

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4836395号  
(P4836395)

(45) 発行日 平成23年12月14日 (2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日 (2011.10.7)

(51) Int. Cl.	F I
C O 9 B 23/00 (2006.01)	C O 9 B 23/00 L
C O 7 D 209/14 (2006.01)	C O 7 D 209/14
C O 7 D 209/60 (2006.01)	C O 7 D 209/60
C O 9 K 11/06 (2006.01)	C O 9 K 11/06

請求項の数 39 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2002-542003 (P2002-542003)	(73) 特許権者	510005889
(86) (22) 出願日	平成13年11月2日 (2001.11.2)		ベックマン コールター, インコーポレ
(65) 公表番号	特表2004-525196 (P2004-525196A)		イテッド
(43) 公表日	平成16年8月19日 (2004.8.19)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 928
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045286		21, プレア, エス. クレーマー ブー
(87) 国際公開番号	W02002/038679		ルバード 250
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成15年10月14日 (2003.10.14)		弁理士 山本 秀策
審判番号	不服2008-11957 (P2008-11957/J1)	(74) 代理人	100062409
審判請求日	平成20年5月9日 (2008.5.9)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	09/710, 575	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成12年11月9日 (2000.11.9)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

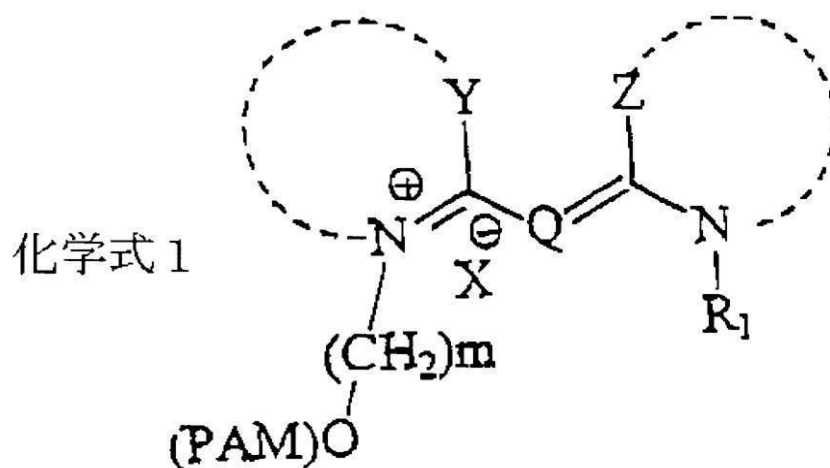
(54) 【発明の名称】 シアニン色素フォスフォアミダイト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の化学式 1

【化 1】



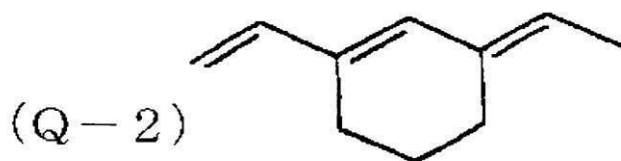
10

を有するDNA合成器での自動合成でのオリゴヌクレオチドの直接標識のためのフォスフォアミダイト色素であって、

20

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、mは1から18までの整数であり、YおよびZは、S、O、N、 $\text{CH}_2$  および  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  からなるグループから独立に選択され、 $\text{R}_1$  はアルキル基であり、(PAM) はフォスフォアミダイト基であり、 $\text{X}^{(-)}$  は陰イオンであり、Qは、以下の化学式 (Q-2)

【化2】



10

である、フォスフォアミダイト色素。

【請求項2】

前記芳香族環は、フェニル基、ナフチル基または複素環である、請求項1に記載のフォスフォアミダイト色素。

【請求項3】

前記アルキル基は、1から18個までの炭素原子を有する、請求項1に記載のフォスフォアミダイト色素。

20

【請求項4】

前記アルキル基はエチル基である、請求項3に記載のフォスフォアミダイト色素。

【請求項5】

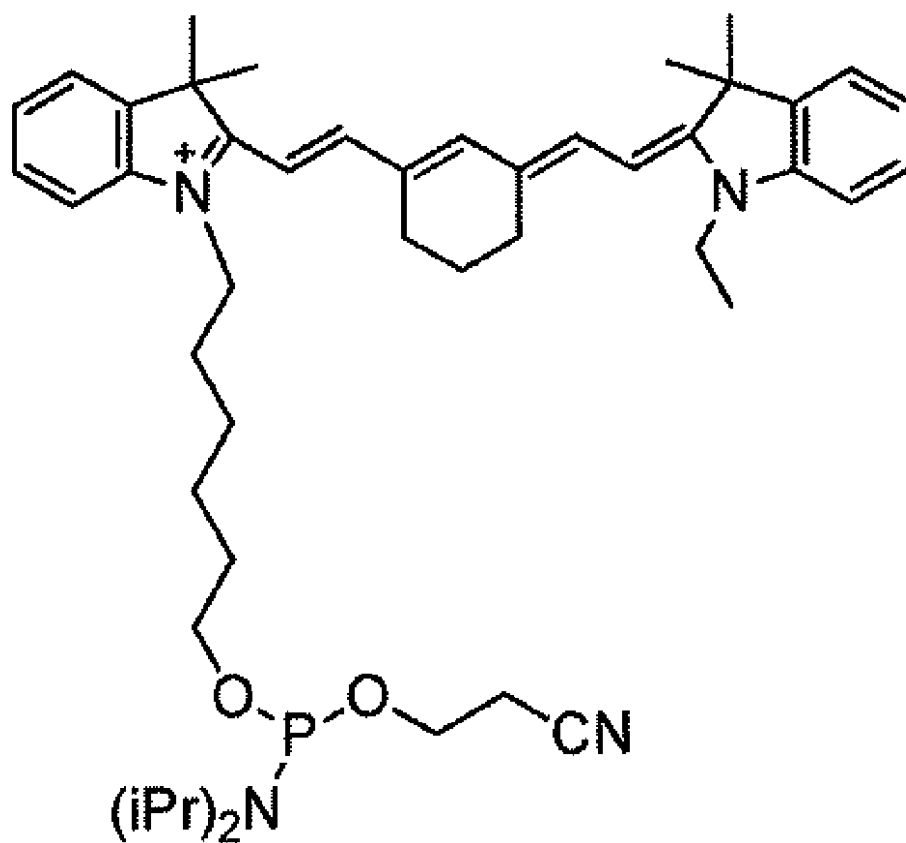
前記色素はシアニン色素である、請求項1に記載のフォスフォアミダイト色素。

【請求項6】

前記シアニン色素は、環状Cy7および環状ジベンゾCy7からなるグループから選択される、請求項5に記載のフォスフォアミダイト色素であって、

該環状Cy7は、以下の化学式

【化 2 A】



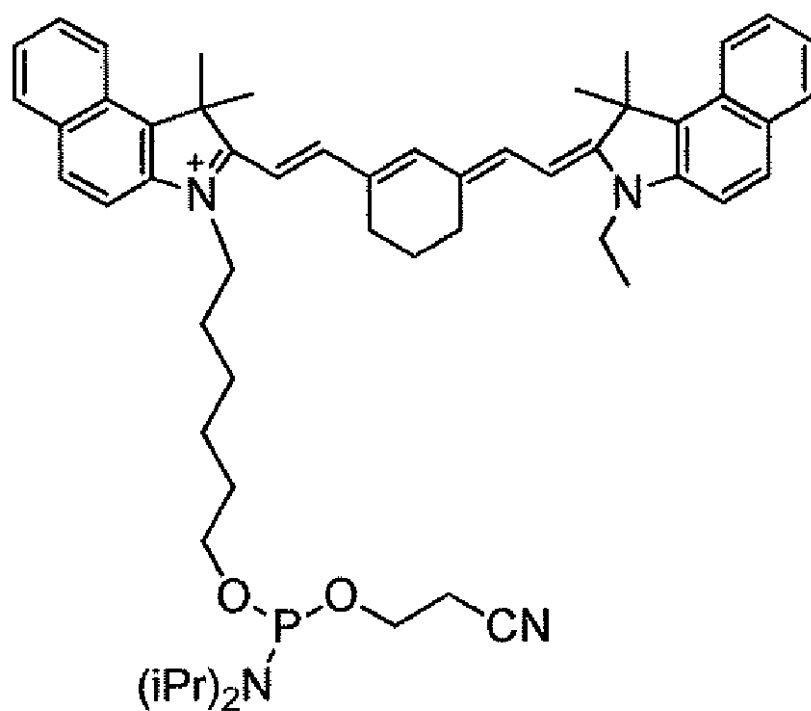
10

20

を有し；

該環状ジベンゾC y 7は、以下の化学式

【化 2 C】



30

40

50

を有する、  
 フォスフォアミダイト色素。

【請求項 7】

前記陰イオンは、 $I^-$  または  $Br^-$  である、請求項 1 に記載のフォスフォアミダイト色素。

【請求項 8】

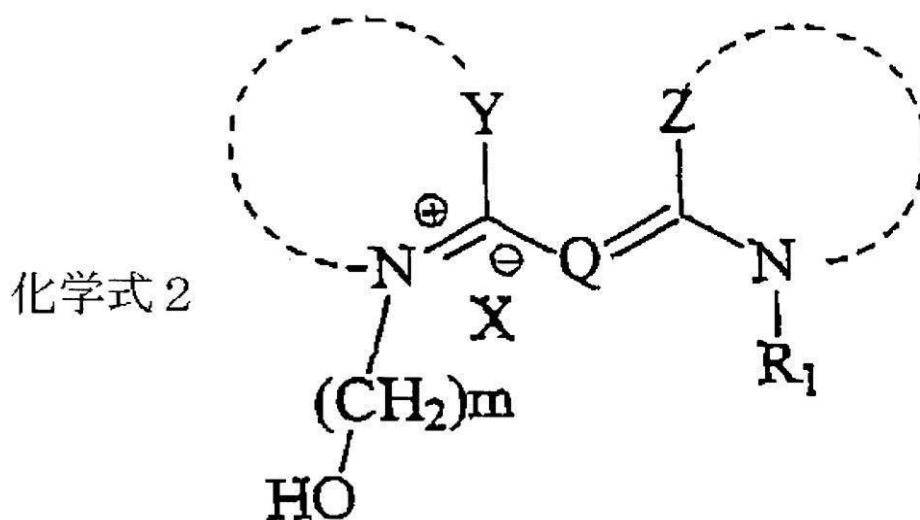
前記フォスフォアミダイト基は、N, N - ジイソプロピル - O - - シアノエチル フォスフォアミダイト基である、請求項 1 に記載のフォスフォアミダイト色素。

【請求項 9】

フォスフォアミダイト色素の合成方法であって、  
 (a) 以下の化学式 2

10

【化 3】



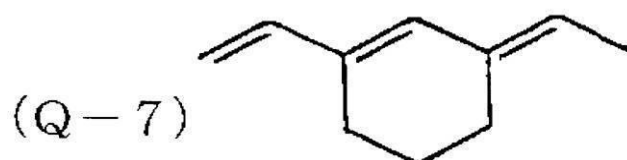
20

を有する前記色素の水酸基誘導体を形成するステップであって、

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、m は 1 から 18 までの整数であり、Y および Z は、S、O、N、 $CH_2$  および  $C(CH_3)_2$  からなるグループから独立に選択され、 $R_1$  はアルキル基であり、 $X^-$  は陰イオンであり、Q は以下の化学式 (Q - 7)

30

【化 4】



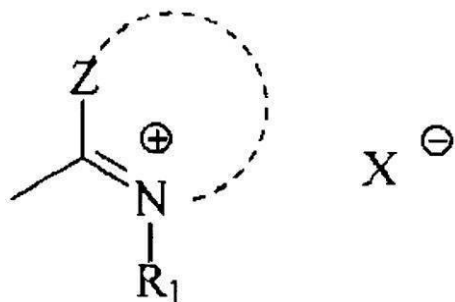
である、色素の水酸基誘導体を形成するステップと、

(b) 前記水酸基の水素をフォスフォアミダイトで置換するステップとを含み、

前記色素の水酸基誘導体を形成するステップは、該水酸基誘導体の形成を可能にする条件下で、以下の化学式

40

【化 5】

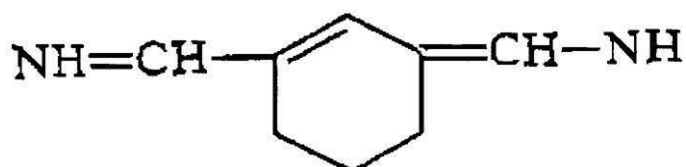


10

を有する化合物 (X I) と、

化学式  $\text{Ph} - \text{R}_3 - \text{Ph}$  を有し、Ph はフェニル基で、 $\text{R}_3$  は以下の化学式

【化 6】

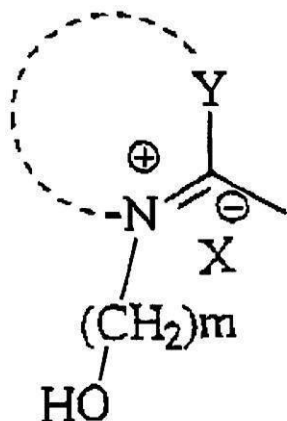


の物質である、化合物 (X I I) と、

以下の化学式

20

【化 7】



30

を有する化合物 (X I I I) とを反応させることを含み、

これらの化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、 $m$  は 1 から 18 までの整数であり、Y および Z は、S、O、N、 $\text{CH}_2$  および  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  からなるグループから独立に選択され、 $\text{R}_1$  はアルキル基であり、 $\text{X}^-$  は陰イオンである、  
フォスフォアミダイト色素の合成方法。

【請求項 10】

40

前記芳香族環は、フェニル基、ナフチル基または複素環である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アルキル基は、1 から 12 個までの炭素原子を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記アルキル基はエチル基である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記陰イオンは、 $\text{I}^-$  または  $\text{Br}^-$  である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記フォスフォアミダイト基は、N, N - ジイソプロピル - O - シアノエチル フ

