 mL) に溶解したペンタフルオロベンズアルデヒド (40 mg) と 11 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ [3, 2, 1 - i j] キノロン (50 mg) の溶液を、150 で 10 分間、攪拌した。得られた溶液を分取 HPLC (H_2O に溶解した 0.1% TFA 中の ACN の勾配) で精製し、青色固形物として標題の化合物 (20 mg) を得た: MS は 565 ($\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}^+$, M^+) を予期し、実測値は 565; $m_{\text{ax}} \text{Abs} = 620 \text{ nm}$ (MeOH)、 $m_{\text{ax}} \text{Em} = 642 \text{ nm}$ (MeOH)。

【0159】

〔実施例 21〕

ビス(ピペリジノアゼピノ) - 6 - ((2 - (2 - (6 - クロロヘキシル) オキシ) エトキシ) エチル) - カルバモイル) ローダミン (PBI3781)

【化 48】



30

DMF (1 mL) に溶解したビス(ピペリジノアゼピノ) - 6 - カルボキシローダミン (10 mg) とジイソプロピルエチルアミン (0.02 mL) の溶液に、TSTU (8 mg) を添加した。15 分間、攪拌した後、2 - (2 - (6 - クロロヘキシル) オキシ) エトキシ) エチルアミン HCl (7 mg) (H. Benink, M. McDougall, D. Klaubert, G. Los, BioTechniques 2009, 47, 769-774 (参照により本明細書に援用される) に記述される手順に従い合成された) を添加した。さらに 30 分攪拌した後、反応混合物を分取 HPLC (H_2O に溶解した 0.1% TFA 中の ACN の勾配) で精製し、青色固形物として標題の化合物 (1 mg) を得た: MS は 769 ($\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{ClN}_3\text{O}_6^+$, M^+) を予期し、実測値は 769。

【0160】

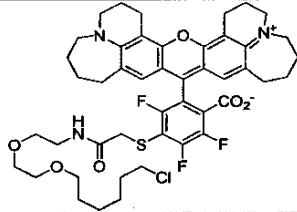
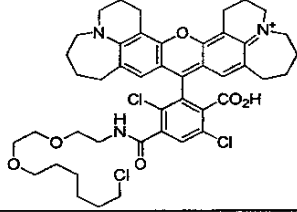
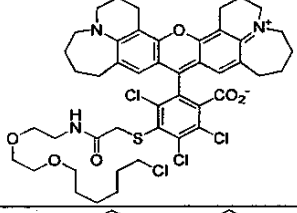
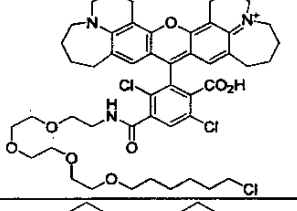
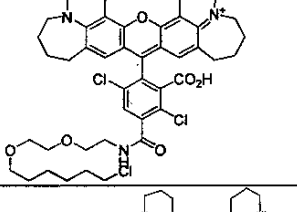
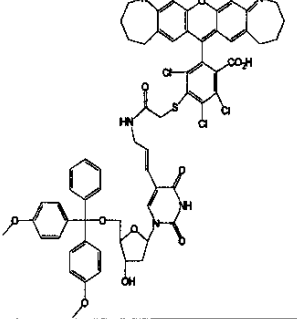
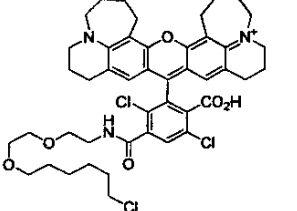
〔実施例 22〕

追加の化合物の合成

適切な色素カルボン酸およびアミンを用いて、PBI3781 と同様の方法で以下の化合物を合成した。

40

【表 5】

構造	PBI 番号	MS
	3780	868
	3782	838
	3783	917
	3905	926
	3906	838
		1280
	3954	838

10

20

30

40

	4356	953
	4357	1042
	4830	769
	4839	857
	4840	945

【 0 1 6 1 】

〔 実施例 2 3 〕

ビス（ピペリジンアゼピノ）トリクロロローダミンアセトアリルアミノ d U 5 ' - D M T
3 ' - ホスホルアミダイト（ P B I 3 8 8 5 ）

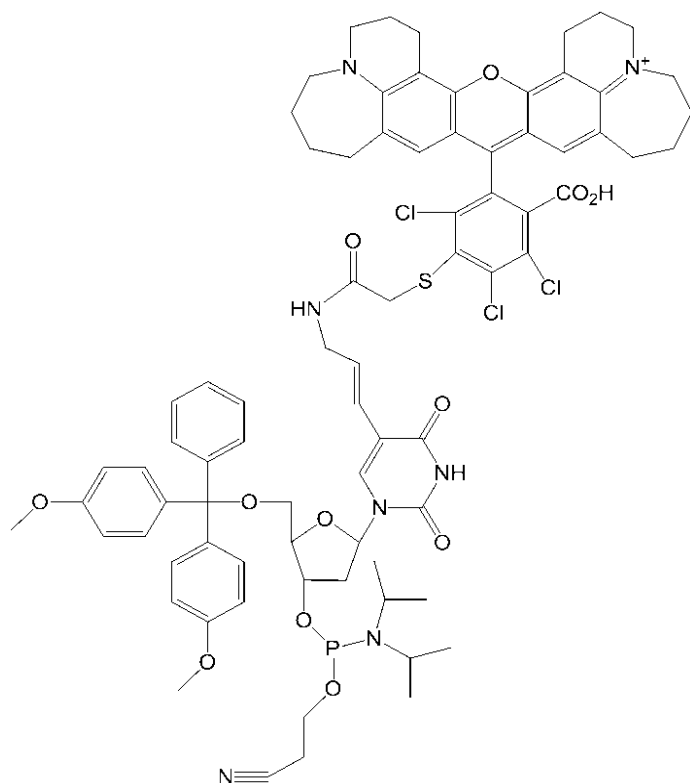
10

20

30

40

【化 4 9】



10

20

固形物ビス（ピペリジンアゼピノ）トリクロロローダミンアセトアリルアミノ d U 5 ´ - DMT（1.0 g）を、N₂ で洗い流し、乾燥 CH₂Cl₂（10 mL）に溶解した。この溶液に、5 - エチルチオテトラゾール（30 mg）、次いで 2 - シアノエチル - N, N, N', N' - テトライソプロピルホスホルジアミダイト（0.31 mL）を添加した。90 分間攪拌した後、反応混合物をヘプタンに滴下して加えた。スラリーを 5 分間攪拌し、ろ過して、青色固形物として標題の化合物（1.0 g）を得た：MS は 1480（C₇₈H₈₄Cl₃N₇O₁₂PS⁺、M⁺）を予期し、実測値は 1480。

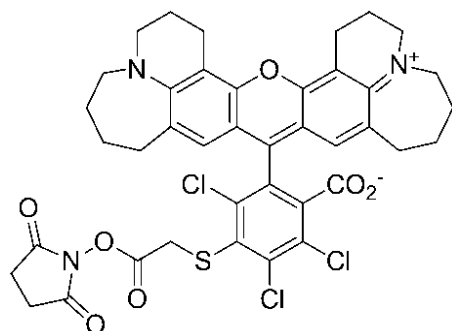
【0162】

30

〔実施例 24〕

ビス（ピペリジンアゼピノ） - トリクロロローダミンメルカプト酢酸 SE（PBI 4574）

【化 50】



40

CH₂Cl₂（0.5 mL）に溶解したビス（ピペリジンアゼピノ） - トリクロロローダミンメルカプト酢酸（10 mg）とジイソプロピルエチルアミン（0.02 mL）の溶液に、2 - スクシミド - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸塩（TSTU）（8 mg）を添加した。1 時間攪拌した後、反応混合物をクエン酸ナトリウム（250 mM、15 mL）へと注ぎ、CH₂Cl₂（10 mL）で 3 回抽出し、混合有機層を乾燥させ（Na₂SO₄）、濃縮し、青色固形物として標題の化合物（5 mg）を得た：MS は 809（C₄₀H₃₆Cl₃N₃O₇S⁺、M⁺）を予期し、実測値は

50

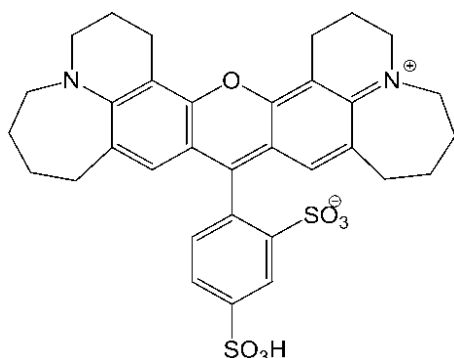
809。

【0163】

〔実施例25〕

ビス(ピペリジンアゼピノ)-3,5-ビススルホローダミン(PBI3904)

【化51】



10

1 mLの濃硫酸に溶解した11-ヒドロキシ-2,3,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-ij]キノリン(50 mg)と4-ホルミルベンゼン-1,3-ジスルホン酸二ナトリウム塩水和物(38 mg)の混合物を、5時間、油槽を用いて100℃まで解放容器中で撹拌しながら加熱した。この後、反応物を油槽から取り出し、液化するまで撹拌しながらゆっくりと氷を加えた。次いで、酸性化された水を、油分の多い残渣から移し、この残渣をさらに水で2回以上洗浄した。次いで、残渣をメタノールに溶解し、溶媒を蒸発させ、残渣をセライト上に沈着させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(CH₂Cl₂に溶解したMeOHの勾配)で精製し、赤色固形物として標題の化合物(78 mg)を得た：MSは635(C₃₃H₃₅N₂O₇S₂、M⁺)を予期し、実測値は635；max Abs = 590 nm(MeOH)、max Em = 613 nm(MeOH)。

20

【0164】

〔実施例26〕

ビス(ピペリジンアゼピノ)-5-塩化スルホニルスルホローダミン

POCl₃(2 mL)およびTHF(2 mL)に溶解したビス(ピペリジンアゼピノ)-3,5-ビススルホローダミン(PBI3904、70 mg)の溶液を、1時間撹拌し、次いで、減圧下で濃縮した。さらに30分撹拌した後、反応混合物を分取HPLC(H₂Oに溶解した0.1% TFA中のACNの勾配)で精製し、青色固形物として標題の化合物(1 mg)を得た：MSは769(C₄₅H₅₅ClN₃O₆⁺、M⁺)を予期し、実測値は769。

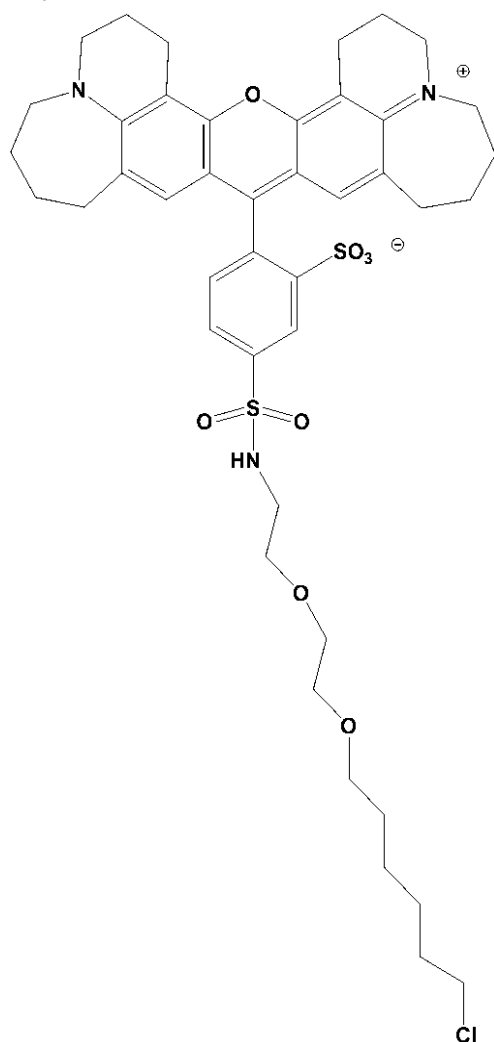
30

【0165】

〔実施例27〕

ビス(ピペリジンアゼピノ)-5-((2-(2-(6-クロロヘキシル)オキシ)エトキシ)エチル)スルホニル)スルホローダミン(PBI3909)

【化 5 2】



10

20

POCl_3 (2 mL) および THF (2 mL) に溶解したビス(ピペリジンアゼピノ)-3,5-ビススルホローダミン (PBI3904、70 mg) の溶液を、1 時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮した。この粗塩化スルホニルを CH_2Cl_2 (5 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.23 mL) および 2-(2-(6-クロロヘキシル)オキシ)エトキシ)エチルアミン HCl (43 mg) を加えた。3 日間攪拌した後、反応混合物を濃縮した。粗生成物を DMF に溶解し、分取 HPLC (H_2O に溶解した 0.1% TFA 中の ACN の勾配) で精製し、青色固形物として標題の化合物 (6 mg) を得た: MS は 840 ($\text{C}_{43}\text{H}_{54}\text{ClN}_3\text{O}_8\text{S}_2^+$, M^+) を予期し、実測値は 840。

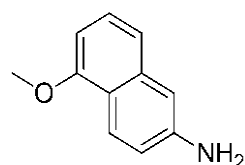
30

【0166】

〔実施例 28〕

5-メトキシ-2-アミノナフタレン

【化 5 3】



40

DMF (50 mL) に溶解した 6-アミノナフト-1-オール (1.0 g) の溶液に、 NaH (鉱物油に溶解した 60%、0.17 g) を加え、反応物を 1 時間攪拌した。ヨードメタン (0.39 mL) を加え、反応物をさらに 1 時間攪拌した。次いで、反応物を NaHCO_3 (水溶液、150 mL) と EtOAc (100 mL) の間で分割し、層を分離させ、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濃縮した。粗反応物をシ

50

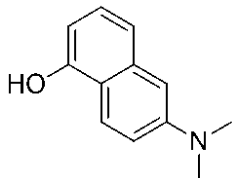
リカゲル（ヘプタンに溶解した E t O A c の勾配）で精製し、オレンジ色の油として標題の化合物（0.8 g）を得た：¹H NMR (DMSO-d₆) 7.81 (d, 1H); 7.16 (dd, 1H), 7.04 (d, 1H), 6.85 (dd, 1H), 6.75 (d, 1H), 6.53 (dd, 1H), 5.32 (s, 2H), 3.86 (s, 3H)。

【0167】

〔実施例29〕

5 - ヒドロキシ - 2 - (ジメチルアミノ) ナフタレン

【化54】



10

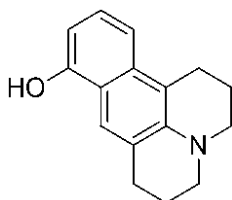
5 - メトキシ - 2 - アミノナフタレンの精製物から、5 - メトキシ - 2 - (ジメチルアミノ) ナフタレンをまた単離した。この化合物を、8 - ヒドロキシ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1 - エチルベンゾ[*b*]アゼピンと同様の方法で脱メチル化し、標題の化合物を得た：¹H NMR (DMSO-d₆) 9.72 (s, 1H), 7.93 (d, 1H); 7.10-7.05 (m, 3H), 6.82 (d, 1H), 6.52 (dd, 1H), 2.96 (s, 6H); MS は 188 (C₁₂H₁₃NO、M + 1) を予期し、実測値は 188。

