

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532805

(P2004-532805A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

| | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 07 D 311/82 | C O 7 D 311/82 | 4 B O 2 4 |
| C 07 D 405/12 | C O 7 D 405/12 | 4 B O 6 3 |
| C 07 K 14/00 | C O 7 K 14/00 | 4 C O 6 2 |
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 Q 1/68 A | 4 C O 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 | C 1 2 Q 1/68 Z | 4 H O 4 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 154 頁) 最終頁に続く | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-539575 (P2002-539575) | (71) 出願人 | 500069057 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年10月30日 (2001.10.30) | | アブレラ コーポレーション |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年4月28日 (2003.4.28) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア 944 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/048654 | | 04 フォスター シティ, リンカーン |
| (87) 国際公開番号 | W02002/036832 | | センター ドライブ 850 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年5月10日 (2002.5.10) | | 850 Lincoln Centre |
| (31) 優先権主張番号 | 09/704, 966 | | Drive Foster City C |
| (32) 優先日 | 平成12年11月1日 (2000.11.1) | | ALIFORNIA 94404 U. S |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | . A. |
| | | (74) 代理人 | 100078282 |
| | | | 弁理士 山本 秀策 |
| | | (74) 代理人 | 100062409 |
| | | | 弁理士 安村 高明 |
| | | (74) 代理人 | 100113413 |
| | | | 弁理士 森下 夏樹 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 不斉キサンテンフルオレセイン色素のアトロプ異性体およびDNA配列決定フラグメント分析の方法

(57) 【要約】

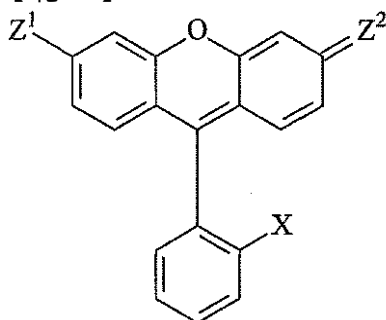
キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体が開示される。種々の分子生物学の適用は、アトロプ異性体キサンテン蛍光色素を、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび炭水化物のような基質のための標識として利用する。本発明が利用され得る方法としては、DNA配列決定、DNAフラグメント分析、PCR、SNP分析、オリゴヌクレオチド連結、増幅、ミニ配列決定、およびプライマー伸長が挙げられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造：

【化 1】



10

を有する、実質的に純粋なアトロプ異性体化合物であって、

Z^1 は、OH、 NH_2 、 NHR 、または NR_2 であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

Z^2 は、O、 $^+NH_2$ 、 ^+NHR 、または $^+NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

20

X は、カルボキシレートまたはスルホネートであり；

そして該構造は、そのアリール置換形態を含む、化合物。

【請求項 2】

Z^1 が OH であり、 Z^2 が O であり、そして X がカルボキシレートである、請求項 1 に記載の実質的に純粋なアトロプ異性体化合物。

【請求項 3】

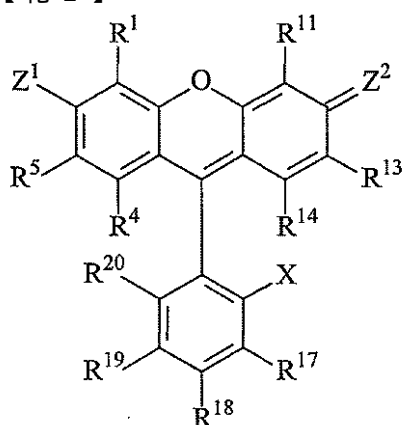
Z^1 が NR_2 であり、 Z^2 が $^+NR_2$ であり、そして X がカルボキシレートである、請求項 1 に記載の実質的に純粋なアトロプ異性体化合物。

【請求項 4】

以下の構造：

30

【化 2】



40

を有する、請求項 1 に記載の実質的に純粋なアトロプ異性体化合物であって、

ここで、 R^1 、 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 Z^1 、または Z^2 のうちの少なくとも 1 つが、アジド、一置換第 1 級アミン、二置換第 2 級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハロゲン化物、エポキシド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホン酸エステル、ハロゲン化シリル、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、ハロゲン化アル

50

キル、ハロゲン化アリル、アルデヒド、ケトン、アシルアジド、無水物、ヨードアセトアミドおよび活性化エステルからなる群より選択される連結部分である、化合物。

【請求項 5】

R^1 および $R^{1'}$ のうちの 1 つが連結部分である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

1 つ以上の置換基 R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1'''}、R^{1''''}$ 、 $R^{1'''''}、R^{1''''''}$ 、および $R^{2'}$ を含む、請求項 4 に記載の化合物であって、該置換基の各々が独立して、フッ素、塩素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル ($-CH_2NH_2$)、アミノアルキル、4 - ジアルキルアミノピリジニウム、ヒドロキシメチル ($-CH_2OH$)、メトキシ ($-OCH_3$)、ヒドロキシアリル ($-ROH$)、チオメチル ($-CH_2SH$)、チオアルキル ($-RSH$)、アルキルスルホン ($-SO_2R$)、アリールチオ ($-SAr$)、アリールスルホン ($-SO_2Ar$)、スルホンアミド ($-SO_2NR_2$)、アルキルスルホキシド ($-SOR$)、アリールスルホキシド ($-SOAr$)、アミノ ($-NH_2$)、アンモニウム ($-NH_3^+$)、アミド ($-CONR_2$)、ニトリル ($-CN$)、 $C_1 \sim C_8$ アルコキシ ($-OR$)、フェノキシ、フェノール、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第 4 級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、および連結部分である、化合物。

10

【請求項 7】

前記 $R^{1''}$ および $R^{1'''}、R^{1''''}$ が一緒になってベンゾを形成する、請求項 4 に記載の化合物。

20

【請求項 8】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - キノリル、3 - キノリル、4 - キノリル、2 - イミダゾール、4 - イミダゾール、3 - ピラゾール、4 - ピラゾール、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、シンノリン、プタラジン、キナゾリン、キノキサリン、3 - (1, 2, 4 - N) - トリアゾリル、5 - (1, 2, 4 - N) - トリアゾリル、5 - テトラゾリル、4 - (1 - O, 3 - N) - オキサゾール、5 - (1 - O, 3 - N) - オキサゾール、4 - (1 - S, 3 - N) - チアゾール、5 - (1 - S, 3 - N) - チアゾール、2 - ベンゾオキサゾール、2 - ベンゾチアゾール、4 - (1, 2, 3 - N) - ベンゾトリアゾール、およびベンゾイミダゾールから選択される、電子不足複素環である、請求項 4 に記載の化合物。

30

【請求項 9】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、フェニルまたは置換フェニルである、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 10】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、ナフチルまたは置換ナフチルである、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 11】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、フッ素または塩素である、請求項 5 に記載の化合物。

40

【請求項 12】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、2 - ピリジルまたは 3 - ピリジルである、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 13】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、2 - キノリルまたは 3 - キノリルである、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 14】

R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、および $R^{1'''}、R^{1''''}$ のうちの少なくとも 1 つが、メトキシ ($-OCH_3$) である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 15】

50

R^1 、 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{13} 、および R^{14} のうちの少なくとも1つが、アミノメチル($-CH_2NH_2$)である、請求項4に記載の化合物。

【請求項16】

R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、および R^{20} のうちの少なくとも1つが、塩素である、請求項4に記載の化合物。

【請求項17】

R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、および R^{20} のうちの少なくとも1つが、フッ素である、請求項4に記載の化合物。

【請求項18】

R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、および R^{20} のうちの少なくとも1つが、4-ジアルキルアミノピリジニウムである、請求項4に記載の化合物。 10

【請求項19】

R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、および R^{20} のうちの少なくとも1つが、チオフェニルである、請求項4に記載の化合物。

【請求項20】

R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、および R^{20} のうちの少なくとも1つが、チオ-4-カルボキシフェニルである、請求項4に記載の化合物。

【請求項21】

R^{18} および R^{19} のうちの1つがカルボキシルであり、そして他方が水素である、請求項4に記載の化合物。 20

【請求項22】

R^{18} および R^{19} のうちの1つが連結部分であり、そして他方が水素である、請求項4に記載の化合物。

【請求項23】

R^{17} および R^{20} が塩素であり； R^{18} および R^{19} のうちの1つが連結部分であり、そして他方が水素であり；そしてXがカルボキシルである、請求項4に記載の化合物。

【請求項24】

請求項4に記載の化合物であって、以下：

第1の架橋基であって、該第1の架橋基は、 Z^1 の窒素、 Z^1 に結合する炭素、および R^1 に結合する炭素と一緒にあって、4～7員の第1の環構造を形成する、第1の架橋基； 30

必要に応じて、第2の架橋基であって、該第2の架橋基は、 Z^2 の窒素、 Z^2 に結合する炭素、および R^{11} に結合する炭素と一緒にあって、4～7員の第2の環構造を形成する、第2の架橋基、を含む、化合物。

【請求項25】

前記第1の環構造および第2の環構造の一方または両方が、5員を有する、請求項24に記載の化合物。

【請求項26】

前記5員環構造が、1つのgem置換された炭素を含む、請求項25に記載の化合物。 40

【請求項27】

前記gem置換基が $C_1 \sim C_8$ アルキルである、請求項29に記載の化合物。

【請求項28】

前記gem置換基がメチルである、請求項27に記載の化合物。

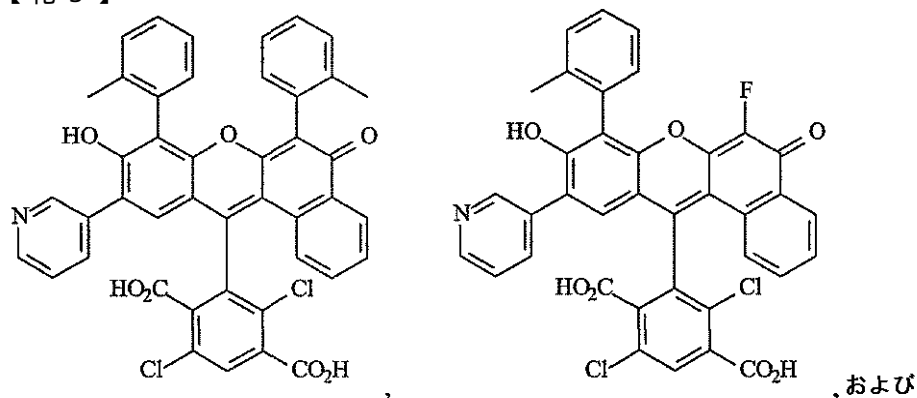
【請求項29】

前記5員環が、連結部分で置換されている、請求項25に記載の化合物。

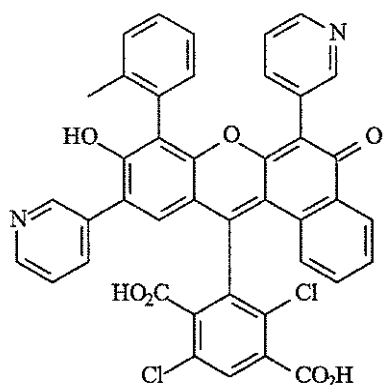
【請求項30】

以下の構造：

【化 3】



10



20

からなる群より選択される、実質的に純粋なアトロプ異性体化合物であって、該化合物が、アトロプ異性体的に濃縮されている、化合物。

【請求項 3 1】

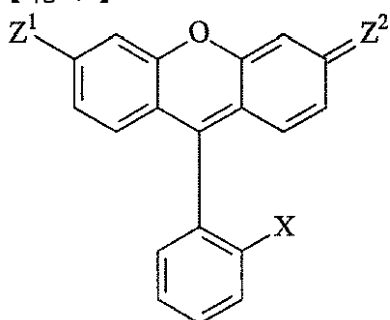
エネルギー移動色素であって、以下：

第 1 の波長の光を吸収し得、そして該吸収に応答して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た該励起エネルギーを吸収し得、そして応答して第 2 の波長で蛍光を発し得る、アクセプター色素；ならびに

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素およびアクセプター色素のうちの少なくとも一方が、以下の構造：

【化 4】



40

またはそのアリール置換形態を有する、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり；

ここで、 Z^1 および Z^2 は、O、OH、 NH_2 、 NHR 、または NR_2 であり；X は、カルボキシレートまたはスルホネートである、エネルギー移動色素。

【請求項 3 2】

前記ドナー色素が、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり、そして前

50

記アクセプター色素が、シアニン色素、フタロシアニン色素、スクアレン色素、b o d i p y 色素、ベンゾフェノキサジン色素、フルオレセイン色素、ジベンゾローダミン色素、またはローダミン色素である、請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3 3】

前記アクセプター色素が、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり、そして前記ドナー色素が、該キサンテン化合物およびポリヌクレオチドに連結されている、請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3 4】

前記ドナー色素が、前記ポリヌクレオチドの 5' 末端に連結されている、請求項 3 3 に記載のエネルギー移動色素。

10

【請求項 3 5】

前記ドナー色素が、前記ポリヌクレオチドの 3' 末端に連結されている、請求項 3 3 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3 6】

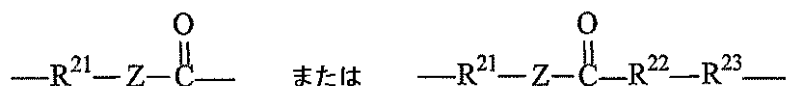
前記ドナー色素が、ポリヌクレオチドの核酸塩基に結合しており、ここで、該核酸塩基がプリンである場合、前記リンカーは、8 位で結合しており、該核酸塩基が 7 - デアザプリンである場合、該リンカーは、7 位または 8 位で結合しており、そして該核酸塩基がピリミジンである場合、該リンカーは、5 位で結合している、請求項 3 3 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3 7】

前記リンカーが、以下の構造：

20

【化 5】



を有し、ここで、

Z は、NH、S および O からなる群より選択され；

R²¹ は、前記ドナー色素に結合した C₁ ~ C₁₂ アルキルであり；

R²² は、C₁ ~ C₁₂ アルキルジイル、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 5 員環または 6 員環、およびカルボニル炭素に結合した縮合環構造からなる群より選択される置換基であり；

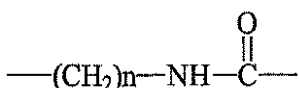
30

R²³ は、該リンカーを前記アクセプター色素に結合させる、官能基を含む、請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3 8】

前記リンカーが、以下の構造：

【化 6】



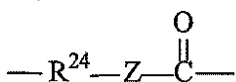
を有し、そして n が 2 ~ 10 の範囲である、請求項 3 7 に記載の化合物。

40

【請求項 3 9】

R²³ が、以下の構造：

【化 7】



を有し、ここで、R²⁴ は、C₁ ~ C₁₂ アルキルである、請求項 3 7 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 4 0】

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

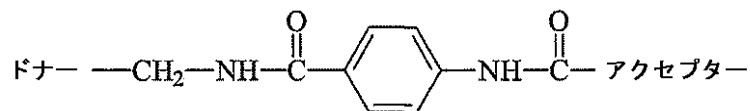
50

、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、オキサジン、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なる群より選択される、5員環または6員環である、請求項37に記載のエネルギー移動色素。

【請求項41】

前記リンカーが、以下の構造：

【化8】



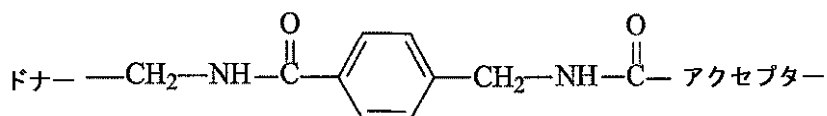
10

を有する、請求項31に記載のエネルギー移動色素。

【請求項42】

前記リンカーが、以下の構造：

【化9】



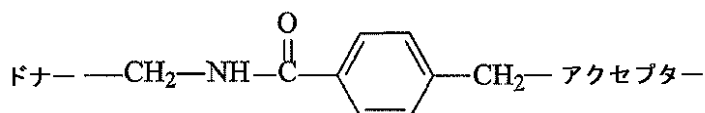
20

を有する、請求項31に記載のエネルギー移動色素。

【請求項43】

前記リンカーが、以下の構造：

【化10】

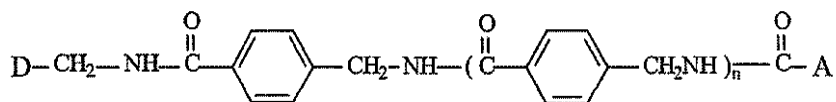


を有する、請求項31に記載のエネルギー移動色素。

【請求項44】

前記リンカーが、以下の構造：

【化11】



30

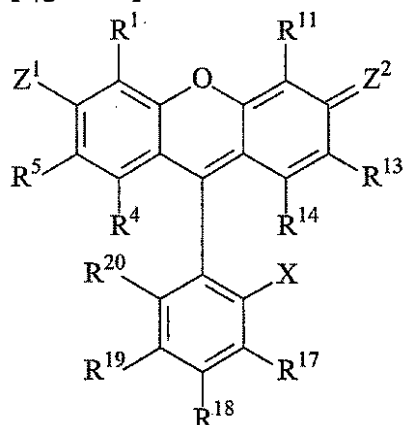
を有し、ここで、Dはドナー色素であり、Aはアクセプター色素であり、そしてnは1または2である、請求項31に記載のエネルギー移動色素。

【請求項45】

前記リンカーが、以下の構造：

40

【化 1 2】



10

を有する前記実質的に純粋なアトロプ異性体キサンテン化合物の R^1 、 R^{11} 、 R^{18} または R^{19} において結合している、請求項 31 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 46】

前記ドナーまたは前記アクセプターに対するリンカーが、 R^1 または R^{11} において結合しており、そしてポリヌクレオチドに対するリンカーが、 R^{18} または R^{19} において結合している、請求項 45 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 47】

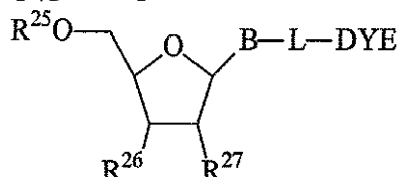
前記リンカーが、前記実質的に純粋なアトロプ異性体キサンテン化合物の Z^1 位または Z^2 位の 1 つにおいて結合している、請求項 45 に記載のエネルギー移動色素。

20

【請求項 48】

以下の式：

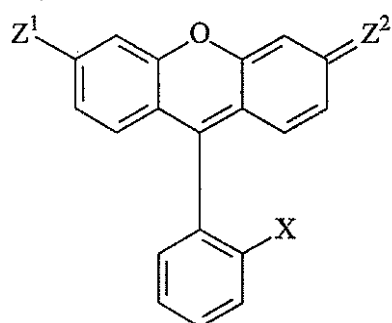
【化 1 3】



30

を有する、標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチドであって、ここで、DYE が、以下の構造：

【化 1 4】



40

を有するキサンテン化合物の、実質的に純粋なアトロプ異性体であり、

Z^1 は、OH、 NH_2 、 NHR 、または NR_2 であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

Z^2 は、O、 $+NH_2$ 、 $+NHR$ 、または $+NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

X は、カルボキシレートまたはスルホネートであり；

50

DYE は、エネルギー移動色素であって、該エネルギー移動色素は、第 1 の波長において光を吸収し得、そして該吸収に応答して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た該励起エネルギーを吸収し得、そして該吸収に応答して、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および該アクセプター色素を結合するための、リンカーを含み；ここで、該ドナー色素およびアクセプター色素のうちの少なくとも 1 つが、該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり；

B は、核酸塩基であり；

L は、リンカーであり；

R^{25} は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、チオホスフェート、またはホスフェートアナログであり；そして

R^{26} および R^{27} は、単独の場合、それぞれ独立して、H、HO、F、またはポリメラーゼにより媒介される標的特異的重合をブロックする他の部分であるか、あるいは一緒になって、 R^{26} および R^{27} は、2' - 3' - ジデヒドロリボースを形成し；そしてここで、DYE は、必要に応じて、アリール置換されている、標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 49】

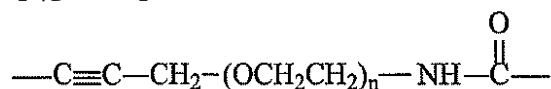
B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、および 7 - デアザグアニンからなる群より選択される、請求項 48 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

20

【請求項 50】

L が、以下：

【化 15】



であり、ここで、n は、0、1、または 2 である、請求項 48 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 51】

酵素的に組み込み可能である、請求項 48 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

30

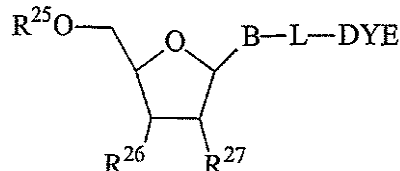
【請求項 52】

ターミネーターである、請求項 48 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 53】

以下の構造：

【化 16】



40

を有する、請求項 52 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチドであって、ここで、 R^{26} および R^{27} は、単独の場合、それぞれ独立して、H、F、またはポリメラーゼにより媒介される標的特異的重合をブロックする他の部分であるか、あるいは一緒になって、2' - 3' - ジデヒドロリボースを形成する、標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 54】

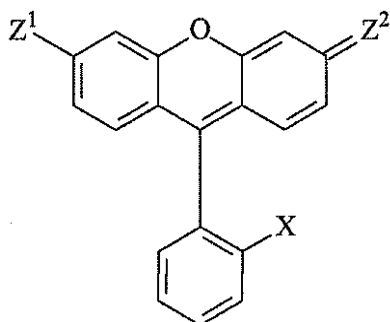
酵素的に伸長可能である、請求項 48 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

50

【請求項 55】

標識に共有結合したポリヌクレオチドを含む、標識されたポリヌクレオチドであって、ここで、該標識が、以下の構造：

【化 17】



10

を有する、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり、

Z^1 は、 OH 、 NH_2 、 NHR 、または NR_2 であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

Z^2 は、 O 、 $^+NH_2$ 、 ^+NHR 、または $^+NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

20

X は、カルボキシレートまたはスルホネートであるか；

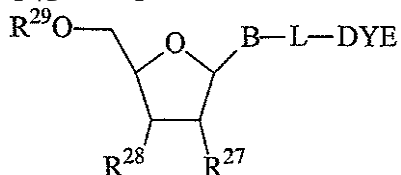
あるいは、エネルギー移動色素であって、以下：第 1 の波長の光を吸収し得、そして該吸収に応答して励起エネルギーを放出し得る、ドナー色素；該ドナー色素によって放出された該励起エネルギーを吸収し得、そして該吸収に応答して、第 2 の波長の蛍光を発し得る、アクセプター色素；ならびに該ドナー色素および該アクセプター色素を結合するための、リンカーを含み；ここで、該ドナー色素およびアクセプター色素のうちの少なくとも 1 つが、該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり；そして該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体が、必要に応じて、アリール置換されている、標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 56】

30

以下の式：

【化 18】



を有する、請求項 55 に記載の標識されたポリヌクレオチドであって、

ここで、 DYE は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはエネルギー移動色素であり；

40

B は、核酸塩基であり；

L は、リンカーであり；

R^{27} は、 H 、 OH 、ハロゲン化物、アジド、アミン、アルキルアミン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アリール、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 OCH_3 、または $OCH_2CH=CH_2$ であり；そして

R^{28} および R^{29} は、単独の場合、それぞれ独立して、 H 、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであり；

ここで、該ポリヌクレオチドが、2 ~ 100 のヌクレオチドを含む、標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 57】

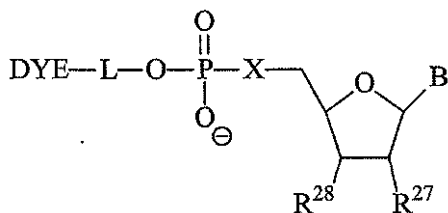
50

B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、および 7 - デアザグアノシンからなる群より選択される、請求項 5 6 に記載の標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 8】

以下の式：

【化 1 9】



10

を有する、請求項 5 5 に記載の標識されたポリヌクレオチドであって、ここで、D Y E は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはエネルギー移動色素であり；

B は、核酸塩基であり；

X は、O、NH、または S であり；

L は、リンカーであり；

R^{2 7} は、H、OH、ハロゲン化物、アジド、アミン、アルキルアミン、C₁ ~ C₆ アルキル、アリル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、OCH₃、または OCH₂CH=CH₂ であり；

20

そして

R^{2 8} は、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであり；

ここで、該ポリヌクレオチドが、2 ~ 1 0 0 のヌクレオチドを含む、標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 9】

B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、および 7 - デアザグアノシンからなる群より選択される、請求項 5 8 に記載の標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 6 0】

L が、C₁ ~ C_{1 2} アルキルジイルである、請求項 5 8 に記載の標識されたポリヌクレオチド。

30

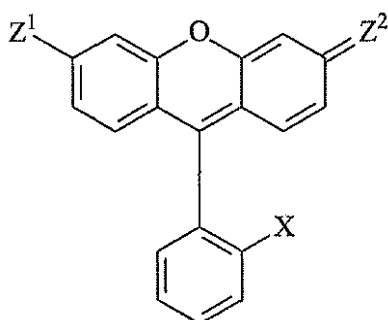
【請求項 6 1】

L が、-(CH₂CH₂O)_n- を含み、ここで、n は、1 ~ 1 0 0 である、請求項 5 8 に記載の標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 6 2】

標識に共有結合したポリペプチドを含む、標識されたポリペプチドであって、ここで、該標識が、以下の構造：

【化 2 0】



40

を有する、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり、

Z¹ は、OH、NH₂、NHR、または NR₂ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、C₁ ~ C_{1 2} アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であ

50

り；

Z^2 は、 O 、 $^+NH_2$ 、 ^+NHR 、または $^+NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

X は、カルボキシレートまたはスルホネートであるか；あるいは

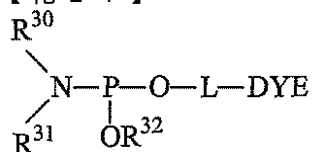
該ポリペプチドは、エネルギー移動色素に共有結合しており、該エネルギー移動色素は、以下：第 1 の波長において光を吸収し得、そして該吸収に応答して励起エネルギーを放出し得る、ドナー色素；該ドナー色素によって放出された該励起エネルギーを吸収し得、そして該吸収に応答して、第 2 の波長において蛍光を発し得る、アクセプター色素；ならびに該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカーを含み；ここで、該ドナー色素およびアクセプター色素のうちの少なくとも 1 つが、該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり；そして該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体が、必要に応じて、アリール置換されている、標識されたポリペプチド。

10

【請求項 63】

以下の式：

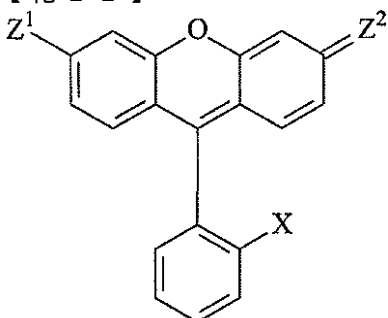
【化 2 1】



20

を有する、ホスホロアミダイト化合物であって、ここで、 DYE は、以下の構造：

【化 2 2】



30

を有するキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり、

Z^1 は、 OH 、 NH_2 、 NHR 、または NR_2 であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

Z^2 は、 O 、 $^+NH_2$ 、 ^+NHR 、または $^+NR_2$ であり、ここで、各 R は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環、または連結部分であり；

X は、カルボキシレートまたはスルホネートであるか；あるいは

40

DYE は、第 1 の波長において光を吸収し得、そして該吸収に応答して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た該励起エネルギーを吸収し得、そして該吸収に応答して、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および該アクセプター色素を連結するための、リンカーを含み；ここで、該ドナー色素およびアクセプター色素のうちの少なくとも 1 つが、該キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体であり；そしてここで、 DYE は、必要に応じて、アリール置換されており；

L は、リンカーであり；

R^{30} および R^{31} は、別々に、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{12}$ シクロアルキル、およびアリールからなる群より選択されるか、または R^{30} および R^{31} は、窒素原子と

50

一緒になって、飽和窒素複素環を形成し；そして
 $R^{3\ 2}$ は、亜リン酸エステル保護基である、
 ホスホロアミダイト化合物。

【請求項 6 4】

$R^{3\ 2}$ が、メチル、2 - シアノエチル、および 2 - (4 - ニトロフェニル) エチルからなる群より選択される、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 6 5】

$R^{3\ 0}$ および $R^{3\ 1}$ が、それぞれイソプロピルである、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 6 6】

$R^{3\ 0}$ および $R^{3\ 1}$ が、一緒になってモルホリノである、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

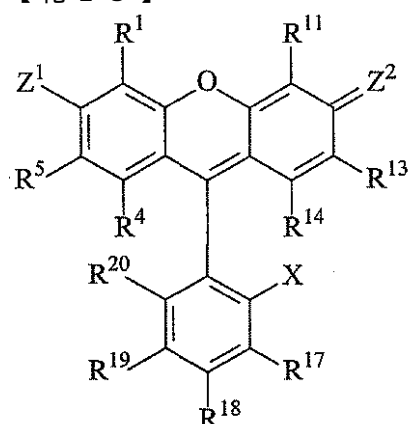
【請求項 6 7】

L が $C_1 \sim C_{12}$ アルキルジイルである、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 6 8】

L が、以下の構造：

【化 2 3】



を有する DYE の $R^{1\ 8}$ または $R^{1\ 9}$ に結合している、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 6 9】

以下の構造：

【化 2 4】

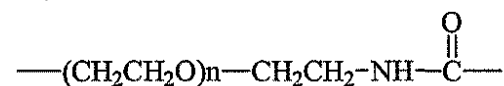


を有する、請求項 6 8 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 7 0】

L が、以下：

【化 2 5】



であり、そして n が、1 ~ 10 の範囲である、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物。

【請求項 7 1】

標識された基質を形成する方法であって、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリペプチド、炭水化物、リガンド、エナンチオマー的に実質的に純粋な化合物、粒子、および表面からなる群より選択される基質を、請求項 5 に記載の化合物の連結部分、または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素と反応させ、これによって、標識された基質が形成する工程を包含する、方法。

【請求項 7 2】

前記連結部分が N - ヒドロキシスクシンイミドである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記連結部分がホスホロアミダイトである、請求項 7 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 4】

前記基質がエナンチオマー的に実質的に純粋である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

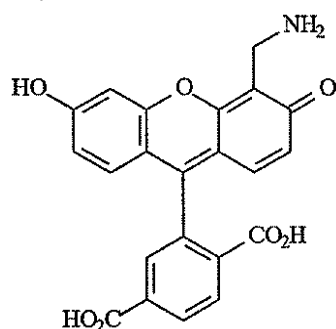
前記エナンチオマー的に実質的に純粋な化合物が、(+)メンチルクロロホルメートまたは(-)メンチルクロロホルメートである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記標識された基質が、以下の構造：

【化 2 6】

20



を有する、C - 1 1 アミノメチル，C - 1 9 カルボキシルフルオレセインを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記粒子が、ナノ粒子、微小球、ビーズ、またはリポソームである、請求項 7 1 に記載の方法。

30

【請求項 7 8】

前記表面がガラスである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 9】

標識されたポリヌクレオチドを合成する方法であって、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物を、ポリヌクレオチドにカップリングさせ、これによって、標識されたポリヌクレオチドが形成される工程を包含し、ここで、該ポリヌクレオチドが、固体支持体に結合されている、方法。

【請求項 8 0】

C - 1 1 アミノメチル，C - 1 9 カルボキシルフルオレセイン化合物のアトロプ異性体を分離する方法であって、以下の工程：

40

(a) C - 1 1 アミノメチル，C - 1 9 カルボキシルフルオレセインを、活性エステルまたはカルボン酸の実質的に純粋なエナンチオマーと反応させて、ジアステレオマーカルバメートを形成する工程；

(b) 該ジアステレオマーカルバメートを分離する工程；および

(c) 該分離されたジアステレオマーを、水性の酸で加水分解する工程、を包含する、方法。

【請求項 8 1】

前記活性エステルが、メンチルクロロホルメートである、請求項 8 0 に記載の方法。

50

【請求項 8 2】

前記ジアステレオマーカルバメートが、逆相 H P L C によって分離される、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

標識された基質の混合物を分離する方法であって、ここで該標識された基質が、請求項 1 に記載の化合物、または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素からなり、該方法は、以下の工程：

(a) 電気泳動によって、標識された基質の混合物を分離する工程；および

(b) 蛍光検出によって、該標識された基質を検出する工程、

を包含する、方法。

10

【請求項 8 4】

前記標識された基質が、標識されたポリヌクレオチドである、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

標識された基質の混合物を分離する方法であって、ここで、該標識された基質が、請求項 1 に記載の化合物または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素からなり、該方法は、以下の工程；

(a) クロマトグラフィーによって、標識された基質の混合物を分離する工程；および

(b) 蛍光検出によって、該標識された基質を検出する工程、

を包含する、方法。

20

【請求項 8 6】

標識されたプライマー伸長産物を生成する方法であって、プライマー - 標的ハイブリッドを、酵素的に組み込み可能なヌクレオチドで伸長させ、これによって、該プライマーが伸張する工程を包含し、ここで、該プライマーまたは該ヌクレオチドが、請求項 1 に記載の化合物、または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動化合物で標識されている、方法。

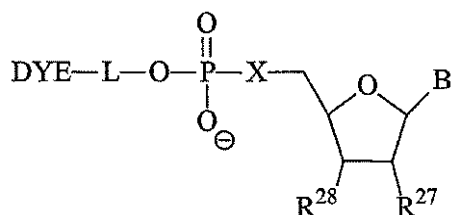
【請求項 8 7】

前記ヌクレオチドが、酵素的に伸長可能である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記プライマーが、以下の式：

【化 2 7】



30

を含む標識されたポリヌクレオチドであり、ここで、

D Y E は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはエネルギー移動色素であり；

B は、核酸塩基であり；

40

X は、O、NH、またはSであり；

L は、リンカーであり；

R^{2 7} は、H、OH、ハロゲン化物、アジド、アミン、アルキルアミン、C₁ ~ C₆ アルキル、アリル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、OCH₃、またはOCH₂CH=CH₂であり；そして

R^{2 8} は、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたはヌクレオチド間アナログであり；

ここで、該ポリヌクレオチドは、2 ~ 1 0 0 のヌクレオチドを含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、および

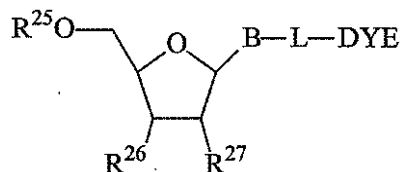
50

7 - デアザグアノシンからなる群より選択される、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記酵素的に組み込み可能なヌクレオチドが、以下の式：

【化 2 8】



を有する標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチドであり、ここで、
D Y E は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはエネルギー移動色素であり；

10

B は、核酸塩基であり；

L は、リンカーであり；

R^{25} は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、チオホスフェート、またはホスフェートアナログであり；そして

R^{26} および R^{27} は、単独の場合、それぞれ独立して、H、HO、および F である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 1】

ターミネーターヌクレオチドをさらに含む、請求項 8 6 に記載の方法。

20

【請求項 9 2】

R^{26} および R^{27} は、単独の場合、それぞれ独立して、H、F、ポリメラーゼにより媒介される標的特異的プライマー伸長をブロックする部分であるか、あるいは一緒になって、2' - 3' - ジデヒドロリボースを形成する、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 3】

ポリヌクレオチド配列決定の方法であって、以下の工程： 第 1、第 2、第 3、および第 4 の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、その結果：

該第 1 のクラスの各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 の色素で標識されており；

該第 2 のクラスの各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 の色素で標識されており；

30

該第 3 のクラスの各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 の色素で標識されており；そして

該第 4 のクラスの各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 の色素で標識されており；

ここで、該第 1、第 2、第 3、または第 4 の色素のうちの 1 つが、請求項 1 に記載の化合物、または請求項 3 8 に記載のエネルギー移動色素であり、そして他の色素が、互いから分光学的に分解可能である、工程；ならびに

該ポリヌクレオチドを、大きさに基づいて分離する工程、
を包含する、方法。

40

【請求項 9 4】

蛍光検出によって、前記分離されたポリヌクレオチドを検出する工程をさらに包含する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記色素の蛍光スペクトルによって、前記ポリヌクレオチドの 3' - 末端ヌクレオチドを同定する工程をさらに包含する、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 6】

オリゴヌクレオチドの連結の方法であって、2つのプローブを標的配列にアニーリングする工程、および一方のプローブの 5' 末端と他方のプローブの 3' 末端との間にホスホジエステル結合を形成する工程を包含し；

50

ここで、一方または両方のプローブが、請求項 1 に記載の化合物または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素で標識されている、方法。

【請求項 9 7】

フラグメント分析の方法であって、大きさに依存する分離プロセスによって、標識されたポリヌクレオチドフラグメントを分離する工程、および該分離プロセスに引き続いて、該分離された標識されたポリヌクレオチドフラグメントを検出する工程を包含し；

ここで、該フラグメントが、請求項 1 に記載の化合物または請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素で標識されている、方法。

【請求項 9 8】

前記フラグメントが、移動度改変標識で標識されている、請求項 9 7 に記載の方法。

10

【請求項 9 9】

前記フラグメントが、連結によって形成されている、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記大きさに依存する分離プロセスが、電気泳動であり、そして前記標識されたポリヌクレオチドフラグメントが、蛍光によって検出される、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

増幅の方法であって、2 つ以上のプライマーを標的ポリヌクレオチドにアニーリングする工程、ならびにポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によって、該プライマーを伸張させる工程を包含し；

ここで、該プライマーのうちの少なくとも 1 つが、請求項 5 5 に記載の標識されたポリヌクレオチドで標識されている、方法。

20

【請求項 1 0 2】

増幅の方法であって、2 つ以上のプライマーを標的ポリヌクレオチドにアニーリングする工程、ならびにポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によって、該プライマーを伸張させる工程を包含し；

ここで、該ヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つが、請求項 4 8 に記載の標識されたヌクレオチドである、方法。

【請求項 1 0 3】

増幅の方法であって、2 つ以上のプライマーおよび蛍光色素 - 消光剤プローブを、標的核酸にアニーリングする工程、ならびにポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によって、該プライマーを伸張させる工程を包含し；

30

ここで、該プローブが、請求項 5 5 に記載の標識されたポリヌクレオチドである、方法。

【請求項 1 0 4】

ポリヌクレオチドを標識するためのキットであって、請求項 4 に記載の連結部分およびポリヌクレオチドを含む化合物を備える、キット。

【請求項 1 0 5】

ポリヌクレオチドを標識するためのキットであって、請求項 3 1 に記載のエネルギー移動色素およびポリヌクレオチドを備える、キット。

【請求項 1 0 6】

ポリヌクレオチドを標識するためのキットであって、請求項 6 3 に記載のホスホロアミダイト化合物およびポリヌクレオチドを備える、キット。

40

【請求項 1 0 7】

標識されたプライマー伸長産物を生成するためのキットであって、1 つ以上の酵素的に組み込み可能なヌクレオチドおよびプライマーを備え、ここで、該プライマーが、請求項 5 5 に記載の標識されたポリヌクレオチドである、キット。

【請求項 1 0 8】

標識されたプライマー伸長産物を生成するためのキットであって、1 つ以上の酵素的に組み込み可能なヌクレオチドおよびプライマーを備え、ここで、少なくとも 1 つのヌクレオチドが、請求項 4 8 に記載の標識されたヌクレオチドである、キット。

【請求項 1 0 9】

50

前記標識されたヌクレオチドがターミネーターである、請求項 108 に記載のキット。

【請求項 110】

4 つの異なるターミネーターを備える、請求項 109 に記載のキットであって、1 つは、標的 A において終結するターミネーターであり、1 つは、標的 G において終結するターミネーターであり、1 つは、標的 C において終結するターミネーターであり、1 つは、標的 T または U において終結するターミネーターである、キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(I. 発明の分野)

本発明は、不斉キサンテン蛍光色素の、特定のアトロブ異性体の形態、および蛍光色素標識試薬を用いた核酸配列決定および核酸分析の分野に関する。 10

【0002】

(II. 発明の背景)

サイズまたは電荷に基づいて分離された後の、蛍光標識生体分子の分析法は、分子生物学の中心である。蛍光標識核酸を利用する方法の例としては、自動 DNA 配列決定、オリゴヌクレオチドプローブ法、ポリメラーゼ連鎖反応生成物の検出、イムノアッセイなどが挙げられる。マルチカラー自動 DNA 配列決定の場合、異なるサイズの標識核酸フラグメントは、電気泳動、代表的には、単一の電気泳動レーン、チャンネルまたはキャピラリーでの電気泳動によって分離される。これらの方法を用いて、自動 4 色 Sanger 型 DNA 配列決定は、分子レベルにおける遺伝子全体の特徴付けを可能にしてきた。 20

【0003】

立体化学的純度は、薬学の分野において重要であり、この分野で最も処方される 20 種の薬物のうち 12 種がキラリティーを示す (米国特許第 6,075,024 号)。適例は、
- アドレナリン様ブロック因子の L 形である R(-) アルブテロールによって与えられ、これは D エナンチオマーよりも 100 倍強力であることが公知である (米国特許第 5,760,090 号)。さらに、特定の異性体は単に不活性というよりもむしろ実際に有害であり得るので、光学純度は重要である。

【0004】

アトロブ異性体は、所定条件下での分離および単離が可能なほど十分に遅い相互変換を示す分子の立体異性体の立体配座である (McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, (1984), S. Parker 編, 36 頁) 30
。熱によるラセミ化へのエネルギー障壁は、キラル軸を形成する 1 本以上の結合の自由回転への立体障害により決定され得る。特定のピアリアル化合物は、C₂ 対称を欠く環内結合に関する回転が制限されているアトロブ異性を示す。鏡像異性化に対する自由エネルギー障壁は、回転に関する環内結合の安定性の尺度である。光学的励起および熱的励起は、電気的要因および立体的要因に依存して、ラセミ化を促進することができる (Tetreau (1982) Nouv. Jour. de Chimie, 6: 461-65)。

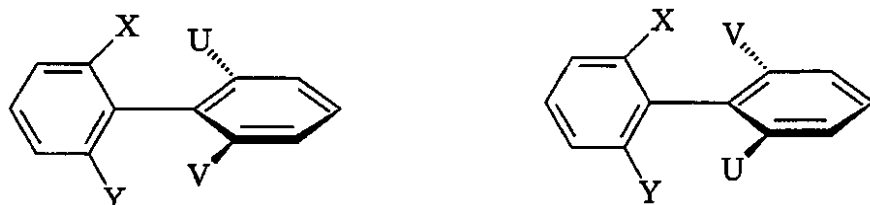
【0005】

オルト置換ビフェニル化合物は、アトロブ異性として公知であるこの種の立体配座的、回転異性を示し得る (Eliehl, E. および Wilen, S. (1994) Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., 1142 頁 - 55 頁)。このようなビフェニルはエナンチオマー的であり、sp²-sp² の炭素-炭素結合 (フェニル環どうしの環内結合) が自由回転への十分に高いエネルギー障壁を有するキラルアトロブ異性体であり、置換基 X-Y および置換基 U-V がこの分子に不斉性を与える。X-U、X-V、および/または Y-V、Y-U の立体相互作用は十分に大きいため、平面構造を最大エネルギーとする。下に示した、軸方向にキラルな 2 種の非平面エナンチオマーは、互いを含まずに単離できるほど十分に相互変換が遅い場合、アトロブ異性体として存在する。ある定義によると、アトロブ異性は、異性体が少なくとも 1000 秒の半減期 t_{1/2} を有する場合に存在すると定義され、これは 300 K において自由エネルギー障壁 22.3 kcal mol⁻¹ 40 50