50

オスフォアミダイト基である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

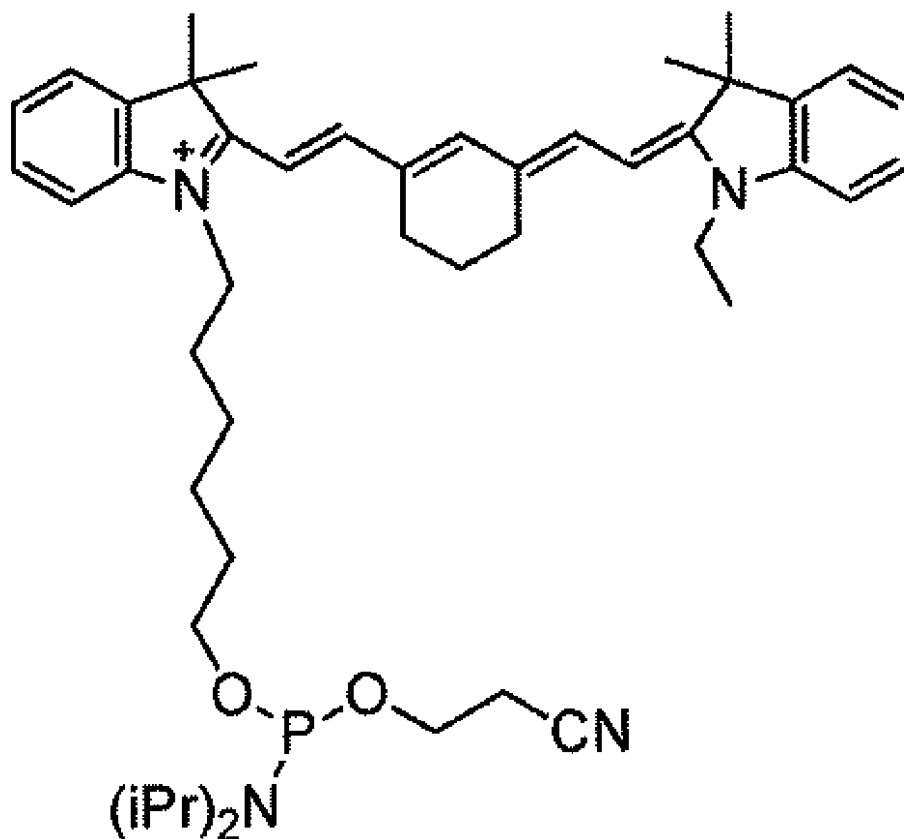
前記色素はシアニン色素である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記シアニン色素は、環状 Cy7 および環状ジベンゾ Cy7 からなるグループから選択される、請求項 15 に記載の方法であって、

該環状 Cy7 は、以下の化学式

【化 2 A】



10

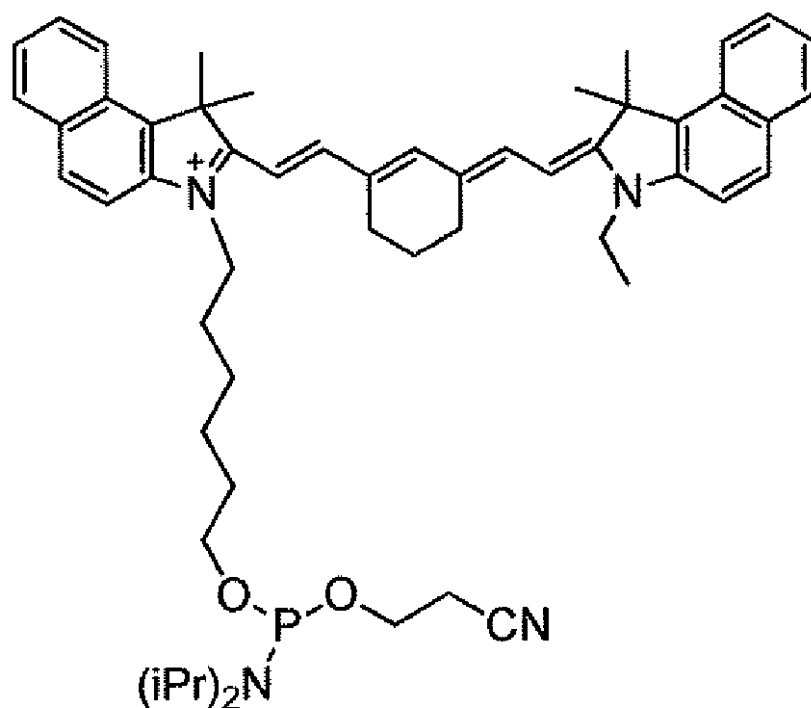
20

30

を有し；

該環状ジベンゾ Cy7 は、以下の化学式

【化 2 C】



10

20

を有する、  
方法。

【請求項 17】

前記芳香族環は、フェニル基、ナフチル基または複素環である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 18】

前記陰イオンは  $\text{Br}^-$  である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アルキル基は、1 から 18 個までの炭素原子を有する、請求項 9 に記載の方法。

30

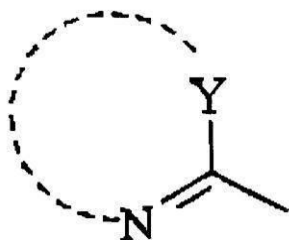
【請求項 20】

前記アルキル基はエチル基である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

化合物 (XIII) は、化合物 (XIII) の形成を可能にする条件下で、以下の化学式

【化 8】



40

を有する化合物 (XIV) を、 $\text{Br}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$  に反応させることにより形成され、

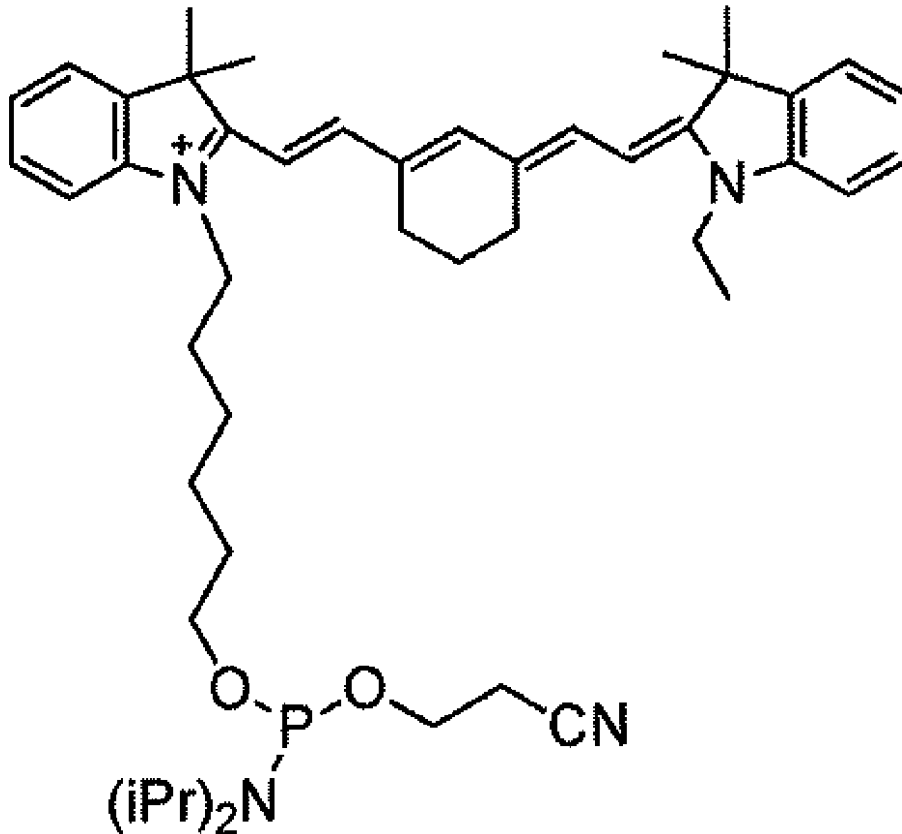
上記の化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、Y は、S、O、N、 $\text{CH}_2$  および  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  からなるグループから選択され、m は 1 から 18 までの整数である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 22】

50

前記色素は環状 Cy 7 であり、化合物 (X I) はヨウ化 1 - エチル - 2 , 3 , 3 - トリメチル - ( 3 H ) - インドールニウムで、化合物 (X I I I) は臭化 1 - ( 6 - ヒドロキシルヘキシル ) - 1 , 1 , 2 - トリメチル - ( 3 H ) - インドールニウムである、請求項 9 に記載の方法であって、

該環状 Cy 7 は、以下の化学式  
【化 8 A】



10

20

30

を有する、  
方法。

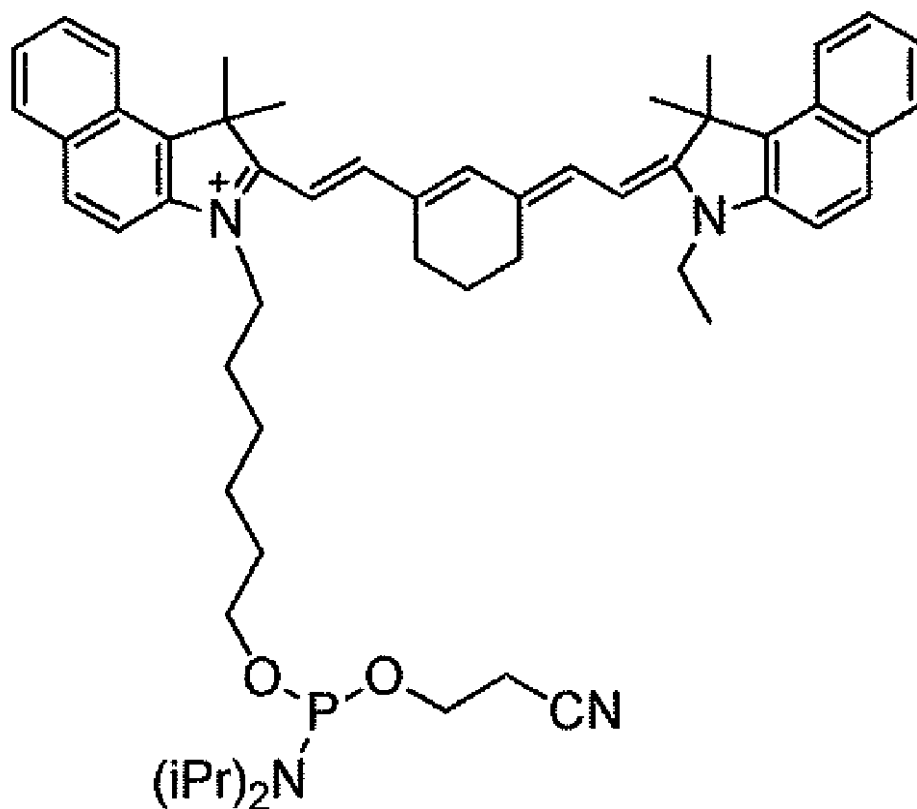
【請求項 2 3】

前記色素は環状ジベンゾ Cy 7 であり、化合物 (X I) はヨウ化 1 - エチル - 1 , 1 , 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムで、化合物 (X I I I) は臭化 1 - ( 6 - ヒドロキシルヘキシル ) - 1 , 1 , 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムである、請求項 9 に記載の方法であって、

該環状ジベンゾ Cy 7 は、以下の化学式



【化 8 B】



10

20

を有する、方法。

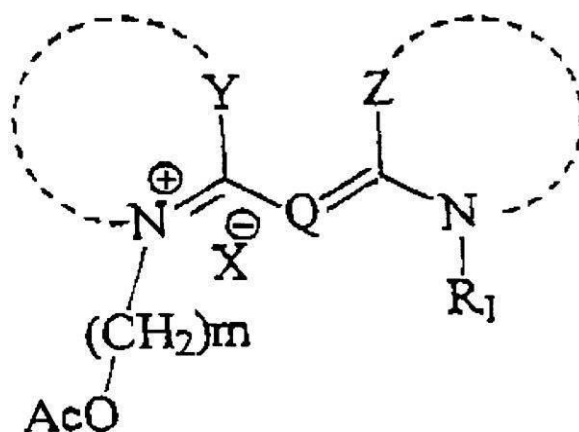
【請求項 2 4】

前記色素の水酸基誘導体を形成するステップは、  
( a 1 ) 以下の化学式 3

【化 9】

30

化学式 3



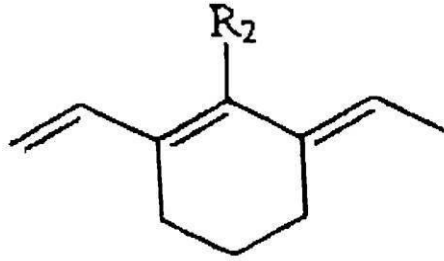
40

を有する前記色素のアセトキシシル基誘導体を形成するステップであって、

上記の化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、mは1から18までの整数であり、YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択され、R<sub>1</sub>はアルキル基であり、X (・) は陰イオンであり、Qは以下の化学式 ( Q - 9 )

【化 10】

(Q-9)



10

であり、R<sub>2</sub> は、ハロゲンまたは水素である、アセトキシシル基誘導体を形成するステップと、

(a2) 前記色素のAcO基をOH基に転換するステップとを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項25】

前記芳香族環は、フェニル基、ナフチル基または複素環である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記アルキル基は、1から12個までの炭素原子を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

前記アルキル基はエチル基である、請求項26に記載の方法。

20

【請求項28】

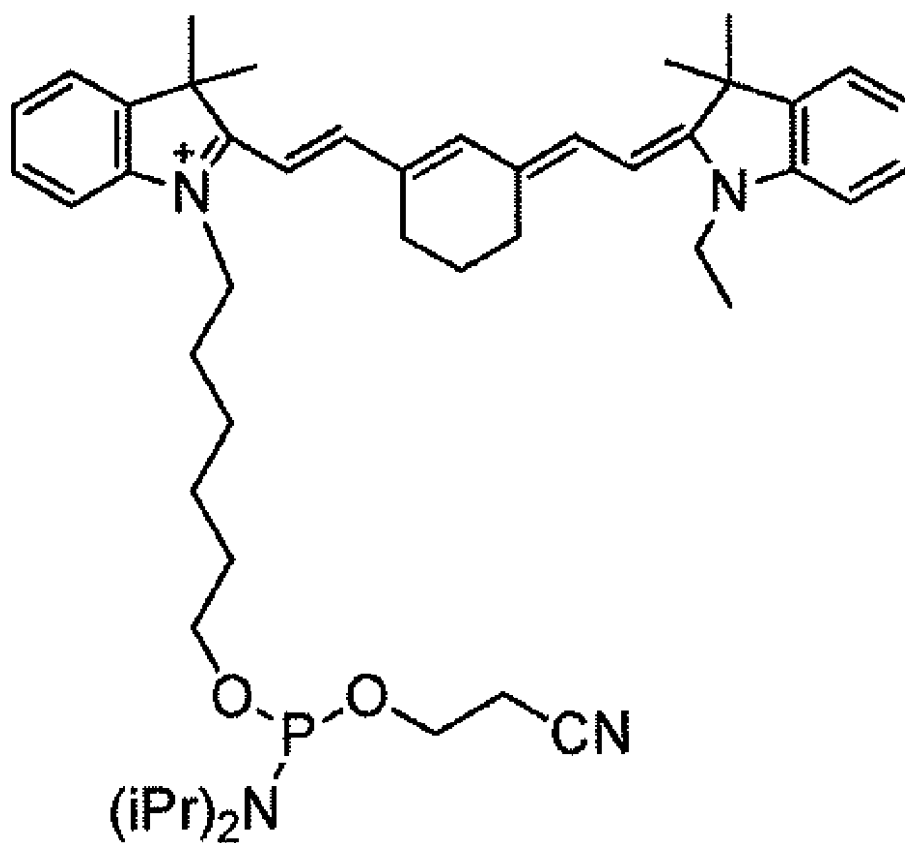
前記色素はシアニン色素である、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