【0168】

〔実施例30〕

9 - ヒドロキシ - 1, 2, 3, 5, 6, 7 - ヘキサヒドロベンゾ[*f*]ピリド[3, 2, 1-*ij*]キノロン

【化55】



30

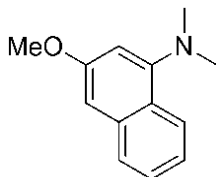
標題の化合物を、5 - メトキシ - 2 - アミノナフタレンから合成開始する 11 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ[3, 2, 1-*ij*]キノロンと同様の方法で合成した：¹H NMR (DMSO-d₆) 9.55 (s, 1H), 7.55 (s, 1H); 7.08-7.00 (m, 2H), 6.48 (dd, 1H), 3.14 (q, 4H), 2.86 (q, 2H), 2.02-1.86 (m, 4H); MS は 240 (C₁₆H₁₈NO、M + 1) を予期し、実測値は 240。

【0169】

〔実施例31〕

3 - メトキシ - 1 - (ジメチルアミノ) ナフタレン

【化56】



40

DMF (5 mL) に溶解した 3 - メトキシ - 1 - アミノナフタレン（米国特許第 7, 018, 431 B2 号、0.13 g）の溶液に、K₂CO₃ (0.31 g) およびヨードメタン (0.09 mL) を添加した。24 時間攪拌した後、反応物を水 (30 mL) および E t O A c (30 mL) の間で分割し、層を分離させ、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濃縮した。粗反応物をシリカゲル（ヘプタンに溶解した E t O A c の勾配）で精製し、透明な油として標題の化合物 (0.14 g) を得た：¹H NMR (DM

50

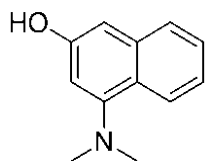
SO-d6) 7.99 (d, 1H); 7.74 (d, 1H), 7.40 (ddd, 1H), 7.30 (ddd, 1H), 6.95 (d, 1H), 6.67 (d, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.78 (s, 6H); MSは202 ($C_{13}H_{16}NO$, $M + 1$)を予期し、実測値は202。

【0170】

〔実施例32〕

3 - ヒドロキシ - 1 - (ジメチルアミノ)ナフタレン

【化57】



10

標題の化合物は、3 - メトキシ - 1 - (ジメチルアミノ)ナフタレンから合成開始する、11 - ヒドロキシ - 2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1H - アゼピノ[3, 2, 1 - i j]キノロンと同様の方法で合成された: 1H NMR (DMSO-d6) 9.53 (s, 1H), 7.95 (d, 1H); 7.60 (d, 1H), 7.32 (ddd, 1H), 7.21 (ddd, 1H), 6.75 (d, 1H), 6.64 (d, 1H), 2.77 (s, 6H)。

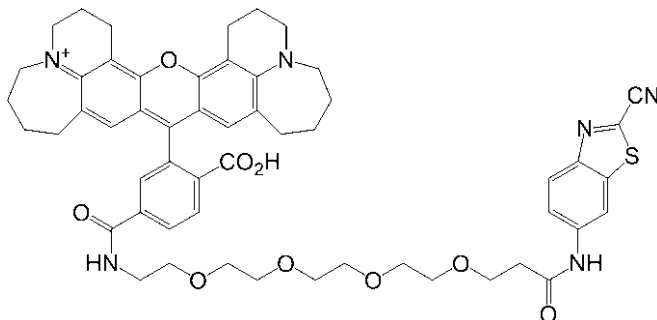
【0171】

〔実施例33〕

ビス(ピペリジンアゼピノ) - 6 - ((2 - (2 - (2 - (2 - (6 - カルボキシアミド - 2 - シアノベンゾチアゾリル)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)カルバモイル)ローダミン(PBI5122)

20

【化58】



30

THF(25 mL)に溶解したt-boc-N-アミド-dPEG(登録商標)4-酸(Quanta BioDesign、1 g)およびN-メチルモルホリン(0.3 mL)の溶液に、イソブチルクロロギ酸(0.36 mL)を添加した。30分間攪拌した後、6-アミノ-2-シアノベンゾチアゾール(White et. al., J. Am. Chem. Soc. 88, 2015 (1966)、0.48 g)を添加し、反応物を一晩攪拌した。次いで、反応物をろ過し、溶離液を濃縮した。粗反応物をシリカゲル(CH_2Cl_2 に溶解したMeOHの勾配)で精製し、透明な油(1.4 g)を得た。

【0172】

40

前述のステップで得た油を、トリフルオロ酢酸(25 mL)に溶解した15%チオアニソール中に、0で溶解した。反応物を3時間攪拌し、ジエチルエーテルで希釈し、次いで、乾燥するまで濃縮した。次いで、反応物をろ過し、溶離液を濃縮した。粗反応物をシリカゲル(CH_2Cl_2 に溶解したMeOHの勾配)で精製し、ただちに次のステップに移った。

【0173】

CH_2Cl_2 (1 mL)に溶解した、ビス(ピペリジンアゼピノ) - 6 - カルボキシローダミン(76 mg)とジイソプロピルエチルアミン(0.04 mL)の溶液に、TSU(8 mg)を添加した。15分間攪拌した後、前ステップの粗アミン(62 mg)を添加した。さらに30分間、攪拌した後、反応混合物を分取HPLC(H_2O に溶解した0

50

、1% TFA中のACN勾配)で精製し、青色固形物として標題の化合物(6mg)を得た: MSは967(C₅₄H₅₉N₆O₉S⁺、M+1)を予期し、実測値は967。

【0174】

〔実施例34〕

本発明の色素でオリゴヌクレオチドを標識するための基本的手順。

A. N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル色素でオリゴヌクレオチドを標識する。

i. 1マイクロモルのスケール

5'-アミノ標識オリゴヌクレオチドは、5' Amino modifier C6 TFAアミダイト(Glen Researchより入手)を用いて、ABI394DNA合成機(1マイクロモル)で合成した。脱保護は、濃縮水酸化アンモニウム中で、一晚、60℃で実施し、5'-アミノヘキシル標識オリゴヌクレオチドを得た。得られたオリゴヌクレオチドを、乾燥するまで脱水させ、1mlの0.5M NaClに再溶解し(対イオン交換のために実施された)、そしてNAP-10サイズ排除カートリッジ(GE Healthcare)で脱塩した。脱塩の後、オリゴヌクレオチドを乾燥するまで蒸発させ、次いで、200μlの0.5M 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)に再溶解した。スクシンイミジルエステル色素(PBI4451、4510、4574、4563、4566および4509)を、20μl/mgの濃度でDMF中に溶解した。色素/DMF溶液の2x20μlのアリコートをし、溶解オリゴヌクレオチドに30分の間を置いて、添加した。色素/DMF溶液の二度目の添加の後、反応物を20℃で1時間、混合した。1時間後、水で1mlに希釈し、NAP-10カラム(GE Healthcare)で脱塩した。NAP-10溶出液を、アセトニトリル/0.1M TEAA緩衝液系を用いて、Phenomenex Jupiter C18カラムで逆相HPLCにより精製した。HPLC精製オリゴヌクレオチドを乾燥するまで脱水させ、0.01M 重炭酸トリエチルアンモニウムに再溶解し、NAP-10カラムで脱塩した。最後の脱塩ステップの後、オリゴヌクレオチドを乾燥するまで脱水し、-20℃で保存した。

【0175】

ii. 100マイクロモルのスケール

5'-アミノ標識オリゴヌクレオチドを、5' Amino modifier C6 TFAアミダイト(Glen Researchより入手)を用いて、AKTA OligoPilot(100マイクロモル)DNA合成機で合成した。脱保護は、濃縮水酸化アンモニウム中で、一晚、60℃で実施し、5'-アミノヘキシル標識オリゴヌクレオチドを得た。得られたオリゴヌクレオチドを、乾燥するまで脱水させ、75mlの2M NaClに再溶解し、500mlのG-25カラム(GE Healthcare)で脱塩した。脱塩の後、オリゴヌクレオチドを乾燥するまで脱水させ、次いで、50mlの0.5M 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)に再溶解した。スクシンイミジルエステル色素(PBI4451、4510、4574、4563、4566および4509)を、20μl/mgの濃度でDMF中に溶解した。2400μlの色素/DMF溶液を、溶解オリゴヌクレオチドに滴下して加えた。反応物を、室温で1時間、混合した。色素が結合したオリゴヌクレオチドを、酢酸ナトリウム(pH5.5)溶液で中性化し、2X体積のエタノールから沈殿させた。沈殿したオリゴヌクレオチドを、60分間、9000rpmで遠心し、上清を移して捨て、得られた固形物を70mlの水に溶解し、イオン交換クロマトグラフィーで精製した。オリゴヌクレオチドを濃縮し、接線流限外ろ過を用いて脱塩し、次いで、乾燥するまで脱水した。-20℃で保存した。

【0176】

B. ホスホルアミダイト色素でオリゴヌクレオチドを標識する。

i. 1マイクロモルのスケール

5' 標識オリゴヌクレオチドは、アセトニトリル中で0.1Mまで溶解した本発明のホスホルアミダイト色素(PBI3885)を用いて、ABI394DNA合成機(1マイクロモル)で合成した。脱保護は、t-ブチルアミン/MeOH/水(25/25/50)中で、一晚、60℃で実施し、5' 標識オリゴヌクレオチドを得た。得られたオリゴヌ

クレオチドを、乾燥するまで脱水させ、0.01M重炭酸トリエチルアンモニウムに再溶解し、アセトニトリル/0.1M TEAA緩衝系を用いて、Phenomex Jupiter C18カラムで、逆相HPLCにより精製した。HPLC精製オリゴヌクレオチドを乾燥するまで脱水し、0.01M重炭酸トリエチルアンモニウムに再溶解し、NAP-10カラム(GE Healthcare)で脱塩した。最後の脱塩ステップの後、オリゴヌクレオチドを乾燥するまで脱水し、-20℃で保存した。

【0177】

ii. 100マイクロモルのスケール

5'標識オリゴヌクレオチドを、アセトニトリル中で0.1Mまで溶解した本発明のホスホルアミダイト色素(PBI3885)を用いて、AKTA OligoPilot DNA合成機(100マイクロモル)で合成した。脱保護はt-ブチルアミン/MeOH/水(25/25/50)中で、一晚、60℃で実施し、5'標識オリゴヌクレオチドを得た。得られたオリゴヌクレオチドを、乾燥するまで脱水させ、0.01M重炭酸トリエチルアンモニウムに再溶解し、イオン交換HPLCにより精製した。得られた精製オリゴヌクレオチドを濃縮し、接線流限外ろ過を用いて脱塩し、乾燥するまで脱水した。標識オリゴヌクレオチドを-20℃で保存した。

【0178】

〔実施例35〕

本発明の色素で標識されたオリゴヌクレオチドを用いたPCRおよびマルチプレックスPCR

本発明の色素で6色素マルチプレックスPCRを実施できることを実証するために、24STR遺伝子座に対するプライマー対を含むマルチプレックス反応を実施した。

【0179】

マルチプレックス反応のために、21STR遺伝子座に対する5xプライマー対マスターミックス(「5x21STR Primer Mix」)(表1に概要をまとめる)ならびに、反応緩衝液およびGoTaq(登録商標)HotStartDNAポリメラーゼを含有する5xリアクションマスターミックス(「5xReaction Master Mix」)を作製した。また、21STR遺伝子座プライマー対に加えて、追加のプライマー対を、本発明の色素を用いて表2に記載するように調製した。これらの追加のプライマー対は、0.1mMのEDTAを含む1mM MOPS中で、25℃、最終pH約7.5で、150μMで作製された。

【表 6】

表 1

遺伝子座	色素	プライマー対濃度 (5 x での μM)
アメロゲニン	5FAM	2.88
D3S1358	5FAM	0.88
D1S1656	5FAM	1.42
D6S1043	5FAM	1.32
D13S317	5FAM	1.6
Penta E	5FAM	7.88
Penta D	JOE	3.68
D16S539	JOE	2.4
D18S51	JOE	1.18
D2S1338	JOE	2.04
CSF1PO	JOE	1.4
TH01	ET TMR	1.38
vWA	ET TMR	1.8
D21S11	ET TMR	1.55
D7S820	ET TMR	2.4
D5S818	ET TMR	2.02
TPOX	ET TMR	1.89
D8S1179	ET ROX	1.7
D12S391	ET ROX	3.75
D19S433	ET ROX	1.05
FGA	ET ROX	1.28

10

20

【 0 1 8 0 】

30

【表 7】

表 2

遺伝子座	色素
D22S1045	6FAM ET PBI 4510 (624nm)
D2S441	6FAM ET PBI 4510 (624nm)
DYS391	6FAM ET PBI 4510 (624nm)
D22S1045	6FAM ET PBI 4563 (640nm)
D2S441	6FAM ET PBI 4563 (640nm)
DYS391	6FAM ET PBI 4563 (640nm)
D22S1045	6FAM ET PBI 4574 (634nm)
D2S441	6FAM ET PBI 4574 (634nm)
DYS391	6FAM ET PBI 4574 (634nm)

40

【 0 1 8 1 】

次いで、マルチプレックス反応を以下のように準備した。

A . マルチプレックス 1 ミックス (1 0 反応用) :

5 x 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μl

5 x リアクションマスターミックス : 5 0 μl

4 5 1 0 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (0 . 6 μM) : 1 μl

50

4 5 1 0 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 4 5 1 0 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 3 7 μ l

B . マルチプレックス 2 ミックス (1 0 反応用) :

5 \times 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μ l
 5 \times リアクションマスターミックス : 5 0 μ l
 4 5 6 3 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 4 5 6 3 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 4 5 6 3 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 3 7 μ l

10

C . マルチプレックス 3 ミックス (1 0 反応用) :

5 \times 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μ l
 5 \times リアクションマスターミックス : 5 0 μ l
 4 5 7 4 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 4 5 7 4 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 4 5 7 4 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (0 . 6 μ M) : 1 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 3 7 μ l

D . マルチプレックス 4 ミックス (1 0 反応用) :

5 \times 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μ l
 5 \times リアクションマスターミックス : 5 0 μ l
 4 5 1 0 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 1 0 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 1 0 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 2 8 μ l

20

E . マルチプレックス 5 ミックス (1 0 反応用) :

5 \times 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μ l
 5 \times リアクションマスターミックス : 5 0 μ l
 4 5 6 3 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 6 3 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 6 3 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 2 8 μ l

30

F . マルチプレックス 3 ミックス (1 0 反応用) :

5 \times 2 1 - S T R プライマーミックス : 5 0 μ l
 5 \times リアクションマスターミックス : 5 0 μ l
 4 5 7 4 - D 2 2 S 1 0 4 5 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 7 4 - D 2 S 4 4 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 4 5 7 4 - D Y S 3 9 1 プライマー対 (2 . 4 μ M) : 4 μ l
 スクレアーゼなしの水 : 1 2 8 μ l

