

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7399882号
(P7399882)

(45)発行日 令和5年12月18日(2023.12.18)

(24)登録日 令和5年12月8日(2023.12.8)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 9 B 11/28 (2006.01)	C 0 9 B 11/28	Z C S P	
C 0 9 B 57/00 (2006.01)	C 0 9 B 57/00	Z	
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	Z Z N A	
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z	
請求項の数 28 (全66頁)			

(21)出願番号	特願2020-562197(P2020-562197)	(73)特許権者	504019928
(86)(22)出願日	令和1年5月7日(2019.5.7)		セファイド
(65)公表番号	特表2021-523268(P2021-523268 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベール カリビアン ドライブ 9 0 4
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)	(74)代理人	110001139
(86)国際出願番号	PCT/US2019/031188		S K弁理士法人
(87)国際公開番号	WO2019/217470	(74)代理人	100130328
(87)国際公開日	令和1年11月14日(2019.11.14)		弁理士 奥野 彰彦
審査請求日	令和4年5月2日(2022.5.2)	(74)代理人	100130672
(31)優先権主張番号	62/668,109		弁理士 伊藤 寛之
(32)優先日	平成30年5月7日(2018.5.7)	(72)発明者	ルンド, ケビン, ビー.
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 9 4 0 8 9 カリフォルニア サニーベール カリビアン ドライブ 9 0 4 セファイド内
		(72)発明者	セルゲエフ, ドミトリ
最終頁に続く			

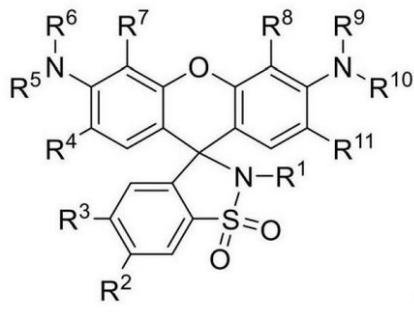
(54)【発明の名称】 スルホローダミンホスホラミダイト色素

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I

【化1】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、
R¹は、C₁-C₆アルキル又はL¹-Xであり、
R²は、ハロゲン又はSO₂NH₂であり、
R³は、H又はハロゲンであり、
R⁴、R⁷、R⁸、及びR¹¹は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換されたC₁-C₆アルキルであり、

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

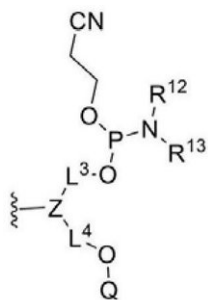
R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

L^1 は、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンであり、

Xは、 N_3 、プロピニル、マレイミド、又は $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 、又はXは、

【化 2】



であり、ここで、

L^3 及び L^4 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Qは、トリチル基又はジメトキシトリチル基であり、

Zは、CH、N、 $NHC(O)N$ 、又は $OC(O)N$ であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである、化合物。

【請求項 2】

R^2 がClであり、且つ R^3 がHである、請求項1の化合物。

【請求項 3】

Xが $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である、請求項1の化合物。

【請求項 4】

L^1 がPEG₂₋₁₀リンカーであるか、又は L^1 が $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ である、請求項1の化合物。

【請求項 5】

R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である、又は

R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、 R^{10} 及び R^{11} は結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、

R^6 及び R^7 は、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^8 及び R^9 は、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結するプロピレン鎖である、
請求項1の化合物。

【請求項6】

R^5 、 R^6 、 R^9 及び R^{10} がそれぞれメチルである、請求項1の化合物。

【請求項7】

Q がトリチル基又はジメトキシトリチル基である、請求項1の化合物。

【請求項8】

L^3 及び L^4 が、独立して、 C_2 - C_6 アルキレン又は $-(OCH_2CH_2)_m-$ であり、 m が2～6の整数である、又は

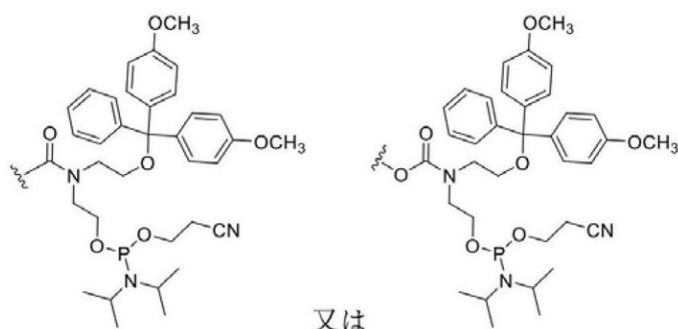
L^3 及び L^4 が、独立して、 CH_2CH_2 である、

請求項1の化合物。

【請求項9】

X が、

【化3】

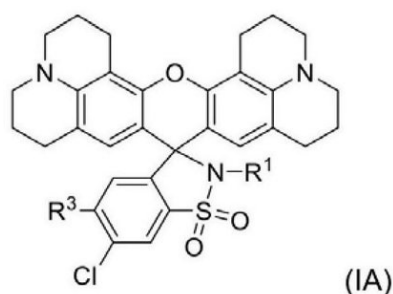


である、請求項1の化合物。

【請求項10】

前記化合物が、式IAで表される化合物

【化4】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩であって、ここで、 R^1 は L^1X であり、且つ R^3 はH又はハロゲンである、請求項1の化合物。

【請求項11】

X が $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である、請求項1又は10の化合物。

【請求項12】

前記化合物が、

10

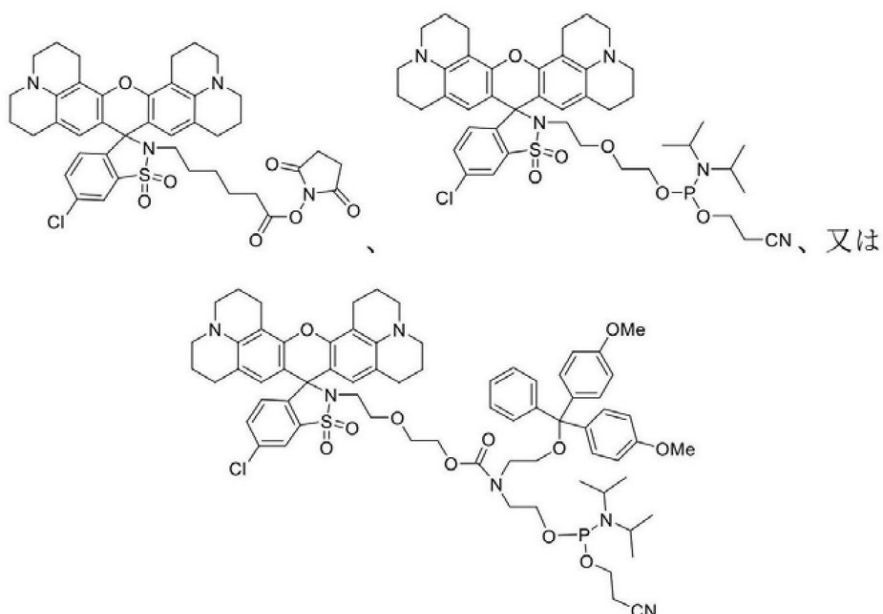
20

30

40

50

【化 5】

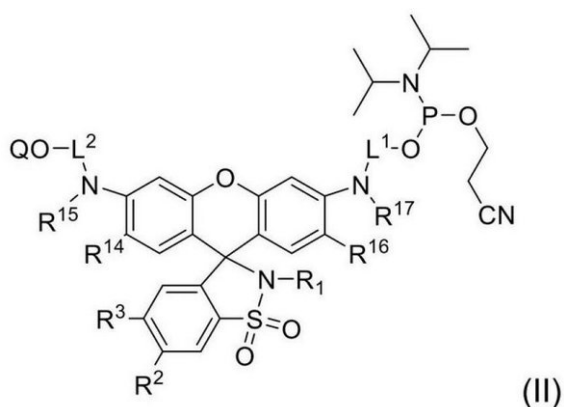


である、請求項1の化合物。

【請求項 1 3】

式II

【化 6】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、

R^1 は C_1 - C_6 アルキルであり、

R^2 は、H、ハロゲン、又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、H又はハロゲンであり、

R^{14} 及び R^{16} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{15} 及び R^{17} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{14} 及び R^{15} は、一緒の場合、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

R^{16} 及び R^{17} は、一緒の場合、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

Qは、トリチル基又はジメトキシトリチル基であり、

L^1 及び L^2 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンである、

化合物。

20

40

50

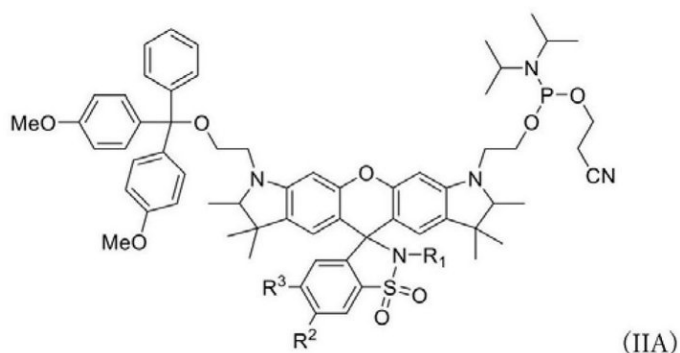
【請求項 14】

R^3 がHである、又は R^2 がHである、又は R^2 がClである、請求項13の化合物。

【請求項 15】

前記化合物が式(IIA)

【化 7】



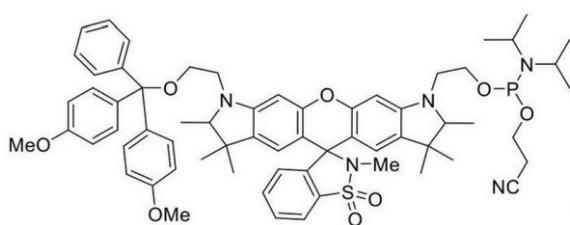
10

で表される、請求項13の化合物。

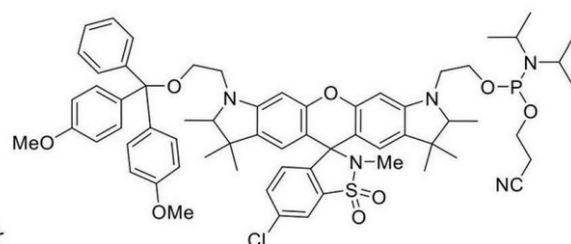
【請求項 16】

前記化合物が、

【化 8】



又は



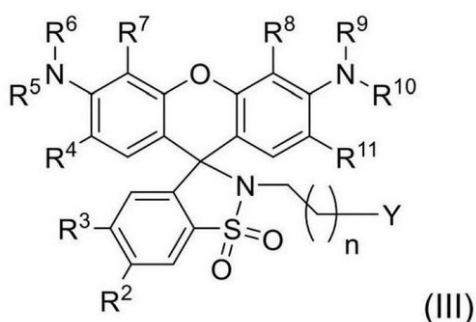
20

である、請求項13の化合物。

【請求項 17】

式III

【化 9】



30

40

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、

R^2 は、H、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、ハロゲン又はHであり、

R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

50

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2-C_3 アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2-C_3 アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2-C_3 アルキレン鎖であり、

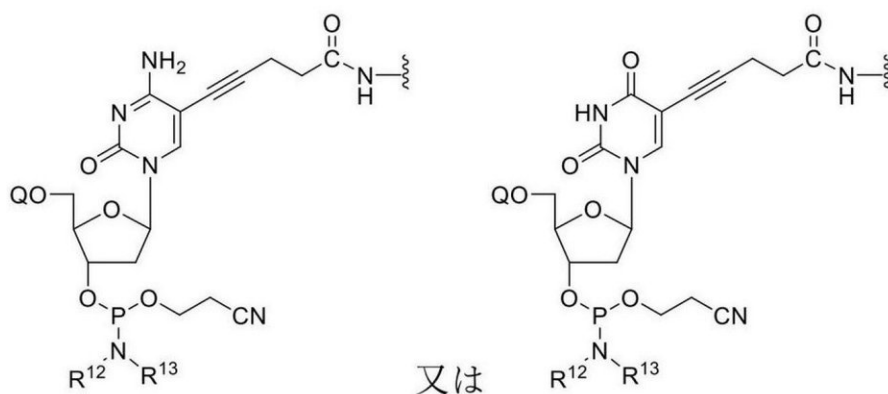
R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

N は、1～9の整数であり、

Y は、

【化 10】



であり、ここで、

Q はトリチル基又はジメトキシトリチル基であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1-C_6 アルキルである、化合物。

【請求項 18】

R^2 が Cl であり、且つ R^3 が H である、又は

R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である、又は

R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結するプロピレン鎖である、

請求項 17 に記載の化合物。

【請求項 19】

前記化合物が、

10

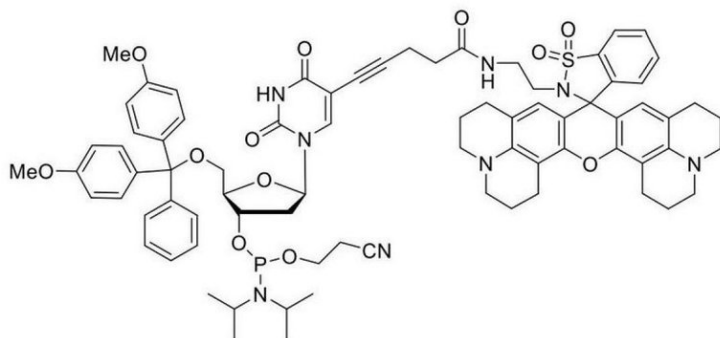
20

30

40

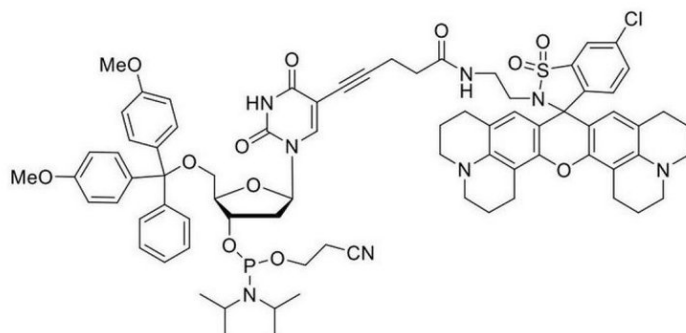
50

【化 1 1】



又は

10



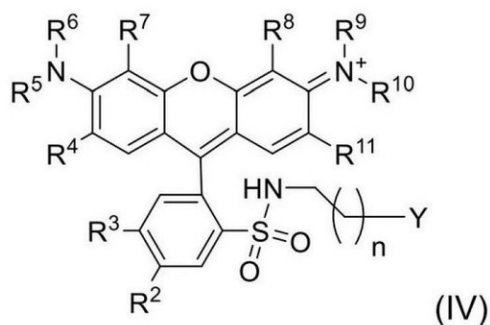
20

である、請求項17の化合物。

【請求項 2 0】

式IV

【化 1 2】



30

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩の化合物を含む標識ポリヌクレオチドであって、ここで、

R^2 は、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、H又はハロゲンであり、

R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

40

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換さ

50

れたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

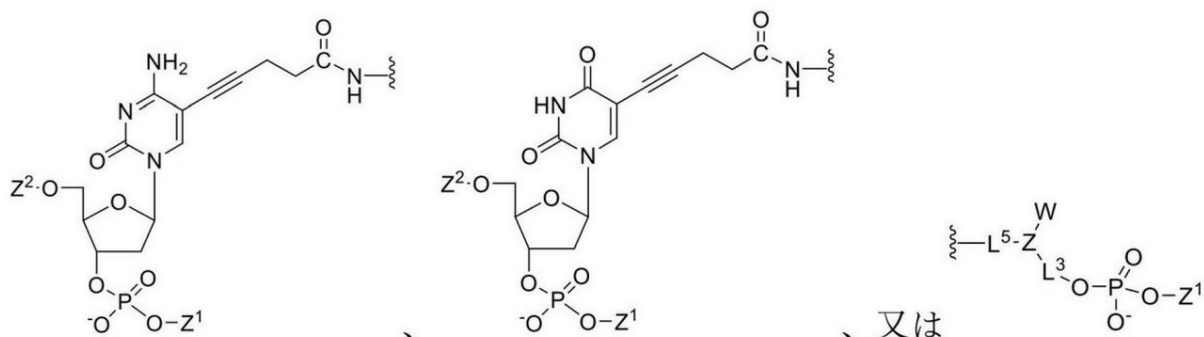
R⁵及びR⁶は、R⁵及びR⁶が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R⁹及びR¹⁰は、R⁹及びR¹⁰が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

Nは、1～9の整数であり、

Yは、

【化 1 3】



10

であり、ここで、

波線は、式IIIへの結合点であり、

Wは、H又はL⁴-O-Z²であり、

L³、L⁴、及びL⁵は、独立して、任意に置換されたC₂-C₁₀アルキレン、又は任意に置換されたC₂-C₃₀ヘテロアルキレンであり、

Zは、CH、N、NHC(O)N、又はOC(O)Nであり、

Z¹は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドであり、及び

Z²は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又はHである、
標識ポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

R²がClであり、且つR³がHである、請求項20の標識ポリヌクレオチド。

【請求項 2 2】

R⁴及びR⁵は、R⁴及びR⁵が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖であり、R¹⁰及びR¹¹は、R¹⁰及びR¹¹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖であり、R⁶及びR⁷は、R⁶及びR⁷が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖であり、R⁸及びR⁹は、R⁸及びR⁹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖である、請求項20の標識ポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

前記標識ポリヌクレオチドが5'-ヌクレアーゼPCRプローブである、又は

前記標識ポリヌクレオチドが蛍光消光剤をさらに含む、又は

前記標識ポリヌクレオチドが固体支持体に結合している、又は

前記固体支持体が、制御ポアガラスビーズ、ポリスチレンビーズ、磁性ビーズ又はマイクロウェルプレートである、

請求項20の標識ポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

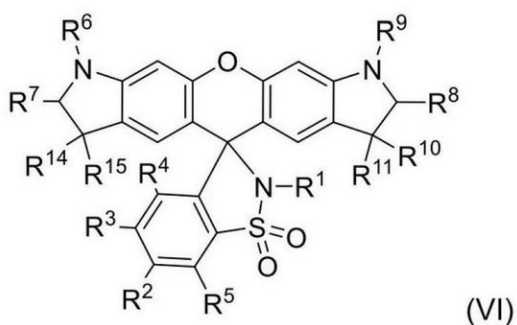
式VI

20

30

40

【化 1 4】



10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、

R^1 は、 L^1-X であり、

R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、独立して、H、ハロゲン、 C_1-C_6 アルキル、又は SO_2NH_2 であり

R^6 及び R^9 は、独立して、H又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、

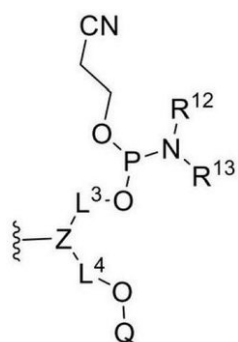
R^7 、 R^8 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{14} 、及び R^{15} は、独立して、H又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、

L^1 は、任意に置換された C_2-C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2-C_{20} ヘテロアルキレンであり、

20

X は、 N_3 、プロピニル、マレイミド、又は $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 、又は X は、

【化 1 5】



30

であり、ここで、

L^3 及び L^4 は、独立して、任意に置換された C_2-C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2-C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Q は、トリチル基又はジメトキシトリチル基であり、

Z は、CH、N、 $NHC(O)N$ 、又は $OC(O)N$ であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1-C_6 アルキルである、化合物。

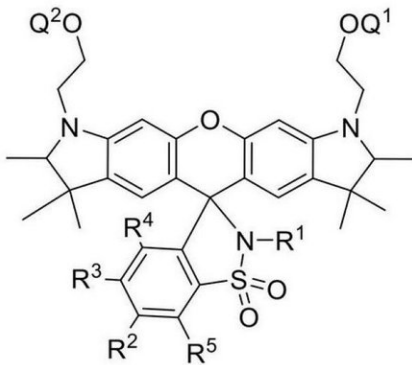
【請求項 2 5】

40

前記化合物が、

50

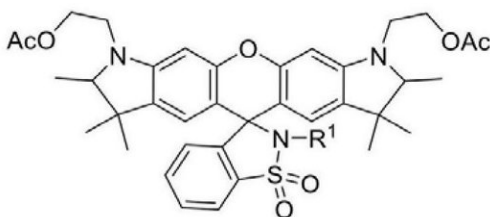
【化 1 6】



10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩であって、ここで、
 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 はHであり、及び
 Q_1 及び Q_2 は、独立して、H又は C_1 - C_6 アシルである、又は
 前記化合物が、

【化 1 7】



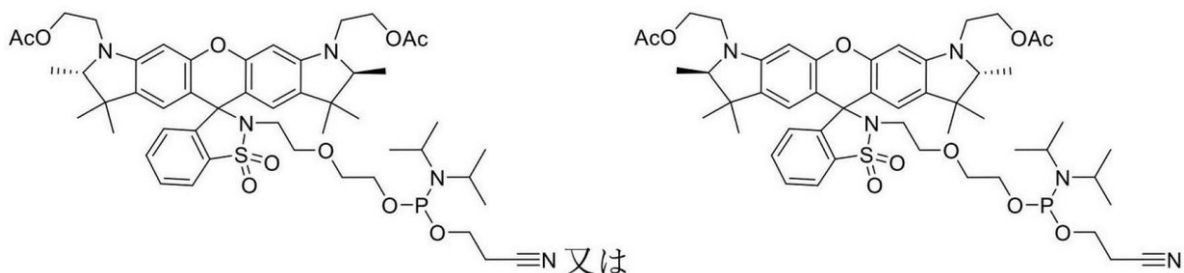
20

である、
 請求項24の化合物。

【請求項 2 6】

前記化合物が、

【化 1 8】



30

である、請求項24の化合物。

【請求項 2 7】

リガンドと請求項1～19又は請求項24～26のいずれか1項の化合物を、前記化合物を前記リガンドに共有結合させるのに十分な条件下の適切な溶媒中で接触させ、それによって標識コンジュゲートを形成する工程を含む、リガンドの標識コンジュゲートの調整方法。

40

【請求項 2 8】

前記リガンドがポリヌクレオチド、蛋白質、ペプチド、ポリサッカライド、エチレン性骨格を有するポリマー、又は固体支持体である、請求項27に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチド自動合成適合性赤色色素として有用な新規なスルホローダミン色素ホスホロアミダイト化合物を提供する。蛍光色素は、PCRからシーケンシング

50

までの幅広い用途で高感度検出を提供するため、オリゴヌクレオチドを修飾するために最も一般的に使用されているタグの一つである。ローダミン色素は、フルオレセイン類などの他の色素に比べて発光極大波長が長く、多色標識や染色が可能であることから、オリゴヌクレオチド標識に広く使用されている。また、ローダミンはフルオレセイン類やクマリン類に比べて高い光安定性を示す。

【0002】

蛍光色素標識ポリヌクレオチドの調製は、典型的には、活性色素中間体とポリヌクレオチドのアミノ誘導体を反応させるなど、合成後のコンジュゲーションによって行われる。この方法では、コンジュゲーション収率が低いことや、コンジュゲーション生成物の追加精製の必要性などの欠点がある。ホスホラミダイト自動合成による合成ポリヌクレオチドへの蛍光色素の組み込みは、より便利なアプローチを提供している。しかし、自動固相合成の一部として蛍光色素をポリヌクレオチドに添加することを可能にする蛍光色素のホスホラミダイト誘導体はほとんど市販されていない。

10

【0003】

人気のあるオリゴヌクレオチド標識色素の一例としては、スルホローダミン101スルホニルクロリド (Texas Red^(R)色素) がある。しかし、Texas Red^(R)色素は、Texas Red^(R)色素のホスホラミダイト誘導体が知られていないため、合成後のカップリングによってのみオリゴヌクレオチドに導入できる。Texas Red^(R)色素は不安定であるため、カルボキシローダミン色素 (5-TAMRA, SEなど) よりもカップリング収率が低く、Texas Red^(R)標識オリゴヌクレオチドの調製に関連するコストが増加する。

20

【0004】

オリゴヌクレオチド自動合成のためのTexas Red^(R)色素の代替品となるためには、蛍光体はTexas Red^(R)色素に近いスペクトル特性を有す必要がある。そのような蛍光体は、標準的なオリゴヌクレオチド合成条件 (例えば、ヨウ素処理、キャッピング、酸脱保護条件) に対して安定であり、オリゴヌクレオチド中の任意の位置に組み込むことが可能であるべきである。さらに、PCR用途では、そのような蛍光体の輝度は生物学的に関連するpH範囲の変化に非感受的であるべきであり、ハイエンドポイント蛍光 (EPF) を生成するために色素を十分に消光する必要があり、この蛍光は、消光したプローブと開裂したプローブ又は消光していないプローブ (例えば、ハイブリダイズドプローブ) との間の蛍光の差として測定される。

30

【0005】

オリゴ合成に適合するTexas Red^(R)色素の以前から知られている代替品には、いくつかの欠点がある。例えば、CAL Fluor Red^(R) 610色素は、可視スペクトルのオレンジ-赤色領域で蛍光を発するホスホラミダイトであり、5'ヌクレアーゼアッセイ、モレキュラービーコン、及び同様の検出法で使用されるプローブなどの蛍光プローブの5'標識に使用できる。しかしながら、この色素は保護されたヒドロキシル基を含まないため、オリゴヌクレオチドの5'末端にのみにしか添加することができず、その用途が制限される。色素の別のファミリーであるAquaPhluor^(R)は、593nmの吸収極大及び613nmの発光極大を有しており高蛍光性の赤色色素を含む。しかし、この色素は構造上の制約から、オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端にしか組み込むことができない。

40

【0006】

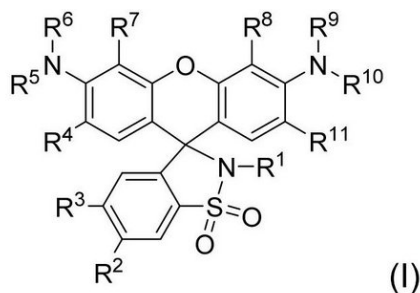
そのため、ホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成条件に適合し、ポリヌクレオチドの任意の位置に組み込むことができ、既存のPCR装置と適合性のある蛍光・吸収極大を持ち、且つPCR用途においてハイエンドポイントの蛍光シグナルを提供する、赤色蛍光色素が求められている。

【発明の概要】

【0007】

一つの側面において、本明細書で提供されるものは、式I

【化 1】



10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される構造を有する化合物であって、ここで、

R^1 は、 C_1 - C_6 アルキル又は L^1 -Xであり、

R^2 は、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、H又はハロゲンであり、

R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_{2-3} アルキレン鎖であり、

20

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_{2-3} アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_{2-3} アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_{2-3} アルキレン鎖であり、