前記シアニン色素は、環状Cy7および環状ジベンゾCy7からなるグループから選択される、請求項24に記載の方法であって、

該環状Cy7は、以下の化学式

【化 1 0 A】



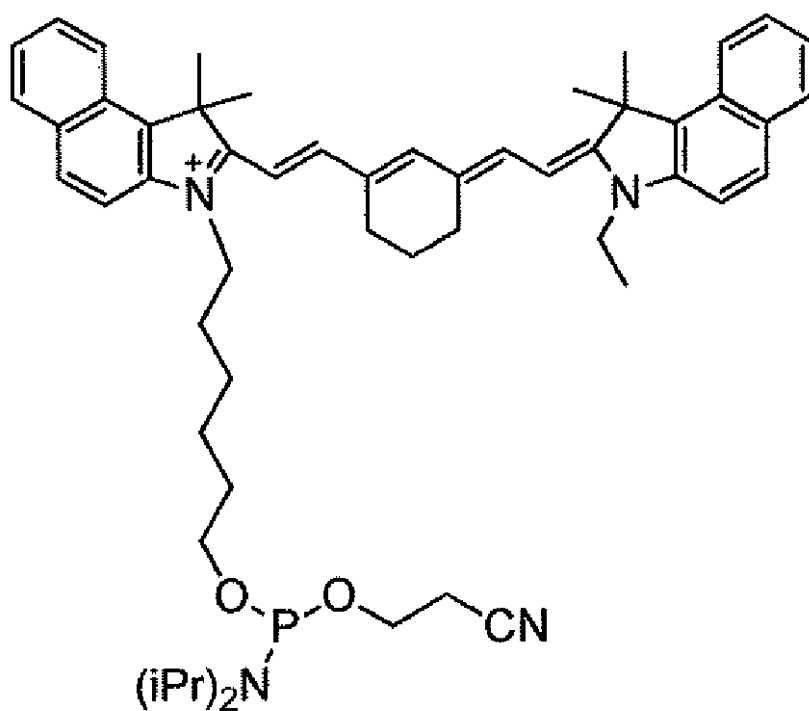
10

20

を有し；

該環状ジベンゾC y 7は、以下の化学式

【化 1 0 C】



30

40

50

を有する、  
方法。

【請求項 3 0】

前記陰イオンは  $I^-$  である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 1】

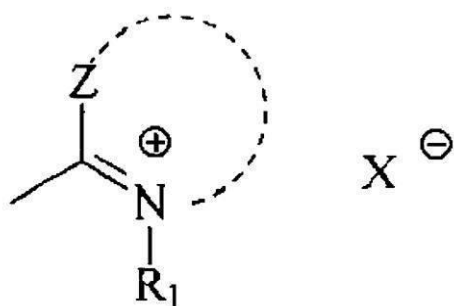
前記ハロゲンは塩素である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記シアニン色素のアセトキシシル基誘導体を形成するステップは、該アセトキシシル誘導体を形成することを可能にする条件下で、以下の化学式を有する化合物 (X I)

【化 1 1】

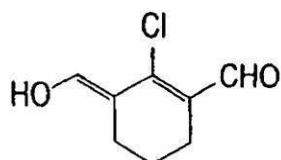
10



と、  
以下の化学式

20

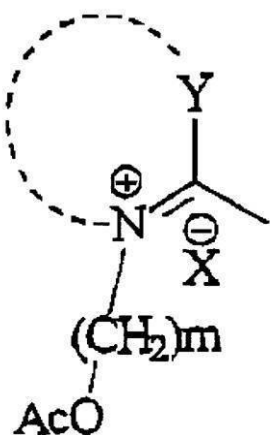
【化 1 2】



を有する化合物 (X X I I) と、  
以下の化学式

【化 1 3】

30



40

を有する化合物 (X X I I I) とを反応させることを含み、

上記の化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表し、m は 1 から 18 までの整数であり、Y および Z は、S、O、N、CH<sub>2</sub> および C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> からなるグループから独立に選択され、R<sub>1</sub> はアルキル基であり、X<sup>-</sup> は陰イオンである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記芳香族環は、フェニル基、ナフチル基または複素環である、請求項 3 2 に記載の方

50

法。

【請求項 3 4】

前記陰イオンは  $I^{-}$  である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記アルキル基は、1 から 12 個までの炭素原子を有する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

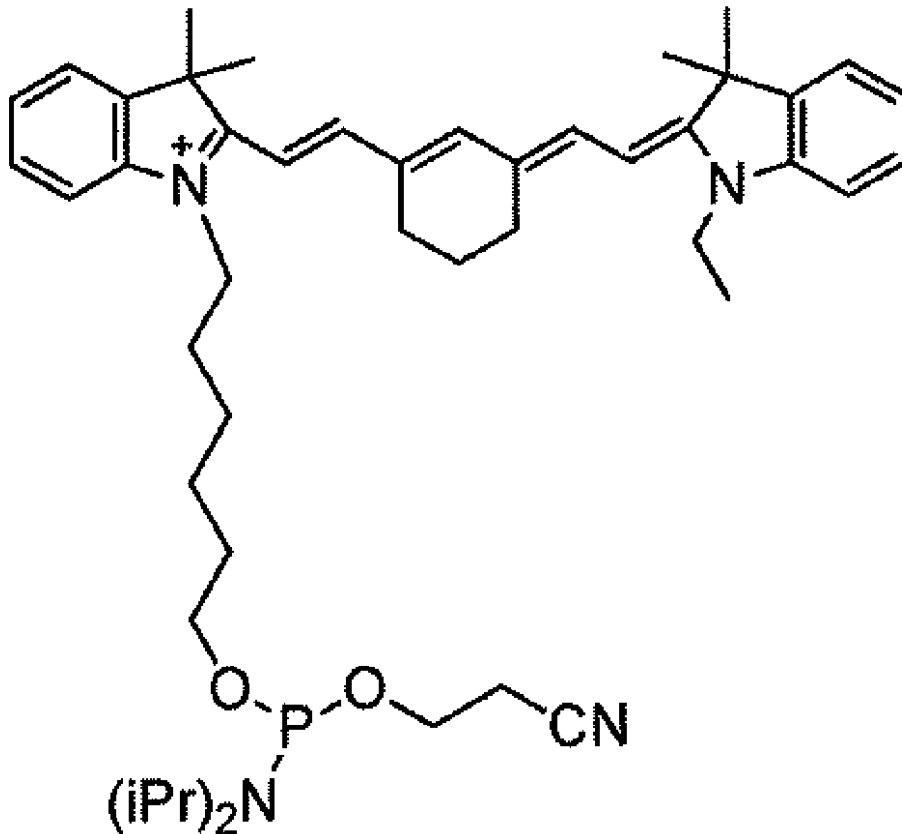
前記アルキル基はエチル基である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記シアニン色素は環状 Cy 7 であり、化合物 (X I) はヨウ化 1 - エチル - 2, 3, 3 - トリメチル - (3 H) - インドールニウムであり、化合物 (X X I I I) はヨウ化 1 - (1' - アセトキシプロピル) - 2, 3, 3' - トリメチル - (3 H) - インドールニウムである、請求項 3 5 に記載の方法であって、

該環状 Cy 7 は、以下の化学式

【化 1 3 A】



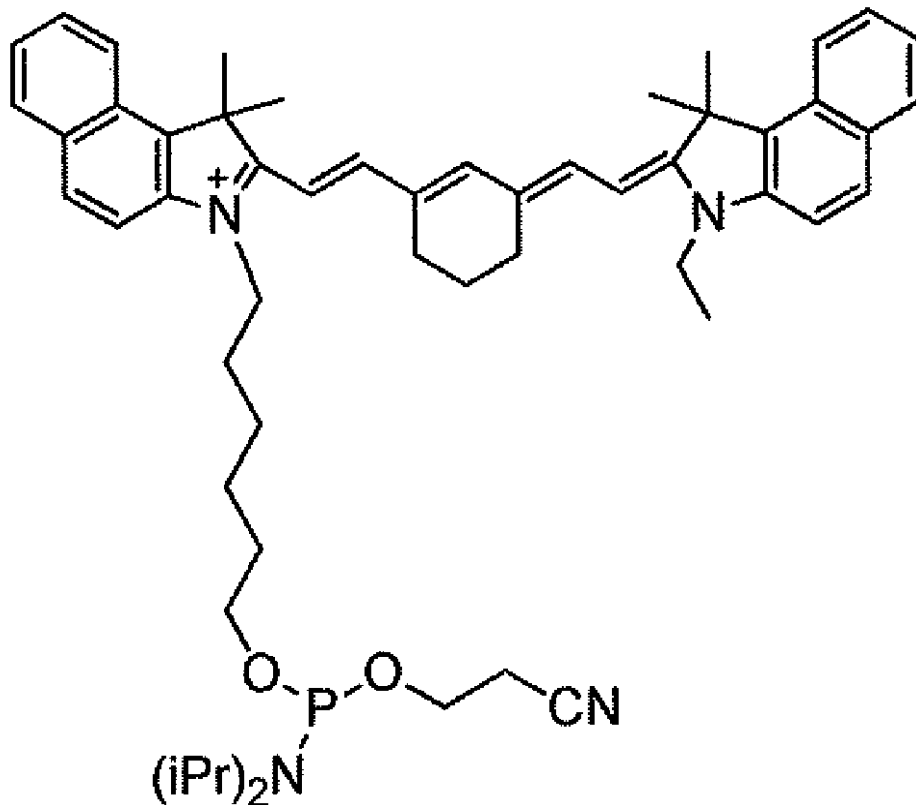
を有する、  
方法。

【請求項 3 8】

前記シアニン色素は環状ジベンゾ Cy 7 であり、化合物 (X I) はヨウ化 1 - エチル - 1, 1, 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムであり、化合物 (X X I I I) はヨウ化 1 - (1' - アセトキシプロピル) - 2, 3, 3' - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムである、請求項 3 5 に記載の方法であって、

該環状ジベンゾ Cy 7 は、以下の化学式

## 【化 8 B】



10

20

を有する、  
方法。

## 【請求項 39】

請求項 1 に記載の色素フォスフォアミダイトとオリゴヌクレオチドとの結合を可能にする条件下で、前記色素フォスフォアミダイトを前記オリゴヌクレオチドに反応させることを含む、オリゴヌクレオチドの標識方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般的には、シアニン色素に関し、具体的には、シアニン色素フォスフォアミダイトと、それらの合成と、オリゴヌクレオチド標識における使用方法とに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

生物学医学研究に用いられる手順の多くは、プローブ、プライマー、リンカー、アダプターおよび遺伝子断片としてのオリゴヌクレオチドの利用に大きく依存している。これらの利用のいくつかは、「分子クローニング、実験マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」第 2 版 (J. サンプルック (Sambrook) ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989 年) および「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols In Molecular Biology)」(F. M. アウシュベル (Ausubel) ら編、Current Publications、1993 年) のような周知の実験マニュアルに説明されている。

40

## 【0003】

望ましい配列のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオシドをリンを含む共有結合で結合することにより、合成される。最も慣用されるオリゴヌクレオチドの合成方法は、弱酸の存在

50

下で、保護されたシアノエチルフォスフォアミダイトのモノマーにヌクレオシドを反応させること、このようにして形成されたリン酸結合を酸化させること、シアノエチル基を加水分解することを伴う（フォスフォアミダイト法によるオリゴヌクレオチド合成の進歩、ボーケージ（Beaucage）、S. L. およびアイアー（Iyer）、R. P.、Tetrahedron、1992年、48巻、2223 - 2311頁）。

#### 【0004】

自動化DNA配列決定および地図作成、*in situ*でのハイブリダイゼーションの検出、PCR産物の検出および構造研究のような多くの用途では、標識されたオリゴヌクレオチドを必要とする。放射能標識が伝統的にこれらの用途に用いられていたが、近年では、ある種のシアニン色素が非常に強い蛍光を有し、生体分子の標識にとっても有用であることが証明されてきた。

10

#### 【0005】

シアニン色素は、取り扱いの安全性と、より長波長での吸光性と、高い吸光率と、比較的高い量子効率と、小さい分子サイズと、化学的操作の容易性と、試薬、pHおよび温度に対する程よい安定性とを含む、多くの望ましい特性を有する。生物学的材料の蛍光バックグラウンドが低いこと、およびスペクトルのより長い方の波長でシアニン色素の吸光度が高いことのため、シアニン色素は優秀なシグナル対雑音比を与える。シアニン色素の発色団の部分の構造修飾を合成することにより、400から約1100nmまでの広い帯域の波長で吸光し発光する、異なる蛍光標識試薬を得ることができる。シアニン色素に取り込むことができる官能基の多目的性が、前記色素および標識生成物の溶解性の制御を可能にし、このような標識材料の検定用混合液の無関係な成分との非特異的な結合を低減するのに役立つ（ワゴナー（Waggoner）、米国特許第5,569,587および5,627,027号明細書）。

20

【特許文献1】米国特許第5,569,587号明細書

【特許文献2】米国特許第5,627,027号明細書

#### 【0006】

現在のところ、オリゴヌクレオチドのシアニン色素による標識は、手作業の2つのステップからなる手順によって実行されている。まず、オリゴヌクレオチドが合成され、それから、活性化シアニン色素が前記合成されたオリゴヌクレオチドの5'末端に結合される。通常、シアニン色素は、オリゴヌクレオチドとの共有結合による結合を補助する反応基の導入により活性化される（例えば、米国特許第5,569,587および5,627,027号明細書を参照せよ）。この2つのステップからなる方法は、遅く（4～5日間）、退屈で、高価で、しばしば望ましくない有機副生成物を製造する。

30

#### 【0007】

代替策となる、より便利な1つのステップからなるアプローチでは、蛍光色素はフォスフォアミダイトに転換されて、オリゴヌクレオチドの合成の間に直接標識するのに用いられる。しかし、シアニン色素の今日入手可能なフォスフォアミダイトは、これらの標準的な、未修飾の対応物に比べて、より高価で、しかもより不安定である。

#### 【0008】

米国特許第5,556,959号明細書（以下「959明細書」という。）は、合成オリゴヌクレオチドを標識するために、カルボシアニンフォスフォアミダイトを利用することを説明する。しかし、前記959明細書のシアニンフォスフォアミダイトは、トリチル基、4-O-モノメトキシトリチル基、4,4'-O-ジメトキシトリチル基またはアシル基のような保護基を含む。保護基は、保存および取り扱い中の不安定さと関連することが常であり、これらのフォスフォアミダイトの商業的な価値を下げている。