【 0 1 8 2 】

次いで、各マルチプレックスミックスを 2 4 μ l、9 6 ウェル P C R プレートのウェルに加えた。1 n g / μ L の男性 DNA (2 8 0 0 M P r o m e g a カタログ番号 D D 7 1 0 1 または 9 9 4 8 P r o m e g a カタログ番号 D D 2 0 6 A) を 1 μ l、または 0 . 5 n g / μ L の男性 DNA (C 2 7 4 または Q C 2 ; P r o m e g a) を 1 μ l、各ウェルに加えた。様々な単一源の男性 DNA 試料を用いて、様々な対立遺伝子パターンでの色素のバランスおよび裏抜け / ブリッジングの変動を測定した。次いで、以下のサイクル条件を用いて、A p p l i e d B i o s y s t e m s 9 7 0 0 サーマルサイクラーで反応を実行した：9 6 を 1 分、次いで、9 4 で 1 0 秒、5 9 で 1 分、7 2 で 3 0 秒を 3 0 サイクル、6 0 で 1 0 分、そして 4 で維持。次いで、反応を A p p l i e d B i o s y s t e m s 3 5 0 0 x L G e n e t i c A n a l y z e r で分析した (図 4 ~ 8)。

40

50

【 0 1 8 3 】

この実施例により、本発明の色素が、マルチプレックスPCRにおいて、良好なシグナルを有し、そして裏抜けまたはブリッジングがほとんどなく、非常によく機能することが実証されている。

【 0 1 8 4 】

〔 実施例 3 6 〕

本発明の色素を用いた細胞標識

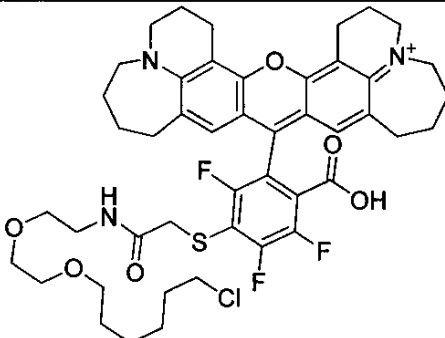
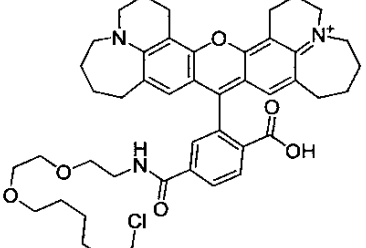
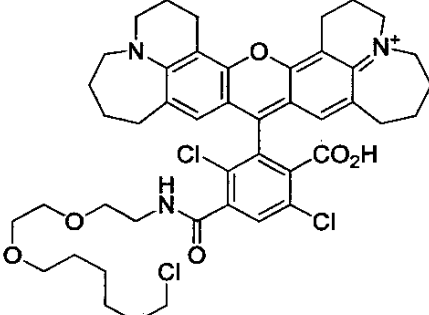
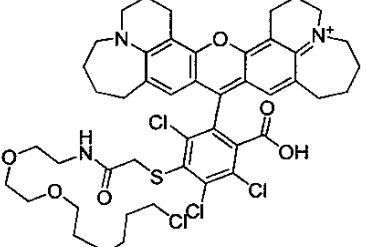
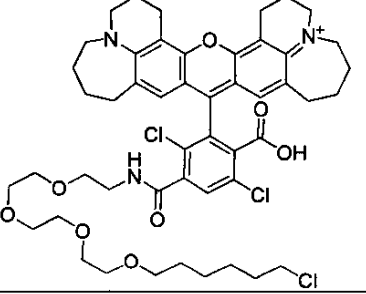
本発明の色素を細胞標識に用いることができるかどうかを測定するために、色素を、HaloTag（登録商標）リガンド（Promega）に結合させ、HaloTag（登録商標）タンパク質またはHaloTag（登録商標）融合タンパク質の活性／運動をモニターした。細胞標識に対して、リガンド番号3780、3781、3782、3783、3905、3906、3954、4356および4357を用いた（表3）。HaloTag（登録商標）タンパク質を核内で安定的に発現しているU2OS細胞（HT-NLS）を用いて、リガンドの細胞透過性を検証した。一部の例において、結合しなかったリガンドの除去効率もまた、測定された。HT-NLS撮像が明らかなリガンド除去問題を示さなかったリガンドは、さらに、p65-HaloTag（登録商標）融合（p65-HT）を用いて、細胞質でHaloTag（登録商標）タンパク質を安定的に発現している細胞およびHaloTag（登録商標）タンパク質を発現していないU2OS細胞で検証された。U2OS p65-HT安定細胞を用いて、中～低発現融合タンパク質に対する撮像パラメーターを確立した。次いで、これらの同じパラメーターを用いて、HaloTagを発現していないU2OS細胞における非結合リガンドの除去を分析した。全てのリガンドは、細胞での使用の前に、DMSOで10mMにまで希釈された。

10

20

【表 8】

表 3

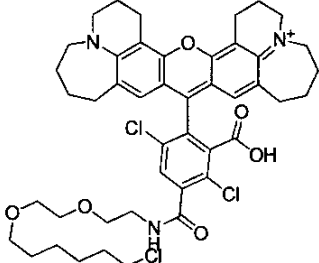
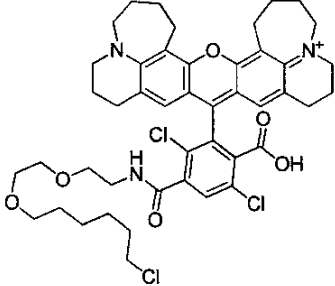
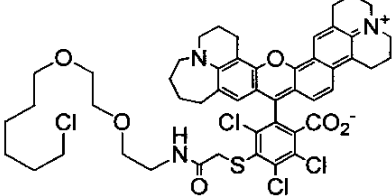
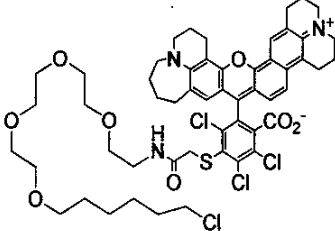
リガンド 番号	リガンド構造	色素番号
3780		
3781		PBI 3739
3782		PBI 3762
3783		PBI 3769
3905		PBI 3762

10

20

30

40

3906		PBI 3763
3954		PBI 3954
4356		
4357		

10

20

【0185】

30

すべての撮像実験のために、U2OS細胞を、仕切りのあるLab-Tek II C G (Nunc) カバースリップに播種し、一晚、 37°C + 5% CO_2 に置き、付着させた。迅速標識プロトコールで、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のリガンドに細胞を曝した。簡潔に言うと、ATCC推奨完全培地の存在下で、15分間、 37°C + 5% CO_2 および $800\text{ }\mu\text{g/ml}$ の G418 (Promega) でリガンドに細胞を曝した。標識の後、細胞を完全培地で3回リンスし、30分間、 37°C + 5% CO_2 でインキュベートした。次いで、培地を新しい完全培地と交換し、細胞を、撮像のために共焦点顕微鏡へと移した。

【0186】

一部の例において、HT-NLSを安定的に発現しているU2OS細胞を、無洗浄プロトコールで標識した。簡潔に言うと、細胞を 100 nM のリガンドに一晚、 37°C + 5% CO_2 に曝した。これらの例の場合、リガンドを、細胞播種時に添加した。翌日、リガンドを含有する培地を、新しい完全培地と交換し、細胞を、撮像のために共焦点顕微鏡へと移した。

40

【0187】

共焦点像は、 37°C + CO_2 の人口気候室 (Solent Scientific Ltd., UK) および適切なフィルターセットを備えられた Olympus Fluoview FV500 共焦点顕微鏡 (Olympus, USA) を用いて得た (図9~16を参照のこと)。

【0188】

リガンドの標識効率を定量化するために、SDS-PAGE分析を実施した。簡潔に言

50

うと、細胞を撮像のために上述のように播種し、最初に $1\ \mu\text{M}$ のリガンドで、15分間、 $37\ ^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ で標識した。リガンド含有培地を、次いで、 $5\ \mu\text{M}$ の HaloTag (登録商標) TMRリガンド (Promega; カタログ番号 G8252) を含有する培地と交換し、15分間、 $37\ ^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ でインキュベートした。次いで、細胞を3回リンスし、30分間、 $37\ ^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ で洗浄した。次いで、細胞を $1\times \text{PBS}$ で1回リンスし、 $1\times \text{SDS}$ ゲルローディング緩衝液 ($4\times$ 緩衝液 ($0.24\ \text{M}$ トリス、 2% SDS、 50.4% グリセロール、 $0.4\ \text{M}$ DTT、 $3\ \text{mM}$ ブロモフェノールブルーおよび塩酸で $\text{pH } 6.8$ に調整) 水で希釈) 中で回収し、 $95\ ^\circ\text{C}$ 、5分間静置し、 $4\sim 20\%$ のトリス-グリシンプレキャストゲル (Invitrogen) 上に負荷した。次いで、ゲルを、Typhoon 9410 (Amersham Biosciences) を用いてスキャンした (図17)。

10

【0189】

標識後の細胞の生存能力を測定するために、細胞を、白色組織培養処置 Costar 96ウェルプレート (Fisher Scientific) に播種した。CellTiter-Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assay および HaloTag (登録商標) タンパク質アレイの両方を、メーカーのプロトコール (Promega) に従い実施した。簡潔に言うと、CellTiter-Glo アッセイについては、 $100\ \mu\text{l}$ の CellTiter-Glo 試薬を、細胞を含有する培地 $100\ \mu\text{l}$ に添加した。内容物は、軌道振とう器上で2分間、混合し、室温で10分間インキュベートした。発光は、GloMax (登録商標) Multi Detection System (Promega) を用いて測定された。生成された発光シグナルは、試料中に存在する ATP の量 (培養物中に存在する細胞数に正比例する) に正比例した。

20

【0190】

ゲルベースの分析に対するリガンド 3782 の活用を評価するために、その性能を、HaloTag (登録商標) TMRリガンド (Promega カタログ番号 G8252) のものと比較した。これを行うに、セルなしの系中で発現されたタンパク質を標識するための標準 Promega プロトコールを使用した。簡潔に言うと、各リガンドを、 $1\times \text{PBS}$ 中で $10\ \mu\text{M}$ にまで希釈し、大腸菌から精製された $2\ \mu\text{l}$ の各 HaloTag (登録商標) - GST Standard Protein (Promega)、または HaloTag (登録商標) - プロテイン G に各リガンド $1\ \mu\text{l}$ を添加した。次いで、 $1\times \text{PBS}$ を $7\ \mu\text{l}$ 、総体積 $10\ \mu\text{l}$ で各標識反応物に添加し、反応物を、室温で30分間、遮光してインキュベートした。次いで $5\ \mu\text{l}$ の各標識反応物を、 $5\ \mu\text{l}$ の $2\times \text{SDS}$ ゲルローディング緩衝液に加え、2分間、 $70\ ^\circ\text{C}$ に加熱した。次いで、試料を SDS ポリアクリルアミドゲルに負荷し、泳動して、上述のように蛍光スキャナーを用いて可視化した (図18および19)。

30

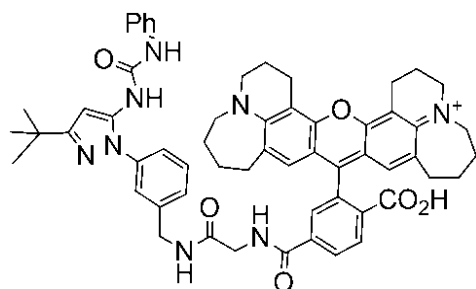
【0191】

〔実施例37〕

5 - ((2 - (4 - (3 - tert - ブチル - 5 - (3 - フェニルウレイド) - 1H - ピラゾール - 1 - イル) ベンジルアミノ) - 2 - オキシエチル) カルバモイル) - 2 - ビス (ピペリジンアゼピノ) ローダミン (PBI 4838) の合成

40

【化59】



50

P B I 4 8 3 8

【 0 1 9 2 】

標題の化合物は、P B I - 3 7 8 1 (実施例 2 1) と同様の方法で、ビス (ピペリジンアゼピノ) - 6 - カルボキシローダミンおよび 1 - (1 - (4 - ((2 - アミノアセトアミド) メチル) フェニル) - 3 - t e r t - ブチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 3 - フェニルウレア (Tecle et al. 2009, Chem. Biol. Drug Des., 74:547-559) を用いて合成された : M S は 8 1 5 ($C_{58}H_{61}N_8O_6^+$ 、M +) を予期し、実測値は 8 1 5。

【 0 1 9 3 】

〔 実施例 3 8 〕

P B I 4 8 2 8 を用いた生物発光共鳴エネルギー転移 (B R E T)

本発明の色素を B R E T 用途に用いることが出来ることを実証するために、本発明の色素 (P B I 4 8 3 8) を含有する蛍光色素トレーサーを作製し、生きている細胞内で、既知の薬剤のキナーゼ標的への結合をモニターした。この実施例においては、p 3 8 アルファキナーゼ阻害剤 (B I R B 7 9 6) を足場として用いて、P B I 4 8 3 8 を含有する不活性 p 3 8 アルファキナーゼに対する蛍光トレーサーを作製した (Tecle et al. 2009, Chem Biol Drug Des: 74: 547-559; 図 2 0)。次いで、そのトレーサーを、N a n o L u c ルシフェラーゼ - p 3 8 アルファキナーゼ融合タンパク質を発現している生きている細胞または溶解した細胞に適用した。N a n o L u c ルシフェラーゼに対するフリマジン (f u r i m a z i n e) 基質を添加すると、用量依存的な B R E T が生細胞および溶解細胞の両方で測定された。

【 0 1 9 4 】

H E K 2 9 3 細胞 (9 6 ウェルフォーマットで、2 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル) を、N a n o L u c (登録商標) ルシフェラーゼ - p 3 8 アルファキナーゼ融合タンパク質をコードする p F 5 プラスミド DNA (P r o m e g a C o r p o r a t i o n) で一過性にトランスフェクト (F u g e n e H D , P r o m e g a C o r p o r a t i o n) した。陰性対照として、一部の細胞は、N a n o L u c ルシフェラーゼ - P K C アルファ融合タンパク質をコードする p F 5 プラスミド DNA でトランスフェクトした。トランスフェクト後 2 日目に、細胞培地を、5 0 u g / m l のジギトニンを含む、または含まない無血清 O p t i - M E M (L i f e T e c h n o l o g i e s) と交換した。

【 0 1 9 5 】

トレーサー飽和実験のために、モル過剰の B I R B 7 9 6 (最終 1 0 u M) の存在下または非存在下、段階希釈した P B I 4 8 3 8 で細胞を処置した。

【 0 1 9 6 】

B I R B 7 9 6 競合実験に対しては、段階希釈した B I R B 7 9 6 を、0 . 5 u M P B I 4 8 3 8 (最終濃度) の存在下または非存在下で、細胞に適用した。

【 0 1 9 7 】

次いで、細胞を 3 7 ° で 2 時間、トレーサーおよび B I R B 7 9 6 で平衡させた。N a n o L u c ルシフェラーゼに対する基質である、フリマジン基質 (P B I 3 9 3 9) を、次いで、最終濃度 2 0 u M まで細胞に添加した。B R E T 比は、V a r i o s k a n 照度計を用いて、以下の波長で記録した : 6 3 0 n m (アクセプター) / 4 5 0 n m (ドナー)。アクセプター / ドナー値を用いて、B R E T 比を決定した (図 2 1 および 2 2)。

【 0 1 9 8 】

データより、本発明の色素は、B R E T 用途に用いることが出来ることが実証された。トレーサー飽和実験においては、N a n o L u c - p 3 8 アルファを発現している生細胞または透過化細胞を、段階希釈した P B I 4 8 3 8 とインキュベートし、B R E T の用量依存的な増加が得られた。その結果より、生細胞中で、P B I 4 8 3 8 が N a n o L u c 融合タンパク質に結合していることが示唆される。極度にモル過剰な非標識 B I R B 7 9 6 の存在下では、B R E T シグナルは完全に阻害され、このことから、N a n o L u c - p 3 8 アルファと P B I 4 8 3 8 の間のほぼ全ての B R E T シグナルが特異的なものであ