R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

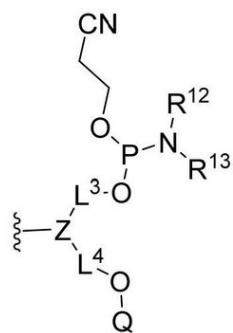
R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

30

L^1 は、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンであり、

Xは、活性エステル、 N_3 、プロピニル、マレイミド、又は $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 、又はXは、

【化 2】



40

であり、ここで、

L^3 及び L^4 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_{2-30} ヘテロアルキレンであり、

Qは、ヒドロキシル保護基であり、

50

Zは、CH、N、NHC(O)N、又はOC(O)Nであり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。

【0008】

いくつかの実施形態では、 R^2 はClであり、且つ R^3 はHである。いくつかの実施形態では、Xは-OP(OCH₂CH₂CN)N(i-Pr)₂である。いくつかの実施形態では、 L^1 は、PEG₂₋₁₀リンカーである。いくつかの実施形態では、 L^1 は、-CH₂CH₂OCH₂CH₂-である。

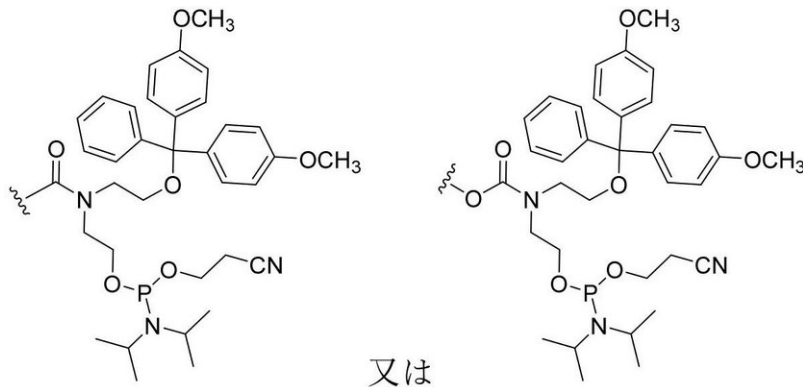
【0009】

いくつかの実施形態では、 R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 と R^5 が結合した原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、及び R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である。いくつかの実施形態では、 R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合されている原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合されている原子を連結するプロピレン鎖であり、及び R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合されている原子を連結するプロピレン鎖である。いくつかの実施形態では、 R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、それぞれメチルである。

【0010】

いくつかの実施形態では、Qは、酸不安定性ヒドロシル保護基である。いくつかの実施形態では、Qは、トリチル基又はジメトキシトリチル基である。いくつかの実施形態では、 C_2 - C_6 アルキレン又は-(OCH₂CH₂)_m-であり、ここで、mは、2~6の整数である。いくつかの実施形態では、 L^3 及び L^4 は、-CH₂CH₂-である。いくつかの実施形態では、Xは

【化3】

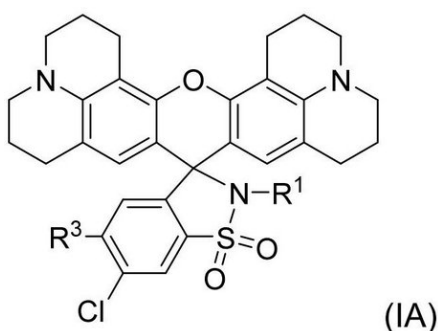


である。

【0011】

いくつかの実施形態では、化合物は、式IA

【化4】



10

20

30

40

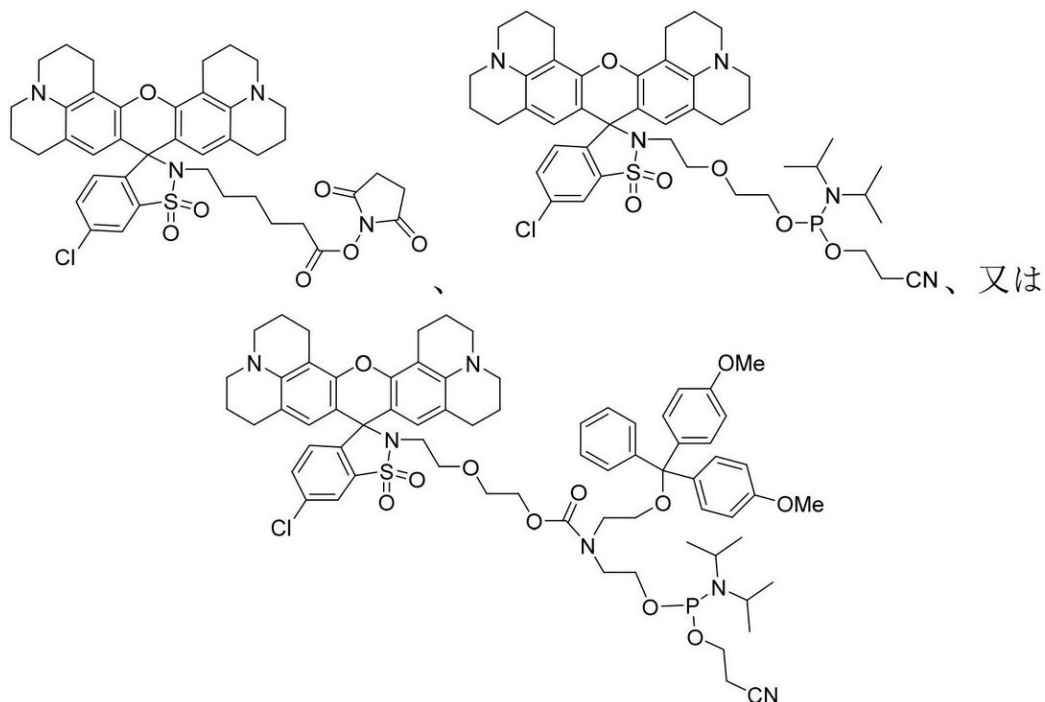
50

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される構造を含み、ここで、 R^1 は L^1X であり、且つ R^3 はH又はハロゲンである。いくつかの実施形態では、Xは $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である。

【0012】

いくつかの実施形態では、化合物は

【化5】



10

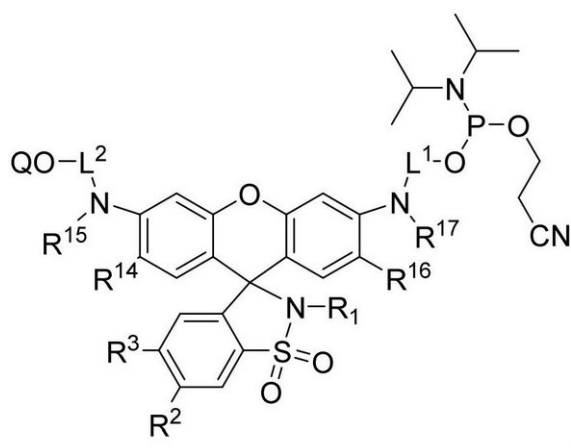
20

である。

【0013】

第二の態様において、本明細書で提供される化合物は、式II

【化6】



30

40

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、
 R^1 は C_1-C_6 アルキルであり、
 R^2 は、H、ハロゲン、又は SO_2NH_2 であり、
 R^3 は、H又はハロゲンであり、
 R^{14} 及び R^{16} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、
 R^{15} 及び R^{17} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、

50

R^{14} 及び R^{15} は、一緒の場合、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

R^{16} 及び R^{17} は、一緒の場合、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

Qは、ヒドロキシル保護基であり、

L^1 及び L^2 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンである。

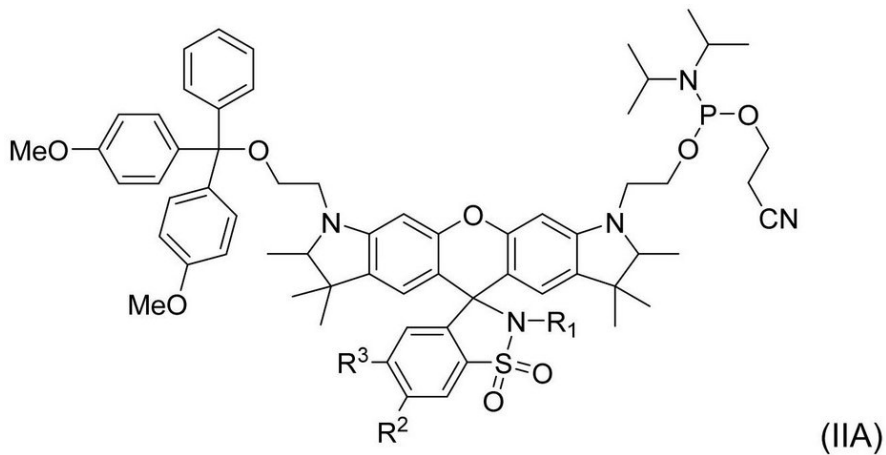
【0014】

いくつかの実施形態では、 R^3 はHである。いくつかの実施形態では、 R^2 はHである。いくつかの実施形態では、 R^2 はClである。

【0015】

いくつかの実施形態では、化合物は、式(IIA)

【化7】

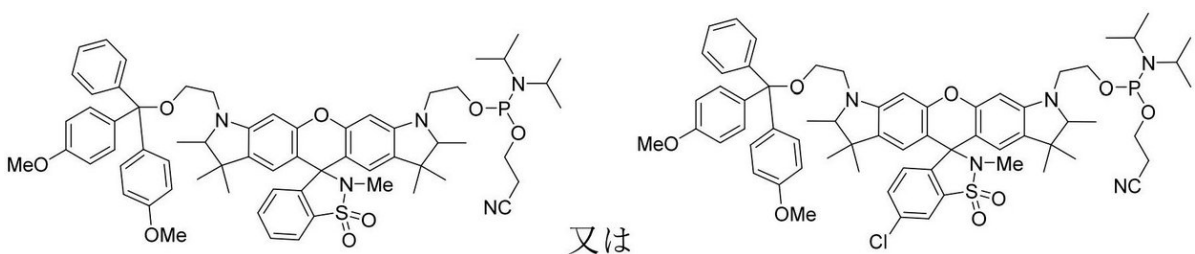


又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、 R^1 は、 C_1 - C_6 アルキルであり、 R^2 は、H、ハロゲン、又は SO_2NH_2 であり、及び R^3 は、H又はハロゲンである。

【0016】

いくつかの実施形態では、化合物は

【化8】



である。

【0017】

第三の態様において、本明細書で提供されるものは、式(III)

10

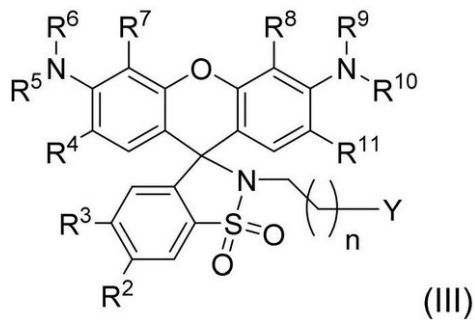
20

30

40

50

【化 9】



10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩の構造を有する化合物であって、ここで、
 R^2 は、H、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、ハロゲン又はHであり、

R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒にいる場合、5員又は6員の不飽和環を形成し、

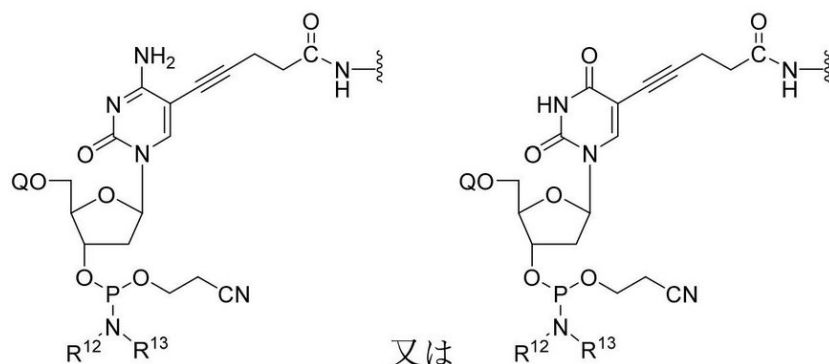
R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒にいる場合、5員又は6員不飽和環を形成し、

Nは、1～9の整数であり、

Yは、

30

【化 10】



40

であり、ここで、

Qはヒドロキシル保護基であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。

【0018】

いくつかの実施形態では、 R^2 はClであり、 R^3 はHである。

【0019】

いくつかの実施形態では、 R^4 及び R^5 は、一緒になって、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10}

50

及び R^{11} が結合されている原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、且つ R^8 及び R^9 は、一緒になって、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である。

【0020】

いくつかの実施形態では、一緒になって、 R^4 及び R^5 は、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^{10} 及び R^{11} は、一緒になって、 R^{10} 及び R^{11} が結合されている原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^6 及び R^7 は、一緒になって、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結するプロピレン鎖であり、 R^8 と R^9 は、一緒になって、 R^8 と R^9 が結合している原子を連結するプロピレン鎖である。

10

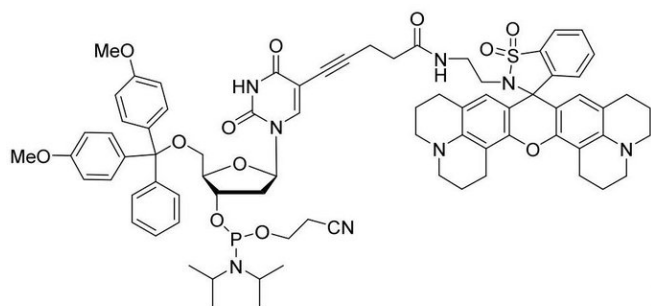
【0021】

いくつかの実施形態では、 Q は、酸-不安定性ヒドロキシル保護基である。いくつかの実施形態では、 Q は、トリチル基又はジメトキシトリチル基である。さらに他の実施形態では、 R^{12} 及び R^{13} は、それぞれイソプロピルである。

【0022】

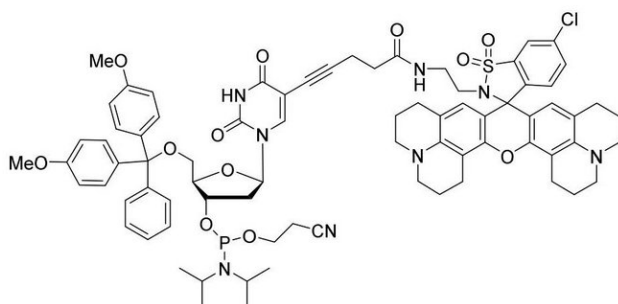
いくつかの実施形態では、化合物は

【化11】



20

又は



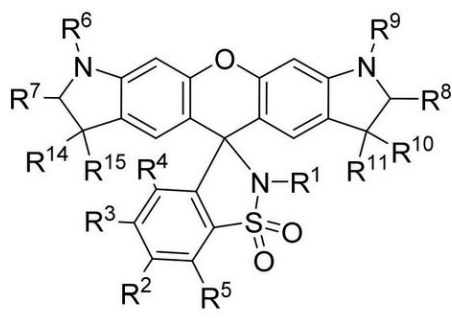
30

である。

【0023】

第四の態様において、本明細書に提供されるのは、式VI

【化12】



40

(VI)

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、 R^1 は、 L^1-X であり、

50

R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、独立して、H、ハロゲン、 C_1 - C_6 アルキル、又は SO_2NH_2 であり

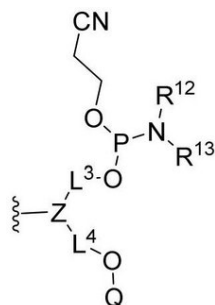
R^6 及び R^9 は、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^7 、 R^8 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{14} 、及び R^{15} は、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

L^1 は、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンであり、

Xは、活性エステル、 N_3 、プロピニル、マレイミド、又は $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 、又はXは、

【化 1 3】



であり、ここで、

L^3 及び L^4 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Qは、ヒドロキシル保護基であり、

Zは、CH、N、 $NHC(O)N$ 、又は $OC(O)N$ であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。

【0 0 2 4】

式VIのいくつかの実施形態において、 R^7 、 R^8 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{14} 、及び R^{15} はメチルである。特定の実施形態では、Xは、 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である。いくつかの実施形態では、 L^1 は、PEG₂₋₁₀リンカーであり、且つ他の実施形態では、 L^1 は、 $-CH_2CH_2OC H_2CH_2-$ である。いくつかの実施形態では、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、Hである。

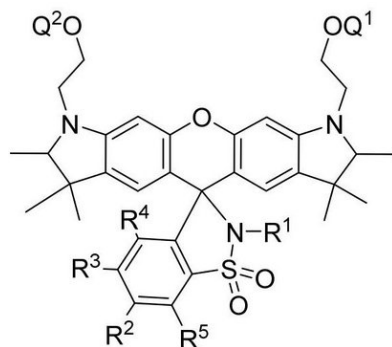
【0 0 2 5】

いくつかの実施形態において、 R^6 は、OH又は C_1 - C_6 アシルオキシで任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、例えば、 R^6 は、OH又はOAcで置換されたエチルである。いくつかの実施形態では、 R^9 は、OH又は C_1 - C_6 アシルオキシで任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、例えば、 R^9 は、OH又はOAcで置換されたエチルである。

【0 0 2 6】

式VIのいくつかの実施形態では、化合物は

【化 1 4】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩であり、ここで、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、式VIについて記載した通りであり、 Q^1 及び Q^2 は、独立して、H又は C_1 - C_6 アシルである

。

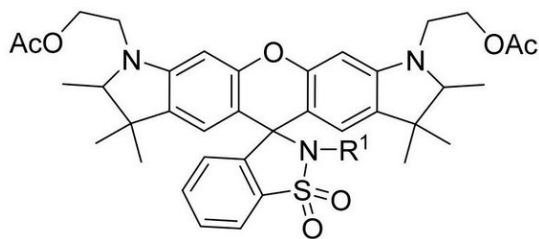
【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 はHである。いくつかの実施形態では、 Q^1 及び Q^2 はアセチルである。

【 0 0 2 8 】

式VIのいくつかの実施形態では、化合物は

【 化 1 5 】



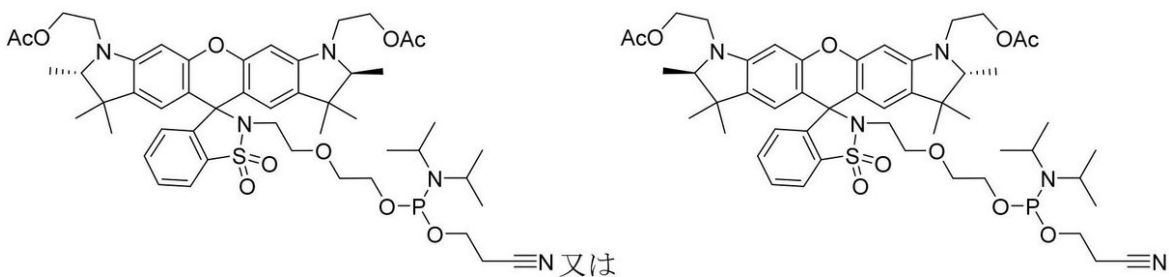
10

であり、ここで、 R^1 は、式VIについて定義した通りである。

【 0 0 2 9 】

式VIのいくつかの実施形態では、化合物は

【 化 1 6 】



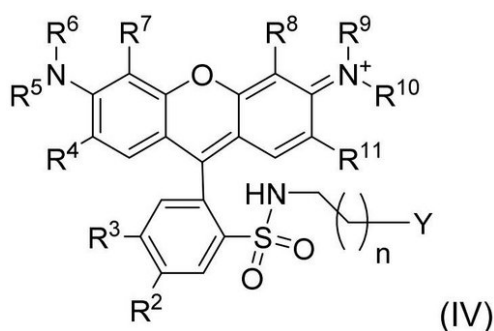
20

である。

【 0 0 3 0 】

第5の態様において、本明細書で提供されるのは、式IV

【 化 1 7 】



30

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩の化合物を含む標識ポリヌクレオチドであって、ここで、

R^2 は、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、H又はハロゲンであり、

R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

50

R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖であり、

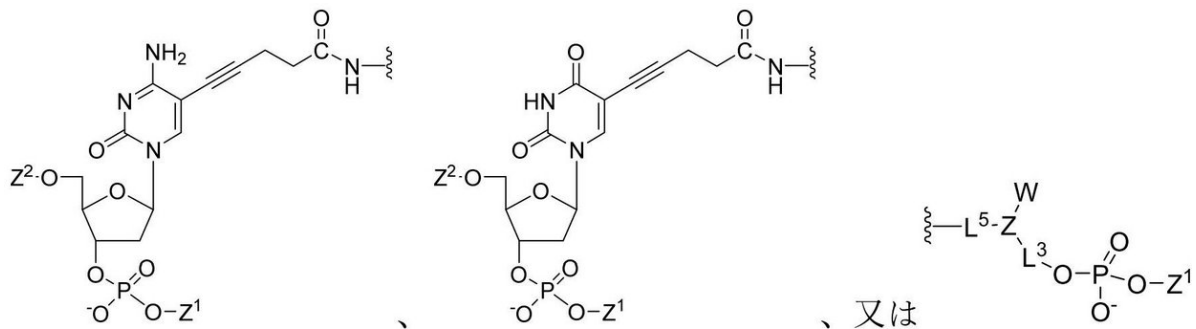
R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

Nは、1～9の整数であり、

Yは、

【化18】



であり、ここで、

波線は、式IIIへの結合点であり、

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

Wは、H又は L^4 -O- Z^2 であり、

L^3 、 L^4 、及び L^5 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Zは、CH、N、NHC(O)N、又はOC(O)Nであり、

Z^1 は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドであり、及び

Z^2 は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又はHである。

【0031】

いくつかの実施形態では、 R^2 はClであり、 R^3 はHである。他の実施形態では、 R^4 及び R^5 は、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である。 R^{10} 及び R^{11} は、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖である。 R^6 及び R^7 は、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖であり、 R^8 及び R^9 は、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する、任意に置換された C_3 アルキレン鎖である。

【0032】

いくつかの実施形態において、標識ポリヌクレオチドは、5'-ヌクレアーゼPCRプローブである。いくつかの実施形態では、標識ポリヌクレオチドは、蛍光消光剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、標識ポリヌクレオチドは、固体支持体に結合している。いくつかの実施形態では、固体支持体は、制御ポアガラスビーズ、ポリスチレンビーズ、磁性ビーズ、又はマイクロウェルプレートである。

【0033】

第五の態様では、リガンドと本明細書に開示の化合物を、化合物をリガンドに共有結合させるのに十分な条件下の適切な溶媒中で接触させ、それによって標識コンジュゲートを形成する工程を含む、リガンドの標識コンジュゲートの調整方法が提供される。

【0034】

いくつかの実施形態では、リガンドは、ポリヌクレオチド、蛋白質、ペプチド、ポリサ

10

20

30

40

50

ツカライド、エチレン性骨格を有するポリマー、又は固体支持体である。いくつかの実施形態では、リガンドはポリヌクレオチドである。他の実施形態では、化合物をリガンドに共有結合させるのに十分な条件は、ホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成条件である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

本発明の前記の態様及び付随する多くの利点は、添付の図面と併せて以下の詳細な説明を参照することにより、よりよく理解され得る。

【 0 0 3 6 】

【図 1 A】図1Aは、Texas Red^(R)色素で標識された例示的なポリヌクレオチド配列番号1の励起及び蛍光スペクトルである。(Tx Red)-TCAGAGTACCTGAAACA; (オリゴA) Ex/Em max = 598 nm/616 nm。この図では、x軸はnm、及びy軸は蛍光単位である。

10

【図 1 B】図1Bは、色素S7で標識された例示的なポリヌクレオチド配列番号1の励起及び蛍光スペクトルである。(S7)-TCAGAGTACCTGAAACA (オリゴB); Ex/Em = 598 nm/616 nm。この図において、x軸はnm、y軸は蛍光単位である。

【図 1 C】図1Cは、スルホローダミン色素S6で標識された例示的なポリヌクレオチド配列番号1の励起及び蛍光スペクトルを示す。(S6)-TCAGAGTACCTGAAACA (オリゴC); Ex/Em max = 568/589 nm。この図において、x軸はnm、y軸は蛍光単位である。

【図 1 D】図1Dは、スルホローダミン色素S10aで5'-標識された例示的なポリヌクレオチド配列番号1の励起及び蛍光スペクトルを示す。Ex/Em max = 568/587 nm。

20

【図 2 A】図2Aは、プライマー配列番号4及び5を用いたモデルPCR反応における、Texas Red^(R)色素 (オリゴD) で標識された配列番号2を有するプローブと、例示的な色素 (オリゴE) で標識された配列番号2を有するプローブの性能を比較したPCR曲線を示している。この図において、x軸はCt、y軸は蛍光単位である。

【図 2 B】図2Bは、プライマー配列番号6及び7を用いたモデルPCR反応における、Texas Red^(R)色素 (オリゴF) で標識された配列番号3を有するTexas Red^(R)色素標識プローブと、例示的な色素 (オリゴG) で標識された配列番号3を有するプローブの性能を比較したPCR曲線を示す。この図において、x軸はCtであり、y軸は蛍光単位である。

【図 3 A - 3 B】図3A及び3Bは、ラセミ例示的化合物S10 (3A) 及びその異性体S10a (3B) で標識された例示的オリゴヌクレオチドのHPLCトレースである。この図において、x軸は分であり、y軸は260nmにおける吸光度である。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 7 】

本明細書に提供されるのは、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介してオリゴヌクレオチドに組み込むことができるスルホローダミン色素ホスホラミダイトである。さらに、他の反応性基を含むスルホローダミン色素が提供される。

【 0 0 3 8 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲全体を通して、「含む (comprise) 」及び「含む (include) 」という言葉、及び「含む (comprises) 」、「含む (comprising) 」、「含む (includes) 」、「含む (including) 」などのそのバリエーションは、文脈が許す限り、特に言及されていない他の要素又は整数を含む可能性を伝えることを意図している。本明細書で使用する「からなる」という用語は、「からなる」というフレーズに続くものを含み、それに限定されることを意味することが意図されている。従って、「からなる」というフレーズは、列挙された要素が必須又は義務的であり、他の要素が存在しなくてもよいことを示している。「本質的にからなる」という用語は、組成物、方法又は構造が追加の成分、工程及び/又は部品を含んでもよいが、追加の成分、工程及び/又は部品が、請求された組成物、方法又は構造の基本的かつ新規な特性を実質的に変化させない場合にのみ、その追加の成分、工程及び/又は部品を含んでもよいことを意味する。

