

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成22年11月25日 (2010.11.25)

【公開番号】特開2009-108098(P2009-108098A)

【公開日】平成21年5月21日 (2009.5.21)

【年通号数】公開・登録公報2009-020

【出願番号】特願2008-335693(P2008-335693)

【国際特許分類】

C 0 7 D 311/02 (2006.01)

C 0 7 D 491/147 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/22 (2006.01)

C 0 9 K 11/06 (2006.01)

C 0 9 B 11/28 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 0 7 K 2/00 (2006.01)

C 0 7 H 19/04 (2006.01)

C 0 7 H 21/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 D 311/02 C S P

C 0 7 D 491/147

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/22

C 0 9 K 11/06

C 0 9 B 11/28 A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 0 7 K 2/00

C 0 7 H 19/04

C 0 7 H 21/00

G 0 1 N 21/64 F

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月1日 (2010.7.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エネルギー移動色素であって、以下：

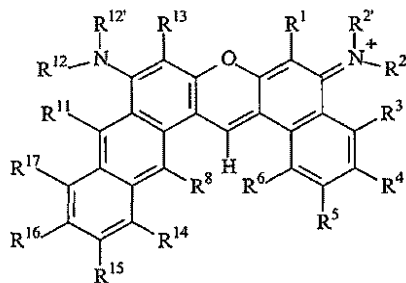
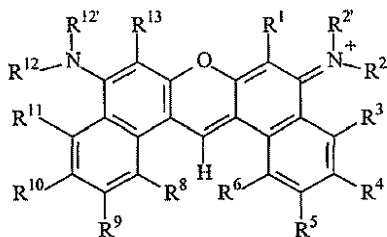
第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するように構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および、

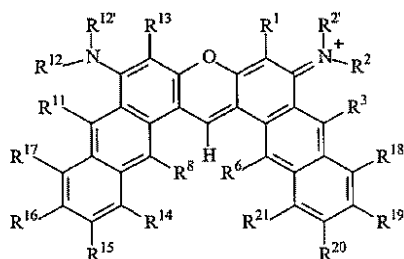
該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、
を含み、ここで、

該ドナー色素およびアクセプター色素の少なくとも一方が、以下の式：

【化 1】



、または



のうちの 1 つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、

R^2 および R^{12} は、独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、 $-(CH_2)_n-R^{40}$ 、 $-(CH_2)_m-Ph-R^{40}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分からなる群より選択され；

$R^{2'}$ および $R^{12'}$ は、独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、 $-(CH_2)_n-R^{40}$ 、 $-(CH_2)_m-Ph-R^{40}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分からなる群より選択されるか、または、 $R^{2'}$ および $R^{12'}$ が、これらが結合する原子と一緒に、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、 R^{12} および R^{13} が、これらが結合する原子と一緒に、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち 1 つ以上を含み；

n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり；

m は 0 または 1 であり；

R^{40} はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R^4 、 R^{10} 、 R^{16} および R^{19} は各々がスルホネートであり；そして

R^1 、 R^3 、 R^5 、 R^6 、 R^8 、 R^9 、 R^{11} 、 R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{20} および R^{21} は、独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1～8 個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル ($-CH_2NH_2$)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1～12 個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4 - アミノピリジニウム (ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1～12 個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル ($-CH_2OH$)、メトキシ ($-OCH_3$)、 $-ROH$ 、チオメチル ($-CH_2SH$)、 $-RSH$ 、 $-SO_2R$ 、アリールチオ ($-SAr$)、アリールスルホン ($-SO_2Ar$)、スルホンアミド ($-SO_2NR_2$)、アルキルスルホキシド ($-SOR$)、アリールスルホキシド ($-SOAr$)、アミノ ($-NH_2$)、アンモニウム ($-NH_3^+$)、アミド ($-CONR_2$)、ニトリル ($-CN$)、 $C_1 \sim C_8$ アルコキシ ($-OR$)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分からなる群より選択され；

ここで、各 R は、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1～12 個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；そして

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1～12 個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトである、

エネルギー移動色素。

【請求項 2】

前記アクセプター色素が、スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素がシアニン、フタロシアニン、スクアライン、ボディピー、ベンゾフェノキサジン、フルオレセイン、ジベンゾローダミン、またはローダミン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 3】

前記アクセプター色素がスルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素が、フルオレセイン色素またはローダミン色素である、請求項 2 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 4】

前記置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環が、スルホネートによって置換されている、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 5】

R^2 、 $R^{2'}$ 、 R^{12} および $R^{12'}$ のうち少なくとも 1 つが、 $-(CH_2)_n-R^{40}$ または $-(CH_2)_m-Ph-R^{40}$ であり、ここで、Ph はフェニレンであり、n は 1～6 の範囲の整数であり、m は 0 または 1 であり、そして、 R^{40} はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 6】

