

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7527537号
(P7527537)

(45)発行日 令和6年8月5日(2024.8.5)

(24)登録日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	2/00 (2006.01)	C 0 7 K	2/00 Z N A
C 0 7 K	17/00 (2006.01)	C 0 7 K	17/00
C 0 9 B	69/10 (2006.01)	C 0 9 B	69/10
C 1 2 Q	1/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/00 Z
G 0 1 N	21/29 (2006.01)	G 0 1 N	21/29
請求項の数 17 (全61頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2018-558655(P2018-558655)	(73)特許権者	000002185 ソニーグループ株式会社 東京都港区港南 1 丁目 7 番 1 号
(86)(22)出願日	平成29年5月10日(2017.5.10)	(74)代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一
(65)公表番号	特表2019-519490(P2019-519490 A)	(74)代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
(43)公表日	令和1年7月11日(2019.7.11)	(74)代理人	100123777 弁理士 市川 さつき
(86)国際出願番号	PCT/US2017/031919	(74)代理人	100111796 弁理士 服部 博信
(87)国際公開番号	WO2017/196954	(72)発明者	マツトレイ, トレイシー アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 2 9 6 , スノホミッシュ, 7 8 ティーエイチ アベニュー エスイー 1 5 2 3 3 最終頁に続く
(87)国際公開日	平成29年11月16日(2017.11.16)		
審査請求日	令和2年5月8日(2020.5.8)		
審判番号	不服2022-8406(P2022-8406/J1)		
審判請求日	令和4年6月2日(2022.6.2)		
(31)優先権主張番号	62/334,243		
(32)優先日	平成28年5月10日(2016.5.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

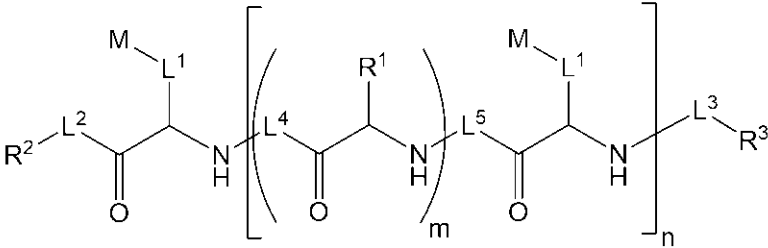
(54)【発明の名称】 ペプチド骨格を有する超明色ポリマー染料

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造 (I) :

【化 2 3】



(I)

を有する水溶性化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体であって、ここで：

Mは、各存在において、独立して、2個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも1の共役度を含む蛍光性または有色部分であり；

L¹は、各存在において、2個の相補的反応性基の反応によって形成できる官能基を含むリンカーであり、および、L¹の少なくとも1個の存在に関して、L¹は、トリアゾリル官能基を含むリンカーであり；

L^2 および L^3 は、各存在において、独立して、任意のアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン、ヘテロアルキニレンリンカーまたは非存在であり；

L^4 および L^5 は、各存在において、独立して、任意のアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン、ヘテロアルキニレンリンカーであり、但し L^4 もしくは L^5 の少なくとも1個の存在、またはその両方が、荷電部分を含み；

R^1 は、各存在において、独立して、H、アルキル、 $-CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_3^+$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(=NH_2^+)NH_2$ またはイミダゾリルであり；

R^2 および R^3 は、各々独立して、H、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2H$ 、アルキル、アルキルエーテル、アルコキシ、ヘテロアルキル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、またはQであり、ここで該アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；

Qは、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

mは、各存在において、独立して、0またはこれより大きな整数であり；そして

nは、1またはこれより大きな整数である、
水溶性化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体。

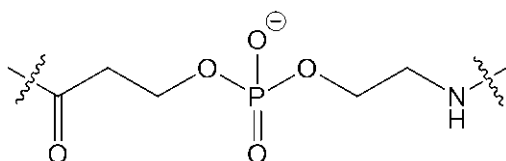
【請求項2】

L^4 もしくは L^5 の少なくとも1個の存在、またはその両方が、リン含有荷電部分または四級アンモニウム含有荷電部分を含む、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも1個の存在、または両方は、以下の構造：

【化26】

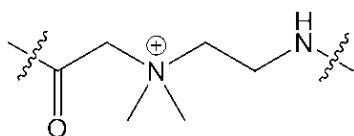


を有する、請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも1個の存在、または両方は、以下の構造：

【化27】

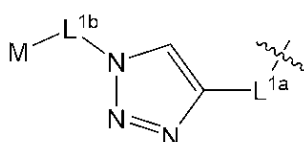


を有する、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

L^1 の少なくとも1個の存在に関して、 L^1-M は、以下の構造：

【化28】



10

20

30

40

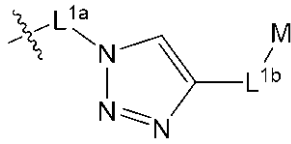
50

を有し、ここで L^{1a} および L^{1b} は、各々独立して、任意のリンカーである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 $L^1 - M$ は、以下の構造：

【化 29】



10

を有し、ここで L^{1a} および L^{1b} は、各々独立して、任意のリンカーである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 7】

R^2 は、 $-NH_2$ である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

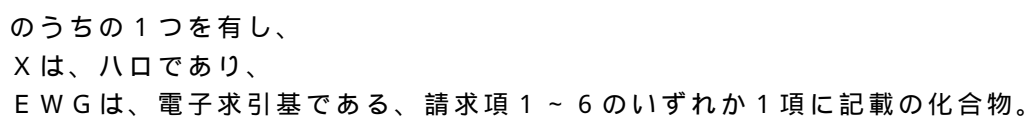
Q は、以下の構造：

20

30

40

50



R²またはR³のうちの一方は、分析物分子への共有結合を含むリンカーであり、ここで、前記分析物分子は、核酸、核酸ポリマー、アミノ酸、アミノ酸ポリマー、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマー、若しくはプリオンであるか、またはポリマービーズ若しくは非ポリマービーズへの共有結合を含むリンカーである、請求項1～6のいずれか1項に記載の化合物。

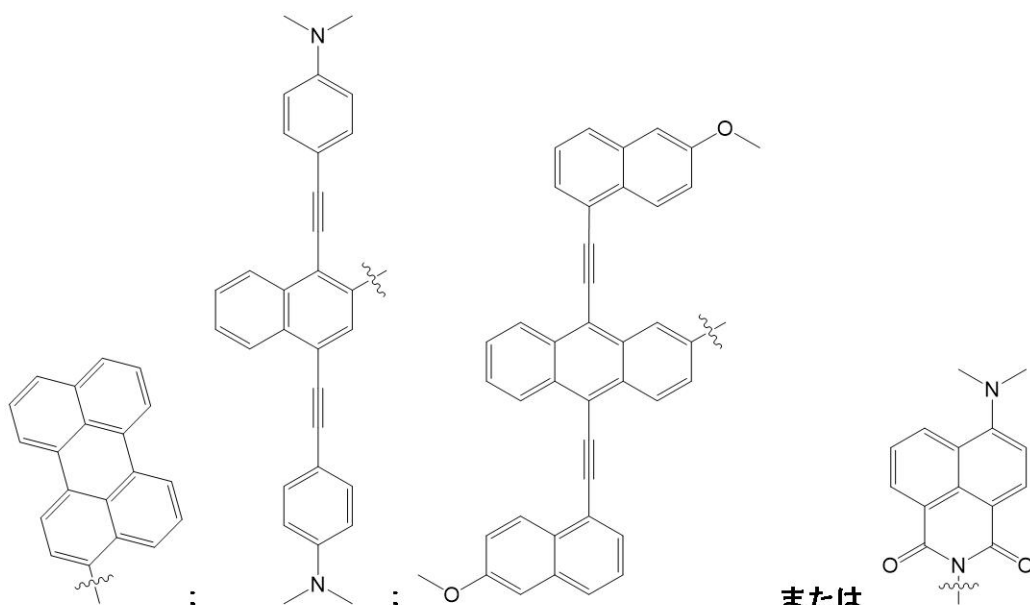
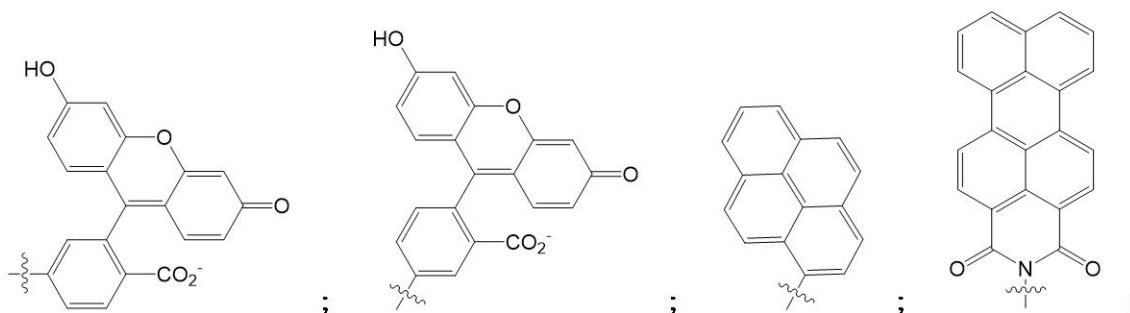
【請求項 10】

Mは、各存在において、独立して、ジメチルアミノスチルベン、キナクリドン、フルオロフェニル - ジメチル - BODIPY、his - フルオロフェニル - BODIPY、アクリジン、テリレン、セキシフェニル、ポルフィリン、ベンゾピレン、（フルオロフェニル - ジメチル - ジフルオロボラ - ジアザ - インダセン）フェニル、（ビス - フルオロフェニル - ジフルオロボラ - ジアザ - インダセン）フェニル、クアテルフェニル、ビ - ベンゾチアゾール、ター - ベンゾチアゾール、ビ - ナフチル、ビ - アントラシル、スクアライン、スクアリリウム、9, 10 - エチニルアントラセンまたはター - ナフチル部分である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 11】

Mは、各存在において、独立して、以下の構造：

【化 30】

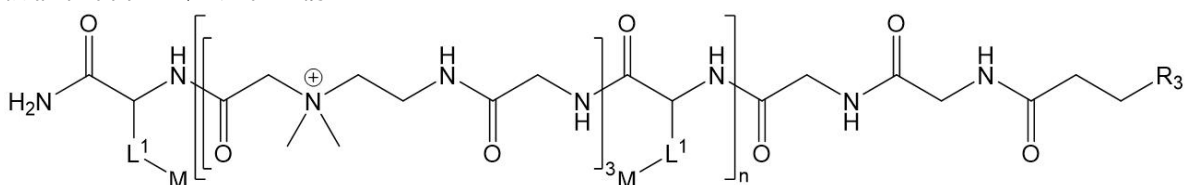


または

のうちの 1 つを有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 12】

前記化合物は、以下の構造：



を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 13】

サンプルを染色するための方法であって、該方法は、該サンプルに、請求項 1 ~ 12 のい

いずれか 1 項に記載の化合物を、該サンプルが適切な波長で照射される場合に光学的応答を生じるために十分な量で添加する工程を包含する方法。

【請求項 1 4】

分析物分子を視覚的に検出するための方法であって、該方法は、

(a) R^2 または R^3 は、該分析物分子への共有結合を含むリンカーである請求項 1 の化合物を提供する工程；および

(b) 該化合物をその視覚的特性によって検出する工程、
を包含する方法。

【請求項 1 5】

分析物分子を視覚的に検出するための方法であって、該方法は、

(a) R^2 または R^3 は、Q または Q への共有結合を含むリンカーである請求項 1 に記載の化合物と、該分析物分子とを混合する工程；

(b) 該化合物と該分析物分子との結合体を形成する工程；ならびに

(c) 該結合体をその視覚的特性によって検出する工程、
を包含する方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の化合物および 1 もしくはこれより多くの分析物分子を含む、組成物。

【請求項 1 7】

前記 1 もしくはこれより多くの分析物分子の検出のための分析方法における請求項 1 6 に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(背景)

(分野)

本発明の実施形態は一般に、ダイマーおよびポリマーの蛍光染料または有色染料、ならびにそれらの調製法および種々の分析法における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(関連技術の説明)

蛍光染料および / または有色染料は、高感度検出試薬が望ましい用途に特に適していることが公知である。サンプル中の特定の成分または構成要素を優先的に標識し得る染料は、研究者がその特定の成分または構成要素の存在、量および / または位置を決定することを可能にする。さらに、多様な環境での空間的および時間的分布に関して、特定の系がモニターされ得る。

【0003】

蛍光法および比色法は、化学および生物学において極めて広く行き渡っている。これらの方法は、生体分子の存在、構造、距離、配向、錯体形成 (complexation) および / または位置に関する有用な情報を与える。さらに、時間分解法は、ダイナミクスおよびキネティクスの測定においてますます使用されている。結果として、生体分子 (例えば、核酸およびタンパク質) の蛍光または色による標識に関する多くの戦略が開発されてきた。生体分子の分析は、代表的には、水性環境において起こるので、焦点は、水溶性の染料の開発および使用に当てられている。

【0004】

高度な蛍光染料または有色染料 (「より明るい」) は、このような染料の使用がシグナル対ノイズ比を増大させかつ他の関連する利益を提供するので望ましい。よって、既知の蛍光部分および / または有色部分からのシグナルを増大させる試みがなされてきた。例えば、2 もしくはこれより多くの蛍光部分および / または有色部分を含むダイマーおよびポリマーの化合物は、このような化合物がより明るい染料を生じることを期待して調製され

10

20

30

40

50

てきた。しかし、分子内蛍光クエンチングの結果として、ダイマーおよびポリマーの染料は、明度の望ましい増大を達成しなかった。

【 0 0 0 5 】

従って、増大したモルあたりの明度を有する水溶性染料が当該分野で必要である。理想的には、このような染料および生体マーカーは、強く有色であるかまたは蛍光性であるべきであり、種々の色および蛍光波長において利用可能であるべきである。本発明は、この必要性を満たしかつさらなる関連の利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

（簡単な要旨）

簡潔には、本発明は一般に、分析物分子（例えば、生体分子）の視覚的検出を可能にする水溶性の、蛍光または有色の染料およびプローブとして有用な化合物、ならびにそれらの調製のための試薬に関する。上記染料を使用して分析物分子を視覚的に検出するための方法もまた、記載される。

【 0 0 0 7 】

本開示の染料の実施形態は、アミノ酸またはペプチドリinkerによって共有結合的に連結される2もしくはこれより多くの蛍光部分および/または有色部分を含む。ダイマーおよび/またはポリマーの染料の以前の報告とは対照的に、本発明の染料は、その対応するモノマー染料化合物より有意に明るい。理論によって拘束されることは望まないが、このリンカー部分が、分子内蛍光クエンチングが低減および/または排除されるために十分な空間的距離を、上記蛍光部分および/または有色部分の間に提供すると考えられる。

【 0 0 0 8 】

さらに、本開示の染料のある種の実施形態は、自動化された方法を使用して合成され得、上記方法は、段階的様式でポリマーを構築し、アミノ酸またはモノマーの特定の配列を組み込む。このような合成はまた、種々のアミノ酸および他のモノマーと適合性である。特定のアミノ酸配列は、ある種の実施形態が所望の三次構造を含むように合わせて作られることを可能にすることは、理解されるべきである。ある種の実施形態は、発色団が容易に組み込まれることを可能にするおよび/または重合後改変を可能にする様式で合成され得る。

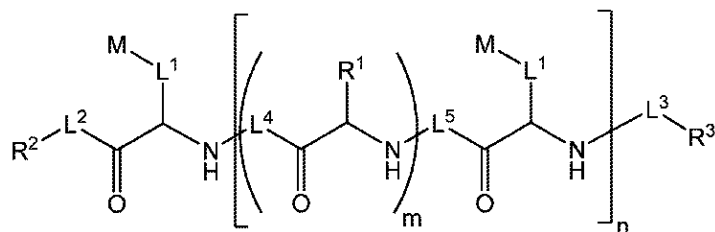
【 0 0 0 9 】

本発明の水溶性の蛍光染料または有色染料は、強く有色および/または蛍光性であり、目視または他の手段によって容易に観察され得る。いくつかの実施形態において、上記化合物は、事前の照射または化学的もしくは酵素的活性化なしに観察され得る。本明細書で記載されるように、上記染料の適切な選択によって、種々の色の視覚的に検出可能な分析物分子が、得られ得る。

【 0 0 1 0 】

一実施形態において、以下の構造（I）を有する化合物：

【化1】



(I)

またはその立体異性体、互変異性体もしくは塩が提供され、ここで R^1 、 R^2 、 R^3 、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 M 、 m および n は、本明細書で定義されるとおりである。

【 0 0 1 1 】

別の実施形態において、サンプルを染色するための方法が提供され、上記方法は、上記サンプルに、本明細書に記載されるような代表的化合物を、上記サンプルが適切な波長で照射される場合に光学的応答を生成するために十分な量で添加する工程を包含する。

【 0 0 1 2 】

さらに他の実施形態において、本開示は、分析物分子を視覚的に検出するための方法を提供し、上記方法は、

(a) 本明細書に記載されるような代表的化合物を提供する工程；および

(b) 上記化合物をその視覚的特性によって検出する工程を包含する。

10

【 0 0 1 3 】

他の開示される方法は、生体分子を視覚的に検出するための方法を包含し、上記方法は、

(a) 開示される化合物のいずれかと 1 もしくはこれより多くの生体分子とを混合する工程；および

(b) 上記化合物をその視覚的特性によって検出する工程を包含する。

【 0 0 1 4 】

他の実施形態は、分析物を視覚的に検出するための方法を提供し、上記方法は、

(a) R^2 または R^3 が上記分析物に対する特異性を有する標的化部分への共有結合を含むリンカーを含む本明細書で開示されるとおりの化合物を提供する工程；

20

(b) 上記化合物および上記分析物を混合し、それによって、上記標的化部分および上記分析物を会合させる工程；ならびに

(c) 上記化合物をその視覚的特性によって検出する工程、を包含する。

【 0 0 1 5 】

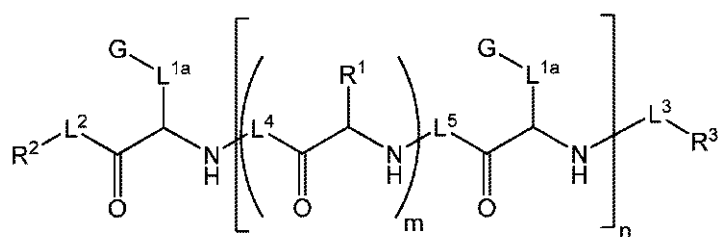
他の実施形態は、構造 (I) の化合物および 1 もしくはこれより多くの分析物分子 (例えば、生体分子) を含む組成物に関する。上記 1 もしくはこれより多くの生体分子の検出のための分析法におけるこのような組成物の使用もまた、提供される。

【 0 0 1 6 】

いくつかの他の異なる実施形態において、構造 (I I) :

30

【 化 2 】



(II)

40

の化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体が提供され、ここで R^1 、 R^2 、 R^3 、 L^{1a} 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、 G 、 m および n は、本明細書で定義されるとおりである。構造 (I I) の化合物は、多くの適用 (構造 (I) の蛍光染料および / または有色染料を調製するための中間体としての使用が挙げられる) において有用性が見出される。

【 0 0 1 7 】

さらに他の実施形態において、分析物分子を標識するための方法が提供され、上記方法は、

(a) R^2 または R^3 は、 Q または Q への共有結合を含むリンカーである構造 (I I) の化合物と、上記分析物分子とを混合する工程；

50

(b) 上記化合物および上記分析物分子の結合体を形成する工程；ならびに

(c) 上記結合体と式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを反応させ、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程、
を包含し、ここで R^2 、 R^3 、Q、G および $M - L^{1b} - G$ は、本明細書で定義されたとおりである。

【0018】

いくつかの異なる実施形態において、分析物分子を標識するための別の方法が提供され、上記方法は、

(a) R^2 または R^3 は、Q または Q への共有結合を含むリンカーである構造 (II) の化合物と、式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程；ならびに

(b) 工程 (A) の生成物と上記分析物分子とを反応させ、それによって、工程 (A) の生成物および上記分析物分子の結合体を形成する工程、
を包含し、ここで R^2 、 R^3 、Q、G および $M - L^{1b} - G$ は、本明細書で定義されたとおりである。