40

【特許文献3】米国特許第5,556,959号明細書

#### 【0009】

##### 発明の概要

上記の関連技術の欠点に照らし、DNA合成機での自動合成の際にオリゴヌクレオチド

50

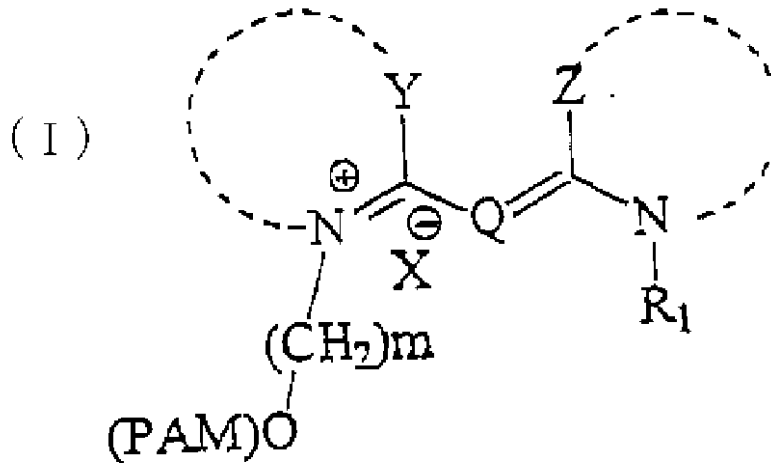
を直接標識するための安定なシアニン色素フォスフォアミダイトを提供することが、本発明の目的である。保護基の導入および脱離のステップを含まない、フォスフォアミダイトを合成する便利な方法を提供することも本発明の目的である。オリゴヌクレオチドの合成の間に該オリゴヌクレオチドを標識する方法を提供することも本発明の目的である。

【 0 0 1 0 】

これらおよびその他の目的は、以下の ( I ) の一般式を有する本発明の色素において達成される。

【 0 0 1 1 】

【 化 1 】



【 0 0 1 2 】

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。(PAM)はフォスフォアミダイト基である。X<sup>(-)</sup>は陰イオンである。Qは、以下の化学式 ( Q - 1 ) または ( Q - 2 ) であって、nは1、2または3である。

【 0 0 1 3 】

【 化 2 】



【 0 0 1 4 】

10

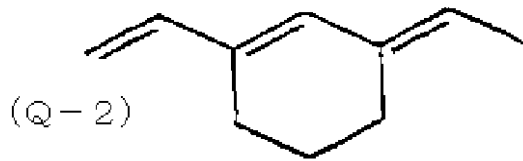
20

30

40



## 【化 3】



10

## 【0015】

本発明の1の実施態様によると、前記色素は、Cy 5、ベンゾCy 5、ジベンゾCy 5、Cy 7、ベンゾCy 7、ジベンゾCy 7、環状Cy 7、環状ベンゾCy 7および環状ジベンゾCy 7からなるグループから選択されるシアニン色素である。前記フォスフォアミダイト基は、N, N - ジイソプロピル - O - シアノエチル フォスフォアミダイト基の場合がある。

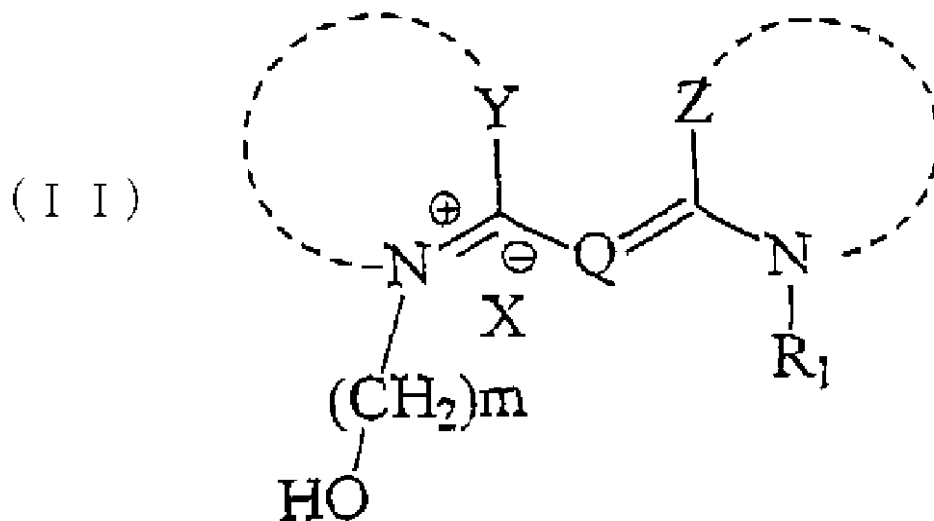
## 【0016】

本発明の別の面は、色素フォスフォアミダイトの合成方法を提供する。前記方法は、(a) 以下の化学式(II)を有する色素の水酸化誘導体を形成するステップと、(b) 前記水酸基の水素をフォスフォアミダイト基で置換するステップとを含む。

20

## 【0017】

## 【化 4】



30

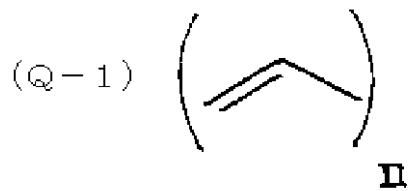
## 【0018】

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。X<sup>-</sup>は陰イオンである。Qは、以下の化学式(Q-1)または(Q-2)であって、nは1、2または3である。

40

## 【0019】

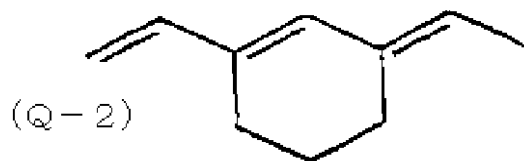
【化 5】



10

【 0 0 2 0 】

【化 6】



20

【 0 0 2 1 】

本発明の実施態様によると、前記色素は、シアニン色素、特に、Cy 5、ベンゾCy 5、ジベンゾCy 5、Cy 7、ベンゾCy 7、ジベンゾCy 7、環状Cy 7、環状ベンゾCy 7または環状ジベンゾCy 7であってもよい。前記フォスフォアミダイト基はN, N - ジイソプロピル - O - - シアノエチル フォスフォアミダイト基の場合がある。

【 0 0 2 2 】

本発明の1の実施態様では、前記色素(II)の水酸基誘導体を形成するステップは、前記シアニン色素の水酸基誘導体の形成を可能にする条件下で、化合物(XI)、(XII)および(XIII)を反応させることを含む。

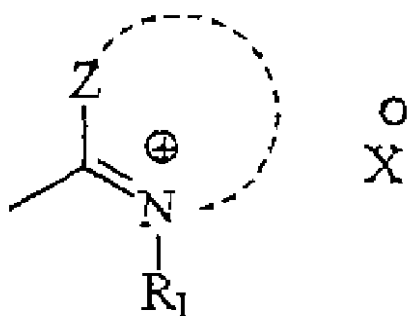
30

【 0 0 2 3 】

化合物(XI)は、以下の一般式を有するいかなる化合物であってもよい。

【 0 0 2 4 】

【化 7】



10

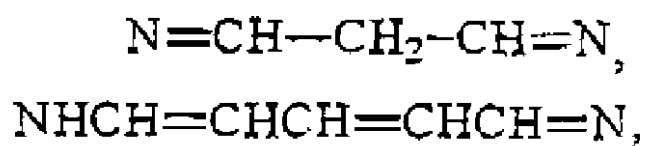
【 0 0 2 5 】

化合物 ( X I I ) は、一般式  $Ph - R_3 - Ph$  を有するいかなる化合物であってもよい。ここで  $Ph$  はフェニル基で、 $R_3$  は以下のいずれかである。

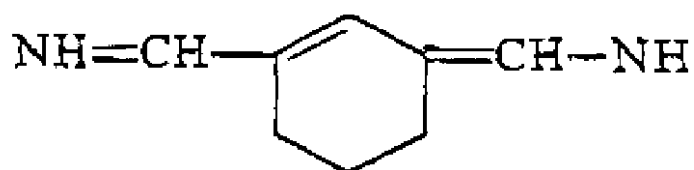
【 0 0 2 6 】

20

【化 8】



または



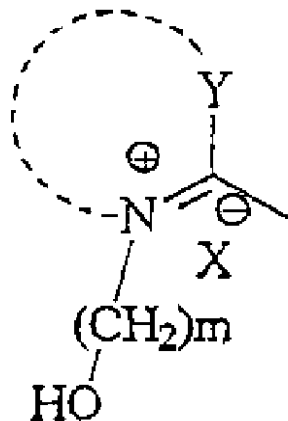
30

【 0 0 2 7 】

化合物 ( X I I I ) は以下の一般式を有するいかなる化合物であってもよい。

【 0 0 2 8 】

【化 9】



10

【0029】

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。X(・)は陰イオンである。

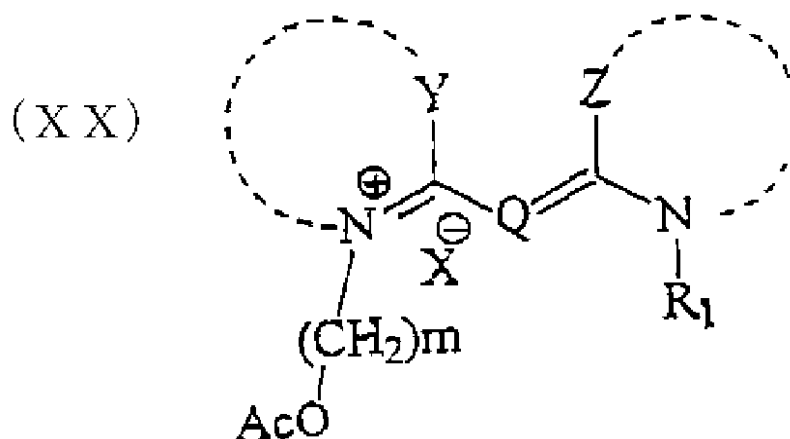
20

【0030】

代替策として、前記色素の水酸基誘導体を形成するステップは、(a1)以下の化学式(XX)を有する色素のアセトキシル基誘導体を形成すること、および(a2)前記色素のAcO基をOH基に変換することを含む。

【0031】

【化10】



30

40

【0032】

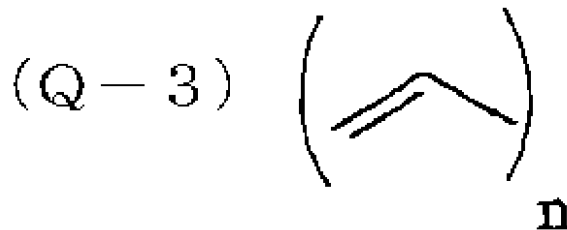
この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。X(・)は陰イオンである。Qは、以下の化学式(Q-3)または(Q-4)で

50

あって、 $n$ は、1または2であり、 $R_2$ は、ハロゲンまたは水素である。

【0033】

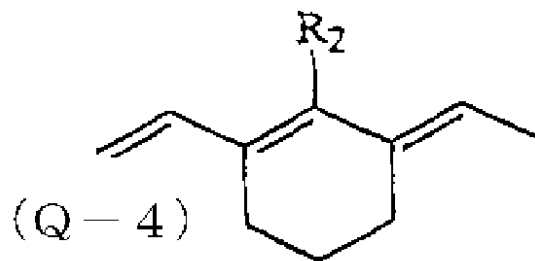
【化11】



10

【0034】

【化12】



20

30

【0035】

本発明の別の面は、発光色素フォスフォアミダイトをオリゴヌクレオチドを直接標識するのに用いる方法を提供する。

【0036】

本発明は、生体高分子、特に、オリゴヌクレオチドの標識において他の色素を使用する場合より優れた、経済的利点および技術的な利点の両方を提供する。以下に詳しく説明されたとおり、本発明の色素フォスフォアミダイトは、合成の過程で、オリゴヌクレオチドに該色素を自動的に付加するために、例えば、オリゴ1000M（ベックマン・コールター、カリフォルニア州）のような、いかなるDNA合成機でも使用可能である。保護基なしの色素フォスフォアミダイトを使用することにより、保護基を除去するステップが削除されるため、標識オリゴヌクレオチドを調製するのに要する全時間が非常に短縮される。Cy7およびDBCy7フォスフォアミダイトの共役二重結合鎖に環状の部分を取り入れることにより、Cy5様の分子種への部分的変換が効果的に防止され、安定な色素が形成される。オリゴヌクレオチド標識に本発明の色素フォスフォアミダイトを使用することにより提供されるコストおよび時間の節約に加え、従来の2つのステップからなる方法と比較して、より高い標識生成物の総合収率が達成される。

40

50

【 0 0 3 7 】

本発明は、添付する特許請求の範囲においてその完全な範囲が定義され、以下の好ましい実施態様において説明される。

【 0 0 3 8 】

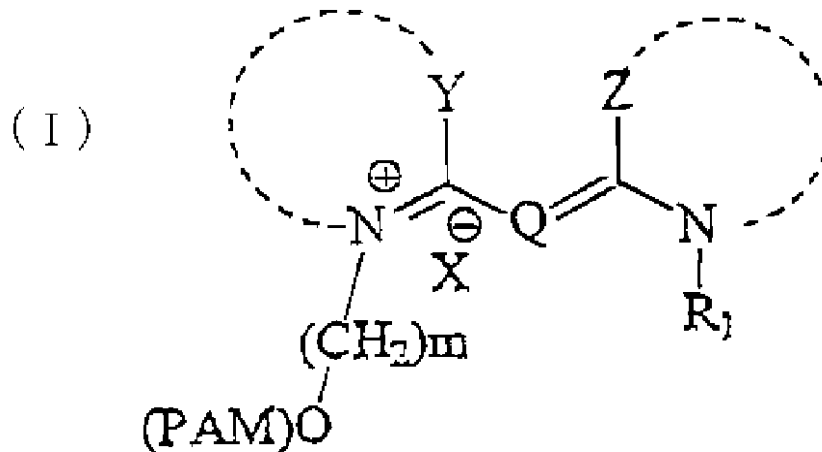
発明の詳細な説明

オリゴヌクレオチドの合成過程で、該オリゴヌクレオチドに色素標識を直接導入することを促進するために、本発明は、以下の化学式 ( I ) を有する色素フォスフォアミダイトを提供する。

【 0 0 3 9 】

【 化 1 3 】

10



20

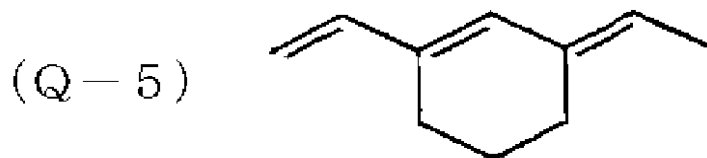
【 0 0 4 0 】

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。(PAM)はフォスフォアミダイト基である。X<sup>( - )</sup>は陰イオンである。Qは、以下の化学式 ( Q - 5 ) または ( Q - 6 ) であって、nは1、2または3である。

