

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4815015号

(P4815015)

(45) 発行日 平成23年11月16日(2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64 F
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533
C O 9 B 3/18 (2006.01)	C O 9 B 3/18

請求項の数 12 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-537753 (P2010-537753)	(73) 特許権者	503360115
(86) (22) 出願日	平成21年11月2日(2009.11.2)		独立行政法人科学技術振興機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/068785		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02010/055789	(74) 代理人	110000110
(87) 国際公開日	平成22年5月20日(2010.5.20)		特許業務法人快友国際特許事務所
審査請求日	平成23年6月23日(2011.6.23)	(72) 発明者	上野 義仁
(31) 優先権主張番号	特願2008-292815 (P2008-292815)		岐阜県岐阜市平和通二丁目23-1-30
(32) 優先日	平成20年11月14日(2008.11.14)		4
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	北出 幸夫
			岐阜県岐阜市伊奈波通3-1
早期審査対象出願		審査官	藤井 美穂

最終頁に続く

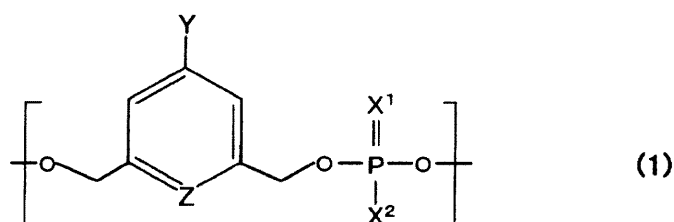
(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド誘導体、ラベル化剤及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式(1)で表される複数のヌクレオチド誘導体単位を備えるラベル化剤。

【化7】



(ただし、式(1)中、Zは、窒素原子又はCHを表し、Yは、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環系炭化水素基(ただし、ピリミジン骨格又はプリン骨格を含む天然塩基を除く。)を含む蛍光色素を表し、X¹は、O、S又はSeを表し、X²は、SH(若しくはS⁻)、S又はSe⁻、炭素数1~4個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。)

【請求項2】

前記Yは、縮合多環系炭化水素基である、請求項1に記載のラベル化剤。

【請求項3】

前記Yは、ナフタレン、フェナントレン、ピレン及びペリレンからなる群から選択され

る、請求項 2 に記載のラベル化剤。

【請求項 4】

複数の前記ヌクレオチド誘導体単位を連続して備える、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のラベル化剤。

【請求項 5】

複数の前記ヌクレオチド誘導体単位をリンカー単位を介して備える、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のラベル化剤。

【請求項 6】

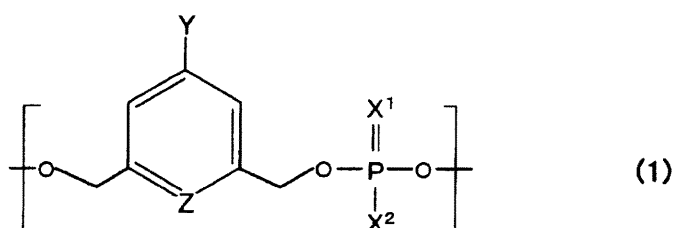
複数の前記ヌクレオチド単位は、前記 Y が互いに同一又は異なる 2 つのヌクレオチド誘導体単位であり、これらを連続して備える、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載のラベル化剤

10

【請求項 7】

以下の式 (1) で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位；

【化 8】



(ただし、式 (1) 中、Z は、窒素原子又は C H を表し、Y は、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環系炭化水素基 (ただし、ピリミジン骨格又はプリン骨格を含む天然塩基を除く。) を含む蛍光色素を表し、X¹ は、O、S 又は S e を表し、X² は、S H (若しくは S⁻)、S 又は S e⁻、炭素数 1 ～ 4 個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。)

を備え、前記複数のヌクレオチド誘導体単位が有する前記 Y の配列が互いに異なる 2 種以上のラベル化剤を含む、ラベル化剤のセット。

【請求項 8】

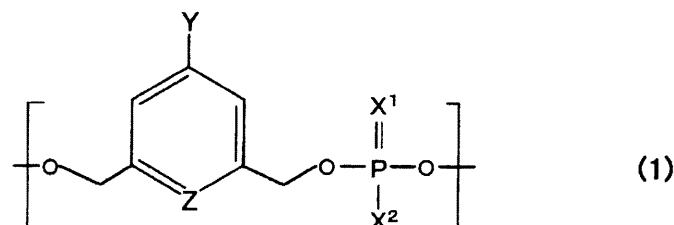
さらに、上記式 (1) で表される 1 個のヌクレオチド誘導体単位を備える、ラベル化剤を含む、請求項 7 に記載のラベル化剤のセット。

30

【請求項 9】

以下の式 (1) で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位を備える、ラベル化されたオリゴヌクレオチドプローブ。

【化 10】



(ただし、式 (1) 中、Z は、窒素原子又は C H を表し、Y は、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環系炭化水素基 (ただし、ピリミジン骨格又はプリン骨格を含む天然塩基を除く。) を含む蛍光色素を表し、X¹ は、O、S 又は S e を表し、X² は、S H (若しくは S⁻)、S 又は S e⁻、炭素数 1 ～ 4 個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。)

【請求項 10】

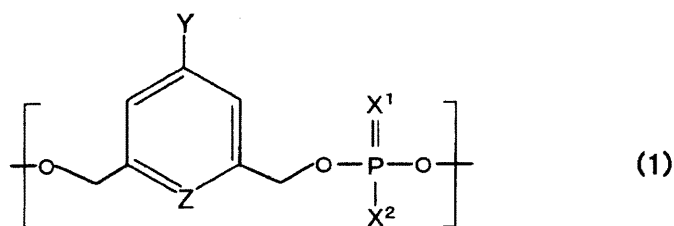
前記複数のヌクレオチド誘導体単位を、その 3' 末端側又は 5' 末端側に備える、請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

50

【請求項 1 1】

以下の式 (1) で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位；

【化 1 1】



(ただし、式 (1) 中、Z は、窒素原子又は C H を表し、Y は、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環系炭化水素基 (ただし、ピリミジン骨格又はプリン骨格を含む天然塩基を除く。) を含む蛍光色素を表し、X¹ は、O、S 又は S e を表し、X² は、S H (若しくは S⁻)、S 又は S e⁻、炭素数 1 ~ 4 個のアルキル基又はモルホリノ基を表す。)

を備え、前記複数のヌクレオチド誘導体単位が有する前記 Y の配列が互いに異なる 2 種以上のラベル化されたオリゴヌクレオチドプローブを含む、オリゴヌクレオチドプローブセット。

【請求項 1 2】

さらに、上記式 (1) で表される 1 個のヌクレオチド誘導体単位を備える、ラベル化剤を含む、請求項 1 1 に記載のオリゴヌクレオチドプローブセット。

【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誘導体、ラベル化剤及びその利用に関する。

(関連出願のクロスリファレンス)

本出願は、2008 年 11 月 14 日に提出された日本国特許出願である特願 2008 - 292815 に基づく優先権を主張するものであり、これらに記載される内容を引用によりここに組み込むものである。

【背景技術】

【0002】

ピレンやペリレンのような蛍光色素で塩基部分に置き換えたオリゴヌクレオチドが知られている (非特許文献 1)。かかるオリゴヌクレオチドは、蛍光色素をヌクレオチド骨格に沿って配列させたものであり、蛍光色素の集積体といえる。同種又は異種の複数の蛍光色素からなる配列を有するオリゴマーは、単一の励起波長で励起したとき、それを構成するモノマーよりも長い波長域の蛍光を発したり、蛍光色素の配列により蛍光波長が変化することでも知られている。このため、異なる蛍光色素の配列を有する複数の集積体を蛍光標識として用いることで、単一励起波長で、異なる検出対象を異なる蛍光発色により検出することができると考えられている。

【0003】

【非特許文献 1】K o o l et al., J . A . C . S . 129 , 15426 (2007)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、非特許文献 1 に記載の集積体は、ヌクレオチドのリボースの炭素原子にピレン等の蛍光色素を結合させるものであり、効率的に合成するのが困難であった。また、蛍光波長の長波長化、すなわち、検出する蛍光波長の多様化も困難であることがわかった。さらにまた、蛍光色素の集積状態が不安定であって、蛍光強度の増強も困難であることがわかった。したがって、現状において、これらを満たすことができる蛍光色素集積体は得られていない。

30

40

50

【 0 0 0 5 】

加えて、一層、生体内で安定なオリゴヌクレオチド誘導体も求められている。例えば、耐ヌクレアーゼ耐性が一層高められたオリゴヌクレオチド誘導体も求められている。

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明は、より実用的なオリゴヌクレオチド誘導体、蛍光色素集積体及びその利用を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

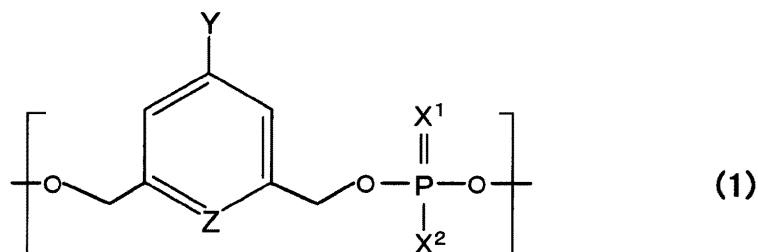
【 0 0 0 7 】

本発明者らは、本発明者らが既に開発したベンゼン - リン酸骨格に沿って蛍光色素を配列することを試みたところ、骨格中のベンゼン炭素原子に対して蛍光色素を連結することで蛍光色素が効果的に集積（スタック）し、安定したエキシマー及び／又はエキシプレックスを形成することができるという知見を得た。また、こうしたヌクレオチド誘導体単位を備えることで、ヌクレアーゼ耐性が向上することも見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき本発明を完成した。本明細書の開示によれば以下の手段が提供される。

【 0 0 0 8 】

本明細書の開示によれば、以下の式（１）で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位を備えるラベル化剤が提供される。

【化１】



（ただし、式（１）中、Ｚは、窒素原子又はＣＨを表し、Ｙは、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環系炭化水素基を表し、 X^1 は、Ｏ、Ｓ又はＳ e^- を表し、 X^2 は、Ｓ H （若しくはＳ $^-$ ）、Ｓ又はＳ e^- 、炭素数１～４個のアルキル基又はホルホリノ基を表す。）

【 0 0 0 9 】

本明細書に開示のラベル化剤においては、前記Ｙは、縮合多環系炭化水素基であることが好ましく、また、前記Ｙは、ナフタレン、フェナントレン、ピレン及びペリレンからなる群から選択されることがより好ましい。さらに、複数の前記ヌクレオチド誘導体単位を連続して備えていてもよいし、複数の前記ヌクレオチド誘導体単位をリンカー単位を介して備えていてもよい。また、複数の前記ヌクレオチド単位は、前記Ｙが互いに同一又は異なる２つのヌクレオチド誘導体単位であり、これらを連続して備えていてもよい。

【 0 0 1 0 】

本明細書の開示によれば、上記式（１）で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位を備え、前記複数のヌクレオチド誘導体単位が有する前記Ｙの配列が互いに異なる２種以上のラベル化剤を含む、ラベル化剤のセットが提供される。本明細書に開示されるラベル化剤のセットは、さらに、上記式（１）で表される１個のヌクレオチド誘導体単位を備える、ラベル化剤を含んでいてもよい。

【 0 0 1 1 】

本明細書の開示によれば、上記式（１）で表される複数のヌクレオチド誘導体単位を備えるオリゴヌクレオチド誘導体が提供される。前記複数のヌクレオチド誘導体単位を、その３′末端側又は５′末端側に備えることができる。

【 0 0 1 2 】

本明細書の開示によれば、上記式（１）で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位を備え、前記複数のヌクレオチド誘導体単位が有する前記Ｙの配列が互いに異なる２種以上

10

30

40

50

のオリゴヌクレオチドプローブを含む、オリゴヌクレオチドプローブセットが提供される。さらに、上記式(1)で表される1個のヌクレオチド誘導体単位を備える、ラベル化剤を含むこともできる。

【0013】

本明細書の開示によれば、上記式(1)で表される、複数のヌクレオチド誘導体単位を備える、RNA干渉剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本明細書に開示のラベル化剤の一態様を示す図である。

【図2】ベンゼンアナログの合成スキームを示す図である。

10

【図3】ナフタレンアナログの合成スキームを示す図である。

【図4】フェナントレンアナログの合成スキームを示す図である。

【図5】ピレンアナログの合成スキームを示す図である。

【図6】ベンゼン及びナフタレンについてフルオロシド化による蛍光スペクトルの変化を比較する図である。

【図7】フェナントレン及びピレンについてフルオロシド化による蛍光スペクトルの変化を比較する図である。

【図8】実施例7で合成したオリゴヌクレオチドの配列を示す図である。

【図9】実施例7で合成したオリゴヌクレオチド誘導体のMALDI-TOF/MSによる分子量の測定結果の表を示す図である。

20

【図10】ピレンアナログを各1つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の各温度における吸光スペクトルを示す図である。

【図11】ピレンアナログを各2つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の各温度における吸光スペクトルを示す図である。

【図12】ピレンアナログを各3つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の各温度における吸光スペクトルを示す図である。

【図13】ピレンアナログを各1つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の単鎖状態と二重鎖状態との蛍光スペクトルを示す図である。

【図14】ピレンアナログを各2つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の単鎖状態と二重鎖状態との蛍光スペクトルを示す図である。

30

【図15】ピレンアナログを各3つ備えるオリゴヌクレオチド誘導体の単鎖状態と二重鎖状態との蛍光スペクトルを示す図である。

【図16】各二重鎖状態における蛍光スペクトルを比較する図である。

【図17】各二重鎖の融解温度のグラフ及び表を示す図である。

【図18】実施例9で合成したペリレンアナログの合成スキームを示す図である。

【図19】実施例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の配列及び構造を示す図である。

【図20】実施例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを示す図である。

【図21】実施例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを示す図である。

40

【図22】実施例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを示す図である。

【図23】実施例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを示す図である。

【図24】実施例11の結果と非特許文献1の結果と対比する図である。

【図25】実験例10で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の水溶液を、365nmの波長の光を照射した結果を示す図である。

【図26】モレキュラービーコン型プローブの消光-発光状態を示す図である。

【図27】siRNAの耐ヌクレアーゼ性を示す図である。

50

【図 28】ベンゼン/ピリジン-リン酸誘導体単位を例示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書の開示は、上記式(1)で表される複数のヌクレオチド誘導体単位を有するラベル化剤及びその利用に関する。本明細書に開示のラベル化剤の一態様を図1に示す。

【0016】

本明細書の開示のラベル化剤によれば、蛍光色素が効果的にスタックできるため、蛍光発色の安定性及び蛍光強度増強効果及び蛍光波長の長波長側へのシフトが容易に実現されるようになる。また、本明細書の開示のラベル化剤でオリゴヌクレオチド等をラベル化することにより、上記の効果を奏することのできるオリゴヌクレオチドプローブ、RNAハイブリダイズ試薬、RNA干渉剤が提供される。さらに、こうした試薬等を用いたオリゴヌクレオチド等の検出方法も提供される。

【0017】

以下、本発明の実施の形態であるラベル化剤及びそのセット、オリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチドプローブ及びそのセット、RNAハイブリダイズ試薬及びRNA干渉剤並びにこれらの用途について詳細に説明する。なお、本発明に関する当業者の技術の範囲内である分子生物学および核酸化学の従来技術は、文献中で説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989年；Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, 編集(1984年)；Hames, B.D.およびHiggins, S.J., Nucleic Acid Hybridization, 編集(1984年)；および一連のMethods in Enzymology, Academic Press, Inc.を参照することができる。

【0018】

(ラベル化剤及びそのセット)

本発明のラベル化剤は、式(1)で表される化合物である。これらの化合物において、Zは、炭素原子(CH)又は窒素原子を表している。また、式(1)においてZを含む環の水素原子は置換されていてもよい。

【0019】

Yは、縮合していない芳香族系炭化水素基又は縮合多環炭化水素基を表す。縮合していない芳香族系炭化水素基としては、芳香族性を有する単環の不飽和有機置換基が挙げられる。例えば、芳香族炭化水素基が挙げられ、典型的にはベンゼンを含む置換基が挙げられる。また、単環の複素環置換基であってもよい。なお、こうした単環の不飽和有機置換基の芳香族性の単環上のいずれかの炭素原子が、式(1)におけるベンゼン環上の炭素原子に連結される。また、こうした置換基の単環上の水素原子は、置換されていてもよい。置換基としては、特に限定されないが、スタックの安定性を低下させたり蛍光強度を低下させないものであることが好ましい。

【0020】

また、縮合多環系炭化水素基における環状化合物は、芳香族化合物であってもよいし非芳香族であってもよいが、好ましくは芳香族化合物である。縮合多環系炭化水素基としては、ナフタレン、アズレン、ヘプタライマータレン、ビフェニレン、フェナントレン、アントラセン、トリフェニレン、ピレン、クリセン、テトラセン、ピセン、ペリレン、ペンタフェン、ペンタセン等が挙げられる。なかでも、ナフタレン、フェナントレン、ピレン及びペリレンから選択される縮合芳香族化合物の置換基を備えることが好ましい。これらは入手容易であるとともに、安定したスタックを形成するのに都合がよいからである。縮合多環系炭化水素基における水素原子は、置換されていてもよい。縮合多環系炭化水素基はその縮合した縮合環のいずれかの炭素原子が式(1)で表されるベンゼン環上の炭素原子に連結される。