(93.3 kJ mol^{-1})である(Ok i, M. (1983)「Recent Advances in Atropisomerism」, Topics in Stereochemistry, 14:1)。下に示した図中の太線および破線は、分子の部分(moiety)、または一部(portion)を表し、これらは回転エネルギー障壁によって立体的に制限される。太線の部分は平面の上部に直交して存在し、破線の部分は分子の残りの平面の下部に直交して存在する。

【0006】

【化29】



10

(III. 要旨)

本発明は、新規な組成物としての、アトロプ異性に富み実質的に純粋である、不斉キサンテン化合物のアトロプ異性体に関する。本発明はまた、単離方法、標識方法、および標識組成物の検出方法を含む。

【0007】

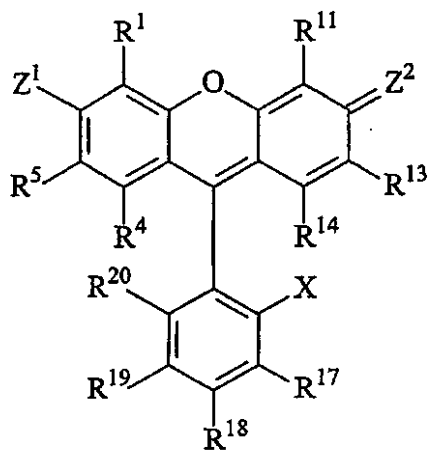
第1の局面において、本発明は、構造IIを有する実質的に純粋なアトロプ異性体化合物

20

を包含する：

【0008】

【化30】



II

30

ここで部位 R^1 、 R^4 、 R^5 、 R^{11} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 Z^1 または Z^2 は、置換基によって置換され得る。少なくとも1つの置換基が連結部分であり得る。1個またはそれ以上の環が環構造IIに縮合され得る。

【0009】

本発明の別の局面としては、第1波長の光の吸収が可能であり、それに対する応答において励起エネルギーの放出が可能であるドナー色素；ドナー色素により放出された励起エネルギーの吸収が可能であり、それに対する応答において第2波長での蛍光を発することが可能であるアクセプター色素；ならびにドナー色素およびアクセプター色素を連結するためのリンカー；を含むエネルギー移動色素化合物が挙げられ、ここで少なくとも1種のドナー色素および少なくとも1種のアクセプター色素は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体である。

40

【0010】

本発明の別の局面は標識基質であり、これらとしては、標識がキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含む

50

エネルギー移動色素である、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドが挙げられる。

【0011】

本発明の別の局面は標識試薬およびこれらの試薬による基質標準化方法であり、これらは、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体のホスホロアミダイトおよび活性エステル連結部分を含み、これらは基質との共有結合を形成する。

【0012】

本発明の別の局面は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体の連結部分またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素の連結部分に基質を反応させる工程を含む、標識基質の形成方法である。

10

【0013】

本発明の別の局面は、実質的にエナンチオマー的に純粋な化合物を用いたジアステレオマーの形成による、キサンテン化合物のアトロプ異性体の分離方法およびジアステレオマーの分離方法である。このジアステレオマーは、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体に変換され得る。

【0014】

本発明の別の局面は、標識がキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素を含む、標識基質の混合物の分離方法である。この標識基質は、プライマー伸長ポリヌクレオチドフラグメントであり得る。この標識基質は、電気泳動、クロマトグラフィー、またはその他の分離法によって分離され得る。この標識されたポリヌクレオチドの混合物は、標識プライマーまたは標識ターミネーターから形成され得る。この標識基質は、蛍光検出により検出され得る。

20

【0015】

本発明の別の局面は、酵素的に導入可能なヌクレオチドを用いてプライマー - ターゲットハイブリッドを伸長することによる、標識されたプライマー伸長生成物の産生法である。このプライマーまたはヌクレオチドは、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素を用いて標識され得る。

【0016】

本発明の別の局面は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素を用いて3'末端ヌクレオチドにおいて標識された、4クラスのポリヌクレオチドの混合物を形成することによる、ポリヌクレオチドの配列決定法であり、これらの標識はスペクトル的に分解可能である。これらのポリヌクレオチドはサイズによって分離される。

30

【0017】

本発明の別の局面は、2本のプローブを標的配列ヘアニースリングし、そして一方のプローブの5'末端と他方のプローブの3'末端との間にリン酸ジエステル結合を形成することによるオリゴヌクレオチドの連結法であり、一方または両方のプローブは、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素を用いて標識されている。

40

【0018】

本発明の別の局面は、2本またはそれ以上のプライマーを標的ポリヌクレオチドヘアニースリングし、そしてポリメラーゼおよび酵素的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によりプライマーを伸長することによる増幅法であり、少なくとも1つのプライマーまたは少なくとも1つのヌクレオチドは、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素によって標識されている。

【0019】

本発明の別の局面は、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体またはキサンテ

50

ン化合物の実質的に純粋なアトロプ異性体を含むエネルギー移動色素を含む、試薬キットである。

【0020】

(V. 例示的な実施形態の詳細な説明)

本発明の特定の実施形態の詳細への言及がここでなされ、これらの例は、添付の図に示される。本発明は、示された実施形態に関連して記述されるが、それらが、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図しないことは理解されるべきである。反対に、本発明は、全ての代替物、改変物および均等物を網羅することを意図し、これらは特許請求された本発明の範囲に含まれ得る。

【0021】

10

(V. 1 定義)

本明細書中で一般に用いられる立体化学的定義および立体化学的慣例は、McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) S. P. Parker 編, McGraw-Hill Book Company, New York ならびに Stereochemistry of Organic Compounds (1994); ならびに Eliel, E および Wilen, S., John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学活性な形態で存在し、すなわち、それらは平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物の記述において、分子のキラル中心に関する分子の絶対配置を示すために、接頭語 D および L または R および S が用いられる。接頭語 d および l または (+) および (-) は、その化合物による平面偏光の回転の符号を指定するために用いられ、(-) または l は、その化合物が左旋性であることを意味する。(+) または d を接頭された化合物は右旋性である。所与の化学構造に対して、立体異性体と呼ばれるこれらの化合物は、それらが互いの鏡像であることを除き、同一である。特定の立体異性体はまた、エナンチオマーと呼ばれ得、そしてこのような異性体の混合物はしばしばエナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの 50 : 50 の混合物は、ラセミ混合物またはラセミ化合物と呼ばれる。用語「ラセミ混合物」および「ラセミ化合物」とは、2つのエナンチオマー種による、光学活性を欠く等モル混合物を表す。

20

【0022】

用語「キラル」とは鏡像パートナーと重なり得ない性質を有する分子を表し、一方、用語「アキラル」とは鏡像パートナーに重なり得る分子を表す。

30

【0023】

用語「立体異性体」とは、同一の化学構成を有するが、原子または化学基の空間における配列に関して異なる化合物を表す。

【0024】

「ジアステレオマー」とは、2つまたはそれ以上のキラル中心を有し、それらの分子が互いの鏡像でない立体異性体を表す。ジアステレオマーは異なる物性(例えば、融点、沸点、スペクトルの性質および反応性)を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動およびクロマトグラフィーのような高分解能の分析手順によって分離され得る。

【0025】

40

「エナンチオマー」とは、互いに重なり得ない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を表す。

【0026】

用語「アトロプ異性体」とは、回転障壁が異性体種を単離し得るほど十分に高い、単結合の周りの制限された回転に起因する立体異性体を表す。アトロプ異性体は、単一の不斉原子を有さないエナンチオマーである。アトロプ異性体は、分子の他の部分との立体的相互作用の結果として分子中の単結合の周りの回転が阻害されるか、または非常に遅く、単結合の両末端の置換基が非対称である場合に生じる立体配座的立体異性体である。

【0027】

用語「実質的に純粋なアトロプ異性体」および「実質的にその立体異性体を含まない」と

50

は、その組成が少なくとも90重量%の1種のアトロブ異性体および10重量%以下の立体異性的アトロブ異性体を含むことを意味する。

【0028】

用語「アトロブ異性に富む」とは、他のアトロブ異性体との関連において、その組成物がより大きな比率 (proportion) またはより大きな割合 (percentage) のキサンテン化合物のアトロブ異性体の1つを含むことを意味する。

【0029】

「核酸塩基」とは、相補的な核酸塩基または相補的な核酸塩基アナログ (例えばプリン、7-デアザプリンまたはピリミジン) と対合して Watson-Crick 水素結合を形成し得る、窒素含有複素環式部分を意味する。代表的な核酸塩基は、天然に存在する核酸塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、および天然に存在する核酸塩基のアナログ、例えば、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、7-デアザ-8-アザアデニン (Kutyavin, 米国特許第5,912,340号)、イノシン、ネブラリン、ニトロピロール、ニトロインドール、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、プソイドシトシン、プソイドイソシトシン、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、イソグアニン、7-デアザグアニン、2-チオピリミジン、6-チオグアニン、4-チオチミン、4-チオウラシル、O⁶-メチルグアニン、N⁶-メチルアデニン、O⁴-メチルチミン、5,6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、4-メチル-インドール、およびエテノアデニン (Fasman (1989) Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 385頁-394頁, CRC Press, Boca Raton, FL) である。

【0030】

「ヌクレオシド」とは、リボース糖のC-1'炭素に連結した核酸塩基からなる化合物を意味する。このリボースは、置換されても良いし、置換されなくても良い。置換リボース糖としては、以下に限定されないが、1個またはそれ以上の炭素原子 (例えば3'炭素原子) が、1個またはそれ以上の同一または異なる-R、-OR、-NRRまたはハロゲン基によって置換されたリボースが挙げられ、ここで各Rは独立して、水素、C₁~C₆アルキルまたはC₅~C₁₄アリールである。リボースの例としては、リボース、2'-デオキシリボース、2'3'-ジデオキシリボース、3'-ハオリボース、3'-フルオリボース、3'-クロロリボース、2'-O-メチルリボースのような3'-アルキルリボース、4'-アノマー性ヌクレオチド、1'-アノマー性ヌクレオチド、および、2'-4'連結およびそれ以外が「ロックされた」二環糖改変体 (Imanishi WO 98/22489; Imanishi WO 98/39352; Wengel WO 99/14226) が挙げられる。核酸塩基がプリン (例えばAまたはG) である場合、リボース糖が核酸塩基のN⁹位に結合する。核酸塩基がピリミジン (例えばC、TまたはU) である場合、ペントース糖が核酸塩基のN¹位に結合する (Kornberg and Baker, (1992) DNA Replication, 第2版, Freeman, San Francisco, CA)。

【0031】

「ヌクレオチド」とは、モノマー単位として、または核酸内の、ヌクレオシドのリン酸エステルを意味する。ヌクレオチドは、時々、リボース糖の構造的特徴を特に指摘するために、「NTP」または「dNTP」および「ddNTP」として表される。「ヌクレオチド5'-トリホスフェート」とは、5'位に三リン酸エステル基を有するヌクレオチドを表す。この三リン酸エステル基は、種々の酸素の硫黄置換体、例えば-チオ-ヌクレオチド5'-トリホスフェートを含み得る。

【0032】

本明細書で用いられているように、用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は互換的に用いられ、ヌクレオチドモノマーの一本鎖ポリマーおよび二本鎖ポリマーを意味し、これはヌクレオチド間ホスホジエステル結合連結によって連結された2'-デオ

10

20

30

40

50

オキシリボヌクレオチド (DNA) およびリボヌクレオチド (RNA)、またはヌクレオチド間アナログ、ならびに会合する対イオン (例えば H^+ 、 NH_4^+ 、トリアルキルアンモニウム、 Mg^{2+} 、 Na^+ など) を含む。ポリヌクレオチドは、全体的にデオキシリボヌクレオチドを含み得るか、全体的にリボヌクレオチドを含み得るか、またはそれらのキメラ混合物を含み得る。ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド間アナログ、核酸塩基アナログおよび糖アナログを含み得る。ポリヌクレオチドは、代表的には、サイズにおいて、少数のモノマー単位 (例えば 5 個 ~ 40 個) (このとき、それらはオリゴヌクレオチドと頻繁に呼ばれる) から、数千個のモノマー性ヌクレオチド単位にまで渡る。他に示さない限り、ポリヌクレオチド配列が表されている場合は常に、ヌクレオチドは、左から右へ、5' 3' の順であり、そして、他に示されていない限り、「A」がデオキシアデノシンを示し、「C」がデオキシチジンを示し、「G」がデオキシグアノシンを示し、「T」がチミジンを示す。

10

【0033】

「結合部位」とは、リンカーに共有結合する、標識上または基質 (例えば、オリゴヌクレオチド) 上の部位を意味する。

【0034】

「リンカー」とは、標識をポリヌクレオチドに、またはある標識を別の標識に共有結合させる、共有結合または原子鎖を含む化学的部分を意味する。

【0035】

「連結部分」とは、化学反応性の基、置換基または部分 (例えば求核部分または求電子部分) を意味し、別の分子と反応して共有結合または連結を形成し得る。

20

【0036】

「アルキル」とは、親のアルカン、アルケンまたはアルキンの単一の炭素原子から 1 個の水素原子を除去することに由来する、飽和または非飽和の、分枝、直鎖、分枝または環状の炭化水素ラジカルを意味する。代表的なアルキル基は 1 個 ~ 12 個の飽和炭素および / または非飽和炭素からなり、これらとしては、以下に限定されないが、メチル、エチル、プロピルおよびブチルなどが挙げられる。

【0037】

「アルコキシ」とは、R が ($C_1 \sim C_6$) アルキルである -OR を意味する。

【0038】

「アルキルジイル」とは、親のアルカン、アルケンまたはアルキンの、同一のまたは異なる 2 個の炭素原子から 2 個の水素原子を除去することに由来する 2 個の一価のラジカル中心を有する、1 個 ~ 20 個の炭素原子の、飽和または非飽和の、分枝、直鎖または環状の炭化水素ラジカルを意味する。代表的なアルキルジイルラジカルとしては、以下に限定されないが、1, 2 - エチルジイル、1, 3 - プロピルジイルおよび 1, 4 - ブチルジイルなどが挙げられる。

30

【0039】

「アリール」とは、親の芳香環系の単一の炭素原子から 1 個の水素原子を除去することに由来する、6 個 ~ 20 個の炭素原子の、一価の芳香族炭化水素ラジカルを意味する。代表的なアリール基としては、以下に限定されないが、ベンゼン由来のラジカル、置換ベンゼン由来のラジカル、ナフタレン由来のラジカル、アントラセン由来のラジカルおよびビフェニル由来のラジカルなどが挙げられる。

40

【0040】

「アリールジイル」とは、共役共鳴電子系を有し、そして親のアリール化合物の異なる 2 個の炭素原子から 2 個の水素原子を除去することに由来する少なくとも 2 個の一価のラジカル中心を有する、6 個 ~ 20 個の炭素原子の、非飽和の環状炭化水素ラジカルまたは多環式炭化水素ラジカルを意味する。

【0041】

「置換アルキル」、「置換アルキルジイル」、「置換アリール」および「置換アリールジイル」とは、それぞれ、1 個またはそれ以上の水素原子がそれぞれ独立して別の置換基で

50

置換されている、アルキル、アルキルジイル、アリールおよびアリールジイルを意味する。代表的な置換基としては、以下に限定されないが、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O^-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S^-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NCO$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $NC(O)R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)NRR$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-OS(O)_2OR$ 、 $-S(O)_2NR$ 、 $-S(O)R$ 、 $-OP(O)O_2RR$ 、 $-P(O)O_2RR$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)X$ 、 $-C(S)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(S)OR$ 、 $-C(O)SR$ 、 $-C(S)SR$ 、 $-C(O)NRR$ 、 $-C(S)NRR$ 、 $-C(NR)NRR$ が挙げられ、ここで各 X は独立してハロゲンであり、そして、各 R は独立して $-H$ 、アルキル、アリール、複素環または連結基である。

10

【0042】

「ヌクレオチド間アナログ」は、以下のような、オリゴヌクレオチドのリン酸エステルアナログを意味する：(i) アルキルホスホネート（例えば、 $C_1 \sim C_4$ アルキルホスホネート、特にメチルホスホネート）；(ii) ホスホラミデート；(iii) アルキルホスホトリエステル（例えば、 $C_1 \sim C_4$ アルキルホスホトリエステル）；(iv) ホスホロチオエート；および(v) ホスホロジチオエート。ヌクレオチド間アナログはまた、糖/ホスフェートサブユニットが骨格構造を含む非ホスフェートによって置換された非ホスフェートアナログを含む。ある型の非ホスフェートオリゴヌクレオチドアナログは、一般に PNA (Nielsen (1991) 「Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymidine-substituted polyamide」, Science 254: 1497-1500) と呼ばれる、2-アミノエチルグリシン単位のような、アミド結合を有する。

20

【0043】

用語「標的配列」および「標的ポリヌクレオチド」とは、例えばプライマーまたはプローブのような相補的なポリヌクレオチドによるハイブリダイゼーションの対象である、ポリヌクレオチド配列を意味する。この配列は、DNA、RNA、これらのアナログから構成され得、これらの組み合わせを含む。

【0044】

用語「標識」とは、本明細書で用いられる場合、例えばオリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはヌクレオチド5'-トリホスフェートのような、基質に結合され得る任意の部分の意味し、そしてそれは以下のように機能する：(i) 検出可能な信号を発する；(ii) 例えばFRETのように、第2標識と相互作用して、第1標識または第2標識によって発せられた検出可能な信号を改変する；(iii) ハイブリダイゼーション（すなわち、二重鎖形成）を安定化する；(iv) 電荷、疎水性、形状またはその他の物理的パラメータにより、例えば電気泳動的易動度または細胞透過度のような易動度に影響を及ぼす；あるいは(v) 例えば親和性、抗体/抗原またはイオン性複合体形成のような捕捉部分を与える。

30

【0045】

「複素環」とは、1個またはそれ以上の環原子が、例えば窒素、酸素および硫黄のようなヘテロ原子で置換された環系を有する分子を意味する。

40

【0046】

「電子欠乏窒素複素環」とは、複素環を置換基として本発明の蛍光色素へと結合するために、環系の単一の原子から1個の水素原子を除去することによって誘導される、一価の電子欠乏窒素複素環である (Joule, Heterocyclic Chemistry, 第3版, Stanley Thornes Publisher, Ltd., Cheltenham, U.K. (1998); Acheson, R., An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds, 第2版, Interscience Publishers (John

50

Wiley & Sonsの一部門), New York (1967))。

【0047】

「基質」とは、本発明の色素化合物が結合する実体である。基質としては、以下に限定されないが、(i)ポリヌクレオチド、(ii)ヌクレオシドまたはヌクレオチド、(iii)ポリペプチド、(iv)炭水化物、(v)リガンド、および(vi)前述の(i)~(v)の任意のアナログが挙げられる。

【0048】

「酵素的に導入可能」とは、新生のポリヌクレオチド鎖の末端(例えば3')に、ポリメラーゼ酵素の作用を通じて酵素的に導入され得る、ヌクレオチドの性質である。

【0049】

「ターミネーター」とは、得られるポリヌクレオチド鎖に対する引き続くヌクレオチドの導入を阻害し、それによってポリメラーゼ伸長を停止させる、酵素的に導入可能なヌクレオチドを意味する。代表的なターミネーターは、3'-ヒドロキシル置換基を欠き、これには、2'3'-ジデオキシリボース、2'3'-ジデヒドロリボース、および2'3'-ジデオキシ、3'-ハオリボース(例えば3'-フルオリボース)が挙げられる。この代わりに、アラビノースのような、リボフラノースアナログが用いられ得る。例示的なヌクレオチドターミネーターとして、2'3'-ジデオキシ-D-リボフラノシル、-D-アラビノフラノシル、3'-デオキシ-D-アラビノフラノシル、3'-アミノ-2'3'-ジデオキシ-D-リボフラノシル、および2'3'-ジデオキシ-3'-フルオロ-D-リボフラノシルが挙げられる(Chidgeavdze(1984)Nucleic Acids Res., 12:1671-1686;およびChidgeavdze(1985)FEB. Lett., 183:275-278)。ヌクレオチドターミネーターはまた、可逆的ヌクレオチドターミネーターを含む(Metzker(1994)Nucleic Acids Res., 22(20):4259)。

【0050】

「酵素的に伸長可能」とは、ヌクレオチドがポリヌクレオチドの末端に酵素的に導入可能であり、得られる伸長ポリヌクレオチドがヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの引き続く導入を起こし得る、ヌクレオチドの性質である。

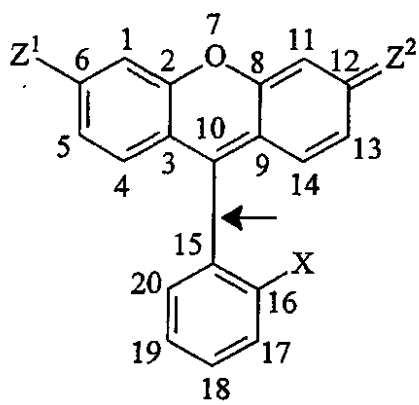
【0051】

(V.2 アトロブ異性体化合物)

本発明の組成物は、安定なアトロブ異性形態で存在する不斉キサンテン化合物である。アリール置換基は、次の構造I中のC-10とC-15との間の二環結合(矢印で示す)の周りの回転を制限し得る：

【0052】

【化31】



I

本発明の不斉化合物は、一般構造IIによって特徴付けられるキサンテン色素を含み：

10

20

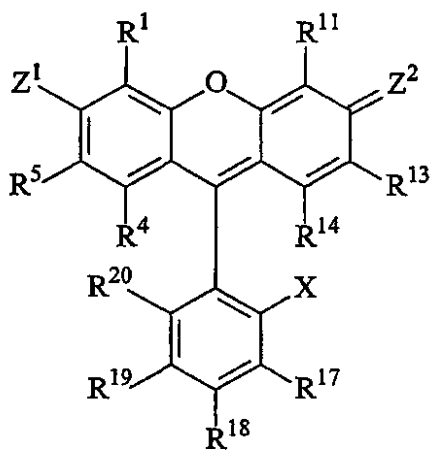
30

40

50

【 0 0 5 3 】

【 化 3 2 】



II

10

これらとしては、フルオレセイン ($Z^1, Z^2 = O$)、ロードル (rhodol) ($Z^1 = O, Z^2 = NR_2$) およびローダミン ($Z^1, Z^2 = NR_2$) が挙げられる。ここで Z^1 または Z^2 は NR_2 であり、R は独立して、水素、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、フェニル、ベンジル、アリール、複素環または連結部分であり得る。

【 0 0 5 4 】

20

置換基 $R^1, R^4, R^5, R^{11}, R^{13}, R^{14}, R^{17}, R^{18}, R^{19}$ および R^{20} は独立して、フッ素、塩素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート ($-SO_3^-$)、アルキルスルホネート ($-R-SO_3^-$)、アミノメチル ($-CH_2NH_2$)、アミノアルキル、4-ジアルキルアミノピリジニウム、ヒドロキシメチル ($-CH_2OH$)、メトキシ ($-OCH_3$)、ヒドロキシアルキル ($-ROH$)、チオメチル ($-CH_2SH$)、チオアルキル ($-RSH$)、アルキルスルホン ($-SO_2R$)、アリールチオ ($-SAr$)、アリールスルホン ($-SO_2Ar$)、スルホンアミド ($-SO_2NR_2$)、アルキルスルホキシド ($-SOR$)、アリールスルホキシド ($-SOAr$)、アミノ ($-NH_2$)、アンモニウム ($-NH_3^+$)、アミド ($-CONR_2$)、ニトリル ($-CN$)、 $C_1 \sim C_8$ アルコキシ ($-OR$)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第4級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシおよび連結部分であり得る。

30

【 0 0 5 5 】

本発明の化合物は、 R^{13} および R^{14} 、あるいは R^4 および R^5 が一緒になってベンゾを形成している縮合ベンゾ環を含み、この縮合ベンゾ基は置換基によって置換される。

【 0 0 5 6 】

置換基 $R^1, R^4, R^5, R^{11}, R^{13}, R^{14}, R^{17}, R^{18}, R^{19}$ および R^{20} はまた、独立して電子欠乏複素環であり得、これらとして、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、2-イミダゾール、4-イミダゾール、3-ピラゾール、4-ピラゾール、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、3-(1, 2, 4-N)-トリアゾリル、5-(1, 2, 4-N)-トリアゾリル、5-テトラゾリル、4-(1-O, 3-N)-オキサゾール、5-(1-O, 3-N)-オキサゾール、4-(1-S, 3-N)-チアゾール、5-(1-S, 3-N)-チアゾール、2-ベンゾオキサゾール、2-ベンゾチアゾール、4-(1, 2, 3-N)-ベンゾトリアゾールまたはベンゾイミダゾールが挙げられる。

40

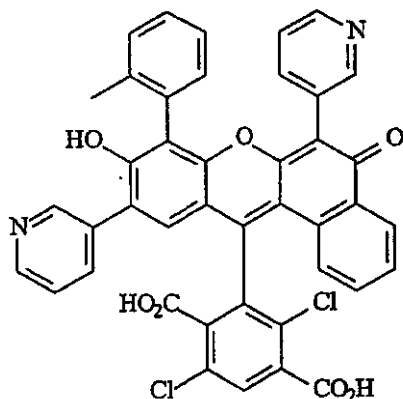
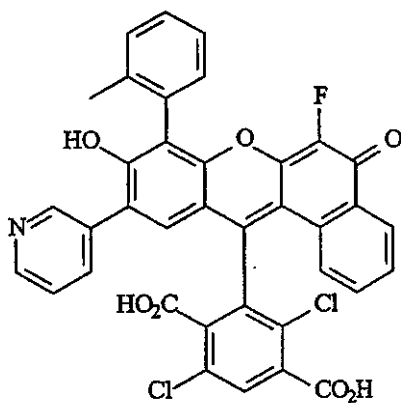
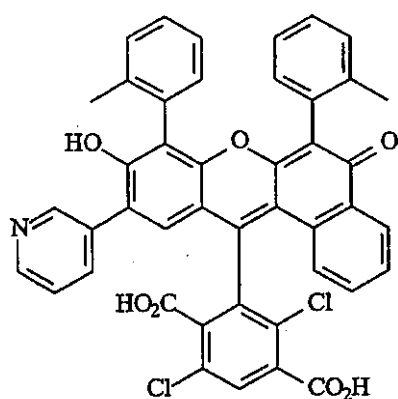
【 0 0 5 7 】

不斉フルオレセイン色素の例としては、以下の構造が挙げられる：

【 0 0 5 8 】

【 化 3 3 】

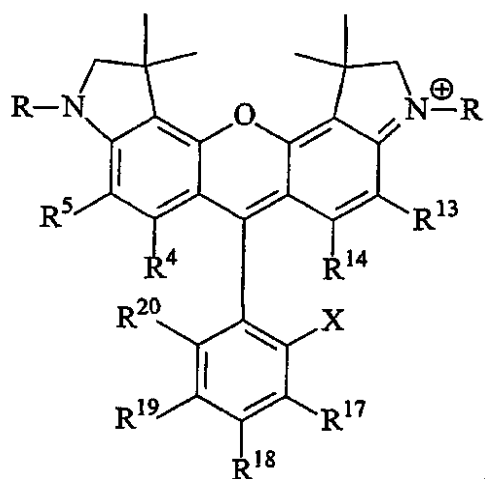
50



本発明の化合物は、 Z^1 窒素、 Z^1 に結合された炭素および R^1 に結合された炭素によって形成され、4員～7員を有する第1環構造を形成する、環構造を有する、アトロプ異性不斉ローダミンを含む。この化合物は必要に応じて、 Z^2 窒素、 Z^2 に結合された炭素および $R^{1'}$ に結合された炭素によって形成され同じく4員～7員を有する、第2環構造を有し得る。例としては、構造 I I a が挙げられる：

【 0 0 5 9 】

【化 3 4】

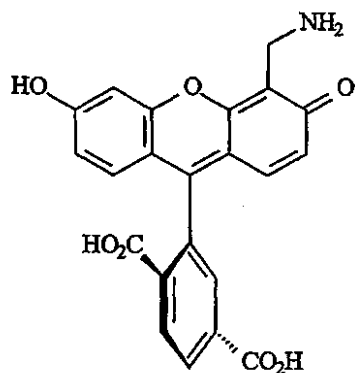
**Па**

不斉性は、以下のどちらの場合でも生じる：(1) R^1 、 $R^{1'}$ 、 R^4 、 $R^{1'4}$ 、 R^5 、 $R^{1'3}$ または Z^1 、 Z^2 、および (2) $R^{1'7}$ 、 $R^{1'9}$ または $R^{2'0}$ X。換言すれば、二環 sp^2-sp^2 結合上の両方のアリール置換基は非対称であり、そしてこの化合物は二環結合軸に沿った C_2 対称軸を欠く。I または II における二環結合を軸としてとり、その軸の周りの 180° の回転が同じ分子を与えることによって C_2 対称は規定される。 C_2 対称を有する対称キサンテン化合物の例は、フルオレセイン (R^1 、 R^4 、 R^5 、 $R^{1'1}$ 、 $R^{1'3}$ 、 $R^{1'4}$ 、 $R^{1'7}$ 、 $R^{1'8}$ 、 $R^{1'9}$ 、 $R^{2'0} = H$ ； $X = CO_2H$) である。

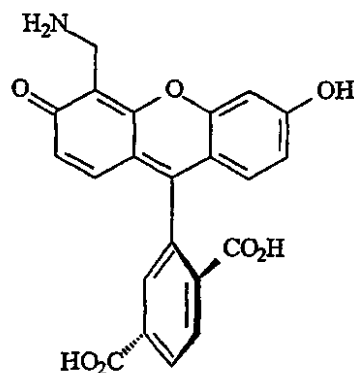
C₂ 対称を有さない不斉キサンテン化合物の例は、C - 11 アミノメチル、C - 19 カルボキシフルオレセイン (R¹, R⁴, R⁵, R¹³, R¹⁴, R¹⁷, R¹⁸, R²⁰ = H; R¹¹ = CH₂NH₂; R¹⁹, X = CO₂H) である。C - 10 から C - 15 への二環結合に隣接する置換基が十分に嵩高いため、回転が妨げられるので、この化合物はアトロプ異性である。回転のエネルギー障壁は十分に高いため、以下に示すような、安定であり互いに重なり得ない鏡像のアトロプ異性形態 2a および 2b が生じる：

【0060】

【化35】



2a



2b

10

20

二環結合の周りの回転は、ラセミ化、およびアトロプ異性の減少を生じる。代表的には、加熱すると、不斉キサンテン化合物のラセミ化が起こる。

【0061】

本発明の化合物は、当該分野において利用可能なあらゆる適切な方法によって調製され得る。種々の異なる不斉キサンテン化合物を調製するその例示的な方法は、下でより詳細に議論されるように、下の実施例の項で与えられ得る。

【0062】

特定の例として、置換基 Z¹ および置換基 Z² への言及が、本明細書の全体に渡ってなされる。この命名法は、示された構造式に対応しており、この構造式が、化合物のいくつかの可能な互変異性形態（または共鳴構造）のうち1個だけを表すため、これらの言及が単なる便宜のためであること、および、このようなあらゆる言及が本明細書に記述される化合物の範囲を限定することを意図しないことは理解される。

30

【0063】

当業者はまた、本発明の化合物が、周囲の環境の中でも特に pH に依存して、多くの異なるプロトン化状態で存在し得ることを認識する。本明細書中に与えられる構造式は可能ないくつかのプロトン化状態のうち1個だけを描写しているが、これらの構造が単なる例示であること、ならびに、本発明がいかなる特定のプロトン化状態にも限定されないこと（この化合物のあらゆる、および全てのプロトン化形態が、本発明の範囲に入ることを意図されていること）は理解される。

40

【0064】

本発明の化合物は、複数の正電荷または負電荷を有し得る。本発明の色素の正味の電荷は、正または負のどちらかであり得る。この色素に会合する対イオンは、代表的には、この化合物が得られる合成方法および/または単離方法によって決定される。代表的な対イオンとして、以下に限定されないが、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、リチウム、ハロゲン化物、アセテート、トリフルオロアセテートなど、および、これらの混合物が挙げられる。あらゆる会合対イオンの性質 (identity) が本発明の決定的な特徴ではないこと、および、本発明があらゆる型の対イオンに会合される色素を包含することは理解されるべきである。さらに、この化合物が種々の異なる形態で存在し得るため、対イオンに会合される形態の色素（例えば乾燥塩）だけでなく、対イオンに会合されない形態の

50

色素（例えば水溶液または有機溶液）も包含することを本発明は意図する。

【0065】

キサンテン色素は、核酸の検出可能な蛍光標識として重要な用途がある。（米国特許第5,188,934号；同第5,654,442号；同第5,885,778号；同第6,096,723号；同第6,020,481号；同第5,863,727号；同第5,800,996号；同第5,945,526号；同第5,847,162号；同第6,025,505号；同第6,008,379号；同第5,936,087号；同第6,015,719号）。不斉二環（binnular）結合を含むキサンテン化合物は、安定なアトロプ異性体形態として存在し得る。アトロプ異性キサンテン化合物とヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび炭水化物、などのキラル基質の結合体はジアステオマーを形成する。これらのジアステレオマー結合体は、電気泳動、クロマトグラフィー、および他の方法などの特定の条件下で分離し得る。ジアステレオマーの分離は、2重のピークまたはバンド、すなわち「2重ピーク（peak doubling）」の表示によって検出を妨げ得る。従って、キサンテン色素のアトロプ異性体を富化したかまたは精製した形態は、検体の分離および検出に基づく方法のための標識として重要である。

10

【0066】

不斉キサンテン化合物は、都合よく前駆体から合成され得る（米国特許番号第5,188,934号；同第5,654,442号；同第5,885,778号；同第6,096,723号；同第6,020,481号；同第5,863,727号；同第5,800,996号；同第5,945,526号；同第5,847,162号；同第6,025,505号；同第6,008,379号；同第5,936,087号；同第6,015,719号）。例示的な合成ルートは、C-19カルボキシフルオレセイン（Shipchandler (1978) Anal. Biochem. 162: 89-101；米国特許第4,510,251号；EP 232736；EP 110186）のアミノメチル化で始まり、C-1（C-11）アミノメチル，C-19カルボキシフルオレセインを与える。

20

【0067】

実質的にその立体異性体を含まないアトロプ異性体は、光学活性な分割剤を用いたジアステレオマーの形成などの方法を用いた、キサンテン化合物の立体異性体の混合物の分割によって得られ得る（E. L. Elielによる「Stereochemistry of Carbon Compounds,」（1962），McGraw Hill；Lochmuller, C. H., (1975) J. Chromatogr., 113: (3) 283-302）。キサンテン色素のアトロプ異性体は、反応性の標識試薬を得るための誘導体化の前、または誘導体化の後に分離および単離され得る。ラセミ混合物からの本発明のアトロプ異性キサンテン化合物の分離は、任意の適切な方法で成され得る。その方法としては、以下が挙げられる：（1）キラル化合物とのイオン性ジアステレオマー塩の形成および分別結晶化または他の方法による分離、（2）キラル誘導体化試薬とのジアステレオマー化合物の形成、ジアステレオマーの分離、および純粋なアトロプ異性体への転換、ならびに（3）キラル条件下におけるアトロプ異性体の直接的な分離。

30

【0068】

方法（1）の下で、ジアステレオマー塩は、ブルシン、キニーネ、エフェドリン、ストリキニーネ、-メチル-フェニルエチルアミン（アンフェタミン）などの鏡像異性体として純粋なキラル塩基と、カルボン酸およびスルホン酸などの酸性官能基を有する不斉キサンテン化合物との反応によって形成され得る。ジアステレオマー塩は、分別結晶化またはイオンクロマトグラフィーによって分離するために誘導され得る。アミノ化合物の光学異性体の分離のために、キラルカルボン酸またはキラルスルホン酸（例えば、ショウノウスルホン酸、酒石酸、マンデル酸、または乳酸）の付加により、ジアステレオマー塩が形成され得る。

40

【0069】

あるいは、方法（2）によって、分割される基質はキラル化合物の1つの鏡像異性体と反応し、ジアステレオマー対を形成する（Eliel, E. and Wilen, S. (

50

1994) *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., p. 322)。ジアステレオマー化合物は、不斉キサンテン化合物を、メンチル誘導体などの純粋な鏡像異性体のキラル誘導体化剤と反応させて、次いでジアステレオマーを分離し、そして加水分解して鏡像異性体を富化された遊離のキサンテンを得ることによって形成され得る。光学純度を測定する方法は、ラセミ混合物のキラルエステル（例えば、メチルエステルまたは Mosher エステル、-メトキシ-（トリフルオロメチル）フェニル アセテート（Jacob I I I, (1982) *J. Org. Chem.* 47: 4165）および2つのアトロブ異性体ジアステレオマーの存在について NMR スペクトルを分析することを包含する。例えば、C-1 アミノメチル、C-19 カルボキシフルオレセイン（ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、および他の蛍光色素に付着するために有用な不斉キサンテン化合物）は、塩基の存在化において（-）クロロギ酸メンチルと反応させて、メンチルカルバメート 1a および 1b（実施例 1、図 1a）のジアステレオマー混合物を形成した。アトロブ異性キサンテン化合物の安定なジアステレオマーは、アトロブ異性体のナフチル-イソキノリン（Hoye, T., WO 96/15111）の分離方法に従って、順相クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーによって分離および単離され得る。ジアステレオマー 1a および 1b を、分取用の逆相 HPLC により分離された（実施例 2、図 1b）。

10

【0070】

方法（3）により、2つの不斉鏡像異性体のラセミ混合物はキラル固定相を用いたクロマトグラフィー（「*Chiral Liquid Chromatography*」（1989）W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York; Okamoto, (1990) 「*Optical resolution of dihydropyridine enantiomers by High-performance liquid chromatography using phenylcalbamates of polysaccharides as a chiral stationary phase*」, *J. of Chromatogr.* 513: 375-378）により分離され得る。キサンテン化合物の鏡像異性体であるアトロブ異性体はキラル固定相でのクロマトグラフィーにより分離および単離され得る。ラセミの、C-1 アミノメチル、C-19 カルボキシフルオレセインのサンプルは、キラル吸着カラムでの HPLC 分析により、アトロブ異性の立体異性体を分離する2つのピークを与えた（図 2b）。例えば、キラル誘導体化方法（実施例 1）、分取 HPLC 分離（実施例 2）およびキラルメンチル補助部の加水分解（実施例 3、図 2a）によってアトロブ異性体が分離される場合、分離されたアトロブ異性体 2a はキラル吸着剤カラムでの HPLC により分析した場合、単一のピークを示す（図 2c）。

20

30

【0071】

アトロブ異性体は、不斉炭素原子を有する他のキラル分子を識別するために用いられる方法（例えば、施光性および円偏光二色性）により識別され得る。

【0072】

（V. 3 エネルギー移動色素）

別の局面において、本発明は、構造式 II で定義される化合物のようなアトロブ異性キサンテン化合物を含むエネルギー移動色素化合物を含む。通常、本発明のエネルギー移動色素は、第 1 の波長における光を吸収し、それに応じて励起エネルギーを放出するドナー色素、このドナー色素により放出された励起エネルギーを吸収し得、そしてそれに応じて第 2 の波長における蛍光を発生し得るアクセプター色素を含む。このドナー色素はリンカーを通じてアクセプター色素と結合し、そのリンカーは、ドナー色素とアクセプター色素との間の効率的なエネルギー移動を促進するために有効的である（Lee, 「*Energy-transfer dyes with enhanced fluorescence*」、米国特許第 5,800,996 号；Lee, 「*Energy-transfer dyes with enhanced fluorescence*」、米国特許第 5,945,526 号；Mathies, 「*Fluorescent labels and*

40

50

their use in separations」、米国特許第5,654,419号; Lee (1997) Nucleic Acids Res. 25:2816-22)。あるいは、ドナー色素およびアクセプター色素は、基質における異なる結合部位で標識され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、5'末端におけるドナー色素および3'末端におけるアクセプター色素で標識され得る。ポリペプチドは、カルボキシ末端におけるドナー色素および内部システインまたはリジン側鎖におけるアクセプター色素で標識され得る (Komoriya, 「Compositions for the detection of proteases in biological samples and methods of use thereof」、米国特許第5,605,809号)。本発明のエネルギー移動色素において、基質を標識するドナー色素およびアクセプター色素の少なくとも1つは、アトロプ異性キサンテン化合物である。エネルギー移動色素を含む他の色素は、アトロプ異性キサンテン化合物とのエネルギー移動プロセスを引き起こす任意の蛍光成分であり得、その例としては、フルオレセイン、ロードル (rhodol)、およびローダミンが挙げられる。他の色素としては、シアニン、フタロシアニン、スクアライン (squaraine)、ボディピー (bodipy)、ベンゾフェノキサジン、フルオレセイン、ジベンゾローダミン、またはローダミンなどの蛍光色素類が挙げられる。

10

【0073】

エネルギー移動色素は、DNAの配列決定のような、混合物中で複数標識された基質の同時検出における使用に利点を有する。単一ドナー色素は、一組のエネルギー移動色素で用いられ得、その結果、各々の色素は共通の波長において強い吸収を有する。次いで、エネルギー移動セット中のアクセプター色素を変えることによって、アクセプター色素は、個々の発光極大波長のスペクトルにおいて分解され得る。エネルギー移動色素はまた、非エネルギー移動色素よりも大きな有効ストークスシフトを与える。ストークスシフトは、ドナー色素が光を最大限吸収する波長である励起極大波長とアクセプター最大限の光を発する発光極大波長との間の差である。

20

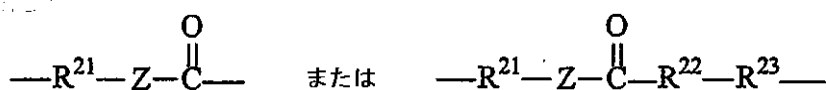
【0074】

通常、ドナー色素とアクセプター色素との間のリンカーは次の構造を有する：

【0075】

【化36】

30

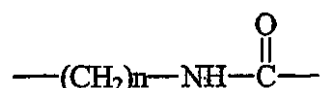


ここでZはNH、S、およびOからなる群から選択され； R^{21} はドナー色素と結合した $C_1 \sim C_{12}$ アルキルであり； R^{22} は $C_1 \sim C_{12}$ アルキルジイル、少なくとも1つの不飽和結合を有する5員環および6員環、ならびにカルボニル炭素と結合した縮合環構造からなる官能基から選択される；そして R^{23} はリンカーをアクセプター色素に結合する官能基を含む。 R^{22} は5員環または6員環であり、例としてシクロペンテン、シクロヘキセン、シクロペンタジエン、シクロヘキサジエン、フラン、チオフラン、ピロール、イソピロール、イソアゾール、ピラゾール、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、オキサジン、インデン、ベンゾフラン、チオナフテン、インドール、およびナフタレンが挙げられる。具体的には、リンカーは以下の構造を有し得る：