40

【 0 0 3 9 】

用語「a」、「an」、「the」及び類似の用語は、本明細書に別段の指示がない限り、又

50

は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーするように解釈される。

【 0 0 4 0 】

本明細書に記載されている全ての方法は、本明細書に別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行できる。本明細書で提供されるあらゆる例示、又は例示的な言語（例えば、「などの」）の使用は、単に本発明をよりよく表現することを意図しており、別の方法で主張される本発明の範囲に制限を与えるものではない。本明細書に開示の本発明の代替的な要素又は実施形態のグループは、制限として解釈されるべきではない。各グループのメンバーは、個別に、又は本明細書に見出されるグループの他のメンバー又は他の要素との任意の組み合わせで参照され、主張され得る。便宜上及び/又は特許性の理由から、グループの1つ以上の構成要素がグループに含まれるか、又はグループから削除されることが予期される。そのような包含又は削除が発生した場合、本明細書では、修正されたグループを含むものとみなされ、従って、添付の特許請求の範囲で使用される全てのマーカッシュグループの書面による説明を満たす。

10

【 0 0 4 1 】

核酸又はオリゴヌクレオチドは、別段の記載がない限り、5'から3'の方向で左から右に記載されている。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される「増幅」という用語は、限定されないが、線形又は指数関数的に核酸配列を増幅するための広範な技術を含む、典型的にはテンプレートに依存した方法で、少なくとも1つの標的核酸又はその配列相補体の少なくとも部分的な配列が生産される任意の手段を指す。非限定的な例示的増幅方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、マルチプレックスPCR、定量的PCR（Q-PCR）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、転写媒介増幅（TMA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、鎖置換増幅（SDA）、リガーゼ検出反応（LDR）、マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（MLPA）、ライゲーションとそれに続くQ-レプリカーゼ増幅、プライマーエクステンション、鎖置換増幅（SDA）、超分岐鎖置換増幅、多重置換増幅（MDA）、核酸ストランドベース増幅（NASBA）、ツーステップマルチプレックス増幅、デジタル増幅などを含む。このような技術の説明は、他の文献の中では、Ausubel et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, Diffenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (2002); and Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)に見られる。

20

30

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される用語「塩基」は、相補的なヌクレオチド塩基又はヌクレオチド塩基アナログ、例えば、プリン、7-デアザプリン、又はピリミジンと水素結合、例えば、ワトソン-クリック型水素結合を形成することが可能な含窒素複素環部位を意味する。典型的な塩基は、天然に生じる塩基であるアデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシルである。また、塩基は、デアザアデニン、7-デアザ-8-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、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、5-メチルシトシン、イソサイトシン、シュードイソサイトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-クロロ-6-アミノプリン、キサンチン、ヒポキサンチンなどのような天然に生じる塩基のアナログを含む。

40

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される用語「相補的」とは、ポリヌクレオチド配列が互いに塩基対にハイブリダイズする能力を指す。塩基対は、典型的には、逆平行ポリヌクレオチド鎖中のヌクレオチド単位間の水素結合によって形成される。相補的なポリヌクレオチド鎖は、ワトソン-クリック様式（例えば、A対T、A対U、C対G）で塩基対を形成することができ、又は

50

デュプレックスを形成することを可能にする他の任意の様式で塩基対を形成することができる。ターゲット配列に対するプローブ配列の「相補性」のパーセンテージは、ターゲットの配列又はターゲットの配列の相補体に対するプローブ配列の「同一性」のパーセンテージである。プローブと標的配列との間の「相補性」の程度を決定する際、「相補性」の程度は、プローブの配列と標的配列の配列又は標的配列の配列の相補体との間の、最もよく一致するパーセンテージ同一性として表される。例示的なプローブは、本明細書に記載されているようなポリヌクレオチドである。

【0045】

本明細書で使用される用語「デュプレックス」とは、相補的（又は部分的に相補的）な一本鎖ポリヌクレオチド、例えば、DNA、RNA、LNA、又はペプチド核酸（PNA）をアニーリング（ハイブリダイズ）することによって形成される二本鎖ハイブリダイゼーション複合体を指す。

10

【0046】

本明細書で使用される「蛍光消光（fluorescence quenching）」とは、蛍光サンプル、即ち蛍光ポリヌクレオチドプローブの蛍光強度を減少させる任意のプロセスを指す。様々な分子相互作用が消光をもたらし得る。非限定的な例としては、励起状態反応、分子再配列、エネルギー移動、基底状態複合体形成、及び衝突消光を含む。

【0047】

本明細書で使用される「ハロゲン」は、F、Cl、Br、又はIを意味する。

【0048】

20

本明細書において「ハイブリダイズ」及び「ハイブリダイゼーション」という用語は、いくつかの実施形態ではストリンジェントな条件下で、特定のヌクレオチド配列への核酸分子の選択的な結合、デュプレキシング、又はアニーリングを行う「特異的ハイブリダイゼーション」に関連して使用される。用語「ストリンジェントな条件」は、プローブがその標的配列に対して選択的にハイブリダイズし、他の配列に対してはより小さい程度で、又は全くハイブリダイズしない条件を指す。核酸ハイブリダイゼーションの文脈における「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」及び「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、配列依存性であり、異なる環境パラメータの下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範なガイドは、例えば、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, Ch. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,"* Elsevier, NYに見られる。ハイブリダイゼーション強度としても知られる標的配列に対するポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの程度は、当該技術分野で周知の方法によって決定される。好ましい方法は、所与のハイブリッドデュプレックスの T_m を決定することである。これは、形成されたデュプレックスを溶液中で徐々に増加する温度にさらし、デュプレックスの変性を、例えば、変性に伴う塩基対のアンスタックに伴って増加する紫外線の吸光度によって監視することによって達成できる。 T_m は、一般に、DNA鎖の半分が一本鎖（ssDNA）状態になる温度として定義される。 T_m は、ハイブリダイズされた相補鎖配列の長さ、それらの特定のヌクレオチド配列、塩基組成、塩基修飾、相補鎖の濃度などの様々なパラメータに依存する。

30

40

【0049】

本明細書で使用される用語「標識」及び「検出可能な標識」は言い換え可能なものとして使用され、生体分子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、又はポリヌクレオチドに結合すると、そのような生体分子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、又はポリヌクレオチドを適切な検出手段によって検出可能な状態にする部分を指す。例示的な標識には、フルオロフォア、クロモフォア、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光化合物、磁気標識、マイクロスフィア、コロイド金属、免疫学的標識、リガンド、酵素などを含む。

【0050】

本明細書で使用される「修飾ヌクレオチド塩基」又は「修飾塩基」という用語は、天然

50

に生じる塩基の構造を持たず、従って、天然に生じない塩基を指す。本明細書で使用される「修飾糖」という用語は、天然に生じる糖、例えば、リボースやデオキシリボース糖のような構造を持たず、天然に生じない糖又は糖アナログを指す。

【0051】

ここでいう「天然に生じる」とは、天然に生じるヌクレオチド配列を有し、塩基、糖、ヌクレオシド、ヌクレオチドなどの天然に生じる成分のみで構成されるRNA又はDNA分子（一本鎖又は二本鎖）を指す。

【0052】

本明細書で使用する「ヌクレオシド」という用語は、本明細書で言及したタイプの窒素性塩基が、本明細書で言及したタイプの糖に結合、例えば、 β -グリコシド結合を介してリボース又はデオキシリボース糖に結合していることからなる分子を指す。ヌクレオシドの例としては、アデノシン、シチジン、グアノシン、チミジン、ウリジン、及びイノシンを含む。

【0053】

本明細書で使用する「ヌクレオチド」という用語は、独立したモノマーとして、又はポリヌクレオチド内のサブユニットとしての、ヌクレオシドのリン酸エステルを意味する。ヌクレオチドモノマーには、例えば、ヌクレオチド5'-モノリンホスフェイト、5'-ジホスフェイト、5'-トリホスフェイト、及び3'-モノホスフェイトを含む。ヌクレオチドトリホスフェイトは、リボース糖の構造的特徴を特に示すために、「NTP」、「dNTP」（2'-デオキシペントース）又は「dddNTP」（2', 3'-ジデオキシペントース）と表記されることがある。「ヌクレオチド5'-トリホスフェイト」は、5'位置にトリホスフェイトエステル基を有するヌクレオチドを意味する。トリホスフェイトエステル基は、1つ以上のリン酸酸素原子に対する硫黄置換、例えば、 α -チオヌクレオチド5'-トリホスフェイトを含んでもよい。ヌクレオチドモノホスフェイト、ジホスフェイト又はトリホスフェイトは、核酸又は核酸中間体の修飾を触媒する核酸処理酵素の基質として機能してもよい。

【0054】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、広義には、主に又は全体的に約2～約300個の天然に生じる又は修飾されたヌクレオチドモノマー単位、例えば、A、C、G、T、又はU塩基で置換されたデオキシリボース又はリボース糖環で構成される一本鎖鎖を意味し、これらは、従来のホスフェイト骨格部分によって連結される。より詳細には、この用語は、上述のサイズ範囲のデオキシリボヌクレオチドの一本鎖を指す。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾された塩基及び/又は糖を含むことができる。ヌクレオチドモノマー単位に加えて、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の検出可能な標識及び/又は1つ以上の反応性基を組み込むことができる。

【0055】

本明細書で使用される「複数」という用語は1より大きいことを意味する。

【0056】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、一般に約10から約300のヌクレオチドモノマーユニットを含むオリゴヌクレオチドを指す。ヌクレオチドモノマー単位に加えて、ポリヌクレオチドは、1つ以上の検出可能な標識及び/又は1つ以上の反応性基を組み込むことができる。

【0057】

本明細書で使用される「プライマー」という用語は、標的核酸鎖に相補的なポリヌクレオチド鎖を合成するための出発点として有効なポリヌクレオチド又は修飾ポリヌクレオチドを指す。例えば、PCRで使用するためのプライマーは、フォワードプライマーとリバースプライマーを含み、フォワードプライマーは、標的核酸ストランドの領域に相補的な配列を含み、相補的なストランドの合成を誘導する。リバースプライマーは、反対側のストランドに相補的な配列を含み、標的核酸ストランドの反対側のストランドに沿って合成を誘導する。

【0058】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「プローブ」という用語は、標的核酸配列の領域に相補的な配列を含む標識オリゴヌクレオチド又は標識修飾オリゴヌクレオチドを指し、プローブが標的配列とデュプレックスを形成し、標的配列の領域の存在を示す検出可能なシグナルを生成することを可能にする。検出可能なシグナルは、直接又は間接的に、ハイブリダイゼーション中又はハイブリダイゼーション後に生成される。5'-ヌクレアーゼPCRにおけるプライマー伸長中などのいくつかの用途へ適用される場合、プローブは、プローブのポリメラーゼ媒介伸長を防ぐために、伸長可能な3'ヒドロキシル基を欠く。特定の実施形態では、プローブは、TaqMan^(R)プローブ、TaqMan MGB^(R)プローブ、Pleiades^(R)プローブ、分子ビーコン（例えば、Tyagi, Sanjay & Kramer, Fred. (2012) Molecular Beacons in Diagnostics. F1000 medicine reports. 4. 10. 10.3410/M4-10に記載のもの）などを含む。

10

【0059】

本明細書で使用される「保護基 (protecting group)」、「保護基 (protective group)」又は「保護形態 (protected form)」という用語は、機能性を保持するため、及び/又は後続の化学反応において化学選択性を得るために意図された官能基（例えば、ヒドロキシル）の不安定な化学修飾を指す。保護基は、脱保護処理（例えば、酸処理）によって最終製品から除去される。

【0060】

本明細書で使用される「固体支持体」という用語は、粒子（例えば、ビーズ）、繊維、モノリス、膜、フィルター、プラスチックストリップ、アレイ、マイクロウェルプレートなどを含む任意の不溶性材料を指す。いくつかの実施形態では、固体支持体は、ポリスチレン及び制御ポアガラス（CPG）などのホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成に適した固体支持体である。

20

【0061】

スルホローダミン色素及びそのホスホラミダイト

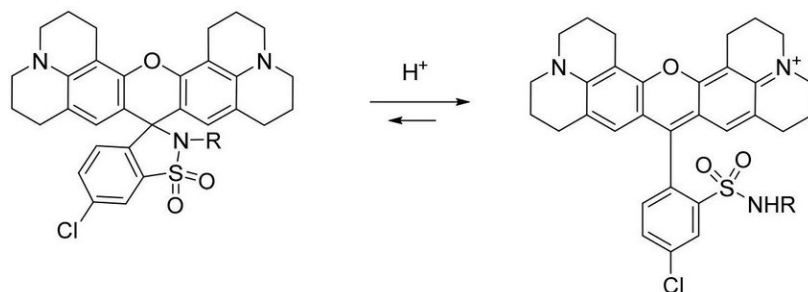
一態様において、本明細書に提供されるのは、一つ以上の反応性基、例えば、ホスホラミダイト基を含むスルホローダミン色素である。

【0062】

特定の実施形態では、本明細書に開示の色素は、スルファム部分を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の色素は、1つの例示的な化合物として以下に示すように、オープン形態又はクローズド形態で存在できる。

30

【化19】



40

「クローズド」（スピロ）形態

「オープン」形態

【0063】

それらの環状又は「クローズド」形態では、本明細書の開示のスルホローダミン色素及びそのホスホラミダイトは、無色であり、非蛍光である。しかしながら、プロトン化、例えば、酸性条件への曝露に伴い、環状形態は、蛍光を有する「オープン」形態に変換できる。本明細書で使用される本明細書に開示の色素を参照する場合、「スルホローダミン色素」という用語は、オープン形態のみが蛍光であっても、オープン蛍光形態とそれに対応するクローズド形態の両方を含む。

【0064】

50

スルホローダミン色素に由来するスルタムの可逆的なオープン-クローズドのpH依存性相互変換に関連する、有色-無色転移のそのような現象は、当技術分野で知られている（例えば、Corrie J.E.T. and Munasinghe V.R. *Dyes and Pigments* 79 (2008)参照）。生体分子の標識に使用されるスルホローダミンBクロリドのようなスルホローダミン色素のある種の反応性誘導体は、一般に、2つのスルホニルクロリド異性体、オルト異性体及びパラ異性体の混合物として商業的サプライヤーから入手可能であるが、キサンチリウム系に対してオルトのスルホニルクロリドを有する異性体のみが、上記のような環鎖プロセスを経る環状スルホンアミド（スルタム）化合物を形成することが可能である。このような色素のオルト異性体は、オルト異性体の蛍光がpH依存性であるため、一般に生物学的用途には好ましくないことが報告されている（例えば、Corrie J.E.T. et al. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001): 186-194参照）。驚くべきことに、本明細書の開示の色素のポリヌクレオチドコンジュゲートは、当技術で開示されている色素のコンジュゲートとは異なり、PCR用途に関連するpH範囲、例えば、約6.5～約8.5においてpH依存性ではない蛍光を有し、BHQ-2消光剤（Biosearch）のような従来の消光剤を用いて良好に消光でき、高いエンドポイント蛍光（EPF）を生成できることを、本発明者らは発見した。本明細書で使用するエンドポイント蛍光とは、消光したプローブと開裂したプローブの蛍光の差、又は消光したプローブとハイブリダイズしたプローブの蛍光の差である。

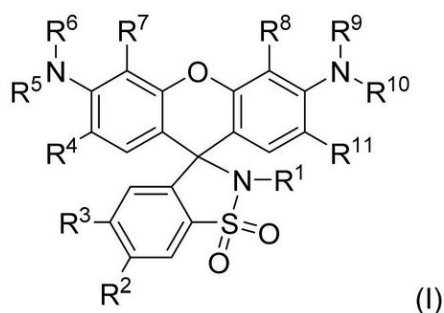
【0065】

特定の実施形態では、本明細書に開示のスルホローダミン色素の「オープン」形態は、驚くべきことに、スルホローダミン101色素又はTAMRA色素に匹敵する又は同等の発光及び吸収極大のようなスペクトル特性を有する。しかしながら、極性スルホン酸基を含み、従って、ホスホラミダイト試薬の形態で調製することができないスルホローダミン101型色素とは異なり、本明細書に開示のスルホローダミン色素は、そのクローズド形態（スルタム）では非極性であり、ホスホラミダイト自動合成及び/又はバイオコンジュゲーション条件に適合する有機溶媒に容易に溶解する。また、本明細書に開示の色素のこの有利な特性はシリカゲルカラムクロマトグラフィーのような従来の実験室技術による精製を容易にすることを可能にする。

【0066】

いくつかの実施形態では、色素は、式I

【化20】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される構造を含み、ここで、

R¹は、C₁-C₆アルキル又はL¹-Xであり、

R²は、ハロゲン又はSO₂NH₂であり、

R³は、H又はハロゲンであり、

R⁴、R⁷、R⁸、及びR¹¹は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換されたC₁-C₆アルキルであり、

R⁵、R⁶、R⁹、及びR¹⁰は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換されたC₁-C₆アルキルであり、

R⁴及びR⁵は、一緒の場合、R⁴及びR⁵が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

R⁶及びR⁷は、一緒の場合、R⁶及びR⁷が結合している原子を連結する任意に置換されたC

2-C₃アルキレン鎖であり、

R⁸及びR⁹は、一緒の場合、R⁸及びR⁹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

R¹⁰及びR¹¹は、一緒の場合、R¹⁰及びR¹¹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

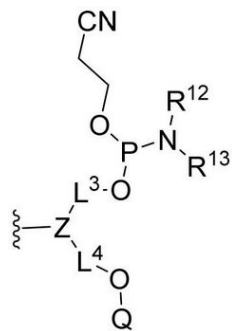
R⁵及びR⁶は、R⁵及びR⁶が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R⁹及びR¹⁰は、R⁹及びR¹⁰が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

L¹は、任意に置換されたC₂-C₁₀アルキレン又は任意に置換されたC₂-C₂₀ヘテロアルキレンであり、

Xは、活性エステル、N₃、プロピニル、マレイミド、又は-O-P(OCH₂CH₂CN)NR¹²R¹³、又はXは、

【化 2 1】



であり、ここで、

L³及びL⁴は、独立して、任意に置換されたC₂-C₁₀アルキレン、又は任意に置換されたC₂-C₃₀ヘテロアルキレンであり、

Qは、ヒドロキシル保護基であり、

Zは、CH、N、NHC(O)N、又はOC(O)Nであり、及び

R¹²及びR¹³は、独立して、任意に置換されたC₁-C₆アルキルである。

【0 0 6 7】

いくつかの実施形態では、式Iは、1つの反応性基を含む。他の実施形態では、式Iは、直交的な2つの反応性基を含む。さらに他の実施形態では、ホスホラミダイト基のような反応性基に加えて、式Iは、トリチル基又はジメトキシトリチル基のような酸不安定性保護基で保護されたヒドロキシル基を構成する。

【0 0 6 8】

式Iの特定の実施形態では、R²はClであり、且つR³はHである。他の実施形態では、R⁴及びR⁵は、R⁴及びR⁵が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖を形成し、R¹¹及びR¹⁰は、R¹¹及びR¹⁰が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖を形成し、R⁶及びR⁷は、R⁶及びR⁷が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖を形成し、及びR⁸及びR⁹は、R⁸及びR⁹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₃アルキレン鎖を形成する。いくつかの実施形態では、R¹はL¹Xである。他の実施形態では、R¹はメチル又はエチルである。いくつかの実施形態では、C₃アルキレンはプロピレンである。

【0 0 6 9】

反応性部分がホスホラミダイトである場合、XはOP(OCH₂CH₂CN)N(i-Pr)₂である。L¹は、N、O、S、P、及びそれらの組み合わせから選択される1つ以上のヘテロ原子を含み得る。いくつかの実施形態では、L¹は、PEG₂₋₁₀リンカーである。他の実施形態では、L¹は-CH₂CH₂OCH₂CH₂-である。

【0 0 7 0】

特定の実施形態では、 R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、 C_1 - C_3 アルキル、例えば、メチルである。

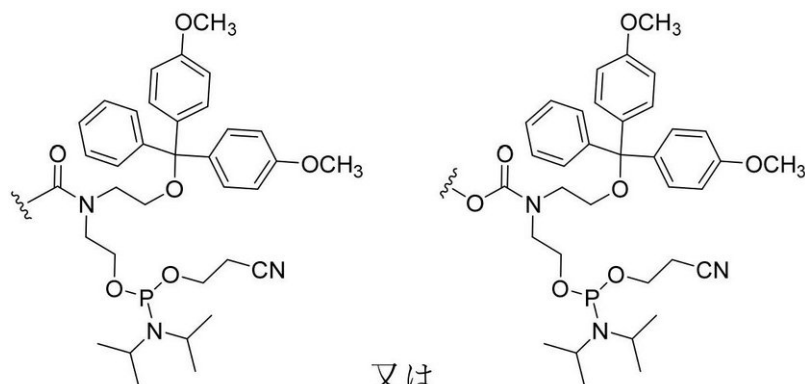
【0071】

一実施形態では、 L^3 及び L^4 は、独立して、 C_2 - C_6 アルキレン又は $-(OCH_2CH_2)_m-$ であり、ここで、 m は2～6までの整数である。他の実施形態では、 L^3 及び L^4 は、 $-CH_2CH_2-$ である。

【0072】

特定の実施形態では、 X は

【化22】



10

である。

【0073】

本明細書に示される式中、 Q はヒドロキシル保護基を表す。このような保護基の例は、当技術分野で知られている（例えば、Peter G. M. Wuts, *Greene's protective groups in organic synthesis* (2006)参照）。好適なヒドロキシル保護基には、塩不安定性基及び酸不安定性基を含む。いくつかの実施形態では、 Q は、トリチル基又はジメトキシトリチル基のような、ホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成条件に適合するヒドロキシル保護基である。

【0074】

また、他の反応性部分又は基を含むスルホローダミン色素も本明細書の開示の範囲内であり、例えば、第一級アミンと化学結合を形成し得る反応性基を含む。そのような反応性基としては、イソチオシアネート類、イソシアネート類、アシルアジド類、NHSエステル類、スルホニルクロライド類、アルデヒド類、グリオキサール類、エポキシド類、オキシラン類、カルボネート類、アリールハライド類、イミドエステル類、カルボジイミド類、アンヒドリド類、ニトロフェニルエステル、及びフルオロフェニルエステル類を含む。好ましくは、反応性基は活性エステルである。本明細書で使用する「活性エステル」は、アミドを形成するアミノ基と反応し得るカルボン酸のエステルである。活性エステルとしては、 N -ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステル類、ペンタフルオロフェニルエステル類、テトラフルオロフェニルエステル類、及び p -ニトロフェニルエステル類を含む。また、*in situ*で生成される（例えば、カルボン酸にカルボジイミドなどの活性化剤を添加することにより）活性エステルも本明細書に含まれる。

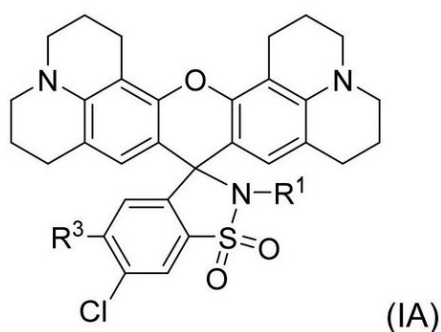
30

40

【0075】

いくつかの実施形態において、スルホローダミン色素は、式IA

【化 2 3】



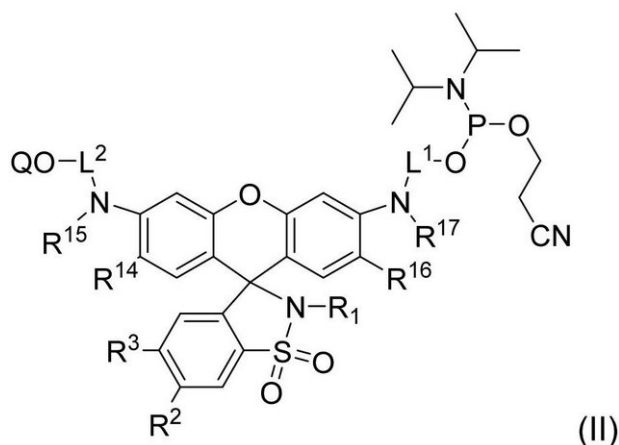
10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される構造を含み、ここで、 R^1 は L^1X であり、且つ R^3 はH又はハロゲンである。式IAのいくつかの実施形態において、 R^1 は、 $CH_2CH_2OCH_2CH_2OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である。

【0076】

いくつかの実施形態において、スルホローダミン色素ホスホラミダイトは、式II

【化 2 4】



20

で表され、ここで、

R^1 は C_1 - C_6 アルキルであり、

R^2 は、H、ハロゲン、又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、H又はハロゲンであり、

R^{14} 及び R^{16} は、単独で、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{15} 及び R^{17} は、単独で、独立して、H又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{14} 及び R^{15} は、一緒になって、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

R^{16} 及び R^{17} は、一緒になって、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

Qは、ヒドロキシル保護基であり、

L^1 及び L^2 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンである。

40

【0077】

式IIのいくつかの実施形態では、 R^3 はHである。他の実施形態では、 R^2 はHである。さらに他の実施形態では、 R^2 はClである。

【0078】

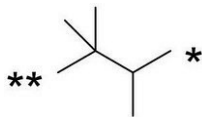
他の実施形態では、 R^{14} 及び R^{15} は、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結して、任意に1、2又は3個のメチル基で置換された、 C_2 アルキレン鎖を形成し、さらに他の実施形態

50

では、 R^{16} 及び R^{17} は、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結して、任意に1、2又は3個のメチル基で置換された、 C_2 アルキレン鎖を形成する。特定の実施形態では、 R^{14} 及び R^{15} は、3個のメチル基で置換されたエチレン鎖を形成し、 R^{16} 及び R^{17} は、3個のメチル基で置換されたエチレン鎖を形成する。

【0079】

特定の実施形態では、 R^{14} 及び R^{15} は、一緒になって、 R^{16} 及び R^{17} は、一緒になって、



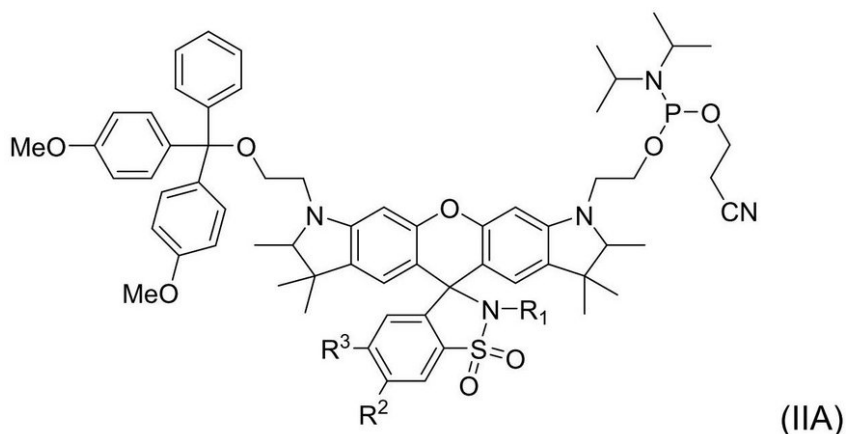
10

であり、*は窒素原子との結合点を示し、且つ**は芳香族炭素原子との結合点を示す。

【0080】

特定の実施形態では、化合物は、式(IIA)

