

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 3 区分

【発行日】平成21年4月23日(2009.4.23)

【公表番号】特表2008-535945(P2008-535945A)

【公表日】平成20年9月4日(2008.9.4)

【年通号数】公開・登録公報2008-035

【出願番号】特願2008-500917(P2008-500917)

【国際特許分類】

C 0 9 B 11/28 (2006.01)

C 0 9 B 57/02 (2006.01)

C 0 9 B 29/085 (2006.01)

C 0 9 B 23/00 (2006.01)

C 0 9 B 57/10 (2006.01)

C 0 9 B 57/00 (2006.01)

C 0 9 K 11/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 0 9 B 11/28 C S P B

C 0 9 B 57/02 Z N A H

C 0 9 B 29/085 Z

C 0 9 B 23/00 L

C 0 9 B 29/085 A

C 0 9 B 11/28 C

C 0 9 B 11/28 J

C 0 9 B 23/00 K

C 0 9 B 57/10

C 0 9 B 57/00 Z

C 0 9 K 11/06

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年3月3日(2009.3.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

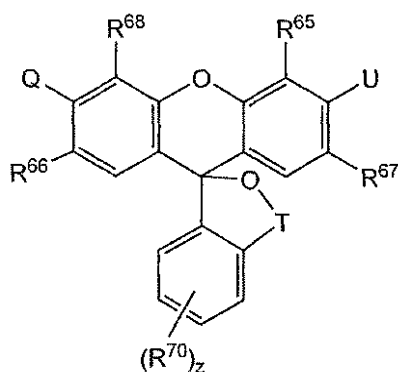
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (V I I I) :

【化 8】



(VIII)

(式中、

z は、1、2 または 3 であり；

T は、 $>C=O$ または $>S(=O)_2$ であり；

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

R_x は、反応基であり、

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

【請求項2】

式(VIII)の色素で置換されているオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド結合体。

【請求項3】

前記色素が、340nmと1100nmとの間に励起を、440nmと1150nmとの間に最高蛍光発光を有する蛍光色素である請求項2記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】

さらに、MGB基を含む請求項2に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項5】

前記MGB基が極性アルソナート基で置換されている請求項4記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項6】

前記オリゴヌクレオチドが、分子標識、Scorpion(登録商標)プローブ、サンライズプローブ、立体配置的に補助されたプローブおよびTaqManTMプローブから選択されたプローブである請求項2に記載のオリゴヌクレオチド結合体。

【請求項7】

標的核酸を直接的に検出する方法であって、

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

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

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

該色素から放射された蛍光を検出するステップと；

を含む方法。

【請求項8】

式(VIII)(式中、 R_x はホスホルアミダイト基である)でのいずれかの色素試薬を使用して、自動化合成でオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、

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

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

該色素標識オリゴヌクレオチドを反応媒体から単離するステップと；

を含む方法。

【請求項9】

さらに、前記オリゴヌクレオチド中のMGBを結合体化するステップを含む請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記MGBが、アルソナート基で置換されている請求項9記載の方法。

【請求項11】

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

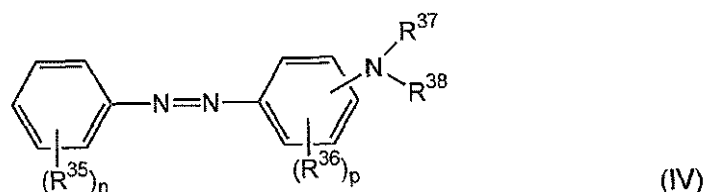
式(IV)の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式(VIII)の蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1個以上の極性アルソナート基を有し、該プローブは、該蛍光色素が該消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；

該色素標識オリゴヌクレオチドプローブをPCR反応媒体に添加するステップと；

該標的が存在する場合、該プローブを該標的とハイブリッド形成させ、該標的をTaqポリメラーゼによって切断するPCR温度サイクルを実行するステップと；

該蛍光シグナルを、該切断された色素からリアルタイムに読み取るステップと；
を含み、ここで、該式(IV)の消光物質色素が、

【化4】



(式中、

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

n は、1、2または3であり；

p は、1または2であり；

各 R^{36} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-\text{N}=\text{N}-R^{39}$ 、 $-\text{As}(=\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OR}^7)$ または $-\text{As}(\text{OR}^6)_2(\text{OR}^7)_2$ であり；

