

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年11月3日 (03.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/103247 A1

- (51) 国際特許分類7: C12N 15/09, C07F 9/24, C12M 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/007666
- (22) 国際出願日: 2005年4月15日 (15.04.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
  - 特願2004-124477 2004年4月20日 (20.04.2004) JP
  - 特願2004-239831 2004年8月19日 (19.08.2004) JP
  - 特願2004-336414 2004年11月19日 (19.11.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区

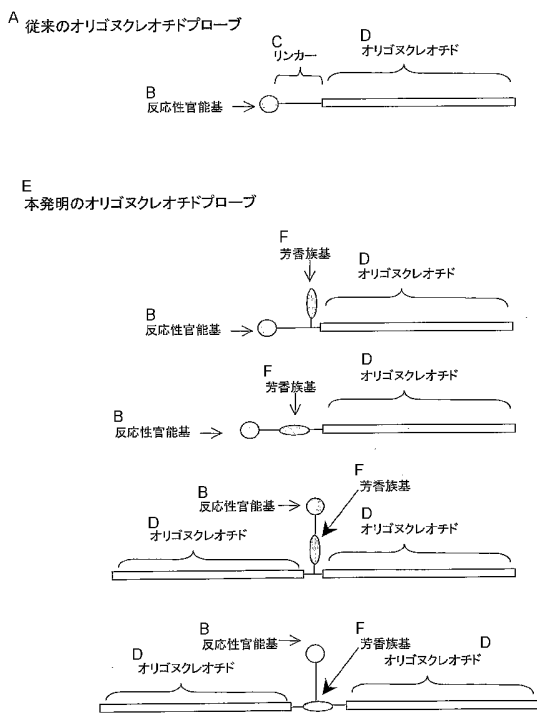
霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社DNAチップ研究所 (DNA CHIP RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43 Kanagawa (JP). 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社 (HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43 Kanagawa (JP).

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松 康雄 (KOMATSU, Yasuo) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 小島 直 (KOJIMA, Naoshi) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 野中 謙 (NONAKA, Ken) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43 株式会社

[ 続葉有 ]

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE PROBE

(54) 発明の名称: オリゴヌクレオチドプローブ



(57) Abstract: An oligonucleotide probe which is tenaciously fixed to a support and efficiently holds a complementary target nucleic acid. It is an oligonucleotide probe represented by the general formula B-D-A (wherein A represents an oligonucleotide; D represents a divalent organic group having at least one aromatic group; and B represents a reactive functional group or a protected form thereof.)

(57) 要約: 担体上に強固に固定化され、かつ相補的な標的核酸を効率よく保持するオリゴヌクレオチドプローブを提供する。本発明は、一般式 1 : B-D-A (式中、Aはオリゴヌクレオチドを表し、Dは少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、Bは反応性官能基又はその保護された形態を表す) で表されるオリゴヌクレオチドプローブに関する。

- A... CONVENTIONAL OLIGONUCLEOTIDE PROBE
- B... REACTIVE FUNCTIONAL GROUP
- C... LINKER
- D... OLIGONUCLEOTIDE
- E... OLIGONUCLEOTIDE PROBE OF THE INVENTION
- F... AROMATIC GROUP



WO 2005/103247 A1



DNAチップ研究所内 Kanagawa (JP). 藤縄 由美 (FUJINAWA, Yumi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43 株式会社DNAチップ研究所内 Kanagawa (JP). 橋田 順也 (HASHIDA, Junya) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川4丁目12番7号 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 武藤 勇 (MUTO, Isamu) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川4丁目12番7号 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,

NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## オリゴヌクレオチドプローブ

## 5 技術分野

本発明は、芳香族基を有するリンカーとオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドプローブ、該オリゴヌクレオチドプローブが固定化された担体及び該オリゴヌクレオチドプローブを合成するための化合物に関する。

## 10 背景技術

DNAチップ又はビーズ等を用いた遺伝子解析においては、合成オリゴヌクレオチド又はPCR産物などをプローブとして担体上に固定化する必要がある。当該担体上に固定化されたプローブと、蛍光などで標識された標的核酸とが相補的に結合することによって、標的核酸が担体上に保持され、標識に由来する  
15 蛍光強度を測定することによって、標的核酸量を検出することができる。DNAチップは、平板状の担体上に数千～数十万種類のプローブが、あらかじめ決まった場所に固定化されているため、他種類の遺伝子の発現量を一度に定量することができ、遺伝子間の複雑なネットワークの解明に極めて有用である。そのため、遺伝子診断のための有力な手法の一つとして期待されている。

20 合成オリゴヌクレオチドプローブを担体上に固定するには、担体上でオリゴヌクレオチドを直接合成する方法 (Nucleic Acids Res., vol. 20, 1675-1678 (1992) 及び Trends Biotechnol., vol. 12, 19-26 (1994))、及び合成したオリゴヌクレオチドを精製後、担体上に固定化する方法とがある。後者の方法に  
25 においては、オリゴヌクレオチドプローブの合成中に、アミノ基などの官能基を導入し、スポット後にこれらの官能基が担体上にコーティングされた官能基と共有結合を形成させることによって、不可逆的にプローブを固定化する方法が知られている。また、プラス電荷を有するポリリジンなどをコーティングした担体上にオリゴヌクレオチドプローブを静電的に結合させる方法なども報告  
30 されている。静電的な結合は、オリゴヌクレオチドのマイナス電荷に依存する

ため、オリゴヌクレオチドプローブの鎖長が短くなるほど、固定化効率が低下してしまふ。そのため、共有結合を介して担体上にオリゴヌクレオチドを固定化する方法が広く用いられている。

アミノ基などの官能基は、リンカーを介してオリゴヌクレオチドに導入することが知られている (Coull et al., Tetrahedron, vol. 27, 3991-3994 (1986) 及び Connolly, B. A., Nucleic Acids Res., vol. 15, 3131-3139 (1987))。アミノ基が結合したリンカーとして、現在、最も頻繁に用いられるものは、炭素数6のリンカーである。このリンカーを介してアミノ基が結合したオリゴヌクレオチドプローブは、DNAチップのプローブライブラリーとしても市販されている (例えば、MWG社、シグマジェノシス社など)。

オリゴヌクレオチドプローブをチップなどの担体上に固定化する場合、アミノ基又はメルカプト基などの官能基をオリゴヌクレオチド合成時に導入する。現在用いられているオリゴヌクレオチドへのアミノ基導入のための試薬には、アミノ基をトリフルオロアセチル基又はモノメトキシトリチル基で保護したアミダイト化合物がある。しかし、上記のような試薬は、オリゴヌクレオチドへのアミノ基の導入効率が低いという問題を有する。また、N-トリフルオロアセチル-6-アミノヘキシルアミダイト化合物を用いる場合、アミノ基の導入されたオリゴヌクレオチド (アミノ基導入オリゴヌクレオチド) と未導入オリゴヌクレオチドを分離精製することが困難であり、これらが混在することが問題となっていた。一方、N-モノメトキシトリチル-6-アミノヘキシルアミダイト化合物を用いる場合、分離精製は可能なものの、分離後の酸性条件下におけるモノメトキシトリチル基の除去に時間を要し、高純度にオリゴヌクレオチドを精製することが困難であった。遺伝子診断では、多数のオリゴヌクレオチドプローブが必要なため、より容易かつ高純度に精製することが望まれていた。

さらに、上記で得られる精製アミノ基導入オリゴヌクレオチドを担体上に固定化する場合、アミノ基と担体表面上のコーティング剤との反応性が低く、十分なオリゴヌクレオチドを担体上に固定化するには、高濃度のオリゴヌクレオ

チドをスポットする必要があった。結果として多くのオリゴヌクレオチドを必要とし、チップの価格を上げる原因となっていた。従って、オリゴヌクレオチドプローブを担体上に効果的に固定化することが望まれていた。

また、DNAチップ等において高い感度を得るためには、検出すべき標的核酸をオリゴヌクレオチドプローブ上に効率よく保持することが重要である。オリゴヌクレオチドと標的核酸との結合の安定性は、オリゴヌクレオチドの長さに依存するため、結合安定性を高めるためには長鎖のオリゴヌクレオチドを合成する必要があった。しかし、DNAチップのように多数のオリゴヌクレオチドプローブを必要とするような場合には、長鎖オリゴヌクレオチドプローブを合成することはコストの観点から適当でないという問題があった。

#### 発明の開示

本発明の課題は、担体上に強固に固定化され、合成後の精製が容易であり、かつ相補的な標的核酸を効率よく保持するオリゴヌクレオチドプローブを提供することである。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、担体への固定化に必要な反応性官能基を芳香族基と連結した新規化合物を合成し、これをオリゴヌクレオチドに導入することによって上記課題が解決できることを見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 一般式 1 :



(式中、Aはオリゴヌクレオチドを表し、Dは少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、Bは反応性官能基又はその保護された形態を表す)で表されるオリゴヌクレオチドプローブ。

(2) 芳香族基が置換又は無置換の1～5環性芳香族炭化水素基である(1)記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

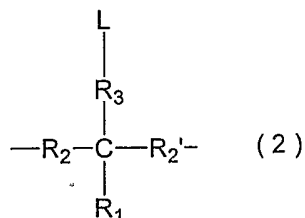
(3) 芳香族基が置換又は無置換のフェナントレン環、フルオレン環、ナフタレン環、アントラセン環又はピレン環を含むものである(2)記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

(4) Dが複素原子を含んでいてもよい直鎖又は分岐の置換又は無置換の二価の炭化水素基であって、少なくとも1つの芳香族基を有する(1)～(3)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

5 (5) Dが主鎖に二価の芳香族基を含む(1)～(4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

(6) Dが側鎖に芳香族基を有する(1)～(4)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

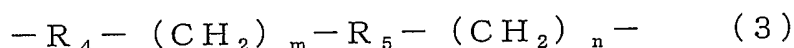
(7) Dが一般式2で表される(6)記載のオリゴヌクレオチドプローブ：



10

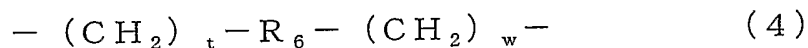
(式中、Lは芳香族基を表し、R<sub>1</sub>は水素原子又は置換基を表し、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>'及びR<sub>3</sub>はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表す)。

15 (8) R<sub>2</sub>が一般式3：



で表され、

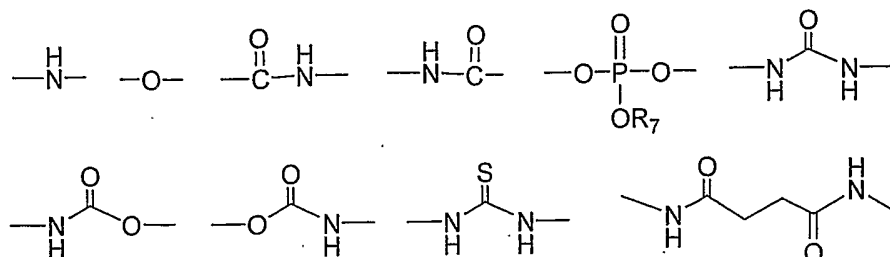
R<sub>3</sub>が一般式4：



20 で表され、

R<sub>4</sub>は、直接結合又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-O-であり、

R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基：



を表し、

m、t は、それぞれ独立して 0～20 の整数を表し、

n、w、i、q はそれぞれ独立して 1～20 の整数を表し、

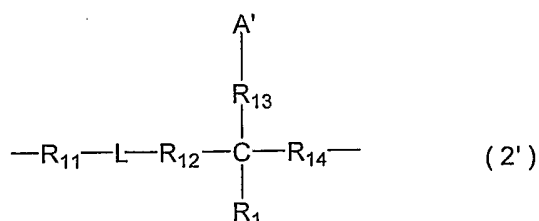
R<sub>7</sub> は水素原子又はリン酸保護基を表す、

5 (7) 記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

(9) L が置換又は無置換のフェニル基、フェナントリル基、フルオレニル基、ナフチル基、アントリル基又はピレニル基である (7) 又は (8) 記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

(10) D が側鎖にさらなるオリゴヌクレオチドを有する、(1)～(6) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

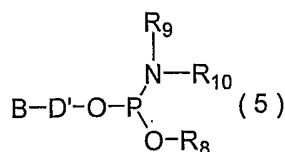
(11) D が一般式 2' で表される (5) 記載のオリゴヌクレオチドプローブ :



15 (式中、L は二価の芳香族基を表し、R<sub>1</sub> は水素原子又は置換基を表し、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub> 及び R<sub>14</sub> はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表し、A' は水酸基又はオリゴヌクレオチドを表す)。

(12) (1)～(11) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプローブが 20 固定化された担体。

(13) 一般式 5 :



25 (式中、D' は少なくとも 1 つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、B は

反応性官能基又はその保護された形態を表し、Oは酸素原子を表し、Pはリン原子を表し、R<sub>8</sub>はリン酸保護基を表し、R<sub>9</sub>及びR<sub>10</sub>は有機基であり、それらが結合している窒素原子と一緒に環を形成していてもよい)

で表される化合物。

- 5 (14) 芳香族基が置換又は無置換の1～5環性芳香族炭化水素基である(13)記載の化合物。

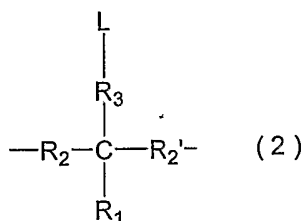
(15) 芳香族基が置換又は無置換のフェナントレン環、フルオレン環、ナフタレン環、アントラセン環又はピレン環を含むものである(14)記載の化合物。

- 10 (16) D'が複素原子を含んでいてもよい直鎖又は分岐の置換又は無置換の二価の炭化水素基であって、少なくとも1つの芳香族基を有する(13)～(15)のいずれかに記載の化合物。

(17) D'が主鎖に二価の芳香族基を含む(13)～(16)のいずれかに記載の化合物。

- 15 (18) D'が側鎖に芳香族基を有する(13)～(16)のいずれかに記載の化合物。

(19) D'が一般式2で表される(18)記載の化合物：



20

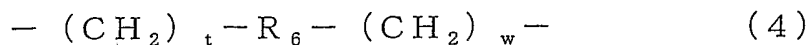
(式中、Lは芳香族基を表し、R<sub>1</sub>は水素原子又は置換基を表し、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>'及びR<sub>3</sub>はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表す)。

(20) R<sub>2</sub>が一般式3：

- 25  $\text{---R}_4\text{---(CH}_2\text{)}_m\text{---R}_5\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---}$  (3)

で表され、

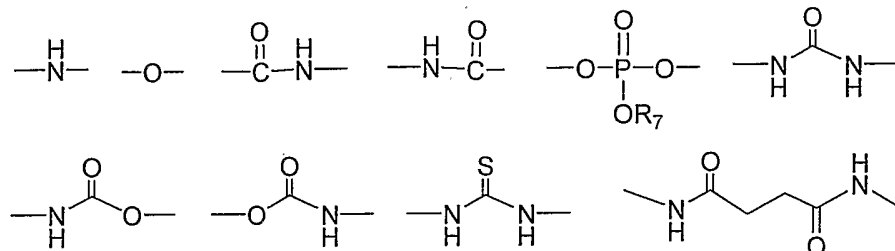
R<sub>3</sub>が一般式4：



で表され、

$\text{R}_4$ は、直接結合又は $-(\text{CH}_2)_i-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q-\text{O}-$ であり、

$\text{R}_5$ 及び $\text{R}_6$ は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基：



5

を表し、

$m$ 、 $t$ は、それぞれ独立して0～20の整数を表し、

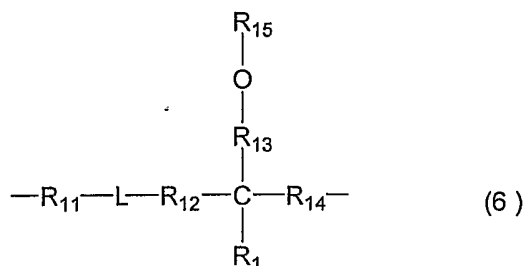
$n$ 、 $w$ 、 $i$ 、 $q$ はそれぞれ独立して1～20の整数を表し、

$\text{R}_7$ は水素原子又はリン酸保護基を表す、

10 (19) 記載の化合物。

(21)  $\text{L}$ が置換又は無置換のフェナントリル基、フルオレニル基、ナフチル基、アントリル基又はピレニル基である(19)又は(20)記載の化合物。

(22)  $\text{D}'$ が一般式6で表される(17)記載の化合物：



15

(式中、 $\text{L}$ は二価の芳香族基を表し、 $\text{R}_1$ は水素原子又は置換基を表し、 $\text{R}_{11}$ 、 $\text{R}_{12}$ 、 $\text{R}_{13}$ 及び $\text{R}_{14}$ はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表し、 $\text{R}_{15}$ は水酸基保護基を表す)。

20

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、担体への反応効率が高いために、固定化に要するオリゴヌクレオチド量を低減することができる。さらに、本発

明のオリゴヌクレオチドプローブは、標的核酸との結合効率が高いために、従来と同じ鎖長のものでも高い感度で検出することが可能である。また、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、合成後の精製が容易であり、複数種のプローブを作製した場合でも、自動化によって精製可能である。

- 5 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2004-124477号、特願2004-239831号、および特願2004-336414号の明細書及び／又は図面に記載された内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

- 10 図1は、従来のオリゴヌクレオチドプローブと本発明のオリゴヌクレオチドプローブの構造を示す。
- 図2は、アミダイト化合物(Y2)の合成方法を示す。
- 図3は、アミダイト化合物(Y3)の合成方法を示す。
- 図4は、アミダイト化合物(Y5、6)の合成方法を示す。
- 15 図5は、アミダイト化合物(Y7)の合成方法を示す。
- 図6は、アミダイト化合物(Y8)の合成方法を示す。
- 図7は、アミダイト化合物(Y9)の合成方法を示す。
- 図8は、オリゴヌクレオチドプローブ( $X_n-S_p$ )の構造を示す。
- 図9は、オリゴヌクレオチドプローブ( $X_n-S_p$ )のガラス基盤への固定
- 20 化量(a)とFITCとの反応性(b:50塩基オリゴヌクレオチド、c:25塩基オリゴヌクレオチド)を示す。
- 図10は、実施例6におけるハイブリダイゼーションの結果を示す。
- 図11は、中間体化合物の具体例を表す。
- 図12は、25塩基オリゴヌクレオチドプローブ( $X_n-S_p25$ ;  $n=1、$
- 25 5、9)と両側にオリゴヌクレオチドをもつプローブ( $X9-S_p35$ )のガラス基盤への固定化量の測定結果を示す。
- 図13は、アミダイト化合物(Y10、Y11)の合成方法を示す。
- 図14は、 $X10-S_p25$ の配列と $X10-S_p25$ の脱保護反応のスキーム(a)、 $X10-S_p25$ を逆相HPLC分析した結果(b)、及び $X1$
- 30  $0-S_p25$ を酸処理した後、逆相HPLC分析した結果(c)を示す。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、反応性官能基及び芳香族基を有するリンカーとオリゴヌクレオチドが結合した構造を有する。すなわち、以下の一般式1で表される。

5 B-D-A (1)

式中、Aはオリゴヌクレオチドを表し、Dは少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、Bは反応性官能基又はその保護された形態を表す。

本発明においてオリゴヌクレオチドは、天然のものでも合成のものでもよく、ポリヌクレオチドをも包含する。また、オリゴヌクレオチドは、DNA及びRNA等の核酸、二本鎖オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド誘導体を包含する。PCR産物も包含される。オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミダイト結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-メトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、及びオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等を挙げることができる。

本発明においてオリゴヌクレオチドの塩基数は、通常1~500、より好ましくは5~200、より好ましくは10~100である。

一般式1においてBは、反応性官能基又はその保護された形態を表す。反応性官能基とは、オリゴヌクレオチドプローブを固定化しようとする担体上に存

在する官能基と共有結合を形成しうる基を意味し、例えば、活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基又はイソシアネート基と共有結合しうる基（例えば、アミノ基など）、あるいはマレイミド基又はジスルフィド基と反応しうる基（例えば、メルカプト基など）等  
5 が挙げられる。本発明においては、メルカプト基及びアミノ基が好ましい。アミノ基としては、1級アミノ基が好ましい。

Bは反応性官能基の保護された形態でもよい。保護された形態とは、官能基の水素原子が保護基で置換された形態を意味する。アミノ基の保護基としては、特に制限されないが、アシル基、カルバメート基、トリアルキルシリル基、フ  
10 タリル基、カルボキシアルキルカルボニル基、トシル基、トリフルオロアセチル基、トリチル基、及びモノ又はジ置換トリチル基が挙げられる。モノ置換トリチル基としては、例えば、モノアルコキシトリチル基、好ましくは炭素数1～4、より好ましくは炭素数1のアルコキシ基を有するモノアルコキシトリチル基、具体的には、モノメトキシトリチル基、モノエトキシトリチル基、モノ  
15 プロポキシトリチル基、モノイソプロポキシトリチル基及びモノブトキシトリチル基が挙げられる。トリチル基又はモノ若しくはジ置換トリチル基は疎水性が強いため、合成したオリゴヌクレオチドプローブを逆相カラムによって容易に精製できるという点で有利である。通常、アミノ基をトリチル基又はモノ若しくはジ置換トリチル基で保護した場合、脱保護するためには強い酸性条件下  
20 で長時間反応させる必要がある。このような条件は、核酸に損傷を与えることも考えられ、また時間を要するという点でも好ましくない。しかし、本発明のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、アミノ基をトリチル基又はモノ若しくはジ置換トリチル基で保護した場合は、緩和な酸性条件下、短時間で脱保護可能なため、核酸を傷つけることもなく、また、脱保護時間を短縮することもで  
25 きる。例えば、pH 2～6、あるいは5～80体積%の酢酸存在下、5～20分処理することにより脱保護することができる。

メルカプト基の保護基としては、特に制限されないが、*t*-ブチル基、アラ  
ルキル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基及びアシル基等が挙げ  
られる。

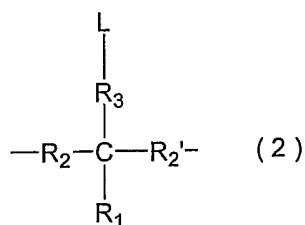
30 本発明のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、オリゴヌクレオチドは、一