40

【0076】

【化37】



50

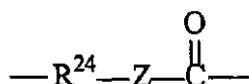
ここで n の範囲は 2 ~ 10 である。

【0077】

また、通常、 R^{23} は、以下の構造を有し得る：

【0078】

【化38】

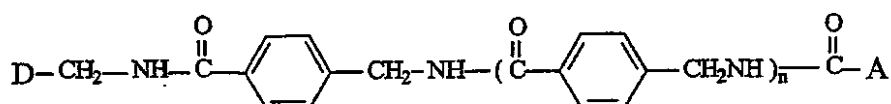
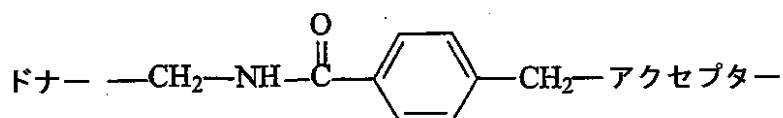
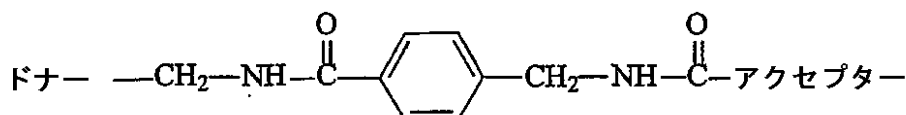
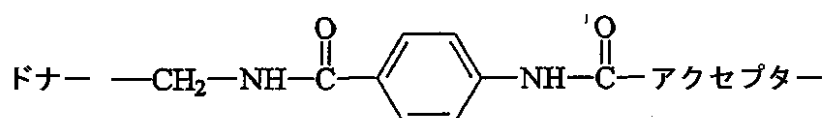


この中で R^{24} は $C_1 \sim C_{12}$ アルキルおよび

1つの実施形態において、ドナー色素とアクセプター色素との間のリンカーは、官能基を含み、その官能基は、アルケン、ジエン、アルキン、少なくとも1つの不飽和結合を有する5員環および6員環または縮合環構造のような、ある程度の構造剛性のリンカーを与える。エネルギー移動色素のドナー色素およびアクセプター色素は、以下の例示的な構造を有するリンカーによって結合され得る：

【0079】

【化39】



ここ D はドナー色素であり、A はアクセプター色素であり、 n は 1 または 2 である。フェニル環は、スルホネート、ホスホネート、および他の荷電基などの基で置換され得る。

【0080】

エネルギー移動色素のドナー色素とアクセプター色素との間のリンカーの結合部位は、ドナー色素およびアクセプター色素のうち一方または両方が本発明の化合物である場合、任意の位置であり得る。例示的な結合部位としては、 R^1 、 R^{11} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 Z^1 および Z^2 が挙げられる。リンカーおよび結合部位の例は、末端ヌクレオチド 25、26、33、および 34 で示され、この結合部位では、リンカーは、ドナーフルオレセイン色素の R^1 または R^{11} において、およびアクセプターローダミン色素の R^{18} または R^1

10

20

30

40

50

⁹ において結合する。代替的な実施形態では、ドナー色素およびアクセプター色素が、 $R^{1\ 8}$ 部位または $R^{1\ 9}$ 部位を介してリンカーによって結合され、ドナー色素またはアクセプター色素のいずれかが、 $R^{1\ 1}$ 部位、 $R^{1\ 1}$ 部位、 $Z^{1\ 1}$ 部位または $Z^{2\ 1}$ 部位を介して基質に結合される。別の代替的な実施形態では、ドナー色素およびアクセプター色素が、 $R^{1\ 1}$ 部位、 $R^{1\ 1}$ 部位、 $Z^{1\ 1}$ 部位または $Z^{2\ 1}$ 部位を介してリンカーによって結合され、そしてドナー色素またはアクセプター色素のいずれかが、 $R^{1\ 8}$ 部位または $R^{1\ 9}$ 部位を介して基質に結合される。

【0081】

エネルギー移動色素化合物は、リンカーを通して共有結合で基質と結合される。そのリンカーは、結合、 $C_{1\ 1} \sim C_{1\ 2}$ アルキルジイルまたは $C_{6\ 1} \sim C_{2\ 0}$ アリールジイルであり得る。そのリンカーは官能基を有し得、その官能基としては、アミド、カルバメート、尿素、チオ尿素、ホスフェート、ホスホネート、スルホネート、ホスホロチオエートなどが挙げられる。好ましいリンカーとしては、1, 2 - エチルジイルおよび 1, 6 - ヘキシルジイルが挙げられる。エネルギー移動色素と基質との間のリンカーの結合部位は、エネルギー移動色素上の任意の位置であり得、その位置においてはドナー色素およびアクセプター色素のうちの 1 つまたはその両方が本発明の色素である。基質はヌクレオシドまたはヌクレオチドである場合、基質上の好ましい結合部位は核酸塩基上である。核酸塩基がプリンである場合、リンカーは 8 位で結合され得る。核酸塩基が 7 - デアザプリンである場合、リンカーは 7 位または 8 位で結合され得る。核酸塩基がピリミジンである場合、リンカーは 5 位で結合され得る。例えば、末端ヌクレオチドの例、25 および 26 において、エネルギー移動色素は、 $R^{1\ 9}$ で核酸塩基に結合される。ここで基質はオリゴヌクレオチドであり、好ましい結合部位としては、3' 末端 (termini) および 5' 末端が挙げられる。他のオリゴヌクレオチド結合部位としては、ヌクレオチド間ホスフェート、またはホスフェート - アナログ連結、あるいは糖上の位置 (例えば 2' または 4') が挙げられる。基質はポリペプチド (ペプチドまたはプロテイン) である場合、好ましい結合部位としては、アミノ末端およびカルボキシル末端、ならびにリジン残基アミノ置換基が挙げられる。

(V. 4 標識の方法)

本発明は、標識試薬を含み、その試薬中でアトロブ異性キサンテン化合物は、基質と反応するための反応性の形態である。別の局面において、本発明は、本発明の化合物 (式 I) で標識された (すなわち、結合された) 基質を含む。基質は仮想的に、本発明の色素が結合体化され得る任意の分子または基質であり得、以下が挙げるが、それに限定しない: ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオシド、ポリペプチド、炭水化物、リガンド、実質的に純粋な鏡像異性体の化合物、粒子、表面、脂質、固体支持体、有機ポリマーおよび無機ポリマー、ならびにこれらの組み合わせおよび集合体 (例えば、染色体、核、生存細胞 (例えば、細菌または他の微生物、哺乳動物の細胞、組織など) など)。粒子としては、ナノ粒子、ミクロスフェア、ビーズ、またはリポソームが挙げられ得る。表面は、ガラスまたは非孔性の平面物質であり得る。本発明の化合物は、種々の手段によって任意のリンカーを経由して基質と結合され、その手段としては疎水性引力、イオン性引力、共有結合が挙げられる。

【0082】

代表的には、当該分野で周知の方法 (Hermanson, Bioconjugate Techniques, (1996) Academic Press, San Diego, CA, pp. 40 - 55, 643 - 71) を用いて、適切な溶媒中において、適切な反応性アトロブ異性キサンテンおよび結合体化されるべき基質を混合し、続いて、任意の結合体化されていない開始物質または望まれない副生成物から、標識された基質、結合体を分離することにより標識される。結合体は、後の使用のために、乾燥状態または溶液で貯蔵され得る。

【0083】

アトロブ異性キサンテンのラセミ混合物は、上述の分離方法および単離方法 (1)、(2

10

20

30

40

50

）および（３）に従って、標識剤の合成における任意の中間段階において、実質的に純粋なアトロブ異性体を単離するために分離され得る。

【００８４】

アトロブ異性キサンテンは、１つの置換基位置における連結部分または別の分子との色素の共有結合を含み得る。連結部分は、代表的には求電子性官能基であり、基質における求核性官能基との反応による共有結合の形成が可能である。求核性官能基としては、例えば、アルコール、アルコキシド、アミン、ヒドロキシルアミン、およびチオールが挙げられ得る。あるいは、連結部分は求核性官能基を含み得、その官能基は基質上の求電子性官能基と反応する。結合部分の例としては、アジド（azido）、一置換の一級アミン、二置換の二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、アルキルハライド、アリルハライド、アルデヒド、ケトン、アシルアジド、無水物、ヨードアセトアミドおよび活性化エステルが挙げられる。

10

【００８５】

１つの連結部分は、アトロブ異性キサンテン化合物のカルボキシル基置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHS）である（図３，６，１０，１１）。化合物のNHSエステル形態は標識剤である。色素のNHSエステルは、予備形成され、単離され、精製され、かつ／または特徴づけられ得るか、あるいは色素のNHSエステルはインサイ

チュで形成され得、そしてオリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリペプチドなどのような基質の求核性官能基と反応し得る（Brinkley, M. (1992) Bioconjugate Chem. 3: 2-13）。代表的に、カルボキシル形態の色素は、下記の組合せのいくつかとの反応によって活性化される：（１）カルボジイミド試薬（例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド）、またはウロニウム（uronium）試薬（例えば、TSTU（O-（N-スクシンイミジル）N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート）、HBTU（O-ベンゾトリアゾール-1-イル）-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート）、HATU（O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート）；（２）1

-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）などの活性化剤；および（３）色素のNHSエステルを与えるためのN-ヒドロキシスクシニミド。NHSエステルの代表例は、構造は4aおよび4b（図３）、構造8（図４）、および構造13（図５）である。

20

30

【００８６】

アトロブ異性キサンテン化合物上の官能基は、誘導体化および化合物上の他の官能基における反応の前に保護され得る。例えば、アトロブ異性体2aおよび2bのアミノ基は、トリフルオロアセチル化され、それぞれ3aおよび3bを与える（図2a、実施例5および6）。次いで、カルボキシル基を、N-ヒドロキシスクシニミドおよびカルボジイミド試薬を用いて（例えば、DAE）活性エステル（NHS）に転換され、それぞれ4aおよび4bを得た（図3、実施例7および8）。

40

【００８７】

いくつかの場合において、アトロブ異性キサンテン化合物および基質は、１つの工程においてアトロブ異性キサンテン基質結合体を形成するために化合物のインサイチュ活性化、および基質との反応によってカップリングされ得る。他の活性化試薬およびカップリング試薬としてはTBTU（2-（1H-ベンゾトリアゾ-1-イル）-1-1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート）、TFFH（N,N',N'',N'''-テトラメチルウロニウム 2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート）、PyBOP（ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート）、EEDQ（2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン）、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）；DIPC

50

D I (ジイソプロピルカルボジイミド)、M S N T (1 - (メシチレン - 2 - スルホニル) - 3 - ニトロ - 1 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾール) およびアリアルスルホニルハライド (例えば、トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロライド) が挙げられる。

【 0 0 8 8 】

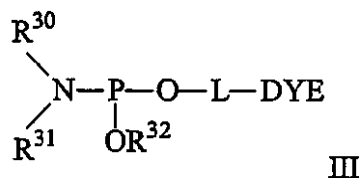
別の好ましい反応性連結基は、不斉キサンテン化合物のホスホロアミダイトである。ホスホロアミダイト色素試薬は、特に本発明の色素で標識されたオリゴヌクレオチドの自動的な合成に有用である。最も都合のよいことに、ホスホロアミダイト色素試薬は、固相合成の通常の過程の間に固体支持体に結合されたオリゴヌクレオチドとカップリングされ得る。オリゴヌクレオチドは、通常、ホスホロアミダイト方法によって固体支持体上で合成される (Caruthers, M. および Beaucage, S. 「Phosphoramidite compounds and processes」, 米国特許第 4, 415, 732 号; Caruthers, M. および Matteucci, M. 「Process for preparing polynucleotides」, 米国特許第 4, 458, 066 号; Beaucage, S. および Iyer, R. (1992) 「Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach」, Tetrahedron 48: 2223 - 2311)。

【 0 0 8 9 】

ホスホロアミダイトアトロブ異性キサンテン試薬は、ヌクレオシド形態または非ヌクレオシド形態であり得る。非ヌクレオシド形態のホスホロアミダイト試薬は、一般式 I I I :

【 0 0 9 0 】

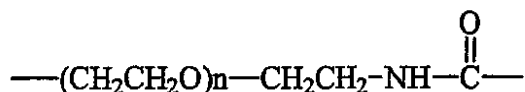
【 化 4 0 】



を有し、ここで D Y E は保護形態または非保護形態のアトロブ異性キサンテン I I (エネルギー移動色素を含む) であり; L はリンカーであり; R^{30} および R^{31} は別々に、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキル、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{10}$ アリール、および 10 個までの炭素原子を含むシクロアルキルであるか、または、 R^{30} および R^{31} はホスホロアミダイト窒素原子と共に、飽和窒素複素環を形成し; そして R^{32} は、オリゴヌクレオチドの望まない伸長を妨げるホスファイトエステル保護基である。通常、 R^{32} は、オリゴヌクレオチド合成条件に対して安定であるが、オリゴヌクレオチドまたは色素の完全性に不利に影響を及ぼさない試薬を用いて、合成オリゴヌクレオチド生成物から除去され得る。 R^{32} は、以下であり得る: (i) メチル、(ii) 2 - シアノエチル; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、または (iii) 2 - (4 - ニトロフェニル) エチル; $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{p}-\text{NO}_2\text{Ph})$ 。ホスホロアミダイト試薬の実施形態としては、以下を含む: (i) R^{30} および R^{31} が、それぞれイソプロピルである場合、(ii) R^{30} および R^{31} が、一緒になってモルホリノである場合 (iii) L が、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキルである場合 (iv) R^{32} が、2 - シアノエチルである場合、ならびに (v) D Y E がリンカーによって R^{18} または R^{19} で結合される場合。そのリンカー、L は代替的に以下:

【 0 0 9 1 】

【 化 4 1 】

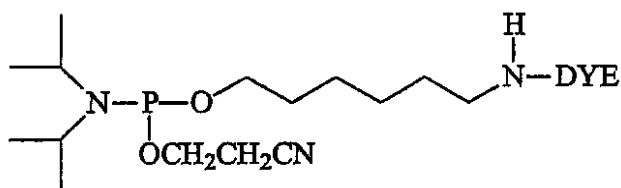


であり得、ここで n の範囲は 1 ~ 10 である。ホスホロアミダイト試薬 I I I の一例は、

次の構造を有する：

【 0 0 9 2 】

【 化 4 2 】



ホスホロアミダイト色素試薬 I I I により、単一であり実質的に純粋である本発明のアトロブ異性キサンテンを用いて基質が標識される。基質が、オリゴヌクレオチドである場合、色素は、典型的な 3' から 5' 方向の合成の結果としてオリゴヌクレオチドの 5' 末端において結合され得るか、または 5' から 3' 方向の合成方法が行われる場合、オリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合される (Wagner (1997) Nucleosides & Nucleotides 16:1657-60)。試薬 I I I は、固体支持体に (例えば、3' 末端を介して) 結合されるポリヌクレオチドとカップリングされ得る。他のホスホロアミダイト色素試薬 (ヌクレオシド形態および非ヌクレオシド形態) は、オリゴヌクレオチドの他の部位 (例えば、3' 末端、核酸塩基、ヌクレオチド間連結、糖) における標識を可能にする。核酸塩基部位、ヌクレオチド間連結部位、および糖部位は、蛍光色素による内部標識および多重標識を可能にする。

10

20

【 0 0 9 3 】

本発明のアトロブ異性キサンテン化合物は、3 価のホスファイト化剤を用いた求核性官能基のホスファイト化の任意の公知の方法によって、非ヌクレオシドホスホロアミダイト標識試薬に転換され得る。例えば、キサンテンがカルボキシル基 (例えば、 $R^{19} = CO_2H$) を含む場合、このカルボキシルは (例えば、 NHS へと) 活性化され得、6 - アミノ - 1 - ヘキサノールでアミド化され得る。得られたヒドロキシルは、ビス (ジイソプロピルアミノ) シアノエチルホスファイトまたはクロロ - ジイソプロピルアミノ - シアノエチルホスフィンでホスファイト化されて、ホスホロアミダイト色素標識剤を与え得る (Theisen (1992) 'Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides', Nucleic Acid Symposium Series No. 27, Oxford University Press, Oxford, pp. 99-100)。あるいは、化合物のカルボキシル基はヒドロキシルに還元されて、ホスファイト化され得る。

30

【 0 0 9 4 】

そのホスホロアミダイト試薬 I I I は、おだやかな酸活性化 (mild acid activation) の下でヒドロキシル基 (例えば、固体支持体に結合されたオリゴヌクレオチドの 5' 末端 OH) と反応し、ヌクレオチド間ホスファイト基を形成し、このホスファイト基が、次いで酸化され、ヌクレオチド間ホスフェート基になる。ある場合に、キサンテン化合物は官能基 (例えば、構造式 I における Z^1 および Z^2 酸素) を含み得、その官能基は、ホスホロアミダイト試薬の合成の間かまたはオリゴヌクレオチドのような分子を標識するための次の使用の間のいずれかの間保護を必要とする。その保護基は官能基の性質によって決まり、当業者には明らかである (Greene, T. and Wuts, P. Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991)。一般的に、使用される保護基は、5' - ヒドロキシル保護基 (例えば、ジメトキシトリチル) を除去するためにオリゴヌクレオチド合成において通常用いられる酸性条件 (例えば、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸) 下において安定であるはずであり、そして固体支持体から合成オリゴヌクレオチドを脱保護および / または切断するために用いられる塩基性条件 (例えば、水酸化アンモニウム、水性メチルアミン) 下においては不安定であるはずである。

40

50

【 0 0 9 5 】

アミノ酸およびアミノ酸アナログから構成される、ポリペプチド、抗体、および他のバイオポリマーは、本発明のアトロブ異性キサンテン化合物との結合体化によって共有結合で標識され得る。代表的に、その化合物は求電子性形態（例えば、N H S 反応性連結基）であり、ペプチドの求核性基（例えば、アミノ末端、またはリジンのようなアミノ酸のアミノ側鎖）と反応する。あるいは、色素は、求核形態（例えば、アミノ反応性連結基またはチオール反応性連結基）であり得、ペプチドの求電子性基（例えば、カルボキシル末端またはアミノ酸のカルボキシル側鎖の N H S ）と反応し得る。標識されたポリペプチドは、細胞表面および細胞内成分との相互作用の際の、標識ポリペプチドの特異的な結合特性および認識特性を保持し得る。キサンテン化合物は色素として作用し、結合または認識事象を局在化、可視化、および定量化するための検出エレメントを提供する。ポリペプチドは、また、2つの部分（蛍光レポーターおよびクエンチャー）で標識され得、その2つの部分は、蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）を共に受ける。その蛍光レポーターは、部分的にまたは有意にインタクトなポリペプチドのクエンチャー部分によってクエンチされ得る。ペプチダーゼまたはプロテアーゼによるポリペプチドの切断の際に、検知できるほどの蛍光の増加が測定され得る（Knight, C. (1995) 「Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes」, Methods in Enzymology, Academic Press, 248: 18-34）。

10

【 0 0 9 6 】

20

（ V . 4 A 標識ヌクレオチド ）

好ましい標識基質の種類としては、本発明の色素で標識されるヌクレオシドの結合体およびヌクレオチドの結合体が挙げられる。そのような標識ヌクレオシドおよび標識ヌクレオチドは、特に酵素合成で形成されるポリヌクレオチドの標識に有用である。例えばPCR増幅、Sanger型ポリヌクレオチドの配列決定、およびニックトランスレーション反応の状況で用いられる、標識されたヌクレオチド5'-トリホスフェート。

【 0 0 9 7 】

ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、糖部分上の部位または核酸塩基部分上の部位で標識され得る。好ましい核酸塩基標識部位としては、プリン核酸塩基の8-C、7-デアザプリン核酸塩基の7Cまたは8C、およびピリミジン核酸塩基の5位が挙げられる。ヌクレオシドまたはヌクレオチドと色素との間では、リンカーは任意の位置でアトロブ異性キサンテン化合物と結合し得る。

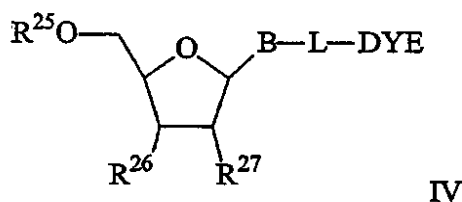
30

【 0 0 9 8 】

標識されたヌクレオシドまたは標識されたヌクレオチドは、酵素により組み込まれ得、酵素により伸長され得る。本発明の化合物で標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチドは、式IVを有し得：

【 0 0 9 9 】

【 化 4 3 】



40

ここでDYEは、保護形態または非保護形態の化合物IまたはIIであり、エネルギー移動色素を含む。Bは、任意の核酸塩基であり得る（例えば、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7-デアザアデニン、グアニン、および8-デアザグアノシン）。R²⁵は、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、チオホスフェート、またはホスフェートエステルアナログである。R²⁶およびR²⁷は、単独の場合、それぞれ

50

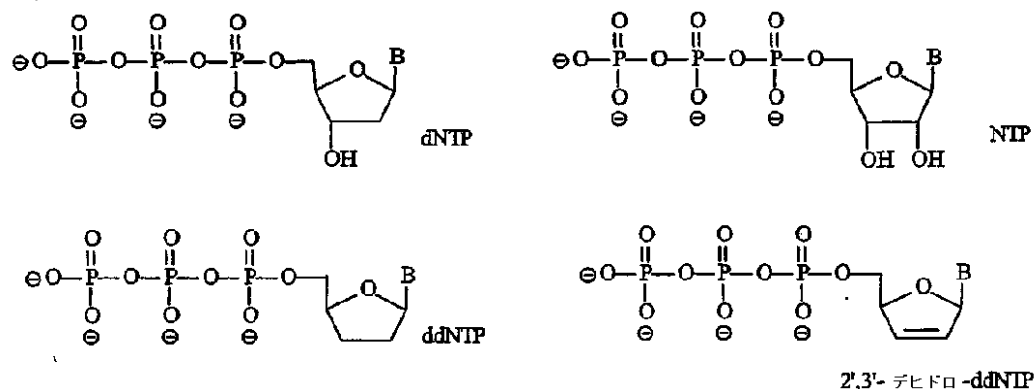
独立してH、HO、Fおよびホスホロアミダイトである。 R^{26} または R^{27} がホスホロアミダイトである場合、 R^{25} は、酸切断可能な (acid-cleavable) ヒドロキシル保護基 (例えば、ジメトキシトリチル) であり、この保護基によって自動合成条件下での次のモノマーカップリングが可能となる (Caruthers, 「Phosphoramidite compounds and processes」, 米国特許第4,415,732号; Caruthers, 「Process for preparing polynucleotides」, 米国特許第4,458,066号; Beaucage, S. および Iyer, R. (1992) 「Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach」, Tetrahedron 48: 2223-2311)。

【0100】

標識されたヌクレオシドまたは標識されたヌクレオチドが、ターミネーター (terminator) である場合、 R^{26} および R^{27} は、ポリメラーゼ媒介テンプレート指向重合 (polymerase-mediated template-directed polymerization) をブロックするように選択される。ターミネーターヌクレオチド R^{26} および R^{27} は、単独の場合、それぞれ独立してH、F、およびポリメラーゼ媒介テンプレート指向重合をブロックする部分であるか、または R^{26} および R^{27} が一緒になった場合は、2'-3'-ジデヒドロリボースを形成する。式IVにおいて、 R^{26} および R^{27} の両方がヒドロキシルである場合、結果として生じる化合物は、標識されたりボヌクレオシドおよびリボヌクレオチド (NTP) である。 R^{27} が水素であり、かつ R^{26} がヒドロキシルである場合、結果として生じる化合物は、標識された2'-デオキシリボヌクレオシドおよびヌクレオチド (dNTP) である。 R^{26} および R^{27} が各々水素である場合、結果として生じる化合物は2',3'-ジデオキシリボヌクレオシドおよびヌクレオチド (ddNTP) である。標識されたddNTPは、蛍光検出を利用するSanger型DNA配列決定方法におけるターミネーターとして特定の用途を見出す。標識された2'-デオキシリボヌクレオシド-5'-トリホスフェート (dNTP) は、DNAポリメラーゼ伸長産物を標識するための試薬として特定の用途を見出す (例えば、ポリメラーゼ鎖反応またはニクトランスレーション)。標識リボヌクレオシド-5'-トリホスフェート (NTP) は、RNAポリメラーゼ伸長産物を標識するための試薬として特定の用途を見出す。

【0101】

【化44】



アルキニルアミノ連結化合物IV (式中、Lがアルキンジイル基を含む) は、アトロブ異性キサンテン化合物をヌクレオシド、ヌクレオチド、およびそれらのアナログに結合体化するために有用である。それらの合成は、EP 8730584.0 および Hobbs, (1989) J. Org. Chem. 54: 3420 に教示される。対応するヌクレオシドモノホスフェート、ヌクレオシドジホスフェート、およびヌクレオシドトリホスフェートは、標準的な技術 (例えば、米国特許第5,821,356号; 同第5,770,71

6号；同第5, 948, 648号；同第6, 096, 875号に記載される方法）によって得られる。改変プロパルギルエトキシアミドリンカーLを有する化合物IVの合成の方法もまた、これらの特許中に見出され得る。構造式IVの化合物を合成する際の使用に適したさらなる合成手順は、例えば、Gibson (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 6455 - 6467; Gebeyehu (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 4513 - 4535; Haralambidis (1987) *Nucl. Acids Res.* 15: 4856 - 4876; Nelson (1986) *Nucleosides and Nucleotides* 5(3): 233 - 241; Bergstrom (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 374 - 375; 米国特許第4, 855, 225号、米国特許第5, 231, 191号、および米国特許第5, 449, 767号に記載され、これらは、本明細書中で参考として援用される。これらの手法のいずれも、本明細書に記載の全範囲の標識されたヌクレオシド、ヌクレオチド、およびアナログを合成するために、必要な場合に慣用的に適合され得るかまたは改変され得る。

10

【0102】

アルキニルリンカーLの1つの実施形態は下記のようにあり得る：

【0103】

【化45】



20

ここでnは、0、1、または2である。

【0104】

エネルギー移動色素対は、核酸塩基アミノ基を介して以下に連結することによってヌクレオチド5'-トリホスフェートに結合体化され得る：(i) エネルギー移動色素対の活性化エステル、または(ii) 1つの色素（例えば、R¹¹-保護アミノメチル、R¹⁸-カルボキシフルオレセイン、次いで非保護R¹¹-アミノメチルの対の第2の色素へのカップリング）への段階的なカップリング。

【0105】

リンカー試薬は、公知の合成方法によって調製され得る。例えば、ホスフェートリンカー試薬5は、環状ホスホロアミダイト7から出発して合成される。メチルグリコレート6を用いた7のホスファイト化に、5価のホスフェート8へのインサイチュ酸化が続く。メチルエステル、トリフルオロアセテート基の加水分解および脱メチル反応により、9を得た。Fmocでのアミノ基の保護により、N-ヒドロキシスクシイミドエステルとして活性化された10、リンカー試薬5を与えた（図4、実施例9）。

30

【0106】

アルキニルアミノ連結ヌクレオチドは、NHSリンカー試薬5と7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-ddATP 12を最初にカップリングして13を得、続いてFmoc基を加水分解し、11を得ることにより調製され得る（図5、実施例10）。アミノアトロプ異性キサンテン1aは、p-アミノメチル安息香酸のN-Fmoc、NHSエステルとカップリングされ（実施例11）、続いて14を与えるためにNHSエステルとして活性化される（図6）。11と14の反応によりアトロプ異性キサンテンddATP化合物16を得た。Fmoc基を、水酸化アンモニウムで除去して、15を得た（図6、実施例12）。

40

【0107】

NHS-ローダミン色素17は、二環式アミン18から合成された。1-ブromo-3-クロロプロパンとの環化により、三環式エステル19を得、19は加水分解して三環式アミン20とした（図7、実施例13）。20と無水物21のフリーデル-クラフツァシル化により、ケトン22を得、22をもう1当量の20と反応させて、対称ローダミンイソプロピルエステル23を得た。23のエステルは、切断され、カルボン酸24はNHS-ロ

50

ーダミン色素 17 に転換された (図 8、実施例 13)。

【0108】

実質的に純粋なアトロプ異性キサンテンエネルギー移動 d d A T P ターミネーター 25 は、15 と 17 のカップリングによって形成され、次いで陰イオン交換 H P L C で精製された (図 9、実施例 14)。

【0109】

異なる集束 (convergent) スキームを用いる、エネルギー移動ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドへの代替の合成ルートを実施し得る。基質、色素、およびリンカーサブユニット、またはシントンは、任意の順番でカップリングのために整理され得る。例えば、ドナー色素およびアクセプター色素のエネルギー移動対は、リンカーを介して共有結合で結合され得、次いでヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに結合され得る。多くの異なる合成ルートが実施され得、結果として本発明の色素でのヌクレオチドの標識に至る。反応性官能基 (例えば、カルボン酸基、アミノ基、ヒドロキシル基) は、有機合成方法論の莫大な技術を利用した、保護を必要とし得る。

10

【0110】

別のローダミン色素 28 は、ビス - トリフルオロアセトアミド 29 として保護され、N H S 化合物 27 に転換された (図 10、実施例 15)。プロパルギルエトキシアミノ d d T T P 30 は、アトロプ異性キサンテン化合物 14 とカップリングされ、F m o c アトロプ異性キサンテン d d T T P 31 を得、31 を加水分解して 32 を得た (図 11、実施例 16)。27 と 32 の反応によってアトロプ異性体、エネルギー移動ターミネーター d d T T P 26 を得、それらを、陰イオン交換 H P L C によって精製した (図 12、実施例 17)。

20

【0111】

(V. 4 B 標識オリゴヌクレオチド)

オリゴヌクレオチドは、市販のホスホロアミダイトヌクレオシド、支持体 (例えば、シリカ、細孔性ガラス (controlled - pore - glass) (米国特許第 4, 458, 066 号)、およびポリスチレン (米国特許第 5, 047, 524 号および同第 5, 262, 530 号) および自動合成機 (Models 392, 394, 3948 DNA/RNA Synthesizers, Applied Biosystems) を用いるホスホロアミダイト法 (米国特許第 4, 415, 732 号; 同第 4, 973, 679 号; 同第 4, 458, 066 号; Beaucage, S. および Iyer, R (1992) Tetrahedron 48: 2223 - 2311) により、通常、固体支持体上で合成される。

30

【0112】

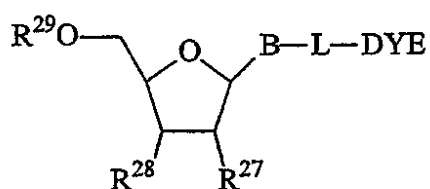
別の好ましい標識基質の種類としては、オリゴヌクレオチドと本発明の化合物との結合体が挙げられる。そのような結合体は、DNA 配列決定プライマー、PCR プライマー、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブ、オリゴヌクレオチドライゲーションプローブ、二重標識 5' - エキソヌクレアーゼ (TaqManTM) プローブなどとしての有用性を見出し得る (Fung, 米国特許第 4, 757, 141 号; Andrus, 「Chemical methods for 5' non - isotopic labelling of PCR probes and primers」(1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39 - 54; Hermanson, Bioconjugate Techniques, (1996) Academic Press, San Diego, CA. pp. 40 - 55, 643 - 71; Mullah (1998) 「Efficient synthesis of double dye - labelled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay」, Nucl. Acids Res. 26: 1026 - 1031)。標識オリゴヌクレオチドは式 V を有し得：

40

50

【 0 1 1 3 】

【 化 4 6 】

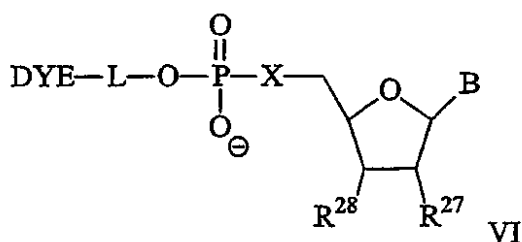


V

ここでこのオリゴヌクレオチドは、2 ~ 100 のヌクレオチドを含有する。DYE は、保護形態または非保護形態の化合物 I または II であり、エネルギー移動色素を含む。B は、任意の核酸塩基である（例えば、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニン、および 8 - デアザグアノシン）。L はリンカーである。R^{2 7} は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C₁ ~ C₆ アミノアルキル、C₁ ~ C₆ アルキル、アリル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、OCH₃、または OCH₂CH=CH₂ である。R^{2 2} は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログである。R^{2 9} は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログである。この実施形態において、構造 V は、核酸塩基標識オリゴヌクレオチドであり、核酸塩基を介して結合される本発明の複数の色素を有し得る。核酸塩基標識オリゴヌクレオチド V は、以下により形成され得る：(i) DNA ポリメラーゼまたはリガーゼによる、酵素により組込み可能なヌクレオチド試薬 I V (R^{2 5} がトリホスフェートである) の酵素的組込み、および (ii) 自動合成によるヌクレオシドホスホロアミダイト試薬のカップリング。それに対して、核酸塩基標識オリゴヌクレオチド V は、1 より多い組込み可能なヌクレオチド I V の組み込みによって多重標識され得、III のような色素標識試薬を用いる標識により、式 V I の 5' - 単独標識オリゴヌクレオチドを導き：

【 0 1 1 4 】

【 化 4 7 】



VI

ここで X は、O、NH、または S であり；R^{2 7} は、H、OH、ハライド、アジド、アミン、C₁ ~ C₆ アミノアルキル、C₁ ~ C₆ アルキル、アリル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、OCH₃、または OCH₂CH=CH₂ であり；R^{2 8} は、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであり；そして L は、C₁ ~ C₁₂ アルキル、アリール、または 100 個までのエチレンオキシ単位のポリエチレンオキシである。

【 0 1 1 5 】

式 V もしくは V I のリンカー L は、構造 I の R¹、R^{1 1}、R^{1 8}、R^{1 9}、Z¹、および Z² を含む、本発明のアトロブ異性体のキサンテン化合物 (DYE) のあらゆる部位に付着し得る。

【 0 1 1 6 】

合成オリゴヌクレオチドの標識化における第一の方法においては、求核官能性、たとえば第 1 級脂肪族アミンは、オリゴヌクレオチド標識付着部位、たとえば 5' 末端の、に導入される。自動化固体支持体合成が完了した後、オリゴヌクレオチドは支持体から切断され、そして全ての保護基は除去される。この求核オリゴヌクレオチドは、求電子部分を含む過剰量の標識試薬、たとえばイソチオシアネート、または活性エステル、たとえば N - ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシスクシンイミド (NHS) と均一溶液条件下で反応する (Hermanson, Bioconjugate Techniques, (1996) Academic Press, San Diego, CA. pp. 40-55, 643-71; ならびに Andrus, A. 「Chemical methods for 5'-non-isotopic labelling of PCR probes and primers」 (1995) PCR2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54)。標識したオリゴヌクレオチド VI は、色素の反応性連結基形態、たとえば NHS と 5'-アミノアルキルオリゴヌクレオチドとを反応させることにより、形成され得る。

【0117】

第二の方法において、標識は、自動合成中もしくはその前に、たとえば支持薬 (Mullah, 「Solid support reagents for the direct synthesis of 3'-labelled polynucleotides」; 米国特許第 5,736,626 号; ならびに Nelson, 「Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis」; 米国特許第 5,141,813 号) もしくはホスホロアミダイト試薬 III として、直接オリゴヌクレオチドに取りこまれる。ある蛍光色素および他の標識は、5' 標識のためのホスホロアミダイト試薬として官能基化された (Theisen (1992) Nucleic Acid Symposium Series No. 27, Oxford University Press, Oxford, pp. 99-100)。

【0118】

一般に、標識されたオリゴヌクレオチドが酵素合成により作製される場合、次の手順が用いられ得る。標的 DNA が変性され、オリゴヌクレオチドプライマーがテンプレート DNA にアニール化される。酵素取りこみ可能なヌクレオチドもしくはプライムされた標的の継続的なテンプレート特異的酵素伸長の補助が可能なヌクレオチドアナログの混合物 (たとえば、dGTP、dATP、dCTP、および dTTP、もしくは dUTP を含む混合物) が、プライムされた標的へ添加される。少なくとも、ヌクレオチドの画分は、標識されたターミネーター IV であり、アトロブ異性体キサンテン色素 II で標識される。ポリメラーゼ酵素は、ポリメラーゼ酵素が活性な条件下で、続いて混合物に添加される。標識されたオリゴヌクレオチドは、標識されたヌクレオチド、もしくはターミネーターの取りこみにより、ポリメラーゼにより媒介される鎖合成中に形成される。代替の酵素合成方法において、1 つではなく 2 つのプライマーが用いられる。ひとつは標的の (+) 鎖に相補的であり、そしてもうひとつは、標的の (-) 鎖に相補的であり、ポリメラーゼは熱安定性のポリメラーゼであり、そして反応温度は変性温度および伸長温度の間で循環される。これによって、PCR により、標的配列に対する標識された補体を急激に合成する (Innis (1990) PCR Protocols, Eds., Academic Press)。

【0119】

ある好ましい合成後化学標識法において、オリゴヌクレオチドは、次のように標識される。構造 I に従う NHS の形態の色素は、DMSO 内で溶解もしくは懸濁され、0.25 M、約 pH 9 のピカーボネート / カーボネート緩衝液中の 5'-アミノヘキシルオリゴヌクレオチドに過剰量 (5 ~ 20 当量) で添加され、6 時間反応される。(たとえば米国特許第 4,757,141 号)。アトロブ異性体キサンテンで標識されたオリゴヌクレオチドは、緩衝液、たとえば 0.1 モル濃度の酢酸トリエチルアミン (TEAA) で溶出して、サイズ排除クロマトグラフィーカラムを通すことにより、未反応色素から分離し得る。粗製の標識したオリゴヌクレオチドを含む画分は、勾配溶離を使用する逆相 HPLC によって、より一層精製される。

【0120】

本発明の、アトロブ異性体キサンテン化合物で標識されたポリヌクレオチドは、電気泳動

10

20

30

40

50

の移動率に影響する部分、すなわち移動修飾標識で、さらに標識され得る。移動修飾標識は、ポリエチレンオキシ単位 - (CH₂CH₂O)_n - を含み、ここでnは1 ~ 100であり得る (Grossman, 米国特許第5,624,800号)。望ましくは、nは2 ~ 20である。ポリエチレンオキシ単位は、リン酸基で分散され得る。不連続で既知の大きさであるポリエチレンオキシのさらなる標識で、アトロプ異性体キサンテン標識ポリヌクレオチドを特異的に標識することは、電気泳動による実質的に、ポリヌクレオチド内にあるヌクレオチドの数に非依存性の分離を可能にする。つまり、同じ長さのポリヌクレオチドは、分光的に分離可能な色素標識、および移動修飾標識の存在により選別され得る。色素標識および移動修飾標識の両方を保有するポリヌクレオチドは、単一標識したポリヌクレオチドおよびヌクレオチド成分のライゲーシオン、もしくはポリメラーゼ伸長により、酵素的に形成され得る。

10

【0121】

(V.5 方法)

特異的にオーバーラップする複数の分析物の同時検出を必要とする方法は、標識としての不斉キサンテン色素の実質的に純粋なアトロプ異性体から有利であり得る。本発明のアトロプ異性体キサンテン化合物は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、DNA配列決定、遺伝子発現のアンチセンス転写および翻訳制御、遺伝解析、およびDNAプローブに基づく診断用試験などの、いかなる蛍光検出を利用した方法にも、よく適している (Kricka, L. (1992); Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, pp. 3-28)。20
蛍光色素標識したオリゴヌクレオチドの蛍光検出は、5'エキソヌクレアーゼアッセイ (Livak, 米国特許第5,723,591号)、FRETハイブリダイゼーション (Tyagi, S. および Kramer, F. (1996); Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridization, Nature Biotechnology, 14:303-08)、遺伝子連鎖マッピング (Dib (1996); 「A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites」, Nature 380:152-54)、およびオリゴヌクレオチドライゲーシオンアッセイ (Grossman (1994), 「High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation」, Nucl. Acids Res. 22:4527-34) などのような核酸配列検出アッセイの基礎である。

20

30

【0122】

本発明は、電気泳動のような生化学的な分離手順に供される、異なって標識されたポリヌクレオチドのクラスを検出するために、特によく適している (Rickwood and Hames 編, Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach, IRL Press Limited, London, 1981)。電気泳動マトリックスは、たとえば架橋もしくは非架橋ポリアクリルアミド、または約2 ~ 20重量%の濃度 (体積あたりの重量) を有する他のアミド含有ポリマーなどのふるい分け高分子であり得る (Madabhushi, 米国特許第5,552,028号、および米国特許第5,567,292号、および米国特許第5,916,426号)。電気泳動マトリックスは、スラブゲルもしくはキャピラリー形式で作製され得る (Rosenblum, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3925-29; Mathies, 米国特許第5,274,240号)。

40

【0123】

(V.5A プライマー伸長)

「フラグメント解析法」もしくは「遺伝子解析法」のような、本明細書中で言及される方

50

法の好ましいカテゴリー内において、実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン化合物を含む、蛍光色素で標識したポリヌクレオチドフラグメントは、たとえばライゲーシオンもしくはポリメラーゼ特異的プライマー伸長などの、標識されたプライマーもしくはヌクレオチドを使用するテンプレート特異的酵素合成を通してもたらされる。ポリヌクレオチドフラグメントは、たとえば電気泳動もしくはクロマトグラフィーなどの大きさに依存する分離プロセスに供され、そして、分離されたフラグメントは、分離に続いて、たとえばレーザー誘導蛍光などによって検出される (Hunkapiller, 米国特許第 4, 811, 218 号)。複数のクラスのポリヌクレオチドは同時に分離され得、そして異なるクラスは、本発明の色素を含んだ、スペクトルの的に分解可能な標識により識別される。電気泳動において、クラスは、電気泳動の移動率に基づいて分離される。

10

【0124】

(V. 5B DNA 配列決定)

好ましくは、DNA 配列決定の連鎖停止方法、すなわちジデオキシ DNA 配列決定、もしくはサンガー型配列決定、およびフラグメント解析が用いられる (Sanger (1977); 「DNA sequencing with chain-terminating inhibitors」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467)。模範的な連鎖停止ヌクレオチドアナログは、3' から 5' への DNA 鎖伸長に必要な 3' OH 基の不足した 2', 3' - ジデオキシヌクレオシド 5' - トリホスフェート (ddNTP) を含む。プライマーもしくは ddNTP は、本発明の実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン色素で標識され得、そして高分解能の電気泳動によるフラグメントの分離後、蛍光により検出される。色素はプライマーの 5' 末端上で、例えば、プライマーの核酸塩基上、もしくはジデオキシヌクレオチドの核酸塩基上のアミノ (Fung, 米国特許第 4, 757, 141 号) で、例えばアルキルアミノ結合基を介して (Khan, 米国特許第 5, 770, 716 号、および米国特許第 5, 821, 356 号、ならびに Hobbs, 米国特許第 5, 151, 507 号) 官能基に結合され得る。