【化25】



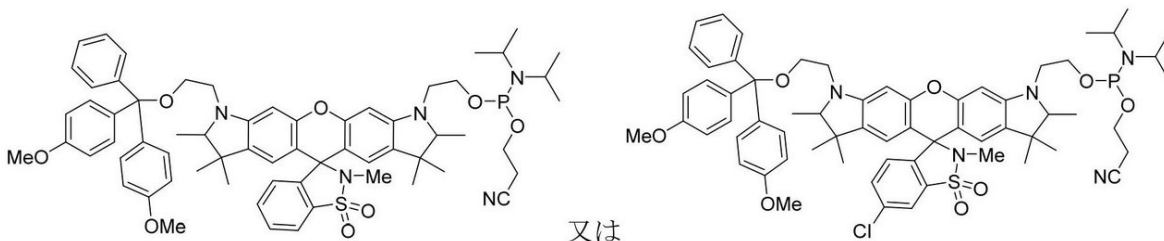
20

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される。

【0081】

特定の実施形態では、化合物は、

【化26】



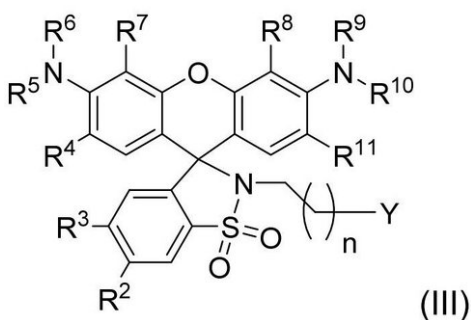
又は

である。

【0082】

いくつかの実施形態では、スルホローダミン色素ホスホラミダイトは、式(III)

【化27】

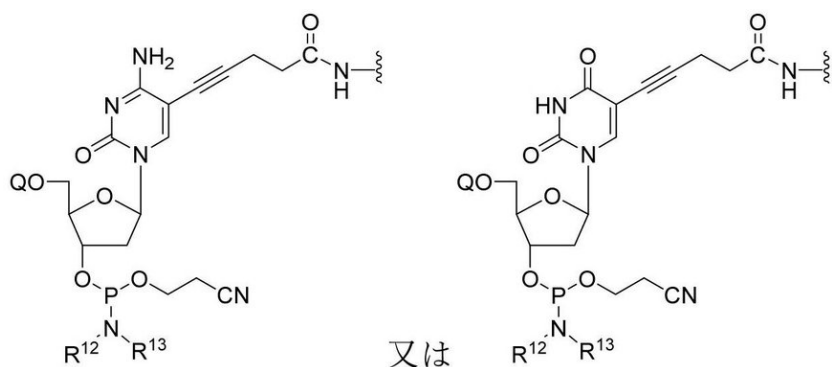


(III)

40

50

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、
 R^2 は、H、ハロゲン又は SO_2NH_2 であり、
 R^3 は、ハロゲン又はHであり、
 R^4 、 R^7 、 R^8 、及び R^{11} は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換された $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルキルであり、
 R^5 、 R^6 、 R^9 、及び R^{10} は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換された $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルキルであり、
 R^4 及び R^5 は、一緒の場合、 R^4 及び R^5 が結合している原子を連結する任意に置換された $\text{C}_2\text{-C}_3$ アルキレン鎖であり、
 R^6 及び R^7 は、一緒の場合、 R^6 及び R^7 が結合している原子を連結する任意に置換された $\text{C}_2\text{-C}_3$ アルキレン鎖であり、
 R^8 及び R^9 は、一緒の場合、 R^8 及び R^9 が結合している原子を連結する任意に置換された $\text{C}_2\text{-C}_3$ アルキレン鎖であり、
 R^{10} 及び R^{11} は、一緒の場合、 R^{10} 及び R^{11} が結合している原子を連結する任意に置換された $\text{C}_2\text{-C}_3$ アルキレン鎖であり、
 R^5 及び R^6 は、 R^5 及び R^6 が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、
 R^9 及び R^{10} は、 R^9 及び R^{10} が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、
 N は、1～9の整数であり、
 Y は、
【化 2 8】



であり、ここで、
 Q はヒドロキシル保護基であり、及び
 R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された $\text{C}_1\text{-C}_6$ アルキルである。

【0083】

特定の実施形態では、 R^2 はClであり、且つ R^3 はHである。特定の実施形態では、 R^4 及び R^5 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、 R^{11} 及び R^{10} は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、 R^6 及び R^7 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、 R^8 及び R^9 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成する。

【0084】

特定の実施形態では、化合物は

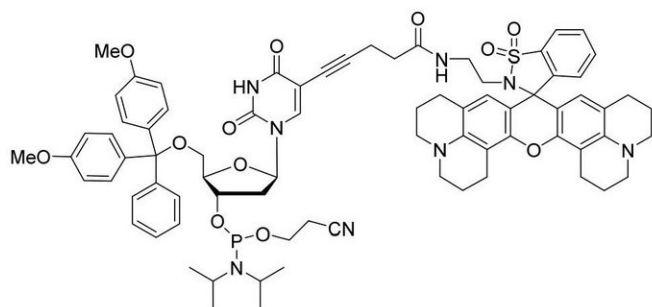
10

20

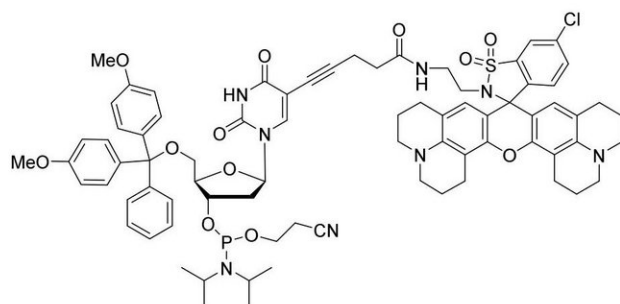
30

40

【化 2 9】



又は

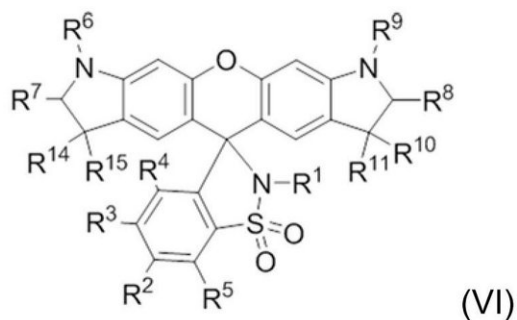


である。

【 0 0 8 5】

いくつかの実施形態では、スルホローダミン色素は、式VI

【化 3 0】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩で表される化合物であって、ここで、

 R^1 は、 L^1-X であり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、独立して、H、ハロゲン、 C_1-C_6 アルキル、又は SO_2NH_2 であり R^6 及び R^9 は、独立して、H又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、 R^7 、 R^8 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{14} 、及び R^{15} は、独立して、H又は任意に置換された C_1-C_6 アルキルであり、 L^1 は、任意に置換された C_2-C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2-C_{20} ヘテロアルキレンであり、 X は、活性エステル、 N_3 、プロピニル、マレイミド、又は $-O-P(OCH_2CH_2CN)NR^{12}R^{13}$ 、又は X は、

10

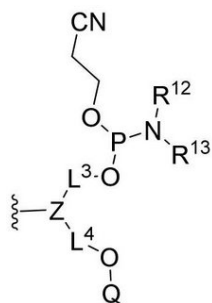
20

30

40

50

【化 3 1】



10

であり、ここで、

L^3 及び L^4 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン、又は任意に置換された C_2 - C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Q は、ヒドロキシル保護基であり、

Z は、 CH 、 N 、 $NHC(O)N$ 、又は $OC(O)N$ であり、及び

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。

【0086】

式 VI のいくつかの実施形態では、 R^7 、 R^8 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{14} 、及び R^{15} はメチルである。式 VI の特定の実施形態では、 X は、 $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$ である。

【0087】

式 VI のいくつかの実施形態では、 L^1 は、 PEG_{2-10} リンカーである。式 VI の他の実施形態では、 L^1 は $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ である。

20

【0088】

式 VI のいくつかの実施形態において、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、 H である。式 VI の特定の実施形態では、 R^6 は、 OH 又は C_1 - C_6 アシルオキシで任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。式 VI の特定の実施形態では、 R^9 は、 OH 又は C_1 - C_6 アシルオキシで任意に置換された C_1 - C_6 アルキルである。

【0089】

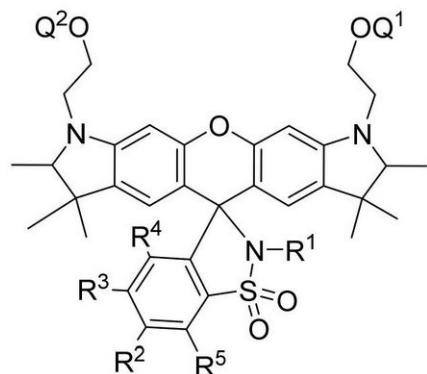
式 VI の特定の実施形態では、 R^6 は、 OH 又は OAc で置換されたエチルである。式 VI のいくつかの実施形態では、 R^9 は OH 又は OAc で置換されたエチルである。

30

【0090】

式 VI のいくつかの実施形態では、化合物は

【化 3 2】



40

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩であり、ここで、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、式 VI の化合物について記載されている通りであり、及び

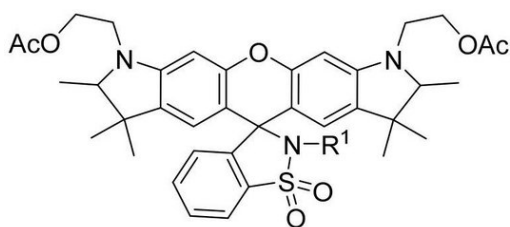
Q^1 及び Q^2 は、独立して、 H 又は C_1 - C_6 アシルである。

【0091】

いくつかの実施形態では、化合物は

50

【化 3 3】

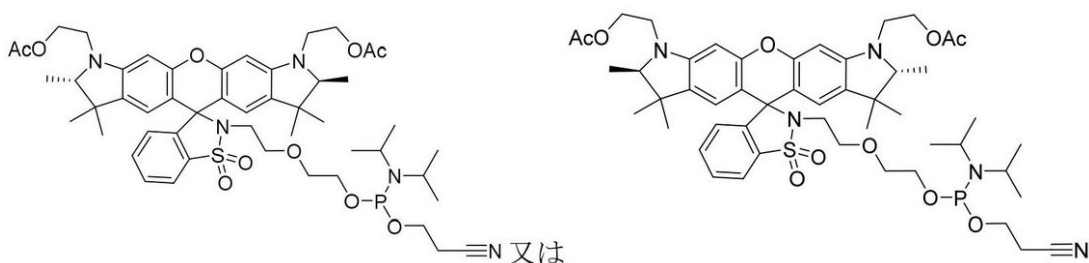


であり、ここで、 R^1 は式VIの化合物について定義されている通りである。

【0092】

特定の実施形態では、化合物は

【化 3 4】



である。

【0093】

本明細書で使用される「アルキル」、「アルケニル」、及び「アルキニル」という用語は、直鎖、分岐鎖、及び環状の一価のヒドロカルビルラジカル、及びそれらの組み合わせを含み、それらが置換されていない場合にはC及びHのみを含む。例としては、メチル、エチル、イソブチル、シクロヘキシル、シクロペンチルエチル、2-プロペニル、3-ブチニルなどを含む。このような各基の炭素原子の合計数は、本明細書に記載されることがあり、例えば、基が10個までの炭素原子を含むことができる場合には、1-10C、 C_1-C_{10} 、C-C10、又はC1-10として表現できる。

【0094】

本明細書で使用される「ヘテロアルキル」、「ヘテロアルケニル」、及び「ヘテロアルキニル」という用語は、1つ以上の鎖状炭素原子がヘテロ原子で置換されている対応する炭化水素を意味する。例示的なヘテロ原子は、N、O、S、及びPを含む。ヘテロ原子で炭素原子を置換することが許容される場合、例えば、ヘテロアルキル基において、その基を記述する数字は、例えば、未だC3-C10と書かれているが、サイクル又は鎖中の炭素原子の数と、記述されているサイクル又は鎖中の炭素原子の置換として含まれるそのようなヘテロ原子の数との合計を表す。

【0095】

典型的には、アルキル、アルケニル及びアルキニル置換基は、1～10個の炭素原子（アルキル）又は2～10個の炭素原子（アルケニル又はアルキニル）を含む。好ましくは、それらは、1～8個の炭素原子（アルキル）又は2～8個の炭素原子（アルケニル又はアルキニル）を含む。ときには、それらは、1～6個の炭素原子（アルキル）又は2～6個の炭素原子（アルケニル又はアルキニル）を含むことを意味する「低級アルキル」と呼ばれることがある。単一の基は、2以上のタイプの多重結合、又は2以上の多重結合を含んでもよい。そのような基は、それらが少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む場合、用語「アルケニル」の定義内に含まれ、それらが少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む場合、用語「アルキニル」の定義内に含まれる。

【0096】

本明細書で使用される「アルキレン」、「アルケニレン」及び「アルキニレン」という用語は、直鎖、分岐鎖、及び環状の二価のヒドロカルビルラジカル、及びそれらの組み合

10

20

30

40

50

わせを含む。アルキル基、アルケニル基、及びアルキニレン基は、そのような置換が化学的に意味をなす範囲で任意に置換されていてもよい。

【 0 0 9 7 】

典型的な置換基としては、限定されないが、ハロゲン (F、Cl、Br、I)、=O、=N-CN、=N-OR、=NR、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRC(O)OR、NRC(O)R、CN、C(O)OR、C(O)NR₂、OC(O)R、C(O)R、及びNO₂を含み、ここで、各Rは、独立して、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈ヘテロアルキル、C₁-C₈アシル、C₂-C₈ヘテロアシル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈ヘテロアルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₂-C₈ヘテロアルキニル、C₆-C₁₀アリール、又はC₅-C₁₀ヘテロアリールであり、各Rは、ハロゲン (F、Cl、Br、I)、=O、=N-CN、=N-OR'、=NR'、OR'、NR'₂、SR'、SO₂R'、SO₂NR'₂、NR'SO₂R'、NR'CONR'₂、NR'C(O)OR'、NR'C(O)R'、CN、C(O)OR'、C(O)NR'₂、OC(O)R'、C(O)R'、及びNO₂で任意に置換され、ここで、各R'は、独立して、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈ヘテロアルキル、C₁-C₈アシル、C₂-C₈ヘテロアシル、C₆-C₁₀アリール、又はC₅-C₁₀ヘテロアリールである。また、アルキル基、アルケニル基及びアルキニル基は、C₁-C₈アシル、C₂-C₈ヘテロアシル、C₆-C₁₀アリール、又はC₅-C₁₀ヘテロアリールによって置換されていてもよく、これらはそれぞれ、特定の基に適した置換基によって置換されていてもよい。

10

【 0 0 9 8 】

本明細書で使用される「アルキル」は、シクロアルキル基及びシクロアルキルアルキル基を含み、「シクロアルキル」という用語は、環状炭素原子を介して連結されている炭素環式非芳香族基を表すために使用され、「シクロアルキルアルキル」という用語は、アルキルリンカーを介して分子に連結している炭素環式非芳香族基を表すために使用される。同様に、「ヘテロシクリル」は、少なくとも1つのヘテロ原子を環状部材として含み、C又はNであってもよい環状原子を介して分子に連結している非芳香族環状基を表すために使用され、且つ「ヘテロシクリルアルキル」は、アルキレンリンカーを介して別の分子に連結しているそのような基を表すために使用されてもよい。本明細書で使用されるこれらの用語はまた、環が芳香族でない限り、二重結合を1つ又は2つ含む環を含む。

20

【 0 0 9 9 】

「芳香族」又は「アリール」置換基又は部分は、芳香族性の周知の特性を有する単環式又は縮合二環式部分を指す。例としては、フェニル及びナフチルを含む。同様に、用語「ヘテロ芳香族」及び「ヘテロアリール」は、1以上のヘテロ原子を環のメンバーとして含む、そのような単環式又は縮合二環式環系を指す。好適なヘテロ原子としては、N、O、及びSが挙げられ、これらのヘテロ原子を含むことにより、5員環及び6員環の芳香族性が許容される。典型的なヘテロ芳香族系には、ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、チエニル、フラニル、ピロリル、ピラゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イミダゾリルなどの単環C₅~C₆芳香族基を含み、且つこれらの単環基のいずれかをフェニル環又はヘテロ芳香族単環基の1つと融合させて形成される縮合二環式部分であって、インドリル、ベンズイミダゾリル、インダゾリル、ベンゾトリアゾリル、イソキノリル、キノリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾフラニル、ピラゾロピリジル、キナゾリニル、キノキサリニル、シノリニルなどのC₈~C₁₀の二環式基を形成する、縮合二環式部分を含む。環系全体の電子分布の点で芳香族性の特徴を有する任意の単環式又は縮合環二環式系は、この定義に含まれる。また、少なくとも分子の残部に直接結合している環が芳香族性の特徴を有する二環式基も含まれる。典型的には、環系は5~12個の環員原子を含む。好ましくは、単環式ヘテロアリールは5~6個の環員原子を含み、且つ二環式ヘテロアリールは8~10個の環員原子を含む。

30

40

【 0 1 0 0 】

アリール及びヘテロアリール部分は、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₅-C₁₂アリール、C₁-C₈アシル、及びこれらのヘテロ型を含む種々の置換基で置換され得、これらの各々はそれ自体がさらに置換され得る。アリール及びヘテロアリール部分の他の置換基としては、ハロゲン (F、Cl、Br、I)、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂N

50

R₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRC(O)OR、NRC(O)R、CN、C(O)OR、C(O)NR₂、OC(O)R、C(O)R、及びNO₂を含み、ここで、各Rは、独立して、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈ヘテロアルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈ヘテロアルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₂-C₈ヘテロアルキニル、C₆-C₁₀アリール、C₅-C₁₀ヘテロアリール、C₇-C₁₂アリールアルキル、又はC₆-C₁₂ヘテロアリールアルキルであり、且つ各Rは、アルキル基について上述したように任意に置換されていてもよい。アリール基又はヘテロアリール基上の置換基は、当然ながら、そのような置換基の種類ごとに、又は置換基の各成分ごとに適したものとして本明細書に記載された基でさらに置換されていてもよい。従って、例えば、アリールアルキル置換基は、アリール部分に、アリール基に典型的なものとして本明細書に記載されている置換基で置換されていてもよく、且つアルキル部分に、アルキル基に適したものとして本明細書に記載されている置換基でさらに置換されていてもよい。

10

【0101】

本明細書で使用される「任意に置換されている」とは、記載されている特定の基が、1個以上の水素置換基が非水素置換基で置換されていてもよいことを示す。いくつかの任意に置換された基又は部分では、全ての水素置換基が非水素置換基である、例えば、C₁-C₆アルキル、C₂-C₆ヘテロアルキル、アルキニル、ハロゲン(F、Cl、Br、I)、N₃、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRC(O)OR、NRC(O)R、CN、C(O)OR、C(O)NR₂、OC(O)R、C(O)R、oxo、及びNO₂で置換され、ここで、各Rは、独立して、H、C₁-C₆アルキル、又はC₂-C₆ヘテロアルキルである。任意の置換基がカルボニル酸素又はオキシ(=O)のような二重結合を介して結合されている場合、そのグループは2つの利用可能な原子価を取るので、含まれてもよい置換基の総数は利用可能な原子価の数に応じて減少する。

20

【0102】

式I、IA、IIA、及びIIIの化合物などの本明細書に開示のスルホローダミン化合物の塩、立体異性体、及び互変異性体もまた、本明細書の開示の範囲内である。本明細書で使用される「立体異性体(stereoisomer)」又は「立体異性体(stereoisomers)」は、1つ以上の立体中心のキラリティーが異なる化合物を指す。立体異性体は、エナンチオマー及びジアステレオマーを含む。本明細書で使用される「互変異性体」は、エノール-ケト及びイミン-エナミン互変異性体のような、プロトンの位置が異なる化合物の代替形態を指す。本明細書で使用される化合物の「塩」とは、化合物のイオンが対イオンとイオンの結合したものを指す。化合物の塩は、酸と塩基の中和反応によって形成できる。塩は、当技術分野でよく知られている様々な有機及び無機の対イオンに由来することができ、例示的にのみ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、及びテトラアルキルアンモニウムを含み、そして、分子が塩基官能性を含む場合には、ヒドロクロリド、ヒドロプロミド、タートレート、メシラート、アセテート、マレート、オキサレートなどの有機又は無機酸の塩を含む。本明細書に開示の化合物の構造は、1つの共鳴形態のみで示すことができるが、全ての共鳴形態を含むことが理解される。

30

【0103】

本明細書に開示のスルホローダミン化合物、例えば、式I、IA、III、及びVIの化合物の合成は、当技術分野で知られている技術及び方法を使用して、任意の適切な方法で達成できる。例えば、Beija M. et al, Chem. Soc. Rev., (2009): 38, 2410-2433; Kreimerman et al, Current Radiopharmaceuticals, (2017): 10, 212-220; Corrie J.E.T. and Munasinghe V.R. Dyes and Pigments 79 (2008): 76-82; Corrie J.E.T. et al. Bioconjugate Chem. 12 (2001): 186-194参照。後述の実施例1~9は、本明細書に開示されるいくつかの例示的な化合物の合成を示す。

40

【0104】

標識ポリヌクレオチド

別の態様において、本明細書に提供されるものは、本明細書に開示のホスホラミダイト系スルホローダミン色素からのオリゴヌクレオチド自動合成によって調製されたスルホローダミン色素標識ポリヌクレオチドである。本明細書で使用される「スルホローダミン色

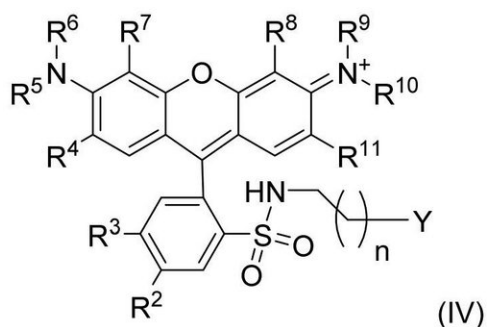
50

素標識ポリヌクレオチド」は、本明細書で開示されるホスホラミダイトスルホローダミン色素からのオリゴヌクレオチド自動合成によって調製されたポリヌクレオチドであって、オープン又はクローズドのいずれかの形態でスルホローダミン色素部分を組み込んでいるポリヌクレオチドを指す。

【0105】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるものは、式IV

【化35】



10

又はその立体異性体、互変異性体、又は塩の化合物を含む標識ポリヌクレオチドであって、ここで、

R²は、H、ハロゲン又はSO₂NH₂であり、

R³は、H又はハロゲンであり、

R⁴、R⁷、R⁸、及びR¹¹は、単独である場合、独立して、H、ハロゲン、又は任意に置換されたC₁-C₆アルキルであり、

R⁵、R⁶、R⁹、及びR¹⁰は、単独である場合、独立して、H又は任意に置換されたC₁-C₆アルキルであり、

R⁴及びR⁵は、一緒の場合、R⁴及びR⁵が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

R⁶及びR⁷は、一緒の場合、R⁶及びR⁷が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

R⁸及びR⁹は、一緒の場合、R⁸及びR⁹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

R¹⁰及びR¹¹は、一緒の場合、R¹⁰及びR¹¹が結合している原子を連結する任意に置換されたC₂-C₃アルキレン鎖であり、

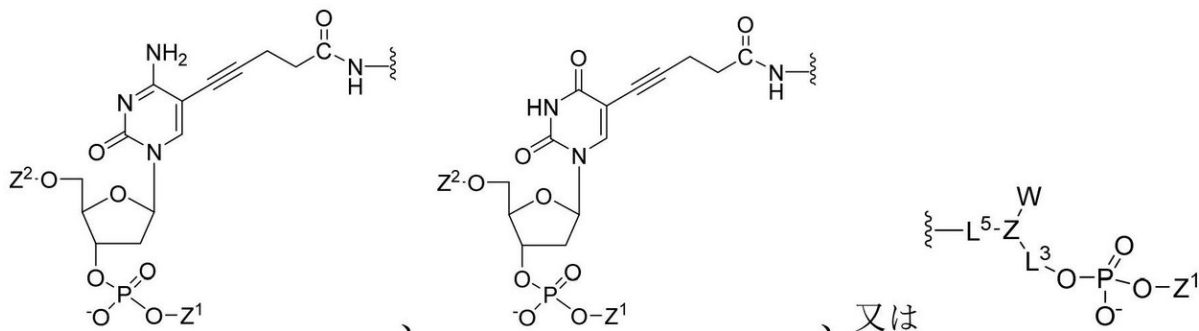
R⁵及びR⁶は、R⁵及びR⁶が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員の不飽和環を形成し、

R⁹及びR¹⁰は、R⁹及びR¹⁰が結合している窒素原子と一緒に、5員又は6員不飽和環を形成し、

Nは、1～9の整数であり、

Yは、

【化36】



20

30

40

50

であり、ここで、

波線は、式IVへの結合点であり、

L^3 、 L^4 、及び L^5 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン又は任意に置換された C_2 - C_{30} ヘテロアルキレンであり、

Z は、 CH 、 N 、 $NHC(O)N$ 、又は $OC(O)N$ であり、

R^{12} 及び R^{13} は、独立して、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

W は、 H 又は L^4-O-Z^2 であり、

Z^1 は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドであり、及び

Z^2 は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又は H である。

【0106】

いくつかの実施形態では、 R^4 及び R^5 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、 R^{11} 及び R^{10} は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、 R^6 及び R^7 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成し、且つ R^8 及び R^9 は、それぞれが結合している原子を連結する任意に置換された C_3 アルキレン鎖を形成する。特定の実施形態では、 R^2 は Cl であり、且つ R^3 は H である。