【0021】

なお、このような縮合していない芳香族系炭化水素基及び縮合多環炭化水素基は、いずれ

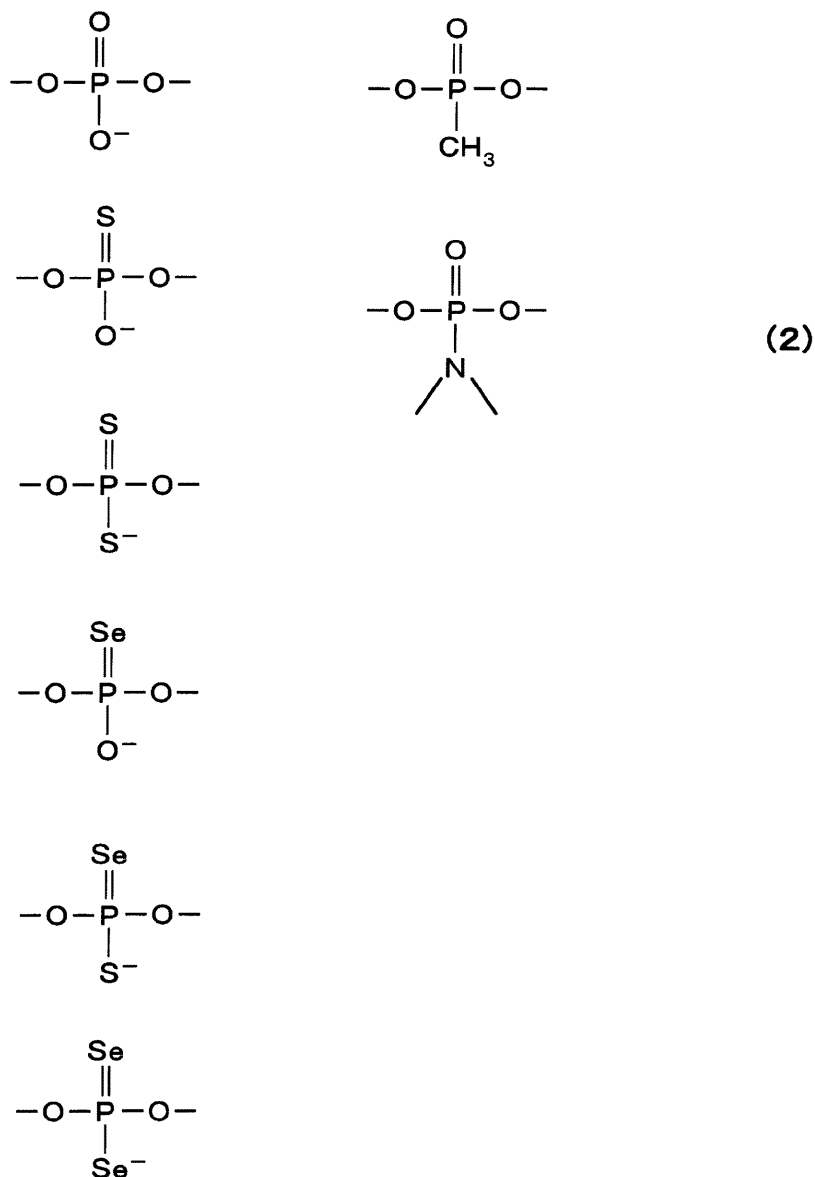
も、公知の蛍光色素を包含することができる。例えば、フルオレセイン系色素、ローダミン系色素、アレクサ (Alexa) 系色素等が挙げられる。

【0022】

式(1)において、 X^1 は、O、S又はSeを表し、 X^2 は、SH(若しくは S^-)、S又は S^- 、炭素数1～4個のアルキル基又はホルノ基を表す。このようなホスホジエステル基としては、以下の式(2)に記載の各種基が挙げられる。

【0023】

【化2】



【0024】

本発明のラベル化剤においては、上記ヌクレオチド誘導体単位は、複数個備えられる。本発明のラベル化剤に備えられるヌクレオチド誘導体単位の個数、含まれる置換基Yの種類、置換基Yの配列は、得ようとする蛍光波長、用いる励起波長等によって決定される。例えば、上記ヌクレオチド誘導体単位の個数が増えるほど蛍光波長が長波長側にシフトする傾向があり、励起波長は、複数個の置換基Pの少なくとも一つを励起する波長を用いることが好ましいことなどが考慮される。ラベル化剤に備えられるヌクレオチド誘導体単位の数は、その組み合わせにもよるが、2個以上から10個以下の範囲で組み合わせることが好ましい。より好ましくは2個以上5個以下の範囲である。

【0025】

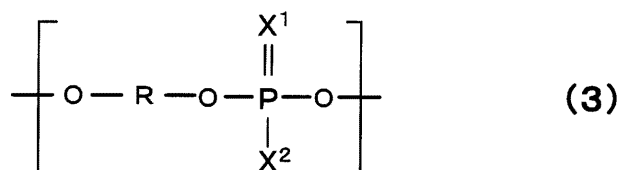
蛍光波長は、隣り合ってスタックされる置換基 Y の距離によっても異なる。距離が長すぎるとスタックの形成が困難になり蛍光強度も増強されず、蛍光波長の長波長側へのシフトも抑制される。一定範囲あるいは網羅的に各種の蛍光色素の配列を設計し合成して、単一の励起波長光を照射することで、各合成ラベル化剤の蛍光波長を知ることができる。

【 0 0 2 6 】

複数個のヌクレオチド誘導体単位は、式 (1) で表される骨格に沿って連続して備えることができる。連続して備えることで、置換基 Y の距離を短くすることができて、置換基 Y を効果的にスタックでき、蛍光強度の増強及び長波長側へのシフトを促進できる。また、複数個のヌクレオチド誘導体単位は、リンカー単位を介して備えることもできる。リンカー単位を介して複数個のヌクレオチド誘導体を備えることで、置換基 Y のスタック距離を調整できるとともに、リン酸基等により負電荷を供給することができ、蛍光波長のシフト程度や蛍光強度の増強程度を調節でき、多様な蛍光発色を生じさせることができるようになる。リンカー単位は、少なくとも、上記式 (1) 中のホスホジエステル結合可能であって、かつ、置換基 Y 及びこれに替わる核酸塩基等を備えていない単位であることが好ましい。典型的には、以下の式 (3) で表される単位が挙げられる。式 (3) 中、 X^3 は、O、S 又は S e を表し、 X^4 は、S H (若しくは S⁻)、S 又は S e⁻、炭素数 1 ~ 4 個のアルキル基又はモルホリノ基を表している。また、R は、炭素数が 2 以上 5 以下程度のアルキレン鎖を表し、より好ましくは炭素数が 3 以上 4 以下のアルキレン鎖を表す。アルキレン鎖は、置換基 Y のスタック効果を低下させない範囲で炭素数 1 ~ 5 程度の低級アルキル基、水酸基及びハロゲン原子等で置換されていてもよい。

【 0 0 2 7 】

【 化 3 】



【 0 0 2 8 】

複数のヌクレオチド誘導体単位を少なくとも 1 個のリンカー単位を介して備えるとき、ヌクレオチド誘導体単位間に介在されるリンカー単位は、4 個以下であることが好ましい。5 個以上であると、スタック効果を得ることが困難になるからである。より好ましくは 3 個以下である。

【 0 0 2 9 】

複数のヌクレオチド誘導体単位は、隣接するヌクレオチド誘導体単位の置換基 Y が同一であってもよいし異種であってもよい。同一の場合には、スタックによりエキシマーを形成し、異種の場合には、エキシコンプレックスを形成することができる。

【 0 0 3 0 】

リンカー単位は、ヌクレオチド誘導体単位を、ラベルをする対象である被ラベル化合物に連結するための連結部位として備えることもできる。上記式 (3) で表されるリンカー単位は、オリゴヌクレオチドに連結するのに好ましく用いることができる。なお、ラベル化剤は、被ラベル化合物の種類に応じて、必要な連結基を備えることができる。例えば、タンパク質に結合させる場合には、タンパク質のアミノ基、カルボキシル基及び S H 基等と共有結合可能な連結基を備えることもできる。

【 0 0 3 1 】

本明細書に開示のラベル化剤によれば、ベンゼン環 - リン酸を骨格とし、ベンゼン環に直接 Y が結合していることから、置換基 Y を効果的にスタックできる。すなわち、従来のごとくリボース環に対して置換基 Y を結合した場合に比べて強固なスタック状態を容易に得ることができる。このため、非特許文献 1 に記載の蛍光色素集積体に比較してより長波

長側へ蛍光波長をシフトでき、また蛍光強度がより増強される。さらに、上記ヌクレオチド誘導体単位間にリンカー単位を含めてもなおスタック効果による長波長シフト及び蛍光強度の増強効果を得ることができて、蛍光波長の多様性及び検出容易性を向上させることができる。以上のことから、同一の励起波長により複数の検出対象を検出するためのラベル化剤として、より利用性に優れたラベル化剤であるといえる。

【 0 0 3 2 】

ラベル化剤は、複数のヌクレオチド誘導体単位を含むものであると、それ自体でスタック効果を発現し、蛍光波長の長波長側へのシフト、蛍光強度の増強、多様な蛍光波長のデザイン等の効果を得ることができるが、単一の上記ヌクレオチド誘導体単位を含むものであっても、蛍光波長の長波長側へのシフトや蛍光強度の増強を部分的に得ることができる。また、このようなラベル化剤を、複数のヌクレオチド誘導体単位を含むラベル化剤と組み合わせセットとして用いることでラベル化剤の蛍光波長の多様性をさらに向上させることができる。

10

【 0 0 3 3 】

本明細書に開示のラベル化剤のセットは、複数のヌクレオチド誘導体単位が有する複数の置換基 Y の配列が互いに異なる 2 種以上のラベル化剤を含むことができる。ここで配列が異なるとは、異なる順序又は異なる種類の置換基 Y で配列が構成されているほか、配列に含まれるリンカー単位の位置、数、リンカー単位の種類が相違する場合も配列が異なるものとする。リンカー単位の態様が異なれば、蛍光波長等が相違するからである。

【 0 0 3 4 】

上述のように、ラベル化剤のセットは、複数の上記ヌクレオチド誘導体単位を含むラベル化剤のほか、単一の上記ヌクレオチド誘導体単位を含むラベル化剤を含んでいてもよい。

20

【 0 0 3 5 】

ラベル化剤に適用される励起波長は、ラベル化剤を構成するヌクレオチド誘導体単位の置換基 Y の種類によって決定される。例えば、ピレン（単独での励起波長：342 nm）及びペリレン（単独での励起波長：約 450 nm）の 2 種類を置換 Y として用いる場合には、これらのいずれか一方を励起する波長光を照射すればよい。

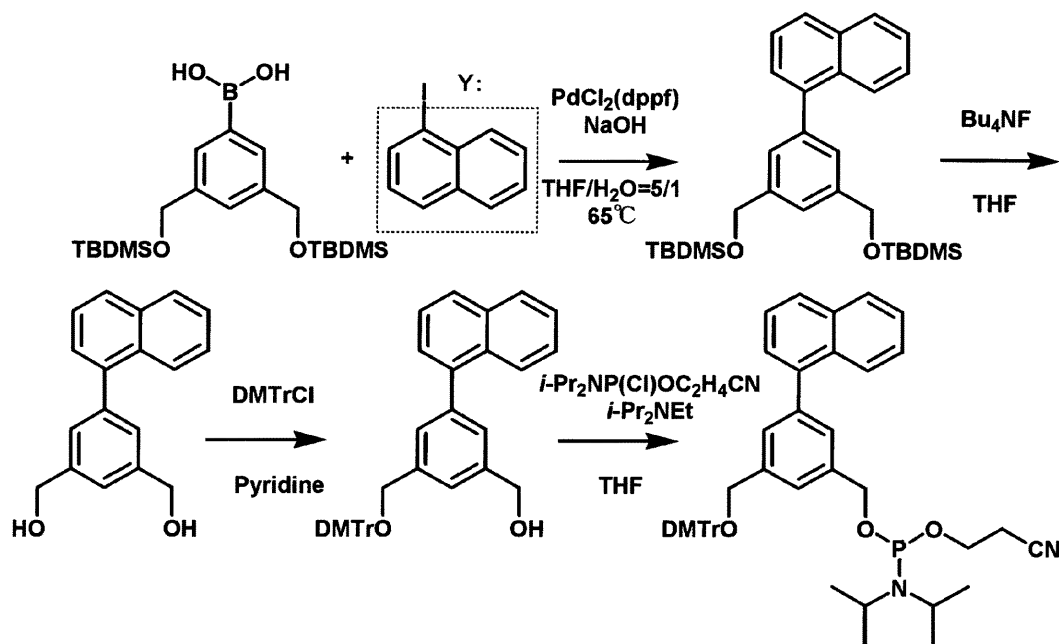
【 0 0 3 6 】

ラベル化剤は、例えば、以下のスキームに示すように、水酸基を保護したベンゼン骨格のボロン酸誘導体を準備し、置換基 Y のハロゲン化誘導体をパラジウム触媒の存在で縮合することにより、容易にその基本骨格を合成することができる。さらに、この縮合体の水酸基保護基を除去したのち、DMTrCl で処理して DMTrCl 化して、さらに、N-エチルジイソプロピルアミンを加え、さらにアミダイト試薬を用いて、固相合成に用いる化合物（アミダイト体）を得ることができる。こうした化合物を用いたオリゴヌクレオチドの固相合成は当業者において周知である。

30

【 0 0 3 7 】

【化 4】



【 0 0 3 8 】

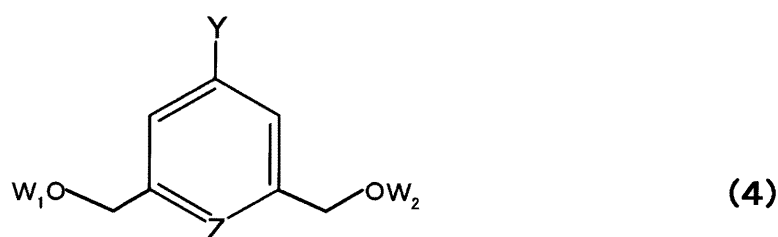
なお、非特許文献 1 に記載の方法では、デオキシリボースのグリコシルハライド体と蛍光色素のカドミウム誘導体とを縮合して、2 種類の異性体を取得し、これをさらに処理して得ることができるものであり、異性化を避けることができないため、非効率的な合成法となっていた。

【 0 0 3 9 】

ラベル化剤は、固相合成用等に好適であるように、以下の式 (4) で表される化合物であってもよい。なお、式 (4) における Z 及び Y 等の定義は、式 (1) におけるのと同義である。

【 0 0 4 0 】

【化 5】



【 0 0 4 1 】

式 (4) において、W₁は水素原子又は水酸基保護基を表すことができる。水酸基保護基としては、水酸基を意図しない反応から保護する基であればよい。こうした水酸基保護基としては、特に限定しないで従来公知の各種の水酸基保護基を用いることができる。本発明の好ましい保護基は、フルオレニルメトキシカルボニル基 (F M O C 基)、ジメトキシトリチル基 (D M T 基)、四級ブチルジメチルシリル基 (T B D M S 基)、モノメトキシトリチル基、トリフルオロアセチル基、レプリニル基、またはシリル基である。好ましい保護基は、トリチル基であり、例えば、ジメトキシトリチル (D M T) 及び四級ブチルジメチルシリル基 (T B D M S 基) から選択される。

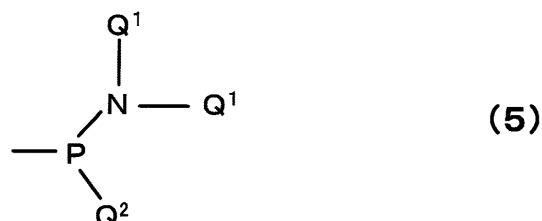
【 0 0 4 2 】

また、W₂は、水酸基保護基、ホスホルアミダイト基又は固相担体に結合される若しく

は結合された連結基を表す。W₂がホスホルアミダイト基である化合物（アミダイト化合物）は、ホスホルアミダイト法によるホスホルアミダイト試薬として用いて、オリゴヌクレオチドを合成するのに用いることができる。なお、本発明において、ホスホルアミダイト基は、以下の式（5）で表すことができる。

【0043】

【化6】



（式（5）中、各Q¹は独立して、同一であっても異なってもよく、分枝状又は直鎖状の炭素数1～5個のアルキル基を表し、Q²は、分枝状又は直鎖状の炭素数1～5個のアルキル基又は置換されていてもよいアルコキシル基を表す。）

【0044】

上記式（5）において、Q¹は、特に限定しないがイソプロピル基が好ましいものとして挙げられ、また、Q²としては、-OCH₃、-OEtCN、-OCH₂CHCH₂等

20

【0045】

また、式（4）においてW₂が固相担体に結合される連結基である化合物は、当該連結基とアミノ基など固相担体上の所定の官能基とを結合させることにより、固相担体に保持される。そして、式（4）において、W₂が固相担体に結合された連結基である化合物は、連結基を介して本発明のヌクレオチド誘導体が固相担体に結合されているため、各種の核酸固相合成法の出発材料として用いることができる。この出発材料を用いることで、式（1）で表されるユニットを有するオリゴヌクレオチドを製造することができる。