20

【0125】

おのおののターミネーターは、異なった蛍光色素を保持し、そして集合的に、実験でのターミネーターは、本発明の色素から 1 つ以上を含む色素のセットを保持する。好ましいフラグメント解析方法において、色素で標識されたフラグメントは、相対的な大きさ、すなわち配列の長さにより同定される。フラグメントの大きさと配列の対応は、4 つの可能な末端ヌクレオチド (「ターミネーター」) ならびに、分光的に分解可能な色素のセットのメンバーの取りこみにより樹立される (Bergot, 米国特許第 5, 366, 860 号)。分光的に分解可能な色素のセットは、少なくとも 1 つの実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン化合物を含み得る。

30

【0126】

(V. 6 ライゲーシオン)

リガーゼ酵素による核酸プローブの共有結合は、分子生物学者に利用可能な最も有益なツールのひとつである。2 つのプローブが、2 つのプローブが隣接し、そして介在性ギャップのないテンプレート核酸にアニール化されるとき、リン酸ジエステル結合は、リガーゼ酵素によって、片方のプローブの 5' 末端ともう一方のプローブの 3' 末端との間で形成され得る (Whitley, 米国特許第 4, 883, 750 号; Landegren, (1988); 「A ligase mediated gene detection technique」, Science 241: 1077-80; Nickerson, 「Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide assay」(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8923-27)。オリゴヌクレオチドライゲーシオンアッセイは、標的 DNA サンプル中の特異的な配列の存在を検出する。一方もしくは双方のプローブが色素で標識される場合、ライゲーシオン生成物が蛍光により検出され得る。一方もしくは双方のプローブは、実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン色素で標識され得る。ライゲーシオン生成物は、電気泳動、クロマトグラフィー、

40

50

もしくは他の、「大きさ」もしくは「電荷」に基づいた分離方法により検出され得る。

【0127】

(V.7 増幅)

本発明のアトロブ異性体キサンテン化合物は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ならびに他の核酸増幅および選択方法における、5'標識したオリゴヌクレオチドプライマー上での標識としての用途を見出す。PCR用途は、繰り返しユニットの数が可変である特定の配列の隣接した複数のコピーを含む、2本鎖DNAの繰り返し領域の、可変数の縦列反復配列(VNTR)増幅法、短い縦列反復配列(STR)増幅法、およびマイクロサテライト増幅法による、遺伝子型決定のための、標識したオリゴヌクレオチドの使用を含む。好ましくは、このようなPCR遺伝子型決定方法において、PCRプライマーは、本発明のアトロブ異性体キサンテンで標識される。

10

【0128】

特に好ましい実施形態において、アトロブ異性体キサンテン化合物は、PCR中の増幅生成物のリアルタイムまたは終点測定を供給する、定量的方法もしくは試薬において用いられ得る(米国特許第5,210,015号、および米国特許第5,538,848号)。蛍光色素失活剤プローブを用いたエキソヌクレアーゼアッセイ(Taqman(登録商標))は、PCRをおこなうために必要以上のサンプル処理のない、閉管システムにおけるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)生成物の直接検出をもたらす(米国特許第5,723,591号;Mullah,(1998):「Efficient synthesis of double dye-labelled oligodeoxynucleotide probes and their application in a real time PCR assay」,Nucl. Acids Res. 26:1026-1031)。Taqmanアッセイにおいて、プライマー伸長を導き、ポリヌクレオチドを増幅するポリメラーゼはまた、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性によって、標的配列にアニール化されたプローブを置換し、切断する。Taqman型アッセイにおいて、プローブは自己失活性であり、蛍光色素および失活剤部分で標識され、これらのどちらかが本発明の色素であり得る。分光のオーバーラップは、プローブが原形のままであるとき、効率的なエネルギー移動(FRET)を導く(Clegg,(1992);「Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids」,Meth. Enzymol. 211:353-388)。標的配列にハイブリダイズされたとき、標的-プローブハイブリッドが存在する量に比例した蛍光シグナルを放出するために、プローブはPCR中に切断される(米国特許第5,538,848号、および米国特許第5,723,591号)。

20

30

【0129】

増幅の進行は継続的に、すなわちリアルタイム検出で観察され得る。本発明の分光的分解可能な、アトロブ異性体キサンテン色素は、標的のPCR増幅の後、遺伝子型決定実験において有益である。特に、各々異なる色素で5'末端を標識されたプライマーオリゴヌクレオチドのセットは、複数の遺伝子座を増幅し、一塩基多型(SNP)および対立遺伝子を識別し得る。標準の大きさにおける色素で標識した増幅生成物の電気泳動分離は、プライマー配列に依存して、ある遺伝子型を示すプロフィール、もしくは特徴的なデータセットを構築する。

40

【0130】

(V.7A ハイブリダイゼーションアッセイ)

標的核酸にハイブリダイズする特定の蛍光色素-失活剤プローブは、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて有益である。プローブが標的にハイブリダイズされない場合、プローブは、蛍光色素と失活部分との間の空間的な接近を可能にするコンホメーションを得、蛍光失活を生じ得る。標的へのハイブリダイゼーションの際に、これらの部分は物理的に分離され、失活が停止もしくは減衰し、そして蛍光が増加する。蛍光が検出可能であるかまたは定量化される場合、サンプル中の標的配列の存在が推定される。本発明のアトロブ異性体色素は、蛍光色素もしくは失活部分としても用いられ得る。ヘアピン領域、いわゆる

50

「分子ビーコン」(Tyagi & Kramer)を形成する自己相補的な配列を有する蛍光色素 - 失活剤プローブは、相補的な標的配列へのハイブリダイゼーションの際に蛍光変化(たとえば生体細胞におけるmRNAのインサイチュ定量)を受ける。異なる蛍光色素で標識されたハイブリダイゼーションプローブは、本発明のアトロブ異性体キサンテン色素を含むが、複数かつ均一なハイブリダイゼーションアッセイが密封した反応チューブ内で実行されることを可能にする。

【0131】

(V. 8 クロマトグラフィー)

実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン化合物で標識された基質を用いた前述の方法は、標識された基質がクロマトグラフィーにより検出される場合にも実施され得る(HPLC of Macromolecules, A Practical Approach, 第2版, R. W. A. Oliver 編(1997) Oxford University Press)。HPLCの十分に確立された技術は、固定固相との吸着性のイオン交換相互作用もしくは疎水相互作用から水性の有機移動相内へ、サンプル基質が溶解され、そして溶出される逆相条件下において、ポリヌクレオチドなどの大きな基質の分離を可能にする。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは多糖類などのキラルな基質がアトロブ異性体キサンテン化合物のラセミ混合物で標識されると、ジアステレオマーとなる。本質的に、得られた過剰のセットの分析物が得られたが、これは、分析結果を不明瞭にし得る。得られるジアステレオマー混合物の分析は、HPLCの高分解条件下で、ダブルピーク、ブロードピーク、および他の限定した人為的結果を引き起こし得る。この問題は、キラル基質が、サンガー配列決定法によりもたらされたポリヌクレオチドフラグメントの包接されたセットのような、密接に関連した化合物の混合物である場合、特に悪影響を及ぼす。キラル基質のための標識としての、キサンテン化合物の実質的に純粋なアトロブ異性体形態の使用は、ジアステレオマーのひとつを除去することにより、分析に対するこの不必要な妨害を抑制する。本発明の、驚くべき予期しない利点は、全体的に、よりシャープなピーク、より少数の割れたピーク、およびより高い分解能であることにより例証され得る。

【0132】

(V. 9 キット)

本発明は、本発明の実質的に純粋なアトロブ異性体キサンテン化合物および/もしくはこれらの標識した複合体を含むキットを包含する。1つの実施形態において、キットは、別の分子、すなわち基質に対する連結部分とアトロブ異性体キサンテン化合物とを複合体化するため有益である。そのようなキットは一般に、任意の連結部分ならびに別の分子もしくは基質に色素を複合体化することに適した試薬、酵素、緩衝剤、溶媒などを含む本発明のアトロブ異性体キサンテンを備える。アトロブ異性体キサンテンは、エネルギー移動色素の受容体もしくは供与体となり得る。

【0133】

1つの実施形態において、キットは、酵素的に合成されたオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの本発明のアトロブ異性体キサンテンでの標識化に有益である。このようなキットは、一般的に、本発明による標識された酵素的に取りこみ可能なヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログ、継続したプライマー伸長の補助が可能な、酵素的に取りこみ可能であるヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログの混合物およびポリメラーゼ酵素を含む。好ましくは、標識した酵素的に取りこみ可能なヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログは、構造IVに基づいた化合物であるが、最も好ましくは標識したターミネーターである。好ましいポリメラーゼは、熱安定性な、AMPLITAQ(登録商標)DNAポリメラーゼFSである(Applied Biosystems, Foster City, CA)などである。

【0134】

あるいは、キットは1つ以上のプライマーを含み得る。プライマーは、アトロブ異性体キサンテンおよびアトロブ異性体キサンテンを含むエネルギー移動色素で標識され得る。

【0135】

(V.10 実施例)

本発明は、以下実施例の考察によりさらに明らかにされ、これらの実施例は、純粹に本発明の模範とされることを意図しているものであり、いかなる方法においても本発明の範囲を制限するものではない。

【0136】

(実施例1) C-1アミノメチル, C-19カルボキシフルオレセインのメンチルカルバメートジステレオマー, 1aおよび1bの調製

C-1アミノメチル, C-19カルボキシフルオレセインの塩酸塩 (5.16g, 11.6mmol, 分子量441.8; Shipchandler (1987) Anal. Biochem. 162: 89-101) を脱イオン化したホルムアミド50mlおよびジイソプロピルエチルアミン10.2mlに溶解した。(-)メンチルククロホルムメート (3.06g, 3.0ml, 14mmol, 分子量219; Aldrich Chemical, Milwaukee, WI; Jour. Chem. Soc., Chem. Commun. (1987) 470; Yodo (1988) Chem. Pharm. Bull. 36: 902) を、アルゴン下で室温にて攪拌しながら滴下した。1.5時間後、TLC分析 (酢酸エチル/ヘキサン: 4/1) は、反応物のより高いRfスポットへの部分的な転換を示した。さらに(-)メンチルククロホルムメート1mlを添加し、さらに0.5時間攪拌を続けた。TLC分析は、より高いRfの生成物への完全な転換を示した。飽和水性NaHCO₃での反応混合物の希釈の後に、酢酸エチル500mlでの抽出をおこなった。水性画分をpH3に酸性化し、酢酸エチルで抽出した。混合した有機画分をNa₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧濃縮して、4.5g、収率66%の1aおよび1bの混合物を黄色粉末状として得た (図1a)。

【0137】

(実施例2) HPLCによるジステレオマー1aおよび1bの分離および単離
オープンカラム、フラッシュ逆相カラム上での大まかな分離、次に分取逆相HPLCでの2段階クロマトグラフィー工程により、粗製のジステレオマー1aおよび1bを分離し、そして精製した。

【0138】

1aおよび1bの混合物を酢酸エチルに溶解し、C-18逆相シリカゲル上に吸着させた。減圧下で溶媒を除去し、そして、先に平衡させたC-18逆相カラムの先端に、固体を充填した (長さ21cm x 直径6cm)。画分を回収することにより、100mM TEAA (トリエチルアンモニウムアセート) 中25% CH₃CNでジステレオマーを分離し、溶出した。画分をC-18カラム (Metachem ODS3, 長さ25cm x 内径4.6mm) での分析逆相HPLCにて、100mM TEAA中25~35%のCH₃CNの線状勾配で、0~30分、1.0ml/分の流速および260nm UV検出にて分析した。1番目に溶出される少なくとも純度75%のジステレオマーを含んだ画分を合わせ、減圧下において、オレンジ色油に濃縮した。1番目に溶出されたジステレオマーを任意に構造1aに割り当てた。2番目に溶出される少なくとも純度75%のジステレオマーを含んだ画分を合わせ、減圧下において、オレンジ色油に濃縮した。2番目に抽出したジステレオマーを任意に構造1bに割り当てた。

【0139】

ジステレオマー1aを、フラッシュ工程により純度75%に精製した1aを600~800mg、100mM TEAA 500mlに溶解し、Metachem ODS3 8μカラム (Waters Prep LC 2000 System) に充填し、40ml/分の流速、および260nmのUV検出を用いて、TEAA 100mM中0~10%のCH₃CNの勾配で16分、10~35%のCH₃CNの勾配で80分溶出し、次いで35%のCH₃CNを32分維持することにより、分取逆相HPLCにて、99%異性体純度に精製した。上記分析逆相HPLC条件で、画分を回収し、分析した (図1b)。異性体純度が少なくとも99%の画分を合わせ、6N HClでpH2に酸性化し、酢

酸エチルで抽出した。酢酸エチル画分を飽和 NaCl で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、減圧下で濃縮し、ヘキサンで沈殿させ、濾過し、乾燥させて、収量 $300 \sim 500 \text{ mg}$ の **1a** を明黄色固体として得た。 ^1H NMR (アセトン- d_6) 9.85 , 2H , br; 9.10 , 1H , br; 8.35 , 1H , d; 8.15 , 1H , d; 7.83 , 1H , s; 7.43 , 1H , br; 6.95 , 1H , s; 6.70 , 4H , m; 4.60 , 3H , m; 1.90 , 2H , m; 1.65 , 2H , m; 1.45 , 1H , m; 1.30 , 2H , m; 0.89 , 3H , d; 0.82 , 3H , d; 0.78 , 3H , d。電子スプレー質量分析: 610 ($\text{M} + \text{Na}$), 588.5 ($\text{M} + \text{H}$)

ジアステレオマー **1b** を同様の分取逆相 HPLC 工程にて精製する。

【0140】

10

(実施例3) アトロブ異性体アミン **2a** の合成

ジアステレオマー **1a** (1.1 g , 1.87 mmol , 分子量 587.6) を、 100 ml の水に溶解し、そして 0°C に冷却した。濃硫酸 (15 ml) を滴下して、褐色溶液を得た (図 2a)。室温に温度を上げ、混合物を一晩攪拌した。混合物を氷水 1.5 ml にゆっくりと加え、次いで、先に平衡させた C-18 シリカゲルに吸着させた (長さ 4 cm \times 直径 3 cm)。溶出物の pH が中性になるまで、支持体を水で洗浄した。粗製生成物を 200 ml の CH_3OH で溶出し、これを減圧下にて濃縮し、そして乾燥して、オレンジ色固体としてアトロブ異性体 **2a** C-1 アミノメチル C-19 カルボキシフルオレセイン硫酸塩を得た (0.93 g , 収率 95% , 分子量 503.4)。 ^1H NMR (メタノール- d_4) 8.43 , 1H , d; 8.34 , 1H , d; 7.92 , 1H , s; 7.23 , 3H , m; 7.06 , 1H , d; 6.98 , 1H , d; 4.58 , 2H , s。

20

【0141】

加水分解し、精製した **2a** のエナンチオ純度をキラルカラム HPLC (Regies (S, S) Wheelk-01 10-100 Kromasil FFC カラム, 長さ 25 cm \times ID 4.6 mm) で分析した。サンプル **2a** を水に溶解し、 0.1% 酢酸含有水中のエタノール $0 \sim 35\%$ の勾配で、 30 分間、 $1 \text{ ml}/\text{分}$ の流速で溶出し、 254 nm UV で検出し (図 2c) そしてラセミ混合物と選別した (図 2b)。

【0142】

(実施例4) アトロブ異性体アミン **2b** の合成

実施例3と同様の工程にて、ジアステレオマー **1b** を加水分解し、精製し、そして解析して、アトロブ異性体 **2b** を得た (図 2a)。

30

【0143】

(実施例5) アトロブ異性体トリフルオロアセトアミド **3a** の合成

硫酸塩であるアトロブ異性体 **2a** (0.93 g , 1.84 mmol , 分子量 503.4) をエタノール 15 ml に溶解した。トリエチルアミン (1.8 ml , 13 mmol) およびトリフルオロ酢酸エチル (2.2 ml , 18 mmol) をゆっくりと添加した (図 2a)。この混合物を室温にてアルゴン下で 2.5 時間攪拌した。減圧下で揮発性物質を除去し、得られた残留物を酢酸エチル 300 ml に溶解し、 $5\% \text{ HCl}$ 50 ml で 2 回洗浄した。酢酸エチル画分を無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、減圧濃縮して、オレンジ固体状としてアトロブ異性体トリフルオロアセトアミド **3a** (0.92 g , 収率 100% , 分子量 501.4) を得た。 ^1H NMR (メタノール- d_4) 8.35 , 1H , d; 8.15 , 1H , d; 7.80 , 1H , s; 6.82 , 1H , s; 6.65 , 4H , m; 4.82 , 2H , s。

40

【0144】

(実施例6) アトロブ異性体トリフルオロアセトアミド **3b** の合成

アトロブ異性体 **2b** を、実施例5と同様の工程で、アトロブ異性体トリフルオロアセトアミド **3b** に変換し、そして実施例5と同様の方法で分析した (図 2a)。

【0145】

(実施例7) アトロブ異性体 NHSE エステル **4a** の合成

アトロブ異性体トリフルオロアセトアミド **3a** (0.92 g , 1.83 mmol , 分子量

50

501.4)、N-ヒドロキシスクシンイミド(0.85g, 7.3mmol)、および1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(DAE)(1.05g, 5.5mmol)を酢酸エチル24mlおよび1-メチル-2-ピロリジノン(NMP)12mlに溶解し、室温にてアルゴン下で2.5時間攪拌した(図3)。混合物を酢酸エチル300mlで希釈し、5% HCl 80mlで2回洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧濃縮し、そしてシリカゲルに吸着させた。生成物を吸着させたシリカゲルを、シリカゲルの乾燥充填したカラムの先端に充填し(長さ12cm x ID 3cm)、酢酸エチル:ヘキサン/2:1で溶出した。アトロプ異性体NHSEステル4aを含む画分を回収し、混合し、減圧下で濃縮し、ヘキサンから沈殿させ、明黄色固体として4aを得た(0.74g, 収率67%, 分子量598.4)¹H NMR(メタノール-d₄) 8.42, 1H, d; 8.22, 1H, d; 7.95, 1H, s; 6.81, 1H, s; 6.68, 4H, m; 4.82, 2H, s; 2.85, 4H, s。

10

【0146】

(実施例8)アトロプ異性体NHSEステル4bの合成

アトロプ異性体トリフルオロアセトアミド3bを、実施例7と同様の工程で、アトロプ異性体NHSEステル4bに変換し、そして実施例7と同様の方法で分析した(図3)。

【0147】

(実施例9)2-[(2-Fmoc-アミノエトキシ) (ヒドロキシホスホリル) オキシ] 酢酸NHSE5の合成

保護したホスホジエステルリンカーシントン5を、メチルグリコレート6(4.5当量)を環状ホスホロアミダイトAmino-LinkTM7(1当量)(Connell(1987)BioTechniques 5:342-348; 米国特許第4,757,151号)および4-N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.1当量)と反応させることにより調製した。混合物を大気温度にて1時間攪拌した。反応が完了した後(TLC分析)、溶液を氷浴で冷却し、塩化メチレン中、3-クロロ過安息香酸(4当量)溶液で処理した。氷浴を除去した。30分後、NaHSO₃水溶液(10%)を添加した。混合物を酢酸エチルで希釈した。有機層をNaHSO₃(10%)、飽和NaHSO₃で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。粗製生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製して、エステル8を得、これをメチルエチルケトンおよびNaI(10当量)中で3時間(36mM、1当量)還流により熱した。粗製の脱メチル化したホスホジエステルを0.3MのLiOH溶液(5当量)(H₂O/CH₃OH:1/3中)に溶解し、メチルエステルを切断するために一晩攪拌した。溶媒を除去して粗製の化合物9を得、これを次いで、水性Na₂CO₃(5%)に溶解した。THF中のN-(9-フルオレニルメトキシ-カルボニルオキシ)スクシンイミド(FmocOSu, 1.5当量)を一度に添加し、大気温度にて3時間攪拌した。粗製生成物を酢酸エチルで希釈し、10% HCl水溶液で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、フラッシュクロマトグラフィーにて精製して、黄色油状物としてFmoc酸10を得た。

20

30

【0148】

Fmoc酸10を無水CH₂Cl₂(1当量)に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(4当量)を添加した。溶液を氷浴で冷却し、次いでジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC, 2当量)で処理した。氷浴を除去し、2次間攪拌を継続した(TLC分析しながら)。反応が完了したとき、酢酸エチルを添加し、その溶液を5% HCl水溶液で洗浄した。溶媒を除去することにより、2-[(2-Fmoc-アミノエトキシ) (ヒドロキシホスホリル) オキシ] 酢酸NHSE5を得た(図4)。

40

【0149】

(実施例10)7-プロパルギルホスホリルアミノ-7-デアザ-ddATP11の合成7-デアザ-7-プロパルギルアミノ-ddATP12(7-(3-アミノ-1-プロピニル)-2',3'-ジデオキシ-7-デアザアデノシン-5'-トリホスフェート(米国特許第5,047,519号および米国特許第5,151,507号)を250mMピカーボネート(pH9.0)に懸濁させ、DMSO中の2-[(2-Fmoc-アミノエ

50

トキシ) (ヒドロキシホスホリル) オキシ] 酢酸 N H S 5 溶液を添加した。1 時間後、反応混合物を H P L C (A X - 3 0 0 陰イオン交換) で精製した。生成物画分を回収し、乾固するまで濃縮し、R P H P L C により (C - 1 8 逆相) 精製して、F m o c リンカー d d A T P 1 3 を得た。濃水酸化アンモニウム (2 8 ~ 3 0 %) を F m o c リンカー d d A T P 1 3 に添加し、溶液を 5 5 で 2 0 分間熱した。減圧下での濃縮により、7 - プロパルギルホスホリルアミノ - 7 - デアザ - d d A T P 1 1 を得、これを C - 1 8 逆相 H P L C により精製した (図 5)。

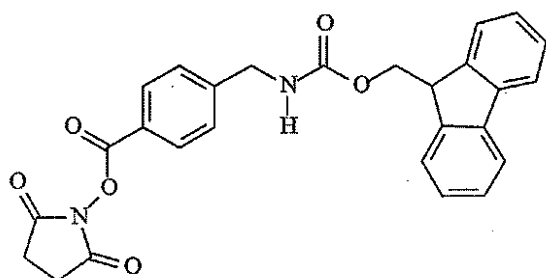
【 0 1 5 0 】

(実施例 1 1) F m o c - アミノメチル - N H S - F A M 1 4 の合成

予測された N - F m o c 誘導体を形成するための塩基の存在下で、p - アミノメチル安息香酸 H C l 塩と、N - ヒドロキシスクシンイミドのフルオレニルメトキシ - カルボニルオキシエステル (F m o c - O S u) (双方とも市販されている) を反応させることにより、F m o c - アミノメチル - N H S - F A M 1 4 を調製した。次いで、この生成物を、D C C 存在下で、N - ヒドロキシスクシンイミドと反応させ、安息香酸のカルボキシル基の N H S エステルを形成した。次いで、次の構造：

【 0 1 5 1 】

【 化 4 8 】



を有するこの N H S エステルである、p - アミノメチル安息香酸の N - F m o c 塩誘導体を、アトロプ異性体 C - 1 アミノメチル、C - 1 9 カルボキシフルオレセイン 2 a と反応させ、実施例 2 の方法で精製し、次いで D C C 存在下で、N - ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、実質的に純粋なアトロプ異性体である F m o c - アミノメチル - N H S - F A M 1 4 を生成した (図 6)。

【 0 1 5 2 】

(実施例 1 2) アミノメチルベンズアミド - アミノメチル - F A M - プロパルギルホスホリルアミノ - d d A T P 1 5 の合成

D M S O 中の F m o c - アミノメチル - N H S - F A M 1 4 溶液を、2 5 0 m M ビカーボネート (p H 9 . 0) に懸濁した 7 - プロパルギルホスホリルアミノ - 7 - デアザ - d d A T P 1 1 に添加した。反応混合物を、大気温度で暗所にて 2 時間放置した。F m o c - アミノ保護された生成物 1 6 を H P L C (A X - 3 0 0 陰イオン交換) で精製し、F m o c 基を加水分解するため、濃水酸化アンモニウム (2 8 ~ 3 0 %) 中で 2 0 分間、5 5 で加熱した。減圧下での濃縮により粗製の、実質的に純粋なアトロプ異性体である、アミノメチルベンズアミド - アミノメチル - F A M - プロパルギルホスホリルアミノ - d d A T P 1 5 を得て、C - 1 8 逆相 H P L C にて精製した (図 6)。

【 0 1 5 3 】

(実施例 1 3) N H S - ローダミン色素 1 7 の合成

二環式アミン 1 8 (1 2 . 8 g , 4 7 m m o l e , 米国特許第 5 , 6 8 8 , 8 0 8 号)、1 - プロモ - 3 - クロロプロパン (2 9 . 3 g , 1 8 7 m m o l e)、ヨウ化ナトリウム (5 6 . 4 g , 3 7 6 m m o l e)、ならびに炭酸水素ナトリウム (7 . 9 g , 9 4 m m o l e) を、C H ₃ C N 1 5 0 m l 中で 1 8 時間還流した。混合物を室温で冷却し、濾過し、エバポレートした。濾過ケーキを、ヘキサン 3 0 0 m l で洗浄し、これを濾液と混合し、水 5 0 m l で 2 回および飽和 N a C l 5 0 m l で洗浄し、M g S O ₄ で乾燥し、濾過し、そして減圧下で濃縮した。生成物を、シリカゲルにてクロマトグラフィーで精製し

10

20

30

40

50

、ヘキサン/酢酸エチル：20/1で溶出し、淡黄色油状物として三環式アミンピバル酸エステル19を得た(9.5g, 30mmole, 収率64%)。エステル19を、水15mlおよびメタノール120ml中の水酸化リチウム水和物(2.6g, 60mmole)溶液で加水分解した。室温で1時間攪拌した後、混合物を減圧下で濃縮し、30mlの1M HClに溶解した混合物を、100mlジエチルエーテルで3回抽出した。混合したエーテル抽出物を200mM、pH7のリン酸緩衝液50mlで洗浄し、MgSO₄で乾燥し、濾過し、そして減圧下で濃縮して、茶色固体として、三環式アミン20を得た(図7)。三環式アミン20および3,6-ジクロロ,4-イソプロピルカルボキシレート無水フタル酸21をトルエン中で還流して、フリーデルクラフツアシル化生成物ケトン22を得た(吸収極大400nm)(図8)。

10

【0154】

ホスホリルトリクロライドおよびクロロホルム中で、還流による20と22の環化により、イソプロピルカルボキシレート位置異性体混合物として23を得た。イソプロピル基の切断後、ローダミンカルボン酸24をNHS-ローダミン色素17に転換した(図8)。

【0155】

(実施例14)ホスフェートリンカーであるエネルギー移動ターミネーターddATP25の合成

実施例12からのアミノメチルベンズアミド-アミノメチル-FAM-プロパルギルホスホリルアミノ-ddATP15を、250mMピカーボネート溶液(pH9.0)に懸濁させた。これにDMSO中のNHSエステル17(合成に関しては米国特許第5,847,162号)の溶液を添加した。反応混合物を大気温度にて2時間、暗所に放置した。HPLC、AX-300陰イオン交換、次いでC-18逆相により精製し、純粋なエネルギー移動ddATPターミネーター25を得た(図9)。

20

【0156】

(実施例15)ビス-トリフルオロアセトアミドローダミンNHS27の合成

ローダミン色素28を、ジエチルエーテル中トリフルオロ酢酸無水物およびトリエチルアミンで室温にて処理することにより、ビス-トリフルオロアセトアミド29に転換した。カルボン酸を、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドで、NHSエステルに転換し、ビス-トリフルオロアセトアミドローダミンNHS27を得た(図10)。

30

【0157】

(実施例16)アミノメチルベンズアミド-アミノメチル-FAM-プロパルギルエトキシアミノ-ddTTP32の合成

5-(3-アミノエトキシ-1-プロピニル)-2',3'-ジデオキシチミジン-5'-トリホスフェート30(米国特許第5,821,356号)を、実質的に純粋なアトロブ異性体であるFmoc-アミノメチル-NHS-FAM14と、実施例12と同様の条件下で反応させ、Fmoc-アミノメチルベンズアミド-アミノメチル-FAM-プロパルギルエトキシアミノ-ddTTP31を得、陰イオン交換HPLCにて精製した。31のFmoc基を切断して、純粋なアトロブ異性体であるアミノメチルベンズアミド-アミノメチル-FAM-プロパルギルエトキシアミノ-ddTTP32を得た(図11)。

40

【0158】

(実施例17)エネルギー移動ターミネーターddTTP26の合成

実施例14の条件に従って、実質的に純粋なアトロブ異性体であるアミノメチルベンズアミド-アミノメチル-FAM-プロパルギルエトキシアミノ-ddTTP32を、250mMピカーボネート溶液(pH9.0)に懸濁させた。これにDMSO中のビス-トリフルオロアセトアミドローダミンNHSエステル27溶液を添加した。反応混合物を大気温度にて2時間、暗所に放置した。これに水酸化アンモニウムを添加して、トリフルオロアセトアミド基を切断した。HPLC、AX-300陰イオン交換、次いでC-18逆相により精製して、純粋なエネルギー移動ddTTPターミネーター26を得た(図12)。

【0159】

50

(実施例18) ホスフェートリンカーであるエネルギー移動ターミネーター ddATP 25を用いた pGEMの配列決定

米国特許第5,770,716号、米国特許第5,948,648号、および同第6096875号の条件に従って、単色自動DNA配列決定実験に、他のサンガー型標準試薬とエネルギー移動ddATPターミネーター25を用いた。ターミネーターヌクレオチド25をアトロプ異性体のラセミ混合物(上の電気泳動図)および実質的に純粋なアトロプ異性体(下の電気泳動図)として試験し、図13aおよび図13bに示した。

【0160】

色素-ターミネーター配列決定反応を、Ampli Taq DNA Polymerase、FSを用い、ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit Manual (Applied Biosystems p/n 402116) に供されたプロトコールに従っておこなった。pGEM-3Zf(+)テンプレートの配列決定を、非標識-21M13配列決定プライマー(順方向)を用いて実施した。緩衝液、非標識プライマー、Ampli Taq DNAポリメラーゼ、FSを含む薬剤は、ABI PRISMTM Dye Terminator Core Kit (Applied Biosystems p/n 402117)のものであった。dNTP混合物は、dATP、dCTP、dITP、dUTP、およびdTTP各2mMからなった。反応成分の予備混合物を、以下のものを含有させて調製した: 5×緩衝液4.0μL、dNTP混合物1.0μL、テンプレート: pGEM(登録商標)-3Zf(+)0.2μg/μL、2.0μL、プライマー: -21M13(順方向)0.8pmol/μL、4.0μL、Ampli Taq DNAポリメラーゼ、FS0.5μL、およびH₂O3.5μL、すべての量は、1回の反応に基づいて与えられる。

【0161】

Perkin-Elmer 480 DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems p/n N801-100またはApplied Biosystems Gene Amp PCR System 9700用のチューブ0.2ml)に適用された0.5mlチューブ内で反応をおこなった。色素ターミネーターの1~250pmolを各反応に添加した。鉱油30μLを各反応の頂部に添加して、蒸発を防止した(Applied Biosystems 480 Thermal Cyclerを使用する際)。反応体積は20μLであり、それは上記反応予備混合物の15μLを含有し、色素で標識したターミネーターの可変量および十分量の水で総全体反応体積を20μLにした。反応を次のように熱循環させた。96で30秒間、50で15秒間、および60で4分間を25サイクル、続いて4に保つサイクル。

【0162】

すべての反応を、Centri-Sepスピнкаラムでのスピнкаラム精製により製造業者の指導書に従って精製した(Princeton Separations p/n CS-901)。カラム中のゲル材料を脱イオン水0.8mlで少なくとも30分間室温にて水和させた。カラムが水和し、気泡がゲル材料内にトラップされていないことが決定された後、上層および下層のカラムのエンドキャップを除去し、カラムを重力により排出させた。次いでカラムを、キットに供された洗浄チューブに挿入し、可変速度微小遠心機で2分間1300gで遠心し、洗浄チューブから除去し、サンプル捕集チューブに挿入した。反応混合物を注意深く油の下から除去し、ゲル材料に充填し、チューブを再遠心した。次いで溶出したサンプルを減圧遠心して乾燥した。

【0163】

配列決定ゲルに充填する前に、乾燥したサンプルをTemplate Suppression Reagent (Applied Biosystems p/n 401674) 25μLに再懸濁した。ボルテックスし、95で2分間加熱して、氷で冷却し、再びボルテックスをし、遠心した(13,000×g)。再懸濁したサンプル10μLをサンプルバイアル(Applied Biosystems p/n 401957)に分

注し、それをABI PRISMTM 310 遺伝分析機に適用した(Applied Biosystems p/n 310-00-100/120)。ふるい分けポリマーおよびキャピラリー(PE Applied Biosystems p/n 402837もしくは4313087(ポリマー)およびp/n 402840(キャピラリー))をDNA配列決定分析に特に適応させて、310 遺伝分析機で電気泳動をおこなった。おのおの場合において、ふるい分けポリマーは、核酸変性剤を含有した。動電学的にサンプルをキャピラリーに30秒2.5kVで注入し、キャピラリーの外壁を50 に維持して、10~12.2kVで2時間まで流し、配列決定データとして電気泳動図を作成した(図13a-d)。

【0164】

図13aおよび13bの電気泳動図は、単色配列決定反応中のポリヌクレオチドフラグメントのプライマー伸長に3'末端上での、エネルギー移動ターミネーター25の特異的な取りこみを示している。電気泳動図は、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzerで行う電気泳動中に、約20~約600のヌクレオチド長の間の標識されたフラグメントの受容体ロードミン色素によって発した蛍光強度(発光極大約650nm)を時間の関数としてプロットする。

10

【0165】

119~242塩基対の溶出フラグメントは、図13aにプロットされている。各フラグメントは、エネルギー移動ターミネーター25によって、3'ターミネートされている。図13bは、148~205塩基対のフラグメントの、より拡大された図を示している。図13aおよび図13b中の矢印下の3つの領域は、25のラセミ混合物で標識されたフラグメントの分離と比較して、25の実質的に純粋なアトロプ異性体形態(下のパネル)で標識したフラグメントの分離に、驚くべきおよび予期しない改良を例示している。25のアトロプ異性体ラセミ混合物よりも、実質的に純粋なアトロプ異性体を用いた下の電気泳動図に、フラグメントのより良好な分解能が観察された。矢印で示された箇所は、25の実質的に純粋なアトロプ異性体形態が、より良好な分解の予期しない利点を提供した、特定の遺伝子座である。対照的に、キラルプライマー伸長生成物を標識する際の25のアトロプ異性体形態ラセミ混合物の使用により、上の電気泳動図中の矢印下で幅広、重複、および分裂したピークにより例示されたように、電気泳動的に異なった速度で移動するフラグメントのジアステレオマー集団が誘導された。

20

30

【0166】

さらに、下の電気泳動図は、配列決定ラダーを通して、25のアトロプ異性体のラセミ混合物を用いた上の電気泳動図よりもさらに一様なピーク高さを示す。

【0167】

(実施例19)スルホネートリンカーであるエネルギー移動ターミネーターddATP33を用いたpGEMの配列決定

前記実施例の一般的な合成経路および条件に従って、実質的に純粋なアトロプ異性体の、スルホネートリンカーであるエネルギー移動ターミネーターddATP33(図14)を合成した。実施例18のプロトコールおよび条件に従って、33をpGEM標的の単色配列決定に用いた。別に、33のラセミ混合物もまた、同様の単色配列決定実験に用いた。

40

148~242塩基対の溶出フラグメントは図13cにプロットされている。各フラグメントは、エネルギー移動ターミネーター33により3'ターミネートされた。図13c中の矢印下の3つの領域は、33のラセミ混合物で標識されたフラグメントの分離(上のパネル)と比較して、33の実質的に純粋なアトロプ異性体形態で標識されたフラグメント(下のパネル)を分離する際の、驚くべきおよび予期しない改良を例示している。33のアトロプ異性体のラセミ混合物よりも、実質的に純粋なアトロプ異性体を用いた下の電気泳動図において、フラグメントのより良好な分解能が観察された。

【0168】

(実施例20)エネルギー移動ターミネーターddGTP34を用いたpGEMの配列決定

50

前記実施例の一般的な合成経路および反応条件に従って、エネルギー移動ターミネーター d d G T P 3 4 (図 1 5) を合成した。アトロプ異性体形態は、逆相 H P L C により合成の最終段階で分離され、すなわち化合物 3 4 である。実施例 1 8 のプロトコールおよび条件に従って、3 4 の実質的に純粋なアトロプ異性体を p G E M 標的の単色配列決定に用いた。別に、3 4 のラセミ混合物もまた、同様の単色配列決定実験に用いた。2 4 ~ 9 9 塩基対の溶出フラグメントは、5 3 5 n m で検出し、図 1 3 d にプロットされている。各フラグメントは、エネルギー移動ターミネーター 3 4 により 3 ' ターミネートされた。図 1 3 d において矢印の下領域は、3 4 のラセミ混合物で標識されたフラグメントの分離 (上のパネル) と比較して、3 4 の実質的に純粋なアトロプ異性体形態で標識されたフラグメントの分離 (下のパネル) は、驚くべきおよび予想しない改良を例示している。3 4 のアトロプ異性体のラセミ異性体よりも、実質的に純粋なアトロプ異性体を用いた下の電気泳動図において、事実上すべてのフラグメントのより良好な分解能が観察された。矢印で示された箇所は、3 4 の実質的に純粋なアトロプ異性体形態が、より良好な分解の予想しない利点を提供した、特定の遺伝子座である。ラセミ 3 4 で標識された、下のパネルのすべてのフラグメントは、2 つのピークに分かれ、データの有用性を下げる。

10

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態のみ上記に詳細に述べられてきたが、これらは、化学および分子生物学の当業者は、例示した実施形態において、その教示から逸脱することなく、多くの修正が可能であることを明確に理解する。すべてのそのような修正は、上記の請求項の範囲内に包含されることを意図される。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 a 】

図 1 a は、C - 1 アミノメチル、C - 1 9 カルボキシフルオレセインおよび (-) メンチルククロホルメートがメンチルカルバメートジアステレオマー 1 a および 1 b を与える反応を示す。

【 図 1 b 】

図 1 b は、メンチルカルバメートジアステレオマー 1 a および 1 b の分離における、分取用 H P L C 画分の逆相 H P L C 分析を示す。画分 # 1 および # 2 は純粋な 1 a を示す。画分 # 3 は 1 a と 1 b との混合物を示す。画分 # 4 および # 5 は純粋な 1 b を示す。

【 図 2 a 】

図 2 a は、以下の反応を示す： (i) 硫酸とメンチルカルバメートジアステレオマー 1 a を反応させて、メンチルカルバメート基を加水分解し、アトロプ異性体アミン 2 a を得る反応、 (i i) エチルトリフルオロアセテートによって 2 a をアミド化し、アトロプ異性体トリフルオロアセトアミド 3 a を得る反応、 (i i i) 硫酸とメンチルカルバメートジアステレオマー 1 b を反応させてメンチルカルバメート基を加水分解し、アトロプ異性体アミン 2 b を得る反応、および (i v) エチルトリフルオロアセテートによって 2 b をアミド化し、アトロプ異性体トリフルオロアセトアミド 3 b を得る反応。

30

【 図 2 b 】

図 2 b は、キラル H P L C 条件下での、アトロプ異性体 2 a および 2 b のラセミ混合物の H P L C クロマトグラムを示す。

40

【 図 2 c 】

図 2 c は、キラル H P L C 条件下での、精製アトロプ異性体 2 a の H P L C クロマトグラムを示す。

【 図 3 】

図 3 は、以下の反応を示す： (i) アトロプ異性体トリフルオロアセトアミド 3 a を N - ヒドロキシスクシンイミドおよび D A E カルボジイミド H C 1 塩と反応させ、アトロプ異性体 N H S エステル 4 a を得る反応、および (i i) アトロプ異性体トリフルオロアセトアミド 3 b を N - ヒドロキシスクシンイミドおよび D A E カルボジイミド H C 1 塩と反応させ、アトロプ異性体 N H S エステル 4 b を得る反応。

【 図 4 】

50

図 4 は、2 - [(2 - F m o c - アミノエトキシ) (ヒドロキシホスホリル) オキシ] 酢酸 N H S 5 の合成を示す。

【 図 5 】

図 5 は、プロパルギルホスホリルアミノ - d d A T P 1 1 の合成を示す。

【 図 6 】

図 6 は、アミノメチル - F A M - プロパルギルホスホリルアミノ - d d A T P 1 5 の合成を示す。

【 図 7 】

図 7 は、3 環式アミン 2 0 の合成を示す。

【 図 8 】

図 8 は、N H S - ロードミン色素 1 7 の合成を示す。

【 図 9 】

図 9 は、エネルギー移動 d d A T P ターミネーター 2 5 の構造を示す。

【 図 1 0 】

図 1 0 は、ビス - トリフルオロアセトアミドロードミン N H S 2 7 の合成を示す。

【 図 1 1 】

図 1 1 は、アミノメチルベンズアミド - アミノメチル - F A M - プロパルギルエトキシアミノ - d d T T P 3 2 の合成を示す。

【 図 1 2 】

図 1 2 は、エネルギー移動 d d T T P ターミネーター 2 6 の構造を示す。

【 図 1 3 a 】

図 1 3 a は、ホスフェート - リンカー、エネルギー移動ターミネーター d d A T P 2 5 、フラグメントサイズ 1 1 9 b p ~ 2 4 2 b p での p G E M の D N A 配列決定を示す。

【 図 1 3 b 】

図 1 3 b は、ホスフェート - リンカー、エネルギー移動ターミネーター d d A T P 2 5 、フラグメントサイズ 1 4 8 b p ~ 2 0 5 b p での p G E M の D N A 配列決定を示す。

【 図 1 3 c 】

図 1 3 c は、スルホネート - リンカー、エネルギー移動ターミネーター d d A T P 3 3 、フラグメントサイズ 1 4 8 b p ~ 2 4 2 b p での p G E M の D N A 配列決定を示す。

【 図 1 3 d 】

図 1 3 d は、エネルギー移動ターミネーター d d G T P 3 4 、フラグメントサイズ 2 4 b p ~ 9 9 b p での p G E M の D N A 配列決定を示す。

【 図 1 4 】

図 1 4 は、スルホネートリンカー、エネルギー移動ターミネーター d d A T P 3 3 の構造を示す。

【 図 1 5 】

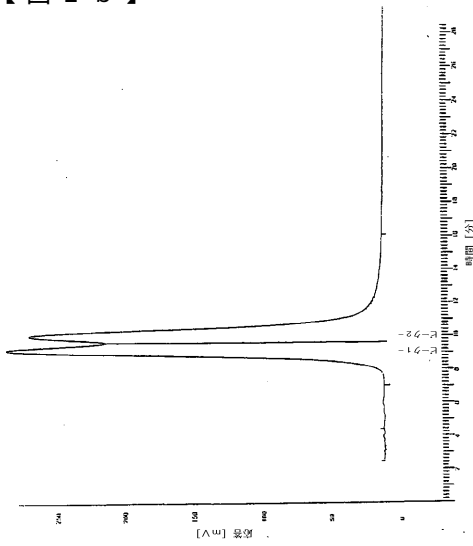
図 1 5 は、エネルギー移動ターミネーター d d G T P 3 4 の構造を示す。