10

20

30

40

50

ることが示される。B I R B 7 9 6 競合実験については、データより、非標識 B I R B 7 9 6 と用量依存的に、P B I - 4 8 3 8 の固定濃度が競合的に置き換えることが出来ることを示している。対照実験によりさらに、P B I 4 8 3 8 と N a n o L u c p 3 8 アルファとの間の特異的 B R E T シグナルの特異性が、支持される。これにより、無関係のキナーゼに融合した N a n o L u c を発現する細胞の使用が実証される。対照実験において、N a n o L u c - P K C アルファを発現している細胞は、P B I 4 8 3 8 の存在下で、ごく微量の B R E T シグナルを示すのみであり、非標識 B I R B 7 9 6 の影響を受けない。

【 0 1 9 9 】

〔実施例 3 9〕

P B I 3 7 8 1 を用いた、生物発光共鳴エネルギー転移 (B R E T)

10

本発明の色素を B R E T 応用に用いることが出来ることを実証するために、本発明の蛍光色素を、実施例 2 1 に記載のようにクロロアルカンに結合させた。色素 - クロロアルカン複合体 P B I 3 7 8 1 が、共有結合的に H a l o T a g (登録商標) タンパク質または H a l o T a g (登録商標) 融合タンパク質に結合することによって、H a l o T a g または H a l o T a g (登録商標) 融合タンパク質を検出および / または測定することができる。P B I 3 7 8 1 を H a l o T a g (登録商標) および N a n o L u c 融合タンパク質と組み合わせて用いて、生きている細胞中でのタンパク質 - タンパク質相互作用を、B R E T を介して測定した。

【 0 2 0 0 】

この実施例において、ラパマイシン介在性の、N a n o L u c ルシフェラーゼ - m T O R (F r b) の F K 5 0 6 結合ドメイン融合物および、H a l o T a g - F K B P 1 2 融合物 (F K 5 0 6 結合タンパク質) の間の相互作用を用いて、誘導性タンパク質 - タンパク質相互作用を実証した。相互作用は、N a n o L u c - F R B 融合物 (ドナー) と P B I 3 7 8 1 に結合した H a l o T a g - F K B P 1 2 融合物 (アクセプター) の間に発生するラパマイシン依存性の B R E T の増加として計測された (図 2 3 A)。

20

【 0 2 0 1 】

F r b - N a n o L u c または F R K B P 1 2 - H a l o T a g (登録商標) 融合タンパク質の発現を目的として、メーカーの説明書 (P r o m e g a C o r p o r a t i o n) に従って、F u G E N E (登録商標) H D T r a n s f e c t i o n R e a g e n t を用いて、H e L a 細胞を、p F 5 ベースの構築物 (P r o m e g a C o r p o r a t i o n) と共トランスフェクトした。次いで、細胞を、一晚、3 7 、5 % C O ₂ でインキュベートした。

30

【 0 2 0 2 】

トランスフェクションの 1 日後、細胞を回収し、9 6 ウェルの白い組織培養プレートのウェルに、1 0 0 μ L D M E M + 1 0 % F B S で、2 0 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで再播種し、3 7 、5 % C O ₂ で 2 4 時間インキュベートした。

【 0 2 0 3 】

トランスフェクションの 2 日後、増殖培地を、5 0 0 n M の P B I 3 7 8 1 を含有するフェノールレッドなしの D M E M + 5 % F B S と交換し、細胞を、3 7 、5 % C O ₂ で 1 2 0 分間インキュベートした。次いで、細胞をフェノールレッドなしの D M E M に溶解し連続希釈したラパマイシン 5 0 μ L で処置し、室温で 1 5 分間インキュベートした。フェノールレッドなしの D M E M に溶解した 4 0 m M フリマジン を 5 0 μ L 加え、T h e r m o V a r i o s k a n プレートリーダーを用いて B R E T を測定した (5 0 0 ミリ秒の積分時間 ; ドナーチャンネル発光 4 5 0 / 6 0 バンドパスフィルター ; アクセプターチャンネル発光 6 1 0 n m ロングパスカラーガラスフィルター) (図 2 4)。

40

【 0 2 0 4 】

本実験により、ラパマイシンの連続希釈添加後の完全 B R E T シグナルの濃度依存性の変化が実証される。また、色素 - クロロアルカン H a l o T a g (登録商標) リガンド (たとえば、P B I 3 7 8 1) を組み合わせた、N a n o L u c と H a l o T a g (登録商標) 融合タンパク質の適切なペアを用いて、本実験は、本発明の色素が、他の細胞内タン

50

パク質 - タンパク質相互作用の検出に用いることができることを実証する。

【 0 2 0 5 】

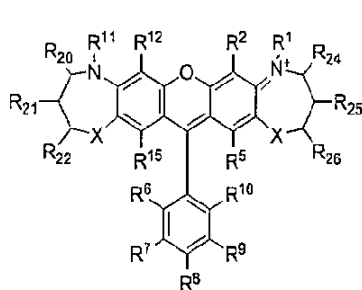
〔 実施例 4 0 〕

色素 - シアノベンゾチアゾール複合体の使用に関する予測実施例。

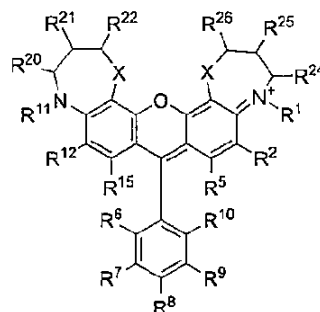
たとえば、上皮増殖因子受容体 (E G F R) に対する上皮増殖因子 (E G F) 等のリガンドの相互作用を、全細胞群で計測することができる。そのような例において、H a l o T a g と E G F タンパク質ドメインの間の T E V プロテアーゼ開裂部位 (T E V プロテアーゼ開裂部位の最終残基はシステイン残基をコードする) を含有する H a l o T a g - E G F 融合タンパク質を用いることができる。T E V プロテアーゼでの開裂で、C y s - E G F タンパク質が生成され、たとえば P B I 5 1 2 2 等の C B T 標識化合物と反応しうる (実施例 3 3) 。 P B I 5 1 2 2 - C y s - E G F は、生細胞中で発現される N a n o L u c - E G F R 融合タンパク質に結合することができるプローブとして使用することができる。ごく近接して結合することで、エネルギー転移 (B R E T) が発生し得、色素発光の増加がもたらされる。別の構成において、非標識 E G F、または類似の結合メカニズムのリガンドは、P B I 5 1 2 2 - E G F : N a n o L u c - E G F R の複合体を妨害し、エネルギー転移の減少をもたらす。これらの標識化学物質の適合性およびエネルギー転移法により、全細胞で創出されるリガンドと受容体のリガンド結合事象を定量化することができる。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔 1 〕 式 (I a) または式 (I b) :



(I a)



(I b)

に記載の化合物であって、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、H または C_{1-4} アルキル、L - R もしくは L - C_s であり、

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1 ~ 16 の非水素原子を有する共有結合であり、

R は、反応基であり、

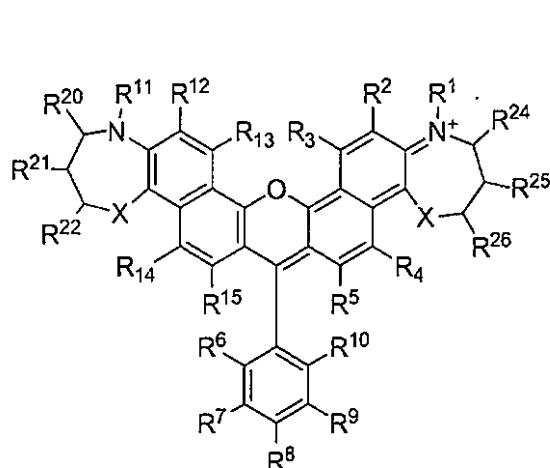
C_s は、結合物質であり、

R^2 、 R^5 、 R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - R または L - C_s であり、

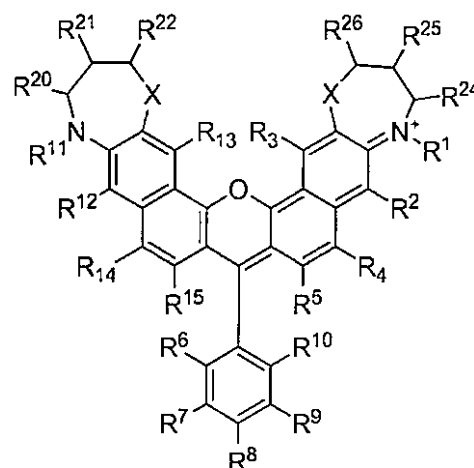
R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^1 および R^2 、ならびに / または、 R^{11} および R^{12} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、ハロ、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2 、 H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、
 各Xは、独立して、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、
 R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである、化合物。
 (2) 式(IIa)または式(IIb)：



(IIa)



(IIb)

に記載の化合物であって、式中、

R^1 および R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、 $L-R$ もしくは $L-C_s$ であり、

Lは、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1~16の非水素原子を有する共有結合であり、

Rは、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} および R^{26} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} 、 R^{24} および R^{25} 、 R^{25} および R^{26} 、ならびに R^{26} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^1 および R^2 、ならびに/または、 R^{11} および R^{12} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

各Xは、独立して、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは、 $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである、化合物。

(3) R^{12} および R^{13} が、共に環を形成する、前記(2)に記載の化合物。

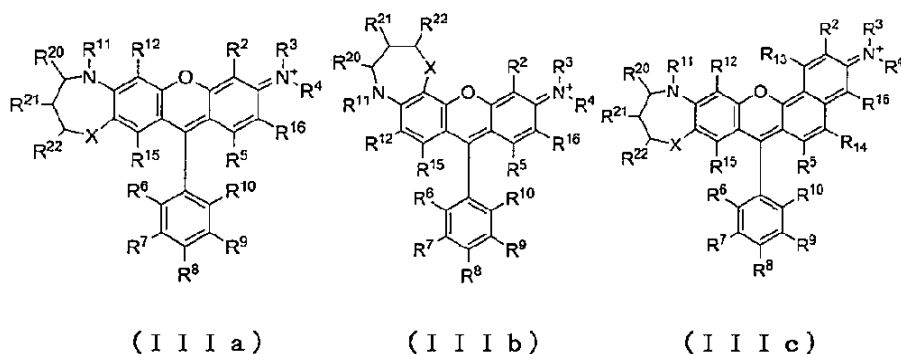
(4) R^{14} および R^{15} が、共に環を形成する、前記(2)または前記(3)に記載の化合物。

(5) R^{24} が、Hである、前記(1)~(4)のいずれか1項に記載の化合物。

(6) R^{25} が、Hである、前記(1)~(5)のいずれか1項に記載の化合物。

(7) R^{26} が、Hである、前記(1)~(6)のいずれか1項に記載の化合物。

〔 8 〕 式 (I I I a)、式 (I I I b) または式 (I I I c) :



10

に記載の化合物であって、式中、

R^{11} は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキル、L - RもしくはL - C_s であり、

Lは、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1 ~ 16の非水素原子を有する共有結合であり、

Rは、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - RまたはL - C_s であり、

R^3 および R^4 は、H、アルキル、L - R、L - C_s 、L - CO_2H 、L - SO_3H であるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R^5 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - RまたはL - C_s であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、 R^{22} および R^{23} の一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環または複素環を共に形成し、

R^{11} および R^{12} は炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - RまたはL - C_s であり、

Xは、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは、 $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである、化合物。

〔 9 〕 Xが、 CH_2 である、前記〔 1 〕 ~ 〔 8 〕のいずれかに記載の化合物。

〔 10 〕 R^1 が、 C_{1-4} アルキル前記〔 1 〕 ~ 〔 4 〕または前記〔 5 〕 ~ 〔 9 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 11 〕 R^1 が、メチルまたはエチルである、前記〔 10 〕に記載の化合物。

〔 12 〕 R^1 および R^2 が、5 ~ 7員炭素環を形成する、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 〕または前記〔 5 〕 ~ 〔 9 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 13 〕 前記環が、6員環である、前記〔 12 〕に記載の化合物。

〔 14 〕 R^{11} が、 C_{1-4} アルキルである、前記〔 1 〕 ~ 〔 13 〕のいずれかに記載の化合物。

〔 15 〕 R^{11} が、メチルまたはエチルである、前記〔 14 〕に記載の化合物。

〔 16 〕 R^{12} が、H、ClまたはOMeである、前記〔 1 〕 ~ 〔 15 〕のいずれかに記載の化合物。

50

〔 1 7 〕 R^{11} および R^{12} が、5 ～ 7 員炭素環を形成する、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 1 8 〕 前記環が、6 員環である、前記〔 1 7 〕に記載の化合物。

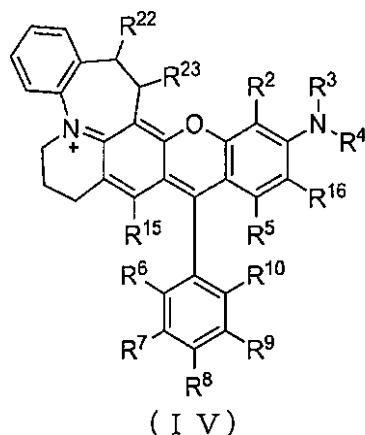
〔 1 9 〕 R^{20} が、H である、前記〔 1 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 2 0 〕 R^{21} が、H である、前記〔 1 〕～〔 1 9 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 2 1 〕 R^{22} が、H である、前記〔 1 〕～〔 2 0 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 2 2 〕 R^{23} が、H である、前記〔 1 〕～〔 2 1 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 2 3 〕 式 (I V) :



に記載の化合物であって、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であってもよく、

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1 ～ 16 の非水素原子を有する共有結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、H またはアルキルであるか、または、炭素環、アリール環、ヘテロアリール環もしくは複素環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成し、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

R^{22} および R^{23} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である、化合物。

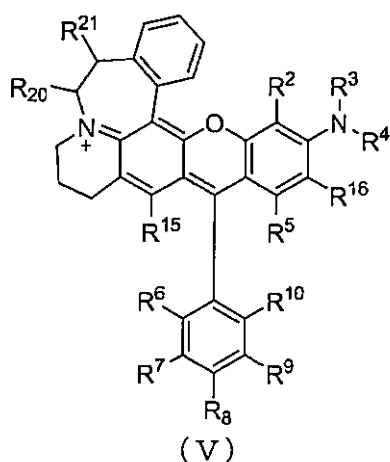
〔 2 4 〕 式 (V) :

10

20

30

40



10

に記載の化合物であって、式中、

R^2 および R^{16} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であってもよく、

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1~16の非水素原子を有する共有結合であり、

20

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^3 および R^4 は、Hまたはアルキルであるか、または、炭素環、複素環、アリール環もしくはヘテロアリール環を共に形成し、

あるいは、 R^2 および R^3 、ならびに、独立して、 R^4 および R^{16} は、炭素環、複素環、アリール環、またはヘテロアリール環を共に形成してもよく、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

R^{20} および R^{21} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環もしくは複素環を共に形成し、および、