【0019】

より異なる実施形態において、構造 (I) の化合物を調製するための方法が提供され、上記方法は、構造 (II) の化合物と式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程を包含し、ここで G および $M - L^{1b} - G$ は、本明細書で定義されたとおりである。

【0020】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明を参照すれば明らかになる。

【発明を実施するための形態】

【0021】

(詳細な説明)

以下の説明において、ある種の具体的詳細が、本発明の種々の実施形態の完全な理解を提供するために示される。しかし、当業者は、これら詳細なしに本発明が実施され得ることを理解する。

【0022】

状況が別段要求しなければ、本明細書および特許請求の範囲全体を通じて、文言「含む、包含する (comprise)」ならびにそのバリエーション (例えば、「含む、包含する (comprises)」および「含む、包含する (comprising)」) は、開放系の包括的な意味で、すなわち、「が挙げられるが、これらに限定されない」として解釈されるべきである。

【0023】

本明細書全体を通じて「一実施形態 (one embodiment)」または「ある実施形態 (an embodiment)」への言及は、上記実施形態と関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が、本発明の少なくとも 1 つの実施形態に含まれることを意味する。従って、本明細書全体を通じて種々の箇所での語句「一実施形態において」または「ある実施形態において」の存在は、必ずしも全てが、同じ実施形態に言及しているわけではない。さらに、特定の特徵、構造、または特性は、1 もしくはこれより多くの実施形態において任意の適切な様式で組み合わせられ得る。

【0024】

「アミノ」とは、 $-NH_2$ 基をいう。

【0025】

「カルボキシ」とは、 $-CO_2H$ 基をいう。

【0026】

「シアノ」とは、 $-CN$ 基をいう。

【0027】

「ホルミル」とは、 $-C(=O)H$ 基をいう。

【0028】

「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」とは、 $-OH$ 基をいう。

【0029】

「イミノ」とは、 $=NH$ 基をいう。

【0030】

「ニトロ」とは、 $-NO_2$ 基をいう。

【0031】

「オキソ」とは、 $=O$ 置換基をいう。

【0032】

「スルフヒドリル」とは、 $-SH$ 基をいう。

10

【0033】

「チオキソ」とは、 $=S$ 基をいう。

【0034】

「アルキル」とは、炭素原子および水素原子のみからなり、不飽和を含まず、1～12個の炭素原子($C_1 - C_{12}$ アルキル)、1～8個の炭素原子($C_1 - C_8$ アルキル)または1～6個の炭素原子($C_1 - C_6$ アルキル)を有し、そして単結合によって分子の残部に結合される直鎖状または分枝状の炭化水素鎖の基(例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、1-メチルエチル(イソ-プロピル)、 n -ブチル、 n -ペンチル、1,1-ジメチルエチル(t -ブチル)、3-メチルヘキシル、2-メチルヘキシルなど)をいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキル基は、必要に応じて置換される。

20

【0035】

「アルキレン」または「アルキレン鎖」とは、分子の残部をラジカル基に連結し、炭素および水素のみからなり、不飽和を含まず、そして1～12個の炭素原子を有する直鎖状または分枝状の二価の炭化水素鎖(例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、 n -ブチレン、エテニレン、プロベニレン、 n -ブテニレン、プロピニレン、 n -ブチニレンなど)をいう。上記アルキレン鎖は、単結合を介して分子の残部に結合され、単結合を介してラジカル基に結合される。分子の残部へのまたはラジカル基への上記アルキレン鎖の結合点は、上記鎖の中の1個の炭素または任意の2個の炭素を介し得る。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキレンは、必要に応じて置換される。

【0036】

30

「アルケニレン」または「アルケニレン鎖」とは、分子の残部をラジカル基に連結し、炭素および水素のみからなり、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含み、そして2～12個の炭素原子を有する直鎖状または分枝状の二価の炭化水素鎖(例えば、エテニレン、プロベニレン、 n -ブテニレンなど)をいう。アルケニレン鎖は、単結合を介して分子の残部に結合され、二重結合または単結合を介してラジカル基に結合される。分子の残部へのおよびラジカル基へのアルケニレン鎖の結合点は、その鎖中の1個の炭素または任意の2個の炭素を介し得る。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルケニレンは、必要に応じて置換される。

【0037】

「アルキニレン」または「アルキニレン鎖」とは、分子の残部をラジカル基に連結し、炭素および水素のみからなり、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を含み、そして2～12個の炭素原子を有する直鎖状または分枝状の二価の炭化水素鎖(例えば、エテニレン、プロベニレン、 n -ブテニレンなど)をいう。アルキニレン鎖は、単結合を介して分子の残部に結合され、二重結合または単結合を介してラジカル基に結合される。分子の残部へのおよびラジカル基へのアルキニレン鎖の結合点は、その鎖中の1個の炭素または任意の2個の炭素を介し得る。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキニレンは、必要に応じて置換される。

40

【0038】

「アルキルエーテル」とは、上記で定義されるとおりの任意のアルキル基であって、ここで少なくとも1個の炭素-炭素結合が炭素-酸素結合で置き換わっているものをいう。

50

この炭素 - 酸素結合は、末端部分に（アルコキシ基の中にあるように）あってもよいし、炭素酸素結合は、内部に（すなわち、 $C - O - C$ ）あってもよい。アルキルエーテルは、少なくとも 1 個の炭素酸素結合を含むが、1 個より多く含んでいてもよい。例えば、ポリエチレングリコール（PEG）は、アルキルエーテルの意味の中に含まれる。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキルエーテル基は、必要に応じて置換される。例えば、いくつかの実施形態において、アルキルエーテルは、アルコールまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ で置換され、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、構造（I）の化合物について定義される通りである。

【0039】

「アルコキシ」とは、式 $-OR_a$ であって、ここで R_a は、1 ~ 12 個の炭素原子を含む上記で定義されるとおりのアルキル基である基をいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルコキシ基は、必要に応じて置換される。

【0040】

「アルコシアルキルエーテル」とは、式 $-OR_aR_b$ の基であって、ここで R_a は、1 ~ 12 個の炭素原子を含む上記で定義されるとおりのアルキレン基であり、 R_b は、本明細書で定義されるとおりのアルキルエーテル基であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルコシアルキルエーテル基は、必要に応じて置換され、例えば、アルコールまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ で置換され、ここで：

R_a は、O または S であり；

R_b は、OH、SH、 O^- 、 S^- 、 OR_d または SR_d であり；

R_c は、OH、SH、 O^- 、 S^- 、 OR_d 、 OL' 、 SR_d 、アルキル、アルコキシ、ヘテロアルキル、ヘテロアルコキシ、アルキルエーテル、アルコシアルキルエーテル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルまたはチオホスホアルキルエーテルであり；そして

R_d は、対イオンである。

【0041】

「ヘテロアルキル」とは、アルキル基内にまたはアルキル基の末端に、少なくとも 1 個のヘテロ原子（例えば、N、O、P または S）を含むアルキル基（上記で定義されるとおり）をいう。いくつかの実施形態において、ヘテロ原子は、アルキル基内にある（すなわち、ヘテロアルキルは、少なくとも 1 個の炭素 - [ヘテロ原子] $_x$ - 炭素結合を含み、ここで x は、1、2 または 3 である）。他の実施形態において、ヘテロ原子は、アルキル基の末端にあり、従って、アルキル基を分子の残部に結合するように働く（例えば、 $M1 - H - A$ （ここで $M1$ は、その分子の一部であり、 H は、ヘテロ原子であり、 A は、アルキル基である））。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアルキル基は、必要に応じて置換される。例示的なヘテロアルキル基は、エチレンオキシド（例えば、ポリエチレンオキシド）を含み、必要に応じて、リン - 酸素結合（例えば、ホスホジエステル結合）を含む。

【0042】

「ヘテロアルコキシ」とは、式 $-OR_a$ の基であって、ここで R_a は、1 ~ 12 個の炭素原子を含む上記で定義されるとおりのヘテロアルキル基であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアルコキシ基は、必要に応じて置換される。

【0043】

「アルキルアミニル」とは、式 $-NHR_a$ または $-NR_aR_a$ のラジカルであって、ここで各 R_a は、独立して、1 ~ 12 個の炭素原子を含む、上記で定義されるとおりのアルキルラジカルであるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキルアミニル基は、必要に応じて置換される。

【0044】

「アルキルカルボニル」とは、式 $-(C=O)R_a$ のラジカルであって、ここで R_a は、1 ~ 12 個の炭素原子を含む、上記で定義されるとおりのアルキルラジカルであるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキルカルボニル基は、必要に

10

20

30

40

50

じて置換される。

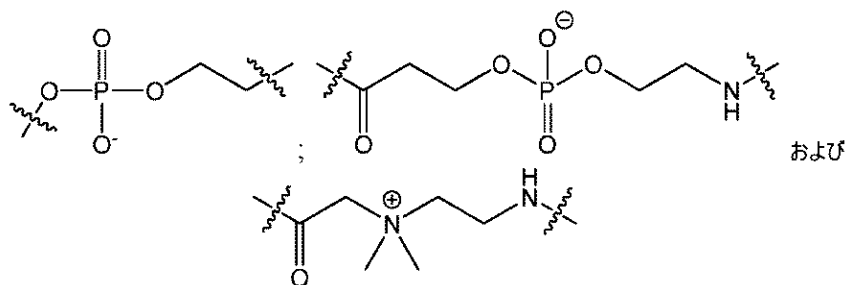
【 0 0 4 5 】

「アルキルオキシカルボニル」とは、式 - (C = O) O R_a のラジカルであって、ここで R_a は、1 ~ 12 個の炭素原子を含む、上記で定義されるとおりのアルキルラジカルであるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アルキルオキシカルボニル基は、必要に応じて置換される。

【 0 0 4 6 】

「ヘテロアルキレン」とは、少なくとも 1 個のヘテロ原子（例えば、N、O、P または S）を、アルキレン鎖内またはアルキレン鎖の末端に含む、上で定義されたようなアルキレン基をいう。いくつかの実施形態において、上記ヘテロ原子は、アルキレン鎖の中にある（すなわち、上記ヘテロアルキレンは、少なくとも 1 個の炭素 - [ヘテロ原子]_x - 炭素結合を含み、ここで x は 1、2 または 3 である）。他の実施形態において、上記ヘテロ原子は、アルキレンの末端にあり、従って、上記アルキレンを分子の残部に結合するように働く（例えば、M₁ - H - A - M₂、ここで M₁ および M₂ は、分子の一部であり、H は、ヘテロ原子であり、A は、アルキレンである）。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアルキレン基は、必要に応じて置換される。例示的なヘテロアルキレン基は、アミノ酸およびペプチジルリンカー、エチレンオキシド（例えば、ポリエチレンオキシド）ならびに以下で図示される連結基：

【 化 3 】



を含む。

【 0 0 4 7 】

上記リンカーのマルチマーは、ヘテロアルキレンリンカーの種々の実施形態に含まれる。

【 0 0 4 8 】

「ヘテロアルケニレン」は、少なくとも 1 個の炭素 - 炭素二重結合を含むヘテロアルキレン（上記で定義されるとおり）である。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアルケニレン基は、必要に応じて置換される。

【 0 0 4 9 】

「ヘテロアルキニレン」とは、少なくとも 1 個の炭素 - 炭素三重結合を含むヘテロアルキレンである。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアルキニレン基は、必要に応じて置換される。

【 0 0 5 0 】

「ヘテロ原子リンカー」に関して「ヘテロ原子（の）」とは、1 個もしくはこれより多くのヘテロ原子からなるリンカー基をいう。例示的なヘテロ原子リンカーは、O、N、P および S からなる群より選択される 1 個の原子、および複数のヘテロ原子を含む（例えば、式 - P (O⁻) (= O) O - または - O P (O⁻) (= O) O - ならびにそのマルチマーおよび組み合わせを有するリンカー）。

【 0 0 5 1 】

「ホスフェート」とは、- O P (= O) (R_a) R_b 基であって、ここで R_a は、OH、O⁻ または O R_c であり；そして R_b は、OH、O⁻、O R_c、チオホスフェート基またはさらなるホスフェート基であり、ここで R_c は、対イオン（例えば、Na⁺ など）であるものをいう。

【 0 0 5 2 】

「ホスホアルキル」とは、 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 基であって、ここで R_a は、 OH 、 O^- または OR_c であり；そして R_b は、 $-O$ アルキルであり、ここで R_c は、対イオン（例えば、 Na^+ など）であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ホスホアルキル基は、必要に応じて置換される。例えば、ある種の実施形態において、ホスホアルキル基の中の上記 $-O$ アルキル部分は、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテル、チオホスホアルキルエーテルまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ のうちの1個もしくはこれより多くで必要に応じて置換され、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、上記定義で定義されるとおりである。

10

【 0 0 5 3 】

「ホスホアルキルエーテル」とは、 $-OP(=O)(R_a)R_b$ 基であって、ここで R_a は、 OH 、 O^- または OR_c であり；そして R_b は、 $-O$ アルキルエーテルであり、ここで R_c は、対イオン（例えば、 Na^+ など）であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ホスホアルキルエーテル基は、必要に応じて置換される。例えば、ある種の実施形態において、ホスホアルキルエーテル基の中の $-O$ アルキルエーテル部分は、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテル、チオホスホアルキルエーテルまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ のうちの1個もしくはこれより多くで必要に応じて置換され、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、上記定義で定義されるとおりである。

20

【 0 0 5 4 】

「チオホスフェート」とは、 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 基であって、ここで R_a は、 O または S であり； R_b は、 OH 、 O^- 、 S^- 、 OR_d または SR_d であり；そして R_c は、 OH 、 SH 、 O^- 、 S^- 、 OR_d 、 SR_d 、ホスフェート基またはさらなるチオホスフェート基であり、ここで R_d は、対イオン（例えば、 Na^+ など）であり、そしてただし：
i) R_a は、 S であり；
ii) R_b は、 S^- または SR_d であり；
iii) R_c は、 SH 、 S^- または SR_d であるか；あるいはiv) i)、ii)および/またはiii)の組み合わせであるものをいう。

【 0 0 5 5 】

「チオホスホアルキル」とは、 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 基であって、ここで R_a は、 O または S であり； R_b は、 OH 、 O^- 、 S^- 、 OR_d または SR_d であり；そして R_c は、 $-O$ アルキルであり、ここで R_d は、対イオン（例えば、 Na^+ など）であり、そしてただし：
i) R_a は、 S であるか、
ii) R_b は、 S^- もしくは SR_d であるか；または
iii) R_a は、 S であり、そして R_b は、 S^- もしくは SR_d であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、チオホスホアルキル基は、必要に応じて置換される。例えば、ある種の実施形態において、チオホスホアルキル基の中の $-O$ アルキル部分は、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテル、チオホスホアルキルエーテルまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ のうちの1個もしくはこれより多くで必要に応じて置換され、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、上記定義で定義されるとおりである。

30

40

【 0 0 5 6 】

「チオホスホアルキルエーテル」とは、 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ 基であって、ここで R_a は、 O または S であり、 R_b は、 OH 、 O^- 、 S^- 、 OR_d または SR_d であり；そして R_c は、 $-O$ アルキルエーテルであり、ここで R_d は、対イオン（例えば、 Na^+ など）であり、そしてただし：
i) R_a は、 S であるか、
ii) R_b は、 S^- もしくは SR_d であるか；または
iii) R_a は、 S であり、そして R_b は、 S^- もしくは SR_d であるものをいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、チオホスホアルキルエーテル基は、必要に応じて置換される。例えば、ある種の実施形態において、チオホスホアルキル基の中の $-O$ アルキルエーテル部分は、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテル

50

、チオホスホアルキルエーテルまたは $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ のうちの 1 個もしくはこれより多くで必要に応じて置換され、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、上記定義で定義されるとおりである。

【0057】

「炭素環式」とは、3～18 個の炭素原子を含む安定な 3～18 員の芳香族または非芳香族の環をいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、炭素環式環は、縮合環系もしくは架橋環系を含み得、部分的にまたは完全に不飽和であり得る単環式、二環式、三環式または四環式の環系であり得る。非芳香族カルボシクリルラジカルとしては、シクロアルキルが挙げられる一方で、芳香族カルボシクリルラジカルは、アリールが挙げられる。本明細書で別段具体的に述べられなければ、炭素環式基は、必要に応じて置換される。

10

【0058】

「シクロアルキル」とは、縮合環系もしくは架橋環系を含み得、3～15 個の炭素原子を有し、好ましくは、3～10 個の炭素原子を有し、そして飽和または不飽和であり、単結合によって分子の残部に結合される安定な非芳香族の単環式または多環式の炭素環式環をいう。単環式シクロアルキル(cycloalkyl)としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。多環式シクロアルキルとしては、例えば、アダマンチル、ノルボルニル、デカリニル、7,7-ジメチル-ビスクロ-[2.2.1]ヘプタニルなどが挙げられる。本明細書で別段具体的に述べられなければ、シクロアルキル基は、必要に応じて置換される。

20

【0059】

「アリール」とは、少なくとも 1 個の炭素環式芳香環を含む環系をいう。いくつかの実施形態において、アリールは、6～18 個の炭素原子を含む。このアリール環は、縮合環系もしくは架橋環系を含み得る単環式、二環式、三環式または四環式の環系であり得る。アリールとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、フルオランテン、フルオレン、a s -インダセン、s -インダセン、インダン、インデン、ナフタレン、フェナレン、フェナントレン、プレリアデン、ピレン、およびトリフェニレンに由来するアリール。本明細書で別段具体的に述べられなければ、アリール基は、必要に応じて置換される。

30

【0060】

「複素環式」とは、1～12 個の炭素原子ならびに窒素、酸素および硫黄からなる群より選択される 1～6 個のヘテロ原子を含む安定な 3～18 員の芳香族または非芳香族の環をいう。本明細書で別段具体的に述べられなければ、上記複素環式環は、縮合環系もしくは架橋環系を含み得、上記複素環式環の中の窒素、炭素または硫黄原子は、必要に応じて酸化され得；窒素原子は、必要に応じて四級化され得；そして上記複素環式環は、部分的にまたは完全に不飽和であり得る単環式、二環式、三環式または四環式の環系であり得る。芳香族複素環式環の例は、ヘテロアリールの定義の中で以下に列举される（すなわち、ヘテロアリールは、複素環式の部分セットである）。非芳香族複素環式環の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ジオキサニル、チエニル[1,3]ジチアニル、デカヒドロイソキノリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、オクタヒドロインドリル、オクタヒドロイソインドリル、2-オキソピペラジニル、2-オキソピペリジニル、2-オキソピロリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、ピラゾロピリミジニル、キヌクリジニル、チアゾリジニル、テトラヒドロフリル、トリオキサニル、トリチアニル、トリアジナニル(triazinanyl)、テトラヒドロピラニル、チオモルホリニル、チアモルホリニル、1-オキソ-チオモルホリニル、および 1,1-ジオキソ-チオモルホリニル。本明細書で別段具体的に述べられなければ、複素環式基は、必要に応じて置換される。

40

【0061】

50

「ヘテロアリール」とは、1～13個の炭素原子、窒素、酸素および硫黄からなる群より選択される1～6個のヘテロ原子、ならびに少なくとも1個の芳香環を含む5～14員の環系をいう。本発明のある種の実施形態の目的に関して、ヘテロアリールラジカルは、縮合環系もしくは架橋環系を含み得；上記ヘテロアリールラジカルの中の窒素、炭素または硫黄原子は、必要に応じて酸化され得；上記窒素原子は、必要に応じて四級化され得る単環式、二環式、三環式または四環式の環系であり得る。例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アゼピニル、アクリジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンズチアゾリル、ベンゾインドリル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾ[*b*][1,4]ジオキセピニル、1,4-ベンゾジオキサニル、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキサソリル、ベンゾジオキシニル、ベンゾピラニル、ベンゾピラノニル、ベンゾフラニル、ベンゾフラノニル、ベンゾチエニル（ベンゾチオフェニル）、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ[4,6]イミダゾ[1,2-*a*]ピリジニル、ベンゾオキサゾリノニル、ベンゾイミダゾールチオニル、カルバゾリル、シンノリニル、ジベンゾフラニル、ジベンゾチオフェニル、フラニル、フラノニル、イソチアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル、インドリル、インダゾリル、イソインドリル、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル、イソオキサゾリル、ナフチリジニル、オキサジアゾリル、2-オキソアゼピニル、オキサゾリル、オキシラニル、1-オキシドピリジニル、1-オキシドピリミジニル、1-オキシドピラジニル、1-オキシドピリダジニル、1-フェニル-1*H*-ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル、プテリジニル、プテリジノニル、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピリジノニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリミジノニル（*pyrimidinonyl*）、ピリダジニル、ピロリル、ピリド[2,3-*d*]ピリミジノニル、キナゾリニル、キナゾリノニル、キノキサリニル、キノキサリノニル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、チアゾリル、チアジアゾリル、チエノ[3,2-*d*]ピリミジン-4-オニル、チエノ[2,3-*d*]ピリミジン-4-オニル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、およびチオフェニル（すなわち、チエニル）。本明細書で別段具体的に述べられなければ、ヘテロアリール基は、必要に応じて置換される。