10

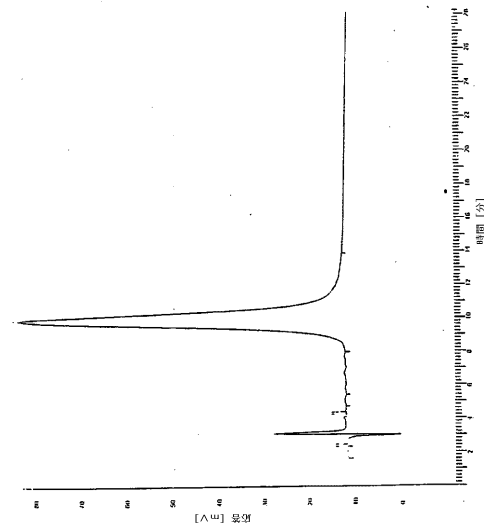
20

30

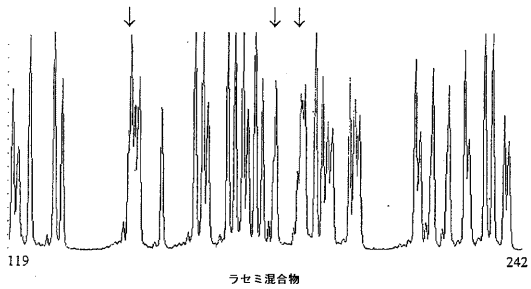
【図 2 b】



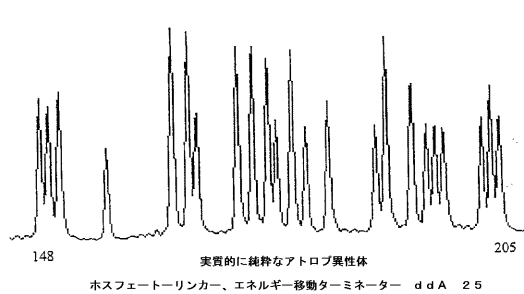
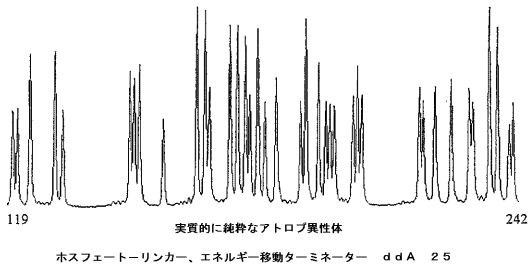
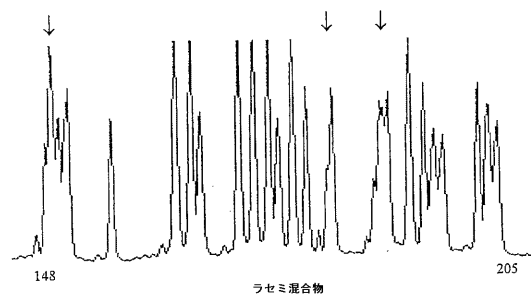
【図 2 c】



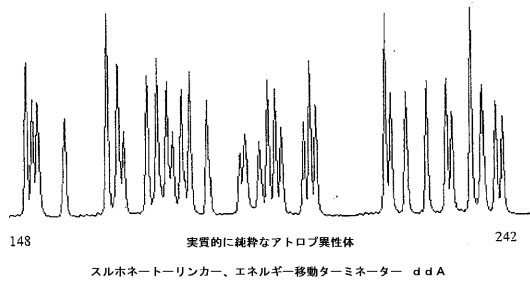
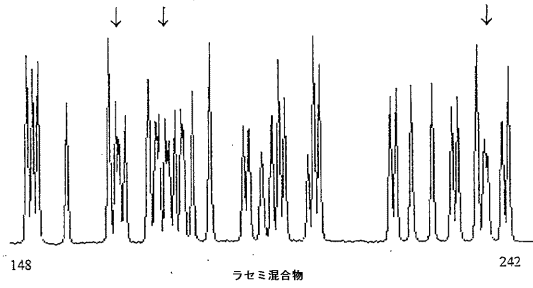
【図 1 3 a】



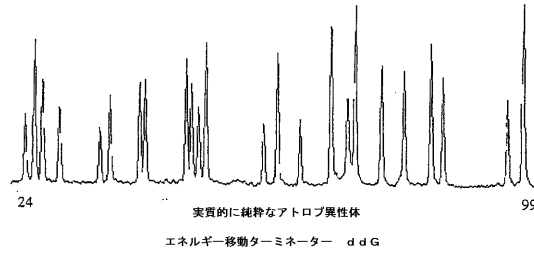
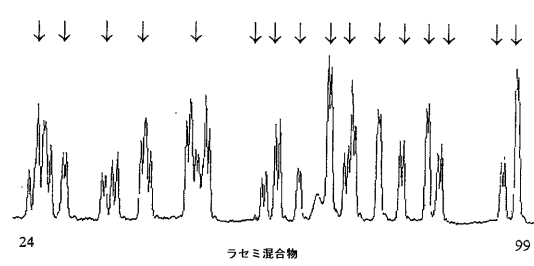
【図 1 3 b】



【図 13 c】



【図 13 d】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36832 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/48654
- (22) International Filing Date: 30 October 2001 (30.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/704,966 1 November 2000 (01.11.2000) US
- (71) Applicant: PE CORPORATION (NY) [US/US]; 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).
- (72) Inventors: LEE, Linda, G.; 2680 Ramona Street, Palo Alto, CA 94306 (US). TAING, Meng, C.; 235 36th Avenue, Apt. C, San Mateo, CA 94403 (US). ROSEMBLUM, Barnett, B.; 1521 Estelle Avenue, San Jose, CA 95118 (US).
- (74) Agents: ANDRUS, Alex et al.; Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/36832 A2

(54) Title: ATROPISOMERS OF ASYMMETRIC XANTHENE FLUORESCENT DYES AND METHODS OF DNA SEQUENCING AND FRAGMENT ANALYSIS

(57) Abstract: Substantially pure atropisomers of xanthene compounds are disclosed. A variety of molecular biology applications utilize atropisomeric xanthene fluorescent dyes as labels for substrates such as nucleotides, nucleosides, polynucleotides, polypeptides and carbohydrates. Methods include DNA sequencing, DNA fragment analysis, PCR, SNP analysis, oligonucleotide ligation, amplification, minisequencing, and primer extension.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

**ATROPISOMERS OF ASYMMETRIC XANTHENE FLUORESCENT DYES AND
METHODS OF DNA SEQUENCING AND FRAGMENT ANALYSIS**

I. FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to certain atropisomer forms of asymmetric xanthene
5 fluorescent dyes and the field of nucleic acid sequencing and analysis with fluorescent
dye-labelled reagents.

II. BACKGROUND OF THE INVENTION

Methods of analyzing fluorescent-labelled biomolecules after separating based on
size- or charge are central to molecular biology. Examples of methods utilizing fluorescent-
10 labelled nucleic acids include automated DNA sequencing, oligonucleotide probe methods,
detection of polymerase-chain-reaction products, immunoassays, and the like. In the case of
multi-color automated DNA sequencing, labelled nucleic acid fragments of varying size are
separated by electrophoresis, typically in a single electrophoresis lane, channel, or capillary.
Employing these methods, automated four-color Sanger-type DNA sequencing has enabled
15 entire genome characterization at the molecular level.

Stereochemical purity is of importance in the field of pharmaceuticals, where 12 of
the 20 most prescribed drugs exhibit chirality (US 6,075,024). A case in point is provided
by the L-form of the beta-adrenergic blocking agent, R(-) albuterol, which is known to be
100 times more potent than the D-enantiomer (US 5,760,090). Furthermore, optical purity
20 is important since certain isomers may actually be deleterious rather than simply inert.

Atropisomers are stereoisomeric conformations of a molecule whose
interconversion is slow enough to allow separation and isolation under predetermined
conditions (McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, (1984), S. Parker, Ed., p. 36).
The energy barrier to thermal racemization may be determined by the steric hindrance to
25 free rotation of one or more bonds forming a chiral axis. Certain biaryl compounds
exhibit atropisomerism where rotation around an intraannular bond lacking C₂ symmetry
is restricted. The free energy barrier for enantiomerization is a measure of the stability of
the intraannular bond with respect to rotation. Optical and thermal excitation can promote
racemization, dependent on electronic and steric factors (Tetreau (1982) Nouv. Jour. de
30 Chimie, 6:461-65).

Ortho-substituted biphenyl compounds may exhibit this type of conformational,
rotational isomerism known as atropisomerism (Eliel, E. and Wilen, S. (1994)

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., pp. 1142-55). Such biphenyls are enantiomeric, chiral atropisomers where the sp²-sp² carbon-carbon, intraannular bond between the phenyl rings has a sufficiently high energy barrier to free rotation, and where substituents X ≠ Y and U ≠ V render the molecule asymmetric. The steric interaction of X-U, X-V, and/or Y-V, Y-U is large enough to make the planar conformation an energy maximum. Two nonplanar, axially chiral enantiomers, shown below, then exist as atropisomers when their interconversion is slow enough such that they can be isolated free of each other. By one definition, atropisomerism is defined to exist where the isomers have a half-life t_{1/2} of at least 1000 seconds, which is a free energy barrier of 22.3 kcal mol⁻¹ (93.3 kJ mol⁻¹) at 300K (Oki, M. (1983) "Recent Advances in Atropisomerism," Topics in Stereochemistry, 14:1). Bold lines and dashed lines in the figures shown below indicate those moieties, or portions of the molecule, which are sterically restricted due to a rotational energy barrier. Bolded moieties exist orthogonally above the plane and dashed moieties exist orthogonally below the plane of the rest of the molecule.



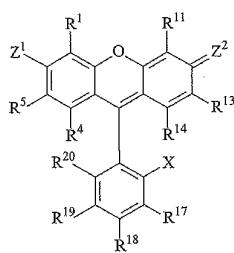
III. SUMMARY

The present invention is directed towards atropisomerically-enriched and substantially pure atropisomers of asymmetric xanthene compounds as novel compositions. The invention also includes methods for isolation, labelling, and detecting labelled compositions.

In a first aspect, the invention includes substantially pure atropisomer compounds having the structure II:

WO 02/36832

PCT/US01/48654



wherein positions R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , R^{14} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} , Z^1 , or Z^2 may be substituted with substituents. At least one substituent may be a linking moiety. One or more rings may be fused on the ring structure II.

- 5 Another aspect of the invention includes energy-transfer dye compounds comprising a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting excitation energy in response thereto; an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and a linker for linking the donor dye and the acceptor dye; wherein at least
- 10 one of the donor dye and acceptor dye is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

- Another aspect of the invention is labelled substrates, including nucleoside, nucleotides, polynucleotides, and polypeptides wherein the label is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a
- 15 substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

Another aspect of the invention is labelling reagents, including phosphoramidite and active ester linking moieties of a substantially pure atropisomer of a xanthene compound, which form covalent attachments with substrates and methods of labelling substrates with the reagents.

- 20 Another aspect of the invention is methods for forming a labelled substrate comprising the step of reacting a substrate with the linking moiety of a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

- Another aspect of the invention is methods for separating atropisomers of
- 25 xanthene compounds by forming diastereomers with substantially enantiomerically

WO 02/36832

PCT/US01/48654

pure compounds, and separating the diastereomers. The diastereomers may be converted to substantially pure atropisomers of xanthene compounds.

Another aspect of the invention is methods for separating a mixture of labelled substrates wherein the labels are comprised of a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound. The labelled substrates may be primer extension polynucleotide fragments. The labelled substrates may be separated by electrophoresis, chromatography, or other separation technique. The mixture of labelled polynucleotides may be formed from a labelled primer or a labelled terminator. The labelled substrates may be detected by fluorescence detection.

Another aspect of the invention is methods of generating a labelled primer extension product by extending a primer-target hybrid with an enzymatically-incorporatable nucleotide. The primer or the nucleotide may be labelled with a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

Another aspect of the invention is methods of polynucleotide sequencing by forming a mixture of four classes of polynucleotides where each class is labelled at the 3' terminal nucleotide with a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound, and the labels are spectrally resolvable. The polynucleotides are separated by size.

Another aspect of the invention is methods of oligonucleotide ligation by annealing two probes to a target sequence and forming a phosphodiester bond between the 5' terminus of one probe and the 3' terminus of the other probe wherein one or both probes are labelled with a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

Another aspect of the invention is methods of amplification by annealing two or more primers to a target polynucleotide and extending the primers by a polymerase and a mixture of enzymatically-extendable nucleotides wherein at least one of the primers or one of the nucleotides is labelled with a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

Another aspect of the invention is kits of reagents including a substantially

WO 02/36832

PCT/US01/48654

pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye comprising a substantially pure atropisomer of a xanthene compound.

IV. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Figure 1a shows the reaction of C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein and (-)
 5 Menthyl chloroformate to give menthyl carbamate diastereomers **1a** and **1b**.
 Figure 1b shows reverse phase HPLC analysis of preparative HPLC fractions in the separation of menthyl carbamate diastereomers **1a** and **1b**. Fractions #1 and #2 show pure **1a**. Fraction #3 shows a mixture of **1a** and **1b**. Fractions #4 and #5 show pure **1b**.
 10 Figure 2a shows the reactions of: (i) menthyl carbamate diastereomer **1a** with sulfuric acid to hydrolyze the menthyl carbamate group to give atropisomer amine **2a**, (ii) amidation of **2a** with ethyl trifluoroacetate to give atropisomer trifluoroacetamide **3a**, (iii) menthyl carbamate diastereomer **1b** with sulfuric acid to hydrolyze the menthyl carbamate group to give atropisomer amine **2b**, and (iv) amidation of **2b**
 15 with ethyl trifluoroacetate to give atropisomer trifluoroacetamide **3b**.
 Figure 2b shows an HPLC chromatogram of the racemic mixture of atropisomers **2a** and **2b** under chiral HPLC conditions.
 Figure 2c shows an HPLC chromatogram of the purified atropisomer **2a** under chiral HPLC conditions.
 20 Figure 3 shows the reactions of: (i) atropisomer trifluoroacetamide **3a** with N-hydroxysuccinimide and DAE carbodiimide HCl salt to give atropisomeric NHS ester **4a**, and (ii) atropisomer trifluoroacetamide **3b** with N-hydroxysuccinimide and DAE carbodiimide HCl salt to give atropisomeric NHS ester **4b**.
 25 Figure 4 shows the synthesis of 2-[(2-Fmoc-aminoethoxy)(hydroxyphosphoryl)oxy]acetic acid NHS **5**.
 Figure 5 shows the synthesis of propargylphosphorylamino-ddATP **11**.
 Figure 6 shows the synthesis of aminomethyl-FAM-propargylphosphorylamino-ddATP **15**.
 30 Figure 7 shows the synthesis of tricyclic amine **20**.
 Figure 8 shows the synthesis of NHS-rhodamine dye **17**.
 Figure 9 shows the structure of energy-transfer ddATP terminator **25**.
 Figure 10 shows the synthesis of bis-trifluoroacetamide rhodamine NHS **27**.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Figure 11 shows the synthesis of aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylethoxyamino-ddTTP 32.

Figure 12 shows the structure of energy-transfer ddTTP terminator 26.

Figure 13a shows DNA sequencing of pGEM with phosphate-linker, energy-transfer terminator ddATP 25, fragment size 119-242 bp.

Figure 13b shows DNA sequencing of pGEM with phosphate-linker, energy-transfer terminator ddATP 25, fragment size 148-205 bp.

Figure 13c shows DNA sequencing of pGEM with sulfonate-linker, energy-transfer terminator ddATP 33, fragment size 148-242 bp.

Figure 13d shows DNA sequencing of pGEM with energy-transfer terminator ddGTP 34, fragment size 24-99 bp.

Figure 14 shows the structure of sulfonate-linker, energy-transfer terminator ddATP 33.

Figure 15 shows the structure of energy-transfer terminator ddGTP 34.

V. DETAILED DESCRIPTION OF EXEMPLARY EMBODIMENTS

Reference will now be made in detail to certain embodiments of the invention, examples of which are illustrated in the accompanying drawings. While the invention will be described in conjunction with the illustrated embodiments, it will be understood that they are not intended to limit the invention to those embodiments. On the contrary, the invention is intended to cover all alternatives, modifications, and equivalents, which may be included within the scope of the claimed invention.

V.1 DEFINITIONS

Stereochemical definitions and conventions used herein generally follow *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Book Company, New York and *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994); and Eliel, E. and Wilen, S., John Wiley & Sons, Inc., New York. Many organic compounds exist in optically active forms, i.e., they have the ability to rotate the plane of plane-polarized light. In describing an optically active compound, the prefixes D and L or R and S are used to denote the absolute configuration of the molecule about its chiral center(s). The prefixes d and l or (+) and (-) are employed to designate the sign of rotation of plane-polarized light by the compound, with (-) or l meaning that the compound is levorotatory. A compound prefixed with (+) or d is dextrorotatory. For a given chemical structure, these compounds, called stereoisomers, are identical except that they are mirror images of one another. A

WO 02/36832

PCT/US01/48654

specific stereoisomer may also be referred to as an enantiomer, and a mixture of such isomers is often called an enantiomeric mixture. A 50:50 mixture of enantiomers is referred to as a racemic mixture or a racemate. The terms "racemic mixture" and "racemate" refer to an equimolar mixture of two enantiomeric species, devoid of optical activity.

The term "chiral" refers to molecules which have the property of non-superimposability of the mirror image partner, while the term "achiral" refers to molecules which are superimposable on their mirror image partner.

The term "stereoisomers" refers to compounds which have identical chemical constitution, but differ with regard to the arrangement of the atoms or groups in space.

"Diastereomer" refers to a stereoisomer with two or more centers of chirality and whose molecules are not mirror images of one another. Diastereomers have different physical properties, e.g. melting points, boiling points, spectral properties, and reactivities. Mixtures of diastereomers may separate under high resolution analytical procedures such as electrophoresis and chromatography.

"Enantiomers" refer to two stereoisomers of a compound which are non-superimposable mirror images of one another.

The term "atropisomer" refers to a stereoisomer resulting from restricted rotation about single bonds where the rotation barrier is high enough to permit isolation of the isomeric species. Atropisomers are enantiomers without a single asymmetric atom. Atropisomers are conformational stereoisomers which occur when rotation about a single bond in the molecule is prevented, or greatly slowed, as a result of steric interactions with other parts of the molecule and the substituents at both ends of the single bond are unsymmetrical.

The terms "substantially pure atropisomer" and "substantially free of its stereoisomer" mean that the composition contains at least 90% by weight of one atropisomer, and 10% by weight or less of the stereoisomeric atropisomer.

The term "atropisomerically enriched" means that the composition is a greater proportion or percentage of one of the atropisomers of the xanthene compound, in relation to the other atropisomer.

"Nucleobase" means a nitrogen-containing heterocyclic moiety capable of forming Watson-Crick hydrogen bonds in pairing with a complementary nucleobase or nucleobase analog, e.g. a purine, a 7-deazapurine, or a pyrimidine. Typical nucleobases are the naturally occurring nucleobases adenine, guanine, cytosine, uracil, thymine, and analogs of the

WO 02/36832

PCT/US01/48654

naturally occurring nucleobases, e.g. 7-deazaadenine, 7-deazaguanine, 7-deaza-8-azaguanine, 7-deaza-8-azaadenine (Kutyavin, U.S. Patent No. 5,912,340), inosine, nebularine, nitropyrrole, nitroindole, 2-aminopurine, 2,6-diaminopurine, hypoxanthine, pseudouridine, pseudocytosine, pseudoisocytosine, 5-propynylcytosine, isocytosine, isoguanine, 7-deazaguanine, 2-thiopyrimidine, 6-thioguanine, 4-thiothymine, 4-thiouracil, *O*⁶-methylguanine, *N*⁶-methyladenine, *O*⁴-methylthymine, 5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrouracil, 4-methyl-indole, and ethenoadenine (Fasman (1989) *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, FL).

"Nucleoside" means a compound consisting of a nucleobase linked to the C-1' carbon of a ribose sugar. The ribose may be substituted or unsubstituted. Substituted ribose sugars include, but are not limited to, those riboses in which one or more of the carbon atoms, e.g., the 3'-carbon atom, is substituted with one or more of the same or different -R, -OR, -NRR or halogen groups, where each R is independently hydrogen, C₁-C₆ alkyl or C₅-C₁₄ aryl. Riboses include ribose, 2'-deoxyribose, 2',3'-dideoxyribose, 3'-haloribose, 3'-fluororibose, 3'-chlororibose, 3'-alkylribose, e.g. 2'-O-methyl, 4'- α -anomeric nucleotides, 1'- α -anomeric nucleotides, and 2'-4'-linked and other "locked", bicyclic sugar modifications (Imanishi WO 98/22489; Imanishi WO 98/39352; Wengel WO 99/14226). When the nucleobase is purine, e.g. A or G, the ribose sugar is attached to the N⁹-position of the nucleobase. When the nucleobase is pyrimidine, e.g. C, T or U, the pentose sugar is attached to the N¹-position of the nucleobase (Kornberg and Baker, (1992) *DNA Replication*, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, CA).

"Nucleotide" means a phosphate ester of a nucleoside, as a monomer unit or within a nucleic acid. Nucleotides are sometimes denoted as "NTP", or "dNTP" and "ddNTP" to particularly point out the structural features of the ribose sugar. "Nucleotide 5'-triphosphate" refers to a nucleotide with a triphosphate ester group at the 5' position. The triphosphate ester group may include sulfur substitutions for the various oxygens, e.g. α -thio-nucleotide 5'-triphosphates.

As used herein, the terms "oligonucleotide" and "polynucleotide" are used interchangeably and mean single-stranded and double-stranded polymers of nucleotide monomers, including 2'-deoxyribonucleotides (DNA) and ribonucleotides (RNA) linked by internucleotide phosphodiester bond linkages, or internucleotide analogs, and associated counter ions, e.g., H⁺, NH₄⁺, trialkylammonium, Mg²⁺, Na⁺ and the like. A polynucleotide may be composed entirely of deoxyribonucleotides, entirely of ribonucleotides, or

WO 02/36832

PCT/US01/48654

chimeric mixtures thereof. Polynucleotides may be comprised of internucleotide, nucleobase and sugar analogs. Polynucleotides typically range in size from a few monomeric units, e.g. 5-40, when they are frequently referred to as oligonucleotides, to several thousands of monomeric nucleotide units. Unless denoted otherwise, whenever a polynucleotide sequence is represented, it will be understood that the nucleotides are in 5' to 3' order from left to right and that "A" denotes deoxyadenosine, "C" denotes deoxycytidine, "G" denotes deoxyguanosine, and "T" denotes thymidine, unless otherwise noted.

"Attachment site" means a site on a label or a substrate, such as an oligonucleotide, which is covalently attached to a linker.

"Linker" means a chemical moiety comprising a covalent bond or a chain of atoms that covalently attaches a label to a polynucleotide, or one label to another.

"Linking moiety" means a chemically reactive group, substituent or moiety, e.g. a nucleophile or electrophile, capable of reacting with another molecule to form a covalent bond, or linkage.

"Alkyl" means a saturated or unsaturated, branched, straight-chain, branched, or cyclic hydrocarbon radical derived by the removal of one hydrogen atom from a single carbon atom of a parent alkane, alkene, or alkyne. Typical alkyl groups consist of 1-12 saturated and/or unsaturated carbons, including, but not limited to, methyl, ethyl, propyl, butyl, and the like.

"Alkoxy" means -OR where R is (C₁-C₆) alkyl.

"Alkylidiyl" means a saturated or unsaturated, branched, straight chain or cyclic hydrocarbon radical of 1-20 carbon atoms, and having two monovalent radical centers derived by the removal of two hydrogen atoms from the same or two different carbon atoms of a parent alkane, alkene or alkyne. Typical alkylidiyl radicals include, but are not limited to, 1,2-ethyldiyl, 1,3-propyldiyl, 1,4-butyldiyl, and the like.

"Aryl" means a monovalent aromatic hydrocarbon radical of 6-20 carbon atoms derived by the removal of one hydrogen atom from a single carbon atom of a parent aromatic ring system. Typical aryl groups include, but are not limited to, radicals derived from benzene, substituted benzene, naphthalene, anthracene, biphenyl, and the like.

"Aryldiyl" means an unsaturated cyclic or polycyclic hydrocarbon radical of 6-20 carbon atoms having a conjugated resonance electron system and at least two monovalent radical centers derived by the removal of two hydrogen atoms from two different carbon atoms of a parent aryl compound.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

"Substituted alkyl", "substituted alkylidyl", "substituted aryl" and "substituted arylidyl" mean alkyl, alkylidyl, aryl and arylidyl respectively, in which one or more hydrogen atoms are each independently replaced with another substituent. Typical substituents include, but are not limited to, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -NCO, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(O)R, -C(O)R, -C(O)NRR, -S(O)₂O⁻, -S(O)₂OH, -S(O)₂R, -OS(O)₂OR, -S(O)₂NR, -S(O)R, -OP(O)O₂RR, -P(O)O₂RR, -P(O)(O⁻)₂, -P(O)(OH)₂, -C(O)R, -C(O)X, -C(S)R, -C(O)OR, -C(O)O⁻, -C(S)OR, -C(O)SR, -C(S)SR, -C(O)NRR, -C(S)NRR, -C(NR)NRR, where each X is independently a halogen and each R is independently -H, alkyl, aryl, heterocycle, or linking group.

"Internucleotide analog" means a phosphate ester analog of an oligonucleotide such as: (i) alkylphosphonate, e.g. C₁-C₄ alkylphosphonate, especially methylphosphonate; (ii) phosphoramidate; (iii) alkylphosphotriester, e.g. C₁-C₄ alkylphosphotriester; (iv) phosphorothioate; and (v) phosphorodithioate. Internucleotide analogs also include non-phosphate analogs wherein the sugar/phosphate subunit is replaced by an a non-phosphate containing backbone structure. One type of non-phosphate oligonucleotide analogs has an amide linkage, such as a 2-aminoethylglycine unit, commonly referred to as PNA (Nielsen (1991) "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymidine-substituted polyamide", Science 254:1497-1500).

The terms "target sequence" and "target polynucleotide" mean a polynucleotide sequence that is the subject of hybridization with a complementary polynucleotide, e.g., a primer or probe. The sequence can be composed of DNA, RNA, an analog thereof, including combinations thereof.

The term "label", as used herein, means any moiety which can be attached to a substrate, e.g., an oligonucleotide, nucleotide or nucleotide 5'-triphosphate, and that functions to: (i) provide a detectable signal; (ii) interact with a second label to modify the detectable signal provided by the first or second label, e.g. FRET; (iii) stabilize hybridization, i.e. duplex formation; (iv) affect mobility, e.g. electrophoretic mobility or cell-permeability, by charge, hydrophobicity, shape, or other physical parameters, or (v) provide a capture moiety, e.g., affinity, antibody/antigen, or ionic complexation.

"Heterocycle" means a molecule with a ring system in which one or more ring atoms have been replaced with a heteroatom, e.g. nitrogen, oxygen, and sulfur.

"Electron-deficient nitrogen heterocycle" is a monovalent electron-deficient nitrogen heterocycle derived by the removal of one hydrogen atom from a single atom of the ring

WO 02/36832

PCT/US01/48654

system to join the heterocycle as a substituent to the fluorescein dyes of the invention (Joule, *Heterocyclic Chemistry*, 3rd Ed., Stanley Thome Publisher, Ltd., Cheltenham, U.K. (1998); Acheson, R., *An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2nd Ed. Interscience Publishers, division of John Wiley & Sons, New York (1967)).

- 5 "Substrate" is an entity to which dye compounds of the present invention are attached. Substrates include, but are not limited to a (i) polynucleotide, (ii) nucleoside and nucleotide, (iii) polypeptide, (iv) carbohydrate, (v) ligand, and (vi) any analog of the preceding (i) to (v). "Enzymatically incorporatable" is a property of a nucleotide in which it is capable of being enzymatically incorporated onto the terminus, e.g. 3', of a nascent polynucleotide
- 10 chain through the action of a polymerase enzyme.

- "Terminator" means an enzymatically incorporatable nucleotide which prevents subsequent incorporations of nucleotides to the resulting polynucleotide chain and thereby halt polymerase extension. Typical terminators lack a 3'-hydroxyl substituent and include 2',3'-dideoxyribose, 2',3'-didehydroribose, and 2',3'-dideoxy, 3'-haloribose, e.g. 3'-fluoro.
- 15 Alternatively, a ribofuranose analog could be used, such as arabinose. Exemplary nucleotide terminators include 2',3'-dideoxy-β-D-ribofuranosyl, β-D-arabinofuranosyl, 3'-deoxy-β-D-arabinofuranosyl, 3'-amino-2',3'-dideoxy-β-D-ribofuranosyl, and 2',3'-dideoxy-3'-fluoro-β-D-ribofuranosyl (Chidgeavadze (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 1671-1686; and Chidgeavadze (1985) *FEB. Lett.*, 183: 275-278). Nucleotide terminators also
- 20 include reversible nucleotide terminators (Metzker (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22(20): 4259).

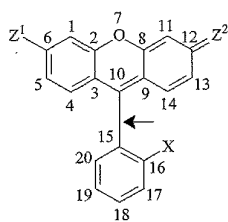
- "Enzymatically extendable" is a property of a nucleotide in which it is enzymatically incorporatable at the terminus of a polynucleotide and the resulting extended polynucleotide can undergo subsequent incorporations of nucleotides or nucleotide
- 25 analogs.

V.2 ATROPISOMER COMPOUNDS

The compositions of the invention are asymmetric xanthene compounds that exist in stable atropisomeric forms. Aryl substituents can restrict rotation around the biannular bond between C-10 and C-15 (noted by an arrow) in the following structure I:

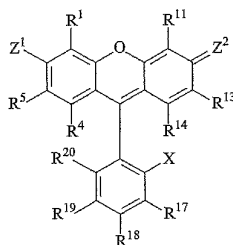
WO 02/36832

PCT/US01/48654



I

Asymmetric compounds of the invention include xanthene dyes characterized by the general structure II:



II

and include asymmetric fluorescent dye classes such as fluorescein ($Z^1, Z^2 = O$), rhodol ($Z^1 = O, Z^2 = NR_2$), and rhodamine ($Z^1, Z^2 = NR_2$). Where Z^1 or Z^2 is NR_2 , R may independently be hydrogen, C_1 - C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety.

- Substituents $R^1, R^4, R^5, R^{11}, R^{13}, R^{14}, R^{17}, R^{18}, R^{19}$, and R^{20} may be independently fluorine, chlorine, C_1 - C_8 alkyl, carboxylate, sulfate, sulfonate ($-SO_3^-$), alkylsulfonate ($-R-SO_3^-$), aminomethyl ($-CH_2NH_2$), aminoalkyl, 4-dialkylaminopyridinium, hydroxymethyl ($-CH_2OH$), methoxy ($-OCH_3$), hydroxyalkyl ($-ROH$), thiomethyl ($-CH_2SH$), thioalkyl ($-RSH$), alkylsulfone ($-SO_2R$), arylthio ($-SAr$), arylsulfone ($-SO_2Ar$), sulfonamide ($-SO_2NR_2$), alkylsulfoxide ($-SOR$), arylsulfoxide ($-SOAr$), amino ($-NH_2$), ammonium ($-NH_3^+$), amido ($-CONR_2$), nitrile ($-CN$), C_1 - C_8 alkoxy ($-OR$), phenoxy,

WO 02/36832

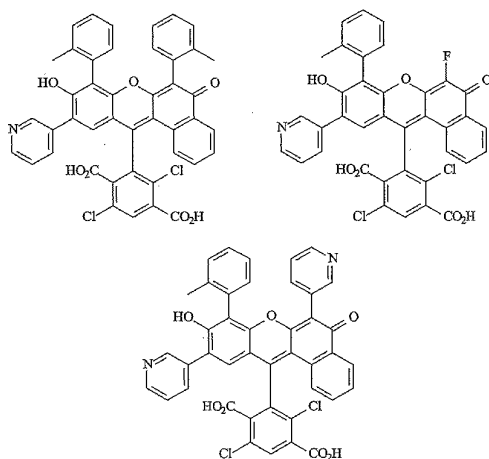
PCT/US01/48654

phenolic, tolyl, phenyl, aryl, benzyl, heterocycle, phosphonate, phosphate, quaternary amine, sulfate, polyethyleneoxy, and linking moiety.

The compounds of the invention include fused benzo rings where R¹³ and R¹⁴, or R⁴ and R⁵, taken together form benzo, and where the fused benzo groups are substituted with substituents.

Substituents R¹, R⁴, R⁵, R¹¹, R¹³, R¹⁴, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, and R²⁰ may also be independently an electron-deficient heterocycle, including 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 2-imidazole, 4-imidazole, 3-pyrazole, 4-pyrazole, pyridazine, pyrimidine, pyrazine, cinnoline, phthalazine, quinazoline, quinoxaline, 3-(1,2,4-*N*-triazolyl, 5-(1,2,4-*N*-triazolyl, 5-tetrazolyl, 4-(1-*O*, 3-*N*)-oxazole, 5-(1-*O*, 3-*N*)-oxazole, 4-(1-*S*, 3-*N*)-thiazole, 5-(1-*S*, 3-*N*)-thiazole, 2-benzoxazole, 2-benzothiazole, 4-(1,2,3-*N*-benzotriazole, or benzimidazole.

Examples of asymmetric fluorescein dyes include the structures:



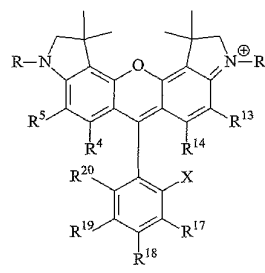
15

The compounds of the invention include atropisomeric, asymmetric rhodamines with ring structures formed by the Z¹ nitrogen, the Z¹-bonded carbon, and the R¹-bonded carbon, to make a first ring structure having from 4 to 7 members. Optionally, the compounds may have a second ring structure formed by the Z²

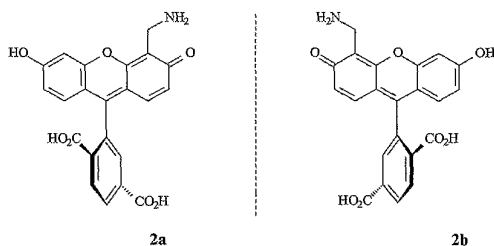
WO 02/36832

PCT/US01/48654

nitrogen, the Z²-bonded carbon, and the R¹¹-bonded carbon, also having from 4 to 7 members. An example includes the structure IIa:



- Asymmetry results where either: (1) $R^1 \neq R^{11}$, $R^4 \neq R^{14}$, $R^5 \neq R^{13}$, or $Z^1 \neq Z^2$, and
 5 (2) $R^{17} \neq R^{19}$, or $R^{20} \neq X$. In other words, both aryl substituents on the biannular sp²-sp² bond are asymmetric and the compound lacks a C₂ axis of symmetry along the biannular bond axis. C₂ symmetry is defined by taking the biannular bond in I or II as the axis such that rotation of 180° around the axis, gives the same molecule. An example of a
 symmetric xanthene compound with C₂ symmetry is fluorescein ($R^1, R^4, R^5, R^{11}, R^{13}, R^{14},$
 10 $R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{20} = H$; $X = CO_2H$). An example of an asymmetric xanthene compound
 without C₂ symmetry is C-11 aminomethyl, C-19 carboxyfluorescein ($R^1, R^4, R^5, R^{13}, R^{14},$
 $R^{17}, R^{18}, R^{20} = H$; $R^{11} = CH_2NH_2$; $R^{19}, X = CO_2H$). This compound is atropisomeric
 because the substituents adjacent to the C-10 to C-15 biannular bond are sufficiently bulky
 that rotation is hindered. The energy barrier to rotation is sufficiently high that stable,
 15 non-superimposable, mirror image atropisomeric forms **2a** and **2b** result, as shown:



WO 02/36832

PCT/US01/48654

Rotation around the biannular bond results in racemization and loss of atropisomerism. Typically, racemization of the asymmetric xanthene compounds occurs upon heating.

The compounds of the present invention can be prepared by any suitable method available in the art. Exemplary methods for preparing a variety of different asymmetric xanthene compounds can be found in the Example section below, and as discussed in greater detail below.

As a specific example, reference is made throughout the specification to Z^1 and Z^2 substituents. As this nomenclature corresponds to the illustrated structural formulae, which represent only one of several possible tautomeric forms (or resonance structures) of the compounds, it will be understood that these references are for convenience only, and that any such references are not intended to limit the scope of the compounds described herein.

Those of skill in the art will also recognize that the compounds of the invention may exist in many different protonation states, depending on, among other things, the pH of their environment. While the structural formulae provided herein depict the compounds in only one of several possible protonation states, it will be understood that these structures are illustrative only, and that the invention is not limited to any particular protonation state – any and all protonated forms of the compounds are intended to fall within the scope of the invention.

The compounds of the invention may bear multiple positive or negative charges. The net charge of the dyes of the invention may be either positive or negative. The counter ions associated with the dyes are typically dictated by the synthesis and/or isolation methods by which the compounds are obtained. Typical counter ions include, but are not limited to ammonium, sodium, potassium, lithium, halides, acetate, trifluoroacetate, etc., and mixtures thereof. It will be understood that the identity of any associated counter ion is not a critical feature of the invention, and that the invention encompasses the dyes in association with any type of counter ion. Moreover, as the compounds can exist in a variety of different forms, the invention is intended to encompass not only forms of the dyes that are in association with counter ions (e.g., dry salts), but also forms that are not in association with counter ions (e.g., aqueous or organic solutions).

Xanthene dyes have important applications as detectable fluorescent labels of nucleic acids (US Patent Nos. 5,188,934; 5,654,442; 5,885,778; 6,096,723; 6,020,481; 5,863,727; 5,800,996; 5,945,526; 5,847,162; 6,025,505; 6,008,379; 5,936,087; 6,015,719).

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Xanthene compounds containing an asymmetric biannular bond can exist in stable atropisomeric forms. Conjugates of atropisomeric xanthene compounds and chiral substrates, such as nucleotides, polynucleotides, polypeptides, and carbohydrates, form diastereomers. These diastereomeric conjugates can separate under certain conditions, such as electrophoresis, chromatography, and other methods. Separation of diastereomers can hinder detection by display of double peaks or bands, i.e. "peak doubling". Thus, atropisomerically enriched or purified forms of xanthene dyes are important as labels for methods based on separation and detection of analytes.

- Asymmetric xanthene compounds can be conveniently synthesized from precursors (US Patent Nos. 5,188,934; 5,654,442; 5,885,778; 6,096,723; 6,020,481; 5,863,727; 5,800,996; 5,945,526; 5,847,162; 6,025,505; 6,008,379; 5,936,087; 6,015,719). An exemplary synthetic route starts by aminomethylation of C-19 carboxyfluorescein (Shipchandler (1987) Anal. Biochem. 162:89-101; U.S. Patent No. 4,510,251; EP 232736; EP110186) to give C-1 (C-11) aminomethyl, C-19 carboxyfluorescein.
- An atropisomer substantially free of its stereoisomer may be obtained by resolution of the mixture of stereoisomers of a xanthene compound using a method such as formation of diastereomers using optically active resolving agents ("Stereochemistry of Carbon Compounds," (1962) by E. L. Eliel, McGraw Hill; Lochmuller, C. H., (1975) J. Chromatogr., 113:(3) 283-302). Atropisomers of xanthene dyes can be separated and isolated, prior to, or after, derivatization to give reactive labelling reagents. Separation of the atropisomer xanthene compounds of the invention from the racemic mixture can be accomplished by any suitable method, including: (1) formation of ionic, diastereomeric salts with chiral compounds and separation by fractional crystallization or other methods, (2) formation of diastereomeric compounds with chiral derivatizing reagents, separation of the diastereomers, and conversion to the pure atropisomers, and (3) separation of the atropisomers directly under chiral conditions.

- Under method (1), diastereomeric salts can be formed by reaction of enantiomerically pure chiral bases such as brucine, quinine, ephedrine, strychnine, α -methyl- β -phenylethylamine (amphetamine), and the like with asymmetric xanthene compounds bearing acidic functionality, such as carboxylic acid and sulfonic acid. The diastereomeric salts may be induced to separate by fractional crystallization or ionic chromatography. For separation of the optical isomers of amino compounds, addition of

WO 02/36832

PCT/US01/48654

chiral carboxylic or sulfonic acids, such as camphorsulfonic acid, tartaric acid, mandelic acid, or lactic acid can result in formation of the diastereomeric salts.

- Alternatively, by method (2), the substrate to be resolved is reacted with one enantiomer of a chiral compound to form a diastereomeric pair (Eliel, E. and Wilen, S. (1994) *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., p. 322).
- Diastereomeric compounds can be formed by reacting asymmetric xanthene compounds with enantiomerically pure chiral derivatizing reagents, such as menthyl derivatives, followed by separation of the diastereomers and hydrolysis to yield the free, enantiomerically enriched xanthene. A method of determining optical purity involves making chiral esters, such as a menthyl ester or Mosher ester, α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenyl acetate (Jacob III. (1982) *J. Org. Chem.* 47:4165), of the racemic mixture, and analyzing the NMR spectrum for the presence of the two atropisomeric diastereomers. For example, C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein, an asymmetric xanthene compound useful for attaching to nucleotides, polynucleotides, and other fluorescent dyes was reacted with (-) menthyl chloroformate in the presence of base to form the diastereomeric mixture of menthyl carbamates **1a** and **1b** (Example 1, Figure 1a). Stable diastereomers of atropisomeric xanthene compounds can be separated and isolated by normal- and reverse-phase chromatography following methods for separation of atropisomeric naphthyl-isoquinolines (Hoye, T., WO 96/15111). Diastereomers **1a** and **1b** were separated by preparative reverse-phase HPLC (Example 2, Figure 1b).

- By method (3), a racemic mixture of two asymmetric enantiomers can be separated by chromatography using a chiral stationary phase ("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York; Okamoto, (1990) "Optical resolution of dihydropyridine enantiomers by High-performance liquid chromatography using phenylcarbamates of polysaccharides as a chiral stationary phase", *J. of Chromatogr.* 513:375-378). Enantiomeric atropisomers of xanthene compounds can be separated and isolated by chromatography on chiral stationary phase. A sample of racemic, C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein gave two peaks, resolving the atropisomeric stereoisomers, by HPLC analysis on a chiral adsorbent column (Figure 2b). When the atropisomers are separated, for example, by the chiral derivatization method (Example 1), preparative HPLC separation (Example 2) and hydrolysis of the chiral menthyl auxiliaries (Example 3, Figure 2a), the separated atropisomer **2a** showed a single peak when analyzed by HPLC on the chiral adsorbent column (Figure 2c).