30

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である、化合物。

〔25〕 R^2 が、H、ClまたはOMeである、前記〔1〕~〔24〕のいずれかに記載の化合物。

〔26〕 R^3 が、 C_{1-4} アルキルである、前記〔2〕~〔25〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔27〕 R^3 が、メチルまたはエチルである、前記〔26〕に記載の化合物。

〔28〕 R^4 が、 C_{1-4} アルキルである、前記〔2〕~〔27〕のいずれか1項に記載の化合物。

40

〔29〕 R^4 が、メチルまたはエチルである、前記〔28〕に記載の化合物。

〔30〕 R^3 が、複素環の一部である、前記〔2〕~〔25〕、〔28〕または〔29〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔31〕前記複素環が、ピペラジンである、前記〔30〕に記載の化合物。

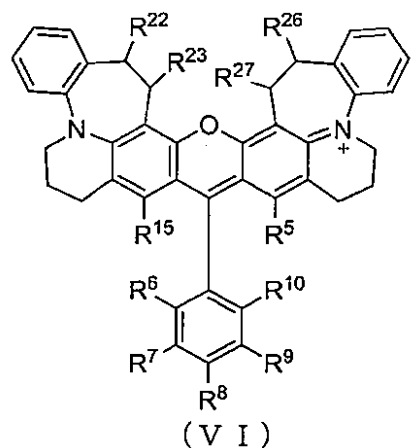
〔32〕 R^4 が、複素環の一部である、前記〔2〕~〔27〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔33〕前記複素環が、ピペラジンである、前記〔32〕に記載の化合物。

〔34〕 R^{16} が、H、ClまたはOMeである、前記〔23〕~〔33〕のいずれか1項に記載の化合物。

50

[3 5] 式 (V I) :



10

に記載の化合物であって、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1~16の非水素原子を有する共有結合であり、

20

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^{22} 、 R^{23} 、 R^{26} および R^{27} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{22} および R^{23} および R^{26} および R^{27} のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

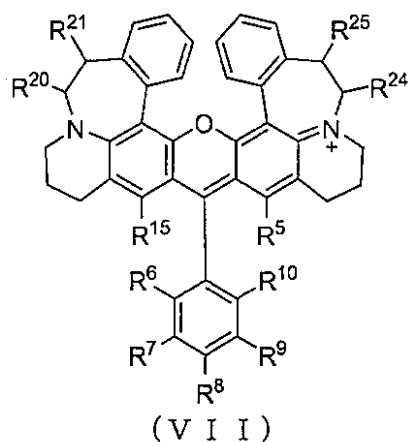
R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ である、化合物。

30

[3 6] R^{26} が、Hである、前記 [3 5] に記載の化合物。

[3 7] R^{27} が、Hである、前記 [3 5] または前記 [3 6] に記載の化合物。

[3 8] 式 (V I I) :



40

に記載の化合物であって、式中、

R^5 および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、 $L-R$ または $L-C_s$ であり、

50

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1 ~ 16 の非水素原子を有する共有結合であり、

R は、反応基であり、

C₈ は、結合物質であり、

R²⁰、R²¹、R²⁴およびR²⁵は、独立して、HまたはC₁₋₆アルキルであるか、または、R²⁰およびR²¹およびR²⁴およびR²⁵のうち一つ以上が、アリール環、ヘテロアリール環、炭素環、または複素環を共に形成し、および、

R⁶⁻¹⁰は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、CO₂H、SO₃H、L - CO₂H、L - SO₃H、L - RまたはL - C₈である、化合物。

〔39〕R²⁴が、Hである、前記〔38〕に記載の化合物。

〔40〕R²⁵が、Hである、前記〔38〕または前記〔39〕に記載の化合物。

〔41〕R²⁰が、Hである、前記〔24〕～〔34〕または前記〔38〕～〔40〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔42〕R²¹が、Hである、前記〔24〕～〔34〕または前記〔38〕～〔41〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔43〕R²²が、Hである、前記〔23〕または前記〔25〕～〔37〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔44〕R²³が、Hである、前記〔23〕または前記〔25〕～〔37〕または前記〔43〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔45〕R⁵が、Hである、前記〔1〕～〔44〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔46〕R¹⁵が、Hである、前記〔1〕～〔45〕のいずれかに記載の化合物。

〔47〕R⁶が、Hまたはハロゲンである、前記〔1〕～〔46〕のいずれかに記載の化合物。

〔48〕R⁹が、Hまたはハロゲンである、前記〔1〕～〔47〕のいずれか1項に記載の化合物。

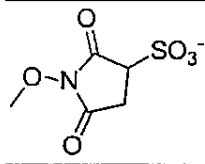
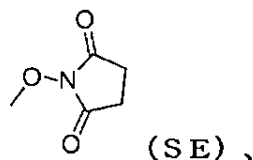
〔49〕R¹⁰が、H、F、Cl、CO₂HまたはSO₂Hである、前記〔1〕～〔48〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔50〕R₇およびR₈のうち一方が、-L-R、-L-CO₂Hまたは-L-C₈であり、他方がH、ClまたはFである、前記〔1〕～〔49〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔51〕Lが、-CO-または-SCH₂CO-または-SO₂-である、前記〔1〕～〔50〕のいずれかに記載の化合物。

〔52〕Lが、自己犠牲リンカーである、前記〔1〕～〔50〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔53〕Rが、



または -Cl である、前記〔1〕～〔52〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔54〕C₈が、NHCH₂CH₂(OCH₂CH₂)_n(CH₂)₆Clであり、ここで、nが

2～6である、前記〔1〕～〔53〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔55〕 C_s が、ヌクレオシドを含有する、前記〔1〕～〔53〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔56〕 C_s が、オリゴヌクレオチドを含有する、前記〔1〕～〔53〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔57〕前記〔1〕～〔56〕のいずれか1項に記載の化合物を含む、標識生体分子。

〔58〕前記生体分子が、ビーズ、固形支持体、樹脂粒子、アッセイプレート、タンパク質、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、リガンド、酵素基質、抗体、ナノボディ、ポリペプチド、ポリペプチドベースの毒素、アミノ酸、ペプチド、脂質、炭水化物、ハプテン、小分子、薬剤、薬剤化合物またはイオン錯化剤である、前記〔57〕に記載の標識生体分子。

〔59〕前記生体分子が小分子、薬剤または薬剤化合物である、前記〔58〕に記載の標識生体分子。

〔60〕前記生体分子がリガンドである、前記〔57〕に記載の標識生体分子。

〔61〕前記リガンドが、クロロアルカンリガンドである、前記〔60〕に記載の化合物。

〔62〕前記標識生体分子がトレーサーである、前記〔59〕に記載の標識生体分子。

〔63〕生体分子と対象のタンパク質の間の相互作用を検出する方法であって、前記対象のタンパク質を、前記〔57〕～〔62〕の標識生体分子と接触させること、および前記相互作用を検出することを含む、方法。

〔64〕前記対象のタンパク質が、レポータータンパク質に融合されている、前記〔63〕に記載の方法。

〔65〕前記レポータータンパク質が、ルシフェラーゼタンパク質である、前記〔64〕に記載の方法。

〔66〕前記標識生体分子がトレーサーである、前記〔63〕に記載の方法。

〔67〕前記相互作用が、生物発光共鳴エネルギー転移により検出される、前記〔63〕～〔66〕の方法。

〔68〕前記対象のタンパク質が細胞で発現されている、前記〔63〕～〔67〕の方法。

〔69〕試料中の選択分子を検出する方法であって、

a) 選択分子を含有すると思われる試料を、前記〔1〕～〔56〕のいずれか1項に記載の化合物および前記選択分子に対するリガンドを含む複合体を含有する組成物と接触させ、混合物を得ること、および

b) 前記混合物中の前記化合物の存在または量を検出すること、を含む、方法。

〔70〕前記複合体が、前記〔1〕～〔57〕のいずれか1項に記載の化合物を含み、ここで、 $-L-C_s$ が、 $-リンカー-A-X$ であり、前記リンカーが、任意選択的に1つ以上のN、SまたはO原子を含む多原子の炭素直鎖もしくは炭素分枝鎖であり、ここで、 $-A-X$ が、デハロゲナーゼの基質であり、Xがハロゲンである、前記〔68〕に記載の方法。

〔71〕前記リガンドが、オリゴヌクレオチドである、前記〔68〕に記載の方法。

〔72〕試料中の核酸ポリマーの存在を検出する方法であって、

a) 核酸ポリマーを含有すると思われる試料を、前記〔1〕～〔56〕のいずれか1項に記載の化合物とオリゴヌクレオチドとを含む複合体を含有する組成物と接触させること、

b) 前記試料中の前記化合物の存在または量を検出すること、を含む、方法。

〔73〕1回の反応で、2つ以上の核酸ポリマーを検出する、前記〔71〕に記載の方法。

〔74〕

a) 選択生体分子を含有すると思われる試料と、前記〔1〕～〔56〕のいずれか1項に

10

20

30

40

50

記載の化合物を含有する組成物を接触させ、混合物を得ること、および、

b) 前記混合物中の前記標識生体分子の存在または量を検出すること、

を含む、生体分子を標識する方法。

〔 7 5 〕 前記化合物が、シアノベンゾチアゾールを含有する、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 7 6 〕 前記生体分子が、タンパク質である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

〔 7 7 〕 前記生体分子が、固形支持体である、前記〔 7 3 〕に記載の方法。

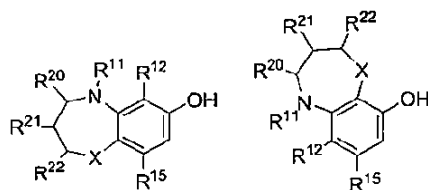
〔 7 8 〕 前記〔 1 〕～〔 5 6 〕のいずれか 1 項に記載の化合物または、前記〔 5 7 〕～〔 6 2 〕に記載の標識生体分子、および使用説明書を含む、キット。

〔 7 9 〕 対象のタンパク質を含有する融合タンパク質を発現するためのベクター、または、対象のタンパク質を含有する融合タンパク質を発現する細胞をさらに含む、前記〔 7 7 〕に記載のキット。

〔 8 0 〕 前記対象のタンパク質が、レポータータンパク質に融合されている、前記〔 7 8 〕に記載のキット。

〔 8 1 〕 前記レポータータンパク質が、ルシフェラーゼタンパク質である、前記〔 7 9 〕に記載のキット。

〔 8 2 〕 式 (V I I I a) または式 (V I I I b) :



(V I I I a) (V I I I b)

の化合物であって、式中、

R^{11} は、H または C_{1-4} アルキル、L - R もしくは L - C_s であり、

L は、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素 - 炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1 ~ 16 の非水素原子を有する共有結合であり、

R は、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - R または L - C_s であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} は、独立して、H または C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、ならびに R^{22} および R^{23} のうち一つ以上が、縮合アリール環を共に形成し、

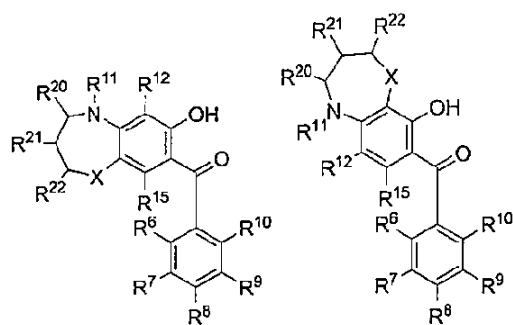
R^{11} および R^{12} は、任意選択的に置換された環において、共に連結されても良く、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、L - CO_2H 、L - SO_3H 、L - R または L - C_s であり、

X は、 CHR^{23} 、O、S または NR^{30} であり、および、

R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは - $C(O)C_{1-4}$ アルキルである、化合物。

〔 8 3 〕 式 (I X a) または式 (I X b) :



(IX a)

(IX b)

10

に記載の化合物であって、式中、

R^{11} は、Hまたは C_{1-4} アルキル、L-Rもしくは $L-C_s$ であり、

Lは、直鎖もしくは分枝状、環状もしくは複素環式の飽和または不飽和である共有結合であり、当該結合が、エステル、酸、アミン、アミド、アルコール、エーテル、チオエーテルもしくはハロゲン基、または、一重、二重、三重もしくは芳香族の炭素-炭素結合のうちの組み合わせを含有するように、1~16の非水素原子を有する共有結合であり、

Rは、反応基であり、

C_s は、結合物質であり、

R^{12} および R^{15} は、独立して、H、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} および R^{23} は、独立して、Hまたは C_{1-6} アルキルであるか、または、 R^{20} および R^{21} 、 R^{21} および R^{22} 、ならびに R^{22} および R^{23} のうち一つ以上が、縮合アリール環を共に形成し、

R^{11} および R^{12} は、任意選択的に置換された環において、共に連結されても良く、

R^{6-10} は、独立して、H、F、Cl、Br、I、OH、アルキル、アリール、 CO_2H 、 SO_3H 、 $L-CO_2H$ 、 $L-SO_3H$ 、L-Rまたは $L-C_s$ であり、

Xは、 CHR^{23} 、O、Sまたは NR^{30} であり、および、

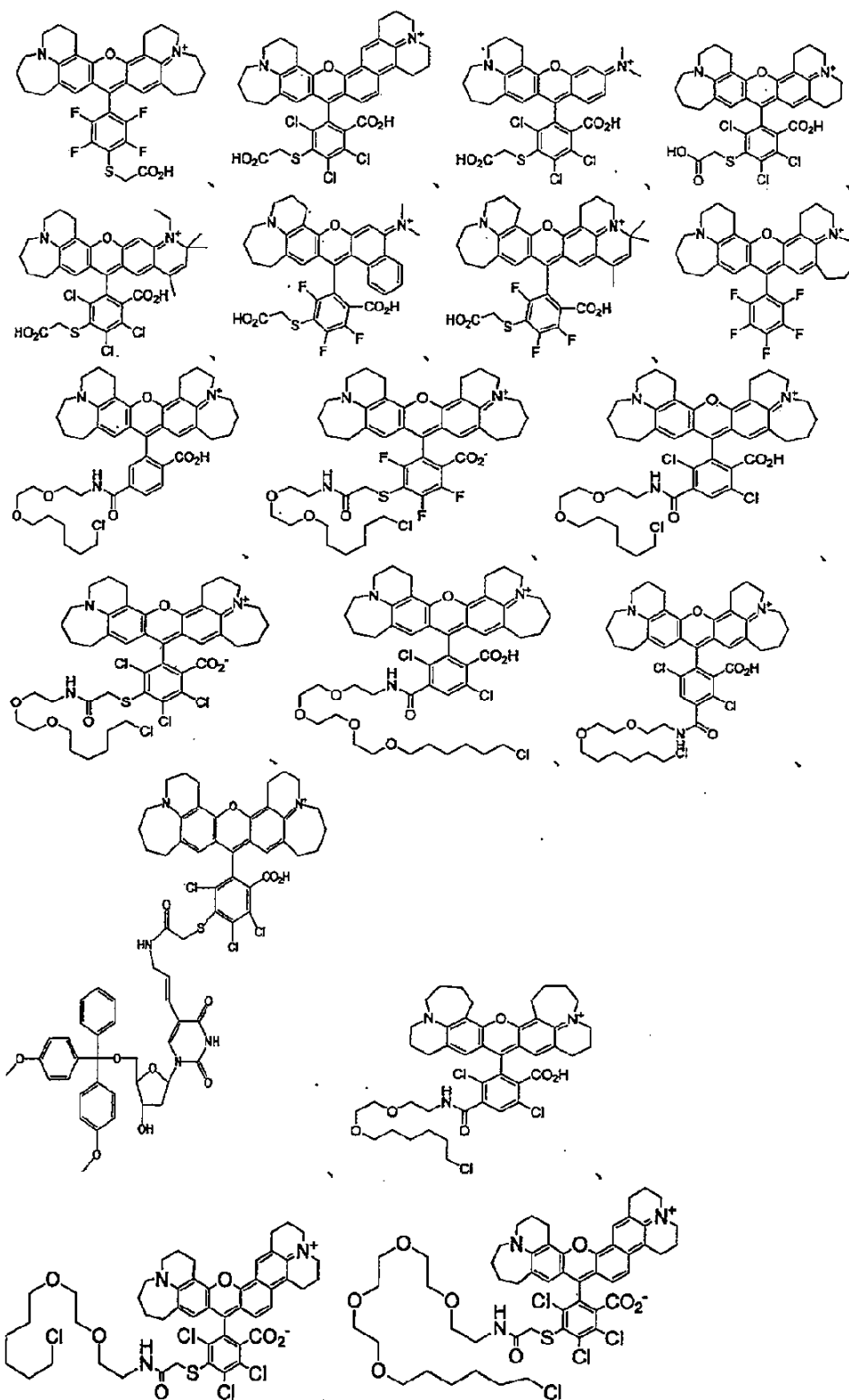
R^{30} は、H、 C_{1-4} アルキルまたは $-C(O)C_{1-4}$ アルキルである、化合物。