【0046】

ここで、固相担体とは、一般に高分子担体を用いられ、例えば、CPG（controlled porous glass）やHCP（highly cross-linked polystyrene）、ある種のゲルなどが挙げられる。また、固相担体には適切なスペーサーを有していてもよい。連結基は、固相担体と本化合物とを連結するリンカーである。こうした連結基としては、公知のコハク酸エステルリンカー、シュウ酸エステルリンカー、シランジイルリンカー、シリルリンカーなどを用いることができる。

30

【0047】

以上説明したラベル化剤は、任意の被ラベル化合物に連結されて、被ラベル化合物と他の化合物との相互作用（タンパク質-タンパク質、タンパク質-オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド間、オリゴヌクレオチド-タンパク質等における相互作用）の検出、分析、各種生体分子や人工構築物のRNA干渉等の機能解析、それらの細胞や組織等における局在の解析に用いられる。

40

【0048】

ラベル化剤は、被ラベル化合物のいずれかの箇所に何らかの作用により結合されるものであればよく、被ラベル化合物による検出を妨げない限りいずれの箇所に結合されるように構成されていてもよい。

【0049】

被ラベル化合物は、オリゴヌクレオチド、タンパク質又はペプチド等とすることができる。被ラベル化合物がオリゴヌクレオチドの場合、ラベル化剤でラベル化した化合物は、特異的ハイブリダイズを検出するためのプローブ、PCR反応におけるプライマー、アンチセンス試薬、siRNA試薬（RNA干渉剤）ほか、各種マイクロRNA試薬等が挙げ

50

られる。また、予めプローブが固定されたアレイなどに対して、試料中のオリゴヌクレオチドを標識するのに用いるラベル化剤としても用いることができる。

【 0 0 5 0 】

また、プローブは、モレキュラービーコンの形態を採ってもよい。この場合、モレキュラービーコンのステムの片側（3'側又は5'側）にラベル化剤の複数のヌクレオチド誘導体単位を備えるようにし、別の片側にBHQやDabなどのクエンチャーを備えるようにすることが好ましい。こうした形態によれば、モレキュラービーコンがターゲット配列にハイブリダイズしないときは、クエンチャーにより蛍光を発しないが、モレキュラービーコンがターゲット配列にハイブリダイズしてステムが開いたときには、ヌクレオチド誘導体単位に基づく蛍光を観察することができる。また、モレキュラービーコンの3'末端及び5'末端の双方に備えることもできる。

10

【 0 0 5 1 】

本明細書において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドとは、ヌクレオチドをモノマー単位として該モノマー単位を複数有するポリマーを意味するものとし、オリゴヌクレオチドは、通常数個以上100個以下程度までのヌクレオチドのポリマーを含むものとする。なお、オリゴヌクレオチドが有するモノマー単位は、デオキシリボヌクレオチドであってもよいし、リボヌクレオチドであってもよい。また、その両者のキメラであってもよい。また、オリゴヌクレオチドは、通常単鎖を意味するが、相補鎖との二重鎖の形態も包含している。二重鎖は、DNA/DNA、RNA/RNAのほか、DNA/RNAのハイブリッドであってもよい。

20

【 0 0 5 2 】

オリゴヌクレオチドは、天然の塩基やリボース以外の改変されたヌクレオチドを備えていてもよい。改変されたヌクレオチドとは、ヌクレオチドの各種部分、すなわち、塩基、糖部分及びリン酸エステル部分において何らかの化学修飾が施されていることをいうものとする。

【 0 0 5 3 】

被ラベル化合物としてのオリゴヌクレオチドは、用途に応じた長さとするすることができるが、オリゴヌクレオチドの合成を考慮すると、10以上35以下とすることが好ましい。上記プローブやプライマーは、典型的にはデオキシリボヌクレオチドをモノマー単位とするオリゴヌクレオチドが被ラベル化合物である。また、アンチセンス試薬、siRNA試薬等は、典型的にはリボヌクレオチドをモノマー単位とするオリゴヌクレオチドが被ラベル化合物である。

30

【 0 0 5 4 】

被ラベル化合物がペプチド又はたんぱく質の場合、例えば、ラベル化合物は、標識抗体や標識二次抗体として用いることができる。なお、本明細書に開示のラベル化剤は、細胞表層に結合され又は現れた適当な介在物質を介して細胞等をラベル対象としてもよい。

【 0 0 5 5 】

本明細書に開示のラベル化剤又はそのセットは、アレイなど適当なデバイスを含む分析、診断のためのキットとして提供されていてもよい。この場合、ラベルに必要な1種又は2種以上の試薬（例えば、ラベル化剤と被ラベル化合物とを結合させるための試薬等）を含むことができる。

40

【 0 0 5 6 】

（オリゴヌクレオチド誘導体）

本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、上記式（1）で表される複数のヌクレオチド誘導体単位を備えるオリゴヌクレオチド誘導体である。本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体における上記式（1）中の各種表示は、ラベル化剤にて定義し各種態様を例示したものと同一の意義を有するものとする。本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、典型的には、本明細書に開示のラベル化剤で非ラベル化合物としてのオリゴヌクレオチドをラベルしたものである。

50

【0057】

オリゴヌクレオチド誘導体における上記ヌクレオチド誘導体単位的位置も特に限定されない。5'末端を含んでいてもよい5'末端側、3'末端を含んでいてもよい3'末端側及びそれ以外部分のいずれにも備えることができる。なお、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体において5'末端には水酸基が結合されていてもよいし、リン酸基(PO_4)が結合されていてもよい。また、同様に、本オリゴヌクレオチドの3'末端には、水酸基が結合されていてもよいし、リン酸基(PO_4)が結合されていてもよい。その他5'末端及び3'末端はそれぞれ必要に応じて適切な構造を採ることができる。なお、本明細書に開示のヌクレオチド誘導体単位は、RNA分解酵素(RNase)耐性が良好である。したがって、当該ヌクレオチド誘導体単位を、RNaseの標的部位に備えることによりRNase耐性が向上したオリゴヌクレオチド誘導体(オリゴリボヌクレオチド誘導体)を得ることができる。特に、siRNAやマイクロRNAなどの末端にこれらのオリゴヌクレオチド誘導体単位を備えることが好ましい。

【0058】

例えば、siRNAのパスセンジャーストランドの5'末端には、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位を1個又は2個以上備えることが好ましい。そして、より好ましくは、このパスセンジャー鎖に対合するガイド鎖の対合部位(ガイド鎖の3'末端側)において、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体1個又は2個以上備えることが好ましい。こうすることで、パスセンジャー鎖とガイド鎖とが対合した状態において、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位同士がスタック構造を形成することによりヌクレオチド誘導体を導入した領域が熱的、熱力学的に安定化され、その結果、siRNAの活性が向上すると共に、ガイド鎖のヌクレアーゼ耐性が向上される。パスセンジャー鎖の5'末端とガイド鎖の3'末端側で対合する本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位は、少なくとも1対あればよい。すなわち、パスセンジャー鎖及びガイド鎖のそれぞれに少なくとも一つの前記ヌクレオチド誘導体単位を有していればよい。

【0059】

ガイド鎖の3'末端の前記ヌクレオチド誘導体単位のさらに3'末端側には、例えば、図27に示すような単位、すなわち、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位においてのベンゼンあるいはピリジン骨格において置換基-Yを含まない単位(以下、ベンゼン/ピリジン-リン酸誘導体単位という。)(本発明者らによりW02007/094135に開示されている。具体的には図28参照)を1又は2以上備えていることが好ましい。こうすることで、ヌクレアーゼ耐性を効果的に向上させることができる。また、パスセンジャー鎖の3'末端は、1又は2以上の、好ましくは2以上のベンゼン-リン酸誘導体単位を備えることができる。こうすることで、パスセンジャー鎖のヌクレアーゼ耐性を高めることができる。なお、ベンゼン/ピリジン-リン酸誘導体単位は図28の上段に示すように、リン酸エステル基を介して、隣接するヌクレオチド単位等と接続されるA(図28の2a~2g)を含むユニットが例示される。なお、2aにおいてZは、C又はNである。好ましくは、Aは、2a、2bであり、より好ましくは、2aである。Aを含むユニットは、オリゴヌクレオチド誘導体の末端においても両側のヌクレオチド単位とリン酸エステルを介して連結される。なお、3'末端及び5'末端において、R1及びR2は水素原子又はヒドロキシル保護基等とすることができる。

【0060】

なお、こうした本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位及びベンゼン-リン酸誘導体単位のsiRNA等における配置は、想定されるヌクレアーゼに応じて設定される。例えば、上記した態様は、3'末端を主として攻撃対象とするヌクレアーゼに対する耐性を高めるものである。したがって、5'末端を攻撃するエキソヌクレアーゼやエンドヌクレアーゼに対しては、当該部位に本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位の対合を少なくとも一対備えることが好ましい。

【0061】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のヌクレオチド誘導体単位以外にリボヌ

クレオチド単位及び／又はデオキシリボヌクレオチド単位を備えることができる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、上記ヌクレオチド誘導体単位を含んでいれば、既に説明した各種の形態を採ることができる。

【 0 0 6 2 】

本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、既に説明したリンカー単位も必要に応じて備えることができる。なお、本発明によれば当然に、本発明のヌクレオチド誘導体単位を備えるポリヌクレオチドも提供される。

【 0 0 6 3 】

本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、既に説明したような方法で合成アミダイトを用いて合成できる。

【 0 0 6 4 】

本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、上記ヌクレオチド誘導体単位を備えているため、蛍光波長がより長波長側にシフトされまた蛍光強度も増強されたものとなっている。そして、異なる置換基 Y の配列を有するヌクレオチド誘導体単位を備える単位を備える 2 種類以上のオリゴヌクレオチド誘導体を組み合わせて用いることで、一つの励起波長で多様な色を発色させることができる。

【 0 0 6 5 】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、プローブ及びプライマーとして用いることができる。特に、こうした複数のオリゴヌクレオチド誘導体をプローブセット又はプライマーセットとして用いたとき、複数の特異的ハイブリダイズ対象を一つの励起波長で容易に検出できる。こうした検出方法は、DNA や RNA の機能解析、各種分析、診断に極めて有用である。さらに、これらオリゴヌクレオチド誘導体をチップやビーズ等の固相担体等に保持したものは、検査装置や診断装置又はこれらの一部として利用することができる。

【 0 0 6 6 】

プローブは、設計または選択により、ターゲット核酸に特異的に規定された塩基配列を有しており、所定のストリンジェンシーの下で、ターゲット核酸とハイブリダイズするようにするに取得されたオリゴヌクレオチドである。典型的にはデオキシリボヌクレオチドを単位としている。上記したことから、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、特に、細胞内の RNA 検出、特にリアルタイム検出用に好ましく用いることができる。また、プライマーは、PCR 法により増幅しようとするターゲット核酸の一部に特異的に規定された塩基配列を有しており、所定のストリンジェンシー（PCR 反応条件）の下で、ターゲット核酸とハイブリダイズするようにするに取得されたオリゴヌクレオチドである。典型的にはデオキシリボヌクレオチドを単位としている。

【 0 0 6 7 】

プローブやプライマーは、典型的には、検査試薬や診断試薬等としてもちいることができる。さらに、これらオリゴヌクレオチド誘導体をチップやビーズ等の固相担体等に保持したものは、検査装置や診断装置又はこれらの一部として利用することができる。さらには、こうした検査試薬や診断薬は、他の試薬や診断薬あるいは装置等と組み合わせた検査用又は診断用キットとしても用いることができる。

【 0 0 6 8 】

本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、各種の遺伝子発現制御剤の形態を採ることができる。すなわち、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、miRNA 及びリボザイムに用いることができる。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、アンチセンス、リボザイム及びアプタマーに用いることもできる。かかるオリゴヌクレオチド誘導体は、典型的にはリボヌクレオチドを単位としている。

【 0 0 6 9 】

本明細書の開示によれば、上記オリゴヌクレオチド誘導体をプローブとして用いた、SNP や変異などのターゲット核酸の検出方法、上記オリゴヌクレオチド誘導体を siRNA やアンチセンス等として機能する遺伝子発現抑制剤として用いた、遺伝子発現の抑制方法

10

20

30

40

50

、遺伝子の機能解析方法も提供される。

以下、本発明を、実施例を挙げて具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例 1】

【0070】

(実験例 1) ベンゼンアナログの合成

図 2 に示すスキームに従い、ホウ酸誘導体を出発原料として、パラジウム存在下でヨードベンゼンとカップリングし化合物 (1) を合成した。続いて脱シリル化により化合物 (2) を 2step 収率 88% で合成した。トリチル化により化合物 (3) を収率 38% で合成し、さらにアミダイト化することで目的化合物 (4) を定量的に合成した。具体的には以下のようにした。

【0071】

6-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylphenyl)-benzene(1)の合成

Iodobenzene 0.498g (2.44mmol) に THF/H₂O 12ml を加えたものに、暗室において PdCl₂(dppf) 0.122g (5mol%) を加えた。3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethyl phenylboronic acid 1g (2.44mmol) を THF/H₂O 12ml に溶解したものを加え、2N NaOH aq 3.66ml (3eq) を投入して遮光下の 65 °C で反応を開始し、6日間撹拌した。TLC (Hexのみ) では目的物と原料の Iodobenzene が重なってしまうため反応の終了を確認できなかった。EtOAc で抽出し有機層を H₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (Hex:EtOAc=5:1) で目的物と Iodobenzene の混合物 1.1651g を得た。

【0072】

3-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylphenyl)-benzene(2)の合成

Ar 雰囲気下で混合物 (1) 1.1651g に THF 7.92ml を加えて、1MTBAF 7.92ml (7.92mmol, 3eq) を滴下した。Ar 雰囲気下で 72時間撹拌した。溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=50:1) で化合物 (2) 0.4596g (2.15mmol, 2step 88%) を単離した。

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 7.60 (2H, s, ベンゼン環), 7.53 (1H, s, ベンゼン環), 7.45 (3H, s, H-2,3,4), 7.37 (2H, s, H-1,5), 4.78 (4H, s, CH₂), 1.80 (2H, s, OH).

元素分析 : H=6.46%, C=78.29% calculated, H=6.59%, C=78.48

Mass : C₁₄H₁₄O₂= 241.09998 calculated, 241.09938

【0073】

1-(3-hydroxymethyl-5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methylphenyl)-benzene(3)の合成

Ar 雰囲気下で化合物 (2) 0.4596g に Pyridine 10.7ml を加えて溶解し、DMTrClO₄ 0.9547g (2.80mmol, 1.3eq) を加えた。Ar 雰囲気下で 96時間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層を H₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=100:1) で化合物 (3) 0.4231g (0.82mmol, 38%) を単離した。

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 7.60 (2H, s, ベンゼン環), 7.53 (1H, s, ベンゼン環), 7.45 (3H, s, H-2,3,4), 6.85 (2H, s, H-1,5), 7.26 (13H, m, DMTr), 4.77 (2H, s, CH₂), 4.25 (2H, s, CH₂), 3.79 (6H, s, OCH₃) 1.69 (1H, s, OH).

【0074】

1-(3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-O-((2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl))-Phosphoramidomethylphenyl)-benzene(4)の合成

化合物 (4) 0.42g (0.82mmol) を実験器具とともに十分乾燥し、Ar 置換したグローブバックを用いて、THF 8.2ml をアルゴン下において加え、さらに HunigBase 0.53ml (4.10mmol, 5.0eq) 存在下、亜リン酸化試薬 0.39 ml (1.64mmol, 2.0eq) を加え室温で 30分間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層を H₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc

のみ)で混合物(4)0.678gを定量的に得た。

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 149.89 ppm.

148.97 ppm

【 0 0 7 5 】

(実験例2)ナフタレンアナログの合成

図3に示すスキームに従い、ホウ酸誘導体を出発原料として、パラジウム存在下でヨードナフタレンとカップリングし化合物(5)合成した。続いて脱シリル化により化合物(6)を2step収率84%で合成した。トリチル化により化合物(7)を収率37%で合成し、さらにアミダイト化することで目的化合物(8)を収率85%で合成した。具体的には以下のようにした。

10

【 0 0 7 6 】

6-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylPhenyl)- naphthalene (5)の合成

Iodonaphthalene0.6199g (2.44mmol)にTHF/H₂O 12mlを加えたものに、暗室においてPdCl₂(dppf) 0.122g (5mol%)を加えた。3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethyl Phenylboronic acid 1g (2.44mmol)をTHF/H₂O 12mlに溶解したものを加え、2N NaOH aq 3.66ml (3eq)を投入して遮光下の65℃オイルバスで反応を開始し、24時間撹拌した。TLC (Hexのみ)では目的物と原料のIodonaphthaleneが重なってしまうため反応の終了を確認できなかった。また肉眼で蛍光を確認した。EtOAcで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aq とsatNaCl aqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし目的物とIodonaphthaleneの混合物1.6530gを得た。

20

【 0 0 7 7 】

3-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylPhenyl)- naphthalene (6)の合成

Ar雰囲気下で混合物(5)1.653gにTHF7.32mlを加えて、1MTBAF7.32ml (7.32mmol、3eq)を滴下した。Ar雰囲気下で72時間撹拌した。溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=50:1)で化合物(6)0.5448g (2.06mmol、2step84%)を単離した。

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 7.90 (4H, s, H-6,7,8,9), 7.53 (2H, s, ベンゼン環), 7.51 (1H, s, ベンゼン環), 7.42 (1H, s, H-3), 7.41 (2H, s, H-2,4), 4.79 (4H, s, CH₂), 1.35 (2H, s, OH).