【0062】

「縮合された」とは、少なくとも2個の環を含み、ここでこの2個の環が少なくとも1個の共通環原子、例えば、2個の共通環原子を共有する環系をいう。縮合環がヘテロシクリル環またはヘテロアリール環である場合、その共通環原子は、炭素または窒素であり得る。縮合環は、二環式、三環式、四環式などを含む。

【0063】

本明細書で使用される用語「置換された」とは、上記基のうちのいずれか（例えば、アルキル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレン、ヘテロアルキニレン、アルコキシ、アルキルエーテル、アルコキシアルキルエーテル、ヘテロアルキル、ヘテロアルコキシ、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、ホスホアルキル、ホスホアルキルエーテル、チオホスホアルキル、チオホスホアルキルエーテル、炭素環式、シクロアルキル、アリール、複素環式および/またはヘテロアリール）であって、ここで少なくとも1個の水素原子（例えば、1個、2個、3個または全ての水素原子）が、非水素原子（例えば、以下が挙げられるが、これらに限定されない：F、Cl、Br、およびIのようなハロゲン原子；ヒドロキシル基、アルコキシ基、およびエステル基のような基の中の酸素原子；チオール基、チオアルキル基、スルホン基、スルホニル基、およびスルホキシド基のような基の中の硫黄原子；アミン、アミド、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、アルキルアリールアミン、ジアリールアミン、N-オキシド、イミド、およびエナミンのような基の中の窒素原子；トリアルキルシリル基、ジアルキルアリールシリル基、アルキルジアリールシリル基、およびトリアリールシリル基のような基の中のケイ素原子；ならびに種々の他の基の中の他のヘテロ原子）への結合によって置き換えられることを意味する。「置換された」

とはまた、1個もしくはこれより多くの水素原子が、ヘテロ原子（例えば、オキソ、カルボニル、カルボキシル、およびエステル基の中の酸素；ならびにイミン、オキシム、ヒドラゾンおよびニトリルのような基の中の窒素）へのより高次の結合（例えば、二重結合または三重結合）によって置き換えられる上記の基のうちのいずれかを意味する。例えば、「置換された」は、1個もしくはこれより多くの水素原子が $-NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)R_h$ 、 $-NR_gC(=O)NR_gR_h$ 、 $-NR_gC(=O)OR_h$ 、 $-NR_gSO_2R_h$ 、 $-OC(=O)NR_gR_h$ 、 $-OR_g$ 、 $-SR_g$ 、 $-SOR_g$ 、 $-SO_2R_g$ 、 $-OSO_2R_g$ 、 $-SO_2OR_g$ 、 $=NSO_2R_g$ 、および $-SO_2NR_gR_h$ で置き換えられる上記の基のうちのいずれかを含む。「置換された」はまた、1個もしくはこれより多くの水素原子が $-C(=O)R_g$ 、 $-C(=O)OR_g$ 、 $-C(=O)NR_gR_h$ 、 $-CH_2SO_2R_g$ 、 $-CH_2SO_2NR_gR_h$ で置き換えられる上記の基のうちのいずれかを意味する。前述において、 R_g および R_h は、同じであるかまたは異なっており、そして独立して、水素、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリールおよび/またはヘテロアリールアルキルである。「置換された」とは、1個もしくはこれより多くの水素原子がアミノ、シアノ、ヒドロキシル、イミノ、ニトロ、オキソ、チオキソ、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、チオアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ヘテロシクリル、N-ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、N-ヘテロアリールおよび/またはヘテロアリールアルキル基への結合によって置き換えられる上記の基のうちのいずれかをさらに意味する。いくつかの実施形態において、選択肢的置換基は、 $-OP(=R_a)(R_b)R_c$ であり、ここで R_a 、 R_b および R_c の各々は、構造(I)の化合物について定義されるとおりである。さらに、前述の置換基の各々はまた、上記の置換基のうちの1個もしくはこれより多くで必要に応じて置換され得る。

【0064】

「共役」とは、1つのp軌道と別のp軌道とが、間に挟まる結合を横断して重なり合っていることをいう。共役は、環式または非環式の化合物で起こり得る。「共役度」とは、少なくとも1つのp軌道と別のp軌道とが間に挟まっているシグマ結合を横断して重なり合っていることをいう。例えば、1,3-ブタジエンは、1の共役度を有する一方で、ベンゼンおよび他の芳香族化合物は、代表的には、多重の共役度を有する。蛍光および有色化合物は、代表的には、少なくとも1の共役度を含む。

【0065】

「蛍光(性)(fluorescent)」とは、特定の周波数の光を吸収し、異なる周波数の光を発することができる分子をいう。蛍光(fluorescence)は、当業者に周知である。

【0066】

「有色(の)(colored)」とは、有色のスペクトル内の光(すなわち、赤、黄、青など)を吸収する分子をいう。

【0067】

「リンカー」とは、分子の一部をその同じ分子の別の部分にまたは異なる分子、部分もしくは固体支持体(例えば、微粒子)に接続する、少なくとも1個の原子(例えば、炭素、酸素、窒素、硫黄、リンおよびこれらの組み合わせ)の連続する鎖に言及する。リンカーは、共有結合または他の手段(例えば、イオン結合または水素結合相互作用)を介して上記分子を接続し得る。

【0068】

用語「生体分子」とは、種々の生物学的物質のうちのいずれか(核酸、炭水化物、アミノ酸、ポリペプチド、糖タンパク質、ホルモン、アプタマーおよびこれらの混合物が挙げられる)をいう。より具体的には、この用語は、RNA、DNA、オリゴヌクレオチド、改変または誘導体化されたヌクレオチド、酵素、レセプター、プリオン、レセプターリガ

10

20

30

40

50

ンド（ホルモンを含む）、抗体、抗原、および毒素、ならびに細菌、ウイルス、血球、および組織細胞が挙げられるが、これらに限定されないことが意図される。本発明の実施形態の視覚的に検出可能な生体分子（例えば、生体分子が連結されている構造（I）の化合物）は、本明細書でさらに記載されるように、生体分子と化合物（これは、上記生体分子上のアミノ、ヒドロキシ、カルボキシル、またはスルフヒドリル基のような任意の利用可能な原子または官能基を介して上記化合物への生体分子の結合を可能にする反応性基を有する）とを接触させることによって調製される。

【0069】

「反応性基」とは、第2の反応性基（例えば、「相補的反応性基」）と反応して、1個もしくはこれより多くの共有結合を、例えば、置換、酸化、還元、付加または環化付加反応により形成し得る部分である。例示的な反応性基は、表1に提供され、例えば、求核性基、求電子性基、ジエン、ジエノフィル、アルデヒド、オキシム、ヒドラゾン、アルキン、アミン、アジド、アシルアジド、アシルハライド、ニトリル、ニトロソ、スルフヒドリル、ジスルフィド、スルホニルハライド、イソチオシアネート、イミドエステル、活性化エステル、ケトン、 α,β -不飽和カルボニル、アルケン、マレイミド、 α,β -ハロイミド、エポキシド、アジリジン、テトラジン、テトラゾール、ホスフィン、ビオチン、チランなどが挙げられる。

【0070】

用語「視覚的」および「視覚的に検出可能な」とは、事前の照射、または化学的活性化もしくは酵素的活性化なしで、目視によって観察可能である物質に言及するために、本明細書で使用される。このような視覚的に検出可能な物質は、約300～約900nmの範囲に及ぶスペクトルの領域にある光を吸収し、発する。好ましくは、このような物質は、強く有色であり、好ましくは、少なくとも約40,000、より好ましくは、少なくとも約50,000、さらにより好ましくは、少なくとも約60,000、なおさらにより好ましくは、少なくとも約70,000、および最も好ましくは、少なくとも約80,000 $M^{-1}cm^{-1}$ のモル吸光係数を有する。本発明の化合物は、裸眼で、または光学ベースの検出デバイス（吸光分光光度計、透過型光学顕微鏡（transmission light microscope）、デジタルカメラおよびスキャナが挙げられるが、これらに限定されない）の助けを借りて観察することによって検出され得る。視覚的に検出可能な物質は、可視スペクトルの中の光を発するおよび/または吸収するものに限定されない。紫外線（UV）領域（約10nm～約400nm）、赤外線（IR）領域（約700nm～約1mm）の中の光を発するおよび/または吸収する物質、ならびに電磁スペクトルの他の領域において発するおよび/または吸収する物質はまた、「視覚的に検出可能な」物質の範囲内に含まれる。

【0071】

本発明の実施形態の目的のために、用語「光安定性視覚的染料（photosustainable dye）」とは、本明細書上記で定義されるように、視覚的に検出可能であり、そして光に曝露した際に、顕著に変化も分解もしない化学部分に言及する。好ましくは、上記光安定性視覚的染料は、少なくとも1時間光に曝された後に、顕著な漂白も分解も示さない。より好ましくは、上記視覚的染料は、少なくとも12時間、さらにより好ましくは、少なくとも24時間、さらになおより好ましくは、少なくとも1週間、および最も好ましくは、少なくとも1ヶ月間光に曝した後に安定である。本発明の化合物および方法における使用に適した光安定性視覚的染料の非限定的例としては、アゾ染料、チオインディゴ染料、キナクリドン顔料、ジオキサジン、フタロシアニン、ペリノン、ジケトピロロピロール、キノフタロン、およびトルアリーカルボニウム（truary carbonyum）が挙げられる。

【0072】

本明細書で使用される場合、用語「ペリレン誘導体」とは、視覚的に検出可能である任意の置換されたペリレンを含むことが意図される。しかし、この用語は、ペリレン自体を含むことは意図されない。用語「アントラセン誘導体」、「ナフタレン誘導体」、および

10

20

30

40

50

「ピレン誘導体」が、同様に使用される。いくつかの好ましい実施形態において、誘導体（例えば、ペリレン、ピレン、アントラセンまたはナフタレンの誘導体）は、ペリレン、アントラセン、ナフタレン、またはピレンのイミド、ビスイミドまたはヒドラザミイミド（hydrazamimide）誘導体である。

【0073】

本発明の種々の実施形態の視覚的に検出可能な分子は、特定の分析物（例えば、生体分子）の存在、位置、または量を決定する必要がある広く種々の分析用途（例えば、生化学的および生物医学的用途）に有用である。従って、別の局面において、本発明は、生体分子を視覚的に検出するための方法を提供し、上記方法は、（a）生物学的系に、生体分子に連結された構造（I）の化合物を含む視覚的に検出可能な生体分子を提供する工程；および（b）上記生体分子をその視覚的特性によって検出する工程を包含する。本発明の実施形態の目的のために、語句「生体分子をその視覚的特性によって検出する」とは、生体分子が、照射または化学的もしくは酵素的活性化なしに、裸眼で、または光学ベースの検出デバイス（吸光分光光度計、透過型光学顕微鏡、デジタルカメラおよびスキャナが挙げられるが、これらに限定されない）の助けを借りて観察されることを意味する。デンストメーターは、存在する視覚的に検出可能な生体分子の量を定量するために使用され得る。例えば、2つのサンプル中の上記生体分子の相対的量は、相対的光学密度を測定することによって決定され得る。1生体分子あたりの染料分子の化学量論が既知でありかつ上記染料分子の吸光係数が既知である場合、上記生体分子の絶対濃度もまた、光学密度の測定から決定され得る。本明細書で使用される場合、用語「生物学的系」は、視覚的に検出可能な生体分子に加えて、1もしくはこれより多くの生体分子を含む任意の溶液または混合物をいうために使用される。このような生物学的系の非限定的例としては、細胞、細胞抽出物、組織サンプル、電気泳動ゲル、アッセイ混合物、およびハイブリダイゼーション反応混合物が挙げられる。

【0074】

「固体支持体」とは、分子の固相支持のための当該分野で公知の任意の固体基材をいい、例えば、「微粒子」とは、本発明の化合物への結合に有用な多くの小さな粒子のうちのいずれか（ガラスビーズ、磁性ビーズ、ポリマービーズ、非ポリマービーズなどが挙げられるが、これらに限定されない）をいう。ある種の実施形態において、微粒子は、ポリスチレンビーズを含む。

【0075】

「固体支持体残基（solid support residue）」とは、分子が固体支持体から切断される場合に、その分子に結合されたままである官能基をいう。固体支持体残基（solid support residue）は、当該分野で公知であり、固体支持体の構造および固体支持体にその分子を連結する基に基づいて容易に導かれ得る。

【0076】

「標的化部分」とは、特定の標的（例えば、分析物分子）と選択的に結合するかまたは会合する部分である。「選択的に」結合または会合するとは、標的化部分が他の標的と比較して所望の標的と優先的に会合するかまたは結合することを意味する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される化合物は、化合物を目的の分析物（すなわち、標的化部分の標的）と選択的に結合させるかまたは会合させ、従ってその分析物の検出を可能にするという目的のために、その標的化部分への連結を含む。例示的な標的化部分としては、抗体、抗原、核酸配列、酵素、タンパク質、細胞表面レセプターアンタゴニストなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記標的化部分は、抗体のような、細胞上にまたは細胞中にある標的特徴（例えば、細胞膜または他の細胞構造上にある標的特徴）と選択的に結合するかまたは会合し、従って、目的の細胞の検出を可能にする部分である。所望の分析物と選択的に結合するかまたは会合する低分子はまた、ある種の実施形態において標的化部分として企図される。当業者は、種々の実施形態において有用である他の分析物および相当する標的化部分を理解する。

【0077】

「塩基対合部分」とは、相補的な複素環式部分と水素結合（例えば、ワトソン - クリック塩基対合）を介してハイブリダイズし得る複素環式部分をいう。塩基対合部分は、天然および非天然の塩基を含む。塩基対合部分の非限定的例は、RNA塩基およびDNA塩基（例えば、アデノシン、グアノシン、チミジン、シトシンおよびウリジンならびにこれらのアナログ）である。

【0078】

本明細書で開示される本発明の実施形態はまた、1個もしくはこれより多くの原子が異なる原子質量または質量数を有する原子によって置き換わることによって、同位体標識されている構造（I）または（II）の全ての化合物を包含することが意味される。開示される化合物に組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素、塩素、およびヨウ素の同位体（例えば、それぞれ、 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 、および ^{125}I ）が挙げられる。

10

【0079】

構造（I）または（II）の同位体標識された化合物は一般に、当業者に公知の従来技術によって、または以下でおよび以下の実施例において記載されるものに類似のプロセスによって、以前に使用されていた標識されていない試薬の代わりに適切な同位体標識された試薬を使用して調製され得る。

【0080】

「安定な化合物」および「安定な構造」とは、反応混合物から有用な純度への単離および有効な治療剤への製剤化に耐えるように十分に強い化合物を示すことが意味される。

20

【0081】

「任意の（optional）」または「必要に応じて（optionally）」とは、その後に記載される事象または状況が起こっても起こらなくてもよいこと、ならびにその記載が上記事象または状況が起こる場合およびそれが起こらない場合を含むことを意味する。例えば、「必要に応じて置換されたアルキル」とは、そのアルキル基が置換されていてもされていなくてもよいこと、ならびにその記載が、置換されたアルキル基および置換を有しないアルキル基の両方を含むことを意味する。

【0082】

「塩」とは、酸付加塩および塩基付加塩の両方を包含する。

30

【0083】

「酸付加塩」とは、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などが挙げられるが、これらに限定されない）および有機酸（例えば、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、カンファー酸、カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、炭酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチジン酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、2-オキソ-グルタル酸、グリセロリン酸、グリコール酸、馬尿酸、イソ酪酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、プロピオン酸、ピログルタミン酸、ピルビン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、チオシアン酸、p-トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、ウンデシレン酸などが挙げられるが、これらに限定されない）と形成される塩をいう。

40

【0084】

「塩基付加塩」とは、遊離酸に無機塩基または有機塩基を添加することから調製される塩をいう。無機塩基に由来する塩としては、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウムの塩などが挙

50

げられるが、これらに限定されない。有機塩基に由来する塩としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：一級、二級、および三級アミン、置換されたアミン（天然に存在する置換されたアミン、環式アミンおよび塩基性イオン交換樹脂（例えば、アンモニア、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、デアノール、2 - ジメチルアミノエタノール、2 - ジエチルアミノエタノール、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、ベネタミン、ベンザチン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、N - エチルピペリジン、ポリアミン樹脂など）が挙げられる）の塩。特に好ましい有機塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、コリンおよびカフェインである。

10

【0085】

結晶化は、本明細書中に記載される化合物の溶媒和物を生じ得る。本発明の実施形態は、記載される化合物の全ての溶媒和物を包含する。本明細書で使用される場合、用語「溶媒和物」とは、1分子もしくはこれより多くの本発明の化合物と、1分子もしくはこれより多くの溶媒とを含む凝集物をいう。上記溶媒は水であり得、この場合、この溶媒和物は水和物であり得る。あるいは、上記溶媒は、有機溶媒であり得る。従って、本発明の化合物は、水和物（一水和物、二水和物、半水和物、セスキ水和物、三水和物、四水和物などが挙げられる）ならびにその対応する溶媒和形態として存在し得る。本発明の化合物は、真の溶媒和物であり得る一方で、他の場合には、本発明の化合物は、偶発の水もしくは別の溶媒を保持しているに過ぎなくてもよいし、水と何らかの偶発の溶媒との混合物であってもよい。

20

【0086】

本発明の化合物の実施形態（例えば、構造 I もしくは I I の化合物）またはそれらの塩、互変異性体もしくは溶媒和物は、1もしくはこれより多くの不斉中心を含み得、従って、エナンチオマー、ジアステレオマー、および絶対立体化学の点から、(R) - もしくは (S) - として、またはアミノ酸に関しては (D) - もしくは (L) - として定義され得る他の立体異性形態を生じ得る。本発明の実施形態は、全てのこのような考えられる異性体、ならびにそれらのラセミ形態および光学的に純粋な形態を含むことが意味される。光学的に活性な (+) および (-)、(R) - および (S) - 、または (D) - および (L) - 異性体は、キラルシントロンもしくはキラル試薬を使用して調製され得るか、または従来技術（例えば、クロマトグラフィーおよび分別結晶化）を使用して分離され得る。個々のエナンチオマーの調製/単離のための従来技術としては、適切な光学的に純粋な前駆体からのキラル合成、あるいは例えば、キラル高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用するラセミ混合物（または塩もしくは誘導体のラセミ混合物）の分離が挙げられる。本明細書に記載される化合物がオレフィン性二重結合または他の幾何的非対称性の中心を含み、そして別段特定されなければ、上記化合物が E および Z 両方の幾何異性体を含むことは、意図される。同様に、全ての互変異性形態がまた、含まれることが意図される。

30

【0087】

「立体異性体」とは、同じ結合によって結合されるが、交換可能ではない異なる三次元構造を有する同じ原子から構成される化合物をいう。本発明は、種々の立体異性体およびその混合物を企図し、分子が互いに重ね合わせることができない鏡像である 2 つの立体異性体をいう「エナンチオマー」を含む。

40

【0088】

「互変異性体」とは、分子の 1 つの原子からその同じ分子の別の原子へのプロトンシフトに言及する。本発明は、任意の上記化合物の互変異性体を含む。上記化合物の種々の互変異性形態は、当業者によって容易に導き出される。