30

【 0 0 4 1 】

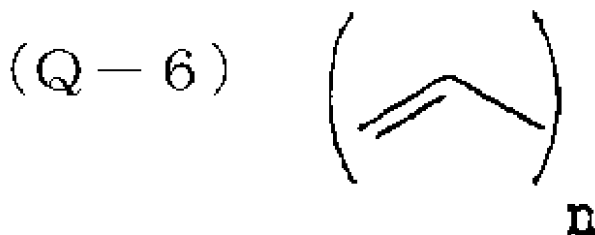
【 化 1 4 】



40

【 0 0 4 2 】

【化 15】



10

【0043】

活性化された色素は、複素環か、フェニル基のような単一の環状芳香族構造か、ナフチル基のような縮合した環状構造かを含む場合がある。アルキル基は1から18個までの炭素原子を有することが一般的であり、2個の炭素原子を有することが好ましい。フォスフォアミダイト基は、通常、アルキル鎖で前記色素に結合している。前記アルキル鎖の長さは、炭素原子約1から12個分であることが好ましい。最も実用的なアルキル鎖の長さは、炭素原子約6個分である。本発明の化合物(I)は、陰イオンX<sup>(-)</sup>を含む。このイオンがハロゲン化物であることが好ましいが、他の陰イオンを使ってもよい。例えば、前記陰イオンは、合成戦略に応じて、I<sup>(-)</sup>またはBr<sup>(-)</sup>であってもよい。前記フォスフォアミダイト基は、N,N-ジイソプロピル-O-シアノエチルフォスフォアミダイト基の場合があるが、当業者に知られた他のフォスフォアミダイトを用いてもよい。

20

【0044】

一般的にみて、本発明の色素は、フォスフォアミダイト基およびアルキル基を取り込んでいる限り、標識の目的に慣用される蛍光色素のどれでもよい。前記フォスフォアミダイト基およびアルキル基は前記色素のインドールまたはベンゾインドールの部分の窒素に結合していることが要求される。前記色素の吸光および発光波長は、スペクトルの特定の領域に制限されず、近紫外から近赤外、あるいはこれらの両端を超える、いかなる波長であってもよい。本発明の実施態様によると、前記色素は、シアニンおよび関連する色素の場合がある。

30

【0045】

シアニン色素は、(安価な検出システムを使用すること、およびこれらの波長での生物学的材料からのバックグラウンドが低いことを意味する)より長い波長での吸収と、高い吸光率と、比較的高い量子収率と、小さい分子サイズと、蛍光特性を損なわずに化学的操作が容易に行えること、および試薬、pHおよび温度に対する安定性が比較的あることを含めて、敏感な検出用標識として役立つ望ましい特性が複数ある。

40

【0046】

シアニン色素は、発色団が、末端に2個の四級窒素原子を有する一連の共役二重結合を含み、該窒素原子は1個の陽電荷を共有する、一般的な構造を有する。中心部の二重結合の数によって、前記シアニン色素は、モノカルボシアニン(n=1、別名、トリメチンカルボシアニンまたはCy3)、ジカルボシアニン(n=2、別名、ペンタメチンカルボシアニンまたはCy5)およびトリカルボシアニン(n=3、別名、ヘプタメチンカルボシアニンまたはCy7)として分類することができる。中心部の二重結合の数は励起光を部分的に決定する。nの値が大きいことは、蛍光および吸光度の増大の原因となることがしばしばある。そのうえ、環状構造の修飾によって、さらなる蛍光を得ることができる。n=2のとき、励起波長は約650nmで、化合物は非常に蛍光性が高い。

50

## 【 0 0 4 7 】

本発明の 1 の実施態様では、ジカルボシアニン色素（C y 5、ベンゾ C y 5（B C y 5）およびジベンゾ C y 5（D B C y 5））と、トリカルボシアニン色素（C y 7、ベンゾ C y 7（B C y 7）およびジベンゾ C y 7（D B C y 7））とのフォスフォアミダイトは、直接標識に用いられる。これら 2 つのグループの色素の間の相違点は、C y 5、B C y 5 および D B C y 5 のそれぞれに対して、C y 7、B C y 7 および D B C y 7 には追加の二重結合が存在することである。そのために、前記ジカルボシアニン色素は、トリカルボシアニン色素の対応する化合物に比べて最大吸光波長も最大発光波長も約 1 0 0 n m 短い。インドールシアニンの対応する化合物に比べて、ベンゾインドールシアニンである、B C y 5 および B C y 7 は、1 個のベンゼン基の置換があり、D B C y 5 および D B C y 7 は、2 個のベンゼン基の置換がある。そこで、ベンゾインドールシアニンは、インドールの対応する化合物よりも最大吸光波長も最大発光波長も長い。

10

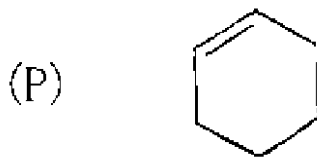
## 【 0 0 4 8 】

本発明の別の実施態様では、環状 C y 7 および D B C y 7 色素のフォスフォアミダイトが用いられている。シアニン色素分子の共有二重結合際に環状の部分を取り込むことが C y 7 分子種の余剰の安定性を提供していることが本発明の発見である。1 の実施態様では、以下の構造をした環状部分を使用する場合がある。1 の実施態様では、以下の化学式（P）を有する環状の部分を用いられる。

## 【 0 0 4 9 】

## 【 化 1 6 】

20



## 【 0 0 5 0 】

本発明の色素フォスフォアミダイトは、前記オリゴヌクレオチドに自動的に添加するために直接いずれかの D N A 合成機に使用することができる。本発明の色素フォスフォアミダイトは、いかなる保護基も含まないが、これによりより安定になる。保護基なしの色素フォスフォアミダイトを使用することにより、保護基を除去するステップが削除されるため、標識オリゴヌクレオチド調製に要する全時間は非常に短縮される。本発明の色素フォスフォアミダイトをオリゴヌクレオチド標識に用いることにより提供されるコストおよび時間の節約に加え、標識生成物のより高い総合収率は、従来の 2 つのステップと比べて、より高い標識生成物の総合収率が達成される。

30

## 【 0 0 5 1 】

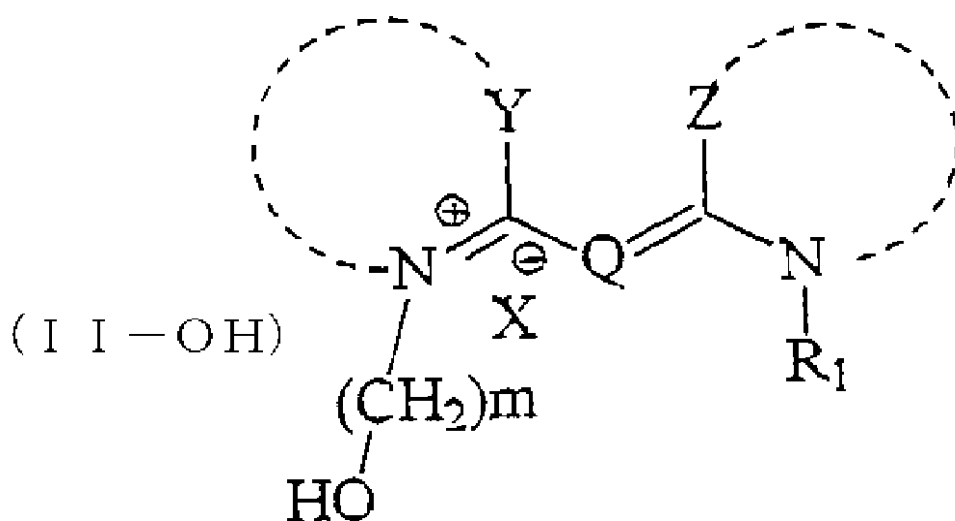
本発明の別の面は、色素フォスフォアミダイトの合成方法を提供する。本発明の色素フォスフォアミダイトの調製のための一般的な合成計画は図 1 A ~ 1 C に示されている。この方法は、（a）以下の化学式（I I - O H）を有する色素（I I）の水酸基誘導体を形成するステップと、（b）前記 O H 基の水素をフォスフォアミダイト基に置換するステップとを含む。

40

## 【 0 0 5 2 】



【化 17】



10

【0053】

この化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、 $\text{CH}_2$ および $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ からなるグループから独立に選択される。 $\text{R}_1$ はアルキル基である。X(・)は陰イオンである。Qは、以下の化学式(Q-7)または(Q-8)であって、nは1、2または3である。

20

【0054】

【化 18】

(Q-7)

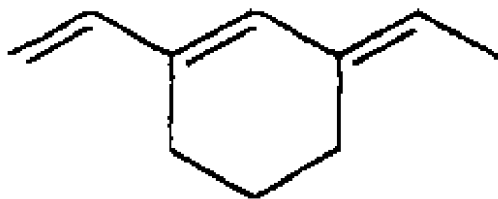


30

【0055】

【化 19】

(Q-8)



10

【0056】

色素は、複素環か、フェニル基のような単一の環状芳香族構造か、ナフチル基のような縮合した環状構造かを含む場合がある。特に関心があるのは、Cy 5、Bcy 5、DBCy 5、Cy 7、Bcy 7、DBCy 7、環状Cy 7、環状Bcy 7および環状DBCy 7を含む、上記のシアニンである。

【0057】

本発明の目的のためには、色素(II)の水酸基誘導体は、色素フォスフォアミダイト(I)を形成するのに十分な条件下で、適当な試薬と反応させられる。本発明にしたがい、かつ、図1Aに示すとおり、水素をフォスフォアミダイト基に置換するための適当な試薬は、テトラゾールと $(iPr_2N_2)_2PO-CH_2-CH_2-CN$ との混合物を含むが、これに限られない。 $iPr_2-P(Cl)OCH_2CH_2CN$ のような他の試薬を用いてもよい。1の実施態様によると、この反応は、 $-20^{\circ}C$ 不活性雰囲気で行われるのが好ましい。

20

【0058】

本発明の実施態様によると、シアニン色素の水酸基誘導体を形成するステップ(a)は、図1Bおよび1Cに示すとおり、2つの代替的な方法で行われる場合がある。

30

【0059】

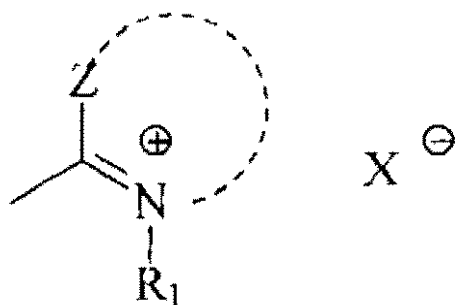
図1Bに示す第1の方法では、シアニン色素の水酸基誘導体を形成するステップは、該シアニン色素の水酸基誘導体の形成を可能にする条件下で、化合物(XI)、(XII)および(XIII)を反応させることを伴う。

【0060】

化合物(XI)は、以下の一般式を有するいかなる化合物でもよい。

【0061】

【化20】



40

【0062】

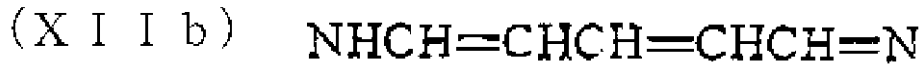
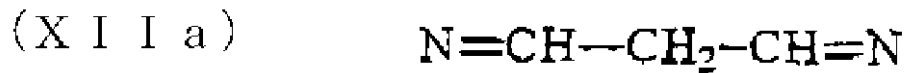
化合物(XII)は、 $Ph-R_3-Ph$ という一般式のいずれの化合物でもよい。ここで、Phはフェニル基で、 $R_3$ は以下の(XIIa)、(XIIb)または(XIIc)

50

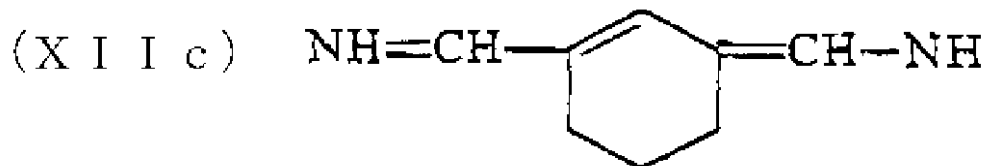
のいずれかである。

【 0 0 6 3 】

【 化 2 1 】



10



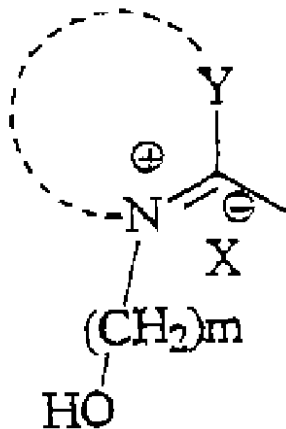
【 0 0 6 4 】

化合物 (X I I I) は、以下の一般式のいずれの化合物であってもよい。

20

【 0 0 6 5 】

【 化 2 2 】



30

【 0 0 6 6 】

上記の化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。上記の化学式において、 $m$  は 1 から 18 までの整数である。Y および Z は、S、O、N、 $\text{CH}_2$  および  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub> はアルキル基である。X<sup>(-)</sup> は陰イオンである。1 の実施態様では、前記陰イオンは臭素である。

40

【 0 0 6 7 】

特定の化合物 (X I)、(X I I) および (X I I I) の選択は、合成される色素フォスフォアミダイトのタイプに依存する。例えば、Cy 5 フォスフォアミダイトを合成するためには、化合物 (X I I a) と、置換されない化合物 (X I) および (X I I I) とを使用する (図 2)。環状 Cy 7 フォスフォアミダイトの合成には、化合物 (X I I c) と、置換されない化合物 (X I) および (X I I I) とを使用する (図 7)。DB Cy 7 フォスフォアミダイトを合成するためには、化合物 (X I I a) と、ベンゾ置換された化合

50

物 (X I) および (X I I I) とが用いられる (図 3)。最後に、環状 D B C y 7 フォスフォアミダイトは、ベンゾ置換された化合物 (X I) および (X I I I) と、化合物 (X I I c) とを用いて合成される (図 8)。当業者は、適当な化合物 (X I)、(X I I) および (X I I I) を選択することにより、他のフォスフォアミダイトを合成することができることを理解する。

#### 【0068】

図 1 B に示す方法によると、一般式 (X I) および (X I I) のいずれの化合物でも使用できるが、1 の実施態様では、化合物 (X I) は、ヨウ化 1 - エチル 2, 3, 3 - トリメチル - (3 H) - インドールニウムであり、化合物 (X I I I) は、臭化 1 - (6 - ヒドロキシヘキシル) - 1, 1, 2 - トリメチル - (3 H) - インドールニウムである。この実施態様では、用いる化合物 (X I I) のタイプに応じて、C y 5 (図 2)、C y 7 または環状 C y 7 (図 7) のような、置換されないシアニン色素のフォスフォアミダイトが得られる。化合物 (X I I a) を用いるとき、C y 5 のフォスフォアミダイトが得られる。同様に、化合物 (X I I b) では、C y 7 のフォスフォアミダイトが生成され、化合物 (X I I c) では、環状 C y 7 のフォスフォアミダイトが形成される。