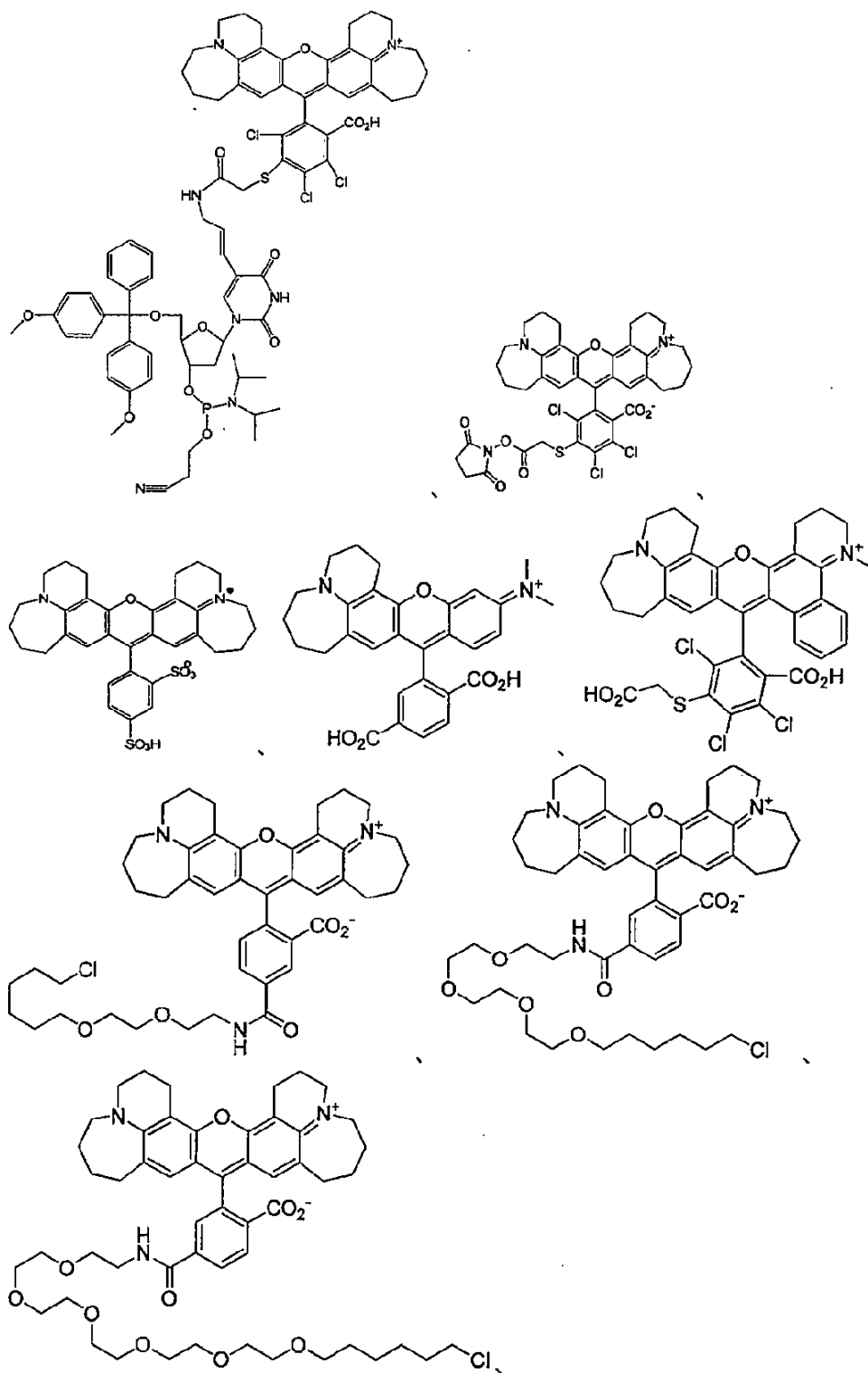
[84]

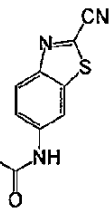
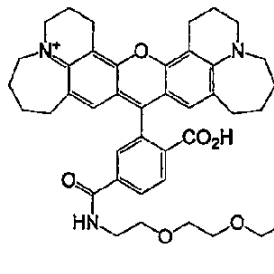
20