【0089】

「アミノ酸側鎖」または「側鎖」とは、アミノ酸の - 炭素、 - 炭素、または - 炭

50

素に結合した置換基をいう。アミノ酸側鎖は、天然または非天然のアミノ酸に関連したものであり得る。

【 0 0 9 0 】

「アミノ酸配列」または「ペプチド配列」とは、ペプチド結合を介して形成される骨格に沿って連結されたアミノ酸残基の一次構造をいう。配列は概してN末端からC末端へと示される。本発明の実施形態は、示される場合に、ある種のアミノ酸配列を含む化合物を包含する。アミノ酸配列は、適切な場合、3文字略語または1文字略語によって示される。

【 0 0 9 1 】

「文字コード」、「1文字コード」または「3文字コード」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸またはアミノ酸残基に関する表示または略語をいう。1文字コードおよび3文字コードならびにそれらが相当するアミノ酸の全般的リストは、以下に見出される：

【表 A】

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V
セレノシステイン	Sec	U
ピロリシン	Pyl	O

【 0 0 9 2 】

「シート」、「 β -シート」、「 β -ブリーツシート」または「 β - β -ブリーツシート」とは、分子内折りたたみを介して形成されるアミノ酸配列の二次構造をいう。アミノ酸の鎖は、水素結合によって横方向に接続されて、概してねじれたひだ状のシートを形成する

。この二次構造を形成するアミノ酸の鎖は、一般に、長さが 3 ~ 10 アミノ酸残基である。本発明は、シート部分が表示される場合、シート形成性質を有するアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含む。これらの残基としては、グリシン、メチオニン、セリン、バリン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、スレオニン、およびイソロイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

「ヘリックス」または「 α -ヘリックス」とは、分子内折りたたみを介して形成されるアミノ酸鎖の二次構造をいう。骨格の N - H 基が 4 残基前のアミノ酸の骨格 C = O 基に水素結合を供与するらせん構造が形成される。アミノ酸側鎖配列は、らせん構造の形成に影響を及ぼす。本発明は、ヘリックス部分が表示される場合、らせん形成性質を有する残基を含むアミノ酸配列を含む。これらの残基としては、グリシン、メチオニン、アラニン、アルギニン、ヒスチジン、ロイシン、グルタメート、グルタミン酸、フェニルアラニン、バリン、チロシン、およびリジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0094】

本明細書で使用される化学的命名法プロトコルおよび構造図は、ACD / Name Version 9.07 ソフトウェアプログラムおよび / または ChemDraw Ultra Version 11.0 ソフトウェア命名プログラム (Cambridge Software) を使用する I . U . P . A . C . 命名法体系の改変形態である。当業者が精通する一般名もまた、使用される。

【0095】

上記のように、本発明の一実施形態において、種々の分析法において蛍光染料および / または有色染料として有用な化合物が提供される。一般論として、本発明の実施形態は、蛍光部分および / または有色部分のダイマーおよびより高次のポリマーに関する。蛍光部分および / または有色部分は、特定の二次構造またはアッセイが行われる pH において複数の正にもしくは負に荷電した部分を必要に応じて有するアミノ酸もしくは他のモノマーユニットを有するリンカーによって連結される。理論によって拘束されることは望まないが、リンカーの長さおよび具体的特徴 (例えば、二次構造、正電荷など) は、分子内クエンチングが低減または排除され、これが高いモル「明度」(例えば、高蛍光発光) を有する染料化合物を生じるように、蛍光部分および / または有色部分の間で十分な空間的距離を維持する一助となると考えられる。

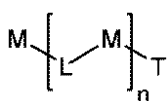
【0096】

例えば、リンカーは、負電荷が所望される場合、カルボキシレート、ホスフェートおよび / またはチオホスフェート部分を含み得る。正電荷が所望される場合には、一級アミン基もしくは四級アミン基および / または正電荷を保持できる他の基を含む連結基が、使用され得る。特定の二次構造が所望される場合、このような構造 (例えば、 α -ヘリックスまたはシート) を受け入れるアミノ酸配列を有する連結基が使用され得る。「荷電部分」とは、その部分がある特定の pH において、例えば、その化合物を使用するアッセイが行われる pH において荷電されるが、その「荷電部分」は、全ての pH において荷電されることが必要条件ではないということが理解される。

【0097】

よって、いくつかの実施形態において、上記化合物は、以下の構造 (A) :

【化 4】



(A)

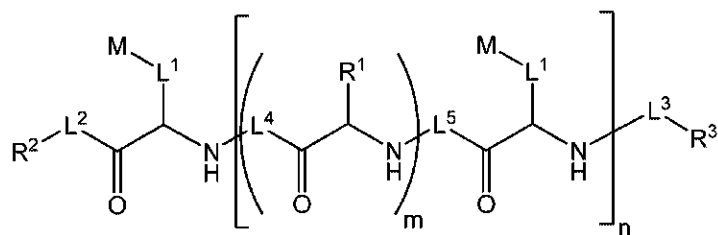
を有し、ここで L は、各存在において、独立して、少なくとも 1 個のアミノ酸を含むリンカー、例えば、ペプチドを含むリンカーであり、M は、各存在において、独立して、構造

(I) に関して定義されるとおりであり、 n は、1 またはこれより大きな整数であり、 T は、非存在、末端基または L への結合である。

【0098】

他の実施形態において、以下の構造 (I) :

【化5】



(I)

を有する化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体が提供され、ここで：

M は、各存在において、独立して、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^1 は、各存在において、独立して、i) 選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンもしくはヘテロアルキニレンリンカー；または ii) 2 個の相補的反応性基の反応によって形成できる官能基を含むリンカー、のいずれかであり；

L^2 、 L^3 、 L^4 および L^5 は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R^1 は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R^2 および R^3 は、各々独立して、 H 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2H$ 、アルキル、アルキルエーテル、アルコキシ、ヘテロアルキル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、 Q 、 Q への共有結合を含むリンカー、標的化部分への共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカー、固体支持体残基への共有結合を含むリンカーまたは構造 (I) のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで上記アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され； Q は、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基 Q と共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

m は、各存在において、独立して、0 またはこれより大きな整数であり；そして

n は、0 またはこれより大きな整数である。

【0099】

構造 (I) の他の実施形態において：

M は、各存在において、独立して、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^1 は、各存在において、独立して、i) 選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンもしくはヘテロアルキニレンリンカー；または ii) 2 個の相補的反応性基の反応によって形成できる官能基を含むリンカー、のいずれかであり；

L^2 、 L^3 、 L^4 および L^5 は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R^1 は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R^2 および R^3 は、各々独立して、 H 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2H$ 、アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミノ、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、 Q 、 Q への共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカーまたは構造 (I) のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで上記アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミノ、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；

10

Q は、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基 Q と共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

m は、各存在において、独立して、0 またはこれより大きな整数であり；そして

n は、1 またはこれより大きな整数である。

【0100】

構造 (I) の化合物中の種々のリンカーおよび置換基 (例えば、 M 、 Q 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 および L^5) は、1 もしくはこれより多くの置換基で必要に応じて置換される。例えば、いくつかの実施形態において、選択肢的な置換基は、構造 (I) の化合物の水溶性または他の特性を最適化するために選択される。ある種の実施形態において、構造 (I) の化合物中の各アルキル、アルコキシ、アルキルエーテル、アルコキシアルキルエーテル、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルおよびチオホスホアルキルエーテルは、ヒドロキシル、アルコキシ、アルキルエーテル、アルコキシアルキルエーテル、スルフヒドリル、アミノ、アルキルアミノ、カルボキシル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルおよびチオホスホアルキルエーテルからなる群より選択される 1 個もしくはこれより多くの置換基で必要に応じて置換される。

20

【0101】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 個の R^1 は、中性アミノ酸側鎖、例えば、 H またはアルキルである。

【0102】

他の実施形態において、少なくとも 1 個の R^1 は、荷電したアミノ酸の側鎖、例えば、アミジニル、グアニジニルまたはイミダゾリル基を含む側鎖である。

30

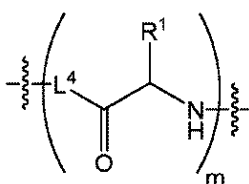
【0103】

他の実施形態において、 R^1 は、各存在において、独立して、 H 、アルキル、 $-CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_3^+$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(=NH_2^+)NH_2$ またはイミダゾリルである。

【0104】

種々の他の実施形態において、 R^1 、 L^4 および m は、

【化 6】



40

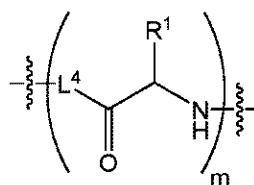
が $(G)_{10}$ 、 $(GDGDGDGDGD)$ または $(GKGKGKGKGK)$ というアミノ酸配列を有するように選択される。

【0105】

異なる実施形態において、 R^1 、 L^4 および m は、

50

【化 7】



が α -ヘリックスまたは β -シート二次構造を形成できるアミノ酸配列を有するように選択される。例えば、いくつかの実施形態において、上記アミノ酸配列は、(G G E E F M L V Y K F A R K H G G) または (G G M S M V V S G G) である。

10

【0106】

異なる実施形態において、 L^4 および L^5 は、各存在において非存在である。他の実施形態において、 L^4 もしくは L^5 、または両方は、少なくとも1個の存在に関して存在する。例えば、いくつかの実施形態において、存在する場合、 L^4 もしくは L^5 、または両方は、ヘテロアルキレンリンカーである。

【0107】

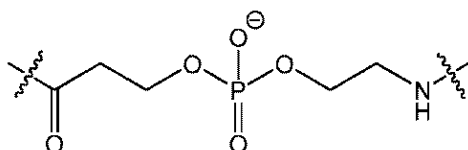
L^4 および/または L^5 は、荷電部分を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、 L^4 および/または L^5 は、水性溶液中で3~11の範囲に及ぶpH値において正電荷または負電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。いくつかの実施形態において、 L^4 および/または L^5 は、水性溶液中で3~11の範囲に及ぶpH値において正電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。いくつかの実施形態において、 L^4 および/または L^5 は、水性溶液中で3~11の範囲に及ぶpH値において負電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、 L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも1個の存在、または両方は、以下の構造：

【化 8】



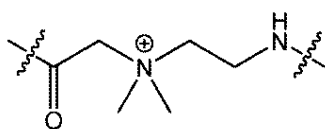
30

を有する。

【0109】

他の実施形態において、 L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも1個の存在、または両方は、以下の構造：

【化 9】



40

を有する。

【0110】

選択的なリンカー L^1 は、化合物の残部へのM部分の結合点として使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、構造(I)の化合物への合成前駆体が調製され、M部分は、当該分野で公知の任意の数の容易な方法(例えば、「クリック化学」といわれる方法)を使用して、その合成前駆体に結合される。この目的のために、迅速でありかつ実質的に不可逆性である任意の反応は、Mをその合成前駆体に結合して、構造(I)の化合物を形成するために使用され得る。例示的な反応としては、トリアゾールを形成するアジ

50

ドおよびアルキンの銅触媒性の反応（ヒュスゲン 1, 3 - 双極環化付加反応）、ジエンおよびジエノフィルの反応（ディールス - アルダー）、歪み促進性アルキン - ニترون環化付加（strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition）、歪みアルケンと、アジド、テトラジンまたはテトラゾールの反応、アルケンおよびアジドの [3 + 2] 環化付加、アルケンおよびテトラジン逆電子要請型ディールス - アルダー、アルケンおよびテトラゾール光化学反応、ならびに種々の置換反応（例えば、求電子性原子に対する求核攻撃による脱離基の置換）が挙げられる。いくつかの実施形態において、 L^1 を形成する反応は、水性環境の中で行われ得る。

【 0 1 1 1 】

よって、いくつかの実施形態において、 L^1 は、各存在において、2 個の相補的反応性基の反応によって形成し得る官能基、たとえば、前述の「クリック」反応のうちの 1 つの生成物である官能基、を含むリンカーである。種々の実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、官能基は、アルデヒド、オキシム、ヒドラゾン、アルキン、アミン、アジド、アシルアジド、アシルハライド、ニトリル、ニترون、スルフヒドリル、ジスルフィド、スルホニルハライド、イソチオシアネート、イミドエステル、活性化エステル、ケトン、 α, β - 不飽和カルボニル、アルケン、マレイミド、 α - ハロイミド、エポキシド、アジリジン、テトラジン、テトラゾール、ホスフィン、ピオチンまたはチラン官能基と、相補的反応性基との反応によって形成され得る。

【 0 1 1 2 】

他の実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、官能基は、アルキンおよびアジドの反応によって形成され得る。

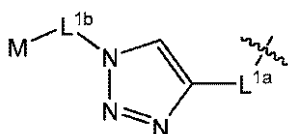
【 0 1 1 3 】

より多くの実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、官能基は、アルケン、エステル、アミド、チオエステル、ジスルフィド、炭素環式、複素環式またはヘテロアリール基を含む。いくつかのより具体的な実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 L^1 は、トリアゾリル官能基を含むリンカーである。

【 0 1 1 4 】

さらに他の実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 $L^1 - M$ は、以下の構造：

【 化 1 0 】

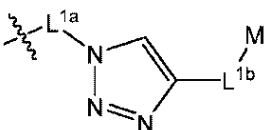


を有し、ここで L^{1a} および L^{1b} は、各々独立して、選択肢的なリンカーである。

【 0 1 1 5 】

異なる実施形態において、 L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 $L^1 - M$ は、以下の構造：

【 化 1 1 】



を有し、ここで L^{1a} および L^{1b} は、各々独立して、選択肢的なリンカーである。

【 0 1 1 6 】

前述のものの種々の実施形態において、 L^{1a} もしくは L^{1b} 、または両方が、非存在である。他の実施形態において、 L^{1a} もしくは L^{1b} 、または両方が存在する。

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態において、 L^{1a} および L^{1b} は、存在する場合、各々独立して、アルキレンまたはヘテロアルキレンである。

【0118】

構造(I)のさらに他の異なる実施形態において、 L^1 は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーである。

【0119】

より多くの他の実施形態において、 L^2 および L^3 は、各存在において、独立して、非存在またはヘテロアルキレンリンカーである。例えば、いくつかの実施形態において、ヘテロアルキレンリンカーは、アミノ酸またはペプチジルリンカーである。

【0120】

他の種々の実施形態において、 R^2 は、 $-NH_2$ である。他の実施形態において、 R^3 は、Q、Qへの共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである。

【0121】

なお他の実施形態において、Qは、各存在において、独立して、分析物分子または固体支持体と共有結合を形成し得る反応性基を含む部分である。他の実施形態において、Qは、各存在において、独立して、相補的反応性基Qと共有結合を形成し得る反応性基を含む部分である。例えば、いくつかの実施形態において、Qは、構造(I)のさらなる化合物上に(例えば、 R^2 位または R^3 位に)存在し、QおよびQは、構造(I)の化合物および構造(I)のさらなる化合物の反応が構造(I)の化合物の共有結合したダイマーを生じるように、相補的反応性基を含む。構造(I)のマルチマー化合物はまた、類似の様式で調製され得、本発明の実施形態の範囲内に含まれる。

【0122】

Q基のタイプおよび構造(I)の化合物の残りへのQ基の接続は、Qが、所望の結合を形成するために適切な反応性を有することを条件として、限定されない。

【0123】

ある種の実施形態において、Qは、水性条件下で加水分解を受けにくい部分であるが、分析物分子または固体支持体上の対応する基(例えば、アミン、アジドまたはアルキン)と結合を形成するために十分に反応性である。

【0124】

構造(I)の化合物のある種の実施形態は、生体結合反応の分野において一般に使用されるQ基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、Qは、求核性反応性基、求電子性反応性基もしくは環化付加反応性基を含む。いくつかのより具体的な実施形態において、Qは、スルフヒドリル、ジスルフィド、活性化エステル、イソチオシアネート、アジド、アルキン、アルケン、ジエン、ジエノフィル、酸ハライド、スルホニルハライド、ホスフィン、 α -ハロアミド、ピオチン、アミノもしくはマレイミド官能基を含む。いくつかの実施形態において、上記活性化エステルは、N-スクシンイミドエステル、イミドエステルまたはポリフルオロフェニルエステルである。他の実施形態において、上記アルキンは、アルキルアジドまたはアシルアジドである。

【0125】

Q基は、便宜的に、貯蔵安定性または他の所望の特性を増大するために保護された形態で提供され得、次いで、その保護基は、例えば、標的化部分または分析物との結合体化のために適時に除去され得る。よって、Q基は、反応性基の「保護された形態」を含み、これらとしては、上記でまたは以下の表1に記載される反応性基のうちのいずれかが挙げられる。Qの「保護された形態」とは、所定の反応条件下で、Qと比較してより低い反応性を有するが、好ましくは、構造(I)の化合物の他の部分を分解もせず、その部分と反応もしない条件下で、Qに変換され得る部分をいう。当業者は、特定のQならびに所望の最終用途および貯蔵条件に基づいて、Qの適切な保護された形態を導き得る。例えば、QがSHである場合、Qの保護された形態は、一般に公知の技術および試薬を使用してSH部分を現すために還元され得るジスルフィドを含む。

10

20

30

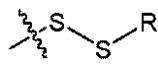
40

50

【 0 1 2 6 】

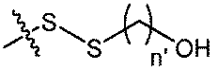
他の実施形態において、そのQ部分は、便宜的に、ジスルフィド部分としてマスク（例えば、保護）され、これは、後に還元されて、所望の分析物分子または標的化部分に結合するための活性化Q部分を提供し得る。例えば、そのQ部分は、以下の構造：

【 化 1 2 】



を有するジスルフィドとしてマスクされ得、ここでRは、必要に応じて置換されたアルキル基である。例えば、いくつかの実施形態において、Qは、以下の構造：

【 化 1 3 】



を有するジスルフィド部分として提供され、ここでnは、1～10の整数、例えば、6である。

【 0 1 2 7 】

例示的なQ部分は、以下の表Iに提供される。

【 表 1 - 1 】

表1. 例示的なQ部分

構造	クラス
	スルフヒドリル
	イソチオシアネート

10

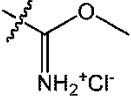
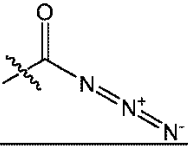
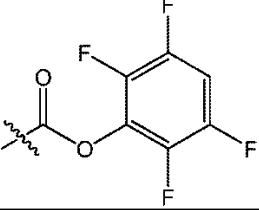
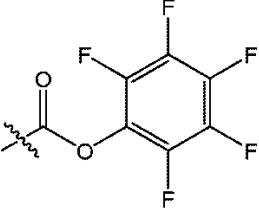
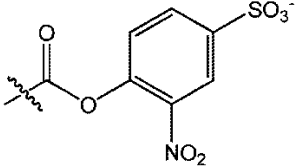
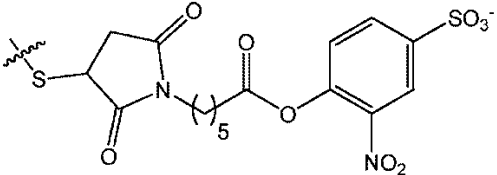
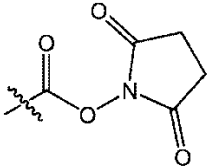
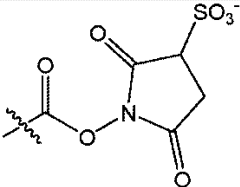
20

30

40

50

【表 1 - 2】

構造	クラス
	イミドエステル
	アシルアジド
	活性化エステル
	活性化エステル
	活性化エステル
	活性化エステル
	活性化エステル
	活性化エステル

10

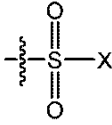
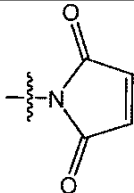
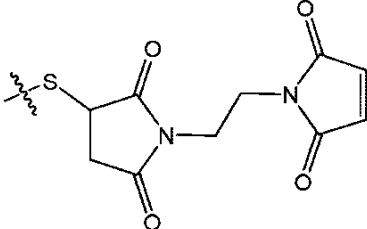
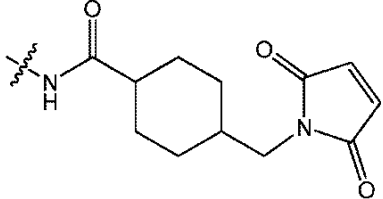
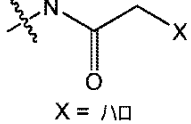
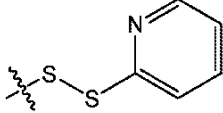
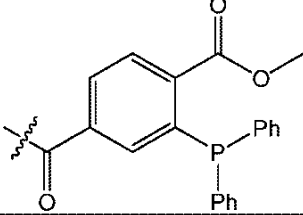