#### 【0069】

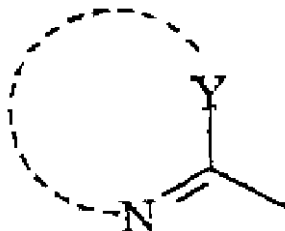
別の実施態様では、化合物 (X I) は、ヨウ化 1 - エチル 1, 1, 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムで、化合物 (X I I I) は、臭化 1 - (6 - ヒドロキシヘキシル) - 1, 1, 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウムである。この実施態様では、用いる化合物 (X I I) のタイプに応じて、D B C y 5 (図 3)、D B C y 7 または環状 D B C y 7 (図 8) のようなベンゼン置換シアニン色素のフォスフォアミダイトが合成される。化合物 (X I I a) が用いられるとき、D B C y 5 が得られる。同様に、化合物 (X I I b) では、D E B C y 7 のフォスフォアミダイトが生成され、化合物 (X I I c) では、環状 D B C y 7 が形成される。

#### 【0070】

さまざまな試薬が化合物 (X I I I) を形成するために使えるが、1 の実施態様では、化合物 (X I I I) は、化合物 (X I I I) の形成を可能にする条件下で、化合物 (X I V) を  $\text{Br}(\text{CH}_2)_m\text{-OH}$  と反応させることにより形成される。化合物 (X I V) は、以下の一般式を有するいかなる化合物でもよい。

#### 【0071】

#### 【化 23】



#### 【0072】

上記の化学式において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。Y は、S、O、N、 $\text{CH}_2$  および  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  からなるグループから選択される。m は 1 から 18 までの整数である。例えば、図 2 および 3 に示すとおり、化合物 (X I V) は、それぞれ、1, 1, 2 - トリメチル - (3 H) - インドールまたは 1, 1, 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールである。前記化合物 (X I V) の

形成を可能にする限り、異なる反応条件を用いてもよい。例えば、図 2 および 3 に示す反応は 125 °C で実行された。

【0073】

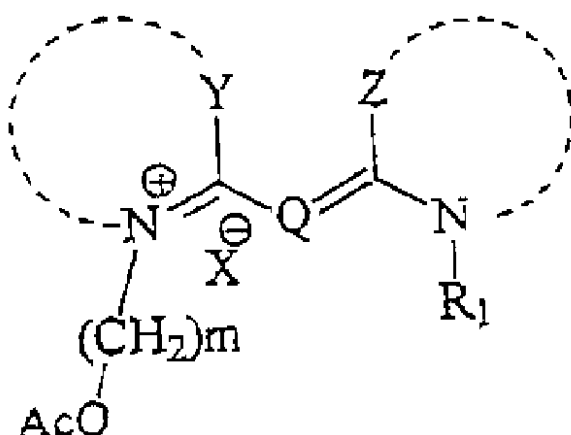
図 1 B に示す方法による色素の水酸基誘導体の合成の成否は、反応条件に依存する。1 の実施態様では、化合物 X I と化合物 X I I とが無水酢酸および酢酸の中で 30 分間 125 °C で加熱される。得られた中間体は、蒸発乾燥され、50 ml のジエチルエーテルで 3 回洗浄され、それから、化合物 X I I I とピリジン中で 125 °C 30 分間反応させられる。実施例 1 および 2 は、適当な反応条件の詳細を提供する。他の反応条件は、前記水酸基誘導体の形成を支持する限り、用いてもよい。

【0074】

代替的な方法では、図 1 C に示す方法によって色素 (I I) の水酸基誘導体を合成してもよい。前記方法は、(a 1) 以下の化学式を有する色素 (X X) のアセトキシシル基誘導体を形成すること、および (a 2) 前記シアニン色素の A c O 基を O H 基に転換することを含む。

【0075】

【化 2 4】

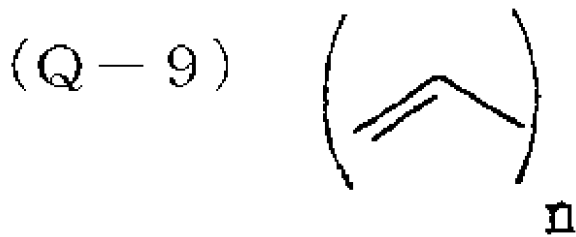


【0076】

化学式 (X X) において、各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。m は 1 から 18 までの整数である。Y および Z は、S、O、N、CH<sub>2</sub> および C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub> はアルキル基である。X<sup>(-)</sup> は陰イオンである。Q は、以下の化学式 (Q - 9) または (Q - 10) であって、n は 1 または 2 である。R<sub>2</sub> はハロゲンまたは水素である。1 の実施態様では、前記陰イオンは I<sup>(-)</sup> である。前記色素は、複素環か、フェニル環のような単一の環状芳香族構造か、ナフチル環のような縮合した環状構造かを含む場合がある。特に関心があるのは、Cy 5、BCy 5 および DBCy 5 と、環状 Cy 7、環状 BCy 7 および環状 DBCy 7 とを含む上記のシアニンである。

【0077】

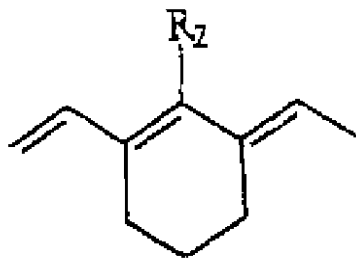
【化 2 5】



10

【0078】

【化 2 6】



20

(Q-10)

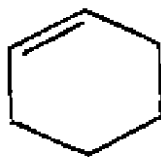
【0079】

フォスフォアミダイトの大半は、前記方法を用いて得ることができるが、Cy7色素は、安定でなく、かつ、保存または操作の間にしばしば分解してCy5タイプの分子種になってしまうために、上記の戦略を用いてCy7タイプのシアニン色素を合成するうえである種の困難が存在する。以下の化学式の構造を有する環状原子団のような安定化原子団がシアニン色素分子の共役二重結合鎖に取り込まれているとき、前記Cy7分子種はより安定となり、それらのフォスフォアミダイトは図1Cに開示された方法によって合成できる、ということが本発明の発見である。代替的には、置換されないCy7タイプのフォスフォアミダイトは、上記のとおり、図1Bに示す方法によって得ることができる。

30

【0080】

【化 2 7】



40

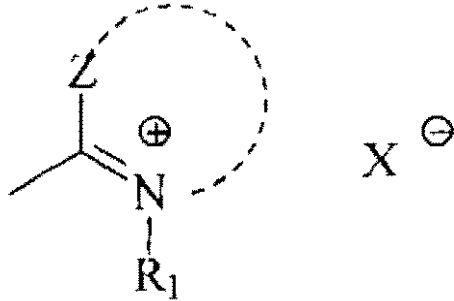
50

## 【 0 0 8 1 】

前記色素（X X）のアセトキシシル基誘導体を形成するステップ（a 1）を実行するために異なる戦略を用いることができるが、1の実施態様では、このステップは、前記シアニン色素のアセトキシシル基誘導体の形成を可能にする条件下で、化合物（X I）、（X X I I）および（X X I I I）を反応させることを含む。この実施態様では、化合物（X I）は、以下の一般式を有するいかなる化合物であってもよい。

## 【 0 0 8 2 】

## 【化 2 8】



10

## 【 0 0 8 3 】

化合物（X I I）は、以下の（X X I I a）または（X X I I b）の一般式を有するいかなる化合物であってもよい。ここでP hはフェニル基である。

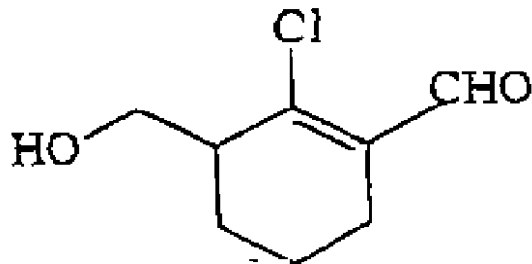
20

## 【 0 0 8 4 】

## 【化 2 9】



30



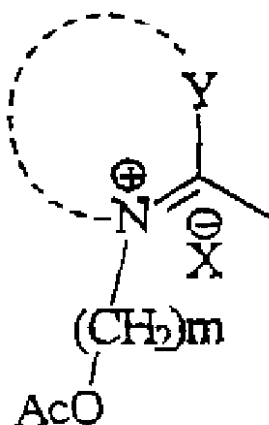
40

## 【 0 0 8 5 】

化合物（X X I I I）は、以下の一般式を有するいずれの化合物でもよい。

## 【 0 0 8 6 】

## 【化 30】



10

## 【0087】

各点線は、縮合した置換または非置換芳香族環を形成するために必要な炭素原子を表す。mは1から18までの整数である。YおよびZは、S、O、N、CH<sub>2</sub>およびC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>からなるグループから独立に選択される。R<sub>1</sub>はアルキル基である。X<sup>(-)</sup>は陰イオンである。1の実施態様では、前記陰イオンはI<sup>(-)</sup>である。

20

## 【0088】

図1Bに示す方法と同様に、特定の化合物(XI)、(XXII)および(XXIII)の選択は、合成される色素フォスフォアミダイトのタイプに依存する。例えば、Cy5フォスフォアミダイトを合成するためには、化合物(XXIIa)と、置換されていない化合物(XI)および(XXIII)とを用いる(図9)。環状Cy7フォスフォアミダイトの合成には、化合物(XXIIb)と、置換されていない化合物(XI)および(XXIII)とを用いる(図13)。DBCy5フォスフォアミダイトを合成するためには、化合物(XXIIa)と、ベンゾ置換された化合物(XI)および(XXIII)とを用いる(図11)。当業者は、適当な化合物(XI)、(XXII)および(XXIII)を選択することにより、他のフォスフォアミダイトを合成することができることを理解する。

30

## 【0089】

図1Cに示す方法によって一般式(XI)および(XXIII)を有するいずれの化合物を用いてもよいが、1の実施態様では、化合物(XI)は、ヨウ化1-エチル2,3,3-トリメチル-(3H)-インドールニウムであり、化合物(XXIII)は、ヨウ化1-(1'-アセトキシプロピル)-2,3,3'-トリメチル-(3H)-インドールニウムである。この実施態様では、化合物(XXII)のタイプに応じて、Cy5(図9)または環状Cy7(図13)のような置換されていないシアニン色素のフォスフォアミダイトが得られる。化合物(XXIIa)を用いるとき、Cy5のフォスフォアミダイトが得られる。同様に、化合物(XXIIb)では、環状Cy7のフォスフォアミダイトが生成される。

40

## 【0090】

他の実施態様では、化合物(XI)はヨウ化1-エチル1,1,2-トリメチル-H-ベンゾインドールニウムで、化合物(XXIII)はヨウ化1-(1'-アセトキシプロピル)-2,3,3'-トリメチル-H-ベンゾインドールニウムである。この実施態様では、化合物(XXII)のタイプに応じて、DBCy5(図11)または環状DBCy7(図示されず)のようなベンゼン置換シアニン色素のフォスフォアミダイトが合成される。化合物(XXIIa)を用いるとき、DBCy5のフォスフォアミダイトが得られる。同様に、化合物(XXIIb)では、環状DBCy7のフォスフォアミダイトが形成さ

50



れる。

#### 【0091】

図1Cに記載の方法によって、前記色素のアセトキシル基誘導体の合成に成功するかどうかは、反応条件に依存する。1の実施態様では、化合物XIおよびXXIIは、オイルバスに入れた酢酸(20ml)および無水酢酸(20ml)の混合液中で120°C2時間インキュベーションされる。溶媒はロータリーエバポレータで除去され、生成物は30mlのジエチルエーテルで2回(全量60mlのジエチルエーテル)洗浄される。得られた生成物は無水酢酸とピリジンとの混合液(20ml/20ml)に溶解され、それから、化合物XXIIIが反応混合液に添加され、前記混合液は110°C30分間インキュベーションされる。前記混合液は冷却され、ロータリーエバポレータ処理して溶媒が除去される。実施例3および4は、適当な反応条件についての詳細を提供する。他の反応条件は、水酸基誘導体(XX)の形成を支持する限り、用いてもよい。

10

#### 【0092】

本発明の別の面は、オリゴヌクレオチドの標識方法を提供する。前記方法は、上記の本発明の色素フォスフォアミダイトを前記オリゴヌクレオチドに結合することを可能にする条件下で、前記色素フォスフォアミダイトを前記オリゴヌクレオチドに反応させるステップを含む。当業者は、本発明の開示に照らして、過度の実験を要することなく標識条件を見つけることができる。

#### 【0093】

当業者は、本発明の色素のフォスフォアミダイトが配列のどこにでも導入されうること

20

#### 【0094】

したがって、本発明は、生体分子の蛍光検出用の安定かつ便利な標識を提供する。前記標識は、いずれのDNA合成機でも単一の自動ステップでオリゴヌクレオチドに付加することができる、従来用いられていた保護-脱保護のステップを必要としない。

#### 【0095】

本発明の色素のフォスフォアミダイトで標識されたオリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNAを含むサンプル中の特異的な相補ヌクレオチド配列の存在および量を同定するための蛍光ハイブリダイゼーションプローブとして使用される場合がある。これらおよびその他のシアニン色素標識の多くの可能な用途の詳細な説明は、「効率的な活性化シアニン色素」という名称の係属中の米国特許出願第09/100,150号明細書と、「発光法による生物学的材料その他の材料の検出用標識試薬としてのシアニン色素」という名称の米国特許第5,627,027号明細書と、「発光性のアリールスルホナートシアニン色素を用いる材料の標識および検出の方法」という名称の米国特許第5,569,587号明細書とに提供されており、これらの関連する内容は、引用によりここに取り込まれている。

30

#### 【0096】

以下の実施例は、本発明に係る特許請求の範囲を例示することを意図するものであって、限定することは意図しない。かかる実施例は、使用されるものの典型的なものであるが、当業者に知られた他の手順が代替的に使われる場合がある。実際、当業者は、過度の実験を要せずに、ここに示す内容に基づいて、さらなる実施態様を予見し、作成することが容易にできる。

40

#### 【0097】

これらの実施例で用いられる一般的な分析方法および特徴付け技術は以下に同定される。300MHzでの<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、(Bruker製)核磁気共鳴分光計で記録された。化学シフトは、TMSとの相対値で100万分の1部( )単位で記録された。300MHzの<sup>31</sup>P NMRスペクトルは、(Bruker製)核磁気共鳴分光計

50

で記録された。化学シフトは、リン酸との相対値で100万分の1部( )単位で記録された。分析用逆相HPLC法による分析は、46mm x 25cmのC18ウルトラスフェア(ultrasphere)カラム(粒径5 $\mu$ )を取り付けたベックマン製の高压液体クロマトグラフィー装置(ベックマン カタログ番号#235329)で行った。

