

【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 07 D 311/02	(2006.01)
C 07 D 491/147	(2006.01)
A 61 K 47/48	(2006.01)
A 61 K 47/22	(2006.01)
C 09 K 11/06	(2006.01)
C 09 B 11/28	(2006.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 Q 1/68	(2006.01)
C 07 K 2/00	(2006.01)
C 07 H 19/04	(2006.01)
C 07 H 21/00	(2006.01)
G 01 N 21/64	(2006.01)

【F I】

C 07 D 311/02	C S P
C 07 D 491/147	
A 61 K 47/48	
A 61 K 47/22	
C 09 K 11/06	
C 09 B 11/28	A
C 12 N 15/00	A
C 12 Q 1/68	A
C 12 Q 1/68	Z
C 07 K 2/00	
C 07 H 19/04	
C 07 H 21/00	
G 01 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】

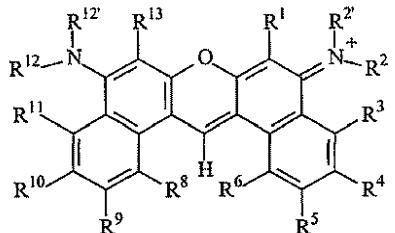
エネルギー移動色素であって、以下：

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；

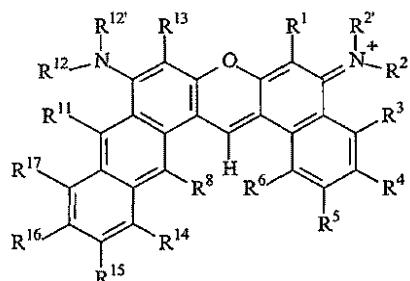
該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および、

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、

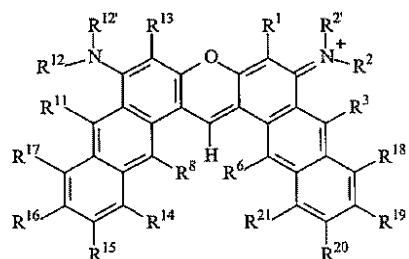
該ドナー色素およびアクセプター色素の少なくとも一方が、以下の式：  
【化1】



,



, 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<sup>2</sup> および R<sup>1 2</sup> 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、- (C<sub>H</sub><sub>2</sub>)<sub>n</sub> -  
R<sup>4 0</sup>、- (C<sub>H</sub><sub>2</sub>)<sub>m</sub> - Ph - R<sup>4 0</sup>、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<sup>2</sup> および R<sup>1 2</sup> 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、- (C<sub>H</sub><sub>2</sub>)<sub>n</sub> -  
R<sup>4 0</sup>、- (C<sub>H</sub><sub>2</sub>)<sub>m</sub> - Ph - R<sup>4 0</sup>、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<sup>2</sup> および R<sup>1</sup> が、  
これらが結合する原子と一緒にになって、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<sup>1 2</sup> および R<sup>1 3</sup> が、これらが結合する原子と一緒に  
になって、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；

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<sup>4 0</sup>はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R<sup>4</sup>、R<sup>1 0</sup>、R<sup>1 6</sup>およびR<sup>1 9</sup>は各々がスルホネートであり；そして

R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>15</sup>、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>、R<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>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<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、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<sub>2</sub>OH)、メトキシ(-OCH<sub>3</sub>)、-ROH、チオメチル(-CH<sub>2</sub>SH)、-RSH、-SO<sub>2</sub>R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO<sub>2</sub>Ar)、スルホンアミド(-SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>)、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<sub>2</sub>)、アンモニウム(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)、アミド(-CONR<sub>2</sub>)、ニトリル(-CN)、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>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、置換ピフェニル、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<sup>2</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>12'</sup>およびR<sup>12</sup>'のうち少なくとも1つが、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>40</sup>または-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Ph-R<sup>40</sup>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<sup>40</sup>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、チオフェン、ベンゾチオフェン、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】**

R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup>、R<sup>15</sup>、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>、R<sup>20</sup>およびR<sup>21</sup>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】**

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が、これらが結合する原子と一緒にになって、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<sup>12</sup>およびR<sup>13</sup>が、これらが結合する原子と一緒にになって、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gem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gem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。