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Atropisomers can be distinguished by methods used to distinguish other chiral molecules with asymmetric carbon atoms, such as optical rotation and circular dichroism.

V.3 ENERGY-TRANSFER DYES

- In another aspect, the present invention comprises energy-transfer dye compounds
- 5 containing atropisomeric xanthene compounds such as those defined by structure II. Generally, the energy-transfer dyes of the present invention include a donor dye which absorbs light at a first wavelength and emits excitation energy in response, an acceptor dye which is capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response. The donor dye may be attached to the
- 10 acceptor dye through a linker, the linker being effective to facilitate efficient energy transfer between the donor and acceptor dyes (Lee, "Energy-transfer dyes with enhanced fluorescence", U.S. Patent No. 5,800,996; Lee "Energy-transfer dyes with enhanced fluorescence", U.S. Patent No. 5,945,526; Mathies, " Fluorescent labels and their use in separations", U.S. Patent No. 5,654,419; Lee (1997) Nucleic Acids Res. 25:2816-22).
- 15 Alternatively, the donor dye and the acceptor dye may be labelled at different attachment sites on the substrate. For example, an oligonucleotide may be labelled with a donor dye at the 5' terminus and an acceptor dye at the 3' terminus. A polypeptide may be labelled with a donor dye at the carboxyl terminus and an acceptor dye at an internal cysteine or lysine sidechain (Komoriya, "Compositions for the detection of proteases in biological
- 20 samples and methods of use thereof", US Patent No. 5,605,809). In the energy-transfer dye of the invention, at least one of the donor or acceptor dyes which label a substrate is an atropisomeric xanthene compounds. Other dyes comprising the energy-transfer dye may be any fluorescent moiety which undergoes the energy transfer process with an atropisomeric xanthene compound, including a fluorescein, rhodol, and a rhodamine.
- 25 Other dyes include classes of fluorescent dyes such as cyanine, phthalocyanine, squaraine, bodipy, benzophenoxazine, fluorescein, dibenzorhodamine, or rhodamine.

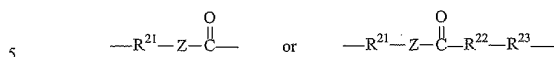
- Energy-transfer dyes have advantages for use in the simultaneous detection of multiple labelled substrates in a mixture, such as DNA sequencing. A single donor dye can be used in a set of energy-transfer dyes so that each dye has strong absorption at a
- 30 common wavelength. By then varying the acceptor dye in the energy-transfer set, the acceptor dyes can be spectrally resolved by their respective emission maxima. Energy-transfer dyes also provide a larger effective Stokes shift than non-energy-transfer dyes. The Stokes shift is the difference between the excitation maximum, the wavelength at

WO 02/36832

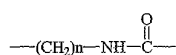
PCT/US01/48654

which the donor dye maximally absorbs light, and the emission maximum, the wavelength at which the acceptor maximally emits light.

Generally the linker between the donor dye and acceptor dye has the structures:

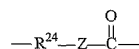


wherein Z is selected from the group consisting of NH, S and O; R²¹ is a C₁–C₁₂ alkyl attached to the donor dye; R²² is a substituent selected from the group consisting of a C₁–C₁₂ alkylidyl, a five and six membered ring having at least one unsaturated bond and a fused ring structure which is attached to the carbonyl carbon; and R²³ includes a functional group which attaches the linker to the acceptor dye. R²² may be a five or six membered ring such as cyclopentene, cyclohexene, cyclopentadiene, cyclohexadiene, furan, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, isoxazole, pyrazole, isoimidazole, pyran, pyrone, benzene, pyridine, pyridazine, pyrimidine, pyrazine, oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, indole and naphthalene. Specifically, the linker may have the structure:



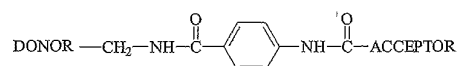
where n ranges from 2 to 10.

Generally also, R²³ may have the structure:



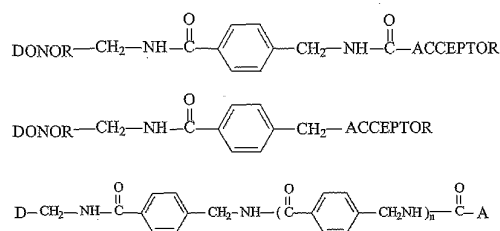
wherein R²⁴ is a C₁–C₁₂ alkyl and

In one embodiment, the linker between the donor dye and acceptor dye includes a functional group which gives the linker some degree of structural rigidity, such as an alkene, diene, an alkyne, a five and six membered ring having at least one unsaturated bond or a fused ring structure. The donor dye and the acceptor dye of the energy-transfer dye may be attached by linkers which have the exemplary structures:



WO 02/36832

PCT/US01/48654



wherein D is a donor dye, A is an acceptor dye and n is 1 or 2. The phenyl rings may be substituted with groups such as sulfonate, phosphonate, and other charged groups.

The attachment sites of the linker between the donor dye and acceptor dye of an energy-transfer dye may be at any position where one or both of the donor dye and acceptor dye is a compound of the present invention. Exemplary attachment sites include R^1 , R^{11} , R^{18} , R^{19} , Z^1 and Z^2 . Examples of linkers and attachment sites are shown in terminator nucleotides **25**, **26**, **33**, and **34** where the linkers attach at R^1 or R^{11} of the donor fluorescein dye and at R^{18} or R^{19} of the acceptor rhodamine dye. An alternative embodiment is where the donor dye and the acceptor dye are attached by a linker through the R^{18} or R^{19} sites, and either the donor dye or the acceptor dye is attached to a substrate through the R^1 , R^{11} , Z^1 or Z^2 site. Another alternative embodiment is where the donor dye and the acceptor dye are attached by a linker through the R^1 , R^{11} , Z^1 or Z^2 sites, and either the donor dye or the acceptor dye is attached to a substrate through the R^{18} or R^{19} site.

The energy-transfer dye compound is covalently attached to a substrate through a linker. The linker may be a bond, C_1 - C_{12} alkylidyl or C_6 - C_{20} arylidyl. The linker may bear functional groups including amide, carbamate, urea, thiourea, phosphate, phosphonate, sulfonate, phosphorothioate, and the like. Preferred linkers include 1,2-ethyldiyl and 1,6-hexyldiyl. The attachment sites of the linker between the energy-transfer dye and the substrate may be at any position on the energy-transfer dye, where one or both of the donor dye and acceptor dye is a dye of the present invention. Where the substrate is a nucleoside or nucleotide, a preferred attachment site on the substrate is on the nucleobase. If the nucleobase is a purine, the linker may be attached at the 8-position. If the nucleobase is a 7-deazapurine, the linker may be attached at the 7-position or 8-position. If the nucleobase is a pyrimidine, the linker may be attached at the 5-position. As examples, in terminator nucleotide examples **25** and **26**, the energy-transfer dye is

WO 02/36832

PCT/US01/48654

attached to the nucleobase at R¹⁹. Where the substrate is an oligonucleotide, preferred attachment sites include the 3' and 5' termini. Other oligonucleotide attachment sites include the internucleotide phosphate, or phosphate-analog linkage, or at a position on the sugar, e.g. 2' or 4'. Where the substrate is a polypeptide (peptide or protein), preferred attachment sites include the amino and carboxyl termini, and lysine residue amino substituents.

V.4 METHODS OF LABELLING

The present invention comprises labelling reagents wherein atropisomeric xanthene compounds are in reactive form to react with substrates. In another aspect, the present invention comprises substrates labelled, i.e. conjugated, with the compounds of the invention, formula I. Substrates can be virtually any molecule or substance to which the dyes of the invention can be conjugated, including by way of example and not limitation, a polynucleotide, a nucleotide, a nucleoside, a polypeptide, a carbohydrate, a ligand, a substantially enantiomerically pure compound, a particle, a surface, a lipid, a solid support, organic and inorganic polymers, and combinations and assemblages thereof, such as chromosomes, nuclei, living cells (e.g., bacteria or other microorganisms, mammalian cells, tissues, etc.), and the like. A particle may include a nanoparticle, a microsphere, a bead, or a liposome. A surface may be glass or other non-porous planar material. The compounds of the invention are conjugated with the substrate via an optional linker by a variety of means, including hydrophobic attraction, ionic attraction, and covalent attachment.

Labelling typically results from mixing an appropriate reactive atropisomeric xanthene and a substrate to be conjugated in a suitable solvent, using methods well-known in the art (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, (1996) Academic Press, San Diego, CA, pp. 40-55, 643-71), followed by separation of the labelled substrate, conjugate, from any unconjugated starting materials or unwanted by-products. The conjugate can be stored dry or in solution for later use.

A racemic mixture of atropisomeric xanthenes may be separated to isolate substantially pure atropisomers at any intermediate stage in the synthesis of the labelling reagents, according to the aforementioned separation and isolation methods (1), (2), and (3).

The atropisomeric xanthene may include a linking moiety at one of the substituent positions or covalent attachment of the dye to another molecule. A linking moiety is

WO 02/36832

PCT/US01/48654

typically an electrophilic functional group, capable of forming a covalent bond by reacting with nucleophilic functionality on a substrate. Nucleophilic functionality may include, for example, alcohols, alkoxides, amines, hydroxylamines, and thiols. Alternatively, a linking moiety may include nucleophilic functionality that reacts with an electrophilic group on a substrate. Examples of linking moieties include azido, monosubstituted primary amine, disubstituted secondary amine, thiol, hydroxyl, halide, epoxide, N-hydroxysuccinimidyl ester, carboxyl, isothiocyanate, sulfonyl chloride, sulfonate ester, silyl halide, chlorotriazinyl, succinimidyl ester, pentafluorophenyl ester, maleimide, haloacetyl, epoxide, alkylhalide, allyl halide, aldehyde, ketone, acylazide, anhydride, iodoacetamide and an activated ester.

One linking moiety is N-hydroxysuccinimidyl ester (NHS) of a carboxyl group substituent of the atropisomeric xanthene compound (Figures 3, 6, 10, 11). The NHS ester form of the compound is a labelling reagent. The NHS ester of the dye may be preformed, isolated, purified, and/or characterized, or it may be formed in situ and reacted with a nucleophilic group of a substrate, such as an oligonucleotide, a nucleotide, a polypeptide, or the like (Brinkley, M. (1992) Bioconjugate Chem. 3:2-13). Typically, the carboxyl form of the dye is activated by reacting with some combination of: (1) a carbodiimide reagent, e.g. dicyclohexylcarbodiimide, diisopropylcarbodiimide, or a uronium reagent, e.g. TSTU (O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate, HBTU (O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate), HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate); (2) an activator, such as 1-hydroxybenzotriazole (HOBt); and (3) N-hydroxysuccinimide to give the NHS ester of the dye. A representative example of an NHS ester are structures 4a and 4b (Figure 3), 8 (Figure 4), and 13 (Figure 5).

Functional groups on an atropisomeric xanthene compound may be protected prior to derivatization and reaction at other functional groups on the compound. For example, the amino group of atropisomers 2a and 2b were trifluoroacetylated to give 3a and 3b, separately (Figure 2a, Examples 5 and 6). The carboxyl groups of were then converted to the active ester, NHS with N-hydroxysuccinimide and a carbodiimide reagent, e.g. DAE to give 4a and 4b, separately (Figure 3, Examples 7 and 8).

In some cases, the atropisomeric xanthene compound and the substrate may be coupled by *in situ* activation of the compound and reaction with the substrate to form the atropisomeric xanthene-substrate conjugate in one step. Other activating and coupling reagents include TBTU (2-(1H-benzotriazo-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium

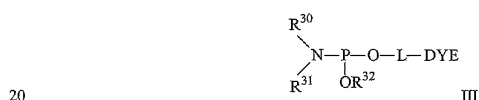
WO 02/36832

PCT/US01/48654

hexafluorophosphate), TFFH (N,N',N'',N'''-tetramethyluronium 2-fluoro-hexafluorophosphate), PyBOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate), EEDQ (2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydro-quinoline), DCC (dicyclohexylcarbodiimide); DIPCDI (diisopropylcarbodiimide), MSNT (1-(mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole, and aryl sulfonyl halides, e.g. triisopropylbenzenesulfonyl chloride.

Another preferred reactive linking group is a phosphoramidite form of asymmetric xanthene compounds. Phosphoramidite dye reagents are particularly useful for the automated synthesis of oligonucleotides labelled with the dyes of the invention. Most conveniently, phosphoramidite dye reagents may be coupled to oligonucleotides bound to a solid support during the normal course of solid-phase synthesis. Oligonucleotides are commonly synthesized on solid supports by the phosphoramidite method (Caruthers, M. and Beaucage, S. "Phosphoramidite compounds and processes", U.S. Patent No. 4,415,732; Caruthers, M. and Matteucci, M. "Process for preparing polynucleotides", US Patent No. 4,458,066; Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311).

Phosphoramidite atropisomeric xanthene reagents can be nucleosidic or non-nucleosidic. Non-nucleosidic forms of the phosphoramidite reagents have the general formula III:

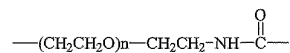


where DYE is a protected or unprotected form of atropisomer xanthene II, including energy-transfer dye; L is a linker; R³⁰ and R³¹ taken separately are C₁-C₁₂ alkyl, C₄-C₁₀ aryl, and cycloalkyl containing up to 10 carbon atoms, or R³⁰ and R³¹ taken together with the phosphoramidite nitrogen atom form a saturated nitrogen heterocycle; and R³² is a phosphite ester protecting group which prevents unwanted extension of the oligonucleotide. Generally, R³² is stable to oligonucleotide synthesis conditions yet is able to be removed from a synthetic oligonucleotide product with a reagent that does not adversely affect the integrity of the oligonucleotide or the dye. R³² may be: (i) methyl, (ii) 2-cyanoethyl; -CH₂CH₂CN, or (iii) 2-(4-nitrophenyl)ethyl; -CH₂CH₂(p-NO₂Ph). Embodiments of phosphoramidite reagents include where: (i) R³⁰ and R³¹ are each isopropyl, (ii) R³⁰ and R³¹

WO 02/36832

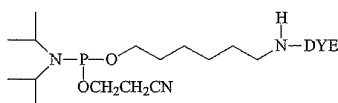
PCT/US01/48654

taken together is morpholino, (iii) L is C₁-C₁₂ alkyl, (iv) R³² is 2-cyanoethyl, and (v) DYE is attached at R¹⁸ or R¹⁹ by a linker. The linker, L, may alternatively be:



where n ranges from 1 to 10. An example of phosphoramidite reagent III has the

5 structure:



Phosphoramidite dye reagents III effect labelling of a substrate with a single, substantially pure, atropisomeric xanthene of the invention. Where the substrate is an oligonucleotide, the dye will be attached at the 5' terminus of the oligonucleotide, as a consequence of the typical 3' to 5' direction of synthesis, or at the 3' terminus of the oligonucleotide when the 5' to 3' direction synthesis method is practiced (Wagner (1997) Nucleosides & Nucleotides 16:1657-60). Reagent III may be coupled to a polynucleotide which is bound to a solid support, e.g. through the 3' terminus. Other phosphoramidite dye reagents, nucleosidic and non-nucleosidic allow for labelling at other sites of an oligonucleotide, e.g. 3' terminus, nucleobase, internucleotide linkage, sugar. Labelling at the nucleobase, internucleotide linkage, and sugar sites allows for internal and multiple labelling with fluorescent dyes.

An atropisomeric xanthene compound of the invention may be converted to a non-nucleosidic, phosphoramidite labelling reagent by any known method of phosphitylation of nucleophilic functionality with trivalent phosphitylating reagents. For example, when the xanthene contains a carboxyl group, e.g. R¹⁹ = CO₂H, the carboxyl may be activated, e.g. to the NHS, and amidated with 6-amino-1-hexanol. The resulting hydroxyl may be phosphitylated with bis(diisopropylamino)cyanoethylphosphite or chloro-diisopropylamino-cyanoethylphosphine to give the phosphoramidite dye-labelling reagent (Theisen (1992) "Fluorescent dye phosphoramidite labelling of oligonucleotides", in *Nucleic Acid Symposium Series* No. 27, Oxford University Press, Oxford, pp. 99-100). Alternatively, the carboxyl group of the compound may be reduced to the hydroxyl, to be phosphitylated.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

The phosphoramidite reagent III reacts with a hydroxyl group, e.g. 5' terminal OH of an oligonucleotide bound to a solid support, under mild acid activation, to form an internucleotide phosphite group which is then oxidized to an internucleotide phosphate group. In some instances, the xanthene compound may contain functional groups, e.g. Z¹ and Z² oxygens as in structure I, that require protection either during the synthesis of the phosphoramidite reagent or during its subsequent use to label molecules such as oligonucleotides. The protecting group(s) used will depend upon the nature of the functional groups, and will be apparent to those having skill in the art (Greene, T. and Wuts, P. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991). Generally, the protecting groups used should be stable under the acidic conditions (e.g. trichloroacetic acid, dichloroacetic acid) commonly employed in oligonucleotide synthesis to remove 5'-hydroxyl protecting groups (e.g., dimethoxytrityl) and labile under the basic conditions (ammonium hydroxide, aqueous methylamine) used to deprotect and/or cleave synthetic oligonucleotides from solid supports.

Polypeptides, antibodies, and other biopolymers comprised of amino acids and amino acid analogs may be covalently labelled by conjugation with the atropisomeric xanthene compounds of the invention. Typically, the compound is in electrophilic form, e.g. NHS reactive linking group, which reacts with a nucleophilic group of the peptide, e.g. amino terminus, or amino side chain of an amino acid such as lysine. Alternatively, the dye may be in nucleophilic form, e.g. amino- or thiol-reactive linking group, which may react with an electrophilic group of the peptide, e.g. NHS of the carboxyl terminus or carboxyl side chain of an amino acid. Labelled polypeptides may retain their specific binding and recognition properties in interacting with cell surface and intracellular components. The xanthene compound, acting as a dye, provides a detection element for localizing, visualizing, and quantitating the binding or recognition event. Polypeptides can also be labelled with two moieties, a fluorescent reporter and quencher, which together undergo fluorescence resonance energy transfer (FRET). The fluorescent reporter may be partially or significantly quenched by the quencher moiety in an intact polypeptide. Upon cleavage of the polypeptide by a peptidase or protease, a detectable increase in fluorescence may be measured (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

V.4A LABELLED NUCLEOTIDES

WO 02/36832

PCT/US01/48654

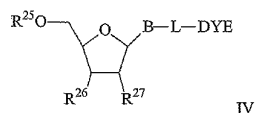
A preferred class of labelled substrates include conjugates of nucleosides and nucleotides that are labelled with the dyes of the invention. Such labelled nucleosides and nucleotides are particularly useful for labelling polynucleotides formed by enzymatic synthesis, e.g., labelled nucleotide 5'-triphosphates used in the context of PCR

- 5 amplification, Sanger-type polynucleotide sequencing, and nick-translation reactions.

Nucleosides and nucleotides can be labelled at sites on the sugar or nucleobase moieties. Preferred nucleobase labelling sites include the 8-C of a purine nucleobase, the 7-C or 8-C of a 7-deazapurine nucleobase, and the 5-position of a pyrimidine nucleobase.

- 10 Between a nucleoside or nucleotide and a dye, a linker may attach to an atropisomeric xanthene compound at any position.

The labelled nucleoside or nucleotide may be enzymatically incorporatable and enzymatically extendable. Nucleosides or nucleotides labelled with compounds of the invention may have formula IV:



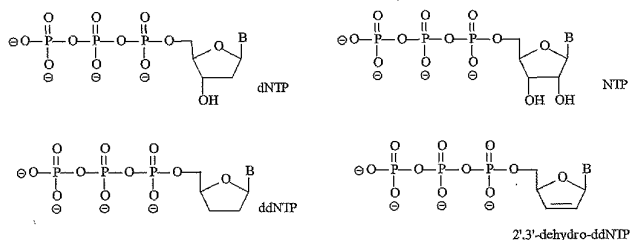
- 15 where DYE is a protected or unprotected form of compounds I or II, including energy-transfer dye. B may be any nucleobase, e.g. uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 8-deazaguanosine. R^{25} is H, monophosphate, diphosphate, triphosphate, thiophosphate, or phosphate ester analog. R^{26} and R^{27} , when taken alone, are each independently H, HO, F and a phosphoramidite. Where R^{26} or R^{27} is
- 20 phosphoramidite, R^{25} is an acid-cleavable hydroxyl protecting group, e.g. dimethoxytrityl, which allows subsequent monomer coupling under automated synthesis conditions (Caruthers, "Phosphoramidite compounds and processes", U.S. Patent No. 4,415,732; Caruthers, "Process for preparing polynucleotides", US Patent No. 4,458,066; Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of
- 25 oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311).

- Where the labelled nucleoside or nucleotide is a terminator, R^{26} and R^{27} are selected to block polymerase-mediated template-directed polymerization. In terminator nucleotides, R^{26} and R^{27} , when taken alone, are each independently H, F, and a moiety which blocks polymerase-mediated template-directed polymerization, or
- 30 when taken together form 2'-3'-didehydroribose. In formula IV, when both R^{26} and R^{27}

WO 02/36832

PCT/US01/48654

are hydroxyl, the resultant compounds are labelled ribonucleosides and ribonucleotides (NTP). When R²⁷ is hydrogen and R²⁶ is hydroxyl, the resultant compounds are labelled 2'-deoxyribonucleosides and nucleotides (dNTP). When R²⁶ and R²⁷ are each hydrogen, the resultant compounds are 2',3'-dideoxyribonucleosides and nucleotides (ddNTP). Labelled ddNTP find particular use as terminators in Sanger-type DNA sequencing methods utilizing fluorescent detection. Labelled 2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphates (dNTP) find particular use as reagents for labelling DNA polymerase extension products, *e.g.*, in the polymerase chain reaction or nick-translation. Labelled ribonucleoside-5'-triphosphates (NTP) find particular use as reagents for labelling RNA polymerase extension products.



Alkynylamino-linked compounds IV, where L includes an alkyndiyl group, are useful for conjugating atropisomeric xanthene compounds to nucleosides, nucleotides and analogs therein. Their synthesis is taught in EP 87305844.0 and Hobbs, (1989) J. Org. Chem. 54:3420. The corresponding nucleoside mono-, di- and triphosphates are obtained by standard techniques (for example, the methods described in U.S. Patent Nos. 5,821,356; 5,770,716; 5,948,648; 6,096,875). Methods for synthesizing compounds IV with modified propargylethoxyamido linkers L can also be found in these patents.

Additional synthesis procedures suitable for use in synthesizing compounds according to structural formula IV are described, for example, in Gibson (1987) Nucl. Acids Res. 15:6455-6467; Gebeyehu (1987) Nucl. Acids Res. 15:4513-4535; Haralambidis (1987) Nucl. Acids Res. 15:4856-4876; Nelson (1986) Nucleosides and Nucleotides. 5(3):233-241; Bergstrom (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:374-375; U.S. Patent No. 4,855,225, U.S. Patent No. 5,231,191 and U.S. Patent No. 5,449,767, which are incorporated herein by reference. Any of these methods can be routinely adapted or

WO 02/36832

PCT/US01/48654

modified as necessary to synthesize the full range of labelled nucleosides, nucleotides, and analogs described herein.

One embodiment of the alkynyl linker L may be:



5 wherein n is 0, 1, or 2.

Energy-transfer dye pairs can be conjugated to a nucleotide 5'-triphosphate by linking through a nucleobase amino group to: (i) an activated ester of a energy-transfer dye pair, or (ii) stepwise coupling to one dye, e.g. R¹¹-protected aminomethyl, R¹⁸-carboxyl fluorescein, then coupling the unprotected R¹¹-aminomethyl to the second dye of the pair.

10 Linker reagents may be prepared by known synthetic methods. For example, phosphate linker reagent 5 is synthesized starting from the cyclic phosphoramidite 7. Phosphitylation of 7 with methyl glycolate 6 was followed by in situ oxidation to the pentavalent phosphate 8. Hydrolysis of the methyl ester, the trifluoroacetate group, and demethylation gave 9. Protection of the amino group with Fmoc gave 10 which was activated as the N-hydroxysuccinimide ester, linker reagent 5 (Figure 4, Example 9).

An alkynylamino-linked nucleotide can be prepared by first coupling NHS linker reagent 5 with 7-deaza-7-propargylamino-ddATP 12 to give 13, followed by hydrolysis of the Fmoc group to give 11 (Figure 5, Example 10). The amino atropisomeric xanthene 1a is coupled with the N-Fmoc, NHS ester of p-aminomethylbenzoic acid (Example 11) and then activated as the NHS ester to give 14 (Figure 6). Reaction of 11 and 14 gave the atropisomeric xanthene ddATP compound 16. The Fmoc group was removed with ammonium hydroxide to give 15 (Figure 6, Example 12).

25 The NHS-rhodamine dye 17 was synthesized from bicyclic amine 18. Cyclization with 1-bromo-3-chloropropane gave tricyclic ester 19, which was hydrolyzed to tricyclic amine 20 (Figure 7, Example 13). Friedel-Crafts acylation of 20 with anhydride 21 gave the ketone 22 which was reacted with another equivalent of 20 to give symmetric rhodamine isopropyl ester 23. The ester of 23 was cleaved and the carboxylic acid 24 was converted to NHS-rhodamine dye 17 (Figure 8, Example 13).

WO 02/36832

PCT/US01/48654

The substantially pure atropisomer xanthene energy transfer ddATP terminator 25 was formed by coupling 15 with 17, followed by anion-exchange HPLC purification (Figure 9, Example 14).

Alternative synthetic routes to energy-transfer nucleotides and polynucleotides, with different convergent schemes may be practiced. The substrate, dye, and linker subunits, or synthons, may be assembled for coupling in any order. For example, the energy-transfer pair of donor dye and acceptor dye may be covalently attached through a linker and then coupled to the nucleotide or polynucleotide. Many different synthetic routes can be practiced which result in the labelling of nucleotides with the dyes of the invention. Reactive functionality, such as carboxylic acid, amino, hydroxyl groups, may require protection, utilizing the vast art of organic synthesis methodology.

Another rhodamine dye 28 was protected as the bis-trifluoroacetamide 29 and converted to the NHS compound 27 (Figure 10, Example 15). Propargylethoxyamino ddTTP 30 was coupled with atropisomer xanthene compound 14 to give Fmoc atropisomer xanthene ddTTP 31 which was hydrolyzed to 32 (Figure 11, Example 16). Reaction of 27 and 32 gave atropisomer, energy-transfer terminator ddTTP 26, purified by anion-exchange HPLC (Figure 12, Example 17).

V.4B LABELLED OLIGONUCLEOTIDES

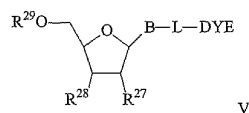
Oligonucleotides are commonly synthesized on solid supports by the phosphoramidite method (U.S. Patent Nos. 4,415,732; 4,973,679; 4,458,066; Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) Tetrahedron 48:2223-2311) using commercially available phosphoramidite nucleosides, supports e.g. silica, controlled-pore-glass (U.S. Patent No. 4,458,066) and polystyrene (U.S. Patent Nos. 5,047,524 and 5,262,530) and automated synthesizers (Models 392, 394, 3948 DNA/RNA Synthesizers, Applied Biosystems).

Another preferred class of labelled substrates include conjugates of oligonucleotides and the compounds of the invention. Such conjugates may find utility as DNA sequencing primers, PCR primers, oligonucleotide hybridization probes, oligonucleotide ligation probes, double-labelled 5'-exonuclease (TaqMan™) probes, and the like (Fung, U.S. Patent No. 4,757,141; Andrus, "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in *PCR 2: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, (1996) Academic Press, San Diego, CA. pp. 40-55, 643-71; Mullah (1998) "Efficient synthesis of

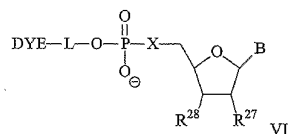
WO 02/36832

PCT/US01/48654

double dye-labelled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay", Nucl. Acids Res. 26:1026-1031). A labelled oligonucleotide may have formula V:



- 5 where the oligonucleotide comprises 2 to 100 nucleotides. DYE is a protected or unprotected form of compounds I or II, including energy-transfer dye. B is any nucleobase, e.g. uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 8-deazaguanosine. L is a linker. R²⁷ is H, OH, halide, azide, amine, C₁-C₆ aminoalkyl, C₁-C₆ alkyl, allyl, C₁-C₆ alkoxy, OCH₃, or OCH₂CH=CH₂. R²² is H, phosphate, internucleotide phosphodiester, or internucleotide analog. R²⁹ is H, phosphate, internucleotide phosphodiester, or internucleotide analog. In this embodiment, structure V, the nucleobase-labelled oligonucleotide may bear multiple dyes of the invention attached through the nucleobases. Nucleobase-labelled oligonucleotide V may be formed by: (i) enzymatic incorporation of enzymatically incorporatable nucleotide reagents IV where R²⁵ is triphosphate, by a DNA polymerase or ligase, and (ii) coupling of a nucleoside phosphoramidite reagent by automated synthesis. Whereas, nucleobase-labelled oligonucleotides V may be multiply labelled by incorporation of more than one incorporatable nucleotide IV, labelling with a dye label reagent such as III leads to singly 5'-labelled oligonucleotides, according to formula VI:



- 20 where X is O, NH, or S; R²⁷ is H, OH, halide, azide, amine, C₁-C₆ aminoalkyl, C₁-C₆ alkyl, allyl, C₁-C₆ alkoxy, OCH₃, or OCH₂CH=CH₂; R²⁸ is H, phosphate, internucleotide phosphodiester, or internucleotide analog; and L is C₁-C₁₂ alkyl, aryl, or polyethyleneoxy of up to 100 ethyleneoxy units.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

The linker L in formulas V or VI may be attached at any site on the atropisomeric xanthene compound of the invention, DYE, including R¹, R¹¹, R¹⁸, R¹⁹, Z¹ and Z² of structure I.

- In a first method for labelling synthetic oligonucleotides, a nucleophilic
 5 functionality, e.g. a primary aliphatic amine, is introduced at a labelling attachment site on an oligonucleotide, e.g. a 5' terminus. After automated, solid-support synthesis is complete, the oligonucleotide is cleaved from the support and all protecting groups are removed. The nucleophile-oligonucleotide is reacted with an excess of a label reagent containing an electrophilic moiety, e.g. isothiocyanate or activated ester, e.g. N-
 10 hydroxysuccinimide (NHS), under homogeneous solution conditions (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, (1996) Academic Press, San Diego, CA. pp. 40-55, 643-71; Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in *PCR 2: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54). Labelled oligonucleotides VI may be formed by reacting a reactive linking group form ,
 15 e.g. NHS, of a dye, with a 5'-aminoalkyl oligonucleotide.

- In a second method, a label is directly incorporated into the oligonucleotide during or prior to automated synthesis, for example as a support reagent (Mullah, "Solid support reagents for the direct synthesis of 3'-labelled polynucleotides", U.S. patent 5,736,626; Nelson, "Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide
 20 synthesis", U.S. Patent No. 5,141,813) or as a phosphoramidite reagent III. Certain fluorescent dyes and other labels have been functionalized as phosphoramidite reagents for 5' labelling (Theisen (1992) *Nucleic Acid Symposium Series* No. 27, Oxford University Press, Oxford, pp. 99-100).

- Generally, if the labelled oligonucleotide is made by enzymatic synthesis, the
 25 following procedure may be used. A target DNA is denatured and an oligonucleotide primer is annealed to the template DNA. A mixture of enzymatically-incorporatable nucleotides or nucleotide analogs capable of supporting continuous template-directed enzymatic extension of the primed target (e.g., a mixture including dGTP, dATP, dCTP and dTTP or dUTP) is added to the primed target. At least a fraction of the nucleotides are
 30 labelled terminators IV, labelled with an atropisomer xanthene dye II. A polymerase enzyme is next added to the mixture under conditions where the polymerase enzyme is active. A labelled oligonucleotide is formed by the incorporation of the labelled nucleotides or terminators during polymerase-mediated strand synthesis. In an alternative enzymatic synthesis method, two primers are used instead of one: one complementary to

WO 02/36832

PCT/US01/48654

the (+) strand of the target and another complementary to the (-) strand of the target, the polymerase is a thermostable polymerase and the reaction temperature is cycled between a denaturation temperature and an extension temperature, thereby exponentially synthesizing a labelled complement to the target sequence by PCR (Innis (1990) *PCR*

5 *Protocols*, Eds., Academic Press).

In one preferred post-synthesis chemical labelling method an oligonucleotide is labelled as follows. An NHS form of a dye according to structure I is dissolved or suspended in DMSO and added in excess (5-20 equivalents) to a 5'-aminoethyl oligonucleotide in 0.25 M bicarbonate/carbonate buffer at about pH 9 and allowed to react

10 for 6 hours, e.g., U.S. Patent No. 4,757,141. The atropisomer xanthene labelled oligonucleotide can be separated from unreacted dye by passage through a size-exclusion chromatography column eluting with buffer, e.g., 0.1 molar triethylamine acetate (TEAA). The fraction containing the crude labelled oligonucleotide is further purified by reverse phase HPLC employing gradient elution.

15 Polynucleotides labelled with the atropisomer xanthene compounds of the present invention may be additionally labelled with moieties that affect the rate of electrophoretic migration, i.e. mobility-modifying labels. Mobility-modifying labels include polyethyleneoxy units, $-(CH_2CH_2O)_n-$ where n may be 1 to 100 (Grossman, U.S. Patent No. 5,624,800). Preferably, n is from 2 to 20. The polyethyleneoxy units may be interspersed

20 with phosphate groups. Specifically labelling atropisomer xanthene-labelled polynucleotides with additional labels of polyethyleneoxy of discrete and known size allows for separation by electrophoresis, substantially independent of the number of nucleotides in the polynucleotide. That is, polynucleotides of the same length may be discriminated upon by the presence of spectrally resolvable dye labels and mobility-modifying labels. Polynucleotides bearing both

25 dye labels and mobility-modifying labels may be formed enzymatically by ligation or polymerase extension of the single-labelled polynucleotide or nucleotide constituents.

V.5 METHODS

Methods requiring simultaneous detection of multiple spatially-overlapping analytes may benefit from substantially pure atropisomers of asymmetric xanthene dyes as

30 labels. The atropisomer xanthene compounds of the present invention are well suited for any method utilizing fluorescent detection, such as polymerase chain reaction (PCR) amplification, DNA sequencing, antisense transcriptional and translational control of gene expression, genetic analysis, and DNA probe-based diagnostic testing (Kricka, L. (1992)

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, pp.3-28). Fluorescence detection of fluorescent dye-labelled oligonucleotides is the basis for nucleic acid sequence detection assays such as 5' exonuclease assay (Livak, U.S. Patent No.

5,723,591), FRET hybridization (Tyagi, S. and Kramer, F. (1996) "Molecular Beacons:

- 5 Probes that fluoresce upon hybridization", *Nature Biotechnology*, 14:303-08), genetic linkage mapping (Dib (1996) "A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites", *Nature* 380:152-54) and oligonucleotide-ligation assay (Grossman (1994) "High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation", *Nucl. Acids Res.* 22:4527-10 34).

The present invention is particularly well suited for detecting classes of differently-labelled polynucleotides that have been subjected to a biochemical separation procedure, such as electrophoresis (Rickwood and Hames, Eds., *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach*, IRL Press Limited, London, 1981). The electrophoretic matrix may be a sieving polymer, e.g. crosslinked or uncrosslinked polyacrylamide, or other amide-15 containing polymer, having a concentration (weight to volume) of between about 2-20 weight percent (Madabhushi, US Patent Nos. 5,552,028; 5,567,292; 5,916,426). The electrophoretic matrix may be configured in a slab gel or capillary format (Rosenblum, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3925-29; Mathies, US Patent No. 5,274,240).

20 V.5A PRIMER EXTENSION

In a preferred category of methods referred to herein as "fragment analysis" or "genetic analysis" methods, polynucleotide fragments labelled with fluorescent dyes, including substantially pure atropisomeric xanthene compounds, are generated through template-directed enzymatic synthesis using labelled primers or nucleotides, e.g. by ligation-25 or polymerase-directed primer extension. The polynucleotide fragments may be subjected to a size-dependent separation process, e.g., electrophoresis or chromatography, and the separated fragments are detected subsequent to the separation, e.g., by laser-induced fluorescence (Hunkapiller, U.S. Patent No. 4,811,218). Multiple classes of polynucleotides may be separated simultaneously and the different classes are distinguished by spectrally-30 resolvable labels, including dyes of the invention. In electrophoresis, the classes separate on the basis of electrophoretic migration rate.

V.5B DNA SEQUENCING

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Preferably, the chain termination methods of DNA sequencing, i.e. dideoxy DNA sequencing, or Sanger-type sequencing, and fragment analysis is employed (Sanger (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467). Exemplary chain-terminating nucleotide analogs include the 2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates (ddNTP) which lack the 3'-OH group necessary for 3' to 5' DNA chain elongation. Primers or ddNTP may be labelled with the substantially pure atropisomer xanthene dyes of the invention and detected by fluorescence after separation of the fragments by high-resolution electrophoresis. Dyes can be linked to functionality on the 5' terminus of the primer, e.g. amino (Fung, U.S. Patent No. 4,757,141), on the nucleobase of a primer, or on the nucleobase of a dideoxynucleotide, e.g. via alkynylamino linking groups (Kham, U.S. Patent No. 5,770,716; and 5,821,356; Hobbs, U.S. Patent No. 5,151,507).

Each of the terminators bears a different fluorescent dye and collectively the terminators of the experiment bear a set of dyes including one or more from the dyes of the invention. In a preferred fragment analysis method, fragments labelled with dyes are identified by relative size, i.e. sequence length. Correspondence between fragment size and sequence is established by incorporation of the four possible terminating nucleotides ("terminators") and the members of a set of spectrally resolvable dyes (Bergot, U.S. Patent No. 5,366,860). The set of spectrally resolvable dyes may include at least one substantially pure atropisomeric xanthene compound.

20 V.6 LIGATION

The covalent joining of nucleic acid probes by ligase enzymes is one of the most useful tools available to molecular biologists. When two probes are annealed to a template nucleic acid where the two probes are adjacent and without intervening gaps, a phosphodiester bond can be formed between a 5' terminus of one probe and the 3' terminus of the other probe by a ligase enzyme, (Whiteley, U.S. Patent No. 4,883,750; Landegren, (1988) "A ligase mediated gene detection technique", Science 241:1077-80; Nickerson, "Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide assay" (1990) Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:8923-27). Oligonucleotide ligation assays detect the presence of specific sequences in target DNA sample. Where one or both probes are labelled with a dye, the ligation product may be detected by fluorescence. One or both probes may be labelled with a substantially pure atropisomeric xanthene dye. Ligation products may be detected by electrophoresis, chromatography, or other size- or charge-based separation method.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

V.7 AMPLIFICATION

The atropisomer xanthene compounds of the invention find applications as labels on 5'-labelled oligonucleotide primers for the polymerase chain reaction (PCR) and other nucleic acid amplification and selection methods. PCR applications include the use of labelled oligonucleotides for genotyping by variable number tandem repeat (VNTR), short tandem repeat (STR), and microsatellite methods of amplification of repeat regions of double-stranded DNA that contain adjacent multiple copies of a particular sequence, with the number of repeating units being variable. Preferably, in such PCR genotyping methods, the PCR primer is labelled with an atropisomer xanthene of the invention.

10 In a particularly preferred embodiment, atropisomer xanthene compounds may be used in quantitative methods and reagents that provide real time or end-point measurements of amplification products during PCR (US Patent Nos. 5,210,015; 5,538,848). The exonuclease assay (Taqman®) employing fluorescent dye-quencher probes (US Patent 5,723,591; Mullah, (1998) "Efficient synthesis of double dye-labelled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay", Nucl. Acids Res. 26:1026-1031) gives direct detection of polymerase chain reaction (PCR) products in a closed-tube system, with no sample processing beyond that required to perform the PCR. In the Taqman assay, the polymerase that conducts primer extension and amplifies the polynucleotide also displaces and cleaves a probe annealed to target sequence by 5' to 3' exonuclease activity. In a Taqman-type assay, the probe is self-quenching, labelled with fluorescent dye and quencher moieties, either of which may be dyes of the invention. Spectral overlap allows for efficient energy transfer (FRET) when the probe is intact (Clegg, (1992) "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids", Meth. Enzymol. 211:353-388). When hybridized to a target sequence, the probe is
15
20
25
cleaved during PCR to release a fluorescent signal that is proportional to the amount of target-probe hybrid present (US Patent Nos. 5,538,848; 5,723,591).

The progress of amplification can be monitored continuously, i.e. real-time detection. Spectrally-resolvable atropisomer xanthene dyes of the invention are useful in genotyping experiments after PCR amplification of target. In particular, a set of primer
30
oligonucleotides, labelled at the 5' terminus, each with different dyes, can amplify multiple loci and discriminate single nucleotide polymorphisms (SNP) and alleles. Electrophoretic separation of the dye-labelled amplification products, with size standards, establishes a profile

WO 02/36832

PCT/US01/48654

or characteristic data set indicating a certain genotype dependent on the set of primer sequences.

V.7A HYBRIDIZATION ASSAYS

- Certain fluorescent dye-quencher probes which hybridize to target nucleic acids are useful in hybridization assays. When the probe is not hybridized to target, the probe may attain conformations that allow spatial proximity between the fluorescent dye and the quencher moieties resulting in fluorescence quenching. Upon hybridization to target, the moieties are physically separated, quenching ceases or diminishes, and fluorescence increases. Where the fluorescence is detectable or quantitated, the presence of target sequence in the sample is deduced. The atropisomeric dyes of the invention can also be employed as the fluorescent dye or the quencher moiety. Fluorescent dye-quencher probes with self-complementary sequences that form a "hairpin" region, so called "Molecular beacons" (Tyagi and Kramer) undergo the fluorescent change upon hybridization to their complementary target sequence, e.g. *in situ* quantitation of mRNA in living cells.
- Hybridization probes labelled with different fluorescent dyes, including the atropisomeric dyes of the invention, enable multiplex, homogeneous hybridization assays to be carried out in sealed reaction tubes.

V.8 CHROMATOGRAPHY

- The aforementioned methods employing substrates labelled with substantially pure atropisomer xanthene compounds may also be conducted where the labelled substrates are detected by chromatography (*HPLC of Macromolecules, A Practical Approach*, Second Edition, R.W.A. Oliver, Ed. (1997) Oxford University Press). The well established techniques of HPLC enable the separation of large substrates such as polynucleotides under reverse phase conditions where the sample substrate is dissolved and eluted in aqueous organic mobile phase from sorptive ion-exchange or hydrophobic interactions with an immobilized solid phase. When a chiral substrate such as a polynucleotide, polypeptide, or polysaccharide is labelled with a racemic mixture of atropisomeric xanthene compounds, diastereomers result. Essentially a redundant set of analytes are created which may obscure the analytical result. Analysis of the resulting diastereomeric mixture may lead to double peaks, broad peaks, and other limiting artifacts under the high-resolution conditions of HPLC. This problem is especially exacerbated where the chiral substrate is a mixture of closely related compounds, such as the nested set of

WO 02/36832

PCT/US01/48654

polynucleotide fragments generated by the Sanger sequencing method. Use of a substantially pure atropisomeric form of xanthene compounds as labels for chiral substrates prevents this unwanted hindrance to analysis by removing one of the diastereomers. The surprising and unexpected benefit of the invention may be exemplified by sharper peaks, less split peaks, and better resolution in general.