#### 【実施例1】

##### 【0098】

DBCy5(図3)およびDBCy7(図5)の水酸基誘導体の合成

ヨウ化1-(1'-エチル)-1,1,2-トリメチル-H-ベンゾインドールニウムおよびマロンアルデヒドビス(フェニルイミン)-塩酸塩(DBCy5)、またはグルタコンアルデヒドジアニル塩酸塩(glutac on a l d e h y d e d i a n i l h y d r o c h l o r i d e)(DBCy7)が無水酢酸中で30分間125°C加熱された。得られた中間体は蒸発乾固され、50mlのジエチルエーテルで3回洗浄され、それから、ピリジン中で臭化1-(6-ヒドロキシヘキシル)-1,1,2-トリメチル-H-ベンゾインドールニウムとともに125°C30分間反応させた。前記ピリジンを蒸発乾固させた後、残渣はジエチルエーテルで洗浄され、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を含むシリカゲルのカラムで精製された。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc/アセトン/MeOH(85/5/5/5)による溶出により、80%の収率でDBCy5-OHが(図4)、あるいは60%の収率でDBCy7-OHが(図6)、それぞれ得られた。フォスフォアミダイトはプロトンNMR(示されず)および<sup>31</sup>P NMR(図4および6)によって特徴付けられた。

#### 【実施例2】

##### 【0099】

環状Cy7の水酸基誘導体(図7)または環状DBCy7の水酸基誘導体(図8)の合成

a 1-ホルミル-1-シクロヘキセン ジエチル アセタールの合成

1-シクロヘキセン-1-カルボキシアルデヒド(5.0g、45.4ミリモル)の溶液中に、無水エタノール(60ml)およびTsOH(0.0085g、2.27ミリモル)に溶かしたオルトギ酸トリエチル(13.5g、90.8ミリモル)が3°Cのモレキュラーシーブ(1g)を通して添加された。上記の反応物は加熱されアルゴン存在下で6時間還流され、それから、室温に冷却された。固体のNaHCO<sub>3</sub>で急冷した後、反応混合液は濾過されて、油状に濃縮され(5.0g、収率60%)、それから、これ以上精製されることなく以下のステップに用いられた。

##### 【0100】

b 5-フェニルアミノ-2,4-トリメチレン-2,4-ペンタジエン)塩化フェニルアンモニウムの合成

ジメチルホルムアミド(DMF)(3.27g、44.7ミリモル)を乾燥するために、アルゴン存在下0°Cで激しく攪拌しながらPOCl<sub>3</sub>が、1滴ずつ添加された。30分後に、DMF(6ml)中に入れた1-ホルミル-1-シクロヘキセン ジエチル アセタール(2.74g、14.9ミリモル)がカニューラを通して添加された。得られた反応混合液は0°Cで1時間攪拌され、それから、室温で2時間攪拌された。反応は0°Cまで冷却され、アニリン(4.16g、44.7ミリモル)が1滴ずつ添加された。アニリンの添加後、反応は30分間室温まで加温され、それから、氷水(100ml)で急冷された。反応混合液は、濃いNaOH溶液でpH10~12に調整され、ジエチルエーテルで3回抽出された。エーテル相と一緒に混ぜ合わせて濃いHClでpH1~2まで酸性にした。エタノール(10ml)が前記混合液に添加され、該混合液は-20°Cで3時間保持された。沈殿は回収され、エタノールから再結晶化され、中間体の紫色の薄片が生成された(3.01g、収率62%)。

##### 【0101】

c 環状Cy7または環状DBCy7の水酸基誘導体の合成

ヨウ化1-エチル-2,3,3-トリメチル-インドールニウムまたはヨウ化1-エチル1,1,2-トリメチル-H-ベンゾインドールニウム(3.00ミリモル)および(

5 - フェニルアミノ - 2 , 4 - トリメチレン - 2 , 4 - ペンタジエン ) 塩化フェニルアンモニウム ( 0 . 9 7 5 g , 3 . 0 0 ミリモル ) が、 $AC_2O$  ( 5 0 m L ) 中で 1 時間 1 2 5 ° C で攪拌された。反応は、室温まで冷却され、濃縮された。残渣は、ジエチルエーテルで 3 回洗浄されて、真空乾燥された。得られた中間体は、臭化 1 - ( 1 ' - ヒドロキシルヘキシル ) - 2 , 3 , 3 - トリメチル - インドールニウムまたは臭化 1 - ( 1 ' - ヒドロキシルヘキシル ) - 1 , 1 , 2 - トリメチル - ベンゾインドールニウム ( 3 . 0 0 ミリモル ) と、ピリジン ( 5 0 m L ) と混合され、1 2 5 ° C 1 時間攪拌された。反応は、室温まで冷却され、濃縮された。粗生成物は、ジエチルエーテルで 3 回洗浄され、フラッシュクロマトグラフィー ( EtOAc、アセトン、MeOH、 $CH_2Cl_2$ 、体積比 5 : 5 : 5 : 8 5 ) により精製され、モノ - ヒドロキシルヘキシル環状 Cy 7 については収率 4 6 . 4 %、モノ - ヒドロキシヘキシル環状 DBCy 7 については収率 4 6 . 7 % であった。

### 【実施例 3】

#### 【0102】

水酸化 Cy 5 ( 図 9 ) または水酸化 DBCy 5 ( 図 1 1 ) の合成

酢酸 ( 2 0 m l ) と無水酢酸 ( 2 0 m l ) との混合液に溶かしたヨウ化 1 - エチル 2 , 3 , 3 - トリメチル - ( 3 H ) - インドールニウム ( Cy 5 ) またはヨウ化 1 - エチル 1 , 1 , 2 - トリメチル - H - ベンゾインドールニウム ( DBCy 5 ) ( 4 . 4 7 ミリモル ) およびマロンアルデヒド ビス ( フェニルアミン ) - 塩酸塩 ( 8 . 5 0 ミリモル ) の溶液が、1 2 0 ° C に予熱されたオイルバス中で 2 時間加熱された。溶媒はロータリーエバポレータで除去され、生成物は 3 0 m l のジエチルエーテルで 2 回 ( 全量 6 0 m l のジエチルエーテル ) 洗浄され、余剰のマロンアルデヒド塩酸ジアニルを除去した。このようにして得られた粗生成物は、無水酢酸およびピリジンの混合液 ( 2 0 m l / 2 0 m l ) に溶解され、ヨウ化 1 - ( 1 ' - アセトキシプロピル ) - 2 , 3 , 3 ' トリメチル - ( 3 H ) - インドールニウム ( Cy 5 ) またはヨウ化 1 - ( 1 ' - アセトキシプロピル ) - 1 , 1 , 2 - トリメチル - H ベンゾインドールニウム ( DBCy 5 ) ( 4 . 4 7 ミリモル ) が添加され、反応混合液は 1 1 0 ° C 3 0 分間加熱された。この混合液は冷却され、ロータリーエバポレータ処理で溶媒を除去した。残渣はジエチルエーテルで洗浄され、乾燥された。前記残渣は水 / メタノールが 5 0 : 5 0 の液 2 0 0 m l 中に 2 M HCl が溶けた溶液に溶解され、終夜室温で攪拌された。溶媒は蒸発され、残渣は  $CH_2Cl_2$  と水との間で分配された。有機層は硫酸ナトリウムで乾燥され、溶媒を蒸発させた。粗生成物は、メタノール : アセトン : エチル酢酸 : ジクロロメタンが 5 / 5 / 5 / 8 5 の割合で混合した液と、これに続いて、同じ成分を 8 / 8 / 8 / 7 6 の割合で混合した液とを用いるシリカゲルでのカラムクロマトグラフィーにより精製された。適当な分画がブールされ、蒸発されて、1 g の水酸化 Cy 5 ( 4 7 % ) および 1 . 2 g の水酸化 DBCy 5 ( 5 6 % ) を得た。

#### 【0103】

水酸化 Cy 5 の  $^1H$  スペクトルは、以下のとおりであった。(化学シフトは ppm 単位である。) 8 . 0 2 ( dd、2 H、 $-CH=$  )、7 . 4 - 7 . 0 ( m、8 H、芳香族 )、6 . 9 ( t、1 H、 $(-CH=)$  )、6 . 5 8 ( d、1 H、 $(-CH=)$  )、6 . 2 1 ( d、1 H、 $(-CH=)$  )、4 . 3 ( m、2 H、 $N-CH_2-CH_3$  )、4 . 1 ( m、2 H、 $N-CH_2$  )、3 . 8 7 ( m、 $CH_2$  )、3 . 6 ( s、1 H、 $-OH$  )、2 . 1 ( m、2 H、 $CH_2$  )、1 . 7 ( d、1 2 H、 $(CH_3)_4$  ) および 1 . 4 2 ( t、3 H、 $-CH_2-CH_3$  )。水酸化 DBCy 5 の  $^1H$  スペクトルは、以下のとおりであった。(化学シフトは ppm 単位である。) 8 . 2 4 ( dd、2 H、 $-CH=$  )、7 . 4 - 8 . 2 2 ( m、1 2 H、芳香族 )、7 . 5 ( t、1 H、 $(-CH=)$  )、6 . 5 ( d、1 H、 $(-CH=)$  )、6 . 2 ( d、1 H、 $(-CH=)$  )、4 . 4 ( m、2 H、 $N-CH_2-CH_3$  )、4 . 1 ( m、2 H、 $N-CH_2$  )、3 . 9 ( m、 $CH_2$  )、3 . 7 ( s、1 H、 $-OH$  )、2 . 2 ( m、2 H、 $CH_2$  )、1 . 9 4 ( d、1 2 H、 $(CH_3)_4$  ) および 1 . 4 ( t、3 H、 $-CH_2-CH_3$  )。

## 【実施例 4】

## 【0104】

環状 Cy 7 の水酸基誘導体の合成 (図 13)

ヨウ化 1 - (1' - アセトキシプロピル) - 2, 3, 3 - トリメチル - (3H) - インドールニウム (774 mg、2 ミリモル) と、ビスアルデヒド (345 mg、2 ミリモル) と、ヨウ化 1 - (1' - エチル) - 2, 3, 3 - トリメチルインドールニウム (630 . 40 mg、2 ミリモル) と、酢酸ナトリウム (328 . 12 mg、4 ミリモル) とが丸底フラスコで混合された。この混合物に 24 ml の AcOH と 18 ml の Ac<sub>2</sub>O とが添加された。反応混合液は 100 °C 60 分間加熱された。反応の進行は 778 nm の UV - VIS で監視された。前記反応混合液は室温まで冷却された。溶媒は脱気により蒸発乾固された。残渣は 50 ml のジエチルエーテルで 3 回洗浄され (全量 150 ml)、生成物 1 . 16 g (74%) を得た。得られた化合物 1 . 16 g は丸底フラスコに入れられ、60 ml の無水 DMF と、NaSC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (20 等量) が添加された。反応混合液は 748 nm で UV - VIS により監視された。前記反応混合液は冷却され、脱気により蒸発乾固された。得られた残渣は CHCl<sub>3</sub> で粉碎された。前記残渣は、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> の入ったシリカゲルカラムで精製された。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / EtOAc / アセトン / MeOH (85 / 5 / 5 / 5) による溶出で所望の生成物を 0 . 231 g (22%) 得た。環状 Cy 7 フォスフォアミダイトは、プロトン NMR と、<sup>31</sup>P NMR とで特徴付けられた。

10

## 【実施例 5】

## 【0105】

本発明の色素フォスフォアミダイトのオリゴヌクレオチドへの結合

所望の標識オリゴヌクレオチドは、自動 DNA 合成機 (オリゴ 1000 M または ABI 392) で A p a c、G i p r - p a c、C a c および T フォスフォアミダイトを用いて得られる。100 mg の前記色素フォスフォアミダイトは 1 ml のアセトニトリル (0 . 1 M 溶液) に溶解され、前記 DNA 合成機に設置された。前記色素フォスフォアミダイトは 10 分間結合された。合成後、前記オリゴヌクレオチドは、NH<sub>4</sub>OH または 0 . 05 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / MeOH を用いて、室温で 2 時間切断および脱保護を施された。得られた溶液は、スピードバック (speed VAC) で蒸発させられた。標識オリゴヌクレオチドは C18 カラムを用いる逆相 HPLC (ベックマン HDL L ゴールドシステム) によって単離された。バッファー A (0 . 1 M NH<sub>4</sub>OAc、pH 7 . 0) と、バッファー B (100% アセトニトリル) とが用いられた。A 中の B の 0 ~ 50% の勾配が用いられた。0 ~ 20 分は 15% B までの勾配、20 ~ 25 分は 25% B までの勾配、25 ~ 32 分は 50% B までの勾配、32 ~ 37 分は 50% B のまま、37 ~ 38 分は 0% B であった (図 15 A および 15 B)。HPLC からの溶出液は完全に蒸発乾固され、それから水に溶解された。この溶液の 260 nm および 650 nm の吸光度はベックマン SU - 70 分光光度計で計測され、シアニン色素で標識されたオリゴヌクレオチドと矛盾しないことがわかった (図示せず)。精製された標識オリゴヌクレオチドの存在は、ベックマンの LIF 検出器 CEQ 2000 を装備した PACE 5000 による毛管電気泳動法と、HPLC とによっても確認された。

20

30

## 【図面の簡単な説明】

40

## 【0106】

【図 1 A】本発明の色素フォスフォアミダイトの合成方法を示す反応概念図。

【図 1 B】本発明の色素フォスフォアミダイトの合成方法を示す反応概念図。

【図 1 C】本発明の色素フォスフォアミダイトの合成方法を示す反応概念図。

【図 2】本発明の Cy 5 フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図 3】本発明の DB Cy 5 フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図 4】図 3 の反応概念図によって得られた本発明の DB Cy 5 フォスフォアミダイトの <sup>31</sup>P NMR スペクトル。

【図 5】本発明の DB Cy 7 フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図 6】図 5 の反応概念図によって得られた本発明の DB Cy 7 フォスフォアミダイトの

50

$^3\text{ }^1\text{P}$  NMRスペクトル。

【図7】本発明の環状Cy7フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図8】本発明の環状DBCy7フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図9】本発明のCy5フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図10】図9の反応概念図によって得られた本発明のCy5フォスフォアミダイトの $^3\text{ }^1\text{P}$  NMRスペクトル。

【図11】本発明のDBCy5フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

【図12】図11の反応概念図によって得られた本発明のDBCy5フォスフォアミダイトの $^3\text{ }^1\text{P}$  NMRスペクトル。

【図13】本発明の環状Cy7フォスフォアミダイトの合成を示す反応概念図。

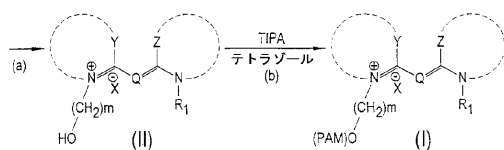
【図14】図13の反応概念図によって得られた本発明の環状Cy7フォスフォアミダイトの $^3\text{ }^1\text{P}$  NMRスペクトル。