元素分析 : H=6.13%, C=80.96% calculated, H=6.10%, C=81.79%

30

Mass : C₁₈H₁₈O₂= 264.11455 calculated,264.11503

【 0 0 7 8 】

1-(3-hydroxymethyl-5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methylphenyl)- naphthalene (7)の合成

Ar雰囲気下で化合物(6)0.5448gにPyridine10.3mlを加えて溶解し、DMTrCl0.909g (2.68mmol、1.3eq)を加えた。Ar雰囲気下で18時間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aq とsatNaCl aqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルムのみ→クロロホルム:メタノール=15:1)で化合物(7)0.4293g (0.75mmol、37%)を単離した。

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 7.92 (4H, s, H-6,7,8,9), 7.53 (2H, s, ベンゼン環), 7.51 (1H, s, ベンゼン環), 7.42 (1H, s, H-3), 7.41 (2H, s, H-2,4), 7.41 (13H, m, DMTr), 6.83 (6H, s, OCH₃), 4.80 (2H, s, CH₂), 4.27 (2H, s, CH₂), 1.60 (1H, s, OH).

40

【 0 0 7 9 】

1-(3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-O-((2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl))-phosphoramidicmethylphenyl)-naphthalene(8)の合成

化合物(7)0.43g(0.75mmol)を実験器具とともに十分乾燥し、Ar置換したグローブバックを用いて、THF7.5mlをアルゴン下において加え、さらにHunigBase0.48ml(3.75mmol、5.0eq)存在下、亜リン酸化試薬0.35ml(1.50mmol、2.0eq)を加え室温で30分間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aqとsatNaCl aqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え

50

乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAcのみ) で化合物(8)0.513g (0.64mmol、85%) を得た。

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 149.00 Ppm.

【 0 0 8 0 】

(実験例3)フェナントレンアナログの合成

図4に示すスキームに従い、ホウ酸誘導体を出発原料として、パラジウム存在下でヨードフェナントレンとカップリングし化合物(9)合成した。続いて脱シリル化により化合物(10)で合成した。トリチル化により化合物(11)を3step収率23%で合成し、さらにアミダイト化することで目的化合物(12)を収率70%で合成した。具体的には以下のようにした。

【 0 0 8 1 】

6-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylphenyl)-phenanthrene (9)の合成

暗室においてIodophenanthrene0.742g (2.44mmol) にPdCl₂(dppf) 0.122g (5mol%) を加え、THF/H₂O 12mlで溶解した。3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethyl Phenylboronic acid 0.90g (2.19mmol) をTHF/H₂O 12mlに溶解したものを加え、2N NaOH aq 3.66ml (3eq) を投入して遮光下の65℃オイルバスで反応を開始し、24時間撹拌した。TLC (Hex : EtOAc = 1 : 1) では目的物と原料のIodophenanthreneが重なってしまうため反応の終了を確認できなかった。また肉眼で蛍光を確認した。EtOAcで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし目的物とIodophenanthreneの混合物1.2749gを得た。

【 0 0 8 2 】

3-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylphenyl)- phenanthrene (10)の合成

Ar雰囲気下で混合物(9)1.2749gにTHF6.57mlを加えて、1MTBAF6.57ml (6.57mmol、3eq) を滴下した。Ar雰囲気下で2日間撹拌した。溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=50:1) で化合物(10)0.9324gをTBAF残留で分離した。

¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.90 (4H, d, H-4,5,6,7) 7.90 (4H, d, H-10,11,12,13), 7.39 (1H, s, ベンゼン環), 7.33 (2H, s, ベンゼン環), 5.26 (2H, s, OH), 4.60 (4H, s, CH₃).

元素分析 : H=5.86%, C=83.14% calculated, H=5.77%, C=84.05%

Mass : C₂₂H₁₈O₂ = 314.13148 calculated, 314.13068

【 0 0 8 3 】

1-(3-hydroxymethyl-5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methylphenyl)-phenanthrene (11)の合成

Ar雰囲気下で化合物(10)0.932gにpyrizine14.5mlを加えて溶解し、DMTrCl1.27g (3.77mmol、1.3eq) を加えた。Ar雰囲気下で27時間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルムのみ→クロロホルム:メタノール=100 : 1) で化合物(11)0.3473g (0.56mmol、3step 23%) を単離した。

¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.90 (4H, d, H-4,5,6,7) 7.90 (4H, d, H-10,11,12,13), 7.39 (1H, s, ベンゼン環), 7.33 (2H, s, ベンゼン環), 7.25 (13H, m, DMTr), ??? (1H, s, OH), 4.78 (2H, d, J=5.6, CH₂), 4.27 (2H, s, CH₃), 3.78 (6H, s, OCH₃).

【 0 0 8 4 】

1-(3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-O-((2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl))-phosphoamidomethylphenyl)- Phenanthrene (12)の合成

化合物(11)0.35g(0.56mmol)を実験器具とともに十分乾燥し、Ar置換したグローブボックスを用いて、THF5.6mlをアルゴン下において加え、さらにHunigBase0.36ml(2.80mmol、5.0eq)存在下、亜リン酸化試薬0.26ml(1.12mmol、2.0eq)を加え室温で30分間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃ aq と satNaCl aq で洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc

10

20

30

40

50

cのみ)で化合物(12)0.335g (0.39mmol、70%)を得た。

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 148.97 ppm.

【0085】

(実験例4)ピレンアナログの合成

図5に示すスキームに従い、ホウ酸誘導体を出発原料とし、パラジウム存在下でプロモピレンとカップリングし化合物(13)合成した。続いて脱シリル化により化合物(14)を合成した。トリチル化により化合物(15)を3step収率30%で合成し、さらにアミダイト化することで目的化合物(16)を定量的に合成した。具体的には以下のようにした。

【0086】

6-(3,5-bis-tert-butylidimethylsilyloxymethylphenyl)-pyrene (13)の合成

10

暗室において1-Bromopyrene0.686g (2.44mmol)にPdCl₂(dppf) 0.122g (5mol%)を加え、THF/H₂O 12mlで溶解した。3,5-bis-tert-butylidimethylsilyloxymethyl Phenylboronic acid 1.0g (2.19mmol)をTHF/H₂O 12mlに溶解したものを加え、2N NaOHaq 3.66ml (3eq)を投入して遮光下の65℃オイルバスで反応を開始し、24時間撹拌した。TLC (Hex : EtOAc = 5 : 1)により肉眼で強い蛍光を確認した。EtOAcで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃aqとsatNaClaqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし目的物と加水分解物の混合物1.5203gを得た。

【0087】

3-(3,5-bis-tert-butylidimethylsilyloxymethylphenyl)- pyrene (14)の合成

20

Ar雰囲気下で混合物(13)1.5203gにTHF7.32mlを加えて、1MTBAF7.32ml (7.32mmol、3eq)を滴下した。Ar雰囲気下で2日間撹拌した。溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール=50:1)で化合物(14)0.9324gをTBAF残留で分離した。

¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.32 (5H, d, H-6,8,9,10,12) 8.22 (2H, d, H-5,13), 8.14 (2H, d, H-2,3), 8.09 (1H, s, ベンゼン環), 8.00 (2H, s, ベンゼン環), 5.30 (2H, s, OH), 4.63 (4H, s, CH₃).

元素分析 : H=5.37%, C=84.21% calculated, H=5.36%, C=85.18%

Mass : C₂₄H₁₈O₂= 338.13123 calculated,338.13068

【0088】

1-(3-hydroxymethyl-5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methylphenyl)- pyrene (15)の合成

30

Ar雰囲気下で化合物(14)0.932gにpyridine14.5mlを加えて溶解し、DMTrCl1.27g (3.77mmol、1.3eq)を加えた。Ar雰囲気下で27時間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃aqとsatNaClaqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルムのみ→クロロホルム:メタノール=100:1)で化合物(15)0.4632g (0.72mmol、3step30%)を単離した。

¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.56 (5H, d, H-6,8,9,10,12) 8.22 (2H, d, H-5,13), 8.18 (2H, d, H-2,3), 8.09 (1H, s, ベンゼン環), 8.02 (2H, s, ベンゼン環), 7.25 (13H, m, DMTr), 5.32 (1H, s, OH), 4.65 (2H, d, J=5.6, CH₂), 4.23 (2H, s, CH₃), 3.16 (6H, s, OCH₃).

【0089】

40

1-(3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-O-((2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl))-phosphamidomethylphenyl)- pyrene(16)の合成

化合物(15)0.46g(0.72mmol)を実験器具とともに十分乾燥し、Ar置換したグローブボックスを用いて、THF7.2mlをアルゴン下において加え、さらにHunigBase0.46ml(3.60mmol、5.0eq)存在下、亜リン酸化試薬0.34ml(1.44mmol、2.0eq)を加え室温で30分間撹拌した。クロロホルムで抽出し有機層をH₂O、satNaHCO₃aqとsatNaClaqで洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAcのみ)で混合物(16)0.7091gを定量的に得た。

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 149.01 ppm.

【0090】

50

(実験例5) 吸光度測定

それぞれの原料と合成したベンゼンタイプ-フルオロシドのノルマル体との吸光度と蛍光強度を解析し、比較検討した。すなわち、それぞれの試料(2)(6)(10)(14)とそれぞれの原料を5mg取り、1mlのMeOHに溶解する。それを元に2stepで0.03 μ mol/mlに調製した。吸光度計でピーク時の値が1以下であることを確認し、蛍光測定をおこなった。結果を図6及び図7に示す。

【0091】

図6に示すように、ベンゼン・ナフタレンの比較結果から原料よりベンゼン・ナフタレンアナログのフルオロシドが格段に高い蛍光強度を示した。また、図7に示すように、それぞれフェナントレン・ピレンの比較結果から、同様に原料よりフェナントレン・ピレンアナログのフルオロシドが格段に高い蛍光強度を示した。これによりベンゼンタイプ-フルオロシドによるフルオロシドオリゴマーを合成した場合に、より高い蛍光強度が得られることがわかった。

【0092】

以上のことから、 π 電子密充填型であるベンゼン-リン酸骨格に蛍光性の化合物を導入したフルオロシドを開発することにより、その π 電子密充填型が光誘起電子移動により電子密度が下がり、励起・蛍光波長の変化とさらなる蛍光強度の強化等の蛍光特性の変化が得られることがわかった。なお、ベンゼン-リン酸骨格は、ヌクレアーゼ耐性を向上させることができる。

【0093】

(実験例6) ピレンアナログの合成

6-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylPhenyl)-pyrene(1)の合成

図5に示すスキームに従い、暗室において1-Bromopyrene (0.686g, 2.44mmol)にPdCl₂(dppf)(0.122g, 5mol%)を加え、THF/H₂O (12ml)で溶解した。3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethyl phenylboronic acid (1.0g, 2.19mmol)をTHF/H₂O (24ml)に溶解したものを加え、2N NaOHaq (3.66ml, 3eq)を投入して遮光下の65℃オイルバスで反応を開始し、2日間撹拌した。TLC (Hex: EtOAc = 5:1)により肉眼で強い蛍光を確認した。反応を確認後、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去し目的物をmixtureとして(1.28g)得た。

【0094】

3-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylphenyl)-pyrene (2)の合成

Ar雰囲気下で混合物(1) (1.29g)にTHF (22.7ml), CH₂Cl₂ (22.7ml)を加えて、TBAF (1.14ml, 1.14mmol, 0.5eq)を滴下した。Ar雰囲気下で45分間撹拌した。TLC (クロロホルム: メタノール = 10:1)により反応を確認した。反応を確認後、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧除去し、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール = 15:1 ~ 10:1)で化合物(2) (0.416g, 1.23mmol, 54.2% 2steps)を得た。¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.32 (5H, d, H-6,8,9,10,12), 8.22 (2H, d, H-5,13), 8.14 (2H, d, H-2,3), 8.09 (1H, s, ベンゼン環), 8.00 (2H, s, ベンゼン環), 5.30 (2H, s, OH), 4.63 (4H, s, CH₃)。

【0095】

1-(3-hydroxymethyl-5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methylPhenyl)-Pyrene (3)の合成

Ar雰囲気下で化合物(2) (0.41g, 1.21mmol)にピリジン (9.06ml)を加えて溶解し、DMTrCl (0.46g, 1.36mmol, 1.1eq)を加えた。Ar雰囲気下で4時間撹拌し、反応をTLC (クロロホルム: メタノール = 10:1)で確認した。反応を確認後、クロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧除去し、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール = 50:1 ~ 10:1)で化合物(3) (0.4478g, 0.699mmol, 57.8%)、原料 (0.113g, 0.334mmol, 27.7%)を得た。

¹H NMR (400MHz) (DMSO) δ : 8.56 (5H, d, H-6,8,9,10,12), 8.22 (2H, d, H-5,13), 8.18 (2H, d, H-2,3), 8.09 (1H, s, ベンゼン環), 8.02 (2H, s, ベンゼン環), 7.25 (13

H, m, DMTr), 5.32 (1H, s, OH), 4.65 (2H, d, J=5.6, CH₂), 4.23 (2H, s, CH₂), 3.16 (6H, s, OCH₃)

【0096】

1-(3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-O-((2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl))-phosphoramidicmethylphenyl)-pyrene(4)の合成

グローブバック中(アルゴン下、完全無水)、RNA条件下で反応させた。

化合物(3)(0.44 g, 0.688 mmol)をTHF (3.43 ml)に溶解させHunig's Base (N-Ethyl diisopropylamine) (0.565 ml, 3.44 mmol, 5eq)を加え、更にアミダイト試薬(0.307 ml,

1.38 mmol, 2eq)を撹拌しながらゆっくり加えた。グローブバックから取り出し30分撹拌した後、クロロホルムに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去しシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル:アセトン=2:1)で単離精製し化合物(4)(0.539 g, 0.615 mmol, 89.3%)を得た。

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 149.25 ppm

【0097】

(実験例7) オリゴヌクレオチドの合成

常法に従い、図8に示すオリゴヌクレオチドの塩基に対応するアミダイト体を準備し、以下の配列のオリゴヌクレオチド誘導体を固相合成法により合成した。なお、MALDI-TOF/MS(図9)にて分子量を確認した。

【0098】

(実験例8) 吸光スペクトル、蛍光スペクトル及び融解温度の測定

これらのオリゴヌクレオチドにつき、Bufferとして10 mM Tris-HCl (pH=7.2), 100 mM NaClを使用して図10~図12に示す各温度で吸光スペクトルを測定した。また、室温にて蛍光スペクトルを測定した。さらに、融解温度及び/又は単鎖の状態それぞれ測定した。励起波長は、342 nmとした。結果を図10~図17に示す。

【0099】

図10~図12に示すように、340 nmがピレン固有の吸収であるが、これらのスペクトルから、低温ではピレン同士がスタックし、温度が上昇して二重鎖が解離するとともに、UV吸収が増大する傾向が確認された。また、図13~図16に示すように、励起波長光を照射すると、二重鎖の状態では最も強く特有のエキシマー由来の蛍光が観察されることがわかった。また、単鎖であってもスタック効果によりエキシマー由来の蛍光が観察された。また、これらの図によれば、少なくとも2つ以上のピレンアナログがスタックされることによりアナログモノマーに由来すると考えられる蛍光(390 nm)が観察されなくなることがわかった。

【0100】

また、図17に示すように、天然の二重鎖のT_mが約64 °であるのに対し、D1では73 °、D2では77 °、D3では、76 °であった。二重鎖の安定性に寄与する水素結合の数がピレンアナログの導入によって減少するにも関わらず、熱安定性が向上していることがわかった。

【0101】

以上の結果によれば、これらのオリゴヌクレオチドにおけるピレンアナログのスタックが効率的に形成され、かつ、安定であることがわかった。

【0102】

(実施例9) ペリレンアナログの合成

3-Bromoperylene (1) の合成

図18に示すスキームに従い、Perylene(252mg, 1mmol)をDMF(45ml)に溶解し、そこへ、NBS(178mg)をDMF(10ml)により溶解させた溶液をゆっくり加えた。24時間室温で撹拌した。H₂O(200ml)を加え、生成物を沈殿させ吸引ろ過した。生成物をヘキサンにより再結晶した。黄褐色化合物(1)(187mg, (mixture))を得た。

【0103】

10

20

30

40

50

3-(3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethylPhenyl)Perylene(2) の合成

暗室において3-BromoPerylene(0.150g, 0.453mmol, 1.3eq.) にPdCl₂(dppf) (17.4mg, 5mol%) を加えた。そこに3,5-bis-tert-butyldimethylsilyloxymethyl Phenylboronic acid (0.143g, 0.348mmol, 1eq.) をTHF/H₂O (5:1)(3.6ml)に溶解したものを加え、2N NaOHaq. 3.66ml (3eq) を投入して遮光下の65 °Cオイルバスで反応を開始し、30時間撹拌した。TLC (Hex : EtOAc = 5 : 1) により反応を確認した。NH₄Cl aq.で中和し、セライトろ過を行った。EtOAcで抽出し有機層をH₂O、sat.NaHCO₃ aq. とsat.NaCl aq.で洗浄した後、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去で飛ばし目的物を3-BromoPeryleneとの混合物(0.192g)で得た。

【 0 1 0 4 】

10

3- (3-hydroxymethyl-5-tert-butyldimethylsilyloxymethylPhenyl) Perylene(3) の合成

予め真空乾燥させておいた化合物(1)、(2)、(3)の混合物(2.37 g)をTHF(38.5 ml)、ジクロロメタン(38.5 ml)に溶解させ、TBAF(2 ml, 2 mmol,)を滴下した。TLC (クロロホルム:メタノール = 1:1) にて反応の進行状況を分刻みで細かく観察しながら、3時間半後に反応を停止した。クロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧除去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル = 10:1 ~ 1:1) で精製し、化合物(3) (0.447g, 0.889 mmol, 11%)を赤色個体として得た。

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 8.09-7.12 (14H, m, aromatic Protons), 4.72-4.66 (4H, m, CH₂), 0.81 (9H, s, t-butyl), 0.0079 (6H, s, TBDMS).