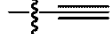
20

30

40

50

【表 1 - 3】

構造	クラス
 X = ハロ	スルホニルハライド
	マレイミド
	マレイミド
	マレイミド
 X = ハロ	α-ハロイミド
	ジスルフィド
	ホスフィン
	アジド
	アルキン

10

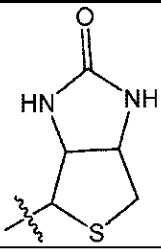
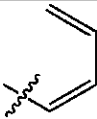
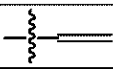

20

30

40

50

【表 1 - 4】

構造	クラス
	ビオチン
	ジエン
	アルケン/ジエノフィル
 EWG = 電子吸引性基	アルケン/ジエノフィル
-NH ₂	アミノ

【 0 1 2 8 】

QがSHであるいくつかの実施形態において、このSH部分は、構造（I）の別の化合物上の別のスルフヒドリル基とジスルフィド結合を形成する傾向にあることに注意すべきである。よって、いくつかの実施形態は、ジスルフィドダイマーの形態にあり、このジスルフィド結合がSH Q基に由来する構造（I）の化合物を含む。

【 0 1 2 9 】

ある種の実施形態において、R²またはR³のうちの一方は、分析物分子への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである。例えば、いくつかの実施形態において、上記分析物分子は、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマーである。他の実施形態において、上記分析物分子は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである。異なる実施形態において、上記固体支持体は、ポリマービーズまたは非ポリマービーズである。

【 0 1 3 0 】

mの値は、所望の蛍光強度および/または色の強度に基づいて選択され得る別の変数である。いくつかの実施形態において、mは、各存在において、独立して、1～20の整数である。例えば、いくつかの実施形態において、mは、各存在において、独立して、1～10の整数、例えば、1、2、3、4または5である。いくつかの実施形態において、mは、1である。いくつかの実施形態において、mは、2である。いくつかの実施形態において、mは、3である。いくつかの実施形態において、mは、4である。いくつかの実施形態において、mは、5である。

【 0 1 3 1 】

蛍光強度はまた、nの種々の値の選択によって整調され得る。ある種の実施形態において、nは、1～100の整数である。例えば、いくつかの実施形態において、nは、1～10の整数である。いくつかの実施形態において、nは、1である。いくつかの実施形態において、nは、2である。いくつかの実施形態において、nは、3である。いくつかの実施形態において、nは、4である。いくつかの実施形態において、nは、5である。いくつかの実施形態において、nは、6である。いくつかの実施形態において、nは、7である。いくつかの実施形態において、nは、8である。いくつかの実施形態において、nは、9である。いくつかの実施形態において、nは、10である。

【0132】

Mは、所望の光学的特性に基づいて、例えば、所望の色および/または蛍光発光波長に基づいて選択される。いくつかの実施形態において、Mは、各存在において同じである；しかし、Mの各存在が同一のMである必要はないことに注意することは重要であり、ある種の実施形態は、Mが各存在において同じでない化合物を含む。例えば、いくつかの実施形態において、各Mは、同じではなく、異なるM部分は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法における使用のための吸光度および/または発光を有するように選択される。例えば、いくつかの実施形態において、その異なるM部分は、1つの波長における放射線の吸光度が、FRET機構によって異なる波長における放射線の発光を引き起こすように選択される。例示的なM部分は、所望の最終用途に基づいて、当業者によって適切に選択され得る。FRET法の例示的なM部分としては、フルオレセインおよび5-TAMRA(5-カルボキシテトラメチルローダミン、スクシンイミジルエステル)染料が挙げられる。

10

【0133】

Mは、M上の任意の位置(すなわち、原子)から分子の残部に結合され得る。当業者は、Mを分子の残部に結合する手段を認識する。例示的な方法は、本明細書中に記載される「クリック」反応を含む。

【0134】

いくつかの実施形態において、Mは、蛍光部分または有色部分である。任意の蛍光部分および/または有色部分が使用され得、例えば、当該分野で公知でありかつ比色アッセイ、UVアッセイ、および/または蛍光アッセイにおいて代表的に使用されるものが、使用され得る。本発明の種々の実施形態において有用なM部分の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：キサンテン誘導体(例えば、フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシンまたはテキサスレッド)；シアニン誘導体(例えば、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニンまたはメロシアニン)；スクアライン誘導体および環置換されたスクアライン(Seta、SeTau、およびSquare染料が挙げられる)；ナフタレン誘導体(例えば、ダンシルおよびプロダン誘導体)；クマリン誘導体；オキサジアゾール誘導体(例えば、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾールまたはベンゾオキサジアゾール)；アントラセン誘導体(例えば、アントラキノン(DRAQ5、DRAQ7およびCyTRAKオレンジが挙げられる)；ピレン誘導体(例えば、カスケードブルー)；オキサジン誘導体(例えば、ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン170)；アクリジン誘導体(例えば、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー)；アリールメチン誘導体：オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン；ならびにテトラピロール誘導体(例えば、ポルフィン、フタロシアニンまたはビルルピン)。他の例示的なM部分としては、以下が挙げられる：シアニン染料、キサンテート染料(例えば、Hex、Vic、Nedd、JoeまたはTet)；Yakimaイエロー；Redmondレッド；tamra；テキサスレッドおよびalexafluor(登録商標)染料。

20

30

【0135】

前述のうちのいずれかのさらに他の実施形態において、Mは、3個もしくはこれより多くのアリアルもしくはヘテロアリアル環、またはこれらの組み合わせ、例えば、4個もしくはこれより多くのアリアルもしくはヘテロアリアル環、またはこれらの組み合わせ、あるいはさらには5個もしくはこれより多くのアリアルもしくはヘテロアリアル環、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、Mは、6個のアリアルまたはヘテロアリアル環、またはこれらの組み合わせを含む。さらなる実施形態において、上記環は縮合される。例えば、いくつかの実施形態において、Mは、3個もしくはこれより多くの縮合環、4個もしくはこれより多くの縮合環、5個もしくはこれより多くの縮合環、またはさらには6個もしくはこれより多くの縮合環を含む。

40

【0136】

いくつかの実施形態において、Mは、環式である。例えば、いくつかの実施形態におい

50

て、Mは、炭素環式である。他の実施形態において、Mは、複素環式である。前述のうちのさらに他の実施形態において、Mは、各存在において、独立して、アリール部分を含む。これら実施形態のうちのいくつかにおいて、上記アリール部分は、多環式である。他のより具体的な実施形態において、上記アリール部分は、縮合多環式アリール部分であり、例えば、これは、少なくとも3個、少なくとも4個、またはさらには4個より多くのアリール環を含み得る。

【0137】

構造(I)または(IA)の前述の化合物のうちのいずれかの他の実施形態において、Mは、各存在において、独立して、少なくとも1個のヘテロ原子を含む。例えば、いくつかの実施形態において、上記ヘテロ原子は、窒素、酸素または硫黄である。

10

【0138】

前述のうちのいずれかのさらにより多くの実施形態において、Mは、各存在において、独立して、少なくとも1個の置換基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、上記置換基は、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、アミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、ヒドロキシ、スルフヒドリル、アルコキシ、アリールオキシ、フェニル、アリール、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、t-ブチル、カルボキシ、スルホネート、アミド、またはホルミル基である。

【0139】

前述のうちのいくつかのさらにより具体的な実施形態において、Mは、各存在において、独立して、ジメチルアミノスチルベン、キナクリドン、フルオロフェニル-ジメチル-BODIPY、his-フルオロフェニル-BODIPY、アクリジン、テリレン、セキシフェニル、ボルフィリン、ベンゾピレン、(フルオロフェニル-ジメチル-ジフルオロボラ-ジアザ-インダセン)フェニル、(ビス-フルオロフェニル-ジフルオロボラ-ジアザ-インダセン)フェニル、クアテルフェニル、p-ベンゾチアゾール、ター-ベンゾチアゾール、p-ナフチル、p-アントラシル、スクアライン、スクアリリウム、9,10-エチニルアントラセンまたはター-ナフチル部分である。他の実施形態において、Mは、各存在において、独立して、p-ターフェニル、ペリレン、アゾベンゼン、フェナジン、フェナントリン、アクリジン、チオキサントレン、クリセン、ルブレン、コロネン、シアニン、ペリレンイミド、もしくはペリレンアミドまたはその誘導体である。さらにより多くの実施形態において、Mは、各存在において、独立して、クマリン染料、レゾルフィン染料、ジピロメテンボロンジフルオリド染料、ルテニウムピピリジル染料、エネルギー移動染料、チアゾールオレンジ染料、ポリメチンまたはN-アリール-1,8-ナフタルイミド染料である。

20

30

【0140】

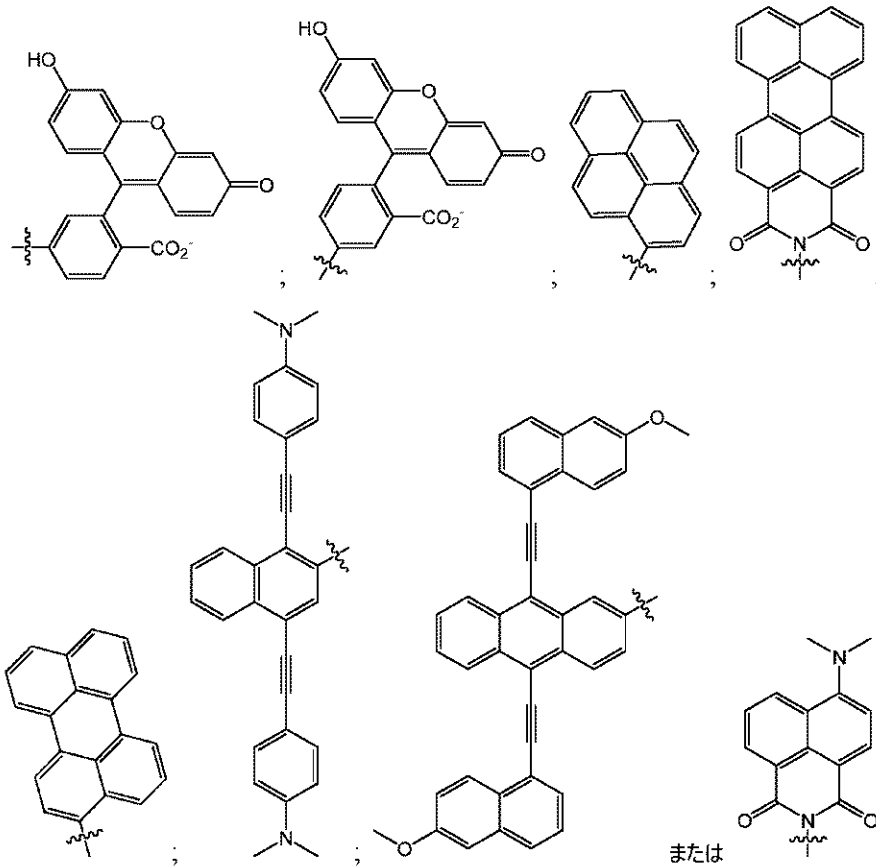
前述のうちのいずれかのさらにより多くの実施形態において、Mは、各存在において同じである。他の実施形態において、各Mは、異なる。さらにより多くの実施形態において、1個もしくはこれより多くのMは、同じであるか、または1個もしくはこれより多くのMは、異なる。

【0141】

いくつかの実施形態において、Mは、ピレン、ペリレン、ペリレンモノイミドもしくは6-FAMまたはその誘導体である。いくつかの他の実施形態において、Mは、以下の構造：

40

【化 1 4】



10

20

のうちの 1 つを有する。

【 0 1 4 2】

カルボン酸基を含む M 部分は、上記でアニオン形態 (CO_2^-) で示されるが、当業者は、これが、pH に依存して変わり、そのプロトン化形態 (CO_2H) が種々の実施形態において含まれることを理解する。

30

【 0 1 4 3】

いくつかの具体的実施形態において、構造 (I) の化合物は、表 2 から選択される化合物である。表 2 の中の化合物は、実施例に記載される手順に従って調製し、それらが何であるかを質量分析法によって確認した。

40

50

【表 2】

表 2. 構造 I の例示的化合物

番号	構造
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	
I-5	
I-6	
I-7	

【0144】

エントリー I - 6 および I - 7 において表 2 に使用される場合、および本出願全体を通じて示される場合、構造図の中に組み込まれた文字配列は、1 文字コードによって示されるアミノ酸配列を示す。

【0145】

表 2 中の化合物のある種の実施形態において、M は、以下の構造 (F'、E' または Y')

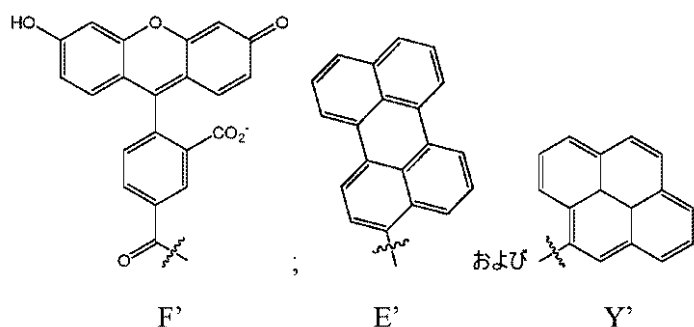
10

20

30

40

【化 1 5】



を有するフルオレセイン、ペリレンまたはピレン部分である。

【0146】

本開示の染料化合物は、「整調可能」であり、これは、前述の化合物のうちのいずれかにおいて変数を適切に選択することによって、当業者は、所望のおよび／または所定のモル蛍光（モル明度）を有する化合物に到達し得ることを意味する。上記化合物の整調可能性は、特定のアッセイにおいて、または目的の特定の分析物を同定するために使用するために、使用者が所望の蛍光および／または色を有する化合物に容易に到達することを可能にする。全ての変数は上記化合物のモル蛍光に対して影響を有し得るが、 m 、 n 、 L^4 および L^5 の適切な選択は、上記化合物のモル蛍光において重要な役割を果たすと考えられる。よって、一実施形態において、所望のモル蛍光を有する化合物を得るための方法が提供され、上記方法は、既知の蛍光を有するM部分を選択する工程、このMを含む構造（I）の化合物を調製する工程、および m 、 n 、 L^4 および L^5 に関して適切な変数を選択して、所望のモル蛍光を達成する工程を包含する。

【0147】

ある種の実施形態においてモル蛍光は、親発蛍光団（例えば、モノマー）の蛍光発光に対しての倍数増加または減少の点で表され得る。いくつかの実施形態において、本発明の化合物のモル蛍光は、上記親発蛍光団に対して $1.1\times$ 、 $1.5\times$ 、 $2\times$ 、 $3\times$ 、 $4\times$ 、 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $7\times$ 、 $8\times$ 、 $9\times$ 、 $10\times$ またはさらにはより高い。種々の実施形態は、 m 、 n 、 L^4 および L^5 の適切な選択によって、親発蛍光団に対して蛍光の所望の倍数増加を有する化合物を調製することを包含する。

【0148】

例証を容易にするために、リン部分（例えば、ホスフェートなど）を含む種々の化合物は、アニオン状態（例えば、 $-OPO(OH)O^-$ 、 $-OPO_3^{2-}$ ）で示される。当業者は、その電荷がpHに依存し、荷電していない（例えば、プロトン化または塩（例えば、ナトリウムもしくは他のカチオン））形態がまた、本発明の範囲に含まれることを容易に理解する。

【0149】

前述の化合物のうちのいずれかおよび1もしくはこれより多くの分析物分子（例えば、生体分子）を含む組成物は、種々の他の実施形態において提供される。いくつかの実施形態において、上記1もしくはより多くの分析物分子の検出のための分析方法でのこのような組成物の使用がまた、提供される。

【0150】

さらに他の実施形態において、上記化合物は、種々の分析法において有用である。例えば、ある種の実施形態において、本開示は、サンプルを染色するための方法を提供し、上記方法は、上記サンプルに構造（I）の化合物を、上記サンプルが適切な波長で照射される場合に光学的応答を生じるために十分な量で添加する工程を包含する。前述の方法のうちのいくつかの実施形態において、 R^2 は、分析物分子（例えば、生体分子）への共有結合を含むリンカーである。例えば、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマー（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）。さらにより多くの実施形態において、上記生体分

10

20

30

40

50

子は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである。

【0151】

前述の方法のうちのさらに他の実施形態において、 R^2 は、固体支持体（例えば、微粒子）への共有結合を含むリンカーである。例えば、いくつかの実施形態において、上記微粒子は、ポリマービーズまたは非ポリマービーズである。

【0152】

さらにより多くの実施形態において、上記光学的応答は、蛍光応答である。

【0153】

他の実施形態において、上記サンプルは、細胞を含み、いくつかの実施形態は、フローサイトメトリーによって上記細胞を観察する工程をさらに含む。

10

【0154】

さらにより多くの実施形態において、上記方法は、上記蛍光応答を、検出可能に異なる光学的特性を有する第2の発蛍光団のものから区別する工程をさらに包含する。

【0155】

他の実施形態において、本開示は、分析物分子（例えば、生体分子）を視覚的に検出するための方法を提供し、上記方法は、

（a） R^2 または R^3 は、該分析物分子への共有結合を含むリンカーである請求項1の化合物を提供する工程；および

（b）該化合物をその視覚的特性によって検出する工程、

20

【0156】

いくつかの実施形態において、上記分析物分子は、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマー（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）である。さらにより多くの実施形態において、上記分析物分子は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである。

【0157】

他の実施形態において、分析物分子（例えば、生体分子）を視覚的に検出するための方法が提供され、上記方法は、

（a）前述の化合物のうちのいずれかと1もしくはこれより多くの分析物分子とを混合する工程；および

30

（b）上記化合物をその視覚的特性によって検出する工程を包含する。

【0158】

他の実施形態において、分析物分子を視覚的に検出するための方法が提供され、上記方法は、

（a） R^2 または R^3 はQまたはQへの共有結合を含むリンカーである請求項1に記載の化合物と、上記分析物分子とを混合する工程；

（b）上記化合物および上記分析物分子の結合体を形成する工程；ならびに

（c）上記結合体を、その視覚的特性によって検出する工程、

40

を包含する。

【0159】

他の例示的方法は、分析物を検出するための方法を包含し、上記方法は、

（a） R^2 または R^3 は、上記分析物に対する特異性を有する標的化部分への共有結合を含むリンカーを含む構造（I）の化合物を提供する工程；

（b）上記化合物および上記分析物を混合し、それによって、上記標的化部分および上記分析物を会合させる工程；ならびに

（c）上記化合物を、例えば、その視覚的特性または蛍光特性によって検出する工程、を包含する。

【0160】

50

前述の方法のある種の実施形態において、分析物は、粒子（例えば、細胞）であり、上記方法は、フローサイトメトリーの使用を含む。例えば、上記化合物は、所望の細胞と選択的に会合させ、従って、任意の数の技術（例えば、視覚的または蛍光検出）によって上記細胞を検出可能にするための標的化部分（例えば、抗体）を提供される。適切な抗体は、所望の最終用途に依存して、当業者によって選択され得る。ある種の実施形態における使用のための例示的な抗体としては、UCHT1およびMOPC-21が挙げられる。

【0161】

本発明の化合物の実施形態は、従って、任意の数の方法において有用性が見出され、有用性としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：細胞計数；細胞ソーティング；生体マーカー検出；アポトーシスを定量する；細胞生存性を決定する；細胞表面抗原を同定する；全DNAおよび/またはRNA含有量を決定する；特異的核酸配列を（例えば、核酸プローブとして）同定する；および疾患（例えば、血液のがん）を診断する。