V.9 KITS

The invention includes kits comprising the substantially pure atropisomer xanthene compounds of the invention and/or their labelled conjugates. In one embodiment, the kits are useful for conjugating an atropisomer xanthene compound with a linking moiety to another molecule, i.e. a substrate. Such kits generally comprise an atropisomer xanthene of the invention including an optional linking moiety and reagents, enzymes, buffers, solvents, etc. suitable for conjugating the dye to another molecule or substance. The atropisomer xanthene may be an acceptor or donor of an energy-transfer dye.

In one embodiment, the kits are useful for labelling enzymatically synthesized oligonucleotides and polynucleotides with the atropisomer xanthenes of the invention. Such kits generally comprise a labelled enzymatically-incorporatable nucleotide or nucleotide analog according to the invention, a mixture of enzymatically-incorporatable nucleotides or nucleotide analogs capable of supporting continuous primer extension and a polymerase enzyme. Preferably, the labelled enzymatically-incorporatable nucleotide or nucleotide analog is a compound according to structure IV, most preferably a labelled terminator. Preferred polymerases are thermostable, such as AMPLITAQ[®] DNA polymerase FS (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Alternatively, the kit may include one or more primers. The primers may be labelled with atropisomer xanthenes and energy-transfer dyes including atropisomer xanthenes.

V.10 EXAMPLES

The invention will be further clarified by a consideration of the following examples, which are intended to be purely exemplary of the present invention and not to in any way limit its scope.

Example 1 Preparation of menthyl carbamate diastereomers of C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein, **1a** and **1b**.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

The hydrochloride salt of C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein (5.16 gm, 11.6 mMol, 441.8 MW; Shipchandler (1987) Anal. Biochem. 162:89-101) was dissolved in 50 ml of deionized formamide and 10.2 ml diisopropylethylamine. (-) Menthyl chloroformate (3.06 gm, 3.0 ml, 14 mMol, 219 MW; Aldrich Chemical, Milwaukee, WI; Jour. Chem. Soc., Chem. Commun. (1987) 470; Yodo (1988) Chem. Pharm. Bull. 36:902) was added dropwise with stirring at room temperature under argon. After 1.5 hours, TLC analysis (ethyl acetate/hexane : 4/1) showed partial conversion of reactant to a higher R_f spot. Another 1 ml (-) Menthyl chloroformate was added and stirring was continued for another 0.5 hour. TLC analysis showed complete conversion to the higher R_f product. Dilution of the reaction mixture with saturated aqueous NaHCO₃ was followed by extraction with 500 ml ethyl acetate. The aqueous fraction was acidified to pH 3 and extracted with ethyl acetate. The combined organic fractions were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give 4.5 gm, 66% yield of a mixture of **1a** and **1b** as a yellow powder (Figure 1a).

Example 2 Separation and isolation of diastereomers **1a** and **1b** by HPLC.

Crude diastereomers **1a** and **1b** were separated and purified by a two stage chromatography process on an open column, flash reverse phase column rough separation, followed by preparative reverse phase HPLC.

The mixture of **1a** and **1b** was dissolved in ethyl acetate and adsorbed on C-18 reverse phase silica gel. The solvent was removed under vacuum and the solid was loaded on the top of a pre-equilibrated C-18 reverse phase column (21cm length x 6cm diameter). The diastereomers were separated and eluted with 25% CH₃CN in 100 mM TEAA (triethylammonium acetate) by collecting fractions. The fractions were analyzed by analytical reverse phase HPLC on a C-18 column (Metachem ODS3, 25cm length x 4.6mm inner diameter) with a linear gradient of 25% to 35% CH₃CN in 100 mM TEAA from 0 to 30 minutes at 1.0 ml/min flow rate and 260 nm UV detection. The fractions that contained the first eluting diastereomer of at least 75% purity were combined and concentrated under vacuum to an orange oil. The first eluting diastereomer was arbitrarily assigned structure **1a**. The fractions that contained the second eluting diastereomer of at least 75% purity were combined and concentrated under vacuum to an orange oil. The second eluting diastereomer was arbitrarily assigned structure **1b**.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

- Diastereomer **1a** was purified to 99% isomeric purity by preparative reverse phase HPLC by loading 600-800 mg of **1a** purified to 75% purity by the flash process, dissolved in 500 ml of 100 mM TEAA on to a Metachem ODS3 8 μ column (Waters Prep LC 2000 System) and eluting under a gradient of 0 to 10% CH₃CN in 100 mM
- 5 TEAA over 16 min., 10 to 35% CH₃CN over 80 min., then hold at 35% CH₃CN for 32 min., at a flow rate of 40 ml/min., with UV detection at 260 nm. Fractions were collected and analyzed by the analytical reverse phase HPLC conditions above (Figure 1b). Fractions with isomeric purity of at least 99% were combined, acidified to pH 2 with 6N HCl and extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was washed
- 10 with saturated NaCl, dried over anhydrous Na₂SO₄, concentrated under vacuum, precipitated with hexane, filtered, and dried to yield 300 to 500 mg of **1a** as a bright yellow solid. ¹H NMR (Acetone-d₆) δ 9.85, 2H, br; 9.10, 1H, br; 8.35, 1H, d; 8.15, 1H, d; 7.83, 1H, s; 7.43, 1H, br; 6.95, 1H, s; 6.70, 4H, m; 4.60, 3H, m; 1.90, 2H, m; 1.65, 2H, m; 1.45, 1H, m; 1.30, 2H, m; 0.89, 3H, d; 0.82, 3H, d; 0.78, 3H, d.
- 15 Electrospray Mass Spectroscopy: 610 (M + Na), 588.5 (M + H),

Diastereomer **1b** is purified by the same preparative reverse phase HPLC process.

Example 3 Synthesis of atropisomer amine **2a**

- Diastereomer **1a** (1.1 gm, 1.87 mmoles, 587.6 MW) was dissolved in 100 ml
- 20 water and cooled to 0 °C. Concentrated sulfuric acid (15 ml) was added dropwise to give a brownish solution (Figure 2a). The temperature was allowed to rise to room temperature and the mixture was stirred overnight. The mixture was added slowly to 1.5 ml of ice water and then adsorbed on pre-equilibrated C-18 silica gel (4 cm length x 3 cm diameter). The support was washed with water until the pH of the eluent was
- 25 neutral. The crude product was eluted with 200 ml CH₃OH which was concentrated under vacuum and dried to yield atropisomer **2a** C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein sulfate salt as an orange solid (0.93 gm, 95% yield, 503.4 MW). ¹H NMR (methanol-d₄) δ 8.43, 1H, d; 8.34, 1H, d; 7.92, 1H, s; 7.23, 3H, m; 7.06, 1H, d; 6.98, 1H, d; 4.58, 2H, s.
- 30 The enantiomeric purity of hydrolyzed and purified **2a** was analyzed by chiral column HPLC (Regies (S,S) Whelk-01 10-100 Kromasil FEC column, 25 cm length x 4.6 mm ID). The sample **2a** was dissolved in water and eluted with a gradient of 0 to 35% ethanol in water containing 0.1% acetic acid over 30 minutes at 1 ml/min. with

WO 02/36832

PCT/US01/48654

254 nm UV detection (Figure 2c) and distinguished from the racemic mixture (Figure 2b).

Example 4 Synthesis of atropisomer amine **2b**

Diastereomer **1b** is hydrolyzed, purified, and analyzed to give atropisomer **2b** by the same processes as Example 3 (Figure 2a).

Example 5 Synthesis of atropisomeric trifluoroacetamide **3a**

Atropisomer **2a** as the sulfate salt (0.93 gm, 1.84 mmoles, 503.4 MW) was dissolved in 15 ml ethanol. Triethylamine (1.8 ml, 13 mmoles) and ethyl trifluoroacetate (2.2 ml, 18 mmoles) were slowly added (Figure 2a). The mixture was stirred at room temperature under argon for 2.5 hours. Volatiles were removed under vacuum and the resulting residue was dissolved in 300 ml ethyl acetate and washed with 2 x 50 ml of 5% HCl. The ethyl acetate fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to yield atropisomeric trifluoroacetamide **3a** as an orange solid (0.92 gm, 100% yield, 501.4 MW). ¹H NMR (methanol-d₄) δ 8.35, 1H, d; 8.15, 1H, d; 7.80, 1H, s; 6.82, 1H, s; 6.65, 4H, m; 4.82, 2H, s.

Example 6 Synthesis of atropisomeric trifluoroacetamide **3b**

Atropisomer **2b** is converted to atropisomeric trifluoroacetamide **3b** by the same process and analyzed by the same methods as Example 5 (Figure 2a).

Example 7 Synthesis of atropisomeric NHS ester **4a**

Atropisomeric trifluoroacetamide **3a** (0.92 gm, 1.83 mmoles, 501.4), N-hydroxysuccinimide (0.85 gm, 7.3 mmoles), and 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (DAE) (1.05 gm, 5.5 mmoles) were dissolved in 24 ml ethyl acetate and 12 ml of 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) and stirred at room temperature under argon for 2.5 hours (Figure 3). The mixture was diluted with 300 ml ethyl acetate and washed with 2 x 80 ml of 5% HCl, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, concentrated under vacuum, and adsorbed on silica gel. The silica gel with adsorbed product was loaded on the top of a dry-packed column of silica gel (12 cm length x 3 cm ID) and eluted with ethyl acetate:hexane / 2:1. Fractions containing atropisomeric NHS ester **4a** were collected and combined, concentrated under vacuum and precipitated from hexane to yield **4a** as a bright yellow solid (0.74 gm, 67% yield,

WO 02/36832

PCT/US01/48654

598.4 MW). ¹H NMR (methanol-d₄) δ 8.42, 1H, d; 8.22, 1H, d; 7.95, 1H, s; 6.81, 1H, s; 6.68, 4H, m; 4.82, 2H, s; 2.85, 4H, s.

Example 8 Synthesis of atropisomeric NHS ester **4b**

Atropisomeric trifluoroacetamide **3b** is converted to atropisomeric NHS ester **4b** by the same process and analyzed by the same methods as Example 7 (Figure 3).

Example 9 Synthesis of 2-[(2-Fmoc-aminoethoxy)(hydroxyphosphoryl)oxy]acetic acid NHS **5**

Protected phosphodiester linker synthon **5** was prepared by reacting methyl glycolate **6** (4.5 eq.) with cyclic phosphoramidite Amino-Link™ **7** (1 eq.) (Connell (1987) *BioTechniques* 5:342-348; US Patent 4,757,151) and 4-N,N-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.1 eq.). The mixture was stirred at ambient temperature for 1 hour. After the reaction was complete (TLC analysis), the solution was cooled with ice-bath and then treated with a solution of 3-chloroperoxybenzoic acid (4 eq.) in methylene chloride. The ice-bath was removed. After 30 minutes, an aqueous solution of NaHSO₃ (10%) was added. The mixture was diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with NaHSO₃ (10%), saturated solution of NaHCO₃, and dried with Na₂SO₄. The crude product was purified by flash chromatography to afford ester **8**, which was heated at reflux for 3 hours (36 mM, 1 eq.) in methylethylketone and NaI (10 eq.). The crude demethylated phosphodiester was dissolved in 0.3 M solution of LiOH (5 eq.) in H₂O/CH₃OH : 1/3) and stirred overnight to cleave the methyl ester. Solvent was removed to afford crude compound **9** which was then dissolved in aqueous Na₂CO₃ (5%). N-(9-Fluorenylmethoxy-carbonyloxy)succinimide (FmocOSu, 1.5 eq.) in THF was added in one portion and stirred at ambient temperature for 3 hours. The crude product was diluted with ethyl acetate and washed with 10% aqueous HCl. The organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered, concentrated under vacuum, and purified by flash chromatography to afford Fmoc-acid **10** as a yellow oil.

Fmoc-acid **10** was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (1 eq.). N-hydroxysuccinimide (4 eq.) was added. The solution was cooled with an ice-bath and then treated with dicyclohexyl carbodiimide (DCC, 2 eq.). The ice-bath was then removed, and stirring was continued for 2 hours (with TLC analysis). When the reaction was complete, ethyl acetate was added and the solution was washed with 5% aqueous HCl. Removal of solvent gave 2-[(2-Fmoc-aminoethoxy)(hydroxyphosphoryl)oxy]acetic acid NHS **5** (Figure 4).

WO 02/36832

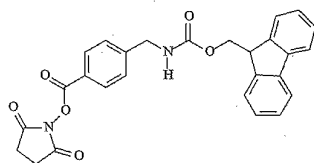
PCT/US01/48654

Example 10 Synthesis of 7-propargylphosphorylamino-7-deaza-ddATP 11

- 7-Deaza-7-propargylamino-ddATP 12 (7-(3-amino-1-propynyl)-2',3'-dideoxy-7-deazaadenosine-5'-triphosphate; US Patent Nos. 5,047,519 and 5,151,507) was suspended in 250 mM bicarbonate (pH 9.0) and a solution of 2-[(2-Fmoc-aminoethoxy)(hydroxyphosphoryl)oxy]acetic acid NHS 5 in DMSO was added. After 1 hour, the reaction mixture was purified by HPLC (AX-300 anion exchange). The product fractions were collected, concentrated to dryness, and purified by RP HPLC (C-18 reverse phase) to afford Fmoc-linker ddATP 13. Concentrated ammonium hydroxide (28-30%) was added to Fmoc-linker ddATP 13 and the solution was heated to 55°C for 20 minutes.
- Concentration under vacuum gave crude 7-propargylphosphorylamino-7-deaza-ddATP 11 which was purified by C-18 reverse phase HPLC (Figure 5).

Example 11 Synthesis of Fmoc-aminomethyl-NHS-FAM 14

- Fmoc-aminomethyl-NHS-FAM 14 was prepared by reacting the fluorenylmethoxy-carboxy ester of N-hydroxysuccinimide (Fmoc-OSu) with the HCl salt of *p*-aminomethylbenzoic acid (both commercially available) in the presence of base to form the expected N-Fmoc derivative. This product was then reacted with N-hydroxysuccinimide in the presence of DCC to form the NHS ester of the benzoic acid carboxyl group. This NHS-ester, N-Fmoc derivative of *p*-aminomethylbenzoic acid having the structure:



- was then reacted with atropisomer C-1 aminomethyl, C-19 carboxy fluorescein 2a, purified by the method of Example 2, followed by reaction with N-hydroxysuccinimide in the presence of DCC to produce substantially pure atropisomer, Fmoc-aminomethyl-NHS-FAM 14 (Figure 6).
- Example 12** Synthesis of Aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylphosphorylamino-ddATP 15

WO 02/36832

PCT/US01/48654

A solution of Fmoc-aminomethyl-NHS-FAM 14 in DMSO was added to 7-propargylphosphorylamino-7-deaza-ddATP 11 suspended in 250 mM bicarbonate (pH 9.0). The reaction mixture was placed in the dark at ambient temperature for 2 hours. The Fmoc-amino protected product 16 was purified by HPLC (AX-300 anion exchange), then heated at 55°C in concentrated ammonium hydroxide (28-30%) for 20 minutes to hydrolyze the Fmoc group. Concentration under vacuum gave crude, substantially pure atropisomer, aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylphosphorylamino-ddATP 15 which was purified by C-18 reverse phase HPLC (Figure 6).

Example 13 Synthesis of NHS-rhodamine dye 17

Bicyclic amine 18 (12.8 gm, 47 mmole, US Patent No. 5,688,808), 1-bromo-3-chloropropane (29.3 gm, 187 mmole), sodium iodide (56.4 gm, 376 mmole) and sodium bicarbonate (7.9 gm, 94 mmole) was refluxed in 150 ml CH₃CN for 18 hours. The mixture was cooled to room temperature, filtered, and evaporated. The filter cake was washed with 300 ml hexane which was combined with the filtrate and washed with 2 x 50 ml water and 50 ml saturated NaCl, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The product was purified by chromatography on silica gel, eluting with hexane/ethyl acetate : 20/1, to give tricyclic amine pivalate ester 19 as a pale yellow oil (9.5 gm, 30 mmole, 64% yield). The ester of 19 was hydrolyzed in a solution of lithium hydroxide monohydrate (2.6 gm, 60 mmole) in 15 ml water and 120 ml methanol. After stirring for one hour at room temperature, the mixture was concentrated under vacuum and dissolved in 30 ml 1M HCl which was extracted with 3 x 100 ml of diethylether. The combined ether extracts were washed with 50 ml of 200 mM pH 7 phosphate buffer, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum to give tricyclic amine 20 as a brown solid (Figure 7). Tricyclic amine 20 and 3,6-dichloro, 4-isopropylcarboxylate phthalic anhydride 21 were refluxed in toluene to give Friedel-Craft acylation product ketone 22 (Abs. max 400 nm) (Figure 8).

Cyclization of 22 with 20 in phosphoryl trichloride and chloroform at reflux gave 23 as a mixture of isopropylcarboxylate regioisomers. After cleavage of the isopropyl group, the rhodamine carboxylic acid 24 was converted to NHS-rhodamine dye 17 (Figure 8).

Example 14 Synthesis of phosphate-linker, energy-transfer terminator ddATP 25

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylphosphorylamino-ddATP 15 from Example 12 was suspended in a solution of 250 mM bicarbonate (pH 9.0). A solution of NHS ester 17 (US Patent 5,847,162 for synthesis) in DMSO was added. The reaction mixture was placed in the dark at ambient temperature for 2 hours. Purification was done by HPLC, AX-300 anion exchange and then C-18 reverse phase to afford pure energy-transfer ddATP terminator 25 (Figure 9).

Example 15 Synthesis of bis-trifluoroacetamide rhodamine NHS 27

Rhodamine dye 28 was converted to the bis-trifluoroacetamide 29 by treatment with trifluoroacetic anhydride and triethylamine in diethylether at room temperature. The carboxylic acid was converted to the NHS ester with dicyclohexylcarbodiimide and N-hydroxysuccinimide to give bis-trifluoroacetamide rhodamine NHS 27 (Figure 10).

Example 16 Synthesis of Aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylethoxyamino-ddTTP 32

5-(3-Aminoethoxy-1-propynyl)-2',3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate 30 (US Patent 5,821,356) was reacted with substantially pure atropisomer, Fmoc-aminomethyl-NHS-FAM 14 under the same conditions as Example 12 to give Fmoc-aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylethoxyamino-ddTTP 31 which was purified by anion-exchange HPLC. The Fmoc group of 31 was cleaved to give substantially pure atropisomer, aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylethoxyamino-ddTTP 32 (Figure 11).

Example 17 Synthesis of energy-transfer terminator ddTTP 26

Following the conditions of Example 14, substantially pure atropisomer, aminomethylbenzamide-aminomethyl-FAM-propargylethoxyamino-ddTTP 32 was suspended in a solution of 250 mM bicarbonate (pH 9.0). A solution of bis-trifluoroacetamide rhodamine NHS ester 27 in DMSO was added. The reaction mixture was placed in the dark at ambient temperature for 2 hours. Ammonium hydroxide was added to cleave the trifluoroacetamide groups. Purification was done by HPLC, AX-300 anion exchange and then C-18 reverse phase to afford pure energy-transfer ddTTP terminator 26 (Figure 12).

Example 18 Sequencing of pGEM with phosphate-linker, energy-transfer terminator ddATP 25

WO 02/36832

PCT/US01/48654

Following the conditions of U.S. Patent Nos. 5,770,716; 5,948,648; and 6096875, the energy-transfer ddATP terminator **25** was used with other standard reagents in a Sanger-type, one-color automated DNA sequencing experiment. The terminator nucleotide **25** was tested as the racemic mixture of atropisomers (top electropherogram) and as a substantially pure atropisomer (bottom electropherogram) shown in Figures 13a and 13b.

The dye-terminator sequencing reactions were performed using AmpliTaq DNA Polymerase, FS following protocols provided in the ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit Manual (Applied Biosystems p/n 402116). Sequencing of the pGEM-3Zf(+) template was conducted with unlabelled -21 M13 sequencing primer (forward). Reagents, including buffer, unlabelled primer, AmpliTaq DNA Polymerase, FS, were from an ABI PRISM™ Dye Terminator Core Kit (Applied Biosystems p/n 402117). The dNTP mix consisted of 2 mM each of dATP, dCTP, dTTP, and dUTP or dTTP. A premix of reaction components was prepared including: 5X Buffer 4.0 µL; dNTP mix 1.0 µL; Template:pGEM®-3Zf(+), 0.2 µg/µL, 2.0 µL; Primer: -21 M13 (forward), 0.8 pmol/µL, 4.0 µL; AmpliTaq DNA Polymerase, FS, 0.5 µL; and H₂O 3.5 µL, wherein all quantities are given on a per reaction basis.

Reactions were assembled in 0.5 ml tubes adapted for the Perkin-Elmer 480 DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems p/n N801-100 or 0.2 ml tubes for the Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700). From 1 to 250 pmol of the dye terminator was added to each reaction. 30 µL of mineral oil was added to the top of each reaction to prevent evaporation (when using the Applied Biosystems 480 Thermal Cycler). Reaction volumes were 20 µL, including 15 µL of the above reaction premix, a variable amount of dye labelled terminator, and a sufficient volume of water to bring the total reaction volume up to 20 µL. Reactions were thermocycled as follows: 96°C for 30 sec, 50°C for 15 sec, and 60°C for 4 min, for 25 cycles; followed by a 4°C hold cycle.

All reactions were purified by spin-column purification on Centri-Sep spin columns according to manufacturer's instructions (Princeton Separations p/n CS-901). Gel material in the column was hydrated with 0.8 mL deionized water for at least 30 minutes at room temperature. After the column was hydrated and it was determined that no bubbles were trapped in the gel material, the upper and lower end caps of the

WO 02/36832

PCT/US01/48654

column were removed, and the column was allowed to drain by gravity. The column was then inserted into the wash tubes provided in the kit and centrifuged in a variable speed microcentrifuge at 1300g for 2 minutes, removed from the wash tube, and inserted into a sample collection tube. The reaction mixture was carefully removed
 5 from under the oil and loaded onto the gel material and the tube re-centrifuged. Eluted samples were then dried in a vacuum centrifuge.

Prior to loading onto a sequencing gel, the dried samples were resuspended in 25 μ L of Template Suppression Reagent (Applied Biosystems p/n 401674), vortexed, heated to 95°C for 2 minutes, cooled on ice, vortexed again, and centrifuged (13,000
 10 x g). 10 μ L of the resuspended sample was aliquoted into sample vials (Applied Biosystems p/n 401957) adapted for the ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems p/n 310-00-100/120). Electrophoresis on the 310 Genetic Analyzer was performed with sieving polymers and capillaries specially adapted for DNA sequencing analysis (PE Applied Biosystems p/n 402837 or 4313087 (polymer)
 15 and p/n 402840 (capillary)). In each case, the sieving polymer included nucleic acid denaturants. Samples were electrokinetically injected onto the capillary for 30 sec at 2.5 kV, and run for up to 2 hr at 10 to 12.2 kV with the outside wall of the capillary maintained at 50°C to generate electropherograms as sequencing data (Figures 13a-d).

The electropherograms in Figures 13a and 13b show the specific incorporation of
 20 the energy-transfer terminator **25** onto the 3' terminus of primer extension, polynucleotide fragments during single color sequencing reactions. The electropherograms plot the fluorescence intensity emitted (Emission maxima about 650 nm) by the acceptor rhodamine dye of the labelled fragments between about 20 to about 600 nucleotides in length as a function of time during an electrophoresis run on the ABI PRISM™ 310
 25 Genetic Analyzer.

Eluting fragments from 119 to 242 base pairs are plotted in Figure 13a. Each of the fragments was 3' terminated by energy-transfer terminator **25**. Figure 13b shows a more magnified view of fragments 148 to 205 base pairs. The three regions under the arrows in Figures 13a and 13b illustrate the surprising and unexpected improvement in
 30 separating fragments labelled with the substantially pure atropisomer form of **25** (bottom panels) relative to the separation of fragments labelled with the racemic mixture of **25**. Better resolution of the fragments was observed in the bottom electropherogram with the substantially pure atropisomer than with the racemic mixture of atropisomers in **25**. The

WO 02/36832

PCT/US01/48654

locations marked with arrows are particular loci where substantially pure atropisomer form of **25** provided the unexpected benefit of better resolution. By contrast, use of the racemic mixture of atropisomeric form of **25** in labelling the chiral primer extension products led to diastereomeric populations of fragments which migrate electrophoretically at different rates, as exemplified by the broad, overlapping, and split peaks under the arrows in the top electropherogram.

Additionally, the bottom electropherogram shows more even peak heights throughout the sequencing ladder than was observed in the top electropherogram with the racemic mixture of atropisomers in **25**.

10 Example 19 Sequencing of pGEM with sulfonate-linker, energy-transfer terminator ddATP **33**

Following the general synthesis routes and conditions of the previous Examples, substantially pure atropisomer, sulfonate-linker, energy-transfer terminator ddATP **33** (Figure 14) was synthesized. Following the protocol and conditions of Example 18, **33** was used in single-color sequencing the pGEM target. Separately, the racemic mixture of **33** was also used in the same single-color sequencing experiment. Eluting fragments from 148 to 242 base pairs are plotted in Figure 13c. Each of the fragments was 3' terminated by energy-transfer terminator **33**. The three regions under the arrows in Figure 13c illustrate the surprising and unexpected improvement in separating fragments labelled with the substantially pure atropisomer form of **33** (bottom panel) relative to the separation of fragments labelled with the racemic mixture of **33** (top panel). Better resolution of the fragments was observed in the bottom electropherogram with the substantially pure atropisomer than with the racemic mixture of atropisomers in **33**.

20 Example 20 Sequencing of pGEM with energy-transfer terminator ddGTP **34**

Following the general synthesis routes and reaction conditions of the previous Examples, energy-transfer terminator ddGTP **34** (Figure 15) was synthesized. The atropisomer forms were separated at the final stage of synthesis, i.e. compound **34**, by reverse-phase HPLC. Following the protocol and conditions of Example 18, a substantially pure atropisomer of **34** was used in single-color sequencing the pGEM target. Separately, the racemic mixture of **34** was also used in the same single-color sequencing experiment. Eluting fragments from 24 to 99 base pairs, detected at about 535 nm, are plotted in Figure 13d. Each of the fragments was 3' terminated by energy-transfer

WO 02/36832

PCT/US01/48654

terminator 34. The regions under the arrows in Figure 13d illustrates the surprising and unexpected improvement in separating fragments labelled with the substantially pure atropisomer form of 34 (bottom panel) relative to the separation of fragments labelled with the racemic mixture of 34 (top panel). Better resolution of virtually every fragment was
5 observed in the bottom electropherogram with the substantially pure atropisomer than with the racemic mixture of atropisomers in 34. The locations marked with arrows are particular loci where substantially pure atropisomer form of 34 provided the unexpected benefit of better resolution. Every fragment in the bottom panel, labelled with racemic 34, separates into two peaks, detracting from the utility of the data.

10 Although only a few embodiments have been described in detail above, those having ordinary skill in the chemical and molecular biology arts will clearly understand that many modifications are possible in the illustrated embodiments without departing from the teachings thereof. All such modifications are intended to be encompassed within the following claims.

15

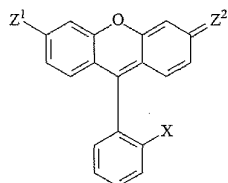
WO 02/36832

PCT/US01/48654

CLAIMS

We claim:

1. A substantially pure atropisomer compound having the structure:



5

Z^1 is OH, NH_2 , NHR , or NR_2 , wherein each R is independently hydrogen,

C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

Z^2 is O, $^+NH_2$, ^+NHR , or $^+NR_2$, wherein each R is independently hydrogen,

C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

10

X is carboxylate or sulfonate;

and said structure includes aryl-substituted forms thereof.

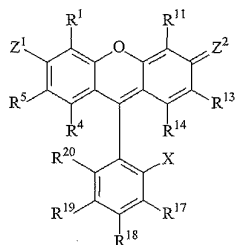
2. The substantially pure atropisomer compound of claim 1 wherein Z^1 is OH,

Z^2 is O, and X is carboxylate.

3. The substantially pure atropisomer compound of claim 1 wherein Z^1 is

15 NR_2 , Z^2 is $^+NR_2$, and X is carboxylate.

4. The substantially pure atropisomer compound of claim 1 having the structure:



WO 02/36832

PCT/US01/48654

wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , R^{14} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , R^{20} , Z^1 , or Z^2 is a linking moiety selected from the group consisting of azido, monosubstituted primary amine, disubstituted secondary amine, thiol, hydroxyl, halide, epoxide, N-hydroxysuccinimidyl ester, carboxyl, isothiocyanate, sulfonyl chloride, sulfonate ester, silyl halide, chlorotriazinyl, succinimidyl ester, pentafluorophenyl ester, maleimide, haloacetyl, epoxide, alkylhalide, allyl halide, aldehyde, ketone, acylazide, anhydride, iodoacetamide and an activated ester.

5. The compound of claim 4 wherein one of R^1 and R^{11} is a linking moiety.
6. The compound of claim 4 comprising one or more substituents R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , R^{14} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} , each of which is independently fluorine, chlorine, C_1 - C_8 alkyl, carboxylate, sulfate, sulfonate, alkylsulfonate, aminomethyl ($-CH_2NH_2$), aminoalkyl, 4-dialkylaminopyridinium, hydroxymethyl ($-CH_2OH$), methoxy ($-OCH_3$), hydroxyalkyl ($-ROH$), thiomethyl ($-CH_2SH$), thioalkyl ($-RSH$), alkylsulfone ($-SO_2R$), arylthio ($-SAr$), arylsulfone ($-SO_2Ar$), sulfonamide ($-SO_2NR_2$), alkylsulfoxide ($-SOR$), arylsulfoxide ($-SOAr$), amino ($-NH_2$), ammonium ($-NH_3^+$), amido ($-CONR_2$), nitrile ($-CN$), C_1 - C_8 alkoxy ($-OR$), phenoxy, phenolic, tolyl, phenyl, aryl, benzyl, heterocycle, phosphonate, phosphate, quaternary amine, sulfate, polyethyleneoxy, and linking moiety.
7. The compound of claim 4 wherein R^{13} and R^{14} taken together form benzo.
8. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is an electron-deficient heterocycle selected from 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 2-imidazole, 4-imidazole, 3-pyrazole, 4-pyrazole, pyridazine, pyrimidine, pyrazine, cinnoline, phthalazine, quinazoline, quinoxaline, 3-(1,2,4-*N*-triazolyl, 5-(1,2,4-*N*-triazolyl, 5-tetrazolyl, 4-(1-*O*, 3-*N*-oxazole, 5-(1-*O*, 3-*N*-oxazole, 4-(1-*S*, 3-*N*-thiazole, 5-(1-*S*, 3-*N*-thiazole, 2-benzoxazole, 2-benzothiazole, 4-(1,2,3-*N*-benzotriazole, and benzimidazole.
9. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is phenyl or substituted phenyl.
10. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is naphthyl or substituted naphthyl.

WO 02/36832

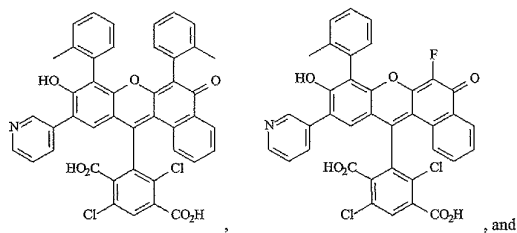
PCT/US01/48654

11. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is fluorine or chlorine.
12. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is 2-pyridyl or 3-pyridyl.
- 5 13. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is 2-quinolyl or 3-quinolyl.
14. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is methoxy ($-\text{OCH}_3$).
15. The compound of claim 4 wherein at least one of R^1 , R^4 , R^5 , R^{11} , R^{13} , and R^{14} is aminomethyl ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$).
- 10 16. The compound of claim 4 wherein at least one of R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} is chlorine.
17. The compound of claim 4 wherein at least one of R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} is fluorine.
- 15 18. The compound of claim 4 wherein at least one of R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} is 4-dialkylaminopyridinium.
19. The compound of claim 4 wherein at least one of R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} is thiophenyl.
- 20 20. The compound of claim 4 wherein at least one of R^{17} , R^{18} , R^{19} , and R^{20} is thio-4-carboxyphenyl.
21. The compound of claim 4 wherein one of R^{18} and R^{19} is carboxyl and the other is hydrogen.
22. The compound of claim 4 wherein one of R^{18} and R^{19} is a linking moiety and the other is hydrogen.
- 25 23. The compound of claim 4 wherein R^{17} and R^{20} are chlorine; one R^{18} and R^{19} is a linking moiety and the other is hydrogen; and X is carboxyl.

WO 02/36832

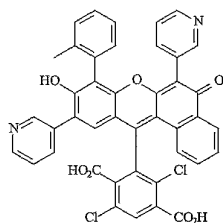
PCT/US01/48654

24. The compound of claim 4 comprising a first bridging group which when taken together with a Z^1 nitrogen, the Z^1 -bonded carbon, and the R^1 -bonded carbon, forms a first ring structure having from 4 to 7 members; and optionally, a second bridging group which when taken together with a Z^2 nitrogen, the Z^2 -bonded carbon, and the R^{11} -bonded carbon forms a second ring structure having from 4 to 7 members.
25. The compound of claim 24 wherein one or both of the first and second ring structures has five members.
26. The compound of claim 25 wherein the five membered ring structure includes one gem disubstituted carbon.
27. The compound of claim 29 wherein the gem substituents are C_1-C_3 alkyl.
28. The compound of claim 27 wherein the gem substituents are methyl.
29. The compound of claim 25 wherein the five membered ring is substituted with a linking moiety.
30. A substantially pure atropisomer compound selected from the group consisting of the structures:

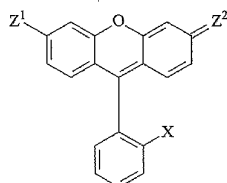


WO 02/36832

PCT/US01/48654



31. An energy-transfer dye comprising:
 a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting
 excitation energy in response thereto;
 5 an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the
 donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and
 a linker for linking the donor dye and the acceptor dye;
 wherein at least one of the donor dye and acceptor dye is a substantially pure
 atropisomer of a xanthene compound having the structure:



- 10 wherein Z^1 and Z^2 are O, OH, NH_2 , NHR , or NR_2 ; X is carboxylate or sulfonate,
 and aryl-substituted forms thereof.

32. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the donor dye is a
 substantially pure atropisomer of a xanthene compound and the acceptor dye is a
 15 cyanine, a phthalocyanine, a squaraine, a bodipy, a benzophenoxazine, a fluorescein, a
 dibenzorhodamine, or a rhodamine dye.

33. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the acceptor dye is a
 substantially pure atropisomer of a xanthene compound and the donor dye is linked to
 the xanthene compound and to a polynucleotide.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

34. The energy-transfer dye of claim 33 wherein the donor dye is linked to the 5'-terminus of the polynucleotide.

35. The energy-transfer dye of claim 33 wherein the donor dye is linked to the 3'-terminus of the polynucleotide.

5 36. The energy-transfer dye of claim 33 wherein the donor dye is linked to a nucleobase of the polynucleotide, wherein if the nucleobase is a purine, the linker is attached at the 8-position, if the nucleobase is a 7-deazapurine, the linker is attached at the 7-position or 8-position, and if the nucleobase is a pyrimidine, the linker is attached at the 5-position.

10 37. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the linker has the structures:



wherein

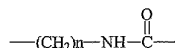
Z is selected from the group consisting of NH, S and O;

15 R²¹ is a C₁-C₁₂ alkyl attached to the donor dye;

R²² is a substituent selected from the group consisting of a C₁-C₁₂ alkyldiyl, a five and six membered ring having at least one unsaturated bond and a fused ring structure which is attached to the carbonyl carbon; and

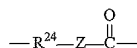
R²³ includes a functional group which attaches the linker to the acceptor dye.

20 38. The compound of claim 37 wherein the linker has the structure:



and n ranges from 2 to 10.

39. The energy-transfer dye of claim 37 wherein R²³ has the structure



25 wherein R²⁴ is a C₁-C₁₂ alkyl.

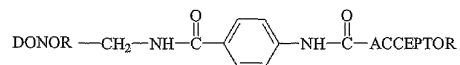
40. The energy-transfer dye of claim 37 wherein R²² is a five or six membered

WO 02/36832

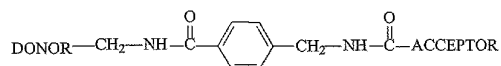
PCT/US01/48654

ring selected from the group consisting of cyclopentene, cyclohexene, cyclopentadiene, cyclohexadiene, furan, thiofuran, pyrrole, isopyrrole, isazole, pyrazole, isoimidazole, pyran, pyrone, benzene, pyridine, pyridazine, pyrimidine, pyrazine oxazine, indene, benzofuran, thionaphthene, indole and naphthalene.

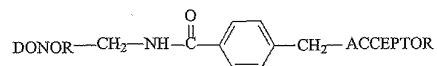
- 5 41. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the linker has the structure



42. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the linker has the structure

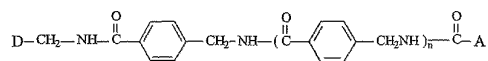


43. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the linker has the structure



10

44. The energy-transfer dye of claim 31 in which the linker has the structure:

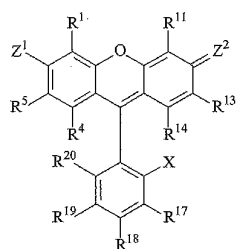


wherein D is a donor dye, A is an acceptor dye and n is 1 or 2.

45. The energy-transfer dye of claim 31 wherein the linker is attached at R¹,
 15 R¹¹, R¹⁸ or R¹⁹ of the substantially pure atropisomeric xanthene compound having the structure:

WO 02/36832

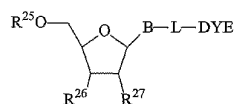
PCT/US01/48654



46. The energy-transfer dye of claim 45 wherein a linker to the donor or the acceptor is attached to R^1 or R^{11} , and a linker to a polynucleotide is attached to R^{18} or R^{19} .

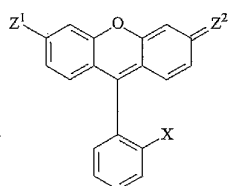
5 47. The energy-transfer dye of claim 45 wherein the linker is attached at one of positions Z^1 or Z^2 of the substantially pure atropisomeric xanthene compound.

48. A labelled nucleoside or nucleotide having the formula:



wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound

10 having the structure:



Z^1 is OH, NH_2 , NHR , or NR_2 , wherein each R is independently hydrogen, C_1 - C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

Z^2 is O, tNH_2 , tNHR , or tNR_2 , wherein each R is independently hydrogen,

15 C_1 - C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

WO 02/36832

PCT/US01/48654

X is carboxylate or sulfonate; or

DYE is an energy-transfer dye comprising a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting excitation energy in response thereto; an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and a linker for linking the donor dye and the acceptor dye; wherein at least one of the donor dye and acceptor dye is a said substantially pure atropisomer of a xanthene compound;

B is a nucleobase;

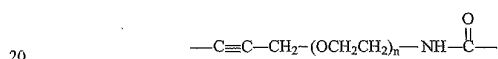
L is a linker;

10 R^{25} is H, monophosphate, diphosphate, triphosphate, thiophosphate, or phosphate analog; and

R^{26} and R^{27} , when taken alone, are each independently H, HO, F, or other moiety which blocks polymerase-mediated target-directed polymerization, or when taken together, R^{26} and R^{27} form 2'-3'-didehydroribose; and wherein DYE is optionally
15 aryl-substituted.

49. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 48 wherein B is selected from the group consisting of uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 7-deazaguanosine.

50. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 48 in which L is:

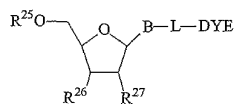


wherein n is 0, 1, or 2.

51. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 48 which is enzymatically incorporatable.

52. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 48 which is a terminator.

25 53. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 52 which has the structure:



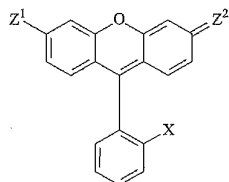
WO 02/36832

PCT/US01/48654

wherein R^{26} and R^{27} , when taken alone, are each independently H, F, or other moiety which blocks polymerase-mediated target-directed polymerization, or when taken together form 2'-3'-didehydroribose.

54. The labelled nucleoside or nucleotide of claim 48 which is enzymatically extendable.

55. A labelled polynucleotide comprising a polynucleotide covalently attached to a label, wherein the label is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound having the structure:



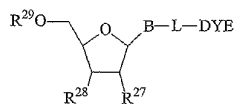
10 Z^1 is OH, NH_2 , NHR , or NR_2 , wherein each R is independently hydrogen, C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

Z^2 is O, $^+NH_2$, ^+NHR , or $^+NR_2$, wherein each R is independently hydrogen, C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

X is carboxylate or sulfonate; or

15 an energy-transfer dye comprising a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting excitation energy in response thereto; an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and a linker for linking the donor dye and the acceptor dye; wherein at least one of the donor dye and acceptor dye is a said
20 substantially pure atropisomer of a xanthene compound; and wherein said substantially pure atropisomer of a xanthene compound is optionally aryl-substituted.

56. The labelled polynucleotide of claim 55 comprising the formula:



WO 02/36832

PCT/US01/48654

wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye;

B is a nucleobase;

L is a linker;

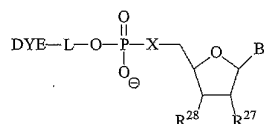
5 R^{27} is H, OH, halide, azide, amine, alkylamine, C_1 - C_6 alkyl, allyl, C_1 - C_6 alkoxy, OCH_3 , or $OCH_2CH=CH_2$; and

R^{28} and R^{29} when taken alone, are each independently H, phosphate, internucleotide phosphodiester, or internucleotide analog;

wherein the polynucleotide comprises 2 to 100 nucleotides.

10 57. The labelled polynucleotide of claim 56 wherein B is selected from the group consisting of uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 7-deazaguanosine.

58. The labelled polynucleotide of claim 55 comprising the formula:



15 wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye;

B is a nucleobase;

X is O, NH, or S;

L is a linker;

20 R^{27} is H, OH, halide, azide, amine, alkylamine, C_1 - C_6 alkyl, allyl, C_1 - C_6 alkoxy, OCH_3 , or $OCH_2CH=CH_2$; and

R^{28} is internucleotide phosphodiester or internucleotide analog;

wherein the polynucleotide comprises 2 to 100 nucleotides.

25 59. The labelled polynucleotide of claim 58 wherein B is selected from the group consisting of uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 7-deazaguanosine.