一般式 1 において D として表されるリンカー部分を介して、反応性官能基と連結されている。D は、少なくとも 1 つの芳香族基を有する二価の有機基を表す。

二価の有機基としては、オリゴヌクレオチドプローブの担体との結合性及び標的オリゴヌクレオチドとの相補的結合を阻害するものでなければ特に制限されないが、好ましくは複素原子を含んでいてもよい置換又は無置換の二価の炭化水素基である。二価の炭化水素基としては、鎖員 2 ～ 50、好ましくは鎖員 3 ～ 30、より好ましくは鎖員 1 ～ 5 のアルキル基、鎖員 2 ～ 50、好ましくは鎖員 3 ～ 30、より好ましくは鎖員 1 ～ 5 のアルキレン基、鎖員 2 ～ 50、好ましくは鎖員 3 ～ 30、より好ましくは鎖員 1 ～ 5 のアルケニレン基、鎖員 2 ～ 50、好ましくは鎖員 3 ～ 30、より好ましくは鎖員 1 ～ 10 の二価の脂環式炭化水素基等が挙げられる。上記炭化水素基においては、炭素の一部が複素原子で置換されていてもよい。複素原子としては、酸素原子、窒素原子、硫黄原子、ケイ素原子、リン原子が挙げられる。

置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数 1 ～ 10 のアルキル基、置換又は無置換の炭素数 1 ～ 10 のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数 1 ～ 10 のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数 1 ～ 10 のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基又はカルボキシル基等を挙げることができる。

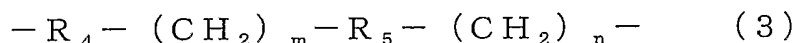
本発明の一態様において、リンカー部分 D は、好ましくは以下の一般式 2 で表される基である。



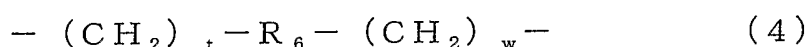
式中、L は芳香族基を表し、R<sub>1</sub> は水素原子又は置換基を表し、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>' 及び R<sub>3</sub> はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表す。ここで置換基は、上記と同様であ

る。また、二価の炭化水素基としては、上記と同様のものが挙げられる。一般式 2 において、 $R_2$  が反応性官能基 B と結合し、 $R_2'$  がオリゴヌクレオチドの 5' 末端又は 3' 末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と結合する。 $R_2'$  が直接結合の場合は、一般式 2 における炭素原子が、オリゴヌクレオチドの 5' 末端又は 3' 末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と直接結合する。

$R_2$  は、好ましくは一般式 3 :



で表される。 $R_3$  は好ましくは一般式 4 :

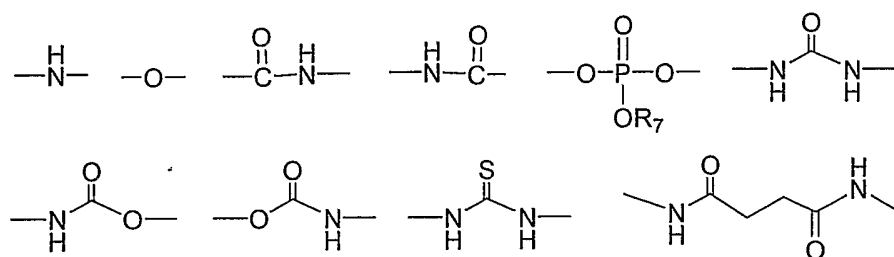


10 で表される。 $R_2'$  は好ましくは直接結合又は  $-R_2''-(CH_2)_j-$  である。

$R_2$  において、 $R_4$  が反応性官能基 B と結合し、 $R_3$  において、 $-(CH_2)_w-$  が芳香族基 L と結合し、 $R_2'$  において  $-(CH_2)_j-$  がオリゴヌクレオチドと結合する。

15  $R_4$  は、好ましくは直接結合又は  $-(CH_2)_i-(OCH_2CH_2)_q-O-$  である。

$R_5$ 、 $R_6$  及び  $R_2''$  は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基 :



から選択される。

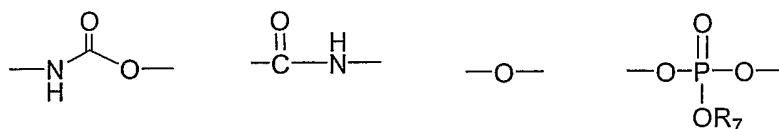
20  $m$ 、 $t$  は、それぞれ独立して 0 ~ 20 の整数を表し、好ましくは 0 ~ 10、より好ましくは 0 ~ 6、さらに好ましくは 0 ~ 3 の整数を表し、 $n$ 、 $w$ 、 $i$ 、 $q$  及び  $j$  はそれぞれ独立して 1 ~ 20 の整数を表し、好ましくは 1 ~ 10、より好ましくは 1 ~ 6、さらに好ましくは 1 ~ 3 の整数を表す。

ここで、 $m+n$  は通常 1 ~ 40、好ましくは 1 ~ 20、より好ましくは 1 ~ 5 であり、 $t+w$  は、通常 1 ~ 40、好ましくは 1 ~ 20、より好ましくは 1 ~ 5 であり、 $i+q$  は通常 2 ~ 40、好ましくは 2 ~ 20、より好ましくは 2

～5であり、 $R_7$ は水素原子又はリン酸保護基を表す。リン酸保護基としては、特に限定されないが、メチル基、2-シアノエチル基、2-トリメチルシリルエチル基、4-オキシペンチル基などを好ましい基として挙げる事ができる。

$R_4$ は、好ましくは直接結合である。

5  $R_5$ は好ましくは



であり、 $R_6$ は好ましくは—O—である。

本発明においては、芳香族基としては、置換又は無置換の芳香族炭化水素基、置換又は無置換の芳香族複素環基、置換又は無置換の多環性芳香族基が挙げられる。本発明においては、疎水性の高い芳香族基が好ましい。また、本発明において芳香族基には核酸塩基は含まれない。

芳香族基の置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、置換又は無置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、置換又は無置換の炭素数1～10のアルキル基、置換又は無置換の炭素数1～10のアルケニル基、置換又は無置換の炭素数1～10のシクロアルキル基、置換又は無置換の炭素数1～10のアルコキシ基、置換又は無置換のアルコキシカルボニル基及びカルボキシル基等を挙げる事ができる。

置換又は無置換の芳香族炭化水素基としては、置換又は無置換の単環性芳香族炭化水素基、具体的には、フェニル基、2-フルオロフェニル基、3-フルオロフェニル基、4-フルオロフェニル基、2-クロロフェニル基、3-クロロフェニル基、2,3-ジフルオロフェニル基、2,5-ジフルオロフェニル基、3,5-ジフルオロフェニル基、2,3-ジクロロフェニル基、2,5-ジクロロフェニル基、3,5-ジクロロフェニル基、2-メチルフェニル基、3-メチルフェニル基、4-メチルフェニル基、2-エチルフェニル基、3-エチルフェニル基、4-エチルフェニル基などが挙げられる。

芳香族複素環基としては、ピリジル基、ピリダジニル基、ピリミジニル基、ピラジニル基、フリル基、チエニル基、ピロリル基、イミダゾリル基、チアゾリル基、オキサゾリル基等が挙げられる。

置換又は無置換の芳香族複素環基の具体例としては、2-ピリジル基、3-ピリジル基、4-ピリジル基、3-ピリダジニル基、4-ピリダジニル基、2-ピリミジニル基、4-ピリミジニル基、5-ピリミジニル基、ピラジニル基、2-フリル基、3-フリル基、2-チエニル基、3-チエニル基、2-ピロリル基、3-ピロリル基、イミダゾリル基、チアゾリル基、オキサゾリル基、2-メチル-3-ピリジル基、6-メチル-3-ピリジル基、2-クロロ-3-ピリジル基、6-クロロ-3-ピリジル基、2-メトキシ-3-ピリジル基、6-メトキシ-3-ピリジル基、2,6-ジクロロ-3-ピリジル基、2,6-ジメトキシ-3-ピリジル基、などを挙げることができる。好ましい置換又は無置換の芳香族複素環基としては、フリル基、ピロリル基、オキサゾリル基が挙げられる。

多環性芳香族基としては、ナフチル基、フェナントリル基、フルオレニル基、アントリル基、ピレニル基、インダニル基、テトラヒドロナフチル基、キノリル基、イソキノリル基、シンノリニル基、キナゾリニル基、キノキサリニル基、ナフチリジニル基、フタラジニル基、インドリル基、イソインドリル基、ベンゾフリル基、ベンゾチエニル基、インダゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基が挙げられる。

置換又は無置換の多環性芳香族基の具体例としては、1-ナフチル基、2-ナフチル基、4-インダニル基、5-インダニル基、5-テトラヒドロナフチル基、6-テトラヒドロナフチル基、キノリル基、イソキノリル基、シンノリニル基、キナゾリニル基、キノキサリニル基、ナフチリジニル基、フタラジニル基、インドリル基、イソインドリル基、ベンゾフリル基、ベンゾチエニル基、インダゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基、2,3-メチレンジオキシフェニル基、3,4-メチレンジオキシフェニル基、2,3-エチレンジオキシフェニル基、3,4-エチレンジオキシフェニル基、4-フルオロ-1-ナフチル基、4-クロロ-1-ナフチル基、2-メチル-1-ナフチル基、4-メチル-1-ナフチル基、2-メトキシ-1-ナフチル基、5-メトキシ-1-ナフチル基、6-メトキシ-1-ナフチル基、7-メトキシ-1-ナフチル基、2-エトキシ-1-ナフチル基、5-エトキシ-1-ナフチル基、6-エトキシ-1-ナフチル基、7-エトキシ-1-ナフチル基、1-

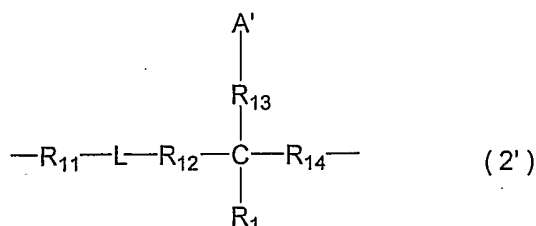
メトキシ-2-ナフチル基、3-メトキシ-2-ナフチル基、5-メトキシ-2-ナフチル基、6-メトキシ-2-ナフチル基、1-エトキシ-2-ナフチル基、3-エトキシ-2-ナフチル基、5-エトキシ-2-ナフチル基、6-エトキシ-2-ナフチル基、2-クロロ-5-キノリル基などを挙げることができる。好ましい置換又は無置換の多環性芳香族基としては、ナフチル基、アントリル基、ピレニル基、フルオレニル基、フェナントリル基が挙げられる。

芳香族基がDの主鎖部分に存在する場合、上記芳香族基の二価の形態となる。例えば、フェニレン基、ピリジレン基、ピリダジニル基、ピリミジニレン基、ピラジニレン基、フリレン基、チエニレン基、ピロリレン基、イミダゾリレン基、チアゾリレン基、オキサゾリレン基、ナフチレン基、アントリレン基、ピレニレン基、インダニレン基、テトラヒドロナフチレン基、キノリレン基、イソキノリレン基、シンノリニレン基、キナゾリニレン基、キノキサリニレン基、ナフチリジニレン基、フタラジニレン基、インドリレン基、イソインドリレン基、ベンゾフリレン基、ベンゾチエニレン基、インダゾリレン基、ベンゾイミダゾリレン基、ベンゾチアゾリレン基が挙げられ、好ましくはナフチレン基、アントリレン基又はピレニレン基である。上記二価の芳香族基は置換でも無置換でもよい。

本発明において、芳香族基は、1～5環性芳香族炭化水素基が好ましい。特に、好ましくは2～4環性芳香族炭化水素基、より具体的には置換又は無置換のナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、フルオレニル基及びピレニル基、特に1-ナフチル基及び9-アントリル基である。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブには、リンカー部分Dの側鎖に、さらなるオリゴヌクレオチドを有するものも包含される。さらなるオリゴヌクレオチドはもう一方のオリゴヌクレオチドと同一でも異なってもよい。

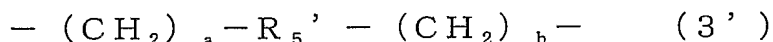
本発明の別の態様において、オリゴヌクレオチドプローブとして、一般式1においてDが以下の一般式2'で表されるものが挙げられる。



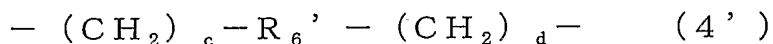
式中、Lは二価の芳香族基を表し、 $R_1$ は水素原子又は置換基を表し、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 及び $R_{14}$ はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表し、 $A'$ は水酸基又はオリゴヌクレオチドを表す。

- 5 ここで置換基は、上記と同様である。また、複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基としては、上記と同様のものが挙げられる。一般式2'において、 $R_{11}$ が反応性官能基Bと結合し、 $R_{14}$ がオリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と結合する。 $R_{14}$ が直接結合の場合は、一般式2'における炭素原子が、オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と直接結合する。
- 10  $A'$ がオリゴヌクレオチドの場合も同様に、 $R_{13}$ がオリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と結合し、 $R_{13}$ が直接結合の場合は、一般式2'における炭素原子が、オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の、水酸基又はリン酸基の酸素と直接結合する。

- 15  $R_{11}$ は、好ましくは、一般式3'：



で表される。 $R_{12}$ は好ましくは一般式4'：

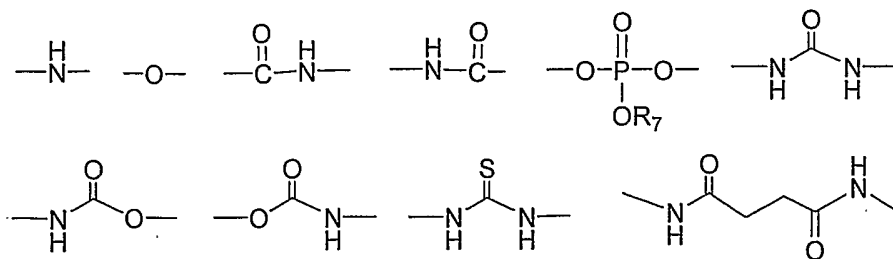


で表される。 $R_{13}$ は好ましくは、直接結合又は $-(CH_2)_e-$ であり、 $R_{14}$

- 20 は好ましくは、直接結合又は $-(CH_2)_f-$ である。

$R_{11}$ において、 $-(CH_2)_a-$ が反応性官能基Bと結合し、 $R_{12}$ において、 $-(CH_2)_c-$ が芳香族基Lと結合する。

$R_{5'}$ 及び $R_{6'}$ は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基：



- 25 から選択される。

$e$ 及び $f$ は、それぞれ独立して1~20の整数を表し、好ましくは1~10、

より好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3の整数を表し、a～dはそれぞれ独立して0～20の整数を表し、好ましくは0～10、より好ましくは0～5、さらに好ましくは0～3の整数を表す。

ここで、a+bは通常1～40、好ましくは1～20、より好ましくは1～5であり、c+dは、通常1～40、好ましくは1～20、より好ましくは1～5である。R<sub>7</sub>は水素原子又はリン酸保護基を表す。リン酸保護基としては、特に限定されないが、メチル基、2-シアノエチル基、2-トリメチルシリルエチル基、4-オキシペンチル基などを好ましい基として挙げるができる。

R<sub>13</sub>及びR<sub>14</sub>は、好ましくは直接結合である。

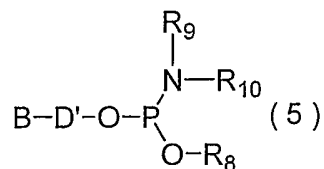
10 R<sub>5</sub>'は好ましくは-NH-CO-であり、R<sub>6</sub>'は好ましくは-CO-NH-である。

二価の芳香族基Lとしては、特に限定されないが、疎水性の高い二価の芳香族基、好ましくは、置換又は無置換のフェナントリレン基、フルオレニレン基、ナフチレン基、アントリレン基又はピレニレン基、特にナフチレン基及びアン  
15 トリレン基が挙げられる。より具体的には、置換又は無置換の2,6-ナフチレン基、1,4-ナフチレン基、1,5-ナフチレン基、2,7-ナフチレン基、2,6-アントリレン基、1,8-アントリレン基、9,10-アントリレン基、1,5-アントリレン基、2,7-フェナントリレン基、2,8-フェナントリレン基、1,5-フェナントリレン基、1,6-フェナントリレン  
20 基、1,7-フェナントリレン基、1,8-フェナントリレン基、1,7-9H-フルオレニレン基、1,6-9H-フルオレニレン基、2,7-ピレニレン基、2,6-ピレニレン基、又は1,8-ピレニレン基などが挙げられる。

上記のような芳香族基を採用することにより、環数の増加に伴ってこれら芳香族基に結合したオリゴヌクレオチドの水への溶解性が低下するのを抑制することができる。また、担体上に固定化されたプローブ間の疎水的相互作用によ  
25 ってプローブ同士が絡み合うこともなく、標的遺伝子の検出を容易に実施できる。

本発明はまた、オリゴヌクレオチドプローブを合成するための中間体化合物に関する。一実施形態において本発明の中間体は、上記オリゴヌクレオチド  
30 プローブにおいて、オリゴヌクレオチド部分がホスホロアミダイトになった構造

を有する化合物である。従って、一実施形態において本発明の中間体化合物は、以下の一般式 5 で表される。



5

式中、Bは反応性官能基又はその保護された形態を表し、D'は少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、Oは酸素原子を表し、Pはリン原子を表し、R<sub>8</sub>はリン酸保護基を表し、R<sub>9</sub>及びR<sub>10</sub>は有機基であり、それらが結合している窒素原子と一緒に環を形成していてもよい。

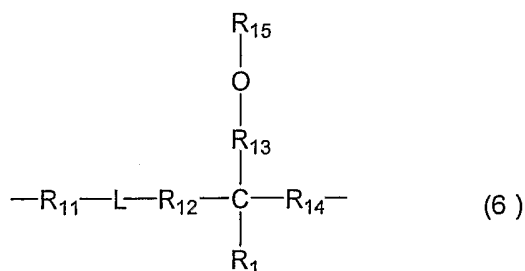
10 R<sub>9</sub>及びR<sub>10</sub>は、特に制限されないが、好ましくは炭化水素基であり、より好ましくは炭素数1～5のアルキル基である。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、イソペンチル基が挙げられる。

あるいは、R<sub>9</sub>及びR<sub>10</sub>は、それらが結合している窒素原子と一緒に環を形成していてもよい。該環はR<sub>9</sub>及びR<sub>10</sub>が結合している窒素原子の他にさらに複素原子を含んでいてもよい。そのような環は、好ましくは環員5～8、好ましくは6の環であり、例えば、モルホリン環、ピペリジン環、ピペラジン環、チオモルホリン環等が挙げられ、好ましくはモルホリン環である。

ここでリン酸保護基は、ホスホロアミダイト法に使用されるものであればどのようなものでもよいが、メチル基、2-シアノエチル基、2-トリメチルシリルエチル基、4-オキシペンチル基などを好ましい基として挙げるができる。

一実施形態において本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、一般式5においてD'が上記Dと等しい中間体化合物を使用して作成することができる。例  
25 えば、Dが一般式2で表される一般式1のオリゴヌクレオチドプローブは、一般式5においてD'がDと等しい中間体化合物を使用して作成することができる。また、Dが一般式2'で表される一般式1のオリゴヌクレオチドプローブは、一般式5においてD'が以下の一般式6で表される中間体化合物を使用し

て作成することができる。



式中、Lは二価の芳香族基を表し、 $R_1$ は水素原子又は置換基を表し、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 及び $R_{14}$ は上記と同義であり、 $R_{15}$ は水酸基保護基を表す。水酸  
 5 基保護基としては、DNA合成においてリボースの5'位の保護に使用される  
 保護基を使用することができ、例えば、アセチル基、5'-O-4, 4',  
 4''-トリス(4-ベンゾイルオキシ)トリチル基及びジメトキシトリチル  
 基が挙げられ、ジメトキシトリチル基が好ましい。一般式6においては、 $R_{11}$   
 10  $R_{11}$ がBと結合し、 $R_{14}$ が酸素原子に結合する。好ましい中間体化合物の具体例  
 を図11に示す。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、上記中間体化合物をオリゴヌクレ  
 オチドと連結させることにより合成することができる。オリゴヌクレオチドへ  
 の中間体化合物の導入は、DNA自動合成機上でオリゴヌクレオチド合成と同  
 時に実施することができる。

15 D'が一般式6で表される一般式5の中間体化合物をオリゴヌクレオチドに  
 導入した後、さらに、オリゴヌクレオチド合成を行うことにより、 $R_{13}$ 及び  
 $R_{14}$ にオリゴヌクレオチドが連結したオリゴヌクレオチドプローブを製造す  
 ることができる。また、D'が一般式6で表される一般式5の中間体化合物の  
 オリゴヌクレオチドへの導入と、オリゴヌクレオチドの合成を繰り返し行うこ  
 20 とにより、中間体化合物を複数含むオリゴヌクレオチドプローブ、すなわち複  
 数の芳香族基を有するオリゴヌクレオチドプローブを合成することもできる。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブ及び上記中間体化合物は、D体及びL  
 体のいずれも合成及び使用することができ、またそれらの混合物でもよい。

本発明はまた、上記オリゴヌクレオチドプローブが固定化された担体に関す  
 25 る。該担体は、本発明のオリゴヌクレオチドプローブが有する反応性官能基と  
 共有結合しうる官能基をその表面に有するものであれば特に制限されない。

担体の基材としては、例えば、石英ガラス、ホウ珪酸ガラス及びソーダライムガラスなどのガラス、シリコン、繊維、木材、紙、セラミックス、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂(Acrylonitrile Butadiene Styrene 樹脂)、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂)が挙げられる。本発明においては、ガラス、シリコン、セラミックス、プラスチックを使用するのが好ましい。上記基材の表面に官能基を導入したものを担体として用い、本発明のオリゴヌクレオチドプローブを固定化する。オリゴヌクレオチドプローブの反応性官能基が保護されているときは、保護基を除去してから固定化することが好ましい。

オリゴヌクレオチドプローブが有する反応性官能基と共有結合しうる官能基としては、例えば、活性エステル基、エポキシ基、アミノ基、クロロ基、ジスルフィド基、アルデヒド基、マレイイミド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基、イソシアネート基等が挙げられる。

アミノ基又はその保護された形態を有するオリゴヌクレオチドプローブを固定化する場合は活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基、イソシアネート基が導入された担体を用いるのが好ましく、メルカプト基又はその保護された形態を有するオリゴヌクレオチドプローブを固定化する場合は、マレイミド基、ジスルフィド基が導入された担体を用いるのが好ましい。