30

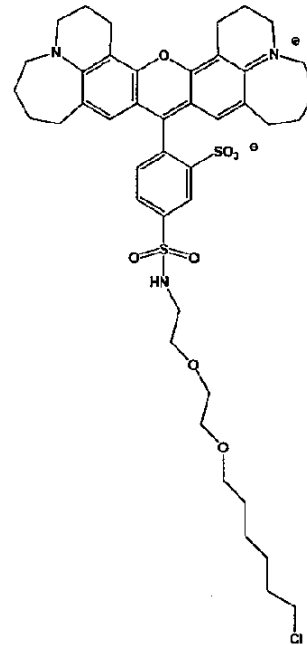








、および、

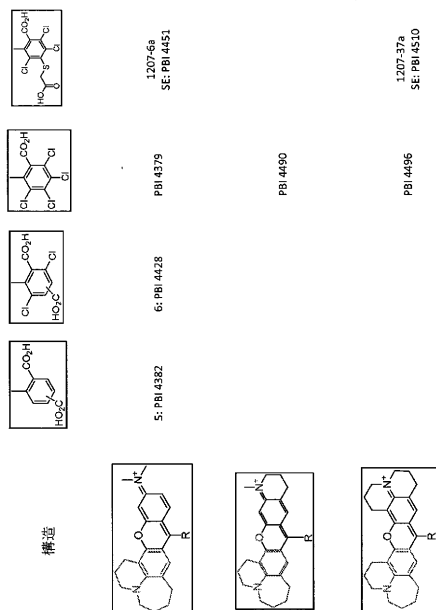


10

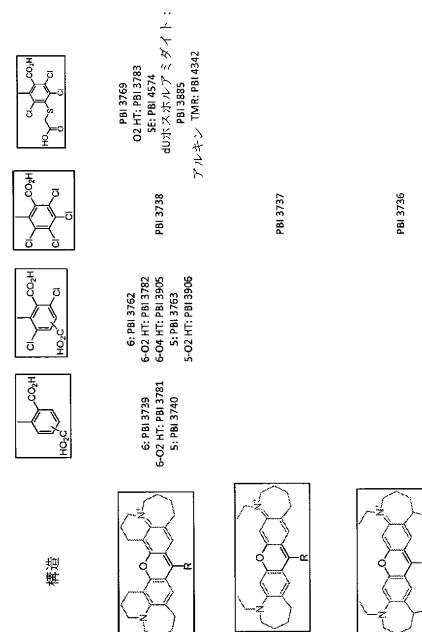
20

からなる群から選択される、化合物。

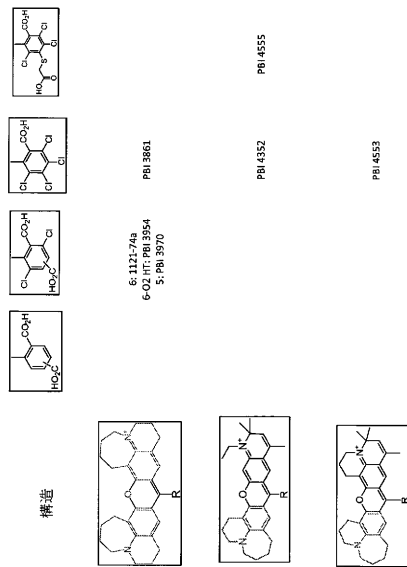
【図 1 A】



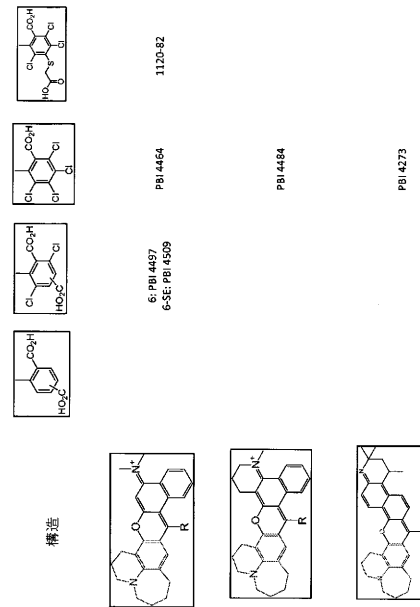
【図 1 B】



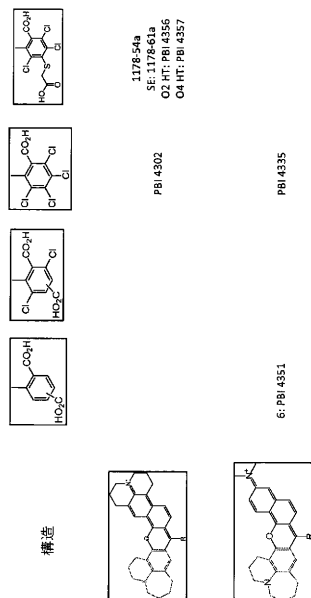
【 図 1 C 】



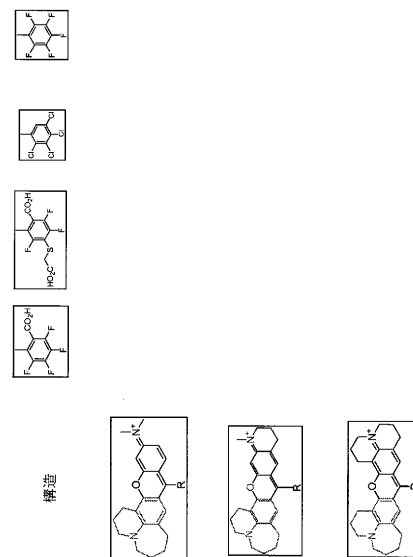
【 図 1 D 】



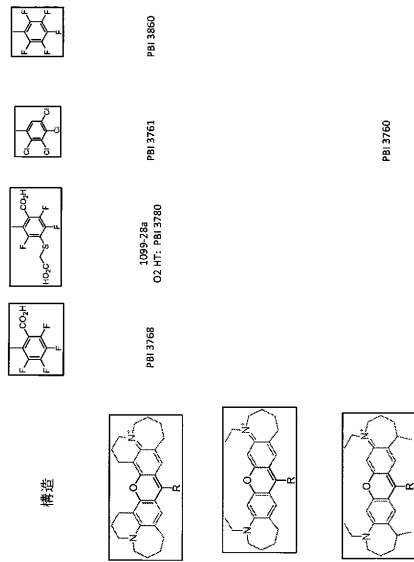
【 図 1 E 】



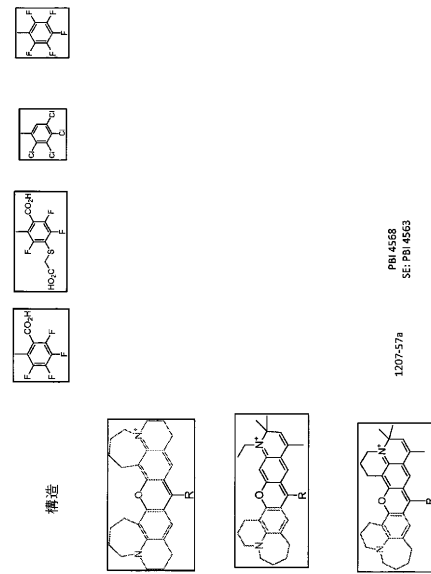
【 図 2 A 】



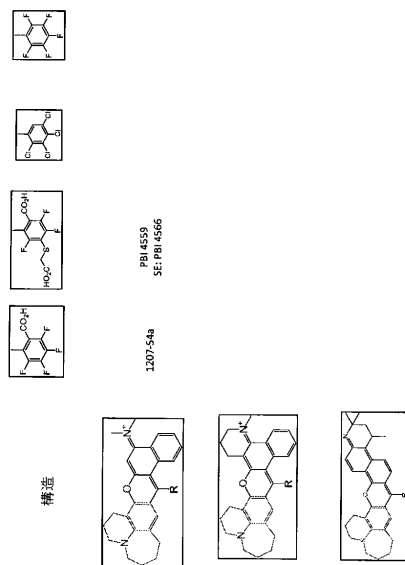
【図 2 B】



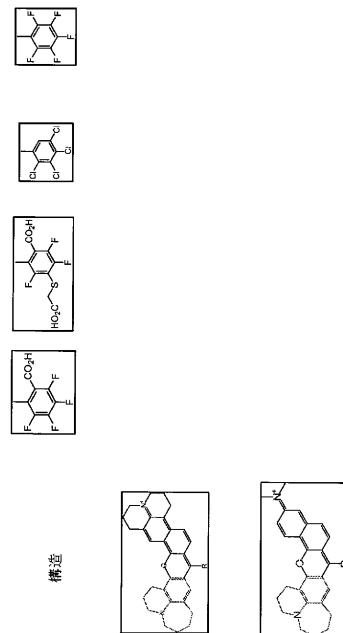
【図 2 C】



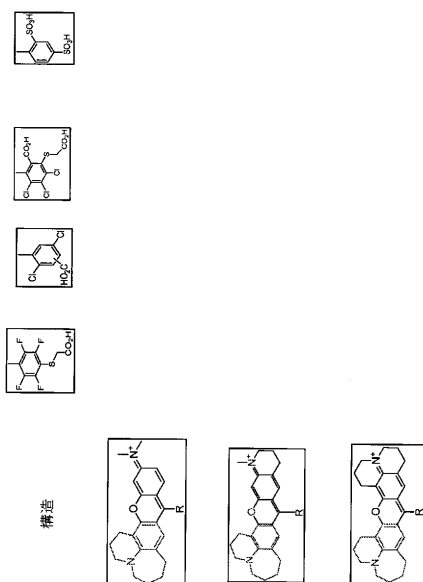
【図 2 D】



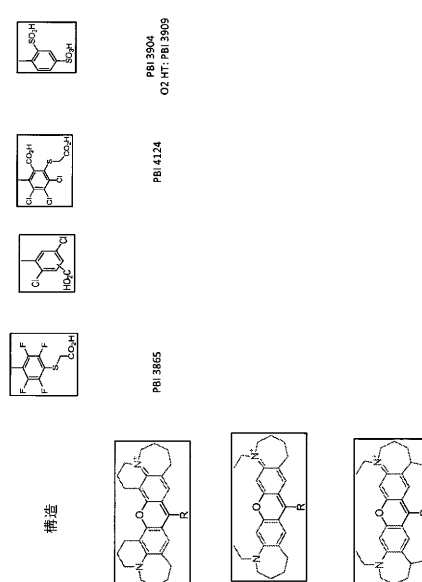
【図 2 E】



【図 3 A】



【図 3 B】

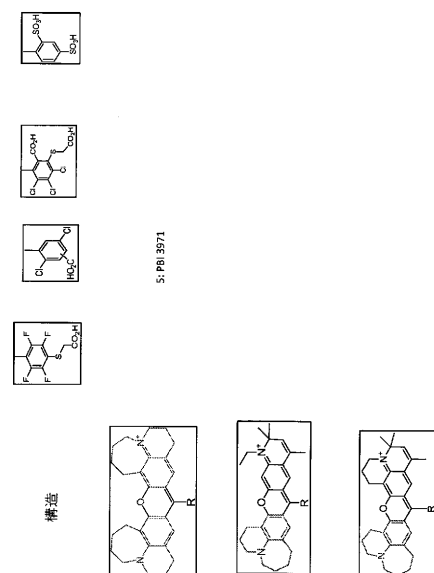


PBI 3804
O2 PI: PBI 3909

PBI 4124

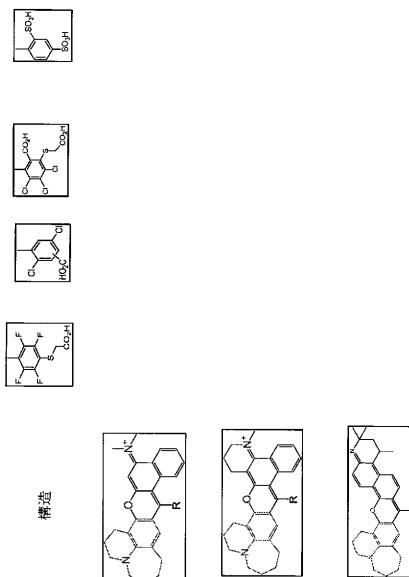
PBI 3865

【図 3 C】

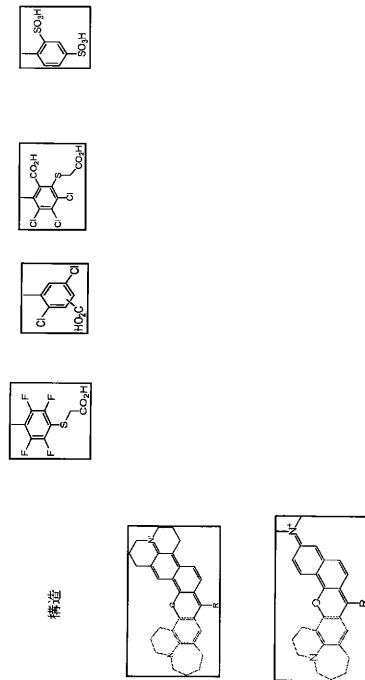


5: PBI 3971

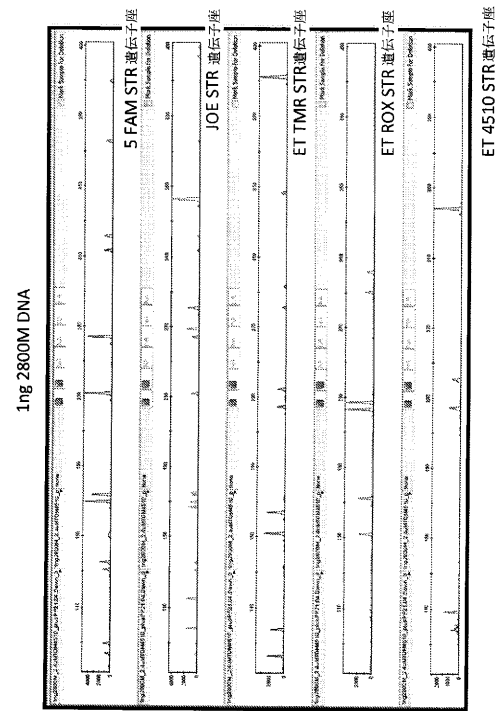
【図 3 D】



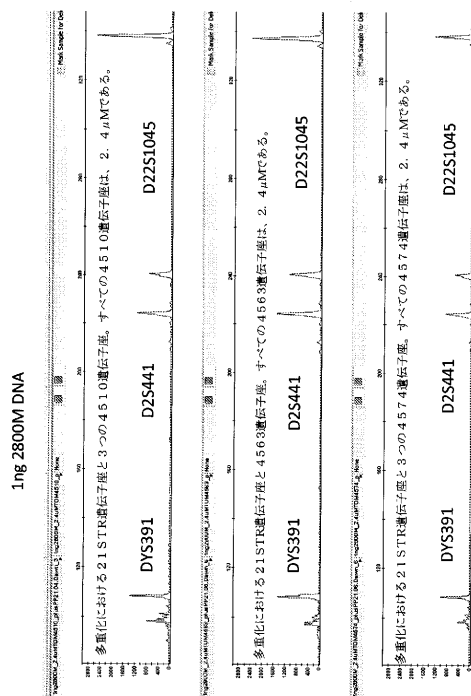
【図 3 E】



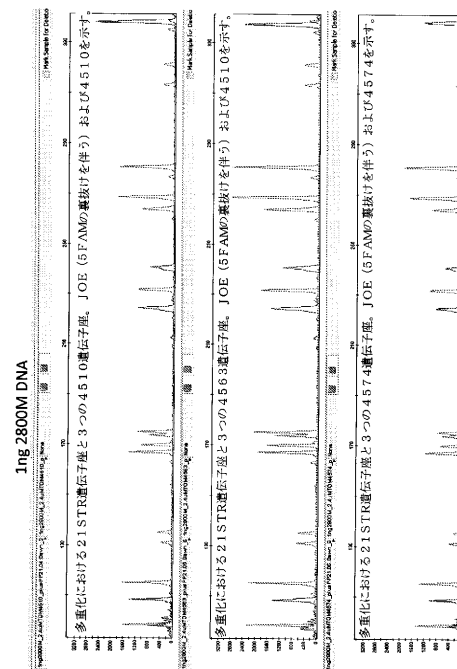
【図 4】



【図 5】

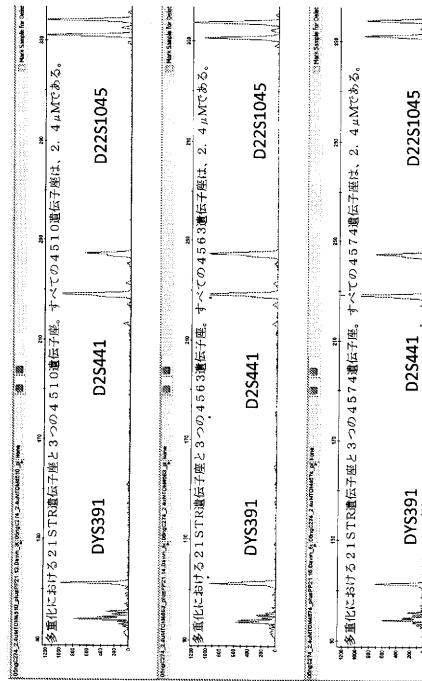


【図 6】



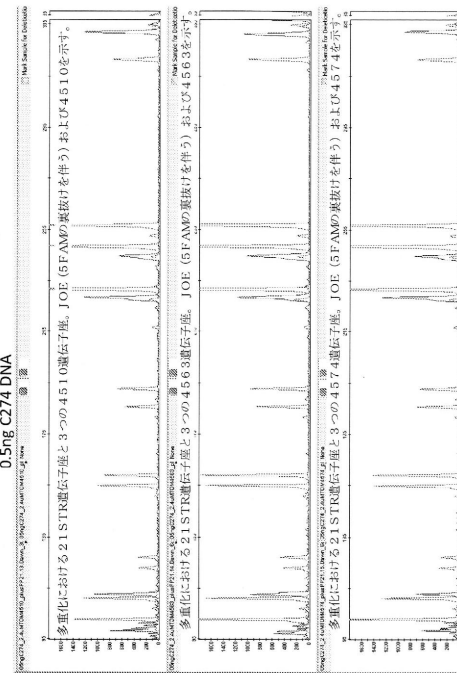
【図 7】

0.5ng C274 DNA

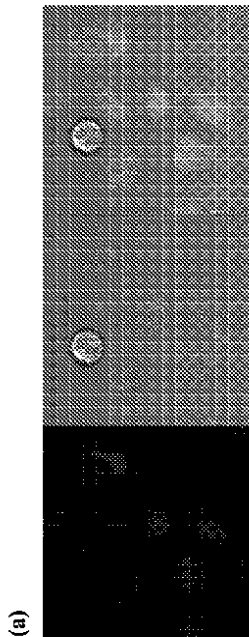


【図 8】

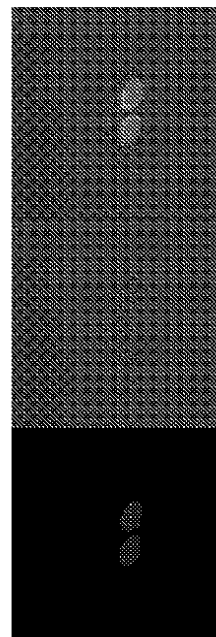
0.5ng C274 DNA



【図 9 (a)】



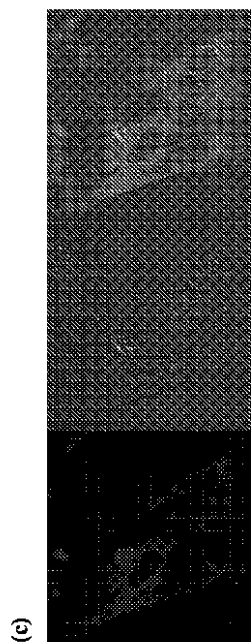
【図 9 (b)】



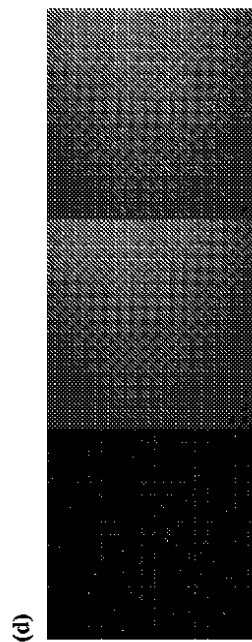
(a)

(b)