前記複素環が、ピロール、インドール、フラン、ベンゾフラン、チオフエン、ベンゾチオフエン、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - キノリル、3 - キノリル、4 - キノリル、2 - イミダゾール、4 - イミダゾール、3 - ピラゾール、4 - ピラゾール、

ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、シンノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、3 - (1 , 2 , 4 - N) - トリアゾリル、5 - (1 , 2 , 4 - N) - トリアゾリル、5 - テトラゾリル、4 - (1 - O , 3 - N) - オキサゾール、5 - (1 - O , 3 - N) - オキサゾール、4 - (1 - S , 3 - N) - チアゾール、5 - (1 - S , 3 - N) - チアゾール、2 - ベンゾオキサゾール、2 - ベンゾチアゾール、4 - (1 , 2 , 3 - N) - ベンゾトリアゾール、またはベンゾイミダゾールである、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 7】

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹¹、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁷、R¹⁸、R²⁰ および R²¹ が水素である、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 8】

R¹ および R² が、これらが結合する原子と一緒に、4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し；そして、R¹² および R¹³ が、これらが結合する原子と一緒に、4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成する、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 9】

前記第一および第二の環構造のうち一方または両方が 5 個の環原子を有する、請求項 8 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 10】

前記環構造が、1 つの g e m 二置換炭素を含む、請求項 9 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 11】

前記 g e m 置換基の各々が飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素である、請求項 10 に記載のエネルギー移動色素。

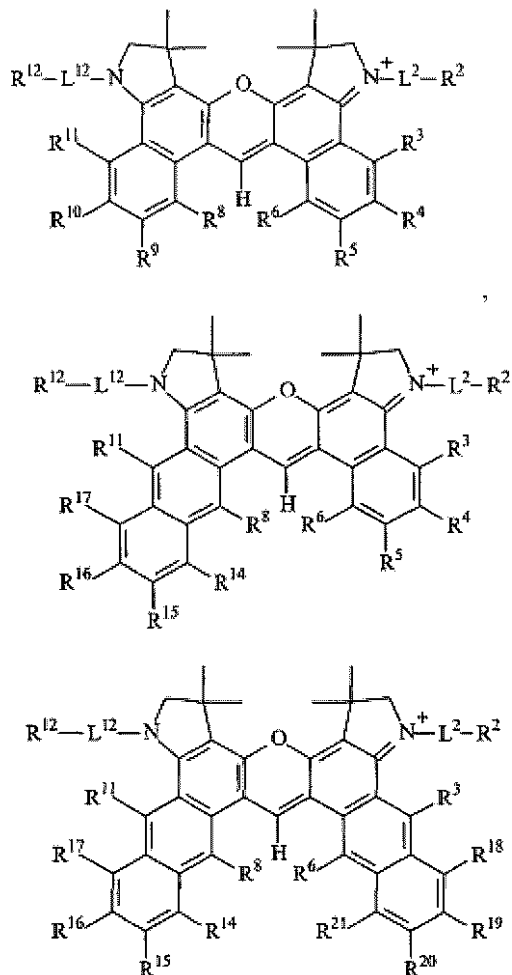
【請求項 12】

前記 g e m 置換基がメチルである、請求項 11 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 13】

前記スルホン化ジアリールローダミン化合物が、以下の式：

【化 2】

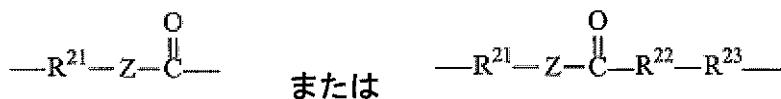


のうちの 1 つの構造を有し、ここで、 L^2 および L^{12} は、各々が独立して、 $-(CH_2)_n-R^{40}$ または $-(CH_2)_m-Ph-R^{40}$ からなる群より選択され、ここで、 Ph はフェニレンであり、 n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり、 m は 0 または 1 であり、そして、 R^{40} はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のエネルギー移動色素であって、該エネルギー移動色素の前記ドナー色素および前記アクセプター色素を連結する前記リンカーが、以下の構造：

【化 3】



を有し、ここで：

Z は、 NH 、 S および O からなる群より選択され；

R^{21} は、該ドナー色素に結合される、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素であり；

R^{22} は、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、5 員環、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 6 員環、および該カルボニル炭素に結合される縮合環構造からなる群より選択される置換基であり；そして

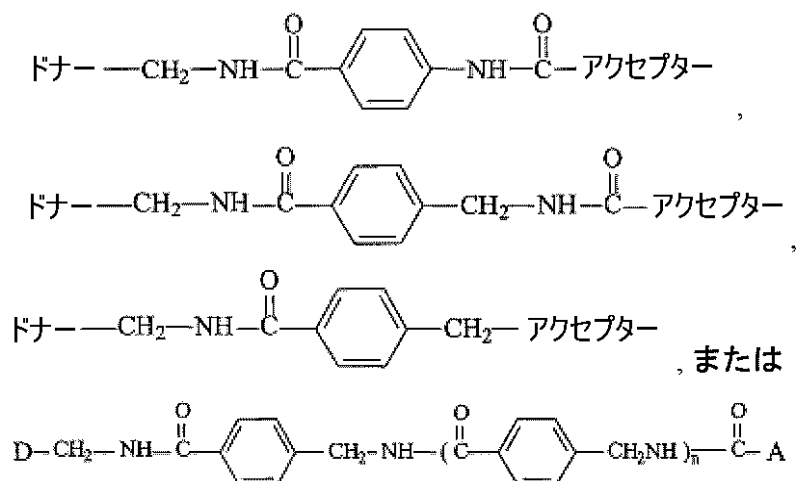
R^{23} は、該リンカーを該アクセプター色素に結合する官能基を含む、

エネルギー移動色素。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のエネルギー移動色素であって、該エネルギー移動色素が、以下の構造：

【化 4】

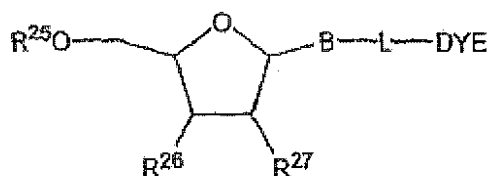


を有し、ここで、D はドナー色素であり、A はアクセプター色素であり、そして、n は 1 または 2 である、エネルギー移動色素。

【請求項 16】

以下の式：

【化 5】



を有する標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチドであって、ここで：

DYE は、請求項 1 ～ 15 のいずれかに記載のエネルギー移動色素であり；

B は、核酸塩基であり；

L は、アルキン部分を含むリンカーであり、ここで、該リンカーは、プリン核酸塩基の 8 - C、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 7、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 8 およびピリミジン核酸塩基の 5 位から選択される核酸塩基上の部位を標識するように構成され、そしてさらに、該リンカーは、該エネルギー移動色素の前記連結部分に結合され；

R²⁶ および R²⁷ は、単独で存在して、各々が独立して H、HO、F もしくはホスホラミダイトであるか、または、一緒になって 2' - 3' - ジデオキシリボースを形成し、ここで、R²⁶ および R²⁷ が H、OH もしくは F である場合、R²⁵ が、H、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、チオホスフェートもしくはリン酸エステルアナログであるか、あるいは、R²⁶ もしくは R²⁷ がホスホラミダイトである場合、R²⁵ はジメトキシトリチルであり；そして

さらにここで、該リン酸エステルアナログは、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 4 個の炭素原子を有する炭化水素で置換されたホスホネート、飽和、もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 4 個の炭素原子を有する炭化水素で置換されたホスホトリエステル；ホスホオチオエート、または、ホスホジチオエートから選択される、

標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

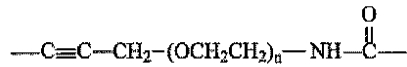
【請求項 17】

B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニンおよび 7 - デアザグアニンからなる群より選択される、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 18】

L が以下：

【化 6】



であり、ここで、n が 0、1 または 2 である、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 19】

R²⁶ がヒドロキシルであり、そして R²⁷ が H または F である、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 20】

ターミネーターである、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 21】

R²⁶ および R²⁷ が、単独で存在して、各々が独立して H または F である、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

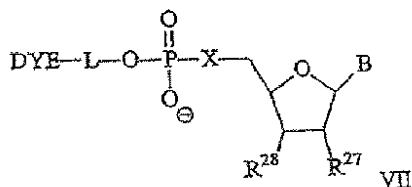
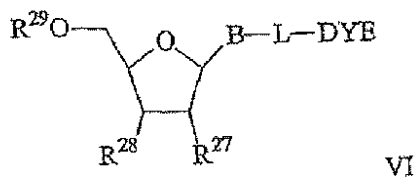
【請求項 22】

酵素学的に伸長可能である、請求項 16 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

【請求項 23】

以下の式 VI または式 VII：

【化 7】



の構造を有する、標識に共有結合されたポリヌクレオチドを含む標識されたポリヌクレオチドであって、ここで：

該標識は、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素である D Y E であり；

B は、核酸塩基であり；

L は、必要に応じて置換された、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、アリールまたはポリエチレンオキシ部分を含むリンカーであり；ここで、該リンカーは、プリン核酸塩基の 8 - C、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 7、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 8 およびピリミジン核酸塩基の 5 位から選択される核酸塩基上の部位を標識するように構成され、そしてさらに、該リンカーは、該エネルギー移動色素の前記連結部分に結合され；