担体の形状は、特に制限されず、基盤状、糸状、球状、ビーズ状、多角形状、粉末状、多孔質状などが挙げられ、本発明においては基盤状が好ましい。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、ビオチン及び蛍光色素などの標識に結合させることができる。蛍光色素としては、例えば、Cy 3及びCy 5などのCy Dye、FITC、RITC、ローダミン、テキサスレッド、TET、TAMRA、FAM、HEX、ROX、GFPなどが挙げられる。本発明のオリゴヌクレオチドプローブはまた、医薬に結合させることもできる。

本発明においては、オリゴヌクレオチドなどの核酸を担体上に固定化する場合、固定化する核酸と、担体への結合に必要な反応性官能基との間に芳香族基

を導入することで核酸を担体上に効率よく固定化することができる。また、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは従来のプローブよりも標的核酸との結合効率が高い。また第三に、本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、その合成と精製が容易である。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により、本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらによって限定されるものではない。

10 本発明のオリゴヌクレオチドプローブを合成するための中間体化合物（以下、アミダイト化合物と称する）を合成し、それをオリゴヌクレオチドに導入し、得られたオリゴヌクレオチドプローブの能力を評価した。

オリゴヌクレオチドへ芳香族基を導入するためのユニット（アミダイト化合物：Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10、Y11）を、  
図2～7及び13に示す方法により合成した。

15 Y2は、アミノ基をもたず芳香族基のみを有するアミダイト化合物であり、DNA自動合成機によりY2をオリゴヌクレオチドに導入後、続けて市販品のN-モノメトキシトリチル-6-アミノヘキシルホスホロアミダイト化合物又はトリフルオロアセチル-6-アミノヘキシルホスホロアミダイト化合物（グレンリサーチ社）を用いてアミノ基を導入し、オリゴヌクレオチドの末端に、  
20 アミノ基と芳香族基を有する50塩基からなるオリゴヌクレオチドプローブ（X2-Sp；図8）を合成した。

Y3、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10、Y11のアミダイト化合物は、分子内にアミノ基を有している。従って、合成アミダイト化合物をオリゴヌクレオチドに導入後に、別途市販のアミノ基結合ホスホロアミダイト化合物  
25 を用いてアミノ基を導入する必要がなく、オリゴヌクレオチドプローブの合成が従来よりも一工程短くなるという利点を有している。Y3とY5は、アミノ基と芳香族基の連結部位の構造が異なるものであり、Y6はY5よりもアミノ基と芳香族基の間に、より長い直鎖リンカーを導入したものであり、オリゴヌクレオチドプローブの担体表面からの距離を保つことができる。Y7は、Y6  
30 の芳香族基がナフチル基ではなくアントリル基であるアミダイト化合物である。

Y 8 は Y 5 の直鎖リンカーの導入部位が異なるアミダイト化合物であり、アミノ基と芳香族基が近接している。これらを 5' 末端に有するオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ DNA 自動合成機により合成した (X 3-S p、X 5-S p、X 6-S p、X 7-S p、X 8-S p、X 9-S p ; 図 8)。

5 芳香族基を有しないオリゴヌクレオチドプローブとして、市販の上記アミノ基結合ホスホロアミダイト化合物を用い、オリゴヌクレオチドの末端にアミノ基を導入したもの (X 1-S p ; 図 8)、オリゴヌクレオチドとアミノ基の間に芳香族基を有しないオリゴヌクレオチドプローブ (X 4-S p ; 図 8) を用い、比較例とした。

10 合成したオリゴヌクレオチドは、逆相カラムを用いて高純度に精製後、オリゴチップ作製のためのスポット溶液に一定濃度に溶解し、ガラス基盤上にスポットし、固定化した。

15 基盤への固定化後、固定化されたオリゴヌクレオチドプローブの 3' 末端を蛍光標識し、その蛍光強度を測定することで各オリゴヌクレオチドプローブの基盤上での固定化量を定量した。実験の結果から、従来のプローブである X 1-S p よりも芳香族基を有するオリゴプローブ (X 2-S p、X 3-S p、X 5-S p、X 6-S p、X 8-S p) は、固定化量の多いことが明らかとなった (図 9 a)。

20 次に各オリゴヌクレオチドプローブの溶液中での活性エステル基との反応効率を調べるため、フルオレセインイソチオシアナート及び Cy 3 スクシンイミジルエステルとの反応を行った。その結果、本発明の芳香族基を有するオリゴヌクレオチドプローブは、いずれの蛍光色素とも、従来のオリゴヌクレオチドプローブと比べて高い反応性を示し、溶液中においても化学物質との反応性が向上することが明らかとなった (図 9 b、c)。

25 Y 9 アミダイト化合物は、オリゴヌクレオチドの末端でも、又は鎖内にも導入可能な誘導体である (図 7)。Y 9 アミダイト化合物を、末端 (X 9-S p 2 5) と鎖内 (X 9-S p 3 5) それぞれに導入したオリゴヌクレオチドを合成した。それらについて、他のアミダイトと同様に蛍光色素との反応性 (図 9 c) 及びガラス基盤上への固定化効率 (図 1 2) について調べた。

30 以下に各アミダイト化合物及びオリゴヌクレオチドプローブの合成方法及び

試験方法を具体的に示す。

(実施例1) アミダイト化合物の合成

薄層クロマトグラフィーは、K i e s e l g e l 60F254 プレート  
(M e r c k) 上で行った。カラムクロマトグラフィーにはW a k o g e l  
5 C-200 (和光純薬工業) を用いた。紫外可視スペクトルは島津UV-25  
00PC分光光度計を用いて測定した。

<sup>1</sup>H-NMRはテトラメチルシランを内部標準とし、J E O L J N M - E  
X 2 7 0 を用いて測定した。<sup>31</sup>P-NMRは無機リン酸を内部標準とし、J  
E O L J N M - E X 2 7 0 を用いて測定した。

10 (1) アミダイト化合物 (Y2) の合成 (図2)

(R) - 1 - O - (1-ナフチルメチル) グリセロール (化合物c)

アルゴン雰囲気下、1-(クロロメチル) ナフタレン (化合物a) 2.40  
m l (16.0 m m o l) 及び (S) - (+) - 2, 2-ジメチルー1, 3-  
ジオキソラン-4-メタノール (化合物b) 1.85 m l (15.0 m m o l)  
15 をトルエンとジオキサンの混合溶液 (2 : 1) 90 m l に溶解し、粉末状に砕  
いた水酸化カリウム4.5 gを加えて120°Cで2.5時間加熱攪拌した。反応  
液を室温まで冷ました後、酢酸エチル300 m lを加えて、水100 m lで4  
回、飽和食塩水100 m lで1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥  
した。溶液を減圧下濃縮し、得られた黄色オイル状物質に80%酢酸水溶液1  
20 00 m lを加えて溶解し、室温で15時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した  
後トルエンとの共沸により酢酸を除き、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラ  
フィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物  
(化合物c) 3.24 g (収率93%) を白色固体状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO- d<sub>6</sub>) δ: 8.12-8.09 (m, 1 H), 7.95-7.86 (m, 2 H),  
25 7.59-7.44 (m, 4 H), 4.93 (s, 2 H), 4.67 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 4.48 (t,  
1 H, J = 5.5 Hz), 3.66 (dddd, 1 H, J = 3.5, 4.8, 5.2, 5.3, 5.9 Hz),  
3.56 (dd, 1 H, J = 4.8, 9.7 Hz), 3.45 (dd, 1 H, J = 3.5, 9.7 Hz), 3.39  
(ddd, 1 H, J = 5.2, 5.5, 10.9 Hz), 3.34 (ddd, 1 H, J = 5.5, 5.9, 10.9  
Hz).

30 (S) - 1 - O - ジメトキシトリチルー3-O - (1-ナフチルメチル) グリ

セロール (化合物 d)

アルゴン雰囲気下、(R)-1-O-(1-ナフチルメチル)グリセロール (化合物 c) 2.20 g (9.50 mmol) をピリジン 80 ml に溶解し、塩化ジメトキシトリチル 3.90 g (1.2 当量) を加え、室温で 1 時間攪拌した。  
5 エタノール 10 ml を加えて反応を止めた後、減圧下溶媒を留去した。残渣を酢酸エチル 300 ml に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 100 ml で 1 回、水 100 ml で 2 回、飽和食塩水 100 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラム  
10 クロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 d) 4.59 g (収率 90%) を淡黄色泡状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.03-7.86 (m, 3 H), 7.55-7.19 (m, 13 H), 6.85-6.81 (m, 4 H), 4.94 (d, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 4.91 (s, 2 H), 3.82 (dddt, 1 H,  $J = 4.9, 5.3, 5.6, 5.9$  Hz), 3.71 and 3.71 (each s, each 3 H), 3.59 (dd, 1 H,  $J = 4.9, 9.9$  Hz), 3.54 (dd, 1 H,  $J = 5.9, 9.9$  Hz),  
15 2.98 (dd, 1 H,  $J = 5.3, 9.2$  Hz), 2.94 (dd, 1 H,  $J = 5.9, 9.2$  Hz).

(S)-1-O-ジメトキシトリチル-3-O-(1-ナフチルメチル)グリセロール 2-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホアミダイト) (化合物 Y 2)

アルゴン雰囲気下、(S)-1-O-ジメトキシトリチル-3-O-(1-  
20 ナフチルメチル)グリセロール (化合物 d) 270 mg (0.50 mmol) を塩化メチレン 10 ml に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン 0.26 ml (3 当量)、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト 0.22 ml (2 当量) を加え、室温で 30 分攪拌した。反応液にクロロホルム 60 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 25 ml  
25 で 1 回、水 25 ml で 1 回、飽和食塩水 25 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 Y 2) 271 mg (収率 74%) を白色泡状物質として得た。

30  $^{31}\text{P}$  NMR (109 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 149.06, 148.64.

(2) アミダイト化合物 (Y3) の合成 (図3)

(S) - 1 - アジド - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール  
(化合物 e)

アルゴン雰囲気下、(R) - 1 - O - (1 - ナフチルメチル) グリセロール  
5 (化合物 c) 1.90 g (8.18 mmol) をピリジン 80 ml に溶解し、塩  
化トシル 2.32 g (1.5 当量) を加えて室温で4時間攪拌した。反応液にエ  
タノール 10 ml を加えて過剰の試薬を分解した。減圧下溶媒を留去した後、  
残渣を酢酸エチル 300 ml に溶解し、水 100 ml で2回、飽和炭酸水素ナ  
トリウム水溶液 100 ml で1回、水 100 ml で1回、飽和食塩水 100 ml  
10 1 で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮  
後、得られたオイル状物質をアルゴン雰囲気下、ジメチルホルムアミド 80 ml  
1 に溶解し、アジ化ナトリウム 1.60 g (3 当量) 及び塩化アンモニウム 1.  
75 g (4 当量) を加えて 80 °C で2時間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷  
ました後、酢酸エチル 300 ml を加えて、水 100 ml で5回、飽和食塩水  
15 100 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減  
圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エ  
チル - ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 e) 1.30 g (収率 6  
2%) を無色オイル状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.11-8.06 (m, 1 H), 7.96-7.87 (m, 2 H),  
20 7.59-7.44 (m, 4 H), 5.29 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 4.94 (s, 2 H), 3.83  
(ddd, 1 H, J = 3.6, 5.3, 6.3, 6.4 Hz), 3.51 (dd, 1 H, J = 5.3, 9.9  
Hz), 3.46 (dd, 1 H, J = 6.3, 9.9 Hz), 3.29 (dd, 1 H, J = 3.6, 12.6 Hz),  
3.21 (ddd, J = 6.4, 12.6 Hz).

(S) - 1 - アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール  
25 (化合物 f)

(S) - 1 - アジド - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール  
(化合物 e) 1.30 g (5.05 mmol) をエタノール 60 ml に溶解し、  
パラジウム - 炭素 (10%) 330 mg を加えて、常圧の水素雰囲気化、室温  
で15時間攪拌した。パラジウム触媒をセライトろ過により除去した後、溶液  
30 を減圧下濃縮し、標記化合物 (化合物 f) 1.17 g (収率 100%) を得た。

当化合物は更なる精製をすることなく、後の反応に用いた。

(S) - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキサノイル] アミノプロパン - 2 - オール (化合物 g)

アルゴン雰囲気下、N-トリフルオロアセチル-6-アミノカプロン酸 (化合物 f) 360 mg (1.3 当量) と 1, 1' - カルボニルジイミダゾール 2 35 mg (1.2 当量) をジメチルホルムアミド、10 ml に溶解し、室温で 2 時間攪拌した。この反応液に (S) - 1 - アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール (化合物 f) 280 mg (1.21 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (5 ml) を加え、室温でさらに 16 時間攪拌した。  
10 反応液に酢酸エチル 70 ml を加えて、水 25 ml で 4 回、飽和食塩水 25 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 g) 417 mg (収率 79%) を白色固体状物質として得た。

15  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.39 (br t, 1 H,  $J = 4.6$  Hz), 8.12-8.08 (m, 1 H), 7.96-7.86 (m, 2 H), 7.73 (br t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 7.59-7.44 (m, 4 H), 4.94 (br s, 1 H), 4.93 (s, 2 H), 3.69 (m, 1 H), 3.45-3.42 (m, 2 H), 3.21 (dt, 1 H,  $J = 5.6, 13.3$  Hz), 3.17 (dt, 2 H,  $J = 4.6, 7.0$  Hz), 3.00 (ddd, 1 H,  $J = 5.6, 6.6, 13.3$  Hz), 2.06 (t, 2 H,  $J = 7.4$  Hz),  
20 1.52-1.41 (m, 4 H), 1.22 (m, 2 H).

(S) - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキサノイル] アミノプロパン - 2 - オール 2 - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 3)

アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキサノイル] アミノプロパン - 2 - オール (化合物 g) 881 mg (2.00 mmol) を塩化メチレン 20 ml に溶解し、2 - シアノエチルテトライソプロピルホスホロジアミダイト 1.27 ml (2.0 当量)、1H-テトラゾールのアセトニトリル溶液 4.9 ml (0.45 M、1.1 当量) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液にクロロホルム 1  
30 00 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 40 ml で 1 回、飽和食塩

水 40 ml で 1 回洗淨し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減  
 圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（中性シリカゲル、  
 溶出溶媒：酢酸エチル-ヘキサン-1%トリエチルアミン）により精製して標  
 記化合物（化合物 Y 3） 831 mg（収率 65%）を無色オイル状物質として  
 5 得た。

$^{31}\text{P}$  NMR (109 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 148.79.

(3) アミダイト化合物 (Y 5) の合成 (図 4)

(R) - 2 - O - (tert-ブチルジメチルシリル) - 1 - O - (1-ナフ  
 チルメチル) グリセロール (化合物 h)

10 アルゴン雰囲気下、(R) - 1 - O - (1-ナフチルメチル) グリセロール  
 (化合物 c) 1.16 g (5.00 mmol) をジメチルホルムアミド 35 ml  
 に溶解し、tert-ブチルジメチルクロロシラン 2.26 g (3 当量)、イミ  
 ダゾール 2.04 g (6 当量) を加えて室温で 21 時間攪拌した。反応液にエ  
 タノール 5 ml を加えて過剰の試薬を分解した後、酢酸エチル 200 ml を加  
 15 えて、水 70 ml で 4 回、飽和食塩水 70 ml で 1 回洗淨し、有機層を硫酸ナ  
 トリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、得られたオイル状物質を塩化  
 メチレン 75 ml に溶解して 0°C に冷却し、トリフルオロ酢酸 2.1 ml (9  
 0% 水溶液) を加えて、0°C で 1 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリ  
 ウム水溶液 80 ml を加えて室温に戻した後、更にクロロホルム 150 ml を  
 20 加えて分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 80 ml で 1 回、飽  
 和食塩水 80 ml で 1 回洗淨し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧  
 下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチ  
 ル-ヘキサン）により精製して標記化合物（化合物 h） 1.70 g（収率 9  
 8%）を無色オイル状物質として得た。

25  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.10-8.07 (m, 1 H), 7.95-7.85 (m, 2 H),  
 7.54-7.43 (m, 4 H), 4.95 (d, 1 H,  $J = 12.3$  Hz), 4.90 (d, 1 H,  $J = 12.3$   
 Hz), 4.60 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 3.79 (dddd, 1 H,  $J = 4.0, 5.6, 6.0,$   
 6.3 Hz), 3.58 (dd, 1 H,  $J = 4.0, 9.9$  Hz), 3.44 (dd, 1 H,  $J = 6.3, 9.9$   
 Hz), 3.36 (ddd, 1 H,  $J = 5.6, 6.0, 11.1$  Hz), 3.31 (dt, 1 H,  $J = 5.6,$   
 30 11.1 Hz), 0.83 (s, 9 H), 0.02 and 0.00 (each s, each 3 H).

(S) - 2 - O - (tert-ブチルジメチルシリル) - 3 - O - (1-ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキシル] カルバモイル] グリセロール (化合物 i)

アルゴン雰囲気下、(R) - 2 - O - (tert-ブチルジメチルシリル) - 1 - O - (1-ナフチルメチル) グリセロール (化合物 h) 695 mg (2.00 mmol) 及びDMA P 50 mg (0.2当量) をジメチルホルムアミド 35 ml に溶解し、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 195 mg (0.6当量) を加えて室温で攪拌した。2時間後、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 195 mg (0.6当量) を追加してさらに2時間攪拌した。この反応液に1, 6-ヘキサンジアミン 1.16 g (5当量) を加えて室温で15時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 150 ml を加えて、水 60 ml で4回、飽和食塩水 60 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、得られた残渣をメタノール 35 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸エチル 1.19 ml (5当量) 及びトリエチルアミン 1.39 ml (5当量) を加えて、室温で14時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 i) 1.07 g (収率 92%) を淡黄色オイル状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$  (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.37 (br s, 1 H), 8.09-8.05 (m, 1 H), 7.95-7.86 (m, 2 H), 7.55-7.43 (m, 4 H), 7.06 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 4.96 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz), 4.91 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz), 4.03-3.87 (m, 3 H), 3.56-3.46 (m, 2 H), 3.15 (t, 2 H,  $J = 6.9$  Hz), 2.93 (q, 2 H,  $J = 6.5$  Hz), 1.47-1.34 (m, 4 H), 1.23 (m, 4 H), 0.81 (s, 9 H), 0.15 and 0.01 (each s, each 3 H).

25 (S) - 3 - O - (1-ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキシル] カルバモイル] グリセロール (化合物 j)

アルゴン雰囲気下、(S) - 2 - O - (tert-ブチルジメチルシリル) - 3 - O - (1-ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキシル] カルバモイル] グリセロール (化合物 i) 1.00 g (1.71 mmol) をテトラヒドロフラン 35 ml に溶解して氷冷し、フッ

化テトラブチルアンモニウム溶液 2.57 ml (1.0 M テトラヒドロフラン溶液、1.5 当量) を加えた。反応液を室温に戻した後、1 時間攪拌した。酢酸 0.15 ml (1.5 当量) を加えて中和した後、反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 j) 734 mg (収率 91%) を無色オイル状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.38 (br s, 1 H), 8.10-8.06 (m, 1 H), 7.96-7.84 (m, 2 H), 7.58-7.44 (m, 4 H), 7.10 (t, 1 H, J = 5.6 Hz), 5.00 (br s, 1 H), 4.93 (s, 2 H), 3.96 (dd, 1 H, J = 4.6, 10.6 Hz), 3.85 (dd, 1 H, J = 5.9, 10.6 Hz), 3.83 (m, 1 H), 3.50 (m, 2 H), 3.15 (dt, 2 H, J = 5.6, 7.0 Hz), 2.94 (q, 2 H, J = 6.4 Hz), 1.48-1.35 (m, 4 H), 1.24 (m, 4 H).

(S) - 3 - O - (1 - ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキシル] カルバモイル] グリセロール 2 - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 5)

アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - O - (1 - ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [6 - (トリフルオロアセトアミド) ヘキシル] カルバモイル] グリセロール (化合物 j) 134 mg (0.28 mmol) を塩化メチレン 6.0 ml に溶解し、2 - シアノエチルテトライソプロピルホスホロアミダイト 0.12 ml (1.3 当量)、1 H - テトラゾールのアセトニトリル溶液 0.76 ml (0.45 M、1.2 当量) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液にクロロホルム 30 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 10 ml で 1 回、飽和食塩水 10 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル - ヘキサン - 1% トリエチルアミン) により精製して標記化合物 (化合物 Y 5) 153 mg (収率 82%) を無色オイル状物質として得た。

<sup>31</sup>P NMR (109 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 149.53.

(4) アミダイト化合物 (Y 6) の合成 (図 4)

(S) - 2 - O - (tert - ブチルジメチルシリル) - 3 - O - (1 - ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [13 - トリフルオロアセトアミド - 4, 7,

10-トリオキサトリデカニル]カルバモイル]グリセロール (化合物k)

アルゴン雰囲気下、(R)-2-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-1-O-(1-ナフチルメチル)グリセロール (化合物h) 790 mg (2.28 mmol) 及びDMAPE 56 mg (0.2当量) をジメチルホルムアミド 35 ml に溶解し、1, 1'-カルボニルジイミダゾール 222 mg (0.6当量) を加えて室温で攪拌した。1.5時間後、1, 1'-カルボニルジイミダゾール 222 mg (0.6当量) を追加してさらに2.5時間攪拌した。この反応液に4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン 2.50 ml (5当量) を加えて室温で20時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 200 ml を加えて、水 70 ml で4回、飽和食塩水 70 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、得られた残渣をメタノール 40 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸エチル 1.36 ml (5当量) 及びトリエチルアミン 1.59 ml (5当量) を加えて、室温で24時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物k) 1.44 g (収率92%) を無色オイル状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.36 (br s, 1 H), 8.09-8.05 (m, 1 H), 7.96-7.84 (m, 2 H), 7.55-7.43 (m, 4 H), 7.05 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 4.96 and 4.90 (each d, each 1 H,  $J = 12.2$  Hz), 4.06-3.86 (m, 3 H), 3.50-3.34 (m, 14 H), 3.22 (t, 2 H,  $J = 7.1$  Hz), 3.00 (q, 2 H,  $J = 6.6$  Hz), 1.69 (m, 2 H), 1.59 (m, 2 H), 0.81 (s, 9 H), 0.12 and -0.01 (each s, each 3 H).

