

【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24年3月15日(2012.3.15)

【公開番号】特開2010-159420(P2010-159420A)

【公開日】平成22年7月22日(2010.7.22)

【年通号数】公開・登録公報2010-029

【出願番号】特願2010-25761(P2010-25761)

【国際特許分類】

C 0 9 B 11/28 (2006.01)

C 0 7 D 311/92 (2006.01)

C 0 7 D 491/147 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【 F I 】

C 0 9 B 11/28 C S P Z

C 0 7 D 311/92 1 0 1

C 0 7 D 491/147

C 0 7 H 21/04 B

C 1 2 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成24年1月27日(2012.1.27)

【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

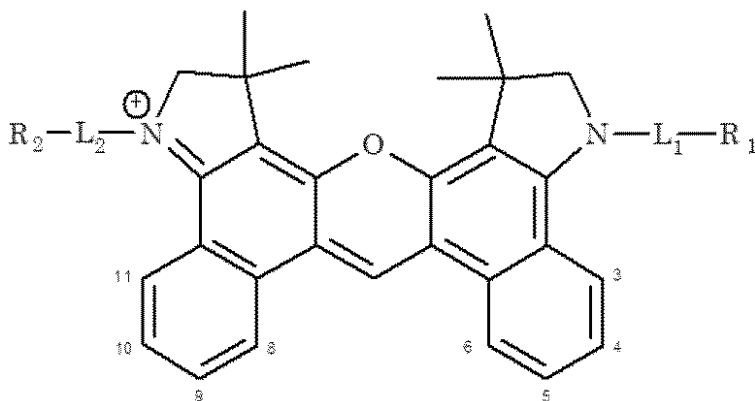
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造を有するジベンゾローダミン化合物：

【化1】



[式中、

L_1 および L_2 は、それぞれ低級アルキル、フェニルおよびそれらの組合せから成る群より選択され、ここで、 L_1 および L_2 の少なくとも一方が低級アルキルとフェニルの組合せから選択され；

R_1 および R_2 は、それぞれ水素、水可溶化基および結合基から成る群より選択され；

ここで、水可溶化基はカルボキシレート、スルホネート、ホスフェート、第4級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシル、および水溶性ポリマーから成る群より選択され；そし

て

結合基はイソチオシアナート、塩化スルホニル、4,6-ジクロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、マレイミド、カルボキシルおよびヨードアセトアミドから成る群より選択される]。

【請求項2】

C-4およびC-5炭素またはC-9およびC-10炭素を介して結合する縮合芳香族環を含む、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

C-4およびC-5炭素ならびにC-9およびC-10炭素を介して結合する縮合芳香族環を含む、請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

エネルギー移動色素であって、以下：

第1の波長において光を吸収し得、そして応答の際に励起エネルギーを放出し得るドナー色素；

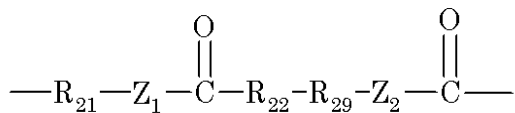
該ドナー色素によって放出される励起エネルギーを吸収し得、そして応答の際に第2の波長において蛍光を発し得る、アクセプター色素；ならびに

該ドナー色素と該アクセプター色素との間のエネルギーの効率的な移動を促進するために役立つ該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するリンカーを含み；

ここで、少なくとも1つの該ドナー色素および該アクセプター色素が、請求項1に記載のジアゾベンゾローダミン化合物であり、

リンカーが式

【化2】



[式中、

Z₁はNH、硫黄および酸素から成る群から選択され；

R₂₁はドナー色素と結合する低級アルキルであり；

R₂₂はアルケン、ジエン、アルキン、少なくとも一つの不飽和結合およびカルボニル炭素と結合した縮合環構造を有する5員または6員環から成る群から選択される置換基であり；

Z₂はNH、硫黄および酸素から成る群から選択され；

R₂₉は低級アルキルである]

の構造式を有し；そして

ドナーまたはアクセプター色素の一つがジベンゾローダミン色素はないとき、該ドナーまたはアクセプター色素の一つはシアニン、フタロシアニン、スクアレン、bodipyまたはフルオレセイン色素である、