20

【 0 1 0 5 】

3- (3-hydroxymethyl-5-(4,4 ' -dimethoxytrityloxy)methylPhenyl) Perylene(4)の合成

化合物(3)(0.411 g, 0.818 mmol)にピリジン(8.2 ml)を加え溶解させ、そこにアルゴン雰囲気下でDMTrCl(0.556 g, 1.64 mmol, 2 eq)を加え室温で18時間撹拌した。TLCにて、原料の消失を確認し、クロロホルムと水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、トルエン共沸によりピリジンを除去してそのまま次の反応へ進んだ。濃縮物をTHF(8.2 ml)に溶解させ、アルゴン雰囲気下でTBAF(1.64 ml, 1.64 mmol, 2 eq)を加え室温で5時間撹拌し、TLCにて反応の終了を確認した。クロロホルムと水で分液し、有機層を飽和NaHCO₃水溶液と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 ~ 1 : 1) でTBAF残留の化合物(4)を得た。その混合物を再結晶 (クロロホルムとn-ヘキサン) により黄色固体の化合物(4)(0.410g, 0.593mmol, 72%(2 steps))を得た。

30

¹H NMR (400MHz) (CDCl₃) δ : 8.25-6.83 (27H, m, aromatic protons), 4.80 (2H, d, J=6.1 Hz,CH₂), 4.29(2H, s, CH₂O-DMTr), 3.78 (6H, s, OCH₃), 1.72(1H, t, J=6.0Hz, OH).

【 0 1 0 6 】

3-3-(4,4 ' -dimethoxytrityloxy)methyl-5-0-{(2-cyanoethyl)-(N,N-diisoPropyl)}-Phos

PhoamidicmethylPhenyl) Perylene(5)の合成

化合物(4)(0.406g, 0.588 mmol)を実験器具とともに十分乾燥し、Ar置換したグローブバックを用いて、THF (3 ml)をアルゴン下において加え、さらにHunig ' s base (0.514 ml, 2.94 mmol, 5.0 eq)存在下、亜リン酸化試薬(0.263 ml, 1.18 mmol, 2.0 eq)を加え室温で1時間撹拌した。反応をTLC (酢酸エチル:アセトン = 20:1) にて確認し、飽和NaHCO₃水溶液を少量加え反応を停止し、そのままクロロホルムで分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、溶媒を減圧留去した後、中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:アセトン = 30:1)にて分離精製し、黄色泡状化合物(5)(0.348 g, 0.391 mmol, 66%)を得た。³¹P NMRにより、亜リン酸基の導入を確認した。

40

³¹P NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 149.09

【 0 1 0 7 】

(実験例 1 0) オリゴヌクレオチド誘導体の合成

50

実施例 6 において既に合成したピレンアナログのアミダイト体及び実施例 9 で合成したペリレンアナログのアミダイト体を用い、さらに、図 19 に示すリンカー (S) を準備して、同じく図 19 に示す配列のラベル化剤をポリ T (チミジンデオキシリボヌクレオチド 10 個) の 5' 側に備えるオリゴヌクレオチドを合成した。なお、リンカーのアミダイト体は、プタンジオールの一つの水酸基をDMTr化、続いてもう一方の水酸基を亜リン酸化することにより合成した。なお、本実験例で得られるオリゴヌクレオチド誘導体は、本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体に相当する。

【0108】

(実験例 11)

オリゴヌクレオチドについての吸光スペクトル及び蛍光スペクトルの測定

10

実験例 10 で合成した合計 11 種のオリゴヌクレオチドにつき、吸光スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。結果を図 20 ~ 図 23 に示す。なお、蛍光スペクトルを測定するのにあたり、ピレンの励起波長である 350 nm 付近とペリレンの励起波長である 455 nm 付近のそれぞれを用いた。

【0109】

図 20 ~ 図 23 に示すように、ピレンアナログ及び / 又はペリレンアナログを含むオリゴヌクレオチド誘導体のスタック効果は、明らかであった。また、図 24 に示すように、非特許文献 1 の結果と対比すると、本明細書に開示のオリゴヌクレオチド誘導体は、蛍光波長がより大きく長波長側へシフトされているとともに、スタック時におけるモノマー由来の蛍光スペクトルの出現が抑制されていることがわかった。

20

【0110】

実験例 10 で合成したオリゴヌクレオチド誘導体の水溶液を、365 nm の波長の光を照射した結果を図 25 に示す。図 25 に示すように、図中左から右に向かって紫、青、緑、黄、赤にわたって全 11 色を発色させることができた。

【0111】

(実施例 12)

本実施例では、3' 末端にクエンチャーとして B H Q 又は D a b を有し、置換基 Y としてピレンアナログとペリレンアナログと有する本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位をリンカー (図 26 参照) を介して 5' 末端に有する所定配列のモレキュラービーコンを以上の実施例に準じて作製した (図 26 参照)。これらのモレキュラービーコンについて、1 塩基のみがミスマッチであるターゲット RNA である RNA 1 と完全マッチ配列のターゲット RNA である RNA 2 とハイブリダイゼーションを行って消光 - 発光を観察した。モレキュラービーコンの濃度は、3 μ M (Na-リン酸緩衝液 pH 7.0、100 mM NaCl) とし、UV (波長 365 nm) で励起して観察した。結果を図 26 に示す。

30

【0112】

図 26 に示すように、ヌクレオチド誘導体単位の数が増えるごとに蛍光が長波長側にシフトする傾向を観察した。また、ミスマッチよりも完全マッチ配列の RNA とのハイブリダイズ時においてより強い蛍光を観察した。以上のことから、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位は、クエンチャーで有効に消光されるとともに、ターゲット核酸とハイブリダイズ時には、確実に蛍光を発することができることを確認できた。

40

【0113】

(実施例 13)

本実施例では、本明細書に開示されるヌクレオチド誘導体単位 (Y はナフタレン) を末端に備える各種 siRNA を合成し (図 27 参照)、タンパク質発現抑制効果を確認した。すなわち、本実施例では、合成した 3' 末端化学修飾 Renilla siRNA のタンパク質発現抑制効果を評価するために 0.1, 0.5, 1, 5, 10 nM の濃度で Luc Assay (Dual Luciferase Assay) による 3' 末端化学修飾 siRNA のタンパク質発現抑制効果の評価) を行なった。操作は以下のようにして行った。

【0114】

(Luc Assay)

50

HeLa細胞を4000 cell / mLになるように調整し、96 well plateの各wellに100 μ Lずつ入れ24時間培養した。合成したsiRNAのそれぞれの鎖をTE buffer (100mM NaCl) に溶解し、95 $^{\circ}$ Cで3分間過熱後、1時間放置し常温に戻した。このsiRNA各量、培地 (OPTI-MEM) 各量、0.2 μ g/ μ L psi-CHECK(Fire fly、Renilla各々のsequenceを持つベクター) 1 μ L、transfast (トランスフェクション試薬) 3 μ Lを総量350 μ Lになるように混合し、培地を吸い出した96 well plateの各wellに35 μ Lずつ入れ、1時間後培地を100 μ L加えて24時間培養した。lysis bufferを各wellに100 μ Lずつ加え振とうした。発光測定用の96 well plateにサンプル24 μ Lを移し、Dual glo substrate (Fire flyの基質) 24 μ Lを加え10分放置後、Fire fly luciferaseを測定した。その後、Stop and glo substrate 24 μ Lを加え10分放置後、Renilla luciferaseを測定した。Renilla luciferaseの値をFire fly luciferaseの値で割り、% of controlを用いて比較した。なお、luciferase測定には、Luminescenser JNR11を使用した。なお、siRNAをトランスフェクションしていない状態をコントロールとし100%とした。結果を図27に示す。

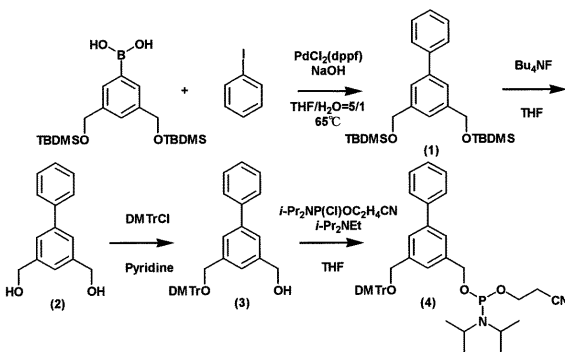
10

【0115】

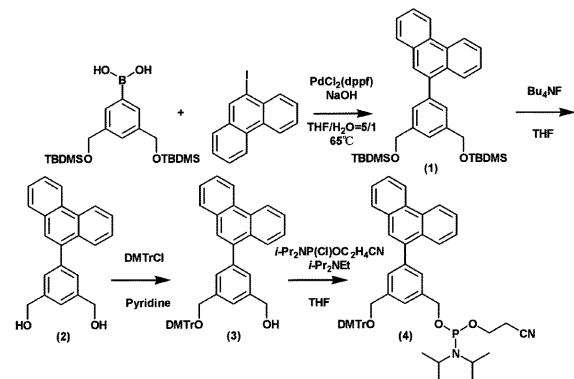
図27に示すように、Dual Luciferase Assayの結果、今回合成したsiRNAはいずれも低濃度でnormal typeのsiRNA (図27におけるdTdT) よりも活性を示すことが分かった。なかでも、BNタイプ (ガイド鎖の3'末端に単位B及び単位Nをそれぞれ1個を有し、パッセンジャー鎖の5'末端に単位N1個、3'末端に単位Bを2個備えるsiRNA) が極めて良好なsiRNA効果を示した。このことは、BNタイプ及びNNタイプのsiRNAのヌクレアーゼ耐性を意味しているものと考えられた。

20

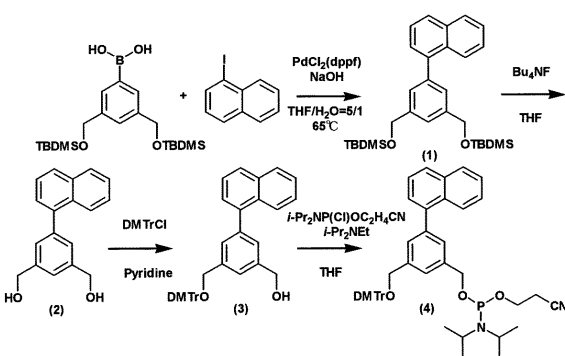
【図2】



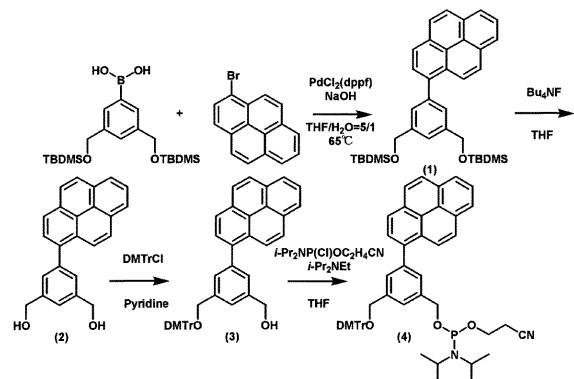
【図4】



【図3】



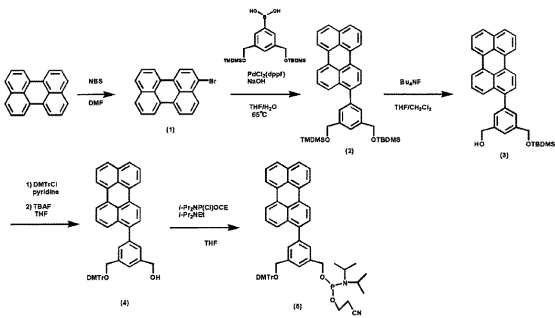
【図5】



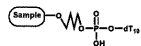
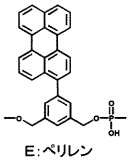
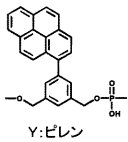
【図 9】

name	calculated	observed
bu-1	6468.1	6468.5
bu-2	6379.1	6381.8
bu-3	6564.2	6563.8
bu-4	6466.1	6467.4
bu-5	6651.2	6653.2
bu-6	6562.2	6566.7
bu-7	6762.2	6764.1
bu-8	6633.2	6634.2

【図 18】



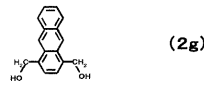
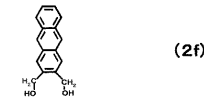
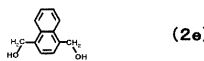
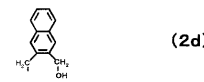
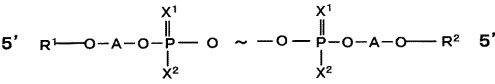
【図 19】



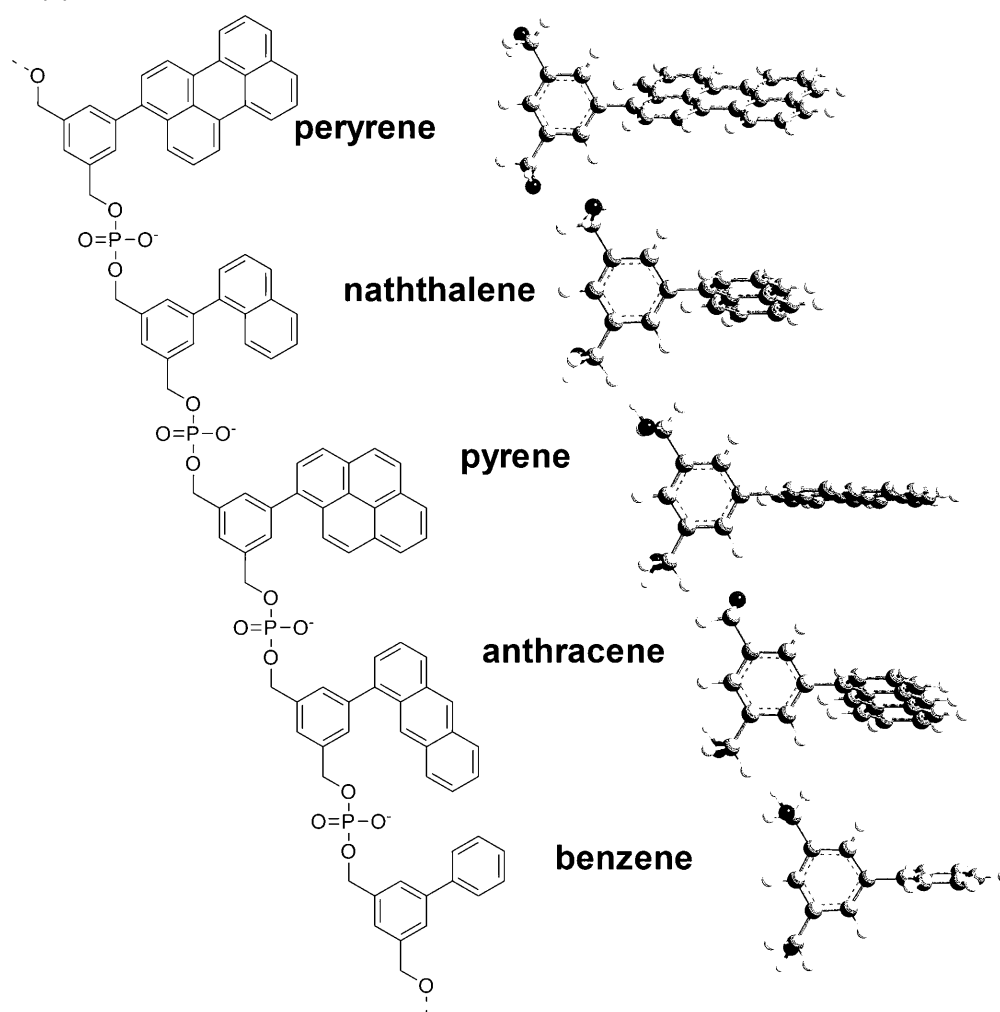
オリゴヌクレオチド誘導体

sample	Mol.wt. calculated.	Mol.wt. observed
YSSS	3986.7	3988.2
YYSSS	4386.8	4387.2
YYYSSS	4786.9	4787.2
ESSS	4036.7	4038.3
EESSS	4486.8	4488.7
EESSS	4936.9	4939.0
EYSSS	4436.8	4439.9
ESYSS	4436.8	4439.2
ESSSY	4436.8	4437.4
EEYYSSS	5287.0	5287.6
EYEESSS	5287.0	5286.9