(S)-3-O-(1-ナフチルメチル)-1-O-[N-[13-トリフルオロアセトアミド-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル]カルバモイル]グリセロール (化合物l)

アルゴン雰囲気下、(S)-2-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-3-O-(1-ナフチルメチル)-1-O-[N-[13-トリフルオロアセトアミド-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル]カルバモイル]グリセロール (化合物k) 1.32 g (1.92 mmol) をテトラヒドロフラン 35 ml に溶解して氷冷し、フッ化テトラブチルアンモニウム溶液 2.90 ml

(1.0 M テトラヒドロフラン溶液、1.5 当量) を加えた。反応液を室温に戻した後、2 時間攪拌した。酢酸 0.17 ml (1.5 当量) を加えて中和した後、反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 1)

5 1.07 g (収率 97%) を無色オイル状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.36 (br s, 1 H), 8.10-8.06 (m, 1 H), 7.96-7.87 (m, 2 H), 7.58-7.44 (m, 4 H), 7.09 (t, 1 H, J = 5.5 Hz), 4.99 (d, 1 H, J = 4.9 Hz), 4.94 (s, 2 H), 4.00-3.77 (m, 3 H), 3.51-3.35 (m, 14 H), 3.23 (q, 2 H, J = 6.6 Hz), 3.01 (q, 2 H, J = 6.4 Hz),  
10 1.70 (m, 2 H), 1.61 (m, 2 H).

(S) - 3 - O - (1 - ナフチルメチル) - 1 - O - [N - [13 - トリフル  
オロアセトアミド - 4, 7, 10 - トリオキサトリデカニル] カルバモイル]  
グリセロール 2 - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホ  
ロアミダイト) (化合物 Y 6)

15 アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - O - (1 - ナフチルメチル) - 1 - O -  
[N - [13 - トリフルオロアセトアミド - 4, 7, 10 - トリオキサトリデ  
カニル] カルバモイル] グリセロール (化合物 1) 260 mg (0.45 mm  
ol) を塩化メチレン 10 ml に溶解し、2 - シアノエチルテトライソプロピ  
ルホスホロジアミダイト 0.19 ml (1.3 当量)、1H - テトラゾールのア  
20 セトニトリル溶液 1.20 ml (0.45 M、1.2 当量) を加え、室温で 1 時  
間攪拌した。反応液にクロロホルム 30 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウ  
ム水溶液 10 ml で 1 回、飽和食塩水 10 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナ  
トリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロ  
マトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル - ヘキサン - 1% トリエチルアミン)  
25 により精製して標記化合物 (化合物 Y 6) 226 mg (収率 64%) を無色オ  
イル状物質として得た。

<sup>31</sup>P NMR (109 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 149.54.

(5) アミダイト化合物 (Y 7) の合成 (図 5)

(R) - 1 - O - (9 - アントリルメチル) グリセロール (化合物 n)

30 アルゴン雰囲気下、9 - (クロロメチル) アントラセン (化合物 m) 1.3

6 g (6.0 mmol) 及び (S) - (+) - 2, 2 - ジメチル 1, 3 - ジオキソラン - 4 - メタノール (化合物 b) 0.82 ml (0.66 mmol) をトルエンとジオキサンの混合溶液 (2 : 1) 60 ml に溶解し、粉末状に砕いた水酸化カリウム 2.0 g を加えて 120 °C で 1.5 時間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷ました後、酢酸エチル 200 ml を加えて、水 70 ml で 3 回、飽和食塩水 70 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた黄色オイル状物質に 80 % 酢酸水溶液 60 ml を加えて溶解し、室温で 18 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後トルエンとの共沸により酢酸を除き、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 : エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 n) 1.41 g (収率 83 %) を淡黄色固体状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.62 (s, 1 H), 8.45-8.42 (m, 2 H), 8.12-8.09 (m, 2 H), 7.62-7.50 (m, 4 H), 5.46 (s, 2 H), 4.70 (d, 1 H, J = 5.0 Hz), 4.50 (t, 1 H, J = 5.7 Hz), 3.69-3.54 (m, 3 H), 3.36 (ddd, 1 H, J = 4.9, 5.7, 11.2 Hz), 3.31 (ddd, 1 H, J = 5.3, 5.7, 11.2 Hz).

(S) - 3 - O - (9 - アントリルメチル) - 1 - O - (ジメトキシトリチル) グリセロール (化合物 o)

アルゴン雰囲気下、(R) - 1 - O - (9 - アントリルメチル) グリセロール (化合物 n) 1.25 g (4.43 mmol) をピリジン 35 ml に溶解し、塩化ジメトキシトリチル 1.80 g (1.2 当量) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。エタノール 5 ml を加えて反応を止めた後、減圧下溶媒を留去した。残渣を酢酸エチル 200 ml に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 70 ml で 1 回、水 70 ml で 2 回、飽和食塩水 70 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 : 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 o) 2.47 g (収率 95 %) を淡黄色泡状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.63 (s, 1 H), 8.39-8.36 (m, 2 H), 8.12-8.08 (m, 2 H), 7.54-7.46 (m, 4 H), 7.34-7.15 (m, 9 H), 6.78-6.73 (m, 4 H), 5.45 (s, 2 H), 4.92 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 3.79 (m, 1 H), 3.72-3.66 (m, 2 H), 3.69 and 3.68 (each s, each 3 H), 2.93 (dd, 1 H, J = 5.3,

9.3 Hz), 2.88 (dd, 1 H, J = 5.6, 9.3 Hz).

(R) - 1 - O - (9 - アントリルメチル) - 2 - O - (トリスプロピルシリル) グリセロール (化合物 p)

アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - O - (9 - アントリルメチル) - 1 - O -  
 5 (ジメトキシトリチル) グリセロール (化合物 o) 760 mg (1.30 mmol) をジメチルホルムアミド 10 ml に溶解し、トリスプロピルシリルクロリド 0.71 ml (2.5 当量)、イミダゾール 450 mg (5 当量) を加えて室温で2日間攪拌した。反応液にエタノール 5 ml を加えて過剰の試薬を分解した後、酢酸エチル 200 ml を加えて、水 70 ml で4回、飽和食塩水 7  
 10 0 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、得られたオイル状物質をクロロホルム 10 ml に溶解し、80%酢酸水溶液 20 ml を加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 p) 523 mg (収率 92%) を淡黄  
 15 色泡状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.62 (s, 1 H), 8.44-8.41 (m, 2 H), 8.12-8.06 (m, 2 H), 7.59-7.49 (m, 4 H), 5.49 and 5.44 (each d, each 1 H, J = 11.5 Hz), 4.59 (t, 1 H, J = 5.4 Hz), 3.81-3.71 (m, 2 H), 3.61 (dd, 1 H, J = 5.3, 9.7 Hz), 3.37 (dd, 2 H, J = 5.4, 5.6 Hz), 0.91-0.84 (m, 21  
 20 H).

(S) - 3 - O - (9 - アントリルメチル) - 1 - O - [N - [13 - トリフルオロアセトアミド - 4, 7, 10 - トリオキサトリデカニル] カルバモイル] - 2 - O - (トリスプロピルシリル) グリセロール (化合物 q)

アルゴン雰囲気下、(R) - 1 - O - (9 - アントリルメチル) - 2 - O -  
 25 (トリスプロピルシリル) グリセロール (化合物 p) 520 mg (1.18 mmol) 及び DMAP 30 mg (0.2 当量) をジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 120 mg (0.6 当量) を加えて室温で攪拌した。2時間後、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 120 mg (0.6 当量) を追加してさらに2時間攪拌した。この反応液に  
 30 4, 7, 10 - トリオキサ - 1, 13 - トリデカンジアミン 1.30 ml (5

当量) を加えて室温で20時間攪拌した。反応液に酢酸エチル130mlを加えて、水50mlで4回、飽和食塩水50mlで1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、得られた残渣をメタノール20mlに溶解し、トリフルオロ酢酸エチル0.71ml(5当量)及びトリエチルアミン0.84ml(5当量)を加えて、室温で24時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン)により精製して標記化合物(化合物q)773mg(収率84%)を淡黄色オイル状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.36 (br s, 1 H), 8.63 (s, 1 H), 8.43-8.40 (m, 2 H), 8.12-8.08 (m, 2 H), 7.59-7.50 (m, 4 H), 7.01 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 5.48 (s, 2 H), 3.99-3.88 (m, 3 H), 3.69 (dd, 1 H,  $J = 4.9, 9.9$  Hz), 3.64 (dd, 1 H,  $J = 4.6, 9.9$  Hz), 3.51-3.35 (m, 12 H), 3.23 (t, 2 H,  $J = 6.9$  Hz), 3.00 (q, 2 H,  $J = 6.6$  Hz), 1.70 (m, 2 H), 1.60 (m, 2 H), 0.90-0.83 (m, 21 H).

15 (S)-3-O-(9-アントリルメチル)-1-O-[N-[13-トリフルオロアセトアミド-4,7,10-トリオキサトリデカニル]カルバモイル]グリセロール(化合物r)

アルゴン雰囲気下、(S)-3-O-(9-アントリルメチル)-1-O-[N-[13-トリフルオロアセトアミド-4,7,10-トリオキサトリデカニル]カルバモイル]-2-O-(トリスプロピルシリル)グリセロール(化合物q)500mg(0.64mmol)をテトラヒドロフラン12mlに溶解して氷冷し、フッ化テトラブチルアンモニウム溶液0.96ml(1.0Mテトラヒドロフラン溶液、1.5当量)を加えた。反応液を室温に戻した後、1時間攪拌した。酢酸55 $\mu$ l(1.5当量)を加えて中和した後、反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: エタノール-クロロホルム)により精製して標記化合物(化合物r)383mg(収率95%)を淡黄色オイル状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.37 (br s, 1 H), 8.63 (s, 1 H), 8.44-8.41 (m, 2 H), 8.12-8.09 (m, 2 H), 7.61-7.50 (m, 4 H), 7.09 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz), 5.47 (s, 2 H), 5.00 (d, 1 H,  $J = 4.6$  Hz), 3.95 (m, 1 H),

3.89-3.79 (m, 2 H), 3.64 (m, 2 H), 3.50-3.36 (m, 12 H), 3.23 (q, 2 H, J = 6.6 Hz), 3.01 (q, 2 H, J = 6.5 Hz), 1.70 (m, 2 H), 1.61 (m, 2 H).

5 (S) - 3 - O - (9-アントリルメチル) - 1 - O - [N - [13-トリフルオロアセトアミド-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル] カルバモイル] グリセロール 2 - O - (2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 7)

アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - O - (9-アントリルメチル) - 1 - O - [N - [13-トリフルオロアセトアミド-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル] カルバモイル] グリセロール (化合物 r) 350 mg (0.56 mmol) を塩化メチレン 10 ml に溶解し、2-シアノエチルテトライソプロピルホスホロジアミダイト 0.21 ml (1.2 当量)、1H-テトラゾールのアセトニトリル溶液 1.38 ml (0.45 M、1.1 当量) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応液にクロホルム 60 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 25 ml で 1 回、水 25 ml で 1 回、飽和食塩水 25 ml で 1 回洗  
15 浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン-1% トリエチルアミン) により精製して標記化合物 (化合物 Y 7) 293 mg (収率 64%) を淡黄色オイル状物質として得た。

$^{31}\text{P}$  NMR (109 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 149.51, 149.43.

20 (6) アミダイト化合物 (Y 8) の合成 (図 6)

(S) - 3 - (1-ナフチルメトキシ) - 1 - トリフルオロアセトアミドプロパン-2-オール (化合物 s)

アルゴン雰囲気下、(S) - 1 - アミノ - 3 - (1-ナフチルメトキシ) プロパン-2-オール (化合物 f) 900 mg (3.89 mmol) をメタノール 50 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸エチル 0.93 ml (2 当量) 及びトリエチルアミン 1.09 ml (2 当量) を加えて、室温で 3 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 s) 860 mg (収率 68%) を白色固体状物質として得た。

30  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.34 (br t, 1 H, J = 5.7 Hz), 8.12-8.08

(m, 1 H), 7.96-7.87 (m, 2 H), 7.59-7.45 (m, 4 H), 5.12 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 4.94 (s, 2 H), 3.83 (dddt, 1 H, J = 4.6, 5.3, 5.6, 7.7 Hz), 3.50 (dd, 1 H, J = 5.3, 9.9 Hz), 3.45 (dd, 1 H, J = 5.6, 9.9 Hz), 3.32 (ddd, 1 H, J = 4.6, 5.7, 13.2 Hz), 3.17 (ddd, 1 H, J = 6.1, 7.7, 13.2 Hz).

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリフルオロアセトアミドプロパン (化合物 t)

アルゴン雰囲気下、(S) - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリフル  
 10 オロアセトアミドプロパン - 2 - オール (化合物 s) 510 mg (1.56 mmol) 及び DMAP 38 mg (0.2 当量) をジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 190 g (0.75 当量) を加えて室温で攪拌した。2 時間後、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 190 mg (0.75 当量) を追加してさらに 2 時間攪拌した。この反応液に 6  
 15 - アミノ - 1 - ヘキサノール 550 mg (3 当量) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 150 ml を加えて、水 50 ml で 4 回、飽和食塩水 50 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル - ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 t) 487 mg (収率 67%)  
 20 を白色固体状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.48 (br s, 1 H), 8.09-8.06 (m, 1 H), 7.96-7.88 (m, 2 H), 7.59-7.44 (m, 4 H), 7.17 (br t, 1 H, J = 5.6 Hz), 5.01 (m, 1 H), 4.97 (d, 1 H, J = 11.9 Hz), 4.91 (d, 1 H, J = 11.9 Hz), 4.33 (t, 1 H, J = 5.2 Hz), 3.68-3.57 (m, 2 H), 3.42-3.34 (m, 4 H),  
 25 2.93 (dt, 2 H, J = 5.6, 6.9 Hz), 1.42-1.33 (m, 4 H), 1.27-1.20 (m, 4H).

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリフルオロアセトアミドプロパン 6' - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 8)

30 アルゴン雰囲気下、(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カル

バモイル] オキシ-3-(1-ナフチルメトキシ)-1-トリフルオロアセト  
アミドプロパン (化合物 t) 188 mg (0.40 mmol) を塩化メチレン  
8 ml に溶解し、2-シアノエチルテトライソプロピルホスホロジアミダイト  
0.15 ml (1.2 当量)、1H-テトラゾールのアセトニトリル溶液 0.9  
5 8 ml (0.45 M、1.1 当量) を加え、室温で20分攪拌した。反応液にク  
ロロホルム 30 ml を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 10 ml で1回、  
水 10 ml で1回、飽和食塩水 10 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウ  
ムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグ  
ラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン-1%トリエチルアミン) により  
10 精製して標記化合物 (化合物 Y8) 170 mg (収率63%) を白色固体状物  
質として得た。

$^{31}\text{P}$  NMR (109 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 147.21.

(7) アミダイト化合物 (Y9) の合成 (図7)

(R)-1-O-トシル-3-O-ジメトキシトリチルグリセロール (化合物  
15 u)

アルゴン雰囲気下、(S)-(+)-2,2-ジメチル1,3-ジオキサラン-  
4-メタノール (化合物 b) 1.24 ml (10.0 mmol) をピリジン 50  
ml に溶解し、塩化トシル 3.81 g (2.0 当量) を加えて室温で17時間攪  
拌した。反応液に水 15 ml を加えて過剰の試薬を分解した。減圧下溶媒を留  
20 去した後、残渣を酢酸エチル 350 ml に溶解し、水 100 ml で1回、飽和  
炭酸水素ナトリウム水溶液 100 ml で1回、水 100 ml で1回、飽和食塩  
水 100 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を  
減圧下濃縮後、得られたオイル状物質に80%酢酸水溶液 70 ml を加えて溶  
解し、室温で20時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後トルエンとの共沸  
25 により酢酸を除き、さらにピリジンと共沸した。アルゴン雰囲気下、この残渣  
をピリジン 60 ml に溶解し、塩化ジメトキシトリチル 4.07 g (1.2 当  
量) を加え、室温で2時間攪拌した。エタノール 10 ml を加えて反応を止め  
た後、減圧下溶媒を留去した。残渣を酢酸エチル 350 ml に溶解し、水 10  
0 ml で1回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 100 ml で1回、水 100 m  
30 1 で1回、飽和食塩水 100 ml で1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムによ

り乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチルーヘキサン）により精製して標記化合物（化合物 u） 4.51 g（収率 82%）を白色泡状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 7.74 (m, 2 H), 7.45 (m, 2 H), 7.29-7.13 (m, 9 H), 6.88-6.84 (m, 4 H), 5.28 (d, 1 H, J = 5.6 Hz), 4.04 (dd, 1 H, J = 3.6, 9.6 Hz), 3.96 (dd, 1 H, J = 5.4, 9.6 Hz), 3.78 (m, 1 H), 3.74 (s, 6 H), 2.94 (dd, 1 H, J = 5.3, 9.2 Hz), 2.83 (dd, 1 H, J = 6.9, 9.2 Hz), 2.39 (s, 3 H).

(R) - 3 - ジメトキシトリチルオキシ - 1 - アジドプロパン - 2 - オール

10 (化合物 v)

アルゴン雰囲気下、(R) - 1 - オートシル - 3 - オ - ジメトキシトリチルグリセロール（化合物 u） 930 mg（1.70 mmol）をジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、アジ化ナトリウム 440 mg（4 当量）及び塩化アンモニウム 455 mg（5 当量）を加えて 80 °C で 2 時間加熱撹拌した。反応液を室温まで冷ました後、酢酸エチル 150 ml を加えて、水 50 ml で 4 回、飽和食塩水 50 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチルーヘキサン）により精製して標記化合物（化合物 v） 690 mg（収率 96%）を黄色オイル状物質として得た。

20 <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 7.41-7.18 (m, 9 H), 6.91-6.86 (m, 4 H), 5.31 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 3.81 (dtdd, 1 H, J = 3.6, 5.3, 6.3, 6.6 Hz), 3.73 (s, 6 H), 3.36 (dd, 1 H, J = 3.6, 12.5 Hz), 3.28 (dd, 1 H, J = 6.3, 12.5 Hz), 3.00 (dd, 1 H, J = 5.3, 9.2 Hz), 2.88 (dd, 1 H, J = 6.6, 9.2 Hz).

25 (R) - 3 - ジメトキシトリチルオキシ - 1 - アミノプロパン - 2 - オール  
(化合物 w)

(R) - 3 - ジメトキシトリチルオキシ - 1 - アジドプロパン - 2 - オール（化合物 v） 620 mg（1.48 mmol）をエタノール 20 ml に溶解し、パラジウム - 炭素（10%） 120 mg を加えて、常圧の水素雰囲気化、室温で 6 時間撹拌した。パラジウム触媒をセライトろ過により除去した後、溶液を

減圧下濃縮し、標記化合物（化合物 w）548 mg（収率94%）を白色泡状物質として得た。当化合物は更なる精製をすることなく、後の反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 7.42-7.21 (m, 9 H), 6.90-6.86 (m, 4 H), 4.71 (br s, 1 H), 3.73 (s, 6 H), 3.55 (dddd, 1 H, J = 4.0, 5.3, 6.0, 6.9 Hz), 2.94 (dd, 1 H, J = 5.3, 8.9 Hz), 2.83 (dd, 1 H, J = 6.0, 8.9 Hz), 2.68 (dd, 1 H, J = 4.0, 12.8 Hz), 2.46 (dd, 1 H, J = 6.9, 12.8 Hz).

10 6 - {N - [ (R) - 3' - ジメトキシトリチルオキシ - 2' - ヒドロキシプロピル] カルバモイル} ナフタレン - 2 - カルボン酸ペンタフルオロフェニル エステル (化合物 x)

アルゴン雰囲気下、2, 6 - ナフタレンジカルボン酸ジペンタフルオロフェニルエステル822 mg (1.5 mmol) 及びN, N - ジイソプロピルエチルアミン0.70 ml (4.0 mmol) をテトラヒドロフラン70 ml に溶解し、この溶液に (R) - 3 - ジメトキシトリチルオキシ - 1 - アミノプロパン - 2 - オール (化合物 w) 520 mg (1.32 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 ml) を10分かけて滴下した。室温でさらに1時間攪拌した後、溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 : 酢酸エチル - ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 x) 664 mg (収率67%) を白色泡状物質として得た。

20 <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 9.01 (m, 1 H), 8.65 (br t, 1 H, J = 5.6 Hz), 8.51 (m, 1 H), 8.32 (d, 1 H, J = 8.6 Hz), 8.26 (d, 1 H, J = 8.6 Hz), 8.19 (dd, 1 H, J = 1.7, 8.6 Hz), 8.02 (dd, 1 H, J = 1.7, 8.6 Hz), 7.45-7.42 (m, 2 H), 7.31-7.17 (m, 7 H), 6.87-6.83 (m, 4 H), 5.12 (d, 1 H, J = 5.6 Hz), 3.94 (m, 1 H), 3.69 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H), 3.56 (m, 1 H), 3.29 (m, 1 H), 3.05-2.96 (m, 2 H).

6 - {N - [ (R) - 3' - ジメトキシトリチルオキシ - 2' - ヒドロキシプロピル] カルバモイル} - 2 - {N - [N - (トリフルオロアセチル) - 3' - アミノプロピル] カルバモイル} ナフタレン (化合物 y)

30 アルゴン雰囲気下、6 - {N - [ (R) - 3' - ジメトキシトリチルオキシ - 2' - ヒドロキシプロピル] カルバモイル} ナフタレン - 2 - カルボン酸ペ

5    ンタフルオロフェニルエステル（化合物 x） 640 mg（0.84 mmol）  
 をジメチルホルムアミド 20 ml に溶解し、1, 3-プロパンジアミン 0.7  
 0 ml（10 当量）を加えて室温で 30 分攪拌した。反応液に酢酸エチル 15  
 0 ml を加えて水 50 ml で 5 回洗浄し、有機層を減圧下濃縮した。得られた  
 10  残渣をアルゴン雰囲気下メタノール 15 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸エチル  
 0.50 ml（5 当量）及びトリエチルアミン 0.59 ml（5 当量）を加え  
 て、室温で 14 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラ  
 ムクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチル-ヘキサン）により精製して標  
 記化合物（化合物 y） 440 mg（収率 70%）を白色泡状物質として得た。  
 15  <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.46 (br s, 1 H), 8.72 (br t, 1 H, J =  
 5.6 Hz), 8.55 (br t, 1 H, J = 5.6 Hz), 8.47 (m, 1 H), 8.41 (m, 1 H),  
 8.09-8.05 (m, 2 H), 7.99-7.91 (m, 2 H), 7.44-7.41 (m, 2 H), 7.31-7.16  
 (m, 7 H), 6.86-6.82 (m, 4 H), 5.10 (d, 1 H, J = 5.3 Hz), 3.93 (m, 1 H),  
 3.68 (s, 3 H), 3.67 (s, 3 H), 3.53 (m, 1 H), 3.41-3.23 (m, 5 H), 2.99  
 15  (m, 2 H), 1.81 (m, 2 H).