【図15A】精製前の本発明の色素フォスフォアミダイトで標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCクロマトグラム。

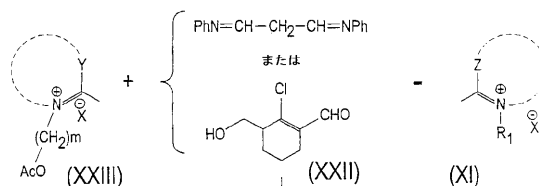
【図15B】精製後の本発明の色素フォスフォアアミダイトで標識されたオリゴヌクレオチドのHPLCクロマトグラム。

10

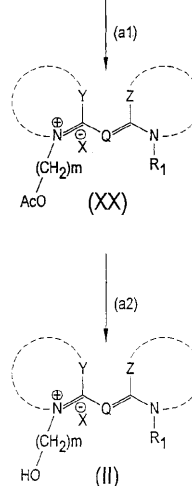
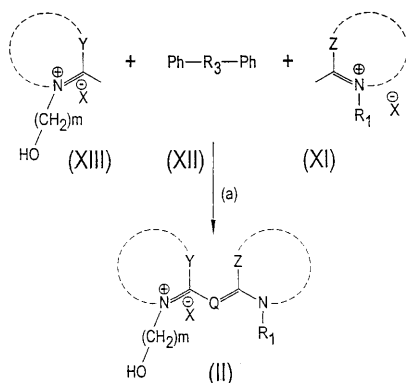
【図1A】



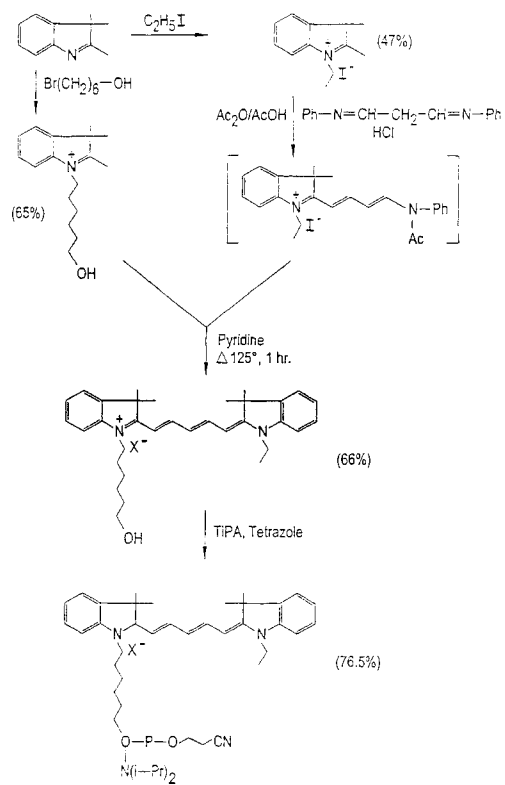
【図1C】



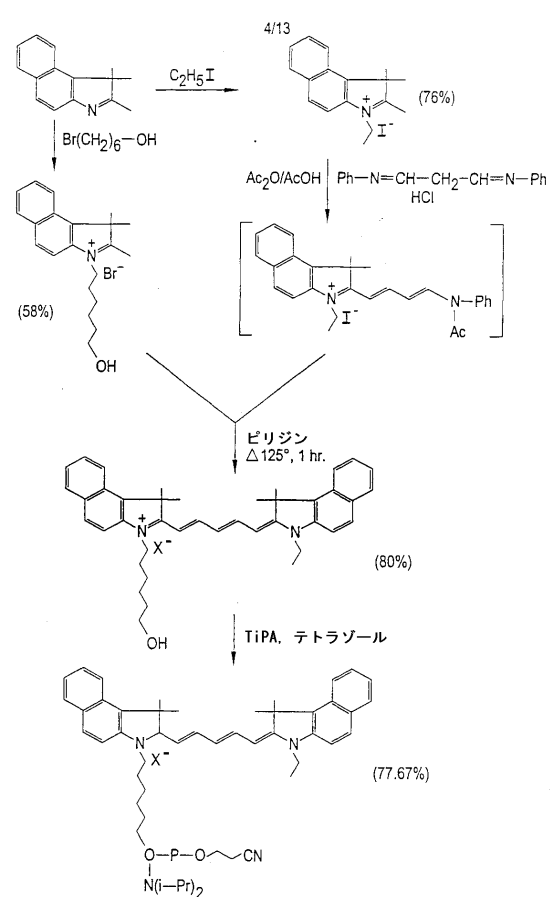
【図1B】



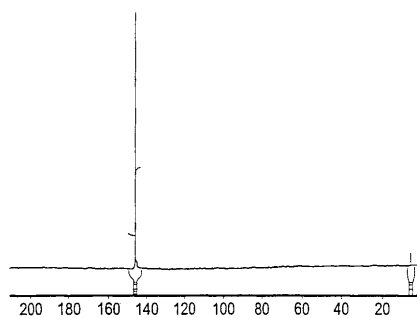
【図 2】



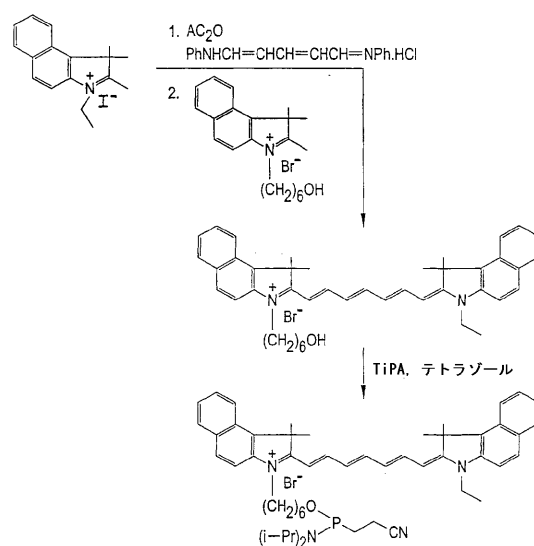
【図 3】



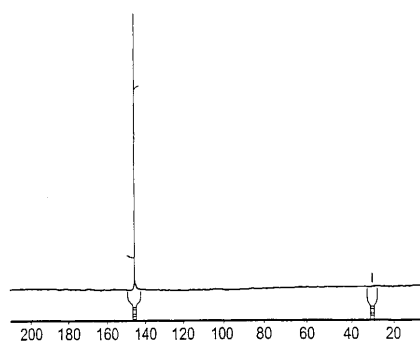
【図 4】



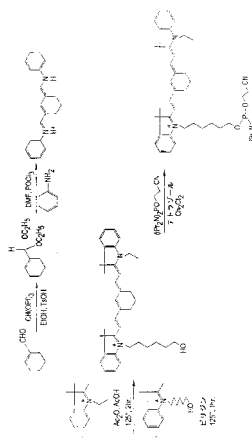
【図 5】



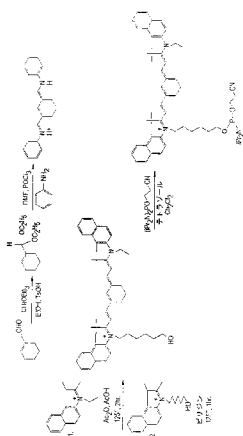
【図 6】



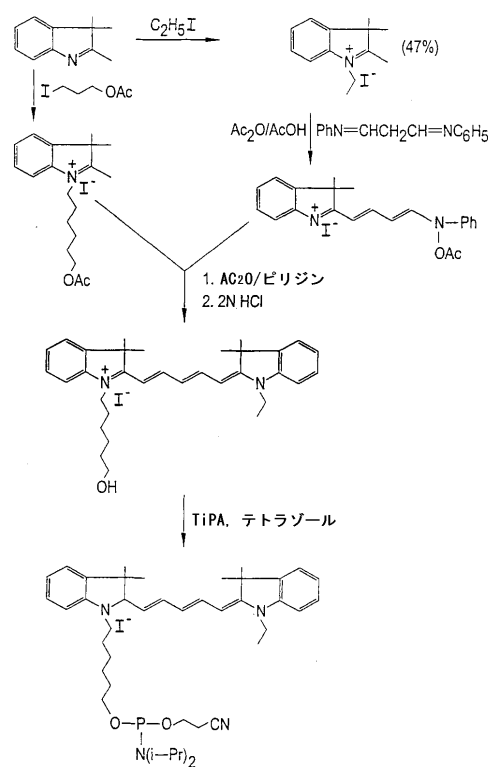
【図 7】



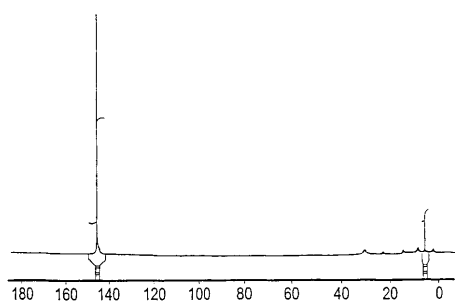
【図 8】



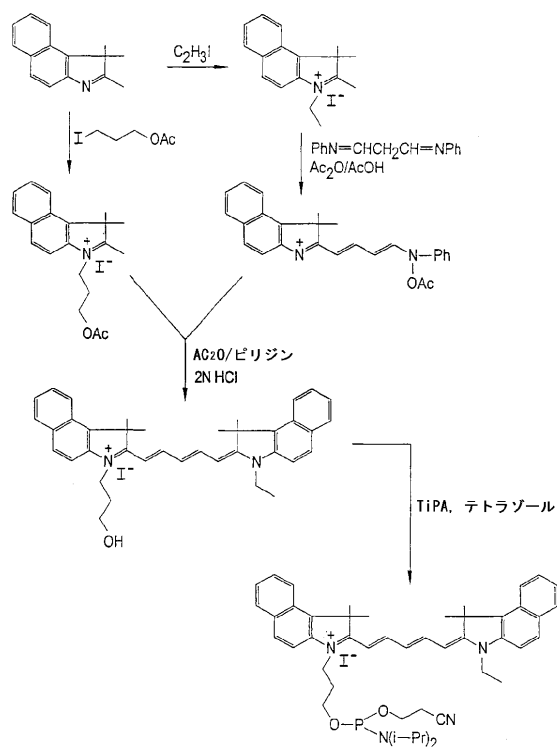
【図 9】



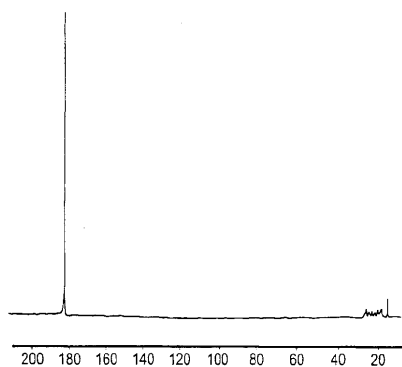
【図 10】



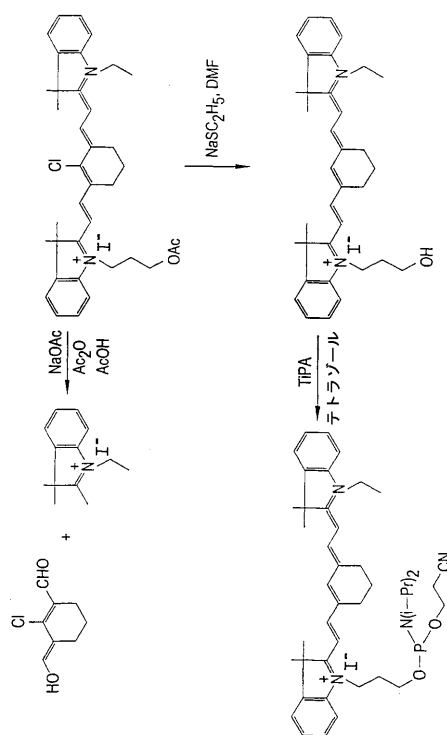
【図 11】



【図 12】

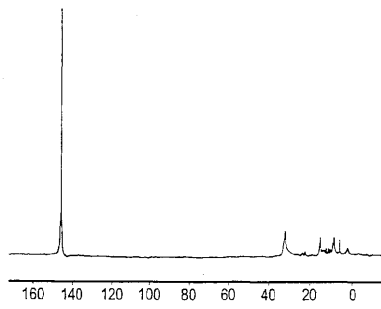


【図 13】

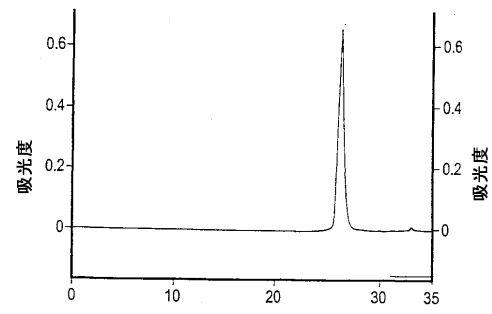




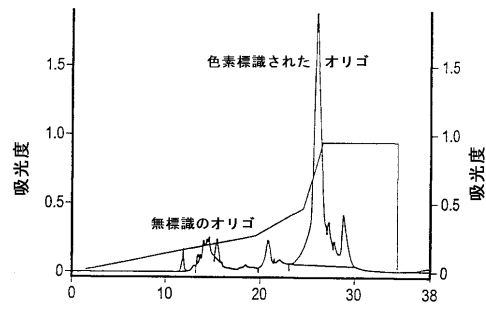
【図 14】



【図 15 B】



【図 15 A】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 レッディー、 エム、 パラメスワラ  
アメリカ合衆国 9 2 8 2 1 カリフォルニア州 ブリー ヴァルヴァード アヴェニュー 2 1  
9
- (72)発明者 ファルークイ、 ファーダス  
アメリカ合衆国 9 2 8 2 1 カリフォルニア州 ブリー アレクサンダー コート 1 5 2 0
- (72)発明者 マイクル、 メイジド、 エイ  
アメリカ合衆国 9 2 8 7 0 カリフォルニア州 プラセンティア ラベンダー レイン 3 4 8

## 合議体

審判長 中田 とし子

審判官 井上 千弥子

審判官 齋藤 恵

- (56)参考文献 米国特許第 6 0 4 8 9 8 2 ( U S , A )  
米国特許第 6 1 3 6 6 1 2 ( U S , A )  
特開平 4 - 2 4 4 8 9 2 ( J P , A )  
特表 2 0 0 1 - 5 1 1 1 9 5 ( J P , A )  
米国特許第 6 1 1 0 6 3 0 ( U S , A )  
米国特許第 5 5 5 6 9 5 9 ( U S , A )

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C09B23/00

REGISTRY

CAPLUS