【0162】

いくつかの他の異なる実施形態において、構造（I）の化合物は、細胞分析のために様々な使用され得る。例えば、フローサイトメトリーの使用によって、上記化合物は、生細胞と死細胞との間を識別し、細胞の健康状態を評価し（例えば、壊死 対 早期のアポトーシス 対 後期のアポトーシス 対 生細胞）、細胞周期の間の倍数性および有糸分裂を追跡し、そして細胞増殖の種々の状態を決定するために使用され得る。理論によって拘束されることは望まないが、構造（I）の化合物の実施形態は、正に荷電した部分と優先的に結合すると考えられる。よって、いくつかの実施形態において、上記化合物は、正に荷電した部分を（例えば、リンカー-L⁴またはL⁵中に）含み、そしてインタクトでない細胞、例えば、壊死細胞の存在を決定するための方法において使用され得る。例えば、壊死細胞の存在は、細胞を含むサンプルと構造（I）の化合物とを混合すること、および上記混合物をフローサイトメトリーによって分析することによって決定され得る。構造（I）の化合物は、壊死細胞と結合し、従って、これらの存在は、フローサイトメトリー条件下で検出可能である。壊死細胞に結合するためにアミン反応性基を要する他の染色試薬とは対照的に、構造（I）の化合物を使用する染色法の実施形態は、タンパク質を含まないインキュベーション緩衝液を要せず、従って、上記方法は、関連する公知の方法より効率的に行われる。

【0163】

種々の他の実施形態において、上記化合物は、インタクトなもしくはインタクトでない細胞、アポトーシス小体、脱分極した膜および/または透過化した膜における正に荷電した部分の存在を決定するための関連法において使用され得る。

【0164】

上記の方法に加えて、構造（I）の化合物の実施形態は、種々の学問分野および方法における有用性（以下が挙げられるが、これらに限定されない：がん組織および他の組織の同定のための内視鏡検査手順における画像化；単一細胞および/または単一分子分析法、例えば、増幅がほぼないかもしくは全くないポリヌクレオチドの検出；例えば、がん細胞に優先的に結合する抗体もしくは糖または他の部分などの標的部分を構造（I）の化合物に含めることによるがんの画像化；手術手順における画像化；種々の疾患の同定のためのヒストンの結合；例えば、構造（I）の化合物におけるM部分を活性薬物部分で置き換えることによる薬物送達；ならびに/あるいは例えば、種々の叢および/または生物への構造（I）の化合物の優先的結合による歯科作業および他の手順における造影剤）が見出される。

【0165】

種々の他の実施形態において、構造（I）の化合物の調製に有用な化合物が提供される。上記化合物は、本明細書で記載されるように調製され得、次いで、M部分は、構造（I）の化合物を形成するために、任意の回数合成方法論（例えば、上記の「クリック」反応）を介してその化合物に共有結合され得る。よって、種々の実施形態において、以下の構造（II）：

10

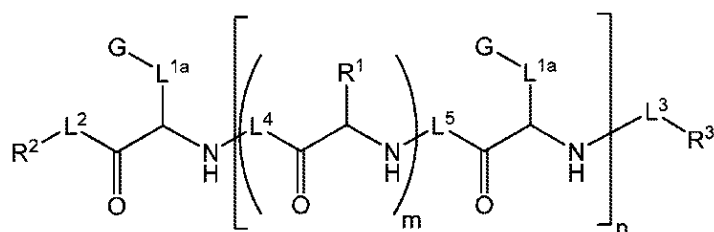
20

30

40

50

【化 1 6】



(II)

10

を有する化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体が提供され、ここで：

Gは、各存在において、独立して、相補的反応性基と共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

L^{1a}、L²、L³、L⁴およびL⁵は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R¹は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R²およびR³は、各々独立して、H、-OH、-SH、-NH₂、-CO₂H、アルキル、アルキルエーテル、アルコキシ、ヘテロアルキル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、Q、Qへの共有結合を含むリンカー、標的化部分への共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカー、固体支持体残基への共有結合を含むリンカーまたは構造(I)のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで上記アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；

20

Qは、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

mは、各存在において、独立して、0またはこれより大きな整数であり；そして

30

nは、1またはこれより大きな整数である。

【0 1 6 6】

構造(II)の他の実施形態において：

Gは、各存在において、独立して、相補的反応性基と共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

L^{1a}、L²、L³、L⁴およびL⁵は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R¹は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R²およびR³は、各々独立して、H、-OH、-SH、-NH₂、-CO₂H、アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、Q、Qへの共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカーまたは構造(I)のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで上記アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；

40

Qは、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

50

m は、各存在において、独立して、0 またはこれより大きな整数であり；そして
n は、1 またはこれより大きな整数である。

【0167】

構造 (II) の化合物中の G 部分は、M 部分上の相補的基と共有結合を形成するための適切な反応性基を有する基を含む任意の部分から選択され得る。例示的な実施形態において、その G 部分は、本明細書で記載される Q 部分のうちのいずれか (表 1 に提供される具体例が挙げられる) から選択され得る。いくつかの実施形態において、G は、各存在において、独立して、トリアゾールを形成するアジドおよびアルキンの銅触媒性反応 (ヒュッゲン 1, 3 - 双極環化付加反応)、ジエンおよびジエノフィルの反応 (ディールス - アルダー)、歪み促進性アルキン - ニトロ環化付加、歪みアルケンと、アジド、テトラジンまたはテトラゾールの反応、アルケンおよびアジドの [3 + 2] 環化付加、アルケンおよびテトラジン逆電子要請型ディールス - アルダー、アルケンおよびテトラゾール光化学反応、ならびに種々の置換反応 (例えば、求電子性原子に対する求核攻撃による脱離基の置換) が挙げられる反応に適切な部分を含む。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、G は、各存在において、独立して、アルデヒド、オキシム、ヒドラゾン、アルキン、アミン、アジド、アシルアジド、アシルハライド、ニトリル、ニトロ、スルフィド、ジスルフィド、スルホニルハライド、イソチオシアネート、イミドエステル、活性化エステル、ケトン、 α,β -不飽和カルボニル、アルケン、マレイミド、 α -ハロイミド、エポキシド、アジリジン、テトラジン、テトラゾール、ホスフィン、ピオチンまたはチラン官能基を含む部分である。

20

【0169】

他の実施形態において、G は、各存在において、独立して、アルキンまたはアジド基を含む。異なる実施形態において、G は、各存在において、独立して、相補的反応性基との反応に際して、アルケン、エステル、アミド、チオエステル、ジスルフィド、炭素環式、複素環式またはヘテロアリアル基を含む官能基を形成し得る反応性基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、ヘテロアリアルは、トリアゾリルである。

【0170】

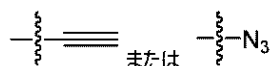
構造 (II) の他の実施形態において、各 L^{1a} は、非存在である。他の実施形態において、各 L^{1a} は存在し、例えば、 L^{1a} は、各存在において、独立して、ヘテロアルキレンである。

30

【0171】

化合物 (II) の前述の実施形態のうちのいずれかの他のものにおいて、G は、各存在において、独立して、

【化 17】



である。

【0172】

40

構造 (II) のいくつかの実施形態において、少なくとも 1 個の R^1 は、中性アミノ酸側鎖、例えば、H またはアルキルである。

【0173】

構造 (II) の他の実施形態において、少なくとも 1 個の R^1 は、荷電したアミノ酸の側鎖、例えば、アミジニル、グアニジニルまたはイミダゾリル基を含む側鎖である。

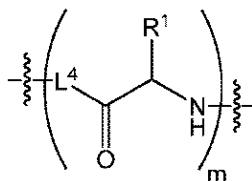
【0174】

構造 (II) の他の実施形態において、 R^1 は、各存在において、独立して、H、アルキル、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$ またはイミダゾリルである。

【0175】

50

構造 (I I) の種々の他の実施形態において、 R^1 、 L^4 および m は、
【化 18】

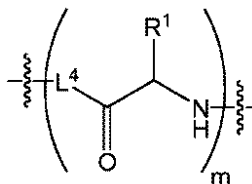


が (G)₁₀、(G D G D G D G D G D) または (G K G K G K G K G K) というアミノ酸配列を有するように選択される。

10

【0176】

構造 (I I) の異なる実施形態において、 R^1 、 L^4 および m は、
【化 19】



が α -ヘリックスまたは β -シート二次構造を形成できるアミノ酸配列を有するように選択される。例えば、いくつかの実施形態において、上記アミノ酸配列は、(G G E E F M L V Y K F A R K H G G) または (G G M S M V V S G G) である。

20

【0177】

構造 (I I) の異なる実施形態において、 L^4 および L^5 は、各存在において非存在である。他の実施形態において、 L^4 もしくは L^5 、または両方は、少なくとも 1 個の存在について存在する。例えば、いくつかの実施形態において、存在する場合、 L^4 もしくは L^5 、または両方は、ヘテロアルキレンリンカーである。

【0178】

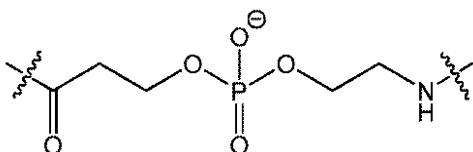
L^4 および / または L^5 は、荷電部分を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、 L^4 および / または L^5 は、水性溶液中で 3 ~ 11 の範囲に及ぶ pH 値において正電荷または負電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。いくつかの実施形態において、 L^4 および / または L^5 は、水性溶液中で 3 ~ 11 の範囲に及ぶ pH 値において正電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。いくつかの実施形態において、 L^4 および / または L^5 は、水性溶液中で 3 ~ 11 の範囲に及ぶ pH 値において負電荷を維持できる官能基を含むヘテロアルキレンリンカーである。

30

【0179】

構造 (I I) のいくつかの実施形態において、 L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも 1 個の存在、または両方は、以下の構造：

【化 20】



40

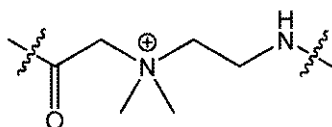
を有する。

【0180】

構造 (I I) の他の実施形態において、 L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも 1 個の存在、または両方は、以下の構造：

50

【化 2 1】



を有する。

【0181】

構造(II)のより多くの実施形態において、 L^2 および L^3 は、各存在において、独立して、非存在またはヘテロアルキレンリンカーである。例えば、いくつかの実施形態において、上記ヘテロアルキレンリンカーは、アミノ酸またはペプチジルリンカーである。

10

【0182】

構造(II)の他の種々の実施形態において、 R^2 は、 $-NH_2$ である。他の実施形態において、 R^3 は、Q、Qへの共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである。

【0183】

構造(II)の化合物のさらに他の実施形態において、Qは、各存在において、独立して、分析物分子または固体支持体と共有結合を形成できる反応性基を含む部分である。他の実施形態において、Qは、各存在において、独立して、相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分である。例えば、いくつかの実施形態において、Qは、構造(II)のさらなる化合物上に(例えば、 R^2 位または R^3 位に)存在し、QおよびQは、構造(II)の化合物および構造(II)のさらなる化合物の反応が構造(II)の化合物の共有結合したダイマーを生じるように、相補的反応性基を含む。構造(II)のマルチマー化合物はまた、類似の様式で調製され得、本発明の実施形態の範囲内に含まれる。

20

【0184】

Q基のタイプおよび構造(II)の化合物の残部へのQ基の結合性は、Qが、所望の結合を形成するために適切な反応性を有する部分を含むことを条件として、限定されない。

【0185】

構造(II)の化合物のある種の実施形態において、Qは、水性条件下で加水分解されにくい、分析物分子または固体支持体上の対応する基(例えば、アミン、アジドまたはアルキン)との結合を形成するために十分に反応性である部分である。

30

【0186】

構造(II)の化合物のある種の実施形態は、生体接合反応の分野において一般に使用されるQ基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、Qは、求核性反応性基、求電子性反応性基または環化付加反応性基を含む。いくつかのより具体的な実施形態において、Qは、スルフヒドリル、ジスルフィド、活性化エステル、イソチオシアネート、アジド、アルキン、アルケン、ジエン、ジエノフィル、酸ハライド、スルホンハライド、ホスフィン、 α -ハロアミド、ピオチン、アミノまたはマレイミド官能基を含む。いくつかの実施形態において、活性化エステルは、N-スクシンイミドエステル、イミドエステルまたはポリフルオロフェニルエステルである。他の実施形態において、アルキンは、アルキルアジドまたはアシルアジドである。

40

【0187】

構造(II)の化合物についての例示的なQ部分は、上記の表Iで提供される。

【0188】

構造(I)の化合物と同様に、構造(II)の化合物のいくつかの実施形態において、QがSHである場合、そのSH部分は、構造(II)の別の化合物上の別のスルフヒドリル基とともにジスルフィド結合を形成する傾向にある。よって、いくつかの実施形態は、ジスルフィドダイマーの形態にあり、そのジスルフィド結合がSH-Q基に由来する構造(II)の化合物を含む。

50

【0189】

構造(II)の化合物のいくつかの他の実施形態において、 R^2 または R^3 のうちの一方は、分析物への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである。例えば、いくつかの実施形態において、分析物分子は、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマーである。他の実施形態において、分析物は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである。さらに異なる実施形態において、固体支持体は、ポリマービーズまたは非ポリマービーズである。

【0190】

構造(II)の化合物の他の実施形態において、 m は、各存在において、独立して、1 ~ 20の整数である。例えば、いくつかの実施形態において、 m は、各存在において、独立して、1 ~ 10の整数、例えば、1、2、3、4または5である。いくつかの実施形態において、 m は、1である。いくつかの実施形態において、 m は、2である。いくつかの実施形態において、 m は、3である。いくつかの実施形態において、 m は、4である。いくつかの実施形態において、 m は、5である。

10

【0191】

構造(II)の化合物のさらに異なる実施形態において、 n は、1 ~ 100の整数である。例えば、いくつかの実施形態において、 n は、1 ~ 10の整数である。いくつかの実施形態において、 n は、1である。いくつかの実施形態において、 n は、2である。いくつかの実施形態において、 n は、3である。いくつかの実施形態において、 n は、4である。いくつかの実施形態において、 n は、5である。いくつかの実施形態において、 n は、6である。いくつかの実施形態において、 n は、7である。いくつかの実施形態において、 n は、8である。いくつかの実施形態において、 n は、9である。いくつかの実施形態において、 n は、10である。

20

【0192】

他の異なる実施形態において、構造(II)の化合物は、表3から選択される。

30

40

50

【表 3】

表 3. 構造 (II) の例示的化合物

番号	構造
II-1	
II-2	
II-3	
II-4	
II-5	
II-6	
II-7	

【0193】

種々の実施形態において、表 3 の化合物における G は、アルキニル、例えば、エチニルである。他の実施形態において、表 3 の化合物における G は、アジドである。

【0194】

構造 (II) の化合物は、種々の方法において使用され得、例えば、実施形態では、分析物分子を標識するための方法が提供され、上記方法は、

(a) R^2 または R^3 は、Q または Q への共有結合を含むリンカーである構造 (II) の記載される化合物のうちのいずれかと、上記分析物分子とを混合する工程；

(b) 上記化合物および上記分析物分子の結合体を形成する工程；ならびに

(c) 上記結合体と式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを反応させ、それによって、少なくとも 1 個の G および少なくとも 1 個の G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程、
を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択肢的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；そして

G は、G に対する相補的反応性基である。

【0195】

異なる実施形態は、分析物分子を標識するための方法であり、上記方法は、

(a) R^2 または R^3 は Q または Q への共有結合を含むリンカーである本明細書で開示される構造 (II) の化合物のうちのいずれかと、式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程；ならびに

(b) 工程 (A) の生成物と上記分析物分子とを反応させ、それによって、工程 (A) の生成物および上記分析物分子の結合体を形成する工程、
を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択肢的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；そして

G は、G に対する相補的反応性リンカーである。

【0196】

さらに、上記で注記されるように、構造 (II) の化合物は、構造 (I) の化合物を調製するために有用である。よって、一実施形態において、構造 (I) の化合物を調製するための方法が提供され、上記方法は、構造 (II) の化合物と式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択肢的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；そして

G は、G に対する相補的反応性リンカーである。

【0197】

構造 (I) または (II) の化合物のうちの任意の実施形態 (上で示されるとおり) ならびに構造 (I) または (II) の化合物において R^1 、 R^2 、 R^3 、 L^1 、 L^{1a} 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、M、G、m および n の変数について本明細書で示される任意の具体的選択 (上で示されるとおり) は、独立して、構造 (I) または (II) の化合物の他の実施形態および / または変数と組み合わせられて、上では具体的には示されない本発明の実施形態を形成し得ることは理解される。さらに、選択肢のリストが、特定の実施形態および / または請求項における任意の特定の R^1 、 R^2 、 R^3 、 L^1 、 L^{1a} 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 L^5 、M、G、m および n の変数に関して列挙される場合において、各個々の選択は、上記特定の実施形態および / または請求項から削除され得ること、ならびにその残りの選択の列挙は、本発明の範囲内にあると考えられることは、理解される。

【0198】

本明細書において、示される式の置換基および / または変数の組み合わせは、このような寄与が安定な化合物を生じる場合にのみ許容可能であることは、理解される。

【0199】

本明細書で記載されるプロセスにおいて、中間体化合物の官能基が、適切な保護基によ

10

20

30

40

50

って保護される必要があり得ることはまた、当業者によって認識される。このような官能基としては、ヒドロキシ、アミノ、メルカプトおよびカルボン酸が挙げられる。ヒドロキシの適切な保護基としては、トリアルキルシリルまたはジアリアルキルシリル（例えば、*t*-ブチルジメチルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリルまたはトリメチルシリル）、テトラヒドロピラニル、ベンジルなどが挙げられる。アミノ、アミジノおよびグアニジノの適切な保護基としては、*t*-ブトキシカルボニル、ベンジロキシカルボニルなどが挙げられる。メルカプトの適切な保護基としては、 $-C(O)-R''$ （ここで R'' は、アルキル、アリールまたはアリールアルキルである）、*p*-メトキシベンジル、トリチルなどが挙げられる。カルボン酸の適切な保護基としては、アルキル、アリールまたはアリールアルキルエステルが挙げられる。保護基は、当業者に公知でありかつ本明細書に記載され

10

【0200】

さらに、遊離塩基または酸形態で存在する全ての本発明の化合物（すなわち、構造（I）および（II）の化合物）は、当業者に公知の方法による適切な無機塩基もしくは有機塩基または無機酸もしくは有機酸での処理によって、それらの塩に変換され得る。本発明の化合物の塩は、標準的技術によってそれらの遊離塩基形態または遊離酸形態へと変換され得る。

20

【0201】

本明細書に記載される化合物を作製するための例示的方法が、実施例に提供される。当業者がこれら化合物を類似の方法によってまたは当業者に公知の他の方法を組み合わせることによって作製する能力があり得ることは、理解される。当業者が以下に記載されるのと類似の様式で、適切な出発構成要素を使用し、必要な場合には、合成のパラメーターを改変することによって、以下で具体的に例証されない構造（I）の他の化合物を作製し得ることもまた、理解される。一般に、出発構成要素は、Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis, Inc.、Maybridge、Matrix Scientific、TCI、およびFluorochem USAなどのような供給

30

源から得られ得るか、または当業者に公知の出典に従って合成され得る（例えば、Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure、5th edition (Wiley, December 2000)を参照のこと）か、または本発明において記載されるとおり調製され得る。

【0202】

以下の実施例は、例証目的で提供されるのであって、限定目的で提供されるのではない。

【実施例】

【0203】

一般的方法

40

¹HおよびNMRスペクトルを、JEOL 400MHz分光計で得る。¹Hスペクトルは、TMSを基準とする。逆相HPLC染料分析を、45℃で保持した2.1mm×50mm Acquity BEH-C18カラム付きのWaters Acquity UHPLCシステムを使用して行う。質量分析を、Waters/Micromass QuattroマイクロMS/MSシステムで（MSのみモードで）、MassLynx 4.1獲得ソフトウェアを使用して行う。染料に関してLC/MSに使用する移動相は、100mM 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）、8.6mM トリエチルアミン（TEA）、pH 8である。ホスホロアミダイトおよび前駆体分子を、ダイオードアレイ検出器および高速オートサンプラーを備えるAgilent Infinity 1260 UHPLCシステムを使用して、AppTec (C) Sp

50

irritTM Peptide C18カラム(4.6mm×100mm、5μmの粒子サイズ)を使用して、分析する。励起および発光プロフィール実験を、Cary Eclipse分光光度計で記録する。