6 - {N - [ (R) - 3' - ジメトキシトリチルオキシ - 2' - ヒドロキシプロ  
 20  ピル] カルバモイル} - 2 - {N - [N - (トリフルオロアセチル) -  
 3' - アミノプロピル] カルバモイル} ナフタレン 2' - O - (2 - シア  
 ノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 9)

20  アルゴン雰囲気下、6 - {N - [ (R) - 3' - ジメトキシトリチルオキシ  
 - 2' - ヒドロキシプロピル] カルバモイル} - 2 - {N - [N - (トリフル  
 オロアセチル) - 3' - アミノプロピル] カルバモイル} ナフタレン（化合  
 物 y） 298 mg（0.40 mmol）を塩化メチレン 10 ml に溶解し、2  
 25  - シアノエチルテトライソプロピルホスホロジアミダイト 0.15 ml（1.2  
 当量）、1H-テトラゾールのアセトニトリル溶液 0.98 ml（0.45 M、  
 1.1 当量）を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液にクロロホルム 30 ml  
 を加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 15 ml で 2 回、飽和食塩水 15 ml  
 1 で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮  
 し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチル-ヘ  
 30  キサン-1%トリエチルアミン）により精製して標記化合物（化合物 Y 9） 2

5 5 m g (収率 6 8 %) を白色泡状物質として得た。

$^{31}\text{P}$  NMR (109 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 149.20, 148, 95.

(8) アミダイト化合物 (Y 1 0 及び Y 1 1) の合成 (図 1 3)

5 (S) - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール (化合物  $\alpha$ )

アルゴン雰囲気下、(S) - 1 - アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール (化合物 f) 1.82 g (7.85 mmol) をピリジン 75 ml に溶解し、塩化モノメトキシトリチル 3.15 g (1.3 当量) を加え室温で 7 時間攪拌した。エタノール 15 ml を加えて反応を止めた後、減圧下溶媒を留去した。残渣を酢酸エチル 200 ml に溶解し、水 70 ml で 1 回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 70 ml で 1 回、水 70 ml で 1 回、飽和食塩水 70 ml で 1 回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、溶出溶媒: 酢酸エチル - ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物  $\alpha$ ) 2.80 g (収率 71%) を白色泡状物質として得た。

15  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.03-8.00 (m, 1 H), 7.94-7.85 (m, 2 H), 7.54-7.34 (m, 8 H), 7.28-7.12 (m, 8 H), 6.82-6.77 (m, 2 H), 4.94 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz), 4.88 (d, 1 H,  $J = 12.2$  Hz), 4.80 (d, 1 H,  $J = 5.3$  Hz), 3.82 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H), 3.51 (m, 2 H), 2.39 (br dd, 1 H,  $J = 7.0, 8.6$  Hz), 2.17 (ddd, 1 H,  $J = 4.6, 8.6, 11.5$  Hz), 1.97 (ddd, 1 H,  $J = 6.6, 7.0, 11.5$  Hz).

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン (化合物  $\beta$ )

25 アルゴン雰囲気下、(S) - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール (化合物  $\alpha$ ) 2.62 g (5.20 mmol) および DMA P 130 mg (0.2 当量) をジメチルホルムアミド 55 ml に溶解し、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 630 mg (0.75 当量) を加えて室温で攪拌した。2 時間後、1, 1' - カルボニルジイミダゾール 630 mg (0.75 当量) を追加してさらに 3 時間攪拌した。この

30

反応液に6-アミノ-1-ヘキサノール1.83g(3当量)を加えて室温で16時間攪拌した。反応液に酢酸エチル300mlを加えて、水100mlで4回、飽和食塩水100mlで1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(中性シリカゲル、溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン)により精製して標記化合物(化合物β)3.07g(収率91%)を白色泡状物質として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.00-7.85 (m, 3 H), 7.53-7.33 (m, 8 H), 7.28-7.12 (m, 9 H), 6.81-6.77 (m, 2 H), 4.95 (d, 1 H, J = 12.0 Hz), 4.95 (m, 1 H), 4.88 (d, 1 H, J = 12.0 Hz), 4.30 (t, 1 H, J = 5.1 Hz), 3.72-3.68 (m, 5 H), 3.36 (m, 2 H), 2.96 (m, 2 H), 2.38 (t, 1 H, J = 8.1 Hz), 2.18 (m, 2 H), 1.41-1.33 (m, 4 H), 1.26-1.22 (m, 4 H).

(S)-2-[N-(6'-ヒドロキシヘキシル)カルバモイル]オキシ-1-(モノメトキシトリチル)アミノ-3-(1-ナフチルメトキシ)プロパン6'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物Y10)

アルゴン雰囲気下、(S)-2-[N-(6'-ヒドロキシヘキシル)カルバモイル]オキシ-1-(モノメトキシトリチル)アミノ-3-(1-ナフチルメトキシ)プロパン(化合物β)323mg(0.50mmol)を塩化メチレン10mlに溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン0.52ml(6当量)、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト0.13ml(1.2当量)を加え、室温で30分攪拌した。反応液にクロロホルム50mlを加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液20mlで1回、水20mlで1回、飽和食塩水20mlで1回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(中性シリカゲル、溶出溶媒:酢酸エチル-ヘキサン-1%トリエチルアミン)により精製して標記化合物(化合物Y10)310mg(収率73%)を無色鉛状物質として得た。

<sup>31</sup>P NMR (109 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 147.27.

(S)-3-(1-ナフチルメトキシ)-1-トリチルアミノプロパン-2-オール (化合物γ)

(S) - 1 - アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール  
 (化合物 f) を出発原料とし、塩化モノメトキシトリチルの代わりに塩化トリチルを用いて、(S) - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン - 2 - オール (化合物 α) の合成と同様に処理して、  
 5 標記化合物 (化合物 γ) を得た。

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリチルアミノプロパン (化合物 δ)

(S) - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリチルアミノプロパン - 2 - オール (化合物 γ) を出発原料とし、(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン (化合物 β) の合成と同様に処理して、  
 10 標記化合物 (化合物 δ) を得た。

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリチルアミノプロパン 6' - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 1 1)

(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) - 1 - トリチルアミノプロパン (化合物 δ) を出発原料とし、(S) - 2 - [N - (6' - ヒドロキシヘキシル) カルバモイル] オキシ - 1 - (モノメトキシトリチル) アミノ - 3 - (1 - ナフチルメトキシ) プロパン 6' - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 Y 1 0) の合成と同様に処理して、標記化合物 (化合物 Y 1 1) を得た。

#### (実施例 2) オリゴヌクレオチドプローブの合成と精製

25 オリゴヌクレオチドの合成は Applied Biosystems 394 型 DNA/RNA シンセサイザー上で行った。

HPLC には Gilson の装置を用い、分析は Waters 996 フォトダイオードアレイ検出器を用いて行った。逆相分析用カラムとして Waters μBondasphere C18、300 Å (内径 3.9 mm × 長さ 1  
 30 50 mm)、逆相分取用カラムとして GL Science Inertsil

1 ODS-3 C18 (内径8.0mm×長さ300mm)、陰イオン交換  
 分析用として東ソーTSK-GEL DEAE-2SW (内径4.6mm×長  
 さ250mm)を使用した。移動相として、逆相の場合には0.1M 酢酸ト  
 リエチルアンモニウム緩衝液 (TEAA、pH7.0) 中アセトニトリル、陰  
 5 イオン交換の場合には20%アセトニトリル水中ギ酸アンモニウムの濃度勾配  
 を用いた。

#### オリゴヌクレオチドプローブの合成

下記の各オリゴヌクレオチドプローブを、デオキシヌクレオシド3'-ホス  
 ホロアミダイト (日本テクノサービス社より購入) を原料として、DNA自動  
 10 合成機 (モデル394A; (株)パーキンエルマージャパン・アプライドバイ  
 オシステムズ事業部製) で、0.2又は1 $\mu$ molスケールで合成した。

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub> (n=1~8) : 5'-X<sub>n</sub>-TCCTCCAAGCAATTCC  
 AATGAAAGCCATGACCACATGGACGACGATGATG-  
 3' (配列番号1)

15 Cy5-AS-S<sub>p</sub> : 5'-Cy5-ATCGTCATCATCGTCGTC  
 CATGTGGTCATGGCAAACATTGGAATTGCTTGAA  
 GAGTTTC-3' (配列番号2)

X<sub>1</sub>-S<sub>p</sub>及びX<sub>4</sub>-S<sub>p</sub>のオリゴヌクレオチドの5'末端に導入するアミ  
 ノ基にはN-モノメトキシトリチル-6-アミノヘキシルホスホロアミダイト  
 20 (グレンリサーチ社)を用いた。X<sub>2</sub>-S<sub>p</sub>、X<sub>3</sub>-S<sub>p</sub>、X<sub>5</sub>-S<sub>p</sub>、X<sub>6</sub>-  
 S<sub>p</sub>、X<sub>7</sub>-S<sub>p</sub>、X<sub>8</sub>-S<sub>p</sub>のアミノ基の導入は、Y<sub>2</sub>、Y<sub>3</sub>、Y<sub>5</sub>、Y  
 6、Y<sub>7</sub>、Y<sub>8</sub>のホスホロアミダイト化合物を用いて行った。合成したオリゴ  
 ヌクレオチドプローブX<sub>1</sub>-S<sub>p</sub>~X<sub>8</sub>-S<sub>p</sub>の構造を図8に示す。

合成終了後、オリゴヌクレオチドプローブは以下のように処理し精製した。  
 25 濃アンモニア水でCPG (Controlled Pore Glass) よりオリゴヌクレオチドプローブを切り出し、50℃で12時間加温した。溶媒  
 を留去し、脱イオン水に溶解した後、C18 (ウォーターズ社製) オープンカ  
 ラムクロマトグラフィーを行なった (カラムサイズ0.8x18cm:5-5  
 0% アセトニトリル、0.1M トリエチルアンモニウムアセテート (以下  
 30 「TEAA」という) 水溶液の溶媒を用いた直線濃度勾配により溶出)。約3

0%濃度のアセトニトリルで溶出されたフラクションを集め、2mlの80%酢酸水溶液を加え、60分間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、水層を酢酸エチルで洗浄した。溶媒を留去後、滅菌水1mlに溶解した。

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub> (n=1~8) は、逆相HPLCで分取し精製した。逆相HPLCの条件は以下の通りであった：

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub> (n=1~6) ではカラム：Inertsil ODS-3 (C-18) カラムΦ8.0x300mm (GL Science社製) を使用。

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub> (n=7, 8) ではカラム：μ-ボンドスフィア (C-18) カラムΦ3.9x150mm (ウォーターズ社製) を使用。

10 表 1

オリゴヌクレオチド プローブ	保持時間 (分)	B溶液濃度 (%) (0分→20分)	溶液
X1-SP	9.99	10→70%	1
X2-SP	8.79	20→80%	1
X3-SP	11.31	20→50%	1
X6-SP	7.92	30→50%	1
X5-SP	6.83	30→50%	1
X4-SP	13.9	30→50%	2
X7-SP	10.3	20→60%	1
X8-SP	16.0	40→60%	2

#### 溶液 1

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

15 カラム温度：50度

#### 溶液 2

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液 25% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

カラム温度：50度

20 (実施例 3) オリゴヌクレオチドプローブと蛍光色素との反応

#### Cy5-X1-AS-SPの合成

X1-AS-SP : 5' -X1-ATCGTCATCATCGTCGTCCA  
TGTGGTCATGGCAAACATTGGAATTGCTTGGAAGA

GTTTC-3'

X1-AS-Spは、X1-Spと相補的なオリゴヌクレオチドであり、まず上記X1-Spと同様のアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドプローブとして合成し、続いて逆相HPLCにより精製した。

- 5 カラム：Inertsil ODS-3 (C-18) カラムΦ8.0 x 300 mm (GL Science社製)

X1-AS-SpのCy5-スクシンイミジルエステルとの反応

- オリゴヌクレオチドプローブ (X1-AS-Sp) (1 nmol) とCy5-スクシンイミジルエステル (ファルマシア社製) (500 nmol) を10% (v/v) ジメチルホルムアミド、0.25M 炭酸緩衝溶液に溶解し (全量100 μL)、遮光し35°Cで反応を行った。反応開始16時間後に、NAP10 (ファルマシア社) で脱塩した。その後逆相HPLCで分取した。カラム：μ-ボンダスフィア (C-18) カラムΦ3.9 x 150 mm (ウォーターズ社製)

15 表 2

オリゴヌクレオチド プローブ	保持時間 (分)	B溶液濃度変化 (0分→20分)	溶液
X1-AS-Sp	10.3	10→80%	1
Cy5-X1-AS-Sp	12.5	0→70%	1

溶液 1

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH 7.0) ;

B溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH 7.0)

- 20 カラム温度：50度

フルオレセインイソチオシアナート (FITC) との反応

- オリゴヌクレオチドプローブ (X<sub>n</sub>-Sp : n=1~8) (1 nmol) とFITC (500 nmol) を10% (v/v) ジメチルホルムアミド、0.25M 炭酸緩衝溶液に溶解し (全量100 μL)、遮光し40°Cで反応を開始した。反応開始後30分~4時間までの任意な時間に15 μLはかりとり、NAP5 (ファルマシア社) で脱塩した。その後逆相HPLCで分析した。フルオレセインと結合した各オリゴヌクレオチドプローブの逆相HPLCによる

分析条件及び結果を表3に示した。

表3

オリゴヌクレオチド プローブ	保持時間 (分)	B溶液濃度 (%) (0分→20分)	溶液
X1-SP	9.1	0→100	1
X2-SP	10.9	0→100	1
X3-SP	11.2	0→100	1
X4-SP	8.7	0→100	1
X5-SP	12.3	0→100	1
X6-SP	12.2	0→100	1
X7-SP	16.6	0→70	1
X8-SP	15.8	0→70	1

#### 溶媒1

- 5 A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0) ;  
B溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0) ;  
カラム温度: 50度

結果を図9bに示す。

(実施例4) オリゴヌクレオチドプローブのスライドガラスへのスポットと結

#### 10 合反応

スライドガラス (20枚) を10%水酸化ナトリウム水溶液 (200mL) に15分間浸した後、水 (200mLで2回)、1%塩酸水溶液 (200mL)、水 (200mLで2回) の順で洗浄した。メタノール (200mL) に浸し5分間の超音波洗浄を行い、遠心によって乾燥させ、さらに180度で3

15 時間乾燥した。

- 続いて乾燥させたスライドガラスを3-アミノトリメトキシシラン (13mL)、水 (8mL)、メタノール (380mL) 中に浸し、室温で少なくとも5時間攪拌下させた。その後スライドガラスを取り出し、メタノール (200mL) で3回洗浄して遠心後、180度で3時間乾燥させた。あらかじめ1,
- 20 4-フェニレンジイソチオシアネート (1400mg) を10%ピリジン・ジメチルホルムアミド溶液 (220mL) に溶解させ、これに上記アミノシラン化を行ったスライドガラスを入れ、室温下16時間攪拌させた。スライドガラ

スを取り出し、ジメチルホルムアミド（200 mL）で2回、ジクロロメタン（200 mL）、アセトン（200 mL）、メタノール（200 mL）の順で洗浄し、減圧下室温で乾燥させ、イソチオシアネート化されたスライドガラスを得た。

- 5 続いてイソチオシアネート化されたスライドガラスをガラス容器に敷き、そこに20又は30%トリス（3-アミノプロピル）アミン・メタノール溶液（130  $\mu$ L）を滴下し、密封して37度で5時間反応させた。その後スライドガラスをメタノール（200 mL）で2回、アセトン（200 mL）で1回洗浄した。減圧下室温で1時間乾燥させた後、あらかじめ1, 4-フェニレンジイソチオシアネート（1400 mg）を10%ピリジン・ジメチルホルムアミド溶液（220 mL）に溶解させた溶液中にそのスライドガラスを入れ、室温下16時間攪拌させた。スライドガラスを取り出し、ジメチルホルムアミド（200 mL）で2回、ジクロロメタン（200 mL）、アセトン（200 mL）、メタノール（200 mL）の順で洗浄し、減圧下室温で乾燥させ、2層目のイソチオシアネート化されたスライドガラスを得、これをオリゴヌクレオチドのスポットに供した。
- 10
- 15

- 50塩基オリゴヌクレオチドプローブ（ $X_n-S_p$ ）（50~300 pmol）を滅菌水（5  $\mu$ L）に溶解し、スポット溶液（5  $\mu$ L; 1M 炭酸緩衝液（pH 9.0））と混合させ、スプッター（SPBIO2000、日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社製）によって1, 4-フェニレンジイソチオシアネートをコーティングしたコーティング済みスライドガラス上にスポットした。スポット後タイトボックスにろ紙を敷き、300 mM リン酸水素二ナトリウム水溶液を湿らせ、溶液が付かないようにスポット済みのスライドガラスを入れ、密閉後室温で放置した。16時間後タイトボックスからスライドガラスを取り出し、スライドガラスを0.1% Triton X（200 mL）で室温5分間、0.02%塩酸水溶液（200 mL）で室温2分間、0.1M 塩化カリウム（200 mL）で室温10分間、滅菌水（200 mL）で室温1分間洗浄した。
- 20
- 25

- 続いて1M エタノールアミン水溶液（200 mL）にガラスを浸し、室温で1時間攪拌ブロッキングを行った。滅菌水で3回洗浄後、ドラフト内で乾
- 30

燥させて冷蔵保存した。

(実施例5) オリゴヌクレオチドプローブのスライドガラス上への固定化の確認

40  $\mu$ M Texas Red-ddATP (2  $\mu$ L)、ジメチルスルホキシ  
5 シド (10  $\mu$ L)、25 mM 塩化コバルト溶液 (10  $\mu$ L)、反応緩衝溶液  
(x5、1M カコジル酸カリウム、125 mM トリシュー塩酸、1.25 m  
g/ml BSA、pH6.6; 20  $\mu$ L)、ターミナルトランスフェラーゼ  
(1  $\mu$ L; 400 units) に滅菌水を加えて全量80  $\mu$ lとした反応溶液  
10 を調製後、直ちに実施例4のスライドガラスに全量滴下した。カバーガラスを  
反応液上へのせ、37度で放置した。15分後1XSSC緩衝液(0.15M  
NaCl、0.03M クエン酸二水和物)、0.1%SDS溶液で60℃、  
10分間、ミリ給水洗浄、エタノール水溶液で洗浄し乾燥させ検出機(スキャ  
ンアレイ)で測定した(図9a)。

(実施例6) 担体上でのハイブリダイゼーション

15 Cy5-X1-AS-Sp (4.8 pmol) に20XSSC (0.6  $\mu$   
l)、10%SDS (1.2  $\mu$ l)、及び滅菌水を加え全量24  $\mu$ lのプロー  
ブ溶液を作製した。そのプローブDNA溶液を静かに実施例4で作製したDN  
Aチップ上へのせた後、カバーガラスを溶液上へのせ、4XSSC溶液で湿ら  
せたキムタオルを敷いたタイトボックス内に入れ、40度又は60度で16時  
20 間放置した。

ハイブリダイゼーション後、チップを0.1XSSC-0.1%SDS溶液  
(200 mL)に5分間、0.05xSSC-0.1%SDS溶液(200 mL)  
L)に10分間、続いて0.05xSSC(200 mL)でそれぞれ室温で洗  
浄した。乾燥させた後、チップスキャナー(Scan Array、A Pa  
25 ckard BioScience Companyの商品名)で検出した。  
結果を図10に示す。

ハイブリダイゼーションの結果から、X1-SpやX4-Spと比べて、本  
発明のオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合は、より好感度に検出できるこ  
とが明らかとなった。

30 (実施例7) 25塩基オリゴヌクレオチドの合成

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub> (n = 1 ~ 8) と同様の方法でX<sub>n</sub>-S<sub>p</sub>25 (n = 1, 3 ~ 9) 及びX<sub>9</sub>-S<sub>p</sub>35を合成し、精製した。

それぞれの逆相HPLCの条件は以下の通りであった：

表 4

リコヌクレオチド プライマー	保持時間 (分)	B溶液濃度 (%) (0分→20分)	溶液	カラム
X1-Sp25	8.47	20→40%	2	A
X3-Sp25	10.31	25→55%	1	B
X4-Sp25	12.19	30→50%	2	B
X5-Sp25	9.47	30→70%	1	B
X6-Sp35	13.41	35→60%	1	B
X7-Sp25	12.88	20→60%	1	A
X8-Sp25	17.16	40→60%	2	A
X9-Sp25	12.8	15→35%	2	A
X9-Sp35	13.97	15→35%	2	A

5

溶液 1

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

カラム温度：50度

10 溶液 2

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液 25% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

カラム温度：50度

カラムA：μ-ボンドスフィア (C-18) カラムΦ3.9 x 150mm

15 (ウォーターズ社製)

カラムB：Inertsil ODS-3 (C-18) カラムΦ8.0 x 300mm (GL Science社製)

X<sub>n</sub>-S<sub>p</sub>25 (n = 1, 3 ~ 9) :

5' - X<sub>n</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGC-3'

20 (配列番号3)

X<sub>9</sub>-S<sub>p</sub>35 :

5' - AGCAAGAAAC-X<sub>n</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGC-3' (配列番号4)

(実施例 8) 25 塩基オリゴヌクレオチドプローブと蛍光色素との反応フルオレセインイソチオシアネート (FITC) との反応

オリゴヌクレオチドプローブ ( $X_n-S_p25$ ;  $n=1, 3\sim 9$ ;  $X9-S_p35$ ) (1 nmol) と FITC (500 nmol) を 10% (v/v) ジメチルホルムアミド、0.25M 炭酸緩衝溶液に溶解し (全量 100  $\mu$ L)、  
5 遮光し 40°C で反応を開始した。反応開始後 30 分～4 時間までの任意な時間に 15  $\mu$ L はかりとり、NAP5 (ファルマシア社) で脱塩した。その後逆相 HPLC で分析した。各オリゴヌクレオチドプローブの逆相 HPLC による分析条件を下記に示した。また FITC の生成率の結果を図 9 c に示した。

10 HPLC 条件溶媒

A 溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH 7.0) ;

B 溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH 7.0) ;

カラム温度 : 50 度

15 カラム :  $\mu$ -ボンドスフィア (C-18) カラム  $\Phi 3.9 \times 150$  mm (ウォーターズ社製)

(実施例 9)