該標識されたポリヌクレオチドが式 VI の構造を有する場合、各 R²⁷ は、独立して、H、OH、ハライド、アジド、アミン、アルキルアミン、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖

、直鎖もしくは環式の 1 ～ 6 個の炭素原子を有する炭化水素、アリル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 OCH_3 、または $OCH_2CH=CH_2$ であり；各 $R^{2\ 8}$ は、独立して、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであり；そして各 $R^{2\ 9}$ は、独立して、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであるか；あるいは

該標識されたポリヌクレオチドが式 V I I の構造を有する場合、各 $R^{2\ 7}$ は、独立して、H、OH、ハライド、アジド、アミン、アルキルアミン、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 6 個の炭素原子を有する炭化水素、アリル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 OCH_3 、または $OCH_2CH=CH_2$ であり；各 $R^{2\ 8}$ は、独立して、H、ホスフェート、ヌクレオチド間ホスホジエステル、またはヌクレオチド間アナログであり；

該ヌクレオチド間アナログは、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 4 個の炭素原子を有する炭化水素で置換されたホスホネート；飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 4 個の炭素原子を有する炭化水素で置換されたホスホトリエステル；ホスホオチオエート；またはホスホチオエートから選択され；そして

該ポリヌクレオチドは、2 ～ 1000 ヌクレオチドを含む、
標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 24】

式 V I I の構造を有する、請求項 23 に記載の標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項 16 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドであって、該標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、結合、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ～ 12 個の炭素原子を有し、かつ 2 つの一価のラジカル中心を有する炭化水素基、または、 $C_6 - C_{20}$ アリールジールからなる群より選択されるリンカーによって、該標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドに共有結合される、標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチド。

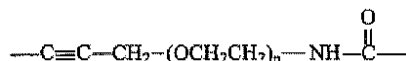
【請求項 26】

請求項 16 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドであって、該標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、アルキニルリンカーを介して該ヌクレオシド、該ヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに共有結合される、標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 27】

請求項 16 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドであって、前記リンカーが、以下の式：

【化 8】



の構造を有し、ここで、n が 0、1 または 2 である、標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 25 に記載の標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドであって、該標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物の $R^{4\ 0}$ カルボキシル部分は、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該ヌクレオシド、該ヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドに結

合する連結部分であるか、または、該ヌクレオシド、該ヌクレオチドもしくは該ポリヌクレオチドにさらに結合されたリンカーに該スルホン化ジアリールローダミン化合物を結合する連結部分である、標識されたヌクレオシド、標識されたヌクレオチド、または標識されたポリヌクレオチド。

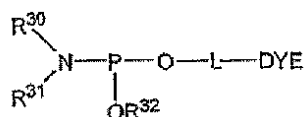
【請求項 29】

請求項 1 に記載のエネルギー移動色素の共有結合されたポリペプチドを含む標識されたポリペプチドであって、該ポリペプチドのアミノ末端、アミノ側鎖、またはカルボキシル側鎖のヒドロキシスクシンイミドエステルは、前記エネルギー移動色素の連結部分に結合される、標識されたポリペプチド。

【請求項 30】

以下の式：

【化 9】



の構造を有するホスホラミダイト化合物であって、ここで：

DYE は請求項 1 に記載のエネルギー移動色素であり；

L は、必要に応じて置換された、飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素を含むリンカーであり；

R³⁰ および R³¹ は、別々に、C₁ ~ C₁₂ アルカニル、C₁ ~ C₁₂ シクロアルカニルおよびアリールからなる群より選択されるか；または R³⁰ および R³¹ は、ホスホラミダイト窒素原子と一緒にあって飽和窒素複素環を形成し；そして

R³² は亜リン酸エステル保護基を含む、

ホスホラミダイト化合物。

【請求項 31】

R³² がメチル、2 - シアノエチルおよび 2 - (4 - ニトロフェニル) エチルからなる群より選択される、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項 32】

R³⁰ および R³¹ が各々イソプロピルである、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項 33】

R³⁰ および R³¹ が一緒になってモルホリノとなる、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項 34】

L が C₁ ~ C₁₂ アルキルジイルである、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

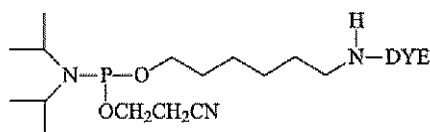
【請求項 35】

L が前記 DYE の R²、R^{2'}、R¹² または R^{12'} において結合される、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項 36】

以下の構造：

【化 10】

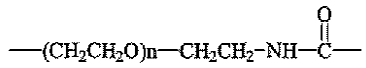


を有する、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

【請求項 37】

L が以下：

【化 1 1】



であり、そして n が 1 ~ 10 の範囲である、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物