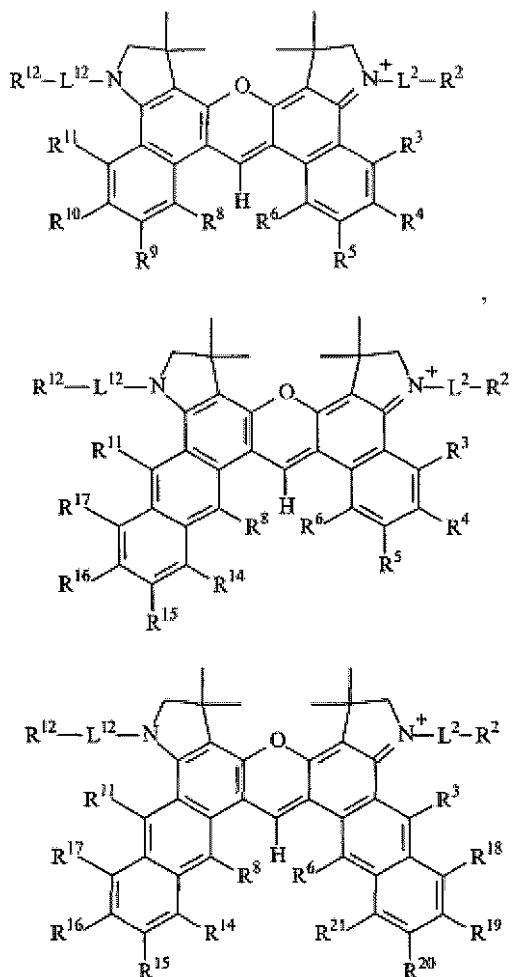
**【請求項12】**

前記gem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。

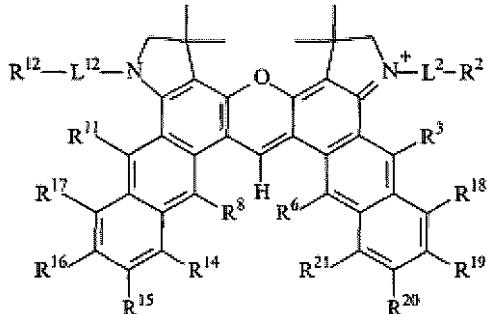
**【請求項13】**

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】



, または

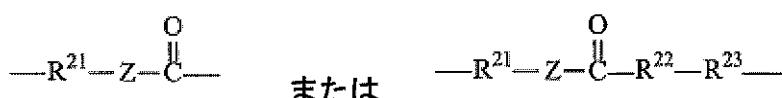


のうちの 1 つの構造を有し、ここで、 $L^2$  および  $L^{1-2}$  は、各々が独立して、 $-(CH_2)_n-R^{4-0}$  または  $-(CH_2)_m-Ph-R^{4-0}$  からなる群より選択され、ここで、 $Ph$  はフェニレンであり、 $n$  は 1 ~ 6 の範囲の整数であり、 $m$  は 0 または 1 であり、そして、 $R^{4-0}$  はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項 1 に記載のエネルギー移動色素。

## 【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；

$R^{2-1}$  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；

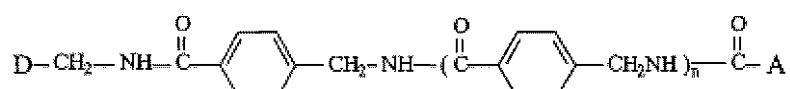
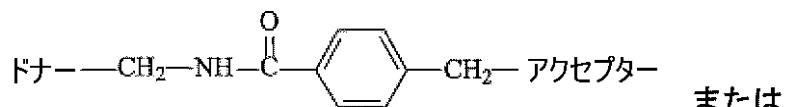
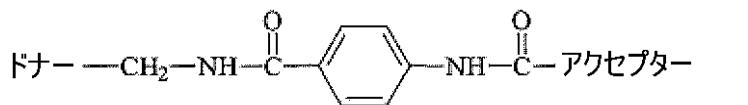
$R^{2-2}$  は、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、5員環、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 6 員環、および該カルボニル炭素に結合される縮合環構造からなる群より選択される置換基であり；そして