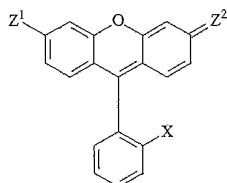
60. The labelled polynucleotide of claim 58 in which L is C_1 - C_{12} alkylidyl.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

61. The labelled polynucleotide of claim 58 in which L comprises $-(CH_2CH_2O)_n-$, where n is 1 to 100.

62. A labelled polypeptide comprising a polypeptide covalently attached to a substantially pure atropisomer of a xanthene compound having the structure:



5

Z^1 is OH, NH_2 , NHR , or NR_2 , wherein each R is independently hydrogen, C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

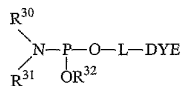
Z^2 is O, $^+NH_2$, ^+NHR , or $^+NR_2$, wherein each R is independently hydrogen, C_1-C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

10 X is carboxylate or sulfonate; or

the polypeptide covalently attached to an energy-transfer dye comprising a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting excitation energy in response thereto; an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and a linker for linking the donor dye and the acceptor dye; wherein at least one of the donor dye and acceptor dye is the said substantially pure atropisomer of a xanthene compound; and wherein a said substantially pure atropisomer of a xanthene compound is optionally aryl-substituted.

15

63. A phosphoramidite compound having the formula:

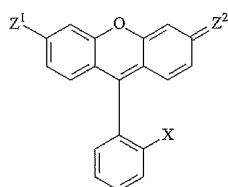


20

wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound having the structure:

WO 02/36832

PCT/US01/48654



Z^1 is OH, NH_2 , NHR , or NR_2 , wherein each R is independently hydrogen, C_1 - C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

Z^2 is O, $^+NH_2$, ^+NHR , or $^+NR_2$, wherein each R is independently hydrogen,

5 C_1 - C_{12} alkyl, phenyl, benzyl, aryl, heterocycle, or a linking moiety;

X is carboxylate or sulfonate; or

DYE is an energy-transfer dye comprising a donor dye capable of absorbing light at a first wavelength and emitting excitation energy in response thereto; an acceptor dye capable of absorbing the excitation energy emitted by the donor dye and fluorescing at a second wavelength in response; and a linker for linking the donor dye and the acceptor dye; wherein at least one of the donor dye and acceptor dye is a said substantially pure atropisomer of a xanthene compound; and wherein DYE is optionally aryl-substituted;

L is a linker;

15 R^{30} and R^{31} taken separately are selected from the group consisting of C_1 - C_{12} alkyl, C_1 - C_{12} cycloalkyl, and aryl; or R^{30} and R^{31} taken together with the nitrogen atom form a saturated nitrogen heterocycle; and

R^{32} is a phosphite ester protecting group.

64. The phosphoramidite compound of claim 64 wherein R^{32} is selected from the group consisting of methyl, 2-cyanoethyl, and 2-(4-nitrophenyl)ethyl.

65. The phosphoramidite compound of claim 63 wherein R^{30} and R^{31} are each isopropyl.

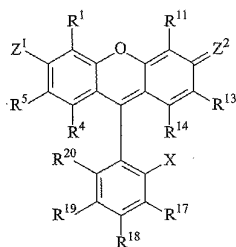
66. The phosphoramidite compound of claim 63 wherein R^{30} and R^{31} taken together is morpholino.

25 67. The phosphoramidite compound of claim 63 wherein L is C_1 - C_{12} alkyldiyl.

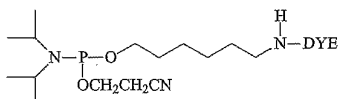
WO 02/36832

PCT/US01/48654

68. The phosphoramidite compound of claim 63 wherein L is attached at R¹⁸ or R¹⁹ of DYE having the structure:

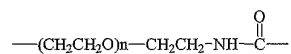


69. The phosphoramidite compound of claim 68 having the structure:



5

70. The phosphoramidite compound of claim 63 wherein L is



and n ranges from 1 to 10.

71. A method of forming a labelled substrate comprising the step of reacting a substrate selected from the group consisting of a polynucleotide, a nucleotide, a nucleoside, a polypeptide, a carbohydrate, a ligand, a substantially enantiomerically pure compound, a particle, and a surface, with the linking moiety of the compound of claim 5 or the energy-transfer dye of claim 31, whereby a labelled substrate is formed.

72. The method of claim 71 wherein the linking moiety is N-hydroxysuccinimide.

73. The method of claim 71 wherein the linking moiety is a phosphoramidite.

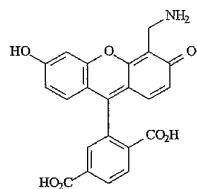
WO 02/36832

PCT/US01/48654

74. The method of claim 71 wherein the substrate is substantially enantiomerically pure.

75. The method of claim 71 wherein the substantially enantiomerically pure compound is (+) menthyl chloroformate or (-) menthyl chloroformate.

5 76. The method of claim 71 wherein the labelled substrate comprises C-11 aminomethyl, C-19 carboxyl fluorescein having the structure:



77. The method of claim 71 wherein the particle is a nanoparticle, a microsphere, a bead, or a liposome.

10 78. The method of claim 71 wherein the surface is glass.

79. A method of synthesizing a labelled polynucleotide comprising the step of coupling the phosphoramidite compound of claim 63 to a polynucleotide, wherein the polynucleotide is bound to a solid support, whereby a labelled polynucleotide is formed.

15 80. A method of separating atropisomers of a C-11 aminomethyl, C-19 carboxyl fluorescein compound comprising the steps of:

(a) reacting a C-11 aminomethyl, C-19 carboxyl fluorescein with a substantially pure enantiomer of an active ester or carboxylic acid to form diastereomeric carbamates;

(b) separating the diastereomeric carbamates; and

20 (c) hydrolyzing the separated diastereomers with aqueous acid.

81. The method of claim 80 wherein the active ester is menthyl chloroformate.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

82. The method of claim 80 wherein the diastereomeric carbamates are separated by reverse-phase HPLC.

83. A method of separating a mixture of labelled substrates wherein the labelled substrates are comprised of a compound of claim 1 or an energy-transfer dye of claim 31, comprising the steps of:

- (a) separating a mixture of labelled substrates by electrophoresis; and
- (b) detecting the labelled substrates by fluorescence detection.

84. The method of claim 83 wherein the labelled substrates are labelled polynucleotides.

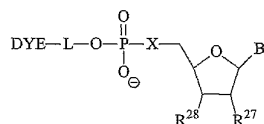
85. A method of separating a mixture of labelled substrates wherein the labelled substrates are comprised of a compound of claim 1 or an energy-transfer dye of claim 31, comprising the steps of:

- (a) separating a mixture of labelled substrates by chromatography; and
- (b) detecting the labelled substrates by fluorescence detection.

86. A method of generating a labelled primer extension product, comprising the step of extending a primer-target hybrid with an enzymatically-incorporatable nucleotide, wherein said primer or said nucleotide is labelled with a compound according to claim 1 or an energy-transfer compound of claim 31, whereby the primer is extended.

87. The method of claim 86 wherein the nucleotide is enzymatically-extendable.

88. The method of claim 86 wherein the primer is a labelled polynucleotide comprising the formula:



wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye;
B is a nucleobase;

WO 02/36832

PCT/US01/48654

X is O, NH, or S;

L is a linker;

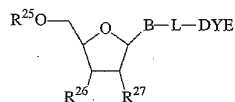
R²⁷ is H, OH, halide, azide, amine, alkylamine, C₁-C₆ alkyl, allyl, C₁-C₆

alkoxy, OCH₃, or OCH₂CH=CH₂; and

- 5 R²⁸ is internucleotide phosphodiester or internucleotide analog;
wherein the polynucleotide comprises 2 to 100 nucleotides.

89. The method of claim 88 wherein B is selected from the group consisting of uracil, thymine, cytosine, adenine, 7-deazaadenine, guanine, and 7-deazaguanosine.

90. The method of claim 86 wherein the enzymatically-incorporatable
10 nucleotide is a labelled nucleoside or nucleotide having the formula:



wherein DYE is a substantially pure atropisomer of a xanthene compound or an energy-transfer dye;

B is a nucleobase;

- 15 L is a linker;

R²⁵ is H, monophosphate, diphosphate, triphosphate, thiophosphate, or phosphate analog; and

R²⁶ and R²⁷, when taken alone, are each independently H, HO, and F.

91. The method of claim 86 further comprising a terminator nucleotide.

- 20 92. The method of claim 90 wherein R²⁶ and R²⁷, when taken alone, are each independently H, F, a moiety which blocks polymerase-mediated target-directed primer extension, or when taken together form 2'-3'-didehydroribose.

93. A method of polynucleotide sequencing comprising the steps of:

- forming a mixture of a first, a second, a third, and a fourth class of polynucleotides
25 such that:
each polynucleotide in the first class includes a 3'-terminal dideoxyadenosine and is labelled with a first dye;

WO 02/36832

PCT/US01/48654

each polynucleotide in the second class includes a 3'-terminal dideoxycytidine and is labelled with a second dye;

each polynucleotide in the third class includes a 3'-terminal dideoxyguanosine and is labelled with a third dye; and

- 5 each polynucleotide in the fourth class includes a 3'-terminal dideoxythymidine and is labelled with a fourth dye;

wherein one of the first, second, third, or fourth dyes is a compound according to claim 1 or an energy-transfer dye of claim 38, the other dyes are spectrally resolvable from each other; and separating the polynucleotides on the basis of size.

- 10 94. The method of claim 93 further comprising the step of detecting the separated polynucleotides by fluorescence detection.

95. The method of claim 93 further comprising the step of identifying the 3'-terminal nucleotide of the polynucleotides by the fluorescence spectrum of the dyes.

- 15 96. A method of oligonucleotide ligation, comprising the steps of annealing two probes to a target sequence and forming a phosphodiester bond between the 5' terminus of one probe and the 3' terminus of the other probe;

wherein one or both probes are labelled with a compound according to claim 1 or an energy-transfer dye of claim 31.

- 20 97. A method of fragment analysis comprising the steps of separating labelled polynucleotide fragments by a size-dependent separation process, and detecting the separated labelled polynucleotide fragments subsequent to the separation process;

wherein the fragments are labelled with a compound of claim 1 or an energy-transfer dye of claim 31.

- 25 98. The method of claim 97 wherein the fragments are labelled with a mobility-modifying label.

99. The method of claim 97 wherein the fragments are formed by ligation.

100. The method of claim 97 wherein the size-dependent separation process is electrophoresis and the labelled polynucleotide fragments are detected by fluorescence.

WO 02/36832

PCT/US01/48654

101. A method of amplification comprising the steps of annealing two or more primers to a target polynucleotide and extending the primers by a polymerase and a mixture of enzymatically-extendable nucleotides;

5 55. wherein at least one of the primers is a labelled polynucleotide according to claim

102. A method of amplification comprising the steps of annealing two or more primers to a target polynucleotide and extending the primers by a polymerase and a mixture of enzymatically-extendable nucleotides;

wherein at least one of the nucleotides is a labelled nucleotide according to claim 48.

10 103. A method of amplification comprising the steps of annealing two or more primers and a fluorescent dye-quencher probe to a target nucleic acid and extending the primers by polymerase and a mixture of enzymatically-extendable nucleotides;

wherein the probe is a labelled polynucleotide according to claim 55.

15 104. A kit for labelling a polynucleotide, comprising a compound including a linking moiety according to claim 4 and a polynucleotide.

105. A kit for labelling a polynucleotide, comprising a energy-transfer dye according to claim 31 and a polynucleotide.

106. A kit for labelling a polynucleotide, comprising a phosphoramidite compound according to claim 63 and a polynucleotide.

20 107. A kit for generating a labelled primer extension product, comprising one or more enzymatically-incorporatable nucleotides and a primer, wherein said primer is a labelled polynucleotide according to claim 55.

25 108. A kit for generating a labelled primer extension product, comprising one or more enzymatically-incorporatable nucleotides and a primer, wherein at least one nucleotide is a labelled nucleotide according to claim 48.

109. The kit of claim 108 wherein the labelled nucleotide is a terminator.

110. The kit of claim 109 which comprises four different terminators, one which terminates at a target A, one which terminates at a target G, one which terminates at a target C and one which terminates at a target T or U.

30

WO 02/36832

PCT/US01/48654

1/21

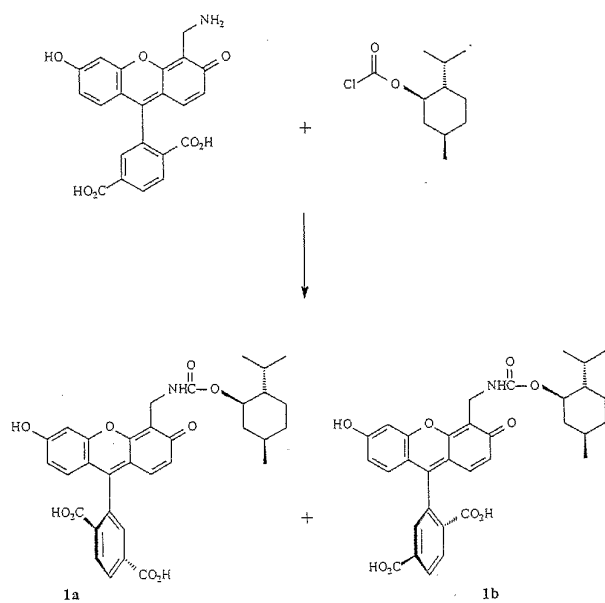


Figure 1a

WO 02/36832

PCT/US01/48654

2/21

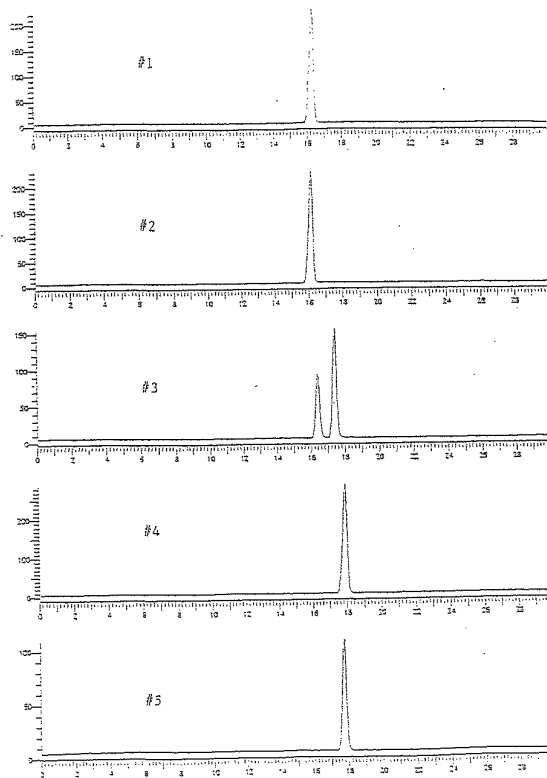


Figure 1b

WO 02/36832

PCT/US01/48654

3/21

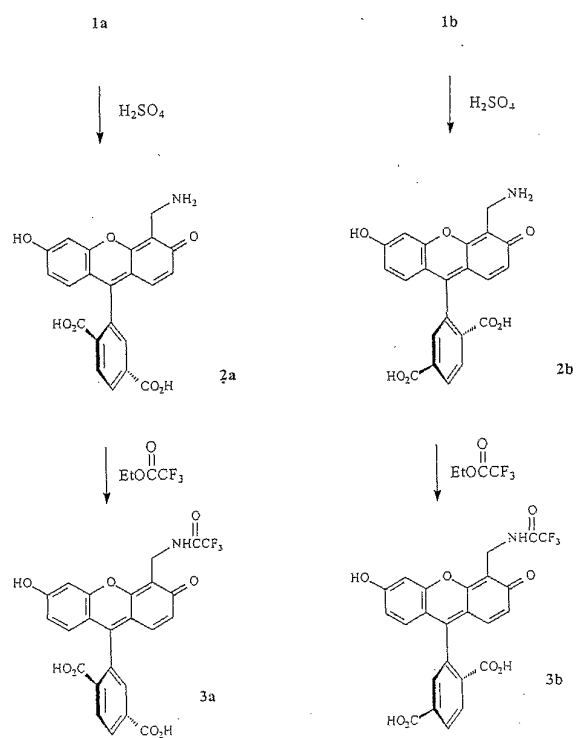


Figure 2a

WO 02/36832

PCT/US01/48654

4/21

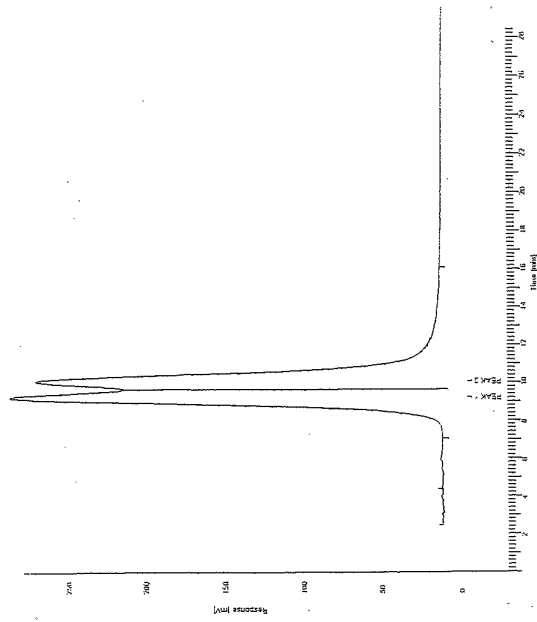


Figure 2b

WO 02/36832

PCT/US01/48654

5/21

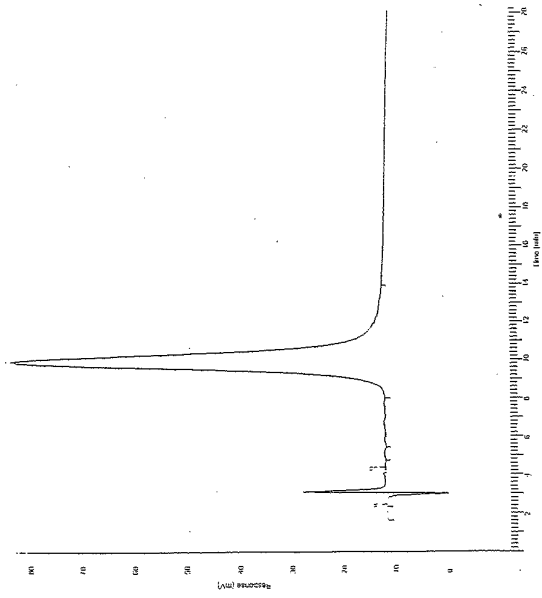


Figure 2c

WO 02/36832

PCT/US01/48654

6/21

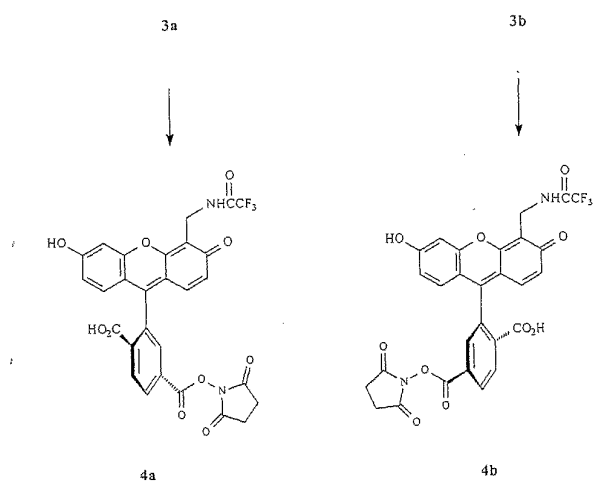


Figure 3

WO 02/36832

PCT/US01/48654

7/21

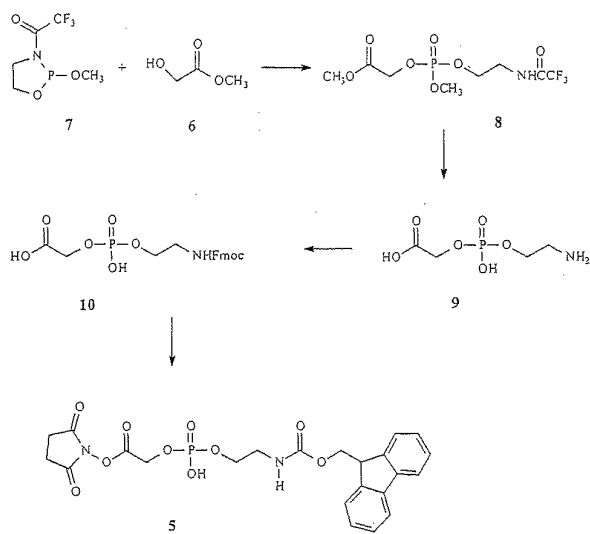


Figure 4

WO 02/36832

PCT/US01/48654

8/21

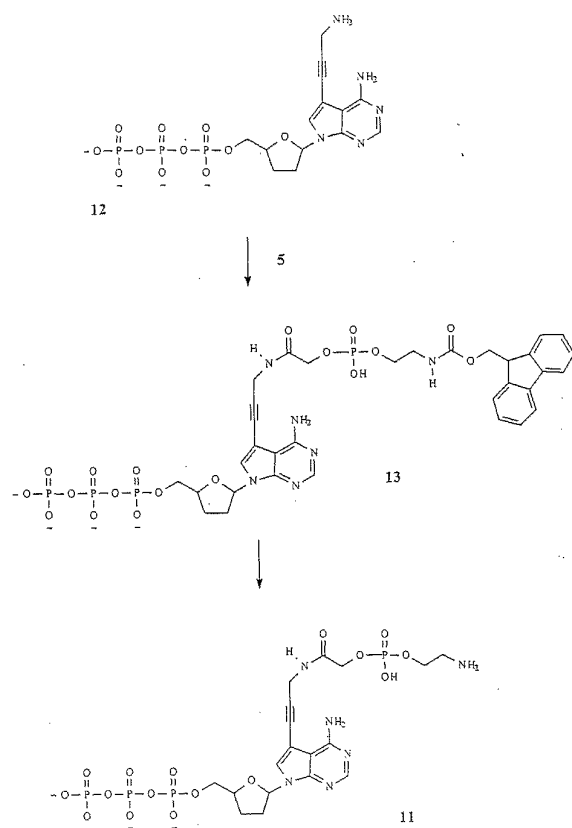


Figure 5

9/21



Figure 6

WO 02/36832

PCT/US01/48654

10/21

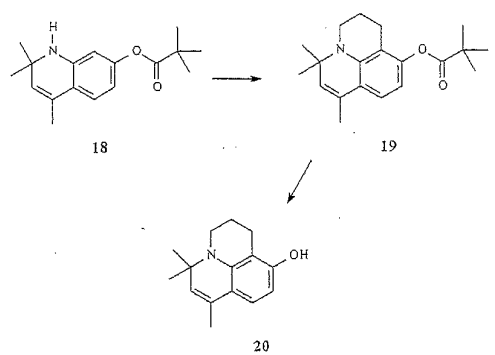


Figure 7

WO 02/36832

PCT/US01/48654

11/21

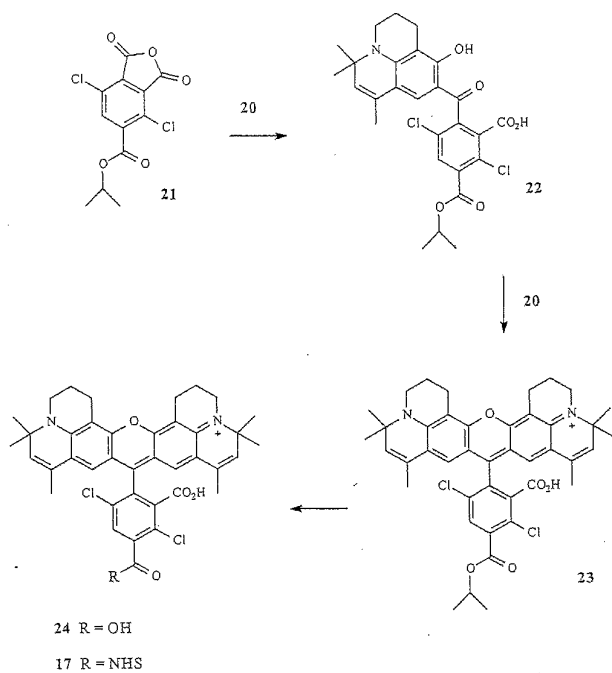


Figure 8

WO 02/36832

PCT/US01/48654

12/21

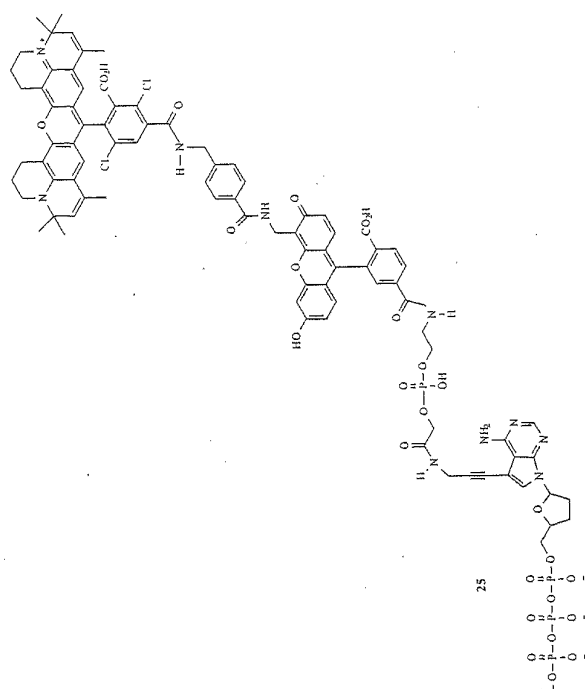


Figure 9

WO 02/36832

PCT/US01/48654

13/21

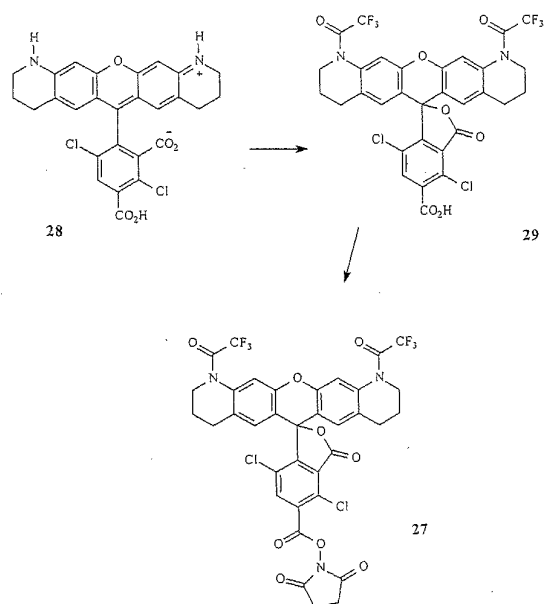


Figure 10

WO 02/36832

PCT/US01/48654

14/21

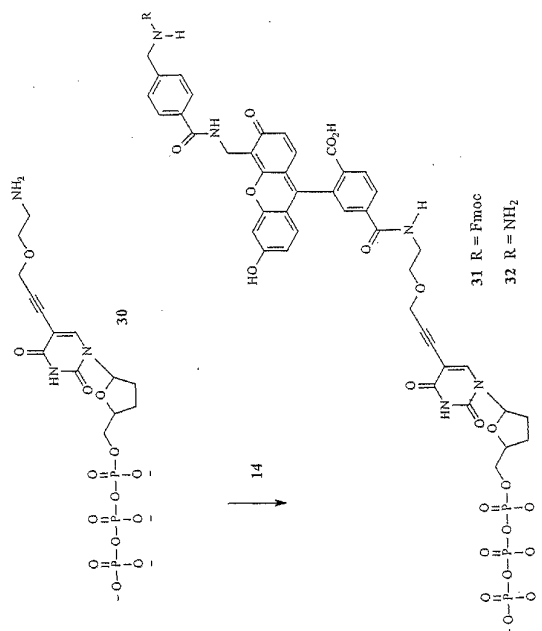


Figure 11

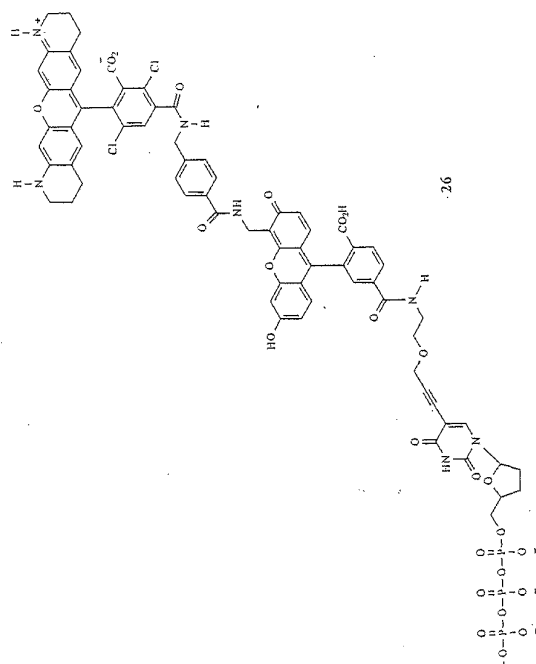


Figure 12

WO 02/36832

PCT/US01/48654

16/21

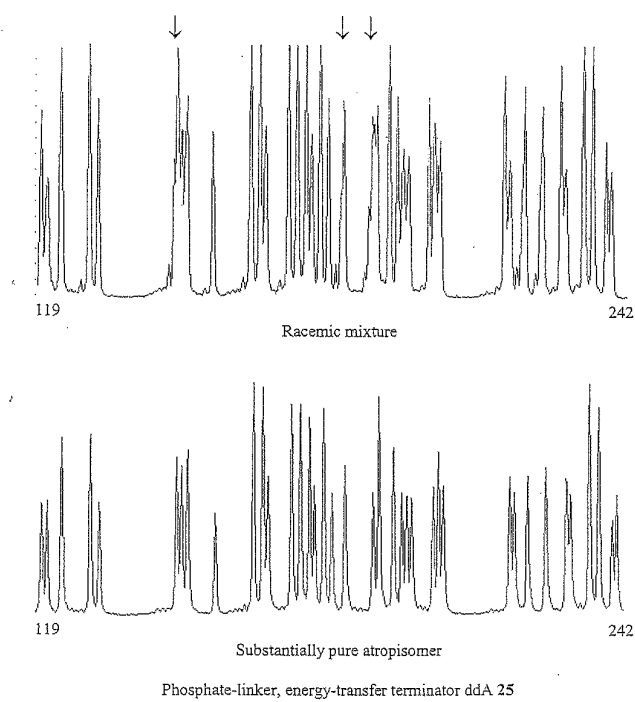


Figure 13a

WO 02/36832

PCT/US01/48654

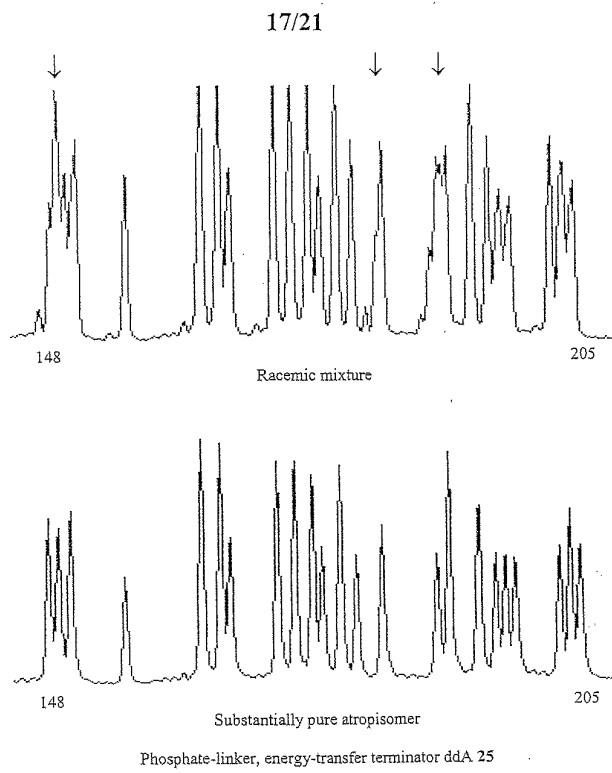


Figure 13b

WO 02/36832

PCT/US01/48654

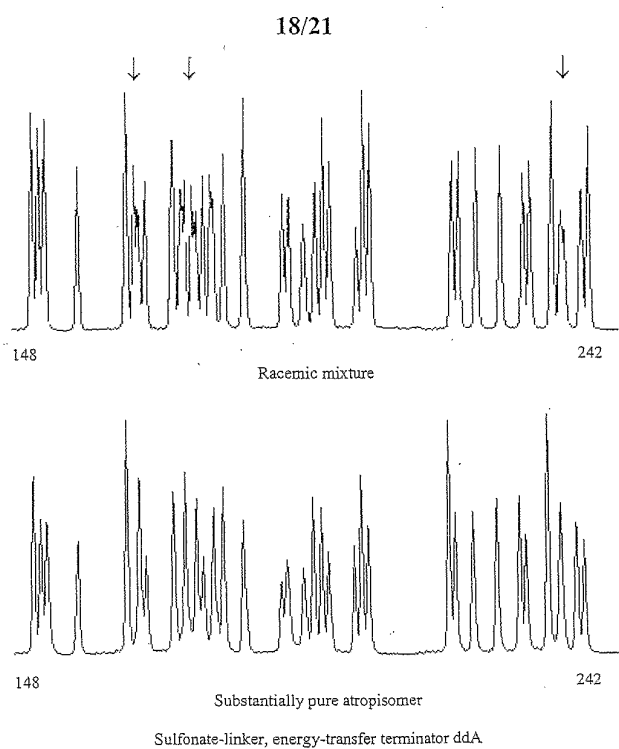


Figure 13c

WO 02/36832

PCT/US01/48654

19/21

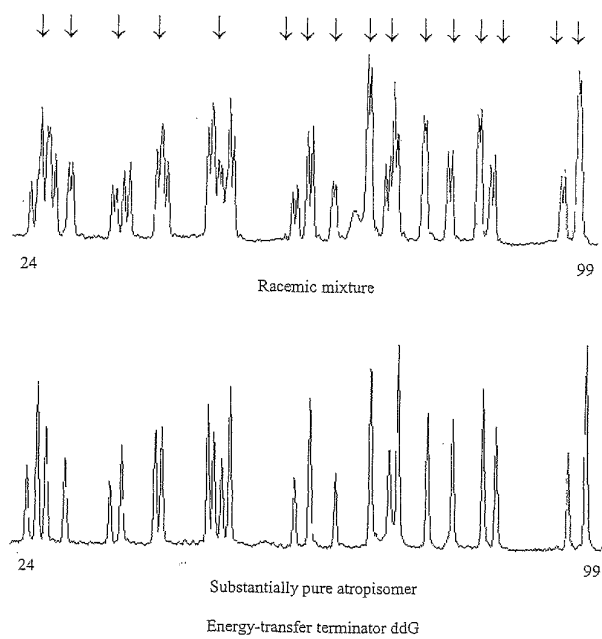
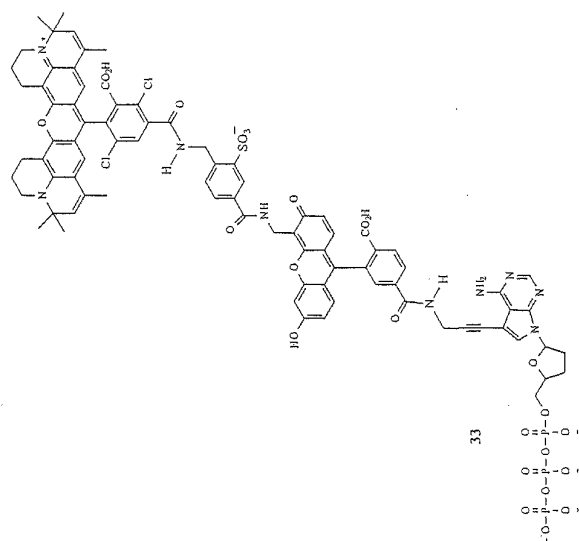
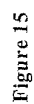


Figure 13d





【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/036832 A3(51) International Patent Classification: **C12Q 1/68**,
C09B 11/04, C07H 19/04, 21/00, G01N 33/58, 33/533

(21) International Application Number: PCT/US01/48654

(22) International Filing Date: 30 October 2001 (30.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/704,966 1 November 2000 (01.11.2000) US

(71) Applicant: PE CORPORATION (NY) [US/US]; 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(72) Inventors: LEE, Linda, G.; 2680 Ramona Street, Palo Alto, CA 94306 (US). TAING, Meng, C.; 235 36th Avenue, Apt. C, San Mateo, CA 94403 (US). ROSEMBLUM, Barnett, B.; 1521 Estelle Avenue, San Jose, CA 95118 (US).

(74) Agents: ANDRUS, Alex et al.; Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments(88) Date of publication of the international search report:
1 August 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/036832 A3

(54) Title: ATROPISOMERS OF ASYMMETRIC XANTHENE FLUORESCENT DYES AND METHODS OF DNA SEQUENCING AND FRAGMENT ANALYSIS

(57) Abstract: Substantially pure atropisomers of xanthene compounds are disclosed. A variety of molecular biology applications utilize atropisomeric xanthene fluorescent dyes as labels for substrates such as nucleotides, nucleosides, polynucleotides, polypeptides and carbohydrates. Methods include DNA sequencing, DNA fragment analysis, PCR, SNP analysis, oligonucleotide ligation, amplification, minisequencing, and primer extension.

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/48654 |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C09B11/04 C07H19/04 C07H21/00 G01N33/58 G01N33/533 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C09B | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | LEE L G ET AL: "NEW ENERGY TRANSFER DYES FOR DNA SEQUENCING" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 14, 1997, pages 2816-2822, XP002919606 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document | 1-110 |
| A | US 6 017 702 A (ROSENBLUM BARNETT B ET AL) 25 January 2000 (2000-01-25) the whole document --- -/- | 1-110 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *8* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 5 June 2002 | | 19/06/2002 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Ginoux, C |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/US 01/48654 |
|---|--|---|
| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | B.B.ROSENBLUM ET AL.: "NEW DYE-LABELED TERMINATORS FOR IMPROVED DNA SEQUENCING PATTERNS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 25, no. 22, 1997, pages 4500-4504, XP002201149 OXFORD GB the whole document | 1-110 |
| A | US 4 510 251 A (KIRKEMO CURTIS L ET AL) 9 April 1985 (1985-04-09) cited in the application claims; examples | 1-110 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/48654

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6017702 | A | 25-01-2000 | AT 199100 T | 15-02-2001 |
| | | | AU 706382 B2 | 17-06-1999 |
| | | | AU 5250798 A | 29-06-1998 |
| | | | CA 2238297 A1 | 11-06-1998 |
| | | | DE 69704055 D1 | 15-03-2001 |
| | | | DE 69704055 T2 | 23-05-2001 |
| | | | EP 0889973 A1 | 13-01-1999 |
| | | | JP 2999267 B2 | 17-01-2000 |
| | | | JP 11506343 T | 08-06-1999 |
| | | | WO 9824930 A1 | 11-06-1998 |
| US 4510251 | A | 09-04-1985 | CA 1217478 A1 | 03-02-1987 |
| | | | EP 0110186 A1 | 13-06-1984 |
| | | | ES 527082 D0 | 16-11-1984 |
| | | | ES 8501531 A1 | 16-02-1985 |
| | | | JP 2089395 C | 02-09-1996 |
| | | | JP 7086110 B | 20-09-1995 |
| | | | JP 59104388 A | 16-06-1984 |
| | | | JP 7041482 A | 10-02-1995 |
| | | | JP 7062019 B | 05-07-1995 |
| | | | US 4614823 A | 30-09-1986 |

【国際調査報告】

特許 2002-539575 60214071211 公開パンフ 32 ページ

(L)60301140008



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/48654

| | | |
|---|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 7 | C1201/68 | C09B11/04 C07H19/04 C07H21/00 G01N33/58 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC 7 C09B | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search phase of data base and, where practical, search terms used | | |
| EP0-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | LEE L G ET AL: "NEW ENERGY TRANSFER DYES FOR DNA SEQUENCING" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 14, 1997, pages 2816-2822, XP002919606 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document | 1-110 |
| A | US 6 017 702 A (ROSENBLUM BARNETT B ET AL) 25 January 2000 (2000-01-25) the whole document | 1-110 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may have double or priority status or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other matter "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 5 June 2002 | | 19/06/2002 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5616 Paternoster 2 NL - 2200 PH The Hague Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018 | | Authorized officer GINOUX, C |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2002)

2

特願2002-539575

60214071211 公開パンフ

33 ページ

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/US 01/48654 |
|--|--|--|
| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | B.B.ROSENBLUM ET AL.: "NEW DYE-LABELED TERMINATORS FOR IMPROVED DNA SEQUENCING PATTERNS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 25, no. 22, 1997, pages 4500-4504, XP002201149 OXFORD GB the whole document | 1-110 |
| A | US 4 510 251 A (KIRKEMO CURTIS L ET AL) 9 April 1985 (1985-04-09) cited in the application claims; examples | 1-110 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1997)

特願2002-539575 60214071211 公開パンフ

34 ページ

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/48654

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6017702 | A | 25-01-2000 | AT 199100 T | 15-02-2001 |
| | | | AU 706382 B2 | 17-06-1999 |
| | | | AU 5250798 A | 29-06-1998 |
| | | | CA 2238297 A1 | 11-06-1998 |
| | | | DE 69704055 D1 | 15-03-2001 |
| | | | DE 69704055 T2 | 23-05-2001 |
| | | | EP 0889973 A1 | 13-01-1999 |
| | | | JP 2999267 B2 | 17-01-2000 |
| | | | JP 11506343 T | 08-06-1999 |
| | | | WO 9824930 A1 | 11-06-1998 |
| US 4510251 | A | 09-04-1985 | CA 1217478 A1 | 03-02-1987 |
| | | | EP 0110186 A1 | 13-06-1984 |
| | | | ES 527082 D0 | 16-11-1984 |
| | | | ES 8501531 A1 | 16-02-1985 |
| | | | JP 2089395 C | 02-09-1996 |
| | | | JP 7086110 B | 20-09-1995 |
| | | | JP 59104388 A | 16-06-1984 |
| | | | JP 7041482 A | 10-02-1995 |
| | | | JP 7062019 B | 05-07-1995 |
| | | | US 4614823 A | 30-09-1986 |

フロントページの続き

| | | |
|--------------------------|-----------------|------------|
| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
| // C 0 7 M 7:00 | C 1 2 N 15/00 A | |
| | C 0 7 M 7:00 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 リー, リンダ ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 6, パロ アルト, ラモーナ ストリート 2 6 8 0

(72)発明者 タイン, メン シー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 3, サン マテオ, 3 6 ティーエイチ アベニュー 2 3 5, アパートメント シー

(72)発明者 ローゼンブルーム, バーネット ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 1 8, サン ノゼ, エステル アベニュー 1 5 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 HA11 HA13 HA19
4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR56 QR62 QR66 QS03 QS16 QS24
QS25 QS34 QS36 QX02
4C062 HH21
4C063 AA01 BB08 CC79 DD04 EE05
4H045 AA10 BA70