実施例 4 と同様に表面をコーティングしたスライドガラスに対し、25 塩基  
オリゴヌクレオチドプローブ ( $X_n-S_p25$ ;  $n=1, 5, 9$ ) (50 又は  
20 100 pmol) を滅菌水 (5  $\mu$ L) に溶解し、スポット溶液 (5  $\mu$ L; 1M 炭酸緩衝液 (pH 9.0)) と混合させ、スポットター (SPBIO2000、日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社製) によって 1, 4-フェニレンジイソチオシアネートをコーティングしたコーティング済みスライドガラス上にスポットした。スポット後タイトボックスにろ紙を敷き、300 mM リン  
25 酸水素二ナトリウム水溶液を湿らせ、溶液が付かないようにスポット済みのスライドガラスを入れ、密閉後室温で放置した。16 時間後タイトボックスからスライドガラスを取り出し、スライドガラスを 0.1% Triton X  
(200 mL) で室温 5 分間、0.02% 塩酸水溶液 (200 mL) で室温 2  
30 0 mL) で室温 1 分間洗浄した。

続いて1M エタノールアミン水溶液（200mL）にガラスを浸し、室温で1時間攪拌しブロッキングを行った。滅菌水で3回洗浄後、ドラフト内で乾燥させて冷蔵保存した。

（実施例10）オリゴヌクレオチドプローブのスライドガラス上への固定化の

5 確認

40 $\mu$ M Texas Red-ddATP（2 $\mu$ L）、ジメチルスルホキシド（10 $\mu$ L）、25mM 塩化コバルト溶液（10 $\mu$ L）、反応緩衝溶液（x5、1M カコジル酸カリウム、125mM トリシュー塩酸、1.25mg/ml BSA、pH6.6；20 $\mu$ L）、ターミナルトランスフェラーズ  
10（1 $\mu$ L；400units）に滅菌水を加えて全量80 $\mu$ lとした反応溶液を調製後、直ちに実施例9のスライドガラスに全量滴下した。カバーガラスを反応液上へのせ、37 $^{\circ}$ Cで放置した。15分後1XSSC緩衝液（0.15M NaCl、0.03M クエン酸二水和物）、0.1%SDS溶液で60 $^{\circ}$ C、  
15 10分間、ミリ給水洗浄、エタノール水溶液で洗浄し乾燥させ検出機（スキャンアレイ）で測定した（図12）。

（実施例11）オリゴヌクレオチド（X10-Sp25）の合成と、緩和な条件での脱保護実験

実施例1で合成したアミダイト化合物（Y10）を用い、X<sub>n</sub>-Sp（n=1~8）と同様の方法で、X10-Sp25を合成し、精製した。

20 X<sub>n</sub>-Sp（n=8、10）

5'-X<sub>n</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGC-3'

（配列番号3）

それぞれの逆相HPLCの条件は以下の通りであった：

表5

オリゴヌクレオチド プローブ	保持時間 (分)	B溶液濃度(%) (0分→20分)	溶液	カラム
X10-Sp25	22.8	0→100%	1	A
X8-Sp25	11.8	0→100%	1	A

25

溶液1

A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液 50% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

カラム温度：50度

カラムA： $\mu$ -ボンドスフィア（C-18）カラム $\Phi$ 3.9 x 150mm  
（ウォーターズ社製）

- 5 X10-Sp25はモノメトキシトリチル基（MMTr）によってアミノ基が保護されている。このオリゴヌクレオチドに10%酢酸水溶液（1mL）を加え、室温で5分間処理した。反応液を減圧下濃縮し、さらに水を加えて減圧下共沸した。共沸を3度繰り返した後、残渣を滅菌水1mLに溶解し、逆相HPLCによって分析した（図14b、c）。以上から、X10-Sp25
- 10 が緩和な酸性条件によって脱保護され、X8-Sp25と同じ構造になったことがわかる（図14a）。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

#### 15 産業上の利用の可能性

本発明により、DNAチップの低価格化が可能になり、広く遺伝子診断技術の手段としてのDNAチップの普及に寄与することが期待される。

#### 配列表フリーテキスト

#### 20 配列番号1～4 合成オリゴヌクレオチド

## 請求の範囲

1. 一般式 1 :



(式中、Aはオリゴヌクレオチドを表し、Dは少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、Bは反応性官能基又はその保護された形態を表す) で表されるオリゴヌクレオチドプローブ。

2. 芳香族基が置換又は無置換の1～5環性芳香族炭化水素基である請求の範囲第1項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

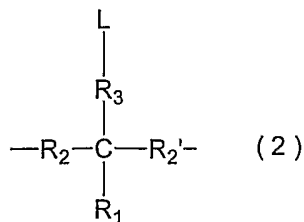
3. 芳香族基が置換又は無置換のフェナントレン環、フルオレン環、ナフタレン環、アントラセン環又はピレン環を含むものである請求の範囲第2項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

4. Dが複素原子を含んでいてもよい直鎖又は分岐の置換又は無置換の二価の炭化水素基であって、少なくとも1つの芳香族基を有する請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

5. Dが主鎖に二価の芳香族基を含む請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

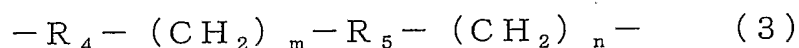
6. Dが側鎖に芳香族基を有する請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

7. Dが一般式2で表される請求の範囲第6項記載のオリゴヌクレオチドプローブ :



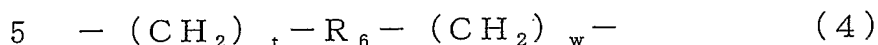
(式中、Lは芳香族基を表し、R<sub>1</sub>は水素原子又は置換基を表し、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>'及びR<sub>3</sub>はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表す)。

8.  $R_2$ が一般式3:



で表され、

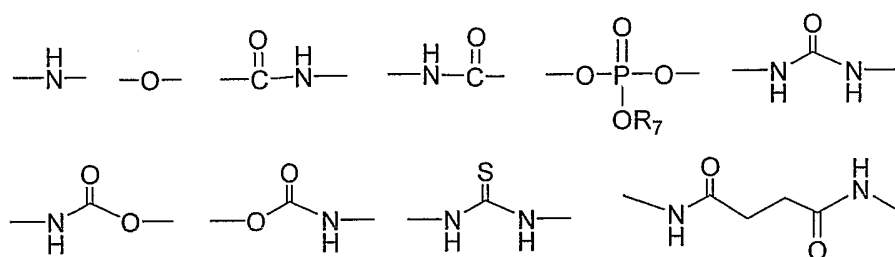
$R_3$ が一般式4:



で表され、

$R_4$ は、直接結合又は $-(CH_2)_i-(OCH_2CH_2)_q-O-$ であり、

$R_5$ 及び $R_6$ は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基:



10 を表し、

$m$ 、 $t$ は、それぞれ独立して0~20の整数を表し、

$n$ 、 $w$ 、 $i$ 、 $q$ はそれぞれ独立して1~20の整数を表し、

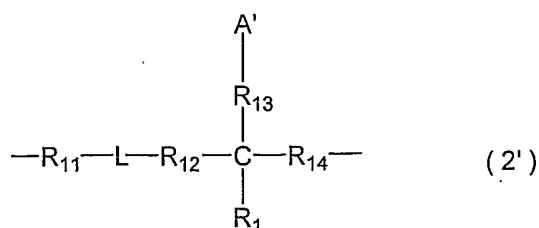
$R_7$ は水素原子又はリン酸保護基を表す、

請求の範囲第7項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

15 9.  $L$ が置換又は無置換のフェナントリル基、フルオレニル基、ナフチル基、アントリル基又はピレニル基である請求の範囲第7項又は第8項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

10.  $D$ が側鎖にさらなるオリゴヌクレオチドを有する、請求の範囲第1項~第6項のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

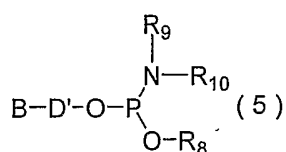
20 11.  $D$ が一般式2'で表される請求の範囲第5項記載のオリゴヌクレオチドプローブ:



(式中、Lは二価の芳香族基を表し、 $R_1$ は水素原子又は置換基を表し、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 及び $R_{14}$ はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表し、 $A'$ は水酸基又はオリゴヌクレオチドを表す)。

5 12. 請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチドプローブが固定化された担体。

13. 一般式5：



10

(式中、 $D'$ は少なくとも1つの芳香族基を有する二価の有機基を表し、 $B$ は反応性官能基又はその保護された形態を表し、 $O$ は酸素原子を表し、 $P$ はリン原子を表し、 $R_8$ はリン酸保護基を表し、 $R_9$ 及び $R_{10}$ は有機基であり、それらが結合している窒素原子と一緒に環を形成していてもよい)

15 で表される化合物。

14. 芳香族基が置換又は無置換の1～5環性芳香族炭化水素基である請求の範囲第13項記載の化合物。

15. 芳香族基が置換又は無置換のフェナントレン環、フルオレン環、ナフタレン環、アントラセン環又はピレン環を含むものである請求の範囲第14項記載

20

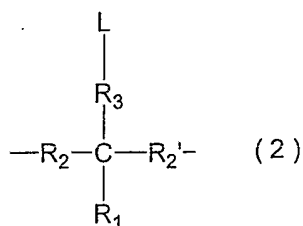
の化合物。  
16.  $D'$ が複素原子を含んでもよい直鎖又は分岐の置換又は無置換の二価の炭化水素基であって、少なくとも1つの芳香族基を有する請求の範囲第13項～第15項のいずれか1項記載の化合物。

17.  $D'$ が主鎖に二価の芳香族基を含む請求の範囲第13項～第16項のいずれ

25

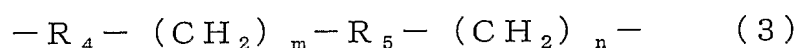
れか1項記載の化合物。  
18.  $D'$ が側鎖に芳香族基を有する請求の範囲第13項～第16項のいずれか1項記載の化合物。

19. D' が一般式 2 で表される請求の範囲第 18 項記載の化合物 :



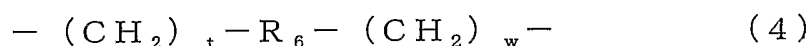
(式中、L は芳香族基を表し、R<sub>1</sub> は水素原子又は置換基を表し、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>' 及び R<sub>3</sub> はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表す)。

20. R<sub>2</sub> が一般式 3 :



で表され、

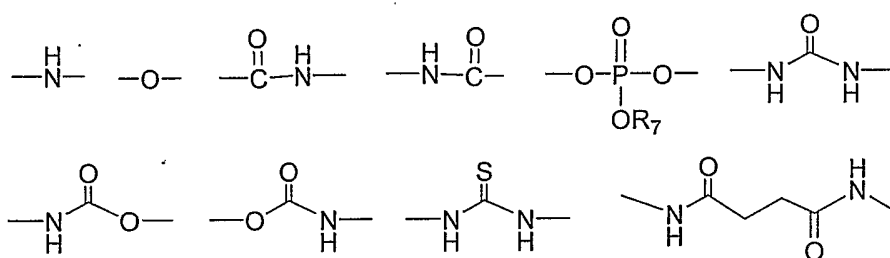
10 R<sub>3</sub> が一般式 4 :



で表され、

R<sub>4</sub> は、直接結合又は  $\text{---}(\text{CH}_2)_i\text{---}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{---O---}$  であり、

R<sub>5</sub> 及び R<sub>6</sub> は、それぞれ独立して、直接結合又は以下に示す基 :



15

を表し、

m、t は、それぞれ独立して 0 ~ 20 の整数を表し、

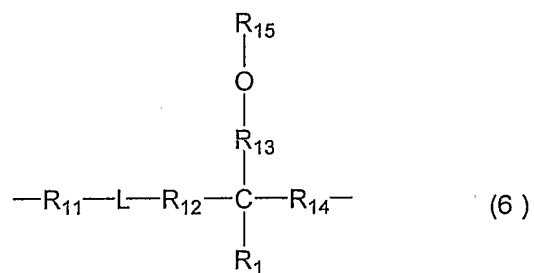
n、w、i、q はそれぞれ独立して 1 ~ 20 の整数を表し、

R<sub>7</sub> は水素原子又はリン酸保護基を表す、

20 請求の範囲第 19 項記載の化合物。

21. L が置換又は無置換のフェナントリル基、フルオレニル基、ナフチル基、アントリル基又はピレニル基である請求の範囲第 19 項又は第 20 項記載の化合物。

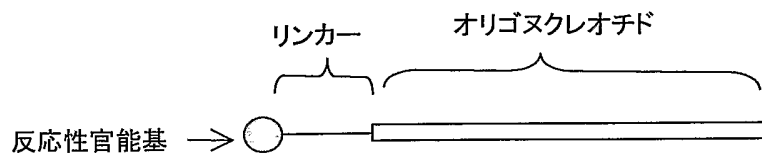
22. D' が一般式 6 で表される請求の範囲第 17 項記載の化合物：



- (式中、Lは二価の芳香族基を表し、R<sub>1</sub>は水素原子又は置換基を表し、R<sub>11</sub>、  
 5 R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>及びR<sub>14</sub>はそれぞれ独立して、直接結合又は複素原子を含んでい  
 てもよい置換若しくは無置換の二価の炭化水素基を表し、R<sub>15</sub>は水酸基保護  
 基を表す)。