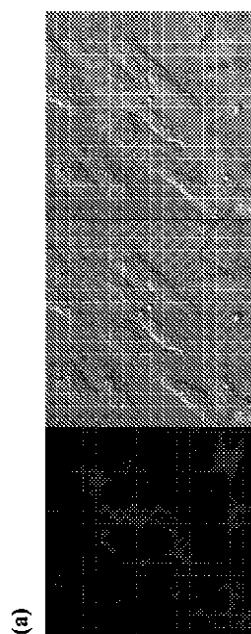
【図 9 (c) 】



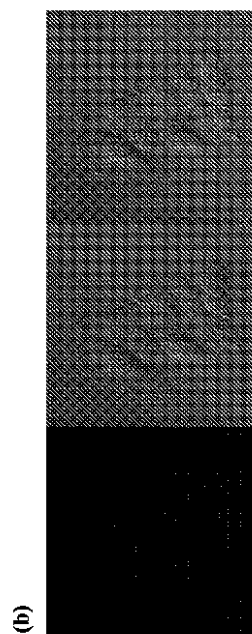
【図 9 (d) 】



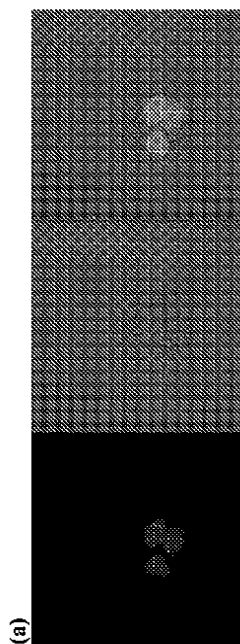
【図 10 (a) 】



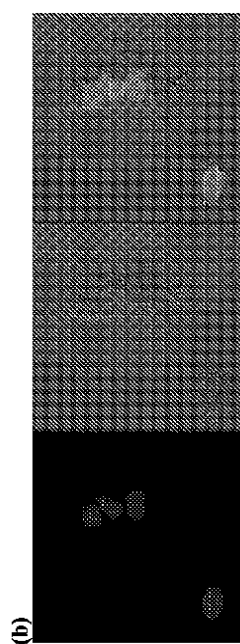
【図 10 (b) 】



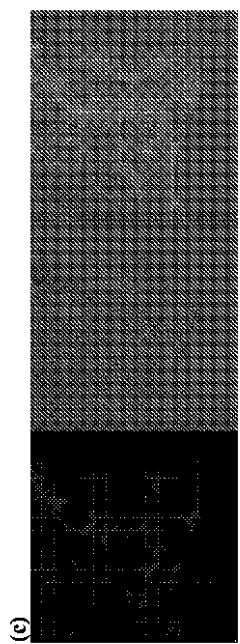
【図 11 (a)】



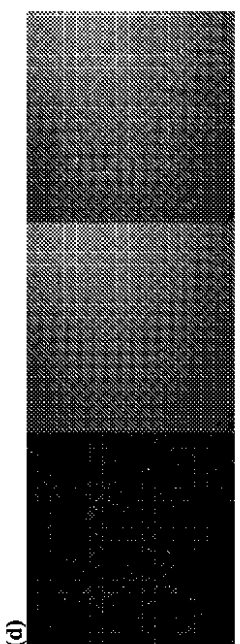
【図 11 (b)】



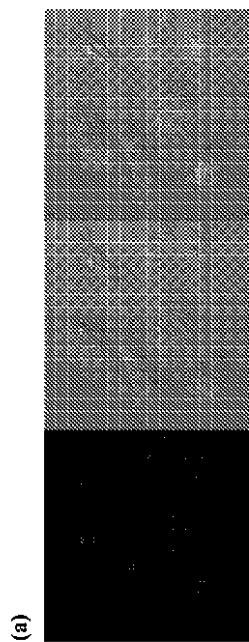
【図 11 (c)】



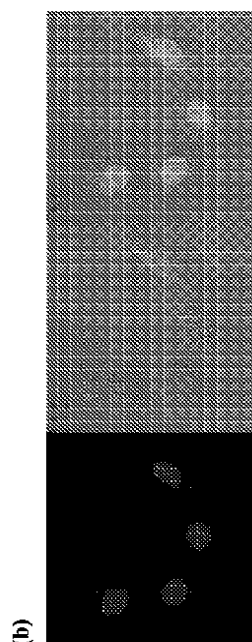
【図 11 (d)】



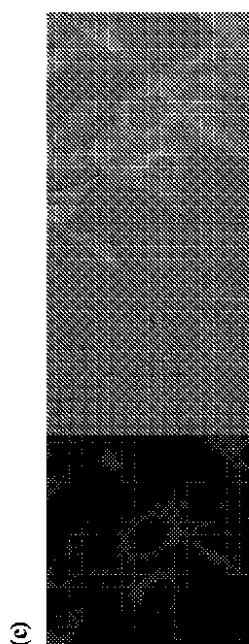
【図 12 (a)】



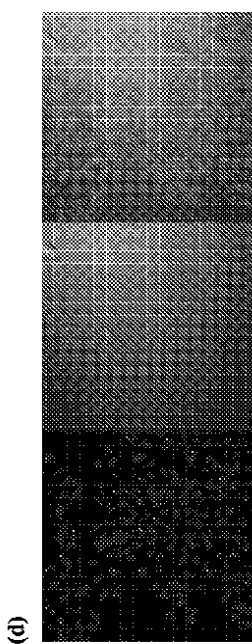
【図 12 (b)】



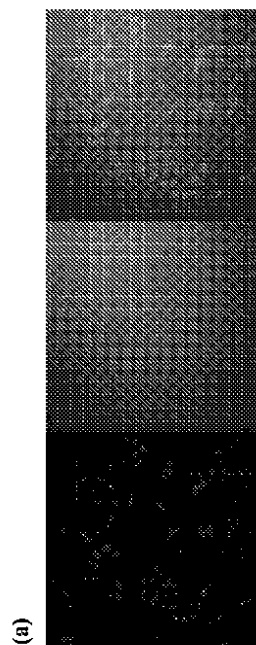
【図 12 (c)】



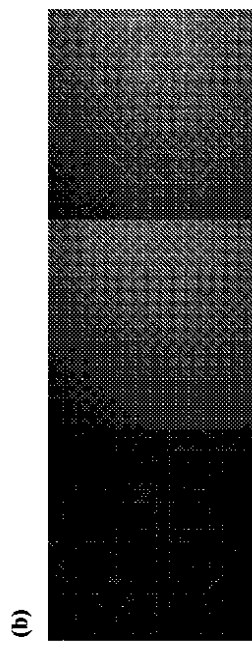
【図 12 (d)】



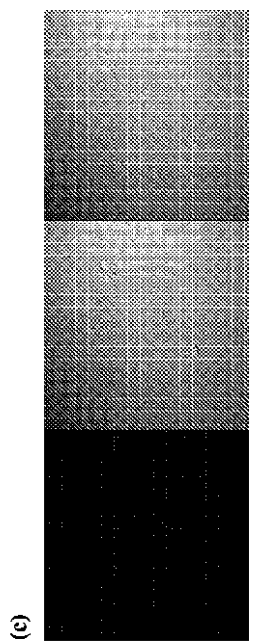
【図 13 (a)】



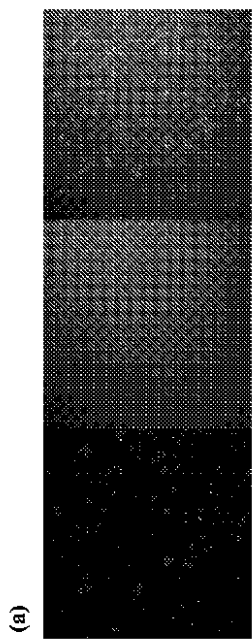
【図 13 (b)】



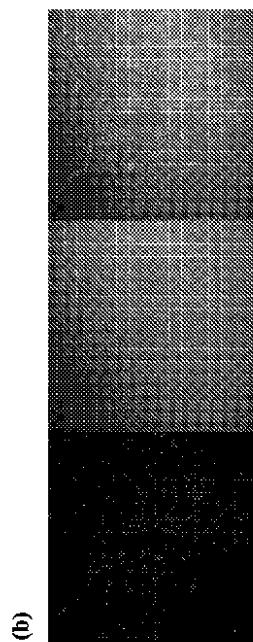
【図 13 (c)】



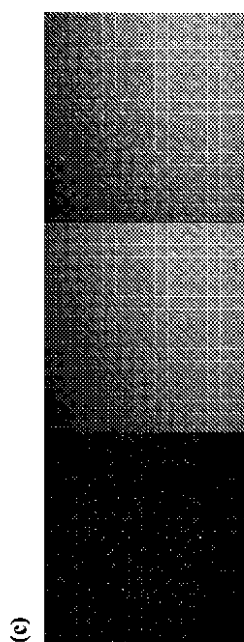
【図 14 (a)】



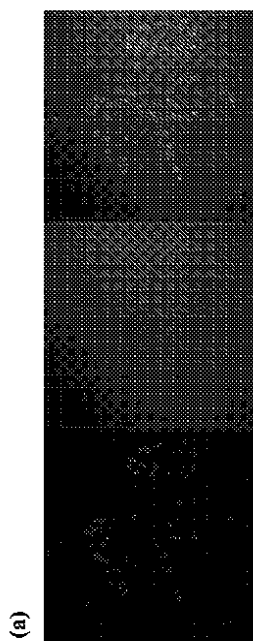
【図 14 (b)】



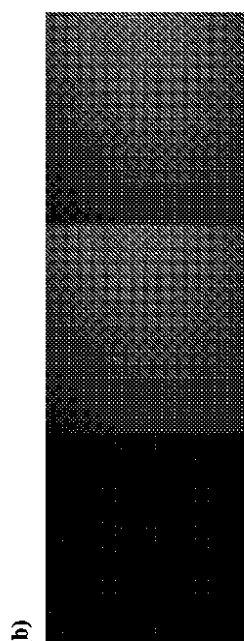
【図 14 (c)】



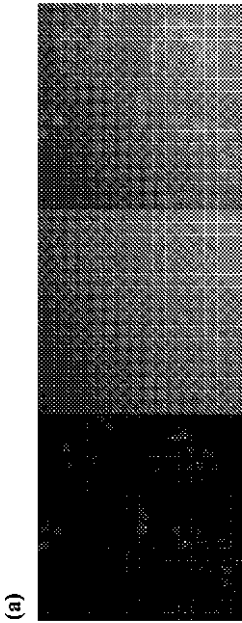
【図 15 (a)】



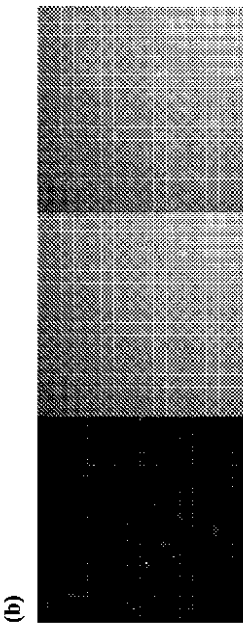
【図 15 (b)】



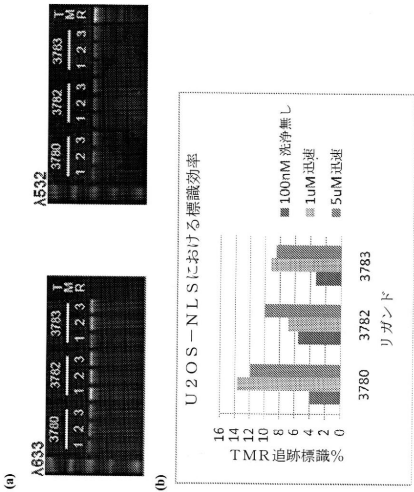
【図 16 (a)】



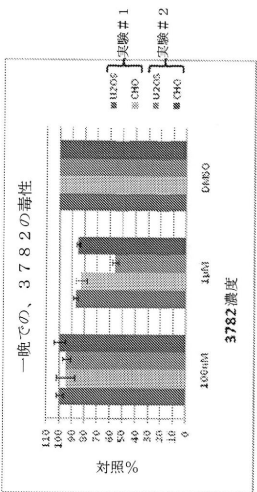
【図 16 (b)】



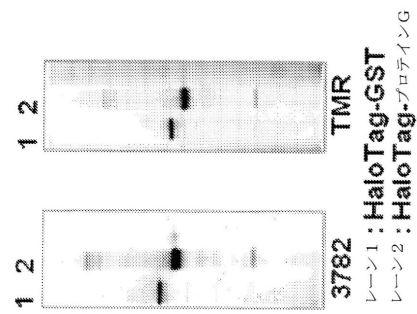
【図 17】



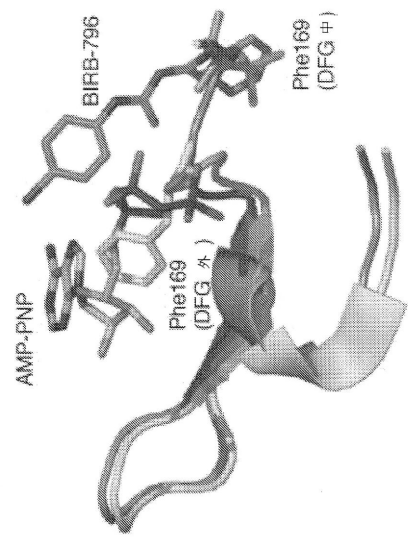
【図 18】



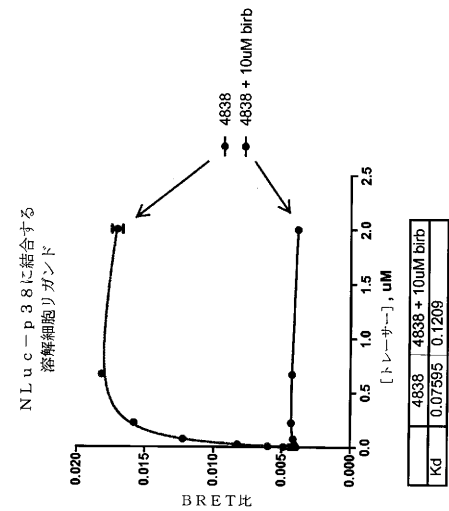
【 図 1 9 】



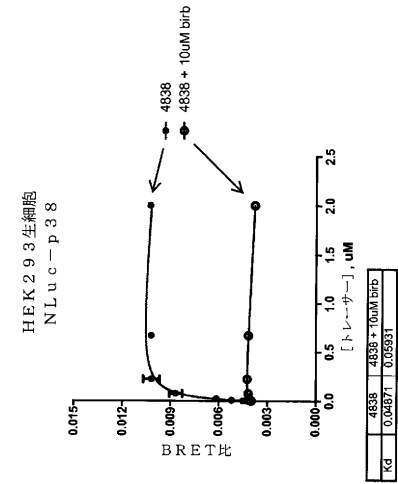
【 図 2 0 】



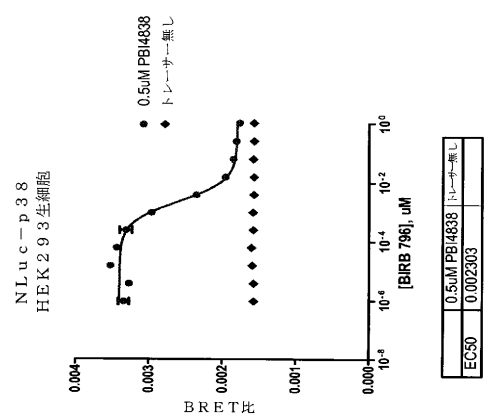
【 図 2 1 A 】



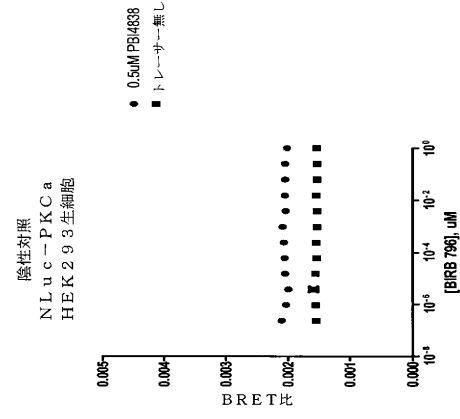
【 図 2 1 B 】



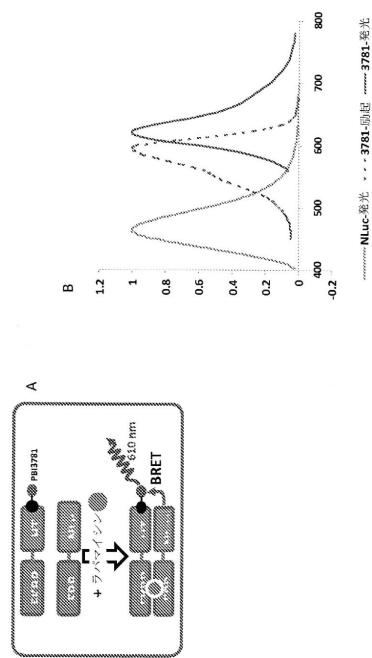
【図 2 2 A】



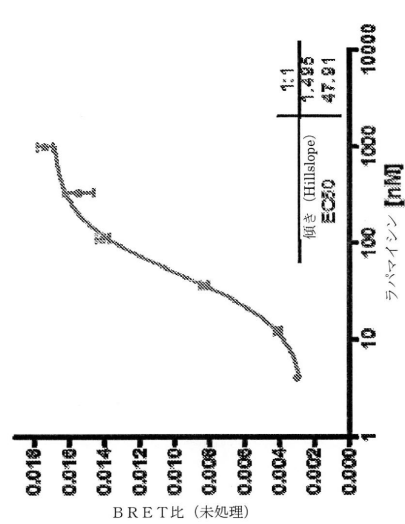
【図 2 2 B】



【図 2 3】



【図 2 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 D 491/22	(2006.01)	C 0 7 D 491/16	
C 0 7 H 19/073	(2006.01)	C 0 7 D 491/22	
C 0 7 H 19/10	(2006.01)	C 0 7 H 19/073	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 0 7 H 19/10	
G 0 1 N 33/533	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/542	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	(2006.01)	G 0 1 N 33/533	
		G 0 1 N 33/542	A
		G 0 1 N 33/566	

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72)発明者 カークランド トーマス エイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 2 アタスカデロ サン アントニオ ロード 1
3 3 5 0

(72)発明者 マクドゥーガル マーク ジー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 0 アロヨ グランデ ヘリテイジ レーン 5 9
5

(72)発明者 ドワイト スティーヴン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 0 アロヨ グランデ ロベス ドライヴ 2 2 6
0

合議体

審判長 佐藤 健史

審判官 富永 保

審判官 佐々木 秀次

(56)参考文献 国際公開第2009/157196(WO,A1)

国際公開第00/07992(WO,A1)

英国特許出願公告第926816(GB,A)

米国特許第5304644(US,A)

国際公開第03/068753(WO,A1)

特表平1-503488(JP,A)

特表2002-540280(JP,A)

特表2004-107331(JP,A)

特表2003-501539(JP,A)

特表2005-509629(JP,A)

Liebigs Ann., (1996), pp. 127-134

薬学雑誌, (1989), 109(2), pp. 107-112

医薬品研究, (1988), 19(6), pp. 951-965

STN International, File REGISTRY[online], Entered STN: 07 Dec 2011, CAS Registry No. 135008
7-90-9

STN International, File REGISTRY[online], Entered STN:06 Dec 2011, CAS Registry No. 1349849-94-0, 1349719-75-0, 1349358-21-9

STN International, File REGISTRY[online], Entered STN:02 Dec 2011, CAS Registry No. 1347643-29-1, 1347638-56-5, 1347357-05-4

STN International, File REGISTRY[online], Entered STN:09 Feb 2011, CAS Registry No. 1262411-16-4

Bioorg. Med. Chem., (2006), 14(6), pp. 2005-2021

SYNTHETIC COMMUNICATIONS, (1992), 22(4), pp. 629-640

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)