【0204】

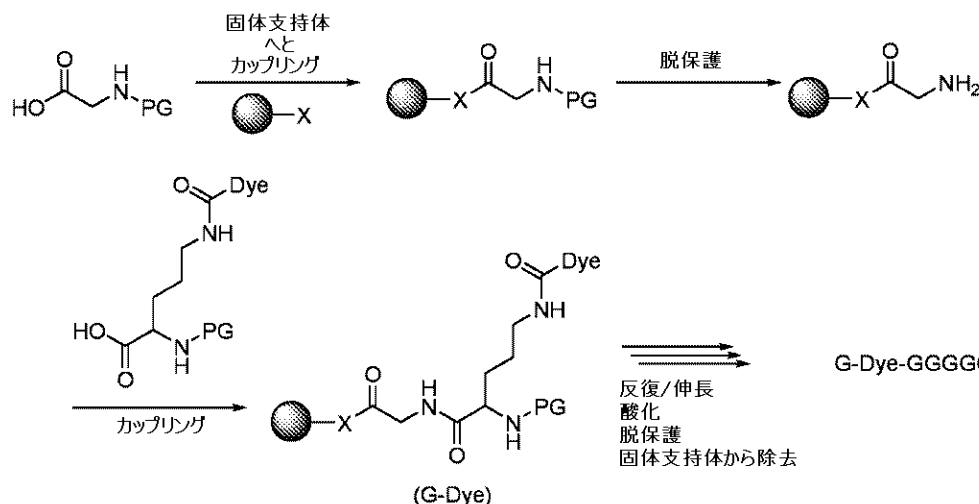
全ての反応を、別段述べられなければ、窒素雰囲気下でオープン乾燥したガラス器具の中で行う。

【0205】

実施例 1

固相合成を介するペプチド骨格の一般的合成

【化22】



【0206】

上記の反応スキームは、構造(I)の化合物の調製に有用な中間体を調製するための例示的方法を図示する(ここでPGは、適切な保護基であり、Xは、ペプチド鎖が上に構築され得る官能基ユニットであり、影付きの円は、適切な固相支持体であり、Dyeは、F'、E'、またはY'である)。

【0207】

小さな多孔性ビーズを、官能基ユニットで最初に処理し、これらが多孔性ビーズの表面に結合する。ペプチド鎖をその官能基ユニット部位上に構築し、それらは切断されるまで、ビーズに共有結合したままになる。結合するとき、ペプチド鎖を固相に固定化し、濾過プロセスの間に保持し、ここでその合成の液体試薬および副生成物を洗い流す。

【0208】

固相合成の一般的サイクルは、脱保護 - 洗浄 - カップリング - 洗浄の反復サイクルのうちの1つである。ペプチドの遊離N末端アミン(固相に結合されている)は、(例えば、FmocまたはBocで)N-保護されたアミノ酸基にカップリングされる。新たに導入したアミノ酸ユニットを脱保護して、新たなN末端アミンを現し、これをさらなるアミノ酸とさらに反応させる。このプロセスを反復し、ペプチド鎖を伸長する。

【0209】

そのペプチド鎖が、全ての所望のアミノ酸およびモノマーユニットを組み込んだとき、そのペプチド鎖をビーズから切断する。切断試薬(例えば、無水フッ化水素またはトリフルオロ酢酸)を使用して、ペプチド鎖をビーズから切断し得る。次いで、そのペプチド鎖を集め、精製し、特徴付ける。

【0210】

実施例 2

オリゴマー染料の一般的特徴付け

【0211】

1 mL の脱イオン水を、乾燥染料化合物に添加して、約 0.3 ~ 1.0 mM (後に決定) の濃ストックを再構成および確立する。各染料構築物のアリコート、HPLC-MS によって分析して、同一性および相対的純度を決定する。エレクトロスプレーイオン化を使用して、その染料配列の分子量を決定し、不純物を特徴付ける一助とする。

【0212】

サンプルを、マイクロピペッターを使用して濃ストックから採取し、0.1 x PBS 中で、NanoDrop UV-vis 分光光度計 (Thermo Scientific) の線形範囲内であるように適切に (1x ~ 100x) 希釈する。ブランクの測定を、0.1 x PBS を使用して NanoDrop で行い、次いで、希釈した染料連続物の吸光度を適切な波長で記録する。吸光係数 () を、染料構築物中の蛍光体 (M 部分) の総数によって、上記連続物に存在する各フルオレセイン (F; 494 nm での読み取り) に関しては 75,000 $M^{-1} cm^{-1}$; 各ピレン (Y; 343 nm での読み取り) に関しては 34,500; および各ペリレン (E; 440 nm での読み取り) に関しては 40,000 を使用して決定する。スペーサーは、 に関して何ら影響を有しないと推測される。

10

【0213】

染料のモル濃度を、式 $\{A_{494} / (L \times \text{Dye})\} \times \text{希釈因子}$ に従って決定する。濃度を決定するとともに、染料ストックを NaPO₄ 緩衝液 (pH 7.5 で 0.1 M) および NaCO₃ 緩衝液 (pH 9.0 で 0.1 M) 中で希釈して、最終容積約 3.5 mL において 2 μM (または 5 μM (上記機器の線形範囲で機能するものなんでも)) の溶液を作製する。これら溶液を、UV/Vis によってスキャンし、次いで、それらを使用して、10 ~ 50 nM の範囲において、蛍光計での読み取りに適切な緩衝液中で第 2 の希釈物を作製する。必要な濃度は、M 部分が何であるかに依存して変動する。

20

【0214】

実施例 3

一般的なフローサイトメトリー法および適用

【0215】

一般的なフローサイトメトリー作業フローは、以下の工程を包含する:

1. 細胞を培養し、代謝ストレスの徴候に関して細胞を視覚的に観察する、および / または新鮮な、誘導された、もしくは刺激された細胞を使用する。
2. 染料化合物を作業容積へと希釈する。
3. 殺傷もアポトーシスの誘導もなく、細胞を採取および調製する。
4. 細胞を遠心分離し、適切な緩衝液で洗浄する。
5. 血球計算板およびトリパンブルー排除法を使用して細胞計数を行う。
6. 細胞を遠心分離および洗浄する。
7. 細胞密度を試験サイズへと調節する。
8. 染料 (予め希釈) または他の目的の同時染色剤を適用する。
9. 細胞 / 染色剤 / 染料混合物をインキュベートする。
10. 細胞を遠心分離し、適切な緩衝液で洗浄する。
11. 細胞を獲得緩衝液中で再懸濁する。
12. 細胞データをフローサイトメトリーによって獲得する。

30

40

【0216】

上記の一般的な作業フローを、具其他的な適用に従って改変し得る。具体的な適用のためのいくつかの改変を、以下に記載する。

【0217】

生 / 死区別

細胞を、壊死 (necrotic) 細胞を陽性染色することによって生存性に関して試験して、損傷細胞と無傷の細胞とを比較する。アッセイを使用して、正に荷電した部分、細胞デブリ、アポトーシス小体、脱分極した細胞膜、および透過化膜を有する無傷でない (固定および非固定の) 細胞を標的化する。次いで、細胞を、慣用的な細胞調製物 (新鮮または固定) を使用して染料で染色し、フローサイトメトリーを使用して分析する。

50

【0218】

細胞の健康状態

死細胞（すなわち、壊死細胞）、早期アポトーシス、後期アポトーシス、および生細胞の間で比較を行う。死細胞を陽性染色し、アポトーシス小体を中間に染色し、生細胞を陰性のままにする。この戦略は、非常に明るい壊死細胞を生じ、細胞透過性を評価するためにも機能する。アッセイを使用して、正に荷電した部分、細胞デブリ、アポトーシス小体、脱分極した細胞膜、および透過化膜を有する無傷でない（固定および非固定の）細胞を標的化する。染料での染色を、インビトロ培養物、初代細胞、および生体異物で処理したサンプルに対して行い、フローサイトメトリーを使用して分析する。

【0219】

細胞周期

細胞倍数性および有糸分裂、細胞周期を、核酸および細胞周期関連タンパク質を含む全ての細胞および細胞小体において、陽性染色DNAインターカラーに相関した染色によって追跡する。アッセイを使用して、正に荷電した部分、細胞デブリ、アポトーシス小体、脱分極した細胞膜、および透過化膜を有する無傷でない（非固定のみ）細胞を標的化する。アッセイを使用して、細胞を保存し、固定し、細胞内染色のために透過化した後の正に荷電した部分を染色することによって、無傷の（固定および透過化した）細胞を標的化する。染料での染色（他の染料と併用して）を、インビトロ培養物、初代細胞、および生体異物で処理したサンプルに対して行い、フローサイトメトリーを使用して分析する。

【0220】

増殖

細胞増殖を、核酸および細胞周期関連タンパク質を含む全ての細胞および細胞小体において、陽性染色DNAインターカラーに相関した染色によってモニターする。アッセイを使用して、正に荷電した部分、細胞デブリ、アポトーシス小体、脱分極した細胞膜、および透過化膜を有する無傷でない（非固定のみ）細胞を標的化する。アッセイを使用して、細胞を保存し、固定し、細胞内染色のために透過化した後の正に荷電した部分を染色することによって、無傷の（固定および透過化した）細胞を標的化する。染料での染色（細胞増殖に関するマーカー、例えば、Ki67、BRDUをモニターすることと併用して）を、インビトロ培養物、初代細胞、および生体異物で処理したサンプルに対して行い、フローサイトメトリーを使用して分析する。

【0221】

実施例4

Jurkat細胞の細胞培養

【0222】

Jurkat細胞（Clone E6-1；ATCC（登録商標）TIB-152^TM）は、末梢血組織において見出されるヒトリンパ球細胞であり、急性T細胞白血病のモデルを作るために使用される。細胞を、RPMI-1640培地、ウシ胎仔血清10%、0.1M HEPES、PenStrepおよびL-グルタミン中で培養する。

【0223】

1×10^5 生細胞/mL ~ 5×10^6 細胞/mLの間で新鮮な培地を追加するかまたは培地を交換することによって、培養物を維持する。あるいは、遠心分離とその後の 1×10^5 生細胞/mLでの再懸濁によって、培養物を確立する。新鮮な培地を、細胞密度に依存して、2~3日ごとに追加する。

【0224】

実施例5

Ramos細胞の細胞培養

【0225】

Ramos（RA 1；ATCC CRL-1596）は、ヒトBリンパ球であり、パーキットリンパ腫（American）のモデルを作るために使用される。細胞を、RPMI-1640培地（熱非働化ウシ胎仔血清10%、0.1 HEPES、PenStr

10

20

30

40

50

e p および L - グルタミンを含む) 中で培養する。

【 0 2 2 6 】

1 × 1 0 ⁵ 生細胞 / m L ~ 5 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L の間で新鮮な培地を追加するかまたは培地を交換することによって、培養物を維持する。あるいは、遠心分離とその後の 1 × 1 0 ⁵ 生細胞 / m L での再懸濁によって、培養物を確立する。新鮮な培地を、細胞密度に依存して、2 ~ 3 日ごとに追加する。

【 0 2 2 7 】

実施例 6

細胞死を誘導し、死細胞を回収するための一般的手順

【 0 2 2 8 】

培養した細胞を、インビトロで壊死およびアポトーシスへと誘導し、死細胞、細胞デブリ、およびアポトーシス小体を形成する。熱ストレスおよび / または代謝ストレスを導入することによって、細胞を誘導する。熱ストレスを、培養物を 5 7 ~ 6 0 °C、3 ~ 5 分間に供し、次いで、細胞培養物を氷へと 1 0 分間移すことによって行う。代謝ストレスを、対数増殖期後混み合い (c r o w d i n g)、毒素、または生体異物処理 (例えば、1 0 n M カンプトテシン (m a p t o t h e c i n)) によって行う。新鮮な細胞を、培養物を処理なしに供することによって維持する。

【 0 2 2 9 】

細胞調製物を、染色緩衝液に再懸濁し、次いで、6 0 ~ 8 0 % の間の無傷な細胞の生きている集団 (すなわち、フローサイトメトリーパラメーター F S C 対 S S C を使用して、形態によって測定される場合に 2 0 ~ 4 0 % の無傷でない細胞デブリ様事象) を目標とする比で混合する。細胞生存性を、生 / 死トリパンブルー排除法によって、または 7 - アミノアクチノマイシン D (7 - A A D) によって、フローサイトメトリーで微視的に検証する。いくつかの実験では、誘導性 / 非誘導性の細胞の混合物は、不要である。代わりに、3 0 ~ 4 0 % の壊死細胞およびアポトーシス細胞を含む代謝ストレスを受けている対数増殖期後培養物を、使用する。

【 0 2 3 0 】

実施例 7

J u r k a t 細胞および R a m o s 細胞の細胞死の誘導および死細胞の回収

【 0 2 3 1 】

対数増殖期中期の J u r k a t 細胞および R a m o s 細胞、または初代 P B M C 細胞を、死細胞および細胞デブリを形成するために、インビトロで壊死へと誘導する。細胞を、培養した細胞を、先ず 5 8 °C へと 3 ~ 5 分間供し、次いで、それらを氷に 1 0 ~ 1 5 分間移すことによって、熱ストレスによって誘導する。新鮮な細胞を、培養物を処置なしに供することによって維持する。

【 0 2 3 2 】

細胞を、C a ⁺⁺ / M g ⁺⁺ を含む 1 × D B S 中に、1 0 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L の細胞密度で再懸濁する。次いで、新鮮な細胞 (約 8 % 壊死) およびストレスを受けた細胞 (約 2 0 % 壊死) を、以下の比で混合して、生細胞 対 壊死細胞の測定可能な勾配を生成する：

- 1 . 1 0 0 % 生 : 0 % 死
- 2 . 5 0 % 生 : 5 0 % 死
- 3 . 2 5 % 生 : 7 5 % 死
- 4 . 1 2 . 7 5 % 誘導なし : 8 5 . 2 5 % 誘導あり
- 5 . 6 % 誘導なし : 9 4 % 誘導あり

【 0 2 3 3 】

予測した生存性は、8 ~ 3 0 % の範囲に及ぶ。開始時および終了時の生存性を、フローサイトメトリーによる 7 - アミノアクチノマイシン D (7 - A A D) またはトリパン (t y p a n) ブルー排除法によって検証する

【 0 2 3 4 】

本明細書において言及される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、

10

20

30

40

50

外国特許出願および非特許刊行物の全ては、本記載と矛盾しない程度までそれらの全体において本明細書に参考として援用される。

【 0 2 3 5 】

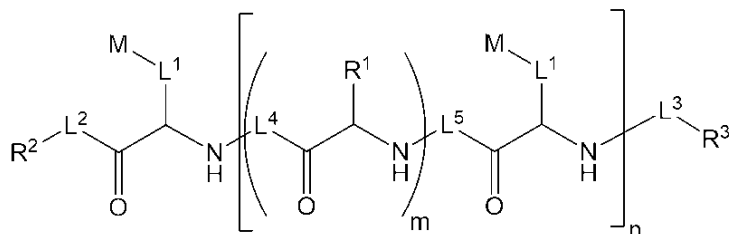
前述から、本発明の具体的実施形態が例証目的のために本明細書に記載されてきたものの、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、種々の改変がなされ得ることは認識される。よって、本発明は、添付の特許請求の範囲による場合を除いて限定されない。

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 〕

以下の構造 (I) :

【 化 2 3 】



(I)

を有する化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体であって、ここで：

Mは、各存在において、独立して、2個またはこれより多くの炭素-炭素二重結合および少なくとも1の共役度を含む部分であり；

L¹は、各存在において、独立して、i) 選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンもしくはヘテロアルキニレンリンカー；またはii) 2個の相補的反応性基の反応によって形成できる官能基を含むリンカー、のいずれかであり；

L²、L³、L⁴およびL⁵は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R¹は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R²およびR³は、各々独立して、H、-OH、-SH、-NH₂、-CO₂H、アルキル、アルキルエーテル、アルコキシ、ヘテロアルキル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、Q、Qへの共有結合を含むリンカー、標的化部分への共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカー、固体支持体残基への共有結合を含むリンカーまたは構造 (I) のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで該アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；Qは、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

mは、各存在において、独立して、0またはこれより大きな整数であり；そして

nは、1またはこれより大きな整数である、

化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体。

〔 2 〕

少なくとも1個のR¹は、中性アミノ酸側鎖である、前記〔 1 〕に記載の化合物。

〔 3 〕

少なくとも1個のR¹は、荷電したアミノ酸側鎖である、前記〔 1 〕または〔 2 〕のいずれ

か 1 項に記載の化合物。

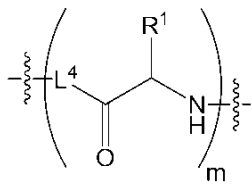
〔 4 〕

R^1 は、各存在において、独立して、H、アルキル、 $-CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CO_2^-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_3^+$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NHC(=NH_2^+)NH_2$ またはイミダゾリルである、前記〔 1 〕～〔 3 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 5 〕

R^1 、 L^4 および m は、

【化 2 4】



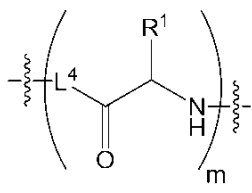
10

が (G)₁₀、(GDGDGDGDGD) または (GKGKGKGKGK) というアミノ酸配列を有するように選択される、前記〔 1 〕～〔 4 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 6 〕

R^1 、 L^4 および m は、

【化 2 5】



20

が - ヘリックスまたは - シート二次構造を形成できるアミノ酸配列を有するように選択される、前記〔 1 〕に記載の化合物。

〔 7 〕

前記アミノ酸配列は、(GGEELVYKFARKHGG) または (GGMSSMVVSGG) である、前記〔 6 〕に記載の化合物。

30

〔 8 〕

L^4 および L^5 は、各存在において非存在である、前記〔 1 〕～〔 7 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 9 〕

L^4 もしくは L^5 、または両方が、少なくとも 1 個の存在に関して存在する、前記〔 1 〕～〔 7 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 1 0 〕

存在する場合、 L^4 もしくは L^5 、または両方が、ヘテロアルキレンリンカーである前記〔 9 〕に記載の化合物。

〔 1 1 〕

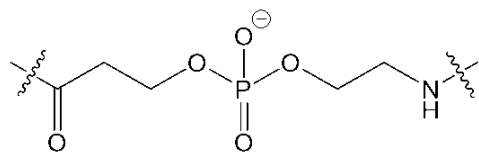
前記ヘテロアルキレンリンカーは、水性溶液中で 3 ～ 11 の範囲に及ぶ pH 値において正電荷または負電荷を維持できる官能基を含む、前記〔 1 0 〕に記載の化合物。

40

〔 1 2 〕

L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも 1 個の存在、または両方は、以下の構造：

【化 2 6】

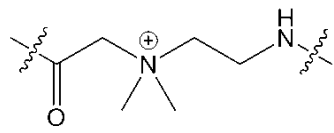


を有する、前記〔 1 1 〕に記載の化合物。

〔 1 3 〕

L^4 もしくは L^5 のうちの少なくとも 1 個の存在、または両方は、以下の構造：

【化 2 7】



を有する、前記〔 1 1 〕に記載の化合物。

〔 1 4 〕

L^1 は、各存在において、アルキレンまたはヘテロアルキレンリンカーである、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 1 5 〕

L^1 は、各存在において、2 個の相補的反応性基の反応によって形成できる官能基を含むリンカーである、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 1 6 〕

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、前記官能基は、アルデヒド、オキシム、ヒドラゾン、アルキン、アミン、アジド、アシルアジド、アシルハライド、ニトリル、ニトロソ、スルフィド、ジスルフィド、スルホニルハライド、イソチオシアネート、イミドエステル、活性化エステル、ケトン、 α,β -不飽和カルボニル、アルケン、マレイミド、 α,β -ハロイミド、エポキシド、アジリジン、テトラジン、テトラゾール、ホスフィン、ピオチンまたはチラン官能基と、相補的反応性基との反応によって形成できる、前記〔 1 5 〕に記載の化合物。

〔 1 7 〕

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、前記官能基は、アルキンおよびアジドの反応によって形成できる、前記〔 1 5 〕に記載の化合物。

〔 1 8 〕

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、前記官能基は、アルケン、エステル、アミド、チオエステル、ジスルフィド、炭素環式、複素環式またはヘテロアリール基を含む、前記〔 1 5 〕に記載の化合物。

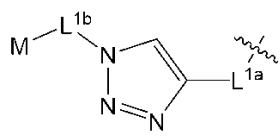
〔 1 9 〕

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 L^1 は、トリアゾリル官能基を含むリンカーである、前記〔 1 5 〕に記載の化合物。

〔 2 0 〕

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 L^1 -M は、以下の構造：

【化 2 8】



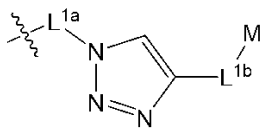
を有し、ここで L^{1a} および L^{1b} は、各々独立して、選択肢的なリンカーである、前記〔 1

5] に記載の化合物。

[2 1]

L^1 の少なくとも 1 個の存在に関して、 $L^1 - M$ は、以下の構造：

【化 2 9】



を有し、ここで L^1a および L^1b は、各々独立して、選択的なリンカーである、前記 [1 5] に記載の化合物。

10

[2 2]

L^1a もしくは L^1b 、または両方が、非存在である、前記 [2 0] または [2 1] のいずれか 1 項に記載の化合物。

[2 3]

L^1a もしくは L^1b 、または両方が、存在する、前記 [2 0] または [2 1] にいずれか 1 項に記載の化合物。

[2 4]

L^1a および L^1b は、存在する場合、各々独立して、アルキレンまたはヘテロアルキレンである、前記 [2 3] に記載の化合物。

20

[2 5]

L^2 および L^3 は、独立して、非存在またはヘテロアルキレンリンカーである、前記 [1] ~ [1 7] のいずれか 1 項に記載の化合物。

[2 6]

前記ヘテロアルキレンリンカーは、ペプチジルリンカーである、前記 [2 5] に記載の化合物。

[2 7]

R^2 は、 $-NH_2$ である、前記 [1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の化合物。

[2 8]

R^3 は、Q、Q への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである、前記 [1] ~ [2 7] のいずれか 1 項に記載の化合物。

30

[2 9]

Q は、求核性反応性基、求電子性反応性基または環化付加反応性基を含む、前記 [1] ~ [2 8] のいずれか 1 項に記載の化合物。

[3 0]

Q は、スルフヒドリル、ジスルフィド、活性化エステル、イソチオシアネート、アジド、アルキン、アルケン、ジエン、ジエノフィル、酸ハライド、スルホニルハライド、ホスフィン、 $-H$ ロアミド、ピオチン、アミノまたはマレイミド官能基を含む、前記 [2 9] に記載の化合物。

[3 1]

前記活性化エステルは、N - スクシンイミドエステル、イミドエステルまたはポリフルオロフェニルエステルである、前記 [3 0] に記載の化合物。

40

[3 2]

前記アジドは、アルキルアジドまたはアシルアジドである、前記 [3 0] に記載の化合物。

[3 3]

Q は、表 1 から選択される部分である、前記 [1] ~ [2 8] のいずれか 1 項に記載の化合物。

[3 4]

R^2 または R^3 のうちの一方は、分析物分子への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである、前記 [1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の化合

50

物。

〔 3 5 〕

前記分析物分子は、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマーである、前記〔 3 4 〕に記載の化合物。

〔 3 6 〕

前記分析物分子は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである、前記〔 3 4 〕に記載の化合物。

〔 3 7 〕

前記固体支持体は、ポリマービーズまたは非ポリマービーズである、前記〔 3 4 〕に記載の化合物。

〔 3 8 〕

mは、各存在において、独立して、1 ~ 2 0 の整数である、前記〔 1 〕 ~ 〔 3 7 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 3 9 〕

mは、各存在において、独立して、1 ~ 1 0 の整数である、前記〔 1 〕 ~ 〔 3 7 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 0 〕

nは、1 ~ 1 0 0 の整数である、前記〔 1 〕 ~ 〔 3 9 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 1 〕

nは、1 ~ 1 0 の整数である、前記〔 1 〕 ~ 〔 3 9 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 2 〕 Mは、各存在において、独立して、4 個もしくはこれより多くのアリールもしくはヘテロアリール環、またはこれらの組み合わせを含む部分である、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 1 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 3 〕

Mは、各存在において、独立して、蛍光性または有色である、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 2 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 4 〕

Mは、蛍光性である、前記〔 4 3 〕に記載の化合物。

〔 4 5 〕

Mは、各存在において、独立して、少なくとも 4 個の縮合環を含む縮合多環式アリール部分を含む、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 4 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 6 〕

Mは、各存在において、独立して、ジメチルアミノスチルベン、キナクリドン、フルオロフェニル - ジメチル - B O D I P Y、h i s - フルオロフェニル - B O D I P Y、アクリジン、テリレン、セキシフェニル、ポルフィリン、ベンゾピレン、（フルオロフェニル - ジメチル - ジフルオロボラ - ジアザ - インダセン）フェニル、（ビス - フルオロフェニル - ジフルオロボラ - ジアザ - インダセン）フェニル、クアテルフェニル、ビ - ベンゾチアゾール、ター - ベンゾチアゾール、ビ - ナフチル、ビ - アントラシル、スクアライン、スクアリリウム、9 , 1 0 - エチニルアントラセンまたはター - ナフチル部分である、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 5 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 7 〕

Mは、各存在において、独立して、p - ターフェニル、ペリレン、アゾベンゼン、フェナジン、フェナントロリン、アクリジン、チオキサントレン、クリセン、ルブレン、コロネン、シアニン、ペリレンイミド、もしくはペリレンアミドまたはその誘導体である、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 5 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

〔 4 8 〕

Mは、各存在において、独立して、クマリン染料、レゾルフィン染料、ジピロメテンボロンジフルオリド染料、ルテニウムビピリジル染料、エネルギー移動染料、チアゾールオレンジ染料、ポリメチンまたはN - アリール - 1 , 8 - ナフタルイミド染料である、前記〔 1 〕 ~ 〔 4 5 〕のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

20

30

40

50

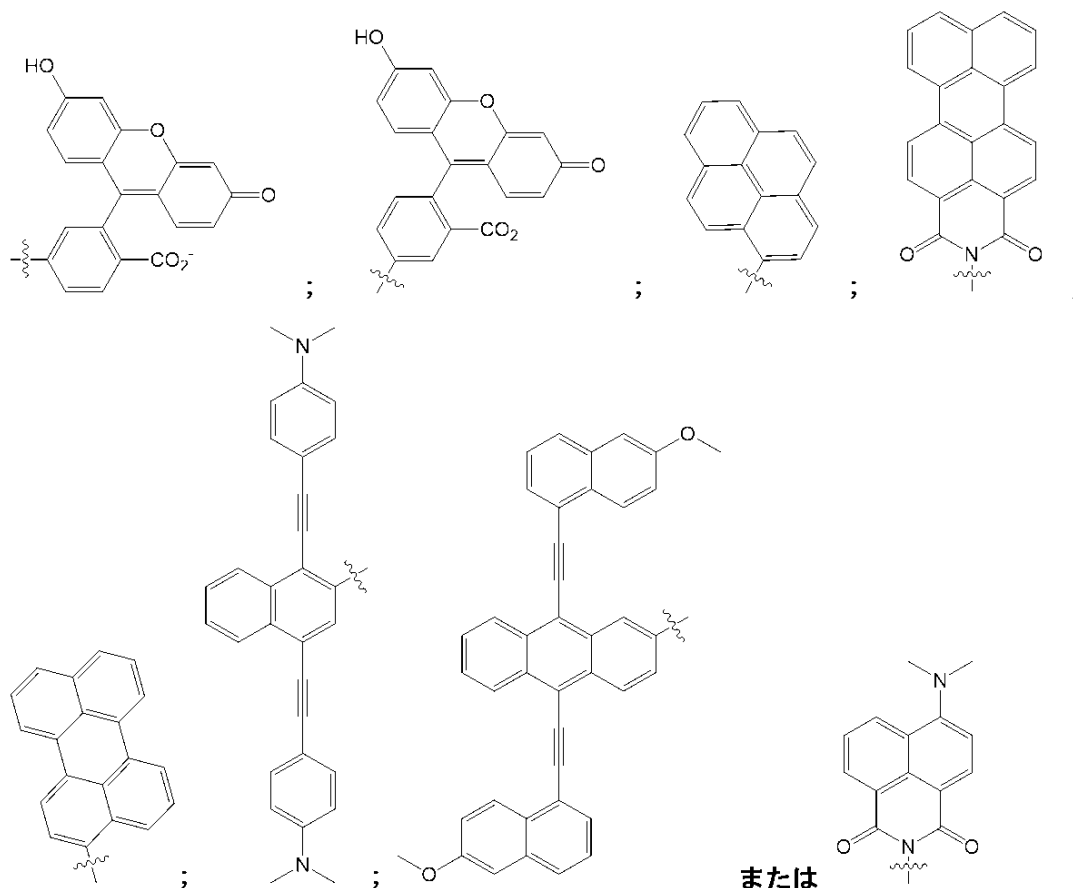
〔 4 9 〕

Mは、各存在において、独立して、ピレン、ペリレン、ペリレンモノイミドもしくは6-FAMまたはその誘導体である、前記〔 1 〕～〔 4 5 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 5 0 〕

Mは、各存在において、独立して、以下の構造：

【化30】



10

20

30

のうちの1つを有する、前記〔 1 〕～〔 4 5 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 5 1 〕

表2から選択される化合物。

〔 5 2 〕

サンプルを染色するための方法であって、該方法は、該サンプルに、前記〔 1 〕～〔 5 1 〕のいずれか1項に記載の化合物を、該サンプルが適切な波長で照射される場合に光学的応答を生じるために十分な量で添加する工程を包含する方法。

〔 5 3 〕

前記光学的応答は、蛍光応答である、前記〔 5 2 〕に記載の方法。

40

〔 5 4 〕

前記サンプルは、細胞を含む、前記〔 5 2 〕～〔 5 3 〕のいずれか1項に記載の方法。

〔 5 5 〕

前記細胞をフローサイトメトリーによって観察する工程をさらに包含する、前記〔 5 4 〕に記載の方法。

〔 5 6 〕

前記蛍光応答を、検出可能に異なる光学的特性を有する第2の発蛍光団の蛍光応答から区別する工程をさらに包含する、前記〔 5 3 〕に記載の方法。

〔 5 7 〕

分析物分子を視覚的に検出するための方法であって、該方法は、

50

(a) R^2 または R^3 は、該分析物分子への共有結合を含むリンカーである前記〔1〕の化合物を提供する工程；および

(b) 該化合物をその視覚的特性によって検出する工程、を包含する方法。

〔58〕

分析物分子を視覚的に検出するための方法であって、該方法は、

(a) R^2 または R^3 は、QまたはQへの共有結合を含むリンカーである前記〔1〕に記載の化合物と、該分析物分子とを混合する工程；

(b) 該化合物および該分析物分子の結合体を形成する工程；ならびに

(c) 該結合体をその視覚的特性によって検出する工程、を包含する方法。

10

〔59〕

前記〔1〕～〔51〕のいずれか1項に記載の化合物および1もしくはこれより多くの分析物分子を含む、組成物。

〔60〕

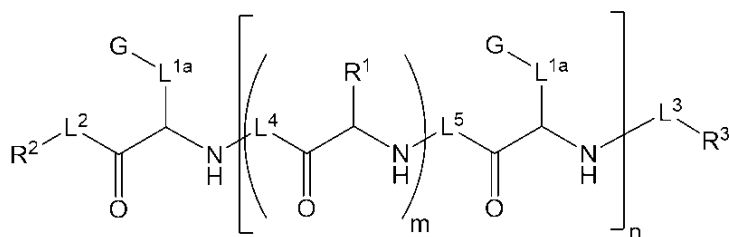
前記1もしくはこれより多くの分析物分子の検出のための分析方法における前記〔59〕に記載の組成物の使用。

〔61〕

以下の構造(II)：

【化31】

20



(II)

を有する化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体であって、ここで：

30

Gは、各存在において、独立して、相補的反応性基と共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

L^{1a} 、 L^2 、 L^3 、 L^4 および L^5 は、各存在において、独立して、選択肢的なアルキレン、アルケニレン、アルキニレン、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニレンまたはヘテロアルキニレンリンカーであり；

R^1 は、各存在において、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；

R^2 および R^3 は、各々独立して、H、-OH、-SH、-NH₂、-CO₂H、アルキル、アルキルエーテル、アルコキシ、ヘテロアルキル、アルキルアミニル、アルキルカルボニル、アルキルオキシカルボニル、Q、Qへの共有結合を含むリンカー、標的化部分への共有結合を含むリンカー、分析物分子への共有結合を含むリンカー、固体支持体への共有結合を含むリンカー、固体支持体残基への共有結合を含むリンカーまたは構造(I)のさらなる化合物への共有結合を含むリンカーであり、ここで該アルキル、アルキルエーテル、アルキルアミニル、アルキルカルボニルおよびアルキルオキシカルボニルは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリル、ホスフェート、チオホスフェート、ホスホアルキル、チオホスホアルキル、ホスホアルキルエーテルもしくはチオホスホアルキルエーテル、またはこれらの組み合わせで必要に応じて置換され；

40

Qは、各存在において、独立して、分析物分子、固体支持体または相補的反応性基Qと共有結合を形成できる反応性基を含む部分であり；

mは、各存在において、独立して、0またはこれより大きな整数であり；そして

nは、1またはこれより大きな整数である、

50

化合物、またはその立体異性体、塩もしくは互変異性体。

〔 6 2 〕

Gは、各存在において、独立して、アルデヒド、オキシム、ヒドラゾン、アルキン、アミン、アジド、アシルアジド、アシルハライド、ニトリル、ニトロソ、スルフヒドリル、ジスルフィド、スルホニルハライド、イソチオシアネート、イミドエステル、活性化エステル、ケトン、 α,β -不飽和カルボニル、アルケン、マレイミド、 α,β -ハロイミド、エポキシド、アジリジン、テトラジン、テトラゾール、ホスフィン、ピオチンまたはチイラン官能基を含む、前記〔 6 1 〕に記載の化合物。

〔 6 3 〕

Gは、各存在において、独立して、アルキンまたはアジド基を含む、前記〔 6 1 〕に記載の化合物。

10

〔 6 4 〕

Gは、各存在において、独立して、前記相補的反応性基との反応に際して、アルケン、エステル、アミド、チオエステル、ジスルフィド、炭素環式、複素環式またはヘテロアリール基を含む官能基を形成できる反応性基を含む、前記〔 6 1 〕に記載の化合物。

〔 6 5 〕

前記ヘテロアリールは、トリアゾリルである、前記〔 6 4 〕に記載の化合物。

〔 6 6 〕

各L^{1a}は、存在しない、前記〔 6 1 〕～〔 6 5 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 6 7 〕

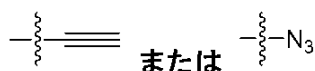
各L^{1a}は、存在する、前記〔 6 1 〕～〔 6 5 〕のいずれか1項に記載の化合物。

20

〔 6 8 〕

Gは、各存在において、独立して、

【化32】



である、前記〔 6 1 〕～〔 6 7 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 6 9 〕

R¹は、前記〔 2 〕～〔 7 〕のいずれか1項に定義されるとおりである、前記〔 6 1 〕～〔 6 8 〕のいずれか1項に記載の化合物。

30

〔 7 0 〕

L⁴およびL⁵は、各存在において非存在である、前記〔 6 1 〕～〔 6 9 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 7 1 〕

L⁴もしくはL⁵、または両方は、少なくとも1個の存在に関して存在する、前記〔 6 1 〕～〔 6 9 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 7 2 〕

存在する場合、L⁴もしくはL⁵、または両方は、前記〔 1 0 〕～〔 1 3 〕のいずれか1項に定義されるとおりである、前記〔 7 1 〕に記載の化合物。

40

〔 7 3 〕

L²およびL³は、独立して、非存在またはヘテロアルキレンリンカーである、前記〔 6 1 〕～〔 7 2 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 7 4 〕

前記ヘテロアルキレンリンカーは、ペプチジルリンカーである、前記〔 7 3 〕に記載の化合物。

〔 7 5 〕

R²は、-NH₂である、前記〔 6 1 〕～〔 7 4 〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔 7 6 〕

50

R^3 は、 Q 、 Q への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである、前記〔61〕～〔75〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔77〕

Q は、求核性反応性基、求電子性反応性基または環化付加反応性基を含む、前記〔61〕～〔76〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔78〕

Q は、スルフヒドリル、ジスルフィド、活性化エステル、イソチオシアネート、アジド、アルキン、アルケン、ジエン、ジエノフィル、酸ハライド、スルホニルハライド、ホスフィン、 α -ハロアミド、ピオチン、アミノまたはマレイミド官能基を含む、前記〔77〕に記載の化合物。

〔79〕

前記活性化エステルは、 N -スクシンイミドエステル、イミドエステルまたはポリフルオロフェニルエステルである、前記〔78〕に記載の化合物。

〔80〕

前記アルキンは、アルキルアジドまたはアシルアジドである、前記〔78〕に記載の化合物。

〔81〕

Q は、表1から選択される部分である、前記〔61〕～〔80〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔82〕

R^2 または R^3 のうちの一方は、分析物分子への共有結合を含むリンカーまたは固体支持体への共有結合を含むリンカーである、前記〔61〕～〔74〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔83〕

前記分析物分子は、核酸、アミノ酸またはこれらのポリマーである、前記〔82〕に記載の化合物。

〔84〕

前記分析物分子は、酵素、レセプター、レセプターリガンド、抗体、糖タンパク質、アプタマーまたはプリオンである、前記〔82〕に記載の化合物。

〔85〕

前記固体支持体は、ポリマービーズまたは非ポリマービーズである、前記〔82〕に記載の化合物。

〔86〕

m は、各存在において、独立して、1～20の整数である、前記〔61〕～〔85〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔87〕

m は、各存在において、独立して、1～10の整数である、前記〔61〕～〔85〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔88〕

n は、1～100の整数である、前記〔61〕～〔87〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔89〕

n は、1～10の整数である、前記〔61〕～〔87〕のいずれか1項に記載の化合物。

〔90〕

表3から選択される化合物。

〔91〕

分析物分子を標識するための方法であって、該方法は、

(a) R^2 または R^3 は、 Q または Q への共有結合を含むリンカーである前記〔61〕に記載の化合物と、該分析物分子とを混合する工程；

(b) 該化合物および該分析物分子の結合体を形成する工程；ならびに；

(c) 該結合体と式 $M-L^{1b}-G$ の化合物とを反応させて、それによって、少なくとも

10

20

30

40

50

も 1 個の G および少なくとも 1 個の G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程、

を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；
そして

G は、G に対する相補的反応性基である、

方法。

[9 2]

分析物分子を標識するための方法であって、該方法は、

(a) R^2 または R^3 は、Q または Q への共有結合を含むリンカーである前記 [6 1] に記載の化合物と、式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程；ならびに

(b) 工程 (A) の生成物と該分析物分子とを反応させ、それによって、工程 (A) の生成物および該分析物分子の結合体を形成する工程、

を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；
そして

G は、G に対する相補的反応性基である、

方法。

[9 3]

前記 [1] に記載の化合物を調製するための方法であって、該方法は、前記 [6 1] に記載の化合物と、式 $M - L^{1b} - G$ の化合物とを混合し、それによって、G および G の反応によって少なくとも 1 個の共有結合を形成する工程を包含し、ここで：

M は、2 個またはこれより多くの炭素 - 炭素二重結合および少なくとも 1 の共役度を含む部分であり；

L^{1b} は、選択的なアルキレン、ヘテロアルキレンまたはヘテロ原子リンカーであり；
そして

G は、G に対する相補的反応性基である、

方法。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 Z

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/48 Z
- (72)発明者 シン , シャラット
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 7 , ランチョ サンタ フェ , トップ オー モーニン
 グ ウェイ 8 1 7 1
- (72)発明者 ヴァンプラント , マイケル
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 4 2 , コピントン , エスイー 2 6 1 エスティー ストリート
 1 6 6 1 9
- 合議体
- 審判長 上條 肇
- 審判官 中根 知大
- 審判官 天野 貴子
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 4 7 9 3 (WO , A 1)
 Chem . Commun . 2 0 1 4 年、 Vol . 5 0、 p . 4 3 3 - 4 3 5、 Suppo
 r t i n g I n f o r m a t i o n
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 C07K