Figure 1

従来のオリゴヌクレオチドプローブ



本発明のオリゴヌクレオチドプローブ

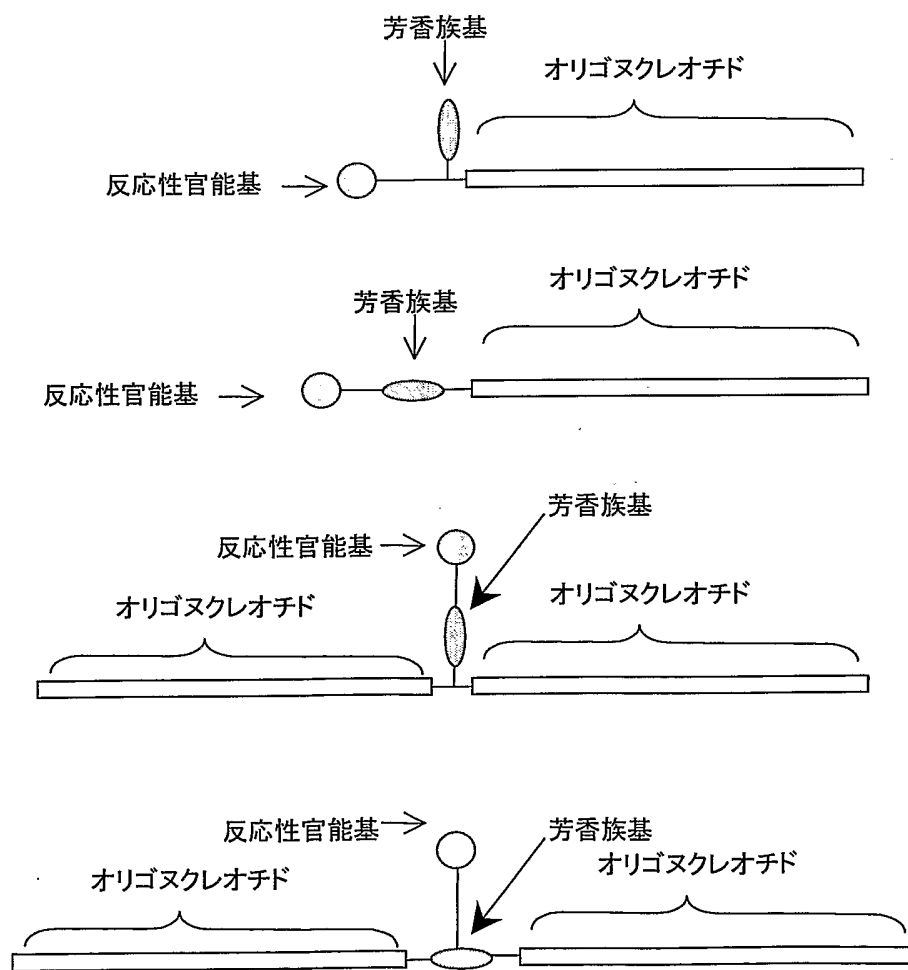


Figure 2

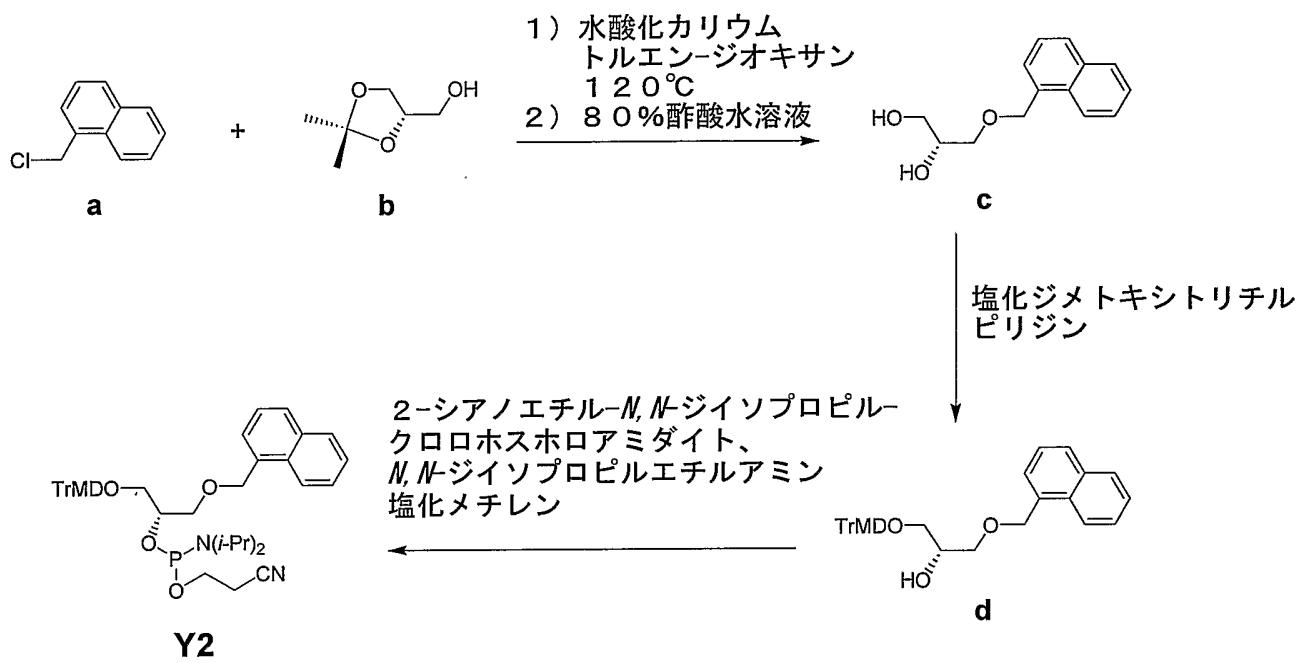


Figure 3

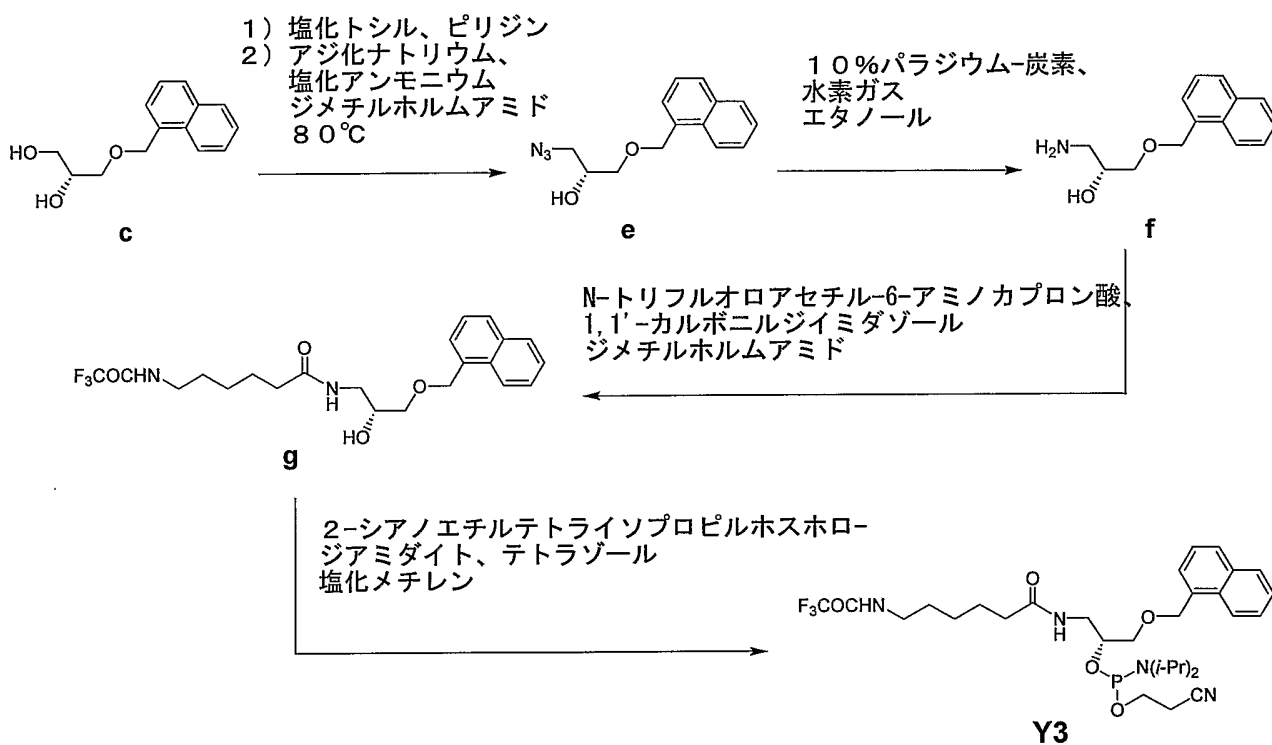


Figure 4

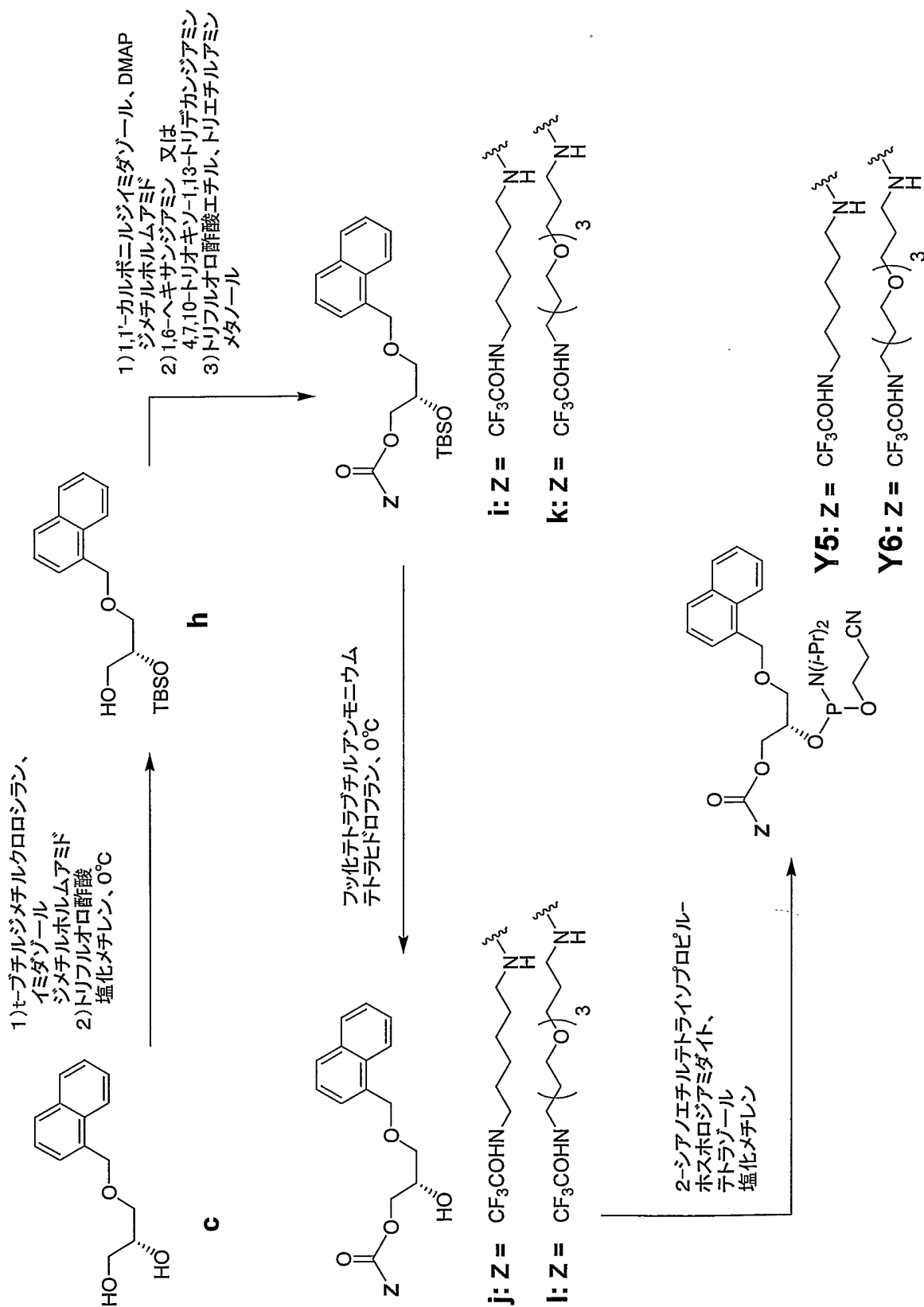


Figure 5

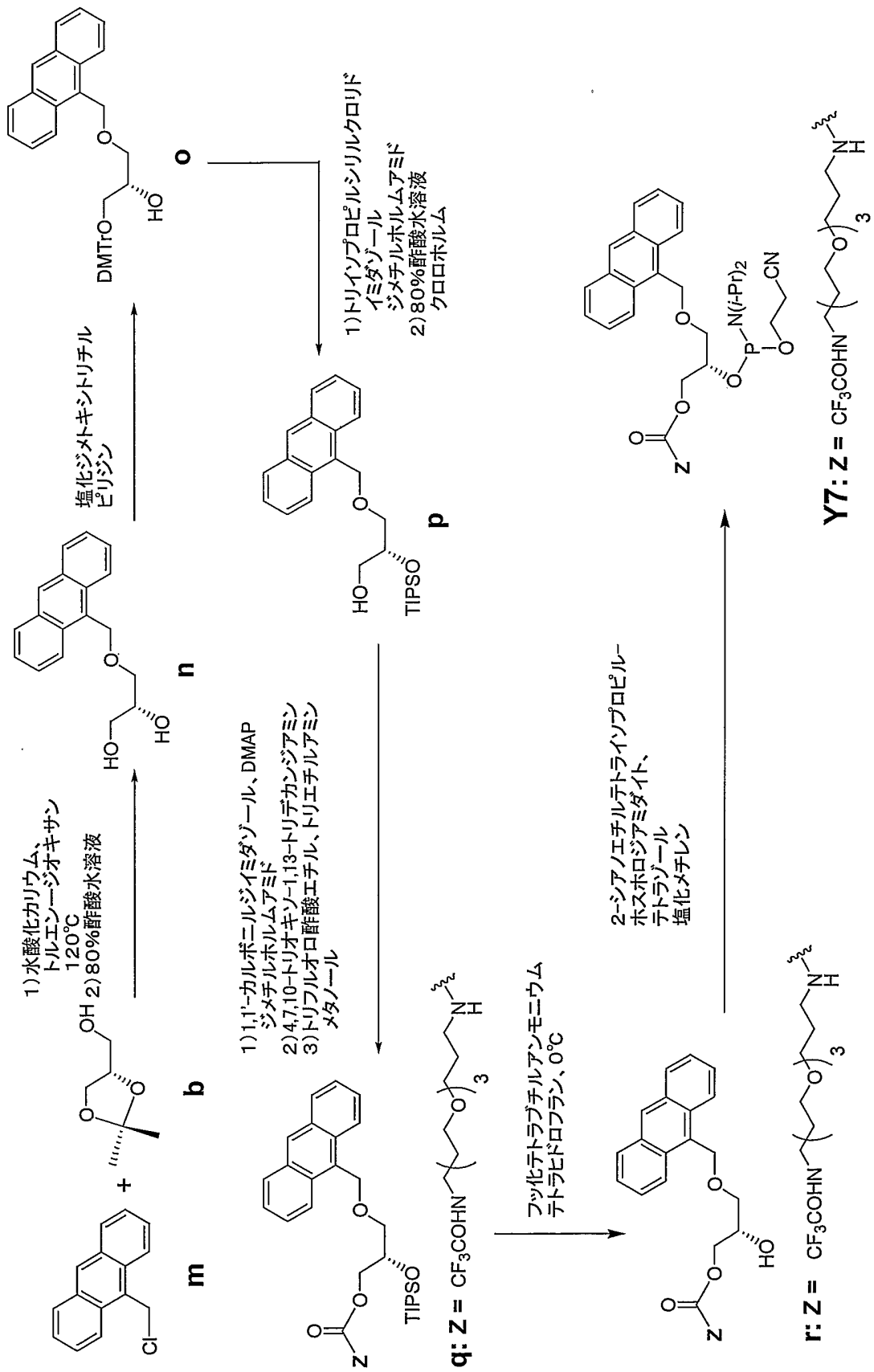


Figure 6

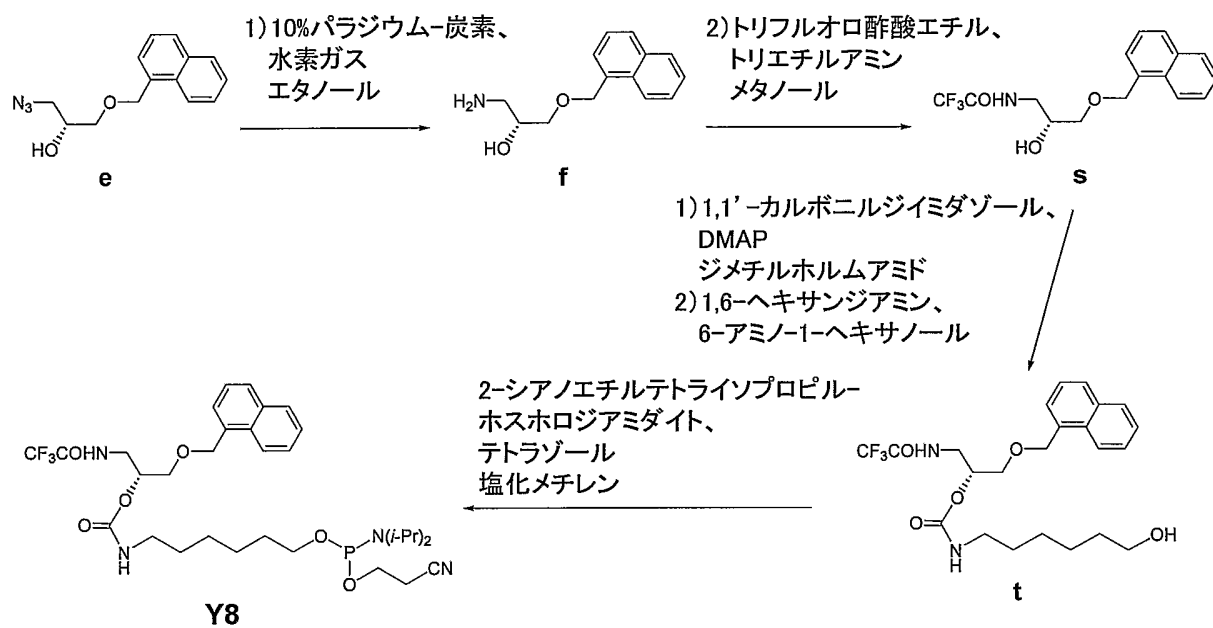


Figure 7

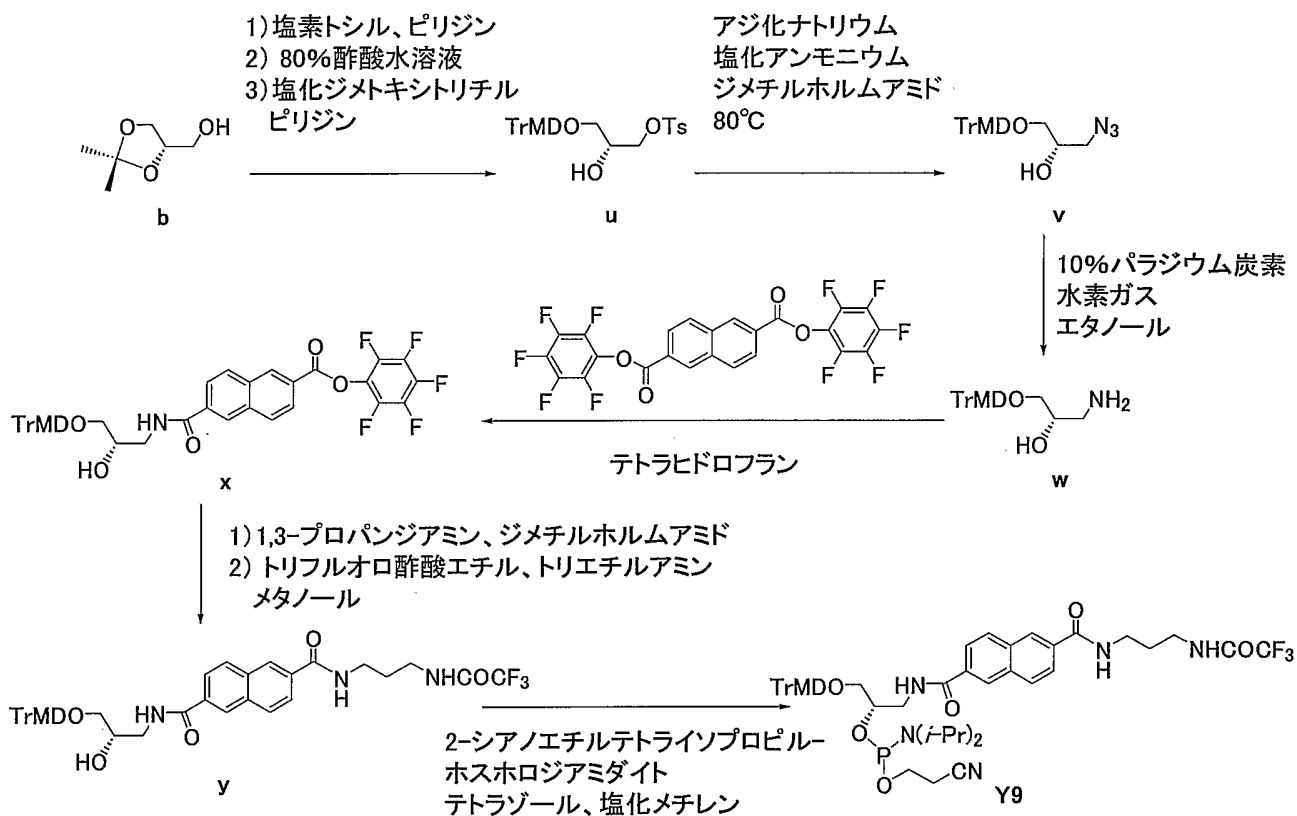


Figure 8

オリゴヌクレオチド(A)

X<sub>n</sub>-Sp 5' -X<sub>n</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGCCATGACCACATGGACGACGATGATG-3'  
 X<sub>n</sub>-Sp25 (n=1, 3~9) 5' -X<sub>n</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGC-3'  
 X<sub>9</sub>-Sp35 5' -AGCAAGAAAC-X<sub>9</sub>-TCTTCCAAGCAATTCCAATGAAAGC-3'

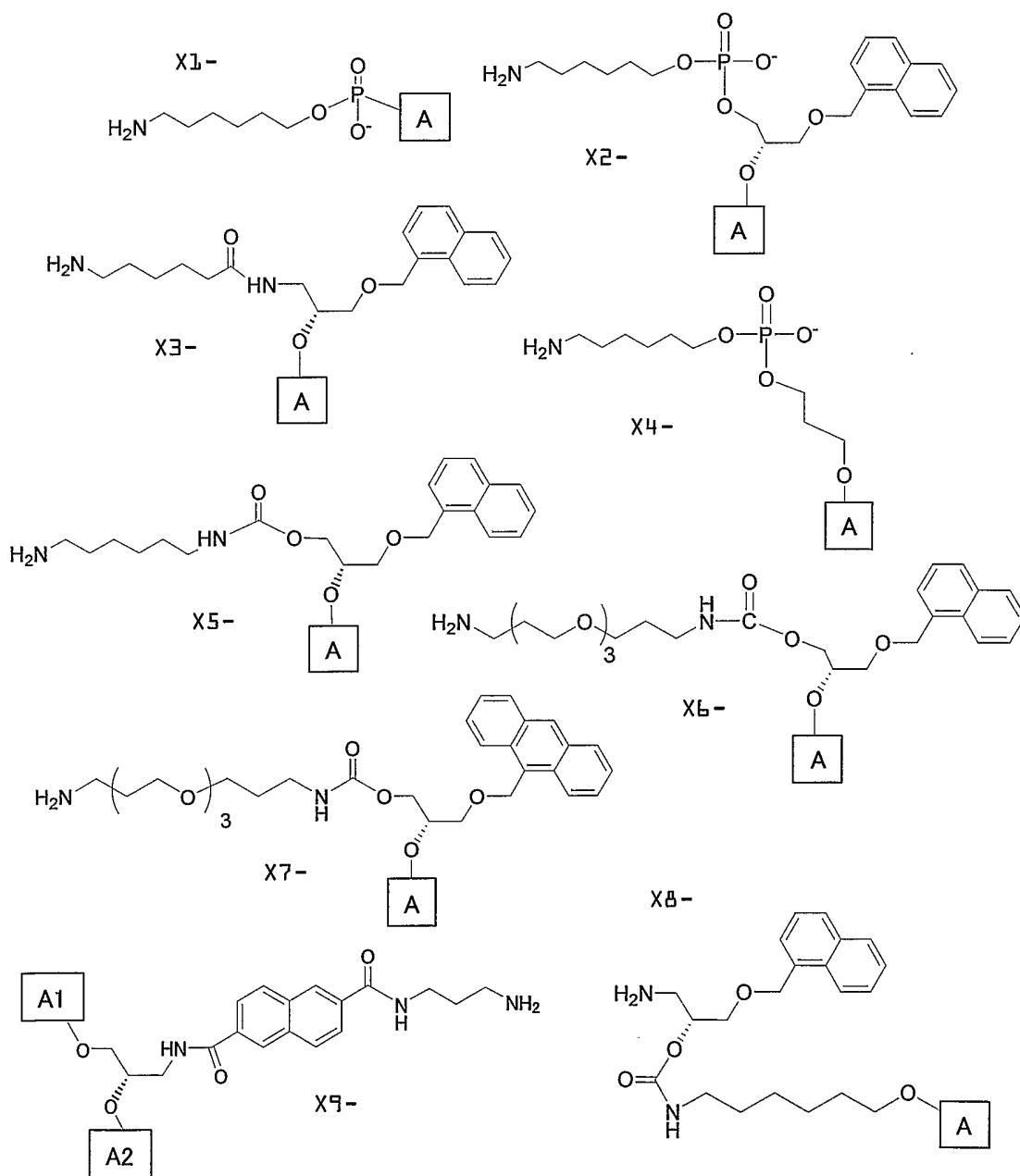


Figure 9

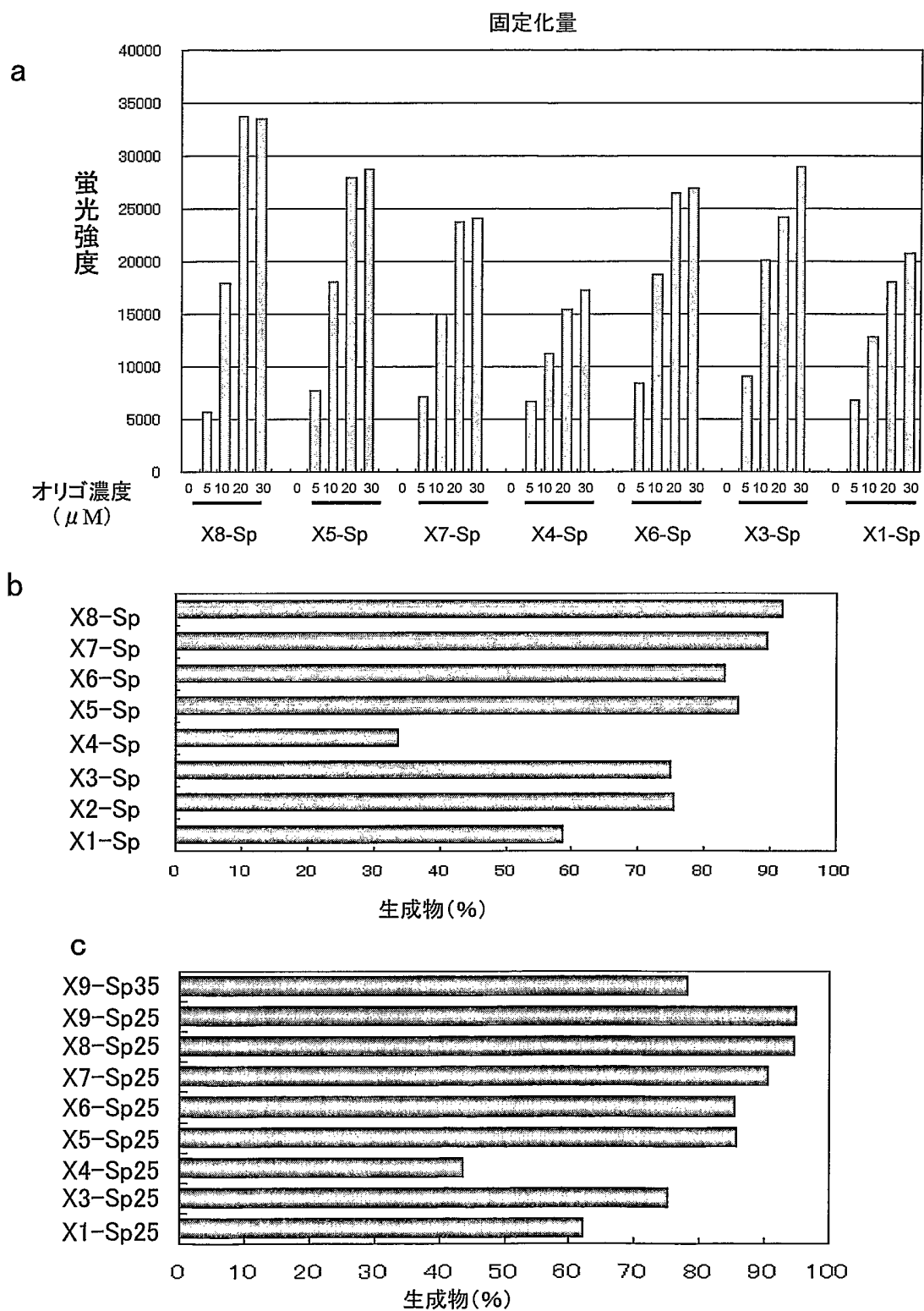


Figure 10

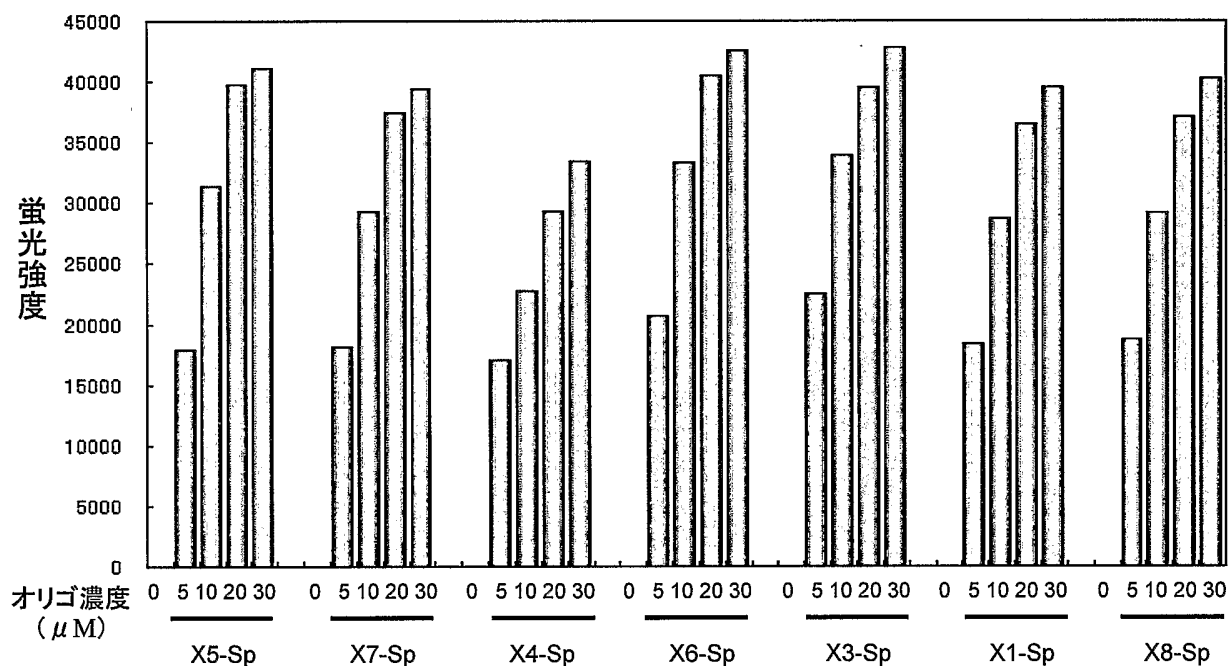
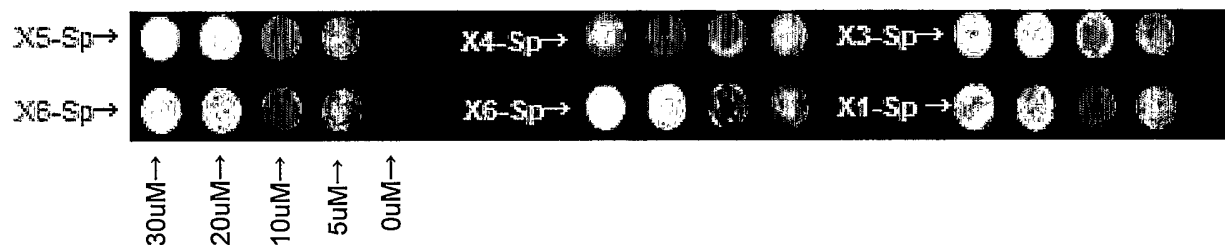