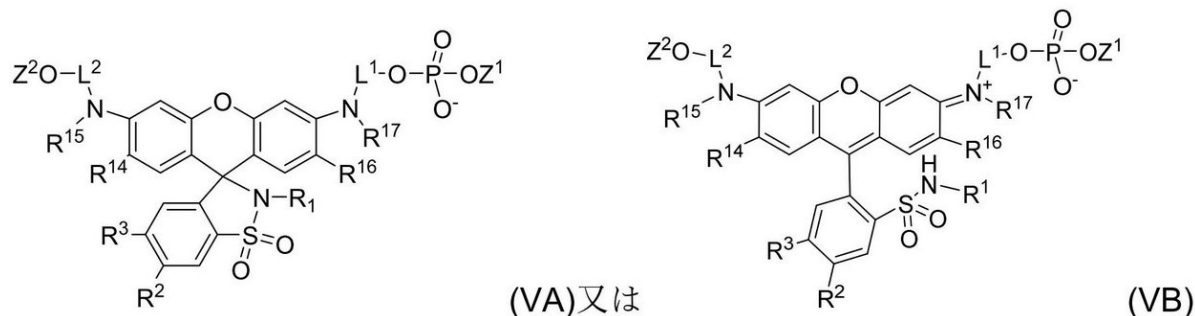
【0107】

L^3 は、 N 、 O 、 S 、 P 、及びそれらの組み合わせから選択される1つ以上のヘテロ原子を含み得る。式IVのいくつかの実施形態では、 L^3 は $-(OCH_2CH_2)_n-$ であり、ここで、 n は1~5の整数である。

【0108】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるものは、式VA又はVB

【化37】



又はその立体異性体、互変異性体、又は塩の化合物を含む標識ポリヌクレオチドであって、ここで、

R^1 は、任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^2 は、 H 、ハロゲン、又は SO_2NH_2 であり、

R^3 は、 H 又はハロゲンであり、

R^{14} 及び R^{16} は、単独である場合、独立して、 H 、ハロゲン、又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{15} 及び R^{17} は、単独である場合、独立して、 H 又は任意に置換された C_1 - C_6 アルキルであり、

R^{14} 及び R^{15} は、一緒の場合、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

R^{16} 及び R^{17} は、一緒の場合、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結する任意に置換された C_2 - C_3 アルキレン鎖を形成し、

L^1 及び L^2 は、独立して、任意に置換された C_2 - C_{10} アルキレン又は任意に置換された C_2 - C_{20} ヘテロアルキレンであり、

Z^1 は、ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドであり、

Z^2 は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又は H である。

【 0 1 0 9 】

式VA又はVBのいくつかの実施形態では、 R^3 はHである。他の実施形態では、 R^2 はHである。さらに他の実施形態では、 R^2 はClである。

【 0 1 1 0 】

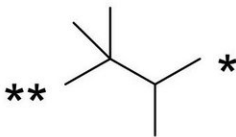
式VA又はVBの他の実施形態において、 R^{14} 及び R^{15} は、 R^{14} 及び R^{15} が結合している原子を連結する、任意に1、2又は3のメチル基で置換された、 C_2 アルキレン鎖を形成し、そしてさらに他の実施形態では、 R^{16} 及び R^{17} は、 R^{16} 及び R^{17} が結合している原子を連結する、任意に1、2又は3のメチル基で置換された、 C_2 アルキレン鎖を形成する。特定の実施形態では、 R^{14} 及び R^{15} は、3個のメチル基で置換されたエチレン鎖を形成し、且つ R^{16} 及び R^{17} は、3個のメチル基で置換されたエチレン鎖を形成する。

10

【 0 1 1 1 】

式VA又はVBの特定の実施形態では、 R^{14} 及び R^{15} は、一緒になって、 R^{16} 及び R^{17} は、一緒になって、

【 化 3 8 】



であり、ここで、*は窒素原子との結合点を示し、**は芳香族炭素原子との結合点を示す。

20

【 0 1 1 2 】

本明細書に開示の標識ポリヌクレオチドは、1つ以上の付加的な化合物を含むことができる。本明細書に開示のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、マイナースターグループバインダーを含む。本明細書に開示のいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはインターカレーターを含む。

【 0 1 1 3 】

典型的には、本明細書に開示の色素で標識されたポリヌクレオチドは、バックボーンが2'-デオキシリボース又はリボースを含むポリヌクレオチドである。しかしながら、標識されたポリヌクレオチドは、1つ以上の修飾を含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、糖修飾、例えば、修飾糖を含む。様々な糖修飾が有用である。いくつかの非限定的な糖修飾は、アラビノース、d-アラビノ-ヘキシトール、2-フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、又は二環式糖を含む。

30

【 0 1 1 4 】

本明細書に開示の標識ポリヌクレオチドは、1つ以上のバックボーン修飾を含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、バックボーン修飾を含む。いくつかの実施形態では、バックボーン修飾は、修飾糖ホスフェイトバックボーン、ロック核酸バックボーン、ペプチドバックボーン、ホスホトリエステルバックボーン、ホスホラミデートバックボーン、シロキサンのバックボーン、カルボキシメチルエステルバックボーン、アセトアミデートバックボーン、カーバメートバックボーン、チオエーテルバックボーン、架橋メチレンホスホネートバックボーン、ホスホロチオエートバックボーン、メチルホスホネートバックボーン、アルキルホスホネートバックボーン、ホスホフェイトエステルバックボーン、アルキルホスホノチオエートバックボーン、ホスホロジチオエートバックボーン、カルボネートバックボーン、ホスフェイトトリエステルバックボーン、カルボキシメチルエステルバックボーン、メチルホスホロチオエートバックボーン、ホスホロジチオエートバックボーン、p-エトキシ結合を有するバックボーン、及びこれらのいずれかの2つ以上の組み合わせからなる群から選ばれる。本明細書に開示の特定の実施形態では、バックボーン修飾は、修飾糖ホスフェイトバックボーンである。

40

【 0 1 1 5 】

本明細書に開示の標識ポリヌクレオチドは、1つ以上の修飾又は非天然塩基を含むこと

50

ができる。修飾塩基は、修飾チミン塩基及びシトシン塩基（例えば、U.S. Pat. Nos 9,598,455及び9,598,456に開示される）、2,6-ジアミノプリン塩基、ユニバーサル塩基などを含む。本明細書に開示の標識ポリヌクレオチドは、非ヌクレオシドセグメント又は非ヌクレオシドモノマー（例えば、ポリ(エチレングリコール)リンカーなどのリンカー）を含むことができる。

【0116】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示のポリヌクレオチドは、プローブ、例えば、5'-ヌクレアーゼPCRプローブである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはさらに、1つ以上の付加的な標識、例えば、蛍光消光剤を含む。当技術分野の通常の当業者であれば理解するであろうが、オリゴヌクレオチド内の標識の位置は様々であり得、本明細書の開示に限定されるものではない。

10

【0117】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるものは、蛍光共鳴エネルギー移動（「FRET」）のようなエネルギー移動機構を介して、蛍光クエンチャーがインタクトプローブ（即ち、プローブとして使用されるオリゴヌクレオチド）中の蛍光体の蛍光シグナルを抑制するように、その配列の一方の端に蛍光体としてのスルホローダミン色素部分を含み、その配列の他方の端に蛍光消光剤を含む修飾ポリヌクレオチドである。ポリメラーゼがプローブがハイブリダイズしたテンプレートに沿ってプライマーを伸長させると、ポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性がプローブを開裂し、それによって蛍光体が蛍光消光剤から離れて拡散し、蛍光シグナルが検出されるようになる。シグナルは、開裂されるプローブの量に比例して、各PCRサイクルで増加し、従って、増幅産物（例えば、アンプリコン、標的配列）の量に比例して増加する。これにより、標的DNA配列の直接検出及び定量が可能となる。

20

【0118】

いくつかの実施形態では、スルホローダミン色素部分は、標識ポリヌクレオチドの配列の末端から離れた少なくとも1つのヌクレオチド位置である塩基に取り付けられ、蛍光消光剤は、修飾ポリヌクレオチドの他の末端から離れた少なくとも1つのヌクレオチド位置である塩基に取り付けられる。いくつかの実施形態では、蛍光体、例えば、スルホローダミン色素部分、及び蛍光消光剤は、プローブ内に内部的に配置される。当業者であれば理解できるように、プローブ内の蛍光体及び/又は蛍光消光剤の位置は様々であり、限定されるものではない。

30

【0119】

いくつかの実施形態では、蛍光体、例えば、スルホローダミン色素部分、及び蛍光消光剤は、FRETプローブの末端にはない。いくつかの実施形態では、スルホローダミン色素の発光スペクトルは、蛍光消光剤の吸収スペクトルとかなり重複する。しかし、このようなスペクトルの重なりは、消光剤が衝突機構を伴う場合や、例えば、反応条件やプローブの構造により重なりが大きくなる場合には、あまり重要ではないか、又は必要とされない。

【0120】

特定のプローブに適切な蛍光体-消光剤ペアを選択するための多くの実用的なガイダンスが当技術分野で利用可能である。例えば、FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971)参照。本明細書に開示のプローブに含めるのに有用な消光剤は、ビス-アゾクエンチャー（例えば、U.S. Pat. No. 6,790,945に記載される）、Biosearch Technologies, Inc.から入手可能な消光剤（Black Hole™ Quenchers: BHQ-1, BHQ-2, and BHQ-3）、TAMRA、カルボキシテトラメチルローダミン、4-((4-(ジメチルアミノ)フェニル)アゾ)安息香酸(Dabcyl)、Zen^(R)クエンチャー、ブラックベリー^(R)クエンチャー、2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノ(DDQ)-I、及び2-[6-(1,3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル)-9-{2-[(4-[(2,5-ジオキサピロリジン-1-イル)オキシ]カルボニルピペリジン-1-イル)スルホニル]フェニル}-3H-キサンテン-3-イルデン]-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドリウムクロリド(QSY 21)及び他の当業者に知られている消光剤を含む。

40

50

【0121】

別の態様では、リガンドの標識コンジュゲートの調製方法であって、リガンドと本明細書に記載されているスルホローダミン色素化合物を、化合物をリガンドに共有結合させるのに十分な条件下の適切な溶媒中で接触させ、それによって色素標識コンジュゲートを形成する工程を含む、方法が開示される。適切なリガンドは、生体分子（例えば、ポリヌクレオチド、蛋白質、抗体、ペプチド、又はポリサッカライド）、合成ポリマー（例えば、ポリアクリル酸などのエチレン性バックボーンを有するポリマー）、及び固体支持体（例えば、制御ポアガラス又はポリスチレン）を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、リガンドはポリヌクレオチドである。特定の実施形態では、本明細書に開示の化合物をリガンド、即ちオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに共有結合させるのに十分な条件は、ホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成条件である。合成オリゴヌクレオチドの合成及び脱保護に使用されるホスホラミダイトオリゴヌクレオチド自動合成条件は、当技術分野でよく知られており、例えば、Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. 1, Beaucage et al., Eds., John Wiley & Sons, 2002に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0123】

オリゴヌクレオチド、例えば、DNAの合成のホスホラミダイト法は、ほとんどの自動合成装置で使用される標準的な合成法と考えられている。合成に使用されるビルディングブロックは、一般にヌクレオチドビルディングブロック、モノマー、又はヌクレオシドホスホラミダイトと呼ばれ、活性化ヌクレオシド誘導体（ホスホラミダイト）である。酸開裂可能な保護基、典型的にはジメトキシトリチル（DMT）基が、ヌクレオシドの5'末端を保護するために使用され、そしてβ-シアノエチル基は、3'-ホスファイト部分の保護に役立つ。また、モノマーは、他の部分、例えば、核酸塩基中の反応性一級アミンを保護するのに役立つ付加的な基を含んでもよい。保護基は、合成中に分岐又は他の望ましくない副反応が起こることを防ぐために選択される。当業者は、特定の合成条件及び脱保護及び/又は開裂条件での使用に適した特性を有する保護基を容易に選択し得る。多種多様なアミン保護基は、例えば、Greene & Wuts, "Protective Groups In Organic Chemistry," 3d Edition, John Wiley & Sons, 1999 (以下「Green & Wuts」)において教示されている。

【0124】

典型的には、オリゴヌクレオチドは、固体支持体、例えば、制御ポアガラス（CPG）又はポリスチレン充填カラム、メンブレン又は同様の材料上で合成される。オリゴヌクレオチドは、典型的には、3'末端から5'末端まで合成される。第一のヌクレオチドビルディングブロック又はモノマーは、典型的には、リンカー、例えば、長鎖アルキルアミン制御ポアガラス（LCAA-CPG）などを介して、支持体に固定される。

【0125】

いくつかの実施形態では、ホスホラミダイト試薬を使用する合成方法は、以下のような複数のラウンドを含む。(i)遊離ヒドロキシルを暴露するためのDMT脱保護であり、例えば、ジクロロメタン中で2.5%又は3%のジ又はトリクロロ酢酸で処理することによって行うことができる。(ii)ヌクレオシド又は他のホスホラミダイト試薬の遊離ヒドロキシルへのカップリングであり、例えば、テトラゾール（例えば、0.45M又は0.5Mテトラゾール）を含むアセトニトリル中で行うことができる。(iii)酸化であり、例えば、I₂/2,6-ルチジン/H₂Oで処理することによって行うことができる。さらに、キャッピングは、例えば、THF中の10%1-メチルイミダゾール（NMI）で活性化テトラヒドロフラン（THF）中の6.5%の無水酢酸で処理することによって行うことができる。

【0126】

また、合成の様々な工程を実施するための他の条件も当技術分野で知られており、本明細書で使用する。例えば、ホスホラミダイトカップリングは、0.25M 5-エチルチオ-1H-テトラゾール、0.25 M 4,5-ジシアノイミダゾール(DCI)又は0.25 M 5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール(BTT)を含むアセトニトリル中で行うことができる。酸化は、THF/H₂O/

10

20

30

40

50

ピリジン(7:2:1)中の0.1M、0.05M又は0.02M I_2 で行うことができる。キャッピングは、THF/ルチジン/無水酢酸で処理した後、THF中の16% NMIで処理することで行うことができる。

【0127】

任意の保護基の除去及び合成試薬からの開裂は、典型的には60 で1~12時間、濃縮水酸化アンモニウムで処理することによって行うことができるが、濃縮水酸化アンモニウムで室温で4~17時間処理、又はメタノール中で0.05M炭酸カリウムで処理、又は水/EtOH中で25% t-ブチルアミンで処理するなどのよりマイルドな条件で除去可能な基で保護されたヌクレオシドホスホラミダイトも知られており、使用できる。

【0128】

固相オリゴヌクレオチド合成に関する用語「開裂」とは、オリゴヌクレオチドを固相支持体に結語させる結合を切断することを指す。いくつかの実施形態では、開裂は、結合したオリゴヌクレオチドの3'ヒドロキシルと固相支持体との間のサクシネートエステル結合の加水分解を含む。

【0129】

本明細書で使用される「脱保護」という用語は、オリゴヌクレオチドの複素環塩基の環外アミンから保護基を除去することを意味する。通常、脱保護は、環外アミン及びアミノ保護基、例えば、ベンゾイル又はイソブチリルからなるアミド部分の加水分解を伴う。脱保護の方法としては、様々な技術や方法が知られている。

【0130】

本発明の各要素は、複数の実施形態を含むものとして本明細書に記載されているが、別段の指示がない限り、本発明の所定の要素の各実施形態は、本発明の他の要素の各実施形態と共に使用することが可能であり、各々のそのような使用は、本発明の区別可能な実施形態を形成することが意図されていることが理解されるべきである。

【0131】

本明細書で参照された特許、特許出願、及び科学文献は、それぞれの出版物、特許又は特許出願が参照により組み込まれることが明確に個別に示されているかのように、その全体が参照により組み込まれている。本明細書に引用されているにんいの参考文献と本明細書の特定の教示との間の矛盾は、後者を支持して解決されるものとする。同様に、偽重的に理解されている単語またはフレーズの定義と、本明細書で具体的に教示されている単語またはフレーズの定義との間の矛盾は、後者を支持して解決されるものとする。

【0132】

本発明を以下の実施例によって説明する。これらの実施例は、例示のみを目的として記載されており、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0133】

プロトン (1H 、400MHz) 及びリン (^{31}P 、160MHz) 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルをBruker Biospin 400装置で得た。NMRサンプルはDMSO- d_6 及びCD $_3$ CNで調製し、残留プロトン化溶媒を内部化学シフト標準として使用した。LCMS データは、Agilent 1200シリーズ (LC/MSD Trap XCT Plus) 及びAgilent 1260インフィニティ (6130 Quadrupole LC/MS) 装置でエレクトロスプレーイオン化 (ESI) により取得した。Biota ge Isolera LSと Teledyne ISCO Torrent^(R) Combi Flash装置を使用して、シリカゲル60上で自動クロマトグラフィーを実施した。分析薄層クロマトグラフィーを、アルミニウム担持シリカゲル60 F254上で実施し、プレートをUVランプ (254及び365 nm) 下で可視化した。全ての試薬は、特に示さない限り、市販のものを使用した。

【0134】

実施例1: スルホローダミン色素S1の合成

本実施例は、ホスホラミダイト基を含む例示的なスルホローダミン色素S1の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に組み込むのに適している。

10

20

30

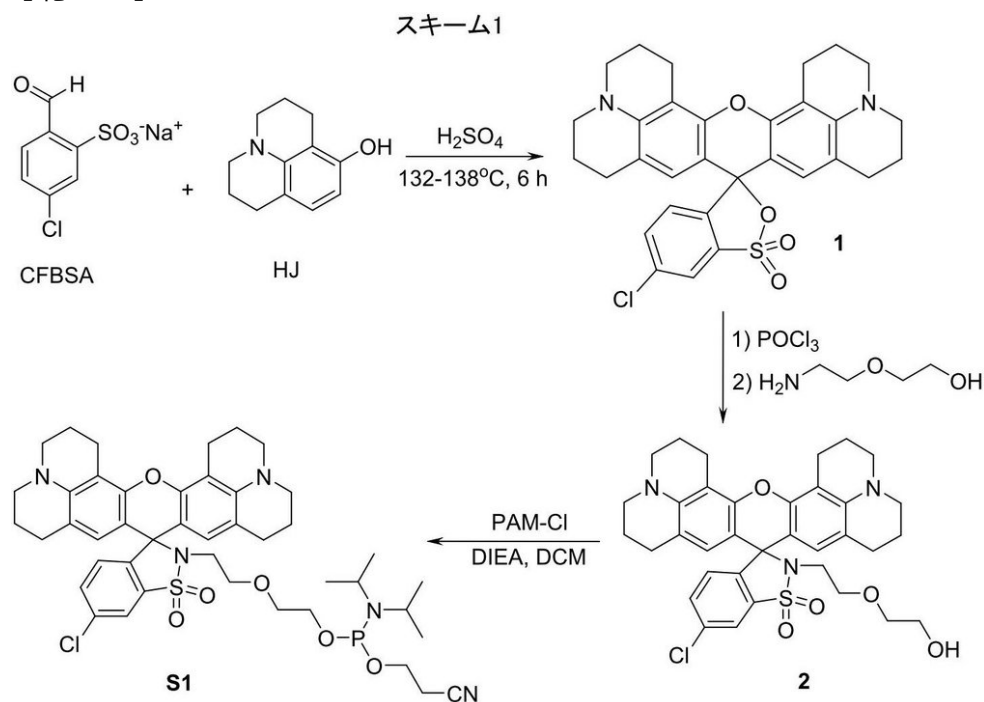
40

50

【 0 1 3 5 】

化合物S1は、スキーム1に概説された手順に従って調製した。

【 化 3 9 】



10

20

【 0 1 3 6 】

化合物1

化合物CFBSA (4.0g、1eq) と8-ヒドロキシジユロリジン (HJ、6.2g、2eq) の乾燥混合物を、132-138 でマルチポート容器 (3、使用されていないポートは大気には開放されていた) 内の硫酸水溶液 (60%、32mL) に少しずつ添加した。反応の進行をHPLCを用いてモニターした。反応が完了したとき (7-16時間)、反応混合物を室温まで冷却し、希釈冷NaOH水溶液 (110mL) に注いだ。pHを8.5 ~ 11に調整した後、環化縮合反応の生成物 (化合物1) を濾過により単離し、その後45 ~ 50 の真空オープンで 16時間乾燥させた。次に、生成物を130mLのジクロロメタン (DCM) に溶解し、溶液を濾過した。DCM層の濃縮により、化合物1 (6g、65%) が得られ、これをさらに精製することなく次の工程で使用した。 LCMS: m/z 561.5; [M+H] 1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.94 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.0, 2.4 Hz), 7.10 (d, 1H, J = 8.0Hz), 6.59 (s, 2H), 3.58 (m, 8H), 2.98 (m, 4H), 2.52 (m, 4H), 1.99 (m, 4H), 1.83 (m, 4H)

30

【 0 1 3 7 】

化合物2

化合物1 (8g、14.3 mmol) を無水DCM (120mL) に室温 (RT) で懸濁し、POCl₃ (13.1mL、10eq) で一晚処理した。反応の進行/完了にTLC (10% MeOH/DCM) を続けた。反応が完了したら、混合物を真空下で濃縮し、得られたフォームを真空下で40 で90 ~ 150分間乾燥させた。次に、フォームをアルゴン下で無水ジクロロメタン (150mL) に溶解した。反応溶液を0 ~ 5 に冷却し、温度を8 未満に維持しながら、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) (25mL、10eq) 及び2-アミノエトキシエタノール (AE E) (7.2mL、5eq) で処理した。反応物を、室温まで1 ~ 2時間温めながら攪拌し、次に室温で一晩攪拌した。反応の進行をTLC (10% MeOH/DCM) でモニターした。反応混合物をDCM (250mL) で希釈し、1N HCl (2 × 185mL)、ブライン (1 × 200mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。濾過、濃縮、及びシリカゲルカラム精製を使用した精製により、純粋な化合物2 (3.74g、40%収率) を得た。

40

LCMS: m/z 648.5 [M+H]; 1H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.19 (d, 1H, J =

50

2.0 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.0, 2.0 Hz), 6.95 (1H, d, J = 8 Hz), 6.28 (s, 2H), 4.4 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 3.30 (m, 3H), 3.15 (m, 12H), 2.90 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.82 (m, 4H), 2.51 (m, 4H), 1.96 (m, 4H), 1.81 (m, 4H)

【 0 1 3 8 】

化合物S1

化合物2 (2.8g、4.3mmol) を3つ口丸底フラスコに入れ、高真空 (2mBar) 下で少なくとも90分間乾燥させた。次に、乾燥した化合物をアルゴン下で無水DCM (88mL) に溶解した。反応混合物を0~5℃に冷却し、DIEA (7.5mL、10eq) を加えた後、内部温度を0~5℃に維持しながら、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (PAM-Cl) (1.2mL、1.4eq) を滴下して加えた。完了するまで (2~3時間) 室温まで温めながら反応を撹拌した。反応物をDCM (88mL) で希釈し、NaHCO₃ (2×45mL) 及びブライン (45mL) で洗浄し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。粗生成物の濾過、濃縮、及びシリカゲルカラム精製により、純粋な生成物をピンク色の固体として得た (1.75g、48%収率)。

LCMS: m/z 848.2 [M+H]⁺; ³¹P NMR (CD₃CN, 160 MHz): δ 148.25; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.18 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 6.96 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.27 (s, 2H), 3.66 (m, 2H), 3.27 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 3.20 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 3.10-3.20 (m, 8H), 2.90 (t, 2H, 6.8 Hz), 2.82 (t, 4H, J = 6.4Hz), 2.70 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.40-2.51 (m, 4H), 1.95 (m, 4H), 1.78 (m, 4H), 1.13 (d, 6H, J = 8 Hz), 1.05 (d, 6H, J = 8 Hz)

【 0 1 3 9 】

実施例2：スルホローダミン色素S2の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基及びジメトキシトリチル基で保護されたヒドロキシル基を含む例示的なスルホローダミン色素S2の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介してオリゴヌクレオチドの5'末端又は中間位置に組み込むのに適している。

【 0 1 4 0 】

化合物S2は、スキーム2に概説された手順に従って調製した。

10

20

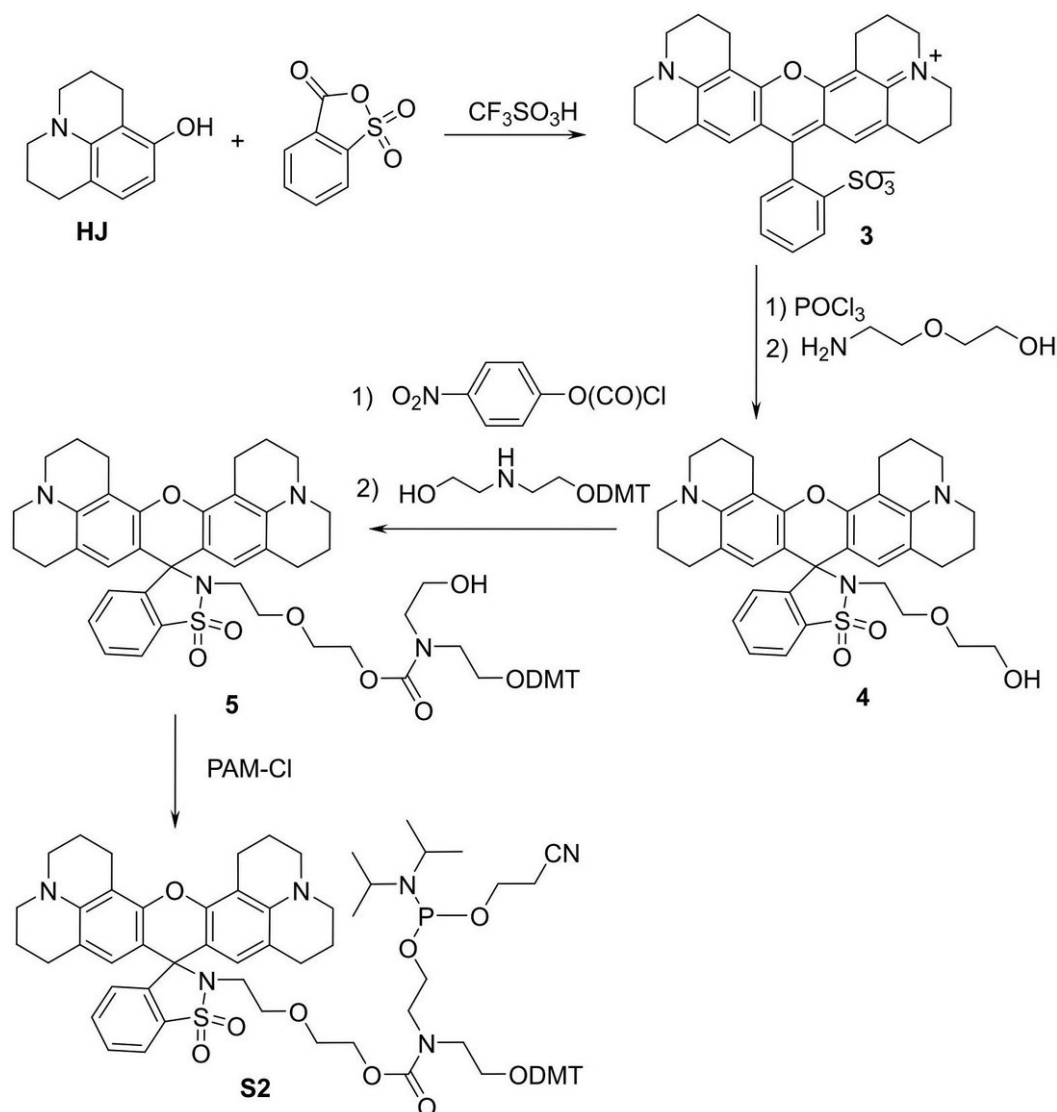
30

40

50

【化 4 0】

スキーム2



【 0 1 4 1】

化合物3

150mLの丸底フラスコ中のトリフルオロメタンスルホン酸（50mL）をアルゴン雰囲気下で0℃に冷却した。8-ヒドロキシジユロリジン（HJ）（15.0g、79.3mmol）を20分かけて少しずつ加え、混合物を室温に温め、次に8-ヒドロキシジユロリジンが完全に溶解するまで室温で撹拌した。2-スルホ安息香酸環状無水物（10.95g、59.5mmol）を一度に加えた。混合物を110℃に加熱し、18時間撹拌し、次に室温に冷却した。反応混合物を3M NaOAc（300mL）と砕いた氷（200mL）の混合物に滴下して加えた。得られた混合物にDCMを加え（500mL）、混合物を分液漏斗に移した。有機層を集め、水とブラインで洗浄した。コンバインした水層をDCMで逆抽出し、全ての有機層を組み合わせた。Na₂SO₄乾燥させた後、溶液を濾過し、DCMを真空下で除去した。生成物を、2%～10%の水/アセトニトリル（ACN）を使用するシリカゲル（3"x7"ベッド）でのクロマトグラフィーによって精製した。暗赤色の不純物が溶媒フロントのカラムから出てきた。TLCでの製品のR_fは、10%水/ACNで0.4である。生成物含有画分の濃縮により、化合物3（8.34g、40%）を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.80 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.60 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 7.51 (t, 1H, J = 7.4 Hz), 7.09 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 6.58 (s, 2H), 3.49 (m, 8H), 2.98 (m, 4H), 2.