エネルギー移動色素。

【請求項5】

第1の波長が600nmを超える、請求項4に記載のエネルギー移動色素。

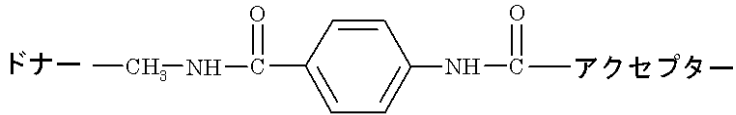
【請求項6】

R₂₂がシクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、イソイミダゾール、ピラン、ピロン、ベンゼン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジンおよびオキサジンから成る群から選択される5員環または6員環であるか、またはインデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドールおよびナフタレンから成る群から選択される縮合環である、請求項4に記載のエネルギー移動色素。

【請求項7】

リンカーが式：

【化 3】

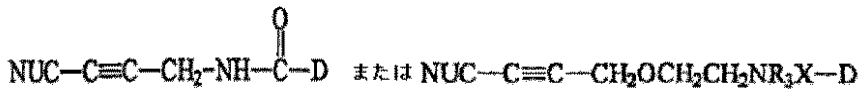


の構造を有する、請求項 6 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 8】

以下の構造の一つを有する標識ヌクレオシド/チド：

【化 4】



[式中、

NUC はヌクレオシド/チドまたはヌクレオシド/チドアナログであり；

D は請求項 1 に記載のジベンゾローダミン化合物または請求項 4 に記載のエネルギー移動色素であり；

該ジベンゾローダミン化合物の R₁ および R₂ の少なくとも一つはカルボキシル基を含み；

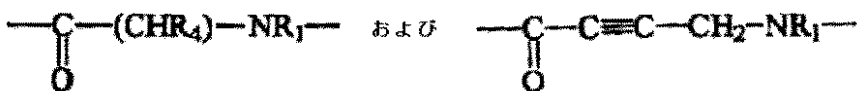
NUC と D との間はリンカーにより連結され；

リンカーは D に、D に存在するカルボキシル基を介して結合しており；

NUC がプリン塩基を含む場合、この結合はこのプリンの 8 位に連結されており、NUC が 7 - デアザプリン塩基を含む場合、この結合はこの 7 - デアザプリンの 7 位に連結されており、そして NUC がピリミジン塩基を含む場合、この結合はこのピリミジンの 5 位に連結されており；

X は

【化 5】



から成る群から選択され、ここで、

n は 1 ~ 5 の整数であり、

R₁ は、H および低級アルキルから成る群から選択され；そして

R₃ は、H および低級アルキルから成る群から選択される]。

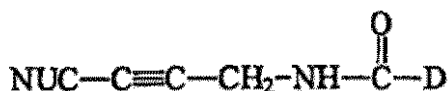
【請求項 9】

NUC がウラシル、シトシン、デアザアデニンおよびデアザグアノシンから成る群から選択される塩基を含む、請求項 8 に記載の標識ヌクレオシド/チド。

【請求項 10】

以下の式：

【化 6】



の構造を有する、請求項 8 に記載の標識ヌクレオシド/シド。

【請求項 1 1】

D が請求項 1 に記載のジベンゾローダミン化合物である、請求項 8 に記載の標識ヌクレオシド/シド。

【請求項 1 2】

D が請求項 4 に記載のエネルギー移動色素である、請求項 8 に記載の標識ヌクレオシド/シド。

【請求項 1 3】

ドナーまたはアクセプター色素の一つが請求項 1 に記載のジベンゾローダミン化合物であり、残りの一つはシアニン、フタロシアニン、スクアレン、b o d i p y またはフルオレセイン色素である、請求項 1 2 に記載の標識ヌクレオシド/シド。

【請求項 1 4】

ジベンゾローダミン化合物ではないドナーまたはアクセプター色素がフルオレセイン色素である、請求項 1 3 の標識ヌクレオシド/シド。

【請求項 1 5】

ポリヌクレオチド配列決定方法であり、以下の工程：

第 1 クラス、第 2 クラス、第 3 クラス、および第 4 クラスのポリヌクレオチドの混合物を形成する工程であって、これによって：

(a) 該第 1 クラスにおける各々のポリヌクレオチドが、3' - 末端ジデオキシアデノシンを含み、そして第 1 の色素で標識され；

(b) 該第 2 クラスにおける各々のポリヌクレオチドが、3' - 末端ジデオキシシチジンを含み、そして第 2 の色素で標識され；

(c) 該第 3 クラスにおける各々のポリヌクレオチドが、3' - 末端ジデオキシグアノシンを含み、そして第 3 の色素で標識され；

(d) 該第 4 クラスにおける各々のポリヌクレオチドが、3' - 末端ジデオキシチミジンを含み、そして第 4 の色素で標識され；

ここで、該第 1、該第 2、該第 3 または該第 4 の色素の少なくとも一つが、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のジベンゾローダミン化合物または請求項 4 から 7 のいずれかに記載のエネルギー移動色素であるジベンゾローダミン色素であり；

該色素のそれぞれは、該ジベンゾローダミン色素からおよび互いからスペクトル的に分解可能であり；

該ポリヌクレオチドを電気泳動的に分離し、それによって様似の大きさのポリヌクレオチドのバンドを形成させる工程；

該色素に蛍光を引き起こさせ得る照射光を用いて該バンドを照射する工程；そして、該色素の蛍光スペクトルによる該バンドにおける該ポリヌクレオチドのクラスを同定する工程、

を含む、方法。

【請求項 1 6】

標識されたポリヌクレオチドを生成する方法であり、以下の工程：

テンプレート DNA を変性する工程；

オリゴヌクレオチドプライマーをテンプレート DNA にアニーリングする工程；

アニールしたプライマー/テンプレート DNA を d G T P、d A T P、d C T P および d T T P を含むデオキシヌクレオチド三リン酸混合物に添加する工程であって、該デオキシヌクレオチド三リン酸の各々が他の色素とスペクトル的に分解可能である色素で標識されており、該デオキシヌクレオチド三リン酸の少なくとも一つの少なくとも一画分が請求項 1 から 3 のいずれかに記載のジベンゾローダミン化合物または請求項 4 から 7 のいずれかに記載のエネルギー移動色素であるジベンゾローダミン色素で標識されている工程；

ポリメラーゼ酵素を、ポリメラーゼ酵素が活性である条件下で添加し、それにより標識したポリヌクレオチドがポリメラーゼ媒介鎖合成中に標識されたデオキシヌクレオチドを組み込むことによって生成される、工程、

を含む、方法。

【請求項 17】

標識されたポリヌクレオチドを生成する方法であり、以下の工程：

テンプレート DNA を変性する工程；

第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーとテンプレート DNA を接触させる工程であって、該第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーがテンプレート DNA のプラス鎖に補足的である工程；

第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーとテンプレート DNA を接触させる工程であって、該第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーがテンプレート DNA のマイナス鎖に補足的である工程；

熱安定性のポリメラーゼを添加する工程；

アニールしたプライマー/テンプレート DNA を d G T P、d A T P、d C T P および d T T P を含むデオキシヌクレオチド三リン酸混合物に添加する工程であって、該デオキシヌクレオチド三リン酸の各々が他の色素とスペクトル的に分解可能である色素で標識されており、該デオキシヌクレオチド三リン酸の少なくとも一つの少なくとも一画分が請求項 1 から 3 のいずれかに記載のジベンゾローダミン化合物または請求項 4 から 7 のいずれかに記載のエネルギー移動色素であるジベンゾローダミン色素で標識されている工程；

反応温度を変性温度と伸長温度との間を循環させ、それによりテンプレート DNA に対する標識された相補体合成する工程

を含む、方法。

【請求項 18】

ジベンゾローダミン色素が請求項 4 に記載のエネルギー移動色素である、請求項 15 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

ドナーまたはアクセプター色素の一つが請求項 1 に記載のジベンゾローダミン化合物であり、残りの一つはシアニン、フタロシアニン、スクアレン、b o d i p y またはフルオレセイン色素である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ジベンゾローダミン化合物ではないドナーまたはアクセプター色素がフルオレセイン色素である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

フラグメント分析方法であり、以下の工程：

標識されたポリヌクレオチドフラグメントを形成する工程であり、該フラグメントが、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のジベンゾローダミン化合物または請求項 4 から 7 のいずれかに記載のエネルギー移動色素であるジベンゾローダミン色素で標識される、工程；

該標識されたポリヌクレオチドフラグメントを、サイズ依存性分離プロセスに供する工程；そして

該分離プロセスに引き続いて、該標識されたポリヌクレオチドを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 22】

サイズ依存性分離プロセスが電気泳動であり、標識ポリヌクレオチドフラグメントを蛍光により検出する、請求項 21 に記載の方法。