Figure 11

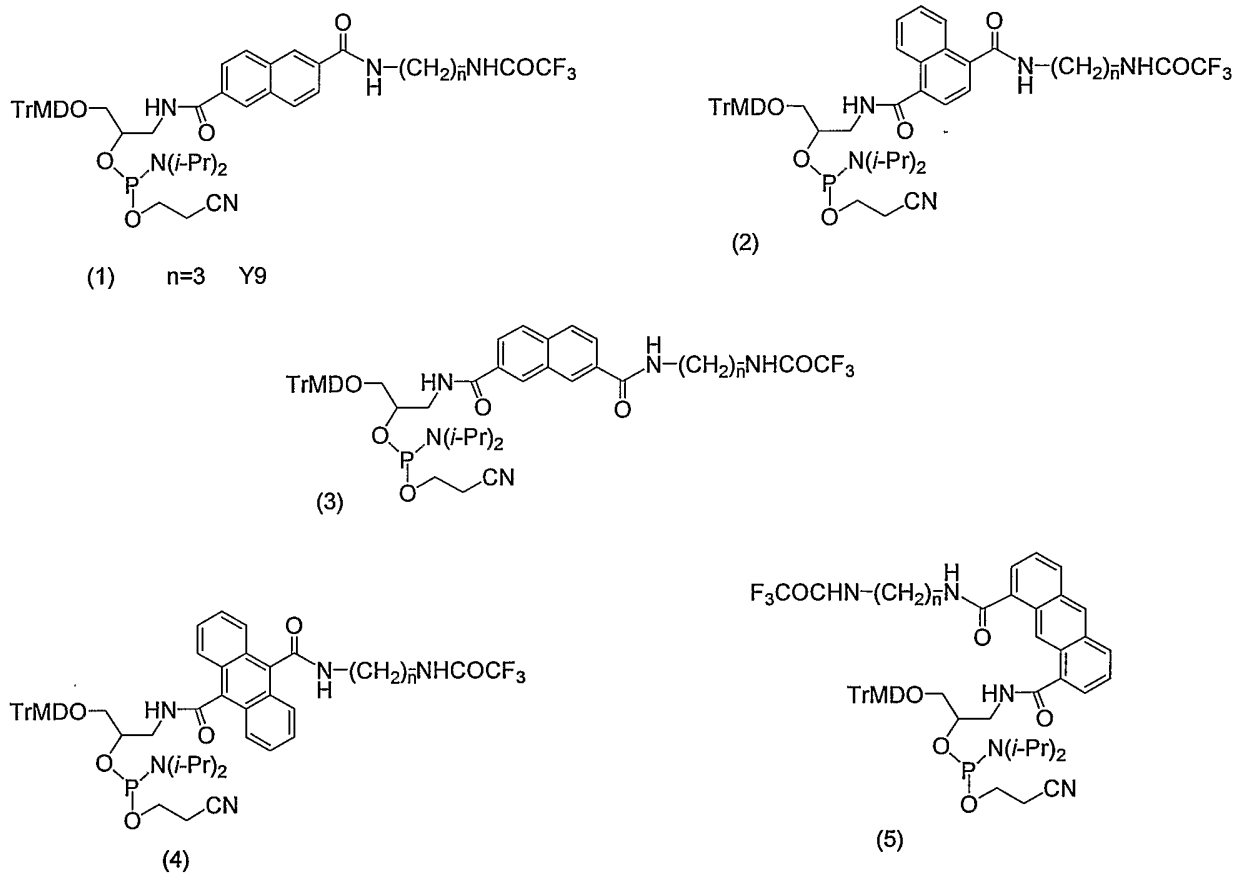


Figure 12

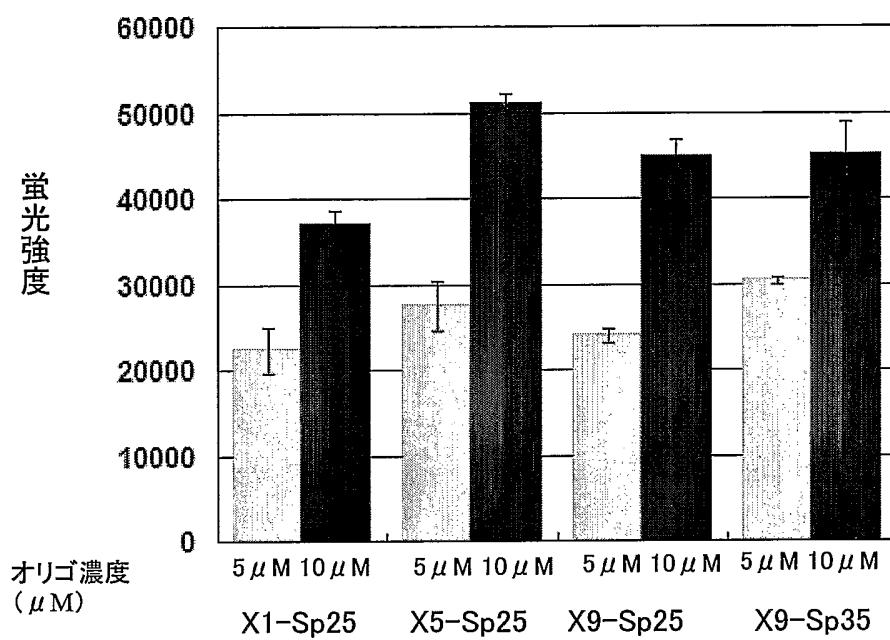


Figure 13

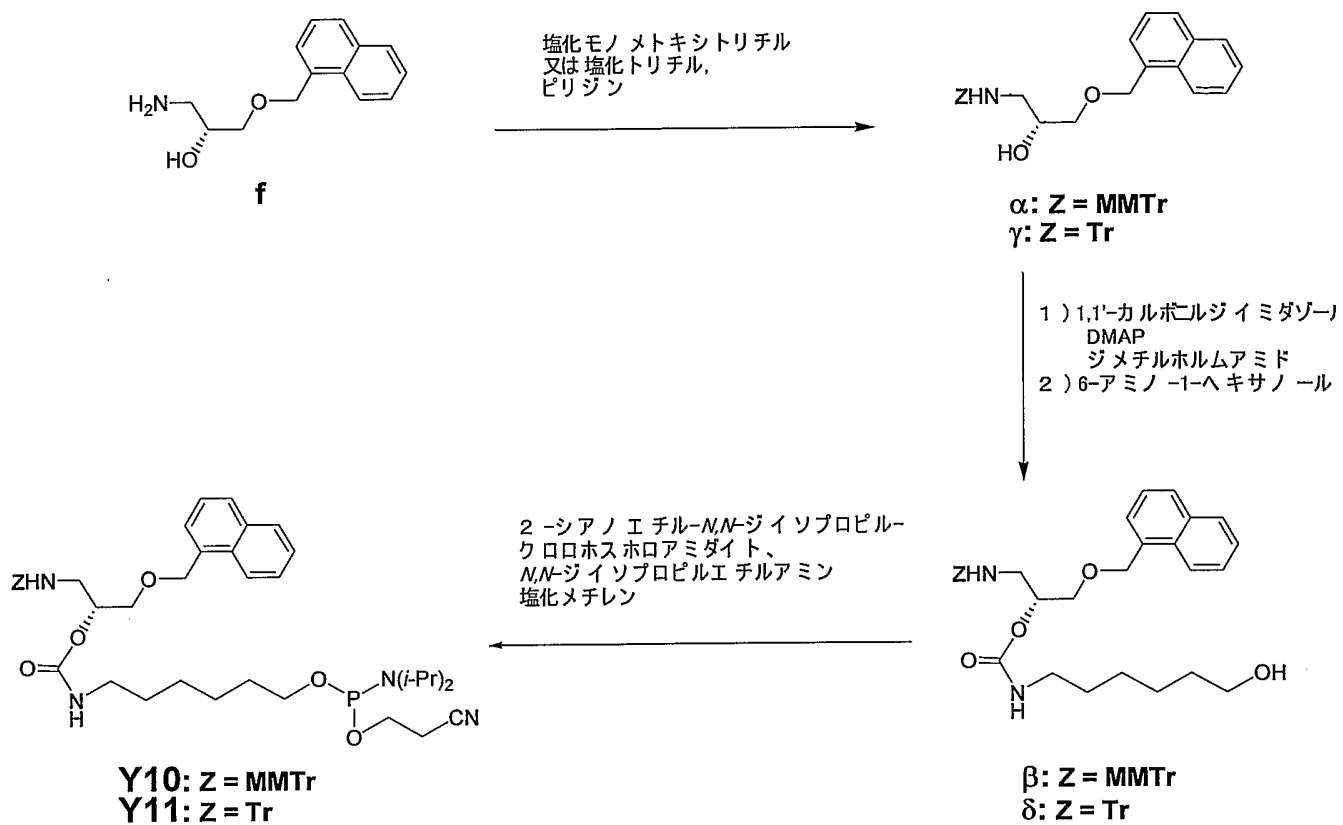




Figure 14

b)

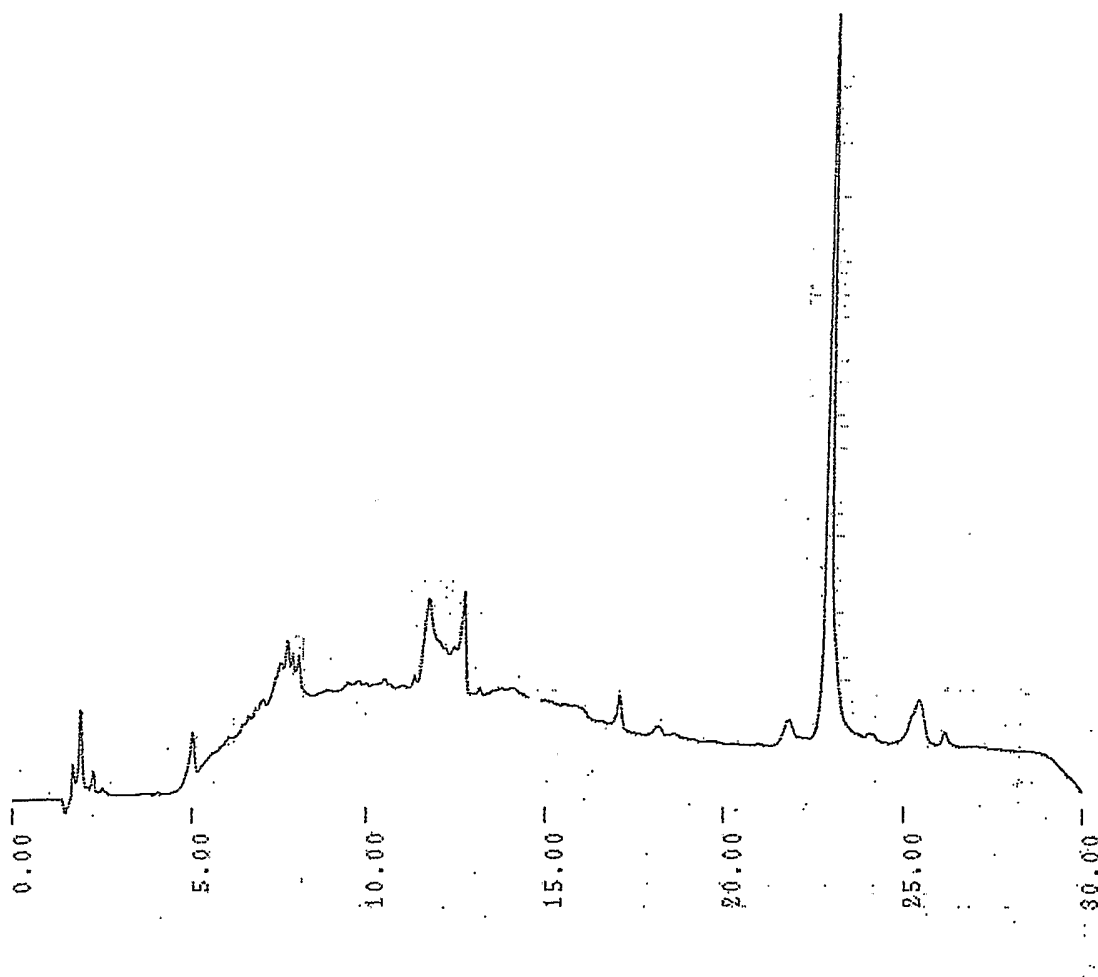
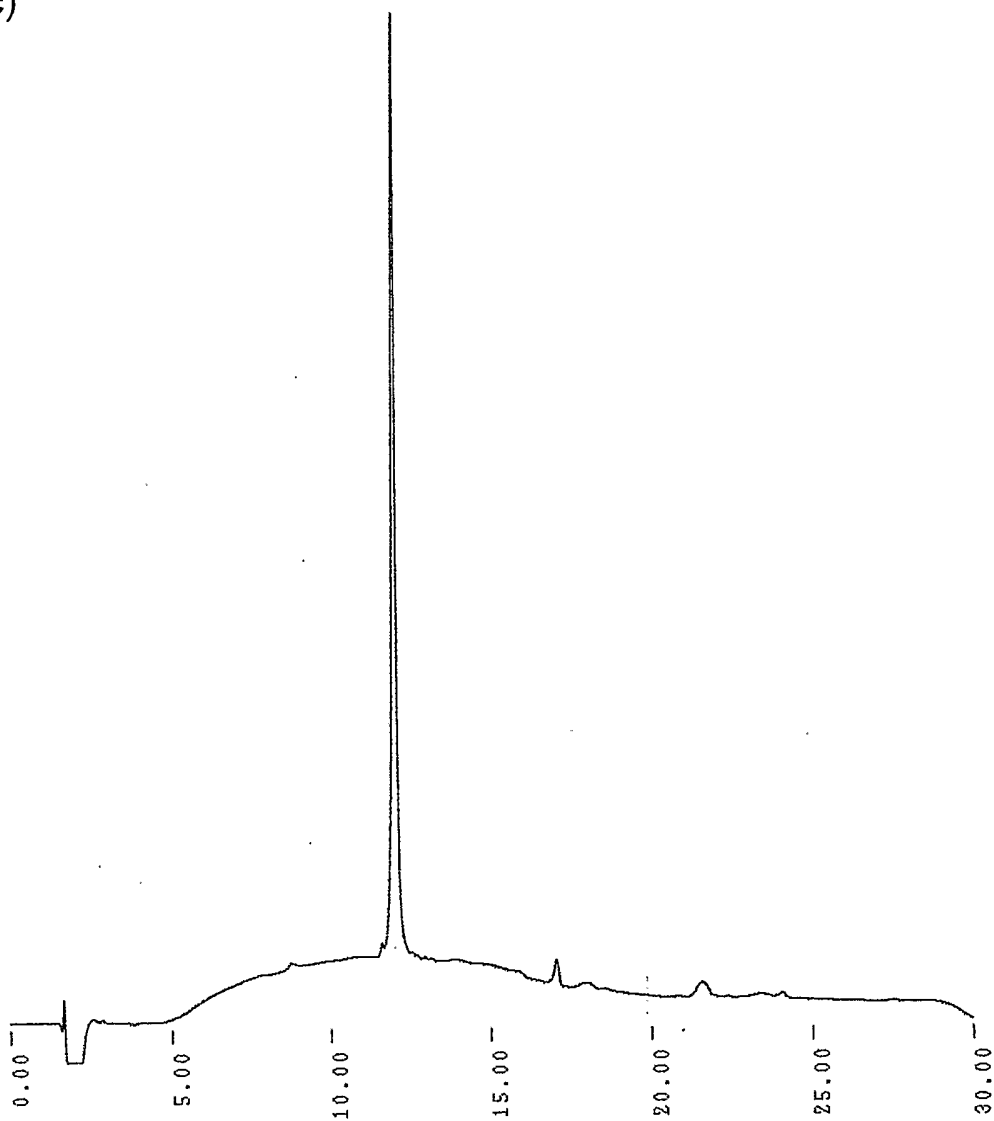


Figure 14

c)



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  
DNA Chip Research Inc.  
Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

<120> Oligonucleotide probe

<130> PH-2432-PCT

<150> JP 2004-124477

<151> 2004-04-20

<150> JP 2004-239831

<151> 2004-08-19

<150> JP 2004-336414

<151> 2004-11-19

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

tcttccaagc aattccaatg aaagccatga ccacatggac gacgatgatg 50

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

atcgtcatca tcgtcgtcca tgtggatcatg gcaaacattg gaattgcttg gaagagtttc 60

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 3

tcttccaagc aattccaatg aaagc 25

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc\_difference

<222> (11)... (11)

<223> n stands for a phosphoramidite compound

<400>

agcaagaaac ntcttccaag caattccaat gaaagc

36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C07F9/24, C12M1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12N15/09, C07F9/24, C12M1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-505109 A (Epoch Biosciences, Inc.), 12 February, 2003 (12.02.03), & WO 01/09385 A2 & AU 200063877 A & US 6339147 B1 & EP 1200628 A2 & US 2002/081591 A1 & US 6441159 B1 & US 2002/137045 A1 & US 6548652 B2	1-12
X	PODYMINOGIN, M.A. et al., Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass. Nucleic Acids Res. 2001, Vol.29, No.24, pages 5090 to 5098	1-12
X	WO 02/14558 A2 (Nanojen Rekogunomikusu GmbH.), 21 February, 2002 (21.02.02), & JP 2004-517043 A & AU 200195005 A & EP 1309730 A2 & US 2004/087807 A1	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July, 2005 (28.07.05)		Date of mailing of the international search report 16 August, 2005 (16.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007666

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RADDATZ, S. et al., Hydrazide oligonucleotides: new chemical modification for chip array attachment and conjugation. Nucleic Acids Res. 2002, Vol.30, No.21, pages 4793 to 4802	1-12
X	JP 2003-521680 A (Nanojen Rekogunomikusu GmbH.), 15 July, 2003 (15.07.03), & WO 01/51689 A1 & AU 200067697 A & EP 1257695 A1 & KR 2002065644 A	1-12
A	HAUSCH, F. et al., Multifunctional DNA conjugates for the in vitro selection of new catalysts. Nucleic Acids Res. 2000, Vol.28, No.8, page e35	1-12
A	LINDROOS, K. et al., Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. Nucleic Acids Res. 2001, Vol.29, No.13, page e69	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/007666

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The subject matter of claim 1 relates to an oligonucleotide probe represented by the general formula B-D-A, whereas the subject matter of claim 13 relates to a compound having a specific structure containing a phosphorus atom and represented by the general formula 15. The subject matters of claims 1-12 and the subject matters of claims 13-22 are hence not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

Therefore, the subject matters of claims 1-22 are classified into two invention groups, and these invention groups are not considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1-12

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C07F9/24, C12M1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C07F9/24, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-505109 A (エポック・バイオサイエンス・インコーポレイテッド) 2003.02.12 & WO 01/09385 A2 & AU 200063877 A & US 6339147 B1 & EP 1200628 A2 & US 2002/081591 A1 & US 6441159 B1 & US 2002/137045 A1 & US 6548652 B2	1-12
X	PODYMINOGIN, M. A. et al. Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass. Nucleic Acids Res. 2001, Vol. 29, No. 24, p. 5090-5098	1-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.07.2005

国際調査報告の発送日

16.8.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9281

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/14558 A2 (ナノジエン・レコグノミクス・ゲートエムベダー) 2002.02.21 & JP 2004-517043 A & AU 200195005 A & EP 1309730 A2 & US 2004/087807 A1	1-12
X	RADDATZ, S. et al. Hydrazide oligonucleotides: new chemical modification for chip array attachment and conjugation. Nucleic Acids Res. 2002, Vol. 30, No. 21, p. 4793-4802	1-12
X	JP 2003-521680 A (ナノジエン・レコグノミクス・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツ ング) 2003.07.15 & WO 01/51689 A1 & AU 200067697 A & EP 1257695 A1 & KR 2002065644 A	1-12
A	HAUSCH, F. et al. Multifunctional DNA conjugates for the in vitro selection of new catalysts. Nucleic Acids Res. 2000, Vol. 28, No. 8, p. e35	1-12
A	LINDROOS, K. et al. Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. Nucleic Acids Res. 2001, Vol. 29, No. 13, p. e69	1-12

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に記載された発明は、一般式1 : B-D-Aで表されるオリゴヌクレオチドプローブに係る発明であるのに対し、請求の範囲13に記載された発明は、一般式15で表されるリン原子を含む特定の構造の化合物に係る発明であるから、請求の範囲1-12に記載された発明と請求の範囲13-22に記載された発明は単一の一般的発明概念を形成するものとは認められない。

したがって、請求の範囲1-22に記載された発明は、2つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-12

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。