$R^{2-3}$  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 1 5】

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】

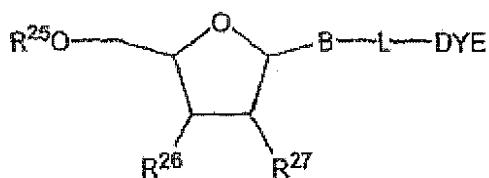


を有し、ここで、D はドナー色素であり、A はアクセプター色素であり、そして、n は 1 または 2 である、エネルギー移動色素。

## 【請求項 1 6】

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；

R<sup>26</sup> および R<sup>27</sup> は、単独で存在して、各々が独立して H、H<sub>2</sub>O、F もしくはホスホラミダイトであるか、または、一緒にになって 2' - 3' - ジデオキシリボースを形成し、ここで、R<sup>26</sup> および R<sup>27</sup> が H、OH もしくは F である場合、R<sup>25</sup> 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、R<sup>26</sup> もしくは R<sup>27</sup> がホスホラミダイトである場合、R<sup>25</sup> 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；ホスホロチオエート、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 1 7】

B が、ウラシル、チミン、シトシン、アデニン、7 - デアザアデニン、グアニンおよび7 - デアザグアノシンからなる群より選択される、請求項 1 6 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 1 8】

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 1 6 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 1 9】

R<sup>2</sup> 6 がヒドロキシルであり、そして R<sup>2</sup> 7 が H または F である、請求項 1 6 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 2 0】

ターミネーターである、請求項 1 6 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 2 1】

R<sup>2</sup> 6 および R<sup>2</sup> 7 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 1 6 に記載の標識されたヌクレオシドまたはヌクレオチド。

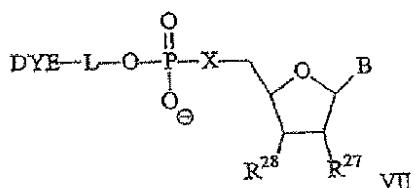
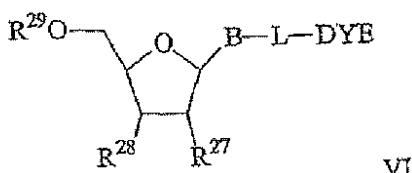
【請求項 2 2】

酵素学的に伸長可能である、請求項 1 6 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 2 3】

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 DYE 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 R<sup>2</sup> 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<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、OCH<sub>3</sub>、またはOCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>であり；各R<sup>2～8</sup>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<sup>2～9</sup>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VIIの構造を有する場合、各R<sup>2～7</sup>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<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルコキシ、OCH<sub>3</sub>、またはOCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>であり；各R<sup>2～8</sup>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；ホスホロチオエート；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VII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<sub>6</sub>～C<sub>20</sub>アリールジイ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<sup>4～10</sup>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。

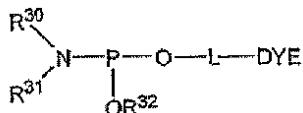
## 【請求項 29】

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ル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：

しは、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：

$R^3$  および  $R^3$  は、別々に、 $C_1 \sim C_{12}$  アルカニル、 $C_1 \sim C_{12}$  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  $R^3$  および  $R^3$  は、ホスホラミダイト窒素原子と一緒にになって飽和窒素複素環を形成し；そして

R<sup>3</sup> 2 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】

$R^{3-2}$  がメチル、2-シアノエチルおよび2-(4-ニトロフェニル)エチルからなる群より選択される、請求項30に記載のホスホラミダイト化合物。

### 【請求項 32】

【請求項 3-2】  
R<sup>3-0</sup> および R<sup>3-1</sup> が各々イソプロピルである、請求項 3-0 に記載のホスホラミダイト化化合物

【請求項 3 3】

R<sup>3-0</sup> および R<sup>3-1</sup> 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】

請求項 3-9 に記載のエヌエラミダイト化合物

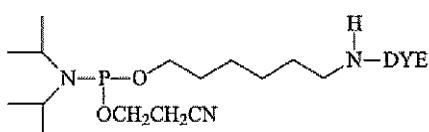
【請求項 35】

【請求項 33】  
L が前記 DYE の  $R^2$  、  $R^2'$  、  $R^{1,2}$  または  $R^{1,2}'$  において結合される、請求項 30 に記載のホフホラミダイト化合物

## 【 請求項 3.6 】

### 【請求項】 以下の構造：

### 以下の構造：

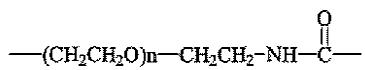


を有する、請求項 30 に記載のホスホラミダイト化合物。

### 【請求項 3 7】

レ が 以 下 ；

【化 11】



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  
。