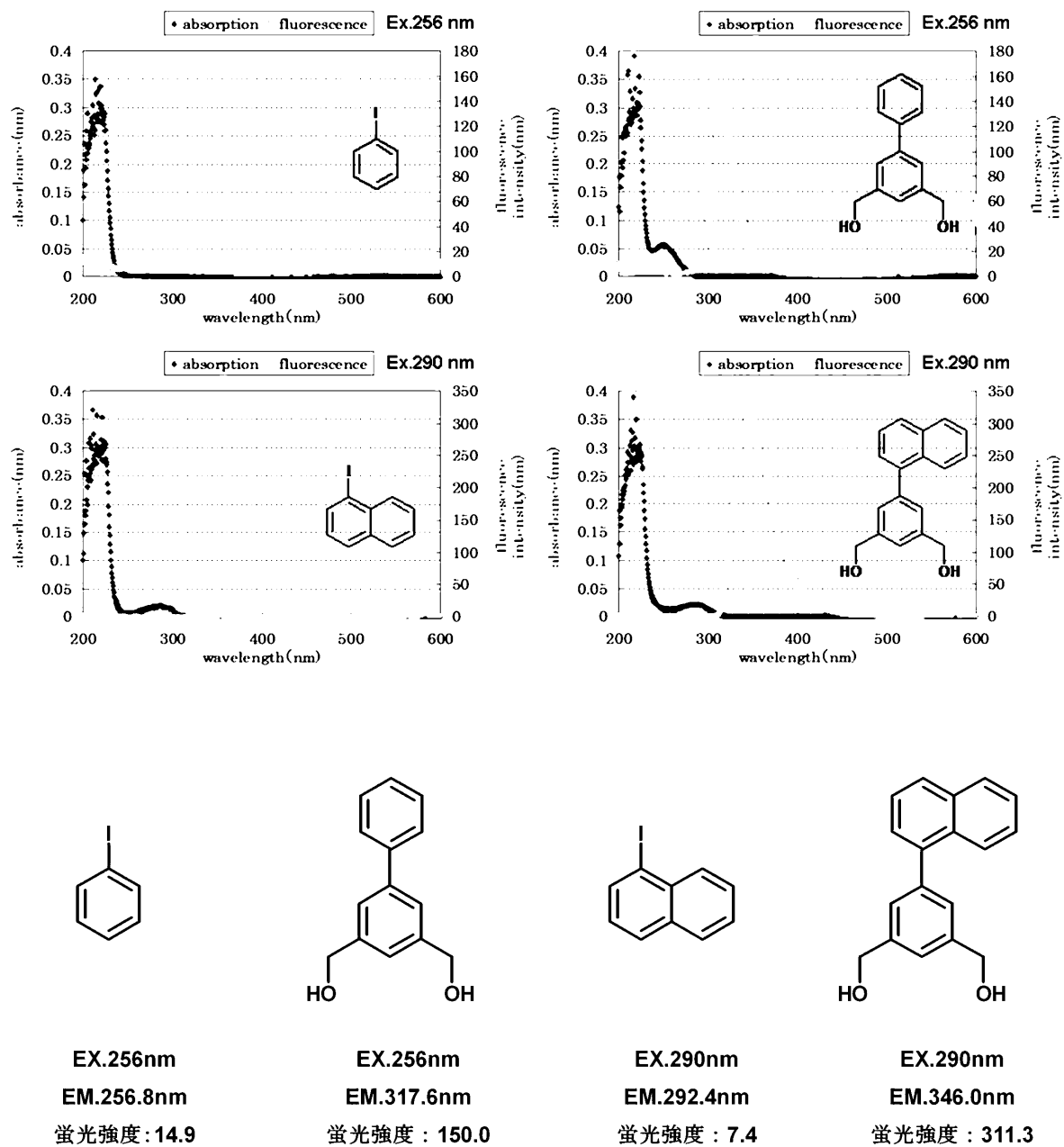
【図 28】



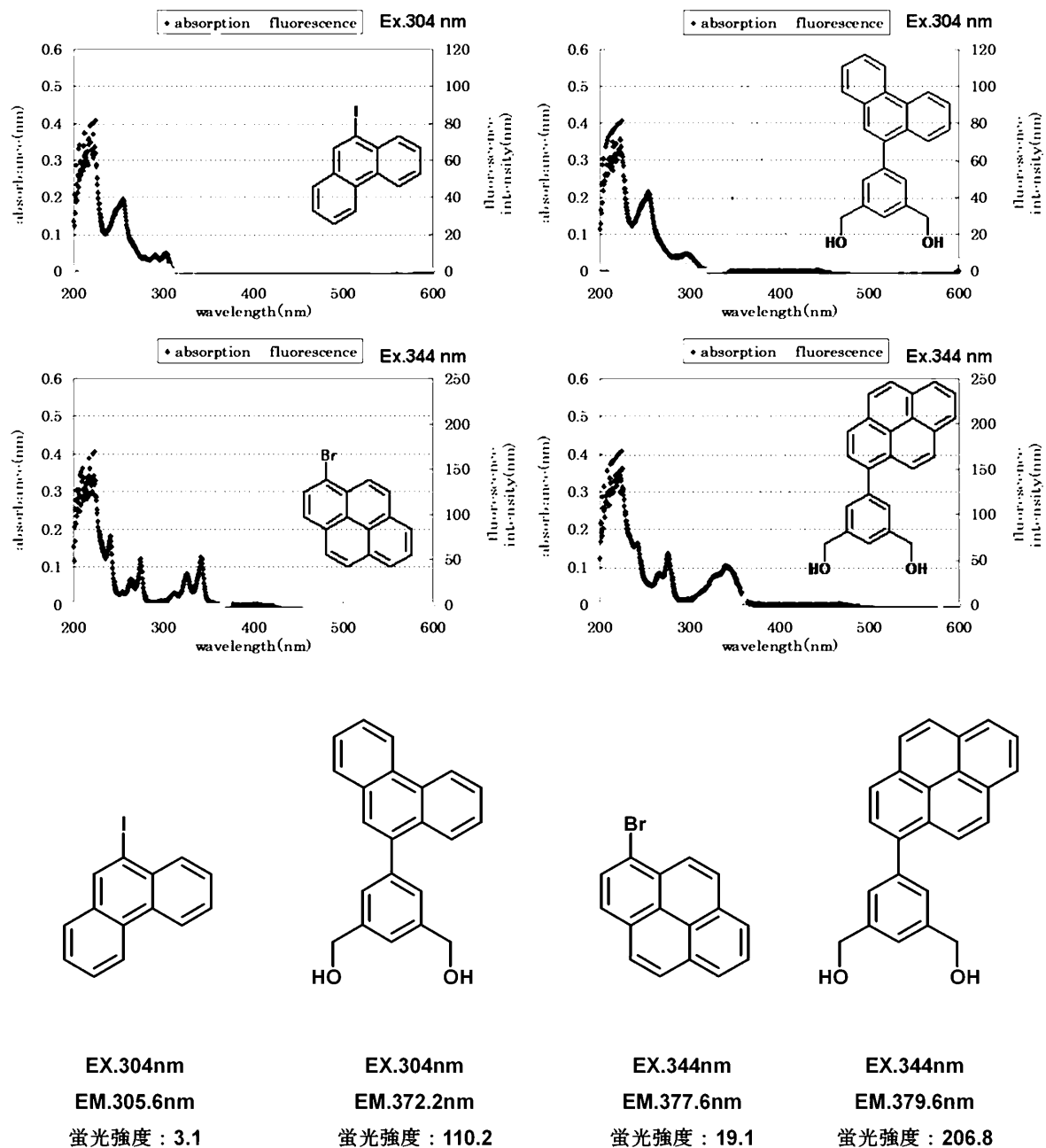
【図 1】



【図 6】



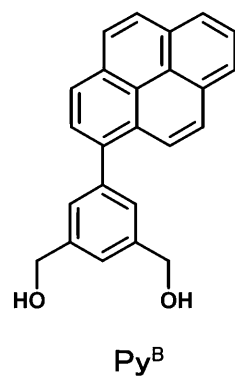
【図 7】



【図 8】

bu-1: 3'-AGCTCGGTCATCGAGAGTGCA-5'

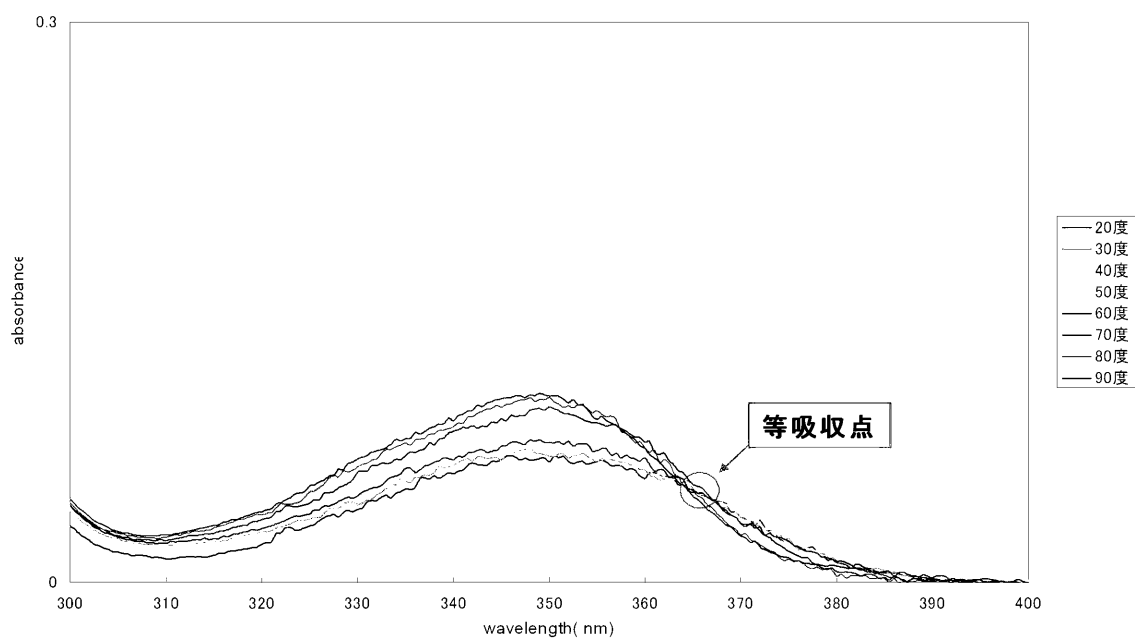
bu-2: 3'-TGCACTCTCGATGACCGAGCT-5'

bu-3: 3'-AGCTCGGTCAPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-4: 3'-TGCACTCTCGPy^BTGACCGAGCT-5'bu-5: 3'-AGCTCGGTCPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-6: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BGACCGAGCT-5'bu-7: 3'-AGCTCGGTPy^BPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-8: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BPy^BACCGAGCT-5'

【図 10】

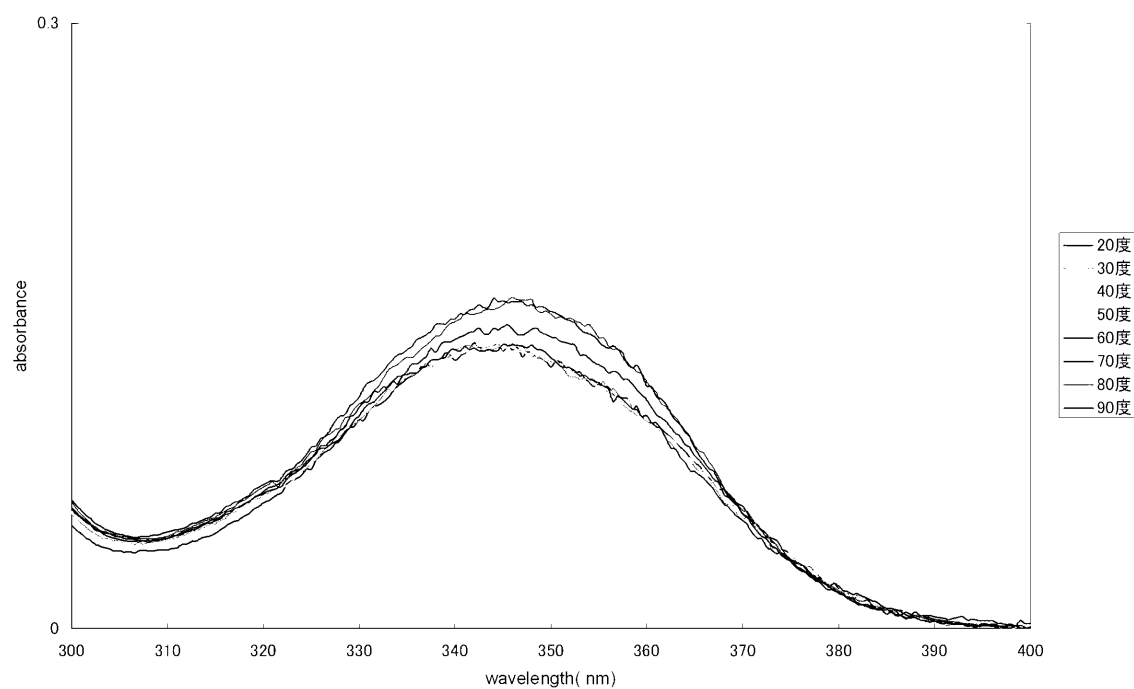
オリゴヌクレオチドの吸光スペクトル

bu-3 : bu-4

bu-3: 3'-AGCTCGGTCAPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-4: 3'-TGCACTCTCGPy^BTGACCGAGCT-5'

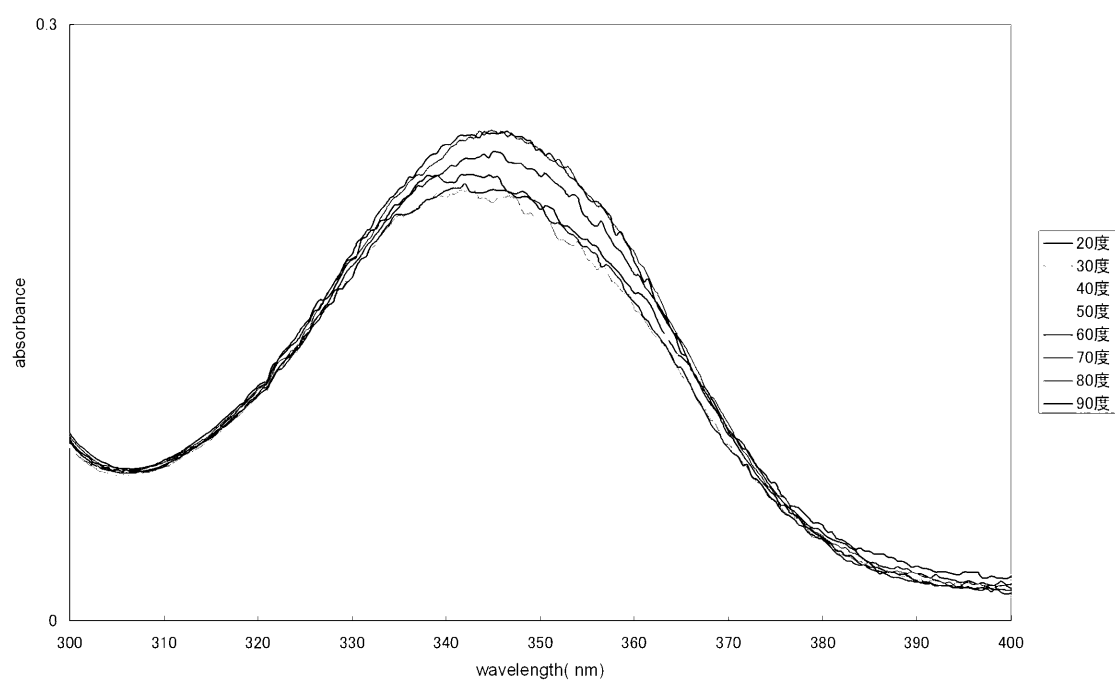
【図 1 1】

bu-5 : bu-6

bu-5: 3'-AGCTCGGTCPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-6: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BGACCGAGCT-5'

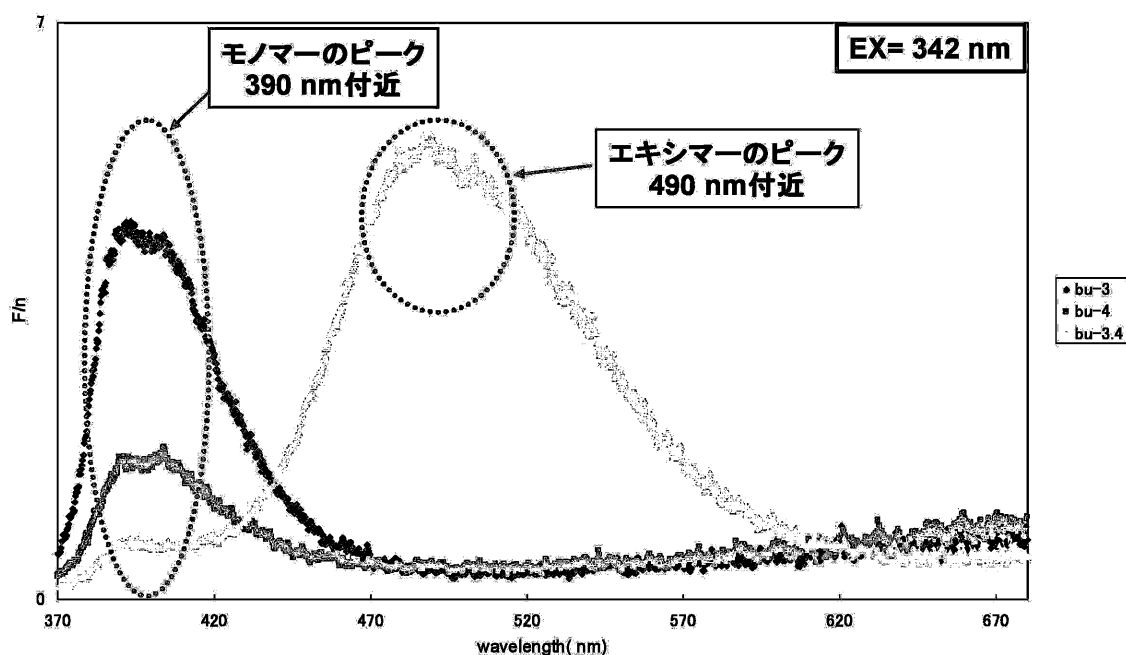
【図 1 2】

bu-7 : bu-8

bu-7: 3'-AGCTCGGTCPy^BPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-8: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BPy^BACCGAGCT-5'