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

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

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

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

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

R_x は、反応基であり、
 ただし、 R^{35} および R^{36} の少なくとも 1 個は、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$
) または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ である)
 である、
 方法。

【請求項 12】

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

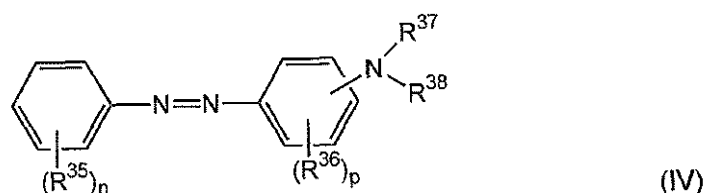
式 (IV) の消光物質色素に結合体化するオリゴヌクレオチドと、式 (VII) の蛍光色素とを含む色素標識オリゴヌクレオチドプローブを得るステップであって、各色素は、1 個以上の極性アルソナート基を有し、該プローブは、該蛍光色素が該消光物質色素によって消光されるようにする配置にあるステップと；

該色素標識オリゴヌクレオチドプローブを PCR 反応媒体に添加するステップと；

該標的が存在する場合、該プローブを該標的とハイブリッド形成させ、それによって該蛍光色素と該消光物質色素とを離す PCR 温度サイクルを実行するステップと；

該蛍光シグナルを、該消光していない蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；
 ；を含み、ここで、該式 (IV) の消光物質色素が、

【化 4】



(式中、

各 R^{35} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-SO_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-N=N-R^{39}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

n は、1、2 または 3 であり；

p は、1 または 2 であり；

各 R^{36} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-SO_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-N=N-R^{39}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

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

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

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

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

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

R_x は、反応基であり、

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

である、

方法。

【請求項 13】

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

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

該色素標識オリゴヌクレオチドプロブを PCR 反応媒体に添加するステップと；

該プライマーを標的 DNA とハイブリッド形成させ、それによって、標的 DNA 上の該プロブを延長する PCR 温度サイクルを実行するステップと；

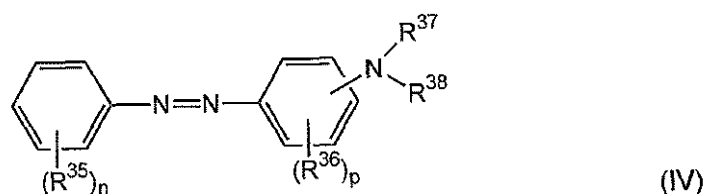
該延長されたプロブを熱変性し、該消光物質色素を切り離すステップと；

該延長されたプロブを冷却し、内部再配列を可能にし、標的の特異的方法で該蛍光色素に蛍光発光させるステップと；

該蛍光シグナルを該蛍光色素からリアルタイムに読み取るステップと；

を含み、ここで、該式 (IV) の消光物質色素が、

【化 4】



(式中、

各 R^{35} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-SO_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-N=N-R^{39}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

n は、1、2 または 3 であり；

p は、1 または 2 であり；

各 R^{36} は、同じまたは異なり、独立して、水素、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-SO_3^-$ 、アルコキシ、アミン、ジアルキルアミン、モノアルキルアミン、 $-N=N-R^{39}$ 、 $-As(=O)(OR^6)(OR^7)$ または $-As(OR^6)_2(OR^7)_2$ であり；

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

R^6 および R^7 は結合し一緒になって、ヒ素と、 R^6 および R^7 が結合する 2 個の酸素原子とを含む 5 または 6 員環の複素環を形成し、ここで、 $-R^6-R^7-$ は、 $-[C(R^8)_2]_w-$ (w は 2 または 3) であり、各 R^8 は、同じまたは異なり、独立して、水素、ヒドロキシ、シアノ、 $-OC(O)-$ アルキル、 $-OC(O)-$ アリール、アルキル、アリール、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2SO_2M$

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

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

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

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

R_x は、反応基であり、

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

である、

方法。