6.2 (m, 4H), 2.02 (m, 4H), 1.83 (m, 4H); LCMS: m/z 527.5 [M+H].

【0142】

化合物4

アルゴン下で、化合物3 (6.50g、12.3mmol) を60 mLの無水DCMに溶解し、POCl₃ (5.00 mL、53.6mmol) を加えた。混合物を室温で24時間撹拌した。DCMを室温減圧下で除去し、次に過剰のPOCl₃を60 減圧下で除去してフォームを生成した。フォームをアルゴン下で150mLの無水DCMに溶解し、溶液を0 に冷却した。ジイソプロピルエチルアミン (22.0mL、124mmol) を加え、混合物を再び0 に冷却し、2- (2-アミノエトキシ) エタノール (6.20mL、62.2mmol) を加えた。反応混合物を室温まで温め、2.5時間撹拌した。全ての固体を溶解するのに十分なメタノールを加えることにより、反応を止めた。混合物を飽和NaHCO₃、水、及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。生成物をシリカゲル (3"x6")、10%トリエチルアミン (TEA) を含有する30%EtOAc/ヘキサンから60%EtOAc/ヘキサンでクロマトグラフィーに供し、4.56g (60%) の化合物4を得た。

10

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.94 (dd, 1H, J = 3.6, 2.8 Hz), 7.58 (dd, 2H, J = 5.6, 3.2 Hz), 6.93 (dd, 1H, J = 6.4, 3.2 Hz), 6.27 (s, 2H), 4.4 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 3.31 (m, 2H), 3.07-3.20 (m, 12H), 2.89 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.83 (t, 4H, J = 6.4 Hz), 2.45 (m, 4H), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H). LCMS: m/z 614.5 [M+H].

【0143】

化合物5

20

アルゴン下で、化合物4 (1.58g、2.57mmol) を50mLの無水DCMに溶解し、TEA (3.60mL、25.8mmol)、続いてp-ニトロフェニルクロロホルメート (777mg、3.85mmol) を加えた。得られた混合物を室温で18時間撹拌した。モノ-DMT-ジエタノールアミン (2.09g、5.13mmol) を加え、室温での撹拌をさらに24時間続けた。混合物を飽和NaHCO₃、水、及びブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。シリカゲル、10%TEAを含有する40%EtOAc /ヘキサンから70%EtOAc /ヘキサンのクロマトグラフィーによる生成物の精製により、1.78g (66%) の化合物5を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.85 (m, 1H), 7.42 (m, 4H), 7.29 (m, 7H), 6.99 (m, 1H), 6.82 (d, 4H, J = 8.8 Hz), 6.44 (s, 2H), 4.10 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.76 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.57-3.21 (m, 10H), 3.18-3.02 (m, 1H), 2.89 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 2.54 (m, 4H), 2.04 (m, 4H), 1.87 (m, 4H). LCMS: m/z 1047.7 [M+H].

30

【0144】

化合物S2

アルゴン下で、化合物5 (300mg、0.287mmol) を20mLの無水DCMに溶解した。DIEA (0.500mL、2.87mmol)、続いてPAM-Cl (0.080mL、0.389mmol) を加えた。混合物を室温で4時間撹拌し、次に飽和NaHCO₃、水、及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。シリカゲルでのクロマトグラフィー (5%TEAを含有する20%EtOAc/ヘキサンから40%EtOAc/ヘキサン) により、0.213g (60%) の化合物S2を得た。

40

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ 7.82 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.42 (m, 4H), 7.24 (m, 7H), 6.82 (m, 5H), 6.36 (s, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.65 (m, 4H), 3.45 (m, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 3.06 (m, 10H), 2.92 (m, 1H), 2.82 (m, 4H), 2.60 (m, 1H), 2.48 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.77 (m, 4H), 1.19 (m, 12H). ³¹P NMR (CD₃CN, 160 MHz): δ 147.5

【0145】

実施例3: スルホローダミン色素S3の合成

この実施例は、NHSエステルを含む例示的なスルホローダミン色素S3の合成を記載する。この色素は、アミノ基との結合反応を介した、生体分子 (例えば、ペプチド) の蛍光標

50

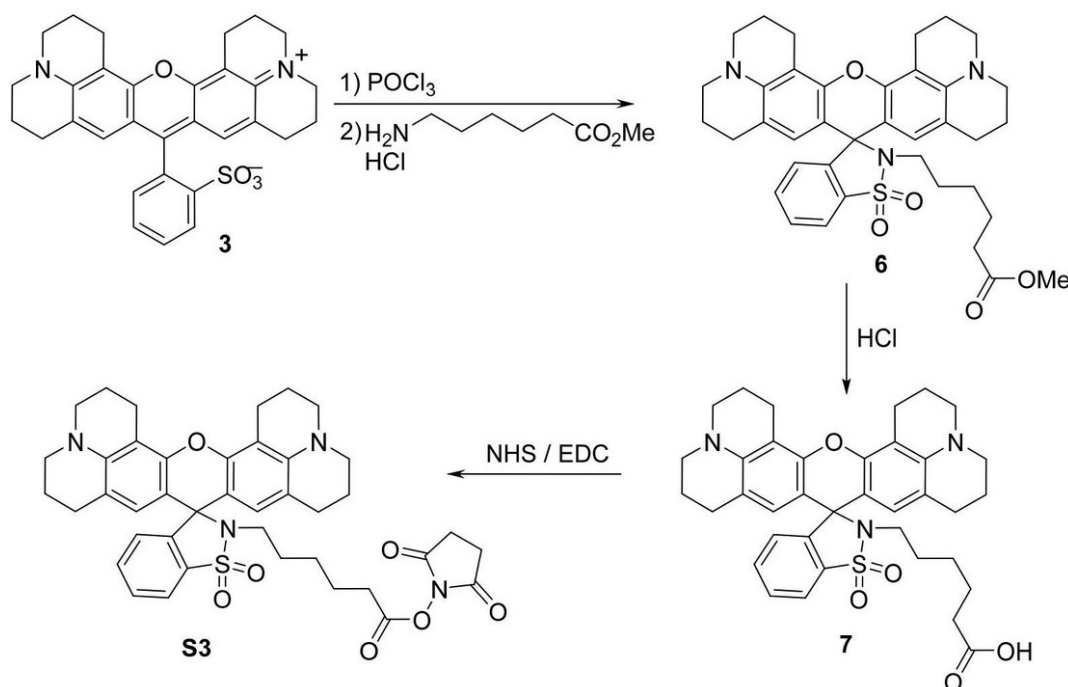
識に適している。

【 0 1 4 6 】

化合物S3は、スキーム3に概説された手順に従って調製した。

【化 4 1 】

スキーム3



【 0 1 4 7 】

化合物6

化合物3 (2.87g、5.28mmol) をアルゴン下で50mLの無水DCMに溶解し、POCl₃ (2.5mL、26.8mmol) を加えた。得られた混合物を室温で一晩撹拌した。DCMとPOCl₃を真空下で除去し、中間体を無水DCM (100 mL) に再溶解した。溶液をアルゴン下で0℃に冷却した。DIEA (18.5mL、106mmol) を加え、続いてメチル-6-アミノカプロエート-HCl (4.83g、26.6mmol) を加えた。反応混合物を室温に温め、2時間撹拌し、次に水 (3x) 及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。生成物を、10% TEAを含む40% EtOAc / ヘキサンを使用するシリカゲルでのクロマトグラフィーによって精製した。塩基性条件下で形成される環化形態の生成物は無色である。TEAが蒸発するにつれて、TLCスポットはゆっくりとピンク色に変わった。精製により、1.30g (37%) の化合物6を水色のフォームとして得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.87 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.46 (m, 2H), 7.00 (m, 1H), 6.44 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.16 (m, 8H), 2.91 (m, 6H), 2.58 (m, 4H), 2.14 (m, 2H), 2.07 (m, 4H), 1.89 (m, 4H), 1.39 (m, 4H), 1.15 (m, 2H). LCMS: m/z 654.3 [M+H]

【 0 1 4 8 】

化合物7

化合物6 (1.30g、1.99mmol) をアセトニトリル (60mL)、水 (15mL)、及び4.5 mLの濃HClに溶解した。溶液を80℃で18時間加熱し、次にDCMで希釈し、飽和NaHCO₃、水、及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させて、1.21gの粗化合物7を得て、これをさらに精製することなく次の工程で使用した。

LCMS: m/z 640.3 [M+H]

【 0 1 4 9 】

化合物S3

化合物7 (1.21g、1.89mmol) を、アルゴン下で25mlの無水ジメチルホルムアミド (

DMF) に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド (435mg、3.78mmol) 及びN-(ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド (EDC) (725mg、3.78mmol) を加えた。混合物を室温で一晩攪拌し、次にDMFを真空下で除去した。残留物をDCMに溶解し、溶液を1N HCl、水、及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。DCM中の5% HOAc及び1% MeOHから5% MeOHを用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにより、880mg (63%) の化合物S3を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.92 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 6.95 (m, 1H), 6.24 (s, 2H), 3.11 (m, 8H), 2.84 (m, 6H), 2.82 (s, 4H), 2.46 (m, 4H), 1.94 (m, 6H), 1.79 (m, 4H), 1.21 (m, 4H), 1.12 (m, 2H). LCMS: m/z 737.3 [M+H]

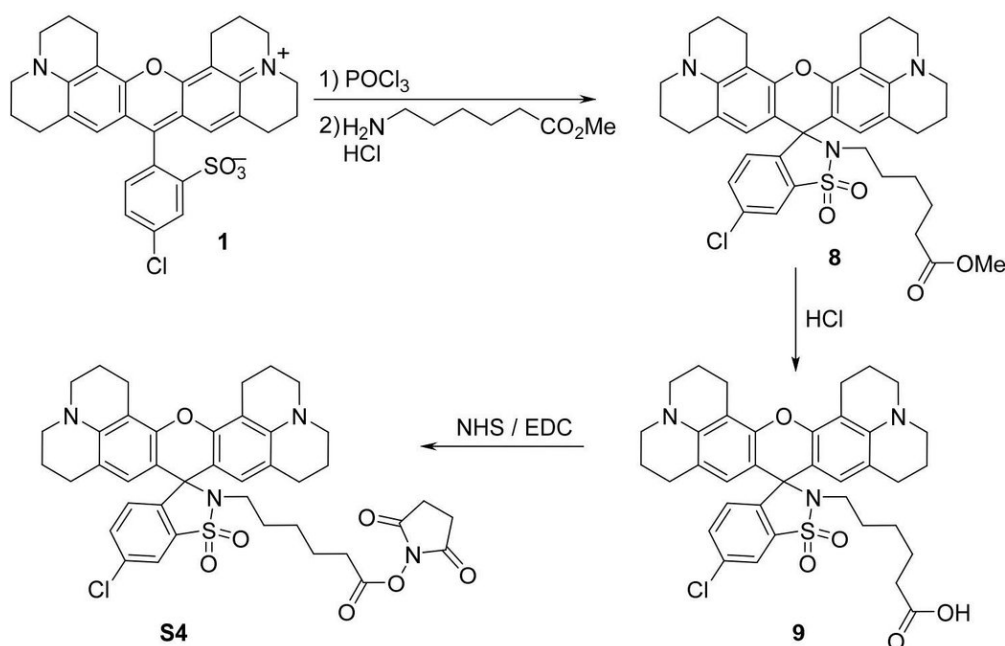
【0150】

実施例4：スルホローダミン色素S4の合成

活性エステル誘導体を含む別の例示的な色素S4は、化合物S3について上述した反応条件を使用して、スキーム4に概説される手順に従って容易に調製できる。

【化42】

スキーム4



【0151】

化合物8

化合物1 (4.0g、0.0071mol) をアルゴン雰囲気下で無水DCM (60mL) に溶解した。ニートオキシ塩化リン (6.5mL、0.071mol) を一度に加え、反応物を室温で23時間攪拌した。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、得られたフォームを5mbarで2時間乾燥させた。フォームに、無水DCM (75mL) をアルゴン雰囲気下に加え、反応フラスコを氷/水浴に入れた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (18.5 mL、0.107mol) を0~5分でゆっくりと加えた。固体のメチル6-アミノヘキサノエートヒドロクロリド (6.5g、0.0360mol) を10分かけて少しずつ加えた。1時間後、氷浴を取り除き、反応混合物を16時間かけて室温まで攪拌した。反応混合物をDCM (125mL) で希釈し、1N HCl (2×90mL) 及びブライン (1×120mL) で洗浄し、次いで硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過、濃縮及びシリカゲルカラム精製 (酢酸エチル/ヘプタン/TEA、30:10:60) により、生成物 (2.4g、~49%収率) を金色の固体として得た。

LCMS: m/z 688.5 [M+H] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.83 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 7.4 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 6.95 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.42 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.16 (m, 8H), 2.89 (m, 6H), 2.58 (m, 4H), 2.14 (t, 2H, J = 8 Hz), 2.06 (m, 4H), 1.91 (m, 4H), 1.40 (m, 4H), 1.15 (m, 2H)

【 0 1 5 2 】

化合物S4

化合物8 (0.60g、0.00087モル) を攪拌しながらアセトニトリル (30mL) に懸濁した。DI (脱イオン) 水 (7mL) を加え、懸濁液を数分間攪拌した。濃塩酸 (3mL) を滴下すると赤/紫色の溶液が得られた。溶液を穏やかな還流で2~3時間加熱し、次に15時間かけて室温まで攪拌した。反応混合物の体積 (紫色) をロータリーエバポレーターでの蒸発により半分にし、反応溶液を室温のDI水 (75mL) に注ぐことにより生成物を沈殿させた。懸濁液を濾過し、ケーキを追加のDI水 (15mL) で洗浄し、40~50 及び 2 mbarの真空で20時間真空オープンで乾燥させて、0.54g (93% 収率) の化合物9が紫色の粉末として得られ、次の工程で使用した

10

【 0 1 5 3 】

上記で得られた化合物9 (0.2g、0.000296モル) を10mLの丸底フラスコに入れ、アルゴン雰囲気下で無水DMF (3.0mL) に溶解した。得られた紫色の溶液に、N-ヒドロキシスクシンイミド (0.04g、0.00034モル、1.15eqv) 及びEDC (0.075g、0.00039モル、1.3eqv) を加え、反応物を周囲温度で21時間攪拌した。反応混合物をDCM (40mL) で希釈し、水 (20mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。溶媒を蒸発させ、残留物を5~15% MeOH/DCMを使用するカラムクロマトグラフィーによって精製して、0.14g (61% 収率) の化合物S4を得た。

LCMS: m/z 771.6 [M+H] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.17 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 8.4, 2.0 Hz), 6.98 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.24 (s, 2H), 3.13 (m, 8H), 2.82 (m, 6H), 2.74 (m, 2H), 2.55 (m, 4H), 2.41 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 1.94 (m, 4H), 1.79 (m, 4H), 1.10-1.35 (m, 8 H)

20

【 0 1 5 4 】

実施例5: スルホローダミン色素S5の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基を含む例示的なスルホローダミン色素S5の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に組み込むのに適している。

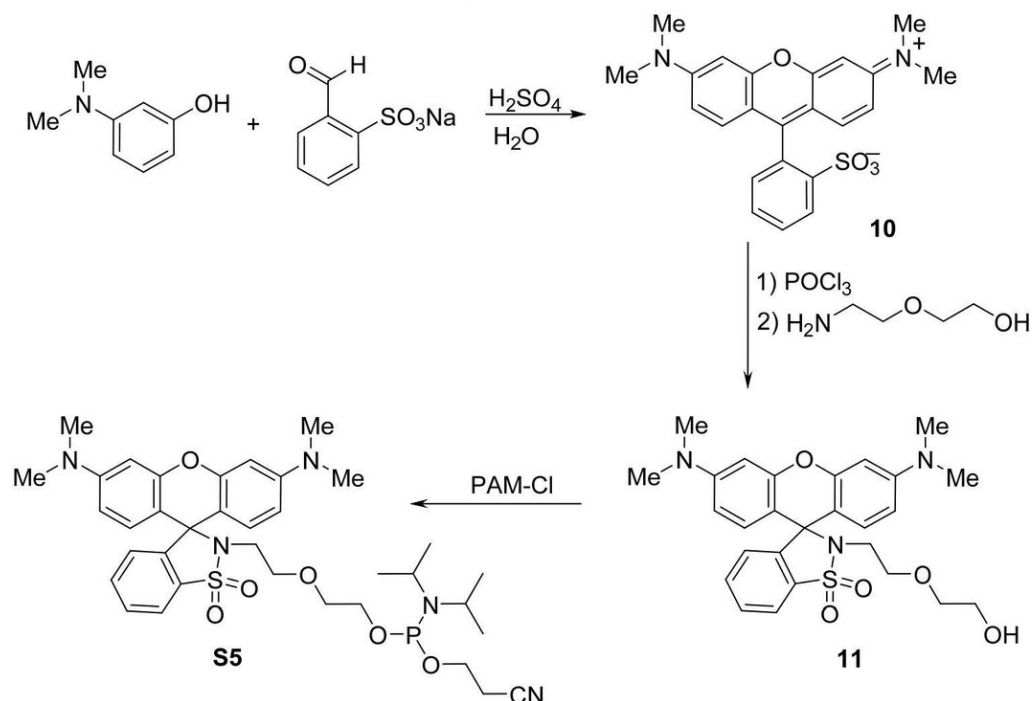
【 0 1 5 5 】

化合物S5は、スキーム5に概説された手順に従って調製した。

【化43】

30

スキーム5



40

50

【 0 1 5 6 】

化合物10

水 (27mL) を0 に冷却し、41mLの濃縮液を加えた。H₂SO₄をゆっくりと加えた。溶液を160 に加熱した。十分に予混合した2-ホルミルベンゼンスルホン酸 (5.03g、24.2 mmol) 及び3-(ジメチルアミノ)フェノール (6.63g、48.3mmol) を1分かけて硫酸溶液に少しずつ加えた。溶液を空気下で160 で8時間攪拌し、次に室温に冷却し、さらに8時間攪拌した。冷水 (300mL、約0) を100mLの10MNaOHと混合した。粗反応混合物を、温度を25 未満に保ちながら、NaOH溶液に滴下して加えた。反応混合物を加えたら、pHが約8.5になるまでさらに10M NaOHを加えた。混合物を室温で一晩攪拌した。固体を真空濾過によって収集し、KOHを用いて高真空下で乾燥させて、約50%の無機塩を含む10.6gの粗物質を得た。粗物質の3.57g部分を、MeOH/DCM溶媒勾配 (4%から10% MeOH) を使用してシリカゲルカラム (2" x 7") でクロマトグラフィーにかけた。異性体の混合物が生成され、所望の異性体が最初に溶出した。780mg (22%) の化合物10を得た。

LCMS: m/z 423.4 [M+H]

【 0 1 5 7 】

化合物11

アルゴン下の75mLの無水DCM中の化合物10 (740mg、1.75mmol) に、POCl₃ (1.64mL、6.50mmol) を加え、混合物を室温で18時間攪拌した。DCMを室温減圧下で除去し、次に過剰のPOCl₃を60 減圧下で除去してフォームを生成した。フォームをアルゴン下で125mLの無水DCMに溶解し、溶液を0 に冷却した。トリエチルアミン (3.10mL、17.8mmol) 及び2-(2-アミノエトキシ)エタノール (0.875mL、8.78mmol) を加えた。混合物を室温まで温め、1時間攪拌し、次に水及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。シリカゲル (1"x7")、10%TEAを含む40%EtOAc/ヘキサンから60%EtOAc/ヘキサンでのクロマトグラフィーにより、438mg (49%) の化合物11を得た。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.00 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 6.96 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.43 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 4.44 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.14 (m, 4H), 2.93 (s, 12H), 2.91 (m, 2H). LCMS: m/z 510.4 [M+H]

【 0 1 5 8 】

化合物S5

化合物11 (423mg、0.830mmol) をアルゴン下で25mLの無水DCMに溶解し、DIEA (0.725mL、4.16mmol)、続いてPAM-Cl (0.190mL、0.924mmol) を加えた。混合物を室温で3時間攪拌し、飽和NaHCO₃、水、及びブラインで洗浄し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。シリカゲル、10%TEAを含む20%EtOAc/ヘキサンから40%EtOAc/ヘキサンでのクロマトグラフィーにより、485mg (82%) の化合物S5を得た。¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ 7.89 (m, 1H), 7.57 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.52 (m, 2H), 6.44 (m, 2H), 3.73 (m, 2H), 3.56 (m, 4H), 3.26 (m, 4H), 2.97 (s, 12H), 2.61 (m, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6H) ³¹P NMR (CD₃CN, 160 MHz): δ 148.1

【 0 1 5 9 】

実施例6: スルホローダミン色素S6の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基及びジメトキシトリチル基で保護されたヒドロキシル基を含む例示的なスルホローダミン色素S6の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介して、オリゴヌクレオチドの5'末端又は中間位置に組み込むのに適している。

【 0 1 6 0 】

化合物S6はスキーム6の手順に従って調製した。

10

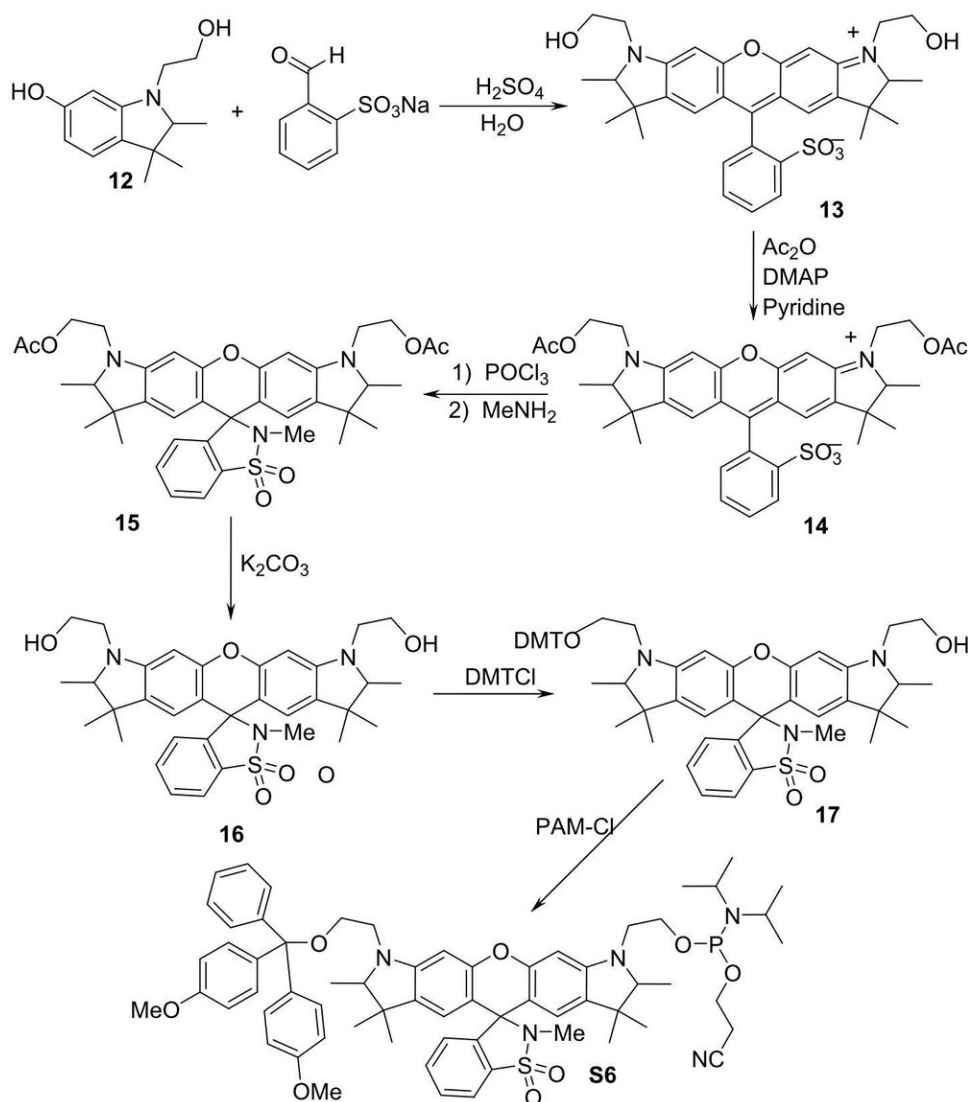
20

30

40

【化 4 4】

スキーム6



【 0 1 6 1】

化合物13

化合物12の合成は、酢酸中のエチレンオキシド2,3,3-トリメチル-2,3-ジヒドロ-1H-インドール-6-オール (FCHグループ、ラトビア) で処理することにより行った。水 (27mL) を約0℃に冷却し、濃 H_2SO_4 (41mL) をゆっくりと加えた。得られた溶液を250mLの3つ口丸底フラスコで160℃に加熱した。十分に予混合した2-ホルミルベンゼンスルホン酸 (3.21g、15.4mmol) 及び化合物12 (6.82g、30.8mmol) を1分かけて硫酸溶液に少しずつ加えた。溶液を空気に開放して160℃で6時間加熱し、次に室温に冷却し、300mLの冷5MNaOHにゆっくりと加えた。 H_2SO_4 でpHを9に調整した。混合物をDCM (2x) で抽出した。コンバインした有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒を真空下で除去し、粗固体をKOHで高真空下で乾燥させて、2.25gの粗物質を得た。ACN / 水溶媒システム (5~8% H_2O) を使用したシリカゲルカラム (2" x 6") でのクロマトグラフィーにより、526 mg (6%) の化合物13を得た。