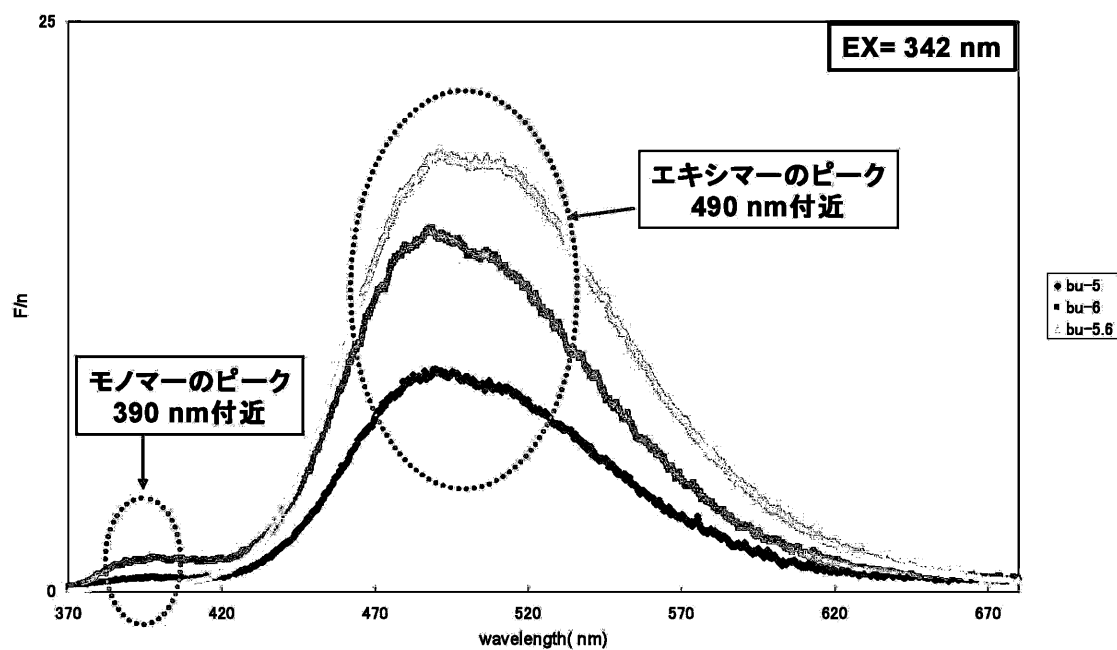
【図 1 3】

bu-3 : bu-4

bu-3: 3'-AGCTCGGTCAPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-4: 3'-TGCACTCTCGPy^BTGACCGAGCT-5'

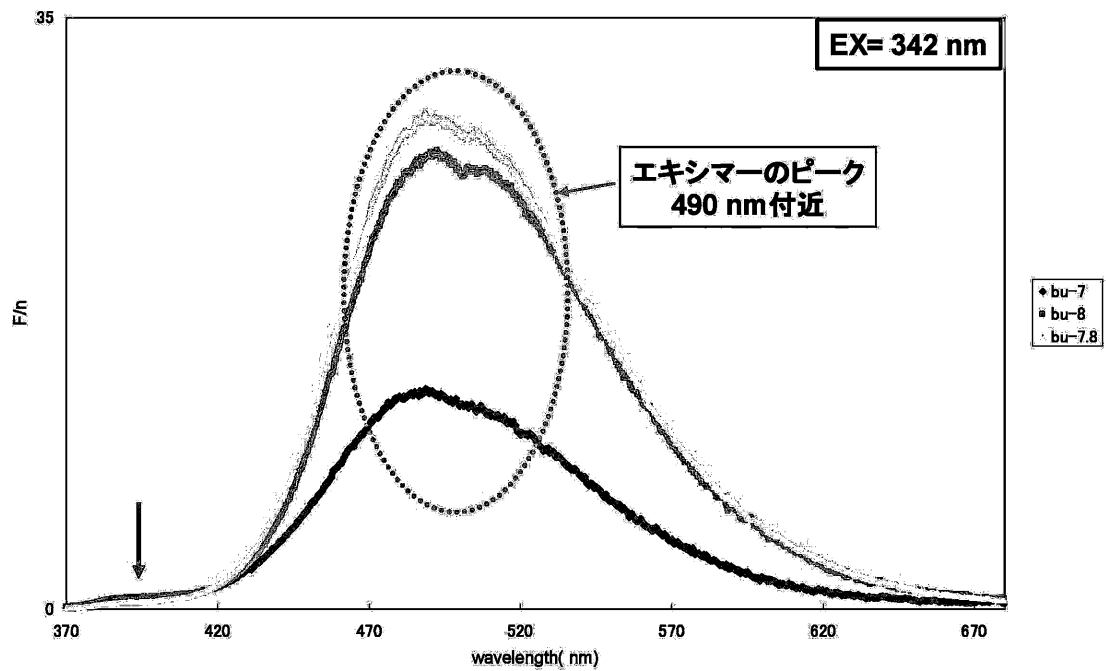
【図 1 4】

bu-5 : bu-6

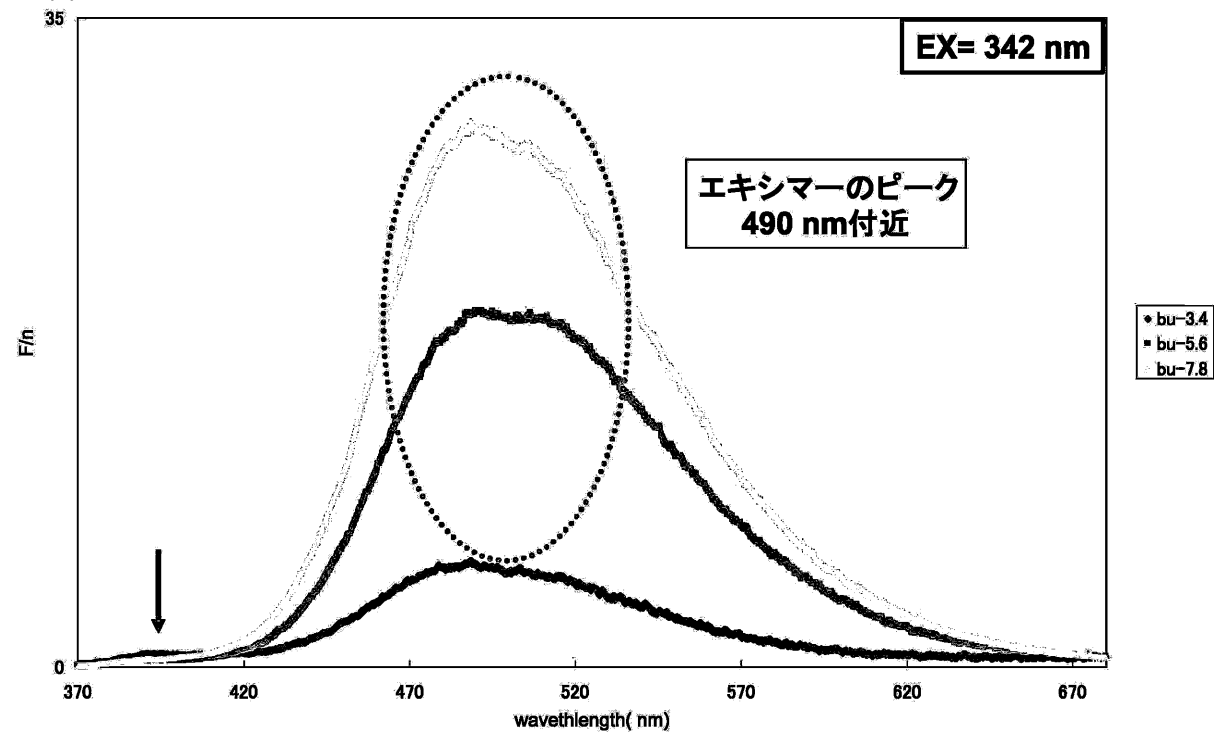
bu-5: 3'-AGCTCGGTCPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-6: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BTGACCGAGCT-5'

【図 15】

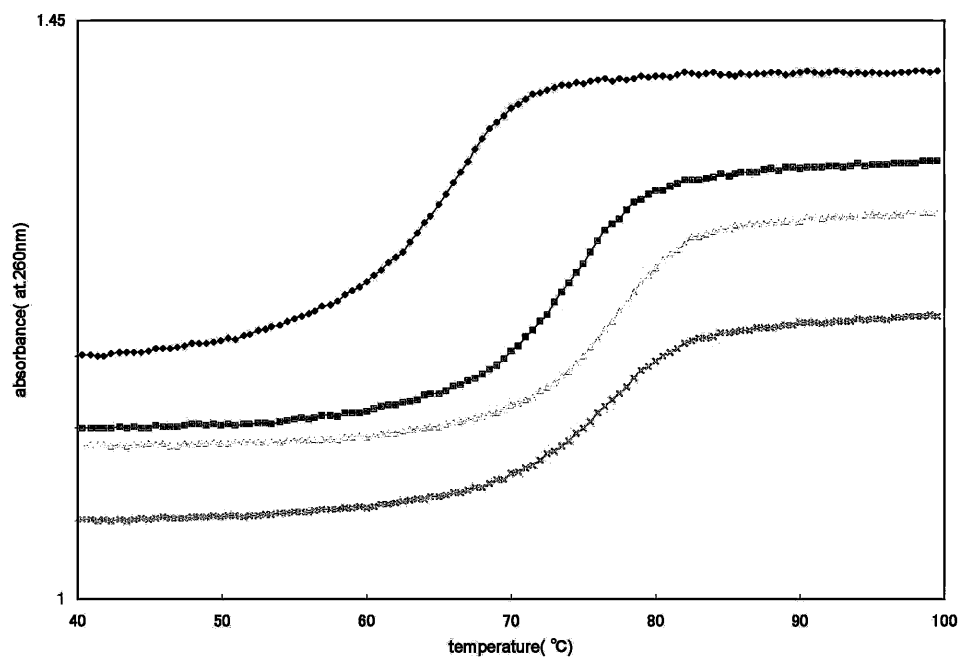
bu-7 : bu-8

bu-7: 3'-AGCTCGGTPy^BPy^BPy^BCGAGAGTGCA-5'bu-8: 3'-TGCACTCTCGPy^BPy^BPy^BACCGAGCT-5'

【図 16】

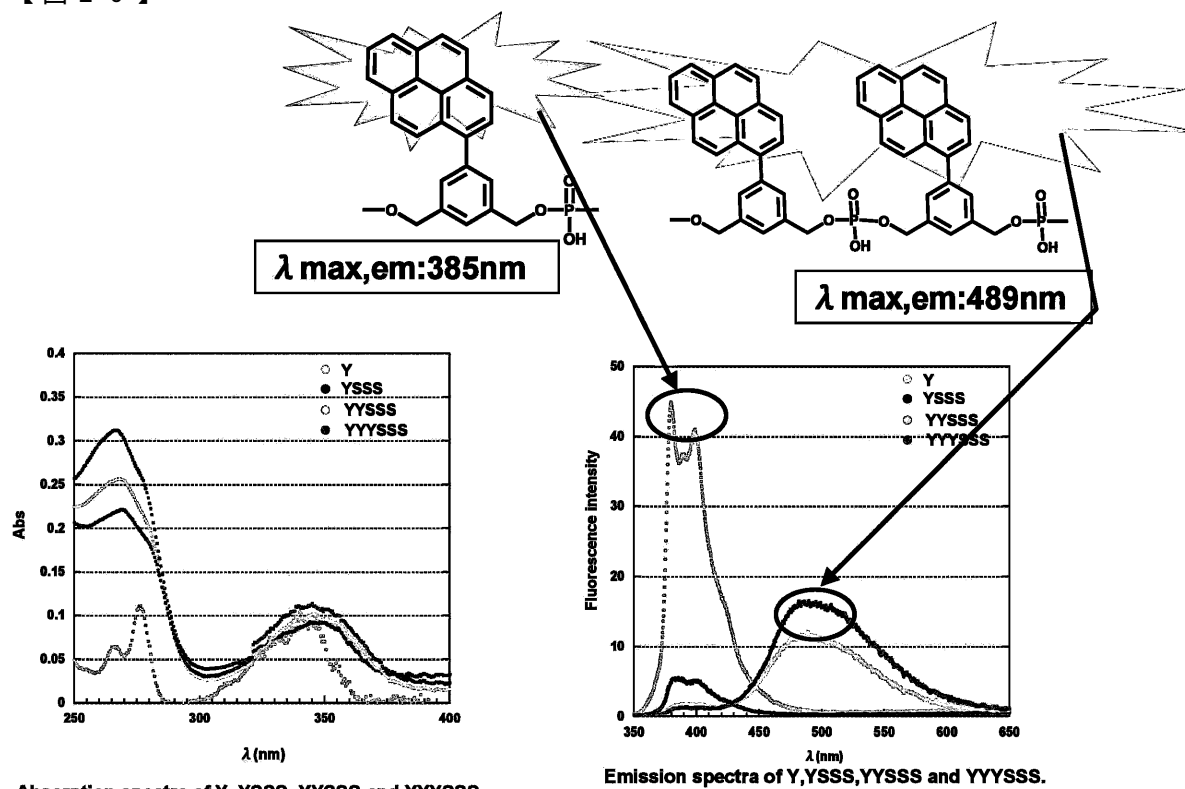


【図 17】

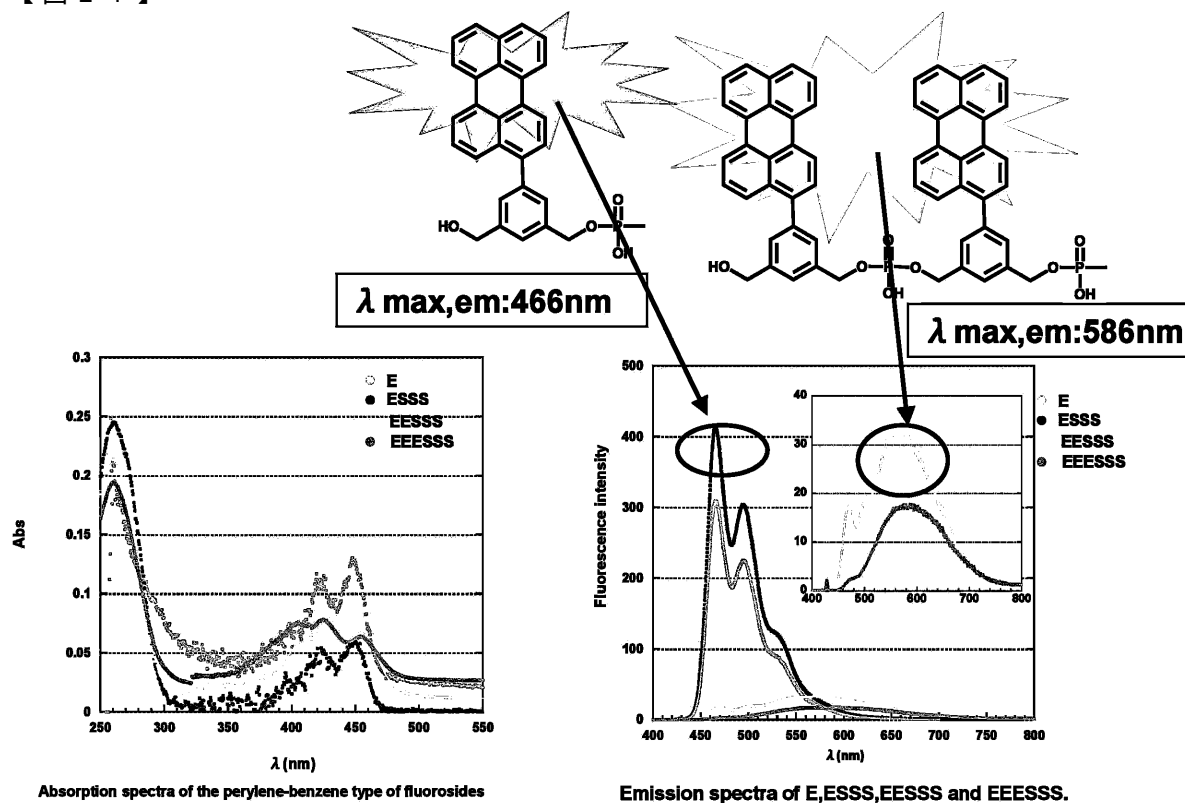


name	T_m (°C)	ΔT_m	ΔT_m per modification
bu-1 : bu-2	67.37	—	—
bu-3 : bu-4	75.59	8.22	8.22
bu-5 : bu-6	78.58	11.21	2.99
bu-7 : bu-8	78.36	10.99	-0.22