^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.64 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 3.76 (m, 8H), 3.48 (m, 2H), 1.11 (m, 18H). LCMS: m/z 591.5 [$\text{M}+\text{H}$]

【 0 1 6 2】

化合物14

10

20

30

40

50

化合物13 (525mg、0.889mmol) を、アルゴン下で15mLの無水ピリジンに溶解した。無水酢酸 (0.210mL、2.22mmol) 及びDMAP (11mg、0.090mmol) を加え、混合物を室温で3時間撹拌した。ピリジンを真空下で除去し、残留物を、MeOH/DCM溶媒系 (2~10%) を使用するシリカゲル (1"x7") でのクロマトグラフィーによって精製して、531mg (89%) の化合物14を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.66 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.18 (m, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.69 (s, 2H), 4.31 (m, 4H), 3.96 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.18 (m, 12H), 0.98 (s, 6H). LCMS: m/z 675.5 [M+H]

【0163】

10

化合物15

化合物14 (520mg、0.771mmol) をアルゴン下で25mLの無水DCMに溶解し、POCl₃ (0.360mL、3.68mmol) を加えた。反応混合物を室温で5時間撹拌し、次にTHF中の2.0Mメチルアミン (11.6mL、23.1mmol) を加え、混合物を1時間撹拌した。混合物を水、飽和NaHCO₃、及びブラインで洗浄し、有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。シリカゲル (1"x7")、10%TEAを含有する10%EtOAc /ヘキサンから30%EtOAc/ヘキサンでのクロマトグラフィーで、437mg (82%) の化合物15を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.01 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.02 (m, 1H), 6.43 (m, 2H), 6.33 (m, 2H), 4.18 (m, 4H), 3.47 (m, 2H), 3.29 (m, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.98 (m, 6H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.71 (s, 3H). LCMS : m/z 688.5 [M+H]

20

【0164】

化合物16

化合物15を20mLのMeOHに溶解し、5mLの水中のK₂CO₃の溶液を加えた。混合物を室温で1時間撹拌した。MeOHを真空下で除去し、残留物を水及びブラインで洗浄し、Na₂CO₃及び高真空下で乾燥させて、336mg (90%) の化合物16を得て、これをさらに精製することなく次の工程で使用した。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.99 (m, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.01 (m, 1H), 6.41 (s, 2H), 6.24 (m, 2H), 4.71 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.54 (m, 4H), 3.28 (m, 4H), 3.16 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.08 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.71 (3H). LCMS: m/z 604.5 [M+H]

30

【0165】

化合物17

化合物16 (329 mg、0.545mmol) を、12mLの無水ピリジン (2X) との共沸蒸発により乾燥させた。乾燥した材料を12mLの無水ピリジンに溶解し、DMTC1 (258mg、0.761mmol) を加えた。混合物を室温で18時間撹拌し、反応をメタノール (2mL) で止めた。溶媒を真空下で除去した。シリカゲル (1"x7")、10%TEAを含む30%EtOAc/ヘキサンから40%EtOAc/ヘキサンでのクロマトグラフィーにより、232mg (47%) の化合物17を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 8.01 (m, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.22 (m, 7H), 7.05 (m, 1H), 6.81 (m, 4H), 6.43 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.29 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 3.68 (m, 6H), 3.57 (m, 3H), 3.25 (m, 7H), 2.25 (m, 3H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (m, 3H), 0.86 (m, 3H), 0.73 (m, 3H). LCMS: m/z 906.8 [M-H]

40

【0166】

化合物S6

アルゴン下の20mLの無水DCM中の化合物17 (227mg、0.251mmol) の溶液に、DIEA (0.218mL、1.25mmol)、続いてPAM-Cl (0.075mL、0.365mmol) を加えた。混合物を室温で2時間撹拌し、次にNaHCO₃、水、及びブラインで洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させた。シリカゲル、10%TEAを含有する20%EtOAc/ヘキサンから30%EtOA

50

c/ヘキサンでのクロマトグラフィーにより、212mg (77%) の化合物S6を得た。

^1H NMR (CD_3CN , 400 MHz): δ 7.91 (m, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.28 (m, 7H), 7.03 (m, 1H), 6.81 (m, 4H), 6.56 (m, 2H), 6.32 (m, 2H), 3.79 (m, 2H), 3.72 (m, 6H), 3.58 (m, 4H), 3.41 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.32 (m, 3H), 1.11 (m, 21H), 1.03 (m, 3H), 0.93 (m, 3H), 0.80 (m, 3H). ^{31}P NMR (CD_3CN , 160 MHz): δ 147.3

【0167】

モデルオリゴヌクレオチド (配列番号1) の5'末端に化合物S6を組み込んだ。例示的なオリゴヌクレオチドの励起及び発光スペクトルを図3に示す。

【0168】

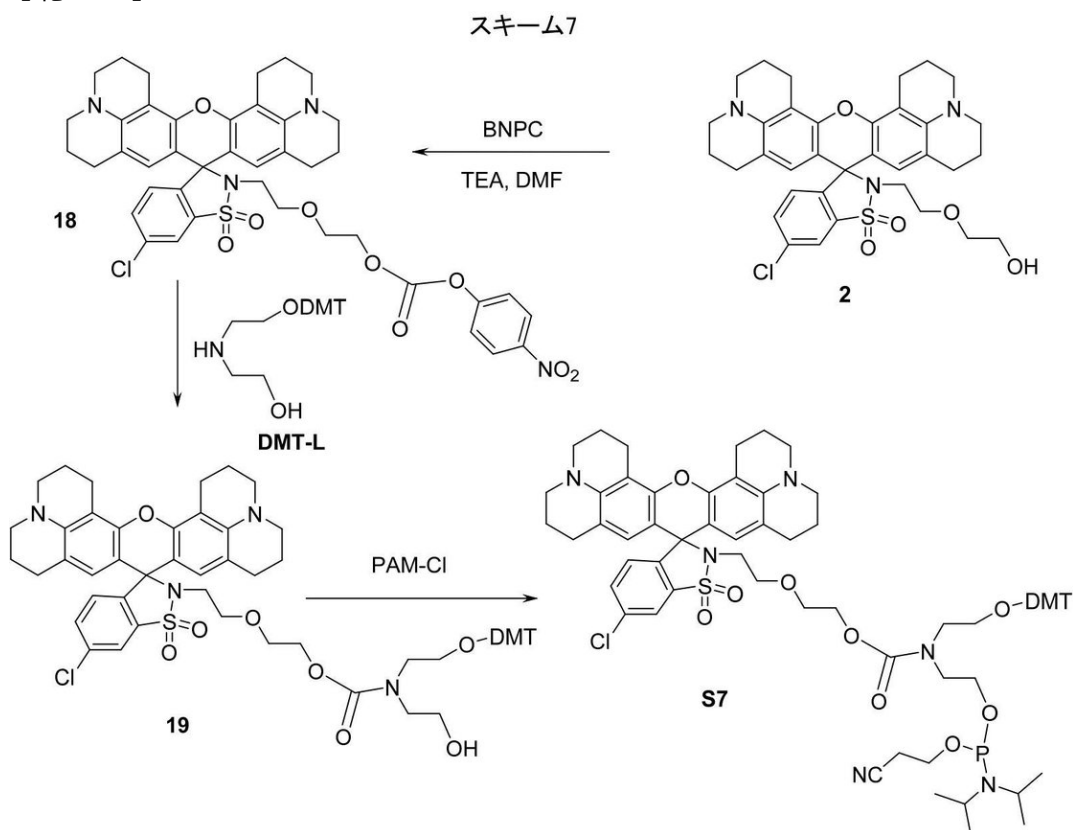
実施例7: スルホローダミン色素S7の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基及びジメトキシトリチル基で保護されたヒドロキシル基を含む例示的なスルホローダミン色素S7の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介して、オリゴヌクレオチドの5'末端又は中間位置に組み込むのに適している。

【0169】

化合物S7はスキーム7の手順に従って調製した。

【化45】



【0170】

化合物19

無水DMF (50mL) 中の化合物2 (4.9g、7.6mmol) の懸濁液を、アルゴン下、過剰のTEA (5.3mL、5eq)、続いてビス-ニトロフェニルカーボネートBNPC (2.8g、1.2eq) と共に室温で処理した。中間体18の形成が完了するまで (BNPCの添加後1.5~3時間)、黒色懸濁液を30~35℃で加熱した。モノ-DMT-ジエタノールアミン (DMT-L) (4.6g、1.5 eq) を一度に加え、反応混合物を30-35℃ (1-3時間)、次に室温 (2時間) で反応が完了するまで撹拌した。反応混合物をEtOAc (530mL) で希釈し、分液漏斗に移した。EtOAc層を、DI水 (4×380mL) 及びブライン (1×380mL) で洗浄した。EtOAc層を Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、蒸発させて、粗化合物19を得た。粗生成物のシリカゲルカ

10

20

30

40

50

ラム精製により、純粋な化合物19をラベンダーから紫色の固体として得た(7.5g、91%収率)。

LCMS: m/z 1082.0 [M+H]. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.18 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 7.22 (dd, 1H, $J = 8.4, 1.6$ Hz), 7.16-7.36 (m, 10H), 6.95 (m, 1H), 6.86 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.81 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 6.28 (s, 2H), 4.60 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.70 (m, 6H), 3.40 (m, 3H), 3.30 (m, 3H), 3.16 (m, 2H), 3.07 (m, 12H), 2.90 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.78 (m, 4H), 2.44 (m, 4H), 1.92 (m, 4H), 1.75 (m, 4H)

【0171】

化合物S7

化合物19(6.5g、6mmol)を3つ口丸底フラスコに入れ、2mBarの高真空下で90分乾燥させた。次に、乾燥した化合物19をアルゴン下で無水DCM(130mL)に溶解した。反応フラスコを0~5℃に冷却し、DIEA(10.5mL、10eq)を加えた後、内部温度を0~5℃に保ちながらN,Nジイソプロピル-クロロホスホラミダイト-Cl(PAM-Cl)(1.7mL、1.3eq)を滴下して加えた。反応が完了するまで(2~3時間)室温で撹拌した。反応物をDCM(130mL)で希釈し、 NaHCO_3 (2×80mL)、ブライン(150mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。粗生成物の濾過、濃縮及びシリカゲルカラム精製により、純粋な化合物S7をピンクからラベンダーの固体として得た(6.07g、78%収率)。

LCMS: m/z 1281.2 [M+H]. ^{31}P NMR (DMSO- d_6 , 160 MHz): δ 147.57. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.90 (s, 1H), 7.48 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.0$ Hz), 7.40 (m, 2H), 7.20-7.30 (m, 7H), 6.82 (m, 5H), 6.35 (s, 2H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.76 (m, 8H), 3.62 (m, 4H), 3.46 (m, 2H), 3.41 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 3.13 (m, 11H), 2.98 (m, 1H), 2.84-2.91 (m, 5H), 2.64 (m, 2H), 2.40-2.56 (m, 6H), 1.95 (m, 4H), 1.78 (m, 4H), 1.10-1.23 (m, 12H)

【0172】

実施例8：化合物S8の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基及びジメトキシトリチル基で保護されたヒドロキシル基を含む例示的なスルホローダミン色素S8の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介して、オリゴヌクレオチドの5'末端又は中間位置に組み込むのに適している。

【0173】

化合物S8はスキーム8の手順に従って調製した。

10

20

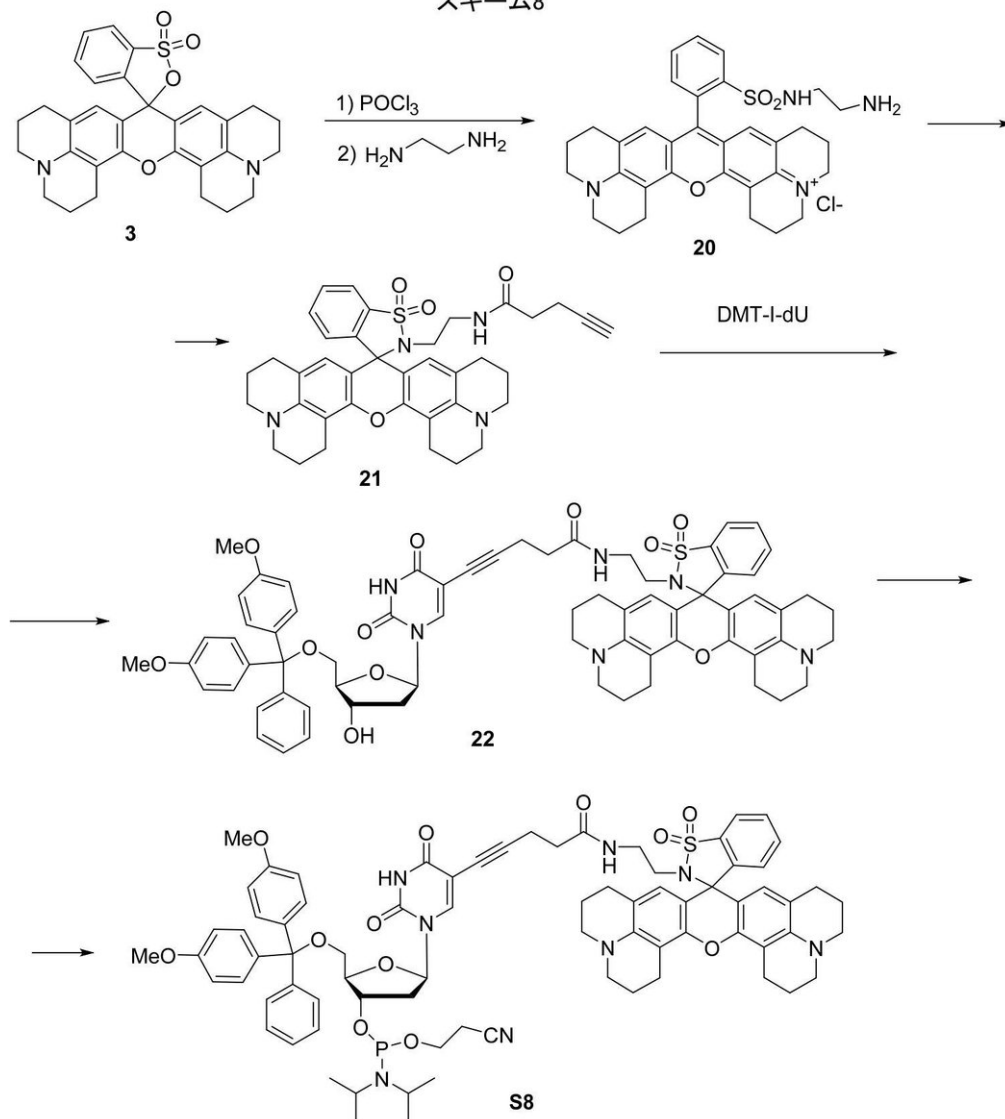
30

40

50

【化 4 6】

スキーム8



【0174】

化合物20

化合物3（2.80g、1eq）を無水ジクロロメタン（50mL）に溶解し、 POCl_3 （6.9mL、14eq）を周囲温度で滴下して加えた。4時間後、反応混合物を蒸発乾燥させて、粗中間体を暗青色の固体として得た。エチレンジアミン（EDA、6.0mL、17.0eq）を無水ジクロロメタン（40mL）に溶解し、溶液を5℃に冷却した。固体を無水ジクロロメタン（20mL）に溶解し、EDA溶液に滴下した。4〜17時間後、反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム（2x40mL）で洗浄し、次にDI水（40mL）で洗浄した。有機層を蒸発乾燥させて、化合物20（3.08g、96%）を暗青色の固体として得た。

LCMS: m/z 569.4 $[\text{M}+\text{H}^+]$. Calc-d: 569.25. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 7.92 (dd, 1H, $J = 6.0, 2.8$ Hz), 7.54 - 7.56 (m, 2H), 6.90 (dd, 1H, $J = 6.4, 2.8$ Hz), 6.30 (s, 2H), 3.3 (br., 2H), 3.07 - 3.14 (m, 8H), 2.75 - 2.88 (m, 6H), 2.35 - 2.49 (m, 6H), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H)

【0175】

化合物21

4-ペンチン酸（4PA、0.67g、1.1 eq）を無水アセトニトリル（6.5mL）に溶解し、溶液を5℃に冷却した。ジイソプロピルエチルアミン（3.3mL、3.0 eq）を加え、続いてペントフルオロフェニルトリフルオロアセテート（PFP-TFA、1.2mL、1.1 eq）を加えた

。反応混合物を周囲温度で1時間インキュベートした。化合物20 (3.1g、1.0 eq) を、10mLのN,N-ジメチルホルムアミド、10mLのジクロロメタン、及び5mLのジメチルスルホキシドの混合物に懸濁した。懸濁液を活性4-ベンチン酸溶液に加え、周囲温度で1時間インキュベートした。反応混合物を50mLの酢酸エチルで希釈し、飽和重炭酸ナトリウム (2×30mL)、次にDI水 (30mL) で洗浄した。有機層を蒸発乾燥させた。粗生成物をシリカゲルカラム精製を使用して精製し、化合物21 (2.74g、68%収率) を青色の固体として得た。

LCMS: m/z 649.5 [M+H⁺]. Calc-d: 649.28. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.93 - 7.96 (m, 1H), 7.65 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 7.54 - 7.58 (m, 2H), 6.87 - 6.90 (m, 1H), 6.32 (s, 2H), 3.05-3.16 (m, 8H), 2.97 - 3.04 (m, 2H), 2.79 - 2.88 (m, 6H), 2.72 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 2.39 - 2.58 (m, 4H, overlaps with DMSO-d₅), 2.20 - 2.27 (m, 2H), 2.10 (t, 2H, 7.6 Hz), 1.95 (m, 4H), 1.79 (m, 4H)

【0176】

化合物22

化合物21 (2.7g、1.0eq) をN,N-ジメチルホルムアミド (22.0mL) に溶解し、トリエチルアミン (1.7mL、3.0eq) を加えた。調製した溶液を不活性雰囲気下で5-ヨード-5'-ジメトキシトリチル-2'-デオキシウリジン (2.7g、1.0eq、DMT-I-dU)、テトラキス(トリフェニルホスフィン) パラジウム(0) (0.48g、0.1eq) 及びヨウ化銅(I) (0.24g、0.3eq) の固体混合物に加え、反応混合物を周囲温度で2時間インキュベートした。反応混合物を酢酸エチル (120mL) で希釈し、0.1MEDTA溶液 (2×80mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ (25g、18時間)、濾過し、蒸発乾燥させた (青色の固体)。粗生成物をシリカゲルカラム精製を使用して精製して、化合物22 (4.73g、97%収率) を青色の固体として得た。

LCMS: m/z 1177.9 [M+H⁺]. Calc-d: 1177.47 ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.93 - 7.96 (m, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.54 - 7.58 (m, 2H), 7.49 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 7.37 - 7.41 (m, 2H), 7.25 - 7.31 (m, 6H), 7.18 - 7.22 (m, 1H), 6.83 - 6.90 (m, 5H), 6.32 (s, 2H), 6.11 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 5.33 (s, 1H), 4.27 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.21 - 3.26 (m, 2H), 3.05-3.14 (m, 8H), 2.97 - 3.04 (m, 2H), 2.77 - 2.88 (m, 6H), 2.38 - 2.59 (m, 4H, overlaps with DMSO-d₅), 2.14 - 2.28 (m, 4H), 1.98 - 2.03 (m, 2H), 1.93 (m, 4H), 1.77 (m, 4H)

【0177】

化合物S8

化合物22 (4.6g、1.0eq) をアルゴン下で無水ジクロロメタン (27.6mL) に溶解した。反応フラスコを0~5℃に冷却し、ジイソプロピルエチルアミン (2.0mL、3.0eq) を加えた後、内部温度を0~5℃に維持しながら、PAM-Cl (1.1mL、1.3eq) を滴下して加えた。反応物を室温で2時間攪拌した。反応物を酢酸エチル (150mL) で希釈し、NaHCO₃ (2×100mL)、ブライン (80mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ (46g、20時間)、濾過し、蒸発乾燥させた (青色の固体)。生成物を200mLのジクロロメタンに溶解し、エーテルとヘキサンの等量混合物 (2L) で沈殿させることにより精製した。濾過及び乾燥により、生成物を青色の固体として得た (1.92g、36%収率)。

LCMS: m/z 1378.3 [M+H]. ³¹P NMR (CD₃CN, 160 MHz): two singlets (diastereomers) δ 147.97 ppm and 148.04 ppm. ¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ 9.2 (br, 1H), 7.94 and 7.97 (s, 1H), 7.85 - 7.89 (m, 1H), 7.53 - 7.59 (m, 2H), 7.42 - 7.47 (m, 2H), 7.30 - 7.37 (m, 4H), 7.19 - 7.29 (m, 3H), 6.80 - 6.92 (m, 5H), 6.35 (s, 2H), 6.13 - 6.21 (m, 1H), 5.36 - 5.41 (m, 1H), 4.55 - 4.64 (m, 1H), 4.08 - 4.15 (m, 1H), 3.73 - 3.75 (m, 6H), 3.55 - 3.70 (m, 4H), 3.25 - 3.40 (m, 2H), 3.05-3.16 (m, 8H), 2.93 - 3.00 (m, 2H), 2.72 - 2.88 (m, 6H), 2.66 (t, 1H, 6.0 Hz), 2.33 - 2.59 (m, 7H), 2.15 - 2.22 (m, 2H), 1.92 - 2.00 (m, 2H), 1.75 - 1.88 (m, 6H), 1.14 - 1.21 (m, 9H), 1.07 and 1.06 (2 x s, 3H)

【0178】

10

20

30

40

50

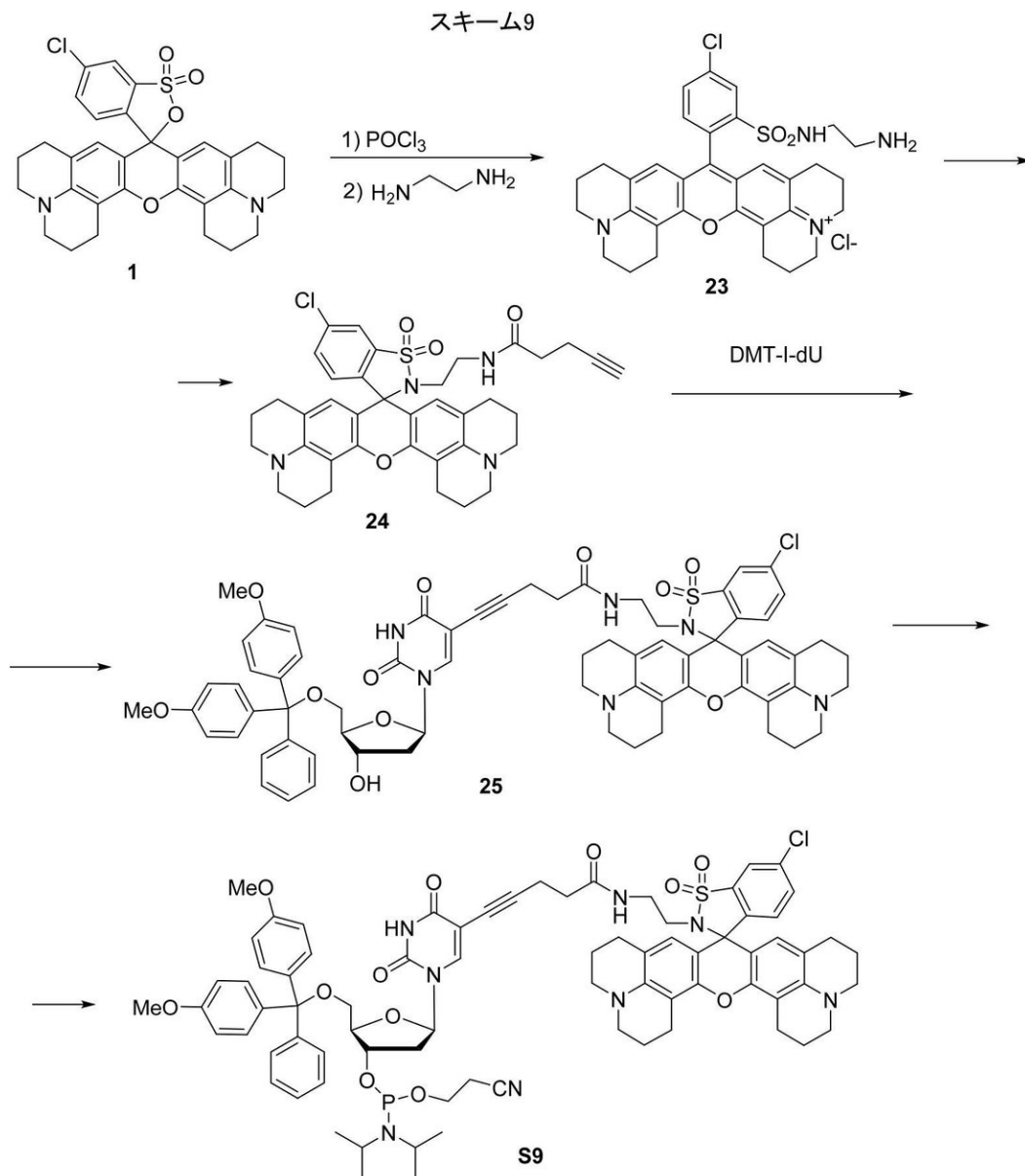
実施例9：化合物S9の合成

この実施例は、ホスホラミダイト基及びジメトキシトリチル基で保護されたヒドロキシル基を含む例示的なスルホローダミン色素S9の合成を記載する。この色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介して、オリゴヌクレオチドの5'末端又は中間位置に組み込むのに適している。

【0179】

化合物S9は、スキーム9に従って上記の化合物S8の調製と同様に調製される。

【化47】



【0180】

実施例10：スルホローダミン色素ホスホラミダイトから蛍光標識ポリヌクレオチドの調製

スルホローダミン色素を含むポリヌクレオチドは、DMT除去 - カップリング - キャッピング - 酸化 - キャッピングのサイクルで、標準の200nmol DNAプロトコルを利用してMerMade-12オリゴヌクレオチドシンセサイザーで合成した。スルホローダミン色素ホスホラミダイトのカップリング時間は6分に延長した。

【0181】

5'スルホローダミン色素を含むポリヌクレオチドでは、最後のスルホローダミン色素ホスホラミダイトカップリングサイクル後に合成が完了した。スルホローダミン色素ホスホラミダイトを内部に組み込む場合は、色素のカップリング後にさらにヌクレオシドモノマ

ーを追加した。最終的なDMT基はポリヌクレオチドに残った。

【0182】

完全にアセンブルしたポリヌクレオチドを固体支持体から開裂させ、55℃で10～12時間30%水酸化アンモニウムで脱保護した。アンモニアを除去した後、オリゴヌクレオチドをpH7でのアセトニトリル/0.1M重炭酸トリエチルアンモニウムの直線勾配で溶出するC18 Geminiカラムでの逆相HPLC (RP-HPLC) によって分析、精製した。DMT基を除去した後、ポリヌクレオチドを2回精製した。

【0183】

スルホローダミン101標識オリゴヌクレオチドは、アミノ-C6-オリゴと市販のTexas Red^(R)-X (NHSエステル) 試薬 (混合異性体、Thermo Fisher Scientific) を結合させて調製した。全ての精製されたポリヌクレオチドは、質量分析によって特徴づけた。

【0184】

例示的なスルホローダミン色素を含む5'-ヌクレアーゼプローブは、市販のBHQ-2消光剤CPG、Glycolate 500 Angstromカラム (BioSearch Technologies) を使用して調製した。A01は、市販の2-アミノ-dA-CEホスホラミダイト (Glen Research、製品カタログ番号: 10-1085) を使用して組み込まれた2-アミノ-dA (2,6-ジアミノ-2'-デオキシプリンリボシド) を示す。

【0185】

スルホローダミン色素ホスホラミダイトとスルホローダミン101 (Tx Red) 標識オリゴヌクレオチドを組み込んだ例示的なオリゴヌクレオチドを表1に示す。

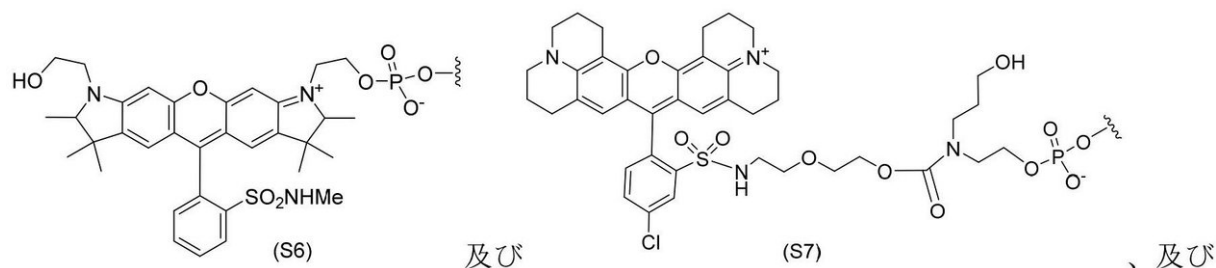
【表1】

名前	5' 色素	配列	3' 消光剤
オリゴA	Tx Red	配列番号1	N/A
オリゴB	(S6)	配列番号1	N/A
オリゴC	(S7)	配列番号1	N/A
オリゴD	Tx Red	配列番号2	BHQ-2
オリゴE	(S7)	配列番号2	BHQ-2
オリゴF	Tx Red	配列番号3	BHQ-2
オリゴG	(S7)	配列番号3	BHQ-2

【0186】

表1において、ポリヌクレオチドの5'末端に組み込まれた色素部分は、以下の構造を有する。

【化48】



オリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

TCA GAG TAC CTG AAA CA (配列番号1)、
CC(A01) CGG (A01)GC G(A01)G AC(A01) TCT CGG CC (配列番号2)、及び
CC(A01) G(A01)G CAA ACT GGG CGG C(A01) (配列番号3)
ここで、A01は2,6-ジアミノプリン2'-デオキシリボシドを示す。

【0187】

標識オリゴヌクレオチドの励起及び発光スペクトルを、Agilent Cary蛍光光度計(200 nMオリゴヌクレオチド、0.1M Trisバッファー、pH 8)で記録した。図1A及び1Bに示すように、例示的な色素ホスホラミダイト試薬化合物S7(オリゴC)を使用したオリゴヌクレオチド自動合成によって調製された例示的なオリゴヌクレオチドの励起及び発光極大値は、TexasRed^(R)色素(オリゴA)を含むオリゴヌクレオチドの励起及び発光極大値と一致する。図1Cに示すように、例示的な色素ホスホラミダイト試薬化合物S6(オリゴB)を使用したオリゴヌクレオチド自動合成によって調製された例示的なオリゴヌクレオチドの励起及び発光極大値は、TAMRA色素標識オリゴヌクレオチドの文献報告された励起及び発光極大値に近い。

10

【0188】

実施例11：5'-ヌクレアーゼPCRにおける例示的なスルホローダミン色素及びTexasRed^(R)色素の性能比較

この実施例では、5'-ヌクレアーゼPCR反応は、本明細書の開示の色素及び市販の消光剤BHQ-2を含む開裂可能な消光蛍光プローブを使用して実施した。図2A及び2Bに示されるPCRプロファイルは、本発明の色素を含むプローブが検出プローブとして効率的に機能したことを実証している。

20

【0189】

本明細書の開示の色素を含む5'-ヌクレアーゼPCRプローブを評価し、Texas Red^(R)を含むPCRプローブと比較した。ヒトゲノムDNAベータグロブリンハウスキーピング遺伝子をターゲットとして使用した。フォワード及びリバースプライマーは以下の配列を有していた。

AAA CCT CCA GGC CAG AAA GAG AGA GTA (配列番号4)
AAA AGG CAT TCC TGA AGC TGA CAG CAT TC (配列番号5)
AAA ACC TGC CTT CTG CGT GAG ATT CT (配列番号6)
CTG TAC GAA AAG ACC ACA GGG CCC AT (配列番号7)

30

【0190】

PCRは、4つのモジュール(検出：Tx Redチャネル、Ex 585 nm、Em 610 nm)を備えたGeneXpert^(R)(Cepheid)機器で行った。各PCR曲線は平均4回の繰り返しである。以下のPCRプロトコルを使用した。

アンプリコン：長さ96 bp、1,000コピー/反応、

ATP、CTP、GTP、TTPのそれぞれのヌクレオシド三リン酸(NTP)濃度：0.25mmol

、

Taqポリメラーゼ：3ユニット/25uL反応、

プライマー(各)濃度：200 nM、及び

プローブ濃度：250 nM、

40

変性を95℃で35秒間、アニーリング-伸長を66℃で30秒間、及び45サイクル：変性を95℃で8秒間、アニーリング-伸長を66℃で30秒間

【0191】

得られたPCRデータを図2A及び2Bに示す。データによって示されるように、本明細書の開示の例示的な色素で標識された5'ヌクレアーゼPCRプローブは、Texas Red^(R)で標識されたPCRプローブと同等の性能を有する。図2A及び2Bのデータから分かるように、例示的な色素S7を含むプローブは、Texas Red^(R)で標識されたプローブによって示されるものと同様のエンドポイントを示す。

【0192】

実施例12：化合物S10a及びS10bの合成

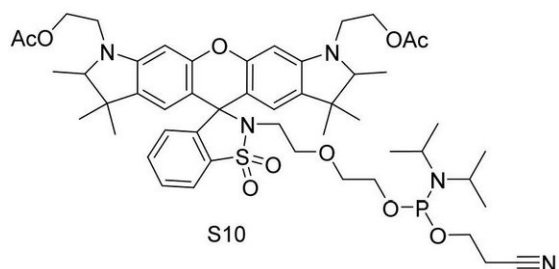
50

この実施例は、ホスホラミダイト基を含む例示的なスルホローダミン色素S10a及びS10bの合成を記載する。これらの色素は、標準的なオリゴヌクレオチド自動合成を介してオリゴヌクレオチドの5'末端位置に組み込むのに適している。

【0193】

ラセミ中間体12から調製した下記の化合物S10などのスルホローダミン色素は2つのキラル中心を含み、最終的な色素は4つのジアステレオマーの混合物として存在する。

【化49】



10

【0194】

このような色素をポリヌクレオチドに組み込むと、例えば、ホスホラミダイト合成又はコンジュゲーションによって、蛍光標識されたポリヌクレオチドのジアステレオマー混合物が生成される。これらのポリヌクレオチドは同一の光学特性を持っているが、ポリヌクレオチドが複数又は広いピークとして溶出するため、HPLCによる精製は困難であり得る。色素の純粋な立体異性体を使用すると、このような標識ポリヌクレオチドのクロマトグラフィー精製を簡素化できる。

20

【0195】

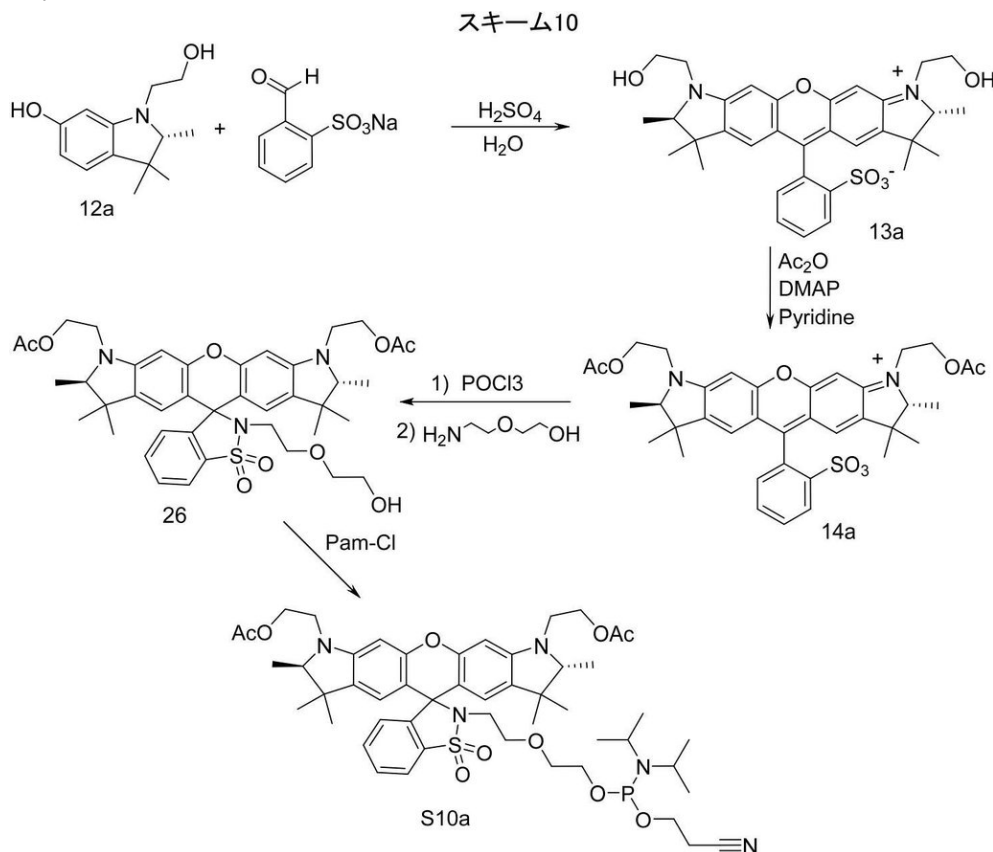
化合物S10aは、化合物12の単一のエナンチオマーである12aから合成されたスルホローダミン色素の例であり、その結果、化合物S10aは単一のジアステレオマーとして存在する。化合物12aは、キラル触媒RuCl(p-シメン)[(R,R)-Ts-DPEN] (Aldrich cat # 703907)を使用した不斉移動水素化 (Org. Lett. 2018, 20, 5107-5111に記載のように) により、2,3,3-トリメチル-3H-インドール-6-オール (FCHグループ、Lativa) から合成できる。同様に、12aの立体異性体である化合物12bは、RuCl(p-シメン)[(S,S)-Ts-DPEN] (Aldrich)を使用する同様の手順によって合成できる。

30

40

50

【化 5 0】



10

20

【 0 1 9 6】

化合物13a

2-ホルミルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩 (1.41g、6.77mmol) 及び1eqの化合物12a (1.50g、6.77mmol) を40mLの60% H_2SO_4 に溶解した。溶液を60℃で3時間加熱し、別の同等の化合物12aを加え、混合物を100℃に加熱した。72時間後、反応混合物を室温に冷却し、40mLの水で希釈し、500mLの砕いた氷に注ぎ、1.5時間攪拌した。得られた固形物を濾過により収集した。ブライン (100mL) を濾液に加え、濾液をジクロロメタン (2X) で抽出した。コンバインした有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、溶媒を *in vacuo* で除去した。有機物から抽出された物質と沈殿物をコンバインし、ACN/水系 (4% ~ 10% H_2O) の勾配を使用するシリカゲルカラム (2" x 7") でのクロマトグラフィーにより精製して、1.08 g (27%) の化合物13Aを得た。

30

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.91 (m, 1H), 6.81 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.65 (m, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.93 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.82 (m, 2H), 3.70 (m, 5H), 3.45 (m, 2H), 1.18 (m, 9H), 1.12 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.97 (s, 3H). LCMS: m/z 591.5 [$\text{M}+\text{H}$]

40

【 0 1 9 7】

化合物14a

アルゴン下で、化合物13a (1.06g、1.79mmol) を25mLの無水ピリジンに溶解した。無水酢酸 (0.510mL、5.39mmol) 及びDMAP (22mg、0.180mmol) を加え、混合物を室温で5時間攪拌した。ピリジンを *in vacuo* で除去し、残留物をMeOH/DCM溶媒系 (4 ~ 8% MeOH) を使用したシリカゲルカラム (1.5" x 5") でのクロマトグラフィーに供し、475mg (39%) の化合物14aを得た。

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 8.03 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.56 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 4.29 (m, 4H), 3.96 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 3.69 (m, 2H), 1.99

50

(s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.21 (d, J=6.7 Hz, 3H), 1.17 (d, J=6.6 Hz, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H). LCMS: m/z 675.5 [M+H]

【0198】

化合物26

化合物14a (455mg、0.674mmol) をアルゴン下で25mLの無水DCMに溶解し、POCl₃ (0.630mL、6.76mmol) を加えた。混合物を室温で18時間攪拌し、その後、DCM及びPOCl₃をin vacuoで除去した。得られたオイルを25mLの無水DCMに溶解し、溶液を0に冷却し、DIEA (1.15mL、6.60mmol) 及び2-(2-アミノエトキシ)エタノール (338 µL、3.37mmol) を加えた。混合物を室温まで温め、2時間攪拌し、次に飽和NaHCO₃で抽出した。抽出物をNa₂SO₄で乾燥させた。粗生成物を、MeOH/DCM (2~6% MeOH) の勾配を使用したシリカゲル (1"x6"カラム) でのクロマトグラフィーに供し、382mg (74%) の化合物26を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 8.00 (m, 1H), 7.60 (m, 2H), 6.99 (m, 1H), 6.43 (d, J=1.3 Hz, 2H), 6.32 (d, J=5.6 Hz, 2H), 4.41 (t, J=4.78, 1H), 4.16 (m, 4H), 3.29 (m, 2H), 3.15 (m, 6H), 3.09 (m, 4H), 2.90 (m, 2H), 1.98 (m, 6H), 1.09 (m, 9H), 0.97 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.72 (s, 3H). LCMS: m/z 762.6 [M+H]

【0199】

化合物S10a

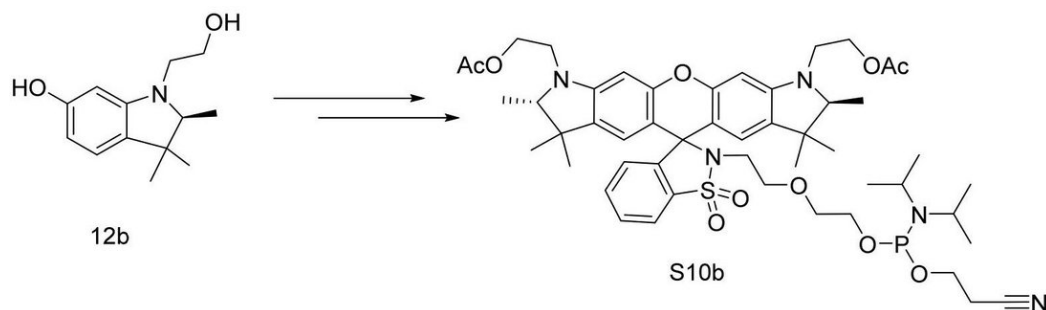
化合物26 (367 mg、0.481mmol) をアルゴン下で20mLの無水DCMに溶解し、DIEA (0.419mL、2.41mmol) を加え、続いてN,N-ジイソプロピルアミノシアノエチルホスホナミド-Cl (0.129mL、0.627mmol) を加えた。混合物を室温で3時間攪拌し、次に飽和NaHCO₃、水、及びブラインで抽出した。抽出物をNa₂SO₄で乾燥させた。10% TEAを含有する20% EtOAc/ヘキサンから30% EtOAc/ヘキサンを用いたシリカゲル (1"x6"カラム) でのクロマトグラフィーにより、350mg (78%) の化合物S10aを得た。

¹H NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ 7.91 (m, 1H), 7.59 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 6.54 (d, J=8.2 Hz, 2H), 6.28 (s, 2H), 4.25 (m, 4H), 3.73 (m, 2H), 3.54 (m, 6H), 3.32 (m, 6H), 3.22 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.97 (pentet, J=2.5 Hz, 2H), 1.15 (m, 15H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.93 (m, 3H), 0.79 (s, 3H). ³¹P NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ 148.2. LCMS: m/z 963.0 [M+H]

【0200】

化合物S10bは、同様の方法で中間体12bから調製できる。

【化51】



【0201】

5'末端に色素S10及びS10aを組み込んだ配列番号1の例示的な標識ポリヌクレオチドは、上記のオリゴヌクレオチド自動合成によって調製した。色素S10を組み込んだ標識ポリヌクレオチドを、0.1 M重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液中の16~34% ACNの勾配で20分かけて溶出するPhenomenex Geminiカラム (5 µm C18 110オングストローム) でのHPLCによって精製した。色素S10を組み込んだ標識ポリヌクレオチドを、Phenomenex Geminiカラム (5 µm C18 110オングストローム) でのHPLCにより、0.1 M重炭酸トリエチルアンモニウムバッファー中の16~34% ACNの勾配で20分以上溶出して精

製した。2つの例示的な標識されたポリヌクレオチドのHPLCプロファイルが、図3A及び3Bに示されている。

【0202】

図1Dは、S10a標識オリゴヌクレオチド配列番号1の発光/励起スペクトルを示しており、S10aをTAMRA色素の代わりに使用できることを示す。さらに、図3Bに示されるように、例示的なS10a-標識ポリヌクレオチドは、例示的なS10標識ポリヌクレオチドによって生成される複数のピーク（図3A）と比較して、HPLCによって主に単一のピークを生成し、これは、そのようなオリゴヌクレオチドのクロマトグラフィー精製を単純化する。

【0203】

本明細書に開示されるプラクティスは、本明細書に別段の記載がない限り、当業者の範囲内である細胞生物学、分子生物学、微生物学、ウイルス学、組換えDNAなどの従来の技術を採用できる。そのような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989), *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait Ed., 1984), *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, Ed., 1987), the series *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos eds. 1987), *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987)参照。

【0204】

例示的な実施形態が例示及び記載されてきたが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、その中で様々な変更を行うことができることが理解され得る。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

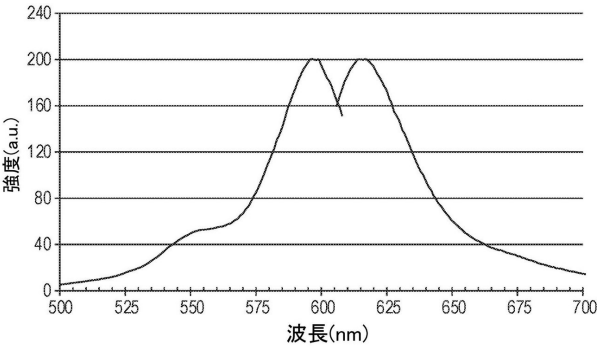


図1A

【図 1 B】

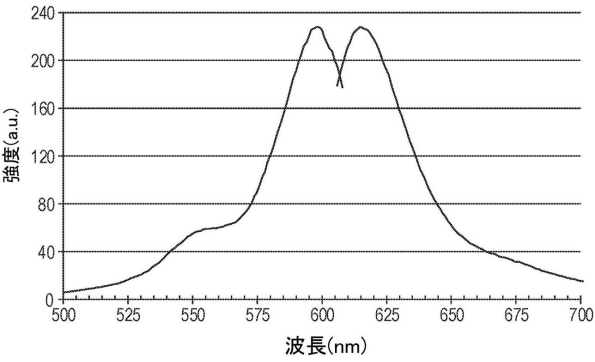


図1B

10

【図 1 C】

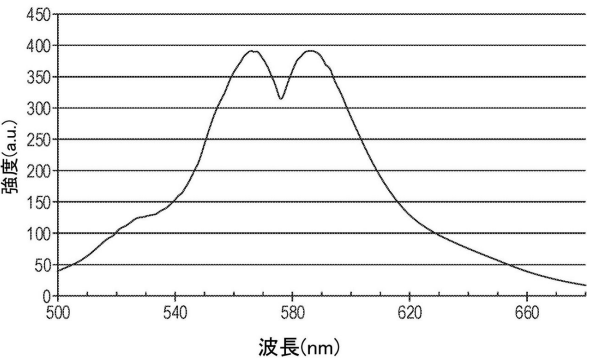


図1C

【図 1 D】

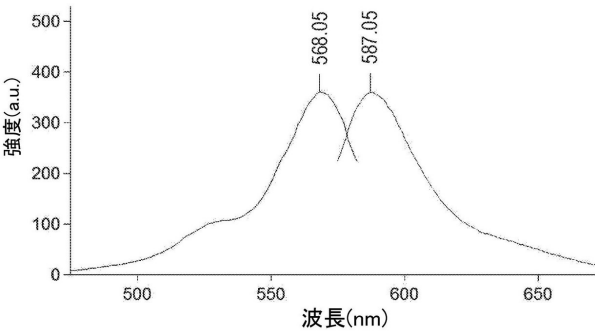


図1D

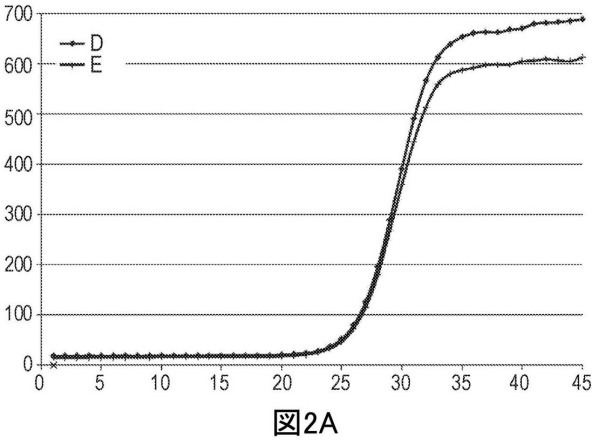
20

30

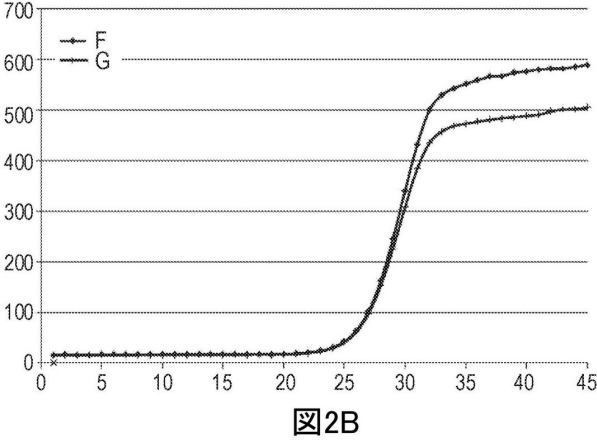
40

50

【 図 2 A 】

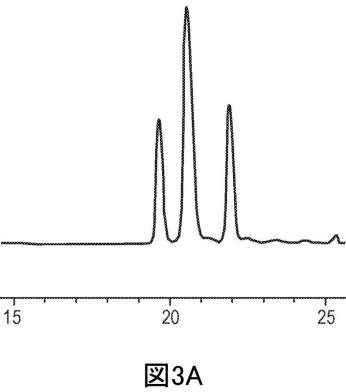


【 図 2 B 】

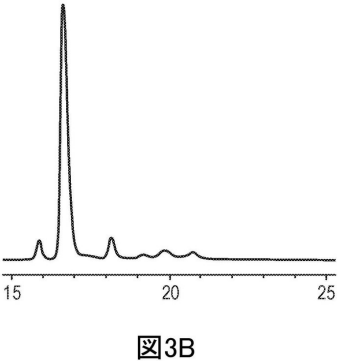


10

【 図 3 A - 3 B 】



20



30

【 配列表 】

0007399882000001.app

40

フロントページの続き

- アメリカ合衆国 9 4 0 8 9 カリフォルニア サニーベール カリビアン ドライブ 9 0 4 セファ
イド内
- (72)発明者 カバル, マーハー, エヌ.
アメリカ合衆国 9 4 0 8 9 カリフォルニア サニーベール カリビアン ドライブ 9 0 4 セファ
イド内
- (72)発明者 ゴール, アレクサンダー
アメリカ合衆国 9 4 0 8 9 カリフォルニア サニーベール カリビアン ドライブ 9 0 4 セファ
イド内
- 審査官 井上 明子
- (56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 2 3 9 6 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 5 8 5 3 5 (W O , A 1)
米国特許第 0 5 4 5 1 4 6 3 (U S , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 7 0 3 6 3 (U S , A 1)
米国特許第 0 5 2 3 1 1 9 1 (U S , A)
特表 2 0 0 9 - 5 3 3 0 2 2 (J P , A)
Zhang, Xiaodong; Ye, Zhiwei; et al. , A targetable fluorescent probe for dSTORM super-resol
ution imaging of live cell nucleus DNA , Chemical Communications , 2019年 , 55, , 1951-
1954
Corrie, John E. T.; Davis, Colin T.; Eccleston, John F. , Chemistry of Sulforhodamine-Amine C
onjugates , Bioconjugate Chemistry , 2001年 , 12(2), , 186-194
Bonnet, Dominique; Riche, Stephanie; et al. , Solid-phase organic tagging resins for labeling
biomolecules by 1,3-dipolar cycloaddition: application to the synthesis of a fluorescent non-
peptidic vasopressin receptor ligand , Chemistry - A European Journal , 2008年 , 14(20),
, 6247-6254
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 9 B
C 0 7 H 2 1 / 0 4
C 1 2 Q 1 / 6 8 7 6
C 1 2 N 1 5 / 1 1
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)