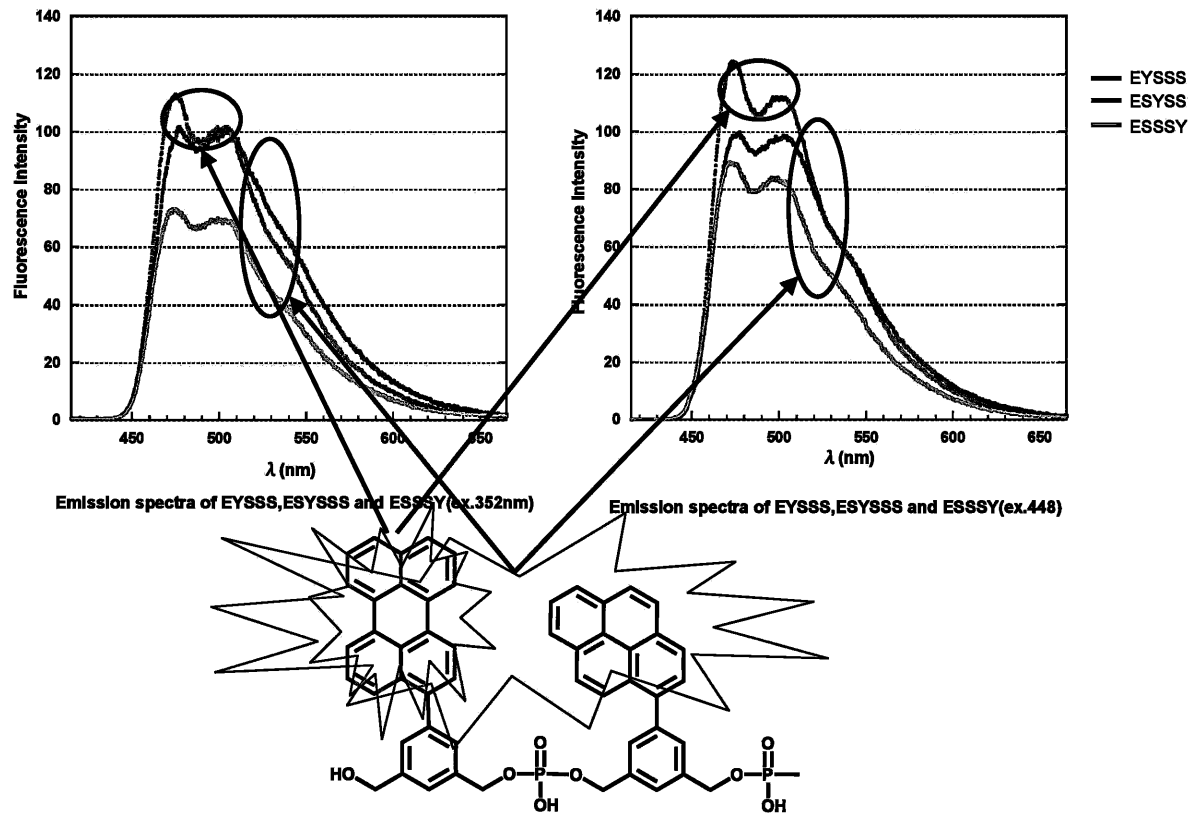
【 図 20 】



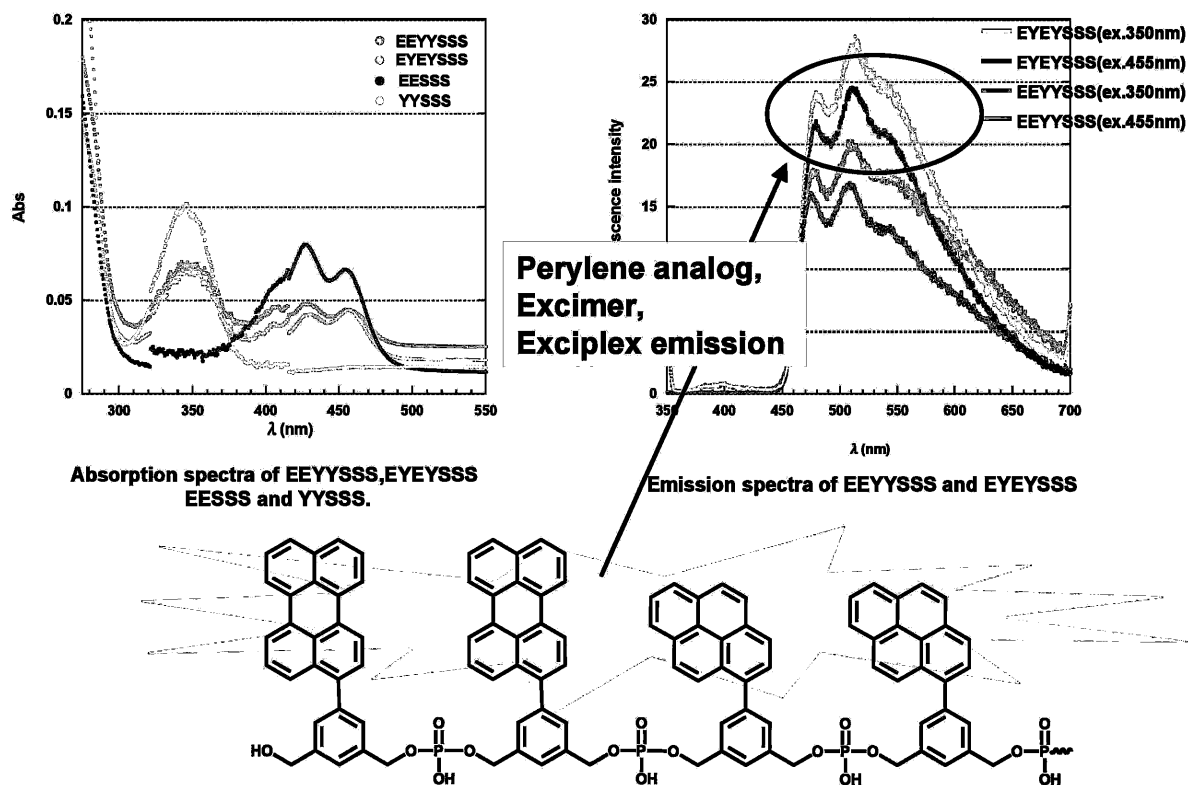
【 図 21 】



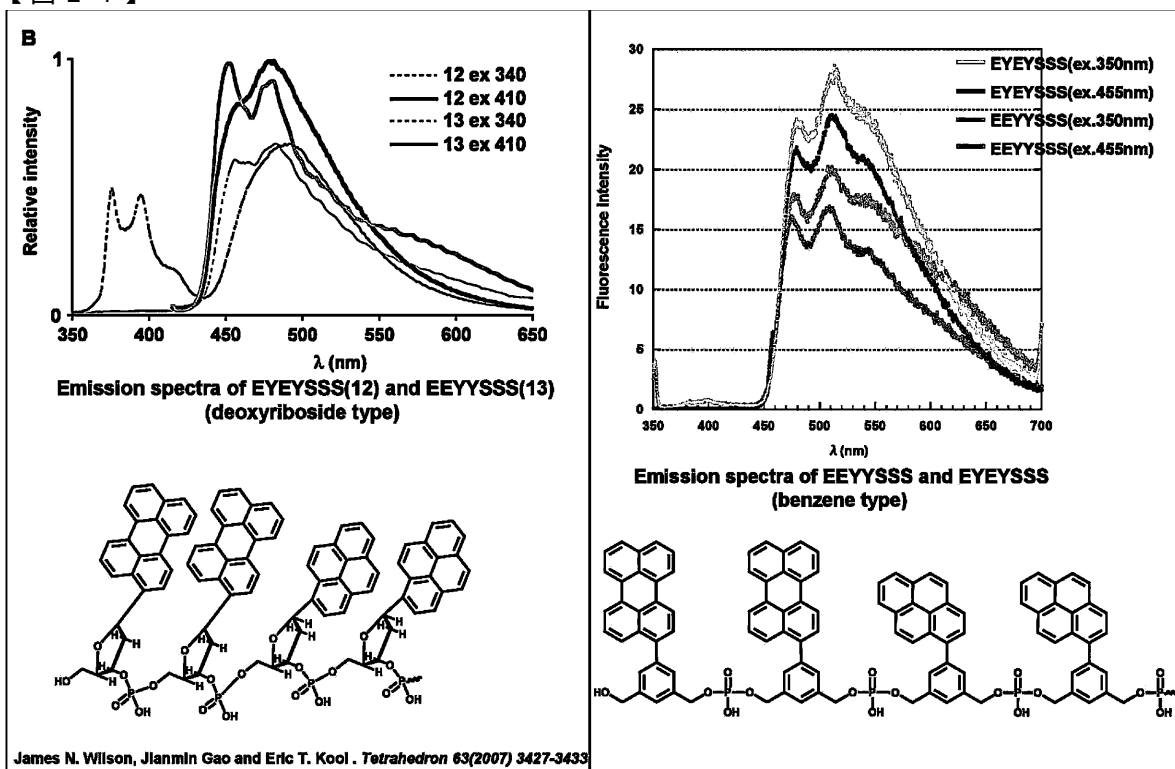
【 図 2 2 】



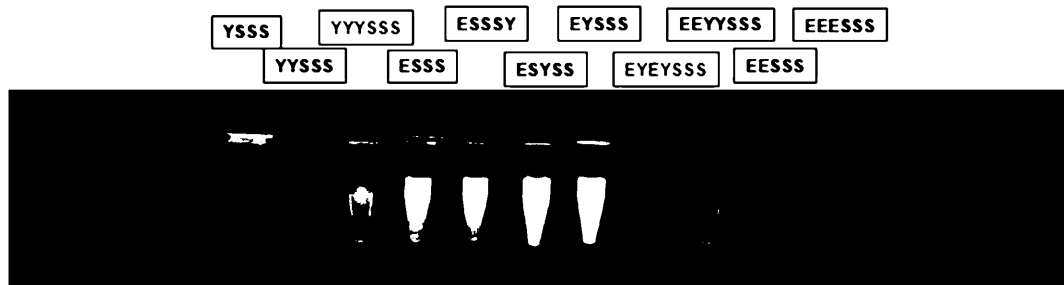
【 図 2 3 】



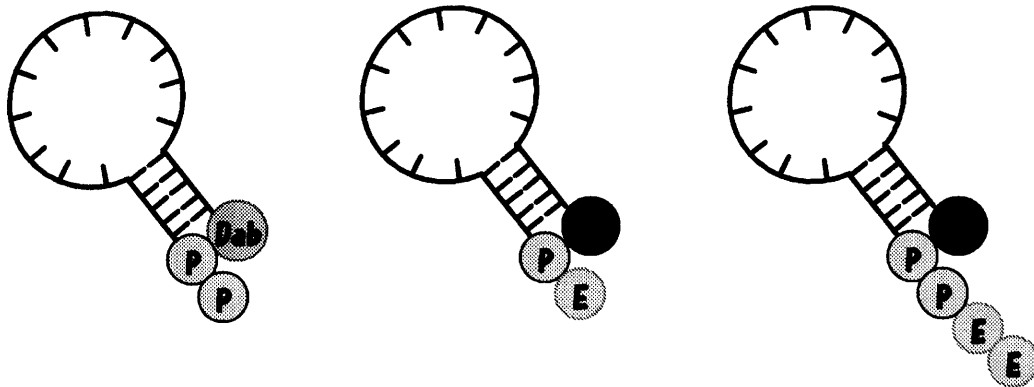
【 2 4 】



【 2 5 】



【図 26】



MB1 PPS-5-**6CAAGCGAAGGTCAAGGTATCTCTGCTTGC-3-Dab**
MB3 EPS-5-**6CAAGCGAAGGTCAAGGTATCTCTGCTTGC-3-BHQ**
MB4 EEPPS-5-**6CAAGCGAAGGTCAAGGTATCTCTGCTTGC-3-BHQ**

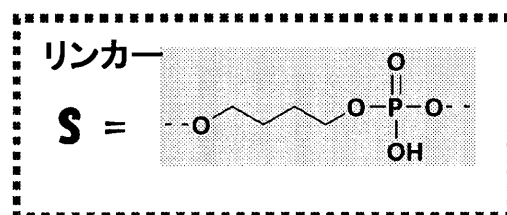
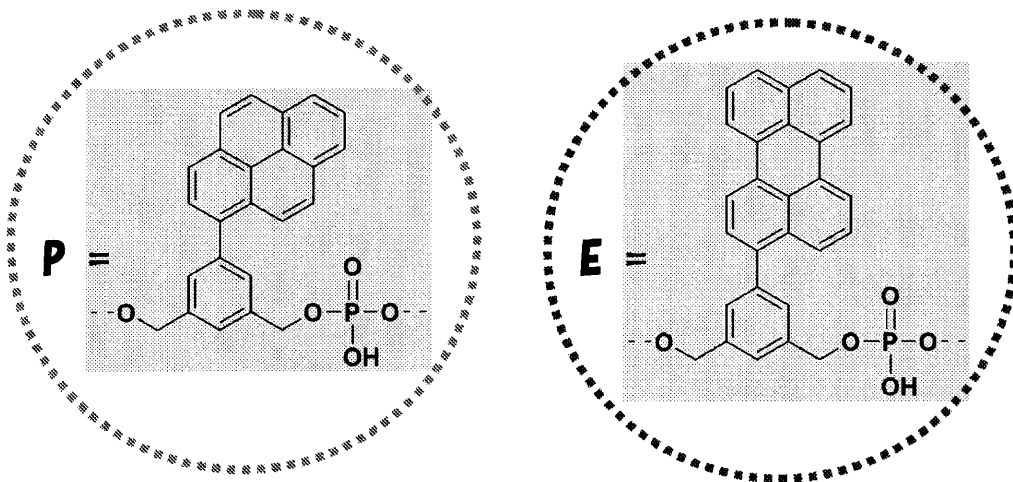
Target (CYP2C9)

RNA1 (mismatch)

3-r (ACCCUCUCCAGUUACAUAGAGACCUGGAG)-5

RNA2 (full match)

3-r (ACCCUCUCCAGUCCAUAAGAGACCUGGAG)-5

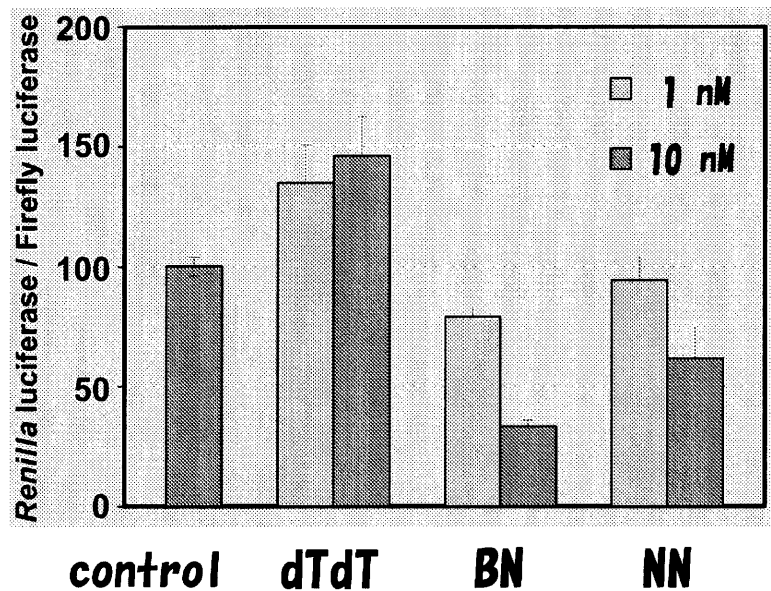
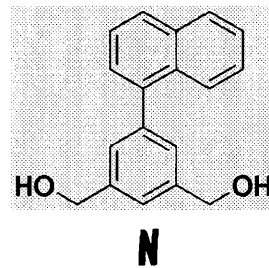
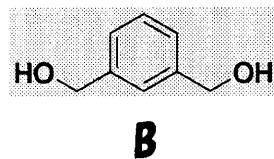


【 図 2 7 】

dTdT Passenger strand
5 -r (UUUCACUACUCCUACGAGC) dTdT-3
3 -dTdTTr (AAAGUGAUGAGGAUGCUCG) -5
 Guide strand

BN
5 -Nr (UUUCACUACUCCUACGAGC) BB-3
3 -BNr (AAAGUGAUGAGGAUGCUCG) -5

NN
5 -Nr (UUUCACUACUCCUACGAGC) BB-3
3 -NNr (AAAGUGAUGAGGAUGCUCG) -5



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 9 B 57/00 (2006.01) C 0 9 B 57/00 Z

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 9 4 1 3 5 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 6 / 0 2 7 8 6 2 (W O , A 1)
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters , 2 0 0 8 年 , Vol.18 , pp.5194-5196
J. Org. Chem , 2 0 0 5 年 , Vol.70 , p.7925-7935
Nucleic Acids Symposium Series , 2 0 0 4 年 , No.48 , Vol.17-18
J. Am. Chem. Soc. , 2 0 0 7 年 , Vol.129 , pp.15426-15427
J. Am. Chem. Soc. , 2 0 0 4 年 , Vol.126 , pp.12748-12749
J. Am. Chem. Soc. , 2 0 0 2 年 , Vol.124 , pp.11590-11591
日本化学会春季年会講演予稿集 , 2 0 0 9 年 3 月 , Vol.89th, No.2 , p.1283, #3 H6-51
日本化学会春季年会講演予稿集 , 2 0 0 9 年 3 月 , Vol.89th, No.2 , p.1283, #3 H6-52

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/68
C07H 21/02
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI